

活血化瘀治法理论“祛瘀血”与“生新”层面的 干细胞生物学特性探讨

张 金 生

河南中医学院第一附属医院, 河南省郑州市人民路 19 号, 450000)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072798); 河南省科技创新杰出人才·科技创新杰出青年基金资助项目(10A08176)

通讯方式: zjssir2004@sina.com.cn

[摘 要] 通过溯源活血化瘀和干细胞相关文献, 分析基质细胞衍生因子 1 及其特异性受体 CXCR4 轴介导间充质干细胞在骨髓、外周血及组织器官之间的迁移机制, 明确活血化瘀治法与“骨髓干细胞循环”的内在关联性, 为借助于干细胞循环理论探索活血化瘀“祛瘀血”与“生新”层面细胞生物学特性, 进一步研究活血化瘀治法的微观机制及物质基础提供新思路。

[关键词] 活血化瘀; 干细胞生物学; 基质细胞衍生因子/特异性受体; 骨髓间充质干细胞

运用现代医学科学方法对活血化瘀治法理论进行研究, 从微观角度阐明活血化瘀法治疗的作用机理, 是当代中医发展活血化瘀治法理论的新思路, 但有关活血化瘀治法理论物质基础观点的差异较大。近年来, 通过活血化瘀方药对干细胞的存在形式、功能以及对其影响和调控机制相关性研究的不断深入^[1-6], 有关活血化瘀治法与骨髓干细胞归巢、迁移、增殖、分化、凋亡关系逐渐明晰, 为探讨活血化瘀法在疾病治疗中的微观机制提供了科学依据。

1 活血化瘀法与干细胞循环

目前虽然传统中医药学说中并没有干细胞之称, 更不可能有较为完善的理论体系, 但通过中药及其复方作用于造血干细胞、神经干细胞与间充质干细胞的基础与临床研究, 揭示中医药学与干细胞的相关性已经取得较大的进展。对活血化瘀法而言, 不仅包含“疏其气血, 令其条达”的“祛瘀血”层面, 还包含“复其真气、化旧生新”的“生新”层面。“祛瘀血”仅仅是活血化瘀法的起点, “生新”是活血化瘀法的结果。虽然有关干细胞循环理论研究仍处于探索阶段, 但在其指导下的骨髓干细胞动员疗法作为细胞移植治疗的一种新思路, 无论在理论上还是在实践中, 均具有其他传统治疗方法无可比拟的优势。研究发现, 骨髓干细胞不仅可向多种组织细胞分化, 而且还存在广泛迁移现象, 即干细胞循环, 是指干细胞通过机体的调控不断由原组织位点向新的组织位点迁移, 并进行自我更新和分化, 参与多种组织的更新和修复, 以维持机体组织形态的完整性和功能的稳定性, 而这正是活血化瘀治法“去瘀为生新之法, 并知以生新为去瘀之法”的精髓所在, 显示活血化瘀治法与骨髓干细胞循环的内在关联性, 为借助于干

细胞循环理论探索活血化瘀“祛瘀血”与“生新”层面的干细胞生物学特性提供理论基础。

2 活血化瘀法“祛瘀血”与“生新”层面干细胞生物学特性研究

活血化瘀方药在临床、动物实验和细胞学层次的研究上均表现出对轴介导间充质干细胞“归巢”的各个环节有调节作用。如肖刚峰等^[7]证实, 丹参素可以促进外周血内皮先祖细胞(EPC)扩增, 显著改善外周血 EPC 的黏附、迁移和增殖能力。郭建文等^[8]发现, 调节“脑中血海”的中药脑脉 1 号可促进接受骨髓间充质干细胞(BMSC)移植治疗的局灶性脑缺血大鼠的血管再生, 改善压力反射敏感性(BRS), 随着疗程的延长, 效果更加显著, 其机理可能与改善骨髓造血微循环, 促进造血细胞增殖分化并向外周血迁移等有关, 活血化瘀方药联合 BMSC 移植或动员治疗脑梗死表现出明显的倍增效应。张芙荣等^[9]在人纤维连接蛋白包被培养板中培养人 EPC, 并分别加入银杏叶提取物和葛根素 24 h 后, 药物组 EPC 数目较对照组增加 1 倍, 且 EPC 数量随药物作用时间延长而增加, 同时 EPC 的黏附、迁移、增殖能力也得到显著改善。曹炜、王阶等^[10-11]发现, 血府逐瘀胶囊对体外培养的血管平滑肌细胞有促增殖作用, 血塞通胶囊无促增殖作用。血府逐瘀胶囊、血塞通胶囊对溶血磷脂酸诱导的血管平滑肌细胞增殖有拮抗作用, 血塞通胶囊作用更强, 其作用机制部分与抑制 DNA 合成、阻止细胞进入 S 期有关。

