

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.01.022 [http://www.crter.org]

富文俊, 敖海清, 曾蕾, 徐志伟. 中药干预对创伤性应激障碍大鼠海马区移植间充质干细胞的保护作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(1):137-141.

中药干预对创伤性应激障碍大鼠海马区移植间充质干细胞的保护作用***☆

富文俊¹, 敖海清¹, 曾蕾², 徐志伟¹

1 广州中医药大学基础医学院, 广东省广州市 510006

2 广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 骨髓间充质干细胞具有自我更新和多向分化的潜能, 将其移植于受损神经组织, 可以实现神经组织的再生和修复, 被广泛应用于多种神经损伤及退行性病变的治疗研究。
- 2 本综述增加的新信息: 分析了骨髓间充质干细胞移植在神经组织的再生和修复领域的研究现状, 提出将其应用于创伤后应激障碍这一疾病领域以修复受损海马具有较好的理论及实践基础。而困扰相关研究的一个主要难题是移植后的干细胞存活率较低, 直接限制了此类研究的进一步深入。
- 3 临床应用的意义: 调肝方药逍遥散在抗应激损伤领域的研究证实其对损伤海马具有较好的修复作用, 如果将干细胞移植与中药干预有机结合, 优势互补, 预期在创伤后应激障碍的临床治疗上可以有较大突破。

关键词:

干细胞; 干细胞综述; 创伤后应激障碍; 间充质干细胞; 移植; 海马; 国家自然科学基金

摘要

背景: 骨髓间充质干细胞移植修复损伤海马具有较高的研究潜力, 但是目前移植后干细胞的成活率较低这一问题尚未得到有效解决。

目的: 综述中药干预对创伤性应激障碍大鼠海马区移植间充质干细胞的保护作用。

方法: 应用计算机检索 2000 年 1 月至 2012 年 1 月 PubMed 数据库相关文章, 检索词为“mesenchymal stem cells, transplantation, survival, post-traumatic stress disorder (PTSD), hippocampus”, 并限定文章语言种类为 English, 同时检索 2000 年 1 月至 2012 年 1 月 CNKI 数据库相关文章, 检索词为“间充质干细胞, 移植, 存活率, 创伤后应激障碍, 海马”, 并限定文章语言种类为中文; 共检索文献 109 篇。最终纳入符合标准的文献 23 篇。

结果与结论: 创伤后应激障碍作为一种由生物、心理、社会等多种因素作用的复杂疾病, 治疗是亟待解决的问题, 中医药在此领域具有独特的优势。创伤后应激障碍所造成的海马损伤可以通过骨髓间充质干细胞移植进行修复, 运用调肝方药逍遥散干预, 预期可有效提高移植干细胞的存活率。

Protective effects of traditional Chinese medicine on mesenchymal stem cells transplanted into the hippocampus of rats with post-traumatic stress disorder

Fu Wen-jun¹, Ao Hai-qing¹, Zeng Lei², Xu Zhi-wei¹

1 School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

2 First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

富文俊☆, 男, 1981 年生, 山西省人, 汉族, 2009 年广州中医药大学毕业, 博士, 讲师, 主要从事中医诊断学的教学及情志致病机理的研究。
fuqingzhu2006@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2013)01-00137-05

收稿日期: 2012-02-10

修回日期: 2012-04-17

(20120210006/WL *S)

Fu Wen-jun☆, M.D., Lecturer,
School of Basic Medical
Sciences, Guangzhou
University of Traditional
Chinese Medicine, Guangzhou
510006, Guangdong Province,
China
fuqingzhu2006@
163.com

Supported by: the Natural
Science Foundation of China,
No.81173144*; Innovation
Foundation Program of
Guangzhou University of
Traditional Chinese Medicine,
No. K0100071*; a grant from
Funds for Key Laboratory of
Higher Education Institutes of
Guangdong Province, No.
AAF108111A29*

Received: 2012-02-10
Accepted: 2012-04-17

Abstract

BACKGROUND: Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells shows great potential in repair of hippocampal injury. However, low survival rate of transplanted stem cells remains unsolved.

OBJECTIVE: To summarize the protective effects of traditional Chinese medicine on bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in the hippocampus of rats with post-traumatic stress disorder.

