

• 综述 •

中药对间质干细胞分化为神经细胞的影响

胡军祥¹, 申屠垠¹, 殷 舒¹, 周国英²

(1. 浙江林学院生命科学学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江大学生命科学学院, 浙江 杭州 310012)

摘 要: 中药成分促进间质干细胞分化为神经细胞的研究是目前中医药和生物医学领域的热点之一。中药对间质干细胞的作用可以概括为促进间质干细胞的生长、增殖、分化, 改变其分泌状态及其保护分化后的神经细胞等多个环节。从细胞培养、细胞分化、作用机制以及治疗作用等方面, 分类综述了三七、黄芪、麝香、绞股蓝、川芎、丹参对间质干细胞分化为神经细胞的影响, 并简述了问题和展望。

关键词: 中药; 间质干细胞; 神经细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)05-0783-03

Effect of some traditional Chinese herbs on neurocyte differentiation of mesenchymal stem cells

HU Jun-xiang¹, SHEN Tu-yin¹, YIN Shu¹, ZHOU Guo-ying²

(1. College of Life Science, Zhejiang Forestry University, Hangzhou 311300, China;

2. College of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

Key words: traditional Chinese herbs; mesenchymal stem cells; neurocyte

随着对间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)生物学特性研究的深入, 近年来, 有关中药对 MSC 诱导分化功能影响的研究也屡见报道。本文就三七、黄芪、黄芩、麝香、绞股蓝、川芎、丹参、人参在 MSC 分化为神经细胞方面的影响研究进行综述。

MSC 的诸多生物学特性已经在大鼠、小鼠、猪、兔、猴子以及人体等多个种属的动物实验中得到证实, 它能从骨髓、外周血、脐血、胰腺、肾、肝、脂肪、肌肉和脑等多种器官组织通过分离培养的方法获得。MSC 的表面抗原具有非专一性, 其特异性标志物尚无确切定论, 一般认为整合素家族成员 CD29, 黏附分子 CD44、CD166 以及 CD105 等是 MSC 的重要标志物。Quirici 等^[1]采用免疫磁性分离法以低亲和 NGFR 抗体标记骨髓细胞可获得形态和功能都相似的细胞, 即都能进行体外扩增, 自我更新, 分化为多种细胞和支持造血, 这一发现为体外分离和鉴定 MSC 提供了又一种新方法。自 1966 年 Friedenstien 在动物模型上进行移植研究第一次发现骨髓间质细胞(bMSC)具有分化潜能以来, MSC 多向分化潜能的研究一直是国内外学者研究的热点。MSC 在特定的条件下能诱导分化为多个细胞系, 包括骨细胞、脂肪细胞、肌细胞、肝细胞^[2]、胰腺细胞^[3]以及神经细胞等。

1 MSC 分化为神经细胞的研究

MSC 不仅能够促进其他细胞分化为神经细胞, 而且

MSC 本身也能在特定条件下分化为神经细胞, MSC 分化为神经细胞的研究为神经系统疾病的临床治疗提供了理论和实验依据。

1.1 MSC 促进其他细胞分化为神经细胞: MSC 作为饲养层能诱导胚胎干细胞大量分化为神经元。Kawasaki 等^[4]研究发现头骨 MSC 获得的 PA6 细胞, 在与小鼠胚胎干细胞共培养时, 后者有 90% 分化为神经干细胞, 其中 52% 可分化为神经元, MSC 对胚胎干细胞分化为多巴胺能神经元也有定向诱导作用。此外, bMSC 提供的微环境可明显促进神经干细胞(NSC)分化为神经元, 包括促进神经干细胞的分化和增加分化后神经元的存活率, 这是 bMSC 分泌可溶性因子作用于 NSC 所致^[5]。bMSC 分泌的细胞因子也能作用于 bMSC 本身, 改变自身的增殖和分泌状态或诱导其他细胞因子的生成, 从而能进一步作用于其他干细胞, bMSC 与神经干细胞的直接接触也有利于其分化。

1.2 MSC 诱导分化为神经细胞: MSC 在体内外均可诱导分化为神经细胞, 目前这方面研究最多的是 bMSC。bMSC 移植入新生或成年小鼠脑内能迁移到整个前脑和小脑, 分化为神经元和神经胶质细胞^[6]。bMSC 是治疗缺血性脑疾病^[7]、帕金森病^[8]和脊髓损伤等神经系统疾病的种子细胞, 患者脑内移植 bMSC 能见到 NF-M、NSE、GFAP 等神经元和胶质细胞标志物的表达。体外事先诱导 MSC 分化为神经

收稿日期: 2005-08-10

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(Y304053)

