

人参皂苷 Rb1 抑制利多卡因 诱导小鼠原代脊髓神经干细胞损伤研究

杨常青^{1,2} 韩芳芳² 袁菲³ 徐松涛² 陈旭东²

摘要 目的 探讨人参皂苷 Rb1 对利多卡因引起的神经干细胞损伤的影响及作用机制。方法 使用抗 Nestin 抗体、抗 CD133 抗体对原代神经细胞进行标记,采用流式细胞仪根据分步分选出神经干细胞,并利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 及免疫荧光染色法检验其干细胞特性。分别利用含有利多卡因或人参皂苷 Rb1 的培养液培养分离出的神经干细胞,使用 RT-qPCR 和 Western blot 检测利多卡因或 Rb1 对神经干细胞 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路分子及细胞凋亡相关分子表达的影响。利用利多卡因和 Rb1 共培养神经干细胞,并检验 Rb1 对利多卡因诱导的神经干细胞凋亡的影响。结果 通过两步筛选,获得了较高纯度的脊髓神经干细胞。该干细胞表达神经干细胞的标记基因 SOX2,并能够向相关神经细胞分化。利多卡因能够激活 JNK 信号通路并诱导神经干细胞的凋亡,而人参皂苷 Rb1 能够抑制 JNK 信号通路的激活并能够部分回复利多卡因处理诱导的神经干细胞凋亡。结论 人参皂苷 Rb1 能够抑制利多卡因处理激活的 JNK 信号通路并回复由利多卡因处理引起的脊髓神经干细胞凋亡。

关键词 利多卡因; 神经干细胞; 凋亡; 人参皂苷 Rb1

中图分类号 R 285

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)09-1332-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.09.004

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)对于受损的脑组织及脊髓修复非常重要^[1],但是局麻药可降低神经干细胞数量,从而影响神经系统功能^[2]。人参皂苷 Rb1 是人参的主要药理活性成分,在神经纤维形成和神经干细胞的增殖过程中起关键作用^[3],可下调炎症因子的表达来降低炎症损伤^[4],也可促

进小鼠局灶性脑梗死小鼠的后期运动恢复^[5]。c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun-terminal kinases, JNK)属于丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族,对其通路进行抑制可缓解神经干细胞凋亡。人参皂苷 Rb1 不仅抑制 JNK 信号通路,还可通过此途径调控促炎症因子表达^[6-7],但尚不清楚人参皂苷 Rb1 可否通过 JNK 通路影响神经干细胞。该文拟研究人参皂苷 Rb1 对于利多卡因诱导的小鼠原代脊髓神经干细胞凋亡的影响,并探讨 JNK 通路在这一过程中与 Rb1 之间的关系,以期降低局麻药对神经组织损伤提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 PE 标记抗鼠源 Nestin 抗体购自美国 R&D 公司; APC 标记抗鼠 CD133 抗体购自美国 Bionlegend 公司; SOX2 和 MAP2 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司; JNK 和 P-JNK 抗体购自英国 Abcam 公司; Caspase3 (P17) 购自武汉博士德生物有限公司; 人参皂苷 Rb1 购自美国 MedChemExpress 公司; 利多卡因购自北京四环科宝制药有限公司。

1.2 流式细胞分选 将分离的原代神经细胞用 PBS 清洗 1 遍,流式染色固定液清洗细胞 1 遍,将带荧光标记的 Nestin 抗体溶解在固定液中孵育原代细胞 30 min 后流式分选出荧光强阳性的细胞, PBS 清洗 1 遍后接至细胞培养皿中培养。待细胞贴壁并生长至状态良好,消化细胞成单细胞状态, PBS 清洗 1 遍,将荧光标记的 CD133 表面抗体加入细胞 37 °C 孵育 30 min 后上流式再次分选,将获得的 CD133 阳性细胞转入细胞培养皿备用。

1.3 免疫染色 普通培养基培养神经细胞,自由分化 1 周,弃去培养液后用 PBS 清洗 1 遍,然后用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min,分别用 0.2% Triton X-100 溶液透膜 15 min, 1% BSA 封闭 30 min,加入相应的一抗(抗 SOX2、抗 MAP2)孵育过夜,合适的荧光标记二抗 37 °C 孵育 1 h, Hoechst33342 染核 5 min,各步之间用 PBS 清洗 3 遍,每遍 5 min。

1.4 Western blot 检测细胞凋亡 将待检测的神

2020-03-20 接收

基金项目: 河南省科技计划项目(编号: 152300410177); 漯河市科技创新项目(编号: 20181000008)

作者单位: ¹漯河医学高等专科学校第三附属医院康复中心, 漯河 462000

²漯河医学高等专科学校, 漯河 462002

³漯河市中医院, 漯河 462000

作者简介: 杨常青,男,主任医师;

