

· 方药研究 ·

筋脉通胶囊对高糖培养雪旺细胞睫状体神经营养因子表达的影响

王普艳¹ 梁晓春¹ 张宏² 孙连庆¹ 吴群励¹ 屈岭¹ 赵丽¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院中医科, 北京市东城区帅府园 1号, 100730

2. 中国医学科学院北京协和医学院基础医学研究所细胞中心)

摘要 目的 探讨筋脉通胶囊对糖尿病周围神经病变的作用及其机制。方法 以 Wistar 大鼠按成人剂量 15 倍给药分别制成筋脉通和神经妥乐平含药血清。实验分为空白对照组 (不加细胞)、正常对照组 (加入正常大鼠血清)、高糖组 (加入葡萄糖)、筋脉通组 (加入筋脉通含药血清和正常大鼠血清)、神经妥乐平组 (加入神经妥乐平含药血清), 除空白对照组和正常对照组之外, 其余各组均加入 50 mmol/L 葡萄糖培养高糖雪旺细胞模型。采用免疫荧光法检测高糖培养雪旺细胞睫状体神经营养因子 (CNTF) 的表达, 实时荧光定量 PCR 法检测 CNTF-mRNA 的表达。结果 与正常对照组相比, 高糖组、筋脉通组、神经妥乐平组雪旺细胞 CNTF 及 CNTF-mRNA 的表达均降低 ($P < 0.01$); 与高糖组相比, 筋脉通组与神经妥乐平组雪旺细胞 CNTF 及 CNTF-mRNA 表达均增高 ($P < 0.01$); 且筋脉通组雪旺细胞 CNTF-mRNA 表达较神经妥乐平组增高 ($P < 0.05$)。结论 筋脉通胶囊可以上调高糖培养雪旺细胞 CNTF 蛋白及其 mRNA 的表达, 从而对糖尿病周围神经病变具有一定的改善作用。

关键词 糖尿病周围神经病变; 高血糖; 雪旺细胞; 睫状体神经营养因子; 筋脉通胶囊

Effect of Jinmaitong Capsule Medicated Serum on Ciliary Neurotrophic Factor of Rat Schwann Cells Cultured in High Glucose Medium

WANG Puyan¹, LIANG Xiaochun¹, ZHANG Hong², SUN Lianqing¹, WU Qunli¹, QU Ling¹, ZHAO Li¹

(1. Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730. 2. Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences)

ABSTRACT Objective To investigate the effect of Jinmaitong Capsule (Herbal capsule for removing obstruction of channels) on diabetic peripheral neuropathy and its mechanism. **Methods** The Jinmaitong Capsule and Neurotrophin medicated serum was prepared respectively according to the 15 times of adult dosage for Wistar rats. In the experiment, the grouping was the blank control group (without cells added), normal control group (with normal rat serum added), high glucose group (with glucose added), Jinmaitong group (with the Jinmaitong Capsule medicated serum and normal rat serum added), and neurotrophin group (with the neurotrophin medicated serum added). Except the blank control group and normal control group, the 50 mmol/L glucose was added to all other groups respectively to make high glucose Schwann cell models. The expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF-mRNA was detected by SABC immunohistochemistry method and real-time fluorogenic quantitative PCR respectively. **Results** Compared with the normal control group, the CNTF and CNTF-mRNA expression in the high glucose group, Jinmaitong group, and neurotrophin group was lowered ($P < 0.01$). Compared with the high glucose group, the CNTF-mRNA and CNTF expression of the Jinmaitong group and neurotrophin group was increased ($P < 0.01$) and the CNTF-mRNA expression in the Jinmaitong group was higher than that in the neurotrophin group ($P < 0.05$). **Conclusion** Jinmaitong Capsule can up-regulate the expression of CNTF and CNTF-mRNA of rat Schwann Cells cultured in high glucose medium, so as to improve the diabetic peripheral neuropathy.

