中国科学 C 辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 8 期: 793 ~ 802
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

论 文

丹酚酸 B 促进胎鼠大脑皮质神经干细胞增殖、突起生长和分化

郭国庆[①], 李斌[①], 王圆圆[①], 山爱景[①], 沈伟哉[①], 原林[②], 钟世镇[②]

① 暨南大学医学院解剖学教研室, 广州 510630;
② 南方医科大学临床解剖学研究所, 广东省组织构建与检测重点实验室, 广州 510150
E-mail: tgqguo@jnu.edu.cn

收稿日期: 2008-12-11; 接受日期: 2009-06-06
国家重点基础研究发展计划(批准号: 2007CB512705)和广州市科技计划(批准号: 2004J1-C0241)资助项目

摘要 丹参是一种常用于治疗脑卒中的传统中草药, 丹酚酸 B 是其有效成份之一. 但人们对丹酚酸 B 如何影响神经干细胞的生长还了解甚少. 本研究用 MTT、流式细胞术、免疫荧光和 RT-PCR 技术检测丹酚酸 B 对胎鼠大脑皮质神经干细胞增殖、突起生长和分化的作用. 结果显示, 20 和 40 μg/mL 丹酚酸 B 对促进神经干细胞增殖的作用相似, 适量的丹酚酸 B 可促进神经干细胞增殖并形成较多的神经干细胞球, 其促增殖作用通过提高 G2/S 期细胞的数量而实现. 丹酚酸 B 还可促进神经干细胞球发出较多的突起并分化出较多的成熟神经元. 分化开始时, tau, GFAP 和 nestin mRNA 均有表达. 但分化后的细胞与对照组比较, tau mRNA 表达增多, 而 GFAP mRNA 表达减少. 说明外源性的丹酚酸 B 具有促进神经干细胞增殖并向神经元分化的作用, 有望成为一种获取更多神经干细胞和促进神经干细胞分化的药物.

关键词
丹酚酸 B
增殖
分化
突起生长
神经干细胞
大脑皮质
胎鼠

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)是一类具有增殖、迁移潜能的细胞, 并能分化为神经元和胶质细胞, 被认为是能够替代或修复缺损和出现功能障碍神经组织的潜在供体细胞来源[1,2]. 由于神经组织受损后胶质细胞大量增生, 神经元难以再生或者仅仅局限于受损部位附近, 所以, 尽管中枢神经系统中存在内源性的 NSCs, 但仅通过内源性 NSCs 再生仍不能完全修复受损神经组织的结构和功能. 由于受损后神经组织的微环境不利于神经元再生, 作为另一种选择, 移植外源性的 NSCs 以替代受损或出现功能障碍的神经元并不能有效的修复受损的神经组织[3]. 单纯应用神经生长因子等生物活性物质能使部分受损的细胞得以幸存, 亦可促进内源性 NSCs 增殖, 但其修复受损神经组织的效果有限[4]. 正是由于受损部位神经组织局部微环境的变化, 造成移植神经元无法存活, 也无法分化为特异性的神经元[5~7], 因此除非能够在 NSCs 的存活和分化等方面取得突破, 才有可能真正达到有效修复受损神经组织的目的[8].

丹参为唇形科植物丹参的干燥根及根茎, 是一种传统的中草药, 常用于治疗心绞痛、心肌梗塞和脑卒中等心脑血管疾病[9]. 丹参的化学成份主要包括脂溶性的丹参酮类化合物和水溶性的酚酸类化合物两大类. 丹参脂溶性成份含有 30 余种二萜醌类化合物, 包括丹参酮(Ⅰ, ⅡA, B), 隐丹参酮, 二氢丹参酮Ⅰ, 甲烯丹参醌和异丹参酮ⅡA 等[10]; 水溶性成份包括丹酚酸 B(Sal B)、丹参素、紫草酸、原儿茶酸和迷迭香酸等[11,12]. 由于人们在服用中草药的时候常采用煎煮的方式, 所以对其有效成份的研究主要集中在

引用格式: 郭国庆, 李斌, 王圆圆, 等. 丹酚酸 B 促进胎鼠大脑皮质神经干细胞增殖、突起生长和分化. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(8): 793—802

水溶性物质. 丹酚酸B是丹参水溶性酚酸类主要的有效成份[13], 也是 8 种复方丹参制剂的主要成份之一[14]. 具有抑制血小板聚集、改善脑血流量[15]、促进新生血管生成[16,17], 并通过减少脂质过氧化、清除自由基和改善能量代谢保护受损的皮肤和减轻心脑等器官缺血性损伤的作用[17,18]. 本实验首先通过传代培养的方法观察胎鼠大脑皮质神经干细胞球自我复制和多向分化等干细胞特性, 从而评估丹酚酸B对其增殖和分化潜能的影响和作用.

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

昆明孕鼠购自广东省医学实验动物中心(佛山南海), 丹酚酸 B 购自昆明长春花科技有限公司(中国昆明); DMEM/F12 培养基购自 Gibco 公司(美国纽约), Trizol 和 B27 购自 Invitrogen 公司(美国), nestin 和 tubulin 单克隆抗体购自 Chemicon 公司(美国); RNA PCR Kit 和 T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司(日本); 组织培养器皿和移液器购自 TKR Biotech 公司(美国), 其余实验试剂均购自 Sigma 公司(美国).

1.2 胎鼠 NSCs 的分离和培养

为获取多向分化潜能的 NSCs, 取怀孕(E)13.5 天的昆明小鼠分离胚胎, Krebs 液(100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 0.6 mmol/L KH_2PO_4, 12 mmol/L $NaHCO_3$, 7 mmol/L 葡萄糖, 0.1%酚磺酞, 0.3%牛血清白蛋白和 0.3%硫酸镁)内分离大脑皮质. 机械粉碎组织制成单细胞悬液, 离心后重悬细胞, 接种于 DMEM/F12 (1∶1)培养基(含 2%的 B27 和 20 ng/mL 的 bFGF)的培养板中, 37℃, 5% CO_2 条件下培养. NSCs 呈未分化状态, 并形成神经干细胞球, 当用 15 μg/mL 的多聚-*l*-赖氨酸包被培养板后, 可见胶质细胞和神经元贴壁并增殖分化发出突起.

