

DOI: 10.3969/j.issn.1006-9771.2016.06.006

· 基础研究 ·

人参皂苷 Rg1 对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响

李锋涛¹, 林磊², 程斌¹

[摘要] 目的 探索人参皂苷 Rg1 对于大鼠脊髓缺血再灌注损伤(SCII)后细胞凋亡的影响。方法 成年健康 Sprague-Dawley 大鼠 48 只, 随机分为假手术组(n=8)、缺血组(n=8)、再灌注组(n=16 只)和药物组(n=16)。假手术组仅安放球囊不阻断血流; 缺血组脊髓缺血 30 min; 药物组大鼠分别于脊髓缺血前 30 min 及术后腹腔注射人参皂苷 Rg1 30 mg/kg; 再灌注组与药物组相同时间点注射相同体积生理盐水。假手术组、缺血组于缺血后 30 min, 药物组和再灌注组于再灌注后 6 h 及 24 h 应用 HE 染色检测细胞形态改变, 应用免疫组织化学染色检测 Bcl-2 及 survivin 表达。结果 缺血组、再灌注组及药物组 HE 染色均有神经元损伤, 药物组损伤较其他两组明显减轻。缺血组、再灌注组和药物组 survivin、Bcl-2 阳性细胞明显高于假手术组($t>3.896$, $P<0.01$)。药物组 6 h、24 h survivin 及 Bcl-2 蛋白阳性细胞均较再灌注组显著增加($t>6.693$, $P<0.001$)。结论 人参皂苷 Rg1 可减少早期大鼠 SCII 后神经元损害, 增加抗凋亡蛋白 survivin、Bcl-2 的表达, 抑制凋亡。

[关键词] 脊髓损伤; 缺血再灌注损伤; 人参皂苷 Rg1; 凋亡; 大鼠

Effect of Ginsenoside Rg1 on Apoptosis after Spinal Cord Ischemia-reperfusion Injury in Rats

LI Feng-tao¹, LIN Lei², CHENG Bin¹

1. Department of Orthopedics, the 2nd Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 2. Department of Orthopedics, the Hanzhong Central Hospital, Hanzhong, Shaanxi 723000, China

Correspondence to CHENG Bin. E-mail: drcheng2006@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effect of ginsenoside Rg1 on apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury (SCII) in rats. **Methods** Forty-eight adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham group (n=8), ischemia group (n=8), ischemia-reperfusion group (n=16) and drug group (n=16). Fogarty catheter was put in the thoracic aorta of the rats and the blood flow wasn't blocked in the sham group. The rats in the ischemia group were sacrificed 30 minutes after spinal cord ischemia. The drug group was injected with ginsenoside Rg1 30 mg/kg 30 minutes before and after SCII. The same volume of normal saline was injected in the ischemia-reperfusion group at the same time. The expression of Bcl-2 and survivin was detected with immunohistochemistry at six hours, 24 hours after reperfusion in the ischemia-reperfusion group and drug group, 30 minutes after ischemia in the ischemia group and in the sham group. The change of cells was observed in each group with HE staining. **Results** The cells were damaged in the ischemia group, the ischemia-reperfusion group and the drug group, in which the drug group was better than the other groups. The expression of survivin and Bcl-2 was higher in the ischemia group, the ischemia-reperfusion group and the drug group than in the sham group ($t>3.896$, $P<0.01$), and were significantly higher six hours and 24 hours after reperfusion in the drug group than in the reperfusion group ($t>6.693$, $P<0.001$). **Conclusion** Ginsenoside Rg1 can reduce the neurons damage and increase the expression of the Bcl-2 and survivin, that inhibit cells apoptosis after SCII in rats.

Key words: spinal cord injury; ischemia-reperfusion injury; ginsenoside Rg1; apoptosis; rats

[中图分类号] R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2016)06-0650-05

[本文著录格式] 李锋涛, 林磊, 程斌. 人参皂苷 Rg1 对大鼠脊髓缺血再灌注损伤后细胞凋亡的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(6): 650-654.

CITED AS: Li FT, Lin L, Cheng B. Effect of Ginsenoside Rg1 on apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Zhongguo Kangfu Lilun Yu Shijian, 2016, 22(6): 650-654.

