



# 人参总皂苷对MPTP诱导的小鼠帕金森病的认知功能和神经炎症的影响

李双英, 王聪聪, 钟士江(武警特色医学中心神经内科, 天津 300162)

**摘要:**【目的】探讨人参总皂苷对1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)诱导的小鼠帕金森病的认知功能影响。【方法】选取80只健康C57小鼠按照区组随机划分为4组:对照组帕金森病(Parkinson's disease, PD)组、对照人参皂苷组、PD人参皂苷组,每组20只。PD模型颈部皮下注射MPTP,剂量为30 mg/kg,连续8 d,对照组注射等量的生理盐水(0.9%NaCl)。将人参总皂苷溶解在生理盐水中,给予小鼠100 mg/kg的腹腔注射剂量,给药8 d,第9天进行行为学实验。采用新物体识别实验和恐惧条件箱实验检测小鼠认知功能改变。PCR和western blotting检测小鼠脑内炎症因子和Tamm-Harsfall(TH)蛋白表达的改变。【结果】在新物体识别实验中,与对照组相比,PD组小鼠的辨别指数明显降低;与PD组相比,PD人参皂苷组小鼠的辨别指数明显增强。在恐惧条件箱实验中,与对照组相比,PD组小鼠的不动时间明显降低;与PD组相比,PD人参皂苷组小鼠的不动时间明显增加。与对照组相比,PD组小鼠的肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )的mRNA水平明显增高;与PD组相比,PD人参皂苷组小鼠的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的mRNA水平明显降低。与对照组相比,PD组小鼠的TH蛋白水平明显降低;与PD组相比,PD人参皂苷组小鼠的TH蛋白水平明显升高。【结论】PD能导致C57小鼠记忆能力下降并产生神经炎症反应,人参总皂苷对PD小鼠的认知功和神经炎症有一定的缓解。

**关键词:**1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶; 认知功能; 帕金森病; 人参总皂苷; 神经炎症

**【文章编号】**2095-3720(2021)05-0006-05   **【中图分类号】**R285   **【文献标志码】**A

## Effect of ginsenosides on cognitive function and neuroinflammation of MPTP-induced Parkinson's disease in mice

LI Shuang-ying, WANG Cong-cong, ZHONG Shi-jiang (Department of Neurology, Characteristic Medical Center of PAP, Tianjin 300162, China)

**Abstract:**【Objective】To explore the effect of ginsenosides on cognitive function of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease in mice.【Methods】A total of 80 healthy C57 mice were randomly divided into 4 groups: control group, Parkinson's disease (PD) group, control ginsenoside group and PD ginsenoside group, with 20 mice in each group. The PD model was subcutaneously injected with MPTP at a dose of 30 mg /kg for 8 consecutive days. The mice in the control group were injected with the same amount of normal saline (0.9% NaCl). The total ginsenosides were dissolved in normal saline, and mice were given intraperitoneal injection of 100 mg/kg for 8 days and behavioral experiments were conducted at the 9th day. The cognitive function of mice was detected by new object recognition experiment and fear condition box test. Inflammatory factors and TH protein expression in mouse brain were detected by PCR and Western blotting.【Results】In the new object recognition experiment, compared with the control group, the discrimination index of PD group was significantly lower. Compared with the PD group, the discrimination index of PD ginsenoside group was significantly increased. In the fear condition box test, compared with the control group, the immobility time of PD group was significantly decreased. Compared with the PD group, the immobility time of PD ginsenoside group was significantly increased.

**【收稿日期】**2021-01-20; **【修回日期】**2021-04-06

**【作者简介】**李双英,硕士,主治医师,主要从事神经内科脑血管病、帕金森、失眠、头痛等方向的研究。The results of PCR showed that compared with the control group, the mRNA levels of tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF -  $\alpha$ ) and interleukin-

IL-1 $\beta$  in the PD group were significantly increased. Compared with the PD group, the mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the PD ginsenoside group were obviously decreased. The results of TH protein showed that compared with the control group, the level of TH protein in the PD group was significantly lower. Compared with the PD group, TH protein level of PD ginsenoside group was significantly increased. **[Conclusion]** PD can decrease the memory ability and induce neuroinflammation in C57 mice, and ginsenosides can improve the cognitive function and alleviate the neuroinflammation in PD mice.

