

· 博士之窗 ·

核因子- κ B 在黄芩甙诱导大鼠骨髓基质细胞 分化为神经细胞中的作用

杨 琴¹ 贾延勤¹ 杨 军¹ 董为伟¹ 杨于嘉²

摘要 目的 研究核因子- κ B (NF- κ B) 在黄芩甙诱导骨髓基质细胞分化为神经细胞中的作用。方法 在无血清条件下,以中药单体黄芩甙作为主要诱导剂,诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经细胞,同时以无血清培养基为对照组。采用免疫荧光细胞化学染色检测神经细胞标记蛋白表达和 NF- κ B 亚基 P65 核移位情况,蛋白质印迹 (Western blot) 检测细胞中 NF- κ B 抑制蛋白 (I κ B α) 表达变化,原位末端标记 (TUNEL 法) 染色评价细胞凋亡率。结果 黄芩甙诱导后细胞形成较典型的神经细胞形态,同时表达多种神经细胞标记蛋白。对照组无类似情况,但出现 P65 由胞浆向胞核移位,细胞内 I κ B α 表达水平显著降低,细胞凋亡率为 $(28.2 \pm 6.1)\%$,黄芩甙诱导后 P65 信号主要仍在胞浆中表达,细胞内 I κ B α 表达水平降低程度较少,细胞凋亡率 $[(12.2 \pm 2.8)\%]$,也显著低于对照组 ($P < 0.01$)。结论 黄芩甙可抑制 NF- κ B 的活化,在骨髓基质细胞诱导分化为神经细胞的过程中可能起到一定的作用。

关键词 核因子- κ B; 黄芩甙; 骨髓基质细胞; 神经细胞

Effect of Nuclear Factor- κ B on Differentiation of Bone Marrow Stromal Cells into Neurons Induced by Baicalin in Rats YANG Qin, JIA Yan-jie, YANG Jun, et al *Department of Neurology, The First Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing (400016)*

Objective To explore the effect of nuclear factor- κ B (NF- κ B) on differentiation of bone marrow stromal cells (MSC) into neurons induced by baicalin. **Methods** Using baicalin as main inducer, differentiation of rats' MSC was induced into NC in serum-free medium, at the same time, untreated cells were cultured in serum-free medium as the control group. The expression of NC special marker protein and the presence of NF- κ B subunits RelA (P65) translocated into nucleus were determined by immunofluorescent cytochemical stain, the change of expression of NF- κ B inhibitory protein (I κ B α) were determined by Western blot, and the apoptotic index was assessed by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP-biotin nick end labeling (TUNEL) assay.

Results MSC displayed typical shape of NC and expressed several NC marker protein after induced by baicalin, while those changes were not revealed in the control group. but showed translocation of P65 from cytoplasm to nucleus, and the markedly reduction of I κ B α expression, the apoptotic index being $28.2 \pm 6.1\%$. After induced by baicalin, the P65 still revealed mainly in cytoplasm with the level of I κ B α expression decreased lesser and the number of apoptosis cell $(12.2 \pm 2.8\%)$ lower than those in the control group, $P < 0.01$. **Conclusion** Baicalin could inhibit NF- κ B activation, and it has certain effect in inducing the differentiation of MSC into NC.

Key words nuclear factor- κ B; baicalin; bone marrow stromal cell; neuron

黄芩甙是从中药黄芩中提取出的黄酮类抗氧化

剂,能够拮抗 H_2O_2 所致的神经元和星形胶质细胞氧化损伤^[1]。近来我们发现黄芩甙可以诱导骨髓基质细胞 (marrow stromal cells, MSCs) 分化为神经细胞^[2]。但其分化的机理尚不清楚。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是细胞信号传导的主要转录因子之一,参与了细胞增殖和分化过程,而且已往研究证明黄芩甙能够抑制 NF- κ B 的过度活化^[3]。NF- κ B 是否也参与

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (第 29 期, No. 2003033363), 重庆市卫生局科学基金 (No. 03-2-070), 重庆市卫生局中医处科学基金资助项目 (No. 2004-B-064)

