

· 论 著 ·

## 刺五加皂苷对体外培养大鼠脊髓运动神经元缺氧损伤的保护作用

陈剑峰<sup>1,2</sup>, 张 烽<sup>2\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属无锡中医院骨科, 无锡 214007; 2. 南通大学附属医院骨科, 南通 226001)

**[摘要]** **目的:**观察刺五加皂苷(*acanthopanax senticosus saponins*, ASS)对脊髓运动神经元缺氧损伤有无保护作用,并探讨其可能机制。**方法:**对胚鼠运动神经元进行原代分离培养,免疫组化鉴定后建立缺氧诱导的神经元凋亡模型。取运动神经元培养在24孔板中,每组10孔,分为4组:对照组,无缺氧损伤;缺氧损伤组;ASS保护组,缺氧前24h加入50 μg/ml的ASS;神经胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)保护组,缺氧前24h加入0.1 μg/ml的GDNF。倒置显微镜及电镜下观察细胞形态学变化;MTT法测定神经元细胞活性;检测细胞外液LDH释放量来观察ASS对神经元细胞膜稳定性的影响。提取细胞匀浆液,Western印迹法检测分析ASS对缺氧的运动神经元HIF-1α表达的影响。**结果:**形态学观察显示ASS、GDNF保护组神经元缺氧损伤较缺氧损伤组明显减轻。ASS保护组神经元的细胞活性(0.21±0.028)比缺氧损伤组(0.15±0.012)高( $P<0.05$ ),而LDH的释放量(28.6±1.309)比缺氧损伤组(40.7±1.885)低( $P<0.01$ );缺氧损伤组的神经元HIF-1α的相对表达量(0.72±0.027)比对照组(0.16±0.003)高( $P<0.01$ ),但ASS保护组HIF-1α的表达(1.15±0.016)最高( $P<0.01$ )。ASS对大鼠脊髓运动神经元缺氧损伤的保护作用与GDNF相仿。**结论:**ASS可以提高体外缺氧损伤的运动神经元的细胞活性,对细胞的缺氧损伤有明显的保护作用,其保护作用的发挥,可能与增强细胞膜的稳定性及提高细胞HIF-1α的表达有关。

**[关键词]** 刺五加皂苷;细胞凋亡;缺氧;运动神经元;脊髓;细胞,培养的

**[中图分类号]** R 282.710.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)02-0173-05

### Protective effect of *acanthopanax senticosus saponins* on anoxia-damaged motoneurons in rat spinal cord *in vitro*

CHEN Jian-feng<sup>1,2</sup>, ZHANG Feng<sup>2\*</sup> (1. Department of Orthopaedics, Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214007, China; 2. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate whether *acanthopanax senticosus saponins*(ASS) has a protective effect on anoxia-damaged rat spinal cord motoneurons(SMNs) *in vitro* and to reveal the possible mechanism of this effects. **Methods:** SMNs were obtained from the spinal cord of embryonic day 15 rats and were cultured *in vitro*. The cultured cells were immunohistochemically identified and were subjected to anoxia exposure to establish apoptosis model. In this study, SMNs were divided into the following 4 groups; normal control group; anoxia-induced apoptosis group; ASS pre-treated group, SMNs were treated with ASS (50 μg/ml) 24 h before anoxia exposure; and glial-cell-line-derived neurotrophic factor(GDNF) pre-treated group, SMNs were treated with GDNF(0.1 μg/ml) 24 h before anoxia exposure. The morphology of SMNs was observed with phase-contrast microscope and electron microscope; the viability of SMNs was detected with MTT method; and the influence of ASS on the stability of SMNs membrane was observed through detection of lactate dehydrogenase (LDH) level in the extracellular solution. The influence of ASS on the expression of HIF-1α in anoxia-damaged SMNs was studied by Western blot analysis. **Results:** The morphological damage of SMNs in ASS and GDNF pre-treated groups was slighter than that in anoxia-induced apoptosis group. The results showed that the viability of SMNs was higher in ASS pre-treated group (0.21±0.028) compared with that in anoxia-induced apoptosis group (0.15±0.012) ( $P<0.05$ ), while the level of LDH was lower in ASS pre-treated group (28.6±1.309) than that in anoxia-induced apoptosis group (40.7±1.885) ( $P<0.01$ ). The expression of HIF-1α in ASS pre-treated group was the highest (1.15±0.016) ( $P<0.01$ ), and that in anoxia-induced apoptosis group (0.72±0.027) was higher than that in the control group (0.16±0.003) ( $P<0.01$ ). Protective effect of ASS on anoxia-damaged SMNs in rats was similar to that of GDNF. **Conclusion:** ASS can increase the viability of hypoxia-damaged SMNs *in vitro* and has obvious protective effects on them, which may be related to the enhanced stability of cell membrane and the up-regulation of HIF-1α expression.

