

同种异体脂肪组织来源干细胞联合地黄低聚糖对心肌梗死小型猪心肌凋亡的影响

裴志勇¹, 曹丹阳¹, 尹巧香², 高伟³, 赵玉生³

(1. 中国人民解放军陆军总医院干部病房一科, 北京 100700; 2. 中国人民解放军空军总医院干部病房心内科; 3. 中国人民解放军总医院老年心血管病研究所)

[摘要] **目的** 探讨同种异体脂肪组织来源干细胞(ASCs)联合地黄低聚糖(RGOs)对心肌梗死(MI)小型猪心肌凋亡的影响。**方法** 球囊封堵冠状动脉前降支制备小型猪 MI 模型, 17 头小型猪造模成功, 采用随机数字表法分为 4 组: ASCs 组($n=4$), RGOs 组($n=4$), RGOs + ASCs 组($n=4$)及对照组($n=5$)。造模前 3 天、造模后 1 月 RGOs 组及 RGOs + ASCs 组均饲以 RGOs 粗提物; 造模 7~10 d 经冠状动脉移植 ASCs, RGOs 组及对照组均注入 0.9% 氯化钠注射液。移植后 8 周检测心肌梗死边缘区细胞凋亡(TUNEL 法)及 Bax、Bcl-2 的表达。**结果** 与对照组比较, RGOs 组及 RGOs + ASCs 组心肌细胞凋亡均显著降低($P<0.05$, $P<0.01$), 三组 Bax 的表达均明显降低($P<0.05$), RGOs 组及 RGOs + ASCs 组 Bcl-2 的表达均明显升高($P<0.01$)。**结论** ASCs 联合 RGOs 抑制了梗死边缘区心肌细胞凋亡。

[关键词] 心肌梗死; 干细胞移植; 地黄; 心室重构; 模型; 动物

中图分类号: R542.22 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2017.02.018

Effect of a combination of allogenic adipose tissue-derived stem cells and rehmannia glutinosa oligosaccharides on apoptosis of miniswine with myocardial infarction Pei Zhiyong*, Cao Danyang, Yin Qiaoxiang, Gao Wei, Zhao Yusheng(* Department of Geriatric Cardiology, Army General Hospital of PLA, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of a combination of allogenic adipose tissue-derived stem cells (ASCs) and Rehmannia Glutinosa Oligosaccharides (RGOs) on the apoptosis of miniswine with myocardial infarction (MI). **Methods** MI was induced in miniswine hearts by occlusion of the left anterior descending artery for 90 minutes. The survived animals after MI were divided into four groups and received intracoronary ASCs (ASCs, $n=4$) 7 to 10 days later, intracoronary saline in combination with RGOs (RGOs, $n=4$) ((administration crude extract of RGOs from 3 days prior to MI to one month post MI), intracoronary ASCs in combination with RGOs (ASCs + RGOs, $n=4$), or remained untreated (control, $n=5$). The apoptosis of border zone and the expression of Bcl-2 and Bax were detected eight weeks after transplantation. **Results** The administration of RGOs significantly inhibited cardiomyocyte apoptosis of border zone in RGOs and RGOs + ASCs groups ($P<0.05$ and $P<0.01$). The expression of Bax in ASCs, RGOs and RGOs + ASCs groups was significantly decreased ($P<0.05$), and the expression of Bcl-2 in RGOs and RGOs + ASCs groups was significantly increased ($P<0.01$) compared to the control group. **Conclusion** The combination of ASCs and RGOs could reduce the apoptosis of peri-infarct myocardium.

[Key words] Myocardial infarction; Stem cell transplantation; Rehmannia glutinosa; Ventricular remodeling; Models, animal

急性心肌梗死(AMI)是一种常见的心血管急症,严重威胁着现代人的健康与寿命。现行的“再灌注”治疗虽然可以恢复缺血梗死区血流,但对于已经发生坏死的心肌也无能为力;另外,“缺血再灌

注损伤”还会进一步损伤心肌细胞,恶化心功能。现已发现,干细胞具有自我复制以及多向分化潜能,这为缺血性心脏病的再生治疗带来了新的曙光^[1]。干细胞存活、分化以及生物学效能的发挥离不开其所处微环境。MI 早期梗死区氧化应激、炎症反应强烈,营养物质严重缺乏,这种恶劣的微环境使干细胞存活率极低,改善梗死区微环境是提高干细胞移植率的重要策略。地黄是一种最常用的滋补中药,地

