

人参皂苷 Rg1 和 IGF- I 对帕金森病小鼠 DA 能神经元作用

晏振¹, 吴林^{1,2}, 薛丹丹¹, 高先琦¹, 陈文芳¹

(1 青岛大学医学院生理学教研室, 山东 青岛 266071; 2 菏泽医学专科学校生理学教研室)

[摘要] 目的 观察人参皂苷 Rg1、胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 及二者合用对小鼠黑质纹状体系统多巴胺 (DA) 能神经元的神经保护作用。方法 C57BL/6 去卵巢 (OVX) 小鼠 50 只, 采用腹腔注射 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 方法制备帕金森病 (PD) 模型小鼠, 随机分为对照组、MPTP 组、Rg1 组 (10 mg/kg 腹腔注射)、IGF- I 组 (0.5 g/L 侧脑室注射)、Rg1 + IGF- I 组, 每组 10 只。应用高效液相色谱法检测各组纹状体内 DA 的含量, 免疫组织化学染色法检测黑质内酪氨酸羟化酶免疫阳性 (TH-IR) 神经元数目。结果 MPTP 组纹状体内 DA 含量、黑质 TH-IR 神经元数目较对照组明显降低, 差异有显著性 ($F = 21.23, 45.45, q = 11.67, 14.24, P < 0.01$)。Rg1 组、IGF- I 组及 Rg1 + IGF- I 组纹状体 DA 含量、黑质 TH-IR 神经元数目较 MPTP 组明显升高, 差异有显著性 ($q = 5.66 \sim 17.91, P < 0.01$); Rg1 + IGF- I 组与 Rg1 组、IGF- I 组比较, 差异有显著性 ($q = 4.37 \sim 8.74, P < 0.05$)。结论 Rg1、IGF- I 及二者合用均能够对抗 MPTP 对黑质纹状体系统 DA 能神经元的毒性作用, 且 Rg1 与 IGF- I 合用具有协同作用。

[关键词] 人参皂苷 Rg1; 胰岛素样生长因子- I; 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶; 多巴胺; 帕金森病

[中图分类号] Q426; R592 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1672-4488(2014)04-0283-04

EFFECTS OF GINSENOSE Rg1 AND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR- I ON DOPAMINERGIC NEURONS IN PARKINSON'S DISEASE MICE YAN Zhen, WU Lin, XUE Dandan, GAO Xianqi, CHEN Wenfang (Department of Physiology, Qingdao University Medical College, Qingdao 266071, China)

[ABSTRACT] **Objective** To investigate the neuroprotective effects of ginsenoside (Rg1), insulin-like growth factor- I (IGF- I) and combined treatment on nigrostriatal dopaminergic (DA) neurons in mice. **Methods** Fifty ovariectomized and 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Parkinson's disease (PD) model C57BL/6 mice were evenly randomized to control group, MPTP group, Rg1 group (10 mg/kg, ip), IGF- I group (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, icv), Rg1 and IGF- I combined group. High performance liquid chromatography-electrical chemical detection (HPLC-ECD) was used to detect the contents of DA in the striatum. The tyrosine hydroxylase-immunoreactive (TH-IR) neurons in the substantia nigra were determined by immunohistochemistry. **Results** The contents of DA in MPTP striatum and the numbers of TH-IR neurons in the substantia nigra significantly decreased as compared with the control group ($F = 21.23, 45.45; q = 11.67, 14.24; P < 0.01$). DA content and the numbers of TH-IR neurons in the substantia nigra in Rg1, IGF- I, and combined Rg1 plus IGF- I groups were significantly higher than that in the MPTP group ($q = 5.66 \sim 17.91, P < 0.01$), and the differences of that between the combination group and both Rg1 and IGF- I groups were significant ($q = 4.37 \sim 8.74, P < 0.05$). **Conclusion** Rg1 or IGF- I or combined both Rg1 and IGF- I can all play a role against MPTP-induced neurotoxicity on nigrostriatal dopaminergic neurons. The combination of Rg1 plus IGF- I has a synergistic effect.

