

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.15.008  
文章编号: 1005-8982 (2023) 15-0046-07

实验研究·论著

## 淫羊藿苷对人牙髓干细胞神经向分化作用的初步研究\*

张欣然<sup>1</sup>, 李昊天<sup>2</sup>, 杨文文<sup>1</sup>, 黎森<sup>1</sup>, 刘俊平<sup>1</sup>, 唐路<sup>1</sup>, 赵颖<sup>1</sup>  
(首都医科大学宣武医院 1. 口腔科, 2. 骨科, 北京 100053)

**摘要:** **目的** 探讨淫羊藿苷(ICA)对人牙髓干细胞(DPSC)神经向分化的作用。**方法** 分离培养DPSCs后, 采用不同浓度ICA(0.01  $\mu\text{mol}$ 、0.10  $\mu\text{mol}$ 、1.00  $\mu\text{mol}$ 、10.00  $\mu\text{mol}$ )处理DPSCs。CCK-8法检测ICA对细胞增殖活力的影响, 确定其最佳促DPSCs增殖浓度。分别进行细胞形态学观察和Nestin细胞免疫荧光检测。Western blotting检测DPSCs神经向分化相关蛋白Nestin、 $\beta\text{III-tubulin}$ 及NSE的表达。**结果** 不同浓度ICA细胞相对活力值比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其中以0.10  $\mu\text{mol}$  ICA细胞相对活力最高。与对照组比较, ICA组神经球的直径增加( $P < 0.05$ ), Nestin荧光强度增强( $P < 0.05$ ), Nestin、 $\beta\text{III-tubulin}$ 、NSE蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ )。**结论** ICA能够有效促进DPSCs增殖, 提高DPSCs神经向分化能力。

**关键词:** 淫羊藿苷; 牙髓干细胞; 神经向分化

**中图分类号:** R741

**文献标识码:** A

## Preliminary study of Icarin on neural differentiation of human dental pulp stem cells\*

Zhang Xin-ran<sup>1</sup>, Li Hao-tian<sup>2</sup>, Yang Wen-wen<sup>1</sup>, Li Miao<sup>1</sup>, Liu Jun-ping<sup>1</sup>, Tang Lu<sup>1</sup>, Zhao Ying<sup>1</sup>  
(1. Department of Stomatology; 2. Department of Orthopedics, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Icarin (ICA) on the neural differentiation of human dental pulp stem cells (DPSCs). **Methods** After isolating and culturing DPSCs through primary culture, ICA with different concentrations (0.01  $\mu\text{mol}$ , 0.10  $\mu\text{mol}$ , 1.00  $\mu\text{mol}$ , 10.00  $\mu\text{mol}$ ) was added into DPSCs. The effects of ICA in different concentrations on proliferation of DPSCs were assessed by CCK-8 assay to select the optimal concentration. Then, the effects of ICA on neural differentiation of DPSCs were observed. The cell morphologies were observed by microscope. Immunofluorescence staining was used to observe the expression of Nestin. Western blotting was used to detect the expressions of Nestin,  $\beta\text{III-tubulin}$  and neuron-specific enolase (NSE). **Results** The results of variance analysis showed that there were differences in the relative vitality values of different concentrations of ICA groups ( $P < 0.05$ ), and the relative vitality of 0.1  $\mu\text{mol}$  ICA group was the highest. More neurosphere formation was noted and the upregulation of Nestin was observed in the ICA group. And the diameters of neurospheres in the ICA group were significantly increased compared that of the control group ( $P < 0.05$ ). Compared with the control group, the fluorescence expression of Nestin in the ICA group was increased ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that expressions of neural differentiation-related protein Nestin,  $\beta\text{III-tubulin}$ , NSE

收稿日期: 2023-01-10

\* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 62005185, No: 62105226); 北京市医院管理中心“青苗”计划专项经费资助(No: QML20230809); 宣武医院国自然青年培育项目(No: QNPY2020025)

[通信作者] 赵颖, E-mail: zhying19@aliyun.com; Tel: 010-83198375

increased significantly in the ICA group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ICA can effectively promote the proliferation and neuronal differentiation of DPSCs.

