

# 复方通络救脑促进神经细胞突触可塑性

陈金燕, 陈文举, 李娇, 丁海敏, 梁迷, 王峰, 华茜\*  
(北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:检测中药复方通络救脑及其主要成分三七总皂苷和京尼平苷对神经突触可塑性有无促进作用。方法:实验分为对照组和给药组,采取细胞活力检测法,即 CCK-8 检测法检测药物对稳转的过表达的瑞典型突变淀粉前体蛋白(swAPP)突变的人神经母细胞瘤(SY5Y)细胞的增殖曲线的影响;通过 Western blotting 检测药物对于神经细胞突触相关蛋白树突棘肌动蛋白结合蛋白(drebrin)和突触后密度蛋白-95(PSD-95)的表达的变化;用神经生长因子(NGF)诱导 PC12 细胞长出神经突起后,检测药物对于细胞突起的作用。结果:复方通络救脑及其主要组成成分京尼平苷和三七总皂苷不影响过表达的瑞典型突变淀粉前体蛋白的神经母细胞瘤(swAPP-SY5Y)的细胞增殖曲线,且复方通络救脑中京尼平苷能够显著增加 swAPP-SY5Y 细胞 drebrin 和 PSD-95 的表达( $P < 0.01$ ),显著增加 PC12 细胞总突起数( $P < 0.01$ );而三七总皂苷没有相应的作用。结论:复方通络救脑能促进神经细胞的突触可塑性,初步断定起主要作用的成分是京尼平苷而不是三七总皂苷。

**[关键词]** 复方通络救脑;三七总皂苷;京尼平苷;突触可塑性;树突棘肌动蛋白结合蛋白;突触后密度蛋白-95

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0164-04

**[doi]** 10.11653/zgxyfjxzz2013070164

## Compound Prescription Tongluo Jiunao Promotes Synaptic Plasticity of Nerve Cells

CHEN Jin-yan, CHEN Wen-ju, LI Jiao, DING Hai-min, LIANG Mi, WANG Feng, HUA Qian\*  
(School of Preclinical Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[收稿日期]** 20121104(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82072901)

**[第一作者]** 陈金燕, 硕士, Tel:010-64888578, E-mail: chenjinyanlsx@sina.com

**[通讯作者]** \* 华茜, 博士, 教授, Tel:010-64286190, E-mail: hqianz@yahoo.com.cn, huaq@bucm.edu.cn

- [6] Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, et al. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation [J]. J Clin Invest, 1996, 97(8):1916.
- [7] Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284: R1.
- [8] Lincoln T M, Dey N, Sellak H. cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression [J]. J Appl Physiol, 2001, 91(3):1421.
- [9] Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B, et al. Ca<sup>2+</sup>-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress [J]. Circ Res, 1998, 82(6): 686.
- [10] Drew B G, Fidge N H, Gallon-Beaumier G, et al. High-density lipoprotein and apolipoprotein A I increase endothelial NO synthase activity by protein association and multisite phosphorylation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(18):6999.
- [11] Bauer P M, Fulton D, Boo Y C, et al. Compensatory phosphorylation and protein-protein interactions revealed by loss of function and gain of function mutants of multiple serine phosphorylation sites in eNOS[J]. J Biol Chem, 2003, 278(17):14841.
- [12] Boo Y C, Jo H. Flow-dependent regulation of endothelial nitric oxide synthase: role of protein kinases [J]. Am J Physiol, 2003, 285(3):C499.

[责任编辑 聂淑琴]

**[ Abstract ] Objective:** To investigate whether the compound prescription Tongluo Jiannao and its main ingredients like geniposide (Gp) and *Panax notoginseng* Saponins (PNS) can promote the synaptic plasticity of nerve cells. **Method:** This experiment was divided into control group and treatment groups. Cell counting kit-8 (CCK-8) kit was used to detect the cell proliferation curve after adding the drugs into the medium at the time interval 6, 12, 18, 24, 48 h. Western blotting was used to assay the synapse-associated proteins, such as drebrin and postsynaptic density protein-95 (PSD-95). PC12 cells induced by nerve growth factor (NGF) were used to observe if the drugs improve the amount of synapses. **Result:** Tongluo Jiannao, Gp and PNS couldn't influence the cell proliferation curve, and Gp could improve the expression of drebrin and PSD-95 significantly ( $P < 0.01$ ), Gp also could increase the amount of synapses ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Tongluo Jiannao and geniposide could promote synaptic plasticity of nerve cells.

