

银杏内酯 B 诱导大鼠骨髓间充质细胞分化为神经元样细胞的电生理研究

陆燕¹ 刘沙² 刘的¹ 刘欣² 刘德全¹ 刘永海^{1△}

(1 徐州医学院附属医院神经内科 徐州医学院神经病学教研室 江苏 徐州 221000 ;

2 南京医科大学第一附属医院神经内科 江苏 南京 210029)

摘要 目的:研究银杏内酯 B(GB)诱导大鼠骨髓间充质细胞(MSCs)分化为神经元样细胞的电生理特性。方法:应用膜片钳技术,采用全细胞记录方式,对由 GB 诱导的大鼠 MSCs 进行诱导前后的电生理功能测定。结果:分化后的神经元样细胞较诱导前细胞的膜特性有了显著改变($P<0.05$)。结论:大鼠 MSCs 经过 GB 诱导能够向功能性神经元方向分化。

关键词 骨髓间充质细胞;银杏内酯 B;全细胞膜片钳;神经元样细胞

中图分类号 Q95-3 R741 R741.02 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)15-2826-03

Electrophysiology Study on Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Stem Cells into Neurom-like Cells by Ginkgolide B

LU Yan¹, LIU Sha², LIU Di¹, LIU Xin², LIU De-quan¹, LIU Yong-hai^{1△}

(1 Department of Neurology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Department of Neurology of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000, China;

2 Department of Neurology, the First Affiliated Hospital to Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the electrophysiological properties of differentiation of rat bone marrow stroma cell (MSCs) induced by Ginkgolide B (GB). **Methods:** Electrophysiological functions of rat MSCs before and after differentiating into neurons-like cells were induced by GB. **Results:** The membrane properties changed a lot between differentiated cell and undifferentiated neuron-like cell ($P<0.05$). **Conclusion:** MSCs can differentiate into functional neurons if induced by GB.

Key words: Marrow stroma cell; Ginkgolide B; Whole cell patch clamp; Neuron-like cell

Chinese Library Classification: Q95-3, R741, R741.02 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)15-2826-03

前言

骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stemcells, MSCs) 是一类多能成祖细胞,具有分化成各种细胞的潜能,包括骨骼、心脏、脂肪、神经细胞等^[1-2]。现在对分化后的神经样细胞形态学水平的鉴定较多,而分化后的神经样细胞是否具有完整的电生理功能研究较少。银杏内酯 B(GB)作为银杏叶提取物,具有神经保护及修复的功能,同时还能减轻神经细胞的损伤和凋亡^[3-4],在体外实验中能诱导神经干细胞分化为神经元^[5],本实验利用膜片钳技术检测诱导后的神经样细胞的电生理功能,研究由 MSCs 分化而成的神经样细胞的钙通道电流。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SD 大鼠,质量(100-150)g,购自徐州医学院动物实验中心。EPC-9 膜片钳放大器(HEKA,德国);微电极拉制仪(PP-83, Narishige, 日本);ALA2VM8 加药装置 (Scientific Instruments, 美国);倒置相差显微镜(Olympus, 日本);玻璃毛细管(内径 1.6

mm,北京先驱威锋技术开发公司);超净工作台(AIRTECH, 美国);细胞培养箱(THERMO, 美国);钙内液(mmol/L):125 CsCl, 2 MgCl₂, 20 HEPES, 11 EGTA, 1 CaCl₂, 4.5 Mg-ATP, 0.3 Li-GTP, CsOH 调节 pH 值至 7.4,过滤除菌,1mL 分装于 EP 管中,-20℃ 保存;钙外液(mmol/L):140 TEA-Cl, 5 CaCl₂, 0.8 Mg-Cl₂, 10 HEPES, 11 D-glucose, Trisbase 调节 pH 至 7.4,4℃ 冰箱保存;标准外液(mmol/L):130 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 10 D-glucose, NaOH 调节 pH 至 7.4,4℃ 冰箱保存;HEPES、EGTA、TEA-Cl、Mg-ATP、KCl、CsCl、CdCl₂、以及 CsF 均购自 Sigma 公司,(6)NaCl、MgCl₂、CaCl₂、D-glucose、NaOH、KCl、KH₂PO₄、NaHCO₃、Na₂HPO₄ 均为国产分析纯。DMEM/F12(HYCLONE),10%胎牛血清(EXCELL),青霉素 100 U/mL 和链霉素 100 U/mL (Gibco),DMSO(Solarbin),胰酶(Sigma),GB(Sigma)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 rBMSCs 的分离、培养和纯化 4 周龄 SD 大鼠(雌雄不限),颈椎脱臼处死,无菌条件下分离股骨和胫骨,骨髓冲洗液离心后用含 10%胎牛血清的培养基重悬,接种于培养瓶中,置于 37℃、5%CO₂ 湿饱和恒温培养箱培养 48h 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%胰蛋白酶消化传代,取 3 代状态良好的细胞进行实验。

