

文章编号:1003-2754(2014)06-0536-04

人参皂苷对癫痫大鼠行为学和突触蛋白的影响

甄军丽, 王维平, 曲珍珍, 房海波, 王洪超, 臧红敏, 王丽娜

摘要: **目的** 探讨人参皂苷 Rb1 对癫痫大鼠学习记忆及海马 kalirin-7 和突触后致密物 95 (PSD-95) 表达的影响。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组、模型组、Rb1 低、高剂量组。模型制备成功后,采用 Morris 水迷宫检测其行为学,电镜法观察海马 CA₁ 区突触超微结构,Western blot 法检测海马 kalirin-7 和 PSD-95 的表达。**结果** 模型组大鼠的末次逃避潜伏期、穿台次数、海马 CA₁ 区 PSD 厚度、kalirin-7 和 PSD-95 表达[分别为 (11.2 ± 1.6) s、 (4.9 ± 1.3) 次、 (25.9 ± 2.4) nm、 (0.32 ± 0.03) 、 (0.95 ± 0.08)];与对照组[分别为 (4.5 ± 0.8) s、 (10.9 ± 2.1) 次、 (34.1 ± 3.7) nm、 (0.86 ± 0.07) 、 (1.94 ± 0.13)],比较均具有显著性差异($P < 0.05$)。而人参皂苷 Rb1 干预组剂量依赖性地逆转了上述的异常变化($P < 0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rb1 可能通过上调海马 kalirin-7 和 PSD-95 蛋白的表达来改善癫痫大鼠的认知功能障碍。

关键词: 人参皂苷 Rb1; 认知功能障碍; kalirin-7; 突触后致密物-95

中图分类号: R742.1 **文献标识码:** A

Effects of ginsenoside on behaviors and synaptic associated proteins in epileptic rats ZHEN Jun-li, WANG Wei-ping, QU Zhen-zhen, et al. (Department of Neurology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of ginsenoside on behaviors and expression of synaptic associated proteins in the hippocampus of epileptic rats. **Methods** Forty rats were randomly divided into 4 groups: control, epileptic, low dose of ginsenoside Rb1 and high dose of ginsenoside Rb1 groups. Rats were given PTZ till being kindled successfully. Their behaviors were afterwards determined by Morris water maze, morphology was observed by electron microscope, and expressions of kalirin-7 and PSD-95 in the hippocampus were detected by Western blot. **Results** Compared to the control group, the ability of learning and memory was impaired in the escape latency (11.2 ± 1.6 compared to 4.5 ± 0.8) and in the number of crossing (4.9 ± 1.3 compared to 10.9 ± 2.1) ($P < 0.05$), the synaptic ultrastructure of hippocampus CA₁ showed significantly changes in the PSD-95 thickness (25.9 ± 2.4 compared to 34.1 ± 3.7) ($P < 0.05$), and expressions of kalirin-7 (0.32 ± 0.03 compared to 0.86 ± 0.07) and PSD-95 (0.95 ± 0.08 compared to 1.94 ± 0.13) obviously decreased in rats with PTZ-kindled epilepsy ($P < 0.05$), while ginsenoside Rb1 could dose-dependently reverse such abnormal changes ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 could effectively improve the cognitive impairment of rats with PTZ-kindled epilepsy by up-regulating the expressions of kalirin-7 and PSD-95 in the hippocampus.

