

[文章编号] 1000-4718(2014)03-0479-07

人参皂苷 Rg1 抑制叔丁基过氧化氢诱导的原代大鼠皮层神经元损伤^{*}

逯丹[△], 舒晓明[△], 张婵娟, 赵佳仪, 朱丽红, 戚仁斌, 王华东, 陆大祥[△]

(暨南大学医学院病理生理学系,暨南大学脑科学研究所,国家中医药管理局重点科研实验室,广东 广州 510632)

[摘要] 目的: 观察人参皂苷 Rg1 对叔丁基过氧化氢(t-BHP)诱导的原代大鼠皮层神经元损伤的改善作用,并探讨其可能机制。方法: 将神经元随机分为正常对照组、10 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 组及 10 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP + 10 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 组,培养 24 h。采用 MTT 检测不同浓度 t-BHP 处理的神经元活性,神经元三维重建研究神经元平均总纤维长度及总突起数量,免疫荧光检测 caspase-3 表达水平及免疫印迹方法检测 Bcl-2、caspase-3 以及磷酸化糖原合成酶激酶 3 β (pGSK-3 β) 蛋白表达水平。结果: 10 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rg1 能够对抗 10 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP 引起的原代大鼠皮层神经元活性水平的降低,并且上调 Bcl-2 及 pGSK-3 β 蛋白表达量,降低 caspase-3 活化为 cleaved caspase-3 的水平($P < 0.05$)。结论: 人参皂苷 Rg1 可能通过提高 GSK-3 β 自身磷酸化从而增强神经元的抗 t-BHP 损伤能力。

[关键词] 人参皂苷 Rg1; 叔丁基过氧化氢; 糖原合成酶激酶 3 β

[中图分类号] R329.21

[文献标志码] A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2014.03.017

Ginsenoside Rg1 protects primary rat cerebrocortical neurons against t-BHP-induced damage *in vitro*

LU Dan, SHU Xiao-ming, ZHANG Chan-juan, ZHAO Jia-yi, ZHU Li-hong, QI Ren-bin, WANG Hua-dong, LU Da-xiang

(Department of Pathophysiology, Institute of Brain Research, Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, School of Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China. E-mail: ldx@jnu.edu.cn)

[ABSTRACT] AIM: To observe the effect of ginsenoside Rg1 (G-Rg1) on tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)-induced injury in primary rat cerebrocortical neurons and their filaments. METHODS: Primary rat cerebrocortical neurons were randomly divided into normal group, 10 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP induction group and 10 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP + 10 $\mu\text{mol/L}$ G-Rg1 treatment group. The MTT assay was used to detect the cell viability under various concentrations of t-BHP. 3D cell reconstruction was performed to measure the filament length and number. The protein expression levels of Bcl-2, phosphorylated glycogen synthase kinase 3 β (pGSK-3 β) and caspase-3 were determined by the methods of immunofluorescence and Western blotting. RESULTS: G-Rg1 at concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ reversed the decrease in cell viability, increased the protein expression level of Bcl-2 and pGSK-3 β , and suppressed the activation of caspase-3 in t-BHP induction group ($P < 0.05$). CONCLUSION: G-Rg1 increases the anti-stress ability of the neurons by increasing the pGSK-3 β phosphorylation under the condition of t-BHP exposure.

[KEY WORDS] Ginsenoside Rg1; Tert-butyl hydroperoxide; Glycogen synthase kinase 3 β

人参是祖国传统中药的珍品,含有多种有效成分,具有延年益寿滋补强身的功效。研究证实人参有效成分对动物的学习记忆功能有改善作用,且人参皂苷 Rg1 具有促智作用,可以显著改善脑缺血及

淀粉样多肽等损害引起的学习记忆功能障碍,并对多种模型的学习记忆功能有保护作用^[1]。人参皂苷 Rg1 作为人参药理作用的主要成分之一,能够提高机体内抗脂质过氧化体系活性从而延缓衰老,长期

[收稿日期] 2013-12-23

[修回日期] 2014-01-20

*[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(No. 2011CB707501);广州市科技计划项目重大专项(No. 11BppZXaa2070006);国家自然科学基金资助项目(No. 81371442)

[△]通讯作者 Tel: 020-85220004; E-mail: ldx@jnu.edu.cn

▲并列第一作者

使用人参皂苷治疗能防止老年小鼠失忆症的发生,可改善记忆全过程^[2],人参皂苷 Rg1 作为益智药的主要有效成分能够促进神经递质乙酰胆碱的释放^[3]、阻止脑内脂质过氧化过程^[4]等。本研究以叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide, t-BHP)诱导建立原代神经无损伤模型,观察人参皂苷 Rg1 处理对 t-BHP 作用后细胞生长的影响以及神经突起变化,并对其机制进行初探。