韩芳芳,女,中级康复师,责任作者, E-mail: fangfhan@163.com

经干细胞弃去培养液,用 PBS 清洗一遍;将培养皿置于冰上,加入含蛋白酶抑制剂 PSMF 的 RIPA 蛋白裂解液,裂解液浸润细胞即可;在冰上裂解存放 15 min,期间晃动培养皿 3 次,使裂解液充分接触细胞;加入蛋白上样缓冲液,用移液器吹打掉细胞并将蛋白溶液转移至 EP 管中,煮沸 5 min 备用。利用 10% SDS-PAGE 胶对提取的蛋白进行分离,并将分离开的蛋白转移至 PVDF 膜上。将膜与对应的一抗,包括抗 JNK (1 : 1 000)、抗 P-JNK (1 : 1 000)、抗 Caspase 3 (1 : 1 000)、抗 Cleaved-caspase3 (1 : 1 000)、抗 β -actin (1 : 2 000) 进行孵育,孵育条件为 4 °C 过夜。待使用 1 × TBST 清洗膜 3 遍后,加入对应的二抗 (1 : 3 000) 进行孵育,条件为室温 1 h。再次使用 1 × TBST 清洗膜 3 次后,使用增强化学发光法进行蛋白条带检测。

1.5 相对定量检测 将细胞培养液弃去,用 PBS 清洗 1 遍,加入 TRIzol,用异丙醇沉淀法提取 RNA,用 oligo(dT) 作为下游引物反转录获得 cDNA,用相应的引物做定量 PCR,以 β -actin 为内参。引物由上海生工生物技术有限公司合成,序列如下表 1 所示。

表 1 各基因 RT-qPCR 序列一览表

| 基因名称 | 引物序列(5'-3') |
|----------------|--|
| GFAP | F: GGAAGTTCGAGAACTCCGGG R: GCCACTGCCTCGTATTGAGT |
| CD11c | F: TTCCTGATTGATGGCTCGGG R: GGAGAACCGTGTGCTAGGTC |
| NeuN | F: ACCATCCTAGAGGGACGGAA R: ATTGGCATATGGGTCCCAGG |
| SOX2 | F: GACCTACATGAACGGCTCGC R: GGAGCCCAGCGCCATACC |
| Nestin | F: CTGCTCTCAGCCCAACATCC R: ACACCACTAGAACTGGGCAC |
| CD133 | F: TGGTGGCTGCTTCTTTTGT R: CATGGCGCATTCTGCTTCTG |
| β -actin | F: CTGGTCTACCACAGGCATT R: AAAAGAGCCTCAGGGCATCG |

1.6 统计学处理 统计性数据均来自 3 次独立实验,灰度值用 Image J 软件统计,凋亡数据统计时采用等比例换算后用 Graphpad Prism5 统计软件进行统计学分析。采用两独立样本 *t* 检验以及单因素方差分析(One-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠原代脊髓神经干细胞分离 使用荧光抗

体 anti-Nestin-PE 标记消化分离得到的小鼠第一代神经细胞,经流式细胞仪第一次分选后得到强荧光的细胞群(II)(图 1A)。将这群细胞置于神经干细胞培养液中继续培养一代,用 anti-CD133-APC 荧光抗体标记,并进行第二次分选,最终得到 CD133 阳性的 IV 亚群细胞(图 1B),即为初步分离的原代神经干细胞。将分离过程中的第 II、IV 亚群细胞和原代总细胞进行鉴定。相对定量检测结果显示,神经干细胞标记基因 Nestin 在分选后的细胞中在第一次分选得到的 II 亚群细胞中表达量高于对照组($t = 16.56, P < 0.001$)。在用 CD133 再次分选后的第 IV 亚群细胞的 Nestin 表达量也高于对照组细胞($t = 15.23, P < 0.001$),见图 1C。另外一个神经干细胞标记基因 CD133 仅在用 CD133 进行第二次筛选后的第 IV 亚群细胞表达量增高($t = 4.497, P < 0.05$),见图 1D。图 1E 中,神经干细胞 SOX2 基因在用 Nestin 分选得到的第 II、IV 亚群细胞中均表现出较高的表达($t = 4.105, P < 0.05; t = 27.86, P < 0.001$)。如图 1F~H 所示,星形胶质细胞,少突胶质细胞和神经元标记基因 GFAP($t = 5.609, P < 0.01; t = 10.62, P < 0.001$)和 NeuN($t = 12.05, P < 0.001; t = 11.19, P < 0.001$)的表达在两次分选得到的细胞中均表现出减少的趋势,CD11c($t = 1.927, P > 0.05; t = 3.011, P < 0.05$)在第二次分选后表达量降低。以上结果显示,这种两步法分离的原代神经干细胞能够表达神经干细胞的一般标记基因,且非干细胞标记基因的表达量较低。

2.2 神经干细胞分化鉴定 为了检验分离到的神经干细胞是否有分化为其它神经细胞的能力,将神经干细胞放在普通的培养基中培养约 7 d,然后进行 102 行免疫荧光染色鉴定。荧光染色结果显示,可清晰的检测到神经干细胞的标志蛋白 SOX2;标记神经元的 MAP2 蛋白能够在少部分细胞中检测到,表明有少部分神经干细胞向神经元分化(图 2A)。此时对这些分化的细胞进行相对定量检测神经干细胞标记基因 Nestin、CD133 和 SOX2 的表达量($t = 5.674, P < 0.01; t = 3.537, P < 0.05; t = 3.644, P < 0.05$)。定量结果显示,在分化后这些基因的表达水平不同程度的降低(图 2B、C、D)。如图 2E~G 所示,指示神经干细胞分化的基因 GFAP、CD11c 和 NeuN($t = 7.033, P < 0.01; t = 9.479, P < 0.001; t = 9.110, P < 0.001$)的 mRNA 丰度表现出不同水平的提高。以上结果提示,该神经干细胞能够向相关神