作者简介: 胡军祥(1956—), 男, 浙江宁波人, 博士, 副教授, 主要从事中药生理药理的研究。

Tel: (0571)63732757 E-mail: hxy@hzncnc.com

细胞,然后进行移植,是 MSC 促进损伤神经的结构和功能恢复的重要途径。将 bMSC 充分分离,加入 RA、BDNF、GDNF、bFGF 等诱导因子进行体外诱导培养,可以成功地使 bMSC 扩增并促进其体外转化为神经元和胶质细胞。MSC 的扩增和诱导分化为神经细胞的量与饲养层物质的特性和浓度相关^[9]。MSC 除移植入中枢神经系统以增加组织再生和功能恢复外,对外周神经系统的神经损伤也有恢复作用^[10]。脂肪组织源性 MSC^[11]和胰腺 MSC^[3]及其分化后的外分泌细胞^[12]都能表达神经元标志物 nestin,说明这些细胞也具有分化为神经元样细胞的可能。

Song 等^[13]研究发现体外培养的 bMSC 能合成和释放生理水平的脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP),BNP 就像心钠素一样,执行强大的利尿排泄、利尿和血管舒张作用,从而提出移植的 bMSC 促进脑和损伤脊髓功能的恢复是通过释放 BNP 和其他血管活性因子,而减轻浮肿、降低颅骨内压和改善脑内血流。另外,根据 MSC 易于外源基因转染的特性,可以将促神经分化作用的细胞因子基因导入 MSC,以提高 MSC 分化为神经细胞的比例。Kurozumi 等^[14]移植经 BDNF 基因修饰的 MSC 到动脉梗死性损伤的大鼠中脑,可见到梗死损伤面积变小以及部分功能的恢复。

2 几种中药对 MSC 分化为神经细胞的作用

中药对机体的作用是紧密地与神经、内分泌、免疫调节网络相联系的,可以通过免疫调节、抗氧化、诱导细胞凋亡及影响神经递质而发挥治疗自身免疫病的作用。多种中药成分和中药制剂对包括 MSC 在内的多种细胞具有一定的促生长和保护作用,益气活血中药如黄芪、山药、太子参、茯苓、白术能减轻组成小鼠造血干细胞微环境的骨髓基质细胞的放射损伤,并能促进损伤后细胞的生长,通过内服、注射以及外用等多种方式治疗外周神经损伤研究的结果表明疗效很好,这与其能促进 NGF 的表达有关^[15]。

中药对 MSC 的影响作用可以概括为促进 MSC 的生长、增殖、分化,改变其分泌状态及其保护分化后的神经细胞等多个环节。目前对 MSC 的影响作用研究较多的几种中药主要有三七、黄芪、黄芩、麝香、绞股蓝、川芎、丹参、人参等。

2.1 三七是五加科人参属植物,从中提取的有效成分三七总皂苷用于治疗心脑血管疾病。用三七总皂苷诱导 bMSC 30 min 到 5 h,胞体逐渐增大并伸出细长突起,形似神经细胞,免疫组化显示 NF-M、NSE、MAP-2、GAP-43、nestin 表达阳性,GFAP 阴性,表明三七总皂苷可诱导 bMSC 分化为神经元样细胞^[16]。

缺血性脑损伤存在着神经细胞的凋亡,抑制神经细胞凋亡的发生有利于该类疾病的治疗,细胞内 Ca^{2+} 超载是缺血性脑损伤的发病机制之一,又在缺血后神经元凋亡发生中起着关键作用。三七总皂苷能特异性地阻断受体操纵性的钙离子通道,降低细胞内 Ca^{2+} 浓度和减少 LDH 的释放,以降低神经细胞凋亡及坏死率,进一步发挥对神经元的损伤修复作用,它对脊髓和视神经同样具有保护作用。采用静脉移植入 bMSC 能治疗缺血性脑梗死,这与单核细胞趋化蛋白-1

(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 利于 bMSC 迁入局部缺血的脑组织微环境有一定关系^[17]。可见,今后的研究除了继续研究三七总皂苷诱导 MSC 分化为神经细胞的量和存活时间外,还应深入探索三七的提取物与 MSC 联合移植对缺血性脑损伤疾病的治疗效果。

2.2 黄芪、黄芩:黄芪是临床上常用的治疗心脑血管疾病的药物,具有益气活血、抗氧化、延缓衰老、增强机体免疫功能等作用。黄芪注射液诱导 MSC 分化为神经细胞的比例高达 95.7%,而且还能促进小鼠骨髓 CFU-F 的增殖,促进小鼠 bMSC 分泌干细胞因子(stem cell factor, SCF),SCF 与其受体 c-kit 结合,对造血干/祖细胞的增殖和分泌有显著的促进作用^[18],提示黄芪也可能通过促进 MSC 的分泌作用而影响其分化为神经细胞的功能或促进其他干细胞分化为神经细胞。

