

人参皂苷 Rg1 对寡聚态 A β ₁₋₄₂ 增加 p38 丝裂原活化蛋白激酶活性 诱导神经元损伤的可能影响

何饶丽¹, 林楠², 方丽君³, 黄天文^{1,2}

摘要: 目的 探讨人参皂苷 Rg1 对 β -淀粉样蛋白 1-42(A β ₁₋₄₂)增加皮质神经元细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)活性、诱导神经元损伤的影响。方法 采用经神经元特异性抗体检测 C57BL/6 胎鼠来源的皮质神经元为研究对象,运用寡聚态 A β ₁₋₄₂诱导神经元损伤,把神经元分为空白对照组、A β ₁₋₄₂单独作用组(模型组)、SB203580 处理组、人参皂苷 Rg1 处理组、人参皂苷 Rg1 单独作用组。采用 Western-blot 方法检测 p38、磷酸化 p38 (p-p38) 的蛋白水平,采用光学显微镜观察神经元形态,采用 TUNEL 染色和 caspase-3 活性检测神经元凋亡相关指标。结果 (1)在寡聚态 A β ₁₋₄₂作用 5 和 15 min 时,皮质神经元中 p-p38 蛋白水平均较空白对照组明显升高,差别均有统计学意义($P<0.05$)。(2)与模型组比较,人参皂苷 Rg1 处理组中,不同浓度(2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$)的人参皂苷 Rg1 作用后,寡聚态 A β ₁₋₄₂诱导升高的 p-p38/p38 水平均明显回落,差别均有统计学意义($P<0.001$)。与空白对照组比较,仅予以 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rg1 也可降低皮质神经元的 p-p38/p38 水平,差别有统计学意义($P<0.005$)。(3)在皮质神经元的形态学观察中,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rg1 处理组的皮质神经元突触的完整性、流畅性均较模型组明显改善;在 TUNEL 染色及 caspase-3 活性检测中,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rg1 处理组 TUNEL 阳性的凋亡神经元比例及 caspase-3 活性均较模型组明显降低($P<0.01$)。结论 p38 MAPK 信号通路可能参与人参皂苷 Rg1 减轻寡聚态 A β ₁₋₄₂诱导的皮质神经元的损伤过程。

关键词: 阿尔茨海默病; 人参皂苷 Rg1; p38 丝裂原活化蛋白激酶

文献标志码: A **文章编号:** 1672-4194(2022)02-0097-06

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种以进行性认知障碍为主要临床特征的神经系统退行性疾病,常见于老年人。调查显示,目前全球约有 5 000 万 AD 患者,我国老年人的 AD 患病率为 3%~7%^[1],给家庭和社会带来了巨大负担。寡聚态 β -淀粉样蛋白 1-42 (amyloid β -protein 1-42, A β ₁₋₄₂)作为 AD 发病机制的 A β 瀑布学说中毒性最大的片段,在 AD 的发病中起重要的作用。在 AD 患者的脑组织及 A β 的毒性机制中发现,p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)的功能异常激活是其重要的病理生理机制。因此,p38 MAPK 被认为是治疗 AD 的重要潜在靶点之一^[2]。

近年来,传统中医药在 AD 防治中的作用备受关注。人参作为我国传统的名贵中药,具有悠久的应用历史,包含多种成分,其主要成分之一是人参皂苷 Rg1,属三醇皂苷,具有较强的生物学活性。本课题

组前期研究证实,人参皂苷 Rg1 可能通过多种途径减轻 A β ₁₋₄₂诱导的神经元凋亡,从而达到防治 AD 的作用^[3-4]。在此基础上,本研究在 A β ₁₋₄₂诱导的 AD 细胞模型进一步探讨人参皂苷 Rg1 对 p38 MAPK 信号转导通路的分子作用机制,以期为人参皂苷 Rg1 防治 AD 提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级 C57BL/6 孕鼠(孕龄 15~16 d, 上海西普尔一必凯实验动物有限公司)。

