

· 论 著 ·

人参皂甙 Rg1 对帕金森病小鼠神经保护作用初探

刘江 李冉 李磊 张宇新 张作凤

【摘要】 目的 研究人参皂甙 Rg1 在对帕金森病(PD)黑质多巴胺能神经元凋亡的可能机制及其神经保护作用。方法 采用神经毒素 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备 PD 小鼠模型,免疫组织化学法与蛋白印迹法观察各组小鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)和促凋亡基因 Caspase-3 表达变化;原位末端标记法(TUNEL)观察黑质细胞凋亡数量变化。结果 人参皂甙 Rg1 干预组黑质 TH 阳性神经元细胞丢失明显减轻(31% vs. 55%)($P < 0.01$),Caspase-3 表达水平明显下降,黑质神经元 TUNEL 阳性细胞数量显著减少。结论 人参皂甙 Rg1 对 MPTP 诱导的帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡具有一定的神经保护作用;Caspase-3 表达降低可能是人参皂甙 Rg1 抗凋亡的重要机制。

【关键词】 帕金森病; 人参皂甙 Rg1; 细胞凋亡; 多巴胺

【中图分类号】 R 741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-6315(2008)09-0898-04

The protective effect of Ginsenoside Rg1 on nerves in the mice model of Parkinson's disease. LIU Jiang, LI Ran, LI Lei, ZHANG Yu-xin, ZHANG Zuo-feng. Department of Anatomy, North China Coal Medical College (Tangshan 063000, China)

【Abstract】 Objective To investigate possible mechanism of Ginsenoside Rg1 on dopaminergic nigral neurons apoptosis of Parkinson's disease (PD) and its protective effect. **Methods** C57BL/6N mice were administrated with 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) to produce chronic PD model, PD mice were observed in behavioral changes. The expression levels of caspase-3 and TH in ventral midbrain were studied with immunohistochemistry and Western blotting. Apoptotic cell numbers were determined by TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). **Results** In group treated with Ginsenoside Rg1, the number of TH-positive neurons in SN was only decreased by 31% as compared with the control group (55%) ($P < 0.01$), the expression of caspase-3 was apparently decreased and major expressed in the cytosol of nigral neurons and TUNEL positive cells in SN decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** The neuroprotective effect of Ginsenoside Rg1 on dopaminergic nigral neurons apoptosis of the mice model of Parkinson's disease induced by MPTP is significant, Decreased expression of Caspase-3 may be the major mechanism of Ginsenoside Rg1 for antiapoptosis.

【Key words】 Parkinson's disease; Ginsenoside Rg1; Apoptosis; Dopamine

帕金森病是一种常见的中老年人神经系统变性疾病,在 60 岁以上人群中患病率高达 1000/10 万。临床上表现为静止性震颤、肌强直、运动迟缓和姿势不稳等,目前帕金森病的发病机制仍不清楚。有研究认为,MPTP 可通过激活凋亡途径参与 MPTP 致帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元丢失过程^[1],而细胞凋亡可能是帕金森病多巴胺能神经元死亡的共同通路^[2]。人参皂甙 Rg1 作为中药人参的有效成分,其生物活性广泛,国内外学者曾对其进行了多方面、系统的药理学研究^[3],发现其具有抗衰老、抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤以及调节中枢神经系统等多种药理作用。本研究采用 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)制备帕金森病小鼠模型,通过采用免疫组织

化学法、蛋白印迹法结合图像分析,研究中脑黑质磷酸化 Caspase-3 蛋白、TH 的表达,观察多巴胺能神经元数量及病理变化,结合 TUNEL 法检测中脑黑质神经细胞凋亡情况,并观察给予人参皂甙 Rg1 后对上述指标的影响,以探讨人参皂甙 Rg1 在 MPTP 诱导的黑质神经元凋亡中的可能作用,并试图从凋亡相关基因的分子水平对其机制进行深入研究;初步探讨人参皂甙 Rg1 能否阻断凋亡通路的激活从而发挥神经保护作用,为今后制定有效的帕金森病防治策略提供线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 MPTP(Sigma, USA),小鼠 TH 单克隆抗体(Chemicon, USA),兔 Caspase-3 多克隆抗体(Santa Cruz, USA),人参皂甙 Rg1(吉林大学基础医学院化学教研中心提供,纯度 > 98%),TUNEL 试剂

