

三七总皂甙诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞

撒亚莲, 李海标

(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】用三七总皂甙(total Panax notoginseng saponins)在体外定向诱导 SD 青年鼠骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cell, rMSC)分化为神经元样细胞。【方法】用低糖 DMEM 冲洗骨髓腔, 收集骨髓细胞悬液, 接种在塑料培养瓶中。经体外扩增、纯化, 选用第 5 代后的间质干细胞进行诱导分化。用 $10 \mu\text{g/L}$ bFGF 预诱导 24 h, 更换成含三七总皂甙的无血清培养基 DMEM 诱导间质干细胞分化为神经元样细胞。用免疫组化 SABC 法鉴定神经丝蛋白(NF-M)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、巢蛋白(nestin)、微管联合蛋白-2(MAP-2)、生长相关蛋白-43(GAP-43)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。【结果】第 5 代间质干细胞形态达到均一, 呈梭形。用三七总皂甙诱导 30 min 到 5 h, 间质干细胞胞体逐渐增大并伸出细长突起, 形似神经细胞。免疫组化显示 NF-M、NSE、MAP-2、GAP-43、nestin 表达阳性, 而 GFAP 阴性。【结论】三七总皂甙可诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞。

关键词: 干细胞; 神经元; 三七皂甙; 细胞分化

中图分类号: R329.25

文献标识: A

文章编号: 1000-257X(2002)06-0409-02

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells with Total Panax Notoginseng Saponins SA Ya-lian, LI Hai-biao. (Department of Histology and Embryology, Zhongshan Medical College, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract 【Objective】To investigate the differentiation of mesenchymal stem cells of young rat(rMSCs) into neuron-like cells with total Panax notoginseng saponins(tPNS). 【Methods】rMSCs were separated from femur marrow flushed out with DMEM (low glucose) by using a needle and syringe, then planted in plastic culture flask. After 5 passages in culture, rMSCs were induced with total Panax notoginseng saponins(tPNS) to differentiate into neuron-like cells. Anti-neurofilament(NF-M), nestin, neuron-specific enolase(NSE), MAP-2, GAP-43 and glial fibrillary acidic protein(GFAP) antibodies were detected by immunohistochemistry. 【Results】rMSCs displayed a fibroblast-like morphology after 5 passage in culture. With $10 \mu\text{g/L}$ bFGF pre-induction for 24 hours, the medium was replaced with induction medium containing total Panax notoginseng saponins. The induced-rMSCs exhibited neuronal morphological characteristics from the first half an hour to 5 hours. The neuron-like cells positively expressed NF-M, NSE, MAP-2, GAP-43 and nestin, but didn't express glial astrocyte marker GFAP. 【Conclusion】rMSCs can be induced with total Panax notoginseng saponins *in vitro* to differentiate into neuron-like cells.

Key words: stem cells; neurons; sanchinoside; cell differentiation

干细胞具有自我更新、无限增殖及形成至少一种高分化后代的潜能^[1]。近年的研究表明在骨髓基质中存有间质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC), 体内外实验已证明它具有可塑性, 可跨越胚层界限, 向中胚层、内胚层和神经外胚层来源的组织细胞分化, 包括成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、肝细胞、神经元及星形胶质细胞等^[2-3]。由于 MSC 取材方便, 而且自体移植可避免排斥反应, 故成为组织工程中理想的种子细胞。如果在体外用特殊的方法改变 MSC 的分化方向或把细胞进行修饰后进行移植, 用于治疗某些疾病, 如: 帕金森病、脊髓损伤、中风和糖尿病等, 将对重建机体功能具有有

重要意义。三七总皂甙(total Panax notoginseng saponins, tPNS)是治疗心脑血管疾病的传统中药, 是从五加科人参属植物三七根提取的有效成分, 能特异性地阻断受体操纵性的钙离子通道, 具有活血祛瘀, 通脉止血, 保护脊髓、视神经及心脑血管缺血性损伤等作用^[4-6]。本实验探讨三七总皂甙对骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的诱导作用, 为三七总皂甙的临床应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 骨髓间质干细胞的分离培养

SD 青年鼠, 雌雄不限(校动物中心提供)。脱

收稿日期: 2002-05-23

基金项目: 国家重点基础研究(973)基金资助项目(G1999054301-2)

作者简介: 撒亚莲(1971-), 女, 云南开远人, 博士生, 李海标, 教授, 博士生导师, 课题主持人。

颈处死,快速在无菌条件下取出股骨,去除周围组织,PBS冲洗,剪断骨两端,用含100 mL/L胎牛血清(杭州四季青产品)的合成培养液(低糖DMEM,购自GIBCO BRL公司)冲洗骨髓腔,收集骨髓细胞悬液,接种在塑料培养瓶中(通常一只鼠的股骨骨髓细胞悬液接种在1个50 mL的培养瓶中)。5 d半量换液,以后每3 d全量换液1次。10~14 d细胞接近融合,用1.25 g/L胰酶消化传代。

