

# 人参皂苷 Rb1 对阿尔茨海默病模型小鼠术后认知功能、海马内突触后致密蛋白-95 及尼氏体表达的影响



许方方,张 珊,李建玲,蒋 淼

**摘要:**目的 观察人参皂苷 Rb1 对 APPswe/PS1dE9 双转基因阿尔茨海默病(AD)模型小鼠肝叶部分切除术后认知功能及海马内突触后致密蛋白-95(postsynaptic density protein-95, PSD-95)、神经元尼氏体表达的影响。方法 将 3 月龄 AD 模型小鼠 120 只随机分为 3 组,手术组(S 组)于麻醉后行肝叶部分切除术;人参皂苷 Rb1 组(Rb1 组)于手术前 5 d 腹腔注射人参皂苷 Rb1 60 mg/kg;对照组(N 组)于手术前 5 d 腹腔注射同体积的生理盐水。以上各组随机抽取 8 只小鼠采用水迷宫连续训练 5 d 并检测术后 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 的学习记忆能力,余小鼠术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 取标本,行尼氏染色并检测海马内 PSD-95 的表达。结果 与 Rb1 组比较,S 组和 N 组术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 平均逃避潜伏期延长( $P < 0.05$ );Rb1 组术后目的象限时间百分比较 S 组和 N 组升高( $P < 0.05$ )。与 Rb1 组比较,S 组和 N 组术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d PSD-95 蛋白表达逐渐减少( $P < 0.05$ )。尼氏染色显示,Rb1 组术后海马 CA1 区神经细胞排列密集、整齐,胞浆中尼氏体丰富;与 Rb1 组比较,S 组和 N 组术后 21 d、28 d 神经元尼氏体减少( $P < 0.05$ )。结论 人参皂苷 Rb1 可以提高 AD 模型小鼠肝叶部分切除术后学习记忆能力,其机制可能与其改善突触相关蛋白 PSD-95 及神经元尼氏体的表达相关。

**关键词:**阿尔茨海默病;人参皂苷 Rb1;致密蛋白-95;认知功能;尼氏体;实验研究

**doi:** 10.12102/j.issn.1672-1349.2022.03.010

## Effects of Ginsenoside Rb1 on Postoperative Cognitive Function, Expression of PSD-95 and Nissl Body in Hippocampus of Alzheimer's Disease Model Mice

XU Fangfang, ZHANG Shan, LI Jianling, JIANG Miao

Renhe Hospital, Shanghai 201900, China

Corresponding Author: JIANG Miao

**Abstract:****Objective** To observe the effects of Ginsenoside Rb1 on cognitive function, expression of postsynaptic density protein-95 (PSD-95) and nissl body in hippocampus of APPswe/PS1dE9 double transgenic Alzheimer's disease(AD) model mice after partial liver lobectomy.**Methods** One hundred and twenty 3-month-old APPswe/PS1dE9 double transgenic AD model mice were randomly divided into three groups:surgical group(S group):partial liver lobectomy after anesthesia; Ginsenoside Rb1 group(Rb1 group):intraperitoneal injection of ginsenoside Rb1 60 mg/kg in the morning 5 days before surgery;control group(N):intraperitoneal injection of the same volume of normal saline in the morning 5 days before surgery.Eight mice were randomly selected from the above groups for continuous training with morris water maze for 5 d and their learning and memory ability were detected at 1 d,3 d,7 d,14 d,21 d,and 28 d after surgery. Specimens were taken from the remaining mice at 3 d,7 d,14 d,21 d,and 28 d after surgery,and the expression of PSD-95 in hippocampus was detected by Nissl staining.**Results** Compared with Rb1 group,the average latency of escape was prolonged at postoperative 3 d,7 d,14 d,21 d,and 28 d in group S and group N( $P < 0.05$ ). The percentage of postoperative objective quadrant time in group Rb1 was more than that in group S and group N( $P < 0.05$ ). Compared with Rb1 group,PSD-95 protein expression in group S and group N was decreased gradually at 3 d,7 d,14 d,21 d,and 28 d after surgery( $P < 0.05$ ).Nissl's staining showed that nerve cells in the hippocampal CA1 region of Rb1 group were arranged densely and neatly,and there were abundant nissl bodies in the cytoplasm. Compared with Rb1 group,the number of neurons in group S and group N was decreased at 21 and 28 days after surgery( $P < 0.05$ ).**Conclusion** Ginsenoside Rb1 can improve the learning and memory ability of AD model mice after partial liver lobectomy,and the specific mechanism may be related to the improvement of the expression of synapse related protein PSD-95 and nissl body.

