

文章编号:1003-2754(2019)03-0200-04

人参皂甙 Rb1 通过调控缝隙连接蛋白 40 治疗脑缺血再灌注损伤的机制

施虹¹, 任大斌², 郑平², 童武松², 冯九庚³, 段剑³, 陈伟³

摘要: **目的** 观察人参皂甙 Rb1(GS-Rb1)通过调控缝隙连接蛋白 40(Cx40)表达在治疗脑缺血再灌注损伤(Cerebral ischemia and reperfusion injury, Cerebral I/R injury)的相关性机制。**方法** 选取 100 只体重 350 ~ 450 g 的 4 月龄的 SD 雄性大鼠随机分为 5 组,每组 20 只,脑缺血再灌注模型建立为采用夹闭颈总动脉法。具体分组为:(1)假手术(sham)组;(2)GS-Rb1(I/R + GS-Rb1)治疗组;(3)GS-Rb1 + H-89 阻断(I/R + GS-Rb1 + H-89)组、(4)溶媒(I/R + DMSO)组及;(5)损伤(I/R)组,每组 20 只。实验时间均设定为 I/R 后 8 h。每组取 10 只大鼠进行行为学检测和脑组织含水量测定,另 10 只则获取海马区皮质通过蛋白免疫印记法(Western Blot, WB)测定神经元 Cx40 蛋白的变化,采用酶联免疫荧光(ELFA)及酶联免疫吸附(ELISA)检测神经元氧化应激因子 NADPH 氧化酶活性、炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等含量的变化。**结果** 实验结果显示,治疗组的 NSS 评分、脑水肿程度、NADPH 氧化酶活性、炎症因子及海马皮质 Cx40 表达均较溶媒组及损伤组明显下降($P < 0.05$)。而 H-89 可明显抑制上述 GS-Rb1 对 Cx40 蛋白表达下调、降低 NADPH 氧化酶活性及缓解炎症因子产生的作用($P < 0.05$)。**结论** GS-Rb1 可能通过激活 PKA 途径而对 Cx40 蛋白表达下调,从而产生抑制损伤性物质的释放及传递,以达到脑损伤缓解作用。

关键词: 缝隙连接 40; 人参皂甙 Rb1; 细胞激酶 A; 脑水肿; 脑缺血再灌注损伤;

中图分类号:R743

文献标识码:A

Regulation of Cx40 By GS-Rb1 In The Treatment For Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury SHI Hong, REN Dabin, ZHENG Ping, et al. (Dept of Out-Patient, Nanchang Infantry College, United Services Support Force 908 Hospital, Nanchang City, Jiangxi Province 330103, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of protective effects of GS-Rb1 against Cerebral ischemia-reperfusion injury in super acute phase with the expression of protein Cx40. **Methods** Cerebral ischemia-reperfusion injury model were established by Sprague-Dawley rats at 3 months age, weight at 300 ~ 500 g, with clipping bilateral CCA and intraperitoneal injection of GS-Rb1 or GS-Rb1 + PKA inhibitor H-89. One hundred rats were randomly divided into 5 groups, 100 rats in total, 20 rats in each group: sham operation, treatment group (I/R 8 hour + GS-Rb1), inhibition group (I/R 8 hour + GS-Rb1 + H-89), vehicle group (I/R 8 hour + DMSO) and injury group (I/R 8 hour). Ten rats were selected for testing behavioral disorder by NSS and cerebral edema by measuring brain water content. Another ten rats in each group were sacrificed and glial tissue in hippocampus were obtained for detecting the level of Cx40 by western blot, NADPH oxidase activity by ELFA, IL-1 β , IL-10 and TNF- α by ELISA. **Result** NSS, brain water content, NADPH oxidase activity, IL-1 β , IL-10, TNF- α and Cx40 in GS-Rb1 treatment group were lower than in vehicle group and injury group, PKA inhibitor H-89 was proved that it can inhibit above protective effect of GS-Rb1. **Conclusion** Protective effect of GS-Rb1 to cerebral I/R injury is involved in PKA pathway to reduce the expression of Cx40, by which can reduce the oxidative stress, inflammatory factors and alleviate the injuries of form and function of brain after cerebral ischemia-reperfusion injury.

