

中药联合干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的研究进展

陈梅, 王立新*

(广州中医药大学第二临床医学院, 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] 脑卒中是全球致死和致残的主要疾病之一,其中缺血性脑卒中是最常见的卒中类型。近年来,随着再生医学领域的发展,国内外对干细胞疗法的研究不断深入。研究证实,干细胞疗法,包括激活内源性神经干细胞和外源性干细胞移植,可以促进内源性神经和血管再生,修复神经损伤,从而改善神经功能,在缺血性脑卒中治疗领域具有广阔的应用前景。然而,该疗法存在细胞存活、迁移及分化率较低的问题,目前尚无有效解决方案。中医药治疗中风已有数千年历史,积累了丰富的临床经验,传统中药用于治疗缺血性脑损伤的疗效已得到肯定。近年来又有研究发现,中药对体内外多种干细胞的增殖、分化等生理活动有促进作用,中药联合干细胞疗法已用于多种疾病的治疗。进一步的研究发现,中药可激活缺血损伤脑组织内源性神经干细胞,促进神经自我修复,并对移植干细胞在体内的一系列生物活动有协同作用。笔者对近几年缺血性脑卒中治疗的研究进行整理、归纳、总结,从干细胞疗法角度对中药复方、单味药以及有效成分在缺血性脑卒中方面的研究进展进行综述,以期为中医药的研究提供新思路,并为中药的进一步深入开发应用提供参考。

[关键词] 中药; 脑缺血; 干细胞疗法; 增殖; 分化; 迁移

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0218-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190218

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1138.022.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 11:38

Effect of Traditional Chinese Medicine Combined with Stem Cell Therapy on Ischemic Stroke

CHEN Mei, WANG Li-xin*

(The Second School of Clinical Medical of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong Province Hospital of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] Stroke is one of the major causes of global death and disability; and ischemic stroke is the most common type of stroke. In recent years, with the development of regenerative medicine, stem cell therapy has become a hotspot. Studies have confirmed that stem cell therapy, including activation of endogenous neural stem cells and exogenous stem cell transplantation, can promote endogenous nerve and vascular regeneration, repair nerve damage, so as to improve neurological function, with a broad prospect in the treatment of ischemic stroke. However, survival, migration and differentiation rates of stem cells remain low, with no effective solution. Traditional Chinese medicine (TCM) have been applied in the treatment of stroke for thousands of years. Recently, researchers have found that TCM can promote proliferation, differentiation and other physiological activities of stem cells *in vitro* and *in vivo*. TCM combined with stem cell therapy has been used to treat multiple diseases. Further studies have found that TCM can activate endogenous neural stem cells of ischemic brain tissues, and promote nerve repair, with a synergistic effect on transplanted stem cells. To provide theoretical support for

[收稿日期] 20170424(014)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373569)

[第一作者] 陈梅,在读硕士,从事脑血管病的基础与临床研究, Tel:15521167176, E-mail:15521167176@126.com

[通讯作者] *王立新,博士,主任医师,教授,从事脑血管病的干细胞基础研究与中药药理学研究, Tel:13922793886, E-mail:plawlx@126.com

subsequent studies, we summarized the studies of ischemic stroke in recent years and reviewed the progress of studies on the effect of TCM with stem cell therapy in treating ischemic stroke.

[**Key words**] Chinese herb medicine; brain ischemia; stem cell therapy; proliferation; differentiation; migration

干细胞疗法包括激活内源性神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 以及移植外源性干细胞^[1]。近年来研究已证实,干细胞疗法不仅可以实现细胞替代和功能重建,而且可以促进内源性神经修复,是缺血性脑卒中后神经功能损伤修复的新疗法^[2-4]。然而,研究显示,干细胞存活率和分化率均较低,其原因可能在于缺血损伤后局部炎症反应及氧化应激反应^[5]。

近年来,中医药领域已开展相关研究,大量基础研究证实部分中药及其有效成分可促进干细胞存活、增殖及分化^[6],中药协同干细胞疗法可用于心脑血管疾病、神经退行性病变及肝硬化等多种疾病的治疗^[7-9]。姜晓锋等^[10]研究发现三七三醇皂苷可改善脑梗死大鼠的神经功能缺损症状,促进大鼠海马齿状回颗粒成体 NSCs 增殖。潘峰等^[11]证实中药脑脉 I 号胶囊可促进骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 移植治疗大鼠缺血再灌注损伤的作用,保护神经元,减轻脑水肿。本文就近年来中药协同干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的研究进行综述,探讨联合疗法的疗效及作用机制,为联合疗法的进一步应用提供理论依据。

1 干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的研究进展

干细胞是一类具有自我更新能力、高度未分化性和多向分化潜能的细胞。目前研究认为干细胞治疗缺血性脑损伤的主要机制包括替代受损细胞、分泌或促进脑组织分泌某些细胞因子以刺激内源性修复、减轻氧化应激和细胞程序死亡^[2, 12]。

1.1 内源性 NSCs NSCs 是指能够分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,并具有自我更新和增殖能力的细胞群^[13]。成年哺乳动物脑内的 NSCs 主要存在于侧脑室脑室下区 (subventricular zone, SVZ) 和海马齿状回颗粒下层 (the subgranular zone, SGZ), 受到缺血缺氧等刺激后,这些 NSCs 可迅速扩增并分化为成熟神经元,实现自我修复^[14]。此外,Arvidsson 等^[15]还发现大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠模型 SVZ 区 NSCs 可向梗死灶迁移,且缺血侧纹状体也出现新生神经元。Thored 等^[16]则发现成年大鼠缺血性脑卒中后 SVZ 区 NSCs 增殖可持续几个月,神经功能也

