

# 人参皂苷 Rg1 对皮质酮介导原代星形胶质细胞损伤的保护作用

任倩<sup>1†</sup>, 夏聪媛<sup>1†</sup>, 王真真<sup>1\*</sup>, 陈乃宏<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 神经科学中心, 北京 100050;

2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208)

**摘要:** 研究人参皂苷 Rg1 对皮质酮介导的星形胶质细胞损伤的保护作用, 并对其作用机制进行初步探索。分离培养原代海马和前额叶皮质区星形胶质细胞, 给予皮质酮 (corticosterone, CORT) 模拟应激条件, 采用 Western blot 方法检测 Rg1 对 Cx43 磷酸化水平的影响; 利用 Cell Counting Kit (CCK8) 方法检测 Rg1 对细胞生存率的影响考察及蛋白酶抑制剂是否影响 Rg1 对细胞生存率的保护作用。结果显示, 人参皂苷 Rg1 显著降低 CORT 介导的 Cx43 磷酸化水平升高。与 CORT (200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组相比, 人参皂苷 Rg1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可显著增加海马和前额叶皮质星形胶质细胞的生存率; 人参皂苷 Rg1 的保护作用在海马星形胶质细胞可被蛋白激酶 Src 抑制剂 PP2、p38 抑制剂 SB203580 及 Akt 的抑制剂 BAY1125976 抑制, 而在前额叶皮质星形胶质细胞仅可被 Src 抑制剂 PP2 和 Akt 的抑制剂 BAY1125976 抑制。结果表明, 人参皂苷 Rg1 可显著减轻 CORT 所致的星形胶质细胞缝隙连接通道蛋白 Cx43 活性的降低, 并通过激活 Src、p38 与 Akt 信号通路发挥抗皮质酮损伤的作用, 这种作用在海马和前额叶皮质存在脑区差异性。

**关键词:** 人参皂苷 Rg1; 星形胶质细胞; 皮质酮; 缝隙连接蛋白; 蛋白激酶

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 09-1410-06

## Protective effects of ginsenoside Rg1 against corticosterone-induced primary astrocytes injury

REN Qian<sup>1†</sup>, XIA Cong-yuan<sup>1†</sup>, WANG Zhen-zhen<sup>1\*</sup>, CHEN Nai-hong<sup>1,2\*</sup>

(1. Institute of Materia Medica Neuroscience Center, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. College of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**Abstract:** The study was designed to explore the effects and the underlying mechanism of ginsenoside Rg1 on corticosterone (CORT)-induced astrocytes injury. The primary hippocampal and prefrontal cortical astrocytes from rats were cultured and purified. CORT was used to stimulate stress condition. Western blot was used to detect the effects of ginsenoside Rg1 on the phosphorylation of Cx43. Cell Counting Kit (CCK8) was used to detect the effects of ginsenoside Rg1 on astrocytes viability. The roles of ginsenoside Rg1 was reversed by protein kinase inhibitors in the change of astrocytes morphology. Our results showed that ginsenoside Rg1 reversed the phosphorylation of Cx43 induced by CORT; ginsenoside Rg1 significantly upregulated the cell viability of astrocytes against CORT; the role of ginsenoside Rg1 was obviously inhibited by Src protein kinase inhibitors PP2 and Akt protein kinase inhibitors BAY1125976 in prefrontal cortical astrocytes; in hippocampal

收稿日期: 2017-05-19; 修回日期: 2017-06-09.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573636, U1402221, 81560663); 北京协和医学院“协和青年基金” (3332016058); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (2014RC03, 2016RC350002); 湖南省重点研发计划项目 (2015SK2029-1); 湖南省教育厅高校科研经费开放基金项目 (15K091); 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室资助项目 (BZ0150).

<sup>†</sup>共同第一作者.

