

· 药理 ·

## 五子衍宗丸对 NTDs 胎鼠神经管细胞凋亡的影响

樊慧杰, 李艳彦, 王永辉, 陈文超, 王悦尧, 柴智\*  
(山西中医学院, 太原 030024)

**[摘要]** **目的:**研究五子衍宗丸对全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA)诱导的神经管畸形(neural tube defects, NTDs)胎鼠模型神经管细胞凋亡的影响。**方法:**将 BALB/c 小鼠以雌雄 2:1 比例合笼, 阴栓阳性者为孕鼠。将孕鼠随机分为正常组、模型组、五子衍宗丸先给组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组、五子衍宗丸后给组, 后 3 组又各分为高、中、低剂量 3 个亚组(4.20, 2.10, 1.05 g·kg<sup>-1</sup>)。在胚胎 7 d 时, 模型组、五子衍宗丸先给组的 3 个亚组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组的 3 个亚组、五子衍宗丸后给组的 3 个亚组均给孕鼠灌胃 50 mg·kg<sup>-1</sup> ATRA 1 次。在胚胎 11 d 时, 处死孕鼠取出胚胎, 制成横切片后进行 HE 染色和 TUNEL 染色, 观察各组神经管发育情况和计算神经管细胞凋亡指数。**结果:**光镜下观察 HE 染色结果, 正常组神经管发育良好, 闭合完全; 模型组神经管发育不良, 闭合不全; 五子衍宗丸中、高剂量先给组, 五子衍宗丸中、高剂量和 ATRA 同时干预组神经管发育较好, 管壁可见完整的神经上皮层、套层、边缘层, 神经上皮细胞排列较致密有序; 五子衍宗丸中、高剂量后给组和五子衍宗丸低剂量各组神经管发育不良, 神经上皮细胞数量减少、排列无序。光镜下观察 TUNEL 染色结果, 与正常组比较, 五子衍宗丸高剂量先给组凋亡指数的差异无统计学意义; 其余各组凋亡指数增高的差异均有统计学意义。与模型组比较, 五子衍宗丸中、高剂量先给组, 五子衍宗丸中、高剂量和 ATRA 同时干预组凋亡指数显著降低, 差异均有统计学意义; 五子衍宗丸中、高剂量后给组和五子衍宗丸低剂量各组凋亡指数的差异均无统计学意义。**结论:**五子衍宗丸可抑制 NTDs 胎鼠模型神经管细胞的凋亡。

**[关键词]** 五子衍宗丸; 神经管畸形; 全反式维甲酸; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)09-0143-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014090143

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13422/j.cnki.syfjx.000060.html>

**[网络出版时间]** 2014-02-25 13:40

## Effect of Wuzi Yanzong Pills on Apoptosis of Neural Tube Cells in NTDs Model

FAN Hui-jie, LI Yan-yan, WANG Yong-hui, CHEN Wen-chao, WANG Yue-yao, CHAI Zhi\*  
(Shanxi College of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030024, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the influence of Wuzi Yanzong pills on apoptosis of neural tube cells in neural tube defects (NTDs) model induced by all-trans-retinoic acid (ATRA). **Method:** BALB/c females and males (ratio 2:1) were caged together overnight. Checked for the presence of a vaginal plug, the females were diagnosed as pregnant mice. Pregnant mice were randomly divided into normal group, model group, the group of early administration of Wuzi Yanzong pills, the group of simultaneous administration of Wuzi Yanzong pills and ATRA, and the group of late administration of Wuzi Yanzong pills. Each Wuzi Yanzong pills group was divided into three subgroups of high, middle and low doses (4.20, 2.10, 1.05 g·kg<sup>-1</sup>). Model group and three subgroups of group of early administration of Wuzi Yanzong pills and group of simultaneous administration of Wuzi Yanzong pills and ATRA and group of late administration of Wuzi Yanzong pills were once fed with 50 mg·kg<sup>-1</sup>

