

## 大黄酸对体外大鼠皮质神经元突起长度及微管相关蛋白 2 mRNA 表达的影响

鄢黎<sup>1</sup>, 周晓雯<sup>1</sup>, 周星<sup>1</sup>, 赖永长<sup>1</sup>, 罗焕敏<sup>1,2,3</sup>

(暨南大学 1. 医学院药理学系, 2. 脑科学研究所, 广东 广州 510632; 3. 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 研究大黄酸 (RH) 对大鼠皮质神经元的营养作用, 并初步探讨其相关机制。方法 体外 DMEM/F12 + 0.4% B27 培养新生大鼠皮质神经元, 应用神经元特异性烯醇化酶 (NSE) 和微管相关蛋白 2 (MAP2) 免疫细胞化学染色法鉴定神经元。神经元细胞加入 RH 2, 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 72 h, 计算神经元平均突起长度; 或分别同时加入 Trk 受体拮抗剂 K252a 50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 PI3K 抑制剂 LY294002 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  测量神经元平均突起长度。MTT 法检测细胞存活, 并测定培养液中乳酸脱氢酶 (LDH) 的含量。逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 半定量检测 MAP2 mRNA 表达。结果 NSE 及 MAP2 免疫荧光染色结果显示, 绝大多数细胞呈阳性反应, 所培养的细胞 90% 以上为神经元。MTT 和 LDH 检测结果表明, 与溶媒对照组相比, RH 2, 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能明显提高神经元存活率 ( $P < 0.01$ ); 平均突起长度明显增加 ( $P < 0.01$ )。与 RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组相比, 同时加入 K252a 50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  或 LY294002 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 平均突起长度明显缩短 ( $P < 0.01$ )。与溶媒对照组相比, RH 2, 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 MAP2 mRNA 表达量明显增加 ( $P < 0.01$ )。结论 RH 对新生大鼠皮质神经元具有神经营养作用, 能促进神经元突起的生长和提高神经元的存活率。RH 神经营养作用可能部分通过激活 Trk 受体, 继而激活 Ras/PI3K/PKB 通路而发挥的。

**关键词:** 大黄酸; 神经营养; 碱性成纤维细胞生长因子; 酪氨酸受体激酶受体; 磷脂酰肌醇 3 激酶

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-3002(2012)01-0052-06

**DOI:** 10.3867/j.issn.1000-3002.2012.01.011

神经元的丢失、死亡以及神经网络破坏近年来被认为是神经退行性疾病的重要病理学特征, 例如帕金森病、阿尔茨海默病和亨廷顿病等<sup>[1]</sup>。在神经退行性疾病中, 神经元及其突触的丢失与神经营养因子 (neurotrophic factors, NTF) 的减少和缺失密切相关<sup>[2]</sup>。NTF 是一类对中枢和周围神经系统均具有营养活性的蛋白质或多肽, 能促进神经细胞生长、发育、分化, 维持其形态功能的完整性并提高其存活率<sup>[2-4]</sup>。但是由于其分子量过大难以通过血脑屏障, 且易被降解和生物利用率低等弊端限制了这类物质的临床应用<sup>[5]</sup>。

大黄酸属单萜醌类 1,8-二羟基萜醌衍生物, 是从大黄、何首乌和虎杖等多种传统中药分离提纯出

的有效成分, 具有抗菌、免疫抑制、利尿及抗炎等作用, 并可用于治疗糖尿病性肾病<sup>[6]</sup>; 大黄酚具有改善  $\text{A}\beta_{25-35}$  致小鼠学习记忆障碍的作用<sup>[7]</sup>; 大黄素能保护去卵巢大鼠并拮抗  $\text{A}\beta$  对神经元的毒性作用<sup>[8]</sup>, 提示大黄素有雌激素样作用; 大黄素甲醚的预处理对大鼠的局灶性脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用<sup>[9]</sup>。大黄酸与大黄酚、大黄素和大黄素甲醚等的化学结构相近, 研究 RH 的促进神经突起再生方面作用有利于进一步肯定萜醌类结构在神经保护方面的作用, 也有利于发现新的神经营养与保护类先导化合物, 为结构改造提供母核。

