

香丹注射液定向诱导大鼠骨髓间质干细胞 分化为神经元的特点及其影响因素

黄 慧¹ 唐云安² 张 成¹

摘要 **目的** 探讨香丹注射液诱导成年 SD 大鼠骨髓间质干细胞(rMSCs)定向分化为神经元样细胞的特点和影响因素。**方法** 体外培养 rMSCs 至第 5 代,培养基中加入碱性成纤维生长因子(bFGF)预诱导 24h,更换含不同浓度香丹注射液的诱导液诱导,比较香丹注射液 rMSCs 分化(诱导率)在不同的培养基组成、诱导剂浓度和接种时的细胞密度等因素的影响,并用台盼蓝染色法、四唑盐比色法(MTT 法)评判上述因素对诱导后细胞存活率的影响。**结果** 1%~5% 香丹注射液的诱导组,均可诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞,诱导后 6~12h 诱导率可达(83.5±3.8)%,90%以上的细胞存活时间>36h。其他条件相同时,香丹注射液 3%~5%的浓度组、无血清的 D/F12+N2+bFGF 诱导组和 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞接种密度,可得到最高的诱导率和细胞存活率。**结论** 3%~5%的浓度、无血清 D/F12+N2+bFGF(10 $\mu\text{g}/\text{L}$)和 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞接种密度是香丹注射液定向诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞的最适条件。

关键词 骨髓间质干细胞;神经元;香丹注射液;细胞分化

Characteristics of Oriented Induction of Xiangdan Injection on Differentiation of Marrow Mesenchymal Stem Cells into Neurons and Its Influencing Factors HUANG Hui, TANG Yun-an, ZHANG Cheng *Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Sun Yet-sen University, Guangzhou (510080)*

Objective To study the effect of Xiangdan injection (XDI) in inducing adult SD rat marrow mesenchymal stem cells (rMSCs) orientedly differentiated into neuron-like cells, its characteristics and influencing factors were explored. **Methods** The 5th generation of rMSCs cultured *in vitro* were pre-treated for 24 hrs by adding basic fibroblast growth factors (bFGF) into the medium, then the inducing liquid was replaced by XDI with different concentration to compare the rMSCs differentiation rate under different constitution of medium, different concentration of inducer and cell density of incubation. The induced cell survival rate under effects of above-mentioned factors was evaluated by trypan blue stain and MTT method. **Results** XDI in 1% - 5% concentration could induce rMSCs differentiated into neuron-like cells, the inducing rate reached 83.5±3.8% 6 - 12 hrs later, more than 90% cells, survival rate was over 36 hrs. The maximal inducing rate and cell survival rate could be obtained by treated with 3% - 5% XDI, serum-free D/F12 + N2 + bFGF and with the cell density in $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, when the other factors were the same. **Conclusion** XDI of 3% - 5% concentration, serum-free D/F12 + N2 + bFGF (10 $\mu\text{g}/\text{L}$) and with the cell density incubated of $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$ is the optimal condition for oriented induction of rMSCs differentiating to neuron-like cells.

Key words marrow mesenchymal stem cell; neuron; Xiangdan injection; cell differentiation

自 20 世纪 70 年代, Friedenstein^[1]发现骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨特性

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30170337; No. 30370510);广东省自然科学基金资助项目(No. 970061);卫生部临床学科重点项目(No. 2001321);博士点专项科研基金(No. 20030558058)

作者单位:1. 中山大学附属第一医院神经科(广州 510080);2. 四川大学华西公共卫生学院

通讯作者:张 成, Tel: 020-87332387, E-mail: czym@gzsums.edu.

cn

后,人们逐渐对这种干细胞的多种潜能和优势有了更深入的了解。到上个世纪末, Kopen 等^[2]、 Sanchez-Ramos 等^[3]进一步揭示了 MSCs 在体内外向神经元分化的潜能,从而不仅为深入研究 MSCs 的干细胞特性和神经元的发育分化提供了一个很好的实验对象,也给神经元损伤疾病的治疗带来了新的希望。前人的研究同时也提示,神经元在发育和分化中不仅受到特定的内因(基因的特异性表达)的控制,还受到周围微环境和众多细胞因子的影响。国内的其他研究^[4]已证