不断改善。这对于缺血性脑卒中的治疗,尤其对于错过治疗时间窗的患者,具有十分重要的意义。然而,受到缺血损伤刺激而激活的内源性 NSCs 数目十分有限,因此,寻找能最大限度激活内源性 NSCs 的有效途径是非常必要的。

1.2 外源性干细胞 此外,近年来研究发现,通过各种途径移植的干细胞同样可以在宿主体内存活、分化,并可迁移至缺血损伤部位,促进缺血后神经功能修复^[17]。目前研究较多的治疗缺血性脑卒中的外源性干细胞有间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs), 内皮祖细胞和 NSCs^[18]。外源性干细胞治疗缺血性脑卒中的疗效在大量动物实验中得到了证实^[19]。Hocum 等^[20]发现人脐带血干细胞移植可促进 MCAO 大鼠神经功能恢复,减少梗死面积,并使巨噬细胞和 T 细胞浸润减少,小神经胶质细胞恢复至正常水平。Gutierrez-Fernandez 等^[21]分别将内源性和外源性脂肪间充质干细胞经股静脉注入两组 MCAO 模型大鼠体内,结果发现 2 种不同来源的脂肪间充质干细胞均能促进缺血性脑损伤后脑血管恢复和神经突触再生。LIN 等^[22]研究证实,经脑实质移植人脐带间充质干细胞可增强皮质神经元的代谢活性,并促进缺血皮质血管再生,改善脑缺血再灌注大鼠自主运动功能。近年来,外源性干细胞移植疗法相关临床试验也陆续开展,美国斯坦福大学近期发表的一项临床研究将 BMSCs 移植至慢性卒中患者体内,随后进行为期 12 个月的随访,结果显示患者神经功能逐渐改善^[23]。尽管存在争议,但不少临床试验证实干细胞移植治疗是安全的。Kalladka 等^[24]将 NSCs 注入缺血性脑卒中患者颅内,随后进行为期 2 年的随访,结果显示患者神经功能有所改善,且无不良事件发生,提示 NSCs 移植治疗缺血性脑卒中是安全有效的。Prasad 等^[25]纳入 120 例急性缺血性脑卒中患者,随机分为移植组和对照组,移植组接受自体骨髓单核干细胞静脉注射,为期 180 d 的随访结果显示,两组不良事件发生率无差异,提示静脉移植骨髓单核干细胞治疗缺血性脑卒中是安全的。Hess 等^[26]开展的一项多中心临床试验进一步证实,出现中风症状后 36 h 内进行多能干细胞移植治疗可以降低患者发生破坏性炎症和严重感染的

风险,减轻残疾程度,且与对照组相比,并未出现死亡及毒副作用。然而,移植干细胞在体内的存活率较低,且迁移至损伤区域的数目十分有限^[17, 27]。

2 中药对体内、外干细胞增殖、分化、存活、迁移的影响

近年来,国内外学者利用中药对体内、外干细胞进行干预,观察这些中药对干细胞增殖、分化、存活、迁移等生命活动的影响,为中医药现代化研究带来了新的切入点。

2.1 中药促进干细胞增殖 实验研究表明,多种中药及中药提取物对干细胞的增殖有一定促进作用。CHEN 等^[28]给予创伤性脑损伤大鼠模型圣愈汤腹腔注射治疗,观察大鼠神经功能恢复及神经元减少情况,结果显示大鼠神经功能有所恢复,海马区 BrdU/NeuN 免疫双标阳性细胞数增多,提示圣愈汤可以促进海马区 NSCs 的增殖。马勇等^[29]用补肾中药煎剂对大鼠连续灌胃给药 7 d,之后颈动脉取血,获得补肾中药血清,取第 3 代人脐血 MSCs,随机分组给予不同浓度补肾中药血清条件培养基培养,结果发现不同浓度补肾中药血清均可促进人脐血 MSCs 增殖。此外,还可以促干细胞增殖作用还有槲皮苷^[30]、柚苷^[31]等。

不少研究对中药促进干细胞增殖的机制进行了探索。杨佳超等^[32]应用 18 α -甘草次酸(18 α -glycyrrhetic acid, 18 α -GA)持续处理晚期 BMSCs (≥ 14 代)30 d,结果提示 18 α -GA 可能通过上调细胞周期相关蛋白表达水平促进晚期大鼠 BMSCs 增殖。查倩等^[33]用黄芪多糖含药血清体外培养 NSCs,研究发现血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量及磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)表达增加,提示黄芪多糖含药血清通过调节 VEGF 含量,活化 PI3K/Akt 信号通路,促进 Akt 磷酸化,调节下游靶基因,促进 NSCs 增殖。

2.2 中药诱导干细胞定向分化 实验研究表明,很多中药具有良好的诱导干细胞分化的作用。SHI 等^[34]构建帕金森大鼠模型,予以 NSCs 移植后,分别观察加或不加止颤汤对多巴胺及多巴胺代谢产物的影响,结果显示两组多巴胺和多巴胺产的水平均上调,其中联合组上调更显著,提示止颤汤可以促进 NSCs 转化为多巴胺能神经元。郭占鹏等^[35]给予大鼠补阳还五汤灌胃 3 d,末次给药后采尾血,获得补阳还五汤含药血清,分别取补阳还五汤含药血清和正常血清培养基培养肌源性干细胞,结果显示药物

