

· 药理 ·

罗布麻叶提取物的抗高血压作用及其机制研究

付剑江¹, 王曦聆¹, 吕红², 刘蓉³, 尹小英¹, 郑洋滨¹, 罗永明^{1*}

(1. 江西中医学院药学院, 南昌 330004; 2. 江西中医学院网络与教育技术中心, 南昌 330004;
3. 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

[摘要] 目的: 研究罗布麻叶提取物(extracts from leaves of *Apocynum venetum*, ELA)的抗高血压作用及其激活磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)和(或)蛋白激酶 B(Akt)信号转导通路促进一氧化氮释放的作用。方法: 采用双肾双夹法建立 Beagle 犬高血压模型, 随后按血压值将 Beagle 犬随机分为模型组(ig, 生理盐水)、马来酸依那普利组(ig, 1.66 mg·kg⁻¹)、ELA 低剂量组(ig 23 mg·kg⁻¹)、高剂量组(ig ELA 46 mg·kg⁻¹)。受试动物在单次给予上述药物后, 每隔 1 h 记录 1 次动物血压, 连续 8 h, 观察 ELA 的降压作用; 采用细胞培养法, 观察 ELA 对内皮细胞(EAhy 926)一氧化氮(NO)产量和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性的影响; 采用 Western blot 法, 观察 ELA 对 eNOS, 磷酸化内皮型一氧化氮合酶(p-eNOS)、磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)以及磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)表达量的影响。结果: 给药后, ELA 高、低剂量组 Beagle 犬收缩压分别为(140.4 ± 7.5), (136.2 ± 6.8) mmHg; 舒张压分别为(63.5 ± 3.3), (72.2 ± 4.4) mmHg; 平均血压分别为(88.9 ± 4.7), (93.3 ± 5.2) mmHg, 与给药前相比均显著降低($P < 0.01$); ELA 可显著增加 EA Hy926 细胞 NO 的释放量($P < 0.01$), 提高 eNOS 活性($P < 0.01$); Western blot 结果表明, ELA 可显著增加 p-eNOS, p-PI3K 以及 p-Akt 的表达量, 与对照组相比, 具有显著差异($P < 0.01$)。结论: ELA 具有明显的降压作用。激活血管内皮细胞内 PI3K/Akt 信号转导途径, 从而促进 eNOS 磷酸化, 提高 eNOS 活性、增加 NO 可能是 ELA 降压作用的机制之一。

[关键词] 罗布麻叶提取物; 高血压; 一氧化氮; 内皮型一氧化氮合酶; 磷脂酰肌醇 3 激酶和(或)蛋白激酶 B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0159-06

[doi] 10.11653/zgsyfjxzz2013070159

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130123.1525.001.html>

[网络出版时间] 2013-01-23 15:25

Anti-hypertensive Effects of Extracts from Leaves of *Apocynum venetum* through Activating PI3K/Akt Pathway on Human Endothelial Cells

FU Jian-jiang¹, WANG Xi-ling¹, LV Hong², LIU Rong³, YIN Xiao-ying¹,
ZHENG Yang-bin¹, LUO Yong-ming^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanchang 330004, China;
2. Modern Education Technology Center, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China;
3. State Key Laboratory of Food Science & Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-hypertensive effects of extracts from leaves of *Apocynum venetum* L. (ELA) and its mechanisms. **Method:** Twelve Beagle dogs were used to establish hypertensive mode by two-kidney two-clip method; endothelial cells were cultured to determine effects of ELA on nitric oxide (NO) output and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) activities; then Western blot method was involved in current

[收稿日期] 20120906(008)

[基金项目] 国家科技重大专项(重大新药创制, 2009ZX09310-005); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB530603)

[第一作者] 付剑江, 博士, 副教授, 从事分子药理学研究, Tel: 791-87118919, E-mail: jianjiang_fu@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 罗永明, 博士, 教授, 从事天然产物活性成分研究, Tel: 791-87118919, E-mail: loym@163.com

study to detect effects of ELA on eNOS, phospho-endothelial NOS (p-eNOS), phospho-phosphonositide-3 kinase (p-PI3K) and phospho-protein kinase B (p-Akt) expression. **Result:** Contractive and diastolic pressure of Beagle dogs showed degression in dose-dependent manner after ELA was administrated ($P < 0.01$). Moreover, NO yield and eNOS activities of EA hy 926 cells were increased significantly when these cells incubated with ELA ($P < 0.01$). It was also showed that ELA enhanced expression of eNOS, p-eNOS, p-PI3K and p-Akt in endothelial cells. **Conclusion:** ELA shows significant anti-hypertensive properties. The mechanisms may be associated with activation of PI3K/Akt pathway in endothelium.

