论著

文章编号:1000-5404(2007)18-1764-04

蒺藜皂苷诱导SD新生大鼠海马神经干细胞分化的实验研究

郑鸿燕,邰浩清,周春祥,吴颢昕 (南京中医药大学解剖学教研室,南京 210029)

提 要:目的 探讨蒺藜皂苷对于诱导SD新生大鼠海马神经干细胞(neural stem cells, NSCs)分化的影响作用以及蒺藜皂苷培养液浓度变化对其的影响。**方法** 采用无血清和单克隆培养方法,将蒺藜皂苷加入离体的海马NSCs的培养液中,应用Nestin、BrdU、NF200、GFAP免疫荧光染色观察NSCs的形态及分化而来的神经元、神经胶质细胞形态,并检测由海马NSCs分化而来的细胞的数量。**结果** 海马NSCs在无血清培养下,可形成Nestin阳性细胞球。在诱导分化后,免疫荧光染色可见NF阳性细胞、GFAP阳性细胞,而其中20 mg/kg蒺藜皂苷干预组海马NSCs向神经元的分化比例最高。**结论** 在蒺藜皂苷的作用下,海马NSCs向神经元分化的数量增多。

关键词: 蒺藜皂苷;海马NSCs;神经元;神经胶质细胞

中图法分类号: R285.5;R322.81;R329.28 **文献标识码:** A

Effects of total saponins of tribulus on the differentiation of rat neural hippocampus stem cells

ZHENG Hong-yan, TAI Hao-qing, ZHOU Chun-xiang, WU Hao-xin (Department of Anatomy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: Objective To observe the effects of total saponins of tribulus of various consistency on the differentiation of neural hippocampus stem cells. Methods The hippocampus stem cells from newborn rat were obtained by serum-free medium and single-cell cloning technique. Hippocampus stem cells were induced by total saponins of tribulus of various consistency. Nestin, BrdU, neurofilament (NF-200), glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression were detected using immunocytochemical stains. The numbers of NF and GFAP positive cells were counted. The percentages of positive cells were obtained. Results The dissociated cells from the organ of hippocampus developed into much of indiffrentiated otopheres of nestin positive cells. The hippocampus stem cell differentiated into neurons and astrocytes with the total saponins of tribulus. The percentage of NF positive neuron in the 20 mg/kg consistency of total saponins of tribulus groups was significantly higher than that in the control group and other consistency of total saponins of tribulus groups. Conclusion Total saponins of tribulus may enhance neural hippocampus stem cells differentiate into NF positive neuron.

Key words: total saponins of tribulus; neural hippocampus stem cells; neuron; astrocyte

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)由胚胎早期的神经上皮产生,具有自我复制和多向分化的潜能[1]。胎鼠脑内的很多脑区存在有NSCs,它们增殖活跃,并最终分化为神经元和胶质细胞。成年脑内仍保留的NSCs则主要位于侧脑室室管膜下层和海马齿状回颗粒细胞下层[2-4]。NSCs的发现是人类发育生物学和疾病研究中的重大突破,给临床诸多疾病的治疗带来了全新的思路,尤其是干细胞移植方面的研究,为损伤细胞的再生和功能重建带来的新的希望。已有研

基金项目:江苏省高校自然科学基金(05KJD310156);南京中医药大学青年科技创新基金(05XZR02)

Supported by Natural Science Foundation of Colleges in Jiangsu Province (05KJD310156) and Sci & Tech Innovative Funds for Young Scholar of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (05XZR02)

作者简介:郑鸿燕(1975-),女,吉林省吉林市人,硕士,讲师,主要从事神经解剖学、老年病学方面的研究,发表论文8篇。电话:13815415059, E-mail: zheng_h_y@163.com

