

黄芪甲苷配伍三七总皂苷对 OGD/R 大鼠骨髓间充质干细胞增殖、凋亡、迁移及神经分化的影响

刘晓丹, 丁 煌, 邓常清*

湖南中医药大学 分子病理实验室, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 细胞生物学与分子技术湖南省高校重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 观察黄芪甲苷 (AST IV) 配伍三七总皂苷 (PNS) 对氧糖剥夺后再复糖复氧 (OGD/R) 大鼠骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 增殖、凋亡、迁移及神经分化的影响。方法 全骨髓贴壁法分离、培养、扩增、纯化 BMSCs, 流式细胞仪检测 BMSCs 表面标志物 CD29、CD90、CD34、CD45 阳性表达率。取第 3 代 BMSCs, 采用 AST IV 与 PNS 高 (100 $\mu\text{mol/L}$ + 60 $\mu\text{mol/L}$)、中 (50 $\mu\text{mol/L}$ + 30 $\mu\text{mol/L}$)、低 (25 $\mu\text{mol/L}$ + 15 $\mu\text{mol/L}$) 剂量配伍预处理 24 h, 以 OGD/R 建立缺血再灌注损伤模型, 同时设立对照组和模型组。CCK-8 法测定细胞增殖情况, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 实验检测细胞迁移, 巢蛋白 (Nestin)/神经特异性烯醇化酶 (NSE)、Nestin/胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 免疫荧光双标观察 BMSCs 向神经元及星形胶质细胞分化情况。结果 成功培养分离 BMSCs, 流式细胞仪检测 CD29、CD90 阳性率分别为 94.23%、94.69%; 而 CD34、CD45 阳性表达率分别为 5.76%、5.31%; 与对照组比较, 模型组细胞存活数量明显减少 ($P < 0.05$)、细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$), 与模型组比较, AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均能促进 BMSCs 增殖 ($P < 0.05$ 、0.01), 并抑制细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、0.01); 与对照组比较, 模型组、AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均能促进 BMSCs 迁移 ($P < 0.05$), 与模型组比较, AST IV 与 PNS 不同剂量配伍组的迁移细胞数量明显增加 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 模型组与 AST IV 与 PNS 不同剂量配伍组均能促进 BMSCs 向神经元及星形胶质细胞分化 ($P < 0.01$), 与模型组比较, AST IV 与 PNS 不同剂量配伍组的 Nestin/NSE、Nestin/GFAP 阳性表达率明显增高 ($P < 0.01$)。结论 AST IV 配伍 PNS 在体外能促进缺血再灌注模型 BMSCs 增殖、迁移, 抑制其凋亡, 并诱导其向神经元、星形胶质细胞定向分化。

关键词: 黄芪甲苷; 三七总皂苷; 骨髓间充质干细胞; 脑缺血再灌注; 凋亡; 迁移; 神经分化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)23-5795-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.23.022

Effects of astragaloside IV combined with *Panax notoginseng* saponins on proliferation, apoptosis, migration and neuronal differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in OGD/R model rats

LIU Xiao-dan, DING Huang, DENG Chang-qing

Molecular Pathology Laboratory, Hunan Key Laboratory of Cerebrovascular Disease Prevention and Treatment of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Key Laboratory of Hunan University for Cell Biology and Molecular Techniques, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To observe the effects of astragaloside IV (AST IV) combined with *Panax Notoginseng* saponins (PNS) on proliferation, apoptosis, migration and neuronal differentiation of oxygen glucosedepriation/reoxygenation model rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs). **Methods** BMSCs were isolated, cultured, amplified and purified by the whole bone marrow adherent method. The positive expression rates of BMSCs surface markers, CD29, CD90, CD34, and CD45 were detected by flow cytometry. The third generation of BMSCs was pretreated with AST IV and PNS doses of high (100 $\mu\text{mol/L}$ + 60 $\mu\text{mol/L}$), medium

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 湖南省自然科学基金项目 (2018JJ3382); 湖南省教育厅优秀青年项目 (18B236); 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划——中医脑病临床研究中心 (2017SK4005); 湖南省自然科学创新群体基金: 中医药防治心脑血管疾病基础研究

