

## · 综 述 ·

# 衰老引发骨髓干细胞演变的规律及中药的干预作用

高 冬<sup>1</sup> 陈文元<sup>1</sup> 吴立娅<sup>1</sup> 宋 军<sup>2</sup>

(1. 福建中医学院, 福州市闽侯上街华佗路 1 号, 350109; 2. 中国中医科学院医学实验中心)

**[关键词]** 衰老; 骨髓; 干细胞; 中药干预; 综述

干细胞被认为具有无限增殖和多向分化的潜能, 骨髓干细胞不仅终生提供各种祖细胞和外周血细胞, 而且还必须通过精细地调节自我更新和终末分化之间的动态平衡, 避免因过度增殖导致白血病等癌症的发生或因过度分化造成储备干细胞的耗竭, 使组织创伤的修复和自我更新上出现障碍。近年的研究表明<sup>[1,2]</sup>, 由于成年后干细胞进行性的功能受损, 逐渐丧失了修复和自我更新能力, 导致组织和器官出现以退行性改变为特征的衰老表现。最早引起对干细胞衰老的关注是临床全骨髓连续移植的有效次数局限于 4~5 次<sup>[3]</sup>, 提示由于连续移植或衰老使上述动态平衡趋于终末分化和干细胞耗竭。骨髓干细胞以造血干细胞(HSC)和间充质干细胞(MSC)为主, 干细胞衰老的研究主要也集中在这两类干细胞上。尽管它们具有不同于其他种类细胞的属性, 即多向分化特性和不对称分裂方式, 但与体细胞在衰老进程中仍存在一些相似的变化。本文对此规律性的变化以及补益活血中药可能具有的干预作用进行如下探讨。

### 1 形态变化

衰老的 MSC 与其他衰老的体细胞一样, 表现出细胞体积的增大, 当 SV 40 或端粒酶转染 MSC 后, 细胞获得永生性且体积变小<sup>[2]</sup>。衰老的 MSC 形状更加扁平, 有较多伸展的更长的突出。老年人骨髓 MSC 体外培养时不呈现纺锤状, 而年轻供体的 MSC 原代培养时呈纺锤状, 随着培养代数的增加, 逐渐丧失这一形状<sup>[2]</sup>。另外, 由衰老 MSC 形成的集落数量下降, 体积变小<sup>[2]</sup>。

### 2 端粒缩短

自 1990 年首次成纤维细胞中发现端粒长短与细胞衰老相关后<sup>[4]</sup>, 无论是体外培养还是在体衰老的 MSC 和 HSC 中均发现了端粒缩短的现象<sup>[2,5]</sup>, 从

Werner 综合征和共济失调毛细血管扩张综合征(ataxia telangiectasia)等老年失调性患者来源的造血干细胞端粒亦明显缩短<sup>[6]</sup>。连续移植的造血干细胞也出现端粒缩短的现象<sup>[5,6]</sup>, 而且正常的造血干细胞连续移植次数可达 4 次, 而端粒酶缺失的造血干细胞只能经受 2 次的连续移植<sup>[5]</sup>。但在 mTERT 转基因小鼠中, 端粒酶过度表达, 端粒长度没有缩短, 其造血干细胞连续移植的次数并不超过野生型的细胞, 提示造血干细胞的衰老还存在其他调控机制。

由于不同检测方法的灵敏度不同, 采用的标准不一, 导致 MSC 是否表达端粒酶还存在争议, 但 MSC 端粒酶敲除基因小鼠会出现早衰<sup>[2]</sup>。人来源 MSC 的端粒以 17bp/year 速度缩短, 直到端粒长度达 10kb 时即停止分裂, 这一点与其他体细胞相同<sup>[2]</sup>。由 MSC 分化而来的成骨细胞的端粒比其前体细胞更长。端粒酶的活性不仅与干细胞的分裂能力有关, 而且与分化能力也有关。端粒酶活性的升高可延长人 MSC 的寿命, 提高其分化潜力<sup>[2]</sup>。

### 3 DNA 损伤

体内存在精细校读机制和修复系统以避免出现 DNA 损伤。一旦 DNA 广泛损伤或损害了 DNA 的代谢过程, 都会触发细胞的衰老和死亡。干细胞在其一生中积累的 DNA 损伤也会导致这种结果。核苷酸切除修复系统的关键蛋白 Ercc1 突变小鼠表现出造血应激反应下降和 HSC 的耗竭<sup>[5]</sup>。

