

益肾化浊方对 $A\beta_{25-35}$ 介导神经干细胞增殖与分化的影响

韩文文^{1,2}, 张玉莲¹, 周震¹, 张琳琳¹, 王凯², 宋宛珊², 崔远武^{1*}

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150; 2. 天津中医药大学, 天津 300193)

[摘要] 目的: 观察益肾化浊方对阿尔茨海默病(AD)脑中神经干细胞(NSCs)增殖分化的影响, 为益肾化浊方治疗 AD 提供实验依据。方法: 分离孕 14 d 小鼠胚胎 NSCs, 并以 β 淀粉样蛋白 25-35 ($A\beta_{25-35}$) 处理, 分为空白组(正常培养基), 模型组 ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$), $A\beta_{25-35}$ + 益肾化浊方低剂量 ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, $A\beta_{25-35}$ + 益肾化浊方中剂量 ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, $A\beta_{25-35}$ + 益肾化浊方高剂量 ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 共 5 组, 药物在 $A\beta_{25-35}$ 作用 2 h 后加入, 培养至 48 h 后, 进行检测。采用 WST 法检测益肾化浊方对 NSCs 增殖的影响, 免疫荧光法检测其对 NSCs 分化的影响。结果: 与空白组比较, 模型组细胞活力明显降低, ($\text{GFAP}^+/\text{DAPI}$)% 比例上升, ($\text{Tubulin}^+/\text{DAPI}$)% 比例降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 益肾化浊方各剂量组均可以提高 $A\beta_{25-35}$ 损伤 NSCs 活力, 降低 ($\text{GFAP}^+/\text{DAPI}$)% 比例, 升高 ($\text{Tubulin}^+/\text{DAPI}$)% 比例, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且均以低剂量组效果更为明显。结论: 益肾化浊方可促进 $A\beta_{25-35}$ 介导的 NSCs 增殖, 诱导其向神经元方向分化, 抑制其向星形胶质细胞方向分化。

[关键词] 阿尔茨海默病; 益肾化浊方; 神经干细胞; 神经元; 星形胶质细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)20-0099-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200099

Effect of Yishen Huazhuo Decoction on Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells Mediated by $A\beta_{25-35}$ HAN Wen-wen^{1,2}, ZHANG Yu-lian¹, ZHOU Zhen¹, ZHANG Lin-lin¹, WANG Kai², SONG Wan-shan², CUI Yuan-wu^{1*} (1. Second Afilicated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Tianjin 300150, China; 2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Yishen Huazhuo decoction on the proliferation and differentiation of Alzheimer's disease (AD) neural stem cells (NSCs), and to provide experimental basis for the treatment of AD by Yishen Huazhuo decoction. **Method:** NSCs were isolated from Kunming rats at embryonic day (E) 14 and were processed with β -amyloid 25-35 ($A\beta_{25-35}$). The cells were randomly divided into blank group, model group ($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} A\beta_{25-35}$) and $A\beta_{25-35}$ + YSHZ decoction low dose group ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), middle dose group ($1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and high dose group ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). The drug was added after 2 h of $A\beta_{25-35}$ action, and the cells were detected after 48 h of culture. The effect of Yishen Huazhuo decoction on the proliferation of NSCs was observed by, WST method and its effect on differentiation was determined by immune fluorescence method. **Result:** Compared with the blank group, the cell activity in model group was significantly reduced, with increased ($\text{GFAP}^+/\text{DAPI}$)% and reduced ($\text{Tubulin}^+/\text{DAPI}$)%, with significantly statistical difference ($P < 0.05$), and the low dose group achieved the best effect. **Conclusion:** Yishen Huazhuo decoction promotes the proliferation of NSCs mediated by $A\beta_{25-35}$, induces NSCs differentiation to neurons and inhibits their differentiation to astrocytes.

[Key words] Alzheimer's disease; Yishen Huazhuo decoction; neural stem cells; neuron; astrocyte

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种 病因未明的中枢神经系统原发性退行性变性疾病,

[收稿日期] 20140921(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81102577); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB530405)

[第一作者] 韩文文, 博士, 住院医师, 从事中西医结合脑病临床与科研工作, Tel: 15900298435, E-mail: wenwen.0623@163.com

[通讯作者] * 崔远武, 博士, 主治医师, 从事中西医结合脑病临床与科研工作, Tel: 022-60335418, E-mail: pxcyw@126.com

