

# 中药诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的研究进展

李盛华<sup>1</sup>, 郭平德<sup>1</sup>, 王文晶<sup>2</sup>

(1. 甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050; 2. 暨南大学医学院 09 级在读研究生)

**【摘要】** 骨髓间充质干细胞具有较强的自我复制和多向分化能力, 近几年发现在一定的条件下, 能够诱导分化为神经细胞。由于其具有取材方便, 回植后不会发生免疫排斥反应, 体外基因转染率高并能稳定高效表达外源基因等优点, 将为神经系统疾病的治疗提供新的思路。本文阐述中药诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化方面的研究进展, 探讨中医基础理论指导下的研究思路。

**【关键词】** 中草药; 间质干细胞; 骨髓; 神经系统疾病; 综述文献

DOI: 10.3969/j.issn.1003-0034.2010.03.029

**Research progress of bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into nerver-like cells induced by traditional Chinese medicine** LI Sheng-hua\*, GUO Ping-de, WANG Wen-jing. \*The TCM Hospital of Gansu, Lanzhou 730050, Gansu, China

**ABSTRACT** Bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs) have active abilities of self-replication and multidifferentiation. In recent years, a lot of studies have proved that MSCs can be induced and differentiated into nerver-like cells under certain conditions. Because of some advaced characteristics including sampling convenience, no immune rejection, high transfection rate and stable exogenous gene expression, MSCs will provide new way in treating disease of nervous system. In this article, the research progress of bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into nerver-like cells induced by Traditional Chinese Medicine shall be discussed, and explore the research thinking guided by basis theory of TCM.

**Key words** Drugs, Chinese herbal; Mesenchymal stem cells; Bone marrow; Nervous system diseases; Review literature

Zhongguo Gushang/China J Orthop & Trauma, 2010, 23(3): 233-235 www.zggszz.com

近年来的研究发现, 骨髓中除含有造血干细胞之外还有另外一类具有多向分化潜能的原始细胞, 即骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)。体外定向诱导分化可使 MSCs 转化为成骨细胞、脂肪细胞、软骨、肌肉细胞等。Kopen 等<sup>[1]</sup>发现 MSCs 注射到新生小鼠脑内可分化为神经元和神经胶质细胞。Woodbury 等<sup>[2]</sup>也发现, 在无血清的 DMEM 中加入 D-巯基乙醇可诱导大部分 MSCs 转变为神经元样细胞, 由此为神经系统的多种难治性疾病如脊髓损伤、周围神经损伤等开辟了一条新的细胞替代疗法。很多传统中药及复方有益智、健脑、抗衰老作用, 在神经系统疾病的治疗上有显著疗效, 故国内学者做了许多就此类中药及复方诱导 MSCs 向神经样细胞分化的实验研究, 并取得了可喜的成果。本文就中药诱导 MSCs 向神经样细胞分化实验研究的现状与进展做一综述。

## 1 中药复方的诱导分化

中药复方是按中医组方理论原则配置而成, 充分体现了

中医整体论的观点, 国内不少学者开展了运用中药复方诱导 MSCs 向神经样细胞分化的研究。黄慧等<sup>[3]</sup>用香丹注射液对 SD 大鼠 MSCs 向神经样细胞分化诱导, 结果发现诱导 3 h, MSCs 出现神经元样的形态学变化; 诱导 6~8 h, 神经元的诱导率达 (83.5±3.8)%。诱导组中, 神经元样细胞 NSE、NF 和 GFAP 为阳性; 对照组细胞和诱导组未变化细胞染色呈阴性。刘金保等<sup>[4]</sup>用当归注射液诱导 MSCs 向神经样细胞分化, 光镜下观察细胞形态, 免疫细胞化学检测神经细胞特异性抗原标志, 结果发现大鼠 MSCs 可通过贴壁法成功分离并可在体外大量扩增, 当归诱导 3 h 后大部分 MSCs 转变为神经元样细胞, 出现胞体和突起, 免疫细胞化学染色 NSE 及 Nestin 呈阳性, GFAP 呈阴性。赵楠等<sup>[5]</sup>用丹参注射液体外诱导人 MSCs 分化为神经元样细胞, 结果发现诱导 1 h 后部分 MSCs 胞体收缩, 有突起伸出; 6 h 后突起增多形成网络结构, 免疫细胞化学染色, NSE 强阳性表达率为 (43.3±4.3)%, 而 GFAP 无阳性表达。黄洁等<sup>[6]</sup>用牛珀至宝微丸诱导大鼠 MSCs 分化为神经元样细胞, 牛珀至宝微丸血清及 bFGF 诱导 MSCs 5 h 后, 部分细胞形态发生明显改变, 胞体变小, 胞质向核周收缩, 由原来的