作者简介: 刘晓丹 (1985—), 女, 实验师, 主要研究方向为心脑血管疾病的中医药防治。E-mail: 314086131@qq.com

***通信作者** 邓常清 (1963—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管疾病及中药 (成) 分配伍研究。

Tel: (0731)88458710 E-mail: dchangq@sohu.com

(50 $\mu\text{mol/L}$ + 30 $\mu\text{mol/L}$), and low (25 $\mu\text{mol/L}$ + 15 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h. The model of ischemia-reperfusion injury was established by OGD/R. Meanwhile, the normal group (BMSCs were cultured normally) and the model group (OGD/R was used to establish an ischemia reperfusion injury model) were established. The cell increment rate was detected by CCK-8 assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry. Transwell assay was used to detect the migration of BMSCs. The condition of BMSCs differentiation into neurons and astrocytes was observed by Nestin/NSE and Nestin/GFAP immunofluorescence double labeling. **Results** BMSCs were successfully cultured and separated, and the positive rates of CD29 and CD90 detected by flow cytometry were 94.23% and 94.69%, while the positive rates of CD34 and CD45 were 5.76% and 5.31%. Compared with the normal group, the survival rate of the model group was reduced significantly and the apoptosis rate was increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the model group, the combination of different doses of AST IV and PNS could promote the proliferation of BMSCs ($P < 0.05, 0.01$) and inhibit the apoptosis ($P < 0.05, 0.01$). Compared with the normal group, the model group and the AST IV and PNS group at different doses could promote the migration of BMSCs ($P < 0.05$). Compared with the model group, the number of migrated cells in the AST IV and PNS groups at different doses was increased significantly ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the model group and the AST IV and PNS groups at different doses could promote the differentiation of BMSCs into neurons and astrocytes ($P < 0.01$). Compared with the model group, the positive expression rates of Nestin/NSE and Nestin/GFAP in the AST IV and PNS groups at different doses were increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** AST IV combined with PNS can promote the proliferation and migration of BMSCs of ischemia-reperfusion model *in vitro*, inhibit the apoptosis, and induce their directional differentiation into neurons and astrocytes.

Key words: astragaloside IV; *Panax notoginseng* saponins; BMSCs; cerebral ischemia-reperfusion injury; apoptosis; migration; neuronal differentiation

脑缺血性疾病的病因及发病机制复杂,致残率、死亡率很高,确有良好疗效的治疗药物和方法还甚少。骨髓间充质干细胞(BMSCs)向神经细胞方向分化的潜力及移植后对实验动物缺血性脑损伤的功能改善作用已逐渐得到人们的认可,为神经系统疾病尤其是脑缺血性疾病的治疗提供了一条新的途径^[1]。但单一的 BMSCs 移植存在体内成活率低和向神经细胞定向分化能力不足等缺陷。因此,研究促进 BMSCs 增殖、迁移并向神经细胞定向分化的方法具有重要意义。近年来,中药对间充质干细胞的干预作用正渐受关注,研究证实^[2-4]中药有效成分及复方均能诱导间充质干细胞分化为不同类别细胞,为中药在间质干细胞移植治疗心脑血管疾病研究领域开辟新的途径。

黄芪 *Astragali Radix* 和三七 *Notoginseng Radix et Rhizoma* 是治疗心脑血管疾病的常用有效中药,两者常作为药对使用。黄芪总苷(astragalosides, AST)和三七总皂苷(*Panax notoginseng* saponins, PNS)为二者发挥心脑血管效应的有效组分。本课题组既往研究发现^[5-6],AST 和 PNS 配伍可显著提高脑缺血后神经细胞存活率,二者配伍具有协同增效作用。本研究采用氧糖剥夺后再复糖复氧(OGD/R)建立体外缺血再灌注损伤模型,探讨 AST 主要有效成分黄芪甲苷(AST IV)和 PNS 配伍对 OGD/R 大鼠 BMSCs 增殖、凋亡、迁移及神经分化

的影响,为中药有效组分配伍联合 BMSCs 移植治疗脑缺血损伤提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 8 只,体质量(150 $\pm$ 20) g,购于斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物质量合格证号 43004700037719,饲养于湖南中医药大学动物实验中心,实验动物许可证号 SKY(湘)2013-0005。

