

· 综述 ·

中药应用于内源性神经干细胞的实验研究进展

张琳琳, 周震, 郭家奎, 刘爽, 张玉莲

(天津中医药大学第二附属医院脑内科, 天津 300150)

[摘要] **目的:**概述中药应用于内源性神经干细胞的实验研究现状。**方法:**在万方数据、维普资讯和中国知网(CNKI)三大全文数据库中检索 2001~2011 所有关于中药和内源性神经干细胞实验研究的文献进行系统分析。**结果:**中药提取物、单味中药、复方中药均对神经干细胞的自我更新和定向分化具有显著的影响。**结论:**与目前干细胞研究着眼于移植和克隆相比,中药主要强调通过药物激活内源性干细胞、或调整干细胞微环境,进而改善再生反应,将中药中的小分子物质作为先导物质为神经干细胞的研究提供一种有效手段,显示了重大的研究意义及乐观的应用前景。

[关键词] 中药;干细胞;内源性神经干细胞;综述

[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)20-0284-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110823.1119.014 [网络出版时间] 2011-08-23 11:19

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1119.014.html>

Experimental Research Progress on Applications of Chinese Medicine in Endogenous Neural Stem Cells

ZHANG Lin-lin, ZHOU Zhen, GUO Jia-kui, LIU Shuang, ZHANG Yu-lian

(Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China)

[Abstract] **Objective:** To summarize the experimental research progress on the applications of Chinese Medicine in endogenous neural stem cells in recent years. **Method:** The literatures about the experimental research on Chinese medicine and endogenous neural stem cells were collected by Wanfang data, VIP information and CNKI in 2001-2010. **Result:** Extractive, single-and mixed-decoction of Chinese Medicine all can effect on the renew - self and differentiation of endogenous neural stem cells. **Conclusion:** With the current research of stem cell compared, which focus the transplantation and cloning, Chinese medicine emphasized on activating endogenous neural stem cells or regulating microenvironment in order to improve regenerative response. It proposes an effective ways and shows the significance and optimistic perspective.

[Key words] Chinese medicine; stem cell; endogenous neural stem cell; review

干细胞(stem cells, SC)是一类具有自我复制能力(self-renewing)的多潜能细胞,在一定条件下,它可以分化成多种功能细胞。根据干细胞所处的发育阶段分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES 细胞)和成体干细胞(somatic stem

cell)。胚胎干细胞(embryonicstemcells, ESCs)是指当受精卵分裂发育成囊胚时内细胞团(inner cell mass)的细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。无论在体外还是体内环境,ES 细胞都能被诱导分化为机体几乎所有

[收稿日期] 20110418(017)

[基金项目] 国家重点基础研究发展(973)计划(2010CB530405)

[第一作者] 张琳琳, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合脑病临床与科研, E-mail: zllr@sina.com, Tel: 022-60335418

[通讯作者] * 张玉莲, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 中华中医药学会脑病专业委员会副主任委员, 天津中医药学会脑病专业委员会主任委员, 从事中西医结合老年性痴呆、脑血管病临床与科研, E-mail: zhy1220@126.com, Tel: 022-60335355

的细胞类型。成体干细胞则存在于已经分化组织中,能够自我更新并且能够特化形成组成该类型组织的细胞。成体干细胞存在于机体的各种组织器官中。成年个体组织中的成体干细胞在正常情况下大多处于休眠状态,在病理状态或在外因诱导下可以表现出不同程度的再生和更新能力。神经干细胞是存在于成年体内的一类成体干细胞,具有向神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞分化的能力。研究已初步揭示神经干细胞在成体内维持、定向分化的主要分子机制。近年来,国内有大量的研究显示中药对神经干细胞的自我更新和定向分化具有显著的影响,为分析中药在此方面的独特优势以及研究前景,现笔者按中药提取物、单味中药、复方中药,对近10年的相关文献进行总结和分析。

1 中药提取物

1.1 人参总皂苷 崔荣太等^[1]取成年雄性 Wistar 大鼠,用线栓法制作大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,结果发现应用人参皂苷后大鼠室管膜下区及海马齿状回阳性细胞数明显增多,与缺血组之间有显著性差异($P < 0.01$)。

