

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.02.019

论著·实验研究

端粒酶激活对缺氧缺血大鼠神经干细胞生物学行为的影响

孟俊杰 李世平 赵凤艳 童煜 母得志 屈艺

(四川大学华西第二医院儿科 / 出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室 /
发育与妇儿疾病四川省重点实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探索神经干细胞端粒酶激活后,在缺氧缺血条件下其增殖与存活能力的变化。**方法** 将传代培养神经干细胞分为对照组、氧糖剥夺(OGD)组、OGD+高浓度环黄芪醇(CAG)组和OGD+低浓度CAG组。高、低浓度CAG组分别加入终浓度为25 μM和10 μM的CAG;除对照组外,其余各组进行OGD处理。Western blot检测细胞端粒酶逆转录酶(TERT)表达水平;TRAP法检测端粒酶活性;显微镜下计数细胞数目、测量神经球直径;化学发光法检测乳酸脱氢酶(LDH)活性;流式细胞术检测细胞增殖和凋亡情况。**结果** 与对照组相比,OGD处理后,神经干细胞数目减少,神经球直径缩小,凋亡细胞增多,细胞增殖率下降,存活率下降($P<0.05$);CAG作用后,神经干细胞TERT表达和端粒酶活性较对照组显著升高($P<0.05$);与OGD组比较,CAG作用后神经干细胞减少和神经球直径缩小程度明显减轻($P<0.05$),细胞增殖率升高,存活率升高($P<0.05$);不同浓度CAG作用效果无明显差异($P>0.05$)。在正常培养的神经干细胞中,与对照组相比,CAG作用能够提高神经干细胞TERT表达水平($P<0.05$),促进细胞数目增加和神经球直径增大($P<0.05$)。**结论** 缺氧缺血状态下,端粒酶激活能够显著促进神经干细胞的增殖与存活,CAG有望用于缺氧缺血后脑损伤的修复与治疗。**[中国当代儿科杂志, 2017, 19(2): 229-236]**

[关键词] 细胞增殖;细胞凋亡;端粒酶;神经干细胞

Effect of telomerase activation on biological behaviors of neural stem cells in rats with hypoxic-ischemic insults

MENG Jun-Jie, LI Shi-Ping, ZHAO Feng-Yan, TONG Yu, MU De-Zhi, QU Yi. Department of Pediatrics, West China Second University Hospital, Sichuan University/Key Laboratory of Birth Defects and Related Diseases of Women and Children, Ministry of Education/Key Laboratory of Development and Related Diseases of Women and Children, Chengdu 610041, China (Qu Y, Email: quyi712002@163.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of telomerase activation on biological behaviors of neural stem cells after hypoxic-ischemic insults. **Methods** The neural stem cells passaged *in vitro* were divided into four groups: control, oxygen-glucose deprivation (OGD), OGD+cycloastragenol (CAG) high concentration (final concentration of 25 μM), and OGD+CAG low concentration (final concentration of 10 μM). The latter three groups were subjected to OGD. Telomerase reverse transcriptase (TERT) expression level was evaluated by Western blot. Telomerase activity was detected by telomerase repeat amplification protocol (TRAP). Cell number and neural sphere diameter were measured under a microscope. The activity of lactate dehydrogenase (LDH) was examined by chemiluminescence. Cell proliferation rate and apoptosis were detected by flow cytometry. **Results** After OGD insults, obvious injury of neural stem cells was observed, including less cell number, smaller neural sphere, more dead cells, lower proliferation rate and decreased survival rate. In CAG-treated groups, there were higher TERT expression level and telomerase activity compared with the control group ($P<0.05$). In comparison with the OGD group, CAG treatment attenuated cell loss

[收稿日期] 2016-08-25; **[接受日期]** 2016-12-08

[基金项目] 国家自然科学基金(81330016; 81270724; 81501302); 四川省科技厅基金(2014SZ0149; 2016TD0002); 国家临床重点专科(儿科新生儿专业)建议项目(1311200003303)。

[作者简介] 孟俊杰,女,硕士研究生。

[通信作者] 屈艺,女,教授。

($P<0.05$) and neural sphere diameter decrease ($P<0.05$), promoted cell proliferation ($P<0.05$), and increased cell survival rate ($P<0.05$). Low and high concentrations of CAG had similar effects on proliferation and survival of neural stem cells ($P>0.05$). In the normal cultural condition, CAG treatment also enhanced TERT expression ($P<0.05$) and increased cell numbers ($P<0.05$) and neural sphere diameter ($P<0.05$) compared with the control group. **Conclusions** Telomerase activation can promote the proliferation and improve survival of neural stem cells under the state of hypoxic-ischemic insults, suggesting telomerase activators might be potential agents for the therapy of hypoxic-ischemic brain injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(2): 229-236]

Key words: Proliferation; Apoptosis; Telomerase; Neural stem cell

新生儿缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿期常见的疾病,可以造成远期神经系统损害,目前尚无特效疗法。神经干细胞是神经系统中一类具有自我更新功能的细胞,在胎儿和新生儿的神经系统中广泛存在。缺氧缺血损伤后,神经元等细胞数量减少,此时主要依赖神经干细胞进行增殖并分化来进行后期修复,因此促进神经干细胞增殖与存活对于神经系统功能修复有着重要的意义。

