

促进脊髓损伤修复的天然药物筛选

王晓华¹, 朱华^{1,2*}, 紺野胜英³, 东田千寻³, 数马恒平³, 久保山友晴³, 宫永贤³

(1. 成都中医药大学, 成都 610075; 2. 广西中医学院, 南宁 530001;
3. 日本富山大学和汉医药学综合研究所, 富山 930-0194)

[摘要] **目的:**从天然药物中筛选促进大脑皮质神经元轴突增长的药物。**方法:**采用系统溶剂提取法得到不同部位的人参、刺五加、黄芪提取液。从大鼠胚胎(SD 大鼠, 妊娠 17 d)的大脑皮质分离神经细胞原代培养;应用磷酸化神经丝 H(pNF-H)抗体(轴突的标记)和微管相关蛋白 2(MAP2a & 2b)抗体(树突的标记)进行免疫染色;采用显微摄影技术及图像分析技术,测量神经细胞轴突和树突的长度。**结果:**人参醇提液 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 可促进大脑皮质神经细胞轴突增长($P < 0.05$);刺五加水提取液 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 在大脑皮质神经细胞轴突增长方面有效($P < 0.05$);从刺五加水提取液中再次分得乙酸乙酯、正丁醇和水部分,其中 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 正丁醇部位和水部位显示出促进轴突增长的作用($P < 0.05$)。**结论:**人参的醇提取液和刺五加的正丁醇部位及水部位可能具有潜在的促进脊髓损伤修复的作用。

[关键词] 人参;黄芪;刺五加;脊髓损伤;原代培养

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0246-03

Screening on Fractions from Some Chinese Herbs for Spinal Cord Injury

WANG Xiao-hua¹, ZHU Hua^{1,2*}, KONNO Katsuhiko³, TOHDA Chihiko³,
KAZUMA Kohei³, KUBOYAMA Tomoharu³, MIYANAGA Satoshi³

(1. Chengdu Traditional Chinese Medical University, Chengdu 610075, China;
2. Gangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning 530001, China;
3. Institute of Natural Medicine, University of Toyama, Toyama 930-0194 Japan)

[Abstract] **Objective:** To search for natural products that could promote neurite outgrowth. **Method:** Neurite outgrowth activity was evaluated after treatment of natural extracts from Ginseng Radix et Rhizoma, Astragali Radix, Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis using primary cultured cortical neurons (SD rat, E17). Extension of axons and dendrites was quantified by immunocytochemistry using Phosphorylated neurofilaments protein H (pNF-H) antibody (axon marker) and MAP2a & 2b (dendrite marker); microscopic analysis and image analysis were used for measuring the growth of axons and dendrites. **Result:** The preliminary experiments indicated that; among methanol extracts of 3 natural medicines, Ginseng Radix et Rhizoma was effective to extend axons at $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$). As to water extracts, Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis has effect to extend axons ($P < 0.05$). The water extracts of Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis was further partitioned by ethyl acetate, n-butanol, and the n-butanol fraction and water subfraction seemed to show the ability to extend the axons ($P < 0.05$). **Conclusion:** The preliminary results indicated that the methanol extracts of Ginseng Radix et Rhizoma and the n-butanol fraction and water subfraction of Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis have the potential ability to repair spinal cord injury. The animal experiment is needed to confirm these results.

[收稿日期] 20111231(850)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2011GXNSFF018006)

[第一作者] 王晓华,在读博士,讲师,Tel:0773-2295240,E-mail:shengyaoxue@glmc.edu.cn

[通讯作者] *朱华,博士,教授,从事中药品种、品质及资源研究工作,Tel:0771-3135848,E-mail:zhuhua@gxtcmu.edu.cn

[Key words] Ginseng Radix et Rhizoma; Astragali Radix; Acanthopanax Senticosi Radix et Rhizoma seu Caulis; spinal cord injury; primary culture

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经损伤,其治疗原则为早期用药、早期手术、早期康复^[1]。药物治疗中主要包括神经保护和促进神经修复再生2个方面^[2],目前临床上以甲泼尼龙(methylprednisolone, MP)应用最为广泛,是迄今为止疗效较为肯定的治疗脊髓损伤药物,但其作用机制至今仍未完全了解^[3]。从中药中筛选和发现神经保护或促进神经修复的药物有着广阔前景。

研究显示,人参皂苷具有神经营养和神经保护作用,能够增强学习记忆,抗衰老^[5];黄芪注射液可通过上调脑缺血再灌注诱导的Bcl-2蛋白表达,下调Bax蛋白表达,Bcl-2/Bax比值升高,从而抑制神经细胞凋亡^[6];刺五加具有类似人参的适应原样作用,可增强免疫力、抗衰老、抗疲劳、抗辐射^[4],其主要成分为刺五加苷A、B、B₁、C、D、E、F、G等多种苷及刺五加多糖。本研究旨在利用大鼠大脑皮层原代神经细胞,从人参、黄芪、刺五加中筛选出具有促进脊髓损伤修复的天然药物。

