论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0144-04

丹参诱导骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的突触功能研究

胡琳燕,余加林,李 芳,刘官信,李禄全 (重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

摘 要:目的 探讨由丹参诱导骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)定向分化的神经细胞是否具有突触循环功能。**方法** 采用优化诱导方案对4~5代状态好的MSCs进行反复多次诱导,终止诱导后分别进行免疫荧光细胞化学、细胞内钙离子流及突触功能检测。以50 mmol/L KCl作为诱发动作电位的刺激因子,采用激光共聚焦显微镜(LSCM)对Fluo-3/AM和SynaptoRed C-2荧光探针进行荧光激发,检测分化神经细胞在细胞外高钾刺激下细胞内钙流及细胞突触功能。**结果** 4次诱导5 h后,神经样细胞伸出突起并交互成复杂网状;免疫荧光细胞化学显示4次诱导5 h后TUJ-1表达率为(96.7±2.8)%,突触小泡蛋白(synaptophysin)表达率为(96.2±2.1)%;LSCM显示4次诱导5 h后细胞在高钾刺激下细胞内钙流增加,细胞突触发生胞吞胞吐。**结论** 丹参可高效快速诱导MSCs分化为神经细胞,此细胞具有正常的突触循环功能。

关键词: MSCs;丹参;神经性分化;突触功能
中图法分类号: R282.71;R329.21;R338.13 **文献标识码:** A

Synapse function of neuron-like cells induced from mesenchymal stem cells by Salvia miltiorrhiza

HU Lin-yan, YU Jia-lin, LI Fang, LIU Guan-xin, LI Lu-quan (Department of Neonatology, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To explore whether the neurons induced from mesenchymal stem cells (MSCs) have synapse function or not. **Methods** Passage 4-5 MSCs in good shape was induced by Salvia miltiorrhiza with optimized protocol for several times, and then the observation under inverted phase contrast microscope, immunofluorocytochemistry and the measurement of neurophysiological function were carried out. Ca^{2+} influx and synapse function were detected with laser-scanning confocal microscopy(LSCM), taking 50 mmol/L KCl as stimuli to evoke action potential. **Results** The cells that had been induced for 5 h at 4th time from MSCs, looked like neurons and displayed that the processes stretched out to form complex net. Immunofluorocytochemistry presented that the rate of TUJ-1 expression was (96.7±2.8)% and that of synaptophysin was (96.2±2.1)%. When the neuron-like cells were stimulated by high concentration of KCl, intracellular Ca^{2+} influx enhanced quickly. When the neuron-like cells were stimulated by high KCl solution for the first time, SynaptoRed-C2 anchored onto the membrane, and after the second excitation, the fluorescence intensity decreased quickly. **Conclusion** The neuron-like cells derived from MSCs that are induced by salvia miltiorrhiza with optimized protocol have synapse function.

Key words: mesenchymal stem cells; Salvia miltiorrhiza; neuron differentiation; synapse function

骨髓间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)属多能干细胞,具有自我更新和多向分化潜能,在一定条件下可分化为神经细胞[1]。近来,诸多报道认为某些条件下所谓MSCs诱导分化的神经样细胞只是细胞的收缩,并不具有神经生理功能[2]。作为神经细胞功能的判断,一是能够感受细胞内外各种刺激而引起的兴奋或抑制,即产生生物电的功能;二是对不同来源的兴奋或抑制进行分析,通过神经突起传递递质,产生一定的生理调节和调控效应[3]。本课题组在前

