

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.08.014

黄芪甲苷对人骨髓间充质干细胞体外增殖 及细胞因子表达的影响*

彭小娟¹ 白海^{2△} 王存邦² 葱瑞² 晁二涛¹

(1 甘肃中医学院 甘肃 兰州 730050; 2 兰州军区兰州总医院全军血液病中心 甘肃 兰州 730050)

摘要 目的:探讨黄芪甲苷对人骨髓间充质干细胞体外增殖及细胞因子表达的影响。**方法:**采用 Percoll 密度离心法和贴壁法分离纯化 hBMSC; 流式细胞术检测 hBMSC 表面标志; MTT 法检测不同浓度黄芪甲苷干预 72 h 后 hBMSC 的增殖情况; Real-time PCR 法检测经黄芪甲苷干预后 hBMSC 对 SCF、VEGF、SDF-1、GM-CSF mRNA 的表达水平。**结果:**成功分离培养出 hBMSC; 不同浓度(20、40、80、160、320 mg / mL)的黄芪甲苷可促进 hBMSC 增殖($P<0.05$), 其中 160 mg/mL 组促增殖最明显; 黄芪甲苷可促进 hBMSC 对 SCF、VEGF、SDF-1 mRNA 的表达, 而 GM-CSF mRNA 表达无明显变化。**结论:**黄芪甲苷可促进 hBMSC 体外增殖, 可能与其促进 hBMSC 对 SCF、VEGF、SDF-1 mRNA 表达有关。

关键词:黄芪甲苷; 骨髓间充质干细胞; 增殖; 细胞因子

中图分类号:R285.5, Q813 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)08-1452-04

Effect of Astragaloside IV on the Proliferation and Cell Factor Expression in hBMSC*

PENG Xiao-juan¹, BAI Hai^{2△}, WANG Cun-bang², XI Ru², CHAO Er-tao¹

(1 Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Gansu, Lanzhou, 730050, China;

2 Hematology Center, Lanzhou Military Area General Hospital, Gansu, Lanzhou, 730050, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Astragaloside IV on the proliferation and the expression of cell factor in human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSC). **Methods:** Human bone marrow mesenchymal stem cells were isolated from bone marrow by percoll isodensity centrifugation and adherent method. The surface marker of hBMSC were detected by flow cytometer. The proliferation of hBMSC with different concentration Astragaloside IV for 72 hours were evaluated by MTT. The expressions of SCF, VEGF, SDF-1, GM-CSF mRNA were measured by Real-time PCR. **Results:** The hBMSC were isolated successfully. Astragaloside IV at 20, 40, 80, 160, 320 mg/mL significantly increased the proliferation of hBMSC ($P<0.05$), especially the group of 160 mg/mL had the most obvious effect. Astragaloside IV could stimulated the expressions of SCF, VEGF, SDF-1 mRNA, but GM-CSF mRNA were not change significantly. **Conclusions:** Astragaloside IV could increase the proliferation of hBMSC and improve the expressions of the SCFV, EGF, SDF-1 mRNA.

Key words: Astragaloside IV; Bone marrow mesenchymal stem cells; Proliferation; Cell factor

Chinese Library Classification(CLC): R285.5, Q813 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2014)08-1452-04

前言

骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC) 是存在于骨髓中具有高度自我更新和多向分化潜能的成体干细胞, 又称间充质祖细胞或骨髓基质干细胞^[1], 在特定诱导条件下可跨胚层向多种细胞分化^[2-6], 具有支持造血、调节免疫和分泌多种细胞因子参与修复损伤组织等功能。但 BMSC 占骨髓有核细胞的量极少约 0.001%~0.01%^[7], 而且随着年龄的增长, BMSC 在骨髓中的含量会进一步减低^[8], 故必须通过体

