

本文引用:李苗苗,王淑秀.人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠中脑黑质神经调节蛋白 1-ErbB4 信号通路活性的影响[J].新乡医学院学报,2016,33(4):275-280. DOI:10.7683/xyxyxb.2016.04.007.

【基础研究】

人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠中脑黑质神经调节蛋白 1-ErbB4 信号通路活性的影响

李苗苗^{1,2}, 王淑秀¹

(1. 新乡医学院基础医学院病理学教研室,河南 新乡 453003;2. 新乡市第一人民医院病理科,河南 新乡 453000)

摘要: 目的 探讨人参皂苷 Rg1 对帕金森病(PD)小鼠中脑黑质中神经调节蛋白 1(NRG1)-ErbB4 信号通路活性的影响。方法 将 40 只 C57BL/6 小鼠随机分为生理盐水对照组、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + N-[2-(P-溴苯丙烯盐基氨基)乙基]-5-异喹啉磺酰胺(H89)组。在注射 MPTP 前 3 d,生理盐水对照组、MPTP 模型组小鼠腹腔注射生理盐水 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 4 d,第 4 天在注射完人参皂苷 2 h 后,MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠腹腔注射 MPTP $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,均注射 4 次,每次间隔 2 h,而 MPTP + Rg1 + H89 组在首次注射 MPTP 前 30 min 腹腔注射 H89 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。药物注射后连续 7 d 观察小鼠行为学变化,采用反转录多聚酶链反应(RT-PCR)检测小鼠中脑黑质中 *Nrg1* 与 *ErbB4* 基因的 mRNA 表达情况,采用 Western blot 检测 NRG1 受体 ErbB4 蛋白及磷酸化 ErbB4(p-ErbB4)蛋白的表达及其磷酸化水平。结果 MPTP 模型组小鼠中脑黑质内 *Nrg1* 基因 mRNA 表达水平低于生理盐水对照组($P=0.0079$)和 MPTP + Rg1 组($P=0.0049$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP 模型组相比,*Nrg1* mRNA 表达水平差异无统计学意义($P=0.1513$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP + Rg1 组比较,小鼠中脑黑质内 *Nrg1* mRNA 表达水平降低($P=0.0493$)。MPTP 模型组小鼠中脑黑质内的 *Nrg1*-type I/II 的 mRNA 表达水平显著低于生理盐水对照组($P=0.0019$)和 MPTP + Rg1 组($P=0.0432$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP 模型组小鼠中脑黑质内 *Nrg1*-type I/II mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($P=0.6885$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP + Rg1 组比较,小鼠中脑黑质内 *Nrg1*-type I/II mRNA 表达显著下降($P=0.0294$)。与生理盐水对照组相比,*Nrg1*-type III mRNA 在 MPTP 组略有降低,但差异无统计学意义($P=0.2908$);与 MPTP 模型组比较,MPTP + Rg1 组小鼠中脑黑质内 *Nrg1*-type III mRNA 表达升高($P=0.0419$),MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质 *Nrg1*-type III mRNA 表达降低($P=0.7289$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP + Rg1 组小鼠黑质 *Nrg1*-type III mRNA 表达比较差异无统计学意义($P=0.1642$)。生理盐水对照组、MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质 *ErbB4* mRNA 表达水平比较差异均无统计学意义($P=0.5318$)。各组小鼠中脑黑质内 ErbB4 蛋白表达水平比较差异均无统计学意义($P=0.8005$);MPTP 模型组小鼠黑质内 p-ErbB4 蛋白表达水平低于生理盐水对照组($P=0.0134$)和 MPTP + Rg1 组($P=0.0199$);MPTP + Rg1 + H89 组 p-ErbB4 蛋白表达水平低于 MPTP + Rg1 组($P=0.0478$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP 模型组 p-ErbB4 表达水平比较差异无统计学意义($P=0.8877$)。结论 PD 小鼠脑内的 NRG1 基因表达及其 ErbB4 受体的活性降低,而人参皂苷 Rg1 可能通过增强小鼠中脑黑质 NRG1-ErbB4 的通路活性而改善 PD 的症状。

关键词: 帕金森病;人参皂苷 Rg1;神经调节蛋白 1;ErbB4

中图分类号: R741 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2016)04-0275-06

Effect of ginsenoside Rg1 on activity of neuregulin1-ErbB4 signal pathway in substantia nigra of midbrain in Parkinson's disease model mouse

