

人参皂苷 Rb1 对癫痫大鼠的脑保护作用及机制*

呼建民¹, 王述莲², 刘献增³, 甄军丽⁴

中国人民武装警察部队北京市总队第三医院¹内一科,²检验科(北京 100141);³北京大学人民医院神经功能科(北京 100044);⁴河北医科大学第二医院神经内科(石家庄 050000)

【摘要】 目的 通过动物实验分析人参皂苷 Rb1 对癫痫大鼠的脑保护作用及机制。**方法** 选择健康性成年 Wistar 雄性大鼠 60 只,随机分为空白对照组(A组)($n=20$)、癫痫组(B组, $n=20$)和人参皂苷 Rb1 干预癫痫组(C组, $n=20$)。C组大鼠腹腔注射 1% 人参皂苷 Rb1 注射液 3 mL/kg(30 mg/kg),A组与B组大鼠则腹腔注射等量生理盐水;同时B组与C组大鼠腹腔注射 80 万 U/mL 青霉素注射液 9.5 mL/kg(760 万 U/kg),对大鼠进行行为学、病理学观察,同时进行细胞凋亡与 β -catenin 阳性表达检测。**结果** A组大鼠行为正常,未见癫痫发作;B组大鼠癫痫发作程度达 III~V 级;C组大鼠癫痫发作程度明显较轻。HE 染色显示 A 组大鼠海马组织结构正常,神经元细胞整齐排列;B 组神经元细胞出现变性坏死损伤改变,细胞排列紊乱;C 组大鼠海马神经元细胞损伤程度较 B 组轻,部分细胞出现空泡变性。TUNEL 法检测显示与 A 组比较,B 组与 C 组海马区凋亡阳性细胞数明显增高($P<0.05$);不过与 B 组比较,C 组海马区凋亡阳性细胞数明显减少($P<0.05$)。同时与 A 组相比,B 组与 C 组 β -catenin 蛋白阳性表达增高($P<0.05$),且 C 组的 β -catenin 蛋白阳性表达明显少于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 青霉素腹腔注射可成功复制大鼠急性癫痫模型,主要表现为神经元的变性和坏死,而人参皂苷 Rb1 能抑制 β -catenin 蛋白的表达,可缓解癫痫的发作,具有一定的脑保护作用。

【关键词】 人参皂苷 Rb1; 癫痫; 大鼠; 脑保护作用; 海马组织

癫痫是临床上比较常见的神经系统紊乱性疾病,特点是持续存在能产生癫痫发作的易感性,并出现相应的神经生物学症状^[1-2]。癫痫的病情进展缓慢且病程较长,可持续 10 年甚至更长时间,部分患者在用药治疗过程中往往产生耐药而发展成为难治性癫痫,对其身心健康均具有严重影响^[3-4]。目前癫痫的发生机制仍不完全清楚,在临床治疗上也颇为棘手。目前认为遗传、中枢神经系统感染、先天及围生期异常、颅脑损伤、恶性肿瘤、中风、脑血管疾病、寄生虫病等都是癫痫的可能致病因素;免疫和细胞信号通路改变、神经递质、神经胶质细胞改变、离子通道异常都可能参与癫痫的发病过程^[5-6]。癫痫治疗的首选方法是药物治疗,其主要作用机制与阻滞钙离子通道以减少突触内钙离子流入和阻滞突触前神经递质的释放、与阻滞钠离子通道以减少神经元持续放电频率等有关^[7]。人参皂苷 Rb1 是从人参、三七、西洋参中提取出的一种活性成分,具有提高免疫、抗肿瘤、抗炎、保护心血管、抗氧化、保护神经系统等作用^[8]。有报道人参皂苷 Rb1 可通过增加脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)的表达,抑制胎鼠海马神经元细胞凋亡,促进海马 CA3 区和齿状回神经元细胞的存活,从而促进神经损伤的修复和再生^[9-10]。2013 年 2 月至 2015 年 4 月,本研究通过动物实验分析人参皂苷 Rb1 对癫痫大鼠的脑保护作用及机制,初步探讨其抗凋亡机制以及相关信号通路的变化,为临床中药参类药物对癫痫的治疗作用及机制研究提供实验性理论依

据。现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 选择健康成年 Wistar 雄性大鼠 60 只(合格证书:SCX2012-011,体重 180~220 g),由我院实验动物中心提供。动物分笼饲养于标准动物房(22 ± 2)℃,自由饮食及饮水,环境温度、湿度适宜,给予规律光照(12 h:12 h)。人参皂苷 Rb1 来自成都曼思特科技有限公司(批号 MUST-12102301)。免疫组化染色试剂盒(SP9000 系列)来自北京中杉金桥生物技术有限公司,Bax、Bcl-2 与 β -actin 的引物合成由大连 TAKARA 公司完成。

