

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.16.016

# 黄芩含药血清对神经干细胞分化钠离子通道基因及 cAMP/PKA 信号通路的影响

赵凡, 尚志远, 瞿融\*

南京中医药大学, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210046

**[摘要]** 目的 研究黄芩含药血清对神经干细胞分化的影响及可能机制。方法 分离培养原代乳大鼠神经干细胞, 利用免疫荧光法进行鉴定。SD 大鼠分别给予 500 和 1000 mg/kg 黄芩水煎剂每日灌胃 1 次, 连续 7 天后制备黄芩高、低剂量含药血清。黄芩低、高含药血清均设 0.1%、1%、10% 三个浓度干预神经干细胞, 进行试验药物浓度筛选。收集神经干细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个接种于 24 孔板中, 实验分为对照组、黄芩含药血清组和含药血清加抑制剂组, 每组 3 个复孔。对照组每孔加入  $10 \mu\text{l}$  空白大鼠血清, 黄芩含药血清组每孔加入  $10 \mu\text{l}$  筛选浓度的黄芩含药血清, 含药血清加抑制剂组每孔加入  $10 \mu\text{l}$  筛选浓度的黄芩含药血清及  $1 \mu\text{l}$  浓度为  $10 \text{ mmol/L}$  的 H89 溶液, 隔天换液, 共分化 7 天。比较各组细胞中双肾肾上腺皮质激素 (DCX)、神经元核心抗原 (NeuN) 细胞增长率; 检测细胞中钠离子通道亚型 SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A mRNA 表达, 蛋白激酶 A (PKA)、磷酸化蛋白激酶 A (p-PKA) 蛋白表达, 细胞上清中腺苷酸环化酶 (AC)、环磷酸腺苷 (cAMP) 浓度。结果 筛选出 1% 黄芩高剂量含药血清用于后续实验。与对照组比较, 黄芩含药血清组细胞中 DCX、NeuN 细胞增长率增加, SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A mRNA 表达增加, p-PKA/PKA 值及 AC、cAMP 浓度增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与黄芩含药血清组比较, 含药血清加抑制剂组上述各指标均不同程度降低 ( $P < 0.01$ )。结论 黄芩含药血清可促进海马神经干细胞分化, 其机制可能与促进钠离子通道基因、cAMP/PKA 通路酶及蛋白的表达有关。

**[关键词]** 黄芩; 神经干细胞; 细胞分化; 钠离子通道; cAMP/PKA 通路

神经元再生包括神经干细胞 (NSCs) 的分裂增殖、迁移和分化, 只有分化为具有生理功能的成熟神经元, 才能完成神经元再生的过程<sup>[1]</sup>。神经元功能成熟的标志之一即电生理功能正常, 而海马神经干细胞分化的神经元电生理特征尚不成熟, 可能是由于离子通道相应亚型的表达不完全, 导致离子通道介导离子电流的能力降低<sup>[2]</sup>。环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cAMP/PKA) 信号通路已被证实与神经再生有关, 参与突触可塑性、记忆形成和神经元功能发挥<sup>[3]</sup>。黄芩常用于治疗中枢神经系统疾病, 具有抗炎、神经保护、促进神经再生等功能<sup>[4-5]</sup>。本研究通过观察黄芩含药血清对原代神经干细胞分化形态及钠离子通道亚型 (SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A) 表达的影响, 探讨其体外调节神

经干细胞分化的可能作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物

SPF 级 SD 乳鼠 (出生 24 h 内) 10 只, 购买于南京市江宁区青龙山动物繁殖场; 6~8 周龄雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 180~220 g, 购买于南京市江宁区青龙山动物繁殖场, 实验动物合格证号: SCXK (苏) 2017-0001, 大鼠饲养于 SPF 级环境, 保持正常的昼夜节律, 自由饮水及进食。