Key words: Cx40; GS-Rb1; PKA; Cerebral edema; Ischemia reperfusion injury

脑缺血再灌注损伤(I/R)所带来的致死及致残率仍然较高^[1],目前临床上缺乏明确有效的治疗手段。人参皂甙(GS)是人参中最主要的活性物质,已经被证明对神经损伤类疾病有着明显的保护作用^[2]。GS-Rb1已被证明是GS中最主要的成份。我们的前期研究显示:GS-Rb1的脑保护作用可能和下调缝隙连接蛋白(Connexin, Cx)40有关^[3],但尚未进一步证明相关的分子机制。本研究通过缺血再灌注损伤后调控PKA途径,观察PKA途径参与GS-Rb1下调Cx40表达的相关性,旨在探讨GS-Rb1对脑I/R损伤保护作用的具体机制及可能涉及多信号分子信号传导途径,为脑缺血再灌注损伤的分子水平的治疗奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂及仪器 100只3月龄、体重350~450g的雄性SD大鼠购置于上海毕凯实验动物有限责任公司(沪ICP备05033115)苯巴比妥麻醉钠购置Fluka公司(德国)。GS-Rb1(纯度大于99%)购自上

海邦景(中国),H-89(纯度大于99%)购自上海RBI生物(中国),兔抗大鼠Cx40一抗购自Santa Cruz(美国),兔抗大鼠GAPDH一抗购自Abcam(英国),辣根酶标记二抗均购自Abcam(英国),化学发光试剂盒购自中山金桥生物科技(中国),所有ELFA、ELISA试剂盒均购

收稿日期:2018-09-14;修订日期:2018-12-26

基金项目: [浦东新区科委民生项目(编号:PKJ2016-Y31);上海健康医学院种子基金项目(编号:SFP-18-21-13-007);上海健康医学院种子基金项目(编号:SFP-18-21-13-005);国家自然科学基金(编号:81701231);上海市自然基金(编号:16ZR1431500)]

作者单位: (1. 中国人民解放军联勤保障部队第908医院驻陆军步兵学院门诊部,江西 南昌 330103;2. 上海健康医学院附属上海浦东新区人民医院神经外科,上海 201299;3. 南昌大学第一附属医院神经外科,江西 南昌 330008)

通讯作者: 陈伟, E-mail: 22248223@qq.com

自武汉博士德生物(中国),激光多普勒血流仪购自 Stockholm(瑞典),蛋白电泳仪购自 Bio-Rad(美国),NAPDH 氧化酶活性试剂盒购自 Beyotime(中国),M200Pro 免疫酶标仪购自 TECAN(奥地利)。

1.2 动物模型制作 实验用大鼠在通风房间内按照光照:黑暗时间比例为 12:12 h,给予水和食物适应性喂养 1 w,动物伦理已得到上海市浦东新区人民医院实验动物伦理委员会的同意。按照夹闭法建立大鼠缺血模型:将 3%戊巴比妥以 65 mg/kg 的浓度给予大鼠麻醉后,以颈部正中切口进入,找到双侧颈总动脉,分离血管外膜及迷走神经,用微血管夹将双侧颈总动脉夹闭,整个手术过程用动物实验专用体温装置把动物体温维持的 37℃ 摄氏度。夹闭效果用激光多普勒血流仪进行测量(以小于正常血流量的 25% 作为有效)。阻断双侧颈总动脉血流 30 min 后,撤去血管夹,恢复血流,产生再灌注(以血流量恢复至基线水平 75% 视为有效)。

1.3 药物的干预及分组 100 只 SD 大鼠被随机分为①假手术(sham)组、②灌注后 GS-Rb1 (I/R + GS-Rb1)治疗组、③灌注后 GS-Rb1 + H-89 阻断(I/R + GS-Rb1 + H-89)组、④溶媒(I/R + DMSO)组及⑤损伤(I/R)组,每组 20 只。①仅暴露而不夹闭颈总动脉,②③均采用夹闭颈总动脉法制作脑 I/R 模型,1 h 后腹腔注射 GS-Rb1 及 GS-Rb1 + H-89,④为 I/R 形成 1 h 后腹腔注射 DMSO,而⑤则是 I/R 形成后不给予处理,所有组实验时间均设定为 I/R 后 8 h。每组取 10 动物行为学检测和脑组织含水量测定,另 10 只动物则行蛋白学检测。根据我们之前预实验及前期实验显示,为获得 P 值在 0.05 水平,1-beta 在 0.20 水平,根据 Effect-Size 计算出所需要的每组动物数量为 8 (G-Power3.0)。在本实验中,我们预定每组 10 只动物,以防动物意外死亡引起样本量的不足。根据脑缺血再灌注损伤的病理生理特点及我们前期的研究经验,设定在再灌注后 8 h,以拉颈法处死动物。

