

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2012.12.005

·基础研究·

人参皂甙 Rg1 对大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧后氧化损伤的保护作用

何斌, 吴鸿浩, 吕金如, 孙昊, 吴昊, 蒋雷, 王淦楠, 胡德亮, 张劲松, 陈彦

[摘要] 目的 观察人参皂甙 Rg1 对大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧后谷胱甘肽(GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)的影响。方法 海马神经元培养 8~10 d, 随机分为正常对照组、模型组、人参皂甙 Rg1 低、中、高剂量组(5 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 60 $\mu\text{mol/L}$)。建立大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧模型, 复糖氧后 6 h 以生物化学法观察各组海马神经元 GSH 含量和 GPx 活性的变化; 复糖氧后 24 h 以 Hoechst 染色法检测细胞凋亡, 并检测各组海马神经元四甲基偶氮唑盐(MTT)代谢率。结果 与模型组相比, 人参皂甙 Rg1 中、高剂量组海马神经元 GSH 含量、GPx 活性显著升高, 凋亡显著减少, MTT 代谢率显著提高($P<0.001$), 人参皂甙 Rg1 低剂量组变化不明显($P>0.05$)。结论 人参皂甙 Rg1 可通过提高缺糖氧神经元 GSH 含量和 GPx 活性, 发挥脑保护作用。

[关键词] 脑缺血; 人参皂甙 Rg1; 谷胱甘肽; 细胞凋亡; 海马

Neuroprotective Effect of Ginsenoside Rg1 on Oxidative Damage Induced by Oxygen-glucose Deprivation and Reperfusion in Cultured Hippocampal Cells HE Bin, WU Hong-hao, LÜ Jin-ru, et al. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of Ginsenoside Rg1 on glutathione (GSH) level and glutathione peroxidase (GPx) activity after oxygen-glucose deprivation/reperfusion in cultured hippocampal cells. **Methods** The model of oxygen-glucose deprivation and reperfusion were established with the hippocampal neurons of rats. They were randomly divided into control group, model group and Ginsenoside Rg1 treatment groups (5 $\mu\text{mol/L}$, 20 $\mu\text{mol/L}$, 60 $\mu\text{mol/L}$). The GSH level and GPx activity were measured 6 h after reperfusion. The apoptosis and the metabolic rate of methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) were detected 24 h after reperfusion. **Results** Compared with model group, the GSH level, GPx activity, and metabolic rate of MTT improved ($P<0.001$), and the apoptosis decreased in the Ginsenoside Rg1 groups ($P<0.001$) except with the dosage of 5 $\mu\text{mol/L}$ ($P>0.05$). **Conclusion** Ginsenoside Rg1 can protect the brain from ischemia by increasing the GSH level and GPx activity.

Key words: cerebral ischemia; Ginsenoside Rg1; glutathione; apoptosis; hippocampus

[中图分类号] R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2012)12-1112-04

[本文著录格式] 何斌, 吴鸿浩, 吕金如, 等. 人参皂甙 Rg1 对大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧后氧化损伤的保护作用[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(12): 1112-1115.

脑缺血卒中是临床常见的高危疾病, 涉及多种病理生理机制, 其中氧化应激是引发神经元死亡级联反应的主要原因之一。体外研究发现, 海马神经元缺糖缺氧再灌注损伤后, 过氧化物大量生成, 谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量减少, 以及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)活性降低, 体内氧化及抗氧化系统平衡破坏, 进而引发神经元死亡级联反应^[1]。人参皂甙 Rg1 是人参活性成分中已提纯的重要单体活性成分, 对缺血脑组织具有保护作用^[2]。另有体外实验表明, 人参皂甙 Rg1 可通过抗氧化反应, 发挥抗衰老、保护帕金森病黑质神经元等药理作用^[3-4]。本实验旨在海马神经元缺糖氧/复糖氧(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD-R)模型基础上, 探讨人

参皂甙 Rg1 对脑缺血后抗氧化能力的影响及其机制, 提供人参皂甙 Rg1 脑保护作用 and 脑缺血病理机制方面的研究资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物 出生 24 h 内 SD 乳大鼠, 雌雄不限, SPF 级, 由南京医科大学实验动物中心提供。

