

· 论著 ·

人参皂甙 Rg1 对 Cdk5 的调控在海马神经元放射性损伤防护中的意义

孙爱民 李传刚 林水苗 张余琴 夏琼

【摘要】 目的 探讨人参皂甙 Rg1 对 Cdk5 的调控在海马神经元放射性损伤防护中的意义。**方法** 通过建立放射性脑损伤的体内模型,将 40 只实验大鼠按随机数字表法分为 4 组,每组 10 只,即:0Gy 组(简称空白组),单纯人参皂甙 Rg1 预处理组(简称对照组),30Gy 组(简称模型组),30Gy + 人参皂甙 Rg1 预处理组(简称中药组),分离、培养海马神经元,用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染核方法检测各组海马神经元凋亡情况,采用 Western blot 检测 p35、p25 蛋白表达以及应用 Cdk5 抑制剂 roscovitine 抑制 Cdk5,观察阻断 Cdk5 后 X 射线对海马神经元损伤的改变。**结果** 与空白组比较,对照组的核固缩百分数、神经元存活数目、p35、p25 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组与中药组的核固缩百分数、p35、p25 蛋白水平则明显升高,神经元存活数目明显降低,且差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,中药组的核固缩百分数、p35、p25 蛋白水平明显降低,神经元存活数目则明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);单就各组 + 二甲基亚砷(DMSO)而言,与空白组 + DMSO 比较,对照组 + DMSO 的核固缩百分数差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组 + DMSO 与中药组 + DMSO 则明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组 + DMSO 比较,中药组 + DMSO 的核固缩百分数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 人参皂甙 Rg1 可通过调控 Cdk5,降低神经元凋亡,而在海马神经元放射性损伤中发挥防护作用。

【关键词】 人参皂甙/治疗应用;细胞周期蛋白质依赖激酶类;海马;神经元;辐射损伤,实验性/中药疗法

The importance of regulatory role of panaxoside Rg1 in Cdk5 on hippocampal neuron radioactive damage protection Sun Aimin*, Li Chuangang, Lin Shuimiao, Zhang Yuqin, Xia Qiong. *Department of Radiation Oncology, Southern Medical university nanfang hospital, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Xia Qiong, Email: xiaqiong@fimmu.com

【Abstract】 Objective To discuss the importance of regulatory role of panaxoside Rg1 in Cdk5 in the process of hippocampal neuron radioactive damage protection. **Methods** Radioactive brain damage in vivo 40 models were built, and divided into 4 groups, including 0 Gy group (short for blank group), pure panaxoside Rg1 preconditioning group (short for control group), 30 Gy group (short for model group), and 30Gy + panaxoside Rg1 preconditioning group (short for traditional Chinese medicine group). Hippocampal neurons were separated and trained. Hippocampal neuron apoptosis condition was tested in every group by 4', 6 - diamidino-2 - phenylindole (DAPI) staining method. The p35 and p25 protein expressions were tested with Western blot. Cdk5 was restrained by Cdk5 restrainer roscovitine. Hippocampal neuron damage after Cdk5 blocking-up was observed with changes of X ray in every group. **Results** Compared with blank group, no significant difference was found in nuclear shrinkage percentage, the number of neuron survival, and the protein expression levels of p35 and p25 in control group; nuclear shrinkage percentage and the protein expression levels of p35 and p25 were significantly increased and the number of neuron survival was significantly decreased in the model group and traditional Chinese medicine group ($P < 0.05$). Compared with model group, nuclear shrinkage percentage and the protein expression levels of p35 and p25 were significantly decreased and the number of neuron survival was significantly increased in the traditional Chinese medicine group ($P < 0.05$). For the addition of dimethyl sulfoxide (DMSO) in every group, the nuclear shrinkage percentage was not significantly changed in control group compared with blank group, was significantly increased in model group and traditional Chinese medicine group compared with blank group ($P < 0.05$), and was significantly decreased in traditional Chinese medicine group compared with model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Panaxoside Rg1 can reduce neuron apoptosis by controlling Cdk5, and plays a protective role in hippocampal neuron radioactive damage.

