

利用干细胞筛选中药神经保护作用活性成分的新方法*

谭睿^{1**}, 赵骞^{1,2}, 卢琼¹, 马晓玲¹, 李金圣¹, 蔡少青^{2**}

(1. 西南交通大学生命科学与工程学院/医学院 成都 610031; 2. 北京大学药学院 北京 100191)

摘要:目的:利用干细胞构建可用于药物筛选的细胞模型,初步建立寻找中药活性成分的新方法。方法:首先,克隆神经生长因子(NGF)启动子的序列,连接到含有荧光素酶报告基因/E2红色荧光蛋白的质粒上,并将合成得到的质粒转入HEK-293细胞中,构建基于启动子的初步筛选稳定的细胞模型。使用阳性药进行验证细胞模型的准确性,并用该模型筛选来自中药的小分子化合物。然后使用筛选得到的化合物诱导大鼠的骨髓间充质干细胞,检测相关神经营养因子的转录水平,验证待测小分子化合物可能对神经生长的生物活性。结果:来自中药益智的三种化合物,白杨素、圆柚酮和杨芽黄素均可以激活NGF启动子。白杨素、圆柚酮诱导MSC不同时间后,细胞表面神经标志物:神经生长因子(NGF)、半乳糖神经酰胺(GalC)、巢蛋白(Nestin)、神经元特异烯醇化酶(NSE)、波形蛋白(Vimentin)对应RNA的转录水平均有不同程度的提高。而杨芽黄素没有明确促进神经细胞分化的活性。结论:白杨素、圆柚酮可以促进干细胞向神经细胞分化,是中药益智发挥神经保护作用物质基础的组成部分。

关键词:骨髓间充质干细胞 白杨素 圆柚酮 神经生长因子 药物筛选

doi: 10.11842/wst.2019.04.001 中图分类号:R285.1 文献标识码:A

中药是中医防病治病的物质基础,中药药效物质是其所含具有防病治病作用的化学物质,也是质量控制的物质基础。然而,大部分中药活性成分尚不明确或只是部分清楚,中药药效物质不明确、指标性成分与功效相关性不强、单指标或少数指标性成分的含量测定难以有效控制整体质量等问题普遍存在,严重限制了中药作用机制的阐明和质量标准的提高。

因此,研究中药复杂体系药效物质的方法和技术有待提高。尤其是,如何对中药中具有显著生理活性、有望成为创新药物研究重要源头分子的微量成分进行可靠的活性评价?本文介绍一种利用干细胞筛选中药中微量活性物质的新方法——“分子靶向筛选+干

胞定向诱导模型”,仅需要 μg 级单体化合物即可进行潜在的活性筛选。

“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”以启动子为筛选序列(靶点)进行质粒初筛,配合干细胞体外验证手段,观察中药单体化合物与干细胞共培养过程中,所表现出对某种病灶的修复倾向。根据显示出可能潜在的相关活性,高效、明确地指向该中药微量成分的药效和机制,借以判断单体化合物活性。其根本原理在于利用干细胞可塑性强、可分化成多种类型细胞的特质。

干细胞具有分化能力恢复因病死亡的细胞,也具有旁分泌能力调节治疗因病损伤的细胞,因此在再生治疗方面有广泛的应用。干细胞的分化具有多能性。

收稿日期:2019-02-12

修回日期:2019-04-11

* 基金项目:国家科技部重点研发计划(2018YFC1706200):中医药现代化研究“常用中药活性成分的合成生物学研究,负责人:谭仁祥;四川省中医药管理局建设专项(2018C031):中藏药大健康产品开发创新团队,负责人:谭睿。

** 通讯作者:谭睿:教授,博士生导师,主要研究方向:生药成分活性和质量标准研究,中药复方药效物质研究;蔡少青:教授,博士生导师,主要研究方向:生药品种鉴定和品质评价,中药复方药效物质研究。

骨髓间充质干细胞的治疗机制分为细胞分化和旁分泌作用,涵盖面广。针对细胞治疗过程中特定的细胞,或者研究基础较少、机制较不明确的生物标志物,可以选择分化的目的细胞所特有的标志物,来达到有的放矢的效果。这样,根据研究目的而构建的独特细胞系,就可以使筛选的条件尽可能符合研究者想要的药效。