基金项目: 国家高科技研究发展计划(2006AA02A105)

作者简介: 裴志勇, 副主任医师, Email: peizy6618222@sina.

com

黄低聚糖 (RGOs) 是地黄的主要成分之一, 近年研究^[2-7]发现, RGOs 具有促进骨骼肌成肌细胞、骨髓干细胞及脂肪组织来源干细胞 (ASCs) 增殖、分化, 抗氧化损伤, 抗凋亡作用。笔者前期的研究发现^[8], RGOs 可以提高 ASCs 移植治疗小型猪 MI 疗效, 改善心功能, 减轻左心室重构, 其作用机制可能与 RGOs 促进 ASCs 增殖分化, 抗纤维化有关。基于以上研究, 本文进一步探讨了 ASCs 联合 RGOs 对梗死边缘区心肌细胞凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 巴马小香猪, 月龄 5~7 个月, 体质量 20~30 kg, 由中国人民解放军总医院实验动物中心提供, 动物合格证号: SYXK (军) 2007-009。

IV 型胶原酶、胰蛋白酶 (Gibco 公司), 特级胎牛血清 (FBS)、Dispase II 中性蛋白酶 (Sigma 公司), TUNEL 试剂盒 (Roche 公司), 羊抗小鼠 IgG、山羊血清、小牛血清蛋白血清 (中杉金桥), 小鼠抗 Bcl-2 单克隆抗体 (Lifespan biosciences 公司), 兔抗 Bax 多克隆抗体 (stressgen 公司), 硝酸纤维素膜 (Bio-Rad 公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce 公司)。二氧化碳孵箱 (Thermo scientific 公司), 低温离心机 (Sigma 3K18), 普通光学显微镜 (Leica DM IL), 倒置相差显微镜 (Olympus BX51)。动脉鞘管、冠脉指引导管及冠脉球囊 (Cordis), 血管造影机 (GE OEC9800), 多导生理记录仪 (成都 RM6240)。RGOs 是以生地黄为原料加工后由解放军总医院中医科提纯, 高效液相色谱法检测 RGOs 提纯物中水苏糖含量为 31.15%。

1.2 方法

1.2.1 ASCs 的分离、培养及鉴定 详见文献^[4]。

1.2.2 动物分组及 MI 模型的制备 17 头小型猪成功造模、存活并完成整个实验, 采用随机数字表法分为对照组 ($n=5$)、ASCs 组 ($n=4$)、RGOs 组 ($n=4$) 及 RGOs + ASCs 联合组 ($n=4$)。造模前 3 d 所有动物均饲以酒石酸美托洛尔 (50 mg/d) 及阿司匹林肠溶片 (100 mg/d), RGOs 组及联合组同时饲以 RGOs 粗提物 (4 g, 2 次/天)。小型猪 MI 模型制备术前处理, 术中操作及术后处理详见文献^[8]。

1.2.3 ASCs 移植 详见文献^[8]。

1.2.4 心脏取材 动物麻醉、称重, 经耳缘静脉注入 100 mg 肝素钠注射液。股动脉放血法使动物致

死, 开胸取出心脏, 垂直左室长轴将左心室切成 5~6 mm 厚度的薄片, 留取心肌梗死边缘区标本 -70℃ 保存及 4% 多聚甲醛固定后保存。

1.2.5 心肌细胞凋亡检测 (TUNEL 法) 每头小型猪随机留取 3 张梗死边缘区切片计算心肌细胞凋亡。方法如下: ①切片脱蜡、水化; ②加蛋白酶 K (20 $\mu\text{g/mL}$), 37℃ 孵育 30 min, 0.01 M PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; ③加 3% 小牛血清清蛋白及 20% 山羊血清, 20 min; ④加反应液 50 μL , 置湿盒内 37℃ 孵育 1 h, 0.01 M PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; ⑤重复步骤③; ⑥加 1:2 稀释的 HRP 连结抗荧光素抗体 20 μL , 置湿盒内 37℃ 孵育 30 min; 0.01 M PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min; ⑦显微镜下观察 DAB-H₂O₂ 显色, 当细胞核呈深棕色时自来水冲洗终止反应, 苏木精染色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 树胶封片。每张切片随机选取 5 个非重叠视野 ($\times 400$), 计数心肌细胞总数及凋亡心肌细胞数, 计算凋亡率。

