

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.06.024 [http://www.crter.org]

饶耀剑, 朱文潇, 马文虎, 王拥军. 益气活血类药物血清对嗅鞘细胞增殖及相关因子分泌的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(6):1094-1100.

## 益气活血类药物血清对嗅鞘细胞增殖及相关因子分泌的影响☆

饶耀剑<sup>1</sup>, 朱文潇<sup>1</sup>, 马文虎<sup>1</sup>, 王拥军<sup>2</sup>

1 河南省洛阳正骨医院脊柱外三科, 河南省洛阳市 471000

2 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市 200000

### 文章亮点:

实验证实益气活血类中药方剂的代表方补阳还五汤及痿证方均能够促进嗅鞘细胞分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子, 说明益气活血类中药方剂可能通过增强细胞分泌神经营养因子水平来达到促进嗅鞘细胞的增殖。

### 关键词:

干细胞; 干细胞与中医药; 补阳还五汤; 痿证方; 益气活血; 含药血清; 嗅鞘细胞; 增殖; 神经生长因子; 脑源性神经营养因子; 促增殖; 组织修复; 干细胞图片文章

### 摘要

**背景:** 益气化瘀是中医药对脊髓损伤的主要治则, 但疗效不确切。那么, 益气活血类中医药治法能否结合现代科技共同治疗脊髓损伤从而提高疗效呢?

**目的:** 观察益气活血类汤剂促进嗅鞘细胞增殖及分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子的作用。

**方法:** 组织块培养法体外培养新生大鼠嗅鞘细胞; 采用 MTT 法检测补阳还五汤和痿证方含药血清对嗅鞘细胞增殖的影响; 采用 Western-Blot 法测定培养上清中神经生长因子、脑源性神经营养因子水平。

**结果与结论:** MTT 结果显示补阳还五汤药物血清及痿证方药物血清均能促进嗅鞘细胞增殖, 且两者促增殖作用无差异; Western-Blot 结果显示补阳还五汤药物血清及痿证方药物血清均能促进嗅鞘细胞分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子, 两组间细胞因子分泌水平也无明显差异。

饶耀剑☆, 男, 1972年生, 湖北省武穴市人, 汉族, 2005年华中科技大学毕业, 博士, 副主任医师, 主要从事脊柱脊髓损伤研究。

raotony@163.com

通讯作者: 王拥军, 博士, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院, 上海市 200000

中图分类号: R394.2

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2013)06-01094-07

收稿日期: 2012-05-18

修回日期: 2012-07-27

(20120518006/M·C)

## Serum-containing drugs responsible for supplementing *qi* and activating blood circulation influences proliferation of olfactory ensheathing cells and secretion of related cytokines

Rao Yao-jian<sup>1</sup>, Zhu Wen-xiao<sup>1</sup>, Ma Wen-hu<sup>1</sup>, Wang Yong-jun<sup>2</sup>

1 Third Department of Spine Surgery, Luoyang Orthopedic-traumatological Hospital, Luoyang 471000, Henan Province, China

2 Affiliated Longhua Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200000, China

### Abstract

**BACKGROUND:** Supplementing *qi* and removing blood stasis is the main therapeutic principle of traditional Chinese medicine for the treatment of spinal cord injury, but the efficacy is not plausible. But, whether the application of serum-containing drugs responsible for supplementing *qi* and activating blood circulation under the guidance of modern technology can treat spinal cord injury and improve the efficacy?

**OBJECTIVE:** To study the effect of serum-containing drugs responsible for supplementing *qi* and activating blood circulation on the proliferation of olfactory ensheathing cells and the secretion of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor.

**METHODS:** The olfactory ensheathing cells were *in vitro* cultured with tissue block culture method. The

Rao Yao-jian☆, Doctor,  
Associate chief physician, Third  
Department of Spine Surgery,  
Luoyang  
Orthopedic-traumatological  
Hospital, Luoyang 471000,  
Henan Province, China  
raotony@163.com

Corresponding author: Wang  
Yong-jun, Doctor, Chief  
physician, Affiliated Longhua  
Hospital of Shanghai University  
of Traditional Chinese  
Medicine, Shanghai 200000,  
China

Received: 2012-05-18  
Accepted: 2012-07-27

effect of *Buyanghuanwu* decoction and *Weizheng* decoction on the proliferation of olfactory ensheathing cells was detected with MTT assay. The expression levels of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the culture supernatant were detected by western blot assay.