外分离纯化和大量扩增才能满足临床需要。

黄芪甲苷为黄芪的主要有效成分之一, 黄芪为常用的补气用药。多项研究表明, 中药可促进骨髓间充质干细胞体外增殖^[9-12]。本试验以“气能生血”的中医理论为指导, 旨在研究黄芪甲苷对人骨髓间充质干细胞 (human bone marrow mesenchymal stem cell, hBMSC) 体外增殖和细胞因子表达的影响, 为其临床应用进一步提供理论依据。

1 材料与方法

* 基金项目: 甘肃省科技重大专项(1102FKDA005)

作者简介: 彭小娟(1979-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 间充质干细胞基础研究, 电话: 13519642354, E-mail: 2468467104@qq.com

△通讯作者: 白海, 主任医师, 教授, 硕士生导师 E-mail: baihai98@tom.com

(收稿日期: 2013-10-11 接受日期: 2013-11-05)

1.1 材料与试剂

骨髓来自健康成人志愿者;黄芪甲苷(兰州维科生物工程公司);低糖 DMEM(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(杭州四季青生物材料有限公司);Percoll 细胞分离液、胰蛋白酶、四甲基偶氮唑盐、二甲基亚砜均购自美国 Sigma 公司;荧光标记鼠抗人抗体 CD34-PE、CD45-FITC、CD44-PE、CD71-FITC (美国 PharMingen 公司);引物由大连宝生物服务有限公司合成;Trizol、逆转录试剂盒、荧光定量试剂盒均购自大连宝生物公司(Takara)。

1.2 骨髓间充质干细胞的分离、培养及鉴定

无菌采集健康成人志愿者骨髓 5 mL, 肝素抗凝, 适量 LG-DMEM 培养液稀释, 置等量的人淋巴细胞分离液上, 2000 r/min 离心 20 min, 取中间单个核细胞层, 用 LG-DMEM 培养液 1000 r/min 离心 10 min, 洗涤 2 次, 再用 LG-DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清)重悬细胞并计数, 按密度为 2×10^5 /mL 接种于 25 cm² 培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱。48 小时后首次换液, 弃去未贴壁细胞, 此后每隔 3 天换一次液。待细胞融合达 80-90% 时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化, 以 1:3 比例传代。在倒置相差显微镜下观察原代及传代细胞生长及形态变化。

PBS 重悬消化后的 P3 hBMSC, 细胞浓度调整为 1×10^6 /mL, 分别加入 CD44-PE、CD45-FITC、CD34-PE、CD71-FITC 标记的单抗 10 μL, 室温下避光反应 15 分钟, 流式液洗涤 1 次, 流式细胞仪检测 hBMSC 表面抗原的表达, CellQuest 软件分析数

据。

1.3 MTT 法检测黄芪甲苷对骨髓间充质干细胞增殖的影响

取生长良好的 P3 hBMSC, 制成 2×10^4 /mL 的单细胞悬液, 每孔 150 μL 均匀地接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后吸弃培养液, 试验组每孔加入含不同浓度(20、40、80、160、320 mg / mL)黄芪甲苷的培养液 150 μL, 对照组和调零孔(不含细胞)只加 150 μL 的 LG-DMEM 培养液, 每组 5 个复孔, 培养 72 小时后, 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg / mL) 20 μL, 37℃ 培养 4 小时后, 弃上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 490 nm 波长测各孔光吸收值(OD)。

1.4 Real-time PCR 法检测细胞因子的表达

取生长良好的 P3 hBMSC, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL 接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后换液, 试验组加入含 160 mg/mL 黄芪甲苷的完全培养基, 对照组只加完全培养基, 培养 72h 后, 用 PBS 洗细胞 3 次, 采用 Trizol 法提取总 RNA。用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA, 将其反转录合成 cDNA。PCR 反应体系: SYBR Premix Ex Taq™ II 25 μL, Forward Primer 2 μL, Reverse Primer 2 μL, ROX Reference Dye 1 μL, cDNA 4 μL, dH₂O 16 μL。反应条件: 95℃ 10 s, 95℃ 5 s, 60℃ 30 s 循环 40 次。反应完成后, 计算机自动分析荧光信号, 并将其转换为 ct 值(循环阈值), 根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 SCF、VEGF、SDF-1、GM-CSF mRNA 的相对表达量。相应引物序列见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table1 The name and sequence of primers