该模型系首次将干细胞技术应用于药效筛选模型构建;借以突破中药微量成分药效学检测瓶颈,从种类多、含量低的化合物群中快捷确定活性单体化合物,为中药药效物质基础的发现和阐释提供科学依据,为中药微量成分的转化和应用提供广阔前景。

1 再生医学干细胞技术用于快速筛选中药药效成分背景

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)广泛存在于动物成体结缔组织和器官间质中,根据来源主要有骨髓间充质干细胞、脂肪间充质干细胞等类型。MSC易于分离培养,在体外可以向各种类型的细胞分化,可分化为中胚层细胞,如脂肪细胞、骨细胞和软骨细胞;可分化成外胚层和内胚层细胞,如皮肤、神经细胞、肝细胞、胰腺胰岛等,其表面标志基因不尽相同。

本模型所用骨髓间充质干细胞(BMSCs),是来自SD大鼠成体的非造血干细胞,具自我更新和分化能力如:脂肪细胞、成骨细胞、软骨细胞^[1]等,且简便易得。我们以此为工具细胞,通过建立神经保护单体化合物筛选或血管保护单体化合物模型,详细阐释“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”的原理、建立方法和应用。

研究发现,在体外特定培养条件下,骨髓间充质干细胞可向神经干细胞、神经元细胞及少突胶质细胞等神经样细胞分化,为神经损伤后的修复再生提供了有利支持。二甲基亚砜(DMSO)^[2,3]、丁羟基茴香醚(BHA)^[2,3]、 β -巯基乙醇^[4-6]、全反式维甲酸(RA)^[2,7]、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)^[8,9]等化合物或细胞因子均可诱导BMSCs向神经样细胞分化,说明小分子化合物具备诱导BMSCs向神经样细胞分化潜力^[10,11]。也有研究发现,土木香内酯、辛伐他汀等小分子化合物可以诱导BMSCs向血管内皮细胞分化的潜力^[12,13]。本文的筛选模型旨在筛选和发现具有诱导分化神经细胞或血管细胞的天然小分子化合物。

2 材料

2.1 细胞、药物和试剂

HEK-293细胞(来源于美国ATCC);胎牛血清

(Gibco,批号:1908121);DMEM低糖培养基(Hyclone,批号:J180003);胰蛋白酶(Hyclone,批号:J180003);盐酸克伦特罗(aladdin,37148-27-9);维甲酸(南京生利德生物科技,302-79-4);白杨素(普思生物科技,480-40-0);杨芽黄素(普思生物科技,520-28-5);圆柚酮(成都嘉叶生物科技,4674-50-4);PCR扩增试剂盒,Lipofectamine™2000(Thermo Fisher,11668019);兔抗神经生长因子(Beyotime,AF1411);兔抗半乳糖神经酰胺(Solarbio,K003717P);兔抗波形蛋白(Beyotime,AF1975);兔抗巢蛋白(Beyotime,AF2215);兔抗神经元特异性烯醇化酶(Beyotime,AF2164)、Total RNA Isolation Kit、二步法RT-PCR试剂盒(成都福际生物技术有限公司,RE-03113)。

2.2 实验动物

SPF级2-4周龄雄性SD大鼠2只(由成都达硕实验动物有限公司提供),平均体质量为120-140g,用于制备骨髓间充质干细胞。

3 “分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”药物筛选模型的构建

该模型分为两部分:分子靶向的高通量筛选、干细胞定向诱导验证。利用干细胞可塑性强且可分化成多种类型细胞的特质,结合干细胞在单体化合物给药后的分化趋向和旁分泌作用,高效、快速判断中药微量成分可能具有的活性和机制。

3.1 分子靶向的高通量筛选

作为神经细胞或血管内皮细胞生长的标志性基因,神经生长因子(NGF)或血管生长因子(VEGF)的转录水平,可表明对神经或血管的修复作用;“分子靶向筛选”是以VEGF或NGF启动子为筛选序列(靶点)进行质粒初筛,将是否促进干细胞启动VEGF或NGF基因的转录,作为初步判断单体化合物是否具有神经或血管保护作用的依据。

(1)分别克隆神经元的保护/再生及血管新生的主要功能基因NGF、VEGF的启动子片段,各自与红色荧光蛋白(E2)或者荧光素酶(Luc)表达基因片段整合,后接报告基因,构建能定性和定量评估这两个基因启动子功能的质粒;

(2)使用Lipofectamine™2000,将含有NGF、VEGF启动子的质粒转染HEK-293细胞,建立稳定的单克隆细胞株,形成具有神经或血管保护的单体化合物高通