脊髓缺血再灌注损伤(spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII)是由于脊髓局部缺血, 引起兴奋性氨基酸毒性作用、大量氧自由基生成和脂质过氧化, 导致多种炎性介质释放、神经细胞变性、坏死和程序性凋亡的复杂过程。其中, 神经细胞凋亡越来越被重视。人参皂苷 Rg1 是人参皂苷最主要的活性成分之一^[1], 具有抗氧化、抗细胞凋亡、提高免疫力、减少

细胞肿胀等作用。研究显示人参皂苷 Rg1 能明显减轻肾、脑等脏器缺血再灌注损伤^[2], 但在 SCII 方面报道较少。本实验旨在观察人参皂苷 Rg1 对于 SCII 后神经细胞凋亡的影响, 探讨其在临床中的意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

survivin 及 Bcl-2 大鼠单克隆抗体: 美国 SANTA

基金项目: 陕西省自然科学基金面上项目(No. 2014JM2_8157)。

作者单位: 1. 西安交通大学医学院第二附属医院, 陕西西安市 710004; 2. 汉中市中心医院, 陕西汉中市 723000。作者简介: 李锋涛(1980-), 男, 汉族, 陕西兴平市人, 博士, 主治医师, 主要研究方向: 脊柱外科。通讯作者: 程斌(1961-), 男, 汉族, 陕西兴平市人, 博士, 教授, 主要研究方向: 脊柱外科。E-mail: drcheng2006@sina.com。

CRUZ 公司。SP 免疫组化试剂盒：北京博奥森生物技术有限公司。Fogarty 导管：美国 EDWARDS LIFE-SCIENCES 公司。图像信号采集与分析系统 (Q500IW)：德国 LEICA 公司。

1.2 动物分组

成年健康清洁级 Sprague-Dawley 大鼠 48 只，体重 (209±16) g，购于西安交通大学医学院实验动物中心。将动物编号后，按随机数字表法分为假手术组 (n=8)、缺血组 (n=8)、再灌注组 (n=16) 和药物组 (n=16)。

1.3 造模

所有动物术前禁食 12 h，不禁水。3% 苯巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉。显露左侧颈总动脉及尾动脉，置入与监护仪连接的 PE50 导管，监测近、远端血压 (近端导管连接放血装置)。暴露左侧股动脉，将 2F Fogarty 导管置入 10.8~11.4 cm，使得球囊位于左锁骨下动脉分支处。充盈球囊，阻断胸主动脉，同时立即通过放血装置开始放血，将近端平均动脉压维持在 45 mmHg。30 min 后，放松球囊，恢复胸主动脉血流，将所放出的血液匀速回输。术后皮下注射硫酸鱼精蛋白 4 mg。将动物置于 25~30℃ 的保温箱内，等待动物苏醒后放回饲养笼中。

假手术组仅安放球囊不阻断血流。

1.4 方法

药物组大鼠脊髓缺血前 30 min 腹腔注射人参皂苷 Rg1 30 mg/kg，术后腹腔注射人参皂苷 Rg1 30 mg/kg。再灌注组相同时间点注射相同体积生理盐水。术后所有大鼠均在 SPF 清洁级实验室内饲养，自由进食及饮水。整个实验过程中各组死亡的动物分别在相同条件下予以补充。

1.5 标本采集

假手术组，缺血组于缺血后 30 min，药物组和再灌注组于再灌注后 6 h (n=8) 及 24 h (n=8) 行 4% 多聚甲醛灌注后取出标本进行石蜡包埋，于 L₃ 节段 2 mm 范围内连续切片，厚度为 10 μm。

1.6 HE 染色

各组动物分别于缺血后及再灌注 6 h、24 h 分别进行 HE 染色，观察各组脊髓内细胞形态变化。切片在二甲苯 I、二甲苯 II 中各脱蜡 10 min；无水乙醇 2 min，95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇各 1 min，蒸馏水洗 2 min；苏木素 5 min，清水冲洗；0.5% 盐酸乙醇 (70% 乙醇配制) 分化，提插数下，清水浸泡 15 min；0.5% 伊红染液染色 2 min；80% 乙醇、90% 乙醇、95% 乙醇及无水乙醇中各 1 min；二甲苯透明 2 次，各 5 min，中性树脂封片。光镜下观察。

