

七叶皂苷对体外培养大鼠神经元生长的作用及其与 BDNF 的关系

李俊彦¹⁾, 张月宁²⁾, 杨金伟³⁾, 茹金²⁾, 赵楠¹⁾, 郭建辉³⁾, 刘俊¹⁾

(1) 昆明市第一人民医院神经外科, 云南昆明 650011; 2) 昆明医科大学神经科学研究所, 云南昆明 650500; 3) 云南省第一人民医院普外二科, 云南昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨七叶皂苷对体外培养大鼠大脑皮质神经元生长的作用及其与脑源性神经营养因子 (BDNF) 及其受体 (TrkB) 的关系. **方法** 取新生 SD 大鼠大脑皮质进行神经元原代培养, 随机分为正常组、对照组和七叶皂苷组. 七叶皂苷组加入 20 mg/mL 七叶皂苷 (生理盐水稀释), 对照组加入等量生理盐水, 正常组不作任何处理. 显微镜下观察各时间点 (24 h、48 h) 神经元数目、胞体面积、突起长度. 采用 MTT 检测细胞活力. RT-PCR 检测 BDNF 和 TrkB mRNA 的表达. **结果** 正常组、对照组各时间点神经细胞数、胞体面积、突起长度及细胞活力无明显差异 ($P > 0.05$), 但随时间点延长, 各指标明显增加 ($P < 0.05$). 七叶皂苷组各指标均明显高于正常组、对照组 ($P < 0.05$). BDNF 和 TrkB mRNA 在正常组、对照组各时间点上无明显差异 ($P > 0.05$), 而七叶皂苷组明显高于正常组、对照组 ($P < 0.05$). **结论** 七叶皂苷可促进 SD 大鼠脑源性神经元的生长, 其作用可能与上调 BDNF 及 TrkB 的表达有关.

[关键词] 七叶皂苷; 大鼠; 神经元; 脑源性神经营养因子

[中图分类号] R651 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 03-0004-05

Effect of Aescine on Growth in Cultured Rat Cerebral Cortical Neurons and the Relationship with BDNF

LI Jun-yan¹⁾, ZHANG Yue-ning²⁾, YANG Jin-wei³⁾, RU Jin²⁾, ZHAO Nan¹⁾, GUO Jian-hui³⁾, LIU Jun¹⁾

(1) Dept. of Neurosurgery, The First People's Hospital of Kunming City, Kunming Yunnan 650011; 2) Institute of Neuroscience, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 3) Second Dept. of General Surgery, The First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650032, China)

[Abstract] **Objective** The aim of this study was to explore the effect of aescine on the growth in cultured rat cerebral cortical neurons and the relationship with BDNF and TrkB. **Methods** The cerebral cortex cells from newborn SD rats were primarily cultured in 24 or 96 well plate. Cells were randomly divided into normal, control and aescine groups. Aescine group was cultured with 20 mg/mL aescine (diluted with physiological saline), control group was cultured with the same volume of normal saline, and normal group do not have any treatment. The sub groups and images were captured at 24 h and 48 h. The expression of BDNF and TrkB mRNA were detected by using RT-PCR, and the neuronal growth vigor was detected by MTT. **Results** There was no difference in normal and control groups at each time point in cells numbers, body area, neurite length and viability ($P > 0.05$), but all indicators have increased in the normal and control groups with the time prolonged. The indicators in aescine group were significantly higher than those in normal and control groups ($P < 0.05$). RT-PCR showed that there was no significant difference in expression of BDNF and TrkB mRNA in normal and control groups at each time point ($P > 0.05$), but the expression in aescine group was significantly higher than that in normal and control groups at each

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81260075, 31260253); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2012FB002, 2012FB092, 2013FB114, 2013FZ295)

[作者简介] 李俊彦 (1964~), 男, 云南昆明人, 医学学士, 副主任医师, 主要从事神经损伤机制的研究工作. 张月宁与李俊彦对本文有同等贡献.

[通讯作者] 郭建辉. E-mail: guojianhuikm@163.com; 刘俊. E-mail: liujun8@163.com

time point ($P < 0.05$). **Conclusion** Aescine can promote neuron growth and may be relationship with the expression of BDNF and its receptor TrkB.

