

人参皂苷 Rb1 预处理对急性束缚性应激大鼠海马组织脑源性神经营养因子表达的影响

戴勤学 王均炉 潘媛媛 金深辉 莫云长 郑丹赞

325000 浙江温州, 温州医科大学附属第一医院麻醉科

通讯作者: 郑丹赞, Email: 529365150@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.022

【摘要】目的 观察人参皂苷 Rb1 预处理对急性束缚性应激大鼠海马组织脑源性神经营养因子(BDNF)表达的影响。**方法** 将 18 只 SD 大鼠按随机区组法分成正常对照组、急性束缚应激模型组、人参皂苷 Rb1 组, 每组 6 只。模型制备采用专业大鼠固定器束缚 2 h 模拟急性束缚性应激状态; 人参皂苷 Rb1 组于制模前 30 min 腹腔注射人参皂苷 Rb1 40 mg/kg, 正常对照组不进行任处理。用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定制模前后大鼠血浆皮质酮(CORT)和促肾上腺皮质激素(ACTH)的水平。采用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测大鼠海马组织中 BDNF mRNA 的表达水平, 用蛋白质免疫印迹试验(Western Bolt)检测大鼠海马组织的 BDNF 蛋白表达水平。**结果** 急性束缚应激模型组制模后血浆 CORT 和 ACTH 含量较制模前明显升高 [CORT($\mu\text{g/L}$): 3.79 ± 0.50 比 2.06 ± 0.35], ACTH($\mu\text{g/L}$): 1.69 ± 0.12 比 0.94 ± 0.12], 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与正常对照组比较, 急性束缚应激模型组海马组织 BDNF 的 mRNA 和蛋白表达水平水平均明显降低 [BDNF mRNA (A 值): 42.87 ± 5.56 比 109.39 ± 9.11 , BDNF 蛋白(灰度值): 0.94 ± 0.02 比 1.02 ± 0.03 , 均 $P < 0.01$]; 与急性束缚应激模型组比较, 人参皂苷 Rb1 组海马组织 BDNF 的 mRNA (113.73 ± 6.24 比 42.87 ± 5.56) 和蛋白 (1.04 ± 0.02 比 0.94 ± 0.02) 表达水平均明显升高(均 $P < 0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rb1 预处理可以维持急性束缚性应激大鼠模型海马组织 BDNF 的 mRNA 和蛋白表达水平, 从而缓解急性束缚性应激所导致的损害。

【关键词】 人参皂苷 Rb1; 急性束缚性应激; 脑源性神经营养因子; 皮质酮; 促肾上腺皮质激素

基金项目: 国家自然科学基金(81573742); 浙江省自然科学基金(LY15H290006); 浙江省温州市科技计划项目(Y20140311)

Influence of ginsenoside Rb1 pretreatment on expression of brain derived neurotrophic factor in rat hippocampus after acute immobilization stress Dai Qinxue, Wang Junlu, Pan Yuanyuan, Jin Shenhui, Mo Yunchang, Jia Danyun

Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Jia Danyun, Email: 529365150@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of ginsenoside Rb1 pretreatment on the expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus of rat models under acute immobilization stress. **Methods** Eighteen Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups (each $n = 6$): normal control group, acute immobilization stress model group, and ginsenoside Rb1 group. The rats in acute immobilization stress model group and ginsenoside Rb1 group were exposed to acute immobilization for 2 hours. Thirty minutes before the modeling, ginsenoside Rb1 (40 mg/kg) was injected intraperitoneally into rats in the ginsenoside Rb1 group, and the control group was not treated. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of plasma cortisol (CORT) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH). The real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to examine the expression of BDNF mRNA in rat hippocampus and its expression of BDNF protein was measured by Western Blot. **Results** In acute immobilization stress model group, compared with those before modeling, the plasma CORT and ACTH concentrations were significantly higher after modeling [CORT ($\mu\text{g/L}$): 3.79 ± 0.50 vs. 2.06 ± 0.35 , ACTH ($\mu\text{g/L}$): 1.69 ± 0.12 vs. 0.94 ± 0.12 , both $P < 0.05$]; compared with the normal control group, the mRNA and protein expressions of BDNF in hippocampus in the acute immobilization stress model group were decreased significantly [BDNF mRNA (A value): 42.87 ± 5.56 vs. 109.39 ± 9.11 , BDNF protein (grey value): 0.94 ± 0.02 vs. 1.02 ± 0.03 , both $P < 0.01$]; compared with acute immobilization stress model group, the mRNA (113.73 ± 6.24 vs. 42.87 ± 5.56) and protein expressions (1.04 ± 0.02 vs. 0.94 ± 0.02) of BDNF in hippocampus of pre-treatment groups were significantly higher (all $P < 0.05$). **Conclusions** The results suggest that pretreatment with ginsenoside Rb1 alleviate hippocampus lesion induced by acute immobilization stress through regulating the BDNF mRNA and protein expressions in hippocampus.