Key words: Ginsenoside Rb1; Cognitive impairment; Kalirin-7; Post synaptic density-95

种类繁多的抗癫痫药物虽应用于临床,但只是控制症状,长期应用可导致认知功能障碍等副作用。因此,寻求一种既无明显的副作用又能有效改善认知功能的药物便成为当务之急。人参皂苷 Rb1 可作用于中枢神经系统,能通过激活神经保护机制、调控神经递质、改善学习记忆等,已广泛应用于临床中,如脑血管病^[1,2]、阿尔茨海默病^[3]等,但在癫痫方面的研究甚少。

本实验采用戊四氮(pentetenetrazol, PTZ)致痫大鼠模型研究不同剂量的人参皂苷 Rb1 对癫痫大鼠认知功能及海马突触相关蛋白 kalirin-7 和突触后致密物 95 (PSD-95) 的表达有无影响,以期为临床治疗癫痫提供新思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 7~8 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重约 180 ± 20 克,由河北医科大学实验动物中心提供,许可证号为:SCXK(冀):2008-1-003;12 h 光亮/黑暗条件、22℃~25℃环境温度,分笼喂养。PTZ(CAS:54-95-5)购自美国 Sigma 公司;人参皂苷 Rb1(SF1743),纯度 > 98%,购自上海士锋生物科技有限公司;兔抗 kalirin-7 多克隆抗体

收稿日期:2014-02-12;修订日期:2014-05-27

基金项目:河北省自然科学基金项目(C2010000548)

作者单位:(河北医科大学第二医院神经内科,河北 石家庄 050000)

通讯作者:王维平, E-mail: WWP_ZJL_456@163.com

(YT1421, ImmunoWay, USA); 兔抗 PSD-95 多克隆抗体(PR-0286), 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 羊抗兔 IgG 荧光二抗(Rockland, USA); BCA 蛋白定量试剂盒购自北京普利莱公司, Western blot 远红外荧光扫描成像系统(Odyssey); 电镜(JEM-1230, 日本)。

1.2 动物分组及模型制备 将大鼠随机分为4组, 每组各10只: 正常对照组(NC)、癫痫模型组(PTZ)、低剂量干预组(PTZ + L-Rb1)和高剂量干预组(PTZ + H-Rb1)。大鼠每日晨8:00~9:00腹腔注射PTZ 35 mg/kg, 连续40 d, 每次注射完毕后观察1 h。人参皂苷Rb1干预组分别在每次注射PTZ前30 min经腹腔注射20 mg/kg Rb1或40 mg/kg Rb1进行低、高剂量干预; NC组大鼠经同样方式给予同等剂量、同等次数的生理盐水。依据 Racine 分级标准^[4]将大鼠行为分为6级。0级: 无反应; I级: 节律性嘴和面部抽动; II级: 点头或甩尾; III级: 一侧前肢阵发性痉挛; IV级: 站立时双前肢阵发性痉挛和强直; V级: 跌倒和全面性强直阵挛发作。完全点燃的标准是连续获得3次IV级或以上的惊厥发作。

1.3 Morris 水迷宫测定大鼠学习记忆能力 实验第41天起行水迷宫检测, 本实验包括: (1) 定位航行实验: 历时4 d, 第1天大鼠在水池内自由游泳2 min, 熟悉环境后每天上下午各测试一次, 每次每只大鼠从4个相同象限入水, 记录逃避潜伏期, 如120 s未找到平台, 将其引上平台休息30 s, 记录潜伏期为120 s。(2) 空间探索实验: 用于测试大鼠的空间记忆能力。定位航行实验完毕后, 将平台撤除, 选平台相对象限为入水点, 记录大鼠在120 s内穿越平台区域的次数及在平台象限的游泳时间。

1.4 电镜观察大鼠海马 CA₁ 区突触的超微结构 水迷宫实验结束后, 每组3只以10%的水合氯醛(300 mg/kg)腹腔麻醉, 迅速开胸经左室快速灌注37℃生理盐水100 ml, 再用1.5%戊二醛和2.5%多聚甲醛混合液250 ml缓慢滴注。断头取脑, 分离大鼠海马并取出CA₁区1 mm³放入4%戊二醛固定液中固定24 h, 1%四氧化锇和0.01%重铬酸钾后固定2 h, 酒精梯度脱水后置于100%丙酮中30 min。将标本浸于50%环氧树脂和50%丙酮混合液中室温30 min, 在80℃聚合的环氧树脂中封闭过夜, 将70 nm厚度切片用乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 最后通过透射电镜观察海马CA₁区的超微结构。应用图像分析软件计算突触间隙的宽度、PSD的厚度、突触后活性带长度及突触界面曲率, 界面曲率以突触界面弧长与弦长之比表示。每组选取

