

损伤作用，这将会是本课题组的下一个研究重点。

参考文献：

[1] Bartz R R, Suliman H B, Piantadosi C A. Redox mechanisms of cardiomyocyte mitochondrial protection [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 291.

[2] 孔瑞瑞. 应激致心肌细胞凋亡过程中 TR3 移位线粒体的分子调控机制[D]. 北京：中国人民解放军军事医学科学院, 2010.

[3] Cheng Z, Völkers M, Din S, *et al.* Mitochondrial translocation of Nur77 mediates cardiomyocyte apoptosis[J]. *Eur Heart J*, 2011, 32(17): 2179-88.

[4] 艾 华, 刘海英, 王守岩. 《金匱要略》瘀血证研究[J]. 吉林中医药, 2009, 29(5): 454-455.

[5] 陈可冀, 付长庚, 丛伟红, 等. 红花黄色素临床应用中国专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(10): 1167-1173.

[6] Duan J L, Wang J W, Guan Y, *et al.* Safflor yellow A protects neonatal rat cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury *in vitro*[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 487-95.

[7] 刘善新. 羟基红花黄素 A 对缺氧/复氧诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡的影响及机制研究[D]. 杭州：浙江大学, 2011.

[8] Niu G, Lu L, Gan J, *et al.* Dual roles of orphan nuclear receptor TR3/Nur77/NGFI-B in mediating cell survival and apoptosis[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2014, 31(3): 219-58.

[9] Lee S O, Li X, Khan S, *et al.* Targeting NR4A1 (TR3) in cancer cells and tumors[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(2): 195-206.

[10] Wang W J, Wang Y, Chen H Z, *et al.* Orphan nuclear receptor TR3 acts in autophagic cell death via mitochondrial signaling pathway[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(2): 133-40.

[11] 吴振华. 中药红花研究进展的概述[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(34): 33-34.

[12] 刘世军, 唐志书, 崔春利, 等. 中药红花化学成分的研究进展[J]. 河南中医, 2017, 37(1): 168-171.

[13] 沈冰冰, 张 松, 朱启仁, 等. 羟基红花黄色素 A 减轻大鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(4): 480-484.

[14] 周凤华, 潘芸芸, 崔小冰, 等. ERK1/2 与 p38 信号通路介导三七皂苷 R1 抗 H₂O₂ 致心肌细胞损伤作用[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(2): 17-20.

[15] 周艳峰. 芦丁抑制 H₂O₂ 诱导的人晶状体上皮细胞氧化损伤和凋亡及其机制研究[D]. 合肥：安徽医科大学, 2016.

[16] Zhou D, Qu Z, Wang H, *et al.* The effect of hydroxy safflower yellow A on coronary heart disease through Bcl-2/Bax and PPAR- γ [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(1): 520-526.

[17] 王丽娜, 梅 玉, 苗艳芳, 等. 羟基红花黄色素 A 抗心肌缺血-再灌注损伤作用与钙超载相关性研究[J]. 北华大学学报 (自然科学版), 2018, 19(4): 465-468.

[18] Liang B, Song X, Liu G, *et al.* Involvement of TR3/Nur77 translocation to the endoplasmic reticulum in ER stress-induced apoptosis[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(13): 2833-2844.

川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞增殖分化的影响

刘 星¹, 李丽娟², 彭莉萍¹, 魏妮娜¹, 刘银花¹, 许佳伟¹, 黎善铭¹
(1. 遵义医科大学珠海校区, 广东 珠海 519041; 2. 香洲区人民医院 妇产科, 广东 珠海 519040)

摘要：目的 探讨川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞增殖分化的影响。**方法** 体外建立神经干细胞培养体系，川续断皂苷 VI 含药血清（高、中、低浓度）处理神经干细胞 72 h。CCK-8 和 BrdU 法检测 NSCs 增殖；细胞免疫荧光检测 NSCs 分化；DAPI 染色检测 NSCs 的凋亡；RT-PCR 和 Western blot 分别检测 mRNA 和蛋白表达。**结果** 川续断皂苷 VI 含药血清（高、中、低浓度）对 NSCs 增殖无影响（ $P>0.05$ ）。川续断皂苷 VI 含药血清（高、中浓度）促进神经干细胞分化（ $P<0.05$ ），促进 *Notch1*、*Tublin*、*caspase-3* mRNA 表达（ $P<0.05$ ），抑制 *Jagged1*、*Hes1*、*Sox2*、*Pax6* mRNA 表达（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）；高浓度川续断皂苷 VI 含药血清促进神经干细胞凋亡（ $P<0.05$ ），促进 *GFAP* mRNA 表达（ $P<0.05$ ），抑制 *Ngn1* mRNA 表达（ $P<0.01$ ）。中浓度川续断皂苷 VI 含药血清促进 *Tublin* 蛋白及 *Ngn1* mRNA 表达，抑制 *GFAP*、*Jagged1* 蛋白及 *GFAP* mRNA 表达（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），而对 *caspase-3* 蛋白表达无影响。**结论** 中浓度川续断皂苷 VI 含药血清通过抑制 *Jagged1* 的表达，阻断 *Notch* 信号通路，诱导 NSCs 向神经元方向分化。

