

网络出版时间:2023-01-20 15:37:36 网络出版地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20230119.1741.014.html>

人参皂苷 Rb1 改善局灶性 CIRI 小鼠模型神经损伤的调控机制研究

周璐,陈珊,赵雪,龙婷婷,朱俊德

摘要 目的 探究人参皂苷 Rb1 对局灶性脑缺血再灌注损伤(CIRI)的调控机制。**方法** 60只C57/BL小鼠随机分为6组($n=10$):假手术组、CIRI模型组、人参皂苷 Rb1 低、中、高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组。手术方法构建局灶性 CIRI 小鼠模型。行神经功能评分、行为学测试,尼氏染色检测海马体中尼氏体数量。qPCR、Western blot 和免疫组化检测人参皂苷 Rb1 对海马体中 Wnt 信号通路分子表达的影响,通过分子对接和共沉淀实验研究人参皂苷 Rb1 的调控机制。**结果** 与 CIRI 模型组相比,添加人参皂苷 Rb1 后能够降低小鼠神经功能评分($P < 0.05$),降低通过平衡木时间($P < 0.05$),提高小鼠进入正确臂时间($P < 0.05$),增加小鼠摇摆时间和攀爬时间($P < 0.05$),证明了人参皂苷 Rb1 能够

有效恢复小鼠神经系统功能,提高模型小鼠行为学能力。人参皂苷 Rb1 治疗后海马体中轴抑制蛋白 2(Axin2)和糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)降低,Wnt3a、Wnt1 和 β-连锁蛋白(β-catenin)表达量增加。**结论** 人参皂苷 Rb1 能够改善 CIRI 小鼠模型的神经功能并提高海马体中尼氏体数量,与激活 Wnt 信号通路有关,可能在卒中治疗期间对局灶性 CIRI 具有神经保护作用。

关键词 人参皂苷 Rb1;局灶性 CIRI;Wnt 信号通路;β-catenin;分子对接

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0252-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.014

2022-12-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81660243);贵州省科技计划项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]一般 415);贵州医科大学国家自然科学基金培育项目(编号:20NSP006)

作者单位:贵州医科大学基础医学院人体解剖教研室,贵阳 550025

作者简介:周璐,女,硕士研究生;

朱俊德,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:
893543000@qq.com

根据 2020 年中国卒中报告,2019 年我国新发卒中 394 万例,其中缺血性卒中 287 万例,约占卒中患者的 72.84%^[1]。它是一种高致残、高死亡率的疾病,严重危害人类的健康。脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury,CIRI)是脑组织缺血后,恢复血液供应时诱发的功能障碍加重的现

The expression of KIRREL in gastric cancer and its effect on angiogenesis

Chen Shuo, Zhang Mingjun, Wang Tao

(Dept of Oncology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the expression of Kin of IRRE-like protein 1 (KIRREL) in gastric cancer tissues and further explore its effect on angiogenesis. **Methods** Western blot and IHC were used to detect the expression of KIRREL in gastric cancer tissues and adjacent tissues. Human gastric cancer cell lines SNU-5 and AGS were selected to construct KIRREL-interfering and overexpressing stable cell lines by lentiviral infection of gastric cancer cells. The expression of hypoxia-inducible factor 1α (HIF-1α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the control, null, interfering and overexpression groups were measured by Western blot, and the effect of KIRREL on the tube-forming ability of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) was observed by angiogenesis assay. **Results** The expression of KIRREL in gastric cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). After silencing KIRREL, the protein expression of HIF-1α and VEGF was significantly reduced, and the tube length and nodes of HUVECs were also significantly reduced; the overexpression of KIRREL was the opposite ($P < 0.05$). **Conclusion** KIRREL is overexpressed in gastric cancer tissues and may promote angiogenesis in gastric cancer.

Key words KIRREL;gastric cancer;angiogenesis;VEGF;HIF-1α

象,减轻 CIRI 的损伤对改善脑缺血卒中的治疗有极大作用。此外,由 CIRI 导致的迟发性神经损伤会严重影响患者预后和神经功能的恢复。Wnt 信号通路与增殖、凋亡、迁移和分化等多种生理病理过程密切相关。当 Wnt 通路激活时,GSK-3 β 功能和 β -catenin 降解受到抑制, β -catenin 大量聚集并进入细胞核内,启动下游基因的转录与翻译,发挥调控细胞代谢的功能^[2-3]。研究^[4-6]表明,经典的 Wnt/ β -catenin 信号通路可以在整个生命周期中维持血脑屏障特征。

1 材料与方法

1.1 实验动物 60 只 C 57/BL 小鼠(5~8 周龄,20~25 g)由重庆恩斯维尔生物科技有限公司提供。小鼠的饲养环境为(25 ± 1)℃,12 h 光照/12 h 黑暗循环,自由进食和饮水。动物实验方案经贵州医科大学伦理委员会批准(No. 2200094),并严格按照其指导方针进行。

