

人参皂苷 Rg1 调控 miR-153/Nrf2/HO-1 减轻肌萎缩侧索硬化模型小鼠损伤

张 钊¹, 王莎莎^{1,2}, 朱天碧^{1,3}, 楚世峰¹, 陈乃宏^{1,2,3*}

(1. 中国医学科学院药物研究所神经科学中心, 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050;
2. 山西中医药大学中药学院, 山西 太原 030619; 3. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208)

摘要: 本文主要通过肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 模型小鼠 (SOD1 G93A) 研究人参皂苷 Rg1 对 ALS 病程及病理的影响, 并对其作用机制进行分析。通过体重及生存率监测小鼠病程, 转棒实验测试小鼠肌肉运动协调能力, 甲苯胺蓝染色及免疫荧光检测小鼠脊髓运动神经元及小胶质细胞改变, Western blot 检测氧化应激相关蛋白 Nrf2 等的表达, 并对其及相关 miRNA 进行干预, 验证 Rg1 的作用及相关机制。结果显示 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Rg1 可明显延缓 ALS 小鼠病程, 改善其运动症状, 减少脊髓运动神经元丢失并抑制小胶质细胞激活。进一步研究发现 Rg1 通过抑制 ALS 小鼠脊髓 miR-153 表达, 解除其对 Nrf2 转录后抑制, 使其表达明显上调, 进而激活 HO-1 抗氧化信号通路。本研究表明 Rg1 通过调节 miR-153/Nrf2/HO-1 抗氧化损伤, 对 ALS 小鼠发挥神经保护作用, 为将 Rg1 开发为有效的 ALS 治疗药物提供理论依据。

关键词: 肌萎缩侧索硬化症; 人参皂苷 Rg1; 氧化应激损伤; NF-E2-相关因子 2; miR-153

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 04-0546-07

Rg1 alleviates the damage in ALS model through regulation of miR153/Nrf2/HO-1

ZHANG Zhao¹, WANG Sha-sha^{1,2}, ZHU Tian-bi^{1,3}, CHU Shi-feng¹, CHEN Nai-hong^{1,2,3*}

(1. State Key Laboratory of Bioactive Substances and Functions of Natural Medicine, Neuroscience Center, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China;
2. College of Chinese Materia Medica, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China;
3. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

Abstract: The impact of Rg1 in the disease progress and pathology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) was investigated in mouse model (SOD1 G93A). Body weight and survival rate were monitored to check the course of disease. Rotarod test was used to evaluate the coordination of muscle movement. Toluidine blue staining and immunofluorescence were used to check the effect of Rg1 on motor neuron and microglia. The expression of oxidative stress related protein Nrf2 and the miRNA were tested to investigate the mechanism of Rg1. We found that 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ Rg1 significantly postponed the disease onset and process, improved the motor syndrome, reduced the loss of motor neuron and inhibited the activation of microglia cells. Rg1 inhibited the aggregation of miR-153 in the spinal cord of ALS mice, which relieved the inhibition of Nrf2 and contributed to its up-regulation in the activation of HO-1 anti-oxidative signal pathway. Our study confirmed that Rg1

收稿日期: 2017-10-16; 修回日期: 2017-12-12.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603316, 81603315); 2017 年湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心开放基金资助项目 (BG201701); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程经费资助 (2016-I2M-1-004).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165177, E-mail: chennh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1012

could protect ALS mice from oxidative damage through the up-regulation of miR-153/Nrf2/HO-1, which provides a theoretical foundation for Rg1 application to the ALS treatment.

Key words: amyotrophic lateral sclerosis; ginsenoside Rg1; oxidative stress damage; NF-E2-related factor 2; miR-153

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 也称 Lou Gehrig 病, 是选择性累及上、下运动神经元的严重致死性运动神经元病 (motor neuron disease, MND), 患者生存期短, 大多在起病 3~5 年后死于呼吸衰竭^[1]。目前仍无有效的治疗药物, 理解其致病机制及寻找有效治疗药物刻不容缓。