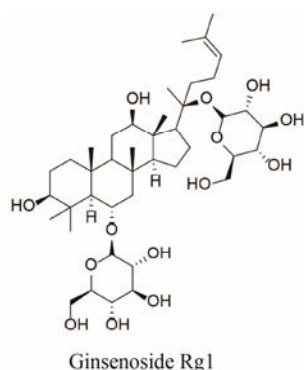
\*通讯作者 Tel: 86-10-63165177, Fax: 86-10-63165211, E-mail: chennh@imm.ac.cn; wangzz@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0500

astrocytes, Src protein kinase inhibitor PP2, p38 protein kinase inhibitor SB203580, Akt protein kinase inhibitor BAY1125976 significantly inhibited the cell protective effects of ginsenoside Rg1. In conclusion, ginsenoside Rg1 improved the activity of Cx43 gap junctions in astrocytes exposed to CORT; ginsenoside Rg1 protected astrocytes against that CORT activated the Src, p38 and Akt signaling pathways, and the mechanism was different in prefrontal cortical and hippocampal astrocytes.

**Key words:** ginsenoside Rg1; astrocyte; corticosterone; connexin; protein kinase

人参皂苷 Rg1 (ginsenoside Rg1, Rg1, 图 1) 是人参 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 的重要生物活性成分之一<sup>[1-3]</sup>。研究<sup>[1,4-6]</sup>证实 Rg1 对多种神经递质的释放均起着调节作用, 如增加啮齿类动物大脑皮层中多巴胺和去甲肾上腺素的浓度。此外, Rg1 可增加皮层及海马组织中乙酰胆碱的含量并促进其释放, 对学习记忆和长时程增强效应 (LTP) 具有明显易化和增强作用<sup>[2, 7-10]</sup>。本课题组前期研究发现, Rg1 具有显著改善大鼠抑郁样行为的作用, 改善抑郁行为伴随的睡眠障碍、认知障碍和性功能障碍等优势, 但其抗抑郁作用机制尚未完全阐明。氟西汀是一种选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI), 它经由强效地抑制神经元从突触间隙中摄取 5-羟色胺 (5-HT), 从而增加间隙中可供利用的神经递质 5-HT, 以此用来改善情感状态, 是目前临床常用的治疗抑郁性精神障碍的药物, 并且常用来作为抑郁模型有效性的一个重要指标。为了进一步阐明 Rg1 抗抑郁的作用机制, 本实验选用氟西汀作为阳性药。



**Figure 1** Chemical structure of ginsenoside Rg1

缝隙连接 (gap junction, GJ) 又称间隙连接、通讯连接, 是由连接相邻 2 个细胞之间的连接通道对接而成的一种特殊膜结构<sup>[11-13]</sup>。其中, 连接蛋白 43 (connexins, Cx43) 细胞间隙连接通讯 (gap junctional intercellular communication, GJIC) 分布广泛, Cx43 通道的开放和关闭决定了细胞间的耦联和缝隙连接通道功能<sup>[14-16]</sup>。本实验室前期研究表明, 前额皮质区

星形胶质细胞缝隙连接蛋白 Cx43 介导 GJIC 功能异常可导致大鼠抑郁样行为发生, 并且与抗抑郁药物作用密切相关<sup>[17]</sup>。Cx43 磷酸化调控 Cx43 缝隙连接通道的开放和关闭, 目前研究表明 Cx43 的 C 端 241~382 为主要磷酸化区, 相关的蛋白激酶有 PKA、PKC、蛋白酪氨酸激酶 (PTK)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、钙调蛋白激酶 II (CaMKII) 和 Akt<sup>[13, 18]</sup>。Cx43 丝氨酸 368 位点的磷酸化介导缝隙连接通道的关闭, 阻断细胞间的物质交换<sup>[2, 19]</sup>。因而, 本研究的目的是探讨 Rg1 发挥抗抑郁作用是否与 Cx43 磷酸化相关的蛋白激酶活性相关, 为 Rg1 作为抑郁症治疗药物的研究提供理论基础。

