

## 人参皂苷 Rb1 通过 AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT 途径抑制 硫化砷诱导的神经细胞 PC12 毒性

邓立军, 吕育玲, 吴丹

(江汉大学附属医院神经内科, 湖北省武汉市 430015)

[关键词] 人参皂苷 Rb1; 硫化砷; 嗜铬细胞瘤细胞; AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT 途径

[摘要] **目的** 探索人参皂苷 Rb1 抑制硫化砷诱导的神经细胞——嗜铬细胞瘤细胞(PC12)毒性的作用机制。**方法** 以 PC12 细胞为研究对象,加入 0、2.5、5、10、15、20、50  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷后观察细胞的损伤情况,采用噻唑蓝法检测细胞活性。在硫化砷损伤的 PC12 细胞培养基内加入 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1,采用磺酰罗丹明 B 法检测其对细胞增殖能力的影响;用流式细胞术检测其对细胞凋亡的影响;ATP 试剂盒荧光素酶法测定其对细胞内 ATP 含量的影响;2',7'-二氯四氧乙烷双乙酸盐探针染色法检测其对细胞内活性氧(ROS)含量的影响。Western blot 检测 PC12 细胞中蛋白激酶 B(AKT)、糖原合成酶激酶 3(GSK-3 $\beta$ )、活化 T 细胞核因子(NFAT)、细胞色素 C(Cyt C)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤 2 蛋白(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的蛋白表达。**结果** 不同浓度硫化砷对 PC12 细胞有损伤,且随着浓度升高及作用时间延长,细胞损伤越严重;硫化砷可抑制 PC12 细胞的增殖。人参皂苷 Rb1 对硫化砷损伤的 PC12 细胞有保护作用,可有效抑制硫化砷诱导的 PC12 细胞的凋亡。硫化砷可降低 PC12 细胞内的 ATP 含量,增加 ROS 的含量;人参皂苷 Rb1 可增加 ATP 的含量,降低 ROS 的含量,加强细胞代谢。硫化砷刺激 PC12 细胞后细胞内 p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、NFAT-c3、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 蛋白的表达显著降低,Caspase-3 与 Bax 蛋白的表达明显提高,线粒体内 Cyt C 表达明显提高( $P < 0.01$ );人参皂苷 Rb1 干预后,细胞内 p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、NFAT-c3、Bcl-2、Cleaved Caspase-3 蛋白表达明显升高,Caspase-3 与 Bax 蛋白的表达明显降低,线粒体内 Cyt C 表达明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** 人参皂苷 Rb1 可抑制硫化砷诱导的 PC12 细胞凋亡,从而保护神经细胞,其可能是通过调节 AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT 信号通路来实现的。

[中图分类号] R74

[文献标识码] A

### Ginsenoside Rb1 inhibits arsenic sulfide-induced toxicity in PC12 nerve cells via AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT pathway

DENG Lijun, LV Yuling, WU Dan

(Department of Neurology, Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuhan, Hubei 430015, China)

[KEY WORDS] ginsenoside Rb1; arsenic sulfide; pheochromocytoma cell; AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT pathway

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanism of ginsenoside Rb1 inhibiting arsenic sulfide-induced toxicity of neurocyte pheochromocytoma cells (PC12). **Methods** PC12 cells were treated with 0, 2.5, 5, 10, 15, 20, 50  $\mu\text{mol/L}$  arsenic sulfide. Cell damage was observed, and cell viability was measured by thiazole blue method. 5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$  ginsenoside Rb1 was added into PC12 cell culture medium damaged by arsenic sulfide, and its effect on cell proliferation was detected by sulforhodamine B assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, ATP content in cells was detected by ATP kit luciferase assay, and intracellular reactive oxygen species (ROS) content was detected by 2',7'-dichlorotetrafluoroethane diacetate probe dyeing. Western blot was used to detect the protein expressions of protein kinase B (AKT), glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), nuclear factor of activated T cell (NFAT), cytochrome C (Cyt C), cysteine protease 3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) in PC12 cells. **Results** The PC12 cells were damaged by different concentrations of arsenic sulfide, with the increase of the concentration and the prolongation of the action time, the cell damage became more serious; Arsenic sulfide could inhibit the proliferation of PC12 cells. Ginsenoside Rb1 had protective effect on PC12 cells damaged by arsenic sulfide and could effectively in-