1 材料

妊娠17~18 d的SD大鼠(Shizuoka 日本);人参,日本大阪,批号TMPW NO 25935;黄芪,日本大阪,批号TMPW NO 25873;刺五加,日本大阪,批号TMPW NO 25910;Neurobasal培养基, Gibco, 批号21103;B-27, Gibco,批号17504044; Hank's液、胎牛血清, Gibco,批号26050088; D-多聚赖氨酸, Sigma,批号P7280; EDTA, Gibco, 批号25300;单克隆抗体, Covance, 批号SMI-35R;多克隆抗体 Millipore, 批号AB5622; Alexa-fluor-568, Invitrogen, 批号A11036; Alexa-fluor-488, Invitrogen, 批号A11029。

2 方法

2.1 原代培养 取妊娠17~18 d的SD大鼠,打开腹腔,取出胚鼠,在解剖显微镜下分离出大脑皮层细胞,用含12%胎牛血清的Neurobasal培养液,以 4×10^4 个细胞/孔密度接种于涂有D-多聚赖氨酸的8孔培养皿中,37℃,5% CO₂ 孵箱中培养。第2天换成无血清的2% B-27培养液,2 d之后加入药物,再培养4 d后进行固定。

2.2 免疫化学与神经细胞长度的测量 用4%的多聚甲醛固定细胞,采用大鼠抗pNF-H单克隆抗体(1:500)作为轴突的标记物,兔抗MAP2a & 2b多克隆抗体(1:500)作为树突的标记,第二抗体分别用

羊抗兔 IgG-Alexa-fluor-568 (1:300),羊抗大鼠 IgG-Alexa-fluor-488 (1:300)。每一处理方法在荧光显微镜下捕获20~30张图片,轴突和树突的长度采用“Neurocyte”软件在图像上进行测量。

2.3 各种提取液的制备

2.3.1 醇提液 分别称取人参、黄芪、刺五加原药材50 g,加入甲醇200 mL回流提取3次,1 h/次,合并提取液,旋转蒸发,冷冻干燥,得人参醇提液5.421 6 g,黄芪醇提液10.943 7 g,刺五加醇提液1.949 7 g。

2.3.2 水提液 分别称取人参、黄芪、刺五加原药材50 g,加水900 mL直接加热煮沸1 h,冷冻干燥,得人参水提液8.647 5 g,黄芪水提液12.805 8 g,刺五加水提液1.935 5 g。

2.3.3 刺五加不同萃取液的制备 将刺五加水提液悬浮在水中,分别用乙酸乙酯和正丁醇进行萃取,得到乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液及水萃取液。

2.4 样品溶液的制备 分别称取各种提取液及萃取液10 mg,放入1.5 mL的灭菌EP管中,无菌条件下每管加入灭菌双蒸水1 mL, vortex上混匀,得10 g·L⁻¹的样品溶液,再分别稀释至1, 0.1 g·L⁻¹。

2.5 数据处理及统计方法 经“Neurocyte”软件测量,得到的轴突总长度及每个神经细胞的长度,将所得每张图片的数据取平均值,得到每个神经细胞轴突的平均长度,采用stata 7.0软件,应用单因素方差分析,多重比较对数据进行统计学处理。

3 结果

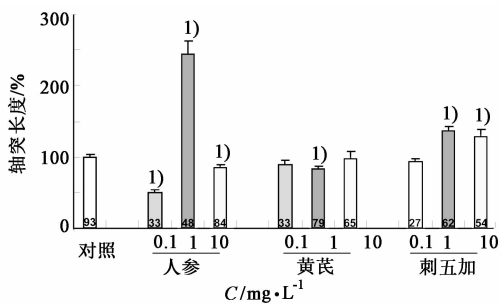
3.1 3种药醇提物对大鼠神经细胞轴突长度的影响 人参醇提液对轴突增长有效($P < 0.05$)有效质量浓度为1 mg·L⁻¹,刺五加醇提液轴突增长有部分效果,黄芪醇提液基本无效,见图1。

3.2 3种药水提液对大鼠神经细胞轴突长度的影响 3种药水提液均表现出一定促进神经细胞轴突增长的效果,其中以刺五加水提液最为有效($P < 0.05$),见图2。

3.3 刺五加水提部分的不同萃取液对轴突长度的影响 从刺五加水提部分所得3种萃取液中,以水萃取层对神经细胞轴突的增长最强,其次为正丁醇层,乙酸乙酯层基本没有作用。见图3,图4。

4 讨论

4.1 脊髓损伤后会导致损伤平面以下运动功能障碍



与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$ (图 2~3 同)

柱形图里面插入的数字表示照片的数目 (图 2~3 同)