1.7 免疫组织化学染色

各组动物分别于缺血后及再灌注 6 h、24 h 分别进

行损伤区脊髓组织 Bcl-2 及 survivin 染色，观察各组脊髓内 Bcl-2 及 survivin 表达量变化。二甲苯透明，梯度乙醇脱水，3% H₂O₂ 去离子水孵育 30 min，5% BSA 封闭液封闭 20 min。滴加小鼠抗大鼠 survivin/Bcl-2 一抗 (1:200)，湿盒 4℃ 孵育过夜，滴加生物素化二抗工作液，室温孵育 20 min。滴加 SABC，室温孵育 15 min。DAB 显色，苏木素轻度复染，梯度酒精脱水，二甲苯透明；中性树脂封片。所有切片均应用 LEICA Q500IW 图像信号采集与分析系统进行图像采集处理，每只动物观察 3 张切片，每张切片随机取 5 个视野，取平均值。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 18.0 软件进行数据分析。两组数据比较采用 *t* 检验。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 HE 染色

假手术组脊髓组织神经细胞饱满，胞浆内尼氏体清晰，细胞核边界清楚，核仁清晰可见。缺血组神经细胞皱缩，尼氏体模糊，细胞核边界及核仁不清，神经细胞数量减少。再灌注组再灌注 6 h 后神经细胞继续皱缩，胞浆及细胞核结构不清，尼氏体模糊，细胞数量减少；24 h 后神经细胞数量显著减少，胞体皱缩，细胞核及尼氏体等结构不清，脊髓组织出现空泡。药物组不同时间点均可见类似损伤性改变，但同再灌注组各亚组相比，损伤程度明显较轻。见图 1。

2.2 免疫组织化学染色

survivin 及 Bcl-2 蛋白表达于胞浆。假手术组脊髓组织 survivin、Bcl-2 基本不表达。缺血组、再灌注组和药物组 survivin、Bcl-2 阳性细胞明显高于假手术组 ($P<0.01$)。药物组 6 h、24 h survivin 及 Bcl-2 蛋白阳性细胞均较再灌注组显著增加 ($P<0.001$)。见表 1、表 2、图 2、图 3。

3 讨论

SCII 后，脊髓组织由于缺血缺氧、能量代谢障碍、多种炎性因子释放^[3-5]、活性氧簇生成、Ca²⁺大量内流等，均可激活细胞凋亡信号通路，引起神经细胞的凋亡^[6]。研究证实哺乳动物细胞凋亡主要通过两条途径^[7]，外源性凋亡配体途径的激活需要配体与所谓的细胞表面的死亡受体相结合，从而激活 caspase-8^[8]。内源性途径可被代谢、基因等其他因素所激活，导致线粒体完整性被破坏及线粒体通透性改变，该过程导致细胞色素 C 释放^[9]，从而激活起始因子 caspase-9。无论哪种刺激，最终会激活起始 caspases，使其下游 caspases 活性增高，导致凋亡^[10]。

人参皂苷 Rg1 是从人参中提取的有效活性成分，具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等作用^[11-14]。其可通过抑制 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun NH₂-terminal Kinase, JNK)

的磷酸化而阻断 JNK 通路，减少线粒体损伤及抑制凋亡^[15-16]；抑制细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达，减少炎症反应；同样也对肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 诱导的丝裂活化蛋白激酶激酶 4(Mitogen-activated protein kinase kinase 4, MKK4)的磷酸化及 JNK-AP-1 通路的激活有抑制作用^[17]。王淑秀等发现人参皂苷 Rg1 可抑制帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元 EphB1、P-c-Jun 蛋白表达，提高酪氨酸羟化酶表达，抑制神经元凋亡，改善神经功能^[18]。黄天文等应用人参皂苷

Rg1 处理寡聚肽 A β_{1-42} 诱导的神经元凋亡过程，发现人参皂苷 Rg1 可通过 JNK 信号通路减轻寡聚肽 A β_{1-42} 诱导的神经元凋亡^[19]。在肾缺血再灌注损伤中，人参皂苷 Rg1 通过抑制 Bax 的表达抑制细胞的凋亡^[20]。袁琼兰等发现人参皂苷 Rg1 通过促进凋亡抑制蛋白(neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP)的表达来抑制脑神经细胞的凋亡^[21]。亦有报道证实人参皂苷 Rg1 可调节 ERK1/2 和 p-JNK 的表达，减少脑缺血再灌注损伤后海马区神经元凋亡^[22]。人参皂苷 Rg1 是否在 SCII 中同样具有抑制神经细胞凋亡的作用罕见报道。

表 1 不同组别及各时间节点脊髓组织 survivin 平均灰度值(n=8)

