

黄芪甲苷和齐墩果酸对体外神经干细胞增殖和 Jagged1 mRNA 表达的影响

刘柏炎^{1,2}, 俞悦¹, 易健¹, 陈雪梅¹, 蔡光先¹ (1.湖南中医药大学, 长沙 410007; 2.益阳医学高等专科学校, 湖南 益阳 413002)

摘要: 目的 观察黄芪甲苷和齐墩果酸对体外神经干细胞增殖和相关基因 Jagged1 表达的影响。方法 采用机械吹打法从胎鼠脑内获得神经干细胞, 随机分组, 分别给予不同浓度(10^{-6} , 5×10^{-7} , 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-8} , 5×10^{-9} , 10^{-9} mol·L⁻¹)的黄芪甲苷、齐墩果酸进行干预, 72 h 后用 WST 法检测细胞的增殖情况, PCR 检测 Jagged1 表达水平。结果 黄芪甲苷对体外神经干细胞增殖影响不显著, 高剂量尚存在细胞毒性。齐墩果酸能促进神经干细胞增殖, 且呈一定的剂量效应关系, 与对照组和黄芪甲苷组比较均有显著差异($P < 0.05$)。细胞未分化状态下 Jagged1 基因存在一定的表达, 增殖率越高 Jagged1 表达水平越高; 与同浓度黄芪甲苷组比较, 齐墩果酸显著上调 Jagged1 表达($P < 0.05$)。结论 不同浓度的黄芪甲苷和齐墩果酸对体外培养神经干细胞增殖和 Jagged1 表达的影响不同; 齐墩果酸作用优于黄芪甲苷。

关键词: 神经干细胞; 增殖; 黄芪甲苷; 齐墩果酸; Jagged1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)09-1033-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.001

Effects of Astragaloside A and Oleanolic Acid on the Proliferation of Neural Stem Cells and the Expression of Jagged1 mRNA *in Vitro*

LIU Baiyan^{1,2}, YU Yue¹, YI Jian¹, CHEN Xuemei¹, CAI Guangxian¹ (1.Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2.Yiyang Medical College, Yiyang 413002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effects of two effective components of traditional Chinese medicine(astragaloside A and oleanolic acid) on the proliferation of neural stem cells and the expression of Jagged1 mRNA *in vitro*. **METHODS** Neural stem cells were obtained from fetal mice's brain by mechanical digestion, and randomly divided, treated with different concentration(10^{-6} , 5×10^{-7} , 10^{-7} , 5×10^{-8} , 10^{-8} , 5×10^{-9} , 10^{-9} mol·L⁻¹) of astragaloside A and oleanolic acid. Cell proliferation was checked by WST assay after 72 h intervention. Expression of Jagged1 mRNA was checked by PCR. **RESULTS** There was no significant effect of astragaloside A on the proliferation of neural stem cells. The high dose of astragaloside A had cytotoxic effect. Oleanolic acid promoted the proliferation of neural stem cells which showed dose-effect relationship, compared with control group and astragaloside A, there was significant difference($P < 0.05$). There was some expression of Jagged1 mRNA in undifferentiation neural stem cells, and its level was up-regulated according to the rate of proliferation. The expression of Jagged1 mRNA was significant different between astragaloside A and oleanolic acid($P < 0.05$). **CONCLUSION** There are different effects on proliferation of neural stem cell and expression of Jagged1 mRNA according to the concentration and the kinds of effective components of traditional Chinese medicine. The effect of oleanolic acid is better than astragaloside A.

KEY WORDS: neural stem cells; proliferation ; astragaloside A; oleanolic acid; Jagged1

随着预期寿命的延长和生活方式的改变, 老年性疾病患病率不断增加, 尤其是以认知功能减退为主的脑部退行性疾病成为影响老年人健康的主要疾病^[1]。阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是老年性痴呆的主要类型, 以记忆减退和认知障碍为临床表现, 已成为家庭和社区的沉重负担^[2]。如何延缓脑衰老、减轻记忆减退和认知障碍是老

年医学研究的热点之一。

神经干细胞作为具有多项分化能力的种子细胞, 被认为是成体脑组织自我修复的重要因素。研究发现自体脑内神经干细胞激活或异体干细胞移植可减轻 AD 症状^[3]。中医学根据脑衰老的临床表现认为本病可归属为“痴呆”、“健忘”等范畴, 常用补益药治疗并取得疗效^[4]。但尚未见不同补益中

