

人参皂甙 Rg1 促进大鼠坐骨神经损伤后再生的作用*

方欣 周朋 闫旭升 杨占君[△]

(内蒙古科技大学包头医学院人体解剖学教研室, 包头 014040)

摘要 目的:观察人参皂甙 Rg1 促进大鼠坐骨神经损伤后修复重建的作用。方法:采用离断左侧坐骨神经的方法建立周围神经损伤模型,建模后随机分为实验组和对照组。实验组大鼠每日腹腔注射人参皂甙 Rg1(剂量为 40 mg/kg),对照组大鼠注射等量生理盐水。用药 4 周时两组取材,免疫组织化学检测神经生长因子(NGF)蛋白的表达情况;给药 4、8、12 周后进行坐骨神经功能指数(SFI)、肌肉及神经组织形态学、腓肠肌湿重恢复率的检测;用药 12 周时,行荧光素逆行追踪观察神经轴突再通情况。结果:大体观察显示术后大鼠左小腿肌萎缩,足趾肿胀溃疡及鼠爪张开及后蹬动作情况,实验组优于对照组。用药 4 周时,实验组 NGF 蛋白的表达(染色密度及染色面积)明显高于对照组;给药 4、8、12 周后,实验组大鼠 SFI 指数、神经传导速度及小腿三头肌湿重恢复率等均优于对照组;术后 4、8、12 周,实验组神经纤维轴突、髓鞘的数量及其排列整齐程度均优于对照组。12 周时荧光逆行追踪结果显示,实验组损伤坐骨神经轴突再通情况较对照组明显。结论:人参皂甙 Rg1 可促进大鼠坐骨神经损伤的修复、再生和功能的恢复。

关键词 人参皂甙 Rg1; 坐骨神经; 神经损伤; 神经保护

Ginsenoside Rg1 promotes sciatic nerve regeneration in rat following nerve transected injury*

Fang Xin, Zhou Peng, Yan Xusheng, Yang Zhanjun[△]

(Human Anatomy Department, Baotou Medical College, Baotou 014040, China)

Abstract Objective: To study effects of ginsenosides Rg1 on the sciatic nerve regeneration after injury. **Methods:** Sixty SD rats were assigned into a treated group and a control group randomly. Ginsenosides Rg1 (40 mg/kg) was administered by intraperitoneal injection each day in the treated group for 12 weeks. The expression of NGF was tested by immunohistochemistry method after 4 weeks. The sciatic nerve function index (SFI), electrophysiological index of the nerve, morphologic alteration of nerve and muscles and weight recovery rate of gastrocnemius were studied to evaluate the recovery of the sciatic nerve after injury. **Results:** The denervated changes of the rats from the test group in the muscle atrophy, swelling and ulcer of the toe, stretch and ascend action of the paw were better than those of the control group. There were more expressions of NGF in the treated group than the control group in 4 weeks. After being treated with ginsenosides Rg1 for 4 to 12 weeks, all results including SFI, nerve conduction velocity, counts of axon and weight recovery rate of gastrocnemius, indicated that there were statistically important differences between two groups. The axon and myelin of the regenerative sciatic nerve in the test group were much denser and regular than those in the control group at the end of 4, 8 and 12 weeks after surgery. **Conclusion:** The present study showed that ginsenosides Rg1 can promote repair, regeneration and functional recovery of the sciatic nerve after injury.

