

当归枸杞制剂诱导脐血单个核细胞分化为肝细胞后人白蛋白的表达**

傅京力^{1,2}, 曾妍³, 龙则灵¹, 唐晓鹏¹

Angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparations induce the differentiation of cord blood mononuclear cells into hepatocytes: Expression of human albumen

Fu Jing-li^{1,2}, Zeng Yan³, Long Ze-ling¹, Tang Xiao-peng¹

Abstract

BACKGROUND: Some traditional Chinese medicine can promote the differentiation and growth of human hematopoietic stem cells.

OBJECTIVE: To observe the promotion effect of angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparation for the differentiation of human umbilical cord blood stem cells (HUCBSCs) into hepatocytes *in vitro* and *in vivo*.

METHODS: HUCBSCs were separated and cultured in different doses of angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparation to screen the suitable dosage for HUCBSCs growth. Albumen mRNA and alpha fetoprotein mRNA expression were detected by RT-PCR. The liver failure models of rats were established after D-aminogalactose was injected intraperitoneally. The survival rats with acute hepatic injury were randomly divided into eight groups to detect the changes of liver function.

RESULTS AND CONCLUSION: 90 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels and 40 mg/L lycium chinense mill preparation was suitable for HUCBSCs proliferation and differentiation. Both angelica sinensis(oliv.) diels and lycium chinense mill preparation could promote and speed up the differentiation of HUCBSCs into hepatocytes, and the former one was superior to the latter one. However, there was no synergistic effect. The difference between groups treated with/without cyclophosphamide was not obvious.

Fu JL, Zeng Y, Long ZL, Tang XP. Angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparations induce the differentiation of cord blood mononuclear cells into hepatocytes: Expression of human albumen. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(45): 8418-8423. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 部分中药能够促进造血干细胞的生长及分化。

目的: 观察当归、枸杞制剂促进人脐血单个核细胞生长分化为肝细胞的作用、作用条件及对肝衰竭的治疗效果。

方法: 分离人脐血单个核细胞, 加入不同剂量的当归及枸杞制剂, 比较不同剂量当归及枸杞制剂对脐血单个核细胞及其转化为肝细胞后人白蛋白 mRNA 及人甲胎蛋白 mRNA 表达的影响。腹腔内注射 D-氨基半乳糖建立大鼠肝衰竭模型, 随机分为生理盐水对照组、脐血单个核细胞组、脐血单个核细胞与当归、枸杞制剂灌胃和腹腔内注射免疫抑制剂不同组合 8 组, 检测大鼠肝功能变化。

结果与结论: 90 mg/L 当归、40 mg/L 枸杞制剂可促进单个核细胞的增殖和分化, 并加快脐血单个核细胞分化为肝细胞, 两者联合无药物协同作用。单独应用当归与枸杞对大鼠肝损伤均有一定的修复作用, 与单个核细胞联合均可促进单个核细胞向肝细胞分化, 增强修复肝损伤的作用, 并且当归的修复效果优于枸杞。加用环磷酰胺后并不能增强当归或枸杞联合单个核细胞的治疗效果。

关键词: 当归; 枸杞; 脐血; 单个核细胞; 细胞分化; 肝细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.45.013

傅京力, 曾妍, 龙则灵, 唐晓鹏. 当归枸杞制剂诱导脐血单个核细胞分化为肝细胞后人白蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(45):8418-8423. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

大量的研究证实干细胞在一定的条件下可以分化为各种体细胞。现在已知骨髓、胎儿肝脏及脐血中均含有大量的干细胞^[1-2], 骨髓及胎儿肝脏来源较为困难, 而脐血来源丰富, 容易采集。

已有实验证实人脐血干细胞可以分化为有功能的肝细胞^[3-5], 因此利用脐血干细胞移植治疗重型肝炎, 具有很好的应用前景。但脐血中干细胞含量较少, 转化为肝细胞所需时间较长, 因此作者拟寻求促使脐血干细胞更快、更多地

转化为肝细胞, 进一步提高临床治疗效果的新途径。

脐血中含有丰富的造血干/祖细胞和间充质干细胞, CD34⁺细胞所占比例与骨髓相似, 高于外周血, 占有核细胞的1%~3%。脐血中的造血干/祖细胞较骨髓干细胞更为原始, 其早期造血前体细胞 CD34⁺CD38⁻ 和 CD34⁺Thy-Lin⁻ 细胞亚群比例高于骨髓和外周血, 具有更强的增殖和分化能力。脐血中的T淋巴细胞较原始, 缺乏T淋巴细胞活化/生长因子, 抗原表达弱且不充分, 自然杀伤细胞活性较弱, 且存在CD4⁺CD45RA⁺抑制淋巴细胞, 因此淋巴细胞毒性低, 发生排异反应少。

