

·基础研究·

人参皂苷Rb1、Rg1对胎鼠体外神经干细胞促增殖分化作用的研究*

张 薇¹ 王大明¹ 谭 渊^{2,3} 黄志健^{2,3}

摘要

目的:探索人参皂苷Rb1、Rg1不同浓度对体外培养神经干细胞(neural stem cells, NSCs)增殖和分化的影响。

方法:对胎鼠大脑皮质源性NSCs进行体外培养、鉴定;用5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)掺入法测定不同浓度的人参皂苷Rb1、Rg1及对对照组(空白组)对NSCs增殖的影响,通过计算BrdU/DAPI比值,确定其促增殖的适宜浓度;荧光免疫细胞化学技术检测各组Tuj1、GFAP及DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)的表达,计算Tuj1/DAPI、GFAP/DAPI百分比,比较人参皂苷Rb1、Rg1对NSCs分化为神经元和神经胶质细胞的效率。

结果:①所培养的细胞经鉴定为NSCs后,增殖实验中除人参皂苷0.1μmol/L Rg1($P>0.05$)外,其余各组Rg1和Rb1的BrdU/DAPI比值均显著性增加($P<0.05$),Rb1和Rg1均能促进体外培养的NSCs增殖,其适宜浓度Rb1、Rg1分别为1μmol/L、10μmol/L。②人参皂苷Rb1(10μmol/L)组GFAP/DAPI百分比与对照组相比显著增高($P<0.05$),而人参皂苷Rg1组GFAP/DAPI百分比及两种人参皂苷Tuj1/DAPI比值与对照组相比无显著性差异($P>0.05$)。

结论:人参皂苷Rg1、Rb1在一定浓度范围内可促进体外NSCs增殖。Rb1能促进NSCs分化为星形胶质细胞。

关键词 神经干细胞;体外培养;人参皂苷Rb1、Rg1;增殖;分化

中图分类号:R329, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-11-1200-008

Effects of ginsenoside Rb1 Rg1 on promoting proliferation and differentiation of cultured neural stem cells/ZHANG Wei, WANG Daming, TAN Yuan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(11): 1200—1207

Abstract

Objective: To investigate the effects of ginsenoside Rb1, Rg1 with different concentrations on the proliferation and differentiation of NSCs in vitro.

Method: NSCs were isolated from the cerebral cortex of embryonic mice. The cells were cultured in vitro and identified by immunocytochemistry staining. The ginsenoside Rb1, Rg1 were co-incubated with NSCs at 0.1 μM, 1μM and 10μM respectively for 48 hours. The BrdU/DAPI ratio was calculated to detect the effect of ginsenosides on the proliferation of NSCs, which identified the most effective concentration for NSCs proliferation. After incubation with 10μM Rb1, for 5—7 days, the differentiation of NSCs into neurons and glial cells was determined by calculating the Tuj1/DAPI and GFAP/DAPI ratio using immunofluorescence staining.

Result: ①After the cultured cells were identified as neural stem cells,we performed proliferation experiment. We found that all ginsenosides obviously promoted the proliferation of NSCs ($P<0.05$) except a concentration of 0.1μmol/L Rg1($P>0.05$). ② The ginsenoside Rb1 promoted astrocytic differentiation compared with the control group($P<0.05$), while Rg1 had no effect on enhancing astrocytic differentiation ($P>0.05$). No effects on neuronal differentiation of NSCs were found in two ginsenosides treated groups.

Conclusion: Ginsenoside Rb1, Rg1 could promote the proliferation of NSCs in vitro at certain concentrations.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.11.005

*基金项目:浙江省金华市科技计划项目(2016-4-021)

1 浙江中医药大学附属金华市中医医院康复医学科, 浙江省金华市,321000; 2 澳门大学中药研究国家重点实验室; 3 澳门大学中华医药研究院

作者简介:张薇,女,副主任医师; 收稿日期:2016-06-01

Rb1 could promote astrocytic differentiation of NSCs.

Author's address Department of Rehabilitation, The Jinhua Hospital of TCM Affiliated of Zhejiang Chinese Medical University, Jinhua, 321000

Key word neural stem cells; in vitro culture; ginsenoside Rb1, Rg1; proliferation; differentiation

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的标志特征是在其体内以及体外有增殖能力,并能分化成不同形态的细胞,如神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞^[1]。NSCs对神经系统疾病的治疗,除了间接旁分泌作用,也可以直接进行神经细胞的补充。研究如何通过NSCs增殖并分化为特定神经细胞来补充缺失的细胞,使成体神经再生,即细胞移植是目前研究的热点问题。

神经干细胞移植由于伦理学方面的原因使供体来源受限,因此寻找药物,尤其是天然植物药对内源性NSCs的促增殖或分化将有更广阔的应用前景。越来越多的研究发现一些中草药,如当归、黄芪、红景天、人参等对神经系统疾病有积极的作用^[2],其机制包括抗炎、抗氧化、神经保护等。其中对人参及其有效成分人参皂苷治疗中枢神经系统疾病的研究在逐年增加。

