

人参皂苷 Rg1 调控 Nrf2 在 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤后的抗氧化作用

边立功¹⁾, 钟莲梅²⁾, 艾青龙²⁾, 陈鑫月³⁾, 许文凯³⁾, 闫润淇³⁾, 邱进⁴⁾, 陆地^{1,5)}

(1) 昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 云南昆明 650500; 2) 第一附属医院神经内科, 云南昆明 650031; 3) 基础医学院; 4) 现代教育技术中心; 5) 生物医学工程研究中心, 云南昆明 650500)

[摘要] **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 在大鼠脑缺血再灌注损伤中的抗氧化作用及机制。 **方法** SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 120 只, 随机分为空白对照组、假手术组、模型组、不同浓度的 Rg1 治疗组。线栓法构建大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 缺血再灌注损伤模型, 各治疗组采用人参皂苷 Rg1 进行预处理, 假手术组仅分离血管而不闭塞。采用 Longa 标准进行神经行为学评分; Western blot 检测 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达情况; 比色法测定 SOD 和 MDA 含量变化。 **结果** 模型组大鼠行为学评分显著高于空白对照组, 不同浓度的 Rg1 治疗组评分明显低于模型组 ($P < 0.05$); 与空白对照组或假手术组相比, 模型组 Nrf2 和 HO-1 的表达有所增加, SOD 的含量显著降低, 而 MDA 的含量明显增加 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 各治疗组 Nrf2 和 HO-1 的表达、SOD 的含量均增加, 而 MDA 的含量则不同程度的减少 ($P < 0.05$)。 **结论** 人参皂苷 Rg1 上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达, 增加 SOD、降低 MDA 的含量, 改善 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤后行为学表现, 发挥保护作用。

[关键词] 人生皂苷 Rg1; 缺血再灌注损伤; 血红素加氧酶 1; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

[中图分类号] R743.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2018) 6-0035-04

The Anti-antioxidant Role of Ginsenoside Rg1 Regulating Nrf2 on Focal Cerebral Ischemia Reperfusion SD Rats

BIAN Li-gong¹⁾, ZHONG Lian-mei²⁾, AI Qing-long²⁾, CHEN Xin-yue³⁾, XU Wen-kai³⁾, YAN Run-qi³⁾,
QIU Jin⁴⁾, LU Di^{1, 5)}

(1) Dept. of Anatomy, Histology and Embryology; 2) Dept. of Neurology, First Affiliated Hospital; 3) Basic Medical College; 4) Dept. of Modern Education and Technology Center; 5) Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study antioxidant role and mechanism of Rg1 in rats with cerebral ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** One hundred and twenty healthy male rats were randomly divided into six groups: control group, sham operation group, model group, different concentration (30, 60, 90 mg/kg) of Rg1 treatment group. MCAO SD rats model was established by suture-occluded method; the Rg1 treatment groups were given Rg1 i.p. in advance, after 24 hours of reperfusion, neurobehavioral scores of all groups were examined by Longa's standard; The expression of Nrf2 and HO-1 were analyzed by western blot; The content of SOD and MDA was detected by kit. **Results** The score of model group rats are significantly higher than control group, compared with the model group, the score of different concentration of Rg1 treatment group was decreased ($P < 0.05$). The Nrf2 and HO-1 expression in model group was mildly higher than the control or sham group ($P < 0.05$). Both of them in every Rg1 treatment group was higher than model group. Compared with control or sham group, SOD content was observably depressed but MDA content was dramatically increased in model group, interestingly, SOD content

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81360200, 81460210, 81460350, 31760292); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目 (2013FB101, 2013FB120)

[作者简介] 边立功 (1981~), 男, 辽宁葫芦岛市人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事神经退行性疾病的研究工作。

[通信作者] 陆地. E-mail: ludi20040609@126.com; 邱进. E-mail: 983457822@qq.com

was enhanced, MDA content was attenuated in different concentration of Rg1 treatment group ($P < 0.05$).

Conclusion Rg1 increases Nrf2 and HO-1 protein expression and SOD content, reduces MDA content, improves neurofunctional performance of rats after MCAO, and alleviates cerebral cerebral IRI.