1.2 试剂与配液 人参皂甙 Rg1(中国药科大学分离纯化); GSH、GPx 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所); 多聚赖氨酸、谷氨酰胺、胰酶(SIGMA 公司); 马血清、DMEM、Neurabasal、B27(GIBCO 公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程公司); 其余为国产分析纯。

解剖液: NaCl (124 mmol/L)、KCl (5 mmol/L)、

基金项目: 江苏高校优势学科建设工程项目(Jx10231081)。

作者单位: 南京医科大学第一附属医院急诊科, 江苏南京市 210029。作者简介: 何斌(1981-), 男, 安徽安庆市人, 硕士, 主治医师, 主要研究方向: 脑缺血损伤与康复。通讯作者: 陈彦。

CaCl₂ (2.4 mmol/L)、MgSO₄ (1.3 mmol/L)、NaH₂PO₄ (1.25 mmol/L)、NaHCO₃ (26 mmol/L) 和 D-Glucose (10 mmol/L), 调节 pH 至 7.4; 培养液: 80% 高糖型 DMEM(含 Glu 4.5 g/L)、10% 马血清、10% 胎牛血清、谷氨酰胺 100 μg/ml、青链霉素 100 U/ml; 培养液: 98% Neurabasal 培养基、2% B27 无血清培养液添加剂。

1.3 海马神经元无血清培养 取新生 24 h 内的乳大鼠, 消毒, 分离出海马组织, 在预冷解剖液中剔除其血管、结缔组织等, 清洗、剪成约 1 × 1 × 1 mm 小块。将其转入含解剖液 2 ml 的离心管中, 加入 0.25% 胰酶 2 ml(终浓度是 0.125%), 混匀, 37 °C 消化 20 min。加入 4 ml 预冷种植培养液中中止消化, 用细口吸管吹打 20 下左右, 过 200 目不锈钢网筛, 1000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 4 ml 种植培养液重悬细胞, 吹打, 过 200 目不锈钢网筛, 收集细胞悬液。取细胞悬液 0.1 ml 以台盼兰拒染法进行活细胞计数, 以 2 × 10⁵~5 × 10⁵/ml 的密度接种于多聚赖氨酸包被过的直径 35 mm 培养皿和 96 孔板中, 贴壁 2 h 后每孔加种植培养液 1 ml 或 0.1 ml。置 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱内培养, 24 h 后换为无血清培养液, 以后每周换液 2 次, 每次更换一半培养液。

1.4 海马神经元 OGD-R 模型制备 海马神经元培养 8~10 d, 随机分为正常对照组、模型组、人参皂甙 Rg1 干预组(低、中、高剂量组)。将模型组及人参皂甙 Rg1 干预组培养液换为低糖型 DMEM(含葡萄糖 ≤ 1 g/L), 后者于缺糖缺氧前 30 min 加入人参皂甙 Rg1 5 μmol/L、20 μmol/L、60 μmol/L。两组神经元放置在密闭缺氧盒中, 充入 5% CO₂ 氮气, 流速约 2 L/min, 并置于 37 °C 培养箱中培养约 2.5 h。复糖氧时将培养液重新换为高糖含氧的 DMEM, 在正常培养条件下继续培养 6 h 或 24 h。正常对照组仅将培养液更换为高糖型 DMEM, 其余条件不变。

1.5 GSH、GPx 测定 于再灌注 6 h 中止培养, 用细胞刮刀收集细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 后用裂解液裂解细胞, 4 °C、12000 r/min 离心 10 min 取上清, 按试剂盒说明检测 GSH、GPx。

1.6 海马神经元细胞凋亡检测 按照 Hoechst 荧光染色试剂盒要求操作, 于再灌注 24 h 时吸出细胞培养液, 加入 0.5 ml 固定液 4 °C 过夜, 去固定液, 加 0.5 ml Hoechst 33258 染色液染色 5 min, 在倒置荧光显微镜下观察细胞形态, 每次随机计数 3 个视野内 200 个细胞, 计阳性凋亡细胞百分率。