DOI:10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2014.05.003

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30973846);广东省科技计划资助项目(2011B031800244)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院放疗科(孙爱民、林水苗、张余琴),超声诊断科(李传刚),医学影像教研室(夏琼)

通信作者:夏琼,Email: xiaqiong@fimmu.com

【Key words】 GINSENSIDE/therapeutic use; Cyclin-dependent kinases; Hippocampus; Neurons; Radiation injuries, experimental/ZHONG YAO LIAO FA

放射性脑损伤是头颈部肿瘤最严重的放射治疗并发症,已成为影响患者疗效及生活质量的主要因素之一^[1],故而研究其有效防治药物具有较大的临床价值。同时,由于海马神经元对于放射线敏感,其受损后主要表现在学习记忆、行为反应以及内分泌调节等方面^[2],然而,现今对其机制尚不清楚。课题组在前期研究中发现,Cdk5 可能在神经元放射性损伤中发挥作用,而 Cdk5 属于 Cdk5 家族的特殊成员,与神经退行性病变关系密切,人参皂甙则属于人参的活性成分^[3]。已有研究证实^[4],人参皂甙可对大鼠脑缺血再灌注损伤发挥保护作用,放射线脑损伤机制与脑组织缺血缺氧性损伤机制在血管及免疫损伤上具有共同点。从而引发课题组思考,是否人参皂甙对于放射线损伤也能发挥保护作用?本研究即以此为切入点,通过建立放射性脑损伤的体外模型,系统研究 Cdk5 在海马神经元放射性损伤中的功能,探讨人参皂甙在海马神经元放射性损伤中的作用及其对 Cdk5 的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物与试剂 人参皂甙 Rg1 (纯度 > 95%) 购自吉林大学有机化学教研室;主要试剂:Western-blot 化学发光检测试剂盒(凯基生物公司);辣根过氧化物酶标记二抗(中杉金桥公司); β -actin(威佳公司);p25/p35(C-19)多克隆抗体(Cell Signaling);roscovitine,纯度 > 95% (Biomol 公司);胎牛血清(Hyclone 公司);转印用 PVDF 膜(美国 Bio-rad 公司);B27 培养基添加剂、DMEM/F12、青链霉素及胰酶(Gibco 公司);谷氨酰胺、多聚赖氨酸及 L-谷氨酸(Sigma)。

1.1.2 实验动物 新生 1 d 的清洁级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,由南方医科大学南方医院实验动物中心提供,动物生产许可证号:SYXK(粤)2005-0056。自由饮食,室温(25 ± 3) $^{\circ}\text{C}$,光/暗周期为 12 h/12 h (光照时间 6:00 ~ 18:00)。

1.2 实验方法

1.2.1 分离、培养海马神经元 取实验大鼠,用 75% 乙醇消毒后,取大脑组织后,进行海马分离,将其剪成直径为 0.4 mm 小块,胰蛋白酶作用后使用 DMEM/F12 终止消化,将组织块进行吹打以分离细胞,筛网过滤后离心,弃上清液,加 Neuralbasal/F12

完全培养基,再次吹打分离细胞,制成单细胞悬液,接种在培养板内,置适宜温度与湿度的 CO_2 培养箱内进行培养。72 h 后,加入阿糖胞苷抑制胶质细胞过度增殖,待 48 h 后更换为新鲜培养液。而后每周换液两次,每次换培养液体积为原有的 1/2,培养至第 12 天进行神经元鉴定,达到纯度高于 95% 时用于下述实验。

1.2.2 放射性损伤照射方法^[5] 采用 Varian 2100C 型直线加速器,相关参数设置为:剂量为 30 Gy,源皮距 100 cm,射野大小为 10 cm \times 10 cm,剂量率为 400 cGy/min 的 6 MV 的 X 线,将射线沿细胞贴壁面垂直进行照射,并垫厚度 1.5 cm 的有机玻璃板。对照组(0 Gy)在细胞孵育箱外放置的时间同“实验组”,但不用 X 线照射。照射完毕后继续培养进行下一步研究。