**Keywords:** icariin; human dental pulp stem cells; neural differentiation

神经损伤及以阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 为代表的神经退行性疾病不仅严重影响患者生活质量, 也给家庭带来巨大的经济负担。由于机体内神经前体细胞数量有限, 成熟的神经系统缺少前体细胞产生新的神经元和胶质细胞, 因此损伤后的神经很难自我恢复, 目前传统的治疗方法 (如外科干预、物理刺激等) 对神经功能性恢复作用十分有限<sup>[1]</sup>。干细胞治疗这一方式的提出为神经系统的修复和再生带来新的希望。目前以干细胞为基础的治疗方式已经取得了一定的进展。干细胞移植能够有效促进神经细胞功能修复及组织再生, 其中, 牙髓干细胞 (dental pulp stem cell, DPSC) 是在胚胎发育过程中从神经嵴分化而来, 其在一定条件下可以被诱导成神经干细胞等神经细胞。DPSCs 移植到大脑损伤区域后, 可分化为神经胶质细胞和神经元, 体视学可见小脑分子层、颗粒层及白质体积明显增加, 浦肯野细胞的退化被遏制, 为神经系统疾病的治疗提供可能<sup>[2]</sup>。

淫羊藿苷 (Icariin, ICA) 是从传统中草药小檗科淫羊藿属植物——淫羊藿的茎叶中提取, 为黄酮类物质, 具有抗凋亡、抗炎、抗氧化等作用。ICA 可以促进间充质干细胞的增殖及成骨向分化。有关神经干细胞 (neural stem cell, NSC) 的研究报道, ICA 可促进 NSCs 的增殖和分化<sup>[3]</sup>, 也有研究表明, ICA 可促进间充质干细胞的神经向分化作用<sup>[4-5]</sup>。目前 ICA 对牙源性干细胞的影响罕见报道, 因此, 本研究拟探讨 ICA 在体外环境下对 DPSCs 神经向分化的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和材料

ICA (上海阿拉丁生化科技股份有限公司),  $\alpha$ -MEM、Neurobasal-A 培养基 (美国 Gibco 公司), B-27 Supplement、碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) (美国 Invitrogen 公司), 胎牛血清 (江苏四季青生物科技有限公司), 胰蛋白酶、I 型胶原酶、Dispase (北京索莱宝科技有限公司), RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (江苏碧云天高新技术有限公司),

PVDF 膜 (美国 Millipore 公司), 抗 Nestin 抗体、抗  $\beta$  III-tubulin、抗 NSE、抗  $\beta$ -actin、小鼠 Alexa Fluor 488 二抗 (美国 Santa Cruz 公司), 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF)、CD29、Stro-1、CD45、CD106 (美国 BD 公司)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 DPSCs 分离培养和神经向诱导分化** 本研究经首都医科大学宣武医院伦理委员会批准 (批准号: 临研审[2021]004 号), 且所有患者知情同意。收集首都医科大学宣武医院口腔科门诊拔除的健康无龋坏第三磨牙, 按照参考文献[5]进行细胞提取与培养: 于无菌条件下劈开牙冠, 取出牙髓组织, 超净台上剪碎牙髓组织后, 配置混合酶消化液 (3 g/L I 型胶原酶、4 g/L dispase) 于 37 °C 下消化 1 h 至组织成絮状, 用 70  $\mu$ mol 细胞筛收集细胞, 1 100 r/min 离心 5 min 后弃上清, 使用  $\alpha$ -MEM 培养基, 添加 20% 胎牛血清和 1% 双抗重悬后接种于 T25 培养瓶中, 置于 37 °C、5% 二氧化碳培养箱中培养。观察细胞生长状况至 80% ~ 90% 融合时进行传代培养, 取 P3 ~ P5 代细胞用于后续实验。使用流式细胞仪检测第 3 代细胞表面标志物抗原 CD29、Stro-1、CD45、CD106 的表达。

配制神经向诱导培养基<sup>[6]</sup> (NSC 优势培养基 Neurobasal-A 添加 2% B-27 Supplement、20  $\mu$ g/L bFGF、20  $\mu$ g/L EGF、2 mmol/L 谷氨酰胺、100 IU/mL 青链霉素) 用于后续诱导 DPSCs 细胞神经向分化。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞活力** DPSCs 接种于 96 孔板中, 细胞密度为  $1 \times 10^3$  个/孔, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 ICA (0.01  $\mu$ mol、0.10  $\mu$ mol、1.00  $\mu$ mol、10.00  $\mu$ mol) 培养 48 h, 每组设置 3 个复孔。检测前吸弃培养基, 每孔加入 100  $\mu$ L 新配置的 CCK-8 反应液后于 37 °C 孵育 4 h, 使用酶标仪于 450 nm 波长处测定 OD 值, 以不加入 ICA 的单纯培养基培养 DPSCs 为对照组, 以无细胞的单纯培养基为空白组。细胞存活率<sup>[7]</sup> =  $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ , 筛选出最佳促增殖浓度的 ICA 用于后续实验。

