

• 论著 •

丹参注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究

余 勤¹, 连俊兰², 郭 莹¹

(1. 浙江中医药大学生物工程学系, 浙江 杭州 310053; 2. 杭州市红十字会医院儿科, 浙江 杭州 310003)

【摘要】 目的:探讨丹参注射液在体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞(rMSCs)向神经元样细胞分化的作用。方法:采用贴壁筛选法分离 rMSCs,并通过不断传代进行纯化和扩增培养。采用含丹参注射液的无血清 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F-12 培养液诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞,观察不同浓度丹参注射液对 rMSCs 诱导分化为神经元样细胞的影响。通过观察 rMSCs 经诱导后细胞的形态变化和采用免疫组化方法检测神经元特异性核蛋白(NeuN)、神经丝蛋白(NF-M)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达来鉴定神经元样细胞。结果:经丹参注射液诱导后,rMSCs 胞体收缩,突起伸出,形似神经元;免疫组化显示诱导出的神经元样细胞 NeuN、NF-M 表达阳性,GFAP 阴性。丹参注射液在浓度为 10 ml/L 时的诱导作用最为显著。结论:丹参注射液可以在体外诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞,其诱导分化率与丹参注射液的浓度有关。

【关键词】 骨髓间充质干细胞;神经元;丹参注射液;诱导分化;大鼠

中图分类号:R285.5;Q254 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2006)04-0210-05

Experimental study on differentiation of bone mesenchymal stem cells into neuron-like cells with salvia miltiorrhiza injection YU Qin¹, LIAN Jun-lan², GUO Ying¹. 1. Department of Bio-engineering, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, Zhejiang, China; 2. Department of Pediatrics, Hangzhou Red-cross Hospital, Hangzhou 310003, Zhejiang, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of differentiation of rat bone mesenchymal stem cells (rMSCs) into neuron-like cells with salvia miltiorrhiza injection in vitro. **Methods** rMSCs were separated from rat bone marrow with wall sticking method and expanding, and cultured in vitro. rMSCs were induced to differentiate into neuron-like cells with salvia miltiorrhiza injection. The effects of different dosages of salvia miltiorrhiza on differentiation of rMSCs into neuron-like cells were observed. Neuron-like cells were identified with neuron-specific enolase (NeuN), neurofilament (NF-M), glial fibrillary acidic protein (GFAP) by immunohistochemistry. **Results** The rMSCs were induced by salvia miltiorrhiza injection to express neuronal phenotype similar to the cell appearance of neurons with NeuN and NF-M positive at 3 hours, but glial astrocyte marker GFAP negative. The differentiation was the most significant when the inducing concentration of salvia miltiorrhiza injection was at 10 ml/L. **Conclusion** rMSCs can be induced to differentiate into neuron-like cells with salvia miltiorrhiza injection. The efficacy of differentiation is correlated with the concentration of salvia miltiorrhiza injection.

【Key words】 bone mesenchymal stem cells; neuron; salvia miltiorrhiza injection; induction and differentiation; rat

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)具有多向分化潜能,通过一定的诱导条件,MSCs 能够分化为神经细胞^[1]。由于 MSCs 具有易获得,体外培养能快速扩增,移植反应较弱,与宿主神经组织能良好整合,并长期存活、多次传代仍有分化功能,以及易于转染和长期表达外源性基因等优势^[2,3],使得它比神经干细胞在治疗神经系统疾病方

面的临床价值更大,在组织工程和细胞治疗等方面具有广阔的应用前景。丹参注射液是临床上治疗心脑血管疾病的常用中药注射剂,具有活血化瘀、凉血安神的作用。现代药理研究表明,丹参具有抗氧化、抗缺血、改善微循环等功效,且对神经细胞损伤具有保护作用^[4]。本研究拟从大鼠中分离出大鼠骨髓间充质干细胞(rat mesenchymal stem cells, rMSCs),并通过不断传代进行分化以及体外培养扩增,进行探讨丹参注射液对 rMSCs 分化为神经元样细胞的诱导作用。

