

## • 基础研究 •

人参皂甙 Rd 对匹罗卡品致痫大鼠模型中  
netrin-1 表达及神经元凋亡的影响

郑佳丽, 杨金升, 刘学娟, 马亚杰

**摘要:**目的 探讨人参皂甙 Rd(GSRd)对大鼠癫痫持续状态后齿状回 netrin-1 表达及海马神经元凋亡的影响。方法 健康 Wistar 大鼠 30 只,随机分为颞叶癫痫组、GSRd 组和对照组,每组 10 只。氯化锂-匹罗卡品建立大鼠颞叶癫痫模型,采用免疫组织化学法及 TUNEL 法观察颞叶癫痫组、GSRd 组和对照组齿状回 netrin-1 蛋白表达及海马神经元凋亡细胞数情况。结果 与对照组比较,颞叶癫痫组大鼠 30 d 齿状回 netrin-1 蛋白表达明显增高,海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数在癫痫持续状态后 7 d 明显增高,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ );与颞叶癫痫组比较, GSRd 组大鼠 30 d 齿状回 netrin-1 蛋白表达明显降低,海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数在癫痫持续状态后 7 d 明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 GSRd 可能通过下调 netrin-1 的表达,并使神经元凋亡数目减少,从而发挥对神经元的保护作用。

**关键词:**人参皂甙类;癫痫;神经元;海马;细胞凋亡;氯化锂;模型;动物

Effects of ginsenoside-Rd on expression levels of netrin-1 and  
neuron apoptosis in epilepsy model

ZHENG Jia-li, YANG Jin-sheng, LIU Xue-juan, et al

(Second Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of ginsenoside-Rd(GSRd) on the expression levels of netrin-1 and neuron apoptosis in the rat hippocampus after lithium-pilocarpine induced epilepsy. **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into the NS control group, temporal lobe epilepsy(TLE) group and GSRd group. The TLE animal model was established using lithium-pilocarpine. Netrin-1 proteins were detected with immunohistochemical method. The neuron apoptosis was observed with TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL) method. **Results** The expression of netrin-1 in GSRd group was notably lower than that of TLE group ( $P < 0.05$ ). The TUNEL positive cells in hippocampus CA3 of TLE group were more than those of NS control group ( $P < 0.05$ ). TUNEL positive cells in TLE group were significantly more than those in NS control group ( $P < 0.05$ ). TUNEL positive cells in GSRd treated group significantly decreased as compared with TLE group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** GSRd may serve as an effective agent for curing the brain damage after TLE *in vivo*. The mechanism of protecting the neuron may include downregulating the expression of netrin-1 and reducing the number of apoptotic neurons.

**Key words:** ginsenosides; epilepsy; neurons; hippocampus; apoptosis; lithium chloride; models, animal

颞叶癫痫是常见的神经系统疾病之一,由于具有耐药性的特点,其发病机制和致痫机制仍然是现代研究的热点。氯化锂-匹罗卡品癫痫模型在神经

病理损害、持续自发反复发作、对抗癫痫药物耐药性等方面与人类颞叶癫痫均有相似性。人参皂甙 Rd (ginsenoside-Rd, GSRd) 是人参的主要药理活性成分。新近的研究表明, GSRd 在神经元可调节各种类型的离子通道,如抑制电压依赖性  $Ca^{2+}$  通道和  $Na^{+}$  通道的活性,抑制配体门控性离子通道如 N-甲基-D-天门冬氨酸受体,阻断  $Ca^{2+}$  内流,清除自由

DOI:10.3969/j.issn.1009-0126.2011.05.024

作者单位:730000 兰州大学第二临床医学院(郑佳丽,刘学娟,马亚杰);兰州军区兰州总医院神经内科(杨金升)