**Keywords:**Alzheimer's disease;Ginsenoside Rb1;postsynaptic density protein-95;cognitive function;Nissl body;experiment research

**作者单位** 上海市宝山区仁和医院(上海 201900)

**通讯作者** 蒋淼,E-mail: 18116344330@163.com

**引用信息** 许方方,张珊,李建玲,等.人参皂苷 Rb1 对阿尔茨海默病模型小鼠术后认知功能、海马内突触后致密蛋白-95 及尼氏体表达的影响[J].中西医结合心脑血管病杂志,2022,20(3):440-444.

认知功能障碍是阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)特征性的临床表现。人参皂苷 Rb1 是人参主要活性成分,通过抑制炎症反应、激活抗凋亡相关通路,从而保护脑细胞功能、改善学习记忆<sup>[1-2]</sup>。研究发现,临床常用的吸入性麻醉药物以及手术创伤刺激可以加重或诱发 AD 临床前期、临床期病人的认知功能障碍<sup>[3-5]</sup>。本研究通过围术期给药,观察人参皂苷 Rb1 对 APPswe/PS1dE9 双转基因 AD 模型小鼠肝叶部分切除术后认知功能以及海马内突触后致密蛋白-95 (postsynaptic density protein P-95, PSD-95)、神经元尼氏体表达的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 3 月龄 APPswe/PS1dE9 双转基因雄性小鼠,体质量 30 g,由南京大学动物模式中心提供,许可证号:SCXK(苏)2015-0001。

**1.2 主要试剂和仪器** Morris 水迷宫装置(上海吉量软件科技有限公司);人参皂甙 Rb1(纯度>95%,批号:17080421)购自上海同田生物技术有限公司,经生理盐水稀释后备用;小鼠单克隆 PSD 抗体(1:1 000, Abcam);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG(1:1 000, Aggen)。

**1.3 分组** 本实验已经通过上海市宝山区仁和医院伦理委员会的伦理论证(编号:201812),并在其监督下进行。将 3 月龄 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠 120 只随机分为 3 组,每组 40 只,手术组(S 组):小鼠腹腔注射 0.1%戊巴比妥 0.3 mg/kg,麻醉后行肝叶部分切除术;人参皂甙 Rb1 组(Rb1 组):术前 5 d 注射人参皂甙 60 mg/kg;对照组(N 组):术前 5 d 注射同体积的生理盐水。从以上各组中随机抽取 8 只小鼠,采用 Morris 水迷宫检测术后 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 学习记忆能力。剩余 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠同样在术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 时间点取标本行蛋白免疫印迹法(Western Blot)检测海马内 PSD-95 的表达及尼氏染色分析尼氏体累积光密度值(OD)。

**1.4 Morris 水迷宫行为学测试** 实验程序包括:①定位航行实验(place navigation)用于测量小鼠获取空间学习记忆的能力。将小鼠从 4 个人入水点随机放入水中,通过自动录像系统记录小鼠 90 s 内找到平台的时间(逃避潜伏期,escape latency)。②空间探索实验(spatial probe test)用于测量小鼠对平台空间位置记忆的能力。拆除平台,将小鼠从离平台最远的象限放