1.1.2 主要试剂和仪器 寡聚态 A β ₁₋₄₂(美国康萨斯大学严世都教授惠赠); 人参皂苷 Rg1(纯度 > 98%, 吉林大学基础医学院有机化学教研室); β -actin 单克隆抗体(美国 NeoMarkers 公司); 磷酸化神经丝多克隆抗体(MAB1592, 美国 Millipore 公司); 多克隆抗体 p38 MAPK、鼠单克隆抗体 phospho-p38 MAPK(Thr180/182)(美国 Cell Signaling Technology 公司); 胎牛血清(杭州江滨生物技术有限公司); Neurobasal 培养基(美国 Gibco 公司); Western-blot 化学发光检测试剂盒(美国 KPL 公司); TUNEL 测定试剂盒(美国 Trevigen 公司); caspase-3 活性检测试剂盒(美国 Clontech Laboratories 公司)。细胞裂解液: Tris (pH 值 7.4, 10 $\mu\text{mol/L}$) + Na₄P₂O₇ (20 $\mu\text{mol/L}$) + Na₃VO₄

收稿日期: 2021-08-29

资助项目: 福建省自然科学基金项目(2020J011035); 福建省卫生计生科研人才培养项目(青年科研课题)(2018-1-41); 福建医科大学启航基金项目(2017XQ1033)

作者单位: 1. 福建医科大学附属协和医院神经内科, 福州 350001;
2. 福建省血管衰老重点实验室(福建医科大学), 福州 350001;
3. 福建医科大学附属协和医院眼科, 福州 350001

作者简介: 何饶丽,女,主治医师,医学硕士

通信作者: 黄天文. Email: huangtianwen2002@163.com

(2 $\mu\text{mol/L}$) + NaCl (100 $\mu\text{mol/L}$) + 乙二胺四乙酸(EDTA) (1 $\mu\text{mol/L}$) + 乙二醇双四乙酸(EGTA) (1 $\mu\text{mol/L}$) + NaF (1 $\mu\text{mol/L}$) + SDS (0.1%) + PMSF (1 $\mu\text{mol/L}$) + Sodium deoxycholate (0.5%) + Triton-X 100 (1%) + 抑酶肽 (60 $\mu\text{mol/L}$) + 亮抑酶肽 (10 $\mu\text{mol/L}$) + 胃蛋白酶抑制剂 (1 $\mu\text{mol/L}$)。解剖小鼠脑组织的溶液: Neurobasal 培养基 + 2 mol/L 的 L-谷氨酰胺 + 2% 的 B₂₇ + 4.4 mmol/L 的 NaHCO₃; 皮质神经元基础培养基: Neurobasal 培养基 + 0.1 IU/L 的青霉素 G + 0.1 IU/L 的链霉素 + 1.19 g/L 的 HEPES + 2 g/L 的 NaHCO₃; 皮质神经元生长培养基: Neurobasal 培养基 + 50 U/mL 的青霉素 + 50 U/mL 的链霉素 + 2 mol/L 的 L-谷氨酰胺 + 2% 的 B₂₇。倒置显微镜(CK40 型, 日本 Olympus 公司); CO₂ 细胞培养箱 (3110 型, 美国 Forma Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 皮质神经元培养 具体方法参考文献[5], 简要步骤如下: 取孕龄为 15~16 d 的 C57BL/6 小鼠, 无菌条件下取出胎鼠, 分离出全脑, 去除脑组织中的脑干、小脑、桥脑及脑膜, 分离出皮质, 再用胰蛋白酶进行适时消化后, 以含 20% 胎牛血清的解剖液终止消化, 分离出小鼠皮质神经元, 进行计数、接种培养, 体外培养 3~5 d 后, 分离出来的皮质神经元稳定生长, 以此进行后续实验。

1.2.2 分组 (1) 空白对照组: 未给予任何干预处理。(2) A β_{1-42} 单独作用组(模型组): 仅给予 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的寡聚态 A β_{1-42} 作用于体外培养的皮质神经元。(3) 人参皂苷 Rg1 处理组: 体外培养的小鼠皮质神经元, 给予不同浓度的人参皂苷 Rg1 预先孵育 24 h, 然后加入 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的寡聚态 A β_{1-42} 共同孵育 48 h。(4) SB203580(p38 抑制剂)处理组: 予 20 $\mu\text{mol/L}$ 的 SB203580 以及 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 寡聚态 A β_{1-42} 共同孵育。(5) 人参皂苷 Rg1 单独作用组: 仅给予 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的人参皂苷 Rg1 作用于体外培养的皮质神经元。