实:丹参能定向诱导成年大鼠 MSCs 分化为神经元样细胞。同时发现多种因素对诱导的结果有不同程度的影响。本实验就香丹注射液(含丹参)定向诱导作用中的影响因素做进一步的研究,为骨髓间质干细胞应用于神经系统疾病的治疗提供更多依据。

材料与方法

1 材料

1.1 骨髓间质干细胞 取自 SD 大鼠(雌雄不限,体重 100g 左右,鼠龄约 1~2 个月,购自中山医科大学实验动物中心,普通级)。

1.2 药物 以香丹注射液(江苏常熟雷允上制药有限公司)为诱导剂。香丹注射液由丹参和降香组成,其浓度均为:12g/100ml,其中主要含有丹参的水溶性成分丹参素。以蔡梅等^[5]对香丹注射液中丹参素的检测量为标准,推算出丹参素实际在注射液中的浓度约为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$;实验时,直接将香丹注射液加入培养基使其体积百分比的终浓度分别为 1%,2%,3%,4%,5%,6%,12%,25%,50%;则丹参素相应的终浓度分别约为 $1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $2\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $3\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $4\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $6\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $12\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $25\mu\text{g}/100\mu\text{l}$, $50\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ 。

1.3 试剂及仪器 L-DMEM[Dulbecco's minimal essential media (low glucose)], DMEM/F12(Dulbecco's minimal essential media: Nutrient Mixture F-12, 1:1 Mixture)、N2-Supplement (N2 添加剂, GIBCO), 碱性成纤维生长因子(fibroblast growth factorbasic, bFGF, Pepro Tech EC), 胎牛血清(杭州四季青公司), L-谷氨酰胺、胰蛋白酶、MTT、DMSO(Sangon), 0.4% 台盼蓝(Sangon), 倒置相差显微镜(德国 ZEISS AXIOVERT100 型), ELX800 Universal Microplate Reader (BIO-TEK INSTRUMENT INC)。

2 方法

2.1 SD 大鼠骨髓间质干细胞的体外分离培养及纯化 参照文献^[6]方法。

2.2 香丹注射液定向诱导的影响因素

2.2.1 培养基成分、诱导剂浓度和诱导时间 将第 5 代、对数生长期的 rMSCs 重新接种于两个 96 孔板($2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$), L-DMEM, 含 15% 胎牛血清(FCS)培养 2~3 天后,加 $10\mu\text{g}/\text{L}$ bFGF 预诱导 24h,换成含不同成分的培养液和不同终浓度(1%,2%,4%,5%,6%,12%,25%)的诱导剂两两搭配的诱导液。其中,培养液分有血清和无血清两个大组:有血清组中,以 L-DMEM 为基础添加血清,并根据血清浓度不同分为

5%,10%,15%和 24%4 个小组。无血清组又分为:L-DMEM, D/F12, D/F12 + N2, D/F12 + N2 + bFGF ($10\mu\text{g}/\text{L}$)4 个小组。每组为具有相同成分的培养液与相同终浓度的诱导剂的组合,如 L-DMEM 与 1% 诱导剂,含 20% FCS 的 L-DMEM 与 6% 诱导剂搭配成一组,依次类推。同一组设计两孔,重复 3 次,同时设立对照组,分别于 2h、4h、8h、24h、2d、3d,计数神经元样细胞的最大诱导率(神经元样细胞占总细胞的百分比),即:每个孔板中随机取 4 个非重叠视野,镜下($\times 100$)计数神经元样细胞占该视野中细胞总数的百分比。

2.2.2 接种前的细胞密度 分别以 $1 \times 10^4/\text{cm}^2$, $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $7.5 \times 10^4/\text{cm}^2$, $10 \times 10^4/\text{cm}^2$ 的细胞浓度接种第 5 代 rMSCs 于 96 孔板,培养基及预诱导同前,诱导培养基为无血清 D/F12 + N2 + bFGF($10\mu\text{g}/\text{L}$)和终浓度为 2% 香丹注射液的诱导剂,分别在 4、8、12、24h 计数诱导率和活细胞百分率(台盼蓝染色法)。