人参是传统的补气中药,《神农本草经》记载:“人参补五脏,安精神,定魂魄,止惊悸,除邪气,明目,开心益智”,故人参有补元气、补脾肺、止渴、生津、安神、增智等功效。临床上常用于各种神经系统疾病的治疗,但人参中究竟是哪种活性成分起作用以及活性成分具体药理机制仍有待阐明。

人参皂苷是人参中的主要药理活性成分。目前认为该活性成分能影响新陈代谢、心血管功能,具有抗凋亡、抑制炎症反应、抗肿瘤以及改善局部脑缺血等药理活性^[3]。目前确认的人参皂苷化合物大约有40种^[4]。主要包括原人参二醇如Rb1、Rb2、Rb3、Rc、Rd、Rg3、Rh2、Rs1和原人参三醇如Re、Rf、Rg1、Rg2、Rh1,以及齐墩果酸类^[5],如Ro。有文献分别报导Rb1、Rg1对神经干细胞的增殖有促进作用^[6-7],但是他们二者对神经干细胞增殖的确切比较却尚未提及,以及它们在治疗神经系统类疾病中,是否仅因促进神经干细胞增殖而起作用也未提及。

因此,本研究观察中药人参皂苷中原人参二醇中具代表性的Rb1和原人参三醇中具有代表性的Rg1对胎鼠皮质区原代NSCs体外促增殖和分化的

作用效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

研究所需实验动物C57BL/6 SPF级小鼠由澳门大学中华医药研究院动物中心提供,所有动物实验均遵循澳门大学中华医药研究院及澳门大学中药研究国家重点实验室伦理委员会制定的准则,切实保证实验动物福利并严格遵守动物实验伦理原则。

1.2 试剂、药品及实验仪器

1.2.1 试剂和药品: DMEM/ F-12 (1:1) basic (1X) (Gibco, USA) N-2 Supplement (100X) (Gibco, USA), B-27 Supplement (50X) (Gibco, USA), bFGF (Recombinant HuMan FGF-basic) (Peprotech, USA), EGF (Recombinant HuMan EGF) (Peprotech, USA), FBS (fetal bovine serum) (Gibco, USA), Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, 加拿大), Poly-L-lysine (PLL), (Sigma, USA), Laminin (Sigma, USA), PFA (Paraformaldehyde) (多聚甲醛) (Boster, 中国), DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (Gibco, USA), BSA (Cellmaxx Bovine Albumol/Lin) (牛血清白蛋白) (Mpbio, 中国), Goat Serum (Gibco, USA), TritonTXM-100 (Sigma, USA), 5-BrdU (MCE, USA) Anti-Mouse-BrdU (Millipore, USA), Anti-Mouse-Nestin (Millipore, USA), Anti-Mouse-Tuj1 (Sigma, USA), Anti-Mouse-GFAP (Sigma, USA), A-M488, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, USA), A-M568, Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, USA), DAPI (Santa Cruz, USA), HCl (37% 盐酸) (润德, 滨州), 四硼酸钠 (99.5%) (嘉诚, 辽宁), 人参皂苷Rg1单体(纯度≥98%) (曼思特, 成都), 人参皂苷Rb1单体(纯度≥98%) (曼思特, 成都)。

1.2.2 主要实验仪器: 荧光显微镜 (ZEISS), 解剖显微镜 (Leica), 生物安全柜 (Thermo Fisher), 细胞培养箱 (Thermo), 离心机 (ZONKIA), 细胞分析仪

2000(General Electric Company)。

1.3 NSC的分离培养和传代方法

1.3.1 神经干细胞培养:颈椎脱臼法处死孕鼠(孕12—13d)。用75%的乙醇消毒腹部,无菌条件下,打开腹部,获得带有子宫的胚胎。将带有子宫的胚胎转移至预先装有4℃ DPBS的10cm培养皿中,将胚胎逐个分离并转移到预先装有4℃ DPBS的6cm培养皿中。在解剖显微镜下,剥离胎鼠大脑脑膜并分离胎鼠大脑皮质。将分离的大脑皮质转移到1.5ml离心管中,离心管内有预冷的神经干细胞完全培养基。用移液枪头把悬浮液中的大脑皮质轻柔吹散成单细胞。用10ml细胞培养基重悬细胞,把细胞悬浮液接种在T25 cm²培养瓶中,置入37℃ 5%CO₂培养箱中,摇晃培养瓶使细胞分布均匀。神经球在2—3天后形成,每隔3天半量更换细胞培养基,直到神经球扩大到合适大小。

1.3.2 神经干细胞的传代和维持。培养皿的准备:细胞培养皿由多聚赖氨酸(poly-L-lysine, PLL)涂覆2h,室温。用吸引器吸弃多余的PLL,并用无菌水清洗培养皿2次。然后用层粘连蛋白(laminin)涂覆培养皿4h,室温。

