

补阳还五汤通过调节自噬促进 OGD/R 损伤大鼠 NSCs 增殖、分化能力

秦彬喻, 彭冬, 王逸雪, 章时杰, 王奇, 关莉*

(广州中医药大学基础医学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤(BDT)对神经干细胞(NSCs)糖氧剥夺/复氧(OGD/R)损伤后增殖、分化的影响。方法:从SD大鼠海马区域分离培养NSCs,将细胞随机分为5组,分别为常氧组,模型组,BDT组,雷帕霉素(Rapa)组和自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)联合BDT组,常氧组和模型组使用20%空白血清,BDT组使用20%含药血清,Rapa剂量 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,3-MA剂量 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。除常氧组外,其余各组进行糖氧剥夺/复氧。光镜观察细胞形态的变化;免疫荧光检测巢蛋白(nestin)表达,鉴定NSCs;细胞增殖与活性检测法(CCK-8)检测NSCs的存活率;5-乙炔基-2-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)标记法检测NSCs增殖;Ad-mCherry-GFP-LC3B检测自噬活性;蛋白免疫印迹法检测BDT对自噬相关蛋白的影响;免疫荧光法检测脑源性神经营养因子(BDNF), β -微管蛋白III(β -tubulin III)和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)。结果:与常氧组比较,糖氧剥夺/复氧会显著降低大鼠NSCs的细胞活力,与模型组比较,20%BDT含药血清明显改善了大鼠NSCs存活($P<0.01$)。BDT可以诱导OGD后NSCs自噬小体的产生,与常氧组比较,微管相关蛋白轻链3II(LC3II),Beclin-1表达升高($P<0.05$, $P<0.01$),p62变化不明显;与模型组比较,BDT组LC3II,Beclin-1明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),p62表达下调($P<0.01$);Rapa组起到类似效果($P<0.05$, $P<0.01$),3-MA组抑制了自噬的活性($P<0.01$)。Ad-mCherry-GFP-LC3B结果显示,与常氧组比较,模型组荧光强度显著增加($P<0.01$);与模型组比较,20%BDT含药血清和Rapa组显著增加自噬荧光强度($P<0.01$),3-MA抑制了自噬活性($P<0.01$)。免疫荧光结果显示,与常氧组比较,EdU, β -tubulin III,GFAP和BDNF阳性细胞数显著减少($P<0.01$);与模型组比较,20%BDT含药血清和Rapa起到了类似的保护和促进作用($P<0.05$, $P<0.01$);3-MA组可以部分阻断BDT的神经保护和分化能力($P<0.05$)。结论:BDT预保护可以通过上调自噬减少糖氧剥夺造成的大鼠NSCs损伤,促进增殖、分化。

[关键词] 补阳还五汤;糖氧剥夺/复氧(OGD/R);神经干细胞(NSCs);自噬;神经再生

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)11-0009-10

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210330.1323.002.html>

[网络出版日期] 2021-3-31 13:35

Buyang Huanwutang Promoted Proliferation and Differentiation of Neural Stem Cells via Regulating Autophagy Following Oxygen-glucose Deprivation/Reoxygenation Injury

QIN Bin-yu, PENG Dong, WANG Yi-xue, ZHANG Shi-jie, WANG Qi, GUAN Li*

(College of Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Buyang Huanwutang (BHT) on proliferation and differentiation in neural stem cells (NSCs) after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury. **Method:** NSCs isolated from the hippocampus of SD rats were cultured and randomly divided into a normoxia group, a model group, a BHT group, a rapamycin (Rapa) group, and a combination group [autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA) combined with BHT]. The 20% blank serum was used in the normoxia group, and 20% BHT-medicated serum in the BHT group. The doses of Rapa and 3-MA were $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The cells were subjected to OGD/R except those in the normoxia group. The cell

[收稿日期] 20210105(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(8167140990)

[第一作者] 秦彬喻, 硕士, 从事中医药防治心脑血管疾病的研究, E-mail: 20181104430@stu.gzucm.edu.cn

[通信作者] * 关莉, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治心脑血管疾病研究, E-mail: guanli@gzucm.edu.cn

morphology was observed under a light microscope. NSCs were confirmed by immunofluorescence detection of nestin expression. The viability and proliferation of NSCs were assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) labeling, respectively. Furthermore, Ad-mCherry-GFP-LC3B fluorescence assay was performed to investigate autophagy. The effect of BHT on autophagy-related protein expression was detected by western blot assay. Brain derived neurotrophic factor (BDNF), β -tubulin III, and glial fibrillary acidic protein (GFAP) were evaluated by immunofluorescence assay. **Result:** OGD/R significantly reduced the cell viability of rat NSCs as compared with the normoxia group. Compared with the model group, the BHT group exhibited significantly improved viability of rat NSCs ($P<0.01$). BHT induced the production of autophagosomes in NSCs after OGD. The BHT group showed increased expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 II (LC3 II) and Beclin-1 ($P<0.05, P<0.01$) and slightly changed p62 compared with the normoxia group, and significantly up-regulated LC3 II and Beclin-1 ($P<0.05, P<0.01$) and down-regulated expression of p62 ($P<0.01$) compared with the model group. The Rapa group had similar effect as the BHT group ($P<0.05, P<0.01$), while the combination group inhibited the activity of autophagy ($P<0.01$). As indicated by the results of ad-mCherry-GFP-LC3B, compared with the normoxia group, the model group showed increased fluorescence intensity ($P<0.01$), and the BHT and Rapa groups could further increase the fluorescence intensity of autophagy ($P<0.01$), while the combination group inhibited autophagy activity ($P<0.01$). Immunofluorescence results revealed that compared with the normoxia group, the model group displayed significantly reduced positive cells of EdU, β -tubulin III, GFAP, and BDNF ($P<0.01$), and the BHT and Rapa groups exerted similar protective and promoting effects ($P<0.05, P<0.01$), while the combination group partially blocked the neuroprotection and differentiation ability of BHT ($P<0.05$). **Conclusion:** BHT pretreatment can effectively protect rat NSCs against OGD-induced injury and promote proliferation and differentiation by up-regulating autophagy.

