

本文引用:武博文,武密山,王慧娜,郭金栋,高维娟,王 茹,韩红伟,师旭亮.地黄饮子含药血清对大鼠 BMSCs 与 NSCs 共培养影响转归的研究[J].湖南中医药大学学报,2017,37(10):1056-1062.

# 地黄饮子含药血清对大鼠 BMSCs 与 NSCs 共培养影响转归的研究

武博文<sup>1</sup>,武密山<sup>1,2\*</sup>,王慧娜<sup>3</sup>,郭金栋<sup>1</sup>,高维娟<sup>1,2</sup>,王 茹<sup>1</sup>,韩红伟<sup>1</sup>,师旭亮<sup>1</sup>

(1.河北中医学院,河北 石家庄 050200;2.河北省心脑血管病中医药防治重点实验室,河北 石家庄 050091;

3.承德医学院,河北 承德 067000)

**[摘要]** **目的** 探讨以升麻为药引子的地黄饮子(CRD)含药血清对经过骨髓间充质干细胞(BMSCs)共培养后的大鼠神经干细胞(NSCs)的存活和分化的影响。**方法** 建立 BMSCs 与 NSCs 共培养模型,在共培养体系中加入 CRD 含药血清,从培养第3天开始分别进行 5-溴-2-脱氧尿嘧啶(BrdU)和神经元特异性烯醇化酶(NSE)、胶质细胞纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性标志物微管相关蛋白 2(MAP-2)、少突胶质细胞特异性表达蛋白标志物(MBP)免疫细胞化学双染色。采用流式细胞仪检测 NSCs 的存活率,利用细胞免疫荧光和 Western blot 法鉴定 NSCs 的分化情况,比较 NSCs 的存活率和分化率,分析 CRD 含药血清对共培养后 NSCs 的存活及分化的影响。**结果** 与生理盐水对照组相比,中、高浓度 CRD 含药血清在 BMSCs 与 NSCs 共培养体系中第 7 天能显著提高 NSCs 存活率和 NSE、GFAP、MAP-2、MBP 活性( $P<0.01$ )。**结论** CRD 含药血清在 BMSCs 与 NSCs 共培养体系中能促进 NSCs 有效分化和提高 NSCs 存活率。

**[关键词]** 骨髓间充质干细胞;神经干细胞;药引子;地黄饮子;含药血清;神经样细胞

**[中图分类号]**R285.5;R393 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.010.003

## Effect of Rehmannia Decoction Contained Serum on NSCs of Rats in BMSCs and NSCs Co-culture System

WU Bowen<sup>1</sup>, WU Mishan<sup>1,2\*</sup>, WANG Huina<sup>3</sup>, GUO Jindong<sup>1</sup>, GAO Weijuan<sup>1,2</sup>, WANG Ru<sup>1</sup>, HAN Hongwei<sup>1</sup>, SHI Xuliang<sup>1</sup>

(1. Hebei College of Chinese Medicine, Shijiazhuang, Hebei 050200, China; 2. Hebei Key Laboratory of Chinese

Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease, Shijiazhuang, Hebei 050091, China; 3. Chengde Medical College,

Chengde, Hebei 067000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of *Cimicifuga heracleifolia* Kom. as medicinal guiding of Rehmannia decoction (CRD) contained serum on survival and differentiation of neural stem cells (NSCs) in NSCs and bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) co-culture system. **Methods** Firstly, the modeling of BMSCs co-cultured with NSCs was set up, then CRD contained serum was put into this co-culture system. The cells of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) and neuron-specific enolase (NSE), glial fibrillary acidic protein (GFAP), microtubule-associated protein (MAP2), myelin basic protein (MBP) were stained with double immunocytochemical staining method at 3rd day of culture. The survival rate of NSCs was detected by the flow cytometry (FCM) and expression of NSCs was detected by immunocytochemistry and Western blot. The effect of CRD contained serum on survival and differentiation of NSCs was analyzed. **Results** Compared with the normal saline group, higher concentration and middle concentration of CRD contained serum could significantly increase the survival rate of NSCs, and the NSE, GFAP, MAP-2 and MBP activity on the 7th day in BMSCs and NSCs co-culture system ( $P<0.01$ ). **Conclusion** CRD

**[收稿日期]**2017-2-23

**[基金项目]**国家自然科学基金资助项目(81073074,30472200);河北省自然科学基金项目(H 2013206005);河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2015053);河北省高等学校高层次人才科学研究项目(GCC2014013)。

**[作者简介]**武博文,女,学士,研究方向:心脑血管病的中医药治疗。

**[通讯作者]**\*武密山,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:wumishan@hebcm.edu.cn。

contained serum could promote the effective differentiation and increase the survival rate activity of NSCs and in BMSCs and NSCs co-culture system.