血清组中的细胞可见多边形改变类似神经样突起,而对照组细胞呈纺锤状,药物血清组中细胞的神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE)和神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达均明显高于对照组,表明补阳还五汤含药血清可促进肌源性干细胞向神经元样细胞分化。除此之外,具有此作用的中药或中药提取物还有丹榭逍遥散^[36]、虎杖苷^[37]等。

有研究对中药诱导干细胞定向分化机制进行了探讨。郭超等^[38]报道用红景天苷诱导 BMSCs 向神经元细胞转化,并使用胞外 Ca²⁺螯合剂、尼莫地平和 LY294002 阻断钙离子通道,结果发现 β -链蛋白(β -catenin),神经元特异性烯醇化酶(NSE),孤儿核受体相关因子 1(nuclear receptor related factor1, Nurr1)和抗微管蛋白(beta 3 class III tubulin, β -tubulin III) mRNA 表达降低, β -catenin 和 NSE 蛋白表达下调,提示 BMSCs 向神经元定向分化还可能与 Ca²⁺信号通路相关。

2.3 中药提高干细胞存活率 YANG 等^[39]用附子散水提取物对阿兹海默症小鼠连续灌胃给药 30 d,发现附子散可促进小鼠内源性 NSCs 增殖,并延长 NSCs 存活时间,从而改善阿兹海默症小鼠认知功能。谭旭仪等^[40]用不同剂量股骨头坏死愈胶囊对大鼠连续灌胃 7 d,制备得到股骨头坏死愈胶囊低、中、高剂量血清,设立正常血清组,模型组和中药血清低、中、高剂量组,模型组和中药血清组均加入全反式维甲酸诱导细胞凋亡,结果显示,与模型组比较中药血清低、中、高剂量组 BMSCs 相对存活率上升,G₁期比例减少,G₂及 S 期比例增加,且随着中药剂量增加而差值明显,提示股骨头坏死愈胶囊含药血清可提高大鼠 BMSCs 的存活率,对全反式维甲酸所致的细胞凋亡有保护作用。其他如复方丹参滴丸^[41]等也可促进干细胞存活。

有研究对中药抑制干细胞凋亡,提高其存活率的机制进行了探讨。杨黎丽等^[42]建立白细胞介素 1 β 诱导体外培养的 SD 大鼠 BMSCs 凋亡体系,分别向其中加入巴戟天含药血清、鹿角胶含药血清、淫羊藿含药血清、骨碎补含药血清和空白血清培养 48 h,结果发现温阳补肾药含药血清可能通过上调抑制凋亡基因 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)的表达,下调促进凋亡基因 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达,抑制其蛋白酶活性从而减少细胞凋亡,提高存活率。

2.4 中药促进干细胞迁移能力 此外,部分文献对中药促进干细胞迁移能力和及其作用机制进行了

探讨。王倩等^[43]采用大鼠中动脉线栓法构建脑缺血模型,造模成功后灌服地黄饮子药液连续灌胃 7 d,对照组不手术,灌服生理盐水,处死后分别获得地黄饮子含药血清和正常血清用于体外培养 NSCs,结果显示治疗组 NSCs 迁移数及迁移率均较对照组高,提示地黄饮子能明显促进 NSCs 迁移。王斌等^[44]用补肾活血汤灌胃治疗大鼠股骨中段骨折模型 7,14,21 d,分别取骨折端 MSCs 进行培养,发现补肾活血汤治疗后第 7,14 天,骨折端 MSCs 体外迁移能力明显加强,表面受体 CC 类趋化因子受体 2 (C-C motif chemokine receptor-2, CCR2) 表达提高,提示补肾活血汤可以促进大鼠骨折愈合过程中 MSCs 的体外迁移,其机制可能与上调 CCR-2 的表达,激活 MCP-1/CCR 2 信号轴有关。此外,二妙散^[45]、活骨 II 方、牛膝^[46]等在体内研究中也证实可以促进干细胞迁移能力。

3 中药辅助干细胞治疗缺血性脑卒中的研究进展

中医药治疗缺血性脑卒中已有数千年历史,积累了丰富的临床经验,大量研究证实中医药对脑缺血的疗效机制是多环节、多靶点、多效应的,涉及到脑缺血损伤后的各个病理环节。脑缺血后受损脑组织修复和功能重建已成为近年来研究的热点,目前中医药领域已有研究一些利用中药复方、单味中药及其有效成分激活内源性 NSCs,或协同外源性干细胞移植,用于缺血性脑卒中的治疗。

3.1 中药激活内源性 NSCs 促进自我修复

3.1.1 中药单体对缺血性脑损伤内源性 NSCs 的影响 目前研究较多的中药单体对缺血性脑损伤后 NSCs 的影响主要集中在促进 NSCs 增殖。ZHENG 等^[47]构建永久性 MCAO 大鼠模型,治疗组于造模前 3 d 开始给予腹腔注射人参总皂苷 (Ginseng total saponins, GTS) 直至处死,设立生理盐水组,结果显示治疗组神经功能评分优于生理盐水组,治疗组缺血侧 SVZ 区和梗死灶 BrdU/NeuN 免疫双标阳性细胞数多于生理盐水组,且神经功能评分和 BrdU 染色、免疫组化染色结果具有高度相关性,提示 GTS 可通过激活内源性 NSCs,促进中枢神经系统神经再生,从而改善神经功能。丹酚酸 B 是从传统中药丹参中提取得到的天然化合物,ZHUANG 等^[48]研究发现丹酚酸 B 可通过提高 Akt 磷酸化水平促进 NSCs 体外增殖,他们进一步建立全脑缺血大鼠模型,给予丹酚酸 B 腹腔注射,每天 1 次,连续 4 周,结果显示丹酚酸 B 组水迷宫实验结果优于空白组,SGZ 区 BrdU 阳性细胞数显著增加,提示丹酚酸 B 可通过

