

人参皂甙 Rb1 对阿尔茨海默病样大鼠海马结构 β -分泌酶和早老素-1 表达的影响*

杨吉平¹ 赖红² 吕永利² 赵朝华¹ 杨石照¹

(1 西安医学院解剖学教研室, 西安 710021; 2 中国医科大学解剖学教研室, 沈阳 110001)

摘要 目的:观察人参皂甙 Rb1 对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠海马结构 β -分泌酶(BACE)和早老素-1(PS-1)表达的影响, 探讨人参皂甙 Rb1 防治 AD 的可能机制。**方法:**SD 大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组, 用 D-半乳糖联合三氯化铝建立 AD 大鼠模型, 治疗组在造模后给予腹腔注射人参皂甙 Rb1; 采用 Morris 水迷宫测试大鼠的空间学习记忆能力, 免疫组织化学显色和免疫印迹方法检测大鼠海马结构 BACE 和 PS-1 的表达。**结果:**模型组大鼠各时间段的逃避潜伏期均较对照组延长, 治疗组对应时间段的潜伏期较模型组明显缩短; 模型组大鼠海马结构 BACE 和 PS-1 的表达较对照组增高, 而治疗组 BACE 和 PS-1 表达均较模型组明显下调。**结论:**人参皂甙 Rb1 可明显改善 D-半乳糖联合三氯化铝制作的 AD 大鼠学习记忆障碍, 其机制可能与下调海马结构 BACE 和 PS-1 的表达有关。

关键词 阿尔茨海默病; 人参皂甙 Rb1; 海马结构; β -分泌酶; 早老素-1; 大鼠

Effect of ginsenoside Rb1 on expression of β -secretase and presenilin-1 in hippocampal formation of Alzheimer's disease-like rats*

Yang Jiping¹, Lai Hong², Lü Yongli², Zhao Zhaohua¹, Yang Shizhao¹

(1. Department of Anatomy, Xi'an Medical College, Xi'an 710021;

2. Department of Anatomy, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective: To observe the effect of ginsenoside Rb1 (GSRb1) on the expression of β -secretase and presenilin-1 in hippocampal formation of Alzheimer's disease(AD)-like rats. **Methods:** 45 male Sprague-Dawley rats were divided randomly into a control group, a model group and a treatment group. The rats in the model group were treated with D-galactose and aluminium trichloride. GSRb1 was given to the rats in the treatment group after the establishment of AD model. Morris water maze was used to test ability of learning and memory of rats. Immunohistochemical staining and Western blot was performed for detecting the expression of β -secretase and presenilin-1 in the hippocampal formation. **Results:** Compared with the control group, every segmental escape latency of model rats was prolonged, and the latency of rats treated GSRb1 was shortened compared with the model group. Compared with the control group, the expression of β -secretase and presenilin-1 in the hippocampal formation of model rats was increased, while their expression in the treatment group was significantly decreased compared with the model group. **Conclusion:** The learning and memory impairment of AD model rats was improved by GSRb1. The mechanism was possibly related to down-regulation of β -secretase and presenilin-1, which resulted in a decrease of A β expression in hippocampal formation after GSRb1 treatment.

Key words Alzheimer's disease; ginsenoside Rb1; hippocampal formation; β -secretase; presenilin-1; rat

老年斑是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)特征性病理改变之一,它的核心成分是 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β),而 A β 是由淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)经 β -分泌酶(beta-site APP cleaving enzyme, BACE)和 γ -分泌酶裂解产生的。BACE 是 A β 生成的关键限速酶,早老素-1(presenilin-1, PS-1)能够促进 BACE 和 γ -分泌酶的协同作用,导致 A β 的生成量明显增加。目前认为,PS-1 本身

