

天麻诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究

董晓先 刘金保 董燕湘 肖庆忠

摘要 目的 探讨天麻对体外定向诱导大鼠骨髓间质干细胞(MSC)分化为神经元样细胞的影响。方法 通过贴壁法分离大鼠 MSC,体外扩增培养。中药天麻定向诱导分化为类神经元样细胞。光镜下观察细胞形态,免疫细胞化学法检测神经细胞特异性抗原标志物神经原烯醇化酶(NSE)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巢蛋白(Nestin)。结果 大鼠 MSC 可通过贴壁法成功分离并可在体外大量扩增。天麻诱导 2h 后大部分可分化为神经元样细胞,出现胞体和突起,免疫细胞化学染色 NSE、Nestin 呈阳性,GFAP 阴性。结论 大鼠 MSC 可诱导分化为神经元样细胞。

关键词 天麻 骨髓间质干细胞 神经细胞 定向分化

Experimental Study on Effect of Gastrodia in Inducing the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells DONG Xiao-xian, LIU Jin-bao, DONG Yan-xiang, et al *Department of Pathophysiology, Guangzhou Medical College, Guangzhou (510182)*

Objective: To investigate the effect of gastrodia in extracorporeal oriented inducing the differentiation of mesenchymal stem cells into neuron-like cells. **Methods:** Mesenchymal stem cells were separated from bone marrow of rats by wall sticking method, amplifying cultured in vitro, and differentiated into neuron-like cells by oriented induction with gastrodia. The morphology of cells was observed under light microscopy, neuro-specific enolase (NSE), nestin and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were detected by immunocytochemistry. **Results:** Rats mesenchymal stem cells could be separated and amplified in vitro. After being induced by gastrodia for 2 hrs, most of the cells would be differentiated into neuron-like cells, revealing cytodendrite. By immunocytochemical staining, cells showed positive of NSE, nestin, and negative of GFAP. **Conclusion:** Rats' mesenchymal stem cells could be induced to differentiate into neuron-like cells.

Key words gastrodia, bone marrow mesenchymal stem cell, nerve cell, oriented differentiation

长久以来人们普遍认为神经系统的再生在出生后已经停止。神经系统退行性疾病如老年性痴呆、帕金森综合征等是严重影响老年人生活质量的高发性疾病,目前尚无特效的西药治疗。近年来细胞移植替代疗法以其潜在的疗效引起了国内外医学科学家的重视。骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是一类广泛存在人体骨髓中的多能干细胞,取材方便、扩增迅速且无免疫原性,被认为是理想的供体细胞来源。建立中药诱导 MSC 转变为神经细胞的体外模型,对研究脑的发育和分化以及神经系统疾病的治疗均具有重大价值。

材料和方法

1 动物 出生后 4 周左右雄性 SD 大鼠(广州医学院动物中心提供)。

2 试剂 低糖 DMEM 培养基(L-DMEM)培养基(GIBCO BRL 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶(GIBCO 公司),天麻注射液(上海福达制药有限公司),小鼠抗大鼠神经原烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE, Chemicon 公司)单克隆抗体、胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP, Maxim 公司)单克隆抗体、巢蛋白(Nestin, Pharmingen 公司)单克隆抗体,HRP/DAB 显色检测系统(Labvision 公司)。

3 MSC 的分离和培养 无菌条件下取出 SD 大鼠的股骨,用 2ml 含 20% 胎牛血清的 L-DMEM 冲出骨髓,充分混匀后加入到 50ml 的细胞培养瓶中,补足

基金项目 国家 863 计划基金资助项目(No. 2002AA204011)及广州市科技攻关引导项目(No. 2003Z3-E0012)

作者单位 广州医学院病理生理学教研室(广州 510182)

通讯作者 刘金保, Tel 020-81340722, E-mail liujinbao@21cn.com

万方数据

培养基,置 37℃ 5% CO₂ 80% 湿度的培养箱中。3 天后弃去悬浮的未贴壁细胞,换新鲜培养基。

4 MSC 的扩增 80%~90% 融合的 MSC 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 的胰酶消化后计数细胞,1:3 传代,每 2 天换液 1 次,培养基为含 10% 胎牛血清的 L-DMEM,逐日观察细胞的生长情况,以上述方法进行传代扩增培养。