Key Words Diabetic peripheral neuropathy; High blood glucose; Schwann cells; Ciliary neurotrophic factor; Jinmaitong Capsule (Herbal capsule for removing obstruction of channels)

糖尿病周围神经病变 (diabetic peripheral neuropathy, DPN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 最常见的慢性并发症之一, 发病机制复杂, 其中神经营养因子缺乏在 DPN 的发病中起重要作用^[1-2]。睫状体神经营养因子 (Ciliary neurotrophic factor, CNTF) 是神经营养因子

家族中的重要成员, 与神经系统发育、功能维持和损伤修复有密切的关系。雪旺细胞作为周围神经系统的髓鞘形成细胞, 能分泌多种神经营养因子, 是目前证明唯一有利于神经再生的神经胶质细胞。在既往的研究中发现筋脉通胶囊有促进糖尿病大鼠周围神经再生和修复的功能^[3], 为了进一步探讨其机理, 本实验以雪旺细胞为靶细胞, 观察了筋脉通对高糖培养环境下雪旺细

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572438)

通讯作者: 梁晓春, xcliang@vip.sina.com, (010) 65295331

胞 CNTF表达的影响。

1 材料

1.1 动物

3~5天新生 Wistar 雄性乳鼠 3只,体重约 6~13g; 清洁级 Wistar 雄性大鼠 30只,体重 280~320g,均购自中国医学科学院实验动物研究所,实验动物许可号: SCXK(京)2005-0013

1.2 药品与试剂

DMEM 细胞培养基 (Gibco 公司),优质 FBS 0.05% 胰蛋白酶 (Hyclone 公司),L 谷氨酰胺 丙酮酸钠、G-418 (Sigma 公司),HEPES 缓冲液 (Amresco 公司),兔抗鼠 S-100 多克隆抗体 兔抗鼠 CNTF 多克隆抗体 即用型 SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒、SABC-FITC 试剂盒、PI (Boster 公司),Triton-X100 (ナカライテツ株式会社),筋脉通胶囊 (由生黄芪、生地黄、丹参、葛根、水蛭、菟丝子、女贞子、桂枝等组成),中国医学科学院北京协和医院院内制剂,由北京九龙制药厂加工生产,每粒含生药 0.35g,批准文号 (97)京卫药制加字 [48]第 F-292 号,生产批号 061019 神经妥乐平片购自日本脏器制药株式会社,4NU 片,批准文号: S20040071,生产批号: 06180

1.3 主要仪器

整体千级局部百级超净工作间 (北京协和医学院基础学院细胞中心),CO₂ 培养箱 (Forma 公司,3111),高速低温离心机 (ALC 公司,PK121R),纯水系统 (Millipore 公司,Elix/BiOs),恒温水浴箱 (杭州雪中炭恒温技术公司,XT5006),倒置相差显微镜 (Olympus 公司,CKX31SF),普通光学显微镜 (Olympus 公司,CX40),共聚焦激光扫描显微镜 (Leica 公司,TCSSP2SE),荧光显微镜 (Leica 公司,DM I4000B),酶标分析仪 (Bio Rad Cada 公司),荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司,7900HT)。

2 方法

2.1 组织标本的采集

将新生 Wistar 乳鼠脱颈处死后于股骨干后外侧切取双侧坐骨神经,并置于含 D-Hank's 液冲洗 3 次,仔细剥离神经外膜,尽可能去除束膜,供细胞培养用。

2.2 含药血清的制备

将清洁级雄性 Wistar 大鼠分为 3 组: 筋脉通组 13 只,神经妥乐平组 2 只,正常组 15 只,适应性喂养 24h 后开始灌胃。筋脉通组按成人剂量的 15 倍给药,即 $1.3125\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 神经妥乐平组按成人剂量的 15 倍给药,即 $4\text{NU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 正常组给予同等体积的蒸馏水。每日灌胃 2 次,连续 3 天。于末次灌胃后 2h 内颈动脉取血,室温静置 2h 后,分离血清,4000r/min 离心

