# 黄芪对低氧环境下 SDF-1 诱导 hBMSCs 迁移的干预作用研究

林冬阳[1]，杨博华[1]，沈　凌[2]

（1. 北京中医药大学东直门医院周围血管科，北京　100700；
2. 中国中医科学院广安门医院骨科，北京　100053）

**摘要**：目的：研究模拟人体内低氧环境，黄芪和血管内皮细胞生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）及间质细胞衍生因子 1（stromal cell-derived factor 1，SDF-1）等重要细胞因子对人骨髓间充质干细胞（human bone marrow mesenchymal stem cells，hBMSCs）向病灶迁移及向血管内皮细胞（vascular endothelial cells，VECs）分化能力的影响。方法：应用 Transwell 系统，实验细胞随机分为 7 组。将常氧 3 组置于普通 $CO_2$ 细胞培养箱（含 21%$O_2$）中培养，低氧 4 组置于三气培养箱（含 5%$O_2$）中培养。培养 48 h 后，随机选择 3 个连续显微镜视野计数迁移到上室膜下的细胞，取平均数。结果：1）在常氧培养 3 组中，SDF＋黄芪＋常氧组与其他 2 组比较，hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.01$，$P<0.05$）；2）在低氧培养 4 组中，SDF＋黄芪＋低氧组与其他 3 组比较，hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.01$）；与 SDF＋低氧组比较，低氧对照组 hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.01$）；低氧对照组与黄芪＋低氧组组间差异无统计学意义（$P>0.05$）；3）与 SDF＋黄芪＋常氧组比较，SDF＋黄芪＋低氧组 hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.05$）；SDF＋常氧组与 SDF＋低氧组、黄芪＋常氧组与黄芪＋低氧组组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。结论：在常氧和低氧环境中，黄芪与 SDF-1 联合使用可促进 BMSCs 迁移；而在低氧环境中，单独应用黄芪没有显著的促进作用。

**关键词**：中医外科学；骨髓间充质干细胞；黄芪；间质细胞衍生因子-1；迁移；血管内皮细胞生长因子
**中图分类号**：R261　　**文献标识码**：B　　**文章编号**：1674-2850(2012)12-2285-5

# Study on the intervention of Astragalus on the hBMSCs migration induced by SDF-1 in hypoxic environment

LIN Dongyang[1], YANG Bohua[1], SHEN Ling[2]

(1. *Department of Peripheral Vessel, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing* 100700, *China*;
2. *Department of Orthopedics, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing* 100053, *China*)

**Abstract**: Objective: To study the effects of Astragalus, vascular endothelial growth factor (VEGF) and stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) on the human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) capabilities of migrating to the lesion sites and differentiating into vascular endothelial cells (VECs) by simulating hypoxic environment of human body. Methods: Using Transwell system, the experimental cells were randomly divided into 7 groups. The three normxic groups were placed in ordinary cell culture incubator (including 21% $O_2$); The four hypoxic groups were placed in the special cell culture incubator (including 5% $O_2$). After 48-h culture, the cells were counted by randomly selecting three consecutive microscope visual fields below the membrane, and the final cell number was the average of three visions. Results: 1) Among the three normoxic groups, the ability of migration of hBMSCs in SDF＋Astragalus＋normoxic group was significantly higher than that of

**基金项目**：高等学校博士学科点专项科研基金（200800260010）
**作者简介**：林冬阳（1977—），男，主治医师，主要研究方向：中西医结合周围血管病. E-mail：nirvirna@sohu.com

others ($P<0.01$, $P<0.05$); 2) Among the four hypoxic groups, the ability of migration of hBMSCs in SDF+Astragalus+hypoxic group was significantly higher than that of others ($P<0.01$); the ability of migration of hBMSCs in SDF+hypoxic group was significantly higher than that in hypoxic control group ($P<0.01$); the ability of migration of hBMSCs in hypoxic+Astragalus group and hypoxic control group had no significant difference ($P>0.05$); 3) The ability of migration of hBMSCs in SDF+Astragalus+hypoxic group was significantly higher than that in SDF+Astragalus+normoxic group ($P<0.05$); The ability of migration of hBMSCs in SDF+normoxic group and SDF+hypoxic group had no significant difference ($P>0.05$); The ability of migration of hBMSCs in Astragalus+normoxic group and Astragalus+hypoxic group also had no significant difference ($P>0.05$). Conclusion: In normoxic and hypoxic environments, Astragalus combined with SDF-1 could promote the migration of BMSCs. However, Astragalus alone could not promote the migration of BMSCs in the hypoxic environment.