**[ Key words ]** compound prescription Tongluo Jiannao; *Panax notoginseng* saponins; geniposide; synaptic plasticity; drebrin; PSD-95

$\beta$ 淀粉样蛋白(A $\beta$ )级联假说认为:A $\beta$ 在大脑皮层异常聚集和沉积,发生复杂的级联变化,是阿尔茨海默病(AD)发病的最主要原因<sup>[1]</sup>。在AD患者脑内有老年斑沉积,而A $\beta$ 是构成老年斑的主要成分,是其前体蛋白—— $\beta$ 淀粉样蛋白前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的正常酶解产物,APP通过 $\beta$ 分泌酶和 $\gamma$ 分泌酶的协同作用产生A $\beta$ <sup>[2]</sup>,A $\beta$ 具有较强的神经细胞毒性<sup>[3]</sup>,会造成神经元的变性和功能障碍,甚至死亡,最终导致AD的发生<sup>[4-5]</sup>。

通络救脑注射液是在“毒损脑络”病机学说指导下制备的中药复方,其包括通络与解毒作用的多种组分,主要有效成分是三七总皂苷和京尼平苷<sup>[6]</sup>。有报道三七对免疫性肝损伤小鼠具有一定的保护作用<sup>[7]</sup>,栀子苷具有较好的体内镇痛、抗炎的作用<sup>[8]</sup>。通络救脑中三七和栀子有效成分能够显著提高该模型大鼠皮层和海马的A $\beta$ 降解酶,主要是胰岛素降解酶(insulin degrading enzyme, IDE)和脑啡肽酶(neprilysin, NEP)的表达量<sup>[9-10]</sup>;对通络救脑作用机制的初步研究提示,其能够提高海马区神经元的数目,增加突触囊泡上突触素的表达,改善神经可塑性。

本实验选取转染了APP的SY5Y细胞模型为研究对象,研究中药复方通络救脑及其主要成分三七总皂苷和京尼平苷对于细胞增殖和突触可塑性方面的作用;并选取PC12细胞研究药物能否促进神经细胞突起的生长,进而加强神经细胞之间的信息联系。

## 1 材料

**1.1 细胞** 稳转swAPP突变的SH-SY5Y细胞,由中国科学院生物物理所赵宝路教授赠送;PC12细胞

从中国协和医科大学细胞中心购买。

**1.2 试剂** DMEM高糖培养基(Gibco, USA); FBS(Gibco, USA); EDTA-胰酶(Gibco, USA); Penicillin-Streptomycin(PS, Gibco, USA); CCK-8 kit(Dojindo, Japan)。

**1.3 药物** 京尼平苷对照品(Gp)(中国药品生物制品检定所)(110749);栀子提取物(南京泽朗医药科技有限公司)(ZL2012ZZG);三七总皂苷(PNS)(南京泽朗医药科技有限公司)(20110502);复方通络救脑(TLJN)由栀子提取物和三七总皂苷根据前期实验室HPLC测定的比例混合配制而成<sup>[6]</sup>;脑源性神经营养因子(BDNF, Peprotech, AF-450-02);神经生长因子(NGF 2.5s, Invitrogen, 13257-019)。

## 2 方法

**2.1 细胞增殖曲线检测** ①96孔板每孔接种 $1 \times 10^4$ 个swAPP-SY5Y细胞,在37℃5%CO<sub>2</sub>培养箱中预培养24h,实验分为5组,空白组(CTRL)、三七总皂苷组(PNS)、京尼平苷组(Gp)、通络救脑组(TLJN)、脑源性神经营养因子组(BDNF);②24h后,加入相应的药物,PNS,Gp,TLJN,BDNF的终浓度分别为10,100,100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (用药浓度参照实验室前期工作);③分别培养6,12,18,24,48h,然后向每孔中加入10  $\mu\text{L}$  CCK-8溶液(注意不要在孔中生成气泡,它们会影响吸光度(A)的读数);④将培养板在培养箱内孵育4h;⑤用酶标仪测定在450nm处的A(630nm作参比)。

**2.2 突触相关蛋白表达检测** ①6孔板每孔接种 $2.5 \times 10^5$ 个swAPP-SY5Y细胞,预培养24h,实验分为5组,CTRL组、PNS组、Gp组、TLJN组、BDNF组;②24h后,加入相应的药物,PNS,Gp,TLJN,BDNF

的终浓度分别为  $10, 100, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}, 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  
③24 h 后, 收集细胞, 提蛋白, 用 BSA 试剂盒进行蛋白定量; ④配制 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 转膜至 PVDF 膜, 加入封闭液, 室温摇床摇 1 h, 然后一抗  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜; ⑤用封闭液洗涤 3 遍, 每次 10 min, 然后二抗孵育 1 h; ⑥洗脱液洗涤 3 遍, 每次 10 min, ECL 发光显色, 胶片曝光, 扫描后用 Image J 软件分析。

