

人参皂苷 Rg1 对阿尔茨海默病模型大鼠脑片磷酸化 Tau 蛋白及胆碱乙酰基转移酶表达的影响

李 源 刘 颖¹ 袁海峰¹ 马新欣¹ 张 欣¹ 李 明¹ 侯吉星¹ 权乾坤¹ 李 玺¹

(西安电力中心医院, 陕西 西安 710032)

〔摘 要〕 目的 观察人参皂苷 Rg1 对阿尔茨海默病(AD)模型大鼠脑片磷酸化 tau 蛋白(P-tau)及胆碱乙酰基转移酶(ChAT)表达的影响。方法 将 5 周龄雄性大鼠脑片随机分为五组, 分别放置人工脑脊液中培养。3 个人参皂苷 Rg1 组培养液中分别加入不同浓度人参皂苷 Rg1, 在模型组和 3 个人参皂苷 Rg1 组培养液中分别加入冈田酸, 空白对照组不加任何处理。采用 Western 印迹、图像分析技术等方法, 检测皮层和海马 P-tau、ChAT 的表达水平。结果 与空白对照组比较, 模型组 P-tau 表达显著增加($P < 0.01$); ChAT 表达降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 人参皂苷 Rg1 各组 P-tau 表达均明显减少($P < 0.01$), ChAT 表达均明显增加($P < 0.01$); Rg1 三个浓度组之间差异显著($P < 0.01$), 以高浓度组效果最佳。结论 人参皂苷 Rg1 可通过降低 P-tau 表达水平, 提高 ChAT 活性, 从而减少神经元纤维缠结的形成, 并可能通过调节胆碱能功能的途径发挥抗痴呆的作用。

〔关键词〕 人参皂苷 Rg1; 阿尔茨海默病; 磷酸化 tau 蛋白; 胆碱乙酰基转移酶

〔中图分类号〕 R285.5 **〔文献标识码〕** A **〔文章编号〕** 1005-9202(2015)06-1640-02; doi:10.3969/j.issn.1005-9202.2015.06.095

阿尔茨海默病(AD)病理改变主要包括老年斑(SP)、神经元纤维缠结(NFT)和神经元丢失等^[1-3]。tau 蛋白异常磷酸化是导致神经元纤维缠结发生的原因之一。神经递质乙酰胆碱的含量会随着年龄的增加而下降, 而老年痴呆患者下降更为严重^[4]。因此, 胆碱乙酰基转移酶(ChAT)的活性也反映了胆碱能神经元的活性和 AD 的严重程度。人参皂苷 Rg1 是人参皂苷中最主要的成分之一, 具有促进海马神经发生、提高神经可塑性、增强学习、记忆力等作用^[5], 提示 Rg1 对 AD 治疗有着重要的潜在价值。但目前, 关于人参皂苷 Rg1 对磷酸化 tau (P-tau)蛋白及 ChAT 的影响国内外均未见研究报道。本研究以冈田软海绵酸(OA)诱导大鼠脑片 tau 蛋白过度磷酸化制备 AD 模型, 观察人参皂苷 Rg1 对 P-tau 蛋白、ChAT 的表达的影响, 旨在阐明人参皂苷 Rg1 抗痴呆的作用机制。

1 材料与方法

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

1.2 药品及试剂 人参皂苷 Rg1, 纯度 98.99%, 吉林宏久生物科技股份有限公司产品; OA, 纯度 98%, 美国 ALEXIS 生物制剂公司产品; P-tau (Sere202) 一抗 ChAT 一抗, 辣根酶标记二抗, 武汉博士德生物工程有限公司产品; PVDF 膜及 DAB 染色试剂盒购自北京博奥森生物工程有限公司。

1.3 仪器 振动切片机(上海之信仪器有限公司, 型号: ZQP-

86); 紫外分光光度仪(日本岛津, 型号: UV-260); 蛋白电泳仪(美国 BIO-RAD, 型号: 迷你型 3); 凝胶成像图像分析仪(意大利 Segrate (Milan))。