[KEY WORDS] ginsenoside Rg1; insulin-like growth factor I; 1-Methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine; dopamine; Parkinson disease

帕金森病 (PD) 主要病理改变是中脑黑质致密部多巴胺 (DA) 能神经元脱失, 导致纹状体 DA 含量下降^[1]。人参皂苷 Rg1 是人参主要活性成分, 具有神经营养和神经保护作用^[2-4]。已有研究结果显示,

Rg1 可通过激活胰岛素样生长因子 I (IGF- I) 受体信号途径, 对抗神经毒素 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 对 DA 能神经元的损伤^[5]。IGF- I 是脑内非常重要的生长因子^[6], 其神经保护作用亦与 IGF- I 受体信号的途径有关^[7-9]。本研究拟应用 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (MPTP) 制备小鼠 PD 模型, 观察 Rg1、IGF- I 及二者合用对黑质纹状体系统 DA 能神经元的作用, 以期对 PD 的预防与治疗提供可能

[收稿日期] 2013-10-26; **[修订日期]** 2014-04-30

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (31271150), 青岛市科技局资助项目 (11-2-4-2-(23)-jch)

[作者简介] 晏振 (1987-), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 陈文芳 (1968-), 女, 博士, 教授, 博士生导师。

方案。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

健康雌性 C57BL/6 小鼠 50 只,体质量为 (20 ± 2) g,由北京维通利华动物实验中心提供,将其置于 $(19.0 \pm 2.0)^\circ\text{C}$ 室温下,12-12 h 昼夜循环光照,自由进食、饮水,实验前适应实验室环境 1 周。人参皂甙 Rg1 由白求恩医科大学提供,用 9 g/L 的 NaCl 配制成为浓度 10 g/L 的溶液;IGF- I、MPTP、DA 和抗酪氨酸羟化酶(TH)抗体为 Sigma 公司产品。

1.2 实验分组及处理

小鼠摘除卵巢,14 d 后,随机分为对照组、MPTP 模型组、Rg1 组、IGF- I 组、Rg1+IGF- I 组,每组 10 只。对照组:每天 9:00 侧脑室注射 1 μL 生理盐水,腹腔注射 0.2 mL 生理盐水,连续 8 d。MPTP 模型组:每天 9:00 侧脑室注射 1 μL 生理盐水,腹腔注射 0.2 mL 生理盐水,于第 4 天侧脑室及腹腔注射后 2 h,腹腔注射 MPTP(15 mg/kg),连续注射 4 次,每次间隔 2 h,自第 5 天开始继续侧脑室及腹腔给予生理盐水,连续 5 d。Rg1 组:每天 9:00 侧脑室注射 1 μL 生理盐水,腹腔注射 Rg1(10 mg/kg),于第 4 天给药后 2 h 开始腹腔注射 MPTP(15 mg/kg),连续注射 4 次,每次间隔 2 h,自第 5 天开始继续给予侧脑室注射生理盐水及 Rg1 腹腔注射,连续 5 d。IGF- I 组:每天 9:00 侧脑室注射 IGF- I(0.5 g/L),于第 4 天给药后 2 h 开始腹腔注射 MPTP(15 mg/kg),连续注射 4 次,每次间隔 2 h,自第 5 天开始继续给予 IGF- I 侧脑室注射,连续 5 d。Rg1+IGF- I 组:每天 9:00 侧脑室注射 IGF- I(0.5 g/L),腹腔注射 Rg1(10 mg/kg),于第 4 天 IGF- I 和 Rg1 给药后 2 h 开始腹腔注射 MPTP(15 mg/kg),连续注射 4 次,每次间隔 2 h,自第 5 天开始继续给予 IGF- I 侧脑室注射及 Rg1 腹腔注射,连续 5 d。第 9 天断头处死小鼠取脑,分离出两侧纹状体,称质量后保存于 -80°C 冰箱备用。中脑放入 40 g/L 多聚甲醛中浸泡固定。

1.3 高效液相色谱法(HPLC)检测纹状体 DA 含量

取双侧纹状体,加入 300 μL 冰冷的样品预处理 A 液,超声匀浆 10 s 后,冰浴静置 1 h,取匀浆液 40 $^\circ\text{C}$ 下 12 000r/min 离心 20 min;取上清液 240 μL 加入样品预处理 B 液 120 μL ,涡旋混匀后进行第 2 次离心,然后取其上清液行 HPLC 分析。设定最大

柱压为 17 MPa,流量设为 1.0 mL/min。ECD 设定电压 0.65 V,每一样品检测 30 min,每次进样 20 μL ,在标准曲线上根据色谱峰面积求出相应含量($\mu\text{g/g}$)。样品预处理液:A 液为 0.4 mol/L 的 HClO_4 ;B 液为 20 mmol/L 柠檬酸钾(1.6 g)、300 mmol/L 磷酸氢二钾(13.06 g)、2 mmol/L EDTA \cdot 2Na(0.185 g)溶于 250 mL 的 ddH $_2$ O 中。实验仪器为美国 Waters 公司 Waters e2695 高效液相色谱仪。

