

· 药理 ·

二苯乙烯苷对 $A\beta_{25-35}$ 致神经干细胞损伤的保护作用

韩文文^{1,2}, 张玉莲^{1*}, 周震¹, 黄建华³, 张琳琳¹

(1. 天津中医药大学第二附属医院脑病科, 天津 300150;

2. 天津中医药大学, 天津 300073; 3. 复旦大学附属华山医院, 上海 200030)

[摘要] 目的: 观察不同浓度二苯乙烯苷(TSG)对 β -淀粉样肽($A\beta_{25-35}$, $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)致损伤的神经干细胞(NSCs)生长、增殖及自我更新能力的影响, 探讨 TSG 对 $A\beta_{25-35}$ 致 NSCs 损伤的保护作用。方法: 从孕 14 d 昆明小鼠体外提取神经干细胞, 以 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度 $A\beta_{25-35}$ 诱导 NSCs 建立稳定的 AD 细胞模型, 与不同浓度二苯乙烯苷共同孵育, 分为对照组、模型组 ($A\beta_{25-35}$ $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、TSG $1 \times 10^{-8} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + A\beta_{25-35}$ 组、TSG $1 \times 10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + A\beta_{25-35}$ 组、TSG $1 \times 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + A\beta_{25-35}$ 组, 共 5 组, 分别采用 EDU 化学荧光染色法检测 NSCs 增殖情况; 采用 WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测法检测不同时段 NSCs 的细胞活性; 体外培养 7 d 后通过神经干细胞球计数法观察 NSCs 的自我更新能力。结果: 与模型组相比, 二苯乙烯苷各剂量组均能在一定程度上抑制 $A\beta_{25-35}$ 对 NSCs 的损伤, 细胞生长状态良好, 细胞增殖率、细胞活性及神经干细胞球计数与模型组相比均有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论: 二苯乙烯苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的神经干细胞损伤具有一定保护作用。

[关键词] 补肾中药; 二苯乙烯苷; 神经干细胞; 增殖; 老年性痴呆; β -淀粉样肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0160-04

[doi] 10.11653/syfy2013110160

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130329.1408.008.html>

[网络出版时间] 2013-03-29 14:08

Protective Effect of Tetrahydroxy Stilbene Glycoside on the NSCs Injury Induced by $A\beta_{25-35}$

HAN Wen-wen^{1,2}, ZHANG Yu-lian^{1*}, ZHOU Zhen¹, HUANG Jian-hua³, ZHANG Lin-lin¹

(1. Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM),
Tianjin 300150, China; 2. Tianjin University of TCM, Tianjin 300073, China;

3. Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of different concentrations of tetrahydroxy stilbene glycoside (TSG) on the growth and proliferation of neural stem cells (NSCs) which were injured by $A\beta_{25-35}$, to discuss the protective effects of TSG on the NSCs injury induced by $A\beta_{25-35}$. **Method:** NSCs were extracted on both sides of brain cortex from the embryos of 14 days of Kunming mice pregnancy, NSCs were cultured by $A\beta_{25-35}$ ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) to establish cell model of Alzheimer's disease (AD) and then were cultured with TSG. All cells were divided into 5 groups, control group; model group ($A\beta_{25-35}$ $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ($\text{TSG } 1 \times 10^{-8} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + A\beta_{25-35}$) group, ($\text{TSG } 1 \times 10^{-7} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + A\beta_{25-35}$) group and ($\text{TSG } 1 \times 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + A\beta_{25-35}$) group. Using the chemical fluorescence staining method (EDU) to detect the proliferation of NSCs; applying WST-1 cell proliferation and

[收稿日期] 20121104(010)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)课题(2010CB530405);国家自然科学基金项目(81102577H2708)

[第一作者] 韩文文, 在读博士, 住院医师, 从事中西医结合脑病临床与科研, Tel: 022-60335408, E-mail: wenwen.0623@163.com

[通讯作者] * 张玉莲, 医学博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中西医结合老年性痴呆、脑血管病临床与科研, Tel: 022-60335355, E-mail: zhy1220@126.com

cell toxicity test to detect the activity of NSCs of different time and then after cultured 7 days *in vitro*, counting neurospheres was used to observe the update ability of NSCs. **Result:** TSG could protect NSCs from $A\beta_{25-35}$ damage. Compared with model group, the morphology, reproduction rate, cell viability and ball count of NSCs were significant different from TSG group ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$). **Conclusion:** TSG can protect the NSCs injury induced by $A\beta_{25-35}$ in some ways.