## 材料与方法

**材料** Rg1 由吉林大学化学学院教研室提供, 纯度  $\geq 98\%$ , 用生理盐水溶解稀释, 过滤除菌。DMEM/F12 培养基、胎牛血清和马血清购自美国 Gibco 公司; PKA 特异性抑制剂 H89、Src 抑制剂 PP2、PKC 抑制剂 GO6076、ERK 抑制剂 PD98059、p38 抑制剂 SB203580、JNK 抑制剂 SP600125、CaMKII 抑制剂 KN-62、Akt 抑制剂 BAY1125976、皮质酮 (corticosterone, CORT) 和氟西汀 (fluoxetine, FLX) 购自美国 Sigma 公司; anti-Cx43 抗体和 anti-Cx43-pS368 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 胞浆膜胞核蛋白提取试剂盒、ECL 发光液购自北京普利莱基因生物技术公司。

**细胞培养** 将新生 2~4 天大鼠置于无菌条件下断头, 取鼠脑组织转移至预冷的 DMEM/F12 培养基中, 用尖镊去除脑膜, 分离前额叶皮质区和海马区组织, 将其剪成碎块, 用巴斯德移液管转移至分离消化液, 37 °C 消化 10 min 后用胎牛血清终止消化, 室温 1.1 r·min<sup>-1</sup> 离心, 5 min 后弃上清。用含 10% 胎牛血清 DMEM/F12 培养基重悬沉淀, 在 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养<sup>[11]</sup>。每周更换培养基 2 次。10 天后在 37 °C 恒温摇床上 180 r·min<sup>-1</sup>, 4 h 后去除上清, 即得到纯净的原代星形胶质细胞, 并采用免疫荧光染色鉴定纯度。

**药物干预及实验分组** 将培养细胞分成 5 组检

测细胞生存率。① 正常组: 不加任何处理因素; ② 溶剂对照组: 在正常组基础上, 加入 CORT 的溶剂无水乙醇; ③ 药物处理组: 在正常组基础上, 加入终浓度为  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氟西汀或  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Rg1 和  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CORT; ④ 抑制剂不同浓度处理组: 在正常组基础上, 加入 H-89 ( $10, 20$  和  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、GO6076 ( $0.1, 1$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PD98059 ( $0.5, 1$  和  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SB203580 ( $0.5, 1$  和  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SP600125 ( $10, 20, 30$  和  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、KN-62 ( $0.1, 1$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PP2 ( $0.5, 1$  和  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、BAY1125976 ( $1, 5$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。⑤ 不同的抑制剂处理组: 在正常组基础上, 加入终浓度为  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Rg1 和于④组中筛选的不同浓度的抑制剂。

**细胞生存率检测** 通过 Cell Counting Kit (CCK8, Dojindo, Japan) 检测细胞生存率, 细胞接种于 96 孔板中, 给予药物处理 24 h, 加入 CCK8 溶液于  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h。在  $450 \text{ nm}$  酶标仪检测吸光度值。

**细胞形态学观察** 细胞经药物干预后, 在倒置荧光显微镜 (奥林巴斯 IX70, 日本) 下观察细胞形态。

**Western blot 测定蛋白表达** 将药物处理后的细胞置于冰上, 利用胞膜胞浆胞核蛋白提取试剂盒提取胞膜蛋白。10% SDS-PAGE 分离样品, 转膜 1 h, 3% 牛血清白蛋白溶液室温封闭 2 h, 加入 anti-Cx43 抗体和 anti-Cx43-pS368 抗体  $4^\circ\text{C}$  孵育过夜。洗膜后, 加入二抗室温孵育 2 h。再加入 ECL 发光液, 凝胶成像系统采集图像。

