

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.06.017

实验研究

从 JAK/STAT 信号转导通路探讨益肾化浊方对神经干细胞定向分化的影响

崔远武¹, 周震¹, 张琳琳¹, 宋宛珊², 韩文文¹, 王凯², 张玉莲^{*}

(1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津市河北区真理道 816 号, 300150; 2. 天津中医药大学)

摘要 目的 探讨益肾化浊方治疗阿尔茨海默病的可能作用机制。方法 从孕 14 天昆明小鼠体外提取并培养神经干细胞, 建立分化系统中可溶性 $A\beta_{25-35}$ ($5 \mu\text{mol/L}$) 介导的具有神经毒性的阿尔茨海默病细胞模型。实验分为对照组 (等量培养基)、模型组 ($5 \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ $100 \mu\text{l}$) 和益肾化浊中药组 ($5 \mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ $100 \mu\text{l}$ + $0.1 \mu\text{g/ml}$ 益肾化浊方 $100 \mu\text{l}$)。常规消化细胞, 计数后以细胞密度每毫升 2×10^5 / 个 (每孔 2 ml) 接种于 6 孔板, 培养 48 h。Western Blot 法检测神经胶质酸性蛋白 (GFAP)、微管蛋白 (Tubulin) 和转录激活子 3 (STAT3)、磷酸化转录激活子 3 (P-STAT3)、Smad1 蛋白表达; RT-PCR 法检测 GFAP、STAT3、Smad1、Tubulin 基因的表达。结果 与对照组比较, 模型组 GFAP、STAT3 基因及蛋白表达显著增加、P-STAT3 蛋白表达显著增加, Tubulin 基因及蛋白表达显著减少 ($P < 0.05$), Smad1 基因及蛋白表达增加不明显 ($P > 0.05$); 与模型组比较, 益肾化浊中药组 GFAP、STAT3、Smad1 基因及蛋白表达均显著下降、P-STAT3 蛋白表达亦下降, 而 Tubulin 基因及蛋白表达显著增加 ($P < 0.05$)。结论 益肾化浊方可能通过调控 JAK/STAT 信号通路中相关蛋白及基因表达, 从而抑制神经干细胞向星形胶质细胞方向分化来延缓阿尔茨海默病发展。

关键词 阿尔茨海默病; 益肾化浊方; β 淀粉样肽; 细胞定向分化; 神经干细胞; 星形胶质细胞

阿尔茨海默病 (alzheimer's disease, AD) 为常见中枢神经系统退行性疾病之一, 其发病机制与脑内 β 淀粉样肽 ($A\beta$) 聚集后激活星形胶质细胞增生^[1], 释放炎症因子, 导致神经元变性凋亡密切相关^[2]。因此, 适当调控神经干细胞分化方向, 抑制其向星形胶质细胞过度分化, 可能成为延缓 AD 进展的一种有效治疗方式。作为将信号从细胞表面传递至细胞内部的最重要途径的 JAK/STAT 信号通路在神经干细胞向星形胶质细胞分化过程中起关键作用^[3]。前期研究发现, 益肾化浊方对 AD 患者中医症状、认知功能及日常生活能力有明显的改善作用^[4], 且可显著改善 SAMP8 小鼠的学习记忆能力^[5]。因此, 本文拟采用 $A\beta$ 刺激神经干细胞建立细胞模型, 以益肾化浊方中药为干预手段, 观察 JAK/STAT 信号转导通路中关键靶点蛋白和基因表

达的变化, 为临床应用益肾化浊方治疗 AD 提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级孕 14 天昆明小鼠, 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 体重 $20 \sim 25 \text{ g}$, 实验动物合格证号: SCXK (沪) 2007-0005。

1.2 药品和配制

益肾化浊方组成: 女贞子 10 g , 淫羊藿 10 g , 补骨脂 10 g , 制何首乌 12 g , 石菖蒲 12 g , 炙黄芪 10 g , 川芎 10 g 。上述药物 370 g , 加 1000 ml 水浸泡 12 h 后再加水 1000 ml , 80°C 、 30 min 超声, 过滤, 保存滤液, 滤渣按上述操作加水煎煮, 反复 3 次, 将滤液合并过滤, 滤液浓缩至 500 ml , 浓度为 1 g/ml , 用基础培养基稀释成终浓度为 0.1 、 1 、 $10 \mu\text{g/ml}$, 预实验筛选出 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 为最佳作用浓度用于后续实验, 4°C 冰箱保存。参照 López-Tolé-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102577), 国家重点基础研究发展计划 (2010CB530405)