基金项目: 国家中医药管理局科研基金([2007]223号)(2006LHR09);重庆市教育委员会科研基金([2006]8号)(KJ060303);重庆市卫生局中医处指导项目([2004]12号)(2004-B-66)
Supported by the Foundation of State Administration of Traditional Chinese Medicine of China (2006LHR09), the Research Foundation Chongqing Municipal Educational Committee (KJ060303) and the Mandatory Program of Chongqing Bureau of Public Health (2004-B-66)
作者简介: 胡琳燕,女,江西省临川市人,博士研究生,医师,主要从事干细胞神经性分化及移植方面的研究。电话:(023)63635567, E-mail: huli3188@yahoo.com.cn
通信作者: 余加林,电话:(023)63635567, E-mail: yujialin486@sohu.com
收稿日期: 2008-03-14;**修回日期:** 2008-05-04

期工作中已经证实丹参可以高效诱导 MSCs 分化为神经样细胞,诱导前的 MSCs 属非兴奋性细胞,受高钾刺激并不能产生去极化,通过丹参多次诱导后,神经样细胞渐趋成熟,在受到高钾刺激后细胞能发生去极化,具有电兴奋性[4]。突触传递是研究神经信息处理、传递的神经生物学的中心问题。本研究主要针对诱导后的细胞是否具有突触传递功能进行实验,旨在为骨髓间充质干细胞应用于临床奠定基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物　　清洁级 4 周龄体质量 60 ~ 80 g Wistar 大鼠 8 只,雌雄不限,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心[合格证号:SCXK(渝)20020003]。

1.1.2　主要试剂　　DMEM/F21 培养基(美国 Gibco 公司),胎牛血清(澳大利亚 PAA 公司),重组人碱性成纤维生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF,英国 PeproTech 公司),丹参注射液(15 g/10 ml,正大青春宝),Nerve Terminal Staining Kit V(包括 SynaptoRed C2 和 Advasep-7,美国 Biotium 公司),Fluo-3/AM (美国 Invitrogen 公司),小鼠抗 TUJ-1 单克隆抗体(美国 Promega 公司),兔抗突触小泡蛋白(synaptophysin)多克隆抗体(美国 Neomarkers 公司),羊抗鼠 FITC 荧光二抗(中杉金桥),羊抗兔 Cy3 荧光二抗(美国 Sigma 公司,武汉博士德公司分装),DAPI(美国 Roche 公司)。

1.1.3　主要试剂的配制　　突触循环荧光染料配制:将 SynaptoRed C2 溶于蒸馏水中,配成 1×10^4 μmol/L 储备液,20 ℃保存,染色前用高钾细胞外液稀释成 10 μmol/L 的工作液。正细胞外液配制(mmol/L):140 NaCl, 5 KCl, 10 Hepes, 10 D-glucose, 1.8 $CaCl_2$,1.0 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 用 NaOH 将 pH 调至 7.4,渗透压 310 mOsm。高钾细胞外液配制(mmol/L):95 NaCl,50 KCl,10 Hepes,10 D-glucose,1.8 $CaCl_2$, 1.0 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,用 NaOH 将 pH 调整至 7.4,渗透压 310 mOsm。Fluo-3/AM 的配制:将 Fluo-3/AM 溶于二甲亚砜(DMSO)配成 5 mmol/L 的储备液, -20 ℃保存。染色前用测钙缓冲液稀释为 5 μmol/L 的工作液。测钙缓冲液(无镁)配制(mmol/L):154 NaCl,5.6 KCl, 2.3 $CaCl_2$,5.6 D-glucose,8.6 Hepes,用 NaOH 将 pH 调至 7.4,渗透压 310 mOsm。高钾刺激液配制:将 KCl 溶于蒸馏水中,配成 250 mmol/L。

1.2　实验方法

1.2.1　MSCs 的培养　　将 Wistar 大鼠断颈处死,无菌条件下分离股骨和胫骨,骨髓冲洗液离心后用含 10% FBS 的培养基重悬,接种于培养瓶中,置于 37 ℃、5% CO_2 湿饱和恒温孵箱培养 48 h 后首次换液,以后每 2 ~ 3 天换液 1 次,细胞达 80% ~ 90% 融合后 0.25% 胰酶消化传代,取 4 ~ 5 代状态良好的细胞进行实验。

