

人参皂苷 Rg2 及其立体异构体对氧糖剥离/再灌注细胞模型的影响

皮明山 茹琴 龚晓康 吴日辉 田香 熊琪 李超英

摘要 **目的** 观察不同浓度的人参皂苷 Rg2 (ginsenoside-Rg2) 及其立体异构体 [20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2] 对氧糖剥离/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 细胞模型的保护作用, 探讨其作用机制并比较天然型 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 作用效果的差异性。**方法** 将培养 7 天的皮层神经元分成 5 组: 对照组、模型组、Rg2 组、20(R)-Rg2 组及 20(S)-Rg2 组, Rg2 组、20(R)-Rg2 组及 20(S)-Rg2 组分别加入浓度为 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 预先处理 24 h, 然后制备 OGD/R 模型; 24 h 后检测细胞存活率、凋亡因子 Caspase-3 的活性、胞内 Ca^{2+} 浓度以及超氧化物歧化酶 (SOD) 和丙二醛 (MDA) 含量。**结果** 与对照组比较, 模型组细胞的存活率、SOD 活力明显降低, Caspase-3 的活性、 Ca^{2+} 荧光灰度值及 MDA 含量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 组细胞存活率、SOD 活力均显著升高, Caspase-3 活性、 Ca^{2+} 荧光灰度值及 MDA 含量均显著降低 ($P < 0.05$); 与 20(S)-Rg2 组比较, 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2 和 20(R)-Rg2 组的细胞存活率升高、MDA 含量降低 ($P < 0.05$), 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 20(R)-Rg2 组及 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2 组的 Caspase-3 活性降低、SOD 活力升高 ($P < 0.05$), 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2 和 20(R)-Rg2 组的 Ca^{2+} 荧光灰度值降低 ($P < 0.05$); 与 20(R)-Rg2 组比较, 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2 组的 Ca^{2+} 荧光灰度值降低 ($P < 0.05$), 40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2 组的 SOD 活力升高 ($P < 0.05$), 20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时 Rg2 组的 MDA 含量降低 ($P < 0.05$)。**结论** 人参皂苷 Rg2 及其立体异构体预处理可以提高 OGD/R 条件下的细胞活力, 其机制可能与提高细胞抗凋亡、抗氧化能力及减少 Ca^{2+} 内流有关, 并且 20(R)-Rg2 的作用效果优于 20(S)-Rg2 却低于天然型 Rg2。

关键词 人参皂苷 Rg2; 人参皂苷立体异构体; 氧糖剥离/再灌注; 皮层神经元

Effect of Ginsenoside Rg2 and Its Stereoisomers on Oxygen-Glucose Deprivation and Reperfusion Induced Cortical Neuronal Injury Model PI Ming-shan, RU Qin, GONG Xiao-kang, WU Ri-hui, TIAN Xiang, XIONG Qi, and LI Chao-ying Wuhan Institute of Biomedical Sciences, Jiangnan University, Wuhan (430056)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of natural type ginsenoside Rg2 (Rg2) and its stereoisomers [20(R)-Rg2 and 20(S)-Rg2] at different concentrations on oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) induced cortical neuronal injury model *in vitro*, and to explore the mechanism, and compare their differences of action. **Methods** Cortical neurons after 7-day culture were randomly divided into 5 groups, i.e., the control group, the model group, the Rg2 group, 20(R)-Rg2 group, and 20(S)-Rg2 group. Cortical neurons in the Rg2 group, 20(R)-Rg2 group, and 20(S)-Rg2 group were pretreated with 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2, 20(R)-Rg2, and 20(S)-Rg2 for 24 h to prepare OGD/R model. The cell survival rate, the activity of Caspase-3, the intracellular Ca^{2+} concentration, contents of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were detected 24 h later. **Results** Compared with the control group, cell survival rates and activities of SOD obviously decreased, the activity of Caspase-3, Ca^{2+} fluorescent optical gray value, and contents of MDA significantly increased with statistical difference ($P < 0.05$). Compared with the model group, cell survival rates and activities of SOD obviously increased, the

基金项目: 江汉大学研究生科研创新基金项目 (No. 301004210001)

作者单位: 江汉大学武汉生物医学研究院 (武汉 430056)

