

人参皂苷 Rb₁ 对术后疲劳综合征老年大鼠海马神经营养因子的影响

张昌静¹, 庄成乐¹, 陈伟哲¹, 刘舒¹, 毛翔宇¹, 章晓东¹, 陈必成², 余震^{1,3*}

1. 温州医科大学附属第一医院 胃肠外科, 浙江 温州 325000

2. 温州医科大学附属第一医院 外科学实验室, 浙江 温州 325000

3. 同济大学附属第十人民医院 胃肠外科, 上海 200072

摘要: 目的 研究术后疲劳综合征(POFS)老年大鼠海马神经营养因子(NTF)水平动态变化及人参皂苷 Rb₁ 的抗疲劳机制。方法 将 96 只老年雄性 SD 大鼠, 随机分为假手术组、模型组和人参皂苷 Rb₁ 干预组, 每组再按时间点分为术后 6 h 及术后 1、3、7 d 组。术后对应时间点进行旷场试验, 并通过 Real-time PCR 检测大鼠海马神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)的 mRNA 表达; 放射免疫法检测 NGF 和 BDNF 蛋白表达; 电镜观察海马 CA1 区超微结构变化。

结果 模型组与假手术组比较, 旷场试验中大鼠穿越格子数减少 ($P < 0.01$), 休息时间延长 ($P < 0.01$); NGF 和 BDNF mRNA 表达降低 ($P < 0.05, 0.01$), 其相应的蛋白表达也降低 ($P < 0.05$)。人参皂苷 Rb₁ 组与模型组比较, 旷场试验中大鼠穿越格子数增多 ($P < 0.05$), NGF 和 BDNF mRNA 表达升高 ($P < 0.05, 0.01$), 其相应的蛋白表达也升高 ($P < 0.01$)。电镜结果显示, 模型组与假手术组比较, 大鼠海马神经元超微结构受损, 人参皂苷 Rb₁ 组得到相应改善。**结论** POFS 老年大鼠海马 NTF 表达降低, 神经元存在一定程度损伤, 人参皂苷 Rb₁ 对 POFS 老年大鼠有一定改善作用。

关键词: 人参皂苷 Rb₁; 术后疲劳综合征; 老年大鼠; 神经生长因子; 脑源性神经营养因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)06-0813-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.06.014

Effect of ginsenoside Rb₁ on neurotrophic factors in elderly rats with postoperative fatigue syndrome

ZHANG Chang-jing¹, ZHUANG Cheng-le¹, CHEN Wei-zhe¹, LIU Shu¹, MAO Xiang-yu¹, ZHANG Xiao-dong¹, CHEN Bi-cheng², YU Zhen^{1,3}

1. Department of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

2. Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

3. Department of Gastrointestinal Surgery, Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Abstract: Objective To investigate the dynamical variation of the hippocampal neurotrophic factors (NTF) in elderly rats with postoperative fatigue syndrome (POFS) and the antifatigue mechanism of ginsengside Rb₁. **Methods** Ninety-six elderly male SD rats were randomly divided into Sham, POFS model, and ginsengside Rb₁ intervention groups, and each group was divided into subgroups by postoperative 6 h, 1, 3, and 7 d. The hippocampus was removed at each time point after open field test (OFT) to detect the mRNA expression levels of nerve growth factors (NGF) and brain-derived neurotrophic factors (BDNF) by Real-time PCR; The content of protein was detected by radioimmunoassay; The ultrastructural changes in hippocampus CA1 area were observed by electron microscopy. **Results** Compared with the Sham group, the number through lattice in OFT of rats in the POFS model group declined ($P < 0.01$), while resting time increased ($P < 0.01$); The expression level of NGF and BDNF mRNA in the POFS model group declined ($P < 0.05, 0.01$), the expression level of corresponding protein declined ($P < 0.05$). Compared with the POFS model group, the number through lattice in OFT of rats in the Rb₁ group increased ($P < 0.05$), the expression level of NGF and BDNF mRNA of rats in Rb₁ group increased ($P < 0.05, 0.01$), and the expression level of corresponding protein also increased ($P < 0.01$). Electron microscopy results showed that compared with the Sham group, the ultrastructures of the hippocampal neurons of rats were significantly damaged in the POFS model group, which

收稿日期: 2013-09-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81171857); 浙江自然科学基金资助项目(LY12H1004); 浙江卫生厅营养学支撑学科项目(11-ZC24, 201231118, 2013ZDA014); 温州市科技局项目(H2005B032)

作者简介: 张昌静(1988—), 男, 研究生, 研究方向为胃肠外科临床营养。Tel: 18858735220 E-mail: zhangchangjing000@163.com

*通信作者 余震 Tel: (0577)88069806 E-mail: yuzhen0577@gmail.com

were relatively improved in the Rb₁ group. **Conclusion** The expression level of NTF in elderly rats with POFS declines, the hippocampal neurons are damaged to a certain extent and the application of ginsenoside Rb₁ may have the improvement to POFS in elderly rats.