10min, 56℃ 水浴灭活 30min,置 -20℃ 冰箱保存备用,避免反复冻融。

2.3 雪旺细胞培养、纯化、传代及鉴定

将分离的组织剪碎至 0.5~1.0mm²,均匀接种于 T25 培养瓶中培养。3~4 天后,加入含 G-418 (100μg/ml) 的培养液进行纯化并传代。取第 3 代生长良好雪旺细胞,消化制成细胞悬液,接种到预先放置了盖玻片的培养板中培养至细胞长成单层时,取出盖玻片进行 S-100 蛋白免疫组织化学鉴定。

2.4 细胞分组及培养液配制

实验分为以下 5 组,即空白对照组、正常对照组、高糖组、筋脉通组、神经妥乐平组。根据既往的研究结果^[4]高糖组、筋脉通组和神经妥乐平组加入 50mmol/L 葡萄糖培养高糖雪旺细胞模型;空白对照组不加细胞;正常对照组的 DMEM 培养基中加入 20% 正常大鼠血清;筋脉通组加入 10% 含药血清和 10% 正常大鼠血清;神经妥乐平组加入 20% 含药血清。上述各组培养液,皆经 0.22μm 微孔滤膜器过滤,置 -20℃ 冰箱保存备用,避免反复冻融。

2.5 免疫荧光法检测 CNTF 的表达

取第 3 代雪旺细胞进行消化 (方法同 2.3),并稀释为细胞悬液,接种于盖玻片内,加入培养液,置于 5% CO₂ 的 CO₂ 培养箱培养 48h;取出盖玻片后 PBS 漂洗、丙酮固定及 0.1% Triton-X100 浸泡后,加入 BAS 封闭液,室温孵育。按照试剂盒说明,依次加入一抗兔抗鼠 CNTF 多克隆抗体 (1:100)、二抗羊抗兔 IgG (1:100) 及 FITC 标记的 SABC 工作液 (1:100);最后用 DAB-CO 封片,指甲油固定 4 周。在共聚焦激光扫描显微镜下探测 PI 的红色荧光和 FITC 的绿色荧光,并照相,所摄图像以 Leica Confocal 图像分析软件检测荧光值,每组计数 15~20 个细胞。

2.6 实时定量 PCR 法检测 CNTF-mRNA 的表达

2.6.1 RNA 的提取和鉴定 取第 3 代雪旺细胞进行消化并稀释成细胞悬液,按 1×10^6 细胞/瓶的浓度接种于培养瓶内,5% CO₂ 培养箱培养 48h。PBS 漂洗,用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA,氯仿和异丙醇抽提。以 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性,28S 和 18S 条带清晰可见,表明 RNA 无降解。紫外分光光度计对 RNA 浓度和纯度进行测定,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0。

2.6.2 cDNA 合成和引物设计与合成 在离心管中加入总 RNA (1μg/μl)、引物 (Oligo dT15, 10pmol/μl)、10mM dNTP mix、H₂O 共 14μl。将以上组分混匀,70℃ 变性 RNA 5min,冰上速冷 2min,离心将溶液收集至管

底。按顺序加入以下组分: 5× PCR buffer 4μl DTT 1μl M-MLV RTase,将以上混合物 42℃延伸 50min, 95℃保温 15min 终止反应。CNTF 基因的引物由 GENELIFE 公司设计, Invitrogen 公司合成。CNTF 引物序列: 上游 5'-TCTGGCTAGCAAGGAAGATTCTG-3'; 下游 5'-TCAGTGCTTGCCACTGGTACAC-3' (扩增片段长度 124bp); β-actin 引物序列: 上游 5'-CATTGCTGACAGGATGCAGAAG-3'; 下游 5'-GAGCCACCAATCCACACAGAGT-3' (扩增片段长度 108bp)。