5 定向诱导 MSC 分化为神经元样细胞 分别将传至 5、7、9 代的 MSC 接种于预先置有盖玻片的 6 孔板中制备细胞爬片。待细胞融合至 70%~80% 时,吸去孔中的培养液,实验组每孔加入预诱导液(含 20 μl 天麻/ml 的 10% 胎牛血清的 L-DMEM),对照组加不含天麻的 10% 胎牛血清 L-DMEM 液。24h 后吸去预诱导液,实验组每孔加入诱导液(100 μl 天麻/ml 不含胎牛血清的 L-DMEM),对照组换液为不含天麻及胎牛血清的 L-DMEM,每隔 15~20min 倒置显微镜观察 1 次细胞的形态变化。

6 神经元样细胞的鉴定 诱导后的细胞用 4% 的多聚甲醛固定 20min, PBS 洗涤,加入过氧化物酶阻断液阻断内源性过氧化物酶,非免疫性动物血清封闭,分别加入稀释后的小鼠抗大鼠 NSE、GFAP、Nestin 单克隆抗体室温孵育 2h, PBS 洗涤,加入生物素标记的二抗,室温下孵育 10min, PBS 洗涤,加入链亲和素-过氧化物酶溶液,孵育 10min, PBS 洗涤, DAB 溶液显色,中性树胶封片。光镜观察,随机取 10 个非重叠视野($\times 100$),计算神经细胞占总细胞数的比例,结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

7 神经元样细胞存活时间检测 诱导后的神经元样细胞继续培养,条件培养液为 100 μl 天麻/ml 不含胎牛血清的 L-DMEM,2 天换液 1 次,观察其存活时间。

结 果

1 MSC 的分离培养 用 L-DMEM(含 20% 的胎牛血清)培养的 MSC,3 天后已经贴壁,残留的各种类型的骨髓细胞通过完全换液除去,此时可以观察到贴壁细胞为单个存在或形成细胞克隆聚集,细胞形态比较均一,为长梭形,贴壁的 MSC 迅速增殖,至第 6 天细胞完全融合,无重叠(见图 1)。

2 MSC 的扩增 用胰酶消化原代可获得约 5×10^5 个 MSC。刚经过传代的 MSC 在 24h 内完全贴壁、伸展、重新变为长梭形,增殖生长迅速,3 天即达到完全融合。体外扩增 15 代细胞数目约为 5×10^{12} ,30 代后生长速度下降,细胞出现衰老现象,并逐渐从培养板

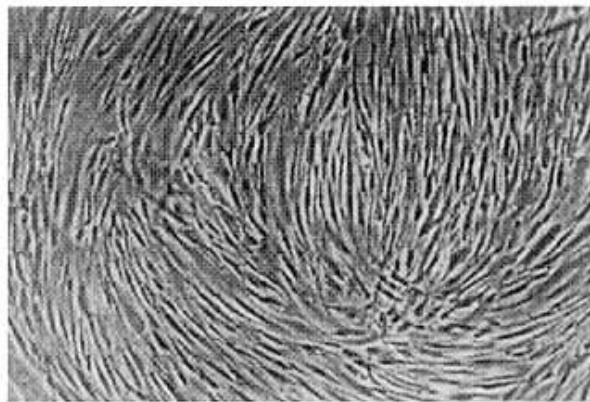


图 1 融合的原代 SD 大鼠 MSC($\times 40$)

注:6 天达到完全融合的原代 MSC,细胞贴壁生长,形态均一,呈长梭形

上脱落。

3 定向诱导 MSC 分化为神经元样细胞 MSC 在含天麻的预诱导液中处理 24h 后,加入诱导液 30min 后细胞形态即明显发生变化,光镜下 MSC 的细胞质向核收缩,呈典型的核周体形态,3h 后大多数细胞均转变为双极或多极神经元细胞样形态,伸出突出(类似轴突或树突),部分细胞之间拉成网状。5、7、9 代细胞之间没有明显差异。

4 神经元样细胞免疫细胞化学鉴定 天麻诱导 3h 后,大部分细胞表现为 NSE 染色阳性,呈棕黄色,表明该细胞具有神经元细胞特性(见图 2),对照组无阳性细胞出现。Nestin 染色结果与 NSE 类似,细胞体和突触为阳性,证明该细胞具有神经干细胞特性(见图