收稿日期:2006-03-21;修回日期:2007-02-28

究证实来源于海马神经组织的干细胞可向神经元和神经胶质细胞分化，但是向神经元的分化比例较低。蒺藜皂苷为蒺藜地上全草提取物，是以呋甾醇和螺甾醇皂苷为主的多种皂苷混合物。很多基础研究表明蒺藜皂苷具有神经保护作用，可对抗脑缺血，减轻脑损伤，临床上常用于脑血管病的治疗[5-7]。本实验对海马 NSCs 进行培养，观察在离体的情况下，蒺藜皂苷对海马 NSCs 增殖分化的影响，旨在为进一步研究中药干预 NSCs 移植和定向分化奠定基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　新生 5 d 龄 SD 大鼠，共 40 只，体质量（12.0 ± 1.5）g，雌雄不拘，由本校动物室提供。

1.1.2　实验试剂和抗体　　Neurobasal 培养基、B27 辅助培养基购自 Gibco 公司，胎牛血清（FCS）购自杭州四季青生物工程材料研究所，碱性成纤维细胞生长因子 bFGF、多聚赖氨酸、胰蛋白酶、巢蛋白（Nestin）抗体、BrdU 以及其单克隆抗体、GFAP 抗体、NF200 抗体均购自 Sigma 公司，蒺藜皂苷由吉林敖东药业股份有限公司生产。

1.1.3　主要仪器　　离心机、超净工作台、CO_2 培养箱、恒温水浴箱、倒置相差显微镜、荧光显微镜。

1.2　海马 NSC 的分离培养和鉴定

在无菌条件下取出 SD 新生大鼠大脑，放入 D-Hanks 液中，剔除脑膜，分离出海马。将海马剪碎置入离心管中，以 1 000 r/min 离心 5 min，吸去上清液，再加入 0.25 % 胰蛋白酶消化10 min（37 ℃），用含 10 % 胎牛血清的培养基终止消化。随后离心 5 min，去上清液，加入 20 mg/L 的无血清 Neurobasal（含 bFGF、B27 等）的培养液，用吸管吹打成单细胞悬液，过滤，细胞计数。以 1×10^5/ml 的细胞密度移入培养瓶中培养，每隔 3 天半量置换培养基。培养 7 ~ 9 d 后，机械分离神经球进行传代。

1.3　克隆诱导分化

选取部分上述的细胞克隆种植于 24 孔培养板，每组各 6 孔。加入有血清培养基进行分化实验。实验分 4 组：第 1 组用 5% 的胎牛血清 + 40 mg/kg 蒺藜皂苷进行诱导分化；第 2 组用 5% 的胎牛血清 + 20 mg/kg 蒺藜皂苷进行诱导分化；第 3 组用 5% 的胎牛血清 + 10 mg/kg 蒺藜皂苷进行诱导分化；第 4 组用 5% 的胎牛血清进行诱导分化；每 3 天半量换液，分别于 9 d 后用含 5 μmol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶（BrdU）的培养液培养 24 h，再行免疫荧光双标实验。

1.4　免疫荧光染色

每孔加入 4% 多聚甲醛（4 ℃）固定 20 min，3% H_2O_2 甲醇孵育 15 min，去除内源性过氧化物酶。加正常山羊血清封闭 30 min，用抗 BrdU 单克隆抗体分别进行免疫荧光染色，然后用 Nestin（标记 NSCs）、NF200（标记神经元）、GFAP（标记神经胶质细胞）抗体进行免疫荧光染色；染色结果用 Leica 倒置荧光显微镜观察并摄片，并在镜下分别对 NF200 和 GFAP 抗体免疫阳性细胞计数。荧光显微镜（×200）下一个视野下计数，用图像扫描分析仪分析。

1.5　统计学处理

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示，利用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠海马 NSC 的分离、培养和鉴定

形态观察：原代培养的新生 SD 大鼠海马 NSCs，在培养液中培养 2 d 后，可见很多个细胞团出现，呈桑葚状形态，培养 6 ~ 7 d 后生长成数十个至数百个细胞的集落，而且可以看到比较大的悬浮生长的 NSCs 克隆，生长状态良好，形态规则，折光性强，未见明显的突起生长，细胞团中心细胞较多。当继续培养时，细胞集落密度增高，相邻的神经球可互相接触并结合成团生长，由于神经球中央缺少营养供应，会发生细胞坏死，此时细胞球仍悬浮生长。

