

- vo antileukemic effects of resveratrol, a natural polyphenolic compound found in grapes [J]. *J Nutr*, 2002, 132 (7): 2076-2081.
- [4] Joe A K, Liu H, Suzui M, *et al*. Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in bio-marker expression in several human cancer cell lines [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(3): 893-903.
- [5] Roman V, Billard C, Kern C, *et al*. Analysis of resveratrol-induced apoptosis in human B-cell chronic leukaemia [J]. *Br J Haematol*, 2002, 117(4): 842-851.
- [6] Nakagawa H, Kiyozuka Y, Vemura Y, *et al*. Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2001, 127(4): 258-264.
- [7] Peng L M, Wang Z L. *Basis and Clinic of Apoptosis* (细胞凋亡的基础与临床) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [8] DeLedinghen V, Monvoisin A, Neaud V, *et al*. Trans-resveratrol, a grapevine-derived polyphenol, blocks hepatocyte growth factor-induced invasion of hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2001, 19(1): 83-88.
- [9] Manna S K, Mukhopadhyay A, Aggarwal B B. Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, activator protein-1, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation [J]. *J Immunol*, 2000, 164(12): 6509-6519.
- [10] Nicolini G, Rigolio R, Miloso M, *et al*. Antiapoptotic effect of trans-resveratrol on paclitaxel-induced apoptosis in the human neuroblastoma SH-SY5Y cell line [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 302(1): 41-44.

阿魏酸钠诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的初步研究

汪 决¹, 邓志锋², 赖贤良², 王共先¹, 李 明², 宋书欣^{2*}

(1. 江西医学院第一附属医院泌尿外科研究所, 江西 南昌 330006;

2. 江西医学院第二附属医院 神经外科, 江西 南昌 330006)

摘 要: 目的 探讨阿魏酸钠诱导大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的可能作用。方法 分离培养大鼠骨髓间充质干细胞, 采用阿魏酸钠对其进行诱导培养, 倒置显微镜下观察诱导培养不同时间后细胞的形态变化, 并应用免疫细胞化学方法鉴定诱导培养后细胞表面神经细胞特异性标志物神经丝蛋白(NF)及神经元特异性烯醇化酶(NSE)的表达。结果 阿魏酸钠诱导培养 6 h 后即可见细胞形态发生明显变化, 24 h 后表现为典型的神经细胞样形态, NF 和 NSE 神经细胞特异性标志物呈阳性表达。结论 初步证实阿魏酸钠具有诱导体外培养的大鼠骨髓间充质干细胞向神经细胞分化的作用。

关键词: 骨髓间充质干细胞; 阿魏酸钠; 神经细胞

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0290-03

Differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells into neurons induced by sodium ferulate

WANG Yang¹, DENG Zhi-feng², LAI Xian-liang², WANG Gong-xian¹, LI Ming², SONG Shu-xin²

(1. Institute of Urinary Surgery, First Affiliated Hospital; 2. Department of Neurosurgery,

Second Affiliated Hospital, Jiangxi Medical College, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Object** To study the possibility that sodium ferulate induced differentiation of adult rat bone marrow mesenchymal stem cells (BMSC) into neurons. **Methods** BMSC from adult rat were isolated and cultured. Then BMSC were induced by sodium ferulate in serum-free medium for different period. The morphological changes of the cells were observed under phase contrast microscope. The neuronal specific markers, neurofilament (NF), and neuron specific enolase (NSE) were evaluated by indirect immunocytochemistry staining. **Results** After induction for 6 h, some BMSC showed morphological changes obviously. Twenty-four hours later, the differentiated cells showed typical neuronal morphology, and expressed neuron-specific markers, such as NF and NSE. **Conclusion** Sodium ferulate has inductive effect on differentiation of BMSC into neurons of adult rat *in vitro*.

Key words: bone marrow mesenchymal stem cell; sodium ferulate; neurons

收稿日期: 2003-08-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30160084); 江西省自然科学基金项目 (0240047)

作者简介: 汪 决(1963—), 女, 江西省南昌市人, 博士, 研究员, 主要从事细胞免疫及组织工程的基础研究。

Tel: (0791) 8872366 E-mail: wangy63@yahoo.com

骨髓中除造血干细胞外,还存在一种骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC),具有多向分化的潜能,在一定条件下可分化为成骨细胞、成软骨细胞、脂肪细胞、肌肉细胞等^[1]。近年来,研究报道 BMSC 在 β -巯基乙醇、二甲亚砜等抗氧化剂的诱导下分化为神经细胞^[2]。为在体外建立 BMSC 定向诱导为神经元的模型,本研究在证实 β -巯基乙醇具有诱导 BMSC 向神经细胞分化的基础上^[3],通过广泛筛选,发现阿魏酸钠具有诱导 BMSC 向神经细胞分化的作用,现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 试剂与动物:DMEM 培养基、胰蛋白酶、B27、bFGF 均购自 Gibco 公司;胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物试剂公司;阿魏酸钠购自广东丽珠集团利民制药厂 (粉剂,纯度 99.8%,批号 11098);神经丝蛋白单抗 (neurofilament protein, NF) 购自 Zymed 公司;神经元特异性烯醇化酶多克隆抗体 (neuron specific enolase, NSE) 购自 Sigma 公司。SD 大鼠,200~250 g,雌雄不限,由江西医学院动物科学部提供。