[**Keywords**] bone marrow mesenchymal stem cells; neural stem cells; medicinal guiding; Rehmannia decoction; drug serum; neuron-like cells

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是损伤脊髓平面以下的感觉及运动功能丧失的中枢神经系统疾病<sup>[1]</sup>,治疗方法主要通过细胞移植<sup>[2]</sup>。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)是理想的种子细胞<sup>[3]</sup>,不仅可向成骨细胞等中胚层细胞定向分化,而且在特定条件下还可向外胚层神经元样细胞、星形胶质样细胞和少突胶质样细胞分化<sup>[4]</sup>。神经干细胞(neural stem cells,NSCs)有多向分化潜能,能分化为特定的神经细胞<sup>[5]</sup>。BMSCs 与 NSCs 因其特有的生物学特征成为细胞移植的主要来源<sup>[6]</sup>,其分化受微环境的影响,亦能各自分泌因子,有关将二者共培养的作用机制研究少见报道。前期研究表明,升麻苷能透过血脑屏障,可调节脑缺血兴奋性氨基酸神经递质,对神经元损伤有保护作用<sup>[7]</sup>。本研究将升麻(*Cimicifuga heracleifolia* Kom)加入地黄饮子(Rehmannia decoction,RD),制备以升麻为药引子的地黄饮子(简称 CRD)含药血清,探索 CRD 对 BMSCs 与 NSCs 共培养中 NSCs 存活及分化的影响,以期干细胞移植治疗脑和脊髓损伤提供实验依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验药物 地黄饮子来源于宋朝刘河间的《黄帝素问·宣明论方》,药物组成:熟干地黄 24 g,巴戟天 12 g,山萸肉 12 g,石斛 12 g,肉苁蓉 12 g,熟附子 9 g,五味子 6 g,肉桂 6 g,白茯苓 9 g,麦冬 12 g,石菖蒲 9 g,远志 6 g,薄荷 5 g,生姜 3 g,大枣 6 g。另备升麻 12 g 作为药引子。地黄饮子加上具有“升清阳”作用的升麻,参照文献<sup>[8]</sup>,水提醇沉,制备 CRD,每毫升药液含生药 5.5 g,相当于临床用量的 20 倍。同法制备 RD 组,生药含量同 CRD 组。

1.1.2 主要试剂 DMEM 低糖细胞培养液(美国 Hyclone 公司);DMEM/F12 细胞培养液(美国 Gibco 公司);小鼠抗兔 BrdU 单克隆抗体(Sigma 公司);兔抗大鼠 NSE 多克隆抗体(Boster biotechnology 公司);小鼠抗大鼠神经胶质细胞酸性纤维蛋白(glia fibrillary acidic protein,GFAP)单克隆抗体(Sigma 公

司);兔抗小鼠抗微管相关性蛋白 2(microtubule-associated protein 2,MAP-2)单克隆抗体(Sigma 公司);兔抗大鼠细胞髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein,MBP)单克隆抗体(Sigma 公司);FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(美国 Santa Cruz 公司);包被用左旋氏多聚赖氨酸(Poly-L-Lysine,Sigma 公司);AnnexinV-PI 凋亡试剂盒(美国 BD 公司);SABC 小鼠/兔免疫组化染色试剂盒、双染试剂盒 Histostain TM-DS kit(北京中山生物技术有限公司);ECL 蛋白显影液试剂盒、Transwell 培养板(美国 Corning 公司);Hoechst 33442 免疫荧光一抗稀释液、免疫荧光二抗稀释液、青/链霉素溶液( $\times 100$ )、即用型胰蛋白酶细胞消化液、抗荧光淬灭封片液(上海碧云天公司)。

1.1.3 实验动物 清洁级 SD 大鼠新生 3 d 雌鼠 3 只,清洁级 10 月龄雌性 SD 大鼠 18 只,体质量( $351 \pm 12$ ) g,购自河北医科大学实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003,合格证号:2016A018。

### 1.2 方 法

1.2.1 大鼠含药血清的制备 18 只 10 月龄 SD 大鼠,随机分为 3 组(每组 6 只):一组为服 CRD 药组,按 1 g/kg 体质量灌服 CRD,每天 1 次,连续 3 d。另一组为对照组,灌服同容量的生理盐水。再一组为服 RD 药组,按 1 g/kg 灌服 RD,每天 1 次,连续 3 d。第 3 次灌胃 1.5 h 后,所有大鼠均在乙醚麻醉下自腹主动脉抽取血液,同组合并后离心获取血清,血清在 56 °C 灭活 30 min,0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤除菌后,参照本实验室方法,按“通法方案”<sup>[8]</sup>,分别制备 0.1  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  低、中、高剂量浓度的 CRD 含药血清和 1  $\mu\text{mol/L}$  剂量浓度的 RD 含药血清及生理盐水对照血清。

