

·综述·

可诱导干细胞分化的小分子化合物研究进展

李 夏¹, 单 磊¹, 李文林³, 张寿德², 张卫东^{1,2*}

(1. 第二军医大学药学院天然药化教研室, 上海 200433; 2. 上海交通大学药学院, 上海 200240;
3. 第二军医大学基础部细胞生物学教研室, 上海 200433)

摘要: 随着干细胞和再生医学 (利用干细胞治疗各种疾病) 研究的进步, 人类在诱导干细胞分化的技术领域也取得了显著进展。其中化学生物学的发展为干细胞研究提供了多种多样的生物活性小分子, 基于其自身的优势, 小分子正越来越多地应用于干细胞的研究。本文综述了天然和合成的小分子化合物针对性的诱导干细胞分化方面的研究。

关键词: 干细胞; 小分子化合物; 诱导; 分化

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 02-0121-06

Application of small molecule compounds in inducing differentiation of stem cells

LI Xia¹, SHAN Lei¹, LI Wen-lin³, ZHANG Shou-de², ZHANG Wei-dong^{1,2*}

(1. Department of Medicinal Chemistry of Natural Product, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China; 3. Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: With the development of stem cells and regenerative medicine (treatment of various diseases using stem cells) research, the induction of differentiation of human stem cell technology has also made significant progress. The development of chemical biology offers a variety of small biological molecules for stem cell biology. This review focuses on how small molecule compounds (natural and synthetic) induce differentiation of stem cells.

Key words: stem cell; small molecule compound; induction; differentiation

在细胞分化过程中, 细胞往往由于高度分化而完全失去了再分裂的能力, 最终衰老死亡。机体在发展适应过程中为了弥补这一不足, 保留了一部分未分化的原始细胞, 称之为干细胞。一旦生理需要, 这些干细胞可按照发育途径通过分裂而产生分化细胞。因其所具有的强大自我更新能力和多向分化潜能使之成为创伤修复、再生医学和组织工程学等研究领域的热点。

根据个体发育过程中出现的先后次序不同, 干细胞可分为胚胎干细胞和成体干细胞。胚胎干细胞是一种高度未分化细胞, 它具有发育的全能性, 能分化出成体动物的所有组织和器官, 包括生殖细胞。成体干细胞存在于成年动物的许多组织和器官的特定内环境中, 是一类能自我维持增殖的未分化的细胞, 通常只能分化为所在组织器官的一种多种功能细胞。造血干细胞和骨髓间质干细胞是熟知的成体干细胞。近年来, 又发现一类诱导多能性干细胞, 在药物筛选领域具有广泛应用, 但目前还处于起步阶段。简单地说, 诱导多能性干细胞是指体细胞经重编程后成为一个类似胚胎干细胞状态的细胞。由于其不受免疫排斥、

收稿日期: 2010-07-12.

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目 (30725045); 国家新药创制重大专项 (2009ZX09311-001).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-81871244, E-mail: WDZhangY@hotmail.com

伦理、宗教和法律等方面的限制, 一经问世即在生命科学领域引起了一次轰动, 被誉为生命科学领域里一次新的里程碑。本文将重点介绍能够诱导胚胎干细胞分化的小分子化合物。

1 可以诱导干细胞分化的因素

干细胞的定向分化是生物体发育、生长和修复的基础, 是由细胞内外因素共同控制、调节特定基因的表达来实现的。这些因素包括生物物理学的相互作用如细胞和细胞间的相互作用; 细胞基质信号相关分子如生长因子、激素类和细胞因子以及小分子 (如营养素、代谢产物、天然产物和合成的药理学因子)。研究显示, 特定转录因子的表达水平可能是维持干细胞特性的关键因素, 生长因子及膜蛋白介导的细胞间相互作用在外源性调控干细胞定向分化方面起着重要作用。小分子化合物由于其显著的优势越来越地被应用于体外诱导干细胞定向分化和疾病的治疗。

