

• 药理与临床 •

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

陈璐¹, 第五永长^{2*}, 温晓强¹, 岳涛¹, 邵怡然¹, 屈夏夏¹, 雷筱菁¹, 缪峰³, 刘亚武⁴, 安泰⁵, 顾杰⁵

1. 陕西中医药大学第一临床医学院 中医系, 陕西 咸阳 712046
2. 陕西中医药大学 学科建设办公室, 陕西 咸阳 712046
3. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712046
4. 东芬兰大学 神经科学系, 芬兰
5. 陕西中医药大学 医学科研实验中心, 陕西 咸阳 712046

摘要: **目的** 研究补益脾胃元气类方药人参、大补元煎、洗心汤对 β 淀粉样蛋白诱导的海马神经干细胞 (neural stem/progenitor cells, NSPCs) 活力与迁移能力的影响, 探讨其对海马神经元修复和再生的作用。 **方法** 从孕 14~16 d Wistar 大鼠胎鼠分离培养 NSPCs 并鉴定, 并随机分为空白组、 $A\beta_{1-42}$ 处理组、正常脑脊液对照组、安理申组及补益脾胃元气方药人参、大补元煎、洗心汤保护组, 共 7 组。以 25 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{1-42}$ 干预 NSPCs, 与抽取的终体积分数为 20% 的不同方药含药脑脊液作用第 3 代神经干细胞 48 h。采用 CCK-8 实验检测各组 NSPCs 的活力, Transwell 实验和划痕实验检测细胞迁移, 流式法检测各组细胞内活性氧 (ROS) 含量。 **结果** 免疫荧光染色鉴定 NSPCs 特异性蛋白 SOX2 染色为阳性; CCK-8 检测结果表明, 补益脾胃元气方药各组海马 NSPCs 活性显著增高 ($P < 0.01$); Transwell 实验和划痕实验检测结果显示, 补益脾胃元气方药各组 NSPCs 迁移能力显著增强 ($P < 0.05$ 、 0.01); 流式法检测 ROS 含量结果表明, 补益脾胃元气方药各组 NSPCs 内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$)。 **结论** 补益脾胃元气方药含药脑脊液对大鼠海马 NSPCs 活力与迁移能力具有促进作用。还可拮抗 $A\beta$ 诱导的氧化应激, 同时其有效成分易于透过血脑屏障, 可能发挥更强的神经保护作用。

关键词: 补益脾胃元气方药; 淀粉样蛋白; 脑脊液; 神经干细胞; 人参; 大补元煎; 洗心汤

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)23-5580-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.23.015

Effects of cerebrospinal fluid containing drugs for tonifying spleen and stomach on activity and migration of rat hippocampal neural stem cells

CHEN Lu¹, DIWU yong-chang², WEN Xiao-qiang¹, YUE Tao¹, SHAO Yi-ran¹, QU Xia-xia¹, LEI Xiao-jing¹, MIAO Feng³, LIU Ya-wu⁴, An Tai⁵, GU Jie⁵

1. Department of Traditional Chinese Medicine, First College of Clinical Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
2. Office of Discipline Construction, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
3. Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China
4. Department of Neuroscience, University of East Finland, Finland
5. Experimental Center of Medical Research, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: Objective To study the effects of prescriptions including Ginseng, Dabuyuan Decoction, and Xixin Decoction for tonifying spleen and stomach on the activity and migration ability of neural stem/progenitor cells (NSPCs) induced by β -amyloid protein (β -amyloid), and investigate the effect of hippocampal neuronal repair and regeneration. **Methods** NSPCs were isolated from fetal rats of 14—16 d gestation and identified. It was randomly divided into seven groups: blank group, blank group treated with $A\beta_{1-42}$, control group of normal cerebrospinal fluid, control group of Aricept, prescription of Tonifying Spleen and Stomach and Yuanqi

收稿日期: 2018-05-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81674042); 陕西省自然科学基金研究计划-重大基础研究项目 (2017ZDJC-15)

作者简介: 陈璐 (1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向为老年病。Tel: 18292921137 E-mail: 779663170@qq.com

*通信作者 第五永长, 硕士生导师, 教授。E-mail: diwuyongchang@126.com

(Ginseng, Dabu Yuan Decoction, and Xixin Decoction) Protection groups. The third generation of neural stem cells were treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ for 48 h. The activity of NSPCs in each group was detected by transwell assay and CCK-8 assay and the migration was detected by scratch test. The content of reactive oxygen species (Ros) in the cells was detected by flow cytometry. **Results** By immunofluorescence staining, NSPCs specific protein Sox2 staining was positive. The CCK-8 detection results showed that the activity of NSPCs in hippocampus was significantly increased in the groups of Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription ($P < 0.01$); The results of Transwell experiment and scratch test showed that the migration ability of NSPCs was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). The flow cytometry showed that the content of ROS in the NSPCs of spleen and stomach prescription groups decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** The prescriptions for invigorating spleen and stomach promoted the activity and migration of NSPCs in rat hippocampal neural stem cells. The oxidative stress induced by $\text{A}\beta$ can be antagonized and its active ingredients can easily penetrate the blood-brain barrier to exert a stronger neuroprotective effect.

