冬虫夏草含药血清诱导神经干细胞定向分化的影响

郑衍芳[1],李艳君[2],钟震亚[2],李啸红[1],黄昕燕[2] (1. 遵义医学院珠海校区人体解剖与组织胚胎学教研室,广东 珠海 519041;2. 佳木斯大学基础医学院,黑龙江 佳木斯 154007)

[摘 要] **目的** 探讨冬虫夏草中含药血清诱导神经干细胞(NSCs)定向分化的作用。**方法** 取新生 24 h 内的 Wistar 大鼠大脑海马区分离培养神经干细胞三代后,加入低、中、高剂量冬虫夏草含药血清与对照血清进行培养,观察其对神经干细胞影响,通过 MTT 检测神经细胞生长曲线和免疫组化法检测神经干细胞向神经元分化的情况。**结果** 新生大鼠海马分离培养的神经克隆球,经免疫细胞化学染色检测为 Nestin 阳性细胞。神经干细胞贴壁分化的细胞呈 NSE、GFAP 阳性。冬虫夏草低、中剂量组诱导神经干细胞分化为神经元的阳性细胞明显高于对照组,且呈量效依赖关系,高剂量组与对照组没有明显差别。**结论** 冬虫夏草含药血清可体外诱导神经干细胞向神经元方向分化,在一定范围内存在量效依赖关系。

[关键词] 神经干细胞;冬虫夏草;细胞分化

[中图分类号] R329.26;Q254 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)05-0507-03

Directed differentiation of neural stem cell induced by aweto serum

ZHENG Yan-fang, LI Yan-jun, ZHONG Zhen-ya, LI Xiao-hong, HUANG Xin-yan (Department of Anatomy, Histology and Embryology, Zhuhai School of Zunyi Medical College, Zhuhai Guangdong 519041, China)

Abstract: Objective To study the effect of aweto serum on directed differentiation of neural stem cells in hippocampi of newborn rats. **Methods** Hippocampi of newborn Wistar rats within 24 hours were isolated and three generations of neural stem cells were cultured. Low, medium and high doses of aweto serum were added in culture medium and their effects on neural stem cells were observed and compared with that of control serum. Nerve cell growth curve was detected by MTT and the differentiation of neural stem cells into neurons was examed by immunohistochemistry. **Results** The isolated hippocampal nerve clone ball was identified as Nestin-positive cells after immunocytochemistry detection. The differentiated cells adhering to NSC were NSE and GFAP positive. More positive neurons differentiated by neural stem cells were observed in low and medium dose of aweto serum group, and the effect was in proportion with the dose. There was no difference between high dose of aweto serum group and control group. **Conclusion** The aweto containing serum can induce the differentiation of neural stem cell into neurons in vitro and the effect is in dependence with the dose to some extent.

Keywords: neural stem cell; aweto; cell differentiation

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是神经系统发育过程中特殊的细胞群,能够在适当的微环境中分化产生神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。研究表明移植神经干细胞治疗急、慢性脊髓损伤以及多种神经系统疾病具有广阔的临床应用前景[1]。本实验取新生 24 h 内的 Wistar 大鼠大脑海马区分离培养神经干细胞三代后,加入低、中、高剂量冬虫夏草含药血清与对照血清进行培养,观察其对神经干细胞影响,通过 MTT 检测神经细胞生长曲线,免疫组化法和 RT-PCR 半定量检测神经干细胞向神经元分化的情况。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

培养神经干细胞取材所用动物为新生 24 h 内的 Wistar 大鼠,灌胃取血清的动物为平均体重 200 g 的 Wistar 大鼠,均由佳木斯大学动物实验中心提供。冬虫夏草由杭州中美华东制药有限公司(国药准字 Z10910036)提供。NSE 一抗、GFAP 一抗、SABC 免疫组化试剂盒、DAB 试剂盒等购自 Gibco 公司。