Key words ginsenoside Rg1; sciatic nerve; nerve injury; neuroprotective effect

周围神经损伤后,将会导致其相应的神经元死亡,引起神经运动功能的丧失,感觉和营养方面的损伤更是无法补救的^[1]。采取对神经元有效的保护措施,是促进周围神经再生的方法之一。目前,由于缺乏经济有效和使用方便的促进神经再生药物,周围神经损伤后修复的效果仍不理想。研究显示人参皂甙(ginsen-

oside, GS)Rg1 具有神经保护作用^[2-3];笔者之前研究也显示,Rg1 对老年痴呆模型大鼠的脑功能有明显的改善作用^[10-11]。本研究利用人参皂甙 Rg1 干预坐骨神经损伤后大鼠,通过观察大鼠坐骨神经功能指数(SFI)、神经传导速度及神经生长因子(nerve growth factor, NGF)蛋白的表达等,研究周围神经损伤后人参皂甙 Rg1 对运动神经元的保护作用及机制,为治疗周围神经损伤开辟有效的新途径提供基础理论和动物实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型与分组

雄性 SD 大鼠共 60 只,体质量为 180~200 g。用

doi:10.3969/j.issn.1001-1633.2013.01.019

* 内蒙古自治区自然科学基金(2012MS1143)

第 1 作者 E-mail: simabeinan@yahoo.com.cn

[△]通讯作者, E-mail: zhanjunyangpume@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-06-04; 修回日期: 2012-09-12

10%水合氯醛(3.5 ml/kg)作腹腔注射麻醉。显露左侧坐骨神经,于梨状肌下缘0.8 cm处将坐骨神经离断,随即用11~0无创伤尼龙线以表面血管走行为标记缝合神经外膜4针,显微缝线留置于该损伤区外膜上作为标记。然后1~0线逐层关闭切口。术后第1天随机分为实验组和对照组,每组30只。实验组每天经腹腔注射人参皂甙Rg1溶液40 mg/kg^[10],对照组以同样的方式注射相当量的生理盐水,直至取材为止。

1.2 坐骨神经功能指数(SFI)

自制大鼠足印行走箱,50 cm×15 cm×20 cm,通道远端放置1个鼠箱,单侧开门。行走箱底放置与行走箱等长、等宽的白纸。用碳素墨水浸染大鼠双后足,放入行走箱近端,让其向远端行走,可记录大鼠双侧后足足印,每侧3~4个。选实验侧足(E)和正常侧足(N)足印测定3个变量:(1)足印长度(podogram length, PL)即从足跟到足尖的距离;(2)足趾宽度(width between the first and fifth toes, TW)第1趾到第5趾连线距离;(3)中间足趾距离(inter-toes distance, IT)第2趾到第4趾连线距离。测量精确到毫米,每次使用最长的一组数据。将3个变量带入Bain公式计算SFI^[4]。SFI = -38.3(EPL-NPL)/NPL + 109.5(ETW-NTW)/NTW + 13.3(EIT-NIT)/NIT - 8.8。SFI=0为完全正常,SFI=-100为完全损伤。

1.3 电生理检测

记录足印后处死大鼠,沿手术切口入路暴露切取右侧坐骨神经全长,置于台氏液中,电极置于神经吻合口两侧各2 cm处,采用PCLab生物信号采集处理系统记录诱发电位,并计算神经传导速度。

1.4 免疫组织化学

电生理检测后将神经用中性甲醛液固定,石蜡包埋,分别取坐骨神经钳夹段3 mm作纵切片,钳夹段近、远侧各3 mm作神经干横切片,按试剂盒说明进行神经生长因子免疫组织化学显色(抗体和SABC免疫组织化学试剂盒均为武汉博士德公司产品)。用图像分析仪观察各组标本,在每一例标本中选10个高表达的视野,摄取图像,分析NGF表达的面积和密度(Image pro plus软件)。

1.5 荧光逆行追踪

术后12周时,实验组和对照组各取6只大鼠,行荧光逆行追踪试验,观察坐骨神经轴突再通的情况。在神经离断处以远5 mm处,用微量注射器向神经干内注入5%荧光金(fluoro gold, FG; Fluorochrome公司)。继续饲养1周后,以生理盐水及4%多聚甲醛经左心室灌注,取坐骨神经,入4%多聚甲醛后固定,在梯度蔗糖液中沉底后冷冻切片,Leica SP2激光扫描共聚焦显微镜(Leica公司)下检测神经内被FG标记的细胞。