1.3 悬浮 NSCs 球的传代

神经干细胞球每 7 天用机械分离的方法传代. 神经干细胞球被机械分离成单细胞悬液后, 取适量的细胞悬液进行台盼蓝染色, 按照试剂盒说明书的步骤在细胞计数器上计数细胞的密度并检测其活力. 然后按照 6×10^5 的密度接种于培养板, 用 DMEM/F12 (1∶1)培养基(含 2%的 B27 和 20 ng/mL 的 bFGF), 37℃, 5% CO_2 条件下培养, 接种细胞 24 h 后形成神经干细胞球, 之后每隔 4 天半量换液. 实验中用原代神经干细胞球观察细胞的增殖和分化.

1.4 神经干细胞球的免疫荧光染色鉴定

传代的神经干细胞球接种于 6 孔板内, 孔内置多聚-*l*-赖氨酸包被的盖玻片, 用 DMEM/F12(1∶1)培养基(含 2%的 B27 和 20 ng/mL 的 bFGF), 37℃, 5% CO_2 条件下培养. 神经干细胞球贴壁后, 弃去培养基并取出盖玻片进行染色. 用小鼠抗 nestin 单克隆抗体鉴定神经干细胞球, 按照免疫荧光染色的标准程序进行. 首先用 4%多聚甲醛固定 20 min, 再分别用羊血清封闭和 0.2%的 Triton X-100 渗透各 30 min, PBS 漂洗后入第一抗体, 4℃过夜, PBS 漂洗后 Cy3 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗 37℃避光孵育 40 min. 盖玻片漂洗后封片, Olympus 荧光显微镜(日本)观察. 用与第一抗体来源匹配的正常血清替代第一抗体作阴性对照.

1.5 MTT 检测方法

细胞分为实验组和对照组用于增殖实验检测. NSCs 用 DMEM/F12(1∶1)培养基(含 2%的 B27 和 20 ng/mL 的 bFGF), 37℃, 5% CO_2 条件下培养共 7 天, 对照组不加丹酚酸 B; 实验组细胞亦培养 7 天, 但在培养基中加不同浓度的丹酚酸 B(0, 1, 5, 10, 20, 40, 80 μg/mL). 用 MTT 法检测 NSCs 的增殖和活力, 所得数据绘制成生长曲线. 机械分离获得 NSCs 后取 200 μL 的细胞悬液, 接种于 96 孔板, 设 5 个复孔. 置 37℃, 5% CO_2 条件下培养 24 h. 之后每孔加 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL)再行培养 4 h. 离心后小心吸去上清液, 每孔加 150 μL DMSO 溶解蓝色结晶. 用酶标仪干涉波长 655 nm 下读取 490 nm 波长处的 *A* 值.

1.6 细胞周期检测

用流式细胞术检测细胞周期时相. 按照 1×10^6/孔的密度接种 NSCs, 加丹酚酸 B(20 μg/mL)后培养, 设 5 个复孔. 培养 5 天后, 用 PBS 漂洗细胞, 4℃的 100%酒精固定 24 h, 加 10 μL RNase A (10 mg/mL)后, 37℃孵育 30 min. 10 mg/mL PI(含 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L $MgCl_2$ 和 0.1% Triton X-100, pH 6.8)染色, PI 与细胞 DNA 结合后用红外光激发荧光. 用流式细胞

仪附带的 ModFIT 软件分析 DNA 的含量, 获得 G0/G1 和 G2/S 期细胞的定量数据.

1.7 丹酚酸 B 对 NSCs 突起生长的作用

为评估丹酚酸 B 是否可以促进 NSCs 分化过程中突起的生长, 用突起生长定量分析试剂盒对突起进行定量分析, 按照说明书的步骤进行检测. 测定前首先用多聚-*l*-赖氨酸包被微孔滤膜, 然后按照 1×10^4/孔的密度把 100 μL 的单细胞悬液接种于 12 孔板内微孔滤膜上(上室). 细胞分为对照组和实验组, 实验组细胞于培养基中加丹酚酸 B(20 μg/mL)培养 7 天诱导突起生长和细胞分化, 设 5 个复孔. 之后取出上室, PBS 漂洗, 用 4℃的 100%甲醇室温下固定 20 min. 后进入含 500 μL 突起染液的下室室温下染色 15 min, 漂洗后用棉签拭去微孔滤膜上面的胞体. 置 200 μL 的突起提取液于切割成小片的封口膜上, 把微孔滤膜的下面置于突起提取液中, 室温下孵育 5 min. 分光光度计 562 nm 波长下测定突起提取液的 *A* 值.

1.8 神经干细胞球的分化

为评估丹酚酸 B 对细胞分化的作用, 把丹酚酸 B 诱导增殖的悬浮 NSCs 接种于预先包被多聚-*l*-赖氨酸的 6 孔板中, 贴壁后用鼠抗 nestin 抗体进行免疫荧光染色, 鉴定丹酚酸 B(20 μg/mL)诱导增殖后的神经干细胞球是否仍然具有干细胞特性. 之后, 设 5 个复孔, 用丹酚酸 B(20 μg/mL)诱导分化, 细胞贴壁后分别培养 1, 3 和 5 天, 分化后的神经干细胞球依照前述的步骤用鼠抗 tubulin 抗体进行免疫荧光染色和观察, Hoechst 33258 复染胞核. 依照胞核和免疫荧光染色结果计数分化细胞的比例.