通讯作者:杨金升, E-mail: yangjinsh@163.com

基,抑制氧化应激的过程,从而发挥对神经组织的保护作用。本实验通过建立氯化锂-匹罗卡品颞叶癫痫大鼠模型,观察 GSRd 对颞叶癫痫大鼠齿状回 netrin-1 表达以及海马神经元凋亡的影响,探讨 GSRd 对颞叶癫痫后神经元凋亡的影响以及可能的神经元保护机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 健康 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,体重 200~250 g,由兰州大学实验动物中心提供。自由摄食、饮水,室内温度 22~24℃,相对湿度 70%,12 h/12 h 昼夜照明变化。采用随机数字表法将大鼠随机分为 3 组:颞叶癫痫组、GSRd 组和对照组,每组 10 只。各组又分为 7 d 和 30 d 2 个时间点,每个时间点 5 只。

**1.2 试剂** 氯化锂颗粒(购自美国 Sigma 公司),匹罗卡品(购自日本 Wako 公司),氢溴酸东莨菪碱注射液(购自上海禾丰制药有限公司)。netrin-1 兔多克隆抗体(购自北京博奥森生物技术有限公司),即用型 SABC 免疫组织化学染色试剂盒(购自北京中杉生物技术有限公司),TUNEL 凋亡检测试剂盒(购自 Promega 公司)。

**1.3 氯化锂-匹罗卡品癫痫模型制作** 大鼠腹腔注射氯化锂生理盐水溶液(130 mg/kg),18 h 后腹腔注射氢溴酸东莨菪碱(1 mg/kg),30 min 后腹腔注射匹罗卡品生理盐水溶液(30 mg/kg)。给药大鼠在 15~30 min 后出现反复强直-阵挛发作,形成癫痫持续状态(status epilepticus, SE)。癫痫发作强度按照 Racine 法分级。颞叶癫痫组和 GSRd 组大鼠均在 Racine IV 级以上。于 SE 30 min 腹腔注射 10%水合氯醛 300 mg/kg 终止发作。在经历 4~7 d 的静止期后出现自发性反复癫痫发作。

**1.4 给药方法及剂量** GSRd 注射液由广东泰禾生物药业有限公司提供(5 mg/支)。造模成功后, GSRd 组每日腹腔注射药物 1 次(2 mg/kg),对照组和颞叶癫痫组根据体重每天注射相应剂量的生理盐水,至相应时间点处死各组大鼠。

**1.5 标本采集和组织切片的制作** 分别于 SE 后 7 d 和 30 d 处死大鼠,用 10%水合氯醛(300 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,经左心室插管,剪开右心耳,依次灌注 0.9%生理盐水、4%多聚甲醛各 200 ml,断头取脑。冠状位切取视交叉后 1~4 mm 脑组织于 4%多聚甲醛溶液中固定 6~8 h,脱水、石蜡包埋后,用振荡切片机从视交叉处开始作冠状连续切片,片厚 4  $\mu$ m,其中每组 7 d 大鼠用于 TUNEL 染色,

30 d 大鼠用于免疫组织化学染色。

**1.6 netrin-1 免疫组织化学染色** 采用过氧化物酶标记的链霉卵白素法(SP 法)检测齿状回 netrin-1 蛋白的表达情况。石蜡切片脱蜡至水,放入 1%枸橼酸盐缓冲液,pH 6.0,高压锅中高温、高压热修复 2.5 min,3% $H_2O_2$  37℃孵育 10 min,10%山羊血清封闭,37℃孵育 15 min,倾去血清,勿洗,滴加 1:100 兔抗鼠 netrin-1 抗体,37℃孵育 3 h,滴加适量生物素标记山羊抗兔二抗工作液,37℃孵育 15 min;滴加适量的辣根酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育 15 min。除血清封闭外,其余步骤间均用 PBS 冲洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色剂显色 5~10 min;自来水冲洗,苏木精对比染色,梯度酒精至水,二甲苯透明,中性树胶封固;显微镜下观察细胞核中出现棕黄色颗粒者为 netrin-1 阳性细胞。阴性对照取 PBS 代替一抗,免疫反应阴性,说明一抗的特异性较强。每张切片随机选择 5 个不重叠视野( $\times 400$ )采集图像,应用 image-pro plus 6.0 图像分析软件测定每个视野的阳性细胞数,取平均值。

