

三七总皂甙对成年小鼠视网膜节细胞存活的影响<sup>①</sup>何颖红<sup>②</sup> 李海标

(中山医科大学组织胚胎学教研室, 广州, 510089)

**摘要** 目的: 探讨三七总皂甙对提高切断视神经后节细胞存活的作用。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三七总皂甙处理的动物于切断视神经 5、7、14 d 后视网膜节细胞的密度。结果: ① 正常视网膜节细胞平均密度为  $(2\ 007 \pm 115)/\text{mm}^2$ ; ② 切断视神经 5、7、14 d 后其视网膜节细胞平均密度分别下降至:  $(1\ 198 \pm 107)/\text{mm}^2$ ,  $(825 \pm 40)/\text{mm}^2$  和  $(196 \pm 10)/\text{mm}^2$ ; ③ 给予生理盐水的对照组在上述各时间组视网膜节细胞平均密度与单纯切断视神经组结果相似; ④ 给予三七总皂甙的实验组在 5、7、14 d 视网膜节细胞的平均密度分别为  $(1\ 461 \pm 96)/\text{mm}^2$ ,  $(1\ 064 \pm 91)/\text{mm}^2$  和  $(302 \pm 19)/\text{mm}^2$ , 与切断视神经组和生理盐水对照组相比在各时间组上均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。结论: 三七总皂甙可提高切断视神经后成年金黄小鼠视网膜节细胞的存活, 三七总皂甙的抑制钙内流作用可能与提高切断视神经后视网膜节细胞的存活有关。

**关键词** 三七/药理学; 皂甙类/药理学; 视网膜节细胞/药物作用; 细胞存活/药物作用

**中图分类号** R 329.25

## EFFECTS OF TOTAL PANAX NOTOGINSENG SAPONINS ON SURVIVAL OF RETINAL GANGLION CELLS IN ADULT HAMSTERS

He Yinghong Li Haibiao

(Department of Histology and Embryology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** To investigate the effects of total panax notoginseng saponins (tPNS) on enhancing survival of axotomized retinal ganglion cells (RGCs) in adult hamster. **Methods:** Fluorescent retrograde tracing method and quantitative anatomical techniques were used to measured the densities of RGCs of normal and animals treated with tPNS in 5, 7, and 14 days after axotomy. **Results:** ① In normal retinas, the mean densities of RGCs were  $(2\ 007 \pm 115)/\text{mm}^2$ . ② 5, 7 and 14 days after axotomy, the mean densities of RGCs had decreased to  $(1\ 198 \pm 107)/\text{mm}^2$ ,  $(825 \pm 40)/\text{mm}^2$  and  $(196 \pm 10)/\text{mm}^2$ , respectively. ③ In the control group treated with sodium saline, the densities of RGCs in 5, 7 and 14 days after axotomy were similar to those observed in the axotomized group. ④ In the group treated with tPNS, the densities of RGCs in 5, 7 and 14 days after axotomy were  $(1\ 461 \pm 96)/\text{mm}^2$ ,  $(1\ 064 \pm 91)/\text{mm}^2$  and  $(302 \pm 19)/\text{mm}^2$  respectively. They were significantly different from the axotomized group or sodium saline group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** tPNS could enhance RGCs survival after axotomy in adult hamsters. The inhibitory effect of tPNS on  $\text{Ca}^{2+}$  influx was related to enhancing the survival of RGCs after axotomy.

**Subject headings** retinal ganglion cells/drug effects; panax notoginseng/pharmacology; saponins/pharmacology; cell survival/drug effects