就是组成 γ -分泌酶复合物中最重要的部分^[1]。由此可见,通过改变 BACE 和 PS-1 的表达量可以直接调节 A β 的水平。人参皂甙 Rb1 (ginsenoside Rb1, GSRb1)是人参的单体成分之一,具有营养神经,促进轴突外生和神经再生的作用^[2],并可增加小鼠海马锥体细胞的突触数目,上调突触素的表达,提高小鼠的空间学习记忆能力^[3],近年来有研究表明 GSRb1 可明显抑制 A β 诱导的海马和皮层神经元 tau 蛋白的过度磷酸化^[4]。然而,GSRb1 对 AD 的分子生化改变,尤其是对这两种与 A β 生成密切相关的酶含量的影响作用尚未见文献报道。因此,该研究拟采用 D-半乳糖联合三氯化铝建

* 辽宁省自然科学基金(20062088);辽宁省教育厅基金(05L511)

第1作者 E-mail: yangjeeing@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-4-8; 修回日期:2009-7-11

立 AD 大鼠模型,观察海马结构神经元 BACE 和 PS-1 的表达情况以及 GSRb1 对其表达的影响。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

D-半乳糖自国药集团化学试剂有限公司;三氯化铝($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)由沈阳第一试剂厂生产;兔抗大鼠 BACE 和 PS-1 抗体为北京博奥森公司产品;SABC 免疫组织化学试剂盒为武汉博士德公司产品;浓缩型辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 为美国 KPL 公司产品;抗 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;免疫印迹法化学发光检测试剂盒购自美国 KPL 公司;GSRb1 由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 动物及分组

选用中国医科大学实验动物中心提供的 5 月龄 SD 雄性大鼠,体质量(250 ± 20)g,适应性饲养 1 周后,经 Morris 水迷宫测试判定其空间辨别性学习记忆能力,淘汰反应过于迟钝或特别敏感的大鼠,将选出的 45 只大鼠随机分为 3 组:对照组、模型组和治疗组,每组 15 只。模型组即每天腹腔注射 D-半乳糖 60 mg/kg 和灌胃三氯化铝 500 mg/kg,连用 60 d;治疗组是在造模结束 1 d 后给予腹腔注射 GSRb1 2.5 mg/kg,每天 1 次,连用 4 周;对照组以等量生理盐水进行腹腔注射和灌胃。

1.3 Morris 水迷宫检测

造模及治疗结束 1 d 后开始行 Morris 水迷宫行为学测试^[5],第 1 天让大鼠自由游泳 2 min,第 2 天开始训练,每天分上、下午 2 个时间段,每段分别训练 4 次。训练期间水迷宫外参照物保持不变,训练开始时,将平台置于 SW 象限,随机选择 1 个入水点,将大鼠面向池壁放入水池,观察其寻找平台的路线图,记录每次找到并爬上平台的时间,即逃避潜伏期。如果大鼠在 120 s 内找不到平台,则将其引上平台,潜伏期记为 120 s,每次间隔 1 min,连续训练 9 个时间段(1-1, 1-2, 2-1, 2-2, 3-1, 3-2, 4-1, 4-2, 5-1),其中,1-1 表示第 1 天上午,1-2 表示第 1 天下午,2-1 表示第 2 天上午,依此类推。

1.4 大鼠海马石蜡切片的制备

行为学测试后,将大鼠麻醉,开胸,经升主动脉相继快灌生理盐水 150 ml,4%多聚甲醛 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)250 ml,速度先快后慢,持续 30 min 以上,取脑,后固定 30 min,脱水、透明、石蜡包埋;冠状位连续切片,片厚为 7 μm ,每隔 3 张取 1 张。

1.5 免疫组织化学显色

BACE 和 PS-1 一抗稀释度均为 1 : 200, DAB 显色约 10 min,镜下控制反应时间,充分水洗;常规脱水、透明和封片。用 PBS 代替一抗孵育作为阴性对照。采用随机方法,每组每种抗体分别取 10 张切片,在 40 倍

物镜下,按照海马 CA1 区、CA3 区及齿状回的部位采集图像,背景及曝光时间等条件均设一致,然后用图像分析系统(Meta Morph/DP10/BX41)进行分析,测定其积分光密度值(IOD)作为定量指标。

