



人参皂苷 R_g 对大鼠脑片 AD 模型磷酸化 Tau 蛋白及 NMDA 受体亚单位 NR1, NR2B 表达的影响

李玺^{1*}, 刘颖¹, 张欣¹, 袁海峰¹, 权乾坤²

(1. 西安交通大学医学院第二附属医院, 陕西 西安 710004;

2. 西安交通大学生命科学与技术学院 康复科学与技术研究中心, 陕西 西安 710049)

[摘要] 目的: 观察人参皂苷 R_g 对大鼠脑片 AD 模型磷酸化 Tau 蛋白 (Phosphory protein Tau, P-Tau) 及 N 甲基-D 门冬氨酸受体亚单位 1 (N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1, NR1)、亚单位 2B (N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B, NR2B) 的表达影响。方法: 将 5 周龄雄性 Wistar 大鼠脑片 (含皮层和海马) 随机分为 5 组: 空白对照组、模型组和低、中、高剂量人参皂苷 R_g 组, 每组 10 张脑片, 脑片放置盛有人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF) 的 6 孔板中培养, 温度 (32.0±0.5) °C, 整个过程 ACSF 中持续通入混合氧气 (95% O₂ + 5% CO₂)。人参皂苷 R_g 各组 ACSF 中首先加入人参皂苷 R_g (60, 120, 240 μmol·L⁻¹) 作用 2 h, 然后模型组和人参皂苷 R_g 各组 ACSF 中分别加入冈田酸 (okadaic acid, OA) 1 μmol·L⁻¹ 作用 3 h, 空白对照组不加任何处理因素。采用免疫组织化学、图像分析技术等方法, 检测皮层和海马 P-Tau, NR1, NR2B 表达水平。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠脑片 P-Tau 的表达增加 (P<0.05 或 P<0.01), NR1, NR2B 的表达降低 (P<0.01); 人参皂苷 R_g 各组与模型组比较, 大鼠脑片 P-Tau 的表达降低 (P<0.01 或 P<0.05), NR1, NR2B 的表达增加 (P<0.01 或 P<0.05), 其中以高剂量人参皂苷 R_g 组效果最佳。结论: 人参皂苷 R_g 可以降低大鼠脑片 AD 模型 P-Tau 表达水平, 并能上调学习记忆相关蛋白 NR1, NR2B 的表达, 以此途径发挥抗痴呆作用。

[关键词] 人参皂苷 R_g; 阿尔茨海默病; 磷酸化 Tau 蛋白; N 甲基-D 门冬氨酸受体亚单位 1; N 甲基-D 门冬氨酸受体亚单位 2B; 大鼠

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的核心病理改变之一是脑内出现大量神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT), 其产生原因是 Tau 蛋白 (protein Tau) 过度磷酸化致使微管正常功能丧失所致^[1]。NFT 的数目与 AD 病人的痴呆程度密切相关^[2,3]。AD 的一个重要临床表现是记忆力明显减退, 尤其近期记忆减退常为首发症状, 研究表明 N-甲基-D 门冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDR) 与学习记忆能力密切相关, 是突触可塑性及皮质和海马神经元长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP) 的主要调控者^[4]。《神农本草经》中记载人参具有“开心益智”的功效, 近年来在人参抗衰老、促进学习记忆方面的研究受到了人们的广泛关注, 人参皂苷 R_g 是人参促智作用的主要

有效成分之一, 有增强记忆和认知功能的作用^[5], 已成为研究中药抗痴呆的热点之一。本实验采用人参皂苷 R_g 对 AD 大鼠脑片模型进行干预, 观察其对磷酸化 Tau 蛋白 (Phosphory protein Tau, P-Tau), NMDA 受体亚单位 1 (N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1, NR1)、亚单位 2B (N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B, NR2B) 表达的影响, 旨在阐明人参皂苷 R_g 抗痴呆的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Wistar 大鼠 10 只, 清洁级, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供, 鼠龄 5 周。体重 110~130 g, 合格证号 SCXK (陕) 2007-001。