1.2.3 实验分组 将 40 只实验大鼠按随机数字表法分为 4 组,即:0Gy 组(简称空白组),单纯人参皂甙 Rg1 预处理组(简称对照组),30Gy 组(简称模型组),30Gy + 人参皂甙 Rg1 预处理组(简称中药组)。将人参皂甙 Rg1 在 X 线照射前 15 min 加入培养板,其终浓度均为 20 $\mu\text{mol/L}$,每组 10 只。

1.2.4 观察指标 神经元凋亡检测:将各组大鼠神经元细胞照射后再培养 24 h,吸弃细胞培养液,而后依次进行漂洗、孵育、漂洗,置于荧光显微镜下观察细胞核的形态改变,并进行计数。

p35/p25 蛋白水平检测:吸弃细胞培养液,分别提取胞质、胞膜、胞核蛋白;于 200 V 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 45 min;转移于硝酸纤维素膜(NC 膜)上,用封闭液室温封闭 2 h,和一抗共同轻摇孵育过夜。洗 3 次,把 NC 膜与辣根过氧化物酶(HRP)结合的二抗,和 HRP-结合的抗生物素抗体室温孵育 1 h;洗 3 次,与 10 ml 1 \times LumiGLO 室温下轻摇 1 min。感光,显影,定影,晾干,拍照、图像分析。

1.3 统计学处理 本研究中所有数据均采用 SPSS 16.0 统计学软件进行处理和分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 人参皂甙 Rg1 对各组海马神经元损伤凋亡的保护作用

2.1.1 对神经元核固缩的影响效果 空白组与对照组的核固缩百分数差异无统计学意义

($P > 0.05$), 模型组与中药组则升高明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组的

核固缩百分数明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1、图 1。

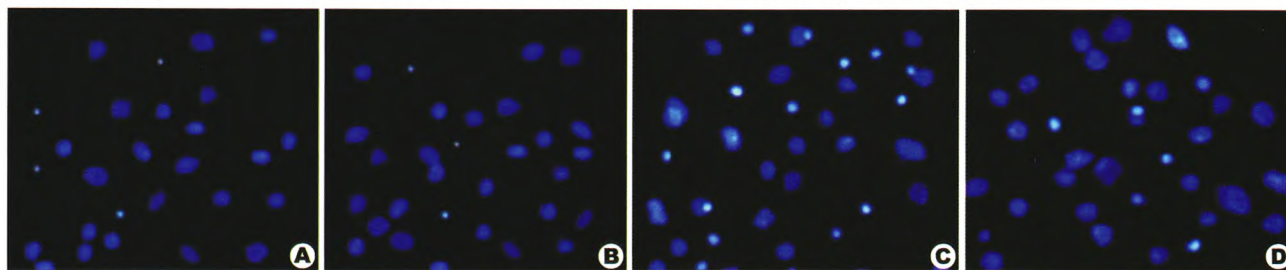


图 1 各组海马神经元核固缩比较 A:空白组;B:对照组;C:模型组;D:中药组

2.1.2 对神经元数目的影响 空白组与对照组的神经元存活数目差异无统计学意义($P > 0.05$), 模型组与中药组则明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组的神经元百分数明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 人参皂甙 Rg1 对 p35、p25 蛋白表达影响 与空白组比较, 对照组的 p35、p25 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$), 模型组与中药组则明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组则明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 1、图 2。

表 1 人参皂甙 Rg1 对各组海马神经元核固缩百分数、海马神经元及 p35、p25 蛋白表达影响比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	核固缩百分数 (%)	存活神经元数目	p35	p25
空白组	10	1.89 ± 0.69	268.3 ± 15.8	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
对照组	10	1.86 ± 0.66	267.1 ± 15.1	0.81 ± 0.18	0.98 ± 0.21
模型组	10	26.1 ± 4.02 ^a	75.2 ± 15.5 ^a	1.62 ± 0.15 ^a	1.77 ± 0.28 ^a
中药组	10	8.21 ± 0.89 ^{ab}	121.4 ± 15.8 ^{ab}	1.50 ± 0.16 ^{ab}	1.62 ± 0.31 ^{ab}