1.9 RT-PCR

用 RT-PCR 方法检测神经干细胞球及其分化后(1 和 5 天)相关基因的表达. 按照试剂说明书步骤用 Trizol 提取 NSCs 的总 RNA, 紫外分光光度仪测 260 nm 光吸收值和 260~280 nm 比值进行 RNA 含量和质量检验. 取 1 mg 的总 RNA 用 Oligo dT 和 AMV 进行逆转录. nestin mRNA 的上游引物: 5′-GAGAAGACATGAGGCAGATAAGTTA-3′, 下游引物: 5′-GCCTGTGTTCTCCAGCTTGCT-3′; tau mRNA 的上游引物: 5′-GCCTGAAGGCTATCCAATAC-3′; 下游引物: 5′-CAGGTCCCAAGTGTCAATAA-3′; GFAP mRNA 的上游引物: 5′-GAGAAGACATGAGGCAGATAAGTTA-3′; 下游引物: 5′-GCCTGTGTTCTCCAGCTTGCT-3′; GAPDH 的上游引物: 5′-GAGAAGTGGTAGGTCTAAGTTTG-3′; 下游引物: 5′-GCCGCTCTAGGGACTCGTT -3′; 2 μg RNA 逆转录的 cDNA 以 25 μL 为反应体系, 30 个循环进行 PCR, 循环反应条件 94℃, 30 s; 55℃, 45 s; 72℃, 1 min. 后终末延伸 72℃, 5 min. 用 1%琼脂糖凝胶电泳分离并分析 PCR 产物.

1.10 统计学分析

所有数据用 $\bar{x}\pm$SD 表示. 用 SPSS 11.0 作单因素方差分析检验对照组和实验组及各时间点的差异, LSD 程序用于配对比较, 以 0.05 为检验水平作双侧检验, 小于 0.05 即具有统计学意义.

2 结果

2.1 神经干细胞球的形态特征

相差显微镜下观察, NSCs 悬液接种于 6 孔板后第 2 天, 逐渐形成神经干细胞球, 漂浮于培养基中; 第 3 天, 细胞完全形成神经干细胞球并逐渐增大. E13.5 天胎鼠大脑皮质 NSCs 于培养 5 天后形成典型的神经干细胞球(图 1(A)), 神经干细胞球呈圆形, 周围有光晕, 由大量单个细胞聚集而成, 边缘有较丰富的纤毛状突起. 神经干细胞球表达非成熟神经元和胶质细胞标志性蛋白 nestin. nestin 阳性免疫荧光染色的单个神经干细胞球呈桔红色(图 1(B)). 结果显示, 通过机械分离培养并传代获得的神经干细胞球具有 NSCs 的特征. 神经干细胞球贴壁后培养 5 天, 逐渐分化为胶质细胞和神经元. 相差显微镜下可见神经干细胞球分化为散在的神经细胞(图 1(C)).

2.2 丹酚酸 B 对神经干细胞球形成和增殖的作用

为确定丹酚酸 B 对 NSCs 增殖的作用, 用梯度浓度的丹酚酸 B 培养 5 天, 均可获得较多数量的 NSCs, 形成的神经干细胞球不仅数量多, 而且体积较大(图 2). 计数单细胞悬液传代的次代神经干细胞球的数量显示, 用丹酚酸 B 干预后形成的神经干细胞球在数量上明显多于对照组(对照组为(28.67±7.03)个, 丹酚酸 B 处理组: 5 μg/mL 为(42.33±5.72)个, 20 μg/mL 为(82.17±12.20)个, 40 μg/mL 为(101.16±11.7)个)(图 3)).

结果显示, 在体外, 丹酚酸 B 具有促进 NSCs 增殖和自我复制的作用.

用 MTT 法检测 NSCs 的增殖情况. 对照组细胞仅增多 2 倍, 与之相比, 丹酚酸 B 处理后的 NSCs 在各个时间点增殖程度均表现出明显增高. 1~4 天, NSCs 的增殖呈逐渐增多的趋势, 4 天后, 不同浓度的丹酚酸B干预后增殖水平均呈现相对稳定的状态. 然而在所设定的时间段内, 40 和 20 μg/mL 的丹酚酸 B 对 NSCs 增殖作用的程度相似, 且均明显强于 5 μg/mL 丹酚酸 B 处理组和对照组(图 4).

进一步用流式细胞术检测细胞周期时相的变化. 丹酚酸 B 诱导后 G2/S 期细胞明显增多(对照组: (13.2±2.41)%; 丹酚酸 B 处理组: 5 μg/mL 为(19.4±0.39)%, 20 μg/mL 为(34.6±1.17)%, 40 μg/mL 为(39.1±1.8%)), 同时伴随 G0/G1 期细胞数量减少(对照组: (86.8±2.41)% 5 μg/mL 为(80.6±0.39)%, 20 μg/mL 为(65.4±1.17)%, 40 μg/mL 为(60.9±1.08)%(图 5(A)~(D)). G0/G1 和 G2/S 细胞的比例用直方图显示

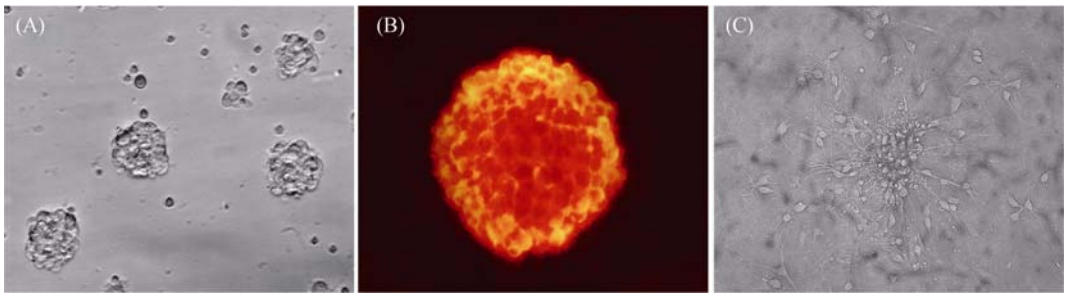


图 1　E13.5 天小鼠大脑皮质分离培养的神经干细胞球

(A) 细胞培养 5 天形成神经干细胞球, ×100; (B) nestin 免疫荧光阳性染色, ×400; (C) 培养 7 天分化后的神经干细胞球, ×100