江琼等^[2]采用体外细胞培养法对胚胎大鼠室管膜前下区神经干细胞(SVZa NSCs)分离、培养,建立 SVZa NSCs 谷氨酸中毒模型,相差显微镜下观察细胞形态变化,结果表明人参皂苷 Rg₁ 能够明显提高谷氨酸损伤 SVZa NSCs 的存活率;可以提高损伤细胞 STAT3 阳性细胞百分比的表达。

李国栋等^[3]将人参皂苷 Rb₁ 作用于 APP 转基因鼠分化中的神经细胞,用免疫荧光化学和免疫蛋白印记法测定总 Tau 蛋白磷酸化水平及 Tau 蛋白在 Ser-396, Ser-262 位点磷酸化水平。结果与阳性对照组相比,人参皂苷 Rb₁ 处理组 Tau 蛋白的总磷酸化水平及在 Ser-396 和 Ser-262 位点磷酸化水平明显下降;而与阴性对照组相比, Tau 蛋白总磷酸化水平及在 Ser-396 和 Ser-262 位点的磷酸化水平明显增高。因此得出结论人参皂苷 Rb₁ 具有一定神经保护作用。

郁伟等^[4]通过贴壁法分离大鼠骨髓间充质干细胞,体外培养扩增,人参皂苷 Rg₁ 诱导分化。结果部分大鼠骨髓间充质干细胞经人参皂苷 Rg₁ 诱导 72 h 后转变为神经元样细胞,免疫细胞化学染色 NSE 呈阳性,分化的神经元样细胞可能表达 NGFmRNA。

施建生等^[5]用大鼠自体尾动脉抗凝血液将 SD 大鼠制成中等量脑出血模型,并随机分为人参总皂苷和单纯脑出血组各 20 只,3,7,14,28,60 d 各 4 只,术后第 1 d 开始腹腔注射人参总皂苷,连续注射 14 d,分别在术后 3,7,14,28,60 d 处死,运用免疫组织化学方法检测脑出血后各组损伤区周围神经干细胞的增殖情况。结果两组在 3,7 d 未发现 NSCs 增殖,14,28,60 d 组发现少量的 NSCs 增殖,人参总皂苷组 14,28,60 d 均较单纯出血组神经干细胞明显增殖($P < 0.01$)。王莎莉等^[6-7]从 7~12 周人工流产胚胎脑组织中分离培养人胚胎 NSC,发现人参总皂苷(TSPG)对 NSC 的增殖有促进作用,能促进神经干细胞定向分化为 DA 能神经元;此外她通过检测移植的神经干细胞在帕金森病模型鼠脑内

分布和迁移以及分化多巴胺能神经元样细胞显示,人参总皂苷+白细胞介素 1 组优于人参总皂苷组,人参总皂苷组优于神经干细胞组,磷酸盐缓冲液组无作用。

1.2 银杏内酯 黄镇等^[8]采用无血清培养和单克隆实验技术在体外分离培养出大量来源于同一细胞的单细胞克隆球,分 3 组分别加入含银杏内酯 B、脑源性神经营养因子 BDNF 和不加任何细胞因子的完全培养液。得出结论银杏内酯 B 亦具有类似 BDNF 促进神经干细胞分化为神经元的作用。苏平等^[9]从成年 Wistar 大鼠骨髓中分离骨髓间充质干细胞(MSCs),在第 5 代培养的 MSCs 中分别加入 20, 40, 80 mg·L⁻¹银杏内酯 B 到含 10% 胎牛血清的 L-DMEM 培养基中进行分化诱导,并设空白对照组。结果不同浓度银杏内酯 B 均促进神经元的分化,并且促进胶质细胞分化的结果随浓度升高而增高。于坚武等^[10]通过在拟 AD 大鼠模型中观察银杏内酯的作用结果发现 OA 可明显改善大鼠认知、学习记忆能力减退等症状。