促进内源性 NSCs 增生促进大鼠认知功能恢复。WANG 等^[49]给予大鼠绞股蓝皂苷连续灌胃 10 d 后,构建 MACO 模型,设立模型组,结果发现治疗组神经自主神经功能优于模型组,治疗组两侧 SVZ 区 BrdU 阳性细胞均增多,提示绞股蓝皂苷可以促进 NSCs 增殖,促进神经再生。血塞通胶囊的主要成分是三七总皂苷,ZHANG 等^[50]构建 MCAO 大鼠模型,并分别给予大鼠不同剂量血塞通胶囊灌胃连续治疗 28 d,酶联免疫法显示高、中剂量血塞通胶囊可以显著增加血浆和骨髓干细胞因子,CD117 阳性细胞数,减少 CD54,CD106 阳性细胞数,提示血塞通可以有效动员外周血 BMSCs。林惠等^[51]制作大鼠 MCAO 模型,随机分为丹参注射液组、生理盐水组,设立假手术组,结果发现,治疗 7,14 d 后,丹参注射液组改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)较生理盐水组下降,各时间点丹参注射液组双侧 SVZ 内 BrdU/NeuN 双标阳性细胞较其他两组增高,提示丹参注射液能够促进 NSCs 向神经元分化改善神经功能。

目前,关于中药单体对缺血性脑损伤后内源性 NSCs 作用机制的研究较少。李蓉等^[52]采用双侧颈总动脉夹闭合并低血压法构建全脑缺血/再灌注大鼠模型,治疗组予以黄芩苷腹腔注射,模型组和假手术组腹腔注射生理盐水,结果发现黄芩苷可以改善全脑缺血大鼠空间学习记忆能力,增加了 SGZ 内 BrdU 阳性细胞数,同时明显上调了海马脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达水平,提示黄芩苷可能通过上调海马 BDNF 蛋白的表达促进 NSCs 增殖,从而改善大鼠认知功能^[52]。

3.1.2 中药复方对缺血性脑损伤内源性 NSCs 的影响 KONG 等^[53]构建 MCAO 大鼠模型,给予治疗组补阳还五汤灌胃,设立对照组,观察大鼠神经功能恢复及 NSCs 增殖情况,结果发现补阳还五汤可以显著提高大鼠存活率,降低神经功能缺损评分,减少脑梗面积,治疗组 SVZ 区,SGZ 区及纹状体的 BrdU 阳性细胞数显著增多,表明补阳还五汤可以通过促进内源性 NSCs 增殖,促进神经功能修复^[53]。LIU 等^[54]则发现补阳还五汤还可以提高 MCAO 大鼠脑组织微管相关蛋白-2 的表达,从而促进内源性 NSCs 向神经元分化改善神经功能。程伟等^[55]制作 MCAO 大鼠模型,设立假手术组、生理盐水组和祛痰通络中药治疗组,比较各组大鼠造模后不同时间点神经功能缺损评分,并应用免疫组化法检测各时间

点自体 NSCs 增殖情况、免疫荧光双标观察增殖干细胞的分化情况,结果显示第 14 天祛痰通络中药治疗组神经功能缺损评分低于生理盐水组,第 3 天开始,中药组 SVZ 内 Brdu 阳性细胞数多于生理盐水组,第 7 天开始,中药组 BrdU/NeuN 阳性细胞数多于生理盐水组,提示祛痰通络中药可促进脑梗死后自体 NSCs 的增殖、分化,从而促进神经功能恢复。楼小亮等^[56]建立 MCAO 大鼠模型,设立养血清脑颗粒高、低剂量组,模型组和假手术组,结果提示治疗组神经功能缺损评分、脑梗死面积低于模型组,Brdu 阳性细胞平均荧光强度值和 Brdu/Nestin 免疫双标荧光强度值均高于模型组。

近年来,用于激活缺血性脑损伤后内源性 NSCs 的中药复方相对较少,因此相关机制研究也比较局限。胡建鹏等^[57]建立 MCAO 大鼠模型,分为益气活血方组、补肾生髓方治疗组、模型组、假手术组,发现 2 种中药复方组缺血侧额顶叶皮质缺血半暗带 Notch-1 和 Jagged1 蛋白表达的阳性总面积和平均吸光度显著低于模型组,提示益气活血方和补肾生髓方均能通过降低缺血半暗带 Notch-1, Jagged1 蛋白表达,抑制 Notch 信号转导通路,从而调节 NSCs 的增殖分化。他们的另一项研究则证实,上述 2 种中药复方还可能通过增强缺血侧脑组织额顶叶皮质 Math-1 和 Mash-1 的表达,调控 Notch 信号转导通路^[58]。

3.2 中药联合干细胞移植治疗缺血性脑损伤

3.2.1 中药单体联合干细胞移植 LI 等^[59]构建 MCAO 大鼠模型,设立 BMSCs 移植联合大黄苷元组, BMSCs 移植组, 大黄苷元组, 模型组和假手术组,联合组和移植组接受 BMSCs 移植,大黄苷元组和联合组予以大黄苷元灌胃,发现移植后 7 d 联合组微血管结构较移植组完整,其各时间点大鼠脑组织中 IV 型胶原 (type IV collagen, ColIV) 表达较移植组增强,14 d 时大鼠脑组织中基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 活性较大黄苷元组降低,金属蛋白酶组织抑制物-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 表达增强,提示大黄苷元与 BMSCs 有协同作用,可使脑缺血再灌注损伤大鼠微血管基底膜 ColIV 降解减少,通透性降低,其作用机制可能与增加 TIMP-1 表达以调节 MMP-9 平衡有关。ZHAO 等^[60]建立 MCAO 大鼠模型,随机分为 BMSCs 移植联合阿魏酸钠组,阿魏酸钠组, BMSCs 移植组,模型组,结果显示联合组脑梗死面积减小,梗死灶边缘 Glut1, Tuj1 的表达,局部缺血区 Tuj1 的表达以及 BMSCs Glut1, GFAP 和 Tuj1 的表达均增