1.6 免疫印迹分析

大鼠颈椎脱臼处死,剥离并取出双侧海马结构称重后剪碎,加入 10 倍于其体积预冷的脑组织裂解液(每毫升含 PMSF 6 μl),静置 30 min 后匀浆离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 13 000 r/min, 30 min),取上清液,用 Bradford 法测定蛋白浓度。等量上样后进行 SDS-PAGE 电泳,半干转印到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入稀释的一抗(BACE 1 : 300, PS-1 1 : 400),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,浓缩型辣根过氧化物酶标记二抗(1 : 2 000 稀释)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, ECL 化学发光显色。以 β -actin 作为内参照,实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

所得数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 11.0 软件单因素方差分析进行组间比较。

2 结果

2.1 Morris 行为学测试

3 组大鼠寻找平台所需潜伏期的时间在前 2 d 均随着训练进程而显著下降(图 1)。自第 3 天起模型组潜伏期趋于平稳,但对照组及治疗组仍缓慢下降。模型组与对照组、治疗组与模型组相比差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

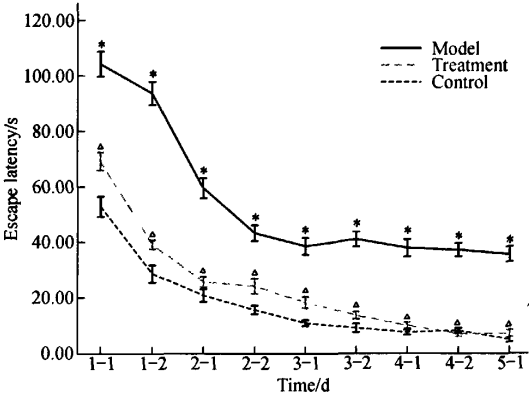


图 1 大鼠平均逃避潜伏期的变化趋势

Fig 1 Change tendency of average escape latency in SD rats

* $P < 0.05$ vs control; $\Delta P < 0.05$ vs model

2.2 免疫组织化学显色

BACE 及 PS-1 免疫反应阳性产物均呈棕黄色或棕褐色细颗粒状,在海马结构各亚区均有表达,以海马 CA3 区最为明显(图 2、3,见封三),高倍镜下可见阳性产物主要位于神经元胞质和突起及其分支,其胞核淡染。对照组大鼠海马 CA3、CA1 区及齿状回可见少量的 BACE 和 PS-1 阳性神经元,阳性产物着色较淡;模

型组 BACE 和 PS-1 阳性神经元着色加深,阳性产物的 IOD 较对照组明显增加($P<0.01$ 、 $P<0.05$);而治疗组 BACE 和 PS-1 阳性产物的 IOD 较模型组降低($P<0.05$) (表 1)。

表 1 大鼠海马结构 BACE 及 PS-1 的表达($\bar{x}\pm s$)
Tab 1 Expression of BACE and PS-1 of hippocampal formation in three groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	BACE			PS-1		
	CA1	CA3	DG	CA1	CA3	DG
Control	10.3 \pm 2.3	16.9 \pm 4.8	20.1 \pm 5.4	7.8 \pm 2.2	20.8 \pm 8.6	15.6 \pm 7.9
Model	35.8 \pm 10.9*	64.8 \pm 15.6**	50.5 \pm 20.3*	23.1 \pm 9.9*	50.8 \pm 11.8**	41.9 \pm 12.0**
Treatment	16.5 \pm 3.8 Δ	36.4 \pm 9.7 Δ	38.3 \pm 11.7 Δ	13.3 \pm 5.4 Δ	29.4 \pm 10.3 Δ	21.3 \pm 10.8 Δ

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control; $\Delta P<0.05$ vs model

2.3 免疫印迹法

在相对分子量为 70 kD 处有一清晰的 BACE 条带, IOD 比值统计分析结果显示模型组表达强于对照组 ($P<0.01$),而治疗组的表达量较模型组下调 ($P<0.05$)。在相对分子量为 48 kD 处有一清晰的 PS-1 条带, IOD 比值统计分析结果显示模型组表达量较对照组增加 ($P<0.05$),而治疗组表达量较模型组下调 ($P<0.05$)。

