

肉苁蓉总苷对大鼠嗅鞘细胞及其分泌神经营养因子的影响*

李剑锋¹ 闫金玉^{1,2} 张 旭¹ 刘遵南¹

摘要

目的:研究不同浓度肉苁蓉总苷对体外培养大鼠嗅鞘细胞及其分泌神经营养因子水平的影响。

方法:采用MTT测定法和流式细胞计测定法检测肉苁蓉总苷对嗅鞘细胞(OECs)增值的影响;用ELISA法测定OECs分泌胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)的含量。

结果:MTT测定结果显示10 μ g/ml和100 μ g/ml浓度肉苁蓉总苷能明显促进OECs增殖;流式细胞计测定结果表明肉苁蓉总苷能促进嗅鞘细胞G1周期的增殖,并能减少嗅鞘细胞凋亡数量;ELISA测定结果表明100 μ g/ml浓度肉苁蓉总苷能对OECs分泌GDNF有显著的促进作用。

结论:肉苁蓉总苷能促进OECs增殖,并能有效促进其GDNF的分泌。

关键词 肉苁蓉总苷;嗅鞘细胞;胶质细胞源性;神经营养因子

中图分类号:R743,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2011)-06-0543-03

Effects of cistanche total glycosides on promoting olfactory ensheathing cells' proliferation and glial-cell-line-derived neurotrophic factor secretion/LI Jianfeng, YAN Jinyu, ZHANG Xu, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2011, 26(6): 543—545

Abstract

Objective: To explore the effects of different concentration of cistanche total glycosides on promoting olfactory ensheathing cells'(OECs) proliferation and glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) secretion.

Method: The promoting effect of cistanche total glycosides was observed by flow cytometry and MTT, while GDNF by ELISA.

Result: The 10 μ g/ml and 100 μ g/ml concentration of cistanche total glycosides could promote OECs' proliferation; 100 μ g/ml concentration of cistanche total glycosides could promote OECs' GDNF secretion.

Conclusion: Cistanche total glycosides could promote OECs' proliferation and GDNF secretion.

Author's address Rehabilitation Department, the Second Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot, 010030

Key word cistanche total glycosides; olfactory ensheathing cells'; glial-cell-line-derived neurotrophic factor

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是中枢神经系统的一种严重损伤,占全身创伤的0.2%—0.5%,在脊柱骨折中有16%—40%并发脊髓损伤,常遗留严重伤残,导致日常生活困难,影响患者生存质量^[1],给家庭和社会造成极大负担。嗅鞘细胞(olfactory

ensheathing cells, OECs)是一种特殊类型的神经胶质细胞,并可伴随嗅神经轴突迁徙入脑,能够分泌很多生长因子如NGF、GDNF、BDNF、NT-3、神经肽-Y和S-100等。由于嗅鞘细胞的这些特点,OECs被认为是细胞移植修复SCI很有希望的种子细胞之一。目前康复医学领域治疗SCI多是以综合康复治疗为

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2011.06.011

*基金项目:国家自然科学基金支持项目(项目:30860300)

1 内蒙古医学院第二附属医院 康复科, 呼和浩特,010030; 2 通讯作者

作者简介:李剑锋,男,住院医师; 收稿日期:2010-06-26

主,为寻求更为有效的方法,将肉苁蓉总苷作用于 OECs 进行如下研究:

1 材料与方法

1.1 实验材料

Wistar 大鼠(内蒙古大学动物中心提供);肉苁蓉总苷(cistanche total glycosides), DMEM/F12 培养基,胎牛血清(FCS),多聚右旋赖氨酸,阿糖胞苷(Ara-C),胰蛋白酶,D-Hanks 溶液,兔抗 p75NGFR (Santa Cruz),ELISA 试剂盒(Promega),细胞培养箱(Thermo-HEPA Class 100),倒置相差显微镜(Olympus CKX41,日本),超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,SW-CJ-2FD),酶标分析仪(Wellscan MK II),流式细胞仪等。

1.2 研究方法

1.2.1 OECs 培养、纯化及鉴定:Wistar 大鼠,断头处死酒精浸泡 5min,将前颅打开暴露嗅球,解剖显微镜下将两个嗅球完整取下,将嗅球组织在含双抗的 D-Hanks 液中清洗;用显微外科剪将嗅球剪碎,加入 0.25%的胰酶 2ml 在 37℃ 培养箱作用 20min;加入含有 10%小牛血清的 DMEM/F12 培养液 2ml 离心管中终止消化;巴士滴管吸除未完全消化组织 800 转/min 离心 5min,弃上清液;最后用条件培养液(20% FCS + 20μmol/L Forskolin + 20μg/ml BPE + DMEM/F12)将其制成 1×10^5 /ml 单细胞悬液,接种于经多聚赖氨酸包被的细胞培养瓶内置于 37℃,5%CO₂ 培养箱内培养,接种 24—48h 后加入 Ara-c 作用 36h 时进行纯化。用兔抗 p75^{NGFR} 及 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗进行免疫组化细胞鉴定,荧光显微镜观察。

