

剂量反应关系,72 h 的 IC₅₀ 为 49.50 μmol/L,流式细胞仪分析证实姜黄素能聚积细胞在 S 期,电镜发现姜黄素可使细胞坏死⁽⁶⁾,诱导细胞凋亡证明姜黄素可干扰 QCY 细胞的周期分布,具有细胞毒作用、抗增殖、诱导细胞凋亡的作用⁽⁷⁾。众多的研究暗示姜黄素可能对肿瘤细胞的生长具有一定抑制作用,也有研究发现姜黄素可以增加放疗的敏感性^(8,9)。本文说明姜黄素可能并不能单纯的起作用,必须和别的措施或者药物协同起作用。

综上所述,姜黄素可以增加直肠癌 CD133⁺ 肿瘤干细胞样细胞群放疗敏感性,抑制肿瘤细胞生长促进细胞凋亡,临床上对于直肠癌治疗时可以使用,但是也要注意姜黄素使用的适应证以及预防可能出现的不良反应。

4 参考文献

- 1 张 鹏,陈方敏,石家齐,等. 增韧基团-姜黄素酯协同二甲双胍对前列腺癌 PC-3 细胞凋亡的影响 (J). 中华实验外科杂志,2013;30(6):1181-3.
- 2 陈方敏,任德帅,石家齐,等. 增韧基团-姜黄素酯对前列腺癌细胞体外靶向影响 (J). 中华实验外科杂志,2012;29(3):1066-8.
- 3 Valent P, Bonnet D, DeMaria R, et al. Cancer stem cell definitions and

- terminology: the devil is in the details (J). Nat Rev Cancer, 2012;12(11):767-75.
- 4 何利兵,王险峰,王红胜,等. 姜黄素衍生物体外抑制结肠癌细胞增殖侵袭作用 (J). 中国癌症杂志,2013;23(1):17-25.
- 5 吕文平,李世拥,安 萍,等. CD/5-FC 对人直肠癌细胞辐射增敏作用的研究 (J). 中华普通外科杂志,2002;17(7):440-2.
- 6 Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between Cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition (J). Breast Cancer Res, 2011;13(3):211-20.
- 7 刘双林,王志华,胡志全. 姜黄素对雄激素非依赖性前列腺癌抑制效应及其机制 (J). 中华实验外科杂志,2010;27(11):1711-3.
- 8 Yang CW, Chang CL, Lee HC, et al. Curcumin induces the apoptosis of human monocytic leukemia THP-1 cells via the activation of JNK/ERK pathways (J). BMC Complement Chem Med, 2012;12:22.
- 9 Shi HS, Gao X, Li D, et al. A systemic administration of liposomal curcumin inhibits radiation pneumonitis and sensitizes lung carcinoma to radiation (J). Int J Nanomed, 2012;7:2601-11.

(2013-11-07 修回)

(编辑 袁左鸣)

人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠黑质 EphB1、ephrinB2 表达的影响

朱丰霞 王淑秀 段 瑛 李培艳 张哲莹 (新乡医学院病理教研室,河南 新乡 453003)

(摘要) 目的 探讨人参皂苷 Rg1 对帕金森病(PD)小鼠黑质中 EphB1、ephrinB2 表达的影响及其意义。方法 将 27 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和人参皂苷 Rg1 组。小鼠腹腔注射人参皂苷 Rg1 预防给药,腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)构建 PD 模型。观察小鼠游泳情况并评分。2 w 后采用免疫组化方法检测小鼠黑质酪氨酸羟化酶(TH)的表达,采用 RT-PCR 法检测黑质 EphB1、ephrinB2 mRNA 的表达,采用 Western 印迹法检测黑质 EphB1、ephrinB2 蛋白的表达。结果 模型组小鼠不同时间点游泳实验分值均显著低于对照组和人参皂苷 Rg1 组($P<0.05$);免疫组化结果显示模型组和人参皂苷 Rg1 组 TH 蛋白表达水平显著低于对照组($P<0.05$);RT-PCR 结果显示模型组 EphB1、ephrinB2 mRNA 表达水平显著高于对照组和人参皂苷 Rg1 组($P<0.01$);Western 印迹显示模型组 ephrinB2 蛋白表达水平显著高于对照组和人参皂苷 Rg1 组($P<0.05$)。结论 人参皂苷 Rg1 可能通过降低 EphB1、ephrinB2 的表达而改善 PD 症状。

(关键词) 帕金森病(PD);人参皂苷 Rg1;EphB1;ephrinB2

(中图分类号) R36 **(文献标识码)** A **(文章编号)** 1005-9202(2015)04-1015-03;doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.04.069