1.2 大鼠 BMSC 的分离与培养:成年 SD 大鼠麻醉处死,无菌条件下取出股骨,除去骨周围的肌肉组织,剪开骨两端,用注射器吸取培养液 (DMEM + 20% FBS) 从骨的一端缓慢地冲洗骨髓腔,立即将含有骨髓的冲洗液离心,去上清液,再次加培养液吹成细胞悬液,移入 6 孔培养板,于 37℃,5% CO₂,饱和湿度条件下培养,一周内不换液,任其生长,以后每 3 d 换 20% FBS/DMEM 1 次,待原代培养的细胞增殖接近融合状态时,用 0.25% 胰蛋白酶 (含 EDTA 1 mmol/L) 消化细胞,按 1:2 传代培养。

1.3 阿魏酸钠对 BMSC 的诱导实验:取传至 3 代的大鼠 BMSC,胰酶消化接种于 24 孔培养板中 (孔中预先放置无菌盖玻片),待细胞生长达 80% 融合状态时,弃除培养基,加入预诱导培养液 (含 bFGF 10 ng/mL DMEM 完全培养基),培养 24 h 后,去除预诱导液,PBS 冲洗,加入诱导液 (无血清 DMEM/B27 培养基,含阿魏酸钠 1 mg/mL) 进行培养 (经预试验筛选得出 1 mg/mL 阿魏酸钠对 BMSC 无明显细胞毒性且诱导效果较好)。对照孔细胞培养液中不含阿魏酸钠。倒置显微镜下观察细胞生长变化情况,并拍照。

1.4 神经细胞特异标志的鉴定:取出培养孔中的盖玻片,4% 多聚甲醛固定,进行免疫细胞化学染色。

一抗分别为 NF,NSE。参照相关试剂说明书进行操作,DAB 显色,苏木素复染。显微镜下观察结果,并拍照,阳性细胞的胞浆呈棕色。图像分析仪 (北京航天医学图像分析系统) 上进行结果分析。

2 结果

2.1 BMSC 的形态特点:原代培养的细胞接种后 24 h 骨髓基质细胞开始缓慢分裂、增殖,见少数细胞开始贴壁生长,细胞形态呈梭形。第 3 天后细胞增殖加快,呈团簇集落样生长 (图 1),贴壁细胞增多,呈成纤维样细胞形态,且有多量漂浮不贴壁圆形细胞。通过换液可逐渐将非贴壁细胞清除。10~14 d 细胞铺满孔底达到融合状态。

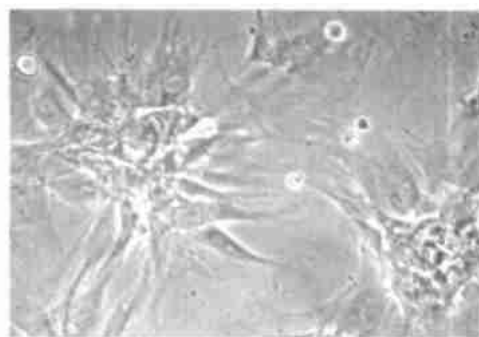


图 1 原代培养的大鼠 BMSC

Fig. 1 BMSC of rats in primary cultured

2.2 阿魏酸钠诱导培养后的 BMSC 的形态变化:传代培养的 BMSC 加入含 bFGF 的预诱导液 24 h 后,细胞形态没有明显变化。加入含阿魏酸钠的诱导培养液后 6 h 即可见细胞形态明显改变,细胞胞体收缩变圆,立体感增强,有突起长出 (图 2),随后突起逐渐增多,24 h 后,细胞间突起相互连接,交错成网,表现出神经细胞样形态 (图 3-A)。此现象持续到第 7 天后,细胞逐渐老化。而不含阿魏酸钠的对照细胞形态无明显变化。



图 2 阿魏酸钠诱导 6 h 时的 BMSC

Fig. 2 BMSC induced by sodium ferulate for 6 h

2.3 神经细胞特异标志的表达: 免疫细胞化学染色结果显示, 经阿魏酸钠诱导培养 24 h 后的 BMSC 中可见 NSE 和 NF 阳性表达的细胞 (胞浆呈棕色, 图 3-B), 而未经阿魏酸钠诱导的对照细胞 NSE 和 NF 均呈阴性表达。图像分析结果显示, 经阿魏酸钠诱导培养 24 h 后的 BMSC, NSE 表达平均灰度值为 105.3 ± 7.5 , 对照组为 27.7 ± 2.4 , 经 *t* 检验, 差异显著 ($P < 0.05$), 说明阿魏酸钠诱导培养后的 BMSC 为神经元样细胞。