1.2.2 体外分离和培养大鼠 BMSCs 参照本实验室全骨髓贴壁法分离 BMSCs<sup>[9]</sup>,从大鼠股骨髓中分离 BMSCs,培养基由含 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素及 10% 胎牛血清的 DMEM 组成,放置于含 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中,每隔 2 d 更换培养液。待细胞铺满培养瓶后,进行细胞传代。每次传代用 0.25% 胰蛋白酶(0.1 mL/cm<sup>2</sup>)消化 2 min,细胞

传至第3代后,利用流式细胞仪检测分析细胞表面特异性标志物(CD<sub>29</sub>、CD<sub>34</sub>、CD<sub>90</sub>),并结合细胞形态学分析,证实所培养的细胞为大鼠 BMSCs。

**1.2.3 体外分离和培养大鼠 NSCs** 取 SD 新生雌鼠,颈椎脱臼法处死,浸泡在 75%酒精中 5 min 后断头,依次分离出全脑组织并将脑膜及残余血管剥除。用剪刀充分剪碎全脑组织,放入 1 mL 即用型胰蛋白酶消化液,放置于恒温培养箱中,5 min 后加入 NSCs 培养液终止消化,转移至筛网,过滤为细胞悬液,转至离心管,1 000 r/min 离心 5 min。加入完全培养基,放置于含 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温培养箱中,每隔 2 d 采取半量换液法更换培养基 1 次,培养传代至第 3 代后,利用免疫细胞化学荧光检测 NSCs 特异性蛋白(Nestin 巢蛋白),证实所培养细胞为大鼠 NSCs。NSCs 移植前 24 h 用 10 mg/L 的 5-溴-2-脱氧尿嘧啶(BrdU)标记 NSCs 细胞。

**1.2.4 BMSCs-NSCs 体外共培养体系的建立** 参照本实验室方法<sup>[8]</sup>,对 96 孔细胞培养板进行改装(图 1)。在距培养孔底部 2 mm 的地方打孔(直径 4 mm),使相邻的 4 孔相通,中间加一层 0.45 μm 的隔膜,隔膜与培养板接触之处用质量分数 3% 的琼脂糖凝胶密封,防止左右两室的细胞混杂,只有培养上清可以经过隔膜相通。将制备好的培养板置于紫外线灯下照射消毒,备用。

将第 3 代 BMSCs 以 1×10<sup>6</sup> 个/mL 的细胞密度接种到 96 孔细胞培养板的 BMSCs 培养室;在培养板的 NSCs 培养室中加入密度为 1×10<sup>3</sup> 个/mL 的第 2 代 NSCs;加入培养基,漫过通道孔,使两侧培养上清相通;每小时将培养板倾斜 1 次,促进双侧上清交流,建立大鼠 BMSCs 与 NSCs 的共培养体系,共培养 12 d。

**1.2.5 含药血清干预方法与分组** 待上述 BMSCs-NSCs 的共培养体系细胞同步化后,实验共分 5 组,分别为:对照组(normal,加入与 L-CRD 组同质量浓度的生理盐水血清),CRD 含药血清低剂量组(L-CRD,加入 0.1 μmol/L 的 CRD 含药血清)、CRD 含药血清中剂量组(M-CRD,加入 1 μmol/L 的 CRD 含药血清)、CRD 含药血清高剂量组(H-CRD,加入 10 μmol/L 的 CRD 含药血清),RD 含药血清组(RD,加入 1 μmol/L 的 RD 含药血清),每组均设 10 个平行培养孔,每孔加入 DMEM 培养液 200 μL,每隔 2 d 换液 1 次。

