

## 左归降糖解郁方调控经典 Wnt 信号改善糖尿病并发抑郁症海马神经干细胞增殖与分化研究

杨 蕙<sup>1,2,3</sup>, 雷诗卉<sup>1</sup>, 李 薇<sup>1</sup>, 孟 盼<sup>2,3</sup>, 王瑾茜<sup>1</sup>, 刘 检<sup>1,2</sup>, 王宇红<sup>2,3\*</sup>

1. 湖南中医药大学第一附属医院 医学创新实验中心, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学 科技创新中心, 湖南 长沙 410208

3. 抑郁类疾病中医药防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

**摘要:** 目的 研究左归降糖解郁方调控模拟糖尿病并发抑郁症脑环境下的体外海马神经干细胞增殖与分化作用及分子机制。方法 纯化和培养 SD 大鼠海马神经干细胞并通过标记巢蛋白 (Nestin) 进行荧光鉴定。取第 3 代海马神经干细胞进行实验, 分为正常组、模型组、空白血清组、左归降糖解郁方含药血清组、左归降糖解郁方含药血清+海马无翅基因 3a (recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a, Wnt3a) 信号抑制剂 XAV-939 组。在干细胞培养液中添加葡萄糖和皮质酮模拟糖尿病并发抑郁症脑环境进行造模, 空白血清组和左归降糖解郁方含药血清组于造模同期分别给予不同血清。干预 18 h 后, 采用 WST-1 检测干细胞活力, 采用 Brdu 免疫荧光结合高内涵细胞成像技术评价干细胞的增殖能力, 分别采用双皮质素 (doublecortin, DCX)、胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)、神经元核抗原 (neuron specific nuclear protein, NeuN) 免疫荧光评估干细胞的分化能力, 采用 Western blotting 检测各组细胞 Wnt3a、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5, LRP5)、LRP6、 $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 表达, 采用 qRT-PCR 法检测神经原素 2 (neurogenin 2, *Ngn2*)、细胞周期蛋白 (*cyclinD1*) 基因表达。结果 左归降糖解郁方能显著增加受损海马神经干细胞的活力 ( $P < 0.01$ ), 增加 Brdu、DCX、GFAP、NeuN 的表达 ( $P < 0.01$ ), 增强其增殖和分化的能力。机制研究发现, 左归降糖解郁方能显著增加神经干细胞中的 Wnt3a、LRP5、LRP6、总  $\beta$ -catenin、核  $\beta$ -catenin 蛋白的表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 激活 Wnt3a 信号并增加  $\beta$ -catenin 的蓄积和入核, 从而促进下游 *Ngn2*、*cyclinD1* 靶基因的转录 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。XAV-939 可通过增加  $\beta$ -catenin 的降解 ( $P < 0.01$ ), 减少其进入细胞核, 减少下游 *Ngn2*、*cyclinD1* 的 mRNA 转录 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 从而降低干细胞的增殖与分化能力。结论 左归降糖解郁方能明显改善葡萄糖与皮质酮对体外海马神经干细胞增殖与分化的抑制作用, 其改善作用与激活 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号有关。

**关键词:** 左归降糖解郁方; 糖尿病并发抑郁症; 神经干细胞; 增殖; 分化; Wnt3a/ $\beta$ -catenin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)07-2163-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.07.016

## Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction improves proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells in diabetes with depression by regulating classical Wnt signaling

YANG Hui<sup>1,2,3</sup>, LEI Shi-hui<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, MENG Pan<sup>2,3</sup>, WANG Jin-xi<sup>1</sup>, LIU Jian<sup>1,2</sup>, WANG Yu-hong<sup>2,3</sup>

1. Center for Medical Research and Innovation, First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

3. Hunan Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Prevention & Treatment of Depressive Diseases, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To explore the effects of Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction (左归降糖解郁方, ZJJ) on proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells *in vitro* under the environment of diabetes with depression. **Method** The neural stem

收稿日期: 2022-11-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82174357); 国家自然科学基金资助项目 (82104793); 湖南省自然科学基金资助项目 (2022JJ30451); 湖南省卫生健康委科研课题 (202102041447); 湖南省中药粉体与创新药物研究省部共建国家重点实验室培育基地开放基金项目 (21PTKF1006)

作者简介: 杨 蕙 (1987—), 女, 副研究员, 博士生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 348541369@qq.com

\*通信作者: 王宇红 (1965—), 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药。E-mail: wyh107@126.com

cells acquired from newborn SD rat hippocampus were purified and cultured, and then were identified by Nestin using fluorescence. The third generation neural stem cells were taken for experiments and divided into normal group, model group, blank serum group, ZJJ-containing serum group, ZJJ-containing serum + recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a (Wnt3a) signaling inhibitor XAV-939 group. Glucose and corticosterone were added to stem cell culture medium for establishing the environment of diabetes with depression. The blank serum group and ZJJ-containing serum group were given different serum at the same period of molding, respectively. After 18 h of the intervention, viability of stem cell was determined by WST-1. The proliferative capacity of stem cells was evaluated by immunofluorescence combined with high-connotation cell imaging technology. The differentiation capacity of stem cells was assessed by doublecortin (DCX), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and neuron specific nuclear protein (NeuN) immunofluorescence. The expressions of Wnt3a, low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), LRP6, and  $\beta$ -catenin were detected by Western blotting. The expressions of neurogenin 2 (*Ngn2*) and *cyclinD1* were determined by qRT-PCR. **Results** ZJJ significantly increased the vitality of hippocampal neural stem cells ( $P < 0.01$ ), and increased the expressions of Brdu, DCX, GFAP, NeuN ( $P < 0.05, 0.01$ ), enhanced ability of proliferation and differentiation. The mechanism study found that ZJJ significantly increased Wnt3a, LRP5, LRP6, total  $\beta$ -catenin and nuclear  $\beta$ -catenin protein expressions in neural stem cells ( $P < 0.05, 0.01$ ), activated Wnt3a signaling and increased the accumulation and entry of  $\beta$ -catenin, then promoted the transcription of downstream *Ngn2* and *cyclinD1* target genes ( $P < 0.05, 0.01$ ). XAV-939 inhibited proliferation and differentiation capacity of neural stem by promoting the degradation of  $\beta$ -catenin ( $P < 0.01$ ), and reducing  $\beta$ -catenin entry into nucleus, decreasing the transcription of downstream *Ngn2* and *cyclinD1* genes ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** ZJJ can significantly improve the proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells induced by glucose and corticosterone, which may be related to the activation of Wnt3a/ $\beta$ -catenin signaling.

