

人参三醇组皂苷对大鼠急性坐骨神经损伤修复 相关蛋白表达的影响

宋昕恬¹, 王琳², 张晶莹¹, 孟令仪¹, 高峰¹, 张琨^{3*}

(1. 吉林省疾病预防控制中心, 吉林长春 130062; 2. 吉林省食品药品认证和培训中心, 吉林长春 130061;

3. 吉林大学第二医院, 吉林长春 130000)

摘要: 研究人参三醇组皂苷(PTS)对大鼠坐骨神经急性损伤蛋白表达的影响。建立大鼠坐骨神经挤压损伤模型, 随机分为 PTS 组, 模型对照组及空白对照组, 每组各 10 只大鼠; 各组均经腹腔注射给药, PTS 组损伤后注射 PTS; 模型对照组, 损伤后注射同剂量生理盐水; 空白对照组, 不损伤坐骨神经, 注射同剂量生理盐水。坐骨神经损伤术后 30 d, 免疫荧光化学染色检测 PTS 对损伤侧坐骨神经神经丝蛋白(NF-M)、微管相关蛋白-2(MAP-2)、生长相关蛋白(GAP-43)表达的影响, 观察 PTS 对损伤侧神经的影响。大鼠损伤侧坐骨神经 NF-M、MAP-2、GAP-43 平均光密度表达(9.66 ± 0.99 、 12.43 ± 1.44 、 0.344 ± 0.040)与模型对照组(8.21 ± 1.25 、 11.90 ± 1.14 、 0.278 ± 0.042)比较有极显著性差异($P < 0.01$)。PTS 可促进坐骨神经损伤大鼠 NF-M、MAP-2、GAP-43 的表达。

关键词: 人参三醇组皂苷; 坐骨神经; 蛋白表达; 免疫组化; 大鼠

中图分类号: S852.2

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2017)12-0078-04

现今坐骨神经损伤是一种较为常见的外周神经损伤性疾病, 损伤后极大地降低了患者的生活质量, 损伤初期会出现肌肉疼痛、功能障碍等症状, 如果未得到及时治疗会相继出现肌无力, 肌肉萎缩等症状, 但周围神经损伤与中枢神经损伤最大的不同就是有再生的可能。研究发现人参三醇组皂苷(panaxtrol saponin, PTS)的主要成分 Rg₁、Re、Rf、Rh₁ 是一种强力的神经保护剂, 可促进神经元的生长, 具有神经保护作用^[1], 但还未见报道过对坐骨神经的保护作用。本试验通过免疫荧光化学染色检测 Wistar 雄性大鼠坐骨神经挤压损伤模型大鼠损伤侧坐骨神经 NF-M、MAP-2、GAP-43 的表达, 观察 PTS 对损伤侧神经的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级健康成年雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 $200 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$, 由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供(SCXK-(吉)2011-0004); 动物室由吉林省疾病预防控制中心提供(吉动设字 10-1005); 温度 $21^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 、相对湿度 $60\% \pm 5\%$; LEICA RM2135 石蜡切片机、DM4000B 显微镜、ASP300S 脱水机,

德国徕卡公司产品。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、PTS 100 mg/kg bw 剂量组, 每组 20 只, 大鼠腹腔注射麻醉, 剂量为 1% 戊巴比妥钠(5 mL/kg), 常规消毒, 右下肢后外侧切口, 钝性分离股外侧肌和股二头肌, 游离出坐骨神经。模型对照组、PTS 100 mg/kg 剂量组两组动物, 在距梨状肌下缘 1 cm 处, 用血管钳扣第 3 格垂直钳夹神经, 保持压迫 30 s, 造成坐骨神经 Sunderland III 度损伤模型^[2], 正常对照组不做手术, 手术结束 30 min, PTS 100 mg/kg 剂量组腹腔注射 PTS, 2 次/d, 连续 30 d^[3]。

1.2.2 观测指标 PTS 对坐骨神经损伤大鼠 NF-M、MAP-2、GAP-43 的检测, 取坐骨神经在 40 mL/L 甲醛溶液中固定 48h→取材→制作蜡块→组织块切片。0.01 mol/L PBS 冲洗、室温孵育、抗原修复、滴加 100 mL/L 山羊血清, 滴加一抗体、二抗, 苏木素复染、冲洗、脱水、封片, 每组染色过程中均设定不加一抗的空白对照染色。显微镜下观察坐骨神经中 NF-M、MAP-2、GAP-43 的表达情况, 经图象分析最终计算 OD 值。

