

## 人参皂甙 Rb1 对 AD 大鼠顶叶皮质 $\beta$ -分泌酶及 PS-1 表达的影响

方欣 杨吉平 高旭红 李兆圣 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 AD 大鼠顶叶皮质  $\beta$ -分泌酶及 PS-1 表达的影响。方法 30 只健康雄性 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同时腹腔注射 D-半乳糖 2 个月, 对照组大鼠给予等剂量生理盐水, 治疗组大鼠于造模结束后腹腔注射人参皂甙 Rb1 4 周。采用刚果红染色法观察老年斑, 镀银染色法观察神经原纤维缠结, Western blot 方法、免疫组化方法和图像分析技术对  $\beta$ -分泌酶及 PS-1 的表达进行检测。结果 模型组与对照组相比有明显的老年斑及神经原纤维缠结形成,  $\beta$ -分泌酶及 PS-1 的表达增多 ( $P < 0.01$ ); 治疗组老年斑及神经原纤维缠结数量减少,  $\beta$ -分泌酶及 PS-1 的表达与模型组相比明显减少 ( $P < 0.05$ )。结论 AD 模型大鼠顶叶皮质神经元  $\beta$ -分泌酶及 PS-1 表达水平明显上调, 人参皂甙 Rb1 可明显改善模型动物上述蛋白的异常表达, 对神经元具有明显保护和营养作用。

**〔关键词〕**  $\beta$ -淀粉样肽;  $\beta$ -分泌酶; 早老素蛋白-1; 人参皂甙 Rb1; 阿尔茨海默病

**〔中图分类号〕** R332.81 **〔文献标识码〕** A **DOI:** 10.3870/zgzzhx.2008.05.012

### EFFECT OF GINSENOSE Rb1 ON $\beta$ -SECRETASE AND PS-1 IN PARIETAL LOBE OF AD MODEL RATS

Fang Xin, Yang Jiping, Gao Xuhong, Li Zhaosheng, Lai Hong\*

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

**〔Abstract〕** Objective To investigate the effect of ginsenoside Rb1 on  $\beta$ -secretase and PS-1 in the parietal lobe of Alzheimer disease-like rats. Methods 30 SD rats were randomly divided into the control group, model group and treatment group. The model was built with administration of D-galactose and aluminum chloride for 2 months, the control group was given the same dose of sodium chloride, and the treatment group was given ginsenoside Rb1 for 4 weeks after the model was built. Congo red staining was used to observe senile plaques, silver impregnation method was used to observe neurofibrillary tangle, and the expression of  $\beta$ -secretase and PS-1 was detected by Western blot and immunohistochemistry with image analysis. Results Compared with the control group, senior plague (SP) and neurofibrillary tangle were clear to be seen in the model group, and the levels of  $\beta$ -secretase and PS-1 were significantly higher ( $P < 0.01$ ). Compared with those in the model group, SP and neurofibrillary tangle were unclear in the treatment group, and the levels of  $\beta$ -secretase and PS-1 were significantly lower ( $P < 0.05$ ). Conclusion The expression of  $\beta$ -secretase and PS-1 are increased in the parietal lobe of Alzheimer disease-like rats, but ginsenoside Rb1 normalizes the expression and protects neurons.

**〔Key words〕**  $\beta$ -Amyloid;  $\beta$ -Secretase; Presenilin-1; Ginsenoside Rb1;  
Alzheimer disease

人参皂甙 (ginsenoside, GS) 是人参的主要活

性成分, 目前为止已确定结构的皂甙单体至少在 40 种以上<sup>[1]</sup>。迄今已有大量关于人参皂甙 Rb1 促智抗痴呆的报道, 但人参皂甙 Rb1 对阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 大鼠顶叶皮质与 A $\beta$  产生有关的分泌酶, 即  $\beta$ -分泌酶及早老素蛋白-1 (presenilin-1, PS-1) 作用方面的报道尚少。因此,

〔收稿日期〕 2007-11-22 〔修回日期〕 2008-01-30

〔基金项目〕 辽宁省自然科学基金 (20062088) 辽宁省教育厅基金 (051511)