材 料 和 方 法

1 动物

新生 24 h 内健康 Sprague-Dawley 大鼠乳鼠,SPF 级,雌雄不限,由南方医科大学实验动物中心提供,许可证号为 4402101947。

2 主要试剂

人参皂苷 Rg1(纯度 ≥96%)购自广东省药品检验所。DMEM/F12 试剂培养基购自 HyClone。Neurobasal 购自 Invitrogen。B27 购自 Gibco,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 HyClone。胰蛋白酶、左旋多聚赖氨酸和 MTT 购自 Sigma。Caspase-3 抗体、磷酸化糖原合成酶激酶 3β(phosphorylated glycogen synthase kinase 3β, pGSK-3β)抗体和 Bcl-2 抗体均购自 Cell Signaling Technology。AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。大鼠神经元特异性微管相关蛋白 2(microtubule-associated protein 2, MAP-2)抗体购自 Millipore。TRICT 标记山羊抗兔抗体以及 FITC 标记的驴抗兔抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。其它生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

3 主要方法

3.1 原代大鼠皮层神经元的分离培养 用乙醇消毒新生鼠头部后,断头处死,无菌条件下打开颅腔,于 PBS 磷酸盐缓冲液分离出皮层,去除脑膜和血管,稍静置待组织沉入离心管底部,以上步骤均在 4℃条件下进行,静止 2 min 后弃去上清,向组织内加入 0.125% 胰蛋白酶,消化 10 min 后加入添加血清的培养基终止其消化,用尖端抛光的玻璃管轻轻吹打至无可见的组织块,组织悬液移至 15 mL 离心管进行离心,离心 5 min 后弃去上清液,加入 DMEM/F12 完全培养基(含 10% FBS)用尖端抛光的玻璃管轻轻吹打数次,将吹打重悬后的沉淀通过 200 目筛网过滤后,用台盼蓝染色计数,调整细胞密度为 2×10^7 /L 接种于培养板中,置 37℃、5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养,接种 4 h 后的细胞用原代神经元 Neurobasal 完全培养基(含 2% B27)全量换液。培

养 3 d 后,原代神经元完全培养基全量换液。

3.2 MAP2 免疫荧光染色鉴定神经元并显示其神经纤维形态 弃去培养基,用 PBS 洗 1 遍。用 4% 多聚甲醛溶液室温固定神经元 20 min。PBS 洗细胞 2 次。用 0.1% Triton X-400 室温透化处理细胞 10 min(24 孔板每孔加入 500 μL)。用 0.1% BSA 室温封闭 1 h。用封闭液中稀释 MAP-2 I 抗至工作浓度,置于湿盒内,4℃冰箱孵育过夜。除去 I 抗,用 PBS 洗 3 次(每次 5 min)。图 4A 为 TRICT 标记的荧光 II 抗临用前用 PBS 稀释至工作浓度,图 4 B 为 FITC 标记的荧光 II 抗湿盒内室温孵育 II 抗 30 min。除去 II 抗,用 PBS 洗细胞 3 次(每次 5 min),加入 500 μL PBS 覆盖后镜下观察,神经纤维的三维重建通过 Imaris software(BitPlane AG)检测。

3.3 实验分组 (1)正常对照组:不加任何处理因素;(2)模型组:加入 10 μmol/L t-BHP 作用于原代皮层神经元 24 h;(3)人参皂苷 Rg1 保护处理组:加入 10 μmol/L Rg1 预保护 4 h 后再与 10 μmol/L t-BHP 共同作用于原代大鼠皮层神经元 24 h。

3.4 MTT 法测细胞活性 原代培养的皮层神经元接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL 细胞悬液,待细胞生长 5 d,用不同浓度 t-BHP 与人参皂苷 Rg1 对细胞处理,每组设 5 个复孔,24 h 后,用磷酸盐缓冲液现配成初始浓度 5 g/L 的溶液,每孔加入 100 μL MTT 与培养基混合液,上述配液及加液过程需避光操作,之后置培养箱中 37℃孵育 4 h,在预热 10 min 的 Bio-Rad 酶标仪 570 nm 波长处进行吸光度(absorbance, A)测定。根据下列公式计算各组细胞活性:细胞活性 = $(A_{\text{处理组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$,实验重复 3 次。

3.5 流式细胞术检测细胞凋亡 培养细胞铺板 6 孔板,按照先前的实验分组,加入不同的损伤及保护处理药物后开始后续实验。达到作用时间后,吸出培养液,用 PBS 洗 2 次,每孔加入胰酶 1 mL,放入培养箱消化 3 min。轻轻吹打细胞使之悬浮于消化液中,在操作中要轻柔并且迅速,然后加含有血清的 DMEM 培养基终止消化。待细胞消化完全后,分组标记,配平。将消化好的细胞放入离心机中,1 000 r/min 离心 × 5 min。轻轻吸取上清,将不同组间加入 loading buffer 200 μL。用枪头吹打成单细胞悬液。然后在避光条件下加入 PI 及 FITC 染料各 2 μL。避光反应 15 min。轻轻吹打混匀后,上级检测各组细胞凋亡率。