Name of primer	Forward(5' -3')	Reverse(5' -3')
SDF-1	CCCTTCAGATTGTAGCCCGG	CGATCCCAGATCAATGTGCC
VEGF	TCGGGCTCCGAAACCATGA	CCTGGTGAGAGATCTGGTTC
GM-CSF	TTTCCTGGGCATTGTGGT	AGGGCAGTTCGTCTGGTAG
SCF	CTCCTATTTAATCCTCTCGTC	TACTACCATCTCGTTATCCA
β-actin	GGTGAAGGTCGGAGTCAACGG	GGTCATGAGTCCTTCCACGAT

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 所得数据(计量资料)均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较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 hBMSC 的形态观察和表型鉴定

原代 hBMSC 培养 24 h 可见部分细胞贴壁伸展, 48 h 时贴壁细胞明显增多, 以多角形细胞为主, 7 d 后贴壁细胞呈较典型的长梭形, 14 d 细胞基本铺满瓶底, 呈网状或漩涡状排列。传代细胞为均匀的长梭型呈漩涡状排列(见图 1)。

流式细胞术检测 hBMSC 表面抗原结果显示: CD44、CD71、CD45、CD34 表达率分别为 98.5%、79.6%、0.47%、0.38%, 表明 hBMSC 高表达间充质干细胞表面标志 CD44、CD71, 低表达或不表达造血干细胞表面标志 CD34、CD45, 说明培养细胞符合骨髓间充质干细胞的生物学特性。

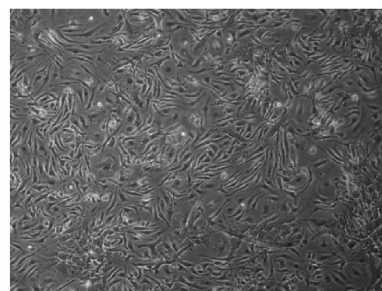


图 1 第三代人骨髓间充质干细胞($\times 100$)

Fig.1 P3 hBMSC ($\times 100$)

2.2 不同浓度的黄芪甲苷对 hBMSC 增殖的影响

不同质量浓度(20、40、80、160、320 mg/mL)的黄芪甲苷干预 hBMSC 72 h 后, hBMSC 的增殖增加, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 其中以 160 mg/mL 黄芪甲苷促增殖最明显, 说明当药物达到一定浓度后, hBMSC 增殖不再增加(见表 2)。

表 2 不同质量浓度黄芪甲苷干预 72 小时对 hBMSC 增殖的影响($\bar{x} \pm s$, n=5)

Table 2 The proliferation of hBMSC with different concentration Astragaloside IV for 72 hours ($\bar{x} \pm s$, n = 5)

Groups	OD Values
Control Group	0.382± 0.015
20 mg/mL	0.398± 0.027
40 mg/mL	0.443± 0.008
80 mg/mL	0.464± 0.011
160 mg/mL	0.520± 0.031
320 mg/mL	0.454± 0.011