**Key words:** Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction; diabetes with depression; neural stem cells; proliferation; differentiation; Wnt3a/ $\beta$ -catenin

随着我国人口老龄化的快速发展以及人们饮食结构和生活方式的改变,糖尿病的患病率持续增长。《中国 2 型糖尿病防治指南 (2020 年版)》中显示,我国 18 岁及以上人群糖尿病患病率为 11.2%,糖尿病知晓率 (36.5%)、治疗率 (32.2%) 和控制率 (49.2%) 虽然有所改善,但仍处于低水平<sup>[1]</sup>。糖尿病并发抑郁症发病隐匿,临床不易诊断,但却严重干扰患者的治疗依从性,影响治疗效果。研究表明,糖尿病全身性代谢紊乱可损伤中枢神经元的功能并造成细胞凋亡或死亡,进而引发抑郁情绪、认知功能减退等行为障碍<sup>[2]</sup>。最新的研究发现,高糖还会引起海马齿状回区神经干细胞的神经发生功能异常,即神经干细胞向新生神经元的分化、迁移和成熟减少<sup>[3]</sup>。而促进海马神经干细胞的增殖与分化已成为抗抑郁研究的新方向<sup>[4]</sup>。

左归降糖解郁方是课题组依据糖尿病并发抑郁症滋阴益气、化痰解郁治法,对左归丸进行加减而得,专利号为 ZL.201910073295.8。前期动物实验发现,左归降糖解郁方对海马无翅基因 3a (recombinant wingless type MMTV integration site family member 3a, Wnt3a) 的表达具有较好的调节作用<sup>[5]</sup>。其中, $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 是 Wnt3a 信号中的核心蛋白。当 Wnt3a 信号被激活时, $\beta$ -catenin 降解减少而蓄积增加,大量  $\beta$ -catenin 进入细胞核并

与 T 细胞因子/淋巴增强因子家族 (T-cell factor/lymphoid enhancing factor, TCF/LEF) 结合,激活下游靶基因的转录,从而发挥调节神经干细胞增殖与分化的功能<sup>[6]</sup>。故本研究拟通过体外细胞实验,以  $\beta$ -catenin 为研究重点,进一步明确左归降糖解郁方调控 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号改善神经干细胞增殖与分化的机制与靶点。

## 1 材料

### 1.1 动物

体外培养的海马神经干细胞来源于 SPF 级 SD 新生鼠 (新生 24 h 内),制备含药血清的动物来源于 SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,以上动物均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号为 SCXK (湘) 2019-0004。动物实验通过湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理审查 (批准号 ZYFY20221111-55)。

### 1.2 药物

左归降糖解郁方由熟地黄 15 g、山茱萸 12 g、枸杞 12 g、菟丝子 9 g、贯叶金丝桃 3 g、丹参 12 g、牡丹皮 6 g、姜黄 9 g、牛膝 9 g、杜仲 9 g、黄芪 18 g 组成,熟地黄购自扬子江药业集团江苏龙凤堂中药有限公司,姜黄购自湖南仁上正元中药饮片有限公司,杜仲购自安徽普仁中药饮片有限公司,其余药材均购自湖南中医药大学第一附属医院。所有药材

均由湖南中医药大学第一附属医院中药房张志国教授鉴定, 熟地黄为玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的块根经加工蒸晒而成, 山茱萸为山茱萸科植物山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果肉, 枸杞为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实, 菟丝子为旋花科植物菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam. 的干燥成熟种子, 贯叶金丝桃为藤黄科植物贯叶金丝桃 *Hypericum perforatum* L. 的干燥地上部分, 丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 牡丹皮为毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮, 姜黄为姜科植物姜黄 *Curcuma Longa* L. 的干燥根茎, 牛膝为苋科植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Bl. 的干燥根, 杜仲为杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥树皮, 黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根。课题组采用 LC-MS/MS 法对左归降糖解郁方的成分进行了定性定量分析, 共鉴定出 30 种化合物, 并对 5 种主要成分进行了定量分析, 含马钱苷 3.48 mg/g、芍药苷 2.05 mg/g、丹酚酸 B 1.08 mg/g、毛蕊异黄酮苷 1.66 mg/g 和梓醇 2.46 mg/g。

### 1.3 药品与试剂

DMEM/F12 培养基 (批号 AF29584968) 购自美国 Hyclone 公司; B27 (2185851) 购自美国 Gibco 公司; 大鼠表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF, 批号 1009390F0619)、大鼠碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF, 批号 1210432-1C2819) 购自 Peprotech 公司; 皮质酮 (批号 SLBJ5337V) 购自美国 Sigma 公司; Brdu (批号 16L08A00) 购自博士德生物公司; Wnt3a 信号抑制剂 XVA-939 (批号 HY-15147) 购自 MedChemExpress 公司; 巢蛋白 (Nestin) 抗体 (批号 19483-1-AP)、 $\beta$ -catenin 抗体 (批号 51067-2-AP)、CoraLite594 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 SA00013-3) 购自 Proteintech 公司; 神经元核抗原 (neuron specific nuclear protein, NeuN) 抗体 (批号 AF300513) 购自艾方生物科技有限公司; 双皮质素 (doublecortin, DCX) 抗体 (批号 4604)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 (low density lipoprotein receptor-related protein 5, LRP5) 抗体 (批号 5731S)、LRP6 抗体 (批号 2560S)、Wnt3a 抗体 (批号 2721)、核纤层蛋白 B1 (Lamin B1) 抗体 (批号 13435)、胶

质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (批号 80788S) 购自美国 CST 公司;  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (批号 BM0627)、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (批号 BA1105) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.4 仪器