1.2 药物与试剂 人参皂苷 R_g 购自吉林宏久生物科技股份有限公司, 纯度 98.99%, 用前溶于双蒸水, 0.25 μm 双层超滤膜过滤。冈田酸 (okadaic acid, OA) 购自美国 ALEXIS 生物制剂公司, 纯度 98%, 用前溶于 10% 的二甲基亚砜, 配制成 1 g·L⁻¹ 溶液待用。P-Tau (pSer202), NR1, NR2B 兔抗鼠多克隆抗体及免疫组织化学试剂盒 (SABC) 购自武

[稿件编号] 20100419001

[基金项目] 陕西省科技发展攻关项目 [2007K15-05(3)]; 陕西省中医药管理局基金项目 (2005030)

[通信作者] * 李玺, Tel: (029) 87679354, E-mail: lix2100@sohu.com



汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 ZQP-86 振动切片机 (上海之信仪器有限公司); BH22 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); HM500 冰冻切片机 (德国 Microm 公司); Qwin550CW 图象处理与分析系统 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备^[6]、分组及干预 在 6% 水合氯醛麻醉下切开大鼠头皮, 暴露颅骨, 迅速断头, 取脑, 置于 0~4℃ 的人工脑脊液 (artificial cerebrospinal fluid ACSF) 冰水混合物中, 洗净血液并降温后, 用振动切片机以振幅 8 档, 速度 3 档行冠状切片, 所切脑片含皮层和海马, 平均厚度 400 μm。挑选形态较好的脑片置入盛有 ACSF 的 6 孔板中培养, 温度 (32.0±0.5)℃, 整个过程 ACSF 中持续通入混合氧气 (95% O₂ + 5% CO₂)。ACSF 成分 (mmol·L⁻¹) (NaCl 150, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 0.5, K₂HPO₄ 1.5, glucose 10, pH 7.4)。每只鼠取脑片 5 张, 随机分为 5 组: 对照组, 模型组, 人参皂苷 R_g 低、中、高剂量组, 每组 10 张脑片。脑片不做任何处理培养于 ACSF 中 1 h 后, 3 个人参皂苷 R_g 组 ACSF 中首先加入人参皂苷 R_g 致使其浓度分别为 60、120、240 μmol·L⁻¹, 预处理 2 h 后, 模型组和人参皂苷 R_g 各组 ACSF 中分别加入 OA, 使其浓度为 1 μmol·L⁻¹, 作用 3 h 对照组不加任何处理因素。

2.2 大鼠脑片 AD 模型 P-Tau, NR1, NR2B 的检测

从 ACSF 中取出脑片, 用 4% 多聚甲醛固定 4 h 取出, 转入 30% 蔗糖溶液浸泡至沉底, 做冰冻切片, 切片 10 μm 厚, 每张切片含皮层、海马、齿状回。采用免疫组织化学染色法 (SABC 法) 分别检测各组脑片皮层和海马 P-Tau (pSer 202), NR1, NR2B 的阳性表达情况, P-Tau (pSer 202), NR1, NR2B 一抗的浓度分别为 1:100, 1:100, 1:150, 染色步骤按说明书进行, PBS 代替一抗作阴性对照。采用图象处理与分析系统对阳性表达进行灰度分析, 每张切片同一区域中, 随机选取 4 个视野, 检测面积相同, 取其平均值作为该切片目标区域的平均灰度值, 灰度值越低, 阳性表达量越高, 反之灰度值越高, 阳性表达量越低。

2.3 统计学处理 使用 SPSS 11.0 统计软件处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方差齐性检验采用 levene 检验, 正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验。多组均数间比较采用单因素方差分析, 两两均数间比较采用 LSD-t 检验。P<0.05 具有统计学意义。

3 结果

3.1 OA 对大鼠脑片 P-Tau, NR1, NR2B 表达的影响 与对照组比较, 模型组皮层和海马内 P-Tau 的表达明显增加 (P<0.05 或 P<0.01), NR1, NR2B 的表达明显减少 (P<0.01), 见表 1~3, 图 1。

表 1 人参皂苷 R_g 对大鼠脑片 AD 模型 P-Tau 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ n=10)

