论著

文章编号:1000-5404(2006)14-1470-03

单味黄芪红花丹参注射液对神经干细胞分化影响的初步研究

刘建军,姚忠祥,秦茂林,陈兴书,陈建芳 (第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 寻找对神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖、分化和存活有促进作用的单味中药成分,进而确定对NSCs的增殖和分化有影响的中药有效成分。**方法** 本研究筛选了黄芪、红花、丹参3种中药注射液分别刺激培养的NSCs,观察NSCs的分化状态。**结果** 发现黄芪、红花有明显的促进NSCs分化的作用,其中黄芪效果最佳,而丹参却有促进NSCs凋亡的作用,这种作用随着其浓度的升高而加强。**结论** 黄芪、红花对NSCs的分化起积极作用,丹参对NSCs的分化有毒性作用,也可能促进NSCs的凋亡,为进一步从细胞水平和分子水平研究中药的作用机制和NSCs的分化机制提供了依据。

关键词:中药注射液;神经干细胞;分化

中图法分类号:R285.5;R322.8;R329.21 **文献标识码**:A

Effect of simple astragali, flos carthami, salvia miltiorrhiza injection on differentiation of neural stem cells

LIU Jian-jun, YAO Zhong-xiang, QIN Mao-lin, CHEN Xin-shu, CHEN Jian-fang (Department of Histology and Embryology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To find a simple traditional Chinese medicine that certainly activates the proliferation, differentiation and survival of neural stem cells (NSCs). Methods The parenteral solution of astragali, flos carthami or salvia miltiorrhiza was used to stimulate NSCs *in vitro* and the differentiation of NSCs was observed. Results Astragali and flos carthami could induce the differentiation of NSCs and the effect of astragali was better. Salvia miltiorrhiza could induce the apoptosis of NSCs in a concentration-dependent manner. Conclusion Astragli and flos carthami were found to accelerate transparently NSCs to differentiate, but salvia miltiorrhiza had toxic effect on differntiation of NSCs.

Key words: traditional Chinese medicine injection; neural stem cell; differentiation

祖国医学历史悠久,源远流长,但方剂成分复杂繁多,种类迭出,而用中药治疗神经系统疾病来说,大多是以方剂和整体的中医理论学和一般的临床疗效来判定其药效,从而导致对其中药药理作用机制难下令人诚服的结论。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)研究是近年来神经科学和脑科学研究的热点话题,如何寻找有效的细胞因子和其他成分来诱导NSCs的定向分化,获得稳定的目标神经细胞移植治疗神经系统疾病,一直是个值得关注的问题。作为单味中药,黄芪(astragalus mongholicus bunge)是一种传统的益气药,具有免疫调节、抗菌利尿、强心等作用,祖国医学还认为黄芪有强化机体的作用,与其他中药配伍可以提高机体对创伤的恢复能力,增加受损部位的供血,有利于神经的再生[1];红花具有活血通经、祛瘀止痛的功效,是传统的活血化瘀类中药[2];丹参是临床常用药物,具有"活血化瘀,养血安神,消肿止痛,排脓生肌,以及调经"之功效[3]。本研究选用黄芪、红花、丹参3种注射液,体外培养胚胎大鼠NSCs,用3种注射液分别刺激NSCs,观察他们对干细胞分化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验选用黄芪注射液[成都地奥九泓制药厂,ZZ-5312-川卫药准字(1998)第013422号],红花注射液[太原华卫药业有限公司,ZZ-5798-晋药准字(2000)第094002号],丹参注射液[成都地奥九泓制药厂,ZZ-5312-川卫药准字(2000)第023356号]。一

基金项目:国家自然科学基金青年基金资助项目(30300463)
Supported by the National Science Funds for Young Distinguished Scholars (30300463)

作者简介:刘建军(1975-),男,湖南武冈市人,博士,助理实验师,主要从事神经干细胞分化调控方面的研究。电话:(023)68752231,E-mail:sydljj@yahoo.com.cn

通讯作者:姚忠祥,E-mail:yaozhx@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-09-07;修回日期:2005-11-07