作者单位: 1. 重庆医科大学附属第一医院神经科 (重庆 400016); 2. 中南大学湘雅医院儿科

通讯作者: 杨于嘉 Tel: 023-89012903 E-mail: xyqh200@sina.com

了黄芩甙的诱导分化过程尚不清楚。我们通过研究 NF- κ B 在此过程中的作用,初步探讨黄芩甙诱导分化的机制。

材料与方法

1 材料

1.1 药物与主要试剂 黄芩甙(纯度 98%,分子量为 446.35)由中南大学湘雅医院药剂科提供;DMEM 培养基(批号:B-01030001)培养基添加剂 B₂₇(批号:10889)购自 GIBCO BRL 公司;胎牛血清(批号:sh30088.02)购自 Hyclone 公司;碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF,批号:09905)购自 Pepro Tech EC 公司;小鼠抗大鼠神经细胞核蛋白(NeuN)抗体(批号:22021251)购自 R&D 公司;神经细胞特异性烯醇化酶(NSE,批号:19102404)神经微丝(NF200,批号:142)胶质纤维酸性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP,批号:0202m)S-100(批号:1Ns-296-p1)P65 抗体(批号:09905)均购自 NeoMarker 公司;小鼠抗大鼠 IgG(批号:09905)羊抗小鼠-FITC 抗体(批号:2012)和羊抗小鼠-碱性磷酸酶(批号:A-1545)购自 Sigma 公司;原位末端标记试剂盒(TUNEL-FITC,批号:950901)购自 Boeringer Mannheim 公司;其余生化试剂均为进口分装分析纯级。

1.2 动物 成年健康 SD 大鼠,雌雄不限,体重 200~300g,由重庆医科大学动物实验部授权使用。

2 方法

2.1 大鼠 MSCs 培养 无菌条件下取大鼠双侧胫骨的骨髓,置于 DMEM 培养基中,加 20% 胎牛血清稀释后直接接种于塑料培养瓶,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养,24 h 后换液,去除未贴壁细胞,以后每隔 72 h 换液。待贴壁细胞完全融合后,用 0.125% 胰蛋白酶消化传代接种,每隔 72 h 换液,传数代后接种于预先置有塑料盖玻片的 6 孔培养板培养 3 天,达到 80%~90% 融合后,进行诱导实验。

2.2 诱导实验 实验分为黄芩甙组和对照组。黄芩甙组将培养的骨髓干细胞参考文献的方法^[2],D-Hank's 液清洗 3 次,加入预诱导液(DMEM 培养基,20% 胎牛血清,bFGF 10 ng/ml)培养 24 h。预诱导后加入诱导液(DMEM 培养基,黄芩甙 200 μ mol/L,预实验发现黄芩甙的浓度在 200~400 μ mol/L 时效果最佳)诱导 6 h,换用维持液(DMEM 培养基,200 μ mol/L 黄芩甙,bFGF 10 ng/ml,B₂₇)继续维持 6 天。对照组预诱导同前,仅加入无血清 DMEM 培养基培养 6 h,然后加入维持液(DMEM 培养基,bFGF 10 ng/ml,

B₂₇)继续维持 6 天。

2.3 免疫细胞化学染色 采用间接免疫荧光法,其中一抗效价为 1:100~200,羊抗小鼠-FITC 效价为 1:64,荧光显微镜下观察照相。每张玻片采用双人双盲随机计数 200 个细胞,观察计算阳性细胞百分率,其中阳性细胞>61% 为强阳性(+++),30%~60% 为阳性(++),6%~29% 为弱阳性(+),1%~5% 为可疑($\pm$),<1% 为阴性(-)。

2.4 P65 核移位定量检测 采用免疫荧光法。实验步骤同前,其中一抗采用 P65 单抗,工作效价为 1:100;二抗采用羊抗小鼠-FITC,工作效价为 1:100,荧光显微镜观察绿色荧光信号位置。每张玻片采用双人双盲随机计数 200 个细胞,以胞核绿色荧光信号阳性细胞占有观察细胞数的百分率,NF- κ B 激活的百分率=绿色荧光阳性细胞数 $\div$ 200 $\times$ 100%。

2.5 Western Blot 分析 参照文献^[4]方法,收集各组细胞后以 PBS 冲洗 3 次,然后在细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, pH6.8,10 mmol/L EDTA,2% SDS,5 mmol/L DTT,0.5 mmol/L PMSF)100 μ l 中裂解 15 min。沸水浴变性 5 min,12 000 g 离心 20 min,收集上清蛋白质样本,测定蛋白质含量,-70℃ 保存待用。取 50 μ g 蛋白在 12% 的 SDS-PAGE 中电泳,之后将蛋白质在电转移电泳槽(40 mA,15 h)中转至硝酸纤维素膜。取出膜后用正常山羊血清室温下封闭 3 h,然后置于杂交袋中,加入 IgG α 抗体(1:1 000),4℃ 孵育过夜。羊抗小鼠-碱性磷酸酶(1:1 000),37℃ 孵育 60~120 min,NBT/BCIP 显色,结果进行扫描和密度分析。