入水中,记录 90 s 内小鼠在原目标象限的时间百分比。

**1.5 手术处理** 小鼠翻正反射消失后,消毒,在剑突下腹部正中中线切开,进入腹腔游离肝脏左侧叶,在远端蒂部用一号丝线结扎切除肝左侧叶。

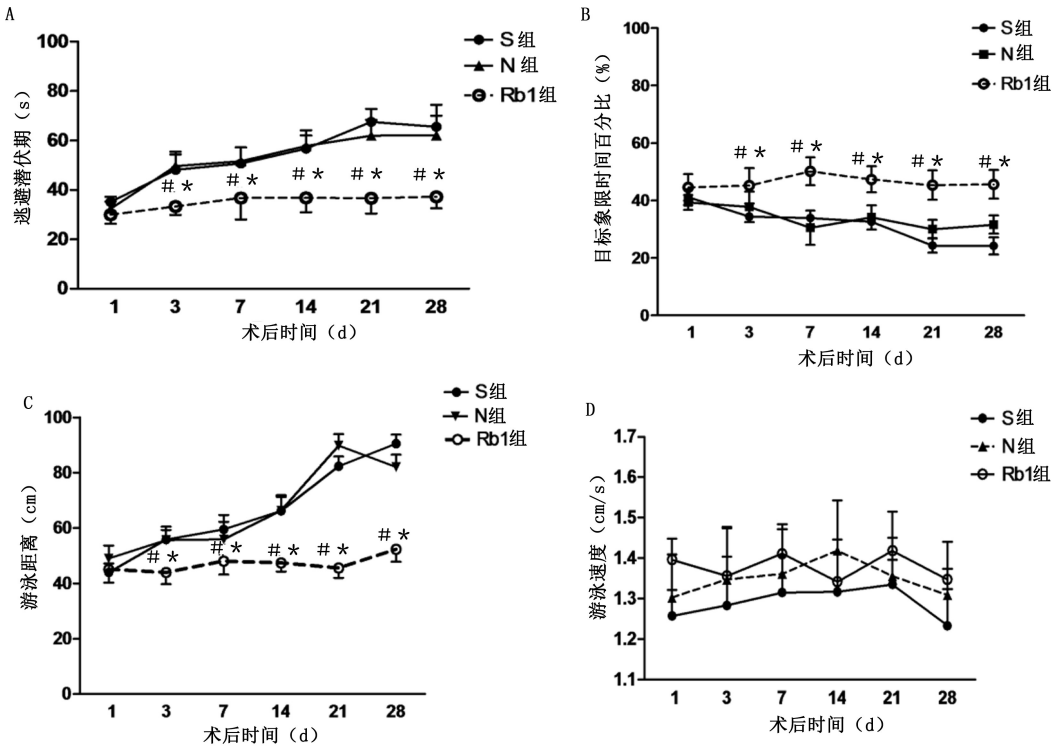
**1.6 尼氏染色** 腹腔注射戊巴比妥深度麻醉小鼠,迅速开胸暴露心脏,经左心室向主动脉插管,剪开右心房,甲醛 50 mL 经升主动脉快速冲洗,断头,液氮速冻组织切片(5  $\mu$ m)4  $^{\circ}$ C 丙酮固定 15 min,纯蒸水冲洗 3 次,每次 5 min,用 1%甲苯胺蓝水溶液置 50  $^{\circ}$ C 温箱中染色 30 min,纯蒸水冲洗 3 次,每次 5 min,95%乙醇迅速分化,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下观察拍照分析,并用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析尼氏体 IOD 值。

