

人参皂甙 Rb1 抑制 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶所致的 内质网应激对多巴胺能神经元的保护作用*

蒙国光¹ 张作风¹ 桓秀杰² 魏子峰¹ 李冉¹ 张宇新^{1△}

(华北煤炭医学院, 1 解剖学教研室, 2 附属医院, 唐山 063000)

摘要 目的:研究内质网应激反应在 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)所致帕金森病(PD)小鼠模型黑质区多巴胺能神经元凋亡的作用。方法:将小鼠随机分为 MPTP 模型组、Rb1 干预剂组和对对照组。观察行为学,免疫组织化学和免疫蛋白印迹法观察黑质酪氨酸羟化酶(TH)、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、半胱氨酸蛋白酶-12 (caspase-12)和半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)的表达。结果:与对照组相比,模型组小鼠出现典型 PD 症状,TH 阳性神经元明显丢失、蛋白水平下降,GRP78、caspase-12、caspase-3 阳性细胞及蛋白水平增加;经人参皂甙 Rb1 处理后,上述变化均减轻。结论:内质网应激(ERS)在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型多巴胺能神经元凋亡中可起重要作用,人参皂甙 Rb1 可通过抑制 ERS 而对 PD 小鼠具有一定的神经保护作用。

关键词 帕金森病;半胱氨酸蛋白酶-3;内质网应激;葡萄糖调节蛋白 78;半胱氨酸蛋白酶-12;酪氨酸羟化酶;1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶

Ginsenoside Rb1 protects the dopaminergic neurons in substantia nigra against the apoptosis via downregulate the endoplasmic reticulum stress proteins expressions in the MPTP-induced Parkinson's disease mouse model*

Meng Guoguang¹, Zhang Zuofeng¹, Huan Xiujie², Wei Zifeng¹, Li Ran¹, Zhang Yuxin^{1△}

(1. Department of Anatomy, 2. Affiliated Hospital, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract Objective: To explore the role of endoplasmic reticulum stress (ERS) in apoptosis of dopaminergic neurons in substantia nigra (SN) of MPTP-induced Parkinson's disease mouse model, therefore, to validate whether ginsenoside Rb1 alleviate the apoptosis above-mentioned. **Methods:** Healthy male C57BL/6N mice were randomly divided into 3 groups: MPTP model group, Rb1 group and control group. Besides of behavior, the number of positive cell for tyrosine hydroxylase (TH), glucose-regulated protein (GRP78), caspase-12 and caspase-3 and the expression levels of these proteins in the SN of midbrain were detected using immunohistochemistry and Western blot. **Results:** Compared with control mice, the model animals showed typical symptoms of PD with decreased positive cell number and expression level of TH, and markedly increased positive cell number and expression levels of GRP78, caspase-12 and caspase-3 in SN of the midbrain. After giving Rb1, the above changes were alleviated obviously. **Conclusion:** In MPTP-induced PD mouse model, ERS mediates the SN dopaminergic neurons to apoptosis that can be suppressed by ginsenoside Rb1.

Key words Parkinson's disease; caspase-3; endoplasmic reticulum stress; glucose-regulated protein 78; caspase-12; tyrosine hydroxylase; MPTP

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是常见的中枢神经系统退变性疾病,其主要病理改变为中脑黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性丢失。迄今为止,病因及发病机制不详。研究认为,细胞凋亡与 PD 发病关系密切^[1]。近年来发现内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)也是引起细胞凋亡的重要

机制^[2],并可能与 PD 发病密切相关^[3]。人参皂甙 Rb1,具有抗衰老、抗炎、抗氧化、提高免疫力和增强记忆等作用,文献报道 Rb1 对损伤的多巴胺能神经元具有一定的保护作用^[4]。本研究采用 MPTP 所致 PD 动物模型,并给予人参皂甙 Rb1 干预治疗,观察内质网应激相关蛋白 GRP78、caspase-12 和凋亡蛋白 caspase-3 表达变化以及 Rb1 干预效果,进一步探讨 ERS 在 PD 发病中的作用,以期对 PD 的防御和治疗提供实验依据。

* 河北省自然科学基金(C2004000689);河北省博士基金(05547008D-4);河北省科学技术与社会发展计划(04276135)

