



汪永锋, 教授, 硕士生导师, 主要研究中西医结合防治消化道疾病。目前任甘肃中医药大学党委常委、副校长, 比较医学学科带头人, 甘肃省实验动物产业技术创新战略联盟理事长, 甘肃省实验动物行业技术中心主任。先后主持国家自然科学基金、省部级课题10项。获甘肃省科技进步二等奖、三等奖4项, 甘肃省皇甫谧医学二等奖、三等奖5项。主编教材及学术著作7部, 参编19部。发表学术论文97篇, 其中SCI论文33篇。作为负责人主持设立甘肃省工信厅认定的“甘肃省实验动物行业技术中心”, 省科技厅批准的“甘肃实验动物产业技术创新战略联盟”。先后获得“全国优秀共青团干部”“全国社会实践先进个人”等荣誉称号。



师长宏, 医学博士, 教授, 博士生导师。目前任空军军医大学(原第四军医大学)实验动物中心主任, 陕西省实验动物质量监督检测中心主任。获全国优秀科技工作者、军队育才银奖和中国实验动物学会青年人才奖。兼任中国实验动物学会常务理事、全军实验动物专业委员会副主任委员、陕西省实验动物学会副理事长。主要从事人源化动物模型研究, 重点围绕肿瘤模型的制备、影像学评估和应用等开展研究工作。近5年, 作为第一作者或通信作者发表SCI论文10余篇, 刊于 *Cancer Cell*、*Biomaterials* 和 *Nano Research* 等期刊。先后承担国家“863”专项、军队和省重大科技项目10余项。获陕西省科技进步二等奖和陕西省教学成果一等奖各1项。

人参皂苷 Rg1 在小鼠创伤性脑损伤修复中的作用

郭文文^{1,2}, 赵亚², 王颖花², 刘可², 葛煦², 张延英^{1,3}, 汪永锋¹, 师长宏²

(1. 甘肃中医药大学基础医学院, 兰州 730030; 2. 空军军医大学实验动物中心, 西安 710032; 3. 甘肃省实验动物行业技术中心, 兰州 730030)

[摘要] **目的** 探讨人参皂苷 Rg1 在创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 小鼠模型血脑屏障、神经炎症、行为学功能等方面的作用。**方法** 实验分2部分。第一部分是27只SPF级雄性BALB/c小鼠随机分为空白组、假手术组、TBI模型组, 每组9只; TBI模型组开颅后采用受控皮质冲击 (controlled cortical impact, CCI) 方式造模, 假手术组只开颅不进行打击, 空白组不经任何处理; 手术后进行造模效果评价。第二部分是40只雄性BALB/c小鼠随机分为假手术组、3个剂量的人参皂苷 Rg1 治疗组和溶剂 DMSO 对照组, 每组8只小鼠。Rg1 治疗组在TBI建模成功后6 h腹腔注射剂量分别为10、20、40 mg/kg 的人参皂苷 Rg1, 而DMSO对照组给予等量的1% DMSO, 持续给药1周, 每天2次。于造模后1、3、7、14 d分别进行改良的神经损伤严重程度评分 (modified neurological severity scores, mNSS); 取造模后第3天的小鼠脑组织, 采用蛋白质印迹法检测血脑屏障渗漏情况; 第14、16天分别采用高架十字迷宫实验、水迷宫实验检测小鼠神经行为功能; 第28天麻醉、灌注后取脑, 免疫荧光染色观察小胶质细胞、星形胶质细胞活化等神经炎症。**结果** 人参皂苷 Rg1 治疗组的血脑屏障标志物 MMP-9 表达量减少 ($P < 0.01$), 小胶质细胞 (Iba-1 阳性表达) 和星形胶质细胞 (GFAP 阳性表达) 数量均明显减少 ($P < 0.05$), 提示神经炎症得到抑制, 且以20 mg/kg 剂量效果最好 ($P < 0.01$)。人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的 mNSS 评分显著低于溶剂 DMSO 对照组 ($P < 0.01$), 进入开放臂次数比例显著高于 DMSO 对照组 ($P < 0.05$); 其在水迷宫实验平台所在象限的时间比及穿越平台的次数均显著多于 DMSO 对照组 ($P < 0.05$), 且均以20 mg/kg 剂量效果最佳。**结论** 成功构建TBI小鼠模型并用于人参皂苷 Rg1 的损伤修复研究。人参皂苷 Rg1 能够显著改善TBI模型小鼠血脑屏障, 减轻神经炎症, 发挥改善神经行为功能的作用, 且以20 mg/kg 剂量作用效果最为显著。

[基金项目] 陕西省创新能力支撑计划-科技资源开放共享平台项目“基于诱导性多潜能干细胞的人神经元嵌合小鼠的制备与评价”(2021PT-037); 军队实验动物专项科研课题“人神经元嵌合小鼠的制备与评价”(SYDW[2018]01)

[第一作者] 郭文文(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经生物学。E-mail: 553743953@qq.com

[通信作者] 汪永锋(1968—), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 中西医防治消化系统疾病。E-mail: wyf@gszy.edu.cn。ORCID: 0000-0003-0560-333x;

师长宏(1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 人源化动物模型的制备与评价。E-mail: changhong@fmmu.edu.cn。ORCID: 0000-0001-7490-3593

[关键词] 创伤性脑损伤; 人参皂苷 Rg1; 小鼠; 神经炎症; 行为学

[中图分类号] R-332; Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2023)03-0243-10



Repairing Effects of Ginsenoside Rg1 on Traumatic Brain Injury in Mice

GUO Wenwen^{1,2}, ZHAO Ya², WANG Yinghua², LIU Ke², GE Xu², ZHANG Yanying^{1,3}, WANG Yongfeng¹, SHI Changhong²

(1. Basic Medical College, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China; 2. Laboratory Animal Center, Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Gansu Province Experimental Animal Industry Technology Center, Lanzhou 730030, China)

Correspondence to: WANG Yongfeng (ORCID: 0000-0003-0560-333x), E-mail: wyf@gszy.edu.cn;