1.6 腓肠肌湿重恢复率

术后4、8、12周分别取左小腿三头肌,立即用电子天平测定肌湿重。腓肠肌湿重恢复率计算公式如

下:腓肠肌湿重恢复率=(损伤侧肌湿重/正常侧肌湿重)×100%。

1.7 H-E染色

取坐骨神经组织6 mm,正常对照侧取相应节段的神经组织置于4%多聚甲醛缓冲固定液中固定24 h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,横断面半薄切片,厚度5 μm,将切片贴于载玻片上,行苏木精-伊红染色(H-E染色),观察再生神经组织中有髓神经纤维的变化情况。

1.8 图像分析和统计学处理

将各组大鼠SFI和MNCV的数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所得结果采用SPSS 13.0软件包进行处理。

2 结果

2.1 坐骨神经功能指数测定

术后4、8、12周分别观察测定实验组与对照组大鼠SFI。结果显示,实验组的SFI优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),不同时间点间亦有明显差异(表1)。

表1 实验组与对照组SFI的比较($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Comparison of SFI between experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Control	-73.67±9.36	-54.32±3.43	-41.95±3.49
Experimental	-60.97±2.40**	-43.73±4.67**	-31.06±2.45**

** $P < 0.01$ vs control

2.2 坐骨神经传导速度测定

术后4、8、12周测定运动神经动作电位波幅并计算坐骨神经传导速度,实验组传导速度优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表2)。

表2 实验组与对照组神经传导速度的比较($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Comparison of nerve conduction velocity between experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Control	15.65±6.02	26.17±6.02	38.24±6.98
Experimental	28.69±5.01*	42.74±6.61*	49.54±7.03*

* $P < 0.05$ vs control

2.3 神经生长因子表达

用药4周后,可见神经生长因子阳性反应产物呈棕黄色或棕褐色颗粒状。高倍镜下可见神经生长因子阳性反应产物主要位于神经元胞质、突起及其分支。实验结果显示,对照组可见少量阳性染色神经元;实验组大鼠阳性神经元数目较对照组明显增多,两组比较差异具有统计学意义(表3,图1A、B)。

表3 NGF蛋白染色密度和染色面积比较($\bar{x} \pm s$)
Tab 3 Comparison of staining density and area of NGF between experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Staining density	Staining area
Control	94.91±19.64	57.30±6.06
Experimental	131.42±24.87**	80.78±5.96**

* $P < 0.01$ vs control

2.4 逆行荧光追踪试验

用药 12 周时,逆行荧光追踪试验结果显示,实验组大鼠荧光强度较对照组明显增强,提示 Rg1 可以促进神经轴突的再生和再通恢复(图 3)。

2.5 大鼠小腿三头肌湿重恢复率

术后两组大鼠小腿三头肌湿重恢复率比较见表 4。

表 4 术后左小腿三头肌湿重恢复率比较(g)($\bar{x} \pm s$, %)
Tab 3 Comparison of weight recovery rate of gastrocnemius between experimental and control groups ($\bar{x} \pm s$, %)

Group	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Control	42.7 \pm 5.1	46.3 \pm 6.1	52.0 \pm 6.6
Experiment	57.6 \pm 5.2*	60.7 \pm 7.1*	71.2 \pm 6.4*

* $P < 0.05$ vs control

2.6 再生神经纤维

术后第 4、8 周,实验组再生神经纤维数目稍多,排列稍规则;对照组再生神经纤维数目少,排列紊乱。新生轴突、髓鞘结构较可见,但实验组多于对照组,实验组毛细血管结构较第 4 周更加丰富,对照组血管结仍较少,增生的成纤维细胞却多于实验组。