**1.7 Western Blot 检测** 在各时间点将小鼠麻醉后断头,冰上取海马组织,经 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗后,置于含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液(RIPA 裂解液)中裂解,离心后取上清液,部分上清液用于蛋白质浓度的测定(BCA 法测定),余上清液置 100  $^{\circ}$ C 煮沸变性结束后,上样行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、加一抗孵育过夜,HRP 标记二抗处理。ECL 发光液孵育、胶片曝光、显影、定影。用 BIO-RAD Quantity One 4.5.0 软件检测目的蛋白 PSD-95 的条带及内参  $\beta$ -actin 条带的灰度值,将目的蛋白灰度值和内参灰度值的比值作为目的蛋白表达的相对水平。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,Graphpad Prism 5 绘图。定量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,水迷宫实验数据采用多重测量的方差分析,尼氏小体 IOD 值及 Western Blot 结果比较采用两因素方差分析(two-ANOVA)比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 水迷宫实验结果** 与 Rb1 组比较,S 组和 N 组术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 平均逃避潜伏期延长( $P < 0.05$ );S 组和 N 组术后各时间点平均逃避潜伏期比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图 1A。与 Rb1 组比较,S 组和 N 组术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 目标象限时间百分比及游泳距离明显缩短( $P < 0.05$ ),详见图 1B、图 1C。各组之间小鼠游泳速度比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见图 1D。



与 S 组同时间点比较, #  $P < 0.05$ ; 与 N 组同时间点比较, \*  $P < 0.05$ 。  
图 1 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠术后水迷宫实验结果  
(A 为 3 组逃避潜伏期比较; B 为 3 组目标象限时间百分比比较;  
C 为 3 组游泳距离比较; D 为 3 组游泳速度比较)

2.2 尼氏染色结果 Rb1 组小鼠术后 7 d、14 d、21 d、28 d 海马 CA1 区神经细胞排列密集, 胞浆中尼氏体丰富; 与 Rb1 组比较, S 组和 N 组术后 21 d、28 d 神经

元尼氏小体部分溶解或消失, 胞浆着色变淡神经元细胞排列紊乱, 尼氏体表达明显减少, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见图 2、图 3。

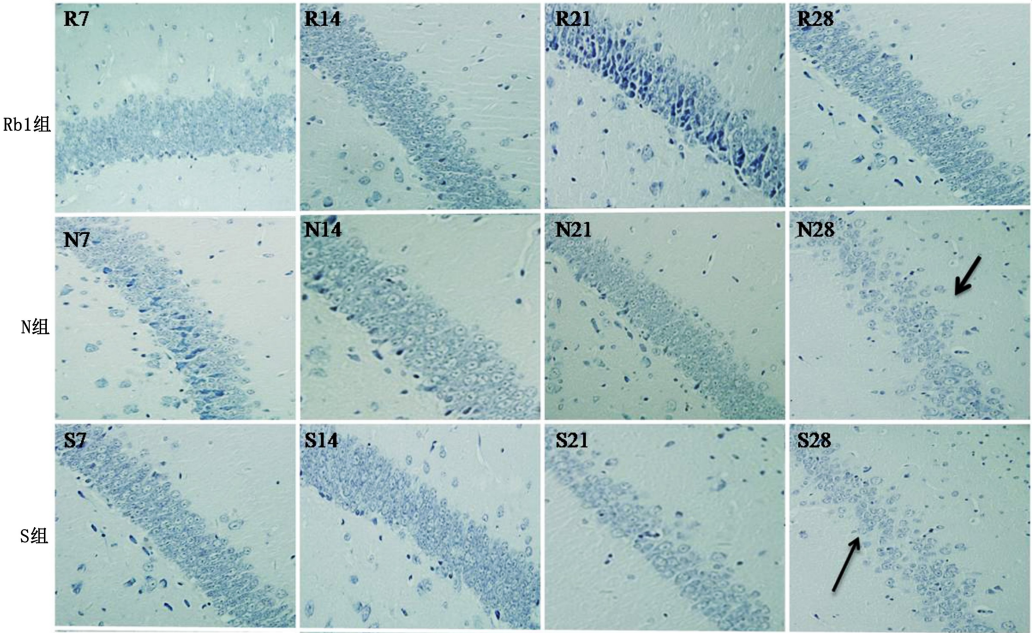


图 2 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠术后海马 CA1 区尼氏染色结果 ( $\times 400$ )  
(R7、R14、R21、R28 为人参皂苷 Rb1 组术后 7 d、14 d、21 d、28 d 海马 CA1 区神经元尼氏体的表达;  
N7、N14、N21、N28 为对照组术后 7 d、14 d、21 d、28 d 海马 CA1 区神经元尼氏体的表达;  
S7、S14、S21、S28 为手术组术后 7 d、14 d、21 d、28 d 海马 CA1 区神经元尼氏体的表达)