Correspondence to: Tang Xiao-peng, Doctor, Professor, Second Xiangya Hospital/Institute of Hepatology, Central South University, Changsha 410011, Hunan Province, China tangxiaopeng2008@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 39870651*; the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 04JJ6048*

Received: 2011-04-16 Accepted: 2011-05-19

中药治疗肝炎已取得了一定的成绩, 在降低转氨酶、保护肝细胞、降低血胆红素水平、增强免疫功能方面均取得了很好的疗效, 目前已有大量的实验及临床资料均显示部分中药能够促进造血干细胞的生长及分化。枸杞为主要的补阴药, 具有滋补肝肾、益精明目的作用。当归为伞形科当归属一种多年生草本植物, 是中国一味常用中药材, 药用历史悠久, 历代本草均有记载, 始记于《神农本草经》谓之“当归味温, 主呃逆上气”被列为中品。有补血、和血、调经止血、润肠滑肠之功效, 为医家常用, 素有“十方九归”之称。

本实验拟观察当归、枸杞制剂对脐血单个核细胞生长分化为肝细胞的作用、作用特点、作用条件以及对大鼠肝损伤的影响。

1 材料和方法

设计: 随机分组细胞学观察实验。

时间及地点: 于2006/2008在中南大学湘雅二医院完成。

材料: 成年SD大鼠140只, 雌雄各半, 体重(250±50) g, 购自中南大学湘雅二医院实验动物中心, 动物许可证号: SCXK湘2006-0001。30%枸杞多糖购自上海康舟真菌多糖有限公司, 用PBS配制成不同浓度。当归注射液购自北京第四制药厂, 每支装2 mL, 相当于当归生药20 g, 用L-DMEM配制成不同浓度。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清、DMEM	Gibco, 美国
D-氨基半乳糖	Sigma 公司
碱性成纤维细胞生长因子及人肝细胞生长因子	Preprotech, 美国
AFP 鼠抗人单克隆抗体(即用型)	福州迈新
ALB 兔抗人多克隆抗体(浓缩型, 用前稀释至 1:200)	DAKO 公司
Rnasin Ribonuclease Inhibitor、M-MLV Reverse Transcriptase	Promega 德国
TaqDNA 聚合酶、10×Buffer、随机引物、dNTP(10 mmol/L)、DNA 分子量标准	天为公司

人脐血来源: 经医院医学伦理委员会批准, 采集30岁以下健康、无急慢性疾病、无传染病、抗HIV及乙、丙肝血清学标志物检测阴性的剖宫产妇产血, 产妇及其家属对实验知情同意, 并签署知情同意书。采血前新鲜配制肝素钠生

理盐水溶液100 mL, 浓度为125 U/mL。戴无菌手套, 将采血袋内原有的抗凝剂引出, 抽取肝素钠液20 mL注入采血袋中。新生儿产出后立即在距脐轮5~7 cm处钳夹结扎脐带并切断, 行脐静脉穿刺直至无脐血流出为止。采血完毕后置冰盒内运输至实验室备用。

实验方法:

分离脐血单个核细胞: 采用密度梯度离心及免疫磁珠分选法分离人CD133⁺脐血单个核细胞, 细胞计数, 将细胞稀释后种瓶(细胞数 1×10^8)。

脐血单个核细胞分组培养: 以0.1%明胶液包被培养瓶, 种瓶后置37 °C、体积分数5%CO₂培养箱内培养。细胞接种后24 h内不宜移动培养瓶。首次换液时间四五天。每次换液只更替1/2液体。当原代细胞生长至30 d左右, 生长良好的细胞可见集落形成并开始融合, 当融合达80%时, 用0.25%新鲜配制的胰酶将细胞消化传代。

将消化好的细胞种入培养板中, 每孔中培养基均含胎牛血清、L-DMEM、人碱性成纤维细胞生长因子20 μg/L、谷氨酰胺1 mmol/L: ①对照组, 不加观察药物。②当归初筛实验取3组, 分别加当归30, 90, 180 mg/L当归。③枸杞初筛实验取3组, 分别加入10, 40, 80 mg/L枸杞。④干细胞分化实验取3组, 均加入肝细胞生长因子10 μg/L。药物初筛实验显示中等剂量较有利于细胞生长分化, 因此3组中分别加入当归90 mg/L, 枸杞40 mg/L, 当归90 mg/L+枸杞40 mg/L。分别取原代培养7, 10, 14, 21, 28 d的细胞进行观察, 观察细胞形态、活性, 随机选取5个视野(×250)取均数进行计数, 并摄片。取传至三四代的脐血单个核细胞进行药物实验。