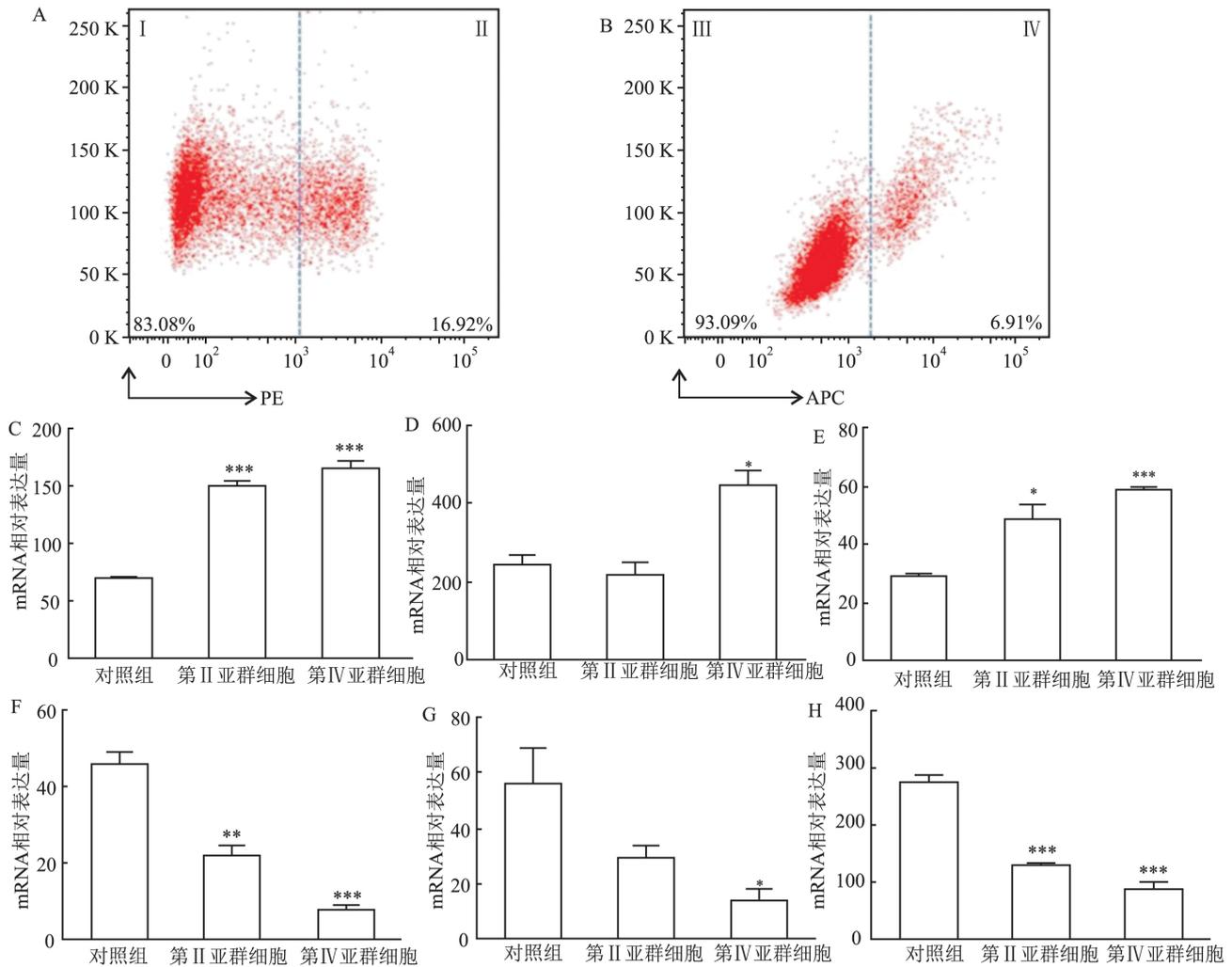


图1 小鼠原代脊髓神经干细胞分离鉴定

A: 利用 Nestin 分子标记对神经干细胞进行流式分选; B: 利用 CD133 分子标记对神经干细胞进行二次流式分选; C ~ H: 利用 qRT-PCR 对对照组细胞及分选后的第 II、IV 亚群细胞中 Nestin、CD133、SOX2、GFAP、CD11c、NeuN 分子 mRNA 水平进行检测; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