1.7 四甲基偶氮唑盐(MTT)代谢率测定 再灌注 24 h 时, 于 96 孔培养板每孔加入 MTT 磷酸缓冲液 20 μl, 至浓度 0.5 mg/ml, 继续培养 4 h, 去除上清液, 每孔加入二四基亚砷 100 μl, 溶解生成的深蓝色结晶, 用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值。

1.8 统计学分析 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 组间差异采用 One-way ANOVA, 显著性水平 α=0.05。

2 结果

2.1 海马神经元形态学观察 在倒置显微镜下, 刚接种的海马神经元为圆形, 体积小, 胞体透亮, 光晕明显; 2 h 后细胞开始贴壁; 24 h 后活性好的细胞全部贴壁, 神经元长出短小的突起, 周围见扁平状多边形的神经胶质细胞; 3~4 d 后大多数胶质细胞死亡, 处于底层, 上层的神经元大多呈梭形、锥形、少数呈多边形, 体积明显增大, 突起增多、伸长; 培养至 8~10 d, 神经元胞体饱满, 轴突成熟, 交织成网状, 可进行试验, 见图 1。



图 1 培养 8~10 d 的海马神经元细胞(400×)

2.2 海马神经元 GSH 含量 再灌注后 6 h, 模型组和人参皂甙 Rg1 各剂量组海马神经元 GSH 较正常对照组降低($P<0.05$); 人参皂甙 Rg1 中、高剂量组神经元 GSH 含量显著高于模型组($P<0.001$), 而低剂量组与模型组无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

2.3 海马神经元 GPx 活性 再灌注后 6 h, 模型组和人参皂甙 Rg1 各剂量组 GPx 活性均显著低于正常对照组($P<0.001$); 人参皂甙 Rg1 中、高剂量组神经元 GPx 活性显著高于模型组($P<0.001$), 而低剂量组与模型组无显著性差异($P>0.05$)。见表 1。

2.4 海马神经元凋亡率 经 Hoechst 染色后, 荧光显微镜下调亡细胞胞核浓缩, 较正常细胞核明亮, 见图 2~图 6。复糖氧 24 h 后, 各组海马神经元凋亡率比较见表 1。模型组及人参皂甙 Rg1 各剂量组神经元凋亡率显著高于正常对照组($P<0.001$); 人参皂甙 Rg1 中、高剂量组凋亡率较模型组显著减少($P<0.001$), 而人参皂甙 Rg1 低剂量组较之无显著性差异。人参皂甙 Rg1 三

