

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

尹明¹, 王士雯², 高磊², 李决², 王新华², 刘鹏²

(解放军总医院①急诊科, ②老年心血管病研究所, 北京 100853)

【摘要】 目的 观察不同浓度地黄低聚糖(RGOs)对离体培养成年大鼠骨骼肌成肌细胞(SMs)增殖的影响。方法 分离成年大鼠 SMs, 每日观察细胞的生长形态。第 3 代(培养 10 d 后)的 SMs 行 α -骨骼肌肌动蛋白免疫组化染色。用无血清培养液[Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F12]孵育原代培养 3 d 的 SMs 24 h 使细胞同步化, 分别以 RGOs 终浓度为 0(对照)、0.156、0.625、2.500 和 10.000 g/L 含体积分数为 15% 胎牛血清(FBS)的 DMEM/F12 培养液培养, 连续计数 6 d。从原代培养到细胞计数, 整个过程分别重复 3 次, 取平均值, 观察不同浓度 RGOs 对 SMs 增殖的影响。结果 本研究分离的 SMs 经锥虫蓝染色显示成活率均在 90% 以上。原代分离提纯的 SMs α -肌动蛋白(α -actin)染色阴性; 传代 2 次后(距原代分离 10 d), α -actin 染色阳性。RGOs 可明显促进原代分离的 SMs 增殖, 这种效应反映在指数增长期提前, 细胞分裂数量增加, 肌管融合速度增加, 较低浓度(0.156~2.500 g/L)时, 促增殖效应呈剂量依赖性(P 均 <0.05); 但给予高浓度(10.000 g/L)时并不能进一步促进 SMs 增殖。结论 RGOs 可以明显改变 SMs 生长特性, 最适干预浓度为 0.625 g/L。有望为临床上心肌梗死的中西医结合细胞学治疗提供实验依据。

【关键词】 地黄低聚糖; 成肌细胞; 离体培养; 增殖

中图分类号: R285.5; Q813.11 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2008)04-0195-04

Effects of various concentrations of rehmannia (地黄) glutinosa oligosaccharides on proliferation of adult rat skeletal myoblasts in vitro YIN Ming¹, WANG Shi-wen², GAO Lei², LI Yang², WANG Xin-hua², LIU Peng². 1. Emergency Department; 2. Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effects of different concentrations of rehmannia (地黄) glutinosa oligosaccharides (RGOs) on proliferation of autologous skeletal myoblasts (SMs) of adult rats in vitro. **Methods** SMs were procured by a modified method from adult Sprague-Dawley (SD) rats. The α -actin protein of the 3rd generation SMs was examined by immunohistochemistry. The primary generation was cultured for 3 days, and the SMs had been incubated in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 culture fluid without serum for 24 hours to synchronize the cells. Afterwards, the SMs were divided into 5 groups, and they respectively contained 0 (control group), 0.156, 0.625, 2.500, 10.000 g/L RGOs in DMEM/F12 and 15% fetal bovine serum (FBS). Cell count had been consecutively done for 6 days to observe the effects of various concentrations of RGOs on proliferation of SMs, the whole course from primary culture to cell count was repeated for 3 times, and the average value of each time was calculated. **Results** The viability of SMs was more than 90% as assessed by trypan blue staining. The α -actin was negative in the primary cultured SMs, but it turned positive after 10 days (the 3rd generation). After the stimulation of RGOs, the results suggested SMs showed a proliferative property manifesting a higher cell number, increase of cell mitotic number, increase of myotube fusion rate and increase of growth rate. The effects depended on the RGOs concentration between 0.156-2.500 g/L (all $P<0.05$). But high concentration (10.000 g/L) of RGOs couldn't promote the proliferation of SMs. **Conclusion** The results suggest that RGOs promote the proliferation of SMs significantly. The optimal concentration is 0.625 g/L. It is expected that this study may provide an experimental basis for the clinical treatment of myocardial infarction treated by cytological method of combination of traditional Chinese and western medicine.