hibit apoptosis of PC12 cells induced by arsenic sulfide. Arsenic sulfide could decrease ATP content and increase ROS content in PC12 cells, and ginsenoside Rb1 could increase ATP content, reduce ROS content and enhance cell metabolism. After arsenic sulfide stimulation, the protein expressions of p-AKT, p-GSK-3 $\beta$ , NFAT-c3, Bcl-2 and Cleaved Caspase-3 in PC12 cells was significantly decreased, the protein expressions of Caspase-3 and Bax was significantly increased, and the expression of Cyt C in mitochondria was significantly increased ( $P<0.01$ ). After ginsenoside Rb1 intervention, the protein expressions of p-AKT, p-GSK-3 $\beta$ , NFAT-c3, Bcl-2 and Cleaved Caspase-3 increased significantly, the protein expressions of Caspase-3 and Bax decreased significantly, and the expression of Cyt C in mitochondria decreased significantly ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Ginsenoside Rb1 can inhibit arsenic sulfide-induced apoptosis of PC12 cells and protect neurons, which may be achieved by regulating AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT signaling pathway.

长期接触砷是一种普遍的威胁人类健康的环境健康问题,高浓度的砷会对神经系统产生毒性,急性暴露在高浓度的砷环境会导致机体产生轻微持久的周围神经病变,慢性暴露会导致感官缺陷和神经系统功能损伤<sup>[1-2]</sup>。人参皂苷 Rb1 (ginsenoside Rb1) 是中药人参的主要有效成分之一,具有抗衰老、抗氧化、提高免疫力和增强记忆力等功效。研究显示,人参皂苷 Rb1 对中枢神经系统的调节起着重要作用,通过促进神经元细胞周围突触的生长起到保护神经元的作用<sup>[3]</sup>。但人参皂苷 Rb1 对砷损伤神经细胞的保护机制尚未明确。本研究旨在基于 AKT/GSK-3 $\beta$ /NFAT 途径探讨人参皂苷 Rb1 对砷诱导的神经细胞——嗜铬细胞瘤细胞 (pheochromocytoma cell, PC12) 毒性的抑制作用及作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞株、试剂和仪器

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞,购买于中国科学院上海生命科学研究院细胞中心。

人参皂苷 Rb1 购买自南京春秋生物工程有限公司(纯度 $\geq 98\%$ )。DMEM 培养液(美国 Sigma 公司);新生牛血清(美国 Gibco 公司);噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶(美国 Amresco 公司);RIPA 裂解液(美国 Amresco 公司);DCFH-DA(2',7'-二氯四氟乙烷双乙酸盐)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(碧云天生物技术研究所);蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)、糖原合成酶激酶 3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK-3 $\beta$ )、活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFAT)、B 淋巴细胞瘤 2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、 $\beta$ -actin 一抗(美国 Santa 公司);WB 试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;

其他试剂均为化学分析纯。

电子分析天平(上海梅特勒-托利多有限公司,型号 AR2130);离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司,型号 TD5B);超净工作台(济南来宝医疗器械有限公司,型号 BBS-DDC);细胞计数器(美国 Nexcelom Bioscience LLC 公司);恒温细胞培养箱(德国 Heraeus 公司,型号 HERAcell);高压灭菌锅(上海博迅医疗生物仪器股份有限公司,型号 BXM-50VD);酶标仪(美国 NanoDrop 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司,型号 IX81);细胞培养板/皿、离心管、EP 管(eppendorf 管)、冻存管、无菌镊(美国 Costar 公司);流式细胞仪(美国 Beckman Coulter 公司);超低温冰箱(日本 Sanyo 公司,型号 MDF-382E);电热恒温水浴箱(德国 HETO 公司);Western blot 蛋白显影仪(美国 Protein Simple 公司)。

### 1.2 细胞培养

采用 DMEM 培养液(含 10% 胎牛血清+100 kU/L 青霉素+100 mg/L 链霉素)在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的条件下培养 PC12 细胞,每隔 2 天更换 DMEM 培养液,取对数生长期的细胞进行后续实验。