收稿日期: 2017-05-22

基金项目: 吉林省卫生计生委科研计划项目(2012Z026)

作者简介: 宋昕恬(1979-), 女, 吉林长春人, 副主任医师, 硕士, 主要从事食品毒理学研究。* 通讯作者

1.2.3 统计方法 数据的统计处理采用 SPSS11.5 统计软件中单因素方差分析进行均值比较,方差齐时,各组间两两比较用 LSD 法;方差不齐时,各组间两两比较采用 Tamhane's 法。

2 结果

免疫荧光化学染色检测 PTS 对损伤侧坐骨神经 NF-M、MAP-2、GAP-43 表达的影响,结果术后

表 1 PTS 对大鼠损伤侧坐骨神经 NF-M、MAP-2、GAP-43 平均光密度表达的影响

Table 1 The effect of PTS on the expression of NF-M, MAP-2 and GAP-43 in the injured sciatic nerve of rats

	NF-M	MAP-2	GAP-43
空白对照组 Blank control group	6.63±0.80 ^b	9.08±1.05 ^b	0.223±0.053 ^a
模型对照组 Model control group	8.21±1.25	11.90±1.14	0.278±0.042
PTS 处理组 PTS group	9.66±0.99 ^b	12.43±1.44 ^b	0.344±0.040 ^b

注:“a”模型对照组与空白对照组比较, $P<0.05$;“b”模型对照组与试验组比较, $P<0.01$ 。
Note: “a” Model control group compared with the blank control group, $P<0.05$; “b” Model control group compared with the experimental group, $P<0.01$.

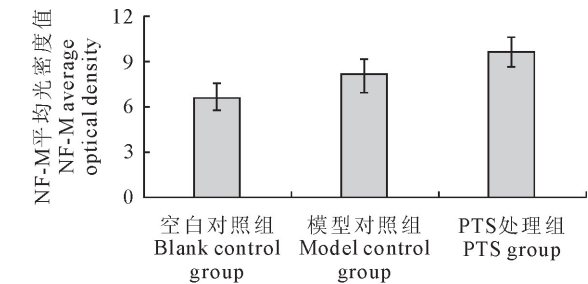
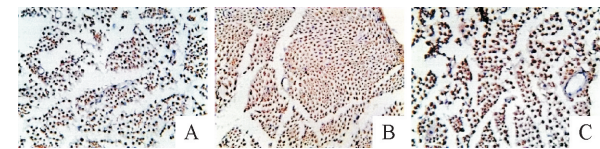


图 1 PTS 对大鼠患侧坐骨神经中 NF-M 表达的影响
Fig.1 Effects of PTS on the expression of NF-M in the sciatic nerve of the affected side of rats



A.空白对照组;B.模型对照组;C.PTS 处理组
A.Blank control group;B.Model control group;C.PTS group

图 2 PTS 对大鼠损伤侧坐骨神经 NF-M 表达的影响(400×)
Fig.2 Effect of PTS on NF-M expression in injured sciatic nerve of rats(400×)

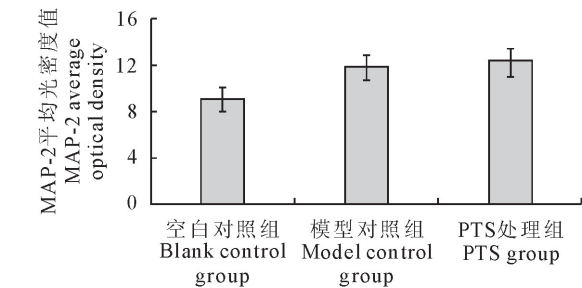
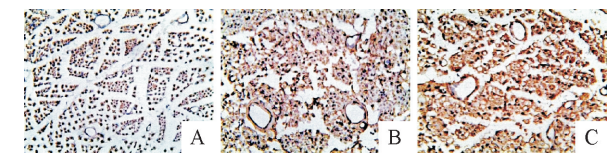


