

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 5/08 (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610070567.1

[45] 授权公告日 2008 年 12 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100445373C

[22] 申请日 2006.12.4

[21] 申请号 200610070567.1

[73] 专利权人 山东大学

地址 250100 山东省济南市历下区经十路
73 号

[72] 发明人 苗俊英 赵宝祥 张尚立 苏乐

[56] 参考文献

US20030203844A1 2003.10.30

CN1374081A 2002.10.16

Effect of safrole oxide on vascular endothelial cell growth and apoptosis induced by deprivation of fibroblast growth factor. Miao Jun, Ying et al. Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 23 No. 4. 2002

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所有限公司

代理人 李健康

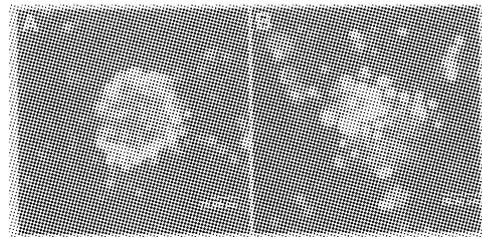
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 4 页

[54] 发明名称

黄樟素氧化物在内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具在血管内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用。其中：所述黄樟素氧化物以浓度为 70mg/L 的量处理血管内皮细胞与神经干细胞的共培养体系，黄樟素氧化物表现为诱导血管内皮细胞凋亡，进而由凋亡的血管内皮细胞又诱导体系中的神经干细胞凋亡及 DNA 片段化。本发明以建立的内皮细胞与神经干细胞的共培养体系来模拟体内的微环境，以黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具，研究了培养体系中血管内皮细胞与神经干细胞的变化，开拓黄樟素氧化物的新用途，同时为研究体内血管内皮细胞维持神经干细胞存活及分化的机制提供方法，为今后治疗各种由于神经细胞缺失造成的神经退型性疾病提供实验基础和理论依据。



1、浓度为 50~100 mg/L 的黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具在血管内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用。

2、如权利要求 1 所述的应用，其特征是：所述黄樟素氧化物以 70 mg/L 的浓度量处理血管内皮细胞与神经干细胞的共培养体系，黄樟素氧化物表现为诱导血管内皮细胞凋亡，进而由黄樟素氧化物引起凋亡的血管内皮细胞又诱导在共培养体系中的神经干细胞凋亡及 DNA 片段化。

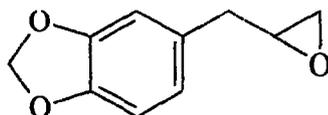
黄樟素氧化物在内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用

技术领域

本发明涉及黄樟素氧化物的用途,尤其涉及黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具,在血管内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用。

背景技术

黄樟素氧化物结构式为:



分子式: $C_{10}H_{10}O_3$

分子量: 178, 性状: 浅黄色液体, 沸点 b. p. 118°C/4mmHg, 折光率 n_D^{20} 1.533。

黄樟素氧化物在 40 多年前已被合成出来。关于其应用的报道, 始见于 20 世纪 70 年代, 其用途多是将该化合物作为底物用于氧化物水解酶的光谱分析; 20 世纪 80 年代又发现黄樟素(微弱的致癌剂)在动物体内代谢时产生黄樟素氧化物。1995 和 1996 年乔特(Qato)和根斯那(Guenther)对黄樟素氧化物与 DNA 的结合性进行了研究(见《Toxicol Lett》1995, 75 (1-3): 201-207 和《Drug Metab Dispos》1996, 24 (9): 1020-7), 发现该化合物在体外能与 DNA 结合, 并通过与 DNA 中的脱氧鸟核苷酸结合形成加合物, 但在动物体内未检测到黄樟素氧化物与肝脏 DNA 之间该加合物的形成, 进一步的研究证明黄樟素氧化物与 DNA 的结合为共价结合, 除主要与鸟核苷酸结合外, 它也能与 DNA 的其它 3 种碱基结合, 其机制与黄樟素氧化物含有具生理活性的甲撑二氧苯基与环氧结构有关。

申请人已经发现, 浓度为 5~25 mg/L 的黄樟素氧化物能促进血管内皮细胞铺展和生长, 而浓度为 50~100 mg/L 的黄樟素氧化物则促进血管内皮细胞的脱壁和 DNA 片段化, 最终诱导血管内皮细胞凋亡(见《Acta Pharmacologica Sinica》2002, 23(4): 323-326 和专利号为: ZL 02110135.3 的《黄樟素氧化物在血管内皮细胞生长与凋亡中的应用》专利)。