### 1 材料与方法

#### 1.1 药品与试剂

RH (纯度 > 98% 中国药品生物制品检定所); L-多聚赖氨酸, 噻唑蓝 (MTT), 二甲基亚砜 (DMSO), LY294002, K252a, Hoechst33258, 焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC), 单克隆兔抗大鼠神经元微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2) (美国 Sigma 公司); B27 添加剂,

**基金项目:** 国家自然科学基金项目资助 (30672450); 国家 973 项目资助 (2011CB707500); 广东省科技计划项目资助 (2010B030700018)

**作者简介:** 鄢黎 (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/Fax: (020)85220500

DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司);胎牛血清 (美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶 (美国 Amresco 公司);单克隆兔抗大鼠神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE) IgG,即用型 SABC 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司);Trizol (Introvengen 公司);RT-PCR 试剂盒 (大连宝生物工程有限公司);SYBR Premix Ex Taq™ 荧光定量试剂盒和 150 bp DNA 标志物 (日本 TaKaRa 公司);溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 替代染料 (北京普利莱基因技术有限公司)。

## 1.2 主要仪器

3K18 冷冻高速离心机 (美国 Sigma 公司);Arium631 纯水仪 (德国 Sartorius 公司);AG 梯度 RT-PCR 仪 (美国 Eppendorf 公司);450 型酶标仪, Mini protean 3 cell 电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司);Omega 10 凝胶成像分析系统 (美国 Ultra-Lum 公司)。

## 1.3 细胞培养

24 h 内的新生大鼠置于 75% 乙醇中消毒 20 s, 在超净台内将大脑皮质与嗅球和海马分离开, 并置于含有 D-Hank 液的青霉素瓶中。用眼科剪将其剪成 1 mm<sup>3</sup> 组织块。用 0.08% (W/V) 的胰酶在 37℃ 的培养箱中消化 10 min。用 DMEM/F12 + 10% FBS 终止消化, 再过滤离心收集细胞。用 DMEM/F12 将细胞混匀, 并将细胞均匀地接种于用多聚赖氨酸 0.1 g·L<sup>-1</sup> 处理过的培养板上。采用无血清培养。

## 1.4 神经元的鉴定

### 1.4.1 NSE 免疫细胞化学染色

将细胞接种于 24 孔板, 培养 72 h 后用 4% 多聚甲醛固定 20 min。用 PBS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 漂洗 3 次后加入纯甲醇和 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50:1) 室温下浸泡 20 min, PBS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 漂洗 3 次后加一抗 (抗 NSE 1:80), 室温 2 h; 除去一抗用 PBS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 漂洗 3 次后加入辣根过氧化物酶标记单克隆兔抗大鼠 NSE, 室温避光放置于湿盒内 20 min, 除去二抗用 PBS 漂洗 2 次滴加 SABC, 置于湿盒 20 min, 再用 PBS 漂洗加入 DAB 显色, 镜下观察并记录结果。

### 1.4.2 MAP2 免疫荧光染色

将细胞接种于 24 孔板, 培养 72 h 后用 4% 多聚甲醛固定 20 min。用 PBS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 漂洗 3 次后加入 0.1% TritonX-100 作用 10 min。PBS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 漂洗 3 次后加一抗 (抗 MAP2 1:200), 4℃ 过夜; 除去一抗用 PBS 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 漂洗 3 次后加入 Cy3 标记单克隆兔抗大鼠 MAP2, 室温避光放置于湿盒内孵育 1 h, 除去二抗用 PBS 漂洗 2 次, 荧光显微镜下

观察并记录结果。

## 1.5 神经元平均突起长度测量

24 孔板培养神经元, 6 h 细胞贴壁后加药换培养基, 实验分为 9 组: 溶媒对照组 (0.1% DMSO) 组, bFGF 10 μg·L<sup>-1</sup> 组, RH 2, 4 和 8 μmol·L<sup>-1</sup> 组, K252a 50 nmol·L<sup>-1</sup> 组, RH 8 μmol·L<sup>-1</sup> + K252a 50 nmol·L<sup>-1</sup> 组, LY294002 10 μmol·L<sup>-1</sup> 组, RH 8 μmol·L<sup>-1</sup> + LY294002 10 μmol·L<sup>-1</sup> 组。作用 72 h, 每孔随机选取 24 个视野, 每组 4 个复孔, 拍照。以突起长度大于 2 倍胞体的神经元为阳性神经元, 统计视野中的 10 个阳性神经元。采用 Image Pro 软件计算照片中神经元的平均突起长度。