术后第 12 周,实验组再生神经纤维数量明显增多,排列规则,对照组再生神经纤维数量有所增多,分布欠均匀。新生轴突,髓鞘结构更加丰富,实验组仍多于对照组,轴突较粗,髓鞘较厚。两组毛细血管结构较第 8 周均稍有减少,实验组仍明显较对照组丰富(图 2、4)。

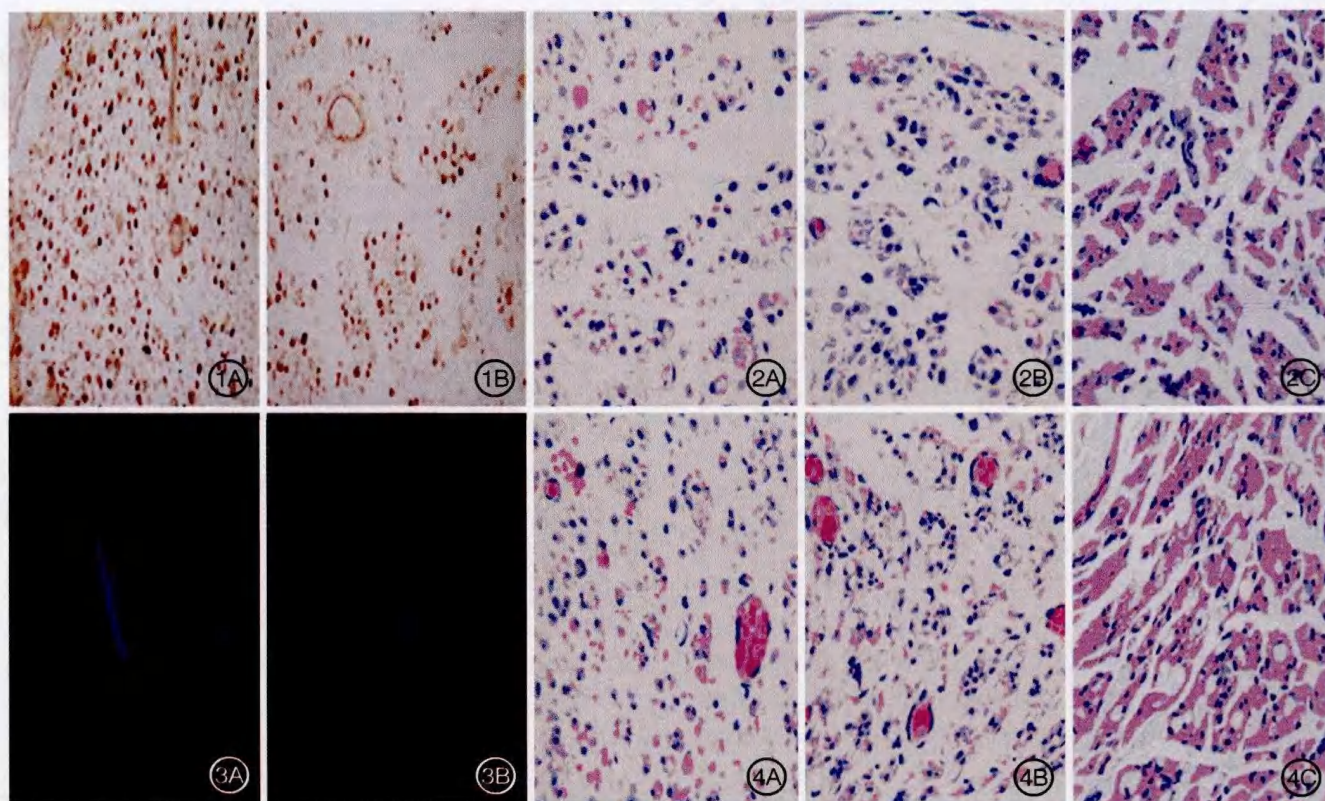


图 1 4 周时 NGF 表达免疫组织化学显色, $\times 400$ 。A: 实验组; B: 对照组。

图 2 坐骨神经组织 H-E 显色, $\times 400$ 。A、B、C: 分别为对照组 4、8、12 周。

图 3 12 周时逆行荧光追踪试验结果。A: 实验组; B: 对照组。

图 4 坐骨神经组织 H-E 显色, $\times 400$ 。A、B、C: 分别为实验组 4、8、12 周。

Fig 1 Expression of NGF at 4 weeks, immunohistochemistry staining, $\times 400$. A: Experimental group; B: Control group.

