

红景天苷体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞**◇

张全伟^{1,2}, 赵兴绪¹, 赵红斌², 张 明², 杨银书³, 葛宝丰²◇

Salidroside induced rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells *in vitro*

Zhang Quan-wei^{1,2}, Zhao Xing-xu¹, Zhao Hong-bin², Zhang Ming², Yang Yin-shu³, Ge Bao-feng²◇

Abstract

BACKGROUND: Preliminary experiments have demonstrated that salidroside (SD) can induce bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) to differentiate into neural-like cells. However, little is known about how SD affects BMSCs differentiation into neural-like cells.

OBJECTIVE: To investigate the molecular mechanism by which SD induces BMSCs to differentiate into neural-like cells.

METHODS: Passage 2 Wistar rat BMSCs were divided into a retinoic acid (RA) group, SD group, and a control group. Cells were observed at different time points.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression levels of neural stem cell marker nestin, neural cell differentiation-related to rabbit anti-microtubule protein and microtubule-associated protein 2 (MAP2) in the RA and SD groups were significantly higher than those in the control group at each time point ($P < 0.01$). The expression level of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the RA group was significantly higher than that in the SD group ($P < 0.01$). Real-time PCR results suggested that there were neuron-specific enolase (NSE) and MAP2 mRNA expressions in the RA and SD groups at each time point. The expression level depended but not absolutely on induction time. The high abundance of GFAP mRNA in the RA and SD groups appeared in the early stage of induction. NSE protein expression in the RA and SD groups was significantly increased with prolongation of induction time and rabbit anti-microtubule protein appeared in the early stage of induction. These findings suggest that SD, similar to RA, can promote BMSCs to differentiate toward neural cells, but it exhibits better effects on differentiation towards neural-like cells than RA.

Zhang QW, Zhao XX, Zhao HB, Zhang M, Yang YS, Ge BF. Salidroside induced rat bone marrow mesenchymal stem cells to differentiate into neuron-like cells *in vitro*. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(14): 2496-2504.

[http://www.crter.cn http://en.zgckf.com]

摘要

背景: 前期实验证明红景天苷能诱导骨髓间充质干细胞向神经元样细胞定向分化, 但是具体的影响方式尚不清楚。

目的: 以骨髓间充质干细胞为研究对象, 进一步探讨红景天苷诱导其向神经元样细胞定向分化的作用方式和分子机制。

方法: 选取第2代 Wistar 大鼠骨髓间充质干细胞, 按照不同的诱导剂分为维甲酸诱导组、红景天苷诱导组和对对照组, 通过不同的时间点对细胞进行观察。

结果与结论: 两诱导组细胞不同时间点神经干细胞标志物巢蛋白、神经细胞分化相关的兔抗微管蛋白和神经微管相关蛋白 2 表达阳性率均高于对照组($P < 0.01$); 神经胶质纤维酸性蛋白阳性率维甲酸组显著高于红景天苷组($P < 0.01$)。Real Time-PCR 结果显示, 维甲酸和红景天苷诱导不同时间, 两组细胞均有神经细胞相关基因神经特异性烯醇化酶、神经微管相关蛋白 2 mRNA 表达, 与诱导时间有关且不完全相同, 两组间神经胶质纤维酸性蛋白 mRNA 的高丰度出现于诱导早期; 诱导后两组神经特异性烯醇化酶蛋白的表达随时间延长显著增加, 兔抗微管蛋白表达出现于诱导早期。说明红景天苷能促进骨髓间充质干细胞向神经细胞分化, 其诱导效应与维甲酸相似, 且向神经元样细胞定向分化方面优于维甲酸。

关键词: 红景天苷; 维甲酸; 骨髓间充质干细胞; 神经元样细胞; 分化

缩略语注释: BMSCs: bone marrow mesenchymal stem cells, 骨髓间充质干细胞; NSE: neuron specific enolase, 神经特异性烯醇化酶; MAP2: microtubule-associated protein 2, 神经微管相关蛋白 2; GFAP: glial fibrillary acidic protein, 神经胶质纤维酸性蛋白

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.14.006

张全伟, 赵兴绪, 赵红斌, 张明, 杨银书, 葛宝丰. 红景天苷体外诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(14):2496-2504. [http://www.crter.org http://cn.zgckf.com]

0 引言

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)在不同条件下能向成骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、心肌细胞甚至神经细胞分化^[1-3]。中枢神经系统的损伤、修复一直是神经生物学研究的重点和热点, 随着

干细胞研究的不断深入, 利用干细胞治疗神经系统性疾病是未来发展的必由之路, 但是由于目前使用的干细胞诱导剂普遍存在一定的毒性, 不能应用于临床。相关文献报道中国传统中药对干细胞具有诱导分化功能^[4-5], 中药单体作为干细胞诱导剂具有以下优势: ①无细胞毒性。②价格低廉。③具有定向诱导功能。基于以上理由, 中药单体作为干细胞诱导剂具有潜在的应用价值。

¹College of Life Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China;
²Institute of Bone Injury, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China;
³Lanzhou Military Region Center for Disease Control and Prevention of Chinese PLA, Lanzhou 730020, Gansu Province, China

Zhang Quan-wei★, Studying for master's degree, College of Life Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China; Institute of Bone Injury, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China zqwfree826@163.com

Corresponding author: Zhao Hong-bin, Doctor, Master's supervisor, Associate chief technician, Institute of Bone Injury, Lanzhou General Hospital of Lanzhou Military Area Command of Chinese PLA, Lanzhou 730050, Gansu Province, China zhao6703@yahoo.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 81073156*

Received: 2011-09-06
Accepted: 2011-09-28

中国传统藏药红景天苷具有强抗氧化性和具有保护神经之功能的特点, 实验研究红景天苷对BMSCs向神经细胞定向分化的作用及影响, 系统阐明红景天苷影响BMSCs向神经细胞定向分化的基本过程, 以期为进一步揭示红景天苷影响BMSCs向神经细胞定向分化的分子机制研究提供理论依据^[6-10]。

1 材料和方法

设计: 分子水平、细胞水平体外观察。

时间及地点: 于2010-09/2011-05在解放军兰州军区兰州总医院骨科研究所完成。

材料:

实验动物: 健康成年Wistar大鼠5只, 雌性, 体质量(100±20) g, 实验动物许可证号: 甘医动字960016号。动物饲养环境为清洁级, 实验过程对动物的处置符合相关动物伦理学要求。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
D/F12 培养基	美国 GIBCO
胎牛血清	杭州四季青公司
CD90-FITC、CD106-FITC、CD45-PE、CD34-PE	EB 公司
兔抗小鼠神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)、巢蛋白、神经微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2)、兔抗微管蛋白(β -Tubulin III)和神经胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)	英国 Abcam 公司
β -actin	中国中杉金桥生物公司
Trizol 试剂	大连宝生物公司
牛血清白蛋白	Spain 公司
红景天苷标准品	中国药品生物制品检定所
全反式维甲酸	美国 Sigma 公司
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo Revco, USA
倒置相差显微镜	OLYMPUS, Japan
荧光定量 PCR7300system	Applied Biosystems 公司
紫外分光光度计、台式高速冷冻离心机	Heraeus, German
电泳仪、电转移仪和酶标仪	Bio-Rad 公司

方法:

BMSCs的分离培养: 成年Wistar大鼠颈椎脱臼处死, 无菌条件下取出大鼠的胫骨、股骨, 10 mL培养液反复冲洗骨髓腔^[11]。接种于底面积为25 cm²的一次性培养瓶中。置37 °C体积分数5% CO₂培养箱中培养48 h后弃未贴壁细胞,