1.2 定向诱导 rMSCs 向神经元样细胞分化

用5代以后的骨髓间质干细胞(rMSCs)进行诱导分化,以 $0.25 \times 10^9/L$ 接种到6孔培养板中,细胞达80%融合时,弃培养液,加入含 $10 \mu\text{g/L}$ 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的完全培养液预诱导24 h,PBS洗3次,更换成含 2.5 g/L 三七总皂甙的无血清培养液诱导,对照组不加任何诱导剂,继续用完全培养液培养。

1.3 诱导细胞鉴定

含 2.5 g/L 三七总皂甙的无血清培养液诱导细胞5 h,用 40 g/L 多聚甲醛在 4°C 固定30 min。PBS洗3次后,按免疫组化SABC法检测神经丝蛋白(NF-M)、神经元特异性烯醇化酶(NSE)、巢蛋白(nestin)、微管联合蛋白-2(MAP-2)、生长相关蛋白43(GAP-43)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达。对照组不加一抗。DAB显色后,随机数10个非重叠视野($\times 100$),计算NSE和MAP-2阳性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。

2 结果

2.1 间质干细胞的形态学特点

在原代,骨髓间质干细胞细胞呈簇样贴壁聚集生长,细胞形态多样,主要有内皮样细胞、成纤维样细胞及巨噬细胞等。经传代扩增,细胞到第5代时,基本纯化为间质干细胞。细胞长梭形,胞界清楚,胞核饱满居中,呈放射状或旋涡样排列(图1)。

2.2 诱导为神经元样细胞的形态变化

含bFGF的完全培养液预诱导骨髓间质干细胞24 h,细胞形态改变不明显,呈梭形。更换诱导液后30 min到5 h,间质干细胞胞体逐渐增大并伸出细长突起,在突起末端出现分支,部分相邻细胞的突起连接成网。对照组细胞呈长梭形,形态无明显变化。

2.3 免疫组化鉴定

三七总皂甙诱导间质干细胞转变为类似于神

经元的形态,经免疫组化鉴定,多数细胞表现为NF-M、NSE、MAP-2、GAP-43和nestin染色阳性,在胞质、突起中有棕黄色的物质,而GFAP染色为阴性(图2)。对照组细胞胞质中无棕黄色物质。三七总皂甙诱导间质干细胞转变为神经元样细胞,SABC法显示NSE和MAP-2阳性细胞数分别为 $71\% \pm 2.1\%$, $73\% \pm 2.5\%$ 。

3 讨论

在1867年,德国病理学家Cohnheim提出骨髓具有向造血组织以外的成分分化的功能^[7]。由于没受到重视,直到近年才开展起相关研究。骨髓是胚胎时期最后一个造血器官,由造血组织和基质构成,已证实在基质中具有多向分化潜能的间质干细胞,可分化为:成骨细胞、软骨细胞、肌细胞、肝细胞、神经元及星形胶质细胞等。Kopen等^[8]将MSC注射到新生小鼠侧脑室,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。Woodbury等^[3]用 β -巯基乙醇、二甲基亚砜及丁羟基茴醚等体外诱导大鼠和人的间质干细胞分化为神经元。

本实验按照Friedenstein的方法,直接把骨髓细胞悬液接种到塑料培养瓶中,利用MSC贴壁生长的特性获取。经换液、传代来纯化细胞,通常第5代细胞就为较均一的间质干细胞。本实验选用第5代后的细胞进行诱导。细胞增殖与分化是一对矛盾。细胞分化抑制细胞增殖,抑制细胞分化有利于细胞增殖。bFGF是一种有效的有丝分裂原和分化抑制因子,可影响中胚层、神经外胚层的细胞增殖和分化。本实验用含bFGF的完全培养液进行预诱导,使细胞处于较佳的增殖状态,细胞呈长梭形,无明显的形态改变。三七总皂甙诱导间质干细胞30 min,胞体逐渐增大并伸出细长突起似神经元。在5 h多数细胞表现为MAP-2、GAP-43、NF-M、NSE和nestin染色阳性,对照组为阴性。MAP-2、GAP-43、NF-M和NSE是神经元特异性标志物。NF-M是构成神经丝的主要蛋白,主要定位于成熟神经元的胞体和树突,而GAP-43是与细胞膜相连的磷酸蛋白,在神经系统发育或再生时,生长锥有高水平的表达,它可能与生长锥的形态改变和可塑性有关。微管联合蛋白-2(MAP-2)对维持微管的结构和功能有重要作用。高相对分子质量MAP-2

(下转第437页 to page 437)