分组	浓度 / μmol·L ⁻¹	CA1	CA3	DG	皮层
对照	—	156.03±1.14	154.84±1.08	154.87±1.11	154.27±1.37
模型	—	144.00±3.06 ²⁾	153.17±2.05 ¹⁾	144.55±3.09 ²⁾	131.15±4.24 ²⁾
人参皂苷 R _g	60	146.34±2.35 ^{3, 6, 8)}	155.34±1.50 ³⁾	147.06±1.88 ^{3, 6, 7)}	132.14±3.62 ^{6, 7)}
	120	149.69±2.49 ^{4, 6)}	155.27±2.36 ³⁾	149.48±2.07 ^{4, 5)}	135.39±1.94 ^{4, 6)}
	240	152.69±2.83 ⁴⁾	154.80±1.93	151.73±2.38 ⁴⁾	142.45±2.79 ⁴⁾

注: 与对照组相比¹⁾ P<0.05, ²⁾ P<0.01; 与模型组相比³⁾ P<0.05, ⁴⁾ P<0.01; 与高剂量人参皂苷 R_g 组相比⁵⁾ P<0.05, ⁶⁾ P<0.01; 与中剂量人参皂苷 R_g 组相比⁷⁾ P<0.01, ⁸⁾ P<0.01。

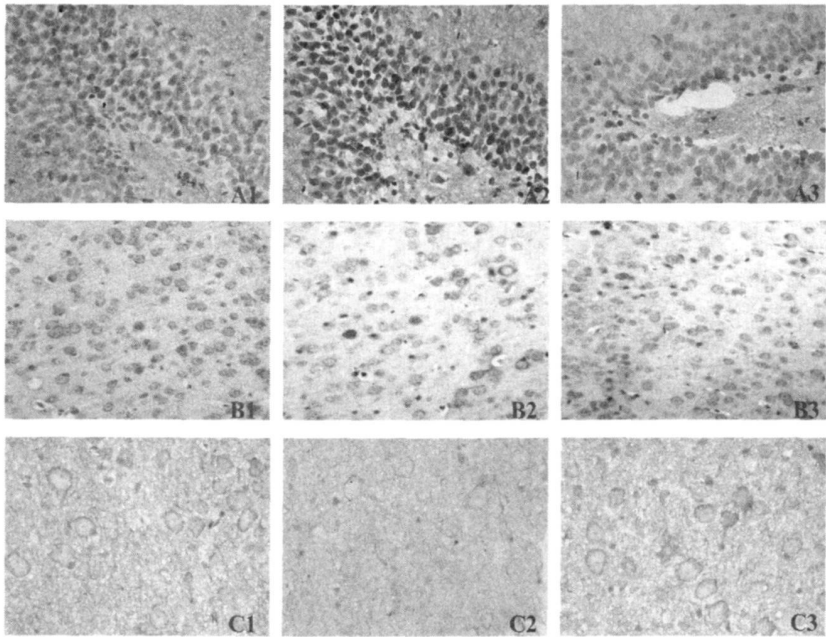
表 2 人参皂苷 R_g 对大鼠脑片 AD 模型 NR1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$ n=10)

分组	浓度 / μmol·L ⁻¹	CA1	CA3	DG	皮层
对照	—	136.07±1.07	115.04±1.62	118.15±1.08	111.91±0.61
模型	—	143.10±1.06 ¹⁾	117.13±1.40 ¹⁾	120.17±1.09 ¹⁾	121.53±2.09 ¹⁾
人参皂苷 R _g	60	138.26±0.35 ³⁾	142.11±0.71 ^{2, 5, 6)}	137.66±0.44 ^{2, 4)}	141.60±0.70 ^{3, 4)}
	120	137.93±0.56 ³⁾	139.14±0.59 ^{3, 5)}	137.04±0.84 ³⁾	140.75±1.36 ³⁾
	240	136.51±0.69 ³⁾	138.22±0.51 ³⁾	135.76±0.81 ³⁾	138.19±0.69 ³⁾

