

脑康 I 号对新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响

陈玉静, 李 林, 李宗信, 黄小波, 陈文强, 于 晓, 王宁群

(首都医科大学宣武医院, 北京 100053)

【摘要】 目的 探讨脑康 I 号含药血清对体外培养大鼠海马神经干细胞(NSCs)增殖分化作用的影响。方法 用无血清 DMEM/F12[含 20 $\mu\text{g/L}$ 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)和表皮生长因子(EGF)及 B27]体外培养新生 Wistar 大鼠海马 NSCs,在 NSCs 分化过程中添加大、中、小剂量(分别为 2.0、1.0、0.5 kg/L)脑康 I 号含药血清进行干预,以免疫荧光及细胞化学方法对 NSCs 及其分化后的细胞进行鉴定。结果 从新生大鼠海马分离培养的 NSCs 能够表达巢蛋白,并具有分化为神经元和星形胶质细胞的能力;5 d 时,脑康 I 号各剂量组神经球突起长度均显著长于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与对照组比较,脑康 I 号各剂量组细胞分化为神经元或星形胶质细胞率均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 脑康 I 号可促进 NSCs 向神经元方向分化,并对所分化的神经元样细胞有促生长、发育作用。

【关键词】 脑康 I 号;神经干细胞;细胞培养;细胞增殖;细胞分化

中图分类号:R285.5;Q254 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.05.001

Effect of Naokangerhao (脑康 I 号) on proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells of newborn rats CHEN YU-jing, LI Lin, LI Zong-xin, HUANG Xiao-bo, CHEN Wen-qiang, YU Xiao, WANG Ning-qun. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China

【Abstract】 **Objective** To observe the effect of Naokangerhao (NKEH, 脑康 I 号) serum on proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells (NSCs) of newborn rats in vitro. **Methods** Hippocampal NSCs from Wistar rats that were born in 24 hours were isolated and cultivated in vitro to undergo clone culturing; serum free DMEM/F12, 20 $\mu\text{g/L}$ basic fibroblast growth factor (bFGF), 20 $\mu\text{g/L}$ epidermal growth factor (EGF) and B27 were used in the culture. During the progress of NSCs differentiation, three different doses of NKEH (2.0, 1.0 and 0.5 kg/L) in serum were added for interference, and immunofluorescence and immunocytochemistry stain were applied to identify the cells in the proliferation and differentiation. **Results** The neural spheres obtained from cultured hippocampal NSCs of newborn rats were positive for nestin expression, with the potential for further cloning and capability of differentiating into neurons or glial cells. On the 5th day of cultivation, the neurite length of neural sphere in the three NKEH groups was significantly longer than that in the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Results from immunofluorescence showed that the percentages of β -III-tubulin and gliofibrillary acid protein (GFAP) positive cells differentiated from NSCs in different NKEH groups were much higher than those in control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** NKEH can promote the differentiation of NSCs into nerve cell and facilitate the growth and development of differentiated neuron-like cells.

【Key words】 Naokangerhao; neural stem cell; cell culture; cell proliferation; cell differentiation

神经干细胞(NSCs)具有自我更新以及增殖、分化产生神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力,因此,它们能够充当神经系统变性疾病移植治疗的供体组织。脑康 I 号是根据中医传统理论严谨组方的医院内制剂,其具有补髓益智、活血化痰的功效。本课题组前期的研究结果表明,脑康 I 号在临床上对于改善糖尿病认知障碍有一定作用^[1]。本实验

基金项目:北京市中医药重点学科项目(京中重Ⅵ26);北京市中医药科技项目(2007-034)

作者简介:陈玉静(1979-),女(汉族),吉林省人,主治医师, Email:cyj0504@sina.com.cn.