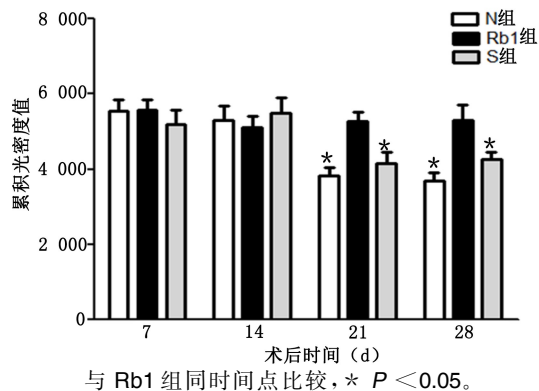
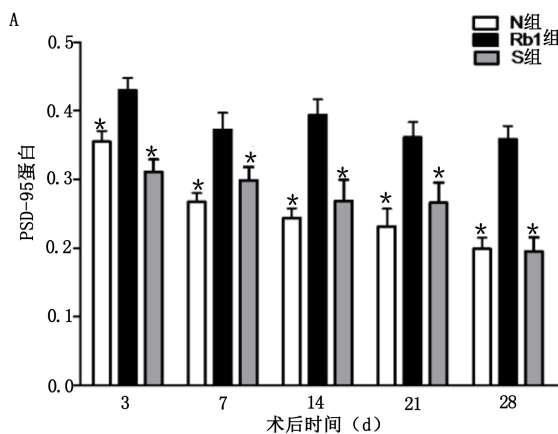


图3 3组CA1区尼氏体  
累积光密度值比较

2.3 Western Blot 检测 3 组 PSD-95 蛋白表达 与 Rb1 组比较,S 组和 N 组术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d PSD-95 蛋白表达逐渐降低,差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ );S 组和 N 组比较,术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d PSD-95 蛋白表达,差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。详见图 4。



与 Rb1 组同时间点比较,\*  $P < 0.05$ 。

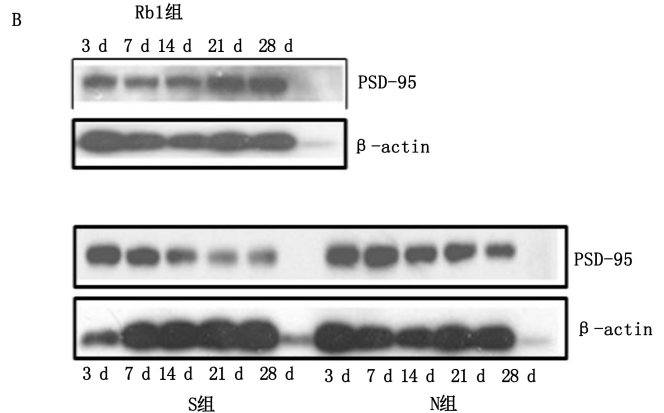


图4 APPswe/PS1dE9 双转基因小鼠术后海马内 PSD-95 蛋白的表达  
(A 为 3 组 PSD-95 蛋白表达柱状图;B 为 3 组 PSD-95 蛋白表达条带图)