近年来, 对活血化瘀法“祛瘀血”与“生新”层面的干细胞生物学特性开展了一系列临床和实验研究^[12-15]。通过活血化瘀方药动员骨髓干细胞治疗

心肌梗死的临床观察发现,活血生新方对心肌梗死患者 c-kit 受体蛋白表达率和血管内皮生长因子(VEGF)含量较对照组明显升高($P < 0.05$)。表明活血化癥方药对 BMSC 动员作用。通过临床观察三七总皂苷对脑梗死患者骨髓干细胞动员效率时发现,三七总皂苷对急性脑梗死后内源性粒细胞集落刺激因子和外周血 CD34⁺ 细胞升高明显,且治疗组优于对照组($P < 0.05$)。实验研究证实,①活血化癥法不仅能协同西药干细胞动员剂动员 BMSC,提高 BMSC 出髓效率,增加 BMSC 数量,并促进干细胞“归巢”到梗死心肌、分化成新的心肌细胞;而且能促进心肌梗死大鼠模型心肌血管新生、提高心肌梗死大鼠模型心肌细胞 VEGF、碱性成纤维生长因子(bFGF)蛋白表达、降低心肌缺血性损伤的作用。活血化癥法能降低细胞间黏附分子 1 和血管细胞黏附分子 1 表达、提高 BMSC 向损伤处迁移能力,促进更多 BMSC“归巢”;②在研究“化旧生新”干预细胞凋亡的机制中发现,血塞通胶囊能明显下调 Bax 蛋白表达,上调 Bcl-2 蛋白表达,“生新”层面之“化旧生新”作用机制与多途径、多靶点降低细胞凋亡有关;③在研究“生新脉”调控血管新生的机制时发现,活血化癥组血管性血友病因子(vWF)染色的血管内皮细胞表达明显增多;微血管数增多,Nestin 蛋白表达阳性细胞总面积增多明显($P < 0.05$)。还能改善半暗带血供、促进缺血区血管再生,促进神经干细胞增殖、迁移并分化,加快微循环建立。④在体外模拟大脑微环境诱导 CD105⁺-BMSC 的分化实验中发现,血府逐瘀汤含药血清可提高 CD105⁺-BMSC 增殖、分化效率、可提高其存活率,降低 CD105⁺-BMSC 凋亡。通过检测星形胶质细胞特征性标志胶质纤维酸性蛋白,新生神经元的特异性标记物 β -Tubulin 发现,CD105⁺-BMSC 主要向星形胶质细胞、神经元细胞等分化。

3 基质细胞衍生因子(SDF-1)/特异性受体(CXCR4),轴介导 BMSC 探索活血化癥法的干细胞生物学特性认识

研究发现,急性脑梗死后骨髓能自发地大量释放 BMSC 到外周血,BMSC 能自发地向损伤病灶区迁移,参与脑缺血病灶区神经结构重建和功能恢复。BMSC 的这一自发过程与 SDF-1 及其特异性受体 CXCR4 轴作用有关,正是 SDF-1 特异地对 CXCR4 阳性细胞产生趋化反应,才使表达 CXCR4 的 BMSC 沿着 SDF-1 浓度梯度迁移,实现 BMSC 自发迁移到受损部位。