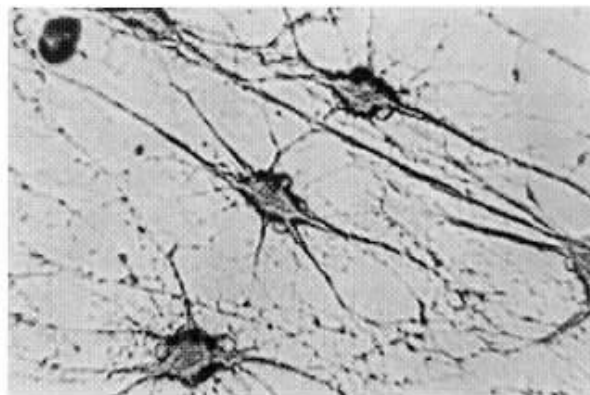


图 2 天麻诱导的神经元细胞样 NSE 染色($\times 250$)

注:天麻诱导 3h 后的 MSC 呈现神经元细胞样形态,伸出类似轴突和树突的突起,细胞之间可通过突起相连,拉成网状。神经元细胞标志 NSE 染色呈阳性

3)。GFAP 免疫细胞化学染色显示无阳性细胞。随机取 10 个视野计算结果表示,大多数 MSC 均被诱导为神经样细胞,其转化率为 $(75.3 \pm 4.1)\%$ 。

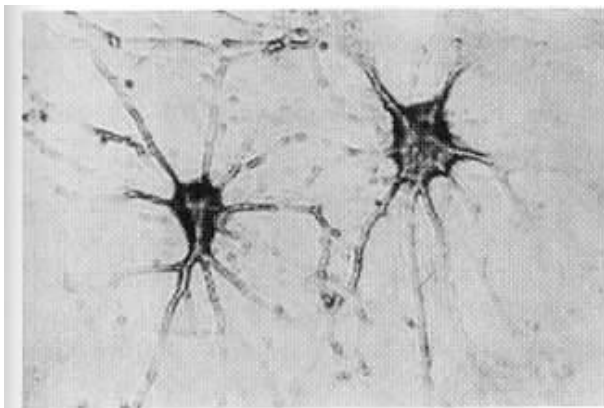


图 3 天麻诱导的神经元细胞样 Nestin 染色($\times 250$)

注:天麻诱导 3h 后的 MSC 呈现多极神经元细胞样形态,细胞周围伸出多个突起,两个细胞可通过突起相互沟通。神经干细胞标志 Nestin 染色呈阳性

5 存活时间检测结果 诱导后的神经元样细胞在条件培养液中可存活 3 周左右,其形态保持不变。

讨 论

骨髓中有两类干细胞,即造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)和间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC),它们都具有自我更新和分化的能力。造血干细胞可以分化为各种血细胞;间质干细胞是易于贴附于塑料培养板表面的细胞^[1],后来的研究证实, MSC 具有多向分化潜能,在适当的培养条件下,可定向诱导分化为成骨细胞、软骨细胞、肌腱、脂肪细胞、血管内皮细胞等^[2]。因此在细胞替代疗法和组织工程方面, MSC 作为一种重要的种子细胞越来越引起人们的关注,显现出巨大的应用前景。神经系统疾病的脑组织和脑细胞移植替代疗法的关键所在是获得足够数量用来移植的脑细胞,神经干细胞(neural stem cell, NSC)由于来源于胚胎和胎脑,难以满足临床需要量,且存在伦理道德方面的争论,因此必须寻求另外一种可以分化为神经细胞的替代细胞。1999 年 Kopen 等发现 MSC 注射到新生小鼠脑内可分化为神经元和神经胶质细胞^[3]。2000 年 Brazelton 等^[4]和 Mezey 等^[5]两个研究小组分别通过不同的方法观察到在体内条件下,外源的 MSC 在小鼠脑内可转变为神经元,这提示 MSC 可以替代 NSC 治疗中枢神经损伤或退行性疾病。同年 Woodbury 等也用 β -巯基乙醇成功地诱导 MSC 转变为了神经元样细胞^[6],建立了体外诱导的模型,对研究脑的发育和分化以及神经系统疾病治疗具有重大价值。

