

远志皂苷元对新生大鼠皮质神经元的营养作用

皮 婷¹, 薛小燕¹, 林炼峰¹, 苏钜年¹, 程 欣³, 罗焕敏^{1,2,4}

(暨南大学 1. 医学院药理学系, 2. 药学院神经药理研究室, 3. 医学院组胚教研室, 4. 暨南大学-香港大学脑功能与健康联合实验室, 广东 广州 510632)

摘要: **目的** 研究远志皂苷元(senegenin)对新生大鼠皮质神经元的神经营养作用。**方法** 原代培养新生 24 h 内 SD 大鼠皮质神经元,采用 0.4% B27 + DMEM/F12 培养基制备营养缺乏模型。远志皂苷元 0.5, 1 和 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及阳性对照组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF) 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。倒置显微镜下观察各组皮质神经元的形态及平均突起生长情况;免疫荧光染色法观察远志皂苷元的营养作用,检测神经元平均突起长度;另外在营养缺乏培养条件下,通过 MTT 法检测神经元的存活情况。**结果** 分别加入药物作用 3d 后,远志皂苷元 0.5, 1 及 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 均可以促进神经元突起生长,从溶媒对照组(152 ± 46) μm 分别增加至 186 ± 51, 188 ± 34 及(193 ± 43) μm ,其中远志皂苷元 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 最为显著($P < 0.01$),稍弱于 bFGF 对照组(203 ± 40) μm 。营养缺乏培养条件下细胞存活率显著下降,从正常培养条件下(100.0 ± 5.4)% 降至(90.8 ± 4.6)% ($P < 0.01$)。远志皂苷元 0.5, 1 及 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可明显改善营养缺乏引起的细胞死亡,细胞存活率分别为(109.7 ± 3.2)%, (111.3 ± 1.6)% 及(112.9 ± 4.8)%,且有一定的浓度依赖性($r = 0.784$, $P < 0.01$)。**结论** 远志皂苷元可以促进神经元的存活,并可促进皮质神经元突起生长,具有神经营养作用。

关键词: 远志皂苷元; 皮质神经元; 神经营养; 突起生长

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2011)01-0040-05

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2011.01.008

神经退行性疾病,如阿尔茨海默病、帕金森综合症、亨廷顿病和肌肉萎缩性侧索硬化症等,都与神经元或突触的丢失有关^[1]。内源性神经营养因子,如神经生长因子、脑源性神经营养因子(neurotrophic factor, NTF)、神经营养因子-3(neurotrophin 3, NT3)和 NT4/5,在神经元的存活、突起生长、突起网络的构建以及神经系统的可塑性等方面发挥着关键的作用。近年研究表明,神经营养因子及与神经营养因子类似作用的小分子物质可预防突触的丢失和突起的损伤,具备治疗神经退行性变的潜力,如帕金森综合征和阿尔茨海默病^[2-3]。但 NTF 难通过血脑屏障,难以发挥治疗神经退行性病的作用。而有着类似作用的小分子物质可克服这些难题,为治疗神经退行性变带来希望。

国内外的研究表明,远志富含皂苷类、寡聚糖类、口山酮类化合物,具有安神益智、祛痰、消肿、抗

氧化衰老、抗抑郁等多方面的生物学活性^[4]。远志皂苷元(senegenin)为远志皂苷水解产物。本研究采用体外原代皮质神经元培养系统,观察远志皂苷元对皮质神经元的存活及促突起生长的影响,阐明其是否具有神经营养作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

远志皂苷元(中国药品生物制品检定所,纯度 >98.7%),实验时用 DMSO 配置成相应浓度,4℃保存,DMSO(北京鼎国生物科技责任有限公司);胰蛋白酶(美国 Amersco 公司);多聚赖氨酸,四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司);DMEM/F12(美国 Gibco 公司);胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);无血清培养添加剂 B27(美国 Gibco 公司);牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)(博大泰克公司);单克隆兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶(neuro specific enolase, NSE),(武汉博士德生物工程有限公司);单克隆小鼠抗大鼠微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP2),(美国 Sigma 公司),即用型 SABC 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司),其