**Key words**: surgery of traditional Chinese medicine; bone marrow mesenchymal stem cells; Astragalus; stromal cell-derived factor 1; migration; vascular endothelial growth factor

## 0 引言

许多实验发现，通过静脉、动脉或局部直接注射途径给予的骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）或动员自体的 BMSCs 均可优先迁移、聚集到缺血的部位。缺血组织的局部微环境可能表达某些信号以促使循环的 BMSCs 迁移到该区域，并在此部位进一步分化为成熟的功能组织或发挥旁分泌作用。

SDF-1 属于趋化因子（chemokine，CXC）类蛋白，来源于 BMSCs，系统命名 CXCL12，是单核细胞与 T 细胞的高效趋化因子。在正常组织中，VECs 等可持续低水平表达 SDF-1，其趋化作用由其唯一受体 CXCR4 所介导[1]。SDF-1/CXCR4 在许多损伤的组织如心脏、肾脏和肝脏组织中表达上调。SDF-1/CXCR4 趋化效应促使 BMSCs 迁移到受损部位支持组织再生。文献[2]～[3]表明：若组织发生损伤缺血，损伤局部 SDF-1 水平升高，刺激内皮祖细胞（endothelial progenitor cells，EPCs）向缺血部位迁移，并分化为内皮细胞。实验将模拟低氧环境，利用体外迁移系统，检测 hBMSCs 经黄芪和 SDF-1 作用后的迁移能力。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

原代 hBMSCs（北京中医药大学东直门医院重点学科实验室制备）；黄芪注射液（成都地奥九泓制药厂生产）；胰蛋白酶、EDTA 及 DMSO（Sigma 公司）；低糖型 DMEM 培养基（L-DMEM）、胎牛血清（Gibco 公司）；重组人 SDF-1α（美国 Peprotech 公司）；青霉素、链霉素（华北制药股份有限公司）。

### 1.2 实验方法和步骤

#### 1.2.1 溶液配制

磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution，PBS）：取氯化钠 8 g，氯化钾 0.2 g，磷酸氢二钠 2.08 g，磷酸二氢钾 0.2 g，三蒸水定容至1 000 mL，调整至 pH 值为 7.4，滤器抽滤、除菌、分装，4℃保存备用。

细胞培养用消化液：0.25%的胰蛋白酶和 0.02%的 EDTA 按 1∶1 体积混合后作为常规消化液，配制方法如下：胰蛋白酶粉 0.5 g，溶于高压灭菌的 100 mL PBS（浓度为 0.01 mmol/L）中，混匀过夜，0.04%EDTA 与 0.01 mmol/L PBS 混匀。二者按 1∶1 体积混合后，抽滤除菌，分装，－2℃保存备用。

基础细胞培养液配制：取 L-DMEM 培养基 10 g，碳酸氢钠 2.82 g，HEPES 2.38 g，溶于

1 000 mL 三蒸水中，充分震荡搅拌溶解后，滤器抽滤、除菌、分装。使用时加入 10%胎牛血清，4℃保存备用。

**1.2.2 实验前准备**

取生长状态良好的 P3 代细胞，加入细胞消化液，消化 2～3 min 后加入少许血清，终止消化。将细胞悬液收集于离心管中，以 1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，用 PBS 洗 1～2 次，加入基础细胞培养液，配置成密度为 $3\times10^5$ 个/L 细胞悬浮液。

**1.2.3 细胞的分组及处理**

将上述细胞随机分为 7 组，分别为 SDF＋常氧组、黄芪＋常氧组、SDF＋黄芪＋常氧组、低氧对照组、SDF＋低氧组、黄芪＋低氧组及 SDF＋黄芪＋低氧组共 7 组：