1.4 方法

1.4.1 AD 模型大鼠脑片模型的制备、分组及干预 将大鼠麻醉, 快速断头, 取出脑组织, 行冠状切片, 取海马及皮层脑片置入盛有人工脑脊液的 6 孔板中培养。整个过程持续通入混合氧气(95% O₂ + 5% CO₂), 温度始终保持低于 4℃。每只大鼠平均取 400 μm 厚海马及皮层脑片 5 张, 随机分为五组: 空白对照组、模型组、人参皂苷 Rg1 高、中、低浓度组。各组脑片首先至于人工脑脊液中不做任何处理恢复 1 h; 然后 Rg1 高、中、低浓度组分别加入 Rg1 致使其终浓度为 240、120、60 μmol/L, 培养至 2 h; 然后将 OA 加入模型组和人参皂苷 Rg1 各组中, 致使其终浓度分别为 1 μmol/L, 作用 3 h, 空白对照组不加任何处理。

1.4.2 Western 印迹 干预结束后, 将脑片取出匀浆, 充分裂解后离心分离, 定量分装。采用不连续 SDS-PAGE 法, 将提出的总蛋白经电泳仪电泳在分离胶上展开、转膜/印, 经多次封闭、漂洗后, 用待测目的蛋白的一抗(P-tau 抗体浓度 200 μg/ml、ChAT 抗体浓度 200 μg/ml)与 PVDF 膜上的蛋白质相互作用, 再与辣根酶标记的 ChAT、P-tau 第二抗体作用。采用 DAB 法显色, 用 PBS 做阴性对照。

1.4.3 图像分析与检测 通过二抗上的标记酶与底物的反应呈色, 用凝胶成像分析仪对各组蛋白条带表达情况进行灰度值扫描分析, 分别检测各组 P-tau、ChAT 阳性表达的情况, 然后以各组条带所测平均灰度值与 β-actin 的灰度值的比值, 表示该组阳性物质的表达量, 采集 10 组数据, 求均值。

1.5 统计学方法 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS13.0 软件进行单因素方差分析法及 LSD-t 检验。

2 结 果

2.1 人参皂苷 Rg1 对 AD 模型大鼠脑片 P-tau 表达的影响 与空白对照组比较, 模型组 P-tau 表达显著增加($P < 0.01$)。

基金项目: 陕西省科技攻关计划项目(2007K15-05(3)); 陕西省中医药管理局基金项目(2005030)

¹ 西安交通大学第二附属医院

通讯作者: 李 玺(1954-), 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事老年医学研究。

第一作者: 李 源(1976-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事老年医学研究。

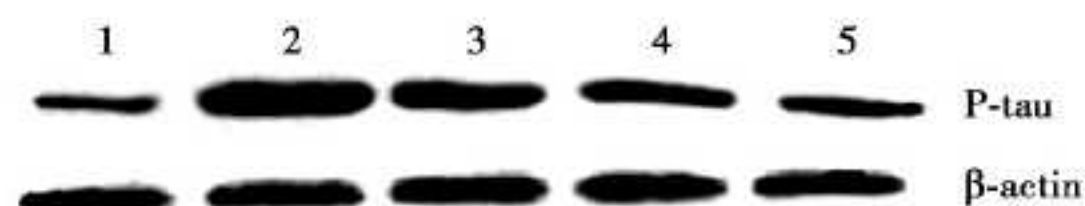
与模型组比较,人参皂苷 Rg1 各浓度组 P-tau 表达均显著减少 ($P < 0.01$),其中高浓度组 P-tau 表达减少最为明显,其次为中、低浓度组。见表 1、图 1。