Key words: Tonifying Spleen and Stomach Yuanqi Prescription; amyloid protein; cerebrospinal fluid; neural stem cells; Ginseng; Dabu Yuan Decoction; Xixin Decoction

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以进行性记忆力减退和认知功能障碍为主要表现的神经变性疾病^[1]。目前普遍认为 β 淀粉样蛋白 (β -amyloid peptide, $\text{A}\beta$) 沉积以及神经元丢失为其重要病理特征^[2]。由于本病发病机制尚未完全阐明, 因此目前的治疗手段无法从根本上阻止其病理进展。近年来国内外研究^[3-4]认为, 神经修复与再生理论的发展和干细胞体外培养的成功为 AD 的治疗提供了新的途径和方法。中医药在 AD 防治方面积累了丰富的理论及临床经验^[5]。补益脾胃元气类方药治疗 AD 显示出肯定的疗效^[6]。已有研究表明, 中药不仅具有神经保护作用, 还可以诱导内源性神经干/祖细胞 (NSPCs) 的存活与迁移^[7], 促进神经功能的恢复, 防治 AD 的病理进展^[8]。本实验采用脑脊液药理学方法^[9], 研究补益脾胃元气类方药的代表方人参、洗心汤、大补元煎含药脑脊液对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 蛋白所诱导的 NSPCs 活力与迁移的影响, 旨在阐明该类方药在神经保护、促神经修复与再生等方面的可能作用及其机制, 为临床应用该方防治 AD 提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 Wistar 大鼠, 孕 14~16 d, 体质量 220~250 g; 雄性新西兰兔, 体质量 (2.0 \pm 0.3) kg, 均购自西安交通大学第一附属医院实验动物中心; 饲养条件: 12/12 h 明暗交替, 室温 28 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 65%, 噪音 \leq 60 dB。

1.2 药物

安理申 (盐酸多奈哌齐), 5 mg/片, 卫材 (中国) 药业有限公司生产, 批号 H20050978; 实验所用中药均采用国药集团广东一方制药公司生产的中药配方颗粒。人参颗粒剂 (批号 6083203): 组方

规格人参 30 g, 由生药提取加工制成颗粒剂, 按 0.885 g/盒分装; 大补元煎: 人参 (批号 6083203)、熟地 (批号 6080403)、杜仲 (批号 5123633)、当归 (批号 6101533)、酒萸肉 (批号 6050243)、枸杞子 (批号 6081283)、炙甘草 (批号 6095343), 以上 7 味药生药以 10:9:6:9:3:9:6 的比例制成颗粒剂, 按 2.85 g/盒分装; 洗心汤: 人参 (批号 6083203)、茯神 (批号 6100433)、半夏 (批号 6063643)、陈皮 (批号 6070373)、神曲 (批号 6095463)、甘草 (批号 6100043)、附子 (批号 6040853)、菖蒲 (批号 6081443)、生枣仁 (批号 6061733), 以上 9 味药生药以 10:10:5:3:3:1:1:1:10 的比例制成颗粒剂, 按 2.52 g/盒分装。

1.3 主要试剂及仪器

$\text{A}\beta_{1-42}$ 冻干粉 (上海荣创生物技术有限公司, 批号 A9810); 噻唑蓝 (MTT)、CCK-8 检测试剂盒由陕西脉元生物科技有限公司提供; 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); DMEM/F12 培养基 (Hyclone 公司); Anti-SOX2 抗体 (ABCAM 公司, 货号 ab97959); Neurobasal 培养基 (Gibco 公司); B27supplement (Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS, Hyclone 公司); D-hank's (Hyclone 公司); Brain Dissociation Kit, mouse and rat (Miltenyibiotec 公司); 离心机 (德国 Eppendorf 公司); 流式细胞仪 (BD 公司); 恒温培养箱 (中仪国科有限公司); LDZX-50KBS 全自动高压蒸汽灭菌器 (申安医疗器械厂); 光学显微镜、倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 海马 NSPCs 的培养及鉴定

在无菌条件下取孕 14~16 d Wistar 大鼠胎鼠大脑海马组织, 去除多余的血管膜等组织, 在预冷的

D-Hank's 液冲洗。用眼科剪刀将海马组织剪碎至 1 mm^3 的碎块,用 Brain Dissociation Kit 消化液 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 消化 10 min ,弃消化液,含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化,再轻轻吹打 $15\sim 20$ 次,尽量避免气泡产生。获取细胞上清悬液,镜下计数并调整细胞密度,接种于 75 mL 的细胞培养瓶中,进行悬浮培养。置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中,每 3 天进行传代观察,传代至第 3 代时进行 NSPCs 免疫荧光染色鉴定,荧光显微镜拍照。