强,此外,联合治疗还可以上调骨形态发生蛋白-2, 骨形态发生蛋白-4, 下调 Notch-1 蛋白, Hes1, Hes5, 提示阿魏酸钠可以促进移植 BMSCs 在体内分化为神经元样和星型胶质细胞样细胞,并且可以通过促进葡萄糖代谢和内源性神经再生从而增强脑实质细胞自我修复。

3.2.2 单味中药联合干细胞移植 成远强等^[61]制备 MCAO 大鼠模型,随机分为脂肪源性干细胞 (adiposederived stem cell, ADSC) 移植组、冬虫夏草 + ADSC 组、模型组、冬虫夏草组,结果发现联合组神经功能缺损评分显著低于单独治疗组和模型对照组,而悬垂实验及被动活动评分则显著增高。与模型组和单独治疗组对比,冬虫夏草 + ADSC 组梗死区 Iba-1, 白细胞介素-1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达水平显著下降,提示冬虫夏草联合 ADSC 移植对大鼠脑缺血神经保护作用优于单独治疗组,其机制可能与冬虫夏草和 ADSC 能够协同发挥抗炎症作用有关。

3.2.3 中药复方联合干细胞移植 ZHANG 等^[62]建立 MCAO 大鼠模型,分为空白组,清开灵组 (QKL), 诱导多能干细胞组 (induced pluripotent stem cells, iPSCs), QKL + iPSCs 组, NSCs 组和 QKL + NSCs 组,结果显示与其他组比较, QKL + iPSCs 组和 QKL + NSCs 组梗死区葡萄糖代谢增加,神经功能评分结果与葡萄糖代谢具有高度相关性,提示清开灵联合 NSCs 或 iPSCs 促进梗死区能量代谢的恢复,治疗效果优于单纯干细胞治疗。田兆华等^[63]构建 MCAO 大鼠模型,分为移植联合超微补阳还五汤组、模型加 NSCs 移植组、模型组、模型加空白移植组、正常组、假手术组,给予不同处理,结果显示用药 7, 14 d, NSCs 移植联合中药组神经功能缺损评分与其他组比较降低, Brdu 阳性细胞数目明显多于同期各组,超微补阳还五汤可以促进移植 NSCs 增殖,进而促进内源性神经再生及神经功能恢复。

部分研究就中药复方联合干细胞移植治疗缺血性脑损伤的机制进行了探讨。李金艳等^[64]建立 MCAO 大鼠模型, BMSCs 组尾静脉注射 BMSCs, 联合治疗组联合注射丹红注射液 + BMSCs, 结果发现移植后 1, 2 周, 联合治疗组大鼠神经功能缺损评分低于其他组, 生长相关蛋白 (growth associated protein-43, GAP-43), Bcl-2 的表达明显较高, 说明丹红注射液联合 BMSCs 移植可通过促进脑梗死局部 GAP-43, Bcl-2 的表达, 抑制脑梗死引起的细胞凋亡, 从而改善大鼠神经功能^[64]。此外, 有研究发现

补阳还五汤联合 MSCs 移植可以促进血管生成,其机制可能是通过上调 VEGF 的表达^[65]。见表 1。

表 1 联合干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的中药

Table 1 Summary of Chinese herb medicine combined with stem cell therapy for ischemic stroke

类别	名称	参考文献
中药提取物	大黄苷元	[59]
	人参总皂苷	[47]
	槲皮素	[66]
	丹酚酸 B	[48]
	阿魏酸钠	[60]
	绞股蓝皂苷	[49]
	三七三醇皂苷	[67]
	三七总皂苷	[50]
	黄芩苷	[52]
	单味药	龟板
冬虫夏草		[61]
复方	补阳还五汤	[53-54,63,65]
	脑脉通	[69]
	脑脉一号	[70]
	祛痰通络方药	[55]
	银杏活脑胶囊	[71]
	蝮龙抗栓丸	[72]
	清热化痰方	[73]
	地黄饮子	[74]
	养血清脑颗粒	[56]
	醒脑通络片	[75]
	牛珀至宝微丸	[76]
	益气活血方	[57,58]
	补肾生髓方	[57,58]

4 讨论与展望

综上所述,大量体内外研究证实,中药用于诱导干细胞增殖、分化,提高干细胞存活率效果显著,中药联合干细胞疗法可有效促进缺血性脑损伤后神经功能恢复。然而,目前尚无中药联合干细胞疗法治疗缺血性脑卒中的临床报道。另外,干细胞移植治疗缺血性脑卒中的困难主要在于向病灶的迁移率和存活率低,而针对缺血性脑卒中,联合疗法相关体内研究主要侧重于总体神经功能的改善以及中药对移植干细胞增殖、分化的影响,对迁移率、存活率的研究较少,原因可能在于缺乏有效监测手段。近年来,有学者将活体生物光学分子成像技术应用于活体干细胞治疗学中,Pendharkar 等^[77]用萤火虫荧光素酶