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金资助(21609101)

作者简介: 皮 婷(1986-),女,硕士研究生,主要从事神经药理学研究。

通讯作者: 罗焕敏, E-mail: tlhm@jnu.edu.cn, Tel: (020)85220160

余试剂均为国产分析纯。

1.2 主要仪器

SW-CJ-1F 型超净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), 培养箱(英国 Galaxy S 公司), 倒置显微镜(日本 Olympus 公司), 酶标仪(美国 BioRad 公司), 24 孔板和 96 孔板(美国 Corning 公司)。

1.3 神经元细胞的制备及培养

取新生 24 h 内大鼠, 75% 乙醇消毒。在超净台内取大脑分离出大脑皮质, 剥离脑膜并去除海马部分, 置于 D-Hank 中清洗, 将其剪成约 1 mm^3 的小块。加入 0.25% 胰蛋白酶后置于培养箱中消化 10 min, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基终止消化。并经过悬浮、离心、过滤等步骤收集细胞, 用 0.4% 台盼蓝拒染法计数活细胞后, 用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基制成细胞悬浮液, 接种细胞于预先用 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的多聚赖氨酸处理的孔板中。置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。

1.4 鉴定培养的神经元

取培养 48 h 的神经元, 加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 漂洗 3 次后加入 30% H_2O_2 与纯甲醇(1:50)浸泡 20 min, PBS 漂洗 3 次后滴加山羊血清封闭液, 孵育 20 min, 弃去上清, 加入一抗(1:80) PBS 液置于 4°C 湿盒内孵育过夜。然后用 PBS 漂洗 3 次, 滴加辣根过氧化物酶标记二抗(羊抗兔 IgG), 室温 20 min, PBS 漂洗 3 次滴加 SABC 试剂, 置于湿盒中 20 min 后 PBS 漂洗 3 次, 然后 DAB 显色, PBS 漂洗后镜下观察并拍照。

1.5 细胞分组

细胞接种 6 h 后, 在形态学实验中培养液换成含 2% B27 的培养基并同时加入药物干预, 随机分为 0.1% DMSO 溶剂对照组, 远志皂苷元 0.5, 1 及 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, bFGF $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; MTT 法检测细胞存活率中培养液换成含 0.4% B27 的培养基, 分组相同并增设正常对照组及模型组。各组设 4~6 个复孔。

1.6 测量神经元平均突起长度

上述分组处理的细胞培养 72 h 后, PBS 漂洗 3 次, 用加入 4% 多聚甲醛固定 20 min, 接着 PBS 漂洗 3 次, 0.1% Triton-100/PBS 破膜 10 min 后 PBS 漂洗 3 次, 加入含 1% BSA/PBS 室温孵育 30 min 后, 弃去上清, 加入抗 MAP2(1:100) 置于湿盒内, 4°C 过夜。PBS 漂洗 3 次, 然后滴加 Cy3 标记二抗(1:1000), 室温孵育 60 min, 去除二抗后 PBS 漂洗, 每孔随机选取 12 个视野, 每组 4 个复孔, 进行拍照, 用 Image-pro plus 6.0 图像分析软件处理照片, 并进行图像分析, 测量神经元平均突起长度。

1.7 MTT 比色法检测细胞存活率

上述分组处理的细胞培养 96 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 $15\text{ }\mu\text{l}$ MTT, 继续培养 4h 后吸弃上清, 加入 $150\text{ }\mu\text{l}$ DMSO, 充分振荡至晶体完全溶解, 于酶标仪 570 nm 波长下测各孔吸光度值(absorbance, A)。每个组设 6 个复孔, 计算其平均值。细胞存活率(%) = $(A_{\text{实验}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