2 可诱导干细胞分化的小分子化合物

小分子在调节细胞命运方面可发挥重要作用, 不但可以调节特定的靶标信号且与基因调控相比具有明显的优势。① 小分子的效应是迅速且可逆的, 可通过改变它们的浓度及联合运用不同种类的小分子对蛋白质功能进行准确和时序的调节; 可以随时加入或除去小分子化合物来启动或中断特定的作用。② 合成化学由于其结构和功能的多样性赋予了小分子无限的潜力去准确控制分子间的识别和相互作用。因此毫无疑问, 越来越多影响干细胞命运的小分子的识别和筛选工作将会大大促进干细胞生物学和再生医学的发展。相对应地, 通过培育出的细胞可作为人类疾病的研究模型也将促进药物筛选和新药研发工作。

2.1 合成的小分子化合物

2.1.1 小分子的联合运用提高鼠胚胎干细胞向中胚层的分化 胚胎干细胞向肾脏细胞系分化的技术一直相对滞后。最新研究实现在未添加外源性细胞因子, 并不经拟胚体的条件下, 将鼠胚胎干细胞分化成肾祖细胞库、间介中胚层 (intermediate mesoderm, IM: 与泌尿系统和生殖系统有关) 细胞。通过联合运用 3 种小分子: Janus 相关酪氨酸蛋白激酶抑制剂 1、PI3K 信号通路抑制剂 LY294002 和 RhoA 转录信号抑制剂 CCG1423^[1], 首先使鼠胚胎干细胞分化成表达 BMP7 的阳性细胞 (BMP7 是预测的 IM 的诱导因子), 加入维甲酸继续培养时, 可以提高 IM 分化过程中必需的

因子 (Osr1) 的表达^[2]。首次实现了不经拟胚体, 并未添加外源性细胞因子的条件下, 使鼠胚胎干细胞选择性分化成 IM, 与之前的报道相比大大提高了 IM 的诱导效率。

2.1.2 可诱导分化成神经元的小分子 神经元是中枢神经系统起主导功能的细胞, 通过小分子诱导的方法可以获得相应表型的神经元, 从而促进损伤中枢神经系统的修复。Ding 等^[3, 4]对 10 000 个经验证具有生物活性的小分子进行高通量筛选, 得到一个具有诱导鼠畸胎瘤细胞和胚胎干细胞定向分化为神经元的小分子, 命名为 TWS119。进一步研究发现, TWS119 可以与糖原合成激酶-3 β (GSK-3 β) 结合。通过亲和技术和生物化学方法的验证, GSK-3 β 被鉴定为 TWS119 作用的一个靶点。Wnt 信号通路是参与胚胎及器官发育的主要四大类信号传导途径之一, GSK-3 β 和 β -连环蛋白 (β -Catenin) 在通路中起着激活与关闭的作用 (相关通路见图 1)。

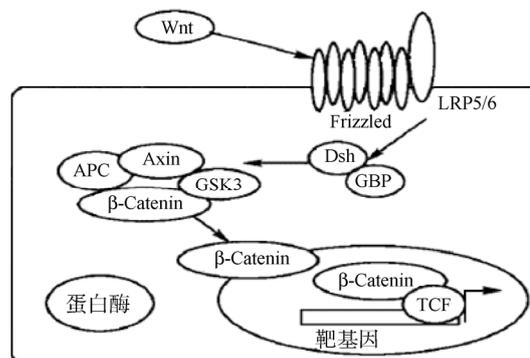


图 1 Wnt 信号通路

Woodbury 等^[5]用 β -巯基乙醇、二甲基亚砜和丁羟基茴香醚等物质成功诱导骨髓间充质干细胞 (MSCs) 转变为神经元, 并表达了神经元特有的标记物神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase) 和神经丝蛋白-M (NF-M)。Deng 等^[6]联合应用异丁甲基嘌呤和二丁基环磷酸腺苷提高胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 的含量, 亦将 MSCs 转变为神经元样细胞。

以苯并吡嗪为母环合成的小分子化合物 **1** 也可以诱导间充质干细胞向神经元细胞分化。实验证实, 经化合物 **1** 诱导后, 超过 95% 的骨髓间充质干细胞可以转化成神经元样细胞。聚合酶链式反应 (PCR) 结果显示, 由于化合物 **1** 的作用使得神经肽、胆碱能受体和 Fbxo2 (神经元细胞的标记物) 的水平显著上调。此外, 经化合物 **1** 处理的间充质干细胞表现出神