Key words: ginsenoside Rb₁; postoperative fatigue syndrome; elderly rat; neurotrophic factors; brain-derived neurotrophic factors

术后疲劳综合征 (postoperative fatigue syndrome, POFS) 严重影响患者术后康复及生活质量, 常见于腹部大手术后, 尤多见于老年患者, 其病因尚未完全阐明^[1]。神经营养因子 (neurotrophic factors, NTF) 是一类对神经细胞损伤修复有重要作用的蛋白质, 包括神经生长因子 (nerve growth factors, NGF)、脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factors, BDNF) 等。本课题组前期研究发现, 人参皂苷 Rb₁ 具有抗疲劳作用^[2-3]。有报道, 在体外神经细胞培养中, 人参皂苷 Rb₁ 能通过促进 NTF 表达来保护神经细胞^[4]。而 POFS 老年大鼠颅内 NTF 的变化及人参能否通过影响 NTF 的表达来改善 POFS, 目前未见报道。本研究采用前期建立的 70% 中段小肠切除 POFS 大鼠模型^[5], 通过观察假手术大鼠、POFS 老年大鼠和人参皂苷 Rb₁ 干预大鼠的海马组织 NTF 表达差异, 为 POFS 的发病机制开辟新的思路, 并为人参皂苷 Rb₁ 的抗疲劳机制提供理论和实验支持。

1 材料

1.1 动物

SPF 级老年雄性 SD 大鼠, 购于北京维通利华实验动物有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2006-0009, 饲养于温州医学院外科学实验室屏障环境中, 给予标准饲料和饮用水, 饲养至 22 月龄, 取 96 只, 体质量 650~750 g 进入实验。本研究得到温州医科大学伦理委员会批准, 在整个实验中遵守《实验动物管理条例》, 做到减轻大鼠痛苦, 增加其舒适度。

1.2 药物与试剂

人参皂苷 Rb₁ (批号 12092821, 质量分数 ≥ 96.0%) 购自上海同田生物技术有限公司; RT 试剂盒 (批号 211600)、SYBR Green 试剂盒 (批号 216700) 购自 TOYOBO 公司; Trizol (批号 47415) 购自 Life Technology 公司; DEPC 水 (批号 1304G02) 购自 GENERAY Biotechnology 公司; NGF 放免药盒 (批号 HY-151)、BDNF 放免药盒 (批号 HY-153), 均购自北京华英生物技术研究所。

1.3 仪器

旷场试验场地 (自制); 5804R 台式低温离心机

(美国 Eppendorf 公司); 电动匀浆器 (Kimble 公司); 数显式电热恒温水浴锅 (上海跃进医疗器械厂); 酶标仪 (Thermo Scientific 公司); 7500 PCR 仪 (美国 Applied Biosys 公司); 超低温冰箱 (Thermo Fisher Scientific); 电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); r-911 全自动放免计数仪 (中国科技大学实业总公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型制备

用体质量测定法, 术前 1 周筛选出体质量稳定在 650~750 g 的 96 只 22 月龄大鼠进入实验。大鼠按体质量完全随机分为假手术组、模型组和人参皂苷 Rb₁ 干预组, 每组再按时间点分为术后 6 h 及术后 1、3、7 d 4 个小组, 共 12 组, 每小组 8 只。假手术组大鼠开腹后仅翻动肠袢, 模型组和人参皂苷 Rb₁ 组大鼠采用 70% 中段小肠切除法制备 POFS 大鼠模型^[5]。术后单鼠单笼饲养于实验室屏障环境中。

2.2 给药^[6]