3.1 SDF-1/CXCR4 轴的生物学功能

SDF-1 属于趋化因子中 CXCL 亚家族,主要在 BMSC 及骨髓内皮细胞表达,SDF-1 基因定位于人第 10 号染色体长臂,CXCR4 是 SDF-1 的唯一受体,主要在 BMSC 上表达,是一个有 7 个跨膜结构域的 G 蛋白耦联受体。研究表明,当机体组织器官出现缺血缺氧时,组织损伤产生的细胞因子可刺激 CXCR4 从细胞内转移至细胞表面,参与 BMSC 的“归巢”,又可促使受损组织分泌大量 SDF-1 释放到外周血,由于 SDF-1 对骨髓和血液中表达 CXCR4 的 BMSC 能产生吸引作用,继而引导 BMSC 沿 SDF-1 浓度梯度向缺血部位聚集,BMSC 在靶组织中利用由 SDF-1 诱导表达的整合素等黏附分子与血管内皮黏附,继而定居到损伤部位。因此,SDF-1/CXCR4 轴的生物学功能主要表现在 SDF-1 和 CXCR4 的相互作用,构成细胞间信息传递、细胞迁移的偶联分子对。

3.2 SDF-1/CXCR4 轴介导 BMSC 向脑缺血病灶区迁移

研究发现,SDF-1/CXCR4 轴介导 BMSC 向脑缺血病灶区迁移作用主要表现在:①动员 BMSC 出髓,提高循环血中 BMSC 数量。受损组织首先通过降低骨髓内 SDF-1 浓度或提高骨髓外 SDF-1 浓度,使骨髓内、外出现 SDF-1 浓度梯度差,同时组织损伤产生的细胞因子刺激 CXCR4 从细胞内转移至细胞表面,并刺激 BMSC 的 CXCR4 表达增强,促使 BMSC 从骨髓释放到外周血循环中。Wang 等^[16] 研究发现,随着损伤局部 SDF-1 浓度增加,BMSC 数量、定向迁移的 BMSC 数量也呈增加趋势。②引导 BMSC 迁移方向,提高 BMSC 迁移速度。SDF-1/CXCR4 轴引导进入外周血的 BMSC 沿着 SDF-1 浓度梯度向受损器官迁移,同时通过增加细胞的(纤)丝状肌动蛋白束的厚度和数量,改变或者重排细胞骨架蛋白,提高 BMSC 的迁移速度。研究显示在心肌梗死急性期,在心梗区域及边缘区域 SDF-1 的表达持续增加,这也是干细胞向心梗部位募集的关键因素之一。③促使 BMSC 黏附到受损区,增强 BMSC 跨越内皮屏障能力。BMSC 迁移到损伤组织的关键在于能否黏附到损伤组织的内膜上和能否跨越内皮屏障。研究表明,SDF-1/CXCR4 轴可以通过激活干细胞表面的整合素等黏附分子,增加 BMSC 表面的 CXCR4 表达,促使 BMSC 与病损组织相互黏附,同时激活核因子 κ B(NF- κ B) 体系、增强基质金属蛋白酶、VEGF 等表达,并调控这些因子

参与 BMSC 跨越内皮屏障,最终穿过血管壁“归巢”到靶器官。Netelenbos 等^[17]在体外迁移实验中发现,SDF-1/CXCR4 轴通过诱导内皮细胞表面的蛋白聚糖直接参与骨髓基质中 SDF-1 浓度梯度的形成,促进干细胞迁移及归巢。Takahashi 等^[18]发现,BMSC 的培养上清液在体外可以促进内皮细胞和平滑肌细胞增殖和迁移,促进大鼠缺血后肢的侧支血管生成。④提高 BMSC 存活率,促进 BMSC 增殖分化。体内外实验证明,SDF-1/CXCR4 轴不仅能对抗缺血再灌注损伤、通过自分泌/旁分泌途径直接保护心肌细胞,增加血管新生、减少组织细胞死亡,还能改善缺血区的微环境,提高 BMSC 增殖分化,达到修复损伤组织和促进神经细胞再生作用。Chen 等^[19]发现,静脉移植 BMSC 大鼠大脑中动脉闭塞模型后,其中一些细胞表达神经元特异核蛋白、微管相关蛋白 2 及胶质纤维酸性蛋白,神经功能缺陷恢复明显。Schneider 等^[20]发现,重组人粒细胞集落刺激因子可动员大量 BMSC 到外周血,迁移到梗死区,并在梗死区分化为神经元和神经胶质细胞,促进脑组织的修复。

