

中药对神经干细胞增殖分化及调控的研究进展

姜英虹, 李江丽, 句红萍, 李 军
(昆明学院 医学院, 云南 昆明 650214)

摘要: 神经干细胞具有自我更新和多向分化潜能的特点, 在理想状态下, 其是中枢神经损伤后修复的重要来源之一, 可修复及补充受损的神经细胞, 增强神经突触之间的联系, 建立新的神经环路, 被广泛用于细胞移植和基因载体治疗的研究, 为神经干细胞的临床应用、神经退行性疾病和中枢神经系统损伤等提供了新的治疗途径. 因此, 探索中药对神经干细胞增殖分化的诱导及调控作用已成为当今的研究热点, 同时也为中药的现代化研究提供了新的思路.

关键词: 中药; 神经干细胞; 增殖分化; 调控

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 5639 (2018) 03 - 0105 - 04

DOI: 10.14091/j.cnki.kmxyxb.2018.03.022

Research Progress on Regulation of the Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells by TCM

JIANG Yinghong, LI Jiangli, JU Hongping, LI Jun
(Medical College, Kunming University, Kunming, Yunnan, China 650214)

Abstract: Neural stem cell has the characteristics of self-renewal and multi-directional differentiation potential. In the best situation, it's one of the important sources to repair the injured central nerve systems and strengthen the connection of the synapses, establishing new neural circuits. That's why the neural stem cell is widely used in researching cell transplantation and gene therapy and provides a new treatment in clinical application, neurodegenerative diseases and the central nervous system injury. Therefore, the induction and regulation effect of Traditional Chinese Medicine (TCM) on the proliferation and differentiation of neural stem cell has become a heated topic in recent years, and also has provided a new way for the modernization research of TCM.

Key words: traditional Chinese medicine (TCM); neural stem cell; proliferation and differentiation; regulation

1992年 Reynolds 和 Weiss^[1]首次从胎鼠和成年小鼠脑纹状体中分离得到神经干细胞 (Neural Stem Cells, NSCs), 随后人们又在大脑皮质、海马、脑室、嗅球等部位分离得到 NSCs, 于是 NSCs 便成为神经系统研究的热点. 而未分化的 NSCs 可通过对称分裂形成两个相同的子代以实现自我更新和增殖, 或经不对称分裂形成神经细胞和神经前体细胞 (经刺激因子干预可诱导分化为神经元和神经胶质细胞) 以维持自我和多向分化潜能, NSCs 增殖分化的命运受多因素的影响及调控, 而中药对疾病状态的治疗具有多靶标、多环节的特性, 在诱导 NSCs 增殖分化、神经修复和损伤过程中发挥着重要作用. 因此, 经中药介导 NSCs 增殖分化进程, 可对 NSCs 增殖分化产生一定的诱导或调控作用,

本文拟从中药经信号通路等途径, 对调控 NSCs 的增殖分化作用进行综述.

1 经 Notch 信号通路调控 NSCs 增殖分化

Notch 通路的信息传递作用主要依赖于蛋白质的相互作用, 引起转录调节因子发生变化或促使转录调节因子与相应的靶基因结合, 从而干预特定基因的转录. Notch 信号途径可调节干细胞的增殖分化, 当激活 Notch 信号途径, 引起干细胞增殖; 而 Notch 通路被抑制时, 干细胞则转入分化程序. NSCs 增殖、分化和存活受缺氧程度的影响, 适度缺氧可促进离体培养的鼠胚皮质 NSCs 增殖并诱导其向神经元分化, 但缺氧过度则导致其增殖减少、凋亡增加. 周胜强等^[2]以胚鼠 NSCs 缺氧 4 h 复氧

收稿日期: 2017 - 12 - 19

作者简介: 姜英虹 (1987—), 女 (白族), 云南大理人, 助教, 硕士, 主要从事神经生理学研究.