盒(美国 IBM 公司)。

1.1.2 实验动物 健康雄性 C57BL/6N 小鼠 45 只(购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXX(京)2002-0003], 6~8 周龄, 体质量 18~23 g, 清洁级(SPF), 自由进食饮水, 室温($25 \pm 2^\circ\text{C}$), 单笼喂养, 自然光照, 饲养 1 周后进行实验。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组和 MPTP 小鼠帕金森病模型制备 取 C57BL/6N 小鼠 45 只随机分成模型组、预防组 and 对照组, 每组各 15 只。①模型组(帕金森病组):腹腔注射 MPTP(30 mg/kg, 盐水溶), 1 次/d, 连续 5 d^[4];②预防组(人参皂甙 Rg1 组):MPTP 注射前 3 d 腹腔注射人参皂甙 Rg1, 1 次/d, 连续 3 d, 随后在每日注射 MPTP 前 2~3 h 注射 1 次 Rg1, 连续 5 d^[5];③对照组:腹腔注射与模型组等体积盐水, 1 次/d, 连续 5 d。各组动物单笼饲养, 正常饮食。于每次注射药物后观察小鼠行为变化, 以判断帕金森病鼠模型的建立情况。

1.2.2 标本采集 动物分别于末次注射后 24 h 和 7 d 以 20% 乌拉坦麻醉, 经左心室生理盐水灌注后, 再行 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定, 迅速开颅取脑, 4% 多聚甲醛后固定 48 h(4°C), 石蜡包埋、切片。MPTP 末次注射后 24 h 所取的标本用于判定是否人参皂甙 Rg1 参与调控 Caspase-3 表达; MPTP 最后一次注射后 7 d 所取的标本用于判定帕金森病模型是否复制成功^[6]。

1.2.3 免疫组化检测 脑组织切片常规脱蜡至水后, 用 TBST(pH 为 7.4 ± 0.2) 洗涤, 每次 3 min; 组织抗原行水浴法热修复; 3% 过氧化氢阻断内源过氧化物酶, TBST 洗涤; 用正常非免疫动物血清室温孵育 10 min; 同一组织相邻切片分别加入小鼠 TH 单克隆抗体(1:400)、兔 Caspase-3 抗体(1:100), 4°C 过夜; TBST 洗涤后, 加入生物素标记第二抗体室温孵育 20 min; TBST 洗涤, 加入链霉毒素抗生物素蛋白-过氧化物酶室温孵育 20 min, DAB 显色, 中性树胶封固, 光镜下观察照相。用多巴胺能神经元特异性标志酶酪氨酸羟化酶(TH)判定模型小鼠黑质区多巴胺能神经元变化; 用促凋亡基因蛋白 Caspase-3 观察人参皂甙 Rg1 对模型小鼠黑质区多巴胺能神经元凋亡的影响。选定黑质所在区域, 采用 CMAS 医学图像免疫组化自动分析系统进行该区域细胞计数。

1.2.4 TUNEL 染色检测凋亡细胞 石蜡切片入二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 蛋白酶 K(20 mg/L in 10mM Tris/HCl, pH 为 $7.4 \sim 8.0$) 37°C 下孵育 30 min, 擦去多余水分, 每张切片加 50 μL 新鲜配制的 TUNEL 反应液(TDT 酶和核苷酸标记液按 1:9 混合)和碱性磷酸酶抗体, 阴性对照只加等量核苷酸反应液, 不含酶, 其余均相同, 37°C 孵育 1 h, DAB 溶液显色 10~15 min, 中性树胶封片。阳性者细胞核着

棕褐色。

1.2.5 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达水平 将小鼠麻醉后取脑, 分离中脑黑质加入细胞裂解液低温制成匀浆液, 4°C 震荡 30 min 后, 12000 r/min 4°C 离心 15 min, 上清液在 -80°C 保存, 用 Bradford 法测定裂解液中总蛋白质的含量; 蛋白定量后加入 4 倍体积样本缓冲液, 95°C 变性 5 min。取 20 μg 样品在 100 g/L 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶上电泳完, 电转至硝酸纤维素膜, 依分子质量大小切取条带, 取相应条带分别加入 Caspase-3 多抗(1:400)和 TH 单抗(1:1000), 4°C 过夜, TBST 冲洗后, 分别与生物素标记的羊抗兔/小鼠 IgG 抗血清(1:200)室温震荡孵育 2 h, TBST 洗涤后, 与卵白素-辣根过氧化物酶复合物室温下孵育 0.5 h, DAB 显色。将特异性蛋白条带用扫描仪扫描, 在同一条件应用 CMAS 真彩医学图像分析系统测定条带平均灰度值。