1.2 药品与试剂

AST IV(批号 MUST-17022804)、PNS(批号 MUST-17060601),质量分数均 $\geq 98\%$,购于成都曼思特生物科技有限公司;Cell Counting Kit(CCK-8)试剂盒(Biosharp 公司);CD29-FITC、CD90-FITC、CD34-PI、CD45-PI(Ebioscience 公司);Anexin/PI 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司);巢蛋白(Nestin)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体(Abcam 公司);L-DMEM 培养基(Hyclone 公司);胎牛血清(Gibco 公司);山羊抗鼠 IgG 荧光二抗、山羊抗兔 IgG 荧光二抗(Thermo Fisher 公司)。重组人基质细胞衍生因子-1 α (SDF-1 α , Biovol 公司)。

1.3 仪器

二氧化碳培养箱(德国 Heraeus 公司);FORMA3131 三气培养箱(美国 Forma 公司)、

SW-CJ-1FD 超净工作台(苏州苏净仪器自控设备有限公司);激光共聚焦显微镜(日本 Nikon 公司);多功能酶标仪(美国博腾仪器有限公司);MoFlo XDP 流式细胞仪(美国贝克曼公司)。

2 方法

2.1 BMSCs 分离、培养及鉴定

SD 大鼠 ip 10%水合氯醛(0.3 mL/kg)麻醉,75%酒精消毒下肢及周围皮肤。无菌分离下肢皮肤和肌肉,充分暴露胫骨和股骨,离体剪断两端,放置于无菌培养皿中。采用同样方法取另一侧下肢骨。在净化工作台中,分别剪开股骨和胫骨两端,暴露髓腔。用 5 mL 注射器吸取 L-DMEM 培养液冲洗髓腔,收集于 15 mL 离心管内。1 500 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 5 mL PBS 缓冲液,1 500 r/min 离心 5 min,洗涤 2 次,弃上清,加 L-DMEM(含 10%胎牛血清、100 U/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素)培养基制成单细胞悬液。获得的 BMNCs 经台盼蓝染色、光学显微镜下计数活细胞,调整至 1×10^5 个/mL 细胞密度接种于 T-75 培养瓶,置于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的孵箱培养。3 d 后更换培养液,弃去未贴壁细胞,以后每 3 天全量换液,同时观察记录倒置显微镜下细胞的形态变化。待贴壁细胞完全融合后,0.25% (质量体积比)胰酶消化传代,每 3 天全量换液。经过不断地传代使 MSCs 扩增和纯化。

选取 P3 代 BMSCs,达到 80%~90%融合时,用含 0.02% EDTA 的 0.25%胰酶消化细胞,加入含 10%胎牛血清的 L-DMEM 细胞培养液重悬细胞,1 000 r/min 离心 10 min,吸弃上清,加入 10 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)1 000 r/min 离心 10 min,洗涤 2 次,弃上清,加 PBS 并制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,先加入 90 μ L PBS,吹打为细胞悬液,再加入流式抗体(CD34、CD45、CD90、CD44)及其同型对照各 10 μ L,37 °C 避光孵育 30 min 后加 400 μ L PBS,上流式细胞仪检测。

2.2 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 增殖的影响

根据本课题组前期的研究结果^[5-6],黄芪总苷 110 mg/kg 配伍 PNS 115 mg/kg 有协同抗小鼠脑缺血损伤的作用,文献报道^[7-8]黄芪甲苷在 20~80 g/L, PNS 在 0.5~2 mg/mL 有诱导 BMSCs 向神经样细胞分化的效应。故根据计算,本实验用 AST IV 与 PNS 高(100 μ mol/L+60 μ mol/L)、中(50 μ mol/L+30