通讯作者: 李超英, Tel: 027-84225417, E-mail: licy.whibs@aliyun.com

DOI: 10.7661/CJIM.2016.03.0333

activity of Caspase-3, Ca^{2+} fluorescent optical gray value, and contents of MDA significantly decreased in 20 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 group, 40 $\mu\text{mol/L}$ 20(R)-Rg2 group, and 80 $\mu\text{mol/L}$ 20(S)-Rg2 group ($P < 0.05$). Compared with 20(S)-Rg2 group, cell survival rates increased and contents of MDA significantly decreased in 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 and 20(R)-Rg2 groups ($P < 0.05$). The activity of Caspase-3 decreased and contents of SOD increased in 80 $\mu\text{mol/L}$ 20(R)-Rg2 group, and 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 groups ($P < 0.05$). Ca^{2+} fluorescent optical gray value decreased in 40, 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 and 20(R)-Rg2 groups ($P < 0.05$). Compared with 20(R)-Rg2 group, Ca^{2+} fluorescent optical gray value decreased in 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 group ($P < 0.05$); contents of SOD increased in 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 groups ($P < 0.05$); contents of MDA decreased in 20, 40, and 80 $\mu\text{mol/L}$ Rg2 groups ($P < 0.05$). Conclusions Rg2 and its stereoisomers could improve cell vitality of cortical neurons against OGD/R induced injury. This might be related to improving anti-apoptotic capacities and antioxidant abilities, and reducing Ca^{2+} inflow. Besides, the neuroprotective effect of 20(R)-Rg2 was better than that of 20(S)-Rg2, but inferior to that of Rg2.

KEYWORDS ginsenoside Rg2; ginsenoside stereoisomers; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; cortical neuron

缺血性脑血管病(ischemic cerebral vascular disease, ICVD)是威胁人类健康与生存的主要疾病之一,是常见病、多发病,致残率极高,是目前的研究热点之一。全球每年都会有 200 万新增脑梗塞性缺血病例出现,并且其中 75% 死于该病^[1],这种脑梗塞性缺血采用溶栓治疗后带来的脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia and reperfusion injury, CIRI)也是目前最受关注的问题之一^[2]。CIRI 的发病机制复杂,目前尚未阐明,研究表明 CIRI 通常会致使脑细胞的凋亡率增加^[3]以及激活 N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartic acid, NMDA)受体,导致 Ca^{2+} 内流,致细胞内钙超载^[4];另有研究证实,CIRI 与氧自由基引起的细胞脂质过氧化而导致的损伤有关^[5]。现有的治疗药物仅局限于改善症状,迄今为止尚无理想的治疗 CIRI 的有效药物。

人参是传统的名贵中药,有重要的药用价值和经济意义。不少研究已经证实了人参的主要活性物质人参皂苷起到了最主要的药理作用,如抗凋亡、抗癌和抗氧化^[6]等。人参皂苷 Rg2 是人参皂苷重要组成成分之一,不少研究报道其对大鼠心肌缺血再灌注损伤诱发的细胞凋亡有保护作用^[7],也有相关研究显示它可以改善学习记忆^[8]和防治脑梗塞性痴呆^[9],但对其抗 CIRI 的机制研究甚少。另外,人参皂苷 Rg2 有两个旋光异构体 20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2,对药物旋光异构体作用差异的研究逐渐成为当前的研究热点,药物的不同结构作用效果通常会有不同,如人参皂苷 Rh2 中 R 型对破骨细胞的形成有抑制作用而 S 型没有^[10];20(R)-人参皂苷 Rg3 对于荷瘤小鼠免疫功能提高强于 20(S)-人参皂苷 Rg3^[11]等。但是,目前尚未见报道人参皂苷 Rg2 立体异构体药理作用

差异的比较研究,更缺少在 CIRI 中作用差异的比较研究。因此,揭示 CIRI 的发生发展机制,寻找有效的防治药物显得十分紧迫和重要。本研究采用原代培养的皮层神经元,建立体外氧糖剥离/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)细胞模型,观察人参皂苷 Rg2 及其立体异构体对其的影响并初步探讨其可能机制及比较天然型 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 作用效果的差异性。