抗羊抗大鼠 NF200(Sigma)，羊抗大鼠 GFAP(Sigma)，兔抗山羊 FITC 荧光二抗(Jackson immunoresearch 公司)。

1.2　NSCs 培养

按照刘仕勇等[4]确立的 NSCs 的培养方法，取 13 d 左右的孕鼠，体质量 200～250 g(第三军医大学实验动物中心提供)，用 1% 戊巴比妥钠(2 ml/200 g)麻醉，腹部朝上，固定于手术台，用消毒棉球将孕鼠腹部消毒，打开腹腔，取出子宫(胎鼠)于一个消毒好的大培养皿内，在超净台内将胎鼠从子宫中取出，放置于另一个大培养皿中，加少量缓冲液和双抗液，逐个用小剪刀剪开胎鼠头部，暴露大脑组织，用镊子取下端脑泡，放置于一个小培养皿内，加少量缓冲液冲洗，移入一个大培养皿，用手术刀切碎，然后加少量培养液，200 目筛网过滤，收集细胞悬液于离心管，按比例加入 B27、bFGF、双抗液，用吸管吹打混匀，移入培养瓶，使每瓶内细胞计数约 $4\times10^5/cm^2$，每瓶含：DMEM/F12(hyclon) 6 ml，B27(Gibco) 120 μl，bFGF(Gibco) 6 μl(20 ng/ml)，双抗(100 U/ml 青霉素，100 U/ml 链霉素) 100 μl，放入 5% CO_2 37 ℃孵箱培养，2～3 d 传代 1 次，传 3 代后并进行鉴定。

1.3　NSCs 的分化

取培养的 NSCs，分成 4 组。第 1 组：黄芪组：黄芪注射液 30 μl/ml；第 2 组：红花组：红花注射液 30 μl/ml；第 3 组：丹参组：丹参注射液 30 μl/ml；第 4 组：空白对照组(以等量的 DMEM/F12 培养基作空白对照)。其他的培养条件相同：50 ml 培养瓶底部涂抹多聚赖氨酸，DMEM/F12 6 ml/瓶；10% 胎牛血清：2 μl/ml；双抗：10 μl/ml，5% CO_2 37℃孵箱培养。

依照以上的分化条件，分 4 组将 NSCs 培养于 3.5 cm 培养皿，内置盖玻片(其上涂抹多聚赖氨酸)。

1.4　免疫组化

分别取分化 7 d 的 4 组细胞(连盖玻片一起)，Zamboni 液固定 24 h，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，加 1% 牛血清白蛋白/0.4% TritonX-100 50 μl/张，室温 30 min，一抗(1∶200) 37 ℃ 2 h，0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次，加 FITC 荧光二抗 (1∶50) 37 ℃ 1 h，甘油封片，荧光显微镜观察照相。

1.5　流式细胞仪检测

收集分化 7 d 的 4 组细胞，0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次，离心去上清，Zamboni 液固定 30 min，离心去上清，0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次，离心去上清，1% BSA/4% TritonX-100，室温 30 min；一抗(1∶200) 37 ℃孵育 2 h，4 ℃过夜，荧光二抗(1∶50) 37 ℃孵育 1 h，室温 3 h，0.01 mol/L PBS 洗涤中止反应，离心去上清；加 400 μl 0.01 mol/L PBS/管制成单细胞悬液，流式细胞仪检测。