DNA 损伤还可以源于自由基引发的氧化损伤, 而 HSC 的自我更新能力依赖于 Atm (ataxia telangiectasia mutated) 基因介导的对氧化应激的抑制, 通过活化 p38MAPK 通路, 可以限制造血干细胞的寿命。在 Atm 基因缺陷小鼠上就能发现活性氧自由基种类的增多和 HSC 功能的缺损, 采用抗氧化剂和 p38 抑制剂治疗可以恢复 HSC 的功能<sup>[7]</sup>。在培养基中添加抗氧化剂, 同样可延长人 MSC 的寿命, 提高其分裂能力<sup>[8]</sup>, 但氧化过程及氧化终产物调控 MSC 增殖与分化的机制尚不清楚。

4 基因表达改变

近年来,相关研究显示,体细胞的衰老主要通过激活细胞周期抑制因子p<sup>53</sup>/p<sup>21</sup>和p<sup>16</sup>/RB基因表达实现的。p<sup>53</sup>路径主要通过影响端粒的结构和DNA的损伤发挥作用;p<sup>16</sup>/RB路径主要影响癌基因、染色质结构和各种应激反应。这些对体细胞的寿命和衰老具有调节作用的基因同样可以调控干细胞的衰老,基因敲除或转基因小鼠导致造血干细胞p<sup>53</sup>表达激活,与野生型相比,小鼠的抗癌性提高,寿命却显著缩短且有早衰的表现<sup>[3]</sup>,在某些情况下,降低p<sup>53</sup>的含量可使衰老的部分表征减弱<sup>[3]</sup>。p<sup>53</sup>和p<sup>16</sup>/RB表达升高的现象在衰老MSC培养时同样出现<sup>[9]</sup>。

5 基质环境改变

骨髓中干细胞的衰老是由其自身变化和环境变化两方面造成的,累积的氧化损伤和基因异常是直接原因,四周组织老化静默,缺乏激活因子,是间接原因。细胞之间的相互作用、细胞因子水平的不同和蛋白间的相互影响决定了干细胞增殖或分化的方向,幼鼠的内环境能激活衰老干细胞<sup>[10]</sup>,就说明环境对干细胞衰老的重要作用。

将MSC培养在类似于基底膜的胞外基质中,对MSC的增殖及其多分化潜能的维持都能起到积极的作用,在体外培养体系中加入HSC最有利于MSC的生长<sup>[11]</sup>,因此,与年龄相关的造血干细胞的变化可能对MSC的功能产生影响<sup>[12]</sup>。另外,骨髓基质中含有的多聚唾液酸糖蛋白合成减少,可导致体内MSC增殖和发育障碍<sup>[8]</sup>,而且衰老造成胶原蛋白交联度增高,衰老细胞释放出金属蛋白酶、炎症因子等信号对MSC和HSC的分化和衰老进程中的再生潜力都有调控作用,上述原因最终皆造成干细胞功能受损,补充祖细胞能力下降,使得各组织器官退化。

6 中药作用

关于补益活血中药对HSC和MSC的作用方面积累了大量的临床和基础研究资料,期望通过对研究结果进行综合与分析,为中医药与干细胞结合的进一步研究提出新思路。

6.1 中药对骨髓间充质干细胞的影响

中药影响MSC的研究主要集中在对其多向分化能力的影响上,许多补益活血和具有抗氧化、抗衰老能力的中药都能影响MSC的分化<sup>[13]</sup>,表现出中药在诱导分化上的巨大潜力。如丹参和麝香多肽体外诱导MSC成功分化成神经细胞,而当归、龟甲、三七总皂苷、黄芪、天麻和刺五加等可以体外诱导MSC定向分化成神经元样细胞;丹酚酸B、黄芪甲苷、三七皂苷和