每周更换2次完全D/F12培养液。待细胞80%融合后, 2.5 g/L胰酶消化传代。

BMSCs的鉴定: 采用单色直接免疫荧光标记检测, 取第2代BMSCs, 胰酶消化, 制成浓度为1×10⁹细胞悬液, 每个待测管中200 μ L细胞悬液, 分别加入CD90、CD106 (FITC标记1:50)、CD45、CD34(PE标记1:50)室温孵育30 min, 同时设立同型对照(FITC和PE标记的mouse IgG1)。孵育结束后PBS洗3次, 行流式细胞仪检测, 以上实验均需避光操作。

BMSCs的诱导分化: 选取第2代BMSCs作为研究对象, 实验分为3组: 维甲酸诱导组给予5 μ g/L维甲酸; 红景天苷诱导组给予20 mg/L的红景天苷; 对照组: 继续给予完全培养基, 待细胞达80%融合后按不同时间加药诱导。

BrdU计数增殖: 用含体积分数10%胎牛血清的培养液配成单个细胞悬液, 以每孔3 000个细胞接种到六孔板爬片, 同一培养条件, 培养3~5 d。在细胞贴壁后开始诱导, 分别加入2 mL的诱导液, 加入诱导液12 h加入BrdU于24, 48和72 h的细胞做BrdU检测。40 g/L的多聚甲醛固定30 min, PBS洗3次2 mol/L盐酸37 °C作用30 min, 0.1 mol/L硝酸钠作用10 min, Triton作用10 min, H₂O₂作用20 min, 羊血清封闭30 min; 滴加一抗(阴性对照用PBS代替一抗), 置湿盒中4 °C过夜, PBS洗3次, 滴加FITC标记的二抗, 37 °C避光孵育30 min, PBS洗3次, 滴加终浓度为5 mg/L的DAPI, 室温避光孵育5~10 min, PBS洗3次, 滴加磷酸甘油封固, 荧光显微镜观察、拍照。随机抽取5张玻片, 每张玻片200倍视野下随机选取4个视野, 计数阳性细胞总数。

荧光免疫细胞化学染色: 各组细胞按照12, 24, 48, 72 h, 6, 12 d进行诱导。荧光免疫细胞化学染色法检测诱导前后3组 β -Tubulin III、NSE、MAP2、巢蛋白和GFAP的表达情况。细胞爬片在4 °C冷甲醛过夜, PBS洗3次; Triton作用10 min, H₂O₂作用20 min, 羊血清封闭30 min; 滴加一抗(阴性对照用PBS代替一抗), 置湿盒中4 °C过夜, PBS洗3次, 滴加FITC标记的二抗, 37 °C避光孵育30 min, PBS洗3次, 滴加终浓度为5 mg/L的DAPI, 室温避光孵育5~10 min, PBS洗3次, 滴加磷酸甘油封固, 荧光显微镜观察、拍照。随机抽取5张玻片, 每张玻片200倍视野下随机选取4个视野, 计数阳性细胞总数。

$$\text{阳性率} = (\text{阳性细胞数} / \text{总细胞数})$$

¹ 甘肃农业大学生命科学院, 甘肃省兰州市 730070; ² 解放军兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃省兰州市 730050; ³ 解放军兰州军区疾病预防控制中心, 甘肃省兰州市 730030

张全伟★, 男, 1986年生, 甘肃省张掖市人, 汉族, 甘肃农业大学在读硕士, 主要从事发育生物学方面的研究。
zqwfree826@163.com

通讯作者: 赵红斌, 硕士生导师, 博士, 副主任技师, 解放军兰州军区兰州总医院骨科研究所, 甘肃省兰州市 730050
zhao6703@yahoo.com.cn

中图分类号: R394.2
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)14-02496-09

收稿日期: 2011-09-06
修回日期: 2011-09-28
(20110716003/D · C)

Real Time-PCR检测: 各组细胞按照30 min、1 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h进行诱导, 提取Total RNA, 检测RNA的完整性, 在分光光度计下检测其浓度, 取500 ng总RNA进行PrimeScript™ RT-PCR试剂盒合成cDNA, 反应体系为10 μ L, 反应条件为37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s。通过荧光定量PCR-7300两步法扩增, 反应体系为20 μ L, 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 31 s, 分别检测NSE、巢蛋白、 β -TubulinIII、GFAP和MAP2 mRNA的表达水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据处理。

根据NCBI/Genebank公布的各基因相应mRNA序列, 使用Primer Premier 5.0引物设计软件设计引物, 由大连宝生物服务有限公司合成, 见表1。

表1 Real time-PCR 引物序列及反应条件
Table 1 Real time-PCR primers and reaction conditions

Gene	Primers (5'-3')	Size of the products	GENEbank
<i>Nestin</i>	F: CAG CAA CTG GCA CAC CTC AAG R: CCT CGT CCA GGT GTC TGC AA	101 bp	NM-016701
<i>NSE</i>	F: TCG CCA CAT TGC TCA ACT R: AAC TCA GAG GCA GCC ACA TC	131 bp	NM-013509
<i>MAP2</i>	F: CAG AAC AAA CAG CTG CAC TGG A R: TCT AAA GGC TCA GCG AAT GAG GA	88 bp	NM-023279
<i>Nurr1</i>	F: CCA ATC CGG CAA TGA CCA G R: GGA CTC AAG GTC GCA GGT CAA	129 bp	NM-013613
<i>GFAP</i>	F: AGT GGC CAC CAG TAA CAT GCAA R: GGA CTC AAG GTC GCA GGT CAA	163 bp	BC1393571
<i>GAPDH</i>	F: TAT CGG ACG CCT GGT TAC R: CTG TGC CGT TGA ACT TGC	140 bp	NM-008084

免疫印记分析: 待细胞80%融合后, 胰酶消化接种至6孔板, 待细胞80%融合后加药开始诱导12, 24, 48, 72, 96 h提取蛋白。BMSCs用冷PBS洗3次, 加入细胞裂解液800 μ L, 在冰上裂解30 min, 反复吹打使其充分裂解后, 移入1.5 mL离心管, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心15 min, 收集上清, 测定蛋白浓度。每组取15 μ g总蛋白, 12% SDS-PAGE分离蛋白, 运用电转移法将蛋白转移至PVDF膜。5%脱脂奶粉室温封闭2 h, 加兔抗小鼠 β -actin(1:1 000, 一抗)、兔抗小鼠NSE(1:1 000, 一抗), 加兔抗小鼠 β -TubulinIII (1:1 000, 一抗)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, 洗膜后加HRP标记的羊抗兔二抗(1:5 000), 37 $^{\circ}$ C孵育2 h, 化学发光法ECL显影。

主要观察指标: ①细胞流式技术检测细胞表型。②荧光免疫细胞化学染色观察细胞形态和与神经细胞相关标志分子的表达。③BrdU检测细胞增殖。④Real-Time PCR和Western blot分别检测与神经细胞相关标志分子基因和蛋白的表达。

统计学分析: Western blot结果应用IPP 6.0软件对

各特异性产物条带进行累计吸光度检测(A), 将实验数据输入SPSS 17.0统计软件, 采用单因素的方差分析进行统计学检验, 试验重复3次。

2 结果

2.1 BMSCs的鉴定结果 流式细胞检测结果显示, BMSCs CD90表达阳性, 阳性率为95.24%, CD106表达阳性, 阳性率为92.21%, 而CD45和CD34表达为阴性, 见图1。结果提示, 本实验分离、培养的细胞符合国际公认的BMSCs的标准。