[**Key words**] Aescine; Rats; Neurons; Brain-derived neurotrophic factor

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 目前仍是死亡率及残疾率较高的一类外伤性疾病, 达 26% ~ 50%^[1]. 据统计我国每年约有 60 万人遭受 TBI, 死亡 10 万人^[2]. 目前, 对 TBI 治疗尚无有效治疗药物. 中药是祖国传统医学中的瑰宝, 对 TBI 有一定的临床治疗作用. 研究发现, 七叶皂苷对中枢及外周神经系统疾病有作用^[3]. 本研究旨在探讨七叶皂苷对体外培养大鼠大脑皮质神经元生长的作用及其与脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 及其受体 (tyrosine kinase B TrkB) 的关系, 为中药临床治疗脑神经损伤疾病提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 试剂

注射用七叶皂苷钠 (批号: 1302014, 公司: 山东绿叶制药股份有限公司). MTT (货号: 11684817910, Roche). RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit、PCR Master Mix Kit (货号: K1621, Fermentas 公司). DNA Marker、DNA 上样缓冲液. TRIZOL (Molecular Research Center). BDNF SENCE 5'-CCTGCGAACCCACTAAA-3', ANTI-SENCE 5'-GGTCCTCCAACAGAAAGC-3', 退火温度 52℃, PCR 产物 477 bp. TrkB SENCE 5'-GCCCTGC-CTCGTTATTG-3', ANTI-SENCE 5'-ACCTGCTCG-ACAGATTCCA-3', 退火温度 54℃, PCR 产物 459 bp. β -actin SENCE 5'-AGGGAATCGTGCCTGAC-3', ANTI-SENCE 5'-CTGGAAGGTGGACAGTGAG-3', 退火温度 53℃, PCR 产物 523 bp. 均由大连宝生物公司合成.

1.2 细胞培养及其分组

怀孕 SD 大鼠购自昆明医科大学动物科, 取其胚胎大脑皮质, 放入 D12 中, 离心, 弃上清. 加 500 μ L 木瓜蛋白酶和 500 μ L DNA 酶, 消化 15 min. 胎牛血清终止消化, 离心 5 min. 滤网过滤收集液, 离心弃上清. 换神经元培养液, 放入包被好的培养板中 (24 孔板及 96 孔板), 37℃, 5%CO₂ 培养. 调整细胞密度为 $0.5 \times 10^6/L$, 改加 B27 无血清培养液 (含 98% Neurobasal+2% B27+0.5 mmol/L L-谷氨酰胺 +0.1 U/L 青、链霉素). 随机分为正常

组、对照组和七叶皂苷组. 七叶皂苷组: 加入 20 mg/mL 七叶皂苷 (生理盐水稀释); 对照组: 加入等量生理盐水; 正常组: 不作任何处理. 每组 $n = 5$.

1.3 显微镜观察神经元生长

随机抽取 5 孔, 在 Leica 倒置显微镜成像系统 20 倍镜下采集图片, 每孔采集左上、右上、中、左下、右下方 5 个视野. 计数每个视野中神经元数目 (个). Leica LAS AF Lite 软件测量每个视野神经元胞体面积 (μm^2)、神经元突起长度 (μm).

1.4 MTT 法检测神经元生长活力

96 孔板每孔加入 10 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL, 用生理盐水稀释), 继续培养 4 h. 若药物与 MTT 能够反应, 可先离心后弃去培养液, 小心用 PBS 冲 2 ~ 3 遍后, 再加入含 MTT 的培养液. 终止培养, 准备溶解结晶. 同时设置调零孔 (培养基、MTT、DMSO), 对照孔 (神经元、七叶皂苷、培养液、MTT、DMSO).