**[KEY WORDS]** *acanthopanax senticosus saponins*; apoptosis; anoxia; motor neurons; spinal cord; cells, cultured

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(2): 173-177]

急性脊髓损伤(ASCI),一直是困扰医学界的一大难题。现研究表明继发性脊髓损伤是脊髓损伤的重要组成部分。随着细胞凋亡概念的提出,研究<sup>[1,2]</sup>

**[基金项目]** 无锡市社会发展基金(20040006)。Supported by Social Development Foundation of Wuxi Municipal Government(20040006)。

**[作者简介]** 陈剑峰,硕士,主治医师。E-mail:chengjfhcy@126.com

\* Corresponding author. E-mail:zhf1017@hotmail.com

发现脊髓损伤后广泛存在神经元的凋亡,延缓或阻断神经细胞广泛的凋亡是神经保护的主要目标,所以神经保护剂的筛选及相关药理机制的研究已成为中枢神经系统损伤修复研究的一大热点。

刺五加皂苷(*acanthopanax senticosus saponins*, ASS)为中草药刺五加中提取的黄酮类制剂,在脑缺血的研究中发现其能明显增加缺血脑组织的超氧化物歧化酶(SOD)含量,减少丙二醛(MDA)含量,对脑组织缺血有保护作用<sup>[3]</sup>。刺五加对缺血培养的大鼠胎鼠大脑皮质神经元具有保护作用,其机制与提高抗氧化物质含量、减少脂质氧化物生成、拮抗兴奋性氨基酸毒性有关<sup>[3]</sup>。鉴于刺五加皂苷的前述作用,推测刺五加皂苷可用于 ASCI 的治疗。缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)是一种分布和作用十分广泛的真核细胞转录因子,可被多种胞外刺激活化,影响细胞存活、生长、分化及凋亡的基因表达,具有重要的生理作用。目前认为 HIF-1 活化是细胞低氧应答的关键环节<sup>[4]</sup>。本实验旨在观察刺五加皂苷能否对体外缺氧条件下大鼠脊髓运动神经元发挥保护作用,并探讨其可能机制。

## 1 材料和方法

1.1 动物和试剂 ASS 由吉林大学有机化学研究室提供,多聚赖氨酸、胰蛋白酶、MTT、DMSO、硝酸纤维膜等购自 Sigma 公司,兔抗鼠神经元特异性烯醇化酶抗体(neuronal specific enolase, NSE)、生物素化的羊抗兔 IgG 购自北京中山公司,DMEM 培养基、胎牛血清、神经胶质细胞源性神经营养因子(glia cell-derived neurotrophic factor, GDNF)购自 Gibco 公司。SD 大鼠由南通大学动物研究中心提供。

1.2 大鼠脊髓运动神经元(spinal motor neurons, SMNs)体外培养<sup>[5,6]</sup>及染色鉴定 乙醚麻醉孕 15 d SD 大鼠,无菌条件下取出并分离脊髓。切取脊髓的腹侧组织,置于 0.25% 胰蛋白酶和 1% 胶原酶中,37℃ 消化;消化后的脊髓前角细胞悬液(培养液为含 10% FBS 的 DMEM 培养基)在培养前进行差速贴壁,离心后换入 NB1 培养液吹打均匀,以  $1 \times 10^6$  /ml 的细胞密度接种,置于 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。每周换液 2 次。取培养 10 d 的细胞进行 NSE 免疫组织化学染色,4% 多聚甲醛室温固定;加入 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 甲醇,以去除内源性过氧化氢酶;10% 绵羊血清封闭 20 min;加入一抗(1:200 兔抗鼠 NSE 抗体)4℃ 冰箱过夜;二抗(1:200 生物素化的山羊抗兔)孵育 60