标记 NSCs,经静脉或动脉注入缺血缺氧成年小鼠模型,用活体生物光学分子成像技术实时动态监测移植 NSCs 在体内的迁移、存活情况。Boehm-Sturm 等^[78]将 NSCs 于造模后 48 h 经脑实质注入 MCAO 模型小鼠体内,用活体生物光学分子成像技术联合核磁共振技术定量分析 NSCs 移植存活率。笔者认为中医药领域可以借鉴使用该项技术,用于联合疗法的研究。

此外,笔者对近几年中药联合内、外源性干细胞治疗缺血性脑损伤的研究进行综述发现:①现有研究仅停留在现象描述,较少涉及深层机制;②不少研究将中药复方作为研究对象,但缺乏对中药复方有效成分的探讨;③高质量研究较少。若能解决上述问题,联合疗法将有望用于临床,这对缺血性脑卒中患者的治疗,尤其是错过最佳治疗时间窗的患者具有十分重要的意义。

[参考文献]

[1] George P M, Steinberg G K. Novel stroke therapeutics: Unraveling stroke pathophysiology and its impact on clinical treatments [J]. *Neuron*, 2015, 87 (2): 297-309.

[2] LIU X, YE R, YAN T, et al. Cell based therapies for ischemic stroke: from basic science to bedside [J]. *Prog Neurobiol*, 2014, (115):92-115.

[3] Vahidy F S, Rahbar M H, ZHU H, et al. Systematic review and meta-analysis of bone marrow-derived mononuclear cells in animal models of ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2016, 47(6):1632-1639.

[4] Savitz S I, Cramer S C, Wechsler L. Stem cells as an emerging paradigm in stroke 3: enhancing the development of clinical trials [J]. *Stroke*, 2014, 45 (2):634-639.

[5] Mangi A A, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts [J]. *Nat Med*, 2003, 9(9):1195-1201.

[6] 方健康,周轶平,李玛琳. 中药对骨髓间充质干细胞增殖、凋亡及分化的影响研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(15):2834-2837.

[7] LIN P C, CHANG L F, LIU P Y, et al. Botanical drugs and stem cells [J]. *Cell Transplant*, 2011, 20 (1):71-83.

[8] DONG S, SU S B. Advances in mesenchymal stem cells combined with traditional chinese medicine therapy for liver fibrosis [J]. *J Integr Med*, 2014, 12 (3): 147-155.

[9] Weber D A, Wheat J M, Currie G M. Cancer stem

- cells and the impact of chinese herbs, isolates and other complementary medical botanicals; a review [J]. *J Chin Integr Med*, 2012, 10(5):493-503.
- [10] 姜晓锋, 张杰文, 罗祖明. 三七通舒在大鼠脑缺血耐受和自体神经干细胞增殖中的作用[J]. *中华老年医学杂志*, 2014, 33(9):1005-1009.
- [11] 潘峰, 郭建文, 李俊雅, 等. 调节“脑中血海”法中药联合骨髓间充质干细胞移植对缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. 2012, 20(5):506-509.
- [12] Hosseini S M, Farahmandnia M, Kazemi S, et al. A novel cell therapy method for recovering after brain stroke in rats [J]. *Int J Stem Cells*, 2015, 8(2):191-199.
- [13] McKay R. Stem cells in the central nervous system [J]. *Science*, 1997, 276(5309):66-71.
- [14] Marlier Q, Verteneuil S, Vandenbosch R, et al. Mechanisms and functional significance of stroke-induced neurogenesis [J]. *Front Neurosci*, 2015, doi: 10.3389/fnins.2015.00458.
- [15] Arvidsson A, Collin T, Kirik D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke [J]. *Nat Med*, 2002, 8(9):963-970.
- [16] Thored P, Arvidsson A, Cacci E, et al. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(3):739-747.
- [17] TANG Y H, MA Y Y, ZHANG Z J, et al. Opportunities and challenges: stem cell-based therapy for the treatment of ischemic stroke [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(4):337-347.
- [18] Sullivan R, Duncan K, Dailey T, et al. A possible new focus for stroke treatment-migrating stem cells [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2015, 15(7):949-958.
- [19] VU Q, XIE K, Eckert M, et al. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells for ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2014, 82(14):1277-1286.
- [20] Hocum Stone L L, XIAO F, Rotschafer J, et al. Amelioration of ischemic brain injury in rats with human umbilical cord blood stem cells: mechanisms of action [J]. *Cell Transplant*, 2016, 25(8):1473-1488.
- [21] Gutierrez-Fernandez M, Rodriguez-Frutos B, Ramos-Cejudo J, et al. Comparison between xenogeneic and allogeneic adipose mesenchymal stem cells in the treatment of acute cerebral infarct: proof of concept in rats [J]. *J Transl Med*, 2015, doi: 10.1186/s12967-015-0406-3.
- [22] LIN Y C, Ko T L, Shih Y H, et al. Human umbilical mesenchymal stem cells promote recovery after ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2011, 42(7):2045-2053.
- [23] Steinberg G K, Kondziolka D, Wechsler L R, et al. Clinical outcomes of transplanted modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells in stroke: a phase 1/2a study [J]. *Stroke*, 2016, 47(7):1817-1824.
- [24] Kalladka D, Sinden J, Pollock K, et al. Human neural stem cells in patients with chronic ischaemic stroke (pisces): a phase 1, first-in-man study [J]. *Lancet*, 2016, 388(10046):787-796.
- [25] Prasad K, Sharma A, Garg A, et al. Intravenous autologous bone marrow mononuclear stem cell therapy for ischemic stroke: a multicentric, randomized trial [J]. *Stroke*, 2014, 45(12):3618-3624.
- [26] Hess D C, Wechsler L R, Clark W M, et al. Safety and efficacy of multipotent adult progenitor cells in acute ischaemic stroke (masters): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16(5):360-368.
- [27] Sart S, MA T, LI Y. Preconditioning stem cells for *in vivo* delivery [J]. *Biores Open Access*, 2014, 3(4):137-149.
- [28] CHEN M M, ZHAO GW, HE P, et al. Improvement in the neural stem cell proliferation in rats treated with modified "shengyu" decoction may contribute to the neurorestoration [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 165(2):9-19.
- [29] 马勇, 郭杨, 鲁俊山, 等. 补肾中药血清联合 bmp-2 对人脐血间充质干细胞增殖及形态学的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 25(1):13-18.
- [30] ZHOU Y, WU Y, JIANG X, et al. The effect of quercetin on the osteogenesis differentiation and angiogenic factor expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6):e0129605.
- [31] LIU M, LI Y, YANG S T. Effects of naringin on the proliferation and osteogenic differentiation of human amniotic fluid-derived stem cells [J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017, 11(1):276-284.
- [32] 杨佳超, 赵云鹤, 蒋蓉, 等. 18 α -ga 通过上调蛋白酶体活性促进晚期骨髓间充质干细胞增殖 [J]. *中国病理生理杂志*, 2015, 31(12):2183-2187.
- [33] 查倩, 江琼, 伍亚民, 等. 黄芪多糖含药血清对神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. *中药材*, 2015, 38(8):1721-1723.
- [34] SHI H, SONG J, YANG X. Zhichan decoction induces differentiation of dopaminergic neurons in parkinson's