项目	假手术组	缺血组	再灌注组 6 h	再灌注组 24 h	药物组 6 h	药物组 24 h
平均灰度值	231.23±7.21	213.76±6.89	199.19±7.43	187.43±8.94	154.97±9.62	127.50±7.76
t^a		4.949	8.754	10.788	17.943	27.661
P^a		0.002	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
t^b					10.326	14.303
P^b					<0.001	<0.001

注：a 为各组与假手术组比较；b 为缺血再灌注组与药物组相同时点比较

表 2 不同组别及各时间节点脊髓组织 Bcl-2 平均灰度值(n=8)

项目	假手术组	缺血组	再灌注组 6 h	再灌注组 24 h	药物组 6 h	药物组 24 h
平均灰度值	225.56±8.17	210.17±7.63	188.93±8.70	165.50±5.16	163.23±6.50	134.13±7.96
t^a		3.896	7.969	17.561	16.892	22.138
P^a		0.006	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
t^b					6.693	9.364
P^b					<0.001	<0.001

注：a 为各组与假手术组比较；b 为缺血再灌注组与药物组相同时点比较

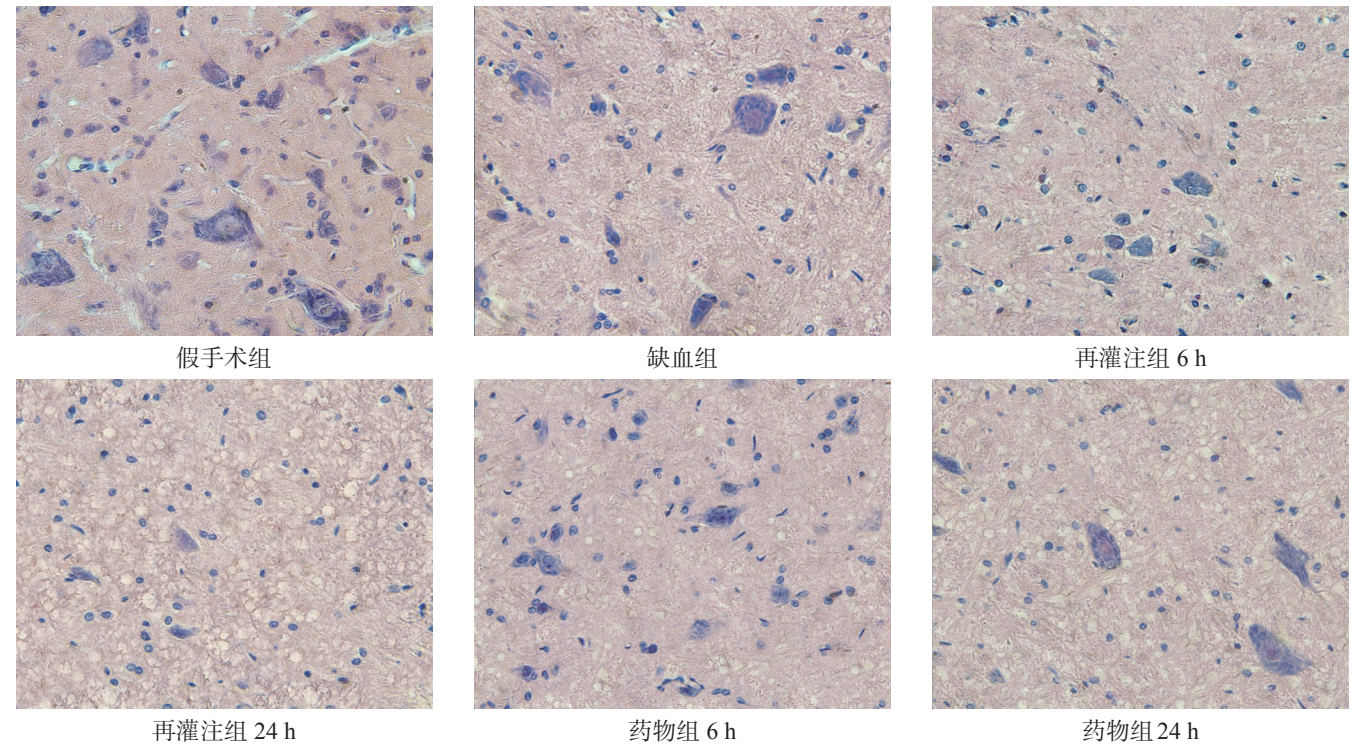


图 1 各组脊髓组织 HE 染色(400×)

