

人参皂甙 Rb1 对老年性痴呆模型大鼠顶叶皮质 β -分泌酶及早老蛋白-1 表达的影响^{*}

方欣 杨吉平 赖红[△]

(中国医科大学基础医学院解剖学教研室, 沈阳 110001)

摘要 目的:探讨人参皂甙 Rb1 对老年性痴呆模型大鼠顶叶皮质 β -分泌酶及早老蛋白-1(PS-1)表达水平的影响。方法:30 只 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组。模型组大鼠胃饲氯化铝 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 同时腹腔注射 D-半乳糖 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 治疗组大鼠于造模结束后, 腹腔注射人参皂甙 Rb1 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。采用免疫组织化学方法和图像分析技术检测 β -分泌酶及 PS-1 的表达, 通过 Morris 水迷宫测试观察大鼠学习记忆能力的改变。结果:与对照组比较, 模型组 β -分泌酶及 PS-1 的表达明显增多, 学习记忆能力明显下降; 与模型组相比, 治疗组 β -分泌酶及 PS-1 的表达明显减少, 学习记忆能力在第 2 天及第 3 天显著提高。结论:人参皂甙 Rb1 可以抑制 β -分泌酶及 PS-1 的表达, 对老年性痴呆模型大鼠有一定的防治作用。

关键词 大脑皮质; β -分泌酶; 早老蛋白-1; 人参皂甙 Rb1; 阿尔茨海默病

Effect of ginsenoside Rb1 on expression of β -secretase and presenilin-1 in the parietal lobe of Alzheimer disease-like rat^{*}

Fang Xin, Yang Jiping, Lai Hong[△]

(Department of Anatomy, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of ginsenoside Rb1 on the expression of β -secretase and presenilin-1 (PS-1) in the parietal lobe of Alzheimer disease-like rats. **Methods:** Thirty SD rats were randomly divided into a control group, a model group and a treatment group. The model rats were established with administration of D-galactose $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ and aluminum chloride $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 2 months, the control group were given the same dose of sodium chloride, and treatment group were given ginsenoside Rb1 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 4 weeks after the model rats were established. The expressions of β -secretase and PS-1 in the parietal lobe were detected by immunohistochemistry with image analysis. Morris test was used to determine the ability of learning and memory. **Results:** Compared with the control group, the levels of β -secretase and PS-1 were significantly higher in the model group ($P < 0.05$), and learning and recognition ability in this group was obviously worse ($P < 0.05$); Compared with the model group, the levels of β -secretase and PS-1 were significantly lower in the treatment group ($P < 0.05$), and learning and recognition ability in this group was better. The learning and recognition ability was obviously improved on the second and the third day ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ginsenoside Rb1 has preventive and therapeutic effect on Alzheimer disease-like rats, via inhibiting the expression of β -secretase and PS-1.

Key words cerebral cortex; β -secretase; presenilin-1; ginsenoside Rb1; Alzheimer disease

阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的主要病理特征之一是神经元间形成大量的以淀粉样蛋白(amyloid protein β , A β)为主的老年斑(senile plaque, SP)。A β 的过量产生和聚集是 AD 发病机制中的始发因素和关键环节^[1], 是 AD 发生发展的共同通路。A β 产生过程中的两个关键酶是 β 及 γ -分泌酶。 β -分泌酶基因剔除的小鼠, 大脑 A β 表达显著降低, 动物发育正常, 其组织形态、脑组织化学、血/尿成分、行为及神经

肌肉等与野生型幼鼠无明显差异^[2], 因此 β -分泌酶是开发 AD 治疗药物的一个理想靶点。早老蛋白-1(Presenilin-1, PS1)是 A β 产生的另一个关键酶 γ -分泌酶的活性中心。敲除编码 PS1 基因的小鼠, γ -分泌酶活性降低 80%, A β 含量大大降低^[3], 因此 PS1 是防治 AD 另一个很有潜力的靶点。人参皂甙(ginsenoside, GS) Rb1 在 AD 中作用如何, 国内未见报道。本实验采用氯化铝联合 D-半乳糖的方法^[4]建立 AD 动物模型, 观察人参皂甙 Rb1 对顶叶皮层 β -分泌酶及 PS1 的影响, 以探讨药物的效果及作用机制。