[Key words] Buyang Huanwutang; oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R); neural stem cells (NSCs); autophagy; neurogenesis

卒中是世界上成年人致残和致死的主要原因之一,其中缺血性卒中约占到71%^[1]。组织纤溶酶原激活剂(tPA)是目前主要的溶栓手段,但是有严格的限定条件^[2]。致残性是由于缺血区神经功能的损伤导致的,严重影响了患者的生活质量。针对神经功能损伤的有效治疗目前还很匮乏^[3]。自TEMPLE^[4]在小鼠脑室下区发现具备自我更新能力的神经干细胞(NSCs)后,可能表述的不清楚。许多的研究都证明了成年哺乳动物的神经发生^[5-6]。这为恢复神经功能损伤带来了新的治疗曙光^[7]。NSCs可以被包括脑缺血在内的多种刺激激活^[8],但是诱导的新生神经元数目有限,在缺血中存活下来的很少,不足以修复神经功能的丢失^[9]。

自噬是一种吞噬自身的细胞分解代谢途径,通过对长寿蛋白、受损细胞器和错误折叠蛋白的循环利用以维持细胞内稳态和细胞功能^[10]。自噬对维持NSCs的功能、保持静息状态、促进自我更新和介导分化都起着重要作用^[11-12],自噬相关基因的敲除也会导致神经发生的减少^[13]。近期的研究表明,纳

米尺度的电刺激可增强自噬信号,促进NSCs向成熟神经元的分化,防止神经变性^[14],SHI等^[15]证明辐射对NSCs的损伤及更新分化能力的下降和自噬有关。

补阳还五汤(BHT)一直以来被应用于中风急性期及后遗症期^[16-17],由黄芪、赤芍、当归、地龙、川芎、桃仁、红花组成,出自清代医学家王清任的《医林改错》。其配伍特点是以“气虚血瘀”学说为指导原则,大剂量补气药配伍活血行瘀药共奏补气活血通经功效。周赛男等^[18]发现BHT可以促进局灶性脑缺血后神经功能的恢复,海马和皮质细胞形态得到改善。曲铁兵等^[19]发现BHT能通过上调神经营养因子(BDNF)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达促进脑缺血后的神经发生。赵欣等^[20]研究发现BHT可以调节自噬降低脑缺血区域的神经元损伤。刘芳等^[21]发现BHT对氧化应激诱导的PC12细胞损伤有神经保护作用。然而,BHT对糖氧剥夺/复氧(OGD/R)后NSCs是否起保护作用尚不清楚,本研究通过OGD/R模型探讨BHT对OGD/R诱导的神

经损伤的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 NSCs取材动物 孕中期SPF级SD大鼠胚胎和雄性SD大鼠,体质量180~220 g,实验动物由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2018-0034,动物取材符合广州中医药大学实验动物伦理要求。

1.2 药物与试剂 补阳还五汤由黄芪120 g,当归尾6 g,赤芍5 g,桃仁3 g,红花3 g,川芎5 g,地龙3 g组成,购自广州中医药大学第一附属医院,所有药材经广州中医药大学吴文如教授鉴定为正品,符合2020年版《中华人民共和国药典》规范,所有药材加纯水浸泡4 h,水煎1 h后过滤,滤渣重复煎煮1次,合并滤液,浓缩至生药含量为 $0.64\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,冷藏备用。3-甲基腺嘌呤(3-MA),雷帕霉素(Rapa)(美国TargetMol公司广州分公司,批号分别为170324,170125);氯喹(美国Selleck公司广州分公司,批号180641);Earle's平衡盐溶液(广州贝博生物科技有限公司,批号BB18051);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂(上海索莱宝生物科技有限公司,批号20190726);5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(EdU)试剂盒,Ad-mCherry-GFP-LC3B,多聚赖氨酸(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为20200723,20200921,20191026);巢蛋白(nestin), β -肌动蛋白(β -actin),微管相关蛋白轻链3 II(LC3 II),Beclin-1,p62抗体,山羊抗鼠二抗,山羊抗兔二抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为J160822, J160910, J160310, J160503, J180301, J180103, J160926); β -微管蛋白III(β -tubulin III),胶质纤维酸性蛋白(GFAP),BDNF抗体,绿色荧光二抗、红色荧光二抗(美国Abcam公司,批号分别为GR3221401-2, GR3219527-2, GR321753-20, GR3233187-7, GR3234187-5);B27试剂(美国Gibco公司,批号1067889)。

1.3 仪器 WTB150型CO₂培养箱,Forma2型三气培养箱(美国Thermo公司);DMi1型光学显微镜,THUNDER型荧光显微镜,STELLARIS STED型激光共聚焦显微镜(德国Leica公司);PowerPac型电泳仪,Trans-Blot型转膜仪,iMark型多功能酶标仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 NSCs培养与鉴定 参考文献[22]的方法分离胎鼠海马组织NSCs,以 2×10^5 个/mL接种于培养瓶,用含2%B27,终质量浓度 $20\text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 的FGF-basic和

EGF,1%双抗的DMEM/F12(1:1)完全培养基培养,隔天半量换液,3 d后半量换液,第7天收集细胞,使用Accutase消化10 min, $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心3 min(离心半径10 cm),加入完全培养基吹打为单细胞悬液继续培养,后续传代如前。用倒置相差显微镜观察拍照,将第3代NSCs接种于多聚赖氨酸包被的24孔板进行nestin免疫荧光鉴定,用含2%FBS的DMEM/F12分化培养基培养7 d,通过免疫荧光鉴定GFAP, β -tubulin III。

2.2 OGD/R模型建立 参考文献[23],将第3代NSCs细胞接种于多聚赖氨酸包被的96孔板中,调整细胞密度为 6×10^4 个/mL培养48 h,更换培养基为Earle's平衡盐溶液,在94%N₂,5%CO₂,1%O₂,37℃三气箱中培养4 h,更换为完全培养基正常培养24 h,进行后续检测。

2.3 含药血清的制备 取健康雄性SD大鼠20只,随机分为空白血清组和BHT组。空白血清组用生理盐水灌胃7 d,灌胃容积2 mL每只。BHT组给予 $0.64\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的补阳还五汤,灌胃容积2 mL每只(体表面积计算,相当于60 kg成人用量的3倍),每天2次灌胃,第7天双倍剂量给药后2 h,乙醚吸入麻醉后解剖胸腔,用一次性无菌注射器心脏采血,56℃水浴灭活30 min,0.22 μm 滤器过滤除菌,-20℃保存备用。

