

DOI:10.19403/j.cnki.1671-1521.2023.01.001

# 人参皂苷 Rh2 通过激活 Akt 和 Erk 通路促进神经分化

何俊桓<sup>1</sup>,徐浩仁<sup>1</sup>,文献学<sup>1</sup>,童美玲<sup>1</sup>,陈晓勇<sup>1</sup>,李姝祺<sup>1</sup>,李彬<sup>1</sup>,唐根云<sup>1,2,3\*</sup>(1.湖南医药学院,怀化 418000;2.脑与神经内分泌疾病湖南省高等学校重点实验室,怀化 418000;  
3.中药合成生物学研究湖南省重点实验室,怀化 418000)

**摘要:**目的 研究人参皂苷 Rh2 的促神经分化作用,初步明确相关分子机制。方法 将细胞分为对照组、实验组,使用 MTT 检测 Rh2 对细胞毒性的影响,筛选最适药物浓度,用倒置相差显微镜观察拍照,使用 Image-J 软件对照片进行细胞分化率和神经突起长度统计分析,用 Western Blotting 检测其促神经分化所激活的信号通路,之后用相关通路抑制剂加以干预,检测神经突起长度、分化率和相关通路的蛋白表达变化。结果 人参皂苷 Rh2 浓度在 2~6  $\mu$ M 不影响细胞存活,能够促进神经分化,随剂量依赖性增加,其中 6  $\mu$ M 的效果最显著,其通过激活 PI3K/Akt、MEK/Erk 发挥作用,其中 p-Akt 和 p-Erk 在 30 min 表达最明显,Rh2 可以降低由于 PI3K/Akt、MEK/Erk 抑制剂所致 p-Akt、p-Erk 抑制的效果。结论 人参皂苷 Rh2 促进神经突起生长、增加和延长,具有较好促进神经分化的效果,具有开发为治疗神经退行性疾病的潜力。

**关键词:**人参皂苷 Rh2;神经分化;PI3K/Akt; MEK/Erk;神经退行性疾病

神经分化是一个复杂的过程,一般经过几个阶段,包括轴突生长、树突发生和突触形成、塑造和重塑等分化过程<sup>[1]</sup>,其在维持神经系统正常生理功能有着很重要的作用。神经元萎缩、死亡是神经退行性疾病、缺血性脑卒中的主要病理变化,这导致神经信息网络不能交织成网,阻碍信息的传递,神经网络受损,从而造成患者神经功能上的病变。因此促进神经细胞存活、神经突起再生或延长是治疗这些疾病的一种较好的策略。人参皂苷是中药人参干燥根的主要有效成分,对中枢神经<sup>[2]</sup>、心血管<sup>[3]</sup>、抗氧化<sup>[4]</sup>和抗肿瘤<sup>[5]</sup>具有较好的药理作用,现代药理学实验及临床应用等研究证明,人参皂苷对神经组织的生长和神经网络的建立具有促进作用<sup>[6]</sup>,抗肿瘤活性作用强的 Rh2 是人参皂苷的单体,与其他类似分子相比,其对神经分化的作用鲜有报道,现已证实人参皂苷 Rh2 通过阻止神经元凋亡和神经炎症来保护三甲基锡诱导的神经毒性<sup>[7]</sup>,并促进海马胆碱能系统,显著抑制氧化应激和激活 ERK-CREB-BDNF 信号通路,对东莨菪碱、tg2576 阿尔茨海默症模型小鼠的认知和记忆缺陷具有改善作用。阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是最常见的老年性中枢神经退行性疾病<sup>[8]</sup>,阿尔茨海默症的主要特征是淀粉样斑块和神经纤维缠结,导致神经元变性死亡,神经突起损伤,而后出现认知障碍的表现,迄今为止还没有找到能够根治 AD 的手段以及药物,如