切断成年哺乳动物视网膜节细胞近胞体端的 轴突, 或其它中枢和外周神经元的轴突, 大量神经

元在短期内迅速死亡。探讨其死亡原因,寻找理想的防治措施是当今神经生物学研究的热点之一。研究表明,兴奋性氨基酸毒性作用;细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  超载;一氧化氮的神经毒作用;自由基的形成和终断神经营养因子的供应等是导致神经元死亡的重要因素<sup>[1]</sup>。近端切断成年哺乳动物视神经后,给予神经营养因子;NMDA 受体拮抗剂;钙离子通道阻断剂或一氧化氮合成酶抑制剂都在不同程度上可提高视网膜节细胞的存活率<sup>[1~3]</sup>。然而,神经营养因子十分昂贵,不能通过血脑屏障,仅能局部应用,各种NMDA 受体阻断剂和  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻断剂的副作用大,严重的可出现精神症状。从中药中寻找有效的防治药物是一项很有希望的工作。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  $\text{Ca}^{2+}$  通道阻滞剂,具有扩张血管、保护心脑血管缺血性损伤的作用<sup>[4~6]</sup>。tPNS 能否对轴突损伤后中枢神经元的存活有促进作用,尚未见报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

成年健康雄性金黄地鼠 65 只,体重 80 ~ 100 g,由中山医科大学实验动物中心提供。动物随机分为 4 组:正常对照组;切断视神经组;切断视神经加注射 tPNS 组;切断视神经加注射生理盐水对照组;后 3 组再按切断视神经后动物存活时间分为 5、7、14 d 的 3 个时间组,每组 5 只。

### 1.2 主要试剂

三七总皂甙产自广西梧州制药集团股份有限公司,为浅黄色粉末,用生理盐水溶解配成 150 g/L,粒蓝 (granular blue; GB)为德国 Merck 公司试剂,用生理盐水配制为 3% 的浓度,4 °C 冰箱避光保存备用。

### 1.3 给药方法与量效关系

术前 1 d 开始每天腹腔注射 200 mg/kg 的三七总皂甙至取材料当天,对照组注射等量的生理盐水。分别注射剂量为 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg 和 250 mg/kg 的 tPNS, 观察其对切断视神经 14 d 后,视网膜节细胞存活的作用的量效关系。

### 1.4 视神经切断术

戊巴比妥钠腹腔注射 (50 mg/kg) 麻醉动物,分离暴露一侧视神经,直视下在距球后 1.5 mm 处剪断视神经,复位眼球,动物苏醒后回笼继续饲养。

### 1.5 视网膜节细胞标记术

动物麻醉开颅后,用吸引器去除覆于上丘上方的大脑皮质,暴露两侧上丘,用粘有 3% 粒蓝的明胶海绵置于上丘表面 7 d,标记正常视网膜节细胞。而切断视神经后存活视网膜节细胞的标记则于取材前 2 d 暴露视神经近侧残端并剪短至 1 mm,在断端放置粘有 3% 粒蓝的明胶海绵。

粒蓝标记后动物存活 2 d (经视神经断端标记) 或 7 d (经上丘标记),在致死量麻醉下取出眼球分离视网膜并置于 4% 多聚甲醛 (0.1 mol/L 磷酸缓冲液, pH=7.3) 4 °C 固定 1~3 h,视网膜平铺片的制备依文献方法<sup>[7]</sup>。

### 1.6 计量学分析

用激发光为 400 nm 的滤光片于荧光显微镜下观察并计数视网膜平铺片上标记细胞数,细胞计数方法按照文献<sup>[3]</sup>,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 20~24 个点,用 40× 物镜观察并在 0.04 mm<sup>2</sup> 目镜网格进行细胞计数。所有数据采用 SPSS 4.0 软件包统计,使用单因素方差分析。

## 2 结 果

### 2.1 正常视网膜节细胞密度

经上丘标记各种大、中、小型 (胞体直径分别为 12~21、9~12、6~9 μm) 节细胞散布于整个视网膜,其平均密度为 (2 007 ± 115) / mm<sup>2</sup> (n=5), 节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的起始部 (图 1)。

### 2.2 三七总皂甙的量效分析

从表 1 可见,三七总皂甙浓度在 100 ~ 200 mg/kg 时,随剂量增加节细胞密度也增加,当增至 150 mg/kg 时,与对照组相比出现显著性差异 (P < 0.05), 剂量 200 mg/kg 时对视网膜节细胞存活影响达到峰值,故以 200 mg/kg 为最佳剂量浓度。