1.5 RT-PCR 检测 BDNF 和 TrkB mRNA 表达

采用 TRIZOL 消化神经元, 用 TRIZOL 试剂盒提取总 RNA, 1.5% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外线透射分析仪上观察电泳结果 (结果未列). 取 1 μ L RNA 样品在紫外分光光度仪 260 nm/280 nm 下测其浓度. 按 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂说明书合成 cDNA, RNA 样品均取 3 μ g. 向 0.2 mL PCR 管中顺序加入 $2 \times$ PCR Master Mix 10 μ L, water nucle-free 8 μ L, 上游引物 0.3 μ L, 下游引物 0.3 μ L, 模板 1 μ L. PCR 反应条件: 94℃ 15 min; 94℃ 45 s, 退火 1 min, 72℃ 45 s, 35 个循环; 72℃ 15 min. 其中 DNA Marker (标准 DNA 样品) 的量为 6 μ L. 反应结束后, 取 10 μ L 样品, 按体积比加入 $10 \times$ DNA 上样缓冲液, 以 TAE 为电流缓冲液, 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定 PCR 产物, 凝胶成像仪拍照并分析图像. 结果以 BDNF 或所测得的 OD 值与同一样品 β -actin 的 OD 值相比较的比值作为进行统计的结果.

1.6 统计学处理

采用 SPSS 统计软件包对所测得结果行统计学检测, 组间采用单因素方差分析, 组内采用 t 检验. 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义.

2 结果

2.1 七叶皂苷对神经元形态的作用

在 LEICA 倒置显微镜下: 培养 5 d 时 (0 h), 大部分神经元已经贴壁, 以分散形式存在, 细胞

胞体大, 多呈类圆形, 贴壁细胞已经长出突起, 折光性良好, 立体感较强 (图 1-A). 培养 24 h, 多个贴壁细胞聚集在一起, 突起较前增长, 并通过突起开始建立了细胞间的联系 (图 1-B-D-F). 培养 48 h, 神经元胞体增大, 胞体呈卵圆形、短梭形或三角形, 细胞成簇聚集, 突起较前增长, 长出分支, 细胞间的联系更为紧密 (图 1-C-E-G).

