

刺五加注射液体外诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经样细胞的最佳浓度探索

刘黎青¹ 高艳霞¹ 周盛年² 王媛¹

(1. 山东中医药大学基础医学院, 山东省济南市长清大学科技园, 250355; 2. 山东大学齐鲁医院神经内科)

[摘要] **目的** 探讨刺五加注射液体外诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经样细胞的最佳浓度。**方法** 体外密度梯度法分离培养骨髓基质细胞, 以不同浓度刺五加注射液对其进行体外诱导, 用 MTT 法检测各组细胞生长情况, 用免疫细胞化学方法计算各组神经样细胞阳性数加以比较。**结果** 用不同浓度刺五加注射液诱导后均可表现为典型的神经样细胞形态, 其中 0.3mg/ml 组和 0.4mg/ml 组细胞生长情况与免疫组化结果均与其余各组差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 刺五加注射液体外诱导成年大鼠骨髓基质细胞分化为神经样细胞以 0.3~0.4mg/ml 浓度最佳。

[关键词] 骨髓基质细胞; 刺五加注射液; 神经样细胞; 浓度

Study on the Optimal Concentration of Ciwujia Injection for Rat Bone Marrow Stromal Cells Differentiating into Neuron-like Cells in Vitro

LIU Li-qing¹, GAO Yan-xia¹, ZHOU Sheng-nian², et al.

(Preclinical Medicine College of Shandong University of TCM, Jinan 250355; 2. Qilu Hospital, Shandong University)

ABSTRACT **Objective** To study the optimal concentration of Ciwujia Injection for rat bone marrow stromal cells differentiating into neuron-like cells in vitro. **Methods** The density-gradient technique was used to separate and culture the bone marrow stromal cells and the different concentration of Ciwujia Injection was applied for inducement in vitro. The growing of cells of all groups was determined with MTT and the neuron-like cells of each group were calculated by immunocytochemistry examination for comparison. **Results** With inducement of Ciwujia Injection in different concentrations, the cells of all groups were typically shaped like neurons. Of them, the growing of cells in 0.3mg/ml and 0.4mg/ml groups and their immunocytochemistry results were both showing differences from other groups in statistics ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The concentration of 0.3~0.4mg/ml was optimal for inducement of bone marrow stromal cells differentiating into neuron-like cells in vitro in adult rats.

Key Words Bone marrow stromal cells; Ciwujia Injection; Neuron-like cells; Concentration

神经系统疾病是威胁人类生命健康的主要疾病之一。神经组织一直被认为是终末分化组织, 神经细胞死亡后被认为不能再生。但近年来的研究表明, 来源于中胚层的骨髓基质细胞(BMSC)在适当的条件下可诱导分化出神经样细胞, 为神经细胞的再生开辟了一条新途径。我们在前期实验^[1]中发现, 刺五加注射液可体外诱导 BMSC 向神经样细胞分化。为此, 本研究旨在探讨刺五加注射液体外促神经分化的最佳诱导浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

动物: SD 大鼠, 体重 200g 左右, 雌雄不限, 山东中医药大学实验动物中心提供, SPF 级, 实验动物生产许可证号: SCXK(鲁) 20050015。

药物及试剂: 刺五加注射液购自黑龙江完达山制药厂(批号: Z23020810, 规格: 含总黄酮 5mg/ml); MTT(批号: M 2128) 购自 Sigma 公司。兔抗大鼠神经

元特异性烯醇化酶(NSE, 批号: BA 0535)、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(GFAP, 批号: BA 0056), 即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒(含山羊抗兔 IgG, 批号: SA 1023)、DAB 显色试剂盒(批号: AR 1022) 均购自武汉博士德公司。微管相关蛋白 2(MAP-2, 批号: bs-0167R) 购自北京博奥森公司; DMEM/F12、胎牛血清(FBS) 均购自美国 Hyclone 公司; 胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。

使用的主要仪器: 超净工作台及 CO₂ 孵箱(SL-JC-2323) 均为美国 Forma Scientific 公司; 倒置显微镜: 日本 OLYMPUS 公司; 离心机: Kendro Laboratory Products 公司; 酶联免疫检测仪为南京华东电子医疗装备有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 SD 大鼠骨髓基质细胞的培养 成年 SD 大鼠断颈处死后酒精浸泡 30 分钟。取出大鼠双侧股骨、胫骨和肱骨, 小心剪去两侧骨垢端, 暴露骨髓腔。抽取含有 10% 胎牛血清(体积分数)的 DMEM/F12 培养液 1ml,