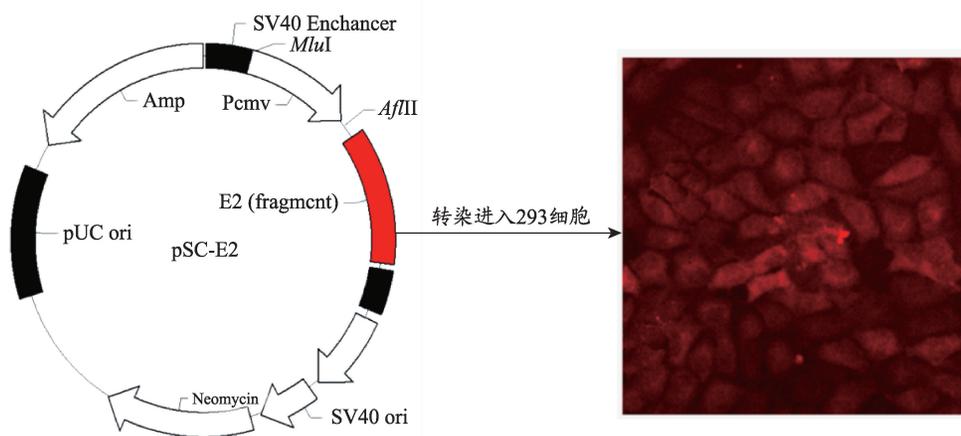


图1 NGF/VEGF高通量筛选模型的构建

量筛选体系(图1),完成前部分“分子靶向筛选”质粒模型构建。

图1红色荧光显示,以盐酸克伦特罗(CLE)为阳性药物进行刺激,质粒中的红色荧光蛋白(E2)被启动转录,确认该高通量筛选体系构建成功。有报道显示^[14],对于神经兴奋毒素红藻氨酸诱导的神经细胞凋亡模型中,定量PCR等方法显示盐酸克伦特罗可以上调NGF的转录水平,从而发挥神经保护作用。由于脑缺血的过程中由于缺血、缺氧等,也伴随着神经细胞的死亡,因此盐酸克伦特罗能够较好的作为脑缺血神经保护的阳性药物使用,一定程度上反映出细胞模型的准确性。

质粒中的荧光素酶被启动转录的情况(表1)。空白组为未转入质粒的HEK293细胞。对照组为转入含有相应启动子和荧光素酶基因的质粒。相对荧光素酶单位的结果对比显示,该质粒被成功转入细胞模型。CLE组为加入盐酸克伦特罗(CLE)后的荧光强度,是对照组的156%,显示明显的提高。

当待测药物处理使启动子被激活时,则启动红色荧光蛋白表达或者荧光素酶活性提高,借以快速直观反映单体化合物潜在的神经或血管保护活性。

3.2 干细胞定向诱导验证模型

将3.1“分子靶向筛选”显阳性的单体化合物,与骨髓间充质干细胞(BMSCs)共培养,检测BMSCs上标志基因NGF和VEGF转录,推测单体是否潜在的神经或血管保护活性;当然,单体化合物也可能具有诱导BMSCs分泌治疗因子作用,但无论是单体化合物的直接诱导分化,还是促进相关因子分泌,均显示该单体化合物具潜在神经保护或血管保护活性。

上述两部分整合,即为“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”,可用于中药微量单体(微克级)筛选,并

表1 转入NGF启动子质粒的HEK293细胞受CLE诱导荧光素酶的变化

分组	加药	转染质粒	相对荧光素酶单位
空白组	无	无	10.9414
对照组	无	pNp-Luc	14317.89
CLE组	CLE	pNp-Luc	22335.91

同时准确指向单体化合物的药效作用及潜在机制。

我们建立的神经保护/再生“分子靶向筛选+干细胞定向诱导”模型,其机理在于:神经生长因子(NGF)、干细胞、小分子药物等都是^[15]促使神经功能再生^[16]的重要因素,NGF能促进突触和轴突重塑及定向再生,通过药物诱导机体干细胞分化或分泌,补充NGF,使之与靶细胞形成功能连接,达到修复受损神经细胞、改善神经功能缺损症状的目的^[17,18]。

