

网络出版时间: 2011-10-25 12:16 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1086.R.20111025.1216.018.html>

## 知母皂苷元对体外培养皮层神经元 树突发育的影响及信号转导机制

王金宁<sup>1,2</sup>, 董燕<sup>1</sup>, 隋海娟<sup>1</sup>, 张永兴<sup>3</sup>

(1. 辽宁医学院药理学教研室 辽宁 锦州 121001; 2. 苏州大学医学部, 江苏 苏州 215000;

3. 厦门大学医学院预防医学系 福建 厦门 361005)

doi: 10.3969/j.issn.1001-1978.2011.11.021

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2011)11-1565-05

中国图书分类号: R-332; R322.81; R329.25; R338.12

**摘要:** 目的 探讨知母皂苷元(Sarsasapogenin, SAR)对大鼠皮层神经元树突发育的促进作用及其信号转导机制。方法

选用出生 0~24 h 的 Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠,取皮层神经元进行体外细胞培养 4 d 后用于实验。倒置相差显微镜测量培养神经元树突分支总长度(TDBL)、一级树突数目(PDN)、最大分支级数(MBO)和神经元胞体面积。Western blot 法观察神经元 p-PDK1、p-Akt473 及 p-mTOR 蛋白表达。结果 形态学观察结果显示 SAR (10、30、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 可明显促进树突发育,表现为树突分支总长度增加、一级树突数目增多、最大分支级数增大及胞体面积增大,并呈明显浓度依赖。SAR 30 + LY 组、SAR 30 + TCBN 组、SAR 30 + Rapa 组的神经元树突总长度、一级树突数目、最大分支级数及胞体面积较 SAR 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组明显降低。Western blot 结果显示 SAR 30 也可明显增加 p-PDK1、p-Akt473 及 p-mTOR 蛋白表达水平。SAR 30 + LY 组明显降低神经元 p-PDK1、p-Akt473 及 p-mTOR 的蛋白表达水平。SAR 30 + TCBN 组明显降低神经元 p-Akt473 及 p-mTOR 的蛋白表达水平。SAR 30 + Rapa 组明显降低神经元 p-mTOR 的蛋白表达水平。结论 SAR 对体外培养皮层神经元树突的发育有促进作用,这种作用可能与 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关。

**关键词:** 知母皂苷元; 皮层神经元; 树突发育; 信号转导通路; 蛋白激酶 B; 雷帕霉素靶蛋白

神经元树突是神经元接收、加工和整合输入信息的基本部位,树突的功能主要取决于树突树的分支类型和树突分化成的树突棘。近年研究发现神经

元树突形成过程受多种细胞外和细胞内因素的调控<sup>[1-2]</sup>。在多种神经退行性疾病中都伴有树突树和树突棘损伤导致神经环路的功能障碍,如海马和皮层神经突触的丢失和神经突起的功能障碍被认为是阿尔采末病(AD)病人记忆力下降的主要原因<sup>[3]</sup>。因此,提高脑损伤病人的脑功能的关键是重构神经网络结构,如促进神经突起再生和突触形成。因此,寻找基于重建损伤脑神经网络结构是抗痴呆药物研究的热点之一。

越来越多的证据表明磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)和细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)信号转导通路参与树突的形成和控制神经元胞体生长<sup>[4-5]</sup>。PI3K/Akt 通过或与 mTOR 协同调节着突触可塑性和记忆形成<sup>[6]</sup>。

知母皂苷元(Sarsasapogenin, SAR)为中药知母的主要活性成分,已有研究表明知母皂苷具有提高多种拟痴呆动物的学习记忆功能<sup>[7]</sup>和对抗淀粉样  $\beta$  蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )引起的神经细胞凋亡的作用<sup>[8]</sup>。但关于 SAR 对神经元树突发育是否有促进作用,目前尚未见报道。本研究应用体外培养神经元观察 SAR 对正常树突发育是否有促进作用,并探讨其可能的信号转导机制。

