

人参皂苷 Rg1 对大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧后钙内流的影响

陈彦, 吴鸿浩, 何斌, 陈旭峰, 吕金如, 王淦楠, 吴昊, 张劲松, 汪琴, 吴婷

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30901578);江苏高校优势学科建设工程项目(Jx10231081);江苏省卫生厅“科教兴卫工程”开放课题(XK20 200905)

作者单位:210029 江苏南京,南京医科大学第一附属医院急诊中心(陈彦,吴鸿浩,何斌,陈旭峰,吕金如,王淦楠,吴昊,张劲松);神经内科(汪琴,吴婷)

作者简介:陈彦(1974-),男,副主任医师。

通讯作者:吴婷(1979-),女,博士,硕士生导师,副主任医师, E-mail: wuting80000@sina.com。

[摘要] 目的 观察人参皂苷 Rg1 对大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧后钙内流的影响,并探讨其可能的脑保护机制。方法 建立大鼠海马神经元缺糖氧/复糖氧模型,随机分为正常对照组、模型组和人参皂苷 Rg1 干预组(5、20、60 $\mu\text{mol/L}$)。复糖氧后 24 h 以 Fluo-3 AM 荧光染色法观察各组海马神经元细胞内钙离子浓度变化,以 Hoechst 染色法检测细胞凋亡,并检测细胞四甲基偶氮唑盐(MTT)代谢率。结果 与模型组比较,人参皂苷 Rg1 中、高剂量组海马神经元细胞内钙离子浓度降低,凋亡细胞减少,MTT 代谢率升高,人参皂苷 Rg1 低剂量组变化不明显。结论 脑缺血后神经元细胞内钙超载与脑损伤关系密切,人参皂苷 Rg1 可通过减少缺糖氧神经元细胞内钙内流,发挥脑保护作用。

[关键词] 脑缺血; 人参皂苷 Rg1; 钙超载; 细胞凋亡; 海马神经元

doi:10.3969/j.issn.1002-1949.2012.11.010

Effect of ginsenoside Rg1 on calcium overload induced by oxygen - glucose deprivation and reperfusion in cultured hippocampal cells CHEN Yan, WU Hong-hao, HE Bin, et al. Emergency Center, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of ginsenoside Rg1 on calcium overload induced by oxygen - glucose deprivation and reperfusion injury in cultured hippocampal cells and to study its possible mechanisms. **Methods** The rat models of oxygen - glucose deprivation and reperfusion of hippocampal neurons were build, and were randomly divided into control group, model group and ginsenoside Rg1 treatment groups(5, 20, 60 $\mu\text{mol/L}$). At 24 h after reperfusion, the intracellular levels of calcium was detected by Fluo-3 AM staining, the cell apoptosis was evaluated by Hoechst staining, and the metabolic rate of MTT were determined. **Results** Compared with model group, the intracellular levels of calcium and cell apoptosis were decreased, and the metabolic rate of MTT were improved in the groups receiving ginsenoside Rg1 middle and high dose except low dose. **Conclusion** Ginsenoside Rg1 has neuroprotective effect by decreasing the intracellular levels of calcium after cerebral ischemia.

[Key words] Cerebral ischemia; Ginsenoside Rg1; Calcium overload; Cell apoptosis; Hippocampal neurons

脑缺血卒中是临床常见的高危疾病,它的病理生理机制复杂,目前仍未完全清楚。有研究显示^[1-2],神经元缺血损伤时,细胞内游离钙显著增

多,超负荷的细胞内钙又加速了细胞功能和结构的破坏。因此,抑制海马神经元的钙超载具有重要的病理生理意义。人参根或茎叶总皂苷中含有数十种

人参皂苷单体成分,它们具有多方面的药理作用。有报道指出^[3],人参总皂苷和人参皂苷单体 Rg1 能减轻脑缺血再灌注损伤,其可能的机制为保护线粒体、抑制凋亡、营养神经等。本实验旨在海马神经元缺糖氧/复糖氧(oxygen - glucose deprivation/reperfusion)模型基础上,探讨人参皂苷 Rg1 对脑缺血后细胞内钙超载的影响及其机制,提供人参皂苷 Rg1 的脑保护作用 and 脑缺血病理机制方面的研究资料。

1 材料与方法

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

1.2 试剂与配液

人参皂苷 Rg1 由中国药科大学分离纯化;多聚赖氨酸、谷氨酰胺、胰酶购自 Sigma 公司;马血清、DMEM、Neurabasal、B27 购自 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司;其余为国产分析纯;Hoechst 荧光染色试剂盒购自碧云天生物技术研究。

