

补肾填精法促进骨髓基质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究

刘黎青*, 李娟, 王媛, 周雪颖
(山东中医药大学, 济南 250355)

[摘要] 目的:探讨补肾填精方右归丸含药血清体外诱导大鼠骨髓基质干细胞分化为神经元样细胞的作用。方法:用 DMEM/F-12 培养液培养 Wistar 大鼠骨髓基质干细胞(BMSCs)。用右归丸含药血清诱导 BMSCs 分化后,倒置显微镜观察细胞形态变化;用尼氏染色法观察神经细胞特征性结构;用免疫细胞化学染色法鉴定神经胶质细胞标志物胶质纤维酸性蛋白(GFAP)及神经细胞特异性标志物神经元特异性烯醇化酶(NSE),微管相关蛋白-2(MAP-2)的表达。结果:诱导 6 h 后,骨髓基质干细胞胞体收缩,有突起伸出;诱导 24 h 后突起增多形成网络结构;尼氏染色法显示诱导后的细胞胞体中有尼氏体。免疫细胞化学染色示 NSE 及 MAP-2 阳性表达,GFAP 无表达。结论:右归丸含药血清可以体外诱导大鼠骨髓基质干细胞分化为神经元样细胞。

[关键词] 补肾填精; 骨髓基质干细胞; 分化; 右归丸

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0283-04

[doi] 10.11653/syjf2013180283

Experiment Research of Inducing Bone Marrow Stem Cells to Differentiate into Neurons-like Cells by Way of Tonifying Kindey Essence

LIU Li-qing*, LI Juan, WANG Yuan, ZHOU Xue-ying
(Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the effect of the serum containing Yougui Pill in inducing bone marrow stem cells to differentiate into neurons-like cells *in vitro*. **Method:** Rat bone marrow stromal stem cells (BMSCs) was cultured in DMEM/F-12 medium and inducted into neurons-like cells by serum containing Yougui Pill. The morphologic changes were observed by light microscope, the specific characteristic structures of neurons cells were observed using Nissl's staining method, glial fiber acidic protein (GFAP), neuron specific enolase (NSE) and microtubule-associated protein-2 (MAP-2) were detected by immunohistochemistry. **Result:** By induction, BMSCs' body shranked and showed processes after 6 hours; the prominences interlaced to net, forming typical nerve fiber net after 24 hours; trachychromatic Nissl body was found in cytolymph. The NSE and MAP-2 were determined by immunohistochemistry, GFAP was undetermined. **Conclusion:** BMSCs could be inducted into neurons-like cells *in vitro* by serum containing Yougui Pill.

[Key words] tonifying the kindey essence; bone marrow stem cells; differentiate; yougui pill

骨髓基质干细胞(bone marrow stromal cells,

BMSCs)是起源于骨髓支持结构的成体干细胞^[1],具有自我更新^[2]和多向分化能力^[3]。在一定诱导条件下 BMSCs 可向成骨细胞^[4]、成肌细胞^[5]、脂肪细胞及神经细胞^[6]等不同的谱系分化。几千年来,传统中医药在防治神经系统疾病方面积累了丰富的经验,并取得了较好的疗效。随着中药提纯技术的发展,使以中药制剂作为诱导剂来治疗疾病的研究

[收稿日期] 20121211(015)

[基金项目] 山东省自然科学基金项目(2009ZRB02563)

[通讯作者] * 刘黎青,教授,从事中西医结合防治心脑血管病的基础与临床研究, Tel: 15910090496, E-mail: 15910090496@163.com

成为可能,且中药制剂作为诱导剂具有毒副作用小,可应用于人体移植等优势。本实验拟采用补肾填精方右归丸含药血清,探索其体外诱导大鼠 BMSCs 分化为神经元样细胞的可行性。

1 材料

1.1 动物 细胞培养取材动物为 6 周龄清洁级 Wistar 雄性大鼠,体重 140 ~ 180 g,由山东大学实验动物中心提供[合格证号 SCXK(鲁)20090001]。含药血清制备动物采用清洁级 Wistar 雄性大鼠,体重 160 ~ 200 g,由山东大学实验动物中心提供[合格证号 SCXK(鲁)20090001]。

1.2 药品及试剂 补肾填精方汤剂制备按照熟地黄-山药-山茱萸-枸杞子-菟丝子-鹿角胶-杜仲-肉桂-当归-制附子 8:4:3:3:4:4:4:2:3:2 的比例称取各饮片(购自漱玉平民大药房),加水 5 倍量,浸泡 30 min,武火加热至药液沸腾,改为文火保持微沸 20 min,滤过,药渣加水 3.3 倍量,武火加热至沸腾,文火保持微沸 15 min,滤过,合并 2 次煎液,浓缩,放置室温,离心,上清液浓缩,定容至每毫升含生药 1.8 g, -20 °C 冻存备用。