其病理特征包括神经炎性斑、神经元纤维缠结及广泛的神经元缺失等。实验研究发现移植神经干细胞(neural stem cells, NSCs)可进行替代治疗,改善认知功能^[1],但存在诸多困难。因此如何激活与诱导内源性 NSCs 增殖分化成为研究热点。益肾化浊方中制何首乌、女贞子补益肝肾,益精生髓,以养元神;淫羊藿、补骨脂补肝肾,壮肾阳,温助肾精;石菖蒲化痰开窍;黄芪补气行血;川芎辛散上行,为血中气药,三者合用可达化浊通络之目的。诸药相辅相成,共奏补肾益精、填髓充脑、化浊通络,强神益智之功。前期研究发现,益肾化浊方具有较好的临床疗效^[2],补肾中药单体具有促进 NSCs 增殖和分化的作用^[3-4],为进一步研究益肾化浊方对 AD 中 NSCs 的影响,本研究观察益肾化浊方对 β 淀粉样蛋白 25-35 ($A\beta_{25-35}$) 介导的 NSCs 增殖和分化的影响。

1 材料

1.1 动物 孕 14 d 昆明种小鼠,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,合格证号 SCXK (沪) 2007-0005。

1.2 药物及试剂 益肾化浊方由天津中医药大学制剂中心制备,其中药组成:制何首乌 12 g,女贞子 10 g,淫羊藿 10 g,补骨脂 10 g,石菖蒲 12 g,炙黄芪 10 g,川芎 10 g。上述药物 370 g,加 1 000 mL 水浸泡 12 h 之后加水 1 000 mL,80 °C,30 min 超声,过滤,保存滤液,滤渣按上述操作加水煎煮,反复 3 次,将滤液合并,过滤,滤液 100 °C 水浴加热,浓缩至 370 mL,含生药为 1 g·mL⁻¹,微孔滤膜过滤除菌,4 °C 保存备用。 $A\beta_{25-35}$ (美国 Anaspac 公司,批号 CA94555), KnockOut DMEM/F12 (批号 12660-012),胎牛血清 FBS (批号 10099-141),表皮生长因子 EGF (批号 PHG0314),成纤维细胞生长因子 bFGF (批号 PHG0024), Stem-Pro Neural supplement 添加剂 (批号 A10508-01),以上试剂均购自美国 Gibco 公司,青-链霉素溶液 (法国 Biowest 公司,批号 L0022-100), Anti-GFAP (美国 Millipore 公司,批号 AB5804), Anti-Tubulin betaIII (美国 Millipore 公司,批号 MAB1637), β -actin (美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-47778), Western 及 IP 细胞裂解液 (上海碧云天公司,批号 P0013), BCA 蛋白浓度试剂盒 (上海碧云天公司,批号 P0010)。

1.3 仪器 Heraguard ECO 型超净工作台 (美国 Thermo Fisher 公司), 8000 型 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司), GX71 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司), PowerPac 型 SDS-PAGE 电泳仪和转

膜仪 (美国 Bio-Rad 公司), Biotek aQuant 型全自动酶标仪 (上海坤肯生物化工有限公司)。

2 方法

2.1 细胞制备 小鼠断颈处死,浸泡在 75% 乙醇中 2~3 min,用眼科剪剪开孕鼠腹部,从子宫中分离出胎鼠,PBS 冲洗。剥离胎鼠大脑皮质,浸泡在 PBS 中。用眼科剪将其剪碎吸入 15 mL 离心管中,反复吹打静置,取上清液注入另一个离心管中,再加入 PBS 反复吹打,此操作重复 2~3 次。将所有上清液进行过滤离心 (1 000 r·min⁻¹, 5 min) 弃上清液,加入 5 mL DMEM/F12 培养基 (1% 双抗, 2% supplement),吹打均匀,计数。以适当密度接种于 DMEM/F12 培养基 (1% 双抗, 2% supplement, 1% FGF 和 EGF) 中,于 37 °C, 5% CO₂ 饱和湿度条件下进行原代培养 3~4 d,收集神经干细胞球。

2.2 $A\beta_{25-35}$ 制备 参照 Miguel A 等方法^[5]将 5 mg 的 $A\beta_{25-35}$ 溶于 1 888 μ L 蒸馏水中,震荡混匀,过滤,配制成浓度为 2.5 mmol·L⁻¹ 的母液,用 DMEM/F12 培养基将其稀释为 5 μ mol·L⁻¹, -20 °C 保存备用。

2.3 分组与给药 实验组分为空白组 (正常培养基),模型组 (5 μ mol·L⁻¹ $A\beta_{25-35}$), $A\beta_{25-35}$ + 复方低剂量 (0.1 mg·L⁻¹) 组, $A\beta_{25-35}$ + 复方中剂量 (1 mg·L⁻¹) 组, $A\beta_{25-35}$ + 复方高剂量 (10 mg·L⁻¹) 组,共 5 组。药物在 $A\beta_{25-35}$ 作用 2 h 后加入,培养至 48 h 后,进行检测。