神经元电生理特性和胆碱能神经元特性^[7]。

林绿标等^[8]研究发现, 一氧化氮 (NO) 能促进神经干细胞的分化, 并能促进细胞分化后轴突的发育。尹时华等^[9]研究发现, 水杨酸钠有促进神经干细胞向谷氨酸 (Glu) 能神经元分化, 同时抑制神经干细胞向 γ -氨基丁酸 (GABA) 能神经元分化的作用。维甲酸在体内对外胚层分化起着关键作用, 人们曾利用维甲酸在体外诱导胚胎干细胞分化成神经元细胞^[10, 11]。

基于以上发现, 可以通过化学合成及计算机模拟的方法设计与化合物 1 和 TWS119 化合物结构类似的小分子, 再用相同的方法筛选出更多的可诱导成神经元的小分子, 这些小分子将有助于以帕金森病为代表的中枢退行性疾病的药物治疗。

2.1.3 诱导鼠胚胎干细胞分化成心肌细胞的小分子 心脏病后修复是再生医学的重要课题和难题。干细胞具有分化成新的心肌细胞和新生血管的潜能, 可再生性修复和代替变性坏死的心肌, 提高和重新整合心肌收缩力, 修复受损和狭窄的冠状动脉, 增加和改善心肌的供血和供氧。

Takahashi 等^[12]通过报告基因法, 利用心肌特异性基因心肌 α -肌球蛋白重链 (α -MHC) 的启动子转染小鼠胚胎干细胞, 通过单层培养的方法对 800 多种化合物进行了筛选, 荧光分析显示维生素 C 可以显著诱导胚胎干细胞向心肌细胞分化。同理, Wu 等^[13]用组合化学的方法合成了大量的小分子化合物并对其进行了筛选, 得到一系列可以定向诱导鼠胚胎干细胞向心肌细胞分化的双氢嘧啶类化合物。分化得到的心肌细胞表达了多种特定标记物, 如肌球蛋白重链、锌指转录因子 GATA-4、肌细胞强化因子-2 (MEF2) 和转录因子 NKX2.5 等。

Graichen 等^[14]通过筛选得到小分子化合物 SB203580, 可诱导悬浮培养的人胚胎干细胞分化为心肌细胞, 转化效率相比对照组提高了 2.5 倍。经鉴定 SB203580 为丝裂原活化蛋白激酶 p38 (P38MAP) 的一种有效抑制剂, 有助于早期中胚层的形成且分化效率与其浓度密切相关。

2.1.4 可调控间充质干细胞向成骨细胞分化的小分子 许多小分子可以用来调控间充质干细胞的分化, 在特定条件下, 地塞米松、5-氮杂胞苷、8-甘油磷酸钠、维生素 C 和过氧化物都可诱导骨髓间充质干细胞 (MSC) 向骨和脂肪细胞的分化。Wu 等^[15]利用 C3H10T1/2 细胞 (小鼠间充质祖细胞系) 通过高

通量筛选的方法发现 2, 6, 9-三取代嘌呤化合物 purmorphamine, 经鉴定能有效诱导间充质干细胞 (MSC) 分化为成骨细胞。鉴于 purmorphamine 可以使原始成体神经干细胞增生, 并且与 RA 联合应用可以诱导鼠胚胎干细胞向运动神经元的分化^[16], 推测其可能机制为 Hh 信号通路的选择性激动剂。

2.1.5 可诱导胚胎干细胞向内胚层细胞分化的小分子 1 型糖尿病是胰岛细胞被机体自身的免疫系统破坏, 无法产生功能胰岛素, 在体内胰岛素绝对缺乏的情况下引起血糖水平持续升高而出现尿糖的一类糖尿病。胚胎干细胞自主分化为胰岛素分泌细胞的比例很小, 但在某些诱导分化因子的作用下胚胎干细胞可以向胰岛素分泌细胞分化。