假手术组和模型组大鼠分别于术前 3 d 开始到取材当天, 每天 ip 4 mL/kg 生理盐水 1 次。人参皂苷 Rb₁ 组大鼠在相同条件下 ip 15 mg/kg 人参皂苷 Rb₁ (4 mL/kg), 人参皂苷 Rb₁ 用生理盐水配制成 3.75 g/L 的溶液, 现配现用。

2.3 疲劳评估

2.3.1 一般状态 观察大鼠腹部术后体质量及自我清洁能力等。

2.3.2 旷场试验 (Open field test, OFT)^[7] 利用 150 cm×150 cm×60 cm 木质旷场箱, 底部划分为 30 cm×30 cm 的方格, 实验于 18:00~20:00 时在安静、弱光源的房内进行。记录大鼠 3 min 内穿越格子数、直立次数、修饰时间及休息时间。

2.4 标本采集

2.4.1 海马组织取材 各组大鼠分别于术后 6 h 及术后第 1、3、7 天, 腹部 sc 2% 戊巴比妥钠 (3.5 mL/kg) 进行麻醉, 之后断头, 迅速冰面上取海马, 置液氮中保存, 24 h 后转移至 -80 °C 超低温冰箱储存待测。

2.4.2 电镜取材 活体心脏灌注, 打开胸腔, 于左心室进针后止血钳夹持, 剪开右心耳, 于 2~4 min

内注入约 300 mL 生理盐水置换循环血液；接着再于 1~2 min 内注入 4%多聚甲醛溶液约 150 mL 进行活体固定，所有灌注液 4 °C 预冷；之后断头打开颅腔，于冰浴下完整剔取海马，2.5%戊二醛固定。

2.5 指标测定

2.5.1 Real-time PCR 取大鼠海马组织，Trizol 法提取总 RNA 并进行逆转录，Real-time PCR 采用 SYBR Green 染料法。扩增条件：95 °C、1 min；40 个循环（95 °C、15 s，60 °C、15 s，72 °C、45 s），总延伸结束后，产物进行电泳。引物序列（表 1）由上海基康生物技术有限公司合成。

2.5.2 放射免疫分析法（radioimmunoassay, RIA）取左侧海马组织采用放射免疫分析法检测 NGF、BDNF 蛋白水平。

2.5.3 电镜标本观察 按常规电镜样品制备程序漂洗、脱水、浸透及环氧树脂包埋。半薄切片，光

镜定位，超薄切片，透射电镜观察海马 CA1 区神经元超微结构改变。

2.6 统计学处理

用 SPSS 14.0 统计软件进行统计分析，实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组间的两两比较，方差齐性用 LSD 检验，方差不齐用 Tamhane's T2 检验。

3 结果

3.1 一般状况

模型组与假手术组比较，大鼠术后一般状态明显变差，怂毛，自我清洁能力变差，嗜睡，进食减少，大便黄软或腹泻，活动度下降，体质量不增。人参皂苷 Rb₁ 组大鼠一般状态介于模型组和假手术组之间。

3.2 旷场试验

模型组与假手术组比较，术后 1、3 d 大鼠穿越格子数明显减少（ $P < 0.01$ ），术后 3 d 休息时间明显延长（ $P < 0.01$ ），直立次数和修饰时间无统计学差异。人参皂苷 Rb₁ 组与模型组比较，术后 1、3 d 大鼠穿越格子数增多（ $P < 0.05$ ），直立次数、修饰时间和休息时间无统计学差异。结果见表 2。

3.3 Real-time PCR 结果

3.3.1 目的基因产物特异性鉴定 由表 1 可知 18 S、NGF、BDNF 基因的扩增片段碱基对数量分别是 129、233、213 bp，对相应的目的基因产物进行电泳特异性鉴定，结果见图 1。18 S 基因扩增片段

表 1 Real-time PCR 引物
Table 1 Primers of Real-time PCR

基因	序列 (5'-3')	产物长度 / bp
18 S	正向: AGTCGCCGTGCCTACCAT	129
	反向: CGGGTCGGGAGTGGGTAAT	
NGF	正向: TGGAGCCGAAGGGGAGC	231
	反向: GGTTCGCTGTACGCCGA	
BDNF	正向: TCACAGCGGCAGATAAAAAGAC	213
	反向: TAAGGGCCCGAACATACGAT	