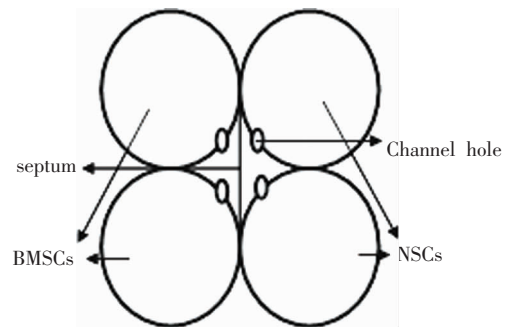


图 1 BMSCs-NSCs 体外共培养体系示意图

### 1.3 观察指标及检测方法

**1.3.1 细胞分化检测** 将各组 BMSCs-NSCs 的共培养体系中 NSCs 培养室的 NSCs,分别于第 3 天至第 12 天用质量浓度为 0.25 g/L 胰蛋白酶消化,1×10<sup>5</sup> 个/mL 接种于经 0.1% 多聚赖氨酸包被的玻片,各组贴壁培养铺满细胞后,用 PBS 洗 3 次,常温下用免疫荧光染色固定液固定 20 min,0.1% Triton X-100 中孵育 20 min,用正常山羊血清封闭液于 37 °C 恒温培养箱中封闭 1 h,将免疫荧光一抗抗体 MAP-2、MBP、GFAP、NSE 抗体 1:100 稀释混合均匀后分别依次加入各培养孔内,在 4 °C 冰箱条件下孵育过夜;后加入 TRITC 标记山羊抗兔 IgG(1:100)及 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:100),于 37 °C 恒温培养箱内避光孵育 1 h;Hoechst 染色 5 min 后 PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。按照试剂盒说明书步骤分别进行 BrdU 和神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase,NSE)、胶质细胞纤维酸性蛋白(GFAP)、神经元特异性标志物微管相关蛋白 2 (MAP-2)、少突胶质细胞特异性表达蛋白标志物(MBP)免疫荧光化学双染色,以确定神经元细胞、胶质细胞和少突胶质细胞。抗荧光淬灭封片液封片后用免疫荧光显微镜观察。阳性细胞为红色细胞核和蓝色细胞浆,2 种特征均具备为双阳性细胞。倒置显微镜下每孔随机读取 10 个不同的视野,每组 40 个视野,采样计数平均每个视野阳性细胞数,结果以阳性表达细胞的百分比表示。以培养时间为横轴,细胞数为纵轴,描绘细胞分化曲线。

**1.3.2 对 NSCs 存活率影响测定** 将各组 BMSCs-NSCs 的共培养体系中 NSCs 培养室的 NSCs 计数后,取细胞悬液 1 mL,1 000 r/min 离心 4 min,去除上清液后加入 100 μL 的 Binding Buffer,重悬细胞后,加入 5 μL 经荧光标记的 Annexin-V 试剂,充分混匀,避光条件下孵育 20 min,加入 5 μL 的 PI 试剂后避光下孵育 5 min,取 400 μL 的细胞重悬

液,按照 AnnexinV-PI 细胞凋亡试剂盒步骤,流式细胞仪测定诱导凋亡后的 NSCs 的存活率。

#### 1.4 统计学处理

统计数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,采用组间  $t$  检验并进行方差分析比较, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

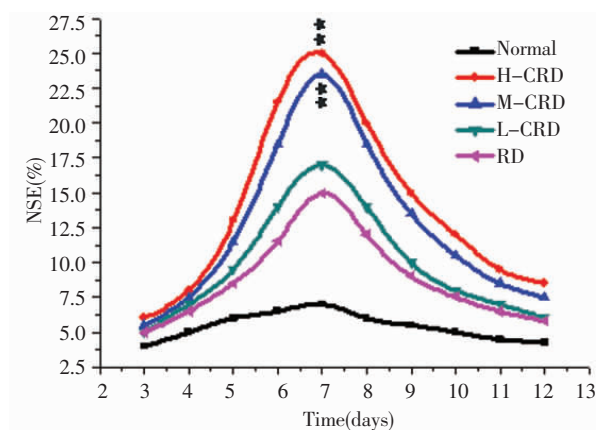
## 2 结果

### 2.1 BMSCs-NSCs 共培养的观察

M-CRD、H-CRD 组 BMSCs 很快贴壁,BMSCs 体积缩小并分化成带突起的神经元样细胞和胶质细胞,约 2 d 可见有神经细胞从神经球中呈放射状伸出轴突,3 d 后在 BMSCs 表面的大部分神经球变成散在的单个细胞,向四周迁徙。L-CRD 组、RD 组第 3 天时才可见少量带突起的神经元样细胞和胶质细胞。Normal 组中未见到细胞变形。

### 2.2 对 NSCs 分化的影响

2.2.1 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 NSE 的影响 与 Normal 组相比,L-CRD 组和 RD 含药血清组 NSE 的双阳性 NSCs 无显著性差异( $P>0.05$ )。M-CRD 组、H-CRD 组 NSE 的双阳性 NSCs 在第 7 天分别与 Normal 组、RD 含药血清组相比,均明显升高( $P<0.01$ )。见图 2。