注: 与对照组相比¹⁾ P<0.01; 与模型组相比²⁾ P<0.05, ³⁾ P<0.01; 与高剂量人参皂苷 R_g 组相比⁴⁾ P<0.05, ⁵⁾ P<0.01; 与中剂量人参皂苷 R_g 组相比⁶⁾ P<0.01 (表 3 同)。

表 3 人参皂苷 R_g对大鼠脑片 AD 模型 NR2B 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$ n=10)

分组	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CA1	CA3	DG	皮层
对照	—	116.29 \pm 1.04	115.04 \pm 1.62	118.15 \pm 1.08	111.91 \pm 0.61
模型	—	123.81 \pm 1.29 ¹⁾	117.13 \pm 1.40 ¹⁾	120.17 \pm 1.09 ¹⁾	121.53 \pm 2.09 ¹⁾
人参皂苷 R _g	60	122.35 \pm 1.15 ^{3 5 6)}	118.58 \pm 1.24 ²⁾	120.48 \pm 1.19 ^{5 6)}	120.05 \pm 2.04 ^{2 5)}
	120	120.47 \pm 1.16 ^{3 4)}	116.97 \pm 1.08 ⁴⁾	118.78 \pm 2.25 ²⁾	119.05 \pm 0.98 ^{3 5)}
	240	119.31 \pm 1.10 ³⁾	117.77 \pm 1.02 ²⁾	118.20 \pm 0.58 ³⁾	115.68 \pm 1.67 ³⁾



A·齿状回 P-Tau 的表达; B·皮层 NR1 的表达; C·皮层 NR2B 的表达; 1. 对照组; 2. 模型组; 3. 高剂量人参皂苷 R_g 组。
图 1 各组大鼠脑片 P-Tau, NR1, NR2B 的表达 (SABC, $\times 400$)

3.2 人参皂苷 R_g对大鼠脑片 AD 模型 P-Tau, NR1, NR2B 表达的影响 与模型组比较, 人参皂苷 R_g 各组脑片内 P-Tau 表达均有不同程度的减少 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), NR1, NR2B 的表达均有不同程度的增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 3 个人参皂苷 R_g 组之间比较存在显著性差异 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 高、中剂量组优于低剂量组。见表 1~3 图 1。

4 讨论

神经纤维缠结 (neuro fibrillary tangle NFT) 是 AD 患者脑内核心病理改变之一, 其产生的原因是脑内 Tau 蛋白的异常过度磷酸化。Tau 是神经元主要微管相关蛋白, 参与了微管的组成并对其有稳定作用。Tau 过度磷酸化后, 与管蛋白竞争结合正常 Tau, 抑制微管的聚集, 则其促进微管组装和稳定微管的生物活性就会丧失, 从而导致细胞骨架的结构异常, 形成神经纤维缠结^[1]。目前已发现 Tau 有 21

个过度磷酸化位点, 其中包括 Ser202 位点^[1]。OA 是蛋白磷酸酶的高效选择性抑制剂^[7], 大鼠脑内注射 OA 可以诱导 Tau 蛋白在 Ser198/Ser199/Ser202, Ser396/Ser404 位点发生磷酸化, 并可导致大鼠空间记忆障碍^[8]。本实验以 OA 诱导大鼠脑片 Tau 过度磷酸化, 制备 AD 模型, 免疫组化染色结果可见模型组大鼠脑内 P-Tau 的表达较对照组增加 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 此表明 OA 可以导致大鼠脑片 Tau 过度磷酸化, 成功制备 AD 模型; 采用人参皂苷 R_g 预处理后, 与模型组比较, 人参皂苷 R_g 各组 P-Tau 的表达明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 并以高剂量组效果最佳, 这表明人参皂苷 R_g 能有效预防 OA 所致大鼠脑片 Tau 蛋白过度磷酸化, 从而可以减少 NFT 的形成。

N 甲基-D 门冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartate receptor, NMDAR) 是离子型谷氨酸受体, 突触前神