【Key words】 rehmannia glutinosa oligosaccharides; skeletal myoblasts; culture in vitro; proliferation

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30371825)

作者简介: 尹明(1973-), 男(汉族), 吉林省人, 医学博士, 主治医师, Email: ym301@163.com。

地黄为玄参科植物地黄属的新鲜或干燥块根,具有滋阴补血的功效,地黄低聚糖(RGOs)系从地黄中提取的低分子质量多糖成分,体外研究证实它具有促进动物造血干细胞增殖分化的功能^[1]。骨骼肌成肌细胞(SMs)是单核的骨骼肌前体细胞,是一种外周成体干细胞。研究表明,SMs 在心脏环境内可发生“环境依赖性分化”而生长分化为成熟心肌细胞,达到修复受损心肌的目的^[2-3]。本研究中拟观察地黄中主要作用成分 RGOs 对 SMs 增殖特性的影响,为中医药用于心肌修复治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料:成年 SD 大鼠,雌雄不拘,体重 100~150 g,由解放军总医院实验动物中心提供。RGOs 提纯物由兰州军区兰州总医院张汝学副主任药师馈赠,样品经高效液相色谱检验,其中水苏糖含量为 65.15%^[4]。干细胞培养专用胎牛血清(FBS)、Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F12 培养液、胰蛋白酶(1:250,美国 Gibco 公司), α -肌动蛋白(α -actin)单克隆抗体(美国 Dako 公司)。

1.2 SMs 的生长观察与鉴定:结合 Johnson 等^[5]与 Dorfman 等^[6]的方法并稍加改进分离 SMs。纯化后的细胞进行锥虫蓝染色计数,用体积分数为 15%的 FBS+DMEM/F12 培养液进行培养,3 d 后换液,细胞进入对数生长期后每日换液 1 次。倒置显微镜下每日观察细胞生长形态,细胞增殖到培养瓶面 70% 后开始传代。用质量分数为 0.05%的胰蛋白酶和 0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)消化,1:2 比例下传,24 h 换液 1 次,每日观察细胞形态。取原代培养和培养至第 3 代(培养 10 d 后)的 SMs,以 1×10^5 /孔接种于 6 孔培养板中,加入生长培养基培养,待细胞分裂、增殖至 80% 汇合时,进行 α -骨骼肌肌动蛋白(α -sarcometric actin)免疫组化染色[卵白素-生物素-过氧化物酶法(ABC 法)]。

1.3 RGOs 对 SMs 增殖的影响:取原代培养 3 d 的 SMs,用 0.05%胰蛋白酶+0.02%EDTA 制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^7 /L,分别置于 24 孔培养板中,用无血清培养液(DMEM/F12)培养 24 h 使细胞同步化。换用含 15%FBS 的 DMEM/F12 培养液,分别加入干预终浓度为 0.156(B 组)、0.625(C 组)、2.500(D 组)和 10.000 g/L(E 组)的 RGOs 溶液,并以等量生理盐水(RGO 为 0 g/L)作为对照(A 组)。在正常条件下培养细胞,每隔 24 h 消化 1 个孔中的细胞,进行锥虫蓝染色,细胞计数板计数。每日换液 1 次,并保持药物的浓度不变,连续计数 6 d。

从原代培养到细胞计数,整个过程分别重复 3 次,取平均值,观察不同浓度 RGOs 对 SMs 增殖的影响。

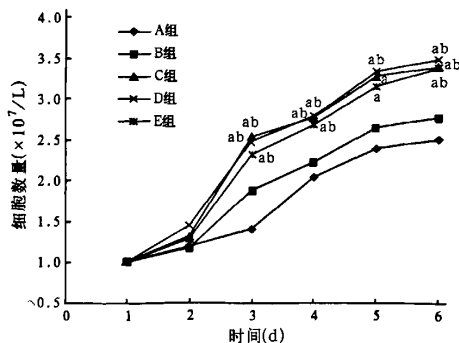
1.4 统计学分析:采用 STATA 8.0 统计软件包完成,计量资料以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成年大鼠 SMs 的生长观察:本研究方法分离的 SMs 经锥虫蓝染色,显示成活率均在 90% 以上。倒置显微镜下观察到刚分离出的原代 SMs 呈球形,折光性强,且有极个别细胞有小突起,培养 12 h 后细胞开始贴壁,但仍为圆形,48 h 后完全贴壁,细胞逐渐延展成梭形或纺锤形,中间夹杂少量肌纤维碎片。传代的 SMs 30 min 即开始贴壁,12 h 贴壁完全,细胞重新舒展为梭形,至传代后第 3 日生长状态稳定(彩色插页图 1)。梭形细胞的数量逐渐增加,其胞质出现 2~3 个突起,相互拉网融合成肌管,肌管呈光滑长条形,多核,呈平行排列的趋势。早期增生较快,之后增生减慢,等 3~8 代的细胞形态较为规则、一致,但传代至第 10 代以后细胞逐渐出现老化现象,表现为细胞形态不规则,边缘不光滑,同时还可出现一些扁平而不规则的细胞。