1.4 大鼠 NSS 评分 采用双盲法,根据以下原则:(1)提鼠尾离地面约 1 尺,观察前肢情况。正常大鼠两前肢对称地伸向地面。有左肩内旋,左前肢内收者,评为 4 分,否则 0 分。(2)将动物置平滑地板上,分别推左(或右)肩向对侧移动,检查抵抗运动的阻力。正常大鼠两侧阻力明显对称。右肩向左侧移动时,发现阻力下降时,根据下降程度的不同,评为 1~3 分;(3)将动物两前肢置一金属网上,观察两前肢的张力,正常大鼠两前肢的张力明显对称,发现左前肢肌张力下降者,根据下降的轻重,评为 0~3 分。根据以上评分,满分 10 分,分数越高,说明动物的行为障碍越严重。

1.5 脑含水量测定 我们采用 Hatashita 的干湿重法测定脑含水量的变化。将完成 NSS 的实验动物处死,快速开颅取出大脑,并移到冰面,并测定大脑的湿重。再将动物大脑放入蒸箱中,在 110℃,烘烤 24 h,测得大脑干重的量。含水率为(湿重大脑-干重大脑)/湿

重大脑 * 100%。

1.6 免疫蛋白印记(WB)实验 将海马区域的皮质组织标本收集,并置入试管中,用冰冷的 PBS 洗涤两次;加入 RIPA 裂解缓冲液(Santa Cruze),含 1% 的蛋白酶抑制剂混合物。冰上匀浆、裂解 10 min,低温离心 12000 r/min,15 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白,经 12% 的 SDS-PAGE Gel 电泳分离,常规方法转印至硝酸纤维素(NC)膜上,5% 脱脂牛奶-TBST 封闭 2 h,再分别将 Cx40(1:1000)、GAPDH(1:2000)一抗加入封闭液,4℃ 轻摇过夜,回收一抗液体,给予 TBST 溶液洗涤 NC 膜,加入辣根酶标记山羊抗兔二抗抗体与封闭液按 1:2000 的比例混合液,37℃,孵育 1 h,再采用化学发光试剂盒进行发光显影。采用 Image J 1.36b 软件下行吸光度分析,蛋白吸光度值/GAPDH 为相对含量,以 Sham 组目标蛋白/GAPDH 为 100%,其余组与之进行比较。

1.7 ELFA 检测氧化应激因子 NAPDH 氧化酶活性 自脑分离出海马的皮质组织,在冰上 PBS 中充分匀浆,以 4℃,12000 r/min,10 min 离心,取上清液,置入 96 孔荧光板中,再加入 80 μl PBS 及 6.25 μl 的 1 mol/L 的光泽精,再加入 100 μmol/L 的 NAPDH 后开始发生反应。采用多功能酶标仪,在吸收波长 340 nm,检测速度 30 s,时间为 5 min。

1.8 ELISA 法炎症因子 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的测定 采用第 1.7 部分的标本,按照炎症因子各自的 ELISA 免疫试剂盒的操作说明进行操作。

1.9 统计学分析 将计量数据以 $\bar{x} \pm s$,使用 SPSS 17.0 统计系统进行分析,组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 认定为有统计学意义。

2 结果

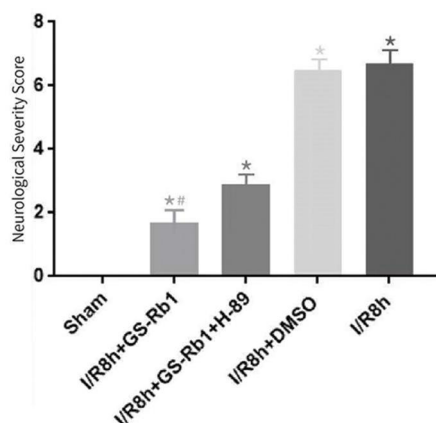
2.1 神经损伤严重程度评分(Neurological Severity Score, NSS) GS-Rb1 治疗组尽管较假手术组 0 分明显升高($P < 0.05$),但相对于溶媒组及损伤组却明显降低($P < 0.05$),具有治疗效应。采用 H-89 后,此种效应可被明显抑制($P < 0.05$)(见图 1)。