2.3 诱导后细胞活力变化的检测

2.3.1 台盼蓝染色法 接种第 5 代 rMSCs(细胞密度 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$)于 24 孔板,培养和预诱导方式同前。诱导时的培养基分别为无血清的 L-DMEM, D/F12, D/F12 + N2, L-D/F12 + N2 + bFGF($10\mu\text{g}/\text{L}$),诱导后 1、2、4、8、12、36h,分别取对照组与各浓度组(1%,2%,3%,4%,5%,6%,12%)的细胞做 0.4% 台盼蓝染色。每孔板中随机取 4 个非重叠视野,镜下($\times 100$)计数染色阴性细胞占该视野中细胞总数的百分比为细胞存活率并绘图。

2.3.2 四唑盐比色法(MTT 法) 接种第 5 代 rMSCs(细胞密度 $2.5 \times 10^4/\text{cm}^2$)于 96 孔板,培养及诱导过程同上。诱导液为 L-DMEM/F12 + N2 + bFGF ($10\mu\text{g}/\text{L}$)和分 6 个浓度组的诱导剂(每组的终浓度分别为 1%,2%,3%,4%,5%,6%),同时设无诱导剂的对照组,诱导后 6~8h 做 MTT 实验。方法参照文献^[7],用 ELX800 Universal Microplate Reader 检测吸光值 A(570nm),记录数据、绘图分析。

2.4 统计学方法 用 SPSS 医学统计学软件对各实验参数进行分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,作单因素方差分析 t 检验和 LSD 检验。

结 果

1 香丹注射液定向诱导率的影响因素

1.1 培养基成分、诱导剂浓度和诱导时间 诱导后,含血清组中的诱导组、对照组和不含血清的对照组

均无明显的神经元样细胞出现;无血清的诱导组中,有神经元样形态的细胞。诱导剂的终浓度>6%时,培养细胞很快死亡飘浮,几乎没有明显的神经元样细胞出现;终浓度<6%时,在诱导 6~12h 内,随诱导剂的浓度增加,神经元的最大诱导率增加,所需时间减少(见表 1)。另外,由于培养基的组成不同,神经元的最大诱导率也不同。在 4 种诱导培养基中,最大诱导率由 L-DMEM, D/F12, D/F12 + N2, D/F12 + N2 + bFGF (10μg/L)依次增加,分别为:(70.3±3.4)%, (73.5±4.7)%, (79.4±5.3)%, (83.5±3.8)%。除了 L-DMEM 和 D/F12 两组的比较差异无显著性外,其他的最大诱导率均值的组间差异均有显著性($P<0.01$);结合诱导后细胞形态学的观察,我们的结论是:随培养液中营养成分的添加,最大诱导率增加,分化后细胞的树突状突起及其轴突的分支更多。

表 1 不同浓度香丹注射液诱导 rMSCs 分化为神经元样细胞的最大诱导率和存活率

香丹注射液浓度	最大诱导率 (%, $\bar{x}\pm s$)	最大诱导率出现的时间 (h)	活细胞<90%出现的时间 (h)
1%	11.2±2.5	8~12	>36
2%	46.3±5.2	6~8	16~24
3%~5%	83.5±3.8	6~8	8~12

1.2 接种前的细胞密度 无血清的 D/F12 + N2 + bFGF(10μg/L) + 2% 香丹注射液组成的诱导液,接种不同细胞密度: $1\times 10^4/\text{cm}^2$, $2.5\times 10^4/\text{cm}^2$, $5\times 10^4/\text{cm}^2$, $7.5\times 10^4/\text{cm}^2$, $10\times 10^4/\text{cm}^2$, 其最大诱导率分别为 (45.9±4.5)%, (46.3±5.2)%, (43.6±3.8)%, (42.2±3.5)%, (38.5±5.1)%, 统计学分析显示:除了 $2.5\times 10^4/\text{cm}^2$ 和 $1\times 10^4/\text{cm}^2$ 组间最大诱导率均值的差异无显著性外,其他两两组间的均值差异均有显著性($P<0.01$)。且随接种前的细胞密度增加,向神经元的诱导分化进程减慢,最大诱导率减低,其出现的时间也相应延后。