神经球的传代与纯化^[8]:将含悬浮神经球的培养基全部吸入15ml离心管中,静置2min,室温。弃上清,上清中含有未成神经球的各种杂细胞,加5ml DPBS洗涤细胞,离心1000r/min,3min,室温。弃上清,加入0.05%胰蛋白酶1ml消化神经球,3—4min,37℃,每隔2min轻晃一下离心管。添加1ml终止消化培养基(含0.1% FBS培养基)以终止胰蛋白酶反应。离心1000r/min,5min,室温。弃上清,用移液枪头吸入适量神经干细胞培养基,把神经球吹散成单细胞。加入1ml神经干细胞培养基重悬细胞,缓慢吹打使细胞均匀分布。

贴壁神经干细胞的传代^[8]:提前制备一定数量包被好的细胞培养皿,室温放置将先前准备的神经干细胞培养基、DPBS、0.05%胰蛋白酶,从4℃冰箱取出,放于室温(或者放于37℃水浴箱内)预热。将NSCs培养皿从培养箱内取出,相差显微镜下作常规观察,确认NSCs细胞应生长良好,大部分贴壁,细胞覆盖培养皿90%以上的底面积。将NSCs培养皿内的液体吸出、弃去,用DPBS清洗一遍。加入

0.05%胰蛋白酶1ml,37℃消化作用2min,显微镜下可见大部分细胞变圆有些飘起。添加1ml终止培养基(0.1% FBS/培养基)终止胰蛋白酶的消化,适度吹打(视消化程度,至看不到明显的大细胞团块为止)。离心1000r/min,3min,室温。弃上清液,加DPBS适度吹打。离心1000r/min,3min,室温。加入1ml神经干细胞培养基重新悬浮细胞。

1.4 神经干细胞的鉴定

1.4.1 神经干细胞的标志——巢蛋白(Nestin)表达的检测:细胞传代后以 3×10^4 个/孔密度接种在预先包被过PLL/Laminin的24孔板中,神经干细胞培养基培养12h以上,即可鉴定。Nestin抗体按说明书所要求的工作浓度(1:200)进行稀释,用细胞免疫荧光化学染色的方法对Nestin表达进行检测。

1.4.2 NSC分化能力检测:细胞传代后以 2×10^4 个/孔密度接种在预先包被过的24孔板中,神经干细胞培养基培养12h以上。弃原培养液,用每1ml DMEM/F-12洗涤细胞1次,以洗去残留的EGF和bFGF。换用分化培养基培养细胞5—7d,中间每隔2d换一次培养基。免疫荧光化学染色标记细胞:TUJ-1/GFAP分别被用作标记分化的神经元和星形胶质细胞。使用荧光显微镜观察细胞及IN CELL2000拍摄照片。

1.5 人参皂苷Rb1、Rg1与神经干细胞促增殖

细胞传代后接种在预先包被过的24孔板中,神经干细胞培养基至少培养12h以上。吸弃原培养基,用每孔1ml DMEM/F-12洗涤细胞2次,以洗去残留的EGF和bFGF。以去除生长因子EGF和bFGF的空白组(DMEM/F-12,N-2,B-27)作为对照组,实验组在对照组培养基的基础上分别加入0.1μmol/L、1μmol/L、10μmol/L三种浓度的人参皂苷Rb1、Rg1与NSCs共培养,37℃、5% CO₂培养箱中培养48h后,进行BrdU染色检测,将两种人参皂苷不同浓度组与对照组比较,分别计算BrdU/DAPI比值,分析对NSCs增殖的作用影响(在预实验中曾探索100μmol/L浓度,因细胞存活率低故在此次研究中未选取)。每种皂苷的每一种浓度均设有三个复孔,每次实验重复3遍。

1.6 人参皂苷Rb1、Rg1与神经干细胞促分化

分别选取人参皂苷Rb1、Rg1各10μmol/L联合

1% FBS 诱导分化 NSCs 5—7d, 选取单纯用 1% FBS 诱导分化 NSCs 作为对照组, 免疫荧光化学染色标记细胞: TUJ-1/GFAP 分别被用作标记分化的神经元和星形胶质细胞, 分别计算 Tuj1/DAPI、GFAP/DAPI 比值, 比较人参皂苷 Rb1、Rg1 单体对 NSCs 的分化神经元、星形胶质细胞的效率。

1.7 统计学分析

计量资料采用单因素方差分析, 数据以均数 $\pm$ 标准差表示, 处理采用 SPSS 22.0 软件。

2 结果

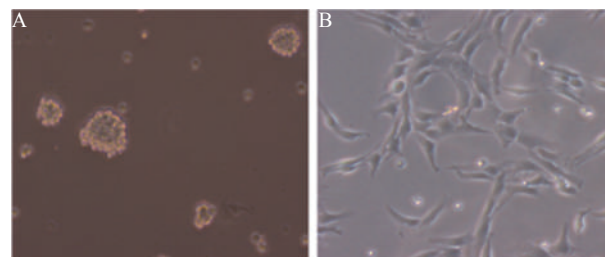
2.1 NSCs 的培养

将 12.5d 孕鼠处死, 取出胎鼠大脑, 去脑膜, 获取小鼠大脑皮质, 消化成单细胞, 一开始以悬浮神经球培养的方式进行扩增培养与纯化(图 1A), 然后进行神经干细胞单层贴壁培养(图 1B)并进行后续实验。