体外定向诱导发现采用天麻诱导 3h 后,大部分

MSC 可转变为神经元样细胞,并有轴突和树突出现,多个神经元之间可形成网络。Nestin 是一种中间丝蛋白,它是神经干细胞特异性标志物。本研究结果显示,诱导 3h 后的神经元 Nestin 表达阳性,证明该细胞具有部分神经干细胞特性。神经元标志物 NSC 也为阳性,而对照组呈阴性,证明该细胞不仅形态学发生改变,而且在分子水平上也发生了改变。GFAP 标志物呈阴性,证明该神经元样细胞不是胶质细胞,并且经实验验证此诱导的细胞可有较长的存活期。天麻在临床上常用的一种名贵中药,常用来镇静、解痉和镇痛^[7]。近年来的研究发现天麻还具有增智、健脑、延缓衰老的作用,对老年性痴呆症有一定的疗效,临床治疗发现给药后可以显著增高不同痴呆量成绩表,显著改善临床症状、神经功能缺损和生活能力,对脑地形图有显著的改善作用^[8]。天麻素还具有清除过度自由基的作用,对体外培养神经细胞的缺血再灌注损伤有保护作用^[9]。天麻在诱导 MSC 转变为神经细胞中的作用估计与其抗氧化作用有关,但确切机制尚有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- 1 Friedenstein A, Chailakhyan R, Gerasimov U. Bone marrow osteogenic stem cell: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 1987; 20:263—272.
- 2 Pittenger MF, Machay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cell. *Sci* 1999; 284(5411):143.
- 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 Brazelton TR, Rossi FMV, Keshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Sci* 2000; 290(5497):1775—1779.
- 5 Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Sci* 2000; 290(5497):1779—1782.
- 6 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364—370.
- 7 杨世林, 兰进, 徐锦堂. 天麻的研究进展. *中草药* 2000; 31(1):66—69.
Yang SL, Lan J, Xu JT. Progress on studying Rhizoma Gastrodiae. *Chin Tradit and Herbal Drugs* 2000; 31(1):66—69.
- 8 汪德清, 沈文梅, 田亚军, 等. 天麻促智冲剂治疗老年血管性痴呆临床观察. *中国中药杂志* 1998; 23(11):695—698.
Wang DQ, Shen WM, Tian YJ, et al. Clinical observation on

Tianma Cuzhi Granule in treating senile vascular dementia.

Chin J Chin Materia Med 1998 23(11):695-698.

- 9 薛柳花,唐一鹏,孙承琳,等.天麻素对缺血再灌注神经细胞膜的保护作用.北京中医药大学学报 1998 21(3):18-22.

Xue LH, Tang YP, Sun CL, et al. Protecting effect of Gatrodonin ischemia/reperfusion neuron cytomembrane. J Beijing Chin Med 1998 21(3):18-22.

(收稿 2003-01-20 修回 2003-10-10)

中药配合透析并滤过治疗血透患者皮肤瘙痒的临床观察

黄小妹 管竞环 张 英

皮肤瘙痒是终末期尿毒症患者的常见并发症。笔者选择属湿热蕴结于里、热毒外达肌肤患者 51 例,观察中药配合透析并滤过(HDF)治疗血透患者皮肤瘙痒的疗效,结果如下。

资料与方法

1 病例选择与分组 2002 年 1 月—2003 年 10 月期间在我院血液净化中心做维持性透析的患者。所有患者均有皮肤瘙痒,口干,大便干结,舌苔黄伴或不伴腻,舌质红/暗红,脉数等症,皮肤有搔抓痕,皮肤干,表皮脱落等继发性皮损。所有患者入选前均停用抗过敏、抗组胺药及止痒剂 3 月以上,且治疗期间不能用以上药物。入选前所有患者均做普通透析(HD)4 周后随机分为 3 组。A 组:HDF 组,15 例,男 8 例,女 7 例,年龄 23~65 岁,平均(42.5±6.5)岁。已维持性血透 9~75 个月,平均(41.2±12.3)个月。原发病为糖尿病肾病 6 例,慢性肾炎 5 例,高血压肾损害 4 例。B 组:HDF 加中药组,20 例,男 11 例,女 9 例,年龄 21~68 岁,平均(42.3±7.5)岁。已维持性血透 9~71 月,平均(41.7±13.4)月。原发病为糖尿病肾病 8 例,慢性肾炎 7 例,高血压肾损害 4 例,多囊肾 1 例。C 组:HD 加中药组,16 例,男 8 例,女 8 例,年龄 26~67 岁,平均(45.7±10.4)岁。已维持性血透 10~69 个月,平均(43.2±9.7)个月。原发病为慢性肾炎 7 例,糖尿病肾病 6 例,高血压肾损害 3 例。