^{*} 辽宁省自然科学基金(20062088)

第 1 作者 E-mail: simabeinan@yahoo.com.cn

[△] 通讯作者, E-mail: laihong88@126.com

收稿日期: 2007-11-20; 修回日期: 2008-04-17

1 材料和方法

1.1 动物及分组

选用相同环境下饲养的 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 30 只,鼠龄 12 个月,体质量 250 g 左右(中国医科大学实验动物中心提供)。将大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,每组 10 只。

1.2 药品与试剂

D-半乳糖(购自北京化学试剂公司);人参皂甙 Rb1(购自大连富生制药有限公司,纯度为 60%),实验时采用生理盐水溶解,浓度为 0.8 mg/ml, -4℃ 保存;β-分泌酶抗体、PS-1 抗体购自北京博奥森生物科技有限公司;Aβ₁₋₄₀ 抗体购自武汉博士德公司。

1.3 模型制作及给药

模型组及治疗组腹腔注射 D-半乳糖 60 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,同时胃饲 AlCl₃ 水溶液 200 mg · kg⁻¹ · d⁻¹,连续给药 2 月。对照组每日腹腔注射与模型组剂量相同的生理盐水,同时模型组胃饲剂量相同的蒸馏水。治疗组造模结束后 1 d 开始腹腔注射人参皂甙 Rb1 (10 μg · kg⁻¹ · d⁻¹),连续给药 4 周。

1.4 标本的收集

大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 0.45 g/kg 麻醉,开胸,经升主动脉相继灌注生理盐水 150 ml,4% 多聚甲醛灌注固定,持续 30 min 以上。断头取脑,置于新配 4% 多聚甲醛中后固定。石蜡切片,片厚 7 μm,切片贴到经多聚赖氨酸处理过的玻璃片上,4℃ 保存备用。

1.5 免疫组织化学显色

切片常规脱蜡至水。3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min 灭活内源性酶,蒸馏水洗 3 次后按照武汉博士德公司提供的即用型 SABC 免疫组织化学显色试剂盒步骤进行免疫组织化学显色,DAB 显色、苏木精复染,常规脱水、透明,中性树胶封固,摄片。三种抗体浓度均为 1 : 300。对照实验采用空白对照,结果为阴性。

1.6 显微镜观察

采用 Leica 摄像显微镜观察并照相。免疫阳性细胞在光镜下可见胞质或突起内有棕黄色颗粒,计数每张切片 4 个,随机高倍视野中阳性细胞数及 D 值后取平均值作为计数结果,随机 10 张切片计数结果取平均值为最后结果。

1.7 行为学检测

所有动物于处死前 5 d 进行 Morris 水迷宫行为测试,用于测试大鼠对水迷宫学习和记忆的获取能力。实验共经历 5 d,第 1 日将大鼠放入水池(不含平台)自由泳 2 min,让其熟悉水迷宫环境。之后每天分上、下午 2 个时间段,每段分别训练 4 次。训练开始时,将平台置于 SW 象限,每个时间段分别从池壁 4 个起始点将大鼠面向池壁放入水池,记录每次找到平台的时间(逃避潜伏期)和游泳路径。如大鼠 120 s 内找不到平台,

由实验者将其引上平台,潜伏期为 120 s,每次间隔 4 min 让大鼠休息,再进行下次实验。

1.8 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS13.0 软件包进行处理,组间差异采用方差分析。