**Key words:** 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; Cognitive function; Parkinson's disease; Ginosesides; Neuroinflammation

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是一种渐进的神经退行性疾病<sup>[1-3]</sup>。临床表现为静息性震颤、运动迟缓和肌肉僵硬,并伴有自主神经功能障碍、认知障碍等非运动症状,是老年人中仅次于痴呆的第2大常见神经退行性疾病<sup>[4]</sup>。其核心病理变化是黑纹状体多巴胺通路的进行性变性,脑黑质区多巴胺能神经元丢失,纹状体多巴胺分泌减少,多巴胺大量耗竭<sup>[5,6]</sup>。多巴胺作为一种内源性神经毒素,通过氧化和酶分解代谢两个过程来产生活性代谢产物和活性氧分子。而它作为神经元用来调节运动输出的神经递质,多巴胺能神经元丧失将导致相关运动性症状。PD的早期阶段包括黑质腹侧多巴胺能神经元的丧失,而由于认知损伤功能区域、病程以及病情存在差异,PD认知功能障碍临床表现复杂多样,发病早期不易鉴别,但随着病情进展不断加剧,PD患者早期的认知功能障碍可演变为PD性痴呆<sup>[7]</sup>。认知障碍影响患者的工作生活,但目前其发病机制尚不清楚,既往研究则认为其机制与 $\alpha$ -突触核蛋白的稳定、氧化应激、线粒体功能障碍、钙稳态的破坏、轴突运输受损和神经炎症有关<sup>[8]</sup>。近年来神经免疫炎症作为PD的发病机制之一受到普遍关注。1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)的毒性引起PD是公认动物模型。已有大量研究表明MPTP可引起人、小鼠和灵长类动物的学习记忆功能减退<sup>[9]</sup>。

人参在AD患者的神经和其他系统、大脑稳态和认知表现等方面具有多种生理和药理作用<sup>[10]</sup>。近年研究表明,人参提取物可促进脑缺血后海马神经发生。然而,对人参的活性成分及其信号转导机制尚未见报道。从人参中分离出的有效成分人参总皂苷是一种含有溶血磷脂酸(lysobisphosphatidic acids, LPA)的糖酵素蛋白<sup>[11]</sup>。已有研究表明,人参总皂苷加强了海马区域的突触传递<sup>[12]</sup>。在阿尔茨

海默病转基因动物模型中,人参总皂苷激活非淀粉样物质生成途径,增强长期记忆障碍,减轻淀粉样 $\beta$ 斑块的沉积,降低海马胶质细胞的活性<sup>[13]</sup>。基于先前人参总皂苷的作用,本研究假设其可能在体内对多巴胺能神经元细胞产生保护作用。因此,本研究探讨人参总皂苷在MPTP作用后的PD小鼠模型中是否具有降低神经免疫炎症反应的作用,从而达到神经保护的效果,改善其学习记忆功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般材料

1.1.1 实验动物 雄性C57小鼠80只,SPF级,体质量为18~22 g,在室温、湿度分别为60%和10%的条件下,昼夜循环自由进食和饮水。

1.1.2 主要试剂与仪器 MPTP购于美国Sigma,人参总皂苷(Rb1、Rb2、Rc、Rd、Re、Rg1和Rg2)由吉林大学提供。TransZol、TransScript All-in-one cDNA kit、TransStart Top Green qPCR SuperMix均购于北京全式金生物。兔单克隆Tamm-Harsfall(TH)蛋白一抗购于Abcam,鼠GAPDH一抗、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗购于索莱宝。新物体识别测试系统、恐惧条件箱系统购于上海欣软信息科技。CFX96 Touch实时荧光定量PCR仪购于Bio-Rad。

### 1.2 方法

1.2.1 模型制备与分组 将小鼠随机分为4组,每组20只,分别为对照组、PD组、对照人参皂苷组、PD人参皂苷组。PD模型颈部皮下注射MPTP,剂量为30 mg/kg,连续8 d,对照组注射等量的生理盐水(0.9%NaCl)。将人参总皂苷溶解在生理盐水中,给予小鼠100 mg/kg的腹腔注射剂量<sup>[10]</sup>,给药8 d,第9天进行行为学实验,每组选取5只小鼠进行新物体识别实验,5只进行恐惧条件箱实验,5只进行PCR实验,5只进行Western blotting实验。