5 d 来模拟脑缺氧损伤修复过程,发现空白对照组 NSCs 中 Notch-1 和 Hes-1 mRNA 高表达, NSCs 缺氧 4 h 组在复氧 5 d 后增殖能力减弱,而缺氧 4 h 经 10% 补阳还五汤(成分为黄芪、赤芍、桃仁、归尾、地龙、红花、川芎,具有补气活血通络之功效,主治脑损伤后遗症)含药血清干预组,通过显著上调缺氧 NSCs 信号通路关联因子(Notch-1, Hes-1, Ngn-1 mRNA)的表达.并且下调 DI-1 mRNA 的表达,促进了 NSCs 增殖.研究认为,调节 NSCs Notch 信号通路相关因子 Notch-1, Hes-1, Ngn-1, DII-1 mRNA 的表达水平可能是补阳还五汤促进缺氧损伤后 NSCs 增殖的机制.

李少恒等^[3]研究应用不同浓度(0, 10, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$)蛇床子素(Ost:具有抗炎、抗氧化和神经保护作用)干预 NSCs,发现 Ost 可促进 NSCs 向神经元和少突胶质细胞分化并与浓度呈正相关,引起 Notch 1 表达下降、Ngn 2 表达上升,研究提示 Ost 可能抑制了 Notch 途径,以诱导并促进 NSCs 向神经元和少突胶质细胞方向分化.

2 经 JAK/STAT 信号通路调控 NSCs 增殖分化

Janus 激酶信号转导递质与转录激活剂(JAK/STAT)信号系统也参与干细胞调控, NSCs 向星形胶质细胞分化过程受 Notch 和 BMP 家族及 JAK/STAT 等多条通路共同调控.信号通路的作用与细胞生存的微环境密切相关,益肾化浊方(能显著改善阿尔茨海默病(AD)患者的日常自理能力、认知功能和中医症状^[4])通过改变微环境调控 NSCs 的增殖与分化方向,其机制可能与 JAK/STAT 信号通路相关.崔远武等^[5]、韩文文等^[6]采用 $\text{A}\beta$ 刺激 NSCs 建立细胞模型,以益肾化浊方(成分为炙黄芪、女贞子、川芎、补骨脂、石菖蒲、淫羊藿、制何首乌)为干预手段,发现益肾化浊方实验组中 GFAP, Smad1, STAT3 基因和蛋白的表达均显著下调,但 Tubulin 基因及蛋白表达明显增加($P < 0.05$),提示益肾化浊方对 NSCs 向星形胶质细胞的分化起到抑制作用,其机制可能是切断了 JAK/STAT 途径中 STAT3 的蛋白磷酸化,使 STAT3 无法与 GFAP(星形胶质细胞特异性基因)启动子结合,从而抑制 NSCs 向星形胶质细胞分化,维持 NSCs 微环境稳态,减少神经元损伤,并促进其向神经元分化以延缓 AD 的发展.

此外,诱导 NSCs 向神经元方向分化也可通过抑制 JAK2/STAT3 通路来实现.王凯等^[7]借助中药脑脊液药理学方法,连续给予家兔灌胃益肾化浊方 3 d 后进行脑脊液的穿刺抽取,发现 NSCs 的增殖显著增强(该增殖作用随时间延长而逐渐减弱),提示益肾化浊方含药脑脊液对 NSCs 增殖的促进作用具有适度性.对 NSCs 增殖分化而言,益肾化浊方既可诱导其向神经元分化,也能抑制其向星形胶质细胞分化,其作用机制可能是抑制了 JAK2/STAT3 途径中 STAT3 磷酸化及 Smad1 蛋白表达.

