

实验研究

竹节参总皂苷对慢性脑缺血大鼠海马 GFAP、GAP-43 表达的影响

王 敏 张秋霞 邹海艳 赵 晖 李 佳

(首都医科大学中医药学院, 北京, 100069)

摘要 目的:观察竹节参总皂苷(TRPJS)对慢性脑缺血大鼠海马胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经生长相关蛋白(GAP-43)表达的影响。方法:双侧颈总动脉结扎制备慢性脑缺血大鼠模型,竹节参总皂苷灌胃给药30天后,免疫印迹方法测定海马GFAP和GAP-43的表达。结果:慢性脑缺血大鼠海马GFAP表达增强,GAP-43表达有降低趋势;tRPJS可明显降低GFAP表达和增加GAP-43表达($P < 0.01$)。结论:tRPJS可降低慢性脑缺血引起大鼠海马星形胶质细胞过度反应,上调生长相关蛋白GAP-43,这可能是其提高学习记忆的作用机制。

关键词 竹节参总皂苷;血管性痴呆;海马;胶质纤维酸性蛋白;神经生长相关蛋白

Effects of Total Panax japonicus Saponins on Glial Fibrillary Acidic Protein(GFAP) and Growth Associated Protein-43(GAP-43) in Chronic Cerebral Ischemia Rats

Wang Min, Zhang Qiuxia, Zou Haiyan, Zhao Hui, Li Jia

(Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Objective: To observe the effect of total rhizoma panacis japonica saponins (tRPJS) on the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and growth-associated protein (GAP-43) in hippocampus of chronic cerebral ischemia rats. **Methods:** The chronic cerebral ischemia model rats were established by ligation of bilateral cephalic artery. Expressions of GFAP and GAP-43 protein in hippocampus region were measured by immune imprinting methods after intragastric administration of tRPJS for 30 days. **Results:** Expression of GFAP protein in hippocampus region increased while expression of GAP-43 protein in hippocampus region decreased obviously in model group. The tRPJS can decrease the expression of GFAP protein in hippocampus region and can increase the expression of GAP-43 protein in hippocampus region significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** The tRPJS can inhibit the overreaction of astroglia cell and up-regulate the expression of GAP-43 protein in hippocampus region in chronic cerebral ischemia rats. This may be one of the mechanisms of improving the capability of learning and memory.

Key Words Total Rhizoma Panacis Japonica saponins; Vascular dementia; Hippocampus; Glial fibrillary acidic protein(GFAP); Growth-associated protein(GAP-43)

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.02.023

竹节参是五加科植物竹节参(*Panax japonicus* C. A Meyer)根茎,为国家珍稀名贵药材。本实验室前期研究发现竹节参的主要活性部位-竹节参总皂苷(Total Saponins of *Panax japonicus*, TSPJ)可以改善慢性脑缺血大鼠学习记忆能力^[1]。为进一步探讨药物作用的机制,本研究拟观察竹节参总皂苷对慢性脑缺血大鼠海马脑区星形胶质细胞增生和生长相关蛋白GAP-43表达的影响。

1 材料

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,体重重280~300g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[合格证号SCXK(京)2006-0009]。饲养在首都医科大学实验动物中心[许可证号SYXK(京)2005-0022]。12h光照/黑暗周期,环境温度(22 ± 1)℃。动物自由进食进水,适应3天后正式进行实验。

1.2 药物 竹节参药材,购于湖北,由首都医科大学

基金项目:首都中医药与护理学研究专项基金(编号:11zyh07、12ZYH08);北京市属高等学校人才强教深化计划“中青年骨干人才培养计划”项目(编号:PXM2011014226);北京市优秀人资助项目(编号:20051D0501823)

通信作者:李佳,女,副教授。研究方向:中药资源学

李佳副教授鉴定为五加科人参属植物竹节参(*Panax japonicus* C. A. Mey.)的干燥根茎。TSPJ 得率 9.58%, 由首都医科大学中医药学院中药化学实验室提供, 为淡黄色粉末(批号:20080707), 临用前以生理盐水稀释至所需浓度。

1.3 试剂 兔抗鼠 GFAP 单克隆抗体、兔抗鼠 GAP-43 单克隆抗体羊抗兔 IgG 均购自 Epitomics 公司; 抗 β -Actin 兔多克隆抗体、Tis-组织蛋白抽提试剂、BCA 蛋白定量试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.4 仪器 BIO-RAP MODEL 680 型酶标仪, 北京元业伯乐科技发展有限公司; 垂直电泳槽, 美国 BIO-RAD 公司; 稳压稳流电泳仪/电转仪, 美国 BIO-RAD 公司生产。

2 实验方法

2.1 动物分组 60 只 SD 雄性大鼠体重(280 ~ 300g), 用随机数字表方法将实验动物随机分为 4 组, 即假手术组、模型组、TSPJ 组(200、100mg $\cdot$ kg⁻¹), 每组 10 只动物。

2.2 模型制备 参考文献方法^[2], 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 大鼠仰卧固定, 颈前部正中切口, 分离双侧颈总动脉, 进行永久性结扎, 缝合伤口。假手术组大鼠仅游离双侧颈总动脉后缝合伤口, 各组大鼠同条件饲养。