1.4 免疫组织化学技术检测中脑黑质酪氨酸羟化酶免疫反应阳性(TH-IR)神经元的数目

中脑在 40 g/L 多聚甲醛中浸泡固定 6 h,再依次放入 200 g/L 和 300 g/L 的蔗糖溶液中,待脑组织下沉后修整中脑组织块,以前囟后 2.5 mm 开始行冠状连续冷冻切片,片厚 16 μm ,进行 TH 免疫组织化学染色。切片的染色严格按 ABC 试剂盒说明书操作,一抗工作浓度为 1:2 000,以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。TH-IR 神经元的计数方法:每组取 12 张切片,在显微镜下找到典型的黑质区域,高倍视野(400 倍)计数视野内阳性细胞数,每个视野数 2 次,取平均数,顺序为自上而下、由左至右,不完全位于视野内的细胞不计数。

1.5 统计学处理

应用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学处理,计量资料结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两两比较采用 Tukey 法。

2 结 果

2.1 各组小鼠纹状体内 DA 含量的比较

MPTP 组纹状体内 DA 含量较对照组明显降低,差异有显著性($F=21.23, q=11.67, P<0.01$)。与 MPTP 组比较,Rg1 组、IGF- I 组及 Rg1+IGF- I 组纹状体 DA 含量均明显升高,差异有显著意义($q=5.66 \sim 10.42, P<0.01$);Rg1+IGF- I 组纹状体 DA 含量高于 Rg1 组、IGF- I 组,差异有显著意义($q=4.37, 4.76, P<0.05$)。见表 1。

2.2 各组小鼠黑质 TH-IR 神经元数目比较

MPTP 组黑质 TH-IR 神经元的数目较对照组明显降低,差异有显著意义($F=45.45, q=14.24, P<0.01$)。Rg1 组、IGF- I 组及 Rg1+IGF- I 组黑质 TH-IR 神经元的数目均较 MPTP 组明显升高,差异有显著性($q=9.17 \sim 17.91, P<0.01$)。Rg1+IGF- I 组 TH-IR 神经元数目较 Rg1 组、IGF- I 组

明显升高,差异有显著性($q=8.70、8.74,P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组小鼠纹状体内 DA 含量及黑质 TH-IR 神经元数目比较($\bar{x}\pm s$)

组别	DA 含量($n=10,\mu\text{g/g}$)	TH-IR 神经元数目($n=6,\text{个}$)
对照组	24.27 \pm 3.98	2 283 \pm 104
MPTP 组	5.90 \pm 2.39	1 609 \pm 60
Rg1 组	15.43 \pm 5.30	2 044 \pm 80
IGF-Ⅰ 组	14.81 \pm 3.11	2 042 \pm 152
Rg1+IGF-Ⅰ 组	22.31 \pm 3.89	2 456 \pm 152

3 讨 论

PD 是一种严重危害中老年人身体健康的神经退行性疾病,典型的临床表现为运动迟缓、肌肉僵直、静止性震颤等。60 岁以上人群的发病率近 2%。随着中国人口老龄化的加剧,PD 的发病率逐渐增高,造成的家庭和社会负担也日益严重。目前尚无有效的药物或方法能阻止或逆转 PD 病情的发展。因此,开发研制有效的防治 PD 药物具有重要意义。

大量研究显示,人参皂苷 Rg1 具有神经营养和神经保护作用。本课题组以往研究结果显示,人参皂苷 Rg1 能够对抗 6-OHDA 对大鼠 DA 能神经元的损伤,Rg1 对 DA 能神经元的保护作用与 IGF-Ⅰ 受体信号途径有关,可通过 IGF-Ⅰ 受体信号途径与雌激素受体信号途径的交互串话,发挥其神经保护作用^[5,10-11]。本文研究结果显示,Rg1 组小鼠纹状体 DA 含量及中脑黑质 TH-IR 神经元的数量均较 MPTP 组明显增加,表明 Rg1 能够对抗神经毒素 MPTP 对小鼠中脑黑质 DA 能神经元的损伤。

IGF-Ⅰ 受体在脑内广泛表达,在黑质几乎所有的 DA 神经元及 67% 的胶质细胞存在 IGF-Ⅰ 受体^[12]。IGF-Ⅰ 为肽类激素,是神经系统发育所必需的神经营养因子。IGF-Ⅰ 通过 IGF-Ⅰ 受体信号途径,促进细胞的增生、分化和存活。干扰 IGF-Ⅰ 基因,会导致脑体积缩小、低髓鞘化及海马神经元的丢失^[13]。有研究显示,血清 IGF-Ⅰ 水平随着年龄增加而降低,IGF-Ⅰ 的减少会导致机体代谢水平的降低,通过氧化应激引起细胞损伤,导致老年人认知功能障碍。给予 IGF-Ⅰ 能够降低大鼠脑缺血的程度,改善运动功能^[14]。应用 PD 大鼠模型研究显示,IGF-Ⅰ 能够对抗神经毒素 6-OHDA 对中脑黑质 DA 能神经元的损伤^[7-8]。本文研究应用 MPTP 制备去卵巢 PD 小鼠模型,侧脑室给予 IGF-Ⅰ 预保护,