帕金森病(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⁽¹⁾。促红细胞生成素产生肝细胞受体(Eph)激酶是细胞表面型受体酪氨酸激酶(RTKs)的一种,其配体主要表达于细胞表面,被命名为 ephrin。Eph/ephrin 酪氨酸激酶家族可能参与调节 PD 多巴胺能神经元的变性过程⁽²⁾。人参皂苷 Rg1 属人参皂苷三醇型,具有保护大鼠大脑皮质神经元、防止细胞凋

亡发生的功能⁽³⁾,对 MPP⁺ 和氨基酸兴奋性毒性对多巴胺能神经元的损伤亦有保护作用⁽⁴⁾。人参皂苷 Rg1 可能通过调控细胞凋亡改善和治疗 PD⁽⁵⁾。本研究观察人参皂苷 Rg1 对 PD 小鼠模型黑质多巴胺能神经元中 EphB1、ephrinB2 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物 12 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 27 只,体重 22~30 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)。自然光照,实验前适应性喂养 1 w。

1.2 试剂 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)购于 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;RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;SP 免疫组化染色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有

基金项目:河南省高校科技创新人才支持计划资助(N₀.2010HASTIT008)

通讯作者:王淑秀(1970),女,硕士生导师,博士,教授,主要从事帕金森病发病机制研究。

第一作者:朱丰霞(1985),女,硕士,主要从事帕金森病发病机制研究。

限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)购于碧云天生物技术有限公司;TRizol(Cat. No. 1559 6-026)为美国 Invitrogen 公司产品;酪氨酸羟化物(TH)和 β -actin 小鼠抗小鼠单克隆抗体为美国 Millipore 公司产品;EphB1 兔抗小鼠多克隆抗体(H-80)、ephrinB2 兔抗小鼠多克隆抗体(H-83)为美国 Santa Cruz 公司产品;PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 动物分组与模型构建 将 27 只小鼠随机分为对照组、模型组和人参皂苷 Rg1 组,每组 9 只。注射 MPTP 前,对照组和模型组腹腔注射 0.9% 生理盐水($1 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),人参皂苷 Rg1 组腹腔注射人参皂苷 Rg1($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续 3 d。预防给药 3 d 后,对照组继续腹腔注射 0.9% 生理盐水(1 ml/kg),模型组和人参皂苷 Rg1 组腹腔注射 MPTP(20 mg/kg),均注射 4 次,每次间隔 2 h。在最后 1 次注射 MPTP 后第 14 天按不同实验要求取材。

1.4 游泳实验 分别于注射完 MPTP 后第 1、5、9、13 天将小鼠放入一个 $40 \text{ cm} \times 25 \text{ cm} \times 16 \text{ cm}$ 、水温(27 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 的水箱中,观察其游泳情况。小鼠游泳评分标准如下:后肢下沉头漂浮者计 0 分;偶尔用后肢游动并漂浮一边者计 10 分;偶尔游泳者计 15 分;漂浮时间占整个受试时间一半者计 20 分;大部分时间游泳仅偶尔漂浮者计 25 分;连续不停游泳者计 30 分^[6]。

1.5 免疫组化染色 小鼠经 6% 水合氯醛麻醉(30 mg/kg),4% 多聚甲醛常规灌注固定脑组织后,迅速开颅取脑,4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}\text{C}$ 后固定过夜,置于 20% 蔗糖沉底后,转入 30% 蔗糖至沉底,对包含黑质的脑组织进行冠状冰冻连续切片,采用 SP 免疫组化方法染色。染色方法按照试剂说明书进行。阴性对照以 PBS 代替一抗进行,余操作相同。每张切片随机选取黑质区的 5 个高倍视野,计数阳性细胞,取其平均值。

1.6 RT-PCR 应用 TRizol 试剂提取组织中总 RNA。根据试剂盒说明书进行逆转录。PCR 反应循环参数为:94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。GAPDH 引物序列:正链为 5'-GCCAAGGTCATCCATGACAAAC-3',负链为 5'-AGTGTAGCCCAAGATGCC CTT-3',PCR 扩增产物长度为 351 bp;EphB1 引物序列:正链为 5'-CTGGCTATTACCGAGCTGACTT-3',负链为 5'-CCCATAGGCTACTGATGAGAC-3',PCR 扩增产物长度为 279 bp;ephrinB2 引物序列:正链为 5'-GTGCCAGACAAGAGCCATGAA-3',负链为 5'-GGTGCTAGAACCTGGATTG-3',PCR 扩增产物长度为 169 bp。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯(310 nm 波长)下观察凝胶,采用快速凝胶成像系统拍摄电泳图谱条带,运用 Geen-tools 分析软件对条带进行分析,以目的基因与 GAPDH 的积分光密度比值表示目的基因 mRNA 表达水平。实验重复 3 次。