氧化应激主要由活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 经有氧代谢产生。过量的 ROS 均为高活性的氧化剂, 能够损伤蛋白、脂及 DNA 等生物大分子, 如改变蛋白构象、通过氧化不饱和脂肪酸改变细胞膜动力学等。ALS 患者脑脊液及尸检脊髓等组织切片发现, ALS 患者与正常人样本相比氧化应激明显增加, 脊髓^[2]及运动皮层^[3]中蛋白质羰基水平升高, 约 20% 家族性 ALS 中存在着超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase 1, SOD1) 基因突变^[4]。SOD1 G93A 小鼠中过表达人突变的 SOD1 基因 (hSOD1), 表现出明显的 ALS 样症状, 是被公认的 ALS 小鼠模型, 对阐述此疾病的病理机制及研发临床治疗药物具有重要意义^[5, 6]。SOD1 G93A 小鼠模型中发现的脑及脊髓中蛋白、脂及核酸等生物大分子的氧化应激损伤明显增加^[7]。上述研究结果均表明氧化应激损伤在 ALS 病理进程中起重要作用^[8]。

NF-E2-相关因子 2 (NF-E2-related factor 2, Nrf2) 能够调控抗氧化酶的产生, 包括血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、NAD(P)H 脱氢酶醌 1 [NAD(P)H dehydrogenase quinone1 (NQO1)]、谷氨酰半胱氨酸连接酶修饰亚单位 [(catalytic or modified subunit of glutamate-cysteine ligase (GCLC/GCLM)] 等^[9, 10], 因此调控 Nrf2 信号对 ALS 病程的缓解有重要意义。

人参皂苷 Rg1 具有抗炎、抗氧化和缓解疲劳等功效。研究表明, Rg1 对 3-硝基邻苯二甲酸 (3-nitrophthalic acid) 诱导的纹状体氧化应激损伤具有保护作用^[11], 且可通过影响 Nrf2 缓解四氯化碳^[7]及酒精^[12]造成的肝损伤; Rg1 在帕金森氏病^[13, 14]等神经退行性疾病中表现出良好的神经保护作用, 然而其在 ALS 中的作用未见报道。因此, 本研究旨在检测 Rg1 是否对 ALS 具有神经保护功能, 并对其机制进行深入探讨, 为将 Rg1 开发为有效的 ALS 治疗药物提供理论

依据。

材料与方法

药品与主要试剂 Rg1 (由云南极粹生物科技有限公司提供, 纯度>98%); 细胞培养基 DMEM、胎牛血清、青链霉素混合液、Lipofectamine 2000、Alexa Fluor[®] 546 标记驴抗兔抗体、Alexa Fluor[®] 488 标记驴抗羊抗体 (Life Technology 公司); 噻唑蓝 (MTT)、多聚赖氨酸、DMSO (Sigma 公司); 微孔滤膜 (默克密理博公司); miR-153 及对照 (上海吉玛制药技术有限公司); RIPA 裂解液、ECL 超敏发光液 (北京普利莱基因技术有限公司), 其他试剂购自北京化工厂。

实验动物及处理 B6SJL-Tg (SOD1 G93A) 1Gur/JNju 小鼠 (J002726), SPF 级, 许可证号: SCXK (苏) 2015-0001, 购自南京大学南京生物医药研究所, 饲养繁殖于斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, Tg (SOD1 G93A) 雄性 & 野生型 B6SJL 雌性繁殖得半合子。实验动物分两批: 第一批分为 4 组, 每组 10 只, 雌雄各半。小鼠经过 3 天适应期后, 进行灌胃给药, 一天一次。对照组给水, 实验组给予 Rg1 (10、20 和 40 mg·kg⁻¹)。小鼠出生后 70 天至死亡每周记录体重。从小鼠体重降低开始每天观察记录各组死亡率。死亡终点判定方法: 从伦理学角度考虑, 按文献^[15]报道小鼠侧卧平板上 25 s 不能自主翻身至正常体式则判定小鼠死亡并给予安乐死。从小鼠体重降低开始每周进行转棒行为学实验; 第二批 4 组给药同前, 每组 6 只, 雄性, 测量体重, 至对照组死亡终点统一取材检测病理改变, 每组 3 只灌流石蜡切片检测病理; 3 只取材进行蛋白核酸等含量检测。

转棒实验 用于评价小鼠运动协调能力。小鼠首先进行转棒适应, 转棒 5 min 内从 5 r·min⁻¹ 均匀加速到 10 r·min⁻¹。小鼠完成转棒适应后, 调节转棒 5 min 内从 5 r·min⁻¹ 均匀加速到 30 r·min⁻¹。记录小鼠停留在转棒上的潜伏时间, 测量 3 次取平均值, 每次至少间隔 30 min。

