DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2001.0112

·基础研究·

丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞

项 鹏[1],夏文杰[1],王连荣[1],陈振光[2],张丽蓉[3],张秀明[1],李 艳[1],李树浓[1]

(中山医科大学 1.病理生理教研室,2.附属第一医院心胸外科,广东 广州 510089;
3.广东药学院病理生理教研室,广东 广州 510224)

摘 要:【目的】丹参注射液体外定向诱导成人骨髓间质干细胞(MSC)分化为神经元样细胞。【方法】采用Ficoll-Paque液离心分离成人MSC,体外扩增,流式细胞仪检测MSC表面抗原表达,分别采用含丹参注射液或硫代甘油等试剂的无血清达乐伯克改良必需基本培养基(DMEM)诱导MSC分化为神经元,免疫组化鉴定神经元特异性烯醇化酶(NSE)、神经丝蛋白(NF-M)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、巢蛋白(nestin)的表达。【结果】成人骨髓间质干细胞在体外扩增原代可获得0.5×10^6,15代可获得(2~3)×10^{12}个细胞,细胞流式细胞仪检测结果显示CD29、CD44、CD90、CD105、CD166表达阳性,CD11a、CD14、CD34、CD38、CD45、CD80、CD86为阴性。加入丹参或硫代甘油诱导后,MSC胞体收缩,突起伸出;免疫组化显示诱导出的神经元样细胞NSE、NF-M、nestin表达阳性,GFAP阴性。【结论】丹参可以在体外诱导成人骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞。

关键词:骨髓间质干细胞;神经元;丹参注射液;细胞分化

中图分类号:R329.2 文献标识码:A 文章编号:1000-257X(2001)05-0321-04

Differentiaton of Human Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells with Danshen Injection

XIANG Peng[1], XIA Wen-jie[1], WANG Lian-rong[1], CHEN Zhen-guang[2], ZHANG Li-rong[3], ZHANG Xiu-ming[1], LI Yan[1], LI Shu-nong[1]

(1. Department of Pathophysiology, 2. Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089; 3. Department of Pathophysiology, Guangdong Pharmcology College, Guangzhou 510224)

Abstract:【Objective】To investigate the differentiation of human mesenchymal stem cells(hMSC) into neuron-like cells with Danshen injection (*Salvia miltiorrhiza*).【Methods】hMSC were separated from rib marrow with Ficoll-Paque reagent and expanded in culture medium. To detect the surface antigens, the labeled cells were analysed on a FACScan flow cytometer. hMSC were induced to differentiate into neurons with DMEM/Danshen injection or DMEM/monothioglycerol respectively. Neuron-specific enolase(NSE), neurofilament(NF), Nestin, glial fibrillary acidic protein(GFAP) were detected by immunohistochemistry.【Results】hMSC were expanded as undifferentiated cells in culture for more than 15 passages. The isolated cultured MSC comprised a single phenotypic population and displayed a fibroblast-like morphology. These expanded attached MSC were uniformly positive for CD29、CD44、CD90、CD105、CD166 and didn't express CD11a、CD14、CD34、CD38、CD45、CD80、CD86. Simple methods with Danshen injection induced-hMSC exhibit a neuronal phenotype, expressing NSE, NF-M, Nestin at 5 hours. But the neuron-like cells didn't express the glial astrocyte marker GFAP.【Conclusion】hMSC can be induced to differentiate into neurons with *Salvia miltiorrhiza*.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cells; neurons; Danshen injection; cell differentiation

收稿日期:2001-07-03

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(G1999054300)

作者简介:项 鹏(1973-),男,安徽合肥人,博士后,李树浓,课题负责人。

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

骨髓间质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)除参与构成造血微环境外还具有多向分化潜能,一定条件下可分化为成骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等[1],在组织工程和细胞治疗等方面具有广阔应用前景。Kopen 等[2]发现 MSC 注射到新生鼠侧脑室后可分化为神经元和神经胶质细胞,但体内复杂的环境限制了对 MSC 分化为神经细胞机理的研究。因此,建立一种体外定向诱导分化体系十分重要。本实验室以往研究发现 β-巯基乙醇、硫代甘油等抗氧化剂可成功诱导 MSC 分化为神经元样细胞[3]。中药丹参(*Salvia miltiorrhiza*)是目前临床治疗心脑血管疾病一种常用药,它在 MSC 分化为神经细胞的作用很值得我们探讨。