黄芩苷作为诱导剂培养 bMSC,可明显见到神经元标志物的 mRNA 和蛋白质表达^[19],而且发现核因子- κB (NF- κB)明显受到抑制,提示黄芩苷诱导 bMSC 分化为神经细胞可能是通过抑制 NF- κB 而实现的^[20]。

2.3 麝香:麝香是一种名贵中药,有舒张血管、抗缺氧、促进苏醒、强心、抗炎及提高免疫力的作用,对体外培养的大鼠大脑神经细胞的生长分化和突起生长具有调节作用。肖庆忠等^[21]采用含麝香水溶性成分麝香多肽的低糖 DMEM 培养基体外诱导第 5~10 代的成年大鼠 bMSC,结果用形态学观察和免疫组化法检测,发现麝香多肽能在体外诱导大鼠 bMSC 定向分化为神经元样细胞,不过其脂溶性成分麝香酮没有这种功能。

2.4 绞股蓝、川芎:绞股蓝也是一种名贵中药,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,不仅能诱导大鼠 bMSC 分化为神经元样细胞,而且还能促其分化为神经胶质细胞,分化率高达 90%,并使细胞长期存活,这可能与绞股蓝对神经细胞的保护作用有关^[22]。

川芎中有效成分川芎嗪也具有诱导大鼠 bMSC 分化为神经元样细胞的能力^[23],可通过升高血浆 NO 和降低血浆 ET-1,以舒张血管平滑肌,降低血液黏滞度,增加缺血区脑血流量,改善缺血区供血、供氧而发挥其治疗缺血性脑损伤作用。

2.5 其他中药:对 MSC 分化为神经细胞也有一定的作用,如丹参^[24]、天麻、人参、当归、人参蜂王浆都能体外诱导大鼠 MSC 表达 NSE、NF-M、nestin,不表达 GFAP,说明它们都能诱导 MSC 分化为神经元样细胞,而不是神经胶质细胞,还有梔子的主要有效成分梔子苷,对培养神经细胞的轴突生长有显著的促进作用,丹参可促进脑缺血损伤时 bFGF 上调,对于神经元的存活、保持突触功能与介导突触再生和修复有重要作用。中药还能与神经营养因子联合作用治疗神经系统疾病效果更加明显,鞘膜内注射 NGF 联合中药神脑康治疗重型脑梗死,结果发现神经功能缺损程度明显改善,临床疗效提高显著,患者的脂代谢紊乱也得到改善。

中药对 MSC 的其他特性也有一定影响。多种中药成分能通过刺激 MSC 及其分化细胞如巨噬细胞、纤维细胞、内皮

细胞等分泌多种较高活性的造血调控因子和基质细胞黏附分子(如 VCAM-1、CD_{49d}),继而促进造血发生;中药也可能通过促进 MSC 分泌多种促神经生长的因子而作用于 NSC 或 MSC 本身而诱导其分化为神经细胞。

近年来的研究发现,采用抗氧化剂 2-巯基乙醇、DMSO、叔丁对甲氧酚可体外诱导 MSC 分化为神经细胞,三七、黄芪、黄芩、麝香、人参也都具有较强的抗氧化作用,也都能诱导 MSC 分化为神经细胞,因此推测它们的诱导机制与它们的抗氧化作用相关。丹参注射液中的 3 种水溶性成分对维生素 C-NADPH 系统及 Fe²⁺-半胱氨酸系统诱发的脑微粒体脂质过氧化有很强的抑制作用,能够清除氧自由基,这可能就是其对神经细胞产生保护的作用机制。总之,中药诱导其他组织来源的 MSC 分化为神经细胞的研究和诱导 MSC 分化为神经细胞的机制研究目前报道甚少,这方面的工作还有待进一步的开展。

3 问题和展望

MSC 在体内外都能分化为神经细胞或通过分泌细胞因子和细胞外基质促进其他干细胞分化为神经细胞,以促进损伤神经的结构重建和功能恢复,治疗多种神经系统疾病。中药能促进神经突触再生,以诱导多种神经生长因子的产生,从而进一步诱导神经细胞再生,实现对神经信息整合功能再塑造;中药还可以影响 MSC 的增殖和分泌活性以及 MSC 向神经细胞方向分化。目前,研究较多的是骨髓源性 MSC,有关中药对 MSC 影响作用的报道至今仍较少,笔者认为应加强以下几个方面的研究:1)增加 MSC 的来源,加大对其他组织源性 MSC 的研究和探索使 MSC 永生化的方法,Okamoto 等^[25]已通过激活端粒酶活性和灭活 Rb/p16^{INK4A}通路获得永生化人 bMSC;2)药物的筛选、用药剂量、药物的作用机制和 MSC 分化的神经生物学等方面仍需要深入研究;3)加强提高 MSC 分化为神经细胞比例的方法研究;4)探索如何更好地延长分化后神经细胞的存活时间等。