2.4 BHT含药血清量效关系研究的分组与给药 选择第3代NSCs分为常氧组,模型组,BHT组。将上述已灭活制备的含药血清用0.22 μm 滤器过滤除菌后使用。BHT组给予5%,10%,20%体积分数含药血清,常氧组和模型组给予20%空白血清,细胞接种24 h后加入药物培养24 h,常氧组和模型组更换EBSS缺氧处理4 h,更换正常培养基复氧24 h。

2.5 CCK-8细胞活力检测 将第3代NSCs接种于多聚赖氨酸包被的96孔板,调整细胞密度为 6×10^4 个/mL,各组设置3个复孔,细胞接种24 h后给要药处理24 h,随后将细胞OGD处理4 h,复氧24 h后将10 μL CCK-8溶液加入每孔,37℃5%CO₂条件下孵育4 h,随后用酶标仪检测在450 nm波长下的吸光度A,取3次实验数据平均值计算细胞存活率。

2.6 BHT含药血清对OGD/R后NSCs自噬影响的分组与给药 为进一步研究自噬是否参与BHT的神经发生,将细胞随机分为5组,分别为常氧组,模型组,BHT组,自噬激动剂Rapa组($1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和自噬抑制剂3-MA($5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)+BHT组,常氧组和模型组给予20%空白血清,BHT组给予20%含药血

清。除常氧组外均进行OGD造模,复氧24 h。每组分别进行3次独立实验。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定相关蛋白的表达 在复氧处理24 h后,每组细胞用PBS洗涤2次,用预冷的RIPA裂解液裂解细胞后在 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下离心30 min,取上清进行BCA蛋白定量,加入Loadingbuffer煮沸后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 分装保存。等量的蛋白样品通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,并转移到PVDF膜上。随后在含5%脱脂奶粉的Tris-HCl-Tween(TBST)($10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5)中封闭2 h,然后室温下洗涤数次,用稀释的一抗(1:1 000)在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,然后与结合辣根过氧化物酶(HRP)的二抗(1:1 000)一起室温孵育1.5 h。最后通过化学发光(ECL)试剂在成像仪中检测蛋白条带。

2.8 Ad-mCherry-GFP-LC3B腺病毒标记 将第3代NSCs接种于多聚赖氨酸包被的共聚焦皿中,调整细胞密度为 6×10^4 个/mL,并用Ad-mCherry-GFP-LC3B转染24 h后,然后将细胞正常给药处理24 h后OGD 4 h,复氧24 h,最后用PBS洗涤1次,在激光共聚焦显微镜下成像。

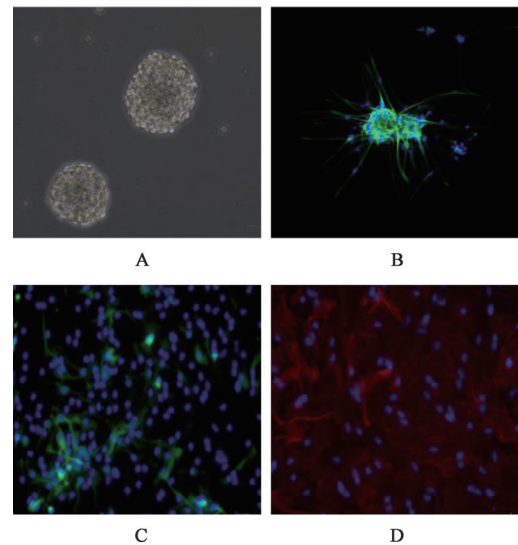
2.9 EdU检测细胞增殖情况 将第3代NSCs接种于多聚赖氨酸包被的24孔板,调整细胞密度为 6×10^4 个/mL,接种24 h后给药处理24 h,OGD 4 h,OGD结束后的细胞与 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EdU孵育复氧24 h,最后用4%多聚甲醛固定15 min,0.5% Triton X-100透化10 min,根据试剂盒染色进行EdU和Hoechst染色,最后将细胞在荧光显微镜下成像。

2.10 免疫荧光检测 nestin, β -tubulin III, GFAP与BDNF分子表达 将第3代NSCs接种于24孔板,NSCs分化能力鉴定调整细胞密度为 3×10^4 个/mL,使用分化培养基培养3 d后给药处理24 h,OGD后继续用分化培养基培养24 h。神经营养因子鉴定调整细胞密度为 6×10^4 个/mL,正常培养24 h后给药处理24 h,OGD后复氧培养24 h。随后用4%多聚甲醛固定30 min,然后在0.1% Triton X-100中透化15 min,含5%牛血清白蛋白(BSA)的封闭液中封闭2 h。随后用一抗(1:300) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,洗涤后室温孵育荧光二抗(1:500)2 h。细胞核用DAPI复染10 min。最后通过荧光显微镜分析细胞样品。

2.11 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行数据分析处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 NSCs的形态学观察及鉴定、分化 接种2 h后,显微镜下可见大量均匀散落的悬浮细胞,培养4 d后,细胞数量增多,形成大小不一的神经球,边缘光滑,折光性好。将培养第3代的神经球用nestin抗体进行免疫荧光染色,均呈现阳性反应,具有干细胞特征性标记。经分化培养基诱导第7天的细胞用神经元标志物 β -tubulin III和胶质细胞标志物GFAP进行细胞免疫荧光染色,反应呈阳性,见图1。



A. 第3代NSCs光镜下成像;B.nestin/DAPI荧光染色;C. β -tubulin III/DAPI荧光染色;D.GFAP/DAPI荧光染色

图1 NSCs的形态观察及鉴定、分化($\times 200$)

Fig. 1 Morphological observation, identification and differentiation of NSCs ($\times 200$)

3.2 BHT含药血清对OGD/R后NSCs细胞活力的影响 与常氧组比较,OGD 4 h显著降低NSCs活性($P<0.01$);与模型组比较,20% BHT显著改善OGD/R导致细胞死亡,促进细胞存活($P<0.01$)。见表1。

表1 BHT对OGD/R损伤的NSCs活力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

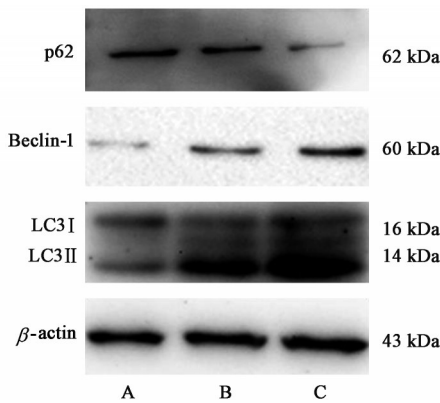
Table 1 Effect of BHT on cell survival in NSCs injured by OGD/R ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	血清体积分数/%	细胞存活率/%
常氧		100
模型		$51.95\pm 1.95^{2)}$
BHT	5	57.04 ± 3.40
	10	$56.11\pm 10.14^{3)}$
	20	$73.65\pm 2.49^{4)}$