2.4 WST 法检测细胞增殖 培养细胞每孔加 10 μ L WST-1 粉末,37 °C,饱和湿度,5% CO₂ 孵育 3 h,用 Biotek aQuant 型全自动酶标仪在 450 nm 处测定各组吸光度 A。

2.5 免疫荧光法鉴定 NSCs 及其分化 主要包括 NSCs 特异性蛋白 (Nestin) 鉴定和神经元 (Tubulin) 及胶质细胞 (GFAP) 鉴定。使用多聚赖氨酸包被过的 96 孔板,通过固定、封闭、一抗孵育 (4 °C,过夜)、洗涤、二抗孵育 (避光,1 h)、洗涤、DAPI 染色、洗涤、荧光显微镜下拍片,计数。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 13.0 统计分析软件分析处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经正态及方差齐性检验后,使用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 NSCs 增殖的影响 与空白组比较,模型组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$),表明 $A\beta_{25-35}$ 具有明显的细胞毒性作用,进而说明模型制作成功。益肾化浊方各剂量组均可以明显提高 $A\beta_{25-35}$ 损伤的细胞活力

($P < 0.05$), 且以低剂量组效果最为明显。见表 1。

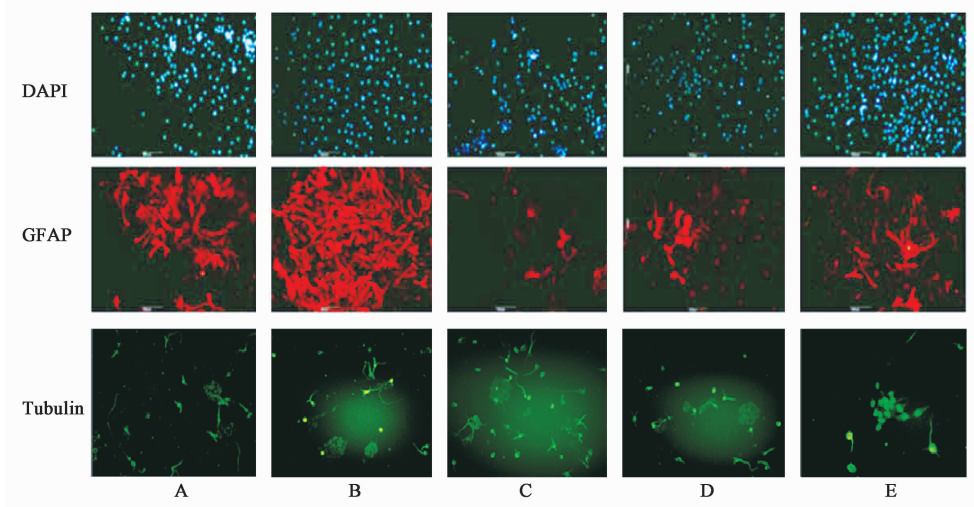
3.2 对 NSCs 分化的影响 各组细胞均能广泛表达 Nestin 巢蛋白, 具有 NSCs 特性。与空白组相比, 模型组细胞 (GFAP⁺/DAPI)% 比例上升, (Tubulin⁺/DAPI)% 比例降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。益肾化浊方各组则能明显降低 (GFAP⁺/DAPI)% 比例, 升高 (Tubulin⁺/DAPI)% 比例, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且以低剂量组效果更为明显。见图 1, 表 2。

表 1 益肾化浊方对 NSCs 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Yishen Huazhuo decoction on NSCs vitality ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量/mg·L ⁻¹ | 细胞存活率/% |
|---------------------------|-----------------------|------------------------------|
| 空白 | - | 100.00 ± 8.33 |
| 模型 (Aβ ₂₅₋₃₅) | - | 69.34 ± 6.90 ¹⁾ |
| 益肾化浊方 | 0.1 | 105.89 ± 10.47 ²⁾ |
| | 1 | 100.27 ± 9.12 ²⁾ |
| | 10 | 92.10 ± 10.59 ²⁾ |

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。



A. 空白组; B. 模型组; C. 益肾化浊 0.1 mg·L⁻¹ 组; D. 益肾化浊组 1 mg·L⁻¹ 组; E. 益肾化浊组 10 mg·L⁻¹ 组

图 1 益肾化浊方对 Aβ₂₅₋₃₅ 介导的 NSCs 分化的影响 (免疫荧光, ×400)

