

人参皂苷 Rg1 对 AD 大鼠脑片模型 Bcl-2 表达的影响

李 源¹⁾, 马欣欣²⁾, 袁海峰²⁾, 侯吉星³⁾, 权乾坤⁴⁾, 王宁宁²⁾, 李 玺²⁾

(1) 西安电力中心医院, 陕西 西安 710032; 2) 西安交通大学医学院第二附属医院, 陕西 西安 710004; 3) 西安市精神卫生中心, 陕西 西安 710061; 4) 西安交通大学生命学院康复科学与技术研究中心, 陕西 西安 710049)

[摘要] **目的** 观察人参皂苷 Rg1 对冈田酸 (okadaic acid, OA) 诱导的 AD 大鼠脑片模型 Bcl-2 表达的影响。 **方法** 将 5 周龄 SD 大鼠脑片随机分为对照组、模型组和小、中、大剂量人参皂苷 Rg1 组, 每组 10 张脑片。各组脑片首先至于人工脑脊液中不做任何处理恢复 1 h; 然后 Rg1 小、中、大剂量组分别加入 Rg1 致使其终浓度为 60、120、240 $\mu\text{mol/L}$, 培养至 2 h; 然后将 OA 加入模型组和人参皂苷 R1 各组中, 致使其终浓度分别为 1 $\mu\text{mol/L}$, 作用 3 h, 空白对照组不加任何处理。干预结束后, 采用 Western blot 技术检测各组大鼠脑片 Bcl-2 蛋白表达水平。 **结果** 与对照组比较, 模型组大鼠脑片 Bcl-2 的表达差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 3 个剂量人参皂苷 Rg1 组 Bcl-2 表达差异有统计学意义 ($P<0.01$), 其中以大剂量人参皂苷 Rg1 组 Bcl-2 表达水平最高。 **结论** 人参皂苷 Rg1 可能通过上调 Bcl-2 基因表达途径从而抑制神经元凋亡, 对 AD 发挥神经保护作用。

[关键词] 人参皂苷 Rg1; 阿尔茨海默病; 冈田酸; Bcl-2

[中图分类号] R969 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 08-0034-04

Effect of Ginsenoside Rg1 on Bcl-2 Expression in Rat Brain Slices Model of AD

LI Yuan¹⁾, MA Xin-xin²⁾, YUAN Hai-feng²⁾, HOU Ji-xing³⁾, QUAN Qian-kun⁴⁾, WANG Ning-ning²⁾, LI Xi²⁾

(1) Xi'an Electric Power Central Hospital, Xi'an Shanxi 710032; 2) The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710004; 3) Xi'an Mental Health Center, Xi'an Shanxi 710061; 4) Research Center of Rehabilitation Science and Technology, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710049, China)

[Abstract] **Objective** The purpose of this study was to investigate the effect of ginsenoside Rg1 on the Bcl-2 expression in rat brain slices model of AD induced by okadaic acid (OA). **Methods** The brain slices of 5 week old SD rats were randomly divided into control group, model group, and ginsenoside Rg1 groups (including small, middle and large dose groups), each group of 10 brain slices. Firstly, each brain slice was put in artificial cerebrospinal fluid without any treatment to restore 1 h. Then, Rg1 was added in the small, middle and large dose groups to make the Rg1 final concentration of 60, 120 and 240 $\mu\text{mol/L}$ for 2 h, respectively. Lastly, OA was added in the model group and ginsenoside R1 groups to make the final concentration of 1 $\mu\text{mol/L}$ for 3 h. While the blank control group was not given any treatment. After intervention, the expression of Bcl-2 protein in the brain slices was detected using the Western blot technology. **Results** Compared with the control group, the expression levels of Bcl-2 in the brain slices of model group was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with the model group, the expression levels of Bcl-2 in the three ginsenoside Rg1 groups were significantly increased ($P<0.01$), of which the Bcl-2 expression levels in the large dose ginsenoside Rg1 group were the highest. **Conclusion**

[基金项目] 陕西省中医药管理局科研基金资助项目 (2005030); 陕西省科技攻关项目 (2007k15-05)

[作者简介] 李源 (1976~), 男, 山东聊城市人, 医学硕士, 主治医师, 主要从事老年医学研究工作。

[通讯作者] 李玺. E-mail: lixi2100@sohu.com

Ginsenoside Rg1 could inhibit neuronal apoptosis and have the neuroprotective effect on AD by up-regulating the Bcl-2 gene expression.