2 结果

2.1 Aβ、β-分泌酶、PS-1 的免疫组织化学显色

对照组大鼠皮层内有少量的 Aβ、β-分泌酶、PS-1 阳性染色神经元;而模型组大鼠皮层内 Aβ、β-分泌酶、PS-1 阳性染色神经元数目均比对照组明显增加,胞体聚集,染色较深,大量棕黄色或棕褐色阳性颗粒位于神经元的胞质,突起及其分支、胞核不着色;治疗组上述各种抗体的染色结果与对照组接近(图 1~3)。

模型组和治疗组大鼠顶叶阳性标记细胞数目除治疗组的早老蛋白-1 外,与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1),蛋白含量比较,除治疗组的 β-分泌酶外,与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1 大鼠顶叶内阳性细胞数目比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Statistical results of positive neurons in the parietal lobe of rat ($\bar{x} \pm s$)

Group	Aβ ₁₋₄₀	β-secretase	PS-1
Control	9.25 ± 2.18	10.34 ± 3.22	8.34 ± 2.24
Model	30.32 ± 10.56*	29.33 ± 12.89*	28.43 ± 11.98*
Treatment	8.92 ± 3.09 ^Δ	9.88 ± 2.98 ^Δ	12.54 ± 3.09

* $P < 0.05$ vs control; ^Δ $P < 0.05$ vs model

表 2 大鼠顶叶内各种蛋白含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, D 值)

Tab 2 Comparison of proteins expressions in the parietal lobe of rat ($\bar{x} \pm s$, D)

Group	Aβ	β-secretase	PS-1
Control	0.166 ± 0.003	0.157 ± 0.003	0.159 ± 0.008
Model	0.238 ± 0.001*	0.234 ± 0.007*	0.227 ± 0.005*
Treatment	0.175 ± 0.003 ^Δ	0.228 ± 0.004	0.170 ± 0.004 ^Δ

* $P < 0.05$ vs control; ^Δ $P < 0.05$ vs model

2.2 Morris 水迷宫学习记忆能力检测结果

大鼠在 Morris 水迷宫中定向航行试验,各组平均逃避潜伏期日渐缩短。从第 2 日开始,模型组与对照组比较,平均逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.05$);治疗组与模型组比较,平均逃避潜伏期在第 2 日及第 3 日有明显缩短, ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 各组大鼠学习记忆能力测试结果 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Results of learning and memory test in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	2 d	3 d	4 d	5 d
Control	39.89 ± 7.58	16.15 ± 1.20	10.94 ± 7.10	9.05 ± 2.40
Model	65.17 ± 11.41*	41.27 ± 1.18*	19.20 ± 5.98*	17.45 ± 2.35*
Treatment	54.39 ± 20.02 ^Δ	24.48 ± 9.59 ^Δ	14.74 ± 4.04	13.93 ± 3.44