1.2 动物分组与模型建立 Wistar 雄性大鼠随机分为空白对照组(A组, $n=20$)、癫痫组(B组, $n=20$)和人参皂苷 Rb1 干预癫痫组(C组, $n=20$)。C组大鼠腹腔注射 1% 人参皂苷 Rb1 注射液 3 mL/kg(30 mg/kg),而 A 组与 B 组大鼠则腹腔注射等量生理盐水。B 组与 C 组大鼠腹腔注射 80 万 U/mL 青霉素注射液 9.5 mL/kg(760 万 U/kg)。

1.3 观察指标

1.3.1 大鼠行为学观察 大鼠腹腔注射青霉素后,观察并记录各组大鼠在 3 h 内的行为学情况,癫痫分级标准:V 级:反复抽搐或抽搐致死;IV 级:全身性强直阵挛抽搐伴站立和跌倒;III 级:全身性的阵挛抽搐伴站立;II 级:全身性阵挛抽搐;I 级:面部抽搐和孤立的肌阵挛;0 级:无抽搐。

1.3.2 病理学观察 所有大鼠经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠溶液 1 mL/kg 麻醉后,打开胸腔后暴露心脏。剪开右心房,选择穿刺针刺入升主动脉,进行生理盐水灌注冲洗,当单数肢体伸展后调整灌注速度。开颅取

* 河北省医学科学研究重点课题(编号:ZD20140234),北京大学人民医院研究与发展基金资助项目(编号:RDC2010-06)

出大脑,置于4%多聚甲醛中后固定8~12 h。将固定好的脑组织进行常规脱水、二甲苯透明和石蜡包埋,将大鼠海马组织石蜡块选择4 μm 厚度进行连续切片。常规行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,在400倍视野下光镜下观察海马组织CA1区、CA2区、CA3区的组织学改变。

1.3.3 细胞凋亡检测 将大鼠海马组织石蜡切片采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒提供的方法检测细胞凋亡情况,每只大鼠选3个视野的凋亡阳性细胞数的平均值作为该大鼠凋亡阳性细胞数值,在400倍的光学显微镜视野下观察计数各大鼠海马CA1区、CA2区、CA3区的凋亡阳性细胞数。

1.3.4 β -catenin 阳性表达检测 大鼠海马组织石蜡切片常规脱蜡至水,进行 β -catenin蛋白多克隆抗体的免疫组织化学标记使用Pro Plus 12.0图像分析软件进行图片分析,测定大鼠海马CA1区、CA2区、CA3区的阳性染色OD值,求其平均值(average optical, AO)。



A: A组; B: B组; C: C组; 箭头所示为受损神经元细胞

图1 各组大鼠海马神经元组织学改变(HE, $\times 400$)

2.3 大鼠海马神经元凋亡细胞对比 TUNEL法检测凋亡阳性细胞呈棕褐色,与A组比较,B组与C组海马区凋亡阳性细胞数明显增多($P < 0.05$);不过与B组比较,C组海马区凋亡阳性细胞数明显减少($P < 0.05$)。见表1。

表1 3组海马各区凋亡神经元细胞凋亡计数比较 $\bar{x} \pm s$

组别	CA1区	CA2区	CA3区
A组	1.50 \pm 1.11	2.33 \pm 1.09	3.82 \pm 1.17
B组	3.28 \pm 0.98 *	6.13 \pm 1.23 *	8.49 \pm 1.45 *
C组	2.67 \pm 1.09 * Δ	3.45 \pm 1.45 * Δ	5.38 \pm 1.32 * Δ

* 与A组比较 $P < 0.05$; Δ 与B组比较 $P < 0.05$

2.4 大鼠海马神经元 β -catenin蛋白表达改变 大鼠海马神经元 β -catenin蛋白表达主要定位于海马神经元的胞浆和胞膜,着色呈棕黄色。与A组(14.29 \pm 2.14)相比,B组(22.98 \pm 2.09)与C组 β -catenin蛋白阳性表达(17.40 \pm 0.56)增高($P < 0.05$),同时C组的 β -catenin蛋白阳性表达明显少于B组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

癫痫是临床上比较常见的神经疾病,目前全世界约有5 000万人患有癫痫^[10]。从发病机制上分析,脑

1.4 统计学方法 采用SPSS 11.0统计软件,计量数据对比采用配对 t 检验或单因素方差分析(One-Way ANOVA),计数数据对比采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠行为学改变对比 A组大鼠行为正常,未见癫痫发作;B组大鼠腹腔注射青霉素后10 min内开始出现呼吸急促,躯干强直收缩,癫痫发作程度达III~V级,其中III级8只,IV级8只,V级4只。而C组大鼠腹腔注射青霉素后出现短暂的一侧肢体抽动和走路不稳等,不过癫痫发作程度明显较轻,其中I级12只,II级8只。

