

# 齐墩果酸诱导多种小鼠胚胎干细胞向生殖细胞方向分化研究

万 谦<sup>1,2</sup> 姚奏英<sup>2,3</sup> 伍林涛<sup>4</sup> 陆 华<sup>1,2</sup>

(1 成都中医药大学第二附属医院,成都,610041; 2 四川省计划生育研究所,成都,610041; 3 成都中医药大学临床医学院,成都,610075; 4 贵州省油菜研究所,贵阳,550008)

**摘要** 目的:寻找一种能诱导多种胚胎干细胞向生殖细胞方向分化的化合物,并以常用的诱导物维甲酸(Retinoic Acid, RA)作为阳性参照物。方法:分别培养小鼠胚胎干细胞 1B10、D3、R1/E,诱导它们形成拟胚体,让拟胚体贴壁生长,加入特定化合物诱导贴壁细胞分化,诱导 72 h 后,提取被诱导细胞的 RNA,再合成 cDNA,最后利用实时荧光定量 PCR 检测各被诱导细胞中与生殖分化相关的基因的表达水平的变化。结果:发现齐墩果酸(Oleanolic Acid, OA)显著上调了所有被研究的小鼠胚胎干细胞的生殖分化关键基因的表达水平,同时发现阳性参照物 RA 仅能诱导 1B10、R1/E,而不能诱导 D3 向生殖细胞方向分化。结论:OA 能诱导多种胚胎干细胞向生殖细胞方向分化,诱导能力方面具有比常用诱导物维甲酸更广泛的普遍性。

**关键词** 齐墩果酸;小鼠胚胎干细胞;体外分化诱导物;生殖方向分化

**Study on Oleanolic Acid Inducing Several Strains of Mouse Embryonic Stem Cells to Differentiation towards Germ Cells**

Wan Qian<sup>1,2</sup>, Yao Zouying<sup>2,3</sup>, Wu Lintao<sup>4</sup>, Lu Hua<sup>1,2</sup>

(1 The Second Affiliated Hospital, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610041, China; 2 Sichuan Family Planning Research Institute, Chengdu 610041, China; 3 The Affiliated College of Medical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China; 4 Guizhou Rape Institute, Guiyang 550008, China)

**Abstract Objective:** To find an agent which can induce several strains of embryonic stem cells to differentiate towards germ cells, with the common inducer retinoic acid (RA) as positive control. **Methods:** Different strains of mouse embryonic stem cells (mESC) 1B10, D3, R1/E were respectively cultured, and induced to form embryoid bodies (EBs) which were allowed to attach; different compounds were then added to intervene the attached cells; the intervene continued for 72 h and RNA were extracted and cDNA were synthesized; finally, real-time fluorescence quantitative PCR (qPCR) assay were used to measure the transcriptional expression patterns of 11 reproductive differentiation related genes. **Results:** It was found that oleanolic acid (OA) can induce all 3 strains of mouse mESC to differentiate towards germ cells and the positive control RA can only induce mESC-1B10 and mESC-R1/E to differentiate towards germ cells. RA cannot induce mESC-D3 to differentiate towards germ cells. **Conclusion:** OA can induce several strains of embryonic stem cells to differentiate towards germ cells and it has broader universality than the positive control RA.

**Key Words** Oleanolic acid; Mouse embryonic stem cells; In vitro differentiation inducer; Differentiation towards germ cells

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.021

胚胎干细胞来源于胚胎在囊胚时期的囊胚中的内细胞团,被发现具有强大的分化能力,在体外能被特定的化合物或者蛋白质因子诱导分化为多种细胞,比如心肌细胞<sup>[1]</sup>、表皮细胞<sup>[2]</sup>、血管细胞<sup>[3]</sup>、角化细胞<sup>[4]</sup>、神经细胞<sup>[5]</sup>、生殖细胞<sup>[6]</sup>等等。目前,体外诱导系统被广泛地采用来研究胚胎干细胞的分化,现已有多种诱导物被发现,包括 PDGF, BMP2, BMP4, Activin A, bFGF, Wnt3a, RA, FGF, DMSO, and