黄芪甲苷和环黄芪醇(cycloastragenol, CAG)是黄芪的主要有效成分,后者已被证实能够有效激发端粒酶活性^[1]。端粒酶是一种RNA依赖的DNA多聚酶,主要由端粒酶逆转录酶(telomerase reverse transcriptase, TERT)和端粒酶RNA组成,前者以后者为模板来合成DNA,从而维持端粒的长度^[2]。端粒酶在大多数肿瘤细胞和永生化细胞中都有活性;正常组织细胞则缺乏端粒酶活性。有研究表明,黄芪甲苷可以增加神经元的端粒酶活性,在动物模型上体现出抗凋亡作用;CAG在多种细胞如HEK293,成纤维细胞中体现了促进细胞增殖的作用^[3-9],但尚无对神经干细胞功能影响的研究报道。本研究选择大鼠神经干细胞进行氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)处理以模拟体内神经干细胞缺氧缺血的状态,探讨CAG对神经干细胞增殖能力的影响及可能的机制,为采用端粒酶激活剂治疗缺氧缺血脑损伤奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

CAG购于成都锦泰和医药化学技术有限公司;DMEM/F12-GLUMAX、B27、bFGF、青霉素/链霉素双抗(Life公司,美国);肝素钠、葡萄糖(Sigma公司,美国);大鼠TERT抗体(Milipore公司,美国);大鼠 β -actin抗体、山羊抗小鼠二抗、山

羊抗兔二抗(CST公司,美国);Annexin V-PI凋亡检测试剂盒、LDH试剂盒(江苏凯基公司);Edu试剂盒(广东锐博公司);端粒酶检测试剂盒(Roche公司,美国)。PCR仪、电泳仪(Bio-Rad公司,美国);倒置显微镜(Olympus公司,日本);多功能酶标仪(Thermofisher公司,美国)。

1.2 神经干细胞的培养以及分组

大鼠神经干细胞系L2.3由四川大学华西第二医院李赫东构建并馈赠^[10]。取相同代次(2~3代)的L2.3细胞,用含DMEM/F12-GLUMAX、2% B27、100 ng/mL bFGF、1 μ g/mL 肝素钠、25 mmol/L 葡萄糖、2% 青霉素/链霉素双抗的培养基,于37℃、20% O₂、10% CO₂的培养箱中培养,待细胞生长达70%~80%时传代。

为了探究CAG对正常培养的大鼠神经干细胞生物行为学的影响,将细胞密度调节为 1×10^5 /mL,分为对照组,高浓度CAG组和低浓度CAG组。高浓度CAG组加入终浓度为25 μ M的CAG,低浓度CAG组加入终浓度为10 μ M的CAG,CAG溶解于二甲基亚砜(DMSO),对照组只加入等量DMSO,于37℃、20% O₂、10% CO₂的培养箱中培养后在不同时间点收集各组细胞和培养基进行后续实验。

为了探究CAG对OGD后大鼠神经干细胞生物行为学的影响,将细胞密度调节为 1×10^5 /mL,分为对照组、OGD组、OGD+高浓度CAG组和OGD+低浓度CAG组。培养12 h后,高浓度CAG组加入终浓度为25 μ M的CAG,低浓度CAG组加入终浓度为10 μ M的CAG,CAG溶解于二甲基亚砜(DMSO)。将OGD组、高浓度CAG组、低浓度CAG组细胞重悬于不含糖的培养基中,置于37℃、1% O₂、10% CO₂的培养箱中培养;对照组只加入等量DMSO不进行OGD处理。OGD后在不同时间点收集细胞和培养基进行后续实验。

1.3 Western blot 法检测神经干细胞 TERT 蛋白的表达

正常培养和 OGD 后 24、48、72 h, 收集上述各组细胞, 每组平行设 3 个样本。加入 250 μ L 新鲜配制含蛋白酶抑制剂的裂解液。超声处理若干次后, 冰上静置 30 min 后用冰冻离心机以 14000 r/min 离心 30 min, 并收取上清液。使用 BCA 试剂盒测定并计算蛋白浓度。SDS-PAGE 每孔上样量为 30 μ g。电泳和转膜后使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2.5 h。使用 1 : 5000 稀释的小鼠抗大鼠 β -actin 和 1 : 1000 稀释的兔抗大鼠 TERT 一抗孵育条带, 4 $^{\circ}$ C 过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入 1 : 3000 稀释的山羊抗小鼠和山羊抗兔的二抗, 室温孵育 2 h。TBST 洗涤 2 次, 曝光后显示条带。用 Quantity One 分析条带, 结果以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值表示。实验重复 3 次。

1.4 TRAP 法检测端粒酶活性

OGD 后 24、48、72 h, 收集上述各组细胞, 每组平行设 3 个样本。按试剂盒说明书操作, 提取端粒酶并扩增端粒重复片段 TTAGGG, 扩增后的产物与地高辛标记的特异性探针杂交, 再用抗地高辛的抗体检测杂交产物, 最终将过氧化物酶与抗地高辛抗体结合显色, 通过检测吸光光度值评价端粒酶活性。实验重复 3 次。

