

三七总皂苷对成年小鼠视网膜节细胞存活的影响

魏莉娜, 朱永红, 李海标

(中山大学中山医学院组织胚胎学教研室, 广东 广州 510080)

摘要: 【目的】探讨玻璃体注射三七总皂苷(tPNS)对视神经切断后视网膜节细胞(RGCs)存活的作用。【方法】用荧光素逆行示踪标记法和定量解剖学技术观察正常和经tPNS处理的金黄地鼠于视神经切断后5、7、14 d时RGCs的密度。动物分为正常组、单纯切断视神经(未注射组)、tPNS处理组和生理盐水对照组。【结果】正常RGCs平均密度为 $(1970 \pm 82)/\text{mm}^2$; 视神经切断后5、7、14 d时RGCs平均密度分别下降至 $(983 \pm 48)/\text{mm}^2$ 、 $(788 \pm 44)/\text{mm}^2$ 和 $(216 \pm 37)/\text{mm}^2$; 生理盐水对照组在各时间点RGCs平均密度与未注射组结果相似; tPNS处理组结果分别为 $(1363 \pm 56)/\text{mm}^2$ 、 $(1169 \pm 70)/\text{mm}^2$ 和 $(477 \pm 25)/\text{mm}^2$, 与未注射组和生理盐水对照组相比在各时间点上均存在显著性差异($P < 0.05$)。【结论】玻璃体注射tPNS可提高成年小鼠视神经切断后RGCs的短期存活率。

关键词: 三七总皂苷; 视网膜节细胞; 细胞存活; 成年小鼠

中图分类号: R329.25

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)05-0495-03

Effects of Total Panax Notoginseng Saponins on Survival of Retinal Ganglion Cells in Adult Hamsters

WEI Li-na, ZHU Yong-hong, LI Hai-biao

(Department of Histology and Embryology, Zhongshan School of Medical, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of tPNS on the survival of axotomized RGCs by intravitreal injection. 【Methods】 Fluorescent retrograde tracing method and quantitative anatomical techniques were used to measure the densities of RGCs in all groups of adult hamsters. Animals were separated into 4 groups, which were normal, ON axotomized only (no injection), treated with tPNS, and treated with sodium saline. 【Results】 In normal retinas, the mean densities of RGCs were $(1970 \pm 82)/\text{mm}^2$. At the 5th, 7th, and 14th day after axotomy, the mean densities of RGCs decreased to $(983 \pm 48)/\text{mm}^2$, $(788 \pm 44)/\text{mm}^2$, and $(216 \pm 37)/\text{mm}^2$, respectively. In the group treated with sodium saline, the results were similar to those observed in the no injection group. In the tPNS group, the results were $(1363 \pm 56)/\text{mm}^2$, $(1169 \pm 70)/\text{mm}^2$, and $(477 \pm 25)/\text{mm}^2$, respectively, which were different from the no injection group or the sodium saline group ($P < 0.05$). 【Conclusions】 tPNS could improve the survival of RGCs during short term after axotomy in adult hamsters.

Key words: total panax notoginseng saponins; retinal ganglion cells; cell survival; adult hamsters

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(5):495-497]

近端切断成年哺乳动物视网膜节细胞(retinal ganglion cells, RGCs)的轴突, 神经元在短期内大量死亡, 其原因可能为: 细胞内 Ca^{2+} 超载和自由基的损害; 靶源性神经营养因子的缺乏; 一氧化氮和兴奋性氨基酸的毒性作用。研究表明, 近端切断成年哺乳动物视神经后, 单一或联合给予 Ca^{2+} 通道阻断剂、自由基清除剂、神经营养因子、一氧化氮合

酶抑制剂或谷氨酸受体拮抗剂均能在不同程度上提高RGCs的存活率^[1-5]。但神经营养因子价格昂贵且只能局部应用, Ca^{2+} 通道阻断剂和谷氨酸受体拮抗剂引起的全身副反应大, 应用受限。寻求有效的中药治疗是目前研究者们关注的课题。三七总皂苷(total panax notoginseng saponins, tPNS)是五加科人参属植物三七的主要有效成分, 是一种受体操

收稿日期: 2006-10-28

基金项目: 广东省科技计划项目(2004b33801003)

作者简介: 魏莉娜(1981-), 女, 河南洛阳人, 硕士生; 朱永红, 副教授, 导师, 通讯作者, E-mail: wzwxr_1995@yahoo.com.cn