小鼠随机分为 6 组,每组 10 只,即假手术组、CIRI 模型组、人参皂苷 Rb1 低剂量组、人参皂苷 Rb1 中剂量组、人参皂苷 Rb1 高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组。假手术组:行假手术,腹腔注射生理盐水。CIRI 模型组:缺血手术,再灌注前 10 min 予腹腔注射生理盐水。人参皂苷 Rb1 低、中、高剂量组和阳性药物组:缺血手术后,再灌注前 10 min 分别腹腔注射人参皂苷 Rb1 20、40、80 mg/kg 和尼莫地平 1 mg/kg。

1.2 局灶性脑缺血再灌注损伤模型制备 小鼠适应性饲养 1 周后,进行大脑中动脉闭塞手术。麻醉后,显露左颈总动脉并使用动脉夹夹住。在手术过程中,使用手术台上的加热垫将体温保持在 36.5~37.0 ℃。切口区域用聚维酮碘溶液消毒。分离并结扎颈外动脉。将带有钝头(直径 0.35 mm)的尼龙缝线拉入颈外动脉,然后拉入颈内动脉。大脑中动脉被颈动脉分叉远侧 18 mm 处的缝线阻塞。缺血再灌注损伤通过在闭塞 2 h 后去除缝合线来执行。在切口闭合后,将小鼠放回笼子,并提供食物和水。

1.3 试剂与仪器 人参皂苷 Rb1 购自北京索莱宝生物科技有限公司;生物素标记的人参皂苷 Rb1 从 Isolife 公司(芬兰)购买;RNAiso Plus 裂解液购自 Takara 公司;反转录试剂盒购自北京擎科生物科技有限公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术公司;糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase

kinase-3 β ,GSK-3 β)、Wnt3a、Wnt1、 β -连链蛋白(β -catenin)、 β -actin 以及辣根过氧化物酶偶联二抗抗体均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司(Abclonal);Mshot MF53 显微镜(广州市明美光电技术有限公司);BioRad 成像系统(美国 BioRad 公司)。

1.4 神经功能评分 动物造模手术 24 h 后,按照 MasaoShmiizu-Sasamata 的方法对所有小鼠进行神经行为评分,评分标准包括:① 自主活动的程度,② 左前肢偏瘫,③ 提尾时左前肢伸不直,④ 抗侧推能力,⑤ 向左倾斜度,⑥ 向左环形度,⑦ 对触须的反应。以上指标无异常为 0 分,中等异常为 1 分,严重异常为 2 分;各项评分相加,总分为 0~14 分^[7]。

1.5 行为学测试 利用平衡木实验、Y 迷宫实验和悬尾实验对小鼠的行为学能力进行测试。平衡木实验方法:将小鼠放置于方形平衡木(长 1 m,宽 14 mm)一侧,另一侧放方形木盒,记录小鼠 60 s 内通过平衡木时间。训练 2 次,第 3 次正式实验。未能达到另一侧或超过 60 s 均记录为 60 s。Y 迷宫实验方法:由三个支臂和一个连接区组成,三臂相互夹角为 120°,每臂末部铺以食物槽,用以盛放食物。各臂可依次分为起步区、错误臂以及正确臂。通过训练后记录 240 s 内进入各臂时间,统计正确臂时间。悬尾实验方法:提起小鼠尾部固定,使头向下悬挂,300 s 内记录小鼠摇摆和攀爬情况。

1.6 尼氏染色 小鼠海马区脑组织样本,4% 多聚甲醛固定,切片,二甲苯脱蜡透明,将切片使用梯度酒精水化,双蒸水清洗后,切片入甲酚紫染色,分化 1~3 min 后,二甲苯脱水,中性树胶封固,使用显微镜对切片进行图像采集。

1.7 qPCR 使用 RNAiso Plus 裂解液提取组织总 RNA,利用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA,并进行 qPCR 检测,反应体系为:2 × T5 Fast qPCR Mix 10.0 μ L;10 μ mol/L Primer F 0.8 μ L;10 μ mol/L Primer R 0.8 μ L;50 × ROX Reference Dye II 0.4 μ L;Template DNA 0.5 μ L;ddH₂O 补充体系到 20 μ L。95 ℃ 反应 30 s 预变性,95 ℃ 5 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 30 s(40 个循环,延伸反应),利用 2^{-ΔΔCT} 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

1.8 Western blot BCA 蛋白浓度测定试剂盒用于蛋白质样品浓度测定,在 95 ℃ 下加热 5 min,每泳道上样 30 μ g,使用 10% SDS-PAGE 分离,然后电转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。将膜与 GSK-3 β (1:500)、Wnt3a(1:500)、Wnt1(1:500)、 β -cate-