min;ABC 液 60 min;DAB 显色,乙醇脱水,二甲苯透明,塑胶封片。

1.3 缺氧损伤模型(神经元凋亡模型)<sup>[7]</sup>的建立及动物分组 取培养 7 d 的运动神经元,吸去培养液,换上无血清 L-15 培养基,同时用石蜡油封闭各孔造成缺氧条件,继续培养 3 d。分组如下:对照组,正常培养 10 d,不进行缺氧损伤;缺氧损伤组,在缺氧损伤前 24 h 给予 0.01 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲溶液(PBS)约 800 μl;ASS 保护组,在运动神经元种植后 24 h 及损伤前 24 h 均加入 50 μg/ml 的 ASS 约 800 μl;GDNF 保护组,在运动神经元种植后 24 h 及损伤前 24 h 均加入 0.1 μg/ml 的 GDNF 约 800 μl。

1.4 形态学观察 倒置显微镜观察:观察神经元的生长状态及形态变化。扫描电镜观察:切片在 4% 戊二醛中固定,漂洗;再用 1% 锇酸固定,漂洗;然后使用 100% 乙醇逐级脱水,真空干燥,镀膜。在 JSM-T300 扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)下观察细胞形态。透射电镜观察:经 4% 戊二醛前固定,1% 锇酸后固定,乙醇梯度脱水,Epon812 树脂包埋,LKB-V 超薄切片机制片,铀-铅复染,在 JEM-100S 型透射电镜(transmission electron microscope, TEM)下观察细胞内结构变化。

1.5 MTT 法测定神经元存活率<sup>[8]</sup> 向 96 孔板加入 25 μl MTT 溶液(终浓度 1 mg/ml),37℃ 下继续培养 4 h,每孔再加入 100 μl 溶于 50% DMF 的 20% SDS,37℃ 放置 20~24 h,用微孔酶标仪在 570 nm 处测定其光密度值( $D_{570}$ 值),各组存活率用百分比的形式表示。

1.6 LDH 释放量测定<sup>[9]</sup> 分别取 0.194 mg/ml 丙酮酸钠及 0.154 mg/ml NADH 各 1.3 ml,溶于 pH7.5 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 缓冲液,加入 0.4 ml 待测培养液,37℃ 下迅速混匀,30 s 后每隔 10 s 用微孔酶标仪在 340 nm 处测定其光密度值( $D_{340}$ 值),连续 5 min,以每毫升培养液每分钟  $D_{340}$  值下降 0.001 为一个 LDH 活性单位( $U \cdot ml^{-1} \cdot min^{-1}$ )。

1.7 SDS-PAGE<sup>[10]</sup>和 Western 印迹分析法检测运动神经元 HIF-1 $\alpha$  表达 采用 SDS-PAGE 系统,对各组细胞的提取液(根据文献<sup>[11]</sup>方法)按常规制胶,加样进行垂直板电泳然后予以转膜,加入一抗、二抗进行抗原抗体反应,显影、定影,扫描后采用四星图像分析仪进行图像分析。

1.8 统计学处理 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 Stata 7.0 统计软件进行数据处理。两组数据间比较用两样本均数比较的  $t$  检验。

## 2 结果

2.1 SMNs 的生长状况及染色鉴定 培养 10 d 神经元相互之间、神经元和非神经元细胞(主要是星形胶质细胞)之间相互形成联系,连接成密集的网络。成纤维细胞和胶质细胞生长铺展于底层,神经元在它们的上层生长。培养 10 d 的脊髓细胞进行 NSE 免疫组织化学染色,阳性染色为棕黄色细胞,能较好的显示细胞形态,培养出生长良好的运动神经元(图 1)。

### 2.2 SMNs 的形态学观察

2.2.1 倒置镜下形态学观察 对照组神经元胞体饱满,周围有光晕,突起细长,相互联系连成网络状(图 2A);缺氧损伤组的细胞透光率下降,胞体皱缩成球形,突起断裂,网络消失,不少细胞破裂死亡,并

出现悬浮死细胞(图 2B);ASS 保护组的神经元形态有所改善,较多细胞保留突起,可见细胞的肿胀、坏死(图 2C),与 GDNF 保护组类似。

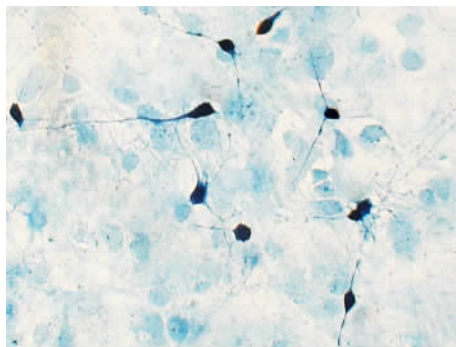


图 1 大鼠脊髓运动神经元 NSE 染色鉴定  
Fig 1 NSE immunohistochemical staining of spinal cord motoneurons in rats( $\times 400$ )