**[收稿日期]** 20131231(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81102552);山西中医学院基础与临床研究计划项目(2011JC14)

**[第一作者]** 樊慧杰, 博士, 讲师, 中药分子生物学研究, Tel:0351-2272378, E-mail: fanhuijie.happy@163.com

**[通讯作者]** \* 柴智, 博士, 讲师, 方剂效用及其物质基础研究, Tel:0351-2272073, E-mail: chaizhi008@126.com

ATRA at embryo 7 d. After pregnant mice were sacrificed at embryo 11 d, embryos were separated. The embryos were performed by preparation for sections using the staining of HE and TUNEL, which were used to observe the development of neural tube and calculate apoptotic index. **Result:** The neural tube developed well and completely closed in normal group. The neural tube appeared dysplasia in model group. The neural tube developed well, and consisted of endymal layer, mantle layer and marginal layer, and neuroepithelial cells arranged in order in groups of early administration of middle and high dose Wuzi Yanzong pills and groups of simultaneous administration of middle and high dose Wuzi Yanzong pills and ATRA. The neural tube appeared dysplasia, and neuroepithelial cells reduced and arranged in disorder in groups of late administration of middle and high dose Wuzi Yanzong pills and the groups of low dose Wuzi Yanzong pills. Compared with the normal group, the apoptotic index in the group of early administration of high dose Wuzi Yanzong pills have no statistically significant difference, but the apoptotic index in other groups were significantly increased. Compared with the model group, the apoptotic index in the groups of early administration of middle and high dose Wuzi Yanzong pills and the groups of simultaneous administration of middle and high dose Wuzi Yanzong pills and ATRA were significantly decreased; but the apoptotic index in the groups of late administration of middle and high dose Wuzi Yanzong pills and the groups of low dose Wuzi Yanzong pills showed no statistically significant decline. **Conclusion:** Wuzi Yanzong pills can inhibit the apoptosis of neural tube cells in NTDs model.

[ **Key words** ] Wuzi Yanzong pills; neural tube defects; all-trans-retinoic acid; apoptosis

神经管畸形 (NTDs) 是一种因神经管未完全闭合所致的出生缺陷<sup>[1]</sup>。我国 NTDs 的发生率居世界第一,山西又是国内的高发区<sup>[2]</sup>。NTDs 严重挑战人类优生优育,影响人口质量。目前国际上主要是针对叶酸预防 NTDs 的机制进行研究<sup>[3]</sup>,但是最近报道无叶酸饲料并不能引起小鼠 NTDs 的发生<sup>[4]</sup>,这就解释了临床上叶酸并不能完全阻断 NTDs 的原因。依据肾精、肾气主司机体生长发育和生殖的理论,NTDs 属于中医先天禀赋不足的范畴,肾精亏损为其主要原因,则将《摄生众妙方》中的补肾方剂五子衍宗丸用于防治 NTDs 的研究。本实验给孕鼠灌胃全反式维甲酸 (ATRA) 制备 NTDs 胎鼠模型,用五子衍宗丸在模型建立前、建立同时、建立后 3 个时间点分别干预孕鼠,观察五子衍宗丸对 ATRA 诱导的 NTDs 胎鼠神经管细胞凋亡的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级成年 BALB/c 小鼠,雌雄 2:1,体重 (23 ± 2) g。购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证编号 SCXK (京) 2009-0004。动物实验室采用自然照明,通风良好,室温为 (22 ± 2) °C,湿度为 45% ~ 55%,小鼠自由进食、饮水。

**1.2 药物和试剂** 五子衍宗丸 (组成:枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子) 由北京同仁堂股份有限公司同仁堂制药厂生产 (批号 2035248)。TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;ATRA 购自美国 Sigma 公司。

**1.3 仪器** IX51 光学显微镜 (日本奥林巴斯公

司),RM-2015 石蜡切片机 (德国莱卡公司),BMJ-1 生物组织包埋机 (天津天利航空机电有限公司),DH-5000A 恒温箱 (天津豪斯特仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 制备 NTDs 胎鼠模型** 将 BALB/c 小鼠以雌雄 2:1 比例合笼过夜,第 2 天早上检查雌鼠阴栓,阴栓阳性者为孕鼠。ATRA 粉末在避光条件下用香油溶解,模型组孕鼠在 E 7 d ig 50 mg·kg<sup>-1</sup> ATRA,正常组给予等体积的香油<sup>[5]</sup>。