表 1 引物序列

基因名	序列
β -catenin	F: 5'-GGTGGACTGCAGAAAATGGT-3' R: 5'-TCAGCACTCTGCTGTGGTC-3'
Axin2	F: 5'-CTGGCTTGGTGAACGTGTTG-3' R: 5'-AGTTGCTCACAGCCAAGACA-3'
β -actin	F: 5'-ACTACATTCAATTCCATC-3' R: 5'-CTAGAAGCACTTGCCTG-3'

nin(1:1 000)以及 β -actin抗体(1:2 000)4℃孵育过夜。用含有吐温的Tris缓冲液(TBST)洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:1 000)在室温下孵育1 h,然后再次用TBST洗涤。增强的化学发光使抗体可视化,BioRad成像系统分析蛋白质条带的密度。

1.9 免疫组化检测 海马组织的石蜡切片烘干后,将切片(5 μm厚)脱蜡并使用3%过氧化氢修复组织抗原。将脑组织与小鼠GSK-3 β (1:50)、Wnt3a(1:50)、Wnt1(1:50)、 β -catenin(1:100)抗体孵育。最后,将组织与生物素标记的二抗(1:500)一起孵育以观察蛋白质表达。

1.10 分子对接与共沉淀实验 在Pubchem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取人参皂苷Rb1分子结构,在PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取 β -catenin蛋白结构,利用AutoDock 4.2(美国Scripps研究所)进行分子对接预测与作图。

将生物素标记的人参皂苷Rb1与亲和素标记的磁珠在室温孵育1 h。通过磁力架吸附磁珠后,清洗磁珠,再将磁珠与总蛋白孵育混合后,在垂直混合器上4℃孵育过夜。短暂离心后,在磁力架吸附磁珠,弃去上清液,清洗磁珠后加入洗脱液获得与生物素标记的人参皂苷Rb1结合的蛋白质,Western blot法检测其是否含有Wnt信号通路蛋白。

1.11 统计学处理 所有数据均以平均值±标准偏差表示,使用单向方差分析和最小差异测试进行分析。所有统计分析均使用GraphPad Prism软件(v.8.0.1,美国)进行。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 局灶性脑CIRI损伤小鼠模型构建 为了研究人参皂苷Rb1对局灶性脑CIRI损伤小鼠模型的影响,利用手术构建局灶性脑CIRI损伤小鼠模型,并对小鼠模型进行平衡木试验、Y迷宫试验和悬尾

试验,随后分离海马体做组织水平和分子水平检测,流程示意图见图1。结果表明,与假手术组比较,CIRI模型组小鼠神经功能评分明显升高($P<0.05$);与CIRI模型组比较,人参皂苷Rb1低剂量组、人参皂苷Rb1中剂量组、人参皂苷Rb1高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组小鼠神经功能评分显著降低($P<0.05$)(图2A)。平衡木试验中,统计分析表明,与CIRI模型组相比,人参皂苷Rb1低剂量组、人参皂苷Rb1中剂量组、人参皂苷Rb1高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组能够显著降低小鼠通过平衡木时间($P<0.05$)(图2B)。Y迷宫试验中,与模型组相比,人参皂苷Rb1低剂量组、人参皂苷Rb1中剂量组、人参皂苷Rb1高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组均能够显著提高小鼠进入正确臂时间($P<0.05$)(图2C)。悬尾试验中,添加人参皂苷Rb1后,与CIRI模型组相比,小鼠摇摆时间和攀爬时间增加($P<0.05$),见图2D、2E。

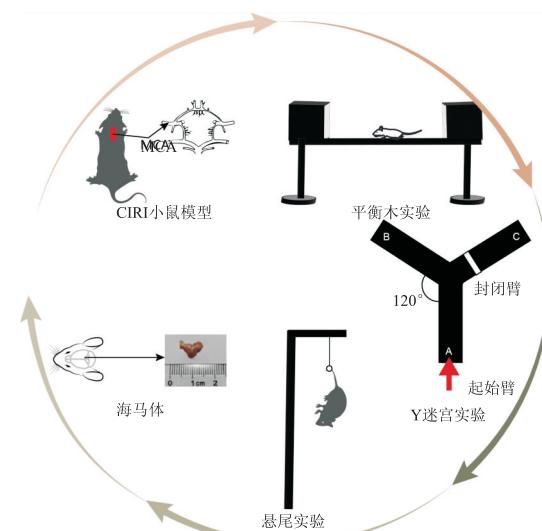


图1 局灶性脑CIRI损伤小鼠模型构建以及行为学检测流程示意图

2.2 人参皂苷Rb1能够提高海马体内尼氏体数量

尼氏染色检测海马体中尼氏体数量变化,结果如图3所示,可以明显看到CIRI模型组中尼氏染色阳性率降低,人参皂苷Rb1中剂量组、人参皂苷Rb1高剂量组和尼莫地平(阳性对照)组尼氏染色阳性率有所恢复,染色强度强于CIRI模型组。