### 1.3 MTT 法检测不同浓度硫化砷对 PC12 细胞活性的影响

取对数生长期的 PC12 细胞,用 DMEM 培养液调节细胞浓度为  $1 \times 10^9/L$ ,接种于 96 孔培养板中,置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养 24 h。每孔加入不同浓度(0、2.5、5、10、15、20、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 硫化砷(arsenic sulfide),每个浓度重复 3 孔,以二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)为空白对照,培养 24、48、72 h 后,每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$ ,37 °C 孵育 4 h。弃去上清液,少量 DMEM 培养液洗涤 2~3 次后加 DMSO 100  $\mu\text{L}$  溶解晶体,用振荡器摇匀,使沉淀充分溶解后,使用酶标仪在 570 nm 波长处测得各孔吸光度(absorbance, A)值,依据下列公式计

算 PC12 细胞的增殖率: 细胞增殖率 = 实验组  $A_{570\text{ nm}}$  / 对照组  $A_{570\text{ nm}} \times 100\%$ 。

#### 1.4 磺酰罗丹明 B 比色法检测不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞增殖能力的影响

将培养的细胞每孔加入不同浓度 (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 人参皂苷 Rb1, 每个浓度重复 3 孔, 培养 2 h 后加入 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷, 以 DMSO 为空白对照, 继续处理 24 h, 每孔加入 50% 三氯乙酸 50  $\mu\text{L}$  固定细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下放置 1 h。用纯水冲洗 2~3 次, 晾干后每孔加入 0.4% 磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 溶液 50  $\mu\text{L}$ , 孵育 15 min, 再用少量 1% 乙酸溶液冲洗 2~3 次, 晾干后每孔加入 10 mmol/L 的 Tris 碱液 100  $\mu\text{L}$  溶解晶体, 并用振荡器摇匀, 使沉淀充分溶解后, 使用酶标仪在 540 nm 波长处测得各孔 A 值。

#### 1.5 流式细胞术检测人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞凋亡的影响

将培养的细胞每孔加入不同浓度 (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 人参皂苷 Rb1, 每个浓度重复 3 孔, 培养 2 h 后加入 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷, 以 DMSO 为空白对照, 继续处理 24 h。离心收集各组细胞, 将收集的细胞用冰冻 70% 乙醇固定过夜, 并保存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中。检测前, 用少量磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 清洗 2 次后, 加碘化丙啶 (PI) 和核糖核酸酶 A (RNaseA) (PI 浓度为 50  $\mu\text{g/L}$ , RNaseA 浓度为 100  $\mu\text{g/L}$ ), 室温避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

#### 1.6 三磷酸腺苷试剂盒荧光素酶法测定细胞内 ATP 含量

将培养的细胞每孔加入不同浓度 (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 人参皂苷 Rb1, 每个浓度重复 3 孔, 培养 2 h 后加入 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷, 以 DMSO 为空白对照, 继续处理 24 h。PBS 洗涤 2 次, 用胰蛋白酶消化细胞后, 置于 EP 管中, 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 保持 EP 管中细胞数量基本一致, 置于 100  $^{\circ}\text{C}$  沸水浴 5~10 min, 超声破碎细胞, 加入 ATP 检测试剂, 使用荧光酶标仪在 636 nm 处检测样本中的荧光强度。

#### 1.7 DCFH-DA 探针染色法检测细胞内 ROS 含量

取指数生长期的 PC12 细胞, 以  $3 \times 10^3$  个/孔的细胞密度接种于 24 孔板中, 置于孵箱中培养过夜, 每孔加入不同浓度 (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 人参皂苷 Rb1, 每个浓度重复 3 孔。培养 2 h 后加入 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷, 以 DMSO 为空白对照, 继续处理 24 h, 弃去剩余培养液, 加入无血清培养基稀释的 DCFH-DA

(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 置于细胞培养箱内孵育 30 min。置于倒置荧光显微镜下, 在激发光的作用下观察细胞的荧光强度。

#### 1.8 Western blot 法检测 AKT、GSK-3 $\beta$ 、NFAT、Cyt C、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白变化

取对照组 PC12 细胞、20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷和不同浓度 (5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ ) 人参皂苷 Rb1 处理的 PC12 细胞, 离心后收集, 并用 PBS 溶液清洗 2~3 次, 加入裂解液使其充分裂解, 14 000 r/min、4  $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min, 取上清液即为蛋白质提取物。BCA 试剂盒检测蛋白质含量, 取适量蛋白质配制成上样缓冲液, 电泳、转膜、封闭、孵育抗体 (采用兔抗 AKT、GSK-3 $\beta$ 、NFAT 和  $\beta$ -actin 抗体作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔作为二抗)、扫膜, 用 ECL 试剂显色, 在暗室中曝光显影。