材料与方法

1 动物 1 日龄 SD 大鼠,SPF 级,由武汉大学动物实验中心提供,许可证号:SCXK-(鄂)-2008-0004。

2 试剂与仪器 人参皂苷 Rg2(南京广润生物制品有限公司),20(R)-人参皂苷 Rg2 和 20(S)-人参皂苷 Rg2(成都曼思特生物科技有限公司),高糖 DMEM(GIBCO, 美国),无糖 DMEM(杭州吉诺生物医药技术有限公司),Neuronbasal 培养基(GIBCO, 美国),2% B-27 Supplement 50 × (GIBCO, 美国),胎牛血清(GIBCO, 美国),多聚赖氨酸(Sigma, 美国),0.25% 胰蛋白酶(GIBCO, 美国),3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(Sigma, 美国),Fluo-3AM(Dojindo, 日本),Caspase-3 活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术研究),细胞 MDA、SOD 检测试剂盒(南京建成科技有限公司),Eppendor 5810R 台式高速冷冻离心机(Eppendorfg Inc, 德国),Multiskan FC 型酶标仪(Sigma Inc, 美国),Olympus IX71 型显微镜(Poohner Inc, 日本),BS224S 型电子分析天平(Sartorius AG Inc, 德国),CO₂ 培养箱(Sigma Inc, 美国)。

3 皮层神经元的培养 按照参考文献[12]的细

胞培养方法,取新生 1 日龄的 SD 大鼠,无菌条件下剥离软脑膜后,分离大脑皮质,剪碎脑组织,加入 0.125% 胰蛋白酶,于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中消化 15 min 后,加入 DMEM 稀释终浓度为 10% 胎牛血清终止消化,200 目细胞筛网过滤,1 000 r/min 离心 8 min。弃上清,加入含 10% 胎牛血清、1% 谷氨酰胺的 DMEM 培养液(种植培养液),吹打成单细胞悬液,调整细胞浓度为 5 × 10⁶ 个/mL,以每瓶 2 mL 接种于多聚赖氨酸包被的 25 cm² 培养瓶,用于检测 Caspase-3 的活性;以每孔 800 μL 接种于 6 孔板,用于检测 SOD 和 MDA 的含量;以每孔 200 μL 接种于 24 孔板,用于检测胞内钙离子浓度;每孔 50 μL 接种于 96 孔板,用于检测细胞存活率。于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 24 h 后全部换成含 2% B27 添加剂、1% 谷氨酰胺的 Neuronbasal 培养液(维持培养液),以后每 2 天半量换液 1 次,培养至 7 ~ 10 天用于实验。

4 分组及模型制备 将培养 7 天的皮层神经元分成 5 组:对照组、模型组、Rg2 组、20(R)-Rg2 组及 20(S)-Rg2 组,Rg2 组、20(R)-Rg2 组及 20(S)-Rg2 组分别加入浓度为 20、40、80 μmol/L 的 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 预先处理 24 h,随后模型组、Rg2 组、20(R)-Rg2 组及 20(S)-Rg2 组按照参考文献[13]造模方法造模,各组弃去培养液,PBS 洗涤 2 次,加入 95% N₂ 和 5% CO₂ 预饱和的无糖 DMEM 培养液模拟细胞缺血缺氧状态,置于 37 °C 低氧环境下培养 2 h 后换成正常的维持培养液在 5% CO₂ 培养箱中培养,以形成再灌注,OGD/R 模型制备完成。对照组不给药也不经过 OGD/R 处理。

5 MTT 法检测细胞存活率 再灌注 24 h 时,取出各 96 孔板,每组每孔均加入 20 μL 5 g/L 的 MTT 溶液,继续置于 5% CO₂、37 °C 的细胞培养箱内。4 h 后,将各组的培养液吸弃,每孔各加入 150 μL DM-SO,振荡混匀 10 min,在 570 nm 波长下用酶标仪检测各孔吸光度(absorbance, A) 值,然后设对照组的吸光度值为 100% 存活率,计算出其他各组相对于对照组的相对存活率。