经细胞分化。

2.3 利多卡因激活 JNK 信号通路诱导神经干细胞损伤 用含 500 $\mu\text{mol/L}$ 利多卡因的培养液培养神经干细胞 24 h 后 相对定量检测神经干细胞的凋亡相关标记基因的变化。结果显示 JNK 信号通路激活的 c-Jun ($t = 13.74, P < 0.01$) 和 ATF2 表达量相对提高 ($t = 15.26, P < 0.01$) ,促进凋亡的 FasL 表达量较对照组提高 ($t = 12.87, P < 0.01$) ,而抑制凋亡的 Bcl2 表达量相对降低 ($t = 24.67, P < 0.01$) ,见图 3A。此外,相对定量检测发现干细胞标记基因 SOX2 表达相对降低 ($t = 7.566, P < 0.01$) ,而神经元标记基因 NeuN 的表达量没有变化 ($t = 0.062, P > 0.05$) ,见图 3B。Western blot 检测用利多卡因处理 24 h 后的神经干细胞,结果显示,磷酸化的 JNK

蛋白含量相对增加 ($t = 17.57, P < 0.01$) ,提示凋亡的 Cleaved-caspase3 含量相对增加 ($t = 9.978, P < 0.01$) ,见图 3C。

2.4 人参皂苷抑制神经干细胞 JNK 信号通路激活

配制含 100 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷干细胞培养液,用该培养液培养神经干细胞 48 h 相对定量检测凋亡相关基因的变化。图 4A 的结果显示 JNK 信号通路激活相关的基因 c-Jun、ATF2 以及促进凋亡相关的 FasL 的 mRNA 丰度降低,而抑制凋亡的基因 Bcl2 表达量提高。 ($t = 3.371, P < 0.05$; $t = 14.22, P < 0.001$)。此外 相对定量结果显示人参皂苷能够提高神经干细胞标记基因 SOX2 的表达,并抑制神经元基因 NeuN 的表达 ($t = 5.183, P < 0.01$; $t = 3.267, P < 0.05$) ,见图 4B。图 4C 中,Western blot 结果