- disease rats after neural stem cell transplantation [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(9):931-936.
- [35] 郭占鹏, 刘堃, 黄米娜, 等. 补阳还五汤对大鼠肌源性干细胞体外生长分化的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(9):2049-2051.
- [36] 董宁, 赵瑞珍, 徐硕, 等. 丹栀逍遥散对广泛性焦虑大鼠海马齿状回神经干细胞增殖与分化能力的干预作用[J]. *北京中医药*, 2015, 34(1):63-66.
- [37] 阮玲娟, 崔戈, 顾旭东, 等. 虎杖苷联合生长因子诱导人脐带间充质干细胞向神经元样细胞分化的研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 25(1):284-287.
- [38] 郭超, 刘润, 赵红斌, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路介导红景天苷诱导间充质干细胞向神经细胞定向分化研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(3):349-354.
- [39] YANG H, WEN S R, ZHANG G W, et al. Effects of chinese herbal medicine fuzhisan on autologous neural stem cells in the brain of samp-8 mice [J]. *Exp Gerontol*, 2011, 46(8):628-636.
- [40] 谭旭仪, 李刚, 高书图, 等. 股骨头坏死愈胶囊含药血清对大鼠骨髓间充质干细胞凋亡的保护作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 20(3):146-149.
- [41] JUN Y, CHUN J Y, QI A, et al. The effects of compound danshen dripping pills and human umbilical cord blood mononuclear cell transplant after acute myocardial infarction [J]. *Exp Clin Transplant*, 2014, 12(2):123-128.
- [42] 杨黎丽, 黄胜杰, 李媚, 等. 温阳补肾药对抗骨髓间充质干细胞凋亡的实验研究[J]. *中医正骨*, 2013, 25(2):3-7.
- [43] 王倩, 范文涛, 贺又舜. 地黄饮子含药血清对胎鼠海马神经干细胞迁移的影响[J]. *中医学报*, 2015, 8(1):8-10.
- [44] 王斌, 罗毅文, 黄永铨, 等. 补肾活血汤促骨折端间充质干细胞体外迁移及 ccr2 表达的研究[J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2015, 23(8):1-5.
- [45] XU Y, DAI G, LIU Q, et al. Effect of ermiao fang with xixin (herba asari mandshurici) on bone marrow stem cell directional homing to a focal zone in an osteoarthritis rat model [J]. *J Tradit Chin Med*, 2014, 34(4):477-487.
- [46] KONG X Y, WANG R T, TIAN N, et al. Effect of huogu ii formula (ii) with medicinal guide radix achyranthis bidentatae on bone marrow stem cells directional homing to necrosis area after osteonecrosis of the femoral head in rabbit [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(10):761-768.
- [47] ZHENG G Q, CHENG W, WANG Y, et al. Ginseng total saponins enhance neurogenesis after focal cerebral ischemia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 133(2):724-728.
- [48] ZHUANG P, ZHANG Y, CUI G, et al. Direct stimulation of adult neural stem/progenitor cells *in vitro* and neurogenesis *in vivo* by salvianolic acid b [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35636.
- [49] WANG X J, SUN T, KONG L, et al. Gypenosides pretreatment protects the brain against cerebral ischemia and increases neural stem cells/progenitors in the subventricular zone [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2014, 33(1):49-56.
- [50] ZHANG J S, ZHANG B X, DU M M, et al. Chinese preparation xuesaitong promotes the mobilization of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with cerebral infarction [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(2):292-297.
- [51] 林惠, 杨万章. 丹参注射液对脑梗死大鼠双侧脑室室管膜下区神经干细胞分化作用的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(4):484-486.
- [52] 李蓉, 李振华, 湛贝贝, 等. 黄芩苷对全脑缺血/再灌注大鼠海马神经干细胞增殖和认知功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2015, 35(9):2322-2324.
- [53] KONG X, SU X, ZHU J, et al. Neuroprotective effect of buyang huanwu decoction on rat ischemic/reperfusion brain damage by promoting migration of neural precursor cells [J]. *Rejuvenation Res*, 2014, 17(3):264-275.
- [54] LIU B, CAI G, YI J, et al. Buyang huanwu decoction regulates neural stem cell behavior in ischemic brain [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(25):2336-2342.
- [55] 程伟, 刘时觉, 郑国庆, 等. 祛痰通络中药对大鼠脑梗死后原位干细胞增殖分化及神经功能恢复的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(3):589-592.
- [56] 楼小亮, 席秋江, 胡雪勇, 等. 养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经干细胞增殖分化的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2014, 40(7):394-399.
- [57] 胡建鹏, 周会, 王键, 等. 益气活血方和补肾生髓方对局灶性脑缺血再灌注大鼠缺血半暗带 notch-1 和 jagged1 表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(3):483-486.
- [58] 张道芹, 胡建鹏, 孟庆萍, 等. 两种中药复方对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 math-1、mash-1 蛋白表达的影响[J]. *中国中医药科技*, 2010, 17(4):289-290, 294, 279-280.
- [59] LI J S, LIU J X, SUN J, et al. effects of rhubarb aglycone on matrix metalloproteinase in cerebral ischemic tissue in rats with bone marrow mesenchymal