[**Key words**] extracts from leaves of *Apocynum venetum* (ELA); hypertension; NO; eNOS; PI3K/Akt

罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 属夹竹桃科植物, 根、叶、花皆可入药^[1], 主要分布于新疆、青海、甘肃等西北盐碱和沙漠地区, 具有十分独特的药用和保健功效。罗布麻用于治疗高血压的历史由来已久, 在新疆地区至今仍流传“高血压不可怕, 三年一斤罗布麻”这一民族医药古训^[2]。然而, 尽管罗布麻叶治疗高血压的历史已逾千年, 但其确切机制尚未可知。

因此, 本课题组以罗布麻叶提取物为对象, 就其抗高血压作用及作用机制展开研究。在前期的研究中, 我们发现罗布麻叶提取物具有显著地血管舒张作用, 并呈现低浓度下具有内皮依赖性, 而高浓度下无内皮依赖性的特点^[3]。为了进一步阐明罗布麻叶提取物的降压机制, 本课题组对罗布麻叶提取物的体内降压作用及其对血管内皮的作用进行了深入探讨。

1 材料

1.1 药材及提取 罗布麻叶 (*Apocyni Veneti Folium*) 购自北京同仁堂 (亳州) 饮片有限公司 (产地吉林), 由本校生药教研室付小梅副教授鉴定, 符合《中国药典》2010 年版标准。

罗布麻叶提取物提取方法: 取适量罗布麻叶, 加 10 倍量水回流提取 2.0 h, 过滤; 药渣加入 8 倍量水继续回流提取 1.5 h, 过滤后合并两次提取液, 并将提取液按 1:6 的比例浓缩。随后将浓缩药液在室温下离心, 转速 $3\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 时间 10 min, 弃去沉淀, 上清液采用 D101 型大孔树脂纯化。纯化工艺如下: 上柱量为每毫升湿树脂 0.5 g 原生药; 洗脱条件为先用 1 BV 的蒸馏水洗脱, 再用 3 BV 的 60% 的乙醇洗脱, 洗脱流速为 $2\ \text{BV} \cdot \text{h}^{-1}$, 收集 60% 的醇洗脱液, 浓缩, 干燥。

1.2 试剂 马来酸依那普利 (上海现代制药股份有限公司, 批号 20100930); 一氧化氮合酶 (NOS) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究中心, 批号 20110927); 一氧化氮 (NO) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究中心, 批号 2011113); 胎牛血清

(GIBCO, 批号 8090485); DMEM 培养基 (GIBCO, 批号 1280330); RIPA 细胞裂解液 (北京百泰克生物技术有限公司, 批号 120017); 磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (phospho-eNOS, Ser1177) 抗体 (Cell Signaling, #9571); 磷酸化磷脂酰肌醇 3 激酶 (phospho-PI3K) p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) 抗体 (Cell Signaling, #4228); 磷酸化蛋白激酶 B (phospho-Akt, Thr308) 抗体 (Cell Signaling, #2965); Akt 抗体 (Cell Signaling, #5373); eNOS 抗体 (Cell Signaling, #9586); PI3K 抗体 (Cell Signaling, #4249); HRP 标记的抗兔 IgG (Cell Signaling, #7074); ECL 显色剂 (Millipore, 批号 1001801)。

1.3 细胞株及细胞培养 人脐静脉内皮细胞 EAhy926, 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。EAhy926 细胞培养于含 10% 胎牛血清、青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中培养, 置于 $37\ ^\circ\text{C}\ 5\%\ \text{CO}_2$ 的培养箱内, 3~4 d 传代 1 次, 实验用 4~12 代。

1.4 动物 健康 Beagle 犬 12 只, 雌雄各半, 体重 9~11 kg, 购自广东高要市康达实验动物科技有限公司, 许可证号 SCXK (粤) 2009-0009, 合格证号 0074103。

1.5 仪器 LE5002 无创血压测试系统 (西班牙 Panlab 公司), ELx800 酶标仪 (Biotek 公司), AllegraX-12R 型冷冻离心机 (Beckman Coulter 公司), EC3 凝胶成像系统 (UVP 公司)。