2 中药组方 分内服及外洗两种。内服:熟大黄 10g 黄芪 30g 当归 15g 白芍 15g 生地 12g 熟地 12g 黄连 8g 天葵子 10g 蒲公英 10g 丹参 15g 红花 10g 防风 10g 浓煎 100ml/d,服用 4 周。外洗:金钱草 30g 威灵仙 30g 苍耳子 15g 生大黄 20g 明矾 30g 野菊花 15g 蛇床子 15g 地肤子 15g。煎后用水稀释,外洗,隔日 1 次。用 4 周。

3 透析方法 (1)普通透析(HD):每周 2~3 次,每次 4~4.5h。空纤用 F6(聚砜膜,1.2m²),透析液流量 500ml/min,血流量 200~280ml/min。(2)HDF:每周 2~3 次,每次 4h。空纤用 F60(聚砜膜,1.2m²),透析液流量 500ml/min,血流量 200~280ml/min。置换液 14 000~16 000ml,后稀释法。

4 瘙痒程度及疗效评价 借鉴官君达等在《中医症状量化及其疗效评定方法探讨》中的建议[官君达,万霞,胡立胜.中医症状量化及其疗效评定方法探讨.中国中西医结合杂志 2002 24(6):431],用 100mm 刻度法来表示瘙痒程度。告诉患者症状的严重程度由左至右逐渐加重,范围为 0~100mm。患者

根据自己的症状及体会在适当的点上选择。

5 观察指标 各组在治疗前及治疗第 4 周的第 2 次透析前取血查肾功能、电解质、全段甲状旁腺素(iPTH,电化学发光法)等。

6 统计学方法 所有数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)。组间资料用 *t* 检验。

结 果

1 各组治疗前后皮肤瘙痒程度评价 见表 1。治疗后各组瘙痒程度均明显减轻($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。B 组优于 A 组($P<0.01$)。

表 1 各组治疗前后皮肤瘙痒程度评价 ($\text{mm } \bar{x} \pm s$)

分别	例数	治疗前	治疗后
A	15	71.2±24.2	51.4±25.1*
B	20	75.4±16.7	22.6±10.2**△
C	16	72.8±26.4	38.4±18.7*

注:与本组治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 A 组比较,△ $P<0.01$

2 各组治疗前后生化指标结果比较 见表 2。各组 BUN、血钙水平治疗前后差异无显著性。治疗后 B 组血磷及 A、B 组甲状旁腺素明显低于治疗前($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

表 2 各组生化指标结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别例数	BUN(mmol/L)	钙(mmol/L)	磷(mmol/L)	iPTH(ng/L)
A 15	治前 29.7±10.2	2.21±0.19	2.41±0.39	401.2±187.6
	治后 27.9±12.1	2.32±0.28	2.19±0.47	141.2±87.6*
B 20	治前 28.9±11.2	2.19±0.31	2.45±0.32	391.5±214.2
	治后 28.3±13.2	2.31±0.22	2.02±0.31**	119.2±92.2*
C 16	治前 29.8±12.9	2.24±0.25	2.43±0.35	418.2±267.3
	治后 28.3±10.4	2.37±0.19	2.22±0.43	421.1±237.5

注:与本组治疗前比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

讨 论

血透患者皮肤瘙痒原因目前不明,现行的治疗方法为抗组胺、抗过敏治疗。HD 对于中大分子毒素的清除能力不佳。HDF 可以清除一部分中大分子毒素,包括 iPTH。因此,本研究试图通过中医辨证施治配合 HDF 治疗血透患者皮肤瘙痒。51 例患者均有口干,皮肤瘙痒,舌苔黄伴或不伴腻,舌质红/暗红,大便干结,为湿热外泄,邪入肌肤之症。同时因血透病常气血两虚,脾虚则气血化源不足,不能敷布濡润肌肤,血虚则化燥生风。治疗时应注意这类患者为本虚标实之证。因此方中在益气养阴、活血祛风的同时兼用清热解毒之药。所有患者在用药后皮肤瘙痒程度均有不同程度改善。

(收稿 2003-02-14 修回 2003-12-06)