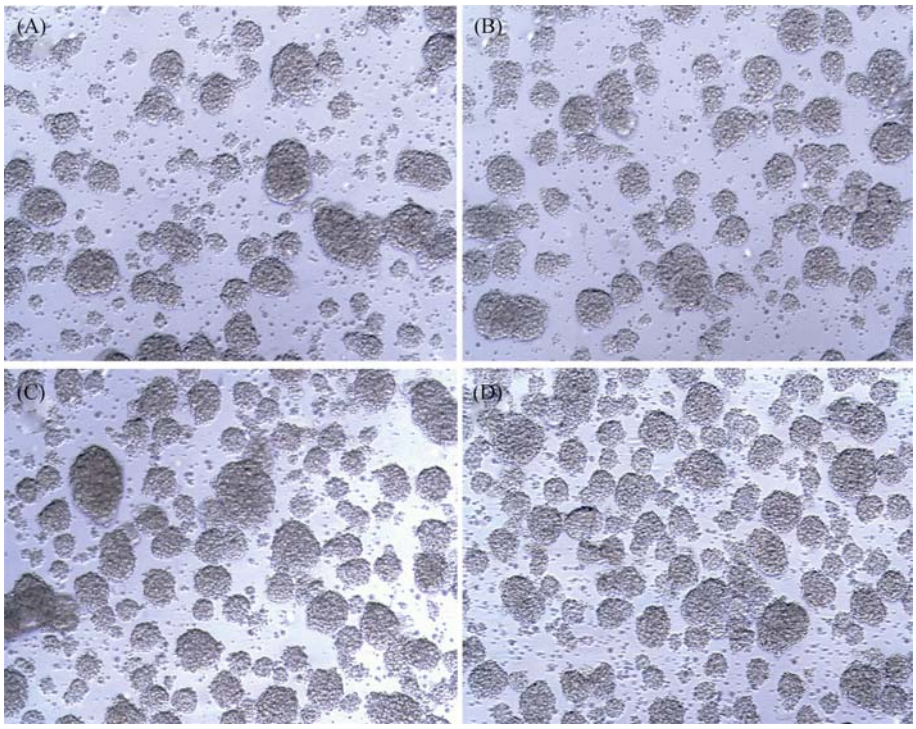


图 2　丹酚酸 B 诱导 5 天后 E13.5 天小鼠大脑皮质 NSCs 形成的神经干细胞球

(A) 对照组, ×100; (B) 5 μg/mL 丹酚酸 B 处理组, ×100; (C) 20 μg/mL 丹酚酸 B 处理组, ×100; (D) 40 μg/mL 丹酚酸 B 处理组, ×100

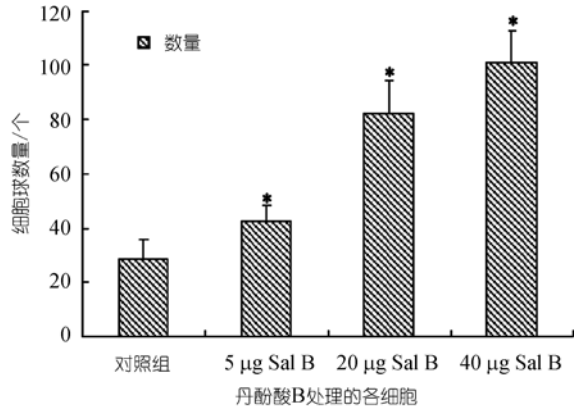


图 3 丹酚酸 B 处理后神经干细胞球的数量变化

* P<0.05, 与对照组比较

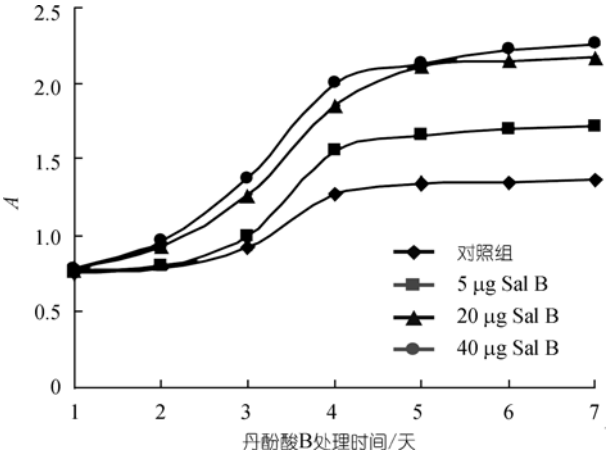


图 4 MTT 法检测丹酚酸 B 处理后 NSCs 的增殖

(图 5(E)).

2.3 丹酚酸 B 对 NSCs 分化的作用

诱导分化前, 确定神经干细胞球在丹酚酸 B 诱导增殖后是否仍然表现出其干细胞特性是一个重要环节. 当神经干细胞球完全形成并贴壁后, 用免疫荧光染色方法分别检测 nestin 蛋白的表达. 用 20 μg/mL 丹酚酸 B 诱导增殖后, 形成的神经干细胞球 nestin 免疫荧光阳性(图 6(A)和(B)), 显示其仍然表达 nestin, 具有 NSCs 特性.

为探讨丹酚酸 B 对 NSCs 分化的作用, 检测了 NSCs 分化为神经元和其他细胞的能力. 首先分离次代神经干细胞球并接种于预先放置盖玻片的培养板内, 贴壁后用 20 μg/mL 的丹酚酸 B 处理 1 和 3 天后观察. 培养 1 天, 与对照组比较, 虽然神经干细胞球内细胞有大量的突起从神经干细胞球的边缘伸出, 但仅见少量的神经元完全从神经干细胞球迁移出来. 免疫荧光染色显示, 这些迁出的细胞和神经干细胞球伸出的突起已表达成熟神经元标志性蛋白 tubulin (图 7(A)和(B)). 培养 3 天后, 较多的神经元从神经干细胞球迁出, 而且显示出神经元的特征, tubulin 免疫荧光染色阳性; 与对照组比较, 可见长且密集的突起从神经干细胞球的边缘伸出(图 7(C)和(D)). 同时对突起长度的定量分析结果显示, 突起提取液的 A 值较对照组明显升高(对照组: 1 天为 0.535±0.061, 3 天为 0.982±0.089; 丹酚酸 B 处理组: 1 天为 1.326±0.101, 3 天为 1.878±0.082)(图 8).