10张照片(放大率为40,000×), 测定过程采用“双盲法”。

1.5 Western blot 法检测大鼠海马 kalirin-7 和 PSD-95 蛋白的表达 将各组剩余的大鼠快速分离海马, 提取总蛋白。BCA法进行蛋白浓度定量, 取50 μg蛋白98℃~100℃变性5 min, 然后以120 g/L非连续的Tris-SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳, 转膜, 在0.01 mol/L PBS配置的5%脱脂奶粉中室温封闭1 h后, 分别与兔抗 kalirin-7(1: 1000)和兔抗 PSD-95 抗体(1: 600)孵育, 4℃过夜。TPBS漂洗5×5 min, 羊抗兔 IgG 荧光二抗(1: 2000, Rockland, USA)中室温孵育1 h, TPBS漂洗5×5 min, Odyssey远红外荧光扫描成像系统扫描并测定目标带单位密度与β-actin(1: 500, Santa Cruz公司)单位密度值相比后再行统计分析, 实验重复2次。

1.6 统计学处理 实验数据应用SPSS13.0软件进行统计学处理, 以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为有统计学差异。多个样本均数间比较首先选用方差齐性检验和正态性检验, 若符合这两种检验, 则数据进行One-Way ANOVA和LSD方差分析; 对于不符合这两种检验的数据则采用秩和检验。

2 结果

2.1 动物模型的制备 癫痫模型组大鼠第5天起开始出现凝视、点头、反复洗脸、头面部抽搐等, 以后症状逐日加重, 于给药第19~25天出现全身肌阵挛、双侧前肢抬起, 最终发生全身强直-阵挛发作, 造模第40天时9只达到点燃标准, 其中3只死于癫痫持续状态, 1只未达到点燃标准被剔除。PTZ + L-Rb1组中1只死于癫痫持续状态。NC组中无癫痫发作, 且NC组和PTZ + H-Rb1组中均无大鼠死亡。

2.2 行为学检测 定位航行实验: 记录每日上下午的逃避潜伏期, 取其平均值进行比较, 第1天无明显变化($F_{3,31} = 0.72, P = 0.15$); 而第2天($F_{3,31} = 12.47, P < 0.001$); 第3天($F_{3,31} = 25.69, P < 0.001$)和第4天($F_{3,31} = 14.37, P < 0.001$)呈进行性缩短, 各组间有统计学差异(见表1)。空间探索试验: 各组间均有统计学差异($F_{3,31} = 43.46, P < 0.001$), 与NC组相比, PTZ组大鼠120 s内穿越平台区域的次数减少了54.5% ($P < 0.05$)。与PTZ组比较, PTZ + L-Rb1组的穿台次数增加了43.2%, PTZ + H-Rb1组增加了84.0%, 均有显著性差异 ($P < 0.05$)。对于在平台象限的游泳时间而言, PTZ组的时间(29.9 ± 3.7 s)虽然少于其它组别, 但各组间差异无统计学意义($F_{3,31} = 17.43, P = 0.08$)(见表1)。

2.3 人参皂苷 Rb1 对大鼠海马 CA₁ 区超微结构的影响 与 NC 组相比,PTZ 组的突触间隙增加了 36.7% ($F_{3,35} = 55.75, P < 0.001$), PSD 的厚度降低了 25.1% ($F_{3,35} = 15.34, P < 0.001$), 突触后活性带长度缩短了 27.8% ($F_{3,35} = 21.39, P < 0.001$)。与 PTZ 组比较,人参皂苷 Rb1 组干预后不同程度地逆转了上述异常的变化($P < 0.05$)。而对于突触界面曲率的变化,各组间的差异则无明显的统计学差异($F_{3,35} = 15.34, P = 0.08$)(见表 2)。