1.8 实验结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 软件 16.0 作统计分析。先经方差齐性检验后, 方差齐性采用 LSD 法, 方差不齐采用 Tamhane 法进行组间比较。显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 鉴定培养的神经元形态

神经元接种 4 h 后, 大多数已贴壁。接种 6 h 后细胞完全贴壁, 胞体呈圆形或椭圆形, 折光性强, 周围有光晕, 少数细胞开始伸出 1~2 个突起(图 1A); 继续培养 48 h 后, 胞体明显增大, 呈圆形、梭形或三角形, 胞体周围有明亮的光晕, 有些可见清晰的胞核及核仁, 神经突起数量、突起长度明显增加, 部分神经细胞突起交织, 神经网络开始形成(图 1B)。对 48 h 的细胞进行 NSE 免疫细胞化学鉴定, 结果显示

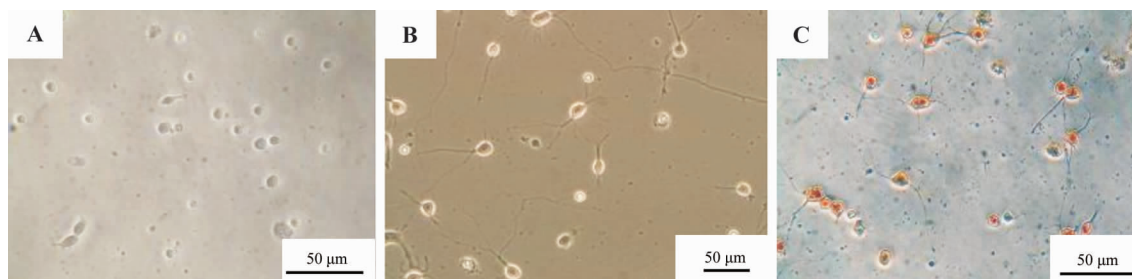


图 1 新生大鼠皮质神经元的形态学观察及鉴定。A: 贴壁 6 h 神经元; B: 培养 48 h 神经元; C: NSE 鉴定神经元, 阳性神经元胞浆内可见棕色阳性颗粒, 而阴性不可见相关免疫反应。

Fig. 1 Morphological observation and identification of newborn rat cortical neuron.

NSE 阳性细胞占绝大多数(图 1C),表明所培养的细胞绝大多数是神经元。

2.2 远志皂苷元对培养的神经元突起生长的影响

表 1 和图 2 结果显示,溶媒对照组神经元大多数仅有 1~2 根轴突且较短,少数神经元突起有分支,有些交织成网。远志皂苷元组神经元生长较旺盛,有突起的细胞多,以三级和多级神经元为主,且突起较长,局部形成丰富网络。药物干预 72 h 后,进行 MAP2 免疫荧光观察,可更直观的观察到远志皂苷元对皮质神经元突起生长的促进作用,与溶媒对照组相比,远志皂苷元各浓度组突起长度明显增长,尤以远志皂苷元 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组增长明显($P < 0.01$)。

表 1 远志皂苷元对原代皮质神经元突起生长影响

Tab.1 Effect of senegenin on neurite outgrowth in primarily cultured cortical neurons

组别	突起长度/ μm
溶媒对照	152 ± 46
bFGF	$203 \pm 40^{**}$
远志皂苷元组 0.5	$186 \pm 51^*$
1	$188 \pm 34^*$
2	$193 \pm 43^{**}$

分组处理见图 2。 $\bar{x} \pm s, n = 4$ 。 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与溶媒对照组比较。

2.3 远志皂苷元对营养缺乏神经元存活率的影响

表 2 结果显示,与正常对照组比较,营养缺乏模型组皮质神经元细胞存活率明显降低,从(100.0 ±

5.4)% 降至(90.8 ± 4.6)%。远志皂苷元 0.5, 1 及 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可明显改善营养缺乏培养条件下细胞的存活情况,细胞存活率分别为(109.7 ± 3.2)% , (111.3 ± 1.6)% 及(112.9 ± 4.8)% ,且呈浓度依赖性($r = 0.784, P < 0.01$)。