仔冲洗骨髓腔。将所得骨髓细胞悬液收集倒离心管, 1000转/分钟离心, 将所得细胞用 DMEM/F12培养液重悬后, 轻轻叠加到等体积的 percoll 分离液上, 2500转/分钟离心15分钟。小心吸取所得中间层, 即单个细胞所在的白膜层, 用 PBS 洗涤两次。将所得含 BMSC 的细胞用细胞完全培养液重悬后按 2×10^6 的细胞密度接种到 25cm^2 塑料细胞培养瓶中, 加入4ml 细胞完全培养液, 置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中饱和湿度培养。接种到培养瓶内的细胞培养3天后全量换液, 以后每2~3天换液。当细胞铺满瓶底近80%~90%时即可用消化法进行传代扩增培养。原代细胞传2~3代后, 即可得到较为典型的 BMSC 细胞。

1.2.2 MTT 法检测细胞生长情况 取传代至第3代的大鼠 BMSC, 胰酶消化接种于96孔培养板中, 待细胞进入对数生长期后进行诱导实验。实验随机分为9组, 每组设2个复孔; 根据刺五加注射液终诱导浓度分别为0.01mg/ml 组、0.05mg/ml 组、0.1mg/ml 组、0.2mg/ml 组、0.3mg/ml 组、0.4mg/ml 组、0.5mg/ml 组、1.0mg/ml 组, 各组诱导前均以0.01mg/ml 浓度的刺五加注射液预诱导24小时, 同时设空白对照组(全程加入细胞完全培养液)。各组细胞分别于诱导后6小时、24小时加入 MTT, 混匀后继续培养4小时。轻轻吸除各孔内液体(尽量吸净), 加入150 μ 二甲基亚砜, 振荡仪振荡5分钟左右, 待紫色结晶完全溶解后, 置酶标仪上以490nm 为检测波长, 测各孔的吸光度值(OD 值), 每组取3个孔的平均值。

1.2.3 免疫细胞化学检测 取传至第3代的大鼠 BM-SC, 胰酶消化接种于24孔培养板中(孔中预先放置无菌盖玻片, 每种浓度设5个平行孔), 待细胞进入对数生长期后进行诱导实验。实验随机分为9组, 其中实验组8组, 根据刺五加注射液终诱导浓度分别为0.01mg/ml 组、0.05mg/ml 组、0.1mg/ml 组、0.2mg/ml 组、0.3mg/ml 组、0.4mg/ml 组、0.5mg/ml 组、1.0mg/ml 组, 同时设空白对照组(全程加入细胞完全培养液)。各实验组诱导前均以0.01mg/ml 浓度的刺五加注射液预诱导24小时。诱导6小时后取出培养孔盖玻片, 4%多聚甲醛固定, 免疫细胞化学染色, 一抗选神经细胞标志物 NSE、MAP-2、星形胶质细胞标志蛋白 GFAP, 工作效价为1:100~500, 操作步骤参照说明书, DAB 显色。显微镜下观察细胞, 每张玻片随机计数200个细胞, 阳性细胞呈胞浆染色, 计算阳性细胞百分比。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 t 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组 BMSC 诱导前后形态学变化

在小于0.05mg/ml 刺五加诱导浓度下, 细胞形态基本不发生变化。小于0.1mg/ml 诱导浓度下, 虽有少量神经元样细胞出现, 但分化率极低, 效果不明显。其余实验诱导组在加入诱导液1小时后 BMSC 形态即发生变化, 原来宽大扁平的细胞体开始向胞核收缩; 3小时后部分细胞胞体呈球形, 折光性增强, 细胞周围有光晕, 有细长突起, 类似神经元样细胞; 6小时后变形细胞增多, 突起变长, 末端产生多级分支, 较密集的部分可交织成网络样结构。随诱导时间的延长, 刺五加注射液低药物浓度(0.1~0.4mg/ml) 组神经元样细胞数目继续增多, 突起增长, 有少量细胞脱落、死亡; 高药物浓度(0.5~1.0mg/ml) 组神经元样细胞数目无明显增多, 部分细胞脱落死亡, 并随时间延长死亡细胞增多。空白对照组 BMSC 形态无变化。