2.3 人参皂苷Rb1对Wnt信号通路调控作用

Western blot结果表明,在CIRI模型组海马体样本中,与假手术组相比,GSK-3 β 蛋白升高($P<0.01$, $F=237.7$),见图4A、4B,而Wnt3a($P<0.01$, $F=122.3$)、Wnt1($P<0.01$, $F=71.59$)和 β -catenin

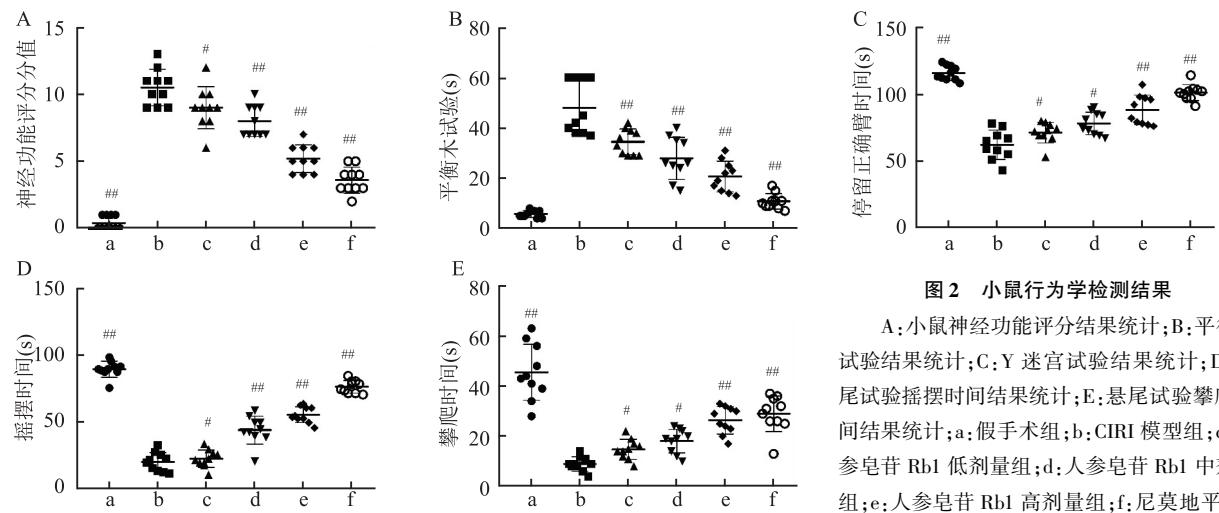
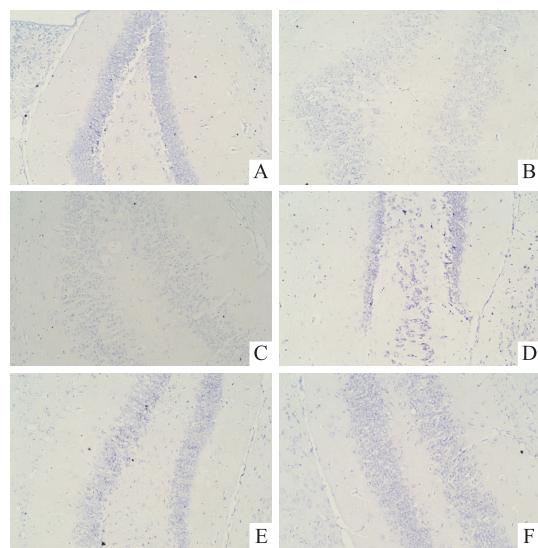


图 2 小鼠行为学检测结果

A:小鼠神经功能评分结果统计;B:平衡木试验结果统计;C:Y迷宫试验结果统计;D:悬尾试验摆摆时间结果统计;E:悬尾试验攀爬时间结果统计;a:假手术组;b:CIRI模型组;c:人参皂苷Rb1低剂量组;d:人参皂苷Rb1中剂量组;e:人参皂苷Rb1高剂量组;f:尼莫地平(阳性对照)组;与 CIRI 模型组比较:[#] $P < 0.05$,
^{##} $P < 0.01$

($P < 0.01$, $F = 180.5$)蛋白表达量降低,见图 4C-4E。人参皂苷 Rb1 低剂量组、人参皂苷 Rb1 中剂量组和人参皂苷 Rb1 高剂量组则能够降低 GSK-3 β , 提高 Wnt3a、Wnt1 和 β -catenin 蛋白表达量, 差异有统计学意义, 并且随着剂量的增加, 作用越显著。免疫组化结果与 Western blot 结果趋势一致, 见图 5~8。

图 3 尼氏染色检测各组海马体中尼氏体数量变化 $\times 200$

A:假手术组;B:CIRI模型组;C:人参皂苷Rb1低剂量组;D:人参皂苷Rb1中剂量组;E:人参皂苷Rb1高剂量组;F:尼莫地平(阳性对照)组

通过分子对接发现人参皂苷 Rb1 与 β -catenin 蛋白可能存在直接结合作用(图 9A), 共沉淀试验结果证明 β -catenin 蛋白与人参皂苷 Rb1 存在直接结合作用(图 9B)。进一步通过 qPCR 检测发现人