1.2.2　MSCs 的诱导分化　　参考本课题组前期方法[4]。

1.2.3　免疫荧光细胞化学　　将经过 4 次诱导 5 h 后的细胞爬片用 0.01 mol/L PBS 洗去诱导液,预冷纯丙酮固定,PBS 洗 3 次,正常山羊血清室温下封闭 30 min,甩去多余血清,一抗 4 ℃反应过夜,PBS 洗 3 次,荧光二抗室温下避光反应 45 min,PBS 洗 3 次,DAPI 染核室温下避光复染 10 min,PBS 洗 3 次,片干后 50% 缓冲甘油封片,激光扫描共聚焦显微镜(LSCM)下观察。阴性对照以 PBS 代替一抗。

1.2.4　钙流的检测　　取经过 4 次诱导 5 h 后的细胞爬片去弃诱导液,用测钙缓冲液洗 3 遍,滴加 5 μmol/L 的 Fluo-3/AM 置于 37 ℃孵育 45 min 后用测钙缓冲液漂洗 3 遍,将细胞爬片置于 LSCM 的载物台上,加 400 μl 测钙缓冲液扫描 30 s 后加 100 μl 250 mmol/L 的高钾(工作浓度为 50 mmol/L)刺激液,再次扫描 30 s,刺激前后均以最快速度获取图片,重复测试 5 张细胞爬片,每张爬片选取 10 个细胞进行荧光强度分析。

1.2.5　突触循环检测　　参考 Willeumier 等[5]的方法,对经过 4 次诱导 5 h 后的细胞进行突触循环功能的检测。LSCM 在用正细胞外液灌洗的最后 30 s 以及第 2 次高钾刺激后以最快速度抓取图片,重复测试 5 张细胞爬片,每张爬片选取 10 个细胞进行荧光强度分析。

2　结果

2.1　MSCs 的培养及分化

首次换液后,可见散在的细胞集落,细胞呈长梭形,成纤维样,7 ~ 8 d 细胞基本铺满瓶底,呈漩涡状生长。传代细胞 2 ~ 3 d 可铺满瓶底,漩涡状生长,分布均匀。加入预诱导液 24 h 内,细胞形态未见明显改变,细胞仍呈梭形,成纤维样。更换含 60 mg/L 丹参液及 10 ng/ml bFGF 的无血清培养基诱导 4 次 5 h 后,细胞胞体缩小,折光性增强,伸出突起相互交错呈复杂网状。

2.2　神经细胞表面蛋白检测结果

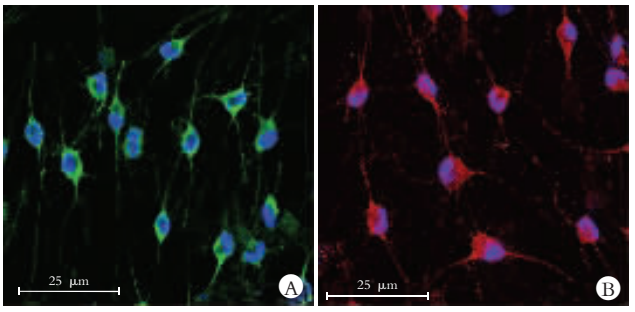
4 次诱导 5 h 后 TUJ-1 和突触小泡蛋白表达阳性,TUJ-1 表达率为(96.7 ± 2.8)%,突触小泡蛋白表达率为(96.2 ± 2.1)%(图 1)。

2.3　钙流检测结果

神经样细胞在受刺激之前,其细胞内荧光值在小范内波动;当被高浓度钾刺激后,荧光强度瞬时明显增强,说明细胞发生动作电位后,细胞内钙流增强(图 2),荧光强度变化经分析后可见荧光强度曲线瞬时升高,升高幅度约 15%。