TGF- $\beta$ 1<sup>[7-9]</sup>。

近年来,新的诱导物或者诱导方法频繁被发现,使得胚胎干细胞的体外诱导系统不断被充实,说明体外诱导系统有广泛的空间可以被挖掘。很多中药单体被发现具有令人感兴趣的功能,所以,我们希望从中药单体中寻找新的可诱导胚胎干细胞向生殖细胞分化的物质。另一方面,目前被研究的胚胎干细胞有多种细胞株,拿小鼠胚胎干细胞来说,就有

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)“从不孕不育探讨“肾主生殖”理论的研究”的相关研究(编号:2010CB530403);成都中医药大学实验技术项目(编号:063003);成都中医药大学校基金(编号:ZRMS201248)

姚奏英为本文并列第一作者

通信作者:陆华, E-mail: kjjlh@126.com

1B10、D3、R1/E、CE3、J1 等,这些细胞株虽然都来自于囊胚的内细胞团,但是其遗传背景是有差别的,同一种诱导物能否诱导多种胚胎干细胞的定向分化的较系统的考察未见报道,所以,我们也希望考察新发现的诱导物和常用诱导物 RA 在诱导能力方面的普遍性。

本研究中,我们首先发现了 OA 能诱导 1B10 的生殖分化,同时发现 RA 有类似作用,接着我们考察了诱导能力的普遍性,发现:OA 能诱导 1B10、D3、R1/E 的生殖分化,而 RA 仅能诱导 1B10、R1/E 的生殖分化,不能诱导 D3 的生殖分化。

综上所述,本研究一方面充实了体外诱导系统的内容,另一方面首次较系统地考察了一种诱导物诱导能力的普遍性。

## 1 材料

1.1 细胞株 1B10 细胞株为四川大学刘聪老师馈赠,D3、R1/E 细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品和试剂 OA 为成都中医药大学药学院制备,纯度 98%,RA 购买自 Sigma 公司,货号:R2625,纯度 98%,OA 和 RA 的原液浓度都为 3 mg/mL,溶剂都为 DMSO;DMEM 高糖培养液、胎牛血清(FBS)、细胞培养用双抗(青霉素和链霉素)、磷酸缓冲液(PBS)、细胞消化用胰蛋白酶均购自成都哈里公司,批号分别为 20130401、20130405、20130315、20130505、20130408;非必需氨基酸(NEAA),美国 Gibco 公司,批号:03985 K11; $\beta$ -巯基乙醇( $\beta$ -ME),美国 Gibco 公司,批号:862986;白血病抑制因子(LIF),美国 Millipore 公司,批号:1993949。普通细胞 6 孔培养板和超低吸附培养 6 孔板购自美国 Corning 公司,批号分别为 04718601、10312041;RNA 提取试剂盒 Tri Reagent,美国 Molecular Research Center 公司,批号:4071;反转录试剂盒 iSCRIPT cDNA SYNTHESIS,美国 Bio-Rad 公司,批号:T730001972;cDNA 合成试剂盒 iQ SYBR GRN,美国 Bio-Rad 公司,批号:T7600000082。

1.3 仪器 UPR-I-10T 纯水机(中国优普公司);3111 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(中国苏州净化公司);TDL-40B 型大体积离心机(中国 Anke 公司);Legend Micro 17R 型高速台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司);DMI3000B 型倒置显微镜(德国 Leica 公司);CFX96 型定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

2.1 小鼠胚胎干细胞的培养 培养小鼠胚胎干细

胞的饲养层细胞使用小鼠胚胎成纤维细胞 NIH3T3。培养 NIH3T3 的培养液为 DMEM 高糖培养液,其中含 10% FBS、100 U/mL 盘尼西林、0.1 mg/mL 链霉素。培养小鼠胚胎干细胞的培养液为 DMEM 高糖培养液,其中含 17% FBS、100 U/mL 盘尼西林、0.1 mg/mL 链霉素、0.1 mmol/L 的 NEAA、0.1 mmol/L 的  $\beta$ -ME 和 1 000 U/mL LIF。待培养孔中的 NIH3T3 生长到 90% 汇合度时,加入丝裂霉素 C 至终浓度为 10  $\mu$ g/mL,将培养板放入细胞培养箱中孵育 3 h,而后用无菌 PBS 清洗细胞 5 遍。在培养孔中加入适量的小鼠胚胎干细胞的培养液,将相应的小鼠胚胎干细胞接种至培养孔,每天更换培养小鼠胚胎干细胞的培养液,4~7 d 后,可见干细胞克隆出现。