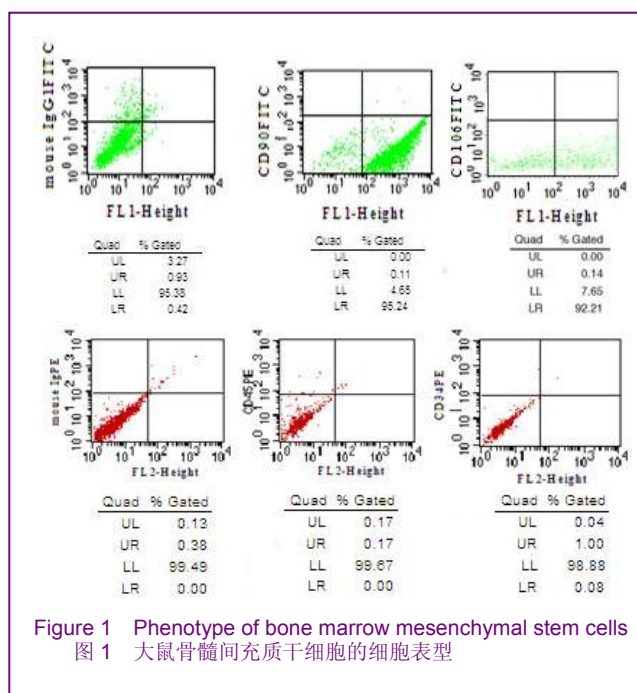


Figure 1 Phenotype of bone marrow mesenchymal stem cells
图1 大鼠骨髓间充质干细胞的细胞表型

2.2 细胞形态观察 利用免疫荧光化学方法标记细胞骨架 β -Tubulin观察诱导前后细胞的形态结构, 见图2。

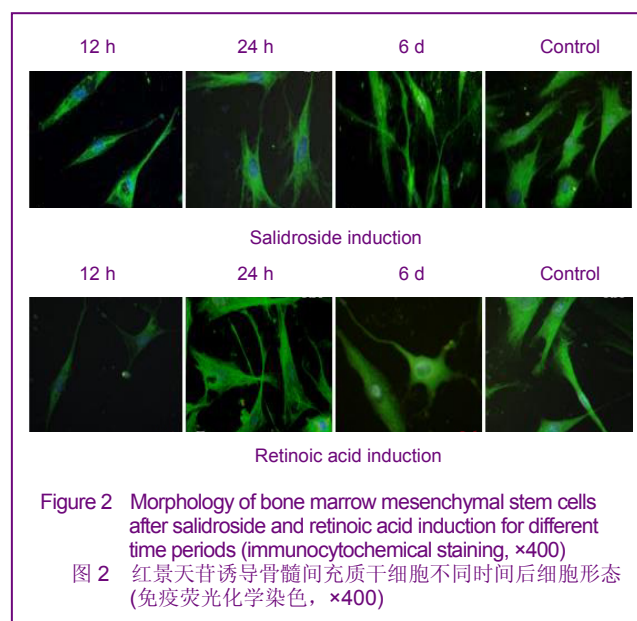
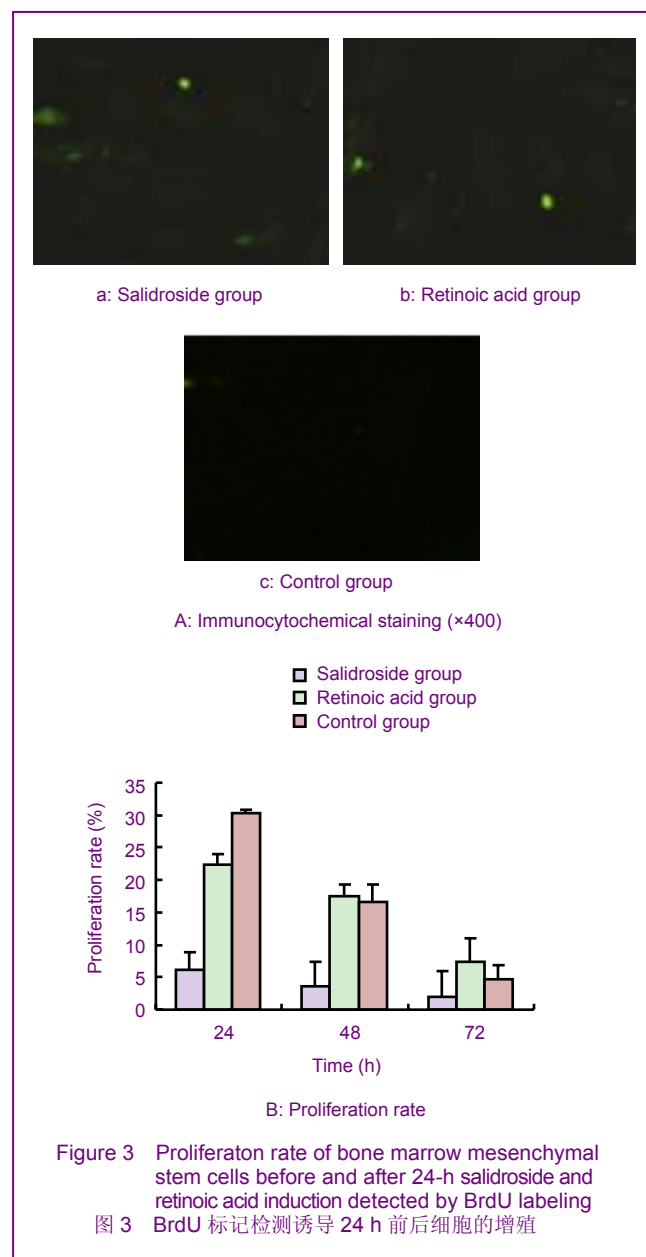


Figure 2 Morphology of bone marrow mesenchymal stem cells after salidroside and retinoic acid induction for different time periods (immunocytochemical staining, $\times 400$)
图2 红景天苷诱导骨髓间充质干细胞不同时间后细胞形态(免疫荧光化学染色, $\times 400$)

结果显示, 诱导前BMSCs形态多呈多角形或纺锤形, 红景天苷诱导12 h时可见部分细胞胞体变大, 有突起形成, 24 h后大多数细胞胞体普遍增大、可见2个以上不等的突起形成, 诱导6 d后形成典型的神经样细胞, 胞体变小、突起细长。维甲酸诱导12 h可见少数细胞有突起形成, 24 h后多数细胞胞体增大、突起变长, 6 d后形成典型的神经样细胞。