关键词：川续断皂苷 VI；含药血清；神经干细胞；增殖；分化

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**1001-1528(2020)06-1467-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.013

收稿日期：2019-08-26
基金项目：珠海市重点实验室开放课题（ZYKL-2016K7）；国家级大学生创新创业训练项目（201610661030）
作者简介：刘 星（1983—），女，博士，高级实验师，从事中药药理作用研究。Tel: (0756) 7623361, E-mail: liuxingas@126.com

Effects of asperosaponin VI medicated serum on proliferation and differentiation of neural stem cells

LIU Xing¹, LI Li-juan², PENG Li-ping¹, WEI Ni-na¹, LIU Yin-hua¹, XU Jia-wei¹,
LI Shan-ming¹

(1. Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China; 2. Department of Obstetrics & Gynecology, Xiangzhou District People's Hospital, Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of asperosaponin VI medicated serum on proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs). **METHODS** In established *in vitro* neural stem cell culture system, the NSCs were treated with asperosaponin VI medicated serum (high, or medium, or low concentration) for 72 h. NSCs were subjected to their proliferation detection by CCK-8 and BrdU methods, differentiation assessment by cellular immunofluorescence, their apoptosis identification by DAPI staining, their mRNA and protein expression determination by RT-PCR and Western blot, respectively. **RESULTS** Concentration differences of asperosaponin VI medicated serum had no impact on the proliferation of NSCs ($P>0.05$). But high and medium concentrations of asperosaponin VI medicated serum promoted neural stem cell differentiation ($P<0.05$) and *Notch1*, *Tublin*, *caspase-3* mRNA expression ($P<0.05$) as well, inhibited *Jagged1*, *Hes1*, *Sox2*, *Pax6* mRNA expression ($P<0.05$, $P<0.01$); the high concentration of asperosaponin VI medicated serum promoted neural stem cell apoptosis ($P<0.05$) and *GFAP* mRNA expression ($P<0.05$), and inhibited *Nggn1* mRNA expression ($P<0.01$). The medium concentration of asperosaponin VI medicated serum promoted the expression of *Tublin* protein and *Nggn1* mRNA, inhibited *GFAP* expression, *Jagged1* protein and *GFAP* mRNA ($P<0.05$, $P<0.01$), but had no effect on the expression of *caspase-3* protein. **CONCLUSION** The medium concentration of asperosaponin VI medicated serum inhibits the expression of *Jagged1*, and represses *Notch* signaling pathway to induce the differentiation of NSCs into neurons. **KEY WORDS:** asperosaponin VI; medicated serum; neural stem cells (NSCs); proliferation; differentiation

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，是威胁老年人健康的“四大杀手”之一，并已成为威胁人类健康的最严重疾病之一^[1]。寻找一种有效减缓其发展的治疗方法，延缓脑衰老、减轻记忆减退和认知障碍等是全球亟待解决的问题，也是老年医学研究的热点之一。神经干细胞(neural stem cells, NSCs)为中枢神经系统中的原始细胞，具有自我更新、多向分化、迁移的潜能，可分化为神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞^[2]。神经干细胞移植治疗为神经再生的治疗策略开辟了崭新的研究方向，被誉为目前神经系统损伤最有潜力的治疗方式，并在临床应用中取得了一定疗效^[3]。

川续断皂苷 VI (Asperosaponin VI) 又名木通皂苷 D，是从传统中草药川续断植物的根中提取分离出的三萜皂苷类化合物，为川续断的主要活性成分。川续断皂苷 VI 在神经保护、抗细胞凋亡、心肌

保护、镇痛等方面的发挥作用，引起广大学者的关注^[4]。川续断皂苷 VI 神经保护效应的研究皆与阿尔兹海默病 (Alzheimer' disease, AD) 有关。研究表明，川续断皂苷 VI 可以显著抑制 Aβ 诱导的星形胶质细胞和小胶质细胞的激活，减少胶质细胞释放细胞因子和炎症因子，有效降低 AD 发病^[5]。川续断皂苷 VI 神经保护机制与其抑制神经细胞凋亡、炎症反应的发生以及氧化应激有关^[6]。川续断皂苷 VI 与人参总皂苷具有类似的药理活性，研究显示人参皂苷对 NSCs 增殖和分化具有促进作用^[7]。同时鉴于川续断皂苷 VI 具有神经保护作用，本研究探讨川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞的增殖和分化的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF 级昆明种小鼠，体质量 (20±2) g，由广东省医学实验动物中心提供，动物生产许可证号 SCXK (粤) 2013-0002。动物饲料购自广东省医学实验动物中心，小鼠饲养环境为温度 25~28 ℃，相对湿度 70%~85%，自然通风，光照/黑暗各 12 h。