2.2 人参皂苷 Rg1 对 AD 模型大鼠脑片 ChAT 表达的影响 与空白对照组比较,模型组 ChAT 表达显著减少 ($P < 0.01$)。人参皂苷 Rg1 各浓度组与模型组比较,ChAT 表达均显著增加 ($P < 0.01$);高浓度组较中浓度组 ChAT 表达增加更为显著 ($P < 0.01$),中浓度组较低浓度组表达增加 ($P < 0.01$)。见表 1、图 2。

表 1 人参皂苷 Rg1 对 AD 大鼠脑片 P-tau、ChAT 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	P-tau	ChAT
空白对照组	1.27 ± 0.07	10.85 ± 0.08
模型组	8.32 ± 0.08 ¹⁾	3.43 ± 0.11 ²⁾
Rg1 低浓度组	6.82 ± 0.28 ¹⁾²⁾	3.76 ± 0.09 ²⁾⁴⁾
Rg1 中浓度组	5.71 ± 0.04 ¹⁾²⁾³⁾	7.89 ± 0.18 ²⁾⁴⁾⁶⁾
Rg1 高浓度组	4.10 ± 0.05 ¹⁾²⁾³⁾⁴⁾	9.64 ± 0.27 ²⁾⁴⁾⁶⁾⁸⁾

与空白组比较:1) $P < 0.01$;与模型组比较:2) $P < 0.01$;与人参皂苷 Rg1 低浓度组比较:3) $P < 0.01$;与人参皂苷 Rg1 中浓度组比较:4) $P < 0.01$



1~5:空白对照组、模型组、Rg1 低、中、高浓度组。下图同

图 1 各组大鼠脑片 P-tau 的表达

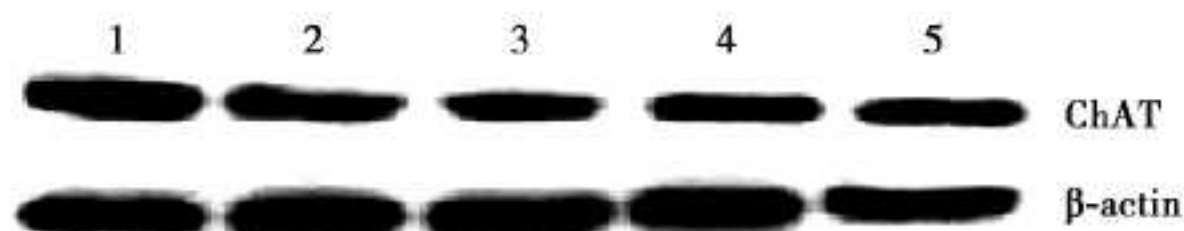


图 2 各组大鼠脑片 ChAT 的表达

3 讨论

AD 即老年性痴呆是以进行性记忆和认知功能丧失为临床特征的大脑退行性疾病。研究提示, Tau 蛋白异常磷酸化在 AD 患者神经变性和学习记忆障碍的发生发展中起重要作用^[6,7]。OA 是一种海洋生物提取物,研究证实,在体内或体外条件下,OA 可通过联结催化亚单位以及甲基化抑制磷酸酯酶活性并引发 tau 蛋白异常的磷酸化这一 AD 关键环节^[8],而 tau 蛋白异常磷酸化会使其结合组装微管的生物学功能降低,进而致微管解聚。由于微管在神经细胞的轴浆运输、极性维持等生理活动中具有重要作用,所以, tau 蛋白过度磷酸化会严重阻碍细胞的正常生理功能,最终导致神经细胞退化,产生或加重 AD 病情^[9]。AD 患者脑中 ChAT 的活性反映了胆碱能神经元的活性和病情的严重程度。本实验结果表明,OA 处理的模型组大鼠 ChAT 阳性表达数量显著减低。考虑这一机制可能正是由于 OA 使海马及皮层神经元中 tau 蛋白过度磷酸化,影响了启动微管组装的微管蛋白-β 亚单位与 GTP 结合的反应,降低了微管组装能力,损害了轴浆流,致使胞体和神经末梢之间的营养物质和递质的运输受到影响,使 ChAT 不能运输到海马及皮层,导