- stem cell transplantation[J]. 中西医结合学报, 2008, 6(8):810-816.
- [60] ZHAO Y, LAI W, XU Y, et al. Exogenous and endogenous therapeutic effects of combination sodium ferulate and bone marrow stromal cells (bmescs) treatment enhance neurogenesis after rat focal cerebral ischemia [J]. *Metab Brain Dis*, 2013, 28(4): 655-666.
- [61] 成远强, 赵龙, 闫园园, 等. 冬虫夏草联合脂肪源性干细胞移植对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中医研究*, 2015, 28(3): 59-61.
- [62] ZHANG H, SONG F, XU C, et al. Spatiotemporal pet imaging of dynamic metabolic changes after therapeutic approaches of induced pluripotent stem cells, neuronal stem cells, and a chinese patent medicine in stroke [J]. *J Nucl Med*, 2015, 56(11): 1774-1779.
- [63] 田兆华, 唐从耀. 超微补阳还五汤对侧脑室移植神经干细胞存活和分化的影响[J]. *新中医*, 2015, 47(10): 204-206.
- [64] 李金艳, 张哲成. 骨髓间充质干细胞联合丹红注射液干预脑梗死组织 gap-43、bcl-2 的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(32): 5871-5876.
- [65] YANG J, GAO F, ZHANG Y, et al. Buyang huanwu decoction (byhwd) enhances angiogenic effect of mesenchymal stem cell by upregulating vegf expression after focal cerebral ischemia [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(4): 898-906.
- [66] 张兰兰, 曹琼, 胡子有, 等. 槲皮素对成年大鼠局灶性脑缺血后侧脑室室管膜下区神经干细胞增殖的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2011, 31(7): 1200-1203.
- [67] 姜晓锋, 张杰文, 罗祖明. 三七三醇皂苷与脑缺血耐受对脑自体神经干细胞增殖的作用[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(37): 6014-6018.
- [68] 杜少辉, 陈东风, 李伊为, 等. 龟板对脑缺血大鼠骨髓间充质干细胞移植后转分化为神经元的影响[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(3): 65-67.
- [69] 郭建文, 李俊雅, 黄燕. 调节“脑中血海”法联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠缺血脑组织血管再生的影响[J]. *中西医结合学报*, 2009, 7(8): 763-768.
- [70] 潘峰, 郭建文, 李俊雅, 等. 调节“脑中血海”法中药联合骨髓间充质干细胞移植对缺血再灌注大鼠的保护作用[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2012, 18(5): 506-509.
- [71] 徐元翠, 鲁启洪. 银杏活脑胶囊对大鼠脑梗死微血管增殖和神经干细胞再生影响[J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 10(16): 3879-3880.
- [72] 李檀, 邓秀君, 孙丽明, 等. 同种异体骨髓源干细胞蛛网膜下腔移植联合中药治疗对缺血性脑卒中大鼠脑脊液中 VEGF 含量的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2011, 9(2): 209-211.
- [73] 胡跃强, 唐农, 雷龙鸣, 等. 神经干细胞移植对大鼠脑缺血损伤的影响及清热化痰方的干预[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2011, 17(10): 1094-1096.
- [74] 范文涛, 王倩. 地黄饮子对急性脑缺血大鼠神经干细胞迁移的影响[J]. *中医学报*, 2013, 28(12): 1834-1835.
- [75] 郭建队, 田华, 黄毓娟, 等. 醒脑通络片对脑缺血损伤大鼠内源性神经干细胞的影响[J]. *中成药*, 2015, 37(11): 2352-2356.
- [76] 楼小亮, 席秋江, 胡雪勇, 等. 养血清脑颗粒对大鼠脑缺血再灌注损伤后神经干细胞增殖分化的影响[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2014, 40(7): 394-399.
- [77] Pendharkar A V, Chua J Y, Andres R H, et al. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia [J]. *Stroke*, 2010, 41(9): 2064-2070.
- [78] Boehm-Sturm P, Aswendt M, Minassian A, et al. A multi-modality platform to image stem cell graft survival in the naive and stroke-damaged mouse brain [J]. *Biomaterials*, 2014, 35(7): 2218-2226.

[责任编辑 邹晓翠]