1.5 细胞计数

正常培养和 OGD 后 24、48、72 h 收集上述各组细胞, 重悬于 1 mL PBS 中, 使用细胞计数板进行计数。实验重复 3 次。

1.6 倒置显微镜测量神经球直径

正常培养和 OGD 后 24、48、72 h 收集上述各组细胞, 每组平行设 3 个样本。在显微镜下拍照, 每组每个样本按照 12 点、3 点、6 点、9 点和中心 5 个位置选取视野拍照, 共取 50 个神经球进行观察, 采用 Image J 软件测量神经球直径。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测细胞增殖

正常培养和 OGD 后 24、48、72 h 收集上述各组细胞, 每组平行设 3 个样本, 检测细胞增殖率。实验步骤按照说明书进行操作, 以 1 : 5000 Edu 终浓度孵育过夜, 上流式细胞仪检测结果。实验重复 3 次。

1.8 化学发光法检测培养基中乳酸脱氢酶活性

OGD 后 24、48、72 h 收集上述各组细胞培养基, 每组平行设 3 个样本。按照试剂盒说明书要求, 将 20 μ L 培养基与乳酸反应后再和 2,4- 硝基苯肼反应生成棕红色丙酮酸二硝基苯腙, 通过检测吸光度判断乳酸脱氢酶 (LDH) 活力。实验重复 3 次。

1.9 流式细胞术检测 OGD 后细胞凋亡情况

OGD 后 24、48、72 h, 使用不含 EDTA 的胰酶消化后, 收集上述各组细胞, 每组平行设 3 个样本。按照试剂盒说明书进行 Annexin V-PI 双染色, 使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。实验重复 3 次。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。不符合正态分布的数据采用中位数 (四分位间距) [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$] 表示, 多组间比较采用 Jonckheere-Terpstra 检验, 组间两两比较采用 Jonckheere-Terpstra test followed by stepwise step-down comparisons 方法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 CAG 对 TERT 表达的影响

不同浓度 CAG 处理正常培养的细胞 24 h 时, 各组 TERT 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 48 h 时低浓度组 TERT 表达水平显著高于对照组和高浓度组 ($P < 0.05$); 72 h 时高浓度和低浓度 CAG 组 TERT 表达水平均高于对照组 ($P < 0.05$), 且 TERT 表达水平在高浓度和低浓度 CAG 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1, 表 1)。经 OGD 处理后, 不同浓度 CAG 处理 OGD 细胞 24 h 时, 低浓度 CAG 组 TERT 表达水平高于对照组 ($P < 0.05$); 48 h 及 72 h 各组 TERT 表达水平差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 1, 表 2)。

2.2 不同浓度 CAG 对 OGD 后神经干细胞端粒酶活性的影响

不同浓度 CAG 处理 OGD 细胞, 其中低浓度 CAG 组在 48 h, 高浓度和低浓度 CAG 组在 72 h 端粒酶活性均高于对照组 ($P < 0.05$), 见表 3。

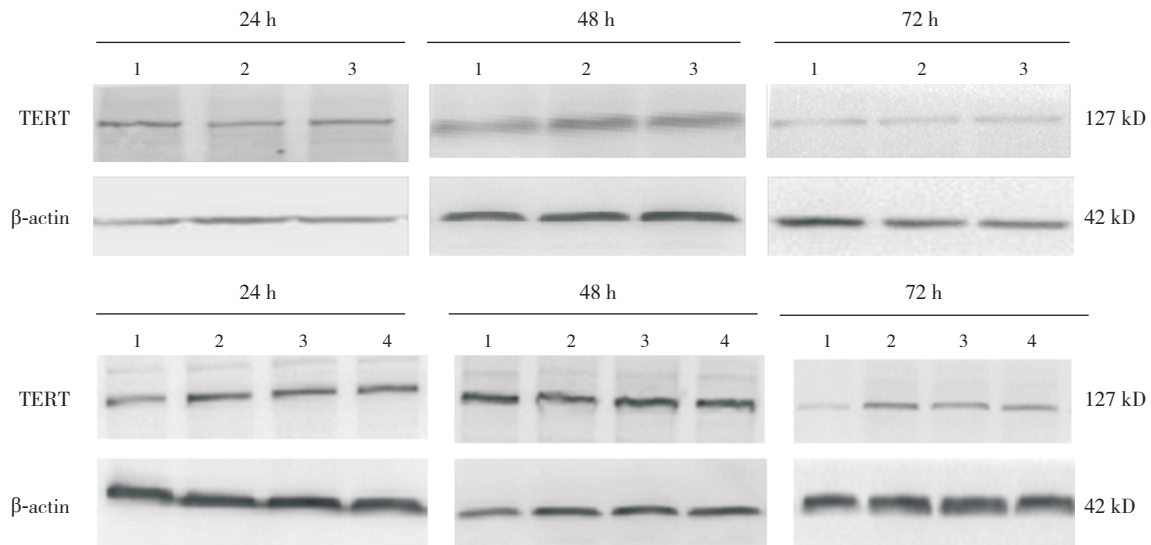


图1 Western blot 检测 CAG 对 TERT 表达的影响 上图为 CAG 在正常培养条件下对 TERT 表达的影响；1: 对照组, 2: 高浓度 CAG 组, 3: 低浓度 CAG 组。下图为 CAG 在 OGD 处理条件下对 TERT 表达的影响；1: 对照组, 2: OGD 组, 3: OGD+ 高浓度 CAG 组, 4: OGD+ 低浓度 CAG 组。