1 材料与方法

1.1 材 料

成人骨髓来源于非血液系统疾病的胸外科手术中摘取的肋骨。达乐伯克改良必需基本培养基(L-DMEM,购自 GIBCO BRL 公司),胎牛血清购自 Hyclone 公司、Ficoll-Paque 分离液购自 Pharmacia 公司,荧光标记抗小鼠抗人抗体 CD11a-FITC、CD14-PE、CD29-PE、CD34-PE、CD38-PE、CD45-FITC、CD86-FITC、CD90-PE 购自 Pharmigen 公司,CD44-FITC、CD80-FITC、CD105-FITC、CD166-FITC 购自 Ancell 公司,碱性成纤维生长因子(bFGF)购自 R&D 公司,硫代甘油购自 Sigma 公司,复方丹参注射液购自河南神草制药有限公司,小鼠抗人神经元烯醇化酶(NSE)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)购自 Maxim 公司,小鼠抗人神经丝蛋白(NF-M)单抗购自 Neomarkers 公司,小鼠抗人巢蛋白(nestin)单抗为美国 Dr. Messam 惠赠,超敏 SP(鼠)试剂盒购自 MBI 公司,DAB 显色试剂盒购自 DAKO 公司。

1.2 MSC 的分离[5]

无菌条件下,用含 100 mL/L 胎牛血清(FCS)的 L-DMEM 冲出骨髓,充分混匀,转入离心管,上海 LXJ-Ⅱ型离心机 1 500 r/min 离心(半径 16 cm),弃上清及脂肪层,沉淀用 L-DMEM 充分混匀,轻轻叠加到密度 1.077 的 Ficoll-Paque 分离液上,2 500 r/min 离心 30 min,收集单核细胞层,用 L-DMEM 洗涤两次,重新悬浮细胞。调整细胞数密度,按 2×10^6/mL 接种,37 ℃饱和湿度的 CO_2 孵箱培养,3 d 后更换培养液,弃去未贴壁细胞,3~4 d 换液 1 次,至细胞完全融合,结束原代培养。

1.3 MSC 的传代扩增

接近融合的 MSC 用含 0.1 mmol/L EDTA 的 2.5 g/L 胰酶室温消化 5~10 min,1 500 r/min 离心 20 min,收集沉淀按 1∶3 比例传代,进行扩增培养。取细胞融合达 90% 的第 1 代(P1)、第 5 代(P5)、第 10 代(P10)、第 15 代(P15)的 hMSC,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,胰酶消化成单个细胞悬液,将细胞悬液移入离心管内,1 500 r/min 离心 15 min,弃去上清液,加入 L-DMEM 培养液制成单细胞悬液,细胞计数,调整细胞数为 $2\times10^3/cm^2$,然后以每孔相同的细胞数接种于 6 孔板内,依次于培养后第 1 天,第 2 天……第 9 天消化细胞,作细胞计数。

1.4 MSC 的鉴定

培养细胞胰酶消化,PBS 洗涤 3 次,分别加入荧光标记的抗体,4 ℃孵育 30 min,洗去未标记抗体,10 g/L 多聚甲醛固定,应用 FACScan 流式细胞仪检测细胞表面抗原表达。

1.5 定向诱导 MSC 向神经元分化

传至 P5、P10 的 MSC 按 0.4×10^6/mL 接种于事先放置有消毒盖玻片的六孔板内制备细胞爬片。丹参诱导组细胞用含 bFGF 的 DMEM(200 mL/L FCS)预诱导 24 h,更换培养液,洗涤 3 次,再加入含复方丹参注射液的无血清 DMEM 诱导 5 h。硫代甘油诱导组细胞用含 1 mmol/L 硫代甘油等试剂的 DMEM(200 mL/L FCS)预诱导 24 h,更换培养液,洗涤 3 次,再加入含 5 mmol/L 硫代甘油等试剂的无血清 DMEM 诱导 5 h.。对照组不加任何诱导剂。每组包括 18 个细胞爬片。

