

从淫羊藿激活内源性干细胞探讨“肾藏精”的科学涵义

沈自尹 黄建华

(复旦大学附属华山医院中西医结合研究所, 上海市乌鲁木齐中路12号, 200040)

[摘要] 结合中医学“肾藏精”的经典理论和现代生命科学热点领域干细胞, 通过具体的实验研究, 从补肾中药激活内源性干细胞角度阐述和论证了“肾藏精”的现代科学内涵。

[关键词] 肾藏精; 干细胞; 淫羊藿

基因组学是生物学上的一次技术革命, 干细胞则是又一次技术革命, 人类与疾病作斗争的历史即将进入再生医学时代。再生医学不但是现代临床医学的一种崭新的治疗模式, 干细胞与再生医学代表了现代生命科学发展的前沿, 即将成为主流的科学前沿。

干细胞有两项最基本、亦是最重要的功能, 就是“自我更新”和“定向分化”。干细胞具有无限或较长时间的自我更新能力, 它在分裂与分化的过程中, 呈指数级增长, 一个变两个、两个变四个……, 其特殊之处是, 干细胞的扩增是不对称的分离, 当一个变两个的时候, 其中一个能保留母体的特性, 将来继续能扩增成两个细胞; 另一项就是定向分化为预想具有特定功能的细胞, 若不是定向分化, 干细胞将无序分化成为畸胎瘤, 或其他并不需要的细胞, 干细胞定向分化的重要条件就是要有适宜的微环境。

目前国际上对干细胞的研究和应用上都是着眼于移植和克隆, 人胚胎干细胞的克隆除了面临伦理与法律之争, 而且可供移植的数量不足, 虽然克隆技术相对成熟, 但克隆出的早期胚胎中, 只有100个胚胎干细胞, 要达到治疗效果至少100万。故而科学家都转向将体细胞重组编程, 使其逆转为胚胎化的多能干细胞。2006年日本山中伸弥^[1]首次报道向小鼠成纤维细胞中转入4个转录因子成为诱导多能干细胞(iPS), 2007年11月20日美国汤姆逊和日本山中伸弥分别在《科学》^[2]和《细胞》发表论文, 成功地将4个转录因子转入人皮肤成纤维细胞成为iPS, 从此胚胎干细胞的研究也进入了一个新的纪元。尽管如此, 但异体iPS植入还存在排异反应, 成为临床应用的瓶颈, 如果不用动物源性试剂并寻找替代转录因子的化合物, 实现完全化学iPS, 按目前研究情况距实际应用尚有待时日。通过激活内源性的干细胞而改善再生反应与从外部植入干细胞是全然不

同的新思路。已有报道称, Notch 配体、成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮细胞生长因子(EGF)等信号对干细胞的自我更新具有显著的调节作用, 并在动物模型上证实能促进脑出血损伤周围的干细胞增殖和促进干细胞迁移^[3]。这是利用提纯的类生长因子或促生长因子的制剂来达到激活内源性干细胞的研究。可见无论干细胞自我更新或是定向分化都需要合适的微环境, 尤其是定向分化, 微环境起决定性作用, 干细胞和微环境的关系如同种子和土壤, 同样的种子细胞移植到不同的受损组织(土壤)能分化为不同的功能细胞, 如干细胞移植到梗死心肌能分化为心肌样细胞, 移植到脑梗死局部则能分化为神经元细胞, 因为梗死后局部(土壤)会分泌相应的细胞因子, 以心肌梗死为例, 心肌梗死后局部分泌的细胞因子对干细胞有趋化作用, 能促进干细胞向梗死心肌迁移。同时心肌细胞释放特定细胞因子, 促使移植细胞表达特异的心肌蛋白, 分化为心肌样细胞。总之, 干细胞周围的微环境似龕(niche), 内有密集高浓度的相关转录因子、促生长因子、营养因子等指引干细胞定向分化。相反的是, 缺血、缺氧、严重酸中毒或过氧化状态、释放一系列炎症反应介质和促凋亡因子的微环境是导致移植干细胞不能存活, 发生凋亡或死亡的主要原因。这就是干细胞和微环境密切相关的表现。