表1 CAG 对正常培养神经干细胞 TERT 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	1	1	1
高浓度 CAG 组	3	1.38 ± 0.37	1.23 ± 0.67	1.67 ± 0.24 ^a
低浓度 CAG 组	3	1.61 ± 0.64	2.24 ± 0.69 ^{ab}	1.51 ± 0.38 ^a
F 值		1.57	8.13	5.36
P 值		0.28	0.02	0.046

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与高浓度 CAG 组比较, $P < 0.05$ 。

表2 CAG 对 OGD 后神经干细胞 TERT 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	1	1	1
OGD 组	3	1.46 ± 0.21	1.50 ± 0.35	1.13 ± 0.32
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	1.85 ± 0.22	2.11 ± 0.64	1.41 ± 0.30
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	2.18 ± 0.71 ^a	1.82 ± 0.45	1.57 ± 0.24
F 值		5.21	3.61	3.18
P 值		0.028	0.065	0.085

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表3 CAG 对端粒酶相对活性的作用 [$P_{50}(P_{25}, P_{75})$]

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	1	1	1
OGD 组	3	1.19(1.09,1.23)	1.00(0.99,1.02)	1.05(1.00,1.10)
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	1.03(1.01,1.15)	1.25(1.20,1.45)	2.08(2.14,2.21) ^a
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	1.34(1.27,1.50)	2.14(2.16,2.30) ^a	1.37(1.33,1.78) ^a
H 值		6.37	9.69	9.18
P 值		0.950	0.021	0.027

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 不同浓度 CAG 对神经干细胞数目的影响

正常培养状态下, 与对照组相比, CAG 可以促进神经干细胞数目增加, 在 48 h 和 72 h 效果较为显著 ($P < 0.05$), 不同浓度 CAG 组间比较神经干细胞数目差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 4)。在 OGD 处理的细胞中, 与 OGD 组相比, 低浓度 CAG 组细胞在 24 h 时神经干细胞数目增多 ($P < 0.05$); 而 48 h 和 72 h 时高浓度和低浓度 CAG 组细胞数目与 OGD 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且均低于对照组 ($P < 0.05$) (表 5)。

表 4 CAG 对正常培养神经干细胞数目的影响
($\bar{x} \pm s$, $\times 10^5$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	2.1 ± 1.1	2.5 ± 1.5	15.1 ± 2.3
高浓度 CAG 组	3	3.6 ± 0.8	14.0 ± 4.4 ^a	26.3 ± 7.6 ^a
低浓度 CAG 组	3	3.3 ± 1.2	16.2 ± 8.5 ^a	26.2 ± 1.6 ^a
F 值		2.03	5.27	5.69
P 值		0.194	0.048	0.041

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 CAG 对 OGD 后神经干细胞数目的影响
($\bar{x} \pm s$, $\times 10^6$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	2.73 ± 0.55	3.56 ± 1.21	3.50 ± 1.18
OGD 组	3	1.33 ± 0.38 ^a	1.32 ± 0.26 ^a	2.12 ± 1.02 ^a
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	2.30 ± 0.67 ^a	1.18 ± 0.34 ^a	2.13 ± 1.24 ^a
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	2.45 ± 0.66 ^b	1.59 ± 1.17 ^a	2.50 ± 1.04 ^a
F 值		4.34	7.25	0.99
P 值		0.043	0.011	0.455

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 OGD 组比较, $P < 0.05$ 。

2.4 不同浓度 CAG 对神经球直径的影响

正常培养条件下, CAG 处理后不同时间点, 与对照组相比, 高浓度和低浓度 CAG 组的神经球直径显著增大 ($P < 0.05$), 不同浓度 CAG 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 6)。在 OGD 处理的细胞中, CAG 处理 72 h 后, 与 OGD 组相比, 高浓度 CAG 组表现出比较好的促神经球直径增大效果 ($P < 0.05$) (表 7)。

2.5 不同浓度 CAG 对神经干细胞增殖率的影响

正常培养条件下, 不同时间点各组神经干细胞增殖率比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 即 CAG 处理后并不能显著促进细胞的增殖率 (图 2, 表 8)。经 OGD 处理后, 与 OGD 组相比, 不同浓度 CAG 组在 24 h 和 48 h 时细胞增殖率显著增高 ($P < 0.05$) (图 3, 表 9)。