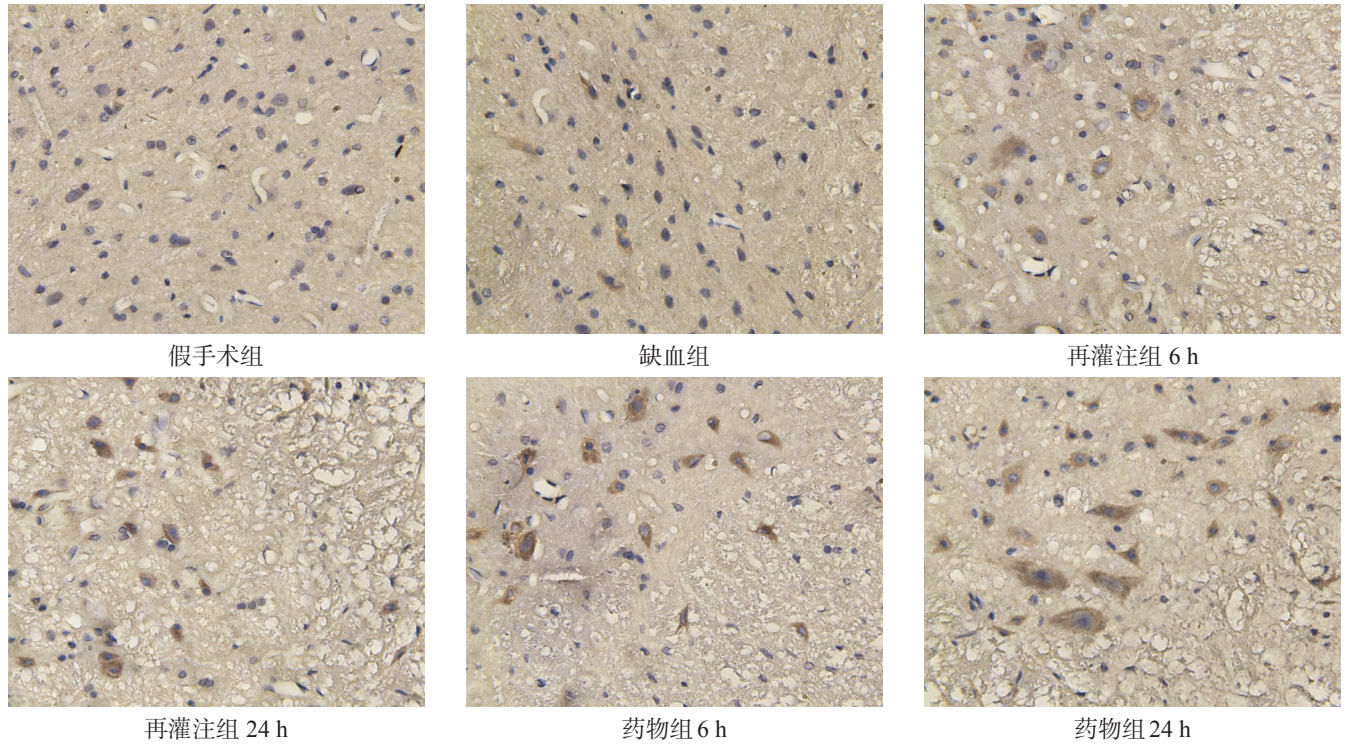


图2 各组脊髓组织 survivin 表达(免疫组化染色, 400×)