3 经 PI3K/AKT 信号通路调控 NSCs 增殖分化

PI3K/AKT 信号转导途径参与细胞增殖、分化、凋亡等功能的调节,而 AKT 是 PI3K 的关键下游靶点,位于 PI3K/AKT 途径的中心环节.黄芪多糖(APS)是中药黄芪的有效提取物之一,多应用于心脑血管、免疫系统和造血系统等疾病,一定质量浓度的黄芪注射液在作用 24 h 后,能显著促进脑缺血组织中神经元样细胞形成突起,增强神经细胞间的连接.郑利强等^[8]在 NSCs 中加入 APS 共培养,发现 APS 组 NSCs 增殖效果最佳(在培养 7 d 时增殖达峰值,然后逐渐下降),VEGF 和 FLK-1 含量最高,表明 APS 可有效促进 NSCs 增殖;在应用 LY294002(PI3K/AKT 抑制剂)干预 AKT 后, NSCs 增殖明显减少,VEGF 和 FLK-1 含量下降,说明 APS 通过 VEGF 与血管内皮细胞上的受体 FLK-1 结合,从而提高了 VEGF 和 FLK-1 含量,促进 Akt 磷酸化,进而活化并调节 PI3K/AKT 信号通路下游靶基因,促进 NSCs 增殖,APS 含药血清^[9]对 NSCs 增殖分化的促进作用也证实了这一点.另外,郜峦等^[10]发现益气活血化痰中药复方药物血清在体外可以促进 NSCs 分化增殖,而应用 LY294002 后,星形胶质样细胞和神经元样细胞数量明显减少,推测益气活血化痰中药复方可能通过调控 PI3K/AKT 通路而促进 NSCs 增殖分化.

4 经 Wnt 信号通路调控 NSCs 增殖分化

Wnt/ β -catenin 通路在 AD 的发生及发展中发挥着重要作用,包括经典的 Wnt 途径和非经典的 Wnt/Ca²⁺ 或 Wnt/PCP 途径. GSK-3 β 是 Wnt/ β -catenin 信号途径上的重要媒介,属于非常保守的丝氨酸/苏氨酸激酶,参与并影响细胞的合成、增

殖分化等作用. 姚瓊珈等^[11]利用蛇床子素 (Ost) 转染 APP 基因于 NSCs 并经 Ost 作用后, RT-PCR 显示 GSK-3 β 的 mRNA 表达量明显下降, β -catenin 的 mRNA 表达上升, Western blot 技术也验证了这一结果, 提示 Ost 可促进转染 APP 基因的 NSCs 增殖. 为了深入研究 Ost 促进转染 APP 基因的 NSCs 增殖作用机制, 研究应用 Wnt/ β -catenin 信号通路的激动剂和阻断剂, 再经 NeuN 和 Hoechst33258 染色检测神经元凋亡, CCK-8 试剂盒检测 NSCs 存活率. 结果显示, Ost 对 NSCs 的促增殖作用可能是通过活化 Wnt/ β -catenin 信号途径, 以抑制 GSK-3 β 活性, 激活 β -catenin 活性, 减少了神经元的凋亡, 促进 NSCs 向神经元方向分化.

5 经 ERK/CREB 信号通路调控 NSCs 增殖分化

黄昕等^[12]采用去势雌性大鼠—脑缺血复合模型 (经双侧卵巢切除术结合大脑中动脉阻塞法复制而来) 作为研究对象, 结果表明, 补阳还五汤可促进去势脑缺血雌性大鼠右侧海马 DG 区 NSCs 增殖及上调 P-ERK1/2 和 P-CREB1 的表达, 且其效果优于戊酸雌二醇, 同时还能被 GPER-1 的特异性阻断剂 G15 部分逆转, 说明补阳还五汤具有类雌激素作用, 而且通过调控 ERK/CREB 通路活性是其发挥类雌激素作用、促进内源性神经再生作用机制之一.

调控 NSCs 增殖分化的中药主要有滋阴、活血、益气、补肾、清热解毒等类型, 其作用机制除信号通路外, 还有其他途径, 例如: 益肾活血法^[13]可通过上调 Hes1 增加 NSCs 增殖; 银杏内酯 B^[14]能明显上调 Nurr1 蛋白的表达, 诱导 NSCs 分化为酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性的多巴胺能神经元; 川芎嗪^[15]在大鼠脊髓损伤修复过程中对脊髓内源性 NSCs 发挥上调作用; 李社芳等^[16]用不同质量浓度丹酚酸 B 处理海马 NSCs 后, 神经元特异性烯醇化酶阳性神经元占比明显升高, 而星形胶质细胞占比降低, 说明丹酚酸 B 可促进海马 NSCs 增殖及向神经元分化; 董宁等^[17]观察到广泛性焦虑 (GAD) 大鼠海马齿状回区 (DG) NSCs 增殖较活跃, 但分化为成熟神经元的能力降低, 在应用丹栀逍遥散后能促进 GAD 大鼠 DG 区 NSCs 的增殖和向神经元定向分化, 增强机体的神经修复与再生能力; 人参皂苷 Rg1^[18]具有类似于生长因子或刺激某些细胞分泌生长因子的作用, 一定质量浓度下可促进体外 NSCs、皮层 NSCs 增殖和神