中通过对脑康 I 号含药血清诱导新生大鼠海马 NSCs 分化过程的研究,为阐明脑康 I 号促进神经发生,进而治疗糖尿病脑病的机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂:新生 Wistar 胚胎大鼠和体重 200~250 g 的 SPF 级 Wistar 大鼠(中国医学科学院实验动物中心提供)。一抗鼠抗巢蛋白、兔抗 β -III-微管蛋白(tubulin)和兔抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)多克隆抗体(美国 Sigma 公司);免疫荧光二抗异硫氰酸荧光素(FITC)羊抗兔、抗鼠 IgG 及

4', 6-二脒基-2-苯基咪唑 (DAPI) 试剂均为美国 Chemicon 公司产品; NSCs 基础培养液 (DMEM/F12 加 B27) 添加碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 20 $\mu\text{g/L}$ 和表皮生长因子 (EGF) 20 $\mu\text{g/L}$ 购自美国 Gibco 公司。脑康 I 号由制首乌、熟地黄、三七、石菖蒲等药物组成, 参照《中国药典》(2000 年版), 由本院中药制剂室制备, 按脑康 I 号成人用量 20、10、5 倍的比例分成含生药 2.0、1.0、0.5 kg/L 3 个剂量, 分装保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用, 保存时间不超过 1 周, 用前摇匀。

1.2 含药血清制备: 将 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常对照组及脑康 I 号大、中、小剂量组, 每组 6 只。脑康 I 号各组大鼠分别灌胃不同剂量脑康 I 号每日 1 次, 连用 3 d; 正常对照组灌胃等量双蒸水。第 3 日灌胃 1 h 后经大鼠腹主动脉采血, 分离血清, 56 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 灭活补体, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, -70 $^{\circ}\text{C}$ 下冻存备用。

1.3 原代培养及实验分组: 取新生 Wistar 胚胎大鼠, 乙醇消毒后断头取脑, 取双侧海马剪碎后加 DMEM/F12 培养液, 经过机械吹打、滤网过滤后获得单细胞悬液并计数, 以 5×10^7 个/L 的细胞密度接种到培养瓶中, 加入 NSCs 基础培养液后进行恒温培养, 2~3 d 进行半量补液, 培养 7~9 d 后, 机械分离神经球进行传代。收集培养的第 2 代神经球, 以约 2×10^8 个/L 的细胞密度接种于多聚赖氨酸处理过的 24 孔培养板各孔中, 每块培养板分为对照组及脑康 I 号大、中、小剂量组, 每组 6 孔。对照组培养液为原有培养液去除 bFGF 及 EGF, 加质量分数 10% 正常鼠血清。脑康 I 号培养液为原有培养液去除 bFGF 及 EGF, 加 10% 脑康 I 号大、中、小剂量含药血清。将培养板置于饱和湿度、37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 孵箱中培养。

1.4 NSCs 分化及脑康 I 号的诱导作用: 取 4 组培养细胞, 每孔加入体积分数为 4% 的多聚甲醛水溶液固定 15 min, 用含 0.3% 曲通 X-100 的磷酸盐缓冲液 (PBST) 漂洗 5 min $\times$ 3; 用 PBST 破膜 30 min, 山羊血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min; 一抗为单克隆鼠抗巢蛋白 (Rat401, 1:100)、多克隆兔抗 β - III -tubulin (1:500) 和多克隆兔抗 GFAP (1:50); 滴加相应的 FITC 标记的荧光二抗 (1:500), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h; PBST 漂洗 (5 min $\times$ 3), 使用 50 mg/L DAPI 复染核, 室温孵育 20 min; PBST 漂洗 (5 min $\times$ 3), 倒置相差荧光显微镜下观察并拍照, 采用图像分析系统及 Image-Proplus 软件测量神经球突起长度。

1.5 统计学分析: 实验数据以均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析, 组间比较使用单因素方差分析, 两样本率的比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 NSCs 增殖及生长状态的观察: 培养 1 d 的细胞呈圆形亮点; 2~3 d 可见数个细胞形成的哑铃样结构; 4~5 d 可见几十个细胞形成的神经球 (彩色插页图 1a); 6 d 可见神经球明显增大, 直径达 100~150 μm ; 8~10 d 直径可达 150~200 μm (彩色插页图 1b)。原代及多次传代培养形成克隆球的细胞圆润饱满, 边界清晰, 活力状态佳, 经鉴定巢蛋白表达阳性 (红色为巢蛋白, 蓝色为细胞核; 彩色插页图 1c)。表 1 结果显示, 细胞培养 5 d 时, 脑康 I 号大、中、小剂量组神经球突起长度均明显长于对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠 NSCs 培养 5 d 神经球突起长度及 β - III -tubulin 和 GFAP 阳性细胞分化率比较