解剖液 (mmol/L): NaCl 124、KCl 5、CaCl₂ 2.4、MgSO₄ 1.3、NaH₂PO₄ 1.25、NaHCO₃ 26 和 D-葡萄糖 10, pH 调至 7.4;培养液:80% 高糖型 DMEM (含葡萄糖 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;无血清培养液:98% Neurabasal 培养基、2% B27 无血清培养液添加剂。

1.3 新生乳大鼠原代海马神经元无血清培养 取新生 24 h 内的乳大鼠,消毒,在无菌条件下分离海马组织,在预冷的解剖液中剔除其上的血管、结缔组织等,清洗,剪成约 1 mm × 1 mm × 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 (胰酶终浓度是 0.125%),混匀,37 °C 消化 20 min。取 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 以台盼蓝拒染法进行活细胞计数,以 (2~5) × 10⁴/mL 的密度接种于多聚赖氨酸包被过的 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 海马神经元缺糖氧/复糖氧模型制备 海马神经元培养 8~10 d,随机分为正常对照组、模型组、人

参皂苷 Rg1 干预组 (低、中、高三剂量组)。将模型组及人参皂苷 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 加入人参皂苷 Rg1 (以 5、20、60 μmol/L 不同浓度)。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 海马神经元内游离钙离子浓度的测定 于再灌注 24 h 时将细胞培养液吸去,用 PBS 将细胞洗 3 遍,加入终浓度为 10 μmol/L 的 Fluo-3 AM,37 °C 水浴中避光负载 30 min。然后用清洗液将细胞洗 3 遍,去除残余染料。以 Zeiss LSM-510 激光扫描共聚焦显微镜钙成像系统测定细胞 [Ca²⁺]_i 的变化。Fluo-3 负载的海马神经元细胞被 488 nm 波长的氩激光激发,发射波长为 525 nm。荧光图像用 LSM 510 V.2.3 软件处理。

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。

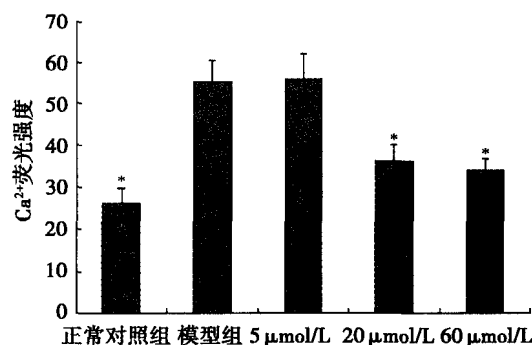
1.7 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 代谢率测定 再灌注 24 h 后,于 96 孔培养板每孔加入 20 μL MTT 磷酸缓冲液,至浓度 0.5 mg/mL,继续培养 4 h,去除上清液,每孔加入 100 μL 二甲基亚砷,溶解生成深蓝色结晶,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光值。

1.8 统计学处理 实验结果采用 SPSS11.5 软件分析,采用 SPSS11.5 软件进行统计分析,组间差异采用 One-way ANOVA, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组海马神经元细胞内钙离子浓度比较 海马神经元细胞经 Fluo-3 AM 染色后,被 488 nm 波长的氩激光激发而发出荧光,见彩色插页图 1。复糖氧 24 h 后细胞内钙离子变化见图 2,模型组细胞内钙离子浓度较正常对照组明显升高;与模型组比较,人参皂苷 Rg1 中、高剂量组神经元细胞内钙离子浓度明显下降,而低剂量不明显;细胞内钙离子浓度随人参皂苷

Rg1 剂量升高而下降,中剂量组较低剂量组下降明显,但与高剂量比较差异无统计学意义。

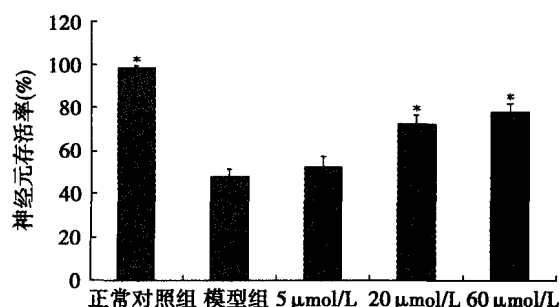


与模型组比较: * $P < 0.05$

图2 人参皂苷 Rg1 对海马神经元缺氧/复糖氧 24 h 后细胞内钙离子浓度的影响

2.2 各组海马神经元凋亡率比较 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,见彩色插页图3。复糖氧 24 h 后,正常对照组、模型组及人参皂苷 Rg1 低、中、高三剂量组海马神经元凋亡率分别为 $(5.24 \pm 0.92)\%$ 、 $(46.94 \pm 3.14)\%$ 、 $(44.24 \pm 4.27)\%$ 、 $(36.24 \pm 2.75)\%$ 和 $(34.32 \pm 2.18)\%$ 。人参皂苷 Rg1 中、高剂量组凋亡率较模型组明显减少,而人参皂苷 Rg1 低剂量组较之无明显变化;人参皂苷 Rg1 三剂量组之间凋亡率比较,中、高剂量组间差异无统计学意义,但均较低剂量组明显减少。