1.7 Western 印迹法 每 100 mg 组织中加入 1 ml 细胞裂解液与 PMSF 的混合液(100:1)冰浴 30 min;超声 1 s,间隔 5 s,连续 5 次;4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心,17 min 后取上清,用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白定量后加 1/4 蛋白体积的 5 \times SDS 凝胶加样缓冲液混匀,沸水浴 5 min,使蛋白变性,冰上冷却。以 12% SDS-PAGE 电泳分离,半干电转移法转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱封闭过夜后加入一抗(EphB1 多克隆抗体,

1:150;ephrinB2 多克隆抗体,1:150; β -actin 单克隆抗体,1:4 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。TBST 冲洗后,分别与生物素标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 抗血清(1:200)室温震荡孵育 2 h。TBST 洗涤后,化学发光法显色,X 线底片曝光。用 HP 扫描仪扫描实验的底片,用 Image J 图像程序分析软件分析免疫印迹蛋白条带的积分光密度值,以目的基因与 β -actin 的积分光密度值之比值代表目的基因蛋白表达。实验重复 3 次。

1.8 统计学分析 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析及 LSD 检验。

2 结果

2.1 游泳实验 与对照组相比,模型组小鼠游泳时肢体协调性较差,大多数小鼠在水中漂浮时间较长;人参皂苷 Rg1 组小鼠游泳情况较模型组有所改善,仅偶尔在水中漂浮。见表 1。

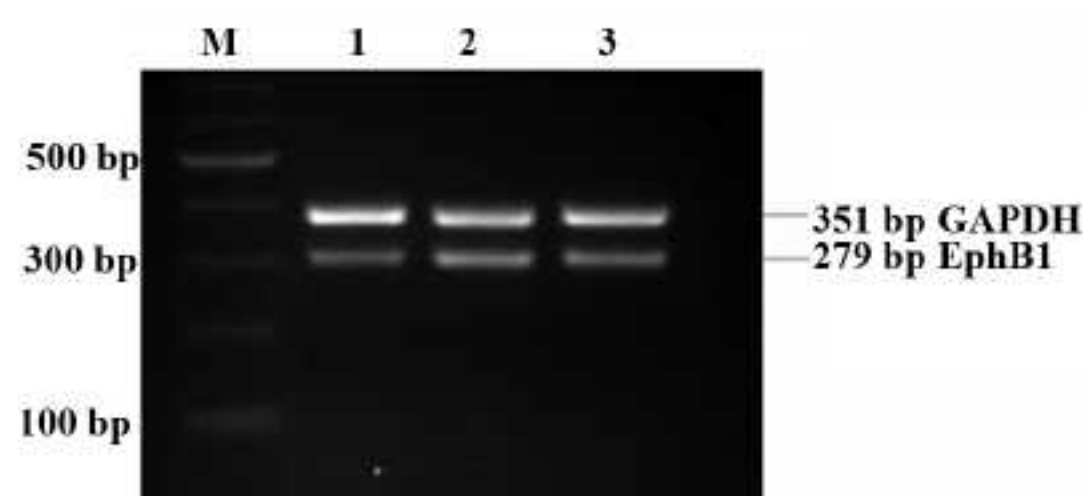
2.2 免疫组化 对照组黑质致密部可见大量 TH 阳性表达神经元,排列整齐呈条带状;与对照组相比,模型组 TH 阳性表达细胞明显减少,排列相对混乱;人参皂苷 Rg1 组,TH 阳性神经元数目较模型组增多。模型组小鼠黑质 TH 阳性细胞数(9.93 ± 4.35)显著低于对照组(20.80 ± 7.08 , $P < 0.01$)和人参皂苷 Rg1 组(13.27 ± 7.11 , $P < 0.05$)。

2.3 RT-PCR 模型组小鼠中脑黑质 EphB1 mRNA 表达水平(0.71 ± 0.01)显著高于对照组(0.46 ± 0.01 , $P < 0.01$)和人参皂苷 Rg1 组(0.63 ± 0.01 , $P < 0.01$);模型组小鼠中脑黑质 ephrinB2 mRNA 表达水平(0.50 ± 0.06)显著高于对照组(0.16 ± 0.02 , $P < 0.01$)和人参皂苷 Rg1 组(0.34 ± 0.05 , $P < 0.01$),见图 1,图 2。