**1.2.3 细胞形态学观察** 接种 DPSCs 于低吸附细

胞培养板中,细胞密度为  $1 \times 10^5$  个/孔,用含  $0.10 \mu\text{mol}$  ICA (ICA 组) 的神经向诱导培养基培养细胞,以不加 ICA 的神经诱导培养基为对照组 (Con 组),每组设置 3 个复孔。每 3 天进行 1 次半换液,诱导培养 7 d,每天于光学显微镜下观察各组细胞的形态变化,并统计细胞直径大小。

**1.2.4 细胞免疫荧光染色** 于诱导分化的第 7 天,吸弃各组培养基,制作各组细胞玻片。室温下使用 4% 多聚甲醛固定细胞玻片 30 min, PBS 洗涤 5 次。使用 0.2% Triton X-100 通透 20 min, 5% BSA 封闭 1 h 后,加入一抗 Nestin (1:500) 于  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。PBS 洗涤 5 次后,加入小鼠 Alexa Fluor 488 二抗室温避光孵育 1 h, 细胞核用 DAPI 复染 3 min 后洗涤,抗淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下进行观察并拍照。每组实验重复 3 次。

**1.2.5 Western blotting 检测 Nestin、 $\beta$  III-tubulin 及 NSE 蛋白表达** 于诱导分化的第 7 天离心收集各组细胞于 EP 管中用于 Western blotting 检测。使用 RIPA 裂解液于冰上裂解各组细胞,  $4^\circ\text{C}$  离心收集上清液, BCA 标准蛋白定量测定蛋白浓度。制备蛋白变性样品,将煮沸后的样品进行 SDS-PAGE 电泳分离,转移至 PVDF 膜上,洗去多余电转液,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。分别加入  $\beta$  III-tubulin (1:1000)、Nestin (1:1000)、NES (1:1000)、 $\beta$ -actin (1:1000) 一抗于  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。TBST 分别洗膜 3 次,每次洗膜 5 min 后加入对应的二抗于室温下孵育 2 h,以  $\beta$ -actin 为内参, TBST 洗膜后加入 ECL 化学发光试剂进行曝光并拍照。每组实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 Graphpad 5.0 和 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组比较用方差分析,进一步两两比较用  $t$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 DPSCs 的原代培养及鉴定

剪碎牙髓组织块后,酶解法培养 3 ~ 5 d 后,于显微镜下可见培养瓶内有少量细胞爬出,细胞形态呈长梭形,培养至第 10 天时,可见局部有大量细胞呈旋涡状排列。培养 20 d 左右细胞融合达 80% ~ 90% 融合,使用胰酶进行传代培养。DPSCs

传至第 3 代时,细胞在培养瓶内分布均匀,形态呈梭形,互相接触,呈放射状紧密联系及排列,为典型的成纤维细胞形态 (见图 1)。流式细胞术检测结果显示:间充质干细胞表面标志物 CD29、Stro-1 为阳性表达,阳性表达率分别为 95.77% 和 97.45%;造血干细胞表面标志物 CD45、CD106 为阴性表达,阴性表达率分别为 1.36% 和 1.30% (见图 2),表明 DPSCs 分离成功,可用于后续实验。