今研究治疗阿尔兹海默症效果显著的药物已刻不容缓<sup>[9]</sup>。神经营养因子多年来一直被认为是神经退行性疾病的潜在治疗选择之一,但是其半衰期短,不稳定,脂溶性差,外周给药进入神经中枢的途径也非常有限,在临床试验中也遭遇失败,开发具有类似活性的小分子药物具有广阔的应用前景,目前大多数神经营养药物通过一些经典的信号转导途径作用于大脑,激活关键信号通路如:有丝分裂活化蛋白激酶(MAPK)途径、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(也称为 Akt)途径等<sup>[10]</sup>,促进神经突起生长。因此,本研究评估人参皂苷 Rh2 对神经细胞分化的促进作用,为其具有神经营养作用阐明药效和作用机制,为人参皂苷 Rh2 在临床开发和治疗神经退行性疾病提供药理学依据。

## 2 实验材料与方法

### 2.1 实验材料

人参皂苷 Rh2(纯度>98%)购买于阿拉丁试剂公司;MEM(EBSS,含 L-谷氨酰胺)购自上海羽圣生物科技;胎牛血清购自 Gibco;蛋白定量测定试剂盒(PierceTMBCA Protein Assay Reagent A)购自 Thermo Scientific 公司;C0201 胰酶细胞消化液、PBS 缓冲液、二甲基亚砜、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型,50 $\times$ )、细胞裂解液、p-Akt、p-Erk1/2、 $\beta$ -actin 抗体、HRP 标记的二抗、PI3K/Akt 抑制剂 LY294002、MAPK/

**基金项目:**国家自然科学基金项目,项目编号:81703821;湖南省教育厅项目,项目编号:18B530;湖南省自然科学基金,项目编号:2017JJ3224;湖南医药学院博士启动基金,项目编号:19KJPY10;国家级大学生创新创业训练计划项目,项目编号:S202012214012。

**作者简介:**何俊桓,男,本科,主要从事中药神经药理研究。

**\*通信作者:**唐根云,女,副教授,博士,硕士生导师,主要从事中药神经药理研究。E-mail:tanggenyun@foxmail.com。

ERK1/2 抑制剂 PD98059、极超敏 ECL 化学发光试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;阳性对照视黄酸(Retinoic acid, RA)购于 Sigma 公司;中分子量神经丝蛋白抗体(Neurofilament M, 简称 NF)购于 Cell Signaling Technology。

## 2.2 细胞培养

小鼠来源神经瘤母细胞(Mouse neuroblastoma N2a Cell, 又称 Neuro-2a, 简称 N2a), 购自于美国模式菌种收集中心(American type culture collection, ATCC)细胞库。本实验中小鼠神经母细胞瘤 N2a 细胞用含 10%胎牛血清以及 1%双抗(青霉素和链霉素)的 MEM 培养基作为培养体系, 放置于二氧化碳培养箱(37℃、5%CO<sub>2</sub>)中培养, 隔天换液, 平均 3~4 天传代。

## 2.3 MTT 法检测药物对细胞毒性的影响

取对数期 N2a 细胞, 将细胞按  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 培养至 48 h 后每孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT (5 mg/mL)(空白对照组不加, MTT 避光-20℃保存), 放置细胞培养箱充分反应 4 h 后, 吸去原细胞培养液, 每孔加入 100  $\mu$ L 的分析纯 DMSO 溶解, 轻轻拍打板身, 避光, 放置摇床, 50~100 rpm/min, 15 min 后停止。使用酶标仪在 490 nm 检测细胞各孔 OD 值。

细胞存活率=(实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%

## 2.4 细胞突起生长实验

取对数期 N2a 细胞进行传代和种板, 将细胞按  $3 \times 10^4$  个/皿的密度接种于 6 孔板中, 培养生长 24 h 后, 加 10  $\mu$ L RA 或不同浓度 Rh2 于分化培养基(含 0.5% FBS 和 1%青霉素/链霉素的 MEM)诱导分化 48 h。化合物人参皂苷 Rh2 设置的浓度为 4  $\mu$ M 和 6  $\mu$ M, 并且设置阴性对照组 DMSO 组和阳性对照组 RA 组。