3.6 免疫细胞化学法检测 caspase-3 的表达 弃去培养基,用 PBS 洗 1 遍。4% 多聚甲醛固定细胞后,

加过氧化氢甲醇溶液灭活内源性的过氧化物酶。正常山羊血清室温孵育 10 min 后,加 PBST(含 0.5% Triton 的 PBS 磷酸盐缓冲液)稀释 caspase-3 I 抗,抗体 4 ℃ 孵育过夜。加 TRITC 标记山羊抗兔 IgG 作用 1 h,Hoechst 33342 染核 10 min 后,洗片封片 3 次,每次 5 min,显微镜下观察并摄片。

3.7 免疫印迹法检测 Bcl-2、pGSK-3β 和 caspase-3 表达 处理后的各组弃培养液,用预冷的 PBS 清洗 2 次,每孔加入 60 μL 细胞裂解液,冰面上裂解 20 min,14 000 × g、4 ℃ 离心 10 min,取上清,Bradford 法通过 BCA 定量试剂盒进行蛋白定量(碧云天)。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,半干电转移法转移至 PVDF 膜,室温下用封闭液封闭 PVDF 膜 1 h 后,分别加入相应 I 抗(1:1 000 稀释)于 4 ℃ 孵育过夜,分别用相应的抗兔或鼠 II 抗(1:5 000 稀释)

室温孵育 2 h,ECL 发光液发光显色,X 线底片曝光。
β-肌动蛋白(β-actin)作为内参照。实验重复 3 次。

4 统计学处理

数据以均数 ± 标准误(mean ± SEM)表示,采用 SPSS 13.0 软件包分析,组间比较用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

结 果

1 原代大鼠皮层神经元鉴定

新生大鼠皮质神经元采用无血清 Neurobasal 完全培养基(含 2% B27)培养,以减少胶质细胞的影响。培养 5 d 后,采用 MAP-2 免疫荧光染色对神经元进行鉴定,见图 1,可见所培养的细胞 80% 以上都为神经元,纯度较高,可用于后续实验。

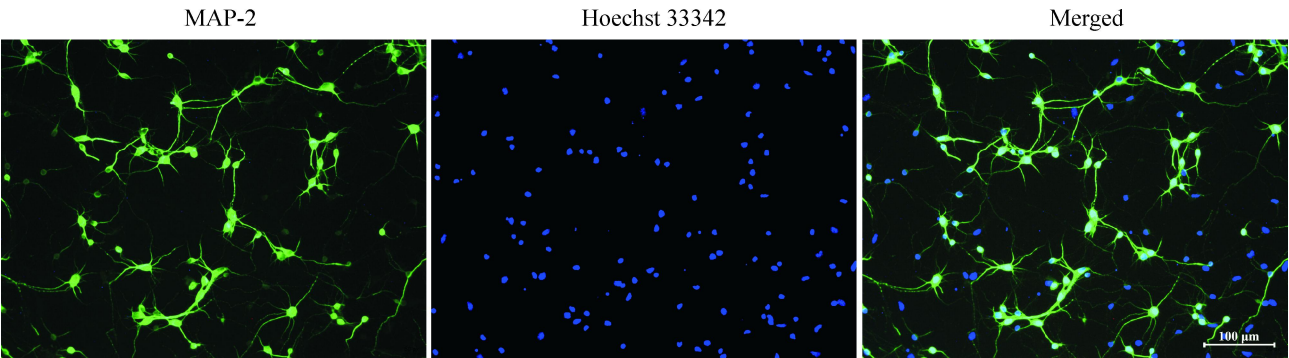


Figure 1. Neuron identification. Analysis of MAP-2 protein expression and Hoechst 33342 in primary rat cerebrocortical neurons by immuncytochemistry.