1.2 冬虫夏草含药血清的制备

随机选取体重约 200 g 的 Wistar 大鼠 40 只随机分为四组,每组 10 只,适应性喂养 7 d 后,实验组分别给予冬虫夏草水溶液 0.5 $g \cdot kg^{1} \cdot d^{-1}$(低剂量组)、0.75 $g \cdot kg^{1} \cdot d^{-1}$(中剂量组)、1 $g \cdot kg^{1} \cdot d^{-1}$(高剂量组),分两次灌胃,其中血清对照组予以等量的生理盐水灌胃。灌胃 14 d,第 14 天早灌胃 1 h 后,将大鼠进行乙醚麻醉后,行心脏采血,分离血清,56 ℃水浴 30 min 灭活,置 -20 ℃冰箱冻存备用。

1.3 NSCs 的分离培养和传代培养

取新生 Wistar 大鼠在无菌条件下断头取海马组织,Hanks

[基金项目] 佳木斯大学重点课题(Sz2009-006)

[作者简介] 郑衍芳(1981 -),女,山东省济宁市人,助教,硕士,主要从事神经干细胞基础和应用方面的研究。电话:(0756)7623354,E-mail:zhengyanfang-123@163.com

[通讯作者] 李艳君,电话:(0454)8618356,E-mail:jmslklyj@163.com

[收稿日期] 2011-03-24 [修回日期] 2011-04-16

液漂洗 3 次后,放入盛有适量 DMEM/F12 培养基的小瓶中,剪成大小约 1 mm × 1 mm × 1 mm 组织块,调整细胞为 1×10^5/mL,接种到含 EGF,bFGF,B27 的 DMEM/F12 培养基的培养瓶中,放入 37 ℃、5% CO_2、湿度 80% 的 CO_2 培养箱中,每隔 3.5 d 量换液,7 d 行细胞传代。

1.4 NSCs 的 Nestin 鉴定及诱导分化

对原代培养 7 d 的神经干细胞进行免疫细胞化学染色,PBS 洗后 0.2% Triton-100 破膜 10 min;30% H_2O_2-甲醇灭活 30 min;封闭血清 20 min;一抗为 Nestin(1∶400)4 ℃孵育过夜;滴加生物素化二抗 20 min;滴加 SAB 复合物,DAB 显色。对照组用 PBS 代替一抗。将传三代后的神经干细胞球分 4 组,接种在赖氨酸包被的 24 孔板上,实验组用 DMEM/F12 培养液加 10% 低、中、高剂量的药物血清培养,对照组用 DMEM/F12 培养液加 10% 的鼠血清培养。每隔 1 天换液,培养 7 d。

1.5 诱导后 NSCs 的免疫细胞化学染色

对药物诱导 7 d 的神经干细胞分别进行免疫细胞化学染色,一抗分别为 Nestin(1∶400)、NSE(1∶200)、GFAP(1∶200)。其余步骤同前述步骤。

1.6 MTT 法检测诱导后细胞生长状况

将三代后的神经干细胞以 1×10^5/mL 的密度接种在 96 孔板中,无血清培养 48 h 后更换培养基,设 4 组空白对照组,冬虫夏草水提取液药物血清低浓度组,冬虫夏草水提取液药物血清中浓度组,冬虫夏草水提取液药物血清高浓度组。各浓度组加入对应药物血清继续培养 7 d,每隔 24 h,各浓度组选 5 孔,加入 5 g/L MTT 溶液 20 μl,再加入一甲基亚砜振荡溶解,在酶联免疫检测仪上测定各孔的吸光度值,绘制细胞生长曲线,分析药物诱导后神经细胞生长状况。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件处理,用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析与 q 检验,$P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

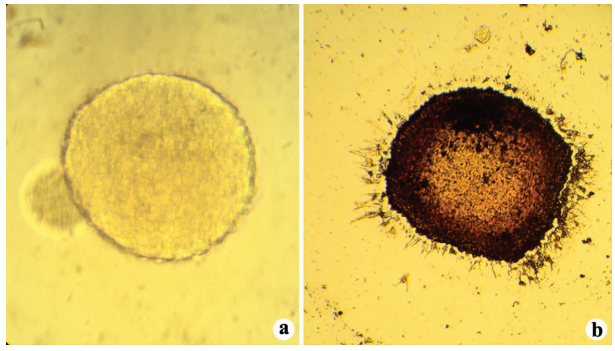
2 结果

2.1 细胞培养及神经干细胞 Nestin 免疫染色观察

原代培养 7 d 可见肉眼可见较多的神经球聚集,液体橘红色,透明。镜下观察,神经球比较多,背景干净,球散在培养液中,密度适中,细胞球透明,折光度好,大多球是吹散后,重新聚集的情况(图 1a)。经免疫细胞化学染色,神经干细胞标记性蛋白 Nestin 在原代及传代培养的神经球均有表达(图 1b),胞浆及突起呈黄褐色。