## 2.5 神经细胞分化的定义及量化统计

诱导分化 48 h 后, 在相差显微镜下拍照并计数 N2a 细胞。使用 Image-J 软件对照片进行分析细胞分化率和神经突起长度。突起长度大于胞体两倍长的细胞为分化细胞, 分化细胞的神经突起长度将会被定量统计。主要分析细胞分化率和分化细胞总神经突起的平均长度。

## 2.6 蛋白免疫印迹技术

将 N2a 细胞接种在密度为  $3 \times 10^5$  个/孔的 6 孔板中, 用药物预处理后, 用 PBS 洗涤细胞, 并用 RIPA 联合蛋白磷酸酶抑制剂配制的裂解液在冰上裂解 30 min, 裂解后在 4℃12000 rpm/min 下离心 15 min 收集蛋白上清液, 经 BCA 蛋白质定量试剂盒进行定量, 样品制备后在 95℃下变性 15min。蛋白样品用 10%十

二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上, 用 5%脱脂牛奶在室温下封闭 60 min, 将膜与特异性一抗(1:1000 稀释)在 4℃孵育过夜, TBST 洗涤后在室温下用相应的辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(1:1500 稀释)孵育 60 min, 用 ECL 化学发光液孵育蛋白条带, 并用凝胶成像系统仪检测分析。

## 2.7 数据处理

采用 GraphPad Prism8 处理数据, 数据处理值表示为平均值±标准误。数据分析使用单因素方差分析(ANOVA), 然后进行 Dunnett's 多重比较, 将相关对照组和各实验组之间进行比较,  $P < 0.05$  视为具有统计学差异。

# 3 结果

## 3.1 人参皂苷 Rh2 对细胞活力的影响

探究不同浓度的人参皂苷 Rh2 对细胞毒性的影响, 如图 1 所示, 4  $\mu$ M 与 6  $\mu$ M 的人参皂苷 Rh2 与对照组细胞活力基本一致, 表明该药物浓度对细胞活力无毒性作用。

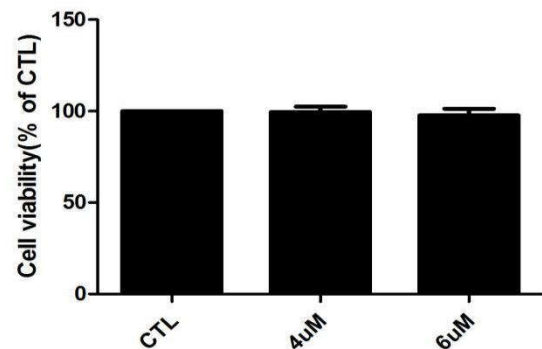


图 1.不同浓度 Rh2 对细胞活力的影响

Fig1. Effects of different concentrations of Rh2 on cell viability

## 3.2 人参皂苷 Rh2 对 N2a 细胞分化的影响

为了探究人参皂苷 Rh2 对 N2a 细胞分化的影响, 我们将 N2a 细胞在低血清(0.5%FBS)培养基中诱导分化, 并用 4  $\mu$ M 和 6  $\mu$ M 的 Rh2 分别处理 48 h 和 72 h, 对诱导分化的细胞用神经突起专一性抗体  $\beta$ -tubulinIII 进行免疫荧光染色, 并用荧光显微镜进行拍照。与 DMSO 组相比, Rh2 组细胞的分化率和神经突起长度都有了很大的提高, 且与 RA 组细胞形态非常相似(图 2A)。经过统计分析发现, 随着时间和浓度的提高, 神经突起长度和细胞的分化率呈依赖性增加(图 3A, B), 其中 6  $\mu$ M 的 Rh2 在 48 h 促神经分化的效果最为显著。同时 Rh2 可以增加中分子量神经丝蛋白 NF 的表达, 与对照组相比具有浓度依赖性(图 2B)。