2.2　Nestin 抗原表达

培养的海马 NSC 神经球进行 Nestin 免疫荧光染色，结果显示原代培养形成的神经球中央大部分细胞表达为阳性，经多次传代后，形成的克隆均为 Nestin 阳性。在荧光显微镜下，可见发出绿色荧光的细胞团，证明是培养的 NSCs（图 1）。

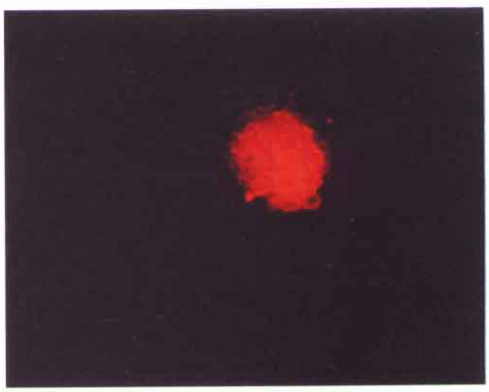


图 1　体外培养的 Nestin 免疫荧光阳性细胞球　（免疫荧光显微镜 ×200）

2.3　BrdU 检测

经与 BrdU 共同孵育后培养形成的细胞球，大多数细胞表达为 BrdU 阳性，证明细胞具有增殖性。

2.4　海马 NSCs 诱导分化结果

新生 SD 大鼠海马 NSCs 培养液中加入胎牛血清后，开始诱导分化实验。细胞贴壁后出现大量的不同形态的新生细胞，并有突起长出。克隆球贴壁，并沿球体周围向四周放射状延伸，少数细胞可从球体中迁移出来，细胞形态不规则，呈三角形、锥形或多角形。Nestin 免疫荧光染色呈阳性反应（图 2）。NF 为特异性标记神经元的抗体；GFAP 为特异性标记胶质细胞的抗体；免疫荧光可显示 NF 阳性细胞和 GFAP 阳性细胞。NF 阳性细胞胞体形态呈圆形或椭圆形，带有 1 个或多个突起，符合神

经元形态(图3)。GFAP阳性细胞胞体扁平,呈三角形,有多个突起,突起直而且较长(图4)。细胞计数采用图像分析扫描仪(表1)。数据显示对照组和蒺藜皂苷干预实验组相比,实验组的NF阳性细胞细胞数量较多,和对照组相比具有统计学差异($P<0.01$)。在实验组当中,第2组即在20 mg/kg蒺藜皂苷干预组中,NF阳性细胞的数量最多,和其他两组浓度相比,具有统计学差异($P<0.01$)。GFAP阳性细胞数量实验组和对照组没有明显差异($P>0.05$)。



图2 诱导分化后的Nestin免疫荧光阳性细胞球
(免疫荧光显微镜×200)

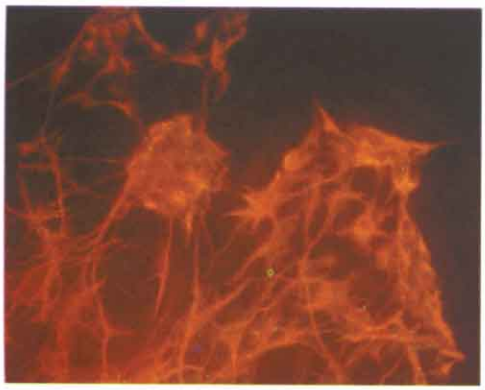


图3 诱导分化后的NF免疫荧光阳性细胞
(免疫荧光显微镜×200)

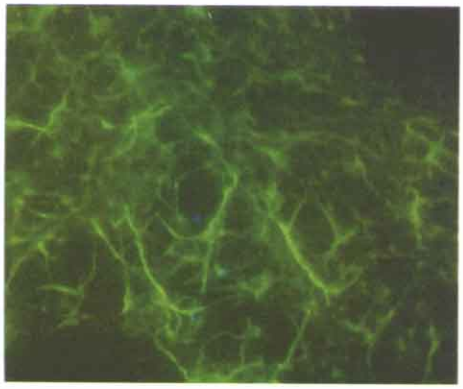


图4 诱导分化后的GFAP免疫荧光阳性细胞
(免疫荧光显微镜×200)