LI Miao-miao^{1,2}, WANG Shu-xiu¹

(1. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, Henan Province, China; 2. Department of Pathology, the First People's Hospital of Xinxiang City, Xinxiang 453000, Henan Province, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of ginsenoside Rg1 on neuregulin1(NRG1)-ErbB4 signal pathway in substantia nigra of midbrain in Parkinson's diseases (PD) model mouse. **Methods** Forty C57BL/6 mice were randomly divided

DOI:10.7683/xyxyxb.2016.04.007

收稿日期:2015-12-21

基金项目:河南省高校科技创新人才支持计划资助项目(编号:2010HASTTT008)。

作者简介:李苗苗(1982-),女,河南济源人,硕士研究生在读,主要从事帕金森病发病机制研究。

通信作者:王淑秀(1970-),女,河南济源人,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事帕金森病发病机制研究;E-mail:shuxiuwang2003@aliyun.com。

into physiological saline control group, 1-methy-4-pheny-1, 2, 3, 6-tetrahy-dropyrdine (MPTP) group, MPTP + Rg1 group, MPTP + Rg1 + N-[2-[[3-(4-bromophenyl)-2-propen-1-yl] amino] ethyl] (H89) group, with ten mice in each group. At three days before injecting MPT, the mice in physiological saline control group and MPTP group were given intraperitoneal injection of physiological saline $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; the mice in MPTP + Rg1 group and MPTP + Rg1 + H89 were given intraperitoneal injection of ginsenoside Rg1 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for four days. On the fourth day, at the tow hours after injecting ginsenoside, the mice in MPTP model group, MPTP + Rg1 group and MPTP + Rg1 + H89 group were given intraperitoneal injection of MPTP $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ for four times at intervals of 2 h; while the mice in MPTP + Rg1 + H89 group were given intraperitoneal injection of H89 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ at 30 min before injecting MPTP. The ethology change of mice were observed after administration of drugs for 7-consecutive-day. Reverse transcription-polymerase chain reaction was used to detected the *Nrg1* and *ErbB4* mRNA expression in substantia nigra of midbrain of mice; Western blotting was used to detect the expression levels of ErbB4 protein and phosphorylation ErbB4 (p-ErbB4) protein. **Results** The expression of *Nrg1* mRNA in substantia nigra of midbrain of mice in MPTP model group was significantly lower than that in physiological saline control group ($P = 0.0079$) and MPTP + Rg1 group ($P = 0.0049$); there was no statistic difference of *Nrg1* mRNA expression between MPTP + Rg1 + H89 group and MPTP model group ($P = 0.1513$); the expression of *Nrg1* mRNA in substantia nigra of midbrain of mice in MPTP + Rg1 + H89 group was significantly lower than that in MPTP + Rg1 group ($P = 0.0493$). The expression of *Nrg1*-type I / II mRNA in substantia nigra of midbrain of mice in MPTP model group was significantly lower than that in physiological saline control group ($P = 0.0019$) and MPTP + Rg1 group ($P = 0.0432$); there was no statistic difference of *Nrg1*-type I / II mRNA expression between the MPTP + Rg1 + H89 group and MPTP model group ($P = 0.6885$); the expression of *Nrg1*-type I / II mRNA in MPTP + Rg1 + H89 group was significantly lower than that in MPTP + Rg1 group ($P = 0.0294$). There was no statistic difference of *Nrg1*-type III mRNA expression between physiological saline control group and MPTP model group ($P = 0.2908$); the expression of *Nrg1*-type III mRNA in MPTP + Rg1 group was significantly higher than that in MPTP model group ($P = 0.0419$); the expression of *Nrg1*-type III mRNA in substantia nigra of midbrain of mice in MPTP + Rg1 + H89 group was significantly lower than that in MPTP model group ($P = 0.7289$); there was no statistic difference of *Nrg1*-type III mRNA expression in substantia nigra of midbrain of mice between the MPTP + Rg1 + H89 group and MPTP + Rg1 group ($P = 0.1642$). There was no statistic difference of *ErbB4* mRNA expression in substantia nigra of mice among physiological saline control group, MPTP model group, MPTP + Rg1 group and MPTP + Rg1 + H89 group ($P = 0.5318$). There was no statistic difference of ErbB4 protein expression in substantia nigra of mice among physiological saline control group, MPTP model group, MPTP + Rg1 group and MPTP + Rg1 + H89 group ($P = 0.8005$); the expression of p-ErbB4 protein in substantia nigra of mice in MPTP model group was significantly lower than that in physiological saline control group ($P = 0.0134$) and MPTP + Rg1 group ($P = 0.0199$); the expression of p-ErbB4 protein in substantia nigra of mice in MPTP + Rg1 + H89 group was significantly lower than that in MPTP + Rg1 group ($P = 0.0478$); there was no statistic difference of the expression of p-ErbB4 protein between the MPTP + Rg1 + H89 group and MPTP model group ($P = 0.8877$). **Conclusion** *Nrg1* gene expression and the activation of ErbB4 are decreased in brain of PD model mice; ginsenoside Rg1 can improve the symptoms of PD by hyperenhancing the activation of NRG1-ErbB4 signal pathway.