2.2 SMs 免疫组化染色鉴定:原代分离提纯的 SMs α -actin 染色阴性,传代 2 次后(距原代分离 10 d), α -actin 染色阳性(彩色插页图 2)。

2.3 不同浓度 RGOs 对 SMs 增殖的影响(图 3):RGOs 可明显促进原代分离的 SMs 增殖,这种效应反映在指数增长期提前,细胞分裂数量增加,肌管融合速度增加,在较低浓度(0.156~2.500 g/L)时,促增殖效应呈剂量依赖性,与 A 组比较,C、D 和 E 组 SMs 的增殖数量显著升高,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);但给予高浓度(10.000 g/L)时并不能进一步促进 SMs 增殖。



注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 不同浓度 RGOs 对 SMs 增殖的影响

3 讨论

心肌梗死(MI)是临床常见急危重症。由于成人心肌细胞自身再生能力很差,故无法自行修复梗死区心肌、微血管和毛细血管的损失。细胞心肌成形术(CCM)通过干细胞移植促进心肌细胞再生,对防止心室重构和改善心脏功能具有较好的应用前景^[7]。研究表明,利用移植自体 SMs 到心肌梗死区,使之存活并分化成心肌、冠状循环血管内皮和平滑肌细胞,可以改善和恢复心肌功能^[2-3]。

细胞移植治疗中选用 SMs 具有以下优点:SMs 比心肌细胞更能耐受缺血,它能耐受缺血数小时而不发生不可逆的损伤;在缺血的心肌组织中,SMs 来源的细胞存活力更强;SMs 移植到心脏 2 周后不再继续分裂,这可避免产生过多的细胞^[8]。基因重组的 SMs 还可作为平台转运重组蛋白,移植到心脏可在局部表达神经营养因子和血管生成因子,在移植部位诱导血管形成^[9]。

α -actin 是横纹肌的结构蛋白和功能蛋白,SMs 作为一种幼稚细胞,其胞质内特异性肌蛋白含量明显低于成熟肌细胞。在本研究实验条件下原代分离提纯 SMs 的 α -actin 染色阴性;培养 10 d 后 α -actin 染色阳性,提示原代分离的 SMs 并不具有肌管,经过培养、分化,细胞内已经有足够肌管形成。

现代中医理论认为,干细胞从产生到发挥功能均与传统中医理论中的“先天之精”显著关联^[10]。中医学的“精”主要有繁衍生殖、生长发育、生髓化血、濡养脏腑四大功能,这是“精”学说指导中医学临床实践的主要理论依据。从干细胞角度看,“精”的功能大部分都是其功能体现。中医经典理论认为脏腑中的“肾”是成年个体储存“先天之精”的器官。肾为先天之本,先天之精及后天脏腑之精统归于肾,内藏五脏之精,主骨生髓,对于成年个体而言,中医范畴的“肾”是“精”的源泉^[11]。因此,具有补肾、益气、养血功能的地黄可能对干细胞的生物学特性发挥效应。

RGOs 系从地黄中提取的低分子质量多糖成分,是地黄中的主要作用成分,由占 60% 的四糖和占 20% 的三糖为其主要成分构成。本研究观察到,

RGOs 可明显促进大鼠离体培养的 SMs 增殖,在较低浓度时,其促增殖效应呈剂量依赖性;但是给予更高浓度时,并不能进一步促进 SMs 增殖。结合效率与成本进行分析,本研究中所观察的最适干预浓度应为 0.625 g/L。RGOs 可以明显改变 SMs 生长特性,表现在指数增长期提前,细胞分裂数量增加,肌管融合速度增加。