### 1.2 药物与试剂

黄芩购自南京中医药大学国医堂, 经南京中医药大学鉴定为唇形科植物黄芩 (*Radix scutellariae Georgi*) 的干燥根。黄芩 100 g 浸泡于 800 ml 纯水中 2 h, 加热沸腾煎煮 2 h, 提取物过 150 目筛网, 转至贮液罐; 再次重复上述煎煮过程, 两次药液混匀后进行悬蒸得到终浓度为 1 g/ml 的提取液。

基金项目: 国家自然科学基金 (81573701); 江苏省研究生培养创新工程研究生科研与实践创新计划 (KYCX19\_1282)

\* 通讯作者: qurong@163.com, (025) 85811929

### 1.3 主要试剂及仪器

H89 溶液 (MCE 公司, 货号 HY-15979A); DMEM/F-12 培养基 (Omega 公司, 货号 DM-25); Neurobasal 培养基 (货号 21103-049)、B27 (货号 17504-044)、N2 (货号 17502-408)、GlutaMAX (货号 35050-038)、L-Glutamine (货号 2503-081)、双抗 (货号 15240-062), 均为 Gibco 公司产品; 成纤维生长因子 2 (FGF-2, 货号 100-18B-B)、表皮生长因子 (EGF, 货号 100-45), 均为 PeproTech 公司产品; 巢蛋白 (Nestin) 抗体 (货号 ab92391)、双肾上腺皮质激素 (DCX) 抗体 (货号 ab18723)、神经核核心抗原 (NeuN) 抗体 (货号 ab128886), 均为 Abcam 公司产品; MACS<sup>®</sup> Neural Tissue Dissociation 试剂盒 (MiltenyiBiotec 公司, 货号 130-092-628); Poly-L-ornithine (Sigma-Aldrich 公司, 货号 p-3655); Laminin (BD Biosciences 公司, 货号 354232); PrimeScript RT 逆转录试剂盒 (TaKaRa 公司, 货号 RR047A); MTT 试剂盒 (Beyotime 公司, 货号 st316); RIPA 缓冲液 (Beyotime 公司, 货号 P0013B); PKA 抗体 (货号 sc-28315)、磷酸化蛋白激酶 A (p-PKA, 货号 sc-377575), 均为 Santa 公司产品; 腺苷酸环化酶 (AC) ELISA 试剂盒 (ZCIBIO 公司, 货号 ZC-37363); 环磷酸腺苷 (cAMP) ELISA 试剂盒 (森贝伽公司, 货号 SBJ-R40); 4% 多聚甲醛 (Bio-sharp 公司, 货号 BL539A); DAPI 染色液 (碧云天公司, 货号 C1006)。

荧光正置显微镜 (Olympus 公司, BX63 型); 组织匀浆机 (OMNI International 公司, 04727-08 型); Nanodrop2000 分光光度计 (Thermo 公司, ND2000 型); ECL 发光仪 (Tanon 公司, 180-5001 型); 全波长多功能酶标仪 (Thermo 公司, Multi-skan FC 型); 电泳及转膜系统 (Bio-Rad 公司, Mini-ProteanTetre 型); 凝胶成像分析系统 (Tanon 公司, 5200 型)。

### 1.4 大鼠神经干细胞的分离、培养及鉴定

从出生 24 h 之内的 SD 乳鼠大脑中制备神经干细胞。将海马齿状回组织切碎并使用 MACS<sup>®</sup> Neural Tissue Dissociation 试剂盒进行酶解, 得到的细胞在包含 1% B27、10 ng/ml EGF 和 FGF-2、2mM GlutaMAX、100 μg/ml 双抗的 Neurobasal 培养基中维持生长。在神经干细胞形成直径约 250 μm 神经球后吹打消化进行传代。当神经球平均直径约 250 μm 时, 进行 Nestin (1: 250) 免疫荧光实验,