Key words: Parkinson's diseases; ginsenoside Rg1; neuregulin1; ErbB4

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种常见的神经退行性疾病,其病理学特征是中脑黑质致密区(SNc)多巴胺能神经元变性及进行性缺失。神经调节蛋白1(neuregulin 1, NRG1)是生长因子家族中的一员,在神经系统发育过程中发挥着重要的作用,参与了神经细胞的存活、增殖、分化,神经元的迁移,神经突起的外向性生长和突触的形成,对中脑的多巴胺能神经元有神经营养作用;它通过激活 ErbB 家族的受体酪氨酸激酶(表皮生长因子受体的经典成员)进行一系列的细胞内信号传导,从而在脑内发挥重要的调节功能^[1]。其中,神经元上的 ErbB4 受体是 NRG1 的主要受体之一,介导着 NRG1 在脑内神经元中的生理效应^[1]。目前研究已经表明,

NRG1-ErbB4 信号通路多种神经系统疾病如精神分裂症、癫痫、抑郁症等疾病的发生发展过程密切相关^[1],但其是否参与 PD 的发生尚未阐明。人参皂苷 Rg1 属于人参皂苷三醇型,具有抗神经细胞凋亡和保护神经元的作用^[2]; N-[2-(P-溴苯丙基盐基氨基)乙基]-5-异喹啉磺酰胺(H89)是腺苷酸环化酶(adenylate cyclase, AC)/环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 信号通路中 PKA 的抑制剂,可以通过 AC/cAMP/PKA 信号通路抑制人参皂苷在帕金森模型小鼠中脑黑质中的作用^[3]。本研究拟观察人参皂苷 Rg1 对 PD 小鼠模型中脑黑质多巴胺能神经元中 NRG1 和 ErbB4 表达及活性的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 11 周龄无特定病原体级 C57BL/6 小鼠 40 只,体质量 20 ~ 25 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证编号 SCXK(京)2006-0009]。实验前给予自然光照,适应性喂养 10 d。

1.2 主要试剂 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 购于美国 Sigma 公司;人参皂苷 Rg1 购于北京寰宇科技生物科技发展有限公司;H89 购于江苏碧云天生物技术有限公司;反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 购于宝生物工程(大连)有限公司,actin 抗体、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购于北京中杉金桥生物有限公司,蛋白磷酸酶抑制剂混合物(All-in-One, 100X) 购于北京普利莱基因技术有限公司,兔多克隆抗磷酸化 ErbB4 抗体购于美国 Santa Cruz 公司,兔单克隆抗 ErbB4 抗体购于美国 Epitomics 公司,PCR 引物由 Life Technology 公司合成,其余试剂均为国产分析纯。

1.3 分组与模型构建 参考文献[4]中 PD 小鼠造模和评价方法,将 40 只小鼠随机分为生理盐水对照组、MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组和 MPTP + Rg1 + H89 组,每组 10 只。在注射 MPTP 前 3 d,生理盐水对照组、MPTP 模型组小鼠腹腔注射生理盐水 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,连续 4 d,第 4 天在注射完人参皂苷 2 h 后,MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠腹腔注射 MPTP $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,均注射 4 次,每次间隔 2 h,而 MPTP + Rg1 + H89 组在首次注射 MPTP 前 30 min 腹腔注射 H89 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按照文献[5]中所述的游泳实验方法和评分标准来进行,将小鼠放于 $50 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ 、水温 $(27 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的水箱中,连续 7 d,观察其游泳情况,对模型小鼠进行运动能力评估和分析。7 d 后对各组小鼠快速断头取脑,于冰上分离出中脑黑质组织,在液氮中快速冷冻后, -80°C 冰箱保存备用。