1.3 统计学分析 选定黑质所在区域, 采用 CMAS 真彩色医学图像免疫组化自动分析系统进行阳性细胞计数。各组每只动物的 3 张脑片数值相加后取平均值, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理。采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。Western blot 数据统计分析方法同上。

2 结果

2.1 帕金森病模型小鼠行为学变化 对照组未出现任何行为学变化; 模型组小鼠于 MPTP 首次注射 20 min 后, 均出现不同程度的震颤、竖毛、弓背、翘尾、活动减少、动作变慢等症状, 四肢肌张力增高, 协调性差, 并伴有烦躁、呼吸急促等精神症状; 预防组与模型组比较上述行为学症状明显减轻。

2.2 黑质区多巴胺能神经元数量变化观察结果 对照组黑质致密部可见大量 TH 阳性细胞, 胞浆着色棕黄, 可见轴突排列整齐, 呈条带状; 与对照组相比, 模型组 TH 阳性细胞的数目减少约 55%, 见表 1; 胞浆着色较浅。Rg1 预防组, TH 阳性神经元的缺失较模型组明显为轻, 较对照组减少约 31%, 经图像分析模型组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.3 Caspase-3 免疫组化染色检测结果 对照组黑质致密部偶见 Caspase-3 免疫反应阳性细胞表达, 胞浆着色浅淡。模型组与对照组相比, Caspase-3 表达增强, 镜下可见其黑质致密部散在分布大量 Caspase-3 阳性细胞, 胞浆呈棕黄色。Rg1 预防组 Caspase-3 表达较模型组减弱, 镜下可见胞浆着色浅。经图像分析模型组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.4 细胞凋亡检测结果 TUNEL 染色阳性细胞胞核呈棕褐色, 单个散在分布, 体积大, 有的呈圆形、深染, 有的呈不规则形, 染色不均匀。模型组与对照组

相比黑质致密带 TUNEL 染色阳性率显著升高 ($P < 0.05$); Rgl 预防组 TUNEL 染色阳性率则较模型组明显降低。经图像分析模型组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 Caspase-3 TH 和 TUNEL 各组阳性细胞数量分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Caspase-3	TH	TUNEL
对照组	15	9.45 \pm 1.13	159.96 \pm 14.60	2.05 \pm 1.08
模型组	15	50.86 \pm 5.86 *	72.73 \pm 13.36 *	20.63 \pm 2.82 *
预防组	15	16.05 \pm 2.60 * [▲]	111.14 \pm 12.96 * [▲]	11.34 \pm 3.45 * [▲]
F 值		13.889	57.512	55.417
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [▲] $P < 0.05$

2.5 Caspase-3 蛋白印迹法检测结果 分别用 3 组小鼠新鲜脑组织全细胞裂解液测定目的蛋白表达水平, 在预染蛋白标准约 Marker 32 000 处, 可见 Caspase-3 特异性蛋白条带。灰度分析发现, 对照组仅有微量 Caspase-3 表达 (6.03 ± 0.68); 模型组 Caspase-3 蛋白条带灰度 (30.81 ± 2.06) 均为 3 组中最高, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Rgl 预防组 (11.54 ± 3.12) 与模型组相比, Caspase-3 的表达量显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

帕金森病是一种以静止性震颤、运动迟缓和姿势步态异常等为主要临床表现, 以中脑黑质致密部多巴胺能神经元变性丢失为主要神经病理学特征的神经系统退变性疾病。本研究复制的帕金森病模型具有典型的行为学表现: 实验结果显示中脑黑质致密部 TH 免疫阳性细胞明显减少, 中脑黑质 TH 蛋白表达下降, 这提示本实验动物中脑黑质存在多巴胺能神经元大量丢失。上述结果说明, 本实验采用的动物模型符合实验要求^[7]。