免疫细胞化学检测: 以多聚赖氨酸包被玻片, 用0.25%胰蛋白酶消化细胞, 接种至多聚赖氨酸包被的盖玻片上, 5 d后行免疫组织化学检测。盖玻片上的细胞用80%丙酮固定15 min后, 常规方法进行甲胎蛋白、白蛋白免疫细胞化学检测。

RT-PCR检测: 分别取培养6, 12, 20 d的细胞进行RT-PCR甲胎蛋白 mRNA和白蛋白 mRNA, 跑胶后照相, 并用凝胶定量系统软件Quantity one分析得出各组细胞的甲胎蛋白 mRNA、白蛋白 mRNA表达的相对定量。

大鼠肝衰竭模型的制备: 取SD大鼠, 用D-氨基半乳糖0.5 g/kg, 即每只0.14 g一次性腹腔内

¹ 中南大学湘雅二医院肝病中心, 中南大学肝病研究所, 湖南省长沙市410011; ² 株洲市一医院感染内科, 湖南省株洲市412000; ³ 湖南省劳动卫生职业病防治研究所附属医院, 湖南省长沙市410007

傅京力, 男, 1979年生, 湖南省湘潭市人, 汉族, 2003年中南大学湘雅医学院毕业, 主治医师, 主要从事传染病研究。12832333@QQ.com

通讯作者: 唐晓鹏, 教授, 博士, 中南大学湘雅二医院肝病中心, 中南大学肝病研究所, 湖南省长沙市410011 tangxiaopeng2008@163.com

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2011)45-08418-06

收稿日期: 2011-04-16
修回日期: 2011-05-19
(20110307004/GW-W)

注射, 48 h后肝衰竭模型建立。

分离新生鼠血干细胞: 取怀孕即将分娩的SD大鼠分笼观察, 待分娩后取刚出生的幼鼠作为新生鼠。由于大鼠个体太小, 无法采集脐血。而脐血实际上就是新生儿外周血, 因此用刚出生的新生大鼠断头取血代替脐血, 分离单个核细胞代替大鼠脐血干细胞。应用淋巴细胞分离液以常规方法分离新生大鼠血单个核细胞并计数。将细胞稀释至 $1 \times 10^{10} L^{-1}$ 备用。

实验动物分组: 将48 h后仍存活的肝衰竭大鼠随机分组, 每组12只。

实验分组:

分组	处理方式
对照组	给予鼠尾静脉注射 1 mL 生理盐水
单个核细胞组	经鼠尾静脉注射 1 mL 鼠血单个核细胞
当归组	给予 20%当归制剂 2 mL 灌胃
细胞+当归灌胃组	经鼠尾静脉注射 1 mL 鼠血单个核细胞+当归制剂 2 mL 灌胃
当归+环磷酸腺苷组	经鼠尾静脉注射 1 mL 鼠血单个核细胞+当归制剂 2 mL 灌胃+环磷酸腺苷腹腔内注射
枸杞组	给予 30%枸杞多糖制剂 2 mL 灌胃
细胞+枸杞灌胃组	经鼠尾静脉注射 1 mL 鼠血单个核细胞+枸杞制剂 2 mL 灌胃
枸杞+环磷酸腺苷组	经鼠尾静脉注射 1 mL 鼠血单个核细胞+枸杞制剂 2 mL 灌胃+环磷酸腺苷腹腔内注射

第7天将仍存活的实验鼠摘眼取血检测肝功能。

主要观察指标: ①不同剂量当归及枸杞制剂对脐血单个核细胞及其转化为肝细胞后人白蛋白mRNA及人甲胎蛋白mRNA表达的影响。②当归及枸杞制剂对肝衰竭大鼠肝功能的影响。

统计学分析: 由第一作者采用SSPS 13.0软件进行统计处理, 组间比较行独立样本t 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 不同剂量当归、枸杞对脐血单个核细胞生长的影响

当归组: 低剂量和中等剂量组细胞形态正常, 生长活性好, 见图1, 高剂量组细胞早期生长活性好, 但极易老化, 无法进行传代扩增; 初步观察显示中等及高剂量的当归制剂均可以促进脐血单个核细胞的增殖, 见表1, 但是后者易导致细胞老化; 而低剂量的药物对细胞无明显作用。

枸杞组: 各剂量组均生长良好, 见图2, 中等及高剂量组均可促进脐血单个核细胞的增殖, 见表1, 但以中等剂量更显著。但总体作用较微弱, 低剂量的药物对细胞无明显作用。