经终末兴奋释放谷氨酸,与突触后膜的谷氨酸受体(主要 NMDAR)结合使离子通道打开, Ca^{2+} 内流入突触后膜,从而触发 LTP 的形成,构成了中枢神经系统的重要功能如学习和记忆的基础^[4]。目前已发现 NMDAR 至少存在 7 个亚单位,即 NR1 亚单位、4 种 NR2 亚单位(NR2A, NR2B, NR2C 和 NR2D)以及 2 种 NR3 亚单位(NR3A 和 NR3B)^[9]。

NR1 由 938 个氨基酸残基组成,相对分子质量约为 105×10^3 kD,广泛分布于中枢神经系统,以海马、大脑皮质、小脑最丰富^[10]。研究表明正常大鼠的新事物探究能力和空间学习能力与其脑内海马 NR1 的表达水平密切相关^[11],另外 NR1 基因缺失也可导致新事物探究能力下降,空间学习记忆障碍和非空间学习记忆障碍^[12-13]。NR2B 为由 1 456 个氨基酸组成的跨膜糖蛋白,相对分子质量约为 180 kD,其第 589 位天冬氨酸残基决定着 NMDA 离子通道受体对 Ca^{2+} 的通透性^[14]。NR2 的 4 个亚单位中以 NR2B 亚单位相对集中,主要分布在前脑区域^[15],其在脑内按数量分布依次为皮质、嗅球、海马、纹状体等^[16]。研究发现敲除 NR2B 基因后小鼠记忆能力下降;而移植转染 NR2B 基因细胞可使大鼠记忆能力明显增高,Bliss T V 发表文章将 NR2B 命名为“聪明基因”,并提出该基因就是记忆基因的新论点^[17]。本实验将 OA 加入培养大鼠脑片的 ACSF 中,结果发现,与对照组比,模型组 NR1、NR2B 表达量下降,具有显著差异 ($P < 0.01$),这说明 OA 可能具有抑制 NR1、NR2B 表达的作用;在 ACSF 中首先加入人参皂苷 Rg 预处理 2 h 然后再加入 OA,结果发现,人参皂苷 Rg 各组脑片 NR1、NR2B 的表达较模型组显著提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),这说明人参皂苷 Rg 可以对抗 OA 对 NR1、NR2B 的抑制作用,可以上调 NR1、NR2B 的表达;人参皂苷 Rg 3 个剂量组之间比较差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),NR1、NR2B 的表达随剂量的增加而增加,人参皂苷 Rg 药效作用呈一定的量效关系。

综上所述,人参皂苷 Rg 可以降低大鼠脑片 AD 模型 P-Tau 的表达水平,从而可以减缓神经纤维缠结的形成;还可以上调学习记忆相关蛋白 NR1、NR2B 的表达,从而可以促进学习记忆能力,以此 2 个途径发挥抗痴呆作用。

[参考文献]

[1] 盛树力.老年性痴呆:从分子生物学到临床诊治[M].北京:

科学技术文献出版社,1998: 207.