结果显示 IGF-Ⅰ 能够对抗 MPTP 对黑质 DA 能神经元的毒性作用。因 Rg1、IGF-Ⅰ 的神经保护作用均与 IGF-Ⅰ 受体信号途径有关,本研究进一步探讨了 Rg1 与 IGF-Ⅰ 合用对中脑黑质 DA 能神经元保护的作用。结果显示,Rg1 与 IGF-Ⅰ 合用对 DA 能神经的保护作用较 Rg1、IGF-Ⅰ 单用明显,表明二者合用具有协同作用。

综上所述,Rg1、IGF-Ⅰ 及二者合用均可明显对抗 MPTP 对 OVX 小鼠黑质纹状体系统 DA 能神经元的毒性作用,且 Rg1 与 IGF-Ⅰ 合用具有协同作用。本研究结果为 PD 的治疗和预防提供了可能的干预措施。

[参考文献]

[1] 刘敏,邢昂. 多巴胺能神经元与帕金森病[J]. 青岛大学医学院学报, 2013,49(1):93-94.

[2] LIU Q, KOU J P, YU B Y. Ginsenoside Rg1 protects against Hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells via inhibiting NF-κB activation[J]. Neurochem Int, 2011,58(1):119-125.

[3] HE Q, SUN J, WANG Q, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 against oxygen-glucose deprivation in cultured hippocampal neurons[J]. J Chin Med Assoc, 2014,77(3):142-149.

[4] 王明波,陈文芳,谢俊霞. 人参皂苷 Rg1 对 6-OHDA 所致 MES23.5 神经细胞损伤的保护作用[J]. 青岛大学医学院学报, 2008,44(5):377-378,381.

[5] XU L, CHEN W F, WONG M S. Ginsenoside Rg1 protects dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease through the IGF-Ⅰ receptor signalling pathway[J]. Br J Pharmacol, 2009,158(3):738-748.

[6] WERNER H, LEROITH D. Insulin and insulin-like growth factor receptors in the brain: physiological and pathological aspects[J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2014, pii:S0924-977X(14): 00041-00048.

[7] LEE C H, AHN J H, PARK J H, et al. Decreased insulin-like growth factor-Ⅰ and its receptor expression in the hippocampus and somatosensory cortex of the aged mouse[J]. Neurochem Res, 2014,39(4):770-776.

[8] QUESADA A, LEE B Y, MICEVYCH P E. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease[J]. Dev Neurobiol, 2008,68(5):632-644.

[9] WANG L, YANG H J, XIA Y Y, et al. Insulin-like growth factor 1 protects human neuroblastoma cells SH-EP1 against MPP⁺-induced apoptosis by AKT/GSK-3β/JNK signaling[J]. Apoptosis, 2010,15(12):1470-1479.

[10] GAO Q G, CHEN W F, XIE J X, et al. Ginsenoside Rg1 protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity (下转第 288 页)

心血管疾病的发生发展。DEN DEKKER 等^[10]研究显示,TLR4 介导的免疫炎症反应贯穿于冠状动脉粥样硬化的形成和发展中。VALLEJO 等^[9]研究显示,TLR4 可能参与心肌缺血再灌注损伤过程中的炎症反应。TLR4 所在的信号传导通路可诱导诸多炎症递质的产生,后者参与血管损伤的炎症反应,并在平滑肌细胞表型分化、过度增殖等过程中起关键的调节作用,故推测 TLR4 可能推动 PCI 术后再狭窄的发生和发展。本实验通过建立大鼠主动脉球囊损伤模型,观察到大鼠主动脉管壁内膜在术后 14 及 28 d 明显增生,血管壁组织中 TLR4 mRNA 表达升高。上述结果提示,TLR4 表达升高与大鼠主动脉球囊损伤后的新生内膜形成有一定关系。