[**Key words**] Ginsenoside Rg1; Ischemia/Reperfusion injury; Heme oxygenase-1; Superoxide dismutase; Malondialdehyde

缺血性脑血管病是神经科常见的多发病,与心脏病、恶性肿瘤构成大多数国家三大最主要的致死疾病,正严重威胁人类健康与生存。脑缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)是指脑缺血在一定时间内恢复血液供应后,大脑功能不仅没有得到及时恢复,反而出现更加严重的脑神经功能障碍,其确切的损伤机制尚未明确,已证实有多种因素参与,包括兴奋性氨基酸的细胞毒性作用、能量衰竭、酸中毒、氧自由基损伤、钙离子超载、缺血半暗带功能障碍、一氧化氮和一氧化氮合成酶的作用、炎症细胞因子损害、凋亡调控基因的激活等^[1-2],其中,氧自由基损伤被认为是一个主要因素,活性氧簇(ROS)直接或间接地损伤细胞内蛋白质、核酸和脂质等大分子物质的生理功能^[3]。IRI后脑组织产生大量的自由基,对神经元具有损伤作用,因此,抑制脑缺血再灌注后氧化应激反应是防治脑缺血性损伤的重要手段之一。Nrf2是经典的调控机体抗氧化信号通路中的核转录因子,在抗氧化损伤中具有重要的作用^[4],Nrf2可以促进下游蛋白的表达,维持细胞内氧化还原环境的平衡^[5]。随着学者对人参皂苷及其单体药理作用研究的不断深入,人参皂苷 Rg1 是人参和三七的主要活性成分,是从人参属植物中分离提取出的 50 多种单体成分之一,对脑缺血的保护作用受到广泛的关注^[6]。因此,本研究通过检测人参皂苷 Rg1 在 SD 大鼠脑缺血再灌注损伤后对 Nrf2/HO-1 信号通路及其下游 SOD 和 MDA 含量的调控作用,阐明 Rg1 调控 Nrf2 信号通路在脑缺血中的抗氧化作用。

1 材料与方法

1.1 试剂和抗体

人参皂苷 Rg1 (购自昆药集团股份有限公司),水合氯醛,多聚甲醛,蔗糖, Nrf2 和 HO-1 一抗, β -actin 一抗, SOD 和 MDA 检测试剂盒(南京建成, A001-1-1&A003-1), ECL 发光液。

1.2 动物与实验分组

SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠 120 只、体重 200 ~ 250 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK (湘) 2016-0002。随机分为空白对照组, 假手术组, 模型组, 高、中、低剂量 Rg1 治疗组, 每组 20 只。模型组采用线栓法构建大鼠大脑中动脉栓塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)脑缺血再灌注损伤模型^[7], 线栓闭塞颈内动脉 2 h 后拔除, 再灌注 24 h, 治疗组提前给予 Rg1 腹腔注射, 假手术组仅分离血管而不闭塞大脑中动脉, 空白对照组不做任何处理。

1.3 神经功能评分

采用 Longa 评分标准^[8]进行神经行为学评分, 0 分: 无神经损伤症状; 1 分: 轻度损伤, 提尾时右侧前肢不能完全伸直; 2 分: 中度损伤, 向左侧转圈; 3 分: 中度到重度损伤, 向右侧跌倒; 4 分: 重度损伤, 不能自发行走意识丧失。

1.4 Western blot 蛋白测定

将大鼠麻醉后采用灌注取脑后, 提取总蛋白并进行定量, SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳, GE AI600 超灵敏多功能成像仪中显影, 图片采用 Gel-Pro analyzer 软件进行灰度分析。以 β -actin 为内参照, 以目的条带 Nrf2、HO-1 的积分光密度值(integrated optical density, IOD)值与 β -actin 条带的 IOD 值的比值作为该蛋白的相对表达量。

1.5 脑组织 SOD 和 MDA 含量测定

将大鼠麻醉, 取出脑组织, 称重, 用生理盐水制成 10% 的组织匀浆, 离心, 取上清液, 用南京建成试剂盒测定 SOD 和 MDA 的含量变化。

1.6 统计学处理

应用 SPSS 统计软件进行分析, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 降低大鼠脑缺血再灌注后神经功能评分

空白对照组和假手术组大鼠未出现神经功能缺

损症状; 模型组大鼠左前肢肌张力明显下降, 爬行时向右侧转圈, 最高可达 3 分, 神经功能评分显著增高 ($P<0.05$); 不同浓度的人参皂苷 Rg1 治疗组神经功能缺损症状明显改善, 神经功能评分均有降低, 以 60 mg/kg 治疗组最为明显 (见表 1), 提示人参皂苷 Rg1 可明显改善大鼠脑缺血再灌注后神经功能, 具有神经保护作用.

2.2 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达

与空白对照组或假手术组相比, 模型组 Nrf2 蛋白的表达略有增加; 不同浓度的人参皂苷 Rg1 治疗组, Nrf2 的蛋白表达均明显高于模型组 (见图 1), 以 60 mg/kg 治疗组最为显著 ($P<0.05$). 与空白对照组和假手术组相比, 模型组 HO-1 蛋白的表达明显增加, 各 Rg1 治疗组, HO-1 的蛋白表达上调更为明显 (见图 1), 以 60 mg/kg 治疗组最为显著 ($P<0.05$).