据报道,目前将成纤维细胞逆分化为多能干细胞,并诱导成神经细胞,并检测到神经分化相关的指标等的重大发现^[19],均系采用多种体内已知的、活性明确的化合物联合诱导所得;而本课题组则是首次单独采用来源于中药的单一天然小分子化合物进行大鼠BMSCs诱导,并检测到神经分化相关指标等,具有重大的意义;也是首次将干细胞作为模式细胞运用于中药单体化合物活性筛选。这可为如何从含有化合物种类多、含量低但临床疗效确切的中药中寻找活性成分,阐释中药药效物质基础提供新方法和新思路,为中药药理学和中药质量控制研究提供新借鉴。

4 采用“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”筛选中药神经保护成分的实例

我们以中药益智为例,展示如何构建神经保护活

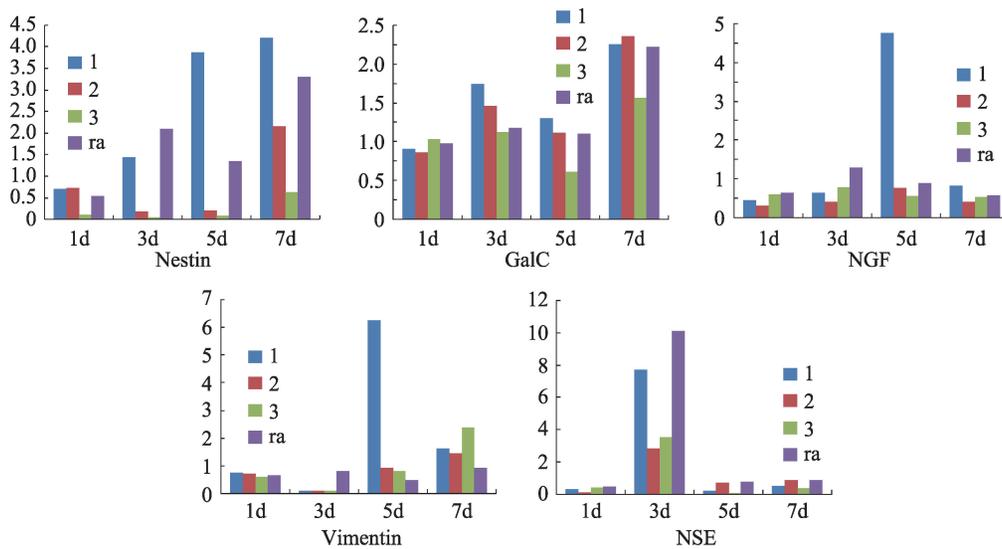


图2 益智仁中3个中药单体诱导bMSC基因转录强度的定量RCR检测
注:图中1号化合物为白杨素,2号化合物为圆柚酮,3号化合物为杨芽黄素

表2 使用NGF启动子筛选体系检测得到三种化合物和对照组相比相对荧光强度

单体名称	相对荧光强度/%
白杨素(chrysin)	154.4
杨芽黄素(tectochrysin)	188.5
圆柚酮(nootkatone)	244.4
(全反式)维甲酸(all-trans retinoic acid, RA)	100

性的“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”,对益智仁的3个黄酮类成分进行抗神经损伤化学成分的筛选。

4.1 实验方法与结果

4.1.1 NGF高通量模型的构建

HEK-293细胞(人胚肾上皮细胞)是真核蛋白表达常用的细胞之一,它具有以下优势:更快的生长速度,更高的生长密度、转染效率和外源蛋白表达量。因此,广泛应用于外源性基因转染的载体,以及蛋白表达体系的构建等。通过 lipo2000 将构建成功的质粒转染进入 HEK-293 细胞,成功构建稳转细胞株(图1)。当启动子被激活,可促进荧光素酶基因的转录并提高其蛋白的表达,通过检测荧光素酶的活性来直观快速显示单体化合物是否可能具有神经或血管保护活性。

4.1.2 具有上调NGF作用的中药单体化合物的筛选

针对益智仁的3个黄酮类单体化合物(白杨素、杨芽黄素和圆柚酮),以维甲酸(RA)为对照,采用前述分子靶向筛选高通量模型,测试各单体是否具有刺激细胞模型中NGF启动子转录作用。3个被测单体化合物的荧光素酶表达强度均高于对照品维甲酸,且圆柚酮