人参总皂苷使不同来源的MSC诱导分化成心肌样细胞;上述药物的诱导机制不甚明确,是否与其抗氧化作用或促进诱导因子的分泌有关,尚需进一步证明。

正常MSC成骨活性弱,骨化过程较慢。中医学认为,肾藏精、主骨、生髓,补肾填精中药在MSC骨化过程中表现出明显的作用。龟甲含药血清显著升高MSC中碱性磷酸酶的表达和基质钙沉积形成的钙化结节,分别在7天、14天、21天和28天各时相点升高培养液中骨钙素的含量<sup>[14]</sup>,并以时效和剂量依赖性促进骨形态发生蛋白4的mRNA及其蛋白表达,使MSC向成骨细胞分化<sup>[15]</sup>。淫羊藿总黄酮200mg/kg灌胃给于或局部释放可通过提高血清中成骨生长因子TGF-β和BMP-2的浓度,显著诱导MSC的成骨分化,且在支架中形成类骨组织<sup>[16]</sup>。核心结合因子α的表达起始于MSC向成骨细胞诱导分化的早期,并持续表达于成骨分化的全过程。在其表达最强的时间点检测发现,巴戟天水提物和醇提物均能加强分化过程中Cbfα的表达,且醇提物促成骨分化的作用强于水提物<sup>[17]</sup>。虽然骨碎补水提液、醇提液和其有效活性成分柚皮苷都对MSC有良好的保护作用,但只有50μg/L的醇提液与同浓度的柚皮苷能提高MSC中碱性磷酸酶的活性以及VonKossa染色的钙结节数量,促进MSC向成骨细胞分化,有利于成骨作用<sup>[18]</sup>。上述补肾中药对MSC骨向分化的促进作用符合“肾主骨,生髓”的中医理论。

促增殖方面的研究发现,补益、活血中药具有显著的促MSC增殖作用<sup>[19-21]</sup>,用10%补肾活血中药的含药血清代替10%的胎牛血清培养大鼠骨髓间充质干细胞,细胞不仅在表型表达和细胞形态上具备MSC特征,而且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<sup>[19]</sup>,提示补肾活血中药能促进MSC在体外增殖。龟甲和人参的有效成分对MSC体外增殖的影响还表现出双向调节的能力,龟甲提取物中十四酸甾醇酯和十六酸甲酯具有促进rMSCs增殖的作用,而十八酸则具有抑制作用<sup>[20]</sup>;人参茎叶皂苷浓度在50~200μg/ml之间时,MSC集落产率显著高于对照组,其中浓度为100μg/ml时效应最明显;但在400μg/ml时,MSC集落产率却明显低于对照组,说明人参茎叶皂苷在一定浓度范围内对体外培养的小鼠MSC具有生长促进作用,但在高浓度时却表现为生长抑制作用<sup>[21]</sup>。

6.2 中药对造血干细胞的影响

造血干细胞是最早发现并应用于临床治疗的,由于传统的中医药在治疗各类血液病和减少放、化疗的副作用,恢复重建骨髓造血机能方面具有独特的功效,

该领域是中药影响干细胞研究介入最早、研究最为深入的。许多补益活血中药不仅能促进 MSC 的体外增殖,对造血干细胞也有不同程度的促增殖作用<sup>[22-29]</sup>,血府逐瘀汤<sup>[22]</sup>和六味地黄丸<sup>[23]</sup>两个复方均能激活造血干细胞。其中,中、低剂量的血府逐瘀汤能显著提高造血干细胞的增殖分裂能力,且低剂量的药物还能提高 CD34 和 Sca-1 的表达,而中剂量的药物只能明显增加 Sca-1 的表达,提示血府逐瘀汤通过增加较早期造血干细胞的数量和功能,提高造血能力,从而达到去瘀生新的作用。更引人关注的是低、中剂量六味地黄丸能提高老年小鼠骨髓中造血干细胞的数量、增殖能力以及原始造血干细胞表型 CD34 的表达,表现出激活衰老造血干细胞的作用<sup>[24]</sup>。单味中药人参、黄芪、当归和鸡血藤对造血功能的影响研究比较深入,人参多种成分都能影响造血干细胞<sup>[25]</sup>,人参总皂苷、皂苷单体 (Rgl, Rbl) 和人参二醇具有促进人脐血和小鼠骨髓造血干细胞的增殖,提高造血祖细胞集落产率的作用;而人参三醇对红系祖细胞增殖的抑制作用呈剂量依赖关系;人参多糖对分化成粒细胞和单核细胞的造血祖细胞具有促进增殖分化的作用。黄芪多糖能促进正常及化疗小鼠骨髓造血干细胞的增殖和外周动员,不同程度地增加脾及外周血中的造血干细胞<sup>[26]</sup>。当归有效成分当归多糖能显著增加外周血中 CD34<sup>+</sup> 细胞百分率和 CFU-Mix 产率,对小鼠外周血造血干细胞有一定的动员作用<sup>[27]</sup>。从鸡血藤乙酸乙酯活性部位中提取的 9 个单体化合物包括没食子儿茶素、芒柄花素、儿茶素、焦性黏液酸、丁香酸、Demethylvestitol、间苯三酚、芒柄花苷、表儿茶素对骨髓抑制小鼠各系造血祖细胞均有显著的促增殖作用,以儿茶素的刺激增殖活性最强<sup>[27]</sup>。