**2.2 分组与给药** 将孕鼠随机分为 5 组:正常组、模型组、五子衍宗丸先给组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组、五子衍宗丸后给组,五子衍宗丸各组又分为高、中、低剂量 3 个亚组 (4.20, 2.10, 1.05 g·kg<sup>-1</sup>)。每组 3 只孕鼠,以其胎鼠为研究对象。将发现阴栓的当天中午 12 时定为胚胎 (embryo, E) 0.5 d。E 4 d, E 5 d, E 6 d 时,正常组、模型组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组的 3 个亚组、五子衍宗丸后给组的 3 个亚组均给孕鼠 ig 蒸馏水,每天 1 次;五子衍宗丸先给组的 3 个亚组按五子衍宗丸高、中、低剂量给孕鼠 ig,每天 1 次。E 7 d 时,模型组、五子衍宗丸先给组的 3 个亚组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组的 3 个亚组、五子衍宗丸后给组的 3 个亚组均给孕鼠 ig 50 mg·kg<sup>-1</sup> ATRA 1 次;同时,五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组的 3 个亚组按五子衍宗丸高、中、低剂量 1 次性给孕鼠 ig;正常组给孕鼠 ig 等体积的香油。E 8 d, E 9 d, E 10 d 时,正常组、模型组、五子衍宗丸先给组的 3 个亚组、五子衍宗丸和 ATRA 同

时干预组的 3 个亚组均给孕鼠 ig 蒸馏水,每天 1 次;五子衍宗丸后给组的 3 个亚组按五子衍宗丸高、中、低剂量给孕鼠 ig,每天 1 次。ig 体积为 20 mL·kg<sup>-1</sup>,每天称重并根据体重调整药量。

### 2.3 指标检测

**2.3.1 HE 染色观察 NTDs** E11d 将正常组、模型组、五子衍宗丸先给组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组、五子衍宗丸后给组孕鼠处死,取出胚胎,置于 10% 甲醛溶液中固定,乙醇梯度脱水和透明、浸蜡、包埋,将其制成横切片,进行常规 HE 染色。参照正常组,显微镜下观察其余各组胎鼠神经管的发育情况。

**2.3.2 TUNEL 染色观察细胞凋亡** 将各组孕鼠于 E11d 时处死,取出胚胎,在制作病理切片的基础上脱蜡、水化,具体操作按照细胞凋亡检测试剂盒说明书方法进行。显微镜下观察各组胎鼠神经管的细胞凋亡情况,细胞核中有棕黄色颗粒的为凋亡细胞。于 400 倍下随机选取 5 个视野计数 200 个细胞中凋亡细胞数。

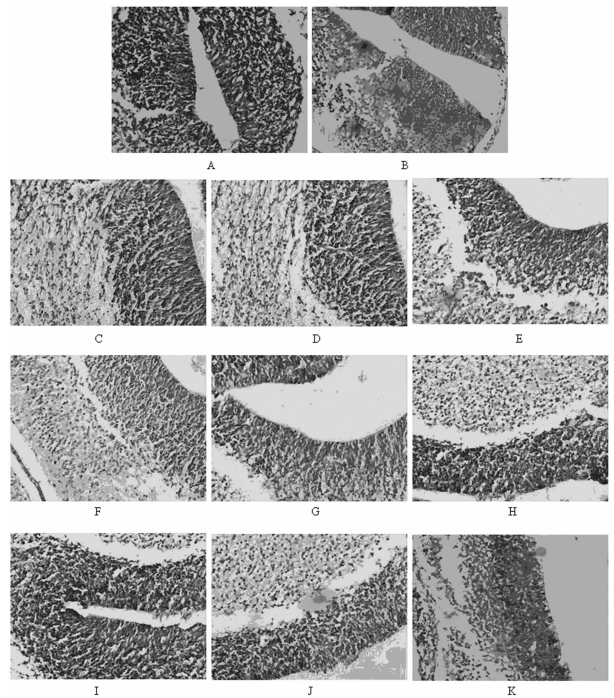
凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 200 × 100%

**2.4 统计学方法** 所有数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据不符合正态性分布,结果以中位数(四分位数间距)表示。多组间的比较采用多个独立样本的非参数检验(Kruskal-Wallis H 检验),多个独立样本两两比较用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对 NTDs 胎鼠神经管发育的观察** 光镜下观察到正常组神经管发育良好,闭合完全,神经管管壁可见完整的神经上皮层、套层、边缘层,神经上皮细胞排列整齐致密。模型组神经管发育不良,未完全闭合,NTDs 的神经上皮层薄,神经上皮细胞数量减少、排列疏松且不规整。五子衍宗丸中、高剂量先给组,五子衍宗丸中、高剂量和 ATRA 同时干预组神经管发育较好,管壁可见完整的神经上皮层、套层、边缘层,神经上皮细胞排列较致密有序。五子衍宗丸中、高剂量后给组和五子衍宗丸低剂量各组神经管发育不良,神经上皮细胞数量减少、排列无序。见图 1。