在机体内, 神经干细胞并不是随意分布的, 而是集中在血管附近, 这就使神经干细胞与血管内皮细胞在空间上紧密相连, 加强了两种细胞间的信息传递, 形成了血管内皮细胞与神经干细胞组成的微环境, 内皮细胞通过向微环境中释放各种细胞因子来维持神经干细胞的存活与分化。为了更好的研究内皮细胞与神经干细胞之间的相互作用, 进而为治疗各种神经系统退型性疾病提供理论依据, 在体外, 人们通常以建立内皮细胞与神经干细胞的共培养体系来模拟体内的微环境。

与神经干细胞共培养的内皮细胞, 可以维持神经干细胞存活并且诱导其分化, 但是凋亡的内皮细胞对神经干细胞有何作用? 经权威机构检索查新, 目前国内外尚未见报道。

发明内容

针对现有技术的不足, 本发明要解决的问题是以黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具影响血管内皮细胞与神经干细胞培养体系, 研究黄樟素氧化物的影响作用以及培养体系

中血管内皮细胞与神经干细胞的变化，开拓黄樟素氧化物的新用途。

本发明所述黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具在血管内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用。

其中：以浓度为 70 mg/L 的黄樟素氧化物处理血管内皮细胞与神经干细胞的共培养体系，黄樟素氧化物表现为诱导血管内皮细胞凋亡，进而由黄樟素氧化物引起凋亡的血管内皮细胞又诱导在共培养体系中的神经干细胞凋亡及 DNA 片段化。

为了更好地理解本发明的实质，下面用黄樟素氧化物的药理实验及结果来说明其作为诱导凋亡的工具，在凋亡的血管内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用。

黄樟素氧化物的制备：将 70% 的间氯过氧化苯甲酸 (27 克，0.11 摩尔) 溶解在 500 毫升氯仿或苯中，加入黄樟素 (黄樟素与间氯过氧化苯甲酸的摩尔比为 1:1.0 ~ 1:1.5)，在 0-50℃ 搅拌 2-24 小时，用 5%~9% 碱液洗涤三次后，再水洗三次，用无水硫酸镁干燥，过滤后减压浓缩，剩余物进行减压蒸馏或用硅胶柱层析分离 (展开剂为石油醚/乙酸乙酯=1:1~3:1，体积比)，得到纯黄樟素氧化物，并经核磁共振及红外光谱验证后备用。其化学合成反应式如下：



血管内皮细胞的制备：以常规方法培养人脐静脉血管内皮细胞，选取生长状态良好的、且处于对数生长期的血管内皮细胞备用。

神经干细胞的制备：以常规方法提取培养小鼠神经干细胞，同样选取生长状态良好的，提取后 6 天的神经干细胞备用。

采用细胞生物学和分子生物学的方法，进行如下实验：研究黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具，在凋亡的血管内皮细胞与神经干细胞培养体系中的应用。

1、黄樟素氧化物对血管内皮细胞的作用

将血管内皮细胞接种于 24 孔板中，经黄樟素氧化物处理 24 小时后，光镜及荧光显微镜下直接观察血管内皮细胞形态变化。结果表明：浓度为 50~100 mg/L 的黄樟素氧化物促进血管内皮细胞脱壁和 DNA 片段化，最终诱导血管内皮细胞凋亡，其最适作用浓度为 70mg/L (见《Acta Pharmacologica Sinica》2002, 23(4): 323-326) (见附图 1)。

2、黄樟素氧化物对神经干细胞的作用

(1) 用 MTT 法检测神经干细胞琥珀酸脱氢酶的活性，以判断神经干细胞生长情况：

将神经干细胞接种于 96 孔培养板中，经黄樟素氧化物处理后加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 0.02 ml，37℃ 孵箱内培养 4 小时，加入 0.2 ml 三连液，37℃ 孵箱内培养 5 小时，振荡 15 分钟，用酶联免疫检测仪测定光密度 (OD 值)，计算细胞相对存活率表明：处理组细胞存活率较正常对照组没有明显变化 (见附图 2)。