SHI Changhong (ORCID: 0000-0001-7490-3593), E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To explore the effects of ginsenoside Rg1 on blood-brain barrier, neuroinflammation and behavioral function of traumatic brain injury (TBI) mouse model. **Methods** The experiment was divided into two parts. In the first part, 27 SPF male BALB/c mice were randomly divided into blank group, sham operation group and TBI model group, with 9 mice in each group. TBI model group was made by controlled cortical impact (CCI) after craniotomy, while sham operation group was only performed craniotomy without any treatment, and the blank group was not treated at all. The effect of modeling was evaluated after operation. In the second part, 50 male BALB/c mice were randomly divided into sham operation group, three different drug dosage groups and solvent (DMSO) control group, with 8 mice in each group. The drug treatment groups were injected with ginsenoside Rg1 at the doses of 10, 20 and 40 mg/kg respectively 6 hours after TBI model had been successfully established, while the DMSO control group was given the same amount of 1% DMSO for one week, twice a day. Modified neurological severity scores (mNSS) were performed on the 1st, 3rd, 7th and 14th day after modeling, and the blood-brain barrier leakage was detected by Western blotting on the 3rd day after modeling. On the 14th and 16th day, the elevated cross maze test and water maze test were used to detect the neurobehavioral function. On the 28th day after anesthesia and perfusion, the brains were taken out, and the neuroinflammation such as activation of microglia and astrocytes was observed by immunofluorescence staining. **Results** The expression level of MMP-9, a marker of blood-brain barrier, decreased in ginsenoside Rg1 treatment group ($P < 0.01$). The number of microglia (Iba-1 positive) and astrocyte (GFAP positive) cells decreased significantly ($P < 0.05$), which indicated that neuroinflammation was inhibited, and the best effect was achieved at the dosage of 20 mg/kg ($P < 0.01$). The mNSS of mice in ginsenoside Rg1 treatment group were significantly lower than those in DMSO control group ($P < 0.01$), and the proportion of times they entered the open arm was significantly higher than that in DMSO control group ($P < 0.05$). The time ratio in the quadrant where the water maze experimental platform was located and the times of crossing the platform were significantly higher than those in control group ($P < 0.05$), and the dosage of 20 mg/kg had the best effect. **Conclusion** The TBI mouse model was successfully constructed and applied to the study of ginsenoside Rg1 repair of mouse traumatic brain injury. Ginsenoside Rg1 can significantly improve blood-brain barrier, alleviate neuroinflammation and improve neurobehavioral function in TBI model mice, and the effect is the most significant at the dose of 20 mg/kg.

[Key words] Traumatic brain injury; Ginsenoside Rg1; Mice; Neuroinflammation; Ethology

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 主要是由外部机械力引起的脑组织病理学改变或脑功能障碍^[1], 如果不及时治疗, 将导致长期的认知问题, 影

响患者进行日常活动和重返工作的能力^[2]。目前, TBI 已成为重要的全球公共卫生问题, 每年至少有 1 000 万例住院或死亡的 TBI 患者^[3]。

目前, 针对TBI的治疗方法及药物大多局限于康复性或姑息性, 尚无法有效恢复神经功能^[4]。人参皂苷是人参的主要生物活性成分, 具有易提取、成本低等优点, 其显著的神经保护和神经营养作用受到普遍关注。研究发现, 人参皂苷能够发挥抑制神经兴奋性毒性、减轻氧化应激和神经炎症、维持神经递质平衡、促进神经干/祖细胞增殖、促进神经突起生长和神经网络形成等作用, 进而显著改善TBI后继发的神经功能损伤^[5]。已有研究证实, 人参皂苷的主要成分之一Rg1 (分子式为C₄₂H₇₂O₁₄, 相对分子量为801.01) 可以修复TBI后被破坏的血脑屏障, 促进体外神经干细胞的增殖、分化, 抑制神经细胞凋亡, 促进神经再生, 若用于颅脑损伤, 可能会减轻神经元的继发性损伤^[6]。

人参皂苷Rg1能否促进TBI后的神经发生和神经元再生, 并有助于神经功能的恢复, 目前国内尚无相关文献报告。因此, 本研究从小鼠TBI建模后血脑屏障渗漏、神经炎症及神经行为功能等方面, 评估不同剂量人参皂苷Rg1的治疗效果, 以期进一步完善中西医结合治疗TBI的策略并探索人参皂苷Rg1的作用价值, 为临床治疗TBI提供新的理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性BALB/c小鼠67只, 6~8周龄, 体重25~30 g, 由空军军医大学实验动物中心 [SCXK (陕) 2019-001] 提供, 均饲养于空军军医大学实验动物中心屏障环境 [SYXK (陕) 2019-001], 室温控制在24~26 °C, 光线每12 h明暗交替, 自由进食, 每周更换2次垫料。相关动物实验方案通过空军军医大学实验动物福利伦理委员会批准 (审批号: IACUC-20220830)。

1.2 主要试剂与仪器

人参皂苷Rg1 (粉剂, 规格1 g, 纯度≥98%, 批号22427-39-0) 购自上海源叶生物科技有限公司; 先用二甲基亚砜 (DMSO) 溶液将人参皂苷Rg1配制成浓度为400 mg/mL的母液, 然后用生理盐水 (即0.9% NaCl溶液) 稀释为1、2、4 mg/mL, -20 °C避光保存备用; 用药前根据动物体重和目标剂量10、20、40 mg/kg计算相应的给药体积。

抗基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 抗体 (Ab283575)、抗胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体 (Ab68428)

和抗离子钙结合衔接分子1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba-1) 抗体 (Ab178846) 均为英国Abcam公司产品; DyLight 594 荧光标记二抗购自美国Genetex公司; Cy3 荧光染料 (EK012) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 10 μg/mL) 及BCA蛋白浓度测定试剂盒 (PA115-02) 购自北京雷根生物技术有限公司; 蛋白提取试剂盒 (P0033) 购自上海碧云天生物技术有限公司; SDS凝胶试剂盒 (EC0004) 为山东思科捷生物技术有限公司产品; 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (YA1701) 为美国Millipore公司产品; 辣根过氧化物酶标记的二抗IgG (AT0001) 为美国Engibody公司产品。

激光共聚焦显微镜 (型号LSM800) 为德国Carl Zeiss AG公司产品; 脑立体定位仪 (型号51730) 为美国Stoelting公司产品; 颅脑损伤打击器 (型号68099 II)、高架十字迷宫 (型号63010) 和水迷宫 (型号63003) 等行为学设备, 以及冰冻切片机 (型号FS800A/FS800) 均为深圳市瑞沃德生命科技有限公司产品。

