

· 实验研究 ·

隐丹参酮诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究*

夏文杰¹ 陈振光² 张丽蓉³ 项鹏⁴ 张秀明¹ 李艳¹ 李树浓¹

内容提要 目的:观察隐丹参酮体外定向诱导成人骨髓间质干细胞(MSC)分化为神经元样细胞。方法:采用 Ficoll-Paque 液分离成人 MSC,体外扩增, FACScan 流式细胞仪检测表面抗原表达,采用含隐丹参酮的无血清 DMEM 诱导 MSC 分化为神经元样细胞。免疫组化鉴定神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF-M、NF-H)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巢蛋白(Nestin)的表达。结果:成人骨髓间质干细胞在体外扩增原代可获得 0.5×10^6 个细胞,15 代可获得 $(2 \sim 3) \times 10^{12}$ 个细胞,流式细胞仪检测显示 CD29、CD44、CD90、CD105、CD166 表达阳性,CD11a、CD14、CD34、CD38、CD45、CD80、CD86 为阴性。加入隐丹参酮诱导后, MSC 胞体收缩,突起伸出;免疫组化显示诱导出的神经元样细胞 NSE、NF-M、NF-H、Nestin 表达阳性,GFAP 阴性。结论:隐丹参酮在体外可诱导成人骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞。

关键词 骨髓间质干细胞 神经元 隐丹参酮 细胞分化

Experimental Study on Effect of Cryptotanshinone in Inducing Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Neuron-like Cells XIA Wen-jie, CHEN Zhen-guang, ZHANG Li-rong, et al *Department of Pathophysiology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou (510080)*

Objective: To investigate the effect of cryptotanshinone (CT) in inducing oriental differentiation of human rib bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) to neuron-like cells. **Methods:** Adult MSC were separated with Ficoll-Paque reagent and amplified in culture medium. The surface antigen was detected by FACScan flow cytometry. MSCs were induced to differentiate into neurons with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing CT, and neuron specific enolase (NSE), neurofilament (NF-M, NF-H), nestin, glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected by immunohistochemistry. **Results:** By amplifying in vitro, 0.5×10^6 human adult bone marrow MSC of primary passage and $2 \sim 3 \times 10^{12}$ of 15 passages could be obtained. Flow cytometric examination showed positive expression of CD29, CD44, CD90, CD105, CD166 and negative expression of CD11a, CD14, CD34, CD38, CD45, CD80, and CD86. After induced by CT, the cytoplasm of MSC contracted with protruding process. Immunohistochemical examination displayed the neuron-like cells with the NF-M, NF-H and nestin expression positive, and negative expression of GFAP. **Conclusion:** CT could induce human adult bone marrow MSC differentiated to neuron-like cells.

Key words bone marrow mesenchymal stem cell, neuron, cryptotanshinone, cell differentiation

骨髓间质干细胞(MSC)属于成体干细胞,由全能干细胞分化而来,具有一定的自我更新和分化能力。近年发现 MSC 在一定条件下可以分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、肌小管和肝细胞等^(1,2)。Kopen 等⁽³⁾将 MSC 注射到新生鼠侧脑室后发现可分化为神

经元和神经胶质细胞,并且有一定的迁移能力,说明 MSC 具有更加广泛的分化潜能。利用上述特性建立体外神经细胞定向诱导模型,不仅有助于研究神经细胞的发育机理,而且对于治疗 Alzheimer 病和帕金森氏病等多种神经系统变性疾病都具有重要意义。隐丹参酮是分离提纯的二萜醌类化合物,是有药性作用的丹参酮的代表成分之一。本研究观察隐丹参酮体外定向诱导成人 MSC 分化为神经元样细胞,发现可利用隐丹参酮建立体外神经细胞定向诱导模型,现将结果

* 国家重点基础研究发展规划项目(973)资助(No. G1999054300)

1. 中山医科大学病理生理教研室(广州 510080); 2. 中山医科大学附属第一医院心胸外科; 3. 广东药学院病理生理教研室; 4. 美国芝加哥大学人类遗传研究所