通讯作者: 李盛华 Tel: 0931-2687001 E-mail: lishenghua0619@126.com

梭形变成圆形,折光性增强,并且伸出类似神经元突起,突起末端又发起分支,突起与相邻胞体或突起相连,形成网络样结构。随着诱导时间延长,MSCs 呈渐进性地向神经元样细胞转化,神经元样细胞增多,对照组未见有神经元样细胞出现。黄志伟等<sup>[7]</sup>用补阳还五汤诱导骨髓间充质干细胞向神经元细胞分化,结果与纯中药组相对比,能够明显促进 MSCs 转化为前角运动神经元样细胞。

以上学者研究表明,中药复方能诱导 MSCs 向神经样细胞分化,为利用中药复方提供了基础。不过也应看到,目前中药复方研究多为活血、开窍类制剂,有的是现代开发的中药注射剂,是否可以继续拓展到中医传统经方,仍需要继续探讨。另外,有关复方中具体起效成分和作用机制、复方组方理论和研究目的之间的内在联系等问题亦需进一步的探索。

### 2 单味中药的诱导分化

董晓先等<sup>[8]</sup>用天麻体外定向诱导大鼠 MSCs 向神经元样细胞分化,结果发现天麻诱导 2 h 后大部分可分化为神经元样细胞,出现胞体和突起,免疫细胞化学染色 NSE、Nestin 呈阳性,GFAP 阴性。张进等<sup>[9]</sup>用龟板水煎液对体外分离培养的大鼠 MSCs 向神经元样细胞分化,结果发现龟板可体外诱导骨髓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。王勇等<sup>[10]</sup>用含黄芪的无血清 L-DMEM 诱导人 MSCs 分化为神经细胞样细胞,结果发现经黄芪诱导后,MSCs 形态发生改变,Nestin、NSE 和 GFAP 表达阳性,分化为神经元或胶质细胞样细胞。陈东风等<sup>[11]</sup>用龟板含药血清体外诱导成鼠 MSCs 分化为神经元细胞,结果发现成年大鼠 MSCs 受龟板血清诱导后神经元样细胞 NF 表达阳性,诱导后 12 h,神经元样细胞 NF 阳性表达达到高峰。陆长青等<sup>[12]</sup>用丹参诱导大鼠 MSCs 向神经元样细胞分化,结果发现未经诱导的 MSCsngn-1,mash-1 mRNA 为阴性,诱导后有表达,诱导后的细胞 NSE 和 GFAP 呈阳性反应。

单味中药(包括传统的水煎液和提取的含药血清)在诱导 MSCs 向神经样细胞分化方面也显示出较好的结果。和复方相比,单味中药选药类型较广泛,其有效作用成分及机制有了进一步的解释。值得关注的是,当前有些所谓的单味中药研究多偏向于天然药化的药用植物领域,不能完全体现中药的传统药性理论,尤其忽视了中药的炮制应用,中药含药血清经过动物代谢,使其作用背景更加复杂化。

### 3 中药有效成分或部位的诱导分化

中药有效成分或部位诱导 MSCs 向神经样细胞分化研究。董燕湘等<sup>[13]</sup>用绞股蓝总甙诱导大鼠 MSCs 分化为神经样细胞,结果发现绞股蓝诱导剂诱导 1~5 h 后,MSCs 形态转变为典型的神经样细胞,免疫细胞化学染色显示诱导出的神经样细胞,NSE、Nestin、GFAP 表达阳性。撒亚莲等<sup>[14]</sup>用川芎嗪诱导大鼠 MSCs 分化为神经元样细胞,结果发现第 5 代 MSCs 形态达到均一,并伸出细长突起形似神经元样细胞,免疫组织化学显示 NF2M、NSE、Nestin、MAP-2 和 GAP-43 表达阳性,而 GFAP 阴性,对照组上述染色均为阴性。余勤等<sup>[15]</sup>用丹参素诱导 MSCs 分化为神经元样细胞,结果发现 MSCs 在体外传代扩增后,胞体收缩,突起伸出,呈典型的核周体形态,类似神经元;免疫组化显示诱导出的神经样细胞 NSE、NF-M、Nestin

