

# 人参皂苷 R<sub>g</sub> 对 AD 模型大鼠脑片 P-Tau caspase-3 表达的影响

李玺<sup>\*</sup>, 张欣, 袁海峰, 权乾坤

(西安交通大学 医学院 第二附属医院, 陕西 西安 710004)

**[摘要]** 目的: 研究人参皂苷 R<sub>g</sub> 对 AD 模型大鼠脑片磷酸化 Tau 蛋白 (Phosphory protein Tau, P-Tau)、半胱氨酸蛋白酶 (caspase-3) 表达的调控作用。方法: 将 5 周龄的雄性 Wistar 大鼠脑片 (含海马及皮层) 随机分为 5 组: 空白对照组, 模型组, 人参皂苷 R<sub>g</sub> 低、中、高 (60, 120, 240  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 3 个浓度组, 每组 10 张脑片。脑片放置人工脑脊液中培养。人参皂苷 R<sub>g</sub> 预防性加入人参皂苷 R<sub>g</sub> 各组 2 h 后, 模型组和人参皂苷 R<sub>g</sub> 各组分别加入用冈田酸 (okadaic acid, OA) 3 h 诱导大鼠脑片 Tau 蛋白过度磷酸化制备 AD 模型, 运用免疫组织化学、图像分析技术等方法, 观察人参皂苷 R<sub>g</sub> 预防性干预对各组大鼠脑片 P-Tau caspase-3 表达的影响。结果: 模型组 P-Tau caspase-3 的表达水平明显高于空白对照组 ( $P < 0.01$ ); 人参皂苷 R<sub>g</sub> 低、中、高浓度组与模型组比较, P-Tau caspase-3 的表达水平明显降低 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); P-Tau caspase-3 的表达随着人参皂苷 R<sub>g</sub> 浓度增加而降低。结论: 人参皂苷 R<sub>g</sub> 可以降低 P-Tau 水平, 从而减缓神经纤维缠结的形成; 还可通过抑制凋亡效应蛋白 caspase-3 的表达, 从而抑制神经元凋亡, 保护神经细胞, 发挥抗痴呆的作用。

**[关键词]** 人参皂苷 R<sub>g</sub>; 阿尔茨海默病; 磷酸化 Tau 蛋白; 半胱氨酸蛋白酶; 大鼠

人参皂苷 R<sub>g</sub> 是从人参中提取的一种生物活性成分<sup>[1]</sup>, 已被证实是人参促智作用的主要有效成分<sup>[2]</sup>, 有增强记忆和认知功能的作用, 已成为研究中药抗痴呆的热点之一。磷酸化 Tau 蛋白 (Phosphory protein Tau, P-Tau) 存在于正常人的大脑中, 但是 Tau 蛋白过度磷酸化参与了神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 的形成, 成为老年性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 的核心病理变化, 并且 NFT 的数目与 AD 病人的痴呆程度密切相关。AD 另一个重要的病理变化是大量神经元的凋亡缺失, 半胱氨酸蛋白酶 (caspase-3) 参与了 AD 中神经元的凋亡, 是细胞凋亡的执行者。本研究参照国内外有关文献<sup>[3-5]</sup>, 采用冈田酸 (okadaic acid, OA) 诱导大鼠培养脑片, Tau 蛋白过度磷酸化, 制备 AD 模型, 观察人参皂苷 R<sub>g</sub> 对 P-Tau caspase-3 表达的调控作用, 旨在阐明人参皂苷 R<sub>g</sub> 抗痴呆的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康雄性 Wistar 大鼠 10 只, 均清洁级 [西安交通大学医学院实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (陕) 2007-001]。鼠龄 5 周, 体重 110~130 g。

### 1.2 药物与试剂

人参皂苷 R<sub>g</sub> 购自吉林宏久生物科技股份有限公司, 纯度 98.99%, 用前溶于双蒸水, 0.25  $\mu\text{m}$  双层超滤膜过滤。OA 购自美国 ALEXIS 生物制剂公司, 纯度 98%, 用前溶于 10% 的二甲基亚砜, 配制成 1  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶液待用。P-Tau 和 caspase-3 多克隆抗体及免疫组织化学试剂盒 (SABC) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 仪器

ZQP-86 振动切片机 (上海之信仪器有限公司); BH22 光学显微镜 (日本 OLYMPUS 公司); HM500 冰冻切片机 (德国 MICROM 公司); Qwin550CW 图像处理与分析系统 (德国 LEICA 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物模型的制备及干预