报告如下。

材料与方 法

1 骨髓的来源 成人骨髓来源于非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。

2 药物 隐丹参酮购自广州市药品检验所。

3 试剂及仪器 L-DMEM 购自 GIBCO BRL 公司 ;胎牛血清购自 Hyclone 公司 ;Ficoll-Paque 分离液购自 Pharmacia 公司 ;荧光标记抗小鼠抗人抗体 CD11a-FITC、CD14-PE、CD29-PE、CD34-PE、CD38-PE、CD45-FITC、CD86-FITC、CD90-PE 购自 Pharmigen 公司(美国);CD44-FITC、CD80-FITC、CD105-FITC、CD166-FITC 购自 Ancell 公司 ;碱性成纤维生长因子(bFGF) 购自 R&D 公司 ;小鼠抗人神经烯醇化酶(NSE) 、小鼠抗人神经丝蛋白(NF-H)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP) 购自 Maxim 公司 ;小鼠抗人神经丝蛋白(NF-M) 单抗(200mg/L) 购自 Neomarkers 公司 ;小鼠抗人巢蛋白(Nestin) 单抗(200mg/L) 为美国 Dr. Messam 惠赠 ;超敏 SP(鼠) 试剂盒购自 MBI 公司 ;DAB 显色试剂盒购自 DAKO 公司。

4 实验方法

4.1 MSC 的分离 参照文献^[4]方法 ,无菌条件下 ,用含 100ml/L 胎牛血清(FCS) 的 L-DMEM 冲出骨髓 ,充分混匀后 1500r/min 离心 ,弃上清及脂肪层 ,沉淀用 DMEM 充分混匀 ,轻轻叠加到密度为 1.077×10^3 g/L 的 Ficoll-Paque 分离液上 ,2500r/min 离心 30min ,收集单核细胞层 ,用 DMEM 洗涤 2 次。

4.2 MSC 的扩增 按细胞数密度 2×10^6 /ml 接种 ,37℃ 饱和湿度的 CO₂ 孵箱培养 ,3d 后更换培养液 ,弃去未贴壁细胞 ,3~4d 换液 1 次 ,至细胞完全融合 ,结束原代培养。接近融合的 MSC 用含 0.1mmol/L EDTA 的 2.5g/L 胰酶室温消化 5~10min ,1500r/min 离心 20min ,弃上清 ,沉淀按 1:3 比例传代 ,进行扩增培养。

4.3 MSC 的鉴定 将培养细胞用磷酸盐缓冲液(PBS) 洗涤 3 次 ,胰酶消化 ,分别加入荧光标记的抗体 4℃ 孵育 30min ,洗去未标记抗体 ,10g/L 多聚甲醛固定 ,应用 FACScan 流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

5 观察项目和检测方法

5.1 定向诱导 MSC 向神经元分化 传至 P5、P10 的 MSC 按 0.4×10^6 /ml 接种于事先放置有消毒盖玻片的 6 孔板内制备细胞爬片。实验分隐丹参酮诱导组和对照组 ,隐丹参酮诱导组细胞用含 bFGF 的

DMEM(200ml/L FCS) 预诱导 24h ,更换培养液 ,洗涤 3 次 ,再加入含隐丹参酮的无血清 DMEM 诱导 5h。对照组不加任何诱导剂。每组包括 18 个细胞爬片。

5.2 诱导细胞鉴定 诱导细胞用 10% 的福尔马林固定 30min ,洗涤后加入过氧化物酶阻断剂 ,非免疫性动物血清封闭 ,分别加入 NSE 单抗、GFAP 单抗、NF-H、NF-M(1:100 稀释) Nestin 单抗(1:100 稀释) 室温孵育 1h ,洗涤后加入生物素标记的二抗 ,室温孵育 10min ,再加入亲和素-过氧化物酶孵育 10min ,DAB 液显色 ,中性树脂胶封固。

6 统计学方法 隐丹参酮诱导组的细胞免疫组化染色后光镜下随机数取 10 个非重叠视野($\times 100$) ,计算 NSE、NF-M 和 NF-H 阳性细胞占总细胞数的比例 ,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

结 果

1 MSC 的分离扩增 用 L-DMEM(含 10% FCS) 培养的骨髓单核细胞 ,72h 后逐渐出现贴壁细胞 ,3 天后完全换液除去大部分血细胞 ,此时贴壁细胞为单个或几个细胞的克隆。细胞形态均一 ,为长梭形 ,贴壁的 MSC 增殖迅速 ,培养至 15~18 天细胞接近融合 ,克隆间出现重叠(见图 1) ,粘附于贴壁细胞之上的杂细胞在换液过程中逐渐被清除 ,细胞接受 90% 融合时原代培养结束 ,大约可获得 $(0.5 \sim 0.6) \times 10^6$ 个细胞。