OPER-ETTA 型高内涵细胞成像分析系统 (美国 PerkinElmer 公司); TD25-WS 型低速离心机 (湖南湘仪实验仪器开发有限公司); S8PAO 型体视显微镜 (德国 Leica 公司); Mini Trans-Blot 蛋白转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); FluorChem R 超灵敏多色荧光成像分析系统 (美国 ProteinSimple 公司)。

## 2 方法

### 2.1 海马神经干细胞的分离、培养与鉴定

取 24 h 的新生 SD 大鼠, 将全身用 75% 酒精擦拭消毒后, 于体视显微镜下取全脑, 置于 D-Hanks 溶液中漂洗干净; 随后剥离外层血管膜, 取双侧海马, 摘除海马中的出血点及血管膜后, 移至干细胞条件培养基中 (100 mL 条件培养基的配比为 95.6 mL DMEM/F12、2 mL B27、0.2 mL EGF、0.2 mL bFGF、1 mL 非必需氨基酸和 1 mL 双抗)。上述全过程均需要在冰盒上完成以保证细胞活力。接着采用 1 mL 移液枪反复吹打直至海马组织成为混悬液, 吹打动作需轻柔以免损伤细胞, 细胞过筛滤去黏膜, 800 r/min 离心 5 min, 弃去上清液并将沉淀细胞进行重悬, 按照  $2 \times 10^5$  个/mL 的密度, 将上述单细胞悬液培养于 6 孔板中且隔天换液。细胞培养至第 3 天开始成球并不断增殖, 到第 8 天神经干细胞球的大小平均约为 150  $\mu$ m, 需进行传代, 传代方法同上, 传代后杂细胞少见, 干细胞的增殖能力较好; 本实验采用第 3 代神经干细胞进行实验。

### 2.2 含药血清的制备

按照课题组方法<sup>[7]</sup>制备左归降糖解郁方含药血清, 步骤如下: 雄性 SD 大鼠 ig 左归降糖解郁方 (32.82 g/kg, 相当于 3 倍临床等效剂量), 空白血清组 ig 等体积蒸馏水, 每日 2 次, 连续给药 3 d。末次给药 1 h 后, 腹主动脉取血, 4500 r/min 离心 15 min, 收集血清后于 56  $^{\circ}$ C 金属浴锅灭活 30 min, -80  $^{\circ}$ C 超低温冰箱冷藏保存, 以备后续实验使用。通过 UPLC-ESI-Q/TOF 对左归降糖解郁方含药血清中的物质基础进行分析, 共鉴定出 32 个入血成分, 并明确了包括马钱苷酸、金丝桃苷、马钱苷、芍药苷、莫诺苷等在内的活性成分群。

### 2.3 体外细胞造模及药物干预

将体外培养的第 3 代神经干细胞分为正常组、模型组、空白血清组、左归降糖解郁方含药血清组和 XAV-939 组。采用课题组已有建模条件高糖(150 mmol/L)和皮质酮(200  $\mu$ mol/L)干预细胞<sup>[8-10]</sup>, 建立模拟糖尿病并发抑郁症脑环境下的海马神经干细胞体外模型, 正常组给予等体积的 PBS, 干预时间为 24 h。同时, 左归降糖解郁方含药血清组加入 10% 左归降糖解郁方含药血清, XAV-939 组加入 10% 左归降糖解郁方含药血清和 XAV-939 (5  $\mu$ mol/L), 空白血清组加入 10% 空白血清, 正常组和模型组分别加入培养液。

### 2.4 检测指标

**2.4.1 干细胞活力检测** 将体外培养的第 3 代神经干细胞制成细胞悬液并接种于 96 孔板中, 细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/孔, 每孔 100  $\mu$ L, 实验孔四周用无菌 PBS 进行填充。将各组进行相应干预及处理后, 每孔加 10  $\mu$ L WST-1 溶液, 继续培养 4 h, 在 450 nm 处测定每孔的吸光度(A)值。

**2.4.2 干细胞增殖功能检测** 在体外培养的第 3 代神经干细胞条件培养基中加入 Brdu, 终浓度为 10  $\mu$ mol/L, 并于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中培养 72 h。随后, 将干细胞球转移至新的 6 孔板中(板底铺经多聚赖氨酸包被过的细胞爬片), 在培养基中添加 10% 胎牛血清以促进神经球贴壁。各组细胞建模及药物干预, 24 h 后取出细胞爬片。采用免疫荧光方法对神经干细胞中的 Brdu 进行显色, 吸去培养基, 用 PBS 漂洗细胞 3 次, 每次 5 min, 所有加液及吸液均应轻柔缓慢进行以减少细胞脱片。每张爬片上依次加入足量 4% 多聚甲醛室温避光固定 30 min 后吸去, PBS 洗涤; 加入足量 0.3% Triton-100 室温避光孵育 15 min 后吸去, PBS 洗涤; 加入足量 BSA 室温避光孵育 60 min 后吸去, PBS 洗涤; 加入 Brdu 抗体(1:200), 150  $\mu$ L/片。将爬片放入湿盒中, 于 4  $^{\circ}$ C 过夜。次日, 吸去一抗, PBS 洗涤; 加入相应二抗(1:200), 150  $\mu$ L/片, 室温避光孵育 60 min, PBS 洗涤; 加入 DAPI 染液, 150  $\mu$ L/片, 避光 10 min 后吸去, PBS 洗涤, 滴加抗荧光猝灭剂, 于激光共聚焦显微镜下观察、拍摄及分析。

**2.4.3 干细胞分化功能检测** 收集第 3 代神经干细胞悬液, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入含有 10% 胎牛血清的条件培养基, 反复吹打后接种于铺有细胞爬片(预包被)的 6 孔板中, 37  $^{\circ}$ C、5%

CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 48 h, 随后进行建模及药物干预, 24 h 后取出细胞爬片, 采用免疫荧光方法检测细胞中 DCX、GFAP、NeuN 的表达, 细胞按照“2.4.2”项下方法处理后, 分别加入一抗 DCX(1:100)、GFAP(1:100)、NeuN(1:100), 150  $\mu$ L/片, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, 吸去一抗, PBS 洗涤; 加入相应二抗(1:200), 150  $\mu$ L/片, 室温避光孵育 60 min, PBS 洗涤; 加入 DAPI 染液, 150  $\mu$ L/片, 避光孵育 10 min 后吸去, PBS 洗涤, 滴加抗荧光猝灭剂, 于激光共聚焦显微镜下观察、拍摄及分析。