2 方法

2.1 肾性高血压模型^[4] 采用双肾双夹法建立肾性高血压 Beagle 犬模型。取 Beagle 犬 8 头, 预先禁食 12 h, 用 3% 的戊巴比妥钠 $1\ \text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉。麻醉完全后, 将 Beagle 犬腹部朝上固定于手术台上, 腹部被皮。消毒后, 在腹部沿腹正中线做长约 10 cm 的腹部切口。暴露一侧肾脏, 分离肾动脉, 小心剔除肾动脉周围的脂肪和结缔组织。随后, 将一直径为 1.1 mm 无菌铁丝与左肾动脉平行结扎后抽

出。确认肾脏无明显瘀血、坏死或苍白后,将肾脏小心放回。同法对对侧肾脏施不完全结扎术。两侧都结扎完成后,小心清除腹腔内的积水,逐层缝合腹腔。肌肉注射 160 万单位青霉素。此后 1 周内,每天每只犬肌肉注射 80 万单位青霉素。术后 2 周,待 Beagle 犬伤口愈合后,用 Panlab 无创血压测试系统测定 Beagle 犬的血压值,待收缩压上升到 160 mmHg 以上时,高血压模型建立。

2.2 分组给药及血压测量 按照血压值将动物进行分组,每组 2 头,分别为模型组(经口给予等体积生理盐水)、马来酸依那普利组(经口给予马来酸依那普利 1.66 mg·kg⁻¹)、ELA 低、高剂量组(经口给予罗布麻叶提取物 23,46 mg·kg⁻¹)。采用 PanLab 无创血压测试系统测量各组动物给药前和给药后的血压值,并计算平均血压。实验结束后,各组动物经过为其一周的药物清洗,随后进行组间交叉给药,并记录血压值。上述实验进行 4 次交叉给药。

2.3 NO 浓度和 NOS 合酶活性测定 取对数生长期的 EAhy 926 细胞,以每孔 3 × 10⁵ 的密度接种于 24 孔板中。24 h 后,将细胞培养液更换成含有不同浓度 ELA 的培养基,药物作用 24 hr 后收集细胞培养液用于检测 NO 浓度。EAhy926 细胞则用 PBS 清洗后加 0.25% 的胰酶消化离心收集细胞,置于冰上用 RIPA 细胞裂解液裂解后去上清,用于检测细胞内 NO 水平和 NOS 活性。NO 浓度和 NOS 活性的检测参照试剂盒说明书进行。

2.4 Western blot 检测蛋白表达 将各处理组细胞加 1 mL 含 0.01 mmol·L⁻¹ PMSF 的细胞裂解液(10 mmol·L⁻¹ Tris, pH 7.6, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 5 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0, 10 mL·L⁻¹ Triton X-100, 1 mmol·L⁻¹ DTT),冰上裂解 30 min,离心(15 000 × g, 10 min, 4 °C),取出细胞碎片,测细胞裂解产物的蛋白含量,取等量蛋白在 100 g·L⁻¹ 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳,电泳结束后将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,经过封闭阻断后,加入一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后用 TTBS 将二抗按 1:1 000 稀释,在杂交袋中放到摇床上室温孵育 1 h。孵育抗体后的硝酸纤维素膜经过 2 次洗涤后,加入显色剂显色,并在凝胶成像系统中拍照。

2.5 统计分析 应用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析,方差齐性采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 ELA 的体内降压作用 与给药前相比,高、低剂量的 ELA 均可显著降低模型动物的收缩压、舒张压以及平均血压值($P < 0.01$)。见表 1。而在图 1 中所列为高血压犬服用了 ELA 后,平均血压随时间变化的时间-效应曲线。从图中可以看出,不论是 ELA 组还是依那普利组,动物血压均随时间的推移而逐渐下降。但是,其时间-效应曲线有所不同,高剂量组 ELA 组合依那普利组血压值下降速度更快,而低剂量组动物血压值下降较平稳。

表 1 罗布麻叶提取物对高血压犬血压的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

mmHg

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	给药前血压			给药后血压		
		收缩压	舒张压	平均血压	收缩压	舒张压	平均血压
模型对照	-	197.5 ± 4.6	113.2 ± 3.9	140.0 ± 4.1	201.0 ± 3.8	114.0 ± 7.8	142.7 ± 6.5
依那普利	1.66	182.1 ± 7.9	107.5 ± 8.8	132.1 ± 8.5	140.7 ± 8.5 ²⁾	57.7 ± 6.3 ²⁾	85.1 ± 7.1 ²⁾
ELA	23.0	193.7 ± 16.2	108.9 ± 9.3	136.9 ± 11.6	136.2 ± 6.8 ²⁾	72.2 ± 4.4 ²⁾	93.3 ± 5.2 ²⁾
	46.0	191.3 ± 15.1	110.6 ± 10.8	137.2 ± 12.3	140.4 ± 7.5 ²⁾	63.5 ± 3.3 ²⁾	88.9 ± 4.7 ²⁾