高,本文2例均复发,故儿童肿瘤的自体 HSCT 应慎重。

文献报道和本文资料提示:allo-HSCT 治疗白血病的复发问题是患者死亡的首要问题,儿童白血病的任何治疗手段的目的是根治,延长生命是无任何意义的。因此,如何降低复发率,达到治愈是令人关注的焦点之一。移植后的免疫治疗以最终杀灭残留肿瘤细胞有可能是提高疗效的重要手段之一。目前 CML 移植后的免疫治疗主要是过继免疫治疗(DLI),已有大量的报道表明 DLI 是预防和治疗 CML 移植后复发的有效方法,但对 ALL 和 AML 患者疗效欠佳。我们对能找到供体淋巴细胞的患儿皆采取分次 DLI。2 例 allo-PBSCT 患儿(AML、CML)在首次 DLI 后出现 aGVHD,但很快控制。至于 DLI 的疗效,本文例数少,时间短,尚无法评价。但对于 UD-UCBT,无法进行移植后 DLI,因此必须寻找其它的免疫治疗方法。有意义的是本文中的例 3,于移植后 53 d 复发,予 2 个疗

程 IL-2 后骨髓象示完全缓解,但 4 周后再次复发。这可能与该患儿属预后差者,以及 IL-2 使用的时间或剂量不足有关。因此 IL-2 的用量及疗程尚须进一步探索。

参考文献:

- [1] 黄绍良, 方建培, 周敦华, 等. 脐血造血干细胞移植治疗重型 β -地中海贫血[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(11): 671.
- [2] 黄绍良, 方建培, 周敦华, 等. 脐血造血干细胞移植治疗重型 β -地中海贫血 1 例[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(2): 封 2.
- [3] 黄绍良, 方建培, 陈 纯, 等. 脐血造血干细胞移植治疗重型 β -地中海贫血[J]. 中华血液学杂志, 2001, 22(4): 182.
- [4] Gluckman E, Rocha V, Chastang C L, *et al.* Cord blood hematopoietic stem cell biology and transplantation[J]. Hematology, 1998, 36(1): 1.
- [5] Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors [J]. N Engl J Med, 1998, 339(11): 1565.
- [6] Gluckman E, Rocha V, Chastang C, *et al.* Cord blood banking and transplant in Europe[J]. Bone Marrow Transplant, 1998, 22 (Suppl 1): 68.

(编辑 张思健)

(上接第 410 页 from page 410)

主要分布于成熟神经元内,而低相对分子质量 MAP-2 主要分布于发育的神经元内。Nestin 为神经前身细胞的中间丝蛋白,可作为神经干细胞的标记物,当它分化为神经元或神经胶质细胞后,这种中间丝蛋白逐渐消失。星形胶质细胞标志物 GFAP 染色为阴性。表明三七总皂甙诱导间质干细胞为神经元样细胞而不是星形胶质细胞。细胞形态变化可能与刺激因子引起细胞骨架结构(微丝、微管及中间丝等)重排有关。项鹏等^[9]首次报道用中药丹参注射液在体外可诱导人骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞,他们认为可能与丹参的抗氧化作用有关。过去的研究表明三七总皂甙是特异性钙离子通道阻断剂。有实验提示三七总皂甙可抑制钙离子内流,减轻脊髓和视神经损伤过程中由于钙离子内流所引起的损伤,对神经元有保护作用^[4~6]。它能诱导 rMSCs 向神经元样细胞分化是否与阻断钙离子通道有关呢?至于其诱导分化的机理及其信号传导通路,诱导分化后的神经元样细胞是否具有神经元的功能等问题仍有待今后进一步研究。

(本文图 1, 2 见插页 1. Fig 1, 2 shown in back coloured page 1)

参考文献:

- [1] Watt F M, Hogan B L. Out of Eden; stem cells and their niches [J]. Science, 2000, 287(5457): 1427.
- [2] Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells[J]. Science, 1999, 284(5411): 143.
- [3] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364.
- [4] Guan Y Y, Kwan C Y, He H, *et al.* Effects of panax notoginseng saponins on receptor-operated Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1994, 15(5): 392.
- [5] 何颖红, 李海标. 三七总皂甙对成年地鼠视网膜节细胞存活的影响[J]. 中山医科大学学报, 1998, 19(3): 175.
- [6] 何凤慈, 龙在云, 周 立, 等. 三七总皂甙对大鼠脊髓损伤组织总钙和脂质过氧化的作用[J]. 第三军医大学学报, 1993, 15(15): 426.
- [7] Prockop D J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. Science, 1997, 276(5309): 71.
- [8] Kopen G C, Prockop D J, Phinney D G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(19): 10711.
- [9] 项 鹏, 夏文杰, 王连英, 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[J]. 2001, 22(5): 321.