* 通讯作者: zhyl220@126.com, (022) 60335355

danoMA 等^[8]方法将 5 mg $A\beta_{25-35}$ (AnaSpec 公司, 批号: CA94555) 溶于 1888 μl 的双蒸水中, 震荡混匀, 过滤, 配制成浓度为 2.5 mmol/L 的母液, 用基础培养基稀释成终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$, -20°C 保存。

1.3 试剂

细胞培养基 KnockOut DMEM/F12 (批号: 12660-012)、胎牛血清 (FBS, 批号: 10099-141)、表皮生长因子 (EGF, 批号: PHG0314)、成纤维细胞生长因子 (bFGF, 批号: PHG0024)、Stem-Pro (r) Neural supplement 添加剂 (批号: A10508-01) 均为 Gibco 公司产品; 青-链霉素溶液 (Biowest 公司, 批号: L0022-100), Anti-GFAP (Millipore 公司, 批号: AB5804), Anti-Tubulin betaIII isoform (Millipore 公司, 批号: MAB1637), Anti-STAT3 (Cell Signaling 公司, 批号: #9139), Anti-STAT3 phospho (Tyr705, Cell Signaling 公司, 批号: #9131), Anti-Smad1 (Cell Signaling 公司, 批号: #9743), β -Actin (Santa Cruz 公司, 批号: sc-47778), Western 及 IP 细胞裂解液 (Beyotime 公司, 批号: P0013), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (Beyotime 公司, 批号: P0012A), BCA 蛋白浓度试剂盒 (Beyotime 公司, 批号: P0010), 超敏 ECL 化学发光试剂盒 (Beyotime 公司, 批号: P0018), Trizol 试剂盒 (Gibco 公司, 批号: 15596026)。

1.4 主要仪器

超净工作台 (Thermo Fisher Scientific 公司), CO_2 恒温培养箱 (Thermo Scientific Forma 公司), 光学显微镜 (Olympus 公司), SDS-PAGE 电泳仪和转膜仪 (Bio-Rad 公司), ABIStep-OnePlusReal-Time PCR System (Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 神经干细胞培养及模型制作

从孕 14 天昆明小鼠大脑皮层提取神经干细胞^[9], 采用 KnockOut DMEM/F12 培养基 (内含 EGF、bFGF、2% Neural supplement、青-链霉素双抗) 培养, 待长成神经干细胞球后, 使用 Accutase 酶进行消化传代, 3 天后纯化培养收集神经干细胞球, 吹打均匀后种于事先用多聚赖氨酸包被好的 6 孔板中, 加入分化培养基 (DMEM/F12、2% supplement、1% 胎牛血清、1% 双抗) 使其贴壁分化。参照前期研究方法^[8]制备分化系统可溶性 $A\beta_{25-35}$ (5 $\mu\text{mol/L}$) 体外诱导神经干细胞损伤的

AD 细胞模型。

2.2 实验分组及给药

实验分为对照组 (等量培养基)、模型组 (5 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 100 μl)、益肾化浊中药组 (5 $\mu\text{mol/L}$ $A\beta_{25-35}$ 100 μl + 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 益肾化浊方 100 μl), 常规消化细胞, 计数后以细胞密度每毫升 2×10^5 个 (每孔 2 ml) 接种于 6 孔板, 每组 5 个孔, 培养 48 h 后用于实验。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 Western Blot 法检测神经胶质酸性蛋白 (GFAP)、微管蛋白 (Tubulin) 和转录激活子 3 (STAT3)、磷酸化转录激活子 3 (P-STAT3)、Smad1 蛋白表达 体外培养 48 h 后收集各组细胞, 采用核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒抽提总蛋白质, 依照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度, 先后经电泳、转膜、封闭、一抗 GFAP (1 : 1000)、STAT3 (1 : 1000)、P-STAT3 (1 : 1000)、Smad1 (1 : 1000)、Tubulin (1 : 500)、 β -Actin (1 : 250) 孵育、二抗孵育、曝光成像, 使用 Image J (v2.1.4.7, National Institutes of Health) 分析各条带光密度值与 β -Actin 灰度比值作为蛋白的相对表达丰度。