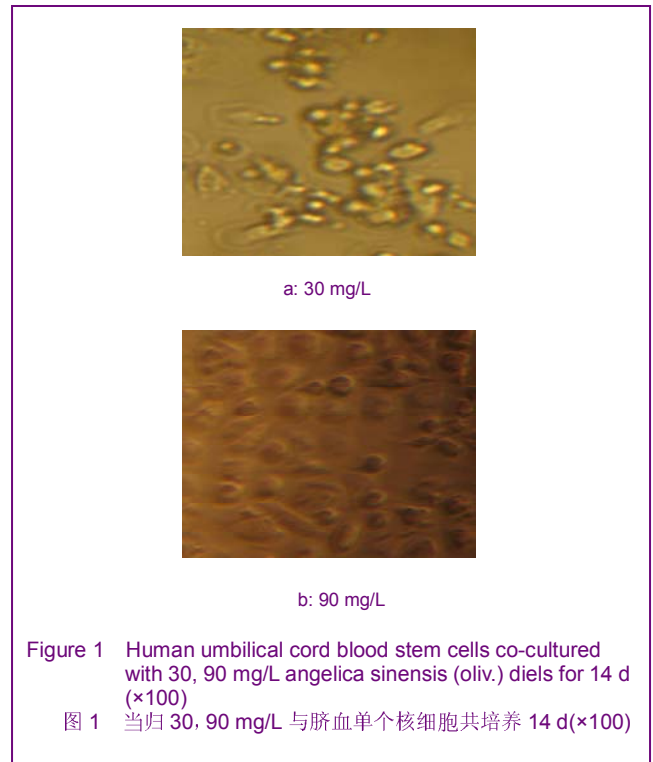


Figure 1 Human umbilical cord blood stem cells co-cultured with 30, 90 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels for 14 d ($\times 100$)
图 1 当归 30, 90 mg/L 与脐血单个核细胞共培养 14 d($\times 100$)

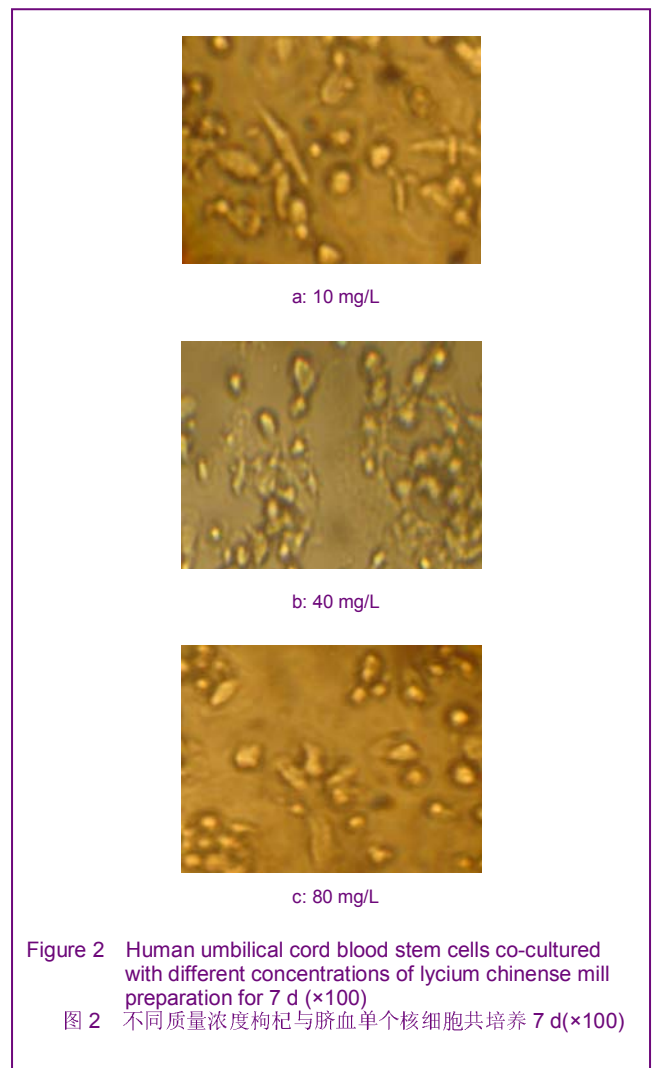


Figure 2 Human umbilical cord blood stem cells co-cultured with different concentrations of lycium chinense mill preparation for 7 d ($\times 100$)
图 2 不同质量浓度枸杞与脐血单个核细胞共培养 7 d($\times 100$)

表 1 不同剂量当归、枸杞对脐血单个核细胞生长的影响
Table 1 Effect of different concentrations of angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparation on cell growth ($\bar{x} \pm s$, cells)