注:与常氧组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

3.3 BHT含药血清对OGD/R后NSCs自噬活性的影响 与常氧组比较,糖氧剥夺后,模型组LC3 II, Beclin-1表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),p62差异

无统计学意义;与模型组比较,BHT组 LC3 II, Beclin-1 明显上调($P<0.05$, $P<0.01$), p62 表达显著下调($P<0.01$),见图2,表2。为了进一步探讨自噬是否有参与BHT的神经保护作用,NSCs 分别用20% BHT,自噬激活剂 Rapa,自噬抑制剂 3-MA+BHT 处理,检测自噬相关蛋白的表达,与模型组比较,Rapa组 LC3 II, Beclin-1 显著上调($P<0.01$), p62 表达明显降低($P<0.05$); 3-MA+BHT 组 LC3 II, Beclin-1 显著下调($P<0.01$), p62 表达显著上调($P<0.01$),见图3,表3。同时将细胞转染腺病毒 Ad-mCherry-GFP-LC3B,未发生自噬呈弥散的黄色荧光,自噬发生后自噬体以斑点的形式表现出来,自噬体与溶酶体结合后,绿色荧光在酸性环境下淬灭呈现红色,与模型组比较,BHT 组阳性细胞数显著增加($P<0.01$),Rapa 同样激活了自噬活性,3-MA 组阳性细胞数显著减少($P<0.01$),见图4,表4。



A. 常氧组; B. 模型组; C. BHT组

图2 BHT含药血清对OGD/R后NSCs自噬活性的影响

Fig. 2 Effect of BHT serum on autophagy activity of NSCs after OGD/R

3.4 BHT含药血清对OGD/R后NSCs的增殖的影响 与常氧组比较,模型组细胞EdU染色数量显著

表3 自噬激活剂和抑制剂对OGD/R损伤后NSCs中自噬蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of autophagy activators and inhibitors on autophagy protein expression in NSCs after OGD/R injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

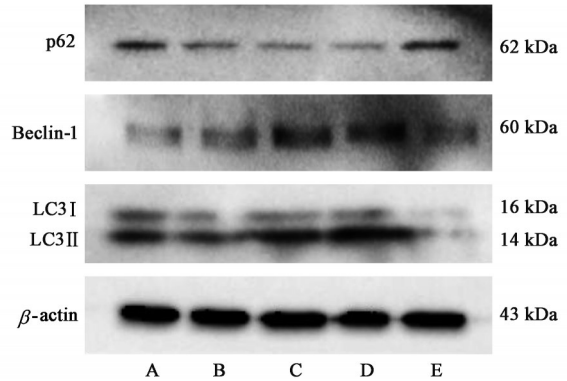
组别	浓度	p62/ β -actin	Beclin-1/ β -actin	LC3 II / β -actin
常氧		0.553 \pm 0.042	0.461 \pm 0.019	0.772 \pm 0.035
模型		0.461 \pm 0.024 ¹⁾	0.745 \pm 0.041 ²⁾	0.794 \pm 0.031
BHT	20% 血清	0.355 \pm 0.320 ³⁾	0.925 \pm 0.029 ⁴⁾	0.926 \pm 0.022 ³⁾
Rapa	1 μ mol \cdot L ⁻¹	0.411 \pm 0.025 ³⁾	1.323 \pm 0.054 ⁴⁾	1.176 \pm 0.047 ⁴⁾
3-MA+BHT	5 mmol \cdot L ⁻¹ +20% 血清	0.661 \pm 0.021 ⁴⁾	0.512 \pm 0.026 ⁴⁾	0.257 \pm 0.013 ⁴⁾

3.6 BHT含药血清对OGD/R后NSCs的BDNF表达影响 与常氧组比较,模型组BDNF阳性细胞数量显著降低($P<0.01$);与模型组比较,BHT组和Rapa组BDNF阳性细胞数量明显增加($P<0.05$),3-

表2 BHT对OGD/R损伤后NSCs中自噬蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of BHT on expression of autophagy protein in NSCs with OGD/R injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	血清体积 分数/%	p62 / β -actin	Beclin-1 / β -actin	LC3 II / β -actin
常氧		0.333 \pm 0.010	0.204 \pm 0.023	0.456 \pm 0.029
模型		0.351 \pm 0.031	0.353 \pm 0.026 ²⁾	0.568 \pm 0.036 ¹⁾
BHT	20	0.225 \pm 0.019 ⁴⁾	0.469 \pm 0.021 ⁴⁾	0.666 \pm 0.031 ³⁾



A. 常氧组; B. 模型组; C. BHT组; D. Rapa组; E. 3-MA+BHT组(图4~8同)

图3 各组NSCs中自噬蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of autophagy protein expression in NSCs of each groups

减少($P<0.01$);与模型组比较,BHT及Rapa组显著升高EdU阳性细胞数量($P<0.01$),3-Ma+BHT组阳性细胞数量减少($P<0.05$),见图5,表5。

3.5 BHT含药血清对OGD/R后NSCs的分化能力影响 与常氧组比较,模型组 β -tubulin III和GFAP阳性细胞数量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,BHT组和Rapa组 β -tubulin III和GFAP阳性细胞数量显著增加($P<0.01$),3-MA+BHT组阳性细胞数量减少,3-MA导致的自噬抑制可能阻止了BHT的保护和促分化作用,见图6,7,表5。