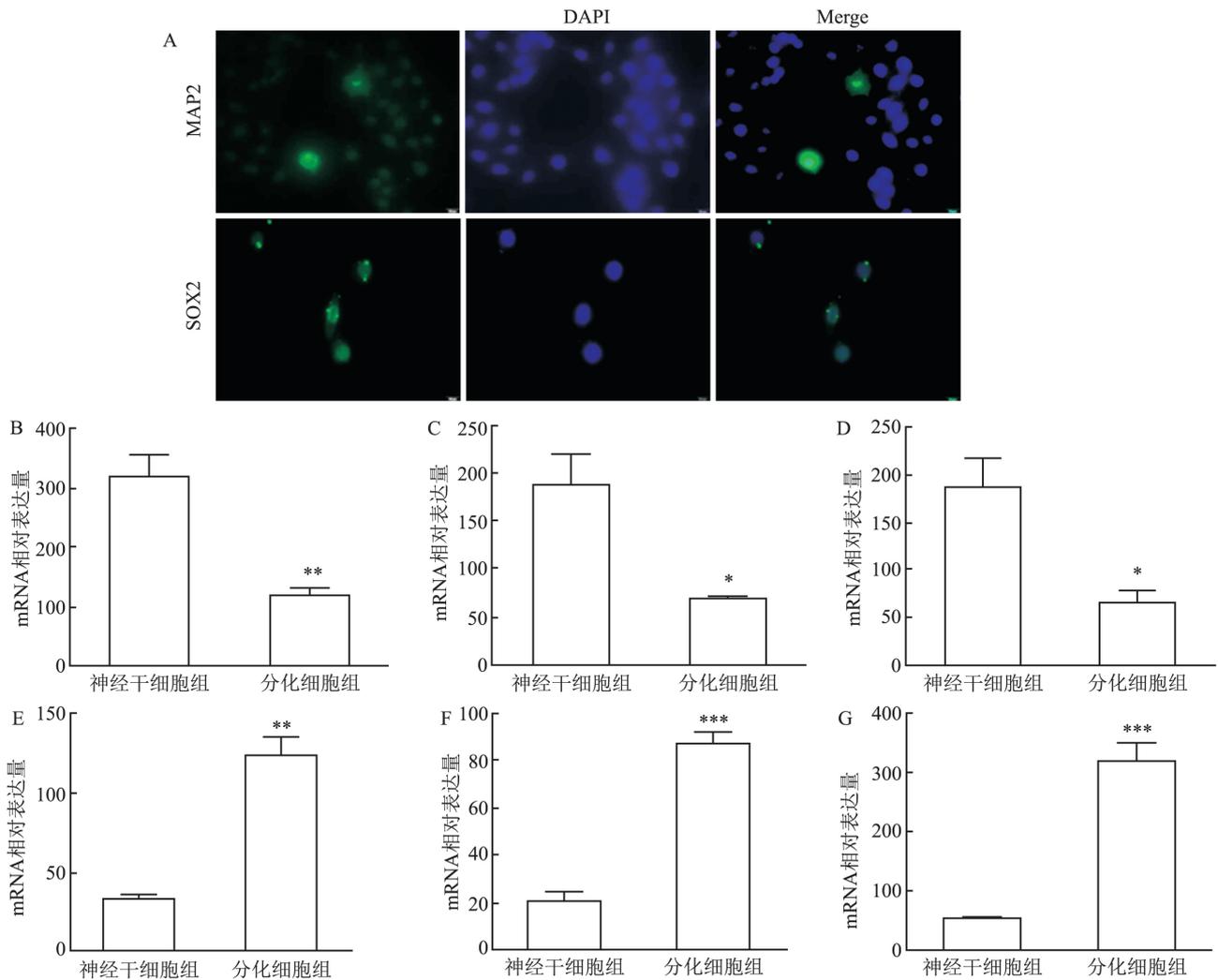


图2 小鼠原代神经干细胞分化能力检测 ×400

A: 免疫荧光检测 MAP2 和 SOX2 的表达; B ~ G: 利用 qRT-PCR 对神经干细胞及分化细胞的细胞内源性 Nestin、CD133、SOX2、GFAP、CD11c、NeuN 分子 mRNA 表达量进行检测; 与神经干细胞组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

显示,人参皂苷加入后能够减少 P-JNK 蛋白含量($t = 2.935$, $P < 0.05$),提示凋亡的 Cleaved-caspase3 表达量也减少($t = 3.651$, $P < 0.05$)。

2.5 人参皂苷抑制利多卡因诱导的神经干细胞损伤 为了验证人参皂苷能否减轻利多卡因造成的损伤,在培养的神经干细胞中同时添加利多卡因和人参皂苷进行处理。相对定量结果显示,在 500 $\mu\text{mol/L}$ 利多卡因和 50 $\mu\text{mol/L}$ 人参皂苷 Rb1 共处理的细胞中,仅 FasL 的表达量有所降低, c-Jun、ATF2 和 Bcl2 的 mRNA 丰度无变化($t = 4.977$, $P < 0.01$; $t = 0.1348$, $P > 0.05$; $t = 1.144$, $P > 0.05$; $t = 14.22$, $P > 0.05$),见图 5A。图 5B 中,神经干细胞标记基因 SOX2 的表达量变化不大($t = 0.467$, $P > 0.05$),而神经元标记基因 NeuN 的表达丰度则在处理后降低($t = 6.964$, $P < 0.01$)。此外,在验证人参

皂苷能否抵消利多卡因的损伤实验中,将人参皂苷分成 3 个浓度梯度(10、50、100 $\mu\text{mol/L}$),结果显示人参皂苷加入后能够抑制 JNK 磷酸化的变化($t = 3.820$, $P < 0.05$; $t = 8.542$, $P < 0.05$; $t = 13.25$, $P < 0.01$),也能减少凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase3 的表达量($t = 2.286$, $P > 0.05$; $t = 4.202$, $P < 0.05$; $t = 17.407$, $P < 0.01$)。图 5C 为三次结果的灰度值。

3 讨论

局部麻醉药品对神经系统及神经干细胞有一定损伤,但是目前仍不清楚其具体的机制。许多中药也被证明能够修复神经损伤,例如参附注射液能够部分保护布比卡因对神经组织的损伤^[8]。白藜芦醇也能够修复局麻药罗哌卡因的部分神经毒性^[9]。但是目前临床上仍然不能完全避免局麻药对神经组