图 1 原代大鼠皮层神经元鉴定

2 人参皂苷 Rg1 对由 t-BHP 诱导的原代神经元细胞损伤的活性影响

t-BHP 对原代皮层神经元损伤有浓度依赖性,见图 2A;10 μmol/L G-Rg1 组处理 24 h 神经元活性为

95.24%,较模型组有显著提高,见图 2B ($P < 0.05$),说明人参皂苷 Rg1 在对抗 t-BHP 诱导的原代皮层神经元细胞活性降低时具有较好的改善作用。

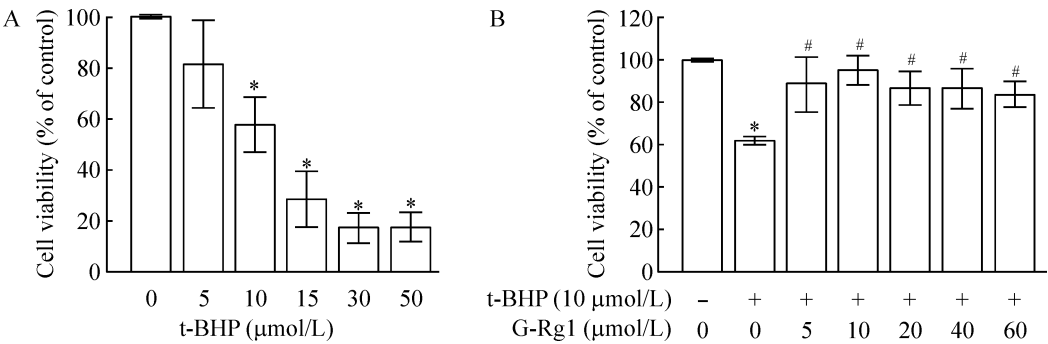


Figure 2. G-Rg1 inhibited t-BHP-induced decrease in the viability of primary rat cerebrocortical neurons. Cell viability was measured by MTT assay. A: effects of different concentrations of t-BHP on cell viability; B: effects of G-Rg1 on t-BHP-induced cell viability. Mean ± SEM. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control (0 μmol/L t-BHP); # $P < 0.05$ vs 10 μmol/L t-BHP alone.

图 2 人参皂苷 Rg1 对 t-BHP 诱导的原代皮层神经元活性的影响

3 人参皂苷 Rg1 对 t-BHP 诱导的细胞凋亡及 caspase-3 和 Bcl-2 表达的影响

如图 3 所示,Q3 区为正常细胞,Q2 区为晚期凋亡细胞,Q4 区为早期凋亡细胞。t-BHP 损伤组与正常对照组相比,细胞凋亡有增加。10 μmol/L 人参皂苷 Rg1 干预组凋亡细胞较 t-BHP 损伤组有降低。各组细胞经过相应处理后,Hoechst 33324 染色结果显示正常对照组细胞核光滑,形态较均匀一致,基本上没有核固缩及核断裂。损伤组与正常对照组相比较,可以观察到大量神经元细胞核体积明显减小,有些细胞核形状不规则,其中一些有染色质浓缩、核固缩现象,边缘化等典型的凋亡形态特征,凋亡细胞率损伤组较对照组有显著增加。而人参皂苷 Rg1 组调

亡细胞率与 t-BHP 损伤组相比较显著降低,通过荧光显微镜可以观察到有些细胞核体积缩小,有少量的核固缩,细胞核光滑,规则,基本均匀一致,少有核碎裂。对应的 t-BHP 损伤组 caspase-3 平均每个视野达到 60.6%,与正常对照组的 14.6% 比较,有显著高表达;而人参皂苷 Rg1 处理后的 caspase-3 显著降低至 36.4%,且与 Hoechst 33324 染色定位一致,见图 4 A ~ C,提示人参皂苷 Rg1 抑制的细胞凋亡可能通过抑制 caspase-3 表达进行的。免疫印迹结果显示,t-BHP 损伤引起的原代皮层神经元 Bcl-2 下调与 caspase-3 活化,经人参皂苷 Rg1 处理的神经元 Bcl-2 表达量显著升高,caspase-3 活性显著降低 ($P < 0.05$),见图 4D、E。