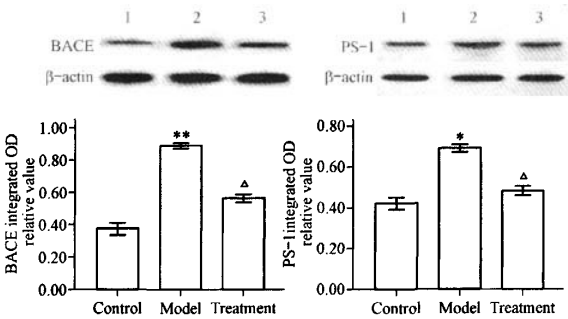


图 4 大鼠海马结构 BACE 和 PS-1 的表达

Fig 4 Expression of BACE and PS-1 in hippocampal formation of rats
1: Control; 2: Model; 3: Treatment
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control; $\Delta P<0.05$ vs model

3 讨论

给动物长期注射 D-半乳糖可使其多器官功能衰退而出现亚急性衰老表现,铝是一种神经毒素,铝离子可以透过肠屏障和血脑屏障,本研究参照罗焕敏等[6]方法用 D-半乳糖联合三氯化铝建立 AD 大鼠模型, Morris 水迷宫行为学测试结果显示模型组大鼠的平均逃避潜伏期较对照组明显延长。大量的实验研究表明海马结构是 AD 最早和最易受损的部位[7],因此,该研究以海马结构作为观察点,其免疫组织化学结果显示, BACE 和 PS-1 在模型组大鼠海马结构,尤其是海马 CA3、CA1 区和齿状回神经元胞质内明显表达,免疫反应阳性产物的 IOD 较对照组明显增加。免疫印迹结果显示,模型组大鼠海马结构 BACE 和 PS-1 表达明显强于对照组,此结果与 AD 患者病理过程中 BACE 及

PS-1 活性增高的有关报道一致。
AD 是一种进行性神经退行性疾病,目前临床主要用胆碱酯酶抑制剂治疗,但也只能改善早、中期患者的部分症状,不能减轻 AD 脑内分子生化的改变,不能阻止病情的进展。A β 沉积构成老年斑的核心部分, A β 级联学说认为 A β 的增多和聚集是 AD 发病的启动因素, A β 的神经毒性作用是 AD 病理过程中的核心事件,减少脑内 A β 含量或降低其活性已经成为治疗 AD 的一个研究方向[8],而 A β 是 APP 分子经 BACE 和 γ -分泌酶共同酶切的产物, PS-1 是 γ -分泌酶的核心部分,其基因突变与 AD 的关系甚为密切[1]。因此, BACE 和 PS-1 已成为治疗 AD 有潜力的靶点。

人参是传统的抗衰老和益智中药,其有效活性成分人参皂甙(ginsenoside, GS)对中枢神经系统具有良好的兴奋作用。Rb1 是 GS 的单体成分之一,属二醇型皂甙,已有实验表明 GSRb1 可明显延长原代培养的海马神经元存活时间,降低细胞死亡率[9];可增加脑内乙酰胆碱的合成和释放,增加 M 胆碱受体数量,提高胆碱乙酰转移酶的活性,从而改善实验动物的学习记忆障碍[10]。最近有研究表明[11-12] GSRb1 能够抑制多种原因诱导的海马和皮层神经元 tau 蛋白的过度磷酸化水平。本课题组前期的研究已经表明 GSRb1 能够明显下调 AD 大鼠海马神经元 A β 蛋白的表达[13]。该研究显示 GSRb1 可明显缩短 AD 模型大鼠各时间段的平均逃避潜伏期,免疫组织化学结果表明 GSRb1 可明显减少海马 CA1、CA3 区及齿状回 BACE 及 PS-1 的表达;免疫印迹结果提示 GSRb1 可使 D-半乳糖联合三氯化铝建立的 AD 大鼠海马结构 BACE 和 PS-1 的表达量明显下调。由此推测, GSRb1 可能主要通过降低海马结构 BACE 及 PS-1 的含量,影响 β 和 γ -分泌酶的活性,使 APP 沿淀粉样途径代谢减少,进而降低 A β 的生成。因此, GSRb1 对 AD 的防治具有潜在的应用前景。该研究从分子生化方面表明 GSRb1 可使 D-半乳糖与三氯化铝联合制作的 AD 模型大鼠海马结构 BACE 及 PS-1 的表达明显下调,从而改善大鼠的学习记忆能力,这可能是其防治 AD 的机制之一。