致 AD 模型大鼠脑片产生 ChAT 阳性表达数量显著减低的改变,最终影响到海马和皮层神经元的形态和功能。

人参皂苷被认为是人参的主要有效物质,约占 4%。根据皂苷元的不同,人参皂苷被分为原人参二醇类皂苷、原人参三醇类皂苷及齐墩果酸类皂苷。到目前为止,已分离鉴定出 40 余种人参皂苷单体。近年来,人参皂苷 Rg1、Rg2、Rb1 等单体治疗 AD 的研究已获得一定的突破^[10],其中,人参皂苷 Rg1 的相关研究已经显示出对 AD 的预防和治疗有一定的作用^[11,12]。但其机制有待进一步探讨。

本实验结果证实人参皂苷 Rg1 可以减少 AD 模型大鼠脑片 P-tau 的表达,同时增加胆碱能系统中乙酰胆碱的合成和释放,增强脑突触受体对胆碱的提取,提高大鼠 ChAT 的活性发挥抗 AD 的作用。并发现该作用具有明显的剂量依赖性。考虑其可能的机制是人参皂苷 Rg1 对抗了 OA 选择性抑制蛋白磷酸酯酶这一作用,保持了蛋白激酶和磷酸酯酶的动态平衡,使得 tau 蛋白异常磷酸化的数量减少,确保微管组装能力不受损害,进而保障了胆碱能系统中 ACh 的合成和释放,维持脑中 ChAT 的正常水平。总之,人参皂苷 Rg1 可能通过抑制 Tau 蛋白磷酸化及促进 ChAT 的表达,从而发挥抗痴呆作用。

4 参考文献

- 柄泽昭秀. 痴呆的流行病学 (J). 日本医学介绍, 2005;26(3):97-100.
- Blennow K, de Leon MJ, Zetterberg H. Alzheimers disease (J). Lancet, 2006;368(9533):387-403.
- 金 环, 黄河胜, 查向东, 等. 阿尔茨海默病的发病机制、早期诊断及治疗的新策略 (J). 中国药理学通报, 2007;23(7):847-97.
- Lawrence AD, Sahakian BJ. The cognitive psychopharmacology of Alzheimer's disease: focus on cholinergic systems (J). Neurochem Res, 1998;23(5):787-94.
- 张均田. 人参冠百草 (M). 第 2 版. 北京:化学工业出版社, 2012:95-103, 117-27, 131-51, 222-8, 293-305.
- 王建枝, 田 青. Tau 蛋白过度磷酸化机制及其在阿尔茨海默病神经元变性中的作用 (J). 生物化学与生物物理进展, 2012;39(8):771-7.
- 刘 颖, 李 玺, 袁海峰. 人参皂苷 Rg1 促进学习记忆作用研究进展 (J). 中国中西医结合杂志, 2006;26(10):956-60.
- Baig S, van Helmond Z, Love S. Tau hyperphosphorylation affects Smad 2/3 translocation (J). Neuroscience, 2009;163(2):561-70.
- Yoon S, Choi J, Haam J, et al. Reduction of mint-1, mint-2, and APP over expression in Okadaic acid-treated neurons (J). Neuro Report, 2007;18(18):1879-83.
- 石楸鸣. 人参皂苷的药理作用研究进展 (J). 中国药理学杂志, 2010;21(31):2967-8.
- Wang YH, Du Gh. Ginsenoside Rg1 inhibits beta-secretase activity in vitro and protects against A beta-induced cytotoxicity in PC12 cells (J). J Asian Nat Prod Res, 2009;11(7):604.
- Shi YQ, Huang TW, Chen LM, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates amyloid-beta content, regulates PKA/CREB activity, and improves cognitive performance in SAMP8 mice (J). J Alzheimers Dis, 2010;19(3):977.

(2013-05-15 修回)

(编辑 安冉冉/曹梦园)