2.6.3 实时荧光定量 PCR 扩增 2× SYBR Green qPCR mix (Modified DNA polymerase SYBR Green I Optimized PCR buffer 5mmol/L MgCl₂ dNTP mix including dUTP) 12μl Primer (2pmol forward and 2pmol reverse) 0.6μl cDNA 模板 1μl H₂O 11.4μl, 共 23μl。PCR 扩增反应条件: 50℃ 2min→95℃ 10min→(95℃ 15s→60℃ 1min) 共 40 个循环。将所扩增的 PCR 产物进行溶解曲线分析, 反应 PCR 反应的特异性。溶解曲线生成的反应程序为 95℃ 15s, 60℃ 15s, 95℃ 15s。整个过程中收集荧光, 反应结束后, 使用荧光定量操作及数据分析软件 (Sequence Detection Software 2.2) 对数据进行处理。仪器根据设定的阈值, 自动计算出每份样品中 CNTF 进行 PCR 扩增时达到阈值时的 Ct 值。由于 Ct 值与样品中 CNTF 的初始模板浓度成反比线性关系, 故根据 Ct 值即可计算出相应的相对原始模板浓度, 通过 β-actin 校正, 得到每份样品中 CNTF 的相对表达量即 Quantity (CNTF/β-actin)。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件, 分析前采用 One Sample Kolmogorov-Smirnov Z test 检验数据是否符合正态分布, 符合正态分布的数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 描述, 多组独立样本比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 雪旺细胞培养的情况

培养结果与前期的实验结果^[4]相同, 初期可见呈梭形的雪旺细胞及扁平的成纤维细胞, 3~5 天后经差速贴壁、G-418 纯化, 成纤维细胞基本消失, 雪旺细胞生长良好, 形态正常; 纯化培养 4~5 天后可以进行传代。通过 S-100 抗体鉴定, 雪旺细胞的纯度可达 90% 左右。

3.2 筋脉通含药血清对高糖培养雪旺细胞 CNTF 及 CNTF-mRNA 表达的影响

从 CLSM 上采集的图像 (图略) 可以看出, CNTF 主要表达于雪旺细胞的胞浆中。正常对照组表达最强; 筋脉通组和神经妥乐平组表达亦较强, 但都较正常对

照组弱; 高糖组的表达较弱; 而空白对照组染色不明显。

表示, 与正常对照组相比, 高糖组、筋脉通组、神经妥乐平组雪旺细胞 CNTF 的荧光强度值及 CNTF-mRNA 的表达降低 ($P < 0.01$); 与高糖组相比, 筋脉通组与神经妥乐平组的雪旺细胞 CNTF 的荧光强度值及 CNTF-mRNA 表达增高 ($P < 0.01$); 且筋脉通组雪旺细胞 CNTF-mRNA 表达较神经妥乐平组增高 ($P < 0.05$), 但两组 CNTF 的荧光强度值比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 1 筋脉通含药血清对高糖培养雪旺细胞 CNTF 及其 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	mRNA 表达 ($\times 10^{-5}$)	荧光强度值
正常对照组	4.57 ± 0.95	56.59 ± 7.14
高糖组	0.57 ± 0.38 [*]	29.97 ± 6.09 [*]
筋脉通组	2.45 ± 0.10 [▲]	44.85 ± 8.47 [△]
神经妥乐平组	2.06 ± 0.31 [△]	46.23 ± 9.50 [△]

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 与高糖组比较, △ $P < 0.01$; 与神经妥乐平组比较, ▲ $P < 0.05$

4 讨论

DPN 发病机理仍未完全阐明, 但最终的结果都是引起神经元或神经纤维的变性和坏死。许多研究证实, 在周围神经损伤后, 体内可以启动一系列神经修复再生机制, 产生多种神经营养因子和细胞因子, 促进神经的修复。DPN 患者神经退行性病变与神经修复再生并存^[5-7]。有研究发现, DM 患者发生轻度神经变性时, 再生程度很高; 但病情严重的 DPN, 轴突再生并不能完全补偿轴突变性, 特别是在糖尿病神经变性的进展期^[8]。因此 DPN 的治疗不能仅限于阻止周围神经的变性及坏死, 增加再生神经纤维的数量及促进变性神经纤维的功能修复也许对治疗 DPN 有着更为重要的意义。