综上所述,SDF-1/CXCR4 轴在 BMSC 向脑缺血病灶区定向迁移中起着关键作用,它参与了 BMSC 向脑缺血病灶区“归巢”过程中“动员、迁移、穿过血脑屏障、增殖、凋亡、分化”等关键环节,因此,以 SDF-1/CXCR4 轴介导 BMSC 在骨髓、外周血及组织器官之间的迁移,为探索活血化瘀法“祛瘀血”与“生新”层面的 BMSC 细胞学基础提供了生物学依据。基于以 SDF-1/CXCR4 轴介导 BMSC 为切入点探索活血化瘀法“祛瘀血”与“生新”层面的干细胞生物学特性,对明确活血化瘀法“祛瘀血”层面的“活血、行血、祛瘀、通络”和“生新”层面的“生新血、生新物、生新脉、化旧生新”在治疗具体疾病进程的病理生理机制,揭示活血化瘀法“生新”层面的物质基础及活血化瘀中药的治疗机制,提高活血化瘀治法在疑难病证的辨证论治水平,丰富和完善活血化瘀治法理论有重要意义。

参考文献

- [1]张金生. 活血化瘀治法理论研究探要[J]. 中医杂志, 2009,50(10):871-873.
- [2]张金生. 中医祛瘀生新理论新解[J]. 辽宁中医杂志, 2009,36(5):704-705.
- [3]张金生. 活血化瘀治法理论“祛瘀血”与“生新”层面的内涵探究[J]. 北京中医药大学学报, 2012,35(4):230-232.
- [4]张金生. 关于骨髓干细胞标记物在干细胞研究中的应用与地位的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010,16(12):

206-208.

- [5]张金生. 关于“干细胞循环”理论在中医基础研究中应用前景的思考[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(2):263-264.
- [6]张金生. 活血化瘀与干细胞循环[J]. 中医杂志, 2012,53(6):451-454.
- [7]肖刚峰,张怀勤,季亢挺,等. 丹参素对体外培养内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. 华西药学杂志, 2006,21(3):232-234.
- [8]郭建文,李俊雅,黄燕. 调节“脑中血海”法联合骨髓间充质干细胞移植对大鼠缺血脑组织血管再生的影响[J]. 中西医结合学报, 2009,7(8):763-768.
- [9]张芙蓉,陈君柱,朱军慧,等. 葛根素对外周血内皮祖细胞数量和功能的影响[J]. 中国中药杂志, 2004,29(8):777-781.
- [10]曹炜,陈凯,王阶. 丹参和三七单体成分对干细胞分化的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2010,17(8):106-108.
- [11]王阶,付莹坤,方素萍,等. 血府逐瘀胶囊、血塞通胶囊对溶血磷脂酸诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2009,16(3):24-26.
- [12]张金生,张宝霞. 三七总皂苷对脑梗死患者骨髓干细胞动员效率的临床观察[J]. 河南中医, 2009,29(3):260-261.
- [13]张金生,何庆勇. 三七总皂苷对不同时点心肌梗死大鼠心肌 VEGF、bFGF 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2009,24(11):1496-1499.
- [14]Zhang JS, He QY, Huang T, et al. Effects of panax notoginseng saponins on homing of C-kit + bone mesenchymal stem cells to the infarction heart in rats[J]. J Tradit Chin Med, 2011,31(3):203-208.
- [15]张金生,王阶. 三七总皂苷动员心肌梗死大鼠骨髓干细胞出髓效率的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2009,34(7):893-895.
- [16]Wang X, Willenbring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes[J]. Nature, 2003,422(6934):897-901.
- [17]Netelenbos T, Zijderduijn S, Van Den Born J, et al. Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells[J]. J Leukoc Biol, 2002,72(2):353-362.
- [18]Takahashi M, Li TS, Suzuki R, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006,291(2):H886-893.
- [19]Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats[J]. Stroke, 2001,32(4):1005-1011.
- [20]Schneider A, Krüger C, Steigleder T, et al. The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis[J]. J Clin Invest, 2005,115(8):2083-2098.

(收稿日期:2012-06-28;修回日期:2012-12-31)

[编辑:侯建春]