μ mol/L)、低(25 μ mol/L+15 μ mol/L)剂量配伍作为药物使用剂量。本课题组前期研究显示^[9],细胞在缺糖缺氧 2 h 再复糖复氧 24 h 后,产生明显的损伤,故在本研究中,采用缺糖缺氧 2 h 再复糖复氧 24 h 复制脑缺血再灌注损伤细胞模型。具体操作如下:胰酶消化 P3 代细胞,调整细胞为 5×10^4 个/mL,接种于 2 块 96 孔培养板,于 37 °C、5% CO₂、饱和湿度的孵箱培养 24 h。其中 1 块弃培养液,分别加入以 L-DMEM 培养基配制的 AST IV 与 PNS 高(100 μ mol/L+60 μ mol/L)、中(50 μ mol/L+30 μ mol/L)、低(25 μ mol/L+15 μ mol/L)剂量配伍方,每孔 100 μ L,模型组每孔加入等体积 L-DMEM 培养基,每组设立 8 个复孔,继续培养 24 h。弃培养液,更换成无糖 Earle's 平衡盐溶液置于含 94% N₂、1% O₂、5% CO₂ 的三气培养箱中培养 2 h,换成 L-DMEM 完全培养基继续培养 24 h,以此方法复制细胞缺血再灌注损伤模型;另 1 块加入 L-DMEM 完全培养基正常培养,作为对照组。之后取出 2 块培养板,每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,37 °C 避光孵育 2 h,于多功能酶标仪测定吸光度(A)值。

2.3 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 凋亡作用

用胰酶消化 P3 代细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于 6 孔板,细胞分组及处理同“2.2”项,处理结束后,收集细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,按照 Annexin V/PI 试剂盒要求进行流式染色,每组设立 5 个复孔,用流式细胞仪计数 2 000 个细胞,计数凋亡细胞,计算凋亡率。

细胞凋亡率=凋亡细胞总数/细胞总数

2.4 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 迁移作用

细胞按照“2.2”项下分组处理后,将各组细胞以 5% FBS 的 L-DMEM 培养基重悬,调整细胞密度至 1×10^5 个/mL,接种于预置 CO₂ 孵箱中平衡 30 min 的 Transwell 小室上室中,每组 3 个复孔。下室为含 100 μ g/L SDF-1 α 及 10%胎牛血清的 L-DMEM 培养基 500 μ L,置于孵箱中继续培养 12 h。取出 Transwell 小室,PBS 小心洗涤 3 次,置于 4%多聚甲醛中固定 15 min。PBS 洗涤 2 次,DAPI 染色 10 min,弃染色液,PBS 清洗 3 次,用棉签擦掉上室上侧细胞。于倒置荧光显微镜下观察小室下侧的细胞。每个小室随机取 5 个视野进行细胞计数,取平均数值统计结果。

2.5 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 神经分化的影响

用胰酶消化 P3 代细胞, 调整细胞为 5×10^4 个/mL, 接种于预置有细胞爬片的 12 孔板, 按照“2.2”项下进行分组处理。PBS 洗 3 次, 加入 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBST 慢洗 3 次, 每次 5 min, 加入 2% BSA (用 0.1% PBST 配制) 封闭 30 min 后, 吸弃封闭液, 加入 1:300 稀释的一抗 (用 0.1% PBST 配制), 置于湿盒, 4 °C 过夜。隔日吸弃一抗, 用 PBST 清洗 3 次, 每次 3 min, 滴加 1:1 000 稀释荧光二抗 (此后均在避光处进行), 湿盒中 37 °C 孵育 1 h, PBST 浸洗玻片 3 次, 滴加 DAPI 避光孵育 5 min, PBST 浸洗 3 遍, 吸水纸吸干多余液体, 用抗荧光淬灭的封片剂封片, 激光共聚焦显微镜采

集荧光图像, 每组细胞 20 倍镜下选取 5 个视野进行阳性细胞率分析, 计算细胞阳性率。

阳性细胞率 = 双阳性细胞数 / 细胞总数

2.6 统计学方法

数据均用 SPSS 19.0 统计软件进行统计。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐者用 LSD 检验, 方差不齐者用 Dunnett T3 检验。

3 结果

3.1 BMSCs 鉴定

流式细胞仪检测 BMSCs 表面抗原结果显示, CD29、CD90 阳性率分别为 94.23%、94.69%; 而 CD34、CD45 阳性表达率分别为 5.76%、5.31%, 原代细胞符合 BMSCs 表面抗原特征, 鉴定为 BMSCs (图 1)。