组别	孔数	突起长度 ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)	β - III -tubulin 阳性细胞率 (%)	GFAP 阳性 细胞率 (%)
对照组	6	85.02 $\pm$ 5.54	20.30	29.00
脑康 I 号大剂量组	6	108.68 $\pm$ 9.23 ^a	51.23 ^b	39.75 ^b
脑康 I 号中剂量组	6	107.26 $\pm$ 3.44 ^b	50.10 ^b	37.38 ^b
脑康 I 号小剂量组	6	98.85 $\pm$ 5.46 ^a	47.85 ^b	35.25 ^a

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

2.2 脑康 I 号对体外培养海马 NSCs 分化的影响 (彩色插页图 2~3; 表 1): 本实验中用 β - III -tubulin 抗体标记神经元, 用 GFAP 抗体标记星形胶质细胞。培养 7 d 后, 脑康 I 号各剂量组细胞大多分化成神经元和星形胶质细胞。镜下观察: β - III -tubulin 阳性神经元的胞体呈圆形或锥体形, 且形态较典型, 突起较长, 具有二三级以上的细小分支, 发育较为成熟; GFAP 阳性星形胶质细胞胞体稍小, 胞突长而直, 分支较少。红色阳性细胞分别为 β - III -tubulin 和 GFAP, 蓝色 (DAPI 着色) 为细胞核。脑康 I 号各剂量组表达 β - III -tubulin 和 GFAP 的阳性细胞数均较对照组明显增多 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而脑康 I 号各剂量组间差异无统计学意义。

3 讨论

糖尿病脑病是指糖尿病对中枢神经系统产生的各种损害, 临床上以认知功能障碍为主要表现, 出现学习记忆能力减退, 空间时间定向困难, 复杂信息的处理和解决问题的能力下降, 以及思维迟钝和运动

缓慢,甚至可发展为痴呆^[2]。2006 年的一项流行病学调查发现,一组阿茨海默病(AD)患者中,合并糖尿病者高达 22%^[3],而早在 1999 年的调查中就已发现糖尿病可使 AD 的患病率增加 2 倍以上^[4]。海马作为学习、记忆的重要解剖结构和神经中枢,与认知功能关系密切。研究发现,中枢神经系统的海马齿状回颗粒下区(SGZ)和侧脑室室管膜下区(SVZ)终生存在着 NSCs^[5],它们增殖、分裂产生新细胞的连续动态变化过程称为神经发生^[6-7]。由 SVZ 和 SGZ 的 NSCs 产生新的细胞并分别迁移到嗅球和海马齿状回颗粒细胞层,分化成中间神经元,使局部神经环路得到不断更新,从而维持正常的嗅觉记忆及空间学习记忆^[8-9]。NSCs 体外增殖和定向诱导分化将有助于新药物的开发及治疗手段的改进^[10-11],通过诱导海马 NSCs 向神经元方向分化,进而促进神经发生,也许对防治糖尿病脑病有一定的作用。

本课题组既往研究中对糖尿病认知障碍患者的中医证型进行聚类分析发现,精亏气虚证发生率为 36.29%,痰瘀互阻证发生率为 27.53%,在糖尿病认知障碍所有中医证型中排前两位^[1]。脑康 I 号是结合对糖尿病认知障碍中医病机的分析,以补髓益智、活血化瘀立法配方。方中制首乌、熟地黄补髓益智,三七活血化瘀,石菖蒲开窍化痰,能有效改善糖尿病认知障碍患者的学习、记忆功能。本次在体外用无血清培养技术从新生大鼠海马中分离、培养成细胞悬浮球,经鉴定巢蛋白呈阳性,表明为 NSCs;并在 NSCs 分化期添加脑康 I 号,发现脑康 I 号各剂量组所用的含药血清均可促进 NSCs 向神经样细胞分化,减少向胶质细胞分化的比例,同时对所分化的神经样细胞有促进生长、发育的作用。众所周知,海马齿状回是与学习和记忆密切相关的结构,该处的神经细胞增殖可促进学习记忆能力的提高^[12]。