1.2.3 神经元的免疫细胞化学鉴定 把神经元特异的磷酸化神经丝抗体作为神经元的特异性识别标志, 采用免疫细胞化学技术(ABC 法)检测培养的皮质神经元的神经丝。主要步骤如下: 培养成熟的神经细胞经 3.7% 甲醛固定 30 min, 加入过氧化氢甲醇溶液灭活内源性的过氧化氢酶, 予 PBS 洗涤后, 通过动物血清封闭非特异性抗原, 经 PBS 洗涤后, 加入磷酸化神经丝抗体(MAB1592)孵育, 经 PBS 洗涤后, 加入链亲和素-过氧化物酶溶液孵育,

经 PBS 洗涤后, 予新鲜配制的 DAB 溶液显色、封片、显微镜下拍照。

1.2.4 Western-blot 检测 皮质神经元经处理后, 用预冷的磷酸盐缓冲液清洗残余的细胞培养液, 加入适量的细胞裂解液, 神经元在冰上裂解 20 min, 用细胞刮刀收集细胞后进行离心 (14 000 $\times g$, 4 °C, 10 min), 取上清液, 用 Bradford 法对蛋白浓度进行定量, 并以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 转膜, 在室温下使用封闭液进行封闭, 一抗 [p38/MAPK、p-p38/MAPK (Thr180/182), 1 : 1 000 稀释], 4 °C 下孵育, 洗涤, 辣根过氧化物酶耦联的抗鼠 IgG 二抗 (1 : 1 000 稀释) 作用 2 h, 采用化学发光法显色、曝光。以 5、15、30 和 60 min 为寡聚态 A β_{1-42} 作用于皮质神经元细胞的观察时间点, 采用 Western-blot 方法检测细胞内 p38 在 Thr180 和 Thr182 位点的磷酸化水平, 以 p-p38/p38 的比值表示 p38 活性的变化, 以 β -actin 为内参照, 实验重复 3 次。

1.2.5 TUNEL 染色 参考文献[6], 采用原位末端标记法检测培养神经元的凋亡情况。简要步骤如下: 经干预处理后的神经元经多聚甲醛等进行固定, 先后用 NeuroPore 试剂、淬链溶液(quenching solution)、末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)标记缓冲液进行处理, 再用标记反应混合物进行作用, 使用 1×TdT 停止缓冲液停止反应; 接着使用 Streptavidin-HRP 处理、DAB 显色、细胞核复染、氨水返蓝、中性树脂封片处理。最后对染色区域内 5 个视野下的 TUNEL 阳性细胞进行计数。

1.2.6 caspase-3 活性测定 参考文献[6], 并根据说明书检测 caspase-3 活性。简要步骤如下: 用人参皂苷 Rg1 或寡聚态 A β_{1-42} 按不同的时间处理原代皮质神经元。将神经元刮下、离心、弃上清, 按照 50 μL 溶液含 2×10^5 个细胞的比例裂解细胞、分离上清液, 加入 2×反应缓冲液/二硫苏糖醇(DTT)混合物孵育 1 h 后, 用荧光酶标仪(激发波长 380 nm/发射波长 460 nm)检测荧光强度以评估 caspase-3 的活性。

1.3 统计学处理 数据以 $\bar{X} \pm S$ 表示, 采用 SPSS 26.0 和 Graphpad Prism 软件进行统计分析。P < 0.05 为差别有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经元纯度 体外培养 5 d 的神经元中绝大多数为磷酸化的神经丝抗体染色阳性细胞, 胞体多呈椭圆形, 有 ≥2 个的突起; 胞质和突起内神经丝呈棕黄色, 胞核不着色(图 1)。