基金项目: 国家自然科学基金(30873355、81273989); 国家重点基础研究发展计划(2010CB530402)

作者简介: 刘柏炎, 男, 博士, 教授, 博导

Tel: 13974884196

E-mail: liubaiyan@126.com

药有效成分对体外神经干细胞影响的比较研究。Jagged1 作为 notch 信号通路重要蛋白,在机体发育与神经干细胞调控上起重要的作用^[5]。本实验拟观察 2 种不同功效中药有效成分(黄芪甲苷和齐墩果酸)对体外神经干细胞增殖和 Jagged1 表达的影响。

1 材料与试剂

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6 小鼠,♀♂各半,体质量为(20±2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物公司,生产许可证号:SCXK(湘)2009-0004。

1.2 药物与试剂

DMEM/F12(1:1)培养基(批号: NZJ1218)、非必需氨基酸(批号: 82K2308)、B27(50×,批号: 1567933)均购自 Invitrogen Gibco 公司; EGF(Sigma 公司,批号: 0808179); Accutase(Sigma 公司,批号: A6964); bFGF(Sigma 公司,批号: 121108); WST-1 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(Boster 公司,批号: 07D20B59); nestin 抗小鼠单克隆抗体(Abcam 公司,批号: GR191399-1); SABC 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号: WP140316); AEC 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号: K1369096); 黄芪甲苷(纯度>98%,批号: 10030523)、齐墩果酸(纯度>95%,批号: 11041321)均购自上海同田生物技术有限公司; Trizol (Invitrogen 公司,批号: 80802); TaKaRa RNA PCR 试剂盒(大连宝生物工程有限公司,批号: BK4301)。

1.3 仪器

SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司); MCO-5M 多气体型二氧化碳培养箱(日本三洋电机株式会社); 奥林巴斯 IX71 显微镜(日本奥林巴斯光学工业株式会社); IPP5.1 图像分析系统(日本奥林巴斯光学工业株式会社); GIS-1000 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技公司); GE-100 凝胶电泳仪、TC-48/T/H(a)基因扩增仪均购自杭州大和热磁电子有限公司。

1.4 方法

1.4.1 神经干细胞培养^[6] 取妊娠 14~16 d(阴栓出现日作为妊娠 0 d)的 C57BL/6 小鼠用 75%的酒精浸泡消毒后迅速剪开腹部组织,取出胎鼠用 75%酒精浸泡消毒,无菌操作依次剪开皮肤、颅骨,完整取出脑组织,移至培养皿中,用预冷的 PBS 冲洗 3 次去除血污,转置盛有神经干细胞培养基

的培养皿中,去视束、小脑,剥离脑膜和血管。收集脑组织于离心管中,采用机械吹打法制备成细胞悬液,800 r·min⁻¹离心 5 min,弃上清得到细胞沉淀。加入 NSC 条件培养基[DMEM/F12(1:1)加 2%B27、EGF(20 ng·mL⁻¹)、bFGF(20 ng·mL⁻¹)、非必需氨基酸(10 mL·L⁻¹)]重新悬浮细胞沉淀,调整细胞密度为每毫升 2×10⁵ 个,接种于 6 孔板,置饱和湿度环境的恒温培养箱(37℃,5%CO₂)中。3~5 d 后,半量换液,7~10 d 用 accutase 消化细胞进行传代。

1.4.2 神经干细胞巢蛋白抗原鉴定 传代后,取悬浮生长的克隆球,接种于多聚赖氨酸包被过的盖玻片上,37℃、5%CO₂ 下培养 2 h 后取出盖玻片,采用免疫细胞化学检测细胞球的神经干细胞特异性标志物巢蛋白表达。

1.4.3 分组与药物干预 在第 3 次传代后 3 d 细胞随机分为空白组、黄芪甲苷组和齐墩果酸组,给药组再随机分为 10⁻⁶, 5×10⁻⁷, 10⁻⁷, 5×10⁻⁸, 10⁻⁸, 5×10⁻⁹, 10⁻⁹ mol·L⁻¹ 亚组。每亚组设 3 个重复孔。

1.4.4 细胞增殖能力检测^[7] 收集生长期的神经干细胞,采用 accutase 消化液 37℃消化 3 min,将神经球机械吹打散开,制成单细胞悬液,调节细胞浓度为 1×10⁶·L⁻¹,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL 细胞悬液。加入不同药物后,于饱和湿度环境的恒温培养箱(37℃,5%CO₂)中继续培养 72 h。每孔加入 20 μL WST 溶液,继续培养 4 h。酶联免疫检测仪 492 nm 处测定每孔的吸光度(optical density, OD)。细胞增殖率=(药物组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值×100%。