图 3 PTS 对大鼠患侧坐骨神经 MAP-2 表达的影响
Fig.3 Effects of PTS on the expression of MAP-2 in the sciatic nerve of the affected side of rats

第 30 天模型对照组及 PTS 处理组大鼠坐骨神经中 NF-M、MAP-2、GAP-43 平均光密度值均高于正常组,有显著性差异($P<0.05$),PTS 处理组大鼠坐骨神经中 NF-M、MAP-2、GAP-43 平均光密度值高于模型对照组,有显著性差异($P<0.05$),说明 PTS 可促进神经损伤大鼠 NF-M, MAP-2, GAP-43 的表达。



A.空白对照组;B.模型对照组;C.PTS 处理组
A.Blank control group;B.Model control group;C.PTS group
图 4 PTS 对大鼠损伤侧坐骨神经 MAP-2 表达的影响(400×)

Fig.4 Effects of PTS on expression of MAP-2 in injured sciatic nerve of rats(400×)

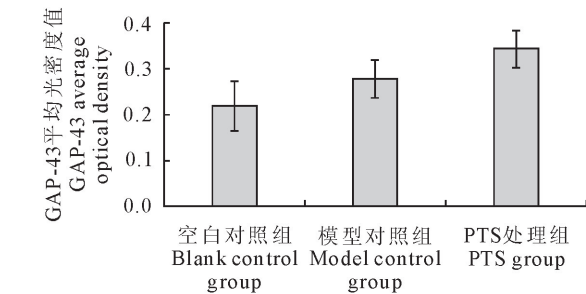
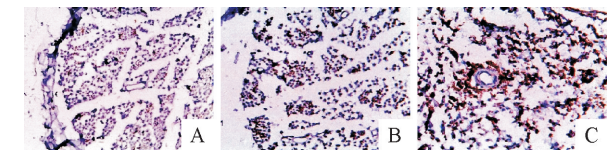


图 5 PTS 对大鼠患侧坐骨神经 GAP-43 表达的影响
Fig.5 Effects of PTS on expression of GAP-43 in injured sciatic nerve of rats



A.空白对照组;B.模型对照组;C.PTS 处理组
A.Blank control group;B.Model control group;C.PTS group

图 6 PTS 对大鼠损伤侧坐骨神经 GAP-43 表达影响(400×)
Fig.6 Effect of PTS on expression of GAP-43 in injured sciatic nerve of rats(400×)

3 讨论

人参自古就是名贵中药材,五加科植物。被誉为“滋阴补生,扶正固本”之极品,有补元气、安神智,生津养血之功效^[4]。人参含有多种皂苷和多糖类成分,其中皂苷类能增强大脑皮层的兴奋性,平衡中枢神经系统的兴奋和抑制过程。其中人参三醇组皂苷主要包括 Re、Rf、Rg₁、Rg₂、Rh₁、20-葡糖基-Rf、三七皂苷 R₁、三七皂苷 R₄ 等单体^[5-6]。有研究表明,这些单体可以调节神经营养及生长等因子促进轴突的再生,有保护神经的作用^[1]。Rb₁ 和 Rg₁ 单体在针对应激、缺血、缺氧等多种因素导致的神经细胞的损伤也有较好的保护作用^[7]。NF-M 在神经元轴突再生修复中起重要作用,它是神经元胞体、神经轴突细胞的主要成分,可以提示神经元细胞生长的状态。有研究表明,神经受到损伤机体自然修复过程中,神经细胞发生氧化应激反应后,NF-M 的表达明显改变,促进神经元功能恢复^[8-9]。GAP-43 是一种热稳定的磷酸蛋白,多分布在神经元内,对于损伤的神经它可以使其再生、发育并加快结构重建。微管结构蛋白 MAP-2 是功能及结构蛋白,又被称为神经生长和修复相关蛋白,是神经元轴突和树突的组成部分,在延长和增强神经元结构的稳定性和维持神经元形态和突触可塑性方面起到主要作用。在神经元受损后 MAP-2 的表达降低,在随后的神经元修复和重建时 MAP-2 的表达明显升高。在正常情况下神经中的 GAP-43 及 MAP-2 表达量很小,当神经受到损伤时 GAP-43 表达开始升高,当神经开始自我修复时 GAP-43、MAP-2 表达明显升高,这些变化发生在神经受损后的 30 天内,直至损伤神经修复完成后 GAP-43、MAP-2 表达水平恢复至正常^[10-13]。由此可见在研究神经系统的可塑性、神经的生长及再生时,常选泽 GAP-43 和 MAP-2 作为研究对象,它们在神经损伤修复和结构重建时,起到重要的积极作用。