(下转 777 页)

植细胞表达突触蛋白,与宿主形成突触联系和神经环路;(2)移植细胞分泌神经营养因子如血管表皮细胞生长因子、胶质细胞源性神经营养因子起神经保护作用,减少缺血区神经细胞凋亡和脑梗死体积,促进神经功能恢复;(3)移植细胞提高宿主脑可塑性,如诱导损伤部位传入、传出神经元与周边区及健侧脑发生联系;(4)提高内源性血管形成因子水平,促使新生血管生成增加;(5)减轻炎症反应;(6)动员内源性前体细胞的神经过发生。

综上所述,局灶性脑缺血后移植 NSCs,移植细胞在脑内能存活、迁徙,并能改善神经缺失症状。后续的实验尚需观察移植细胞的分化,进一步研究移植的 NSCs 是否形成功能性神经元,整合到宿主的神经环路。

参考文献

- [1] Ormerod B K, Palmer T D, Caldwell M A. Neurodegeneration and cell replacement [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2008,363(1489): 153-170.
- [2] Chen J L, Yi L, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 2001,189(1-2):49-57.
- [3] Lee H J, Kim K S, Kim E J, et al. Brain transplantation of immortalized human neural stem cells promotes functional recovery in mouse intracerebral hemorrhage stroke model [J]. *Stem Cells*, 2007,25(5):1204-1212.

- [4] 林绿标,章翔,林旭妍,等. 小鼠胚胎神经干细胞在猫全脑缺血再灌注损伤模型中的存活、迁移及分化[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2007,6(3):207-209.
- [5] Okano H, Sawamoto K. Neural stem cells: involvement in adult neurogenesis and CNS repair [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2008,363(1500):2111-2122.
- [6] Kelly S, Bliss T M, Shah A K, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate and differentiate in ischemic rat cerebral cortex [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004,101(32):11839-11844.
- [7] 潘凤华,李晓波,丁新生,等. 人胚胎神经干细胞移植治疗大鼠脑缺血的实验研究[J]. *临床神经病学杂志*, 2005,18(2):84-87.
- [8] Kim D E, Schellingerhout D, Ishii K, et al. Imaging of stem cell recruitment to ischemic infarcts in a murine model [J]. *Stroke*, 2004,35(4):952-957.
- [9] Zhang Z H, Wang R Z, Wang R Z, et al. Transplantation of neural stem cells modified by human neurotrophin-3 promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2008,444(3):227-30.
- [10] Chu K, Park K, Lee S T, et al. Combined treatment of vascular endothelial growth factor and human neural stem cells in experimental focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Res*, 2005,53(4): 384-390.
- [11] 刘永海,赵莲花,赵辉,等. 神经干细胞移植治疗大鼠脑缺血再灌注损伤的实验研究[J]. *卒中与神经疾病*, 2006,13(6):328-331.
- [12] Bliss T, Guzman R, Daadi M, et al. Cell transplantation therapy for stroke [J]. *Stroke*, 2007,38(2):817-826.