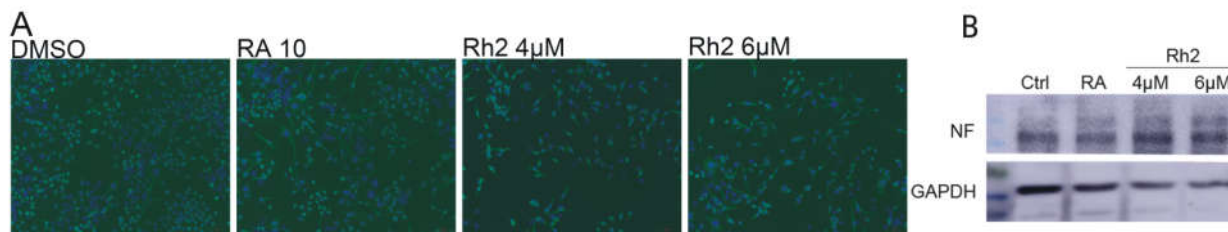


图 2. Rh2 诱导 N2a 细胞分化的形态图和蛋白表达变化

Fig2. Morphological pattern and protein expression changes of N2a cell differentiation induced by Rh2

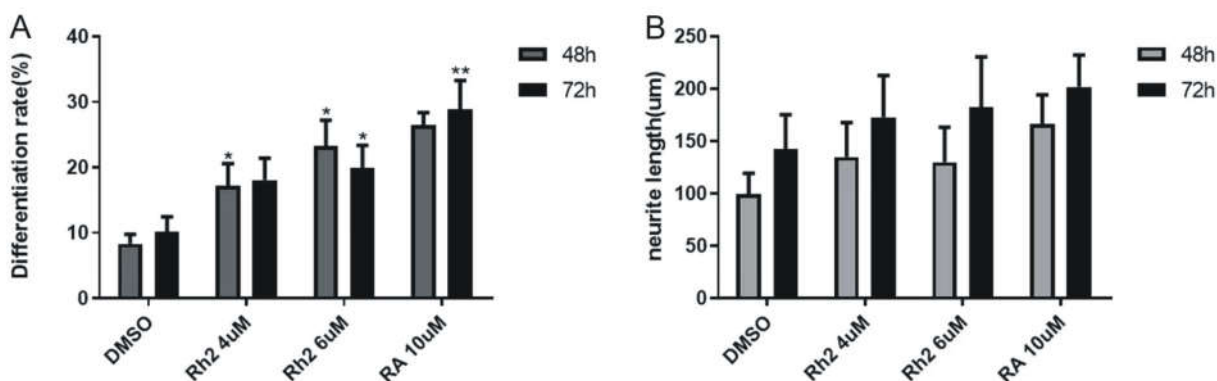


图 3. Rh2 诱导 N2a 细胞的分化率和神经突起长度

Fig3. Rh2 induces differentiation rate and neurite length in N2a cells

### 3.3 人参皂苷 Rh2 对 PI3K/Akt、MEK/Erk 通路的影响

为了确定 Rh2 激活这些信号通路的时间,用 Rh26μM 作用不同时间(0~90min)后提取蛋白进行检测,随着 Rh2 处理时间的延长,p-Akt 和 p-Erk 表达

增加(图 4),在处理 30min 后 Akt 和 Erk 的磷酸化最明显,随后呈现出逐级递减的趋势。表明人参皂苷 Rh2 可能通过快速激活 MEK/Erk、PI3K/Akt 通路促进神经分化。