神经球可被神经干细胞标记物 Nestin 特异性染色鉴定神经干细胞。

### 1.5 黄芩含药血清的制备及浓度筛选

SD 大鼠适应性喂养 7 天后按随机数字表分为空白组、黄芩低剂量组、黄芩高剂量组, 每组 10 只。空白组给予 0.1 ml/10 g 生理盐水, 黄芩低剂量组给予 500 mg/kg 黄芩水煎剂, 黄芩高剂量组给予 1000 mg/kg 黄芩水煎剂, 均每日灌胃 1 次, 连续 7 天。末次灌胃 2 h 后腹主动脉取血, 将所得血液在室温下静置 2 h, 4℃ 3000 r/min 离心 10 min, 离心半径 10 cm, 得到空白组血清及黄芩高、低剂量含药血清。收集对数期神经干细胞铺 96 孔板, 每孔细胞数为 7000 个, 空白组血清为对照, 黄芩低、高含药血清均设 0.1%、1%、10% 三个浓度进行给药, 每孔 100 μl 培养基, 每组设 5 个复孔, 进行 3 次独立的重复实验。采用 MTT 法检测细胞增殖情况, 测量每孔的 OD 值。

### 1.6 实验分组及干预方法

收集神经干细胞以每孔  $1 \times 10^5$  个接种于 poly-L-ornithine 和 Laminin 包被的 24 孔板中。实验分为对照组、黄芩含药血清组和含药血清加抑制剂组, 每组设 3 个复孔。对照组每孔加入 10 μl 空白组大鼠血清, 黄芩含药血清组每孔加入 10 μl 黄芩含药血清, 含药血清加抑制剂组每孔加入 10 μl 黄芩含药血清及 1 μl 浓度为 10 mmol/L 的 H89 溶液, 隔天进行换液, 共分化 7 天。

### 1.7 观察指标及方法

1.7.1 细胞中 DCX、NeuN 标记的阳性细胞数  
分化 7 天后用 4% 的多聚甲醛固定细胞 30 min。免疫细胞化学染色, 细胞 0.1% Triton X-100 的 PBS 透膜 30 min 后 5% BSA 封闭 1 h, 然后用一抗 DCX (1: 500)、NeuN (1: 1000) 过夜孵育。用 PBS 洗涤后用二抗孵育细胞, DAPI 染核。使用显微镜观察 DCX、NeuN 阳性细胞的数量。将 DCX、NeuN 标记的阳性细胞数量除以 DAPI 染色的细胞总数, 计算出细胞增长率。

1.7.2 细胞中钠离子通道亚型 SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A mRNA 表达  
采用实时荧光定量 PCR 法检测。神经干细胞分化 7 天后, 收集细胞, RT-PCR 操作按照 PrimeScript RT 逆转录试剂盒说明书进行。Trizol 法<sup>[6]</sup>提取 RNA, 提取后稀释 RNA, 并检测其 OD 260/OD 280 值。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, SCN1A: 上游 CCCACCACTCAGAATCTCATAC, 下游 GGC-

TATACATTGAACGTCATCC, 产物长度 129 bp; SCN2A: 上游 AGGAACGCAAGGACGAAG, 下游 TCTAATGGGGTTGAAGGGAG, 产物长度 242 bp; SCN3A: 上游 AGGGAAGGATTGACTTGCC, 下游 TGGACCTCTCCTTAGAGTCCA, 产物长度 37 bp; SCN8A: 上游 AACTTCCGAATCTCACGGATG, 下游 GTGTGGAACATGCAGTAACCG, 产物长度 172 bp; GAPDH: 上游 CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA, 下游 GGCATGGACTGTGCTCATGA, 产物长度 169 bp。结果采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法表示。

1.7.3 细胞中 PKA、p-PKA 蛋白表达 采用 Western Blot 法检测, 收集分化 7 天后的细胞迅速置于冰上, 在含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解。采用 Nanodrop2000 分光光度计测定蛋白浓度, 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白裂解产物, 转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上。用 5% BSA 封闭 1 h 后, 用一抗 PKA (1: 1000), p-PKA (1: 1000) 4 °C 过夜。与相应的二抗孵育 1 h 后观察印迹。结果采用 Image J 6.0 进行量化光密度, 结果用 p-PKA/PKA 值表示。

