

专家论坛

“肾生骨髓,髓生肝”的科学内涵

李瀚¹* 高翔²*

李瀚¹ (1956~), 2000年毕业于湖北中医学院, 获医学博士学位。现任湖北中医学院附属医院国家中医肝病医疗中心主任医师, 中西医结合研究生导师, 肝病研究所实验室(国家中医药科研Ⅲ级细胞分子生物学实验室)主任。主要研究方向: 中医药防治肝炎后肝硬化及肝癌的作用及机制研究; 肝肾同源与肝再生的基础与临床研究。主持湖北省“九五”攻关重点科技发展规划项目——抗毒软坚胶囊防治肝炎后肝硬化和肝癌的新药开发研究, 获联合国和平基金会优秀成果奖。完成国家自然科学基金项目“从左归丸对MSG-肝再生-大鼠肝再生的影响研究肝肾同源、慢性乙型肝炎分子证候辨证的研究”等科研工作。取得科技成果10项, 获湖北省卫生厅科技进步一等奖, 湖北省人民政府科技进步二、三等奖和获国家中医药管理局中医药基础研究三等奖各1项。申请国家专利2项, 已获国家专利1项, 转让科技成果1项。目前主持国家自然科学基金项目——“肾生骨髓, 髓生肝”的分子基础研究、湖北省自然科学基金项目——左归丸影响MSG-肝再生-大鼠肝再生的基因表达谱分析等。新世纪全国高等医药院校中西医结合专业规划教材《中西医结合传染病学》编委、副主编, 参加编写学术专著9部, 发表学术论文40余篇。

主题词 肾(中医)/生理学 肝肾同源

“肾生骨髓, 髓生肝”的精辟论断见于《素问·阴阳应象大论》, 是“肝肾同源”的理论基础和核心内容, 一直科学地指导着中医药临床实践。近现代国内外学者采用先进的现代科学技术, 对“肾生骨髓”的科学内涵进行了比较系统而深入地研究, 但对于“髓生肝”的理论精髓鲜有学者深入挖掘其科学内涵。主要原因是经典胚胎发育学认为, 在发育过程中一种胚层的细胞不能转化为另一种胚层的细胞, 源于中胚层的骨髓不会产生源于内胚层的肝脏。受此观点限制, 长久以来缺乏对于“肾藏精、精生髓成肝”的研究, “髓生肝”只能是尚无现代科学依据的科学假说。近些年来, 国内外学者突破经典胚胎发育学的某些固有认识, 获得了一系列创

新性强和应用前景广阔的研究成果。特别是随着骨髓干细胞研究的深入, “髓生肝”的科学内涵逐渐被揭示。

1 “肾生骨髓”的科学内涵

自上世纪80年代以来, 国内外许多学者围绕“肾生骨髓”的理论核心, 按照中医学“肾主藏精, 精聚生髓, 髓聚为脑, 精可化血”等传统理论精髓, 结合现代科技方法从宏观、微观水平不同层次进行了比较系统而深入地研究, 从肾藏精、精生髓化血, 肾藏精、精生髓壮骨, 肾藏精、精生髓健脑等方面入手深入探讨了“肾生骨髓”的科学内涵。

不同学者采用多种骨髓损伤的动物模型进行补肾生髓化血的实验研究, 得到了比较一致可以重复的结果: 补肾生血药有明显保护骨髓, 促进造血生血的作用。临床观察进一步验证了实验结果的科学性与可靠性, 国内数家重点医疗单位验证了补肾生血药对放化疗肿瘤、血液病的肾虚贫血证等有明显的疗效, 特别是对 β -地中海贫血及早期造血障碍有很好的疗效; 治疗3个月后的 β -地中海贫血患者的临床症状的改善与血红蛋白提高有很好的一致性, 在停药后3个月复查, 其血红蛋白仍能维持较高水平^[1]。有研究表明, 补肾生髓化血是通过刺激骨髓造血干细胞增殖、分化, 直接促进造血功能而“生血”; 同时也刺激骨髓间质细胞增殖、改善造血微环境, 间接影响造血机能^[2]。揭示了“肾藏精、精生髓化血”的科学内涵。