结果说明：浓度为 10-100 mg/L 的黄樟素氧化物处理神经干细胞 72 小时，对神经干细胞存活没有影响，不能诱导神经干细胞死亡，细胞存活率无明显变化。

(2) 倒置相差显微镜观察神经干细胞形态学变化：

以诱导血管内皮细胞凋亡用的最适作用浓度为 70mg/L 的黄樟素氧化物，处理神经干细胞 72 小时后，光镜下直接观察神经干细胞的形态学变化。

结果表明:神经干细胞形态没有发生明显变化,仍呈现克隆球状悬浮于培养液中(见附图3)。

以上实验说明,浓度为10—100 mg/L 黄樟素氧化物不能抑制小鼠神经干细胞生长,不诱导其凋亡。

3、黄樟素氧化物对血管内皮细胞与神经干细胞共培养体系的作用

(1) 倒置相差显微镜观察血管内皮细胞与神经干细胞共培养体系中细胞形态学变化:

将神经干细胞与血管内皮细胞共培养3天后,光镜下直接观察,悬浮的神经干细胞全部贴于血管内皮细胞上,并且伸出细胞突触呈现神经元及神经胶质细胞状,克隆球与克隆球之间通过神经细胞突触形成网络状连接(见附图4)。

(2) 神经细胞特异性标记物鉴定分化的神经干细胞:

激光共聚焦电子扫描显微镜观察与血管内皮细胞共培养后的神经干细胞,神经元特异性标记物NSE、NF-L及突触素呈现阳性;星形胶质细胞特异性标记物GFAP呈现阳性(见附图5)。

结果表明:共培养体系中,血管内皮细胞诱导神经干细胞分化为神经元及胶质细胞。

(3) 黄樟素氧化物处理血管内皮细胞与神经干细胞的共培养体系:

将血管内皮细胞接种于24孔培养板中,培养两天后,将神经干细胞直接接种于血管内皮细胞上,以诱导血管内皮细胞凋亡用的最适作用浓度为70mg/L的黄樟素氧化物处理共培养体系。5小时后,倒置相差显微镜下观察到少量的神经干细胞伸出突触,开始分化;10小时后,血管内皮细胞凋亡,同时,已分化的神经细胞突触断裂消失,克隆球出现弥散状,克隆球的紧密结构解体,神经干细胞凋亡(见附图6)。

(4) 荧光显微镜观察细胞核凝缩及核碎裂情况:

将血管内皮细胞与神经干细胞共培养,同时加入70 mg/L黄樟素氧化物处理10小时,进行AO染色。血管内皮细胞大量凋亡,细胞核DNA发生大量的凝缩及碎裂。在荧光显微镜下选取神经干细胞所在的焦平面,观察神经干细胞细胞核DNA的凝缩及核碎裂情况。

结果显示:黄樟素氧化物处理血管内皮细胞与神经干细胞共培养体系后,神经干细胞核DNA发生大量的凝缩及碎裂(见附图7)。

(5) 乳酸脱氢酶活性检测细胞坏死:

正常组:接触共培养血管内皮细胞和神经干细胞10小时。

实验组:70 mg/L的黄樟素氧化物处理共培养体系10小时。

分别取两组细胞的培养液,用紫外分光光度计检测其乳酸脱氢酶活性,两组细胞培养液中乳酸脱氢酶活性没有明显差异,凋亡的血管内皮细胞没有引起神经干细胞坏死(见附图8注:^{*} $P>0.05$ vs. ^{*})。

以上结果表明,70 mg/L黄樟素氧化物处理血管内皮细胞与神经干细胞共培养体系10小时后,内皮细胞发生凋亡,继而神经干细胞发生凋亡及DNA片段化。

上述的实验数据统计学处理:

实验数据以平均值±标准误差表示,经 t 检验: $P<0.05$ 表示有明显差异。

归纳上述实验及其结果，可以看出：

将神经干细胞与血管内皮细胞共培养后，血管内皮细胞可以促进神经干细胞分化为神经元与神经胶质细胞。

向神经干细胞与血管内皮细胞共培养后的体系中加入浓度为 70 mg/L 黄樟素氧化物，黄樟素氧化物表现为诱导血管内皮细胞凋亡，之后，神经干细胞也发生凋亡及 DNA 片段化。

前期实验已证实：浓度为 10—100 mg/L 的黄樟素氧化物均不影响神经干细胞存活与生长，不能引起神经干细胞凋亡，因此，可以推断神经干细胞的凋亡是由于血管内皮细胞的凋亡引起的。