1.7.4 细胞上清 AC 及 cAMP 浓度 采用 ELISA 法检测, 按照说明书方法测定建立基于标准产品浓度的标准曲线线性回归方程, 用酶标仪在 450 nm 处测定溶液的光密度 (OD)。

### 1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6 软件, 数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 用单因素方差分析和 Bonferroni 多重比较进行多组比较。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄芩含药血清浓度筛选结果

表 1 示, 黄芩低剂量组 0.1%、1%、10% 浓度含药血清干预下, 细胞活力与空白组比较差异无统计学意义 (P > 0.05), 而黄芩高剂量组 1% 及 10% 浓度含药血清干预下细胞活力较空白组均升高 (P < 0.01)。1% 黄芩高剂量组含药血清对神经干细胞的增殖能力作用最强, 故选取用于后续实验。

表 1 黄芩高、低剂量组不同浓度含药血清对神经干细胞活力的影响 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	含药血清浓度	样本数	细胞活力
空白组	—	3	100.00 ± 2.11
黄芩低剂量组	0.1%	3	98.26 ± 1.50
	1%	3	102.78 ± 4.27
	10%	3	99.21 ± 2.57
黄芩高剂量组	0.1%	3	104.94 ± 4.03
	1%	3	154.40 ± 20.95*
	10%	3	133.67 ± 6.41*

注: 与空白组比较, \* P < 0.01

### 2.2 各组细胞中 DCX 及 NeuN 阳性细胞增长率比较

表 2 示, 与对照组比较, 黄芩含药血清组 DCX 及 NeuN 阳性细胞增长率显著增加, 差异具有统计学意义 (P < 0.01); 与黄芩含药血清组比较, 含药血清加抑制剂组 DCX 及 NeuN 阳性细胞增长率显著降低, 差异具有统计学意义 (P < 0.01)。

表 2 各组细胞中 DCX、NeuN 细胞增长率比较 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	DCX 细胞增长率	NeuN 细胞增长率
对照组	3	100.00 ± 9.07	100.00 ± 7.96
黄芩含药血清组	3	159.26 ± 15.93*	172.34 ± 18.79*
含药血清加抑制剂组	3	86.44 ± 10.98#	91.07 ± 8.75#

注: DCX, 双肾上腺皮质激素; NeuN, 神经核核心抗原; 与对照组比较, \* P < 0.01; 与黄芩含药血清组比较, #P < 0.01

### 2.3 各组细胞中 SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A mRNA 表达比较

表 3 示, 与对照组比较, 黄芩含药血清组细胞中 SCN1A、SCN2A、SCN3A 及 SCN8A mRNA 表达升高, 差异具有统计学意义 (P < 0.01); 与黄芩含药血清组比较, 含药血清加抑制剂组细胞中 SCN1A、SCN2A、SCN3A 及 SCN8A mRNA 表达显著降低, 差异具有统计学意义 (P < 0.01)。

### 2.4 各组细胞上清中 AC、cAMP 浓度比较

表 4 示, 与对照组比较, 黄芩含药血清组细胞上清中 AC 及 cAMP 含量升高, 差异具有统计学意义 (P < 0.05 或 P < 0.01); 与黄芩含药血清组比较, 含药血清加抑制剂组 AC 及 cAMP 含量则显著降低, 差异具有统计学意义 (P < 0.01)。

表 3 各组细胞中 SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN8A mRNA 表达比较 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	SCN1A	SCN2A	SCN3A	SCN8A
对照组	3	1.00 ± 0.16	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.1	1.00 ± 0.02
黄芩含药血清组	3	3.19 ± 0.73*	1.47 ± 0.15*	4.04 ± 0.79*	2.83 ± 0.55*
含药血清加抑制剂组	3	0.01 ± 0.01#	0.00 ± 0.00#	0.32 ± 0.04#	0.37 ± 0.03#

