

中藥誘導幹細胞定向分化的研究進展

胡 俊¹, 黃秀榕¹, 祁明信², 楊麗英^{1*}

(1. 福建中醫學院 病理生理研究中心, 福建 福州 350003; 2. 福建省第二人民醫院 眼科, 福建 福州 350003)

摘 要: 近年來, 大量實驗研究表明多種中藥對幹細胞的定向分化有調控作用, 這些發現不僅為幹細胞的定向分化開辟新的途徑, 而且對於中藥作用機制的研究、中藥新藥的研製開發、某些疑難疾病防治水平的提高等都具有重要意義。現就有關中藥誘導幹細胞定向分化的研究進展進行綜述。

關鍵詞: 中藥; 幹細胞; 定向分化

中圖分類號: R 282.710.5

文獻標識碼: A

文章編號: 0253-2670(2005)01-0147-03

Advances in studies on committed differentiation of stem cell induced by Chinese materia medica

HU Jun¹, HUANG Xiu-rong¹, QI Ming-xin², YANG Li-ying¹

(1. Pathophysiology Research Center, Fujian College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350003, China;

2. Ophthalmic Department, the Second People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350003, China)

Key words: Chinese materia medica; stem cell; committed differentiation

幹細胞(stem cell)是指具有自我更新、高度增殖及多分化潛能的細胞, 它能產生出表型與基因型完全相同的子細胞, 是機體其他細胞的起源^[1], 即幹細胞是一種具有多分化潛能和自我複製的早期未分化細胞。在特定條件下, 它可分化成不同的功能細胞, 形成多種組織和器官。按幹細胞的分化潛能, 可將其分為如下幾類: (1) 全能幹細胞, 具有自我更新並分化為任何類型組織細胞的能力, 如受精卵和胚胎幹細胞(embryonic stem cell, ESC); (2) 多能幹細胞, 屬分化方向已確定的幹細胞, 如神經幹細胞、造血幹細胞等; (3) 定向祖細胞(committed progenitor), 是多能幹細胞分化的下游細胞, 其分化和自我維持、自我更新能力受限, 如造血祖細胞; (4) 前體細胞(precursor), 指在發育過程中較另一細胞更早期的細胞, 又稱專能幹細胞, 即只能向某一類型細胞分化, 如神經前體細胞。幹細胞作為一類既有自我更新能力(self-renewal), 又具有多分化潛能(multilineage differentiation)的細胞, 具有非常重要的理論研究意義和臨床應用價值。但是如何誘導幹細胞分化成為人們所期待的組織或細胞, 是目前幹細胞研究領域的重要環節。近年來國內外學者^[2-5]採用生長因子, 如腦源性神經生長因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、鹼性成纖維生長因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)等; 抗氧化劑, 如β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol, βME)、二甲亞砷、硫代甘油等; 及增加胞內環磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)等定向誘導幹細胞的分化。幹細胞的研究同樣也為中藥現代化研究帶來了新的切入點, 中藥對幹細胞定向誘導分化的研究, 有助於了解中藥的作用機制, 為

中藥的臨床應用提供理論基礎。本文就近 5 年中藥對幹細胞誘導分化的研究進展作一綜述。

1 中藥複方誘導幹細胞分化

中藥複方是天然的組合化學庫。大量的實驗研究表明, 很多中藥複方具有良好的誘導幹細胞分化的作用。由於神經幹細胞(neural stem cell, NSC)及 ESC 主要取自流產胎兒的腦組織, 存在一定倫理道德問題, 而近年來的研究發現, 骨髓間充質幹細胞(mesenchymal stem cell, MSC)是骨髓中的一類幹細胞, 具有多向分化潛能^[2-4], 取材方便, 體外培養能迅速擴增, 體內植入反應較弱, 與宿主神經組織能良好整合並長期存活等優勢^[5]。目前中藥誘導分化幹細胞的研究以 MSC 為主, 少數涉及到 NSC、造血幹細胞(hematopoietic stem cell, HSC)等。