2 MSC 的传代培养 传代 hMSC 呈圆形 ,簇状分布 ,24h 内完全贴壁、伸展并重新变为长梭形 ,以后增殖生长迅速 ,生长潜伏期较短 ,10 天左右即达到完全融合。体外扩增 5 代 ,细胞数为 0.1×10^9 个左右 ;体外扩增 10 代 ,细胞数为 20×10^9 个左右 ;扩增 15 代 ,细胞数为 $(2 \sim 3) \times 10^{12}$ 个。随着传代次数增加 ,细胞增殖速度逐渐下降 ,细胞出现衰老、核固缩的现象 ,并有细胞从培养板脱落。

3 MSC 表面抗原鉴定 流式细胞仪结果显示细胞均一性较好 ,二代细胞均一性在 95% 以上 ,CD11a、CD14、CD34、CD38、CD45、CD80、CD86 表达为阴性。CD29、CD44、CD90、CD105、CD166 表达阳性。

4 光镜下观察 MSC 诱导为神经元的形态变化 加入隐丹参酮诱导液 3h 后 MSC 细胞形态发生明显变化 ,胞质向核收缩 ,呈典型的核周体形态 ,7h 后 ,大多数 MSC 细胞均转变为类似于神经元形态 ,突起伸出(轴突) ,并在轴突末端出现一级和二级分支 ,类似树突(见图 2) ,部分细胞之间拉成网状。此时有小部分细胞从培养板上脱落。但诱导时间延长后细胞能存活至

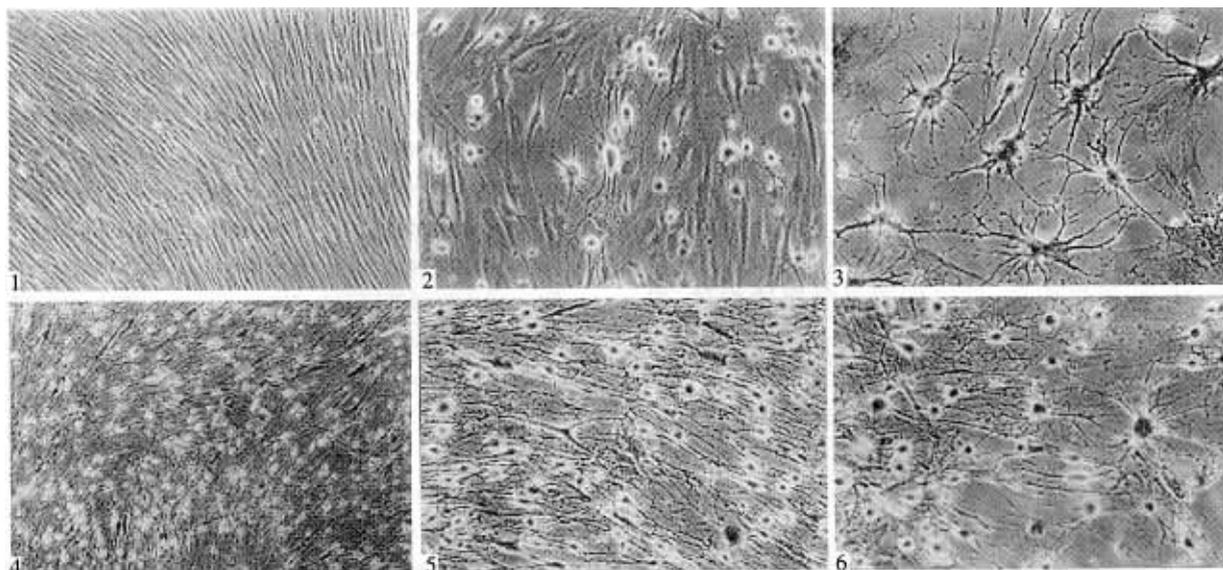


图 1 原代骨髓间质干细胞贴壁 15 天后达到融合 ($\times 40$) 图 2 隐丹参酮诱导 5h 后出现神经元样细胞,相差显微镜摄影 ($\times 100$) 图 3 神经元样细胞 Nestin 染色阳性 ($\times 40$) 图 4 神经元样细胞 NSE 染色阳性 ($\times 40$) 图 5 神经元样细胞 NF-M 染色阳性 ($\times 100$) 图 6 神经元样细胞 NF-H 染色阳性 ($\times 100$)