6 Caspase-3 活性检测 按试剂盒说明,以 pNA 为标准品稀释成不同浓度绘制标准曲线;取出培养瓶,吸取培养液备用,用胰酶消化神经元,收集至备用培养液中,4 °C 1 000 r/min 离心 8 min,小心吸除上清,PBS 洗涤 1 次,吸取上清后按每 200 万细胞加入 100 μL 裂解液的比例加入裂解液,重悬沉淀,冰浴裂解 15 min,4 °C 10 000 r/min 离心 10 min 后将上清转入预冷的离心管中作为样品,取少量样品用 Bradford 法

测定蛋白浓度,调整浓度为 1 ~ 3 mg/mL;设置 100 μL 反应体系(检测缓冲液 50 μL,待测样品 40 μL,荧光底物 Ac-DEVD-pNA 10 μL),加到 96 孔培养板,混匀,37 °C 孵育过夜;在 405 nm 波长下用酶标仪检测各孔吸光度值,然后将吸光度值代入标准曲线计算出相应 pNA 的浓度,再根据 Caspase-3 酶活力单位的定义计算出相应 Caspase-3 的活性。

7 神经元内 Ca²⁺ 荧光检测 再灌注 24 h 时,取出各 24 孔板,弃培养液,用预冷的 HBSS 洗涤 2 次,每组每孔均加入 1 μmol/L Fluo-3-AM 染液覆盖细胞,37 °C 避光孵育 30 min,然后用 HBSS 轻轻漂洗 3 次,再每孔加入 HBSS 覆盖细胞,37 °C 避光孵育 20 min 使 AM 体完全去酯化。于荧光显微镜下观察。用绿光激发,拍照,每个孔随机取 5 个视野。将收集的图像利用 Image J 进行灰度值的换算。

8 SOD 活力和 MDA 含量的测定 再灌注 24 h 时,取出各 6 孔板,弃去细胞培养上清,用 0.25% 胰酶消化 2 ~ 3 min,终止后 1 000 r/min 离心 10 min,加入 PBS 清洗 1 次,离心弃上清。按试剂盒说明,将细胞超声破碎后分别加入相应的试剂,分别经过相应的步骤,分别在 450 nm 和 530 nm 波长下测定各样本的吸光度,计算出 SOD 的活力及 MDA 的含量。

9 统计学方法 采用统计学软件 SPSS 19.0 对各组数据进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *q* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞存活率比较(表 1) 与对照组比较,模型组细胞的存活率明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与模型组比较,20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 组的细胞存活率均显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);另外,20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2 和 20(R)-Rg2 组的细胞存活率均显著高于 20(S)-Rg2 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。

2 各组 Caspase-3 活性比较(表 1) 与对照组比较,模型组 Caspase-3 的活性明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05);与模型组比较,20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2、20(R)-Rg2 和 20(S)-Rg2 组的 Caspase-3 活性均显著降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05);另外,80 μmol/L 浓度时 20(R)-Rg2 组的 Caspase-3 活性显著低于 20(S)-Rg2 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),且 40、80 μmol/L 浓度时

Rg2 组的 Caspase-3 活性均显著低于 20 (S)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组细胞存活率及 Caspase-3 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	相对存活率 (%)	Caspase-3 活性 (U/mg 蛋白)
对照	6	100.0 ± 4.6	65.0 ± 9.7
模型	6	56.7 ± 2.7*	245.0 ± 15.1*
Rg2	20 μmol/L	82.4 ± 2.9 [△]	188.6 ± 14.8 [△]
	40 μmol/L	88.6 ± 4.6 [△]	168.9 ± 15.7 [△]
	80 μmol/L	99.7 ± 2.1 [△]	134.5 ± 15.4 [△]
20 (R)-Rg2	20 μmol/L	78.7 ± 5.7 [△]	192.5 ± 10.8 [△]
	40 μmol/L	87.7 ± 3.4 [△]	173.8 ± 24.1 [△]
	80 μmol/L	99.5 ± 1.4 [△]	135.4 ± 12.2 [△]
20 (S)-Rg2	20 μmol/L	71.4 ± 2.4 [△]	200.3 ± 19.1 [△]
	40 μmol/L	79.8 ± 1.9 [△]	183.4 ± 15.9 [△]
	80 μmol/L	92.1 ± 2.8 [△]	156.2 ± 13.4 [△]

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$;与 20 (S)-Rg2 组同浓度比较, [▲] $P < 0.05$

