

## 三七总皂甙对成年大鼠视网膜节细胞再生的影响

项 平, 黄锦桃, 李 卉, 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】探讨三七总皂甙(tPNS)对成年大鼠视网膜节细胞(RGCs)再生的影响。【方法】成年 SD 大鼠近端切断视神经(ON)并缝接自体一段坐骨神经(AG),腹腔注射 tPNS。动物随机分为 AG + 溶剂(生理盐水)组;AG + tPNS 组;量效关系组。用粒蓝逆行标记再生的 RGCs,在荧光镜下观察视网膜平铺片再生 RGCs 的数量变化。【结果】① AG + 溶剂组术后 3 和 4 周,每个视网膜再生的节细胞数分别为  $698 \pm 111$  和  $568 \pm 107$ ;②在上述两个时间点 AG + tPNS 组每个视网膜再生的节细胞数分别为  $1\ 656 \pm 135$  和  $1\ 329 \pm 144$  约为对照组的 2 倍,  $P < 0.05$ 。【结论】三七总皂甙可促进视网膜节细胞再生。

**关键词:**三七总皂甙;视网膜节细胞;再生;大鼠

中图分类号:R329.25

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2004)04-0319-03

## Effects of Total Panax Notoginseng Saponins on Regeneration of Retinal Ganglion Cells in Adult Rats

XIANG Ping, HUANG Jin-tao, LI Hui, LI Hai-biao

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

**Abstract:** 【Objective】To investigate the effects of total panax notoginseng saponins(tPNS) on regeneration of axotomized retinal ganglion cells (RGCs) in adults rats. 【Methods】After optic nerve (ON) transection, an autologous sciatic nerve (attached graft AG) was removed and sutured to the proximal stump of the ON. tPNS was injected into abdominal cavity. Animals were divided into 3 groups: regenerating control group (AG + Solution); AG + tPNS group; effect and dosage group. Regenerating RGCs were labeled retrogradely by granular blue, and the changes of regenerating RGCs in each retina were observed under fluorescent microscope. 【Results】① In control retinas, the mean number of regenerating RGCs were  $698 \pm 111$ /retina and  $568 \pm 107$ /retina respectively at the 3rd and 4th week after surgery. ② The mean number of regenerating RGCs in AG + tPNS group at the 3rd and 4th week were  $1\ 656 \pm 135$ /retina and  $1\ 329 \pm 144$ /retina, respectively, almost doubled when compared with control,  $P < 0.05$ . 【Conclusion】tPNS could promote the regeneration of RGCs after axotomy.

**Key words:** total panax notoginseng saponins; retinal ganglion cells; regeneration; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2004, 25(4): 319 - 321]

成年哺乳动物中枢神经系统(CNS)损伤后,神经元再生困难,目前认为影响成年哺乳动物中枢神经系统再生的因素有神经元内在的再生能力、细胞外基质、神经营养因子以及胶质细胞瘢痕的形成和

胶质细胞产生的抑制因子等<sup>[1]</sup>。视网膜是中枢神经系统的延续,视网膜节细胞已被广泛用于研究中枢神经系统再生。大量研究表明神经营养因子(NTFs)对某些中枢神经元的存活和再生有重要作

收稿日期:2003-10-21

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870266)

作者简介:项平(1964-),男,安徽枞阳人,博士生,副教授,李海标,教授,博士生导师,课题负责人,李卉,中山医学院1999级学生。

用。中药能否促进中枢神经元的存活和再生是值得深入探讨的重要问题。三七总皂甙 (total panax notoginseng saponins, tPNS) 是从五加科人参属植物三七根提取的有效成分, 是一种受体操纵  $Ca^{2+}$  通道阻断剂。它具有扩血管和对心脑血管缺血性损伤及脊髓损伤有保护作用<sup>[2-4]</sup>。我们先前的研究表明三七总皂甙可促进视网膜节细胞存活<sup>[5]</sup>。在此基础上我们研究 tPNS 能否促进中枢神经元的再生。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和分组