1.2.2 新物体识别实验 新物体识别实验用来检测实验动物的学习记忆功能,特点是识别能力不受动

物运动功能影响,进行新型物体的探索。测试工具为开口的塑料箱( $40\text{ cm} \times 40\text{ cm} \times 40\text{ cm}$ ),准备A、B、C 3个大小材质相同的特制立方体( $5\text{ cm} \times 5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ ),其中A、B物体颜色完全一样,c物体颜色与A、B物体完全不同。新物体识别实验包括训练实验和测试实验,实验开始前每天对实验小鼠进行抚摸,以减轻应激刺激,训练实验的前1天将动物放在测试的房间内,适应测试环境。在训练实验中,将实验小鼠与A和B两物体放入场地内,进行5 min识别。4 h后进行测试实验,将场地内的B物体换作c物体,仍将小鼠放入实验场地,记录5 min。实验结束时将小鼠放回饲养处,观察指标为探索新物体的时间(exploration time for new object, Tn)和旧物体的时间(exploration time for former object, Tf),最后进行识别系数的计算,公式为:识别系数=(Tn-Tf)/(Tn+Tf)。

**1.2.3 恐惧条件箱实验** 恐惧条件实验同样也可用来检测实验动物的记忆能力,测试工具为可控制声光电的实验箱体,箱体底部为带电的电栏,本实验也包括训练实验和测试实验,实验开始前每天对实验小鼠进行抚摸,以减轻应激刺激,训练实验的前1天将动物放在测试的房间内,适应测试环境。训练实验声音为20 Hz,电流为0.3 mA,时间为6 min,连续训练2 d,第3天进行测试,测试时间为6 min。观察指标则是动物不动时间。训练实验条件和测试条件见图1。

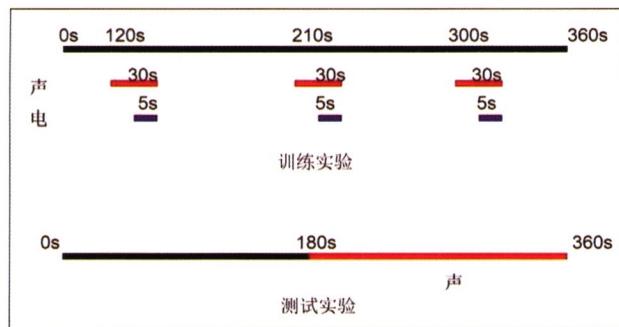


图1 恐惧条件箱训练和测试实验示意图

**1.2.4 PCR实验** 将小鼠用浓度为4%的水合氯醛,0.01 ml/g,腹腔注射麻醉,处死后提取小鼠海马组织,加入1 ml的TransZol,匀浆后后加入0.2 ml氯仿充分震荡静置10 min。12 000 r/min 4 ℃离心15 min,取最上层无色的水相置于新的EP管中加入等体积异丙醇,颠倒混匀,室温静置5 min,然后12 000 r/min 4 ℃离心10 min,弃上清,保留胶状沉淀。加入0.5 ml DEPC水配置的75%乙醇,剧烈涡旋后7 500 r/min

4 ℃离心5 min,晾干后加50 μl RNA溶解液,进行浓度检测后,反转体系为20 μl,其中RNA加入1 μg,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,进行反转。将引物及cDNA和试剂盒其他试剂轻轻混匀后,放入荧光定量PCR仪进行3步法扩增,第1步变性95 ℃ 10 s,第2步退火57 ℃ 20 s,第3步延伸72 ℃ 15 s,进行40个循环,最后添加溶解曲线。得到Ct值计算并分析 $-\Delta\Delta Ct$ 值。肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)和白介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)引物序列见表1。