1）SDF＋常氧组（Transwell 下室中加入含 100 μg/L SDF-lα 的 600 μL 细胞培养液）；

2）黄芪＋常氧组［Transwell 下室中加入含 12 g/L 黄芪注射液（Astragalus membranaceus injection，AMI）的 600 μL 细胞培养液］；

3）SDF＋黄芪＋常氧组（Transwell 下室中加入含 100 μg/L SDF-lα 和 12 g/L AMI 的 600 μL 细胞培养液）；

4）低氧对照组（Transwell 下室中加入 600 μL 基础细胞培养液）；

5）SDF＋低氧组（Transwell 下室中加入含 100 μg/L SDF-lα 的 600 μL 细胞培养液）；

6）黄芪＋低氧组（Transwell 下室中加入含 12 g/L AMI 的 600 μL 细胞培养液）；

7）SDF＋黄芪＋低氧组（Transwell 下室中加入含 100 μg/L SDF-lα 和 12g/L AMI 的 600 μL 细胞培养液）。

7 组均将 100 μL 细胞悬浮液注入上室；将 SDF＋常氧组、黄芪＋常氧组、SDF＋黄芪＋常氧组 3 组培养瓶置于普通 $CO_2$ 细胞培养箱（含 21%$O_2$）中；低氧对照组、SDF＋低氧组、黄芪＋低氧组、SDF＋黄芪＋低氧组 4 组置于三气培养箱（含 5%$O_2$）中培养。培养 48 h 后，取上室，酒精棉球擦掉上室膜上未迁移的细胞，95%酒精固定 10 min，苏木素染色 5 min，随机选择 3 个连续显微镜视野（×200）计数迁移到上室膜下的细胞，取平均数。

**1.2.4 统计学方法**

使用 SPSS 15.0 和 Excel 2003 软件进行统计学分析。所有数值用均数±标准差（$\overline{X}\pm S$）表示；组间比较用单因素方差分析，$P<0.05$ 为差异显著。

## 2 结果与分析

**2.1 常氧组 hBMSCs 迁移能力比较**

体外趋化迁移实验结果显示：在常氧培养 3 组中，SDF＋黄芪＋常氧组与 SDF＋常氧组及黄芪＋常氧组比较，常氧 hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.01$，$P<0.05$），如表 1 所示。

**2.2 低氧组 hBMSCs 迁移能力比较**

如表 2 所示，在低氧培养 4 组中，SDF＋黄芪＋低氧组与低氧对照组、SDF＋低氧组及黄芪＋低氧组 3 组比较，hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.01$）；与 SDF＋低氧组相比较，低氧对照组显著升高（$P<0.01$）；低氧对照组与黄芪＋低氧组组间差异无统计学意义（$P>0.05$）。

**表 1 常氧组 hBMSCs 迁移能力（$n=6$，$\overline{X}\pm S$）**

Tab. 1 Migration ability of hBMSCs in normoxic groups（$n=6$，$\overline{X}\pm S$）

| 组别 | 苏木素染色细胞数 |
|---|---|
| SDF＋常氧组 | 12.17±2.32* |
| 黄芪＋常氧组 | 3.16±1.72** |
| SDF＋黄芪＋常氧组 | 16.17±2.32 |

注：与 SDF＋黄芪＋常氧组比较，* 为 $P<0.05$，** 为 $P<0.01$

**表 2 低氧组 hBMSCs 迁移能力（$n=6$，$\overline{X}\pm S$）**

Tab. 2 Migration ability of hBMSCs in hypoxic groups（$n=6$，$\overline{X}\pm S$）

| 组别 | 苏木素染色细胞数 |
|---|---|
| 低氧对照组 | 2.00±1.41** |
| SDF＋低氧组 | 12.67±2.25**△△ |
| 黄芪＋低氧组 | 4.00±1.76** |
| SDF＋黄芪＋低氧组 | 19.17±2.32△△ |

注：与 SDF＋黄芪＋低氧组比较，* 为 $P<0.05$，** 为 $P<0.01$；与低氧对照组比较，△为 $P<0.05$，△△为 $P<0.01$

### 2.3 常氧和低氧对应组 hBMSCs 迁移能力比较

如表 3 所示，与 SDF＋黄芪＋常氧组相比较，SDF＋黄芪＋低氧组的 hBMSCs 迁移能力显著升高（$P<0.05$）；SDF＋常氧组与 SDF＋低氧组、黄芪＋常氧组与黄芪＋低氧组组间 hBMSCs 迁移能力的差异无统计学意义（$P>0.05$）.