2.2 含药脑脊液制备

实验动物选用体质量 $(2.0\pm 0.3)\text{ kg}$ 雄性新西兰兔 15 只,随机分为对照组、安理申组、人参组、洗心汤组和大补元煎组,每组 3 只。根据人临床用量的等效剂量和动物体表面积计算^[10],人参组、洗心汤组、大补元煎组、安理申组分别按每只兔 0.295 g 、 0.84 g 、 0.95 g 、 0.25 mg 药量,溶于蒸馏水,每只 ig 给药 $7\sim 8\text{ mL}$ 。对照组 ig 等量蒸馏水,每日 2 次,连续给药 14 d 。末次给药 1 h 后经皮小脑延髓池穿刺法抽取含药脑脊液。选取人参皂苷 Rg_1 作为标志性成分,将含药脑脊液与人参皂苷 Rg_1 对照品溶液预处理后,一同进行 HPLC 检测^[11]。

2.3 MTT 法检测 $\text{A}\beta_{1-42}$ 作用最佳浓度和时间

将 $\text{A}\beta_{1-42}$ 冻干粉溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 溶液中,配制成 $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的母液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 7 d 备用。临用时按实验需要用无血清培养液稀释至所需浓度。实验分为低浓度 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 组);中浓度 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组 ($15\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 组)和高浓度 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 组)处理成熟神经元细胞 24 、 48 、 72 h ,通过 MTT 法检测 450 nm 处吸光度 (A) 值,筛选 $\text{A}\beta_{1-42}$ 最佳浓度和最佳作用时间。结果显示, $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 作用神经元细胞 48 h ,对细胞活力影响最大。因此后续实验均选用 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$ 作为诱导药物浓度,作用细胞时间为 48 h 。

2.4 不同含药脑脊液浓度和作用时间筛选

实验分为对照组(正常培养基)、 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组、空白脑脊液对照组、安理申组、人参组、洗心汤组、大补元煎组。海马神经元按每孔 2×10^4 个,每孔 $200\text{ }\mu\text{L}$ 的密度接种于 96 孔培养板,每组设 4 个复孔。细胞培养 $5\sim 7\text{ d}$,显微镜下观察其生长良好,按上述分组,除对照组及 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组外,其余各组分别加入对应含药脑脊液,终体积分数分别为 5%、10%、20%,分别培养 24 、 48 、 72 h ,采用

MTT 法检测不同时间不同浓度脑脊液处理后的神经细胞活性,进一步筛选不同脑脊液作用最佳时间和最佳浓度。结果显示,在 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 的诱导损伤海马神经元后,各组终体积分数为 20%的不同含药脑脊液培养 48 h ,对细胞活力保护作用最大,因此选择脑脊液体积分数为 20%,作用时间 48 h 。

2.5 细胞分组及处理

①空白组 (Neurobasal 完全培养基),② $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$),③正常脑脊液对照组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ + 20%正常脑脊液),④安理申组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ + 20%安理申含药脑脊液),⑤人参组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ + 20%人参含药脑脊液),⑥洗心汤组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ + 20%洗心汤含药脑脊液),⑦大补元煎组 ($25\text{ }\mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ + 20%大补元煎含药脑脊液)。

2.6 CCK-8 实验检测 NSPCs 活力

经 accutase 消化成单个细胞,按照每孔 5×10^3 个细胞,接种细胞于 96 孔板中,向 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组中加入终浓度为 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 $\text{A}\beta_{1-42}$,空白组不做任何处理,其余 5 组分别加入终体积分数为 20%的对应含药脑脊液,作用 48 h ,在 450 nm 波长处测定吸光度 (A) 值,检测细胞活性。

2.7 Transwell 实验检测 NSPCs 的迁移

取第 3 代细胞活性高的 NSPCs 球,经 accutase 酶消化成单个细胞,将 NSPCs 单细胞悬液接种于孔径为 $8\text{ }\mu\text{m}$ 的 Transwell 板上室,调整细胞密度为 $1\times 10^6/\text{mL}$,取 $100\text{ }\mu\text{L}$ 接种于 Transwell 小室上室,下室分别加入不同含药脑脊液(终体积分数为 20%)的含有 1% BSA 的完全培养基各 $600\text{ }\mu\text{L}$,培养 48 h 后,0.1%结晶紫染色。用棉签擦去膜上未迁移细胞,随机选取 5 个视野进行拍照及迁移细胞计数。