骨髓基质细胞是造血微环境的主要成分,对造血起不可缺少的调节和支持作用。人参、黄芪、当归和鸡血藤的活性成分在提高骨髓细胞分裂能力的基础上,还可升高体内正向造血调控因子的水平,如人参总皂苷可显著提高大鼠和人的 Epo、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF)、IL-3、IL-6 的蛋白表达水平<sup>[24]</sup>;黄芪多糖刺激骨髓基质细胞合成和分泌干细胞因子 (SCF)、IL-6、IL-3、GM-CSF,升高血清 Meg-CSA 水平;鸡血藤的活性成分刺激 IL-1、IL-2、IL-3 等的分泌<sup>[28]</sup>。几种药物都通过保护和改善造血微环境,影响内源性细胞因子的分泌,进而促进各系造血祖细胞的增殖和分化。

虽然缺乏直接的证据表明中药能延缓骨髓干细胞的衰老进程,但由于衰老会导致干细胞增殖能力和多向分化潜能的下降,并引起骨髓基质环境等的改变,而

上述补益、活血及抗氧化中药对骨髓中 MSC 和 HSC 的初步研究结果已经说明,中药对干细胞增殖、分化和骨髓微环境的影响作用,提示中药在干细胞衰老的干预方面具有巨大的应用前景,必将吸引更多的关注,开展更加深入、广泛的探索。

## 参考文献

- [1] Van Zant G, Liang Y. The role of stem cells in aging[J]. Exp Hematol, 2003, 31(8): 659-672.
- [2] Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells[J]. Ageing Res Rev, 2006, 5(1): 91-116.
- [3] Harrison DE, Astle CM. Loss of stem cell repopulating ability upon transplantation: effects of donor age, cell number, and transplantation procedure[J]. J Exp Med, 1982, 156(6): 1767-1779.
- [4] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts[J]. Nature, 1990, 345(6274): 458-460.
- [5] Kamminga LM, de Haan G. Cellular Memory and Hematopoietic Stem Cell Aging[J]. Stem Cells, 2006, 24(5): 1143-1149.
- [6] Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, et al. Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation[J]. Blood, 2003, 102(2): 517-520.
- [7] Ito K, Hirao A, Arai F, et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells[J]. Nature, 2004, 431(7011): 997-1002.
- [8] Zou X, Li H, Chen L, et al. Stimulation of porcine bone marrow stromal cells by hyaluronan, dexamethasone and rhBMP-2[J]. Biomaterials, 2005, 25(23): 5375-5385.
- [9] Park JS, Kim HY, Kim HW, et al. Increased caveolin-1, a cause for the declined adipogenic potential of senescent human mesenchymal stem cells[J]. Mech Ageing Dev, 2005, 126(5): 551-559.
- [10] Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, et al. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment[J]. Nature, 2005, 433(7027): 760-764.
- [11] Friedenstein AJ, Latzinik NV, Gorskaya YuF, et al. Bone marrow stromal colony formation requires stimulation by haemopoietic cells[J]. Bone Miner, 1992, 18(3): 199-213.
- [12] Van Zant G. Genetic control of stem cells: implications for aging[J]. Int. J. Hematol, 2003, 77(1): 29-36.
- [13] 刘黎青, 高艳霞, 周盛年, 等. 中药制剂诱导骨髓间充质干细胞多向分化的研究进展[J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(6): 520-522.
- [14] 黎晖, 周健洪, 陈东风, 等. 龟甲对大鼠骨髓间充质干细胞向成骨分化的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2005, 16(3): 159-161.

[15]黎晖,李春,陈东风,等. 龟甲含药血清促进骨髓间充质干细胞骨形态发生蛋白 4 的表达[J]. 解剖学报, 2007, 38( 3) : 304-309.

[16]李东晓,张磊,王岚,等. 淫羊藿总黄酮对肌内植入组织工程化骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中药药理与临床, 2007, 23( 5) : 88-91.

[17]王和鸣,王力,李楠. 巴戟天对骨髓基质细胞向成骨细胞分化过程 Cbfa1 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2004, 12( 6) : 22-27.

[18]邓展生,张璇,邹冬青,等. 骨碎补各种提取成分对人骨髓间充质干细胞的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15( 16) : 2426-2429.

[19]曾意荣,樊勇光,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.

[20]陈薇,曾和平,王春燕,等. 中药龟甲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[J]. 化学学报, 2007, 65( 3) : 265-270.

[21]郭少三,黄畅,韩大良,等. 人参茎叶皂苷对体外条件下小鼠骨髓间充质干细胞和粒-巨噬系祖细胞增殖的影响[J]. 中医药导报, 2007, 13( 6) : 6-7.