贴壁神经干细胞球继续培养至 5 天后, 用 tubulin 抗体进行免疫荧光染色, 并用 Hoechst 33258 复染胞核, 计数阳性细胞及其百分比. 有趣的是, 当在培养基中加入丹酚酸 B 后, 神经干细胞球分化出较多的神经元, 神经元所占的比例提高(对照组: 26.5±7.53, 20 μg/mL 丹酚酸 B 处理组: 61.2±8.61)(图 9(A)和(B)), 而胶质细胞的数量相对减少. 结果显示, 当在培养基中加入丹酚酸 B 诱导后促进了神经干细胞球分化出较多的神经元.

为进一步确定分化后细胞的特性, 用 RT-PCR 方法检测了开始分化和分化后相关基因的表达. 通过电泳条带的分析, 证实丹酚酸 B 诱导分化开始时, tau, GFAP 和 nestin mRNA 均有表达. 定量分析结果显示, 与对照组比较各基因的灰度无明显差异(图 10(A)), 对照组 tau, GFAP 和 nestin mRNA 分别为 0.215±0.016, 0.303±0.085 和 0.929±0.017; 20 μg/mL 丹酚酸 B 处理组分别为 0.310±0.013, 0.325±0.017 和 0.845±0.022. 丹酚酸 B 诱导分化后, 对照组细胞表达 Tau mRNA 和 GFAP mRNA, A 值分别为 0.466±0.036 和 0.519±0.014, 未检测到 nestin mRNA 表达. 与对照组相比, 丹酚酸 B 处理后分化的神经干细胞球高水平表达 tau mRNA, GFAP mRNA 表达水平较低, A 值分别为 0.703±0.012 和 0.312±0.068, 未检出 nestin mRNA 表达(图 10(B)).

3 讨论

有关 NSCs 增殖分化的认识源于其自我更新的特

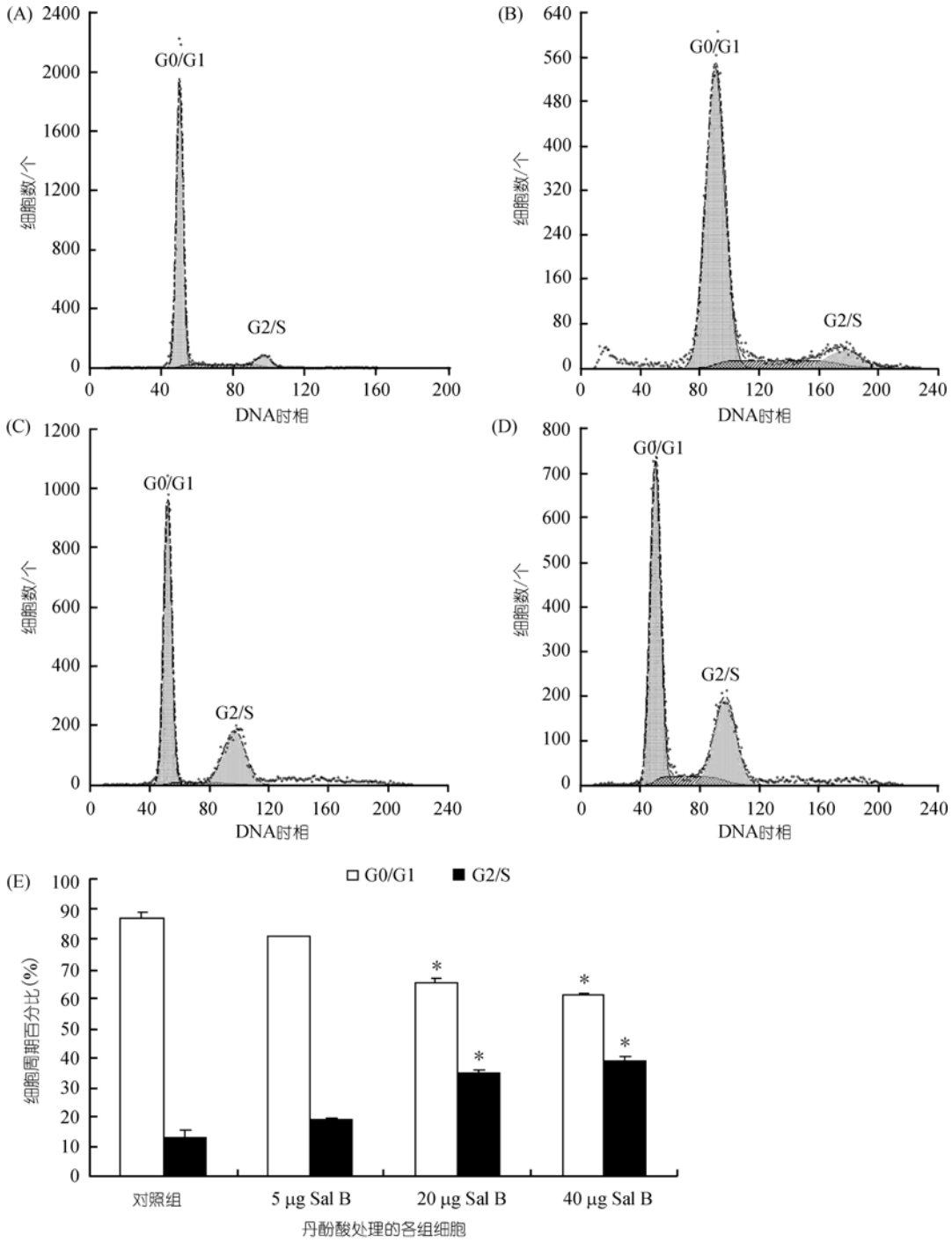


图 5　流式细胞术检测丹酚酸 B 处理后 NSCs 细胞周期时相

(A) 对照组; (B) 5 μg/mL 丹酚酸 B 处理组; (C) 20 μg/mL 丹酚酸 B 处理组; (D) 40 μg/mL 丹酚酸 B 处理组; (E) G0/G1 和 G2/S 期细胞百分比, * P<0.05, 与对照组细胞比较