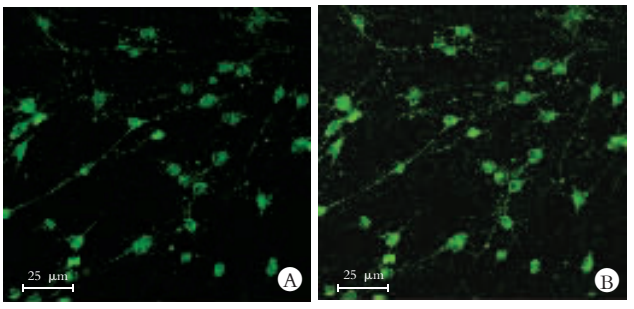
2.4　突触循环检测结果

神经样细胞首次被高钾激发后均被 SynaptoRed-C2 染色。这些染色颗粒多位于胞体近突起端和突起上,呈致密点状分布,说明细胞在高钾刺激后产生动作电位后发生胞吞作用。当再次被高钾激发后细胞荧光强度降低(图 3),荧光强度变化经分析可见荧光强度曲线瞬时下降,下降幅度为 27%。



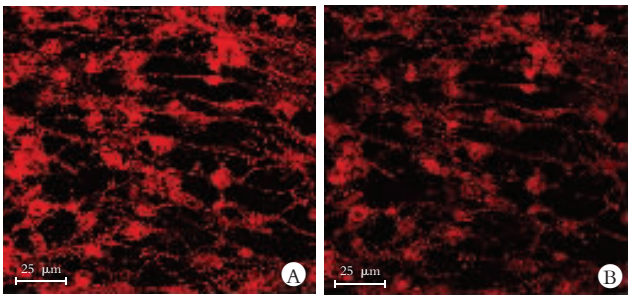
A:TUJ-1(绿色为 FITC 染色)与 DAPI(蓝色)叠加图; B:突触小泡蛋白(红色为 Cy3 染色)与 DAPI(蓝色)叠加图

图1 LSCM 下观察 MSCs 经丹参诱导4次5 h后神经样细胞表面蛋白的表达 (免疫荧光细胞化学染色)



A:神经样细胞的荧光探针 Fluo-3/AM 染色; B:神经样细胞经高钾刺激后

图2 MSCs 经丹参诱导4次5 h后的神经样细胞内钙流变化 (免疫荧光细胞化学染色)



A:神经样细胞第1次经高钾刺激后的荧光探针 SynaptoRed-C2 染色; B:神经样细胞第2次经高钾刺激后荧光脱色

图3 MSCs 经丹参诱导4次5 h后的神经样细胞受高钾刺激后的突触循环 (免疫荧光细胞化学染色)

3 讨论

目前,诱导 MSCs 神经性分化有抗氧化剂和细胞因子。多项研究表明,丹参提取成分丹参酮ⅡA、隐丹参酮可以诱导 MSCs 定向神经性分化[6,7]。本课题组前期工作中业已证实丹参注射液可以诱导 MSCs 神经性分化。在诱导分化过程中,bFGF 起着启动和促进作用,而丹参具有较强的抗氧化作用,在诱导环节中担当着操纵子的角色[8]。本课题组前期研究证实了丹参结合 bFGF 对 MSCs 进行分化和去分化多次处理后,形态学更趋向成熟型神经样细胞,且在高钾的刺激下表现出有电生理特性[4]。

本实验继续沿用前期的优化诱导方案,即将 MSCs 进行多次分化及去分化,细胞经过4次诱导5 h后,成熟神经元标志物 TUJ-1 和突触小泡蛋白均表达阳性,且两者的表达阳性率基本吻合,说明从形态学及蛋白表达水平上来说,分化后的细胞具有合成突触素蛋白的能力。