表1 TNF-α和IL-1β引物序列

引物	引物序列	
GAPDH	Forward	5' ATCACCATCTCCAGGAGCGA 3'
	Reverse	5' AGCCTTCTCCATGGTGGTGG 3'
TNF-α	Forward	5' TGATCCGAGATGTGGAAC 3'
	Reverse	5' GGCCATGGAACGTGATGAGAG 3'
IL-1β	Forward	5' CAGCAATGCTGGAC 3'
	Reverse	5' ATAGGTAAGTGGTTGCCT 3'

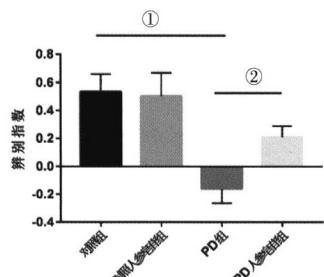
**1.2.5 Western blotting实验** 将小鼠用浓度为4%的水合氯醛,0.01 ml/g,腹腔注射麻醉,处死后提取小鼠海马组织,加入凯基全蛋白提取试剂,提取蛋白后在562 nm波长下检测光密度值(D),计算蛋白浓度后,根据被检测蛋白分子量16~80 kDa,制备15%分离胶和5%的浓缩胶。电泳后转膜250 mA 70 min,5% BsA室温封闭1 h,分别加入配制好的一抗[TH(1:2 000)和GAPDH(1:5 000)],4 ℃摇床过夜,回收一抗,TBST摇床漂洗3次,每次10 min。室温孵育配制好的二抗[山羊抗兔(1:5 000)、山羊抗小鼠(1:5 000)]1 h。TBST摇床漂洗3次,每次10 min。滴加显影液在凝胶成像仪上成像,用Image Lab 4.0进行灰度分析。

**1.2.6 统计学方法** 采用GraphPad Prism 7.0和SPSS软件进行统计分析,使用t检验和单因素方差分析检测,所有数据均用( $\bar{x}\pm s$ )表示, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 新物体识别行为

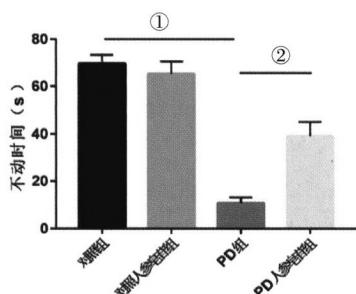
与对照组相比,PD组小鼠的辨别指数明显降低;与PD组相比,PD人参皂苷组小鼠的辨别指数明显增强,差异具有统计学意义( $P<0.01$ )。该结果提示PD能导致C57小鼠记忆能力下降,人参总皂苷对PD小鼠的学习记忆能力有一定的缓解。见图2。



①与对照组比较,  $P<0.01$ ; ②与PD组比较,  $P<0.01$   
图2 各组小鼠的新物体识别实验( $n=5$ )

## 2.2 恐惧条件箱实验

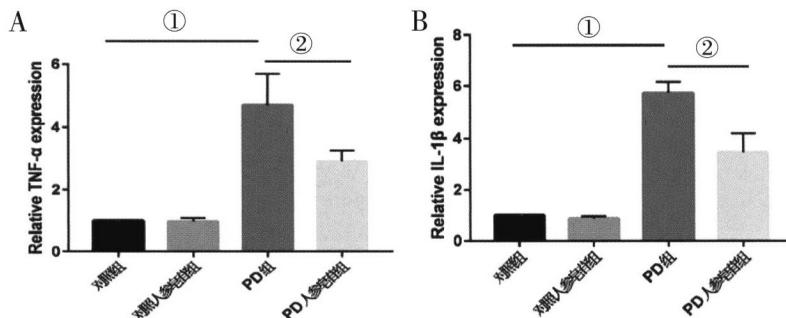
与对照组相比, PD组小鼠的不动时间明显降低( $P<0.001$ );与PD组相比, PD人参皂苷组小鼠的不动时间明显增加( $P<0.01$ ),差异具有统计学意义。该结果提示PD能导致C57小鼠记忆能力下降,人参总皂苷对PD小鼠的学习记忆能力有一定的缓解。见图3。



①与对照组比较,  $P<0.001$ ; ②与PD组比较,  $P<0.01$   
图3 各组小鼠的恐惧条件箱实验( $n=5$ )