### 1 材料与方法

**1.1 药品和试剂** SAR,黄色粉末,纯度 >98%,购于成都普瑞法科技开发有限公司,临用时用二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解。DMEM、F12 培养基购于 Invitrogen 公司; DMSO、胰蛋白(Trypsin, 1:250)、L-多聚赖氨酸(Poly-L-lysine)均购于 Sigma 公司; 新生胎牛血清、马血清购于广州蕊特生物科技有限公司; HEPES 购于 Calbiochem 公司; 阿糖胞苷购于意大利 SPA 公司; LY294002(#S1737)和 Rapamycin(#S1842)购于碧云天生物技术有限公司; mTOR Substrates Antibody Sampler Kit(#

收稿日期: 2011-07-11, 修回日期: 2011-07-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No 81071927); 福建省自然科学基金资助项目(No 2009J01199); 辽宁省教育厅创新团队项目(No LT2010064)

作者简介: 王金宁(1987-),男, E-mail: wangjinning1987@126.com; 隋海娟(1980-),女,硕士,实验师,研究方向: 神经药理学及信号转导机制,通讯作者, Tel: 0416-4673111, E-mail: suihaijuan0930@yahoo.com.cn

9862)、Phospho-Akt Pathway Antibody Sampler Kit (# 9916) 购于 Cell Signaling 公司; Triciribine (# SC200661)、山羊抗兔和山羊抗鼠二抗均购自 Santa Cruz 公司;  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin) 抗体购于 Beyotime 试剂公司; SuperSignal West Pico 化学发光底物购于美国 Thermo Scientific 公司。其他相关试剂均由辽宁医学院药理实验室提供。

**1.2 大脑皮层神经元原代培养** 取出生 24 h 以内的 SD 大鼠乳鼠(辽宁医学院动物实验中心提供), 75% 乙醇浸泡消毒, 无菌条件下取出大脑皮层, 置于培养基中, 剔除血管和软脑膜, 剪成  $1\text{ mm}^3$  左右的小块。加入 0.125% 胰蛋白酶  $37\text{ }^\circ\text{C}$  消化 10 min。待细胞分散后, 加入含 10% 胎牛血清和 10% 马血清的 DMEM/F12 培养基终止消化。200 目筛网过滤,  $1\ 000\times g$  离心 10 min, 用含 10% 胎牛血清和 10% 马血清的 DMEM/F12 培养基制成细胞悬液, 调整细胞密度为  $1\times 10^5\sim 10^7\cdot\text{L}^{-1}$ , 接种在铺有 L-多聚赖氨酸培养皿或 6 孔培养板中, 置于  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。培养 48 h 后加入含阿糖胞苷(终浓度为  $5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的培养基, 抑制非神经细胞增殖。以后每 3 天换液 1 次。应用抗特异性稀醇化酶(NSE) 多克隆抗体和抗神经丝蛋白(NF200) 抗体免疫荧光染色进行神经元纯度鉴定, 结果表明神经元纯度在 90% 以上。

**1.3 神经元处理及树突形态学观察分析** 实验分为正常对照组, 培养 4 d 神经元加入 0.1% 的 DMSO 作用 48 h; SAR(10、30、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组, 培养 4 d 神经元加入不同剂量的 SAR, 作用 48 h; LY 组, 培养 4 d 神经元单独加入 LY294002(30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 48 h; SAR 30 + LY 组: 培养 4 d 神经元加入 LY294002(30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 1 h, 再加入 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 SAR 共同作用 48 h; TCBN 组, 培养 4 d 神经元单独加入 Triciribine(5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 48 h; SAR 30 + TCBN 组: 培养 4 d 神经元加入 Triciribine(5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 1 h, 再加入 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 SAR 共同作用 48 h; Rapa 组, 培养 4 d 神经元单独加入 Rapamycin(100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 48 h; SAR 30 + Rapa 组: 培养 4 d 神经元加入 Rapamycin(100  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 1 h, 再加入 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 SAR 共同作用 48 h。

体外培养神经元用配置 CCD 和 Tsview 软件的 Olympus CKX41 型倒置相差显微镜, 用 10 倍或 20 倍物镜观察以确保将一个神经元拍摄到一个视野中, 用 40 倍物镜观察树突分支以确保能够清楚显示所有树突分支。分析时采取了 Ohara 和 Havton 的