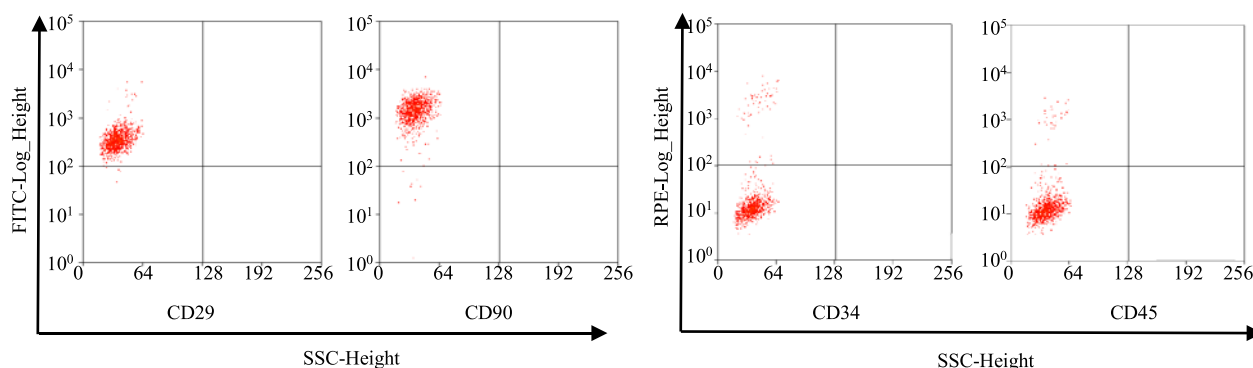


图 1 流式细胞术检测 BMSCs 表面抗原

Fig. 1 BMSCs surface antigen detected by flow cytometry

3.2 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 增殖的影响

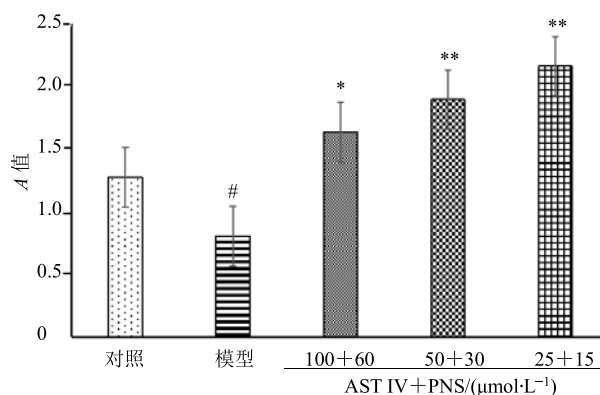
与对照组比较, 模型组细胞经 OGD/R 刺激后, A 值明显降低, 存活细胞数量明显减少, 细胞增殖率降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, AST IV 与 PNS 高、中、低剂量配伍均可减轻细胞损伤, 促进细胞增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 2。

3.3 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 凋亡的影响

与对照组比较, 模型组细胞经 OGD/R 刺激后, 细胞凋亡率明显增加 ($P < 0.05$)。与对照组比较, AST IV 与 PNS 高、中、低剂量配伍均可不同程度抑制 BMSCs 凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见表 1。

3.4 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 迁移的影响

迁移细胞计数结果显示, 对照组仅有 ($56.42 \pm$



与对照组比较: # $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

$P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

图 2 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of AST IV combined with PNS on BMSCs proliferation of OGD/R model rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

表 1 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of AST IV combined with PNS on BMSCs apoptosis of OGD/R model rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	凋亡率/%	早期凋亡细胞个数	晚期凋亡细胞个数
对照	—	9.60 ± 0.07	128.60 ± 11.76	63.40 ± 6.25
模型	—	$42.46 \pm 0.45^{##}$	386.80 ± 9.95	462.40 ± 13.18
AST IV+PNS	100+60	$21.55 \pm 0.04^{**}$	215.80 ± 7.47	215.20 ± 5.25
	50+30	$28.64 \pm 0.90^{**}$	281.40 ± 11.98	291.40 ± 9.99
	25+15	$36.66 \pm 0.45^{*}$	325.40 ± 12.44	407.80 ± 8.66

与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$, 表 2 同

$^{##}P < 0.01$ vs control group, $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group, same as table 2