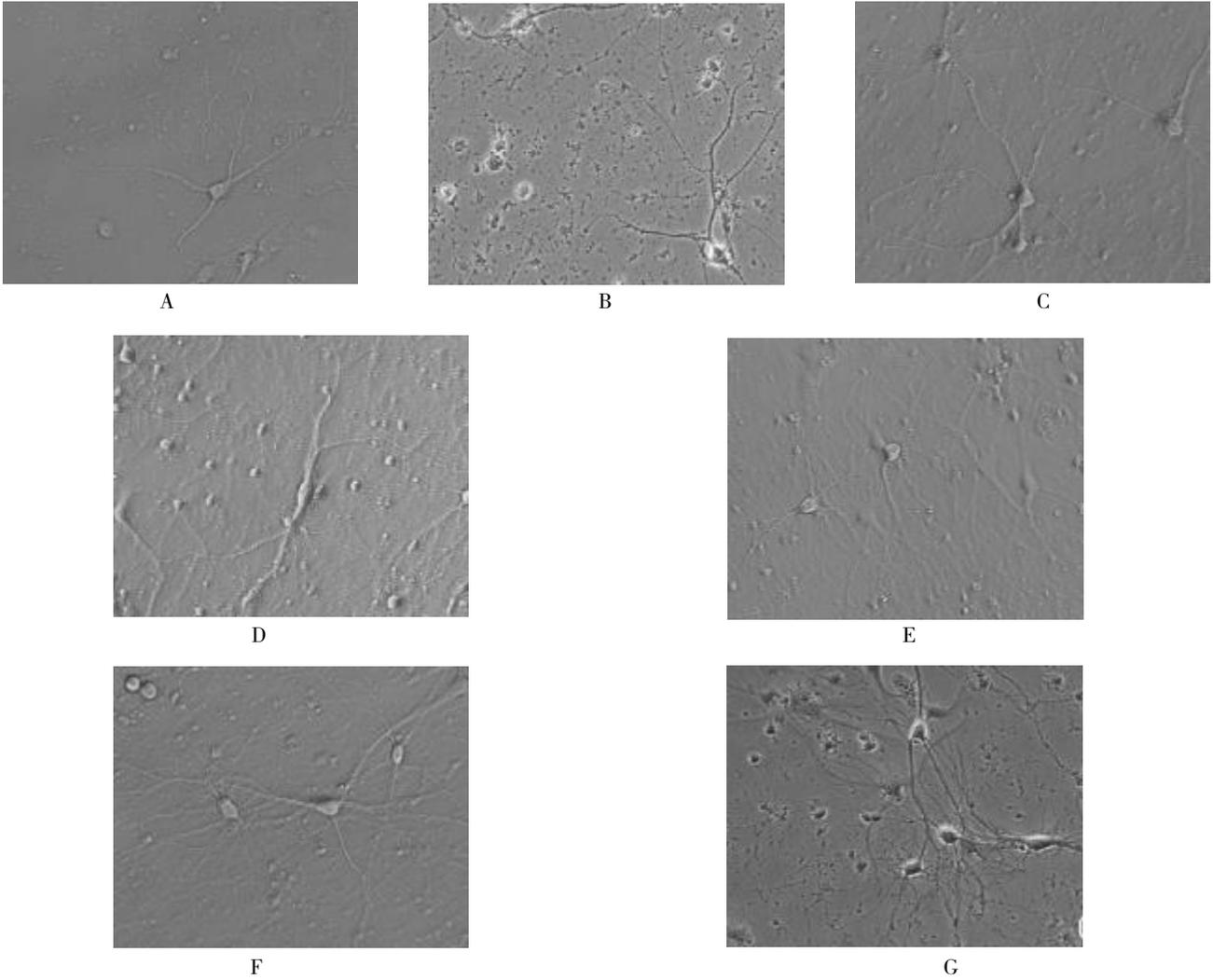


图 1 七叶皂苷对神经元形态的作用 (200 ×)

Fig. 1 The effect of aescine on neuronal growth (200 ×)

A:正常组 0 h; B:正常组 24 h; C:正常组 48 h; D:对照组 24 h;

E:对照组 48 h; F:七叶皂苷 24 h; G:七叶皂苷 48 h.

2.2 七叶皂苷对神经元的数量、胞体面积、突起长度及细胞活力的作用

胞体数量: 正常组、对照组及七叶皂苷组 48 h 较 24 h 增多 ($P < 0.05$), 七叶皂苷组 24、48 h 较对照组增多 ($P < 0.05$). 胞体面积: 正常组、七

叶皂苷组 48 h 较 24 h 增大 ($P < 0.05$), 突起长度: 正常组随时间延长, 突起增长 ($P < 0.05$), 对照组及七叶皂苷组 48 h 较 24 h 增长 ($P < 0.05$). 细胞活力: 正常、对照及七叶皂苷组 48 h 较 24 h 增加 ($P < 0.05$), 七叶皂苷组 24、48 h 较对照组增加 ($P < 0.05$), 见表 1、图 2.

2.3 七叶皂苷对神经元 BDNF 及 TrkB mRNA 的表达影响

各组中均有 β -actin、BDNF 和 TrkB mRNA 的表达 (图 3). BDNF mRNA 表达: 正常组、对照组及七叶皂苷组 48 h 较 24 h 表达上调 ($P < 0.05$),

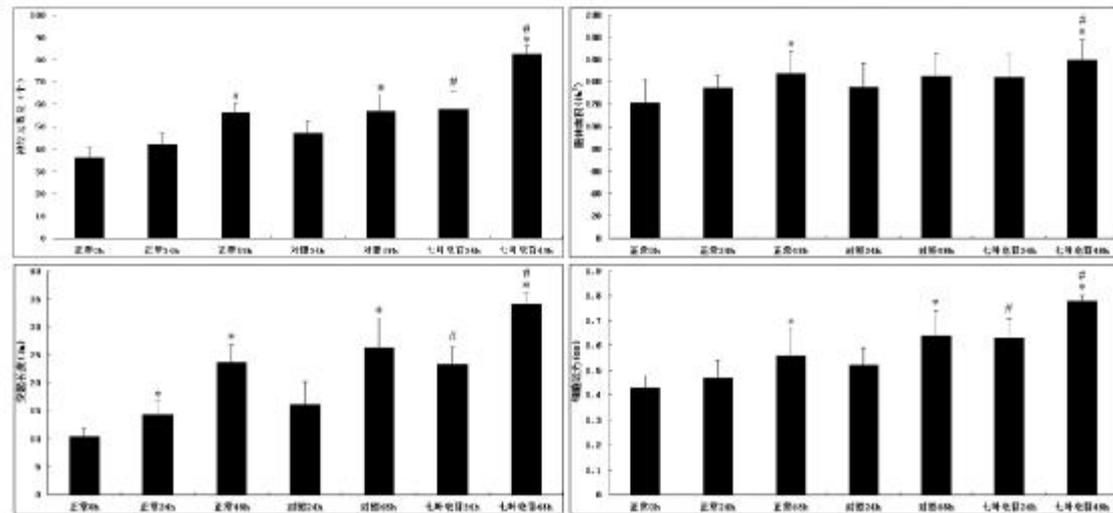
七叶皂苷组 24、48 h 较对照组表达上调 ($P < 0.05$). TrkB mRNA 表达: 正常、对照及七叶皂苷组 48 h 较 24 h 表达上调 ($P < 0.05$), 七叶皂苷组 24、48 h 较对照组表达上调 ($P < 0.05$), 见图 3、表 2.