1.6 诱导细胞鉴定

诱导细胞用 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min,洗涤后加入过氧化物酶阻断剂,非免疫性动物血清封闭,分别加入 NSE 单抗、GFAP 单抗、NF-M 单抗(1∶100 稀释)、巢蛋白单抗(1∶100 稀释)室温孵育 1 h,洗涤后加入生物素标记的二抗,室温孵育 10 min,再加入亲和素一过氧化物酶孵育 10 min,DAB 液显色,中性树胶封固。丹参及硫代甘油诱导组的细胞免疫组化染色后光镜下随机数取 10 个非重叠视野(×100),计算 NSE 和 NF-M 阳性细胞占总细胞数的比例,结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结 果

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1　**MSC** 的分离、扩增

骨髓单核细胞悬液接种于塑料培养瓶后, 细胞呈圆形, 散在分布于瓶底。72 h 后完全换液去除未贴壁血细胞, 此时贴壁细胞呈长梭形, 为单个或几个细胞的克隆(图 1.1)。培养的 2 ~ 5 d 为生长潜伏期, 细胞增殖较慢, 细胞数变化不明显。6 ~ 12 d 为细胞快速增殖期, 集落中的细胞不断增殖, 排列有一定方向性呈"旋涡样"生长。培养至 15 ~ 18 d, 每个克隆约数百至数千个细胞, 集落间细胞出现重叠, 粘附于贴壁细胞之上的杂细胞在换液过程中逐渐被清除, 细胞接近 90 %融合时原代培养结束(图 1.2), 大约可获得(0.5 ~ 0.6)× 10^6 个细胞。

2.2　**MSC** 的传代培养

传代 hMSC 呈圆形, 簇状分布。24 h 内完全贴壁、伸展并重新变为长梭形; 生长迅速, 生长潜伏期较短, 为 1 ~ 2 d; 3 ~ 6 d 是细胞快速增殖期, 6 ~ 9 d 增殖速度减慢进入平台期, 10 d 左右达到完全融合。体外扩增 5 代, 细胞数为 0.1× 10^9 左右; 体外扩增 10 代, 细胞数为 20× 10^9 左右; 扩增 15 代, 细胞数为(2 ~ 3)× 10^{12} 个。细胞生长曲线显示(图 2), 随着传代次数增加细胞增殖速度逐渐下降, P15 代后细胞衰老、核固缩, 并有细胞从培养板脱落。

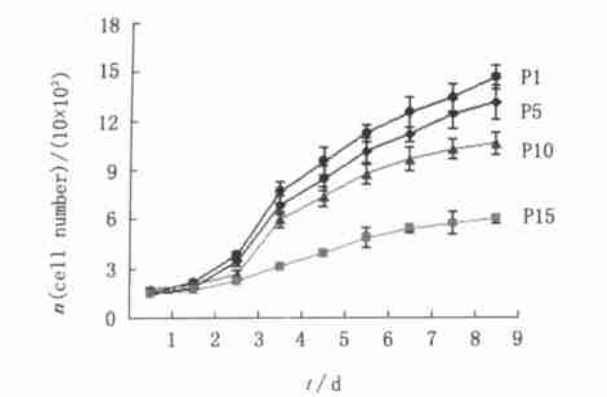

图 2　人骨髓间质干细胞 **P1**、**P5**、**P10**、**P15** 代生长曲线

Fig. 2　The growth curve of P1, P5, P10, P15 passage of human mesenchymal stem cells

2.3　**MSC** 表面抗原鉴定

流式细胞仪结果显示细胞均一性较好, 二代细胞均一性在 95 %以上, CD11a、CD14、CD34、CD38、CD45、CD80、CD86 表达为阴性。CD29、CD44、CD90、CD105、CD166 表达阳性。