2.3 黄芪甲苷对 hBMSC 细胞因子表达的影响

凝胶电泳鉴定 RNA 结果如图 2 所示: 说明试验组 2、3 及对照组 1(从左往右第 2、3 及 4)RNA 提取成功。

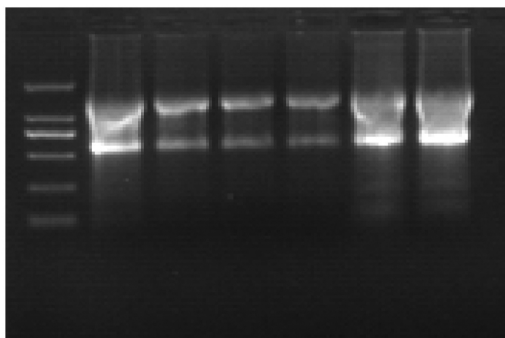


图 2 凝胶电泳鉴定 RNA

Fig. 2 RNA identification with gel electrophoresis

经 160 mg/mL 黄芪甲苷干预 hBMSC 72 h 后, hBMSC 对 SCF、VEGF、SDF-1 mRNA 表达均增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 GM-CSF mRNA 表达无明显变化 ($P > 0.05$) (见图 3)。

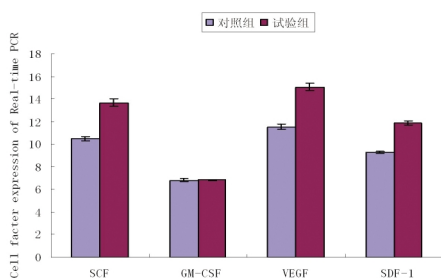


图 3 160 mg/mL 黄芪甲苷对 hBMSC 基因表达的影响

Fig. 3 The effect of hBMSC gene expression with 160 mg/mL Astragaloside IV

3 结论

骨髓间充质干细胞是造血微环境的主要组成部分。其联合造血干细胞移植可以促进造血干细胞植入, 加快造血恢复, 预防移植抗宿主病^[13,14]。因此, 骨髓间充质干细胞在血液病治疗中发挥着重要作用, 但其获得细胞数少且来源有限。谭艳芳等^[15]研究表明黄芪甲苷与 BMSC 增殖有关。

本实验成功分离培养出 hBMSC, 并研究证实黄芪甲苷可以促进 hBMSC 体外增殖。其中以 160 mg/mL 黄芪甲苷组促增殖最明显, 说明当药物达到一定浓度后, hBMSC 增殖不再增加。既往研究表明, 黄芪甲苷促进 rBMSC 增殖的机制可能与其促进了 SCF mRNA 的表达有关^[15]。本实验采用 real-time PCR 法检测细胞因子表达的结果显示, 经 160 mg/mL 黄芪甲苷干预 hBMSC 72 h 后, 其 SCF、VEGF、SDF-1 mRNA 表达均增加, 而 GM-CSF mRNA 表达无明显变化。SCF 是 c-kit 原癌基因编码受体的配体蛋白, 参与机体发育中多种细胞生长的调控, 能促进骨髓间充质干细胞增殖^[16], 并对造血干细胞的生存、增殖、分化和黏附及骨髓微环境起着关键作用^[17]。VEGF 是血管内皮细胞特异的有丝分裂原, 合成后以旁分泌形式发挥生物效应^[18], 血管内皮生长因子可以促使血管生成, 并能促进骨髓间充质干细胞增殖^[19]。SDF-1 为 α 类趋化因子, 它通过与其表面受体 CXCR4 特异性结合发挥作用^[20]。Kortesidis 等^[21]研究发现, 基质细胞衍生因子 -1 可促进骨髓间充质干细胞增殖。由此表明, 黄芪甲苷促进 hBMSC 增殖, 可能与其促进 hBMSC 对 SCF、VEGF、SDF-1 mRNA 表达有关, 但其作用途径和信号机制还有待进一步研究。

综上所述, 黄芪甲苷可促进 hBMSC 体外增殖, 可能与其促进 hBMSC 对 SCF、VEGF、SDF-1 mRNA 表达有关。这为解决临床上 hBMSC 数量少及来源有限提供了另一条途径, 以促进其更好的应用于血液系统疾病的治疗。

参考文献 (References)