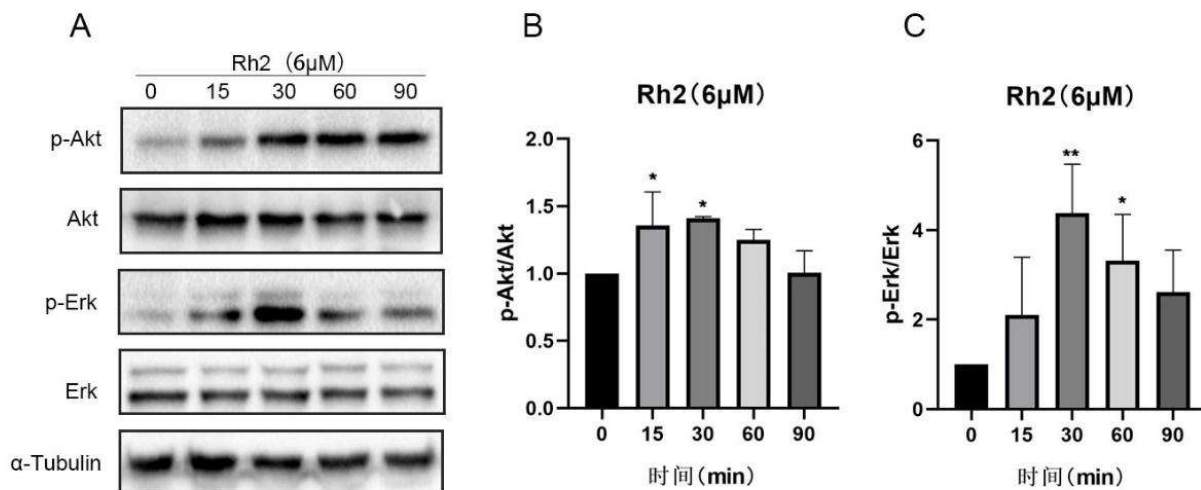


图 4. Rh2 不同时间点对 Akt 和 Erk 信号通路的影响

Fig4. Effects of Rh2 on Akt and Erk signaling pathways at different time points

### 3.4 人参皂苷 Rh2 不同浓度对 PI3K/Akt、MEK/Erk 通路的影响

为了确定不同浓度 Rh2 对 Akt 和 Erk 表达的影响,用人参皂苷 Rh2 (2、4、6 $\mu$ M) 作用 30 min 提取蛋白进行检测。随着人参皂苷 Rh2 浓度增高 p-Akt 和 p-Erk 的表达呈现递增趋势(图 5)。

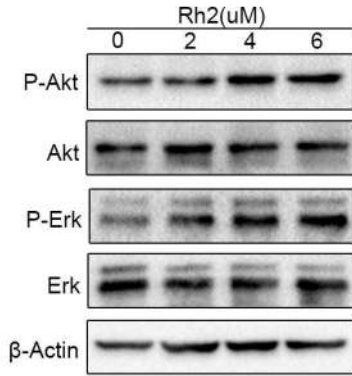


图 5. Rh2 不同浓度对 Akt 和 Erk 信号通路的影响

Fig5. Effects of different concentrations of Rh2 on Akt

### 3.5 PI3K 和 MEK 抑制剂对人参皂苷 Rh2 促神经分化的影响

为了进一步验证激活的信号通路对人参皂苷 Rh2 促进神经分化和神经突起生长的影响,我们利用信号通路关键蛋白的药理抑制剂 LY294002 和 PD98059 对 Rh2 处理组进行干预。结果表明 LY294002 和 PD98059 能够显著抑制 Rh2 诱导 N2a 细胞分化形成神经突起(图 6A),通过统计分析可以发现抑制剂组的分化率明显低于 Rh2 组,具有统计学意义(图 6B)。Western Blotting 检测蛋白表达显示,用 PI3K 和 MEK 抑制剂处理后, p-Akt、p-Erk 的表达水平受到明显抑制(图 7A、B),而用相应抑制剂加上 Rh2 共同处理后 p-Akt、p-Erk 的表达有所增加。这些结果表明 LY294002 和 PD98059 能够抑制 Rh2 诱导的 N2a 细胞分化,进一步证明了 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 参与了人参皂苷 Rh2 诱导 N2a 细胞分化的过程。