[22]高冬,林久茂,郑良朴,等. 血府逐瘀汤影响小鼠骨髓造血干细胞的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27( 6) : 527-530.

[23]高冬,林薇,郑良朴,等. 六味地黄丸对衰老小鼠造血干细胞影响的实验研究[J]. 中药材, 2008, 31( 2) : 251-254.

[24]王欣,麻柔. 人参单药及其组分对造血影响的基础研究与临床应用[J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26( 12) : 1139-1141.

[25]翁玲,刘学英,刘彦,等. 黄芪多糖对小鼠骨髓及外周血造血干细胞的增殖及动员作用[J]. 基础医学与临床, 2003, 23( 3) : 306-309.

[26]胡晶,吴宏. 当归多糖对小鼠外周血造血干细胞动员作用的研究[J]. 中草药, 2006, 37( 12) : 1835-1838.

[27]王东晓,刘屏,陈若芸,等. 鸡血藤单体化合物对骨髓抑制小鼠造血祖细胞增殖的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12( 21) : 4163-4166.

[28]余梦瑶,罗霞,陈东辉,等. 鸡血藤煎剂对小鼠细胞分泌细胞因子的影响[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40( 1) : 27-30.

( 收稿日期:2008-04-29;修回日期:2008-08-18)

[编辑:李 巍]

## 《中医杂志》第四届编辑委员会名单

主任委员 胡熙明

名誉主编 费开扬

主 编 曹洪欣

副主任委员 王永炎 王文中 吕玉波 张大宁 李俊德 李大鹏 费开扬 陈啸宏 杨明会 房书亭 郑守曾  
施 杞 徐镜人 曹洪欣 谢阳谷

委员( 以姓名笔画为序)

|     |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 于生龙 | 于淑芳      | 马有度 | 王永炎 | 王文中 | 王炳岐 | 王东生 | 王 琦 | 王乃平 | 王之虹 | 王 玲 | 王国庆 | 王忠和 |
| 王喜军 | 王书臣      | 王承德 | 王鱼门 | 王振邦 | 邓大学 | 包文辉 | 龙致贤 | 龙济瀛 | 刘保廷 | 刘红星 | 向方远 | 吕玉波 |
| 吕志平 | 孙万珍      | 孙耀志 | 孙树椿 | 阮诗玮 | 闫希军 | 吴以岭 | 吴坤平 | 张大宁 | 张之君 | 张世臣 | 张孝娟 | 张承烈 |
| 张炳厚 | 李连达      | 李大鹏 | 李俊德 | 李沈明 | 李天太 | 李怀荣 | 李乾构 | 肖小河 | 肖燕军 | 陈可冀 | 陈克正 | 陈贵廷 |
| 陈 桦 | 陈抗生      | 陈金甫 | 陈保华 | 陈啸宏 | 苏荣彪 | 杨殿兴 | 杨世兴 | 杨卓欣 | 杨明会 | 邹节明 | 林日初 | 林天东 |
| 林立军 | 拉蒙( 西班牙) | 房书亭 | 周岱翰 | 周宜强 | 周 然 | 周超凡 | 周绍明 | 周铭心 | 郑守曾 | 姚乃礼 | 施 杞 |     |
| 胡熙明 | 费开扬      | 胡晓军 | 晁恩祥 | 赵 松 | 赵步长 | 赵树森 | 徐志伟 | 徐镜人 | 索天仁 | 梁菊生 | 袁长津 | 高思华 |
| 高文柱 | 曹洪欣      | 曹正逵 | 梅国强 | 傅世垣 | 彭 炜 | 程兆盛 | 谢阳谷 | 詹文涛 | 翟胜利 | 戴锡孟 |     |     |

顾问( 以姓名笔画为序)

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 刁跃池 | 万有生 | 王绪鳌 | 王荣和 | 王绵之 | 王雪苔 | 王其飞 | 王玉川 | 王一章 | 韦贵康 | 邓铁涛 | 田景福 | 冯天有 |
| 任继学 | 刘志明 | 许锦柏 | 李任先 | 李炳文 | 李惠治 | 李顺成 | 李振华 | 何 任 | 张学文 | 张奇文 | 张 琪 | 吴炳新 |
| 吴咸中 | 沈自尹 | 陈佑邦 | 陈彤云 | 金树滋 | 庞春生 | 周仲瑛 | 赵藕善 | 胡志祥 | 姜正谦 | 贺志光 | 高 德 | 殷顺海 |
| 唐由之 | 黄春源 | 蔡剑前 | 费淳璐 | 程莘农 | 路志正 | 魏福凯 |     |     |     |     |     |     |