Fig. 1 Effects of Yishen Huazhuo decoction on NSCs differentiation of Aβ₂₅₋₃₅ mediated (IF, ×400)

表 2 益肾化浊方对 NSCs (GFAP⁺/DAPI)%, (Tubulin⁺/DAPI)% 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of Yishen Huazhuo decoction on (GFAP⁺/DAPI)%, (Tubulin⁺/DAPI)% in NSCs ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| 组别 | 剂量 /mg·L ⁻¹ | GFAP ⁺ /DAPI /% | Tubulin ⁺ /DAPI /% |
|-------|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| 空白 | - | 43 ± 1.6 | 7.1 ± 0.5 |
| 模型 | - | 72 ± 2.4 ¹⁾ | 3.8 ± 0.4 ¹⁾ |
| 益肾化浊方 | 0.1 | 25 ± 1.7 ²⁾ | 6.8 ± 0.6 ²⁾ |
| | 1 | 37 ± 1.8 ²⁾ | 6.4 ± 0.6 ²⁾ |
| | 10 | 47 ± 2.1 ²⁾ | 5.0 ± 0.7 ²⁾ |

4 讨论

AD 属祖国医学“呆证”、“善忘”、“不慧”等病证范畴。中医认为肾与脑的关系极为密切,“肾藏精”理论内涵中更包含了“肾主骨,生髓,通于脑”,“脑为髓之海”等重要学术论点。老年人随着年龄增加肾中精气日渐匮乏,导致精髓空虚,脑失所养,神明失司,加之年老脏腑功能整体下降,气血凝滞多生瘀血,津液失调而痰饮丛生,在临床多表现为善忘、痴呆等证

候。因此,年老体衰,肾精亏虚,五脏不足,脑髓渐空,痰浊上蒙,瘀阻脑络为本病的基本病机。

益肾化浊方由制何首乌、女贞子、淫羊藿、补骨脂、石菖蒲、黄芪、川芎组成,现代研究也发现淫羊藿苷能促进肾上腺皮质干细胞增殖、迁移,上调某些激素和生长因子的释放^[6],并可通过提高核因子-κB (NF-κB)的活性和诱导 p65 高表达来抑制细胞过度凋亡从而延缓衰老^[7];何首乌可提高血清及组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性,降低丙二醛(MDA)含量,以延缓 D-半乳糖的大鼠衰老^[8];黄芪可以抑制脑缺血或脑出血急性期星形胶质细胞的过度增生活化和 GFAP 的过度表达,利于损伤后的神经功能恢复^[9]。补骨脂可通过提高 ER-β 受体, NR2B 受体的基因表达水平,改善痴呆大鼠的学习记忆^[10]。

NSCs 是中枢神经系统中的一种具有自我更新和多潜能分化能力的细胞,其在大脑受损时会代偿性地促进神经元分化来弥补缺损,使其保持一种平衡以确保大脑的正常生理功能^[11],当这种平衡被打

乱时便会出现包括 AD 在内的神经退行性疾病。 $A\beta$ 级联假说是 AD 的主要病因学说,主要是由 β 淀粉样前体蛋白在胞质溶酶体经 β -分泌酶和 γ -分泌酶作用裂解而来^[12],其中 $A\beta_{25-35}$ 为 $A\beta$ 中毒性最强的片段^[13]。 $A\beta$ 在细胞外沉积可导致神经元的变性死亡与突触丢失,可溶性 $A\beta_{25-35}$ 具有损伤海马突触可塑性和空间记忆能力的作用^[14]。 $A\beta$ 沉积周围有大量星形胶质细胞存在,研究发现在大鼠背部后区皮质注射 $A\beta$ 寡聚体会导致星形胶质细胞的大量激活^[15]。结果显示:不同浓度益肾化浊法中药作用于 $A\beta_{25-35}$ 介导的 NSCs 模型后,细胞存活率均有不同程度的升高;不同浓度益肾化浊法中药均可明显促进 $A\beta_{25-35}$ 介导的 NSCs 向神经元分化,同时抑制其向星形胶质细胞分化。其中以 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 益肾化浊法中药组对 $A\beta_{25-35}$ 介导的细胞毒性保护作用最有优势, $1, 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 益肾化浊组虽在对抗 $A\beta_{25-35}$ 细胞毒性及促进胶质细胞转化方面有较强作用,但不排除随中药剂量增大,其复方杂质增多及毒副作用蓄积对细胞本身的损伤也会逐渐增大。所以,选用低剂量复方中药长期使用,在减少药物毒副作用的同时,更好的治疗 AD,这也与临床 AD 治疗疗程长,需长期服药相契合。