从胚胎干细胞向胰岛素分泌细胞分化过程中的关键一步就是胰脏祖细胞的形成。胰脏祖细胞可以表达 Pdx1 并能产生所有类型的胰腺细胞, Pdx1 是调节胰脏发育和成熟 β 细胞功能的主要转录因子^[17, 18], Pdx1 阳性细胞在体内外可进一步分化成更加成熟的 β 细胞。 $(-)$ -Indolactam V 是经高通量筛选的方法鉴定出的一个可以诱导人胚胎干细胞分化成 Pdx-1 细胞、内胚层细胞分化成胰脏祖细胞^[19]的小分子。

尼克酰胺也叫维生素 PP, 是维生素 B₃ 的一种形式, 通过其主要的代谢产物烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 起作用。NAD⁺ 在生物体中广泛存在, 能量的产生、营养素的代谢、信号转导以及维持基因组的完整性等都与其密切相关。其抗糖尿病发生作用已经被人们所了解, 研究发现尼克酰胺具有诱导分化潜能, Lumelsky 等^[20]曾报道, 烟酰胺可以将小鼠 ES 细胞诱导分化为胰岛素分泌细胞。诱导后的细胞不仅表达胰岛素、胰高血糖素、生长抑素等蛋白质, 而且可以分泌胰岛素。Hori 等^[21]证实磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3-K) 抑制剂 LY294002 能促使体外培养的胚胎干细胞分化为分泌胰岛素的 β 细胞, 且分化得到的 β 细胞确能提高体内胰岛素水平。

2.1.6 可诱导胚胎干细胞发育成内胚层的小分子化合物 干细胞在治疗和研究应用方面的一个关键作用是利用它来分化成各种所需的细胞类型。其中由内胚层细胞分化而来的包括肺、肝和胰腺在再生医学里都有着广泛的应用。

下面介绍的两个小分子可有效地诱导鼠和人的胚胎干细胞发育成完全的内胚层。Borowiak 等^[22]利用 pSox17-dTomato (内胚层祖细胞的标记物) 转染胚胎干细胞, 对 4 000 个化合物进行了筛选, 选择在低

血清且不含 Activin A 的条件下可以诱导 Sox17 表达的化合物。鉴于它们能从鼠和人的胚胎干细胞中有效诱导出发育完全的内胚层而分别命名为 IDE1 (引起胚胎干细胞 Smad2 的磷酸化和内胚层的分化) 和 IDE2, 两个结构相似的小分子在不含 Activin A 的条件下能使 80% 的胚胎干细胞分化成发育完全的内胚层。另外发现由 IDE1 和 IDE2 诱导的内胚层样细胞在含有小分子 Indolactam V 的条件下可进一步分化成胰脏细胞系。

2.1.7 增强干细胞分化能力的小分子 抑制细胞的分化和死亡能够促进胚胎干细胞的自我更新, 同样, 抑制细胞的自我更新能力可提高胚胎干细胞的分化能力。

Zhu 等^[23]对 20 000 多个小分子化合物进行了筛选, 得到能诱导胚胎干细胞表达内源性 Sox17 的小分子 stauprimide, 发现它能在较低浓度的 Activin A 条件下提高鼠和人胚胎干细胞诱导 Sox17 的效率, 并且 stauprimide 和 Activin A 具有协同作用, 在不含 Activin A 的条件下 stauprimide 不会引起内胚层的分化。用亲和靶点识别的方法证实 stauprimide 可与 NME2 (c-Myc-激活转录因子) 相互作用并抑制其核定位, 在利用 stauprimide 进行治疗时, c-Myc (一种管家基因) 的下调可打乱胚胎干细胞的自我更新状态, 从而使胚胎干细胞更容易分化。事实上, 进一步研究