剂量组之间凋亡率比较,中、高剂量组间无显著性差异($P>0.05$),但均较低剂量组显著减少($P<0.001$)。见表1。

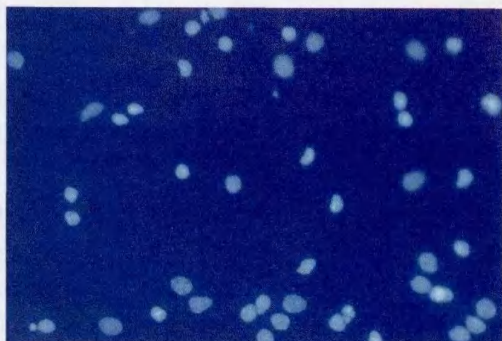


图2 正常对照组



图3 模型组

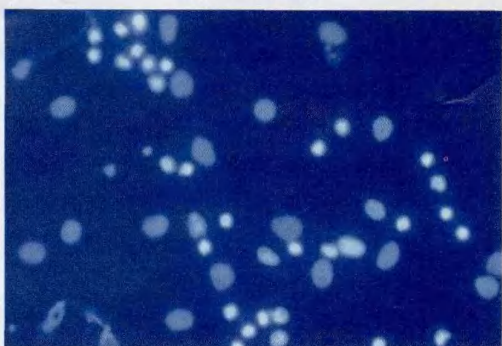


图4 人参皂甙Rg1 5 μmol/L组

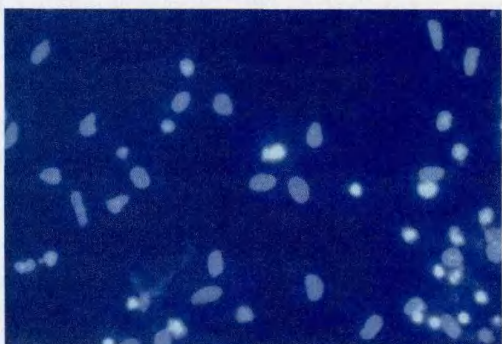


图5 人参皂甙Rg1 20 μmol/L组

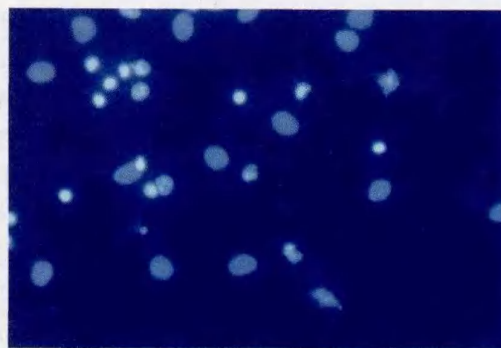


图6 人参皂甙Rg1 60 μmol/L组

2.5 海马神经元存活率 应用MTT测定复糖氧24 h后神经元存活率。模型组及人参皂甙Rg1各剂量组神经元存活率显著低于正常对照组($P<0.001$);人参皂甙Rg1中、高剂量组存活率较模型组显著升高($P<0.001$),而人参皂甙Rg1低剂量组较之无显著性差异($P>0.05$)。见表1。

表1 各组6 h后GSH含量、GPx活性及24 h后海马神经元凋亡率、存活率比较

组别	GSH含量(mg/gprot)	GPx活性(%)	凋亡率(%)	存活率(%)
A	32.08±2.06	98.25±0.94	5.24±0.92	99.42±0.39
B	17.48±3.11	59.25±6.05	46.94±3.14	58.17±7.17
C	19.28±5.03	60.83±4.17	44.24±4.27	61.86±5.12
D	27.68±2.96	72.58±2.33	36.24±2.75	76.17±3.25
E	28.20±1.79	75.83±3.19	34.32±2.18	78.08±4.18
F	24.79	104.61	200.32	75.43
P	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{ASB}	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{ASC}	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{ASD}	0.025	0.000	0.000	0.000
P _{ASE}	0.046	0.000	0.000	0.000
P _{BSC}	0.675	0.472	0.116	0.179
P _{BSD}	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{BSE}	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{CSD}	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{CSE}	0.000	0.000	0.000	0.000
P _{DSE}	0.782	0.146	0.258	0.477

注: A: 正常对照组; B: 模型组; C: 人参皂甙Rg1 5 μmol/L组; D: 人参皂甙Rg1 20 μmol/L组; E: 人参皂甙Rg1 60 μmol/L组。

3 讨论

发生脑缺血/再灌注时,受损脑组织发生氧化应激反应,并产生大量的活性氧(reactive oxygen species),如超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢(H_2O_2)等,大量活性氧可与细胞脂质、蛋白及核酸发生反应,造成细胞死亡/凋亡。机体可通过一系列抗氧化酶及抗氧化分子清除ROS:超氧化物歧化酶将超氧阴离子歧化为 H_2O_2 , H_2O_2 进一步由GPx、过氧化氢酶清除。目前认

为, GPx 是神经元清除 H_2O_2 的主要过氧化物酶, 该过程以 GSH 为底物。GSH 在脑组织中含有丰富, 在体大鼠模型研究发现, GSH 缺失可加重脑缺血/再灌注脑损伤, 而给予 GSH 类似物或 GSH 前体物可明显减轻损伤^[5]。其可能的机制为, GSH 是体内重要的抗氧化剂, 可清除过量的氧应激产物, 并且能与蛋白质形成二硫化物, 后者被称为蛋白质谷胱甘肽化, 谷胱甘肽化的蛋白质可降低神经元氧应激损伤^[6]。此外, GSH 还是调节氧化-还原转化的信号分子, GSH 的缺失可导致 Fos 过表达, 进而引起神经元凋亡^[7]。本实验发现, 再灌注后 6 h GSH 含量、GPx 活性较高的神经元, 其后受到的损伤较小, 与以上观点一致。