目前,不仅有国内学者发现补肾填髓中药能促进神经元细胞能量代谢和利用,激活内源性神经营养因子,促进神经元存活与再生^[16];同时有研究表明以补肾为主的中药复方可以通过抑制神经细胞凋亡的作用^[17]和降低 β 淀粉样蛋白在脑组织的沉积,保护脑组织海马形态的完整性^[18],从而达到改善空间学习记忆能力的作用。本次实验中结果表明补肾复方不仅能降低 $A\beta$ 细胞毒性,同时在诱导体内 NSCs 的分化方面起到神经保护作用,这对于不管是激活内源性的干细胞而改善再生反应还是外源性 NSCs 植入后的定向分化,补肾复方都具有十分重要的意义,值得深入探索研究。

[参考文献]

[1] Chen S Q, Cai Q, Shen Y Y, et al. Neural stem cell transplantation improves spatial learning and memory via neuronal regeneration in amyloid- β precursor protein/presenilin 1/tau triple transgenic mice [J]. Am J Alzheimers Dis Other Dement, 2014, 29(2): 142-149.

[2] 傅凯丽,林翠茹,张玉莲,等. “益肾化浊法”治疗轻度阿尔茨海默病 15 例临床研究[J]. 江苏中医药, 2012, 44(8): 28-29.

[3] 张玉莲,周震,韩文文,等. 何首乌有效成分二苯乙烯苷对 $A\beta_{25-31}$ 诱导神经干细胞定向分化的影响[J]. 中医杂志, 2014, 55(4): 323-327.

[4] 韩文文,张玉莲,周震,等. 二苯乙烯苷对 $A\beta_{25-35}$ 致神经干细胞损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 160-163.

[5] Miguel A, Michael S. Neurogenic effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells [J]. J Neurosci, 2004, 24(23): 5439-5444.

[6] 沈自尹,黄建华,吴斌,等. 淫羊藿激活内源性干细胞及其机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(3): 251-254.

[7] 汪海东,夏世金. 淫羊藿苷经信号通路干预大鼠免疫衰老的作用及机制[J]. 中国老年医学杂志, 2010, 20: 2938-2941.

[8] 陈正爱,李贵铃,尹大维. 不同蒸制时间制首乌对亚急性衰老大鼠抗衰老作用的影响[J]. 时珍国医国药, 2006, 18(4): 848-849.

[9] 张守信,汪丙昂,肖文,等. 黄芪注射液对大鼠脑出血灶周围区内胶质细胞纤维酸性蛋白表达的影响[J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(1): 77-79.

[10] 郑里翔,邓科穗. 补骨脂汤对血管性痴呆大鼠海马内雌激素受体- β 、NMDAR2B 基因表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(9): 1496-1498.

[11] Trouche S, Bontempi B, Rouillet P, et al. Recruitment of adult-generated neurons into functional hippocampal networks contributes to updating and strengthening of spatial memory [J]. PNAS, 2009, 106(14): 5919-5924.

[12] Torreilles F, Touchon J. Pathogenic theories and intrathecal analysis of the sporadic form of Alzheimer's disease [J]. Prog Neurobiol, 2002, 66: 191-203.

[13] Deshpande A, Mina E, Glabe C, et al. Different conformations of amyloid-beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons [J]. Neuroscience, 2006, 26(22): 6011-6018.

[14] Holscher C, Gengler S, Gault V A, et al. Soluble $A\beta_{25-35}$ reversibly impairs hippocampal synaptic plasticity and spatial learning [J]. Eur J Pharmacol, 2007, 561(1/3): 85-90.

[15] Carrero I, Gonzalo M R, Martin B, et al. Oligomers of beta-amyloid protein (Abeta1-42) induce the activation of cyclooxygenase-2 in astrocytes via an interaction with interleukin-1beta, tumour necrosis factor-alpha, and a nuclear factor kappa-B mechanism in the rat brain [J]. Exp Neurol, 2012, 236: 215-227.

[16] 李林,魏海峰,张兰,等. 中医“肾生髓,脑为髓海”现代生物学基础探讨[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(17): 1397-1399.

[17] 杨聘,董克礼,曾望远. 益智健脑颗粒对 SAMP8 快速老化小鼠行为学及神经元凋亡的影响[J]. 中南大学学报, 2006, 31(1): 56-59.

[18] 刘剑刚,李浩,姚明江,等. 还脑益聪方对老龄大鼠学习记忆及脑组织 β 淀粉样蛋白和 p 物质水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(2): 52-55.

[责任编辑 周冰冰]