2.2 脑含水量的测定 脑水肿含量测定结果表明,GS-Rb1 治疗后,脑水肿程度较溶媒组及损伤组明显缓解($P < 0.05$),且与假手术组无明显差异($P > 0.05$)。但 H-89 可明显降低 GS-Rb1 的这种脑保护效应($P < 0.05$)(见图 2)。

2.3 蛋白学检测 Cx40 在 GS-Rb1 及 GS-Rb1 + H-89 单独及联合作用下表达的变化 在给予 GS-Rb1 治疗后,Cx40 蛋白表达尽管较假手术组升高,但较溶媒组及损伤组明显下降,而 H-89 则可明显抑制 GS-Rb1 的这种效应(见图 3)。

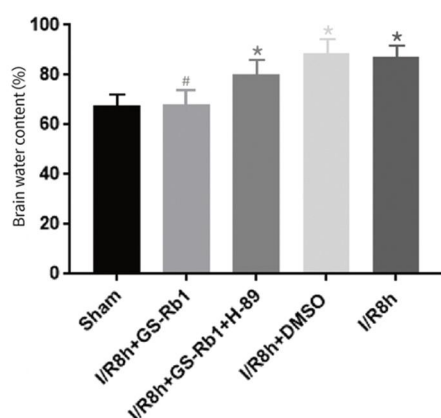
2.4 氧化应激因子 NAPDH 氧化酶(NAPDH oxidase activity)活性测定 GS-Rb1 可明显下调损伤后神经元 NAPDH 氧化酶的活性($P < 0.05$),且与假手术组相比亦无明显差异($P > 0.05$),但是此种效应可被 H-89 明显的抑制($P < 0.05$)(见图 4)。

2.5 ELISA 检测海马区神经元氧化应激因子炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 等炎症因子蛋白的表达 GS-Rb1 治疗组较阻断组可明显降低 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达 ($P < 0.05$), 但给予 H-89 后, 则可明显抑制 GS-Rb1 的这种效应 ($P < 0.05$) (与假手术组比较 * $P < 0.05$; 与 GS-Rb1 保护组比较 # $P < 0.05$) (见图 5)。



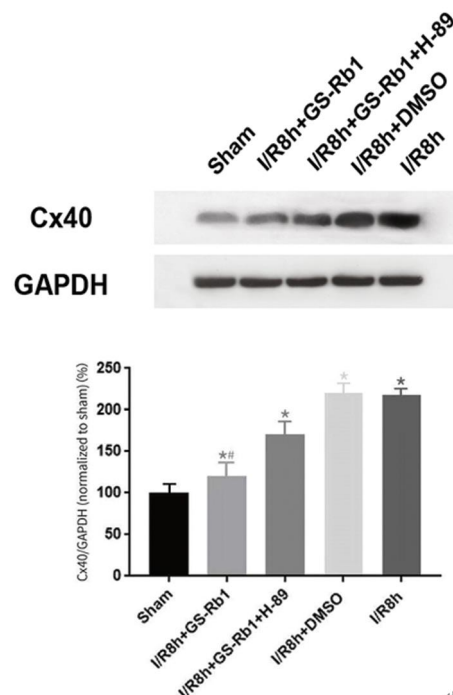
各实验组与假手术 (Sham) 组比较 * $P < 0.05$, I/R8 h + GS-Rb1 组与 I/R8 h + GS-Rb1 + H-89 组比较 # $P < 0.05$

图 1 NSS 评分的变化 ($n = 10$)



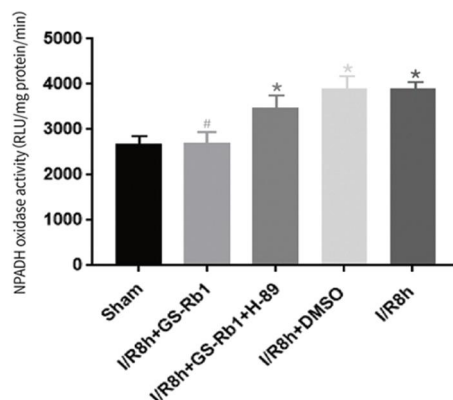
各实验组与假手术 (Sham) 组比较 * $P < 0.05$, I/R8 h + GS-Rb1 组与 I/R8 h + GS-Rb1 + H-89 组比较 # $P < 0.05$

图 2 脑含水量的变化 ($n = 10$)