脊髓病理切片 动物麻醉后固定, 用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 经心脏灌流至肝脏白色, 换 4% 多聚甲醛灌流 10 min, 取小鼠脊髓腰段置于 4% 多聚甲醛固定 48 h 送石蜡切片 (武汉谷歌生物科技有限公司), 每片厚

4 μm , 1% 甲苯胺蓝染色 30 min, 镜检观察。

免疫荧光 脊髓腰段切片用 0.1 mol·L⁻¹ PBS 洗涤, 0.5% Triton X-100 室温孵育 30 min, 5% BSA 室温封闭 1 h, 一抗 (ChAT 兔多抗 1:200, Iba1 羊多抗 1:200) 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次, 荧光二抗 (Alexa Fluor® 546 标记驴抗兔荧光二抗 1:500, Alexa Fluor® 488 标记驴抗羊荧光二抗 1:500, Hoechst 33342 1:1000) 室温孵育 1 h, PBS 漂洗后封片, 荧光显微镜下观察。

Western blot 小鼠断头处死, 冰上分离脊髓组织腰段, 液氮速冻后加入 RIPA 裂解液超声破碎, BCA 蛋白定量, 加入 loading buffer 后 95 °C 处理 5 min, -20 °C 保存。蛋白上样量为 30 μg , 将蛋白转印至 PVDF 膜, 以 3% BSA 封闭 1 h, 一抗 (Nrf2、HO-1、 β -actin) 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h, PBST 漂洗后加入 ECL 发光液显影。使用 Gelpro 凝胶分析软件对蛋白条带进行灰度分析。

RNA 提取及定量 脊髓新鲜腰段组织用 miRNA 提取试剂盒 (ER601-01) 提取, 经 miRNA 两步 qRT-PCR (AQ202-01) 检测 miR-153 丰度。

细胞培养 NSC-34 鼠神经元细胞 (广州吉妮欧生物科技有限公司) 用 DMEM 高糖培养基 (10% FBS 和 1% 青链霉素) 培养^[16]。Lipofectamin 2000 转染 pcDNA-SOD1 G93A。

细胞存活/死亡率检测 细胞存活率用 MTT 法检测。细胞接种于 96 孔板 (5×10^3 个细胞/孔), 24 h 后转染 pcDNA-SOD1 G93A/Nrf2 siRNA/miR-153, 6 h 后换完全培养基含或不含 Rg1。48 h 后加入 0.5 mg·mL⁻¹ MTT 10 μL , 37 °C 处理 4 h 后加入三联液 100 μL 作用 8 h 溶解结晶。检测 570 nm 吸光度。

统计分析 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 6 软件进行统计分析。数据组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 post hoc Newman-Keuls test 检验。以 $P < 0.05$ 为具有统计学差异。

结果

1 Rg1 可推迟 ALS 小鼠发病时间并延迟其生存期

前期研究^[13]表明, 10~40 mg·kg⁻¹ Rg1 表现出明显的神经保护作用, 故本实验 Rg1 的给药剂量为 10、20 和 40 mg·kg⁻¹。文献报道 SOD1 G93A 小鼠体重最高点可被认为是其发病的起点^[15, 17], 对其体重监测发现 13 周左右 SOD1 G93A 小鼠体重达到最大值, Rg1 10 mg·kg⁻¹ 剂量组在 14~15 周体重持平, 15 周后开始下降。20 及 40 mg·kg⁻¹ Rg1 明显推迟起病时间,

40 mg·kg⁻¹ 与 20 mg·kg⁻¹ 相比未表现出显著性差异 (图 1A)。对其生存率进行统计发现, 20 及 40 mg·kg⁻¹ Rg1 明显延长了其生存期 (图 1B)。

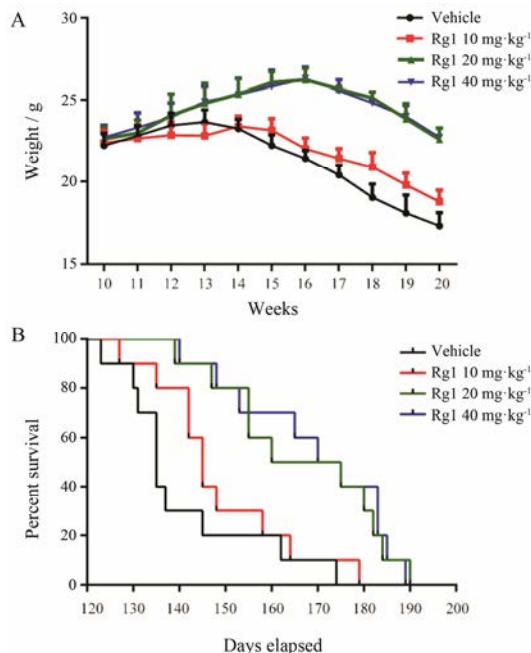


Figure 1 Rg1 treatment postponed the onset age of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (A) and improved the survival interval (B). $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