2.8 划痕实验检测 NSPCs 的迁移

提前利用多聚赖氨酸包被 24 孔板过夜。无菌 PBS 清洗 3 次,用直尺在底部每横排孔标记 3 条横线,使其均匀的穿过各孔。取第 3 代细胞活性高的神经干细胞球,经 accutase 酶消化成单个细胞。按照每孔 5×10^4 个细胞接种细胞于 24 孔板中, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养过夜,待细胞完全贴壁后,生长融合为 90%时,用 $10\text{ }\mu\text{L}$ 的灭菌枪头划痕,利用培养基将划掉的细胞冲洗掉,加入新鲜完全培养基。再加入 20%的含药脑脊液作用第 3 代神经干细胞 48 h 。分别在 0 、 12 、 24 、 48 h 时间点拍照,检测损伤距离。

2.9 流式细胞法检测细胞内 ROS

取第 3 代细胞活性高的神经干细胞球, 经 accutase 酶消化成单个细胞, 按照 1×10^6 个/mL 的密度接种在 6 孔培养板中, 每孔 1 mL, 各组细胞培养 3 d, 生长状态良好后加入含不同含药脑脊液的完全培养基, 于 37°C 、5% CO_2 细胞培养箱中培养。培养 48 h 后, 按照 ROS 试剂盒 (E004) 说明书进行检测。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 20.0 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。

3 结果

3.1 NSPCs 的分离培养及鉴定

原代培养 3 d 的 NSPCs 以克隆神经球的方式生长, 5 d 后神经球体积继续增大数量增多, 悬浮生

长, 8~9 d 后神经球直径可增加到几百微米, 神经球体中心细胞呈现黄褐色, 进行细胞传代。免疫荧光结果显示分离培养的细胞中约 90% 表达 NSPCs 特异性蛋白 SOX2 阳性 (图 1), 表明培养至第 3 代的细胞仍为纯度很高的神经干细胞。

3.2 标志性成分检测结果

人参皂苷 Rg_1 对照品在进样 3 min 左右出现 1 个明显色谱峰 (图 2), 人参组、大补元煎组、洗心汤组含药脑脊液在进样 3 min 左右也同样出现 1 个明显色谱峰 (图 2), 结果表明人参组、大补元煎组、洗心汤组含药脑脊液中均能检测出人参皂苷 Rg_1 。

3.3 NSPCs 活力检测结果

CCK-8 法检测各组大鼠海马 NSPCs 活性, 结果见图 3, 与空白组比较, $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理组大鼠海马 NSPCs 活性显著降低 ($P < 0.01$); 与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 处理

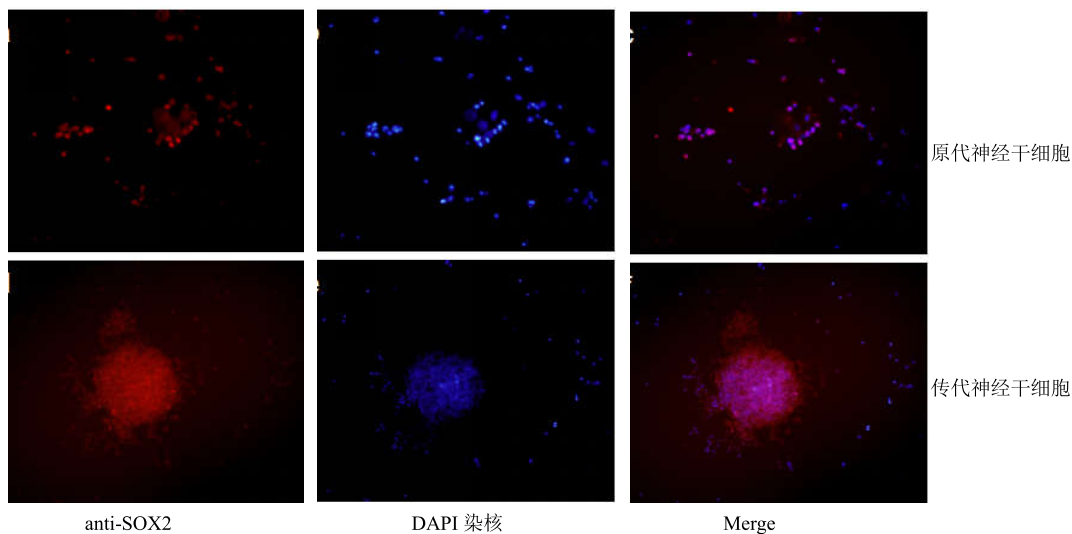


图 1 原代海马神经干细胞和传代至第 3 代的克隆神经球特异性蛋白 SOX2 免疫荧光染色鉴定结果 ($\times 200$)

Fig. 1 Results of identification of original hippocampal neural stem cells and third generation of clonal neuro modulation-specific protein SOX2 immunofluorescence staining ($\times 200$)