基金项目:国家中医药管理局基金资助项目(2003LHR11);浙江省科技厅基金资助项目(2004C33014)

作者简介:余 勤(1962-),女(汉族),浙江人,医学硕士,教授。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂:健康 Wistar 大鼠骨髓(浙江中医药大学动物实验中心提供,鼠龄 4~6 周,体重 120 g 左右,雌雄不限);丹参注射液(批号:0412106,正大青春宝药业有限公司);1:1 Dulbecco 改良 Eagle 培养基(DMEM)/F-12 培养液(英国 Invitrogen 公司),胎牛血清(hyclone corporation, FCS),质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶和 1 mmol 乙二胺四乙酸(EDTA, Invitrogen 公司),硫代甘油(Sigma 公司),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, R&D 公司);小鼠抗大鼠神经元特异性核蛋白(neuronal nuclear specific protein, NeuN)单克隆抗体(单抗),小鼠抗大鼠神经丝蛋白(neurofilament protein, NF-M)单抗,胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)单抗(加拿大 Chemicon 国际公司),二甲基亚砜(上海试剂总厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 rMSCs 的体外分离和原代培养:于无菌条件下取正常 Wistar 大鼠的股骨和胫骨,剔除脂肪组织,露出骨髓端,用 5 ml 含体积分数为 10% FCS 的 DMEM/F-12 冲出骨髓,充分混匀后,1 000 r/min (离心半径 105 mm)离心 10 min,制成单细胞悬液。细胞重悬于含 10% FCS 的 DMEM/F-12 培养液,接种在一次性塑料培养瓶中(通常一只大鼠的双股骨骨髓细胞悬液接种在面积 25 cm² 的培养瓶中进行,置 37℃、体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度 CO₂ 细胞培养箱培养。12 h 后弃去未贴壁细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,更换培养液,以后每 3~4 d 换液 1 次。贴壁细胞接近 80%~90% 融合后,结束原代培养。

1.2.2 rMSCs 的传代扩增培养:取出贴壁细胞接近 80%~90% 融合的面积 25 cm² 塑料培养瓶,采用 0.25% 胰蛋白酶和 1 mmol EDTA 1~2 ml 消化 2 min,待细胞形态开始皱缩后,用含 10% FCS 的 DMEM/F-12 培养液约 1.5~2.0 ml 终止消化,加入 PBS 反复轻轻吹打,使细胞充分脱离培养壁,移入离心管,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入培养液,按 1:3 比例传代培养。

1.2.3 丹参注射液定向诱导作用:用丹参注射液定向诱导 rMSCs 向神经元样细胞分化。

1.2.3.1 bFGF-丹参注射液诱导组(实验组):传至细胞培养第 1、3、5 代的 rMSCs 按 4×10⁵/L 接种于预先放置有消毒盖玻片的 6 孔板内,制备细胞爬片(每孔 2 ml)。当细胞达到 60%~70% 融合时,弃

培养液,加入含 bFGF(10 μg/L)的 DMEM/F-12 培养液(含 20% FCS)预诱导 24 h 后, PBS 洗 2 次,加入含不同浓度丹参注射液的 DMEM/F-12 诱导液后对 rMSCs 进行诱导分化。

1.2.3.2 空白对照组(对照组 1):不加任何诱导剂。

1.2.3.3 硫代甘油诱导对照组(对照组 2):用含有 1 mmol/L 硫代甘油的 DMEM/F-12 培养液(含 20% FCS)预诱导 24 h 后,再加入含 5 mmol/L 硫代甘油的无血清 DMEM/F-12 培养液诱导 5 h。

1.2.3.4 单用丹参注射液对照组(对照组 3):不用 bFGF 预诱导,直接用含 10 ml/L 丹参注射液的无血清 DMEM/F-12 培养液诱导 5 h。