**2.3 形态观察** ①预培养的 PC12 细胞, 吹打转移, 离心  $1\ 500 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}, 5 \text{ min}$ , 弃去上清, 用含有  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ NGF}^{[11]}$  的 DMEM/-培养基混匀 PC12 细胞, 12 孔板每孔接种  $8 \times 10^4$  个细胞, 预培养 48 h, 实验分为 5 组, CTRL 组、NGF 诱导组、NGF 诱导 PNS 组、NGF 诱导 Gp 组、NGF 诱导 TLJN 组; ②48 h 后, 全换液为 DMEM/-培养基, 加入相应的药物, PNS, Gp, TLJN 的终浓度分别为  $10, 100, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ③24 h 后, 照相, 每孔取 6 个视眼, 每组 3 次实验, 用 Image J 分析实验结果。

**2.4 统计学方法** 采用 SPSS 16.0 软件统计数据。实验数据用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行组间比较, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。所有统计检验均采用双侧检验, 符合正态性和方差齐性的资料, 采用 LSD 检验; 不符合正态性和方差齐性的资料, 采用秩和检验;  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 细胞增殖曲线检测** 通过 CCK-8 试剂盒检测细胞增殖, 发现 5 组 swAPP-SY5Y 细胞在 6~48 h 的生长曲线均呈现良好的 S 型增长曲线, PNS, Gp, TLJN 和 BDNF 加入细胞, 并不会影响细胞的增殖, 也说明药物对于细胞没有毒性作用, 这些药物浓度是细胞的安全用药浓度。并且细胞在 18~24 h 的增殖最快, 为我们后续实验给药时间的确定提供了依据, 后续我们均选择 24 h 给药时间。见图 1。

**3.2 突触相关蛋白 drebrin 和 PSD-95 表达** 通过 Western blotting 实验发现, swAPP-SY5Y 细胞在给药 24 h 后, Gp 均能显著性提高突触相关蛋白 drebrin 和 PSD-95 的表达, 且 PNS, TLJN 和 BDNF 也能够显著提高 PSD-95 蛋白的表达, 而 PNS 不能促进 drebrin 的表达。本实验总共重复了 4 次, 实验结果可靠, 从该结果中, 初步可以说明通络救脑中, 主要是京尼平苷能够促进突触可塑性。见图 2。

**3.3 PC12 细胞总突起数** 药物处理前, PC12 细胞均用 NGF 诱导处理 48 h, 48 h 后全换液为 DMEM/-培养基并加入药物处理。用 NGF 诱导处理细胞的

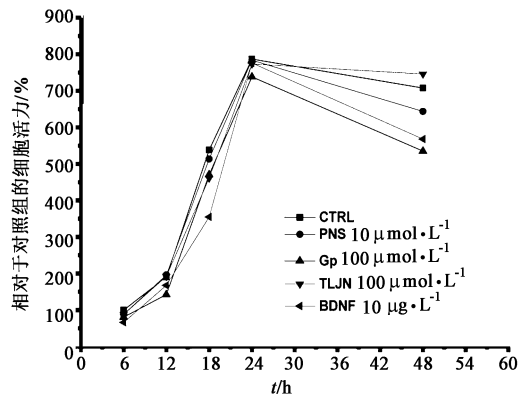


图 1 不同药物对于细胞增殖的影响

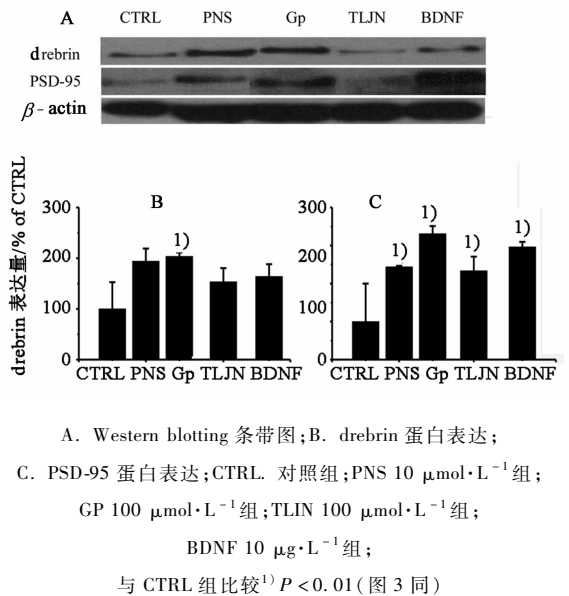


图 2 突触相关蛋白 drebrin 和 PSD-95 表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