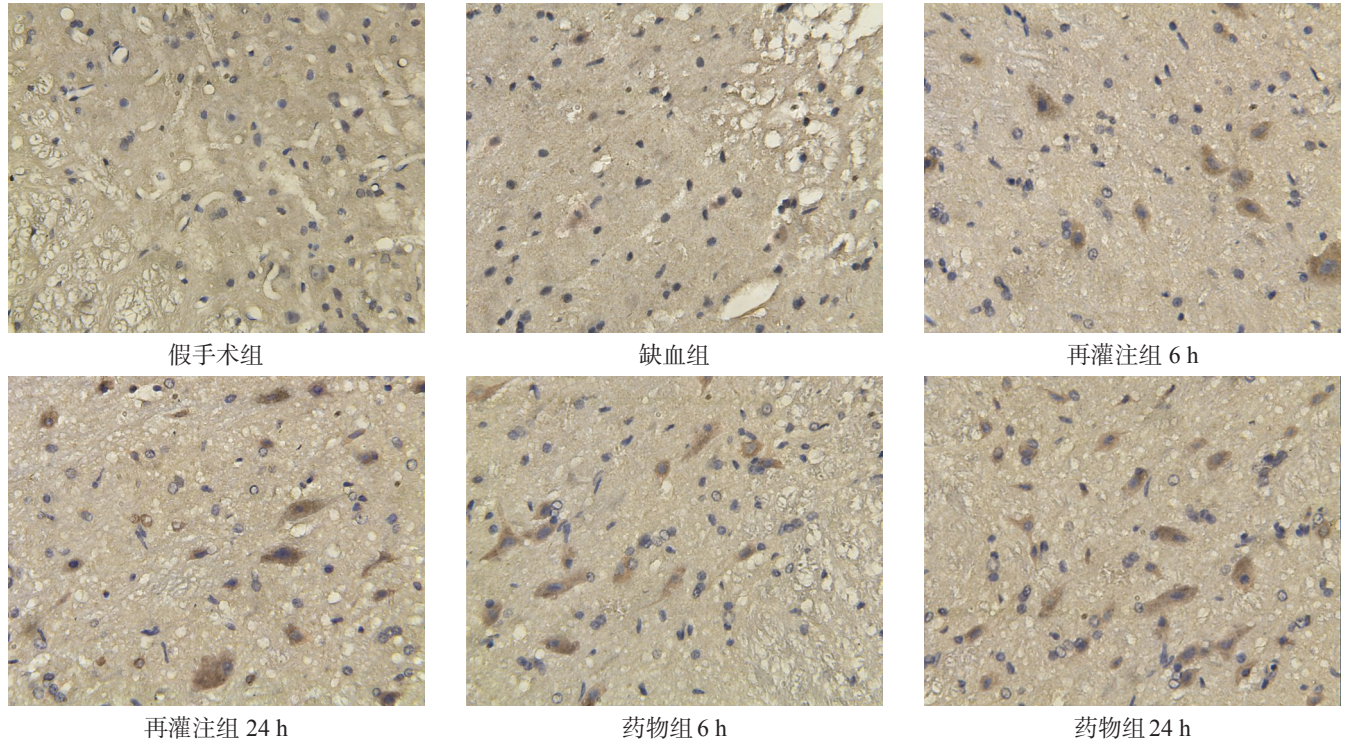


图3 各组脊髓组织 Bcl-2 表达(免疫组化染色, 400×)

Bcl-2 是细胞内重要的抗凋亡蛋白, 是线粒体介导的凋亡途径中细胞内关键的检查点, 可通过抑制促凋亡蛋白介导的凋亡^[23-24], 保持线粒体膜的完整性, 阻止线粒体膜通透性孔(permeability transition pore, PT 孔)开放, 减少细胞色素 C、凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)等释放, 而抑制细胞的凋亡。survivin 是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis proteins, IAPs)中最小的成员^[25], 包括 142 个氨基酸, survivin 蛋白 N-端的杆状病毒细胞凋亡抑制蛋白重复序列(BIR)结构域可以通过抑制 procaspase-3 和 procaspase-7 或直接抑制激活的 caspase-3 和 caspase-7 的活性来发挥抑制凋亡的作用。