表 6 CAG 对正常培养神经球直径的影响
($\bar{x} \pm s$, μm)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	17 ± 4	36 ± 7	60 ± 24
高浓度 CAG 组	3	20 ± 5 ^a	47 ± 17 ^a	82 ± 36 ^a
低浓度 CAG 组	3	20 ± 5 ^a	50 ± 21 ^a	78 ± 25 ^a
F 值		7.119	25.36	25.78
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 7 CAG 对 OGD 后神经球直径的影响
($\bar{x} \pm s$, μm)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	17.5 ± 5.7	30.9 ± 9.8	46.6 ± 10.4
OGD 组	3	13.0 ± 2.5 ^a	24.2 ± 7.8 ^a	32.6 ± 9.7 ^a
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	14.5 ± 5.4 ^b	28.7 ± 7.8 ^{a,b}	46.3 ± 12.9 ^b
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	15.5 ± 4.1 ^b	23.3 ± 7.9 ^{a,b}	37.7 ± 6.3 ^a
F 值		6.125	8.05	12.65
P 值		0.013	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, b 示与 OGD 组比较, $P < 0.05$ 。

表 8 CAG 对正常培养神经干细胞增殖率的影响
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	75.2 ± 3.6	78.6 ± 4.0	57.4 ± 7.6
高浓度 CAG 组	3	71.3 ± 13.7	79.5 ± 4.8	59.7 ± 5.0
低浓度 CAG 组	3	61.9 ± 5.4	72.4 ± 14.2	65.0 ± 1.7
F 值		1.11	0.51	0.80
P 值		0.399	0.658	0.53

表 9 CAG 对 OGD 后神经干细胞增殖率的影响
($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	83.5 ± 8.2	71.0 ± 6.1	60.7 ± 2.1
OGD 组	3	50.5 ± 13.7 ^a	28.1 ± 10.4 ^a	10.0 ± 1.9 ^a
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	77.1 ± 3.6 ^b	51.5 ± 2.7 ^{a,b}	13.3 ± 3.2 ^a
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	70.2 ± 12.0 ^b	60.2 ± 5.6 ^b	24.8 ± 14.4 ^a
F 值		6.125	21.80	26.477
P 值		0.013	<0.001	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 OGD 组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 不同浓度 CAG 对 OGD 后 LDH 活性的影响

不同时间点, 经 OGD 处理后各组 LDH 释放量均高于对照组, 但仅 24 h 和 72 h 时差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 不同时间点, 经 OGD 处理后各组间 LDH 释放量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 10)。

2.7 不同浓度 CAG 对 OGD 后细胞存活率的影响

与对照组相比, OGD 处理后的细胞存活率显著下降 ($P < 0.05$), 细胞主要死亡方式为坏死, 少量细胞存在凋亡。CAG 处理可以增加细胞的存活率, 与 OGD 组相比, 48 h 各 CAG 处理组细胞存活率都显著增加, 72 h 高浓度 CAG 组细胞存活率显著增加 ($P < 0.05$) (图 5, 表 11)。