METHODS: The databases of Pubmed, and CNKI were retrieved for papers published from January 2000 to January 2012 with key words "mesenchymal stem cells, transplantation, survival and post-traumatic stress disorder (PTSD), hippocampus" in English and Chinese. A total of 109 papers were retrieved. Among them, 23 papers were included in the final analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Post-traumatic stress disorder is a complex disease influenced by biological, psychological, social and other factors and remains unsolved in treatment. Traditional Chinese medicine exhibits a unique advantage in this research field. Hippocampal damage caused by post-traumatic stress disorder can be repaired by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation combined with intervention of *Xiaoyaosan*, a traditional Chinese medicine, is expected to increase the survival rate of transplanted stem cells.

Key Words: stem cells; stem cell review; post-trauma stress disorder; mesenchymal stem cells; transplantation; hippocampus; National Natural Science Foundation of China

Fu WJ, Ao HQ, Zeng L, Xu ZW. Protective effects of traditional Chinese medicine on mesenchymal stem cells transplanted into the hippocampus of rats with post-traumatic stress disorder. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(1):137-141.

0 引言

创伤性应激障碍是对异乎寻常的威胁性、灾难性事件的延迟和(或)持久的反应。临床上主要表现为重新体验创伤(闪回、闯入性回忆、频频出现的痛苦梦境);回避、麻木症状(回避有关想法、感受及话题,心理麻木);持续性的焦虑和警觉水平增高(焦虑、睡眠障碍,容易受惊吓、易激惹)等3组症状^[1]。

近年来,由于战争、自然灾害、暴力事件等频频发生,创伤性应激障碍的发病率越来越高,造成了患者的生理残疾、自杀企图、患精神或躯体疾病的危险性显著增加(尤其是患抑郁症最常见)、工作能力丧失、家庭及社会功能的丧失等,占用大量医疗资源,形成人力、财力的消耗。流行病学调查显示,在经历过创伤事件的人群中创伤性应激障碍发生率为50%~90%不等,以DSM-IV为诊断标准的创伤性应激障碍发生率为5%~10%^[2]。由此可见,创伤性应激障碍已经成为危害人类身心健康的常见疾病。

药物治疗是创伤性应激障碍主要的治疗方法之一,而目前已应用于临床的一些经典抗应激损伤的药物仍无法在大多数创伤性应激障碍患者中获得满意的治疗效果,存在药物疗效滞后的问题^[3],还存在着具有一定不良反应,患者对药物耐受性差以及易复发等问题,有残留症状的患者高达70%^[4],因而迫切需要寻找新的创伤性应激障碍治疗途径。

1 资料和方法

1.1 资料来源 文章由第一作者应用计算机检索2000年1月至2012年1月PubMed数据库相关文章,检索词为“mesenchymal stem cells, transplantation, survival, post-traumatic stress disorder (PTSD), hippocampus”,同时检索2000年1月至2012年1月CNKI数据库相关文章,检索词为“间充质干细胞,移植,存活率,创伤后应激障碍,海马”;共检索文献109篇。

1.2 入选标准

纳入标准:①文章所述内容需与创伤后应激障碍海马损伤密切相关。②与骨髓间充质

干细胞的生物学特性、培养、鉴定、分化、存活率、转分化相关。③同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

排除标准: ①重复性研究。②Meta 分析。

1.3 资料提取 计算机初检得到 109 篇文献, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究 86 篇, 共保留其中的 23 篇归纳总结。

1.4 质量评估 符合纳入标准的 23 篇文献中, 有关创伤性应激障碍生物学研究概述的 4 篇, 有关间充质干细胞生物学特性的 5 篇, 有关间充质干细胞分化及其机制的 14 篇, 有关间充质干细胞转分化的 10 篇, 有关间充质干细胞转分化质疑的 5 篇。

2 结果

2.1 创伤性应激障碍对海马神经元的损伤 创伤性应激障碍已经成为危害人类身心健康的常见疾病。但遗憾的是, 与其他精神心理类疾病相似, 由于其动物模型的建立、药物靶标确认、以及采用动物模型和药靶进行新药评价筛选均存在着滞后性, 导致创伤性应激障碍病理生理机制、药物作用机制和药物筛选的研究开展较晚。目前, 关于创伤性应激障碍准确的发病机制尚不完全清楚, 但已有研究均表明其本质上是一种中枢神经系统的功能紊乱^[5], 主要包括下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴、单胺(5-羟色胺、去甲肾上腺素)、谷氨酸系统以及 P11 蛋白、一氧化氮合成酶、神经肽 Y 及胆囊收缩素等一些新型靶点的变化。结合整个应激性疾病的研究情况来看, 目前研究比较一致地认为创伤性应激障碍可以造成患者大脑海马神经元的损伤^[6], 但是, 这种损伤的信号传导途径, 启动机制尚有待于深入研究。