[**Key words**] kindey medicine; tetrahydroxy stilbene glycoside (TSG); neural stem cell; proliferation; Alzheimer's disease (AD); $A\beta_{25-35}$

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年性痴呆,是以近期记忆障碍为主要临床症状,以老年斑 (SP)、神经元纤维缠结 (NFT) 和神经元丢失为主要病理改变的进行性神经变性疾病,发病机制复杂,其中 β -淀粉样肽 (β -amyloid, $A\beta$) 沉积被公认为 AD 发病的始动环节和关键因素,研究药物诱导内源性 NSCs 的增殖、迁移与分化,以促进神经功能的恢复,可为 AD 的治疗提供新的途径和方法^[1]。二苯乙烯苷 (TSG) 是何首乌中的主要水溶性成分。近年来发现二苯乙烯苷对神经具有保护作用,其作用机制可能通过钙通道拮抗、抗氧化、胆碱脂酶抑制剂、调节细胞凋亡等途径而起作用的^[2],本文以 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经干细胞 (NSCs) 损伤建立痴呆细胞模型,并观察二苯乙烯苷对该模型引起的神经细胞毒性及损伤的保护作用,为临床应用 TSG 防治 AD 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 孕 14 d 昆明种小鼠 (品系为 ICR),由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,合格证号为 SCXK (沪)2007-0005。

1.2 药品和配制 二苯乙烯苷 (纯度 >99%,批号 109010,上海友思生物技术有限公司)。单体溶于 DMSO 溶液,配制成 $1 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,用基础培养基稀释成所需浓度。参照 Miguel A. 等^[3]方法将 5 mg $A\beta_{25-35}$ (AnaSpac 公司)溶于 1 888 μL 的双蒸水中,震荡混匀,过滤,配制成浓度为 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液,用基础培养基稀释成 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

1.3 试剂 细胞培养基 (KnockOut DMEM/F12)、胎牛血清 (FBS)、StemPro[®] Accutase 酶、表皮生长因子 (EGF)、成纤维细胞生长因子 (bFGF)、StemPro[®] Neural supplement 添加剂 (Gibco, 美国 Invitrogen 公司),青-链霉素溶液 (美国 Biowest 公司),多聚赖氨酸 (美国 Millipore 公司),WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (中国,碧云天生物有限公司),Click-iT EDU 检测试剂盒 (美国,Invitrogen 公司)。

1.4 仪器 超净工作台 (USA, Thermo Fisher

Scientific), CO_2 恒温培养箱 (USA, Themro Scientific Forma), 光学显微镜 (Japan, Olympus), Sartorius SP211 电子分析天平 (German, Sartorius), Bioteka Quant 型全自动酶标仪 (China, 上海坤肯生物化工有限公司), 荧光显微镜 (Japan, Nikon)。

2 方法

2.1 原代 NSCs 培养 由孕 14 d 昆明小鼠两侧大脑皮层提取神经干细胞作为原代细胞,采用无血清 DMEM/F12 培养基 (内含 EGF, bFGF, Neural supplement, 青-链霉素双抗) 进行常规细胞培养,待长成神经干细胞球后,使用 Accttase 酶进行消化传代。

2.2 建立增殖系统可溶性 $A\beta_{25-35}$ ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 体外诱导神经干细胞损伤的 AD 细胞模型 体外培养正常的神经干细胞为悬浮生长,3 ~ 5 d 后由于单细胞克隆而成球生长,分别采用神经干细胞球计数及 WST-1 法检测不同浓度可溶性 $A\beta_{25-35}$ 对神经干细胞体外增殖及细胞活性的影响。