### 3 讨论

β-淀粉样蛋白 (amyloid-β protein, Aβ) 的沉积,tau 蛋白高磷酸化是 AD 特征性病理改变。研究发现,手术创伤刺激引起的中枢神经系统炎性因子高表达可以诱发和加剧 Aβ 的异常聚集<sup>[5]</sup>。挥发性麻醉药物(异氟醚、地氟烷)通过上调 Aβ 前体蛋白切割酶 β 分泌酶 (BACE) 的活性,促进 Aβ 寡聚化进而诱导神经细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。围术期低温使神经元骨架蛋白 tau 蛋白过度磷酸化,造成神经元丢失,进而提示手术麻醉有可能是诱发和加剧 AD 高风险人群发病的潜在因素<sup>[8]</sup>。在本实验中,手术组及对照组 AD 模型小鼠术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 逃避潜伏期逐渐延长、目的象限时间百分比缩短,提示术后认知功能异常。人参皂苷是人参的生物活性成分之一,已发现大约有 50 多种,其中 Rb1 主要作用在中枢神经系统,对免疫细胞、细胞因子、一氧化氮、活性氧 (ROS) 等炎症介质均有抑制作用,通过多种途径不同环节在增强免疫力、活血、抗氧

化、延缓衰老等方面发挥着重要的药理作用<sup>[9-13]</sup>。研究发现,人参皂苷 Rb1 通过改变 β-淀粉样前体蛋白 (β-amyloid precursor protein, APP) 裂解途径,减少 Aβ 的生成,抑制 Aβ 诱导的神经毒性反应<sup>[14]</sup>;通过抑制细胞凋亡因子 Bax、Caspase-3 表达,激活抗细胞凋亡因子 Bcl-2,保护神经元细胞从而改善痴呆鼠的认知功能<sup>[2]</sup>。因此,从理论上讲,人参皂苷 Rb1 有可能成为治疗 AD 病人术后认知功能下降的潜在药物。既往研究显示,人参皂苷 Rb1 在 60 mg/kg 时可以有效改善老年鼠术后认知功能下降<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,与手术组及对照组同时间点比较,人参皂苷 Rb1 组小鼠术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 找到安全平台的逃避潜伏期明显缩短,提示通过围术期给药,人参皂苷 Rb1 可以改善 AD 模型小鼠术后的记忆功能。

学习记忆与海马内突触相关蛋白表达水平密切相关,PSD-95 位于突触后膜与 F-actin 骨架蛋白、神经递质受体和信号蛋白分子共同形成复合物参与突触后信

号的转导和整合<sup>[16]</sup>。因此,本实验采用 Western Blot 检测海马内 PSD-95 的表达水平,结果显示,与 Rb1 组比较,手术组及对照组术后 3 d、7 d、14 d、21 d、28 d PSD-95 蛋白条带密度逐渐变小变浅,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示人参皂甙 Rb1 在保护突触功能及防止突触丢失中起重要作用。

神经元尼氏小体是反映神经元功能变化的重要指标,当神经元功能受损时,尼氏小体会溶解甚至消失。研究发现,人参皂甙 Rb1 可以通过上调神经元周期蛋白 D1(Cyclin D1)表达、激活非磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)依赖的蛋白激酶 B(Akt)信号转导通路,进而保护神经元细胞的活性<sup>[17-18]</sup>。在本实验中,尼氏染色结果显示,人参皂甙 Rb1 组小鼠术后 7 d、14 d、21 d、28 d 海马 CA1 区神经元细胞排列密集、整齐,胞浆中尼氏体丰富,提示神经元活性功能正常,而手术组与对照组术后 21 d、28 d 小鼠海马 CA1 区神经元细胞排列紊乱,尼氏体表达减少。据此推测,人参皂甙 Rb1 通过诱导尼氏体的表达,进而维持神经元细胞形态和功能的稳定性。

综上所述,人参皂甙 Rb1 可能通过诱导突触相关蛋白 PSD-95 及神经元尼氏体的表达,改善突触结构,保护神经元活性,提高 AD 模型小鼠术后学习记忆能力。

参考文献:

[1] YE J,YAO J P,WANG X,*et al.* Neuroprotective effects of ginsenosides on neural progenitor cells against oxidative injury[J].Molecular Medicine Reports,2016,13(4):3083-3091.

[2] WANG Y R,LI Y,YANG W,*et al.* Ginsenoside Rb1 inhibit apoptosis in rat model of Alzheimer's disease induced by A $\beta$ 1-40[J].American Journal of Translational Research,2018,10(3):796-805.

