

胚胎干细胞素与神经干细胞 治疗阿尔兹海默病疗效比较的实验研究

谢培增¹ 邓寅¹ 孙成玲² 李元昊¹ 谢成³ (通讯作者)

(1. 中国广东新征程生命科学研究院 广东 广州 510318)

(2. 中国人民解放军 32265 部队医院妇产科 广东 广州 510318)

(3. 中国星海音乐学院民族声乐系 广东 广州 510006)

【摘要】目的探讨胚胎干细胞素 (ESCF) 和神经干细胞 (NSCs) 对阿尔兹海默症 (AD) 的治疗疗效。方法取雄性 8 月龄 APP^{swe} / PS1^{dE9} 双转基因小鼠 90 只, 被随机分为 3 组, 即未治疗对照组 (组 I)、NSCs 治疗组 (组 II) 和 ESCF 治疗组 (实验组), 每组各 30 只。组 I 取生理盐水 1ml, 腹腔注射, d-1, 连续 15d; 组 II 取神经干细胞 5 μ L (细胞浓度 1 \times 10⁸ L⁻¹), 腹腔注射, d-1, 连续 15d; 实验组取 10% ESCF 0.02ml, d-1, 腹腔注射, 连续 15d。干预后对 AD 小鼠进行 Morris 水迷宫实验 (Morris Water Maze, MWM) 和脑内神经递质和蛋白质印迹水平检测, 各参数相互比较。结果干预后, 组 II 和实验组 AD 小鼠 MWM 潜伏期时间缩短; 脑内 AChE 和 MAO 水平是降低, ChAT 水平是升高, 蛋白质印迹表达水平明显改善 (P<0.05)。结论 ESCF 与 NSCs 均可明显改善 AD 小鼠的学习与记忆能力, ESCF 明显优于 NSCs 的疗效。ESCF 可激活脑内 NSCs 分化出新的神经细胞, 替代死亡细胞, 达到在病变部位原位分化, 原位修复脑的结构, 恢复其功能, ESCF 是治疗 AD 好的方法。

【关键词】阿尔兹海默病; 胚胎干细胞因子; 神经干细胞防治; 实验研究

阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是常见的神经退行性疾病。据 2021 年世界 AD 报告^[1], 全球超过 5500 万, 预计至 2050 年, 全球痴呆症患者将达到 1.32 亿。AD 患者的死亡率为 34.6%, 平均存活年限只有 5.9 年^[2]。AD 临床表现为记忆力减退、空间功能障碍和性格改变三大症状, 至目前为止, 尚无有效的治疗药物。为探索治疗 AD 的有效方法, 本研究在 2022 年 1-10 月期间, 采用胚胎干细胞素 (embryonic stem cell factors, ESCF) 和神经干细胞 (neural stem cell, NSCs) 对比干预实验, 结果显示 ESCF 对 AD 有较好的治疗作用。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

从本院实验中心选择 8 月龄 APP^{swe}/PS1 Δ E9 双转基因小鼠, 18~20g, 共 90 只, 各项动物实验操作均符合医院伦理委员会标准审查 (2022010128)。所有动物按照 5 只/笼, 按常规喂养, 即温度 20~24 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~60%, 自然光线, 每 12h 昼夜交替。适应性喂养 1 周后进行实验。

1.1.2 实验试剂与仪器

胰蛋白酶、DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公

司); ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司); 24 孔板 (杭州沃森生物技术有限公司); 培养箱 (上海如吉生物科技发展有限公司); 荧光显微镜 (德国 Lecia 公司); Morris 水迷宫 (淮北正华生物仪器设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 ESCF 与 NSCs 的制备

ESCF 的制备: 按广东新征程生命科学研究院专利制作^[3], 即取孕 18d 的 C57BL/6 雌性小鼠 10 只, 无菌下取出子宫, 分离胚胎、洗净, 粉碎, 重复冰冻 5 次, 2 次离心, 获取上层混合液, 分子量在 180~480 道尔顿 (Dalton, Dal) 之间的小分子肽即得 ESCF, 巴氏法灭菌, 用生理盐水配成 10% 的悬浮液, -18 $^{\circ}$ C 冰冷保存备用。NSCs 分离培养: 按 NSCs 培养^[4]: 即取孕 18d 的 C57BL/6 雌性小鼠 10 只, 取死后获得胚胎, 分离组织, 清洗、剪碎、反复吹打成细胞悬液、过滤、离心、去除上清液, 添加神经干细胞基础培养基, 接种于培养瓶, 置于 37 $^{\circ}$ C, 体积分数为 5% CO₂ 培养箱中培养, 每隔 3d 半量换液, 每 5-7d 传代 1 次。收集 3 代细胞, 进行细胞重悬, 将细胞接种于多聚赖氨酸的盖玻片的 24 孔板中, 培养 4h, 待神经球贴于盖玻片上, 取出, 而获得 NSCs, 随后免疫荧光检测, 备用。