**3.2 对 NTDs 胎鼠神经管细胞凋亡的影响** 与正常组比较,五子衍宗丸高剂量先给组凋亡指数的差异无统计学意义;其余各组凋亡指数升高的差异均有统计学意义。与模型组比较,五子衍宗丸中、高剂量先给组,五子衍宗丸中、高剂量和 ATRA 同时干预组凋亡指数显著降低,差异均有统计学意义;五子衍宗丸中、高剂量后给组和五子衍宗丸低剂量各组凋



A. 正常组;B. 模型组;C. 五子衍宗丸 4.20 g·kg<sup>-1</sup> 先给组;D. 五子衍宗丸 2.10 g·kg<sup>-1</sup> 先给组;E. 五子衍宗丸 1.05 g·kg<sup>-1</sup> 先给组;F. 五子衍宗丸 4.20 g·kg<sup>-1</sup> 和 ATRA 同时干预组;G. 五子衍宗丸 2.10 g·kg<sup>-1</sup> 和 ATRA 同时干预组;H. 五子衍宗丸 1.05 g·kg<sup>-1</sup> 和 ATRA 同时干预组;I. 五子衍宗丸 4.20 g·kg<sup>-1</sup> 后给组;J. 五子衍宗丸 2.10 g·kg<sup>-1</sup> 后给组;K. 五子衍宗丸 1.05 g·kg<sup>-1</sup> 后给组;E7d 时,模型组、五子衍宗丸先给组的 3 个亚组、五子衍宗丸和 ATRA 同时干预组的 3 个亚组、五子衍宗丸后给组的 3 个亚组均给孕鼠灌胃 50 mg·kg<sup>-1</sup> ATRA 1 次(图 2 同)

图 1 五子衍宗丸对 ATRA 诱导的 NTDs 胎鼠模型神经管发育的影响(HE 染色, ×400)

亡指数的差异无统计学意义。见表 1,图 2。

表 1 各组神经管细胞凋亡指数比较

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	凋亡指数/% 中位数 (四分位数间距)
正常	-	0.38(0.89)
模型	-	37.67(45.42) <sup>2)</sup>
五子衍宗丸先给	4.20	1.18(1.95) <sup>4)</sup>
	2.10	1.54(24.28) <sup>1,3)</sup>
	1.05	8.25(30.60) <sup>2)</sup>
五子衍宗丸与 ATRA 同时干预	4.20	1.47(9.14) <sup>1,3)</sup>
	2.10	1.43(27.28) <sup>1,3)</sup>
	1.05	20.00(35.94) <sup>2)</sup>
五子衍宗丸后给	4.20	3.00(30.75) <sup>2)</sup>
	2.10	16.00(36.45) <sup>2)</sup>
	1.05	22.33(43.50) <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

神经管由神经板演变而来。神经板经弯曲形成管状结构,神经板的交融处为神经褶,其逐渐发育成为神经管的背部。神经管完成封闭以后,前段迅速

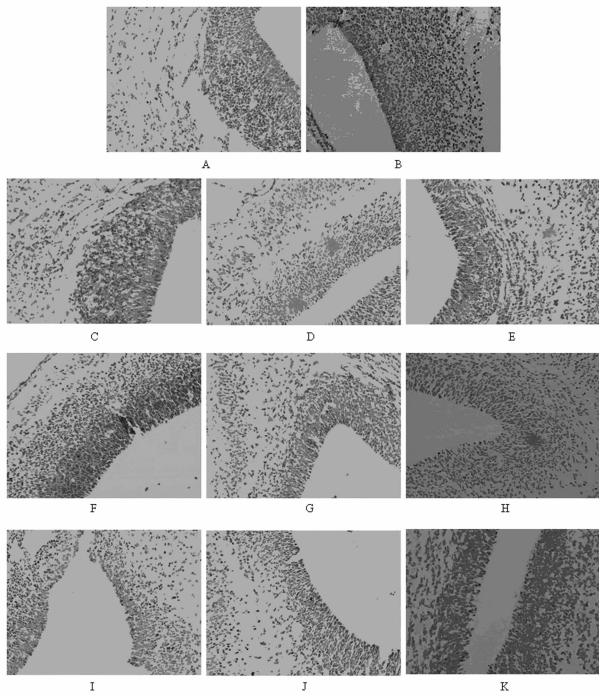


图2 五子衍宗丸对 ATRA 诱导的

NTDs 胎鼠模型神经管细胞凋亡的影响(TUNEL 染色, ×400)