2.2 大鼠海马神经元组织学对比 A组大鼠海马组织结构正常,神经元细胞整齐排列(图1-A);B组神经元细胞出现变性坏死损伤改变,细胞排列紊乱(图1-B);C组大鼠海马神经元细胞损伤程度较癫痫组轻,部分细胞出现空泡变性(图1-C)。

部损伤可造成神经细胞变性甚至坏死,而变性神经细胞以及周围细胞发生功能异常并且过度放电等,即可产生癫痫。同时局部小血管受损破裂而出血可引起脑内微小出血灶形成,而已经坏死的组织碎片以及相关代谢产物在病灶周围聚集,可引起病灶区域内小血管发生痉挛,引发微循环障碍,并导致血液的黏稠度升高,进而导致脑组织的缺氧缺血加重,使得组织能量代谢功能障碍,大量自由基蓄积,从而引发癫痫^[11]。

在癫痫大鼠模型制备中,青霉素是较早被公认的致病用药,它可以打破大脑皮层兴奋与抑制的平衡关系,减弱内源性抑制性递质的作用,进而引起癫痫发作^[12]。本研究显示A组大鼠行为正常,未见癫痫发作;B组大鼠癫痫发作程度达III~V级,表明青霉素腹腔注射可成功复制大鼠急性癫痫模型。

近年来在癫痫的防治中,脑保护药物的研究与开发进展迅速,大量从中药中提取的有效活性部位或成分具有明显的癫痫防治作用。人参皂苷Rb1具有强心、增加冠状血流量、改善心肌代谢、扩张冠状动脉、抑制心律失常等作用;还具有降低血小板表面活性、降低血黏度、改善微循环、抑制血小板活化、黏附和聚集、抗血栓形成等作用^[13]。有研究表明人参皂苷Rb1用于脑缺血再灌注损伤大鼠可明显减小脑梗死体积,减轻神经功能缺损,脑保护作用显著。海马是与学习和记

忆能力密切相关的重要结构,海马硬化与癫痫的主要脑组织病理改变相同,主要表现为神经元丢失和胶质细胞增生。细胞凋亡是机体生长发育过程中由特定基因调控的细胞有序自杀的过程,神经元细胞凋亡是癫痫脑损伤的重要原因^[14-15]。本研究显示所有大鼠海马组织石蜡切片进行了 HE 染色, A 组大鼠海马组织结构正常,神经元细胞整齐排列; B 组神经元细胞出现变性坏死损伤改变,细胞排列紊乱; C 组大鼠海马神经元细胞损伤程度较 B 组轻,部分细胞出现空泡变性。TUNEL 法检测凋亡阳性细胞呈棕褐色,与 A 组比较, B 组与 C 组海马区凋亡阳性细胞数明显增多 ($P < 0.05$); 与 B 组比较, C 组海马区凋亡阳性细胞数明显减少 ($P < 0.05$)。表明癫痫发作可导致神经元细胞凋亡,主要表现为神经元的变性和坏死。而人参皂苷 Rb1 可通过抑制钙超载、清除自由基、抑制神经元细胞凋亡等机制保护中枢神经系统和减轻各种原因引起的神经元损伤。

癫痫是神经系统疾病中的常见病之一,其发病机制非常复杂。研究证实癫痫发作可导致神经元细胞凋亡及凋亡途径中某些因子如 caspase-3 等活性增加^[16]。 β -catenin 是经典 Wnt 信号通路中的关键蛋白, Wnt 信号通路对细胞的凋亡有重要调控作用,激活 Wnt/ β -catenin 信号通路可降低肾内皮细胞 Bax 活化,减轻膜损伤和细胞凋亡^[17-18]。人参皂苷 Rb1 对中枢神经系统具有促智、脑缺血损伤保护和神经损伤保护等多种作用,人参皂苷 Rb1 可减轻癫痫大鼠的痫样发作和神经元损伤,也可通过抗氧化机制发挥抗癫痫作用,减轻癫痫发作^[19-21]。本研究显示大鼠海马神经元 β -catenin 蛋白表达主要定位于海马神经元的胞浆和胞膜,着色呈棕黄色。与 A 组相比, B 组与 C 组 β -catenin 蛋白阳性表达增高 ($P < 0.05$),同时 C 组的 β -catenin 蛋白阳性表达明显少于 B 组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。推测 Wnt/ β -catenin 信号通路激活可能参与癫痫大鼠神经元损伤和细胞凋亡,人参皂苷 Rb1 可一定程度上缓解癫痫的发作,具有治疗效果,其原因和机制尚有待于进一步的研究阐明。