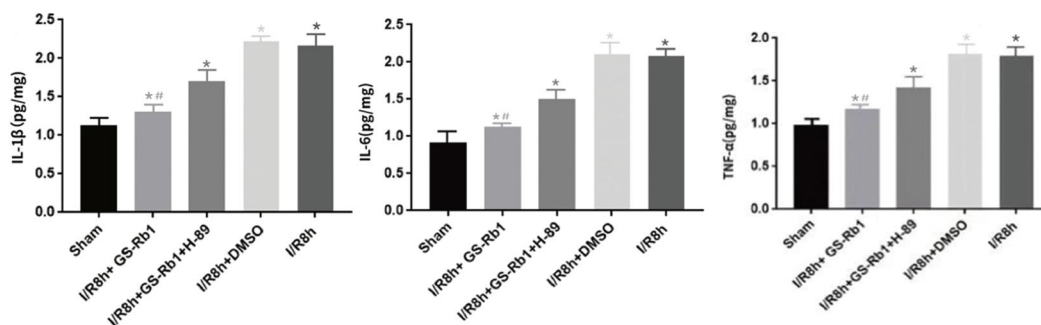
各实验组与假手术 (Sham) 组比较 * $P < 0.05$, # I/R8 h + GS-Rb1 组与 I/R8 h + GS-Rb1 + H-89 组比较 # $P < 0.05$

图 3 Cx40 相对含量的表达 ($n = 10$)



各实验组与假手术 (Sham) 组比较 * $P < 0.05$, # I/R8 h + GS-Rb1 组与 I/R8 h + GS-Rb1 + H-89 组比较 # $P < 0.05$

图 4 NADPH oxidase activity 的变化 ($n = 10$)



A. IL-1 β ; B. IL-6; C. TNF- α 各实验组与假手术 (Sham) 组比较 * $P < 0.05$, # I/R8 h + GS-Rb1 组与 I/R8 h + GS-Rb1 + H-89 组比较 # $P < 0.05$

图 5 炎症因子的含量的变化 ($n = 10$)

3 讨论

人参已经被广泛的作为药物、保健及饮食之用。人参皂甙(GS)已被证明是人参的最主要的活性成分。目前大量实验证明:GS 具有抗炎、抗氧化及降低脂质类代谢产物的作用^[4]。Rb1 作为 GS 中含量最为主要的成分,得到越来越多的重视。目前已证实 GS-Rb1 能维持脑血屏障的完整,在脑缺血后治疗中起着明显脑保护作用。我们的前期研究发现:GS-Rb1 可抑制氧化应激因子 NOX1、NOX2、NOX4、NAPDH 及炎症因子 IL-1 β ,并上调细胞骨架蛋白 ZO-1、Occludin 的表达,具有神经功能保护作用^[5]。但以上的研究尚未对 GS-Rb1 参与调节的损伤因子的具体方式和机制进行进一步分析,因此我们在本项实验中,我们采用信号传导通路的调节,来进一步观察 GS-Rb1 对上述产物的具体作用机制。

缝隙连接(Gap Junction, GJ)为细胞间的直接联系的方式。GJ 可供细胞内的离子、某些小分子信号传导因子及细胞内容物(<1.2KD)在细胞间进行传递^[6]。GJ 在脑损伤的过程中起着重要的作用,不同类型的 GJ 对损伤/抗损伤信号具有选择性,但相关机制仍未完全清楚^[7]。目前大量研究认为,Cx43 和谷氨酰胺转移酶、Na-Ka-ATP 酶、热休克蛋白相关性密切,可加强脑损伤性物质的转运,并减少氧化应激产物的产生^[8,9],Cx43 还可与 Bcl2 结合,缓解细胞凋亡的现象^[10]。针对于 Cx40 蛋白与脑损伤的相关性,来自于动物模型及临床标本的研究均显示:脑损伤后 Cx40 蛋白含量的升高及 Cx40 与 Cx43 形成的异型缝隙连接的升高增多与脑损伤程度呈现一致性^[11,12]。我们的前期研究还证实,Cx40 的增多可能与氧化应激活性的增强密切相关^[3]。此外,近年来的研究显示 Cx40 与 IkBa 具有同源性,其异常升高可能与核因子途径的激活相关^[13]。因此,我们推测,Cx40 蛋白的异常增多可能是 Cx43 功能的丧失的一种补偿机制,且异常表达 Cx40 对损伤/抗损伤物质的通过性平衡失调,导致损伤信号的扩大、氧化应激作用增强及核因子途径活化所致的炎症因子的大量增生,具有脑损伤的效应。同时在我们对上游的信号途径的筛选研究中发现,ERK1/2 通路及 Cx40 异常增多及 Cx43 磷酸化的相关性最大,且通过抑制 ERK1/2 通路,可明显缓解脑损伤的程度^[11]。有文献指出,在多条不同功能信号传导通路中存在竞争性抑制的 Gatekeeper^[14]效应,而 PKA 途径可上调 Cx43 的功能,从而被称为 Cx43 功能的 Gatekeeper。因此我们推测,脑损伤后 ERK1/2 途径的激活可抑制 PKA 途径的活性,导致 Cx40 蛋白异常增多及 Cx43 蛋白磷酸化升高及缝隙连接功能紊乱可能与脑损伤密切相关。