由此得出结论：以浓度为 70 mg/L 的黄樟素氧化物处理血管内皮细胞与神经干细胞的共培养体系，血管内皮细胞被诱导凋亡，体系中的血管内皮细胞因凋亡不能维持神经干细胞的存活与分化，反而凋亡的血管内皮细胞诱导在共培养体系中的神经干细胞凋亡及 DNA 片段化。

机体内，神经干细胞总是集中于血管附近，在血管内皮细胞与神经干细胞组成的微环境中，血管内皮细胞通过释放各种细胞因子维持神经干细胞的存活，生长及分化。本发明以建立的内皮细胞与神经干细胞的共培养体系来模拟体内的微环境，以黄樟素氧化物作为诱导凋亡的工具，研究了培养体系中血管内皮细胞与神经干细胞的变化，开拓黄樟素氧化物的新用途，同时为研究体内血管内皮细胞维持神经干细胞存活及分化的机制提供方法，为今后治疗各种由于神经细胞缺失造成的神经退型性疾病提供实验基础和理论依据。

附图说明

图 1 是倒置相差显微镜下所示 70 mg/L 黄樟素氧化物处理 24 小时后的血管内皮细胞。

其中：A 为正常培养组；B 为黄樟素氧化物处理组。

图 2 是 MTT 法检测细胞琥珀酸脱氢酶的活性，统计神经干细胞存活率。

图 3 是倒置相差显微镜下所示正常组与经 70 mg/L 黄樟素氧化物处理 72 小时后的神经干细胞。

其中：A 为正常培养组；B 为黄樟素氧化物处理组。

图 4 是倒置相差显微镜下所示，血管内皮细胞诱导神经干细胞分化。

其中：A 为正常单独培养的神经干细胞；B 为神经干细胞与血管内皮细胞共培养 0 小时；C 为共培养 10 小时；D 为共培养 24 小时；E 为共培养 48 小时；F 为共培养 72 小时。

图 5 是分化的神经干细胞对神经细胞特异性标记物的表达。

其中：A 为神经元特异性标记物—神经元特异型烯醇化酶 (NSE)；B 为神经元特异性标记物—神经微丝蛋白 (NF-L)；C 为神经元特异性标记物—突触素 (synapsin)；D 为星型胶质细胞特异性标记物—胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP)。

图 6 是倒置相差显微镜下所示，凋亡的血管内皮细胞诱导神经干细胞凋亡。

其中：A 为神经干细胞与血管内皮细胞正常共培养 0 小时；B 为正常共培养 5 小时；

C 为正常共培养 10 小时；D 为 70 mg/L 黄樟素氧化物处理共培养体系 0 小时；E 为黄樟素氧化物处理 5 小时；F 为黄樟素氧化物处理 10 小时。

图 7 是荧光显微镜下所示正常组与 70 mg/L 黄樟素氧化物处理共培养体系 10 小时后神经干细胞中核凝缩及核碎裂。

其中：A 为共培养血管内皮细胞和神经干细胞 10 小时；B 为 70 mg/L 黄樟素氧化物处理共培养体系 10 小时。

图 8 是乳酸脱氢酶活性检测。

其中：正常组为共培养血管内皮细胞和神经干细胞 10 小时；实验组为 70 mg/L 黄樟素氧化物处理共培养体系 10 小时。

具体实施方式

实施例 1 黄樟素氧化物的合成

将含量为 70%的间氯过氧化苯甲酸（27 克，0.11 摩尔）溶解在 500 毫升氯仿中，加入黄樟素（16.2 克，0.10 摩尔），25℃下搅拌 20 小时，用 5%氢氧化钠水溶液洗涤三次（每次 80 毫升）后，再水洗三次（每次 80 毫升），用无水硫酸镁干燥，过滤后减压浓缩蒸出氯仿，剩余物进行减压蒸馏，b. p. 118℃/4mmHg，得到纯黄樟素氧化物 14 克，收率为 80%。