2.2 NSCs 的鉴定

在含 EGF, bFGF 等生长因子培养基的培养下,

图1 神经干细胞培养 (200 $\times$)

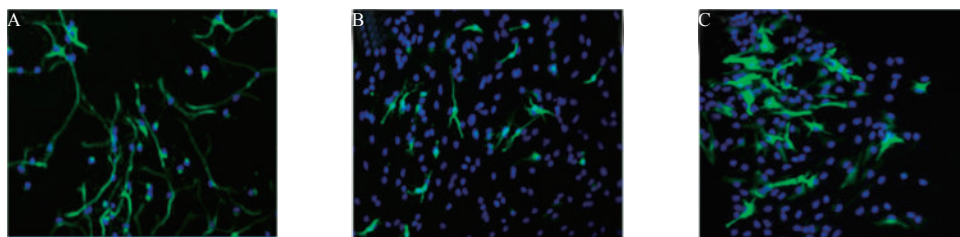


悬浮培养的神神经球

单层贴壁培养的神经干细胞

大多数细胞显示小细胞体伴有双极或多极形态并具有 Nestin, Nestin 是 NSCs 的标记物, 其中绿色为 Nestin 阳性标记, 蓝色为 DAPI 细胞核染(图 2A)。当神经干细胞培养基中的 EGF、bFGF 被 1% FBS 代替后, NSCs 开始分化。分化培养基培养 5 天后, NSCs 成功地分化成为 Tuj-1 标记的神经元(图 2B)和 GFAP 标记的星形胶质细胞(图 2C)。从而证明培养的是神经干细胞。

图2 神经干细胞鉴定 (200 $\times$)



(A)Nestin 阳性标记 NSCs;(B)NSCs 分化为 Tuj-1 标记神经元细胞;(C)NSCs 分化为 GFAP 标记星形胶质细胞

2.3 不同浓度的人参皂苷 Rb1、Rg1 对神经干细胞促增殖作用

采用 BrdU 免疫荧光染色法来研究人参皂苷 Rg1、Rb1 不同浓度对神经干细胞增殖的影响。通过不同人参皂苷不同浓度组和空白对照组的比较, 人参皂苷 Rb1 的 0.1 μ mol/L、1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 三组浓度 BrdU 染色的阳性细胞数所占百分比和对照组比较, 差异均有显著性意义。Rg1 的 1 μ mol/L 和 10 μ mol/L 两组浓度和对照组比较, 差异有显著性意义, 而 Rg1 的 0.1 μ mol/L 组和对照组比较, 差异无显著性意义。即人参皂苷 Rg1 除 0.1 μ mol/L 无明显促进作用外, 其他浓度各组及 Rb1 各组均显著性增加 BrdU 阳性细胞比例。人参皂苷 Rb1、Rg1 促进 NSCs

增殖的适宜浓度分别为 1 μ mol/L、10 μ mol/L, 而这两组相比, 1 μ mol/L 的 Rb1 对 NSCs 促增殖作用更强。

由于实验采用的 Nestin 和 BrdU 抗体均为鼠抗, 无法同时完成双标染色, 但在 NSCs 加入人参皂苷培养 48h 后(未加 1% FBS), 曾取对照组及各人参皂苷组进行 Nestin 和 DAPI 染色, 可见 Nestin 标记阳性的细胞形态均较正常培养的 NSCs 变得细长, 但 Nestin/DAPI 比值均大于 98%, 说明加入人参皂苷处理后及对照组的细胞仍为 NSCs, BrdU 标记的细胞只占其中一部分, 从而可以确定 BrdU 标记的细胞也是 NSCs, 也可以染上 NSCs 特异性标记: Nestin。见图 3, 表 1。