**统计学分析** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间用单因素方差分析和组间  $t$  检验进行统计差异性检验,  $P < 0.05$  认为存在显著性差异。

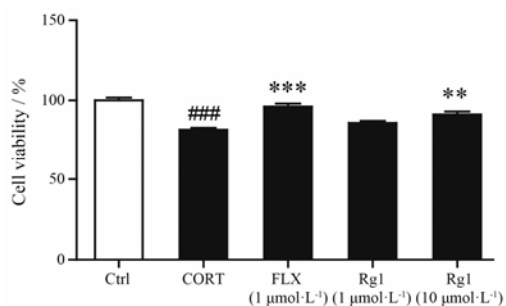
## 结果

### 1 Rg1 对皮质酮介导星形胶质细胞毒性的影响

通过皮质酮造成的海马和前额叶皮质星形胶质细胞损伤模型, 并检测 Rg1 对细胞生存率的影响。由图 2 可知, 与正常组比较, 用 CORT 诱导的模型组细胞生存率下降 ( $P < 0.001$ ); 与 CORT 组相比, 预孵育 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 或 FLX ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 时, 细胞生存率明显增加 ( $P < 0.01, P < 0.001$ )。说明预孵育 FLX ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 可以发挥抗皮质酮损伤的作用。

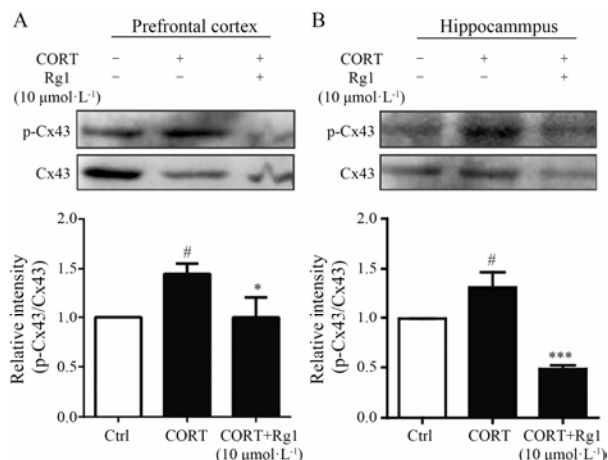
### 2 Rg1 对皮质酮介导星形胶质细胞磷酸化的影响

Cx43 丝氨酸 368 位点磷酸化 (p-Cx43) 介导缝隙连接通道关闭, 因此本实验对原代星形胶质细胞膜上 p-Cx43 含量进行检测。结果显示, CORT 上调前



**Figure 2** Ginsenoside Rg1 and antidepressants fluoxetine (FLX) protect the hippocampal astrocytes from the damage by corticosterone (CORT).  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs Ctrl group; \*\* $P < 0.01, ***P < 0.001$  vs CORT group

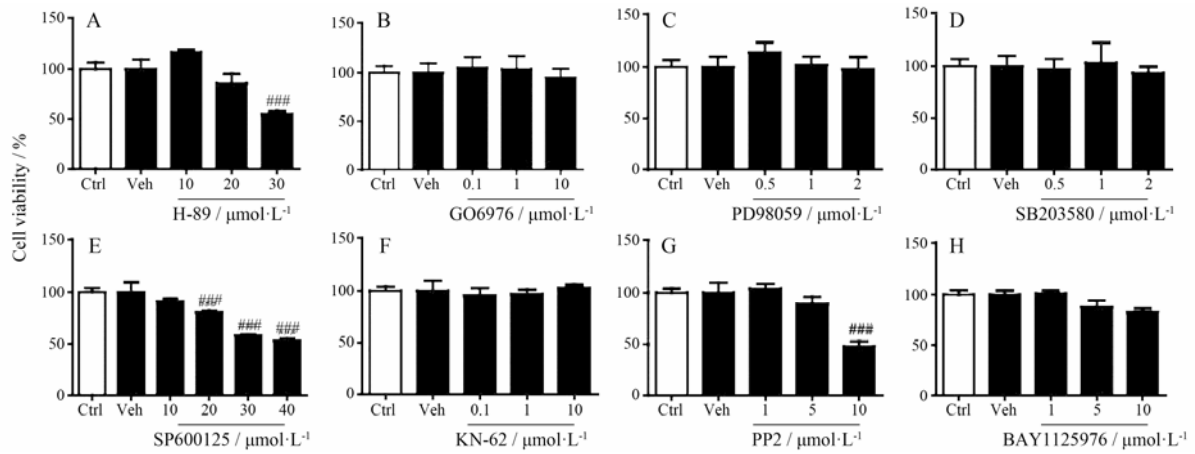
额皮质星形胶质细胞和海马星形胶质细胞膜上 Cx43 丝氨酸 368 位点磷酸化水平; 与 CORT 组相比, 给予 Rg1 降低前额皮质星形胶质细胞和海马星形胶质细胞膜上 p-Cx43 含量 (图 3)。