实施例 2

将黄樟素氧化物配制成 5mg/L、10mg/L、15mg/L、20mg/L、25mg/L、30mg/L、40mg/L、50mg/L、60mg/L、70mg/L、80mg/L、90mg/L、100mg/L 等浓度，分别加入以常规方式培养的血管内皮细胞中，处理 24 小时，在倒置显微镜下每 4 小时观察一次细胞的变化，结果看到：5~25 mg/L 的药物浓度使血管内皮细胞贴在培养板上的能力增强，细胞铺展能力增强，生长旺盛；50~100 mg/L 的药物浓度处理血管内皮细胞时，随药物浓度的增加细胞不断地脱离培养板底面而漂浮于培养液中，然后细胞逐渐形成凋亡小体，即发生典型的细胞凋亡，24 小时后仅有 10%的细胞存活，而空白对照组此时的存活率为 40%。说明黄樟素氧化物在 5~25 mg/L 浓度时，有促进血管内皮细胞铺展和生长，抑制血管内皮细胞凋亡作用；而在 50~100 mg/L 浓度时，有促进血管内皮细胞凋亡作用。

实施例 3

将黄樟素氧化物配制成 10mg/L、40mg/L、70mg/L、100mg/L 浓度，分别加入以常规方式培养的神经干细胞中，处理 72 小时，在倒置显微镜下每 12 小时观察一次细胞的变化，结果看到：10~100 mg/L 的药物浓度均不能影响神经干细胞的生长。

将神经干细胞接种于 96 孔培养板中，经以上所配浓度黄樟素氧化物处理 20h、44h、68h 后加入 5 mg/ml 的 MTT 溶液 0.02 ml，37℃孵箱内培养 4 小时，加入 0.2 ml 三连液，37℃孵箱内培养 5 小时，振荡 15 分钟，用酶联免疫检测仪测定光密度（OD 值），取各平行孔 OD 值的平均值，根据下式计算细胞相对存活率：存活细胞 % = (实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%（以不含细胞的培养液为空白组调零）。

结果显示：黄樟素氧化物 10—100 mg/L 浓度处理神经干细胞 72 小时，对神经干细胞存活没有影响，不能诱导神经干细胞死亡，细胞存活率无明显变化。

实施例 4

将血管内皮细胞接种于 24 孔培养板中，培养两天后，待其形成单细胞层，将神经

干细胞直接接种于血管内皮细胞上。培养3天后，光镜下直接观察。然后弃去培养液，用4%的多聚甲醛固定15分钟。用0.1M PBS清洗后，加入正常血清封闭液。弃封闭液，加一抗，弃一抗加二抗，37℃下30分钟，弃去二抗，用0.1M PBS清洗后观察。观察上述细胞是否表达NSE、NF-L、synapsin及GFAP。

结果显示：共培养体系中，血管内皮细胞可以诱导神经干细胞分化为神经元及胶质细胞。

实施例5

将血管内皮细胞接种于24孔培养板中，培养两天后，待其形成单细胞层，将神经干细胞直接接种于血管内皮细胞上，以诱导血管内皮细胞凋亡用的最适作用浓度为70mg/L的黄樟素氧化物处理共培养体系10小时，光镜下直接观察。

分别取两组细胞的培养液，用乳酸脱氢酶试剂盒检测其酶活性。

AO染色，在荧光显微镜下观察神经干细胞细胞核DNA的凝缩及核碎裂情况。

结果显示：70mg/L黄樟素氧化物诱导血管内皮细胞凋亡，凋亡的内皮细胞进而诱导神经干细胞凋亡。说明在黄樟素氧化物的作用下，体系中的血管内皮细胞因凋亡不能维持神经干细胞的存活与分化，反而诱导神经干细胞凋亡及DNA片段化。