[Key words] Ginsenoside Rg1; Alzheimer's disease; Okadaic acid; Bcl-2

阿尔茨海默病 (alzheimer disease, AD) 是一种中枢神经退行性疾病, 目前临床尚无疗效满意的药物。《神农本草经》中记载人参具有“开心益智”的功效^[1], 人参皂苷 Rg1 是人参促智、抗衰老作用的主要有效成分之一, 具有抗氧化^[2]、清除自由基^[3]、抑制细胞凋亡^[4]、增强记忆和认知功能^[5]等作用, 对 AD 具有多重神经保护作用, 已成为研究中药抗痴呆的热点之一。Bcl-2 基因是公认的细胞凋亡的特异性抑制基因, 研究表明对 AD 也具有抗神经元凋亡作用^[6], 可以抑制氧化应激引起的神经元的凋亡, 阻断神经细胞的损伤, 延长神经元的存活时间, 进而影响学习记忆功能等。然而目前还没有实验证实人参皂苷 Rg1 是否对 AD 患者或动物模型脑内 Bcl-2 基因表达有上调作用。本实验拟用磷酸酯酶特异性抑制物冈田酸 (okadaic acid, OA) 孵育大鼠脑片制备 AD 模型, 然后给予人参皂苷 Rg1 进行孵育干预, 观察人参皂苷 Rg1 对 AD 大鼠脑片模型 Bcl-2 蛋白表达水平的影响, 旨在证实人参皂苷 Rg1 是否通过上调 Bcl-2 基因表达从而抑制神经元凋亡, 对 AD 发挥神经保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 10 只, 清洁级, 鼠龄: 5 周, 体重: 110 ~ 130 g, 购自西安交通大学医学院实验动物中心, 合格证号: SCXK (陕) 2007-001。

1.1.2 药品及试剂 人参皂苷 Rg1, 纯度 98.99%, 购自吉林宏久生物科技股份有限公司; OA, 纯度 98%, 购自美国 ALEXIS 生物制剂公司; P-tau (Sere202) 一抗, Bcl-2 一抗, 辣根酶标记二抗, 购自武汉博士德生物工程有限公司; PVDF 膜及 DAB 染色试剂盒等购自北京博奥森生物工程有限公司。

1.1.3 仪器 振动切片机, 上海之信仪器有限公司, 型号: ZQP-86; 紫外分光光度计, 日本岛津工业, 型号: UV-260; 蛋白电泳仪, 美国 BIO-RAD 公司, 型号: 迷你型-3; 凝胶成像图像分析仪, 意大利 Segrate (Milan) 公司。

1.2 方法

1.2.1 AD 模型大鼠脑片模型的制备、分组及干预 AD 大鼠脑片模型参照文献方法进行^[7]。将大鼠麻醉, 快速断头, 取出脑组织, 行冠状切片, 脑片均含皮层和海马, 厚度 400 μm 整个过程持续通入混合氧气 (95% O_2 +5% CO_2), 温度始终保持低于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。将脑片随机分为 5 组: 对照组、模型组和小、中、大剂量人参皂苷 Rg1 组, 每组 10 张脑片。各组脑片首先不做任何处理, 至于 6 孔板中孵育恢复 1 h; 然后小、中、高剂量人参皂苷 Rg1 组分别加入人参皂苷 Rg1 致使其终浓度为 60、120、240 $\mu\text{mol/L}$, 孵育 2 h; 然后将 OA 加入模型组和人参皂苷 R1 各组中, 致使其终浓度分别为 1 $\mu\text{mol/L}$, 作用 3 h。对照组仅使用人工脑脊液孵育, 不加任何处理。

1.2.2 Western blot 干预结束后, 将各组脑片取出, 然后进行匀浆、裂解、提取总蛋白。采用不连续 SDS-PAGE 法, 将提取的总蛋白经电泳仪电泳进行蛋白分离, 然后将分离的蛋白转入硝酸纤维素膜, 脱脂奶粉抗体封闭后, 加入 Bcl-2 抗体 (浓度 1:200), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 然后加入辣根酶标记的 Bcl-2 二抗体。采用 DAB 法显色, 用 PBS 做阴性对照。

1.2.3 图像分析与检测 DAB 法显反应结束后, 用凝胶成像分析仪对各组蛋白条带表达情况进行灰度值扫描分析, 分别分析各组 Bcl-2 阳性表达的情况。以各组条带所测平均灰度值与 β -action 的灰度值的比值, 表示 Bcl-2 蛋白含量。

1.3 统计学处理

所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS 软件进行统计学比较分析, 方差齐性检验采用 levene 检验, 正态性检验采用 Shapiro-Wilk 检验。多组均数间比较采用单因素方差分析, 方差分析后组间两两比较采用 LSD-t。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

大鼠脑片经过 OA 孵育后, Bcl-2 表达蛋白表达明显减少, 对照组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 人参皂苷 Rg1 干预后, 可以明显对抗 OA 这种作用, 明显提高 OA 处理大鼠脑片的 Bcl-2 含量, 各剂量人参皂苷 Rg1 组与模型组比较

