

## ·基础研究·

麝香组分诱导成年大鼠骨髓间质干细胞体外定向  
分化为神经元样细胞的能力肖庆忠<sup>1,2</sup>, 温冠媚<sup>1</sup>, 李浩威<sup>1</sup>, 黄少华<sup>3</sup>, 张秀明<sup>1</sup>, 李艳<sup>1</sup>, 李树浓<sup>1</sup>

(1. 中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东广州 510080; 2. 广州医学院第一附属医院, 广东广州 510120; 3. 广州医学院, 广东广州 510182)

**摘要:**【目的】探讨麝香组分体外诱导成年大鼠骨髓间质干细胞(adult rat bone marrow mesenchymal stem cells, rBMMSCs)定向分化为神经元样细胞的能力。【方法】分别采用含麝香多肽或麝香酮的 L-DMEM 培养基体外定向诱导第 5 代至 10 代的 rBMMSCs, 并分别应用相差显微镜观察神经元样细胞和免疫细胞组化检测神经元样细胞所表达的神经干细胞特异性标志(nestin)、神经元特异性标志[神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)和神经丝蛋白(neurofilament, NF)]及星形胶质细胞特异性标志[胶质纤维酸性蛋白(glia fiber acid protein, GFAP)], 并进行神经元样细胞计数分析。【结果】成年大鼠 BMMSCs 在加入含麝香多肽的无血清 L-DMEM 培养基诱导后, 发现细胞胞体收缩, 突起伸出, 形似神经元; 免疫组化显示诱导出的神经元样细胞 NSE、NF、nestin 表达阳性, GFAP 阴性。神经元样细胞计数分析发现: rBMMSCs 经过麝香多肽诱导后, NSE<sup>+</sup> 神经元样细胞和 NF-H<sup>+</sup> 神经元样细胞的比例分别高达 93.5% 和 88.2%; 而用含麝香酮的无血清 L-DMEM 培养基却无上述变化。【结论】麝香多肽能在体外诱导 rBMMSCs 定向分化为神经元样细胞, 而麝香酮却无此能力。从而可为神经组织工程和临床上各类神经疾病的神经移植及细胞替代治疗提供大量的种子细胞, 为临床上各类神经疾病的治疗提供一种新的治疗策略。

关键词: 骨髓间质干细胞; 细胞分化; 神经元; 麝香多肽; 麝香酮

中图分类号: R338.8 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)06-0405-04

**The Ability of Adult Rat Bone Mesenchymal Stem Cells Differentiating into Neurons-like Cells with Musk' s Component *in vitro*** XIAO Qing-zhong<sup>1,2</sup>, WEN Guan-mei<sup>1</sup>, LI Hao-wei<sup>1</sup>, HUANG Shao-hua<sup>3</sup>, ZHANG Xiu-ming<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, LI Shu-nong<sup>1</sup>. (1. Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. The First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China; 3. Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

**Abstract** 【Objective】To investigate the ability of the adult rat bone marrow mesenchymal stem cells (rBMMSCs) differentiate into neurons-like cells with Musk' s component *in vitro*. 【Methods】rBMMSCs (passage 5 to 10) was pretreated with DMEM/ low glucose (L-DMEM) containing 20% FCS and 10<sup>6</sup>g/L basic fibroblastic growth factor (bFGF) for 24 h, then was induced with induction media consisting of L-DMEM and Musk' s polypeptide (Mu-p) or L-DMEM and muscone (Mu-n) for 5 h to 7 d. The differentiating cells was observed by phase-contrast microscopy, and the neural cell markers, including Neuron-specific enolase (NSE), neurofilament (NF), Nestin, and glial fibrillary acidic protein (GFAP), were detected by immunohistochemistry. The NSE<sup>+</sup> and/or NF-H<sup>+</sup> neurons-like cells were counted by microscopy. 【Results】One treatment protocols with Mu-p, not with Mu-n, can induce rBMMSCs differentiated into neuron-like cells in the present study. The neuron-like cells expressed neuron-specific marker, such as Nestin, NSE, and NF-H, but could not express GFAP, which was the astrocytes specific marker. With this differentiation protocol, about 93.5% and 88.2% of the rBMMSCs was NSE positive and NF positive cells, respectively. 【Conclusion】From these findings, we could conclude that rBMMSCs could be expanded, passaged, and induced to differentiate into neurons-like cells with Mu-p (not with Mu-n) *in vitro*. Consequently, adult rBMMSCs can also be induced to overcome their mesenchymal committed fates and may constitute an unlimited and accessible cellular reservoir for the treatment of a variety of neurologic diseases.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; cell differentiation; neurons; musk polypeptide; muscone