的表达量最强(表2)。

4.1.3 单体对BMSCs神经样细胞分化的诱导

为进一步验证单体化合物活性,以 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度,将各单体分别与BMSCs共培养1-7d,测定其基因转录水平,观察是否具有神经样或血管内皮样细胞分化的潜力。经3个单体化合物的诱导培养,BMSCs表面的5个神经细胞标志蛋白:神经生长因子(NGF)、半乳糖神经酰胺(GalC)、巢蛋白(Nestin)、神经元特异烯醇化酶(NSE)、波形蛋白(Vimentin)所对应的基因转录明显上调,说明BMSCs经过药物诱导后,具有向神经样细胞分化的作用,推测该3个单体化合物白杨素、杨芽黄素和圆柚酮可能具有神经保护活性(图2)。

本实验设3种单体化合物实验组(白杨素、杨芽黄素和圆柚酮组),阳性对照(维甲酸组),阴性对照(DMSO组),用各单体化合物处理BMSCs,检测在BMSCs细胞表面前述5种标志基因的mRNA转录水平变化。将阴性组(DMSO)的基因转录情况视为1,其他的每组转录情况除以阴性组转录情况,计算得到各组的相对转录强度。

由图2数据可见:各组与阳性对照维甲酸RA相比,诱导趋势基本一致;第3天,各实验组诱导BMSCs产生NSE基因相对转录水平均达峰值;第5天,白杨素(chrysin)组产生的NGF、Nestin和Vimentin基因转录水平均达峰值,GalC则在第7天达峰值;杨芽黄素(tectochrysin)组各基因转录水平上调量几乎都弱于对照维甲酸RA。本数据作为基因转录水平,反映了细胞

内对应的神经相关 mRNA 的转录效率,对应当天该蛋白增加的情况。对于 NGF、NSE、Vimentin 来说,若 3 d 已经合成了足够多的蛋白并在细胞内积累达到饱和,则不需要继续保持高转录强度,也能发挥该蛋白的功能。因此部分基因在 5 d 或者 7 d 后相对转录水平发生下降。数据显示 BMSCs 在受到白杨素、圆柚酮干预后,神经细胞特征性和分化相关的多种基因转录水平均发生了上调,推测两种单体化合物白杨素、圆柚酮具有提高 BMSCs 中某些神经细胞分化基因的转录水平、促进神经分化的生物活性,是益智仁发挥神经保护作用的药效物质基础组成部分。

4.1.4 单体化合物的体内药效学验证

针对单味中药和复方成药中的神经保护活性成分,我们采用“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”,各自进行相应单体化合物筛选,然后,逐一进行体内药效实验验证。

(1) 单味中药的神经保护单体化合物验证

从中药益智仁中,筛选出 2 个具神经保护作用单体,依次为白杨素、圆柚酮。为验证体内药效,课题组采用脑缺血-再灌注模型体内药效实验,进行了白杨素对脑缺血-再灌注损伤神经保护作用和相关研究验证,详见本刊“白杨素对脑缺血-再灌注损伤的神经保护机制研究”一文。通过建立脑缺血-再灌注大鼠模型考察了不同剂量白杨素给药组神经功能评分、脑梗死体积、脑含水量的变化,结果显示白杨素具有减轻缺血-再灌注损伤中神经损伤的作用,同时对各组脑缺血半暗带进行组织学染色,观察到给药后组织空泡减少,联系紧密,病变减轻。综上所述,体内药效实验证实:白杨素通过上调脑缺血-再灌注损伤组织部位中 NGF 和 BDNF 蛋白表达,促进神经细胞的再生,减轻神经损伤症状,发挥治疗神经元损伤的作用。

(2) 经典成方十五味木香丸神经保护活性成分验证

针对临床应用广泛的藏药经典名方,我们追踪到病人入血成分之一,一种倍半萜内酯类化合物--木香炔内酯(costunolide)。以木香炔内酯为诱导剂,用“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”体外检测出其对 BMSCs 向神经样细胞分化的诱导作用,用脑缺血-再灌注损伤大鼠模型体内验证其神经保护药效,详见本刊“木香炔内酯诱导骨髓间充质干细胞用于脑缺血再灌注损伤治疗”一文,也与临床疗效和文献报道^[20]不谋而合;