## 1.6 神经元存活率检测

### 1.6.1 MTT 比色法

将大鼠皮质神经元接种于 96 孔板中, 每孔 3.3 × 10<sup>4</sup> 个细胞, 6 h 神经元贴壁后, 换培养基加药, 实验分为 5 组: 0.1% DMSO 溶媒对照组; bFGF 10 μg·L<sup>-1</sup> 组, RH 2, 4 和 8 μmol·L<sup>-1</sup> 组。培养 72 h 后, 每孔加入 20 μl MTT 5 g·L<sup>-1</sup>, 4 h 后移去上清, 加入 150 μl DMSO, 震荡 10 min, 用酶标仪上在 570 nm 波长下测各孔吸光度值 (absorbance, A), 每组 6 个复孔, 计算其平均值。细胞存活率 (%) =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

### 1.6.2 LDH 测定

将大鼠皮质神经元接种于 24 孔板中, 每孔 2.5 × 10<sup>5</sup> 个细胞, 6 h 神经元贴壁后, 换培养基加药, 按 1.6.1 项分组处理。取上清液, 4℃, 92 × g 离心 1 min。按照 LDH 测定试剂盒说明书操作, 用 7600 全自动生化仪测定 LDH 含量 (U·L<sup>-1</sup>)。

## 1.7 RT-PCR 测定神经元 MAP2 mRNA 含量

将大鼠皮质神经元接种于 6 孔板中, 每孔 1.0 × 10<sup>6</sup> 个细胞, 贴壁后, 换培养基加药, 实验分为 5 组: 溶媒对照组 (0.1% DMSO) 组, bFGF 10 μg·L<sup>-1</sup> 组, RH 2, 4 和 8 μmol·L<sup>-1</sup> 组。培养 72 h 后用 Trizol 提取大鼠皮质神经元总 RNA, 管家基因 GAPDH 作为内参基因。根据 GenBank 的序列 (表 1), 用 Primer5.0 软件设计小鼠 MAP2 引物。PCR 反应参数为: 预变性 94℃, 30 s; 变性 94℃, 15 s; 退火 58℃, 15 s; 延伸 72℃, 30 s; 总循环数为 35。用 2% 琼脂糖凝胶在 60 V, 70 mA, 1 h 条件下对扩增好的 PCR 反应产物进行电泳, 并用 Multi Genius 型凝胶成像分析系统进行图像分析, 对扩增 DNA 片段进行吸光度扫描, 求出积分吸光度 (integrated absorbance, IA), 计算 MAP2 基因与内参照基因 GAPDH 的 IA 比值表示 mRNA 的相对含量并拍摄照片。

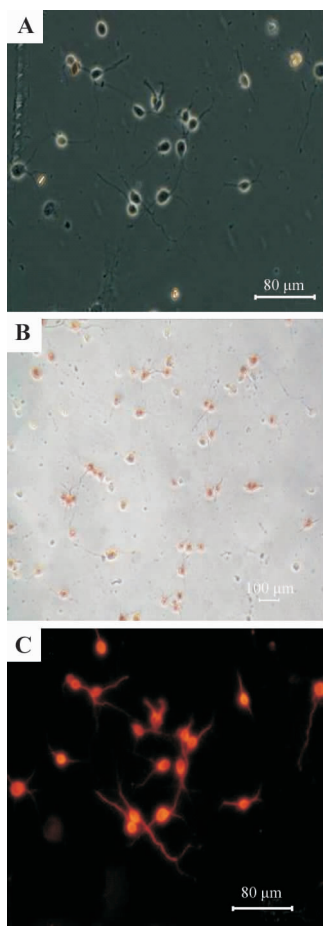
**Tab. 1 Primer sequences of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and GAPDH**