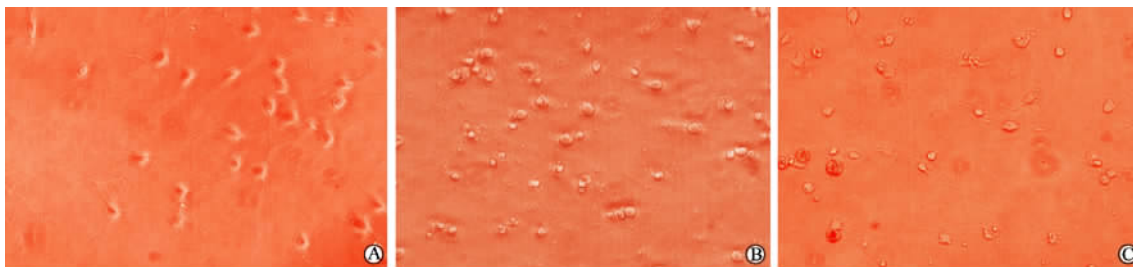


图 2 各组大鼠脊髓运动神经元倒置相差显微镜形态观察

Fig 2 Spinal cord motoneurons under phase-contrast microscope in different groups ( $\times 400$ )

A: SMNs cultured for 10 d in control group; B: SMNs cultured for 3 d in anoxia-induced apoptosis group; C: SMNs cultured for 3 d in ASS pre-treated group

2.2.2 电镜形态变化 扫描电镜:培养 10 d 的对照组神经元,胞体饱满,细胞膜光滑,突起粗大(图 3A);缺氧损伤组神经元,胞体皱缩、穿孔,突起断

裂、消失(图 3B);ASS 保护组神经元胞体缩小,突起变细,有断裂现象(图 3C),与 GDNF 保护组类似。



图 3 各组大鼠脊髓运动神经元扫描电镜形态观察

Fig 3 Spinal cord motoneurons under scanning electron microscope( $\times 3\ 500$ )

A: Neurons showed smooth and integrated cytomembrane, round cell body, phase-bright appearance with long neurites in control group; B: Some neurons were degenerated, with shrunken somas and broken neuritis in anoxia-induced apoptosis group; C: Less degeneration cells were found in ASS pre-treated group than in anoxia-induced apoptosis group and GDNF pre-treated group. But the neurons were smaller and their neuritis (with breakpoints) were slighter than those in control group

2.2.3 透射电镜 对照组形态保持正常,核膜光滑,核大呈圆形或椭圆形,染色质细小均匀,核周池均匀,可见明显的核仁,胞质内线粒体、粗面内质网结构清晰,核糖体丰富(图4A)。缺氧损伤组神经元胞体呈现体积缩小,细胞变圆、部分核膜有小凹陷、突触断裂、消失,胞质浓缩、线粒体肿胀空泡化、内质

网扩张明显,染色质浓缩及边聚等凋亡现象(图4B)。ASS保护组细胞形态趋于正常,与缺氧损伤组相比,细胞损伤有明显减轻,大部分核染色质分布均匀,超微结构与对照组相似,线粒体板层状嵴清楚,核糖体较丰富(图4C),与GDNF保护组类似。

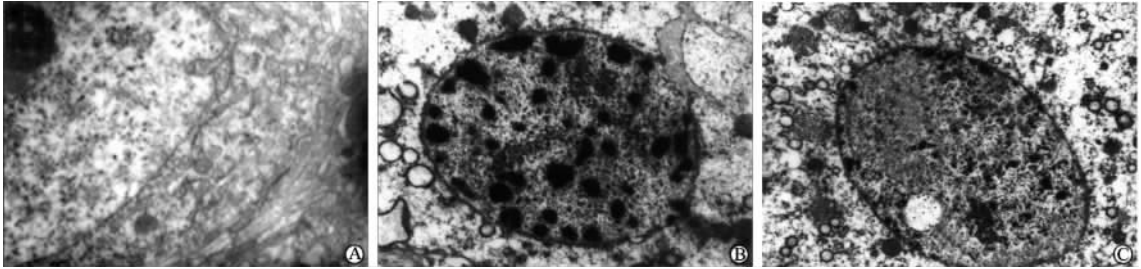


图4 各组大鼠脊髓运动神经元透射电镜形态观察

Fig 4 Spinal cord motoneurons under transmission electron microscope ( $\times 6\ 000$ )