(3) 经典名方如意珍宝丸神经保护活性成分验证

我们对中动脉阻断缺血大鼠进行藏药名方灌胃给药,采用 HPLC 进行口服给药前后血液成分对比,追踪到血清中两种含量较大的单体成分鞣花酸(ellagic)和木犀草素(luteolin),将 2 种单体化合物加入至 E2 高通量筛选模型中,均可上调 HEK-293 细胞中的 E2 荧光素酶表达,显示具神经保护作用;又与 BMSCs 共培养后,经诱导后的 BMSCs 显著性地上调了神经细胞的标志性基因的转录水平,说明单体鞣花酸和木犀草素可诱导 BMSCs 向神经样细胞分化或具有神经保护样作用。最后,进行体内神经保护药效实验验证,单体鞣花酸和木犀草素均能显著减少缺血再灌注引起的脑组织梗死体积(TTC 染色),减轻脑水肿率,保持组织结构完整(H&E 染色),显著性的减少损伤部位细胞凋亡,从而降低神经元损伤,证实了从藏药名方如意珍宝丸中提取得到的单体鞣花酸、木犀草素能减轻脑缺血损伤症状,具有神经保护活性^[21-23]。

综上所述,运用“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”筛选,可对单味中药和复方成药中的微量单体化合物进行活性筛选,且结果均准确、可靠。

5 结论

我们以质粒初筛配合干细胞体外诱导,建立“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”,快速发现中药单味药和复方中潜在的神经保护或血管修活性成分,该微量成分活性筛选方法,简洁、快速,具有较好准确性和可靠性;由于时间有限,我们仅仅进行了神经保护/血管保护活性的模型构建,即:以 NGF 启动子质粒模型结合 BMSCs 共培养,检测 5 种神经标志基因用于神经保护活性单体的筛选;和通过 VEGF 启动子质粒模型结合 BMSCs 共培养,检测 3 种血管标志基因用于血管保护活性单体的发现(数据已发表^[23]),另外,关于肝脏、肾脏保护修复其他活性单体筛选模型和验证实验正在进行。

值得一提的是,神经损伤和血管损伤为脑缺血两个主要要素,采用我们的“分子靶向筛选+干细胞定向诱导模型”,配合体内中动脉阻断-再灌注经典模型药效实验,为寻找新的抗脑缺血候选药物分子提供新思路和新工具。

6 讨论

传统单体化合物活性筛选方式多以模型细胞的存

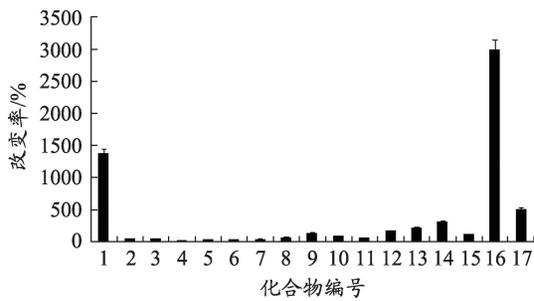


图3 来自三个藏药的17个小分子化合物对NGF基因表达的影响

活率作为药物活性的评判标准(如MTT, CCK8), 其优势为通过给药浓度与细胞生存率等直观指标, 快速判断单体化合物活性, 但若需明确作用靶点及机制, 则必须进行体内药效实验研究, 单体消耗量大、作用靶点难以明确。

此外, 亦有利用亲和色谱法通过单体化合物与作用靶点的特异性吸附, 对与靶点相结合的药物进行洗脱、鉴定是目前筛选微量活性化合物的热点方案, 相对于传统药物筛选模式具有一定优势, 但仅能锁定对作用靶点具特异性靶向作用的单体化合物, 若系因调节其他生物因子间接起效的单体分子, 则会漏筛, 而且可与靶点结合的小分子不一定是活性成分, 可能并不引起下游生物通路的改变, 甚至起到相反抑制作用。因此, 该方法实质上并未完全突破中药微量成分活性研究瓶颈, 其准确性和效率有待提高。

以单基因作为指标进行筛选的模型, 多以靶基因调控序列中特定转录因子或受体的结合位点为靶点, 靶点单一、筛选得到仅针对单结合位点的活性成分。而基因启动子序列中往往含多个、多种不同调控因子的结合位点, 故本文模型前部分以启动子为筛选序列(靶点), 有望获得影响该基因表达大类成分, 扩大了筛选范围, 后利用干细胞可塑性强、可分化成多种类型细胞的特质, 测定干细胞表面表达的特定标志基因, 借以