表明 stauprimide 不仅能提高胚胎干细胞向内胚层的分化, 在适宜的条件下还能使其向中胚层及外胚层分化。

2.2 天然来源的小分子化合物

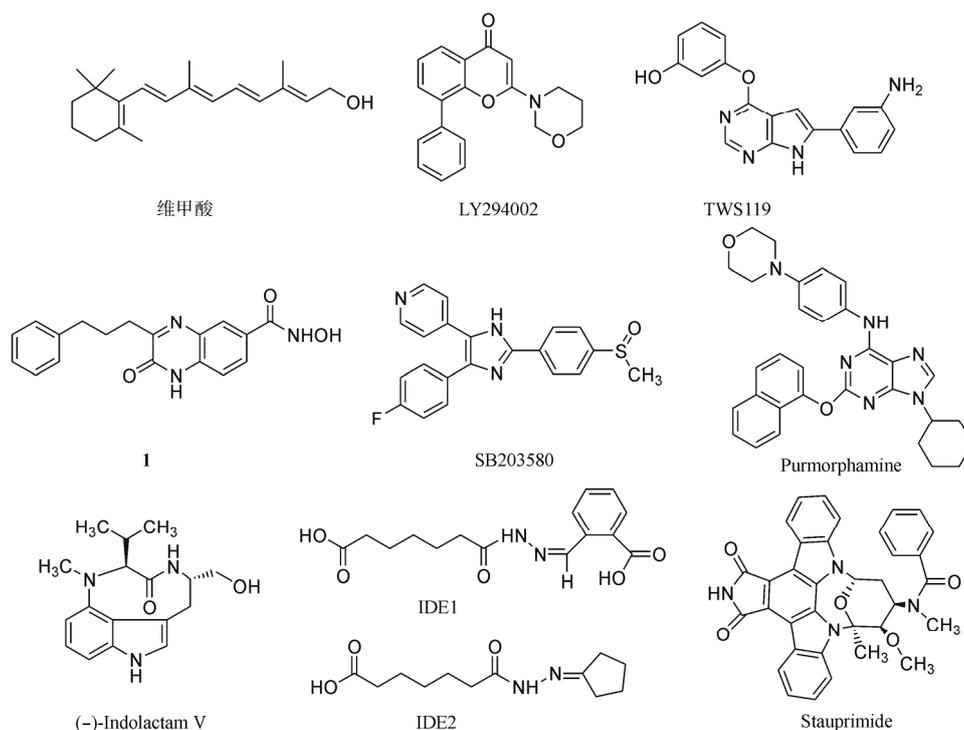
来自中药的小分子化合物因其结构的多样性和新颖性, 具有各种较好的药理活性。因此, 利用这些天然的小分子化合物诱导干细胞分化也是非常有力的一条途径。

2.2.1 单味中药提取物诱导干细胞向心肌细胞分化

三七皂苷是三七的主要成分, 以含人参二醇型皂苷为主。实验研究证明骨髓间充质干细胞在三七总皂苷诱导下可分化为心肌样细胞^[24]。

黄芪甲苷是黄芪的有效成分之一, 冼绍祥等^[25]观察黄芪甲苷在体外具有诱导骨髓间充质干细胞定向分化为心肌样细胞的作用。RT-PCT (逆转录聚合酶链反应) 结果显示, 诱导后鼠骨髓间充质干细胞表达成熟的心肌特异性蛋白, 心肌 α -肌球蛋白重链 (α -MHC) 和心肌 β -肌球蛋白重链 (β -MHC), 但诱导率有待提高。

丁英等^[26]应用银杏内酯 B 对培养的神经干细胞进行诱导分化, 结果表明, 一定浓度范围内的银杏内酯 B 对神经干细胞分化为神经元样细胞有促进作用, 对神经干细胞分化为星形胶质样细胞也有促进作用, 并随浓度的增加而作用增强。



体外试验证明从藜芦属植物中分离得到的生物碱西洛帕明 (cyclopamine) 可以促进胚胎干细胞向胰脏细胞的分化^[27]。西洛帕明具有类固醇样结构, 可以抑制膜蛋白平滑, 此作用与 sonic hedgehog (Shh) 通路有关^[28]。抑制 Shh 与其受体 Patched 的结合对胰腺的分化和形成起着关键的作用^[29]。当 Shh 和 Patched 结合时会导致胰脏分化的抑制。因此, 在体外直接阻断 Shh 信号通路可以实现胰岛细胞的分化。利用 Shh 的抗体来阻断 Shh-Patched 相互作用或利用西洛帕明直接抑制膜蛋白平滑的作用, 可以诱导胰岛素和 Pdx-1 因子的表达, 此实验已在鼠胚胎干细胞分化试验中得到证实^[30, 31]。此外, 作者实验室前期研究发现, 西洛帕明具有良好的抗肿瘤活性^[32, 33]。因此, 藜芦属植物无论从促干细胞分化或是抗肿瘤活性角度来讲都值得我们继续深入研究。