纵 Ca^{2+} 通道阻断剂, 具有扩张血管、清除自由基、抗炎、抗氧化等药理作用^[6-8]。研究表明, 腹腔注射 tPNS 对轴突损伤后 RGCs 的存活有促进作用^[9]。本实验拟研究玻璃体注射 tPNS 对轴突损伤后 RGCs 存活的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康成年金黄地鼠 60 只, 雄性, 体质量 80~100 g, 中山大学北校区实验动物中心提供。动物随机分为 4 组 ($n=6$): 正常组、单纯切断视神经组 (未注射组)、tPNS 处理组和生理盐水对照组。后 3 组按视神经切断后视网膜取材的时间再分为 5 d、7 d、14 d 的 3 个时间组。

1.2 主要试剂及仪器

tPNS (广西梧州制药集团股份有限公司), 为浅黄色粉末, 溶于生理盐水配成 200 g/L, 保存于 -20。快蓝 (fast blue, FB, 德国 Merck 公司), 用生理盐水配制为 30 g/L 的浓度, 4 冰箱避光保存。XTS-4C 手术显微镜 (镇江光学仪器厂), DMIRB 荧光显微镜 (Olympus)。

1.3 手术方法

玻璃体注射 2 μL 不同浓度的 tPNS 或生理盐水后 30 min, 距球后 1.0 mm 处剪断视神经, 复位眼球。在 7 d 的实验组, 再次注射时间为 5 d; 在 14 d 的实验组, 补充注射时间为 4、7、10 d。玻璃体注射 2 μL 浓度分别为 50、100、150、200 g/L 的 tPNS, 观察其对视神经切断后 7 d 时 RGCs 存活的作用, 以获取最佳浓度。

1.4 RGCs 的标记与计数

正常组动物于视神经切断后立即在近侧残端放置沾有 FB 的明胶海绵, 2 d 后取材。其余组于取材前 2 d 再次暴露视神经, 将近侧残端剪短至 0.5 mm, 同上标记。

取材时在致死量麻醉状态下取出眼球, 置于 40 g/L 多聚甲醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH=7.3) 中剥离视网膜, 4 固定 1~3 h, 按照文献制备视网膜平铺片^[10]。荧光显微镜下观察并拍摄视网膜平铺片上 FB 标记的 RGCs, 拍摄视野的选择方法参照文献^[11], 即以视乳头为中心, 在通过视乳头的坐标轴上, 分别从视网膜鼻上、鼻下、颞上、颞下等距取点, 每个视网膜共取 24~32 个点, 用 Photoshop 在

0.04 mm^2 方框中计数细胞, 重复两次求平均值。所有数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 12.0 软件单因素方差分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 正常 RGCs 密度

经视神经残端标记的正常 RGCs 平均密度为 $(1970 \pm 82)/\text{mm}^2$ (图 1)。细胞胞体为圆形或卵圆形, 逆行标记的荧光物质主要分布在神经元的核周质和树突起始部 (图 1:A)。标记的 RGCs 在视网膜平铺片上散在分布, 且从视乳头中心区到外周区呈现递减趋势 (图 1B~D)。

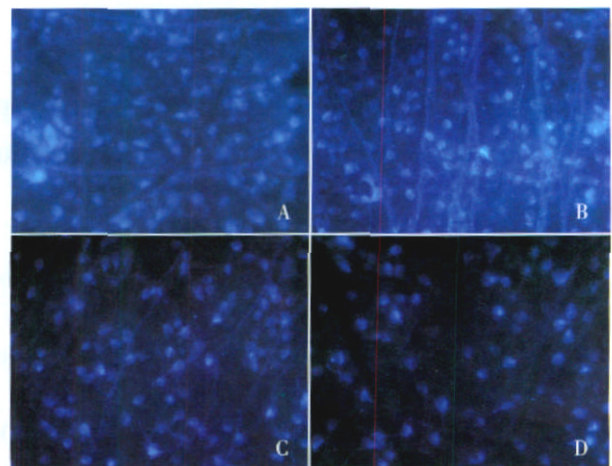


图 1 正常 RGCs 密度

Fig.1 The densities of RGCs in normal retinas ($\times 200$)

A: The FB-labeled RGCs in normal retinas; B, C, D: The densities of RGCs in inner 1/3, intermedial 1/3, and outer 1/3 zone of normal retinas, respectively

2.2 视神经切断后存活 RGCs 的密度

视神经近端切断后, 短期内 RGCs 大量死亡, 其密度明显下降, 切断后 5、7、14 d 时 RGCs 平均密度分别下降至 $(983 \pm 48)/\text{mm}^2$ 、 $(788 \pm 44)/\text{mm}^2$ 和 $(216 \pm 37)/\text{mm}^2$, 与正常 RGCs 密度相比, 其存活率分别为 50%、40% 和 11%。