2.2 拟胚体(EB)的诱导形成 诱导 EB 形成的培养液与培养小鼠胚胎干细胞的培养液成分一样,只是没有 LIF。EB 形成的操作程序如下:往培养孔中加入细胞消化用胰蛋白酶;将培养板放入细胞培养箱中消化 3 min;吹打消化下来的细胞至细胞呈单细胞状态;细胞混合液放入细胞培养箱中静置 30 min,以利用差速贴壁法分离饲养层细胞 NIH3T3 和小鼠胚胎干细胞;收集混合液静置后的上清液(大部分悬浮细胞为小鼠胚胎干细胞),移入超低吸附培养板;24 h 后,可观察到悬浮的类圆形的 EB 形成,再过 24 h,收集所有 EB 待用。

2.3 相关化合物对小鼠胚胎干细胞形成的 EB 的干预 将收集得到的 EB 移入普通细胞培养板。24 h 内 EB 贴壁并生长。24 h 后,对相应的培养孔中分别加入 RA 和 OA,终浓度都为 3.0  $\mu$ g/mL,同时设 DMSO 溶剂对照,干预 72 h 后。

2.4 实时荧光定量 PCR 分析(qPCR) 贴壁的 EB 被干预 72 h 后,利用 RNA 提取试剂盒 Tri Reagent 提取各孔的总 RNA,而后以提取的 RNA 为模板利用 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA,最后以 cDNA 为模板利用 Sybr Green Qpcr 试剂盒进行 qPCR 分析,目标基因为 11 种与生殖分化相关的基因,分析中以  $\beta$ -actin 为内参基因,具体基因名称和各引物序列,见表 1。表 1 所列基因的功能可描述如下:Oct-4 对于保持干细胞的多能性很重要,过低或者过高的 Oct-4 将导致干细胞分化<sup>[10]</sup>;GDF-9 是向雌性生殖细胞分化的早期标记基因<sup>[11]</sup>;Stra8 是向雄性生殖细胞分化的早期标记基因<sup>[12]</sup>;SCP3 是减数分裂的早期标记基因<sup>[13]</sup>;Mvh 是向雌性生殖细胞和雄性生殖细胞分化的早期标记基因<sup>[14]</sup>;ZP1, ZP2, and ZP3 是卵子细胞形成的标记基因<sup>[15]</sup>;Itga6, Itgb1, and TP2 是精子

细胞形成的标记基因<sup>[16-17]</sup>;β-Actin 被做为 qPCR 检测的内参基因。

表 1 qPCR 分析中的相关基因名称及引物序列

| 编号 | 基因名     | 引物方向 | 引物序列                      |
|----|---------|------|---------------------------|
| 1  | Oct-4   | 5'方向 | CGGAAGAGAAAGCGAACTAGCA    |
|    |         | 3'方向 | TGATTGGCGATGTGAGTGATC     |
| 2  | GDF-9   | 5'方向 | TGCTTTGCTGCGCTGTGTT       |
|    |         | 3'方向 | TCTACAGGCAGCAGCAAGGA      |
| 3  | Stra8   | 5'方向 | TGCCACCTGCAACTCAGAAA      |
|    |         | 3'方向 | CTGGTTCCTGGTTTAATGGAGTGT  |
| 4  | SCP3    | 5'方向 | ATCTGGGAAGCCACCTTTGG      |
|    |         | 3'方向 | CTGGAGCCTTTTCATCAGCAA     |
| 5  | Mvh     | 5'方向 | CAAAGGAACAACGCCAAACC      |
|    |         | 3'方向 | TTGCCAACAGCGACAAAC        |
| 6  | ZP1     | 5'方向 | TCGAGCCTGGCTTTGAATACA     |
|    |         | 3'方向 | CAAACCGGTTCCCAAATTCAT     |
| 7  | ZP2     | 5'方向 | CTCTCTTCACTCAAGCTGACCTTCT |
|    |         | 3'方向 | AAACCCATCCTGTGCACACA      |
| 8  | ZP3     | 5'方向 | CCGGGTGTCCGTGGATAC        |
|    |         | 3'方向 | CGAGGGTCTGGAAGTAGGAA      |
| 9  | Itga6   | 5'方向 | GACATGAAGTCCGCGCATCT      |
|    |         | 3'方向 | TGCCACCCATCTGCATT         |
| 10 | Itgb1   | 5'方向 | TCCAAATAAGGACTCTGAAACCATT |
|    |         | 3'方向 | GGATGCCATGGCTTTGACA       |
| 11 | TP2     | 5'方向 | CATCCGTGCACTCTCGACACT     |
|    |         | 3'方向 | CCTCCTGACGGCCTTTCTCT      |
| 12 | β-Actin | 5'方向 | TGGCATCCATGAACTACATTCA    |
|    |         | 3'方向 | TGCCTGGGTACATGCTGTA       |