* $P < 0.05$ vs control; ^Δ $P < 0.05$ vs model

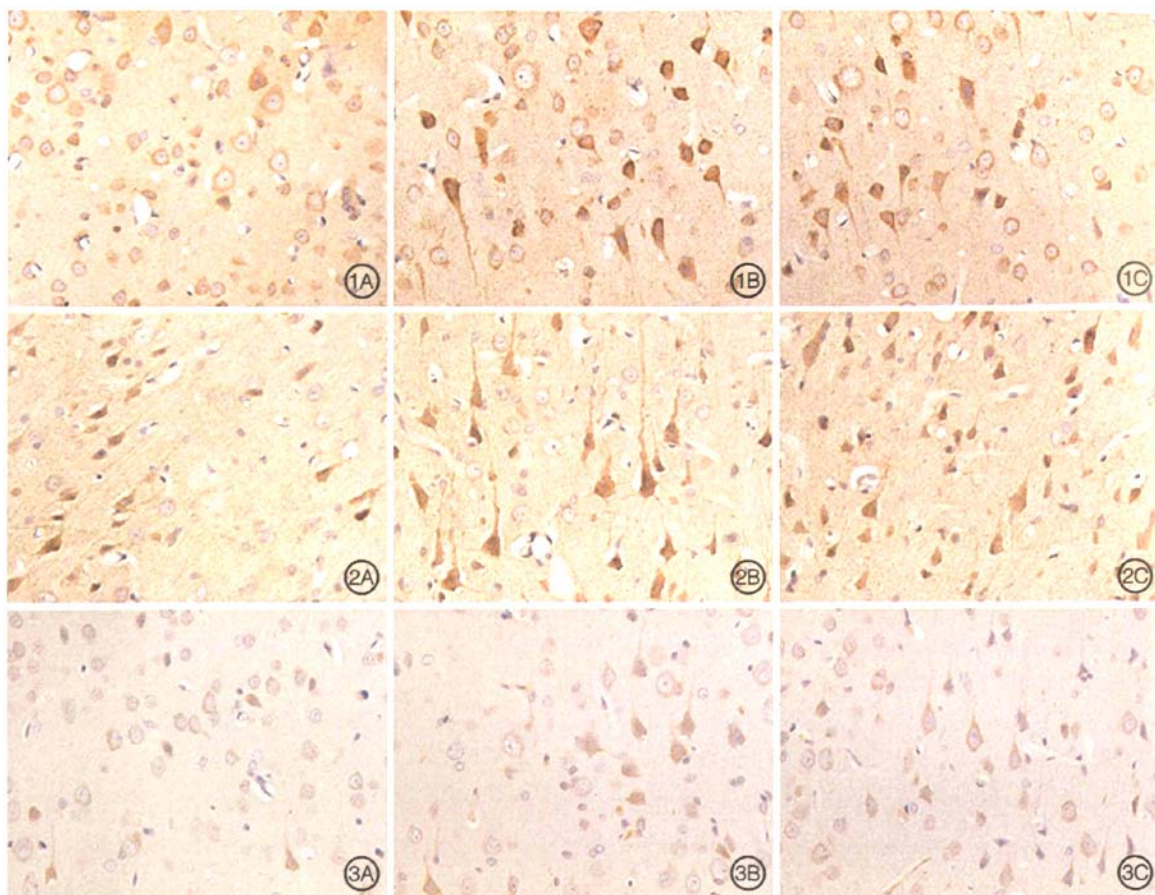


图 1 大鼠顶叶皮层神经元的 A β 表达,免疫组织化学显色,×400。A:对照组;B:模型组;C:治疗组。

图 2 大鼠顶叶皮层神经元的 β -分泌酶表达,免疫组织化学显色,×400。A:对照组;B:模型组;C:治疗组。

图 3 大鼠顶叶皮层神经元的 PS-1 表达,免疫组织化学显色,×400。A:对照组;B:模型组;C:治疗组。

Fig 1 A β expression in parietal lobe, immunohistochemistry staining, ×400. A: Control group; B: Model group; C: Treatment group.

Fig 2 β -secretase expression in parietal lobe, immunohistochemistry staining, ×400. A: Control group; B: Model group; C: Treatment group.

Fig 3 PS-1 expression in parietal lobe, immunohistochemistry staining, ×400. A: Control group; B: Model group; C: Treatment group.

3 讨论

A β 是由 β -淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor protein, APP) 经 β 、 γ -分泌酶作用产生的。APP 还可以经 α -分泌酶作用产生可溶性的 SAPP- α 和 CTF α , 此途径可以阻止 A β 的形成和沉积^[5]。正常情况下这两种途径之间保持着一定的平衡, β 级联假说^[6]认为当环境或基因突变导致 APP 代谢异常时,APP 多经 β 、 γ -分泌酶途径产生大量具有神经毒性作用的 A β ;各种原因引起 β 和 γ -分泌酶含量增多或活性过高,就会导致过多的 A β 产生,因此抑制 β 、 γ -分泌酶已成为治疗 AD 非常有潜力的靶点^[7-9],其抑制剂的应用为 AD 的治疗提供了有效的途径^[8-9]。国外已有应用 β 、 γ -分泌酶抑制剂的报道^[10]。Siman 等^[11]认为早老蛋白-1 本身就是 γ -分泌酶,或者是组成 γ -分泌酶复合物的主要部分。