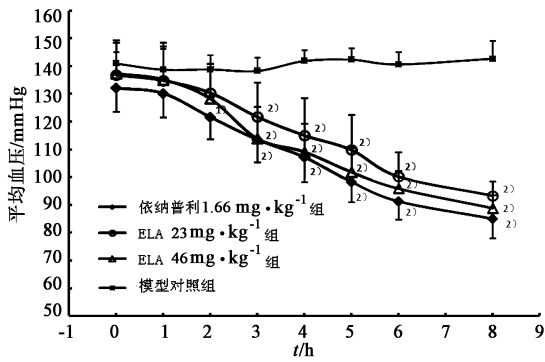
注:与给药前相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;平均血压 = 舒张压 + 0.33 × (收缩压 - 舒张压)。

3.2 ELA 对血管内皮细胞释放 NO 及 eNOS 活性的影响 如表 2 所示,人脐静脉内皮细胞 EAhy926 与不同浓度的 ELA 孵育 24 h 后,细胞内、外的 NO 含量均有明显的提高。其中,中、高剂量 ELA 可显著增加细胞外 NO 含量($P < 0.05$, $P < 0.01$),而高剂量 ELA 还可刺激内皮细胞大量合成 NO,与溶剂对照相比,有极显著差异($P < 0.01$)。该结果进一步印证了 ELA 的降压作用与 NO 释放密切相关。

另外,表 2 中还列出 ELA 对血管内皮细胞 eNOS 活性的影响。结果表明,经 ELA 孵育 24 h 后,

EAhy926 细胞内的 eNOS 活性明显提高,各孵育浓度均有显著性差异($P < 0.05$)。提示低浓度 ELA 的血管扩张效应可能与其下调内皮细胞 eNOS 活性有关。

为了进一步确定 ELA 对血管内皮细胞 eNOS 活性的影响,我们采用 Western blot 的方法,检测了浓度分别为 1×10^{-6} , 10×10^{-6} , 100×10^{-6} mol·L⁻¹ 的 ELA 与 EAhy926 细胞孵育 24 h 后,其 eNOS 和磷酸化 eNOS 表达情况的影响。如图 3 所示,ELA 可剂量依赖性的促进 p-eNOS 的表达($P < 0.01$),但对非磷酸化的 eNOS 则无显著性差异。提示,ELA 可促



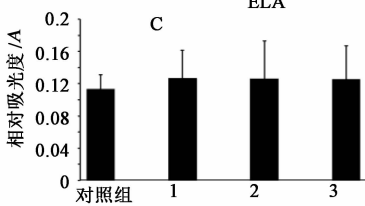
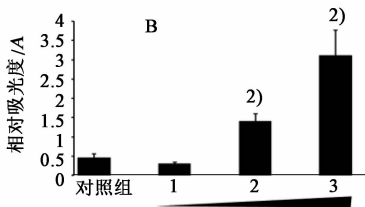
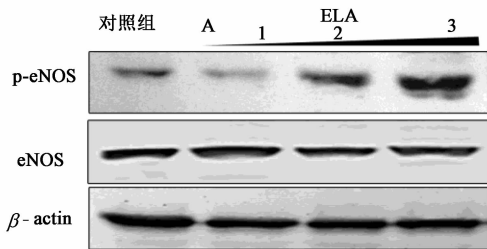
与给药前相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;

图 1 ELA 对高血压 Beagle 犬平均血压影响的时效关系

表 2 ELA 对人脐静脉内皮细胞 EAhy926 NO 释放量 eNOS 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	胞外 NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	胞内 NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	eNOS/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白对照	-	77.92 ± 6.56	54.33 ± 18.49	2.85 ± 0.32
溶剂对照	-	80.58 ± 6.42	53.58 ± 17.75	2.91 ± 0.28
ELA	1	92.04 ± 16.53	70.37 ± 15.42	3.37 ± 0.18 ¹⁾
	10	102.29 ± 18.09 ²⁾	64.02 ± 20.61	3.59 ± 0.49 ²⁾
	100	96.88 ± 13.00 ¹⁾	100.01 ± 12.80 ²⁾	3.32 ± 0.43 ¹⁾