海马(Hippocampus)其不仅是应激损伤的敏感区, 而且还是 HPA 轴应激反应的高位调节中枢^[7]。应激发生时, HPA 轴兴奋性提高, 促肾上腺皮质激素释放激素分泌增多, 引起糖皮质激素水平升高, 从而动员储能, 适应应激反应, 若机体长期处于应激状态 HPA 轴功能持续亢进, 高皮质酮/醇血症将对大脑海马神经元细胞造成严重损伤, 继发引起海马神经元内 N-甲基-D-天门冬氨酸受体过度激活及海马神经元内糖皮质激素受体表达减少或其活性降低, 引起 HPA 轴负反馈减弱, 而这将进一步加重高皮质酮/醇血症, 形成一恶性循环^[8]。在应激反应中, 海马不仅可抑制

HPA 轴的应激反应, 而且可促进应激状态下亢进的 HPA 轴功能恢复到基础水平^[9]。应激增加海马神经元的凋亡, 引起海马结构和功能的变化, 参与创伤性应激障碍的发病。修复受损海马, 研究其发生机制成为创伤性应激障碍疾病领域的重要问题。

2.2 从神经干细胞角度修复海马结构的分析 海马是有神经再生能力的组织, 啮齿动物的海马齿状回亚颗粒细胞层存在神经干细胞, 它可以不断的产生神经元, 迁移至颗粒细胞层分化, 伸出突触并表达神经标记蛋白。应激引起的高糖皮质激素水平抑制神经元的发生, 降低齿状回产生新的颗粒细胞的能力, 而各种条件的应激都会抑制海马颗粒细胞的形成, 影响海马结构修复^[10-11]。

脑细胞有多种机制维持神经环路完整性和促进损伤后功能的恢复, 除了和神经营养因子和细胞因子的产生, 端粒末端转移酶基因组和修复蛋白的保护有关外, 还涉及神经干细胞的迁移、增殖、分化。包括人在内的成年哺乳动物中, 中枢神经系统的某些部位均存在神经干细胞, 在慢性应激的条件下神经干细胞可以增殖, 并且分化成神经元和胶质细胞^[12], 显示出中枢神经系统可能具有自我修复的潜能。

有研究表明无论是急性还是慢性应激都能明显抑制海马神经干细胞的增殖^[13], 减少新神经元的产生。神经干细胞的发育分化, 迁移机制与细胞的成熟程度, 细胞周围的环境以及细胞所在基质的状态、细胞间通讯有关。干细胞自身及临近或远隔部位其他细胞所分泌的细胞因子、黏附分子、激素、递质、细胞代谢产物等, 均参与神经干细胞在体内的迁移调节。根据这一推论, 运用促进神经干细胞在体内迁移、增殖、分化的小分子药物或者是神经元保护剂, 进而修复海马结构是否也可以用来治疗和预防创伤性应激障碍? 或者直接定向移植神经干细胞以修复海马结构? 或者以上两种思路结合, 双管齐下, 是否治疗和预防创伤性应激障碍效果更好? 这为基础和临床开展防治创伤性应激障碍的研究带来了新思路。

2.3 为什么不直接进行神经干细胞移植 神经干细胞的概念于 1989 年被首次提出, 其是具有自我复制能力, 并能够分化产生一种以上功能细胞的早期未分化细胞。围绕神经干细胞的生物学特性与分离培养, 大

量的基础研究工作取得了突破性进展。实验室中, 研究者发现了神经干细胞的巨大潜能。还在实验室创造出的特殊环境中, 从胚胎或者成体细胞中能够分化出神经干细胞, 能够诱导发育成为神经细胞, 移植进动物的身体, 能够“长”出神经细胞, “修复”受损的神经细胞。这就是神经干细胞移植的理论基础, 也就是说, 把神经干细胞“种”进大脑, 让它去需要的地方“修修补补”是有可能的, 这也是主张神经干细胞移植可以用于临床的理由, 而目前的临床治疗也正在努力证实神经干细胞移植的安全和有效。但也有大量实验数据显示, 当神经干细胞分别被移植入脑后, 神经干细胞基本全部分化成星形胶质细胞, 偶见类神经元样细胞, 而且这些类神经元样细胞只是显示神经细胞的特异性标志蛋白表达阳性, 未见突起发出及突触形成。即使是将神经干细胞与许旺细胞共移植体内, 也只见极少数神经干细胞有神经细胞特异性标志蛋白的表达, 但无突起形成。医学界和科学家对神经干细胞移植应用于临床治疗的质疑之声不断, 也有研究发现在神经干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤部位出现了未分化的细胞团块, 这表明神经干细胞移植有致瘤性这一不稳定因素^[14]。