1.3 TBI动物模型建立及评价

27只小鼠经适应性饲养1周后, 随机分为空白组、假手术组、TBI模型组, 每组9只。术前所有动物禁食12 h, 但自由饮水。TBI模型组根据文献^[7-8], 采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型: 经异氟烷麻醉后固定小鼠于脑立体定位仪上, 在两耳之间正中做一矢状切口, 暴露前正中线及前囟点, 在前囟后1 mm, 前正中线左侧2 mm, 做直径3 mm的颅骨切除手术, 暴露硬脑膜, 注意在开颅过程中保持硬脑膜完整性; 将颅脑损伤打击器的撞击头 (直径2 mm) 移至该坐标点, 调节并校正打击零界面, 设置打击参数为打击速度5.6 m/s, 深度1.5 mm, 直径2 mm, 打击停留时间1 s, 造成左脑初级视觉皮层损伤; 撞击后及时止血并缝合头皮。假手术组只进行开颅但不撞击。通过脑组织缺损观察和行为学测试评价TBI模型建立效果。

1.4 药物干预及评价

40只小鼠随机分为假手术组、人参皂苷Rg1治疗组 (3个剂量) 和溶剂DMSO对照组, 每组8只小鼠。假手术组只进行开颅但不撞击; Rg1治疗组小鼠在TBI手术后6 h, 腹腔注射剂量分别为10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg的人参皂苷Rg1; 溶剂对照组给予等量的1% DMSO。连续给药1周, 每天2次。观察各组小鼠的饮食情况、体重变化等特征, 记录其肢体运动、角膜反

射、耳廓反射等基本情况。然后通过蛋白质印迹、行为学测试、免疫荧光染色评价药物作用。

1.5 小鼠行为学观察

随机选用手术建模后的每组9只实验小鼠以及用药干预后的每组8只小鼠,进行以下行为学实验。

(1) 神经功能评分:在TBI建模后第1、3、7、14天进行改良的神经损伤严重程度评分(modified neurological severity scores, mNSS)。根据参考文献[9-11]的神经功能评分判定标准:每出现一个异常行为或缺乏测试条件反射,就得1分;评分范围0~18,分数越高,提示损伤越严重;总分为0分表示正常,1~6分表示轻度损伤,7~12分表示中度损伤,13~18分表示严重损伤。

(2) 高架十字迷宫实验:TBI后14 d将小鼠置于高架十字迷宫装置的中心(直径10 cm、臂长45 cm),由Smart 3.0行为学检测系统分别记录5 min内小鼠在开放臂及闭合臂的行动路程及探索时间,以评估焦虑及探索行为。

(3) 水迷宫实验:在神经功能评分及高架十字迷宫实验后,让动物休息2 d。然后,采用海马依赖性行为任务的水迷宫实验来研究小鼠的空间学习和记忆能力。正式实验前所有小鼠自由游泳120 s,用以排除与年龄相关的视觉缺陷和运动能力缺陷。然后进行为期4 d、每天4次、每次60 s的训练,根据随机数字表选择任一象限作为入水点,面向池壁将小鼠放入水中,小鼠在添加非过敏性黑色水粉颜料的圆柱形水池(直径120 cm,高度60 cm)中找到位于水面以下2 cm(24 °C)的水下平台(直径10 cm)。如果在60 s内未找到平台,则将动物引导至平台并停留15 s。使用视频跟踪系统记录小鼠寻找平台所需时间。在第5天进行一次60 s的探测试验:将平台从池中移出,将小鼠从平台所在象限对侧放入水池,记录小鼠在原平台所在象限的停留时间、穿越平台次数及运动路程,以评估各组小鼠的空间学习及运动能力。

1.6 脑损伤观察及脑组织取材

TBI手术后第28天,小鼠经麻醉后开胸,剪开右心耳,同时左心室插管,先灌注生理盐水(即0.9%NaCl溶液)100 mL,然后换用质量分数4%的多聚甲醛溶液灌注250 mL。断头后完整取脑,各组随机取2只小鼠脑组织用于观察组织缺损。

再随机选取各组3只小鼠脑组织,放置于4%多聚甲醛溶液中,4 °C温度下保存至少24 h。然后分别用梯度蔗糖溶液进行脱水,在FS800A/FS800冰冻切片机

上行冠状连续切片,用于免疫荧光染色。切片厚度为20 μm,置于-20 °C保存。

1.7 免疫荧光染色及激光共聚焦观察

将切片在PBS(pH 7.4)中洗涤5 min,用0.2% Triton 20通透10 min,然后进行免疫荧光标记处理。切片在2% BSA中孵育1 h后,加入一抗4 °C孵育过夜(GFAP和Iba-1抗体的工作液稀释比例分别为1:250、1:500)。第2天在PBS中洗涤3次,将切片与相应的二抗(Dylight 594和Cy3荧光标记的二抗工作液稀释比例均为1:500)在室温下避光孵育2 h。切片在PBS中洗涤3次,每次5 min,避光。细胞核用DAPI溶液(10 μg/mL)染色8 min,然后用甘油明胶进行封片。使用激光共聚焦显微镜拍摄照片,并使用Image J软件分析区域内阳性细胞数。

1.8 蛋白质印迹法检测相关蛋白表达

TBI手术后第3天,各组取3只小鼠损伤部位的新鲜脑组织,采用蛋白提取试剂盒提取蛋白质。提取的蛋白质于-70 °C保存备用。用BCA蛋白定量法检测样品蛋白质浓度,取50 μg蛋白质加入2×SDS凝胶加样缓冲液中,将样品经10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(浓缩胶60 V 30 min,分离胶120 V 1 h)分离。分离后的蛋白质在120 V恒压状态下2 h电转移至PVDF膜。PVDF膜在5%脱脂奶粉溶液中,37 °C封闭2 h。分别加入相应的抗MMP-9一抗(工作液稀释比例为1:2 000),与PVDF膜在4 °C培育过夜,与辣根过氧化物酶标记的二抗IgG(工作液稀释比例为1:4 000)于37 °C孵育2 h。采用化学发光底物进行化学发光,暗室曝光,显影定影后用Bio-RAD Quantity One图像分析软件进行扫描分析。

1.9 统计学处理

采用SPSS 22.0和GraphPad Prism 8.4.0软件进行数据统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较使用两因素方差分析,应用LSD-*t*检验进行组内两两比较,以 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