表达阳性,GFAP 阴性。蔡光先等<sup>[16]</sup>用地黄多糖诱导 MSCs 分化为神经样细胞,结果发现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,对照组神经丝蛋白及胶质纤维酸性蛋白染色均为阴性。项平等<sup>[17]</sup>用黄连素诱导 SD 大鼠 MSCs 分化神经元样细胞,结果发现大鼠 MSCs 体外扩增第 5 代后细胞形态达到均一,成梭形,MSCs 体积逐渐增大并伸出细长突起,形似神经样细胞,免疫组化显示诱导的神经样细胞 NSE、NF 表达阳性,GFAP 阴性。贾延劫等<sup>[18]</sup>用黄芩甙诱导大鼠 MSCs 分化为神经样细胞,结果发现黄芩甙诱导 6 d 后,MSCs 形成较典型的神经样细胞形态,诱导 6 d 表达神经细胞标记蛋白和 mRNA,不表达胶质细胞标记蛋白和 mRNA,细胞凋亡率为(12.20±2.80)%。郑国庆等<sup>[19]</sup>用人参总皂甙对体外定向诱导大鼠 MSCs 向神经元样细胞分化,诱导 30 min 后,开始发生形态变化,扁平、梭形细胞胞浆回缩,向核集中,形成一个呈水滴样的细胞体,并可见小的突起从细胞膜向外伸出;诱导 3 h 后,细胞的突起伸长,圆形胞体折光增强,可出现其他的突起,部分相邻细胞的突起连接成网;诱导 5~6 h 后,大部分呈现神经元样细胞的形态。

文献检索发现,中药有效成分或部位的诱导分化报道比复方及单位中药的报道多,反映出此研究领域的当前热点,中药有效成分或部位的作用相对单一,其有效成分和作用机制的解释符合了现代医学的药理理论,较易结合现代研究方法和实验技术。但是,这类研究依然忽视了中医整体论的观点。

### 4 讨论

目前,国内学者从中药单体成分、单味中药及中药复方的不同角度运用中医药思想对诱导骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化做了大量的实验研究,并取得了令人鼓舞的成果。然而,应该注意在探讨中药单体、单味中药或中药复方的诱导机制的过程中往往偏向于某种有效成分的作用,这就忽视了中医药整体理论的观点,如果能从传统中药的药性、药效理论结合中医基础理论知识,从中医整体论的观点出发获得研究思路,再结合现代的研究方法,应该能更好地推动中医药现代化的发展。

#### 参考文献

- [1] Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(19): 10711-10716.
- [2] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res, 2000, 61: 364-370.
- [3] 黄慧, 唐云安, 张成. 香丹注射液定向诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞. 中药材, 2004, 27(8): 585-589.
- [4] 刘金保, 董晓先, 董燕湘, 等. 当归诱导骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞. 广东医学, 2003, 24(5): 466-468.
- [5] 赵楠, 冯忠堂, 王廷华, 等. 丹参注射液诱导骨髓基质细胞分化为神经元的研究. 昆明医学院学报, 2004, 25(4): 27-29.
- [6] 黄洁, 张宜, 杜少辉, 等. 牛珀至宝微丸对骨髓间充质干细胞移植后转分化为神经元的影响. 中华中医药杂志, 2005, 20(12): 721-723.

## · 继续教育园地 ·

## 骨科科研实验中配对设计资料统计分析方法及 SAS 实现

胡良平, 王琪

(军事医学科学院生物医学统计学咨询中心, 北京 100850)

**关键词** 配对分析; 实验设计; 统计学, 医学; 数据说明, 统计**DOI:**10.3969/j.issn.1003-0034.2010.03.030

Zhongguo Gushang/China J Orthop &amp; Trauma, 2010, 23(3):235-238 www.zggszz.com

当实验中仅涉及 1 个实验因素, 一切非实验因素对该因素各水平组的影响是均衡的, 选用单因素设计是合适的<sup>[1]</sup>。在前面的统计讲座中, 我们详细介绍了单因素设计中的单组设计及其用 SAS 实现数据分析的方法, 本文将重点介绍配对设计资料的统计分析方法及 SAS 实现。配对设计是属于单因素还是两因素的设计类型呢? 从下面的定义和特点中可以获得答案。