2.3 各组海马神经元存活率比较 应用 MTT 测定复糖氧 24 h 后神经元存活率,见图4。与正常对照组比较,模型组神经元存活率明显下降;经不同浓度人参皂苷 Rg1 处理发现,中、高剂量组神经元存活率较模型组明显提高,两组比较差异无统计学意义;低剂量组神经元存活率较模型组无明显变化,较中、高剂量组明显减少。



与模型组比较: * $P < 0.05$

图4 人参皂苷 Rg1 对海马神经元缺氧/复糖氧 24 h 后存活率的影响

3 讨论

脑缺血损伤涉及众多机制,至今尚未完全清楚。以往研究发现,脑缺血时神经元损伤因素包括 Glu 过多释放、自由基产生增加、线粒体损伤以及二氧化氮合成增多等,它们常伴随胞浆 Ca^{2+} 浓度升高,后者将引发一系列酶活性反应导致神经元损伤直至死亡。因此,钙超载被认为是神经元变性的“最后共同通道”^[1]。 Ca^{2+} 的出胞由 Ca^{2+} 泵、 $\text{Na}^{+} - \text{Ca}^{2+}$ 泵完成,入胞则通过 Ca^{2+} 通道,后者包括电压依赖性通道(voltage-dependent channel, VDC)和受体控制型通道(receptor operated channel, ROC)。脑缺血时, Ca^{2+} 出胞受阻,而 VDC 开放时间延长、ROC 受其配体(谷氨酸、IP₃ 等)影响开放,则引起 Ca^{2+} 内流增多,导致神经元细胞内钙超载。本实验研究发现,神经元缺氧再灌注后细胞内 Ca^{2+} 浓度明显升高,且细胞内 Ca^{2+} 浓度越高,该组的神经元存活率越低,提示钙超载可能在神经元缺血损伤过程中起重要作用,与以往报道相符^[1-2]。

人参是祖国传统中药资源中应用最为广泛的药物之一,人参皂苷 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。然而近几年人们发现,其具有神经保护作用,国内外相关研究也逐渐增多。但以往研究多通过动物模型,发现人参皂苷 Rg1 可以通过改善血供、减少谷氨酸释放、保护线粒体、抑制凋亡、营养神经等作用^[4-9]对抗脑缺血损伤。本实验在大鼠海马神经元缺氧再灌注模型基础上,研究人参皂苷 Rg1 对一个重要的致伤因素—钙超载是否存在抑制作用,从而减轻其介导的脑缺血损伤。结果表明,人参皂苷 Rg1 可减轻缺氧再灌注神经元的钙超载,呈剂量依赖性,并发挥脑保护作用。推测可能的机制如下:①人参皂苷 Rg1 可抑制缺血时神经细胞释放谷氨酸、促进胶质细胞摄取谷氨酸^[4-5],而谷氨酸作为 ROC 的配体,其增多将导致 ROC 开放, Ca^{2+} 内流增加;②人参皂苷 Rg1 可保护线粒体,促 ATP 生成^[9],为 Ca^{2+} 泵、 $\text{Na}^{+} - \text{Ca}^{2+}$ 泵提供能量,使本因脑缺血而功能丧失的两泵恢复部分功能,促 Ca^{2+} 出胞;此外,线粒体作为细胞内钙库,对细胞内 Ca^{2+} 稳定有缓冲作用,人参皂苷 Rg1 减轻了线粒体受损,增加能量生成,有利于线粒体发挥摄取 Ca^{2+} 作用。不过

目前人参皂苷 Rg1 对缺氧神经元钙超载影响的报道较少,其具体的作用机制尚需进一步研究证实。人参皂苷 Rg1 对脑缺血的保护作用可能涉及多项机制,根据本研究结果可推断人参皂苷 Rg1 能够减轻缺氧神经元内钙超载,该机制可能在脑保护过程中发挥重要的作用。

综上所述,神经元细胞内钙超载在脑缺血再灌注损伤中起重要作用。本实验研究发现,人参皂苷 Rg1 可对抗脑缺血损伤,保护脑组织,其机制可能与其减少缺氧神经元细胞内钙内流有关。本实验结果丰富了人参皂苷 Rg1 的脑保护研究,但其具体作用机制还有待进一步阐明。

参考文献

- [1] Sun L, Ai J, Wang N, et al. Cerebral ischemia elicits aberration in myocardium contractile function and intracellular calcium handling[J]. Cell Physiol Biochem, 2010, 26(3): 421-430.
- [2] Weng XC, Zheng JQ, Jin QE, et al. Inhibition of acid-induced

apoptosis by targeting ASIC1a mRNA with short hairpin RNA[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28(10): 1621-1627.