表 2 营养缺乏对远志皂苷元对原代皮质神经元存活率的影响

Tab.2 Effects of senegenin on primarily cultured cortical neurons survival rate under trophic withdrawal culture

组别	细胞存活率/%
正常对照	100.0 ± 5.4
营养缺乏模型	$90.8 \pm 4.6^{**}$
营养缺乏 + 溶媒对照	100.0 ± 3.2
营养缺乏 + bFGF	$114.5 \pm 1.6^{###}$
营养缺乏 + 远志皂苷元 0.5	$109.7 \pm 3.2^{##}$
1	$111.3 \pm 1.6^{###}$
2	$112.9 \pm 4.8^{###}$

细胞换液时,正常对照组用含 2% B27 的培养基培养,其余各组用含 0.4% B27 的培养基培养并按照分组分别同时加入 0.1% DMSO(溶媒对照),bFGF $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,远志皂苷元 0.5, 1 和 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用 96 h。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。 ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较;### $P < 0.01$, 与营养缺乏模型组比较。

3 讨论

远志皂苷元为远志皂苷在盐酸条件下的水解产物,为齐墩果烷型五环三萜。五环三萜类化合物作为皂苷的糖苷基在自然界中普遍存在。有报道称,

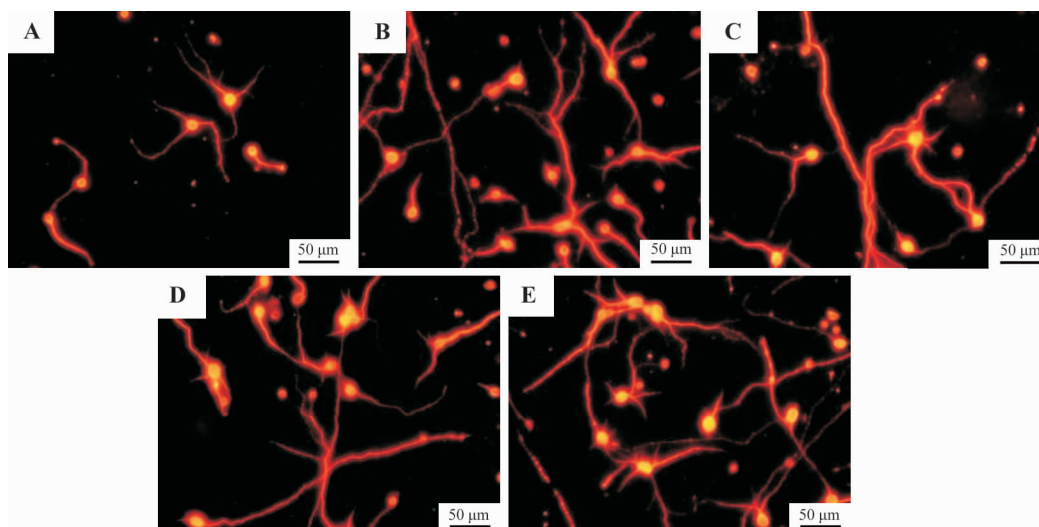


图 2 远志皂苷元对培养的神经元突起生长的影响(微管相关蛋白 2 免疫荧光染色)。各组细胞换液含 2% B27 的 DMEM/F12 培养基培养,同时分别加入 0.1% DMSO(溶媒对照组,A), bFGF $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (B), 远志皂苷元 0.5, 1 和 $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (C~E)作用 72 h。

Fig.2 Effect of senegenin on neurite outgrowth by microtubule-associated protein-2 immunofluorescent staining.