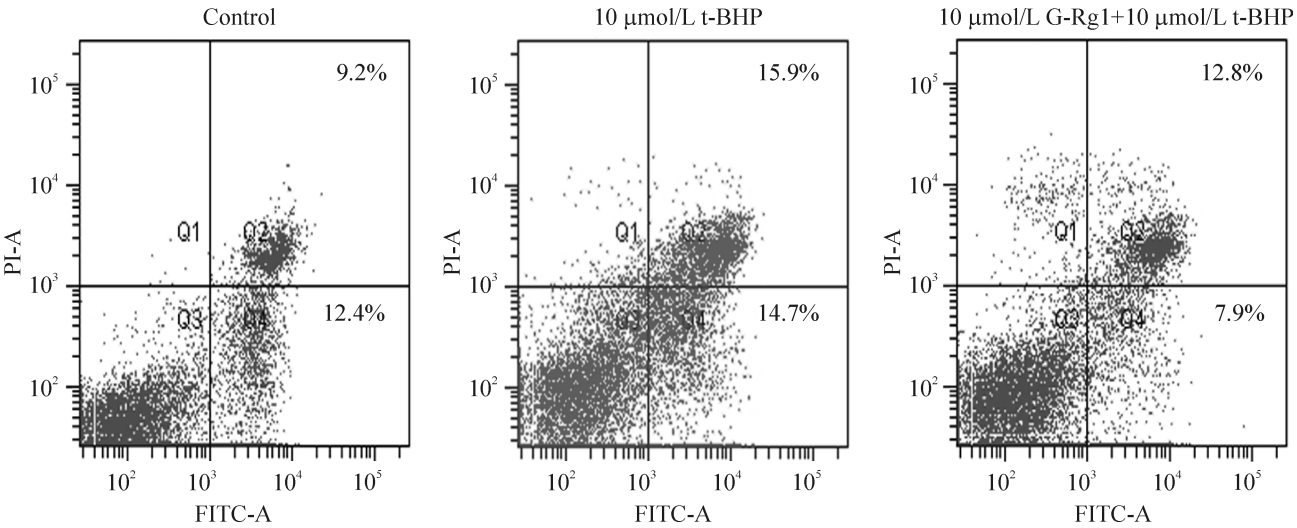


Figure 3. G-Rg1 reduced t-BHP-induced apoptosis in primary neurons .

图 3 人参皂苷 Rg1 对 t-BHP 诱导的原代皮层神经元凋亡的影响

4 人参皂苷 Rg1 提高神经元突起的抗损伤能力

如图 5A 所示,人参皂苷 Rg1 单独作用的神经纤维长度为 1 086.53 μm,与正常对照组的 894.9 μm 相比较有略微增长,虽然无显著差异 ($P > 0.05$),但提示人参皂苷 Rg1 对神经元保护作用可能与其维持神经纤维生长有关。按实验分组处理后,10 μmol/L t-BHP 损伤后神经纤维长度 (146.25 μm) 较正常对照组 (854.6 μm) 有显著损伤,而 10 μmol/L t-BHP + 10 μmol/L 人参皂苷 Rg1 组的纤维总长度 (354.35 μm) 较 10 μmol/L t-BHP 损伤后神经纤维长度 (146.25 μm) 有所延长 ($P < 0.05$),见图 5B ~ E。免疫印迹检测显示,10 μmol/L t-BHP + 10 μmol/L 人参皂苷 Rg1 组 pGSK-3β 蛋白较 t-BHP 单独损伤组水平有增加 (图 5E),提示人参皂苷 Rg1 能够通过 pGSK-3β 途径稳定神经元纤维,从而抵抗 t-BHP 诱导的损伤。

万方数据

讨 论

氧化损伤引起的过多神经元丢失与神经退行性疾病有密切关系^[5]。大量实验证实神经退行性疾病中,神经元丢失多是由于凋亡通路被激活后诱发凋亡所致^[6]。其中 Bcl-2 家族蛋白质是线粒体凋亡途径的主要调控因子,上调 Bcl-2 成为抑制神经退行性疾病的细胞凋亡相关药物的一类重要靶标。凋亡通路中一个重要的半胱氨酸蛋白酶成员 caspase-3 一直被认为是凋亡发生的执行者,实验证实 caspase-3 被抑制后细胞能够抵抗来自多种损伤的凋亡^[7-8]。同时,两者是氧化损伤线粒体途径的重要节点。人参皂苷 Rg1 在多种细胞中验证能够减少细胞凋亡,例如 Aβ₁₋₄₂ 引起的 PC12 凋亡、MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡等等^[9-10]。本实验用 t-BHP 建立原代皮层神经元的衰老损伤模型,神经元可呈现与凋亡有关的