#### 1.9 统计分析方法

采用 SPSS 18.0 进行分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析 (One way ANOVA), 2 组间比较采用  $t$  检验, 计数资料采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度硫化砷对 PC12 细胞活性的影响

给予不同浓度硫化砷处理 PC12 细胞 24、48、72 h 后, 对照组细胞排列紧密, 细胞有活力; 硫化砷干预后细胞出现皱缩, 活性降低, 且随着硫化砷浓度的增加损伤更为显著; 随着作用时间的延长, 细胞的活性降低加剧, 细胞之间的连接逐渐稀疏, 损伤明显 (图 1)。

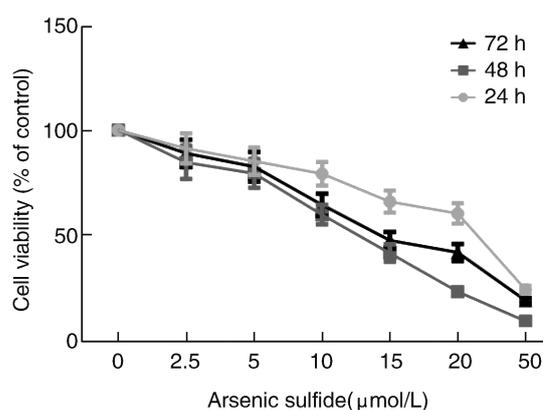


图 1. MTT 法检测硫化砷对 PC12 细胞活性的影响

Figure 1. Effect of arsenic sulfide on the activity of PC12 cells detected by MTT

## 2.2 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞增殖能力的影响

5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1 分别与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷共同处理 PC12 细胞 24 h, A 值随着人参皂苷 Rb1 浓度的改变逐渐发生变化, 表明 PC12 细胞的增殖能力发生了不同程度的变化, 人参皂苷 Rb1 对硫化砷损伤的 PC12 细胞有保护作用, 且其保护作用与药物浓度呈现一定的依赖性(图 2)。

## 2.3 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞凋亡的影响

5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1 分别与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷共同处理 PC12 细胞 24 h, 与对照组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组 PC12 细胞的凋亡率明显上升; 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组相比, 人参皂苷 Rb1 组 PC12 细胞的凋亡率明显降低, 说明人参皂苷 Rb1 可有效抑制硫化砷诱导的 PC12 细胞的凋亡, 并且呈现药物浓度依赖性(图 3)。

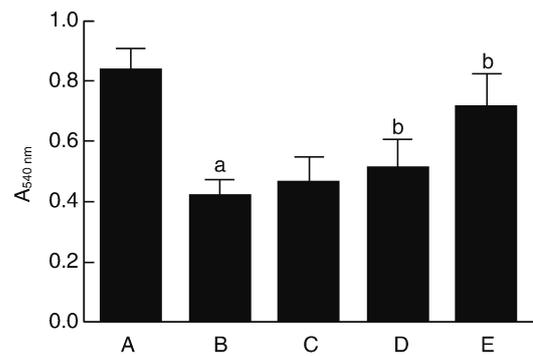


图 2. SRB 法检测人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞增殖能力的影响 A 为对照组, B 为 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, C 为 5  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, D 为 10  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, E 为 20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组。a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组比较。