1.4 RT-PCR 检测总 *Nrg1*、*Nrg1* 亚型 I/II/III 及受体 *ErbB4* mRNA 水平 应用 TRIzol 试剂提取中脑黑质中总 RNA,根据试剂盒说明反转录合成 cDNA。总 *Nrg1* 上游引物序列:5'-TTGGAAATGGA-CAGCAACCC-3',下游引物序列:5'-TGTTCTGTAT-GCCCAGGAATGG-3',PCR 扩增产物长度为 102 bp;*Nrg1*-type I/II 上游引物序列:5'-ATGTGCAAAGT-

GATCAGCAAG-3',下游引物序列 5'-TGAGGACA-CATAGGGTCTTT-3';PCR 扩增产物长度为 120 bp;*Nrg1*-type III 上游引物序列:5'-GCTGTCTGCTTTTC-CTCCCTT-3'下游引物序列:5'-TGTTTGTGGCT-GAGTTCCTGA-3',PCR 扩增产物长度为 103 bp;ErbB4 上游引物序列:5'-CTCAGGACCAAAGGA-CAC-3',下游引物序列:5'-GGAATCTAC-CACGAAGTTAT-3',PCR 扩增产物长度为 190 bp;GAPDH 上游引物序列 5'-GCCAAGGTCATCCATGA-CAAC-3',下游引物序列 5'-AGTGTAGCCCAAGAT-GCCCTT-3',PCR 扩增产物长度为 351 bp。PCR 反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,变性 30 s,60 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,共 29 个循环,72 $^\circ\text{C}$ 再延伸 10 min。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用快速凝胶成像系统拍摄电泳图谱条带,利用图像分析软件分析条带灰度值。以各实验组目的基因相对于 GAPDH 的亮度值与生理盐水对照组再做相对比值,来表示各组目的基因的相对表达变化程度。实验重复 3 次。

1.5 Western blot 实验检测 ErbB4 及磷酸化 ErbB4 (p-ErbB4) 蛋白表达水平 取中脑黑质组织,每 100 mg 组织中加入 1 mL 细胞裂解液与蛋白磷酸酶抑制剂混合物(99 : 1),冰上研磨,4 $^\circ\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 17 min 后取上清,取 20 μL 用于测蛋白浓度,其余上清液加聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白上样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,冰上冷却,蛋白变性, -20°C 保存。以聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,用湿转法转移至聚偏二氟乙烯膜上,质量分数 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加一抗(ErbB4 多克隆抗体 1 : 200, p-ErbB4 多克隆抗体 1 : 100, β -actin 单克隆抗体 1 : 1 000),4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜。三羟甲基氨基甲烷缓冲液冲洗后,分别与辣根酶标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 抗血清(1 : 12 000)室温震荡孵育 2 h,暗室内 X 光片曝光显影,用惠普扫描仪扫描底片,采用 Quantity One 图像分析软件测定条带灰度值,以目的条带与 β -actin 灰度值之比作为目的基因蛋白的表达。以各实验组目的蛋白条带相对于 β -actin 条带的灰度值与生理盐水对照组再做相对比值,表示各组 ErbB4 蛋白的相对表达变化程度。实验重复 3 次。

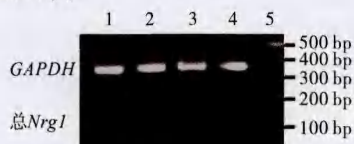
1.6 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析比较组间差异,LSD-*t* 检验进行两两比较; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

2.1.1 *Nrg1* mRNA 表达水平变化 琼脂糖凝胶

电泳成像见图 1。GAPDH 在 351 bp 处出现条带,目的基因总 *Nrg1* 在 102 bp 处出现条带,并且各组目的条带的表达程度有所不同,MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质总 *Nrg1* mRNA 表达水平分别为 0.46 ± 0.17 、 0.93 ± 0.17 、 0.65 ± 0.20 。方差分析表明组间差异有统计学意义($F=8.0230$, $P=0.0211$)。进一步两两比较发现,与生理盐水对照组比较,MPTP 模型组小鼠中脑黑质内的 *Nrg1* 基因 mRNA 表达水平显著降低($P=0.0079$);MPTP + Rg1 组与 MPTP 模型组相比,*Nrg1* mRNA 表达水平显著升高($P=0.0049$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP 模型组小鼠中脑黑质内 *Nrg1* mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($P=0.1513$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP + Rg1 组相比,小鼠中脑黑质内 *Nrg1* mRNA 表达水平降低($P=0.0493$)。