1.4.5 RT-PCR 检测 取高、中、低浓度(分别为 10⁻⁶, 5×10⁻⁸, 10⁻⁹ mol·L⁻¹)神经球用 Trizol 法提取细胞总 RNA,鉴定纯度与含量,进行逆转录,引物根据 www.ncbi.nlm.nih.gov 基因库基因序列用软件 Prime 5.0 自行设计,由上海捷瑞生物工程公司合成, Jagged1 上游引物: 5'-GCACGCCGAC AAAACACCCGAAC-3', 下游引物: 5'-ATTAGGACCGCTGGCAGATGTGG-3', 产物长度 324 bp; β-actin: 上游引物: 5'-CTTCCTTCTTGGGTAT GG-3', 下游引物: 5'-TCAGTAACAGTCCGCC -3', 产物长度 353 bp。反应体系为 50 μL,反应条件为变性 94℃ 30 s,退火 58℃ 30 s,延伸 72℃ 45 s,共 35 个循环。取 3 μL 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝

胶上电泳, 采用凝胶图像分析仪进行吸光度扫描, 应用 GIS-1000 数码凝胶图像分析系统观察条带的灰度强弱, 表达水平以 Jagged1 与 β -Action PCR 产物的电泳条带 OD 比值表示。

1.4.6 统计学处理 所有测量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计分析, 组间与组内比较采用多因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经干细胞生长情况及其鉴定

细胞培养接种 1 d 后, 镜下可见较多细胞死亡, 表现为透光度较差的小点, 其间可见单个细胞漂浮于培养基中, 部分为数个细胞的聚集, 和周围悬浮细胞碎片相比, 呈透光度较好的亮点。原代培养 2~3 d 后, 悬浮细胞碎片间可见一定数量的细胞聚集, 形态较为规则, 多为类圆形或近圆形, 胞体通透, 呈悬浮生长, 同时培养板底部可见少量细胞贴壁。第 1 次换液后, 悬浮碎片明显减少, 细胞生长迅速, 可见有较多细胞团聚集, 大小不一, 形态各异, 呈球型、长椭圆型或桑葚型悬浮生长。Accutase 消化加机械吹打传代后, 可见克隆球大部分被吹散, 呈悬浮生长, 7 d 后可见不同大小的新克隆球形成, 少量细胞贴壁分化。免疫细胞化学检测表明神经克隆球表现为巢蛋白强阳性, 证实培养获得的克隆球为神经干细胞。结果见图 1。

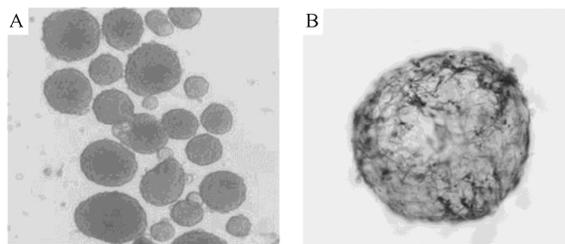


图 1 神经干细胞培养与鉴定
A-神经干细胞球(40 \times); B-巢蛋白(100 \times)。

Fig. 1 Culture and identification of neural stem cells
A-neurosphere(40 \times); B-nestin(100 \times)。

2.2 黄芪甲苷和齐墩果酸对神经干细胞增殖的影响

与黄芪甲苷最低浓度组比较, 黄芪甲苷对神经干细胞增殖无明显影响, 高浓度 (10^{-6} , $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可使培养液中细胞碎片增加, 增殖减慢; 齐墩果酸能显著促进神经干细胞增殖, 且呈一定的剂量-效应关系 ($P < 0.05$)。齐墩果酸与同浓度黄芪甲苷组比较, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。结果见图 2。