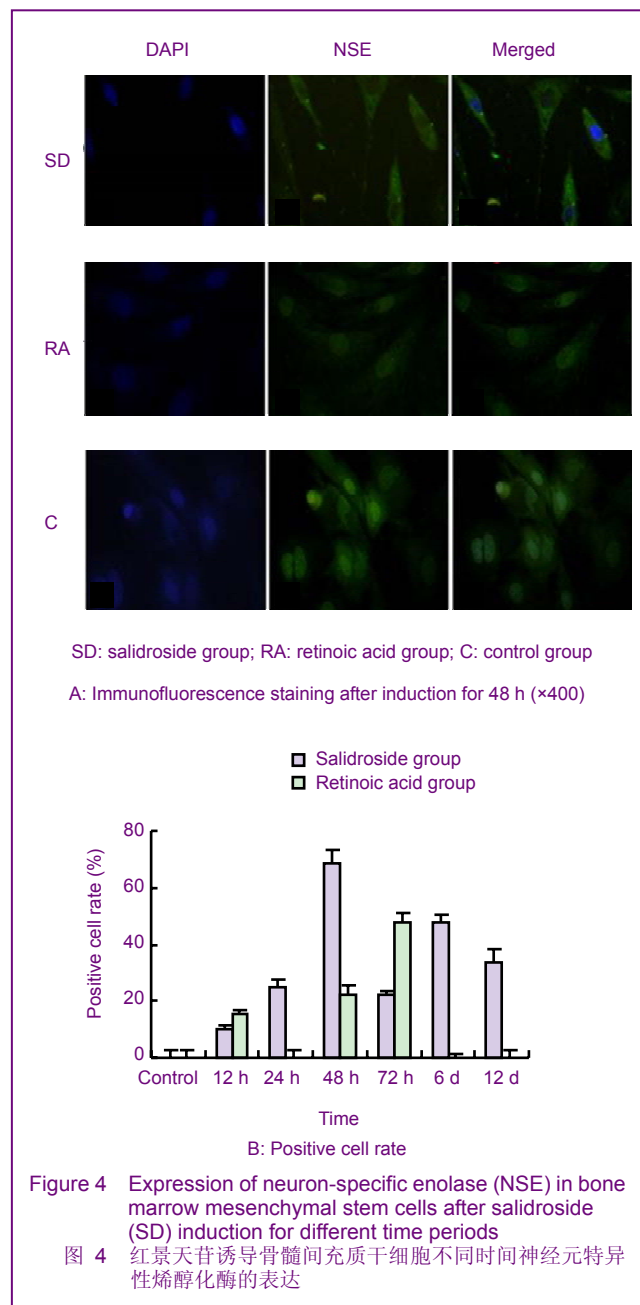
2.3 Brdu检测细胞的增殖 Brdu标记结果表明, 红景天苷诱导24, 48, 72 h的增殖率分别为22.41%, 17.46%, 7.47%; 维甲酸诱导24, 48, 72 h的增殖率分别为30.27%, 16.50%, 4.60%, 随着红景天苷和维甲酸诱导时间的延长BMSCs的增殖率明显降低, 组间比较差异有显著性意义($P < 0.01$), 见图3。



2.4 荧光免疫细胞化学染色结果

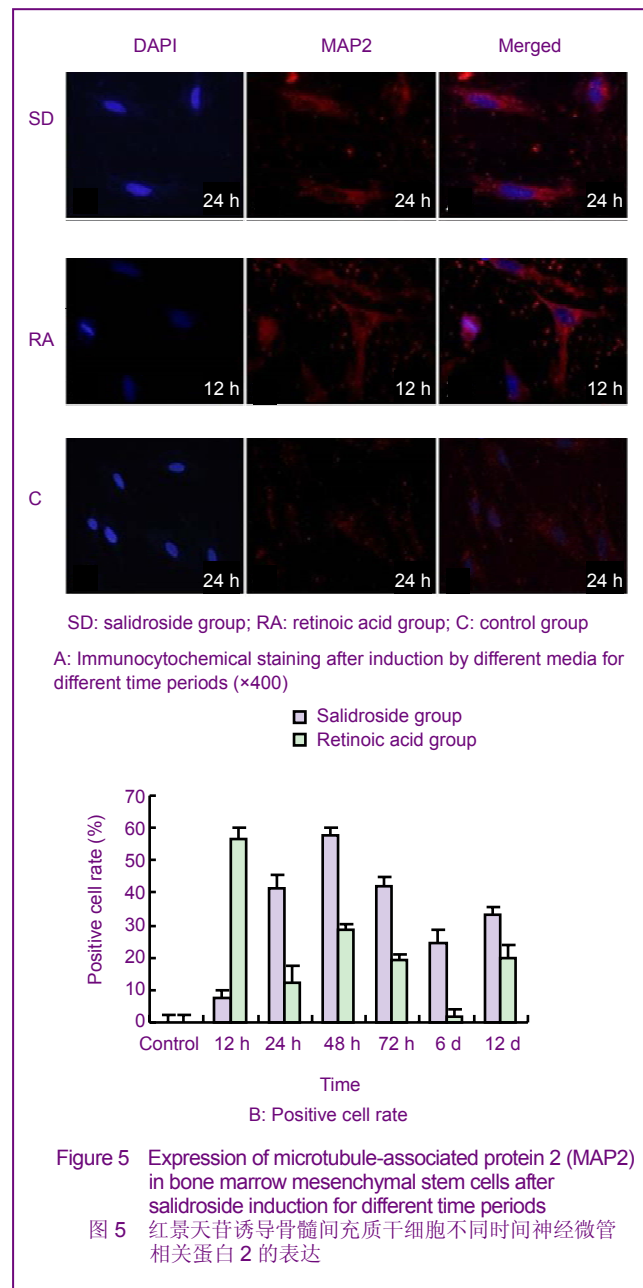
NSE阳性率: 荧光免疫细胞化学染色表明, 红景天苷

诱导BMSCs后, 12 h时NSE阳性率为10.25%, 24 h阳性率为25%, 48 h阳性率为68.75%, 72 h阳性率为26.8%, 6 d阳性率为48.05%, 12 d阳性率为33.3%, 48 h阳性率最高与其他时间点相比差异有显著性意义($P < 0.01$); 维甲酸诱导BMSCs后12 h时NSE阳性率为15.62%, 48 h阳性率为21.87%, 72 h阳性率为48.4%, 72 h阳性率最高, 与其他时间点相比差异有显著性意义($P < 0.01$), 见图4。