(编辑:王 栋)

(上接 764 页)

参考文献

- [1] Kimberly W, Wolfe M. Identity and function of gamma-secretase [J]. *Neurosci Res*, 2003,74(3):353-360.
- [2] Chen Y S, Wu C H, Yao C H, et al. Ginsenoside Rb1 enhances peripheral nerve regeneration across wide gaps in silicone rubber chambers[J]. *Int J Artif Organs*, 2002,25(11):1103-1108.
- [3] Mook J I, Hong H S, Boo J H, et al. Ginsenoside Rb1 and Rg1 improve spatial learning and increase hippocampus synaptophysin level in mice[J]. *Neurosci Res*, 2001,63(6):509-515.
- [4] Xie Y H, Chen X C, Zhang J, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates beta-amyloid peptide 25-35 induced hyperphosphorylation of tau protein through CDK5 signal pathway[J]. *Acta Pharmac Sinica*, 2007,42(8):828-832.
- [5] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat[J]. *J Neurosci Methods*, 1984,11(1): 47-60.
- [6] 罗焕敏,肖飞. D-半乳糖和三氯化铝诱导小鼠产生类阿尔茨海默病变[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004,18(1):22-26.
- [7] Allen G, Barnard H, McColl R, et al. Reduced hippocampal functional connectivity in Alzheimer disease[J]. *Arch Neurol*, 2007,64(10):1482-1487.

- [8] Golde T E, Dickson D, Hutton M. Filling the gaps in the abeta cascade hypothesis of Alzheimer's disease [J]. *Curr Alzheimer Res*, 2006,3(5):421-430.
- [9] Liu M, Zhang J T. Protective effects of ginsenoside Rb1 and Rg1 on cultured hippocampal neurons[J]. *Acta Physiol Sinica*, 1995, 30(9):674-678.
- [10] Xue J F, Liu Z J, Hu J F, et al. Ginsenoside Rb1 promotes neurotransmitter release by modulating phosphorylation of synapsins through a cAMP-dependent protein kinase pathway [J]. *Brain Res*, 2006,1106(1):91-98.
- [11] Zeng Y Q, Chen X C, Zhu Y G, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates beta-amyloid peptide 25-35 induced tau hyperphosphorylation in cortical neurons [J]. *Acta Pharmac Sinica*, 2005, 40(3): 225-230.
- [12] Li Y K, Chen X C, Zhu Y G, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates okadaic acid-induced Tau protein hyperphosphorylation in rat hippocampal neurons[J]. *Acta Physiol Sinica*, 2005,57(2):154-160.
- [13] 杨吉平,赖红,方欣,等. 人参皂甙 Rb1 对阿尔茨海默病大鼠海马结构 β 淀粉样蛋白表达的影响[J]. *中国组织化学和细胞化学杂志*, 2008,17(4):301-305.

(编辑:冀凯宏)