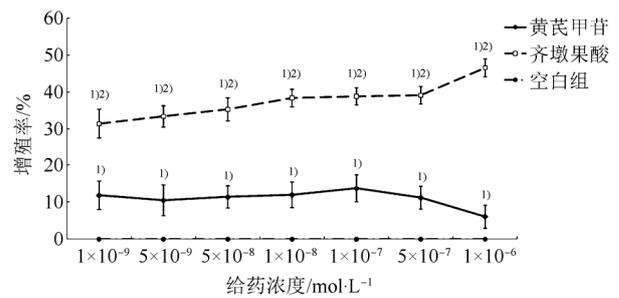


图 2 黄芪甲苷和齐墩果酸对神经干细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

与空白组比较, $^1P < 0.05$; 与同浓度黄芪甲苷组比较, $^2P < 0.05$ 。

Fig. 2 Effects of astragaloside A and oleanolic acid on proliferation of neural stem cells ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Compared with control group, $^1P < 0.05$; compared with the same concentration of astragaloside A group, $^2P < 0.05$ 。

2.3 黄芪甲苷和齐墩果酸对神经干细胞 Jagged1 表达的影响

黄芪甲苷低、中浓度能显著增加 Jagged1 mRNA 表达 ($P < 0.05$), 高浓度对 Jagged1 表达上调现象不明显; 高、中、低浓度齐墩果酸均能显著增强 Jagged1 mRNA 表达, 与细胞增殖趋势相吻合, 与同浓度黄芪甲苷组比较, 差异也均有显著性 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

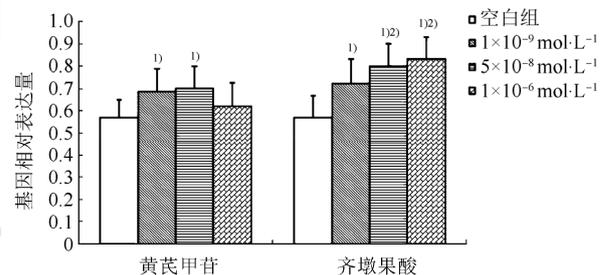


图 3 黄芪甲苷和齐墩果酸对 Jagged1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

与空白组比较, $^1P < 0.05$; 与同浓度黄芪甲苷组比较, $^2P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effects of astragaloside A and oleanolic acid on the expression of Jagged1 mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Compared with control group, $^1P < 0.05$; compared with the same concentration of astragaloside A group, $^2P < 0.05$ 。

3 讨论

干细胞作为一类祖细胞, 能自我增殖和多向分化, 进而维持组织和器官的正常结构和功能。正是由于干细胞这一特性, 可以通过调节生物体内干细胞的增殖与分化, 防治由于细胞缺失或损伤引起的疾病, 为细胞丢失或损伤性疾病的防治提供了崭新的视点和思路^[8], 同时也为药物筛选和机制研究提供了新的平台。

中医药在临床上对中风后神经功能康复有一

定效果,但其作用机制尚不明确。目前,从影响神经干细胞角度探讨其机制成为研究热点之一^[9-10]。女贞子味甘、苦、性凉,归肝、肾经,具有滋补肝肾之功效,齐墩果酸等萜类物质是其主要化学成分^[11]。齐墩果酸能清除氧自由基,降低脑组织过氧化脂质的含量而延缓衰老^[12];还能增加体外培养星形胶质细胞的糖原合成,抑制糖原降解及乳酸生成,改善脑缺血后的能量供应^[13]。黄芪性微温味甘,为扶正固本常用药物,具有益气固表升阳之功效,含有多糖、皂苷、黄酮等多种成分^[14]。黄芪甲苷是皂苷的主要组分,能改善血脑屏障通透性、减轻氧化应激和炎症损伤,有神经保护作用^[15]。因此研究黄芪的有效成分黄芪甲苷、女贞子的有效成分齐墩果酸对体外神经干细胞增殖的影响。研究表明,多个浓度的黄芪甲苷对体外神经干细胞的增殖作用不明显,与柴丽娟等^[16]研究不一致,这可能与两者研究方法不同有关:柴丽娟等通过 BrdU 标记收集细胞进行细胞免疫化学检测,显微镜下计算阳性细胞数,可能存在视野选择、细胞浓度的影响,本实验采用 WST 法选取整孔细胞,且用酶标仪读板,人为因素相对减少。齐墩果酸能促进体外神经干细胞的增殖,且存在量效关系。