成年健康雄性 SD 大鼠 45 只, 体质量 200 ~ 250 g, 中山大学北校区动物中心提供。模型制作: 质量分数 4% 水合氯醛 (100 mg/kg) 麻醉动物, 手术显微镜下, 眶内分离视神经 (optic nerve, ON), 距球后约 1.0 mm 切断视神经, 其近残端缝接一段约 2.0 cm 自体坐骨神经, 坐骨神经另一端包埋、固定于颅顶肌肉。动物随机分为 3 组, AG + 溶剂 (生理盐水) 组: 在切断视神经 (ON) 近端缝接 1 段自体坐骨神经并腹腔注射生理盐水; AG + tPNS 组: 在切断视神经 (ON) 近端缝接 1 段自体坐骨神经并手术前一天开始每天腹腔注射 tPNS 150 mg/kg。以上各组动物分别存活 3、4 周, 每个时间点 5 只动物。量效关系组: 在切断视神经 (ON) 近端缝接 1 段自体坐骨神经并腹腔注射 tPNS, 剂量分别为按体质量 0、50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg、200 mg/kg, 每个计量点 5 只动物, 于术前 1 d 开始每天腹腔注射。3 周后观察不同剂量 tPNS 与 RGCs 再生数的关系。

### 1.2 实验试剂

三七总皂甙粉剂购于广西梧州制药集团, 生理盐水溶解成 100 g/L; 粒蓝 (granular blue, GB) 购至德国 Merck 公司, 生理盐水配制为 3% 浓度 4 °C 避光保存。

### 1.3 再生视网膜节细胞标记和记数

取材前 3 d 距移植端约 1.5 cm 处切断坐骨神经, 粘有质量分数 3% 粒蓝的明胶海绵填塞, 逆行标记。3 d 后, 麻醉动物摘出眼球, 置 40 g/L 多聚甲醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液 pH7.3) 中剥离视网膜 4 °C 固定 1 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液漂洗, 视网膜平铺片参照文献<sup>[6]</sup>。荧光显微镜下用 400 nm 波长观察并计数整个视网膜的节细胞数, 数据用统计学 *t* 检验分析。

## 2 结果

### 2.1 三七总皂甙的量效分析

tPNS 浓度在 50 ~ 150 mg/kg 时, 随剂量增加再生视网膜节细胞数也增多, 当增至 100 mg/kg 时, 与对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 剂量 150 mg/kg 时对节细胞再生作用达到峰值, 故以 150 mg/kg 为最佳剂量 (表 1)。

表 1 不同浓度三七总皂甙对 3 周受损视网膜节细胞再生的影响 (RGCs/视网膜)

Group	tPNS (mg/kg)	n	Number of regeneration RGCs
1	0	5	698 ± 111
2	50	5	712 ± 123
3	100	5	1 533 ± 129
4	150	5	1 654 ± 135
5	200	5	1 420 ± 140

Group 3, 4, 5 compared with group 1,  $P < 0.05$

### 2.2 三七总皂甙对视网膜节细胞再生的影响

腹腔注射 tPNS 可促进受损视网膜节细胞的再生 (图 1), 术后 3、4 周再生节细胞数目约比对照组多 2 倍 (表 2,  $P < 0.05$ )。

表 2 三七总皂甙对视网膜节细胞再生的影响

Group	n	3rd week	4th week
Sodium saline	5	698 ± 111	568 ± 107
tPNS	5	1 656 ± 135	1 329 ± 144

tPNS group compared with sodium saline,  $P < 0.05$

## 3 讨论

以往的研究表明坐骨神经缝接于视神经后, 可促进视网膜节细胞的再生, 可能原因是: ①坐骨神经的施万细胞增生, 为再生轴突提供了一个合适通道; ②新生的施万细胞分泌大量神经营养因子, 如 NGF, BDNF, CNTF, GDNF 等, 通过视神经逆行运输到视网膜节细胞体, 促进其存活和再生<sup>[7-8]</sup>。