2.3 tPNS 量效分析

从表 1 可见, tPNS 在 50~150 g/L 时, 随浓度增加 RGCs 密度也增加, 当浓度为 200 g/L 时, RGCs 密度未见上升。但 tPNS 处理组与对照组相比 RGCs 密度均增加 ($P < 0.05$)。当浓度为 150 g/L 时 RGCs 存活达到峰值, 故以 150 g/L 为最佳浓度。

表 1 不同浓度的 tPNS 对视神经切断后 7 d 时 RGCs 密度的影响

Table 1 Effects of different concentrations of tPNS on the densities of RGCs on the 7th day after axotomy ($\bar{x} \pm s$, cell/mm²)

tPNS (g/L)	n	Fast blue-labeled RGCs
0	6	766 ±41
50	6	942 ±19 ¹⁾
100	6	1045 ±49 ¹⁾
150	6	1169 ±70 ¹⁾
200	6	1102 ±59 ¹⁾

One-way ANOVA for all groups: $F=67.314$, $P=0.000$; LSD-*t* test: 1) Compared with 0 g/L group, $P=0.000$

2.4 tPNS 对 RGCs 存活的影响

经 tPNS 处理的动物, 切断视神经后 5 d、7 d、14 d 时的存活 RGCs 平均密度见表 2, 与正常 RGCs 密度相比, 其存活率分别为 69%、59% 和 24%。与未注射组相比, 5、7 d 的 RGCs 存活率均增加了 19%, 14 d 的存活率增加了 13%。生理盐水对照组结果与未注射组结果相近。经单因素方差分析, tPNS 组与未注射组和生理盐水对照组相比在视神经切断后不同时间点均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 tPNS 对视神经切断后 5、7、14 d 时 RGCs 密度的影响
Table 2 Effects of tPNS on the densities of RGCs after axotomy on the 5th, 7th, and 14th day ($\bar{x} \pm s$, cell/mm²)

After axotomy	tPNS group	Sodium saline group	No injection group	F	P
5 d	1363 ±56 ^{1),2)}	984 ±36 ³⁾	983 ±48	127.276	0.000
7 d	1169 ±70 ^{1),2)}	766 ±41 ³⁾	788 ±44	108.373	0.000
14 d	477 ±55 ^{1),2)}	213 ±33 ³⁾	216 ±37	134.221	0.000

LSD test: on the 5th d, 7th d, and 14th d, respectively, 1) compared with sodium saline group, $P=0.000$; 2) compared with no injection group, $P=0.000$; 3) compared with no injection group, $P > 0.05$.

3 讨 论

本实验所得正常 RGCs 平均密度为 (1970 ± 82)/mm², 视神经切断后 5、7、14 d 时 RGCs 存活率分别为 50%、40%、11%, 结果与以往的报道基本相似^[11]。端切断成年哺乳动物的视神经可导致 RGCs 在短期内大量死亡^[1], 探讨 RGCs 死亡原因并提出有效的防治措施是神经生物学研究的重要课题。Ca²⁺是神经细胞内重要的信息物质, 大量研

究表明, 胞内 Ca²⁺超载可导致神经元的死亡, 而降低胞内 Ca²⁺浓度的措施可促进受损神经元的存活^[5,12]。

近来有研究提示, 中药对中枢神经系统受损神经元的存活有保护作用^[13,14], 其中传统中药三七的神经保护作用很受关注^[15-17]。tPNS 是五加科人参属植物三七的主要有效成分, 是一种受体操纵 Ca²⁺通道阻断剂, 具有扩张血管, 清除自由基, 抗炎, 抗氧化等药理作用^[6-8]。本课题组以往的研究表明, 腹腔注射 tPNS 可以促进视神经切断后 RGCs 的存活, 5 d、7 d、14 d 时 RGCs 存活率分别提高了 13%、12%、5%^[9]。但腹腔注射的 tPNS 通过血液循环到达损伤局部才能发挥作用, 影响因素较多, 不利于对其机制的探讨。本实验选择玻璃体腔内局部注射的方式, 便于 tPNS 直接作用于受损 RGCs, 促使其有效发挥保护作用, 也便于以后对其作用机制的研究。

本实验结果表明玻璃体注射 tPNS 对视神经切断后 RGCs 的存活有保护作用。与未注射组相比, 在视神经切断后 5、7、14 d 的节细胞存活率分别提高了 19%、19%、13%。其作用在切断后 5 d、7 d 较 14 d 时显著。与腹腔注射 tPNS 对 RGCs 存活的作用相比, 玻璃体注射 tPNS 在各个时间点均有优势。

本实验结果还表明, tPNS 对受损 RGCs 的保护作用呈现剂量依赖性, 有最佳作用浓度, 与人参皂苷有相似性^[13]。这可能与其抑制 Ca²⁺内流的机制有关, 因为只有合适的胞内 Ca²⁺浓度才能对细胞的生存起促进作用, 但确切机制尚需进一步研究。在视神经切断后两周内, tPNS 提高受损 RGCs 存活率的效果显著, 提示其短期内对受损神经元有保护作用, 其长期作用情况将在下一步实验中进一步探讨。