命名法<sup>[9]</sup>: 从胞体直接伸出的树突分支为一级分支, 从一级分支伸出的为二级分支, 依次类推。用 Image J 软件测量随机选取的神经元, 测量树突分支总长度(total dendrite branch length, TDBL), 神经元一级树突分支数目(PDN)、神经元树突总分支数(maximum branch order, MAO) 和神经元胞体面积。计数样本来自 3 个不同批次培养的神经元, 每批次随机选取 10~15 个细胞。为了减少实验误差, 实验采取双盲方法进行。

**1.4 Western blot 法检测磷酸化 PDK1、磷酸化 Akt 和磷酸化 mTOR 蛋白表达水平** 原代培养的大脑皮层神经元, 经各种药物处理不同时间后, 用冷的 PBS 冲洗, 立即放入预冷的裂解缓冲液中(1% Triton  $\rho$ . 1% SDS  $\rho$ . 5% Deoxycholate, 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, 20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris (pH 7.4), 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaF, 0.1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  PMSF),  $4\text{ }^\circ\text{C}$  超声粉碎后,  $12\ 000\times g$  离心 30 min, 取上清, 用 Lowry 法测定蛋白质含量, 以牛血清白蛋白(BSA) 为标准品, 将各组蛋白浓度调成一致。用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质, 每个泳道蛋白上样量为 20  $\mu\text{g}$ 。为了准确判断目的蛋白带的位置, 一个泳道加 See Blue Plus 2 预染蛋白标记物, 电泳后将 PAGE 凝胶中的蛋白质电转移至硝酸纤维素膜上, 取出后将膜放入 3% BSA 阻断缓冲液中, 封闭 60 min, 再用 TBS(10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris (pH 8.0), 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl) 洗膜 3 次, 每次 10 min。将膜放入一抗中(抗体 1:1 000 稀释)  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜。TTBS 冲洗后, 将膜放入二抗(二抗均 1:1 000 稀释) 中, 室温孵育 1~2 h, 用 TTBS 洗膜 3 次, 每次 10 min, 将膜在 SuperSignal West Pico 底物工作液中孵育 5 min, 吸干多余试剂, 放置化学发光凝胶系统分析仪中进行 Ecl 化学发光。测定 p-PDK1、p-Akt(Ser473) 和 p-mTOR 的蛋白表达的改变。然后应用蛋白漂洗液洗掉相应的蛋白, 再应用总 PDK1、Akt、mTOR 抗体进行 PDK1、Akt、mTOR 蛋白表达测定。同样应用蛋白漂洗液洗掉相应的蛋白, 再应用  $\beta$ -肌动蛋白抗体进行  $\beta$ -肌动蛋白测定, 以保证蛋白上样量的一致性。利用 Visionworks 6.3.3 图像采集及分析软件对蛋白带进行分析。实验重复 3 次。

**1.5 统计学方法** 实验数据用  $\bar{x}\pm s$  表示, 采用 one-way ANOVA 和 LSD's post hoc test 进行统计学分析。

## 2 结果

**2.1 SAR 促进皮层神经元树突发育作用** SAR(10、30、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 加入培养 4 d 神经元作用

48 h 后,可明显促进神经元树突发育,表现为神经元树突总长度明显增加、一级树突数目明显增多、最大分支级数明显增多及胞体面积增大,并呈明显浓度依赖性(Tab 1, Fig 1)。应用 PI3K 阻断剂 LY294002(30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、Akt 阻断剂 Triciribine(5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及 mTOR 阻断剂 Rapamycin(100 nmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 加入培养 4 d 神经元作用 1 h 后,再加入 SAR (30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 共同作用 48 h 相差显微镜观察神经元树突发育结果显示: SAR 30 + LY 组、SAR 30 + TCBN 组、SAR 30 + Rapamycin 组的神经元树突总长度、一级树突数目、最大分支级数及胞体面积较 SAR 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组明显降低;单独应用 LY294002、Rapamycin 组的神经元树突总长度、一级树突数目、最大分支级数及胞体面积较正常对照组没有明显的变化,但单独应用 Triciribine 可以使神经元的胞体变小(Tab 1, Fig 1)。