Fig 2 H-E staining results of sciatic nerve in control group, $\times 400$. A: 4 weeks; B: 8 weeks; C: 12 weeks.

Fig 3 Result of retrograde fluorescent axonal tracing, $\times 400$. A: Experimental group; B: Control group.

Fig 4 H-E staining results of sciatic nerve in experimental group, $\times 400$. A: 4 weeks; B: 8 weeks; C: 12 weeks.

3 讨论

周围神经损伤的修复一直是临床实验的难点,其中最关键的内容是神经细胞的修复。神经细胞作为一个整体,胞体与轴突之间有密切的联系。周围神经损伤后,远端的轴突和髓鞘很快自近端发生瓦勒变性,变性的轴突、髓鞘被雪旺细胞或巨噬细胞吞噬、破坏。轴

突的损伤会累及神经元胞体,可致神经元胞质尼氏体聚集或溶解消失,细胞核肿胀、边移,部分神经元可见核皱缩、碎裂,胞质溶解甚至死亡,继而相应靶器官失用。目前,临床上仍缺乏经济有效的促进神经再生药物。

根据中医传统理论,神经损伤证属外伤后气血瘀滞,营卫失和,筋脉失养。治宜补气生肌,活血通络^[5]。

随着对某些中药研究的深入,越来越多证据显示它们可以通过促进周围神经损伤后神经生长因子蛋白表达,雪旺细胞增殖,保护受损神经元和促进神经再生及结构重建等机制发挥实验神经损伤的作用^[6-8]。人参是最重要的气血滋补药物。笔者既往研究证实,人参皂甙 Rb1 对老年痴呆模型大鼠有较为显著的实验作用^[9-10]。Rg1 是人参的主要有效成分之一,Rg1 可增加胆碱能系统功能,即增加脑突触体对 3H-胆碱的摄取,增加乙酰胆碱的合成与释放,同时提高中枢 M 胆碱受体的密度,并明显增加动物脑内蛋白质含量^[11-12]。本研究通过观察 Rg1 对坐骨神经损伤模型大鼠的作用,探讨 Rg1 可能的神经损伤修复作用及机制。结果可能具有重要的理论及临床意义。

本研究使用 SFI 这一较为公认且稳定可靠的指标,从行为功能角度进行分析。结果提示,术后 4、8 及 12 周实验组大鼠 SFI 优于对照组,提示坐骨神经功能有明显恢复。神经传导速度测定提示,实验组大鼠坐骨神经传导速度明显优于对照组,且结果均存在时间相关性。以上两项指标提示经 Rg1 干预后,损伤的坐骨神经功能有明显的恢复。那么,Rg1 通过何种机制促进了坐骨神经功能的恢复呢?

文献报道 NGF 是最早被发现、兼有神经元营养和促突起生长双重生物学功能的一种细胞生长调节因子,它对中枢和周围神经元的发育、分化、生长、再生和功能特性的表达均具有重要的调控作用^[13-14]。对于神经细胞,NGF 不仅有神经元营养效应,而且能诱导和促进神经突起的生长。NGF 对神经所支配的组织也有重要的营养作用。

