

• 论著 •

复方丹参滴丸对骨髓干细胞移植梗死心肌 胶原蛋白表达的影响

曲丽霞, 朱 巧, 张 雷

(山东省烟台市中医医院心内科, 山东 烟台 264000)

【摘要】 目的 观察复方丹参滴丸(CDDP)干预骨髓间充质干细胞(MSCs)移植治疗实验性急性心肌梗死(AMI)后对大鼠心肌组织 I、III 型胶原的影响。方法 采用随机、单盲、对照的研究方法将 AMI 大鼠均分为模型组、MSCs 移植组、CDDP 干预组,另设正常对照组,每组 12 只。采用梗死区多点注射法进行 MSCs 移植, CDDP 干预组每日喂服 CDDP 1 次,每次 1 ml,连用 30 d 后采用免疫组化法检测心肌组织 I、III 型胶原的表达水平,观察心肌组织病理学改变,并在图像分析系统上进行 I、III 型胶原的相对定量分析。结果 病理学观察结果显示, MSCs 移植组及 CDDP 干预组 I、III 型胶原阳性表达较模型组均明显减少,其中 CDDP 干预组较 MSCs 移植组阳性表达减少更为明显。图像分析结果显示, MSCs 移植组及 CDDP 干预组 I、III 型胶原积分吸光度(A)值均较模型组明显下降(I 型胶原:5 394.0 和 3 189.1 比 25 687.3; III 型胶原:14 025.0 和 3 984.4 比 37 239.0, P 均 <0.05),其中 CDDP 干预组下降幅度虽大,但两组比较差异无统计学意义。结论 CDDP 可延缓 MSCs 移植后 AMI 大鼠 I、III 型胶原蛋白的合成,抑制心肌间质纤维化形成,从而起到防治左室重构进展的作用。

【关键词】 复方丹参滴丸; 骨髓干细胞; 移植; I 型胶原; III 型胶原

中图分类号:R285.5;R542.22 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.012

Effect of compound Danshen dripping pill (复方丹参滴丸) intervention on expression of collagen in rats with transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction QU Li-xia, ZHU Qiao, ZHANG Lei. Cardiac Medicine Department, Hospital of TCM, Yantai 264000, Shandong, China

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of compound Danshen dripping pill (CDDP, 复方丹参滴丸) intervention on the myocardial expression of collagen I and III in rats with transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) after experimental acute myocardial infarction (AMI). **Methods** Random, single-blind, control method was adopted to divide 48 rats into four groups: normal group, model group, MSCs transplantation group, CDDP+MSCs transplantation groups (each $n=12$). MSCs were injected into multiple points in the infarction area of rats with AMI. In the CDDP+MSCs transplantation group, the rats were fed with 1 ml CDDP once a day for 30 days. Afterwards, all rats were executed and hearts were obtained for pathological examination, an immunohistological method was applied to detect the expression levels of collagen I and III in the myocardial tissues, and relative quantitative analysis of collagen I and III was carried out by image analysis system. **Results** The pathological examination revealed the following results: compared with the model group, the expression levels of collagen I and III in CDDP+MSCs transplantation group and MSCs transplantation group were obviously lower, in which the expression level in the former group was lowered more significantly than that in the latter group. The image analyses showed that the integral absorbance (A) values of collagen I and III in the MSCs transplantation group and CDDP+MSCs transplantation group were markedly lower than those in the model group (collagen I: 5 394.0 and 3 189.1 vs. 25 687.3; collagen III: 14 025.0 and 3 984.4 vs. 37 239.0, all $P<0.05$), in which the amplitude of lowering was more significant in the latter group than that in the former group. **Conclusion** CDDP can put off the synthesis of collagen I and III and inhibit the myocardial mesenchymal fibrosis in rats with transplantation of bone marrow MSCs after experimental AMI, therefore it has preventive and therapeutic effects on the progress of left cardiac ventricular remodeling.