经过 20 多年的临床实践证实筋脉通胶囊能够改善 DPN 患者的肢体疼痛、麻木、发凉等症状, 增加神经传导速度, 改善糖脂代谢; 显著降低 DPN 患者的红细胞醛糖还原酶 (AR) 活性, 减轻红细胞山梨醇的蓄积, 提高红细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。本研究表明, 筋脉通可降低 STZ-DM 大鼠坐骨神经的醛糖还原酶 (AR) 活性, 减轻山梨醇的蓄积, 减少蛋白非酶糖基化终产物 (AGEs) 的形成及下调 AGEs 受体 mRNA 表达, 提高抗氧化酶活性及抗脂质过氧化作用^[9-14]。据此推测筋脉通能通过多途径、多靶点的综合作用, 达到防止糖尿病周围神经组织结构破坏, 促进受损神经纤维的功能修复。本文延续这条思路, 就同属于神经营养因子家族

的 CNTF 进行研究

雪旺细胞是周围神经系统中的胶质细胞和髓鞘形成细胞,可以通过其支架作用和分泌的营养因子,影响有效的神经再生,在维持神经结构和功能及修复损伤中起着重要作用;因此本研究通过高糖环境下培养雪旺细胞作为靶细胞^[4]。周围神经受损后,CNTF在雪旺细胞中的表达与其功能状况是同步的。由于缺乏信号肽,CNTF通过雪旺细胞大量聚集于周围神经中,一旦周围神经发生损伤,雪旺细胞中的CNTF即可大量释放于细胞间隙中而发挥促进神经损伤修复的作用,支持损伤后运动和感觉神经元的存活和轴索的再生。若能促进雪旺细胞中CNTF的合成分泌,就可能有效防止DPN各种损害因素对神经组织的进一步损伤,增强神经再生能力和/或降低神经变性的速度,改善神经病理改变,有利于神经功能的恢复。神经妥乐平是运用牛痘免疫病毒疫苗接种家兔皮肤组织所提取的非蛋白性生理活性物质,具有镇痛、改善冷感和麻木等异常神经症状及促进体外培养雪旺细胞的增殖、促进轴突形成的作用^[15-17],故将其作为阳性对照药物。本实验中观察到正常对照组CNTF表达明显高于高糖组,而筋脉通组和神经妥乐平组雪旺细胞中CNTF及其mRNA的表达虽然低于正常对照组,却明显高于高糖组,这表明筋脉通和神经妥乐平含药血清均可抑制高糖诱导的雪旺细胞中CNTF及其mRNA表达的下调,进而通过CNTF的作用间接参与周围神经修复再生,二者含药血清促进雪旺细胞CNTF的合成与分泌的作用是相似的。

参考文献

- [1] Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT. Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors[J]. Diabetes, 1997, 46(Suppl 2): 43- 49.
- [2] Apfel SC. Neurotrophic factors in the therapy of diabetic neuropathy[J]. Am J Med, 1999, 107(2B): 34- 42.
- [3] 屈岭,梁晓春,孙连庆,等. 筋脉通对糖尿病大鼠周围神经组织神经生长因子表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(11): 2539- 2543.
- [4] Qu L, Liang XC, Zhang H, et al. Effect of Jinmaitong serum on the proliferation of rat Schwann cells cultured in high glucose medium[J]. Chin J Integr Med, 2008, 14(4): 293- 297.
- [5] Yasuda H, Terada M, Maeda K, et al. Diabetic neuropathy and nerve regeneration[J]. Prog Neurobiol, 2003, 69(4): 229- 285.
- [6] Kennedy JM, Zochodne DW. Impaired peripheral nerve regeneration in diabetes mellitus[J]. J Peripher Nerv Syst, 2005, 10(2): 144- 157.
- [7] Apfel SC. Nerve regeneration in diabetic neuropathy[J]. Di-

abetes Obes Metab, 1999, 1(1): 3- 11.