**2.4.4 Western blotting 检测** 各组细胞建模及药物干预 24 h 后, 收集细胞悬液, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 蛋白裂解液, 提取蛋白并定量, 加入上样缓冲液, 100  $^{\circ}$ C 加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中封闭 1 h, 加入一抗低温孵育过夜。次日, 将膜放置于室温下平衡 30 min, 弃去一抗并用 TBST 漂洗 5 次, 然后加入相应的二抗, 于摇床中孵育 1 h, 弃去二抗并用 TBST 漂洗 5 次, 最后进行 ECL 显色, 采用超灵敏多色荧光成像分析系统进行曝光及灰度值计算。

**2.4.5 qRT-PCR 检测** 采用 Trizol 提取各组大鼠海马齿状回的总 RNA, 随后反转录得 cDNA。采用 qRT-PCR 法扩增细胞周期蛋白 D1(*cyclinD1*) 和神经元素 2(*neurogenin 2*, *Ngn2*), 引物序列: *cyclinD1* 上游引物 5'-GAGACCACAGCCCTCCCCAGACGG-3', 下游引物 5'-AAGCGGTCCAGGTAGTTCATGG-3'; *Ngn2* 上游引物 5'-TCGTCAAATCTGAGACTCTGGAG-3', 下游引物 5'-CGGCGCAGC-TCCTCGTCCT-3';  $\beta$ -actin 上游引物 5'-CCGAGCGTGGCTACAGCTTC-3', 下游引物 5'-ACCTG-GCCGTCAGGCAGCTC-3'。反应体系为 20  $\mu$ L, 包含 SYBR Green Mix 10  $\mu$ L、上下游引物各 0.5  $\mu$ L、cDNA 模板 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。反应程序为 95  $^{\circ}$ C、3 min, 95  $^{\circ}$ C、8 s, 60  $^{\circ}$ C、30 s, 72  $^{\circ}$ C、25 s, 40 个循环。

### 2.5 统计分析

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析(ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 海马神经干细胞的形态学及标记物鉴定结果

如图 1 所示, 海马中分离培养的原代神经干细

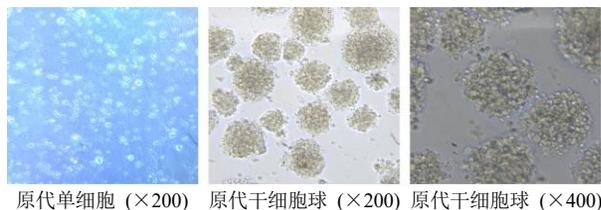


图1 海马神经干细胞的体外培养观察

Fig. 1 Observation on culture of hippocampal neural stem cells *in vitro*

胞均为单细胞且悬浮于培养基中，随着培养时间的延长，干细胞不断增殖形成悬浮细胞球。显微镜下可见细胞球饱满，立体感较强，透光性良好。对不同培养阶段的悬浮神经干细胞球进行Nestin免疫荧光标记（图2），其中Nestin为绿色荧光，细胞核为蓝色荧光，神经干细胞在培养第3天，可形成直径约50 μm的神经球，在培养第6天，直径可达100 μm。

### 3.2 海马神经干细胞的活力检测结果

如图3所示，与正常组比较，模型组、空白血

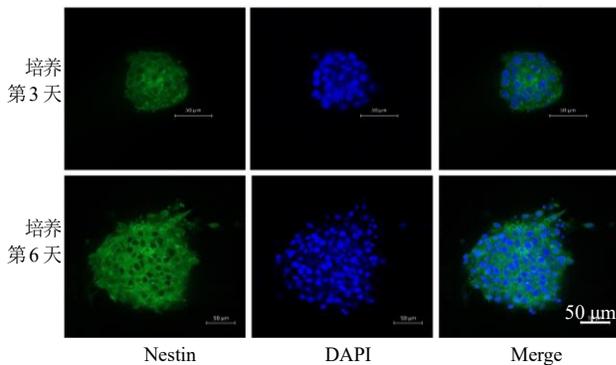
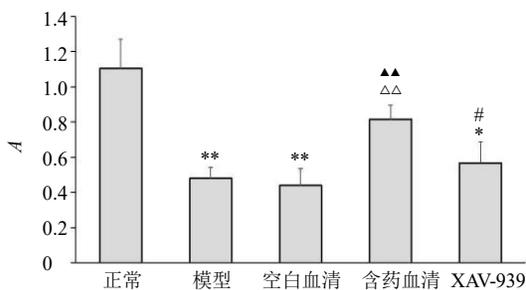


图2 神经干细胞标记物 Nestin 标记结果 (×100)

Fig. 2 Expression of neural stem cell marker Nestin (×100)



与正常组比较：\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较： $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$ ；与空白血清比较： $\blacktriangle P < 0.05$   $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ；与左归降糖解郁方含药血清组比较： $\# P < 0.05$   $\#\# P < 0.01$ ，下图同  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs normal group;  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$  vs model group;  $\blacktriangle P < 0.05$   $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs blank serum normal group;  $\# P < 0.05$   $\#\# P < 0.01$  vs compared with Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction containing serum group, same as below figures

图3 神经干细胞的A值 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Absorbance value of neural stem cells ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

清组、XAV-939组神经干细胞A值明显降低 ( $P < 0.05, 0.01$ )。与模型组和空白血清组比较，左归降糖解郁方含药血清组神经干细胞的A值均明显升高 ( $P < 0.01$ )，提示左归降糖解郁方可显著提升受损神经干细胞的活力。与左归降糖解郁方含药血清组比较，XAV-939组神经干细胞的A值明显降低 ( $P < 0.05$ )，提示XAV-939显著抑制了左归降糖解郁方对神经干细胞活力的增强作用。