2 Rg1 改善 ALS 小鼠运动能力

后肢肌肉的逐步萎缩是 ALS 小鼠发病的典型特征。转棒实验可被用于快速检测小鼠运动协调能力。结果显示, 17 周以后 SOD1 G93A 小鼠及 Rg1 10 mg·kg⁻¹ 剂量组的运动能力开始出现降低。20 与 40 mg·kg⁻¹ 剂量组运动能力下降趋势明显, 较 ALS 小鼠缓慢 (图 2A)。对腓肠肌进行病理检测发现, SOD1 G93A 小鼠纤维束明显变得不规则, 纤维间肌内膜空间明显增大, 纤维增生引起的核高度聚集化表明肌肉萎缩明显。Rg1 10 mg·kg⁻¹ 剂量组中上述现象出现缓解, 而 Rg1 20 及 40 mg·kg⁻¹ 剂量组可见纤维排列较为正常, 同期肌肉萎缩现象不明显 (图 2B)。

3 Rg1 减少脊髓运动神经元丢失并抑制小胶质细胞激活

对小鼠进行病理检测发现, ALS 小鼠对照组在病程晚期脊髓前角细胞丢失明显, 而同时取材的 Rg1 20 及 40 mg·kg⁻¹ 剂量组小鼠与 ALS 对照组相比, 脊髓前角运动神经元的丢失明显降低, 表明 Rg1 具有运动神经元保护功能 (图 3A)。胶质细胞的激活在 ALS 疾病进程中发挥重要作用^[18], 为了检测小胶质细胞的活化, 本研究用 Iba1 抗体对脊髓切片进行染色,

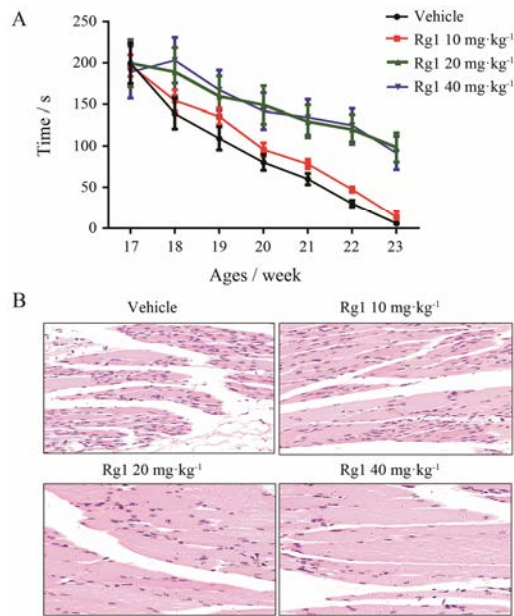


Figure 2 Rg1 treatment alleviated the motor dysfunction of ALS mice (A, $n = 3-10$, $\bar{x} \pm s$) and muscle atrophy (B, Scale bar = 50 μm)

为了进一步验证小胶质活化情况对脊髓运动神经元的影 响, 同时用胆碱乙酰转移酶抗体 (ChAT) 特异性标记脊髓运动神经元进行免疫荧光染色, 发现 Rg1 在降低 Iba1 激活的同时能够明显增加 ChAT 阳性细胞数 (图 3B)。

4 Rg1 调节 Nrf2/HO-1 信号通路参与脊髓运动神经元保护作用

上述结果表明, 给予 Rg1 能够缓解运动功能损伤, 降低神经元丢失, 抑制小胶质细胞激活, 为进一步检测其作用机制, 采用 Western blot 检测脊髓中 Nrf2 和 HO-1 的表达情况。Nrf2 作为转录因子能够结合抗氧化应激反应元件 (antioxidant response element, ARE), 进而调控胞内抗氧化及抗炎相关因子的表达, 其中 HO-1 等发挥了重要作用。结果显示, Rg1 组 Nrf2 和 HO-1 的表达升高 (图 4A)。为进一步验证 Nrf2 在 Rg1 抗 ALS 中的作用, 采用 NSC-34 细胞过表达 hSOD1 G93A 制备细胞模型, 对其同时转染 Nrf2 siRNA 或对照 siRNA 后给予 Rg1, 观察 Rg1 的作用。结果显示 Nrf2 siRNA 处理明显抑制了 Rg1 引起的 Nrf2 的升高 (图 4B)。采用 MTT 检测细胞活力发现, Rg1 对细胞的保护作用受到抑制 (图 4C), 以上结果表明 Rg1 通过 Nrf2 在 ALS 病程中发挥保护功能。