缬沙坦可高选择性地结合血管紧张素 II 的 1 型受体,从而阻断血管紧张素 II 的生物学效应,发挥降血压、抑制心肌重塑^[11]、延缓血管重构等作用,上述作用为其预防 PCI 术后再狭窄提供了理论依据。2009 年,PETERS 等^[12]首次在人体中尝试使用缬沙坦涂层金属支架,结果证明其与雷帕霉素抑制支架内再狭窄的效果相当。近年来,血管紧张素受体拮抗剂(ARB)类药物抑制炎症反应的观点越来越受到关注,多项研究证明其可以改善体内的炎症状态,从而延缓或阻止相关疾病的发展。有研究显示,口服 ARB 类药物可改善维持性血液透析病人体内的微炎症状态^[4]。另有研究证实,缬沙坦可降低高血压并持续性心房颤动病人血清炎症因子的水平,从而发挥独立于降压以外的抗炎作用^[5]。本实验结果显示,缬沙坦可使大鼠主动脉球囊损伤术后 14 及 28 d 内膜增生程度均减轻,并可使血管组织中 TLR4 mRNA 表达降低,进一步证明了缬沙坦可通过发挥抗炎作用而减轻内皮损伤后新生内膜的形成。

关于缬沙坦下调内皮损伤后 TLR4 表达的具体机制还有待进一步研究。本研究证实了缬沙坦可通过下调 TLR4 的表达减轻球囊损伤后的炎症反

应,从而抑制血管重塑,为其在临床预防 PCI 术后再狭窄提供了新的理论依据与研究思路。

[参考文献]

- [1] XU H Y, QIAO S B, LI J J, et al. Different effects of inflammation and lipid levels on coronary lesions after PCI[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2009,89(32):2249-2252.
- [2] FRANTZ S, ERTL G, BAUERSACHS J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular diseases[J]. Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2007,4(8):444-454.
- [3] 康晓敏,吕宏娟,王霞,等. Toll 样受体 4 在血管紧张素 II 所致高血压小鼠血管重构中的作用[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2013,15(1):67-70.
- [4] GAMBOA J L, PRETORIUS M, TODD-TZANETOS D R, et al. Comparative effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade on inflammation during hemodialysis[J]. J Am Soc Nephrol, 2012,23(2):334-342.
- [5] 牛力,孟欣颖,周长宏,等. 缬沙坦对高血压伴持续性房颤病人血清炎症因子的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2012,6(19):6082-6083.
- [6] 周晓彬,张健. 医学统计软件系统 PPMS 1.5 的应用举例[J]. 齐鲁医学杂志, 2011,26(6):502-505.
- [7] DEHMER G J, SMITH K J. Drug eluting coronary artery stents[J]. Am Fam Physician, 2009,80(11):1245-1251.
- [8] KANG S J, MINTZ G S, PARK D W, et al. Mechanisms of in-stent restenosis after drug-eluting stent implantation intravascular ultrasound analysis [J]. Cir Cardiovasc Interv, 2011,4(1):9-14.
- [9] VALLEJO J G. Role of toll-like receptors in cardiovascular diseases[J]. Clin Sci(Lond), 2011,121(1):1-10.
- [10] DEN DEKKER W K, CAROLINE C, PASTERKAMP G, et al. Toll-like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization[J]. Atherosclerosis, 2010,209(2):314-320.
- [11] 蔡智荣,王立宏,巩会平,等. 缬沙坦对压力负荷增高性心力衰竭大鼠心肌重塑影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2010,46(1):13-14.
- [12] PETERS S, BEHNISCH B, HEILMANN T, et al. First-in-man use of poly-free valsartan-eluting stents in small coronary vessels: a comparison to poly-free rapamycin (2%) -eluting stents[J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2009,10(2):91-95.

(本文编辑 厉建强)

(上接第 285 页)

- in neuroblastoma SK-N-SH cells via IGF- I receptor and estrogen receptor pathways[J]. J Neurochem, 2009,109(5):1338-1347.
- [11] 葛科立,陈文芳. 人参皂苷 Rg1 激活 PI3K/Akt 信号通路对 6-OHDA 毒性作用的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2009,45(5):407-409.
 - [12] QUESADA A, ROMEO H E, MICEVYCH P. Distribution and localization patterns of estrogen receptor-beta and insulin-like growth factor-1 receptors in neurons and glial cells of the

female rat substantia nigra: localization of ERbeta and IGF-1R in substantia nigra[J]. J Comp Neurol, 2007,503(1):198-208.

- [13] BECK K D, POWELL-BRAXTON L, WIDMER H R, et al. Igf1 gene disruption results in reduced brain size, CNS hypomyelination, and loss of hippocampal granule and striatal parvalbumin-containing neurons[J]. Neuron, 1995,14(4):717-730.
- [14] CHANG H C, YANG Y R, WANG P S, et al. The neuroprotective effects of intramuscular insulin-like growth factor- I treatment in brain ischemic rats[J]. PLoS One, 2013,8(5):e64015.

(本文编辑 黄建乡)