第 1 作者 E-mail: mengguoguang790621@163.com

△ 通讯作者, E-mail: jpzyx@163.com

收稿日期: 2010-10-27; 修回日期: 2011-02-28

1 材料和方法

1.1 试剂

MPTP (Sigma, USA), 兔抗鼠 GRP78 多克隆抗体, 兔抗鼠 caspase-12 多克隆抗体, 兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体(北京博奥森生物公司); 预染蛋白 Marker(天津灏洋生物公司); 小鼠抗人酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)单克隆抗体(Chemicon, USA); 人参皂甙 Rb1(吉林大学基础医学院化学教研中心); FITC 标记山羊抗兔 IgG 二抗, TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗(北京中杉生物); UltraSensitive SP 超敏试剂盒(福州迈新公司)。

1.2 实验动物

健康雄性 C57BL/6N 小鼠 85 只, 12~14 周龄, 体重 25~30 g, 清洁级, 购于北京维通利华公司[scxx(京)2002—2003], 自由进食, 饮水, 室温 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 单笼喂养, 自然光照。

1.3 动物分组和模型制备

实验动物随机分为模型组、Rb1 干预剂组和对照组 3 组。模型组: 腹腔注射 MPTP (30 mg/kg, 生理盐水溶解), 每天 1 次, 连续 5 d, 共 25 只; Rb1 干预剂组: 除给予模型组相同的处理外, MPTP 注射前 4 d 每天定时腹腔注射人参皂甙 Rb1, 干预剂组依剂量的不同(分别为 10 mg/kg 和 20 mg/kg, 生理盐水溶解)分为干预剂低浓度和高浓度两个亚组, 分别为 25 只和 10 只; 对照组: 注射与模型组和干预剂组等量生理盐水, 共 25 只。

1.4 标本采集

MPTP 第 5 次注射后 72 h, 除干预剂 2 组外每组随机取 15 只小鼠。以 0.3 ml/100 g 水合氯醛腹腔麻醉小鼠后, 经左心室生理盐水灌洗, 然后用 4% 的多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注固定, 取中脑黑质部位脑块, 于 4% 多聚甲醛后固定 48 h (4°C), 其中 10 块脑组织经石蜡包埋后, 石蜡切片机做连续冠状切片, 片厚 $5\ \mu\text{m}$, 4°C 保存备用; 剩余 5 块脑组织置于 30% 蔗糖液中过夜, 直至脑组织沉底。次日取脑组织标本后, 自视交叉处用恒冷箱切片机连续冠状切片, 片厚 $15\ \mu\text{m}$, 贴附于载玻片上, 置于 -20°C 冰箱待用。每组小鼠中随机取 6 只进行免疫蛋白印迹分析。小鼠麻醉后取脑, 分离中脑黑质部分, 置入细胞裂解液中, 低温匀浆, 4°C 震荡 30 min 后, $12\ 000\ \text{r/min}$, 4°C 离心 15 min, 取上清液, -80°C 保存备用。

1.5 免疫荧光组织化学显色

取脑组织切片室温放置 30 min 后, 用 PBS ($\text{pH}\ 7.4 \pm 0.2$) 洗涤; 正常非免疫动物血清室温孵育 30 min, 同一组织相邻切片分别加入小鼠抗人 TH 单克隆抗体 (1:300) 与兔抗鼠 GRP78 多克隆抗体 (1:100) 一抗混合液、小鼠抗人 TH 单克隆抗体 (1:300) 与兔抗鼠 caspase-12 抗体 (1:100) 一抗混合液、小鼠抗人 TH 单

克隆抗体 (1:300) 与兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体 (1:100) 一抗混合液 4°C 过夜, 加入 FITC 标记山羊抗兔 IgG (1:60) 和 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG (1:100) 荧光二抗混合液, 37°C 孵育 60 min, 双蒸水振洗 10 min, 甘油缓冲液封片, 激光共聚焦显微镜观察照相。绿色荧光为 GRP78、caspase-12、caspase-3 表达, 红色荧光为 TH 表达, 橘黄色为双重荧光染色。

1.6 免疫组织化学显色

脑组织切片常规脱蜡至水后, 用 PBS ($\text{pH}\ 7.4 \pm 0.2$) 洗 3 次, 每次 5 min; 组织切片进行水浴法抗原修复; 降至室温; 加入 30 ml/L 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶 7 min; 正常非免疫兔血清室温孵育 10 min; 同一组织相邻切片分别加兔抗鼠 GRP78 多克隆抗体 (1:200), 兔抗鼠 caspase-12 多克隆抗体 (1:200), 兔抗鼠 caspase-3 多克隆抗体 (1:200), 小鼠抗人 TH 单克隆抗体 (1:400), 4°C 过夜; 次日取出, 室温放置 20 min; 加入生物素标记二抗室温孵育 20 min; 加入链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶室温孵育 20 min, DAB 显色, 中性树脂胶封片, 光镜下观察。