【Key words】 compound Danshen dripping pill; bone marrow mesenchymal stem cell; transplantation; collagen I; collagen III

急性心肌梗死(AMI)是由于冠状动脉闭塞导

作者简介:曲丽霞(1952-),女(汉族),山东省人,副主任医师。

致心脏血流供应中断而形成的心肌细胞坏死;因心肌细胞是一种终末分化细胞,成熟后即失去了再生

的能力,故 AMI 心室壁变薄,发生左室重构,成为患者后期出现心功能不全和心源性死亡的主要原因。目前临床上治疗所采用的药物溶栓、经皮冠状动脉介入治疗(PCI)和冠状动脉旁路移植术等均无法使梗死的心肌再生,因此,AMI 患者的远期预后不能得到显著改善。骨髓间充质干细胞(MSCs)移植治疗 AMI 具有重要意义。动物实验研究表明:心肌缺血、梗死后,将干细胞移植入梗死心肌周边区,可见左室梗死面积和左室重构明显缩小,心脏功能明显改善,同时观察到移植的干细胞分化为心肌细胞^[1-3]。心肌胶原网络可随 AMI 病程的演变发生动态变化,因此,测定心肌胶原蛋白水平有助于了解 AMI 程度、梗死范围以及心肌修复与预后^[4]。本实验中通过中药复方丹参滴丸(CDDP)干预 MSCs 移植治疗 AMI,探讨其对 AMI 后左室重构的防治作用。

1 材料和方法

1.1 大鼠 MSCs 的分离培养与扩增:选择 100 g 左右体重的雄性 Wistar 大鼠,采用颈椎脱臼法处死,无菌条件下取股骨和胫骨,用注射器抽吸 20 ml 基础培养基注入骨端的生长面上,从另一端收集冲洗出来的骨髓培养液,离心弃上清液,用 20 ml 完全培养基重悬细胞,接种于塑料培养瓶中,置于 37 ℃、体积分数 5%CO₂、饱和湿度的孵箱中培养;3~5 d 换液 1 次,洗去未贴壁细胞;10~14 d 后待贴壁细胞增殖、相互融合至铺满培养瓶底 80%~90%时,用胰蛋白酶溶液消化,进行传代。

1.2 AMI 动物模型复制^[5]:选择 200~250 g 雄性 Wistar 大鼠,用水合氯醛腹腔注射麻醉,开胸,暴露心脏,在左冠状动脉前降支(LAD)1/2 处进行结扎,接多导生理记录仪记录心电图标准 II 导联,以 ST 段抬高和(或)T 波抬高或降低、大鼠周围心肌组织出现颜色苍白或变暗为发生 AMI 的标志。然后将 100 μl 细胞悬液(约含 MSCs 1×10⁶ 个)注入缺血区心肌内,关胸,伤口局部注射青霉素,连用 3 d。

1.3 实验分组:将成活的 AMI 大鼠按随机数字表法分为模型组、MSCs 移植组、CDDP 干预组,另增设正常对照组,每组 12 只。CDDP 干预组移植后次日开始喂服 CDDP 1 ml,每日 1 次,连用 30 d。

1.4 检测指标及方法:术后 30 d 用水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,开胸、取出心脏,用乙醇浸泡,石蜡包埋,冠状切片,染色,烤片,显微镜下每张切片随机采样测量 3 处,用免疫组化法检测 I、III 型胶原蛋白的表达水平,用图像分析系统读取阳性染色区域的积分吸光度(A)值作为其相对定量。

1.5 统计学分析:采用 SPSS 11.5 统计软件,结果以中位数(M)表示,经 log 转换成正态分布后采用单因素方差分析,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织病理学观察(彩色插页图 1~2):正常对照组心肌纤维排列整齐,细胞核大小、形态基本一致,染色质均匀,未见肥大、坏死、萎缩、断裂等现象,可见少量胶原表达。模型组心肌细胞水肿,细胞间分离,胞质及部分细胞外缘可见棕黄色颗粒强阳性表达。MSCs 移植组心肌细胞水肿,细胞间分离,胞质及部分细胞外缘可见棕黄色颗粒弱阳性表达,较模型组明显减少。CDDP 干预组心肌细胞水肿,细胞间分离,胞质及部分细胞外缘可见棕黄色颗粒弱阳性表达,较 MSCs 移植组减少。

2.2 心肌细胞胶原阳性表达结果(表 1):模型组 I、III 型胶原阳性表达明显高于正常对照组(P 均<0.05)。MSCs 移植组、CDDP 干预组 I、III 型胶原阳性表达均较模型组明显下降(P 均<0.05),虽以 CDDP 干预组下降幅度大,但两组间差异无统计学意义(P>0.05)。