Ma+BHT组BDNF阳性细胞数明显减少($P<0.05$),见图8,表5。

4 讨论

中风后脑血流量的减少和随之而来的缺氧会

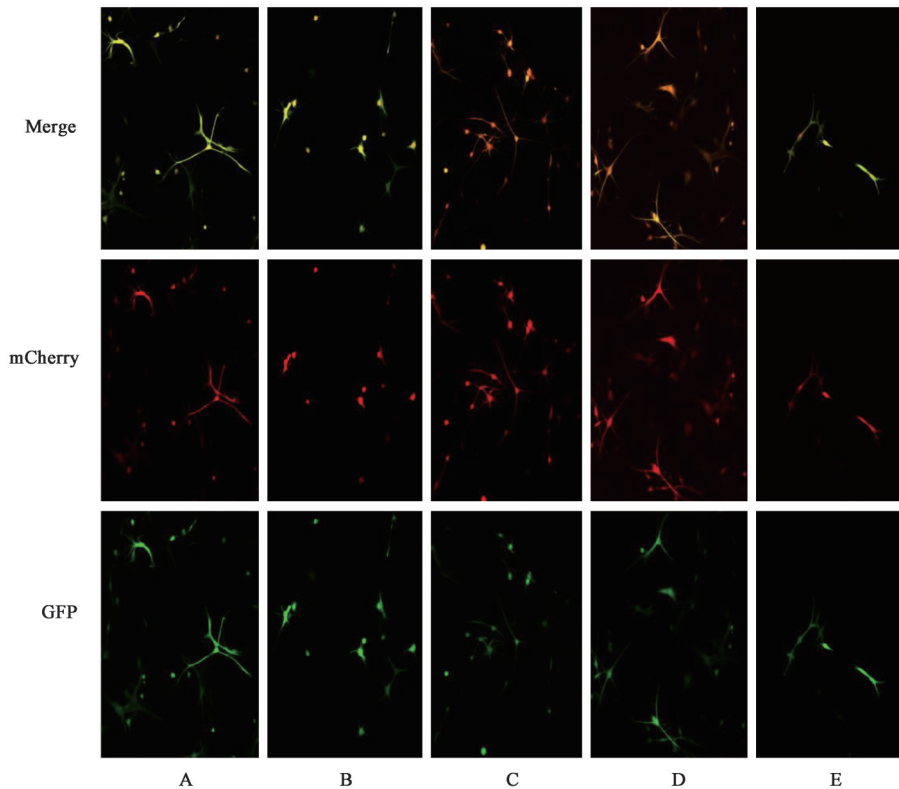


图4 自噬激活剂和抑制剂对 OGD/R 损伤后 NSCs 自噬的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of autophagy activators and inhibitors on autophagy in NSCs after OGD/R injury (IF, ×200)

表4 自噬激活剂和抑制剂对 OGD 损伤后 NSCs 自噬的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of autophagy activators and inhibitors on autophagy in NSCs after OGD injury ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	平均荧光强度
常氧		32.24±1.24
模型		41.79±0.76 ²⁾
BHT	20% 血清	75.58±1.93 ⁴⁾
Rapa	1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	83.46±1.18 ⁴⁾
3-MA+BHT	5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ +20% 血清	20.97±2.57 ⁴⁾

触发复杂的级联反应,从而导致细胞死亡和神经功能缺损。当前的治疗策略主要是神经保护和溶栓疗法,其目的是减少神经元的死亡和保护受损的细胞,但是两种疗法都不能再生新的神经元并修复受损大脑^[24]。脑损伤后神经发生的激活对于脑缺血后的再生医学具有重要意义,越来越多的研究关注于能够刺激不同阶段成人神经发生的药物^[25]。

补阳还五汤是治疗“气虚血瘀”型中风的经典方剂,记载于清代王清任的《医林改错》。既往研究发现补阳还五汤可以通过调控钙信号、兴奋毒性、炎症反应等多种机制,对脑缺血损伤神经元、血管、神经胶质细胞、脑内微环境等多方面产生保护和改善作用^[26-28]。除了上述机制外,补阳还五汤还可以

刺激缺血后海马和脑室下区的神经祖细胞增殖^[29],通过调节轴突生长相关蛋白、改善突触可塑性促进缺血后轴突再生^[30]。另有研究发现补阳还五汤可能直接促进神经祖细胞的分化,与胚胎神经管源 NSCs 移植联合治疗增强了脊髓损伤后 NSCs 的定向分化能力^[31]。

自噬是溶酶体介导的细胞降解机制。Beclin-1 为酵母自噬基因 Atg6 在哺乳动物的同源物,形成的 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶复合物介导自噬体结构的形成^[32]。LC3-PE 复合体的形成与自噬泡的结合被认为是自噬膜延伸并最终封闭形成囊泡的重要步骤,自噬增加了 LC3B I 到 LC3B II 的转化,该转化通过自噬溶酶体而降解^[33]。p62 也称为 SQSTM1 蛋白,可结合 LC3 靶向自噬体并促进泛素化蛋白的清除,p62 通过自噬过程被降解,因此可以作为自噬清除的标志^[34]。相比于正常细胞,NSCs 更需要自噬对于细胞稳态的调节,NSCs 的发育和分化与自噬有着紧密的联系。自噬通过调节活性氧,降低胞内氧化应激水平促进 NSCs 的增殖和分化^[35]。FIP200 的敲除导致 NSCs 逐渐减少,且产后大脑中枢神经元分化受损^[36]。自噬的抑制也可以导致 NSCs 分化为星形胶质细胞的数量变少^[37]。自噬与细胞的程序性死亡之间也有着相互的影响,控制着 NSCs 的