本实验采用大鼠 SCII 模型, 在缺血损伤 30 min, 再灌注损伤后 6 h、24 h 时观察人参皂苷 Rg1 神经细胞形态、Bcl-2 及 survivin 表达水平。结果显示, 与再灌注组比较, 药物组在再灌注损伤 6 h、24 h 时神经细胞的变性、皱缩、脊髓组织中空泡形成等病理变化明显减轻; 而神经元胞体内 Bcl-2 及 survivin 表达水平, 显著高于其他各组。以上结果提示, 通过上调 Bcl-2 及 survivin 的表达, 稳定线粒体膜, 减少细胞色素 C、AIF 等的释放, 抑制 procaspases 家族的激活, 可能是人参皂苷 Rg1 发挥抗凋亡作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] 王洪财, 蒋玉萌, 赵雪, 等. 人参皂苷 Rb1 对 A β 淀粉样蛋白诱导大鼠海马神经元损伤的保护作用[J]. 吉林大学学报(医学版), 2012, 38(3): 447-450.
- [2] 胡霞敏, 严常开, 胡先敏. 人参皂苷 Rg1 对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2006, 11(2): 192-196.
- [3] Nakata T, Kawachi K, Nagashima M, et al. Transient ischemia-induced paresis and complete paraplegia displayed distinct reactions of microglia and macrophages [J]. Brain Res, 2011, 1420: 114-124.
- [4] Zhu P, Li JX, Fujino M, et al. Development and treatments of inflammatory cells and cytokines in spinal cord ischemia-reperfusion injury [J]. Mediators Inflamm, 2013: 701970.
- [5] Smith PD, Puskas F, Meng X, et al. The evolution of chemokine release supports a bimodal mechanism of spinal cord ischemia and reperfusion injury [J]. Circulation, 2012, 126(11): 110-117.
- [6] De Lator MS, Binda NS, Fukushima FB, et al. Ischemia-reperfusion model in rat spinal cord: cell viability and apoptosis signaling study [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 9941-9949.
- [7] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. Br J Cancer, 1972, 26(4): 239-257.
- [8] Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development [J]. Nature, 2000, 407(6805): 796-801.
- [9] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points [J]. Cell, 2004, 116(2): 205-219.
- [10] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. Nature, 2000, 407(6805): 770-776.
- [11] 曹妍群, 黄凯, 罗特坚. 人参皂苷 Rg1 对视网膜氧化应激损伤的保护作用[J]. 神经解剖学杂志, 2015, 31(4): 515-519.
- [12] 张庆勇, 陈燕萍, 刘芬, 等. 人参皂苷 Rg1 对大鼠急性心肌梗死抗氧化损伤指标及超微结构的影响[J]. 中国循环杂志, 2015, 30(2): 164-167.
- [13] Yu HT, Zhen J, Pang B, et al. Ginsenoside Rg1 ameliorates oxidative stress and myocardial apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16(5): 344-354.
- [14] Du J, Cheng B, Zhu X, et al. Ginsenoside Rg1, a novel glucocorticoid receptor agonist of plant origin, maintains glucocorticoid efficacy with reduced side effects [J]. J Immunol, 2011, 187(2): 942-950.
- [15] Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis [J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6245-6251.
- [16] Ye R, Zhang X, Kong X, et al. Ginsenoside Rd attenuates mitochondrial dysfunction and sequential apoptosis after transient focal ischemia [J]. Neurosci, 2011, 178: 169-180.
- [17] Chen XC, Zhou YC, Chen Y, et al. Ginsenoside Rg1 reduces MPTP-induced substantia nigra neuron loss by suppressing oxidative stress [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(1): 56-62.
- [18] 王淑秀, 常海敏, 朱丰霞, 等. 人参皂苷 Rg1 对帕金森病小鼠黑质多巴胺能神经元凋亡及 EphB1、TH、P-c-Jun 蛋白表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2015, 50(2): 176-180.
- [19] 黄天文, 何饶丽, 周梦, 等. 人参皂苷 Rg1 对寡聚 A β 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.
- [20] Zhu MX, Ran B, Feng ZQ, et al. Effects of Rb1 and Rg1 on the expression of Bcl-2, Bax in apoptosis of HK-2 cells induced by the serum of kidney ischemia/reperfusion [J]. Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi, 2009, 25(4): 496-499.
- [21] 袁琼兰, 孙珠蕾, 杨朝鲜, 等. 人参皂甙 Rb1 阻止大鼠局灶性脑缺血细胞凋亡和诱导 NAIP 表达[J]. 神经解剖学杂志, 2007, 23(4): 355-361.
- [22] Wang QY, Liu F, Wu FJ, et al. Effects of ginsenoside Rg1 on the expressions of p-eRK1/2 and p-JNK in local cerebral ischemia/reperfusion injury rats [J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2013, 33(2): 229-234.
- [23] Chaudhary KS, Abel PD, Stamp GW, et al. Differential expression of cell death regulators in response to thapsigargin and adriamycin in Bcl-2 transfected DU145 prostatic cancer cells [J]. J Pathol, 2001, 193(4): 522-529.
- [24] Zhang QH, Sheng HP, Loh TT. Bcl-2 protects HL-60 cells from apoptosis by stabilizing their intracellular calcium pools [J]. Life Sci, 2001, 68(25): 2873-2883.
- [25] Mobahat M, Narendran A, Riabowol K, et al. Survivin as a preferential target for cancer therapy [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(2): 2494-2516.

(收稿日期: 2015-11-16 修回日期: 2016-01-22)