参考文献:

- [1] CUI U, HARVEY A R. At least two mechanisms are involved in the death of retinal ganglion cells following target ablation in neonatal rats [J]. *J Neurosci*, 1995, 15 (12):8143-8155.
- [2] KASHII S, MANDAI M, KIKUCHI M, et al. Dual actions of nitric oxide in N-methyl-D-aspartate receptor-mediated neurotoxicity in cultured retinal neurons [J]. *Brain Res*, 1996, 711(1-2): 93-101.

(下转第 510 页 to page 510)

- [5] 王 筠, 刘清芸, 华海婴, 等. 冬凌草甲素诱导 HL-60 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17 (4): 402-404.
- [6] 张春玲, 吴立军, 田代真一, 等. 冬凌草甲素通过激活 caspase 诱导 HeLa 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19 (5): 521-525.
- [7] OLSEN B B, BJORLING-POULSEN M, GUERRA B. Emodin negatively affects the phosphoinositide 3-kinase/AKT signalling pathway: a study on its mechanism of action [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1):227-237.
- [8] ARLT A, GEHRZ A, MUERKOSTER S, et al. Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death [J]. *Oncogene*, 2003, 22(21):3243-3251.
- [9] LIU H M, YAN X, KIUCHI F, et al. A new diterpene glycoside from *Rabdosia rubescens* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2000, 48(1):148-149.
- [10] WU C, HUANG J. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(6):3571-3583.
- [11] CIECHOMSKA I, PYRZYNSKA B, KAZMIERCZAK P, et al. Inhibition of Akt kinase signalling and activation of Forkhead are indispensable for upregulation of FasL expression in apoptosis of glioma cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22(48):7617-7627.
- [12] BURGERING B M, KOPS G J. Cell cycle and death control: long live Forkheads [J]. *Trends Biochem Sci*, 2002, 27(7): 352-360.
- [13] REDAELLI C, GRANUCCI F, DE GIOIA L, et al. Synthesis and biological activity of Akt/PI₃K inhibitors [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2006, 6(10):1127-1136.

(编辑 张恩健)

(上接第 497 页 from page 497)

- [3] ROBARY S M, CLARKE D B, WANG Y C, et al. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(5):1632-1636.
- [4] KOEBERLE P D, BALL A K. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor [J]. *Neuroscience*, 2002, 110(3): 555-567.
- [5] ESCHWEILER G W, BAHM M. Flunarizine enhances rat retinal ganglion cell survival after axotomy [J]. *J Neurol Sci*, 1993, 116(1): 34-40.
- [6] 韩一波. 三七总皂苷的研究进展 [J]. *中国药师*, 2005, 8(3): 197-199.
- [7] 马丽焱, 肖培根. 三七总皂苷对脑细胞内游离钙浓度的影响 [J]. *中国药学杂志*, 1998, 33(8): 467-469.
- [8] KWAN C Y, KWAN T K. Effects of *Panax notoginseng* saponins on vascular endothelial cells in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, 21(12):1101-1105.
- [9] 何颖红, 李海标. 三七总皂苷对成年地鼠视网膜节细胞存活的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(3): 175-178.
- [10] 马 科, 徐 亮. 视网膜定向铺片方法 [J]. *眼科*, 2002, 11(4): 238-239.
- [11] 朱永红, 李海标. IBMX 对成年金黄地鼠视网膜节细胞存活的影响 [J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(2):96-99.
- [12] DAS A, GARNER D P, DEL R E A M, et al. Calpeptin provides functional neuroprotection to rat retinal ganglion cells following Ca²⁺ influx [J]. *Brain Res*, 2006, 1084(1):146-157.
- [13] 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(2): 224-234.
- [14] RADAD K, GILLE G, LIU L, et al. Use of ginseng in medicine with emphasis on neurodegenerative disorders [J]. *Pharmacol Sci*, 2006, 100(3):175-186.
- [15] 韩吉安, 胡威夷, 孙增会. 颅脑损伤后钙、钙调蛋白的变化及三七总皂苷的治疗作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1999, 19(4): 227-229.
- [16] 刘 雯, 吴青锋, 李 华, 等. 三七皂苷对无糖培养引起 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用 [J]. *上海中医药杂志*, 2002, (2):46-48.
- [17] 龙在云, 伍亚民, 曾 琳, 等. 三七总皂苷对脊髓损伤后脊髓血流量和感觉诱发电位的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(3):212-213.

(编辑 张恩健)