2.3 脑组织中 SOD 与 MDA 的含量变化

空白对照组和假手术组的 SOD 和 MDA 含量无显著性差异; 与空白对照组或假手术组比较, 模型组 SOD 含量 (483.02 ± 10.89) 显著减少, MDA 含量 (24.26 ± 3.50) 显著增多 ($P<0.05$); 与模型组比较, 各 Rg1 治疗组 SOD 含量显著增多, MDA 含量则明显降低, 均以 60 mg/kg 治疗组最为显著, 见表 2.

表 1 人参皂苷 Rg1 改善大鼠脑缺血再灌注损伤后的神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The ginsenoside Rg1 improve neural function after cerebral ischemic-reperfusion injury in SD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	评分
空白对照组	20	0
假手术组	20	0
模型组	20	$2.90 \pm 0.55^*$
Rg1 30 mg/kg 治疗组	20	1.80 ± 0.77
Rg1 60 mg/kg 治疗组	20	$1.55 \pm 0.51^{\#}$
Rg1 90 mg/kg 治疗组	20	$1.65 \pm 0.67^{\#}$

与空白对照组或假手术组比较, $*P<0.05$; 与模型组比较, $^{\#}P<0.05$.

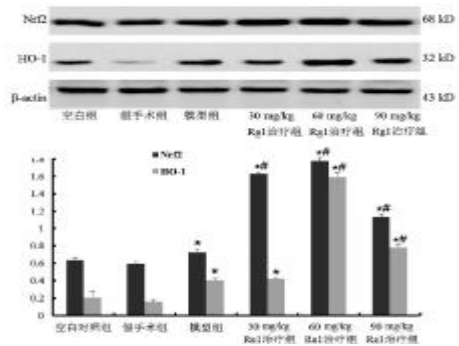


图 1 Western blot 测定 Nrf2 和 HO-1 蛋白含量
Fig. 1 Expression of Nrf2 and HO-1 in different groups by western blot

与空白对照组或假手术组比较, $*P<0.05$; 与模型组比较, $^{\#}P<0.05$.

表 2 各组大鼠脑组织中 SOD、MDA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The change of SOD and MDA in brain of different SD rats groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD(U/mg)	MDA(nmol/m)
空白对照组	20	582.16 ± 9.51	16.37 ± 1.94
假手术组	20	584.35 ± 11.72	15.42 ± 2.66
模型组	20	$483.02 \pm 10.89^*$	$24.26 \pm 3.50^*$
Rg1 30 mg/kg 治疗组	20	$529.57 \pm 12.19^{\#}$	22.25 ± 2.56
Rg1 60 mg/kg 治疗组	20	$543.42 \pm 15.34^{\#}$	$18.33 \pm 2.38^{\#}$
Rg1 90 mg/kg 治疗组	20	$539.24 \pm 19.36^{\#}$	$19.86 \pm 2.98^{\#}$

与空白对照组或假手术组比较, $*P<0.05$; 与模型组比较, $^{\#}P<0.05$.

3 讨论

人参作为药用的历史已有几千年, 具有抗氧化、抗衰老、减轻神经功能损伤的作用^[8]. 云南文山所产三七习称“文三七”、“田七”, 为著名药材, 其活性成分人参皂苷 Rg1 能抑制细胞内 Ca^{2+} 超载, 减少星形胶质细胞的活性氧产生^[9], 脑组织的氧化应激水平与缺血性脑卒中的发生、发展及

转归密切相关^[10-11], 在缺血再灌注损伤中扮演非常重要的角色^[12]. MDA 作为不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应产生的代谢产物, 是脂质过氧化反应的终产物之一, 反映脑组织中脂质过氧化程度, 与 ROS 一样, 脑组织中 MDA 浓度升高, 表明脂质过氧化作用增强. SOD 是氧自由基的清除剂, 组织内 SOD 活性的高低可部分反映机体清除自由基的能力, 其活性可代表抗脂质过氧化的水平, 间

接反映细胞损伤的程度^[3],脑缺血再灌注时,新生成的氧自由基和存留的氧自由基进一步发生脂质过氧化,从而加重脑组织进一步损伤^[14]。

脑缺血再灌注时,氧自由基可通过激活炎症因子,促进趋化因子释放,引起白细胞向内皮细胞移动、黏附。聚集的细胞可释放氧自由基和溶蛋白酶等,造成组织细胞坏死。同时,中性粒细胞在微血管内的聚集,可释放细胞因子和炎症介质,进而导致更多的中性粒细胞聚集和浸润,从而加重炎症反应。大量研究表明,过度的炎症反应是缺血再灌注损伤的重要机制之一,干预炎症反应能够减轻脑缺血再灌注损伤^[14]。