- [1] Maligneri A, Kantzari E, Patrizi MP, et al. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art [J]. Int J Clin Exp Med, 2010, 3(4): 248-269
- [2] 王南丁, 张晓凤, 陈艳秋, 等. 模拟微重力对骨髓间充质干细胞增殖及其向脂肪方向分化能力的影响[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(1): 31-34
Wang Nan-ding, Zhang Xiao-feng, Chen Yan-qiu, et al. The Effect of Simulated Microgravity on Proliferation and Adipogenic Differentiation Capacity of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2013, 13(1): 31-34
- [3] Feng Z, Li C, Jiao S, et al. In vitro differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into hepatocytes[J]. Hepatogastroenterology, 2011, 58(112): 2081-2086
- [4] 聂蕾, 殷祯隆, 刘永琦, 等. 当归红芪超滤膜提取物诱导小鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(5): 632-637
Nie Lei, Yin Yi-long, Liu Yong-qi, et al. Ultrafiltration Membrane Extract Mixture from Angelica sinensis and Hedysarum polybotrys Induced Transdifferentiation of BMSCs in Mice: an Experimental Research [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional And Western Medicine, 2013, 33(5): 632-637
- [5] 牛红星, 穆军升, 张健群, 等. 骨髓间充质干细胞向心肌分化的实验研究[J]. 心肺血管病杂志, 2013, 32(3): 357-360
Niu Hong-xing, Mu Jun-sheng, Zhang Jian-qun, et al. Experimental study of mouse bone marrow mesenchymal stem cells induced to differentiate into the Cardiomyocyte-like cells[J]. Journal of Cardiovascular & Pulmonary Diseases, 2013, 32(3): 357-360