参皂苷 Rb1 处理后, 海马体中 Axin2 mRNA 表达量降低($P < 0.05$), β -catenin mRNA 表达量增加($P < 0.05$)(图 9C、9D)。

3 讨论

天然产物可用于调节细胞因子活性以治疗疾病。本研究结果表明天然产物人参的主要生物活性成分之一人参皂苷 Rb1 能改善大脑中动脉栓塞小鼠模型的神经功能并提高海马体中尼氏体数量。人参皂苷 Rb1 治疗后海马体中 Axin2 和 GSK-3 β 降低, Wnt3a、Wnt1 和 β -catenin 表达量增加, 差异有统计学意义, 表明人参皂苷 Rb1 能够激活 Wnt 信号通路, 可能在卒中治疗期间对局灶性 CIRI 具有神经保护作用。

许多研究^[8-9]已经证明了人参皂苷 Rb1 在治疗缺血性中风中的有益作用, 人参皂苷 Rb1 可促进局灶性脑梗死小鼠的后期恢复, 然而, 人参皂苷 Rb1 功能的机制需要进一步研究。大脑中的氧化应激和炎症反应是影响缺血性卒中的主要因素, 可促进自由基释放, 导致脑组织氧化损伤^[10]。有研究^[11]表明人参皂苷 Rb1 能够激活 PI3K/AKT 信号通路, 调控细胞自噬, 保护神经元免受缺血性损伤。也有研究^[8]表明, 在小鼠大脑中动脉栓塞再灌注模型中, 腹腔注射人参皂苷 Rb1 可以有效保护血脑屏障, 提高紧密连接蛋白的含量, 抑制自由基的产生, 保护血脑屏障完整性。本研究结果表明, 在局灶性 CIRI 小鼠模型中, 腹腔注射人参皂苷 Rb1 干预后, 与 CIRI 模型组相比, 人参皂苷 Rb1 低剂量组、人参皂苷 Rb1

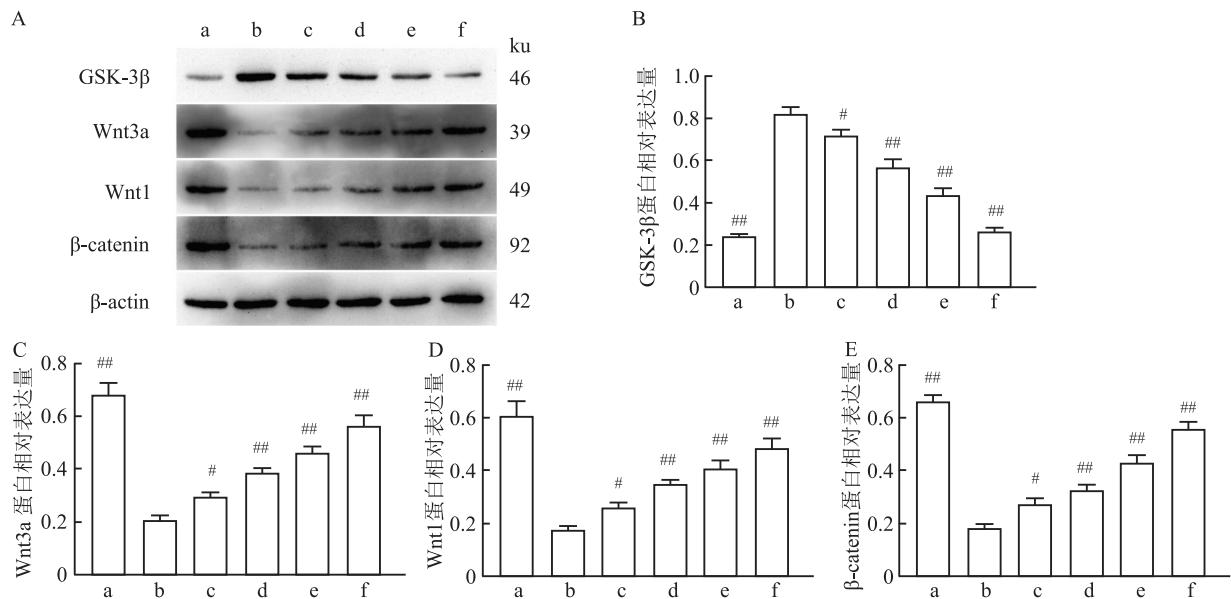
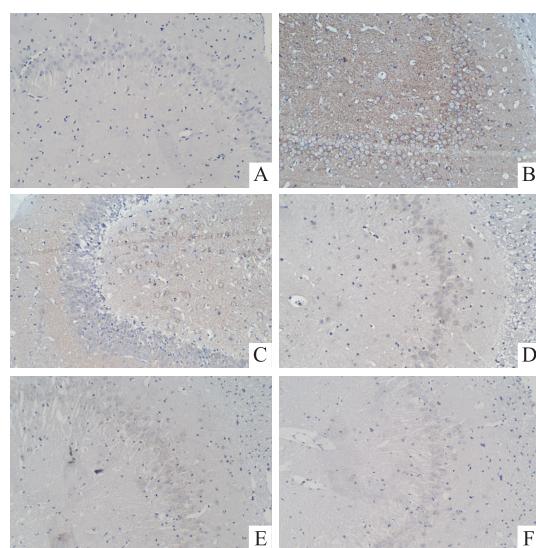