因此猜测,脑康 I 号对 NSCs 的促生长、分化作用也许是改善糖尿病认知障碍的作用机制之一,更加详细的作用尚需结合动物体内实验加以证实。

参考文献

- [1] 黄小波,李宗信,陈文强,等. 2 型糖尿病认知障碍的中医证候聚类分型[J]. 中国中西医结合急救杂志,2009,16(1):11-13.
- [2] Northam EA, Anderson PJ, Jacobs R, et al. Neuropsychological profiles of children with type 1 diabetes 6 years after disease onset[J]. Diabetes Care,2001,24(9):1541-1546.
- [3] Mimura M, Yano M. Memory impairment and awareness of memory deficits in early-stage Alzheimer's disease[J]. Rev Neurosci,2006,17(1-2):253-266.
- [4] Ott A, Stolk RP, van Harskamp F, et al. Diabetes mellitus and the risk of dementia; the Rotterdam study[J]. Neurology, 1999,53(9):1937-1942.
- [5] Seaberg RM, van der Kooy D. Adult rodent neurogenic regions; the ventricular subependyma contains neural stem cells, but the dentate gyrus contains restricted progenitors[J]. J Neurosci,2002,22(5):1784-1793.
- [6] Kornack DR, Rakic P. Continuation of neurogenesis in the hippocampus of the adult macaque monkey[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1999,96(10):5768-5773.
- [7] Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus[J]. Nat Med,1998,4(11):1313-1317.
- [8] Lois C, Alvarez-Buylla A. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain[J]. Science,1994,264(5162):1145-1148.
- [9] Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1996,93(25):14895-14900.
- [10] 白晓东,付小兵. 骨髓间充质干细胞诱导增殖分化信号的研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2004,16(5):318-320.
- [11] 王振辉,付小兵. 小肠干细胞增殖分化调节机制的研究进展[J]. 中国危重病急救医学,2002,14(2):117-119.
- [12] 李建业,王超要,周思朗,等. 老年大鼠学习能力与海马齿状回神经细胞增殖的关系[J]. 实用医学杂志,2006,22(10):1120-1121.

(收稿日期:2009-04-13)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

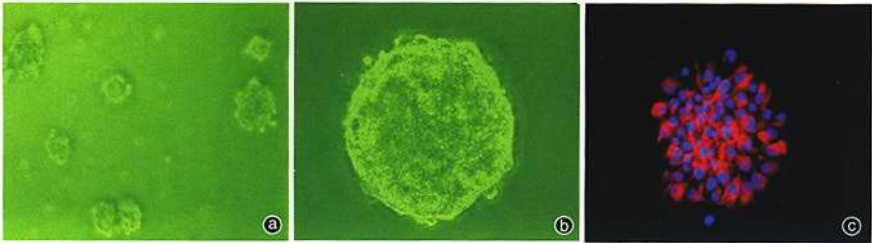
高张生理盐水可减轻脊髓损伤时的脊髓水肿和肿胀

美国加利福尼亚大学的学者应用磁共振成像(MRI)技术观察了脊髓损伤(SCI)以后的组织变化,研究了高张盐水对脊髓水肿、肿胀和髓内出血的影响。研究以 12 只成年 L-E 雌性大鼠为对象,在大鼠颈 5 水平实施单侧 12.5 mm 横断损伤深度的 SCI,30 min 后以 $1.4 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 速度分别静脉滴注质量分数为 0.9%NaCl($n=6$)和 5%NaCl($n=6$),损伤后立即将大鼠置于 4.7T MRI 系统中连续摄 8 h,然后处死大鼠。结果发现,损伤后 36 min,损伤处发现明显水肿,同时 MRI 的 T1、PD 和 T2 加权影像可见到低强度核团,即髓内出血;之后此核团逐渐减小,损伤后 8 h 有些核团完全消失,但组织病理学检查仍有红细胞存在。随后 T2 加权影像可见到高张的肿胀环围绕低强度核团,肿胀环边缘占据了整个单侧损伤处,并延伸到对侧。高张盐水可提高血浆 Na^+ 浓度,减轻脊髓水肿,MRI 影像低强度信号和肿胀面积缩小。研究人员认为,应用 MRI 可观察到由于组织病理生理学改变引起的细微变化,相信高张盐水可减轻 SCI 时的脊髓水肿和肿胀,对急性 SCI 具有潜在的治疗作用。