表 1 小鼠游泳实验分值变化($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	第 1 天	第 5 天	第 9 天	第 13 天
对照组	28.89 \pm 2.21	29.44 \pm 1.67	29.44 \pm 1.67	28.78 \pm 2.64
模型组	19.2 \pm 5.34 ²⁾	20.71 \pm 6.73 ¹⁾	22.1 \pm 5.67 ¹⁾	21.43 \pm 3.78 ¹⁾
人参皂苷 Rg1 组	22.78 \pm 3.63 ³⁾	23.89 \pm 4.86 ³⁾	26.67 \pm 3.54 ³⁾	27.75 \pm 2.32 ⁴⁾

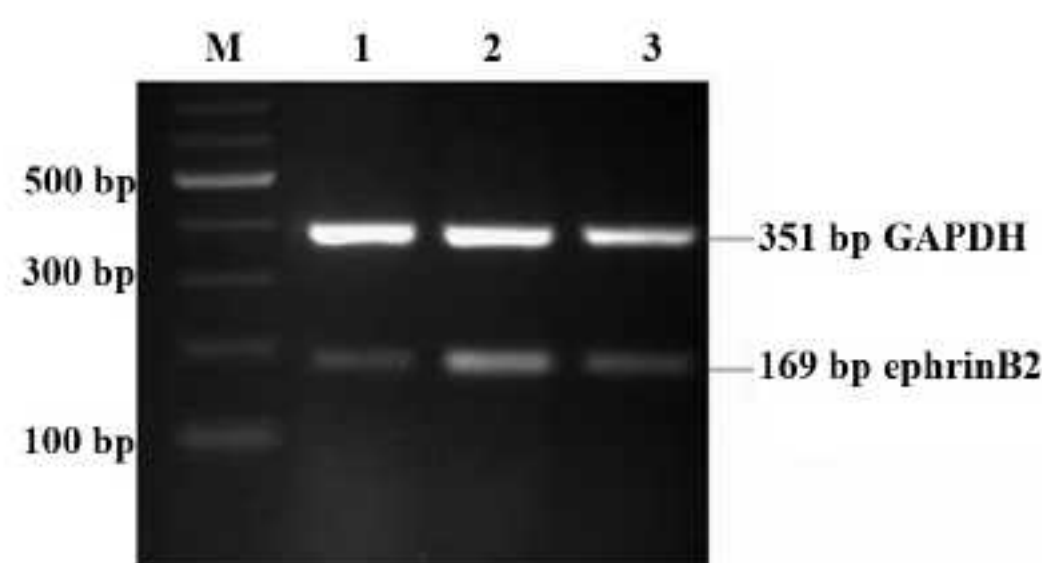
与对照组比较:1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$;与模型组比较:3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$



M: Marker, 1: 对照组, 2: 模型组, 3: 人参皂苷 Rg1 组

图 1 RT-PCR 检测小鼠黑质 EphB1 mRNA 表达的变化

2.4 Western 印迹法 模型组小鼠黑质 ephrinB2 蛋白表达水平(0.40 ± 0.02)显著高于对照组(0.14 ± 0.01 , $P < 0.01$)和人参皂苷 Rg1 组(0.18 ± 0.13 , $P < 0.01$),各组差异显著($F = 371.07$, $P < 0.01$);模型组、对照组及人参皂苷 Rg1 组小鼠黑质 EphB1 蛋白水平分别为 0.40 ± 0.03 、 0.37 ± 0.01 、 0.36 ± 0.05 ,各组间 EphB1 蛋白表达水平无显著差异。



M: Marker, 1: 对照组, 2: 模型组, 3: 人参皂苷 Rg1 组

图2 RT-PCR 检测小鼠黑质 ephrinB2 mRNA 表达的变化

3 讨论

PD 在 65 岁以上人群中发病率高达 1%, 其主要病变是黑质多巴胺能神经元显著变性丢失, 黑质纹状体多巴胺能通路变性, 纹状体多巴胺递质浓度显著降低, 乙酰胆碱系统功能相对亢进, 导致运动减少、肌肉僵直、静止性震颤等临床表现⁽⁷⁾。