表1 不同浓度的三七总皂甙对切断视神经14 d后视网膜节细胞密度的影响

Table 1 Effects of different concentration of tPNS on the densities of RGCs after axotomy in 14 days

tPNS(mg/kg)	n	granular blue-labeled RGCs ( $\bar{x} \pm s$ , cell/mm <sup>2</sup> )
0.0	5	193±20
100	5	209±13
150	5	267±17
200	5	302±19
250	3	275±63

group 3, 4, 5 compared with control,  $P < 0.05$

### 2.3 视神经切断后存活视网膜节细胞的密度

近端切断视神经后大量视网膜节细胞死亡,其密度明显下降,切断5、7、14 d后的节细胞平均密

度见表2和图2a, 3a, 4a, 与正常视网膜节细胞( $2\ 007 \pm 115$ )/mm<sup>2</sup>相比其存活率5 d为60%, 7 d为41%, 到14 d时下降至10%。

### 2.4 三七总皂甙对视网膜节细胞存活的影响

经三七总皂甙处理的动物, 切断视神经5、7、14 d后的存活节细胞的平均密度见表2和图2b, 3b, 4b, 与正常视网膜节细胞密度相比, 其存活率分别为73%、53%和15%。5、7 d组的节细胞存活率增加了12%~13%, 14 d组的存活率仅增加5%。生理盐水对照组, 在切断视神经5、7、14 d后其节细胞存活率与单纯切断视神经组结果相近(表2), 经方差分析, 三七总皂甙组与视神经切断组和生理盐水对照组相比在视神经切断后不同时间段其  $P$  值均小于0.05, 表明它们有显著性差异。

表2 三七总皂甙对切断视神经后视网膜节细胞的密度的影响

Table 2 Effects of tPNS on the densities of RGCs after axotomy ( $\bar{x} \pm s$ , cell/mm<sup>2</sup>)

after axotomized	tPNS group	sodium saline group	no injection group
5 d	1 461±96	1 218±125	1 198±107
7 d	1 064±91	803±71	825±40
14 d	1 302±19	193±20	196±10

1) tPNS group compared with sodium saline group and no injection group,  $P < 0.05$

## 3 讨论

本实验所示正常视网膜节细胞平均密度为( $2\ 007 \pm 115$ )/mm<sup>2</sup>。视神经切断后节细胞密度明显下降, 切断视神经5、7、14 d后的节细胞分别下降了40%、60%与90%, 结果与以往报道相似<sup>[3]</sup>。

大量研究表明, 近端切断新生或成年哺乳动物的视神经可导致节细胞大量死亡, 其中包括坏死和凋亡, 后者受基因编程的调节, 通过主动的生化过程而自杀死亡<sup>[1, 8]</sup>。造成节细胞大量死亡原因还不清楚, 其可能原因有: ①终断靶源性神经营养因子的供给。切断视神经后给予脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-4/5(NT-4/5), 睫状神经营养因子(CNTF), 可促进损伤后视网膜节细胞的存活, 减少因轴突损伤所触发视网膜节细胞的凋亡<sup>[1, 3, 9]</sup>。②兴奋性氨基酸的神经毒性作用和胞内钙超载, 当脑缺血、脑损伤可引起大量谷氨酸释放, 构成对谷氨酸受体的病理性过度刺激, 大量Ca<sup>2+</sup>

内流<sup>[1, 2]</sup>, 激活黄嘌呤氧化酶(xanthin oxidase, XO)系统和磷脂酶A<sub>2</sub>(phospholipaseA<sub>2</sub>)产生自由基, 又可激活一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)产生过量的一氧化氮, 导致神经元的死亡<sup>[1, 11]</sup>。已有的研究还表明, 视网膜节细胞上有NMDA受体<sup>[10]</sup>, 它们对天冬氨酸、海人藻酸高度敏感, 兴奋性氨基酸和NMDA受体激动剂对视视网膜节细胞有毒性作用, 给予NMDA受体拮抗剂MK-801, 非NMDA受体拮抗剂DNQX(6, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione)、NOS抑制剂氮<sup>W</sup>-硝基-L-左旋精氨酸甲酯(N<sup>W</sup>-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)自由基清除剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)以及钙通道阻滞剂氟桂嗪(Flunarizine)<sup>[10]</sup>, 均可提高受损视网膜节细胞的存活率, 但此类药物对心血管和呼吸系统的副作用较大, 严重者有致精神失常。