**1 配对设计的定义和特点**

与同一个定量指标对应的两组数据成对出现, 每对数据有 3 种可能的来源: 其一, 来自同一个体(接受处理前后或两个对称部位), 称为自身配对设计; 其二, 来自母体(如双胞胎或多胞胎中的两个)相同的两个个体分别接受 A、B 处理, 称为同源配对设计; 其三, 来自条件接近(如性别、年龄、体重、病情等相同或相近)的两个个体分别接受 A、B 处理, 称为条件相近者配对设计<sup>[2]</sup>。

上述 3 种形式的配对设计本质上都涉及 2 个因素, 一个称为实验因素(如处理前后或 A 与 B 两种处理), 另一个称为区组因素(即配对条件)。若观测结果为定量的, 则进行统计分析所用的指标为每对数据的差量, 此时, 就把一个原本为两因

素(一个实验因素、一个区组因素)的配对设计定量资料转化为一个单组设计定量资料了。

上述 3 种配对设计的配对条件的严格程度一样吗? 不一样! 在时间间隔不长且处理因素的 2 个水平中有 1 个为空白的前提下, 自身配对设计最为严格, 其结果的可信度最高; 若 A、B 两种处理都是真实的处理且观测的定量指标受遗传因素影响较大, 显然, 自身配对设计很不适用, 此时, 同源配对设计明显优于条件相近者配对设计。条件相近者配对设计不可轻易使用, 仅当以对定量观测指标有影响的全部重要非实验因素为配对条件时, 其结果和结论才是基本正确的, 否则, 宜采用单因素 2 水平设计(或简称为成组设计)取代条件相近者配对设计。

在配对设计中, 若观测结果为二值的(如阳性、阴性), 就称为配对设计定性资料, 即配对设计 2×2 表资料。它是按照两种处理方法或两位检测者对每一个受试者或样品检测的结果进行配对, 然后清点(阳性、阳性)、(阳性、阴性)、(阴性、阳性)和(阴性、阴性)这 4 种结果出现的频数。假定括号中写在第 1 个位置上的结果为 A 法检测的结果、第 2 个位置上的结果为 B 法检测的结果, 参见本文中的表 3。

- [7] 黄志伟, 谢华, 崔晓军, 等. 补阳还五汤对大鼠脊髓损伤后移植间充质干细胞分化的作用. 解剖学研究, 2008, 30 (3): 203-205.
- [8] 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细胞的实验研究. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(1): 51-54.
- [9] 张进, 徐志伟. 补肾法诱导间充质干细胞向神经方向分化研究. 现代医院, 2004, 4(9): 15-17.
- [10] 王勇, 陆长青, 王凡. 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. 四川解剖学杂志, 2006, 14(1): 5-8.
- [11] 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. 广州中医药大学学报, 2003, 20(3): 224-226.
- [12] 陆长青, 王勇, 陈登榜, 等. 丹参诱导骨髓基质干细胞向神经元样细胞分化及相关基因的表达. 四川解剖学杂志, 2006, 14(1): 1-4.
- [13] 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. 中华神经科杂志, 2003, 36(5): 355-358.
- [14] 撒亚莲, 李海标. 川芎嗪诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的研究. 解剖学报, 2003, 34(5): 515-518.
- [15] 余勤, 罗依, 鄂艳, 等. 丹参素定向诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的研究. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(1): 49-54.
- [16] 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. 中国临床康复, 2005, 9(17): 17-19.
- [17] 项平, 李海标. 黄连素诱导大鼠骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞. 中国病理生理杂志, 2004, 20(1): 51-53.
- [18] 贾延勃, 杨于嘉, 周燕, 等. 黄芩甙体外诱导大鼠骨髓基质细胞成为神经细胞. 中华医学杂志, 2002, 82(19): 1337-1342.
- [19] 郑国庆, 王小同, 陈伟, 等. 人参总皂苷体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞. 中华中医药学刊, 2008, 26(6): 1257-1259.

(收稿日期: 2009-12-04 本文编辑: 连智华)