Gene	Sense primer	Antisense primer	GenBank entry
MAP2	GGAAGAAAGGAGACCATAACC	AGGCTGTCCGGATCCATAAT	NM 013066.1
GAPDH	GGCAAGTTCAACGGCACA	CCACAGCTTTCAGAGGG	NM 017008.3

## 2 结果

### 2.1 培养的神元形态学观察与鉴定

从图 1A 中可以看出细胞有明显的突起,胞体呈圆形或梭形,在其周围伴有明显的光晕,胞核及核仁清晰可见。NSE 免疫细胞化学鉴定(图 1B)和 MAP2 免疫荧光鉴定(图 1C)结果表明,95% 以上的细胞呈阳性反应,故所培养的细胞大多数为神经元。



**Fig. 1 Immunocytochemical staining to identify cells in culture.** A: the cultured neurons observed by inverted phase contrast microscope; B: the same neurons stained by NSE; C: these neurons stained further by MAP2 immunofluorescence.

### 2.2 大黄酸对神经元突起生长的影响

表 2 结果显示,与溶媒对照组相比较,RH 2, 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组能明显促进神经元突起生长,从  $(127 \pm 33) \mu\text{m}$  增加到  $(160 \pm 36) \mu\text{m}$ ,具有统计学差

异( $P < 0.01$ )。

**Tab. 2 Effect of RH on neurite length**

Group	Neurite length/ $\mu\text{m}$
0.1% DMSO	127 $\pm$ 32
bFGF 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	165 $\pm$ 55 **
RH 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	157 $\pm$ 34 **
4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	158 $\pm$ 38 **
8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	160 $\pm$ 36 **

Cells were cultured for 72 h.  $\bar{x} \pm s, n = 4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0.1% DMSO group.

与 RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组相比较, Trk 受体拮抗剂 K252a 50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 PI3K 拮抗剂 LY294002 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组神经元的平均突起长度均显著性缩短,具有统计学差异( $P < 0.01$ )。RH 与 K252a 或与 LY294002 同时加入,RH 延长神经元长度的作用被拮抗剂阻断( $P < 0.01$ ),基本恢复至溶媒对照组水平(表 3,表 4)。

**Tab. 3 Effect of RH with K252a on neurite length**

Group	Neurite length/ $\mu\text{m}$
0.1% DMSO	109 $\pm$ 14
RH 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	150 $\pm$ 24 **
K252a 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	127 $\pm$ 20 <sup>##</sup>
RH 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + K252a 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$	108 $\pm$ 23 <sup>##</sup>

Cells were cultured for 72 h.  $\bar{x} \pm s, n = 4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0.1% DMSO group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.

**Tab. 4 Effect of RH with LY294002 on neurite length**

Group	Neurite length/ $\mu\text{m}$
0.1% DMSO	136 $\pm$ 33
RH 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	159 $\pm$ 37 **
LY294002 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	129 $\pm$ 32 <sup>##</sup>
RH 8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + LY294002 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	136 $\pm$ 30 <sup>##</sup>

Cells were cultured for 72 h.  $\bar{x} \pm s, n = 4$ . \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0.1% DMSO group; <sup>##</sup> $P < 0.01$ , compared with RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group.

### 2.3 大黄酸对神经元存活率的影响

MTT 结果(表 5)表明,与溶媒对照组相比, RH 2, 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞的存活率均明显增加。A 值从  $0.089 \pm 0.002$  增加到  $0.100 \pm 0.005$ , 存活率增加到  $(115.7 \pm 2.5)\%$  具有显著意义 ( $P < 0.05$ )。bFGF 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组细胞存活率明显增高, 达  $(178.7 \pm 8.0)\%$ 。

神经细胞衰老或受损时会导致生物膜功能异常, LDH 的渗漏量增加, 因此, 培养液中 LDH 的活性可反映神经细胞的生长和存活状态。LDH 检测结果(表 6)显示, 与溶媒对照组相比, RH 2, 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组神经元中 LDH 含量均显著降低 ( $P < 0.05$ ), 最低达  $(7.50 \pm 0.58) \text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ ; bFGF 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组神经元中 LDH 含量也明显降低 ( $P < 0.01$ ), 达到  $(7.25 \pm 1.26) \text{U}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**Tab.5 Effect of RH on neurons survival rate by MTT assay**