本实验利用图像分析软件,比较实验组和对照组坐骨神经 NGF 表达的差异。结果显示,实验组损伤侧远端坐骨神经组织 NGF 蛋白表达阳性呈棕褐色着色较多且密度大,而对照组 NGF 表达较少,两组比较差异有统计学意义。提示 NGF 可能是神经功能恢复的重要原因。小腿三头肌湿重恢复率结果提示实验组小腿三头肌湿重恢复率明显优于对照组。显微镜观察,4、8、12 周时实验组神经纤维及新生轴突数量等明显优于对照组;而荧光逆行追踪结果显示,实验组轴突再通情况明显较对照组改善。结果印证了 NGF 促进神经轴突恢复,并发挥其神经营养作用,促进远端肌营养和功能恢复。人参皂甙 Rg1 还可能通过抗氧化,抗凋亡等机制发挥有效的神经保护作用^[15]。

综上所述,Rg1 可能通过促进 NGF 表达上调等机

制促进大鼠损伤坐骨神经轴突再通和功能的恢复。本研究提示,人参皂甙 Rg1 是外周神经损伤后一种有效的药物,值得进一步进行临床及基础研究。

参考文献

- [1] 陆裕朴. 实用骨科学[J]. 北京:人民军医出版社,1991:855-872.
- [2] Radad K, Gille G, Moldzio R, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on survival and neurite growth of MPP affected mesencephalic dopaminergic cells [J]. J Neural Transm, 2004,111(1): 37-45.
- [3] Rudakewich M, Ba F, Benishin G G. Neurotrophic and neuroprotective actions of ginsenosides Rb1 and Rg1 [J]. Planta Med, 2001,67(6):533-537.
- [4] Bain J R, Mackinnon S E, Hunter D A. Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat [J]. Plast Reconstr Surg, 1989,83(1):129-138.
- [5] 何振辉. 补气通络方对大鼠坐骨神经损伤后小腿三头肌湿重的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2001,9(1):10.
- [6] 杨迎,张均田,石成璋,等. 人参皂甙 Rg1 对慢性应激大鼠空间学习记忆能力的影响[J]. 解剖学研究,2004,26(1):29-31.
- [7] 胡圣望,胡旺平,周红. 人参皂甙 Rg1,Rb1 促智作用机制的探讨一 对小鼠脑神经发育的影响[J]. 药学报,1994,29(4):241-245.
- [8] Li A H, Ke K F, Wu X M, et al. Effects of GSRb-1, Rb-3, Rg1 against ischemic injury of cultured cortical neurons and its mechanism [J]. J Apoplexy Nerv Dis, 2004,21(3):231-234.
- [9] 方欣,杨吉平,赖红. 人参皂甙 Rb1 对老年性痴呆模型大鼠顶叶皮质 β -分泌酶及早老蛋白-1 表达的影响[J]. 解剖学杂志,2008,31(6):812-815.
- [10] 方欣,杨吉平,高旭红. 人参皂甙 Rb1 对 AD 大鼠顶叶皮质 β -分泌酶及 PS-1 表达的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2008,17(5):459-464.
- [11] Liang W, Ge S, Yang L, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 promote proliferation and expression of neurotrophic factors in primary Schwann cell cultures [J]. Brain Res, 2010,1357:19-25.
- [12] Ma J, Li W, Tian R, et al. Ginsenoside Rg1 promotes peripheral nerve regeneration in rat model of nerve crush injury [J]. Neurosci Lett, 2010,478(2):66-71.
- [13] Aoki Y, An H S, Takahashi K, et al. Axonal growth potential of lumbar dorsal root ganglion neurons in an organ culture system: response of nerve growth factor-sensitive neurons to neuronal injury and an inflammatory cytokine [J]. Spine, 2007,15,32(8): 857-863.
- [14] Krenz N R, Weaver L C. Nerve growth factor in glia and inflammatory cells of the injured rat spinal cord [J]. J Neurochem, 2000,74(2):730-739.
- [15] 方芳,陈晓春,朱元贵. 抗氧化作用可能是人参皂甙 Rg1 抗细胞凋亡的机制[J]. 中国临床药理学与实验学,2002,7(5):412-416.

(编辑:张志英)