

文章编号:1001-6880(2016)11-1687-04

锁阳乙酸乙酯提取物的雌激素样作用研究

郑俊超¹, 马素亚¹, 于雪¹, 胡京红¹, 刘永刚², 田方泽², 鲁艺^{1*}¹北京中医药大学基础医学院; ²北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要: 雌激素提高学习记忆能力的功能已被广泛承认, 前期实验证实锁阳乙酸乙酯提取物(ECS)可表现出雌激素样作用, 提高去卵巢大鼠的学习记忆能力及血清E2水平, 对Aβ损伤SK-N-SH细胞有一定的保护作用。为了进一步研究ECS的雌激素样作用机制, 拟在小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro2A)上探寻ECS对学习记忆相关蛋白突触素蛋白synaptophysin和环磷腺苷效应元件结合蛋白表达影响。采用CCK8法测定ECS对小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro2A)细胞活力的影响。将小鼠神经母细胞瘤细胞分为正常组、DMSO组、ECS组、Tamoxifen组、Tamoxifen+ECS组; 正常组、ECS组、ECS+G15组和正常组、DMSO组、ECS组、PD98059组、PD98059+ECS组。采用Western blot法测定synaptophysin, p-creb蛋白表达情况。实验表明锁阳乙酸乙酯提取物可促进synaptophysin, P-CREB表达, ER受体竞争性拮抗剂Tamoxifen可降低synaptophysin表达, 对ECS促进synaptophysin表达无显著影响。GPR30受体特异性阻断剂G15可显著降低ECS促进synaptophysin表达。p-CREB上游Erk1/2-MAPK通路的阻断剂PD98059可显著抑制ECS上调p-CREB表达, 结合前期实验结果, 我们认为ECS可与GPR30结合通过MAPK通路促进学习记忆相关蛋白synaptophysin表达。

关键词: 锁阳; synaptophysin; p-CREB; GPR30

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2016.11.001

Estrogen-like Effect of Ethyl Acetate Extract of *Cynomorium songaricum* Rupr

ZHENG Jun-chao¹, MA Su-ya¹, YU Xue¹, HU Jing-hong¹, LIU Yong-gang², TIAN Fang-ze², LU Yi^{1*}¹School of Preclinical Medicine; ²School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: It is widely recognized that estrogen can improve the ability of learning and memory function. Former study have shown that EtOAc extract of *Cynomorium songaricum* (ECS) can improve both E2 level and the ability of learning and memory in ovariectomized rat, protect sk-n-sh cells from Aβ injury. To contribute a better understanding of the mechanism of ECS that improve ability of learning and memory, we investigated the expression of synaptophysin and p-CREB in Neuro-2a cells. Using cck8 to detect the influence of ECS on Neuro-2a cells. Divided the cells into Normal group, DMSO group, ECS group Tamoxifen group, ECS + Tamoxifen group; Normal group, ECS group, ECS + G15 group and Normal group, DMSO group, ECS group, PD98059 group, ECS + PD98059 group. The results showed that ECS can significantly improve the expression of synaptophysin and p-CREB on Neuro2A cells. Treatment of the cultures with ER antagonist Tamoxifen + ECS cannot significantly decreased the expression of synaptophysin, but with GPR30 antagonist G15 + ECS can significantly decreased the expression of synaptophysin. The antagonist of MAPK/ERK pathway anyagonist PD98059 + ECS also significantly decreased the expression of p-CREB. According to preliminary experimental results, we hypothesized that ECS can improve the ability of learning and memory through MAPK pathway by combing with GPR30.

Key words: *Cynomorium songaricum*; p-CREB; synaptophysin; GPR30

雌激素是一类具有广泛生物活性的类固醇化合物。上世纪70年代开始, 雌激素在学习记忆过程中发挥的作用开始被人们认识, 随后被广泛应用于防治老年性痴呆。然而单纯应用雌激素防治老年学习记忆能力下降也存在潜在风险, 如增加子宫内膜癌

的发生率, 导致乳腺增生^[1], 因此筛选具备雌激素样活性的中药对防治因雌激素缺乏而导致的学习记忆及认知功能下降具有重要的意义。雌激素发挥生物学效应主要通过两条路径:一条是经典的基因组效应, 即与ER结合到靶基因启动子区的雌激素反应元件上发挥配体依赖的转录调节作用;另一条是非经典的快速效应, 主要和膜受体GPR30结合, 从而激活多种蛋白激酶最终影响下游转录因子的活