1.7 免疫印迹法

每组取 30 μg 样品进行 10% SDS-PAGE 电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 依分子量大小切取条带, 加入封闭液室温下震荡 2 h 后, 取相应条带分别加入 GRP78 多抗 (1:150), caspase-12 多抗 (1:150), TH 单抗 (1:350), caspase-3 多抗 (1:150), 4°C 过夜。室温孵育 1 h; 再加入二抗室温孵育 1 h; 然后加入辣根过氧化物酶室温下孵育 0.5 h; DAB 显色, 中间均用 Tris-0.1% Tween 20 振摇洗涤 5 次, 每次 3 min。将特异性蛋白条带扫描后, 在同一条件下应用 CMIAS 真彩医学图像分析系统测定条带平均光密度值。

1.8 统计学处理

选定黑质所在区域, 采用 CMIAS 真彩医学图像免疫组织化学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。实验结果使用 SPSS13.0 统计软件进行统计处理。分别采用单因素方差分析 q 检验; 免疫印迹法统计分析同上。

2 结果

2.1 行为学观察

模型组小鼠于第 1 次注药后 10~30 min 均出现不同程度的震颤、竖毛、翘尾, MPTP 第 5 次注射后, PD 组小鼠出现步态蹒跚、活动减少、动作变慢等症状; 对照组未出现上述行为学变化; Rb1 组与 PD 组相比较, 上述行为学症状明显减轻。

2.2 免疫荧光双重显色

模型组中脑黑质区可见 TH 免疫荧光单标记细胞为红色(图 1A、D、G, 见封二), GRP78 免疫荧光单标记细胞为绿色(图 1B、E、H, 见封二), 融合图像可见橘

黄色荧光,表明 GRP78 与 TH 有部分共定位(图 1C,见封二);caspase-12、caspase-3 和 TH 也有部分共定位,融合图像呈橘黄色荧光(图 1F、I,见封二)。

2.3 免疫组织化学检测结果

对照组小鼠中脑黑质区可见大量 TH 阳性细胞,胞质着色棕黄,排列整齐,呈条带状,轴突密集;GRP78、caspase-12、caspase-3 免疫阳性细胞较少,其中 GRP78、caspase-3 阳性表达主要位于细胞质且胞

质着色较淡,caspase-12 在细胞质中有弱表达。与对照组比较,模型组小鼠黑质区 TH 阳性细胞缺失,胞间纤维稀疏;GRP78、caspase-12 和 caspase-3 免疫阳性细胞增多,阳性细胞着色加深,且分布与 TH 阳性细胞高度一致。与模型组比较,干预剂低浓度组 TH 阳性细胞丢失程度减轻,GRP78、caspase-12 和 caspase-3 免疫阳性细胞减少。图像分析结果显示,差异具有统计学意义($P < 0.01$,表 1,图 2,见封二)。

表 1 各组小鼠黑质区 TH、GRP78、Caspase-12 和 Caspase-3 阳性细胞数量的变化($n=15$, $\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Number of positive cells of TH, GRP78, caspase-12 and caspase-3 in different groups ($n=15$, $\bar{x} \pm s$)

| Group | TH | GRP78 | Caspase-12 | Caspase-3 |
|---------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Control | 140.56 \pm 7.64 | 4.56 \pm 1.44 | 2.47 \pm 0.78 | 2.23 \pm 1.45 |
| Model | 53.41 \pm 3.24 ** | 48.15 \pm 2.36 ** | 47.65 \pm 1.56 ** | 42.78 \pm 2.52 ** |
| Rb1 | 90.73 \pm 6.12 ** $\Delta\Delta$ | 17.36 \pm 0.56 ** $\Delta\Delta$ | 18.32 \pm 2.45 ** $\Delta\Delta$ | 12.21 \pm 0.87 ** $\Delta\Delta$ |

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group (results from 72 h after the fifth injection of MPTP)

2.4 免疫印迹法检测结果

预染蛋白标准相对分子质量约 61 kD 处可见 TH 特异性蛋白条带,对照组蛋白条带着色最深,模型组着色较浅,干预剂低浓度组和干预剂高浓度组与模型组比较条带着色较深。经图像分析,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 3)。预染蛋白标准相对分子质量约 78、46 和 30 kD 处分别可见 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 特异性蛋白条带,对照组蛋白条带不明显,模型组条带略宽,着色最深,与模型组比较,干预剂低浓度组和干预剂高浓度组蛋白条带着色变浅,结果分析显示,差异具有统计学意义($P < 0.01$,图 3)。干预剂低浓度组与干预剂高浓度组比较无明显差异。

