

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.14.021

[http://www.crter.org]

高月彩, 李蒙, 李瑞玉, 孙艳孚. 补肾中药在干细胞培养与移植中的干预作用[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(14):2609-2616.

补肾中药在干细胞培养与移植中的干预作用*

高月彩¹, 李蒙², 李瑞玉³, 孙艳孚³

1 邢台医学高等专科学校第二附属医院急诊科, 河北省邢台市 054000

2 武警新疆总队和田地区支队卫生队, 新疆维吾尔自治区和田市 848011

3 邢台医学高等专科学校第二附属医院中西医结合研究所, 河北省邢台市 054000

文章亮点:

1 此问题的已知信息: 补肾中药在很多新兴的领域展现了它独特的价值, 在补肾中医药与干细胞的相关研究中, 已报道了很多补肾中药单味及复方对间充质干细胞增殖与分化有促进作用, 并且与其他诱导剂或者方法相比, 具有安全、易于在临床推广使用等特点。

2 文章增加的新信息: 补肾中药干预干细胞移植在治疗相关疾病方面已有应用证据, 但是, 补肾中药具体的有效成分、作用靶点、作用的机制仍未清楚, 补肾中药的药物动力学和药物代谢学才刚刚起步, 补肾中药的研究方法还需要进一步规范、标准化, 补肾中药干预干细胞移植的研究还处于起步阶段, 还有许多问题需要解决。

3 临床应用的意义: 加强补肾中药干预干细胞移植的临床基础研究, 可按传统中医理论, 辨证论治, 如补肾中药对造血干细胞移植干预, 就是基于中医理论的全身辨证用药, 用于辅助移植治疗, 临床取得了较好效果。因此, 可以如研究造血干细胞移植一样, 尝试开展补肾中药在其他干细胞移植治疗中的临床应用研究。

关键词:

干细胞; 干细胞学术探讨; 补肾中药; 骨髓干细胞; 骨髓基质细胞; 骨髓间充质干细胞; 造血干细胞; 神经干细胞; 肝细胞; 成骨细胞; 动物实验; 增殖分化; 免疫组化; 诱导; 体外培养; 血管生成; 省级基金

摘要

背景: 干细胞移植的不断改进和对传统中医理论认识的不断深入, 促进了补肾中药干预干细胞分化的研究。

目的: 探讨补肾中药在干细胞培养与移植中的干预作用。

方法: 收集干细胞移植治疗疾病过程加入不同类别单味或复方补肾中药起到的促进干细胞增殖分化、诱导分化的作用等相关研究, 进行实验数据分析, 应用血清药理学原理评估补肾中药在干细胞培养与移植中的干预作用。

结果与结论: 加强补肾中药与干细胞的基础研究, 在现有新理论基础上, 继续深化相关的基础理论研究, 使补肾中药与干细胞研究有科学的理论指导, 在干细胞增殖、分化及转分化机制研究的基础上, 筛选能调节干细胞不同发育阶段的补肾中药。在此初步筛选的基础上, 结合临床应用中已经取得的成果, 才能有针对性地选定相关的单味或复方补肾中药, 研究其对干细胞移植治疗重大疾病的干预作用。

Revealing nourishing kidney drugs in the culture and differentiation of stem cells

Gao Yue-cai¹, Li Meng², Li Rui-yu³, Sun Yan-fu³

高月彩, 女, 1981年生, 河北省广宗县人, 汉族, 四川大学护理系毕业, 主管护师, 主要从事临床护理的科研及教学工作。

通讯作者: 李瑞玉, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 邢台医学高等专科学校第二附属医院中西医结合研究所, 河北省邢台市 054000
liruiyu651021@163.com

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)14-02609-08

收稿日期: 2013-01-02

修回日期: 2013-03-05

(20121204004/YL·C)

Gao Yue-cai, Nurse-in-charge,
Department of Emergency,
Second Affiliated Hospital of
Xingtai Medical College, Xingtai
054000, Hebei Province, China

Corresponding author: Li
Rui-yu, Professor, Chief
physician, Master's supervisor,
Institute of Integrative Medicine,
Second Affiliated Hospital of
Xingtai Medical College, Xingtai
054000, Hebei Province, China
liruiyu651021@163.com

Supported by: Projects of
Administration of Traditional
Chinese Medicine of Hebei
Province, No. 2012068*

Received: 2013-01-02
Accepted: 2013-03-05

1 Department of Emergency, Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei Province, China
2 Department of Health, Hotan Detachment of the Xinjiang Armed Police Corps, Hotan 848011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China
3 Institute of Integrative Medicine, Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai 054000, Hebei Province, China

Abstract

BACKGROUND: The continuous improvement of stem cell transplantation and understanding of the traditional Chinese medicine theory can strengthen the research regarding the effect of nourishing kidney drugs on the differentiation of stem cells.

OBJECTIVE: To investigate the interventional effect of nourishing kidney drugs on stem cell culture and transplantation.

METHODS: The relative studies on different categories of single herb or compound nourishing kidney drugs for the proliferation, differentiation and induction of stem cells during stem cell transplantation for the treatment of diseases were collected to analyze the experimental data, and to evaluate the interventional effect of nourishing kidney drugs on the stem cell culture and transplantation based on serum pharmacology.