性及其与神经再生关系的研究[1,2]. 越来越多的研究集中于NSCs作为多能祖细胞维持成年脑组织的再生能力, 以及其治疗神经退行性疾病的潜力[3]. 体外培养技术的发展让人们认识到NSCs的自我更新背后的机制, 及其分化为神经系统神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞等 3 种主要细胞的潜能[19,20]. 然而, 在体外, NSCs 的生长行为和分化潜能受多种因素的影响, 包括培养基的组份和神经营养因子等分化因子的应用[4]. 作为广泛应用于心肌梗塞和脑卒中等心脑血管疾病治疗的传统中草药, 丹参可能是具有促进NSCs 分化为神经元和重建受损神经组织结构和功能的潜在药物.

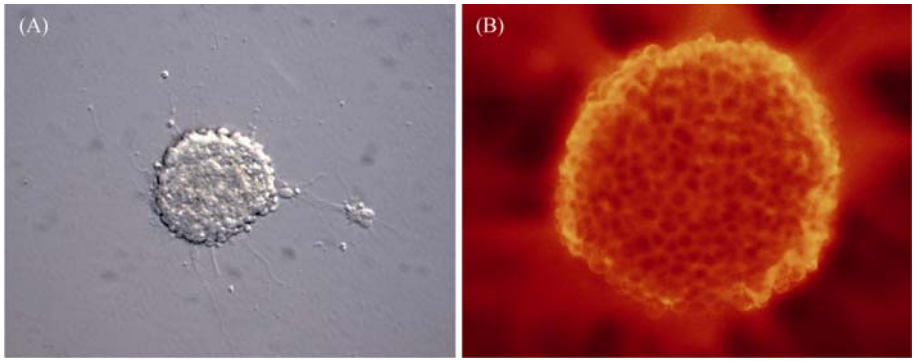


图 6 丹酚酸 B 诱导增殖后贴壁的神经干细胞球

(A) 贴壁的神经干细胞球, ×100; (B) nestin 免疫荧光阳性染色, ×400

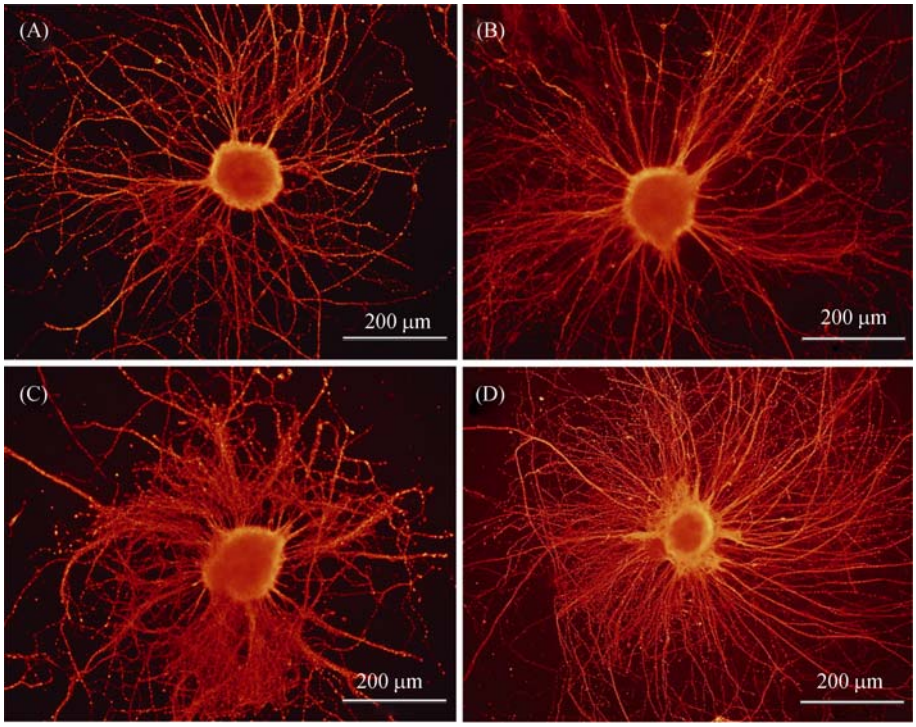


图 7 丹酚酸 B 诱导 1 和 3 天后分化的贴壁神经干细胞球

(A) 对照组贴壁后 1 天, ×100; (B) 对照组贴壁后 3 天; (C) 20 μg/mL 丹酚酸 B 处理组贴壁后 1 天, ×100; (D) 20 μg/mL 丹酚酸 B 处理组贴壁后 3 天, ×100