2.6 细胞凋亡观察 采用 TUNEL 法,取各组诱导后的细胞,4% 多聚甲醛固定,1% H₂O₂ 作用 15 min,TUNEL 反应液 37℃ 孵育 60 min,封片后直接在荧光显微镜观察绿色荧光信号,并且随机计数 200 个细胞,计算阳性细胞百分率。

3 统计学方法 采用 χ^2 检验。

结 果

1 诱导后细胞鉴定 黄芩甙组预诱导 24 h,个别细胞体积变小,立体感增强,胞体收缩成锥形或球形;诱导 6 h,部分细胞成三角形,细胞微丝收缩,伪足形成细胞长突起,局部交织成网,有些细胞周围有光晕,类似神经细胞。对照组形态基本没有变化。免疫细胞化学染色提示,黄芩甙组表达多种神经细胞标记物如神经细胞特异性烯醇化酶(NSE)、神经细胞核蛋白(NeuN)和神经微丝(NF)等,但是未见胶质细胞标记蛋白胶质纤维酸性蛋白(GFAP)S-100 的表达;对照组各

标记蛋白表达均为阴性或可疑(见表 1)。

表 1 两组神经细胞标记蛋白的间接免疫荧光染色结果

项目	对照组			黄芩甙组		
	诱导前	诱导 6 h	诱导 6 天	诱导前	诱导 6 h	诱导 6 天
nestin	-	++	-	-	+++	-
NSE	±	++	+++	±	+	+++
NeuN	-	-	+	-	-	++
NF200	-	-	+	-	-	+++
GFAP	-	-	-	-	-	-
S-100	-	-	-	-	-	-

注: nestin 巢蛋白; NSE 神经细胞特异性烯醇化酶; NeuN 神经细胞核蛋白; NF200 神经微丝; GFAP 胶质纤维酸性蛋白

2 P65 核移位检测结果 诱导前 MSCs 细胞 P65 信号[(89.3±1.2)%]主要位于胞浆。黄芩甙组诱导后, P65 信号[(66.4±8.5)%]主要仍在胞浆, 但较诱导前显著降低($P<0.01$); 对照组诱导后, P65 信号主要在胞核, 而胞浆中信号降至(18.4±3.0)%, 与诱导前比较, 黄芩甙组诱导后均显著降低($P<0.01$)。以上结果提示, 对照组无血清培养状态可激活 MSCs 中 NF- κ B, 使之向胞核移位, 而黄芩甙可减少 NF- κ B 活化(图略)。

3 Western Blot 分析结果 见图 1。黄芩甙组 I κ B α 的表达水平有一定程度的下降, 相对密度为 0.4556±0.1008(诱导前密度为 1.0000); 对照组 I κ B α 的表达水平显著降低, 相对密度为 0.0296±0.0099, 对照组和黄芩甙组均显著降低($P<0.01$), 但对照组较黄芩甙组降低更明显($P<0.01$)。

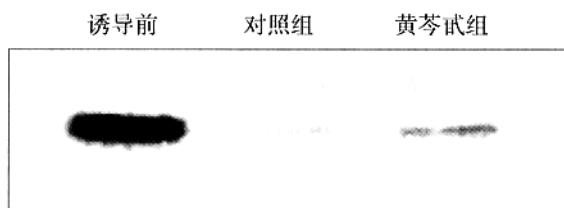


图 1 Western Blot 结果

4 TUNEL 染色结果 对照组许多细胞核着色, 呈深浅不等的绿色, 提示有细胞凋亡存在; 黄芩甙组凋亡细胞数目减少, 细胞凋亡率为(12.2±2.8)%, 显著低于对照组的(28.2±6.1)%($P<0.01$, 图略)。

讨 论

体外诱导 MSCs 分化为神经细胞方法中, 可以采用抗氧化剂 2-巯基乙醇、二甲基亚砷、叔丁对甲氧酚等作为诱导剂^[4,5]。本研究选择具有较强抗氧化能力的黄芩甙作为主要诱导剂, 可以诱导 MSCs 表达多种神经细胞相关的特异性标记蛋白, 如早期的神经细胞标记物 NSE 和中晚期的标记物 NF200、NeuN 等, 不