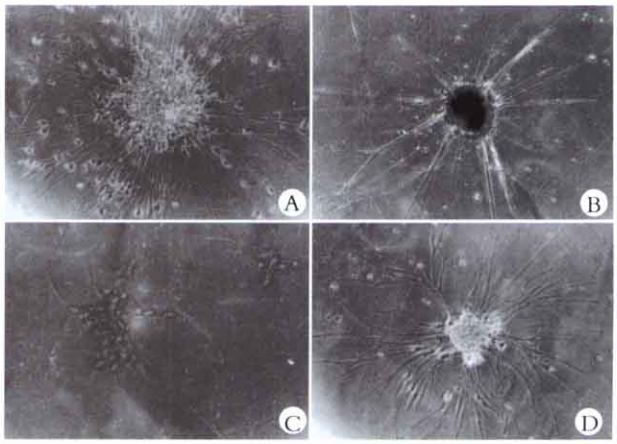
1.6　统计学分析

计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　NSCs 分化的形态学观察

分化 7 d 后，相差显微镜观察 1.3 条件下分化的 NSCs，黄芪组培养瓶在 NSCs 球周围均可见到放射状排列的细胞：一种为细胞具有多个粗长突起的星形胶质细胞样细胞，细胞较大，排列紧密，折光性较弱；另一种具有 1～2 个或多个突起，胞体呈圆形或椭圆形的神经元样细胞，细胞较小，突起短而少，细胞排列疏松，折光性较强；在细胞较多的地方，突起互相连接成网格状机构，散在的单个细胞也有以上的特征；红花组培养瓶在 NSCs 球周围也见到放射状排列的细胞，情况与黄芪组相似；而丹参组，只有少量细胞贴壁生长，NSCs 球周围长出的细胞较少，细胞的突起较短；对照组培养瓶内可见到较多的存活细胞，细胞在 NSCs 球周围也呈放射状排列，但是细胞数量较少，突起较短(图 1)。

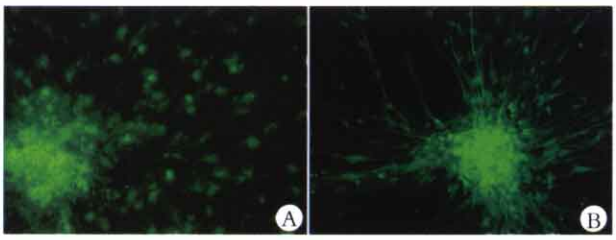


A：黄芪组；B：红花组；C：丹参组；D：空白对照组

图 1　倒置显微镜下观察在各种注射液作用下，NSCs 的分化状态　(×100)

2.2　免疫组化化学检测结果

免疫组化显示分化后细胞中 NF200 阳性和 GFAP 阳性细胞，与对照组相比，可见在黄芪组分化细胞中 NF 细胞较多，而丹参组细胞较少，NF 阳性和 GFAP 阳性细胞均不多，红花组状态居中(图 2)。



A：黄芪组；B：红花组

图 2　免疫荧光显示黄芪、红花注射液作用下，NSCs 分化为 NF200 阳性神经元　(×200)

2.3　流式细胞仪检测结果

流式细胞仪检测显示，分化 7 d 后，黄芪组中细胞 NF 阳性细胞所占比例较高；红花组和对照组中 NF 阳性细胞与 GFAP 阳性细胞相差不大；然而丹参组中细胞总数较少，NF 阳性细胞和 GFAP 阳性细胞的数量都很低(表 1)。

表1 各组单味中药注射液诱导NSCs分化7 d各细胞类型的百分比[$n=3$, $(\bar{x}\pm s)\%$]

组别	细胞类型	
	$NF200^+$细胞	$GFAP^+$细胞
黄芪组	65.74±0.03[a]	29.23±0.13[a]
红花组	45.57±0.14	43.41±0.07
丹参组	19.54±0.06[a]	22.54±0.08[a]
空白对照组	45.22±0.12	44.76±0.12

a: $P<0.05$,与空白对照组比较

3 讨论

如何诱导NSCs的定向分化,是目前NSCs研究的重点和难点之一。而作为博大精深的祖国医学,种类繁多和成分复杂的中草药,能否对NSCs的定向具有贡献?本研究拟选择了单味黄芪、丹参和红花3种注射液,诱导体外培养的NSCs,进而观察他们诱导效果。

黄芪是豆科黄芪属植物,为中医传统的重要益气药之一。现代药理研究报道黄芪有多方面的药理作用,如黄芪具有免疫调节、抗菌、利尿、强心等作用[1]。研究证明黄芪的有效成分主要有3种:黄芪酮(Flavonoids of Astragalus, FA)、黄芪皂甙(Saponins of Astragalus, SA)、黄芪多糖(Polysaccharide of Astragalus, PA),研究认为黄芪这3种提取成分对氧自由基作用有影响,其中FA和SA有良好的清除氧自由基作用,FA效果最好,SA次之,而PA对氧自由基有部分清除作用[5]。此外有研究黄芪与其他中药配伍可以提高机体对创伤的恢复能力,增加受损部位的供血,有利于神经的再生[6,7]。在本实验中,我们用黄芪注射液诱导体外培养的NSCs,发现在黄芪作用下,撤除丝裂原的NSCs很快贴壁开始分化,免疫组化显示,分化后细胞主要为NF200阳性细胞和GFAP阳性细胞,而进一步的流式细胞仪检测,发现NF阳性细胞的比例明显高于GFAP阳性。与对照组相比,NF阳性细胞比例上升,GFAP阳性细胞比例下降,因此我们认为,黄芪注射液有利于NSCs向神经元方向分化。