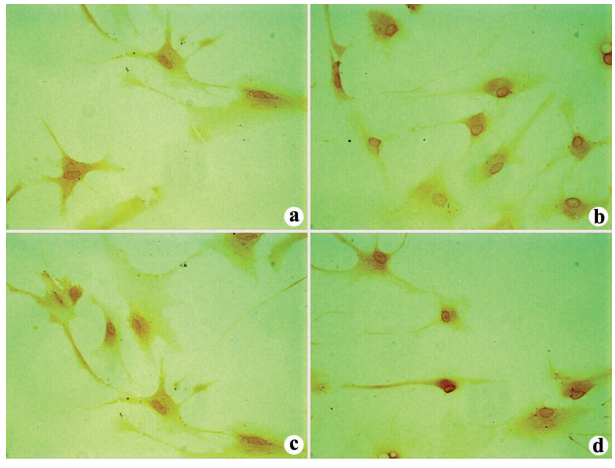
2.2 冬虫夏草含药血清诱导 NSCs 增殖分化的检测

免疫组化显示分化后细胞 NSE 阳性。与对照组相比,在冬虫夏草各剂量实验组分化细胞 NSE 阳性细胞较多(图 2),差异显著($P < 0.05$),存在一定的量效关系(表 1)。实验组较对照组相比胞体较大,突起较长、较粗。利用 MPLAS-500 图像分析系统检测显示各剂量实验组 NSE 阳性细胞面积、周长均大于对照组,差异显著,见表 2。



a:原代培养第 7 天神经球;b:神经干细胞 Nestin 染色

图 1 细胞培养及神经干细胞 Nestion 染色观察(×250)



a:血清对照组分化 7 d;b:低剂量组分化 7 d;c:中剂量组分化 7 d;d:高剂量组分化 7 d

图 2 免疫组化显示 NSE 阳性细胞(×400)

表 1 诱导神经干细胞分化 7 d 后 NSE、GFAP 阳性细胞数量($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	NSE 阳性细胞总数(个)	GFAP 阳性细胞总数(个)
对照组	14.73 ± 1.17	23.83 ± 1.14
低剂量组	26.50 ± 1.87*	15.83 ± 1.16*
中剂量组	23.83 ± 1.47*	18.00 ± 1.41*
高剂量组	18.33 ± 1.37#	21.50 ± 1.05#

*:与对照组比较,$P < 0.01$;#:与对照组比较,$P < 0.05$

表 2 诱导神经干细胞分化 7 d 后 NSE 阳性细胞周长和面积测量($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	周长(μm)	面积(μm^2)
对照组	114.50 ± 6.79	151.15 ± 18.82
低剂量组	145.71 ± 5.17*	248.10 ± 29.26*
中剂量组	142.23 ± 6.54*	239.19 ± 26.23*
高剂量组	118.91 ± 5.21#	167.63 ± 16.74#

*:与对照组比较,$P < 0.01$;#:与对照组比较,$P < 0.05$

2.3 MTT 检测结果

药物诱导后细胞增殖 MTT 比色法检测结果显示,冬虫夏草低、中剂量组对神经干细胞的促增殖作用显著($P<0.01$),高剂量组与对照组无显著性差别($P<0.05$),见图 3。

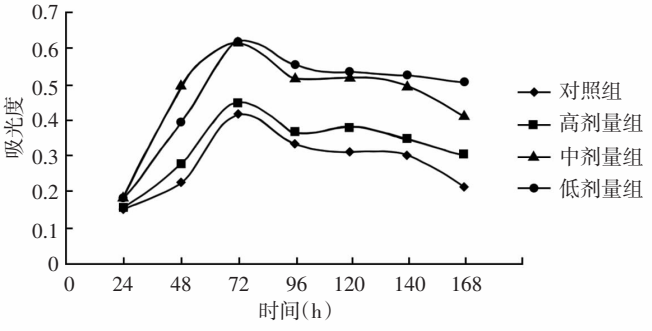


图 3 药物诱导后各组细胞生长曲线

3 讨论

NSCs 是神经系统发育过程中特殊的细胞群,是能够在适当的微环境中分化产生神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞的一类多能干细胞。神经干细胞的特性有:①可生成神经组织;②具有自我更新能力;③能够分裂增殖。NSCs 的特异性标志抗原是神经巢蛋白,或称神经上皮干细胞蛋白,是 NSCs 的特异性标志物[2-3]。