2 诱导后细胞活力变化的检测

2.1 台盼蓝染色法 对不同诱导剂浓度组在诱导后的不同时间点的染色结果见图 1。对照组与 1% 浓度组在 24h 内的存活细胞百分比无明显差异;浓度 5% 以下的各浓度组,在 8h 内与对照组比较,活细胞的百分比无明显差异;但 12~24h 以后,随浓度增加,活细胞的百分比有减低趋势;浓度在 6% 以上的各浓度组在 8h 以内的细胞活力即开始减低(见图 1)。其中,染色阳性的细胞在有反应细胞(神经元样细胞)和无反应细胞(非神经元样细胞)中的分布比例基本等同($P>0.01$)。另外,各细胞密度组的平均活细胞百分率在诱导后的 16~18h 之前均保持在 90% 以上;16~18h

之后,随接种时细胞密度的增加,出现平均的细胞存活率<90% 的时点延后,依次发生于诱导后的:19~20h, 21~22h, 21~22h, 22~23h, 22~23h, 22~24h。

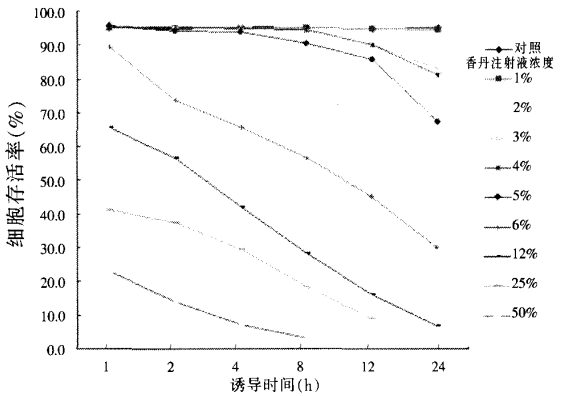


图 1 不同浓度的香丹注射液在不同诱导时间对第 5 代培养细胞存活率的影响(台盼蓝染色法)

2.2 MTT 法 对照组和各浓度组(1%~6%)的 A 均值分别为 0.738 ± 0.059 , 0.855 ± 0.012 , 0.887 ± 0.020 , 1.052 ± 0.057 , 1.010 ± 0.033 , 0.932 ± 0.026 , 0.532 ± 0.061 。统计学分析显示:1%~5% 各浓度组与对照组的 A 值的差异分别有显著性($P<0.01$),随诱导剂浓度由 1%~4%, A 均值有上升趋势;5%~6% 浓度组的 A 均值虽与对照组的差异有显著性($P<0.01$),但呈下降趋势(见图 2)。

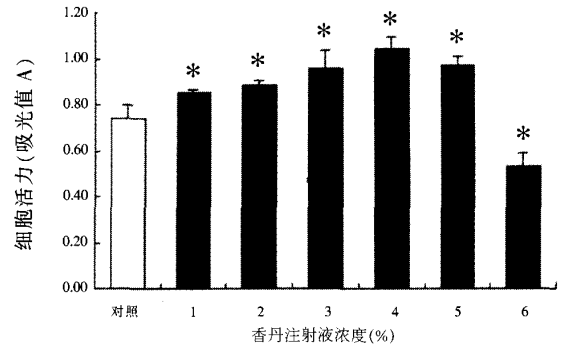


图 2 不同浓度香丹注射液诱导对第 5 代培养细胞活力的影响(MTT 法)

注:与对照组比较, * $P<0.01$

由上述的两种检测方式,提示诱导后神经元样细胞的存活率及其影响因素与诱导剂的浓度有关:浓度 $\geq 6\%$,处理后 4h 以内,细胞存活率即<90%;当浓度<6%时,与诱导的时间有关:诱导后的 8h 之前,细胞存活率与对照组无明显差异;8h 后,各浓度组的细胞存活率与诱导的时间、诱导剂浓度成反比。1% 浓度组的细胞存活率在诱导后 24~48h 内与对照组无明显差异。由此可见:3%~5% 的终浓度、无血清 D/F12 +

N2 + bFGF (10 μ g/L) 和 2.5×10^4 /cm² 的细胞接种密度是香丹注射液定向诱导 rMSCs 分化为神经元的最适条件,而诱导后 6~8h 是神经元样细胞形成的最佳时间。

