

氯胺酮对骨髓间充质干细胞向神经细胞体外分化的影响

程丽娟 瞿胜 杨逢润

430000 武汉市精神卫生中心110病区(程丽娟),司法鉴定科(瞿胜),美沙酮门诊(杨逢润)

通信作者:瞿胜,Email:244480917@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2019.05.014

【摘要】目的 探讨氯胺酮对骨髓间充质干细胞(BMSCs)向神经细胞体外分化的影响。**方法** 处死SFP级SD大鼠,分离与纯化大鼠BMSCs,然后加入不同浓度的氯胺酮对其进行诱导:0 $\mu\text{mol/L}$ (对照组)、1 $\mu\text{mol/L}$ (实验1组)和10 $\mu\text{mol/L}$ (实验2组)。MTT法检测细胞增殖,流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blot检测微管相关蛋白2(MAP2)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)表达水平。**结果** 细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的细胞存活率与MAP2、GFAP相对表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),实验2组显著高于实验1组($P < 0.05$)。实验2组与实验1组的细胞凋亡率显著低于对照组($P < 0.05$),实验2组也显著低于实验1组($P < 0.05$)。**结论** 氯胺酮能增加BMSCs的MAP2、GFAP蛋白表达,促进BMSCs增殖与抑制细胞凋亡,从而促进其向神经细胞体外分化。

【关键词】 氯胺酮; 骨髓间充质干细胞; 神经细胞; 体外分化

Effects of ketamine on differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neural cells in vitro

Cheng Lijuan, Qu Sheng, Yang Fengrun

110 Ward, Wuhan Mental Health Center, Wuhan 430000, China (Cheng LJ); Department of Judicial Authentication, Wuhan Mental Health Center, Wuhan 430000, China (Qu S); Methadone Maintenance Treatment Clinic, Wuhan Mental Health Center, Wuhan 430000, China (Yang FR)

Corresponding author: Qu Sheng, Email: 244480917@qq.com

【Abstract】 Objectives To investigate the effects of ketamine on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) into neural cells in vitro. **Methods** SFP-grade rats were sacrificed, and the rat BMSCs were isolated and purified, and then induced with different concentrations of ketamine: 0 $\mu\text{mol/L}$ (control group), 1 $\mu\text{mol/L}$ (experiment group 1), and 10 $\mu\text{mol/L}$ (experiment group 2). Cell proliferation were detected by MTT assay, apoptosis were detected by flow cytometry, and microtubule-associated protein 2 (MAP2) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression levels were detected by Western blot. **Results** The cell survival rates, the relative expression of MAP2 and GFAP protein in the experiment group 2 and the experiment group 1 were significantly higher than those in the control group, and those in the experimental group 2 were significantly higher those in the experimental group 1, at 24 h and 48 h after treatment ($P < 0.05$). The apoptosis rates of the experiment group 2 and the experiment group 1 were significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$), and that of the experimental group 2 were also significantly lower than that of the experimental group 1 ($P < 0.05$). **Conclusions** Ketamine can increase the MAP2 and GFAP proteins of BMSCs, promote the proliferation of BMSCs and inhibit cell apoptosis, thus promote their differentiation into neural cells in vitro.

【Key words】 Ketamine; Bone marrow mesenchymal stem cells; Nerve cells; Differentiation in vitro

神经细胞损伤导致的脊髓损伤在临床上比较常见,如果受损的神经细胞得不到补充,将不利于神经修复的微环境^[1]。细胞移植可补充受损处神经细胞的缺失,且其后续分泌的神经营养因子也可为改善神经细胞损伤提供合适的微环境^[2]。随着组织工

程学及分子生物学快速发展且不断完善,采用组织工程技术治疗可促进脊髓损伤患者的神经恢复。骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)是目前骨组织工程中应用最广泛的种子细胞,具有与生物支架材料的黏附性能好、取材

方便、对机体损伤少、增殖传代能力等优点^[3]。最新研究显示BMSCs具有跨胚层分化的能力,可以向外胚层的神经细胞分化^[4]。特别是通过提高细胞内环磷酸腺苷(cAMP)的水平也能诱导BMSCs向神经细胞分化,促进表达神经标记物^[5-6]。其中氯胺酮是一种常用的麻醉剂,具有快速抗抑郁的作用,其能使交感活性增加,血浆儿茶酚胺升高,使代谢和内分泌处于亢进状态;也能提升突触间隙单胺类递质的水平,具有促进神经细胞体外分化的能力^[7],但是目前其对BMSCs向神经细胞损伤的作用机制还不够明确。本文具体探讨了氯胺酮对BMSCs向神经细胞体外分化的影响,希望为神经细胞损伤的移植治疗开辟新的途径。