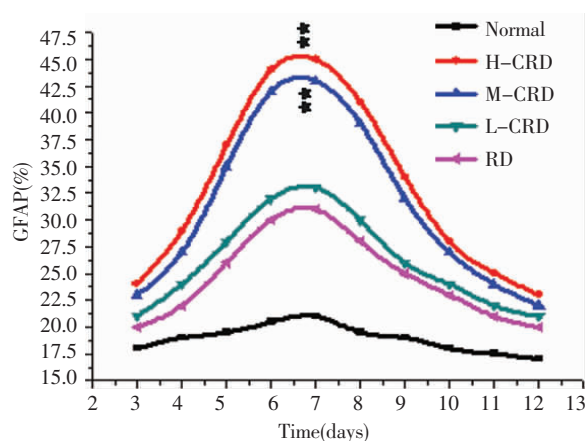


注:与 Normal 组相比较,\*\* $P<0.01$ ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

图 2 不同剂量组 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 NSE 的影响

2.2.2 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 GFAP 的影响 与 Normal 组相比,L-CRD 组和 RD 含药血清组 GFAP 的双阳性 NSCs 无显著性差异( $P>0.05$ )。M-CRD 组、H-CRD 组 GFAP 的双阳性 NSCs 在第 7 天分别与 Normal 组、RD 含药血清组相比,均明显升高( $P<0.01$ )。见图 3。

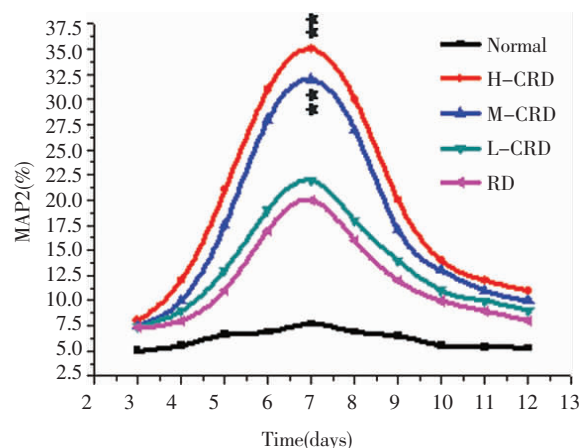
2.2.3 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 MAP2 的影响 与 Normal 组相比,L-CRD 组



注:与 Normal 组相比较,\*\* $P<0.01$ ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

图 3 不同剂量组 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 GFAP 的影响

和 RD 含药血清组 MAP2 的双阳性 NSCs 无显著性差异( $P>0.05$ )。M-CRD 组、H-CRD 组 MAP2 的双阳性 NSCs 在第 7 天分别与 Normal 组、RD 含药血清组相比,均明显升高( $P<0.01$ )。见图 4。



注:与 Normal 组相比较,\*\* $P<0.01$ ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

图 4 不同剂量组 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 MAP2 的影响

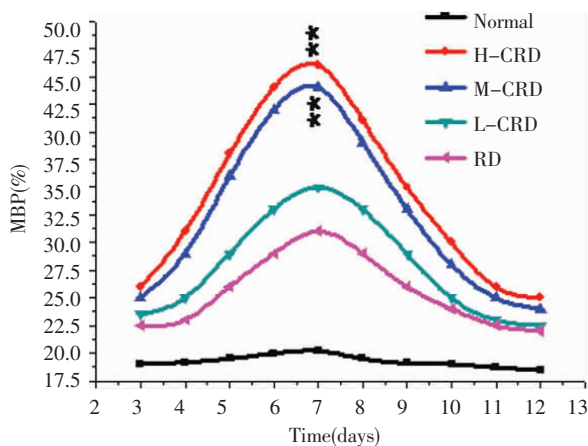
2.2.4 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 MBP 的影响 与 Normal 组相比,L-CRD 组和 RD 含药血清组 MBP 的双阳性 NSCs 无显著性差异( $P>0.05$ )。M-CRD 组、H-CRD 组 MBP 的双阳性 NSCs 在第 7 天分别与 Normal 组、RD 含药血清组相比,均明显升高( $P<0.01$ )。见图 5。

### 2.3 对 NSCs 存活率的影响

与 Normal 组相比,L-CRD 组和 RD 含药血清组 NSCs 存活率无显著性差异( $P>0.05$ )。M-CRD 组、H-CRD 组 NSCs 存活率在第 7 天分别与 Normal 组、RD 含药血清组相比,均明显升高( $P<0.01$ )。见图 6。

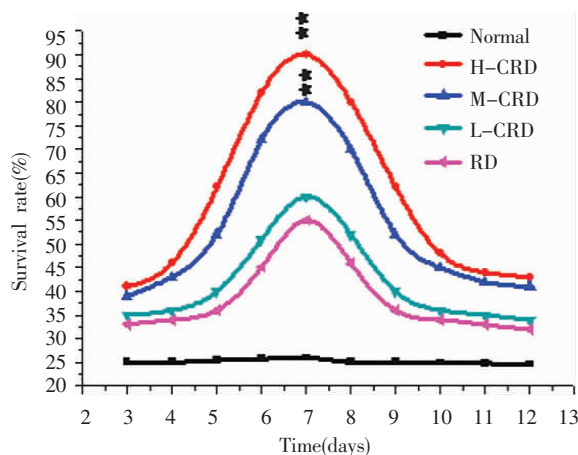
## 3 讨论

神经元特异性烯醇化酶是烯醇化酶的一种同工



注:与 Normal 组相比较,\*\* $P < 0.01$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