Figure 2. Effect of ginsenoside Rb1 on proliferation of PC12 cells by SRB assay

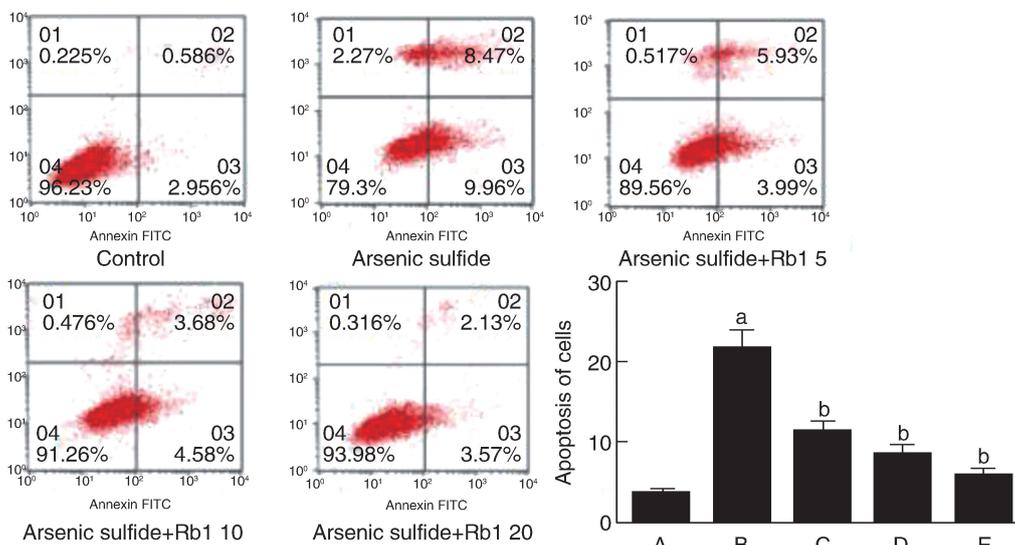


图 3. 人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞凋亡的影响 A 为对照组, B 为 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, C 为 5  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, D 为 10  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, E 为 20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组。a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组比较。

Figure 3. Effect of ginsenoside Rb1 on apoptosis of PC12 cells

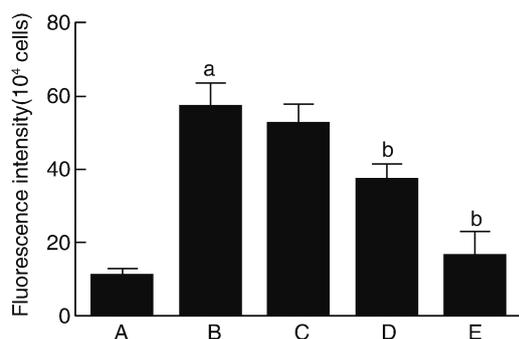
## 2.4 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 ROS 含量的影响

5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1 分别与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷共同处理 PC12 细胞 24 h, 与对照组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组 PC12 细胞内 ROS 的含量明显增多; 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组相比, 人参皂苷 Rb1 组 PC12 细胞的 ROS 含量明显降低, 并且呈现药物浓度依赖性(图 4)。

## 2.5 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 ATP 含量的影响

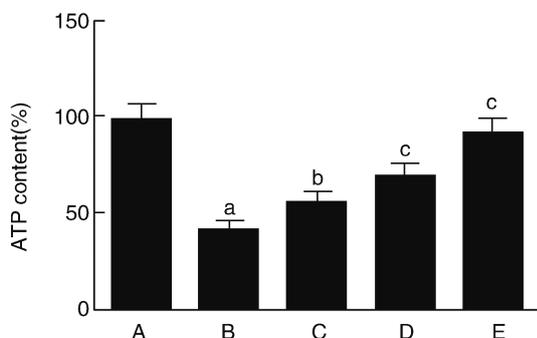
5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1 分别与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷共同处理 PC12 细胞 24 h, 与对照组相比, 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组 PC12 细胞 ATP 的含量明显降低; 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组相比, 人参皂苷 Rb1 组 PC12 细胞 ATP 的含量明显升高, 并且呈现药物浓度依赖性, 说明人参皂苷 Rb1 可提高 PC12 细胞

ATP 的水平,增强细胞的代谢能力(图 5)。



**图 4. 人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 ROS 含量的影响** A 为对照组, B 为 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, C 为 5  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, D 为 10  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, E 为 20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组比较。

**Figure 4. Effect of ginsenoside Rb1 on ROS content in PC12 cells**



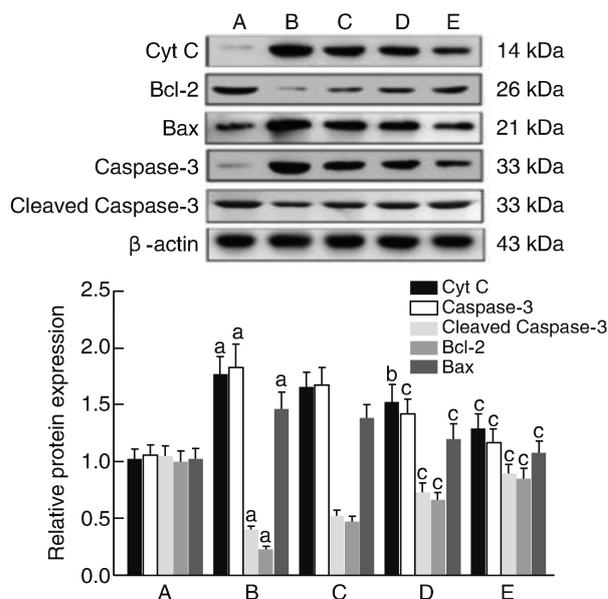
**图 5. 人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 ATP 含量的影响** A 为对照组, B 为 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, C 为 5  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, D 为 10  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, E 为 20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组比较。