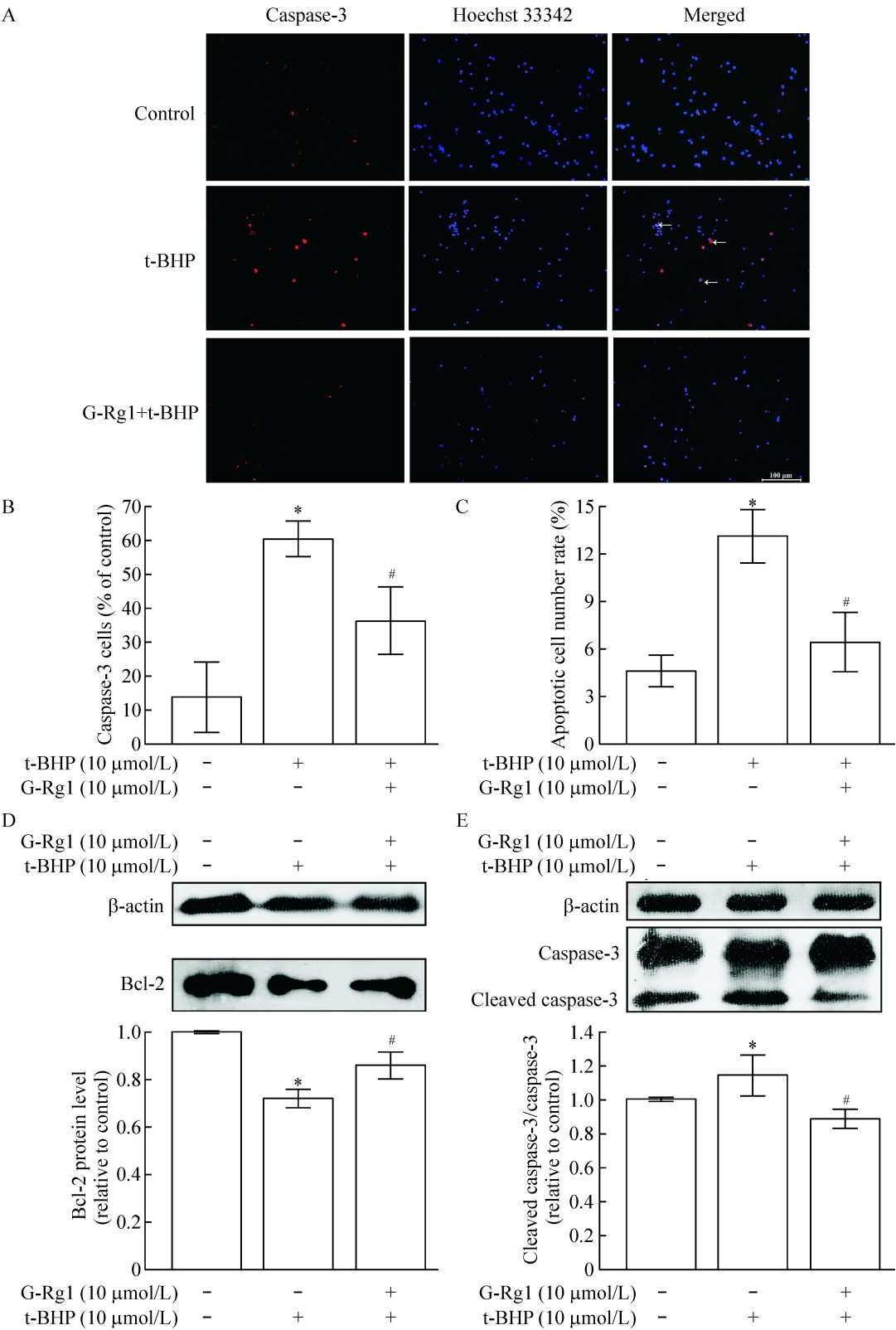


Figure 4. Effects of G-Rg1 on the activation of caspase-3 and the expression of Bcl-2 in t-BHP-induced primary rat cerebrocortical neurons. A ~ C: the immunofluorescence images showed remarkable changes using antibodies against caspase-3. The arrow-heads pointed to examples of apoptotic cells marked by high intensity of blue fluorescence and nuclear condensation. D and E: Western blotting showed the expression of Bcl-2, cleaved caspase-3 and caspase-3. Mean ± SEM. *n* = 3. * *P* < 0.05 vs control (no treatment); # *P* < 0.05 vs t-BHP alone.