一、材料与方法

1. 实验动物:本研究实验动物的使用遵循国家科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。SFP级Sprague-Dawley(SD)大鼠1只(雄性,2周龄),体重为86 g,购自济南赛福实验动物养殖有限公司。大鼠安置于标准的环境,饲养温度(25±1)℃,相对湿度(60±10)%,正常昼夜交替采光。

2. 大鼠BMSCs的分离和纯化:颈椎脱臼法处死SD大鼠,分离出股骨及胫骨,75%酒精中浸泡5 min。用组织剪剪除胫骨、股骨两端,露出骨髓腔,采用完全培养液交替冲洗胫骨、股骨两端。收集细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^7 个/ml进行常规培养,随后每3天进行全量换液,当细胞生长密度为80%左右时按1:2的比例进行传代培养。

3. 细胞分组与处理:选择生长良好的对数期BMSCs,将其消化后稀释,调整细胞密度为 1×10^4 个/ml,接种到24孔板中。细胞贴壁后,然后加入不同浓度的氯胺酮(购自美国Ketamine-Sigma-Aldrich公司)对其进行诱导。氯胺酮加入的浓度分别为:0 μmol/L(对照组)、1 μmol/L(实验1组)、10 μmol/L(实验2组),诱导24 h与48 h后,对经诱导的细胞进行观察并记录。

4. MTT法检测细胞增殖:细胞处理后24 h与48 h,在药物作用时间结束之前4 h,直接向各组每孔中分别加入20 μl MTT贮液,置于培养箱内继续培养4 h。弃各孔上清液,分别加入DMSO 100 μl,震荡摇匀20 min。酶标仪下在550 nm检测各组的吸光度值,计算细胞存活率。

5. 流式细胞仪检测细胞凋亡:细胞处理后24 h与48 h,离心后留细胞去上清, PBS清洗细胞3次,然后采用PBS重悬细胞,加入1 mg/ml RNAase 2 μl,

37℃水浴40 min。将10 μl FITC Annexin V和5 μl PI加入200 μl 孵育缓冲液中混匀,混匀后配成1 μg/ml的标记液。滴加100 μl的标记液重悬细胞,室温下避光孵育20 min。离心去上清留细胞,采用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

6. Western blot检测蛋白表达:细胞处理后24 h与48 h,收集细胞,裂解细胞,离心取蛋白,采用BCA法定量蛋白浓度,上样SDS-PAGE胶,转膜后,一抗稀释抗β-Actin抗体、抗微管相关蛋白2(MAP2)抗体、抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体(1:1 000, Santa Cruz公司),使用入HRP标识的二抗稀释液(1:10 000,北京中杉金桥公司),放入自动显像系统,读取与计算MAP2、GFAP蛋白的相对表达水平。上述实验均重复3次,每次实验设置3个平行,取平均值作为最终结果。

7. 统计学方法:选择Excel 2010软件整理原始数据结果,分析时应用统计学软件SPSS 20.00,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 细胞存活率比较:见表1。细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的细胞存活率显著高于对照组($P < 0.05$),实验2组显著高于实验1组($P < 0.05$)。

表1 不同时间点3组细胞存活率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
对照组	45.66 ± 7.29	56.99 ± 8.14
实验1组	67.20 ± 8.11 ^a	78.09 ± 7.44 ^a
实验2组	76.02 ± 5.61 ^{ab}	89.77 ± 6.47 ^{ab}
<i>F</i> 值	9.833	7.683
<i>P</i> 值	< 0.001	0.005

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验1组比较,^b $P < 0.05$

2. 细胞凋亡率比较:见表2。细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的细胞凋亡率显著低于对照组($P < 0.05$),实验2组也显著低于实验1组($P < 0.05$)。

3. MAP2、GFAP蛋白相对表达水平比较:见表3。细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的MAP2、GFAP蛋白相对表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),实验2组也显著高于实验1组($P < 0.05$)。

讨论 脊髓损伤的治疗一直是困扰医学界的难题,脊髓损伤后的病理生理过程包括原发性损伤阶

表2 不同时间点3组细胞凋亡率比较(% , $\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h
对照组	14.55 ± 2.18	21.74 ± 3.77
实验1组	6.88 ± 0.89 ^a	8.34 ± 1.22 ^a
实验2组	2.14 ± 0.33 ^{ab}	4.28 ± 0.42 ^{ab}
F值	13.084	12.788
P值	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验1组比较,^b $P < 0.05$

表3 不同时间点3组MAP2、GFAP蛋白相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h		48 h	
	MAP2	GFAP	MAP2	GFAP
对照组	1.03 ± 0.23	1.67 ± 0.45	1.14 ± 0.32	1.73 ± 0.51
实验1组	8.38 ± 1.33 ^a	8.67 ± 1.34 ^a	9.23 ± 1.44 ^a	7.87 ± 2.14 ^a
实验2组	13.28 ± 2.17 ^{ab}	13.00 ± 2.48 ^{ab}	14.09 ± 2.57 ^{ab}	15.09 ± 3.11 ^{ab}
F值	19.838	15.863	20.822	22.414
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,^a $P < 0.05$;与实验1组比较,^b $P < 0.05$