Keap1/Nrf2/ARE 信号通路在抗炎和抗氧化应激损伤中发挥着重要的作用^[15]。在生理状态下,Nrf2 与肌动蛋白结合蛋白(Keap1)结合,锚定于胞质中,不能进入细胞核发挥转录活性。当受到氧化应激时,Nrf2 与 Keap1 解离进入细胞核,与抗氧化反应组件(ARE)结合,启动下游抗氧化基因和血红素氧合酶-1(HO-1)的转录,提高细胞的抗氧化能力。大鼠脑缺血再灌注后,损伤区 Nrf2 蛋白表达迅速上调,HO-1 蛋白的表达在再灌注后 48 h 达高峰,在 72 h 下降。急性期 Nrf2 和 HO-1 表达的增加,可减少氧化应激损伤,是一种保护性应激反应,但反应持续时间很短。脑缺血后,上调 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达,可明显改善神经功能,减小脑梗死面积,减轻脑水肿^[16]。本研究中发现:较空白对照组或假手术组相比,模型组中 Nrf-2 和 HO-1 蛋白的表达均有所增加;不同浓度的人参皂苷 Rg1 治疗组较模型组相比 Nrf2 和 HO-1 均有不同程度地增加,同时发现 SOD 的含量也明显增加,而 MDA 的含量显著降低。综上所述,本研究结果提示人参皂苷 Rg1 可能通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路,促进氧自由基清除,抑制脂质过氧化反应,减少氧化应激损伤,但是其具体的机制和确切的作用靶点,尚需进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 崔海月,王庆国.缺血性脑血管病发病机制的新进展[J].长春中医药大学学报,2009,25(2):291-292.
[2] 彭智远,刘旺华,曹雯.脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制的研究进展[J].中华中医药学刊,2017,35(8):1957-1961.
[3] RODRIGO J,FERNANDEZ AP,SERRANO J. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia[J]. Free Radic Biol Med,2005,39(1):26-50.

[4] 黄小平,邓常清,邱咏园,等.黄芪甲苷和三七的三种有效成分伍伍对小鼠脑缺血/再灌注后氧化应激和 Nrf2/HO-1 途径的影响[J].中国药理学通报,2013,29(11):1596-1601.
[5] 吴露,黄小平,邓常清,等.人参皂苷 Rg1 对小鼠脑缺血再灌注组织伤及 Nrf2/HO-1 途径的影响[J].中国病理生理杂志,2013,29(11):2066-2071.
[6] 鲁婵婵,戴彦成,王蓓,等.人参皂苷对脑缺血保护作用的研究进展[J].上海医药,2015,36(3):69-71,75.
[7] LONGA EZ,WEINSTEIN PR,CARLSON S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke,1989,20(1):84-91.
[8] 胡文涛,闫秋月,方瑜,等.人参皂苷 Rg1 参与诱导小鼠多潜能干细胞的研究[J].神经损伤与功能重建,,2014,9(3):184-186.
[9] SUN C,LAI X,HUANG X,et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 on astrocytes and cerebral ischemic-reperfusion mice [J]. Biol Pharm Bull,2014,37 (12):1891-1898.
[10] AMARO S,LLULL L,RENU A,et al. Uric acid improves glucose-driven oxidative stress in human is chemic stroke [J]. Ann Neurol,2015,77(5):775-783.
[11] ZHANG T Z,ZHOU J,JIN Q,et al. Protective effects of remifentanyl preconditioning on cerebral injury during pump-assisted coronary artery bypass graft[J]. Genet Mol Res,2014,13(3):7658-7665.
[12] LIU B,QIAN J M. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury[J]. Int J Clin Exp Med,2015,8(11):19867-19873.
[13] SHEN M,FAN D,ZANG Y,et al. Neuroprotective effects of methane-rich saline on experimental acute carbon monoxide toxicity[J]. J Neurol Sci,2016,369:361-367.
[14] CHEN S H,LIN M T,CHANG C P. Ischemic and oxidative damage to the hypothalamus may be responsible for heat stroke[J]. Curr Neuropharmacol,2013,11(2):129-140.
[15] CHOUCRY M A,KHALIL M N A,EIAEDAN S A. Protective action of Crateva nurvala Buch. Ham extracts against renal ischaemia reperfusion injury in rats via antioxidant and anti-inflammatory activities [J]. J Ethnopharmacol,2017,214:47-57.
[16] 黄娟,廖君,彭熙炜,等.脑泰方对脑缺血/再灌注大鼠海马区 Nrf2、HO-1 和膜铁转运辅助蛋白表达的影响[J].中国药理学通报,2017,33(10):1467-1472.