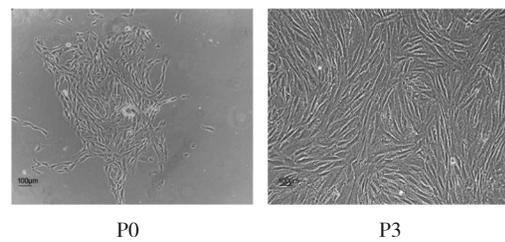


图 1 DPSCs 原代培养

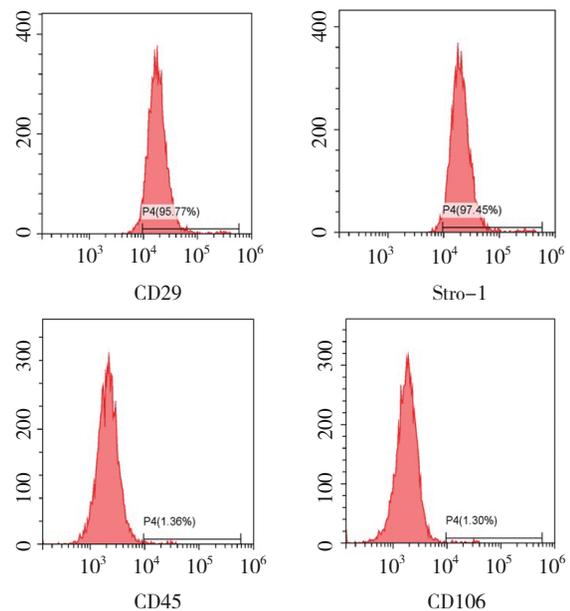


图 2 DPSCs 流式细胞术检测

### 2.2 不同浓度 ICA 组 DPSCs 相对活力的比较

加入不同浓度的 ICA ( $0.01 \mu\text{mol}$ 、 $0.10 \mu\text{mol}$ 、 $1.00 \mu\text{mol}$ 、 $10.00 \mu\text{mol}$ ) 培养细胞 48 h 后检测 DPSCs 相对活力, CCK-8 法实验结果显示,各组细胞存活率分别为  $(99.39 \pm 7.83)\%$ 、 $(110.11 \pm 3.72)\%$ 、 $(121.50 \pm 13.55)\%$ 、 $(119.32 \pm 14.25)\%$ 、 $(112.48 \pm 6.41)\%$ 。不同浓度 ICA 组的 DPSCs 相对活力值比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 3.718$ ,  $P = 0.027$ ) (见图 3)。选取 DPSCs 相对活力值最高的  $0.10 \mu\text{mol}$  ICA 用于后续神经向诱导实验。

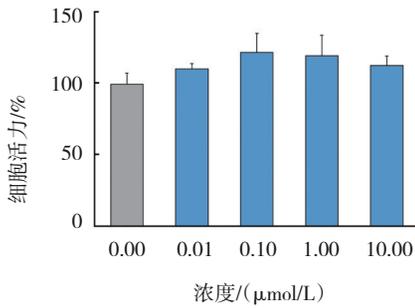


图3 不同浓度ICA组DPSCs相对活力比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 ICA 促进 DPSCs 来源的神经球形成

神经向诱导分化后,细胞形态发生了很大的变化,原本为长梭形的 DPSCs 胞体缩小成圆形,细胞有成球生长趋势,呈现出类似于神经细胞的形态。随着培养时间的增加,细胞不断聚集形成神经球样结构。加入 0.10  $\mu\text{mol}$  ICA 后,光学显微镜下可见 ICA 组神经球直径不断增大,说明 ICA 的加入有助于细胞的聚集成球(见图 4)。对各组形成的神经球直径进行统计,对照组(Con 组)与 ICA 组神经球直径分别为 ( $67.57 \pm 21.34$ )、( $137.14 \pm 44.98$ )  $\mu\text{m}$ 。ICA 组与 Con 组神经球直径比较,经  $t$  检验,差异有统计学意义 ( $t=3.697, P=0.003$ )。ICA 组神经球直径较 Con 组增大 ( $P<0.05$ )(见图 5)。

### 2.4 ICA 促进 DPSCs 来源的神经球 Nestin 免疫荧光表达

Nestin 荧光染色结果显示,两组细胞形态均

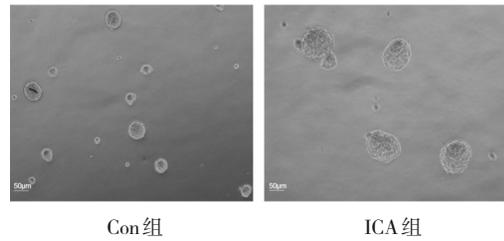


图4 光学显微镜下观察神经球的形成

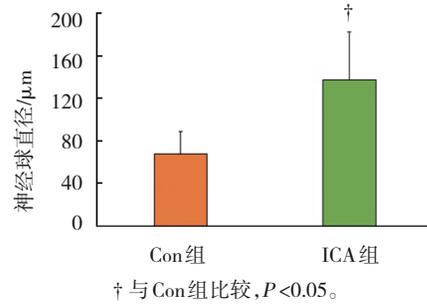


图5 神经球直径大小比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

呈球形, Nestin 呈阳性表达,但与 Con 组比较, ICA 组可见神经球样结构直径增大,与光学显微镜下观察结果一致(见图 6)。Con 组与 ICA 组 Nestin 荧光强度相对值分别为 ( $0.43 \pm 0.08$ )、( $0.82 \pm 0.07$ ) ,经  $t$  检验,差异有统计学意义 ( $t=6.956, P=0.000$ )。ICA 组 Nestin 荧光强度增加 ( $P < 0.05$ ) (见图 7)。