图 4 人参皂苷 Rg1 对 t-BHP 诱导的海马神经元 caspase-3 活化水平及 Bcl-2 蛋白表达的影响

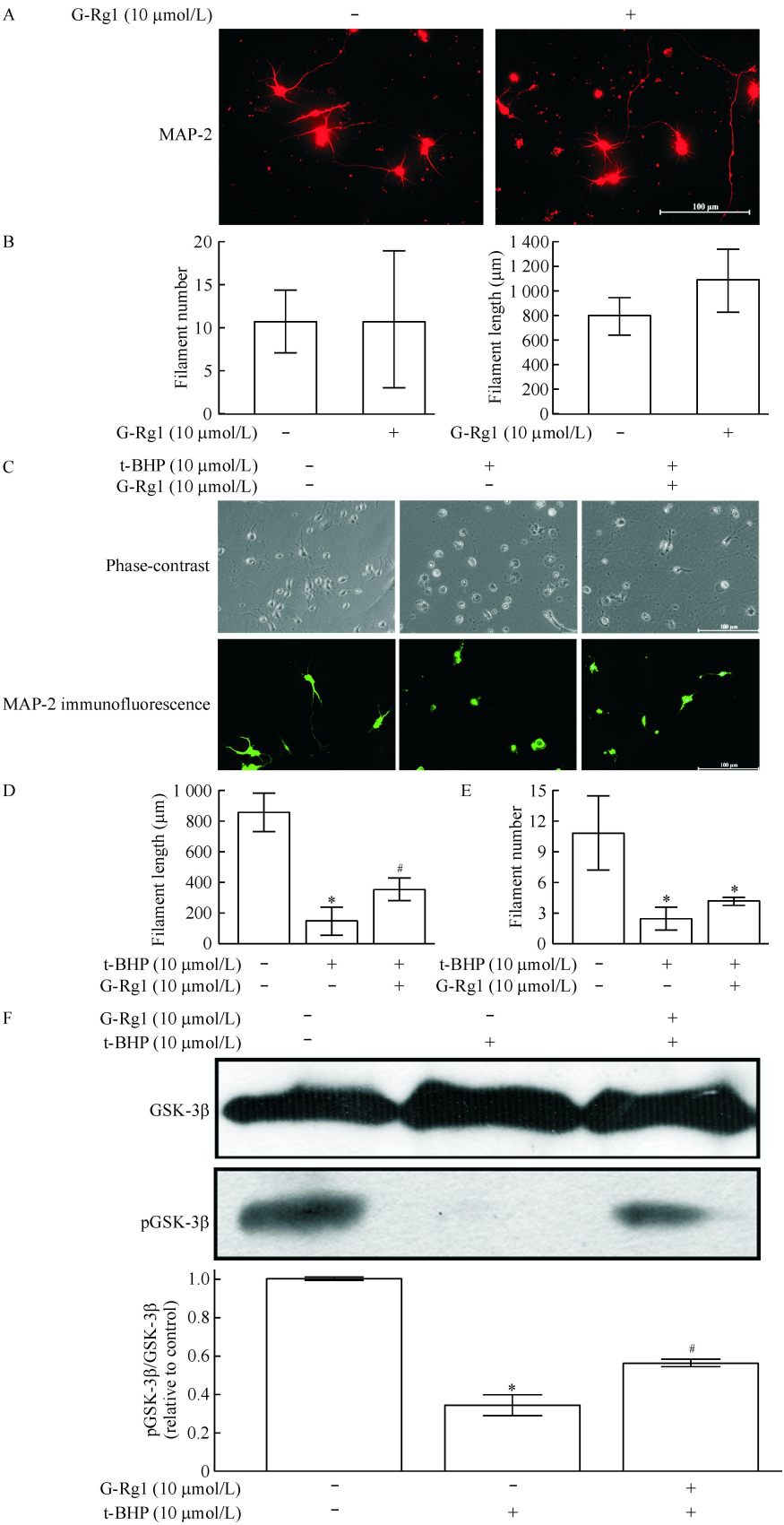


Figure 5. Effect of G-Rgl on the injuries of cerebrocortical neurons and pGSK-3 β protein expression induced by t-BHP. A and B: neurons were treated with or without 10 $\mu\text{mol/L}$ G-Rgl for 24 h, and MAP-2 immunofluorescence staining was performed for quantitative analysis of total filament; C ~ E: neurons were treated with or without 10 $\mu\text{mol/L}$ G-Rgl and 10 $\mu\text{mol/L}$ t-BHP, and their injuries were demonstrated using MAP-2 immunofluorescence staining; F: expression of pGSK-3 β protein analyzed by Western blotting. Mean \pm SEM. $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control (no treatment); # $P < 0.05$ vs t-BHP alone.

图5 人参皂苷 Rgl 对 t-BHP 诱导的大脑皮层神经元损伤及 p-GSK-3 β 蛋白表达的影响

衰老的细胞特征:MTT 法显示细胞活性降低;免疫荧光显示 caspase-3 活化细胞增多;Hoechst 33342 染色显示异常细胞核增多。而人参皂苷 Rg1 显著减轻了以上的衰老变化。