1.2.2 动物分组与给药

分组：90 AD 小鼠按数字表随机分为 3 组，即未治疗对照组（组 I）、NSCs 干预组（组 II）和 ESCF 干预组（实验组），每组各 30 只。干预方法：组 I 取生理盐水 1ml，腹腔注射，d-1，连续 15d；组 II 取 NSCs 5 μL（细胞浓度 1×10⁸ L⁻¹），腹腔注射，d-1，连续 15d；实验组取 10% ESCF 0.02ml，d-1，腹腔注射，连续 15d，各组动物按常规喂养，不作其他处理。

1.2.3 检测方法

Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM) 实验^[5]

测量平均上台潜伏期时间 (s)，在移植后 1, 5, 10, 15d 时间点测试，统计结果，对三组组内与组间不同时间点参数相互比较。

脑内神经递质检测

在迷宫实验结束后 (30d)，动物麻醉处死，取双侧海马组织，用冰冷生理盐水冲洗脑组织，滤纸滤干，准确称量。9 倍于脑组织质量的生理盐水放入匀浆机研碎，制成 10% 脑组织匀浆，4℃ 条件下 3000 r/min 离心 10 min，取上清液，4℃ 冰箱中保存。按照 ELISA 试剂说明程序操作^[6]，检测上清液中乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE)、单胺氧化酶 (monoamine oxidase, MAO) 和胆碱乙酰转移酶 (Choline acetyltransferase, ChAT) 水平。

蛋白质印迹 (Western Blot) 检测^[7]

检测小鼠脑组织中相关蛋白表达。以 β-actin 为内参，计算核因子 κB (NF-κB)、p-NF-κB、Toll 样受体 4 (TLR 4)、PI3K、p-PI3K、AKT 及 p-AKT 的表达。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 21.0 软件统计实验数据，以平均值 ± 标准差 (x ± s) 表示，组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 LSD-t 检验，以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MWM 实验结果：随着训练天数增加，三组小鼠 MWM 时间均有缩短。

组内比较：组 II 和实验组显著缩短，差异有统计学意义 (P < 0.05)。组间比较：与组 I 比较，组 II 和实验组小鼠 MWM 明显缩短，差异有统计学意义 (两组 F 值分别为 7.676 和 13.331, P < 0.05)；与组 II 比较，实验组明显缩短，差异有统计学意义 (P < 0.05)。(见表 1)。

2.2 脑内神经递质检测结果

①组 II 和实验组 AChE、MAO 水平均降低，与组 I 比较，组 II 和实验组比较水平均降低，差异显著，有统计学意义 (两组 AChE 值分别为 8.643 和 12.346；MAO 分别为 7.512 和 10.662, P < 0.05)；与组 II 比较，实验组水平显著降低，差异有统计学意义 (P < 0.05)。

②组 II 和实验组胆 ChAT 升高，与组 I 比较，组 II 和实验组比较显著升高，差异有统计学意义 (F 值分别为 8.357 和 11.654, P < 0.05)；与组 II 比较，实验组显著升高，差异有统计学意义 (P < 0.05)。(见表 2)。

2.3 Western Blot 检测结果

①组 II 和实验组 p-NF-κB/NF-κB 和 TLR 4 参数降低，与组 I 比较，组 II 和实验组显著降低，差异有统计学意义 (p-NF-κB/NF-κB 值分别为 9.371, 13.467；TLR 4 为 6.851, 12.347, P < 0.05)；与组 II 比较，实验组显著降低，差异有统计学意义 (P < 0.05)。

②组 II 和实验组 p-PI3K/PI3K 与 p-AKT/AKT 水平增高，与组 I 比较，组 II 和实验组显著增高，差异有统计学意义 (p-PI3K/PI3K 值分别为 8.423 和 13.549；p-AKT/AKT 为 7.634 和 12.367, P < 0.05)；实验组和组 II 比较差异显著，具有统计学意义 (P < 0.05)。(见表 3)。

3 讨论

目前，普遍认为^[8]AD 的发病机制主要是 β-淀

表 1 三组 AD 小鼠 Morris 水迷宫实验逃避潜伏期的影响结果比较 (x ± s, s, n = 30)

Table 1 Comparison of the effects of Morris water maze experiment in three groups AD mice (x ± s, s)