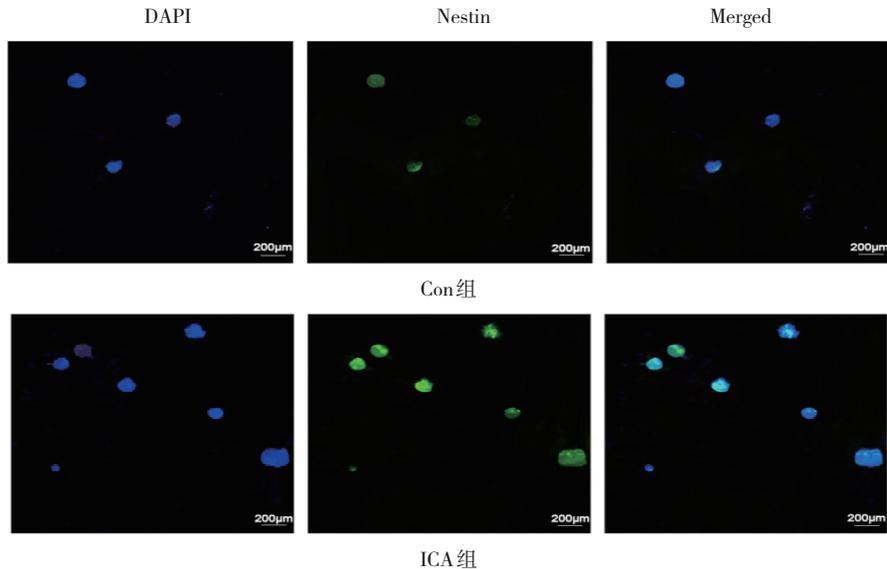
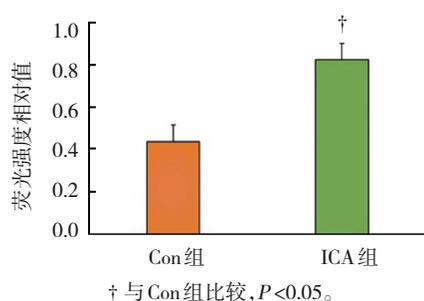


图6 Nestin 细胞免疫荧光染色



† 与Con组比较,  $P < 0.05$ 。  
图7 荧光强度相对值比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

## 2.5 ICA组与Con组各神经相关蛋白 Nestin、 $\beta$ III-tubulin、NSE 表达的比较

Western blotting 检测结果显示, 各组细胞中神

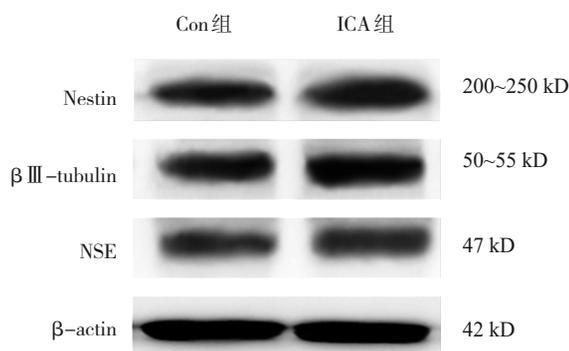
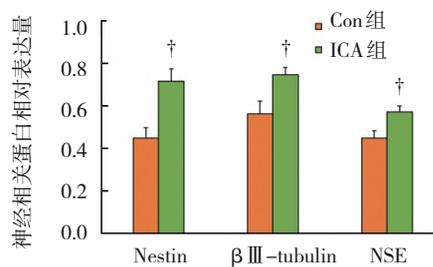


图8 ICA组与Con组各神经相关蛋白的表达

经相关蛋白 Nestin、 $\beta$  III-tubulin、NSE 的表达见图8。Con组和ICA组Nestin蛋白相对表达量分别为(0.45 ± 0.05)、(0.71 ± 0.06), 两组比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 6.057, P = 0.004$ ), ICA组Nestin蛋白相对表达量升高。Con组和ICA组 $\beta$  III-tubulin蛋白相对表达量分别为(0.56 ± 0.06)、(0.75 ± 0.04), 两组比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 4.484, P = 0.011$ ), ICA组 $\beta$  III-tubulin蛋白相对表达量升高。Con组和ICA组NSE蛋白相对表达量分别为(0.45 ± 0.04)、(0.57 ± 0.03), 两组比较, 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t = 4.699, P = 0.009$ ), ICA组NSE蛋白相对表达量升高(见图9)。



