

人参皂苷 Rb₁ 对急性束缚性应激大鼠海马组织酪氨酸激酶 B mRNA 表达的影响

郑丹赞¹ 张明晓¹ 姚玉瑞¹ 金 玮¹ 刘俊伟¹ 王均炉¹ 陈必成²

摘要 目的 观察急性束缚性应激对大鼠海马组织酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase B, TrkB) mRNA 表达的影响。方法 将 18 只 SD 大鼠随机分成正常组、模型组和给药组, 每组 6 只。模型组采用急性束缚 2 h 制备急性束缚性应激模型; 给药组于造模前 30 min 给予人参皂苷 Rb₁ (40 mg/kg) 腹腔注射, 余同模型组; 正常组不作任何处理。采用 ELISA 法检测大鼠血浆促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 和皮质酮 (corticosterone, CORT) 含量; 实时荧光定量 RT-PCR 检测大鼠海马组织 TrkB mRNA 表达水平。结果 造模前, 各组血浆 ACTH、CORT 含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。造模后, 模型组和给药组血浆 ACTH、CORT 含量均较本组造模前显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且模型组明显高于正常组同期 ($P < 0.05$), 给药组明显高于模型组同期 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 模型组海马组织 TrkB mRNA 表达水平下降 (87.73 ± 7.62 vs 50.65 ± 5.19), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 给药组 TrkB mRNA 表达水平 (78.91 ± 18.07) 较模型组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 人参皂苷 Rb₁ 预处理可增加大鼠血浆 CORT 和 ACTH 含量, 并维持海马组织 TrkB mRNA 表达水平, 从而缓解急性束缚性应激所导致的损害。

关键词 急性束缚性应激; 酪氨酸激酶 B; 人参皂苷 Rb₁; 促肾上腺皮质激素和皮质酮

Effects of Ginsenoside Rb₁ on the mRNA Expression of Tyrosine Kinase B in the Hippocampus of Acute Immobilization Stress Rats JIA Dan-yun¹, ZHANG Ming-xiao¹, YAO Yu-rui¹, JIN Wei¹, LIU Jun-wei¹, WANG Jun-lu¹, and CHEN Bi-cheng² 1 Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China; 2 Lab for Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China

ABSTRACT Objective To observe the effects of acute immobilization stress on the mRNA expression of tyrosine kinase B (TrkB) in rats' hippocampus. Methods Eighteen SD rats were randomly divided into three groups, i.e., the normal control group, the model group, and the medication group, 6 in each group. The acute immobilization stress model was prepared in the model group using acute immobilization for 2 h. Ginsenoside Rb₁ (40 mg/kg) was peritoneally injected to rats in the medication group 30 min before modeling, with the same procedure as those for rats in the model group. No treatment was performed to rats in the normal control group. The plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and corticosterone (CORT) contents were detected using ELISA. The mRNA expression of TrkB in the rats' hippocampus was detected using real-time fluorescence quantitative RT-PCR. Results Before modeling there was no statistical difference of plasma CORT or ACTH concentrations among three groups ($P > 0.05$). The plasma CORT and ACTH concentrations increased in the model group and the medication group more significantly after modeling than before modeling, showing statistical difference ($P < 0.05$). Besides, they were obviously higher in the model group than in the normal control group ($P < 0.05$). They were obviously higher in the medication group than in the model control group ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the mRNA expression of TrkB significantly decreased in the model group (87.73 ± 7.62 vs 50.65 ± 5.19 , $P <$

0.05), showing statistical difference. The mRNA expression of TrkB was significantly higher in the medication group (78.91 ± 18.07) than in the model group, showing statistical difference ($P < 0.05$). Conclusion Pretreatment by ginsenoside Rb₁ could increase the plasma CORT and ACTH concentrations, maintain the mRNA expression of TrkB, thus relieving injury induced by acute immobilization stress.

KEYWORDS acute immobilization stress; tyrosine kinase B; ginsenoside Rb₁; adrenocorticotrophic hormone and corticosterone