多数学者主要采用老龄雄性大鼠为模型研究补肾生髓健脑的作用, 从18月龄开始给药, 连续给药6个月后, 测定老龄大鼠脑组织乙酰胆碱(ACh)、胆碱乙酰基转移酶(ChAT)、胆碱酯酶(ChE)和乙酰胆碱-M受体, 结果表明, 补肾生髓健脑药能降低ChAT, 提高ChE活性, 从而使ACh含量明显降低, 同时提高乙酰胆碱-M受体的亲和力, 并增加受体的数量, 使这些指标的改变接近年轻大鼠的水平, 进而提高中枢胆碱能神经系统的应答能力。进一步研究表明, 补肾生髓健脑药可明显提高给药老龄大鼠脑组织DNA甲基化酶活力, 也能明显提高该酶对热稳定性, 对盐的耐受性; 结果还提示能影响基因表达与调控, 从而有利于提高机体的生命活力, 健脑益智, 延缓衰老^[1]。揭示了“肾藏

基金项目: 国家自然科学基金(30271562, 30371787); 科技部重大基础研究前期研究专项(2002CCC00300); 湖北省自然科学基金(2001ABB171)

* 湖北中医学院附属医院肝病研究所, 武汉市武昌区花园山4号(4300061)

收稿日期: 2005-06-06

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

精、精生髓健脑”的科学内涵。

研究者主要采用骨质疏松(去势大鼠)和自然衰老大鼠两种动物模型观察补肾生髓壮骨的作用。去势大鼠的性激素停止分泌,表现为雌二醇(E_2)和降钙素(CT)含量下降,甲状旁腺激素(PTH)上升,碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)活性上升,这些变化与老年骨质疏松症的临床改变相吻合。用补肾生髓壮骨药灌胃去势大鼠 3 个月后,发现可以升高 E_2 和 CT 含量,降低 PTH 含量和 ALP、ACP 活性。采用自然衰老大鼠模型的实验结果证实,老年大鼠肋软骨氨基多糖(GAG)中己糖醛酸、氨基己糖、氨基半乳糖含量随增龄明显下降,而补肾生髓壮骨药可明显提高老龄大鼠 GAG 分子中己糖醛酸含量,有效调节和促进实验动物软骨的代谢。国内许多学者通过大量临床实践证实了补肾(左归丸等)生髓壮骨的作用,以左归丸为基本方治疗骨折延迟愈合、肾病性骨质疏松症、绝经期骨质疏松症等骨代谢障碍病症多有收效^[3]。揭示了“肾藏精、精生髓壮骨”的科学内涵。

我们采用左旋谷氨酸单钠皮下注射结合肝大部切除复制肝肾精血亏虚证动物模型,模型动物不仅表现出肝再生过程严重失调,还表现出骨髓有核细胞增生度降低、外周血红细胞计数和血红蛋白量减少,造血机能减退。给予左归丸治疗后在改善模型动物肝再生过程的同时,促进模型动物骨髓有核细胞增生,升高外周血红细胞和血红蛋白^[2,4]。进一步研究其作用机理时发现,经左归丸补肾治疗后,在骨髓有核细胞增生,外周血红细胞和血红蛋白恢复正常的同时,其 ARN 神经细胞凋亡得到显著减轻和 ARN 神经细胞核变化的形状因子、圆形度、异形指数等指标显著改善^[2,5]。这些实验结果表明,“肾生骨髓”的科学内涵不仅包括“肾生骨髓”,还包括“肾生脑髓”。“肾生骨髓”与“髓生肝”(调节肝再生)可以相继或同时发生;补肾不仅可以生髓,还可以促进“髓生肝”,这就为进一步揭示“髓生肝”的科学内涵奠定了实验基础^[6]。

2 “髓生肝”的科学内涵

长久以来,虽然有学者认识到“髓生肝”反映了肾水通过“髓”而涵养肝木的母子相生关系,但对其真正科学内涵认识不清,特别是没有将其联系到“髓”生成肝的直接转化关系。经典的胚胎发育学也认为 3 个主要的细胞系(外胚层、中胚层、内胚层)在胚胎囊胚期分化,不同胚层的细胞之间不能相互转化,骨髓细胞和肝、胆管细胞分属于中胚层和内胚层细胞,因此,并不存在骨髓细胞形成肝细胞的可能性。