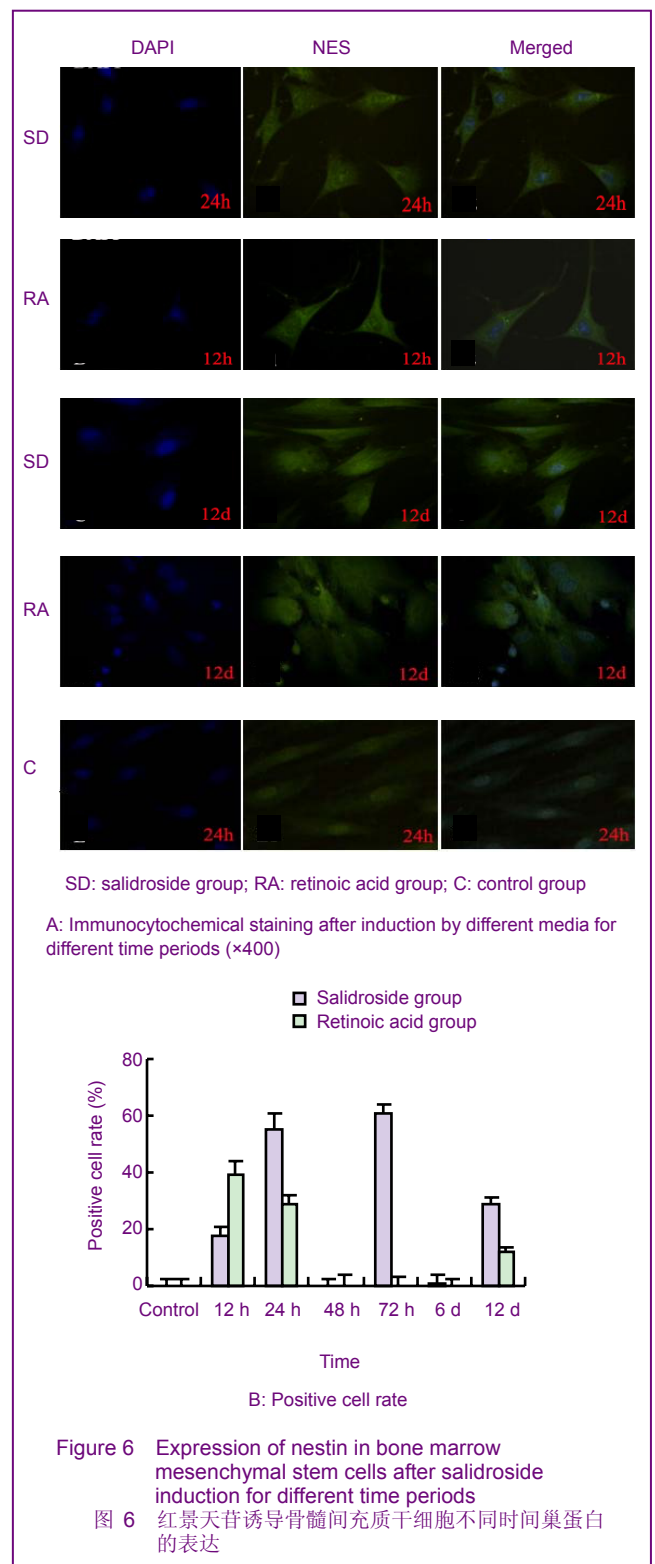


MAP2 阳性率: 红景天苷诱导 BMSCs 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 6 d 和 12 d 时, MAP2 的阳性率分别为 7.54%、41.30%, 57.5%, 42.22%, 24.24%和 33.34%, 其中 48 h 时阳性率最高, 与 12 h 和 24 h 时相比较差异有显著性意义($P < 0.01$); 维甲酸诱导 BMSCs 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 6 d 和 12 d 后, MAP2 的阳性率分

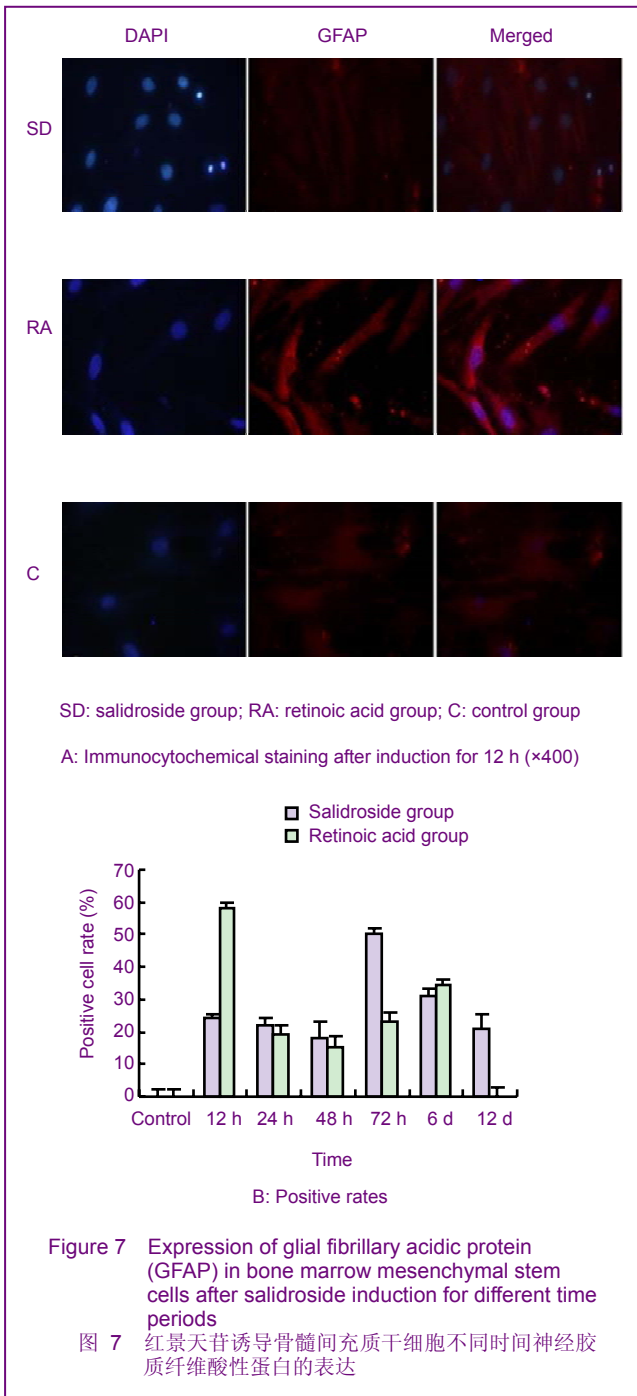
别为 56.52%, 12.5%, 28.5%, 19.23%, 1.67% 和 20%, 其中 12 h 时 MAP2 阳性率最高, 与其他时间点相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。红景天苷诱导后 MAP2 的表达比维甲酸诱导后 MAP2 的表达延迟, 见图 5。



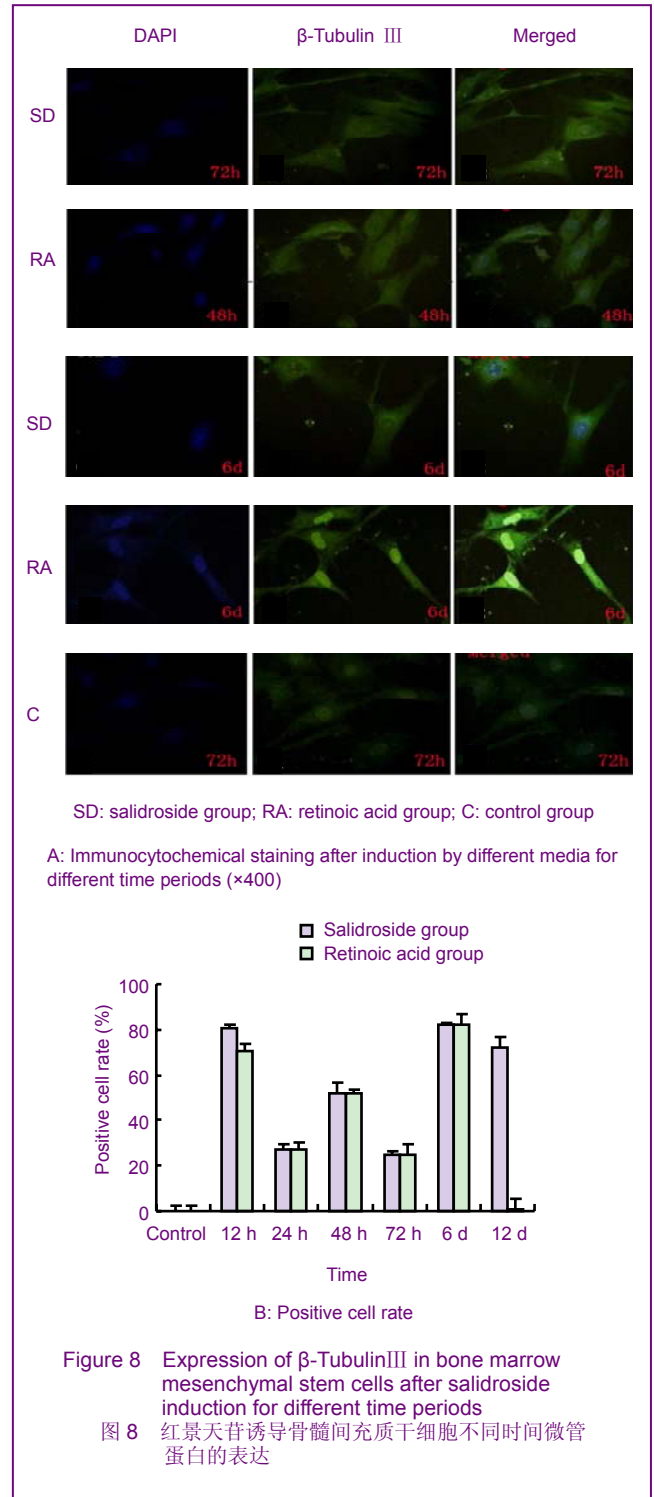
巢蛋白阳性率: 红景天苷诱导不同时间 BMSCs 后, 12 h 时巢蛋白的阳性率为 17.24%, 24 h 时阳性率为 55.55%, 72 h 阳性率为 60.97%, 6 d 阳性率为 48.05%, 12 d 阳性率为 33.3%, 其中 72 h 时阳性率最高, 与其他组相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$); 维甲酸诱导 BMSCs 不同时间后, 12 h 时巢蛋白阳性率为 15.62%, 48 h 阳性率为 21.87%, 72 h 阳性率为 48.4%, 72 h 阳性率最高, 与其他时间点相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。红景天苷诱导后巢蛋白的表达比维甲酸诱导后要高, 见图 6。