2.2 各组细胞生长情况分析

表1示, 细胞接种后迅速贴壁, 2~3天进入对数生长期。加入不同浓度刺五加注射液前6小时细胞生长状态良好, 与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。诱导6小时后高药物浓度(0.5~1.0mg/ml) 组细胞部分脱落死亡, 随时间延长死亡细胞增多, 24小时 OD 值与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。因刺五加浓度小于0.1mg/ml 时, 细胞分化率极低, 故未做统计。

表1 各组 BMSC 生长情况比较(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	诱导后6小时	诱导后24小时
空白对照组	3	0.288 $\pm$ 0.024	0.455 $\pm$ 0.045
0.1mg/ml 组	3	0.272 $\pm$ 0.010	0.431 $\pm$ 0.061
0.2mg/ml 组	3	0.276 $\pm$ 0.029	0.435 $\pm$ 0.043
0.3mg/ml 组	3	0.283 $\pm$ 0.033	0.449 $\pm$ 0.056
0.4mg/ml 组	3	0.292 $\pm$ 0.036	0.461 $\pm$ 0.055
0.5mg/ml 组	3	0.271 $\pm$ 0.050	0.349 $\pm$ 0.047 *
1.0mg/ml 组	3	0.233 $\pm$ 0.046	0.299 $\pm$ 0.028 *

与空白对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 各组 BMSC 诱导后免疫组化结果

表2示, BMSC 诱导6小时免疫细胞化学染色后, 神经细胞标志物 NSE、MAP-2在浓度低于0.05mg/ml 时, 细胞无明显分化; 低于0.1mg/ml 时, 虽有少量神经元样细胞出现, 但分化率极低, 故未列于表内。其余6组不同浓度细胞, 均出现强阳性表达。表明这些细胞均具有神经元样细胞特征。与0.1mg/ml 组比较, 除1.0mg/ml 组的 NSE 外, 其余各组 NSE 和 MAP-2均与其有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与0.2mg/ml 组比较,

0.3mg/ml 组和0.4mg/ml 的 NSE、MAP-2 均有统计学差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) ; 与 1.0mg/ml 组比较, 0.3mg/ml 组、0.4mg/ml 组、0.5mg/ml 组 3 组的 NSE、MAP-2 亦均与其有统计学差异 ($P < 0.01$) 。

表2 各组神经细胞抗原表达率比较(%, $\bar{x} \pm s$)			
组别	玻片数	NSE	MAP-2
0.1mg/ml 组	5	25.6 $\pm$ 3.65	13.4 $\pm$ 2.61
0.2mg/ml 组	5	38.0 $\pm$ 4.30 *	19.2 $\pm$ 3.70 *
0.3mg/ml 组	5	49.8 $\pm$ 6.94 * $\Delta\blacktriangle$	26.4 $\pm$ 4.34 * $\Delta\blacktriangle$
0.4mg/ml 组	5	52.2 $\pm$ 8.17 * $\Delta\Delta\blacktriangle$	28.0 $\pm$ 3.16 * $\Delta\Delta\blacktriangle$
0.5mg/ml 组	5	43.2 $\pm$ 3.35 * $\blacktriangle$	28.6 $\pm$ 5.41 * $\Delta\Delta\blacktriangle$
1.0mg/ml 组	5	27.0 $\pm$ 3.16 $\Delta\Delta$	18.4 $\pm$ 3.65 *

与0.1mg/ml 组比较, * $P < 0.05$, * * $P < 0.01$; 与0.2mg/ml 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与1.0mg/ml 组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

3 讨论

骨髓基质细胞分化为神经细胞, 目前国内外采用的诱导剂主要有抗氧化剂和生长因子等。虽然抗氧化剂诱导的具体机制还不清楚, 但有关抗氧化剂对骨髓基质细胞的诱导作用有过很多报道^[2~4]。

本实验所用刺五加注射液中的主要成分刺五加, 含有超氧化物歧化酶, 具有抗氧化作用, 能促进核糖核酸、蛋白质的合成及清除氧自由基^[5,6]。通过先期实验工作^[1], 已证实了刺五加注射液体外诱导 BMSC 分化为神经样细胞的可行性。烯醇酶是糖酵解中的裂解酶, NSE 是烯醇化酶的一种同工酶, 此酶在正常脑组织中含量最高; MAP-2 是组成神经元细胞骨架的重要组成部分; 故 NSE、MAP-2 是神经细胞的标志物。本实验中不同浓度刺五加注射液诱导所得神经样细胞 NSE、MAP-2 染色均呈阳性, 而星形胶质细胞标志蛋白 GFAP 表达阴性, 从而说明诱导所得细胞为神经元样细胞。