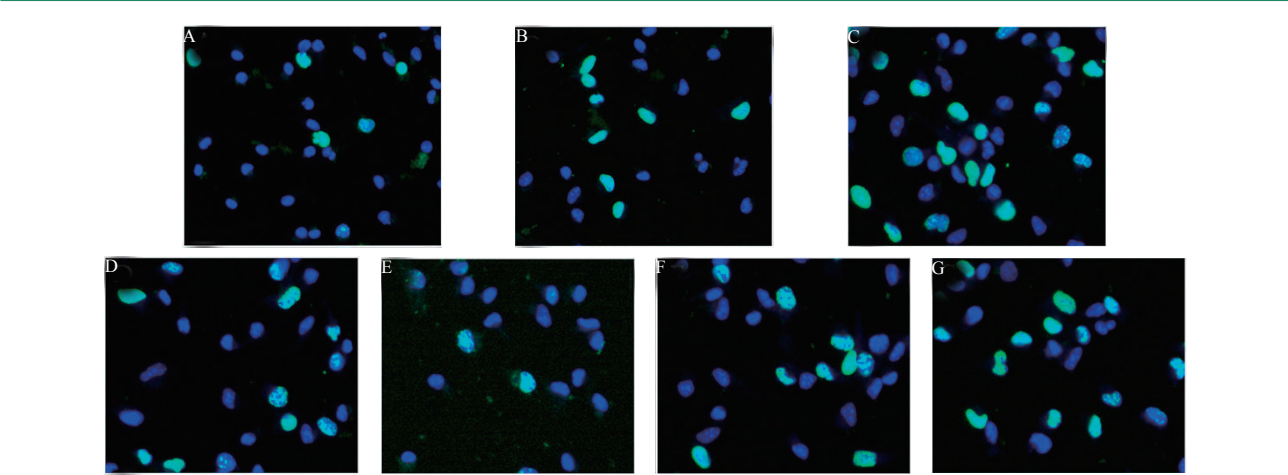
2.4 人参皂苷 Rb1、Rg1 对神经干细胞促分化作用

分别选取人参皂苷 Rb1、Rg1 各 10 μ mol/L 联合 1% FBS 诱导分化 NSCs 5—7d, 选取单纯用 1% FBS 诱导分化 NSCs 作为对照组, 分别计算 Tuj1/DAPI、GFAP/DAPI 比值, 比较人参皂苷 Rb1、Rg1 单体对 NSCs 的分化神经元、星形胶质细胞的效率。其中人参皂苷 Rb1、Rg1 组和空白对照组比较, Tuj1/DAPI 比值比较无显著性差异, 未发现人参皂苷

Rb1、Rg1 对 NSCs 分化为神经元细胞有促进作用 (图 4)。

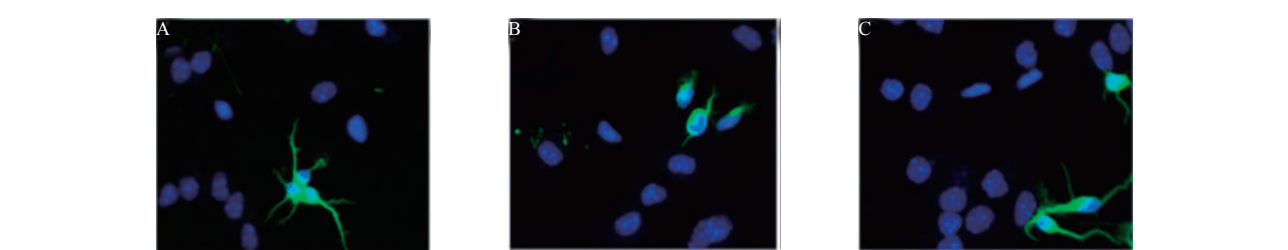
人参皂苷 Rb1、Rg1 组和对照组比较, 发现人参皂苷 Rg1 组 GFAP 阳性细胞比例明显增高, 可证实人参皂苷 Rg1 可促进 NSCs 分化为星形胶质细胞, 而在本实验中没有检测到人参皂苷 Rb1 对 NSCs 分化为星形胶质细胞有促进作用 (图 5)。见表 2。

图3 不同浓度 Rb1 和 Rg1 对 NSCs 促增殖的作用 (荧光染色, 400 $\times$)



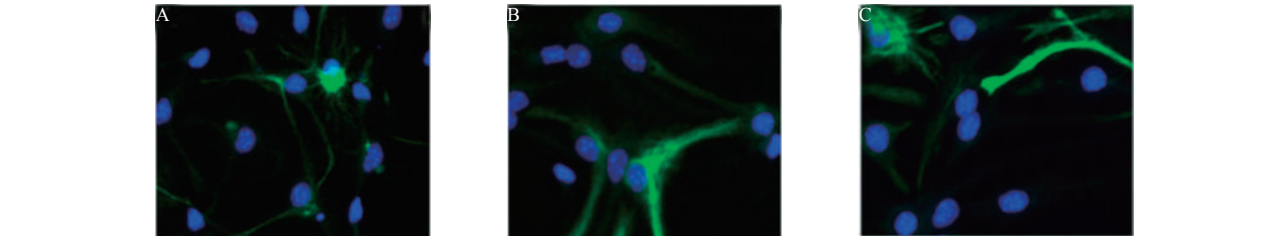
(A)代表对照组的 BrdU 荧光染色的显微图片。(B)(C)(D)分别代表人参皂苷 Rb1 的 0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L 三种浓度的 BrdU 荧光染色的显微图片。(E)(F)(G)分别代表人参皂苷 Rg1 的 0.1 μ mol/L、1 μ mol/L、10 μ mol/L 三种浓度的 BrdU 荧光染色的显微图片。其中绿色为 BrdU 阳性标记, 蓝色为 DAPI 细胞核染。

图4 人参皂苷 Rb1、Rg1 对神经元分化的作用 (Tuj1 染色, 400 $\times$)



(A)代表对照组的 Tuj1 染色图片。(B)(C)分别代表人参皂苷 Rb1、Rg1 处理后 Tuj1 染色的图片。其中蓝色为 DAPI 细胞核染, 绿色为 Tuj1 阳性细胞标记。Tuj1 阳性细胞形态呈圆形或椭圆形, 带有一个或多个突起, 符合神经元形态。