1:生理盐水对照组;2:MPTP 模型组;3:MPTP + Rg1 组;4:MPTP + Rg1 + H89 组;5:Marker。

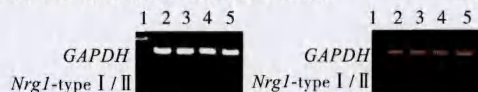
图 1 各组小鼠中脑黑质 *Nrg1* 总 mRNA 水平的 RT-PCR 结果

Fig. 1 RT-PCR results of *Nrg1* mRNA expression in substantia nigra of midbrain of mouse in each group

2.1.2 *Nrg1* mRNA 各亚型表达变化 *Nrg1*-type I/II 在 120 bp 处出现条带,各组条带的表达有所不同(图 2A)。MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质 *Nrg1*-type I/II mRNA 的表达水平(见表 1),方差分析表明组间差异有统计学意义($F=12.46$, $P=0.0187$)。进一步两两比较发现,MPTP 模型组小鼠中脑黑质内的 *Nrg1*-type I/II 的 mRNA 表达水平显著低于生理盐水对照组,差异有统计学意义($P=0.0019$);与 MPTP 模型组相比,MPTP + Rg1 组小鼠中脑黑质内的 *Nrg1*-type I/II mRNA 表达水平升高($P=0.0432$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP 模型组小鼠中脑黑质内 *Nrg1*-type I/II mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($P=0.6885$);与 MPTP + Rg1 组比较,MPTP + Rg1 + H89 组小鼠中脑黑质内 *Nrg1*-type I/II mRNA 表达显著下降($P=0.0294$)。

Nrg1-type III 在 103 bp 处出现条带,各组条带的表达差异不大($F=3.418$, $P=0.1199$),见图 2B。MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质 *Nrg1*-type III mRNA 表达水平见表 1。与生理盐水对照组比较,MPTP 模型组小鼠黑质 *Nrg1*-

type III mRNA 表达略有降低,但差异无统计学意义($P=0.2908$);与 MPTP 模型组比较,MPTP + Rg1 组小鼠黑质 *Nrg1*-type III mRNA 表达升高($P=0.0419$),MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质 *Nrg1*-type III mRNA 表达降低($P=0.7289$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP + Rg1 组小鼠黑质 *Nrg1*-type III mRNA 表达比较差异无统计学意义($P=0.1642$)。



A:*Nrg1*-type I/II 的 RT-PCR 检测结果;B:*Nrg1*-type III 的 RT-PCR 检测结果。1:Marker;2:生理盐水对照组;3:MPTP 模型组;4:MPTP + Rg1 组;5:MPTP + Rg1 + H89 组。

图 2 各组小鼠中脑黑质 *Nrg1* mRNA 不同亚基的表达水平
Fig. 2 Expression levels of distinct *Nrg1* mRNA isoforms in the substantia nigra of midbrain of mouse in each group

表 1 各组小鼠中脑黑质 *Nrg1* mRNA 各亚型表达水平
Tab. 1 Expression levels of distinct *Nrg1* mRNA isoforms in the substantia nigra of midbrain of mouse in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	<i>Nrg1</i> -type I/II mRNA	<i>Nrg1</i> -type III mRNA
生理盐水对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MPTP 模型组	0.38 ± 0.12^a	0.82 ± 0.29
MPTP + Rg1 组	0.77 ± 0.14^b	1.12 ± 0.18^b
MPTP + Rg1 + H89 组	0.31 ± 0.29^c	0.88 ± 0.24

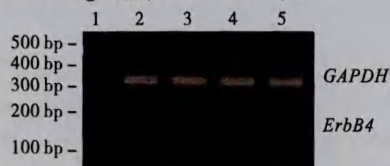
注:与生理盐水对照组比较^a $P<0.01$;与 MPTP 模型组比较^b $P<0.05$;与 MPTP + Rg1 组比较^c $P<0.05$ 。

2.1.3 NRG1 受体 *ErbB4* mRNA 表达水平 *ErbB4* mRNA 的 PCR 检测结果在 190 bp 处出现条带,各组条带的表达强度之间差异不大(图 3)。MPTP 模型组、MPTP + Rg1 组、MPTP + Rg1 + H89 组小鼠黑质 *ErbB4* mRNA 表达水平分别为 0.90 ± 0.33 、 1.05 ± 0.29 、 1.03 ± 0.29 。方差分析表明,组间差异无统计学意义($F=0.7849$, $P=0.5318$)。