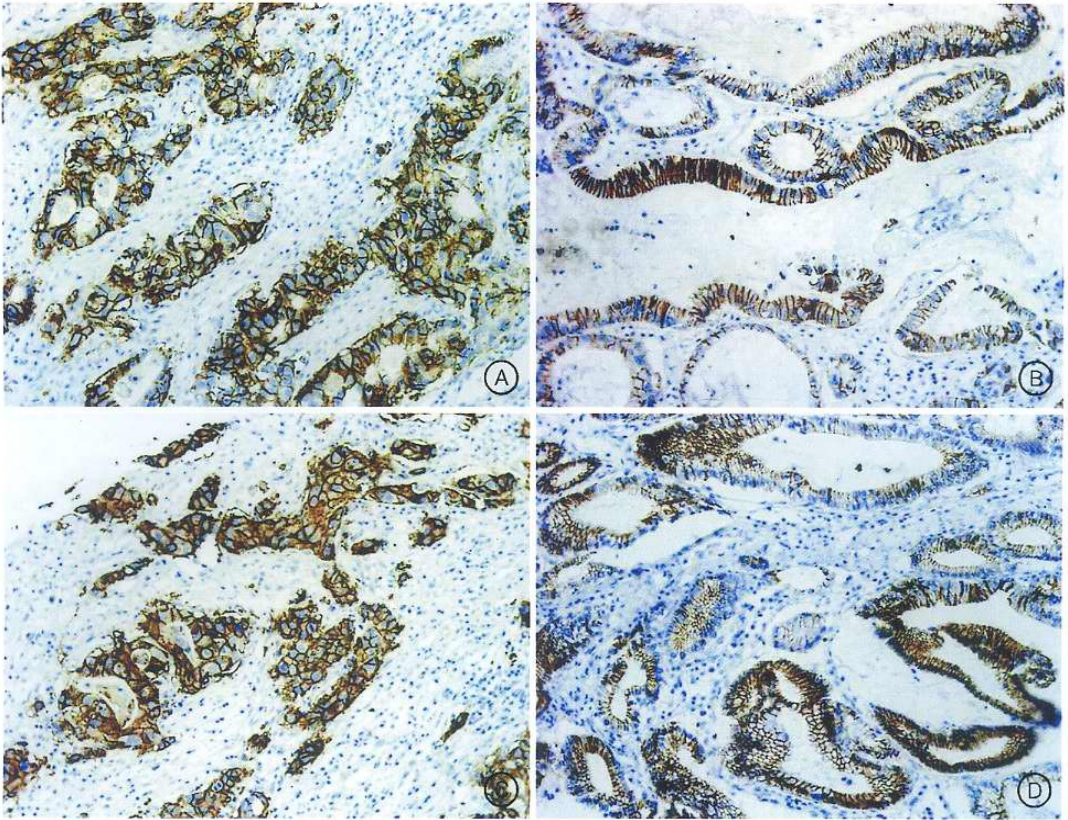


图1 上皮钙黏蛋白和 CD44v6 在青年和老年胃癌组织中的免疫组织化学显色,EnVision 法,×100

Fig 1 Immunohistochemistry results of E-cadherin and CD44v6 in two groups, EnVision, ×100

A: Expression of CD44v6 in the young group; B: Expression of CD44v6 in the old group;
C: Expression of E-cadherin in the young group; D: Expression of E-cadherin in the old group

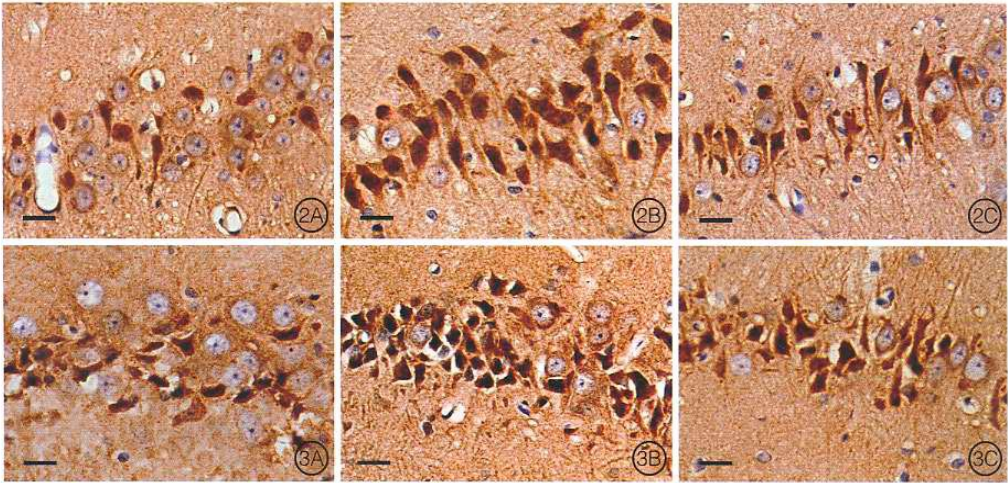


图2 大鼠海马 CA3 区 BACE 的表达,免疫组织化学显色,bar=20 μm。A: 对照组;B: 模型组;C: 治疗组。

图3 大鼠海马 CA3 区 PS-1 的表达,免疫组织化学显色,bar=20 μm。A: 对照组;B: 模型组;C: 治疗组。

Fig 2 BACE expression in hippocampal CA3, immunohistochemistry staining, bar=20 μm. A: Control; B: Model; C: Treatment.

Fig 3 PS-1 expression in hippocampal CA3, immunohistochemistry staining, bar=20 μm. A: Control; B: Model; C: Treatment.