2.5 统计学处理 利用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,各干预组的数据与相应的 DMSO 溶剂对照的数据进行比较,比较采用独立样本 *t* 检验。*P* < 0.05 被认为有统计学意义。

3 结果

3.1 RA 能诱导 1B10、R1/E,同时不能诱导 D3 向生殖细胞方向分化 对于 1B10,RA 显著上调了 GDF-9、Stra8、Mvh、ZP2、ZP3、TP2,非显著上调了 Itga6、Itgb1,显著下调了 Oct-4,非显著下调了 SCP3、ZP1,小结起来:RA 能启动 1B10 向雌性生殖细胞和雄性生殖细胞方向的分化;对于 D3,RA 显著上调了 Stra8,显著下调了 Oct-4、GDF-9、SCP3、Mvh、ZP3、Itga6、Itgb1、TP2,非显著下调了 ZP1、ZP2,小结起来:RA 不能启动 D3 向雌性生殖细胞和雄性生殖细胞方向的分化;对于 R1/E,RA 显著上调了 GDF-9、Stra8、SCP3、Mvh、ZP1、ZP2、ZP3,非显著上调了 TP2,显著下调了 Oct-4、Itga6、Itgb1,非显著下调了 Oct-4,小结起来:RA 能启动 R1/E 向雌性生殖细胞方向的分化,不能诱导 R1/E 向雄性生殖细胞方向的分化。综上所述:RA 能诱导 1B10、R1/E,同时不能诱导 D3 向生殖细胞方向分化。见图 1。

| A<br>1B10-RA |           |         | B<br>D3-RA |           |         | C<br>R1/E-RA |           |         |
|--------------|-----------|---------|------------|-----------|---------|--------------|-----------|---------|
| Gene         | Change(%) | P-value | Gene       | Change(%) | P-value | Gene         | Change(%) | P-value |
| Oct-4        | ↓ 57.99   | 0.0003  | Oct-4      | ↓ 77.93   | 0.0298  | Oct-4        | ↓ 52.15   | 0.3099  |
| GDF-9        | ↑ 177.89  | 0.0003  | GDF-9      | ↓ 97.89   | 0.0097  | GDF-9        | ↑ 2567.56 | 0.0021  |
| Stra8        | ↑ 1354.07 | 0.0000  | Stra8      | ↑ 1099.79 | 0.0003  | Stra8        | ↑ 255.56  | 0.0045  |
| SCP3         | ↓ 32.19   | 0.0873  | SCP3       | ↓ 106.33  | 0.0009  | SCP3         | ↑ 134.57  | 0.0109  |
| Mvh          | ↑ 89.81   | 0.0323  | Mvh        | ↓ 79.83   | 0.0010  | Mvh          | ↑ 5356.67 | 0.0009  |
| ZP1          | ↓ 39.81   | 0.1324  | ZP1        | ↓ 26.78   | 0.6415  | ZP1          | ↑ 340.33  | 0.0397  |
| ZP2          | ↑ 302.77  | 0.0009  | ZP2        | ↓ 53.24   | 0.3944  | ZP2          | ↑ 569.23  | 0.0078  |
| ZP3          | ↑ 99.42   | 0.0497  | ZP3        | ↓ 108.92  | 0.0009  | ZP3          | ↑ 677.56  | 0.0069  |
| Itga6        | ↑ 34.99   | 0.0677  | Itga6      | ↓ 97.34   | 0.0090  | Itga6        | ↓ 61.07   | 0.0080  |
| Itgb1        | ↑ 10.78   | 0.4787  | Itgb1      | ↓ 45.92   | 0.0238  | Itgb1        | ↓ 103.67  | 0.0479  |
| TP2          | ↑ 54.93   | 0.0178  | TP2        | ↓ 79.98   | 0.0497  | TP2          | ↑ 34.79   | 0.5609  |