2.3.2 RT-PCR 法检测 GFAP、STAT3、Smad1、Tubulin 基因的表达 按照 Trizol 试剂盒提取总 RNA, 紫外分光光度计检测吸光度 A 值 (A_{260}/A_{280} 应大于 1.8), 经预变性、DNA 变性、引物退火、引物延伸循环, 在 Taq 酶 (72°C 左右) 的作用下, 以 dNTP 为原料, 从引物的 5'端 $\rightarrow$ 3'端延伸, 合成与模板互补的 DNA 链。采用 PCR 仪扩增, 循环完成后 72°C 继续延伸 10 min。引物合成由上海欧易生物医学科技有限公司完成: GFAP (105bp), 上游: TCAATGACCGCTTTGCTAGC, 下游: TGCAAAGTTGTCCCTCTCCA; STAT3 (155bp), 上游: CATGCTGACCAATAACCCCA, 下游: CCAGCCATGTTTCTTTGCA; Smad1 (183bp), 上游: ATGGA-CACGAACATGATGGC, 下游: CGGTTAACGTTG-GAGAGCAA; Tubulin (169bp), 上游: CTACCTCAG-GCATCTGCTATGT, 下游: GTCACACAGACTCGACT-TCACG; β -Actin (187bp), 上游: AGTGTGACGTTGA-CATCCGTA, 下游: CCAGAGCAGTAATCTCCTTCT。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计分析软件进行处理, 计量数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组数据间的比较采用单因素方差分析。

表 1 各组细胞 GFAP、STAT3、Smad1、Tubulin 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	GFAP	STAT3	Smad1	Tubulin
对照组	5	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.06
模型组	5	2.46 ± 0.33*	1.97 ± 0.45*	1.21 ± 0.17	0.75 ± 0.16*
益肾化浊中药组	5	1.14 ± 0.28 [△]	1.35 ± 0.25 [△]	0.89 ± 0.10 [△]	1.27 ± 0.19 [△]

注: GFAP, 神经胶质酸性蛋白; STAT3, 转录激活子 3; Tubulin, 微管蛋白; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

表 2 各组细胞 GFAP、STAT3、P-STAT3、Smad1、Tubulin 蛋白表达相对丰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	GFAP	STAT3	P-STAT3	Smad1	Tubulin
对照组	5	0.50 ± 0.15	0.51 ± 0.11	0.45 ± 0.13	2.10 ± 0.25	0.82 ± 0.02
模型组	5	2.51 ± 0.12*	1.52 ± 0.04*	2.30 ± 0.33*	2.20 ± 0.21	0.71 ± 0.01*
益肾化浊中药组	5	0.72 ± 0.18 [△]	0.67 ± 0.13 [△]	0.60 ± 0.16 [△]	1.66 ± 0.24 [△]	0.80 ± 0.03 [△]

注: GFAP, 神经胶质酸性蛋白; STAT3, 转录激活子 3; P-STAT3, 磷酸化转录激活子 3; Tubulin, 微管蛋白; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

3 结果

3.1 各组细胞 GFAP、STAT3、Smad1、Tubulin 基因表达比较

表 1 示, 与对照组比较, 模型组 GFAP、STAT3 基因表达显著增加, Tubulin 基因表达显著减少($P < 0.05$), Smad1 基因表达增加不明显($P > 0.05$); 与模型组比较, 益肾化浊中药组 GFAP、STAT3、Smad1 基因表达均显著下降, 而 Tubulin 基因表达显著增加($P < 0.05$)。

3.2 各组细胞 GFAP、STAT3、P-STAT3、Smad1、Tubulin 蛋白表达比较

表 2 示, 与对照组比较, 模型组 GFAP、STAT3、P-STAT3 蛋白表达均显著增加, Tubulin 蛋白表达显著减少($P < 0.05$), Smad1 蛋白表达无明显变化($P > 0.05$)。与模型组比较, 益肾化浊中药组 GFAP、STAT3、P-STAT3、Smad1 蛋白的表达均显著下降, 而 Tubulin 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。