RESULTS AND CONCLUSION: According to the basic research on nourishing kidney drugs and stem cells, and based on the existing new theory, the basic theoretical research was deepened continuously, in order to provide scientific theoretical guidance for the research on nourishing kidney drugs and stem cells. Based on the researches on the proliferation, differentiation and transdifferentiation mechanism of stem cells, the nourishing kidney drugs that could regulate stem cell growth were screened out. Then, combined with the achievement obtained from the clinical application, the single herb or compound nourishing kidney drugs were selected targetedly, and the interventional effect of the drugs on stem cell transplantation in the treatment of major diseases was analyzed.

Key Words: stem cells; stem cell academic discussion; nourishing kidney drugs; bone marrow-derived stem cells; bone marrow stromal cells; bone marrow mesenchymal stem cells; hematopoietic stem cells; neural stem cells; hepatocyte; osteoblasts; animal experiments; proliferation and differentiation; immunohistochemistry; induction; *in vitro* culture; angiogenesis; provincial grants-supported paper

Gao YC, Li M, Li RY, Sun YF. Revealing nourishing kidney drugs in the culture and differentiation of stem cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(14):2609-2616.

0 引言

干细胞具有迁移性、趋向性、归巢性、分化性、稳定性,并且干细胞还具有两种功能,一个是干细胞能够分裂增殖,另一个是干细胞能够向多种细胞分化^[1-2],这其实是因为它所具备生物学特性及能力。正是因为干细胞所具备的生物特性及能力,使干细胞能够通过移植来替代和修复患者损失的细胞,恢复细胞组织功能,从根本上达到治疗疾病的目标,因而在细胞替代治疗、基因治疗、组织工程等方面具有良好的应用前景^[3]。

干细胞移植属于再生医疗技术,是指通过对干细胞进行分离、体外培养、定向诱导、基因修饰等过程,在体外繁育出全新的、正常的甚至更年轻的细胞、组织或器官,并最终通过细胞、组织或器官的移植实现对临床疾病的治疗^[4]。最新研究发现,成体干细胞可以横向分化为其他类型的细胞和组织,为干细胞的广泛应用提供了基础。

应用干细胞技术能治疗神经系统、免疫系统等疾病,且相比很多传统及现代的治疗方法具有无可比拟的优势^[5-6]: ①干细胞移植治疗安全,低毒性或无毒性。②干细胞治疗在尚未完全了解疾病发病的确切机制前也可以应用。③对某些病症,干细胞移植效果,一次性植入,作用持久。④干细胞移植治疗材料来源充足^[7]。⑤干细胞治疗范围广泛,

理论上能治疗大多数疾病。⑥干细胞是较好的免疫治疗和基因治疗载体^[8]。

目前, 已开展一些补肾中药干预干细胞移植治疗中的研究, 一些补肾中药可在体外诱导间充质干细胞分化并促进间充质干细胞移植成功^[9-10]。相关的大量研究表明^[11], 许多补肾中药可促进骨髓造血干细胞增殖分化, 并可促进神经干细胞增殖分化, 对其他干细胞的移植也有诱导分化为成骨细胞、神经细胞及肝细胞等作用, 而且, 补肾中药可防治造血干细胞治疗中的不良反应^[12-13]。

1 资料和方法

资料来源: 补肾中药在干细胞移植治疗中的干预作用的相关文献^[14], 研究文献范围 1990 至 2011 年, 检索词为“补肾中药; 干细胞; 骨髓干细胞; 骨髓基质细胞; 骨髓间充质干细胞; 造血干细胞; 神经干细胞; 肝细胞; 成骨细胞; 动物实验; 大鼠模型; 增殖分化; 免疫组化; 诱导; 体外培养; 血管生成”, 选取文献 38 篇^[15-52]。

纳入标准: ①补肾中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响相关研究。②补肾中药诱导间充质干细胞向神经方向分化的相关研究。③补肾中药含药血清促进骨髓间充质干细胞成骨性分化的相关研究。④补肾中药对骨髓基质细胞向成骨细胞分化影响的实验研究。⑤补肾中药含药血清对骨髓间质细胞转化为肝细胞的作用相关研究。⑥补肾中药对体外培养新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响相关研究。