Group	Cell viability(A)	Cell survival/%
0.1% DMSO	$0.089 \pm 0.002$	$100.0 \pm 5.0$
bFGF 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.160 \pm 0.016^{**}$	$178.7 \pm 8.0^{**}$
RH 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.100 \pm 0.003^*$	$113.5 \pm 1.5^*$
4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.100 \pm 0.001^*$	$112.4 \pm 0.5^*$
8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.100 \pm 0.005^{**}$	$115.7 \pm 2.5^{**}$

Cells were cultured for 72 h.  $\bar{x} \pm s, n=4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0.1% DMSO group.

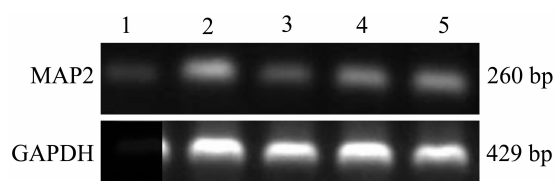
**Tab.6 Effect of RH on neurons survival rate by LDH release assay**

Group	LDH/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
0.1% DMSO	$9.75 \pm 0.96$
bFGF 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$7.25 \pm 1.26^{**}$
RH 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$8.25 \pm 0.50^*$
4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$8.00 \pm 0.82^*$
8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$7.50 \pm 0.58^{**}$

Cells were cultured for 72 h.  $\bar{x} \pm s, n=4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0.1% DMSO group.

### 2.4 大黄酸对大鼠皮质神经元 MAP2 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果(图 2 和表 7)表明,与溶媒对照组比较, RH 2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 MAP2 mRNA 无明显改变, RH 4 和 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  显著增加皮质神经元中 MAP2 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ), 作用效果与阳性对照药 bFGF 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  相当。说明 RH 可以增强大脑皮质神经元 MAP2 mRNA 表达能力。



**Fig.2 Effect of RH on microtubule-associated protein 2 mRNA (MAP2 mRNA) expression in cortical neurons of rats.** Lane 1: 0.1% DMSO; lane 2: bFGF 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lanes 3-5: RH 2, 4 and 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**Tab.7 Effect of RH on MAP2 mRNA expression**

Group	MAP2 mRNA expression ( $I_{A_{MAP2}} : I_{A_{GAPDH}}$ )
0.1% DMSO	$0.24 \pm 0.03$
bFGF 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.57 \pm 0.17^*$
RH 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.38 \pm 0.11$
4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.51 \pm 0.18^*$
8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.51 \pm 0.23^{**}$

Cells were cultured for 72 h.  $\bar{x} \pm s, n=4$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with 0.1% DMSO group.

## 3 讨论

神经元体外培养模型是神经元发育分化、神经再生、神经疾病的发生机制药物筛选等众多研究领域的重要模型。体外培养神经元的方法总体可分为有血清培养和无血清培养。血清可以提供细胞生长所需要的各种营养物质, 当培养基中去除血清后, 神经元存活率会大大降低<sup>[10]</sup>。但由于血清成分复杂, 对实验结果影响干扰较大。而无血清培养步骤简便, 培养的细胞活性及生理特性保持良好。故本实验选用无血清培养模型, 探讨 RH 对神经元突起生长及神经元存活率的影响。

提高神经元的存活率和促进突起生长是考察被筛选的药物在体外实验中是否具有神经营养作用的主要指标。本实验形态学结果表明, RH 与溶媒对照组比较能显著增长神经元突起长度, MAP2 属于结构性相关蛋白家族, 主要存在于中枢神经元的树突和胞体<sup>[11]</sup>, 在维持神经元形态方面起着重要的作用, 并能调控突起的生长和可塑性<sup>[12]</sup>。RT-PCR 结果表明, RH 促进 MAP2 mRNA 表达, 说明 RH 能促进神经元突起的生长, 维持其形态的稳定。MTT 比色法和 LDH 检测结果显示, 与溶媒对照组相比, RH 各浓度组均可以提高细胞活力, 使神经元的存活率