表 1 各组 AMI 大鼠心肌细胞胶原蛋白阳性表达(M)

组别	动物数	I 型胶原(A 值)	III 型胶原(A 值)
正常对照组	12	713.2	1 276.3
模型组	12	25 687.3 ^a	37 239.0 ^a
MSCs 移植组	12	5 394.0 ^b	14 025.0 ^b
CDDP 干预组	12	3 189.1 ^b	3 984.4 ^b

注:与正常对照组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05

3 讨论

AMI 后左室重构是决定预后的重要因素,其中 I、III 型胶原改变的过程是重构的主要因素之一,这两种胶原含量变化是促使心脏几何形态改变、心肌收缩和舒张功能恶化的重要因素。心肌细胞间质的主要成分是胶原蛋白,其中 I 型胶原主要聚合成粗纤维,其僵硬大,伸展和回缩弹性较小;III 型胶原主要构成细纤维,其伸展和回缩弹性较大;正常情况下,它们编织成胶原纤维网,起着心肌细胞支架及保证心肌细胞收缩和舒张同步协调以及瓣膜正常闭合的作用^[6]。由于致病因素干扰了 I、III 型胶原蛋白分子合成和降解的平衡过程,导致 I、III 型胶原纤维在心肌间质和血管周围区域过度堆积,形成灶状或融合成片的纤维替代区,由此发生了左室重构。

AMI 属中医“胸痹心痛”范畴。祖国医学认为,气塞不通、血塞不流、瘀阻血脉是引发胸痹心痛的病

因病机之一。因此,活血化瘀在治疗中成为主要治法,这也为 CDDP 治疗 AMI 提供了理论依据。

本实验中观察到正常大鼠心肌组织中 I、III 型胶原蛋白表达很少,颜色较淡;而模型组大鼠心肌胶原成分明显增多,可看到大量棕黄色的 I、III 型胶原蛋白阳性表达,说明模型组大鼠心肌发生了明显的纤维化。经图像分析及统计学处理,按 I、III 型胶原蛋白表达从高至低依次为模型组、MSCs 移植组、CDDP 干预组、正常对照组。由此可见, MSCs 移植和 CDDP 干预均能有效抑制大鼠心肌胶原蛋白的过度沉积,其中以 CDDP 干预降低胶原蛋白表达更为明显。说明干预手段能够抑制心肌纤维化,减少室壁张力,增加心肌顺应性,从而抑制左室重构。

目前, MSCs 及中药防治 AMI 后左室重构的机制尚不清楚,可能的原因有 MSCs 本身可分泌多种抗心肌细胞凋亡的细胞因子,影响炎症细胞因子生成,中药诱导 AMI 后移植干细胞在心肌中的存活及分化为心肌样细胞等。本研究表明,活血化瘀中药联

合 MSCs 移植确实能降低 I、III 型胶原蛋白的表达,抑制心肌纤维化,防治左室重构。这为 MSCs 及中药在 AMI 后左室重构的防治提供了理论基础。

参考文献

[1] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium[J]. Nature, 2001, 410(6829): 701-705.

[2] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(18): 10344-10349.

[3] 杨国勋, 刘唐威, 钟国强, 等. 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(7): 428-430.

[4] 王伟华, 喻艳林, 陈月云, 等. III 型及 IV 型前胶原与心肌梗死病程演变的关系[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(7): 410-420.

[5] 许丹, 张春来, 李霞, 等. 制作大鼠急性心肌梗死模型的实验分析[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2006, 9(2): 190-191.

[6] 牛建立, 成纪润, 贾清仁, 等. 心脏瓣膜间质细胞的表型转化及其与瓣膜病理形态发生的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(3): 140-142.

(收稿日期: 2009-03-12)
(本文编辑: 李银平)

• 治则 • 方剂 • 针灸 •

老年性足跟疼痛的防治

李红峰

(宁夏回族自治区人民医院, 宁夏 银川 750021)

【关键词】 足跟疼痛; 老年; 防治

中图分类号: R255.6 文献标识码: B DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.013