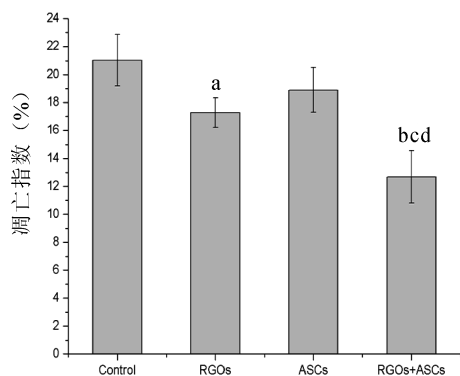
1.2.6 梗死边缘区 Bax、Bcl-2 的表达 RIPA 裂解液提取各组心肌总蛋白, BCA 法检测样品蛋白浓度。蛋白样品和蛋白上样缓冲液按 1:4 (V:V) 混合, 100℃ 加热 5 min。12% 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳, 完毕后将蛋白转至硝酸纤维素膜, 转膜后经 5% 脱脂奶粉室温下封闭 1 h, TTBS 杂交液漂洗 3 次, 加入一抗 (Bax, 1:200; Bcl-2, 1:200), 4℃ 过夜; 次日加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 以 ECL 化学发光法进行检测。 β -actin 为内参对照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计量资料两组间比较采用 t 检验, 多组之间比较先采用 F 检验而后进行 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小型猪 ASCs 形态学观察及 ASCs 表面抗原表达 详见参考文献^[4]。

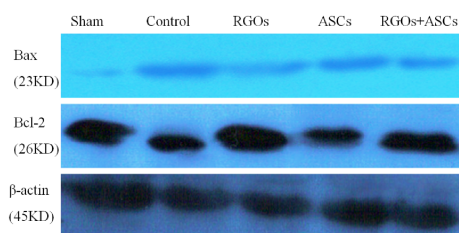
2.2 梗死边缘区心肌细胞凋亡指数 各组心肌细胞凋亡指数分别为 (21.02 ± 1.83)%, (17.28 ± 1.06)%, (18.9 ± 1.61)%, (12.68 ± 1.88)%。与对照组比较, RGOs 组及联合治疗组凋亡指数均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 ASCs 组差异无统计学意义; ASCs 组与 RGOs 组凋亡指数比较, 差异无统计学意义, 而联合治疗组凋亡指数明显低于单纯 RGOs 及 ASCs 治疗组 (均 $P < 0.01$) (图 1) ($F = 20.1052$, $P = 0.0000$)。



与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 RGOs 组比较, ^c $P < 0.01$; 与 ASCs 组比较, ^d $P < 0.01$

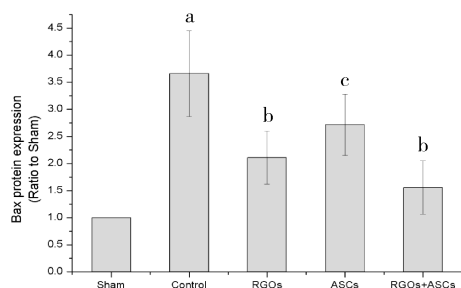
图 1 移植后 8 周各组梗死边缘区心肌细胞凋亡指数

2.3 梗死边缘区 Bax、Bcl-2 表达 图 2 示各组 Bax、Bcl-2 的表达。Bax 半定量分析: 与假手术 (Sham) 组比较, 对照组 Bax 水平明显升高 ($P < 0.01$); 干预治疗后 ASCs 组、RGOs 组及联合治疗组 Bax 水平均明显低于对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 3) ($F = 13.5858$, $P = 0.0005$)。Bcl-2 半定量分析: 与假手术 (Sham) 组比较, 对照组 Bcl-2 水平明显降低 ($P < 0.01$), 干预治疗后 RGOs 组、联合治疗组 Bcl-2 的水平均明显高于对照组 (均 $P < 0.01$); 而 ASCs 组与对照组比较, 差异无统计学意义 (图 4) ($F = 34.1665$, $P = 0.0000$)。