2.4　光镜下观察 **MSC** 诱导为神经元的形态变化

MSC 在含 bFGF 的 DMEM 预诱导液中处理 24 h 后, 加入诱导液 1 h 后细胞形态改变, 原来宽大扁平的 MSC 胞质向核收缩, 呈典型的核周体形态, 5 h 后大多数细胞均转变为类似神经元形态, 突起伸出(轴突), 轴突末端出现一级和二级分支, 类似树突(图 1.3), 部分细胞拉成网状; 对照组细胞仍保持宽大扁平形态。5 h 后小部分细胞从培养板上脱落。但诱导时间延长后细胞仍能存活, 最长可至第 5 天。硫代甘油诱导组诱导结果与丹参诱导组相似, 但超过 5 h 后大部分细胞从培养板上脱落。

2.5　免疫组化鉴定

为进一步确定 MSC 是否分化为神经元, 采用神经元标志物 NSE、NF-M, 神经干细胞标志物巢蛋白, 星形胶质细胞标志物 GFAP 进行鉴定。结果显示, 丹参诱导 5 h 后, 多数细胞表现为 NSE 阳性棕黄色染色, 细胞形态多样, 出现简单的双极细胞和复杂的多极细胞(图 1.4)。对照组无阳性细胞出现。NF 是神经元特异性中间纤维, 是神经元胞质主要结构之一, NF 免疫组化结果与 NSE 类似, 部分细胞胞体与突触皆为阳性(图 1.5)。诱导 5 h 后多数细胞巢蛋白染色阳性, 证明该细胞具有神经干细胞特性(图 1.6)。GFAP 免疫组化染色显示无阳性细胞, 证明本研究诱导 MSC 分化为神经元而非星形胶质细胞。硫代甘油诱导后免疫组化结果与丹参诱导组相似。

随机记数 10 个视野, 计算结果显示丹参诱导后多数细胞转变为神经元样细胞, NSE 阳性细胞为(61.2 ± 3.4)%, NF-M 阳性细胞为(58.1 ± 3.1)%; 硫代甘油诱导组, NSE 阳性细胞为(70.8 ±2.7)%, NF-M 阳性细胞为(68.2±2.3)%。

3　讨　论

骨髓间质干细胞具有高度自我更新能力和多向分化潜能, 是细胞治疗的候选细胞之一。2000 年 Brazelton[4] 和 Mezey[5] 分别通过不同方法观察到体内条件下外源性 MSC 在小鼠脑内可转变为神经元(表达 NF 等神经元标志蛋白), 提示可用 MSC 治疗神经退行性疾病和中枢神经系统损伤。上述研究均在体内进行, 若能在体外建立 MSC 定向诱导为神经元的模型, 将对研究神经系统发育机理具有重要意义。

本研究基于 Fredenstein 方法进行改进, 从成人骨髓中分离得到骨髓间质干细胞, 并在体外大量

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

扩增,传至 15 代时可得到大约(2~3)×10^{12}个细胞,该发现为临床应用 MSC 奠定了基础。流式细胞仪研究细胞表面抗原发现,MSC 表面不表达造血细胞表面抗原,造血前体细胞标志抗原 CD34、成熟造血细胞标志抗原 CD38、白细胞标志抗原 CD45、淋巴细胞表面抗原 CD11a、单核细胞/巨噬细胞表面抗原 CD14 等均为阴性,证明 MSC 为非造血类细胞。另外 MSC 不表达共刺激分子 CD80(B7-1)、CD86(B7-2),提示 MSC 具有异体移植可行性。MSC 表达的表面标志具有非单一性,它表达间质细胞、内皮细胞和表皮细胞的表面标志[6],目前认为 CD29、CD44、CD105、CD166 为 MSC 的标志抗原。本研究结果发现上述标志抗原均为阳性,证实该细胞为骨髓间质干细胞。