### 3.3 海马神经干细胞的增殖检测结果

如图4所示，与正常组比较，其余各组BrdU的A值显著减少 ( $P < 0.01$ )；与模型组和空白血清组比较，左归降糖解郁方含药血清组神经干细胞BrdU的A值均显著增加 ( $P < 0.01$ )，提示左归降糖解郁方可增加干细胞的增殖能力。与左归降糖解郁方含药血清组比较，XAV-939组神经干细胞BrdU的A值显著降低 ( $P < 0.01$ )，提示XAV-939抑制了左归降糖解郁方对神经干细胞增殖的促进作用。

### 3.4 海马神经干细胞的分化功能检测结果

通过标记DCX、GFAP、NeuN评估神经干细胞的分化功能，如图5所示，DCX标记的是新生神经元，与正常组比较，其余各组神经干细胞中DCX表达均显著降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组和空白血清组比较，左归降糖解郁方可显著升高DCX表达 ( $P < 0.01$ )，提示左归降糖解郁方可显著增强神经干细胞向新生神经元的分化；与左归降糖解郁方含药血清组比较，XAV-939组DCX表达显著减少 ( $P < 0.01$ )，提示XAV-939可抑制左归降糖解郁方的上述促分化作用。

GFAP用以标记星形胶质细胞，与正常组比较，其余各组神经干细胞中GFAP表达均显著降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，空白血清组、左归降糖解郁方含药血清组、XAV-939组的GFAP表达均明显增加 ( $P < 0.05, 0.01$ )；与空白血清组比较，左归降糖解郁方含药血清组GFAP表达显著增加 ( $P < 0.01$ )，提示虽然空白血清对神经干细胞向星形胶质细胞分化具有一定的促进作用，但左归降糖解郁方对于该分化方向的促进作用更强；与左归降糖解郁方含药血清组比较，XAV-939组GFAP表达显著减少 ( $P < 0.01$ )，提示XAV-939可抑制左归降糖解郁方对神经干细胞向星形胶质细胞分化的作用。

NeuN标记成熟神经元，与正常组比较，其余各组神经干细胞中NeuN表达均显著降低 ( $P < 0.01$ )；与模型组和空白血清组比较，左归降糖解郁方含药

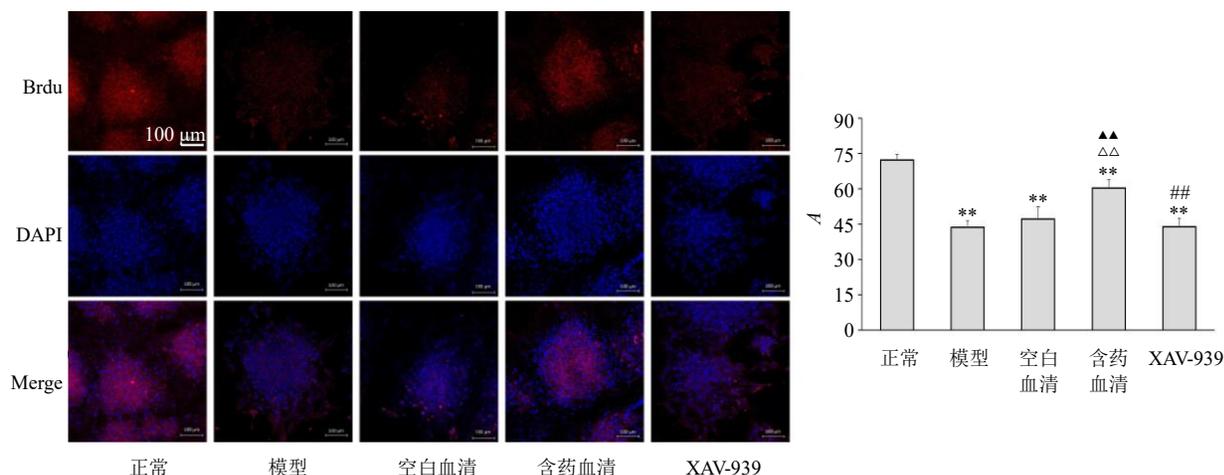


图 4 神经干细胞 Brdu 染色 ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 4 Brdu staining of neural stem cells ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

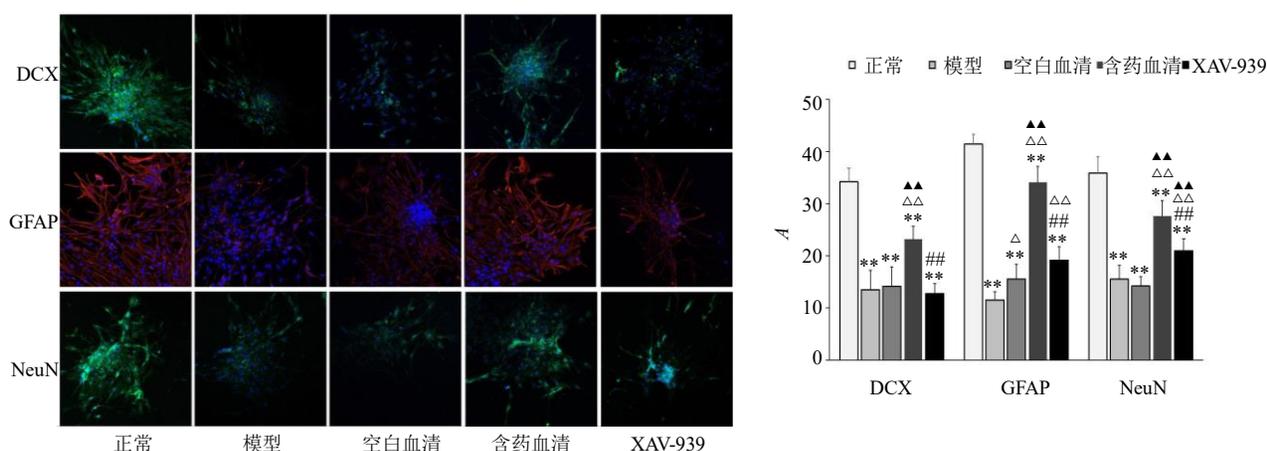


图 5 神经干细胞 GFAP、DCX、NeuN 染色结果 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 5 GFAP, DCX and NeuN staining results of neural stem cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