## 2.3 PCR实验检测TNF- $\alpha$ 与IL-1 $\beta$ 的mRNA水平

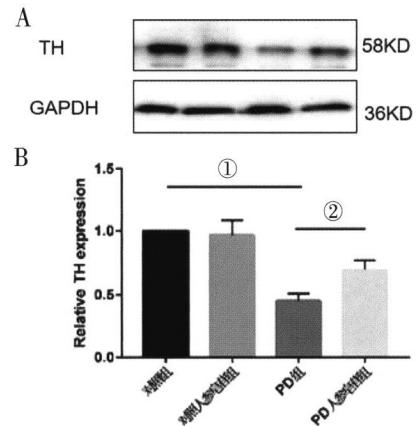
与对照组相比, PD组小鼠的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的mRNA水平( $P<0.001$ )明显增高;与PD组相比, PD人参皂苷组小鼠的TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 的mRNA水平( $P<0.05$ )明显降低,差异具有统计学意义。该结果提示PD能导致C57小鼠产生神经炎症反应,人参总皂苷对PD小鼠的神经炎症有一定的缓解。见图4。



A:TNF- $\alpha$ 的mRNA水平表达柱状图;B:IL-1 $\beta$ 的mRNA水平表达柱状图;①与对照组比较,  $P<0.001$ ; ②与PD组比较,  $P<0.05$   
图4 各组小鼠的TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$  mRNA表达( $n=5$ )

## 2.4 Western blotting实验检测TH蛋白水平

与对照组相比, PD组小鼠的TH蛋白水平( $P<0.001$ )明显降低;与PD相比, PD人参皂苷组小鼠的TH蛋白水平( $P<0.05$ )明显升高,差异具有统计学意义。见图5。



A:TH蛋白表达条带;B:TH蛋白表达柱形图;①与对照组比较,  $P<0.001$ ; ②与PD组比较,  $P<0.05$   
图5 各组小鼠TH蛋白表达( $n=5$ )

## 3 讨论

认知功能障碍是PD患者的非运动功能障碍,认知障碍出现较运动功能障碍早。已有大量研究发现在PD早期的患者出现学习记忆的下降症状<sup>[14]</sup>。MPTP因其可以选择性地造成多巴胺神经元变性,是一种公认且高效的进行PD模型构建的神经毒物。虽然MPTP也可引起小鼠出现一系列的小鼠学习记忆功能下降,但是其机制尚未见报道。既往研究则认为其机制与 $\alpha$ -突触核蛋白的稳定、氧化应激、线粒体功能障碍、钙稳态的破坏、轴突运输受损和神经炎症有关<sup>[8]</sup>。近年来神经免疫炎症作为PD的发病机制之一受到普遍关注。

人参作为一种传统草药对AD患者的神经系统大脑稳态和认知能力具有各种生理和药理作用<sup>[10]</sup>。

研究表明人参提取物增加了局灶性脑缺血后海马神经发生<sup>[15]</sup>。人参作为一种传统草药对人类和AD患者的神经系统大脑稳态和认知能力具有各种生理和药理作用<sup>[10]</sup>。已有研究报道,人参总皂苷是一种溶血磷脂酸糖脂蛋白<sup>[16]</sup>,可以改善小鼠抑郁样行为,改善PD小鼠的运动功能和认知障碍<sup>[17]</sup>。但其对PD小鼠是否同样具有改善认知功能障碍,提高其学习记忆能力,尚未见报道。

本研究探讨了人参总皂苷对MPTP诱导的PD小鼠模型的作用。针对人参总皂苷对行为改变,对神经炎症发生的作用进行了相关实验。在本研究中发现人参总皂苷对MPTP诱导的PD雄性C57小鼠具有改善神经炎症作用。人参总皂苷对MPTP诱导的PD雄性C57小鼠具有提高其已降低的认知功能的作用。这可能与神经炎症的改善有关,人参总皂苷降低了PD小鼠的炎症反应,使得炎症体表达下降,改善炎症反应激活的相关自噬与凋亡反应,减缓对多巴胺能神经元的损伤作用,通过进行TH蛋白检测发现,与PD组相比,PD人参皂苷组的TH明显高表达,证明其阳性细胞数多于PD组,损伤程度低于PD,但是与对照组相比,TH表达仍然偏低,证明人参总皂苷对于PD可以起到延缓多巴神经元损伤的作用。