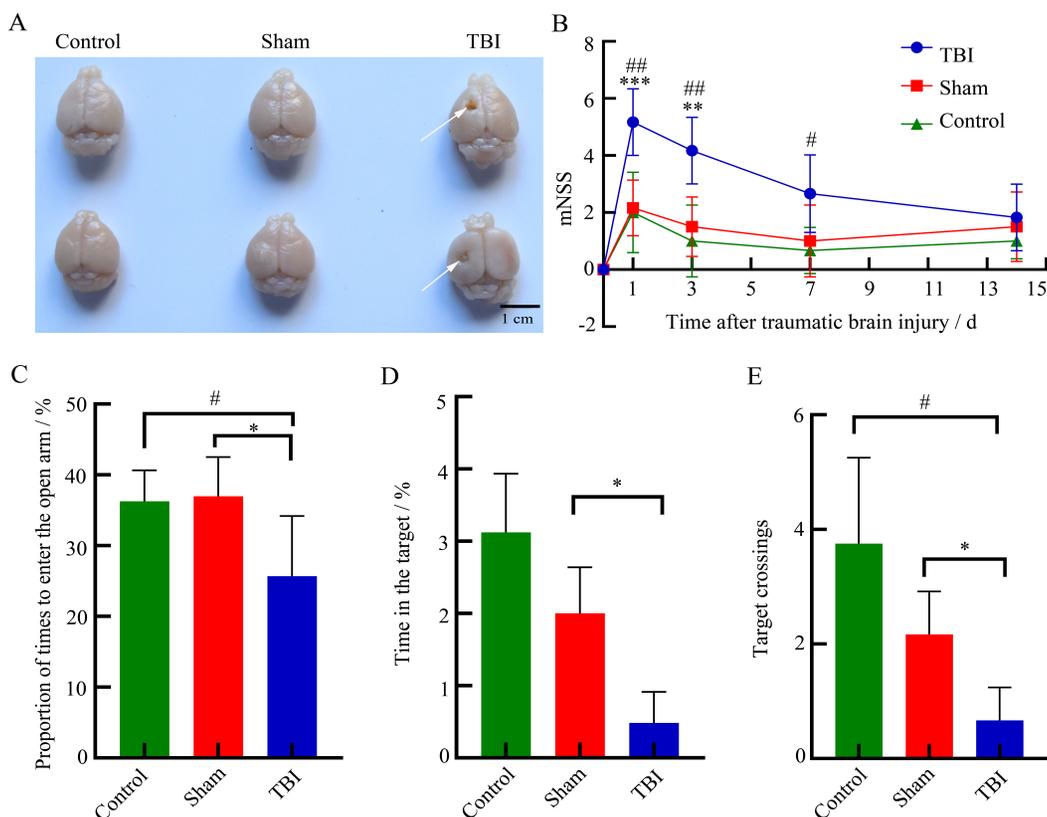
2 结果

2.1 成功建立TBI模型

本实验通过脑组织观察、神经功能评分及高架十字迷宫、水迷宫等行为学实验评价受控皮质冲击手术后小鼠的学习、认知及运动功能以确认TBI模型是否成功建立。脑损伤后灌注取脑观察,可见明显的脑挫伤部位(图1A);TBI模型组小鼠的神经功能评分显著

高于假手术组 ($P < 0.01$, 图1B), 进入开放臂次数比例显著低于假手术组 ($P < 0.05$, 图1C), 水迷宫实验中其在平台所在象限的时间比及穿越平台的次数均显

著少于假手术组 ($P < 0.05$, 图1D~E)。结果表明TBI后小鼠神经功能受损, 出现了学习、认知及运动功能障碍。



注: A, 脑组织损伤情况观察 (白色箭头所指为TBI后脑组织缺损); B, 神经功能评分 (mNSS即改良的神经损伤严重程度评分); C, 高架十字迷宫实验; D~E, 水迷宫实验。Control即不进行任何处理组; Sham即假手术组; TBI即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型组, 每组9只小鼠。与Sham组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与Control组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: A, Observation of brain tissue injury (the white arrow refers to damaged brain region by TBI); B, Neurological function score (mNSS is the improved nerve injury severity score); C, Elevated cross maze experiment; D-E, Water maze experiment. Control is the blank group without any treatment; Sham is the sham operation group; TBI is TBI modeling group by controlled cortical impact method, with 9 mice in each group. Compared with the sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图1 小鼠创伤性脑损伤模型的建立与评估

Figure 1 Establishment and evaluation of traumatic brain injury (TBI) model in mice

2.2 人参皂苷Rg1改善脑损伤后血脑屏障功能

蛋白质印迹法检测各组小鼠脑组织中血脑屏障功能指标MMP-9蛋白的表达情况, 结果显示, 与假手术组相比, TBI模型组MMP-9蛋白水平略升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图2); 而与溶剂DMSO对照组相比, 经过10~40 mg/kg的人参皂苷Rg1治疗后MMP-9蛋白表达量均明显下降 (均 $P < 0.01$, 图2)。结果提示10~40 mg/kg人参皂苷Rg1能够明显改善脑损伤后的血脑屏障功能。

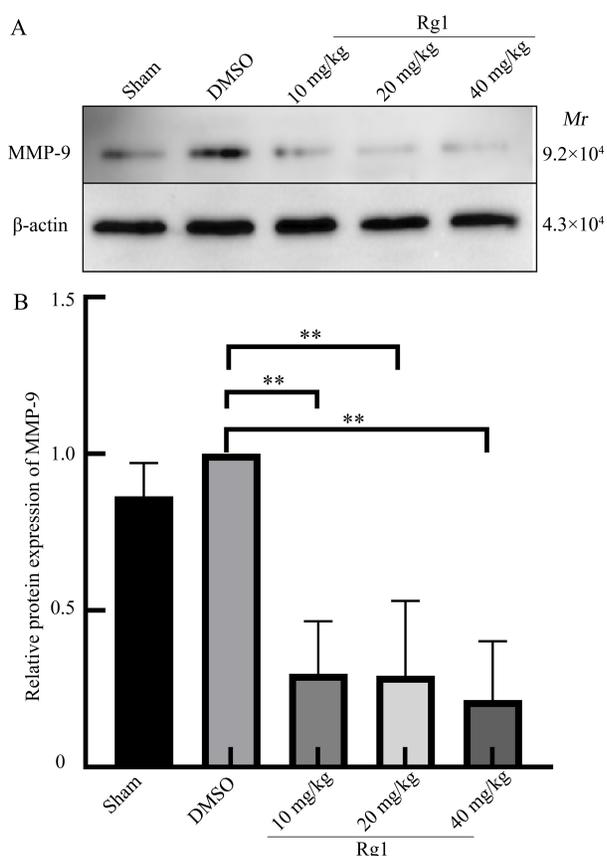
2.3 人参皂苷Rg1改善脑损伤后神经炎症

通过免疫荧光染色检测发现, TBI建模28 d的小鼠

脑组织中小胶质细胞 (Iba-1 阳性标记) 及星形胶质细胞 (GFAP 阳性标记) 在病变区域显著富集, 相应地在假手术组小鼠脑组织中未看到Iba-1和GFAP明显表达; 与溶剂DMSO对照组相比, 经过10~40 mg/kg的人参皂苷Rg1治疗后TBI小鼠脑组织中小胶质细胞及星形胶质细胞活化均显著减少 (均 $P < 0.05$, 图3), 尤以20 mg/kg效果最显著 ($P < 0.01$)。