图5 人参皂苷 Rb1、Rg1 对星形胶质细胞分化的作用 (GFAP 染色, 400 $\times$)



(A)代表对照组 GFAP 染色图片。(B)(C)分别代表人参皂苷 Rb1、Rg1 处理后 GFAP 染色的图片。其中蓝色为 DAPI 细胞核染, 绿色为 GFAP 阳性细胞标记。GFAP 阳性细胞形态呈星形, 胞体发出许多长而分支的突起。

表1 不同浓度人参皂苷 Rb1、Rg1 对 NSCs 促增殖的作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BrdU ⁺ cell(%)
对照组	25.61±2.25
Rb1 0.1μmol/L 组	28.66±2.73 ^①
Rb1 1μmol/L 组	38.00±2.35 ^{②③}
Rb1 10μmol/L 组	33.55±3.60 ^②
Rg1 0.1μmol/L 组	27.39±3.73
Rg1 1μmol/L 组	33.35±2.73 ^②
Rg1 10μmol/L 组	33.46±3.94 ^{②③}

BrdU⁺ cell(%)表示计数增殖细胞占总细胞数的百分比, BrdU⁺ cell(%)=(BrdU 标记细胞数/DAPI 标记细胞数)×100%。每组三孔, 每组实验重复三遍。每孔随机选取 16 个视野进行细胞计数。实验组与对照组比较: ① $P < 0.05$; ② $P < 0.01$; Rb1 与 Rg1 比较: ③ $P < 0.05$

表2 人参皂苷 Rb1、Rg1 对 NSCs 促分化作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Neurons Tuj1 ⁺ (%)	Astrocytes GFAP ⁺ (%)
对照组	11.73±2.16	10.89±3.22
Rb1 10μmol/L 组	11.84±2.17	16.73±9.04 ^①
Rg1 10μmol/L 组	11.78±3.27	14.73±4.07

Neurons Tuj1⁺(%)表示计数分化神经元细胞占总细胞数的百分比, Neurons Tuj1⁺(%)=(Tuj1 标记细胞数/DAPI 标记细胞数)×100%。Astrocytes GFAP⁺(%)表示计数分化胶质细胞占总细胞数的百分比, Astrocytes GFAP⁺(%)=(GFAP 标记细胞数/DAPI 标记细胞数)×100%。每组三孔, 每组实验重复三遍。每孔随机选取 16 个视野进行细胞计数。实验组与对照组比较: ① $P < 0.05$

3 讨论

实验中用胎鼠大脑皮质分离培养的 NSCs, 通过荧光免疫细胞化学技术对其进行鉴定, 可观察到培养的细胞 Nestin 表达阳性, 将分离培养的细胞经血清诱导分化后, 可表达神经元和星形胶质细胞, 说明所培养的细胞具有多能性, 符合 NSCs 的特性。将本实验所培养的单层贴壁 NSCs 连续传代到第 10 代后, 相差显微镜下未发现细胞形态有明显改变, 免疫荧光染色 Nestin 表达仍然具有高比例阳性, 表明本实验培养 NSCs 的条件具有很好的维持 NSCs 自我更新与多向潜能的特点。

目前关于 NSCs 的增殖研究, 大部分集中于细胞因子对 NSCs 的影响^[9]。生长因子可以影响 NSCs 分化形成神经系统的各类细胞。如碱性成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor, FGF-2)在胚胎早期维持 NSCs 的生存, 并促进其增殖和分化^[9]。

神经表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)在发育较晚期促使 NSCs 增殖和分化, 并且仅对胶原祖细胞起作用。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、胰岛素样生长因子 1(insulin-like growth factors, IGF1)主要促进祖细胞向神经元方向分化。为了评估 NSCs 分化能力, 通常将细胞种植于多聚赖氨酸和层粘连蛋白共包被^[10]或基质胶单包被的细胞培养板中, 并以不同浓度的胎牛血清或者加入某些分化因子如全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)诱导其分化^[11]。

BrdU 是胸腺嘧啶的衍生物, 常用于标记活细胞中新合成的 DNA, 可代替胸腺嘧啶选择性整合到复制细胞中新合成的 DNA 中(细胞周期 S 期)。这种掺入可以稳定存在, 随着 DNA 复制进入子细胞中。BrdU 特异性抗体可以用于检测 BrdU 的掺入, 从而判断细胞的增殖能力^[12]。本试验通过 BrdU 对这两种皂苷不同浓度组和去生长因子(EGF、bFGF)的对照组比较, 发现除 0.1μmol/L 人参皂苷 Rg1 对 NSCs 增殖无明显促进作用外, 其他各组均对 NSCs 有不同程度促增殖作用。虽然郑玉芹等^[6]发现一定浓度范围内的人参皂苷 Rb1 对体外分离培养胎鼠皮质 NSCs 增殖有促进作用, 并发现 1μmol/L 的 Rb1 是促进 NSCs 增殖的最佳浓度, 庄朋伟等^[13]研究人参皂苷 Rg1 能显著增加 NSCs 的 BrdU 细胞数。但以上研究大多是单个实验, 尚缺乏对两种较具活性的人参皂苷间的比较。如能在同等条件下, 集中研究两种人参皂苷对 NSCs 促增殖和分化的作用, 探索出其中哪种人参皂苷的哪个浓度对体外 NSCs 相对更有增殖效果及分化能力, 就可为配合后续细胞移植的成功性提供更多实验依据。本研究正是在同等条件下探索出人参皂苷 Rb1、Rg1 促进 NSCs 增殖的适宜浓度分别为 1μmol/L、10μmol/L, 而这两者相比, 1μmol/L 的 Rb1 对 NSCs 促增殖作用更强。这个筛选结果为今后研究 NSCs 从体外转到体内的增殖、细胞移植后的存活以及选择人参皂苷的种类、浓度提供实验基础, 同时今后也可在此基础上进一步探讨其可能的作用机制。