2.2 Western blot 结果 *ErbB4* 和 p-*ErbB4* 蛋白表达水平见图 4、表 2。在预染蛋白标准相对分子质量 43 000 附近可见 β -actin 表达条带,在相对分子质量 147 000 处可见 *ErbB4* 表达条带,且各组条带的表达强度差异不大。各组小鼠中脑黑质内 *ErbB4* 总的蛋白表达水平差异无统计学意义($F=0.1578$, $P=0.8005$)。

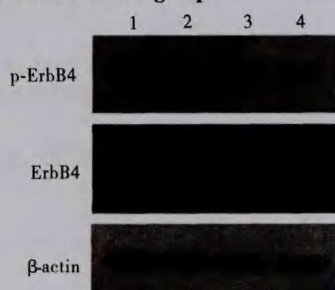
在预染蛋白标准相对分子质量 200 000 处可见 p-*ErbB4* 的表达条带,各组条带的表达有所不同。各组小鼠黑质 p-*ErbB4* 蛋白的相对表达水平比较差异有统计学意义($F=17.0400$, $P=0.0282$),进一步两两比较发现,MPTP 模型组 p-*ErbB4* 表达水平低于生理盐水对照组($P=0.0134$);MPTP + Rg1 组 p-*ErbB4* 表达水平高于 MPTP 模型组($P=0.0199$);MPTP + Rg1 + H89 组与 MPTP 模型组 p-*ErbB4* 表达水平比较差异无统计学意义($P=$

0.887 7);MPTP + Rg1 + H89 组 p-ErbB4 表达水平低于 MPTP + Rg1 组($P=0.047\ 8$)。



A: *Nrg1*-type I/II 的 RT-PCR 检测结果;B: *Nrg1*-type III 的 RT-PCR 检测结果。1: Marker;2: 生理盐水对照组;3: MPTP 模型组;4: MPTP + Rg1 组;5: MPTP + Rg1 + H89 组。

图3 各组小鼠中脑黑质 NRG1 受体 *ErbB4* mRNA 表达水平
Fig.3 Expression of *ErbB4* mRNA in substantia nigra of midbrain of mouse in each group



1: 生理盐水对照组;2: MPTP 模型组;3: MPTP + Rg1 组;4: MPTP + Rg1 + H89 组。

图4 各组小鼠中脑黑质 *ErbB4* 及 p-*ErbB4* 蛋白表达水平
Fig.4 Results of *ErbB4* and p-*ErbB4* protein expression in the substantia nigra of midbrain of mouse in each group

表2 各组小鼠中脑黑质 *ErbB4* 及 p-*ErbB4* 蛋白表达水平
Tab.2 Expression of *ErbB4* and p-*ErbB4* protein in the substantia nigra of midbrain of mouse in each group

组别	($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	<i>ErbB4</i> 蛋白	p- <i>ErbB4</i> 蛋白
生理盐水对照组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
MPTP 模型组	1.05 ± 0.21	0.34 ± 0.13 ^a
MPTP + Rg1 组	0.94 ± 0.11	0.78 ± 0.14 ^b
MPTP + Rg1 + H89 组	0.97 ± 0.26	0.37 ± 0.27 ^c

注:与生理盐水对照组比较^a $P<0.05$;与 MPTP 模型组比较^b $P<0.05$;与 MPTP + Rg1 组比较^c $P<0.05$ 。

3 讨论

PD 的主要病理改变是中脑黑质致密区多巴胺能神经元变性进行性缺失,当黑质多巴胺能神经元数量减少 50% ~ 60%,患者出现静止性震颤、肌肉僵硬、运动迟缓和姿势反射异常等运动障碍^[5,6]。PD 的治疗方法一直处在探索阶段,目前的主要治疗方法为药物(如左旋多巴等)替代治疗和手术治疗(如核团毁损或者深部脑刺激等),这些治疗方法只能缓解其症状,并不能阻止疾病的进展。一直以来,学者对 PD 的治疗进行了大量研究,其中,神经营养因子是一种对神经元有保护作用的营养因子,因能