近年来研究发现可从大量的成年组织中分离到多种多能干细胞, 参与正常组织中的细胞替代及

修复, 并可进行自我更新<sup>[1]</sup>。在骨髓中除造血干细胞外还含有另一类干细胞, 即间质干细胞 (mes-

收稿日期: 2002-08-18

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(2001CB509904); 广东省“十五”重大专项基金资助项目(A3020101)

作者简介: 肖庆忠(1971-), 男, 重庆人, 博士生, 讲师; 李树浓, 课题负责人

enchymal stem cell, MSC)。这是一群具有多向分化潜能的均质性细胞,在特定诱导条件下可分化为多种组织细胞,如成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、成肌细胞和神经细胞等<sup>[1~4]</sup>。麝香是祖国医药中极其珍贵的药品之一。我国最早的医药典籍《神农本草经》中即有记载。全国中成药处方集收集2621种方剂,其中含麝香的方剂295种之多。近年来药理研究表明:麝香中起主要药理作用的是其脂溶性成分和水溶性成分,其对心血管、神经系统、呼吸系统、内分泌及免疫功能均有广泛的影响。因此,本研究从大鼠骨髓中分离出骨髓间质干细胞(BMMSCs),并首次采用麝香多肽(水溶性成分)和麝香酮(脂溶性成分)对成年大鼠骨髓间质干细胞(rBMMSCs)进行体外诱导分化,现将结果报道如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 动物 SD大鼠(1个月大小,购自中山大学实验动物中心)。

1.1.2 培养基及主要试剂 L-DMEM培养基、胎牛血清(FCS, Hyclone, USA),碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblastic growth factor, bFGF, USA)、胰酶(Sigma),小鼠抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron-specific enolase, NSE, USA)单克隆抗体、小鼠抗大鼠高相对分子质量神经丝蛋白(neurofilament,  $M_r=200\ 000$ , NF-H, Chemicon, USA)单克隆抗体、兔抗大鼠胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP, USA)血清、小鼠抗大鼠 nestin (Chemicon, USA), EDTA (江苏金城制药厂)。SABC试剂盒(DAKO公司,丹麦),DAB显色试剂盒(DAKO公司,丹麦)。麝香多肽(musk polyptide, Mu-P)、麝香酮(muscone, Mu-n)(由广州中医药大学新药开发中心苏子仁教授和广州医学院黄少华研究员提供,其提取、分离、纯化方法见文献[5])。

### 1.2 方 法

1.2.1 rBMMSCs分离培养 按文献[6]进行。

1.2.2 rBMMSCs的传代培养 按文献[6]进行。

1.2.3 rBMMSCs的神经诱导分化 将待诱导分化的rBMMSCs移至放有无菌盖玻片的6孔板中培养成单层,用含 $10\ \mu\text{g/L}$  bFGF的L-DMEM(体积分数20%的FCS)预处理24h后,再分别加入含