TH 在多巴胺能神经元中含量丰富, 是脑内多巴胺能神经元的蛋白标志, 由于黑质区其他神经元缺乏 TH, 故黑质区 TH 免疫反应阳性神经元即多巴胺能神经元。在 PD 患者脑组织中, TH 表达含量明显下降, 表明多巴胺能神经元数量减少, 因而黑质中 TH 阳性表达的神经元数量减少已成为 PD 动物模型建立成功的指标之一⁽⁸⁾。MPTP 能显著降低黑质中 TH 的表达水平⁽⁸⁾。本研究结果提示 MPTP 诱导了黑质多巴胺能神经元变性, 而人参皂苷 Rg1 可能保护多巴胺能神经元免受 MPTP 的毒性作用或防止多巴胺能神经元凋亡。游泳实验显示模型组小鼠四肢协调性比对照组和人参皂苷 Rg1 组差, 可能与 MPTP 致多巴胺能神经元变性坏死或凋亡有关⁽⁹⁾, 提示人参皂苷 Rg1 对神经元有一定的保护作用。

Eph 受体酪氨酸激酶是一类具有酪氨酸激酶活性, 参与细胞生理和病理过程的受体样物质。Eph 受体及其配体 ephrinB2 在神经系统发育中参与组织边界形成、细胞迁移、轴突向导、突触信息和神经环路集合⁽¹⁰⁾。EphB 在正常成年大鼠神经系统中低表达⁽¹¹⁾, 当神经损伤后其表达上调⁽¹²⁾, 激活星形胶质细胞和少突胶质细胞, EphB 在这些细胞上重新分布⁽¹³⁾。本研究发现 EphB1 和 ephrinB2 在正常小鼠和 PD 小鼠黑质中均有不同程度的表达, PD 模型中 EphB1 和 ephrinB2 的 mRNA 及 ephrinB2 的蛋白表达水平均明显高于对照组, 可能由于大剂量注射 MPTP 后导致小鼠黑质大量的多巴胺能神经元变性坏死, 局部小胶质细胞和星形胶质细胞反应性增生, 且 EphB1 和 ephrinB2 在这些细胞中重新分布呈高表达有关⁽¹³⁾, 而 EphB1 蛋白在各组的表达无显著性差异, 可能由于刺激因子尚未影响其翻译过程。人参皂苷 Rg1 干预后 EphB1、ephrinB2 的表达较模型组明显减少, 可能与人参皂苷 Rg1 具有抗炎作用⁽¹⁴⁾, 抑制小胶质细胞的增生有关。

综上所述, 本研究认为人参皂苷 Rg1 可能通过降低 EphB1、ephrinB2 的表达改善 PD 症状, 其具体机制尚需进一步研究。

4 参考文献

- Pandey S. Parkinson's disease: recent advances (J). J Assoc Physicians India, 2012; 60: 30-2.
- Yue Y, Widmer DA, Halladay AK, et al. Specification of distinct dopaminergic neural pathways: roles of the Eph family receptor EphB1 and ligand ephrinB2 (J). J Neurosci, 1999; 19 (6): 2090-101.
- Liu Q, Kou JP, Yu BY. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in pc12 cells via inhibiting NF-κB activation (J). Neurochem Int, 2011; 58 (1): 119-25.
- Leung KW, Yung KK, Mak NK, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 in primary nigral neurons against rotenone toxicity (J). Neuropharmacology, 2007; 52 (3): 827-35.
- Chen XC, Zhou YC, Chen Y, et al. Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress (J). Acta Pharmacol Sin, 2005; 26 (1): 56-62.
- 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.
- Wichmann T, De Long MR. Pathophysiology of Parkinson's disease: the MPTP primate model of the human disorder (J). Ann N Y Acad Sci, 2003; 991 (1): 199-213.
- Li S, Pu XP. Neuroprotective effect of kaempferol against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease (J). Biol Pharm Bull, 2011; 34 (8): 1291-6.
- Arraf Z, Amit T, Youdim MB, et al. Lithium and oxidative stress lessons from the MPTP model of Parkinson's disease (J). Neurosci Lett, 2012; 516 (1): 57-61.
- Wilkinson DG. Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly (J). Int Rev Cytol, 2000; 196: 177-244.
- Song XJ, Cao JL, Li HC, et al. Upregulation and redistribution of ephrinB and EphB receptor in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury and dorsal rhizotomy (J). Eur J Pain, 2008; 12 (8): 1031-9.
- Fu CT, Tran T, Stretavan D. Axonal/glia upregulation of EphB/ephrin-B signaling in mouse experimental ocular hypertension (J). Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010; 51 (2): 991-1001.
- Zhao J, Yuan G, Cendan CM, et al. Nociceptor-expressed ephrinB2 regulates inflammatory and neuropathic pain (J). Mol Pain, 2010; 6 (1): 77-90.
- 张均田. 人参皂甙 Rg1 和 Rb1 药理作用的比较 (J). 基础医学与临床, 2000; 23 (5): 4-6.

(2012-12-17 修回)

(编辑 赵慧玲/曹梦园)