图 1 3 种药物醇提液对大脑皮质细胞轴突长度的影响

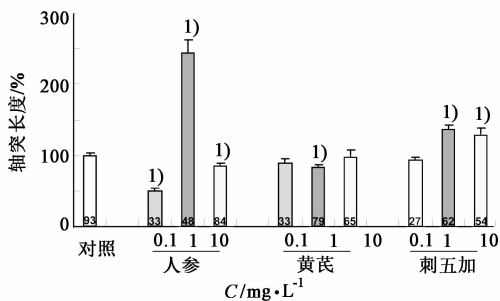


图 2 3 种药物水提液对大脑皮质细胞轴突长度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

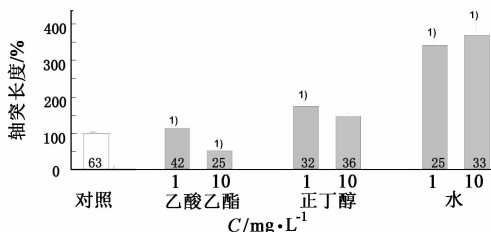


图 3 刺五加水提部位不同萃取液对轴突长度的影响

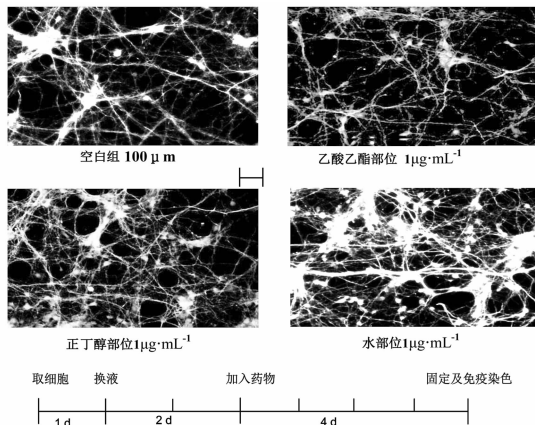


图 4 刺五加水提部位的不同萃取液对轴突长度的影响

碍,这是由于大脑向脊髓传递运动指令的下行性传导束中断所致,其中重要的传导束之一是皮质脊髓束(corticospinal tract, CST)。有研究表明^[7-8],SCI后大脑皮质神经元可能会出现死亡、萎缩等病理变

化;再加上神经细胞属于分裂后期细胞,不具备分化能力,神经细胞的体外培养较其他组织细胞培养更困难。脊髓是神经系统的特殊部分,主要是由长行的传导束组成,神经元分散,数量较大(小)脑皮层神经元少^[9];最好的脑细胞培养物来自妊娠 16~18 d(正常孕期为 1 个月)的胚胎,大白鼠又是广泛用于高级神经活动实验的动物,在本研究中我们采用大鼠大脑皮质神经细胞作为原代培养细胞,研究药物对神经细胞的修复作用。

4.2 本研究表明,3 种天然药物的醇提液中,以 1 mg·L⁻¹的人参醇提液在大脑皮质神经细胞轴突增长方面有效;水提液中,以刺五加水提取液有效;从刺五加水提取液中再次分得乙酸乙酯、正丁醇和水部分,以正丁醇部位和水部位有效人参醇提液和刺五加正丁醇部位及水部位具有潜在的促进脊髓损伤修复的作用,此结果尚需要利用模拟脊髓损伤环境的细胞实验及动物实验进一步证实。

[致谢] 本实验得到日本富山大学和汉医药学综合研究所的大力支持,尤其是制剂开发部门和民族药理学部门,得到了日本文化部地区创新战略支援计划北陆健康创造集体推广项目(文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム北陆健康创造クラスター広域化プログラム)的赞助。

[参考文献]

- [1] 唐硕,许扬滨. 脊髓损伤的治疗原则及进展[J]. 临床急诊杂志,2011,12(5):312.
- [2] 陈宇飞,王四旺,罗卓荆. 中药治疗脊髓损伤的研究现状[J]. 现代生物医学进展,2010,10(10):1983.
- [3] 王国宾,游洪波,孙凯. 急性脊髓损伤的药物治疗进展[J]. 医药导报,2010,29(3):324.
- [4] 蔡少青. 生药学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2011:194.
- [5] 徐丽. 人参皂苷神经保护作用机制的研究进展[J]. 牡丹江医学院学报,2007,28(4):81.
- [6] 曲友直,赵燕玲,秦怀洲,等. 黄芪注射液对脑缺血再灌注后的神经细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 神经疾病与精神卫生,2007,7(1):13.
- [7] Lee B H, Lee K H, Kim U J, et al. Injury in the spinal cord may produce cell death in the brain[J]. Brain Res,2004,1020:37.
- [8] Wannier T, Schmidlin E, Bloch J, et al. A unilateral section of the corticospinal tract at cervical level in primate does not lead to measurable cell loss in motor cortex[J]. J Neurotrauma, 2005, 22(6):703.
- [9] 余磊,潘树义,秦建强. 脊髓神经细胞培养的方法[J]. 中国临床解剖学杂志,2002,20(4):267.

[责任编辑 何伟]