**2.1.1 离体脑片的制备及分组** 大鼠在 6% 水合氯醛麻醉下切开头皮, 暴露颅骨, 迅速断头, 取脑, 置于 0~4℃ 的人工脑脊液冰水混合物中, 洗净血液并

**[收稿日期]** 2009-05-10

**[基金项目]** 陕西省科技发展攻关项目 [2007K15-05 (3)]; 陕西省中医药管理局基金项目 (2005030)

**[通信作者]** \* 李玺, Tel: (029) 87679354, Email: lix2100@sohu.com

降温后,用振动切片机以振幅 8 档,速度 3 档行冠状切片所切脑片含皮层和海马,平均厚度  $400\ \mu\text{m}$ 。挑选形态较好的脑片置入盛有人工脑脊液的 6 孔板中培养,温度  $(32.0\pm0.5)\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,整个过程人工脑脊液中持续通入混合氧气 ( $95\%\text{ O}_2+5\%\text{ CO}_2$ )。人工脑脊液成分 ( $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) ( $150\text{ NaCl}$   $2\text{ CaCl}_2$ ,  $1.2\text{ MgSO}_4$ ,  $0.5\text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $1.5\text{ K}_2\text{HPO}_4$ ,  $10$  葡萄糖,  $\text{pH}$   $7.4$ )。每只鼠取脑片 5 张,随机分为 5 组:空白组,模型组,人参皂苷  $\text{Rg}$  低、中、高浓度组,每组 10 张。

**2.1.2 AD 模型的制备及干预** 脑片不做任何处理培养于人工脑脊液中  $1\text{ h}$ 。1 h 后人参皂苷  $\text{Rg}$  低、中、高浓度组分别加入人参皂苷  $\text{Rg}$  ( $60, 120, 240\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 培养  $2\text{ h}$ 。然后,模型组和人参皂苷  $\text{Rg}$  各浓度组分别加入 OA 至其浓度分别达到  $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,培养  $3\text{ h}$ 。

**2.2 免疫组化法检测脑内 P-Tau、caspase-3 的表达**

取出的脑片迅速经人工脑脊液清洗后,用  $4\%$  多聚甲醛固定  $4\text{ h}$  取出,转入  $30\%$  蔗糖溶液浸泡至沉底,做冰冻切片,切片  $10\ \mu\text{m}$  厚,每张切片含皮

层、海马、齿状回。采用免疫组化 (SABC 法) 分别检测各组脑片皮层和海马 P-Tau、caspase-3 的阳性表达情况, P-Tau ( $\text{ser}^{202}$ ), caspase-3 一抗浓度均为  $1:100$ ,染色步骤按说明书进行, PBS 代替一抗作阴性对照。采用图象处理与分析系统对阳性表达进行灰度分析,每张切片同一区域中,随机选取 6 个视野,检测面积相同,取其平均值作为该切片目标区域的平均灰度值。

**2.3 统计学处理**

使用 SPSS11.0 统计软件处理,数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,方差齐性检验采用 leven 法,多组均数间比较单因素方差分析,两两均数比较采用 LSD-t 检验。  $P<0.05$  具有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 OA 对 AD 模型大鼠脑片 P-Tau、caspase-3 表达的影响**

模型组与空白对照组比较,各脑区 P-Tau 和 caspase-3 阳性反应物质表达增加 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见表 1。

表 1 OA 对 AD 模型大鼠脑片 P-Tau、caspase-3 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s\ n=10$ )

组别	P-Tau				caspase-3			
	CA1	CA3	DG	Cortex	CA1	CA3	DG	Cortex
空白	$114.48\pm1.15$	$108.94\pm2.44$	$109.68\pm1.68$	$115.16\pm1.85$	$180.82\pm2.06$	$184.26\pm1.32$	$186.31\pm1.73$	$186.31\pm1.73$
模型	$103.2\pm1.51^{1)}$	$101.67\pm1.57^{1)}$	$101.26\pm1.38^{1)}$	$100.66\pm1.85^{1)}$	$116.83\pm1.75^{1)}$	$123.46\pm1.25^{1)}$	$127.20\pm1.63^{1)}$	$126.38\pm1.78^{1)}$

注:与空白组比较  $^{1)} P<0.01$ 。

**3.2 人参皂苷  $\text{Rg}$  对 AD 模型大鼠脑片 P-Tau 表达的影响**

人参皂苷  $\text{Rg}$  各浓度组与模型组比较,除 CA3 区各浓度组与模型组无明显差异,皮层、海马 CA1、齿状回低浓度组和模型组无明显差异外,在其他部

位,人参皂苷  $\text{Rg}$  各浓度组与模型组比较差异明显 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );人参皂苷  $\text{Rg}$  各浓度组之间比较,除 CA3 和齿状回外,高浓度组比中、低浓度组更有效降低大脑各区 P-Tau 的表达 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。见表 2。