- [8] Akkina SK, Patterson CL, Wright DE. GDNF rescues non-peptidergic unmyelinated primary afferents in Streptozotocin-treated diabetic mice[J]. Exp Neurol, 2001, 167(1): 173- 182.
- [9] 梁晓春. 糖尿病神经病变的治疗[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(1): 4.
- [10] Liang XC, Guo SS. Role of Traditional Chinese and Western Medicine that inhibits aldose reductase in the treatment of peripheral neuropathy[J]. CJIM, 2000, 6(1): 76- 78.
- [11] 梁晓春, 崔丽英, 郭赛珊, 等. 筋脉通治疗糖尿病周围神经病变临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(9): 517- 519.
- [12] 张克俭, 梁晓春, 崔丽英, 等. 筋脉通胶囊对糖尿病周围神经病变患者钠-钾-腺苷三磷酸酶活性的影响[J]. 中医杂志, 2000, 42(3): 159.
- [13] 梁晓春, 张宏, 郭赛珊, 等. 筋脉通对糖尿病大鼠坐骨神经传导速度、醛糖还原酶及山梨醇浓度的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(1): 37- 39.
- [14] 郝伟欣, 贾力, 徐惠媛, 等. 筋脉通对大鼠坐骨神经传导速度及红细胞抗氧化作用的影响[J]. 中国新药杂志, 2003, 12(5): 343- 345.
- [15] De Reuck J, Decoo D, Vanderdonck P, et al. A double-blind study of neurotrophin in patients with acute ischemic stroke[J]. Acta Neurol Scand, 1994, 89(5): 329- 335.
- [16] 宁光, 邹大进, 刘伟, 等. 神经妥乐平治疗糖尿病神经病变的多中心研究[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(21): 1785- 1787.
- [17] 程飏, 陈峥嵘, 汪洋, 等. 神经妥乐平促进雪旺细胞体外增殖作用的研究[J]. 中华手外科杂志, 2002, 18(1): 495- 451.

(收稿日期: 2009- 07- 23; 修回日期: 2009- 10- 10)

[编辑: 崔京艳]

关于设立“北京展旭医学研究院分支机构 科研基地、课题项目”的通知

北京展旭医学研究院是面向全国专门从事医学研究的科研机构,拥有一大批专家教授为顾问、专家委员。为贯彻“继承、创新、现代化、国际化”的中医药战略目标,发挥本院优势,带动基层,特面向全国各地设立分支机构、科研基地、课题项目。

1. 发展对象: 各级医疗机构、康复、理疗、诊所、门诊部、科研院所等单位,及相关科研人员。2. 设立分支机构名称: 北京展旭医学研究院××省××市(县)分院、×××病科研基地、×××课题项目。3. 本院为分支机构、科研基地、课题项目提供的支持: (1)批准后的分支机构、科研基地、课题项目,在成果转化、融资等方面,可优先获得本院的政策倾斜或资金扶持; (2)在本院官方网站刊载分支机构、科研基地、课题项目的特色,以供分支机构、科研基地、课题项目做宣传与推广; (3)向分支机构、科研基地、课题项目授予证书和铜牌; (4)分支机构、科研基地、课题项目的主要领导人纳入本院专家库,档案统一管理。其它支持请来来电来函咨询。申请建立分支机构、科研基地、课题项目的单位和个人,请来函来电索取申请表。联系地址: 北京市丰台区丰管路 48 号,北京展旭医学研究院,联系人: 张文智。联系电话: 010- 52204958 63000289 52204956 (兼传真) 18611263638 电子邮件: lg@acsyx.com