4 讨论

阿尔茨海默病属中医学“呆病”“善忘”“不慧”等范畴, 认为年老体衰, 肾精亏虚, 五脏不足, 脑髓渐空, 痰浊上蒙, 瘀阻脑络为本病的基本病机^[9]。因此, 我们采用益肾化浊法补益肾精、化浊通络治疗本病, 益肾化浊方中制何首乌、女贞子补肝肾, 益精髓, 使脑髓得以充养; 淫羊藿、补骨脂壮肾阳, 温肾精, 以应“阴中求阳, 阳中求阴”之意; 石菖蒲化痰开窍、黄芪补气行血、川芎辛散上行, 三者合用化浊开窍, 切中病机。

β 淀粉样蛋白级联假说是 AD 发病机制的主流学说, 而星形胶质细胞在 $A\beta$ 级联假说中起关键作用, 并为直接作用点^[10]。星形胶质细胞主要由神经干细胞分化而来^[11], 以维持中枢神经系统的正常工作。AD 病理反应中 $A\beta$ 的生成增加和清除障

碍的不断加重, 星形胶质细胞逐渐呈现过度活化并继而产生各种不利影响, 如造成血脑屏障功能障碍、神经细胞死亡及神经炎性反应, 造成未损伤神经元的死亡^[12-13]。因此, 适当抑制神经干细胞向星形胶质细胞分化, 减轻其炎症反应, 促进其向神经元分化, 可能成为缓解 AD 进展的一种潜在治疗方式。神经干细胞向星形胶质细胞分化过程受 Notch 通路、BMP 家族信号通路和 JAK/STAT 通路等多条途径的共同调控, JAK/STAT 通路是将信号从细胞表面传递至细胞内部的最重要途径之一^[9], 只有在该通路被激活的情况下, 其他两条通路才能参与到神经干细胞向星形胶质细胞分化过程中^[14]。

本实验结果显示, 与模型组相比, 益肾化浊中药组 GFAP、STAT3、Smad1 基因和蛋白表达均显著下降, 而 Tubulin 基因和蛋白表达显著增加($P < 0.05$)。提示益肾化浊方抑制神经干细胞向星形胶质细胞分化的作用机制可能在于阻断了 JAK/STAT 信号转导通路中 STAT3 蛋白的磷酸化, 使其不能发生聚合成为同源或异源二聚体形式的活化的转录激活因子, 继而影响了 STAT 蛋白的激活, 使 STAT3 不能在转录共激活蛋白 p100 的作用下与 BMP 家族下游的转录因子 Smad1 结合, 形成 STAT3 : Smad1 : P300 复合体进入细胞核, 不能与星形胶质细胞特异性基因 GFAP 的启动子结合, 从而抑制了神经干细胞向星形胶质细胞方向分化, 同时促进其向神经元方向分化, 维持了神经干细胞微环境稳态。

综上所述, 益肾化浊方可通过抑制神经干细胞向星形胶质细胞过度分化, 减少神经元损伤, 并促进其向神经元分化, 其作用机制可能与调控 JAK/STAT 信号通路关键靶点有关, 为该方的临床应用提供了部分实验依据。