高效、快速判断微量单体化合物活性和可能机制。该方法相对传统方法具有可筛选范围广、效率高、准确性高的优势。例如本课题组对来自三个藏药(如意珍宝丸、二十味沉香丸、二十五味珊瑚丸)的17种小分子化合物使用NGF-293细胞模型进行筛选。这17种化合物覆盖了黄酮类、萜类、苯丙素类、胡萝卜素类等多种类别。结果显示, 其中有3种化合物(分别为1种黄酮类、2种萜类)对NGF启动子有较为明显的上调作用(图3)。进一步使用干细胞研究的结果(图4), 1和16两种化合物对bMSC细胞中NGF启动子有较好的上调作用^[24]。这证明了本筛选体系在待测化合物较多的时候仍然能有保持较高的效率, 并可以验证得到有促进神经相关因子分泌提高的化合物。此外, 本课题组针对VEGF也建立了不同的药物筛选干细胞模型, 检测了木香烃内酯、芒果苷等4种化合物对VEGF-293细胞的转录激活作用, 以及对bMSC中CD31、 α -SMA等与血管再生有关的基因转录水平^[25]。同时, 本研究在体外建立了基于干细胞技术的药物筛选模型。首次发现, 在中药单一天然小分子诱导下, 大鼠骨髓间充质干细胞可向神经细胞分化, 并转录了与神经干细胞、神经元、少突胶质细胞等分化相关的基因。这不仅为神经损伤后修复以及再生提供了有利的证据, 有助于含量低的中药化学成分生物活性的发现, 也可以通过干细胞的多能性、选择性, 为中药微量成分的临床应用和干细胞移植提供参考。

面对现今中药药效物质不明确、指标性成分和药效关联性不强、少数指标成分的含量测定无法控制整体质量等关键问题, 本技术有助于发现更多来自中药的小分子活性化合物, 强化整体控制、多成分控制、特征专属性控制, 为完善中药质量评价模式、提高中药标准水平、阐释中药药效物质基础, 提供了具有原创性和实用性的研究思路和方法体系。