图5 不同剂量组 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养 MBP 的影响



注:与 Normal 组相比较,\*\* $P < 0.01$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

图6 不同剂量组 CRD 含药血清对大鼠 BMSCs-NSCs 体外共培养存活率的影响

酶,主要存在于大脑神经元和神经内分泌细胞内并参与糖酵解,是糖原酵解途径中甘油分解最后的酶,NSE 是神经元损伤的标志物<sup>[10]</sup>。正常情况下,血液中的 NSE 含量比脑组织内低 30 倍。当脑组织由于缺血、中毒或外伤时,细胞膜完整性遭到破坏,NSE 释放出来进入脑脊液,由于血脑屏障破坏而进入血液循环。NSE 与学习、记忆及认知能力有关<sup>[11]</sup>,认知障碍程度与血清 NSE 呈负相关<sup>[12]</sup>。

星形胶质细胞 (astrocyte, AS) 是大脑中数量众多的细胞,与中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的内环境稳定、突触传递等病理、生理过程密切相关<sup>[13]</sup>,在神经元的发育、突触连接的形成中有重要作用<sup>[14]</sup>。胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 是星形胶质细胞的骨架蛋白及特异性标志物,反映细胞激活和胶质化程度,可作为脑损伤后星形胶质细胞活化及增殖的标志<sup>[15]</sup>。中枢神经系统受损时星形胶质细胞反

应性增生,GFAP 水平上调<sup>[16]</sup>。GFAP 表达的增多有正、反两方面的作用:一方面活化的星形胶质细胞膜上有 5-羟色胺、 $\gamma$ -氨基丁酸等受体,具有维持脑损伤后内环境的稳定、神经细胞的可塑性作用<sup>[17]</sup>;另一方面活化的星形胶质细胞可产生有神经毒性作用的细胞因子,释放细胞毒性物质和炎症介质,加重神经组织的损伤<sup>[18]</sup>。

神经元内存在两种高分子量的微管相关蛋白 (MAPs),即 MAP1 和 MAP2,MAP2 主要存在于神经元的胞体和树突中,且在树突中的含量多于胞体,作为神经元的标志蛋白,MAP2 是神经元细胞骨架蛋白,与微管蛋白形成微管,同肌动蛋白、微丝等相互作用构成细胞骨架<sup>[19]</sup>,维持微管力学稳定,参与突起生长、胞浆蛋白运输、神经元塑形<sup>[20]</sup>。MAP2 免疫活性下降可造成微管堆积,影响细胞骨架的完整,导致神经元死亡,MAP2 是脑损伤的敏感标志<sup>[21]</sup>。MAP2 mRNA 只存在于大脑灰质以及停止分化的迁移到大脑皮质区的神经元<sup>[22]</sup>。MAP2 损失对神经元细胞产生严重的影响<sup>[19]</sup>。

髓鞘碱性蛋白 (MBP) 是中枢神经髓鞘膜的主要成分,MBP 是少突胶质细胞和雪旺细胞合成的强碱性膜蛋白,在少突胶质细胞内以共价键结合于髓鞘质浆膜面,与细胞骨架、微管、微丝相连,维持中枢神经系统髓鞘结构和功能稳定,是急性脑损伤和脱髓鞘改变的特异性指标<sup>[23]</sup>。当脑损伤累及髓鞘时,MBP 发生崩解,释放入脑脊液,导致血液中 MBP 水平升高,引起神经功能障碍。MBP 水平特异地反映髓鞘脱失、神经组织损伤程度<sup>[24]</sup>,作为判断颅脑损伤病情严重程度和评估预后的指标<sup>[25]</sup>,MBP 是中枢神经系统急性脱髓鞘的客观生化指标<sup>[26]</sup>。

细胞信息交流 (即细胞通讯) 有长距通讯和短距通讯两种方式,长距通讯以激素或生长因子为介质,通过血液循环和局部组织液的流动,将信息从一个细胞传递至另一个细胞;短距通讯在相邻的细胞间形成直接通道,信息物质进行相互交流。BMSCs 有免疫特性,不仅能够逃避免疫识别,还有免疫抑制作用<sup>[27]</sup>,可用于异体移植。BMSCs 分泌多种神经营养因子<sup>[28]</sup>,以旁分泌的方式促进内源性 NSCs 增殖、分化,促进轴突再生和再髓鞘化,促进神经损伤修复。本实验建立培养上清可以相互交流,但 BMSCs 与 NSCs 互不接触的共育体系呈左右两室平行结构,能在倒置显微镜下观察两种细胞的情况,可同