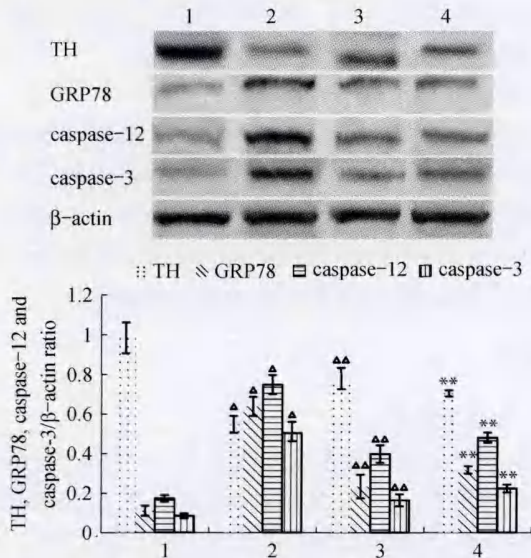


图 3 中脑黑质区 TH、GRP78、caspase-12 和 caspase-3 免疫印迹结果
Fig 3 Western blot of TH, GRP78, caspase-12 and caspase-3 in the SN of the midbrain

1: Control group; 2: Model group; 3: Low dose Rb1 group; 4: High dose Rb1 group. $\Delta P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; ** $P < 0.01$ vs model group (results from 72 h after the fifth injection of MPTP)

3 讨论

内质网应激(ERS)是细胞的一种应激反应过程,在缺氧、饥饿、钙平衡紊乱、自由基侵袭及药物等情况下,均可导致内质网功能失调。适度应激会激活未折叠蛋白反应(unfold protein response, UPR),使蛋白折叠能力提高、蛋白合成抑制,以适应应激,但是长时间或过强 ERS 可触发其介导的凋亡信号通路。文献报道,许多神经系统退行性疾病与 ERS 相关^[5]。分子伴侣 GRP78 和 caspase-12 是 ERS 时表达增多的两种分子,其中 GRP78 是应激激活的标志,而 caspase-12 则引起 caspase 级联反应启动细胞凋亡程序^[6-8]。

有研究表明,ERS 与 PD 病理过程密切相关,可能是 PD 患者黑质 DA 能神经元缺失重要因素^[9]。Alladi 等^[10]在 PD 患者脑内发现 GRP78、caspase-12 显著活化。本实验结果显示,模型组小鼠黑质区出现大量 GRP78、caspase-12 阳性细胞,其蛋白水平也升高,同时 TH 阳性神经元大量缺失,蛋白水平降低。提示中脑黑质区 DA 能神经元大量缺失可能与黑质区 ERS 密切相关。为进一步明确 DA 能神经元变性缺失与 ERS 的关系,本实验结果显示,中脑黑质区绝大多数 GRP78、caspase-12 阳性细胞是 DA 能神经元。该结果提示模型组黑质区残存的 DA 能神经元可能发生 ERS 反应。以上结果表明,在本实验条件下,中脑黑质 DA 能神经元大量丢失可能与 ERS 在 DA 能神经元内介导的凋亡程序密切相关,ERS 可能是 DA 能神经元变性丢失的关键事件。

Caspase-3 是细胞凋亡的最终执行者,在 PD 患者脑内 DA 能神经元丢失的同时存在 caspase-3 活化^[11],而抑制 caspase-3 激活能明显起到对 DA 能神经元的保护作用^[12]。Yang 等^[13]在体外实验中表明抑制内质网应激反应能够减少 caspase-3 表达,DA 能神经元丢失

程度得以减轻。鉴于 ERS、caspase-3 以及 PD 发病可能存在的联系,本实验观察了上述三者在中脑黑质区的表达情况。结果显示,模型组中脑黑质 caspase-3 表达水平升高,其分布与 GRP78、caspase-12 和 TH 阳性细胞相一致。以上结果表明,caspase-3 可能参与中脑黑质区 DA 能神经元内 ERS 凋亡通路中 caspase-12 所介导的凋亡过程,并且与 DA 能神经元变性丢失密切相关。为进一步明确上述三者在中脑黑质区的表达关系,本实验免疫荧光双标记显色结果显示黑质区大多数 caspase-3 阳性细胞与 TH 有部分共定位,表明其是 DA 能神经元表达。当给予 Rb1 处理后黑质区 GRP78、caspase-12、caspase-3 阳性细胞大幅减少,蛋白水平降低,TH 阳性神经元丢失程度得到减轻,小鼠行为学症状得以改善。以上实验结果表明,在本实验条件下,MPTP 可导致 DA 能神经元内 ERS 凋亡通路的激活,启动 caspase-3 表达,导致 DA 能神经元变性丢失。Rb1 抑制 ERS,保护了由 MPTP 介导的 DA 能神经元损伤。由此认为,在 MPTP 诱导的 PD 小鼠模型中,抑制 ERS 对 DA 能神经元可能具有一定的神经保护作用。