长时程增强是学习网络形成必不可少的神经系统活动,需要许多神经纤维被同时激活,神经元的纤维主要包括轴突树突,因此神经纤维的抗损伤能力越强,则越有利于神经网络的维持,而人参皂苷 Rg1 具有促进海马神经发生、增强学习和记忆力、抗衰老、提高神经可塑性的作用^[11],学习记忆及神经可塑性方面的改善可能与其对神经纤维的影响有关,通过本实验以光镜观察及三维重建检测神经纤维长度及形态在模型组有明显损伤,而人参皂苷 Rg1 作用组神经纤维长度及形态有显著改善,证明人参皂苷 Rg1 对神经纤维生长有促进作用从而使神经系统网络的建立、树突轴突的成熟和稳定趋于完善。与生存有关的 GSK-3 蛋白主要有两种亚型,即 GSK-3 α 和 GSK-3 β ,GSK-3 β 还能作用于众多信号蛋白、结构蛋白和转录因子,调控糖原合成酶的活性,调节细胞的分化、增殖、存活和凋亡,而且活化的 GSK-3 β 诱导 tau 蛋白的过度磷酸化,神经纤维过度缠结,神经元丢失,突触丢失,同时抑制 GSK3 β 高表达能够稳定细胞微管的结构^[12]。文献报道 pGSK-3 β 是抑制 GSK-3 β 活化的调节方式,因此人参皂苷 Rg1 作用的神元对抗 t-BHP 损伤与增加 GSK-3 β 磷酸化有关。GSK3 β 本身能活化 caspase-3,也可能是促使神经元细胞损伤(或凋亡)的一个重要机制^[13-14]。本研究发现,人参皂苷 Rg1 组较 t-BHP 损伤组 caspase-3 蛋白活化的水平显著降低,进一步说明人参皂苷 Rg1 能够通过 GSK-3 β 磷酸化升高而降低 GSK-3 β 表达,从而抑制 caspase-3 的活化,达到抑制细胞凋亡的目的。另外,抑制 GSK-3 β ,即磷酸化 GSK-3 β 后,能够激活蛋白酶 B 通路,最终使得 Bcl-2 上调,引起凋亡抵抗^[15-16]。本研究亦发现,人参皂苷 Rg1 组较 t-BHP 损伤组 Bcl-2 蛋白水平显著升高,细胞对抗 t-BHP 损伤的能力增强。

综上所述,人参皂苷 Rg1 能够通过磷酸化 GSK-3 β 而抑制 GSK-3 β 活性,从而在提高原代皮层神经元抗衰老和抗损伤方面具有重要的意义,但其作用途径及机制比较复杂,尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

- 王巧云,吴峰阶. 人参皂苷 Rg1 对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织 NOS 活性及蛋白表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(12):2328-2332.
- Fang F, Chen X, Huang T, et al. Multi-faced neuroprotective effects of Ginsenoside Rg1 in an Alzheimer mouse model [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1822(2):286-292.
- Wang Q, Sun LH, Jia W, et al. Comparison of ginsenosides Rg1 and Rb1 for their effects on improving scopolamine-induced learning and memory impairment in mice [J]. Phytother Res, 2010, 24(12):1748-1754.
- Zhang JT, Qu ZW, Liu Y, et al. Preliminary study on anti-amnesic mechanism of ginsenoside Rg1 and Rb1 [J]. Chin Med J (Engl), 1990, 103(11):932-938.
- Li WZ, Li WP, Zhang W, et al. Protective effect of extract of Astragalus on learning and memory impairments and neurons' apoptosis induced by glucocorticoids in 12-month-old male mice [J]. Anat Rec (Hoboken), 2011, 294(6):1003-1014.
- Wines-Samuelson M, Schulte EC, Smith MJ, et al. Characterization of age-dependent and progressive cortical neuronal degeneration in presenilin conditional mutant mice [J]. PLoS One, 2010, 5(4):e10195.
- Fuentealba RA, Liu Q, Kanekiyo T, et al. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes anti-apoptotic signaling in neurons by activating Akt survival pathway [J]. J Biol Chem, 2009, 284(49):34045-34053.
- Gui C, Wang JA, He AN, et al. Heregulin protects mesenchymal stem cells from serum deprivation and hypoxia-induced apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2007, 305(1-2):171-178.
- Chang CS, Chang CL, Lai GH, et al. Reactive oxygen species scavenging activities in a chemiluminescence model and neuroprotection in rat pheochromocytoma cells by astaxanthin, beta-carotene, and canthaxanthin [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2013, 29(8):412-421.
- Chen XC, Fang F, Zhu YG, et al. Protective effect of ginsenoside Rg1 on MPP⁺-induced apoptosis in SHSY5Y cells [J]. J Neural Transm, 2003, 110(8):835-845.
- Chu SF, Zhang JT. New achievements in ginseng research and its future prospects [J]. Chin J Integr Med, 2009, 15(6):403-408.
- Zhao MR, Li D, Shimazu K, et al. Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis [J]. Biol Psychiatry, 2007, 62(5):381-390.
- Dewachter I, Ris L, Jaworski T, et al. GSK3beta, a centre-staged kinase in neuropsychiatric disorders, modulates long term memory by inhibitory phosphorylation at serine -9 [J]. Neurobiol Dis, 2009, 35(2):193-200.
- Gould RG, Owen R, Gordon-Weeks PR. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones [J]. J Cell Sci, 1999, 112(Pt 19):3373-3384.
- Takashima A. GSK-3 is essential in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2006, 9(3 Suppl):309-317.
- Pan JJ, Chang QS, Wang X, et al. Activation of Akt/GSK3beta and Akt/Bcl-2 signaling pathways in nickel-transformed BEAS-2B cells [J]. Int J Oncol, 2011, 39(5):1285-1294.