组别	Day1	Day1	Day1	Day1	组内比较 F P
组 I	66.58 ± 4.37	58.14 ± 1.36	58.4 ± 3.62	56.36 ± 2.17	3.28 0.100
组 II	66.54 ± 4.28	41.06 ± 1.67	49.2 ± 2.26b	31.19 ± 1.24ab	17.24 0.025
实验组	66.61 ± 3.69	32.63 ± 1.54abc	26.31 ± 2.13abc	21.21 ± 1.89abc	21.24 0.020
组间 F 2.347 17.73 18.36 19.54					
比较 P 0.20 0.001 0.001 0.001					

注：与第 1 天比较 aP < 0.05；与组 I 比较 bP < 0.05；与组 II 比较 cP < 0.05。

粉样蛋白 (amyloid beta, Aβ) 的变性和沉淀聚集; Tau 蛋白产生的神经原纤维凝集 (Neurofibrillary tangles, NFTs), 并进一步造成该蛋白的大量磷酸化及小胶质细胞炎症等。本研究 ESCF 与 NSCs 干预后, 两组 AD 小鼠的行为、学习与记忆能力的提高; 脑内神经递质和蛋白质印迹各参数都明显好转, 说明了 ESCF 与 NSCs 促进了 AD 小鼠细胞分化, 增加突触连接, 减轻了毒性和炎症反应, 增加神经元之间连接及代谢, 改善脑的功能等, 且证明 ESCF 明显优于 NSCs 的疗效。近年诸多学者^[9] 采用 NSCs 治疗 AD 取得了较好的效果, 但 NSCs 移植还存在着免疫排斥、过敏反应、感染等问题。本研究采用 ESCF 对 AD 小鼠的干预结果证明, ESCF 既有胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESCs) 的治疗作用, 又无 SCs 移植后的副作用。据有关资料与本研究分析其原因可能与 ESCF 和 NSCs 异同特征与特点有关。

ESCF 与 NSCs 异同的特征: 相同特征: ①来源相同: ESCF 和 NSCs 都是来源于 ESCs。②作用相同: 两者均可防治神经损伤和神经退行性疾病等。不同的特征: ①剂型不同: ESCF 是从 ESCs 中萃取的一组小分

子活性肽悬浮液, 主要有神经生长肽、免疫调节肽、抗氧化活性肽等生物活性肽。NSCs 是从 ESC 体外培养而得到的鲜活细胞。②作用机理不同: NSCs 作用机理^[10]: NSCs 直接作用机制: 移植的 NSCs 迁移到损伤的神经部位分化出不同类型的细胞, 其特点是这种分化出的细胞仍是异体细胞, 但可替代死亡的神经细胞和连接神经网络。NSCs 间接作用机制: NSCs 释放相关的营养因子, 一方面改善局部脑内微环境, 另一方面启动内源性神经干细胞的激活与分化, 促进神经元的存活与再生。ESCF 作用机理: ESCF 既有 ESCs 的作用机理, 还有小分子肽的生物学作用特性。ESCF 作用机理: 提供原料: ESCF 中肽富含脂类, 不饱和脂肪酸, 而脂类和不饱和脂肪酸是大脑的重要组成部分, 为脑细胞的发育和生理活动提供充足的原料^[11]。修复细胞: ESCF 可修复损伤的神经细胞、使局部微血管再生, 抗细胞凋亡。促进分化: ESCF 可激活脑内的 NSCs 分化出新的神经细胞, 其特点是在病变部位原位分化, 原位修复脑的结构与神经网络。激活休眠的神经细胞: 人脑有几百亿个细胞, 只有约 1% ~ 1.5% 的细胞参加脑的神经功能活动^[12]。当 ESCF 进入脑组织后, 可促

表 2 干预后 3 组 AD 小鼠 30d 的神经递质结果比较 (x±s)

Table 3 Comparison of neurotransmitter results of 3 groups AD mice at 30d after intervention(x±s)

组别	n	乙酰胆碱酯酶 (U/L)	单胺氧化酶 (μg/L)	胆碱乙酰转移酶 (μg/L)
组 I	30	53.73 ± 4.56	24.34 ± 4.65	10.23 ± 3.25
组 II	30	41.60 ± 4.61a	19.23 ± 4.37a	13.83 ± 3.18a
实验组	30	38.60 ± 4.53ab	11.23 ± 4.26a b	18.88 ± 3.24ab
实验组与组 II 比较	F	13.356	12.612	13.372
	P	0.001	0.001	0.001

注: 与组 I 比较 aP < 0.05; 与组 II 比较 bP < 0.05

表 3 三组小鼠脑组织中相关蛋白表达的影响的比较 (x±s, %, n = 30)

Table 3 Comparison of the effects of relevant protein expression in brain tissues of the three groups (x±s, %)