**Figure 3** Ginsenoside Rg1 decreased the phosphorylation of connexins43 (Cx43) at serine368. Effects of ginsenoside Rg1 on the phosphorylation of Cx43 in prefrontal cortical (A) and hippocampal (B) astrocytes.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . # $P < 0.05$  vs Ctrl group; \* $P < 0.05, ***P < 0.001$  vs CORT group

### 3 不同的蛋白激酶抑制剂对细胞生存率的影响

为了选取不影响细胞生存率的合适蛋白激酶抑制剂浓度, 选取常用的作用于细胞的蛋白激酶抑制剂, 给予正常的原代海马星形胶质细胞。如图 4 所示, 与正常组相比, GO6976 ( $0.1, 1$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PD98059 ( $0.5, 1$  和  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SB203580 ( $0.5, 1$  和  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、KN-62 ( $0.1, 1$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及 BAY1125976 ( $1, 5$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对细胞的生存率没有影响; H-89 ( $10$  和  $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SP600125 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 及 PP2 ( $1$  和  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对细胞的生存率没有影响, 但 H-89 ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SP600125 ( $20, 30, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 PP2 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对细胞的生存率



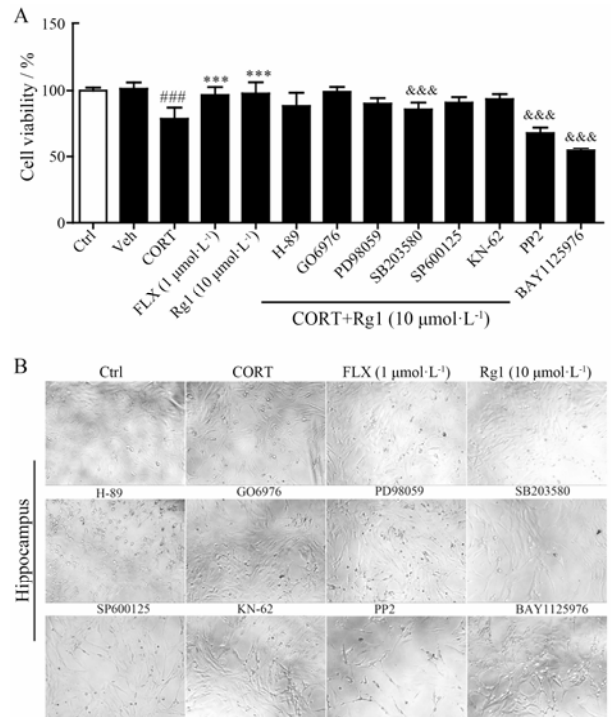
**Figure 4** Effects of different protein kinase inhibitors in hippocampus astrocytes. Effects of H-89, GO6976, PD98059, SB203580, SP600125, KN-62, PP2, BAY1125976 on cell viability in hippocampal astrocytes was shown as A-H.  $n=3$ ,  $\bar{x}\pm s$ . ### $P<0.001$  vs Ctrl group. H-89, GO6976, PD98059, SB203580, SP600125, KN-62, PP2, BAY1125976 were protein kinase inhibitors of PKA, PKC, ERK, p38, JNK, CaMKII, Src, Akt, respectively

均有非常显著的影响 ( $P<0.001$ )。因此, 选择合适的蛋白激酶抑制剂的浓度为 H-89 ( $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、GO6976 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PD98059 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SB203580 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、SP600125 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、KN-62 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PP2 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 BAY1125976 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