項鵬等^[6]報道用含複方丹參注射液(含丹參和降香)及硫代甘油的培養基分別誘導成人 MSC (human MSC, hMSC) 分化, 均誘導出神經元樣細胞。免疫組化顯示神經幹細胞標志物巢蛋白(nestin)、神經元特異性標志物中分子量神經絲蛋白(neurofilament-M, NFM, 1.6×10^5)、神經元特異性烯醇化酶(neuron specific enolase,NSE)均陽性, 而星形膠質細胞(astrocyte)標志物膠質纖維酸性蛋白(glia fiber acid protein, GFA P)陰性。雖然丹參組的細胞誘導率比硫代甘油組略低, 但其細胞存活時間較長。推測複方丹參注射液的有效成分丹參酮或總丹酚酸的抗氧化作用可能與其定向誘導機制有關。黃慧等^[7]用香丹注射液(含丹參和降香)定向誘導大鼠 MSC (rat MSC, rMSC) 分化為神經元樣細胞, 推測

* 收稿日期: 2005-06-02

作者簡介: 胡 俊(1981—), 男, 江西省修水縣人, 現為福建中醫學院 2004 級病理學與生理學專業碩士研究生, 研究方向為白內障的基礎與臨床研究。Tel: (0591)83570171 E-mail: tmhujun@163.com

丹参的水溶性成分丹参素的抗氧化作用可能是产生定向诱导的主要原因之一。其可能机制是丹参素能抑制环核苷酸磷酸二酯酶的活力,提高胞内 cAMP 环核苷酸水平,后者进一步激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)、p38ERK1/2 等信号传导,最终引起神经突起发生和延长。另外,丹参素也可能通过刺激 MSC 产生白细胞介素而诱导或参与 MSC 定向分化为神经元样细胞。

武衡等^[8]应用血清药理学方法证实,脑溢安(钩藤、生地黄、牡丹皮、三七、地龙等)含药血清具有促进大鼠海马 MSC 向神经元方向分化的作用,提高 NSC 分化为神经元的比率,此外尚具有促进神经细胞存活的作用。并认为脑溢安通过影响 MSC 的增殖、分化、移行来促进神经元再生,提高神经功能恢复水平。姚晓衡等^[9]报道参芪液(含党参和黄芪)可在体外诱导 hMSC 分化为神经元样细胞。参芪液具有补中益气、生津养血的功效,可以促进正常机体生长,有抗氧化、增强免疫和抑制细菌的作用。

2 单味中药诱导干细胞分化

刘金保等^[10-12]采用多种单味中药(当归、人参、天麻、黄芪等)诱导 MSC,1~3 h 后,其中大部分 MSC 分化为神经元样细胞,其转化率分别为当归(74.2±3.8)%、人参(69.3±4.1)%、天麻(75.3±4.1)%、黄芪(93.7±2.3)%。陈东风等^[13]报道 MSC 经龟板含药血清体外诱导后分化的神经元样细胞 NF 表达阳性,诱导 12 h 后,神经元样细胞阳性率达到高峰,细胞存活时间较长,至第 7 天仍有神经元样细胞存活。在干细胞具先天属性新理论指导下,张进等^[14]采用龟板水煎液体外诱导 MSC 分化为 MSC,但未被诱导为神经细胞。他认为中医学的“精”在内涵上与干细胞有很大的相关性,“先天之精”与干细胞的基本属性较相似,补肾法可促进干细胞之间的相互转换,并提出干细胞具先天之精属性,是先天之精在细胞层次的存在形式。

3 中药有效成分或部位诱导干细胞分化

3.1 诱导骨髓 MSC 分化为神经细胞

3.1.1 抗氧化剂:贾延勃等^[15]首次采用黄芩苷诱导 MSC 在体外分化成为神经细胞,多数细胞表达 NSE、NF,黄芩苷与 βME 相比,虽然在早期诱导效果不如 βME,但是长期效果优于 βME,且细胞存活率较高。

夏文杰等^[16,17]选用第 5、10 代的 MSC 以 bFGF 预诱导,再用丹参酮 II_A 和隐丹参酮诱导,发现大部分 MSC 可转变为神经元样细胞,并有轴突和树突出现,多个神经元之间可形成网络。前者诱导的神经细胞表达 NSE、NF-M,提示该细胞可能尚处于神经元前体细胞阶段;后者诱导的神经细胞表达 NSE、高分子量神经丝蛋白(neurofilament-H, NF-H 2×10⁵),提示神经元趋向成熟。并推测两者的诱导机制可能与其抗氧化作用有关。