† 与Con组比较,  $P < 0.05$ 。

图9 ICA组与Con组各神经相关蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

## 3 讨论

创伤、神经退行性疾病等可导致受损区域的神经元损伤、变性甚至死亡, 成熟的神经元在受损后不能再生。传统治疗通常采用外科手术干预配合药物、康复治疗等, 预后恢复受限, 不能从根本上解决神经元缺失的问题, 严重影响患者身体健康和生活质量<sup>[8]</sup>。干细胞是一类非特化细胞, 具有自我更新及分化为多种细胞的潜能, 干细胞移植是目前治疗神经损伤最有前途的治疗措施, 其可以在损伤部位增殖、分化形成神经元和/或胶质细胞等, 促进功能性恢复。NSCs在神经损伤的细胞治疗中具有重要地位, 其可以从大脑海马下区或脊髓中央管分离得到。NSCs具有自我更新及分化为所有神经外胚层细胞的能力, 可代替损伤区的受损细胞<sup>[9]</sup>, 但其细胞数量少、取材困难, 难以满足临床和研究需要。间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)移植后可发挥多潜能分化作用, 在适宜的诱导条件下可分化为NSCs或神经元等, 还可通过自分泌及旁分泌效应与内环境中

其他细胞相互作用, 促进神经损伤的再生与修复<sup>[10]</sup>。

与骨髓间充质干细胞(bone marrow stem cell, BMSC)及脂肪来源的间充质干细胞(adipose-derived stem cell, ADSC)比较, DPSCs在临床获取较易, 可从临床常规拔除的牙齿(智齿、正畸减数牙、脱落乳牙等)中提取培养, 临床标本数量充足且伦理学争议少, 因此成为干细胞领域研究的热点<sup>[11]</sup>。目前研究<sup>[12]</sup>表明, 在胚胎发育过程中, DPSCs来源于神经嵴细胞, 与神经细胞具有同源性, 自身高表达神经细胞标志物; DPSCs较BMSCs、ADSCs等具有更好的增殖率和分化活力, 并且有一定的旁分泌作用, 能够分泌神经营养因子, 说明其具有更好的神经保护作用。DPSCs在幼稚状态下也可自发地表达早期神经元和神经嵴标志物Nestin等<sup>[13]</sup>, 在神经向分化后可表达成熟的神经元标志物 $\beta$  III-tubulin、GATA3等<sup>[14]</sup>, 即这种细胞易于分化为功能性神经元, 因此适合作为NSCs的替代细胞来源。

在干细胞神经向分化的诱导方式中, 常常运用

化学试剂、细胞因子等进行细胞诱导。近年来许多学者对传统中医药在神经损伤和修复中的作用进行了研究,其中淫羊藿是一种已广泛使用了数千年的药物,其具有补肝肾、强筋健骨等功效。ICA 是从淫羊藿中提取的主要活性成分,属于黄酮类化合物,其在骨骼系统、神经系统、免疫系统等多方面具有一定的药理活性,能够促进成骨细胞生长、调节免疫水平、调控机体代谢等<sup>[6]</sup>。ICA 在对神经损伤(如脑损伤、脊髓损伤、缺血再灌注损伤等)及神经退行性疾病治疗与研究中取得了瞩目的进展。有研究表明,ICA 对脑损伤后的大脑神经组织具有保护作用,其具有强大的抗缺血再灌注功能,通过改善血流变化、抑制小胶质细胞激活,发挥脑保护作用<sup>[15]</sup>。ZHU 等<sup>[16]</sup>研究表明,ICA 在脑损伤后可以抑制脂质过氧化与炎症反应,通过抑制相关凋亡通路如 Caspase 通路,显著降低神经元凋亡比例,从而促进神经功能恢复。在进一步脊髓损伤的研究中,LI 等<sup>[17-18]</sup>证实了 ICA 能够抑制脊髓损伤后促炎症细胞因子及中性粒细胞的表达,显著降低 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平;同时,ICA 还可提高机体的抗氧化酶 SOD 活性,抑制脊髓损伤后自由基激增,降低氧化应激产物 MDA 等水平。ICA 可以维持神经系统稳态,维持神经元的正常形态与功能,促进神经干细胞的增殖与神经球的形成,从而对神经退行性疾病发挥保护作用。有研究报道,在 AD 和帕金森综合征(Parkinson's syndrome, PD)这 2 种以神经元退行性病变为特征的疾病中,ICA 可通过多种途径抑制神经元凋亡,对神经元起保护作用<sup>[19]</sup>。