排除标准: ①排除综述及循证医学类型的文献。②重复性研究类型文献。

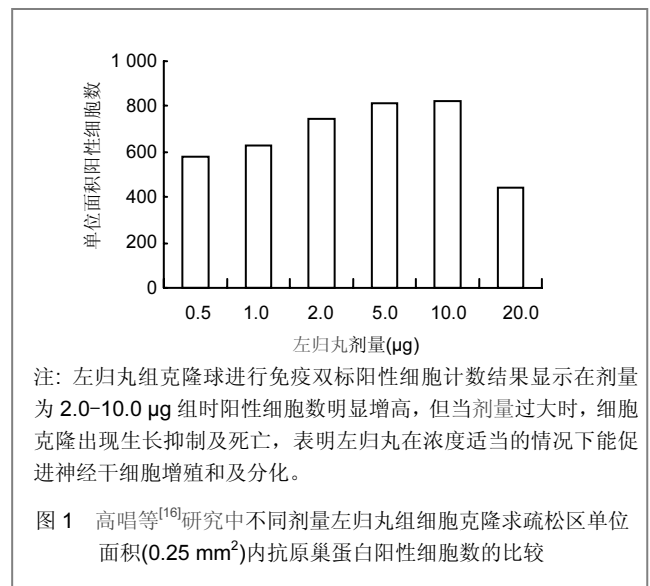
分析指标: ①补肾中药对神经干细胞增殖分化的影响。②补肾中药对骨髓间充质干细胞增殖分化的影响。③补肾中药诱导干细胞向成骨细胞分化的作用。④补肾中药诱导干细胞向肝细胞分化的作用。⑤补肾中药诱导干细胞向神经干细胞分化的作用。⑥补肾中药促进心肌细胞及血管内皮细胞分化的作用。

2 结果

2.1 补肾中药对干细胞增殖分化的影响

2.1.1 补肾中药对神经干细胞增殖分化的影响 具

有滋阴补肾功效的左归丸, 其主要成分为熟地黄、怀山药、枸杞子、山茱萸、菟丝子、牛膝、鹿角胶、龟板胶等^[15]。高唱等^[16]为探讨左归丸对分离培养乳鼠神经干细胞增殖分化的作用, 将提取的乳鼠神经干细胞加入培养液机械分离克隆球进行传代, 用还有溴脱氧尿嘧啶的培养液培养, 再行免疫光双标实验。行溴脱氧尿嘧啶抗体免疫细胞化学染色后, 结果表明克隆的大部分细胞为溴脱氧尿嘧啶阳性细胞。实验的左归丸组分为 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg 不同剂量组, 最后对克隆球进行免疫双阳性细胞计数, 不同剂量左归丸组细胞克隆球疏松区单位面积(0.25 mm^2)内抗原巢蛋白阳性细胞数的比较, 结果见图 1。



到目前为止, 左归丸是如何影响神经干细胞的增殖分化, 又是如何影响细胞周期的变化, 对神经干细胞增殖分化相关基因有何影响以及左归丸对神经干细胞增殖分化的作用机制, 这些问题需要进一步深入研究^[17]。

2.1.2 补肾中药对骨髓间充质干细胞增殖分化的影响 骨髓间充质干细胞具有取材方便、机体损伤小、便于临床应用等特点, 但是成人骨髓平均 10 万个有核细胞中仅含有 1 个骨髓间充质干细胞, 并随着年龄的增加, 细胞数量逐渐减少, 生理状态下 20% 为静止期细胞, 体外往往需要大量扩增, 而体外培养、扩增条件的要求比较严格^[18]。有研究人员采用骨髓基质干细胞分离、培养方法, 对大鼠骨髓基质干细胞进行分离、纯化, 观察补肾中药对大鼠骨髓基质干细胞的增殖作用^[19-20]。发现补肾中药含药血清能促进干细胞

在体外增殖, 其机制可能与细胞因子样作用相关。国内关于补肾中药对骨髓间充质干细胞增殖分化的影响有很多相关报道。

文题: 补肾方剂对大鼠骨髓基质干细胞增殖与分化的影响
第一作者: 胡黎平^[21]; 文献来源: 中国药物与临床; 发表时间: 2007

文题: 补肾中药对大鼠骨髓基质干细胞增殖和分化的影响
第一作者: 范海蛟^[22]; 文献来源: 广州中医药大学博士论文; 发表时间: 2008

文题: 补肾活血中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响
第一作者: 曾意荣^[23]; 文献来源: 中国组织工程研究与临床康复; 发表时间: 2008

文题: 补肾填精药促进间充质干细胞增殖的效应及机制研究
第一作者: 张进^[24]; 文献来源: 第六届全国中西医结合基础理论研究学术研讨会论文集; 发表时间: 2010

文题: 补肾活血法对激素性股骨头坏死家兔骨髓基质干细胞增殖的影响
第一作者: 郭浩^[25]; 文献来源: 陕西中医学院硕士论文; 发表时间: 2011

文题: 补肾方剂诱导骨髓间充质干细胞增殖分化的理论和实验研究
第一作者: 谭峰^[26]; 文献来源: 南京中医药大学博士论文; 发表时间: 2011

文题: 温阳补肾药对骨髓间充质干细胞促增殖的实验研究
第一作者: 黄胜杰^[27]; 文献来源: 中国中医骨伤科杂志; 发表时间: 2012

2.2 补肾中药对干细胞的定向诱导

2.2.1 补肾中药诱导干细胞向成骨细胞分化的相关作用

补肾中药诱导干细胞向成骨分化是近年来一个新兴的研究领域, 从干细胞研究领域研究中医基础理论的研究还相对较少, 使用补肾中药诱导干细胞定向成骨分化的研究才刚刚起步, 其诱导机制有待进一步深入研究^[28]。补肾中药有着来源广、不良反应小等优势, 对干细胞长期生长分化无毒且有利于分化后细胞活体移植^[29]。另外, 补肾中药从骨髓间充质干细胞周期调节和细胞代谢等方面发挥促进骨髓间充质干细胞成骨分化的作用, 对研究骨质疏松症、骨坏死、骨缺损等有重要意义^[30], 补肾中药诱导干细胞向成骨细胞的分化已有很多相关动物实验的研究报道。