5 Rg1 抑制 miR-153 上调 Nrf2 表达

为研究 Rg1 对 Nrf2 的调控机制, 本研究检测了靶向 Nrf2 的 miR-153 表达。对实验动物脊髓 miR-153 表达进行检测发现, Rg1 给药组与 ALS 小鼠对照组相

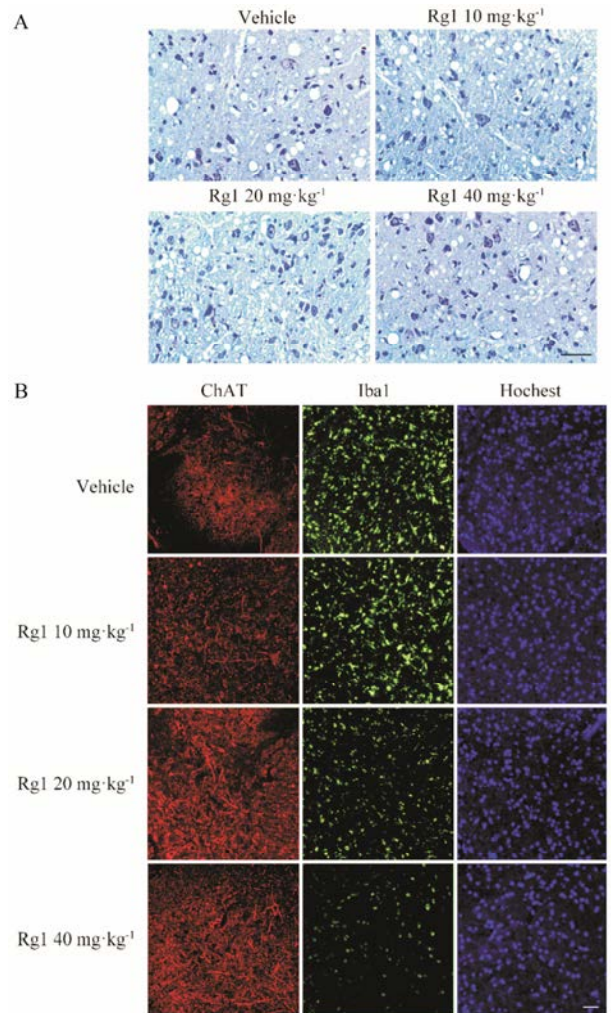


Figure 3 Attenuation of motor neuron loss and microglia activation in the spinal cord by Rg1. (A) Toluidine blue staining of lumbar segments of spinal cord. Scale bar = 100 μm . (B) Immunohistochemical staining of motor neuron (ChAT, red) and microglia (Iba1, green). Scale bar = 100 μm

比, 脊髓中 miR-153 的表达明显降低 (图 5A)。为验证 miR-153 的作用, 在转染 SOD1 G93A 的细胞中加入 miR-153 后检测 Rg1 对 Nrf2 和 HO-1 及细胞生存率的影响。结果显示加入 miR-153 后降低了 Rg1 对 Nrf2 的上调作用, 削弱其对细胞生存率的改善, 表明 Rg1 通过 miR-153 上调 Nrf2 表达发挥保护作用 (图 5B, C)。

讨论

中枢神经系统因含有高浓度易被超氧化的多不饱和脂肪酸而对氧化应激损伤特别敏感, 同时中枢神经系统几乎不具有再生修复功能, 抵抗外界损害的能力更为降低。鉴于上述因素, 针对氧化应激介导的病理损伤的抑制已成为改善中枢神经退行性疾病的研究焦点。Nrf2-ARE 信号通路是重要的内源性抗