**1.7 TUNEL 染色** 按照 Promega 公司 TUNEL 试剂盒提供的实验步骤进行操作。用荧光显微镜检测凋亡细胞的绿色荧光。阴性对照采用不含 rTdT 酶的对照孵育缓冲液(去离子水:核苷混合物:平衡缓冲液=1:5:45)。每张切片选择阳性细胞最集中的 5 个高倍镜下视野,计算每个高倍视野的阳性细胞数,取平均值。

**1.8 统计学方法** 采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,用单向方差分析和  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 组大鼠齿状回 netrin-1 的表达** 对照组大鼠齿状回未见明显 netrin-1 阳性。与对照组比较,颞叶癫痫组大鼠 30 d 齿状回 netrin-1 蛋白表达明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与颞叶癫痫组比较,GSRd 组大鼠 30 d 齿状回 netrin-1 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,表 1,图 1~3)。

表 1 3 组大鼠海马 CA3 区凋亡细胞数及齿状回 netrin-1 阳性细胞数的比较( $\bar{x} \pm s$ , 个/视野)

组别	7 d	30 d
对照组	6.6 $\pm$ 1.0	3.5 $\pm$ 1.8
颞叶癫痫组	16.0 $\pm$ 2.1 <sup>a</sup>	62.3 $\pm$ 4.8 <sup>a</sup>
GSRd 组	7.7 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>	31.6 $\pm$ 4.7 <sup>b</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与颞叶癫痫组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$

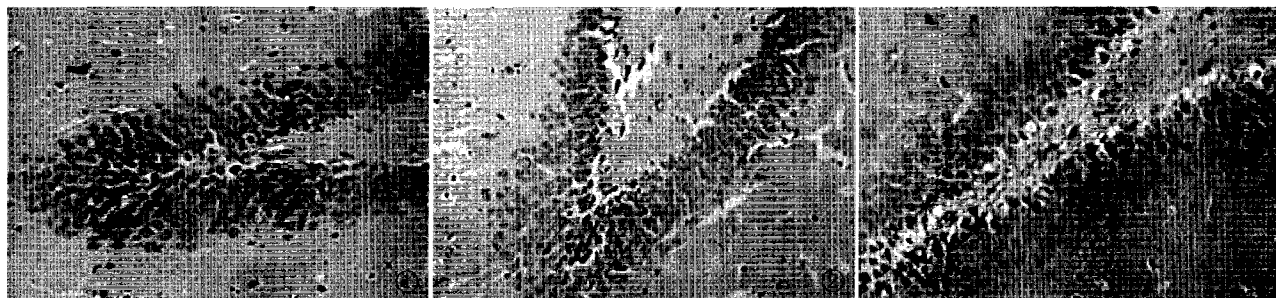


图 1~3 3 组大鼠齿状回 30 d netrin-1 蛋白表达 DAB  $\times 100$  图 1 对照组 图 2 颞叶癫痫组 图 3 GSRd 组

**2.2 3 组大鼠海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数的比较** 与对照组比较, 颞叶癫痫组大鼠海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数在 SE 后 7 d 明显增高 ( $P < 0.05$ ); 与颞叶癫痫组比较, GSRd 组大鼠海马 CA3 区 TUNEL 阳性细胞数在 SE 后 7 d 明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