本研究中仍采用高钾作为刺激,使细胞产生动作电位,使神经样细胞产生电-化学-电得传递过程,当突触前神经元兴奋时,通过动作电位的全或无式传导,兴奋很快传到神经末稍。神经末梢的动作电位可以使突触前膜发生去极化,当去极化达一定水平时,则引起前膜电压门控式 Ca^{2+} 通道开放,于是细胞外液中的 Ca^{2+} 进入突触前膜,通过降低轴浆的黏度以及消除突触前膜内侧的负电位而最终导致神经递质得释放。即递质释放过程经历:细胞去极化产生动作电位→胞内钙流增加→递质释放,胞内钙流的增加是引起突触释放递质也即突触循环的前提。在本实验中,为排除细胞外镁对实验结果的影响,我们采用无镁测钙缓冲液,检测结果显示该神经样细胞受高钾刺激后发生去极化引起胞内 Ca^{2+} 流增加,说明该细胞已具备释放递质的前提条件。

突触传递中的一个关键环节为神经递质释放,神经递质储藏于突触前囊泡中,在神经冲动和 Ca^{2+} 触发下,经一系列过程导致囊泡与突触前膜融合,将所含递质以胞吐形式释放出来;然后神经递质又被回收,重新充盈囊泡,为下一次释放作准备,完成一个突触囊泡循环过程。苯乙烯类荧光探针是近年来发展和广泛应用于突触囊泡循环及突触传递研究领域的一类工具药,能特异性地标记突触囊泡,发出荧光,而又不影响囊泡的活性和运转,因此在突触事件中依照荧光强度的变化就可以推断相应的神经胞吞及胞吐的程度,以一种活性依赖的方式追踪囊泡的胞吞胞吐及循环过程[9]。Nerve Terminal Staining Kit V 包括 SynaptoRed-C2 和 Advasep-7。SynaptoRed-C2 用来跟踪细胞突触循环过程,细胞发生去极化时,由于细胞发生胞吞作用而使探针镶嵌到细胞膜上,当细胞再次受到刺激发生动作电位时,细胞发生胞吐作用而使细胞突触及胞体的荧光强度降低,即利用2次激发细胞的动作电位而检测细胞的胞吞胞吐循环功能。Advasep-7 是 SynaptoRed-C2 荧光淬灭剂,它可以淬灭被胞吐出来的荧光染料,而减少背景荧光强度,使荧光染料集中聚居于细胞质内,也使研究结果更为精确。本研究结果证实了诱导后的神经样细胞具有突触循环功能,也具有释放递质的能力,

具体释放何种递质还有待于进一步实验证实。

丹参具有以下功能:①改善脑血流灌注和脑血流自动调节机制;②阻滞钙离子内流;③抗生物膜过氧化作用;④改善血流流变性以抗血栓形成;⑤改善微循环以助内环境稳定[10]。但仅依赖丹参还不能解决根本问题。前期工作中我们证实了丹参可以提高MSCs的神经性分化效率,诱导后的细胞具有电生理特性[4],本研究结果还提示诱导后的细胞在发生动作电位后发生胞吞胞吐循环,具有释放神经递质的能力。这些都可能为体内MSCs移植结合丹参干预并以最少后期副作用且最佳治疗效果治疗中枢神经系统损伤提供理论依据。

(致谢:衷心感谢第三军医大学基础医学部中心实验室孙伟、王丽婷老师对本实验的完成给予的技术支持和帮助!)

参考文献:

[1] 江和碧, 卓本慧, 代 英, 等. bFGF促进大鼠骨髓间充质干细胞向神经元转化及机制[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(2): 98-101.
[2] Lu P, Blesch A, Tuszynski M H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: Differentiation, transdifferentiation, or artifact? [J]. J Neurosci Res, 2004, 77(2): 174-191.
[3] 朱大年. 神经系统功能[M]//姚 泰. 生理学, 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 275-337.
[4] 胡琳燕, 余加林, 刘官信, 等. 丹参诱导鼠骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞优化方案及电生理研究[J]. 细胞生物学杂志, 2008, 30:392-396.
[5] Willeumier K, Pulst S M, Schweizer F E. Proteasome inhibition triggers activity-dependent increase in the size of the recycling vesicle pool in cultured hippocampal neurons [J]. J Neurosci, 2006, 26(44): 11333-11341.
[6] 夏文杰, 陈振光, 张丽蓉, 等. 隐丹参酮诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(12): 921-924.
[7] 夏文杰, 项 鹏, 张丽蓉, 等. 丹参酮ⅡA定向诱导骨髓间质干细胞分化为神经元样细胞的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(7): 865-869.
[8] 李禄全, 余加林, 刘官信, 等. 复方丹参注射液诱导鼠骨髓间充质干细胞向神经样细胞分化的研究[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(1): 53-54.
[9] Cousin M A. Use of FM1-43 and other derivatives to investigate neuronal function[J]. Curr Protoc Neurosci, 2008, Chapter 2: Unit2.6.
[10] Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use [J]. J Clin Pharmacol, 2005, 45(12): 1345-1359.

(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2009)02-0147-01

个案与短篇

青春期输卵管扭转保留输卵管治疗成功1例

张 流,冯惠玲 (广西柳州柳钢集团职工医院妇产科,广西 柳州 545002)

输卵管扭转是一种较为少见并缺乏特异性表现的急腹症,临床一时难以确诊,常被误诊为急性阑尾炎、卵巢肿瘤蒂扭转等,传统术式为切除患侧输卵管,这无疑增加了不孕症的发病率。本院收治1例青春期输卵管扭转并保留输卵管治疗成功,现报告如下。

1 临床资料

患者女性,12岁,学生。因"右下腹疼痛9 h"于2008年1月15日15:30时拟诊为"急性阑尾炎?"收住入本院普外科。月经来潮1年余,无性生活史。查体:体温37.6 ℃,脉博102次/min,呼吸20次/min ,血压100/60 mmHg,急性痛苦面容,右下腹腹肌稍紧张,压痛明显,轻度反跳痛,腰大肌试验(+),移动性浊音(-)。B超:右下腹见一混合性肿块,大小56 mm×28 mm,尿HCG(-)。血常规:WBC 8.1×10^9/L,中性粒细胞0.641,Hb 133 g/L。次日11时行阑尾切除术,术中发现:盆腔有少量淡红色渗液,右侧输卵管扭转,阑尾未见明显充血、水肿。术中请我科医师上台探查:子宫前位,大小约5 cm×4 cm×3 cm,左输卵管外观正常,长约12 cm;右侧输卵管峡部由后向前扭转360°×3周,壶腹部至伞部肿大瘀血,大小为10 cm×7 cm×6 cm,其伞端呈紫黑色,水肿,未见渗血;壶腹部输卵管卵巢侧见一滤泡囊肿,大小约1 cm×1 cm。右侧卵巢大小约2 cm×2 cm×1.5 cm,有一破裂口大小约1 cm×1 cm,,有少许活动性渗血(考虑为排卵所致)。经与家属沟通,决定保留患侧输卵管并签字。将肿物向对侧提拉以充分暴露骨盆漏斗韧带,查清该韧带下方及腹膜后方的输尿管走形后,纵行剪开骨盆漏斗韧带表面的腹膜约3 cm,锐性分离血管(卵巢动、静脉)与其周围腹膜间的结缔组织,提起卵巢血管,确认与其下方相邻的输尿管完全分离后,用4-0丝线在扭转蒂的根部上方(近端)3 cm处结扎卵巢动、静脉(不剪断)。已剪开的骨盆漏斗韧带表面的腹膜可用4-0可吸收线缝合[1]。然后将已扭转的输卵管按相反

(下转165页)

作者简介:张 流,女,广西壮族自治区柳州市人,主治医师,主要从事妇科肿瘤治疗方面的研究。电话:(0772)2596036, E-mail:838695572@qq.com

收稿日期:2008-10-27;修回日期:2008-12-02