实验表明, 刺五加注射液体外诱导骨髓基质细胞

分化为神经元样细胞具有一定的浓度依赖性。小于 0.05mg/ml 的浓度对骨髓基质细胞基本无影响, 未见神经元样细胞转化; 本实验所选的其余浓度刺五加注射液均能诱导 BMSC 向神经元样细胞转化, 但浓度过低(小于 0.1mg/ml), 虽有少量神经元样细胞出现, 但分化率极低, 效果不明显, 故未做统计。0.3~0.5mg/ml 浓度 6 小时诱导率较高, 但通过观察和细胞 OD 值检测, 浓度过高(大于 0.5mg/ml) 虽可刺激骨髓基质细胞向神经元样细胞分化, 但其对细胞的毒性也随之加大, 细胞死亡明显, 影响细胞增殖。故本研究认为在 0.3~0.4mg/ml 刺五加注射液诱导浓度下, 神经元样细胞分化率较高, 对细胞的毒性小, 可能为最佳体外诱导浓度。

参考文献

[1]王媛,刘黎青,周盛年. 刺五加注射液体外诱导大鼠骨髓基质细胞分化研究. 山东中医药大学学报, 2006, 30(4) : 339~340.

[2]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.

[3]Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. Exp Neurol, 2000, 164(2) : 247~256.

[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.

[5]雷载权,张廷模. 中华临床中药学. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 1629.

[6]董昆山,王秀琴,董一凡. 现代临床中药学. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 147.

(收稿日期: 2008-03-10; 修回日期: 2008-05-04)

[编辑: 邓 媛]

参芪五味子片临床应用有奖征文活动通知

参芪五味子片是针对睡眠障碍及中医虚证的药物, 是《中华人民共和国药典》品种, 国家中药保护品种, 国家基本医疗保险目录品种, 在临床上获得了广泛的应用。为进一步总结和评估参芪五味子片的临床疗效, 交流临床用药经验, 指导临床合理用药, 中医杂志社与甘肃独一味生物制药股份有限公司联合举办参芪五味子片临床应用有奖征文活动。

1 征文内容: (1) 参芪五味子片改善睡眠障碍、神经衰弱、焦虑症的临床疗效和安全性观察; (2) 参芪五味子片改善更年期综合症的疗效和安全性观察; (3) 参芪五味子片改善肿瘤术后, 肿瘤放、化疗后的疗效和安全性观察; (4) 参芪五味子片改善虚证的疗效和安全性观察; (5) 参芪五味子片与其它药物联合应用的临床疗效; (6) 参芪五味子片药效经济学研究; (7) 参芪五味子片临床应用的新经验和体会等。2 征文要求: (1) 征文请参照《中医杂志》稿约规范, 且未在公开发行的期刊上发表过; (2) 附中、英文标题及 500 字左右中文摘要; (3) 标注中、英文关键词; (3) 请附打字文稿及电子文档(Word 文本); (4) 请注明作者姓名、单位、职称、地址、邮编、电子邮箱及联系电话。3 评奖方法: (1) 由全国有关专家组成参芪五味子片征文活动评委会, 召开论文评审会, 评奖时间为 2009 年 6 月, 结果将于 2009 年 8 月公布于《中医杂志》; (2) 获一等奖文章将被推荐发表在《中医杂志》正刊; (3) 优秀文章将收入 2009 年《中医杂志》增刊。4 奖励办法: 设一等奖 5 名, 二等奖 10 名, 三等奖 25 名, 分别奖励 3000 元、2000 元、1000 元。奖励仅限第一作者。凡符合征文要求的论文作者都将获得纪念品鼓励。5 投稿截止日期: 2009 年 4 月 30 日。6 投稿邮箱: jtcmm@163.com。7 投稿地址: 北京市东直门内南小街 16 号《中医杂志》编辑部 201 编辑收, (请在信封上注明“参芪五味子片征文”字样), 电话: (010) 64035632, 传真: (010) 64050201, 邮编: 100700。电子邮件: jtcmm@163.com。本次活动的最终解释权归甘肃独一味生物制药股份有限公司和中医杂志社。