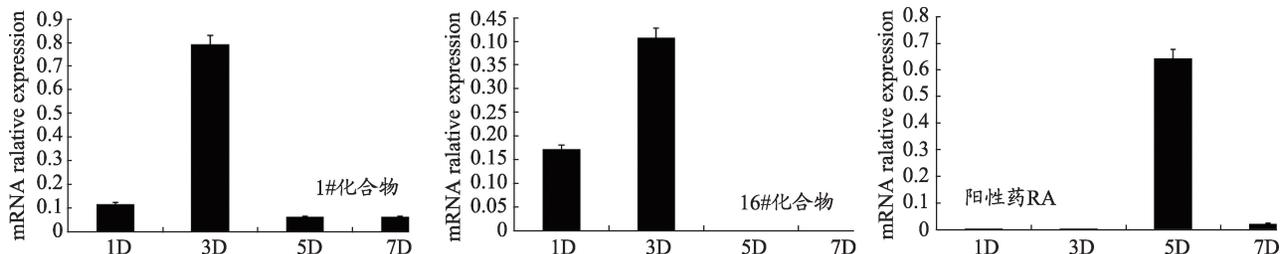


图4 来自三个藏药的两个化合物对bMSC细胞NGF基因转录水平的影响

参考文献

- 高梅, 杜冠华. 抗脑缺血药物的研究现状进展. 中国医药导刊, 2006, 8(5): 323-325.
- Mu MW, Zhao ZY, Li CG. Comparative study of neural differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by different induction methods. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 14169-14176.
- Choi CB1, Cho YK, Prakash KV, *et al.* Analysis of neuron-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 350(1): 138-146.
- Keum SB, Joon BP, Hyun SK, *et al.* Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*, 2011, 52(3): 401-412.
- Black IB, Woodbury D. Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. *Blood Cells Mol Dis*, 2001, 27(3): 632-636.
- Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al.* In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 282(1): 148-152.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al.* Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*, 2000, 164(2): 247-256.
- Xiong N, Yang H, Liu L, *et al.* bFGF promotes the differentiation and effectiveness of human bone marrow mesenchymal stem cells in a rotenone model for Parkinson's disease. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(2): 411-422.
- Sun X, Jiang H, Yang H. In vitro culture of bone marrow mesenchymal stem cells in rats and differentiation into retinal neural-like cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2007, 27(5): 598-600.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, *et al.* Adult Bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*. *Exp Neurol*, 2000, 164(2): 247-256.
- Deng W, Obrocka M, Fischer I, *et al.* In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 281(1): 148-152.
- Lu YJ, Lu Q, Su RK, *et al.* Study on alantolactone-induced differentiation of mesenchymal stem cells into vascular cells. *Traditional Medicine Research*, 2018, 3(4): 181-190.
- 陈建梅, 张馥敏, 王连生, 等. 辛伐他汀对骨髓间充质干细胞增殖及分泌功能影响的研究. 南京医科大学学报(自然科学版), 2010, 30(1): 20-24.
- Gleeson LC, Ryan KJ, Griffin EW, *et al.* The beta(2)-adrenoceptor agonist clenbuterol elicits neuroprotective, anti-inflammatory and neurotrophic actions in the kainic acid model of excitotoxicity. *Brain Behav Immun*, 2010, 24(8), 1354-1361.
- 张雯, 宋俊科, 杜立达, 等. 急性脑缺血治疗药物研究进展. 神经药理学报, 2014, 4(4): 50-58.
- Emanuelli C. Nerve growth factor promotes Angiogenesis and Arteriogenesis in ischemic hindlimbs. *Circulation*, 2002, 106(17): 225.
- Yang JP, Liu HJ, Yang H, *et al.* Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. *Neurol Sci*, 2011, 32(3): 433-441.
- Bonilla IE, Tanabe K, Strittmatter SM. Small proline-rich repeat 1A is expressed by axotomized neurons and promotes axonal outgrowth. *J Neurosci*, 2002, 22(4): 1303-1315.
- Li X, Zuo X, Jing J, *et al.* Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(2): 195-203.
- 潘阳, 王小静, 潘娟, 等. 木香炔内酯的药理作用及构效关系研究进展. 中南药学, 2013, 11(2): 108-112.
- 卢琼. 脑缺血药物筛选细胞模型的构建及应用研究. 成都: 西南交通大学硕士研究生学位论文, 2014.
- Tan LW, Liang C, Wang YY, *et al.* Pharmacodynamic effect of luteolin micelles on alleviating cerebral ischemia reperfusion injury. *Pharmaceutics*, 2018, 10(4): 248.
- 吴莹, 谭立伟, 梁晨, 等. 没食子酸改善脑缺血再灌注损伤大鼠的药效评价. 中药药理与临床, 2018, 34(2): 28-32.
- 马晓玲. 三个藏药经典方的脑缺血药效物质基础研究. 成都: 西南交通大学硕士研究生学位论文, 2016.
- 卢彦姣. 三个藏药经典方中血管再生活性单体化合物的筛选及药效研究. 成都: 西南交通大学硕士研究生学位论文, 2018.

A New Method for Screening Active Ingredients of Neuroprotection in Traditional Chinese Medicine by Using Stem Cells

Tan Rui¹, Zhao Qian^{1,2}, Lu Qiong¹, Ma Xiaoling¹, Li Jinsheng¹, Cai Shaoqing²

(1. School of Life Science and Engineering, College of Medicine, Southwest Jiaotong University, Chengdu 610031, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract: Objective: To construct a cell model that can be used for drug screening by using stem cells, and initially establish a new method for finding active ingredients of traditional Chinese medicines. Methods: First, the sequence of the nerve growth factor (NGF) promoter was cloned, ligated into the plasmid containing the luciferase reporter gene/E2 red fluorescent protein, and the synthetic plasmid was transferred into HEK-293 cells, and the construction was started based on a preliminary screening of stable cell models. The positive drug was used to verify the accuracy of the cell model, and the model was used to screen small molecule compounds from Chinese medicine. Then, the obtained compound was used to induce bone marrow mesenchymal stem cells of the rat, and the transcription level of the relevant neurotrophic factor was detected to verify the biological activity of the small molecule compound to be tested for nerve growth. Results: Three compounds from Chinese medicine Fructus Alpiniae Oxyphyllae, chrysin, nootkatone and popidin, activated the NGF promoter. Cellulose neuronal markers: nerve growth factor (NGF), galactosylceramide (GalC), nestin (Nestin), neuron-specific enolase (NSE), waveforms after induction of MSCs at different times in MSCs. The transcription level of the protein (Vimentin) corresponded to different degrees of RNA. However, popoflavin did not clearly promote the activity of neural cell differentiation. Conclusion: Chrysin and nootkatone can promote the differentiation of stem cells into neural cells, which is a component of the neuroprotective effect of traditional Chinese medicine.

Keywords: BMSCs, chrysin, nootkatone, NGF, drug screening

(责任编辑:周哲琦,责任译审:王 昭)