表 1 七叶皂苷对神经元数量、胞体面积、突起长度及细胞活力的作用 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The effects of aescine on neuron numbers, cell size, neurite length, and cell viability ($\bar{x} \pm s$)

测量指标	正常组			对照组		七叶皂苷组	
	0 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
胞体数量(个)	36.14 ± 4.25	42.05 ± 5.02	56.03 ± 4.41*	47.04 ± 5.32	57.11 ± 7.46*	57.84 ± 8.32#	82.2 ± 4.09**
胞体面积(μm^2)	121.25 ± 20.51	134.6 ± 11.53	147.3 ± 20.4*	135.26 ± 21.34	145.21 ± 20.02	144.13 ± 21.73	82.2 ± 4.09**
突起长度(μm)	10.38 ± 1.62	14.31 ± 2.39*	23.65 ± 3.05*	16.14 ± 4.16	26.2 ± 5.29*	23.24 ± 3.18#	159.3 ± 19.01**
细胞活力(OD)	0.43 ± 0.05	0.47 ± 0.07	0.56 ± 0.11*	0.52 ± 0.07	0.64 ± 0.10*	0.63 ± 0.08#	0.78 ± 0.02**

与同组 24 h 比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P < 0.05$.



与同一组前一时间点比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P < 0.05$. 每组 $n = 5$.

图 2 七叶皂苷对神经元的数量、胞体面积、突起长度及细胞活力的作用

Fig. 2 The effects of aescine on neuron numbers, cell size, neurite length, and cell viability

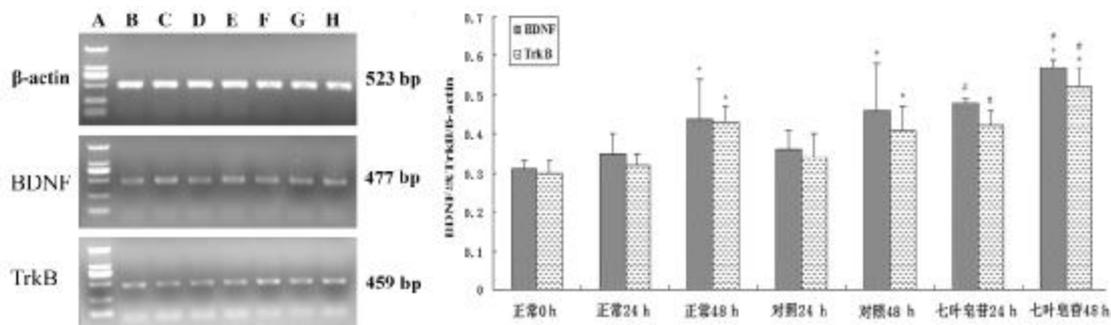


图 3 七叶皂苷对神经元 BDNF 及 TrkB mRNA 表达的作用

Fig. 3 The effects of aescine on expression of BDNF and TrkB mRNA in neurons

A:Marker DL2000; B:正常组 0 h; C:正常组 24 h; D:正常组 48 h; E:对照组 24 h; F:对照组 48 h; G:七叶皂苷组 24 h; H:七叶皂苷组 48 h. A:PCR 图. B:直方图. 与同组 24 h 比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P < 0.05$.