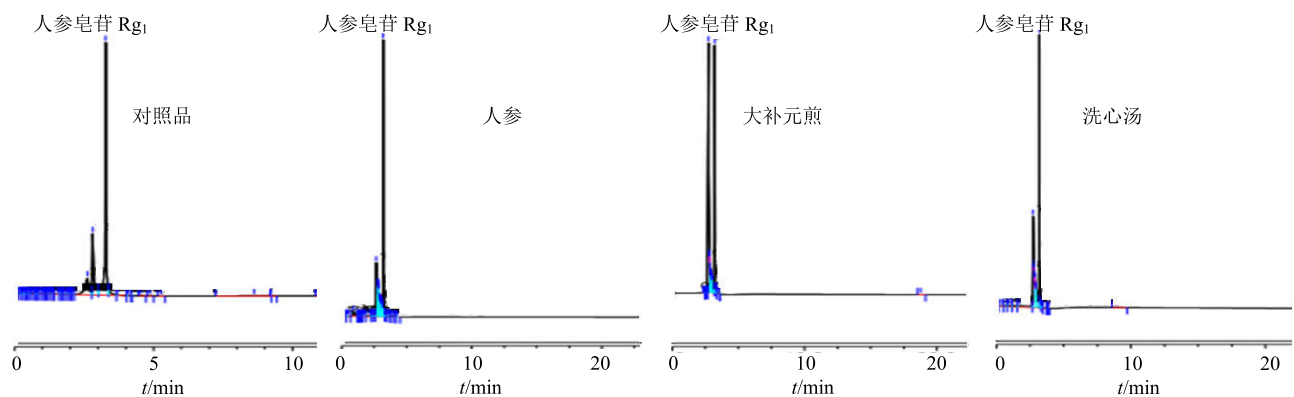
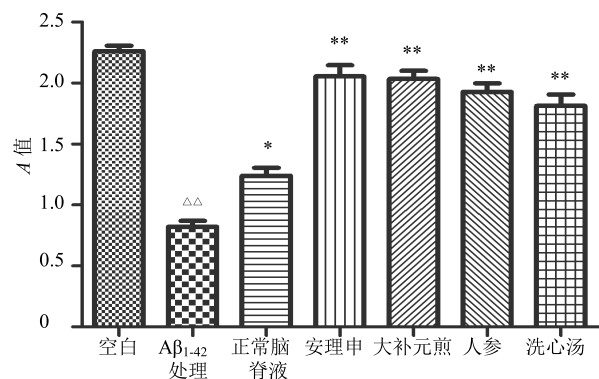


图 2 标志性成分检测结果

Fig. 2 Test results of signature components



与空白组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 Aβ₁₋₄₂ 处理组比较: * $P < 0.05$

** $P < 0.01$, 下同

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs blank group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs Aβ₁₋₄₂ group, same as below

图 3 CCK-8 检测不同脑脊液对海马 NSPCs 活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 CCK-8 detects activity of different cerebrospinal fluid on hippocampus NSPCs ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组比较, 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组及安理申组海马 NSPCs 活性显著增高 ($P < 0.01$), 正常脑脊液对照组海马 NSPCs 活性增高 ($P < 0.05$); 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3.4 NSPCs 迁移检测结果

3.4.1 Transwell 检测 结果显示 (图 4、5), 与空白组比较, Aβ₁₋₄₂ 处理组的神经干细胞迁移数量显著降低 ($P < 0.01$); 与 Aβ₁₋₄₂ 处理组比较, 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组、安理申组神经干细胞迁移数量均升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3.4.2 划痕实验检测 结果显示 (表 1), 划痕后 12、24、48 h 时 NSPCs 可以自发迁移一定距离。与空白组比较, Aβ₁₋₄₂ 处理组的 NSPCs 迁移距离显著

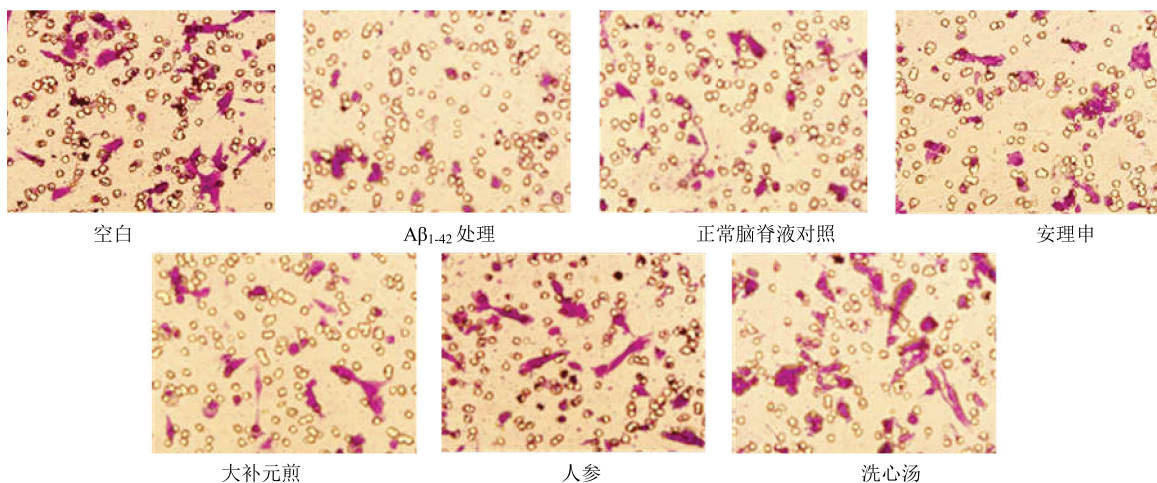


图 4 Transwell 检测 NSPCs 的迁移 (结晶紫染色, $\times 200$)