本实验结果显示,与对照组相比,模型组大鼠顶叶皮层内 A β 、 β -分泌酶与 PS-1 表达均明显增高,平均逃避潜伏期也明显延长。A β 的产生与 β -分泌酶与 PS-1 表达相关的一致性以及行为学检测结果的一致性都说明,A β 的异常分泌可能是通过 β -分泌酶与 PS-1 的大量表达而实现的,这与 AD 脑的病理改变有一定的相似性,因此本实验制作的 AD 模型可作为 AD 理想动物实验模型,本实验检测的各组 A β 、 β -分泌酶与 PS-1 表达等指标可作为观察药物治疗 AD 的理想指标。

人参是我国传统的益智药物。近年来,国内外均有人参能够易化学习记忆及改善动物学习记忆障碍的报道。人参的有效活性成分人参皂甙能明显地增强人的记忆力、辨别力,对老年人的大脑与神经系统有良好的改善作用^[12],可以通过抑制炎症细胞因子的表达而减少对神经元的损伤^[13]。已有报道表明,人参皂甙 Rb1 可以通过促进乙酰胆碱 (ACh) 释放、增加神经末

稍摄取 ACh 而改善记忆^[14],并可促进神经元突起再生,增强神经元抗损伤与凋亡的能力^[15-16]。但在较长期给予的情况下,Rb1 能否改善 AD 动物的脑损伤,进而改善其记忆功能,迄今未见有关报道。本实验结果显示,应用人参皂甙 Rb1 后,AD 大鼠皮层神经元中 β -分泌酶与 PS-1 水平明显下降,A β 的异常表达明显减少,AD 大鼠学习记忆能力明显提高。提示人参皂甙 Rb1 可能通过抑制分泌酶的表达而达到减少 A β 的产生,提高模型大鼠的学习记忆能力的作用。然而,人参皂甙 Rb1 究竟是通过何种机制,在分泌酶的基因表达、转录,还是翻译过程中抑制了其活性还不清楚,需要做进一步的实验研究。

参考文献

- [1] Wirths O, Multhaup G, Bayer T A. A modified beta-amyloid hypothesis: intraneuronal accumulation of the beta-amyloid peptide-the first step of a fatal cascade [J]. *J Neurochem*, 2004,91(3):513-520.
- [2] Robers S L, Anderson J, Basi G, et al. BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain; implications for Alzheimer's disease therapeutics [J]. *Hum Mol Genet*, 2001,10(12):1317-1324.
- [3] Zohar O, Cavallaro S, D'Agata V, et al. Quantification and distribution of beta-secretase alternative splice variants in the rat and human brain [J]. *Mol Brain Res*, 2003,115:63-68.
- [4] 罗焕敏,肖飞. D-半乳糖和三氯化铝诱导小鼠产生类阿尔茨海默病变[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2004,18(1):22-26.
- [5] Kuramer C, Wehner S, Quast T, et al. Expression and potential function of beta-amyloid precursor proteins during cutaneous wound repair [J]. *Exp Cell Res*, 2002,280(2):222-232.
- [6] 陈生弟. 神经病学[M]. 第 18 卷. 北京:人民军医出版社,2002; 262-269.
- [7] 杨红旗,陈生弟. α 分泌酶在阿尔茨海默病治疗中的作用[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2006,33(2):109-115.
- [8] 董炜疆,冯改丰. β 分泌酶-治疗阿尔茨海默病的靶点[J]. *分子生物医学*, 2005,11(10):865-867.
- [9] 郇浩,姜凤超. γ -分泌酶抑制剂研究进展[J]. *化学进展*, 2006,18(2):356-362.
- [10] Yang F, Lim G P, Begum A N, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2005,280(7):5892-5901.
- [11] Siman R, Velji J. Subunit composition of γ -secretase and effect of mutant presenilin-1 [J]. *Neurobiol Aging*, 2002,25(1):177-181.
- [12] Johnson D A, Zamboni N J, Gibbs R B, et al. Selective lesion of cholinergic neurons in the medial septum by 192 IGG-SAPORIN impairs learning in a delayed matching to position T-maze paradigm [J]. *Brain Res*, 2002,943(1):132-141.
- [13] 李玮,李林,褚燕琦,等. 人参皂苷对 A β 诱导单核细胞培养上清液致神经细胞损伤的影响[J]. *中国药理学杂志*, 2007,42(21):1626-1628.
- [14] Benishin C G, Lee R, Wang L C, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on central cholinergic metabolism [J]. *Pharmacology*, 1991, 42(4):223-229.
- [15] Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro [J]. *Exp Neurol*, 2002,173(2):224-234.
- [16] Rudakewich M, Ba F, Benishin C G. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenosides Rb1 and Rg1 [J]. *Planta Med*, 2001,67(6):533-537.