表1 诱导分化后的细胞数($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞种类	诱导分化后时间(d)	
		5	15
第1组	NF200(+)	39.02±6.13[ab]	44.80±9.71[ab]
	GFAP(+)	40.56±1.68	39.61±3.95
第2组	NF200(+)	55.43±7.34[a]	61.25±5.64[a]
	GFAP(+)	36.00±6.58	30.90±4.85
第3组	NF200(+)	33.41±5.73[ab]	29.05±9.44[ab]
	GFAP(+)	40.85±8.49	40.13±3.31
第4组	NF200(+)	22.40±6.44	24.00±4.22
	GFAP(+)	44.38±1.16	39.20±9.84

分化细胞以100个为单位,计算每100个克隆分化而来的细胞数
a:$P<0.01$,与第4组比较;b:$P<0.01$,与第2组比较

3 讨论

NSCs具有自我更新特性和多分化潜能,在疾病及损伤的治疗中具有广阔的应用前景,因此分离和扩增NSCs具有重要的临床应用价值。近年来,随着现代医学的发展,基因治疗和干细胞移植治疗已成为各类疾病的主要研究治疗手段。大量研究表明,体外可定向诱导胚胎干细胞分化为某种特异细胞,并把这种细胞移植入相应的动物模型体内,可修补或替代坏死的组织细胞,从而治疗一些临床疾病。目前,NSCs已用于中枢及视网膜移植,治疗损伤及退行性病变[8-11]。

以往研究采用一种或多种生长因子作用诱导NSCs分化,但是NSCs的分化受到多种因素的影响,是多种因子共同作用的结果。蒺藜为蒺藜科蒺藜属植物,是破症瘕积聚、补肝肾、平肝潜阳的良药。蒺藜皂苷是从蒺藜地上全草中提制的有效成分之一,研究已证实蒺藜皂苷具有降低血压,抗缺氧作用,且对中枢神经损伤具有保护和修复作用。那么,我们设想,成分复杂的中药制剂是否会对NSCs的诱导分化产生一定的影响呢?我们用蒺藜皂苷干预离体的海马NSCs分化。

本实验结果显示,在海马NSCs的培养过程中,可形成球形细胞团,Nestin免疫荧光反应呈阳性,说明培养的细胞是具有自我更新能力的NSCs,并且在球形细胞团中有些细胞整合BrdU(细胞分裂标记物),这就说明这些NSCs是具有增殖能力的细胞团。在对照组的实验当中,也就是用胎牛血清来诱导分化后,我们观察到培养的海马NSCs可分化为神经元和神经胶质细胞,因为海马组织是神经组织,所以可向神经细胞方向分化[12,13]。形态学观察结果显示,蒺藜皂苷干预实验组中海马NSCs也可向神经元和神经胶质细胞方向分化,细胞形态差别不大,但是细胞计数结果显示蒺藜皂

苷干预实验组中海马 NSCs 向神经元分化的数量较多，远远高于对照组，统计学上有差异。而向胶质细胞方向分化没有差异，这说明蒺藜皂苷对海马 NSCs 向神经元的分化有促进作用，因为蒺藜皂苷是一种成分很复杂的中药制剂，以往研究表明蒺藜皂苷是从蒺藜科植物蒺藜中提取的甾体皂苷，具有降低血淤大鼠全血黏度，抗血小板聚集，抑制血栓形成，改善血液流变学，抗心肌缺血、缺氧，抗脑缺血及改善脑缺血部位的血流量，减轻心脑缺血、缺氧损伤的作用，临床主要用于缺血性心脑血管疾病治疗。我们推测蒺藜皂苷的成分中，可能含有 EGF 等神经生长因子，以诱导干细胞分化。而且我们还发现，在 20 mg/kg 蒺藜皂苷干预组中，海马 NSCs 向神经元分化的数量较多，神经元是神经系统的功能细胞，促使 NSCs 向神经元的方向分化细胞数量越多，获得的功能细胞越多，干细胞治疗效果越好。所以从这个意义上说，蒺藜皂苷对于诱导海马 NSCs 向功能细胞方向分化具有十分重要的意义。另外 NSCs 的分化还受到各种因素的影响，包括细胞自身基因[14]和外来信号[15]的调控。外来因素对 NSCs 分化的影响也越来越受到人们的重视。但是蒺藜皂苷是如何影响 NSCs 的增殖分化，对 NSCs 分化的基因和外来信号的影响如何，是我们下一步的研究方向。相信随着对干细胞定向分化和可塑性研究的深入，人类 NSCs 将会取得突破性进展，从而为治疗临床疾病开辟一条崭新的道路。