2.4 人参皂苷Rg1改善脑损伤后小鼠行为学功能

在TBI造模之前, 各组之间的神经功能评分没有差异 (图4A)。TBI造模后第1天、第3天溶剂DMSO对照组小鼠的神经功能评分显著高于假手术组 ($P <$



注: MMP-9, 基质金属蛋白酶-9。Sham 即假手术组; DMSO 即采用受控皮质冲击方法建立小鼠 TBI 模型后的溶剂对照组; 10、20、40 mg/kg Rg1 即采用受控皮质冲击方法建立小鼠 TBI 模型后的 10、20、40 mg/kg 人参皂苷 Rg1 灌胃治疗组, 每组 8 只小鼠。与 DMSO 组相比, ** $P < 0.01$ 。

Note: MMP-9, matrix metalloprotein-9. Sham is the sham operation group; DMSO is the solvent control group after TBI modeling by controlled cortical impact method; 10 mg/kg, 20 mg/kg, and 40 mg/kg Rg1 are 10, 20, 40 mg/kg of ginsenoside Rg1 treatment groups after TBI modeling by controlled cortical impact method, with 8 mice in each group. Compared with DMSO group, ** $P < 0.01$.

图2 人参皂苷 Rg1 对小鼠创伤性脑损伤后血脑屏障的影响
Figure 2 Effect of ginsenoside Rg1 on blood-brain barrier after traumatic brain injury (TBI) in mice

0.01), 表明 TBI 建模后小鼠神经损伤严重。而与溶剂对照组相比, 经过 10~40 mg/kg 的人参皂苷 Rg1 治疗后, 小鼠神经功能评分显著降低 ($P < 0.05$)。从第 7 天到第 14 天, 各剂量人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的神经功能评分与假手术组小鼠相比逐渐没有显著性差异, 表明经过较长时间的 Rg1 治疗 TBI 小鼠的神经功能逐渐恢复 (图 4A)。

高架十字迷宫实验显示, 与假手术组相比, TBI 建模后溶剂 DMSO 对照组小鼠进入开放臂次数比例显著降低 ($P < 0.01$); 而 20~40 mg/kg 的人参皂苷 Rg1 治疗

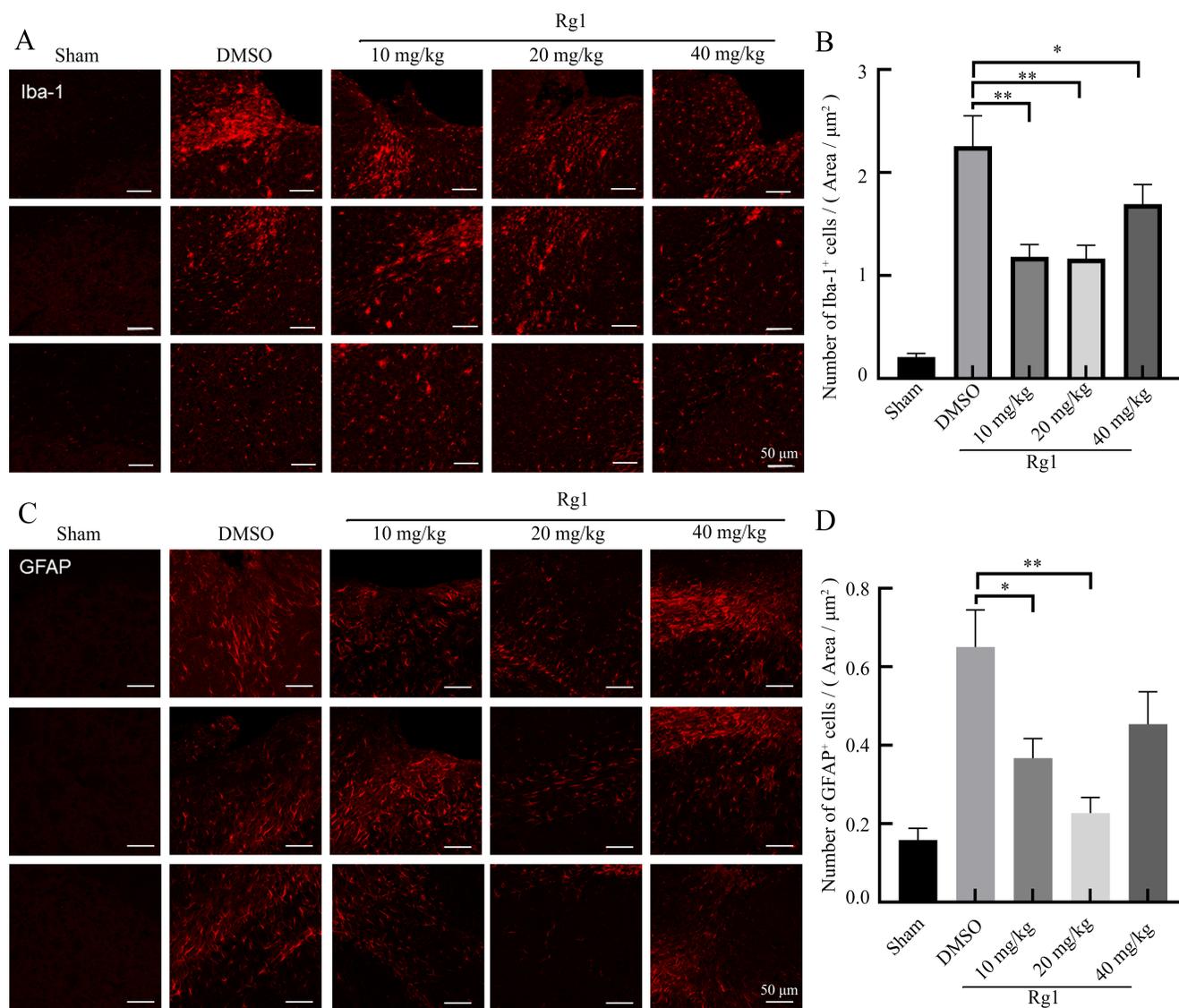
后小鼠进入开放臂次数的比例显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$), 其中 20 mg/kg 组与假手术组小鼠相比已无显著差异 ($P > 0.05$, 图 4B), 提示人参皂苷 Rg1 改善了 TBI 后小鼠的焦虑情绪。