2.4 人参皂苷 Rb1 对大鼠海马 CA₁ 区 kalirin-7 和 PSD-95 表达的影响 Western blot 结果显示,

kalirin-7 和 PSD-95 表达均有统计学差异(分别为 $F_{3,19} = 491.64, P < 0.001$; $F_{3,19} = 152.33, P < 0.001$)。与 NC 组相比,PTZ 组中大鼠海马 kalirin-7 的表达减少了 62.8%, PSD-95 表达减少了 51.0% ($P < 0.05$)。与 PTZ 组相比,人参皂苷 Rb1 剂量依赖性地上调了 kalirin-7 和 PSD-95 的表达($P < 0.05$)。PTZ + H-Rb1 组中 kalirin-7 的表达虽低于 NC 组, PSD-95 的表达稍高于 NC 组,但与 NC 组相比均无统计学意义($P = 0.11, P = 0.06$)。与 NC 组比较 $*P < 0.05$; 与 PTZ 组比较 $\#P < 0.05$; 与 PTZ + L-Rb1 组比较 $\Delta P < 0.05$ 。

表 1 水迷宫实验逃避潜伏期及穿越平台界限次数、游泳时间的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	逃避潜伏期(s)				穿台次数	游泳时间(s)
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天		
NC 组	10	47.1 ± 5.4	29.2 ± 3.2	14.2 ± 1.7	4.5 ± 0.8	10.9 ± 2.1	32.5 ± 3.2
PTZ 组	6	45.2 ± 6.1	38.9 ± 3.5 *	27.3 ± 3.9 *	11.2 ± 1.6 *	4.9 ± 1.3 *	29.9 ± 3.7
PTZ + L-Rb1 组	9	49.5 ± 5.2	35.4 ± 2.7 *	21.6 ± 3.8 *#	9.1 ± 2.0 *#	7.1 ± 1.8 *#	33.1 ± 2.8
PTZ + H-Rb1 组	10	46.8 ± 3.9	30.7 ± 4.0	18.3 ± 5.2 ** Δ	6.2 ± 1.1 ** Δ	9.2 ± 1.4 Δ	31.2 ± 4.1

与 NC 组比较 $*P < 0.05$; 与 PTZ 组比较 $\#P < 0.05$; 与 PTZ + L-Rb1 组比较 $\Delta P < 0.05$

表 2 各组间大鼠海马 CA₁ 区突触超微结构的比较($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	突触间隙 (nm)	PSD 厚度 (nm)	突触后活性带长度 (nm)	突触界面曲率
NC 组	19.9 ± 2.4	34.1 ± 3.7	314.2 ± 11.3	1.1 ± 0.02
PTZ 组	27.2 ± 1.7 *	25.9 ± 2.4 *	227.5 ± 10.2 *	1.2 ± 0.06
PTZ + L-Rb1 组	24.1 ± 1.5 **	31.3 ± 2.7 **	281.3 ± 9.1 **	1.1 ± 0.01
PTZ + H-Rb1 组	20.1 ± 1.2 Δ	33.8 ± 3.5 Δ	316.8 ± 7.7 Δ	1.2 ± 0.04

与 NC 组比较 $*P < 0.05$; 与 PTZ 组比较 $\#P < 0.05$; 与 PTZ + L-Rb1 组比较 $\Delta P < 0.05$

3 讨论

PTZ 点燃致病模型是目前研究癫痫后认知功能障碍的理想模型^[5],所致的大鼠海马 CA₁ 区神经元丢失及相关的病理改变与人类癫痫极其相似。本实验结果表明癫痫组大鼠学习记忆能力较正常对照组明显下降,提示慢性癫痫发作对大鼠认知功能有明显的损害作用,而人参皂苷 Rb1 能够剂量依赖性地改善癫痫所致的认知功能下降。