优级胎牛血清、胰蛋白酶购自 Gibco 公司; DMEM/F12 培养液购自 Hyclone 公司;甲苯胺蓝购自沃凯;神经元特异性烯醇化酶(NSE)抗体、微管相关蛋白 2(MAP-2)抗体、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体、即用型 SABC 免疫细胞化学染色试剂盒、抗体稀释液、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司。

1.3 仪器 立式压力蒸气灭菌器 LDZX-50FBS, GZY-DH 型电热恒温干燥箱;超净工作台;CO₂ 细胞培养箱;倒置相差显微镜;医用离心机;酶联免疫检测仪。

2 方法

2.1 大鼠 BMSCs 的分离与培养 将脱颈处死的大鼠置于无菌条件下迅速取出双侧的肱骨、胫骨和股骨,用含青链霉素的培养液冲洗骨髓腔,PBS 清洗 2 次后,接种到一次性塑料细胞培养瓶中。3 d 后换液,细胞 90% 以上融合时进行传代培养。

2.2 右归丸含药血清的制备 根据《医用实验动物学》及黄臣虎^[7]等的研究,确定含药血清的制备方法:大鼠给药前禁食 6 ~ 12 h,不禁水。大鼠给药量根据《人和动物按体表面积折算的等效剂量比值表》中人鼠体表面积法换算,以 16 g·kg⁻¹ 给予补肾填精方汤剂,空白对照组给予等量生理盐水灌胃。每日 2 次,连续 3 d,末次给药后 1 h,无菌操作下腹主动脉取血,静置 2 h 后,以 3 000 r·min⁻¹ 离心

15 min,提取血清,同组血清混匀(有溶血的剔除),56 °C 水浴,灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤器过滤除菌,-20 °C 冻存备用。用时以无血清 DMEM/F12 培养液稀释为 2.5% 含药血清。

2.3 骨髓基质干细胞的诱导分化 取 3 ~ 6 代细胞,进行诱导分化,具体步骤如下:①将大鼠 BMSCs 消化后,以密度为 1 × 10⁵ 个/孔接种于预先置有盖玻片的 6 孔培养板中,培养 1 d。②接种第 2 天,吸除培养液,右归丸含药血清组加入 1 mL 诱导液,空白对照组加入 1 mL 细胞完全培养液,DMSO 对照组加入 1 mL 含 2.5% DMSO 的 DMEM/F12 培养液。③右归丸含药血清组细胞诱导 6 h 后,各组按步骤②换液,继续培养 24 h 后进行各指标的检测。

2.4 尼氏染色 将诱导后的细胞爬片;0.02 mol·L⁻¹ PBS 轻轻漂洗细胞爬片 1 ~ 2 次,每次 1 min;4% 多聚甲醛固定至少 1 h,0.02 mol·L⁻¹ PBS 漂洗 2 次,每次 5 min;置 50 ~ 60 °C 温箱,甲苯胺蓝染色 60 min;由 70% 到 100% 梯度乙醇分色,同时镜下观察控制分色时间,每步 2 ~ 3 s;双蒸水冲洗,自然干燥;中性树胶封片。

2.5 免疫细胞化学染色检测神经细胞标志物 免疫细胞化学染色实验中,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以大鼠神经胶质瘤细胞作为 GFAP 的阳性对照,以大鼠神经母细胞瘤细胞作为 NSE, MAP-2 的阳性对照。4% 多聚甲醛固定 30 min,蒸馏水洗;30% H₂O₂-蒸馏水(1:10)混合,室温 5 ~ 10 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗 3 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,不洗;滴加适当稀释的一抗(1:200),37 °C 孵育 1 h, PBS 洗 2 min × 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG, 20 ~ 37 °C 20 min, PBS 洗 2 min × 3 次;滴加试剂 SABC, 20 ~ 37 °C 20 min, PBS 洗 5 min × 4 次;然后除去 PBS,加新鲜配制的 DAB 溶液进行显色处理,取 1 mL 蒸馏水,加显色剂 A, B, C 各 1 滴,混匀。加至标本上,室温显色,镜下控制反应时间,一般在 5 ~ 30 min。蒸馏水洗涤;脱水,中性树胶封片,显微镜观察。每张玻片采用双人双盲随机计数 100 个细胞,计算阳性细胞百分比。

2.6 统计学处理 以 $\bar{x} \pm s$ 表示实验数据,用 SPSS 17.0 统计软件对数据作处理,采用 *t* 检验和单因素方差分析对数据进行分析,*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组 BMSCs 诱导前后形态学变化 倒置显

显微镜下观察发现,细胞接种 1 d 后部分细胞已贴壁,且折光性较强,呈圆形;3 d 后,贴壁的部分细胞已伸展为梭形、三角形或不规则形的扁平宽阔细胞,折光性差,立体感不强(图 1);未贴壁的细胞随着换液被去除;接种 4~5 d 后,开始有克隆形成;待克隆细胞间的融合达到 90% 以上时,进行首次传代。