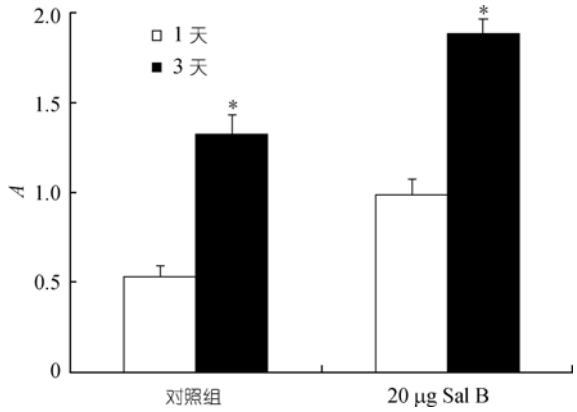


图 8　丹酚酸 B 诱导 1 和 3 天后检测贴壁神经干细胞球突起生长

* P<0.05, 与对照组比较

首先要解决的问题是传代的神经干细胞球是否表现出自我更新和多向分化潜能等干细胞特性, 未成熟神经元和胶质细胞的标志蛋白 nestin 常被用于判断 NSCs 的特征. 本实验分离培养的 NSCs 所形成的神经干细胞球 nestin 表达阳性, 说明具有神经前体细胞的特性. 实验主要观察丹参主要的水溶性成份丹酚酸 B 的促细胞增殖作用. 所得结果显示, 丹酚酸 B 能够影响 NSCs 的增殖和分化. 与丹酚酸 B 对其他种类细胞的作用一致. 本实验结果显示, 丹酚酸 B 可以使传代神经干细胞球的平均直径增加, 而且可以获取数量更多的神经干细胞球. MTT 的检测结果也说明, 与对照组细胞相比, 神经干细胞球的数量有逐渐增加的趋势. 流式细胞术的检测结果显示, 丹酚酸 B 可改变细胞周期的时相, G2/S 期细胞的数量增多, 同时 G0/G1 期细胞的数量减少. 而且, 实验证实丹酚酸 B 诱导增殖后形成的神经干细胞球仍然具有 NSCs 的特性.

丹参的促增殖作用主要源于对周围组织细胞的临床和组织培养等药理学资料, 证明丹参对促生长或抑制、改变细胞周期、促增殖或凋亡等细胞功能活动有广泛的作用[17,18]. 其作用的多样性提示丹参对于不同种类的组织可能通过多种不同的途径发挥作

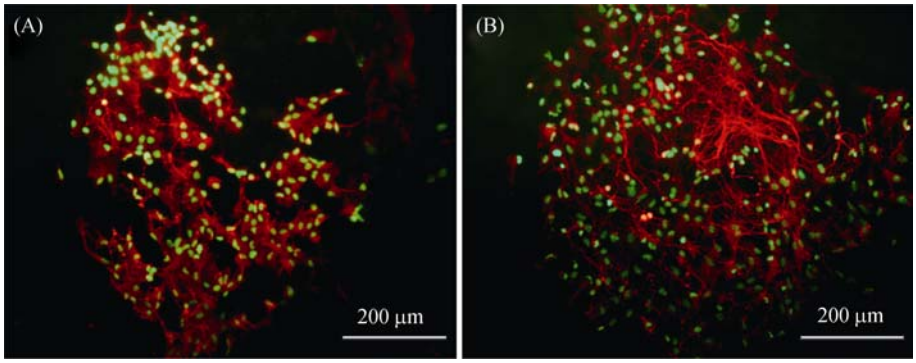


图 9　丹酚酸 B 诱导 5 天分化的贴壁神经干细胞球

(A) 对照组, ×100; (B) 丹酚酸 B 处理组, ×100. 神经元标志蛋白染色, tubulin(红色), Hoechst 33258(蓝色)

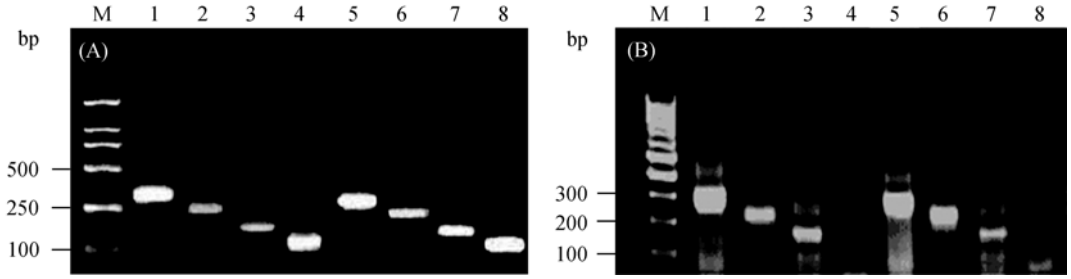


图 10　RT-PCR 检测丹酚酸 B 诱导分化后神经干细胞球相关基因的表达

(A) 分化后 1 天; (B) 分化后 5 天. M: 250 和 100 bp DNA ladder marker; 泳道 1 和 5: GADPH; 泳道 2 和 6: Tau; 泳道 3 和 7: GFAP; 泳道 4 和 8: nestin; 泳道 1~4: 对照组; 泳道 5~8: 丹酚酸 B 处理组

用, 但是尚不清楚有关丹参不同功能之间相对独立性的机制. 如丹酚酸B可以通过抑制人肾小球膜细胞由G1期向S期转变, 使其停滞于G1期, 从而阻断高血糖诱导的细胞周期进程[21]. 另一种有效成份丹参酮ⅡA对多种人肿瘤细胞系具有细胞毒性, 也可诱导肿瘤细胞分化、凋亡, 抑制侵袭和转移[22,23]. 而对于其他种类的细胞, 丹参的细胞增殖作用不仅性质不同, 在一定程度上作用相反. 比如, 适量的丹参酮促进软骨细胞增殖并保护它们免受氧化损伤[24]. 尽管丹参诱导细胞产生不同的反应是由于与增殖和凋亡相关基因的表达, 以及改变细胞表面的抗原性有关的观点已被认可, 但丹酚酸B作用多样性原因的另一种可能是由于其对 DNA 合成的全方位的影响.

除了影响 NSCs 增殖外, 丹参的另一个特性是其具有使外周细胞分化为神经元样细胞的能力. 以往的资料显示, 丹参通过影响细胞代谢、分子和酶的活性、上调与神经元相关基因的表达等途径发挥其细胞增殖作用, 最终改变细胞的表型[25]. 虽然丹酚酸B的诱导机制仍未阐明, 但与这些研究相一致的是, 本实验观察到神经干细胞球分化为神经元和胶质细胞的潜能与丹酚酸B的诱导有关. 进一步观察丹酚酸B干预是否影响神经干细胞球的分化能力, 丹酚酸B诱导增殖形成的神经干细胞球表达 nestin, 说明其仍具有干细胞的特性. 加入丹酚酸 B 后, 在诱导分化之初, 相关基因 *tau*, *GFAP* 和 *nestin* mRNA 均有表达, 而且神经干细胞球分化为 tubulin 免疫阳性细胞的数量明显增加, 与对照组相比, 分化后的细胞 tau mRNA 高度表达, GFAP mRNA 则处于低表达状态, 说明丹酚酸B诱导后所分化的细胞主要为神经元. 推测丹酚酸B 诱导分化的作用不仅涉及细胞代谢、分子和酶活性, 还包括神经元相关基因的表达, 以及其他未阐明的机制有关.