图 1 RA 对不同小鼠胚胎干细胞的 11 种与生殖分化相关基因表达的影响  
A:1B10;B:D3;C:R1/E

3.2 齐墩果酸能诱导 1B10、R1/E、D3 向生殖细胞方向分化 对于 1B10,OA 显著上调了 GDF-9、Stra8、Mvh、ZP2、ZP3、TP2,非显著上调了 Oct-4、Itga6、Itgb1,非显著下调了 SCP3、ZP1,小结起来:OA 能启动 1B10 向雌性生殖细胞和雄性生殖细胞方向的分化;对于 D3,OA 显著上调了 GDF-9、Mvh、ZP3、Itga6、Itgb1、TP2,非显著上调了 Oct-4、SCP3、ZP1,非显著下调了 Stra8、ZP2,小结起来:OA 能启动 D3 向雌性生殖细胞和雄性生殖细胞方向的分化;对于 R1/E,OA 显著上调了 Stra8、SCP3、Mvh、ZP1、ZP2、Itga6、Itgb1、TP2,非显著上调了 Oct-4、GDF-9、ZP3,小结起来:OA 能启动 R1/E 向雌性生殖细胞和雄性生殖细胞方向的分化。综上所述:OA 能诱导 1B10、D3、R1/E 向生殖细胞方向分化,见图 2。

| A<br>1B10-OA |           |         | B<br>D3-OA |           |         | C<br>R1/E-OA |           |         |
|--------------|-----------|---------|------------|-----------|---------|--------------|-----------|---------|
| Gene         | Change(%) | P-value | Gene       | Change(%) | P-value | Gene         | Change(%) | P-value |
| Oct-4        | ↑ 28.43   | 0.0843  | Oct-4      | ↑ 1179.43 | 0.0002  | Oct-4        | ↑ 46.02   | 0.2067  |
| GDF-9        | ↑ 1045.75 | 0.0001  | GDF-9      | ↑ 1673.12 | 0.0000  | GDF-9        | ↑ 2.80    | 0.5798  |
| Stra8        | ↑ 735.71  | 0.0002  | Stra8      | ↓ 32.98   | 0.0539  | Stra8        | ↑ 201.79  | 0.0098  |
| SCP3         | ↓ 5.37    | 0.1058  | SCP3       | ↑ 1679.77 | 0.0152  | SCP3         | ↑ 19.86   | 0.1078  |
| Mvh          | ↑ 99.74   | 0.0023  | Mvh        | ↑ 497.05  | 0.0017  | Mvh          | ↑ 170.99  | 0.0028  |
| ZP1          | ↓ 39.45   | 0.6555  | ZP1        | ↓ 27.25   | 0.5799  | ZP1          | ↑ 243.46  | 0.0209  |
| ZP2          | ↑ 995.70  | 0.0097  | ZP2        | ↓ 17.54   | 0.7213  | ZP2          | ↑ 192.77  | 0.0048  |
| ZP3          | ↑ 47.79   | 0.0401  | ZP3        | ↑ 1777.58 | 0.0117  | ZP3          | ↑ 53.70   | 0.3480  |
| Itga6        | ↑ 21.50   | 0.4379  | Itga6      | ↑ 1983.77 | 0.0089  | Itga6        | ↑ 27.24   | 0.2106  |
| Itgb1        | ↑ 5.68    | 0.7354  | Itgb1      | ↑ 1373.31 | 0.0022  | Itgb1        | ↑ 109.75  | 0.0386  |
| TP2          | ↑ 1305.77 | 0.0089  | TP2        | ↑ 143.37  | 0.0487  | TP2          | ↑ 213.79  | 0.0030  |