性。本课题组前期研究发现锁阳乙酸乙酯提取物(ECS)具有雌激素样活性,在SK-N-SH细胞上表现出抗 $\text{A}\beta$ 毒性作用^[2],可显著提高去势大鼠学习记忆能力,提高血清E2水平^[3]。而ECS提高大鼠学习记忆能力是否与其雌激素样作用相关,可能的机制是什么尚未被证实。因此,本实验拟在小鼠神经母细胞瘤细胞上进行深入研究,应用雌激素受体ER竞争性拮抗剂Tamoxifen,GPR30通路特异性拮抗剂G15以及MAPK信号转导通路抑制剂PD98059干预细胞,以探讨锁阳乙酸乙酯提取物提高学习记忆能力的可能途径。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 药物提取与配制

锁阳乙酸乙酯提取物(ECS):由北京中医药大学中药学院药化系提供,用DMSO配置成100 mg/mL的存储液。Tamoxifen和PD98059购自Sigma,G15购自Cayman,分别用DMSO配置成存储液。

1.1.2 细胞

小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro2A)细胞购自中国协和医科大学细胞中心。

1.1.3 主要试剂

MEM培养基(Hyclone公司),FBS(Coring公司),胰蛋白酶(Gibco公司),CCK8(Dojindo公司)。Synaptophysin抗体(Abcam公司)P-CREB,(CST公司)。 β -actin(康为世纪公司)。RIPA裂解液(碧云天公司),PMSF(碧云天公司),蛋白酶抑制剂(Roche公司),BCA蛋白定量试剂盒(Thermo公司),预染蛋白marker(Thermo公司)。

1.1.4 主要仪器

倒置相差显微镜(Olympus公司),电泳仪,电转仪(Bio-Rad公司),酶标仪(Thermo公司),FORMA3111型二氧化碳培养箱(Thermo公司)。

2 实验方法

2.1 细胞抑制率检测

①实验分组:小鼠神经母细胞瘤细胞以 $5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 接种于96孔板中,每孔100 μL ,36 h后加入锁阳乙酸乙酯提取物,使其终浓度分别为12.5、25、50、100、200、400、800 mg/L,每组6个复孔,对照组不加药,24 h后测定细胞存活率。②CCK8法检测定细胞存活率:每孔加入10 μL CCK8,

2 h后在酶标仪上测定450 nm OD值。计算公式:细胞抑制率(%) = $1 - [A(\text{给药}) - A(\text{空白})] / [A(\text{对照组}) - A(\text{空白})]$ 。

2.2 细胞蛋白的制备

分组与给药:取对数生长期的细胞以 $5 \times 10^4 \text{ cell/mL}$ 的密度接种于 10 cm^2 培养皿中,实验分为:(1)正常组,(2)DMSO组,(3)锁阳乙酸乙酯提取物(ECS)组:加入终浓度为100 mg/L的锁阳乙酸乙酯提取物,(4)Tamoxifen,(5)Tamoxifen + ECS;(1)正常组,(2)ECS组,(3)ECS + G15组;(1)正常组,(2)DMSO组,(3)ECS组,(4)PD98059,(5)PD98059 + ECS组。24 h后收集细胞,充分裂解后12000 r/min,4 °C离心20 min,收集上清液,BCA法检测蛋白浓度。

2.3 Western blot法检测synaptophysin、p-creb蛋白表达

BCA定量后将蛋白浓度调至2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,上样体积为20 μL 。经12%的聚丙稀酰胺凝胶电泳分离后转至PVDF膜上。5% BSA室温下封闭2 h,加入兔抗P-PCREB抗体(1:1000),兔抗P-P38抗体(1:1000),鼠抗 β -actin抗体(1:2000),4 °C过夜,第二天经TBST充分漂洗后加入HRP标记的羊抗兔抗体(1:5000),羊抗鼠抗体(1:5000),室温下孵育90 min,经TBST充分漂洗后,ECL发光显影。

2.4 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SAS 9.3数据统计软件包处理,各组均数的比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为显著性差异。

3 实验结果

3.1 细胞抑制率检测结果

图1为细胞抑制率检测结果,由图可知随着锁阳乙酸乙酯提取物浓度增高细胞的存活率逐渐增高,使用Graph prism 5.0软件计算EC₅₀值为116 mg/L。

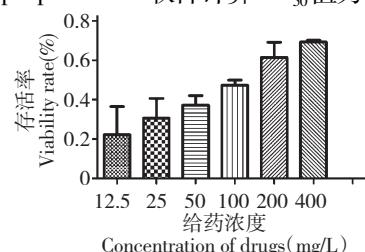


图1 细胞存活率($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Fig. 1 The cell survival rate ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

3.2 Synaptophysin、p-CREB 蛋白表达结果

Western blot 结果显示锁阳乙酸乙酯提取物可促进 Neuro2a 细胞 synaptophysin、p-CREB 蛋白表达, 和正常组相比有显著性差异 ($P < 0.05$) ; Tamoxifen 可降低 synaptophysin 表达, 和正常组相比有显著性差异, 对 ECS 促进 synaptophysin 表达无显著影响; G15 + ECS 可降低 synaptophysin 表达, 与 ECS 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$) 。 PD98059 + ECS 可降低 p-CREB 表达, 与 ECS 组比较有显著性差异 ($P < 0.05$) 。