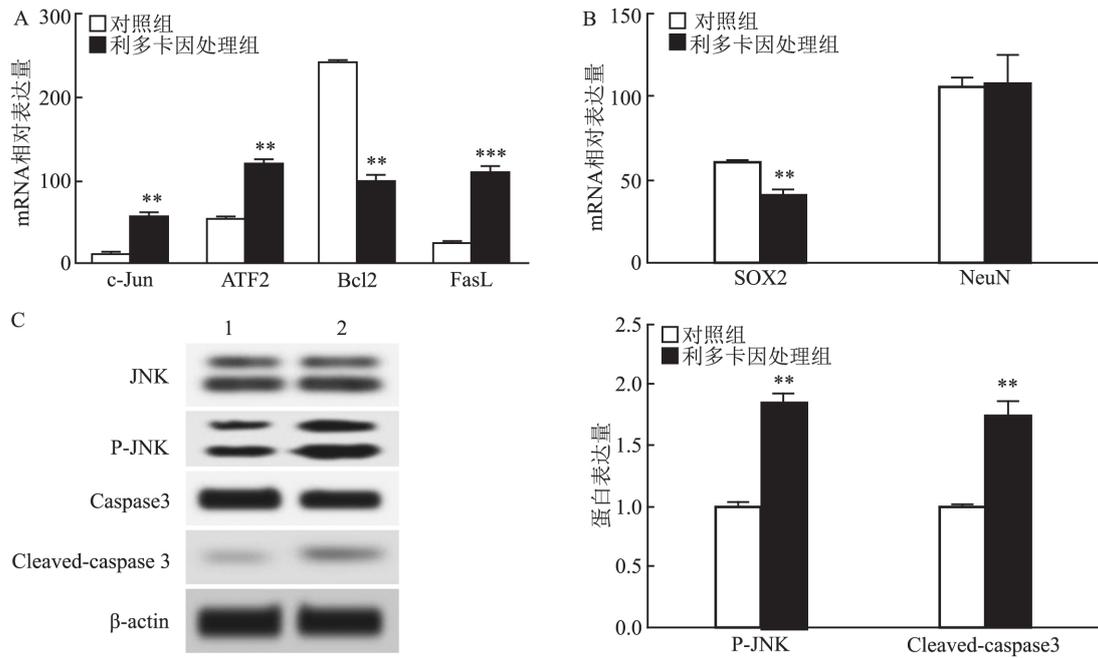


图3 利多卡因对神经干细胞的影响

A: 神经干细胞细胞凋亡相关基因 mRNA 水平检测; B: 神经干细胞标志物 SOX2 和 NeuN mRNA 水平检测; C: JNK、P-JNK、Caspase 3、Cleaved-caspase 3 蛋白表达水平检测; 1: 对照组; 2: 利多卡因处理组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

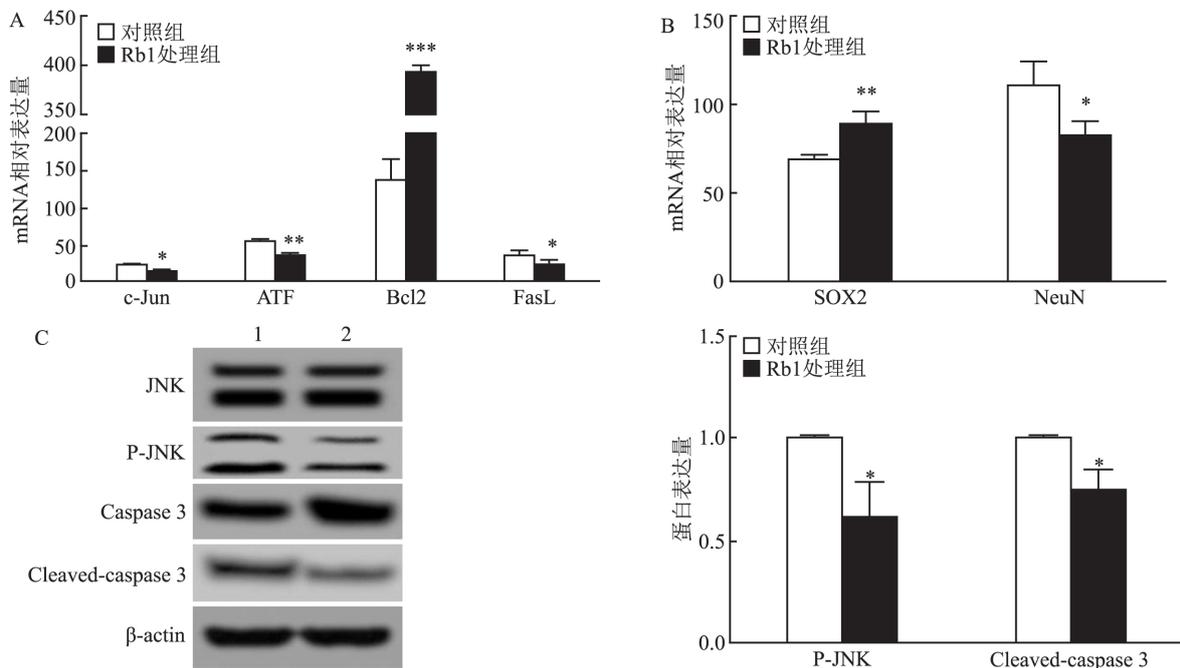


图4 人参皂苷 Rb1 对神经干细胞的影响

A: 神经干细胞细胞凋亡相关基因 mRNA 水平检测; B: 神经干细胞标志物 SOX2 和 NeuN mRNA 水平检测; C: JNK、P-JNK、Caspase 3、Cleaved-caspase 3 蛋白表达水平检测; 1: 对照组; 2: Rb1 处理组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

织的损伤作用,需要探索新的方案及药物去减轻局麻药的相关副作用。人参是我国的传统药用植物,其主要药理活性成分为人参皂苷。人参皂苷化合物有 40 种,具有抗氧化、缓解心血管病变、减缓肿瘤发

展、改善脑部缺血、调节炎症反应等功能^[10]。原人参二醇代表成分人参皂苷 Rb1 已被证明在神经系统中发挥重要作用,例如促进神经干细胞增殖^[4]。但是,目前尚不清楚人参皂苷 Rb1 是否可抑制局部