3 各组胞内 Ca^{2+} 荧光强度比较 (表 2, 图 1) 与对照组比较, 模型组 Ca^{2+} 荧光强度增强;与模型组比较, 20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2、20 (R)-Rg2 和 20 (S)-Rg2 组的荧光强度均降低;同时, 利用软件 image J 换算得出的灰度值, 与对照组比较, 模型组的 Ca^{2+} 荧光灰度值明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2、20 (R)-Rg2 和 20 (S)-Rg2 组的 Ca^{2+} 荧光灰度值均明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);另外, 40、80 μmol/L 浓度时 Rg2 和 20 (R)-Rg2 组的 Ca^{2+} 荧光灰度值均显著低于 20 (S)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且 80 μmol/L 浓度时 Rg2 组的 Ca^{2+} 荧光灰度值明显低于 20 (R)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

4 各组 SOD 活力及 MDA 含量比较 (表 2) 与对照组比较, 模型组 SOD 的活力明显下降, MDA 的含量明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较, 20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2、20 (R)-Rg2 和 20 (S)-Rg2 组的 SOD 活力均显著升高, MDA

含量均显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);另外, 80 μmol/L 浓度时 20 (R)-Rg2 组的 SOD 活力显著高于 20 (S)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且 40、80 μmol/L 浓度时 Rg2 组的 SOD 活力不仅均明显高于 20 (S)-Rg2 组, 而且均明显高于 20 (R)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$);同时, 20、40、80 μmol/L 浓度时 20 (R)-Rg2 组的 MDA 含量均显著低于 20 (S)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 并且 20、40、80 μmol/L 浓度时 Rg2 组的 MDA 含量不仅均明显低于 20 (S)-Rg2 组, 而且均明显低于 20 (R)-Rg2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

讨 论

CIRI 的发病机制复杂, 仍然是目前的研究热点。中医药在 CIRI 的防治方面逐渐得到重视, 目前的研究和临床实践证明, 人参、葛根素、川芎嗪等多种具有扶正或祛邪功效的中药, 均有良好的抗 CIRI 的作用^[14, 15]。人参皂苷 Rg2 的药理作用通常表现为抗细胞凋亡、防止 Ca^{2+} 内流以及抗细胞氧化应激损伤等^[7-9], 但对其抗 CIRI 的作用机制尚不明确, 并且目前尚未见报道关于人参皂苷 Rg2 立体异构体在 CIRI 中药理作用差异的比较研究。

OGD/R 细胞模型是一种国际公认通常用来模拟 CIRI 的体外模型^[2]。皮层神经元 OGD/R 后, 细胞存活率会显著下降, 然而当预先给予不同浓度的人参皂苷 Rg2 后, 均会抑制其存活率的下降, 说明人参皂苷 Rg2 具有对抗这种损伤的神经保护作用。细胞凋亡是一种基本和复杂的生物学过程, 在 OGD/R 条件下死亡蛋白 Caspase-3 的激活促进细胞的凋亡^[16], 本实验结果显示, 皮层神经元经过 OGD/R 后 Caspase-3 活性显著升高, 不同浓度的人参皂苷 Rg2 有效的抑制了 Caspase-3 活性的升高。

表 2 各组 Ca^{2+} 相对灰度值、SOD 活力及 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Ca^{2+} 相对灰度值	SOD 活力 (U/mg · pro)	MDA 含量 (nmol/mg · pro)
对照	6	100.0 ± 1.5	142.9 ± 4.2	34.5 ± 4.5
模型	6	163.4 ± 2.4*	49.1 ± 6.2*	89.2 ± 6.3*
Rg2	20 μmol/L	149.3 ± 2.8 [△]	70.2 ± 6.8 [△]	63.2 ± 3.9 [△] ▲○
	40 μmol/L	135.6 ± 2.6 [△] ▲	86.6 ± 1.6 [△] ▲○	52.4 ± 5.4 [△] ▲○
	80 μmol/L	117.6 ± 1.4 [△] ▲○	113.3 ± 4.9 [△] ▲○	41.7 ± 2.5 [△] ▲○
20 (R)-Rg2	20 μmol/L	151.3 ± 2.2 [△]	67.7 ± 1.2 [△]	69.2 ± 3.3 [△] ▲
	40 μmol/L	136.8 ± 2.5 [△] ▲	79.0 ± 4.1 [△]	58.5 ± 2.6 [△] ▲
	80 μmol/L	122.9 ± 2.5 [△] ▲	104.8 ± 4.1 [△] ▲	49.6 ± 2.3 [△] ▲
20 (S)-Rg2	20 μmol/L	154.3 ± 2.5 [△]	62.0 ± 2.4 [△]	76.6 ± 2.4 [△] ▲
	40 μmol/L	144.3 ± 2.7 [△] ▲	75.7 ± 9.7 [△] ▲	71.9 ± 5.6 [△] ▲
	80 μmol/L	131.0 ± 2.4 [△] ▲	90.3 ± 5.5 [△] ▲	63.3 ± 6.0 [△] ▲