[3] SCHENNING K J,MURCHISON C F,MATTEK N C,*et al.* Surgery is associated with ventricular enlargement as well as cognitive and functional decline[J].Alzheimer's & Dementia,2016,12(5):590-597.

[4] INOUE S K,MARCANTONIO E R,KOSAR C M,*et al.* The short-term and long-term relationship between delirium and cognitive trajectory in older surgical patients[J].Alzheimer's & Dementia,2016,12(7):766-775.

[5] TANG J X,MARDINI F,JANIK L S,*et al.* Modulation of murine Alzheimer pathogenesis and behavior by surgery[J].Annals of Surgery,2013,257(3):439-448.

[6] MIAO H H,DONG Y L,ZHANG Y Y,*et al.* Anesthetic isoflurane or desflurane plus surgery differently affects cognitive function in

Alzheimer's disease transgenic mice[J].Molecular Neurobiology,2018,55(7):5623-5638.

[7] JIANG J,JIANG H.Effect of the inhaled anesthetics isoflurane, sevoflurane and desflurane on the neuropathogenesis of Alzheimer's disease(review)[J].Molecular Medicine Reports,2015,12(1):3-12.

[8] TOURNISSAC M,VANDAL M,FRANÇOIS A,*et al.* Old age potentiates cold-induced tau phosphorylation:linking thermoregulatory deficit with Alzheimer's disease[J].Neurobiology of Aging,2017,50(9):25-29.

[9] 周彬,吴琳,凌叶盛,等.人参皂苷 Rb1 通过抑制 NF- $\kappa$ B p65 介导的炎症和氧化应激改善内皮细胞复制性衰老[J].中山大学学报(医学版),2018,39(6):835-843.

[10] LU S,ZHANG Y B,LI H J,*et al.* Ginsenoside Rb1 can ameliorate the key inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 in a cancer Cachexia mouse model[J].BMC Complementary Medicine and Therapies,2020,20(1):1-9.

[11] ZU G,GUO J,CHE N W,*et al.* Protective effects of ginsenoside Rg1 on intestinal ischemia/reperfusion injury-induced oxidative stress and apoptosis via activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J].Scientific Reports,2016.DOI:10.1038/srep38480.

[12] CHENG Z K,ZHANG M,LING C L,*et al.* Neuroprotective effects of ginsenosides against cerebral ischemia[J].Molecules,2019,24(6):1102.

[13] JANG M,LEE M J,CHOI J H,*et al.* Ginsenoside Rb1 attenuates acute inflammatory nociception by inhibition of neuronal ERK phosphorylation by regulation of the Nrf2 and NF- $\kappa$ B pathways[J].The Journal of Pain,2016,17(3):282-297.

[14] LIN J W,GAO S Y,WANG T Q,*et al.* Ginsenoside Rb1 improves learning and memory ability through its anti-inflammatory effect in A $\beta$ 1-40 induced Alzheimer's disease of rats [J].American Journal of Translational Research,2019,11(5):2955-2968.

[15] MIAO H H,ZHANG Y,DING G N,*et al.* Ginsenoside Rb1 attenuates isoflurane/surgery-induced cognitive dysfunction via inhibiting neuroinflammation and oxidative stress[J].Biomedical and Environmental Sciences,2017,30(5):363-372.

[16] HUNT C A,SCHENKER L J,KENNEDY M B.PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses[J].The Journal of Neuroscience,1996,16(4):1380-1388.

[17] 张璟璇,袁美春,李海霞,等.人参皂苷 Rb1 对氧-糖剥夺诱导的大鼠原代皮层神经元损伤的保护作用[J].中成药,2019,41(10):2339-2344.

[18] 曹梦园,赵月鸣,张晶,等.人参皂苷 Rb1 对 A $\beta$ 25-35 诱导痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J].中国现代医学杂志,2015,25(35):33-36.

(收稿日期:2020-10-09)

(本文编辑 邹丽)