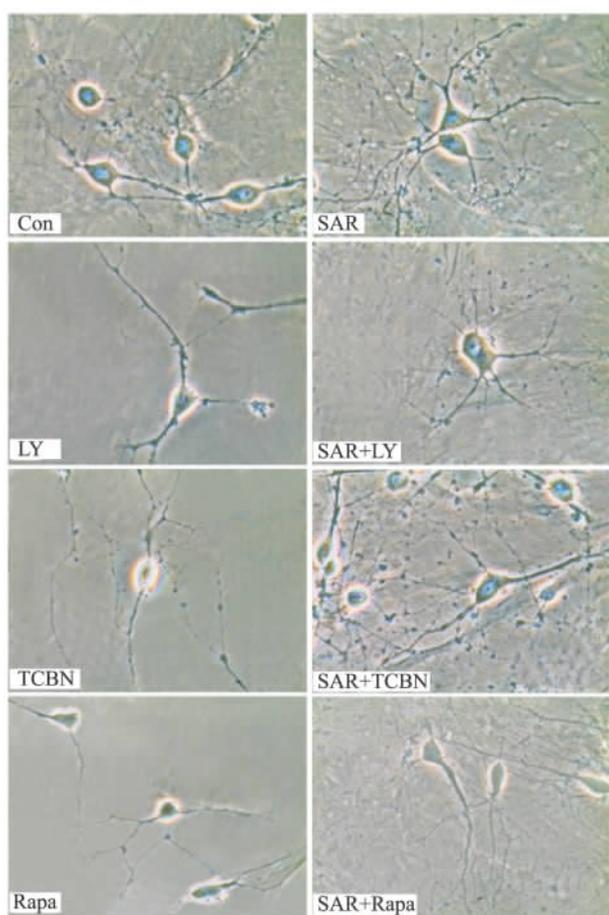


Fig 1 Effect of SAR on dendritic development in cortical neurons(  $\times 400$ )

**2.2 SAR 对皮层神经元磷酸化 PDK1 蛋白表达水平的影响** Fig 2 结果显示, SAR (30、100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组可明显增加神经元 p-PDK1 的蛋白表达水

平。SAR 30 + LY 组明显降低神经元 p-PDK1 的蛋白表达水平。单独应用 LY294002 组使神经元 p-PDK1 的蛋白表达水平有所降低,但差异无统计学意义(Fig 2)。

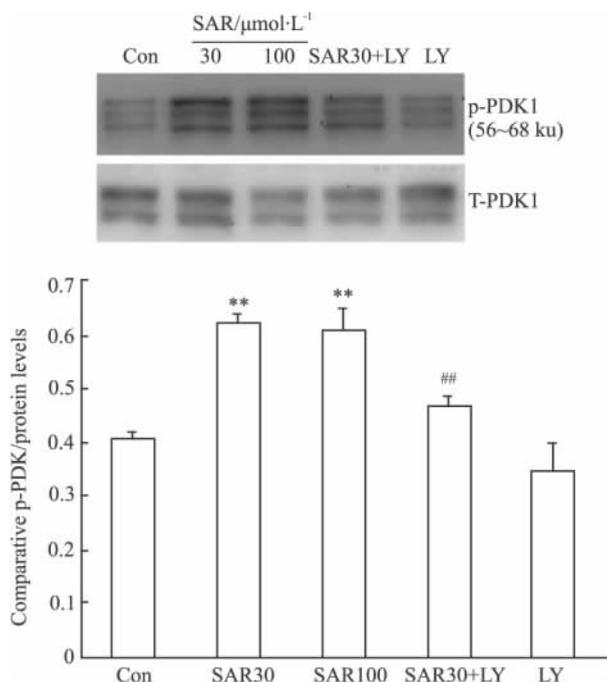


Fig 2 p-PDK1 protein expression increased by SAR( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
\*\*  $P < 0.01$  vs control; ##  $P < 0.01$  vs SAR 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

**2.3 SAR 对皮层神经元磷酸化 Akt473 蛋白表达水平的影响** Fig 3 结果显示, SAR 可明显增加神经元 p-Akt473 的蛋白表达水平。SAR 30 + LY 组及 SAR 30 + TCBN 组明显降低神经元 p-Akt473 的蛋白表达水平。单独应用 LY294002 组对神经元 p-Akt473 的蛋白表达水平没有影响,而单独应用 TCBN 组完全抑制神经元 p-Akt473 的蛋白表达水平(Fig 3)。