100~150 mg/L 麝香多肽或含100~200 mg/L 麝香酮的L-DMEM培养基诱导5h至7d,每隔24~48h换液。每次诱导时都设3个实验对照组,对照组1为空白对照,即预诱导液中不含bFGF和诱导液中不含麝香多肽或麝香酮等诱导剂;对照组2为预诱导液中含bFGF,而诱导液中不含麝香多肽或麝香酮等诱导剂;对照组3为预诱导液中不含bFGF,而诱导液中含麝香多肽或麝香酮等诱导剂。每隔一定时间在倒置显微镜或相差显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 免疫细胞组化分析 取出盖玻片,用40 g/L多聚甲醛固定30 min,蒸馏水洗涤,干燥后加入体积分数0.5%的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液封闭内源性过氧化物酶30 min,蒸馏水洗涤,体积分数5%的正常羊血清封闭20 min,甩去封闭液,分别加入Nestin、NSE、NF-H、GFAP第一抗体(滴度分别为1:100, 1:100, 1:200, 1:1000),置 $37\ ^\circ\text{C}$  1h或 $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜, PBS洗涤3次后,滴加生物素化山羊抗小鼠/兔IgG,  $37\ ^\circ\text{C}$ 反应20 min, PBS洗涤3次后,加入SABC试剂,  $37\ ^\circ\text{C}$ 反应20 min, PBS洗涤4次。最后用新配制的DAB液在室温反应5~30 min,显微镜下监测其颜色变化。用 $0.01\ \text{mol/L}$  PBS替代一抗作为对照组,用正常大鼠脑冰冻切片作为细胞阳性对照,用成纤维细胞爬片作为细胞阴性对照。

1.2.5 神经分化的计数分析 rBMMSCs在经过诱导分化后进行免疫细胞组化分析,从每张细胞爬片的上、下、左、右、中5个方位分别选取2个不重复的视野计数神经元样细胞(NSE或NF染色阳性的细胞),并计算其每视野平均百分比例。共10个视野,求出 $x$ 。

## 2 结 果

### 2.1 rBMMSCs分离培养

细胞接种24h后可见部分大圆形单核细胞贴壁,骨髓中的造血干细胞不会贴壁,可在每次换液中逐渐清除掉。原代培养36~48h后贴壁的单核细胞开始增多,但仍保留圆形。72h后细胞开始增殖并出现多种形态,一型为成纤维细胞样细胞:细胞呈梭形并带有2~3个长的突起,细胞核较大,扁圆形,可见1~2个核仁。二型为大的、扁平的不定型的细胞:细胞不规则形态多样,胞体大,胞核为圆形或椭圆形,有多个核仁,胞浆可向不同方向伸出突起。还可见少量的纤维细胞型细胞(细小梭形,

为两极突起)、脂肪细胞(可见空泡样脂滴)。5~6 d,细胞逐渐形成分散的集落,多为一型或二型细胞,称之为成纤维细胞集落。10~12 d,细胞集落间相互融合成单层,排列具有一定方向性(图1a)。

## 2.2 rBMMSCs的传代培养

刚经传代的rMSCs呈圆形,迅速贴壁、伸展,重新变为梭形。传代培养过程中,rBMMSCs的倍增时间为3~5 d。

## 2.3 rBMMSCs的神经诱导

在用Mu-p进行诱导的组别中,rBMMSCs经过预诱导后,实验组中某些rBMMSCs便出现可见的形态变化。诱导2 h后,少数rBMMSCs出现明显的形态变化,胞质向核收缩,呈典型的核周体形态;在诱导后3~24 h中,rBMMSCs呈渐进性的向神经元样细胞转化,诱导12 h后,大多数rBMMSCs变为典型的神经元样细胞,其胞体向胞核收缩成锥形且变得致密及有折光性,有较多的长突起,有些长突起末端形成生长锥样的膨大及丝性伪足。多个神经元样细胞的突起可相互延伸并形成网状(图1b)。虽然在诱导24~36 h后,有部分细胞开始脱落、悬浮、直至死亡,但直到诱导后第7天,仍然有约10%的细胞存活。对照组1中rBMMSCs形态未见明显改变;对照组2中有少量神经元样细胞出现;对照组3中出现部分神经元样细胞。而在用Mu-n进行神经诱导的组别中,rBMMSCs折光