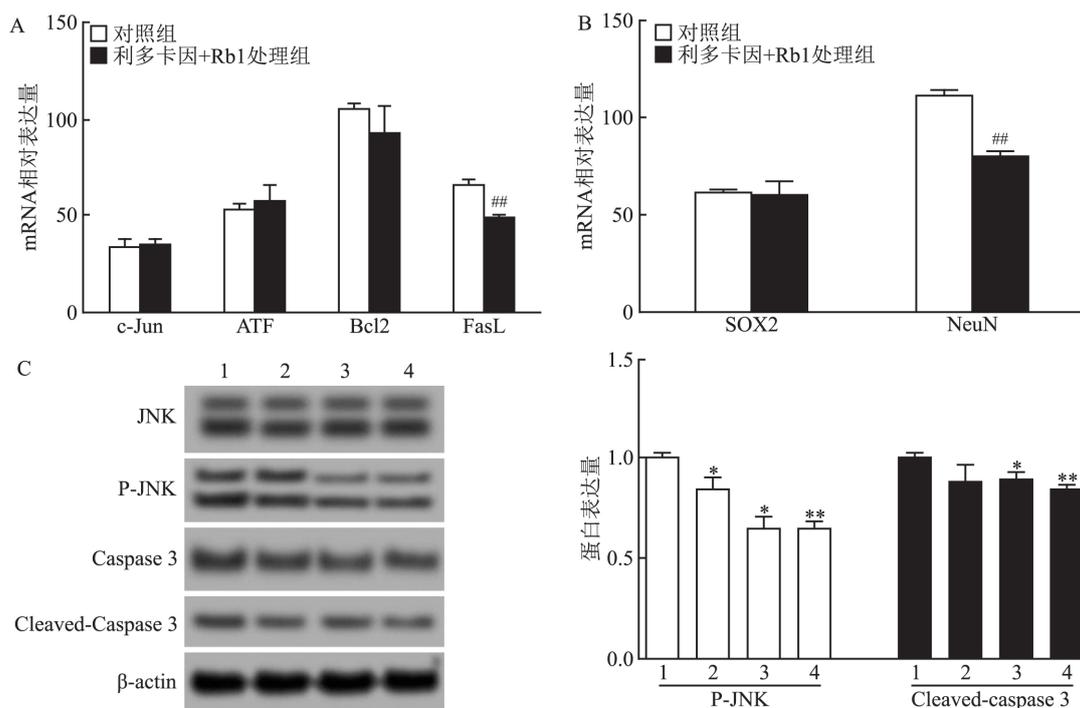


图5 人参皂苷 Rb1 对利多卡因诱导的神经干细胞损伤修复作用检测

A: Rb1 和利多卡因共处理后神经干细胞细胞凋亡相关基因 mRNA 水平检测; B: Rb1 和利多卡因共处理后神经干细胞标志物 SOX2 和 NeuN mRNA 水平检测; C: Rb1 和利多卡因共处理后 JNK、P-JNK、Caspase3、Cleaved-caspase3 蛋白表达检测; 1: 利多卡因单处理组; 2: 利多卡因 + 10 μmol/L Rb1 处理组; 3: 利多卡因 + 50 μmol/L Rb1 处理组; 4: 利多卡因 + 100 μmol/L Rb1 处理组; 与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与利多卡因单处理组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

麻醉药物造成的神经干细胞损伤。

为了探究这一问题,本研究首先需要分离脊髓神经干细胞。本文在分离脊髓源神经干细胞的过程中使用了 Nestin 和 CD133 流式抗体。Nestin 是神经干细胞的标记^[11],其抗体特异性识别神经组织中的某些细胞^[12]。本实验中分离原代神经干细胞时采用 Nestin 作为分选标记,在第一步分离后所得到的分离细胞在细胞亚群上区分不明显,这可能是原代细胞比较杂乱造成的。而在用经典的神经干细胞标记 CD133 做第二次分选时,得到了将近 7% 的阳性细胞,且这些二次分选的细胞高度表达神经干细胞标志基因 SOX2^[13-14],神经细胞分化的相关标记基因则呈现低表达状态,说明细胞保持了很好的干细胞状态。文中采用 MAP2 作为阳性细胞标志进行检测,并辅助以 GFAP、CD11c 和 NeuN 的 mRNA 表达量作为分化的标志来判断分选出的脊髓神经干细胞的分化能力。通过对比分化前后的标志物表达量趋势变化以及免疫荧光检测的结果来综合判断细胞的分化能力。文中的结果提示用 Nestin 和 CD133 两个标记分两步分选脊髓来源神经干细胞,以及通过上述标志物分子鉴定细胞分化能力是可行的,该方法能够较为有效地分离到较高纯度的脊髓神经干细

胞,对以后的分离和鉴定手段提供了一定的参考价值。

利多卡因是一种较常用的局麻药,本实验中通过利多卡因刺激神经干细胞,结果表明利多卡因能够激活神经干细胞的 JNK 信号通路。JNK 信号参与调控细胞凋亡,其通路下游被激活的 c-Jun 等分子可进一步激活凋亡相关基因。JNK 还可以通过经典的线粒体凋亡途径促进 Bcl 家族成员参与凋亡调控。文中,利多卡因不仅激活了 JNK 通路,还促进了神经干细胞的凋亡,因此结合 JNK 通路的特性,推测利多卡因可通过 JNK 通路影响神经干细胞的生长。而对 JNK 通路信号进行阻断或抑制则有可能回复利多卡因对神经干细胞的影响。