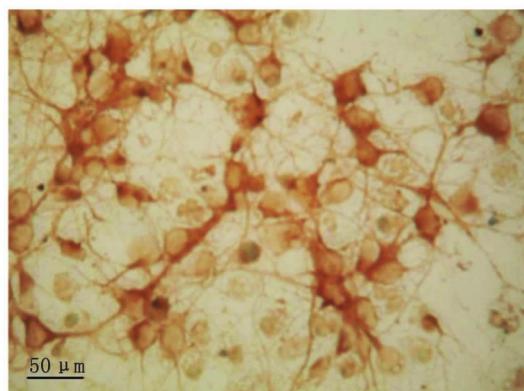
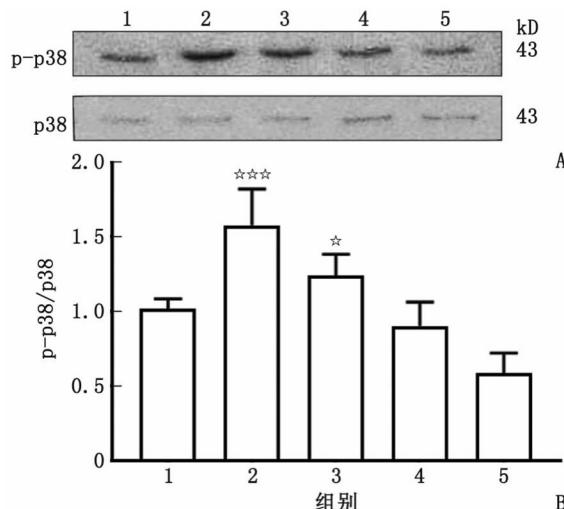
图 1 神经元纯度鉴定(免疫化学染色 $\times 400$)

Fig. 1 Identification of neuron purity
(immunochemical staining $\times 400$)

2.2 寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 作用不同时间对皮质神经元 p-p38 和 p38 蛋白水平的影响 与空白对照组比较, 在寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 作用于原代皮质神经元 5 和 15 min 时, p-p38 蛋白水平及 p-p38/p38 比值均明显升高, 差别均有统计学意义 ($P < 0.05$), 且在作用 5 min 时最为明显 ($P < 0.005$)。但皮质神经元内 p-p38/p38 的比值随着时间延长在组间呈下降趋势(图 2)。



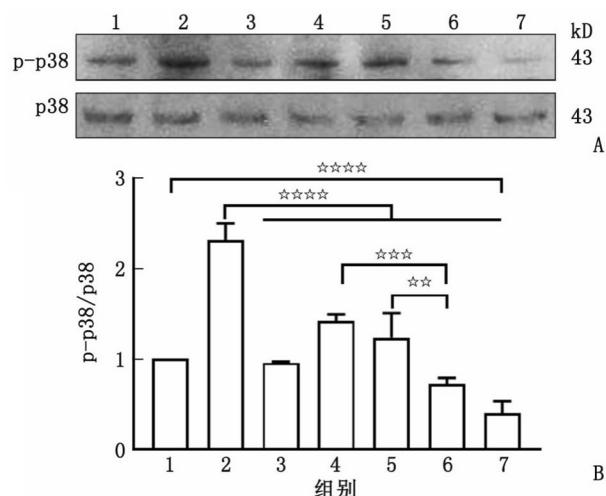
p-p38:磷酸化 p38。1:空白对照组;2~5 分别为 5、15、30 和 60 min $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组。A: Western-blot 条带; B: Western-blot 定量分析图。与空白对照组比较, $\star: P < 0.05$; $\star\star\star: P < 0.005$ 。

图 2 寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 不同作用时间点对皮质神经元细胞 p-p38、p38 及 p-p38/p38 水平的影响

Fig. 2 Protein level of p-p38, p38 and p-p38/p38 in cortical neurons treated with oligomeric $\text{A}\beta_{1-42}$ at different time points

2.3 人参皂苷 Rg1 减轻寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的皮质神经元 p38 磷酸化 与模型组比较, 不同浓度(2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$)的人参皂苷 Rg1 处理组可不同程度降低 p-p38/p38 的比值水平, 差别均有统计

学意义 ($P < 0.001$), 其中 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组皮质神经元细胞中 p-p38/p38 水平低于 2.5 $\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.005$) 及 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组 ($P < 0.01$)。同时, SB203580 处理组及 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 单独作用组的 p-p38/p38 的比值低于 $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组 ($P < 0.001$)。10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 单独作用组 p-p38/p38 水平也低于空白对照组 ($P < 0.001$, 图 3)。



p-p38:磷酸化 p38;1:空白对照组;2: $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组;3:SB203580 处理组;4~6:2.5、5.0 和 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 处理组;7:10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 单独作用组。A: Western-blot 条带; B: Western-blot 定量分析图。组间比较, $\star\star\star\star: P < 0.001$; $\star\star\star: P < 0.005$; $\star\star: P < 0.01$ 。