表 2 人参皂苷  $\text{Rg}$  对 AD 模型大鼠脑片 P-Tau 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s\ n=10$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CA1	CA3	DG	Cortex
空白	—	$114.48\pm1.15$	$108.94\pm2.44$	$109.68\pm1.68$	$115.16\pm1.85$
模型	—	$103.25\pm1.51^{1)}$	$101.67\pm1.57^{1)}$	$101.26\pm1.38^{1)}$	$100.66\pm1.85^{1)}$
人参皂苷 $\text{Rg}$	60	$104.64\pm1.75^{4)}$	$101.86\pm1.57$	$103.27\pm0.38$	$103.46\pm1.57^{5, 6)}$
	120	$107.03\pm1.52^{2)}$	$102.84\pm1.72$	$105.60\pm1.52^{2)}$	$109.59\pm1.51^{3, 5)}$
	240	$109.46\pm1.51^{2)}$	$103.68\pm1.59$	$107.21\pm2.17^{2)}$	$112.64\pm2.17^{3)}$

注:与空白对照组比  $^{1)} P<0.01$ ;与模型组比  $^{2)} P<0.05$ ,  $^{3)} P<0.01$ ;与人参皂苷  $\text{Rg}$  高浓度组比  $^{4)} P<0.05$ ,  $^{5)} P<0.01$ ;与人参皂苷  $\text{Rg}$  中浓度组比  $^{6)} P<0.05$ 。

**3.3 人参皂苷  $\text{Rg}$  对 AD 模型大鼠脑片 caspase-3 表达的影响** 人参皂苷  $\text{Rg}$  各组与模型组比较,海

马各区 caspase-3 表达明显减少 ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );人参皂苷  $\text{Rg}$  各组之间比较,在各脑区,高、

中浓度组之间无明显差异,高浓度组和低浓度组之间差异明显 ( $P<0.05$ 或  $P<0.01$ )。见表 3。

表 3 人参皂苷  $R_g$  对 AD 模型大鼠脑片 caspase-3 的影响 ( $\bar{x}\pm s$   $n=10$ )

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	CA1	CA3	DG	Cortex
空白	—	180.82 $\pm$ 2.06	184.26 $\pm$ 1.32	186.31 $\pm$ 1.73	186.85 $\pm$ 2.06
模型	—	116.83 $\pm$ 1.75 <sup>1)</sup>	123.46 $\pm$ 1.25 <sup>1)</sup>	127.20 $\pm$ 1.63 <sup>1)</sup>	126.38 $\pm$ 1.78 <sup>1)</sup>
人参皂苷 $R_g$	60	153.12 $\pm$ 3.41 <sup>2, 4, 6)</sup>	164.26 $\pm$ 1.71 <sup>2, 4, 5)</sup>	160.64 $\pm$ 2.32 <sup>2, 3)</sup>	157.27 $\pm$ 1.67 <sup>2, 4, 6)</sup>
	120	164.65 $\pm$ 2.41 <sup>2)</sup>	170.26 $\pm$ 1.83 <sup>2)</sup>	164.24 $\pm$ 2.15 <sup>2)</sup>	168.34 $\pm$ 1.76 <sup>2)</sup>
	240	166.77 $\pm$ 1.88 <sup>2)</sup>	171.64 $\pm$ 1.91 <sup>2)</sup>	165.93 $\pm$ 1.68 <sup>2)</sup>	169.51 $\pm$ 2.09 <sup>2)</sup>

注:与空白对照组比<sup>1)</sup>  $P<0.01$ ;与模型组比<sup>2)</sup>  $P<0.01$ ;与人参皂苷  $R_g$  高浓度组比<sup>3)</sup>  $P<0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P<0.01$ ;与人参皂苷  $R_g$  中浓度组比<sup>5)</sup>  $P<0.05$ ,<sup>6)</sup>  $P<0.01$ 。

4 讨论

神经原纤维缠结 (NFT) 是 AD 患者脑内主要病理改变之一,其产生的原因是 Tau 蛋白的过度磷酸化。Tau 蛋白是神经元微管相关蛋白,正常情况下 Tau 蛋白磷酸化和去磷酸化处于平衡状态, Tau 蛋白的过度磷酸化后,则其促进微管组装的生物活性就会丧失,导致细胞骨架的结构异常而形成 NFT。AD 另一个重要病理改变是神经元死亡缺失。AD 中神经细胞的死亡形式主要以凋亡为主。caspase 是一类位点特异性蛋白水解酶,在细胞凋亡的信号转导中起着重要作用。研究表明, caspase-3 是 caspase 家族中最为重要的凋亡执行者之一<sup>[6]</sup>,在凋亡执行阶段,负责对全部或者部分关键性蛋白的酶切(激活或者灭活)。另有研究表明 caspase-3 参与切割 Tau 蛋白,切掉 19 个氨基酸片段后, Tau 蛋白也就变成凋亡的效应器<sup>[7]</sup>,而 Tau 蛋白被切割后又可促进细胞凋亡。