#### 4 蛋白激酶抑制剂对 Rg1 介导的海马星形胶质细胞保护作用的影响

在海马星形胶质细胞上, 通过 CCK8 法检测不同蛋白激酶抑制剂对 Rg1 作用的影响。如图 5A 所示, 与正常组相比, CORT 模型组细胞生存率显著下降 ( $P<0.001$ ); 与模型组相比, FLX ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组细胞的生存率均显著升高 ( $P<0.001$ ); 与单独 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比, 加入 SB203580 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PP2 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 BAY1125976 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 后细胞的生存率明显下降 ( $P<0.001$ )。

此外, 通过倒置相差显微镜观察各组细胞形态。由图 5B 形态学观察可见, 正常组海马星形胶质细胞胞体多呈树突状, 胞体饱满、折光度好, 胞浆均匀、透亮, 大多数伸出微小的突起。皮质酮造模后, 细胞胞体萎缩、相邻细胞间隙扩大, 造模同时给予 FLX ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对皮质酮损伤所致海马星形胶质细胞形态变化可显著缓解。而加入 SB203580 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、PP2 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 BAY1125976 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 后细胞多呈现细丝状, 胞体明显变小, 胞核突出。结果表明, 在海马星形胶质细胞上, PP2、BAY1125976 和 SB203580 可以抑制 Rg1 的保护作用。提示 Rg1 在海马星形胶质细胞上抗皮质酮损伤作用与 p38、Src 和 Akt 蛋白激酶相关。

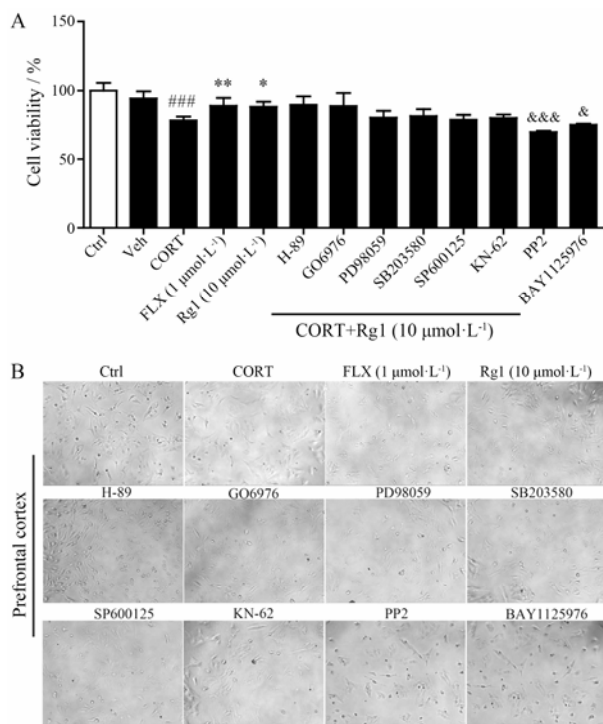


**Figure 5** Effects of different protein kinase inhibitors on the cell viability (A) and morphology (B) in the hippocampus astrocytes.  $n=6$ ,  $\bar{x}\pm s$ . ### $P<0.001$  vs Ctrl group; \*\*\* $P<0.001$  vs CORT group, &&& $P<0.001$  vs Rg1 group

#### 5 蛋白激酶抑制剂对 Rg1 介导的前额叶皮质星形胶质细胞保护作用的影响

在前额叶皮质星形胶质细胞上, 通过 CCK8 法检测不同蛋白激酶抑制剂对 Rg1 作用的影响。如图 6A 所示, 与正常组相比, CORT 组细胞生存率显著下降 ( $P<0.001$ ); 与 CORT 组相比, FLX ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $P<0.01$ ) 和 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $P<0.05$ ) 组细胞的生存率显著升高; 与单独 Rg1 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比,