实验结论: 发现补肾壮骨汤有促进分化中的干细胞分泌碱性磷酸酶和骨钙素, 从而加速骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 其作用原理与密钙息作用原理基本相同。

第一作者: 郑良朴^[31]; 实验动物: 30 d 龄 SD 大鼠; 实验药物: 补肾壮骨汤; 检测方法: 观察不同浓度的补肾壮骨汤对体外培养骨髓间充质干细胞分化的影响

实验结论: 巴戟天水提物及醇提物均能促进含药血清法体外培养的骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化, 且巴戟天醇提物的作用强于水提物。

第一作者: 王和鸣^[32]; 实验动物: 30 d 龄 SD 大鼠; 实验药物: 补肾中药巴戟天; 检测方法: 观察含巴戟天血清对体外培养骨髓间充质干细胞碱性磷酸酶比活性及骨钙素含量的影响。

实验结论: 所培养的大鼠骨髓细胞在表型表达和细胞形态上具备骨髓间充质干细胞特征, 补肾活血中药含药血清组增长速度比空白对照组明显加快, 并与剂量呈正比, 因此, 补肾活血中药含药血清能对大鼠干细胞在体外增殖能力有促进作用。

第一作者: 曾意荣^[33]; 实验动物: SD 大鼠; 实验药物: 补肾活血中药; 检测方法: 绘制生长曲线, 观察补肾活血中药含药血清促进骨髓间充质干细胞体外增殖的作用。

实验结论: 结果发现不同浓度右归饮含药血清对培养骨髓基质细胞均显示增殖刺激作用, 其中 10% 含药血清组的增殖刺激作用较为显著, 因此, 认为右归饮可以有效地诱导骨髓基质细胞定向分化为软骨细胞。

第一作者: 肖鲁伟^[34]; 实验动物: 出生 24 h 内的胎兔; 实验药物: 补肾中药复方右归饮; 检测方法: 应用四甲基偶氮唑蓝比色法及免疫组织化学染色方法观察右归饮含药血清对骨髓基质细胞体外培养的增殖及向软骨细胞诱导分化的影响。

实验结论: 淫羊藿总黄酮活性代谢产物强烈刺激骨髓间充质干细胞的增殖和成骨性分化, 是淫羊藿总黄酮抗骨质疏松症的重要机制。

第一作者: 马慧萍^[35]; 实验动物: 60 d 龄 SD 大鼠; 实验药物: 补肾中药淫羊藿总黄酮; 检测方法: 进行细胞增殖和成骨性分化的分析。

2.2.2 补肾中药诱导干细胞向肝细胞分化的作用相关研究

目前补肾中药或补肾中药成分诱导干细胞分化为肝细胞的报道很少, 现有的报道表明, 补肾中药促进干细胞分化为肝细胞的研究分为利用有补气作用的单味中药来体外诱导骨髓干细胞向肝细胞分化, 应用血清药理学原理, 利用具有补肾活血功效的复方中药血清, 促进骨髓干细胞向肝细胞的分化^[36]。李瀚旻等^[37]为观察补肾中药左归丸含药血清对骨髓间质细胞分化为肝细胞的影响。对大鼠随机分为对照组、补肾中药组, 制作药物血清, 以体外肝细胞培养上清为诱导条件培养液, 采用贴壁分离法纯化大鼠骨髓间质细胞, 分别于诱导第 0, 7, 14, 21, 28 天免疫细胞化学法检测肝细胞标志物甲胎蛋白、细胞角蛋白 18 及白蛋白阳性细胞率等。结果发现: ①诱导第 0 天, 各组甲胎蛋白、白蛋白阳性细胞呈极少数表达, 细胞角蛋白 18 及糖原均未见阳性细胞表达。②肝细胞生长因子加左归丸组、条件培养液加左归丸组在诱导第 7, 14, 21, 28 天白蛋白、细胞角蛋白 18、糖原的

阳性细胞率均显著高于其他组, 甲胎蛋白阳性细胞率于诱导第7天时增高显著, 此外各时间点又明显降低。③与肝细胞生长因子加左归丸组比较, 条件培养液加左归丸组白蛋白阳性细胞率在诱导第14, 21, 28天时显著升高, 甲胎蛋白阳性细胞率在诱导第7天时显著升高, 至诱导第14, 21, 28天则明显下降。因此, 左归丸含药血清能够影响骨髓间质细胞向肝系细胞转化过程中的肝细胞标志物, 从而提高骨髓间质细胞向肝细胞的转化率。

万荣等^[38]为观察别毒护肝方及其拆方含药血清对大鼠骨髓干细胞增殖作用和向肝系分化的影响。对大鼠随机分为生理盐水对照组、别毒护肝方组, 制作药物血清, 使用密度梯度离心和贴壁筛选相结合, 分离骨髓干细胞, 通过噻唑氮蓝比色法检测含药血清处理48 h时骨髓干细胞的增殖率, 采用免疫组化法检测骨髓干细胞肝系标志甲胎蛋白、白蛋白的表达情况, 诱导后甲胎蛋白和白蛋白放射免疫定量检测结果比较, 见表1。