图 2 OA 对不同小鼠胚胎干细胞的 11 种与生殖分化相关基因表达的影响  
A:1B10;B:D3;C:R1/E

4 讨论

本研究发现了 OA 能诱导 1B10、D3、R1/E 等多种小鼠胚胎干细胞向生殖细胞方向分化,而研究中作为阳性药物对照的 RA 仅能诱导 1B10 和 R1/E,不能诱导 D3 向生殖细胞方向分化,而且对于 R1/E,RA 仅能诱导其向雌性生殖细胞分化,不能诱导其向雄性生殖细胞分化。

小鼠胚胎干细胞 1B10 是 E14TG2a( ATCC No. : CRL-1821) 的亚克隆,其最终来源于 129/Ola 小鼠系,同时,当其被注射进入囊胚后,将形成生殖细

胞<sup>[18]</sup>。小鼠胚胎干细胞 RI/E (ATCC No. : SCRC-1036) 来源于 129X1 × 129S1 系的雄性的 3.5 d 的囊胚, 同时, 其具有形成生殖细胞的能力<sup>[19]</sup>。小鼠胚胎干细胞 D3 (ATCC No. : CRL-11632) 来源于 129/Sv + c/ + p 系的 3.5 d 的囊胚, 同时, 当其被注射进入囊胚后, 将形成生殖细胞<sup>[20]</sup>。综上所述, 从 ATCC 的描述上, 3 种小鼠胚胎干细胞虽然来源有一些差别, 但是都具有分化为生殖细胞的潜能, 尚不能看出上述 3 种小鼠胚胎干细胞在成为生殖细胞方面的重大差别, 所以 RA 和 OA 在诱导它们向生殖细胞分化的能力差别, 更有可能是源自于 RA 和 OA 诱导潜能方面的差别。

RA 和 OA 功能上的差别最终源自于结构上的差别。RA 是维生素 A 的衍生物, 是目前获得公认的胚胎干细胞的生殖分化诱导物<sup>[21]</sup>。OA 为五环三萜类化合物, 以游离或结合成苷的形式存在于白花蛇舌草、山楂、丁香、大枣、女贞子、枇杷叶、橡木及夏枯草等植物中<sup>[22]</sup>。OA 有保肝、降糖、抗 HIV 和抗肿瘤等作用<sup>[23]</sup>。OA 是补肾中药女贞子的主要有效成分之一<sup>[24]</sup>, 较新的研究表明 OA 也具有调节中医药概念“肾精”的功能<sup>[25]</sup>。图 3 和图 4 展示了 OA 和 RA 的结构, 可见两者结构差异较大, 反映在诱导能力上 OA 强于 RA。进一步的研究将探索 OA 类似物的诱导能力。

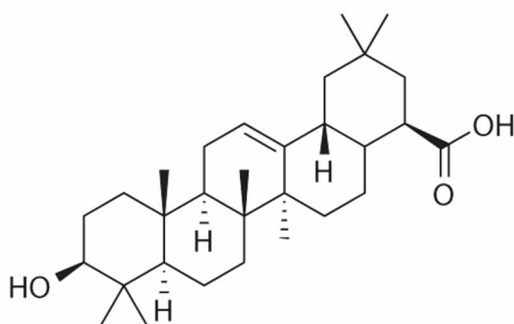


图 3 齐墩果酸 (OA) 的结构图

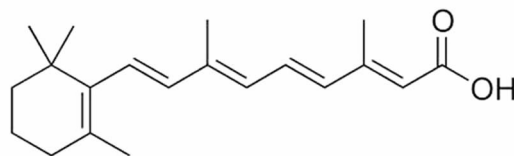


图 4 维甲酸 (RA) 的结构图

综上所述, 在诱导小鼠胚胎干细胞向生殖细胞分化方面, OA 比 RA 具有更广阔的适用对象。此研究结果不仅拓宽了外源的生殖分化诱导物的范围, 也完成了较系统评估某种化合物诱导生殖分化能力的首次报道。本研究具有一定的创新性和一定的潜