段与继发性损伤阶段,特别是由于局部血液灌注受损,过量产生的自由基具有一定的神经毒性作用引起,也不利于神经修复。传统的手术治疗只能减轻脊髓受损部位的水肿情况及恢复脊柱的稳定性,很难补充受损的神经元^[7]。

BMSCs是一群有着基质细胞系的干细胞,主要位于骨髓的支持结构;其可塑性强,在特定环境与诱导因素下,能够转化成体内多个胚层来源细胞,尤其是神经外胚层来源和中胚层来源的组织细胞^[8]。当前研究显示在特定的环境下,BMSCs可以分化为神经细胞,可为治疗神经组织退行性疾病、神经损伤疾病提供良好的理论依据和实验基础。但BMSCs在骨髓中的存在率仅为0.1%,在自然状态下大多向成纤维细胞方向分化,很难在自然条件下向神经细胞方向分化。已有研究显示抑郁症与神经可塑性存在较密切的关系,但抑郁的发生发展过程跟神经可塑性之间的具体关系还需要进一步分析^[9],本研究通过探讨具有抗抑郁作用的氯胺酮对BMSCs向神经细胞体外分化的影响,分析其对神经组织退行性疾病、神经损伤疾病的潜在作用。

在氯胺酮单剂量给药后时,可激活mTOR信号通路,增强新生突触功能。本研究显示细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的细胞存活率显著高于对照组($P < 0.05$),实验2组显著高于实验1组($P < 0.05$),表明氯胺酮可促进BMSCs向神经细胞体

外分化与增殖。当前也有研究显示氯胺酮可通过阻断静息时的NMDA受体,抑制eEF2的磷酸化,促进BDNF的表达,从而发挥抗抑郁效果;氯胺酮也可调节树突的延伸和树突棘密度的变化,促进神经元细胞适应环境的变化^[10-11]。

BMSCs可在体外进行培养,可塑性强,遗传背景单纯,体外培养后植入受损部分不会发生免疫排斥现象,是组织工程学中比较理想的种子细胞。氯胺酮可诱导海马区RacGTPase显著增多,而海马Rac1的活化可增加海马区神经元的神经可塑性。并且氯胺酮可促进丝切蛋白Cofilin磷酸化失活,最终增强树突棘可塑性^[12]。本研究显示细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的细胞凋亡率显著低于对照组($P < 0.05$),实验2组也显著低于实验1组($P < 0.05$),表明可抑制BMSCs的凋亡。

BMSCs具有取材方便、来源广泛的特点,在适当的诱导条件下可以向骨、软骨及神经细胞分化。神经细胞分化的一个变化是细胞相关蛋白表达变化,MAP2是一种与微管结合的蛋白,与细胞分化成熟密切相关,可通过调节细胞增殖调控蛋白而影响细胞分化^[13]。其主要分布在神经元的胞体及突起中,可以促进神经元突起的形成及神经元结构的稳定,也能促进神经元的发育及突起形成^[14]。GFAP为星形胶质细胞的骨架成分之一,是反映星形胶质细胞的标志物,其表达量的高低反映星形胶质细胞坏死、增殖等改变的程度。且GFAP在轴浆运输、大脑发育以及神经元再生和可塑性方面发挥调控作用,也对维持神经元的形态具有重要的作用。本研究显示细胞处理后24 h与48 h,实验2组与实验1组的MAP2、GFAP蛋白相对表达水平显著高于对照组($P < 0.05$),实验2组也显著高于实验1组($P < 0.05$)。从机制上分析,氯胺酮能增加海马树突棘密度,进而增多突触连接来达到治疗神经损伤的目的;也有研究显示氯胺酮抗抑郁的持久效应很可能与其诱导了海马区神经元树突发生重塑有关^[15]。本研究也有一定的不足,氯胺酮对BMSCs的影响还无明确机制,且可能存在一定的外在毒性,长期诱导能力可能存在不足,长期应用于抑郁症远期疗效也不明确,患者可能存在依赖性,临床上目前尚存在争议,将在后续研究中深入分析。

总之,氯胺酮能增加BMSCs的MAP2、GFAP蛋白表达,促进BMSCs增殖与抑制细胞凋亡,从而促进其向神经细胞体外分化。

利益冲突 本文所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 文章构思及试验设计为程丽娟, 实验操作及数据统计为程丽娟、瞿胜、杨逢润, 绘制表格为程丽娟、瞿胜, 论文撰写为程丽娟, 论文修订为瞿胜、杨逢润