血清组 NeuN 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提示左归降糖解郁方可显著促进新生神经元的成熟; 与左归降糖解郁方含药血清组比较, XAV-939 组 NeuN 表达显著减少 ( $P < 0.01$ ), 提示 XAV-939 可抑制左归降糖解郁方对新生神经元成熟的促进作用。

### 3.5 海马神经干细胞中 Wnt3a 信号通路蛋白检测

分别对 Wnt3a 信号的上游分子 Wnt3a、LRP5、LRP6 以及其下游  $\beta$ -catenin 进行检测, 结果见图 6。Wnt3a 信号上游蛋白结果显示, 与正常组比较, 模型组和空白血清组 Wnt3a、LRP5、LRP6 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 空白血清组、左归降糖解郁方含药血清组和 XAV939 组 Wnt3a 表达显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 左归降糖解郁方含药血清组和 XAV939 组 LRP5、LRP6 表达均显著升高 ( $P < 0.01$ )。与空白血清组比较, 左归降糖解郁方含药血清组和 XAV939 组 Wnt3a、LRP5、LRP6 蛋白

表达显著升高 ( $P < 0.01$ )。左归降糖解郁方含药血清组与 XAV939 组之间上述 3 个蛋白表达没有显著性差异。提示左归降糖解郁方能够显著升高海马神经干细胞中 Wnt3a、LRP5、LRP6 3 个蛋白的表达, 即对 Wnt3a 信号具有较好的促进作用, 而 XAV939 则对以上蛋白无明显抑制效果。

Wnt3a 信号下游蛋白结果显示, 与正常组比较, 模型组、空白血清组和 XAV939 组细胞中总  $\beta$ -catenin 和核  $\beta$ -catenin 的表达均显著降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组和空白血清组比较, 左归降糖解郁方含药血清组总  $\beta$ -catenin 和核  $\beta$ -catenin 的表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提示左归降糖解郁方能够显著增加  $\beta$ -catenin 的表达及入核。与左归降糖解郁方含药血清组比较, XAV939 组细胞中总  $\beta$ -catenin 和核  $\beta$ -catenin 的表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 提示 XAV939 可通过降解  $\beta$ -catenin 并减少其入核, 从而阻断 Wnt3a

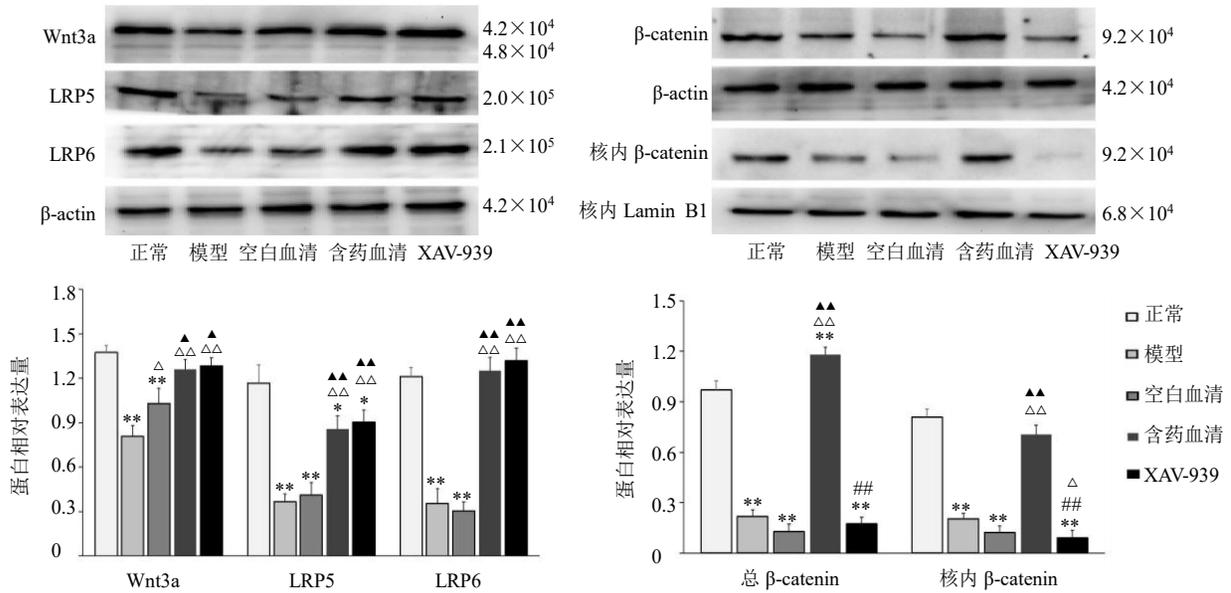


图 6 Wnt3a 信号通路中相关蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 6 Related protein expressions in Wnt3a signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

信号下游的信号传导。

### 3.6 海马神经干细胞中 Wnt3a 信号调控因子的表达

如图 7 所示,与正常组比较,模型组、空白血清组、XAV939 组 *cyclinD1* 和 *Ngn2* 的 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ );与模型组和空白血清组比较,左归降糖解郁方含药血清组 *cyclinD1* 和 *Ngn2* 的 mRNA 表达均显著升高 ( $P < 0.05, 0.01$ ),XAV939 组 *Ngn2* 的 mRNA 表达显著升高 ( $P < 0.05$ ),提示左归降糖解郁方能显著增加神经干细胞中 *cyclinD1* 和 *Ngn2* 的转录;与左归降糖解郁方含药血清组比较,XAV939 组 *cyclinD1* 和 *Ngn2* 的 mRNA 表达显著降低 ( $P < 0.05, 0.01$ ),提示 XAV939 抑制了上述因子的转录表达。

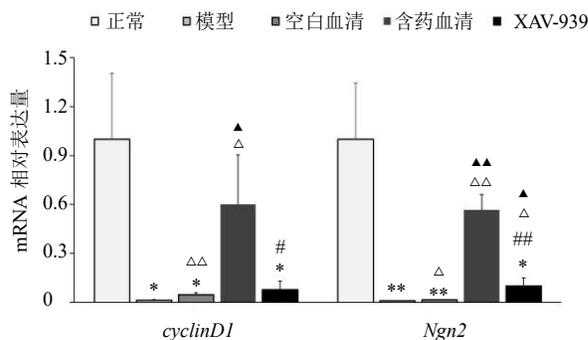


图 7 Wnt3a 信号通路下游转录因子 mRNA 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 7 mRNA expressions of downstream transcription factor of Wnt3a signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