**Figure 5. Effect of ginsenoside Rb1 on ATP content in PC12 cells**

## 2.6 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 Cyt C、Caspase-3、Cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

与对照组比较,经 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷处理 24 h 后,PC12 细胞线粒体内细胞色素 C (cytochrome C, Cyt C) 显著增加,细胞内 Caspase-3、Bax 表达也显著提高, Cleaved Caspase-3、Bcl-2 表达下降;与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组相比,人参皂苷 Rb1 组线粒体内 Cyt C 显著降低,细胞内 Caspase-3 与 Bcl-2 的表达

明显降低, Cleaved Caspase-3、Bcl-2 表达明显升高(图 6)。



**图 6. 人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 Cyt C、Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响** A 为对照组, B 为 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, C 为 5  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, D 为 10  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组, E 为 20  $\mu\text{mol/L}$  人参皂苷 Rb1+20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组比较。

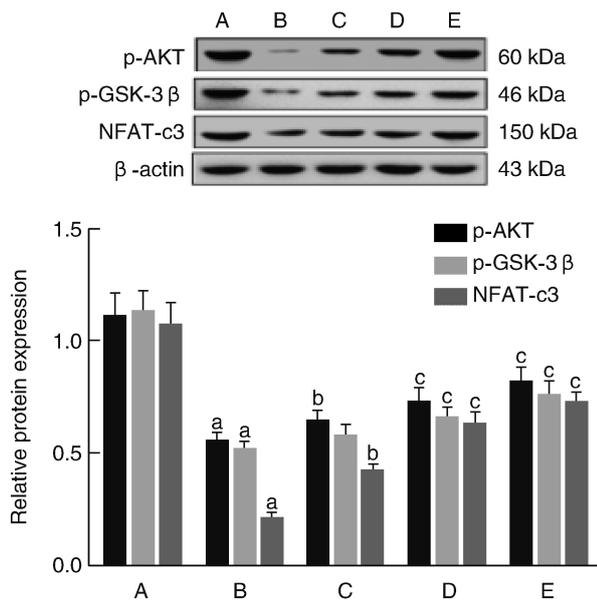
**Figure 6. Effects of ginsenoside Rb1 on protein expressions of Cyt C, caspase-3, Bcl-2 and Bax in PC12 cells**

## 2.7 不同浓度人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、NFAT 蛋白表达的影响

与对照组比较,经 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷处理 24 h 后,PC12 细胞 p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、NFAT-c3 蛋白表达明显降低;与 20  $\mu\text{mol/L}$  硫化砷组相比,人参皂苷 Rb1 组 p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、NFAT-c3 蛋白表达明显升高(图 7)。

## 3 讨论

人参皂苷 Rb1 是人参二醇系皂苷的主要代表成分之一,对中枢神经系统的调节起着重要作用。有研究报道,采用人参皂苷 Rb1 治疗皮质神经细胞受到氧自由基损伤的大鼠,结果神经细胞抗自由基的能力增强,缓解了神经元细胞的损伤,起到保护神经细胞的作用<sup>[4]</sup>。另外,人参皂苷 Rb1 还能通过改变胞膜的流动性缓解神经细胞老化,它可以促进细胞内蛋白质的合成,使细胞生物膜维持在稳定状态,达到保护神经元的作用<sup>[5]</sup>。



**图7. 人参皂苷 Rb1 对 PC12 细胞 p-AKT、p-GSK-3β、NFAT 蛋白表达的影响** A 为对照组, B 为 20 μmol/L 硫化砷组, C 为 5 μmol/L 人参皂苷 Rb1+20 μmol/L 硫化砷组, D 为 10 μmol/L 人参皂苷 Rb1+20 μmol/L 硫化砷组, E 为 20 μmol/L 人参皂苷 Rb1+20 μmol/L 硫化砷组。a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 20 μmol/L 硫化砷组比较。