1.2 药物与试剂 川续断皂苷 VI (批号 111685-201605) 购自广州永凯生物科技有限公司; CCK-8 试剂 (批号 160816) 购自广州速研生物科技有限公司; B27 (批号 1678168)、EGF (批号 1680430)、DMEM/F12 (批号 1672580) 购自美国 Gibco 公司; FITC-羊抗兔 IgG (批号 L147A)、TRITC-羊抗小鼠 IgG (批号 L146A) 购自美国 Gene Copoeia 公司; Nestin 单克隆抗体 (批号 2370145)、Tubulin 单克隆抗体 (批号 2468132) 购自美国 Santa Cruz 公司; GFAP 多克隆抗体 (批号 A0237)、BrdU 单克隆抗体 (批号 A1482)、Actin 多克隆抗体 (批号 A2319)、caspase-3 多克隆抗体 (批号 A19654)、Jagged 1 多克隆抗体 (批号 A12754) 购自美国 ABclonal 公司; TRIzol (批号 1712036)、逆转录试剂盒 (批号 1711282) 购自宝日生物技术有限公司 (北京) 有限公司; SYBR master mix (批号 1801275) 购自诺唯赞生物有限公司。

2 方法

2.1 含药血清制备 称取 100 mg 川续断皂苷 VI 溶于 50 mL 超纯水, 使终质量浓度为 2 mg/mL。给药组小鼠腹腔注射川续断皂苷 VI (10 mL/kg), 空白对照组小鼠则腹腔注射超纯水, 连续给药 7 d, 末次给药 1 h 后摘眼球取血, 4 ℃ 静置 1~2 h, 3 000 r/min离心 15 min, 取上清用 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌, -20 ℃ 保存备用。给药组所得的血清为高浓度含药血清, 分别稀释 1、2 倍为中、低浓度含药血清, 空白对照组取得的血清为空白血清。

2.2 神经干细胞分离与培养 选取 13~15 d 孕龄小鼠 (SPF 级昆明种小鼠), 颈椎脱臼法处死小鼠, 酒精消毒剖开腹腔取出胚胎。在 D-Hank's 溶液中剥离胎盘、胎膜, 并用 D-Hank's 漂洗 4 次。用手术刀切取前脑侧脑室周围组织 (包含脑室下区) 于培养皿内, 加入 2 mL 培养基 (1% 双抗、1% B27、0.02% EGF、DMEM 培养基) 吹打制成细

胞悬液, 400 目筛网过滤, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清加入培养基重悬细胞。接种于培养板内, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 观察细胞生长情况。

2.3 神经干细胞的鉴定、分化、凋亡 取无菌盖玻片, 置于多聚赖氨酸中避光包被 24 h。使用前用灭菌 PBS 漂洗 3 次, 5 min/次, 晾干, 平铺于 6 孔板内。取神经干细胞悬液滴加在盖玻片上静置 2 h, 分别加入含有 10% 含药血清 (高、中、低浓度)、空白血清培养基 1 mL, 置于培养箱中继续培养 72 h。弃除培养基, PBS 漂洗 3 次, 滴加预冷的 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min, PBS 漂洗。0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, PBS 漂洗。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, PBS 漂洗。滴加一抗 (Nestin、BrdU、Tublin 按 1:500 稀释, GFAP 按 1:200 稀释), 4 ℃ 过夜, PBS 漂洗 3 次。滴加 FITC 或 TRITC 标记的二抗 (1:200) 室温孵育 30 min, PBS 洗 3 次。滴加 DAPI 染核 15 min, PBS 漂洗, 荧光显微镜下观察^[8]。

2.4 CCK-8 法检测神经干细胞增殖 取神经干细胞悬液加入 96 孔细胞培养板中, 分别加入含有 10% 含药血清 (高、中、低浓度)、空白血清培养基 200 μL, 培养 72 h。培养结束后每孔加入 10 μL CCK-8 试剂培养 4 h, 取出轻微振荡混匀后, 酶标仪检测 450 nm 处 OD。