注: 与对照组比较, \* P < 0.01; 与黄芩含药血清组比较, #P < 0.01

表 4 各组细胞上清中 AC、cAMP 浓度比较 (  $\mu\text{g/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$  )

组别	样本数	AC	cAMP
对照组	3	12.08 $\pm$ 1.68	14.08 $\pm$ 0.68
黄芩含药血清组	3	18.17 $\pm$ 1.35 <sup>**</sup>	16.02 $\pm$ 0.88 <sup>*</sup>
含药血清加抑制剂组	3	6.35 $\pm$ 0.51 <sup>#</sup>	11.51 $\pm$ 1.37 <sup>#</sup>

注: AC, 腺苷酸环化酶; cAMP, 环磷酸腺苷; 与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与黄芩含药血清组比较, #  $P < 0.01$

### 2.5 各组细胞中 p-PKA/PKA 值比较

表 5 示, 与对照组比较, 黄芩含药血清组细胞中 p-PKA/PKA 显著升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 与黄芩含药血清组比较, 含药血清加抑制剂组细胞中 p-PKA/PKA 显著降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

表 5 各组细胞中 p-PKA/PKA 值比较 (  $\bar{x} \pm s$  )

组别	样本数	p-PKA/PKA
对照组	3	100.00 $\pm$ 3.12
黄芩含药血清组	3	115.11 $\pm$ 4.16 <sup>*</sup>
含药血清加抑制剂组	3	64.81 $\pm$ 3.40 <sup>#</sup>

注: PKA, 蛋白激酶 A; p-PKA, 磷酸化蛋白激酶 A; 与对照组比较, \*  $P < 0.01$ ; 与黄芩含药血清组比较, #  $P < 0.01$

### 3 讨论

黄芩是唇形科植物黄芩的干燥根, 性寒、味苦, 具有清热燥湿、泻火解毒之功效。有研究<sup>[7-8]</sup>表明, 气郁化火证及火热病理因素在抑郁症中较为常见。气滞与内火相互影响, 又可变生诸症。因此, 临床治疗常以黄芩清泄肝胆实火, 以收疏肝清热之效。另研究<sup>[4]</sup>显示, 黄芩提取物和分离出的单体化合物可通过抑制氧化应激、抑制兴奋性毒性、促进神经发生、减少凋亡、抑制炎症等途径有效防止各种神经及精神疾病。前期实验研究<sup>[5]</sup>显示, 黄芩水提物可显著改善慢性轻度不可预知压力 (CUMS) 抑郁模型大鼠的抑郁样行为, 缓解 CUMS 诱导后的神经发生降低, 且可以上调 cAMP/PKA 通路中相关蛋白的表达。本研究首先对实验药物浓度进行了筛选, 结果选出 1000 mg/kg 黄芩干预下 1% 含药血清进行实验, 观察黄芩含药血清对神经干细胞分化的影响及可能作用机制。

成年大脑中的神经发生存在于从鱼到灵长类动物的各种脊椎动物中, 从细胞增殖开始, 到新神经元功能整合到现有神经回路中结束<sup>[9]</sup>。电压门控的钠通道在人类神经祖细胞分化过程中表达, 并可能参与调节神经发生<sup>[10]</sup>。人类脑中神经祖细胞分化为神经元 3 周后逐渐成熟产生基本的神经元特性, 如河豚毒素敏感的钠通道动作电位功能正