注:与溶剂对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。



A. 电泳条带; B. p-eNOS 吸光度扫描图, 以 β -actin 为对照;

C. eNOS 吸光度扫描图; 以 β -actin 为对照;

1, 2, 3. 依次为 ELA 1, 10, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

与溶剂对照组相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3 ~ 4 同)

图 2 ELA 对 EAhy926 细胞 eNOS 及 p-eNOS 表达的影响

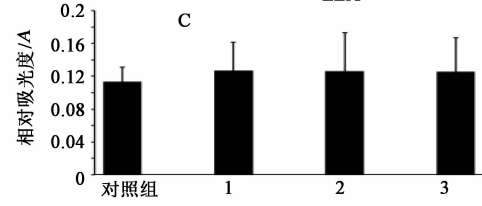
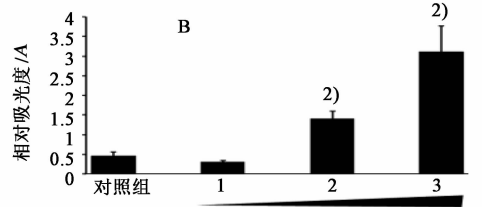
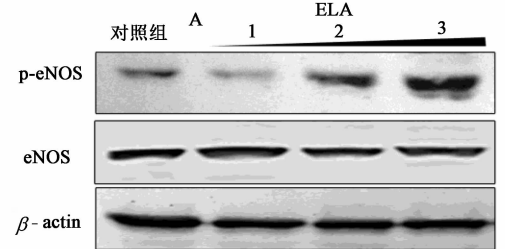
PI3K/Akt 信号转导通路的活化, 从而活化 eNOS, 促进 NO 释放, 产生降压效果。

4 讨论

在前期的研究中^[3], 我们发现罗布麻叶提取物

进血管内皮细胞中 eNOS 的活化。见图 2。

3.4 ELA 对血管内皮细胞 PI3K/Akt 信号转导通路的影响 PI3K/Akt 信号转导通路是 eNOS 活性的重要调控途径, 为进一步探讨 ELA 促进 eNOS 活化的机制, 本研究采用 Western blot 法检测了 ELA 对 PI3K/Akt 信号转导途径的影响。图 3 和图 4 分别为 ELA 对 PI3K/p-PI3K, Akt/p-Akt 表达的影响 (ELA 与内皮细胞的孵育时间和处理浓度同 3.3)。从图中可以看出, ELA 可明显促进该信号转导途径的活化, 磷酸化 PI3K 和 Akt 表达量显著增加 ($P < 0.01$)。提示, ELA 可以通过促进血管内皮细胞

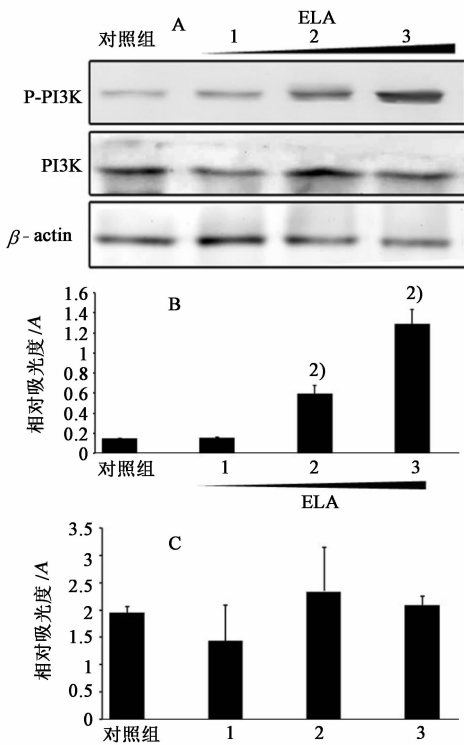


A. 电泳条带; B. p-PI3K 吸光度扫描图, 以 β -actin 为对照;

C. PI3K 吸光度扫描图, 以 β -actin 为对照;

图 3 ELA 对 EAhy926 细胞 PI3K 及 p-PI3K 表达的影响

对离体大鼠胸主动脉具有明显的舒张反应, 并表现为低浓度下内皮依赖性、高浓度下内皮非依赖性的特点。在低浓度下, 罗布麻叶提取物的血管舒张作用可能与 NO 释放有关, 而高浓度下的扩血管作用则可能有血管平滑肌细胞表面的 Ca^{2+} , K^+ 通道参