〔作者简介〕 方欣, 女 (1982 年), 汉族, 在读硕士生。

\* 通讯作者 (To whom correspondence should be addressed)

本实验拟采用氯化铝联合D-半乳糖<sup>[2]</sup>的方法建立AD动物模型,观察人参皂甙Rb1对大鼠顶叶皮质 $\beta$ -分泌酶及PS-1的影响,进而为人参皂甙Rb1对老年性痴呆的临床预防和治疗提供可靠的实验依据。

## 材料和方法

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,体重在250克左右,中国医科大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(辽)2003-0013。将大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,每组10只。

2. 药品与试剂 D-半乳糖(国药集团化学试剂有限公司);人参皂甙Rb1(中国药品生物制品检定所,批号110704-20318),实验时采用生理盐水溶解,浓度为0.8 mg/ml, -4℃保存;三氯化铝( $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )(沈阳第一试剂厂); $\text{A}\beta_{1-40}$ 抗体和SABC免疫组化试剂盒(武汉博士德公司); $\beta$ -分泌酶抗体,PS-1抗体(北京博奥森生物科技有限公司)。

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/d,同时胃饲 $\text{AlCl}_3$ 水溶液200 mg/kg/d,连续给药2个月。对照组每日腹腔注射与模型组剂量相同的生理盐水,同时胃饲与模型组剂量相同的蒸馏水。治疗组造模结束后1 d开始腹腔注射人参皂甙Rb1(10  $\mu\text{g}$ /kg/d),连续给药4周。

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,经升主动脉相继快灌生理盐水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。常规石蜡切片制备,片厚7  $\mu\text{m}$ ,切片贴到经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,进行镀银染色,刚果红染色及免疫组化染色。

5. 刚果红染色 切片常规脱蜡至水。苏木素染色液浸染2 min,0.5%盐酸乙醇液分化10 s,自来水冲洗后,蒸馏水洗2次。刚果红染色液中浸染25 min,无水乙醇脱水3 min  $\times$  2次,二甲苯透明,中性树胶封固。

6. 镀银染色方法 组织切片经脱蜡、逐级乙醇脱水及水洗后,于37℃温箱内用质量分数为20%的硝酸银水溶液避光浸染60 min,随后氨银溶液内5-8 min,载玻片用滤纸吸干后,入10%酒石酸钾水溶液内,以颜色变成黄褐色为度。水洗后

入1%醋酸内1 min。水洗2-3次,入5%的硫代硫酸钠水溶液固定5-10 min。常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

7. 免疫组织化学染色 切片常规脱蜡至水。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育5-10 min以灭活内源性酶,蒸馏水洗3次后按照武汉博士德公司提供的即用型SABC免疫组化染色试剂盒步骤进行免疫组织化学染色,DAB呈色、苏木素复染,常规脱水、透明,中性树胶封固,摄片。

8. Western blot 各组给药结束后,将大鼠断头取脑,剥离大脑皮层称重后加入组织裂解液(50 mmol/L、pH 7.4 三羟甲基氨基甲烷10 ml、10 mg/ml 苯甲基磺酰氟0.1 ml、10 mg/ml 亮抑制肽0.002 ml)进行组织匀浆;以11000 r/min离心30 min,取上清液分装,于-20℃冻存备用;采用Lowry法进行蛋白定量分析;按照“分子克隆(第二版)”方法,进行凝胶转移电泳,检测 $\beta$ -分泌酶及PS-1,第一抗体稀释度均为1:400;碱性磷酸酶偶联抗大鼠IgG按1:2000稀释;用DAB显色系统显色。

9. 图像分析及统计学分析 测定Western blot结果图像扫描后各条带的平均光密度(OD)值及免疫组化结果阳性细胞OD值。所有数据均以均数 $\pm$ 标准差表示,采用SPSS13.0软件包进行处理,组间差异采用方差分析。