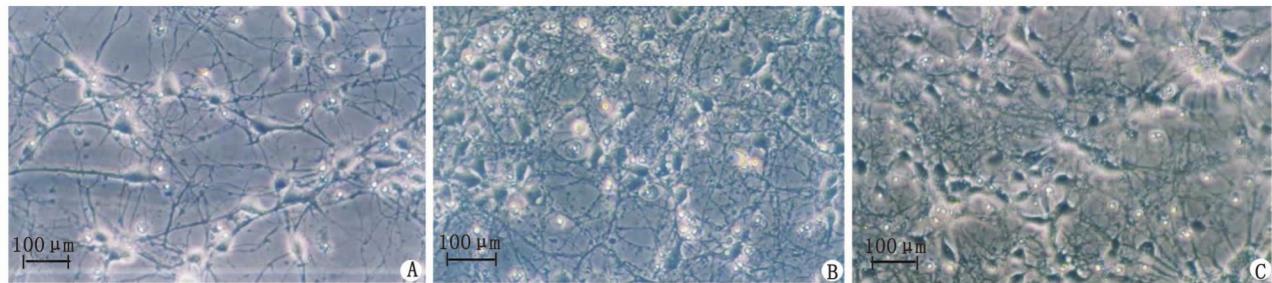
图 3 不同浓度的人参皂苷 Rg1 对寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导皮质神经元细胞 p-p38 及 p38 水平的影响

Fig. 3 Effects of ginsenoside Rg1 at different concentrations on p-p38 and p38 in cortical neurons induced by oligomeric $\text{A}\beta_{1-42}$

2.4 人参皂苷 Rg1 减轻寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的皮质神经元凋亡 空白对照组的皮质神经元细胞及神经元间突触形态及结构正常、完整, 呈均匀分布, 突触间联系光滑、完整、流畅(图 4A)。 $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组皮质神经元明显减少, 神经元突触形态屈曲、粗糙, 结构不完整(图 4B)。10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 处理组皮质神经元细胞数目和突触完整性、流畅性较 $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组明显改善(图 4C)。TUNEL 染色结果显示, 与空白对照组皮质神经元细胞比较, $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组 TUNEL 阳性细胞/总细胞的比值明显增高 ($P < 0.001$); 与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组皮质神经元细胞比较, 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 处理组 TUNEL 阳性细胞/总细胞的比值明显降低 ($P < 0.001$, 图 5A)。皮质神经元的 caspase-3 的活性检测结果显示, 在相同条件下, $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组

皮质神经元的 caspase-3 活性较空白对照组显著增加 ($P < 0.001$)；与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组比较，

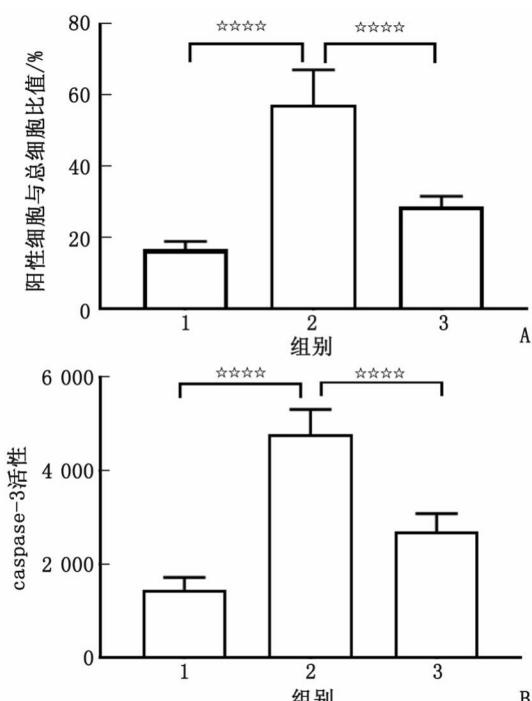
$10.0 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 处理组皮质神经元的 caspase-3 活性显著降低 ($P < 0.001$, 图 5B)。



A:空白对照组;B: $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组;C: $10.0 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 处理组。

图 4 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 对寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的皮质神经元凋亡具有神经保护作用(倒置显微镜)

Fig. 4 $10.0 \mu\text{mol/L}$ ginsenoside Rg1 has neuroprotective effect on apoptosis of cortical neurons induced by oligomeric $\text{A}\beta_{1-42}$ (observed by inverted microscope)



1:空白对照组;2: $\text{A}\beta_{1-42}$ 单独作用组;3: $10.0 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 处理组。A:TUNEL染色阳性细胞与总细胞的比值;B:caspase-3活性检测,指每毫克蛋白质中含量。组间比较,☆☆☆☆: $P < 0.001$ 。