近些年来,随着研究的深入,越来越多的实验证据

已改变和突破了这一传统观点。首先在胚胎发育学上存在肝脏—骨髓相关性,骨髓干细胞和肝细胞经历过共同的阶段。胚胎时期造血干细胞由卵黄囊进入胎肝,使胎肝成为造血的主要部位和 B 淋巴细胞成熟的诱导环境,随后造血干细胞迁移入骨髓,成为成体造血的骨干力量,但成体肝脏内仍含有造血干细胞、具有髓外造血潜能。其次,肝内具有分化潜能的卵圆细胞具有与造血干细胞相似的表型,两者都表达 $CD34$ 、 $Thy-2$ 和 $c-kit$ mRNA 及蛋白质^[7],以前认为仅表达于造血干细胞的 $flt-3$ 受体 mRNA 也被证明表达于卵圆细胞^[8],由此可以看出骨髓和肝脏之间可能存在一种品系关系,两者分别处于分化谱的两端。更重要的是,近年来骨髓干细胞的研究进展已经证实骨髓细胞和肝细胞不仅仅具有相关性,骨髓干细胞确实可以横向分化为肝细胞,而且这种转化即使在没有合并严重的肝损伤时也可实现,在生理状态下始终存在着骨髓细胞向肝细胞的低水平移动^[9]。临床实践中通过特异性 Y 染色体 DNA 探针检测接受男性骨髓移植的女性患者肝组织和接受女性供肝的男性肝移植患者的肝组织,发现了 Y 染色体阳性上皮细胞,根据其定位和 CK8 阳性表达,说明它们是骨髓起源的肝细胞^[10],从而证实人体生理病理条件下同样可以发生骨髓形成肝细胞这一过程。这些研究成果不但突破了经典胚胎发育学的某些固有认识,而且逐渐揭示出“髓生肝”科学内涵,即“髓生肝”理论包含了“髓”生成肝的直接转化关系。

为探讨骨髓干细胞在体外转化为肝细胞的能力和机制,我们进行了肝脏细胞条件培养基诱导大鼠骨髓间质细胞分化为肝细胞的实验研究。从大鼠骨髓中分离纯化培养间质细胞,诱导前 24 小时在培养液中加入 $1 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维生长因子以促进细胞分裂,再以肝脏细胞条件培养基(即肝脏细胞培养基上清液)进行诱导,分别于诱导培养 0、7、14、21、28 天时留取细胞,观察细胞形态的变化,并采用免疫细胞化学方法检测肝系细胞特异性标志物(AFP、白蛋白、CK18),用 PAS 法进行糖元染色试验以验证诱导分化的结果。我们观察到诱导后 3 天骨髓间质细胞开始表现为肝细胞样细胞形态,10 天左右与肝细胞体外贴壁形态几乎一样。诱导后细胞逐渐出现肝细胞特异性标志物,而且随着诱导时间的延长逐渐成熟。AFP 在 7、14 天时表达较高,21 天、28 天时表达显著减少;白蛋白、CK18 和糖元随着诱导时间的延长表达逐渐增多。实验结果表明,骨髓间质细胞在适合其转化为肝细胞的环境中(肝脏细胞条件培养基)能诱导分化为肝细胞^[11],提供了“髓生肝”的体外实验依据。

3 “补肾生髓成肝”的理论认识及其意义

鉴于有关人类胚胎干细胞的研究受到伦理道德和法律的限制,成体干细胞的研究越来越受到重视。最近的许多研究证明,骨髓中的干细胞在特定环境下可分化成为多种组织细胞^[12],骨髓细胞向肝细胞横向分化的潜能已得到肯定。骨髓移植在白血病领域的广泛应用使得这项技术日益成熟,结合骨髓细胞转化为肝细胞的潜能,可以看到骨髓干细胞的研究成果在肝脏疾病治疗方面具有广阔的应用前景。在人工肝方面,可以在人工肝装置中利用患者自体骨髓细胞诱导转化的肝细胞作为生物人工肝的细胞来源,不仅解决了肝细胞的来源问题,而且避免了交叉感染的可能性。另外,可以运用生物工程学的理论与技术在体外诱导自体骨髓细胞定向分化,形成可供移植的人工肝脏,这可从根本上解决目前原位肝移植存在的三大问题:供肝缺乏、移植排异反应和交叉感染。在先天性或代谢缺陷性肝脏疾病的治疗方面,自体骨髓细胞可以作为理想的转基因治疗的靶细胞。在其它中毒性、炎症性、以及慢性损伤性肝脏疾病的治疗方面,自体骨髓来源肝干细胞移植也是一种较为理想的根治性治疗方法,优点是不仅可以使因病变而减少的肝细胞数和因病变而破坏的肝组织结构得到恢复,而且完全避开了移植排异问题。但是,骨髓转化为肝细胞的自然转化率较低(2%左右),不能满足临床应用的需要。因此,如何提高其转化率、转化速度和维持其肝细胞功能,使之能尽快应用于临床是目前学术界关注的热点和难点。