图 4 海马体组织中 GSK-3β、Wnt3a、Wnt1 和 β-catenin 的蛋白表达

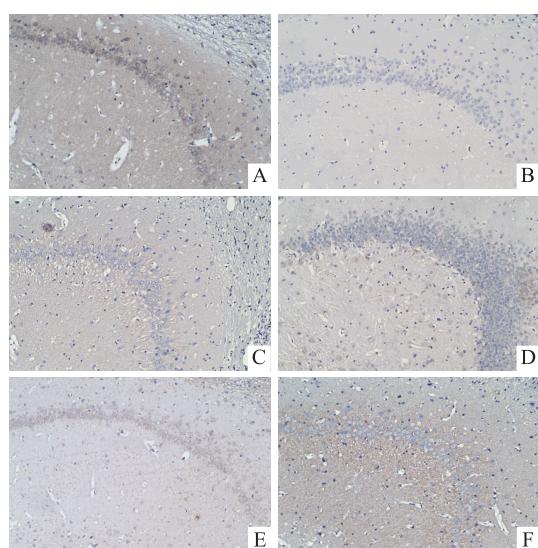
A: Western blot 条带; B-E: GSK-3β、Wnt3a、Wnt1 和 β-catenin 蛋白灰度值统计结果; a: 假手术组; b: CIRI 模型组; c: 人参皂苷 Rb1 低剂量组; d: 人参皂苷 Rb1 中剂量组; e: 人参皂苷 Rb1 高剂量组; f: 尼莫地平(阳性对照)组; 与 CIRI 模型组比较: [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01

图 5 免疫组化法检测海马体组织中 GSK-3β 表达 $\times 400$

A: 假手术组; B: CIRI 模型组; C: 人参皂苷 Rb1 低剂量组; D: 人参皂苷 Rb1 中剂量组; E: 人参皂苷 Rb1 高剂量组; F: 尼莫地平(阳性对照)组

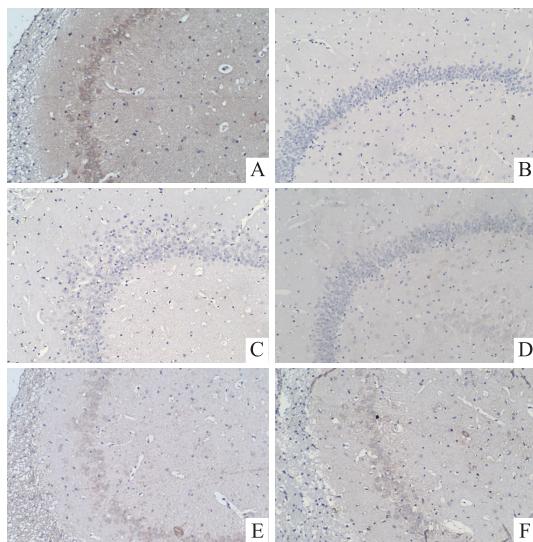
中剂量组、人参皂苷 Rb1 高剂量组能够降低小鼠神经功能评分和通过平衡木时间,增加小鼠进入正确臂时间、摇摆时间和攀爬时间,证明了人参皂苷 Rb1 能够有效恢复小鼠神经系统功能,提高模型小鼠行为学能力。

Wnt/β-catenin 信号通路在缺血性脑卒中的预防和损伤修复过程中发挥重要作用。以往研究^[12-13]

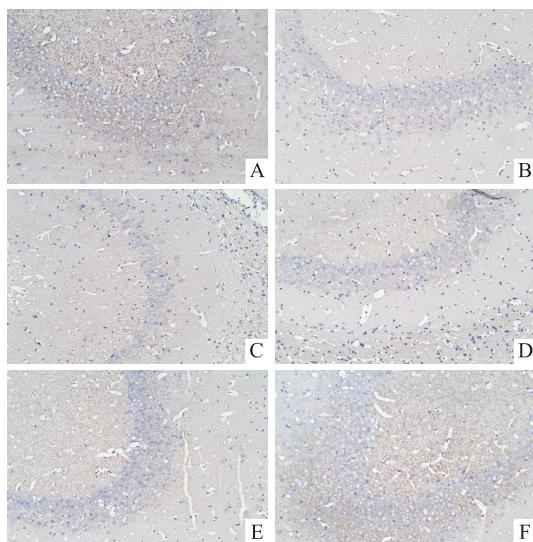
图 6 免疫组化法检测海马体组织中 Wnt3a 表达 $\times 400$

A: 假手术组; B: CIRI 模型组; C: 人参皂苷 Rb1 低剂量组; D: 人参皂苷 Rb1 中剂量组; E: 人参皂苷 Rb1 高剂量组; F: 尼莫地平(阳性对照)组