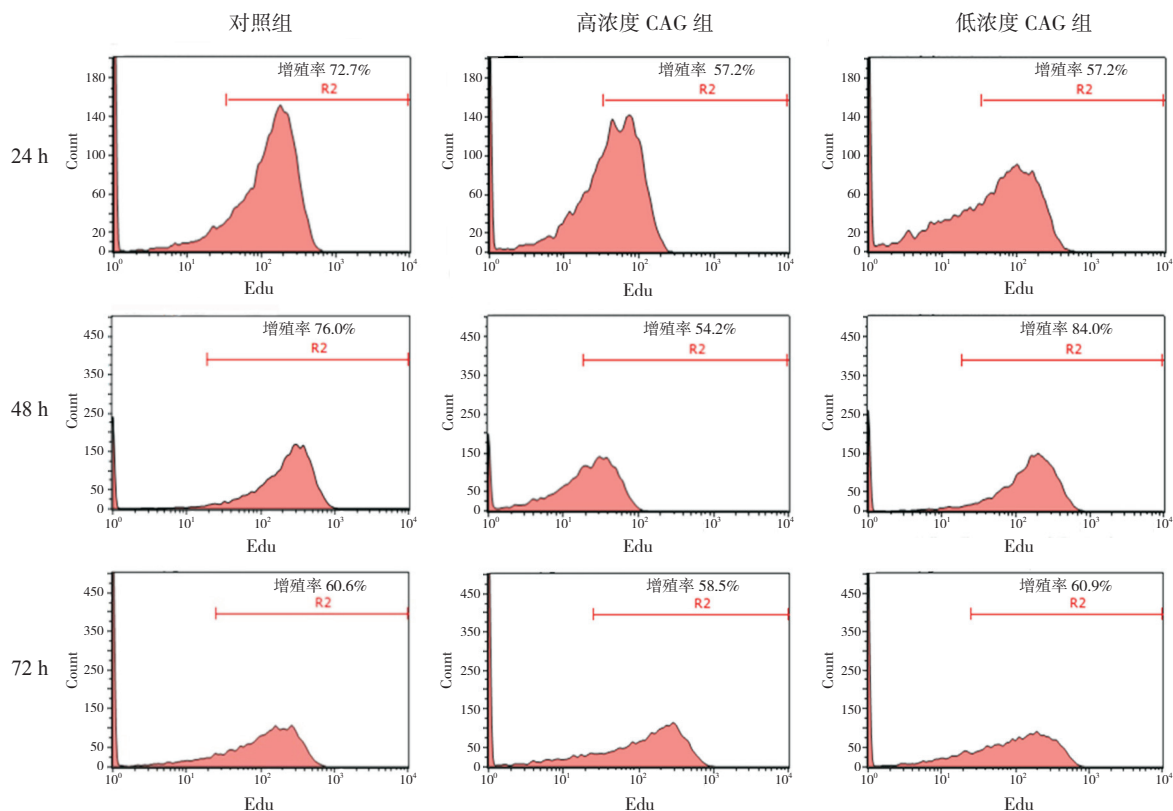


图2 流式细胞术检测 CAG 对正常培养细胞增殖率的影响 R2 下面积反映处于增殖状态的细胞数量。

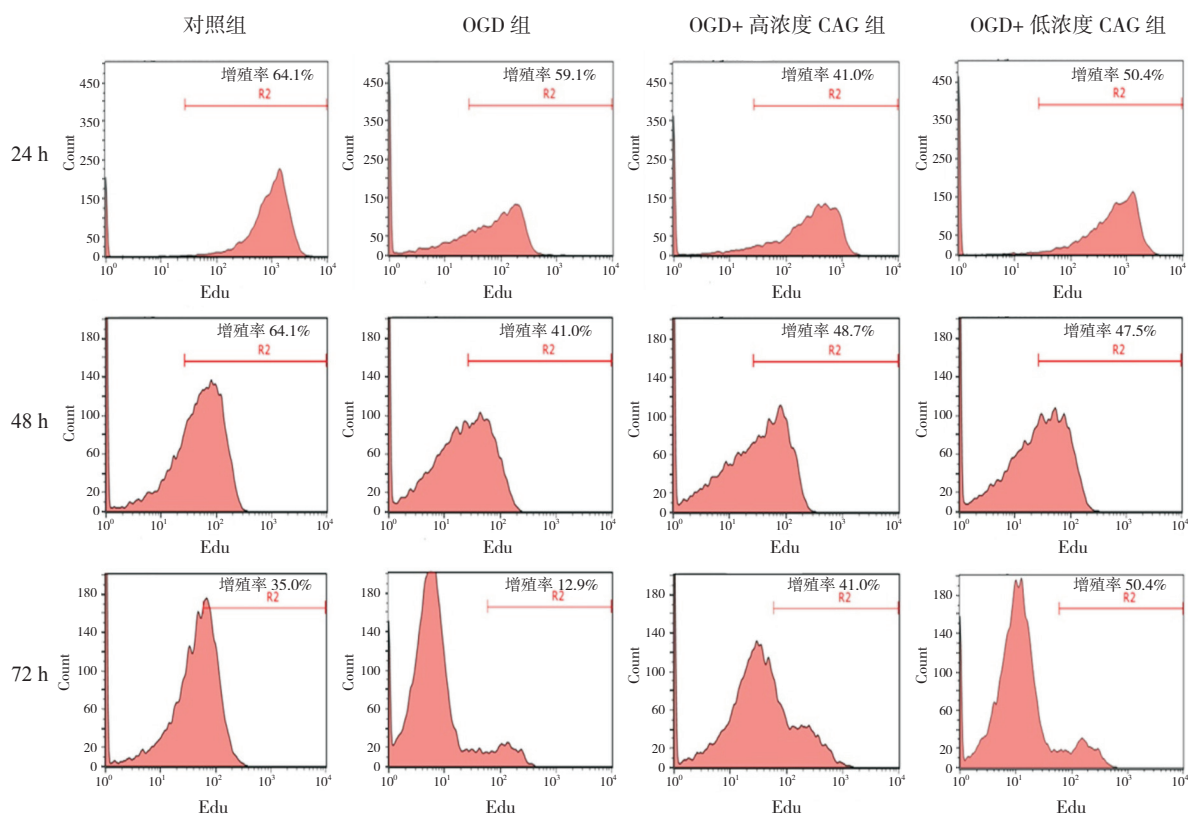


图3 流式细胞术检测 CAG 对 OGD 后细胞增殖率的影响 R2 下面积反映处于增殖状态的细胞数量。

表 10 CAG 对 OGD 后细胞释放 LDH 的影响 ($\bar{x} \pm s$, U/L)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	2264 ± 669	2562 ± 182	2405 ± 124
OGD 组	3	4519 ± 649 ^a	5242 ± 1621	5337 ± 1025 ^a
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	4280 ± 767 ^a	5328 ± 1484	5116 ± 1293 ^a
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	4360 ± 373 ^a	4927 ± 1144	5038 ± 1527 ^a
F 值		6.201	3.354	5.481
P 值		0.009	0.076	0.024

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 11 CAG 对 OGD 后细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
对照组	3	84.3 ± 5.0	79.4 ± 3.8	62.7 ± 2.5
OGD 组	3	40.4 ± 2.1 ^a	39.6 ± 5.0 ^a	38.7 ± 2.1 ^a
OGD+ 高浓度 CAG 组	3	46.9 ± 3.5 ^a	58.2 ± 14.6 ^b	55.5 ± 8.6 ^b
OGD+ 低浓度 CAG 组	3	40.2 ± 1.2 ^a	62.5 ± 14.2 ^b	45.0 ± 4.4
F 值		69.34	4.15	12.343
P 值		<0.001	0.031	0.001