常<sup>[11]</sup>。人类钠通道 (SCN)  $\alpha$  亚基由 11 个基因编码, 其中 SCN1A、SCN2A、SCN3A 和 SCN8A 亚基在中枢神经系统中表达最高。SCN 中 70% 的钠电流归因于 I 型 (NaV1.1) 和 II 型 (NaV1.2) 钠通道, 它们分别是 SCN1A 和 SCN2A 转录后产物<sup>[12]</sup>。最近研究<sup>[13]</sup>发现, 许多神经及精神疾病是由编码离子通道蛋白的基因突变及成人海马功能异常引起的, 如癫痫、焦虑症、精神分裂症和抑郁症等。

cAMP/PKA 信号通路已被认为是参与神经元轴突生长能力和抑制环境的关键途径<sup>[14]</sup>。cAMP 是重要的第二信使, 其形成由 AC 催化; PKA 是 cAMP 的关键下游效应子, 细胞内升高的 cAMP 活化 PKA, cAMP/PKA 信号通路被激活后可刺激一系列下游因素, 促进神经再生。目前研究<sup>[15]</sup>表明, 天麻通过 cAMP/PKA/CREB 信号通路促进血清剥夺后 PC12 细胞的存活, 其保护作用被 PKA 抑制剂预处理所阻断。

本研究结果显示, 黄芩含药血清可显著促进海马神经干细胞分化, 使 DCX 及 NeuN 阳性细胞增长率增加, 且增加了钠离子通道亚型 SCN1A、SCN2A、SCN3A 及 SCN8A mRNA 表达, 亦可显著增加 AC、cAMP 及 PKA 的表达。在给予抑制剂 H89 溶液后, 黄芩含药血清的作用均被减弱。上述结果提示, 黄芩含药血清可促进海马神经干细胞分化及钠离子通道 mRNA 的表达, 该作用可能与 cAMP/PKA 通路的激活有关。

### 参考文献

- [1] TODA T, PARYLAK SL, LINKERSB, et al. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease [J]. Mol Psychiatry 2019 24(1): 67-87.
- [2] KELNER KL. Ion channels: opening the gate [J]. Science, 1996 271(5249): 615.
- [3] LI L, FAN X, ZHANG XT, et al. The effects of Chinese medicines on cAMP/PKA signaling pathway in central nervous system dysfunction [J]. Brain Res Bull, 2017, 2017(132): 109-117.
- [4] KANDHASAMY S, PONNUVEL D, MINJU K, et al. Neuroprotective and cognitive enhancement potentials of baicalin: a review [J]. Brain Sci 2018 8(6): 104-128.
- [5] ZHANG R, GUO L, JI Z, et al. Radix scutellariae attenuates cums-induced depressive-like behavior by promoting neurogenesis via cAMP/PKA pathway [J]. Neurochem Res 2018 43(11): 2111-2120.
- [6] HAIMOV-KOCHMAN R, FISHER SJ, WINN VD. Modification of the standard trizol-based technique improves the integrity of RNA isolated from RNase-rich placental tissue

- [J]. Clin Chem ,2006 ,52( 1) : 159-160.
- [7]姜劲峰,王玲玲. 抑郁症中医辨证证型因子频次分析[J]. 新中医 2008 ,40( 2) :64-65.
- [8]曲森,唐启盛,包祖晓,等. 贝叶斯网络模型在中医证候研究中的应用[J]. 中华中医药学刊 2008 ,26( 7) :1497-1498.
- [9]AIMONE JB ,DENG W ,GAGE FH. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions [J]. Trends Cogn Sci 2010 ,14( 7) :325-327.
- [10]YU SP ,CANZONIERO LMT ,CHOI DW. Ion homeostasis and apoptosis [J]. Curr Opin Cell Biol ,2001 ,13( 4) :405-411.
- [11]WEGNER F ,KRAFT R ,BUSSE K ,et al. Glutamate receptor properties of human mesencephalic neural progenitor cells: NMDA enhances dopaminergic neurogenesis in vitro [J]. J Neurochem 2009 ,111( 1) :204-216.
- [12]MWISLER MH ,JANELLER EB ,SHARKEY LM. Sodium channel gene family: epilepsy mutations , gene interactions and modifier effects [J]. J Physiol 2010 ,588( 11) :1841-1848.
- [13]DWORAKOWSKA B ,DOLOWY K. Ion channels-related diseases [J]. Acta Biochim Pol 2000 ,47( 3) :685-703.
- [14]RYDEL RE ,GREENE LA. cAMP analogs promote survival and neurite outgrowth in cultures of rat sympathetic and sensory neurons independently of nerve growth factor [J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A. ,1988 ,85( 4) :1257-1261.
- [15] TSAI CF ,HUANG CL ,LIN YL ,et al. The neuroprotective effects of an extract of *Gastrodia elata* [J]. J Ethnopharmacol 2011 ,138( 1) :119-125.