时收集两室的 BMSCs 和 NSCs 进行定量指标的检测。本研究将 BMSCs 和 NSCs 共培养,结果显示 BMSCs 很快贴壁,约 2 d 可见有神经细胞从神经球中呈放射状伸出轴突,3 d 后在 BMSCs 表面的大部分神经球变成散在的单个细胞,向四周迁徙。CRD 含药血清提高了 BMSCs 促进 NSCs 增殖和分化,其途径可能是促进 BMSCs 分泌某些蛋白质,通过微孔滤膜弥散到隔膜的另一侧,促进 NSCs 向神经元细胞或少突胶质细胞方向分化。

毛茛科植物大三叶升麻,具有“升清阳”的功效,升麻中所含的三萜皂苷升麻 H-1(cimicifugoside H-1)可以抑制脑缺血时兴奋性氨基酸(Glu、Asp)的过度释放,并增加抑制性氨基酸(Gly、 $\gamma$ -GABA)的浓度,减少由于兴奋性氨基酸造成的神经细胞损伤<sup>[7]</sup>。本研究结果显示,CRD 含药血清中、高剂量组分别和对照组、RD 含药血清组比较,NSE、GFAP、MAP-2、MBP 双阳性 NSCs 差异有统计学意义,表明 CRD 含药血清促进 NSCs 分化成神经元和胶质细胞的比例增高,CRD 含药血清浓度的高低决定了 NSCs 向神经元和胶质细胞方向分化的转归。详细机制有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Kwon BK, Fisher CG, Dvorak MF, et al. Strategies to promote neural repair and regeneration after spinal cord injury[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2005,30(17 Suppl):S3-13.
- [2] Miljkovic-Lolic M, Silbergleit R, Fiskum G, et al. Neuroprotective effects of hyperbaric oxygen treatment in experimental focal cerebral ischemia are associated with reduced brain leukocyte myeloperoxidase activity[J]. *Brain Res*, 2003,971(1):90-94.
- [3] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow[J]. *Nature*, 2002,418(6893):41-49.
- [4] Ma K, Fox L, Shi G, et al. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [J]. *Neurol Res*, 2011,33(10):1083-1093.
- [5] Reeves A, Keirstead HS. Stem cell based strategies for spinal cord injury repair[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012,760:16-24.
- [6] Ma W, Tavakoli T, Chen S, et al. Reconstruction of functional cortical-like tissues from neural stem and progenitor cells[J]. *Tissue Eng Part A*, 2008,14(10):1673-1386.
- [7] 武密山,赵素芝,高维娟,等.升麻苷 H-1 对脑缺血大鼠纹状体氨基酸类神经递质含量的影响[J]. *中国病理生理学杂志*, 2016,32(5):831-835.
- [8] 武密山,赵素芝,任立中,等.密骨打老儿丸含药血清对共育体系中成骨细胞和破骨细胞功能的影响 [J]. *中国病理生理学杂志*, 2013,29(5):913-917.
- [9] 武密山,赵素芝,任立中,等.川续断皂苷 VI 诱导大鼠骨髓间充质干细胞向成骨细胞方向分化的研究[J]. *中国药理学通报*, 2012,28(2):222-226.
- [10] Komiya A, Yasuda K, Nozaki T, et al. Small cell carcinoma of the prostate after high-dose-rate brachytherapy for low-risk prostatic adenocarcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2013,5(1):53-56.
- [11] Klijn CJ, Hankey GJ. Management of acute ischaemic stroke: new guidelines from the American Stroke Association and European Stroke Initiative[J]. *Lancet Neuro*, 2003,2(11):698-701.
- [12] Chou ST, Ko LE, Lim PS, et al. Effect of age and sex on plasma total homocysteine in Taiwanese subjects[J]. *Chin J Physiol*, 2000,43(4):159-164.
- [13] Araque A. Astrocyte-neuron signaling in the brain-implications for disease[J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006,7(7):619-624.
- [14] Nimmerjahn A. Astrocytes going live: advances and challenges [J]. *J Physiol*, 2009,587(Pt 8):1639-1647.
- [15] Kajihara H, Tsutsumi E, Kinoshita A, et al. Activated astrocytes with glycogen accumulation in ischemic penumbra during the early stage of brain infarction: immunohistochemical and electron microscopic studies[J]. *Brain Res*, 2001,909(1/2):92-101.
- [16] Martinian L, Boer K, Middeldorp J, et al. Expression patterns of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-delta in epilepsy-associatedlesional pathologies[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2009,35(4):394-405.
- [17] Valentim LM, Michalowski CB, Gottardo SP, et al. Effects of transient cerebral ischemia on glial fibrillary acidic protein phosphorylation and immunoccontent in rat hippocampus [J]. *Neuroscience*, 1999,91(4):1291-1297.
- [18] Koprowski H, Zheng YM, Heber-Katz E, et al. In vivo expression of inducible nitric oxide synthase in experimentally induced neurologicdiseases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993,90(7):3024-3027.
- [19] Law AJ, Hutchinson LJ, Burnet PW, et al. Antipsychotics increase microtubule-associated protein 2 mRNA but not spinophilin mRNA in rat hippocampus and cortex [J]. *J Neurosci Res*, 2004,76(3):376-382.
- [20] Yamaguchi S, Fujii-Taira I, Murakami A, et al. Up-regulation of microtubule-associated protein 2 accompanying the filial imprinting of domestic chicks (*Gallus gallus domesticus*)[J]. *Brain Res Bull*, 2008,76(3):282-288.
- [21] Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, et al. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *J Clin Invest*, 1998,101(9):1992-1999.
- [22] Tucker RP, Garner CC, Matus A. In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain[J]. *Neuron*, 1989,2(3):1245-1256.
- [23] Inglis HR, Greer JM, McCombe PA. Gene expression in the spinal cord in female lewis rats with experimental autoimmuneencephalomyelitis induced with myelin basic protein [J]. *PLoS One*, 2012,7(11):e48555.