从干细胞的生成到其功能发展为中医藏象理论的“肾”展示了新的思路, 如按《灵枢·决气》, “肾藏精”精的来由是: “两神相搏, 合而成形, 常先身生, 是为精”。说明先天之精秉受于父母, 是构成人体胚胎的原始物质, 因此, 肾所藏之精可相应于胚胎干细胞及它分化为各种组织器官的成体干细胞。干细胞具有先天之精的属性。《素问·六节藏象论》: “肾者主蛰, 封藏之本, 精之处也”。干细胞一般处于休眠状态, 只有出现损伤或刺激时才会被唤醒(激活), 提示“精”平时是藏而不露, 这对“肾藏精”的含意有进一步的理解。古人虽对干细胞并无直接的了解, 但通过人体成形、发育成长以及精气活动的过程, 提出了肾藏精这一生命活动天才的认识。

干细胞分布于全身的各种组织器官,依存于它们所处的微环境的不同而分化成为不同的细胞和组织,而能同时激活干细胞和发挥微环境作用的中医药可设想为温补命门之火的药物。明代赵献可在《医贯》里有一段著名的描述:“命门之旁有二窍,一则出相火,一则出真水,二者周行全身,譬之元宵走马灯,拜者舞者无一不具,其中惟是一火耳。火旺则动速,火微则动缓,火熄则寂焉不动,而拜者舞者飞者走者,躯壳未尝不存也”。命门之火其实集中体现为肾阳的功能,我们的前期工作证明温补肾阳药——右归饮可以提高全身的神经—内分泌—免疫(NEI)网络功能,体现为命门之火周行全身的温煦与推动作用^[4]。中医中药擅长从整体着眼,调动机体的储备功能,促使干细胞再生,有别于提纯的促生长因子的作用。肾精与命门之火是否体现为干细胞功能和微环境的推动作用,而温补肾阳药是否起了唤醒干细胞,同时激活有利于干细胞定向分化微环境的作用,对此我们做了一些初步的研究,希望对阐明中医藏象理论中肾藏精与命门之火相互关系及其科学内涵有所帮助。

在肾本质的研究中,我们证明了温补肾阳药的作用涵盖了NEI网络,并且其调控中心定位在下丘脑^[5]。值得注意的是能提高NEI网络功能的4个自拟及经典的温肾复方中都有淫羊藿,按李时珍《本草纲目》:“淫羊藿味甘气香,性温不寒,能益精气,乃手足阳明命门药也”,淫羊藿对应的药靶包括了NEI网络,因此,命门之火与NEI网络有共同的属性。

我们用以淫羊藿为主的补肾复方成功地使激素依赖性哮喘患者撤除激素及为具有过度T细胞凋亡率的老年人延缓衰老^[6-7],在这样的临床疗效基础上,分别在皮质酮大鼠、老年大鼠体内,采用淫羊藿总黄酮(EF)或淫羊藿苷进行激活内源性干细胞的实验观察及相应的机制研究。

1 淫羊藿总黄酮(EF)对皮质酮大鼠肾上腺皮质干细胞的作用及机制

超过生理剂量的糖皮质激素长期应用造成下丘脑—垂体—肾上腺(HPA)轴抑制和肾上腺皮质萎缩。突然停药之后,易致肾上腺皮质功能不全,对机体内环境稳定甚至是生命存在潜在的威胁。迄今国外还没有找到有效拮抗糖皮质激素对HPA轴抑制的药物。而根据我们前期临床和实验研究,EF能有效拮抗糖皮质激素对HPA轴抑制,保护肾上腺皮质功能^[8-9]。肾上腺皮质功能有赖于肾上腺皮质细胞的数量和功能。研究表明,肾上腺皮质干细胞在外侧增殖并向内侧迁移和分化从而形成肾上腺皮质各个功能层,依次为球状带、束