在实用性。

## 参考文献

- [1] 孙晓冬, 董韬, 于宏伟, 等. 淫羊藿苷体外诱导小鼠胚胎干细胞分化为心肌细胞[J]. 解剖科学进展, 2011, 2(1): 124 - 127.
- [2] 张仁礼, 刘彩霞, 孟锦绣, 等. 胚胎干细胞分化为表皮样细胞的基因表达谱差异[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2012, 33(2): 149 - 155.
- [3] 李春, 周诗君, 翟志敏, 等. 特异性标记胚胎干细胞分化的成血管细胞[J]. 安徽医科大学学报, 2013, 5(1): 545 - 549.
- [4] 赵厚明. 胚胎干细胞诱导分化为角化细胞的研究进展[J]. 临床口腔医学杂志, 2013, 29(6): 381 - 383.
- [5] 徐乐勤, 丁道芳, 李晓峰, 等. 胚胎干细胞移植治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中国康复理论与实践, 2011, 17(1): 51 - 53.
- [6] 董云玲, 刘锦云, 王克华, 等. 胚胎干细胞向生殖细胞分化的研究进展[J]. 中国计划生育学杂志, 2011, 4(2): 247 - 249.
- [7] Jiang J, Han P, Zhang Q, et al. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells[J]. J Cell Mol Med, 2012, 16(8): 1663 - 1668.
- [8] Marques-Mari AI, Lacham-Kaplan O, Medrano JV, et al. Differentiation of germ cells and gametes from stem cells[J]. Hum Reprod Update, 2009, 15(3): 379 - 390.
- [9] Scott MA, Nguyen VT, Levi B, et al. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev, 2011, 20(10): 1793 - 1804.
- [10] 杜丽丽, 林戈, 卢光琇. 人诱导多能干细胞与人胚胎干细胞分化过程中 Oct4/Nanog 基因[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(1): 1 - 4.
- [11] 郭新宇, 李海霞, 谢妍, 等. 自然排卵、促排卵和超促排卵状态下小鼠卵巢组织中生长分化因子-9 (GDF-9) 的表达[J]. 生殖与避孕, 2013, 1(1): 1 - 5.
- [12] 郑英, 张露萍, 王海燕, 等. 小鼠 Stra8 相互作用蛋白的筛选[J]. 中国现代医学杂志, 2012, 23(1): 18 - 22.
- [13] Kei-ichiro I, Jihye K, Sally FN, et al. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing[J]. EMBO Rep, 2011, 12(3): 267 - 275.
- [14] 孙敏, 施青青, 李碧春. 胚胎干细胞诱导分化为雄性生殖细胞的研究进展[J]. 生命科学, 2012, 24(1): 37 - 42.
- [15] White YA, Woods DC, Takai Y, et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women[J]. Nat Med, 2012, 18(3): 413 - 421.
- [16] 孟雅楠, 孟丽军, 宋亚娟, 等. 小 RNA 分子与精子发生调控[J]. 遗传, 2011, 33(1): 9 - 16.
- [17] 刘林洪, 史小芳, 罗奋华, 等. 大鼠睾丸曲细精管组织支持细胞/生殖细胞长期共培养与精子发生分析[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 34(5): 454 - 460.
- [18] [EB/OL]. <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1821.aspx?slp=1#generalinformation>, 2014 - 5 - 26.
- [19] [EB/OL]. <https://www.atcc.org/Products/All/SCRC-1036.aspx#generalinformation>, 2014 - 5 - 26.
- [20] [EB/OL]. <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-11632.aspx?slp=1#generalinformation>, 2014 - 5 - 26.

(下接第 242 页)

效较好,肾虚血瘀为最佳,有效率达 88.89%<sup>[17-20]</sup>。故肾病的治疗应紧扣“本虚标实”病机,治宜益肾活血为主。益肾活血中药肾康灵方中黄芪补气升阳、利水消肿、益气行血,生地黄清热凉血、益肾活血,二药共为君药,主益肾活血;山茱萸补益肝肾、收敛固涩,山药益气养阴、补脾肾、固肾精,牡丹皮活血凉血,三七活血化瘀止血。全方共奏益肾气、行气血、化瘀血之功效。中药肾康灵应用于临床治疗 PNS 已有二十余年,取得显著疗效,益肾活血法疗效明显优于单纯益肾法和单纯活血法,在本研究中通过结合现代分子生物学技术,证实肾康灵可抑制 CXCL16、CD36 的释放,进而减少 IFN- $\gamma$ 、IL6、TNF- $\alpha$  等炎性反应递质的分泌,有效地抑制系膜细胞的增殖而发挥其保护作用。