## 结 果

1. 老年斑的刚果红染色 对照组大鼠顶叶皮层仅见少量橘红色斑块(图1);模型组可见大量斑块,染色较深,数量较多,分布密集(图2);治疗组有少量的斑块(图3)。

2. 神经原纤维的镀银染色 对照组大鼠顶叶皮层神经原纤维排列规则,染色较浅(图4);模型组背景淡棕色,细胞萎缩变形,可见大量神经原纤维缠结,位于神经元胞浆及轴突起始处,走行紊乱,呈棕黑色(图5);治疗组神经元染色较浅,损伤减轻,神经元突起保留较完整,神经原纤维排列增粗、紊乱减轻(图6)。

3. 免疫组化染色 对照组大鼠皮层内有少量的 $\text{A}\beta$ 、 $\beta$ -分泌酶、PS-1阳性染色神经元;而模型组大鼠皮层内 $\text{A}\beta$ 、 $\beta$ -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颗粒阳性颗粒位于神经元的胞浆,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7—图15）。

三组大鼠顶叶阳性标记细胞数目比较见表1，各组蛋白OD值比较见表2。

4. Western blot Western blot结果显示，在相对分子质量为55KD处有一组晰的β-分泌酶条带

（图16），在相对分子质量为51KD处有一组清晰的PS-1条带（图17）。模型组顶叶β-分泌酶、PS-1的表达较对照组明显增多（ $P<0.05$ ），治疗组β-分泌酶、PS-1的表达较模型组明显减少（ $P<0.01$ ）（表3）。



图16 对照组（A）、模型组（B）和治疗组（C）大鼠顶叶皮质β-分泌酶的表达水平

Fig. 16 Expressions of β-secretase in rat parietal lobe of control group (A), model group (B) and treatment group (C).



图17 对照组（A）、模型组（B）和治疗组（C）大鼠顶叶皮质PS-1表达水平

Fig. 17 Expressions of PS-1 in rat parietal lobe of control group (A), model group (B) and treatment group (C).

表1 三组大鼠顶叶抗体阳性细胞数目比较 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 The statistical results of positive neurons in the parietal lobe of three experimental groups ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Group	Aβ <sub>1-40</sub>	β-secretase	PS-1
Control group	9.25±2.18	10.34±3.22	8.34±2.24
Model group	30.32±10.56**	29.33±12.89**	28.43±11.98**
Treatment group	8.92±3.09 <sup>Δ</sup>	9.88±2.98 <sup>Δ</sup>	12.54±3.09

\*\*  $P<0.01$  vs control group; <sup>Δ</sup> $P<0.05$  vs model group

表2 三组大鼠顶叶各种蛋白含量的比较（OD值）( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 2 The comparisons of expressions of protein among groups of parietal lobe (OD) ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

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

\*\*  $P<0.01$  vs control group; <sup>Δ</sup> $P<0.05$  vs model group

表3 Western blot检测各组大鼠顶叶皮质β-分泌酶和PS-1的OD值比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Comparisons of β-secretase and PS-1 OD in parietal lobe of rats ( $\bar{x}\pm s$ )

Group	β-secretase	PS-1
Control group	63.28±7.32	56.83±5.27
Model group	89.23±6.94 <sup>▲</sup>	67.38±4.29 <sup>▲</sup>
Treatment group	74.89±4.45*	60.22±6.21*