结合上述的情况,我们认为 GS-Rb1 脑保护效应可能与 PKA 途径的激活、通过 Gatekeeper 效应抑制

ERK1/2 途径的活性从而进一步抑制 Cx40 升高有关。在我们的此项试验中,我们采用 PKA 的特异性抑制剂 H-89,观察其如何影响 GS-Rb1 在脑损伤后的治疗效应,我们发现,H-89 能明显抑制 GS-Rb1 下调 Cx40 的功能,同时能抑制 GS-Rb1 降低氧化应激因子及炎症因子等脑保护作用,并且这些作用均在形态学及行为学上得到了进一步的证实。

综上所述,我们的此项研究结果进一步明确 GS-Rb1 参与损伤后脑保护机制与抑制 Cx40 蛋白表达异常升高有着密切的关系,同时也明确了 PKA 途径可能参与了这个过程,从而以期为进一步研究脑缺血再灌注损伤可能的基因靶点治疗奠定基础。

[参考文献]

- [1] Jiang B, Wang WZ, Bao QJ, et al. Incidence and trend of stroke and its subtypes in China results from three cities [J]. *Stroke*, 2006, 37(1): 63-68.
- [2] Cho IH. Effect of Panax ginseng in neurodegenerative diseases [J]. *J Gins Res*, 2012, 36(4): 342-353.
- [3] Chen W, Guo YJ, Tong WS, et al. Cx40 correlated with oxidative stress in brains of TBI rats [J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2017, 35(2): 217-224.
- [4] Hou YL, Tsai YH, Chao JC, et al. Ginseng extract and ginsenoside Rb1 attenuate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 25(10): 415.
- [5] Chen W, Guo YJ, Tong WS, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 on integrity of BBB following cerebral ischemia [J]. *Exp Brain Res*, 2015, 233(10): 2823-2831.
- [6] Elfgang C, Eckert R, Willecke K, et al. Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected Hela cells [J]. *J Cell Biol*, 1995, 129(3): 805-817.
- [7] Contreras JE, Sanchez HA, Veliz LP, et al. Role of connexin based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2004, 47(1-3): 290-303.
- [8] Rajamanickam GD, Kastelic JP, Thundathil JC. The ubiquitous isoform of Na/Ka-ATPase regulates junctional proteins, connexin43 and claudin 11 via EGFR-ERK1/2-CREB pathway in rat Sertoli cells [J]. *Biol Reprod*, 2017, 96(2): 456-468.
- [9] Goldberg GS, Lampe PD, Nicholson BJ. Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins [J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(7): 457-459.
- [10] Wang GY, Bi YG, Zhang QY, et al. Upregulation of Cx43 and apoptosis-associated protein expression by high glucose in H9C2 cells was improved by resveratrol via the autophagy signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 3262-3268.
- [11] Chen W, Feng JG, Tong WS. Phosphorylation of astrocytic Cx43 by ERK1/2 impairs BBB in acute cerebral ischemia [J]. *Cell Biosci*, 2017, 7: 43.
- [12] Chen B, Sun L, Ma J, et al. Correlation between connexin and traumatic brain injury in patients [J]. *Brain and Behavior*, 2017, 7(9): e00770.
- [13] Jean-Franco D, Anna P, Brenda RK, et al. Cx40 controls endothelial activation by dampening NF-kB activation [J]. *Oncotarget*, 2017, (8): 50972-50986.
- [14] Pidoux G, Tasken K. Anchored PKA as gatekeeper for gap junction [J]. *Commun Integr Biol*, 2015, 8(4): e1057361.