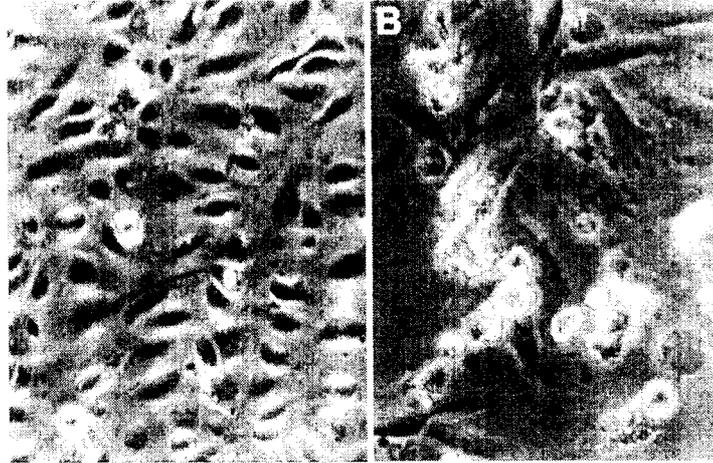


图 1

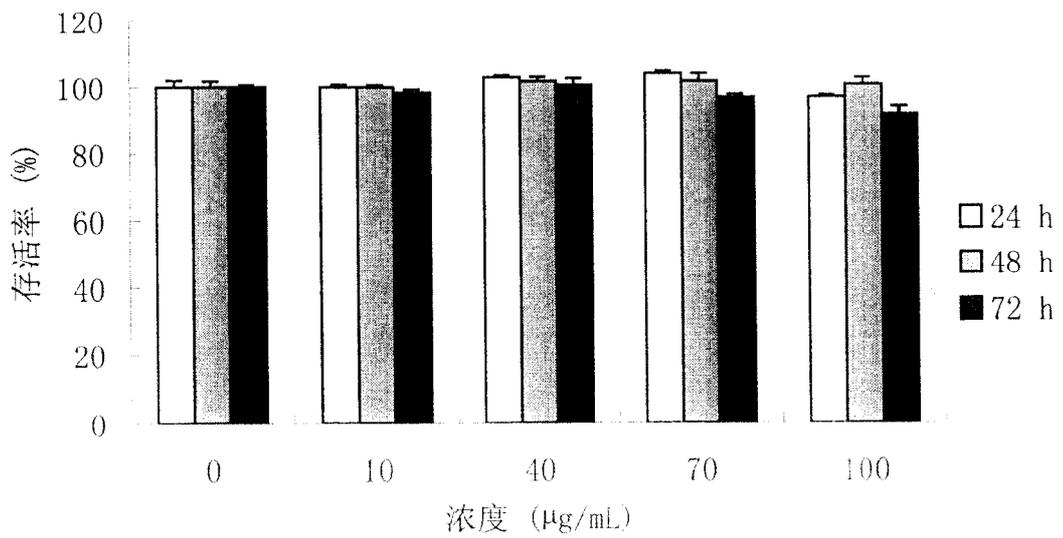


图 2

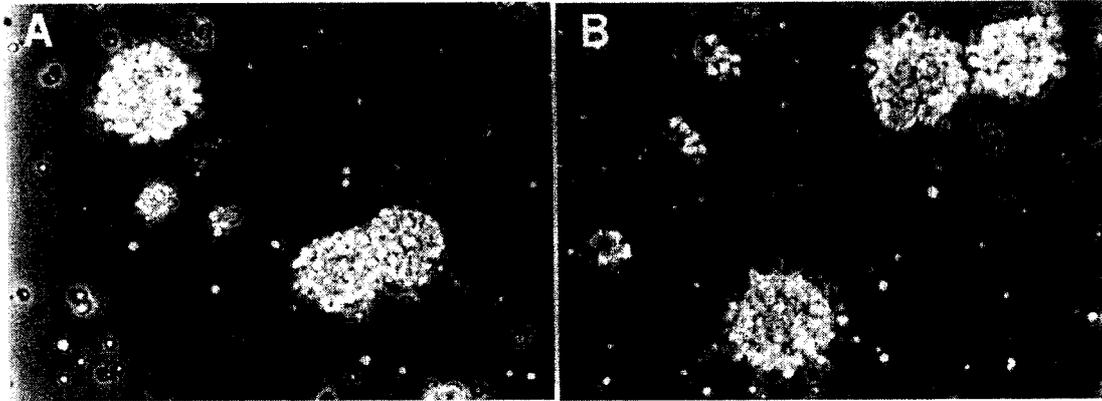