【Key words】 Ginsenoside Rb1; Acute immobilization stress; Brain-derived neurotrophic factor; Corticosterone; Adrenocorticotrophic hormone

人参皂苷 Rb1 是人参中有效成分之一,对缺血性脑损伤、阿尔茨海默病、癫痫等多种神经系统疾病都具有很好的治疗效果^[1-5]。急性应激可以引起大脑功能减退和神经细胞损害。机体发生应激时中枢神经系统损伤的主要部位是海马^[6]。研究发现,在急性应激情况下,机体内促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质酮(CORT)明显增加,但海马中的脑源性神经营养因子(BDNF)表达明显降低,说明 BDNF 在海马损害过程中起着至关重要的作用^[7-9]。BDNF 对神经元的分化、生存、生长以及维持神经元正常生理功能都有至关重要的作用,同时还有抵抗有害刺激和促进神经再生的作用^[10-11]。目前国内关于人参皂苷对急性应激时大鼠海马区 BDNF 表达影响的文章较少。本实验观察人参皂苷 Rb1 预处理对急性束缚性应激模型大鼠海马区 BDNF 表达的影响,并研究其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验分组:健康成年雄性 SD 大鼠 18 只,体重(250±10)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物合格证号:SCXK(沪)20070012。将大鼠按随机区组法分为 3 组:对照组、模型组、人参皂苷 Rb1 组,每组 6 只。

1.2 急性束缚应激模型复制:将大鼠用 ZH-TXQ 型筒形大白鼠固定器束缚 2 h 的方法制备急性束缚应激模型^[12]。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 干预方法:人参皂苷 Rb1 组将人参皂苷 Rb1 溶于生理盐水,使用时配成 2 mg/mL 溶液,于制模前 30 min 以 40 mg/kg 腹腔注射^[13]。正常对照组和模型组给予等量生理盐水。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 ACTH 和 CORT 含量测定:用水合氯醛麻醉大鼠,经内眦静脉采血 1 mL,4 ℃离心 15 min 后将血浆贮存于 -20 ℃低温环境中待测。用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 ACTH 和 CORT 水平,操作按试剂盒说明书进行,试剂盒购自上海西糖商务科技有限公司。

1.4.2 BDNF mRNA 表达量测定:制模 0.5 h 后麻醉大鼠取脑,游离海马置于液氮中保存,用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 BDNF mRNA 表达量,用 TRIzol 提取海马组织 RNA,甲醛变性后,凝胶电泳验证 RNA 完整性,用紫外分光光度法测定波长 260 nm 和 280 nm 处 RNA 样品吸光度(A)值,计算 RNA 含量的浓度和纯度。反转录成

cDNA,引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计合成。反应条件:95 ℃、3 min,35~40 个循环(95 ℃、30 s,55 ℃、30 s,72 ℃、30 s),最后 72 ℃、15 min。目的基因校正后的相对含量用目的基因与基因 18 S 浓度比值表示。

1.4.3 BDNF 蛋白表达测定:取大鼠大脑海马组织,提取蛋白质。用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定 BDNF 蛋白表达,用二喹啉甲酸(BCA)法定量蛋白质,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)转膜、封闭,抗体孵育,将膜置于反应液中,室温孵育,X 线曝光胶片。扫描图片,用 AlphaEaseFC 4.0 软件分析图片上特异条带的灰度值,目的蛋白的表达量用 BDNF 蛋白与三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)灰度值的比值表示。