2.5 RT-PCR 检测基因表达 加入含有 10% 含药血清 (高、中、低浓度)、空白血清培养基处理神经干细胞 72 h, 收集细胞。参照 TRIzol RNA 试剂盒说明书提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。使用 ABI 7500 荧光实时定量 PCR 仪检测基因的相对表达量。扩增程序为 95 ℃ 预变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火延伸 34 s, 40 个循环。以 Actin 作为内参, 利用 2^{-ΔΔct} 方法分析基因的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tabl.1 Primer sequences		
基因名称	正向(5'—3')	反向(5'—3')
Jagged1	CAGGTCTTACCACCGAACA	CAGGTCTTACCACCGAACA
Notch1	GAGATGCTCCCAGCCAAGT	CGTCCAGCATCTTTACA
Hes1	AGAGGCTGCCAAGGTTTT	ACATGGAGTCCGAAGTGA
GFAP	AAACTGGCTGATGTCTAC	GGTGGTTTCATCTTGGA
Actin	CATCGTGTGGATTCTGG	AGGTAGTCAGTGAGGTCGG
caspase-3	GACTGGAAGCCGAAACT	GCAAGCCATCTCCTCATC
Tublin	TTCATCGGCAACAGCACT	GGACACCAGGTCGTTTCAT
Ngn1	GAGGAGTCGTCGCTCAAA	CCAGATGTAGTTGTAGGC
Sox2	CCAGATGTAGTTGTAGGC	CCAGATGTAGTTGTAGGC
Pax6	CCAGATGTAGTTGTAGGC	CCAGATGTAGTTGTAGGC

2.6 Western blot 检测蛋白表达 加入含有 10% 含药血清（高、中、低浓度）、空白血清培养基处理神经干细胞 72 h，收集细胞。提取总蛋白，用 BCA 法测定样品蛋白浓度，按 50 μg 总蛋白量计算上样体积。100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min，12% SDS-PAGE 电泳 1.5 h，250 mA 转膜 1 h，5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h。加入一抗（Actin、caspase-3、Tublin 按 1：1 000 稀释，Jagged1、GFAP 按 1：500 稀释）4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，TBST 漂洗后室温孵育二抗（1：10 000）1 h。TBST 再次漂洗后，滴加 ECL 超敏发光液至 PVDF 膜上，采用天根成像仪曝光。以 Actin 为内参，计算目的蛋白灰度值，并将空白对照组的蛋白灰度值比定为 1，计算实验组中各蛋白的相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 20.0 统计软件进行处理，数据以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，以 $P\leq 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 神经干细胞鉴定 初期原代神经干细胞呈单个悬浮状，表面圆润光滑，透光性强；培养 24 h 后细胞开始聚集成团；72 h 可见神经球形成，立体感和折光性强，表面光滑、透亮，表明干细胞活力良好。经免疫荧光法鉴定，Nestin 染色阳性细胞呈绿色荧光，DAPI 染色后细胞核呈蓝色荧光。见图 1。经统计神经干细胞比例达 95% 以上，表明该培养体系可用于后续实验研究。

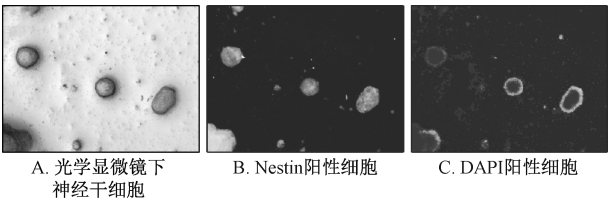


图 1 NSCs 鉴定 (×200)
Fig. 1 NSCs identification (×200)

3.2 川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞增殖影响 不同浓度含药血清 $OD_{450\text{ nm}}$ 与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 2。DAPI 核染细胞呈椭圆形，均匀分布。BrdU 阳性细胞数量较少，占总细胞数比例低。与空白对照组相比，不同浓度含药血清 BrdU 阳性细胞数量百分比差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 3，与 CCK-8 检测结果一致。说明川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞增殖无作用。