6.12) 个细胞发生迁移, 模型组迁移细胞数目为 88.45 ± 3.42 , AST IV 配伍 PNS 高、中、低剂量组细胞迁移数目分别为 102.44 ± 3.21 、 131.06 ± 2.89 、 139.49 ± 4.88 。与对照组比较, 模型组细胞迁移数目明显增加 ($P < 0.05$), 表明缺血缺氧微环境可促进 BMSCs 向损伤区迁移; 与模型组比较, AST IV 与 PNS 不同剂量配伍组均可促进细胞的迁移 ($P < 0.05$), 见图 3。

3.5 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 神经分化的影响

正常 BMSCs Nestin 蛋白阳性表达率低, 说明 BMSCs 在正常情况下神经细胞分化能力较弱 (图 4 和表 2), OGD/R 刺激后, Nestin 蛋白阳性表达率明显增强, 说明缺血缺氧微环境可诱发 BMSCs 的神经分化特性, 促使其向神经元及神经胶质细胞定向分化。与模型组比较, AST IV 配伍 PNS 高、中、

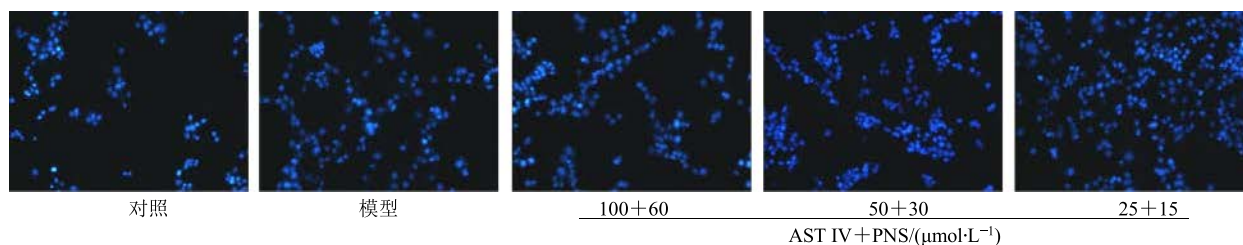


图 3 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 迁移的影响 ($\times 100$)

Fig. 3 Effects of AST IV combined with PNS on BMSCs migration in OGD/R model rats ($\times 100$)

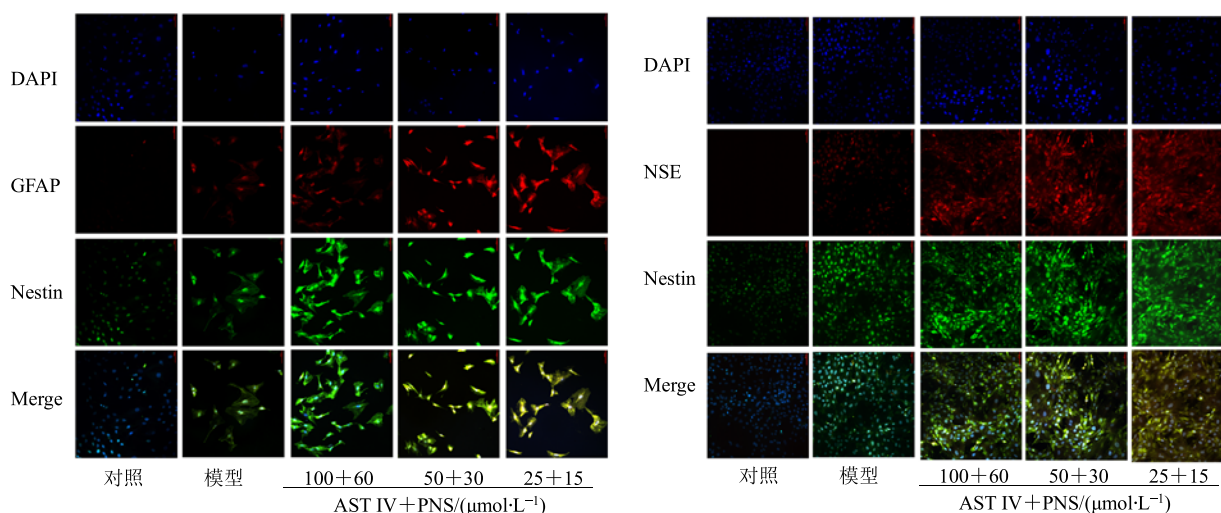


图 4 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 神经分化的影响 ($\times 200$)