海马长时程增强(LTP)是学习记忆的基础,其形成需要有扩增的树突棘、增加的突触前膜递质释放及后膜受体的有效性等共同作用来维持。突触既是神经元之间在功能上发生联系又是信息传递的关键部位,大量研究已证实,在慢性癫痫发作过程中,大鼠海马区的突触结构及功能均发生了明显的改变^[6-8]。

kalirin 是脑内新发现的一种多功能 Rho 鸟苷酸交换因子,它是维持神经元树突分支、树突棘数量、突触结构与功能所必需的因子,对树突棘的形成是必需的,在神经元的胞体和轴突中高表达^[9-11]。kalirin-7 是成年大鼠脑内最普遍的 kalirin 同源物,在维持神经元正常的生理过程和突触可塑性及学习、记忆等行为方面起着至关重要的作用^[12]。kalirin-7 包含的 PDZ(PSD-95/Dlg/ZO1)结合基序,使这个亚型能够定位在突触后密度片段上^[13,14],在海马神经元中过度表达时能激发神经元突起再生,而 kalirin-7 基因敲除或内源性的减少可导致海马 CA₁ 区锥形神经元从顶树突到基树突的树突棘进行性减少,甚至丢失^[15,16]。本实验结果显示,癫痫组大鼠在行为学检测中认知功能下降的同时,海马内 kalirin-7 表达也减少,与对照组相比差异显著;而人参皂苷 Rb1 可

有效地上調 kalirin-7 的表達,表明慢性癲癇發作可通過減少海馬內 kalirin-7 的表達使神經元樹突棘數量減少,進而改變突觸可塑性,這可能是癲癇後所致認知功能障礙的病理機制之一。

PSD-95 是位於突觸活性區突觸後膜下方與胞漿相連的一種膜相關蛋白,與神經終末突觸囊泡膜上的突觸素及突觸後的 kalirin-7 蛋白的表達密切相關,參與神經遞質的調節,串集 N-甲基-D-門冬氨酸 (NMDA) 受體^[10],此受體是誘發 LTP 的必要條件,在信號轉導中起着關鍵作用^[17],該蛋白表達的減少最終在行為學上可表現為學習記憶障礙^[18-20]。本研究結果發現,癲癇組大鼠的空間學習記憶能力下降,海馬 CA₁ 區突觸的密度減低,數量減少,PSD-95 蛋白表達也明顯減少,表明 PTZ 誘導的癲癇可使大鼠海馬區突觸結構明顯受損,影響突觸對點的信息傳遞,干擾 LTP 的形成,最終導致認知功能障礙。通過應用不同劑量的人參皂苷 Rb1 對 PTZ 致癲大鼠的行為學、形態學及分子生物學多方面進行對比研究,發現人參皂苷 Rb1 干預組能有效地提高癲癇大鼠的學習記憶能力,增加突觸超微結構的密度和數量,同時可上調 kalirin-7 和 PSD-95 蛋白的表達,提示這種保護機制可能與增強大鼠海馬的突觸可塑性密切相關。

總之,本研究結果表明,慢性癲癇發作導致的認知功能下降可能的病理機制是通過減少大鼠海馬內 kalirin-7 和 PSD-95 突觸相關蛋白的表達,進而影響其突觸可塑性。而人參皂苷 Rb1 可能為今後臨床防治癲癇所致的認知功能障礙提供新的靶點和應用依據。然而,由於癲癇的發病機制較為複雜,人參皂苷 Rb1 是否還具有其它相關的保護機制尚需進一步研究。

[參考文獻]