- [24] Kuboyama K, Fujikawa A, Masumura M, et al. Protein tyrosine phosphatase receptor type z negatively regulates oligodendrocyte differentiation and myelination[J]. PLoS One, 2012,7(11): e48797.
- [25] Nawaz S, Kippert A, Saab AS, et al. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent interaction of myelin basic protein with the plasma membrane in oligodendroglial cells and its rapid perturbation by elevated calcium[J]. J Neurosci, 2009,29(15):4793-4807.
- [26] Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular status admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke[J]. J Neurol Sci, 2004,227(1):49-53.
- [27] Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells[J]. Clin Exp Immunol, 2011,164(1):1-8.
- [28] Jiang J, Lv Z, Gu Y, et al. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro[J]. Neurosci Res, 2010,66(1):46-52.

(本文编辑 杨 瑛)

## 2018 年中国首届中医文化人类学 学术论坛征文通知

中医文化人类学是运用文化人类学研究中医文化相关问题的新兴交叉学科。自上世纪 80 年代,人类学被引入国内中医相关研究,已在中医医史文献、中医文化、中医文化传播(尤其是跨文化传播)等研究领域显现出其学科特色、优势和价值。为促进学科发展,聚合领域力量,培养青年人才,提升学科的国际发声能力,特定于 2018 年 5 月 19 日-20 日在湖南长沙举办我国首届中医文化人类学学术论坛。现将论坛征文相关事宜通知如下。

### 一、征文内容:

内容为中医文化人类学范畴内皆可,重点在以下几方面:(1)中医文化人类学的学科内涵与外延界定;(2)中医文化人类学学科史与国内外研究进展(如西方学界的中医相关人类学者及其学术观点述评);(3)中医文化人类学学科特色、价值和应用前景;(4)中医文化人类学学科建设、人才培养;(5)中医文化人类学研究方法论;(6)中医文化人类学的理论研究(如人类学某学派或某领域与中医的结合);(7)中医文化人类学的田野志(基于已完成的田野调查);(8)中医文化人类学的其他相关研究。

### 二、论文要求:

(1)来稿达到发表水平者,将优先优惠在《湖南中医药大学学报》杂志发表,优秀者可免版面费,请按其投稿要求撰写论文;(2)论文观点明确,具有一定的学术性、针对性、前瞻性、建设性、创新性;(3)论文字数为 3000-10000 字(综述另议),中英文皆可,并附 300 字以内的中英文摘要;(4)来稿请注明作者姓名、单位、职务、联系电话、电子邮箱等信息,另附 200 字左右个人简介;(5)论文将择优作为论坛发言,并将由国内外著名专家进行点评,请作者做好与会准备;(6)来稿请以 Word 方式发送至联系人邮箱;(7)截稿日期:2018 年 4 月 1 日。

### 三、联系方式:

联系人:严暄暄(湖南中医药大学) 电话:15974200701(微信同号)

投稿邮箱:xxytcm@126.com

湖南中医药大学中医学院  
湖南中医药大学湖南省中医药文化研究基地  
《湖南中医药大学学报》编辑部  
2017 年 9 月