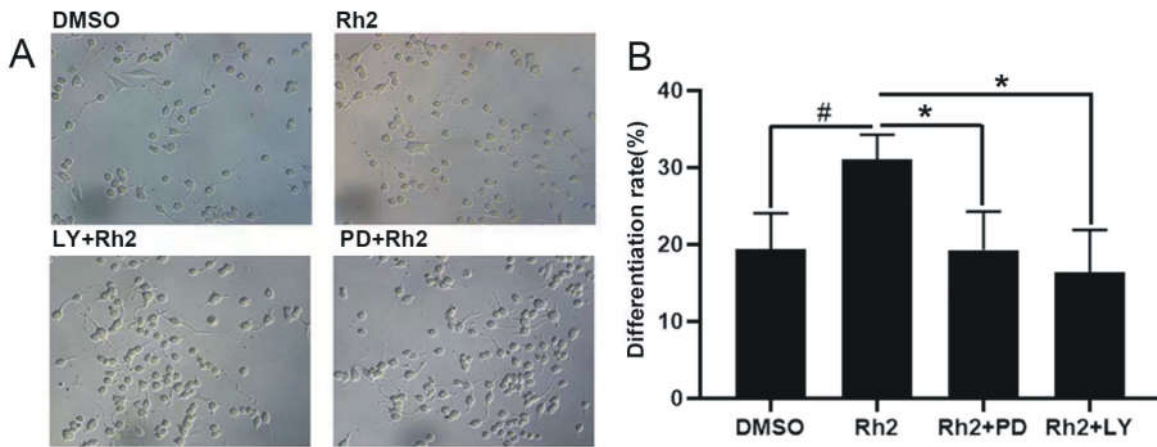


图 6. Rh2 诱导 N2a 细胞分化需要激活 PI3K/Akt 和 MEK/Erk 信号通路

Fig6. Rh2 induces N2a cell differentiation by activating PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways

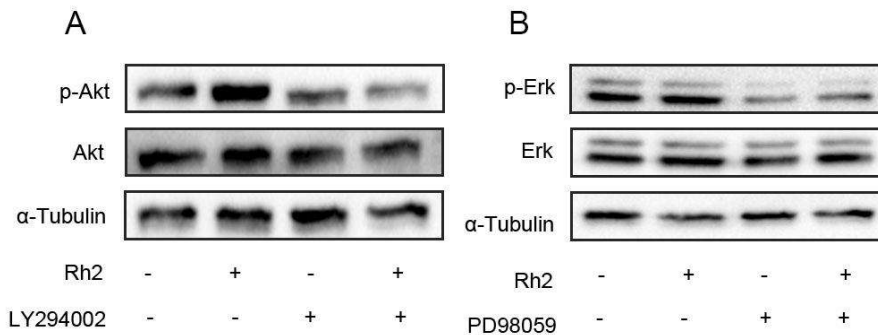


图 7. 抑制剂预处理后 Rh2 对 p-Akt 和 p-Erk 信号通路的影响

Fig7. Effect of Rh2 on Akt and Erk signaling pathways after inhibitor pretreatment

#### 4 讨论

Neuro-2a 细胞是研究神经分化机制<sup>[11, 12]</sup>的最佳模型之一。人参一直被认为具有增强记忆、促进大脑发育的作用,而人参皂苷 Rh2 有文献报道其可以减轻由于睡眠剥夺或者阿尔茨海默症模型小鼠引起的行为缺陷以及记忆障碍<sup>[13-15]</sup>。本研究中人参皂苷 Rh2 在 2~6  $\mu\text{M}$  浓度下不影响细胞的活力,人参皂苷 Rh2 能够促进中分子量神经丝蛋白的表达实现神经分化和神经突起的生长,有利于维持神经系统功能结构的稳定,对重建损伤的神经网络结构、恢复信息传递和记忆的储存有一定的作用,其中 6  $\mu\text{M}$  的人参皂苷 Rh2 在 48 h 促神经分化效果最为显著,在 72 h 后神经分化率有所降低,故不推荐作用时间太长。在促神经分化的作用中,人参皂苷 Rh2 对 p-Akt 和 p-Erk 的表达具有剂量依赖性,6  $\mu\text{M}$  效果最为显著,Akt 和 Erk 的磷酸化在 30~60 min 激活最为明显,之后随时间延长而递减,这说明 Akt 和 Erk 的磷酸化在短时间被激活,Rh2 的起效时间较快。利用 LY294002 和 PD98059 处理细胞后,神经分化率和神经突起长度降低,p-Akt、p-Erk 的表达受到明显抑制,而使用 Rh2 可以增加 p-Akt、p-Erk 的表达。这些结果进一步证实了人参皂苷 Rh2 促神经分化和轴突延伸依赖 PI3K/Akt、MEK/Erk 信号通路。人参皂苷 Rh2 可以通过激活 PI3K/Akt、MEK/Erk 信号通路促进神经细胞分化和神经突起生长,具有很好的神经营养作用,为其在临床应用于治疗神经退行性疾病提供了药理学依据。