性有所增强,但未出现明显的形态改变,极少出现神经元样细胞,经免疫细胞组化染色分析也进一步证实了Mu-n不能在体外诱导rBMMSCs定向分化为神经元样细胞。

## 2.4 免疫细胞组化分析

为了进一步描述及证实诱导分化出来的神经元样细胞,分别进行了神经干细胞标志(nestin)、神经元特异性标志(NSE及NF-H)和星形胶质细胞特异性标志(GFAP)的免疫组化染色分析,发现神经元样细胞的胞体及部分突起 nestin、NSE 和 NF 染色呈强阳性(棕色),而未分化扁平 rBMMSCs 为阴性(图1c、1d、1e)。GFAP 染色为阴性(结果未显示)。从而进一步说明我们诱导分化所得的细胞为神经元,而不是星形胶质细胞。

## 2.5 神经分化的记数分析

结果见表1。从表1中可发现用Mu-p处理rBMMSCs后实验组出现NSE阳性的细胞约93.5%,出现NF阳性的细胞约为88.2%。对照组1中rBMMSCs形态未见明显改变;对照组2中有少量神经元样细胞出现(NSE阳性细胞和NF阳性细胞比例小于5%);对照组3中出现部分神经元样细胞(NSE阳性细胞比例约为36%,NF阳性细胞比例约为34%)。而用Mu-n处理的各组细胞未见明显改变,从而说明用上述定向诱导分化方法可获得高比例的神经元样细胞。

表1 大鼠骨髓间质干细胞神经诱导分化记数分析

Table 1 Counting analysis of the neural differentiation of rBMMSCs<sup>1)</sup>

(%)

	Mu-p <sup>2)</sup>			Mu-n <sup>3)</sup>				
	Experimental group	Control group 1	Control group 2	Control group 3	Experimental group	Control group 1	Control group 2	Control group 3
NSE <sup>+</sup> cells	93.5	1	5	36	6	1	5.5	2
NF <sup>+</sup> cells	88.2	1	4	34	5	1	5	1

1) rBMMSCs; rat bone marrow mesenchymal stem cells; 2) Mu-p: musk's polypeptide; 3) Mu-n: muscone

## 3 讨论

自从1999年Pittenger等<sup>[1]</sup>在Science杂志上报道了骨髓MSCs是骨髓中的另一类干细胞,且具有多向分化潜能后,因其取材方便,体内植入反应较弱,正逐渐受到学者们的广泛关注。骨髓间质干细胞除了已发现的可以转变为成骨细胞、软骨细胞等间叶组织外,近来的研究发现它也可以分化为神经细胞等非间叶组织细胞。Kopen等<sup>[7]</sup>将纯化后

的MSC注射到新生小鼠脑侧室,发现,BMMSCs在脑内发生迁移,在海马、嗅球、纹状体等部位均有MSC来源的神经胶质细胞和神经元的表达。2000年,Brazelton等<sup>[2]</sup>和Mezey等<sup>[3]</sup>两个研究小组又分别通过不同的方法观察到在体内条件下,外源性的BMMSCs在小鼠脑内可转变为神经元(表达NeuN、NF等神经元标志蛋白),这提示可以用BMMSCs治疗神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的可能性。

麝香是祖国医药中极其珍贵的药品之一。临床药效学研究表明:麝香有舒张血管、抗缺氧、促进苏醒、强心、抗炎及提高免疫力的作用。多用于心脑血管疾患及风湿、类风湿等变态反应性疾病的治疗。从20世纪70年代起,天然麝香有效成分的分析、含量测定及其药理作用的研究已日益受到重视。已分离出多种有效成分,并对其药效及药理作用进行了深入的研究。目前已知的天然麝香的化学成分包括:麝香酮、麝香吡啶类、C19甾体类、氨基酸、多肽和蛋白质成分,胆甾醇及其脂类成分,尿囊素,硫酸脂等。除了蛋白、多肽类成分外,其他成分已可以通过人工方法合成。近年的研究证明:麝香抗炎活性主要存在于水溶性部分的酸性蛋白多肽中,并且其抗炎作用是氢化可的松的36倍<sup>8</sup>。临床药效学研究表明:麝香有舒张血管、抗缺氧、促进苏醒、强心、抗炎及提高免疫力的作用。姜秋颖等<sup>9</sup>研究发现,麝香对体外培养的大鼠大脑神经细胞的生长分化和突起生长具有调节作用。