## 4 讨论

海马神经干细胞具有增殖和分化等功能,可通过不断产生新的神经细胞,参与神经网络的整合和功能发挥,在海马依赖的情绪和认知调节中展现出越来越重要的作用。目前,海马神经干细胞功能减退已成为糖尿病脑病以及抑郁症发生机制的研究热点,以神经干细胞为靶细胞的降糖及抗抑郁药研究逐渐增多<sup>[11-12]</sup>。然而,上述研究大多以动物实验为主,细胞实验较为少见,故建立贴合在体表现的体外细胞模型将有助于深入开展对糖尿病并发抑郁症海马神经干细胞的研究。课题组前期采用葡萄糖(150 mmol/L)和皮质酮(200 μmol/L)联用的方式,模拟糖尿病并发抑郁症脑环境,对体外神经元、小胶质细胞、神经血管单元等多种神经细胞/细胞系进行刺激干预,体外细胞功能与形态的病理表现与在体相似,为糖尿病并发抑郁症的在体研究提供了有力佐证<sup>[7-10]</sup>。本研究采用上述建模条件,对体外培养的神经干细胞进行干预,结果发现,葡萄糖和皮质酮干预体外神经干细胞后,干细胞活力减弱且增殖能力下降,其向神经元和星形胶质细胞分化的程度明显降低,该结果与糖尿病并发抑郁症大鼠海马齿状回神经干细胞的增殖与分化功能下降保持一致,可作为细胞模型用于后续研究。

左归降糖解郁方是课题组根据糖尿病并发抑郁症“虚、瘀、郁”病机,在经典名方左归丸的基础上加减而得,能够有效降低糖尿病并发抑郁症大鼠

外周高血糖和高血脂,改善动物的抑郁样行为<sup>[13-15]</sup>。已有研究表明,该方中的部分药味对海马神经干细胞功能具有较好的调节作用。如山茱萸能够显著增加正常大鼠海马齿状回 Brdu 和微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2) 的阳性细胞数,促进内源性神经干细胞的增殖与分化<sup>[16]</sup>。姜黄可通过调控海马源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)/环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)信号通路促进糖尿病脑病大鼠海马区神经发生,从而改善动物的空间记忆障碍<sup>[17]</sup>。杜仲可通过影响小鼠的肠道菌群促进海马成体神经干细胞的增殖,以及新生神经元细胞的分化和存活,进而提高动物的学习记忆能力<sup>[18]</sup>。本研究发现,左归降糖解郁方能够明显提高葡萄糖和皮质酮对体外海马神经干细胞活性的抑制作用,增强干细胞增殖能力,改善细胞分化功能。首先,WST-1 作为 MTT 的升级替代产品,可以被线粒体内的一些脱氢酶还原生成橙黄色的 formazan,其还原后的产物具有水溶性,更适合悬浮细胞的活力检测,且 WST-1 稳定型更好、灵敏度更高。实验发现,左归降糖解郁方干预后的干细胞 A 值明显增加,即对干细胞活力的增强作用较为明显。其次,实验采用经典的 Brdu 对干细胞内新合成的 DNA 进行标记,用以评价细胞的增殖情况。结果发现,左归降糖解郁方能显著增加干细胞球中 Brdu 的荧光强度,促进干细胞的增殖。最后,采用 DCX、NeuN、GFAP 对神经干细胞的分化功能进行评估,其中,DCX、NeuN 用于评价其分化成神经元的能力,GFAP 为其分化成星形胶质细胞的能力。结果发现,左归降糖解郁方能够显著增加神经干细胞分化过程中 DCX、NeuN、GFAP 的表达,即增强干细胞向神经元和星形胶质细胞的分化能力。

Wnt 家族可通过经典与非经典信号通路参与调节体内多种细胞的增殖、分化、迁移和极化等过程,且以经典 Wnt 信号的研究最为广泛和深入。Wnt 家族中的 Wnt3a 成员所介导的 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 经典信号在调节海马齿状回神经发生中发挥了重要作用,并可通过调节神经干细胞的命运走向而影响动物行为<sup>[19]</sup>。慢病毒介导的 Wnt3a 过表达不仅可诱导成年大鼠齿状回的神经发生,也可增加体外神经祖细胞的增殖<sup>[20]</sup>。本研究结果表明,左归降糖解郁方可显著提高体外培养的海马神经干细胞中 Wnt3a 的

表达,该结果与之前动物实验的结果保持一致<sup>[5]</sup>。此外,实验发现,左归降糖解郁方可增加神经干细胞中 LRP5/6 的表达水平。LRP5 和 LRP6 是 Wnt3a 信号激活的重要受体,其通过与 Wnt3a、FZD 形成三元复合物,实现对蓬乱蛋白同源物(dishevelled, Dvl)、Axis 抑制蛋白(axis inhibition protein, Axin)、酪蛋白激酶 1(casein kinase 1, CK1)和糖原合成酶激酶-3 $\beta$ (glycogen synthase kinase-3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )的募集。此时,由 Dvl、Axin、CK1 和 GSK-3 $\beta$  形成的降解复合体无法发挥对  $\beta$ -catenin 的磷酸化作用,使得  $\beta$ -catenin 的泛素化被抑制而减少降解。 $\beta$ -catenin 在胞质中不断蓄积,最终进入细胞核启动下游基因表达<sup>[21]</sup>。由此可见,左归降糖解郁方可通过增加 Wnt3a 与 LRP5/6 的表达,促进降解复合体的募集,从而减少  $\beta$ -catenin 的降解,增加其入核。