3.1.2 钙离子拮抗剂:川芎嗪是从川芎中提取的一种生物碱单体,是一种新型的钙离子拮抗剂,对中枢神经系统(CN)有镇静作用,可保护视神经,促进骨髓移植后造血重建等作用。川芎嗪可体外诱导 MSC 分化为神经元样细胞,诱导后

的神经元样细胞初步观察可存活 5 d。三七总皂苷是从五加科人参属植物三七根提取的有效部位,也是一种特异性钙离子通道阻断剂,可抑制钙离子内流,减轻脊髓和视神经损伤过程中由于钙离子内流所引起的损伤,对神经元有保护作用。两者能诱导 MSC 向神经元样细胞分化是否与阻断钙离子通道有关,其诱导分化的机制及其信号传导通路,诱导分化后的神经元样细胞是否具有神经元的功能等问题仍有待今后进一步研究^[18,19]。

3.1.3 其他:麝香多肽(musk polypeptide, Mu-p)是从天然麝香中分离提纯的一种有抗炎作用的酸性糖蛋白,是麝香的水溶性成分;麝香酮(muscone, Mu-n)是麝香的脂溶性成分。肖庆忠等^[20,21]用含 Mu-p 或 Mu-n 的培养基体外定向诱导第 5~10 代 MSC,结果发现细胞突起伸出,形似神经元,免疫组化同样显示诱导出的神经元样细胞 NSE、NF、巢蛋白表达阳性,GFAP 阴性。神经元样细胞计数分析发现 MSC 经 Mu-p 诱导后, NSE 和 NF-H 阳性细胞的比例分别高达 93.5% 和 88.2%。而含 Mu-n 的培养基却无上述变化。表明 Mu-p 能在体外诱导 MSC 定向分化为神经元样细胞,而 Mu-n 却无此能力。研究中所诱导得到的神经元样细胞可在体外存活时间较长(7 d 后仍有约 10% 的神经元存活)。同时应用所获得的神经细胞进行了大鼠脊髓横断性损伤和大鼠帕金森病的细胞替代治疗发现其可重建相应的神经功能,证明其在体内发挥了相应的神经细胞功能,因此推测研究中所获得的神经元样细胞极有可能是有功能的神经元。Mu-p 的诱导机制可能与其对神经细胞生长分化和突起生长的调节作用以及其具有抗氧化、抗损伤作用有关。

绞股蓝总皂苷是从葫芦科植物绞股蓝中提得的一类皂苷类化合物,具有抗肿瘤、抗突变诱变、增强机体免疫力、延缓衰老的作用,对小鼠脑皮层神经元缺糖缺氧致损伤具有保护作用。董燕湘等^[22]用绞股蓝总皂苷诱导 MSC 分化为神经细胞,分化率达 90%,所得的神经细胞能长期存活 3 周左右且形态仍保持不变,可能与绞股蓝对神经细胞的保护作用有关。并在实验中观察到 MSC 培养时自发出现神经细胞,推测骨髓中可能存在神经干细胞。

3.2 诱导 MSC 分化为神经细胞:张艳军等^[23]研究证实具有清热泻火作用的黄芩、栀子提取物中黄芩苷、栀子苷可诱导 MSC 特异性分化成非成熟神经元,与具有活血化痰作用的三七提取物中三七总皂苷及补气作用的黄芪提取物中黄芪甲苷联合应用,可以明显提高成熟神经元比例。

三七总皂苷在离体能够促进胎鼠皮层 MSC 分化为神经元特异性微管蛋白(Tuj-1)、NF 阳性的神经元和波形蛋白(vimentin)、GFAP 阳性的胶质细胞,阳性细胞聚集成团,其组成细胞大小不等,提示它们可能还未充分成熟,处于分化的不同阶段。研究结果显示,与对照组比较三七总皂苷促进 bFGF、BDNF 在原代培养胎鼠皮层细胞中表达,神经营养因子对 NSC 的增殖分化起着重要的调控作用,并推测三七总皂苷可能通过促进胎鼠皮层 NSC 或前体细胞 bFGF、BDNF 自身合成增加(bFGF、BDNF 通过自分泌或旁分泌相互作用