状带、网状带,这种肾上腺皮质再生调节了肾上腺皮质细胞的数量和功能。我们的另一项研究表明,EF能促进肾上腺皮质外侧区域细胞的增殖,并能促进被标记的增殖细胞向内侧迁移^[10]。进一步采用基因芯片技术研究EF作用于与肾上腺皮质干细胞相关的分子机制,共进行了两次,取得可重复的结果^[11]。发现了大量应用皮质酮后基因表达下调,而EF能逆转这些基因的表达。包括神经递质受体如多巴胺受体(DAR)、 γ 氨基丁酸受体(GABAR)、谷氨酸受体(GluR)等;生长激素或生长因子基因,如生长激素(GH)、神经生长因子(NGF)、FGF、EGF;性激素相关基因,如促卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、孕酮受体、雄激素受体;肾上腺皮质激素相关如促肾上腺皮质激素释放激素(CRH);甲状腺激素相关基因,如甲状腺刺激素(TSH)、甲状腺刺激素释放激素(TRH);还有能量代谢相关的基因包括细胞色素C450(CytP450)、热休克蛋白70(HSP70)。其中EF对生长激素类相关基因表达的逆转可能是其改善肾阳虚证和/或激活肾上腺皮质干细胞的分子机制^[12]。

2 EF和淫羊藿苷通过激活干细胞延缓衰老的机制研究

我们多年研究证明,肾虚与衰老具有相同的神经内分泌免疫网络功能低下的特征,而补肾药可以恢复此网络功能^[8]。在老年大鼠基因表达谱分组比较实验中,可见在下丘脑EF组使众多的DAR、ER、GABA-AR、GLuR、5羟色氨酸受体(5-HTIR)神经递质受体明显上调,多种神经递质的共同释放可起协同作用,以此为启动因素,激发一系列内分泌免疫效应和调节因子上调,在神经内分泌免疫网络中,属于下行通路^[13]。因此,我们不仅利用基因芯片技术观察了EF逆转多组织老化的作用,并研究干细胞是否介导了EF延缓衰老的效应。

干细胞的分裂与染色体的复制有关,染色体的复制与核物质的合成原料有关,合成细胞核物质的原料主要依靠人体内的生理合成,GH在人的生长发育和衰老过程中起着不可替代的中心作用,就因为GH促进核酸核蛋白质代谢,影响DNA的复制及RNA的转录,促使RNA合成增加,显示GH是提高干细胞增殖(分裂)能力的源泉。

干细胞的增殖能力有赖于生长激素及各类生长因子的促进作用,GH和各类生长因子是相互依赖与相互推动,而各类生长因子则促使干细胞定向分化。为此,我们在2004年和2005年两次利用基因芯片技术,也采用肾虚证老年大鼠为模型,观察EF对与GH相关的

基因表达的变化^[11,13],以利于了解 EF 激活内源性干细胞的可能机制。研究发现,老年大鼠于青年大鼠比较,同样有神经递质受体,如 DAR、ER、GABAR、GluR;生长激素相关基因,如 GH、泌乳素(PRL)、胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP) 1、3等;性激素如促性腺激素释放激素(GnRH)、FSH、LH、雄激素受体;甲状腺激素如 TRH、TSH;淋巴细胞的细胞周期素(Cyclin) B 和 G、 γ 干扰素下调。EF 作用之后,这些基因的表达均被逆转。

另外,为从基因表达角度观察 EF 延缓衰老的效果,结果显示,EF 能使24月龄相应组织的神经内分泌免疫相关基因表达与8~13月龄大鼠相似,使老化组织逆转,亦即有显著的年轻化作用。

为进一步证明 EF 对干细胞激活的直接作用,我们采取体外分离培养胚鼠神经干细胞,结果发现,淫羊藿苷中剂量与高剂量与空白对照组比较,促增值活性显著升高,表明淫羊藿苷能显著促进神经干细胞增殖。

结合我们前期工作,人二倍体胚肺成纤维细胞(2BS 细胞)模型上,EF 不但延长了寿限,而且明显延缓端粒的缩短^[14]。在果蝇的实验中^[15],EF 不但延长了寿限,而且具有抗氧化效应。提示 EF 之所以能延缓衰老,延长寿命,动员神经内分泌包括各类促生长因子,激活干细胞当是重要的一环。