提高。以上结果提示, RH 兼有促进神经元突起生长和促进细胞存活的双重作用, 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及其相关疾病的作用。

目前一般认为, 小分子神经营养拟似物可通过直接激活 Trk 受体、间接激活 Trk 受体(有些物质可能通过腺苷 A2a 受体活化间接激活 Trk 受体)、促进 NTF 与 Trk 受体结合以及诱导神经营养素的表达或分泌等途径发挥作用。本实验中, 工具药 K252a (Trk 受体抑制剂)能部分阻断 RH 的作用, 表明 RH 可能是部分通过 Trk 受体产生作用。

NTF 主要通过激活 Ras/PI3K/PKB 途径, 促进神经元存活, 抑制其凋亡, 从而起到神经保护作用的<sup>[14]</sup>。本实验中, 加入 LY294002 后, RH 的作用被完全阻断, 暗示 RH 可能主要通过 PI3K 这一信号通路产生神经营养作用。后续实验将运用 Western 印迹技术检测 PI3K 等下游相关蛋白的磷酸化水平, 从而进一步确证 RH 的作用机制是否是通过激活 Ras/PI3k/PKB 通路而发挥作用的。

#### 参考文献:

- [1] Golde TE. The therapeutic importance of understanding mechanisms of neuronal cell death in neurodegenerative disease[J]. *Mol Neurodegener*, 2009, **4**:8.
- [2] Salton SR. Neurotrophins, growth-factor-regulated genes and the control of energy balance[J]. *Mt Sinai J Med*, 2003, **70**(2):93-100.
- [3] Sharma HS, Sharma A. New strategies for CNS injury and repair using stem cells, nanomedicine, neurotrophic factors and novel neuroprotective agents[J]. *Expert Rev Neurother*, 2011, **11**(8):1121-1124.
- [4] Sullivan AM, Toulouse A. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, **22**(3):157-165.
- [5] Esumi T, Makado G, Zhai HF, Shimizu Y, Mitsumoto Y, Fukuyama Y. Efficient synthesis and structure-activity relationship of honokiol, a neurotrophic biphenyl type neolignan[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, **14**(10):2621-2625.
- [6] Zhao RZ, Yuana D, Liu SJ, Chen YJ, Liu LY, Zhao Y. Liver targeting effect of vinegar-baked Radix Bupleuri on rhein in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, **132**(2):421-428.
- [7] Gervais F, Paquette J, Morissette C, Krzywkowski P, Yu M, Azzi M, et al. Targeting soluble A $\beta$  peptide with tramiprosate for the treatment of brain amyloidosis[J]. *Neurobiol Aging*, 2007, **28**(4):537-547.
- [8] Li L, Duan GL, Zhao L, Wu JL. Influence of emodin on the behavior of ovariectomized rats and its protective effect on cultured neurons from these rats and those murine neurons treated with  $\beta$ -amyloid protein[J]. *Her Med*(医药导报), 2005, **24**(2):100-103.
- [9] França VC, Agra M, Barbosa-Filho JM, da-Cunha EVL, da-Silva MS. Physcion and dihydrocarinatin from *Aristolochia birostris*[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2003, **31**(11):1341-1343.
- [10] 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.
- [11] Mandelkow E, Mandelkow EM. Microtubules and microtubule-associated proteins[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7**(1):72-81.
- [12] Kurz JC, Williams RC Jr. Microtubule-associated proteins and the flexibility of microtubules[J]. *Biochemistry*, 1995, **34**(41):13374-13380.
- [13] Segal RA, Greenberg ME. Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors[J]. *Annu Rev Neurosci*, 1996, **19**:463-489.