Group	7 d	10 d	14 d	21 d	28 d
A	14.4±1.4	19.2±1.0	30.0±3.0	55.6±1.4	70.2±2.4
B	13.8±1.8	19.8±1.8	31.4±1.4	56.6±1.4	71.6±1.4
C	18.4±1.4 ^a	30.4±1.4 ^a	56.0±2.5 ^a	90.4±1.4 ^a	113.4±1.4 ^a
D	17.4±1.4 ^a	29.6±1.4 ^a	51.8±1.8 ^a	87.6±1.4 ^a	100.0±2.0 ^a
E	14.2±1.6	19.4±1.4	28.4±1.4	57.4±1.4	70.0±2.0
F	15.6±1.4 ^a	24.8±1.0 ^a	42.4±1.4 ^a	70.6±1.4 ^a	90.0±2.0 ^a
G	15.2±1.0	23.6±1.9 ^a	40.4±1.4 ^a	61.4±1.4 ^a	75.8±1.8 ^a

A: control group; B: 30 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels group; C: 90 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels group; D: 180 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels group; E: 10 mg/L lycium chinense mill preparation group; F: 40 mg/L lycium chinense mill preparation group; G: 80 mg/L lycium chinense mill preparation group; ^a $P < 0.05$, vs. control group

2.2 当归、枸杞制剂对脐血单个核细胞分化为肝细胞的影响 各组细胞白蛋白免疫组织化学染色见图3。

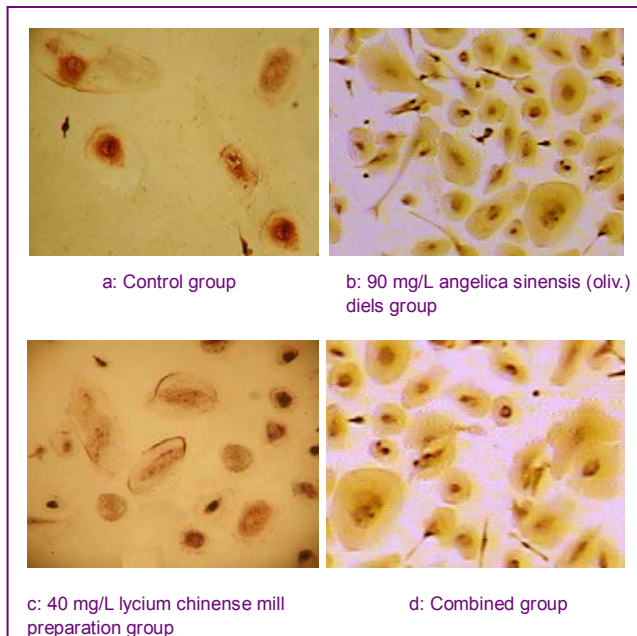


Figure 3 Immunohistochemical staining results of albumin after treated with angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparation ($\times 400$)

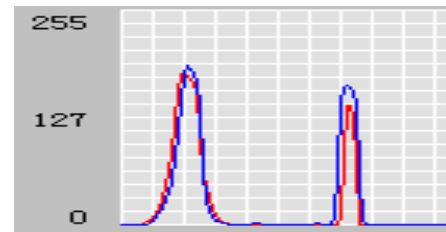
图 3 当归与枸杞干预后各细胞白蛋白免疫组织化学染色结果($\times 400$)

当归 90 mg/L 组细胞白蛋白免疫组织化学染色阳性细胞数 8.70 ± 1.61 、枸杞 40 mg/L 组细胞白蛋白免疫组织化学染色阳性细胞数 7.00 ± 1.42 及同时加入当归和枸杞的联合组细胞表达肝细胞的特征产物白蛋白的量 7.50 ± 1.97 均明显高于对照组 4.70 ± 1.42 ($P < 0.05$)。但联合用药并不能增加白蛋白的表达。

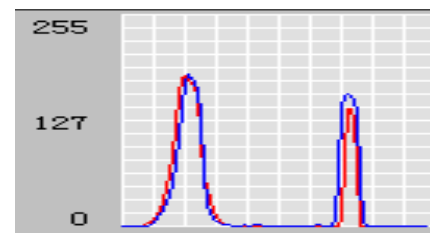
2.3 RT-PCR 检测当归、枸杞干预后细胞白蛋白 mRNA、甲胎蛋白 mRNA 的表达