急性应激是机体在各种内外环境因素及社会、心理因素刺激时所出现的全身性非特异性适应反应,可以引起大脑功能减退及神经元损害,海马是应激时中枢神经系统损伤的主要部位^[1,2]。酪氨酸激酶 B (tyrosine kinase B, TrkB) 在海马组织大量表达,是脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的高亲和力受体,两者结合对恢复神经元正常生理功能、挽救神经元变性及突触重塑等具有重要作用^[3,4]。同时在急性应激情况下,机体激活下丘脑—垂体—肾上腺轴 (HPA 轴),促使血浆中促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 和皮质酮 (corticosterone, CORT) 的浓度增加,是对抗外来突发事件的一条重要反馈和自我保护途径^[5]。人参皂苷 Rb₁ 作为人参中的主要有效成分,其对缺血性脑损伤、癫痫、阿尔茨海默病等多种神经系统疾病具有一定的疗效^[6-8]。目前国内关于急性束缚性应激对海马 TrkB mRNA 表达影响的文章尚少,也鲜有关于人参皂苷在这一方面的研究。本实验观察急性束缚性应激对大鼠海马组织 TrkB mRNA 表达的影响,并研究人参皂苷 Rb₁ 预处理对急性应激血浆 ACTH 和 CORT 及海马区 TrkB mRNA 表达的影响,并探讨其可能机制。

材料与方法

1 动物 健康成年 SD 大鼠 18 只, SPF 级, 雄性, 7 周, 体重 (250 ± 10) g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 动物生产许可证号: SCXK (沪) 2007-0005。于实验前 7 天购买并饲养于标准动物房中, 给予充足的水分和食物。

2 药物、试剂及仪器 人参皂苷 Rb₁ (批号: 10072432, 含量 $\geq 98.0\%$, 购于上海同田生物技术股份有限公司), 使用时将其溶解于生理盐水中, 于使用当天配制成 2 mg/mL 浓度; 大鼠 CORT 和 ACTH ELISA 试剂盒 (购于上海西唐生物科技有限公司); Trizol 试剂盒 (Invitrogen, Cat. 15596, 美国); 反转录试剂盒 (Bio-Serve Cat No: BS-PCR005); PCR 扩增试剂盒 (Bio-Serve Cat No: BS-PCR003); 10%

水合氯醛; ZH-TXQ 型筒形束缚器 (杭州雷琪实验器材有限公司); 酶标仪 (DENLEY DRAGON Wellscan MK 3, Thermo, 芬兰); ABI 7500 型定量 PCR 仪 (ABI, 美国); 微量分光光度计 (Thermo, Nano-Drop1000, 美国)。

3 分组、造模与给药 将 18 只大鼠按随机区组法分为正常组、模型组和给药组, 每组 6 只。正常组不作任何处理。模型组采用 ZH-TXQ 型筒形束缚器束缚 2 h。操作方法: 抓住大鼠尾端, 使其钻入束缚器, 调节束缚器的长度使大鼠制动 2 h^[9,10]。给药组于造模前 30 min 给予人参皂苷 Rb₁ (40 mg/kg)^[11,12] 腹腔注射, 余同模型组。

4 ELISA 法检测血浆 ACTH 和 CORT 浓度 大鼠造模前及造模结束后即刻用 10% 水合氯醛 (3 mL/kg) 进行腹腔注射麻醉, 再用肝素化的 1 mL 针筒通过目内眦静脉采血 1 mL, 收集在冷冻过的肝素化的 EP 管中, 4 ℃, 3 000 r/min 离心 15 min, 取血浆标本于 -20 ℃ 保存。采用 ELISA 法检测 ACTH 和 CORT 浓度, 按试剂盒说明书进行操作。以造模后血浆 CORT、ACTH 含量较造模前显著增加作为造模成功的评价标准。

5 实时荧光定量 RT-PCR 检测海马组织 TrkB mRNA 表达 造模结束后 0.5 h, 大鼠深麻醉后断头取脑, 冰上游离海马组织, 迅速置于液氮中, 后于 -80 ℃ 保存。采用实时荧光定量 RT-PCR 检测大脑海马组织中 TrkB mRNA 表达量。使用 Trizol 试剂提取 RNA, 甲醛变性胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度法在 260, 280 nm 波长处测定 RNA 样品吸光度 (A) 值, 计算 RNA 纯度和浓度。逆转录成 cDNA。引物由上海捷瑞生物工程有限公司设计, 引物序列见表 1。反应体系组成: 2 × PCR Master Mixture 15 μL, PCR 特异引物 F 0.5 μL, PCR 特异引物 R 0.5 μL, 模板 2 μL, 余下体积用水补足到 30 μL。各指标按以下程序进行: 95 ℃, 3 min; 35 ~ 40 个循环 (95 ℃, 30 s; 55 ℃, 30 s; 72 ℃, 30 s); 72 ℃, 15 min。目的基因浓度除以基因 (18 S) 的浓度, 即为此基因校正后的相对含量。

表 1 目的基因引物序列

基因		双向引物序列	退火温度 (℃)	引物长度 (bp)
18S	上游	5'-AGTCGCCGTGCCTACCAT-3'	60	129
	下游	5'-CGGGTCGGGAGTGGGTAAT-3'		
TrkB	上游	5'-CGCGGCTCTGGGGCTTATGCT-3'	68	130
	下游	5'-GGAAATGCCACGATGCCAGAGAA-3'		