国内外利用传统中药对神经干细胞分化的研究甚少。动物灌服中药后,提取血清用于体外实验是日本学者 Hiriko Iwama 首先提出的。有研究表明[4-6],NSCs 自然分化为神经元的比例非常低。本实验各试验组促进神经干细胞分化为神经元的数量均高于对照组,且神经元样细胞的面积、周长均大于对照组,这无疑是冬虫夏草水溶液发挥的药理作用。

冬虫夏草含粗蛋白、粗脂肪、总糖、粗纤维,还含有氨基酸、脂肪酸、核苷类物质、甾醇、甘露醇、脂、水分,肪酸,多糖等。其中核苷类中腺苷是最重要的活性物质之一,具有明显的药理作用[7],可抑制神经递质释放和调节腺苷酸环化酶活性等。虫草中的虫草素和 D-甘露醇可以清除自由基[8],起到抗氧化的作用。近年的一系列研究表明,细胞内 ROS 水平的轻微增高促进 NSCs 的增殖和分化,而胞内 ROS 水平的显著增高则快速触发 NSCs 的凋亡。糖蛋白是药食用真菌发挥药效的活性成分之一。大量药理试验表明,虫草糖蛋白具有多种作用,实验证明各种糖蛋白、粘蛋白组成通过调节粘着和迁移能力,以及与细胞外基质中各种生长因子和细胞因子的结合,来影响 NSCs 的增殖和分化[9]。冬虫夏草能够促进轴突再生,可能是通过调节 CRMP-2/FCP-β 的平衡以促进受损伤运动神经元的轴突再生从而有利于神经元轴突的延伸[10]。

由此推断,冬虫夏草能通过上述几个方面促进神经干细胞向神经元方向分化,并对所分化的神经元样细胞有良好的促发育作用。由于血清成分复杂,冬虫夏草的确切机制还有待进一步研究,但我们利用冬虫夏草分化出较多的神经元细胞,这一结果为冬虫夏草治疗神经系统损伤性疾病提供了实验依据,为临床应用做出有益探索。

[参考文献]

[1] cKay R. Stem cells in the central nervous system[J]. Science, 1997, 276(5309):66 - 71.

[2] Rechards LJ, Lilpatrick TJ, BArtlett PF. Denovo generation of neuronal cells from the adult mouse brain[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:(8):591 - 595.

[3] Santa-Olalla J, Covarrubias L. Bacic fibrobiast growth factor promots epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells[J]. Neurobio1, 1999, 40(1):14 - 21

[4] Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, et al. Directed differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells[J]. J Stem Cells, 2005, 23(6):781 - 790.

[5] Tateno M, LTkai W, Ozawa H, et al. Ethanol inhibition of neural stem differentiation is reduced by neurotrophic factors[J]. Alcohol Clin Exp 2004, 28(8):134S - 138S.

[6] 孙 鹏,邹春林,董 恺,等. 人胚海马神经干细胞体外培养及分化研究[J]. 中华神经外科杂志,2005,21(7):393 - 397.

[7] 李绍平,李 萍,季 晖,等. 天然与发酵培养冬虫夏草中核苷类成分的含量及其变化[J]. 药学学报,2001,36(6):436.

[8] Low HP, Savarese TM, Schwartz WJ. Neural precursor cells form rudimentary tissue-like structures in a rotating-wall vessel bioreactor [J]. In Vitro Cell Dev Biol Mim, 2001, 37(3):141 - 147.

[9] Plup M, Core RM, Orali OG, et al. Cadherinsin neural crest cell development and transformation[J]. Cell Physip, 2001, 1989(2):121 - 132.

[10] Nishimura T, Fukata Y, Kato K, et al. CRMP-2 regu-lates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth[J]. Nat Cell Biol, 2003, 5(9):819 - 826.

(编辑:左艳芳)