### 参考文献

- [1] Ruth EM, Kemper MJ, Leumann EP, et al. Children with steroid-Sensitive nephrotic syndrome come of age: long-term outcome[J]. J Pediatr, 2005, 147(2): 202-207.
- [2] Andrea Cove-Smith, Bruce M, Hendry. The Regulation of Mesangial Cell Proliferation[J]. Nephron Exp Nephrol, 2008, 108(4): 74-79.
- [3] Hyun Soon, Lee Chi, Young Song. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Oxidative Stress in the Development of Glomerulosclerosis[J]. Am J Nephrol, 2009, 29(1): 62-70.
- [4] Mitsuoka H, Toyohara M, Kume N, et al. Circulating soluble SR-PSOX/CXCL16 as a biomarker for acute coronary syndrome-comparison with high-sensitivity C-reactive protein[J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16(5): 586-593.
- [5] 魏武杰, 文红艳. 趋化因子与临床疾病[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 798-800.
- [6] McKimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 1006-1011.
- [7] Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, et al. CXCL16 in kidney and cardiovascular injury[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(3): 317-325.

- [8] Xia, Y., Entman, M. L., Wang, Y. Critical role of CXCL16 in hypertensive kidney injury and fibrosis[J]. Hypertension, 2013, 62(6): 1129-1137.
- [9] Norlander AE, Saleh MA, Madhur MS. CXCL16: A Chemokine-Causing Chronic Kidney Disease[J]. Hypertension, 2013, 62(6): 1008-1010.
- [10] Lin Z, Gong Q, Zhou Z, et al. X. Increased plasma CXCL16 levels in patients with chronic kidney diseases[J]. Eur J Clin Invest, 2011, 41(8): 836-845.
- [11] Yang YL, Lin SH, Chuang LY, et al. CD36 is a novel and potential anti-fibrogenic target in albumin-induced renal proximal tubule fibrosis[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 735-744.
- [12] Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 299(1-2): 19-22.
- [13] Miyahara Y, Nishimura S, Watanabe M, et al. Scavenger receptor expressions in the kidneys of mice with lipoprotein glomerulopathy[J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16(1): 115-121.
- [14] 眭维国, 黄礼玲, 邹贵勉, 等. CD36 在慢性肾脏病中的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(10): 1459-1461.
- [15] Susztak K, Ciccone E, McCue P, et al. Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy[J]. PLoS Med, 2005, 2(2): e45.
- [16] Kennedy DJ, Chen Y, Huang W, et al. CD36 and Na/K-ATPase- $\alpha$ 1 form a proinflammatory signaling loop in kidney[J]. Hypertension, 2013, 61(1): 216-224.
- [17] 郑健, 魏金花, 吴群励, 等. 益肾活血中药肾康灵治疗小儿频复性肾病 15 例临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(7): 295-298.
- [18] 郑健. 小儿原发性肾病综合征病证结合的中医临床思维[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(6): 34-35.
- [19] 郑健. 小儿原发性肾病综合征中医辨证施治的临床思维[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(4): 225-227.
- [20] 郑健, 褚克丹, 林青, 等. 肾康灵治疗小儿频复发性肾病 30 例临床研究[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(2): 1-3.

(2014-05-09 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 235 页)

- [21] Chen W, Jia W, Wang K, et al. Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(3): 571-577.
- [22] 肖崇厚, 杨松松, 洪筱坤. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 447.

- [23] 张蜀艳, 李政. 齐墩果酸研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 20-24.
- [24] 王兵. 补肾养肝—女贞子[J]. 现代中华医药, 2005, 2(1): 50-54.
- [25] 万谦, 王兆会, 李启佳, 等. 齐墩果酸对分化后的 3T3-L1 脂肪细胞的作用[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 68-71.

(2014-05-30 收稿 责任编辑: 徐颖)