1.2.2 定向诱导 rBMSCs 向神经元样细胞分化 将培养的第 3 代 MSCs 收集,以 $2.0 \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种于预先置有用 100

作者简介:陆燕(1985-)女,硕士研究生,主要研究方向:神经干细胞的相关机制 E-mail: luyan19850110@126.com

△通讯作者:刘永海,电话:13013959968,
E-mail: yhliu9968@126.com

(收稿日期:2011-12-30 接受日期:2012-01-29)

mg/L 多聚赖氨酸处理过的盖玻片的 6 孔板中置备细胞爬片。40mg/L GB 诱导。将培养板置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每隔 3 天换液 1 次,培养 7 d。

1.2.3 全细胞膜片钳记录 记录用微电机由玻璃毛细管(内径 1.6 mm,北京先驱威锋技术开发公司,中国)经 PP-83 型微电极拉制仪分两次垂直拉制而成。拉制后玻璃微电极尖端直径为 1-2 μm,充灌电极内液后电极阻抗为 4-6 MΩ。用 EPC-9 膜片钳放大器进行全细胞膜片钳记录,参考电极为 Ag-AgCl 电极,电流记录和测量采用 pulse+pulsefit 程序(德国 HEKA 公司)进行控制,刺激频率为 0.1 Hz,采集和滤波频率分别为 20 Hz 和 3 Hz。慢电容(Cs)以及局部串联电阻(Rs),系统电阻、漏电阻和电容电流均由计算机自动补偿,破膜后稳定 10 min 开始记录,实验过程中将 Rs<20 MΩ 且电流稳定的数据被看作是有效数据。所有实验均在 22-25℃ 室温下进行。

1.3 统计学分析

所有数据采用 mean ± SE 的形式表示,由 Clampfit(Axon

Instrument Inc, USA)和 Sigmaplot(Jandel Scientific, CA)软件分析处理,用配对 t 检验进行统计学分析, P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

取扩增 3 代的大鼠骨髓 MSCs, 40 mg/L 银杏内酯 B 诱导 1 周后的细胞爬片,分化后的神经样细胞呈长梭型或椭圆形,较 1 周时的 MSCs 胞体大,经多次换液体代后,杂质明显减少。选取表面光滑,胞体呈锥形,具有长突起的神经样细胞进行检测,不同细胞电流幅值存在较大差异。全细胞电压钳记录模式下,置钳制电压为 -60 mV,给予从 -50 mV 到 +30 mV 的去极化方波,步幅为 10 mV 递增,波宽 80 ms,可记录到一系列内向电流,激活阈值在 -30 mV,峰值电压在 0 mV,未分化细胞的峰值电流为 (1.47 ± 0.15 pA/pF, n=10),诱导后的神经样细胞为 (2.17 ± 0.14 pA/pF, n=12),差异有统计学意义 (P<0.05)。这些都提示该电流为钙电流(I_{Ca}) (图 1-2)。

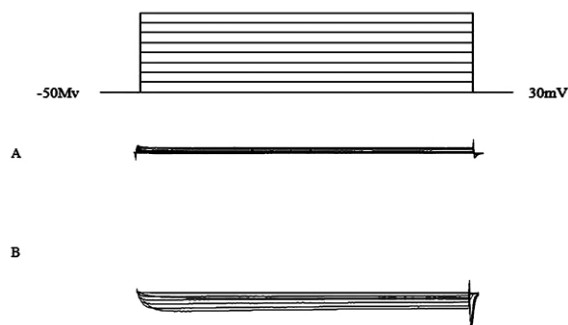


图 1 未分化和分化的 MSCs 细胞的电流特点: A: 未分化的 MSCs 细胞未见明显通道开放; B: GB 诱导分化后的钙电流示意图。两组钙电流施加一组 -50 mV ~ +30 mV, 以 10 mV 递增, 时程为 80 ms 的指令电压。
Fig.1 Current flow feature of undifferentiated and differentiated marrow stroma cell