注:与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$;与 20 (S)-Rg2 组同浓度比较, [▲] $P < 0.05$;与 20 (R)-Rg2 组同浓度比较, [○] $P < 0.05$

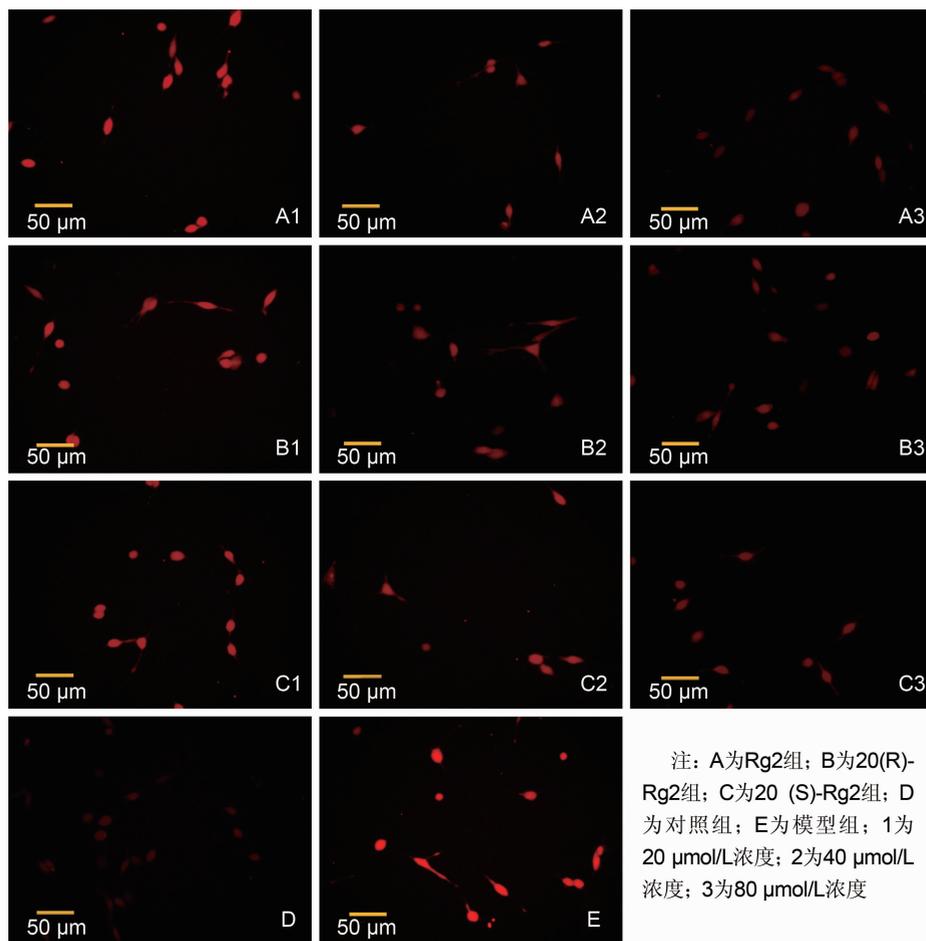


图 1 各组 Ca^{2+} 荧光染色图 ($\times 200$)