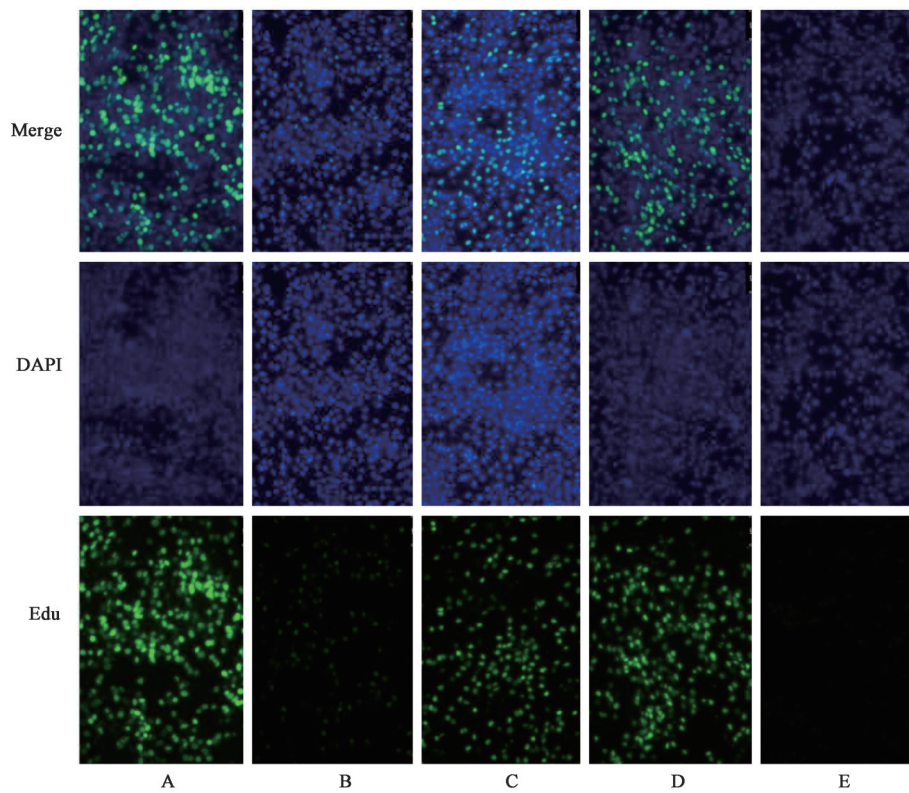


图5 BHT含药血清对OGD/R后NSCs的增殖能力影响(免疫荧光,×100)

Fig. 5 Effect of BHT serum on proliferation of NSCs after OGD/R (IF, ×100)

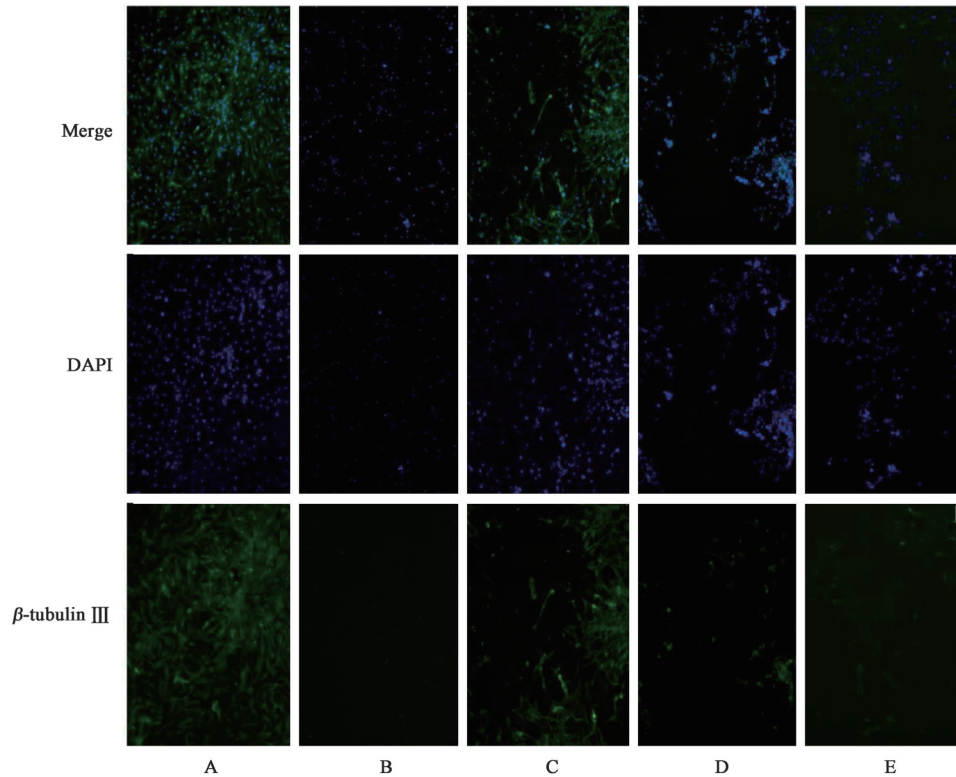


图6 BHT含药血清对OGD/R后 β -tubulin III的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 6 Effect of BHT serum on β -tubulin III after OGD/R (IF, ×100)

存活,从而保证成年神经发生过程的自我更新^[38]。在发育的过程中,需要自噬来调节神经元的充分分

化,而在成人神经发生中,自噬也起到了促生存的作用^[39]。在动物模型中进行的神经发生研究证明

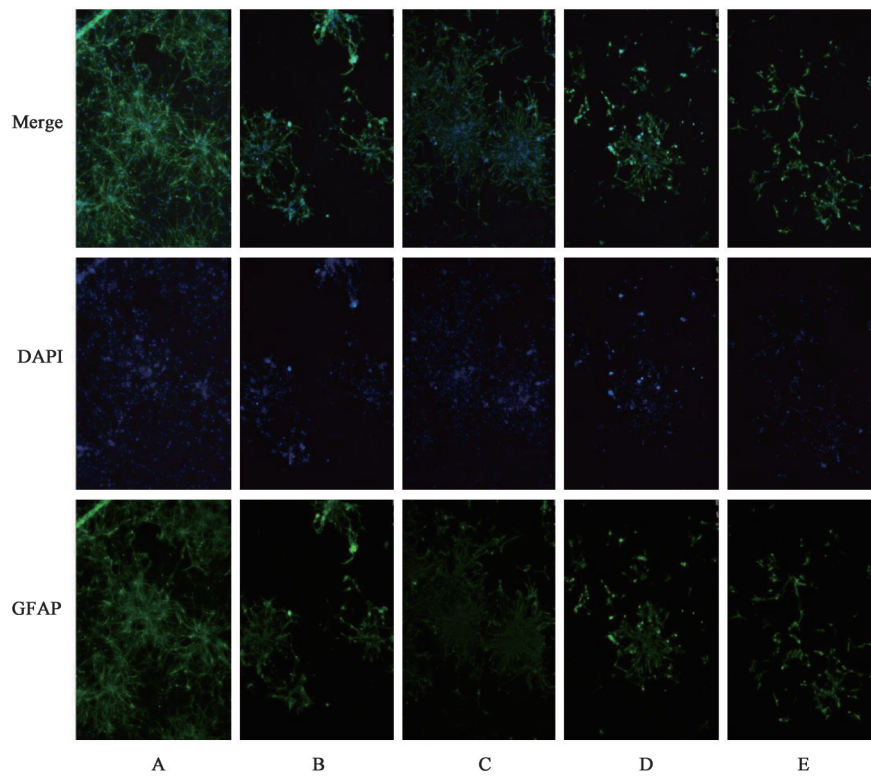


图7 BHT含药血清对OGD/R后NSCs GFAP的影响(免疫荧光,×100)