参考文献：

[1] Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system[J]. Science, 1992, 255 (5052): 1707 - 1710.

[2] Lendahl U, Zimmerman L B, McKay R D. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein[J]. Cell, 1990, 60(4): 585 - 595.

[3] Reynolds B A, Tetzlaff W, Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes[J]. J Neurosci, 1992, 12(11): 4565 - 4574.

[4] Weiss S, Reynolds B A, Vescovi A L, *et al*. Is there a neural stem cell in the mammalian forebrain? [J]. Trends Neurosci, 1996, 19 (9): 387 - 393.

[5] 王秀华，李　红，温　克，等. 注射用蒺藜皂苷的抗脑缺血作用[J]. 吉林大学学报：医学版，2004，30 (1)：60 - 62.

[6] 王雪云，李　红，杨世杰. 蒺藜皂苷对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报，2005，21 (1)：111 - 114.

[7] 刘建军，姚忠祥，秦茂林，等. 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[J]. 第三军医大学学报，2006，28 (14)：1970 - 1472.

[8] Keirstead H S. Stem cell transplantation into the central nervous system and control of differentiation[J]. J Neurosci Res, 2001, 63(3): 233 - 236.

[9] Bjorklund L M, Sanchez-Pernaute R, Chung S, *et al*. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(4): 2344 - 2349.

[10] Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, *et al*. Transplantation of *in vitro*-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats[J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 925 - 933.

[11] 阳运康，鲁晓波，张忠杰，等. 人胚神经干细胞的培养与基因修饰后体内的表达[J]. 第三军医大学学报，2007，29(3)：270 - 272.

[12] 吴智远，芦　奕，惠国桢，等. 人胚骨髓基质干细胞的分离纯化及向神经样细胞的诱导分化[J]. 实用临床医药杂志，2004，8 (1)：6 - 9.

[13] 席　恺，董明敏. 新生豚鼠海马神经干细胞的分离培养及鉴定[J]. 郑州大学学报：医学版，2005，40(3)：471 - 473.

[14] Hermanson O, Jepsen K, Rosenfeld M G. N-CoR controls differentiation of neural stem cells into astrocytes[J]. Nature, 2002, 419 (6910): 934 - 939.

[15] Kokuzawa J, Yoshimura S, Kitajima H, *et al*. Hepatocyte growth factor promotes proliferation and neuronal differentiation of neural stem cells from mouse embryos[J]. Mol Cell Neurosci, 2003, 24(1): 190 - 197.

（编辑　汪勤俭）

《军医大学学报》(英文版)欢迎投稿

Journal of Medical Colleges of PLA 是由3所军事大学和南方医科大学共同主办的，国内外公开发行的综合性学术类英文期刊，是中国英文版科技论文统计源期刊，并被列为中文核心期刊数据库、中国期刊全文数据库、重庆维普数据库。国内统一刊号：31 - 1002/R，国际标准刊号：ISSN 1000 - 1948。双月刊，逢自千字，注本方法，千字报道，突破篇幅，免费赠阅样刊5本；千字收取审稿费；大幅酌减一段检索卡；中文或大摘要1，英文摘各1份，照片提供3份。电子投稿 E-mail：kindin@mail.tmmu.com.cn。原则需以附件形式发送 DOC 或 TIF 格式。电子投稿请注明英文版。联系地址：重庆市渝中区陈家桥第三军医大学学报编辑部（400038）电话：(023)68752782