- [2] Arriagada P V, Growdon JH, Hedley-Whyte E T, et al. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 1992, 42 (3/1): 631.
- [3] Giannakopoulos P, Hermann FR, Bussiere T, et al. Tangle and neuron numbers but not amyloid load predict cognitive status in Alzheimer's disease[J]. *Neurology*, 2003, 60(9): 1495.
- [4] 周越菡. NMDA 受体 NR2B 亚单位拮抗剂与神经系统退行性疾病[J]. 中山大学研究生学刊: 自然科学与医学版, 2008, 29(3): 19.
- [5] 张均田. 人参皂苷 Rg 的促智作用机制——对神经可塑性和神经发生的影响[J]. *药学报*, 2005, 40(5): 385.
- [6] Gong C X, Lidsky T, Wegiel J, et al. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain[J]. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2001, 6(3): 134.
- [7] Cohen P, Holmes C F, Tsukitani Y, Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation[J]. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15(3): 98.
- [8] 田青, 张蕲, 王群, 等. OA 诱导大鼠基底核 Ach 降低及 τ 蛋白过度磷酸化[J]. *华中科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(12): 94.
- [9] Vicini S, Wang J F, Li J H, et al. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors[J]. *J Neurophysiol*, 1998, 79(2): 555.
- [10] 陈松芳, 黄汉津, 王小同. NMDA 受体 NR1 亚单位与学习记忆[J]. *中国行为医学科学*, 2006, 15(1): 91.
- [11] 徐淑君, 沈海清, 陈忠, 等. 大鼠海马 NMN 受体 NR1 亚单位蛋白的基础表达量与学习记忆相关[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2003, 32(6): 465.
- [12] Rampon C, Tang Y P, Goodhouse J, et al. Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice[J]. *Nat Neurosci*, 2000, 3(3): 238.
- [13] Tsien J Z, Huerta P T, Tonegawa S. The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory[J]. *Cell*, 1996, 87(7): 1327.
- [14] Chung H J, Huang Y H, Lau L F, et al. Regulation of NMDA receptor complex and trafficking by activity-dependent phosphorylation of the NR2B subunit PDZ ligand[J]. *Neuroscience*, 2004, 24(45): 10248.
- [15] LoGrasso P, Mckelvy J. Advances in pain therapeutics[J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2003, 7(4): 452.
- [16] Goebel D J, Poosch M S. NMDA receptor subunit gene expression in the rat brain: a quantitative analysis of endogenous RNA levels of NR1C α , NR2A, NR2B, NR2C, NR2D and NR3A[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 69(2): 164.
- [17] Bliss T V. Young receptors make smart mice[J]. *Nature*, 1999, 401(6748): 25.

Effect of ginsenoside R_{g1} on expressions of phosphory protein Tau and N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1 and NR2B in rat brain slice model of Alzheimer's disease

LIXI^{1*}, LIU Ying¹, ZHANG Xin¹, YUAN Haifeng¹, QUAN Qiankun²

(1. Second Affiliated Hospital Xi'an Jiaotong University College of Medicine Xi'an 710004, China;

2. Research Center of Rehabilitation Science and technology, School of Life Science and Technology Xi'an Jiaotong University Xi'an 710049, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of ginsenoside R_{g1} on the expressions of phosphory protein Tau (P-Tau), N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1 (NR1) and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B (NR2B) in rat brain slice model of Alzheimer's disease. Method: Brains of 5-week-old Wistar rats were cut into slices which were 400 μm thick. These brain slices were randomly divided into normal control group, untreated group, low-dose ginsenoside R_{g1} group, medium-dose ginsenoside R_{g1} group and high-dose ginsenoside R_{g1} group with 10 slices in each group. All brain slices were cultured with artificial cerebrospinal fluid (ACSF) that was aerated via polyethylene tubing attached to a source of 95% O₂, 5% CO₂ at $(32.0 \pm 0.5)^\circ\text{C}$. And brain slices in the ginsenoside R_{g1} groups were administered with the ginsenoside R_{g1} (60, 120 and 240 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respectively) in ACSF for 2 h firstly. Then okadaic acid (OA) was administered into ACSF of untreated group and ginsenoside R_{g1} groups separately for 3 h to induce Tau phosphorylation to prepare AD models. The concentration of OA in each group was 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. And there was no any intervention for the brain slices in the normal control group. The expressions of P-Tau, NR1 and NR2B in brain slices in each group were determined by immunohistochemical method and the results were analyzed by image acquisition and analysis system. Result: Compared with the normal control group, the expression of P-Tau was significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and the expressions of NR1 and NR2B were decreased ($P < 0.01$) in untreated group. Compared with the untreated group, the expression of P-Tau was significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and the expressions of NR1 and NR2B were increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) in ginsenoside R_{g1} groups, especially in high-dose ginsenoside R_{g1} group. Conclusion: Ginsenoside R_{g1} can play the role of anti-dementia by inhibiting the expression of P-Tau so as to slow the formation of neurofibrillary tangles and increasing the expression of NR1 and NR2B so as to improve learning and memory abilities in rat brain slice model of Alzheimer's disease.

[Key words] ginsenoside R_{g1}; Alzheimer's disease; phosphory protein Tau; N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1; N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B; rats

doi: 10.4268/cjmm.20102424

[责任编辑 张宁宁]