本实验以 OA 诱导大鼠培养脑片 Tau 蛋白过度磷酸化,模型组大鼠脑片的 HE 染色可见少量细胞结构的破坏,及少量胶质细胞增生,未见细胞层厚度的变化;模型组大鼠脑片的免疫组化染色可见 P-Tau 和 caspase-3 阳性反应物质表达比空白对照组明显增加 ( $P<0.05$ 或  $P<0.01$ ),这表明成功建立 AD 模型。本实验结果显示人参皂苷  $R_g$  各组 P-Tau 和 caspase-3 的表达比模型组明显降低 ( $P<0.05$

或  $P<0.01$ ),并以高浓度组效果最佳,这表明人参皂苷  $R_g$  能有效减轻岗田酸引起的 Tau 蛋白过度磷酸化,从而减轻 NFT 的形成;还可通过抑制凋亡效应蛋白 caspase-3 的表达,从而抑制神经元凋亡缺失,保护神经细胞。本实验从代表 AD 本质病理变化的 NFT 形成和神经元凋亡缺失两个方面,揭示了人参皂苷  $R_g$  抗痴呆作用机制,为人参皂苷  $R_g$  治疗 AD 的研究提供了新靶点、新思路。

[参考文献]

[1] Byun B H, Shin I, Yoon Y S, et al. Modulation of protein kinase activity in NH 3T3 cells by plant glycosides from Panax ginseng [J]. Planta Med. 1997, 63: 389.

[2] Benishin C G, Lee R, Wang L C, et al. Effects of ginsenoside Rb<sub>1</sub> on central cholinergic metabolism [J]. Pharmacology. 1991, 42: 224.

[3] 常艳, 薛毅珑. 阿尔茨海默病的发病机制及研究进展 [J]. 中国临床康复, 2004, 8(4): 693.

[4] 王德生, 张守信. 老年性痴呆 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001, 15.

[5] Giannakopoulos P, Hermann FR, Bussiere T, et al. Tangle and neuron numbers but not amyloid loads predict cognitive status in Alzheimer's disease [J]. Neurology. 2003, 60(9): 1495.

[6] Shaw R D, Hempson S J, Mackow E R, et al. Rotavirus infection in lambs. Pathogenesis and pathology [J]. Arch Virol. 1977, 55: 263.

[7] Vicin S, Wang J F, Li J H, et al. Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-Aspartate receptors [J]. Neurophysiology. 1998, 79: 555.

## Experimental research on effect of ginsenoside R<sub>g1</sub> on expressions of P-Tau and caspase-3 in brain slices from AD model rats

LIXi\*, ZHANG Xin, YUAN Haifeng, QUAN Qiankun

(Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of ginsenoside R<sub>g1</sub> on the expressions of phosphory protein Tau (P-Tau) and caspase-3 in brain slices from AD model rats. Method: The brains of 5 week-old Wistar rats were cut into slices which were 400  $\mu\text{m}$  thick. These brain slices were divided into five groups: normal control group, untreated group, low-dose, medium-dose and high-dose ginsenoside R<sub>g1</sub> groups (60, 120, 240  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). And there were 10 slices in each group. These brain slices were cultured with artificial cerebrospinal fluid. After the brain slices in ginsenoside R<sub>g1</sub> groups were administration with ginsenoside R<sub>g1</sub> for 2 h preventively, brain slices in untreated group and ginsenoside R<sub>g1</sub> groups were administered with okadaic acid (OA) for 3 h to induce hyperphosphorylation of Tau protein to prepare AD models. And the effects of ginsenoside R<sub>g1</sub> on the expressions of P-Tau and caspase-3 in brain slices from AD model rats in each group were observed with immunohistochemistry and image analysis technology. Result: The levels of the expressions of P-Tau and caspase-3 in the untreated group were significantly higher than those in the normal control group ( $P < 0.01$ ). Compared with untreated group, the levels of the expressions of P-Tau and caspase-3 in ginsenoside R<sub>g1</sub> groups were significantly low ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Conclusion: Ginsenoside R<sub>g1</sub> could inhibit the expression of P-Tau to slow the formation of neurofibrillary tangles and could inhibit the expression of caspase-3 to inhibit neuronal apoptosis to protect the nerve cells, so as to play the role of anti-dementia.

[Key words] ginsenoside R<sub>g1</sub>; Alzheimer's disease; P-Tau; caspase-3; rats

doi: 10.4268/cjmm.20100325

[责任编辑 古云侠]