

人参皂苷Rb1对CUMS应激大鼠海马-杏仁核MAP-2磷酸化影响

刘继刚¹, 臧蔚², 袁杨², 刘昊²

(1. 遵化市人民医院, 河北 遵化 064200; 2. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000)

摘要:目的: 研究人参皂苷Rb1对不可预见性温和应激(CUMS)大鼠海马-杏仁核组织微管相关蛋白-2(MAP-2)磷酸化的影响, 探讨人参皂苷Rb1抗抑郁作用的可能机制。方法: 选用30只成年Wistar大鼠, 随机分为对照组、应激组和干预组。给予应激组大鼠CUMS应激22 d, 干预组大鼠同时给予人参皂苷Rb1。采用糖水实验和旷场实验进行行为学检测, 采用Western blot方法检测海马、杏仁核组织MAP-2及pMAP-2表达, Real-time PCR检测mRNA表达。结果: (1) 对照组、应激组和干预组大鼠糖水偏好百分比、旷场实验得分比较, 应激组大鼠明显低于对照组, 干预组低于对照组, 高于应激组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 (2) 应激组大鼠海马和杏仁核组织pMAP-2蛋白和mRNA表达水平明显低于对照组($P < 0.05$), 干预组表达明显升高, 但仍低于对照组($P < 0.05$)。结论: 人参皂苷Rb1抗抑郁作用可能与影响海马、杏仁核MAP-2磷酸化有关。

关键词: 人参皂苷Rb1; 应激; 海马; 杏仁核; 微管相关蛋白

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-842X(2016)07-0047-03

Influence of Ginsenoside Rb1 on Expression of Phosphorylated MAP-2 in Hippocampus and Amygdala of CUMS Rat

LIU Jigang¹, ZANG Yu², YUAN Yang², LIU Hao²

(1. Zunhua People's Hospital, Zunhua 064200, Hebei, China; 2. Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, Hebei, China)

Abstract: Objective: To observe the effect of ginsenoside Rb1 on phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (pMAP-2) in hippocampus and amygdala of depressive rats. Methods: Thirty male Wistar rats were randomly divided into control group, stress group and treatment group. The stress group rats were gave the chronic unpredicted mild stress and the treatment group rats were gave ginsenoside Rb1. The behavior changes were examined using sucrose preference test and open-field test. The expression of pMAP-2 protein and mRNA were detected by Western blot and real-time PCR respectively. Results: (1) Compared to control rats, preference of sucrose and score of open-field test of stress group rats were significantly lower, while the escape latency were higher ($P < 0.05$). These index were reversed in treatment group. (2) The expression of pMAP-2 protein and mRNA of stress group were lower than that of control group, while the index was higher after treatment with ginsenoside Rb1 ($P < 0.05$). Conclusion: Effect of ginsenoside Rb1 antidepressant may induced by affect the phosphorylation of MAP-2 in hippocampus and amygdala.

Keywords: ginsenoside Rb1; stress; hippocampus; amygdala; microtubule-associated protein

随着生活压力增加和应激事件的不断增多, 应激所导致的精神性疾病(如抑郁症)的发病率呈现增高趋势, 已经成为目前研究的一个热点, 但其详细发病机制尚未阐明。可以肯定的是, 反复应激是导

致抑郁症发生的根本原因。慢性不可预见性温和应激(Chronic unpredicted mild stress, CUMS)是模仿人类生活中遭受的各种应激, 可用于抑郁症的基础研究。临床资料表明, 抑郁症患者海马、杏仁核等部

independent, X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)-mediated Bax protein oligomerization on mitochondria to initiate cytochrome c release and caspase activation[J]. J Biol Chem, 2011, 286 (33): 28749-28760.

[9] Pucci B, Bertani F, Karpnich NO, et al. Detailing the role of Bax translocation, cytochrome c release, and perinuclear clustering of the mitochondria in the killing of HeLa cells by TNF[J]. J Cell Physiol, 2008, 217 (2): 442-449.

[10] Sudjit Luanpitponga, Pithi Chanvorachoteb, Christian Stehlike, et al. Regulation of apoptosis by Bcl-2 cysteine oxidation in human lung epithelial cells[J]. Mol Biol Cel, 2013, 24 (6): 858-869.

[11] Makinen K, Loimus S, Haklaa T, et al. Tumour suppressor protein (p53), apoptosis inhibiting protein (bcl-2) and

proliferating cell nuclear antigen expressions in a rat pancreatic tumour model[J]. Anticancer Res, 2007, 27 (1A): 23-26.

[12] Kim KY, Seol JY, Jeon GA, et al. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cells[J]. Cancer Lett, 2003, 189 (2): 157-166.

[13] WANG Z, YANG J, Fisher T, et al. Akt activation is responsible for enhanced migratory and invasive behavior of arsenic-transformed human bronchial epithelial cells[J]. Environ Health Perspect, 2012, 120 (1): 92-97.