加入当归 90 mg/L 组、枸杞 40 mg/L 组细胞白蛋白 mRNA、甲胎蛋白 mRNA 的表达优于对照组；两组联合用药并不能显著增

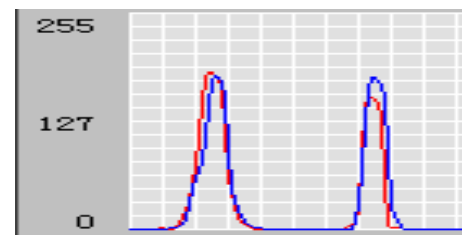
加这些蛋白的表达。图 4 显示加入当归、枸杞及两者合用后白蛋白随着时间延长而表达增加，上述密度曲线表明加药培养后的细胞表达白蛋白在时间上早于对照组细胞，这说明当归和枸杞均可以缩短脐血单个核细胞向肝细胞分化的周期。



a: 90 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels group



b: 40 mg/L lycium chinense mill preparation group



c: 90 mg/L angelica sinensis (oliv.) diels + 40 mg/L lycium chinense mill preparation group

Figure 4 Comparison of albumin mRNA expression in angelica sinensis (oliv.) diels and lycium chinense mill preparation group for 12 d (blue) and model control group for 20 d (red): the former curve is the relative density of β -actin; the latter is the relative density of albumin mRNA

图 4 当归、枸杞干预 12 d 与未加药培养 20 d 细胞白蛋白 mRNA 的比较

2.4 枸杞与当归对肝衰竭大鼠肝功能的影响

用药第 7 天时对照组 4 只大鼠、当归组 1 只大鼠及枸杞组 2 只大鼠死亡，其余各实验组大鼠均未死亡。治疗前各组大鼠各项指标差异无显著性意义 ($P > 0.05$)，具有可比性。治疗后第 7 天各组存活大鼠肝功能改变见表 2。

当归组丙氨酸转氨酶及天冬氨酸转氨酶下降幅度大于对照组，但差异不明显 ($t = 1.294, 1.654; P = 0.213, 0.116$)。总胆红素下降幅度明显优于对照组 ($t = 2.281, P = 0.036$)。枸杞组上述指标下降幅度也大于对照组，但差异均不明显 ($t = 1.419, 1.739, 1.926; P = 0.175, 0.101, 0.072$)。其余各组丙氨酸转氨酶及天冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度均明显优于对照组 (P 均 < 0.01)。

表2 枸杞与当归对肝衰竭大鼠肝功能的影响
Table 2 Effect of lycium chinense mill preparation and angelica sinensis (oliv.) diels on liver function (x±s)

Group	Before treatment		
	ALT (μkat/L)	AST (μkat/L)	TBIL (μmol/L)
A	574.6±209.7	650.4±192.4	18.5±14.9
B	596.6±207.8	689.9±159.0	14.83±8.0
C	638.0±203.1	672.3±212.0	15.90±6.4
D	566.8±259.0	708.4±135.3	19.00±6.8
E	565.7±189.6	701.9±217.6	18.10±6.3
F	583.1±198.1	759.7±143.4	14.60±3.9
G	604.3±232.2	746.8±177.0	16.70±5.7
H	596.9±198.6	717.4±250.0	19.10±8.3

Group	7 d after treatment		
	ALT (μkat/L)	AST (μkat/L)	TBIL (μmol/L)
A	281.3±188.5	326.8±156.0	10.5±2.8
B	103.5±33.2	130.5±45.9	6.0±1.7
C	195.5±98.6	221.0±123.0	7.8±2.3
D	64.1±36.0	67.5±56.5	4.1±1.7
E	58.8±30.3	78.8±47.5	3.8±2.0
F	192.1±59.8	226.0±87.1	8.3±2.1
G	72.8±24.6	93.4±52.0	6.3±1.8
H	93.7±47.7	114.3±64.3	5.6±3.1

A-H: control group, Mononuclear group, Angelica sinensis (oliv.) diels group, Cells+Angelica sinensis (oliv.) diels group, Angelica sinensis (oliv.) diels+Cyclophosphamide group, Lycium chinense mill preparation, Cells+ Lycium chinense mill preparation group, Lycium chinense mill preparation+Cyclophosphamide group

细胞+当归组丙氨酸转氨酶、天门冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度明显优于当归组($t=4.320, 3.902, 4.461; P=0, 0.001, 0$); 也明显优于单个核细胞组($t=2.790, 2.998, 2.689; P=0.011, 0.007, 0.013$)。但与当归+环磷酰胺组比较差别不明显(P 均 > 0.05)。

细胞+枸杞组丙氨酸转氨酶、天门冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度明显优于枸杞组($t=6.323, 4.424, 2.420; P=0, 0, 0.025$); 丙氨酸转氨酶下降也明显优于单个核细胞组($t=2.573, P=0.017$)。细胞+枸杞组天门冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度虽然大于单个核细胞组, 但差异不明显($t=1.853, 0.437; P=0.077, 0.666$); 其与枸杞+环磷酰胺组比较差别也不明显(P 均 > 0.05)。细胞+当归组细胞与+枸杞组丙氨酸转氨酶、天门冬氨酸转氨酶下降幅度比较差别不明显($t=0.694, 1.169; P=0.495, 0.255$)。但细胞+当归组总胆红素下降幅度明显优于细胞+枸杞组($t=3.079, P=0.005$)。