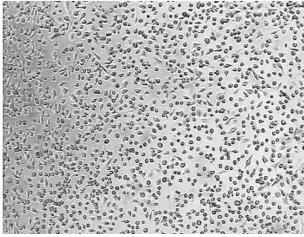
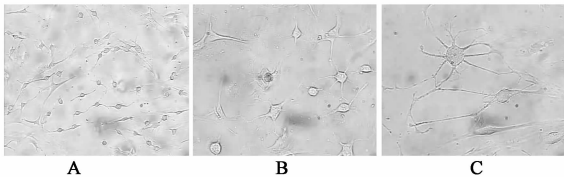


图 1 BMSCs 原代第 4 天(100 ×)

右归丸含药血清组诱导 BMSCs 3 h 后,部分细胞形态开始出现变化;诱导 6 h 后,细胞的胞体开始收缩变圆并有突起形成,且突起与突起间互相连接,细胞折光性明显增强;诱导 24 h 后突起增多形成网络结构;随诱导时间的延长,神经元样细胞数目增多,突起增长,但同时有少量细胞脱落、死亡(图 2)。倒置显微镜下观察,经含药血清诱导 30 h 后 BMSCs 的分化率为(84.13 ± 3.26)%。

空白对照组无明显形态学变化。DMSO 组细胞可见胞体有突起形成,但细胞形态和数量明显不及右归丸含药血清组。



A. 100 ×; B. 200 ×; C. 400 ×

图 2 BMSCs 诱导后形态

3.2 尼氏染色 诱导后的神经元样细胞胞核淡染,核仁清晰,胞质内可见大量团块状或颗粒状的被甲苯胺蓝染成紫蓝色的尼氏小体(图 3)。

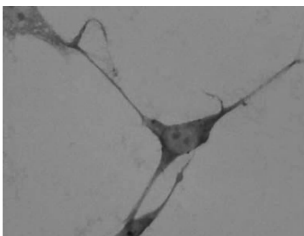


图 3 诱导后尼氏体染色(400 ×)

3.3 免疫细胞化学染色 诱导前 NSE, MAP-2 有个

别表达,诱导后的细胞的 NSE 和 MAP-2 均出现强阳性表达(图 4,5);表达率分别为(42.40 ± 3.67)% , (25.58 ± 3.73)% (表 1,2),神经胶质细胞标记物 GFAP 在各组细胞中均无表达。

表 1 各组细胞诱导前后 NSE 的表达情况($\bar{x} \pm s$) %

组别	诱导前 NSE 阳性 表达率	诱导后 NSE 阳性 表达率
空白对照	0.57 ± 0.43	1.13 ± 0.65
DMSO 对照	0.34 ± 0.23	0.43 ± 0.44
右归丸含药血清	0.75 ± 0.34	42.40 ± 3.67 ¹⁾

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 各组细胞诱导前后 MAP-2 的表达情况($\bar{x} \pm s$) %

组别	诱导前 MAP-2 阳性 表达率	诱导后 MAP-2 阳性 表达率
空白对照	0.47 ± 0.32	0.33 ± 0.34
DMSO 对照	0.37 ± 0.43	0.21 ± 0.32
右归丸含药血清	0.82 ± 0.47	25.58 ± 3.73 ¹⁾

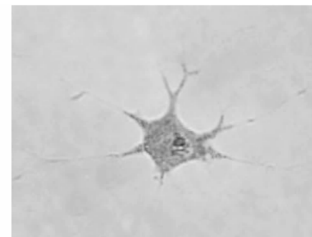


图 4 诱导后 NSE 的表达(400 ×)

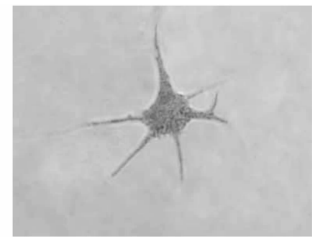


图 5 诱导后 MAP-2 的表达(400 ×)

4 讨论

神经组织一直被认为是高分化组织,神经细胞死亡后不能再生。但近年来的研究表明,由其他组织中分离得到的、经诱导定向分化为神经元样细胞的干细胞,有助于修复受损的神经组织,已成为治疗神经系统疾病的一种重要方法。骨髓基质干细胞具有自我更新和多向分化能力,因其取材方便、容易纯化、短时间内可以大量扩增、不存在免疫排斥、无伦理道德争议而备受关注,成为目前国内外干细胞研究领域的热点。国内学者根据干细胞的研究进展,结合中医基础理论分别从精的来源和精的繁衍生殖、生长发育、骨髓化血、濡养脏腑四大功能研究发