Conophylline 是从热带植物 *Ervatamia microphylla* 中提取得到的长春花生物碱, 此化合物同样作用在 Shh 通路上。在鼠胰脏退化器官的培养中发现, Conophylline 可以抑制囊状结构的形成并增加胰岛细胞的数量, 这种作用与 Activin A 的作用很相似^[34]。Conophylline 添加到含有胰脏退化器官并加入 AR42J 细胞 (胰脏的原始细胞模型) 的培养基中, 可以增加胰岛素的含量和 Pdx-1 阳性细胞的数量。

2.2.2 中药复方诱导干细胞定向分化 中药在干细胞领域的研究目前主要集中在单味中药及其有效成分, 尤以提取物为多, 这必将限制了中药多因素作用的优势。中药复方即是由多种中药配伍在一起具有特殊功效的药剂。

李禄全等^[35]报道, 用复方丹参注射液成功诱导鼠骨髓间充质干细胞分化为神经细胞, 巢蛋白 (Nestin)、烯醇化酶 (NSE) 神经元特异性标志物表达

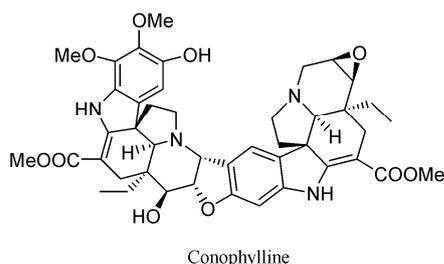
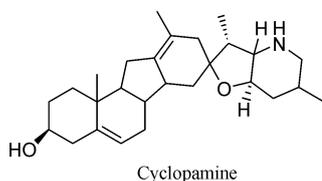
呈阳性。

3 展望

干细胞的分化过程是一个十分复杂且受到多种因素调控的过程。细胞内外各种调控因素之间相互协调、相互制约使得干细胞的基因表达发生一系列的改变, 最终分化成为具有特定功能的终末细胞。小分子在诱导干细胞分化中的应用将会对合成及天然来源的小分子化合物在药物筛选工作中产生新的意义, 与其他生长因子、抗氧化剂相比有着来源广泛、药理作用广泛的优势, 因此小分子诱导干细胞定向分化将有可能成为近年来一个新兴的研究领域。然而如何解释这些小分子的特殊作用机制并使它们在体外有效的诱导干细胞分化、不同类型的干细胞对小分子化合物剂量的敏感度如何都是亟待解决的问题。总之, 将会有更多的决定干细胞命运的小分子化合物等待被发现, 也相信干细胞凭借其特性和优势, 定会拥有更广阔的应用前景。

References

- [1] Evelyn CR, Wade SM, Wang Q, et al. CCG-1423: a small-molecule inhibitor of RhoA transcriptional signaling [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 2249–2260.
- [2] Mae S, Shirasawa S, Yoshie S, et al. Combination of small molecules enhances differentiation of mouse embryonic stem cells into intermediate mesoderm through BMP7-positive cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 877–882.
- [3] Ding S, Schultz PG. A role for chemistry in stem cell biology [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 833–840.
- [4] Ding S, Wu TY, Brinker A, et al. Synthetic small molecules that control stem cell fate [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 7632–7637.
- [5] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiation into neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 363–370.
- [6] Deng W, Obrocka M, Fischer I, et al. *In vitro* differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282: 148–152.
- [7] Kimt NR, Kang SK, Ahn HH, et al. Discovery of a new and efficient small molecule for neuronal differentiation from mesenchymal stem cell [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 7931–7933.
- [8] Lin LB, Zhang X, Ji XT, et al. Promotive effect of ectogenic nitric oxide on differentiation of neural stem cells [J]. *J Fourth Mil Med Univ (第四军医大学学报)*, 2004, 25: 301–303.
- [9] Yin SH, Gong SS, Yan KS, et al. Effects of sodium salicylate on neural stem cells differentiation in newborn mice nucleus of