▲与对照组比较 (compared with control group)  $P<0.05$

\*与模型组比较 (compared with model group)  $P<0.01$

## 讨 论

AD 是一种中枢神经系统原发性、退变性疾病,是老年人的常见病。其主要临床表现为进行性记忆力减退和认知功能障碍,其三大病理特征为:神经元之间形成大量的老年斑 (senile plaque, SP),神经元内出现神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangle, NFT) 以及区域性神经元及突触连接的退行性变。SP 的主要成分  $\beta$ -淀粉样肽 ( $\beta$ -amyloid, A $\beta$ ) 在细胞外的沉积,能对细胞造成毒性损害,是导致患者脑功能障碍的主要原因。A $\beta$  是由  $\beta$ -淀粉样前体蛋白 ( $\beta$ -amyloid precursor protein, APP) 经  $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶作用产生的。在正常情况下,APP 经  $\alpha$ -分泌酶途径产生可溶性的 SAPP- $\alpha$  和 CTF $\alpha$ ,此途径可以阻止 A $\beta$  的形成和沉积<sup>[3]</sup>。 $\beta$  级联假说<sup>[4]</sup>认为当环境或基因突变引起  $\beta$  和  $\gamma$ -分泌酶表达过高时,APP 多经  $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶途径产生大量具有神经毒性作用的 A $\beta$ , $\beta$  和  $\gamma$ -分泌酶是 A $\beta$  产生过程中非常关键的限速酶,通过激活或者抑制  $\beta$  和  $\gamma$ -分泌酶,可直接调节 A $\beta$  水平的高低。有实验表明, $\beta$ -分泌酶基因剔除的小鼠,大脑 A $\beta$  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<sup>[5]</sup>;敲除编码早老蛋白-1 (presenilin-1, PS-1) 基因的小鼠, $\gamma$ -分泌酶活性降低 80%,A $\beta$  含量大大降低<sup>[6]</sup>。因此, $\beta$ 、 $\gamma$ -分泌酶已成为治疗 AD 的非常有潜力的靶点<sup>[7~8]</sup>。Siman R [9] 等认为早老蛋白-1 (PS-1) 本身就是  $\gamma$ -分泌酶,或者是组成  $\gamma$ -分泌酶复合物的主要部分。AD 的另一病理特征 NFT 位于细胞内,其主要成分为异常磷酸化的微管相关蛋白 Tau 组成的双股螺旋丝。

本实验结果证明了模型组大鼠与对照组相比,顶叶皮层内 A $\beta$ 、 $\beta$ -分泌酶与 PS-1 表达均明显增高,模型组大鼠顶叶皮层形成明显的 SP 与 NFT。因此,我们认为,SP 的产生及  $\beta$ -分泌酶与 PS-1 表达相关的一致性都证明:A $\beta$  的异常分泌可能是通过  $\beta$ -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,因此本实验制作的动物模型可作为比较理想的 AD 动物实验模型。

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。张均田等也证明人参可促进脑的生长发育和学习过程,且可改善记忆的获得再现<sup>[10]</sup>。已

有研究证实人参皂甙 Rb1 可以通过促进乙酰胆碱 (ACh) 释放、增加神经末梢摄取 ACh 而改善记忆<sup>[11]</sup>,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<sup>[12,13]</sup>。但在较长期给予的情况下,人参皂甙 Rb1 能否改善 AD 动物的脑损伤,营养保护神经元,迄今未见报道。AD 患者脑内蛋白磷酸酯酶 2A (PP2A) 含量较正常同龄对照人群明显下降,而 PP2A 表达的减少,会引起 Tau 蛋白过度磷酸化,进而形成神经原纤维缠结。李永坤<sup>[14]</sup>等发现,人参皂甙 Rb1 可能通过提高脑内 PP2A 的活性,减轻冈田酸诱导的大鼠海马神经元 Tau 蛋白的过度磷酸化,从而减少 AD 模型大鼠脑内的神经原纤维缠结,这与本实验结果一致。本实验结果证明,应用人参皂甙 Rb1 后,AD 大鼠顶叶皮层老年斑表达明显减少,神经元中  $\beta$ -分泌酶与 PS-1 水平明显下降。这提示人参皂甙 Rb1 可能具有通过抑制分泌酶的表达而减少 A $\beta$  产生,从而减少老年斑表达的作用。然而,人参皂甙 Rb1 作用的具体机制,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,尚需要进一步的实验研究。