Fig. 7 Effect of BHT serum on GFAP of NSCs after OGD/R (IF, ×100)

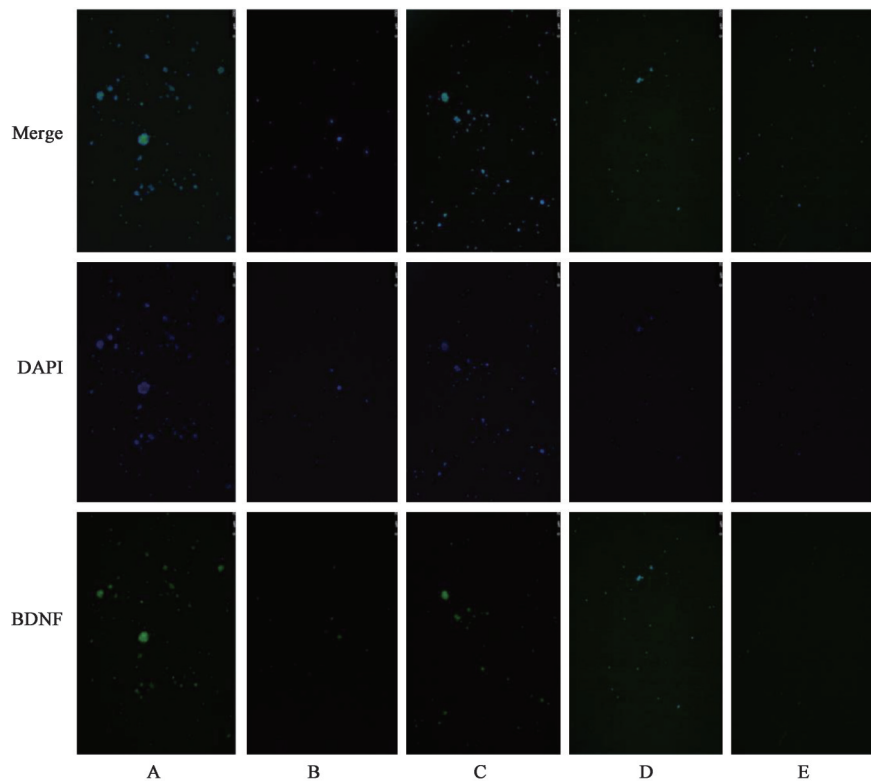


图8 BHT含药血清对OGD/R后NSCs的BDNF表达影响(免疫荧光,×100)

Fig. 8 Effect of BHT serum on BDNF expression in NSCs after OGD/R (IF, ×100)

了自噬有利于移植后的神经元存活和成熟,对于内源性NSCs的积极作用可能成为促神经功能恢复的

新治疗靶点。

在本研究中,证明了补阳还五汤在糖氧剥夺后

表 5 BHT 含药血清对 OGD/R 损伤后 NSCs 增殖,分化, BDNF 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of BHT drug serum on proliferation, differentiation and BDNF of NSCs after OGD/R injury ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度	EdU/%	β -tubulin III 荧光强度	GFAP 荧光强度	BDNF 荧光强度
常氧模型		88.51 \pm 1.84	132.33 \pm 2.03	146.83 \pm 3.41	19.37 \pm 1.65
BHT	20% 血清	67.71 \pm 1.09 ⁴⁾	88.15 \pm 1.14 ⁴⁾	82.35 \pm 1.25 ⁴⁾	13.48 \pm 3.24 ³⁾
Rapa	1 μ mol \cdot L ⁻¹	75.32 \pm 2.88 ⁴⁾	94.24 \pm 0.89 ⁴⁾	88.69 \pm 1.39 ⁴⁾	12.76 \pm 2.49 ³⁾
3-MA+BHT	5 mmol \cdot L ⁻¹ +20% 血清	9.08 \pm 2.03 ³⁾	49.39 \pm 1.78	51.22 \pm 0.94	5.51 \pm 3.68 ³⁾

进一步上调了 NSCs 的自噬活性,并且自噬可能参与了神经发生。一直来自噬被认为是细胞适应机制的一把双刃剑,自噬的利弊取决于自噬诱导的速率和激活的持续时间^[40]。同时,由于模型,局部缺血的强度及缺血时间的不同可能会导致实验结果的差异。多项证据表明自噬在脑缺血的早期具有神经保护作用,但是当缺血时间过长,反而产生了不利影响^[41-43]。补阳还五汤如何调控自噬仍然有待进一步的研究,对于自噬在 NSCs 的作用的理解也需要高度特异性的靶向自噬试剂和更符合疾病的缺血缺氧模型来共同推动。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke [J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 70.

[2] RODRIGO R, FERNANDEZ-GAJARDO R, GUTIERREZ R, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12(5): 698-714.

[3] BARTHEL D, DAS H. Current advances in ischemic stroke research and therapies [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(4): 165260.

[4] TEMPLE S. Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture [J]. Nature, 1989, 340(6223): 471-473.

[5] KUHN H G, PALMER T D, FUCHS E. Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage [J]. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 2001, 251(4): 152-158.

[6] KUHN H G, TODA T, GAGE F H. Gage adult hippocampal neurogenesis: a coming-of-age story [J]. J Neurosci, 2018, 38(49): 10401-10410.

[7] URBÁN N, BLOMFIELD I M, GUILLEMOT F. Quiescence of adult mammalian neural stem cells: a highly regulated rest [J]. Neuron, 2019, 104(5):

834-848.

[8] KOH S H, PARK H H. Park neurogenesis in stroke recovery [J]. Transl Stroke Res, 2017, 8(1): 3-13.

[9] HOU S W, WANG Y Q, XU M, et al. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain [J]. Stroke, 2008, 39(10): 2837-2844.

[10] KLIONSKY D J, ABDELMOHSEN K, ABE A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. Autophagy, 2016, 12(1): 1-222.