- [1] Zhang B, Hata R, Zhu P, et al. Prevention of ischemic neuronal death by intravenous infusion of a ginseng saponin, ginsenoside Rb(1), that upregulates Bcl-x(L) expression[J]. *J Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2006, 26(5): 708 - 721.
- [2] Zhang B, Matsuda S, Tanaka J, et al. Ginsenoside Rb(1) prevents image navigation disability, cortical infarction, and thalamic degeneration in rats with focal cerebral ischemia[J]. *J Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 1998, 7(1): 1 - 9.
- [3] Wang Y, Liu J, Zhang Z, et al. Anti-neuroinflammation effect of ginsenoside Rb1 in a rat model of Alzheimer disease[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 487(1): 70 - 72.
- [4] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation II Motor seizure[J]. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*, 1972, 32(3): 281 - 294.
- [5] Mortazavi F, Ericson M, Story D, et al. Spatial learning deficits and emotional impairments in pentylenetetrazole-kindled rats [J]. *Epilepsy Behav*, 2005, 7(4): 629 - 638.
- [6] Jackson J, Chugh D, Nilsson P, et al. Altered synaptic properties during integration of adult-born hippocampal neurons following a seizure insult[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35557.
- [7] Yokoi N, Fukata M, Fukata Y. Synaptic plasticity regulated by protein-protein interactions and posttranslational modifications [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 297: 1 - 43.
- [8] Yudowski GA, Olsen O, Adesnik H, et al. Acute inactivation of PSD-95 destabilizes AMPA receptors at hippocampal synapses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53965.
- [9] Nicholson DA, Cahill ME, Tulisiak CT, et al. Spatially restricted actin-regulatory signaling contributes to synapse morphology [J]. *J Neurochem*, 2012, 121(6): 852 - 860.
- [10] Lemtiri-Chlieh F, Zhao L, Kiraly DD, et al. Kalirin-7 is necessary for normal NMDA receptor-dependent synaptic plasticity [J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 126.
- [11] Ma XM. Kalirin-7 is a key player in the formation of excitatory synapses in hippocampal neurons [J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10: 1655 - 1666.
- [12] Penzes P, Jones KA. Dendritic spine dynamics-a key role for kalirin-7 [J]. *Trends Neurosci*, 2008, 31(8): 419 - 427.
- [13] McPherson CE, Eipper BA, Mains RE. Genomic organization and differential expression of Kalirin isoforms [J]. *Gene*, 2002, 284(1): 41 - 51.
- [14] Kiraly DD, Stone KL, Colangelo CM, et al. Identification of kalirin-7 as a potential post-synaptic density signaling hub [J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(6): 2828 - 2841.
- [15] Penzes P, Johnson RC, Sattler R, et al. The neuronal Rho-GEF Kalirin-7 interacts with PDZ domain-containing proteins and regulates dendritic morphogenesis [J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 229 - 242.
- [16] Penzes P, Johnson RC, Kambampati V, et al. Distinct roles for the two Rho GDP/GTP exchange factor domains of kalirin in regulation of neurite growth and neuronal morphology [J]. *J Neuroscience*, 2001, 21(21): 8426 - 8434.
- [17] Akama KT, Thompson LI, Milner TA, et al. Post-synaptic density-95 (PSD-95) binding capacity of G-protein-coupled receptor 30 (GPR30), an estrogen receptor that can be identified in hippocampal dendritic spines [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(9): 6438 - 6450.
- [18] Chao HW, Tsai LY, Lu YL, et al. Deletion of CPEB3 Enhances Hippocampus-Dependent Memory via Increasing Expressions of PSD95 and NMDA Receptors [J]. *J Neuroscience*, 2013, 33(43): 17008 - 17022.
- [19] Head E, Corrada MM, Kahle-Wrobleski K, et al. Synaptic proteins, neuropathology and cognitive status in the oldest-old [J]. *Neurobiol Aging*, 2009, 30(7): 1125 - 1134.
- [20] Zamzow DR, Elias V, Shumaker M, et al. An increase in the association of GluN2B containing NMDA receptors with membrane scaffolding proteins was related to memory declines during aging [J]. *J Neuroscience*, 2013, 33(30): 12300 - 12005.