参考文献

- [1] HUANG J, CHEN YJ, BIAN WH, et al. Unilateral amyloid- β_{25-35} injection into the rat amygdala increases the expressions of aberrant tau phosphorylation kinases [J]. Chin Med J, 2010, 123(10): 1311-1314.
- [2] WRAY S, NOBLE W. Linking amyloid and tau pathology in Alzheimer's disease: the role of membrane cholesterol in A β -mediated tau toxicity [J]. J Neurosci, 2009, 29(31): 9665-9667.
- [3] HE F, GE W, MARTINOWICH K, et al. A positive auto-regulatory loop of JAK-STAT signaling controls the onset of astrogliogenesis [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(5): 616-625.
- [4] 傅凯丽, 林翠茹, 张玉莲, 等. “益肾化浊方”治疗轻度阿尔茨海默病 15 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2012, 44(8): 28-29.
- [5] 张玉莲, 崔远武, 周震, 等. 益肾化浊方对 SAMP8 小鼠学习记忆能力及海马神经元突触关键蛋白 CREB 的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(22): 1942-1946.
- [6] LÓPEZ-TOLEDANO MA, SHELANSKI ML. Neurogenic effect of beta-amyloid peptide in the development of neural stem cells [J]. J Neurosci, 2004, 24(23): 5439-5444.
- [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] 张玉莲, 周震, 韩文文, 等. 何首乌有效成分二苯乙炔苷对 $A\beta_{25-35}$ 诱导神经干细胞定向分化的影响 [J]. 中医杂志, 2014, 55(4): 323-327.
- [9] 傅喆喆, 黄宝康, 郑汉臣, 等. 补肾中药防治老年痴呆症研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2003, 14(1): 45-47.
- [10] SIMON AM, FRECHILLA D. Perspectives on the amyloid cascade hypothesis of Alzheimer's disease [J]. Rev Neurol, 2010, 50(11): 667-675.
- [11] TAGA T, FUKUDA S. Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation [J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2005, 28(3): 249-256.
- [12] 尹海燕. 针灸对 SAMP8 小鼠嗅球神经干细胞向胶质细胞分化的影响 [J]. 成都医学院学报, 2009, 4(3): 50-52.
- [13] AHLENIUS H, VISAN V, KOKAIA M, et al. Neural stem and progenitor cells retain their potential for proliferation and differentiation into functional neurons despite lower number in aged brain [J]. J Neurosci, 2009, 29(14): 4408-4419.
- [14] GE W, MARTINOWICH K, WU X, et al. Notch signaling promotes astrogliogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation [J]. J Neurosci Res, 2002, 69(6): 848-860.

Effects of *Yishen Huazhuo Fang* (益肾化浊方) on Directional Differentiation of Neural Stem Cells Based on JAK/STAT Signal Transduction Pathway

CUI Yuanwu¹, ZHOU Zhen¹, ZHANG Linlin¹, SONG Wanshan², HAN Wenwen¹, WANG Kai², ZHANG Yulian¹

(1. Second Affiliated Hospital, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300150; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study possible mechanism of *Yishen Huazhuo Fang* (益肾化浊方) to treat Alzheimer's disease. **Methods** The researchers extracted and cultured neural stem cells in vitro from Kunming mice with 14-day pregnancy. Then the researchers established neurovirulent cell models of Alzheimer's disease mediated by soluble $A\beta_{25-35}$ (5 μ mol/L) in differentiation system. Samples were divided into the control group (equivalent medium), the model group ($A\beta_{25-35}$, 100 μ l, 5 μ mol/L) and the Chinese medicine of *Yishen Huazhuo Fang* group ($A\beta_{25-35}$, 100 μ l, 5 μ mol/L + *Yishen Huazhuo Fang* 100 μ l, 0.1 μ g/ml). After conventional digesting those cells and counting, the researchers inoculated them in 6-hole plates according to cell density 2×10^5 /ml (2 ml in per hole) and cultured for 48 h. The researchers used western blot method to detect expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), microtubulin (Tubulin) and transcriptional activator 3 (STAT3), phosphorylated transcriptional activator 3 (P-STAT3) and Smad1 protein. They also used RT-PCR method to detect gene expression of GFAP, STAT3, Smad1 and Tubulin. **Results** Compared with the control group, expression of GFAP, STAT3 gene and protein and P-STAT3 protein in the model group significantly increased. However expression of Tubulin gene and protein significantly decreased ($P < 0.05$). Expression of Smad1 gene and protein unconspicuously increased ($P > 0.05$). Compared with the model group, expression of GFAP, STAT3, Smad1 gene and protein and P-STAT3 protein in the Chinese medicine of *Yishen Huazhuo Fang* group significantly decreased. However expression of Tubulin gene and protein significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** *Yishen Huazhuo Fang* may restrain neural stem cells from differentiation towards astrocytes through regulating expression of related proteins and gene in the JAK/STAT signaling pathway to delay the development of Alzheimer's disease.

Keywords Alzheimer's disease; *Yishen Huazhuo Fang* (益肾化浊方); β amyloid peptide; directional differentiation of cells; neural stem cells; astrocytes

(收稿日期: 2015-05-05; 修回日期: 2015-08-24)

编辑: 邓 媛