表1 万荣等^[38]研究大鼠骨髓干细胞诱导后甲胎蛋白和白蛋白放射免疫定量检测结果比 (n=4, mg/L)

组别	甲胎蛋白	白蛋白
生理盐水对照组	1.63	0
别毒护肝方组	41.38	0.70

注: 甲胎蛋白是不成熟肝细胞的表面标志, 合成白蛋白是正常成熟肝细胞必备功能, 采用免疫组化检测甲胎蛋白和白蛋白来判定骨髓干细胞的肝系标志。

以上相关实验研究结果别毒护肝方组对骨髓干细胞有增殖作用, 可诱导骨髓干细胞横向分化为肝实质细胞。别毒护肝方中发挥主要作用的药物可能与黄芪有关, 关于其分化的具体机制还有待进一步研究^[39]。

2.2.3 补肾中药诱导干细胞向神经样干细胞的分化 张进^[40]为探讨补肾中药龟板对间充质干细胞的体外诱导作用, 体外分离培养间充质干细胞, 以龟板水煎液对其进行体外诱导, 免疫组织化学法鉴定检测培养细胞中神经细胞标志抗原巢蛋白、神经元特异性烯醇化酶、胶质纤维酸性蛋白的表达情况。其中抗原巢蛋白移植被作为神经干细胞特异性的标志, 它是一个中等纤维骨架蛋白, 属于第Ⅵ类中间丝蛋白, 因其中枢神经系统发育过程中的瞬时性

表达而被克隆^[41]。结果显示, 龟板液诱导5 d后, 部位细胞呈抗原巢蛋白染色阳性。研究认为龟板可体外诱导间充质干细胞转分化为神经干细胞, 但还没有被诱导为神经元样细胞与星形胶质细胞, 因此, 补肾中药可诱导干细胞分化为神经干细胞。

蔡光先等^[42]探讨地黄多糖对骨髓间充质干细胞分化为神经细胞的诱导效应, 取1月龄SD大鼠1只, 取股骨和胫骨, 利用贴壁法分离纯化骨髓间充质干细胞。将骨髓间充质干细胞分为地黄多糖组、 β -巯基乙醇组, 对照组不做任何处理, 光镜下观察细胞形态, 采用免疫细胞化学方法鉴定神经细胞特异性抗原标志神经丝蛋白和神经胶质细胞特异性抗原胶质纤维酸性蛋白的表达。结果显示地黄多糖组经地黄多糖诱导培养24 h后细胞显示为典型的神经细胞样形态, 神经丝蛋白阳性为(82.3±6.1)%, 胶质纤维酸性蛋白阳性细胞为(10.5±2.1)%。 β -巯基乙醇组的细胞神经丝蛋白及胶质纤维酸性蛋白阳性细胞数较少, 分别为(22.3±4.7)%, (42.3±5.3)%, 对照组神经丝蛋白及胶质纤维酸性蛋白染色均为阴性。因此, 认为地黄多糖具有诱导骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的作用。

2.2.4 补肾中药诱导干细胞向心肌样细胞的分化 关于补肾中药诱导干细胞向心肌细胞及血管内皮细胞分化的作用这方面的研究也有学者进行了报道, 如Zhu等^[43-44]研究了淫羊藿苷诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化的作用, 结果发现淫羊藿苷可体外诱导胚胎干细胞分化为心肌细胞, 分化的心肌细胞经免疫荧光染色后, 心脏 α -辅肌动蛋白、肌钙蛋白T呈阳性, 说明中药淫羊藿在心血管系统再生修复治疗方面显示积极作用。

汪朝晖等^[45]为观察人参总皂甙对骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的诱导作用, 进行了实验研究。取成年SD大鼠骨髓细胞, 采用密度梯度分离法与贴壁法结合获取骨髓间充质干细胞, 进行原代培养和克隆培养, 采用流式细胞仪检测细胞表面抗原CD34和CD44以鉴定该法所获细胞是否为骨髓间充质干细胞, 对传至第8代的骨髓间充质干细胞进行分组诱导, 分别为人参总皂甙组、5-氮胞苷组、人参总皂甙+5-氮胞苷组, 每组再分3个亚组, 分别对骨髓间充质干细胞进行24, 48, 72 h诱导, 并设空白对照组, 采用共聚焦荧光显微镜观察细胞数及阳性

细胞数, 计算心肌样细胞转化率; 采用免疫组化法检测分化的心肌样细胞的特异性蛋白结蛋白和肌钙蛋白, 采用逆转录聚合酶链反应检测诱导前后心肌细胞特征性基因 α -心肌肌球蛋白重链和 β -心肌肌球蛋白重链的表达, 结果发现, 分离培养后的细胞生长密集, 形态呈纺锤状, 表面抗原鉴定为CD44表达阳性, 表明所获细胞为骨髓间充质干细胞; 经人参总皂甙、5- α -胞苷诱导后, 骨髓间充质干细胞分化成类心肌细胞, 表明骨髓间充质干细胞在人参总皂甙体外诱导下已向心肌样细胞转化, 并具有心肌样细胞的特性。因此人参总皂甙可体外诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞。