- [6] 张诚, 杨玉龙, 林美举, 等. 体外诱导骨髓间充质干细胞向胆管上皮样细胞分化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1): 17-22
Zhang Cheng, Yang Yu-long, Lin Mei-ju, et al. In vitro induced differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into bile duct epithelial-like cells [J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2013, 17(1): 17-22
- [7] 李洪伟, 郭开今, 周冰, 等. 人骨髓间充质干细胞体外培养及其生物学特性分析[J]. 山东医药, 2011, 51(26): 91-92
Li Hong-wei, Guo Kai-jin, Zhou Bing, et al. Analysis of the human bone marrow mesenchymal stem cells on biological characteristics and In vitro culture[J]. Shandong Medical Journal, 2011, 51(26): 91-92
- [8] 娄典, 周新伏. 体外扩增临床应用骨髓间充质干细胞的研究进展[J]. 医学综述, 2013, 19(10): 1748-1750
Lou Dian, Zhou Xin-fu. Research Progress in Clinical Application of Ex Vivo Expansion of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells [J]. Medical Recapitulate, 2013, 19(10): 1748-1750
- [9] 张爱国, 蔡建平, 许宝满, 等. 四种中药煎剂和雪莲花醇提液对骨髓间充质干细胞增殖活性的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(23): 4287-4290
Zhang Ai-guo, Cai Jian-ping, Xu Bao-man, et al. Effect of four traditional Chinese medicine decoctions and ethanolic extract from Saussurea involucre on bone marrow mesenchymal stem cell proliferation activity in vitro [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(23): 4287-4290
- [10] 刘国岩, 徐展望, 徐琬梨. 骨碎补提取物对骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化及 Cbfa1 表达的影响[J]. 山东医药, 2013, 53(25): 10-12
Liu Guo-yan, Xu Zhan-wang, Xu Wan-li. Effect of drynaria extract on the osteogenic differentiation of BMSCs and expression of Cbfa1 [J]. Shandong Medical Journal, 2013, 53(25): 10-12
- [11] 王艳春, 闫承慧, 刘晶, 等. 独参汤促进骨髓间充质干细胞体外增殖: 最佳干预剂量的筛选 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(23): 4291-4294
Wang Yan-chun, Yan Cheng-hui, Liu Jing, et al. Dushentang promotes the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells in vitro: Screening of the optimal intervention concentration [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(23): 4291-4294
- [12] 王晓娟. 丹参多酚酸盐对大鼠骨髓间充质干细胞增殖及血管内皮生长因子表达的影响[J]. 环球中医药, 2013, 6(7): 492-495
Wang Xiao-juan. Effect of salvianolate on cell proliferation and levels of VEGF of rat bone marrow mesenchymal stem cells [J]. Global Traditional Chinese Medicine, 2013, 6(7): 492-495
- [13] 雷晓宇, 周新伏. 骨髓间充质干细胞的生物学特性以及在血液系统疾病中的应用[J]. 临床医学, 2011, 31(1): 101-103
Lei Xiao-yu, Zhou Xin-fu. The biological characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells and the application of the blood system diseases [J]. Clinical medicine, 2011, 31(1): 101-103
- [14] 吕璐璐, 宋永平, 房佰俊, 等. 人类脐带源间充质干细胞细胞因子分泌及造血支持作用的研究[J]. 白血病淋巴瘤, 2008, 17(6): 404-407
Lv Lu-lu, Song Yong-ping, Fang Bai-jun, et al. Cytokine Production and hematopoiesis-supportive function of human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. Journal of Leukemia & Lymphoma, 2008, 17(6): 404-407
- [15] 谭艳芳, 殷小成, 熊玉娟, 等. 黄芪甲甙对大鼠骨髓间充质干细胞多种造血相关因子表达的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10): 1817-1820
Tan Yan-fang, Yin Xiao-cheng, Xiong Yu-juan, et al. Stem cell factor secretion by bone mesenchymal stem cells stimulated with astragaloside II [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2010, 14(10): 1817-1820
- [16] 黄进, 张进, 徐志伟. 黄芪多糖对体外培养骨髓间充质干细胞增殖和干细胞因子表达的刺激作用[J]. 复旦学报(医学版), 2011, 38(4): 343-348
Huang Jin, Zhang Jin, Xu Zhi-wei. Effect of astragalus polysaccharide on the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and the expression of stem cell factor in vitro [J]. Fudan Univ J Med Sci, 2011, 38(4): 343-348
- [17] 吴艳, 于洁, 张磊, 等. 再生障碍性贫血患儿骨髓间充质干细胞体外造血支持作用的研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(4): 455-459
Wu Yan, Yu Jie, Zhang Lei, et al. Hematopoiesis support of mesenchymal stem cells in children with aplastic anemia [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(4): 455-459
- [18] 徐杰, 范维琥. 丹参多酚酸盐对人血管内皮细胞迁移的影响[J]. 中西医结合学报, 2003, 1(3): 211-214
Xu Jie, Fan Wei-hu. Effect of salvianolate on Migration of human vascular endothelial cells [J]. J Chin Integr Med, 2003, 1(3): 211-214
- [19] 刘琳, 白海, 王存邦, 等. 黄芪多糖对人骨髓间充质干细胞增殖的影响[J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(3): 8-12
Liu Lin, Bai Hai, Wang Cun-bang, et al. Effects of Astragalus polysaccharide on the proliferation of bone mesenchymal stem cells of human [J]. Journal of Gansu College of Traditional Chinese Medicine, 2013, 30(3): 8-12
- [20] 丁鹏, 冯忠堂, 杨智勇, 等. 趋化因子 SDF-1 体外趋化骨髓基质细胞迁移的实验研究[J]. 中华神经医学杂志, 2007, 6(3): 225-227
Ding Peng, Feng Zhong-tang, Yang Zhi-yong, et al. In vitro study of the migration of marrow stromal cells induced by SDF-1 [J]. Chinese Journal of Neuromedicine, 2007, 6(3): 225-227
- [21] Kortessidis A, Zannettino A, Isenmann S, et al. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival and development of human bone marrow stromal stem cells [J]. Blood, 2005, 105(10): 3793-3801