之前的研究显示人参皂苷 Rb1 可降低 JNK 通路中 JNK1 和 c-Jun 的表达,提示人参皂苷 Rb1 可作为 JNK 通路潜在的抑制剂^[7-8]。本实验结果也显示 Rb1 处理可降低 JNK 信号通路激活相关的基因 c-Jun、ATF2 的表达量。而 mRNA 及蛋白水平的凋亡分子检测表明加入 Rb1 可抑制所分离的神经干细胞的凋亡。该结果证明人参皂苷 Rb1 在神经干细胞中可以抑制 JNK 通路的激活,从而抑制神经干细胞的凋亡。而 SOX2 的表达量则说明 Rb1 并不会

影响神经干细胞状态的维持,表明了 Rb1 作用的特异性。文中进一步探讨人参皂苷 Rb1 能否通过抑制 JNK 通路修复利多卡因对神经干细胞的损伤作用。本文研究显示人参皂苷不仅降低了利多卡因诱导的 JNK 信号通路激活,还抑制了凋亡相关基因 Caspase3 的活化,即抑制了神经干细胞的凋亡。

参考文献

- [1] Zhao X, Moore D L. Neural stem cells: developmental mechanisms and disease modeling [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 371(1): 1-6.
- [2] Aguilar J L, Peláez R. Transient neurological syndrome: does it really exist [J]. *Curr Opin Anesthesiol*, 2004, 17(5): 423-6.
- [3] 郑玉芹,姜正林,徐美玉. 人参皂苷 Rb1 对体外培养胎鼠神经干细胞增殖及分化的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2014, 30(3): 273-9.
- [4] 张 苏. 人参皂苷 Rb1 对 LPS 引起全身炎症反应综合征及肾损伤影响的研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2017.
- [5] 高 璇. 人参皂苷 Rb1 促进局灶性脑梗死小鼠轴突再生及其机制研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [6] Habertzell P, Hill B G. Oxidized lipids activate autophagy in a JNK-dependent manner by stimulating the endoplasmic reticulum stress response [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 56-64.
- [7] Zhang X J, He C W, Tian K, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm through inactivation of the JNK and p38 signaling pathways [J]. *Vasc Pharmacol*, 2015, 73: 86-95.
- [8] Xiong L Z, Wang Q, Liu M Y, et al. Shenfu injection attenuates neurotoxicity of bupivacaine in cultured mouse spinal cord neurons [J]. *Chinese Med J-Peking*, 2007, 120(22): 1958-62.
- [9] 芮海涛. 白藜芦醇苷对大鼠鞘内注射罗哌卡因神经毒性的影响 [D]. 广州: 南方医科大学, 2008.
- [10] Na N, Qiang L, Huixia R, et al. Ginsenoside Rb1 protects rat neural progenitor cells against oxidative injury [J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 3012-24.
- [11] Tiziana A, Patrizia C, Simona R, et al. Isolation and characterization of neural stem cells from dystrophic mdx mouse [J]. *Exp Cell Res*, 2016, 343(2): 190-207.
- [12] Hockfield S, McKay R D G. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system [J]. *J Neurosci*, 1986, 5(12): 3310-28.
- [13] Feng R, Wen J. Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development [J]. *Biol Chem*, 2015, 396(8): 883-91.
- [14] Cimadamore F, Fishwick K, Giusto E, et al. Human ESC-derived neural crest model reveals a key role for SOX2 in sensory neurogenesis [J]. *Cell stem cell*, 2011, 8(5): 538-51.

Protective effect of Ginsenoside Rb1 on mice primary spinal cord neural stem cells damage induced by lidocaine

Yang Changqing¹, Han Fangfang², Yuan Fei³, et al

(¹Dept of Rehabilitation, The Third Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462000;

²Luohe Medical College, Luohe 462002; ³Luohe Hospital of Chinese Medicine, Luohe 462000)

Abstract Objectives To investigate the effect and mechanism of ginsenoside Rb1 on neural stem cell injury induced by lidocaine. **Methods** Primary neural cells were labeled with anti-Nestin antibody and anti-CD133 antibody. Neural stem cells were sorted out by using a flow cytometer, and their characteristics were examined by RT-qPCR and immunofluorescence staining. The isolated neural stem cells were cultured with a medium containing lidocaine or ginsenoside Rb1, and the effects of lidocaine or Rb1 on the neural stem cell JNK signaling pathway and expression of apoptosis-related molecules were detected by RT-qPCR and Western blot. Neural stem cells were co-cultured with lidocaine and Rb1, and the effect of Rb1 on lidocaine induced neural stem cell apoptosis were examined. **Results** Through two-step screening, spinal cord neural stem cells with higher purity were obtained. The stem cells expressed SOX2, a marker gene of neural stem cells, and could differentiate into related neural cells. Lidocaine treatment could activate the JNK signaling pathway and induce apoptosis of neural stem cells, while addition of ginsenoside Rb1 inhibited the activation of the JNK signaling pathway and partially restored the apoptosis of neural stem cells caused by lidocaine treatment. **Conclusion** Ginsenoside Rb1 inhibits lidocaine treatment-activated JNK signaling pathway and restores spinal cord neural stem cell apoptosis induced by lidocaine treatment.

Key words lidocaine; neural stem cells; apoptosis; ginsenoside Rb1