- [3] 江山,姜正林,曾因明,等.九种人参皂苷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.
- [4] 江山,姜正林.人参皂苷 Rb1 对大鼠海马脑片缺血损伤的保护作用[J].中风与神经疾病杂志,2003,20(5):415-417.
- [5] 石永江,罗雪,王永红,等.人参皂苷 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):173-176.
- [6] Chen XC, Zhu YG, Wang XZ, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on dopamine-induced apoptosis in PC12 cell[J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(8): 673-678.
- [7] 姜正林,吴新民,陈云,等.人参皂苷的抗鼠脑缺血损伤作用[J].中华航海医学杂志,2000,7(1):28-32.
- [8] 崔荣太,蒲传强,刘洁晓,等.人参皂苷 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.
- [9] 杨朝鲜,刘军祥,孙珠蕾,等.人参皂苷 Rb1 对大鼠脑缺血再灌注时神经元凋亡及 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J].四川大学学报,2008,39(2):214-217.

[收稿日期:2012-08-10][本文编辑:陈娜]

《中国急救医学》杂志第六届编辑委员会名单

学术指导委员会委员:于汉力 王一镗 王宇夫 王佩燕 刘仁树 张凤岭

杨涵铭 杨瑞和 高世明 景炳文 蒋 健

名誉主编:杨 镜

主编:曹俊强

副主编:周 晋

编辑部主任:裴 俏

主任委员:杨 镜 沈 洪 于学忠 周 晋

副主任委员:李为民 杨兴易 林才经 陈晓辉 吕传柱 黄显凯

常务编辑委员:王秀杰 史 忠 付 研 任成山 刘励军 许国根 张劲松 何忠杰

张新超 武秀昆 金发光 周荣斌 胡丽辉 耿晓增 霍正禄 霍建民

编辑委员(按姓氏笔画为序):

于凯江	于学忠	马朋林	王 仲	王立祥	王秀杰	王育珊	王新春	王建明	文 亮
方 强	尹 文	邓跃林	卢 微	卢中秋	卢君强	史 忠	史若飞	田英平	付 研
吕传柱	朱继红	任成山	刘励军	刘宏宇	刘佰运	刘保池	许国根	孙志扬	孙海晨
吴长君	邱泽武	何 庆	何 建	何忠杰	宋祖军	沈 洪	张 泓	张云明	张文武
张连东	张劲松	张献全	张新超	张国强	陆一鸣	陆士奇	陈 锋	陈尔真	陈庆贺
陈晓辉	武秀昆	林才经	李 云	李为民	李正斌	李奇林	李培杰	杨 径	杨 秋
杨 镜	杨兴易	罗 毅	周 晋	周立君	周发春	周荣斌	周继如	金发光	孟新科
赵 良	赵世光	赵晓东	胡丽辉	胡辉莹	姚咏明	秦 俭	秦伟毅	秦华东	耿晓增
聂时南	钱传云	钱素云	徐秋萍	高 燕	黄子通	黄显凯	梅 雪	曹义战	曹俊强
商德亚	梁显泉	董利军	董朝阳	曾健生	裴 俏	廖晓星	霍正禄	霍建民	

人参皂苷 Rg1 对大鼠海马神经元缺糖氧 / 复糖氧后钙内流的影响

(正文见 1001 页)

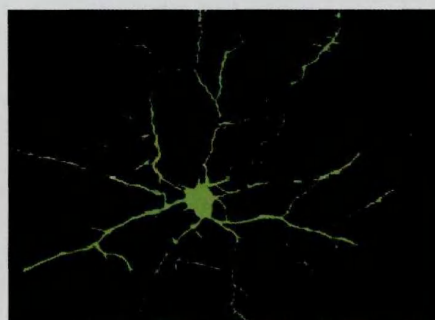
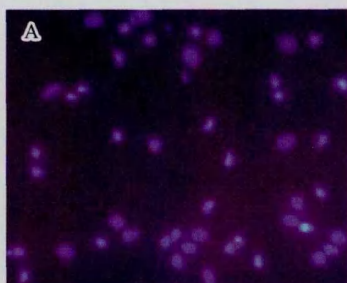
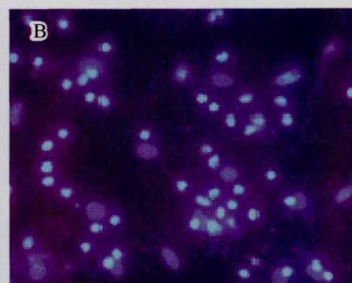