膨大形成脑,后端则发育成为脊髓。任何影响神经管发育的干扰因素都可能导致神经管不能完全闭合。若头部神经管没有闭合则会出现 NTDs 中露脑或者无脑畸形;若脊髓部位的神经管没有闭合则会出现 NTDs 中脊柱裂畸形。

细胞凋亡与 NTDs 的发生机制关系密切。细胞凋亡是一种由基因控制的细胞程序性主动死亡。细胞凋亡与细胞增殖、分化相同,均是胚胎发育过程中的重要环节。在基因严格精密的调控下,他们协同作用使神经板融合成神经管并闭合完全,促进胚胎中枢神经系统发育。若这种协同作用营造的平衡关系被破坏,神经管异常凋亡,导致神经管发育畸形。通过基因芯片技术研究 NTDs 小鼠,发现多个与细胞凋亡相关的基因出现差异性表达<sup>[6]</sup>。

ATRA 是维生素 A 的功能形式,通过诱导细胞凋亡、分化而发挥抗增殖的效应,在神经管发育过程中起着重要作用。研究发现,过量的 ATRA 可以诱导孕鼠胚胎发生 NTDs<sup>[7]</sup>。具体机制是,过量的 ATRA 可使神经管细胞出现大量凋亡;使神经上皮细胞增殖速度放缓;使神经褶细胞生长受到抑制<sup>[8]</sup>。

五子衍宗丸是中医补肾填精的经典方剂。实验研究发现,五子衍宗丸具有明显增强小鼠记忆力和空间认知力,提高小鼠耐缺氧、抗疲劳能力的作用,同时可提高非特异性免疫功能<sup>[9]</sup>;而且其具有降低支持细胞和生精细胞凋亡率的作用<sup>[10-11]</sup>。

本实验用五子衍宗丸对 NTDs 胎鼠模型进行不同时间点的干预,在 E11d 时观察五子衍宗丸对 NTDs 胎鼠神经管细胞凋亡的影响。实验发现,对 NTDs 胎鼠细胞凋亡指数有降低作用的四组分别是五子衍宗丸高剂量先给组、五子衍宗丸中剂量先给组、五子衍宗丸高剂量和 ATRA 同时干预组、五子衍宗丸中剂量和 ATRA 同时干预组;五子衍宗丸低剂量先给组、五子衍宗丸低剂量和 ATRA 同时干预组、五子衍宗丸高剂量后给组、五子衍宗丸中剂量后给组和五子衍宗丸低剂量后给组凋亡指数的降低趋势均无统计学上意义。

综上所述,五子衍宗丸可降低 NTDs 胎鼠神经管细胞的凋亡程度。这不仅从微观证实了五子衍宗丸对 NTDs 的可能作用机制,而且有利于指导五子衍宗丸在临床上防治 NTDs 的初步推广应用。

[参考文献]

[1] Kumar A. Neural tube defects; a neglected problem[J]. Indian Pediatrics, 2009, 46(8):665.

[2] 裴丽君,李竹,李松,等. 中国神经管畸形高低发地区季节性 & 性别分布特征[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(6):465.

[3] Eichholzer M, Tönz O, Zimmermann R. Folic acid; a public-health challenge [J]. Lancet, 2006, 367(9519):1352.

[4] Pitkin R M. Folate and neural tube defects[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85(1):285S.

[5] Shang Y, Zhao H, Niu B, et al. Correlation of polymorphism of MTHFRs and RFC-1 genes with neural tube defects in China[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2008, 82(1):3.

[6] 李新军,韩杨云,徐宏,等. 基因芯片分析 NTD 小鼠细胞周期和凋亡相关基因表达的变化[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2013, 12(2):117.

[7] Wilson L, Gale E, Maden M. The role of retinoic acid in the morphogenesis of the neural tube[J]. J Anat, 2003, 203(4):357.

[8] Cai W, Zhao H, Guo J, et al. Retinoic acid-induced lumbosacral neural tube defects; myeloschisis and hamartoma[J]. Childs Nerv Syst, 2007, 23(5):549.

[9] 金龙,葛争艳,刘建勋. 五子衍宗丸对小鼠记忆力、免疫功能、耐缺氧及耐疲劳的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16):123.

[10] 殷金龙,徐渊,吴斌. 五子衍宗复方对睾丸支持细胞氧化应激损伤和细胞凋亡的影响[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(3):257.

[11] 杨阿民,刘保兴,张圣强,等. 五子衍宗丸改善肾精亏虚大鼠支持细胞功能的机理研究[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(6):378.

[责任编辑 聂淑琴]