注:A.电泳条带;B. p-Akt 光度扫描图,以 β -actin 为对照;

C. Akt 吸光度扫描图,以 β -actin 为对照;

图4 ELA对EAhy926细胞Akt及p-Akt表达的影响

与。但是,罗布麻叶提取物的体内降压效果并未得到证实。因此本研究首先对ELA的体内降压作用进行验证。结果发现,ELA可显著降低双肾双夹高血压Beagle犬的收缩压、舒张压。这一结果提示,罗布麻叶提取物不仅在离体组织中表现出显著地血管舒张反应,而且在整体动物模型中也表现出明显的降压作用。

随后,本研究观察了ELA对内皮细胞NO释放量以及eNOS活性的影响。结果表明,ELA可以显著提高内皮细胞的NO产量,并增加eNOS活性。提示,ELA可能是通过提高内皮细胞eNOS活性从而增加NO的释放量。NO是由L-精氨酸(L-Arg)在血管内皮细胞内经内皮NO合酶(eNOS)的作用下合成。它通过激活平滑肌细胞鸟苷酸环化酶,使cGMP产量增加^[5]。生理条件下,内皮细胞不断合成、释放基础量的NO,抑制血管对收缩因子的反应,从而维持血管的舒张状态^[6]。然而,内皮细胞所产生的NO可以被多种因素所影响,例如各种不同的机械力,包括切应力、循环张力等;包括生长因子、多肽等在内的多种激素因素包括Ach,VEGF,缓激肽,雌激素,S-1P,H₂O₂,血管紧张素II等^[7]。尽管eNOS的活性与细胞内Ca²⁺水平直接相关联^[8-9],

但是单独的Ca²⁺浓度增加不足以影响该酶的活性,因为Ca²⁺与CaM之间的结合以及酶的还原结构域流向氧化结构域的电子流都依赖于eNOS的磷酸化和去磷酸化^[10-11]。为了进一步了解ELA对eNOS活性影响机制,我们采用Western blot的方法检测了ELA对内皮细胞内eNOS以及磷酸化eNOS的影响。结果发现,ELA可显著提高磷酸化eNOS(Ser1177)的表达量,而对非磷酸化的eNOS则没有明显影响。上述结果表明,ELA可能通过影响内皮细胞eNOS的磷酸化,从而提高eNOS活性,增加NO产量,产生降压效果。

随后,我们考察了ELA对内皮细胞PI3K/Akt信号转导通路的影响。结果发现在ELA可明显促进PI3K和Akt的磷酸化,刺激该信号转导途径的活性。研究表明,在eNOS的磷酸化调节中,PI3K/Akt信号转导通路起了至关重要的作用。在eNOS的众多磷酸化位点中,位于还原酶功能域内的Ser1177和位于CaM结合域内的Thr495是最重要的两个磷酸化位点。例如,切应力刺激可以通过活化G蛋白,导致Ser1177残基磷酸化,从而启动eNOS的活化。另外,VEGF,雌激素,S-1P以及缓激肽都可通过与其受体结合之后,导致Ser1177的磷酸化,激活eNOS。在上述信号转导中,PI3K/Akt途径都发挥了重要作用^[9,12]。

综上所述,罗布麻叶提取物具有明显的降压作用。激活血管内皮细胞内PI3K/Akt信号转导途径,从而促进eNOS磷酸化,提高eNOS活性、增加NO产量可能是ELA降压作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] 高双立,管庆海.绿色保健植物罗布麻[J].中国社区医师,2005,7(20):8.
- [2] 虞颖映,邵健忠,王海明.罗布麻茶对心血管系统的生物学效应研究[J].同济医科大学学报:医学版,2006,27(4):40.
- [3] 付剑江,吕红,杨华生,等.罗布麻叶提取物对离体大鼠胸主动脉环的舒张作用[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(24):114.
- [4] 王军,张伟,王警卫,等.硝普钠预处理对高血压犬气管插管血流动力学的影响[J].第四军医大学学报,2006,27(2):139.
- [5] Petruson K, Stafors J, Jacobsson K E, et al. Nitric oxide production in the sphenoidal sinus by the inducible and constitutive isozymes of nitric oxide synthase[J]. Rhinology,2005,43(1):18.

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. Ca²⁺-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]