## 参 考 文 献

- [1] 窦德强,靳玲,陈英杰.人参的化学成分及药理活性的研究进展与展望.沈阳药科大学学报,1999,16 (2): 151-156
- [2] 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.中国药理学与毒理学杂志,2004, Feb, 18 (1): 22-26
- [3] Kuramer C, Wehner S, Quast T, et al. Expression and potential function of beta-amyloid precursor proteins during cutaneous wound repair. Exp Cell Res, 2002, 280 (2): 222-232
- [4] 陈生弟.神经病学.北京:人民军医出版社,2002, 262-269
- [5] Roberds SL, Anderson J, Basi G, et al. BACE knock-out mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. Hum Mol Genet, 2001, 10 (12): 1317-1324
- [6] Yang F, Lim GP, Begum AN, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo. J Biol Chem, 2005, 280: 5892-5901
- [7] 杨红旗,陈生弟. $\alpha$ -分泌酶在阿尔茨海默病治疗中的作用.生物化学与生物物理进展.2006, 33: 109-115

- [8] 酃浩, 姜凤超.  $\gamma$ -分泌酶抑制剂研究进展. 化学进展, 2006, 18 (2): 356-362
- [9] Siman R, Velji J. Subunit composition of  $\gamma$ -secretase and effect of mutant presenilin-1. *Neurobiol Aging*, 2002, 25: 177-181
- [10] 杨迎, 张均田, 田成璋, 等. 人参皂甙 Rb1 和 Rg1 促智作用机制的探讨-对小鼠脑神经发育的影响. 药学报, 1994, 294: 241-245
- [11] Benishin CG, Lee R, Wang LC, et al. Effects of ginsenoside Rb1 on central cholinergic metabolism. *Pharmacology*, 1991, 42 (4): 223-229
- [12] Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons in vitro. *Exp Neurol*, 2002, 173 (2): 224-234
- [13] Rudakewich M, Ba F, Benishin CG. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenosides Rb1 and Rg1. *Planta Med*, 2001, 67 (6): 533-537
- [14] 李永坤, 陈晓春, 朱原贵, 等. 人参皂甙 Rb1 减轻冈田酸诱导的大鼠海马神经元 Tau 蛋白过度磷酸化. 生理学报, 2005, 57 (2): 154-160

### 图 版 说 明

- 图 1、2、3 对照组、模型组和治疗组大鼠顶叶皮层老年斑。刚果红染色。 $\times 400$  标尺=20 $\mu\text{m}$
- 图 4、5、6 对照组、模型组和治疗组大鼠顶叶皮层神经原纤维缠结, 镀银染色。 $\times 400 \rightarrow$ 指示为神经原纤维缠结。标尺=10 $\mu\text{m}$
- 图 7、8、9 对照组、模型组、治疗组大鼠顶叶皮层神经

元的 A $\beta$  表达。免疫组化染色。 $\times 400$  标尺=20 $\mu\text{m}$

图 10、11、12 对照组, 模型组, 治疗组大鼠顶叶皮层神经元的  $\beta$ -分泌酶表达。免疫组化染色。 $\times 400$  标尺=20 $\mu\text{m}$

图 13、14、15 对照组, 模型组, 治疗组大鼠顶叶皮层神经元的 PS-1 表达, 免疫组化染色。 $\times 400$  标尺=20 $\mu\text{m}$

### EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1, 2, 3 SP in rat parietal lobe of control group, model group and treatment group, Congo red staining.  $\times 400$  Bar=20 $\mu\text{m}$

Fig. 4, 5, 6 NFT in rat parietal lobe of control group, model group and treatment group, Silver impregnation method.  $\times 400$  Bar=10 $\mu\text{m} \rightarrow$  shows neurofibrillary tangles.

Fig. 7, 8, 9 A $\beta$  expression in parietal lobe of control group, model group, and treatment group. Immunohistochemical stain.  $\times 400$  Bar=20 $\mu\text{m}$

Fig. 10, 11, 12  $\beta$ -secretase expression in parietal lobe of control group, model group, and treatment group. Immunohistochemical stain.  $\times 400$  Bar=20 $\mu\text{m}$

Fig. 13, 14, 15 PS-1 expression in parietal lobe of control group, model group, and treatment group. Immunohistochemical stain.  $\times 400$  Bar=20 $\mu\text{m}$