**Figure 7. Effects of ginsenoside Rb1 on protein expressions of p-AKT, p-GSK-3β and NFAT in PC12 cells**

本研究结果表明,硫化砷可诱导 PC12 细胞发生凋亡,并且诱导 AKT、GSK-3β、NFAT 蛋白表达降低,说明 AKT/GSK-3β/NFAT 信号通路可能参与了硫化砷损伤 PC12 细胞的过程。人参皂苷 Rb1 可促进神经元细胞周围突触的生长,保护神经元和神经细胞,但是否对砷诱导的神经细胞毒性具有保护作用尚未可知。因此,本研究探索人参皂苷 Rb1 是否对硫化砷损伤 PC12 细胞具有保护作用,是否与 AKT/GSK-3β/NFAT 信号通路有关。

采用不同浓度的硫化砷作用于 PC12 细胞后,MTT 值随着硫化砷浓度的增大而降低,说明 PC12 细胞发生损伤,细胞增殖率下降,细胞活性降低。给予不同浓度的人参皂苷 Rb1 干预后,人参皂苷 Rb1 组 PC12 细胞的细胞活性及细胞增殖率均显著提高,且呈现明显的剂量依赖性,提示人参皂苷 Rb1 可以显著降低硫化砷对 PC12 细胞产生的细胞毒性。

线粒体在机体的能量代谢中发挥关键作用<sup>[6]</sup>,诸多研究显示,线粒体膜的通透性及细胞膜脂质过氧化后膜的变化与神经细胞的凋亡机制有密切关系,细胞膜去极化,使得 ATP 的消耗加剧<sup>[7-8]</sup>。本

实验通过检查细胞内 ATP 能量水平,发现硫化砷损伤组 ATP 水平较低,采用 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 含量,发现硫化砷损伤组细胞 ROS 水平较高;给予不同浓度的人参皂苷 Rb1 干预后,PC12 细胞内 ATP 水平明显提高,ROS 含量明显减少,且呈现明显的剂量依赖性,说明人参皂苷 Rb1 对神经细胞的线粒体具有明显的保护作用。

细胞色素 C 是由线粒体释放而进入细胞质,参与细胞的凋亡过程,线粒体膜通透性转换通道开放,可激活 Caspase 家族促使细胞发生凋亡<sup>[9-10]</sup>。Bax 作为凋亡前体蛋白,可激活并释放 Cyt C 和调节细胞凋亡的相关因子,调控细胞的凋亡过程<sup>[11-12]</sup>; Bcl-2 可以抑制 Cyt C 的释放,使得 Caspase 家族成员失活,以保护细胞<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,硫化砷损伤组 Cyt C、Bax、Caspase-3 蛋白表达明显增加, Bcl-2 表达明显减少,给予人参皂苷 Rb1 干预后可明显增加 Cyt C、Bax 的表达,抑制 Caspase-3 表达,增加 Bcl-2 表达,且呈现明显的剂量依赖性,说明人参皂苷 Rb1 可以减轻硫化砷诱导的细胞损伤。

糖原合成酶激酶 3β 调节的线粒体信号和细胞凋亡在神经细胞毒性中起关键性作用,AKT 的激活可以引起下游 GSK-3β 的磷酸化,导致 GSK-3β 的失活,进一步减少细胞凋亡<sup>[14-16]</sup>。NFAT 的活化与神经元的凋亡及损伤也存在着密切的联系<sup>[17-18]</sup>。长期暴露在高浓度砷会产生严重的神经毒性,导致大量的神经元凋亡。有研究者报道,砷中毒的大鼠大脑 GSK-3β 活性明显降低,且神经元发生 NFAT3/4 核转位,导致死亡配体(FasL)的水平明显升高,激活 FasL/Fas 凋亡通道,使得下游的凋亡蛋白酶 Caspase-3 的蛋白表达增加,从而诱导神经元的凋亡<sup>[19-21]</sup>。本研究发现不同浓度人参皂苷 Rb1 可增加由硫化砷诱导的 PC12 细胞 AKT、GSK-3β、NFAT-c3、Bcl-2 蛋白表达,降低 Cyt C、Caspase-3 与 Bcl-2 蛋白表达,且呈现明显的剂量依赖性,表明 AKT/GSK-3β/NFAT 信号通路参与了人参皂苷 Rb1 对硫化砷诱导 PC12 细胞损伤的保护过程。

综上所述,人参皂苷 Rb1 可抑制硫化砷诱导的 PC12 细胞凋亡,从而保护神经细胞,其可能是通过调节 AKT/GSK-3β/NFAT 信号通路来实现的。

#### [参考文献]

- [1] Hsu LI, Hsieh FI, Wang YH. Arsenic exposure from drinking water and the incidence of CKD in low to moderate exposed areas of Taiwan: A 14-year prospective study[J]. Am J Kidney Dis, 2017, 70(6): 787-797.