差异有统计学意义 ($P<0.05$)；人参皂苷 Rg1 各组比较，大剂量组与中剂量组之间 Bcl-2 蛋白水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)，中、小剂量组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)，大剂量组与小剂量组之间比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)，见图 1 和表 1。

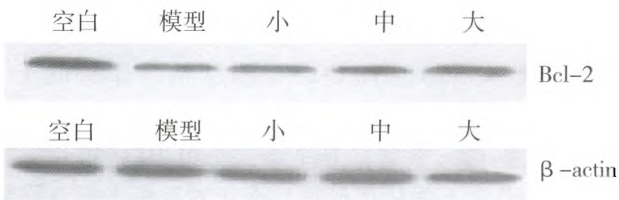


图 1 人参皂苷 Rg1 干预后各组大鼠脑片 Bcl-2 蛋白表达
Fig. 1 Expression of Bcl-2 protein in rat brain slices of each group after intervention by ginsenoside Rg1

表 1 人参皂苷 Rg1 干预后各组大鼠脑片 Bcl-2 蛋白水平比较 (灰度值) ($\bar{x} \pm s$)
Tab. 1 Comparison of Bcl-2 protein expression level in rat brain slices of each group after intervention by ginsenoside Rg1 (gray value) ($\bar{x} \pm s$)

组 别	n	Bcl-2
空白组	10	6.10 ± 0.31
模型组	10	4.38 ± 0.61*
小剂量 Rg1 组	10	5.05 ± 0.15* [△]
中剂量 Rg1 组	10	5.27 ± 0.18* [△]
大剂量 Rg1 组	10	5.54 ± 0.27* ^{△▲}

与空白组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，[△] $P<0.05$ ；与小剂量人参皂苷 Rg1 组比较，[▲] $P<0.05$ 。

3 讨论

AD 的一个重要病理特征是脑内神经元大量死亡、缺失。研究表明在 AD 脑内易损区存在着 DNA 断裂损伤、凋亡小体、染色质凝集及凋亡相关的基因改变^[8]，这提示凋亡可能是 AD 脑中神经元死亡的机制之一。目前研究认为导致 AD 神经元凋亡的主要因素有脑内 β-淀粉样蛋白沉积、tau 蛋白磷酸化、氧化损伤、低能量代谢等^[9]。所以抗凋亡可能成为治疗 AD 的有效途径之一。

近年来 Bcl-2 基因作为公认的细胞凋亡的特异性抑制基因，在神经细胞凋亡的调节网络中起着越来越重要的作用。Bcl-2 位于细胞内氧自由基产生的细胞器，如线粒体、内质网、核膜等^[10]。Bcl-2 基因过量表达已被证实可以抑制氧化应激引起的神经元凋亡，阻断神经元损伤的过程，延长神经元存

活时间，进而影响学习记忆功能^[11]。研究表明 AD 的关键病理改变之一神经元纤维缠结中的 Bcl-2 表达减少，这成为诱发神经元凋亡缺失的原因之一。伴随疾病严重程度的增加，AD 患者脑组织中 Bcl-2 的表达量也可能代偿性的增加^[12]，这对神经元起到了一定的保护作用，可以对抗神经元凋亡发生；然而 Bcl-2 代偿能力是有限的，AD 脑内元发生凋亡仍进行性加重，所以 AD 患者或动物模型仍表现为记忆能力的下降。所以理论上通过某种途径上调 AD 脑内 Bcl-2 基因的表达有助于对抗神经元凋亡，改善 AD 患者的认知功能。

人参皂苷 Rg1 作为人参促智作用的主要有效成份之一，对 AD 具有多种神经保护作用^[2-5]，然而目前还没有研究证实人参皂苷 Rg1 是否可以通过上调脑内 Bcl-2 基因途径抑制神经元凋亡，从而缓解 AD 病理改变和症状。研究表明 OA 可以诱导脑内神经元 Tau 蛋白发生过度磷酸化，形成神经纤维缠结^[13-15]，继而导致神经元凋亡^[16]。本实验以 OA 诱导大鼠培养脑片制备 AD 模型，结果表明经 OA 处理后，大鼠脑片 Bcl-2 表达水平明显下降，这表明成功制备 AD 大鼠脑片模型。经过人参皂苷 Rg1 孵育干预后，AD 大鼠脑片模型中 Bcl-2 表达增加，其中以大剂量人参皂苷 Rg1 组表达最多。所以这些结果表明人参皂苷 Rg1 可以通过通过上调 Bcl-2 基因表达途径从而抑制 AD 模型大鼠脑片神经元凋亡，对 AD 发挥神经保护作用。

[参考文献]

[1] 侯家玉. 中药药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002:10—30.

[2] LIU Q A,KOU J P,YU B Y. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells via inhibiting NF-kappa B activation[J]. Neurochemistry International,2011,58 (1):119—125.