3 讨论

Lin及Moon等^[6-7]发现人脐血干细胞移植可以减轻化学药物引起的大鼠肝纤维化, 可以产生白蛋白、肝细胞生长因子等。Jung等^[8]用四氯化碳建立大鼠肝硬化, 然后输入人脐血干细胞, 认为可以改善肝硬化大鼠的胰岛素抵抗, 稳定血糖水平。Kakinuma 等及作者研究^[9-10]

发现经过21 d的培养后, 约50%的人脐血单个核细胞在含重组人肝细胞生长因子等的培养基中可以表达白蛋白。这些白蛋白阳性脐血单个核细胞还同时表达其他肝细胞标志并且能够在上述培养基中扩增。脐血干细胞在体内及体外可分化为有肝细胞功能的细胞, 减轻大鼠的肝脏损伤。Newsome等^[11]将未分类的人脐血干细胞经皮下注入已经放射破坏了免疫系统的NOD-SCID鼠体内, 发现脐血干细胞可以移植到NOD-SCID鼠的肝脏并成为成熟的肝细胞, 认为脐血干细胞可以在体内分化为肝细胞。

实验显示当归多糖能加快血虚动物骨髓有核细胞DNA的合成, 增加骨髓有核细胞数量, 提高骨髓造血细胞的总量, 并刺激造血干/祖细胞集落形成, 加快血细胞的分化与成熟, 促进血虚动物外周血细胞数量恢复正常^[12]。临床观察显示当归补血汤治疗白细胞减少症有效率达91.2%^[13]。实验显示枸杞对辐射损伤小鼠造血功能恢复具有较好的效果^[14], 这些实验均提示当归、枸杞对造血细胞生长具有正向调节作用。

作者对中药促进人脐血单个核细胞生长的效果进行了初步的药物筛选, 实验结果显示当归、枸杞均有促细胞增殖作用。本实验对中药当归、枸杞调节人脐血单个核细胞生长、分化及其对大鼠肝衰竭的治疗效果进行了更深入的研究。结果显示不同剂量的当归、枸杞制剂对细胞的生长影响程度是不同的, 剂量过低对细胞的增殖生长无明显作用亦无明显毒副作用, 而剂量过高则反而对细胞有毒性甚至加速细胞的凋亡, 这可能是因为中药成分并不单一且其中每一种成分的作用不是很清楚。因此合适的药物剂量是非常重要的。

本实验细胞分化结果显示当归、枸杞制剂均能增加人脐血单个核细胞表达肝细胞特征产物白蛋白、白蛋白mRNA、甲胎蛋白 mRNA, 加快人脐血单个核细胞表达白蛋白的时间, 提示当归、枸杞可以促进人脐血单个核细胞向肝细胞的分化及缩短其向肝细胞分化的时间。但两者联合用药并不优于各药单用, 提示两者并无协同或相加的作用。

本实验显示各实验组及对照组肝损伤大鼠7 d后肝功能均有明显改善, 提示肝细胞具有一定程度的自我修复及再生功能。加用当归后大鼠总胆红素下降幅度优于对照组, 但丙氨酸转氨酶及天冬氨酸转氨酶下降幅度差异不明显。提示当归对大鼠肝损伤有一定修复作用, 但疗效有限。枸杞组与对照组大鼠肝功能改善程度差别不明显, 提示单用枸杞对大鼠肝损伤的修复作用不明显。单个核细胞组大鼠丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度均明显优于对照组, 提示单个核细胞能促进大鼠肝损伤修复、减轻肝脏损害。当归+细胞组丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度明显优于单个核细胞组, 提示当归能促进单个核细胞向

肝细胞的分化, 增强单个核细胞移植治疗大鼠肝损伤的作用。枸杞+细胞组丙氨酸转氨酶下降明显优于单个核细胞组, 而天冬氨酸转氨酶及总胆红素下降幅度虽然大于单用干细胞治疗组, 但差异不明显。提示枸杞仅能在一定程度上增强干细胞移植治疗大鼠肝损伤的作用。细胞+当归组丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶下降幅度与细胞+枸杞组比较差别不明显, 但总胆红素下降幅度明显优于细胞+枸杞组, 提示当归促进促进单个核细胞向肝细胞的分化及增强单个核细胞移植治疗大鼠肝损伤的作用稍强于枸杞。加用环磷酸胺后并不能增强当归或细胞+枸杞的治疗效果, 提示在干细胞移植7 d内免疫排斥反应不明显。