图 3

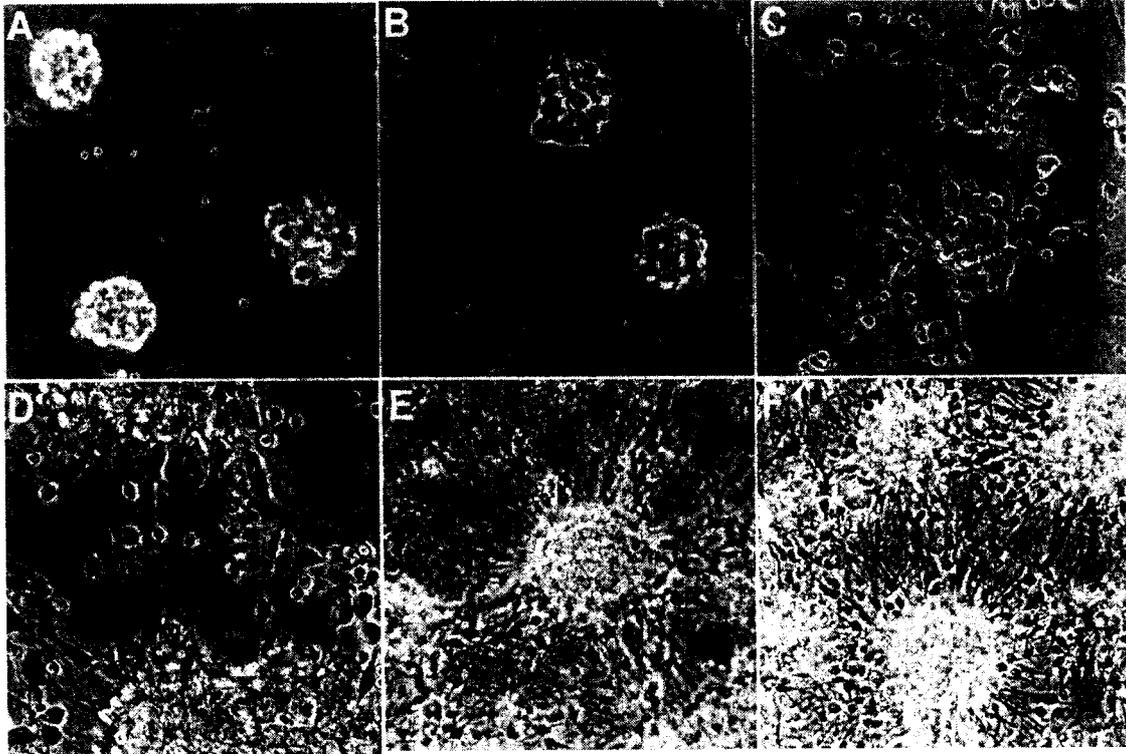


图 4

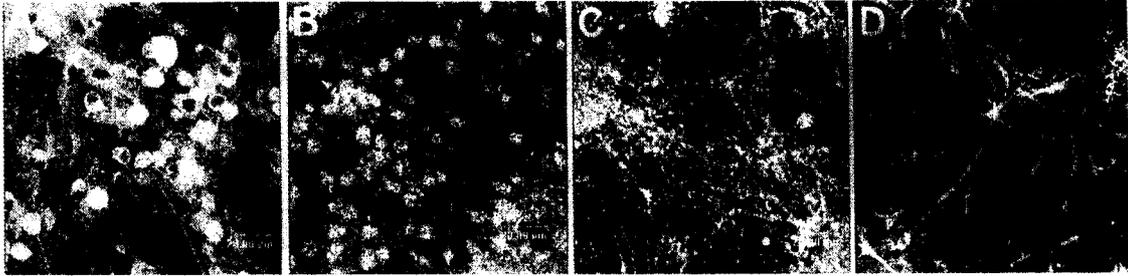


图 5