1.5 统计学分析:使用 SPSS 17.0 软件对数据进行分析,正态分布的计量资料以均数±标准误($\bar{x}\pm s_x$)表示,采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠制模前后激素变化比较(表 1):制模后大鼠血浆 ACTH 和 CORT 水平均明显高于制模前(均 $P<0.05$)。

表 1 大鼠制模前后血浆 ACTH 和 CORT 的比较($\bar{x}\pm s_x$)

组别	动物数(只)	ACTH(μg/L)	CORT(μg/L)
制模前	6	2.06±0.35	0.94±0.12
制模后	6	3.79±0.50 ^a	1.69±0.12 ^a

注:与制模前比较,^a $P<0.05$

2.2 人参皂苷 Rb1 对大鼠海马组织 BDNF mRNA 表达水平的影响(表 2):急性束缚应激模型组海马组织 BDNF mRNA 表达量较正常对照组明显下降(均 $P<0.01$);而人参皂苷 Rb1 组 BDNF mRNA 表达较急性束缚应激模型组明显升高($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠海马组织 BDNF mRNA 和蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s_x$)

组别	动物数(只)	BDNF mRNA(A 值)	BDNF 蛋白(灰度值)
正常对照组	6	109.39±9.11	1.02±0.03
急性束缚应激模型组	6	42.87±5.56 ^a	0.94±0.02 ^a
人参皂苷 Rb1 干预组	6	113.73±6.24 ^b	1.04±0.02 ^b

注:与正常对照组比较,^a $P<0.01$;与急性束缚应激模型组比较,^b $P<0.01$

2.3 人参皂苷 Rb1 对大鼠海马组织 BDNF 蛋白表达量的影响(表 2;图 1):急性束缚应激模型组海

马组织 BDNF 蛋白表达量较正常对照组明显降低；而人参皂苷 Rb1 干预组 BDNF 蛋白表达量则较急性束缚应激模型组明显升高（均 $P < 0.01$ ）。



图 1 Western Blot 检测各组大鼠海马组织 BDNF 蛋白表达水平

3 讨论

急性应激是各种内外环境、社会、心理因素刺激时，机体出现的非特异性适应反应，可出现糖皮质激素（人体为皮质醇，大鼠为皮质酮）的增加^[14]。本研究发现，制模后血浆 CORT 和 ACTH 含量明显高于制模前，可见，急性束缚性应激模型制模成功。

应激参与了代谢类疾病、心血管疾病以及精神类疾病等多种疾病发病过程^[15]。研究发现，应激可影响中枢系统多种神经递质的转导通路。BDNF 是神经营养因子家族中以一个小二聚体形式存在的神经保护蛋白，其在成熟哺乳类动物大脑中广泛表达。BDNF 可以在突触后水平作用于酪氨酸受体激酶 B (TrkB)，从而激活树突钙瞬变和多种细胞内信号转导通路^[16]。上述通路激活使 Bcl-2 蛋白合成增加，Bcl-2 蛋白是维持突触可塑性和细胞生存必不可少的，同时还能维持线粒体膜稳定性^[17]。目前有研究发现，应激发生时大鼠海马组织 BDNF 表达量下降^[7-8]。本研究发现，急性应激后海马区 BDNF 的 mRNA 和蛋白表达均降低。

人参皂苷 Rb1 具有多种生物活性，是人参的主要成分之一^[18]。研究发现，人参皂苷可增加免疫功能^[19]，改善模型动物的记忆功能，抑制脑神经元细胞凋亡，保护海马神经元^[1, 18]。然而关于人参皂苷 Rb1 对急性应激时 BDNF 表达影响的报道甚少，故本实验采用人参皂苷 Rb1 预处理，观察急性应激时 BDNF 表达的变化，并探讨其可能机制。结果发现，人参皂苷 Rb1 预处理后，急性束缚应激模型大鼠海马区 BDNF 的表达量维持在正常对照组水平，表明人参皂苷 Rb1 预处理可以通过维持 BDNF 的表达量，从而参与缓解急性应激的作用。有研究表明，人参皂苷可以明显增加大鼠海马组织的腺苷酸环磷酸 (cAMP) 的含量^[20]，同时腺苷 A2a 受体激活后 BDNF 表达量增加^[21]。因此推测，人参皂苷 Rb1 可能是通过调节 cAMP 来调节 BDNF 的表达。