干细胞的增殖(分裂)与分化(转化为组织结构)的速度一般是平衡的,由此决定人的生命活力。干细胞减少的原因就是其分化速度超过分裂速度所致,由于生命力的减弱,就开始走向衰老。干细胞的减少是一个可逆的过程,只要设法促进人体组织中干细胞的分裂,就可提高人体组织中干细胞的比列。淫羊藿通过激发 HPA 轴,多类促生长因子,提高干细胞活力,能使24月龄的老年大鼠7个重要组织逆转到8~13月龄,从而实现老年人的延缓衰老。

以上研究表明,用益火之源的温补命门之火的药物——淫羊藿的提取物 EF 和淫羊藿苷,采取以药测证的方式,观察到能同时激活 NEI 网络中生长激素类相关因子基因表达(微环境)促进肾上腺皮质干细胞及神经干细胞定向分化并迁移归巢^[16],从而有助于阐明肾藏精与命门之火理论的科学涵义。当然以上仅是初步的工作,有待于深化。干细胞的研究不但对阐明中医藏象理论的实质提供了一个难得的机遇,而进一步的深入研究将会对生命科学作出贡献。

参考文献

[1]Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by

defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4):663-676.

[2]Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858):1917-1920.

[3]Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo[J]. Nature, 2006, 442(7104):823-826.

[4]沈自尹.有关证与神经内分泌免疫网络的研究[J].中医药学刊, 2003, 21(1):10-11, 14.

[5]沈自尹.肾虚证的定位研究[J].中国中西医结合杂志, 1997, 17(1):50-52.

[6]董竟成,李娅丽.大剂量皮质类固醇吸入加补肾中药治疗激素依赖型哮喘的临床研究[J].中国中西医结合杂志, 1994, 14(8):458-461.

[7]沈自尹,郭为民,陈瑜.补肾方对老年人 T 细胞凋亡相关基因群转录的调控模式研究[J].中国老年学杂志, 2002, 22(4):241-243.

[8]杨连卿,沈自尹,钟慈声,等.滋肾阴、温肾阳药对大鼠肾上腺皮质轴受抑模型的作用.见:沈自尹主编.肾的研究续集[M].上海:上海科学技术出版社, 1990, 142-147.

[9]蔡定芳,沈时谋,陈晓红,等.仙灵脾减轻外源性糖皮质激素抑制神经内分泌免疫作用的临床与实验研究[J].中国中西医结合杂志, 1998, 18(1):4-7.

[10]黄建华,沈自尹,陈伟华.基因表达谱揭示 EF 对皮质酮大鼠肾上腺皮质再生的调控机制[J].中国中西医结合杂志, 2006, 26(5):426-430.

[11]沈自尹,黄建华,陈伟华.以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究[J].中国中西医结合杂志, 2007, 27(2):135-137.

[12]沈自尹,董竟成,蔡定芳,等.改善肾上腺皮质功能在某些疾病恢复过程中的重要作用[J].中国中西医结合杂志, 2007;27(4):364-367.

[13]沈自尹,陈瑜,黄建华,等.EF 延缓 HPAT 轴衰老的基因表达谱研究[J].中国免疫学杂志, 2004, 20(1):16-18.

[14]胡作为,沈自尹,黄建华,等.淫羊藿总黄酮保护衰老细胞端粒长度缩短的实验研究[J].中国中西医结合杂志, 2004, 24(12):1094-1097.

[15]沈自尹,袁春燕,黄建华,等.淫羊藿总黄酮延长果蝇寿命及其分子机制[J].中国老年学杂志, 2005, 25(9):1061-1063.

[16]沈自尹,黄建华,吴斌,等.淫羊藿激活内源性干细胞及其机制研究[J].中国中西医结合杂志, 2009, 29(3):251-254.

(收稿日期:2009-08-04;修回日期:2009-09-04)

[编辑:黄健]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

1951~1986年(4张光盘)480元;1995~2004年(1张光盘)280元。光盘合订本为计算机用数据光盘,可对所有文章进行任意字检索,方便实用,欢迎邮购。

汇款地址:北京东直门内南小街16号中医杂志医海林音像书店,邮编:100700。电话:010-64035632。