[14] SONG L, XIONG H, LI J, et al. Sphingosine kinase-1 enhances resistance to apoptosis through activation of PI3K/Akt/NF- κ B pathway in human non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17 (1): 1839-1849.

收稿日期: 2015-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(81201048)

作者简介: 刘继刚(1962-), 男, 河北遵化人, 主治医师, 学士, 研究方向: 应激性疾病发病机制。

通讯作者: 刘昊(1974-), 女, 河北唐山, 主任医师, 硕士, 研究方向: 应激性疾病。E-mail: liuhao938@163.com。



微信公众号: lnzyydx (或扫左侧二维码关注)

投稿平台: <http://lzyb.cbpt.cnki.net>

位存在容积缩小的现象^[1-2]。这可能与这些部位细胞骨架相关蛋白磷酸化有关^[3]。研究结果表明,人参皂苷(Ginsenoside)活性成分Rb1具有明显的抗抑郁作用^[4-5]。为深入研究人参皂苷详细药效机制,本研究给予大鼠CUMS应激和人参皂苷Rb1,观察人参皂苷Rb1对应激大鼠海马、杏仁核微管相关蛋白-2变化的影响,为人参皂苷Rb1抗抑郁机制研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

健康SPF级成年雄性Wistar大鼠30只,体质量180~210 g,实验动物合格证号:SCXK京2009-0004,由华北理工大学实验动物中心提供。适应性饲养1周后用于实验。兔MAP-2多克隆抗体和兔pMAP-2多克隆抗体购自Santaz Cruz公司,Western blot相关试剂购自武汉博士德生物工程有限公司,Real-time PCR试剂盒购自Takara公司。人参皂苷Rb1购自中国药品生物制品检定所。其它试剂为国产分析纯。

1.2 实验分组和CUMS应激

适应性饲养结束后,随机将大鼠分为对照组、应激组和干预组,每组10只。应激组给予CUMS应激,在每天9:00进行。应激共11种,包括夹尾1 min,黑白颠倒、天敌声音3 min,冰水强迫游泳15 min,热水强迫游泳15 min,潮湿垫料,鼠笼倾斜等。每天随机给予1种应激,同种应激不连续出现,共持续22 d,具体方法参见^[3]。干预组在给予应激的同时,通过灌胃给予大鼠人参皂苷Rb1,每日1次(每毫升药液含原生药1 g,剂量:1 mL/100 g体质量)。对照组大鼠除每天抓取1次外,不作其他处理。

1.3 行为学实验

1.3.1 糖水实验

对大鼠禁止饮水2.5 h后,每笼同时给予10%蔗糖水和自来水,让其自由饮用。分别记录每只大鼠1 h内的蔗糖水和自来水的消耗量,计算糖水偏好百分比(糖水消耗量/总液体消耗×100%)。

1.3.2 旷场实验

采用鼠博士行为学分析系统对3组大鼠进行旷场实验。旷场箱长宽各100 cm、高60 cm,底部划有25个边长为20 cm的方格,在距离旷场箱底部1.5 m高度安置摄像头。将大鼠放入旷场中间,通过动物行为视频分析系统记录分析5 min内大鼠的活动情况。记录大鼠行动过程中穿过的方格数(四爪进入方格内可计数),为水平运动得分。前两爪离开地面或攀附箱壁为垂直运动得分。取水平运动得分和垂直运动得分之和为旷场实验得分。箱底消毒后进行另一只大鼠测试。

1.4 Western blot检测海马、杏仁核组织MAP-2和pMAP-2表达

3组各取5只大鼠,麻醉后断头取脑,冰上快速分离海马和杏仁核,加适量RIPA裂解液完全裂解后,4℃12000 r/min离心10 min,收集上清液。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,按照40 μg蛋白量上样,进行10% SDS-PAGE电泳,2 h后PVDF膜电转印(180 mA,1.5 h),5%牛血清白蛋白室温封闭1 h, PBST漂洗后,加MAP-2一抗(1:500)4℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗IgG(1:2000)

37℃孵育1 h, ECL显色。同上方法进行海马、杏仁核pMAP-2和内参照β-actin的Western blot分析。使用Quantity One软件对蛋白显色条带进行分析,以目的条带与内参照的光密度比值表示蛋白相对表达。

1.5 Real-time PCR检测海马、杏仁核组织pMAP-2 mRNA表达

3组各取5只大鼠,麻醉后断头取脑,在冰上快速分离海马和杏仁核组织,分别提取组织总RNA。定量后取1 μg RNA,按照试剂盒说明书进行反转录和PCR扩增。引物序列:sense 5'-TGG CTT TCT CAT CTC CAT CC-3', antisense 5'-CTC ACT GCC CCA TTA GTG C-3',产物大小357 bp。PCR扩增条件:94℃4 min;94℃30 s;55℃30 s;72℃25 s;35个循环。按照公式 $\Delta Ct = Ct(\text{目的基因}) - Ct(\text{管家基因})$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{实验组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ 计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (pMAP-2 mRNA水平)。