综上所述,关于 PTS 在大鼠坐骨神经损伤后的修复作用的研究目前尚未见报道。本课题组在前期通过对 PTS 100、50、25 mg/kg 3 个剂量组的研究,发现只有 100 mg/kg 剂量组对急性损伤的坐骨神经有保护作用^[14],本试验只选用 100 mg/kg 剂量。本课题组还发现伤侧腓肠肌湿重及腓肠肌恢复率 PTS 处理组明显优于模型对照组。PTS 处理组与模型对照组比较,坐骨神经神经纤维排列更整齐,轴索更清晰,雪旺细胞基本保持正常;腓肠肌肌细胞直径更均匀,细胞核更清晰,数量增多;故 PTS 对大鼠坐

骨神经急性病理损伤有一定的修复作用^[15]。通过本试验的结果可以观察到,造模后第 30 天模型对照组及 PTS 处理组大鼠坐骨神经中 NF-M、MAP-2、GAP-43 平均光密度值均高于正常组,有显著性差异($P<0.05$),PTS 处理组大鼠坐骨神经中 NF-M、MAP-2、GAP-43 平均光密度值高于模型对照组,有显著性差异($P<0.05$),说明人组皂苷可促进神经损伤大鼠 NF-M、MAP-2、GAP-43 的表达。因此,PTS 对大鼠坐骨神经急性损伤有一定的修复作用,这不仅填补了国内相关外研究的空白,同时为 PTS 在坐骨神经损伤后的功能恢复时的临床辅助治疗提供科学依据。

参考文献:

- [1] Lu Z F, Shen Y X, Zhang P, et al. Ginsenoside Rg₁ promotes proliferation and neurotrophin expression of olfactory ensheathing cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2010, 12(4): 265-72.
- [2] 赵娟,俞红,徐义明,等.物理治疗促进坐骨神经损伤再生的实验研究[J].中国修复重建外科杂志, 2011, 25(1): 107-111.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[S].北京:中国医药科技出版社, 2015: 8.
- [4] 宋昕恬,张晶莹,孟令仪,等.人参三醇组皂苷对大鼠坐骨神经急性损伤后修复的研究[J].中国卫生工程学, 2016, 15(4): 318-321.
- [5] 张彩,史磊.人参化学成分和药理作用研究进展[J].食品与药品, 2016, 18(4): 300-304.
- [6] 王敏,田丹,谭伟,等.人参皂苷 Rg₁ 对染铅幼鼠学习记忆的影响[J].毒理学杂志, 2012, 26(1): 28-30.
- [7] 王国丽,李晓娇,张力娜,等.人参皂苷 Rb₁、Rg₁ 对中枢神经系统作用及相关机制的研究进展[J].上海中医药杂志, 2017, 51(3): 92-95.
- [8] Chiasson K, Lahaie-Collins V, Bournival J, et al. Oxidative stress and 17- α - and 17- β -estradiol modulate neurofilaments differently [J]. Mol Neurosci, 2006, 30(3): 297-310.
- [9] 高玉峰,姚斌彬,吴剑聪,等.推拿对大鼠坐骨神经损伤后 MAP-2 和 NF-M 表达的影响[J].中医药导报, 2014, 20(1): 11-13.
- [10] Maddodi N, Bhat KM, Devi S, et al. Oncogenic BRAFV600E induces expression of neuronal differentiation marker MAP-2 in melanoma cells by promoter demethylation and down-regulation of transcription repressor HES1 [J]. Biol Chem, 2010; 285(1): 242-254.
- [11] Beltramino C A. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP-2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity. [J] Brain Res, 2010, 13(28): 130-138.
- [12] 姚中凯,吴作培,孙贵新.微管相关蛋白 2: 调节神经元发育、结构稳定及突起形成和突触可塑性[J].中国组织工程研究, 2015; 19(37): 6010-6016.
- [13] Pereno G L, Beltramino C A. Timed changes of synaptic zinc, synaptophysin and MAP2 in medial extended amygdala of epileptic animals are suggestive of reactive neuroplasticity [J]. Brain Res, 2010, 1328 (1): 130-138.