近几年来, 对帕金森病发病机制的研究飞速发展, 随着细胞凋亡研究的深入, 对帕金森病患者的实验研究发现了黑质神经元的凋亡^[8], 进一步支持细胞凋亡与帕金森病发病机制的相关性。用嗜黑质多巴胺能神经毒素 MPTP 制备的帕金森病鼠模型已广泛用于帕金森病发病机制和治疗方法的研究^[9]。本研究应用 TH 免疫组化染色法及 TUNEL 法检测显示 30 mg/kg MPTP, 连续 5 d 可诱发 C57BL 小鼠黑质神经元凋亡。模型组黑质致密部多巴胺能神经元减少, 凋亡细胞增多, 经人参皂甙 Rgl 预处理后, 多巴胺能神经元脱失现象减少, 凋亡细胞也明显减少。以上的研究结果提示, 人参皂甙 Rgl 在阻断 MPTP 诱导的黑质神经元凋亡的过程中发挥了其抗细胞凋亡作用的。

人参皂甙 Rgl 属原人参三醇类物质, 以往的研究发现人参皂甙 Rgl 可以明显保护大鼠皮质神经细胞使 DNA 免于断裂, 具有抗凋亡作用^[10]。本实验中, Caspase-3 免疫组化结果显示, Rgl 预防组小鼠黑

质致密部免疫反应阳性多巴胺能神经元数目较模型组明显减少, 并可显著改善帕金森病小鼠运动障碍, 提示人参皂甙 Rgl 具有保护黑质多巴胺能神经元的作用。TUNEL 染色结果进一步显示, 经人参皂甙 Rgl 预处理后, TUNEL 阳性细胞比例较模型组明显下降, 同时 TH 阳性神经元脱失现象减少, 提示人参皂甙 Rgl 在阻断 MPTP 诱导的黑质神经元凋亡的过程中, 可能是通过增加 Caspase-3 表达发挥其抗细胞凋亡作用, 使黑质多巴胺能神经元在很大程度上免于凋亡发生。

由于帕金森的发病是多种致病因素, 如遗传因素、环境因素、年龄因素等共同作用的结果, 其病因和发病机制尚不完全清楚。目前无一种理想的药物和治疗方法能有效地减缓、阻止甚至逆转帕金森患者中脑黑质神经元的退行变性过程。因此, 寻找一种确实有效的抗帕金森病的药物具有重要的临床意义。人参皂甙 Rgl 是人参单体成分之一, 有多种生物活性, 但其对神经细胞凋亡保护作用的研究较少。本研究结果表明, MPTP 诱导黑质神经元凋亡与增加促凋亡蛋白 Caspase-3 表达有关, 而人参皂甙 Rgl 的保护作用则是通过逆转神经元中凋亡调控蛋白的异常表达来实现的。

参考文献:

- [1] 师亮, 张宇新, 张作风, 等. 环氧化酶-2 参与 MPTP 致帕金森病小鼠黑质细胞的凋亡[J]. 中国临床康复, 2006, 10(2): 108-110.
- [2] Chen S, Zhang X, Yang D, et al. D2/D3 receptor agonist ropinirole protects dopaminergic cell line against rotenone-induced apoptosis through inhibition of caspase- and JNK-dependent pathways[J]. Febs Lett, 2008, 582(5): 603-610.
- [3] Lin WM, Zhang YM, Moldzio R, et al. Ginsenoside rd attenuates neuroinflammation of dopaminergic cells in culture[J]. J Neural Transm Suppl, 2007, (72): 105-112.
- [4] Watanabe Y, Kato H, Araki T, et al. Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease[J]. Metab Brain Dis, 2008, 23(1): 51-69.
- [5] Chen XC, Zhou YC, Chen Y, et al. Ginsenoside Rgl reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(1): 56-62.
- [6] Xia XG, Haring T, Weller M, et al. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of parkinson's disease[J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98(18): 10433-10438.
- [7] Smeyne RJ, Jackson-Lewis V. The MPTP model of parkinson's disease[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 134(1): 57-66.
- [8] Singh S, Dikshit M. Apoptotic neuronal death in parkinson's disease: involvement of nitric oxide[J]. Brain Res Rev, 2007, 54(2): 233-250.
- [9] Jankowski M. The role of JNK pathway in familial Parkinson's disease[J]. Postepy Biochem, 2007, 53(3): 297-303.
- [10] 陈晓春, 周宜灿, 陈澄, 等. 人参皂甙 Rgl 保护多巴胺能神经元的实验研究[J]. 医学研究通讯, 2005, 34(6): 28.

[收稿: 2008-05-26]

(本文编辑 张印朋)