References:

- [1] Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, *et al.* Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(7): 783-791.
- [2] Yamamoto N, Terai S, Ohata S, *et al.* A subpopulation of bone marrow cells depleted by a novel antibody, anti-Liv8, is useful for cell therapy to repair damaged liver [J]. *BBRC*, 2004, 313(4): 1110-1118.
- [3] Selander L, Edlund H. Nestin is expressed in mesenchymal and not epithelial cells of the developing mouse pancreas [J]. *Mech Dev*, 2002, 113(2): 189-192.
- [4] Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, *et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity [J]. *Neuron*, 2000, 28(1): 31-40.
- [5] Lou S J, Gu P, Chen F, *et al.* The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats [J]. *Brain Res*, 2003, 968(1): 114-121.
- [6] Li Y, Chopp M, Chen J, *et al.* Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(9): 1311-1319.
- [7] Chen J L, Li Y, Wang L, *et al.* Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *J Neurol Sci*, 2001, 189(1): 49-57.
- [8] Hou L L, Zheng M, Wang D M, *et al.* Migration and differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in the rat brain [J]. *Acta Physiol Sin* (生理学报), 2003, 55(2): 153-159.
- [9] Qian L C, Saltzman W M. Improving the expansion and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells through culture surface modification [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(7): 1331-1337.
- [10] Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, *et al.* Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells [J]. *Neurol Res*, 2002, 24(7): 634-638.
- [11] Kristine M, Kevin C, Shawn D, *et al.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells [J]. *BBRC*, 2002, 294(2): 371-379.
- [12] Delacour A, Nepote V, Trumpp A, *et al.* Nestin expression in pancreatic exocrine cell lineages [J]. *Mech Dev*, 2004, 121(1): 3-14.
- [13] Song S, Kamath S, Mosquera D, *et al.* Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells [J]. *Exp Neurol*, 2004, 185(1): 191-197.
- [14] Kurozumi K, Nakamura K, Tamiya T, *et al.* BDNF gene-modified mesenchymal stem cells promote functional recovery and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model [J]. *Mol Ther*, 2004, 9(2): 189-197.
- [15] Yin Z S, Gu Y D, Gu Y H, *et al.* The effect of Chinese herbs on nerve growth factor (NGF) protein expression after sciatic nerve injury at rats [J]. *Chin J Hand Surg* (中华手外科杂志), 2003, 19(1): 55-57.
- [16] Sa Y L, Li H B. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells with total *Panax notoginseng* saponins [J]. *J Sun Yat-sen Univ; Med Sci* (中山大学学报:医学科学版), 2002, 23(6): 409-410.
- [17] Wang L, Li Y, Chen J L, *et al.* Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(7): 831-836.
- [18] Zhu X L, Zhu B D, Liu J, *et al.* Study on SCF production of bone marrow stromal cell stimulated with astragalus membranaceus in anemic mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2001, 17(5): 19-20.
- [19] 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 Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, 18(3): 247-249.
- [20] Jia Y J, Yang Y J, Song J H, *et al.* Role of NF- κ B in baicalin-induced differentiation of rat bone marrow stromal cells into neurons [J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2003, 5(1): 1-4.
- [21] Xiao Q Z, Wen G M, Li H W, *et al.* The ability of adult rat bone mesenchymal stem cells differentiating into neurons-like cells with musk's component *in vitro* [J]. *J Sun Yat-sen Univ; Med Sci* (中山大学学报:医学科学版), 2002, 23(6): 405-408.
- [22] Dong Y X, Dong X X, He H H, *et al.* Rat mesenchymal stem cells differentiating into neuron-like cells induced by Chinese medicine-gynenosides [J]. *Chin J Neurol* (中华神经科杂志), 2003, 36(5): 355-358.
- [23] Sa Y L, Li H B. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells with ligustrazin hydrochloride [J]. *Acta Anatom Sin* (解剖学报), 2003, 34(5): 514-517.
- [24] Yang L Y, Liu X M, Hui G Z, *et al.* *Salvia miltiorrhiza* inducing rat bone marrow stromal cells to differentiate into neurons [J]. *Chin J Neurosurg Dis Res* (中华神经外科疾病研究杂志), 2003, 2(1): 29-32.
- [25] Okamoto T, Aoyama T, Nakayama T, *et al.* Clonal heterogeneity in differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells [J]. *BBRC*, 2002, 295(2): 354-361.