表 3 常氧和低氧对应组 hBMSCs 迁移能力（$n=6$，$\overline{X}\pm S$）

Tab. 3 Migration ability of hBMSCs in normoxic and hypoxic groups（$n=6$，$\overline{X}\pm S$）

| 组别 | 苏木素染色细胞数 |
|---|---|
| SDF＋常氧组 | 12.17±2.32 |
| 黄芪＋常氧组 | 3.16±1.72 |
| SDF＋黄芪＋常氧组 | 16.17±2.32 |
| SDF＋低氧组 | 12.67±2.25 |
| 黄芪＋低氧组 | 4.00±1.76 |
| SDF＋黄芪＋低氧组 | 19.17±2.32▲ |

注：与 SDF＋黄芪＋常氧组比较，▲为 $P<0.05$

## 3 讨论与结论

趋化因子是一类可诱导的、分子质量为 7～10 kDa 的促炎细胞因子。迄今发现的趋化因子，根据其 N 端半胱氨酸模体的不同可分为 C，CC，CXC，CX3C 4 个亚家族。其中，SDF-1 属于 CXC 类趋化蛋白，来源于 BMSCs，系统命名为 CXCL12，是单核细胞与 T 细胞的高效趋化因子。在正常组织中，VECs 等可持续低水平表达 SDF-1，其趋化作用由其唯一受体 CXCR41 所介导。SDF-1/CXCR4 在许多损伤的组织如心脏、肾脏和肝脏组织中表达上调。低氧环境中，BMSCs 移植后能够在体内向损伤部位迁移，这种迁移可能涉及多种因子和受体间的相互作用，如 SDF-1/CXCR4，CD44/透明质酸，VEGF/VEGFR-1 等[4~6]。目前公认的机制为：缺血的组织在 HIF-1 的直接调控下表达高水平的 SDF-1，从而募集滞留循环中表达 CXCR4 的干细胞[7]。因此，低氧对 BMSCs 和相应的组织同时具有调节相应分子表达的作用，从而提高 BMSCs 的定向迁移能力。

研究显示，在 SDF 的作用下，单纯的低氧环境也可促进 BMSCs 迁移（$P<0.01$）。国内外关于中医药干预干细胞迁移的研究相对较少，欧阳长生等[8]应用丹参、血府逐瘀汤含药血清对兔 BMSCs 进行干预，结果显示：1）干预前，各组血清 SDF-1 的质量浓度大致相同；干预 7 d 后，对照组 SDF-1 质量浓度无明显改变，丹参组、血府组 SDF-1 质量浓度均明显升高；2）干预 12 h 后，对照组迁移细胞数增加 1 倍，与对照组比较，干预 4 h 后丹参组、血府逐瘀汤组 BMSCs 迁移数均明显增加（$P<0.05$），此后一直呈增加趋势；3）与对照组比较，丹参组、血府逐瘀汤组 BMSCs 的倍增时间均明显缩短（$P<0.05$）。郭国庆等[9]使用 Boyden 小室发现，40 mg/L 丹参素或 40 mg/L 丹酚酸可明显诱导胎鼠脑神经干细胞迁移，且丹酚酸的作用优于丹参素。张芙荣等[10]使用改良的 Boyden 小室，发现3 mmol/L 葛根素明显促进 EPCs 迁移。王兴祥等[11]报道银杏叶提取物和 VEGF 共同作用，可提高 EPCs 的迁移功能。顾俊等[12]发现低浓度白藜芦醇、VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblastic growth factor，bFGF）共同作用，可提高 EPCs 的迁移功能，认为其机制与促进内皮型一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase，eNOS）表达有关。研究显示：在常氧和低氧环境中 AMI 与 SDF-1 联合使用可促进 BMSCs 迁移；而在低氧环境中，单独使用 AMI 没有明显的促进作用。但是，本研究只是对低氧环境中 AMI 对 SDF-1 诱导 hBMSCs 迁移的促进作用进行了初步探讨，而对于其具体的作用机制，仍需进一步深入研究。