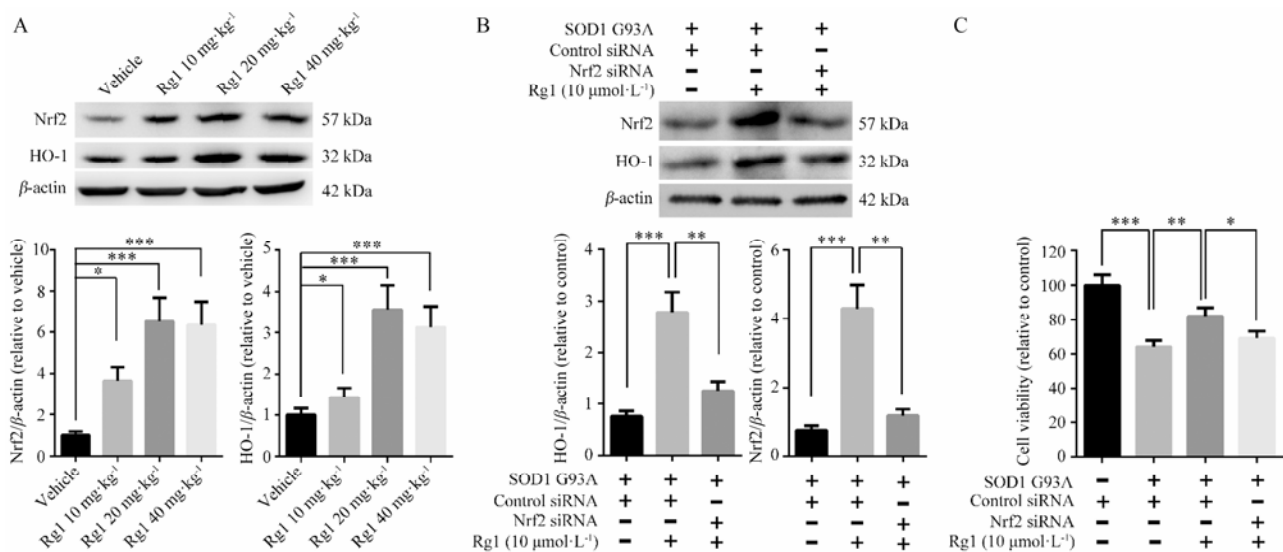


Figure 4 Rg1 functions through Nrf2 in ALS treatment. (A) Effects of Rg1 treatment on the expression of Nrf2 and HO-1. (B) The expression of Nrf2 and HO-1 after transfection of Nrf2 siRNA in Rg1 treated NSC-34 cells. (C) Cell viability was tested by MTT. $n=4$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

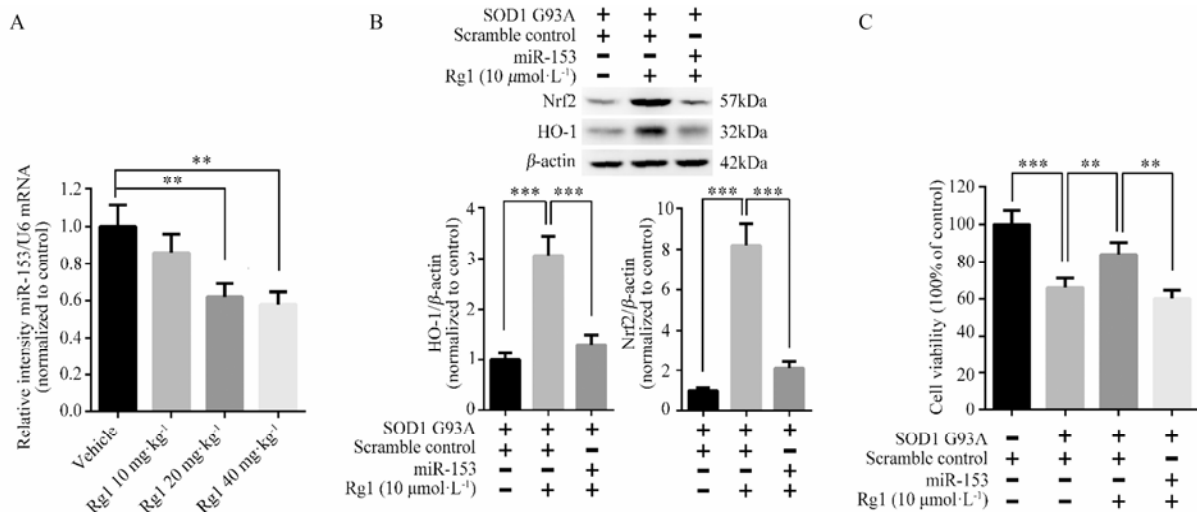


Figure 5 miR-153 participates in the regulation of Rg1 on Nrf2. (A) The expression of miR-153 in the lumbar segments of spinal cord. (B) The expression of Nrf2 and HO-1 after transfection of miR-153 or scramble control in Rg1 treated NSC-34 cells. (C) Cell viability was tested by MTT. $n=5$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