作者所在课题组在中医药干预骨髓间充质干细胞移植、增殖、分化方面也做了一定的理论及实践探索^[15], 为本领域相关研究的开展奠定了较好基础。研究中, 作者并没有采取直接移植神经干细胞的方法, 而是在中医药干预下, 移植骨髓间充质干细胞入创伤性应激障碍大鼠海马区, 采取措施将其诱导分化为神经干细胞, 从而达到修复受损海马结构的目的, 取得的初步成果令人鼓舞, 相关研究正在不断深入展开。

2.4 骨髓间充质干细胞移植在神经元修复领域的分析

骨髓间充质干细胞在骨髓组织中的含量最为丰富, 还存在于脐静脉内皮下层、外周血、肌肉及肝脏等多种组织中, 具有高度增殖、自我更新和多向分化的潜能, 具有一定表面可塑性; 另外骨髓间充质干细胞还具有获取方便、自体移植可实施性高等特点。骨髓间充质干细胞的自体移植可以完全规避免疫排斥反应, 不会导致畸胎瘤的形成, 并较少引发道德或政治问题。

骨髓间充质干细胞在中枢神经元修复领域的研究取得了很大进展^[16-17], 其内部机制也逐步得到认识, 如有研究指出骨髓间充质干细胞移植改善神经变

性疾病相关症状及起效机制是骨髓间充质干细胞产生了神经营养因子以有效支持神经细胞存活, 诱导内源性神经细胞增殖, 促进损伤部位的神经纤维再生^[18]。

随着研究的不断深入, 研究者们却发现骨髓间充质干细胞虽然可分化为神经元, 但体内分化率明显低于体外培养分化率^[19]。同时研究指出, 超过 90% 的骨髓间充质干细胞通常死于干细胞移植后的第 3 天^[20]。所以如何提高骨髓间充质干细胞移植后的存活率、增殖及定向分化率以更好的发挥神经元修复作用成为研究热点。

2.5 逍遥散对移植骨髓间充质干细胞的保护作用机制探讨

近年来, 课题组对于应激领域中医调肝理论进行持续深入研究, 课题组前期在中药干预干细胞增殖、分化方面也做了一定的理论及实践探索^[21-22], 为实验开展奠定了较好基础。由此, 认为中医学中“肝”的功能与以“下丘脑-垂体-肾上腺轴”为核心的“神经-内分泌-免疫”网络密切相关^[23]。即通过调肝方药逍遥散, 可以实现对内分泌轴及神经-内分泌-免疫网络的调控, 调控干细胞增殖、分化。

逍遥散作为调肝解郁的代表方, 被广泛用于临床治疗郁证及相关病证, 具有较高的研究和应用价值。课题组在徐志伟教授带领下, 多年来致力于开展逍遥散及其他中医方药干预应激相关疾病的实验和临床研究, 具有深厚的学术积淀。

课题组在前期慢性应激的研究基础上提出, 创伤性应激障碍是由于突然强烈或长期持久的情志刺激, 超出了人体的生理调节范围, 引起情志变化异常, 使气机紊乱, 脏腑损伤, 阴阳失调而导致疾病的发生, 其中尤以肝失疏泄, 肝气郁滞为主要因机, 治疗以调肝解郁的逍遥散为主。

创伤性应激障碍是一种以大脑神经元损伤为病变基础的应激性疾病, 骨髓间充质干细胞移植预期可以有效改善其神经元损伤, 但骨髓间充质干细胞移植初期的成活率较低, 所以如何保护移植干细胞, 提高其成活率是需要先期解决的问题。这里课题组提出, 在骨髓间充质干细胞移植于创伤性应激障碍大鼠海马区后, 运用调肝方药逍遥散干预, 可以显著提高移植干细胞生存率, 其内在机制有待于进一步明确。