1.2.2 利用 MTT 及流式细胞法测定肉苁蓉总苷对嗅鞘细胞的影响:将培养纯化后的嗅鞘细胞以 1×10^6 接种于 96 孔板,加入肉苁蓉总苷(作用浓度分别为 1μg/ml, 10mg/ml, 100mg/ml),作用 24h 后测 OD 值并测细胞流式。设立对照组及肉苁蓉总苷不同浓度组:A 组(对照组):将含血清培养液作为阴性对照;B 组(肉苁蓉总苷低浓度组):1μg/ml;C 组(肉苁蓉总苷中浓度组):10μg/ml;D 组(肉苁蓉总苷高浓度组):100μg/ml。每组 15 只大鼠。

1.2.3 ELISA 法测定上清液神经营养因子的含量:将培养纯化后的嗅鞘细胞以 1×10^6 接种于 6 孔板,

24h 后加入肉苁蓉总苷(作用浓度同上)作用 24h,分别收集上清液,于 -80℃ 保存。用 ELISA 法测定液神经生长因子含量。

1.3 统计学分析

本研究数据作为计量资料处理,所得数据用均数±标准差表示,采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计分析,所得数据资料采用方差分析, $P < 0.05$ 为存在显著性差异。

2 结果

2.1 肉苁蓉总苷对嗅鞘细胞的作用

2.1.1 甲基噁唑基四唑法(MTT)测定结果:A 组: 0.617 ± 0.149 ; B 组: 0.589 ± 0.147 ; C 组: 0.761 ± 0.138 ; D 组: 0.732 ± 0.234 。肉苁蓉总苷组(B)与对照组(A)比较 $P > 0.05$, 差异无显著性;肉苁蓉总苷 10mg/ml、100mg/ml 浓度组(C、D)与对照组(A)相比 $P < 0.05$, 差异有显著性。

2.1.2 流式细胞法测定结果显示:见图 1。肉苁蓉总苷组与对照组相比,G1 期均高于对照组,凋亡细胞数量百分比均低于对照组。

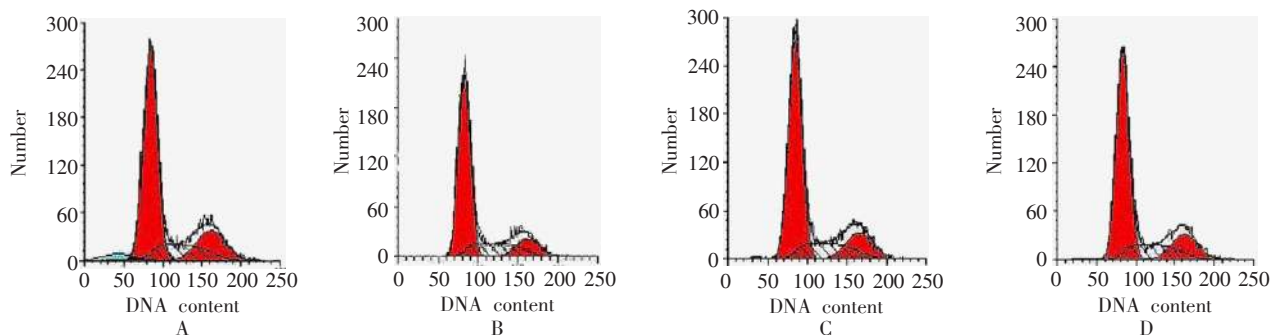
2.2 酶联免疫吸附法(ELISA)测定结果

检测结果显示胶质细胞源性神经营养因子(glial-cell-line-derived neurotrophic factor, GDNF)含量:加药前: 302.1 ± 16.6 pg/ml, A 组: 340.5 ± 13.2 pg/ml; B 组: 333.2 ± 23.6 pg/ml; C 组: 355.2 ± 17.6 pg/ml; D 组: 379.2 ± 15.3 pg/ml。与加药前相比 GDNF 含量均明显增加;与对照组(A)比,肉苁蓉总苷 100mg/ml 浓度组(D)的 GDNF 含量明显增加。

3 讨论

神经轴突再生困难是造成脊髓损伤后难以康复的主要原因之一,OECs 对中枢神经元轴突再生有着其他类型细胞难以取代的作用^[2]。近年来嗅鞘细胞的研究成为热点。嗅鞘细胞是一种特殊类型的神经胶质细胞,兼有雪旺细胞和星型胶质细胞的特性^[3],起源于嗅基底膜,广泛分布于嗅黏膜、嗅神经和嗅球的表面两层,具有终生分裂和再生的能力,并可伴随嗅神经轴突迁徙入脑。嗅神经的轴突每 30—60d 就可以穿越周围神经系统与中枢神经系统的交界区,重新长入嗅鞘并建立起突触联系^[4]。嗅鞘细胞能够