表达胶质细胞标记蛋白, 证明诱导后细胞具备了神经细胞的部分特点。

NF- κ B 是广泛存在于多种细胞内的一种转录因子, 参与氧应激、炎症、免疫反应等多种重要的病理生理过程, 也是近年来基因治疗研究中的重点基因。在未活化状态下, NF- κ B 的 Rel 同源区通过蛋白质之间的相互作用与抑制 I κ Bs 的 Ank 重复序列结合而存在于胞浆中。在活化状态下, I κ Bs 被磷酸化, 与 NF- κ B 分离, 分离后的 NF- κ B 二聚体发生核移位, 与 κ B 反应基因增强子区域中共有的 κ B 序列结合, 从而反向激活这些基因的表达。随着对细胞信号传导通道研究发现, NF- κ B 在分子动力学调控网络中处于一个枢纽作用。一方面, NF- κ B 受上游的基因调控, 如活性氧族、细胞因子等; 另一方面, 活化的 NF- κ B 调节下游 κ B-反应基因。NF- κ B 是重要的细胞信号传导的中心之一, 参与了细胞增殖和分化过程。未活化的 NF- κ B 以三聚体形式在胞浆中存在, 即 P50、P65 和抑制蛋白 I κ B α 。细胞外信号刺激后, I κ B α 被磷酸化后与 NF- κ B 聚合体分离, 这种由 P50~P65 二聚体构成的活化状态的 NF- κ B, 可以移位到核内, 与 κ B 反应基因增强子区域中的共有 κ B 序列结合, 从而促进这些基因的表达。而且血清剥夺的状态, 可以通过活化 NF- κ B, 触发凋亡事件的启动信号^[6]。本研究发现对照组无血清条件下可导致 P65 大量由胞浆向胞核移位, 同时降低细胞内 I κ B α 的信号强度, 说明血清剥夺状态促进了 NF- κ B 的活化, 并且伴随凋亡事件的发生。黄芩甙可以抑制这些分子事件, 对血清剥夺状态所致 P65 向胞核移位有抑制作用, 可减少 I κ B α 下降程度, 减少细胞凋亡, 与其它研究结论一致^[4]。

虽然本研究结果尚不能说明黄芩甙诱导分化的详细机制, 但至少提示黄芩甙通过抑制 NF- κ B 的活化为 MSCs 诱导分化提供了一个必要的微环境。目前体外诱导 MSCs 分化为神经细胞方法均在无血清条件下进行, 此时的血清剥夺状态会导致 NF- κ B 的活化^[2,3]。活化后的 NF- κ B 可以调控下游基因的表达, 如白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 3、6(IL-3、IL-6)、粒系集落刺激因子(G-CSF)、粒巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子^[7]。而这些细胞因子, 如 IL-3、IL-6、G-CSF 等可以阻碍干细胞进一步的分化。因此, 本研究对照组中诱导分化效果不佳可能与此有关。而且已知的其它诱导剂, 如 2-巯基乙醇、DMSO、BHA 等都可以抑制 NF- κ B 的活化^[3,8,9]。

除了黄芩甙之外, 许多中药或其单体在 MSCs 体外诱导分化为神经细胞中也起到积极作用, 如丹参和

丹参酮ⅡA、天麻、黄连素等。是否 NF- κ B 在这些中药诱导 MSCs 分化中起到类似的作用,有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 宋元宗,杨于嘉,贾延.黄芩武拮抗大鼠神经元和星形胶质细胞氧应激损伤.中国中西医结合杂志 2004;24(4):339—342.
Song YZ, Yang YJ, Jia YJ. Antagonistic effect of baicalin on oxidative stress injury in neurons and astrocytes of rats. Chin J Integr Tredit West Med 2004;24(4):339—342.
- 2 贾延,杨于嘉,周燕,等.黄芩武诱导骨髓基质细胞向神经细胞分化的研究.中华医学杂志 2002;82(19):1335—1339.
Jia YJ, Yang YJ, Zhou Y, et al. Differentiation of rat bone marrow stromal cells into neuron induced by baicalin. Natl Med J Chin 2002;82(19):1335—1339.
- 3 杨于嘉,朱彩云,陈翔,等.黄芩武对百日咳菌液致大鼠脑水肿的保护作用.中华医学杂志 1998;78(8):630—632.
Yang YJ, Zhu CY, Chen X, et al. The protective effects of baicalin on pertussis bacilin-induced brain edema in rats. Natl Med J Chin 1998;78(8):630—632.
- 4 杨军,董为伟,贾延.体外诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经元样细胞中 NF- κ B 的表达改变.重庆医学 2003;32(11):1502—1504.