注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$;与模型组比较, ^b $P < 0.05$

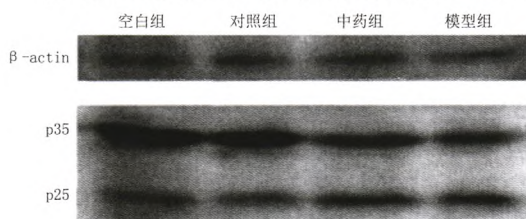


图 2 各组 p35、p25 蛋白表达比较(采用 Western blot)

2.3 Cdk5 抑制剂 roscovitine 对 X 线诱导的海马神经元损伤的作用 DMSO 即 roscovitine 的溶质, 空白组与空白组 + DMSO, 对照组与对照组 + DMSO 之间比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 模型组与模型组 + DMSO, 中药组与中药组 + DMSO 比较, 则明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。单就各组 + DMSO 而言, 与空白组 + DMSO 比较, 对照组 +

DMSO 的核固缩百分数差异无统计学意义($P > 0.05$), 模型组 + DMSO 与中药组 + DMSO 则明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组 + DMSO 比较, 中药组 + DMSO 的核固缩百分数明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 Cdk5 抑制剂 roscovitine 对 X 线诱导的海马神经元损伤的作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	核固缩百分数 (%)
空白组	10	1.89 ± 0.69
空白组 + DMSO	10	2.07 ± 0.81
对照组	10	1.86 ± 0.66
对照组 + DMSO	10	2.00 ± 0.79
模型组	10	26.1 ± 4.02
模型组 + DMSO	10	7.81 ± 3.41 ^{ab}
中药组	10	8.21 ± 0.89
中药组 + DMSO	10	5.31 ± 4.20 ^{bcd}

注:与模型组比较, ^a $P < 0.05$;与中药组比较, ^c $P < 0.05$;与空白组 + DMSO 比较, ^b $P < 0.05$;与模型组 + DMSO 比较, ^d $P < 0.05$

3 讨论

3.1 X 线对海马神经元的影响 随着对于脑瘤等疾患治疗及预后的深入研究, 患者出现的智力降低、记忆缺失等神经放射损伤现象逐渐增多, 从而提示在治疗过程中神经细胞受到放射线损伤, 临床实践证实, 在治疗过程中, 一定的照射剂量即可导致神经细胞的凋亡, 同时出现神经功能障碍^[6], 一般而言, 晚期的放射性脑损伤主要以白质坏死和脱髓鞘的病理学改变为主^[7], 然其机制如何, 尚不清楚, 但随着现今临床放射线损伤患者的渐趋增多, 探讨其机制已成为亟需解决的问题。

神经细胞凋亡普遍存在于生物体内, 而电离辐射是诱导其出现的最常用手段, 研究发现, 神经系统疾病在发生与发展过程中与凋亡具有较大相关性, 国外系列研究发现, 如发现放射性脑损伤后胶质细胞的凋亡主要发生在第 1 天, 其后逐渐减少^[8]; 且

进一步研究认为 4 h 即可发生凋亡,至 12 h 达到高峰^[9]。本研究结果与此基本一致,照射 24 h 之内即发现凋亡细胞,但进一步细化不同时间段凋亡情况的数据尚在整理之中,有待同期发表。

3.2 Cdk5 在中枢神经系统中的作用 Cdk5 作为丝氨酸/苏氨酸激酶家族,其与激活蛋白(NcK5a)结合所形成的复合物方具有生物活性,生理状态下,Cdk5 在 p35、p25 等调节亚基的信号作用下锚定于膜上,发挥促凋亡和促存活信号转导通路平衡的功效,可见,其在神经元发育、迁移、神经元存活中具有重要作用^[10]。反之,若 Cdk5 被过度激活,则极易导致神经元变性坏死,研究显示:用 AB 孵育培养的原代神经元,p35 可经中性蛋白酶作用,降解为 p25,游离在胞浆内,其蛋白激酶活性更高,更易导致神经元的死亡^[11];临床实践证实,在海马硬化症中,与正常神经元比较,患处神经元的 p25/p35 表达明显升高,可见,p35 被降解为 p25,激活 Cdk5,促进神经元死亡^[12]。本研究结果显示,与空白组比较,对照组的 p35、p25 蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$),模型组与中药组则明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,中药组则明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。可见,受 X 线照射后体外培养海马神经元的 p35、p25 表达均增加;照射后 p35 裂解成 p25,而 p25 则进一步激活 Cdk5,致 Cdk5 激酶活性更高,从而促进神经元退行性病变的发生。