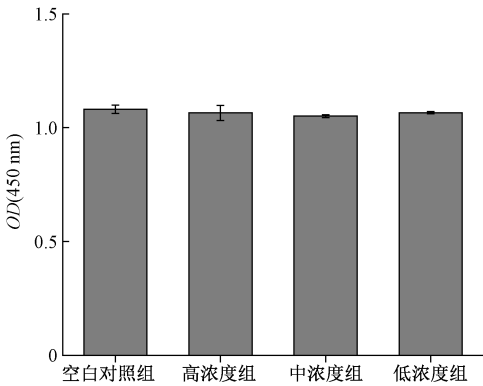


图 2 MTT 检测各组神经干细胞增殖
Fig. 2 NSCs proliferation in each group by MTT

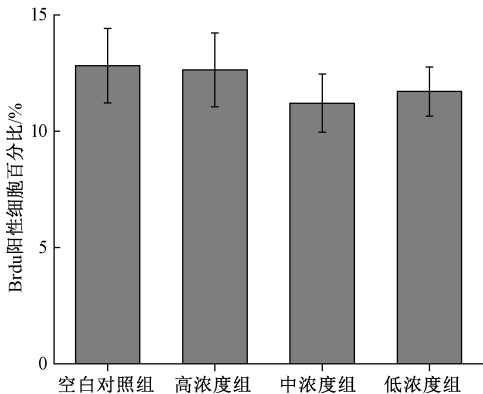


图 3 BrdU 检测各组神经干细胞增殖
Fig. 3 NSCs proliferation in each group by BrdU

3.3 川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞分化的影响 免疫荧光染色结果显示，神经元胞体呈椭圆形或梭形，细胞体积缩小向核靠拢，突起呈双极或多级状，细长的突起交织成网。空白对照组神经元数量较少，趋向于分化为星形胶质细胞。不同浓度川续断皂苷 VI 含药血清均能促进 NSCs 分化，且主要向神经元方向分化。与空白对照组相比，川续断皂苷 VI 含药血清高、中浓度组的神经元分化率更高 ($P<0.05$)，见图 4。

3.4 川续断皂苷 VI 含药血清对神经干细胞凋亡的影响 经 DAPI 染色后，凋亡的神经干细胞体积缩小，与周围的细胞脱离，细胞质密度增加，通透性改变，核质浓缩，胞质明亮。与空白对照组相比，川续断皂苷 VI 含药血清高浓度组细胞凋亡率更高 ($P<0.05$)，而低、中浓度组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 5。说明川续断皂苷 VI 含药血清高浓度可诱导细胞凋亡，低、中浓度含药血清不引起细胞凋亡。

3.5 川续断皂苷 VI 含药血清高、中浓度对神经干细胞相关 mRNA 表达的影响 与空白对照组相比，

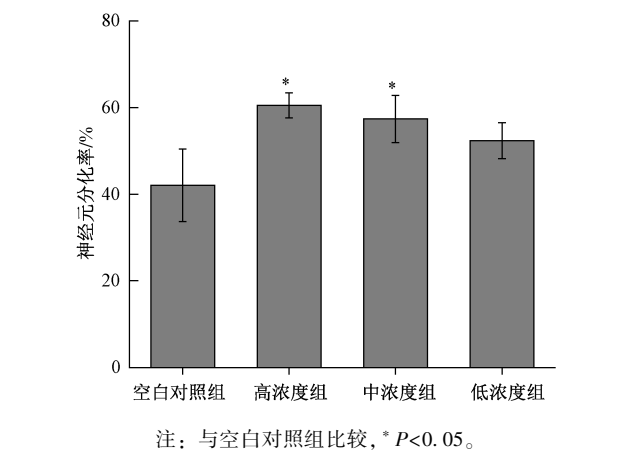


图 4 不同浓度川续断皂苷 VI 含药血清对 NSCs 分化的影响
Fig. 4 Effects of different concentrations of asperosaponin VI medicated serum on NSCs differentiation

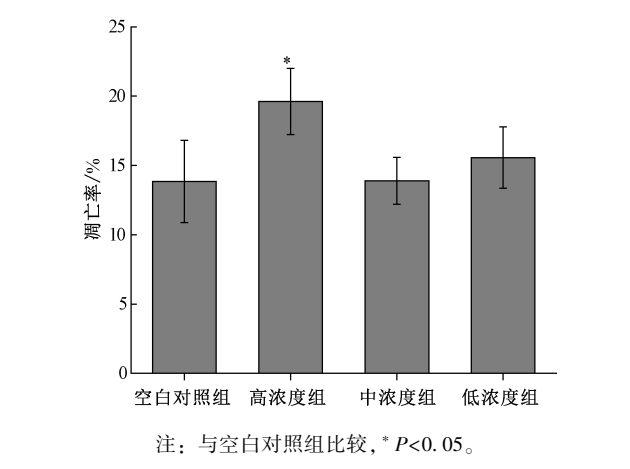


图 5 不同浓度川续断皂苷 VI 含药血清对 NSCs 凋亡率的影响
Fig. 5 Effects of different concentrations of asperosaponin VI medicated serum on NSCs apoptosis rate

高、中浓度组中 *Notch1*、*Tublin*、*caspase-3* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)，*Jagged1*、*Hes1*、*Sox2*、*Pax6* mRNA 表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；高浓度组 *GFAP* mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)，中浓度组 *GFAP* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)；高浓度组 *Ngn1* mRNA 表达降低 ($P < 0.01$)，中浓度组 *Ngn1* mRNA 表达升高 ($P < 0.01$)。见图 6。

3.6 中浓度川续断皂苷 VI 含药血清对 GFAP、Tublin、Jagged1、caspase-3 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示，与空白对照组比较，中浓度组 Tublin 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)，GFAP、Jagged1 蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 7，与基因表达的结果一致。说明川续断皂苷 VI 含药血清中浓度 NSCs 向神经元方向分化较多，而向胶质细胞分化较少，与 Jagged1 的表达水平降低密切相关。