综上所述,本研究结果阐明人参总皂苷可通过改善PD小鼠的炎症反应,延缓多巴神经元损伤,从而提高学习记忆功能。未来研究的重点则将对其进行对神经炎症作用的靶点级机制的探讨,为今后的临床应用提供更可靠的理论依据。

### 【参考文献】

- [1] Massano J, Bhatia KP. Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012, 2(6):a008870.
- [2] Shen XL, Song N, Du XX, et al. Nesfatin-1 protects dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup>/MPTP-induced pathway[J]. Sci Rep, 2017, 7:40961.
- [3] Skibinski G, Hwang V, Ando DM, et al. Nrf2 mitigates LRRK2- and  $\alpha$ -synuclein-induced neurodegeneration by modulating proteostasis[J]. Proc Natl Acad Sci, 2017, 114(5): 1165–1170.
- [4] Sigurlaug S. The clinical symptoms of Parkinson's disease[J]. J Neurochem, 2016, 139 Suppl 1:318–324.
- [5] Przedborski S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease[J]. Park Relat Disord, 2005, 11(Suppl 1):S3–S7.
- [6] Wang YQ, Zhao WL, Li G, et al. Neuroprotective effect and mechanism of thiazolidinedione on dopaminergic neurons in vivo and in vitro in Parkinson's disease[J]. PPAR Res, 2017, 2017:4089214.
- [7] 殷盛明, 于德钦, 王世伟, 等. MPTP对小鼠空间学习和记忆能力的影响[J]. 中国行为医学与脑科学杂志, 2005, 14(1):18–20.
- [8] Ozkan A, Parlak H, Tanriover G, et al. The protective mechanism of docosahexaenoic acid in mouse model of Parkinson: The role of heme oxygenase[J]. Neurochem Int, 2016, 101: 110–119.
- [9] Schneider JS, Roehgen DP. Delayed matching-to-sample, object retrieval, and discrimination reversal deficits in chronic low dose MPTP treated monkeys. Brain Res, 1993, 615(2):351–354.
- [10] Lee CH, Kim JM, Kim DH, et al. Effects of Sun ginseng on memory enhancement and hippocampal neurogenesis[J]. Phytother Res, 2013, 27(9):1293–1299.
- [11] Hwang SH, Lee BH, Choi SH, et al. Gintonin, a novel ginseng-derived lysophosphatidic acid receptor ligand, stimulates neurotransmitter release[J]. Neurosci Lett, 2015, 584: 356–361.
- [12] Shin TJ, Kim HJ, Kwon BJ, et al. Gintonin, a ginseng-derived novel ingredient, evokes long-term potentiation through N-methyl-D-aspartic acid receptor activation: involvement of LPA receptors[J]. Mol Cells, 2012, 34(6):563–572.
- [13] Hwang SH, Shin EJ, Shin TJ, et al. Gintonin, a ginseng-derived lysophosphatidic acid receptor ligand, attenuates Alzheimer's disease-related neuropathies: involvement of non-amyloidogenic processing[J]. J Alzheimers Dis, 2012, 31(1): 207–223.
- [14] Leplow B, Holl D, Zeng L, et al. Spatial behaviour is driven by proximal cues even in mildly impaired Parkinson's disease[J]. Neuropsychologia, 2002, 40(8):1443–1455.
- [15] Lee JS, Choi HS, Kang SW, et al. Therapeutic effect of Korean red ginseng on inflammatory cytokines in rats with focal cerebral ischaemic reperfusion injury[J]. Am J Chin Med, 2011, 39(1):83–94.
- [16] Pyo MK, Choi SH, Hwang SH, et al. Novel glycolipoproteins from ginseng[J]. J Ginseng Res, 2011, 35(1):92–103.
- [17] Lee BH, Kim J, Lee RM, et al. Gintonin enhances performance of mice in rotarod test: Involvement of lysophosphatidic acid receptors and catecholamine release[J]. Neurosci Lett, 2016, 612:256–260.

(责任编辑:高洁)