### 3 讨论

Kennedy 及其同事于 1994 年发现 netrin-1, 后者在胚胎发育的中枢神经系统组织中高表达, 在成年动物中枢神经系统中仍有表达。在中枢神经系统发育阶段, netrin-1 与不同受体结合, 参与促进或抑制轴突生长, 对神经轴突的生长、突触形成以及神经轴突的靶向性生长起着重要的作用。缺乏 netrin-1 可导致胼胝体、前联合、海马联合等形成不能。在发育异常、肿瘤、自身免疫性疾病、帕金森病中都有 netrin-1 及其受体表达的改变<sup>[1-3]</sup>。有研究表明, netrin 家族成员在神经元迁移时也具有导向分子的作用。近年来研究发现, netrin-1 还具有抗凋亡的作用, 局部注射 netrin-1 对大脑中动脉闭塞导致的局部缺血动物模型有保护作用, 可能通过降低 P53 相关的细胞凋亡途径, 保护大脑中动脉闭塞后脑组织的作用<sup>[4]</sup>。

海马结构的苔藓纤维发芽和突触重组, 是导致癫痫患者脑电生理功能异常及癫痫反复自发性发作的根源。颞叶癫痫状态后 7 d, 海马齿状回颗粒细胞层可见 netrin-1 蛋白的表达增加, 并持续到癫痫状态后 28 d, 与海马出芽苔藓纤维以及突触重组一致<sup>[5]</sup>。这表明 netrin-1 激活可能有助于海马齿状回苔藓纤维轴突生长, 从而有利于颞叶癫痫的发生。

GSRd 是人参皂甙中的主要活性成分之一, 其提取成本较低, 能够大规模工业生产, 目前其制剂已进入 III 期临床研究。GSRd 可能是一种神经保护剂, 在中枢神经系统疾病, 如缺血性脑血管病、神经变性疾病中的治疗作用已有报道。其机制可能包括清除氧自由基、抑制脂质过氧化、稳定内源性抗氧化

酶的活性及保护线粒体功能等而发挥对细胞的保护作用<sup>[6]</sup>。本研究结果发现, GSRd 组干预后齿状回 netrin-1 蛋白表达明显减少, 同时细胞凋亡数目与颞叶癫痫组比较明显减少。

我们的前期研究发现, 颞叶癫痫组大鼠 30 d 可观察到苔藓纤维穿越海马齿状回颗粒细胞层到达内分子层, 表现为连续、浓密、呈层状分布的 Timms 染色颗粒带; 而 GSRd 干预组大鼠则见到少量的、不连续或斑片状的苔藓纤维穿过颗粒细胞层进入内分子层<sup>[7]</sup>。这提示 GSRd 可能通过使 netrin-1 蛋白的表达降低, 而抑制海马齿状回苔藓纤维轴突生长及突触形成, 从而减少反复自发性癫痫发作。但其在癫痫中的作用机制仍有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Mehlen P, Llambi F. Role of netrin-1 and netrin-1 dependent receptors in colorectal cancers. *Br J Cancer*, 2005, 93: 1-6.
- [2] Waage-Baudet H, Dunty WC Jr, Dehart DB, et al. Immunohistochemical and microarray analyses of a mouse model for the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Dev Neurosci*, 2005, 27: 378-396.
- [3] Moon C, Kim H, Ahn M, et al. Enhanced expression of netrin-1 protein in the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis; possible role of the netrin-1/DCC binding pathway in an autoimmune PNS disorder. *J Neuroimmunol*, 2006, 172: 66-72.
- [4] Wu TW, Li WW, Li H. Netrin-1 attenuates ischemic stroke-induced apoptosis. *Neuroscience*, 2008, 156: 475-482.
- [5] Lin H, Wu LW, Huang YG, et al. Correlation between hippocampal mossy fiber sprouting and synaptic reorganization and mechanisms of temporal lobe epilepsy. *Zhong Hua Yi Xue Za Zhi*, 2007, 87: 341-344.
- [6] Ye R, Han J, Kong X, et al. Protective effects of ginsenoside Rd on PC12 cells against hydrogen peroxide. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31: 1923-1927.
- [7] 张明磊, 杨金升, 范磊, 等. 人参皂甙 Rd 对慢性颞叶癫痫大鼠空间学习记忆能力的影响. *癫痫与神经电生理学杂志*, 2010, 19: 65-68.

(收稿日期: 2010-12-27)

(本文编辑: 马卫东)