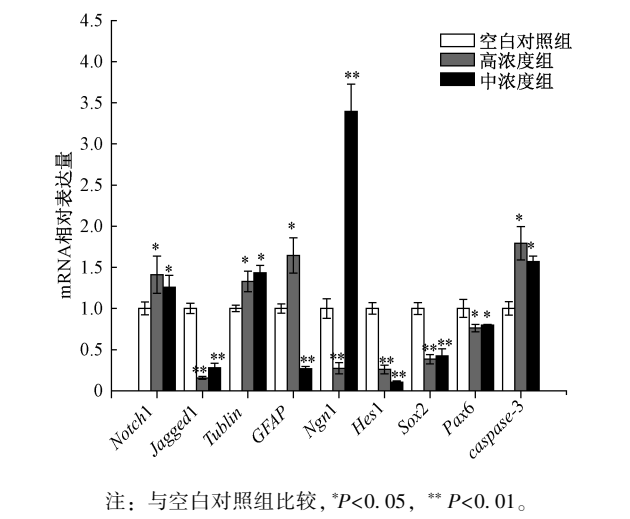


图 6 川续断皂苷 VI 含药血清高、中浓度对神经干细胞相关 mRNA 表达的影响
Fig. 6 Effects of high and medium concentrations of asperosaponin VI medicated serum on expression of NSCs related mRNA

caspase-3 蛋白表达与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，说明川续断皂苷 VI 含药血清中浓度对细胞凋亡无作用。

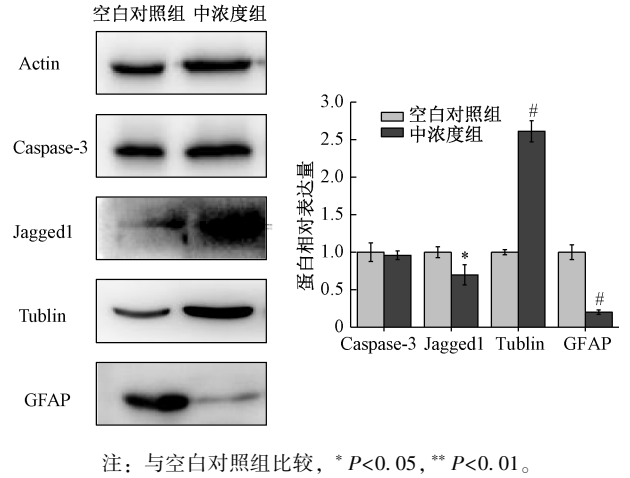


图 7 中浓度川续断皂苷 VI 含药血清对 GFAP、Tublin、Jagged1、caspase-3 蛋白表达的影响
Fig. 7 Effects of medium concentration of asperosaponin VI medicated serum on the relative expression of GFAP, Tublin, Jagged1 and caspase-3

4 讨论

许多研究表明，中药复方或单体对神经干细胞的增殖和分化有重要作用。如黄芪甲苷可通过上调与细胞增殖相关基因 *Hes1*、*Hes5*、*cyclin D1* 的表达促进神经干细胞增殖^[9]。姜黄素在体内外均能促进 NSCs 的增殖，并呈剂量效应关系^[10]。人参皂苷 Rg1 可在体外诱导脂肪干细胞增殖并向神经元分

化^[11]。人参 Rd 能在体内外诱导 NSCs 增殖，但对其分化无明显促进作用^[12]。人参皂苷 Rg1、Rd1 通过介导 PI3K/Akt 信号通路促进体外培养的 NSCs 增殖，对脑缺血再灌注损伤模型的神经干细胞有保护作用^[13-14]。还有研究表明，淫羊藿苷、黄芪多糖、三七总皂苷、银杏内酯 B、银杏提取物、红花、丹参、刺梨和龟板等中药单体成分或中药可明显促进 NSCs 增殖，或还可诱导其向神经元样细胞分化^[15-17]。

鉴于中药在临床应用中大多以复方形式进行配药，其化学成分十分复杂，药理作用具有多个靶点、多层次的特点，且体内干扰因素较多。本文采用川续断皂苷 VI 含药血清可尽可能的模拟体内药物活性成分与细胞间相互作用的微环境，更真实地反映中药药效，实现中药体外实验和体内反应相结合，使实验结果更具有客观性和可靠性^[18]。