GFAP 阳性率: 红景天苷诱导 BMSCs 12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 6 d 和 12 d 后, GFAP 阳性率分别为 24.09%、21.73%、18.27%、50.0%、30.76%、20.7%; 维甲酸诱导 12 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 6 d 后, GFAP 的阳性率分别为 58.18%、19.23%、15%、23.18%、34.54%, 12 h 时与其他组相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$)。红景天苷诱导后 GFAP 的表达阳性率比维甲酸诱导后低, 见图 7。

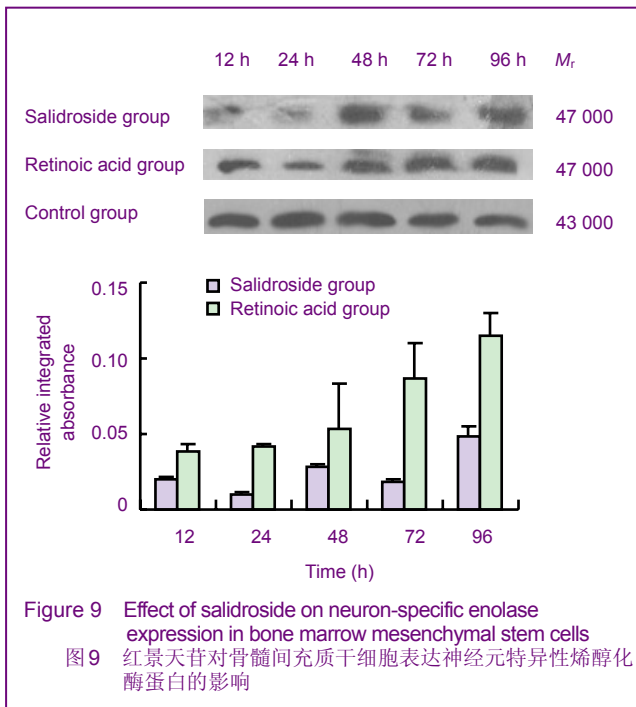


β -Tubulin III 阳性率: 红景天苷诱导BMSCs后, β -Tubulin III在12 h时阳性率为80.85%, 24 h阳性率为27.11%, 72 h阳性率为51.93%, 6 d阳性率为81.81%, 12 d阳性率为72.09%, 12 h和6 d时 β -Tubulin III阳性率同24, 48 h和72 h相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$); 维甲酸诱导BMSCs 12 h时 β -Tubulin III阳性率为70.85%, 24 h阳性率为27.11%, 48 h阳性率为51.92%, 72 h阳性率为24.76%, 6 d阳性率为81.81%, 12 d阳性率为0.72%, 6 d时与12, 24, 48, 72 h相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$), 见图8; 红景天苷诱导BMSCs后, β -Tubulin III阳性率比维甲酸组明显高且时间长。