A: Control neurons had integrated nuclear membrane, well-distributed nuclear chromatin and distinct endoplasmic reticulum; B: Neurons in anoxia-induced apoptosis group had intact nuclear membrane, condensed nuclear chromatin and severely overspread endoplasmic reticulum; C: Neurons in ASS pre-treated group had integrated nuclear membrane, slightly condensed nuclear chromatin and slightly overspread endoplasmic reticulum

2.3 神经元存活率测定结果 MTT法测定结果可见,神经元经缺氧损伤处理后, $D_{570}$ 值( $0.15 \pm 0.012$ )显著下降,与对照组( $0.26 \pm 0.035$ )相比有非常显著性差异( $P < 0.01$ ),表明细胞活性非常显著地下降;ASS预保护组的 $D_{570}$ 值( $0.21 \pm 0.028$ )显著高于缺氧损伤组( $P < 0.05$ ),表明ASS均可显著改善细胞活性。ASS保护组与GDNF保护组( $0.20 \pm 0.026$ )间无显著差异。

2.4 ASS对LDH释放量( $D_{340}$ 值)的影响 缺氧损伤组LDH释放量( $40.7 \pm 1.885$ )明显高于对照组( $14.15 \pm 0.416$ ,  $P < 0.01$ );ASS保护组的LDH释放量( $28.6 \pm 1.309$ )明显低于缺氧损伤组( $P < 0.01$ )。ASS保护组与GDNF保护组( $26.5 \pm 0.885$ )间无显著差异。

2.5 ASS对HIF-1 $\alpha$ 表达的影响 运动神经元经缺氧处理后提取蛋白进行Western印迹检测分析。对照组几乎未见HIF-1 $\alpha$ 表达,缺氧损伤组有HIF-1 $\alpha$ 表达,ASS保护组、GDNF保护组HIF-1 $\alpha$ 表达量均进一步增强。

统计学分析表明缺氧损伤组HIF-1 $\alpha$ 相对表达量( $0.72 \pm 0.027$ )较对照组( $0.16 \pm 0.003$ )显著增高( $P < 0.01$ ),ASS保护组( $1.15 \pm 0.016$ )、GDNF保护组( $1.12 \pm 0.016$ )较缺氧损伤组明显增高( $P < 0.01$ ),ASS与GDNF保护组间无显著差异。

### 3 讨论

随着脊髓缺氧性损伤分子机制研究的深入,神经保护剂的研究已成为新的着眼点。ASS具有抗低氧、抗水肿、清除自由基提高细胞内SOD活性、阻止钙离子通道、抑制内皮素分泌和NO释放、减少血小板聚集等药理活性<sup>[3]</sup>。已有研究显示,ASS对实验性脑损伤和临床脑功能不全有较明显的治疗效果。有关ASS对体外培养的皮质神经元缺氧具有保护作用的报道很多,并推测该作用的多种机制。本实验结果表明ASS对体外培养脊髓运动神经元在缺氧条件下具有保护作用。

本实验选用对缺氧较为敏感的运动神经元进行体外培养,建立的缺氧损伤模型引起的神经元细胞损害的病理过程,与临床脊髓损伤后继发性病理损害常引起的脊髓组织缺氧病理过程类似,为研究早期缺氧对脊髓组织继发损伤的发病机制和早期药物干预提供了较为理想的实验平台。GDNF是目前已知的特异性最强的胆碱能运动神经元营养因子,对运动神经元有明显的助存活、促分化、增强代谢的功能<sup>[12]</sup>。正因为如此本实验选GDNF作阳性对照物。脊髓损伤后继发性病理损害常引起脊髓组织缺氧,进而诱导HIF-1在创伤后缺血脊髓组织中表达。HIF-1是缺氧条件下广泛存在于哺乳动物和人体内