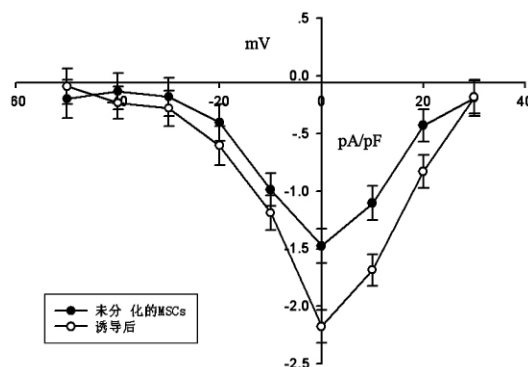


图 2 两组电流的 I-V 曲线示意图

Fig. 2 I-V relationship for the mean of the normalized peak currents in two groups: ● Undifferentiated marrow stroma cell, ○ marrow stroma cell induced by Ginkgolide B

3 讨论

骨髓间充质干细胞(MSCs)是存在于骨髓组织内的一类干细胞,具有向多种细胞分化的功能,在一定的诱导条件下,可以分化为星形胶质细胞、神经元细胞、神经胶质细胞以及心肌细胞,具有体外基因转染率高且传代稳定的特点^[6-7]。MSCs 在脑损伤以及变性病的治疗中发挥重要作用^[8]。目前对其的研究目的主要是用来修复损伤的神经系统,诱导的后的神经样细胞是否成熟,电生理技术是一个较为可靠的指标。作为电生理技术的一种,膜片钳技术为细胞水平和分子水平研究离子通道的功能开辟了新的途径^[9-10]。

离子通道在不同类型的细胞上广泛表达,钙离子在细胞内信号的传递、神经信号传导以及细胞的分化中起到重要的作用。细胞外钙离子内流是钙离子发挥细胞内信号传导、参与细胞电活动等生理功能的主要途径^[11]。电压门控型钙通道(VGCCs)能够调控钙离子在细胞内的进出,参与各种钙依赖的病例或生理过程,如:肌肉收缩,神经递质的释放,细胞的分化及凋亡等^[12]。实验表明, VGCCs 的激活使得 KCl 诱导的胞质内

钙离子浓度明显增高^[13]。钙信号在细胞功能的成熟中是必不可少的,早期 MSCs 早期阶段就能检测到钙电流的存在,阻断钙通道使得其神经元细胞特性受损,说明钙信号与早期的神经分化有极大的关联性^[14]。

本实验应用膜片钳技术对诱导后的神经样细胞继续检测。实验证实,经 Neuritin 诱导骨髓基质细胞定向分化的神经样细胞具有活跃的电生理特性, 5- 氮胞苷对骨髓基质细胞进行诱导结果表明,检测到外向延迟整流 K⁺^[15]。说明诱导分化条件对 MSCs 来源的神经样细胞的成熟度有影响。经 GB 诱导后得到的神经样细胞具有电生理的特性。诱导后的神经样细胞具有正常神经元细胞的形态及电生理特性,并且记录到有钙电流的存在。实验发现,经 GB 诱导后的神经样细胞与未分化的 MSCs 的膜特性有显著的改变,说明。

获得稳定的 MSCs 是进行实验的前提,本实验室联合应用密度梯度离心法及贴壁筛选法,采用单克隆培养法来分离、培养 MSCs,使获得的 MSCs 尽可能为同一细胞来源的,从而使其纯度大为提高。

GB 通过阻滞核因子 kappa-B 的激活,能够减少经氧化后

低密度脂蛋白刺激的血管内皮细胞上炎性蛋白的表达^[16]。GB 能够抑制氧化型低密度脂蛋白刺激的炎性蛋白^[17]。GB 能够抑制血小板聚集,并对缺血/再灌注大脑损伤有保护作用^[18-19]。在中枢神经系统,GB 能够使损伤后的脊髓白质显著增多,同时减低促炎因子 mRNA 的水平^[20]。GB 通过缺血再灌注抑制大鼠脑组织的炎性反应,并能够利用脂多糖对星形细胞进行修复,并且 GB 通过拮抗 β -淀粉样蛋白 25-35 的表达和缺血引起的细胞凋亡对神经元细胞起到保护作用^[21]。所以本实验选择 GB 作为诱导剂,诱导出具有明显神经特性的神经元样细胞。