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 OGD 组比较, $P < 0.05$ 。

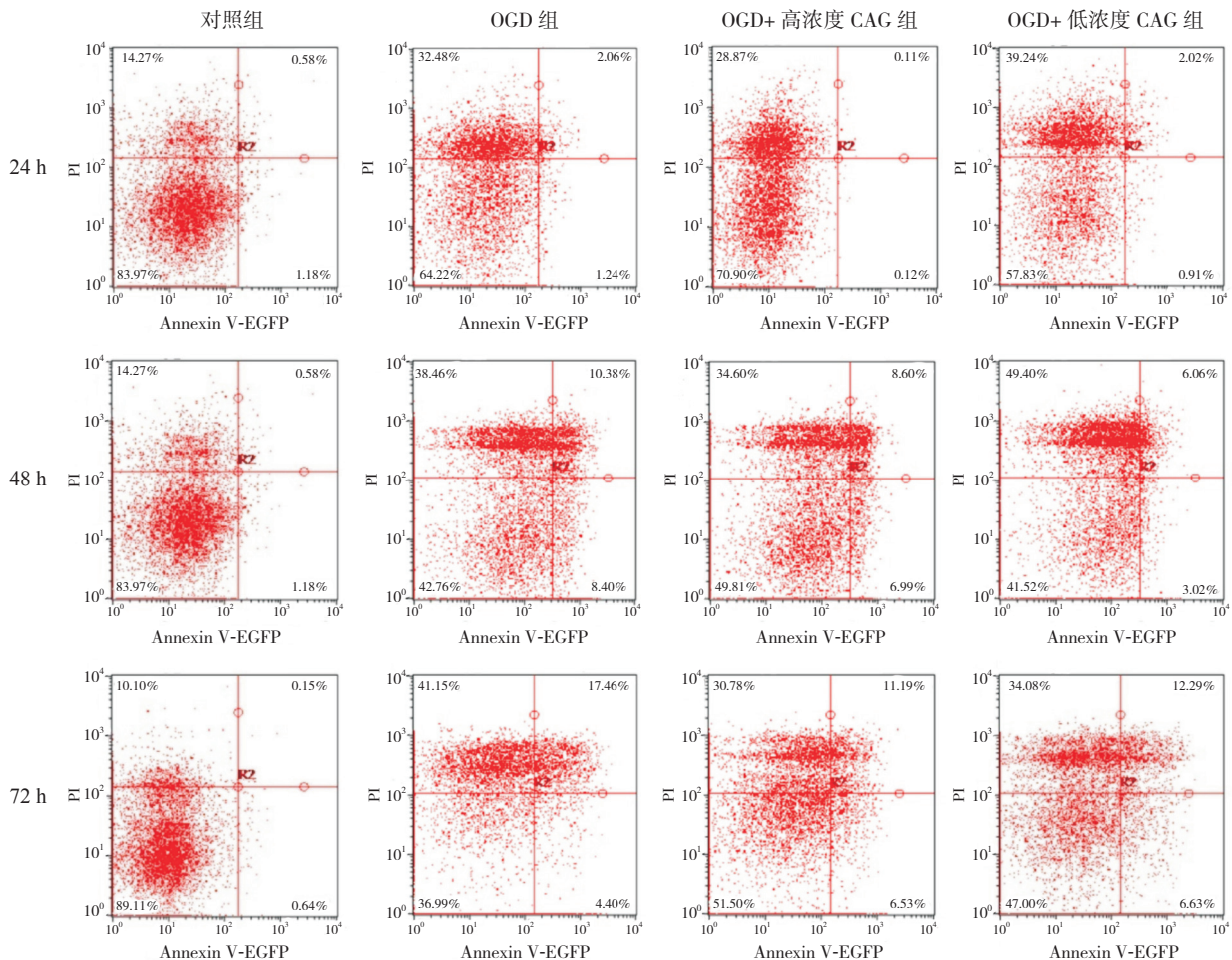


图 5 流式细胞术检测 CAG 对 OGD 后细胞存活率的影响 左下象限反映细胞存活率。

3 讨论

HIE 是常见的导致新生儿死亡和残疾的原因, 中到重度的 HIE 患儿往往预后不理想。既往研究表明, 在动物模型上移植神经干细胞可以有效减轻疾病导致的脑损伤, 改善神经系统功能^[11-13]。但是干细胞移植存在着来源有限、免疫排斥和致肿瘤风险等缺点。在胚胎和新生儿脑中存在着大

量神经干细胞, 因此与干细胞移植相比, 促进内源性神经干细胞增殖不失为一种理想的治疗手段。

本实验以神经干细胞 L2.3 细胞为研究对象, 检测端粒酶激活剂 CAG 在缺氧缺血刺激下对其增殖能力和存活情况的影响。长时间 OGD 处理后, 细胞的增殖活性减弱, 数目减少, 存活率下降。CAG 处理可以促进 OGD 后细胞增殖, 减少细胞死亡。对正常培养的细胞, CAG 也有促神经球直径

和数目增加的效果。值得注意的是,细胞计数和神经球直径测量结果不完全吻合,可能的原因是神经球长到一定程度时,中心的细胞营养不足容易死亡,最终导致神经球直径增长与细胞数目增长不完全一致。