众多研究表明，激活 Notch 信号通路会抑制 NSCs 向神经元分化，促进 NSCs 向星型胶质细胞分化，抑制 NSCs 向少突胶质细胞分化。阻断 Notch 信号通路，则促进 NSCs 向神经元分化^[19-20]。Notch 信号通路的 Ngn1 可阻断干细胞 Jak/STAT 信号途径，抑制 NSCs 增殖，并诱导神经元的生成。而 Hes1 可诱导细胞周期蛋白表达，促进干细胞增殖，抑制 NSCs 分化。活化的 Notch 信号通路可以增加 Hes1 和 Hes5 的表达，进而使细胞周期蛋白表达上调，促进干细胞增殖^[21-22]。本文结果显示，高、中浓度含药血清中 Hes1 mRNA 表达降低，可能是由于配体 Jagged1 表达下调，导致 Notch 信号通路被抑制引起的。Hes1 mRNA 表达降低使 NSCs 的增殖受到抑制，因此在高、中浓度组中神经干细胞均未见显著增殖。Ngn1 mRNA 表达在中浓度组表达显著上调，说明中浓度含药血清诱导 Ngn1 mRNA 表达。免疫荧光和免疫印迹检测结果均表明，中浓度组神经元比例较高，且 Tublin 蛋白表达升高。表明中浓度含药血清可能通过抑制 Notch 信号通路，增强 Ngn1 mRNA 表达，进而诱导 NSCs 向神经元分化。

Sox2 在发育早期对于维持 NSCs 的自我更新及多向分化潜能具有关键性的调节作用，可直接作用于 GFAP 基因而抑制其表达，对神经元前体细胞的分化起到至关重要的调节作用。Sox2 可以通过上调 survivin 蛋白表达而抑制 caspase-9 的活性，从而调控 NSCs 的存活，而 PI3K/Akt 通路可调控 Sox2 的表达^[23]。加入高、中浓度含药血清后，Sox2

mRNA 表达显著降低，可能是由于 PI3K/Akt 通路发生改变引起的。在中浓度组中，GFAP mRNA 和蛋白表达均显著降低，可能是由于 Sox2 mRNA 表达下调引起的，与中浓度含药血清不能促进 NSCs 向胶质细胞分化的结果一致。Pax6 参与调控神经干细胞向多巴胺能神经元的分化，可能也参与海马的发育过程中。本文结果显示，高、中浓度组其表达水平显著降低，说明这 2 种浓度的含药血清抑制 Pax6 mRNA 表达。

综上，高、中浓度川续断皂苷 VI 含药血清对 Notch 通路有显著作用，可抑制配体 Jagged1mRNA 表达而阻碍该通路，从而促使 NSCs 向神经元方向分化。但高浓度含药血清细胞毒性作用较大，导致细胞凋亡率升高。而中浓度含药血清既可诱导 NSCs 向神经元分化，又不导致细胞凋亡，可望成为治疗神经退行性疾病备选药物。

参考文献：

[1] Belbin O, Morgan K, Medway C, *et al.* The epistasis project: a multi-cohort study of the effects of BDNF, DBH, and SORT1 epistasis on Alzheimer' s disease risk[J]. *J Alzheimers Dis*, 2019, 68(4): 1535-1547.

[2] 尚 进, 孙逸贤, 曹秀丽, 等. 长链非编码 RNA 对神经干细胞的调控作用及其机制[J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(6): 761-765.

[3] 陈 璐, 第五永长, 温晓强, 等. 补益脾胃元气方药含药脑脊液对大鼠海马神经干细胞活力与迁移的影响[J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5580-5587.

[4] 田 欢, 赵 锋, 李 晔, 等. 川续断皂苷 VI 的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(5): 226-234.

[5] Yu X, Wang L N, Du Q M, *et al.* Akebia saponin D attenuates amyloid β -induced cognitive deficits and inflammatory response in rats: involvement of Akt/NF- κ B pathway[J]. *Behav Brain Res*, 2012, 235(2): 200-209.

[6] Wang Y, Shen J, Yang X, *et al.* Akebia saponin D reverses corticosterone hypersecretion in an Alzheimer' s disease rat model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107(3): 219-225.

[7] 石永江. 人参皂甙 Rg1、Rb1 对神经干细胞增殖的影响及保护作用研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2007.

[8] 朱 琼, 皋月娟, 高顺记, 等. 神经干细胞的培养鉴定及分化[J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(17): 2708-2713.

[9] 柴丽娟, 钟佩茹, 周志焕, 等. 黄芪甲苷对体外神经干细胞增殖作用影响的研究[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(5): 670-673.

[10] Hucklenbroich J, Klein R, Neumaier B, *et al.* Aromatic-turmerone induces neural stem cell proliferation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2014, 5(4): 100.

[11] Xu F T, Li H M, Yin Q S, *et al.* Effect of ginsenoside Rg1 on proliferation and neural phenotype differentiation of human

adipose-derived stem cells *in vitro* [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014, 92(6): 467-475.

[12] Lin T, Liu Y, Shi M, *et al.* Promotive effect of ginsenoside Rd on proliferation of neural stem cells *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 754-761.

[13] 李英博, 赵香琴, 姜英虹, 等. 基因芯片技术筛选人参皂苷 Rg₁ 促进人神经干细胞增殖的分子靶点研究[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(16): 2701-2705.

[14] 郑玉芹, 姜正林, 徐美玉. 人参皂苷 Rb₁ 对体外培养胎鼠神经干细胞增殖及分化的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(3): 273-279.