对由红藻氨酸盐诱导的小鼠海马神经元兴奋性中毒,五环三萜皂苷表现出显著保护作用,远志皂苷可显著保护由淀粉样 β 蛋白及 H_2O_2 诱导的皮质神经元及 PC12 的损伤^[5-6],说明五环三萜类化合物可阻断神经细胞坏死的不同环节,增加神经细胞存活、促进神经功能恢复。

突起的生长和延伸是神经元生长发育的重要特征,是维持其良好生长状态的主要因素。体外实验中受试物能否促进突起生长是考察其是否具有神经营养作用的重要指标之一^[7]。同时,促突起生长作用在保护神经元免于损伤中也发挥着重要的作用。研究表明,和厚朴酚可保护大鼠局部缺血缺氧引起的大脑损伤,厚朴酚可保护神经元细胞因局部缺血及化学缺氧造成的损伤等,均与和厚朴酚及厚朴酚具有促突起生长作用密切相关^[8]。本研究 MAP2 免疫荧光染色及突起长度分析结果均显示,远志皂苷元可促进神经元突起生长,且呈剂量依赖性,表明远志皂苷元是一个有潜力的神经营养物质。且远志皂苷元 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对突起生长的促进作用仅稍弱于 bFGF,可见远志皂苷元具有较强的营养作用。

神经元的存活与神经系统疾病的发生及发展关系密切。神经退行性疾病与神经元及突触的丢失有关,而神经毒作用、创伤或营养缺乏等最终都将导致神经元及突触的丢失^[9]。目前,无血清培养神经元所用的添加剂 B27 终浓度为 2%,细胞状态较好,存活率可达 80%^[10]。本研究用含 0.4% B27 培养基,即在营养缺乏的条件下培养神经元,细胞状态较差,存活率显著性降低,而远志皂苷元可显著促进该培养条件下神经元的存活,表明其可提供神经元存活的营养因素。

本研究结果提示,远志皂苷元兼有促突起生长及促神经元存活的双重作用,与神经营养因子的作用类似,具有潜在的治疗神经退行性疾病的作用。在下一步的实验中,将建立不同的细胞及动物模型,如淀粉样 β 蛋白细胞损伤模型,兴奋性细胞损伤模型,动物痴呆模型等,观察远志皂苷元是否也具有保

护作用,并阐明远志皂苷元营养作用的机制。

参考文献:

- [1] Zhai H, Nakatsukasa M, Mitsumoto Y, Fukuyama Y. Neurotrophic effects of talaumidin, a neolignan from *Aristolochia arcuata*, in primary cultured rat cortical neurons[J]. *Planta Med*, 2004, **70**(7):598-602.
- [2] Alvarez XA, Cacabelos R, Laredo M, et al. A 24-week, double-blind, placebo-controlled study of three dosages of cerebrolysin in patients with mild to moderate Alzheimer's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2006, **13**: 45-54.
- [3] Lang AE, Gill S, Patel NK, Lozano A, Nutt JG, Penn R, et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease[J]. *Ann Neurol*, 2006, **59**(3):459-466.
- [4] 马洪伟,付文亮,钟美蓉,和亚强,陈志宏,薛景凤.远志药理活性研究进展[J].承德医学院学报,2010, **27**(2):196-198.
- [5] 陈勤,李磊珂.远志皂苷对 β 淀粉样蛋白 1-40 诱导的体外培养皮层神经细胞损伤的保护作用[J].中国中药杂志,2007, **32**(13):1336-1339.
- [6] 孙桂波,邓响潮,李楚华.远志皂苷对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用[J].中药材,2007, **30**(8):991-993.
- [7] Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases[J]. *N Engl J Med*, 2003, **348**(14):1365-1375.
- [8] Lee YK, Choi IS, Kim YH, Kim KH, Nam SY, Yun YW, et al. Neurite outgrowth effect of 4-O-methylhonokiol by induction of neurotrophic factors through ERK activation[J]. *Neurochem Res*, 2009, **34**:2251-2260.
- [9] Zhai H, Nakatsukasa M, Mitsumoto Y, Fukuyama Y. Neurotrophic effects of talaumidin, a neolignan from *Aristolochia arcuata*, in primary cultured rat cortical neurons[J]. *Planta Med*, 2004, **70**(7):598-602.
- [10] Xie C, Markesbery WR, Lovell MA. Survival of hippocampal and cortical neurons in a mixture of MEM⁺ and B27-supplemented neurobasal medium[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, **28**(5):665-672.