2.3 分组及用药 实验分为对照组,模型组 ($A\beta_{25-35} 25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), (TSG $1 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $A\beta_{25-35}$) 组, (TSG $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $A\beta_{25-35}$) 组, (TSG $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $A\beta_{25-35}$) 组,共 5 组。常规消化细胞,计数后以 1×10^5 个/mL 的细胞密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,培养 24 h 后用于实验。

2.4 观察指标 ①细胞形态学观察:每天用倒置显微镜对 96 孔培养板上各组细胞进行观察及拍照。②EDU 增殖检测,按照 Invitrogen 公司 Click-iT EDU 试剂盒的要求逐步进行荧光染色,并计算新增神经干细胞比率。③细胞活性检测:采用 WST-1 法对培养了不同时段 (24, 48, 72 h) 的细胞进行检测,可分别得到各组细胞存活率相对应的吸光度 (A)。按照 WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒的要求配制 WST-1 溶液,每孔加入该溶液 10 μL , $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 饱和湿度,5% CO_2 孵育 3 h,用酶标仪在 450 nm 处测定各组 A。细胞增殖越多越快,则颜色越深, A 越大。④神经干细胞球计数:选取二代培养的 NSCs,

用增殖培养基调整细胞密度,按 96 孔板每孔 100 μL 500 个细胞接种,每组 10 个复孔,于 37 $^{\circ}\text{C}$,饱和湿度,5% CO_2 条件下培养,7 d 后利用倒置显微镜,以 50 μm 为标准对每孔中的细胞克隆球数进行计数,并将数据统计制作图表。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据间的比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 体外神经细胞损伤 AD 模型 与对照组相比,25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{A}\beta_{25-35}$ 能够明显减少神经干细胞球的形成,并显著降低 NSCs 细胞活性,从而建立了增殖系统可溶性 $\text{A}\beta_{25-35}$ (25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 体外诱导神经干细胞损伤的 AD 细胞模型。

3.2 细胞形态学观察 对照组与 TSG 各剂量组细胞增长良好,胞浆均匀透亮,细胞表面无明显斑点及沉积物;模型组细胞胞体明显缩小,折光性显著下

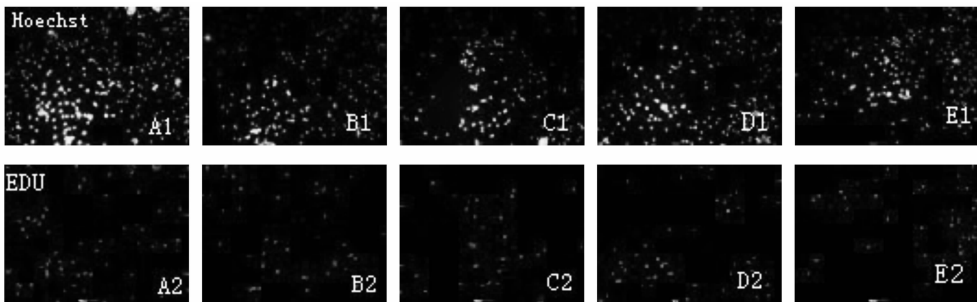
降,胞质内有大量颗粒形成,球体松散,大部分细胞膜破裂,生成碎片。

3.3 细胞增殖率检测 EDU 染色结果显示,模型组新增殖处于 S 期的 NSCs 所占比率明显低于正常对照组,与模型组相比,TSG 各组新增殖率均有增高趋势,其中 TSG 中、高剂量组差异显著 ($P < 0.01$),尤以高剂量组最为明显。见表 1,图 1。