Fig. 4 Effects of AST IV combined with PNS on neural differentiation in OGD/R model BMSCs ($\times 200$)

表 2 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 神经分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 Effects of AST IV combined with PNS on BMSCs neural differentiation in OGD/R model rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	C/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Nestin/NSE 双阳性表达率/%	Nestin/GFAP 双阳性表达率/%
对照	—	10.11 $\pm$ 0.96	3.08 $\pm$ 0.09
模型	—	32.18 $\pm$ 2.88 ^{##}	24.18 $\pm$ 3.02 ^{##}
AST IV + PNS	100 + 60	54.41 $\pm$ 5.32 ^{**}	66.09 $\pm$ 2.34 ^{**}
	50 + 30	62.14 $\pm$ 3.81 ^{**}	79.01 $\pm$ 1.30 ^{**}
	25 + 15	63.18 $\pm$ 2.59 ^{**}	78.88 $\pm$ 3.66 ^{**}

低剂量组细胞 Nestin/NSE、Nestin/GFAP 双阳性表达率明显增高,表明 AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均可促进 OGD/R 模型 BMSCs 向神经元及神经胶质细胞定向分化。

4 讨论

缺血性脑损伤的过程是一种复杂的多环节、多因素、多途径损伤级联反应,其核心问题是神经细胞受损所引起的一系列神经功能障碍。针对不同阶段脑缺血后发生的损伤级联反应,及时给予神经细胞保护措施,对缩小梗死面积,改善预后都具有极为重要的意义。中枢神经系统疾病的细胞替代治疗是向中枢神经系统植入同种或异种供体细胞,或者激活内源性神经再生功能以替代和修复损伤或退行性病变的组织,达到重建神经传导环路和恢复神经功能的一种治疗方法,在脑缺血性疾病的治疗方面得到广泛认可^[10]。BMSCs 以其来源广泛,取材方便,体外分离、扩增简便,自体移植无免疫排斥反应,避开了伦理学争议的优势,成为神经系统疾病理想的种子细胞^[11]。但单一的 BMSCs 移植仍存在体内的成活率低和向神经细胞定向分化的能力不足、移植后改善宿主缺血性脑损伤功能的机制尚不明确的缺陷。

中医药治疗强调整体观念,中药既可以直接作用于体内的干细胞,促进其增殖、分化;也可以影响其微环境,促进其存活与功能建立;或者调整机体的免疫功能,减轻或消除免疫排斥反应。大量研究证实,益气活血中药方剂及单体、复方有协同 BMSCs 移植,发挥抗缺血性脑损伤的作用。课题组前期对黄芪和三七的有效组(成)分配伍抗缺血性脑损伤的作用进行了系统研究^[12-17],发现 AST 和 PNS 配伍可显著提高脑缺血后神经细胞存活率,二者配伍具有协同增效作用,其机制与保护血脑屏障、抑制脑缺血后氧化应激损伤、改善脑组织能量代谢、抑制脑缺血后神经细胞凋亡等有关。由于 AST 中的

主要有效成分为 AST IV, PNS 的主要有效成分是人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁ 和三七皂苷 R₁,因此,进一步研究了 4 种主要有效成分配伍的抗脑缺血作用。发现 4 种有效成分配伍可提高缺血脑组织中抗氧化物活性、增强抗氧化应激损伤、改善脑组织能量代谢、减轻脑组织炎症反应、抑制神经细胞凋亡。

为进一步探讨 AST IV 配伍 PNS 联合 BMSCs 移植治疗脑缺血是否具有协同增效的作用,本研究建立体外缺血再灌注模型,研究 AST IV 配伍 PNS 对 OGD/R 大鼠 BMSCs 功能的影响。结果显示 OGD/R 损伤后,一方面 BMSCs 细胞增殖显著减少,凋亡明显增加,提示脑缺血再灌注损伤可导致 BMSCs 损伤,影响其移植后在脑中的存活;同时 BMSCs 向损伤区迁移细胞明显增多,且免疫荧光双染显示 Nestin/NSE、Nestin/GFAP 双阳性表达率明显增高,提示缺血缺氧微环境可促进 BMSCs 向损伤区迁移、并诱导其成为具有神经分化潜能的 Nestin 阳性表达的 BMSCs,并促进其向神经元及星形胶质细胞定向分化。AST IV 与 PNS 不同剂量配伍均能促进 BMSCs 增殖、抑制细胞凋亡、促进其向损伤部位迁移、并诱导其向神经元和星形胶质细胞定向分化,证明 AST IV 配伍 PNS 一方面可减轻缺血再灌注损伤后 BMSCs 的损伤,另一方面可增强其神经修复功能。本研究为益气活血中药有效组分联合 BMSCs 移植治疗脑缺血提供实验依据。