本课题组近几年来一直致力于各类干细胞的分离、增殖、鉴定、分化及其应用,并着重探讨了各类中药对骨髓MSCs向神经细胞的定向分化能力,获得了较好的结果。本课题组项鹏等<sup>10</sup>应用丹参注射液等中药诱导rBM MSCs在体外定向分化为神经元样细胞,但其比例较低[NSE阳性细胞比例为(61.2±3.4)%,NF阳性细胞比例为(58.1±3.1)%],而本研究应用Mu-p诱导rBM MSCs分化为神经元样细胞的比例极高(NSE阳性细胞比例高达93.5%,NF阳性细胞比例也高达88.2%)。除此之外,本研究所诱导出来的神经元样细胞可在体外成活时间较长(7d后仍有约10%的神经元成活)。从而可为临床应用打下基础。从表1结果可知,本研究采用麝香多肽可定向诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞,而麝香酮却无此特性,从而可进一步提示天然麝香的各种成分中,主要为麝香多肽对神经细胞的生长分化和突起生长具有重要的调节作用。由于BM MSCs取材方便、适合自体移植,因此在临床应用中比其他干细胞(包括神经干细胞和胚胎干细胞)更有优越性。同时,建立体外定向诱导模型,有助于我们研究BM MSCs分化为神经元的分子机理,为BM MSCs更广泛的分化提供理论基础。

由于本课题组同时应用本研究中所获得的神

经细胞进行了大鼠脊髓横断性损伤和大鼠帕金森病的细胞替代治疗,发现其可重建相应的神经功能,证明其在体内发挥了相应的神经细胞功能(这部分资料另文发表),因此,本研究中所获得的神经元样细胞极有可能是有功能的神经元。从本研究结果可知,利用一简单的处理程序便可定向诱导rBM MSCs分化为神经元样细胞。由于其具有易得性、易于体外培养性、克服了从神经系统分离NSCs的危险性、可自我更新性以及可进行自体移植而克服了与应用胎儿组织有关的伦理及免疫排斥问题等优点,从而使利用BM MSCs源性神经细胞治疗一系列神经疾病比其他干细胞具有更为明显的优势。

(本文图1a~1e见封2 Fig. 1a~1e shown in inside front cover)

#### 参考文献:

- [1] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiswal S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143.
- [2] Brazelton T R, Rossi F M V, Keshet G I, *et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice[J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1775.
- [3] Mezey E, Chandross K J, Harta G, *et al.* Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow[J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1779.
- [4] Horwitz E M, Prockop D J, Fitzpatrick L A, *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in chirden with osteogenesis imperfecta[J]. *Nat Med*, 1999, 5(3):309.
- [5] 柳雪枚,李虹奇,肖宣,等.天然麝香抗炎蛋白质的研究 I. Mu-a-1 的分离纯化及其部分性质的鉴定[J]. *动物学报*, 1992, 38(3): 302.
- [6] 肖庆忠,温冠媚,李浩威,等.成年大鼠骨髓间充质干细胞体外分化为神经元样细胞[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2001, 18(6): 323.
- [7] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G, *et al.* Marrow stromal cells migrate throughout the forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(19): 10711.
- [8] 王文杰,白金叶,程桂芳,等.麝香糖蛋白成分对B4激活的大鼠中性粒细胞功能的影响[J]. *中国中药杂志*, 1998, 23(4): 238.
- [9] 姜秋颖,张莹,张朝颖,等.麝香对体外培养大鼠大脑神经细胞的影响[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 1998, 32(4): 247.
- [10] 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[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(5): 321.