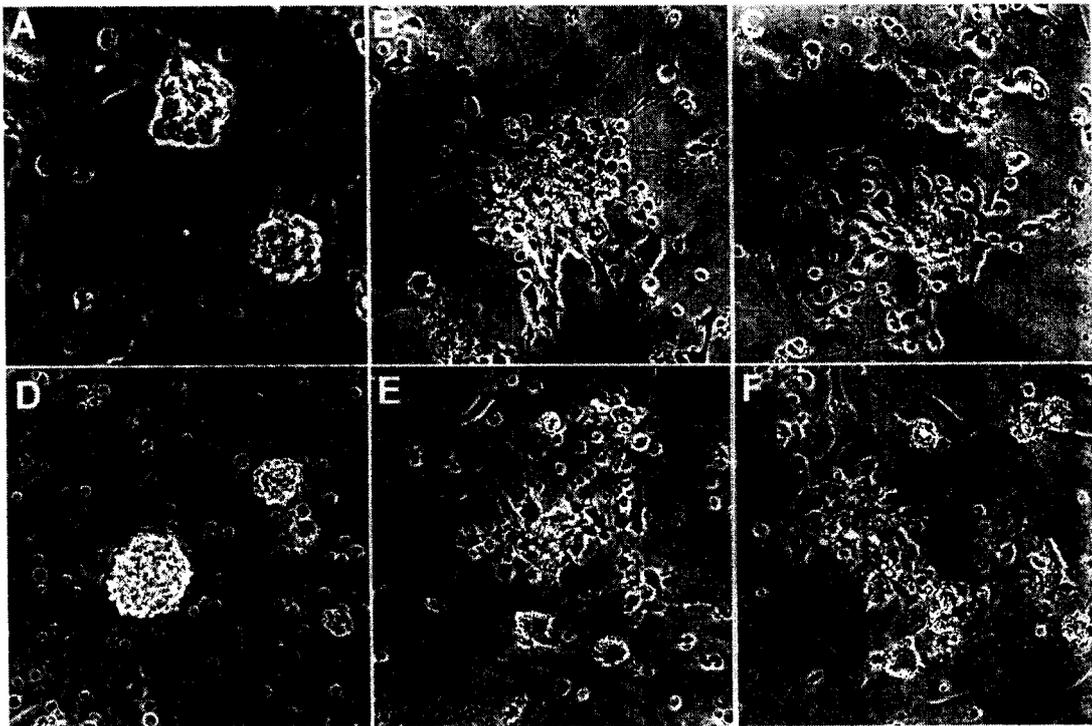


图 6

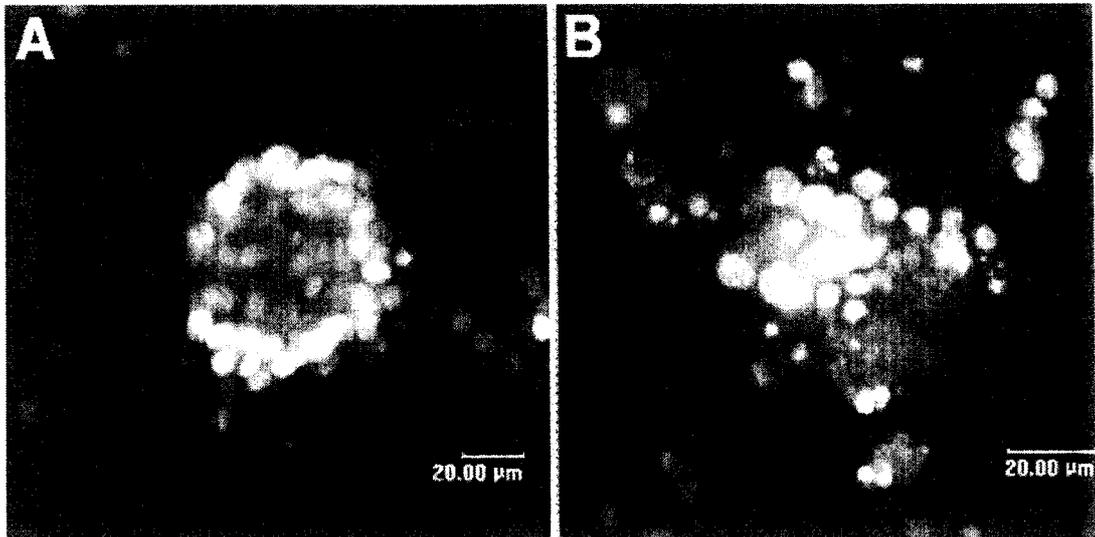


图 7

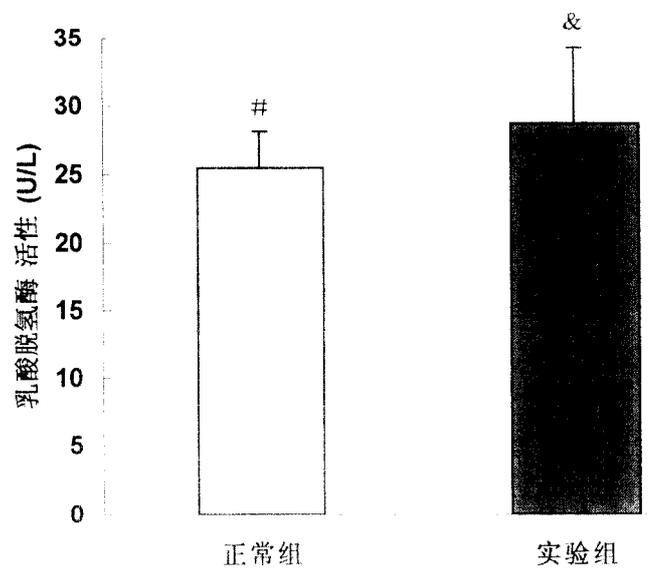


图 8