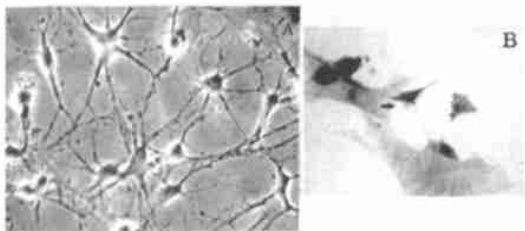


图 3 阿魏酸钠诱导 24 h 时的 BMSC

Fig. 3 BMSC induced by sodium ferulate for 24 h

3 讨论

BMSC 是来源于成熟组织中的多能干细胞, 具有高度自我更新能力和多向分化潜能, 是细胞治疗和组织工程的新型种子细胞, 显示出广阔的应用前景。Brazelton 和 Mezey 在 2000 年分别通过不同方法观察到外源性 BMSC 在小鼠脑内可转变为神经元, 提示可用 BMSC 治疗神经退行性疾病和中枢神经系统损伤。为更好地应用 BMSC 及了解 BMSC 向神经细胞分化的机制, 许多学者在体外培养条件下探讨了 BMSC 定向诱导为神经元的模型。如 Woodbury 等^[4]使用 2-巯基乙醇、2% 二甲基亚砷、丁羟回醚等作为诱导剂培养 BMSC, 结果诱导后 30 min 即可检测到神经元特异性标志 NSE 的表达, 5 h 后即有神经干细胞的特异性标志巢蛋白 (nestin) 的表达。6 d 后可检测到 NF 的表达; Sanchez 等^[5]在培养液中加入 EGF 和 PDGF 等生长因子培养人 BMSC, 结果有 0.2% ~ 0.5% 的细胞分化为不成熟的神经元或胶质细胞。阿魏酸钠是传统活血化瘀中药当归、川芎等的主要成分阿魏酸的钠盐, 具有清除

自由基、抗脂质过氧化和抗血小板聚集作用, 已用于治疗血栓性疾病^[6,7]。最近研究报道, 阿魏酸钠对缺血性脑损伤具有明显的保护作用, 并认为阿魏酸钠可能是通过加强突触后致密物质-95 (PSD-95) 活性而起到改善缺血性损伤作用^[8]。本研究首次观察到阿魏酸钠可在体外定向诱导 BMSC 分化为神经元样细胞, 这不仅为进一步研究 BMSC 的定向分化机制及其在神经系统疾病的临床治疗应用打下了基础, 而且为分析阿魏酸钠的神经保护作用机制提供了新的思路。笔者推测阿魏酸钠的体外诱导 BMSC 向神经细胞分化的机制可能与其抗氧化作用有关; 此外, 实验中还观察到阿魏酸钠具有促进 BMSC 增殖的现象, 笔者将对其诱导机制作进一步探讨。BM-SC 取材方便, 适合自体移植, 因此在临床应用上比神经干细胞更有优越性, 而阿魏酸钠的特殊作用可能为 BMSC 的日后应用效果起到促进作用。

References:

[1] Pittenger M F, Mackay A M, Jaiswal S C, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.

[2] Iblack I B, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, 27(3): 632-636.

[3] Lai X L, Deng Z F, Wang Y, *et al.* Adult rat bone marrow stromal cells were induced into neurons by β mercaptoethanol [J]. *Acta Acad Med Jiangxi* (江西医学院学报), 2003, 43(2): 18-20.

[4] Woodbury D, Schwarz E J, Prockop D J, *et al.* Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61: 364-370.

[5] Sanchez R J, Song S, Cardozo P F, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro* [J]. *Exp Neurol*, 2000, 164: 247-256.

[6] Lin Y H, Zhang J J, Chen W W. Protective effect of sodium ferulate on damage of the rat liver mitochondria induced by oxygen free radicals [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1994, 29(3): 171-175.

[7] Zhang J J, Cai Z, Liu X M, *et al.* The effect of sodium ferulate on TXB2 and lipid peroxide in patients with acute cerebral infarction [J]. *Acta Univ Med Tongji* (同济医科大学学报), 1994, 23(2): 103-106.

[8] Chen S Y, Wang Q, Xiong L Z, *et al.* Effect of sodium ferulate on activation of postsynaptic density-95 after transient cerebral artery occlusion in the rat brain [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2002, 23(12): 1151-1153.

声 明

为适应我国信息化建设需要, 扩大作者学术交流渠道, 本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入光盘及网络数据库, 请在来稿时声明, 本刊将作适当处理。本刊所付稿酬包含刊物内容编入数据库服务报酬, 不再另付。