氧化应激信号通路。正常稳态下 Nrf2 半衰期很短，在绝大多数细胞系中几乎检测不到，其在胞质中结合一个同型二聚体蛋白 Keap1，可将 Nrf2 递呈至泛素蛋白酶系统降解 Nrf2。氧化剂及亲电子试剂如泛醌等与 Keap1 中的半胱氨酸反应，使其不能与 Nrf2 结合，导致 Nrf2 入核与 bZip 形成二聚体，结合 II 相酶基因启动子区的 ARE，使其转录活性增加，抗氧化能力增强。但外界损伤加剧，仅依靠自身抗氧化反应无法达到稳态平衡，且许多外界因素本身对 Nrf2/ARE 系统有破坏，如 Wang 等^[19]报道 NSC-34 细胞中转染 SOD1 G93A 可损伤 Nrf2-ARE 信号通路活性。

人参具有抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡的作用，并

能刺激免疫应答，增加机体抵抗力。有报道人参根对 SOD1 G93A 小鼠具有保护作用，小鼠 30 天后将人参混于饮用水中服用，其运动功能减退出现的时间及存活率与对照组相比明显延长^[20]。研究发现，人参可以增加培养的皮质神经元存活率，并促进神经突起生长^[21, 22]，为人参用于 ALS 的治疗提供了理论依据。在对人参成分的研究中发现，人参皂苷 Rb1 及 Rg1 能够保护脊髓神经元免受谷氨酸及卡因酸诱导的兴奋毒性损伤及过氧化氢引起的氧化应激损伤，可能是治疗脊髓损伤的有效因子^[23]。此外，Rg1 对 3-硝基邻苯二甲酸诱导的纹状体氧化应激损伤具有保护作用^[11]，可通过对 Nrf2 的调控缓解四氯化碳^[7]及酒精^[12]造成

的肝损伤; Rg1 在 PD 等神经退行性疾病中也表现出良好的神经保护作用, 因此推测 Rg1 可能通过抗氧化应激损伤对 ALS 发挥神经保护作用。研究中 Rg1 无论对 ALS 小鼠模型抑或 NSC-34 细胞模型都能增加 Nrf2 的表达, 具有神经保护作用。对其机制进一步研究发现 miR-153 可调节 Nrf2 的表达, 增加的 miR-153 降低 GCLC 及 GSR 的表达, 导致依赖 Nrf2 的氧化还原失衡^[24]。百草枯及 H₂O₂ 等能明显增加脑内 miR-153 的表达, 并降低 Nrf2 及 GCLC 和 NQO1 的表达^[25], 上述研究均表明 miR-153 对 Nrf2 的抑制具有病理意义。本研究中发现 Rg1 可降低 SOD1 G93A 导致的脊髓组抑制, 发挥抗氧化功能, 表明 Rg1 对 miR-153/Nrf2/HO-1 的调控介导其在 ALS 中的保护作用, 而 Rg1 如何调控 miR-153 有待进一步研究。另外, Rg1 在 10 mg·kg⁻¹ 对 miR-153 的影响虽然没有显著性差异, 但其趋势相当明显, 而其下游 Nrf2 表现出显著变化也是非常客观的结果, 推测可能是对其效应的放大, 也可能潜在其他 microRNA 共同调控, 甚至是对 Nrf2 的其他层面的调节, 需要研究者后继的进一步论证。同时值得注意的是任何疾病都是多种致病因素协作的结果, ALS 也不例外。研究报道, 人参皂苷 Rg1 具有抗炎、抗氧化和缓解疲劳等功效, 且具有多靶点效应, 将其应用于 ALS 的治疗中可能较单一靶点药物具有更明显的治疗优势。此外, ALS 发病率本身存在性别差异, 本实验采用雌雄各半的小鼠, 发现 Rg1 对其都有保护作用, 然而其对 ALS 的治疗效果是否存在性别差异仍有待进一步检测。