综上所述，急性应激时大鼠海马区 BDNF 表达量下降。人参皂苷 Rb1 对大鼠急性应激的保护效应可能是通过维持海马 BDNF 的表达量而实现的。

参考文献

- [1] 何海娟, 杨燕青, 俞玉龙, 等. 人参皂苷 Rb1 对脑缺血 / 再灌注损伤大鼠脑血流量的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (5): 461-463.
- [2] 樊兴娟, 柯开富, 姜正林, 等. 人参皂苷单体对大鼠局灶性脑缺血再灌注的神经保护研究 [J]. 中华医学杂志, 2006, 86 (29): 2071-2074.
- [3] 张维, 沈洪. 人参皂苷在复苏后综合征中的应用前景 [J]. 中华危重病急救医学, 2010, 22 (2): 123-125.
- [4] Wang Y, Liu J, Zhang Z, et al. Anti-neuroinflammation effect of ginsenoside Rb1 in a rat model of Alzheimer disease [J]. Neurosci Lett, 2011, 487 (1): 70-72.
- [5] 戴勤学, 张荣, 张民远, 等. 腺苷 A2a 受体介导人参皂苷 Rb1 增加脑缺血 / 再灌注损伤大鼠的脑血流量 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (4): 337-340.
- [6] Sapolsky RM. Why stress is bad for your brain [J]. Science, 1996, 273 (5276): 749-750.
- [7] Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, et al. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly [J]. Neurosci Res, 2005, 53 (2): 129-139.
- [8] Shi SS, Shao SH, Yuan BP, et al. Acute stress and chronic stress change brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and tyrosine kinase-coupled receptor (TrkB) expression in both young and aged rat hippocampus [J]. Yonsei Med J, 2010, 51 (5): 661-671.
- [9] Connor B, Dragunow M. The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain [J]. Brain Res Brain Res Rev, 1998, 27 (1): 1-39.
- [10] Yoshii A, Constantine-Paton M. Postsynaptic BDNF-TrkB signaling in synapse maturation, plasticity, and disease [J]. Dev Neurobiol, 2010, 70 (5): 304-322.
- [11] Tanaka S, Sekino Y, Shirao T. The effects of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor on cerebellar granule cell movement and neurite extension in vitro [J]. Neuroscience, 2000, 97 (4): 727-734.
- [12] Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, et al. Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus [J]. Neurosci Lett, 2002, 318 (2): 85-88.
- [13] 刘俊伟, 张慧玲, 金深辉, 等. 人参皂苷 Rb1 对脑创伤后 SD 大鼠脑含水量及血清 S100 β 的影响 [J]. 中国中医急症, 2012, 21 (3): 388-389.
- [14] 王卫霞, 王巍, 陈可冀. 人参皂苷对动物脑神经保护作用及其机理研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25 (1): 89-93.
- [15] Heuser I, Lammers CH. Stress and the brain [J]. Neurobiol Aging, 2003, 24 Suppl 1: S69-76.
- [16] Lang SB, Stein V, Bonhoeffer T, et al. Endogenous brain-derived neurotrophic factor triggers fast calcium transients at synapses in developing dendrites [J]. J Neurosci, 2007, 27 (5): 1097-1105.
- [17] 贾继明, 王宗权, 吴立军, 等. 人参皂苷 Rb1 的药理活性研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33 (12): 1371-1377.
- [18] 黄陆平, 何昕, 戴勤学, 等. 参麦注射液对大鼠大脑皮质嘌呤含量的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (2): 154-156.
- [19] 黄增峰, 缪心朗, 陈德昌, 等. 人参皂苷对烫伤脓毒症大鼠 CD19 细胞和 NK 细胞的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14 (4): 219-221.
- [20] 孙荣青, 史晓奕, 杨宏富, 等. 脑损伤程度与激活素 A 和 C-反应蛋白表达的相关性研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (11): 681-685.
- [21] Assaife-Lopes N, Sousa VC, Pereira DB, et al. Activation of adenosine A2A receptors induces TrkB translocation and increases BDNF-mediated phospho-TrkB localization in lipid rafts: implications for neuromodulation [J]. J Neurosci, 2010, 30 (25): 8468-8480.

(收稿日期: 2016-11-07)