经胶质样定向分化^[19]. 微环境中不同细胞因子对 NSCs 增殖能力和分化方向有一定影响, 例如万凤等^[20]利用 Transwell 装置, 将 NSCs 与星形胶质细胞共同培养以模拟体内微环境, 结果发现在脑损伤状态下, 人参皂苷显著上调了星形胶质细胞 HIF-1 α 蛋白表达, 促进了下游 VEGF 的分泌, 并以旁分泌方式作用于 NSCs, 改善了 NSCs 生存微环境, 促进 NSCs 增殖和分化, 从而修复脑组织损伤. 此外, 山茱萸环烯醚萜苷 (CIG)^[21]、壮通饮^[22]等对 NSCs 增殖及分化也有一定的促进作用.

6 结语

在一定条件下, NSCs 经干预后可被诱导分化为神经元和神经胶质细胞, 因此 NSCs 生存的微环境中刺激因子的改变均能调控干细胞的迁移和分化类型. 鉴于中药治疗具有多环节、多靶点的特点, 因此中药对 NSCs 增殖和分化的调节远不止上述几条信号通路, 但目前的相关研究多集中于单一信号通路, 而多种信号途径之间相互作用的研究相对较少, 尚不能全面反映信号通路对 NSCs 增殖和分化的调控作用 (其机制有待于深入研究). 总之, 随着生物细胞技术的不断发展以及在干细胞分化调控的相关研究带动下, 人们对 NSCs 增殖分化的信号通路及其调控的研究定能取得更大的进展, 而 NSCs 细胞移植和基因载体治疗可能成为神经系统损伤后最有潜力的修复及治疗方法之一.

[参考文献]

- [1] REYNOLDS B A, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system [J]. *Science*, 1992, 255 (5052): 1707 - 1710.
- [2] 周胜强, 肖周华, 易健, 等. 补阳还五汤含药血清对体外缺氧损伤神经干细胞增殖及 Notch 信号通路相关因子 mRNA 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31 (11): 4515 - 4519.
- [3] 李少恒, 胡昱, 姚瓊珈, 等. 蛇床子素对神经干细胞体外分化的影响 [J]. *医药导报*, 2015, 34 (7): 856 - 860.
- [4] 傅凯丽, 林翠茹, 张玉莲, 等. “益肾化浊方”治疗轻度阿尔茨海默病 15 例临床研究 [J]. *江苏中医药*, 2012, 44 (8): 28 - 29.
- [5] 崔远武, 周震, 张琳琳, 等. 从 JAK/STAT 信号转导通路探讨益肾化浊方对神经干细胞定向分化的影响