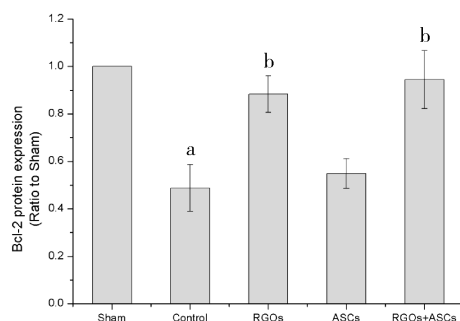
sham: 假手术组

图 2 各组 Bax、Bcl-2 表达的条带图



与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与对照组比较, ^c $P < 0.05$; ^b $P < 0.01$; sham: 假手术组

图 3 各组 Bax 的表达



与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与对照组比较, ^b $P < 0.01$; sham: 假手术组

图 4 各组 Bcl-2 的表达

3 讨论

目前研究发现, 细胞凋亡受多条信号通路调控, 如线粒体通路、内质网通路及死亡受体通路。各种引起细胞凋亡的因素均可以破坏线粒体膜, 使线粒体膜通透性转变孔道开放, 线粒体跨膜压下降及通透性增加, 激活胞浆内的 caspase, 导致细胞凋亡^[9]。Bcl-2 蛋白家族在调节线粒体通透性及细胞凋亡信号转导中发挥了关键作用。根据 Bcl-2 蛋白家族在细胞凋亡中发挥的生物效应不同可分为以下两类, ①促凋亡蛋白: 如 Bax、Bak、Bad、Bid、Bim、Bik、Bok、Puma 等; ②抗凋亡蛋白: 如 Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xl、Mcl-1 等; 其中, Bax 与 Bcl-2 之间的平衡在细胞是否发生凋亡中发挥重要作用^[10]。

RGOs 是从地黄中提取的低分子量多糖成分, 药理研究表明, 地黄多糖对于正常及病理动物具有较好的抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降血糖、增强免疫功能、促进造血等作用^[11]。近年研究发现, RGOs 还具有促进骨骼肌成肌细胞、脂肪间充质干细胞增殖^[2-4], 诱导骨髓造血干细胞分化成心肌样细胞及神经样细胞的作用^[12-13]。多位学者对于地黄及其组分抗氧化、抗缺血性损伤进行了深入研究。杨兵等^[14]研究发现, 地黄多糖可以降低正常动物血清丙二醛含量, 增强血清谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性。Huang 等^[15]研究发现, 缺血再灌注前给予梓醇处理, 可以明显降低大鼠心肌细胞凋亡和心肌坏死, 改善心功能, 其作用机制与降低过氧亚硝基阴离子的形成, 增加蛋白激酶、内皮型一氧化氮合酶磷酸化和一氧化氮的生成, 提高抗氧化能力, 降低一氧化氮合酶表达和超氧阴离子自由基的在心肌缺血再灌注心脏中的产生有关。另一研究^[16]发现, 梓醇预处理后可以明显减少星形胶质细胞数目, 增加神经元及微血管数量, 使胞体和突起数目及形态

趋近于正常,提示梓醇具有保护神经血管单元、促进脑缺血后神经功能恢复的作用。程小丽等^[17]研究发现,经地黄饮子孵育的骨髓间充质干细胞移植可以明显增加脑缺血损伤大鼠脑组织 Bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 蛋白的表达,从而调节 Bcl-2/Bax 的表达,抑制细胞凋亡。彭辉^[18]研究显示,地黄多糖能够通过抑制氧化应激损伤和细胞凋亡对缺氧/复氧损伤乳鼠心肌细胞起到一定的保护作用,其作用机制可能与改善抗氧化酶活性,提高 Bcl-2/Bax 的表达,抑制促凋亡蛋白 caspase-3 表达有关。