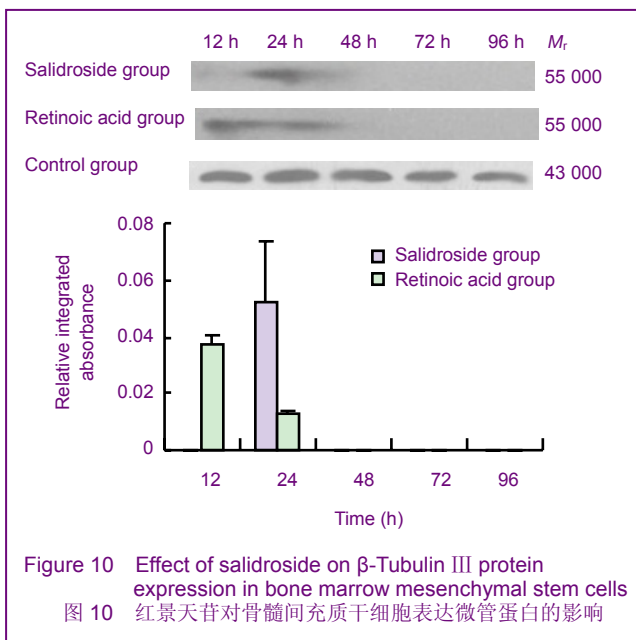


2.5 红景天苷对BMSCs表达神经相关蛋白的影响

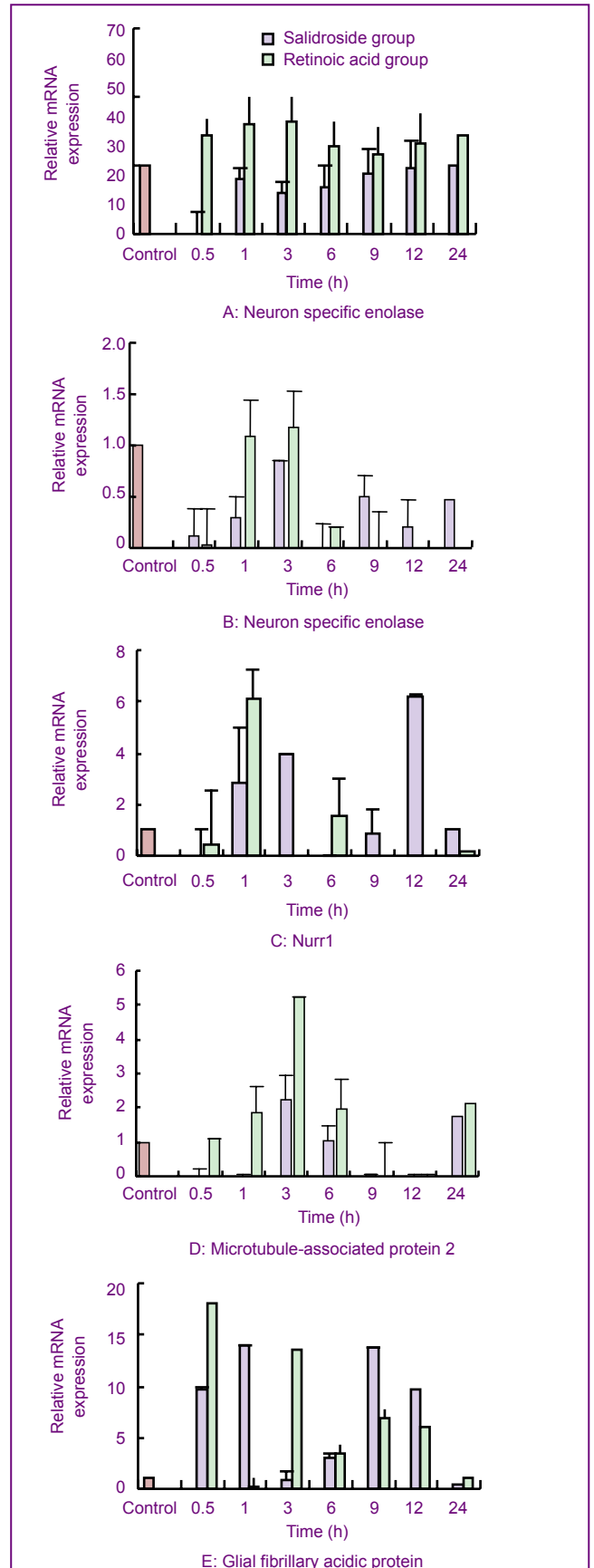
Western blot 结果显示 红景天苷诱导BMSCs 12, 24, 48, 72, 96 h后, NSE蛋白表达上调, 其中48, 72, 96 h时NSE蛋白表达丰度显著上调, 与12, 24 h时相比差异有显著性意义 ($P < 0.01$); 维甲酸诱导BMSCs 12, 24, 48, 72, 96 h后, NSE蛋白表达均上调, 其中48, 72, 96 h时NSE蛋白表达丰度显著上调, 与12 h, 24 h时相比差异具有显著性意义 ($P < 0.05$), 见图9。



红景天苷诱导BMSCs 24 h后 β -Tubulin III表达上调, 12, 48, 72, 96 h未见其表达; 维甲酸诱导BMSCs 12, 24 h后, β -Tubulin III蛋白表达上调, 48, 72, 96 h未见其表达, 见图10, 两者相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。



2.6 红景天苷对BMSCs表达神经相关基因的影响
Real Time-PCR结果显示, 红景天苷和维甲酸分别诱导BMSCs 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 h时, 红景天苷组在9, 12和24 h时NSE mRNA的表达水平与其他时间比较上调, 维甲酸组从0.5 h开始NSE mRNA的表达明显上调, 维甲酸组的表达水平显著高于红景天苷组且两者相比具有显著性意义($P < 0.01$), 见图11。



红景天苷组在3 h时与其他时间点相比较巢蛋白mRNA的表达显著上调, 维甲酸组在1 h和3 h时巢蛋白mRNA的表达较其他时间点明显上调; 红景天苷组在1, 3, 12 h时Nurr1 mRNA的表达与其他时间点相比显著上调, 维甲酸组在1 h时Nurr1 mRNA的表达明显上调, 红景天苷组Nurr1 mRNA的表达显著高于维甲酸组($P < 0.01$); 红景天苷诱导3, 6, 24 h时MAP2 mRNA表达水平显著上调, 维甲酸诱导1, 3, 6, 24 h时MAP2 mRNA的表达明显上调且在3 h时尤为显著, 维甲酸组MAP2 mRNA表达水平高于红景天苷组; 随着诱导时间延长, NSE表达逐渐升高。9 h时GFAP基因表达达到最高值, 其后GFAP表达明显降低。GFAP是神经胶质细胞的标志分子, 实验结果表明, 红景天苷诱导0.5, 1, 9, 12 h时GFAP mRNA表达水平显著上调, 24 h时明显下调, 维甲酸诱导0.5, 1, 9, 12 h时GFAP mRNA表达水平也显著上调, 维甲酸组在0.5, 3 h时GFAP mRNA表达水平高于红景天苷组。

3 讨论

目前国内外研究干细胞向神经细胞定向分化, 主要以化学制剂作为诱导剂(如 β -巯基乙醇、全反式维甲酸等), 其具有以下不足: ①有一定的细胞毒性。②诱导后的神经元样细胞存活时间短。③不能用于临床治疗。寻找具有无毒、高效的干细胞诱导剂, 对进一步研究干细胞定向分化的机制及适用于临床治疗具有重要的理论和应用价值。

大量研究报道传统中药能诱导BMSCs定向分化为神经细胞^[12], 利用中药单体研究干细胞向神经细胞定向分化是解决目前利用化学制剂作为干细胞诱导剂存在的不足。传统藏药红景天具有强抗氧化功能, 对神经细胞有明显的保护作用, 红景天苷是红景天的主要有效单体成分^[13-14], 课题组前期研究结果表明, 红景天苷能诱导BMSCs向神经样细胞定向分化, 但是红景天苷对BMSCs的具体作用和影响还认识不够, 进一步研究其具体的作用方式和影响机制, 对深入揭示红景天苷影响BMSCs向神经样细胞定向分化的分子机制、有效筛选高效的中药干细胞诱导剂具有重要的理论意义。

本研究证实, 红景天苷诱导BMSCs后能改变细胞的形态, 随着诱导时间的延长细胞形态发生明显改变, 表现为细胞由多角形或纺锤形转变为具有典型的神经样细胞。红景天苷诱导后细胞的形态变化与维甲酸诱导后细胞形态变化基本一致。

细胞增殖实验表明, 红景天苷和维甲酸诱导BMSCs后, 细胞的增殖率发生显著改变, 诱导24 h和48 h时细胞的增殖率较对照组明显升高, 72 h时细胞的增殖率显著降低, 该结果提示, 在诱导的早期红景天苷

具有促进细胞增殖的作用, 而后期具有抑制细胞增殖的功能, 这表明随着诱导时间的延长, 细胞定向分化功能增强进而抑制了细胞的增殖。

NSE是成熟神经细胞的标志分子的标志分子^[15], 巢蛋白是神经干细胞标志物, β -Tubulin III是一种与神经细胞分化相关的微管蛋白^[15], MAP2是神经微管相关蛋白的标志物, 这些标志分子的动态变化能客观反映BMSCs是否向神经细胞定向分化。本实验结果表明, 红景天苷能促进BMSCs表达上述神经细胞相关标志分子, 其阳性率与诱导时间呈动态变化, 与维甲酸诱导相比较细胞表达神经细胞相关标志分子的阳性率并不完全一致, 即诱导不同的时间细胞表达的水平也不相同。

这提示红景天苷和维甲酸影响BMSCs向神经细胞定向分化的作用方式有可能存在差异。GFAP是神经胶质细胞的标志分子, 红景天苷诱导BMSCs不同时间后, GFAP的阳性率明显低于维甲酸诱导组, 该结果证实红景天苷诱导形成的神经样细胞主要是神经元样细胞, 而维甲酸诱导后的部分细胞为神经胶质细胞, 该结果显示, 红景天苷诱导BMSCs定向分化为神经细胞的效果要优于维甲酸诱导的细胞^[16]。