用), 以满足其存活、增殖、分化和自我更新的需要^[24]。Bang 等^[25]采用从三七中提取的人参皂苷 R_d 诱导 NSC 分化为星形胶质细胞, 而三七中的其他成分人参皂苷 R_{g₁}、R_{b₁}、R_e 与三七皂苷 R₁ 的混合物无此诱导作用。

3.3 CD₃₄⁺造血干/祖细胞分化为粒系细胞、红系细胞: 金锦梅等^[26]报道, 采用含人参皂苷(ginsenosides, GS)的无血清培养基诱导人脐血 CD₃₄⁺造血干/祖细胞分别向红系或粒系定向分化, 不同质量浓度的 GS 诱导 14 d 后, 细胞表面表达 CD₃₃⁺细胞随 GS 的质量浓度升高而增加, GS 50 μg/mL 时以 CD₁₅⁺细胞数最高。这些表面标记的变化说明 GS 具有诱导祖细胞分化的作用, 且对粒系细胞的作用强于红系祖细胞。

三七皂苷(*Panax notoginosides* spanins, PNS)是五加科人参属植物的主要活性成分, 研究表明, 在诱导粒细胞分化的培养体系中适宜浓度的 PNS 可促进人骨髓 CD₃₄⁺造血干细胞向粒系细胞定向分化。粒系表面标记 CD₃₃⁺和 CD₁₅⁺的细胞百分比无明显高于无 PNS 的对照组, 而红系细胞则没有明显的诱导分化作用, 红系细胞表面 CD₇₁⁺和 G-A⁺细胞百分比与对照组无明显差别^[27]。

4 评价与展望

干细胞技术无疑将推动医学界一场新的革命, 而中医药要走向世界, 走向现代化, 无疑也需与现代生物医学新技术、新领域相结合。中药诱导干细胞定向分化是近年来一个新兴的研究领域, 由于传统中医理论本身重整体轻微观的原因, 从干细胞领域研究中医基础理论的工作还相对较少, 使用中药诱导干细胞定向分化的研究工作才刚刚起步, 其诱导机制有待进一步深入研究。中药有着来源广、价廉、副作用小等优势, 对干细胞长期生长分化无毒且有利于分化后细胞活体移植。另外建立中药诱导 MSC、NSC 等干细胞转变为神经细胞的体外模型, 对研究脑的发育和分化以及神经系统疾病的治疗也有重大价值。

References

[1] Gong F L. *Medical Immunology* (医学免疫学) [M]. Vol II. Beijing: Science Press, 2004.
 [2] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro* [J]. *Exp Neurol*, 2000, 162(2): 247-256.
 [3] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 364-370.
 [4] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
 [5] Deng W, Obrocka M, Fisher I, et al. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282: 148-152.
 [6] Xiang P, Xia W J, Zhang L R, et al. Differentiation of human mesenchymal stem cells into neuron-like cells with Danshen Injection [J]. *Acad J Sun Yat-sen Univ Med Sci* (中山医科大学学报), 2001, 22(5): 321-324.
 [7] Huang H, Tang Y A, Zhang C, et al. The study committed differentiation from adult MSCs into neuron-like cells induced by Xiangdan Injection *in vitro* [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2004, 27(8): 585-588.
 [8] Wu H, Li X Q, Tang T, et al. Effect of naoyian on the differentiation of neural stem cells in hippocampus of rats [J]. *Chin J Clin Rehab* (中国临床与康复), 2004, 8(28): 6148-