[15] 汪宏锦, 李晶晶, 柯 慧, 等. 中药对神经干细胞增殖分化信号通路的综合调控作用分析[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4093-4103.

[16] Wang C, Han Z. Ginkgo biloba extract enhances differentiation and performance of neural stem cells in mouse cochlea[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(6): 861-869.

[17] 查 倩, 江 琼, 伍亚民, 等. 黄芪多糖含药血清对神经干细胞增殖和分化的影响[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1721-1723.

[18] 谢兴文, 李应福, 李 宁, 等. 不同浓度麝香含药血清对骨髓间充质干细胞增殖、分化的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(1): 57-61.

[19] Tao J, Chen B, Gao Y, *et al.* Electroacupuncture enhances hippocampal NSCs proliferation in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via activation of notch signaling pathway[J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(3): 204-212.

[20] 王俊杰, 楼 琦, 石巧娟, 等. 中医药调控 Notch 信号通路影响神经干细胞增殖分化研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 408-411.

[21] Saeb S, Azari H, Mostafavi-Pour Z, *et al.* 9-cis-Retinoic acid and 1, 25-dihydroxy vitamin D3 improve the differentiation of neural stem cells into oligodendrocytes through the inhibition of the notch and Wnt signaling pathways[J]. *Iran J Med Sci*, 2018, 43(5): 523-532.

[22] Miller S R, Benito C, Mirsky R, *et al.* Neural crest Notch/Rbpj signaling regulates olfactory gliogenesis and neuronal migration [J]. *Genesis*, 2018, 56(6-7): e23215.

[23] Cui C P, Zhang Y, Wang C, *et al.* Dynamic ubiquitylation of Sox2 regulates proteostasis and governs neural progenitor cell differentiation[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 4648.

醒脑益智汤对 AD 模型小鼠 tau 蛋白及 Aβ 表达的影响

殷 紫¹, 张二飞², 邓祥敏¹, 张建华¹, 季润元¹, 韩永红¹, 齐 越^{3*}

(1. 江苏护理职业学院 检验药学系 江苏 淮安 223001; 2. 江苏食品药品职业技术学院 江苏 淮安 223001; 3. 辽宁中医药大学附属第二医院 辽宁 沈阳 110034)

摘要: **目的** 观察醒脑益智汤对 AD 模型小鼠 tau 蛋白及 Aβ 表达的影响。**方法** 小鼠右侧海马注射 3 μL 老化的 Aβ₂₅₋₃₅ (3 nmol/L) 构建 AD 模型, 将 114 只 ICR 小鼠随机分成假手术组、模型组、醒脑益智汤组 (18 g 生药/kg)、醒脑益智汤组 (9 g 生药/kg)、醒脑益智汤组 (4.5 g 生药/kg)、多奈哌齐组 (1.3 mg/kg)。造模后第 2 天, 小鼠分别灌胃给予不同剂量的醒脑益智汤及盐酸多奈哌齐, 灌胃 28 d。第 23 天进行 Morris 水迷宫训练; 第 28 天, ELISA 及硫黄素 S 染色测定 Aβ 表达; Western blot 测定 tau 蛋白磷酸化位点 (Ser 202, Thr 231)、PI3K/Akt 及 NEP、IDE 蛋白表达。**结果** 醒脑益智汤可降低 AD 模型小鼠的游泳潜伏期, 降低 Aβ 表达, 抑制 tau 蛋白化点 (Ser 202, Thr 231) 发生磷酸化, 增加 p-PI3K、p-Akt、NEP 及 IDE 的表达 ($P<0.05$)。**结论** 醒脑益智汤可能是通过 PI3K/Akt 信号通路, 抑制 tau 蛋白位点的异常磷酸化, 通过增加 NEP、IDE 的表达, 抑制 AD 模型小鼠脑内的 Aβ 表达, 进而改善其学习记忆能力。

关键词: 阿尔茨海默病; 醒脑益智汤; Aβ; tau 蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2020)06-1473-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.014

Effects of Xingnao Yizhi Decoction on expression of tau protein and Aβ in AD mouse models

收稿日期: 2019-10-12

基金项目: 江苏省卫生职业技术教育研究项目 (J201709); 淮安市 2017 年科技局指导项目 (HANZ201714); 江苏省高校青蓝工程项目 [苏教师 (2019) 3 号]; 2018—2019 年度江苏食品药品职业技术学院面上引导基金项目 (JS-FP 2018006-Z)

作者简介: 殷 紫 (1987—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为中药药理学。Tel: (0517) 87088237, E-mail: jshlxx_yz@163.com

* **通信作者:** 齐 越, 博士, 研究员, 研究方向为神经药理学。Tel: (024) 86803170, E-mail: lnzyxyqy2003@163.com