1.3 五味子酮 李国栋等^[11]剪取新生 APP 转基因小鼠尾尖,常规提取 DNA,采用 PCR 法检测动物是否携带有 APP 基因,分别取 APP+ 鼠和 APP-鼠海马部位脑组织,体外分离培养神经干细胞,并将纯化的神经干细胞向神经细胞方向诱导分化。结果在 APP 转基因小鼠神经干细胞诱导分化过程中,五味子酮可以明显降低 Tau 蛋白在 396,262 位点的磷酸化水平,减轻神经元损伤,但其磷酸化程度并未达到阴性细胞水平。

1.4 灵芝孢子 丁英等^[12]将成年 SD 大鼠随机分成损伤不用药组和损伤用药组。对两组动物 T12 脊髓段施行右侧半横断后,在其腹腔内注射溴脱氧尿嘧啶(BrdU 50 mg·kg⁻¹),每天 2 次,连续注射 10 d,损伤用药组动物胃饲灵芝孢子。结果损伤用药组大鼠脊髓室管膜细胞 BrdU 阳性染色数量[(45.67 ± 3.62) 个]高于损伤不用药组[(29.91 ± 3.68) 个]。说明灵芝孢子能够促进大鼠受损伤脊髓中央管室管膜细胞增殖,少数增殖后的细胞能分化为神经干细胞、神经元样细胞、少突胶质样细胞和星形胶质样细胞。

2 单味中药

2.1 丹参 王勇等^[13]分离提取大鼠的骨髓间充质干细胞(MSCs),体外培养扩增。用含丹参的无血清的 L-DMEM 培养基进行诱导,发现大多数细胞转变为类似双极或多极神经元样形态,伸出轴突或树突样突起。免疫细胞化学显示诱导后的 MSCs 表现为 nestin, NSE, GFAP 染色阳性。

2.2 黄芪、红花 刘建军等^[14]将黄芪、红花、2 种中药注射液分别刺激培养的 NSCs,观察 NSCs 的分化状态。结果发现黄芪、红花有明显的促进 NSCs 分化的作用,其中黄芪效果最佳。另外黄芪还可以促进骨髓间充质干细胞向神经干细胞的分化^[15]。董立华等^[16]发现经黄芪诱导细胞分化为神经元或胶质细胞样细胞。

2.3 龟板 李伊为等^[17]观察龟板对大鼠脊髓损伤后 nestin 表达和后肢功能恢复的影响中发现脊髓损伤后第 1 d,在两

组受损伤脊髓灰质中都可见到 nestin 的表达;第 14 d 时达到高峰,龟板组为 38.24 ± 6.83 ,损伤组为 22.48 ± 7.83 ($P < 0.05$)。龟板组可使损伤的脊髓中 nestin 持续高表达至术后第 28 d,而损伤组仅持续高表达至术后 21 d。因此说明龟板可减轻神经损伤症状和促进脊髓损伤后神经干细胞的增殖。

2.4 淫羊藿 沈自尹等^[18]观察到淫羊藿及其提取物总黄酮(EF)能促进肾上腺皮质干细胞的增殖、迁移,采用基因芯片技术发现 EF 对皮质酮大鼠生长激素(GH)、生长激素释放激素(GHRH)及各类促生长因子如胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP)、神经生长因子(NGF)等具有显著上调作用。在自然衰老大鼠(肾虚证模型)发现 EF 能使多个组织的基因表达年轻化,也使老年大鼠下调的 GH, GHRH, IGFBP, NGF 等的表达上调。提示淫羊藿及其提取物对干细胞的作用可能是其拮抗糖皮质激素对下丘脑-垂体-肾上腺轴的抑制和延缓衰老的细胞学基础;也表明它可通过动员与提高激素、细胞因子水平激活内源性干细胞,发挥机体储备的潜力而治疗疾病。