图 5 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 减少 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的皮质神经元凋亡

Fig. 5 $10.0 \mu\text{mol/L}$ ginsenoside Rg1 has neuroprotective effect on apoptosis of cortical neurons induced by oligomeric $\text{A}\beta_{1-42}$

3 讨 论

AD 是中老年人中最为常见的痴呆类型,但其病因至今尚不明确,其治疗方法也有待进一步研发。在 AD 的病理学进展中, $\text{A}\beta$ 的瀑布学说仍为大多数学者所接受。该学说认为, $\text{A}\beta$ 可通过氧化应激、线

粒体功能障碍等途径引起神经元损伤和死亡、突触缺失、神经炎症和 tau 蛋白过度磷酸化,是触发 AD 病理改变的一个中心环节。这些病理过程同时也促进了 $\text{A}\beta$ 沉积^[7-8],从而进一步加速 AD 的病理损害和疾病的发展。在 $\text{A}\beta$ 的毒性片段中,寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 是细胞毒性最强的物质,也是研究 AD 病理生理的重要物质。本研究及课题组的前期研究^[6,9]都通过神经元形态观察、TUNEL 染色技术和 caspase-3 活性检测验证了寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 毒性对神经元的损害作用。因此,本研究选择寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 作为模拟 AD 病理生化的物质,并在前期以 $5.0 \mu\text{mol/L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体诱导原代皮质神经元细胞损伤,成功制备了体外 AD 模型。

MAPK 家族受广泛的细胞外刺激影响,参与细胞增殖、分化和凋亡等一系列生理病理过程,其中 c-Jun 氨基末端激酶/应激活化蛋白激酶(JNK/SAPK)与 p38 MAPK 均是 MAPK 家族的主要成员^[10]。本课题组前期研究发现,具有神经毒性的寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ ($5 \mu\text{mol/L}$) 可诱导皮质神经元内的 JNK 磷酸化,活化的 JNK/SAPK 可参与介导线粒体损伤^[3,6],与文献[11]的报道一致。而另一重要通路 p38 MAPK 激活后,可通过调控下游多种酶及转录因子的表达活性,从而对细胞功能进行调节。在 AD 模型中,p38 MAPK 可同时作为氧化应激的下游因子被磷酸化激活,改变 caspase-9 的构象,并启动 caspase 级联反应,激活下游的 caspase-3,通过蛋白水解作用,诱发过度的氧化应激,促进神经元的凋亡,加快 AD 的发病进程,其磷酸化程度与 AD 发病时间正相关^[12]。同时,有研究认为,在与学习记忆相关的脑区中,高表达的 p38 MAPK 是海马中代谢性谷氨酸受体 (metabotropic glutamate receptor,

mGluR)和N-甲基-D-天冬氨酸受体依赖性长时程抑制(long-term depression, LTD)形成的信号转导途径,参与了突触可塑性调节^[13-15]。在AD模型中, $\text{A}\beta$ 增多可通过p38 MAPK依赖性方式诱导mGluR-LTD,造成树突棘损失,与记忆减退密切相关^[16]。因此,p38 MAPK在AD的病理学进展中具有重要作用。本研究对不同作用时间(5、15、30、60 min)下 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导皮质神经元p38蛋白磷酸化的情况进行探索,发现5.0 $\mu\text{mol/L}$ 寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 作用5和15 min后,p38 MAPK在Thr180和Thr182位点的磷酸化水平明显增高,且p38磷酸化水平在作用5 min后升高最为明显,提示 $\text{A}\beta_{1-42}$ 介导的p38蛋白磷酸化是AD的早期病理生理过程中的关键环节,p38可能是研究AD治疗的重要靶点之一。