- [2] Zhang L, Tian W, Kim S. Arsenic sulfide, the main component of realgar, a traditional Chinese medicine, induces apoptosis of gastric cancer cells in vitro and in vivo [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 79-92.
- [3] 沈思钰, 干振华, 傅晓东, 等. Gs-Rb1 对神经系统作用的研究现状及分析 [J]. *安徽中医学院学报*, 2004, 23(1): 62-64.
- [4] 文飞, 张帆, 冷沁. 人参皂苷 Rb1 对过氧化氢诱导的心肌细胞凋亡的保护作用 [J]. *湖北中医杂志*, 2010, 32(7): 5-7.
- [5] Cheng Y, Shen L H, Zhang JT. Anti-amnesic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(2): 143-149.
- [6] Yunis JJ, Yunis EJ. Mitochondrial DNA (mt DNA) haplogroups in 1526 unrelated individuals from 11 Departments of Colombia [J]. *Genet Mol Biol*, 2013, 36(3): 329-335.
- [7] Yan C, Huang D, Zhang Y. The involvement of ROS overproduction and mitochondrial dysfunction in PBDE-47-induced apoptosis on Jurkat cells [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2011, 63(5): 413-417.
- [8] 张红, 刘剑, 秦大莲, 等. A $\beta$ 25-35 致 PC12 细胞凋亡和线粒体跨膜电位损伤关系研究 [J]. *四川生理科学杂志*, 2011, 33(1): 5-8.
- [9] Kitamura Y, Taniguchi T, Shimohama S. Apoptotic cell death in neurons and glial cells: implications for Alzheimer's disease [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1999, 79(1): 1-5.
- [10] Liu X, Xu K, Yan M, et al. Protective effects of galantamine against A $\beta$ -induced PC12 cell apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress [J]. *Neurochem Int*, 2010, 57(5): 588-599.
- [11] Berghella L, Ferraro E. Early decrease in respiration and uncoupling event independent of cytochrome C release in PC12 cells undergoing apoptosis [J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 2012: 643929.
- [12] Fan L, Dang X, Shi Z, et al. Hydroxysafflor yellow A protects PC12 cells against the apoptosis induced by oxygen and glucose deprivation [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2011, 31(8): 1187-1194.
- [13] Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family [J]. *Nature*, 1997, 387(6635): 773-776.
- [14] Ahn J, Jang J, Choi J, et al. GSK3 beta, but not GSK3 $\alpha$ , inhibits the neuronal differentiation of neural progenitor cells as a downstream target of mammalian target of rapamycin complex 1 [J]. *Stem Cells Dev*, 2014, 23(10): 1121-1133.
- [15] Arron JR, Winslow MM, Polleri A. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21 [J]. *Nature*, 2006, 441(7093): 595-600.
- [16] Gómez-Sintes R, Lucas JJ. NFAT/Fas signaling mediates theneuronal apoptosis and motor side effects of GSK-3 inhibition in amouse model of lithium therapy [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(7): 2432-2445.
- [17] Jayanthi S, Deng X, Ladenhiem B, et al. Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway isinvolved in methamphetamine-induced neuromal apoptosis [J]. *Proc Natl Acad*, 2005, 102(3): 868-873.
- [18] Li H, Rao A, Hogan PG. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins [J]. *Trends Cell Biol*, 2011, 21(12): 91-103.
- [19] Huang GN, Huso DL, Bouyain S, et al. NFAT binding and regulation of T cell activation by the cytoplasmic scaffolding Homer proteins [J]. *Science*, 2008, 319(5862): 476-481.
- [20] Nayak A, Glckner-Pagel J, Vaeth M, et al. Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(15): 10935-10946.
- [21] 孙越, 赵艳娥, 骆静. 活化的 T 细胞核内因子 (NFAT) 的调节及其在神经系统中的功能 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(7): 623-629.
- (此文编辑 曾学清)