我们的结果表明三七总皂甙可促进成年哺乳动物受损视网膜节细胞的再生。三七总皂甙是钙离子通道阻断剂, 有实验提示三七总皂甙可抑制细胞

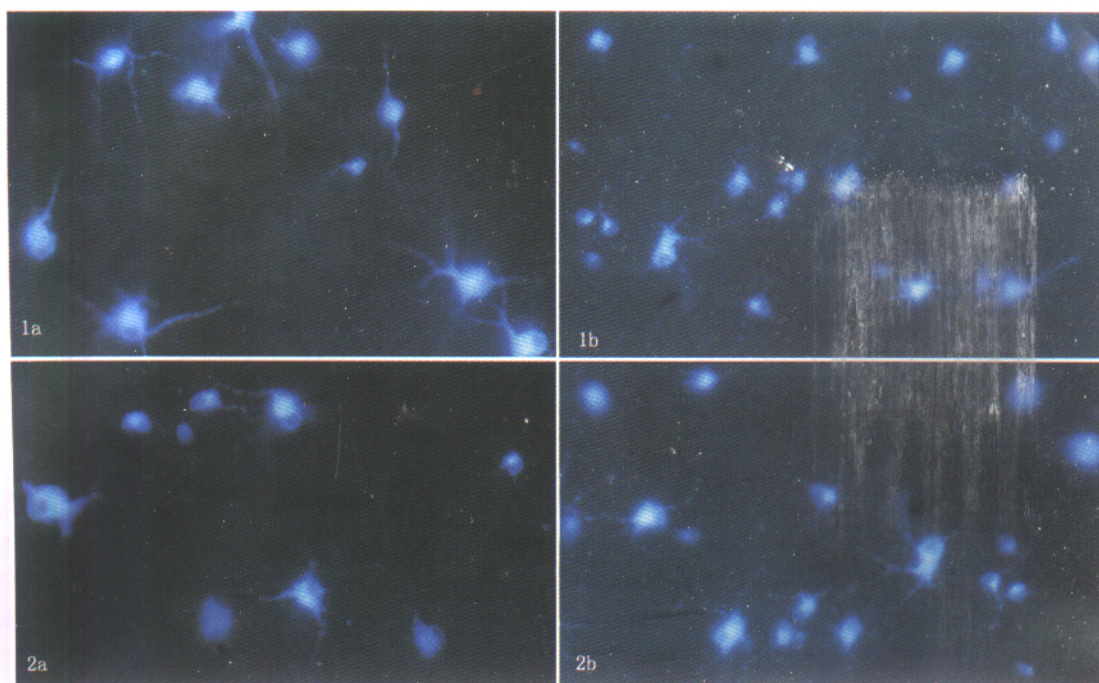


图1 动物存活3、4周各组粒蓝标记的再生视网膜节细胞

Fig. 1 The regenerating RGCs labeled by granular blue in 3, 4 weeks survival groups ×100

1a, 2a Sodium saline group in 3, 4 weeks; 1b, 2b tPNS group in 3, 4 weeks

钙离子内流,减轻脊髓损伤时钙离子内流所引起脂质过氧化损伤,还可诱导热休克蛋白(heat shock protein, HSP)表达增加保护脊髓损伤<sup>[2]</sup>,还可清除脑缺血过程形成的自由基和降低脑缺血所导致一氧化氮含量增高,对神经元有保护作用<sup>[9,10]</sup>。

目前我们还不清楚三七总皂甙通过什么机制来促进视网膜节细胞的再生。我们先前的研究表明三七总皂甙促进视网膜节细胞存活。神经元的胞体是神经细胞的营养中心,神经元胞体的存活是其轴突再生的前提,只有胞体的存活才有轴突的再生。至于三七总皂甙是否可通过上调中枢神经元再生能力,是否可抑制胶质细胞瘢痕的形成和降低胶质细胞产生的抑制因子表达,或通过与神经营养因子(尤其CNTF和BDNF)协同作用来促进中枢神经元的再生等问题仍有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Stichel C C, Muller H W. Experimental strategies to promote axonal regeneration after traumatic central nervous system injury[J]. Prog Neurobiol, 1998, 56(2): 119-48.
- [2] 李志强,雷君,陈泽斌,等.三七总皂甙对大鼠脊髓损伤后HSP70阳性神经元表达的影响[J].中国中医骨伤科杂志,2001,9(3):20-2.
- [3] 马丽焱,肖培根,梁发权,等.三七总皂甙对原代培养

大鼠皮层神经细胞的保护作用[J].中国药理学杂志,1998,33(3):143-5.

- [4] Guan Y Y, Kwan C Y, He H, et al. Effects of Panax notoginseng saponins on receptor-operated  $Ca^{2+}$  channels in vascular smooth muscle[J]. Zhongguo Yao Li Xue Bao, 1994, 15(5): 392-8.
- [5] 何颖红,李海标.三七总皂甙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(6): 175-8.
- [6] 李雯,李海标.P物质样免疫反应神经元在蟾蜍视网膜的定位和分布[J].中山医科大学学报,1994,15(4):95-8.
- [7] So K F, Aguayo A J. Lengthy regrowth of cut axons from ganglion cells after nerve transplantation into the retinal adult rat[J]. Brain Res, 1985, 328(2): 349-54.
- [8] Cui Q, Lu Q, So K F, et al. CNTF, not other trophic factor, promotes axonal regeneration of axotomized retinal ganglion cells in adult hamster[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(3): 760-6.
- [9] 李麟红,王子灿,黄志宏,等.三七总皂甙对急性脑缺血的保护作用[J].中国药理学通报,1991,17(4): 56-8.
- [10] 韩金安.三七总皂甙对中枢神经损伤时氧自由基病理作用的影响[J].中国药理学通报,1996,12(6): 487-9.

(编辑 张恩健)