细胞内 Ca^{2+} 作为一种重要的第二信使,在细胞的各种生理功能中具有广泛的调节作用。脑缺血再灌注时细胞内钙超载主要通过破坏线粒体的结构与功能导致细胞能量代谢障碍,触发一系列酶促反应加速细胞损伤进程、促进氧自由基生成、激活非选择性氧离子通道等途径产生细胞毒性作用^[4]。本研究建立体外 OGD/R 模型,利用荧光染色验证了胞内 Ca^{2+} 浓度在缺血再灌注后会显著升高,然而人参皂苷 Rg2 能显著抑制其升高。目前认为,由于 NMDA 受体过度兴奋介导与其偶联的 Ca^{2+} 通道开放、膜通透性增大及封阻机制障碍而致细胞外 Ca^{2+} 内流增加、胞浆钙外排障碍,造成细胞内 Ca^{2+} 浓度增高^[17]。有研究显示,人参皂苷 Rg2 能有效抑制脑缺血再灌注大鼠 NMDA 受体亚单位表达^[18];也有研究表明,人参皂苷 Rg2 可能是通过缩短 Ca^{2+} 通道开放时间,减少开放概率,而减轻神经细胞的钙超载^[19]。但人参皂苷 Rg2 防治钙超载发生的机制还有待进一步研究。

正常情况下体内产生少量自由基属生理范围,可被抗氧化防御系统清除,使自由基的产生及清除处于动态平衡状态。当缺血再灌注时,此平衡状态被打破,

自由基蓄积而造成脑损伤,其中 MDA 含量的高低可反映机体内脂质过氧化的程度和细胞损伤的程度^[20]。本实验中,模型组 MDA 的含量最高,不同浓度人参皂苷 Rg2 预防给药组均受到明显的抑制。机体的防御系统中主要发挥作用的是 SOD,其活力高低间接反映了机体清除氧自由基的能力,常与 MDA 相配对作为检测机体氧化程度的指标^[21]。本实验中,模型组中 SOD 含量明显降低,其余组别均得到明显升高,说明 OGD/R 抑制了 SOD 的活性,人参皂苷 Rg2 却能使其活性增强。这与本实验中 MDA 的结果相对应,说明人参皂苷 Rg2 可能通过抑制脂质过氧化发挥抗缺血再灌注损伤的作用。

天然药物的立体异构性日益受到关注。例如,左旋四氢巴马汀具有良好的镇痛作用,而右旋体没有^[22]。本研究中,对人参皂苷 Rg2 的天然型、R 型以及 S 型的作用效果均进行了比较,高剂量 20(R)-Rg2 作用效果均显著优于 S 型;中、高剂量天然型 Rg2 作用效果均显著优于 S 型并且高剂量天然型 Rg2 对胞内 Ca^{2+} 浓度、SOD 及 MDA 含量的作用效果均显著优于 R 型。说明 20(R)-Rg2 抗缺血再灌注损伤的作用效果优于 20

(S)-Rg2 却不如天然型 Rg2。

综上所述,人参皂苷 Rg2 可能通过防止细胞凋亡,提高神经元的抗氧化和抗钙超载能力起到一定预防皮层神经元拟缺血再灌注损伤的作用。这种预防作用 20(R)-Rg2 强于 S 型却低于天然型,这一发现不仅为人参皂苷 Rg2 药理作用的立体异构性提供一定理论基础,而且能指导临床上合理利用人参皂苷 Rg2。然而,对人参皂苷 Rg2 是通过何通路来调节细胞凋亡以及减少 Ca^{2+} 内流的发生机制还有待进一步研究。根据以往的研究和本研究显示,人参皂苷 Rg2 (在一定范围内的剂量)可能作为一种神经保护剂通过特定途径用于治疗脑梗塞性痴呆所诱导的中风以及进一步改善溶栓治疗后带来的 CIRI,但仍需要更多的动物实验以及临床实验来进一步验证。