丹参注射液的药理作用已有许多报道,丹参的药用化学成分主要为两部分:一为脂溶性丹参酮;二为水溶性原儿茶酚醛和儿茶醛的衍生物、丹参素等。其中丹参素为活血化淤的主要成分,丹参酮-A也有耐缺氧和活血化淤的作用。研究表明,丹参可改善微循环、增加脑组织ATP含量、减轻缺血引起的脑水肿,部分抑制缺血后脑组织c-fos基因的表达、拮抗缺血后脑组织的单胺类介质、兴奋性氨基酸的异常变化[3]。也有研究表明:应用丹参后使全脑缺血后bcl-2免疫阳性细胞数明显增加,证实丹参能上调脑缺血后的bcl-2表达,从而发挥其神经保护作用[8,9]。本实验中我们用不同浓度的丹参注射液作用于NSCs,却发现NSCs有不同程度的死亡,死亡数量与丹参浓度几乎成正相关。而仅存的少数细胞中,NF阳性和GFAP阳性细胞数量与对照组相比都明显减少,据此我们认为在我们所用的浓度作用时,丹参不利于NSCs的体外分化,促进了NSCs的凋亡。这种促凋亡机制显然与丹参上调bcl-2表达,保护神经元的作用是相背离的,有待于我们进一步的研究。

红花是祖国医学的常用活血化瘀药物,现代药理学证明,红花可抑制血小板聚集,提高血液蛋白酶的活性,防止微血栓形成并对其有溶解作用,增加微循环血流量等作用[10,11]。这些均有利于改善小血管功能状态,因此研究显示了红花注射液能够有效控制糖尿病性周围神经的病变。本实验中,我们用不同浓度的红花注射液作用于NSCs,发现红花注射液对NSCs分化作用并不明显,几乎接近对照组水平。因此我们推测在实验所用的浓度范围内红花对NSCs的分化影响不大,是否在其他的浓度作用下会有影响还需要我们进一步的实验观察。

参考文献:

[1] 方有生,陈德松,顾玉东. 党参黄芪丹参等复方中草药合剂对周围神经再生影响的实验研究[J]. 中华手外科杂志, 1998, 14(3): 181-183.

[2] 薛腊梅,董幼平. 红花注射液治疗糖尿病周围神经病变[J]. 宁夏医学杂志, 2001, 23(6): 367.

[3] 崔桂云,沈 霞,张 璐, 等. 丹参神经保护作用机制的研究[J]. 徐州医学院学报, 2002, 22(6): 492-494.

[4] 刘仕勇,张可成,杨 辉, 等. 神经干细胞的分离培养及其鉴定[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 26-28.

[5] 史东葵,汪学文,陈国俊. 黄芪皂甙对大鼠脑缺血再灌流神经元一氧化氮合成酶的影响[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2000, 26(5): 290.

[6] 刘 梅,顾晓松,刘 炎, 等. dd-PCR法研究中草药促神经生长过程中的基因差异表达[J]. 南通医学院学报, 1999, 19(4): 363-365.

[7] 刘世清,马永刚,彭 昊, 等. 中药黄芪对实验性脊髓损伤的神经保护作用[J]. 中国骨伤, 2003, 16(8): 463-465.

[8] KUANG P G, ZHOU X F, XU B, *et al*. The protective effect of Radix Salviae Miltiorrhizae composita in cerebral ischemia[J]. J Tradit Chin Med, 1983, 3(3): 193-198.

[9] KUANG P, XIANG J. Effect of radix salviae miltiorrhizae on EAA and IAA during cerebral ischemia in gerbils: a microdialysis study[J]. J Tradit Chin Med, 1994, 14(1): 45-50.

[10] 孟凡迅,张沛云,程 纯, 等. 神经细胞培养法观察单味中药促神经生长的研究[J]. 南通医学院学报, 1999, 19(1): 14-15.

[11] 鞠富盛,李 晋,徐仁莲, 等. 红花注射液治疗糖尿病性周围神经病效果探讨——附神经传导速度测定[J]. 山西医药杂志, 1994, 23(2): 107-108.

(编辑 陈聪连)