ICA 在神经系统中的机制与应用是目前神经科学的前沿,其神经保护机制尚不明确。最新研究提示,ICA 可能通过调控干细胞的增殖与分化等发挥其相关作用<sup>[20]</sup>。体外研究表明,ICA 可促进 NSCs 的增殖及神经球的形成,并且其相关机制可能与激活 ERK/MAPK 通路或 Wnt 通路相关<sup>[21]</sup>。动物实验表明,ICA 可以促进内源性干细胞向神经细胞分化,改善神经损伤大鼠的神经病理改变<sup>[22]</sup>。此外,ICA 也可以促进 MSCs 的神经向分化,病理改变促进 ADSCs 的增殖,诱导 ADSCs 的神经向分化,上调施旺细胞标志物 S100、P75、GDNF 等<sup>[23]</sup>。因此可推测,ICA 可能具有调控牙源性干细胞 DPSCs 分化与增殖的作用,并可能促进其神经向分化。既往研究表明,0.01 ~ 10.00  $\mu\text{mol}$  的 ICA 可显著促进 MSCs 细胞增殖,其中促进效果最佳的浓度为 0.10  $\mu\text{mol}$ <sup>[24]</sup>。WEI 等<sup>[25]</sup>针对 ICA 对大鼠

来源的 BMSCs(rBMSCs)的研究表明,ICA(0.10  $\mu\text{mol}$ ) 在 1 ~ 14 d 内可显著提高 rBMSCs 增殖活力,但当 ICA 浓度超过 20.00  $\mu\text{mol}$  时,对 rBMSCs 增殖活力则具有一定的抑制作用<sup>[26]</sup>。同时研究表明,当 ICA 浓度过低时,例如 0.001  $\mu\text{mol}$ ,则对增殖无明显作用<sup>[27]</sup>。总体上认为 ICA 对细胞增殖活力具有促进作用的浓度范围为 0.01 ~ 10.00  $\mu\text{mol}$ 。本研究首先探索不同浓度的 ICA 对 DPSCs 增殖活力的影响,结果表明,0.10  $\mu\text{mol}$  ICA 可显著促进 DPSCs 的增殖活力,因此后续实验中使用 0.10  $\mu\text{mol}$  ICA 进行其对 DPSCs 神经向分化的研究。本实验在 DPSCs 神经向诱导的基础上加入 ICA,结果显示 ICA 组诱导形成的神经球直径明显增加。神经球是由于细胞不断自我更新和球聚集产生的,首先形成一些小的神经球,然后每个神经球通过细胞分裂与其他细胞团聚集形成大的神经球,神经球直径的大小反映了神经球的增殖潜能<sup>[28]</sup>,说明 ICA 可以促进 DPSCs 来源的神经球形成。本实验进一步采用细胞免疫荧光染色及 Western blotting 检测神经向分化相关蛋白 Nestin、 $\beta$  III-tubulin、NSE 的表达,结果显示,加入 ICAs 后,神经各相关蛋白相对表达量均较对照组有明显升高,说明 ICA 可以促进 DPSCs 的神经向分化。

综上所述,ICA 可促进 DPSCs 的增殖,并且 0.10  $\mu\text{mol}$  ICA 的促增殖效果最佳。ICA 对 DPSCs 神经向分化的结果表明,ICA 能够促进 DPSCs 成球,促进其神经向分化各相关蛋白的表达。本研究结果表明,ICA 对 DPSCs 的神经向分化具有一定的促进作用,为神经损伤的修复治疗提供一种新的思路和初步的探索。

#### 参 考 文 献 :

- [1] NIYAZI M, ZIBAI M I, CHAVOSHINEZHAD S, et al. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells by optogenetics stimulation[J]. J Chem Neuroanat, 2020, 109: 101821.
- [2] ALIAGHAEI A, BOROUJENI M E, AHMADI H, et al. Dental pulp stem cell transplantation ameliorates motor function and prevents cerebellar atrophy in rat model of cerebellar ataxia[J]. Cell Tissue Res, 2019, 376(2): 179-187.
- [3] MA D L, ZHAO L H, ZHANG L, et al. Icarin promotes survival, proliferation, and differentiation of neural stem cells *in vitro* and in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Stem Cells Int, 2021: 9974625.
- [4] LIU D D, YE Y L, XU L H, et al. Icarin and mesenchymal stem cells synergistically promote angiogenesis and neurogenesis after