Fig. 4 Migration of neural stem cells in the hippocampus detecting by Transwell assay (Crystal violet dyeing, $\times 200$)

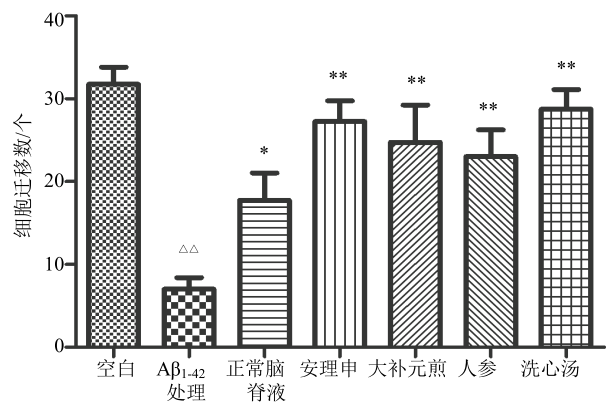


图 5 Transwell 检测 NSPCs 的迁移数量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Migration of neural stem cells in hippocampus detecting by Transwell assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

减少 ($P < 0.01$); 与 Aβ₁₋₄₂ 处理组比较, 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组、安理申组, NSPCs 迁移距离均增加 ($P < 0.01$); 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3.5 细胞内 ROS 检测结果

流式细胞法检测各组大鼠海马 NSPCs 内 ROS 水平, 结果见图 6, 与空白组比较, Aβ₁₋₄₂ 处理组大鼠海马 NSPCs 内 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 Aβ₁₋₄₂ 处理组比较, 补益脾胃元气方药 (人参、大补元煎、洗心汤) 各组及安理申组海马 NSPCs 内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$); 补益脾胃元气方药中人参、大补元煎组海马 NSPCs 内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.01$)。

表 1 划痕实验检测不同含药脑脊液组海马 NSPCs 迁移情况 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Hippocampal NSPCs migration in cerebrospinal fluid (CSF) groups with different drugs detected by scratch test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	迁移距离/ μm		
	12 h	24 h	48 h
空白	31.76 ± 0.51	40.54 ± 1.35	65.76 ± 0.67
A β_{1-42}	4.66 ± 1.34 ^{△△}	15.53 ± 0.82 ^{△△}	4.57 ± 0.33 ^{△△}
正常脑脊液对照	1.81 ± 0.95	19.83 ± 1.16*	49.65 ± 0.39**
安理申	19.62 ± 1.31**	35.92 ± 0.75**	47.22 ± 1.21**
大补元煎	10.72 ± 1.51**	33.65 ± 0.66**	57.74 ± 0.94**
人参	31.00 ± 0.32**	36.99 ± 0.58**	63.67 ± 0.67**
洗心汤	25.64 ± 0.81**	31.48 ± 1.04**	54.75 ± 0.19**

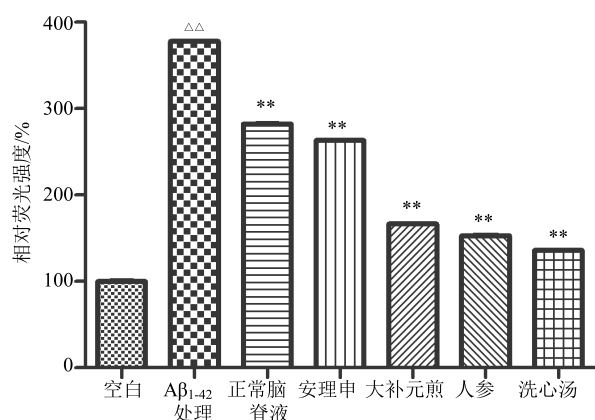


图 6 细胞内 ROS 检测 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Intracellular ROS detection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