表 2 旷场试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Results of OFT ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	术后时间	穿越格子数 / 个	直立次数 / 次	修饰时间 / s	休息时间 / s
假手术	6 h	13.7 ± 4.8	3.5 ± 1.6	7.3 ± 6.0	68.3 ± 23.7
	1 d	35.7 ± 14.0	9.7 ± 6.7	12.0 ± 7.8	46.0 ± 29.0
	3 d	44.3 ± 10.2	11.0 ± 4.7	10.3 ± 8.3	11.8 ± 4.0
	7 d	43.7 ± 9.9	9.2 ± 2.7	7.3 ± 9.5	13.0 ± 13.4
模型	6 h	11.2 ± 4.9	3.3 ± 1.6	5.8 ± 7.3	73.8 ± 20.5
	1 d	12.0 ± 4.9 ^{##}	4.5 ± 2.3	13.0 ± 10.5	66.0 ± 36.7
	3 d	23.5 ± 9.0 ^{##}	7.5 ± 3.4	9.3 ± 8.8	45.8 ± 18.7 ^{##}
	7 d	34.3 ± 4.1	10.0 ± 3.3	4.5 ± 5.3	27.3 ± 8.4
人参皂苷 Rb ₁	6 h	14.3 ± 3.8	4.2 ± 2.4	9.8 ± 8.7	69.2 ± 29.9
	1 d	29.0 ± 13.2*	4.7 ± 2.7	14.3 ± 12.8	49.0 ± 8.9
	3 d	35.8 ± 7.8*	8.5 ± 2.8	13.2 ± 13.9	30.0 ± 15.8
	7 d	37.5 ± 6.7	10.0 ± 6.0	5.8 ± 6.7	24.8 ± 16.5

与假手术组同时期比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组同时期比较: * $P < 0.05$
^{##} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time; * $P < 0.05$ vs POFS model group at the same time

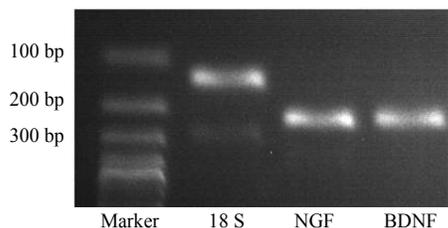


图 1 18 S、NGF、BDNF Real-time PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of Real-time PCR products of 18 S, NGF, and BDNF

条带位于 100~200 bp, 且接近 100 bp 处, NGF 和 BDNF 基因扩增片段的条带均位于 200~300 bp, 且 NGF 扩增片段的条带相对于 BDNF 条带更靠近 300 bp 处。同时 18 S、NGF、BDNF 基因扩增片段均无明显杂带。由此可知, 产物即为各自目的基因目的产物, 且纯度高。

3.3.2 NGF 和 BDNF 相对表达量 模型组相对于同时期假手术组 NGF mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 人参皂苷 Rb₁ 组相对于模型组 NGF mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.01$)。术后 1 d 模型组相对于同时期假手术组 BDNF mRNA 相对表达量显著降低 ($P < 0.01$), 人参皂苷 Rb₁ 组术后 6 h、1 d 相对于同时期模型组 BDNF mRNA 相对表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 3。

表 3 Real-time PCR 结果

Table 3 Results of Real-time PCR

组别	术后时间	NGF ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)	BDNF ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
假手术	6 h	0.98 ± 0.18	1.08 ± 0.11
	1 d	1.08 ± 0.30	1.12 ± 0.19
	3 d	1.14 ± 0.25	1.03 ± 0.45
	7 d	1.01 ± 0.25	0.98 ± 0.31
模型	6 h	0.74 ± 0.13 [#]	0.80 ± 0.32
	1 d	0.52 ± 0.22 ^{###}	0.52 ± 0.22 ^{###}
	3 d	0.71 ± 0.11 ^{###}	0.97 ± 0.33
	7 d	0.59 ± 0.18 ^{###}	0.97 ± 0.39
人参皂苷 Rb ₁	6 h	1.40 ± 0.27 ^{**}	6.26 ± 3.57 [*]
	1 d	2.72 ± 1.16 ^{**}	9.63 ± 4.81 ^{**}
	3 d	1.61 ± 0.45 ^{**}	1.30 ± 0.40
	7 d	2.25 ± 0.88 ^{**}	1.35 ± 0.49

与假手术组同时期比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$

与模型组同时期比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下表同

[#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs Sham group at the same time

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs POFS model group at the same time, same as below