2.2.5 补肾中药对干细胞移植治疗后不良反应的防治

补肾中药对干细胞移植治疗后移植物抗宿主病的抑制作用: 干细胞移植是治疗白血病的有力手段之一。白血病复发和移植物抗宿主病仍然是移植失败的最重要原因^[46-47]。患者体内仍残存一定数量的白血病细胞, 单靠预处理要彻底杀灭这些白血病细胞是不可能的。所以, 干细胞移植治愈白血病并非完全依赖移植前大剂量放、化疗, 这些白血病细胞的杀灭更重要的由移植物抗白血病效应来完成^[48]。国内不少学者在补肾中药结合干细胞移植治疗血液病、放化疗后骨髓移植等方面进行了大量相关实验研究, 如卢锡林等^[49]为观察补肾中药对干细胞移植后抗排斥及移植物抗白血病效应的相关作用, 体外培养正常小鼠骨髓细胞对放疗后肌营养不良症模型小鼠尾静脉移植, 用补肾中药水提液灌胃实验小鼠, 观察实验小鼠存活率和移植物抗宿主病症状, 移植后4-8个月取小鼠骨骼肌以常规染色观察病理状况, 以免疫荧光方法检测细胞骨架蛋白表达, 结果发现, 补肾方能不同程度降低肌营养不良症模型鼠核中心移位比例和提高细胞骨架蛋白表达量, 同时能明显减轻移植物抗宿主病症状。

干细胞移植后, 在数年中机体处于免疫抑制状态, 况且体内存在微小残留病灶, 使原发病易于复发, 补肾中药在免疫应答方面具有多种复杂的机制, 尤其对免疫抑制状态显示出其优越性^[50-51]。补肾中药作为一种免疫调节剂, 对提高自体免疫功能、杀伤和抑制微小残留病灶、预防复发具有重要意义^[52]。刘晓等^[53]以致死量辐照并行外周血造血干细胞移植的小鼠为模型, 移植后给予黄芪注射液10 g/kg或20 g/kg腹腔

注射, 连续15 d, 观察4周内外周血象的恢复情况, 并对骨髓造血微环境行透射电镜观察, 结果发现, 黄芪组小鼠外周血白细胞的恢复快于对照组, 血小板的恢复与对照组无显著差异, 两个黄芪剂量组之间无显著差异, 电镜检查发现黄芪组小鼠骨髓中内皮细胞、肉状细胞的损伤轻于对照组, 内皮细胞、网状细胞与造血原始细胞之间的接触较对照组紧密, 因此, 认为补肾中药黄芪对外周血造血干细胞移植后早期造血功能重建有促进作用。

补肾中药预防干细胞移植后肝静脉闭塞病: 肝静脉闭塞病是造血干细胞移植后的主要并发症之一, 表现在移植后较早出现黄疸、腹水、肝肿大等症状。王茂生等^[54]对补肾中药预防造血干细胞移植后肝静脉闭塞病的作用方面也做了相关研究, 探讨中医药联合自体造血干细胞移植治疗难治性急性髓细胞白血病临床疗效。对11例难治性急性髓细胞白血病患者进行中医药干预下的自体造血干细胞移植。分别在造血干细胞移植前干细胞动员采集、预处理化疗、干细胞回输造血重建期及移植后预防复发等阶段在中医辨证论治原则指导下给予补肾中药序贯治疗。结果发现, 所有患者干细胞采集单个核细胞数均达移植要求, 预处理化疗毒副反应轻微, 未出现肝静脉闭塞病等严重并发症, 因此, 补肾中药联合自体造血干细胞移植治疗难治性急性髓细胞白血病可有效提高移植成功率, 明显降低移植后不良反应和预防移植后复发。

补肾中药复方丹参注射液能扩张血管, 增加血流速度, 改善微循环, 具有抑制脂质过氧化和抗氧化损伤, 清除自由基, 降低全血黏度等作用, 并有显著的抗血小板表面活性及聚集作用^[55-56]。复方丹参不但可以预防肝静脉闭塞病, 也可预防环孢素A对肾脏损害和保护心脏, 且无不良反应^[57]。因此, 复方丹参在干细胞移植中作用较大。刘嘉等^[58]观察了补肾中药丹参联合前列腺素E1、低分子肝素钙及低分子右旋糖酐对造血干细胞移植后肝静脉阻闭塞病的预防作用, 对520例进行造血干细胞移植的患者, 采用复方丹参注射液40-60 mL, 低分子右旋糖酐250-500 mL, 前列腺素E1 40-60 μ g, 均每天1次静脉滴注, 低分子肝素钙3 000-5 000 IU, 每天1次皮下注射, 观察对造血干细胞移植后肝静脉闭塞病的预防作用。结果 520例患者, 1例发生肝静脉阻闭塞病并死亡, 发生率为0.19%, 未发现明显药物不良反应, 未出现凝血功能