足跟疼痛是骨伤科常见的一种病症,好发于老年人,尤以女性为多见。足跟疼痛属于祖国医学“痹证”范畴,多因肝肾虚弱,气血不足,营卫失调,筋脉失养,寒痰凝滞血脉,复感风寒湿邪或慢性劳损导致经络瘀滞、气血运行受阻所致。由于此症与肝肾有关,所以有些患者伴有头晕、耳鸣、失眠、健忘、脉沉无力等症状。参照《疼痛诊断治疗学》的标准,足跟疼痛可分为跟骨骨刺、跟部滑囊炎、跟腱周围炎、足下脂肪纤维炎、跖腱膜炎等类型。

根据祖国医学“审证求因”的法则,足跟疼痛治宜温化寒痰、温经通络止痛。主要以补益肝肾、活血化瘀、通筋活络、除湿蠲痹为主,并根据临床表现辨证论治。肾阴亏虚者治宜滋补肾阴;肾阳不足者治宜温补肾阳、通络止痛;寒湿凝者治

宜散寒除湿、通络止痛;湿热痹者治宜除湿蠲痹;瘀血内阻者治宜活血化瘀。

2.2 中医外治疗法:①艾灸疗法:鲜生姜切成 0.3~0.5 cm 厚的薄片,中间针刺数孔,将塔形艾炷放在姜上,灸患侧足跟部,艾炷烧尽,足跟有灼痛时用姜片磨擦局部,每日 1~2 次。②土制醋熏法:用木瓜、透骨草、红花、牛膝各 30 g 加石子半斤装于布袋中,放入 1 000 ml 醋中煮沸取出,待其不烫脚后垫于足底及足跟疼痛处,早晚各 1 次。③物理疗法:可进行理疗、局部热敷等。

2.3 局部封闭法:2%利多卡因加得宝松 1 ml 用生理盐水稀释注入痛点,即跖筋膜附着的跟骨处,以跖腱膜炎效果最好。跟骨滑囊炎、跟骨结节滑囊炎也可使用。每周 1 次,4~6 次为 1 个疗程。

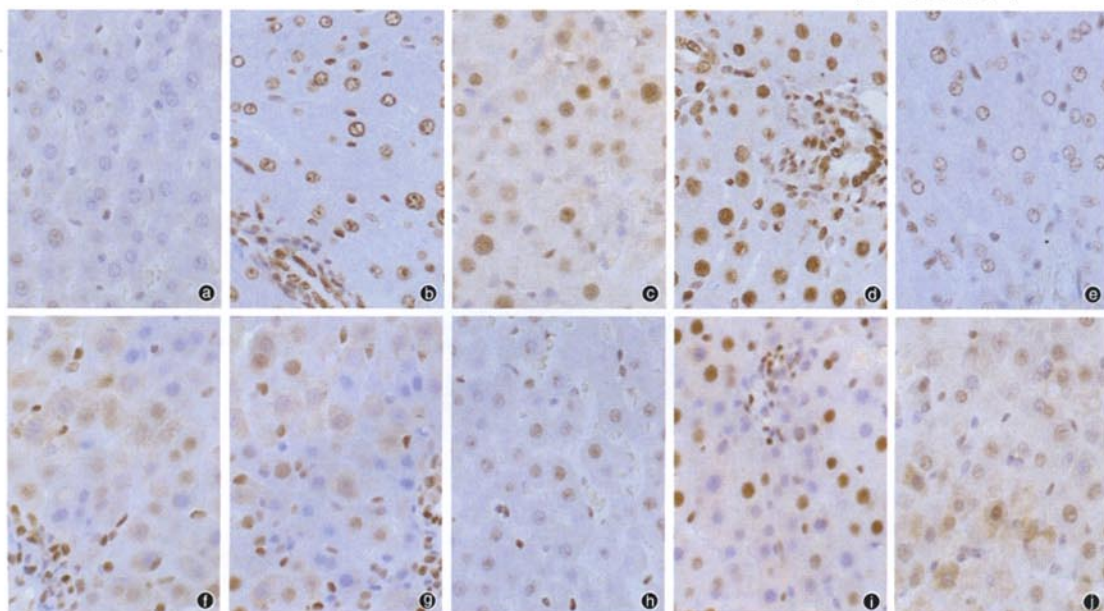
2.4 手术治疗:以上保守治疗无效时可

采用手术治疗,治疗方法有:①小针刀:取小针刀沿针头方向刺入,达跟骨结节处,拔去针头,用小针刀行上下左右铲除、切割,松懈数次后,拔除小针刀,盖上消毒敷料,压迫止血,同时施以足部过度背屈手法数次,包扎创口。小针刀可直接铲除骨刺、松懈粘连,配以药物注射直接阻断痛觉的神经传导通路,改善局部血液循环,促进炎性水肿的消散和吸收,从而达到疼痛康复的目的。②对顽固性跟骨痛、X 线片证实有骨刺者,行足跟骨刺切除术。③对跟骨内压高者可行跟骨钻孔术。④对无原因顽固性足跟痛可采用射频热凝手术毁损与足跟疼痛相关的神经。⑤此外还有跟骨滑囊切除术、平足症的跟骨截骨术。