杨明星,编译自《Crit Care Med》,2009,37(7):2174-2179;胡 森,校校

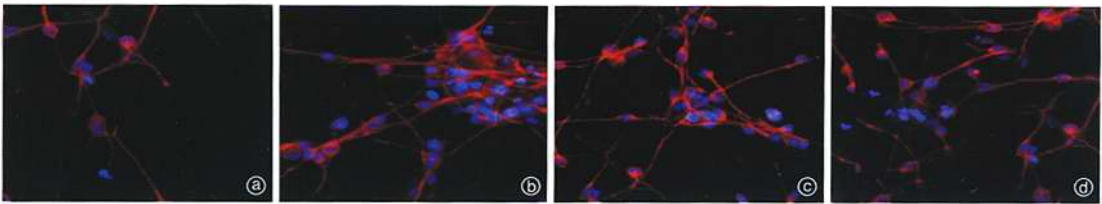
脑康 II 号对新生大鼠海马神经干细胞增殖分化的影响

(正文见259页)



①:培养4d(×100); ②:培养8d(×400); ③:培养7d巢蛋白阳性表达(红色为巢蛋白, 蓝色为细胞核, FITC 标记的荧光二抗染色, ×400)

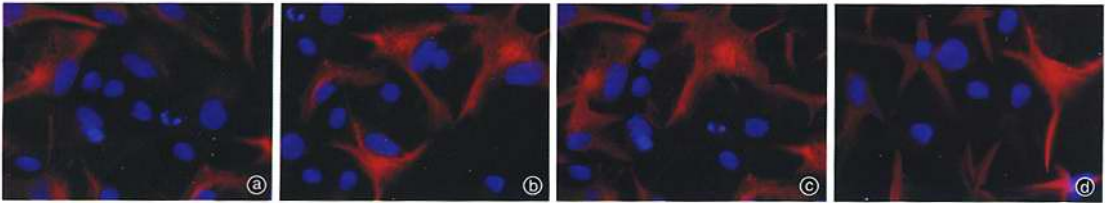
图1 倒置相差荧光显微镜下观察体外培养大鼠海马 NSCs 不同时间点的生长状态及巢蛋白阳性表达



①:对照组; ②:脑康 II 号大剂量组; ③:脑康 II 号中剂量组; ④:脑康 II 号小剂量组;

图中红色阳性细胞为 β -III-tubulin, 蓝色(DAPI 着色)为细胞核

图2 倒置相差荧光显微镜下观察各组体外培养大鼠海马 NSCs β -III-tubulin 阳性神经元改变(FITC 标记的荧光二抗染色, ×400)



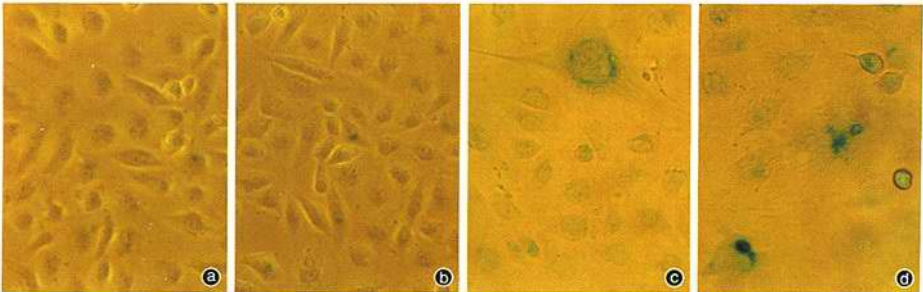
①:对照组; ②:脑康 II 号大剂量组; ③:脑康 II 号中剂量组; ④:脑康 II 号小剂量组;

图中红色阳性细胞为 GFAP, 蓝色(DAPI 着色)为细胞核

图3 倒置相差荧光显微镜下观察各组体外培养大鼠海马 NSCs GFAP 阳性星形胶质细胞改变(FITC 标记的荧光二抗染色, ×400)

高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老过程中活性氧和一氧化氮合酶/一氧化氮系统的变化

(正文见275页)



①:对照组; ②:高糖低浓度组; ③:高糖中浓度组; ④:高糖高浓度组

图1 荧光显微镜下观察鉴定各组 HUVECs 衰老程度(β -gal 染色, ×200)