6 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠造模前后血浆 ACTH、CORT 含量比较(表 2) 造模前,各组血浆 ACTH、CORT 含量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后,模型组和给药组血浆 ACTH、CORT 含量均较本组造模前显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);且模型组明显高于正常组同期($P < 0.05$),给药组明显高于模型组同期($P < 0.05$)。

2 各组大鼠海马组织 TrkB mRNA 表达的相对含量比较(表 2) 与正常组比较,模型组海马组织 TrkB mRNA 表达水平下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);给药组海马组织 TrkB mRNA 表达水平较模型组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

讨 论

应激是多种疾病如代谢类疾病、心血管疾病以及精神类疾病等的风险因素。随着研究的进展,发现应激对中枢系统多种神经递质传导通路有很大的影响^[13]。海马是应激对大脑产生作用最重要的区域之一,目前关于应激对大脑海马影响的研究很多,并发现应激可以使海马的细胞因子 NF- κ B、p-38 蛋白激酶等发生改变^[14],但关于急性束缚性应激和 TrkB 的研究尚少。本实验采用急性束缚性应激模型,观察大鼠海马区 TrkB mRNA 表达量的变化。结果发现,急性束缚 2 h 后大鼠海马区 TrkB mRNA 表达量下降。

研究表明,TrkB 信号传导在兴奋性突触形成过程中起着重要作用,其主要机制可能是通过 TrkB 信号介导的自主细胞信号作用于突触前后细胞,从而使兴奋性突触发生^[15]。这一过程为突触发生提供一个生长和稳定的环境^[15]。应激会导致大脑海马突触减少,海马体积萎缩等^[16],因此 TrkB 可能介导这一过程。同时 TrkB 信号还介导下游几条通路,分别是丝裂原激活的蛋白激酶/MAP 激酶(MAPK)通路、胞内磷脂酰肌醇激酶 3(PI3K)通路和 γ -磷脂酶 C-Ca²⁺(PLC γ -Ca²⁺)通路^[17]。这 3 条通路介导各种生物学改变,同时也与多种疾病发生关系密切。由此可见,TrkB 可能介导了应激所导致的生理病理性改变,同时也可以解释应激所导致疾病多样性的原因。至于具体疾病的具体途径,尚待进一步研究。

人参是传统的补益中药,人参皂苷 Rb₁ 是人参的代表成分之一。大量研究发现其可以改善记忆功能、抑制脑神经细胞凋亡、保护海马神经元^[12]。已有研究证实人参皂苷 Rb₁ 可促进大脑神经生长因子(nerve growth factor,NGF)和 TrkA 的表达^[18]。本研究发现急性束缚性应激使大鼠海马 TrkB mRNA 表达明显下降,故采用人参皂苷 Rb₁ 预处理方法,探讨其对这一过程是否存在保护作用及可能机制。结果发现,给药组造模后可以维持海马 TrkB mRNA 的正常表达量,从而达到缓解急性应激的效果。其具体机制可能与人参皂苷具有钙通道拮抗及氧化作用等有关^[19],尚待进一步研究。

同时,研究认为急性应激是糖皮质激素(人体为皮质醇,大鼠为皮质酮)增加的过程^[5,20]。有研究表明急性应激激活 HPA 轴致使其释放的 ACTH 及 CORT 含量增高,与其受体结合,从而产生一系列的自我调节作用^[5]。本研究发现急性束缚 2 h 后血浆 CORT 和 ACTH 含量明显上升,提示造模成功,同时人参皂苷 Rb₁ 可以升高血浆 CORT 和 ACTH 的含量,提示其可能与增强急性应激的自我保护作用有关。然而人参皂苷 Rb₁ 上调急性应激下血浆中 CORT 和 ACTH 含量的具体机制尚不明确,同时是否还存在其他的保护通路有待于进一步研究。

表 2 各组大鼠血浆 ACTH、CORT 含量及 TrkB mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ACTH (ng/mL)		CORT (ng/mL)		TrkB mRNA
		造模前	造模后	造模前	造模后	
正常	6	1.852 $\pm$ 0.844	1.940 $\pm$ 0.846	0.894 $\pm$ 0.387	0.825 $\pm$ 0.367	87.73 $\pm$ 7.62
模型	6	2.065 $\pm$ 0.866	3.958 $\pm$ 0.916 * Δ	0.939 $\pm$ 0.302	2.305 $\pm$ 0.655 * Δ	50.65 $\pm$ 5.19 Δ
给药	6	1.033 $\pm$ 0.770	5.991 $\pm$ 1.353 * $\blacktriangle$	1.361 $\pm$ 0.900	4.078 $\pm$ 1.716 * $\blacktriangle$	78.91 $\pm$ 18.07 $\blacktriangle$