3 讨论

综上, 课题组在前期研究基础之上并结合文献学习, 认为调肝方药逍遥散联合骨髓间充质干细胞移植以干预创伤后应激障碍模型大鼠, 可以有效提高移植干细胞的存活率, 进而促进其海马神经元细胞增殖、分化, 修复海马结构, 充分发挥抗应激损伤的效果。

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(81173144); 广州中医药大学创新基金项目(K0100071); 广东省普通高校重点实验室-中医病机与治法研究重点实验室开放课题(AAF108111A29)。

作者贡献: 全部作者负责资料收集、成文、及审校, 第一作者对本文负责。

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。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] 张娅玲, 白艳秋, 彭正午, 等. 创伤后应激障碍(PTSD)的生物学研究概述[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(1):172-176.
- [2] Wittchen HU, Gloster A, Beesdo K, et al. Posttraumatic stress disorder: diagnostic and epidemiological perspectives. *CNS Spectr*. 2009;14(1 Suppl 1):5-12.
- [3] Stassen HH, Angst J, Hell D, et al. Is there a common resilience mechanism underlying antidepressant drug response? Evidence from 2848 patients. *Evidence from 2848 patients. J Clin Psychiatry*. 2007;68(8):1195-1205.
- [4] Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006;163(1):28-40.
- [5] Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Dautzenberg FM, et al. Molecular and cell signaling targets for PTSD pathophysiology and pharmacotherapy. *Neuropharmacology*. 2012;62(2):705-714.
- [6] Hughes KC, Shin LM. Functional neuroimaging studies of post-traumatic stress disorder. *Expert Rev Neurother*. 2011; 11(2):275-285.
- [7] Cazakoff BN, Howland JG. Acute stress disrupts paired pulse facilitation and long-term potentiation in rat dorsal hippocampus through activation of glucocorticoid receptors. *Hippocampus*. 2010;20(12):1327-1331.
- [8] Park JH, Yoo KY, Lee CH, et al. Comparison of glucocorticoid receptor and ionized calcium-binding adapter molecule 1 immunoreactivity in the adult and aged gerbil hippocampus following repeated restraint stress. *Neurochem Res*. 2011; 36(6):1037-1045.
- [9] Mifsud KR, Gutiérrez-Mecinas M, Trollope AF, et al. Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain Behav Immun*. 2011;25(7):1305-1315.
- [10] Abercrombie HC, Jahn AL, Davidson RJ, et al. Cortisol's effects on hippocampal activation in depressed patients are related to alterations in memory formation. *J Psychiatr Res*. 2011;45(1):15-23.
- [11] Lisowski P, Juszcak GR, Goscik J, et al. Effect of chronic mild stress on hippocampal transcriptome in mice selected for high and low stress-induced analgesia and displaying different emotional behaviors. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2011;21(1):45-62.
- [12] Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev*. 2005; 85(2): 523-569.
- [13] Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, et al. Fuchs E. Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(22):12796-12801.
- [14] 《中国组织工程研究与临床康复》杂志社学术部. 神经干细胞移植是目前神经损伤修复的又一新生力量吗? [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(19):3558-3559.
- [15] 黄进. 补肾益精法对骨髓间充质干细胞增殖的影响及机理研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2010.
- [16] Lee JK, Jin HK, Endo S, et al. Intracerebral transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduces amyloid-beta deposition and rescues memory deficits in Alzheimer's disease mice by modulation of immune responses. *Stem Cells*. 2010;28(2):329-343.
- [17] Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, et al. Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy*. 2012;14(1):56-60.
- [18] Kan I, Melamed E, Offen D. Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2007; (180):219-242.
- [19] Koda M, Okada S, Nakayama T, et al. Hematopoietic stem cell and marrow stromal cell for spinal cord injury in mice. *Neuroreport*. 2005;16(16):1763-1767.
- [20] Liu X, Duan B, Cheng Z, et al. SDF-1/CXCR4 axis modulates bone marrow mesenchymal stem cell apoptosis, migration and cytokine secretion. *Protein Cell*. 2011;2(10):845-854.
- [21] 敖海清, 朱艳芳, 徐志伟. 肝肾“藏泄互用”内涵发微[J]. 江苏中医药, 2011, 43(3):5-6.
- [22] 黄进, 张进, 徐志伟. 5种中药多糖及其含药血清对MSCs增殖的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(9):1821-1823.
- [23] 李达, 刘琨, 胡永珍, 等. 调和肝脾方辅助造血干细胞移植治疗血液系统疾病的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(5):626-630.