1.2.3.5 单用 bFGF 对照组(对照组 4):用 bFGF 预诱导 24 h 后,不加入后诱导剂。

1.2.4 诱导细胞鉴定:为进一步明确 rMSCs 是否分化为神经元样细胞,采用神经元标志物 NeuN、NF-M 和 GFAP 进行鉴定。诱导细胞用 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤后加入过氧化物酶阻断剂,非免疫性动物羊血清封闭,分别加入 NeuN 单抗(1:100 稀释)、NF-M(1:100 稀释)和 GFAP(1:50 稀释)单抗 4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤后加入免疫组化检测进口试剂盒中二抗 Envision 显色试剂孵育 30 min, Tris 缓冲生理盐水(TBS)洗涤, 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,中性树胶封固。各诱导组细胞于免疫组化染色后在光镜下随机选取 10 个非重叠视野(×100),计算 NeuN、NF-M 和 GFAP 阳性细胞占总细胞数的比例。

1.3 统计学方法:结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, *t* 检验, SPSS 软件分析结果, Microsoft Excell 绘制图表。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rMSCs 的形态学和生长特性:大鼠骨髓单个核细胞悬液接种于塑料培养瓶后, 2~4 h 左右细胞贴壁,贴壁细胞呈圆形、短梭形或三角形,核位于中央,散在分布于瓶底。12 h 更换培养液后, 2~3 d 出现长梭形贴壁细胞(彩色插图 1)。3~4 d 培养瓶底圆形细胞减少,梭形细胞增多,并可见到少量细胞集落形成。培养 1 周左右,细胞密度进一步增加,细胞接近 80%~90% 融合时原代培养结束(彩色插图 2)。原代培养消化后达(5~6)×10⁵ 个细胞,扩增至 5 代时获得(2~3)×10⁸ 个细胞。

2.2 光镜下观察 rMSCs 经诱导后细胞的形态变化:实验组 rMSCs 经过预诱导后无形态变化。经丹参注射液诱导 0.5 h 后,少数 rMSCs 发生形态变

化,在诱导 1~2 h 中,rMSCs 呈渐进性地向神经元样细胞转化(彩色插页图 3);诱导 3 h 后,大多数 rMSCs 胞体收缩成锥形或球形,立体感增强,细胞突起变细、变长,有些长突起末端形成生长锥样的膨大及丝性伪足,轴突末端出现一级和二级分支,类似树突,并可见相互交织,部分细胞周围有光晕(彩色插页图 4)。诱导 5 h 后细胞形态无进一步变化。对照组 1 细胞形态未见任何变化;对照组 2 诱导 3 h 后,多数细胞呈较典型的神经元样细胞形态,但诱导 5 h 后部分细胞脱落;对照组 3 和 4 中仅有少量神经元样细胞出现。

2.3 免疫组化鉴定(彩色插页图 5,图 6):免疫组化染色结果显示,实验组和对照组 2 中神经元样细胞的胞体及部分突起 NeuN、NF-M 染色呈强阳性(棕褐色),而未分化的扁平 rMSCs 为阴性(蓝色)。

2.3.1 不同浓度丹参注射液对 NeuN、NF-M 和 GFAP 阳性细胞率的影响(图 7):随机计数 10 个视野,结果发现,丹参注射液的诱导浓度分别为 1、5、10、20 和 25 ml/L 时,NeuN 阳性细胞占总细胞数的比例分别为 $(7.12 \pm 1.34)\%$ 、 $(44.22 \pm 1.40)\%$ 、 $(72.50 \pm 1.84)\%$ 、 $(45.90 \pm 1.97)\%$ 、 $(25.00 \pm 2.83)\%$,在一定范围内随着丹参注射液浓度的增加,NeuN 阳性细胞率增加,当诱导浓度为 10 ml/L 时,阳性细胞率最高,但之后随着浓度的增加,NeuN 阳性细胞率减少。诱导浓度为 10 ml/L 时,NF-M 阳性细胞率亦最高,为 $(67.60 \pm 3.20)\%$ 。GFAP 阳性细胞率小于 2%。