讨 论

1 影响香丹注射液诱导率和细胞存活率的因素 实验结果发现,影响香丹注射液诱导 rMSCs 定向分化程度的因素有:血清、诱导剂浓度、诱导时间、诱导时培养液中的其他成分以及诱导前接种的细胞密度。如同以往的结论一样:在有血清组的诱导体系中未见神经元样细胞的形成。我们推测其原因可能是:血清中的蛋白成分或缓冲体系阻断了丹参素对 rMSCs 的定向分化作用;血清中的蛋白质或某些因子抑制 MSC 向神经元的定向分化;因此只有在无血清的条件下,整个培养体系的信号传递才不得不依赖于产生的神经元来实现。由于丹参素为超氧负离子(O₂⁻)的清除剂,具有抗氧化作用;而项鹏等^[4]证实,rMSCs 经抗氧化剂诱导后能定向分化为神经元样细胞。所以,随着诱导剂浓度增加,丹参素在诱导体系中的含量增多,抗氧化的能力加强,因此能有更多的 rMSCs 被诱导分化为神经元样细胞。另外,随着诱导时间的延长,分化 rMSCs 的神经元特异性蛋白合成增多,从而使越来越多的 rMSCs 表现为神经元样的形态。

在无血清的诱导培养基中,随 F12, N2-Supplement, bFGF 等成分的添加,不仅增加了诱导率,细胞存活率也有所提高。原因可能是:这些添加成分都是特别有利于神经元体外培养的限定性培养基的必备成分。薛庆善等^[8]发现 DMEM/F12 + N2-Supplement 的培养基不仅能支持神经元原代培养物的体外存活,还能促进神经元的形态(促进神经突起的生长)和生理、生化水平的分化。本试验中发现诱导后细胞的形态随培养液中添加成分的增多,树突状突起以及轴突的分支和分级都更加丰富,这一点也符合并支持前述的理论。由于这些限定性培养基只适合于神经元的体外生长,不适合神经胶质细胞、成纤维细胞等非神经元细胞的生长^[8],所以有利于干细胞向神经元的分化。司徒镇强等^[7]研究提示,以神经元的限定性培养基培养神经干细胞,可诱导神经干细胞向神经元的方向分化,推测:本研究中所使用的培养基也可能有利于 rMSCs 分化为神经元而增加诱导率。bFGF 被认为是一种双相调节因子,在低浓度范围内,促进干细胞的增殖,在高浓度范围时,可促使干细胞向神经元分化。在本诱导体系中,由于 bFGF 的终浓度很低(10 μ g/L),考虑其

可能的作用主要是促进细胞增殖,因而在某种程度上维持细胞的活力^[9]。

2 定向诱导中出现细胞存活率明显减低的可能原因 吸光值有显著性意义地减低提示细胞增殖力或活力减低。在 $\geq 5\%$ 的浓度组中,A 值开始下降(尤其是 6% 浓度组)。另外,本试验发现:诱导时间超过 24h,大部分浓度组(除了 1%)的神经元样细胞存活率明显减低,而且出现不同程度的细胞损伤和凋亡表现:如胞浆内颗粒增多,空泡样改变,核固缩,破裂。这种现象在张孟夏等研究^[10]中也有报道。考虑有如下原因:香丹注射液中的降香有一定细胞毒作用;姜会庆等^[11]研究提示,丹参素有促使成纤维细胞、肿瘤细胞等幼稚细胞凋亡的作用(因为抑制核转录因子 NF- κ B 的活性),对于未分化的 rMSCs 是否也启动此类凋亡过程则有待于进一步了解;未分化的细胞相对具有永生性,而分化后的细胞在某种程度上启动走向衰亡的过程,而人为地过分干预作用(如诱导剂浓度较高)可能加速上述过程的发展^[12];体外培养环境缺陷以及缺乏靶细胞的回馈效应导致分化后的神经元样细胞存活率下降、存活时间缩短^[12]。

建立骨髓间质干细胞定向分化为神经元的体外诱导体系,有利于确定定向诱导因子的诱导作用。但由于体内环境复杂,存在影响干细胞分化为神经元的有利和不利因素,患病个体的不利因素可能更多。为了使骨髓间质干细胞更好应用于临床治疗,还需要更多地了解影响其定向分化为神经元的因素,最大程度地发挥干细胞对神经元相关疾病的疗效。