神经干细胞增殖受众多信号调控。Jagged1 为单次跨膜糖蛋白,位于哺乳动物细胞膜上,在神经发生、血管生成、造血、肌肉形成等过程中起重要作用。Jagged1 蛋白表达贯穿胚胎发育、神经元分化整个过程,当神经组织出现损伤时,可检测到其高表达^[5]。Jagged1 具有促进神经干细胞自我修复的能力,从而维持大脑内局部干细胞数量的稳定^[17]。目前普遍认为在体外实验中,Jagged1 通过 Notch 通路维持神经干细胞的未分化状态、保持其多向分化潜能。如体外培养神经干细胞时,在培养基中添加 Jagged1,和对照组相比神经元数量明显减少,提示 Jagged1 蛋白抑制干细胞向神经元分化^[18]。本研究发现,细胞增殖越快,Jagged1 表达水平越高;在高中低浓度($10, 5 \times 10^{-8}, 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)齐墩果酸与黄芪甲苷 Jagged1 基因表达水平有显著差异($P < 0.05$)。

综上所述,不同功效中药的有效成分对体外神经干细胞增殖的作用存在差异,齐墩果酸明显优于黄芪甲苷,上调 Jagged1 mRNA 表达的作用亦强于黄芪甲苷。

REFERENCES

- [1] DONG M J, PENG B, LIN X T, et al. The prevalence of dementia in the People's Republic of China: a systematic analysis of 1980-2004 studies [J]. *Age Ageing*, 2007, 36(6): 619-624.
- [2] GIANNAKOPOULOS P, KÖVARI E, GOLD G, et al. Pathological substrates of cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. *Front Neurol Neurosci*, 2009(24): 20-29.
- [3] 张华, 晏勇, 孟涛, 等. 激活内源性神经干细胞治疗阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29(19): 2555-2557.
- [4] MAO L, ZHANG Y L. Treatment of senile dementia by medicinal herbs for tonifying the kidney replenishing essence [J]. *Jilin J Tradit Chin Med*(吉林中医药), 2010, 30(5): 394-396.
- [5] JOHN G R, SHANKAR S L, SHAFIT-ZAGARDO B, et al. Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation [J]. *Nat Med*, 2002, 8(10): 1115-1121.
- [6] KELLY C M, ZIETLOW R, DUNNETT S B, et al. The effects of various concentrations of FGF-2 on the proliferation and neuronal yield of murine embryonic neural precursor cells *in vitro* [J]. *Cell Transplant*, 2003, 12(3): 215-223.
- [7] AWASTHI N, WAGNER B J. Suppression of human lens epithelial cell proliferation by proteasome inhibition, a potential defense against posterior capsular opacification [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47(10): 4482-4489.
- [8] HAN M, ZHANG W S, LI J F, et al. A new insight and strategy of treatment and prevention for neurodegenerated or damaged disease-stem cell drugs [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2008, 24(7): 841-844.
- [9] 刘柏炎, 蔡光先. 试论中医学精气与干细胞生物学的关系 [J]. *湖南中医学院学报*, 2003, 23(6): 29-30.
- [10] 王康锋, 张洪斌, 张立娟. 中医肾精理论与神经干细胞关系探讨 [J]. *新中医*, 2005, 37(12): 76-77.
- [11] TAN W G, LIU W, LU F F, et al. Extracction and content determination of triterpenoids in Fructus Ligustri Lucidi [J]. *Food Sci*(食品科学), 2006, 27(11): 260-262.
- [12] LIU T T, WANG M. Research progress of chemical composition and pharmacological effects of Fructus Figustri Lucidi [J]. *Chin J Exper Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2014, 20(14): 228-234.
- [13] ZHANG X L, WEI S. Effect of oleanolic acid on glycogen metabolism in rat astrocytes [J]. *Chin J Clin Pharmacol*(中国临床药理学杂志), 2013, 29(4): 293-295.
- [14] LIANG J, FENG S L, LIU X H, et al. Research progress of HPLC fingerprint and the main component determination methods of Radix Astragali [J]. *Northwest Pharm J*(西北药学杂志), 2012, 27(5): 490-493.
- [15] 许亮, 陈春富. 黄芪甲苷防治缺血性脑卒中的研究进展 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2011, 13(7): 664-665.
- [16] CHAI L J, ZHONG P R, ZHOU Z H, et al. Proliferation effects of astragaloside on neural stem cells *in vitro* [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2010, 26(5): 670-673.
- [17] NYFELER Y, KIRCH R D, MANTEI N, et al. Jagged1 signals in the postnatal subventricular zone are required for neural stem cell self-renewal [J]. *EMBO J*, 2005, 24(19): 3504-3515.
- [18] FAN Y J, CUI X Y, WU S L, et al. Inhibition effect of Jagged1 protein on differentiation of neural stem cells into neurons [J]. *Chin J Anat*(解剖学杂志), 2005, 28(2): 124-126.

收稿日期: 2014-11-05