本实验结果显示当归、枸杞能够促进人脐血单个核细胞向肝细胞分化, 缩短细胞诱导分化时间并能增强单个核细胞移植治疗肝损伤的效果。当归、枸杞诱导干细胞分化的可能机制是其具有清除氧自由基、超氧阴离子的作用, 从而抗氧化、抗损伤、保护细胞膜、刺激骨髓基质细胞的增殖, 促进其分泌细胞因子和白细胞介素, 通过直接或间接影响造血干细胞的生物学特征而实现对造血系统的正向调节。作者利用当归、枸杞促进脐血单个核细胞生长分化为肝细胞, 提高干细胞移植治疗肝衰竭的效果, 为利用中药治疗重型肝炎提供新思路。但其确切机制仍有待于进一步研究, 由于药物在动物和体外的效果与人体内的治疗效果可能有差异, 因此当归、枸杞对脐血干细胞移植治疗肝衰竭的效果仍有待于进一步临床研究证实。

4 参考文献

- [1] Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif.* 2011;44 Suppl 1:60-69.
- [2] Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells.* 2003;21:105-110.
- [3] Yang SE, Ha CW, Jung MH, et al. Mesenchymal stem/progenitor cells developed in cultures from Umbilical Cord blood. *Cytotherapy.* 2004;6:476-480.
- [4] Sellamuthu S, Manikandan R, Thiagarajan R, et al. In vitro trans-differentiation of human umbilical cord derived hematopoietic stem cells into hepatocyte like cells using combination of growth factors for cell based therapy. *Cytotechnology.* 2011;63(3):259-268.
- [5] Kim S, Kim HS, Lee E, et al. In vivo hepatic differentiation potential of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Int J Mol Med.* 2011;27(5):701-706.
- [6] Lin SZ, Chang YJ, Liu JW, et al. Transplantation of human Wharton's Jelly-derived stem cells alleviates chemically induced liver fibrosis in rats. *Cell Transplant.* 2010;19(11):1451-1463.
- [7] Moon YJ, Yoon HH, Lee MW, et al. Multipotent progenitor cells derived from human umbilical cord blood can differentiate into hepatocyte-like cells in a liver injury rat model. *Transplant Proc.* 2009;41(10):4357-4360.
- [8] Jung KH, Uhm YK, Lim YJ, et al. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells improve glucose homeostasis in rats with liver cirrhosis. *Int J Oncol.* 2011;39(1):137-143.
- [9] Kakinuma S, Tanaka Y, Chinzei R, et al. Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells.* 2003;21(2):217-227.
- [10] Tang XP, Zhang M, Yang X, et al. Differentiation of human umbilical cord blood stem cells into hepatocytes in vivo and in vitro. *World J Gastroenterol.* 2006;12(25):4014-4019.
- [11] Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, et al. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology.* 2003;124(7):1891-1900.
- [12] Ning L, Chen CX, Jin RM, et al. *Zhongguo Zhongyao Zazhi.* 2002;27(1):50-53. 宁炼, 陈长勋, 金若敏, 等. 当归补血汤促进造血功能的成分及其作用的研究[J]. *中国中药杂志.* 2002;27(1):50-53.
- [13] Zheng TY, Ke WX. *Zhongguo Hangtian Yiyuan Zazhi.* 2001;3(6):21. 郑通勇, 柯文祥. 当归补血汤治疗白细胞减少症[J]. *中国航天医药杂志.* 2001;3(6):21.
- [14] Qiu SC, Li ZS, Wang YP. *Binzhou Yixueyuan Xuebao.* 2000;23(5):634-635. 邱世翠, 李宗山, 王运平. 枸杞对辐射损伤小鼠造血功能恢复的影响[J]. *滨州医学院学报.* 2000;23(5):634-635.

来自本文课题的更多信息一

基金资助: 国家自然科学基金项目(39870651); 湖南省自然科学基金项目(04JJ6048)。

作者贡献: 唐晓鹏进行实验设计, 实施为曾妍及傅京力, 评估为傅京力及曾妍, 资料收集为曾妍及龙则灵, 傅京力及曾妍成文, 唐晓鹏审校, 唐晓鹏对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 经中南大学湘雅二医院伦理委员会批准, 实验过程中对大鼠处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 以“脐血, 干细胞, 肝细胞, 当归, 枸杞”为关键词检索 CNKI 数据库 2001-01/2011-05 文章, 检索到当归与脐血干细胞相关文献 2 篇, 枸杞与脐血干细胞相关文献 1 篇, 尚未检索到当归/枸杞与脐血干细胞及肝细胞相关的文献。实验观察当归、枸杞制剂对脐血单个核细胞生长分化为肝细胞的作用及特点、作用条件以及对大鼠肝损伤的影响。