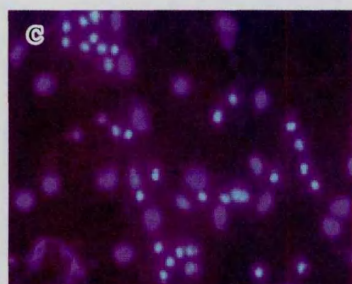
图1 海马神经元在 Fluo-3 AM 染色后经氩激光激发荧光 ($\times 400$)



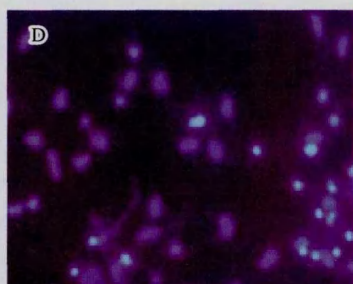
A. 正常对照组



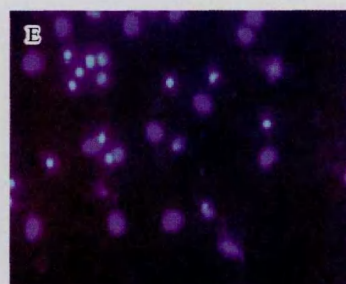
B. 模型组



C. 人参皂苷 Rg1 5 $\mu\text{mol/L}$ 组



D. 人参皂苷 Rg1 20 $\mu\text{mol/L}$ 组



E. 人参皂苷 Rg1 60 $\mu\text{mol/L}$ 组

图3 各组海马神经元细胞凋亡比较 (Hoechst 染色, $\times 400$)

雌激素对慢性低灌注大鼠血脑屏障通透性的影响

(正文见 1005 页)

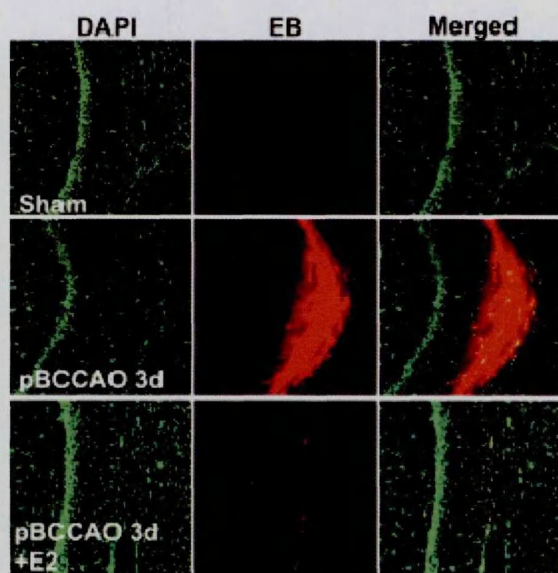


图1 B 激光扫描共聚焦显微镜观察 E2 的影响 ($10\times$)

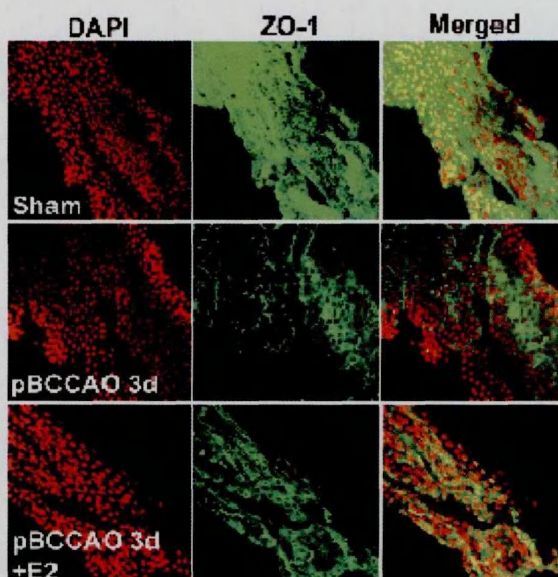


图2 E2 对 pBCCAO 后 3 d 大鼠脉络丛 ZO-1 蛋白表达的影响 ($40\times$)