加入 PP2 (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $P < 0.001$ )、BAY1125976 (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $P < 0.05$ ) 后细胞的生存率显著下降。此外, 通过倒置相差显微镜观察各组细胞形态。由图 6B 形态学观察可见, 正常组海马星形胶质细胞胞体多呈树突状, 胞体饱满、折光度好, 胞浆均匀、透亮, 大多数伸出微小的突起。皮质酮造模后, 细胞胞体萎缩、相邻细胞间隙扩大, 造模同时给予 FLX (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Rg1 (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对皮质酮损伤所致海马星形胶质细胞形态变化可显著缓解。加入 PP2 (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 BAY1125976 (1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 后细胞多呈现细丝、颗粒状, 胞体明显变小, 胞核突出。结果表明, 在前额叶皮质星形胶质细胞上, PP2 和 BAY1125976 可以抑制 Rg1 的保护作用。提示 Rg1 在前额叶皮质星形胶质细胞上抗皮质酮损伤作用与 Src、Akt 蛋白激酶相关。



**Figure 6** Effects of different protein kinase inhibitors on the cell viability (A) and morphology (B) in prefrontal cortex astrocytes.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs Ctrl group; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs CORT group; &&& $P < 0.001$ , & $P < 0.05$ , &&& $P < 0.001$  vs Rg1 group

讨论

近年来, 越来越多的研究表明人参皂苷 Rg1 在大鼠抑郁模型中发挥抗抑郁作用, 但其作用机制尚未完全阐明。慢性应激大鼠抑郁模型中星形胶质细胞缝隙连接功能损伤, 另损伤缝隙连接功能可诱导大鼠抑郁样行为发生<sup>[7, 16]</sup>。本研究证明皮质酮上调星形胶质细胞胞膜上缝隙连接通道蛋白 Cx43 磷酸化水平,

给予人参皂苷 Rg1 后缝隙连接通道蛋白 Cx43 磷酸化水平显著下调, 提示 Rg1 可能通过下调星形胶质细胞膜上缝隙连接通道蛋白 Cx43 磷酸化水平促进缝隙连接通道开放发挥抗抑郁作用<sup>[15]</sup>。

缝隙连接通道的开放和关闭由缝隙连接蛋白的磷酸化调节, Cx43 丝氨酸 368 位点的磷酸化介导缝隙连接通道关闭<sup>[16, 19]</sup>。缝隙连接通道介导相邻细胞间物质交换, 如离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 和  $\text{Na}^{+}$ 等), 小分子代谢物质 (葡萄糖和谷氨酸等), 第二信使 (cAMP 和  $\text{IP}_3$  等) 及其他分子质量小于 1.5 kDa 的物质<sup>[12]</sup>。此外, 缝隙连接通道也介导正常细胞与即将死亡细胞之间的物质交换, 但缝隙连接通道在促进细胞生存和介导细胞死亡方面的作用仍然存在争议<sup>[18, 19]</sup>。结果显示, Rg1 可抑制皮质酮介导的 Cx43 丝氨酸 368 位点磷酸化, 促进缝隙连接通道开放; 皮质酮促进星形胶质细胞死亡, 给予 Rg1 后显著增加星形胶质细胞生存率。提示在皮质酮介导的细胞损伤中, 促进缝隙连接通道开放发挥细胞保护作用。

Cx43 磷酸化相关的蛋白激酶有 PKA、PKC、蛋白酪氨酸激酶 (PTK)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶、CaMKII 和 Akt<sup>[18]</sup>。同时给予蛋白酶抑制剂, 海马星形胶质细胞中 SB203580、PP2 和 BAY1125976 可消除 Rg1 的保护作用, 表明在海马星形胶质细胞中 Rg1 细胞保护作用与 p38、Src 和 Akt 蛋白激酶相关; 前额叶星形胶质细胞中 PP2 和 BAY1125976 可消除 Rg1 的保护作用, 表明在前额叶皮质星形胶质细胞中 Rg1 细胞保护作用与 Src、Akt 蛋白激酶相关。此外, 显微结构表明给予 p38、Src 和 Akt 蛋白激酶抑制剂可阻断 Rg1 对海马星形胶质细胞形态的改善作用; 前额叶皮质星形胶质细胞在给予 Src、Akt 蛋白激酶抑制剂后逆转 Rg1 保护作用, 形态学发生明显变化。本文结果显示人参皂苷 Rg1 在皮质酮介导的星形胶质细胞损伤模型中的细胞保护作用机制与细胞内 p38、Src 和 Akt 信号通路有关, 但其上、下游的信号级联尚有待进一步阐明。