水迷宫实验显示, 在隐藏平台获取阶段, 几乎所有组小鼠都表现为潜伏期逐渐缩短, 表明受试小鼠可以了解平台的位置。但与溶剂 DMSO 对照组相比, 20 mg/kg 人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的逃逸潜伏期明显减少 ($P < 0.05$, 图 4C)。在第 5 天训练试验后 24 h 进行了无平台探测测试, 结果显示 20、40 mg/kg 人参皂苷 Rg1 治疗组小鼠的平台穿越次数显著高于溶剂 DMSO 对照组小鼠 ($P < 0.05$, 图 4D)。实验结果提示人参皂苷 Rg1 治疗显著改善了 TBI 小鼠的空间学习和记忆能力。

3 讨论

TBI 往往以各种形式出现, 继而引起中枢神经系统长期且严重损伤。根据损伤的严重程度不同, 针对 TBI 的治疗方法也大有不同, 同时治疗手段需要不断更新^[12]。从日常认知疗法到根治性手术, 都需要根据具体情况来制定合适的治疗方案, 而中医药作为辅助治疗手段也能发挥明显功效。其中, 人参因其“补五脏、镇静身心”的功效被广泛用于治疗精神障碍^[13]。作为人参主要活性成分之一的人参皂苷 Rg1 具有抗炎、抗氧化、神经保护等多种药理活性, 已被证明在几种神经疾病动物模型中可用作神经保护剂, 改善认知和记忆功能障碍^[14]。在目前的相关研究中, 人参皂苷 Rg1 的应用剂量多为 5~60 mg/kg, 其中 20~40 mg/kg 剂量效果较为显著^[15-18]。因此本实验采用文献 [7-8] 报告的受控皮质冲击方法制备精确模拟 TBI 的小鼠模型, 并通过脑组织缺损观察及相关行为学实验验证 TBI 模型建立成功与否, 然后在 TBI 模型构建成功 6 h 后进行 10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg 人参皂苷 Rg1 干预, 并对人参皂苷 Rg1 的最佳药物作用剂量进行探索。

据报告, 血脑屏障破坏是由脑血管内皮细胞间的紧密连接与完整的血管系统相断开所导致^[19], 且这种破坏进一步引起了正常神经元生理学微环境的恶化。在大脑中, 基质金属蛋白酶对组织形成、神经元网络重塑和血脑屏障完整性至关重要, 目前研究得最明确的是 MMP-2 和 MMP-9^[20]。虽然药代动力学研究表明人参皂苷 Rg1 不能被充分转运穿过血脑屏障^[21], 但在一些研究中仍然发现人参皂苷 Rg1



注：A~B为免疫荧光染色法检测各组小鼠脑组织中Iba-1蛋白表达（反映小胶质细胞活性），及其阳性表达细胞数的统计图；C~D为免疫荧光染色法检测各组小鼠脑组织中GFAP蛋白表达（反映星形胶质细胞活性），及其阳性表达细胞数的统计图。A和C图中，各组上中下3个照片分别表示3只小鼠脑组织中相似层面的3个切片。Sham即假手术组；DMSO即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的溶剂对照组；10、20、40 mg/kg即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的10、20、40 mg/kg人参皂苷Rg1灌胃治疗组，每组8只小鼠。与DMSO组相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Note: A-B show ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1) protein expression (reflecting microglia activity) and the number of Iba-1 positive cells in brain tissues of mice in each group detected by immunofluorescence staining. C-D show glial fibrillary acidic protein (GFAP) expression (reflecting the activity of astrocytes) and the number of GFAP positive cells in the brain tissue of mice in each group detected by immunofluorescence staining. In Figures A and C, the top, middle, and bottom three photos in each group show three slices of similar layers in the brain tissue of three mice. Sham is the sham operation group; DMSO is the solvent control group after TBI modeling by controlled cortical impact method; 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg Rg1 are 10, 20, 40 mg/kg of ginsenoside Rg1 treatment groups after TBI modeling by controlled cortical impact method, with 8 mice in each group. Compared with DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

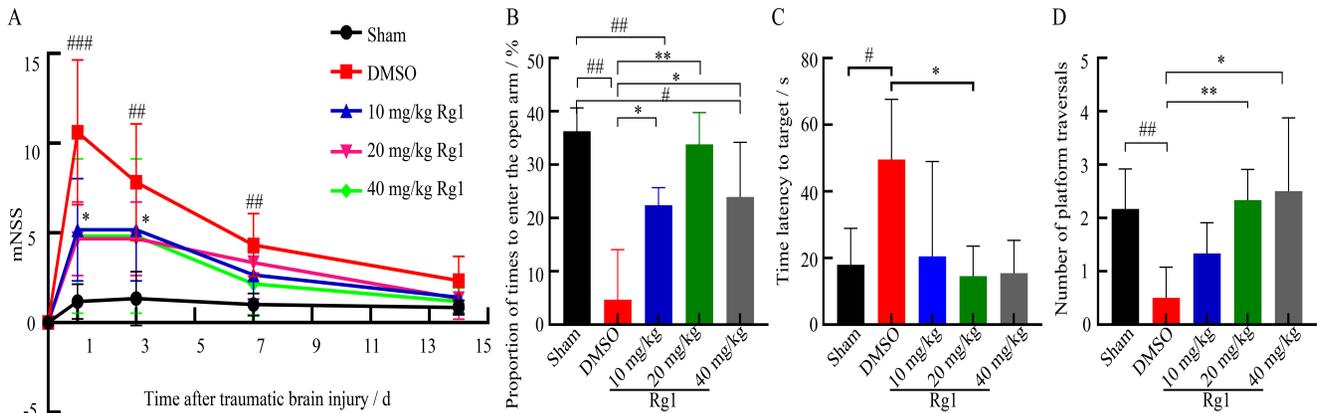
图3 人参皂苷Rg1对小鼠创伤性脑损伤28 d后小胶质细胞及星形胶质细胞的影响

Figure 3 Effect of ginsenoside Rg1 on microglia and astrocytes 28 d after traumatic brain injury (TBI) in mice

可以加速基质金属蛋白酶水解，进而发挥减轻脑血管内皮损伤的作用，保护血脑屏障的完整性，具有良好的治疗TBI的潜力^[18]。本实验中选用MMP-9作为反映血脑屏障变化的标志物，结果显示TBI损伤