**2.4 SAR 对皮层神经元磷酸化 mTOR 蛋白表达水平的影响** Fig 4 结果显示, SAR 可明显增加神经元 p-mTOR 的蛋白表达水平。SAR 30 + LY 组, SAR 30 + TCBN 组及 SAR 30 + Rapa 组明显降低神经元 p-mTOR 的蛋白表达水平。单独应用 LY294002 组及 TCBN 组对神经元 p-mTOR 的蛋白表达水平没有影响,而单独应用 Rapa 组完全抑制神经元 p-mTOR 的蛋白表达水平(Fig 4)。

### 3 讨论

神经元具有形态复杂的树突结构,一个神经元有一个或多个树突,呈光滑的锥体状从胞体发出,树突干一般呈锐角反复分支,越分越细,多数树突干附

Tab 1 Dendritic development in cortical neurons increased by SAR ( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

Group	Dose/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TDBL/ $\mu\text{m}$	PDN	MBO	Soma area/ $\mu\text{m}^2$
Control		258 ± 22	3.36 ± 0.92	2.12 ± 0.45	51.6 ± 5.5
SAR	10	369 ± 25**	4.67 ± 0.90**	2.28 ± 0.81*	63.3 ± 4.9**
	30	420 ± 23**	5.18 ± 0.93**	2.78 ± 0.45**	89.9 ± 16.2**
	100	503 ± 58**	5.89 ± 0.13**	3.16 ± 0.52**	100.3 ± 8.5**
LY	30	267 ± 26	2.94 ± 0.21	2.15 ± 0.34	45.3 ± 7.7
SAR 30 + LY		362 ± 38#	4.13 ± 0.2##	2.42 ± 0.24#	39.9 ± 13.4##
TCBN	5	262 ± 27	3.48 ± 0.24	2.09 ± 0.54	41.5 ± 5.1
SAR 30 + TCBN		302 ± 23##	3.42 ± 0.25##	2.34 ± 0.19##	36.8 ± 8.3##
Rapa	0.1	273 ± 24	3.54 ± 0.7	2.11 ± 0.29	49.6 ± 5.7
SAR 30 + Rapa		327 ± 25##	3.28 ± 0.19##	2.46 ± 0.36#	57.9 ± 7.2#

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs SAR 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

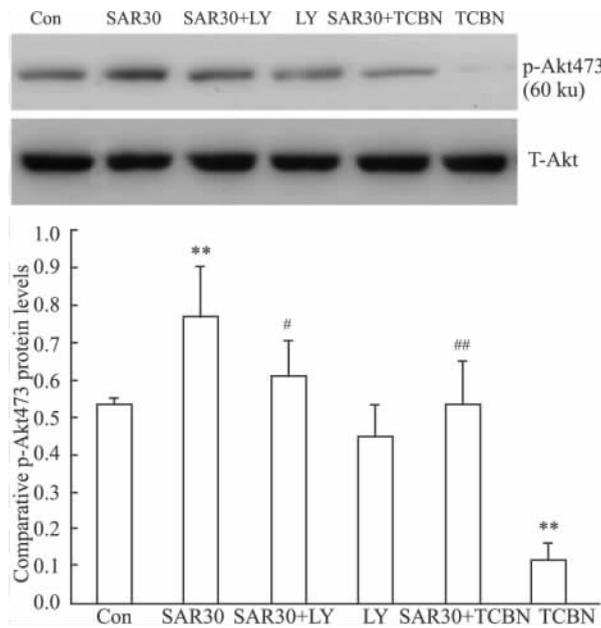


Fig 3 p-Akt protein expression increased by SAR ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

\*\*  $P < 0.01$  vs control; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs SAR 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

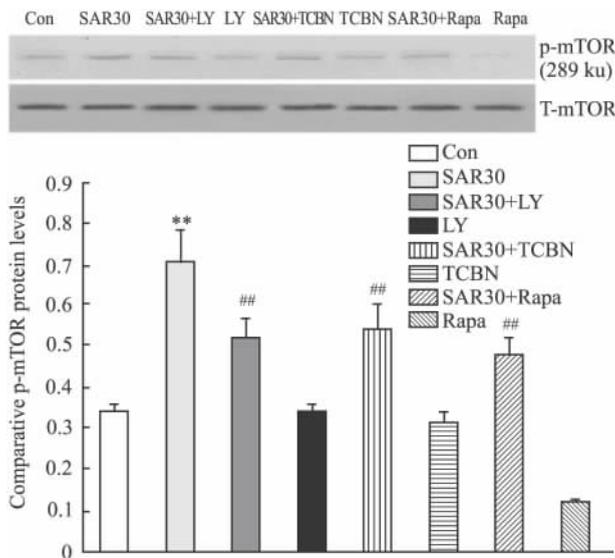


Fig 4 p-mTOR protein expression increased by SAR ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