注:与本组造模前比较,* $P < 0.05$;与正常组同期比较, $\Delta P < 0.05$;与模型组同期比较, $\blacktriangle P < 0.05$

综上,急性应激使大鼠海马区 TrkB mRNA 表达量明显下降。人参皂苷 Rb₁ 预处理可升高血浆 CORT 和 ACTH 含量,同时维持海马 TrkB mRNA 的正常表达量。本实验对急性应激性疾病发病原因进行了探讨,同时为临床使用人参皂苷治疗此类疾病提供了理论基础和科学依据。

参 考 文 献

- [1] 张银娥,杨惠芳,宋辉. 应激与海马神经元凋亡[J]. 工业卫生与职业病, 2007, 33(3): 180-183.
- [2] Robert MS. Why stress is bad for your brain[J]. Science, 1996, 273(9): 749-750.
- [3] Numakawa T, Suzuki S, Kumamaru E, et al. BD-NF function and intracellular signaling in neurons[J]. Histol Histopathol, 2010, 25(2): 237-258.
- [4] von Bohlen und Halbach O, Krause S, Medina D, et al. Regional- and age-dependent reduction in TrkB receptor expression in the hippocampus is associated with altered spine morphologies[J]. Biol Psychiatry, 2006, 59(9): 793-800.
- [5] Katan M, Christ-Crain M. The stress hormone copeptin: a new prognostic biomarker in acute illness[J]. Swiss Med Wkly, 2010, 140: w13101.
- [6] 王国华,樊柯姜. 人参皂苷单体对大鼠局灶性脑缺血再灌注的神经保护研究[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(29): 2071-2074.
- [7] Wang Y, Liu J, Zhang Z, et al. Anti-neuroinflammation effect of ginsenoside Rb₁ in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Neuroscience Lett, 2011, 487(1): 70-72.
- [8] Lian XY, Zhang ZZ, Stringer JL. Anticonvulsant activity of ginseng on seizures induced by chemical convulsants[J]. Epilepsia, 2005, 46(1): 15-22.
- [9] Theoharides TC, Spanos C, Pang X, et al. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect[J]. Endocrinology, 1995, 136(12): 5745-5750.
- [10] Yun SJ, Park HJ, Yeom MJ, et al. Effect of electroacupuncture on the stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus[J]. Neurosci Lett, 2002, 318(2): 85-88.
- [11] 刘俊伟,张慧玲. 人参皂苷 Rb₁ 对脑创伤后 SD 大鼠脑水含量及血清 S100 β 的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21(3): 388-389.
- [12] 王卫霞,王巍,陈可冀. 人参皂苷对动物脑神经保护作用及其机理研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(1): 89-91.
- [13] Heuser I, Lammers CH. Stress and the brain[J]. Neurobiol Aging, 2003, 24(Suppl 1): S69-S76.
- [14] Miller DB. Aging, stress and the hippocampus[J]. Ageing Res Rev, 2005, 4(2): 123-140.
- [15] Luikart BW, Parada LF. Receptor tyrosine kinase B-mediated excitatory synaptogenesis[J]. Progr Brain Res, 2006, 157: 15-24.
- [16] de Kloet ER. Stress in the brain[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 405(1-3): 187-198.
- [17] Minichiello L. TrkB signalling pathways in ITP and learning[J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(12): 850-860.
- [18] Salim KN, McEwen BS, Chao HM. Ginsenoside Rb₁ regulates ChAT, NGF and TrkA mRNA expression in the rat brain[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1997, 47(1-2): 177-182.
- [19] Jiang Y, Liu W, Wang XM, et al. Calcium channel blockade and anti-free-radical actions of panaxatriol saponins in cultured myocardiocytes[J]. Acta Pharmacol Sin, 1996, 17(2): 138-141.
- [20] Levine S. Influence of psychological variables on the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 405(1-3): 149-160.

(收稿:2012-04-28 修回:2012-08-03)

更 正

本刊 2012 年第 32 卷 12 期第 1681 页右栏表 5 第 2 行“ $280 \pm 48^*$, $0.23 \pm 0.09^*$ ”有误,改为“ $582 \pm 130^*$, $0.33 \pm 0.10^*$ ”;第 3 行“ $582 \pm 130^\Delta$, $0.33 \pm 0.10^\Delta$ ”有误,改为“ $280 \pm 48^\Delta$, $0.23 \pm 0.09^\Delta$ ”。谨向作者及读者致歉。