参 考 文 献

- [1] Rosamond W, Flegal K, Furie K, et al. Heart disease and stroke statistics – 2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee [J]. *Circulation*, 2008, 117(4): 125 – 146.
- [2] Tang Q, Han R, Xiao H, et al. Neuroprotective effects of Tanshinone II_A and/or tetramethylpyrazine in cerebral ischemic injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *Brain Res*, 2012, 1488: 81 – 91.
- [3] Tang LH, Xia ZY, Zhao B, et al. Phosphocreatine preconditioning attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of rat brain [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011: 107091.
- [4] Frantseva MV, Carlen PL, Perez Velazquez JL. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons [J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31(10): 1216 – 1227.
- [5] 李荣,吴伟,陈宏珪,等. 脑醒喷鼻剂对再灌注损伤脑组织自由基及一氧化氮合成酶变化的干预作用 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2003, 10(7): 23 – 25.
- [6] Christensen LP. Ginsenosides chemistry, biosynthesis, analysis, and potential health effects [J]. *Adv Food Nutr Res*, 2009, 55: 1 – 99.
- [7] 田建明,郑淑秋,郭伟芳,等. 人参皂苷 Rg2 对大鼠心肌缺血再灌注损伤诱发心肌细胞凋亡的保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20(4): 480.
- [8] Zhang G, Liu A, Zhou Y, et al. *Panax ginseng* ginsenoside-Rg2 protects memory impairment via anti-apoptosis in a rat model with vascular dementia [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 115(3): 441 – 448.
- [9] 宫志华,刘明霞,宫丽丽,等. 人参皂苷 Rg2 抗 MTD 大鼠海马神经元凋亡的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(6): 1069 – 1075.
- [10] Liu J, Jun S, Shimizu K, et al. 20(R)-Ginsenoside Rh2, not 20(S), is a selective osteoclast genesis inhibitor without any cytotoxicity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(12): 3320 – 3323.
- [11] Wu R, Ru Q, Chen L, et al. Stereospecificity of ginsenoside Rg3 in the promotion of cellular immunity in hepatoma H₂₂-bearing mice [J]. *J Food Sci*, 2014, 79(7): H1430 – 1435.
- [12] Wang CP, Li GC, Shi YW, et al. Neuroprotective effect of Schizandrin A on oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced cell injury in primary culture of rat cortical neurons [J]. *J Physiol Biochem*, 2014, 70(3): 735 – 747.
- [13] Huang SL, He XJ, Li ZF, et al. Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 on oxygen-glucose deprivation reperfusion in PC₁₂ cells [J]. *Pharmazie*, 2014, 69(3): 208 – 211.
- [14] Cheon SY, Cho KJ, Lee JE, et al. Cerebroprotective effects of red ginseng extract pretreatment against ischemia-induced oxidative stress and apoptosis [J]. *Int J Neurosci*, 2013, 123(4): 267 – 277.
- [15] Zhao LX, Liu AC, Yu SW, et al. The permeability of puerarin loaded poly nanoparticles coated with polysorbate 80 on the blood-brain barrier and its protective effect against cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Biol Pharm Bull*, 2013, 36(8): 1263 – 1270.
- [16] Luo Y, Yang X, Zhao S, et al. Hydrogen sulfide prevents OGD/R-induced apoptosis via improving mitochondrial dysfunction and suppressing an ROS-mediated caspase-3 pathway in cortical neurons [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(8): 826 – 831.
- [17] Marks AR. Intracellular calcium-release channels regulators of cell life and death [J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(2 Pt 2): H597 – H605.
- [18] 张敏,徐丽,刘黎星,等. 人参皂苷 Rg2 对脑缺血再灌注大鼠学习记忆及海马神经元 Glu 和 NMDA 受体亚单位表达的影响 [J]. *齐鲁医学杂志*, 2006, 21(4): 286 – 289.
- [19] Liu CT, Wang HB, Xu BJ, et al. A comparative study on anticoagulant activities of three Chinese herbal medicines from the genus *Panax* and anticoagulant activities of ginsenosides Rg1 and Rg2 [J]. *Pharm Biol*, 2013, 51(8): 1077 – 1080.
- [20] 王晓英,罗嘉,邢虹,等. 神经元缺氧复氧损伤时氧自由基的毒性作用及其机制 [J]. *生物物理学报*, 1999, 15(6): 375 – 380.
- [21] 王守彪,王双燕,沈若武,等. 人参皂苷 Rg2 对体外培养的海马缺氧神经元的预防保护作用 [J]. *神经解剖学杂志*, 2006, 22(1): 99 – 102.
- [22] Hu JY, Jin GZ. Arcuate nucleus of hypothalamus involved in analgesic action of I-THP [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(5): 439 – 444.

(收稿:2014-10-27 修回:2015-07-10)