表 2 七叶皂苷对神经元形态的作用 (200×) ($\bar{x} \pm s$)Tab. 2 The effects of aescine on expression of BDNF and TrkB mRNA in neurons ($\bar{x} \pm s$)

因 子	正常组			对照组		七叶皂苷组	
	0 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
BDNF	0.31 ± 0.02	0.35 ± 0.05	0.44 ± 0.10*	0.36 ± 0.05	0.46 ± 0.12*	0.48 ± 0.01#	0.57 ± 0.02**
TrkB	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.43 ± 0.04*	0.34 ± 0.06	0.41 ± 0.06*	0.42 ± 0.04#	0.52 ± 0.05**

与前一时间点比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, # $P < 0.05$. 每组 $n = 5$.

3 讨论

七叶皂苷是 1931 年由 Winterstein 从欧马栗种子中分离得到, 随后 1953 年 Merkel 等从欧马栗中得到具有溶血作用的皂苷, 即七叶皂苷 (Aescin), 该皂苷由等相对分子质量的七叶皂苷元、乙酸、惕各酸、葡萄糖醛酸和 2 分子葡萄糖构成, 分为 α -七叶皂苷和 β -七叶皂苷^[4,5]. 研究表明, 七叶皂苷具有抗渗出、恢复毛细血管通透性、消水肿、抑制蛋白质透过血管进入炎症区域、改善血液循环、增加静脉张力、促进淋巴回流、纠正脑功能失常、抑制胃排空、清除活性氧以及抗肿瘤等作用^[6]. 七叶皂苷钠是含多酯键的三萜皂苷钠盐注射剂. 程鹏等^[7]发现 β -七叶皂苷可以减轻脊髓损伤后自由基的氧化损伤, 减小空洞面积, 减少炎症细胞活化, 促进脊髓损伤的修复. 宫明智等^[8]研究发现, 七叶皂苷钠对神经细胞凋亡具有抑制作用. 注射用七叶皂苷可能会通过刺激血清髓鞘碱性蛋白的合成, 激活脑的可塑性, 从而促进髓鞘的再生^[9]. 本研究发现: 七叶皂苷能够增加神经元的数量、胞体面积、突起长度及细胞活力, 提示七叶皂苷对神经元生长具有促进作用.

神经营养因子家族 (neurotrophins, NTs) 是一组在结构与功能上具有相似性的多肽因子, 对神经元存活、生长有维持作用, 与神经细胞的生长、发育、分化及功能维持有密切关系, 神经细胞受损时, 可保护其存活, 并促进其生长^[10,11]. NTs 通过前体蛋白的切割而成为具有特定功能的成熟蛋白, 为不同的神经细胞亚群提供营养支持, 在中枢神经系统和周围神经系统的发育、分化及病理中起着至关重要的作用^[12,13]. BDNF 是 NTs 的重要成员之一^[14], 与神经元的生长、发育、分化、成熟、神经系统发育有很大关系^[15]. TrkB 是 BDNF 的受体, BDNF 与 TrkB 结合才能发挥生物学作用^[16]. 本研究发现: 七叶皂苷可上调神经元 BDNF mRNA 及其受体 TrkB mRNA 表达. 据此, 笔者推测七叶皂苷对神经元生长的促进作用, 可能与上调 BDNF 及 TrkB 表达有关. 本研究只是初步探讨了七叶皂苷对

体外培养大鼠神经元生长的作用及其与 BDNF 的关系, 但 BDNF 及 TrkB 在此过程中的确切作用, 有待进一步的研究.

[参考文献]