[3] CHEN X C,CHEN Y,ZHU Y G,et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 against MPTP-induced apoptosis in mouse substantia nigra neurons [J]. Acta Pharmacologica Sinica,2002,23 (9):829—834.

[4] GONG L,LI S L,LI H,et al. Ginsenoside Rg1 protects primary cultured rat hippocampal neurons from cell apoptosis induced by beta beta-amyloid protein [J]. Pharmaceutical Biology,2011,49 (5):501—507.

[5] MOOK-JUNG I,HONG H S,BOO J H,et al. Ginsenoside Rb1 and Rg1 improve spatial learning and increase hippocampal synaptophysin level in mice [J]. Journal of

(下转第 66 页)

- Hepatology, 2009, 49(2): 646—657.
- [7] WEI W U, JIE L I, FENG CHEN, et al. Circulating Th17 cells frequency is associated with the disease progression in HBV infected patients [J]. Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(4): 750—757.
- [8] JING —PING Z, JING Y. Increased intratumoral IL-17 producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients [J]. Journal of Hepatology, 2009, 50(3): 980—989.
- [9] 中华医学会肝病学分会, 传染病和寄生虫学分会. 丙型肝炎防治指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2004, 12(4): 194—198.
- [10] 李婕, 陈智. Th17细胞亚群与病毒感染性疾病[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2009, 36(6): 395—398.
- [11] 廖卓君, 徐建华. Th17细胞及其相关细胞因子在自身免疫病中的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(11): 789—791.
- [12] WEAVER C T, HATTON R D, MANGAN P R, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages [J]. Annu Rev Immunol, 2007, 25(8): 21—852.
- [13] VELDHOEN M, HOCKING R J, ATKINS C J, et al. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells [J]. Immunity, 2006, 24(8): 179—189.
- [14] BELTELLI E, CARRIER Y, GAO W, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells [J]. Nature, 2006, 441(7090): 235—238.
- [15] MANGAN P R, HARRINGTON L E, O'QUINN D B, et al. Transforming growth factor- β induces development of the T (H)17 lineage [J]. Nature, 2006, 441(7090): 231—234.
- [16] KIMURA A, NAKA T, KISHIMOTO T. IL-6-dependent and independent pathways in the development of interleukin-17-producing T helper cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(29): 12099—12104.
- [17] KORN T, MITSDOERFFER M, CROXFORD A L, et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(47): 18460—18465.
- [18] IVANOV I I, MCKENZIE B S, ZHOU L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells [J]. Cell, 2006, 126(6): 1121—1133.
- (2014-04-21 收稿)

(上接第 36 页)

- Neuroscience Research, 2001, 63(6): 509—515.
- [6] 陈雪, 孙婧霞, 蒋常文. Bcl-2、Caspase-3与阿尔茨海默病关系的研究进展[J]. 临床医学工程, 2013, 20(9): 1177—1179.
- [7] GONG CX, LIDSKY T, WEGIEL J, et al. Metabolically active rat brain slices as a model to study the regulation of protein phosphorylation in mammalian brain [J]. Brain Res Brain Res Protoc, 2001, 32(6): 134—140.
- [8] 王润生. 黄皮酰胺的抗细胞凋亡作用及其作用机制研究[D]. 北京: 中国协和医科大学, 2000.
- [9] 蔡高梅, 毕建忠. TRAIL在A β 25-35诱导的大鼠海马组织中的表达[J]. 医学临床研究, 2008, 10(4): 1856—1858.
- [10] 王新玲, 李月彩, 侯颖春. 自由基、细胞凋亡与衰老关系的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 1999, 11(4): 62—63.
- [11] 吕仁花, 索爱琴, 张杰文, 等. 缺血预处理对大鼠皮质神经元缺血耐受性和Bcl-2表达的影响[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2007, 4(18): 278—279.
- [12] 李玺, 张英泽, 张智燕, 等. 脑尔康对Alzheimer病小鼠脑细胞凋亡相关基因表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2004, 5(24): 433—434.
- [13] COHEN P, HOLMES C F, TSUKITANI Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation [J]. Trends Biochem Sci, 1990, 15(3): 98—102.
- [14] TIAN Q, ZHANG J, WANG Q, et al. Hyperphosphorylation of tau and decrease of ACh level in the meynert nuclei of rat brain induced by OA [J]. Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao (Zi Ran Ke Xue Ban), 2004, 32(12): 94—96.
- [15] 李玺, 刘颖, 袁海峰, 等. 人参皂苷Rg1对冈田酸所致大鼠脑Tau蛋白磷酸化的影响 [J]. 中西医结合学报, 2010, 8(10): 955—960.
- [16] 徐爱华, 孙永新, 商秀丽. 外源性脑源性神经营养因子通过抑制tau蛋白磷酸化减少细胞凋亡[J]. 中国医科大学学报, 2013, 10(4): 296—300.
- (2014-03-19 收稿)