人参是祖国传统中药资源中应用最为广泛的药物之一, 人参皂甙 Rg1 是人参活性成分中已提纯的重要单体活性成分, 已发现具有抗疲劳、抗衰老、抗癌、降血脂、增强记忆力、提高免疫力等药理作用。近几年人们发现人参皂甙 Rg1 可以经减少谷氨酸释放、抑制凋亡、营养神经等作用^[8-10], 对抗脑缺血损伤。另有在体实验发现, 人参皂甙 Rg1 具有抗氧化应激反应的功能, 保护缺血再灌注的心、肾器官减轻损伤, 并在抗衰老、保护帕金森病黑质神经元等方面发挥作用^[3-4, 11-12]。本实验通过离体细胞模型发现, 人参皂甙 Rg1 减少脱糖氧再灌注神经元 GSH、GPx 的缺失, 在脑缺血时也可发挥抗氧化作用, 对抗脑缺血损伤。不过目前人参皂甙 Rg1 对缺糖氧神经元抗氧化作用的报道较少, 其具体的作用机制尚需进一步研究明确。人参皂甙 Rg1 对脑缺血的保护作用可能涉及多项机制, 根据本研究结果, 我们认为人参皂甙 Rg1 可减轻缺糖氧神经元抗氧化成分的缺失, 该机制可能在脑保护过程中发挥重要的作用。

综上所述, 氧化应激反应在脑缺血再灌注损伤中起重要作用。本实验经研究发现, 人参皂甙 Rg1 可对抗脑缺血时的氧化损伤, 保护脑组织, 其机制可能与人参皂甙 Rg1 减轻 GSH 缺失、提高 GPx 活性有关。本实验结果丰富了人参皂甙 Rg1 的脑保护研究, 但其具体作用机制还有待于进一步阐明。

[参考文献]

- [1] Jiang X, Mu D, Manabat C, et al. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation [J]. *Exp Neurol*, 2004, 190(1): 224-232.
- [2] 江山, 姜正林, 曾因明, 等. 九种人参皂甙单体抗脑缺血损伤作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(2): 19-20.
- [3] 周宜灿, 陈晓春, 朱元贵, 等. 人参皂甙 Rg1 可能通过抗氧化作用来保护帕金森病鼠黑质神经元[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2003, 8(3): 273-277.
- [4] 彭彬, 陈茂山, 蒲莹, 等. 人参皂甙 Rg1 延缓 D-半乳糖大鼠脑衰老作用及机制的初步研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2011, 36(4): 419-422.
- [5] Gotoh O, Yamamoto M, Tamura A, et al. Effect of YM737, a new glutathione analogue, on ischemic brain edema [J]. *Acta Neurochir*, 1994, 60(suppl): 318-320.
- [6] Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ, et al. Glutaredoxin: role in reversible protein S-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(3-4): 348-366.
- [7] Fratelli M, Goodwin LO, Ørom UA, UA, et al. Gene expression profiling reveals a signaling role of glutathione in redox regulation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(39): 13998-14003.
- [8] 石永江, 罗雪, 王永红, 等. 人参皂甙 Rg1 和 Rb1 对培养大鼠室管膜前下区神经干细胞谷氨酸兴奋毒性的保护作用及其与 STAT3 表达的关系[J]. *国际脑血管病杂志*, 2007, 15(3): 172-176.
- [9] Chen XC, Zhu YG, Wang XZ, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cell [J]. *Acta Phannacol Sin*, 2001, 22(8): 673-678.
- [10] 崔荣太, 蒲传强, 刘洁晓, 等. 人参皂甙 Rg1 对大鼠局灶性脑缺血后侧脑室下区神经干细胞增殖分化的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2007, 9(10): 707-709.
- [11] Liu K, Abe T, Sekine S, et al. Experimental study on the scavenging effects of ginsenosides on oxygen free radicals using model of heterotopic heart transplantation in rats [J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 4(4): 188-191.
- [12] Yokozawa T, Liu ZW, Dong E. A study of ginsenoside-Rd in a renal ischemia-reperfusion model [J]. *Nephron*, 1998, 78(2): 201-206.

(收稿日期: 2012-07-31)