- cerebral ischemia via PI3K and ERK1/2 pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 663-669.
- [5] SONG B, JIANG W K, ALRAIES A, et al. Bladder smooth muscle cells differentiation from dental pulp stem cells: future potential for bladder tissue engineering[J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 6979368.
- [6] OSATHANON T, SAWANGMAKE C, NOWWAROTE N, et al. Neurogenic differentiation of human dental pulp stem cells using different induction protocols[J]. *Oral Dis*, 2014, 20(4): 352-358.
- [7] ZHANG D W, LIU L, JIA Z B, et al. Flavonoids of *Herba Epimedii* stimulate osteogenic differentiation and suppress adipogenic differentiation of primary mesenchymal stem cells via estrogen receptor pathway[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(6): 954-963.
- [8] GROCHOWSKI C, RADZIKOWSKA E, MACIEJEWSKI R. Neural stem cell therapy-brief review[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2018, 173: 8-14.
- [9] CHENG Z J, BOSCO D B, SUN L, et al. Neural stem cell-conditioned medium suppresses inflammation and promotes spinal cord injury recovery[J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(3): 469-482.
- [10] AN N, YANG J X, WANG H Q, et al. Mechanism of mesenchymal stem cells in spinal cord injury repair through macrophage polarization[J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 41.
- [11] MEAD B, LOGAN A, BERRY M, et al. Concise review: dental pulp stem cells: a novel cell therapy for retinal and central nervous system repair[J]. *Stem Cells*, 2017, 35(1): 61-67.
- [12] SUI B D, WU D, XIANG L, et al. Dental pulp stem cells: from discovery to clinical application[J]. *J Endod*, 2020, 46(9S): S46-S55.
- [13] GONMANEE T, THONABULSOMBAT C, VONGSAVAN K, et al. Differentiation of stem cells from human deciduous and permanent teeth into spiral ganglion neuron-like cells[J]. *Arch Oral Biol*, 2018, 88: 34-41.
- [14] MAJUMDAR D, KANAFI M, BHONDE R, et al. Differential neuronal plasticity of dental pulp stem cells from exfoliated deciduous and permanent teeth towards dopaminergic neurons[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(9): 2048-2063.
- [15] ZONG N, LI F, DENG Y Y, et al. Icarin, a major constituent from *Epimedium brevicornum*, attenuates ibotenic acid-induced excitotoxicity in rat hippocampus[J]. *Behav Brain Res*, 2016, 313: 111-119.
- [16] ZHU T, WANG L, WANG L P, et al. Therapeutic targets of neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke: applications for natural compounds from medicinal herbs[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 148: 112719.
- [17] LI H T, ZHANG X R, QI X, et al. Icarin inhibits endoplasmic reticulum stress-induced neuronal apoptosis after spinal cord injury through modulating the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(2): 277-286.
- [18] LI H T, ZHANG X R, ZHU X, et al. The effects of icariin on enhancing motor recovery through attenuating pro-inflammatory factors and oxidative stress via mitochondrial apoptotic pathway in the mice model of spinal cord injury[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 1617.
- [19] WANG G Q, LI D D, HUANG C, et al. Icarin reduces dopaminergic neuronal loss and microglia-mediated inflammation in vivo and in vivo[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 441.
- [20] HUANG J H, CAI W J, ZHANG X M, et al. Icarin promotes self-renewal of neural stem cells: an involvement of extracellular regulated kinase signaling pathway[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 20(2): 107-115.
- [21] YANG P, GUAN Y Q, LI Y L, et al. Icarin promotes cell proliferation and regulates gene expression in human neural stem cells in vivo[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(2): 1316-1322.
- [22] XU Y, XIN H, WU Y, et al. Effect of icariin in combination with daily sildenafil on penile atrophy and erectile dysfunction in a rat model of bilateral cavernous nerves injury[J]. *Andrology*, 2017, 5(3): 598-605.
- [23] ZHENG T, ZHANG T B, ZHANG W X, et al. Icariside II facilitates the differentiation of ADSCs to schwann cells and restores erectile dysfunction through regulation of miR-33/GDNF axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109888.
- [24] ZHANG D W, ZHAO N, WAN C, et al. Icarin and icariside II reciprocally stimulate osteogenesis and inhibit adipogenesis of multipotential stromal cells through ERK signaling[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 8069930.
- [25] WEI Q S, HE M C, CHEN M H, et al. Icarin stimulates osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal stem cells by increasing TAZ expression[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 581-589.
- [26] WU Y Q, XIA L G, ZHOU Y N, et al. Icarin induces osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in a MAPK-dependent manner[J]. *Cell Prolif*, 2015, 48(3): 375-384.
- [27] HUANG J M, BAO Y, XIANG W, et al. Icarin regulates the bidirectional differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through canonical Wnt signaling pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017: 8085325.
- [28] MORI H, NINOMIYA K, KINO-OKA M, et al. Effect of neurosphere size on the growth rate of human neural stem/progenitor cells[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(8): 1682-1691.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 张欣然, 李昊天, 杨文文, 等. 淫羊藿苷对人牙髓干细胞神经向分化作用的初步研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(15): 46-52.

Cite this article as: ZHANG X R, LI H T, YANG W W, et al. Preliminary study of Icarin on neural differentiation of human dental pulp stem cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(15): 46-52.