3 中药成方

3.1 复方丹参注射液 孟凡刚等^[19]研究发现复方丹参注射液诱导体外培养的成年小鼠骨髓间质干细胞分化为神经样细胞,并且作用较为缓和,是较为理想的诱导剂。

3.2 脑灵汤 罗红波等^[20]研究发现脑灵汤(由杜仲、石菖蒲、补骨脂、红景天等 8 味药组成)对海马神经元形态和功能都有积极地促进作用,与保护脑组织海马神经元的完整性和促进神经元树突的生长密切相关,具有抗老年斑神经毒性和神经元保护作用。

3.3 脑络欣通 唐巍等^[21]研究不同浓度脑络欣通(黄芪、川芎、三七、蜈蚣等)药物血清可在一定程度上促进大鼠 NSC 生长,并均可诱导绝大多数 NSC 分化成神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。

3.4 脑溢安 罗杰坤等^[22]发现脑溢安血清干预缺氧损伤的神经干细胞,可上调 Akt 的磷酸化,减少缺氧的神经干细胞凋亡,发挥保护作用。

3.5 芪棱汤 周荣峰等^[23]从神经干细胞增殖分化的角度探讨益气养阴活血之芪棱汤对 SD 大鼠脑缺血再灌注后的脑神经保护作用,结果芪棱汤能够促进 nestin, 5-BrdU, GFAP 的表达。

4 分析与展望

目前国际上对干细胞的研究和应用日新月异,如体细胞重编程、干细胞定向分化等,但大多着眼于移植和克隆,而上述大量的研究均着眼于激活体内的干细胞,增强或调整干细胞的再生反应,通过药物激活内源性干细胞与从外部植入干细胞相比是全然不同的新思路。目前有关中药对神经干细胞(neural stem cell, NSC)影响的研究日益增多,的确它在治疗中枢神经系统疾病中占有一定优势,因为内源性 NSCs 是针对环境的变化调整增殖与分化的速度,而且这种潜力不局限于正在进行神经组织生成的区域,因此可以用各种干预

因素对其加以调整和改善,以期通过综合利用神经营养因子、针刺或电刺激、药物、康复治疗等促进 NSCs 的激活与增殖,并迁移至靶区进一步分化与整合。

神经干细胞一方面自我更新,维持干细胞池的稳定;另一方面,定向分化,补充凋亡的神经细胞,在自我更新和分化之间存在一种动态的平衡。神经干细胞的这些过程受到内部和外部因子的严格调控,如 JNK-STAT 信号通路诱导神经干细胞向胶质方向分化;而 notch 信号使干细胞处于自我更新的状态。研究表明,神经干细胞的内部因子也发挥重要作用,如胚胎早期的神经干细胞即使碰到胶质分化诱导因子(JNK-STAT 信号通路激活)也只能向神经元方向分化,只有胚胎中后期的神经干细胞,在外部信号 JNK-STAT 信号通路激活时,出现胶质分化。研究已表明,神经干细胞在胚胎早期和晚期相关基因的表现遗传修饰存在差别,决定了它对相同的外部信号反应有别。如上所述的中药干预神经干细胞的大量研究表明中药确有效果,但在机制研究上还十分缺乏,因此也就不能深入认识中药作用于神经干细胞的性质,这是今后应该深入研究的重点。

化学生物学是自 20 世纪 90 年代中期以来的新兴研究领域,化学生物学与传统的生物化学、分子生物学等相比,不同之处在于化学生物学使用小分子作为工具解决生物学的问题。简言之,化学生物学利用已知功能的小分子物质作为探针,如某个小分子具有诱导细胞凋亡的功能,但还不知其分子机制,因此深入研究它的作用机制,就有可能发现一条新的调控细胞凋亡的机制。由此可见,化学生物学是一种逆向思维的研究方法。上述如此众多的中药单体或复方均能调节神经干细胞的生物学行为,也就是发现了大量研究神经干细胞机制的小分子探针,这些中药中的小分子物质可以作为先导物质为神经干细胞的研究提供一种有效手段,显示了重大的研究意义及乐观的应用前景,显然这是一条中药介入和推动现代干细胞生物学研究,贡献于现代生命科学的重要途径。

[参考文献]