1.6 统计分析

分析结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 17.0统计分析软件对数据进行单因素方差分析和LSD检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 3组大鼠行为学实验结果

糖水实验结果表明,对照组、应激组和干预组大鼠糖水偏好百分比分别为(81.33%±9.28%)、(43.38%±4.11%)和(64.88%±8.67%)。与对照组比较,应激组和干预组大鼠糖水偏好百分比明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与应激组比较,干预组糖水偏好百分比明显高于应激组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。旷场实验结果显示,3组大鼠旷场实验得分分别为(59.33±7.14)、(26.53±2.89)和(46.81±5.09)分,应激组大鼠得分明显低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$);干预组得分低于对照组,高于应激组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表1。

表1 3组大鼠行为学实验结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	糖水偏好百分比(%)	旷场实验得分(分)
对照组	81.33±9.28	59.33±7.14
应激组	43.38±4.11*	26.53±2.89*
干预组	64.88±8.67* ^Δ	46.81±5.09* ^Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与应激组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 海马、杏仁核组织中MAP-2和pMAP-2蛋白表达结果

分析结果表明,对照组、应激组和干预组大鼠海马组织MAP-2相对表达量分别为1.05±0.12、1.18±0.20和0.71±0.08, pMAP-2相对表达量分别为0.94±0.11、0.18±0.02和0.43±0.05。pMAP-2与MAP-2比值分别为0.90±0.11、0.15±0.03、0.61±0.04。3组大鼠杏仁核组织MAP-2相对表达量分别为1.12±0.15、1.02±0.12和1.03±0.08, pMAP-2相对表达量分别为1.17±0.09、0.62±0.07和1.01±0.06。pMAP-2与MAP-2比值分别为1.04±0.10、0.61±0.04、0.98±0.09。与对照组比较,应激组海马和杏仁核组织pMAP-2和pMAP-2/MAP-2比值均出现显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。干预组低于对照组,高于应激组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表2,图1。

表2 3组大鼠海马、杏仁核组织MAP-2和pMAP-2蛋白表达结果($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	pMAP-2		MAP-2		pMAP-2/MAP-2	
	海马	杏仁核	海马	杏仁核	海马	杏仁核
对照组	0.94±0.11	1.17±0.09	1.05±0.12	1.12±0.15	0.90±0.11	1.04±0.10
应激组	0.18±0.02*	0.62±0.07*	1.18±0.20	1.02±0.12*	0.15±0.03*	0.61±0.04*
干预组	0.43±0.05 [△]	1.01±0.06 [△]	0.71±0.08 [△]	1.03±0.08*	0.61±0.04 [△]	0.98±0.09*

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与应激组比较, $\Delta P<0.05$ 。

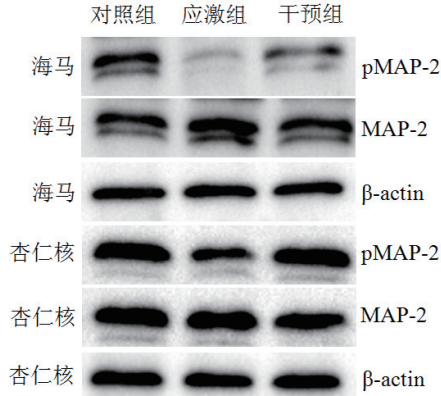


图1 Western-blot检测海马和杏仁核MAP-2、pMAP-2表达结果

2.3 海马、杏仁核组织中pMAP-2 mRNA表达结果
对照组、应激组和干预组海马pMAP-2 mRNA相对表达量分别为1.00、 0.38 ± 0.04 和 0.75 ± 0.11 。杏仁核组织表达量分别为1.00、 0.27 ± 0.05 和 0.50 ± 0.04 。应激组大鼠海马和杏仁核pMAP-2 mRNA相对表达量明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),干预组低于对照组,高于应激组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 3组大鼠海马、杏仁核组织pMAP-2 mRNA表达($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	pMAP-2 mRNA	
	海马	杏仁核
对照组	1.00	1.00
应激组	$0.38 \pm 0.04^*$	$0.27 \pm 0.05^*$
干预组	$0.75 \pm 0.11^{*\Delta}$	$0.50 \pm 0.04^{*\Delta}$

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与应激组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3 讨论