药理学实验表明, 三七总皂甙是钙通道阻滞剂<sup>[4]</sup>。有实验提示三七总皂甙可抑制Ca<sup>2+</sup>内流, 减轻脊髓损伤过程中由于Ca<sup>2+</sup>内流所引起脂质过氧化损伤, 还可清除脑缺血过程中所形成的自由基

和降低脑缺血所致的一氧化氮含量增高,对神经元有保护作用<sup>[5,6]</sup>。本实验结果表明三七总皂甙有提高切断视神经后节细胞存活的作用,其作用在切断视神经后的5、7 d较切断14 d后显著。三七总皂甙对受损视网膜节细胞的保护作用可能与阻断受损视网膜节细胞的钙离子通道,从而减少钙离子内流和抑制自由基的形成有关,但三七总皂甙究竟是通过什么途径来实现对受损视网膜节细胞的保护,仍有待进一步研究。

(本文图见封2)

### 参 考 文 献

- 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 Neurosci*, 1995, 15(12): 8143
- 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. *Brain Res*, 1996, 711: 73
- 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 1632
- 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. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1994, 15(5): 392
- 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. *中国药理通报*, 1991, 17(1): 56
- 何凤慈,龙在云,周立,等.三七总皂甙对大鼠脊髓损伤组织总钙和脂质过氧化的影响. *第三军医大学学报*, 1993, 15(15): 426
- 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的分布. *中山医科大学学报*, 1994, 15(1): 95
- Garcia-Valenzuela E, Gorczyca W, Darzynkiewicz Z, *et al*. Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *J Neurobiol*, 1994, 25(4): 431
- Rabacch S A, Ehsini M, Bonfanti L, *et al*. Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat. *Neuroscience*, 1994, 63(4): 969
- Watanabe M, Mishina M, Inoue Y. Differential distribution of the NMDA receptor channel subunit mRNAs in the mouse retina. *Brain Res*, 1994, 634: 328
- Choi D W. Calcium: still center-stage in hypoxic ischemic neuronal death. *TINS*, 1995, 18(2): 58

(1997-10-22 收稿 1998-04-01 修回)

(上接第171页)

低,但未恢复到正常,肾病理变化也明显减轻,这说明骆驼蓬总碱毒性的靶器官是肾脏。因此,我们认为病人在用药期间应定期检查肾功能,肾功能不良者应慎用。

停药4周后高剂量组大鼠组织学观察及血尿素氮水平检测结果发现,肾脏病变程度比刚停药时减轻,血尿素氮升高程度明显减轻。中、低剂量组给药停止时少数大鼠肾脏有改变,停药4周后病变均已消失,提示肾脏病变在一定程度上是可逆的。

### 参 考 文 献

- 李春杰,刘得玺,买买提依明,等.骆驼蓬抗癌化学成分的分鉴定和药理实验研究(附21例病人疗效观察). *新疆医学院学报*, 1987, 10(1): 27
- 潘启超,杨小平,利国威,等.骆驼蓬种籽混合生物碱5L抗肿瘤作用. *广东医学*, 1985, 6(5): 40
- 潘启超,杨小平,利国威,等.骆驼蓬种籽一吡啶生物碱的抗癌作用. *癌症*, 1985, 4(4): 192
- 杨小平,潘启超,李春杰.骆驼蓬总碱体内、外对人体肝癌和胃癌瘤株的抑制作用. *癌症*, 1991, 10(6): 463
- 徐叔云主编. *药理实验方法学*. 第2版,北京:北京人民出版社, 1991. 201~207
- Normon R. Hallucinogenic plants. *Science*, 1968, 162(2): 1086

(1997-09-03 收稿 1998-05-18 修回)