表明,Wnt/β-catenin 信号通路在脑缺血再灌注损伤中起重要作用,参与神经干细胞的增殖、分化和轴突形成等过程。同时,该信号通路在血脑屏障的形成和维持、脑血管再生和重塑中也至关重要。Wnt 蛋白广泛存在于脑血管和血脑屏障中,可参与调节脑血管生成和血脑屏障分化。许多研究^[6]已经证实脑缺血再灌注损伤可以激活 Wnt/β-catenin 信号通

图7 免疫组化法检测海马体组织中Wnt1表达 $\times 400$

A:假手术组;B:CIRI模型组;C:人参皂苷Rb1低剂量组;D:人参皂苷Rb1中剂量组;E:人参皂苷Rb1高剂量组;F:尼莫地平(阳性对照)组

图8 免疫组化法检测海马体组织中 β -catenin表达 $\times 400$

A:假手术组;B:CIRI模型组;C:人参皂苷Rb1低剂量组;D:人参皂苷Rb1中剂量组;E:人参皂苷Rb1高剂量组;F:尼莫地平(阳性对照)组

路,但该通路的激活是否保护或损伤组织尚存在争议。本研究通过免疫组化与Western blot检测显示,人参皂苷Rb1能够降低GSK-3 β ,提高Wnt3a、Wnt1和 β -catenin蛋白表达量,并且随着剂量的增加,作用越显著。

综上所述,本研究表明人参皂苷Rb1对局灶性CIRI中的神经系统具有保护作用,能够改善CIRI小鼠模型的神经功能并提高海马体中尼氏体数量,

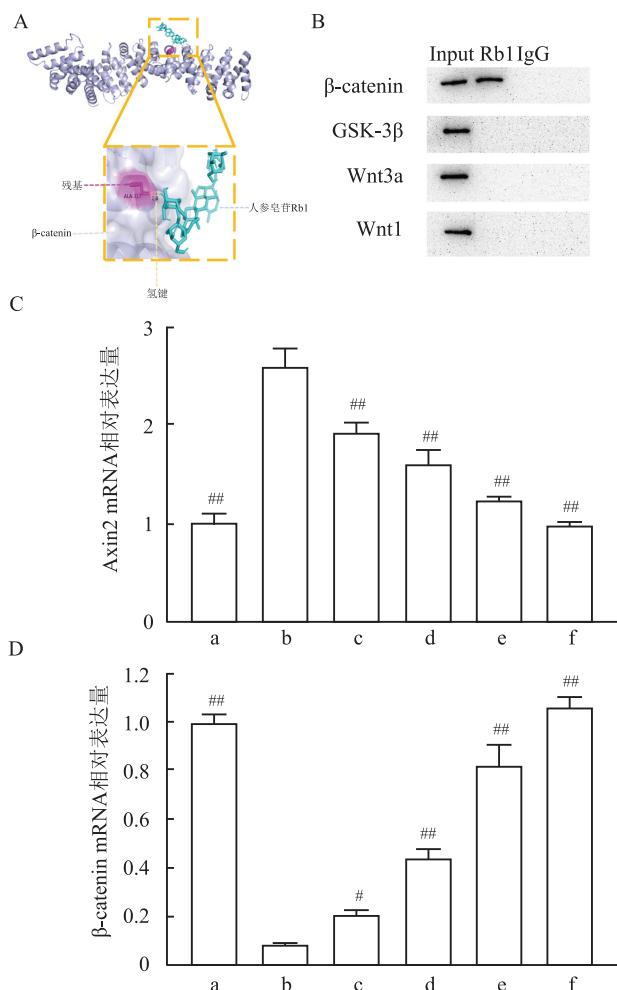


图9 人参皂苷Rb1调控海马体组织中基因表达

A:人参皂苷Rb1与 β -catenin蛋白分子对接图;B:人参皂苷Rb1与组织总蛋白共沉淀试验;C、D:qPCR检测海马体中Axin2和 β -catenin的mRNA表达量;a:假手术组;b:CIRI模型组;c:人参皂苷Rb1低剂量组;d:人参皂苷Rb1中剂量组;e:人参皂苷Rb1高剂量组;f:尼莫地平(阳性对照)组;与CIRI模型组比较: ${}^{\#}P < 0.05$, ${}^{\#\#}P < 0.01$

人参皂苷Rb1通过与 β -catenin结合激活Wnt信号通路可能在该过程中发挥重要作用。人参皂苷Rb1与激活Wnt信号通路相关,可能在卒中治疗期间对局灶性CIRI具有神经保护作用。研究证明人参皂苷Rb1可能是一种很有前途的神经保护候选物,需要进一步的实验室和临床研究。