综上所述,本研究在传统中医理论和干细胞指导下,于细胞水平观察 RGOs 对 SMs 分化、增殖的作用,为临床上 MI 的中西医结合细胞学治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] 刘福君,程军平,赵修南,等.地黄多糖对正常小鼠造血干细胞、祖细胞及外周血象的影响[J].中药药理与临床,1996,12(2):12-14.
- [2] Menasché P. Skeletal myoblast for cell therapy[J]. Coron Artery Dis,2005,16(2):105-110.
- [3] Menasché P, Hagège A A, Vilquin J T, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction[J]. J Am Coll Cardiol,2003,41(7):1078-1083.
- [4] 张汝学,樊俊杰,贾正平,等.地黄中多糖的提取分离工艺研究[J].解放军药学报,2005,21(1):34-37.
- [5] Johnson S E, Allen R E. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is expressed in activated rat skeletal muscle satellite cells[J]. J Cell Physiol,1993,154(1):39-43.
- [6] Dorfman J, Duong M, Zibaitis A, et al. Myocardial tissue engineering with autologous myoblast implantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,1998,116(5):744-751.
- [7] Vilquin J T. Myoblast transplantation: clinical trials and perspectives[J]. Acta Myol,2005,24(2):119-127.
- [8] Tang Y L. Cellular therapy with autologous skeletal myoblasts for ischemic heart disease and heart failure[J]. Methods Mol Med,2005,112:193-204.
- [9] Leor J, Prentice H, Sartorelli V, et al. Gene transfer and cell transplant, an experimental approach to repair a 'broken heart' [J]. Cardiovasc Res,1997,35(3):431-441.
- [10] 张进,徐志伟,杜少辉.“精”学说与干细胞辨识[J].中医学刊,2004,22(7):1198-1200.
- [11] 王康峰,张洪斌,张丽娟.中医肾精理论与神经干细胞关系探讨[J].新中医,2005,37(12):76-77.

(收稿日期:2008-04-25)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国中西医结合急救杂志》稿约说明

《中国中西医结合急救杂志》欢迎广大作者踊跃投稿,同时欢迎全英文稿件(应同时附中文摘要 1 份)。投稿请严格按照杂志上所登稿约的要求。同时交付文稿 1 份、单位介绍信或文稿加盖公章、软盘(Word 排版)、审稿费(每篇 40 元)、课题批件复印件,以利于稿件审稿过程,提高稿件刊出速度。

本刊对所有来稿均采用同行审稿的方式进行公平、公正审定。

(本刊编辑部)

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

(正文见195页)



图1 SMs生长3 d后细胞形态(锥虫蓝染色, $\times 400$)

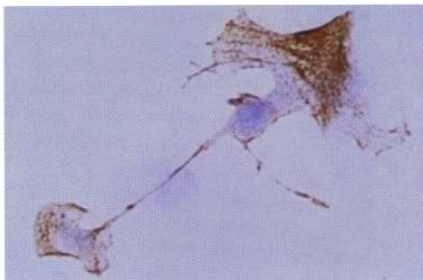
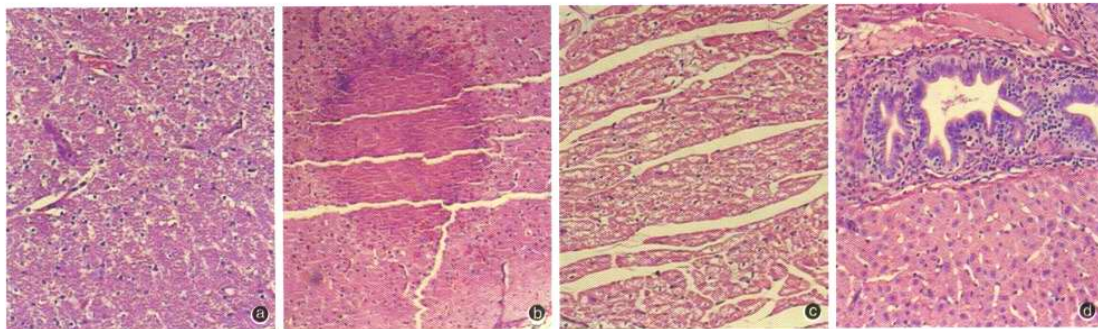


图2 第3代SMs α -actin阳性(免疫组化, $\times 1\ 000$)

急性草乌中毒兔血浆毒性成分及组织病理学改变的研究

(正文见198页)



①: 大脑皮质, $\times 200$; ②: 大脑皮质, $\times 100$; ③: 心室肌, $\times 100$; ④: 肝脏, $\times 100$

图2 急性草乌中毒兔脏器组织病理学改变(HE)

欢迎订阅

欢迎投稿

中华医学会主办
邮发代号: 6-58
全年定价: 117.6元

中国中西医结合学会主办
邮发代号: 6-93
全年定价: 54元

刊社地址: 天津市和平区睦南道122号 邮编: 300050
请到当地邮局办理订阅手续, 也可到本刊发行部订阅
电话: 022-23042150 传真: 022-23306917 Email: cccm@em120m.com
万方数据