- [1] 张华, 陈君, 樊玉霞, 等. 严重胸部损伤合并颅脑损伤 92 例[J]. 中华创伤杂志, 2013, 29(3): 271 - 272.
- [2] HARRISON D, PRABHU G, GRIEVER, et al. Risk adjustment in neurocritical care (RAIN) prospective validation of risk prediction models for adult patients with acute traumatic brain injury to use to evaluate the optimum location and comparative costs of neurocritical care: a cohort study [J]. Health Technol Assess, 2013, 17(23): 350.
- [3] 李焱焱, 王永刚, 刘学源. β -七叶皂苷钠的研究进展 [J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2009, 6(2): 147 - 150.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 275.
- [5] 湛建峰, 牛剑钊, 张启明, 等. 七叶皂苷化学成分研究进展 [J]. 中国药事, 2010, 24(8): 822 - 824.
- [6] 薛云丽, 孙启泉. 七叶树属药用植物化学成分、生物活性及临床应用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(11): 2305 - 2308.
- [7] 程鹏, 冯斌, 鞠躬. β -七叶皂苷早期应用对大鼠脊髓损伤的保护作用 [J]. 神经解剖学杂志, 2011, 27(2): 119 - 123.
- [8] 宫明智, 张佐伦, 刘浩中, 等. 脊髓牵拉损伤后七叶皂苷钠对细胞凋亡的抑制作用 [J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(5): 363 - 366.
- [9] 段建刚, 刘鸣. 七叶皂苷对缺血性脑卒中大鼠血清 MBP 含量和髓鞘再生的影响 [J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(1): 1 - 5.
- [10] KODAM, HASHIMOTO M, MURAKAMI M, et al. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord [J]. J Neurotrauma, 2004, 21(3): 329 - 337.
- [11] 江东, 于建云. 脑源性神经营养因子临床研究进展

(下转第 12 页)

- 2011,26(2):55 – 58.
- [6] 王月婷,王宗保. 小型猪糖尿病模型研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2011,21(12):70 – 73.
- [7] 梁斌,吴晓云. 非人灵长类糖尿病动物模型研究进展[J]. 动物学研究,2011,32(1):91 – 96.
- [8] 朱华,徐艳峰,刘颖,等. 链脲佐菌素诱导糖尿病恒河猴胰岛细胞数量的变化 [J]. 中国比较医学杂志,2012,22(12):1 – 5.
- [9] KYLIE KAVANAGH, DAVID M, FLYNN, CHRIS NELSON, et al. Characterization and validation of a streptozotocin-Induced diabetes model in the vervet monkey [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2011, 63(3): 296–303.
- [10] 彭燕章,叶智彰,邹如金,等. 树鼩生物学[M]. 昆明:云南科技出版社,1991:91 – 117.
- [11] YOKO OZAWA, TOSHIHIDE KURIHARA, MARIKO SASAKI, et al. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model[J]. *Experimental Diabetes Research*, 2011, 11:108 328.
- [12] KRITIKA KACHAPATI, DAVID E, ADAMS, et al. The B10 Idd9.3 locus mediates accumulation of functionally superior CD137pos T regulatory cells in the NOD Type 1 diabetes model[J]. *J Immunol*, 2012, 189(10): 5 001 – 5 015.
- [13] ANIL K, BIDANI, MARIA PICKEN, et al. Spontaneously reduced BP load in the rat streptozotocin-induced diabetes model: potential pathogenetic relevance [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(2): F647 – F654.
- [14] TIE-JUN SHI, MING-DONG ZHANG, HUGO ZEBERY, et al. Coenzyme Q10 prevents peripheral neuropathy and attenuates neuron loss in the db/db mouse, a type 2 diabetes model[J]. *PNAS*, 2013, 110(2): 690 – 695.
- [15] JONATHAN LOU S, ESGUERRA, CAROLINE BOLMESON, et al. Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model go-to-kakizaki Rat[J]. *PLOS ONE*, 2011, 6(4): e1 8613.
- [16] 吴晓云,李昀海,常青,等. 链脲佐菌素诱导树鼩2型糖尿病[J]. 动物学研究,2013,34(2):108 – 115.
(2014 – 01 – 24 收稿)

(上接第 8 页)

- [J]. *创新医学*, 2011, 27(2): 221 – 225.
- [12] 王超, 王国林. 神经生长因子前体的研究进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2007, 28(4): 353 – 359.
- [13] 樊拥军, 许健. 神经营养因子前体蛋白功能的研究进展[J]. *细胞生物学杂志*, 2008, 30(4): 425 – 430.
- [14] BARDE Y A, EDGER D, THOENEN H. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain [J]. *EMBOJ*, 1982, 1(5): 549 – 553.
- [15] HENDERSON C E. Role of neurotrophic factors in neuronal development[J]. *Curr Opin Neuro*, 1996, 6(1): 64 – 70.
- [16] ROHE M, HARTL D, FJORBACK A N, et al. SORLA – mediated trafficking of TrkB enhances the response of neurons to BDNF[J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72 164.
(2014 – 02 – 10 收稿)