保护多巴胺能神经元而成为关注焦点^[7]。

NRG1 是神经营养家族的一员,含有 EGF 功能结构域,在各个脑区域包括下丘脑、海马、基底核和脑干等部位均有广泛的分布和表达^[1]。NRG1 在不同类型的细胞中发挥不同的功能:促进神经元细胞分化;促进乙酰胆碱受体聚集,促进神经肌肉接头发育;促进神经胶质细胞增殖^[8]。在神经系统中,由于发生在 NRG1 转录产物的不同部位的选择性剪接作用,根据 2 种亚基的 EGF 样结构域的 N 端不同,人们将 NRG1 分为含有一个免疫球蛋白(Ig)样结构域的 Type I 和 Type II,含有一个半胱氨酸丰富的结构域 CRD 形式 Type III,其中 Type I 和 Type II 在脑内神经元中表达较高,而 Type III 在施旺细胞和胶质细胞中表达较高;这些不同的亚型与其受体的亲和力也各不相同^[8]。在脑组织中,NRG1 通过激活其 ErbB 酪氨酸激酶受体家族的蛋白二聚体来发挥不同的生物学效应,这些受体主要包括 ErbB2、ErbB3 和 ErbB4,其中 NRG1 与 ErbB2 和 ErbB4 的亲合性较高,而 ErbB2 主要表达于胶质细胞中,因此,NRG1 激活的 ErbB4 磷酸化活性信号通路在神经元的功能调节中占据重要地位^[1,8]。本研究通过动物体内实验发现,MPTP 模型组小鼠中脑黑质内的 *Nrg1* 基因的 mRNA 表达水平显著降低,*Nrg1* 各个亚型的基因表达均低于生理盐水对照组小鼠。进一步对 *ErbB4* 的表达水平进行了分析,PCR 和 Western blot 结果均显示,各组小鼠脑内的 *ErbB4* mRNA 表达水平相对稳定。据文献已经表明,脑内 NRG1 的升高会增强 ErbB4 的磷酸化活性和下游通路的功能^[8],于是对 ErbB4 的磷酸化做进一步研究,结果与前述 *Nrg1* 基因表达变化趋势一致。这可能是由于大剂量注射 MPTP 后诱导急性 PD 模型,导致大量的多巴胺能神经元变性坏死,使得来源于神经元的 NRG1 表达下降,也降低了 ErbB4 磷酸化活性和下游通路的功能,尤其对含有免疫球蛋白(Ig)样结构域的 *Nrg1*-type I/II 作用更明显。这些研究提示了 NRG1-ErbB4 信号通路在 PD 患者脑内可能具有一定的调节作用。

人参皂苷 Rg1 是人参中的主要生物活性成分,具有抗氧化、抗凋亡、抗炎的作用,其主要作用于中枢神经系统,在神经营养、神经保护、神经可塑性方面具有显著效果。本课题组前期的实验发现,给予 PD 小鼠模型注射人参皂苷 Rg1,可以显著改善小鼠的 PD 症状^[9],但是其分子机制仍不明确。在本研究中,当使用 Rg1 干预 PD 小鼠模型时,发现 Rg1 可以上调中脑黑质内 *Nrg1* 的基因表达水平,其中对 *Nrg1*-type I/II mRNA 的上调作用最明显。有研究表明,H89 可以通过 AC/cAMP/PKA 通路抑制人参

皂苷 Rg1 的作用^[3]。当给予 PD 小鼠以 H89 来阻断人参皂苷 Rg1 的作用后, *Nrg1* mRNA 及其主要剪切体的表达上调则不明显。这些研究表明, 人参皂苷 Rg1 对多巴胺能神经元具有保护作用, 增强小鼠中脑多巴胺能神经元中 NRG1 的基因表达, 进而激活其 ErbB4 受体的磷酸化活性, 缓解 PD 症状。

综上所述, PD 小鼠脑内的 *Nrg1* 基因表达及其 ErbB4 受体的活性降低, 而人参皂苷 Rg1 可能通过增强小鼠中脑黑质 NRG1-ErbB4 的通路活性而改善 PD 的症状。

参考文献:

- [1] 郭汝金, 敖丽娟, 李咏梅, 等. 神经调节蛋白 1-ErbB 信号通路的研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 2(7): 30-34.
- [2] LIU Q, KOU J P, YU B Y. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in pc12 cells via inhibiting NF- κ B activation[J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(1): 2090-2101.
- [3] 魏家彬, 杨帆, 王淑秀, 等. 人参皂苷 Rg1 对 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶诱导的帕金森病小鼠黑质酪氨酸蛋白激酶 A4

表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(5): 404-407.