\*\*  $P < 0.01$  vs control; ##  $P < 0.01$  vs SAR 30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

有树突棘。树突的功能是接收整合临近神经细胞的传入信息。树突分支结构和生物物理特性决定了突触输入输出的过程，分支的长度、数目、直径等可反映细胞的功能状态，而许多营养因子和应激可影响树突发育，进而影响神经环路的形成和功能。已有研究表明，在多种神经退行性疾病中都伴有树突树和树突棘损伤导致神经环路的功能障碍，如AD病人记忆力下降的主要原因被认为是海马和皮层神经突触丢失及神经突起功能障碍。

PI3K/Akt 通过或与 mTOR 协同调节着突触可塑性和记忆形成。PI3K<sup>[10]</sup> 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成的异源二聚体。静息状态下普遍存在于胞质中，当接受来自酪氨酸激酶和 G 蛋白偶联受体的信号后被激活，聚集到细胞膜上把底物 Ptd Ins(4, 5) P<sub>2</sub> (PIP<sub>2</sub>) 转化为 Ptd Ins(3, 4, 5) P<sub>3</sub> (PIP<sub>3</sub>)。PIP<sub>3</sub> 作为第二信使，激活下游的 Akt 蛋白等。Akt 蛋白为细胞内反转录病毒 v-Akt 的同源物所编码一种蛋白激酶，在静息细胞中大部分位于胞质中。由于与 PKA 和 PKC 有相似性，所以又被称为蛋白激酶 B (PKB)。活化后的 PI3K 在膜上生成 PIP<sub>3</sub>，PIP<sub>3</sub> 通过与 Akt 蛋白的 PH 结构域的相互作用，聚集 Akt 蛋白到膜上，在 3-磷脂酰肌醇依赖性蛋白激酶 (PDK1) 的帮助下，通过使 Akt 蛋白上的苏氨酸磷酸化位点 (Thr308) 和丝氨酸磷酸化位点 (Ser473) 磷酸化而使其激活。激活后的 Akt 蛋白再转位到胞质中或胞核内，通过对一系列底物的磷酸化，使其下游的 mTOR 激活，它们共同调节突触的形成与连接。

随着国际老龄化，老年性痴呆患者逐渐增多，世界医学界越来越重视采用天然药物防治老年性痴呆。SAR 是从中草药知母中提取分离的有效成分，对老年性痴呆有一定治疗作用，能改善患者学习记忆能力。我们实验室研究已表明 SAR 可通过抑制 Akt/PKB 信号转导通路，发挥抑制炎症因子的释放

而起到保护神经细胞的作用<sup>[11]</sup>。本研究表明, SAR 可明显促进神经元树突发育, 表现为神经元树突总长度明显增加、一级树突数目明显增多、最大分支级数明显增多及胞体面积增大, 并呈明显浓度依赖性。而应用各阻断剂后, SAR 30 + 各阻断剂组的神经元树突总长度、一级树突数目、最大分支级数及胞体面积明显降低, 结果表明 SAR 促进树突发育的作用可能与 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关。通过测定 p-PDK1、p-Akt473 及 p-mTOR 的蛋白表达变化进一步说明 SAR 对树突发育的促进作用与 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关。我们将更深入的探讨研究, 为 AD 病人的治疗提供更广阔的思路。