$\beta$ -catenin 进入细胞核并启动下游靶基因转录的过程是 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号调控干细胞增殖和分化作用的关键。细胞质中游离的  $\beta$ -catenin 进入到细胞核,与 TCF/LEF 相结合形成转录复合体,激活下游 *Ngn2*、*cyclinD1* 等基因转录,*cyclinD1* 主要刺激神经干细胞增殖而 *Ngn2* 主要促进干细胞的分化和神经元的成熟<sup>[22]</sup>。故对神经干细胞核中  $\beta$ -catenin 的蛋白及下游靶基因的表达进行了检测。结果发现,左归降糖解郁方能显著增加神经干细胞核中的  $\beta$ -catenin 蛋白表达以及 *Ngn2* 和 *cyclinD1* 的 mRNA 表达。此外,选择化学抑制剂 XAV-939 进行验证。XAV939 是一种细胞可穿透性的 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号转导抑制剂,可通过抑制多聚 ADP-核糖基化酶 Tankyrase1 和 Tankyrase2,稳定降解复合体成分 Axin,从而刺激  $\beta$ -catenin 降解,减少其进入细胞核的量。结果发现,给予 XAV939 后,左归降糖解郁方对神经干细胞增殖、分化的改善作用被抑制,细胞核中  $\beta$ -catenin 蛋白和 *Ngn2*、*cyclinD1* 的 mRNA 表达均显著减少,但 Wnt3a、LRP5 和 LRP6 的表达没有明显改变。该结果提示,在增加神经干细胞中  $\beta$ -catenin 的降解后,左归降糖解郁方虽仍可增强 Wnt3a 的表达,但无法通过促进  $\beta$ -catenin 的入核而增加神经发生相关因子的转录,继而失去对神经干细胞功能的调节作用,推测  $\beta$ -catenin 可能是左归降糖解郁方的关键作用靶点。

综上所述,左归降糖解郁方可明显改善模拟糖尿病并发抑郁症脑环境下海马神经干细胞的增殖与分化功能,上述作用与其调控 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号,

增加  $\beta$ -catenin 入核, 促进神经干细胞功能相关基因转录有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

**参考文献**

[1] 中华医学会糖尿病学分会, 朱大龙. 中国2型糖尿病防治指南(2020年版)[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.

[2] Zhou Z Y, Wang M, Huang C Y, *et al.* Treadmill exercise training alleviates diabetes-induced depressive-like behavior and cognitive impairment by improving hippocampal CA1 neurons injury in db/db mice [J]. *Brain Res Bull*, 2022, 190: 84-96.

[3] 张俊涛, 刘志贞, 刘丹, 等. 高糖对神经干细胞凋亡的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(14): 1610-1613.

[4] Carrard A, Cassé F, Carron C, *et al.* Role of adult hippocampal neurogenesis in the antidepressant actions of lactate [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(11): 6723-6735.

[5] 杨蕙, 雷诗卉, 李薇, 等. 左归降糖解郁方调控 Wnt3a/ $\beta$ -catenin 信号通路改善糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经发生的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5): 2519-2524.

[6] Xiao H H, Chen J C, Li H, *et al.* Icarisid II rescues cognitive dysfunction via activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway promoting hippocampal neurogenesis in APP/PS1 transgenic mice [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(5): 2095-2108.

[7] 孟盼, 向韵, 雷昌, 等. 左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁症环境下小胶质细胞活化的干预作用及其机制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2309-2315.

[8] 刘检, 王宇红, 徐雅岚, 等. 改良的胎鼠海马神经元原代培养及模拟糖尿病并发抑郁环境对其的损伤作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2016, 32(4): 459-465.

[9] 凌佳, 罗薇絮, 刘灿, 等. 左归降糖解郁方对模拟糖尿病并发抑郁症环境下海马神经血管单元的保护作用 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(10): 5865-5869.

[10] Liu J, Wang Y H, Li W, *et al.* Structural and functional damage to the hippocampal neurovascular unit in diabetes-related depression [J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(2): 289-297.

[11] 张琦, 许顺江. 成年海马神经发生障碍在糖尿病脑病发生和发展中的作用 [J]. 生理学报, 2022, 74(5): 837-842.

[12] Hamal C, Velugoti L S D R, Tabowei G, *et al.* Metformin for the improvement of comorbid depression symptoms in diabetic patients: A systematic review [J]. *Cureus*, 2022, 14(8): e28609.

[13] Yang H, Ling J, Meng P, *et al.* Activation of hippocampal IR/IRS-1 signaling contributes to the treatment with Zuogui Jiangtang Jieyu Decoction on the diabetes-related depression [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6688723.

[14] 杨蕙, 刘检, 唐林, 等. 左归降糖解郁方对糖尿病并发抑郁症大鼠海马胰岛素抵抗的影响 [J]. 中草药, 2020, 51(11): 3013-3020.

[15] 刘检, 刘林, 唐林, 等. 左归降糖解郁方对自噬介导的糖尿病并发抑郁症大鼠海马神经血管单元中神经元损伤的保护作用及其机制 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2420-2427.

[16] 张丽, 赵丽红, 张兰, 等. 山茱萸环烯醚萜苷促进成体大鼠海马神经干细胞增殖和分化的影响 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(5): 550-553.

[17] 朱艳娟, 杜君, 朱艳香, 等. 姜黄素促进海马神经发生改善糖尿病大鼠空间记忆损伤 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2016, 32(10): 846-850.

[18] 柴学军, 吴永继, 孙鹏浩, 等. 杜仲通过肠道菌群促进小鼠海马成体神经发生和学习记忆能力 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2019, 33(9): 705.

[19] Zhao Y, Yu J, Ping F, *et al.* Insulin and liraglutide attenuate brain pathology in diabetic mice by enhancing the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(1): 439.

[20] Lie D C, Colamarino S A, Song H J, *et al.* Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis [J]. *Nature*, 2005, 437(7063): 1370-1375.

[21] 顾嘉伟, 牛耿明, 柯重伟. 经典 Wnt 信号通路中  $\beta$ -catenin 在细胞核内外分布的调控机制及潜在治疗靶点的研究进展 [J]. 复旦学报: 医学版, 2022, 49(2): 300-308.

[22] Qu Q, Sun G, Murai K, *et al.* Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 33(13): 2551-2559.

[责任编辑 李亚楠]