参考文献

- [1] 王拥军,李子孝,谷鸿秋,等.中国卒中报告2020(中文版)(1)[J].中国卒中杂志,2022,17(5):433-47.
- [2] Nazarinia D, Sharifi M, Dolatshahi M, et al. FoxO1 and Wnt/ β -catenin signaling pathway: Molecular targets of human amniotic mesenchymal stem cells-derived conditioned medium (hAMSC-

- CM) in protection against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Chem Neuroanat*, 2021, 112;101918.
- [3] Pan W, Xu Z. Triptolide mediates Wnt/beta-catenin signalling pathway to reduce cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Folia Neuropathol*, 2020, 58;324 – 33.
- [4] Li X, Zhang Y, Wang Y, et al. Exosomes derived from CXCR4-overexpressing BMSC promoted activation of microvascular endothelial cells in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Plast*, 2020, 2020;8814239.
- [5] Mu Q, Zhou H, Xu Y, et al. NPD1 inhibits excessive autophagy by targeting RNF146 and wnt/beta-catenin pathway in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2020, 40(5):456 – 63.
- [6] Zhang G, Ge M, Han Z, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway contributes to isoflurane postconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury and is possibly related to the transforming growth factorbeta1/Smad3 signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110;420 – 30.
- [7] Wang Z, Fang B, Tan Z, et al. Hypoxic preconditioning increases the protective effect of bone marrow mesenchymal stem cells on spinal cord ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):1953 – 60.
- [8] Fu Y, Xing R, Wang L, et al. Neurovascular protection of salvianolic acid B and ginsenoside Rg1 combination against acute ischemic stroke in rats [J]. *Neuroreport*, 2021, 32(13):1140 – 6.
- [9] 杨常青, 韩芳芳, 袁菲, 等. 人参皂苷 Rb1 抑制利多卡因诱导小鼠原代脊髓神经干细胞损伤研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(9):1332 – 8.
- [10] Chamorro A, Dírnagl U, Urrea X, et al. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation [J]. *Lancet Neurol*, 2016, 15(8): 869 – 81.
- [11] Wang Z, Wang L, Jiang R, et al. Ginsenoside Rg1 prevents bone marrow mesenchymal stem cell senescence via NRF2 and PI3K/Akt signaling [J]. *Free Radical Bio Med*, 2021, 174:182 – 94.
- [12] Fei Y X, Zhu J P, Zhao B, et al. XQ-1H regulates Wnt/GSK3beta/beta-catenin pathway and ameliorates the integrity of blood brain barrier in mice with acute ischemic stroke [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 164:269 – 88.
- [13] Chen X, Zhou B, Yan T, et al. Peroxynitrite enhances self-renewal, proliferation and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through activating HIF-1alpha and Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 117:158 – 67.

The regulatory mechanism of ginsenoside Rb1 to improve nerve injury in focal CIRI mouse model

Zhou Lu, Chen Shan, Zhao Xue, Long Tingting, Zhu Junde

(Dept of Human Anatomy, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To explore the regulatory mechanism of ginsenoside Rb1 on focal cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **Methods** A total of 60 C57/BL mice were randomly divided into 6 groups ($n=10$): sham-operated group, CIRI model group, ginsenoside Rb1 low-, medium-, and high-dose group and nimodipine (positive control) group. The surgical method was used to construct the focal CIRI mouse model. The neurological function scores and behavioral tests were performed, and Nissl staining was utilized to detect the number of nissl bodies in the hippocampus. The effect of ginsenoside Rb1 on the molecule expression of the Wnt signaling pathway in the hippocampus was detected by qPCR, Western blot and immunohistochemistry assays. The regulatory mechanism of ginsenoside Rb1 was investigated through molecular docking and co-precipitation assays. **Results** Compared with the CIRI model group, the addition of ginsenoside Rb1 reduced the neurological function scores of mice ($P < 0.05$), shortened the time passing the balance beam ($P < 0.05$), but increased the time entering the correct arm ($P < 0.05$) and the swinging time and climbing time of mice ($P < 0.05$), indicating that ginsenoside Rb1 could effectively resume the function of the nervous system in mice and improve the behavioral ability of model mice. After ginsenoside Rb1 treatment, axis inhibition protein 2 (Axin2) and glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) in the hippocampus decreased, whereas the expression of Wnt3a, Wnt1 and β-catenin increased. **Conclusion**

The ginsenoside Rb1 can improve neurological function of the CIRI mouse model and increase the number of Nissl bodies in the hippocampus, which is correlated with the activation of the Wnt signaling pathway, and it may be neuroprotective against focal CIRI during stroke treatment.

Key words ginsenoside Rb; focal CIRI; Wnt signaling pathway; β-catenin; molecular docking