本研究通过全细胞膜片钳对 MSGs 上钙离子通道电流的研究,初步了解其电生理特性,为神经干细胞细胞分化和调控提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Khang G, Kim HL, Hong M, et al. Neurogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells onto β -mercaptoet hanol-loaded PLGA film[J]. Cell Tissue Res, 2011 Sep 20.[Epub ahead of print]
- [2] Matsumoto T, Li M, Nishimura H, et al. Lnk-dependent axis of SCF-cKit signal for osteogenesis in bone fracture healing [J]. J Exp Med, 2010, 207(10): 2207-2223
- [3] Hu YY, Huang M, Dong XQ, et al. Ginkgolide B reduces neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain: Possible involvement of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(3): 1462-1468
- [4] Pahwa R, Jaggaiahgari S, Pahwa S, et al. Isolation and expansion of human natural T regulatory cells for cellular therapy [J]. J Immunol Methods, 2010, 363(1): 67-79
- [5] 苏平, 黄建华, 雒晓东, 等. 银杏内酯 B 对骨髓间充质干细胞分化为神经样细胞的影响[J]. 广东医学, 2007, 28(1): 33-35
Su Ping, Huang Jian-hua, Luo Xiao-dong, et al. Effects of Ginkgolide B induced Marrow Stromal Stem Cells into Neurom-like Cells [J]. Guangdong Medical Journal, 2007, 28(1): 33-35 (In Chinese)
- [6] Croft AP, Przyborski SA. Mesenchymal stem cells expressing neural antigens instruct a neurogenic cell fate on neural stem cells [J]. Exp Neurol, 2009, 216(2): 329-341
- [7] Bernardo ME, Locatelli F, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells[J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1176: 101-117
- [8] Chen YJ, Chun G, Ai NH, et al. Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction [J]. Zhejiang Univ Sci B, 2008, 9(8): 630-637
- [9] Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres [J]. Nature, 1976, 260: 779-802
- [10] Hamillo P, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. Pfluegers Arch, 1981, 391: 85-100
- [11] 邓方阁, 郭连峰, 李玉林, 等. 人骨髓间充质干细胞的分离培养及其膜表面电压依赖型钙通道的研究 [J]. 中华生物医学工程杂志, 2010, 16(5): 457-460
Deng Fang-ge, Guo Lian-feng, Li Yu-lin, et al. Isolation and culture of human marrow mesenchymal stem cells and their voltage-operated Ca^{2+} channels on the membrane surface [J]. Chin J Biomed Eng, 2010, 16(5): 457-460 (In Chinese)
- [12] Lory P, Chemin J. Towards the discovery of novel T-type calcium channel blockers[J]. Expert Opin Ther Targets, 2007, 11(5): 717-722
- [13] Fox LE, Shen J, Ma K, et al. Membrane properties of neuron-like cells generated from adult human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. Stem Cells Dev, 2010, 19(12): 1831-1841
- [14] Lepski G, Jannes CE, Maciacyk J, et al. Limited Ca^{2+} and PKA-pathway dependent neurogenic differentiation of human adult mesenchymal stem cells as compared to fetal neuronal stem cells [J]. Exp Cell Res, 2010, 15, 316(2): 216-231
- [15] 李东正, 李静, 王倩, 等. Neuritin 诱导大鼠骨髓基质细胞分化为神经元样细胞的电生理研究 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(11): 2076-2078
Li Dong-zheng, Li Jing, Wang Qian, et al. Electrophysiology Study on Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Stem Cells into Neuron-like Cells by Neuritin [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010, 10(11): 2076-2078
- [16] Zhang S, Chen B, Wu W, et al. Ginkgolide B reduces inflammatory protein expression in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human vascular endothelial cells[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(6): 721-727
- [17] Li R, Chen B, Wu W, et al. Ginkgolide B suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression via blocking nuclear factor-kappaB activation in human vascular endothelial cells stimulated by oxidized low-density lipoprotein[J]. J Pharmacol Sci, 2009, 110(3): 362-369
- [18] 姜秀新, 管斯斯, 鲍利, 等. 银杏内酯 B 对胶原或二磷酸腺苷刺激血小板活化后一氧化氮含量及血管舒张因子刺激磷酸蛋白磷酸化的影响 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(11): 2066-2070
Jiang Xiu-xin, Guan Si-si, Bao Li, et al. Effects of ginkgolide B on NO generation and vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation following platelet activation induced by collagen or adenosine diphosphate [J]. J Clin Rehab Tiss Engin Res, 2009, 13(11): 2066-2070 (In Chinese)
- [19] 黄贱英, 孙建宁, 梅世昌, 等. 银杏内酯 B 对缺血/再灌注损伤大鼠的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(2): 269-272
Huang Jian-ying, Sun Jian-ning, Mei Shi-chang, et al. Protective effects of ginkgolide B on cerebral ischemia reperfusion injury in rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2008, 24(2): 269-272 (In Chinese)
- [20] Wang JH, Sun GY. Platelet activating factor (PAF) antagonists on cytokine induction of iNOS and sPLA2 in immortalized astrocytes (DITNC)[J]. Neurochem Res, 2000, 25(5): 613-619
- [21] Xiao Q, Wang C, Li J, et al. Ginkgolide B protects hippocampal neurons from apoptosis induced by beta-amyloid 25-35 partly via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 647(1-3): 48-54