AD 属于老年神经退行性疾病，严重威胁老年人的生命健康。目前认为 A β 沉积形成的细胞外老年斑是 AD 最典型的病理改变之一，最终导致神经元变性、死亡、突触丢失^[12]。脑内的神经元主要源于 NSPCs 的分化，NSPCs 可分化为星形胶质细胞、神经元及少突胶质细胞^[13]。新生的神经元细胞形态和特性类似于成熟的神经元，可迁移到脑损伤部位，能与周围神经元建立突触联系，使损伤神经元的功能得以补偿^[14]。AD 早期以海马病变所致记忆缺损为主，海马齿状回颗粒细胞下区的 NSPCs 数量和功能均降低^[15]，导致海马神经再生障碍，无法代偿丢失的神经元，因此部分学者认为神经退行性病变的本质是神经元修复与再生的失败^[16]。已有研究表明，A β 能使体外培养的 NSPCs 活力、迁移等功能受到抑制^[17]。因此 NSPCs 修复再生与 AD 的病理过程密切相关。NSPCs 的标记物转录因子 SOX2 在胚胎到成年整个发育阶段均有表达，实验培养的

NSPCs 呈 SOX2 阳性，表明海马 NSPCs 体外培养成功^[18]。ROS 是一种能调控多种 NSPCs 的功能信号分子^[19]。有研究表明，异常沉积的 A β 可以诱导氧化应激^[20]。ROS 在生理水平下，可以调控 NSPCs 的活力和迁移等一系列的细胞功能^[21]。然而由于 A β 的神经毒性主要聚集于此，在病理情况下，其水平的异常增加能抑制 NSPCs 自我更新能力和神经修复再生^[22]。

AD 属中医“痴呆”的范畴。早在《内经》中就载有：“水谷皆入于胃，五脏六腑皆禀气于胃”“上气不足，脑为之不满”。再者，《医林改错》谓：“灵机记性在脑者，因饮食而生气血……化而为髓，由脊骨上行入脑，名曰脑髓。”因此，痴呆的根本病机在于脑髓空虚。脾胃元气充足，才能化生气血，进而生精养髓，充养脑窍。补益脾胃元气是治疗痴呆的重要治法^[23-24]。补益脾胃元气方药对改善中枢神经系统的不良微环境、诱导干细胞增殖、分化、迁移，促进神经再生功能修复的研究也取得了重要进展^[25-26]。现代研究表明，洗心汤可抑制痴呆模型大鼠脑内 Tau 蛋白毒性作用^[27]；人参的主要成分人参皂苷 Rg₁ 能促进 NSPCs 分化增殖^[28]；D-半乳糖诱导的 MRC-5 模型中，大补元煎和人参含药血清能促进衰老细胞增殖，抑制凋亡^[29]。

本实验在中医“气化精”“精生髓”理论指导下，对照研究补益脾胃元气类方药（人参、大补元煎、洗心汤）对神经元存活和修复再生的影响，以期揭示其防治 AD 的可能机制。实验在体外以 A β_{1-42} 诱导，模拟 AD 神经元的病理变化，采用脑脊液药理学方法观察神经元的形态学、活力、迁移能力等变化。实验以 CCK-8 检测法、Transwell 检测法、划痕实验检测法检测 NSPCs 活力和迁移的研究结

果表明, $A\beta_{1-42}$ 处理组 NSPCs 活力和迁移能力较空白组显著降低, 说明 $A\beta$ 的神经毒性作用能抑制 NSPCs 活力和迁移。与 $A\beta_{1-42}$ 处理组比较, 补益脾胃元气类方药各组 NSPCs 活力和迁移能力增强, 补益脾胃元气类方药各组间无显著差异, 提示补益脾胃元气方药各组均能够促进 NSPCs 的活力和迁移。同时, 本研究以流式法检测 ROS 含量显示, $A\beta_{1-42}$ 处理组较空白组升高, 说明 $A\beta$ 诱导的氧化应激可以生成 ROS。与 $A\beta_{1-42}$ 处理组比较, 补益脾胃元气方药各组 ROS 含量均降低, 说明补益脾胃元气方药各组可拮抗 $A\beta$ 诱导的氧化应激, 发挥抗氧化作用。本实验涉及的 3 种补益脾胃元气方药, 其中均含有人参。洗心汤在补益脾胃元气基础上兼有开郁化痰之效; 大补元煎兼有滋补肾阴之效; 独参汤兼有安神益智之效。所选 3 方均有补益脾胃元气的共性功效, 并各有偏重。实验中通过 HPLC 检测显示各组含药脑脊液中均含有人参皂苷 Rg_1 , 说明补益脾胃元气方药改善 NSPCs 活力及迁移能力的作用可能与人参皂苷 Rg_1 有关。

本研究结果初步表明 3 种补益脾胃元气类方药不仅具有促进 NSPCs 活力、迁移和自我更新能力的作用, 还可拮抗 $A\beta$ 诱导的氧化应激, 保护神经元损伤修复。本实验为补益脾胃元气类方药的临床应用提供了实验依据, 关于其确切机制值得进一步研究。