- inferior [J]. J Huazhong Univ Sci Technol (Health Sci) (华中科技大学学报 医学版), 2004, 33: 579–588.
- [10] Bain G, Kitchens D, Yao M, et al. Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro* [J]. Dev Biol, 1995, 168: 342–357.
- [11] Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, et al. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons [J]. Cell, 2002, 110: 385–397.
- [12] Takahashi T, Lord B, Schulze PC, et al. Ascorbic acid enhances differentiation of embryonic stem cells into cardiac myocytes [J]. Circulation, 2003, 107:1912–1916.
- [13] Wu X, Ding S, Ding Q, et al. Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells [J]. J Am Chem Soc, 2004, 126: 1590–1591.
- [14] Graichen R, Xu X, Braam SR, et al. Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK [J]. Differentiation, 2008, 76: 357–370.
- [15] Wu X, Ding S, Ding Q, et al. A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells [J]. J Am Chem Soc, 2002, 124: 14520–14521.
- [16] Chen S, Hilcove S, Ding S, et al. Exploring stem cell biology with small molecules [J]. Mol Biosyst, 2006, 2: 18–24.
- [17] Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, et al. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 16105–16110.
- [18] Kim SK, MacDonald RJ. Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis [J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12: 540–547.
- [19] Chen S, Borowiak M, Fox JK, et al. A small molecule that directs differentiation of human ESCs into the pancreatic lineage [J]. Nat Chem Biol, 2009, 5: 258–265.
- [20] Lumelsky N, Blondel O, Iaeng P, et al. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets [J]. Science, 2001, 292: 1389–1394.
- [21] Hori Y, Rulifson IC, Tsai BC, et al. Growth inhibitors promote differentiation of insulin-producing tissue from embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 16105–16110.
- [22] Borowiak M, Maehr R, Chen S, et al. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2009, 4: 348–358.
- [23] Zhu S, Wurdak H, Wang J, et al. A small molecule primes embryonic stem cells for differentiation [J]. Cell Stem Cell, 2009, 4: 416–426.
- [24] Yang ZQ, Xian ZQ, Wang ZH, et al. Effects of panax notoginseng saponins on the differentiation of marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol (中药新药与临床药理), 2006, 17: 239–242.
- [25] Xian SX, Yang ZQ, Wang ZH, et al. An experimental study on astragaloside inducing bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into cardiomyogenic cells *in vitro* [J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med (广州中医药大学学报), 2007, 24: 37–40.
- [26] Ding Y, Zeng YS, Zhang W, et al. The effects of ginkgolide of various consistency on the differentiation of neural stem cells [J]. Acta Anat Sin (解剖学报), 2004, 35: 484–488.
- [27] Kim SK, Melton DA. Pancreas development is promoted by cyclopamine a hedgehog signaling inhibitor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13036–13041.
- [28] Taipale J, Chen JK, Cooper MK, et al. Effects of oncogenic mutations in smoothed and patched can be reversed by cyclopamine [J]. Nature, 2000, 406: 1005–1009.
- [29] Kim SK, Hebrok M. Intercellular signals regulating pancreas development and function [J]. Genes Dev, 2001, 15: 111–127.
- [30] Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, et al. *In vitro* directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells [J]. Diabetologia, 2004, 47: 1442–1451.
- [31] Skoudy A, Rovira M, Savatier P, et al. Transforming growth factor (TGF) beta, fibroblast growth factor (FGF) and retinoid signalling pathways promote pancreatic exocrine gene expression in mouse embryonic stem cells [J]. Biochem J, 2004, 379: 749–756.
- [32] Tang J, Li HL, Shen YH, et al. Antitumor and antiplatelet activity of alkaloids from *Veratrum dahuricum* [J]. Phytother Res, 2010, 24: 821–826.
- [33] Tang J, Li HL, Shen YH, et al. Antitumor activity of extracts and compounds from the rhizomes of *Veratrum dahuricum* [J]. Phytother Res, 2008, 22: 1093–1096.
- [34] Ogata T, Li L, Yamada S, et al. Promotion of β -cell differentiation by conophylline in fetal and neonatal rat pancreas [J]. Diabetes, 2004, 53: 2596–2602.
- [35] Li LQ, Yu JL, Liu GX, et al. Danshen injection inducing mouse bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into nerve-like cells [J]. Chin J Pediatr (中华儿科杂志), 2005, 43: 53–54.