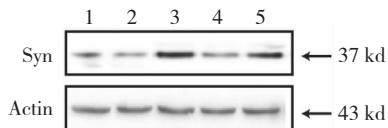


图 2 Neuro2a 细胞 synaptophysin 蛋白表达情况

Fig. 2 Expression of synaptophysin in Neuro2a cell

1-正常组;2-DMSO 组;3-ECS 组;4-Tamoxifen 组;5-Tam + ECS 组
1-normal;2-DMSO;3-ECS;4-Tamoxifen;5-Tam + ECS

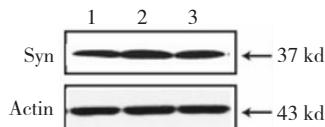


图 3 Neuro2a 细胞 synaptophysin 蛋白表达情况

Fig. 3 Expression of synaptophysin in Neuro2a cell

1-正常组;2-ECS 组;3-ECS + G15 组;
1-normal;2-ECS;3-ECS; + G15;

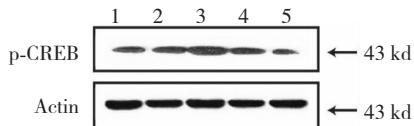


图 4 Neuro2a 细胞 p-CREB 蛋白表达情况

Fig. 4 Expression of p-CREB in Neuro2a cell

1-正常组;2-DMSO 组;3-ECS 组;4-PD98059 组;5-PD + ECS 组
1-normal;2-DMSO;3-ECS;4-PD98059;5-PD + ECS;

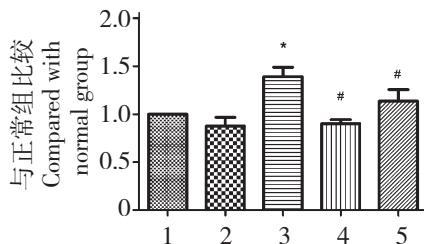


图 5 各组灰度值 ($n = 3, x \pm s$)

Fig. 5 The content of gray value of all group cells ($n = 3, x \pm s$)

注:与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 ECS 组相比, # $P < 0.05$

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compare with ECS, # $P < 0.05$

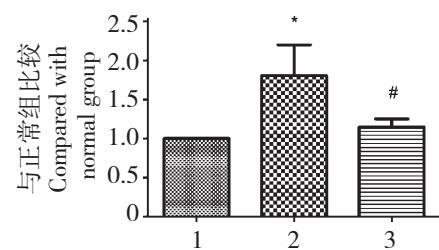


图 6 各组灰度值 ($n = 3, x \pm s$)

Fig. 6 The content of gray value of all group cells ($n = 3, x \pm s$)

注:与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 ECS 组相比, # $P < 0.05$

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compare with ECS, # $P < 0.05$

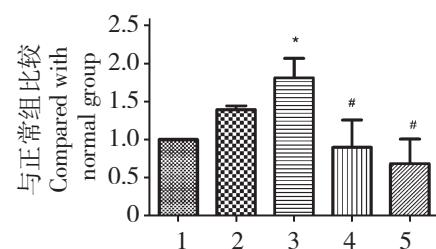


图 7 各组灰度值 ($n = 3, x \pm s$)

Fig. 7 The content of gray value of all group cells ($n = 3, x \pm s$)

注:与正常组相比, * $P < 0.05$; 与 ECS 组相比, # $P < 0.05$

Note: Compared with control, * $P < 0.05$; Compare with ECS, # $P < 0.05$

4 讨论与结论

本实验结果显示 ECS 可显著上调 synaptophysin 和 p-CREB 的表达, ER 受体竞争性拮抗剂 tamoxifen 可降低 synaptophysin 表达, 而对 ECS 上调 synaptophysin 表达无显著影响。GPR30 受体特异性拮抗剂 G15 可显著抑制 ECS 上调 synaptophysin 表达, p-CREB 上游 Erk1/2-MAPK 通路的阻断剂 PD98059 可显著抑制 ECS 上调 p-CREB 表达。由此可见 ECS 可与 GPR30 受体结合并通过 MAPK 通路促进与学习记忆能力密切相关的 synaptophysin 蛋白的表达。

近年来, 雌激素在神经保护方面的作用已被广泛证实, 其发挥生物学效应主要通过两条途径:一条是由核受体 ER α 和 ER β 介导的经典信号途径, 另一条是由膜受体 GPR30 介导的非经典信号途径, 后者被证实在脑内广泛存在^[4], 且有研究发现雌激素在脑内发挥神经保护作用主要通过与 GPR30 受体结合^[5], 因此 GPR30 受体被认为是具有独立作用的新型雌激素受体^[6-8]。