5 天。对照组细胞形态保持不变。

5 诱导细胞鉴定结果 为进一步确定诱导细胞是否为神经元,采用神经元标志物 NSE、NF-M、NF-H 和神经干细胞标志物 Nestin、星形胶质细胞标志物 GFAP 进行鉴定。结果显示隐丹参酮诱导 5h 后,大多数细胞 Nestin 染色阳性,证明该细胞具有神经干细胞特性(见图 3)。诱导 7h 后,大多数细胞表现为 NSE 染色阳性,呈棕黄色,从简单的双极细胞到复杂的多极细胞均有出现,部分神经元拉成网状(见图 4)。对照组无阳性细胞出现。NF-M 免疫组化结果与 NSE 结果类似,部分细胞胞体与突触皆为阳性(见图 5)。诱导 5 天后,NF-H 染色阳性(见图 6)。同时 GFAP 免疫组化结果显示无阳性细胞出现。

6 随机计数 10 个视野,计算结果显示采用隐丹参酮诱导后大多数细胞均转变为神经元样细胞,NSE 阳性细胞为 $(79.2 \pm 3.4)\%$,NF-M 阳性细胞为 $(78.1 \pm 3.1)\%$,NF-H 阳性细胞为 $(74.2 \pm 2.6)\%$ 。

讨 论

过去认为 MSC 主要参与构成造血干细胞生存和分化的微环境,近年大量实验证明,MSC 不仅具有分化为成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞和肌肉细胞等多种间质组织的能力,还可跨越胚层界限,分化为外胚层的神经元、神经胶质细胞以及内胚层的肝细胞。Brazelton 等⁽⁵⁾为证实数据报道骨髓抑制的小鼠经静脉输入骨髓细胞后,

外源性 MSC 在小鼠脑内可定向分化为神经元,提示 MSC 有治疗神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的可能性。但上述研究均在体内进行,体内的复杂环境限制了对 MSC 分化为神经元机理的研究,因此建立体外神经细胞定向诱导模型有重要意义。

本研究基于 Friedenstein 的方法并作改进,采用 Ficoll-Paque 分离液 (1.077g/ml) 分离单核细胞,再利用 MSC 粘附于塑料培养板的特点获得较纯的成人 MSC,原代培养结束时细胞数为 $(5\sim 6) \times 10^5$ 个细胞,显示成人 MSC 有较强的增殖分裂能力,传至 15 代时可以得到大约 $(2\sim 3) \times 10^{12}$ 个细胞。本实验分析了 10 个样本,发现成人 MSC 不表达造血细胞表面抗原,造血前体细胞标志抗原 CD34、成熟造血细胞标志抗原 CD38、泛白细胞标志抗原 CD45、淋巴细胞表面抗原 CD11a 和单核细胞/巨噬细胞表面抗原 CD14 等均为阴性,证明 MSC 为一群非造血类细胞,而整合素家族成员 CD29 (VAL- β_1) 粘附分子 CD44 (HCAM)、CD166 (ALCAM) 以及 CD105 (Endoglin)、CD90 (Thy-1) 均为阳性,与文献报道 MSC 表面标志具有非单一性特性,表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞表面标志的结果相一致⁽⁶⁾,证明本实验所分离培养扩增的细胞是骨髓间质干细胞。值得注意的是上述 MSC 不表达共刺激因子 CD80 和 CD86,提示存在免疫缺陷,可能不引起 T 淋巴细胞的识别。国外也有文献报道 MSC 可抑制 T 淋巴细胞反应⁽⁷⁾,MSC 具有异体移植可能性。