参考文献

- [1] Zhang Q, Zhao Y, Xu Y, *et al.* Sodium ferulate and *n*-butylidenephthalate combined with bone marrow stromal cells (BMSCs) improve the therapeutic effects of angiogenesis and neurogenesis after rat focal cerebral ischemia [J]. *J Transl Med*, 2016, doi: 10.1186/s12967-016-0979-5.
- [2] 张全伟,赵兴绪,赵红斌,等.红景天苷体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J].中国组织工程研究,2012,16(14):2496-2504.

- [3] 陈兵, 尹延庆, 柯俊龙, 等. 川芎嗪诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞: 最佳诱导剂量筛选 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(6): 1072-1077.
- [4] 杨新文, 王勇. 黄芪诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(25): 4996-5000.
- [5] 黄小平, 谭华, 陈北阳, 等. 黄芪总苷和三七总皂苷对脑缺血再灌注后 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(16): 2187-2191.
- [6] 谭华, 黄小平, 邓常清. 黄芪总苷和三七皂苷配伍对小鼠缺血再灌注脑组织氧化应激的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(5): 448-452.
- [7] 李鹏涛, 高志红, 段晓亮, 等. 黄芪甲苷 IV 诱导 SAMR1 小鼠骨髓间充质干细胞分化为神经细胞的实验研究 [J]. 河北医科大学学报, 2018, 39(11): 1338-1343.
- [8] 刘瑞玲, 李光来, 陈文超. 三七总皂苷对人骨髓间充质干细胞诱导分化后神经元样细胞生长状态的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(3): 339-341.
- [9] 丁煌, 李静娴, 唐标, 等. 黄芪甲苷与人参皂苷 Rg₁ 配伍抗 PC12 细胞氧糖剥夺/复糖复氧后自噬性损伤相互作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(2): 235-243.
- [10] 杨振军, 徐运. 干细胞治疗中枢神经系统疾病 [J]. 临床神经病学杂志, 2007, 20(1): 73-74.
- [11] Schmal H, Niemeyer P, Roesslein M, *et al.* Comparison of cellular functionality of human mesenchymal stromal cells and PBMC [J]. *Cytotherapy*, 2007, 9(1): 69-79.
- [12] Huang X P, Ding H, Lu J D, *et al.* Effects of the combination of the main active components of *Astragalus* and *Panax notoginseng* on inflammation and apoptosis of nerve cell after cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(7): 1419-1438.
- [13] 黄小平, 刘晓丹, 邓常清. 黄芪和三七主要有效成分配伍对氧化损伤所致的 PC12 细胞凋亡及其活性氧、线粒体膜电位的影响 [J]. 中西医结合学报, 2012, 10(10): 1127-1134.
- [14] Huang X P, Ding H, Yang X Q, *et al.* Synergism and mechanism of astragaloside IV combined with ginsenoside Rg₁ against auto-phagic injury of PC12 cells induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, doi: 10.1016/j.biopha.2017.02.015.
- [15] 刘晓丹, 成绍武, 范婧莹, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞凋亡及胞内 Ca²⁺变化的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(3): 236-239.
- [16] 丁煌, 李静娴, 杨筱倩, 等. 黄芪甲苷与人参皂苷 Rg₁ 配伍对 PC12 细胞氧糖剥夺复糖复氧后细胞自噬和 PI3K 信号通路的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(11): 2003-2009.
- [17] 刘晓丹, 邓常清. 黄芪甲苷和三七总皂苷中主要有效成分抗 PC12 细胞氧化损伤的配伍研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2012, 32(1): 8-12.