突触是神经元细胞间传递信息的结构基础, 突

触间传递信息需要一些特定的功能蛋白的参与,如突触素(synaptophysin)蛋白,被公认为与突触可塑性有关,在认知功能方面起着重要作用,突触素蛋白含量减少,可影响囊泡的转运能力,减弱突触的传递功能,出现老年性的学习记忆能力减退^[9]。

环磷酸苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein)CREB,是一种可以调节基因转录翻译的蛋白,Filardo等发现^[10],雌激素可通过非经典信号途径引起ERK1/2磷酸化,进而引起MAPK磷酸化,进一步引起CREB的磷酸化,将信号转入细胞核内,实现基因组效应与细胞信号的“交互-通话”(Cross-talk)过程,这一过程对中枢神经内环境的稳定,学习记忆能力的改善,突触重建与神经元保护方面起着重要作用。可见,在整个信号通路中,CREB的磷酸化激活发挥了重要作用,一方面磷酸化CREB是激活多条通路的共同环节,CREB激活可将信号传递到细胞核,引发下游基因或功能蛋白的改变,另一方面,磷酸化CREB本身的表达量与AD大脑中Aβ的含量呈负相关,可从一定程度上反映了AD患者脑部的病理改变^[11]。因此,我们推测,Syn的改变很有可能是由于药物ECS通过GPR30将ERK1/2MAPK通路激活,进而将CREB磷酸化,引发下游基因的转录翻译,而GPR30特异性阻断剂G15和ERK1/2MAPK通路阻断剂PD98059可阻断这一作用,这就说明,ECS有类雌激素样作用,并通过与GPR30受体结合促进突触可塑性相关蛋白的表达,影响突触的信息传递和信号加工,从而影响认知功能。

本实验所用药物ECS是传统中药锁阳的乙酸乙酯提取部位。锁阳是传统的补肾益精之药。中医理论认为,肾精“上充于脑而生髓,脑髓充而神机灵”。髓海的充盛是学习记忆的基础。老年人肾气渐虚,髓海空虚,故而学习记忆能力下降。故中医临床治疗与年老相关的记忆能力下降,多使用补肾益精的药物。

综上所述,ECS可通过与雌激素受体GPR30结合上调Neuro2A细胞synaptophysin的表达,并可通过MAPK/erk1/2通路上调CREB的表达,表现出雌激素样作用,与前期在体实验结果相符合,进一步补充说明了锁阳改善学习记忆能力的药理学机制,同时也为研究开发针对神经退行性病变的新药提供了新靶点。

参考文献

- Wang Q(王清). Questions about hormone replacement therapy. *China J Rehabil Theory Pratice*(中国康复理论与实践),2002,8:630.
- Lu Y,Wang Q,Melzig MF,et al. Extracts of *Cynomorium songaricum* protect human neuroblastoma cells from beta-amyloid25-35 and superoxide anion induced injury. *Pharmazie*,2009,64:609-612.
- Tian FZ(田方泽),Chang HS(畅洪昇),Zhou JY(周静洋),et al. Effects of ethyl acetate extract from *Cynomorium songaricum* Rupr. on learning and memory function and hippocampal neurons in ovariectomized rat model with Alzheimer's disease. *J Beijing Univ Tradit Chin Med*(北京中医药大学学报),2014,11:763-766.
- ODowd BF,Nguyen T,Marchese A,et al. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*,1998,47:310-313.
- Liu SB,Han J,Zhang N,et al. Neuroprotective effects of oestrogen against oxidative toxicity through activation of G-protein-coupled receptor 30 receptor. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2011,38:577-585.
- Carmeci C,Thompson DA,Ring HZ,et al. Identification of a gene(GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics*,1997,45:607-617.
- Wen M(文敏),Zhou B(周波),Kang CS(康朝胜),et al. Synaptophysin changes associated with aging in the CA3 area of rats' hippocampus. *J Shandong Univ*(山东大学报),2008,4(3):35-37.
- Owman C,Blay P,Nilsson C,et al. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's Lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*,1996,228:285-292.
- Filardo EJ,Quinn JA,Bland KI,et al. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog,GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol*,2000,14:1649-1660.
- Filardo EJ,Quinn JA,Jr FA,et al. Estrogen action via the G protein-coupled receptor,GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecul Endocrinol*,2002,16(1):70-84.
- Zhang N(张囡),Yang JX(杨静娴),Sun D(孙东),et al. Protective effect of arctigenin against H89-induced SH-SY-5Y Cell injury. *Progr Pharm Sci*(药学进展),2014,3:215-219.