表 1 二苯乙烯苷对神经干细胞新增殖率及神经干细胞球计数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TSG / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞新增殖率 /%	神经干细胞球 /个
对照	-	20.0 \pm 0.65	66.9 \pm 29.1
模型	-	15.0 \pm 0.56 ¹⁾	32.9 \pm 12.7 ¹⁾
二苯乙烯苷	1×10^{-8}	18.5 \pm 2.52	58.3 \pm 20.5 ²⁾
	1×10^{-7}	20.0 \pm 2.85 ³⁾	51.1 \pm 22.9 ²⁾
	1×10^{-6}	21.4 \pm 1.63 ³⁾	54.5 \pm 22.1 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。



A1, A2. 对照组; B1, B2. 模型组 ($\text{A}\beta_{25-35}$ 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; C1, C2. (TSG $1 \times 10^{-8} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $\text{A}\beta_{25-35}$) 组;
D1, D2. (TSG $1 \times 10^{-7} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $\text{A}\beta_{25-35}$) 组; E1, E2. (TSG $1 \times 10^{-6} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + $\text{A}\beta_{25-35}$) 组

图 1 二苯乙烯苷对 $\text{A}\beta_{25-35}$ 致神经干细胞损伤的影响 (EDU 染色, $\times 100$)

3.4 神经干细胞球计数 NSCs 体外培养为成球生长,神经干细胞球的大小、多少能够反应其自我更新的能力。神经干细胞球计数结果显示,模型组明显低于对照组 ($P < 0.05$); TSG 各剂量组与模型组相比,均有不同程度的升高,差异具有显著性 ($P < 0.05$),但缺乏明显的量效关系。见表 1。

3.5 不同时段细胞活力检测 TSG 各组均能够提高损伤 NSCs 的细胞活力,尤以高浓度最为显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且具有一定的时效关系,随着时间的延长,A 值逐渐增高,细胞活力具有逐渐提高的趋势(表 2)。

表 2 二苯乙烯苷对损伤 NSCs 不同时段 A 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	TSG / $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞活力 (A)		
		24 h	48 h	72 h
对照	-	0.123 \pm 0.045	0.148 \pm 0.068	0.191 \pm 0.037
模型	-	0.085 \pm 0.027 ¹⁾	0.095 \pm 0.021 ¹⁾	0.149 \pm 0.020 ¹⁾
二苯乙烯苷	1×10^{-8}	0.111 \pm 0.044	0.134 \pm 0.036 ²⁾	0.159 \pm 0.055
	1×10^{-7}	0.126 \pm 0.054 ²⁾	0.151 \pm 0.062 ²⁾	0.178 \pm 0.058 ²⁾
	1×10^{-6}	0.130 \pm 0.056 ²⁾	0.193 \pm 0.015 ³⁾	0.198 \pm 0.046 ²⁾

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

AD 是一种原发性大脑神经退行性病变,为特有的中枢胆碱能神经元的大量死亡及丢失引起的学习记忆减退,认知障碍等。现代研究证明 $A\beta$ 的沉积是 AD 病理的始发因素和中心环节^[4-5]。 $A\beta$ 来源于 APP^[6],具有神经元毒性作用,可以引起神经元的退变、凋亡^[7]。其决定毒性的主要部位在第 25 ~ 35 氨基酸序列,通过在细胞外的积聚,促进神经细胞骨架的改变,从而导致神经损伤。神经干细胞(neural stem cell, 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,在分裂增殖过程中子代细胞仍然维持干细胞属性^[8],在病理状态或在外因诱导下可以表现出不同程度的再生和更新能力^[9]。在神经干细胞中加入 $A\beta_{25-35}$ 片段后,可使细胞的形态学、增殖率、凋亡及自我更新能力等与 AD 的病理生理变化表现基本一致,因此,可用 $A\beta_{25-35}$ 片段诱导神经干细胞建立 AD 细胞模型。