(编辑 张思健)

三七总皂甙诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞 (正文见第 409 页)

Differentiation of Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells with Total Panax
Notoginseng Saponins (Text in page 409)

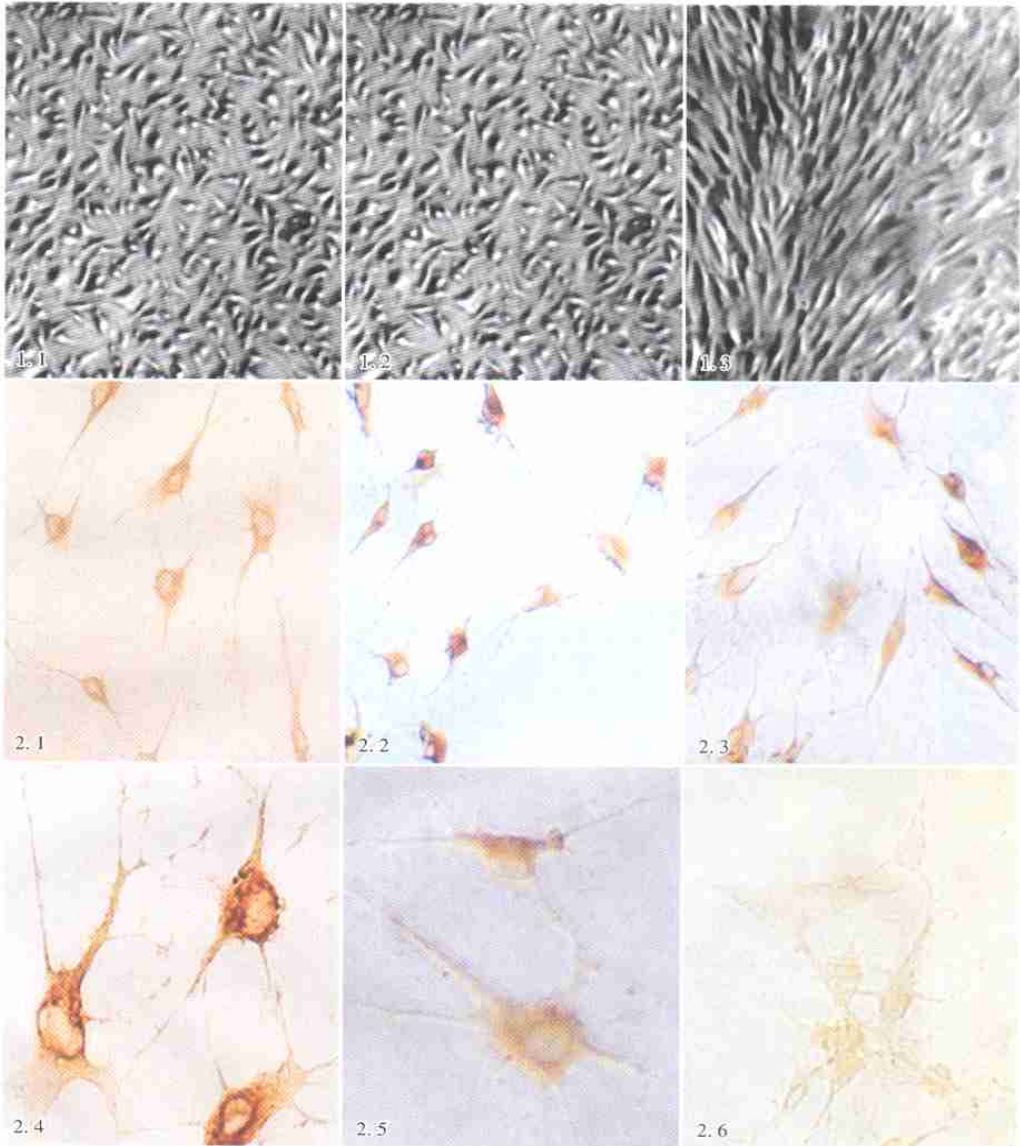


图 1 体外培养的骨髓间质干细胞

图 2 三七总皂甙诱导骨髓间质干细胞为神经元样细胞

Fig. 1 The bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro*

1. 1: the primary cells; 1. 2: the third passage cells; 1. 3: the fifth passage cells. Scale bar: 1. 1, 1. 2, 1. 3 50 μm

Fig. 2 The rMSCs can be induced to differentiate into neuron-like cells by total Panax notoginseng saponins

(The expression of MAP2, GAP43, NF, NSE and nestin were positive, but GFAP didn't express)

(2. 1: MAP2; 2. 2: nestin; 2. 3: NSE; 2. 4: NF; 2. 5: GAP43; 2. 6: GFAP)

Scale bar: 2. 1, 2. 2, 2. 3, 2. 6 50 μm ; 2. 4, 2. 5 100 μm