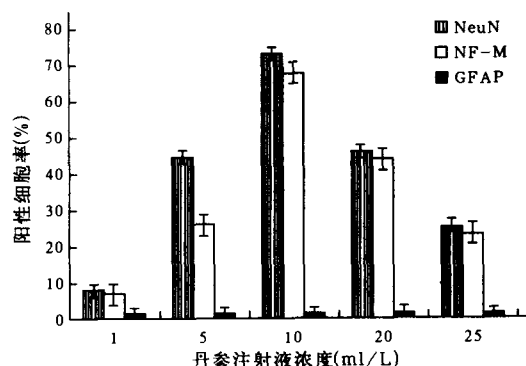


图 7 不同浓度丹参注射液对 NeuN、NF-M 和 GFAP 阳性细胞率的影响

Figure 7 Effects of different concentration of salvia miltiorrhiza injection on positive rate of NeuN, NF-M and GFAP

2.3.2 丹参注射液(10 ml/L)诱导 rMSCs 后对 NeuN、NF-M 和 GFAP 免疫组化阳性细胞率的影响(表 1):实验组与对照组 1、3、4 间 NeuN、NF-M

阳性细胞率差异均具有显著性(P 均 < 0.05)。对照组 1 中细胞形态未见任何变化;对照组 2 中有大量神经元样细胞(NeuN、NF-M);对照组 3 有少量神经元样细胞(NeuN、NF-M 阳性细胞率小于 2%);对照组 4 有部分神经元样细胞(NeuN 阳性细胞率小于 15%)。

表 1 实验组与各对照组免疫组化阳性细胞率比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of positive cells rate among experiment group and control groups detected by immunohistochemistry($\bar{x} \pm s$)

组别	免疫组化阳性细胞率(%)		
	NeuN	NF-M	GFAP
实验组	72.50 ± 1.84 [*]	67.60 ± 3.20	1.40 ± 1.34
对照组 1	3.10 ± 2.13 [△]	2.01 ± 1.88 [△]	1.90 ± 1.52
对照组 2	73.40 ± 1.26	68.89 ± 3.64	2.51 ± 1.23
对照组 3	1.23 ± 0.32 [△]	1.50 ± 0.67 [△]	0
对照组 4	10.50 ± 2.21 [△]	14.20 ± 1.01 [△]	0

注:与实验组比较; $\triangle P < 0.05$,与对照组 2 比较; $^* P < 0.05$

3 讨论

MSCs 具有高度自我更新和多向分化能力,不仅可以分化为多种间质组织细胞,还可跨越胚层界限分化为外胚层的神经细胞,为多种神经系统疾病的治疗提供了新思路^[1]。为了解中医中药如何在间质干细胞研究中发挥作用,近 5 年来国内在用中药诱导 MSCs 分化为神经元样细胞方面进行了尝试。本课题组已经证实丹参素、丹参酮可在体外成功诱导人 MSCs 为神经元样细胞^[5,6]。我们发现人 MSCs 和 rMSCs 在贴壁时间、生长速度、形态方面等均有差异,为进一步明确丹参注射液对 rMSCs 体外分化为神经元样细胞的作用,也为下一步 rMSCs 移植、体内应用促 rMSCs 诱导分化剂的研究奠定了基础。本研究在从大鼠骨髓中分离 rMSCs 和体外传代培养技术的基础上,证实了丹参注射液具有诱导 rMSCs 转化为神经元样细胞的作用,经 bFGF 预诱导后,用 10 ml/L 诱导 3 h 时作用最为显著,其诱导作用与丹参注射液的浓度相关。诱导 3 h 后,大部分 rMSCs 可转变为神经元样细胞,并有轴突和树突出现,多个神经元之间可形成网络。单用 bFGF 或丹参注射液诱导均不表达此效果,说明 bFGF 和丹参注射液联合应用具有协同作用,整个分化诱导过程是连续的、逐步的,省略预诱导期和诱导期都可能影响细胞分化率。

NeuN 是一种神经元特异性核蛋白,是神经元细胞的特异性标志之一。NF-M 是神经元特异性中间纤维,是一种细胞骨架蛋白,主要定位于神经元,

是构成神经元胞体和突起的重要结构。GFAP 是星形胶质细胞的标志物。本研究结果显示,丹参注射液诱导后多数细胞 NeuN、NF-M 阳性,GFAP 阴性,表明所诱导出的细胞为神经元样细胞,而星形胶质细胞形成不明显。