目前对于 AD 的治疗尚无特别有效的药物,有效地防止或逆转由老年斑的沉积而引起的神经毒性作用,可能对 AD 的防治具有一定意义。二苯乙烯苷(2,3,5,4'-四羟基-二苯乙烯- β -D-葡萄糖苷, TSG)是何首乌中的主要水溶性成分,是一种多羟基酚类化合物,具有较强的抗氧化作用,能显著提高实验动物脑组织中超氧化物歧化酶活性,降低过氧化物酶含量,具有抗衰老、降低血脂、防治动脉硬化等作用。临床运用中亦发现中药何首乌可明显改善 AD 患者的记忆能力,其作用机制可能是多靶点、多环节、多途径的。

本实验采用 EDU 染色法观察损伤 NSCs 的增殖能力,同时采用 WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测法观察不同时段细胞活性变化,并通过神经干细胞球计数反应其自我更新的能力。实验结果显示:经 $25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $A\beta_{25-35}$ 作用 48 h 后,NSCs 形态结构及生长情况较正常培养的细胞发生了明显的变化。细胞数量明显减少,可见死亡、变黑、碎裂细胞,表明 $A\beta_{25-35}$ 片段可损伤体外培养的 NSCs,抑制细胞的生长和增殖,并进一步诱导细胞死亡,从而建立了增殖系统可溶性 $A\beta_{25-35}$ 体外诱导神经干细胞损伤的 AD 细胞模型。而与 $A\beta_{25-35}$ 共培养的二苯乙烯苷各剂量组细胞增长较好,细胞透亮、均匀,表面无明显斑点及沉积物,细胞增殖率、细胞活性及神经干细胞球计数与模型组比较,均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明二苯乙烯苷能在一定程度上抑制 $A\beta_{25-35}$

对细胞的损伤作用,抑制损伤神经元的凋亡,最终诱导 NSC 增殖、迁移及自我更新,有助于神经再生^[10]。有关其详细的保护作用机制,仍需通过进一步实验加以证实。

因此可以认为, TSG 促进学习和记忆的作用与其清除并抑制老年斑的形成,促进神经细胞的增殖与自我更新相关,具有抗老年斑神经毒性和神经元保护作用,有利于改善 AD 患者的记忆能力和认知功能,达到防治 AD 的目的^[11]。对老年性痴呆等神经退行性病变的防治具有很好的应用价值,可开发研制为治疗老年性痴呆的新药物。

[参考文献]

- [1] 吴颢昕,李辉,岳晓杰,等. 双根清脑颗粒对血管性痴呆模型大鼠神经干细胞增殖迁移的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 110.
- [2] 贾新,陈建宗. 二苯乙烯苷神经保护作用及其机制的研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2007, 29(6): 347.
- [3] Miguel A, López-Toledano M A, Shelanski M L, et al. Neurogenic Effect of β -amyloid peptide in the development of neural stem cells[J]. J Neurosci, 2004, 24(23): 5439.
- [4] 覃仁安,罗佳波,黄竹英,等. 复方丹参片对阿尔茨海默病大鼠学习记忆障碍和脑组织 β -AP 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(6): 377.
- [5] Kumar S, Nigel H G, Debomoy K L. Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease [J]. Neuromolecular Med, 2002, 1(1): 1.
- [6] Gevorkian G, Petrushina I, Manoutcharian K, et al. Mi-motopes of conformational epitopes in fibrillar β -amyloid[J]. J Neuroimmunol, 2004, 156(1/2): 10.
- [7] 陈烈冉,张博爱,高林,等. 大鼠前脑不全缺血再灌注后 β -淀粉样蛋白的表达及意义[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2006, 9(2): 50.
- [8] Morrison S J, Shah M N, Anderson D J, et al. Regulatory mechanisms in stem cell biology [J]. Cell, 1997, 88(3): 287.
- [9] 张琳琳,周震,郭家奎,等. 中药应用于内源性神经干细胞的实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 284.
- [10] 王义周,寇爽,刘妍,等. 中医药促进中枢神经再生的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 197.
- [11] 罗红波,杨金升,石向群. 二苯乙烯苷对 AD 模型鼠老年斑和行为障碍的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(5): 872.

[责任编辑 聂淑琴]