障碍。因此,采用补肾中药复方丹参联合前列腺素E₁、低分子肝素钙及低分子右旋糖酐的中西医结合方法可有效预防肝静脉闭塞病。

3 小结

补肾中药在干细胞培养与移植中干预作用的研究为中药与干细胞结合研究展示了新的思路,有望为干细胞开创新的治疗途径。今后应加强补肾中药与干细胞的基础研究,在干细胞增殖、分化及转分化机制研究基础上,有针对性地筛选能调节干细胞不同发育阶段的的补肾中药单体或复方,研究其对干细胞移植治疗重大疾病的干预作用。

基金资助: 河北省中医药管理局资助项目(2012068)。

作者贡献: 李瑞玉进行实验设计,李蒙、高月彩进行实验实施及评估,资料收集为孙艳浮,李瑞玉成文,李瑞玉对实验进行审校并对文章负责。

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。

伦理要求: 实验获得所在单位的伦理委员会批注,符合伦理学标准。

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

- 程建,袁涛,马勇,等.中医药及骨髓间充质干细胞移植治疗激素性股骨头缺血性坏死的研究进展[J].中国中西医结合杂志,2012,32(7):1004-1007.
- 蓝海峰,袁振刚,张春阳,等.同胞基因外周血干细胞移植治疗多发性骨髓瘤10例疗效观察[J].中华血液学杂志,2012,33(3):191-194.
- 撒亚莲,李海标.三七总皂甙诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞[J].中山医科大学学报,2002,23(6):409-410.
- 张艳军,范祥,胡利民,等.不同治则中药单体对体外培养神经干细胞分化的影响[J].天津中医药,2004,21(2):156-157.
- 张维焯,李艳君,钟震亚,等.红景天苷对神经干细胞作用的研究[J].黑龙江医药科学,2005,28(6):3-4.
- 陈东,孟晓婷,刘佳梅,等.鹿茸多肽对胎大鼠脑神经干细胞体外诱导分化的实验研究[J].解剖学报,2004,35(3):240-243.
- 陈东风,杜少辉,李伊为,等.龟板含药血清体外诱导成年大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元[J].广州中医药大学学报,2003,20(3):224-226.
- 董晓先,刘金保,董燕湘,等.天麻诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J].中国中西医结合杂志,2004,24(1):51-54.
- 沈骅睿,吕文科,杨松涛,等.中药仙茅对骨髓干细胞向神经细胞定向诱导的实验研究[J].成都中医药大学学报,2005,28(4):8-11.
- 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(医学版),2007,38(3):417-420.
- 董晓云,杨忠奇,冼绍祥,等.补肾益精中药在干细胞研究中的应用进展[J].时珍国医国药,2009,20(5):1216-1219.
- 项鹏,夏文杰,王连荣,等.丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞[J].中山医科大学学报,2001,22(5):321-3248.
- 王勇,陆长青,王凡,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].四川解剖学杂志,2006,14(1):5-8.
- 中国知网.中国学术期刊总库[DB/OL].2012-08-10. <https://www.cnki.net>
- 董燕湘,董晓先,何慧华,等.大鼠骨髓间质干细胞用中药绞股蓝诱导为神经细胞的研究[J].中华神经科杂志,2003,36(5):355-358.
- 高唱,王景周.左归丸对体外培养新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响[J].中国医药学报,2004,19(11):691-693.
- 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):367-371.
- Ferrari G,Cusella-De Angelis G,Coletta M,et al.Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors.Science.1998;279(5356):1528-1530.
- Monga SP,Tang Y,Candotti F,et al.Expansion of hepatic and hematopoietic stem cells utilizing mouse embryonic liver explants.Cell Transplant.2001;10(1):81-89.
- Crosby HA,Kelly DA,Human hepatic stem-like cells isolated using c-kit or CD34 can differentiate into biliary epithelium.Gastroenterology.2001;120(2):534-544.
- 胡黎平,涂平生,谢富康,等.补肾方剂对大鼠骨髓基质干细胞增殖与分化的影响[J].中国药物与临床,2007,7(5):329-331.
- 范海蛟.补肾中药对大鼠骨髓基质干细胞增殖和分化的影响[D].广东:广州中医药大学,2008:1-70.
- 曾意荣,樊粤光,刘红,等.补肾活血中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2008,12(8):1581-1585.
- 张进.补肾填精药促进间充质干细胞增殖的效应及机制研究[C].第六届全国中西医结合基础理论研究学术研讨会.长沙.2010.
- 郭浩.补肾活血法对激素性股骨头坏死兔骨髓基质干细胞增殖的影响[D].陕西:陕西中医学院,2011:1-37.
- 谭峰.补肾方剂诱导骨髓间充质干细胞增殖分化的理论和实验研究[D].江苏省:南京中医药大学,2011:1-94.
- 黄胜杰,李媚,王和鸣.温阳补肾药对骨髓间充质干细胞促增殖的实验研究[J].中国中医骨伤科杂志,2012,20(10):1-4.
- Bianco P,Riminucci M,Gronthos S,et al.Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.Stem Cells.2001;19(3):180-192.
- Grande DA,Halberstadt C,Naughton G,et al.Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts.J Biomed Mater Res.1997;34(2):211-220.
- Schwartz RE,Reyes M,Koodie L,et al.Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells.J Clin Invest.2002;109(10):1291-1302.
- 郑良朴,李楠,王和鸣.补肾合剂对体外培养骨髓基质细胞分化影响的观察[J].福建中医学院学报,2003,13(6):33-35.
- 王和鸣,王力,李楠.巴戟天对骨髓基质细胞向成骨细胞分化影响的实验研究[J].福建中医学院学报,2004,14(3):16-20.
- 曾意荣,樊粤光,刘红,等.补肾活血中药对大鼠骨髓间充质干细胞体外增殖的影响[J].中药新药与临床药理,2007,18(2):93-96.
- 肖鲁伟,武中庆,季卫锋,等.右归饮诱导胎兔骨髓基质细胞向软骨细胞分化的实验研究[J].中国中医药科技,2005,12(3):154-155.