- Yang J, Dong WW, Jia YJ. Expressional changes of NF- κ B in rat bone marrow stromal cells differentiating into neuron-like cells *in vitro*. J Chongqin Med 2003;32(11):1502—1504.
- 5 Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. J Neurosci Res 2000;61(4):364—370.
- 6 Tamatani M, Mitsuda N, Matsuzaki H, et al. A pathway of neuronal apoptosis induced by hypoxia/reoxygenation: roles of nuclear factor-kappaB and Bcl-2. J Neurochem 2000;75(2):683—693.
- 7 徐令,乔春平,黄绍良,等.体外定向诱导胚胎干细胞为造血细胞.科学通报 2000;45(8):815—820.
Xu L, Qiao CP, Huang SL, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hemopoietic cells induced by baicalin *in vitro*. Chin Sci Bull 2000;45(8):815—820.
- 8 Schreck R, Riebar P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1. EMBO J 1991;10(11):2247—2258.
- 9 Tong L, Perez-polo JR. Effect of nerve growth factor on AP-1 NF- κ B, and Oct DNA binding activity in apoptotic PC12 cells; extrinsic and intrinsic elements. J Neurosci Res 1996;45(1):1—12.

(收稿 2004-08-18 修回 2004-11-26)

抗疮凝胶治疗Ⅱ度溃疡型褥疮 30 例

柳仓生 张军 张捷 李红 高佩凤

2001 年 1 月—2004 年 1 月,我院用自制的抗疮凝胶治疗Ⅱ度溃疡型褥疮 30 例,现报告如下。

临床资料 选择Ⅱ度溃疡型褥疮患者,排除浸入真皮下层及肌肉层者。30 例患者,男 18 例,女 12 例,年龄 40~82 岁,平均 65.2 岁,重症肺结核 16 例,肺癌晚期 10 例,肺部感染、肺性脑病 4 例;入院前Ⅱ度者 28 例,褥疮时间为 1~6 个月,平均 1.5 个月;入院后Ⅱ度者 2 例,褥疮时间为 2~12 天,平均 7 天;部位:骶尾 20 处,髌 10 处,脚踝 3 处,肘关节 3 处,面积 3 cm $\times$ 3 cm 10 例,5 cm $\times$ 5 cm 10 例,7 cm $\times$ 7 cm 5 例,>7 cm 2 3 例,<3 cm 2 2 例,低蛋白血症 15 例,分泌物情况:脓性分泌物 2 例,血样分泌物 28 例,伤口分泌物阳性 10 例(其中链球菌 3 例,大肠杆菌 3 例,缘脓杆菌 1 例,结核杆菌 2 例,真菌 1 例)。

方法 (1)抗疮凝胶制作:凝胶基质为羟甲基纤维素钠 1 g 加入生理盐水 20 ml 溶后高压消毒。取左氧氟沙星 0.2 g、利福平 0.5 g、中药脉络宁注射液 5 ml 加入基质中调合成胶状。(2)治疗方法:常规先将创面清理干净,将抗疮凝胶涂在创口处,每日换药,疗程 4 周,观察用药过程中伤口分泌物情况。

结果 (1)疗效:显效(伤口再生皮肤生长 3/4)20 例,有效(伤口再生皮肤生长 1/2)8 例,无效(皮肤生长不足 1/4)2 例。肉芽生长情况:水肿 2 例,充血 3 例,鲜活 25 例。(2)伤口愈合时间:6 周 10 例,8 周 8 例,10 周 8 例,未愈合 4 例(其中死亡 2 例,自动出院 2 例)。

讨论 褥疮是局部组织长期受压,血循环障碍,持续缺血、缺氧、营养不良而致的软组织溃疡和坏死。抗疮凝胶是我院自行配制的,其中羧甲基纤维素钠具有吸湿性强,能溶于水,稳定的黏性溶液,pH 为 8~10,本品可以改善创面酸碱度,使细菌不易生长繁殖,创口分泌物减少;脉络宁注射液可以使局部血管扩张,改善微循环,增加血流量,抗凝血溶栓作用;利福平为广谱抗菌素,并对结核杆菌有效;左氧氟沙星为三代喹诺酮类药,抗菌谱广的特点。几种药物对局部组织及机体无不良反应发生,30 例患者在使用过程中未发生过敏和伤口进一步坏死等情况。本品配制方便,配制后在常温下可以使用 1 周,无需进一步消毒,很容易用盐水清除,值得临床推广应用。

(收稿 2004-06-04 修回 2005-01-14)