本实验的结果显示, 丹酚酸 B 在体外具有促进神经干细胞球增殖并向神经元方向分化. 丹酚酸B可能作为一种大量获取 NSCs 和诱导 NSCs 分化为神经元的药物, 其促 NSCs 增殖和分化的潜能使人们有机会获取足够的种子细胞以利修复受损神经组织的结构和功能.

参考文献

1 Reynolds B A, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammol/Lalian central nervous system. Science, 1992, 255: 1707—1710

2 Wang Y, Chen S, Yang D, et al. Stem cell transplantation: a promising therapy for Parkinson's disease. J Neuroimmol/Lune Pharmacol, 2007, 2: 243—250

3 Rothstein J D, Snyder E Y. Reality and immol/Lortality: neural stem cells for therapies. Nat Biotechnol, 2004, 22: 283—285

4 Grondin R, Zhang Z, Yi A, et al. Chronic, controlled GDNF infusion promotes structural and functional recovery in advanced parkinsonian monkeys. Brain, 2002, 125: 2191—2201

5 Cao Q L, Howard R M, Dennison J B, et al. Differentiation of engrafted neuronal-restricted precursor cells is inhibited in the traumatically injured spinal cord. Exp Neurol, 2002, 177: 349—359

6 Chow S Y, Moul J, Tobias C A, et al. Characterization and intraspinal grafting of EGF/bFGF- dependent neurospheres derived from embryonic rat spinal cord. Brain Res, 2000, 874: 87—106

7 Lepore A C, Han S S, Tyler-Polsz C J, et al. Differential fate of multipotent and lineage-restricted neural precursors following transplantation into the adult CNS. Neuron Glia Biol, 2004, 1: 113—126

8 Bjorklund A, Dunnett S B, Brundin P, et al. Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. Lancet Neurol, 2003, 2: 437—445

9 Ji X Y, Tan B K, Zhu Y Z. Salvia miltiorrhiza and ischemic diseases. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 1089—1094

10 Zhou L, Zuo Z, Chow M S. Danshen: an overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use. J Clin Pharmacol, 2005, 45: 1345—1359

11 Chan K, Chui S H, Wong DYL, et al. Protective effects of Danshensu from aqueous extract of Salvia miltiorrhiza(Danshen) against homocysteine-induced endothelial dysfunction. Life Sci, 2004, 75: 3157—3171

12 Kamata K, Iizuka T, Nagai M, et al. Endothelium-dependent vasodilator effects of the extract from *Salviae miltiorrhizae* radix. A study on the identification of lithospermic acid B in the extracts. Gen Pharmacol, 1993, 24: 977—981

13 Chen J, Wang F, Lee F S, et al. Separation and identification of water-soluble salvianolic acids from *Salvia miltiorrhiza* Bunge by high-speed counter-current chromatography and ESI-MS analysis. Talanta, 2006, 69: 172—179
14 Zhou L, Chow M, Zuo Z. Improved quality control method for Danshen products: consideration of both hydrophilic and lipophilic active components. J Pharm Biomed Anal, 2006, 41: 744—750
15 Tang M K, Ren D C, Zhang J T, et al. Effect of salvianolic acids from *Radix Salviae miltiorrhizae* on regional cerebral blood flow and platelet aggregation in rats. Phytomedicine, 2002, 9: 405—409
16 Lay I S, Chiu J H, Shiao M S, et al. Crude extract of Salvia miltiorrhiza and salvianolic acid B enhance *in vitro* angiogenesis in murine SVR endothelial cell line. Planta Med, 2003, 69: 26—32
17 Lay I S, Hsieh C C, Chiu J H, et al. Salvianolic acid B enhances *in vitro* angiogenesis and improves skin flap survival in Sprague-Dawley rats. J Surg Res, 2003, 115: 279—285
18 Chen Y H, Du G H, Zhang J T. Salvianolic acid B protects brain against injuries caused by ischemia-reperfusion in rats. Acta Pharmacol Sin, 2000, 21: 463—466
19 Reynolds B A, Weiss S. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammol/Lalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Dev Biol, 1996, 175: 1—13
20 Song H J, Stevens C F, Gage F H. Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. Nat Neurosci, 2002, 5: 438—445
21 Luo P, Tan Z, Zhang Z, et al. Inhibitory effects of salvianolic acid B on the high glucose-induced mesangial proliferation via NF-kappaB-dependent pathway. Biol Pharm Bull, 2008, 31: 1381—1386
22 Takahashi K, Ouyang X, Komatsu K, et al. Sodium tanshinone ⅡA sulfonate derived from Danshen (Salvia miltiorrhiza) attenuates hypertrophy induced by angiotensin II in cultured neonatal rat cardiac cells. Biochem Pharmacol, 2002, 64: 745—749
23 Yuan S L, Wei Y Q, Wang X J, et al. Growth inhibition and apoptosis induction of tanshinone ⅡA on human hepatocellular carcinoma cells. World J Gastroenterol, 2004, 10: 2024—2028
24 Liu Y R, Qu S X, Maitz M F, et al. The effect of the major components of Salvia Miltiorrhiza Bunge on bone marrow cells. J Ethnopharmacol, 2007, 111: 573—583
25 Ma L, Feng X Y, Cui B L, et al. Human umbilical cord Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells differentiation into nerve-like cells. Chin Med J(Engl), 2005, 118: 1987—1893