#### 参考文献:

- [1] Miller F D, Kaplan D R. Signaling mechanisms underlying dendrite formation [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2003, **13**(3): 391–8.
- [2] Kumar V, Zhang M X, Swank M W, et al. Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways [J]. *J Neurosci*, 2005, **25**(49): 11288–99.
- [3] McKee A C, Kosik K S, Kowall N W. Neuritic pathology and dementia in Alzheimer's disease [J]. *Ann Neurol*, 1991, **30**(2): 156–65.
- [4] Dijkhuizen P A, Ghosh A. BDNF regulates primary dendrite formation in cortical neurons via the PI3-kinase and MAP kinase signaling pathways [J]. *J Neurobiol*, 2005, **62**(2): 278–88.
- [5] Jaworski J, Spangler S, Seeburg D P, et al. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway [J]. *J Neurosci*, 2005, **25**(49): 11300–12.
- [6] Cammalleri M, Lütjens R, Berton F, et al. Time-restricted role for dendritic activation of the mTOR-p70S6K pathway in the induction of late-phase long-term potentiation in the CA1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(24): 14368–73.
- [7] 刘卓金, 英, 刘婉珠, 等. 知母皂苷对脂多糖引起的大鼠学习记忆障碍和炎症反应的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2010, **26**: 1362–6.
- [7] Liu Z, Jin Y, Liu W Z, et al. Effects of SAaB on LPS-induced learning and memory disorders and inflammatory reaction in rat hippocampus [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, **26**(10): 1362–6.
- [8] Liu Z, Jin Y, Yao S Y, et al. Saponins from *Anemarrhena asphodeloides* Bge protects neurons from amyloid  $\beta$ -protein fragment 25–35-induced apoptosis [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2006, **20**: 295–304.
- [9] Havton L A, Ohara P T. Quantitative analyses of intracellularly characterized and labeled thalamocortical projection neurons in the ventrobasal complex of primates [J]. *J Comp Neurol*, 1993, **336**(1): 135–50.
- [10] Shankar S, Srivastava R K. Involvement of Bcl-2 family members, phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT and mitochondrial p53 in curcumin (diferulolylmethane)-induced apoptosis in prostate cancer [J]. *Int J Oncol*, 2007, **30**(4): 905–18.
- [11] 刘卓金, 英, 隋海娟, 闫恩志. 知母皂苷对  $A\beta_{25-35}$  引起的巨噬细胞炎症介质释放的抑制作用及信号转导机制 [J]. *中国药理学通报* 2011, **27**(5): 695–700.
- [11] Liu Z, Jin Y, Sui H J, Yan E Z. Effect and signaling mechanism of SAaB on the  $A\beta_{25-35}$ -induced release of inflammatory mediators in cultured macrophages [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, **27**(5): 695–700.

## The effects of Sarsasapogenin on dendritic development in cultured cortical neurons and the mechanisms of signal transduction

WANG Jin-ning<sup>1,2</sup>, DONG Yan<sup>1</sup>, SUI Hai-juan<sup>1</sup>, ZHANG Yong-xing<sup>3</sup>

(1. Dept of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou Liaoning 121001, China; 2. Medical College of Soochou University, Suzhou Jiangsu 215000, China; 3. Dept of preventive medicine, Medical college of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract: Aim** To investigate the effects of Sarsasapogenin on dendritic development in cultured cortical neurons and the mechanisms of signal transduction.

**Methods** Cortical neurons cultures were prepared from postnatal Sprague-Dawley (SD) rats in 24 h. After 4 d cultured, cortical neurons were used for experiment, using inverted phase-contrast microscopy, we analyzed the total dendrite branch length (TDBL), number of primary-order dendrite (PDN), maximum branch order (MBO), and soma size. Western blot was used to observe p-PDK1, p-Akt and p-mTOR protein expression. **Results** Incubation of cortical neurons with SAR (10, 30, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) for 48 h resulted in dose-dependent increases in TDBL, PDN,

MBO, and soma size. The results of Western blot showed that SAR (30, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) treatment for 48 h also increased the levels of synaptophysin protein expression in a dose-dependent manner whereas those were lowered in group SAR 30 + LY. SAR 30 + TCBN group induced the decrease in p-Akt473 and p-mTOR expression. SAR 30 + Rapa group decreased p-mTOR expression. **Conclusion** These results show that SAR can promote dendritic development and maturation of postnatal cortical neurons *in vitro*, which is mainly via activated PI3K/Akt/mTOR signal pathway.

**Key words:** Sarsasapogenin; cortical neurons; dendritic development; signal transduction pathway; protein kinases; mammalian target of rapamycin