根据《内经》“肾生骨髓,髓生肝”的理论认识,结合现代“肾生骨髓”和“髓生肝”的研究基础,我们将二者结合起来,提出“补肾生髓成肝”的科学假说,开展补肾促进骨髓形成肝细胞的实验研究,探讨补肾促进骨髓形成肝细胞的方法和机制,为进一步运用左归丸等补肾中药及其活性成分从骨髓诱导分化、扩增肝细胞产生人工肝以及在临床中运用补肾结合骨髓移植(或骨髓干细胞移植)治疗肝脏疾病,奠定坚实的实验基础和提供分子生物学的理论指导。

4 补肾促进骨髓形成肝细胞及其机制

为提高骨髓形成肝细胞的转化率,我们进行了体内(交叉性别骨髓移植模型)和体外(骨髓间质细胞转化为肝细胞)两种实验研究。在左归丸药物血清促进诱导大鼠骨髓间质细胞分化为肝细胞作用的实验研究中发现,肝脏细胞条件培养基诱导培养3天左右即有少量细胞形态开始变化,表现为肝细胞样细胞形态:7~8天呈多边形,胞浆丰富,核大;12天左右与肝细胞体外贴壁形态几乎一样。随着诱导时间的延长,肝细胞样的

细胞数量也渐增多。诱导后28天,肝细胞样的细胞仍存活。左归丸药物血清能促进这一诱导作用,与对照组比较,在诱导后7、14、21、28天,肝细胞样的细胞数量有显著增加。未经诱导的骨髓间质细胞始终呈梭形,传代至15代时细胞开始变得宽大、扁平,逐渐脱壁死亡。表明在体外细胞培养的条件下,用补肾的左归丸药物血清不仅可显著提高骨髓转化肝细胞的转化率,而且能维持已转化为肝细胞的功能。

参考文献

- 1 吴忠垒,姜葆华,李承军,等. 肾生髓理论现代研究. 中医杂志, 1999, 40(10): 626~628.
- 2 李瀚,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. 湖北中医学院学报, 2001, 3(4): 30~33.
- 3 孙湘. 加味左归丸治疗骨质疏松症腰痛临床疗效观察. 中国中医骨伤科杂志, 2002, 10(5): 36~37.
- 4 李瀚,张六通,邱幸凡,等. “肝肾精血亏虚大鼠”动物模型的建立. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(4): 291~295.
- 5 Li Han-min, Gao X, Yang ML, et al. Effects of Zuogui Wan on neurocyte apoptosis and down-regulation TGF- β expression in nuclei of arcuate hypothalamus of monosodium glutamate—liver regeneration rats. World Gastroenterology, 2004, 10(19): 2823~2826.
- 6 李瀚,张六通,邱幸凡. “肝肾同源于脑”与肝肾本质研究. 中医杂志, 2000, 41(2): 69~71.
- 7 Petersen BE, Goff JP, Greenberger JS, et al. Hepatic oval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. Hepatology, 1998, 27(2): 433~445.
- 8 Omori N, Omori M, Evarts RP, et al. Co-expression of flt-3 ligand/flt-3 and SCF/C-kit signal transduction systems in bile duct ligated S1 and W mice. Am J Pathol, 1997, 150(4): 1179~1187.
- 9 Theise ND, Badve S, Saxena R, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. Hepatology, 2000, 31(1): 235~240.
- 10 Alison MR, Poulsom R, Jeffery R, et al. Hepatocytes from non-hepatic stem cells. Nature, 2000, 406(6793): 257.
- 11 李瀚,晏雪生,明安萍,等. 肝脏细胞条件培养基诱导大鼠骨髓间质细胞分化为肝细胞的作用. 中西医结合肝病杂志, 2005, 15(1): 28~30.
- 12 赵春华,廖联明. 对成体干细胞可塑性的新认识及其在再生医学中的意义. 中华血液学杂志, 2003, 24(2): 57~58.

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产,符合药用各项指标,有0号、1号、2号等型号,多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎需要的单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格:每万粒135元(含邮资)。

地址:浙江省新昌县一诺胶丸有限公司,电话:0575-6061888; 013706852676; 邮编:312560

联系人:潘炎锋