NSCs 移植的前期基础, 不仅和细胞增殖相关, 还包括活性成分对干细胞分化的影响, 因为在细胞移植早期, 增殖和分化是必不可少的, 有时也是密不

可分的。人参皂苷不仅可促进 NSCs 的增殖,还可促进其分化,同样可用荧光免疫细胞化学技术检测。通过对照组和不同人参皂苷组的比较,发现人参皂苷 Rb1 组 GFAP 阳性细胞比例明显增高,由此可证实人参皂苷 Rb1 可促进 NSCs 分化为星形胶质细胞。同时,本实验中人参皂苷 Rb1、Rg1 组和对照组比较,Tuj1 阳性细胞比例没有明显增高,未发现人参皂苷 Rb1、Rg1 对 NSCs 分化为神经元细胞有促进作用,这可能和选取的皂苷浓度以及不同实验室条件和实验操作手法等有关。因有报道星形胶质细胞在大脑中可起支持和分隔神经细胞的作用^[14],所以 Rb1 有可能在支持和分隔神经细胞方面发挥作用。有学者发现将星形胶质细胞作为治疗脑卒中的靶细胞,对其进行一定的保护或者刺激,不仅可在前期减少缺血缺氧对大脑造成的损伤,减少神经细胞死亡,更可促使星形胶质细胞获得干细胞特性向神经元分化,进行更加全面且安全的神经修复^[15]。有研究将星形胶质细胞移植入帕金森病(Parkinson's disease, PD)模型大鼠纹状体后,PD 症状得到改善,提示星形胶质细胞可能在保护多巴胺神经元方面发挥重要作用,星形胶质细胞也可能作为 PD 细胞替代治疗的重要细胞来源^[16]。本分化结果也为将来传统中医药结合 PD 细胞替代治疗提供实验基础。

人参在临床上应用极为广泛,常配伍各种中药组成不同的方剂治疗循环、呼吸、消化、内分泌、生殖及神经系统等疾病。如常配伍当归、酸枣仁、龙眼肉等组成归脾汤治疗心脾两虚之心神不安、失眠多梦等;配蛤蚧组成人参蛤蚧散用于肺气亏虚之呼吸短促、动则气喘等;配伍白术、茯苓、炙甘草组成四君子汤应用于脾气不足之食欲不振、上腹痞满等;加麦冬、五味子构成生脉散治疗气阴两虚之口渴多汗、气虚脉弱等。更有单用本品大量浓煎即独参汤用于大失血吐泻及所有元气虚极欲脱之证。该研究提示中药已经在心肌细胞替代治疗方面发挥作用,结合本实验人参皂苷体外促 NSCs 增殖和分化的结果,为进一步推动人参相关汤剂在 NSCs 移植研究及神经系统细胞替代治疗提供实验依据。