笔者前期的研究发现^[8],ASCs 联合 RGOs 使小型猪心肌梗死体积明显缩小,梗死区室壁厚度显著增加,同时心功能进一步改善;其可能的机制包括 RGOs 促微血管形成,提高 ASCs 存活率,促进 ASCs 向心肌细胞分化,抗纤维化,改善心室重构。基于以上研究,本研究进一步探讨了 ASCs 联合 RGOs 对梗死边缘区心肌细胞凋亡的影响。本研究发现,单纯 RGOs 组心肌细胞凋亡指数明显小于对照组,而联合治疗组心肌细胞凋亡指数又显著低于单纯 RGOs 组;本研究还显示 RGOs 既能下调 Bax 的表达,又能上调 Bcl-2 的表达,而 ASCs 仅能下调 Bax 的表达,对于 Bcl-2 的表达无明显上调作用。提示 RGOs 具有抗心肌细胞凋亡的作用,ASCs 可能也有潜在的抗心肌细胞凋亡作用,而两者联合抗凋亡作用最强。本研究发现,ASCs 联合 RGOs 可以明显减少心肌梗死边缘区细胞凋亡,其可能的机制与调节 Bax/Bcl-2 的表达有关。这为 ASCs 联合 RGOs 改善 MI 小型猪心功能提供了新的证据。

参考文献

- [1] DAUWE DF, JANSSENS SP. Stem cell therapy for the treatment of myocardial infarction [J]. *Curr Pharm Des*, 2011, 30(17):3328-3340.
- [2] 尹明,王士雯,高磊,等.不同浓度地黄低聚糖对离体培养成年大鼠骨骼肌成肌细胞增殖的影响[J].*中国中西医结合急救杂志*,2008,15(4):195-197.
- [3] 王新华,王士雯,李泱,等.地黄低聚糖诱导骨髓间充质干细胞向心肌样细胞分化的实验研究[J].*解放军医学杂志*,2009,34(4):412-414.
- [4] 裴志勇,赵玉生,高伟,等.地黄低聚糖对体外培养的小型猪脂肪组织来源干细胞增殖的影响[J].*中国临床保健杂志*,2012,15(6):615-618.
- [5] YU HH, KIM YH, JUNG SY, et al. *Rehmannia glutinosa* activates intracellular antioxidant enzyme systems in mouse auditory cells [J]. *Am J Chin Med*, 2006, 34(6): 1083-1093.
- [6] YU HH, SEO SJ, KIM YH, et al. Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals [J]. *J Ethnopharmacol*, 2006, 107(3):383-388.
- [7] 裴志勇,赵玉生,高伟,等.地黄低聚糖对过氧化氢-血清饥饿诱导脂肪组织来源干细胞凋亡的影响[J].*中国临床保健杂志*,2014,17(5):519-522.
- [8] 裴志勇,尹巧香,张晓晶,等.地黄低聚糖联合脂肪组织来源干细胞移植治疗小型猪急性心肌梗死的疗效[J].*中国临床保健杂志*,2016,19(5):505-509.
- [9] CHIPUK JE, GREEN DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? [J]. *Trends Cell Biol*, 2008, 18(4):157-164.
- [10] HSU SY, HSUEH AJ. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm [J]. *Physiol Rev*, 2000, 80(2):593-614.
- [11] 王志江,魏国栋,马思缙.地黄多糖的化学和药理作用研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2015,21(16):231-234.
- [12] 杜红阳,付海燕,包翠芬,等.地黄多糖对大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞诱导分化作用的研究[J].*中国实验方剂学杂志*,2012,18(6):133-137.
- [13] 刘宇卓,王霞,杜红阳,等.地黄多糖诱导骨髓间充质干细胞为神经样细胞后的突触功能[J].*解剖学杂志*,2013,36(3):285-288.
- [14] 杨兵,夏先林,施晓丽,等.熟地黄多糖对断奶仔猪抗氧化性能和免疫性能的影响[J].*江苏农业学报*,2012,28(4):787-791.
- [15] HUANG C, CUI Y, JI L, et al. Catalpol decreases peroxynitrite formation and consequently exerts cardioprotective effects against ischemia/reperfusion insult [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(4):463-473.
- [16] 谭茉莉,崔丹丹,祝慧凤,等.梓醇对脑缺血后神经血管单元构筑的影响[J].*中国药理学通报*,2014,30(1):44-48.
- [17] 程小丽,刘永琦,潘政,等.地黄饮子孵育骨髓间充质干细胞对大鼠缺血性脑损伤 Bcl-2 及 Bax 表达的影响[J].*中华中医药杂志*,2011,26(1):153-155.
- [18] 彭辉.地黄多糖对乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤后氧化应激和细胞凋亡的影响[J].*中国实验方剂学杂志*,2016,22(23):150-164.

(收稿日期:2017-01-06)