原因是, 只有用 NGF 诱导 PC12 细胞, 细胞才会长突起; 且统计细胞总突起发现, 相比较只用 NGF 诱导的 PC12 细胞, 加了 Gp 和 TLJN 能够显著增加细胞的突起数, 而 PNS 不能增加细胞的突起数目, 可初步得出结论复方通络救脑中能够促进突触可塑性的主要成分是京尼平苷, 而不是三七总皂苷。见图 3。

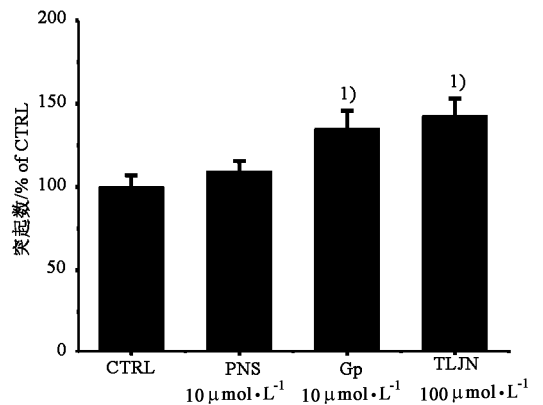


图 3 PC12 细胞总突起数 ( $\bar{x} \pm s, n = 18$ )

#### 4 讨论

突触是神经细胞信息传递的关键结构,神经细胞借助突触彼此相互联系,构成机体复杂的神经网络,形成神经系统的各种功能。突触在形态和传递效能上的改变称为突触可塑性。神经元的突触可塑性包括功能可塑性和结构可塑性,与学习和记忆密切相关。drebrin 位于突触后膜,与树突和树突棘的可塑性密切相关,在树突棘形态形成早期起到关键性的作用。PSD-95 是突触后致密物质,主要位于突触后膜,其功能与锚定神经递质受体有关。

本实验中,主要研究复方通络救脑及其主要成分京尼平苷和三七总皂苷对于突触可塑性的作用。实验结果发现,通络救脑、京尼平苷和三七总皂苷在其安全浓度下均不会影响 swAPP-SY5Y 的增殖,且通过 Western blotting 的实验结果,可以初步确定复方通络救脑中京尼平苷能够显著促进突触相关蛋白 drebrin 和 PSD-95 的表达,而三七总皂苷只能微弱地促进 PSD-95 的表达,同时后期实验可以考虑增加实验次数,进行组间比较;同时运用 PC12 细胞观察细胞形态分析也发现京尼平苷可以促进突触数目的增加,而三七总皂苷没有相应的功能。总之,复方通络救脑及其主要成分京尼平苷和三七总皂苷均能在一定程度上促进突触可塑性,但是复方通络救脑中主要起到促进突触可塑性作用的是京尼平苷,而不是三七总皂苷。

综上所述,本实验为实验室后续实验提供了参考依据,为用复方通络救脑及其单品京尼平苷治疗阿尔兹海默病提供一些理论依据,具有比较重大的实际意义。

#### [参考文献]

[1] Maurer K, Volk S, Gerbaldo H, Auguste D and Alzheimer's disease [J]. Lancet, 1997, 349

(9064):1546.

- [2] Ross C A, Poirier M A. Protein aggregation and neurodegenerative disease [J]. Nat Med, 2004, 10 Suppl:S10.
- [3] Ling Y, Morgan K, Kalsheker N. Amyloid precursor protein (APP) and the biology of proteolytic processing: relevance to Alzheimer's disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2003, 35(11):1505.
- [4] 卢静,苗君叶,赫荣乔,等. 甲醛诱导的磷酸化减弱 Tau 蛋白与 DNA 相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(12):1113.
- [5] 王建之,田青. Tau 蛋白过度磷酸化机制及其在阿尔茨海默病神经元变性中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(8):771.
- [6] Hua Q A, Qing X M, Li P T, et al. Brain microvascular endothelial cells mediate neuroprotective effects on ischemia/reperfusion neurons [J]. J Ethnopharmacol, 2010, 129(3):306.
- [7] 汪永忠,姜辉,孙文静,等. 三七总皂苷对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7):159.
- [8] 张文娟,李茂星,贾正平,等. 栀子苷的快速提取分离及其镇痛抗炎作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(21):170.
- [9] Liu Y, Hua Q, Lei H, et al. Effect of Tong Luo Jiu Nao on a beta-degrading enzymes in AD rat brains [J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(2):1035.
- [10] 张颖,林森相,华茜,等. 三七和栀子有效成分对 AD 转基因小鼠早期脑内淀粉样蛋白清除作用的研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2):173.
- [11] Counts S E, Che S L, Ginsberg S D, et al. Gender differences in neurotrophin and glutamate receptor expression in cholinergic nucleus basalis neurons during the progression of Alzheimer's disease [J]. J Chem Neuroanat, 2011, 42(2):111.

[责任编辑 聂淑琴]