References

- [1] Mitchell JD, Callaghan P, Gardham J, et al. Timelines in the diagnostic evaluation of people with suspected amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND)--a 20-year review: can we do better? [J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2010, 11: 537-541.
- [2] Shaw PJ, Ince PG, Falkous G, et al. Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord [J]. *Ann Neurol*, 1995, 38: 691-695.
- [3] Ferrante RJ, Browne SE, Shinobu LA, et al. Evidence of increased oxidative damage in both sporadic and familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurochem*, 1997, 69: 2064-2074.
- [4] Valdmanis PN, Daoud H, Dion PA, et al. Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2009, 9: 198-205.
- [5] Shibata N. Transgenic mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis with superoxide dismutase-1 mutation [J]. *Neuropathology*, 2001, 21: 82-92.
- [6] Gurney ME, Pu H, Chiu AY, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation [J]. *Science*, 1994, 264: 1772-1775.
- [7] Shibata N, Nagai R, Uchida K, et al. Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycooxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients [J]. *Brain Res*, 2001, 917: 97-104.
- [8] Barber SC, Shaw PJ. Oxidative stress in ALS: key role in motor neuron injury and therapeutic target [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48: 629-641.
- [9] Zhang Q, Pi J, Woods CG, et al. A systems biology perspective on Nrf2-mediated antioxidant response [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 244: 84-97.
- [10] Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47: 1304-1309.
- [11] Gao Y, Chu SF, Li JP, et al. Protopanaxtriol protects against 3-nitropropionic acid-induced oxidative stress in a rat model of Huntington's disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36: 311-322.
- [12] Gao Y, Chu S, Li J, et al. Anti-inflammatory function of ginsenoside Rg1 on alcoholic hepatitis through glucocorticoid receptor related nuclear factor-kappa B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 173: 231-240.
- [13] Heng Y, Zhang QS, Mu Z, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates motor impairment and neuroinflammation in the MPTP-probenecid-induced parkinsonism mouse model by targeting alpha-synuclein abnormalities in the substantia nigra [J]. *Toxicol Lett*, 2016, 243: 7-21.
- [14] Zhang JT. Nootropic mechanisms of ginsenoside Rg1--influence on neuronal plasticity and neurogenesis [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2005, 40: 385-388.
- [15] Thomsen GM, Gowing G, Latter J, et al. Delayed disease onset and extended survival in the SOD1G93A rat model of amyotrophic lateral sclerosis after suppression of mutant SOD1 in the motor cortex [J]. *J Neurosci*, 2014, 34: 15587-15600.
- [16] Vaz AR, Cunha C, Gomes C, et al. Glycoursodeoxycholic acid reduces matrix metalloproteinase-9 and caspase-9 activation in a cellular model of superoxide dismutase-1 neurodegeneration [J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51: 864-877.
- [17] Riancho J, Ruiz-Soto M, Berciano MT, et al. Neuroprotective effect of bexarotene in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 250.
- [18] Boillee S, Yamanaka K, Lobsiger CS, et al. Onset and

- progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia [J]. *Science*, 2006, 312: 1389–1392.
- [19] Wang F, Lu Y, Qi F, et al. Effect of the human SOD1-G93A gene on the Nrf2/ARE signaling pathway in NSC-34 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 2453–2458.
- [20] Jiang F, DeSilva S, Turnbull J. Beneficial effect of ginseng root in SOD-1 (G93A) transgenic mice [J]. *J Neurol Sci*, 2000, 180: 52–54.
- [21] Sugaya A, Yuzurihara M, Tsuda T, et al. Proliferative effect of ginseng saponin on neurite extension of primary cultured neurons of the rat cerebral cortex [J]. *J Ethnopharmacol*, 1988, 22: 173–181.
- [22] Mizumaki Y, Kurimoto M, Hirashima Y, et al. Lipophilic fraction of Panax ginseng induces neuronal differentiation of PC12 cells and promotes neuronal survival of rat cortical neurons by protein kinase C dependent manner [J]. *Brain Res*, 2002, 950: 254–260.
- [23] Liao B, Newmark H, Zhou R. Neuroprotective effects of ginseng total saponin and ginsenosides Rb1 and Rg1 on spinal cord neurons *in vitro* [J]. *Exp Neurol*, 2002, 173: 224–234.
- [24] Narasimhan M, Patel D, Vedpathak D, et al. Identification of novel microRNAs in post-transcriptional control of Nrf2 expression and redox homeostasis in neuronal, SH-SY5Y cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e51111.
- [25] Narasimhan M, Riar AK, Rathinam ML, et al. Hydrogen peroxide responsive miR153 targets Nrf2/ARE cytoprotection in paraquat induced dopaminergic neurotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 228: 179–191.