2.3 给药 造模 24h 开始给药, 每日 1 次, 连续给药 30 天后进行各项指标检测。假手术组及模型组动物灌胃给等容量生理盐水。

2.4 海马 GFAP GAP-43 蛋白检测 动物, 断头处死, 迅速在冰盆中分离海马组织, 放置液氮; Tis-蛋白抽提试剂抽提海马组织蛋白, BCA 法蛋白定量; 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 上样量为 10 μ g, 电泳结束后, 进行蛋白质转膜; 与 GAP-43 一抗(1:100 00)、GFAP 一抗(1:200 00)杂交反应; 再将 NC 膜与辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:100 00)杂交反应 1h, 在暗室进行 X-光胶片曝光、显影和定影。然后用同一张 NC 膜与内参 GAPDH(1:100 00)进行杂交反应。采用 YLN-2000 凝胶影像分析系统分析目的条带, 目的蛋白吸光度值和内参蛋白吸光度值的比值, 作为目的蛋白表达的相对水平。

2.5 统计方法 运用 SPSS 10.0 进行方差分析, LSD 检验比较两组间差异。结果以($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

Western blot 结果显示, 慢性脑缺血 30 天大鼠海马 GFAP 表达明显上调($P < 0.01$); TRPJS 能明显上调

海马 GAP-43 蛋白的表达, 下调海马 GFAP 蛋白的表达, 与模型组差异显著($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠海马 GAP-43、GFAP 蛋白的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

分组	剂量/mg $\cdot$ kg ⁻¹	GAP-43/GAPDH	GFAP/GAPDH
假手术组	-	0.85 $\pm$ 0.10	0.93 $\pm$ 0.10 **
模型组	-	0.74 $\pm$ 0.16	1.83 $\pm$ 0.11
TSPJ	100	1.02 $\pm$ 0.14 **	1.22 $\pm$ 0.21 **
TSPJ	200	1.13 $\pm$ 0.16 **	0.96 $\pm$ 0.32 **

注: 与模型组相比, ** $P < 0.01$ 。

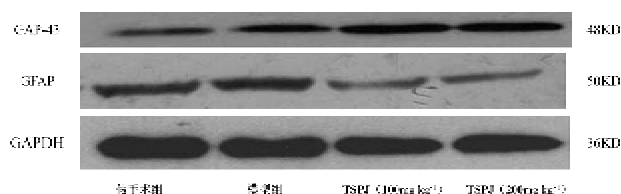


图 1 Western blot 检测大鼠海马 GAP-43、GFAP 蛋白的表达

4 讨论

突触可塑性是学习记忆的重要神经基础, 海马直接参与信息贮存和回忆, 是脑内参与记忆贮存功能的重要部分, 慢性脑缺血可损害海马突触可塑性引起学习记忆能力下降^[3]。GAP-43 对新突触形成及功能完善具有显著的调控作用^[4]。成年大部分脑区 GAP-43 表达水平较低, 新皮质、嗅球和海马 GAP-43mRNA 一直保持在较高水平。损伤时, 这些区域的神经元都表现为侧枝出芽和反应性轴突再生, 并伴随着 GAP-43 表达增高, 这是机体自我修复的一种正常反应^[5]。本次实验中, 我们观察到慢性脑缺血 30 天后, 海马 GAP-43 的表达较假手术组有降低趋势, 结果提示, 机体内源性修复能力有限, GAP-43 的表达会随着缺血时间的延长而逐步降低。星形胶质细胞在突触可塑性及突触功能活动中发挥着关键性作用^[6]。GFAP 作为星形胶质细胞的特异性标志蛋白, 是星形胶质细胞活化及增殖的标志物之一, 脑缺血后海马出现的过度增殖的胶质细胞以及胶质疤痕的形成不仅影响到正常的局部神经回路, 而且可能是继发癫痫以及认知功能损害的重要因素^[7]。因此调节 GAP-43 表达, 有效抑制星形胶质细胞的过度增殖, 防止胶质疤痕的形成是脑保护的研究重点。

竹节参是五加科植物竹节参 *Panax japonicus* C. A. Meyer 根茎, 为国家珍稀名贵药材。早在清代《纲目拾遗》中有载, 称其为“血症良药”。竹节参与人参和三七是同科同属的植物, 目前的研究认为, 皂苷是人参属植物的主要有效成分。竹节参的化学研究证实竹节参中的皂苷既有齐墩果烷型五环三萜皂苷, 也有在人参

和三七中活性最显著的达玛烷型四环三萜皂苷以及甾体皂苷。本实验室前期研究工作发现——竹节参的有效活性部位,总皂苷对多种脑缺血模型有很好的保护作用,能够改善脑缺血动物的神经功能症状和血液流变学指标,减轻脑组织病理形态学改变,同时能够提高拟血管痴呆模型动物的学习记忆能力^[8-10],本次研究发现竹节参总皂苷可上调慢性脑缺血大鼠海马神经生长相关蛋白 GAP-43 的表达,降低海马星形胶质细胞的增生有一定的相关性。