参 考 文 献

- 1 Friedenstein AY, Lalykina KS. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res* 1970;(Suppl):105—106.
- 2 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(16):10711—10716.
- 3 Sanchez Ramos J, Song S, Cardozo pelaze F, et al. Adult bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95(7):3908.
- 4 项 鹏,夏文杰,王连荣,等.丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞. *中山医科大学学报* 2001;22(5):321—324.
- Xiang P, Xia WJ, Wang LR, et al. Differentiation of human

- mesenchymal stem cells into neuro-like cells with Danshen injection. Acad J SUMS 2001;22(5):321—324.
- 5 蔡梅,赵陆华,胡昌勤,等.高效毛细管电泳法测定香丹注射液中丹参素和原儿茶醛的含量.中国药科大学学报 2001;32(2):130—132.
Cai M, Zhao LH, Hu CQ, et al. Determination of salvianic acid and protocatechuic aldehyde in Injection Salvia miltiorrhiza Composita by HPLC. J Chin Pharm Univ 2001; 32(2): 130—132.
 - 6 唐云安,王瑞淑,张成,等.大鼠脊髓匀浆上清液对骨髓间质干细胞的诱导分化作用.中风与神经疾病杂志 2003;20(3):196—198.
Tang YA, Wang RS, Zhang C, et al. The inducing differentiation with the spinal cord extracts on rat mesenchymal stem cells *in vitro*. J Apoplexy Ner Dis 2003;20(3):196—198.
 - 7 司徒镇强,吴军正.细胞培养.第4版.西安:世界图书出版西安公司,2001:186.
Situ ZQ, Wu JZ, Cell Culture. 4th ed. Xi'an: World Publishing Corporation, 2001:186.
 - 8 薛庆善.体外培养的原理与技术.北京:科学出版社,2001:660—663.
Xue QS. The principle and technique of the culture *in vitro*. Beijing: Science Press,2001:660—663.
 - 9 Martin I, Muraglia A, Campanile G, et al. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. Endocrinology 1997;138(10):4456—4462.
 - 10 张孟夏,谢富康.成年SD鼠骨髓基质干细胞向神经元样分化过程中分化与凋亡关系的研究.中国病理生理杂志 2003;19(1):32—35.
Zhang MX, Xie FK. The correlation between differentiation and apoptosis in the process of differentiation from adult rat mesenchymal stem cells into neuron-like cells. Chin J Pathophysiol 2003;19(1):32—35.
 - 11 姜会庆,哈团柱,韦多,等.丹参素对成纤维细胞生物学作用机制的研究.中华烧伤杂志 2001;17(1):36—38.
Jiang HQ, Ha TZ, Wei D, et al. A study on the mechanism of the biological roles of danshensu on fibroblast. Chin J Burns 2001;17(1):36—38.
 - 12 蔡文琴,李海标.发育神经生物学.北京:科学出版社,1999:227—229.
Cai WQ, Li HB. The developmental neurobiology. Beijing: Science Press,1999:227—229.

(收稿:2003-12-24 修回:2004-07-20)

香港浸会大学授予本刊主编陈可冀教授荣誉博士学位

香港浸会大学于2004年11月9日举行的第45届毕业及颁授荣誉博士学位典礼上,向中国科学院院士、本刊主编陈可冀教授颁授了荣誉理学博士学位,以表彰他在中西医结合研究领域杰出的学术成就和对社会的贡献。这不仅是陈可冀教授的荣誉,也反映了中西医结合医学已经得到医学界的广泛重视,今后必将对人类的健康做出更大的贡献。同时香港浸会大学还向被誉为“模糊数学之父”的加州大学柏克莱分校 Lofti A.



Zadeh教授颁授了荣誉理学博士学位,向被誉为“香港设计之父”的Henry Steiner教授和香港及好莱坞电影导演吴宇森先生颁授了荣誉社会科学博士学位,向台湾著名舞蹈家林怀民先生颁授了荣誉文学博士学位,他们分别向公众做了相关领域的学术报告。香港浸会大学是一所综合性大学,也是香港地区第一家创办中医药学院并招收五年制本科生及研究生的大学,已取得了很大的成就。(本刊讯)