图版说明(图见封二)

图 1 GRP78、caspase-12 和 caspase-3 与 TH 免疫荧光双标记显色,400×。A, D, G:模型组中 TH 阳性细胞呈红色;B, E, H:模型组中 GRP78、caspase-12、caspase-3 阳性细胞呈绿色;C, F, I:分别为 TH 和 GRP78、caspase-12、caspase-3 共存的细胞呈橘黄色。

图 2 中脑黑质区 TH、GRP78、caspase-12 和 caspase-3 免疫组织化学显色。A, B, C: TH, 200×;D, E, F: GRP78, 400×;G, H, I: caspase-12, 400×;J, K, L: caspase-3, 400×;A, D, G, J:对照组;B, E, H, K:模型组;C, F, I, L:干预剂组-1。

Explanation of figures (See inside front cover)

Fig 1 Double-labeling immunofluorescence assay of GRP78, caspase-12, caspase-3 and TH, 400×. A, D, G: TRITC-labeling for TH in model group (red); B, E, H: FITC-labeling for GRP78, caspase-12 and caspase-3 in model group (green); C: Merged image of A and B; F: Merged image of D and E; I: Merged image of G and H.

Fig 2 SP immunohistochemical staining for TH, GRP78, caspase-12 and caspase-3 in SN of the midbrain. J, K, L: Immunohistochemical staining for TH, 200×; M, N, O: Immunohistochemical staining for GRP78, 400×; P, Q, R: Immunohistochemical staining for caspase-12, 400×; S, T, U: Immunohistochemical staining for caspase-3, 400×. J, M, P, S: Control group; K, N, Q, T: model group; L, O, R, U: low dose Rb1 group.

参考文献

[1] Eberhardt O, Schulz J B. Apoptotic mechanisms and antiapoptotic

therapy in the MPTP model of Parkinson's disease [J]. *Toxicol Lett*, 2003,139(2-3):135-151.

[2] Rasheva V I, Domingos P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2009, 14 (8): 996-1007.

[3] Tanaka M, Yamazaki M, Chiba K. Neuroprotective action of genipin on tunicamycin-induced cytotoxicity in neuro2a cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009,32(7):1220-1223.

[4] Hwang Y P, Jeong H G. Ginsenoside Rb1 protects against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress by increasing heme oxygenase-1 expression through an estrogen receptor-related PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway in human dopaminergic cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010,242(1):18-28.

[5] Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases [J]. *Cell Death Differ*, 2006,13(3):385-392.

[6] Martinez J A, Zhang Z, Svetlov S I, et al, Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(12):1480-1493.

[7] Kishi S, Shimoke K, Nakatani Y, et al, Nerve growth factor attenuates 2-deoxy-d-glucose-triggered endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis via enhanced expression of GRP78 [J]. *Neurosci Res*, 2010,66(1):14-21.

[8] Fribley A, Zhang K, Kaufman R J. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response [J]. *Methods Mol Bio*, 2009,559 (10):191-204.

[9] Shastri B S. Neurodegenerative disorders of protein aggregation [J]. *Neurochem Int*, 2003,43(1):1-7.

[10] Alladi P A, Mahadevan A, Vijayalakshmi K, et al, Ageing enhances alpha-synuclein, ubiquitin and endoplasmic reticulum stress protein expression in the nigral neurons of Asian Indians [J]. *Neurochem Int*, 2010,57(5):530-539.

[11] Han B S, Hong H S, Choi W S, et al. Caspase-dependent and -independent cell death pathways in primary cultures of mesencephalic dopaminergic neurons after neurotoxin treatment [J]. *J Neurosci*, 2003,23(12):5069-5078.

[12] Ikeda Y, Tsuji S, Satoh A, et al. Protective effects of astaxanthin on 6-hydroxydopamine induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *J Neurochem*, 2008, 107 (6): 1730-1740.

[13] Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Koh H C, et al. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 191(2-3):203-210.

(编辑:刘芳)