(编辑:王 栋)

(上接 778 页)

- [2] Friedman S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver [J]. *Physiol Rev*, 2008,88(1): 125-172.
- [3] Yu Y, Yao A H, Chen N, et al. Mesenchymal stem cells over expressing hepatocyte growth factor improve small-for-size liver grafts regeneration [J]. *Mol Ther*, 2007,15(7):1382-1389.
- [4] Kim W, Matsumoto K, Bessho K, et al. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis [J]. *Am J Pathol*, 2005,166(4):1017-1028.
- [5] Cramer T, Schuppan D, Bauer M, et al. Hepatocyte growth factor and c-Met expression in rat and human liver fibrosis [J]. *Liver Int*, 2004,24(4):335-344.
- [6] 刘平,高云华. 肝纤维化动物模型的建立[J]. *世界华人消化杂志*, 2002,10(6):693-695.
- [7] Qiu J F, Zhang Z Q, Chen W, et al. Cystamine ameliorates liver fibrosis induced by carbon tetrachloride via inhibition of tissue transglutaminase [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(32): 4328-4332.
- [8] 郭跃华,于小舫,于会群. 围手术期肠内免疫营养对肝硬化肝切除大鼠肝再生的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2007,16(3):258-260.
- [9] Goss J A, Mangino M J, Callerg M P, et al. Prostaglandin E2 down regulates kuffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration [J]. *Am J Physiol*, 1993, 264 (4 Pt1): G601-G608.
- [10] 徐洪雨,李宝杰,王瑞峰,等. Notch/Jagged 信号在肝部分切除后肝再生中的表达[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2007,16(5):465-467.
- [11] Kanzler S, Teufel A, Galle PR. Liver function test to predict hepatic failure after liver resection-expensive and without clinical relevance [J]. *Zentralbl Chir*, 2007,132(4):267-273.
- [12] Colakoglu T, Keskek M, Colakoglu S, et al. Serum endostatin levels and regenerative capacities of normal and cirrhotic livers following partial hepatectomy in mice: the response to different resection sizes [J]. *J Surg Res*, 2007,143(2):337-343.
- [13] 李俊生,嵇振岭. 肝硬化大鼠肝切除术后肝重量与功能恢复的研究[J]. *南京铁道医学院学报*, 2000,19(2):85-87.
- [14] Herrmann J, Haas U, Gressner A M, et al. TGF-beta up-regulates serum response factor in activated hepatic stellate cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007,1772(11-12):1250-1257.
- [15] Huh G, Factor M, Sanchez A, et al. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004,101(13):4477-4482.
- [16] 赵峰,徐文,陈栋,等. 肝硬化大鼠部分肝切除后 TGF-和 C-met 蛋白在肝脏中的表达及其意义[J]. *中国现代普通外科进展*, 2002,5(3):165-168.

(编辑:冀凯宏)