- [4] 郭德玉, 于向东, 陈彪, 等. MPTP 致 C57BL/6 小鼠帕金森病模型的复制及常用的行为学分析方法[J]. 实验动物学, 2010, 27(2): 1-4.
- [5] BLES A J, JURI C, GARCIA-CABEZAS M A, et al. Inter-hemispheric asymmetry of nigrostriatal dopaminergic lesion: a possible compensatory mechanism in parkinson's disease[J]. *Front Syst Neurosci*, 2011, 5(3): 92-94.
- [6] 姜建凯, 王玉梅, 邢红霞, 等. 米诺环素对帕金森病模型大鼠胶质细胞源性神经生长因子受体 α 1 表达的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(8): 612-615.
- [7] 韩暄, 牛朝诗. 新型神经营养因子 CDNF/MANF 家族与帕金森病[J]. 立体定向和功能神经外科杂志, 2011, 5(3): 91-93.
- [8] MEI L, XIONG W C. Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(6): 437-452.
- [9] 朱丰霞, 王淑, 段瑛, 等. 人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠黑质 EphB1、ephrinB2 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 4(35): 1015-1017.

(本文编辑: 孟 月 英文编辑: 孟 月)

(上接第 274 页)

的神经元钙超载, amino-Nogo + 尼莫地平组神经元细胞内钙离子浓度随着时间推移呈持续上升趋势, 在 3 min 时, amino-Nogo + 尼莫地平组与 amino-Nogo 组相比神经元细胞内钙离子浓度差异无统计学意义, 5, 7 min 时, amino-Nogo + 尼莫地平组较 amino-Nogo 组神经元细胞内钙离子浓度低, 但较同时间点对照组和 Nogo-66 组明显升高, 提示 amino-Nogo 所引起的钙超载可能与其他因素(如 T 型钙通道、钙库等)也具有相关性。

虽然本实验揭示了 amino-Nogo 是 Nogo-A 中导致神经元细胞内钙离子浓度升高的责任功能片段, 但目前其受体和相关信号通路并不明确。amino-Nogo 是 Nogo-A 的氨基端, 一部分位于细胞表面, 一部分位于细胞内, 功能片段包括 Nogo-A- Δ 2、Nogo-A- Δ 20^[9];除了可以抑制神经轴突生长, 该片段还具有抑制细胞粘附和迁移的功能^[10]。目前 Nogo-A- Δ 2、Nogo-A- Δ 20 的受体和信号通路均不明确, 明确上述功能片段的对应受体及信号通路, 从而寻找其竞争性拮抗剂具有重要意义。本实验对于揭示上述机制提供了有益的思路, 即从 amino-Nogo 导致神经元钙超载途径的角度筛选与钙超载相关的信号通路, 从而进一步探索 Nogo-A- Δ 2、Nogo-A- Δ 20 所对应的受体及信号通路。

参考文献:

- [1] CHEN M S, HUBER A B, VAN DER HAAR M E, et al. Nogo-A is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1[J]. *Nature*, 2000, 403(6768): 434-439.
- [2] GOMEZ T M, ZHENG J Q. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(2): 115-125.
- [3] 熊南翔, 赵洪洋, 张方成, 等. 钙离子参与 Nogo-A 抑制轴突生长的作用[J]. 解剖学报, 2005, 36(6): 582-585.
- [4] HUO Y, YIN X L, JI S X, et al. Amino-Nogo inhibits optic nerve regeneration and functional recovery via the integrin α v signaling pathway in rats[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(2): 616-626.
- [5] 李晓娟, 白瑞樱, 郭直岳, 等. β 淀粉样蛋白对三磷酸腺苷所致大鼠海马神经元损伤的影响[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31(9): 691-694.
- [6] SUI Y P, ZHANG X X, LU J L, et al. New insights into the roles of Nogo-A in CNS biology and diseases[J]. *Neurochem Res*, 2015, 40(9): 1767-1785.
- [7] ATWAL J K, PINKSTON-GOSSE J, SYKEN J, et al. PirB is a functional receptor for myelin inhibitors of axonal regeneration[J]. *Science*, 2008, 322(5903): 967-970.
- [8] 杜宇翔, 郭大东, 毕宏生. 视觉系统中钙库操纵钙内流通路的研究进展[J]. 眼科新进展, 2014, 34(4): 389-393.
- [9] KEMPF A, SCHWAB M E. Nogo-A represses anatomical and synaptic plasticity in the central nervous system[J]. *Physiology*, 2013, 28(3): 151-163.
- [10] HU F, STRITTMATTER S M. The N-terminal domain of Nogo-A inhibits cell adhesion and axonal outgrowth by an integrin-specific mechanism[J]. *J Neurosci*, 2008, 28(5): 1262-1269.

(本文编辑: 李胜利 英文编辑: 杨 博)