人参皂苷Rg1在抗炎、抗氧化、延缓衰老等方面具有重要作用^[17]。因此,本研究在AD的细胞模型中,以人参皂苷Rg1为干预手段,通过p38 MAPK探讨其在AD早期氧化应激中的保护作用,观察人参皂苷Rg1对寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的神经元细胞p-p38和p38蛋白水平的影响,结果发现,人参皂苷Rg1可下调p38磷酸化水平。相对于未经 $\text{A}\beta_{1-42}$ 干预的空白对照组及10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷Rg1处理组,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷Rg1单独作用组的p-p38/p38水平明显减低。一方面说明空白对照组(体外培养的皮质神经元)中也可能存在一定的应激反应和p38 MAPK信号通路,这与既往文献[18-19]的相关研究结果一致,当然其具体机制仍需进一步研究,笔者也将在未来的研中关注这一变化,探索其中的机制。另一方面论证了寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 可增加p38磷酸化水平,组间差别也进一步说明了人参皂苷Rg1对p38 MAPK信号通路具有抑制作用。本研究发现,p38磷酸化水平随人参皂苷Rg1浓度的增加而降低,其中10.0 $\mu\text{mol/L}$ 处理组中的p-p38水平及p-p38/p38比值最低,推测人参皂苷Rg1可能通过剂量依赖性方式抑制p38 MAPK,减少 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的神经元毒性。本研究还从形态学和凋亡两方面探索了人参皂苷Rg1对皮质神经元的影响,结果发现,与模型组比较,10.0 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷Rg1可有效保护神经元、维护突触结构,检测caspase-3的活性也得到相同的结果,进一步论证了人参皂苷Rg1在AD早期的应激反应中对神经元起保护作用。

本研究也存在一定局限性,虽然p38的异常磷酸化是AD早期病理生理过程中的重要环节,但AD的发病机制复杂,仅通过抑制p38活性并不能

完全实现AD的治疗目标。此外,本课题组进行的系列研究也发现,人参皂苷Rg1可能具有多靶点作用,后期将继续探讨人参皂苷Rg1的作用机制。

综上所述,本研究发现寡聚态 $\text{A}\beta_{1-42}$ 可诱导p38磷酸化,激活p38活性;而人参皂苷Rg1可减轻p38磷酸化,具有保护神经细胞作用。因此,p38 MAPK信号通路可能参与人参皂苷Rg1保护神经元,减轻寡聚肽 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的神经元损伤。

参考文献:

- [1] RAJAN K B, WEUVE J, BARNES L L, et al. Population estimate of people with clinical Alzheimer's disease and mild cognitive impairment in the United States (2020—2060)[J]. *Alzheimer's Dement*, 2021, 17(12):1966-1975.
- [2] LEE J K, KIM N J. Recent advances in the inhibition of p38 MAPK as a potential strategy for the treatment of Alzheimer's disease[J]. *Molecules*, 2017, 22(8):1287.
- [3] 黄天文,何饶丽,周梦,等.人参皂苷Rg1对寡聚肽 $\text{A}\beta_{1-42}$ 增加JNK活性及诱导凋亡的影响[J].中国药理学通报,2015,31(1):60-63.
- [4] 黄天文,何饶丽,周梦,等.人参皂苷Rg1对寡聚肽淀粉样 β 蛋白抑制蛋白激酶A通路的影响[J].中华老年医学杂志,2015,34(3):316-318.
- [5] TAKUMA K, YAO J, HUANG J M, et al. ABAD enhances $\text{A}\beta$ cell stress via mitochondrial dysfunction[J]. *FASEB J*, 2005, 19(6):597-598.
- [6] HUANG T W, FANG F, CHEN L M, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates oligomeric $\text{A}\beta$ (1-42)-induced mitochondrial dysfunction[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9(3):388-395.
- [7] CASTELLANI R J, PLASCENCIA-VILLA G, PERRY G. The amyloid cascade and Alzheimer's disease therapeutics: Theory versus observation[J]. *Lab Invest*, 2019, 99(7):958-970.
- [8] HENEKA M T, O'BANION M K, TERWEL D, et al. Neuroinflammatory processes in Alzheimer's disease[J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2010, 117(8):919-947.
- [9] 黄天文.人参皂苷Rg1通过抑制应激反应损害减轻寡聚态 $\text{A}\beta$ 介导的神经毒性作用[D].福州:福建医科大学,2007.
- [10] KONG A N, YU R, CHEN C, et al. Signal transduction events elicited by natural products: Role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis[J]. *Arch Pharm Res*, 2000, 23(1):1-16.
- [11] ZHU X, RAINA A K, ROTTKAMP C A, et al. Activation and redistribution of c-jun N-terminal kinase/stress activated protein kinase in degenerating neurons in Alzheimer's disease[J]. *J Neurochem*, 2001, 76(2):435-441.
- [12] CHEN X, LIN R, CHANG L, et al. Enhancement of long-term depression by soluble amyloid β protein in rat hippocampus is mediated by metabotropic glutamate receptor and involves activation of p38 MAPK, STEP and caspase-3[J].