(收稿日期: 2009-04-05)
(本文编辑: 李银平)

红花注射液对急性肝损伤大鼠炎症因子的影响

(正文见152页)

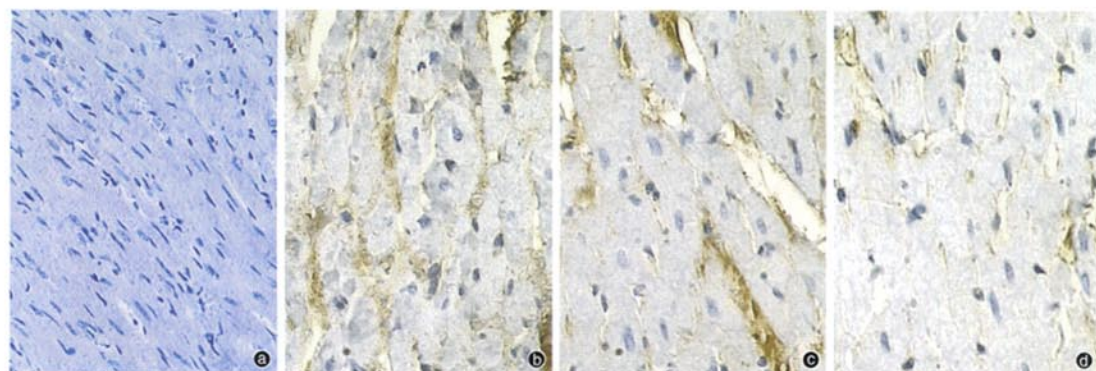


①:对照组, ②~③:ALI组 6、24、48h组, ④~⑥:H组 6、24、48h组, ⑦~⑨:TAD组 6、24、48h组

图1 光镜下观察各组大鼠肝组织HMGB1表达(免疫组化, ×400)

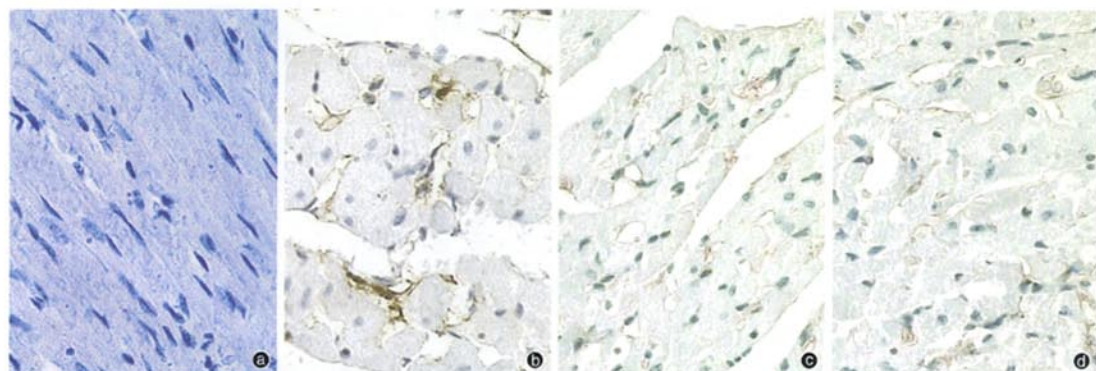
复方丹参滴丸对骨髓干细胞移植梗死心肌胶原蛋白表达的影响

(正文见162页)



①:正常对照组, ②:模型组, ③:MSCs移植组 ④:CDDP干预组

图1 各组大鼠心肌细胞I型胶原阳性表达(免疫组化, ×400)



①:正常对照组, ②:模型组, ③:MSCs移植组 ④:CDDP干预组

图2 各组大鼠心肌细胞III型胶原阳性表达(免疫组化, ×400)