[11] GARCIA-PRAT L, SOUSA-VICTOR P, MUNOZ-CANOVES P. Proteostatic and metabolic control of stemness [J]. Cell Stem Cell, 2017, 20(5): 593-608.

[12] VAZQUEZ P, ARROBA A I, CECCONI F, et al. Atg5 and Ambral differentially modulate neurogenesis in neural stem cells [J]. Autophagy, 2012, 8(2): 187-199.

[13] LV X, JIANG H, LI B, et al. The crucial role of Atg5 in cortical neurogenesis during early brain development [J]. Sci Rep, 2014, doi: 10. 1038/srep06010.

[14] HE L, SUN Z, LI J, et al. Electrical stimulation at nanoscale topography boosts neural stem cell neurogenesis through the enhancement of autophagy signaling [J]. Biomaterials, 2021, doi: 10. 1016/j. biomaterials. 2020. 120585.

[15] SHI W, LIU W, MA J, et al. The role of Atg7-mediated autophagy in ionizing radiation-induced neural stem cell damage [J]. Gene, 2020, doi: 10. 1016/j. gene. 2020. 144485.

[16] 明康文,洪佳明. 补阳还五汤对急性脑梗死患者侧支循环的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(1): 1-4.

[17] 隋文乐,李爱萍. 补阳还五汤改善缺血性中风恢复期神经功能缺损临床研究 [J]. 新中医, 2014, 46(7): 40-42.

[18] 周赛男,蔺晓源,易健,等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经功能及细胞形态的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 1(2): 251-254.

[19] 曲铁兵,俞天虹,刘志婷,等. 补阳还五汤及其拆方对

- 大鼠脑缺血后神经发生的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(3): 342-347.
- [20] 赵欣, 姬孟艳, 董强. 补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠神经元自噬的保护作用及机制分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(9): 910-914.
- [21] 刘芳, 朱炎贞, 赵冯岩. 补阳还五汤类方提取物对PC12细胞氧化应激损伤模型凋亡与自噬的调控[J]. 中草药, 2020, 51(20): 5228-5236.
- [22] PACEY L K K, STEAD S, GLEAVE J A, et al. Neural stem cell culture: neurosphere generation, microscopical analysis and cryopreservation [J]. Protocol Exchange, 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.215.
- [23] HUANG Q, ZHANG R, ZOU L, et al. Cell death pathways in astrocytes with a modified model of oxygen-glucose deprivation [J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61345.
- [24] DIRNAGL U, BECKER K, MEISEL A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia: from experimental strategies to clinical use [J]. Lancet Neurol, 2009, 8(4): 398-412.
- [25] FIDALEO M, CAVALLUCCI V, PANI G. Nutrients, neurogenesis and brain ageing: from disease mechanisms to therapeutic opportunities [J]. Biochem Pharmacol, 2017, 141: 63-76.
- [26] 袁磊, 杨进平, 闻瑛, 等. 补阳还五汤治疗缺血性中风恢复期(气虚血瘀)的临床疗效及对Hcy影响的临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(1): 195-197.
- [27] 关莉, 刘微, 闫福曼, 等. 补阳还五汤对全脑缺血再灌大鼠皮层神经元NR1的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(2): 22-25.
- [28] 余颜, 王宇红, 邵乐, 等. 补阳还五汤精简方对大鼠脑缺血后血管新生及Nrf2/HO-1信号途径的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 123-128.
- [29] 马博, 薛冰洁, 陈进成, 等. 基于定量蛋白质组技术探索补阳还五汤治疗脑梗死气虚血瘀证的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(11): 2199-2206.
- [30] 余爱明, 闫向丽, 郑昊圳, 等. 补阳还五汤对大鼠缺血性脑中风损伤后轴突再生的影响[J]. 中国实验方剂学, 2020, 26(21): 15-20.
- [31] ZHANG M, CHAI Y, LIU T, et al. Synergistic effects of Buyang Huanwutang and embryonic neural stem cell transplantation on the recovery of neurological function in a rat model of spinal cord injury [J]. Exp Ther Med, 2015, 9(4): 1141-1148.
- [32] FUJITA N, ITOH T, OMORI H, et al. The Atg16L complex specifies the Site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(5): 2092-2100.
- [33] JIANG P, MIZUSHIMA N. LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells [J]. Methods, 2015, 75: 13-18.
- [34] LI H, ZHANG Y, LIU S, et al. Melatonin enhances proliferation and modulates differentiation of neural stem cells via autophagy in hyperglycemia [J]. Stem Cells, 2019, 37(4): 504-515.
- [35] HAN X, TAI H, WANG X, et al. AMPK activation protects cells from oxidative stress-induced senescence via autophagic flux restoration and intracellular NAD(+) elevation [J]. Aging Cell, 2016, 15(3): 416-427.
- [36] WANG C, LIANG C C, BIAN Z C, et al. FIP200 is required for maintenance and differentiation of postnatal neural stem cells [J]. Nat Neurosci, 2013, 16(5): 532-542.
- [37] HA S, JEONG S H, YI K, et al. Autophagy mediates astrogenesis in adult hippocampal neural stem cells [J]. Exp Neurobiol, 2019, 28(2): 229-246.
- [38] RYU J R, HONG C J, KIM J Y, et al. Control of adult neurogenesis by programmed cell death in the mammalian brain [J]. Mol Brain, 2016, doi: 10.1186/s13041-016-0224-4.
- [39] CASARES-CRESPO L, CALATAYUD-BASELGA I, GARCIA-CORZO L, et al. On the role of basal autophagy in adult neural stem cells and neurogenesis [J]. Front Cell Neurosci, 2018, doi: 10.3389/fncel.2018.00339.
- [40] WEI K, WANG P, MIAO C Y. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2012, 18(11): 879-886.
- [41] XUE Y, LI D M, ZHANG Y G, et al. Angelica polysaccharide moderates hypoxia-evoked apoptosis and autophagy in rat neural stem cells by downregulation of BNIP3 [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2492-2499.
- [42] CHANG Y, KONG R. Ganoderic acid A alleviates hypoxia-induced apoptosis, autophagy, and inflammation in rat neural stem cells through the PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. Phytother Res, 2019, 33(5): 1448-1456.
- [43] WANG M, LIANG X, CHENG M, et al. Homocysteine enhances neural stem cell autophagy *in vivo* and *in vitro* model of ischemic stroke [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 561.

[责任编辑 周冰冰]