- [J]. 中医杂志, 2016, 57 (6): 512-515.
- [6] 韩文文, 张玉莲, 张琳琳, 等. 益肾化浊方条件培养基对神经干细胞增殖分化影响的研究 [J]. 时珍国医国药, 2015, 26 (10): 2339-2342.
- [7] 王凯, 张琳琳, 宋宛珊, 等. 从 JAK2/STAT3 信号转导通路探讨益肾化浊方含药脑脊液对神经干细胞增殖与分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (5): 1879-1882.
- [8] 郑利强, 江琼, 伍亚民, 等. APS 通过 PI3K/AKT 信号通路促进神经干细胞增殖 [J]. 基础医学与临床, 2016, 36 (10): 1359-1363.
- [9] 查倩, 江琼, 伍亚民, 等. 黄芪多糖含药血清对神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中药材, 2015, 38 (8): 1721-1723.
- [10] 邵峦, 王键, 程发峰, 等. 益气活血化痰中药复方对大鼠胚胎神经干细胞生长分化增殖的影响机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39 (2): 113-118.
- [11] 姚瓊珈, 孔亮, 教亚男, 等. 蛇床子素通过 Wnt/ β -catenin 信号通路促进转染 APP 基因的神经干细胞分化为更多神经元且减少神经元凋亡 [J]. 中国药理学报, 2015, 31 (11): 1516-1523.
- [12] 黄昕, 周胜强, 刘胜贤, 等. 补阳还五汤对去势脑缺血雌性大鼠海马神经干细胞增殖及 ERK/CREB 信号通路的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36 (12): 1-6.
- [13] 任德启, 关东升, 郭健. 益肾活血法对 EAE 大鼠模型的影响及对神经干细胞增殖分化的机制研究 [J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31 (12): 1382-1384.
- [14] 谭雪锋, 孙冰晶, 朱倩, 等. 银杏内酯 B 体外诱导神经干细胞向多巴胺能神经元分化 [J]. 解剖学杂志, 2016, 39 (1): 10-13.
- [15] 祁文, 熊鹰, 韩杰, 等. 川穹嗉对大鼠脊髓损伤后内源性神经干细胞增殖分化过程中 GFAP 表达的影响 [J]. 大众科技, 2017, 19 (1): 53-55.
- [16] 李社芳, 苗灵娟, 李宁, 等. 丹酚酸 B 对糖氧剥夺损伤大鼠海马神经干细胞增殖、凋亡和分化的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21 (17): 2735-2740.
- [17] 董宁, 赵瑞珍, 徐硕, 等. 丹梔逍遥散对广泛性焦虑大鼠海马齿状回神经干细胞增殖与分化能力的干预作用 [J]. 北京中医药, 2015, 34 (1): 63-66.
- [18] 张薇, 王大明, 谭渊, 等. 人参皂苷 Rb1、Rg1 对胎鼠体外神经干细胞促增殖分化作用的研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2016, 31 (11): 1200-1207.
- [19] 田沫, 万凤, 高健, 等. 人参皂苷 Rg1 对体外胚鼠皮层神经干细胞的增殖和神经胶质定向分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (11): 4527-4530.
- [20] 万凤, 司银楚, 牛欣. 人参皂苷作用于星形胶质细胞对中风后神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31 (5): 1617-1624.
- [21] 张丽, 赵丽红, 张兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷促进大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24 (5): 550-553.
- [22] 陈晓锋, 王婧婧, 陆惠, 等. 壮通饮对体外培养新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26 (7): 1099-1102.

(上接第 104 页)

移植 3 个月后, 宿主的每搏量并没有改善, 可能与心肌通常被认作是不可再生组织有关, 相比于处于不断更新的可再生组织, 种间移植的干细胞较难发挥组织重塑作用.

[参考文献]

- [1] 易再超, 方云龙, 尹亚楠. 浅析有氧运动对老年人抗衰老作用的研究 [J]. 文体用品与科技, 2014 (22): 177-179.
- [2] LI J, CHEN H, LV Y B, et al. Intraperitoneal injection of multipotent cells treatment on a mouse model with aplastic anemia [J]. Stem Cells International, 2016 (3): 1-6.
- [3] 李军, 张涓, 刘革修. 小鼠胎盘组织细胞移植的抗衰老作用研究 [J]. 生物医学工程学杂志, 2010 (6): 1312-1316.
- [4] 李军, 张涓, 王彦平, 等. 小鼠胎盘源干细胞移植对臭氧致衰老模型的影响 [J]. 广东医学, 2010 (4): 404-406.
- [5] 李军, 刘革修. 再生障碍性贫血治疗中有待解决的主要问题 [J]. 广东医学, 2009, 30 (3): 476-478.
- [6] LI J, ZHANG L, ZHOU L, et al. Beneficial effects of non-matched allogeneic cord blood mononuclear cells upon patients with idiopathic osteoporosis [J]. Journal of Translational Medicine, 2012, 10 (1): 1-6.
- [7] 鲍雷, 王军波, 张远, 等. 吉林人参低聚肽对雄性小鼠性功能影响的实验研究 [J]. 中国预防医学杂志, 2015, 16 (10): 757-760.