参 考 文 献

- [1] Abbas OL, Özatik O, Cönen ZB, et al. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation Enhances Nerve Regeneration in a Rat Model of Hindlimb Replantation[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019, 143(4): 758e-768e. DOI: 10.1097/PRS.00000000000005412.
- [2] Hakim R, Covacu R, Zachariadis V, et al. Mesenchymal stem cells transplanted into spinal cord injury adopt immune cell-like characteristics[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 115. DOI: 10.1186/s13287-019-1218-9.
- [3] 罗丹, 廖燕凌, 邱丽丽, 等. 氯胺酮下调神经连接蛋白-1在创伤后应激功能障碍动物模型中的作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2018, 34(1): 80-83. DOI: 10.12089/jca.2018.01.019.
Luo D, Liao YL, Qiu LL, et al. Role of ketamine-mediated-decreased expression of neuroligin-1 in the hippocampus on rats with post-traumatic stress disorder[J]. *Journal of Clinical Anesthesiology*, 2018, 34(1): 80-83.
- [4] 黄良峰, 陈洋洋, 赵炳功, 等. 抑郁症的成因及其新药治疗研究进展[J]. *现代生物医学进展*, 2018, 18(1): 180-185. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.01.039.
Huang LF, Chen YY, Zhao BG, et al. Research progress on the causes of depression and for its new drug treatments[J]. *Progress in Modern Biomedicine*, 2018, 18(1): 180-185.
- [5] Jo CH, Lim HJ, Yoon KS. Characterization of Tendon-Specific Markers in Various Human Tissues, Tenocytes and Mesenchymal Stem Cells[J]. *Tissue Eng Regen Med*, 2019, 16(2): 151-159. DOI: 10.1007/s13770-019-00182-2.
- [6] Mesentier-Louro LA, Teixeira-Pinheiro LC, Gubert F, et al. Long-term neuronal survival, regeneration, and transient target reconnection after optic nerve crush and mesenchymal stem cell transplantation[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10(1): 121. DOI: 10.1186/s13287-019-1226-9.
- [7] 张锦曦, 潘灵辉. 亚麻醉剂量氯胺酮介导NMDA-NO通路在小鼠术后认知功能障碍机制中的研究[J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(5): 652-656. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2018.05.016.
Zhang JX, Pan LH. NMDA-NO pathway mediates the effect of a subanesthetic-dosage of ketamine on postoperative cognitive dysfunction in mice[J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2018, 35(5): 652-656.
- [8] Moosazadeh Moghaddam M, Bonakdar S, Shokrgozar MA, et al. Engineered substrates with imprinted cell-like topographies induce direct differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells into Schwann cells[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1022-1035. DOI: 10.1080/21691401.2019.1586718.
- [9] Song L, Yuan X, Jones Z, et al. Assembly of Human Stem Cell-Derived Cortical Spheroids and Vascular Spheroids to Model 3-D Brain-like Tissues[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 5977. DOI: 10.1038/s41598-019-42439-9.
- [10] 杨飞, 钮峥嵘, 苏涛, 等. AMPA受体增强剂CX546减轻氯胺酮麻醉后神经元活动损伤的作用机制研究[J]. *中国医师杂志*, 2018, 20(9): 1367-1371. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2018.09.023.
- [11] Wang C, Chi J, Che K, et al. The combined effect of mesenchymal stem cells and resveratrol on type 1 diabetic neuropathy[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(5): 3555-3563. DOI: 10.3892/etm.2019.7383.
- [12] Wei ZJ, Fan BY, Liu Y, et al. MicroRNA changes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiated into neuronal-like cells by Schwann cell-conditioned medium[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(8): 1462-1469. DOI: 10.4103/1673-5374.253532.
- [13] 王莹, 宋俊杰, 慎晓飞, 等. 氯胺酮通过抑制蛋白激酶B/雷帕霉素靶蛋白信号通路诱导B103细胞自噬产生抗帕金森病的作用及分子机制[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2018, 39(5): 390-394. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2018.05.002.
Wang Y, Song JJ, Shen XF, et al. Anti-Parkinson's disease effects of ketamine via inhibiting protein kinase B/mammalian target of rapamycin signal pathway and triggering autophagy in rat B103 neuroblastoma cells[J]. *International Journal of Anesthesiology and Resuscitation*, 2018, 39(5): 390-394.
- [14] 龙云辉, 刘小梅, 王敏肖, 等. 氯胺酮对乳腺癌细胞迁移及NET-1、RhoA表达的影响[J]. *中国妇幼保健*, 2018, 33(20): 4756-4759. DOI: 10.7620/zgfybj.j.issn.1001-4411.2018.20.62.
- [15] Xie LB, Chen X, Chen B, et al. Protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells modified with klotho on renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 175-182. DOI: 10.1080/0886022X.2019.1588131.

(收稿日期: 2019-03-13)

(本文编辑: 赵金鑫)