本研究利用隐丹参酮诱导发现大部分 MSC 可转变为神经元样细胞,并有轴突和树突出现,多个神经元之间形成网络。Nestin 是一种中间丝蛋白,为神经干细胞特异性标志物,鉴定结果显示诱导 5h 后诱导细胞 Nestin 表达阳性,提示该细胞具有部分神经干细胞特性。神经丝蛋白(NF)是一种细胞骨架蛋白,包括大、中、小 3 种亚单位,它们是构成神经元胞体和突起的重要结构。本研究发现诱导 7h 后多数诱导细胞的胞体和突起 NF-M 染色阳性,部分细胞只有胞体阳性,可能该细胞尚处于神经元前体细胞阶段。诱导 5d 后诱导细胞 NF-H 染色阳性,提示神经元趋向成熟,只有成熟神经细胞才表达 NF-H。神经元标志物 NSE 表达也为阳性。这些结果提示该细胞不仅形态学发生改变,而且在分子水平上也发生改变。GFAP 标志物染色阴性证明该神经元样细胞不是星形胶质细胞。本实验室以往的研究证实硫代甘油、巯基乙醇、叔丁基对甲氧酚等抗氧化剂可诱导 MSC 分化为神经元样细胞⁽⁸⁾。隐丹参酮是分离提纯的二萜醌类化合物,是有药性作用的丹参酮的代表成分之一,具有抗氧化的作用。因此作者认为隐丹参酮的诱导机理可能也与其具有抗氧化作用有关,但确切机制仍需进一步探讨。

参 考 文 献

1. Pittenger MF, Mackay AM, Jaiswal SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.

Science 1999;284(5411):143—150.

2. Thomas T, Gori F, Spelsberg TC, et al. Response of bipotential human marrow stromal cells to insulin-like growth factors: effect on binding protein production, proliferation, and commitment to osteoblasts and adipocytes. Endocrinology 1999;140(11):5036—5044.

3. Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(19):10711—10716.

4. Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. Science 2000;290(5497):1779—1783.

5. Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science 2000;290(5497):1775—1780.

6. Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, et al. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats—similarities to astrocyte grafts. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(7):3908—3913.

7. Klyushnenkova E, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells suppress allogeneic T cell response in vitro: Implication for allogeneic transplantation. Blood 1998;92:642—649.

8. 项 鹏,夏文杰,张丽蓉,等.成人骨髓间质干细胞定向诱导为神经元样细胞的研究.中国病理生理杂志 2001;17(5):385—387.

(收稿 2001-11-05 修回 2002-04-20)

· 征文通知 ·

中国中西医结合学会拟 2003 年 4 月在安徽黄山市召开第二届全国中西医结合男科学术会议,现将征文事宜通知如下:

(1) 征文内容:中医、西医及中西医结合诊治男性不育症、前列腺疾病、男性功能障碍、性传播疾病、中老年部分雄激素缺乏综合征等男科疾病的基础、临床以及实验研究。(2) 征文要求:正文字数在 3000 字以内,附 800 字论文摘要,请用 400 字稿纸誉写,字迹清楚,欢迎打印稿或附光盘;论文请注明作者姓名、单位、通讯地址、邮编、电话,并加盖单位公章。于 2003 年 2 月 20 日前(以邮戳为准)寄至中国中医研究院广安门医院男科郭军、孔令青医师收,信封注明“征文”。地址:北京市宣武区北线阁 5 号,邮编:100053,电话:(010)88001126/88001053,论文也可发电子邮件(E-mail:gamynk@sina.com),具体会议时间地点另行通知。如需更多信息,请访问中国男科网(<http://www.adpyn.com>)

中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会筹委会将于 2003 年 11 月上旬在海南省海口市召开全国时间生物医学

学术会议,会议将交流时间医学的临床、基础研究及教学方面学术论文,包括时间中医学、时间针灸治疗学(子午流注、灵龟八法等)及时间养生学等方面的文献、临床、基础研究或经验、医案等,并将正式成立中国中西医结合学会时间生物医学专业委员会。

征文要求:论文全文与摘要(1000 字以内,研究性论文的摘要请按目的、方法、结果、结论四部分撰写)各一份,A4 纸打印件和软盘或电子邮件附件方式(Word 或纯文本文件)一并寄会议联系人山东省医学科学院抗衰老研究中心赵子彦。地址:济南市经十路 89 号;邮编:250062;电话:0531-2919892;传真:0531-2601295;电子信箱:ziyanzhao@sina.com 或 ziyanzhao@163.com 截稿日期 2003 年 8 月 31 日。

推荐或自荐申请加入时间生物医学专业委员会者,务请将介绍材料于 2003 年 5 月 31 日前寄到,以便按照学会规定的程序遴选专业委员会委员候选人。