参考文献

- [1] Wang J M, Sun C Y. Calcium and neurogenesis in Alzheimer, s disease [J]. *Front Neurosci*, 2010, 10.3389/fnins.2010.00194.
- [2] 何 娜. $A\beta$ 引起神经干细胞衰老及降低烟碱类似物 ZY-1 治疗的反应性 [D]. 上海: 上海交通大学, 2014.
- [3] 秦 峥, 王晓锋, 叶 华, 等. 羟基红花黄色素 A 对 SD 乳鼠器官型海马脑片细胞再生的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(8): 1856-1858.
- [4] 张 喻, 肇玉明, 王晓良, 等. 干细胞治疗阿尔茨海默病的研究进展及挑战 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(7): 889-894.
- [5] 王清峰, 张 丹, 李 柱. 健脾化痰法治疗老年性痴呆痰浊阻窍证的疗效及机制研究 [J]. *中医临床研究*, 2013, 5(2): 12-13.
- [6] 翟家明, 第五永长. 洗心汤治疗髓空痰浊型痴呆刍议 [J]. *四川中医*, 2017, 35(8): 20-22.
- [7] 张玉莲, 张琳琳, 宋宛珊, 等. 三种补肾中药有效成分对 AD 小鼠胚胎神经干细胞自我更新及神经元样分化作用研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(10): 1245-1249.
- [8] 冯靖涵, 蔡宝昌, 过伟峰, 等. 中医药治疗阿尔茨海默病的实验研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2012, 28(4): 394-396.
- [9] 章亚兵, 汪 宁. 中药脑脊液药理学研究及应用进展 [J]. *安徽医药*, 2015, 19(4): 613-616.
- [10] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [11] 郭 冲, 郜玉钢, 臧 埔, 等. HPLC 法同时测定人参及其制剂中 16 种人参皂苷 [J]. *中草药*, 2014, 45(14): 2009-2013.
- [12] Bateman R J, Xiong C, Benzinger T L S, *et al*. Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease [J]. *New Engl J Med*, 2012, 367(9): 795-804.
- [13] Kim S U, Lee H J, Kim Y B. Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases [J]. *Neuropathology*, 2013, 33(5): 491-504.
- [14] Sun G J, Zhou Y, Stadel R P, *et al*. Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain [J]. *Proceed Nat Acad Sci USA*, 2015, 112(30): 9484-9489.
- [15] Benarroch E E. Adult neurogenesis in the dentate gyrus: General concepts and potential implications [J]. *Neurology*, 2013, 81(16): 1443-1452.
- [16] Gendreau K L, Hall G F. Tangles, toxicity, and tau secretion in AD new approaches to a vexing problems [J]. *Front Neurol*, 2013, doi: 10.3389/fneur.2013.00160.
- [17] Haas C. Strategies, development, and pitfalls of therapeutic options for Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Disease Jad*, 2012, 28(2): 241-281.
- [18] 郝国礼, 王淑梅, 刘雅贤, 等. 多能性转录因子 OCT4 和 SOX2 在体外发育的小鼠 2-细胞胚胎的表达与定位 [J]. *动物学杂志*, 2015, 50(2): 176-184.
- [19] Butterfield D A, Reed T, Newman S F, *et al*. Roles of amyloid beta-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43(5): 658-677.
- [20] Querfurth H W, Laferla F M. Alzheimer's disease [J]. *New Engl J Med*, 2010, 362(4): 329-344.
- [21] Kennedy K A, Sandiford S D, Skerjanc I S, *et al*. Reactive oxygen species and the neuronal fate [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(2): 215-221.
- [22] Morkuniene R, Zvirbliene A, Dalgediene I, *et al*.

- Antibodies bound to A β oligomers potentiate the neurotoxicity of A β by activating microglia [J]. *J Neurochem*, 2013, 126(5): 604-615.
- [23] 栗广辉. 加味洗心汤合多奈哌齐治疗老年性痴呆的临床研究 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(11): 26-28.
- [24] 第五永长, 田金洲, 时晶. 洗心汤对散发性老年性痴呆大鼠脑内 tau 蛋白 O-GlcNAc 糖基化修饰的影响 [J]. 中成药, 2013, 35(8): 1620-1625.
- [25] 王凯, 张琳琳, 宋宛珊, 等. 从 JAK2/STAT3 信号通路探讨益肾化浊方含药脑脊液对神经干细胞增殖与分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1879-1882.
- [26] 郜 峦, 王 键, 程发峰, 等. 益气活血化痰中药复方对大鼠胚胎神经干细胞生长分化增殖的影响机制研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(2): 113-118.
- [27] 第五永长, 田金洲, 时晶. 洗心汤颗粒对散发性老年性痴呆模型大鼠脑内 Tau 蛋白毒性的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1448-1454.
- [28] 田 沫, 万 凤, 高 健, 等. 人参皂苷 Rg₁ 对外胚鼠皮层神经干细胞的增殖和神经胶质定向分化的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(11): 4527-4530.
- [29] 郭 岚. 《内经》长寿理论与培元固本治法延缓衰老作用的研究 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2013.