后MMP-9表达显著增加，而经过人参皂苷Rg1干预后MMP-9表达又明显减少，证实人参皂苷Rg1具有改善血脑屏障破坏的效能。

神经炎症是TBI后继发性反应的主要病理过程。



注: A, mNSS神经功能评分; B, 高架十字迷宫实验; C~D, 水迷宫实验。Sham即假手术组; DMSO即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的溶剂对照组; 10、20、40 mg/kg即采用受控皮质冲击方法建立小鼠TBI模型后的10、20、40 mg/kg人参皂苷Rg1灌胃治疗组, 每组8只小鼠。与Sham组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与DMSO组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: A, mNSS neurological function score; B, Elevated cross maze experiment; C-D, water maze experiment. Sham is the sham operation group; DMSO is the solvent control group after TBI modeling by controlled cortical impact method; 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg Rg1 are 10, 20, 40 mg/kg of ginsenoside Rg1 treatment groups after TBI modeling by controlled cortical impact method, with 8 mice in each group. Compared with Sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with DMSO group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图4 人参皂苷Rg1对创伤性脑损伤后小鼠行为学功能的影响

Figure 4 Effect of ginsenoside Rg1 on behavioral performance in mice after traumatic brain injury (TBI)

星形胶质细胞和小胶质细胞通常是在TBI之后最先出现的能够反映神经炎症的细胞类型, 可分泌各种细胞因子、趋化因子和生长因子, 并在中枢神经系统损伤后发生形态学变化, 因此这两种细胞的激活都被认为是大脑损伤反应的生物标志^[22-23]。小胶质细胞是中枢神经系统中的固有免疫细胞。在病理条件下, 小胶质细胞是导致脑外伤后炎症反应的最重要的细胞类型之一。脑损伤后小胶质细胞被迅速激活并启动各种炎症级联反应以恢复组织稳态。星形胶质细胞对损伤反应的增加被称为星形胶质细胞增生^[24], 这种反应包括形态学变化、中间丝蛋白、GFAP和波形蛋白的表达增加, 且这种反应性胶质增生在损伤后可维持长达60 d^[25]。本实验通过免疫荧光染色观察到, 在TBI后28 d小鼠大脑损伤区域及附近有大量Iba-1标志的小胶质细胞及GFAP标志的星形胶质细胞富集, 形成胶质瘢痕, 影响神经纤维和神经元再生。经过人参皂苷Rg1治疗后Iba-1、GFAP阳性细胞数量减少, 荧光强度下降, 表明人参皂苷Rg1有助于改善TBI后的局部神经炎症。

学习和记忆障碍等认知缺陷是TBI后最重要的后遗症之一^[26]。神经功能评分、高架十字迷宫、水迷宫实验是评估啮齿类动物神经功能最常用的方法, 因此本实验采用这3种行为学实验分别从初步的神经功能、

焦虑情绪到深层的学习记忆等3个方面评估人参皂苷Rg1的作用。结果发现, 在TBI后第1天和第3天即TBI急性期, 溶剂DMSO对照组小鼠的神经功能评分显著高于假手术组, 从第7天到第14天逐渐与假手术组无明显差异, 表明在TBI急性期内神经功能严重缺损, 而后有自限性恢复的趋势。但是经过人参皂苷Rg1治疗的TBI小鼠的神经功能评分在第1、3天即显著低于溶剂DMSO对照组小鼠, 各剂量组无显著差异。高架十字迷宫实验结果显示溶剂DMSO对照组小鼠焦虑情绪严重、学习探索能力降低, 具体表现为进入开放臂的次数比例显著降低, 人参皂苷Rg1治疗后这种情况显著改善, 且以20 mg/kg剂量组效果最为显著。水迷宫实验结果显示, 各组小鼠在寻找平台的潜伏期均逐渐缩短, 表明实验小鼠可以了解平台的位置; 在训练期结束撤除平台后的探查实验中, 与溶剂DMSO对照组小鼠相比, 人参皂苷Rg1治疗组小鼠的逃逸潜伏期显著较短(各剂量组之间无显著差异), 且人参皂苷Rg1治疗组小鼠的平台穿越次数显著多于溶剂DMSO对照组, 表明人参皂苷Rg1治疗可改善TBI后小鼠的空间记忆能力, 且以20 mg/kg剂量的作用效果最为显著。

综上所述, 人参皂苷Rg1具有明显的神经保护作用, 可显著改善TBI后的血脑屏障破坏、神经炎症等继发性损伤, 可能起到修复神经功能的良好作用。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过空军军医大学科学伦理委员会的审核批准(批号 IACUC-20220830)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All experimental animal protocols in this study were reviewed and approved by the Scientific Ethics Committee of Air Force Medical University (Approval Letter No. IACUC-20220830). All experimental procedures were performed in accordance with the requirements of laws and regulations in China related to experimental animals, including *Animal Management Regulations* (01/03/2017), *Laboratory Animal: Guideline for Ethical Review of Animal Welfare* (GB/T 35892-2018) and so on.

[作者贡献 Author Contribution]

郭文文负责方案策划、动物实验、数据处理、软件处理、初稿写作及修改;

赵亚、王颖花负责方法设计、提供资源和动物实验;
刘可负责文献支持;

葛煦、张延英负责提供资源和方法设计;