图1 流式细胞法测定结果



分泌很多生长因子如NGF、BDNF、GDNF、NT-3、神经肽-Y和S-100等,研究表明神经生长因子(NGF)能够防止脊髓红核神经元萎缩,增强皮质脊髓束发芽和促进红核脊髓神经通路的再生;脑源性神经营养因子(BDNF)和神经营养素-3(NT-3)均能阻止轴突切断损伤的成年大鼠红核脊髓束细胞凋亡,解救濒死的神经元并促进轴索再生^[5]。除此之外,嗅鞘细胞在其胞膜上还表达另外一些因子,如神经细胞黏附因子(N-CAM)等涉及细胞黏附和轴突的生长功能。由于嗅鞘细胞的这些特点,OECs被认为是细胞移植修复SCI很有希望的种子细胞之一。

肉苁蓉的化学成分主要包括苯乙醇苷类、环烯醚萜类、挥发性成份、木脂素类、多糖以及生物碱等。研究发现,肉苁蓉及其所含的化学成分有神经保护作用,Deng等^[6]研究了管花苷B对肿瘤坏死因子 α (TNF α)所致SH-SY5Y神经元凋亡的影响,结果表明经100 μ g/L的TNF α 作用36h后的SH-SY5Y神经元出现典型细胞凋亡特征,而管花苷B处理2h能明显减轻TNF α 诱导的细胞凋亡。此外,研究还表明,苯乙醇苷类可通过抑制caspase-3和caspase-8而抑制大鼠小脑颗粒细胞的凋亡^[7],并对甲基苯基四氢吡啶(MPTP)所致的C57小鼠黑质多巴胺能神经元损伤具有保护作用^[8]。不仅如此,肉苁蓉还可以减轻神经系统缺血再灌注等各种损害,小鼠脑缺血损伤实验表明^[9],与脑缺血再灌注组缺血后24h和48h平均72.98%及60.45%的梗死范围相比,肉苁蓉总苷大、中、小剂量组(分别为250.0mg·kg/d;125.0mg·kg/d;62.5mg·kg/d)分别可使脑缺血再灌注24h后小鼠脑梗死范围缩小至25.94%、25.81%和31.13%,48h后脑梗死范围缩小至22.14%、20.06%及22.27%,两

者比较具有显著性差异,显示出其对神经元凋亡的显著抑制作用。

本研究将不同浓度肉苁蓉总苷作用于OECs,利用MTT法及流式细胞计测定证实了10mg/ml,100mg/ml肉苁蓉总苷能够促进嗅鞘细胞的增殖,并从流式细胞计测定结果说明肉苁蓉总苷主要促进嗅鞘细胞G1周期的增殖及明显减少凋亡细胞,因此,肉苁蓉总苷不仅能促进嗅鞘细胞增殖,而且能提高细胞活性抑制其凋亡。通过酶联免疫法检测证明肉苁蓉总苷能够明显促进嗅鞘细胞分泌GDNF,上述结果为肉苁蓉总苷的临床应用提供了实验基础。

参考文献

- [1] 丘卫红,朱洪翔,张百祥,等. 脊髓损伤患者康复期生存质量的影响因素[J]. 中国康复医学杂志,2009,4(24):313.
- [2] Richter MW, Fletcher PA, Liu J, et al. Lamina propria and olfactory bulb ensheathing cells exhibit differential integration and migration and promote differential axon sprouting in the lesioned spinal cord[J]. J Neurosci, 2005, 25(46):10700—10711.
- [3] Fairless R, Barnett SC. Olfactory ensheathing cells: their role in central nervous system repair[J]. Int J Biochem Cell Bio, 2005, 37(4):693—699.
- [4] Chen X, Fang H, Schwob JE. Multipotency of purified, transplanted glucose basal cells in olfactory epithelium[J]. J Comp Neurol, 2004, 469(4):457—474.
- [5] Lu P, Jones LL, Tuszynski MH. BDNF-expressing marrow stromal cells support extensive axonal growth at sites of spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2005, 191(2):344—360.
- [6] Deng M, Zhao JY, Ju XD, et al. Protective effect of tubuloside B on TNF α -induced apoptosis in neuronal cells[J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(10): 1276.
- [7] TianXue-Fei, PuXiao-Ping. Phenylethanoid glycosides from Cistanches salsa inhibit apoptosis induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion in neurons[J]. J Ethnopharmacol, 2005, 97(1): 59.
- [8] Geng X, Song L, Pu X, et al. Neuroprotective effects of phenylethanoid glycosides from Cistanches salsa against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)-induced dopaminergic toxicity in C57 mice[J]. Biol Pharm Bul, 2004, 27(6): 797.