#### 参 考 文 献

- [1] FRESE C K, MIKHAYLOVA M, STUCCHI R, et al. Quantitative Map of Proteome Dynamics during Neuronal Differentiation [J]. Cell Rep, 2017, 18 (6): 1527-1542.
- [2] XIE W, ZHOU P, SUN Y, et al. Protective Effects and Target Network Analysis of Ginsenoside Rg1 in Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury: A Comprehensive Overview of Experimental Studies [J]. Cells, 2018, 7(12):270.
- [3] WANG Q, FU W, YU X, et al. Ginsenoside Rg2 alleviates myocardial fibrosis by regulating TGF- $\beta$ 1/Smad signalling pathway [J]. Pharm Biol, 2021, 59 (1): 106-113.
- [4] BAIK I H, KIM K H, LEE K A. Antioxidant, Anti-Inflammatory and Antithrombotic Effects of Ginsenoside Compound K Enriched Extract Derived from Ginseng Sprouts [J]. Molecules, 2021, 26(13):4102.
- [5] LI X, CHU S, LIN M, et al. Anticancer property of ginsenoside Rh2 from ginseng [J]. Eur J Med Chem, 2020, 203: 112627.
- [6] HOU J, XUE J, WANG Z, et al. Ginsenoside Rg3 and Rh2 protect trimethyltin-induced neurotoxicity via prevention on neuronal apoptosis and neuroinflammation [J]. Phytother Res, 2018, 32(12): 2531-2540.
- [7] HONG S, BEJA-GLASSER V F, NFONOYIM B M, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models [J]. Science, 2016, 352(6286): 712-716.
- [8] SORIA LOPEZ J A, GONZÁLEZ H M, LÉGER G C. Alzheimer's disease [J]. Handb Clin Neurol, 2019, 167: 231-255.
- [9] 毕进方. 九谷酵汁促神经分化作用及其机制研究 [D]. 吉林大学, 2018.
- [10] XU M L, ZHENG Z Y, XIA Y J, et al. Shexiang Baixin Pill, a Formulated Chinese Herbal Mixture, Induces Neuronal Differentiation of PC12 Cells: A Signaling Triggered by Activation of Protein Kinase A [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 1130.
- [11] WANG J L, LIN Y C, YOUNG T H, et al. Far-infrared ray radiation promotes neurite outgrowth of neuron-like PC12 cells through AKT1 signaling [J]. J Formos Med Assoc, 2019, 118(2): 600-610.
- [12] HUO B, YANG Y, LI M, et al. Pax3 inhibits Neuro-2a cells proliferation and neurite outgrowth [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(2): 1252-1262.
- [13] SAINATH R, GALLO G. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation [J]. Cell Tissue Res, 2015, 359(1): 267-278.
- [14] WARBURTON E C, BROWN M W. Neural circuitry for rat recognition memory [J]. Behav Brain Res, 2015, 285: 131-139.
- [15] WEISSMILLER A M, WU C. Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders [J]. Transl Neurodegener, 2012, 1 (1): 14.