的一种转录因子,能激活多种低氧反应基因(hypoxia-response gene, HRG)的表达,是哺乳动物和人在缺氧条件下维持氧稳态的关键性物质<sup>[13]</sup>。

本研究发现经缺氧处理的神经元,其凋亡的百分率升高;而未经处理及给予 ASS 预保护的神经元凋亡率明显低于损伤组。经缺氧处理的神经元电镜下呈现典型的凋亡超微结构特征:受损的细胞体积缩小、突触断裂或消失,细胞变圆、失去微绒毛,胞质浓缩、内质网扩张,胞膜起泡、穿孔,核皱缩、核膜断裂、染色质浓缩及边聚等凋亡现象;而给予 ASS、GDNF 保护的神经元与正常对照组相似。由此可见,缺氧能诱导神经元凋亡,ASS、GDNF 可有效地拮抗缺氧引起的神经元凋亡,并且 ASS、GDNF 对神经元的保护作用效力相仿。通过对 LDH 释放量的测定,结合 Western 印迹分析,发现神经元经缺氧处理后可诱导 HIF-1 $\alpha$  表达;ASS、GDNF 预处理 24 h 后再进行缺氧处理,则 HIF-1 $\alpha$  表达量进一步增加。提示 ASS 抗缺氧损伤作用的机制,可能与其增强缺氧神经元细胞膜稳定性及提高神经元 HIF-1 $\alpha$  表达有关。以往研究<sup>[14]</sup>表明 HIF-1 $\alpha$  反义寡核苷酸可与 mRNA 上游起始密码子相结合,阻断蛋白的翻译,从而封闭 HIF-1 $\alpha$  表达。ASS 可能在细胞缺氧初期促进 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达上调,启动其下游基因表达,促进氧自由基的清除,增强细胞膜的稳定性,从而有利于细胞维持内环境的稳定,使机体可以对抗缺氧的损伤。但 ASS 如何调控 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达上调,ASS 是否通过相同的信号转导途径发挥作用,有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Johnson EM Jr, Greenlund LJ, Akins PT, et al. Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury[J]. J Neurotrauma, 1995,

12:843-852.

- [2] Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, et al. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat[J]. Exp Neurol, 1997, 148:453-463.
- [3] PAN YJ, GU YJ, GU XS. Protection of acanthopanax senticosus saponin on free radical injury induced aging of nerve cell [J]. CJIM, 2002, 8:200-203.
- [4] Huang LE, Bunn HF. Hypoxia-inducible factor and its biomedical relevance[J]. J Biol Chem, 2003, 278:19575-19578.
- [5] Kuhn TB. Growing and working with spinal motor neurons[J]. Methods Cell Biol, 2003, 71:67-87.
- [6] Guigoni C, Coulon P. Rabies virus is not cytolitic for rat spinal motoneurons *in vitro* [J]. J Neurovirol, 2002, 8:306-317.
- [7] Romijn HJ, Ruijter JM, Wolters PS. Hypoxia preferentially destroys GABA-ergic neurons in developing rat neocortex explants in culture[J]. Exp Neurol, 1988, 100: 332-340.
- [8] 温汉平,王小宁,孙华蕴,等. 肿瘤细胞体外药敏试验 MTT 分析法[J]. 中华肿瘤杂志, 1993, 15:470-471.
- [9] Liu B, Du L, Hong JS. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293: 607-617.
- [10] 罗 侃. 临床化学方法学评价[M]. 兰州:兰州大学出版社, 1996. 352-353.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫 主译. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1992. 872-888.
- [12] Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, et al. Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF[J]. Nature, 1995, 373: 344-346.
- [13] Bergeron M, Gidday JM, Yu AY, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain[J]. Ann Neurol, 2000, 48: 285-296.
- [14] Qian D, Lin HY, Wang HM, et al. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells[J]. Biol Reprod, 2004, 70:1822-1827.

[收稿日期] 2005-08-09

[修回日期] 2005-11-25

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群

## 《现代修复重建外科丛书》已出版

本丛书为修复重建外科领域权威著作,介绍成熟手术技术和最新研究成果。由张涤生院士担当顾问,钟世镇院士审阅全书,顾玉东院士分册主编。

由第二军医大学出版社出版、发行。首批 5 分册,16 开,精装,定价:50~100 元。

发行电话:021-65493093,25074198;邮购电话:021-25070240-802

地址:上海市翔殷路 800 号第二军医大学出版社发行科,邮编:200433