总之,青霉素腹腔注射可成功复制大鼠急性癫痫模型,主要表现为神经元的变性和坏死,而人参皂苷 Rb1 能抑制 β -catenin 蛋白的表达,能缓解癫痫的发作,具有一定的脑保护作用。

参考文献

- [1] 彭沛,宋志明,刘勇,等. 人参皂苷 Rb1 抗小鼠脑自然衰老及其对 mTOR/p70S6K 通路的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2015, 36(2): 176-180.
- [2] 张福鹏,赵晓燕,王晞星,等. 三七总皂苷抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中医药科技, 2015, 22(1): 110-112.
- [3] Wemhöner K, Kanyshkova T, Silbernagel N, et al. An N-terminal deletion variant of HCN1 in the epileptic WAG/Rij strain modulates HCN current densities[J]. Front Mol Neurosci, 2015, 3(8): 63-65.
- [4] 杨翠,任建勋,吴红金,等. 人参皂苷 Rb1 经 ERK1/2 对 H_2O_2 诱导的乳鼠心肌细胞损伤的保护作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(2): 207-209.
- [5] 刘明刚,朱权,孙美珍,等. 血脑屏障通透性在外伤性癫痫大鼠中的作用机制研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(10): 1244-1247.
- [6] Mishra V, Shuai B, Kodali M, et al. Resveratrol Treatment after Status Epilepticus Restrains Neurodegeneration and Abnormal Neurogenesis with Suppression of Oxidative Stress and Inflammation[J]. Sci Rep, 2015, 7(5): 17807-17809.
- [7] 郑琦,赵晖,邹海燕,等. 竹节参总皂苷的药理研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2015, 22(5): 478-480.
- [8] 刘俊伟,张慧玲,李斌,等. 人参皂苷 Rb1 联合亚低温对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 中国中医急症, 2014, 23(10): 1793-1795.
- [9] Bittencourt S, Covolan L, Hamani C, et al. Replacement of Asymmetric Synaptic Profiles in the Molecular Layer of Dentate Gyrus Following Cycloheximide in the Pilocarpine Model in Rats[J]. Front Psychiatry, 2015, 17(6): 157-159.
- [10] Bercum FM, Rodgers KM, Benison AM, et al. Maternal Stress Combined with Terbutaline Leads to Comorbid Autistic-Like Behavior and Epilepsy in a Rat Model[J]. J Neurosci, 2015, 35(48): 15894-15902.
- [11] 杜家琇,王明强,姜季宇. 七叶皂苷钠对脑缺血再灌注损伤大鼠 MG、iNOS 表达的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 16(9): 33-34.
- [12] 黄小平,欧阳国,丁煌,等. 黄芪甲苷与三七有效成分配伍对小鼠脑缺血再灌注后神经细胞凋亡和内质网应激的影响[J]. 中草药, 2015, 46(15): 2257-2264.
- [13] Ledri LN, Melin E, Christiansen SH, et al. Translational approach for gene therapy in epilepsy: Model system and unilateral overexpression of neuropeptide Y and Y2 receptors[J]. Neurobiol Dis, 2015, 86: 52-61.
- [14] 刘磊,王宏英,方艳秋,等. 人参二醇组皂苷对内毒素休克大鼠脑皮质损伤的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2014, 23(7): 6694-6695.
- [15] 康健,龚平,任延波,等. β -七叶皂苷钠对心肺复苏后大鼠脑细胞中低氧诱导因子-1 α 的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22(4): 373-378.
- [16] Maxwell JR, Denson JL, Joste NE, et al. Combined in utero hypoxia-ischemia and lipopolysaccharide administration in rats induces chorioamnionitis and a fetal inflammatory response syndrome[J]. Placenta, 2015, 4(15): 69-72.
- [17] 黄小平,卢金冬,丁煌,等. 黄芪和三七的主要有效成分配伍对脑缺血/再灌注小鼠 NF- κ B 信号通路及炎症因子表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 9(1): 141-146.
- [18] 胡光强,张慧,萧洪文,等. 人参皂苷 Rb1 对大鼠局灶性脑缺血白质重塑的影响[J]. 中国临床解剖学杂志, 2015, 4(26): 451-454.
- [19] Fu CY, He XY, Li XF, et al. Nefiracetam Attenuates Pro-Inflammatory Cytokines and GABA Transporter in Specific Brain Regions of Rats with Post-Ischemic Seizures[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 37(5): 2023-2031.
- [20] 刘征,焦志勤,李艳凤,等. 癫痫对癫痫大鼠海马内 Glu 及 GABA 的影响[J]. 中医药学报, 2015, 22(4): 43-45.
- [21] 赖伟华,许百虹,夏晨. 川芎嗪对癫痫大鼠脑内苯妥英钠浓度与疗效的影响研究[J]. 中药材, 2015, 38(3): 598-600.

(收稿日期: 2015-12-15 编辑: 罗劲娜)