当今社会,各种应激事件对人的身心影响愈发受到人们的关注。随着生活压力的增加,应激导致的抑郁症发病率有增高趋势^[6],其发病机制及治疗研究成为医学领域的热点内容。由于受到伦理学限制,对抑郁症的基础研究往往通过建立抑郁症动物模型而进行。CUMS即模仿人类生活中遭遇的各种应激,给予大鼠CUMS能较好地表现出抑郁症的核心临床症状,是被普遍接受的抑郁症大鼠模型^[7]。本研究行为学实验结果表明,给予大鼠CUMS后,大鼠糖水偏好百分比和旷场实验得分明显减低,提示经过CUMS刺激后,大鼠表现出明显的快感缺失、焦虑等行为改变。随着影像技术的发展,对抑郁症患者脑结构改变的研究取得显著成果,发现抑郁症患者存在海马、杏仁核部位结构异常^[1-2]。对其原因进行探讨,结果表明可能与这些部位神经细胞凋亡增强以及神经细胞骨架蛋白改变有关^[3,8-9]。微管相关蛋白(Microtubule-associated protein, MAPS),特别是微管相关蛋白-2(MAP-2)能调节微管的聚合状

态,在维持神经元形态和突触可塑性方面起到主要作用^[10]。本研究结果表明,CUMS应激大鼠海马组织和杏仁核组织pMAP-2蛋白和mRNA以及pMAP-2与MAP-2比值明显降低。此结果提示,海马、杏仁核部位MAP-2磷酸化可能是抑郁症发病过程中一个重要因素。

祖国传统医学对抑郁症有独到认识。中医认为,抑郁症是情志不舒,肝气郁结,渐致五脏不和,化火、生痰、瘀阻、耗气、伤阴等而致,多采用疏肝理气法对其进行治疗^[11]。人参具有补气、安神、生津、益智等作用,活性成分人参皂苷Rb1具有明显的抗抑郁作用^[4,12]。本研究行为学实验结果表明,使用人参皂苷Rb1对大鼠进行干预后,能明显减轻CUMS大鼠糖水偏好百分比和旷场实验得分的降低,说明人参皂苷Rb1具有明显的抗抑郁作用。为探讨其机制,本研究观察了人参皂苷Rb1对大鼠海马、杏仁核组织MAP-2及其磷酸化改变的影响,结果表明,CUMS应激大鼠经人参皂苷Rb1治疗后,MAP-2蛋白磷酸化降低现象得到显著逆转,pMAP-2与MAP-2比值明显增高($P<0.05$),提示人参皂苷Rb1能影响海马、杏仁核组织MAP-2磷酸化,这可能是其抗抑郁作用的机理之一。

综上所述,人参皂苷Rb1能影响CUMS大鼠海马、杏仁核组织MAP-2磷酸化,这可能是其抗抑郁作用的机理之一。但使用人参皂苷Rb1治疗后,海马和杏仁核组织MAP-2蛋白磷酸化程度仍然低于对照组,提示影响MAP-2磷酸化的还有其他因素,值得我们进一步探讨。◆

参考文献

- [1] Colle R, Chupin M, Cury C, et al. Depressed suicide attempters have smaller hippocampus than depressed patients without suicide attempts[J]. J Psychiatr Res, 2015, 61: 13-18.
- [2] Wijeratne C, Sachdev S, Wen W, et al. Hippocampal and amygdala volume in an older bipolar disorder sample[J]. Int Psychogeriatr, 2013, 25(1): 54-60.
- [3] 隋竹欣. 抑郁大鼠海马神经结构改变及机制研究[D]. 唐山: 华北理工大学, 2015.
- [4] 黄倩, 楚世峰, 张均田, 等. 人参皂苷Rg1的抗抑郁作用及对突触超微结构的影响[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(8): 1124-1127.
- [5] 刘昊, 徐爱军, 秦丽娟, 等. 人参皂苷Rb1对抑郁症大鼠海马5-HT及5-HT1A受体表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2565-2567.
- [6] Duman RS, Kehne JH. Depression[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2007, 6(2): 85-86.
- [7] LI Q, YANG D, WANG J, et al. Reduced amount of olfactory receptor neurons in the rat model of depression[J]. Neurosci Lett, 2015, 603: 48-54.
- [8] 隋竹欣, 李珍, 刘昊, 等. 抑郁大鼠海马微管蛋白pMAP-2和p-Tau表达的研究[J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(2): 175-180.
- [9] 田艳霞, 王海涛, 李冉, 等. 抑郁模型大鼠杏仁核神经元凋亡增加[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(8): 779-783.
- [10] Pereno GL, Beltramino CA. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity[J]. Brain Res, 2010, 1328(1): 130-138.
- [11] 周庆莹, 刘宏岩. 中医治疗抑郁症研究[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(1): 88-89.
- [12] 刘昊, 徐爱军, 秦丽娟, 等. 人参皂苷Rb1对抑郁症大鼠海马5-HT及5-HT1A受体表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(11): 2565-2567.