Neurotrophic effects of senegenin on the cultures of newborn rat cortical neurons

PI Ting¹, XUE Xiao-yan¹, LIN Lian-feng¹, SU Ju-nian¹, CHENG Xin³, LUO Huan-min^{1,2,4}

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, 2. Neuroparmacology Laboratory, College of Pharmacy, 3. Department of Histology and Embryology, School of Medicine, 4. Joint Laboratory of Brain Function and Health, Jinan University-Hong Kong University, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: OBJECTIVCE To explore the neurotrophic effects of different concentration of se-

negenin on cortical neurons in newborn rat. **METHODS** Primary cultured cortical neurons from 24 h newly born rat were dissociated and cultured. And the cultured cortical neurons were randomly divided into 7 groups: blank control group(2% B27 + DMEM/F12); model group(0.4% + DMEM/F12), to detection cells survival in the trophic withdrawal culture; solvent control group(0.1% DMSO), senegenin 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups, and basic fibroblast growth factor 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ control group. Morphology and the average growth projections of each cortical neurons group were observed by inverted microscope. An image analysis software, the Image-pro plus 6.0, was adopted to collect data of average neurite outgrowth for analysis of effects of different concentration of senegenin on the neurite growth. Neurite situation were observed using immunofluorescent staining. Additionally, in the trophic withdrawal cultured condition, the neurons survival was detected by MTT method. **RESULTS** After intervention for 3 d, in normal cultured condition, compared to solvent control group, senegenin 0.5, 1 and 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly promoted neurite growth, from (152 \pm 46) μm to 186 \pm 51, 188 \pm 34 and (193 \pm 43) μm , respectively, and senegenin 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ showed the strongest promotion effect ($P < 0.01$), slightly lower than bFGF control group (203 \pm 40) μm . Compared to the normal cultured condition, cell survival under the trophic withdrawal condition was decreased from (100.0 \pm 5.4)% to (90.8 \pm 4.6)%. Senegenin 0.5, 1, 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ can obviously improved cells death caused by the trophic withdrawal condition, and survival are (109.7 \pm 3.2)%, (111.3 \pm 1.6)% and (112.9 \pm 4.8)%, respectively. **CONCLUSION** Senegenin can promote neurons survival, and can enhance cortical neuron neurite growth, has the neurotrophic effects.

Key words: senegenin; cortical neurons; neurotrophic; neurite outgrowth

Foundation item: The project supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (21609101)

Corresponding author: LUO Huan-min, E-mail: tlhm@jnu.edu.cn, Tel: (020)85220160

(收稿日期: 2010-09-02 接受日期: 2010-12-31)

(本文编辑: 乔虹)

新书介绍

由金国章教授主编的《脑内多巴胺》已由上海科学技术出版社出版。

本书系统阐述了脑内的多巴胺神经元特性和两大多巴胺神经系统,以及由多巴胺功能失调引发的帕金森病、精神分裂症、注意力缺陷多动障碍、毒品成瘾的机制,细致分析了左旋千金藤碱等药物在治疗中的作用机制,并有关于哺乳动物和果蝇行为与多巴胺关系的专门论述。

本书定价 195 元。可在全国各大新华书店、网上书店(卓越网、当当网等)购买,或直接与出版社联系邮购。

地址:上海市钦州南路 71 号,上海科学技术出版社邮购部(邮编 200235),电话:(021) 64085630