Real Time-PCR结果显示, 红景天苷和维甲酸诱导BMSCs不同时间后, 神经细胞相关基因NSE, Nurr1 (Nurr1是一种转录因子, 它可以促进神经细胞相关基因的表达并能维持其表型)和MAP2 mRNA的表达, 但是两组表达的动态变化与作用的时间有密切关系。巢蛋白在红景天苷诱导的早期表现为高丰度表达, 随着诱导时间的延长NSE的表达丰度降低, 这表明在诱导的前期BMSCs主要分化为神经干细胞, 而后期主要向神经元细胞分化, 这同维甲酸诱导的结果相一致。红景天苷和维甲酸组GFAP mRNA的表达在诱导早期为高表达, 相反在后期表达水平下降, 该结果提示GFAP的高表达是BMSCs向神经细胞定向分化过程中的早期效应和表现。Western blot结果证实, 随着红景天苷和维甲酸诱导时间的延长, NSE蛋白的表达水平显著增加, 而 β -Tubulin III在诱导的早期表现为高表达。上述结果显示, 红景天苷能有效促进BMSCs向神经细胞分化。

综上所述, 红景天苷能促进BMSCs向神经元分化, 其诱导效应同维甲酸基本类同, 甚至在向神经元样细胞定向分化方面优于维甲酸。本实验结果为课题组下一步揭示红景天苷影响干细胞向神经细胞定向分化的分子机制研究提供了理论依据, 同时也为利用红景天苷作为干细胞诱导剂研究神经损伤的治疗指明了目标和方向。

致谢: 感谢兰州军区兰州总医院骨科研究所在实验过程的帮助, 感谢兰州军区兰州总医院动物实验科提供的动物。

4 参考文献

- [1] Noth U, Rackwitz L, Heymer A, et al. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. J Biomed. 2007;83(3):626-35.
- [2] Briggs T, Treiser MD, Holmes PF, et al. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on poly(ethylene glycol)-variant biomaterials. J Biomed Mater Res A. 2009;91(4):975-984.
- [3] Lin W, Chen X, Wang X, et al. Adult rat bone marrow stromal cells differentiate into Schwann cell-like cells in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2008;44(1-2):31-40.
- [4] Wang XS, Li HF, Zhao Y, et al. Radix Astragali-induced differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Neural Regen Res. 2009;4(7):497-502.
- [5] Yin YQ, Chen B, Ke JL, et al. Xuefuzhuyu injection induces neuronal differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. Neural Regen Res. 2011;6(3):177-182.
- [6] Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. Regen Med. 2006;1(4):497-509.
- [7] Goldman S. Stem and progenitor cell-based therapy of the human central nervous system. Nat Biotechnol. 2005;23(7):862-871.
- [8] Zhang Z, Wang X, Wang S. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from bone marrow of patients with Parkinson's disease. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2008;44(5-6):169-177.
- [9] Zhao Q, Ren H, Zhu D, et al. Stem/progenitor cells in liver injury repair and regeneration. Biol Cell. 2009;101(10):557-571.
- [10] Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, et al. Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. Inflamm Allergy Drug Targets. 2009;8(2):110-123.
- [11] Yan XH, Huang RB. Differentiation of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells toward neurons induced by baicalin in vitro. Zhonghua Er Ke Za Zhi. 2006;44(3):214-219.
- [12] Schmeisser C, Steele H, Streit WR. Metagenomics, biotechnology with non-culturable microbes. Appl Microbiol Biotechnol. 2007;75(5):955-962.
- [13] Pei JJ, Wu R, Zhao HB, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010; 14(10):1808-1812.
裴晶晶, 吴润, 赵红斌, 等. Ca^{2+} 信号介导红景天苷促进小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的定向分化[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(10):1808-1812.
- [14] Liu YY, Zhai XX, Zhao HB, et al. Gansu Nongye Daxue Xuebao. 2010; 4:21-25.
刘云云, 赵兴绪, 赵红斌, 等. Ca^{2+} 信号介导川芎嗪诱导小鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞的定向分化[J]. 甘肃农业大学学报, 2010, 4:21-25.

- [15] Ma L, Cai DL, Li HX, et al. Protective effects of salidroside on oxidative damage in fatigue mice. J Chin Integr Med/Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2009;7(3):237-241.
- [16] Brazelton TR, Rossi FM, Veshet GI, et al. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. Science. 2000;290(5497):1775-1779.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 国家自然科学基金面上项目资助(81073156), 课题名称: 红景天苷诱导间充质干细胞向神经细胞分化的作用及分子机制。

作者贡献: 第一作者进行实验实施, 第三作者进行设计, 第二作者进行实验评估, 资料收集为第一、二、三作者, 第一作者成文, 第二、三作者审核, 第一、三作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。伦理批准: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

本文创新性: 国内外同行关于中药单体诱导间充质干细胞向神经细胞分化的研究报道主要集中在定性研究, 本实验的创新之处在于利用中药单体红景天苷, 系统研究了红景天苷诱导间充质干细胞向神经细胞定向的作用及影响, 目前尚未见相关的研究报道。

通过系统探讨红景天苷影响间充质干细胞向神经细胞定向分化, 为进一步筛选有效的干细胞诱导分化剂及指导临床应用具有重要的理论意义和应用价值; 实验证实红景天苷能促进间充质干细胞向神经细胞定向分化, 与维甲酸相比较具有相似的诱导效果, 红景天苷诱导的神经样细胞以神经元样细胞为主, 优于维甲酸。这些研究结果对指导进一步阐明其分子机制提供了技术路线和研究方向, 具有重要的学术价值。

Mesh 词表词汇实用例句: “基因, 免疫球蛋白——genes, immunoglobulin”

例句: An immunoglobulin (Ig) consists of 2 identical light chains (L) and 2 identical heavy chains (H) (for example IgG-type); at the three-dimensional level, an Ig chain consists of one N-terminal variable domain, V, and one (for an L chain) or several (for an H chain) C-terminal constant domain(s), C. The cells of the B line synthesize immunoglobulins. They are either produced at a membrane (on the surface of the B-lymphocytes) or are secreted (by the plasmocytes).

译文: 编码免疫球蛋白轻链和重链的基因, 它们分别位于不同染色体上。可变区基因片段 V、D、J 在淋巴细胞发育中发生重排; 恒定区基因 C 包括决定免疫球蛋白类别和型别的各种基因。为表达免疫球蛋白(即抗体)的基因, 它具有表达抗体分子多样性的复杂机制。抗体

分子的 H 链及 L 链(还有 κ 链及 λ 链)的肽链, 分别由可变区(V)及恒定区所构成(参见免疫球蛋白)。在通过生殖细胞而传递的基因(germ

line genes)中, 这些表达各个肽链的基因形成多重基因族。

英文主题词	Genes, Immunoglobulin
英文注释	Genes encoding the light and heavy chain segments of immunoglobulins. Light chain gene segments are symbolized L-V (variable), J(joining) and V (constant); Ig heavy chain segments have, in addition, a diversity (D) gene. Each segment codes for certain amino acids, and each has a different nucleotide sequence; the genes are assembled by a remarkable shuffling of the segments during B lymphocyte maturation.
中文主题词	基因, 免疫球蛋白
中文注释	编码免疫球蛋白类轻链和重链区段的基因。轻链基因区段用符号 L-V(可变)、J(连接)和 C(恒定)表示, 免疫球蛋白重链区段除此之外还具有 1 个高变(D)基因。各节段编码特定氨基酸类, 且各自具有不同核苷酸序列。此基因在 B 淋巴细胞成熟过程中通过显著改组来装配。