3.4 RIA 结果

模型组术后 3 d 相对于假手术组 NGF 蛋白表达量降低 ($P < 0.05$), 人参皂苷 Rb₁ 组术后 6 h、1 d 相对于模型组 NGF 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$)。模型组术后 6 h 相对于假手术组 BDNF 蛋白表达量降低 ($P < 0.01$), 人参皂苷 Rb₁ 组术后 6 h、1 d 相对于模型组 BDNF 蛋白表达量升高 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

表 4 RIA 结果

Table 4 Results of RIA

组别	术后时间	NGF / (pg·mg ⁻¹)	BDNF / (ng·mg ⁻¹)
假手术	6 h	14.3 ± 1.5	0.239 ± 0.015
	1 d	17.8 ± 3.1	0.265 ± 0.034
	3 d	15.7 ± 0.8	0.261 ± 0.023
	7 d	12.3 ± 1.6	0.203 ± 0.022
模型	6 h	13.1 ± 1.6	0.197 ± 0.016 ^{###}
	1 d	16.2 ± 0.6	0.231 ± 0.021
	3 d	14.0 ± 0.9 [#]	0.237 ± 0.040
	7 d	11.8 ± 2.9	0.189 ± 0.021
人参皂苷 Rb ₁	6 h	17.4 ± 1.5 ^{**}	0.250 ± 0.030 ^{**}
	1 d	17.1 ± 1.6	0.284 ± 0.047 ^{**}
	3 d	19.3 ± 2.2 ^{**}	0.294 ± 0.032 ^{**}
	7 d	12.6 ± 2.1	0.203 ± 0.033

3.5 电镜结果

各组海马 CA1 区神经元超微结构变化见图 2。各组神经元细胞质内散在分布老年大鼠特有的脂褐素。模型组和假手术组对比, 细胞形态不规则, 体积普遍减小; 细胞核固缩, 核仁固缩, 核膜双层结构不明显; 细胞质颜色深, 内质网扩张, 游离核糖体密集, 线粒体肿胀, 部分嵴断裂或融合消失, 双层膜结构不完整, 术后 3 d 最为明显。人参皂苷 Rb₁ 组相对于模型组上述表现有所改善, 术后 3 d 改善最明显。

4 讨论

POFS 分为外周疲劳和中枢疲劳, 中枢疲劳临床上主要表现为精神障碍, 其发病机制是多元性的。NTF 是一类由神经支配的组织和星形胶质细胞产生, 并是神经细胞维持正常形态和功能所必须的蛋白质, 其中, NGF 和 BDNF 主要分布于海马组织和大脑皮质, 对维持神经元的形态和功能及神经系统的损伤与修复起重要作用^[8]。海马与人体的学习

- [2] 谈善军, 余震, 董千铜, 等. 人参皂苷 Rb₁ 对术后疲劳综合征大鼠骨骼肌氧化应激的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(11): 1535-1538.
- [3] 杜璐迪, 张昌静, 叶星照, 等. 人参皂苷 Rb₁ 对术后疲劳综合征大鼠中枢氧化应激的影响 [J]. 中草药, 2013, 44(9): 1168-1173.
- [4] Liang W, Ge S, Yang L, *et al.* Ginsenosides Rb1 and Rg1 promote proliferation and expression of neurotrophic factors in primary schwann cell cultures [J]. *Brain Res*, 2010, 1357: 19-25.
- [5] Zhang X D, Chen B C, Dong Q T, *et al.* Establishment and assessments of a new model for the postoperative fatigue syndrome by major small intestinal resection in rats [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2011, 46(11): 1302-1309.
- [6] 章晓东, 余震, 姚建高, 等. 肠内营养联合人参皂甙 Rb₁ 对术后疲劳综合征大鼠模型的影响 [J]. 中华临床营养杂志, 2010, 18(1): 38-41.
- [7] Choleris E, Thomas A, Kavaliers M, *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, 25(3): 235-260.
- [8] Skaper S D. The neurotrophin family of neurotrophic factors: An overview [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846: 1-12.
- [9] Masi G, Brovedani P. The hippocampus, neurotrophic factors and depression: Possible implications for the pharmacotherapy of depression [J]. *CNS Drugs*, 2011, 25(11): 913-931.
- [10] Zhu J, Jiang Y, Wu L, *et al.* Suppression of local inflammation contributes to the neuroprotective effect of ginsenoside Rb₁ in rats with cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2012, 202: 342-351.