### Effects of the Serum Containing *Radix Scutellariae*— on Sodium Channel Genes and cAMP/PKA Signaling Pathway of Neural Stem Cells Differentiation

ZHAO Fan , SHANG Zhiyuan , QU Rong

Nanjing University of Chinese Medicine , Nanjing , 210046

**ABSTRACT Objective** To study the effects and possible mechanism of Huangqin ( *Radix Scutellaria* ) -containing serum on differentiation of neural stem cells. **Methods** Primary rat neural stem cells were isolated , cultured and identified by immunofluorescence. SD rats were given 500 and 1000 mg/kg of *Huangqin Decoction* ( 黄芩水煎剂 ) once a day for gavage. After 7 consecutive days , high-dose and low-dose *Radix Scutellariae*-containing serum were prepared. The low and high drug-containing serums were set at 3 concentrations of 0.1% , 1% , and 10% to intervene neural stem cells , and the test drug concentration was screened. Neural stem cells were collected and inoculated into a 24-well plate with  $1 \times 10^5$  per well. The experiment was divided into a control group , a drug-containing serum group , and a drug-containing serum plus inhibitor group , with 3 replicate wells per group. The control group was added with 10  $\mu$ l of blank rat serum per well , the drug-containing serum group was added with 10  $\mu$ l of screening concentration of *Radix Scutellariae*-containing serum per well , the drug-containing serum plus inhibitor group was added with 10  $\mu$ l of screening concentration of *Radix Scutellariae*-containing serum per well. In the drug-containing serum plus inhibitor group , 10  $\mu$ l of *Radix Scutellariae* containing serum and 1  $\mu$ l of H89 solution at a concentration of 10 mmol/L were added to each well , and the fluid was changed every other day for 7 days. The cell growth rates of the double adrenocortical hormone ( DCX ) and neuronal core antigen ( NeuN ) in each group of cells were compared; the expression of sodium channel subtypes SCN1A , SCN2A , SCN3A , SCN8A mRNA , protein kinase A ( PKA ) , phosphate in the cells Protein kinase A ( p-PKA ) protein expression , concentration of adenylate cyclase ( AC ) and cAMP in cell supernatant were detected. **Results** 1% *Radix Scutellariae* high-dose serum was screened for subsequent experiments. Compared with the control group , the growth rate of DCX and NeuN cells in the drug-containing serum group cells increased , SCN1A , SCN2A , SCN3A , SCN8A mRNA expression increased , p-PKA/PKA value and AC , cAMP concentration increased (  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$  ); compared with the drug-containing serum group , the above-mentioned indexes of the drug-containing serum plus inhibitor group were reduced to varying degrees (  $P < 0.01$  ). **Conclusion** The *Radix Scutellariae*-containing serum can promote the differentiation of hippocampal neural stem cells. The mechanism may be related to the promotion of the expression of sodium channel genes , cAMP/PKA pathway enzymes and proteins.

**Keywords** *Radix Scutellariae*; neural stem cells; cell differentiation; sodium channel; cAMP/PKA pathway

( 收稿日期: 2019 - 10 - 22; 修回日期: 2020 - 01 - 01)

[编辑: 邓 媛]