锦州某奶牛养殖场乳房炎大肠埃希菌药敏试验及耐药基因检测

于长泳

(辽宁省动物疫病预防控制中心, 辽宁沈阳 110164)

摘要:为对锦州某奶牛养殖场临床型乳房炎病原菌耐药情况进行调查。对该场进行患病乳样采集、主要病原菌分离、鉴定、药物敏感性试验和耐药基因筛选。结果表明,该场乳房炎主要病原菌为大肠埃希菌,共得到乳房炎大肠埃希菌分离株 36 株;药物敏感性试验结果表明,分离株对磺胺类药物高度耐药、对头孢噻唑和头孢唑啉敏感;对分离株进行磺胺类药物耐药基因筛查结果表明, *sul1*、*sul2*、*sul3* 基因的阳性率分别为 76.0%、17.1%和 0%,说明 *sul1* 基因为该场大肠埃希菌磺胺类药物主要耐药基因。

关键词:乳房炎大肠埃希菌;药物敏感性检测;磺胺类;耐药基因

中图分类号: S857.26

文献标识码: A

文章编号: 1007-5038(2017)12-0081-05

乳房炎是奶牛养殖业常发疾病之一,其主要临床表现为患病牛乳房红、肿、热、痛、泌乳机能障碍等,并同时伴有凝乳、乳汁结块、血乳及絮状物沉淀

等,给养殖业带来巨大经济损失^[1-3]。据报道,奶牛乳房炎在世界范围内发病率高达 50%左右,我国每年约有 10%~15%的奶牛因乳房炎而被淘汰^[4]。

收稿日期: 2017-04-17

作者简介: 于长泳(1978—),男,辽宁沈阳人,高级兽医师,双学士,主要从事动物疫病防控工作。* 通讯作者

[14] 宋昕恬,张晶莹,孟令仪,等.人参三醇组皂苷对大鼠坐骨神经急性损伤后修复的研究[J],中国卫生工程学,2016,15(4): 318-321.

[15] 宋昕恬,王琳,张晶莹,等.人参三醇组皂苷对大鼠坐骨神经急性损伤保护作用的研究[J],毒理学杂志,2017,31(2): 122-124.

Preventive Effect of Panaxatri Set Saponins on Expression of Related Protein in Rats with Acute Sciatic Nerve Injury

SONG Xin-tian¹, WANG Lin², ZHANG Jing-ying¹, MENG Ling-yi¹, GAO Feng¹, ZHANG Kun³

(1. Jilin Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changchun, Jilin, 130062, China;

2. Jilin Certification Training Center for Food and Drug, Changchun, Jilin, 130061, China;

3. The Second Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin, 130000, China)

Abstract: To investigate the effect of protein expression changes of acute injury of sciatic nerve in rats induced by PTS, the rat sciatic nerve crush injury model was established and were divided into PTS group, model control group and blank control group randomly, 10 rats in each group, each group was administered by intraperitoneal injection, than PTS group was injected with PTS after injury, model control group was injected with same dose normal saline, blank control group was injected with same dose normal saline without sciatic nerve injury. 30 days after sciatic nerve injury, the effects of PTS on the expressions of NF-M, MAP-2 and GAP-43 in the sciatic nerve of the injured side were observed by immunofluorescence chemical staining, and the effects of PTS on the injured lateral nerve were observed. The expressions of NF-M, MAP-2 and GAP-43 in the sciatic nerve of injured rats were significantly higher than that in the control group (8.21 ± 1.25 , 11.90 ± 1.14 , 0.278 ± 0.042), and the mean optical densities (9.66 ± 0.99 , 12.43 ± 1.44 , 0.344 ± 0.040) were significantly different ($P < 0.01$). PTS can promote the expressions of NF-M, MAP-2 and GAP-43 in sciatic nerve injury rats.

Key words: panaxtriol saponin; sciatic nerve; protein expression; immunohistochemistry; rat