3.3 人参皂甙的干预作用分析 人参皂甙是人参的主要有效活性成分,是糖的衍生物,按组成结构上可以分为三大类,即:二醇型、三醇型以及齐墩果酸型,该药物对神经系统具有保护作用、有促进学习及记忆的作用以及拮抗神经元凋亡的作用^[2],其中人参皂甙 Rg1 是较受关注的一种人参单体,现今报道中证实,其对帕金森病等神经退行性病导致的神经细胞凋亡有保护作用^[13]。本研究结果发现:与模型组比较,中药组的核固缩百分数、p35、p25 蛋白水平明显降低,神经元存活数目则明显升高且差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组 + DMSO 比较,中药组 + DMSO 的核固缩百分数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,人参皂甙 Rg1 可通过调控 Cdk5,降低神经元凋亡,而在海马神经元放射性损伤中发挥

防护作用。然而,由于文章篇幅有限,不同浓度的人参皂甙 Rb1、Rb3、Re 对于调控 Cdk5 而发挥抗神经元损伤的作用机制研究的相关数据仍在整理之中,有待近期公开发表。

参考文献

- [1] 韩永清,孙爱民,刘鹤凌,等. X 线照射原代培养大鼠海马神经元后 p35、p25 的表达及 Cdk5 激酶活性变化[J]. 南方医科大学学报,2009,29(3):405-407,411.
- [2] 刘慧莲. 人参皂甙的药理作用研究进展[J]. 潍坊学院学报,2009,9(2):106-108.
- [3] 郑亚莉,陆晓华,保莉,等. 以 Cdk5 为靶点探讨 Cdk5 活性抑制肽 CIP 在神经细胞和胰岛 β 细胞的作用机制[J]. 中华保健医学杂志,2013,15(2):152-155.
- [4] 徐卫财,倪玉霞,刘小青,等. 丙酮酸乙酯对大鼠全脑缺血再灌注损伤海马区 SOD、NO 和 iNOS 的影响[J]. 中国现代医学杂志,2010,20(1):45-48.
- [5] 刘鹤凌,孙爱民,韩永清,等. 放射性脑损伤大鼠海马神经元 P35 及 P25 的表达[J]. 山东医药,2008,48(45):19-21.
- [6] 刘俊丽. 他莫昔芬对放射性脑损伤的神经保护作用及其机制研究[D]. 武汉:华中科技大学,2010.
- [7] 刘鹤凌. 放射性脑损伤大鼠动物模型的建立及其海马神经元 P35 及 P25 的表达变化[D]. 广州:南方医科大学,2009.
- [8] Acharya MM, Lan ML, Kan VH, et al. Consequences of ionizing radiation-induced damage in human neural stem cells[J]. Free Radic Biol Med,2010,49(12):1846-1855.
- [9] Järnüm H, Steffensen EG, Knutsson L, et al. Perfusion MRI of brain tumours: a comparative study of pseudo-continuous arterial spin labelling and dynamic susceptibility contrast imaging[J]. Neuroradiology,2010,52(4):307-317.
- [10] Potter GM, Marlborough FJ, Wardlaw JM. Wide variation in definition, detection, and description of lacunar lesions on imaging[J]. Stroke,2011,42(2):359-366.
- [11] Trivedi R, Khan AR, Rana P, et al. Radiation-induced early changes in the brain and behavior: serial diffusion tensor imaging and behavioral evaluation after graded doses of radiation[J]. J Neurosci Res,2012,90(10):2009-2019.
- [12] Thomason ME, Thompson PM. Diffusion imaging, white matter, and psychopathology[J]. Annu Rev Clin Psychol,2011,7:63-85.
- [13] 陈勇,孙爱民,陈智贤,等. 人参皂甙 Rg1 对 NOS 的调控在海马神经元放射性损伤防护中的意义[J]. 南方医科大学学报,2010,30(7):1522-1525.

[收稿日期:2014-02-10]

(本文编辑:龙智钢)