了解 rMSCs 的生长特性对选择健康细胞进行移植具有重要的指导意义。本研究结果表明,rMSCs 细胞在传代后 3~5 d 进行细胞移植较合适,培养时间过长不仅不会增加细胞数量,反而会剥夺细胞生长空间,消耗营养成分,堆积代谢产物,影响细胞功能。同时通过流式细胞术鉴定 rMSCs 第 2、3 代已有相当高的纯度,且在第 2、3 代细胞增殖较快,胞核透明,形态均一。体外诱导结果也显示了较高的阳性率。所以我们认为,选择第 2、3 代处于对数增值期的 rMSCs 可能是进行移植实验的最佳时期。

已有动物实验表明,MSCs 可促进脑出血及脊髓损伤的神经修复^[7],一般认为其作用机制是移植的 MSCs 本身或刺激宿主细胞分泌神经营养因子的营养作用致使神经功能恢复。丹参注射液具有在体外诱导 rMSCs 向神经元样细胞分化的作用,但在动物模型中,移植 rMSCs 并同时应用丹参注射液诱导,能否增加 rMSCs 分化为神经元样细胞的阳性转化率,促进新生神经元存活;能否更有效地刺激宿主

细胞分泌神经营养因子,促进神经损伤功能恢复;体外将从 rMSCs 诱导分化形成的神经元样细胞用于动物体内是否具有神经元样细胞功能;如何提高中药诱导 rMSCs 向神经细胞的转化率以及向神经细胞定向分化的能力;rMSCs 诱导分化为神经细胞的确切机制如何等,都是我们下一步需要探索和研究的问题。

参考文献:

- [1]常颖,齐欣,卜丽莎,等.成人骨髓间充质干细胞体外多向分化潜能特性的研究[J].中国危重病急救医学,2005,17:95-97.
- [2]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.
- [3]方利君,付小兵,孙同柱,等.猪骨髓间质干细胞的分离培养及分化潜能的鉴定[J].中国危重病急救医学,2003,15:606-608.
- [4]吴俊芳,王洁,张均田.总酚酸小鼠脑缺氧的保护作用[J].中国临床药理与治疗学杂志,1999,4:261-264.
- [5]余勤,罗依,鄂艳,等.丹参素定向诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的研究[J].中国中西医结合杂志,2005,25:49-53.
- [6]余勤,罗依,鄂艳,等.丹参酮诱导间质干细胞分化为神经元样细胞的研究[J].中医药学刊,2004,22:1410-1413.
- [7] Cuevas P, Carceller F, Dujovny M, et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells [J]. Neurol Res, 2002, 24: 634-638.

(收稿日期:2006-05-11)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅 2006 年《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志,是我国急救医学界权威性学术期刊,为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊,每月 10 日出版,国际通用 16 开大版本,内文用 80 克铜版纸印刷,内容丰富,且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2006 年的订阅手续。邮发代号:6-58;定价:7.8 元/期,全年 93.6 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误,请将刊物寄回编辑部调换,我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国 NLM《MEDLINE》、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”和“em120.com 危重病急救在线”。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议,并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清,不同意者论文可不投本刊。

《中国危重病急救医学》杂志开设有述评、专题讨论、理论与方法学探讨、循证医学、论著、研究报告、经验交流、短篇报道、病例报告、临床病理(病例)讲座、治则·方剂·针灸、老中医经验、继续教育、综述、讲座、基层园地、启事、读者、作者·编者等栏目。欢迎广大作者踊跃投稿。

地址:天津市和平区睦南道 122 号天和医院内;邮编:300050。

(期刊编辑部)

宣肺透解剂对流感病毒性肺炎小鼠肺部炎症及炎症相关因子的影响
(正文见198页)



A: 正常对照组; B: 病毒感染组; C: 宣肺透解剂治疗组
图1 宣肺透解剂对流感病毒FM1感染小鼠呼吸器官炎症病变的影响 (HE, ×66)
Figure 1 Effect of XTP on inflammatory pathological change of respiratory organs in mice infected by influenza virus FM1 (HE, ×66)