6149.
 [9] Yao X L, Liu W B, Liu T Y, et al. Effect of Shenqi Injection on induction and differentiation of adult bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Chin J Neuro Ment Dis* (中国神经精神疾病杂志), 2004, 30(3): 211-213.
 [10] Liu J B, Dong X X, Xiao Q Z, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells with the inducement of some Chinese traditional herbal drugs [J]. *Chin Ren Clin* (中国药物与临床), 2003, 3(3): 234-236.
 [11] Dong X X, Liu J B, Dong Y X, et al. Experimental study on effect of gastrodia in inducing the differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2004, 24(1): 51-54.
 [12] Dong X X, Liu J B, Dong Y X, et al. Mesenchymal stem cells induced with astragale differentiate into neuron-like cells [J]. *Chin J Mod Med* (中国现代医学杂志), 2004, 14(19): 19-22.
 [13] Chen D F, Du S H, Li Y M, et al. *In vitro* induction of mesenchymal stem cells differentiation into neurons in adult rats by serum containing *Carapax et Plastrum Testudinis* [J]. *J Guangzhou Univ Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 2003, 20(3): 224-226.
 [14] Zhang J, Xu Z W. Induction of the differentiation of mesenchymal stem cells of nerve system by invigorating the kidneys [J]. *Mod Hosp* (现代医院), 2004, 4(9): 15-17.
 [15] Jia Y J, Yang Y J, Song Y Z. Rat bone marrow stromal cells differentiate into neurons induced by baicalin *in vitro* [J]. *Chin J Pathophys* (中国病理生理杂志), 2002, 18(3): 247-249.
 [16] Xia W J, Xiang P, Chen Z G, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate into neuron-like cells with tanshinone IIA [J]. *Chin J Pathophys* (中国病理生理杂志), 2003, 19(7): 865-869.
 [17] Xia W J, Chen Z G, Zhang L R, et al. Experimental study on effect of cryptotanshinone in inducing differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells to neuron-like cells [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2002, 12(22): 921-924.
 [18] Sa Y L, Li H B. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells with eugustrazin hydrochloride [J]. *Acta Anat Sin* (解剖学报), 2003, 34(5): 514-517.
 [19] Sa Y L, Li H B. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells with total *Panax notoginseng* saponins [J]. *Acad J Sun Yat-sen Univ Med Sci* (中山医科大学学报), 2002, 23(6): 409-410.
 [20] Xiao Q Z, Li H W, Wen G M, et al. Adult rat and human bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into neurons with Musk's polypeptide [J]. *Chin J Pathophys* (中国病理生理杂志), 2002, 18(10): 1179-1182.
 [21] Xiao Q Z, Wen G M, Huang S H, et al. The ability of adult rat bone mesenchymal stem cells differentiating into neurons-like cells with Musk's component *in vitro* [J]. *Acad J Sun Yat-sen Univ Med Sci* (中山医科大学学报), 2002, 23(6): 405-408.
 [22] Dong Y X, Dong X X, He H H, et al. Rat mesenchymal stem cells differentiating into neurons-like cells by Chinese medicine gypenosides [J]. *Chin J Neurol* (中华神经科杂志), 2003, 36(5): 355-358.
 [23] Zhang Y J, Fan X, Hu L M, et al. Influence of extracts from Chinese herbs according to different therapeutic principles on the differentiation of neural stem cell *in vitro* [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med* (天津中医药), 2004, 21(2): 156-157.
 [24] Si Y C, Cheng L, Hong Q T, et al. Effects *Panax notoginseng* saponins on proliferation and differentiation of embryonic rat cortical neural stem cells *in vitro* [J]. *Chin J Stereol Image Anal* (中国体视学与图像分析), 2004, 9(2): 78-83.
 [25] Bang L, Qin S, Qi H, et al. Ginsenoside-Rb from *Panax notoginseng* enhances astrocyte differentiation from neural stem cells [J]. *Life Sci*, 2005 (76): 983-995.
 [26] Jin J M, Tao H, Gao R L, et al. Effect of ginsenosides on proliferation and differentiation of human CD₃₄⁺ Hematopoietic stem/progenitor cells [J]. *Chin J Integr Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2000, 20(9): 673-676.
 [27] Qian X D, Gao R L, Ma K, et al. Proliferation and differentiation of human CD₃₄⁺ hematopoietic stem/progenitor cells induced by *Panax notoginseng* [J]. *J Exp Hematol* (中国实验血液学杂志), 2003, 11(2): 120-123.