- [1] 崔荣太,蒲传强,刘洁,等. 人参皂苷对大鼠局灶性脑缺血脑组织神经干细胞增殖的影响[J]. 解放军医学杂志,2007,32(8):842.
- [2] 江琼,石永江. 人参皂苷 Rg₁ 对大鼠室管膜前下区神经干细胞的保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2009,35(10):748.
- [3] 李国栋,袁保梅,鄢文海,等. 人参皂苷 Rb₁ 对内源性 A β 所致小鼠神经细胞 Tau 蛋白过磷酸化的干预作用[J]. 山东中医药,2009,49(3):26.
- [4] 邬伟,闫峻,张艳梅,等. 人参皂苷 Rg₁ 诱导骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的作用[J]. 中风与神经疾病杂志,2007,24(3):282.
- [5] 施建生,高志伟,柯开富. 人参总皂苷对脑出血后内源

- 性神经干细胞增殖的影响[J]. 南通医学院学报, 2009,29(4):253.
- [6] 王莎莉,李英博,王亚平,等. 人参总皂苷对人胚胎神经干细胞增殖及定向诱导为多巴胺能神经元的影响[J]. 中国中药杂志, 2007,32(13):1310.
- [7] 王莎莉,李英博,王亚平,等. 人参总皂苷在神经干细胞移植治疗帕金森病模型小鼠中的作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(41):19.
- [8] 黄镇,金国华,张新化,等. 银杏内酯 B 对成年大鼠神经干细胞向神经元分化的促进作用[J]. 解剖学报, 2003,34(4):367.
- [9] 苏平,黄建华,雒晓东,等. 银杏内酯 B 对骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的影响[J]. 广东医学, 2007,28(1):33.
- [10] 于坚武. 银杏内酯预处理对拟 AD 大鼠海马 CA1 区神经元 NFT 和 ChAT 的影响[J]. 中国现代药物应用, 2008,2(5):1.
- [11] 李国栋,鄢文海,邢莹. 五味子酮对 APP 转基因鼠神经干细胞分化中 Tau 蛋白过磷酸化水平的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(23):4490.
- [12] 丁英,曾园山,马钦桃,等. 灵芝孢子对大鼠受损伤的脊髓神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004,24(1):65.
- [13] 王勇,陆长青,王凡,等. 丹参诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(2):207.
- [14] 刘建军,姚忠祥,秦茂林,等. 单味黄芪红花丹参注射液对神经干细胞分化影响的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2006,28(14):1470.
- [15] 王新生,崔慧先,马海东,等. 黄芪诱导骨髓间充质干细胞向神经干细胞分化[J]. 解剖学杂志, 2007, 30(5):534.
- [16] 董立华,王勇,陆长青,等. 黄芪诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的研究[J]. 四川大学学报, 2007,38(3):417.
- [17] 李伊为,崔晓军,陈东风,等. 龟板对脊髓损伤大鼠神经干细胞的作用[J]. 神经解剖学杂志, 2003, 19(3):321.
- [18] 沈自尹,黄建华,吴斌,等. 淫羊藿激活内源性干细胞及其机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(3):251.
- [19] 孟凡刚,吴承远,刘兆华,等. 丹参诱导成年小鼠骨髓基质干细胞分化为神经细胞研究[J]. 上海中医药杂志, 2005,39(10):47.
- [20] 罗红波,何明大. 脑灵汤对 AD 模型大鼠学习记忆及海马内老年斑的影响[J]. 中国行为医学科学, 2005, 14(7):599.
- [21] 唐巍,王键,陈业农,等. 脑络欣通药物血清对大鼠胚胎神经干细胞生长分化的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2007,30(1):32.
- [22] 罗杰坤,黎杏群,刘伯炎,等. 脑溢安对大鼠缺氧神经干细胞丝氨酸/苏氨酸激酶磷酸化的影响[J]. 中南大学学报, 2004,29(6):697.
- [23] 周荣峰,赵喜连,邓茜,等. 芪棱汤对脑缺血后神经干细胞增殖分化作用的研究[J]. 中国中医急症, 2009, 18(10):1650.

[责任编辑 邹晓翠]