CAG在正常培养和OGD的条件下均可增加TERT的表达。在正常培养下,CAG的促TERT表达、促增殖等作用在不同浓度间没有差异;在OGD条件下,不同浓度CAG处理表现出一定的差异。有报道称TERT的激活具有抗凋亡的效果,TERT能够减少缺氧缺血后神经元中的活化型Caspase 3,调节Bax/Bcl2表达来发挥抗凋亡作用^[14-16]。本实验中,Annexin V-PI荧光双染结果提示缺氧缺血诱导的神经干细胞L2.3主要以坏死的方式发生死亡。CAG处理能够增加OGD后细胞存活率,提示端粒酶激活不仅能够对抗凋亡,对坏死等其他细胞死亡方式也有对抗作用。LDH检测提示CAG并不减少细胞裂解数目,但是能够减少细胞裂解的比例。

既往研究发现TERT表达增加可以减少细胞ROS激活,是细胞对抗死亡的主要原因^[6,15,17]。另有研究发现,有端粒酶活性的细胞可以分泌含有端粒酶TERT mRNA的外泌体。正常组织细胞摄入这种外泌体后呈现端粒酶激活状态,并且表现出抗DNA损伤的作用^[18]。这种作用可能是TERT直接与引物酶结合促进核酸修复实现的。在神经干细胞L2.3中,CAG是否也通过ROS途径对抗细胞死亡,能否抗DNA损伤值得进一步研究。

综上所述,CAG能够显著促进神经干细胞增殖,减少缺氧缺血诱导的细胞死亡,提示端粒酶激活剂有望用于缺氧缺血后脑损伤的治疗。其保护作用涉及的分子机制及相关信号通路尚需进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Ip FC, Ng YP, An HJ, et al. Cycloastragenol is a potent telomerase activator in neuronal cells: implications for depression management[J]. *Neurosignals*, 2014, 22(1): 52-63.
- [2] Wesch NL, Burlock LJ, Gooding RJ. Critical telomerase activity for uncontrolled cell growth[J]. *Phys Biol*, 2016, 13(4): 046005.
- [3] Zhao Y, Li Q, Zhao W, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 169: 210-218.
- [4] Yung LY, Lam WS, Ho MK, et al. Astragaloside IV and cycloastragenol stimulate the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in multiple cell types[J]. *Planta Med*, 2012, 78(2): 115-121.
- [5] Xu ME, Xiao SZ, Sun YH, et al. Effects of astragaloside IV on pathogenesis of metabolic syndrome in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(2): 229-236.
- [6] Luo Y, Qin Z, Hong Z, et al. Astragaloside IV protects against ischemic brain injury in a murine model of transient focal ischemia[J]. *Neurosci Lett*, 2004, 363(3): 218-223.
- [7] Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR, et al. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression[J]. *Thromb Haemost*, 2003, 90(5): 904-914.
- [8] Sun J, Chen XL, Zheng JY, et al. Astragaloside IV protects newborn rats from anesthesia-induced apoptosis in the developing brain[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(3): 1829-1835.
- [9] Fauci SR, Jamieson BD, Chin AC, et al. Telomerase-based pharmacologic enhancement of antiviral function of human CD8⁺ T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 7400-7406.
- [10] Li H, Babiarz J, Woodbury J, et al. Spatiotemporal heterogeneity of CNS radial glial cells and their transition to restricted precursors[J]. *Dev Biol*, 2004, 271(2): 225-238.
- [11] Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, et al. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells[J]. *Front Neurosci*, 2013, 7: 194.
- [12] Hsueh YY, Chang YJ, Huang CW, et al. Synergy of endothelial and neural progenitor cells from adipose-derived stem cells to preserve neurovascular structures in rat hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 14985.
- [13] Tajiri N, Acosta SA, Shahaduzzaman M, et al. Intravenous transplants of human adipose-derived stem cell protect the brain from traumatic brain injury-induced neurodegeneration and motor and cognitive impairments: cell graft biodistribution and soluble factors in young and aged rats[J]. *J Neurosci*, 2014, 34(1): 313-326.
- [14] 李益清,尹松梅,冯思琼,等.丙戊酸诱导白血病HL-60细胞凋亡及其对h-tert基因表达的影响[J].*中国实验血液学杂志*, 2010, 18(6): 1445-1450.
- [15] Li J, Qu Y, Chen D, et al. The neuroprotective role and mechanisms of TERT in neurons with oxygen-glucose deprivation[J]. *Neuroscience*, 2013, 252: 346-358.
- [16] Zhao F, Qu Y, Xiong T, et al. The neuroprotective role of TERT via an antiapoptotic mechanism in neonatal rats after hypoxia-ischemia brain injury[J]. *Neurosci Lett*, 2012, 515(1): 39-43.
- [17] Liu Q, Sun Y, Lv Y, et al. TERT alleviates irradiation-induced late rectal injury by reducing hypoxia-induced ROS levels through the activation of NF-kB and autophagy[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(3): 785-793.
- [18] Gutkin A, Uziel O, Beery E, et al. Tumor cells derived exosomes contain hTERT mRNA and transform nonmalignant fibroblasts into telomerase positive cells[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(37): 59173-59188.

(本文编辑: 万静)