参考文献

- [1] 赵晖,王嵩,张秋霞,等. 竹节参总皂苷对血管痴呆大鼠递质氨基酸及白蛋白代谢的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,11(30):3096-3098.
- [2] 田金洲. 血管性痴呆. 北京:人民卫生出版社,2003:598-607.
- [3] 谭米勋,孙圣刚,段申汉,等. 大鼠海马星形胶质细胞对突触可塑性的影响[J]. 卒中与神经疾病,2005,12(6):158.
- [4] Carulli D, Buff A, Strata P. Reparative Mechanisms in the Cerebellar Cortex. Prog Neurobiol,2004,72(6):373.
- [5] Takei H, Buckleair I.W, Rivera A, et al. Brain Tissue Microarrays in Neurodegenerative Diseases: Validation of Methodology and Immunohistochemical Study of Growth-associated Protein-43 and Calretinin. Pathol,2007,57(12):775-83.
- [6] Andersson M, Blomstrand F, Hanse E. Astrocytes Play a Critical Role in Transient Heterosynaptic Depression in the rat Hippocampal CA1 Region. J Physiol,2007,585(3):843-52.
- [7] Lee Y, Su M, Messing A, et al. Astrocyte Heterogeneity Revealed by Expression of a GFAP-LacZ Transgene. Glia,2006,53(7):677-87.
- [8] 赵晖,张秋霞,穆阳. 竹节参总皂苷对局灶性脑缺血大鼠模型的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志,2005,12(3):43.
- [9] 刘家兰,李德清,段先宇. 竹节人参提取物对大鼠和小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. 湖北民族学院学报(医学版),2002,19(1):35.
- [10] 赵晖,李佳,穆阳. 竹节参总皂苷对动脉粥样硬化模型大鼠血液流变学的影响[J]. 中国中医药信息杂志,2006,13(11):33.

(2012-08-15 收稿)

软坚消瘤片药物血清对乳腺癌 MCF-7 细胞生长的机制研究

张士云 朱瑞丽 高 磊 王彦云 莫爵飞 潘菊华 刘起华 汪 莲 刘贵建

(中国中医科学院广安门医院,北京,100053)

摘要 目的:通过观察软坚消瘤片药物血清对乳腺癌 MCF-7 细胞的芳香化酶和雌激素受体基因的表达、细胞增殖周期及细胞凋亡的影响,探讨软坚消瘤片治疗乳腺肿块性疾病的可能机制。方法:制备软坚消瘤片含药动物血清,以体外培养的 MCF-7 细胞为研究对象,以 qRT-PCR 法检测乳腺癌细胞芳香化酶(CYP19)及雌激素受体(ER)mRNA 表达水平;流式细胞术(FCM)测定细胞增殖周期和凋亡水平;MTS 实验测定细胞生长曲线。结果:与空白对照组比较,含药血清组作用细胞 24 h 后能明显抑制乳腺癌细胞株 MCF-7 的 CYP19 mRNA、ER mRNA 表达水平,表达水平分别降低 0.32 和 0.09 倍;药物血清作用 48 h 后 S 期和 G2/M 期细胞所占比例降低,尤以 G2/M 期最为显著,相应的 G0/G1 期细胞增加,药物血清抑制了细胞增殖的正常进行;凋亡实验示细胞早期凋亡率增加,药物血清组总体凋亡率高于对照组;药物血清作用细胞 48 h 以后细胞生长曲线幅度开始明显低于对照组,在 96 h 时抑制效果最明显。结论:软坚消瘤片药物血清影响乳腺癌 MCF-7 细胞的雌激素合成及其作用发挥,同时抑制一定时段的细胞生长。

关键词 乳腺癌/中医药疗法;@ 软坚消瘤片;药物血清;MCF-7 细胞

Mechanism Research of Inhibition of MCF-7 Cell Growth with Ruanjian Xiaoliu Pill Drug Serum

Zhang Shiyun, Zhu Ruili, Gao Lei, Wang Yanyun, Mo Juefei, Pan Juhua, Liu Qihua, Wang Lian, Liu Guijian

(Guang An Men Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Ruanjian Xiaoliu Pill (RJXLp) drug serum on aromatase, estrogen receptor (ER) expression level, cell generation cycle and apoptosis in breast carcinoma cell line MCF-7 cells. **Methods:** RJXLp drug serum was prepared and MCF-7 cells were treated with it for 24, 48 and 96h respectively. Then the expression of aromatase and ER mRNA were analyzed by qRT-PCR, cell generation cycle and apoptosis were assayed by flow cytometry (FCM) and cell growth curve was determined by MTS. **Results:** After incubated in RJXLp drug serum for 24h, expression of CYP19 mRNA, ER mRNA of MCF-7 cells decreased significantly compared to control group (0.32 and 0.09 fold, respectively). For the cell generation cycle analysis, cell cycle process of MCF-7 cells

基金项目:中国中医科学院广安门医院科研基金资助附属项目(编号:81333)

通信作者:刘贵建,教授,主任医师, E-mail:liuguijian@hotmail.com