- [35] 马慧萍,贾正平,张汝学,等.淫羊藿总黄酮含药血清促进骨髓间充质干细胞增殖与成骨性分化[J].中国骨质疏松杂志,2004,10(4):420-422.
- [36] Freed LE,Grande DA,Lingbin Z,et al.Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds.J Biomed Mater Res.1994;28(48):891-899.
- [37] 李瀚旻,晏雪生,罗建君,等.左归丸药物血清对骨髓间质细胞转化为肝细胞的作用[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(28):5465-5468.
- [38] 万荣,张红梅,吴其恺,等.别毒护肝方及其拆方对大鼠骨髓干细胞增殖分化的影响[J].中西医结合肝病杂志,2007,17(2):94-96.
- [39] Ben-Yishay A,Grande DA,Schwartz RE,et al.Repair of articular cartilage defects with collagen-chondrocyte allografts. Tissue Eng.1995;1(2):119-133.
- [40] 张进.补肾法诱导间充质干细胞向神经方向分化研究[J].现代医院,2004,4(9):15-17.
- [41] Woodbury D,Schwarz EJ,Prockop DJ,et al.Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.J Neurosci Res.2000;61(4):364-370.
- [42] 蔡光先,林琳,刘柏炎,等.地黄多糖诱导骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的效应[J].中国临床康复,2005,9(17):46-47.
- [43] Zhu D,Qu L,Zhang X,et al.Icariin-mediated modulation of cell cycle and p53 during cardiomyocyte differentiation in embryonic stem cells.Eur J Pharmacol.2005;514(2-3):99-110.
- [44] Zhu DY,Lou YJ.Inducible effects of icariin, icaritin, and desmethylcaritin on directional differentiation of embryonic stem cells into cardiomyocytes in vitro.Acta Pharmacol Sin.2005;26(4):477-485.
- [45] 汪朝晖,洗绍祥,杨忠奇,等.人参皂甙诱导骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞的实验研究[J].广州中医药大学学报,2006,23(2):100-103.
- [46] 张杰,李滢,崔成德,等.补肾益精方药对老年大鼠染色体端粒DNA重复序列长度的影响[J].中国中医基础医学杂志,2004,10(10):16-17.
- [47] 许冬青,王明艳,姜海英,等.五种补益方对环磷酸腺苷造模小鼠骨髓、胸腺细胞周期的影响[J].中药药理与临床,2002,18(5):11-12.
- [48] 陈薇.中药复方四物汤提取物化学成分及其调控鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)增殖活性的实验研究[D].广东省:华南师范大学,2007:1-73.
- [49] 卢锡林,李群,姚晓黎,等.补肾方辅助骨髓干细胞移植治疗DMD的实验研究[J].中药材,2006,29(10):1056-1058.
- [50] 李瀚旻,张六通,邱幸凡,等.左归丸改善MSG-肝再生-大鼠肝肾精血亏虚证的作用机制研究[J].湖北中医学院学报,2001,3(4):30-33.
- [51] 卓勤,徐琦.补肾益精药物对老年小鼠DNA双链结构及损伤修复能力影响[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(9):40-44.
- [52] 王蕾,吕鑫霞,吴志奎.补肾生血药对金黄地鼠子宫组织bFGF、VEGF表达水平的影响[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(12):25.
- [53] 刘晓,武正炎,范萍.黄芪在外周血造血干细胞移植中应用的初步实验研究[J].镇江医学院学报,2001,11(1):15-17.
- [54] 王茂生,杨淑莲,段连凤,等.中药联合自体造血干细胞移植治疗难治性急性髓细胞白血病临床观察[J].中国中西医结合杂志,2011,31(6):847-850.
- [55] 张树成,刘效群,张志洲.补肾调经方药对人着床期子宫内膜血管生成因子及其受体的影响[J].中国中医基础医学杂志,2002,8(5):64-66.
- [56] 张树成,吴志奎,蔡连香,等.由补肾中药促进组织血管生成实验论提出"补肾生脉"的理论意义[J].中医药学刊,2005,23(6):1078-1080.
- [57] 张树成,吴志奎,王蕾,等.补肾生血和补肾调经方药促血管生成作用实验研究[J].中医杂志,2000,41(6):369.
- [58] 刘嘉,张曦,陈幸华,等.中西医结合预防造血干细胞移植后肝静脉闭塞病的临床观察[J].中国中西医结合杂志,2010,30(10):1049-1051.