综上所述, 本研究阐明了人参皂苷 Rg1 改善 CORT 所致的星形胶质细胞缝隙连接通道蛋白 Cx43 活性降低的现象; 在海马星形胶质细胞上, 人参皂苷 Rg1 通过激活 Src、p38 与 Akt 信号通路, 减轻皮质酮对细胞毒性作用; 在前额叶星形胶质细胞是通过激活 Src、Akt 信号通路, 减轻皮质酮对细胞毒性作用。本研究结果为进一步研究人参皂苷 Rg1 抗抑郁作用机制提供新的思路。

## References

- [1] Cheng Y, Shen LH, Zhang JT. Anti-amnestic and anti-aging effects of ginsenoside Rg1 and Rb1 and its mechanism of action [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26: 143–149.
- [2] Attele AS, Wu JA, Yuan CS. Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58:1685–1693.
- [3] Lu XZ, Wang JH, Wu X, et al. Ginsenoside Rg1 promotes bone marrow stromal cells proliferation *via* the activation of the estrogen receptor-mediated signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29:1209–1214.
- [4] Chen XM, Zhu JB, Sun WD, et al. Effect of absorption enhancers on nasal ginsenoside Rg1 delivery and its nasal ciliotoxicity [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 149–155.
- [5] Shen LH, Zhang JT. Culture of neural stem cells from cerebral cortex of rat embryo and effects of drugs on the proliferation ability of stem cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2003, 38: 735–738.
- [6] Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, et al. Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals [J]. *Apoptosis*, 2005, 10: 459–469.
- [7] Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, et al. Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? [J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16: 524–536.
- [8] Moreno AP, Lau AF. Gap junction channel gating modulated through protein phosphorylation [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2007, 94: 107–119.
- [9] Morioka N, Suekama K, Zhang FF, et al. Amitriptyline up-regulates connexin43-gap junction in rat cultured cortical astrocytes *via* activation of the p38 and c-Fos/AP-1 signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171: 2854–2867.
- [10] Yamada A, Futagi M, Fukumoto E, et al. Connexin43 is necessary for salivary gland branching morphogenesis and FGF10-induced ERK1/2 phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291: 904–912.
- [11] Sun JD, Liu Y, Yuan YH, et al. Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37: 1305–1320.
- [12] Solan JL, Lampe PD. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects [J]. *Biochem J*, 2009, 419: 261–272.
- [13] Lampe PD, TenBroek EM, Burt JM, et al. Phosphorylation of connexin43 on serine368 by protein kinase C regulates gap junctional communication [J]. *J Cell Biol*, 2000, 149: 1503–1512.
- [14] Zhang CZ, Mu XF, Xu XX, et al. The effect of connexin43 downregulation on biological functions of HUVEC [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 298–304.
- [15] Jin C, Wang ZZ, Zhou H, et al. Ginsenoside Rg1-induced antidepressant effects involve the protection of astrocyte gap junctions within the prefrontal cortex [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2017, 75: 183–191.
- [16] Dere E, Zlomuzica A. The role of gap junctions in the brain in health and disease [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2012, 36: 206–217.
- [17] Xue JF, Hu JF, Liu ZJ, et al. The mechanism of ginsenosides Rg1 and Rb1 promoting glutamic acid release from PC12 cells [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2006, 41: 1141–1145.
- [18] Quesseveur G, Portal B, Basile JA, et al. Attenuated levels of hippocampal connexin43 and its phosphorylation correlate with antidepressant- and anxiolytic-like activities in mice [J]. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 490.
- [19] Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, et al. Connexins and their channels in cell growth and cell death [J]. *Cell Signal*, 2006, 18: 592–600.