临床大量研究证实,人参皂苷对多种神经系统疾病包括帕金森病、阿尔茨海默病、卒中等都有神经保护作用。NSCs 固有的生物学特性为各种神经障

碍性疾病提供新的治疗方案,特别对缺血性脑卒中及神经退行性疾病等。本研究成功在体外分离及培养胎鼠神经干细胞,同时证实人参皂苷 Rg1、Rb1 不同浓度对神经干细胞增殖分化的影响,进而为其是否能促进成体神经再生,以及神经功能的修复与重建建立实验基础,这也有望为缺血性脑损伤及其他神经退行性疾病的中药治疗开辟新途径。但其作用机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Vishwakarma SK, Bardia A, Tiwari SK, et al. Current concept in neural regeneration research: NSCs isolation, characterization and transplantation in various neurodegenerative diseases and stroke: A review[J]. J Adv Res, 2014, 5(3): 277—294.
- [2] Si YC, Li Q, Xie CE, et al. Chinese herbs and their active ingredients for activating xue (blood) promote the proliferation and differentiation of neural stem cells and mesenchymal stem cells[J]. Chinese Medicine, 2014, 9(1):13.
- [3] Ni N, Liu Q, Ren H, et al. Ginsenoside Rb1 protects rat neural progenitor cells against oxidative injury[J]. Molecules, 2014, 19(3):3012—3024.
- [4] Zhou W, Li J, Li X, et al. Development and validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative determination of ginsenosides Rb1, Rd, F2, and compound K during the process of biotransformation of ginsenoside Rb1[J]. J Sep Sci, 2008, 31(6—7):921—925.
- [5] Kim HJ, Kim P, Shin CY. A comprehensive review of the therapeutic and pharmacological effects of ginseng and ginsenosides in central nervous system[J]. J Ginseng Res, 2013, 37(1):8—29.
- [6] 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,(03):273—279.
- [7] 周志焕,王秀云,钟佩茹,等.人参皂苷 Rg1 对体外培养胚胎神经干细胞增殖作用的影响[J].中国中医药信息杂志,2010,17(2): 28—30.
- [8] Walker TL, Kempermann G. One mouse, two cultures: isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice[J]. J Vis Exp, 2014, (84):e51225.
- [9] Nam H, Lee KH, Nam DH, et al. Adult human neural stem cell therapeutics: Current developmental status and prospect[J]. World J Stem Cells, 2015, 7(1):126—136.
- [10] He L, Tang S, Prabhakaran MP, et al. Surface modification of PLLA nano- scaffolds with laminin multilayer by LbL assembly for enhancing neurite outgrowth[J]. Macro-

- mol Biosci, 2013, 13(11):1601—1609.
- [11] 钟德君,张德盛,宋跃明.全反式维甲酸对鼠胚神经干细胞增殖和分化的作用[J].中国修复重建外科杂志,2008,22(2):206—211.
- [12] 朱茜,赵云鹤,刘雪芹,等.BrdU标记法检测不同年龄阶段小鼠神经前体细胞的增殖潜能[J].中国组织工程研究,2012,16(6):994—997.
- [13] 庄朋伟,张艳军,庞坦.人皂苷Rg1促进体外培养神经干细胞增殖的研究[J].中国中药杂志,2009,(04):443—446.
- [14] Shi Q, Hao Q, Bouissac J, et al. Ginsenoside-Rd from *Panax notoginseng* enhances astrocyte differentiation from neural stem cells[J]. Life Sci, 2005, 76(9):983—995.
- [15] 杜静,王建武,胡汉通,等.星形胶质细胞:治疗脑卒中的靶细胞[J].中华针灸电子杂志,2015,4(6):289—292.
- [16] 孙艳芸.星形胶质细胞FEZ1对帕金森病神经修复作用的研究[D].苏州:苏州大学,2013.

(上接第1199页)

- ic Area[J].Molecular Medicine Reports,2015,12:4441—4447.
- [8] Feng Z, Zhong YJ, Wang L, et al. Resuscitation therapy for traumatic brain injury-induced coma in rats: mechanisms of median nerve electrical stimulation[J].Neural Regeneration Research,2015,10(4):594—598.
- [9] 黄强,戴伟民.重型颅脑损伤昏迷患者持续右正中神经刺激促进复苏的临床研究[J].中国临床神经科学,2011,19(3):314—316,320.
- [10] 许袁琦,杨仪,郝丽君,等.脑梗死伴失语症的SPECT/CT脑血流灌注断层显像和MRI的对比分析[J].苏州大学学报(医学版),2012,32(4):550—551.
- [11] Cooper EB, Cooper JB. Electrical treatment of coma via the median nerve[J]. Acta Neurochir Suppl,2003,87:7—10.
- [12] Yoshifumi H, Ukitaka U. A case of successful treatment by median nerve stimulation for prolonged moderate consciousness disturbance[J]. The Society for Treatment of Coma,2000,9:85—86.
- [13] 孙久荣主编.脑科学导论[M].北京:北京大学出版社,2001.124—126.
- [14] Arndt DH, Lerner JT, Matsumoto JH, et al. Subclinical early posttraumatic seizures detected by continuous EEG monitoring in a consecutive pediatric cohort[J]. Epilepsia, 2013, 54(10):1780—1788.
- [15] Young GB, McLachlan RS, Kreeft JH, et al. An electroencephalographic classification for coma[J]. Can J Neurol Sci, 1997,24(4):320—325.
- [16] 吴在德. 外科学[M]. 第5版. 北京:人民卫生出版社, 2002.289.
- [17] 文立,李善泉. 脑损伤生物学指标研究进展[J].国际神经病学神经外科学杂志,2006,33:577.
- [18] 李飞,张弘,翟洪建,等.51例昏迷患者的促醒临床观察[J].西南国防医药,2010,17(5):63.
- [19] 孙莉,董建梅,杨毅,等.多重感觉刺激对重型颅脑损伤昏迷的促醒作用[J].武警医学,2012,1(23):14—15.
- [20] 王广斌,谢丽君,吴贵平,等.右正中神经电刺激对重型颅脑损伤患者脑血流灌注影响的SPECT-CT观察[J].临床神经外科杂志,2014,11(2):137—139.
- [21] 朱宏伟. 深部脑刺激治疗病人持续植物状态[J].中国微侵袭神经外科杂志,2008,13(11):522—524.