组别	p-NF-κB/NF-κB	TL R 4	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
组 I	0.96 ± 0.16	1.02 ± 0.20	0.16 ± 0.40	0.95 ± 0.13
组 II	0.39 ± 0.04a	0.42 ± 0.06a	0.43 ± 0.17a	1.21 ± 0.26a
实验组	0.19 ± 0.08ab	0.27 ± 0.05ab	0.92 ± 0.12ab	1.67 ± 0.14ab
实验组 F 与组 II P	21. 235	33. 767	34.359	7. 567
	0.001	0.001	0.001	0.025

注: 与组 I 比较 aP < 0.05; 与组 II 比较 bP < 0.05

醒部分休眠的神经细胞参与生理活动。ESCF 的小分子肽的作用特点：①剂量少：研究表明^[13]，小分子肽几乎完全被吸收，所以极微量的 ESCF 就可起到较大的作用。②疗效快：小分子肽在两分钟内即可进入血液循环，可自由地进入各类细胞，也可随意透过血脑-屏障等^[14]。③作用广：ESCF 对机体其他组织损伤的修复与疾病的防治有同等作用^[15]。④操作简捷：ESCF 可多途径用药，操作方便。⑤无不良反应：小分子肽本身无抗原性，激活自体 NSCs 分化的细胞不会产生免疫排斥反应；ESCF 为无菌制剂，也不会使机体感染等。

参考文献：

[1] Ramachandran AK, Das S, Joseph A, et al. Neurodegenerative pathways in alzheimer's disease: a review[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2021, 19(5): 679-692.

[2] 李梦婷, 曾朝阳, 黄文蓉, 等. 阿尔兹海默症的发病机制研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2020, (76): 39-41.

[3] 谢培增, 邓寅, 谢成等. 胚胎素防治阿尔兹海默症的实验研究[J]. *中文科技期刊数据库(全文版)医药卫生*, 2023, 14(8): 50-54.

[4] 李瑞鑫, 苏刚, 刘骥飞等. 干细胞移植对大鼠脑缺血再灌注损伤神经保护作用的系统评价[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(10): 1634-1640.

[5] 何佳, 鄢波, 宋晓征, 等. 胎盘间充质干细胞移植改善阿尔兹海默模型大鼠行为学及脑内的神经递质[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(29): 4650-4656.

[6] 程洪斌, 王晓东, 杨静, 等. 阿尔兹海默病细胞治疗[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2020, 41(21): 2716-2719.

[7] 方毅, 宋光捷, 陈黎等. 丹参酮 IIA 对阿尔兹海默症模型小鼠神经保护用及对 PI3K/AKT 通路的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2021, 29(4): 499-505.

[8] Mukhamebshina Y O, Gracheva O A, Mukhutdinova D M, et al. Mesenchymal stem cells and tdv aevroval

microevvirovmevt in tde area of spinal cord injury[J]. *NevraS Regev Res*, 2019, 14(2): 227-237.

[9] Kinjo T, Higashi H, Uno K, et al. A pelin/Apelin receptor system: molecular characteristics, physiological roles, and prospects as a target for disease prevention and pharmacotherapy[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, 14(2): 210-219.

[10] 赵思琦, 杜鹃, 屈海峰等. 丰富环境联合褪黑素对 SAMP8 小鼠学习记忆功能及脑神经细胞凋亡的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(5): 701-706.

[11] 廖彭莹, 杨玉蓉, 韦引金等. 小分子肽 LK-5 对肝纤维化小鼠的防治效果初步研究[J]. *中国民族民间医药*, 2021, 30(17): 38-40.

[12] 李红星, 张信岳, 武柠子等. 阿尔兹海默症体外模型研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2020, 25(10): 1178-1187.

[13] 刘畅, 孟宪勇, 董晓华. 阿尔兹海默症的发病机制及治疗药物研究进展[J]. *神经药理学报*, 2020, 10(4): 36-40.

[14] 陈妙纯, 吴高椿, 刘韬. 人诱导性多能干细胞向红系分化的研究进展[J/CD]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2022, 12(2): 115-120.

[15] 郭庆, 李冠琳, 刘慧等. 脂肪间充质干细胞治疗糖尿病及其慢性并发症的研究进展[J/OL]. *中华细胞与干细胞杂志(电子版)*, 2023, 13(1): 58-62.

基金项目：

全军医学科学技术十四五课题项目(19MB174)；本研究《胚胎素制作方法及应用的发明》获得 2022 年在第 48 届日内瓦国际发明金奖。

作者简介：

谢培增(1954.11-)，男，汉族，湖南衡阳市，研究生(博士学位)，教授、主任医师，俄罗斯自然科学院外籍院士、乌克兰国家科学院外籍院士，从事神经医学、生命科学及军事医学研究。

通讯作者：谢成。