(编辑 张敏瑞)

麝香组分诱导成年大鼠骨髓间质干细胞体外定向分化为  
神经元样细胞的能力 (正文见第 405 页)

The Ability of Adult Rat Bone Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Neurons  
with Musk's Component *in vitro* (Text in page 405)

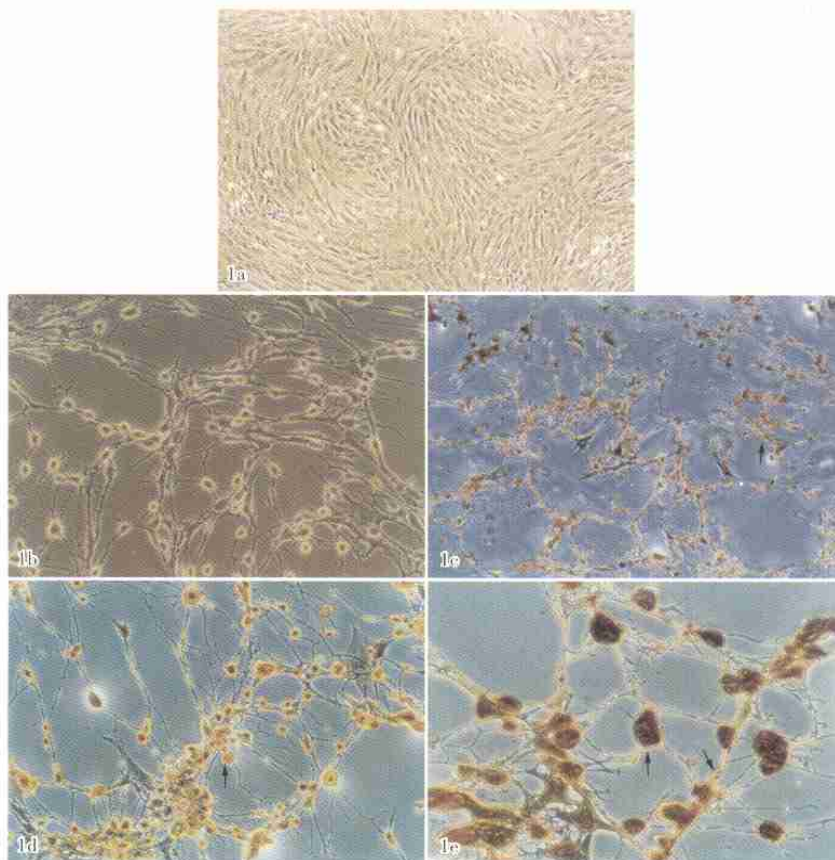


图 1a 第 5 代大鼠骨髓间质干细胞(rBMSCs)

图 1b 麝香多肽诱导 rBMSCs 12 h 后出现神经元样细胞,相差显微镜摄影

图 1c 神经元样细胞 Nestin 染色阳性(箭头)

图 1d 神经元样细胞 NSE 染色阳性(箭头),绿色箭头显示个别扁平、未分化的 BMSCs

图 1e 神经元样细胞 NF-H 染色阳性(箭头显示胞体和突起为染色阳性)

Fig. 1a Passage 5 rat bone marrow mesenchymal stem cells ( $\times 40$ )

Fig. 1b Phase contrast micrograph of neuronal differentiation of rBMSCs after 12 hours with Mu-P ( $\times 100$ )

Fig. 1c Nestin expression in differentiating neuron-like cells(arrow) ( $\times 40$ )

Fig. 1d NSE expression in differentiating neuron-like cells(arrow), green arrow showed flat, undifferentiated BMSCs ( $\times 100$ )

Fig. 1e NF-H expression in differentiating neuron-like cells, and process(arrow) ( $\times 200$ )