现,精与干细胞有较大的相关性^[8],其中先天之精与干细胞直接相关,其禀受于父母的生殖之精,即来自父的精子与母的卵子结合而成的受精卵,为全能干细胞;精的繁衍生殖功能,与生殖干细胞相关;生长发育功能,与成体干细胞的增殖分化相关;骨髓造血功能,分别与骨髓基质干细胞及神经干细胞和造血干细胞相关。

《景岳全书·新方八阵·补阵》曰:“右归丸,治元阳不足,或先天察衰,或劳伤过度,以致命门火衰……俱速宜益火之原,以培右肾之元阳,而神气自强矣,此方主之。”右归丸由熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、鹿角胶、杜仲、肉桂、当归、制附子组成,具有温补肾阳、填精益髓的功用^[9]。有研究表明,右归丸可降低海马区 Asp, Glu, Gly, GABA 及杏仁核部位 Asp, Glu, Gly 的含量,主要调节海马区氨基酸类神经递质,不同程度纠正递质代谢的紊乱,使兴奋性和抑制性氨基酸这两大类递质最终趋向平衡,改善大脑边缘系统功能^[10]。右归丸能够提高老年大鼠下丘脑 N-甲基 D-天门冬氨酸(NMDA)受体 NMDAR1(谷氨酸受体亚型之一)、GABA 受体 GABAAR α 1 蛋白的表达;提高海马 DG, CA1, CA2, CA3 分区低下的脑源性神经营养因子(BDNF)、酪氨酸激酶受体 B(TrkB)mRNA 的表达,改善学习记忆功能^[11]。以中药制剂作为诱导剂不仅能够成功的达到诱导分化的效果^[12-15],而且具有比化学诱导剂毒副作用小,适宜于人体移植等优势,从而有利于提高临床 BMSCs 移植治疗中枢神经系统疾病的疗效和安全性。

NSE, MAP-2 是神经细胞的标志物。NSE 在正常脑组织中含量最高,是糖酵解中的裂解酶;MAP-2 是组成神经元细胞骨架的重要组成成分。实验中右归丸含药血清诱导所得神经元样细胞 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。

结果表明补肾填精方右归丸含药血清可在体外诱导大鼠 BMSCs 分化为神经元样细胞。为进一步探索中医学的补肾填精法促进骨髓基质干细胞向神经元样细胞分化、增加新生神经细胞的数量,从而为神经系统疾病的治疗提供一定的实验依据。

[参考文献]

[1] Krause D S. Plasticity of marrow-derived stem cells[J]. Gene Ther, 2002, 9(11):754.

[2] Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, et al. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell [J]. Kobe J Med Sci, 2007, 53(1/2):25.

[3] Lin H T, Tarng Y W, Chen Y C, et al. Using human plasma supplemented medium to cultivate human bone marrow-derived mesenchymal stem cell and Evaluation of its multiple-lineage potential[J]. Transplant Proc, 2005, 37(11):4504.

[4] Lisheng W, Meng E, Guo Z. High mobility group box1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4):805.

[5] 闫晓风,叶晔杰,刘会洋,等.骨髓间充质干细胞向肌成纤维细胞转化及一贯煎的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(22):123.

[6] Mercedes Zurita, Celia Bonilla, Laura Otero, et al. Neural transdifferentiation of bone marrow stromal cells obtained by chemical agents is a short-time reversible phenomenon[J]. Neurosci Res, 2008, 60(3):275.

[7] 黄臣虎,陆茵,高骁君,等.中药血清药理学研究进展[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10):266.

[8] Zhang J, Xu Z W. Induction of the differentiation of mesenchymal stem cells of nerve system by invigorating the kidneys[J]. Mod Hosp, 2004, 4(9):15.

[9] 朱维芳,丁小梅.右归丸临床应用[J].湖北中医杂志, 1999, 21(8):369.

[10] 康湘萍,金国琴,龚张斌,等.左归丸、右归丸对老年大鼠下丘脑氨基酸类神经递质受体表达的影响[J].中药药理与临床, 2007, 23(3):6.

[11] 戴薇薇,金国琴,张学礼,等.补肾方药对衰老大鼠海马学习记忆相关基因 BDNF 及其受体 TrkB mRNA 表达的影响[J].中华中医药杂志, 2008, 23(4):296.

[12] 谭峰,樊巧玲,王明艳,等.左归丸对 SD 大鼠骨髓间充质干细胞增殖的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13):145.

[13] 刘黎青,高艳霞,周盛年,等.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[J].中医杂志, 2008, 49(9):836.

[14] 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[J].山东中医药大学学报, 2006, 30(4):339.

[15] 杜红阳,付海燕,包翠芬,等.地黄多糖对大鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞诱导分化作用的研究[J].中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6):1337.

[责任编辑 邹晓翠]