体外定向诱导研究发现在无血清 DMEM 中加入硫代甘油等试剂诱导 5 h 后,MSC 转变为神经元样细胞,但该细胞存活时间较短。采用 bFGF 预诱导,复方丹参注射液诱导 5 h 后,MSC 也可转变为神经元样细胞,并有神经突起出现。巢蛋白是一种中间丝蛋白,为神经干细胞特异性标志物,本研究显示诱导 5 h 后的神经元巢蛋白表达阳性,证明该细胞具有部分神经干细胞特性。神经元标志物 NSE、NF-M 表达也为阳性,对照组无阳性细胞,证明该细胞不仅形态学发生改变,而且在分子水平上也发生改变。NF 是一种细胞骨架蛋白,包括大、中、小 3 种亚单位,是构成神经元胞体和突起的重要结构。本研究发现大部分细胞胞体和突起均为阳性,部分细胞只有胞体阳性,可能该细胞尚处于神经元前体细胞阶段。GFAP 标志物染色为阴性,证明该细胞不是星形胶质细胞。利用该方法诱导虽然诱导率比硫代甘油组略低,但细胞存活时间较长,本研究观察至第 5 天仍有神经元样细胞存活。其确切诱导机制尚不清楚,其中 bFGF 可能参与骨髓间质干细胞向神经元分化的启动,有报道显示纤维生长因子家族成员在胚胎干细胞分化为神经细胞中起重要作用[7],而且 bFGF 对神经干细胞的增殖也有作用。Ishii 等[8]发现巯基乙醇等抗氧化剂有助于神经元在体外存活。本实验室以往的研究证实硫代甘油、巯基乙醇、叔丁基对甲氧酚等抗氧化剂可诱导 MSC 分化为神经元样细胞。丹参含有丹参酮、总丹酚酸等多种抗氧化成分,治疗缺血性脑血管病具有良好疗效。吴俊芳等[9]发现总丹酚酸可降低神经细胞缺氧损伤时的细胞死亡率,其机理可能与减少脂质过氧化物生成有关。因此作者认为丹参的诱导机理可能也与其具有抗氧化作用有关。本研究显示采用丹参以及硫代甘油可定向诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞,发现除神经干细胞外骨髓间质干细胞也可以分化为神经元。MSC 取材方便,适合自体移植,因此在临床应用上比神经干细胞更有优越性。同时,建立体外定向诱导模型,有助于研究 MSC 分化为神经元的分子机理,为 MSC 更广泛的分化提供理论基础。但目前关于丹参诱导 MSC 分化为神经元的确切机制仍有待进一步研究。

(本文图 1.1~1.6 见插页 1)

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] 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 USA, 1999, 96(19): 10711.

[3] 项 鹏, 夏文杰, 张丽蓉, 等. 成人骨髓间质干细胞定向诱导为神经元样细胞的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(5): 385.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Conget P A, Minguell J J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenclymal progenitor cells [J]. J Cell Physiol, 1999, 181(1): 67.

[7] Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro A C, *et al*. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro* [J]. Mech Dev, 1996, 59(1): 89.

[8] Ishii K, Katayama M, Hori K, *et al*. Effects of 2-mercaptoethanol on survival and differentiation of fetal mouse brain neurons cultured *in vitro* [J]. Neurosci Lett, 1993, 163(2): 159.

[9] 吴俊芳, 王 洁, 张均田. 总丹酚酸对小鼠脑缺氧的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学杂志, 1999, 4(4): 261.

(编辑 张敏瑞)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

丹参注射液诱导间质干细胞分化为神经元样细胞 （正文见第 321 页）

Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Neuron-like Cells with Danshen Injection (Text in page 321)