## [参考文献] (References)

[1] KUCIA M, RATAJCZAK J, RECA R, et al. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury[J]. Blood Cells Mol. Dis., 2004, 32(1): 52-57.

[2] MASTSEN F A 3rd, WYSS C R, ROBERTSON C L, et al. The relationship of transcutaneous PO2 and laser-doppler measurement in a human model of local arterial insufficiency[J]. Surg. Gynecol. Obstet., 1984, 159(5): 418-422.

[3] de FALCO E, PORCELLI D, TORELLA A R, et al. SDF-1 involvement in endothelial phenotype and ischemia-induced recruitment of bone marrow progenitor cells[J]. Blood, 2004, 104(12): 3472-3482.

[4] OKUYMA H, KRISHNAMACHARY B, ZHOU Y F, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptor 1 in bone marrow-derived mesenchymal cells is dependent on hypoxia-inducible factor 1[J]. J. Biol. Chem., 2006, 281(22): 15554-15563.

[5] RADINI D J, GURTNER G C. Homing to hypoxia: HIF-1 as a mediator of progenitor cell recruitment to injured tissue[J]. Trends Cardiovasc. Med., 2005,15(2): 57-63.

[6] ZHU H, MITSUHASHI N, KLEIN A, et al. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix[J]. Stem Cells, 2006, 24(4): 928-935.

[7] STELLOS K, LANGER H, DAUB K, et al. Platelet-derived stromal cell derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human $CD34^+$ cells to endothelial progenitor cells[J]. Circulation, 2008, 117(2): 206-215.

[8] 欧阳长生，王云开，苏海，等. 丹参及血府逐瘀汤含药血清与兔骨髓间充质干细胞的体外迁移：促进还是抑制？[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2009，13 (40)：7847-7851.
OUYANG C S, WANG Y K, SU H, et al. Effects of serum containing salvia miltiorrhiza and xuefuzhuyu decoction on the migration of bone-derived mesenchymal stem cells: Improvement or inhibition?[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2009, 13 (40): 7847-7851. (in Chinese)

[9] 郭国庆，沈伟哉，钟世镇. 丹参素和丹酚酸对胎鼠脑神经干细胞迁移的诱导[J]. 中国组织工程研究与临床康复，2007，11 (7)：1225-1228.
GUO G Q, SHEN W Z, ZHONG S Z. Induction effect of danshensu and salvianolic acid on the migration of neural stem cells from mouse embryo[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2007, 11 (7): 1225-1228. (in Chinese)

[10] 张芙荣，陈君柱，朱军慧，等. 葛根素对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. 中国中药杂志，2004，29 (8)：777-781.
ZHANG F R, CHEN J Z, ZHU J H, et al. Effects of puerarin on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood[J]. China Journal of Chinese Material Media, 2004, 29(8): 777-781. (in Chinese)

[11] 王兴祥，尚云鹏，陈君柱，等. 银杏叶提取物对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. 药学学报，2004，39 (8)：656-660.
WANG X X, SHANG Y P, CHEN J Z, et al. Effects of Ginkgo biloba extract on number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2004, 39 (8): 656-660. (in Chinese)

[12] 顾俊，王长谦，范华骅，等. 白藜芦醇对外周血内皮祖细胞功能的影响[J]. 心脏杂志，2006，18 (6)：617-621.
GU J, WANG C Q, FAN H H, et al. Effects of resveratrol on function of endothelial progenitor cells from peripheral blood[J]. Chinese Heart Journal, 2006, 18(6): 617-621. (in Chinese)