## Effect of rhein on neurite outgrowth and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in primary cultured rat cortical neurons

YAN Li<sup>1</sup>, ZHOU Xiao-wen<sup>1</sup>, XING Zhou<sup>1</sup>, LAI Yong-chang<sup>1</sup>, LUO Huan-min<sup>1,2,3</sup>

(1. Department of Pharmacology, School of Medicine, 2. Institute of Brain Sciences, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. The Joint Laboratory of Brain Function and Health of Jinan University-University of Hong Kong, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract: OBJECTIVE** To investigate the neurotrophic effects of rhein (RH) on rat cortical neurons and explore possible mechanisms. **METHODS** Cortical neurons were cultured in serum-

free medium *in vitro*. The neurons were identified by immunofluorescence staining of two related proteins: neuron-specific enolase (NSE) and microtubule-associated protein 2 (MAP2). Neurons were treated with RH 2, 4 and 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for 72 h. RH merely or co-treated with K252a (a tyrosine kinase receptor inhibitor) or LY294002 (a specific inhibitor of PI3K) was added before the average length of neurite outgrowth was measured by Image-Pro software for morphological analysis. Neuronal survival by MTT assay and LDH assay was investigated. The expression of MAP2 mRNA was determined by RT-PCR. **RESULTS** NSE and MAP2 immunofluorescence staining of cultures suggested that most of the cultured cells were neurons. Compared with vehicle control group, RH 2, 4 and 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  could raise the neuron survival rate ( $113.5 \pm 1.5\%$ ), ( $112.4 \pm 0.5\%$ ) and ( $115.7 \pm 2.5\%$ ) ( $P < 0.5$ ), respectively; and increase the lengths of neurites to  $157 \pm 34$ ,  $158 \pm 38$  and ( $160 \pm 36$ )  $\mu\text{m}$  ( $P < 0.01$ ), respectively. Compared with RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group, average length of neurites was reduced in K252a 50  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  + RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group and in LY294002 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  + RH 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  group to  $127 \pm 20$  and ( $136 \pm 30$ )  $\mu\text{m}$  ( $P < 0.01$ ), respectively. Compared with vehicle control group, the expression of MAP2 mRNA increased in RH 4 and 8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  groups. **CONCLUSION** RH can significantly increase neurite lengths and neuronal survival in the primary cultured rat cortical neurons. The neurotrophic effect of RH may depend on activating the Trk receptor and subsequently the Ras/PI3k/PKB pathway.

**Key words:** rhein; neurotrophic factor; bFGF; Trk tyrosine kinase receptor; PI3K

**Foundation item:** The project supported by National Natural Science Foundation of China (30672450); National Program on Key Basic Research Project of China (973 Program) (2011CB707500); and Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2010B030700018)

**Corresponding author:** LUO Huan-min, E-mail: tlhm@jnu.edu.cn, Tel/Fax: (020)85220500

(收稿日期: 2011-09-19 接受日期: 2011-12-22)

(本文编辑: 乔虹)

## 第十五届中国神经精神药理学学术会议通知(第一轮)

第十五届(2012年)中国神经精神药理学专业委员会学术年会将于2012年7月20-23日在河北省张家口市召开。会议由中国药理学学会神经药理专业委员会主办、河北北方学院承办。会议将邀请国内外著名药理学家和相关学科的专家作大会学术报告,还将举行药理学研究专题和青年英文报告。欢迎神经精神药理学、神经内科、神经外科、精神病科、麻醉科等科研工作者以及医药企业代表积极投稿,征文将择优以摘要形式在《中国药理学与毒理学杂志》刊出。征文内容以摘要形式投稿;摘要采用中文撰写,每篇不超过600字,Word格式,小四号宋体,1.5倍行距,不附图表。具体实例请见《中国药理学与毒理学杂志》2010年第24卷第5期中的“第十四届中国神经精神药理学学术会议论文摘要”。论文摘要请以E-mail发至:yaolihui2012@126.com,注明“张家口会议征文”。征文截止日期:2012年5月30日。会务费和资料费:正式代表900元,学生代表700元,港台代表1800元,国际代表400美元。

通讯地址:河北省张家口市钻石南路11号河北北方学院研究生部;邮编:075000

联系人:李 炜:(0313)4029306,18932635613

武 欣:(0313)4029555,18931316996

E-mail: yaolihui2012@126.com

中国药理学学会神经药理专业委员会  
河北北方学院  
2012-01-28