- Neuroscience, 2013, 253:435-443.
- [13] WANG S, ZHANG C, SHENG X N, et al. Peripheral expression of MAPK pathways in Alzheimer's and Parkinson's diseases[J]. J Clin Neurosci, 2014, 21(5):810-814.
- [14] WANG Q W, ROWAN M J, ANWYL R. Inhibition of LTP by beta-amyloid is prevented by activation of beta 2 adrenoceptors and stimulation of the cAMP/PKA signalling pathway[J]. Neurobiol Aging, 2009, 30(10):1608-1613.
- [15] IZUMI Y, TOKUDA K, ZORUMSKI C F. Long-term potentiation inhibition by low-level *N*-methyl-D-aspartate receptor activation involves calcineurin, nitric oxide, and p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Hippocampus, 2008, 18(3):258-265.
- [16] HSIEH H, BOEHM J, SATO C, et al. AMPAR removal underlies A β -induced synaptic depression and dendritic spine loss[J]. Neuron, 2006, 52(5):831-843.
- [17] CHEN L M, ZHOU X M, CAO Y L, et al. Neuroprotection of ginsenoside Re in cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Asian Nat Prod Res, 2008, 10(5/6):439-445.
- [18] LIU X W, JI E F, HE P, et al. Protective effects of the p38 MAPK inhibitor SB203580 on NMDA induced injury in primary cerebral cortical neurons[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4):1942-1948.
- [19] XIAO L, HU C, FENG C Z, et al. Switching of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-favorite intracellular signal pathways from ERK1/2 protein to p38 mitogen-activated protein kinase leads to developmental changes in NMDA neurotoxicity[J]. J Biol Chem, 2011, 286(23):20175-20193.

The Possible Effect of Ginsenoside Rg1 on Oligomeric A β_{1-42} Increasing p38 MAPK Activity and Inducing Neuronal Injury

HE Raoli¹, LIN Nan², FANG Lijun³, HUANG Tianwen^{1,2}

1. Department of Neurology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China;

2. Fujian Key Laboratory of Vascular Aging, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China;

3. Department of Ophthalmology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect of ginsenoside Rg1 on the increase of p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) activity and neuronal injury induced by amyloid β -protein 1-42 (A β_{1-42}) in cortical neurons. **Methods** The cortical neurons of C57BL/6 fetal rats were detected by neuron specific antibody as the object of study. We used oligomeric A β_{1-42} to induce neuronal damage, and divided neurons into blank control group, oligomeric A β_{1-42} group, SB203580 treatment group, ginsenoside Rg1 treatment group and only ginsenoside Rg1 group. The protein levels of p38 and p-p38 were detected by Western-blot, and the morphology of neurons was observed by light microscope. TUNEL staining and caspase-3 activity were used to detect the related indexes of neuronal apoptosis. **Results** (1) Compared with the blank control group, the level of p-p38 protein in cortical neurons increased significantly in the presence of oligomeric A β_{1-42} on 5 min and 15 min ($P<0.05$); (2) Compared with the model group (oligomeric A β_{1-42} group), ginsenoside Rg1 at different concentrations (2.5, 5.0 and 10.0 μ mol/L) significantly reduced the level of p-p38/p38 in the ginsenoside Rg1 treatment group ($P<0.001$). Compared with the blank control group, only ginsenoside Rg1 group also could reduce the level of p-p38/p38 in cortical neurons ($P<0.005$); (3) In the morphogenetic observation of cortical neurons, compared to the model group (oligomeric A β_{1-42} group), synaptic integrity and fluency significantly improved in the 10.0 μ mol/L ginsenoside Rg1 treatment group. And compared to the model group, the 10.0 μ mol/L ginsenoside Rg1 treatment group showed a decrease in the ratio of TUNEL positive apoptotic neurons to total cells and caspase-3 activity ($P<0.001$). **Conclusion** p38 MAPK signaling pathway participates in ginsenoside Rg1 to alleviate oligomeric A β_{1-42} induced cortical nerve damage process.

KEY WORDS: Alzheimer's disease; ginsenoside Rg1; p38 mitogen activated protein kinase

(编辑:何佳凤)