丹参注射液诱导大鼠骨髓间质干细胞分化
为神经元样细胞的实验研究
(正文见210页)

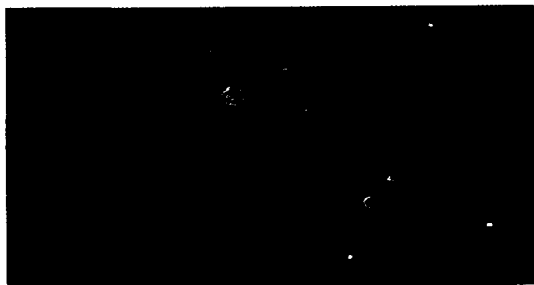


图1 原代rMSCs培养2 d细胞形态(×100)
Figure 1 rMSCs after primary culture for 2 days(×100)

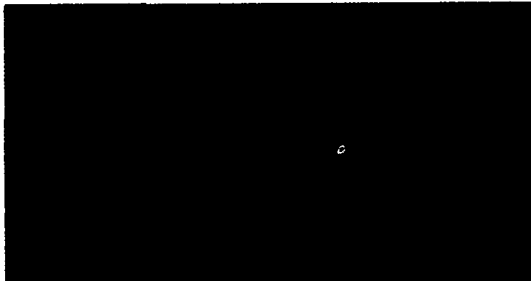


图2 原代rMSCs培养细胞接近融合(×100)
Figure 2 rMSCs reached to amalgamation after primary culture(×100)



图3 丹参注射液诱导1 h时的神经元样细胞(×100)
Figure 3 Neuron-like cells induced by salvia miltiorrhiza injection for 1 hour(×100)

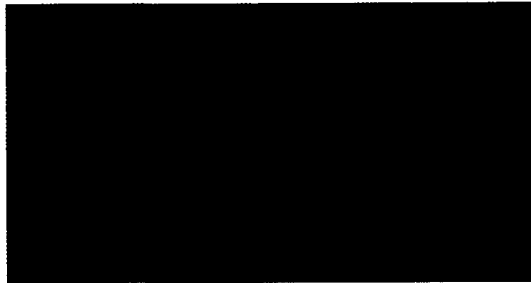


图4 丹参注射液诱导3 h时的神经元样细胞(×100)
Figure 4 Neuron-like cells induced by salvia miltiorrhiza injection for 3 hours(×100)

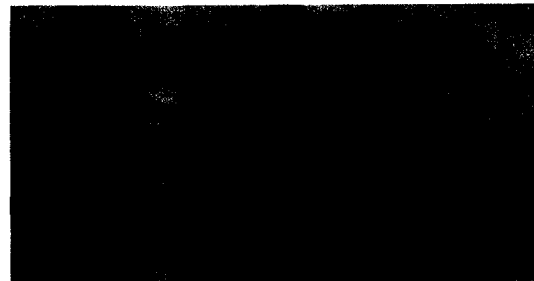


图5 丹参注射液诱导rMSCs分化为神经元样细胞
NeuN染色阳性(免疫组化, ×200)
Figure 5 Positive expression of NeuN-stained rMSCs after differentiating into neuron-like cells induced by salvia miltiorrhiza injection(immunohistochemistry, ×200)

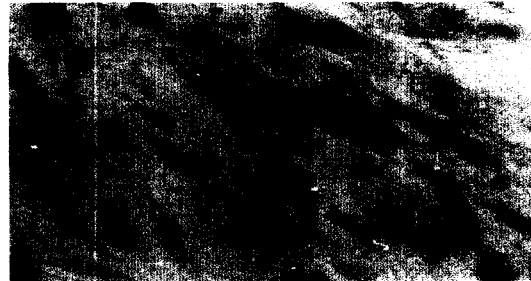


图6 丹参注射液诱导rMSCs分化为神经元样细胞
NF-M染色阳性(免疫组化, ×200)
Figure 6 Positive expression of NF-M-stained rMSCs after differentiating into neuron-like cells induced by salvia miltiorrhiza injection(immunohistochemistry, ×200)