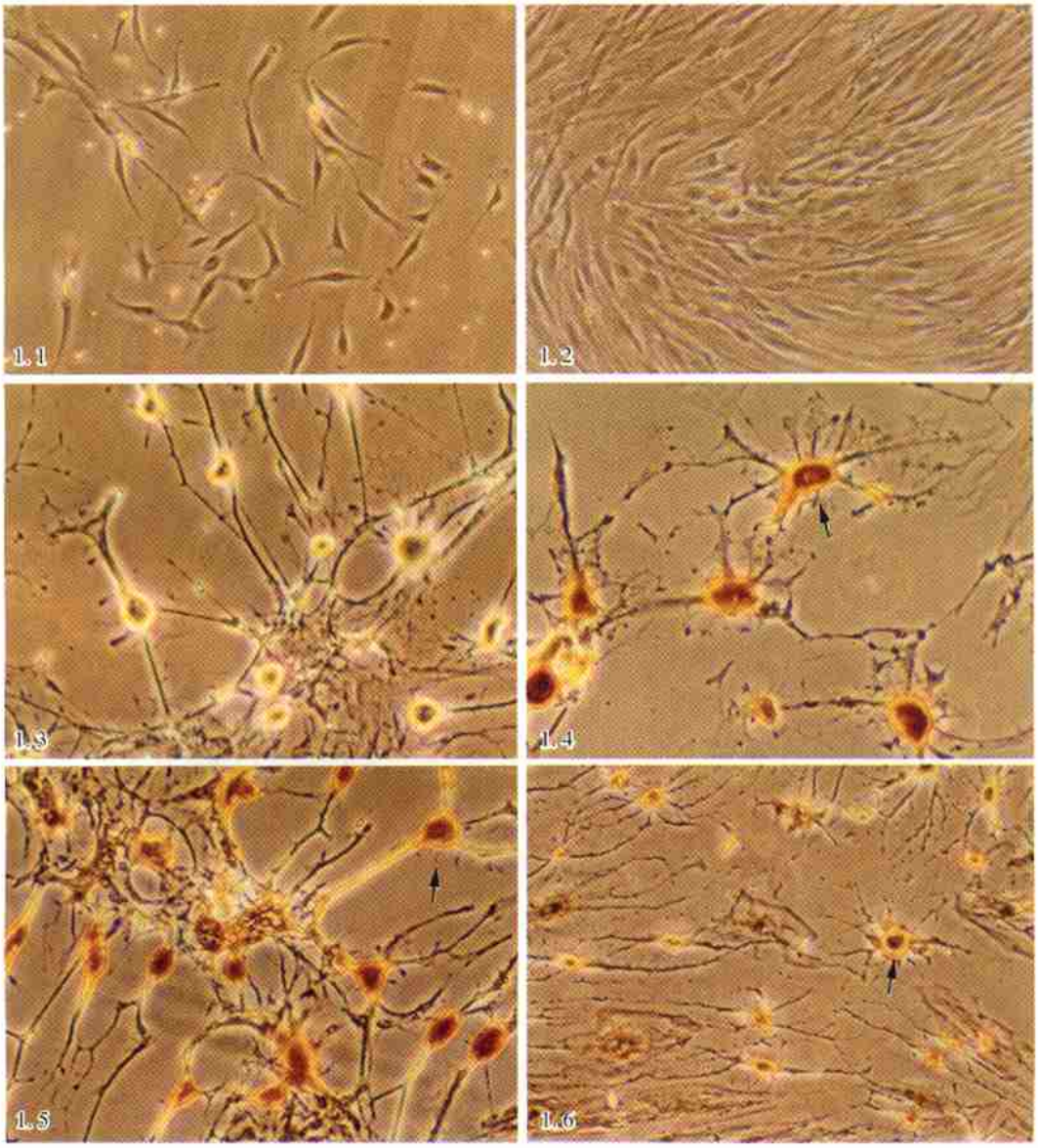

图 1.1　72 h 贴壁的原代骨髓间质干细胞

图 1.2　原代骨髓间质干细胞贴壁 15 d 后达到融合

图 1.3　丹参注射液诱导 5 h 后出现神经元样细胞，相差显微镜摄影

图 1.4　神经元样细胞 NSE 染色阳性（↑）

图 1.5　神经元样细胞 NF-M 染色阳性（↑）

图 1.6　神经元样细胞 Nestin 染色阳性（↑）

Fig. 1.1　Primary mesenchymal stem cells were cultured at 72 h after plating (×40)

Fig. 1.2　Primary mesenchymal stem cells reach to confluence at 15 d after plating (×40)

Fig. 1.3　Phase contrast micrograph of neuronal differentiation after 5 h with Danshen injection (×100)

Fig. 1.4　NSE expression(↑) in differentiating neuron-like cells (×100)

Fig. 1.5　NF-M expression(↑)in differentiating neuron-like cells (×100)

Fig. 1.6　Nestin expression(↑)in differentiating neuron-like cells (×40)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net