汪永锋、师长宏负责有效验证、项目管理、监督指导、提供资源,以及稿件核定。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] LANGLOIS J A, RUTLAND-BROWN W, WALD M M. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview[J]. *J Head Trauma Rehabil*, 2006, 21(5):375-378. DOI: 10.1097/00001199-200609000-00001.
- [2] KATZ D I, BERNICK C, DODICK D W, et al. National institute of neurological disorders and stroke consensus diagnostic criteria for traumatic encephalopathy syndrome[J]. *Neurology*, 2021, 96(18): 848-863. DOI: 10.1212/WNL.0000000000011850.
- [3] SILVERBERG N D, IACCARINO M A, PANENKA W J, et al. Management of concussion and mild traumatic brain injury: a synthesis of practice guidelines[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2020, 101(2):382-393. DOI: 10.1016/j.apmr.2019.10.179.
- [4] GALGANO M, TOSHKKEZI G, QIU X C, et al. Traumatic brain injury: current treatment strategies and future endeavors[J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(7): 1118-1130. DOI: 10.1177/0963689717714102.
- [5] AHMED T, RAZA S H, MARYAM A, et al. Ginsenoside Rb1 as a neuroprotective agent: a review[J]. *Brain Res Bull*, 2016, 125: 30-43. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.04.002.
- [6] GAO J, BAI H J, LI Q, et al. In vitro investigation of the mechanism underlying the effect of ginsenoside on the proliferation and differentiation of neural stem cells subjected to oxygen-glucose deprivation/reperfusion[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(1):353-363. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3253.
- [7] WU Y X, WU H J, ZENG J X, et al. Mild traumatic brain injury induces microvascular injury and accelerates Alzheimer-like pathogenesis in mice[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1):74. DOI: 10.1186/s40478-021-01178-7.
- [8] CUI W X, WU X, FENG D Y, et al. Acrolein induces systemic coagulopathy via autophagy-dependent secretion of von willebrand factor in mice after traumatic brain injury[J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(8):1160-1175. DOI: 10.1007/s12264-021-00681-0.
- [9] CHEN Y F, LI J, MA B T, et al. MSC-derived exosomes promote recovery from traumatic brain injury via microglia/macrophages in rat[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(18):18274-18296. DOI: 10.18632/aging.103692.
- [10] LONG X B, YAO X L, JIANG Q, et al. Astrocyte-derived exosomes enriched with miR-873a-5p inhibit neuroinflammation via microglia phenotype modulation after traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1):89. DOI: 10.1186/s12974-020-01761-0.
- [11] ZHANG Y L, ZHANG Y, CHOPP M, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve functional recovery in rats after traumatic brain injury: a dose-response and therapeutic window study[J]. *Neurorehabil Neural Repair*, 2020, 34(7):616-626. DOI: 10.1177/1545968320926164.
- [12] ARAKI T, YOKOTA H, MORITA A. Pediatric traumatic brain injury: characteristic features, diagnosis, and management[J]. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2017, 57(2):82-93. DOI: 10.2176/nmc.ra.2016-0191.
- [13] 雷助明. 人参皂苷 Rg1 对新生鼠缺氧缺血性脑损伤海马神经元凋亡及学习记忆能力的影响[J]. *中国中西医结合儿科学*, 2018, 10(4): 277-279. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3865.2018.04.001.
- LEI X M. Effects of ginseng Rg1 on hippocampal neuronal apoptosis and learning ability of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage[J]. *Chin Pediatr Integr Tradit West Med*, 2018, 10(4): 277-279. DOI: 10.3969/j.issn.1674-3865.2018.04.001.
- [14] SONG X Y, HU J F, CHU S F, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates okadaic acid induced spatial memory impairment by the GSK3 β /tau signaling pathway and the A β formation prevention in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 710(1-3): 29-38. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.051.
- [15] ZOU S F, CHEN W, DING H, et al. Involvement of autophagy in the protective effects of ginsenoside Rb1 in a rat model of traumatic brain injury[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2022, 47(6):869-877. DOI: 10.1007/s13318-022-00799-0.
- [16] ZHANG Z R, SONG Z J, SHEN F M, et al. Ginsenoside Rg1 prevents PTSD-like behaviors in mice through promoting synaptic proteins, reducing Kir4.1 and TNF- α in the Hippocampus[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(4): 1550-1563. DOI: 10.1007/s12035-020-02213-9.
- [17] HU B Y, LIU X J, QIANG R, et al. Treatment with ginseng total saponins improves the neurorestoration of rat after traumatic brain injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(2):1243-1255. DOI: 10.1016/j.jep.2014.07.009.
- [18] ZHAI K F, DUAN H, WANG W, et al. Ginsenoside Rg1

- ameliorates blood-brain barrier disruption and traumatic brain injury via attenuating macrophages derived exosomes miR-21 release[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3493-3507. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.03.032.
- [19] DHANDA S, SANDHIR R. Blood-brain barrier permeability is exacerbated in experimental model of hepatic encephalopathy via MMP-9 activation and downregulation of tight junction proteins[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 3642-3659. DOI: 10.1007/s12035-017-0521-7.
- [20] REMPE R G, HARTZ A M S, BAUER B. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: versatile breakers and makers[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, 36(9):1481-1507. DOI: 10.1177/0271678X16655551.
- [21] LI Y H, MENG Q, YANG M B, et al. Current trends in drug metabolism and pharmacokinetics[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(6):1113-1144. DOI: 10.1016/j.apsb.2019.10.001.
- [22] XIONG Y, MAHMOOD A, CHOPP M. Animal models of traumatic brain injury[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(2): 128-142. DOI: 10.1038/nrn3407.
- [23] KARVE I P, TAYLOR J M, CRACK P J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(4):692-702. DOI: 10.1111/bph.13125.
- [24] SOFRONIEW M V, VINTERS H V. Astrocytes: biology and pathology[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(1):7-35. DOI: 10.1007/s00401-009-0619-8.
- [25] VILLAPOL S, BYRNES K R, SYMES A J. Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury[J]. *Front Neurol*, 2014, 5:82. DOI: 10.3389/fneur.2014.00082.
- [26] KOLIATSOS V E, RAO V. The behavioral neuroscience of traumatic brain injury[J]. *Psychiatr Clin North Am*, 2020, 43(2): 305-330. DOI: 10.1016/j.psc.2020.02.009.

(收稿日期:2022-12-06 修回日期:2023-04-13)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,郭家欣)

[引用本文]

郭文文, 赵亚, 王颖花, 等. 人参皂苷 Rg1 在小鼠创伤性脑损伤修复中的作用[J]. *实验动物与比较医学*, 2023, 43(3): 243-252. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.187.

GUO W Q, ZHAO Y, WANG Y H, et al. Repairing effects of ginsenoside Rg1 on traumatic brain injury in mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2023, 43(3): 243-252. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.187.

《实验动物与比较医学》有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物科学与比较医学领域的一本专业学术期刊, 严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准, 包括但不限于《实验动物管理条例》(2017年3月1日修订版)和《实验动物福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等, 同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识(如ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010等)。因此, 本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下:

1. 涉及动物实验的来稿, 需提供实验动物生产许可证和质量合格证, 以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配, 并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿, 需在考虑3R(替代、减少和优化)原则的基础上设计动物实验, 并提供作者单位实验动物福利伦理委员会(或相关机构)出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合, 并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药, 尤其是麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂, 特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂(如三溴乙醇、水合氯醛等)的相关性状及对实验动物的影响, 从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性, 而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择, 因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用, 请提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究, 本刊参考国内及国际通用准则, 建议单个肿瘤体直径不超过20 mm(小鼠)或40 mm(大鼠)且不出出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章有超出上述标准的研究内容, 需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件, 以及从科学角度判断肿瘤体积合理性的依据材料。

《实验动物与比较医学》编辑部