**RESULTS AND CONCLUSION:** MTT results showed that both *Buyanghuanwu* decoction and *Weizheng* decoction could promote the proliferation of olfactory ensheathing cells, and there was no significant difference in proliferation-promoting effect. Western blot assay results showed that both *Buyanghuanwu* decoction and *Weizheng* decoction could promote the expression of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in olfactory ensheathing cells, and there was no significant difference in secretion level between two groups.

**Key Words:** stem cells; stem cells and traditional Chinese medicine; culture and differentiation; *Buyanghuanwu* decoction; *Weizheng* decoction; supplementing *qi* and activating blood circulation; drug-containing serum; olfactory ensheathing cells; proliferation; nerve growth factor; brain-derived neurotrophic factor; proliferation promotion; tissue repair; photographs-containing paper of stem cells

Rao YJ, Zhu WX, Ma WH, Wang YJ. Serum-containing drugs responsible for supplementing *qi* and activating blood circulation influences proliferation of olfactory ensheathing cells and secretion of related cytokines. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(6):1094-1100.

## 0 引言

嗅鞘细胞是修复脊髓损伤最有应用前景的候选细胞之一<sup>[1]</sup>。嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的机制包括释放生长因子及神经营养因子, 减少抑制性因素的产生<sup>[2]</sup>; 发挥神经保护作用, 保护残存的轴突<sup>[3-4]</sup>; 改善损伤微环境<sup>[5]</sup>; 促进轴突再生<sup>[6]</sup>; 穿越胶质瘢痕<sup>[7]</sup>; 亲和神经元和导向神经等<sup>[8]</sup>。其中嗅鞘细胞表达的神经营养因子中神经生长因子、脑源性神经营养因子在促进脊髓功能恢复中起着重要作用<sup>[9]</sup>。

目前发现嗅鞘细胞移植后其存活情况受到很多因素的影响, 如局部区域的缺血缺氧、局部形成的酸性环境、氧自由基的堆积等<sup>[10]</sup>, 这些都将不利于植入断端间隙嗅鞘细胞的存活。益气化瘀是中医药对脊髓损伤的主要治则, 临床亦应用广泛, 但疗效不确切。那么, 益气活血类中医药治法能否结合现代科技共同治疗脊髓损伤从而提高疗效呢? 益气活血类方剂能否提高嗅鞘细胞活性呢?

文章即运用中医药与现代医学结合的思维并遵循整体治疗原则, 通过研究经典方补阳还五汤以及上海中医药大学经验效方痿证方促进嗅鞘细胞分泌神经营养因子情况, 初步揭示益气活血类方剂联合嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的可能作用机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物实验。

**时间及地点:** 实验于2011年10月至2012年4月在河南省洛阳正骨医院中心实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 2月龄 SD大鼠30只, 清洁级, 体质量(200±20) g, 雌雄各半; 新生SD乳鼠10只, 合格证号: SCXK(豫)2010-0002, 均由河南省动物实验中心提供。实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。大鼠用于含药血清的制备, 乳鼠用于嗅鞘细胞的原代培养。

**补阳还五汤组分:** 生黄芪, 当归尾, 赤芍, 地龙, 川芎, 桃仁, 红花。

**痿证方组分:** 炙黄芪、党参、炒白术、当归。

## 主要试剂与仪器:

## Main reagents and instruments:

试剂及仪器	来源
25 cm <sup>2</sup> 培养瓶、96 孔培养板、细胞刮刀	Corning, 美国
细胞培养箱-HEPAClass 100	Thermo, 美国
Mini-PROTEAN Tetra cell 垂直电泳槽、PowerPac HC 电泳仪、GelDoc-XR 凝胶成像系统、转膜槽	Bio-Rad, 美国
100 mmol/L PMSF、RIPA 裂解液、BAC 试剂盒、SDS-PAGE Tricine 蛋白上样缓冲液、SDS 凝胶试剂盒、R1PA 裂解液、神经生长因子和脑源性神经营养因子兔多克隆抗体、GRP75、一抗 $\beta$ -actin 兔多克隆抗体、二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG	武汉博士德公司
各味中药	河南省洛阳正骨医院 中药房

## 实验方法:

**大鼠分组及含药血清制备:** 预先将大鼠雌雄分笼随机分为补阳还五汤组、痿证方组、对照组, 每组10只。补阳还五汤及痿证方原方经水煎至100 mL, 制成相当于含生药1.0 g/mL的水煎剂。按人体质量60 kg每天1剂换算, 200 g大鼠等效用药剂量为2.89 g<sup>[11-12]</sup>。根据前期实验的结果(另文发表)及参阅文献<sup>[13-15]</sup>, 大鼠嗅鞘细胞存活随药物浓度的增加而呈现剂量-效应依赖关系, 其中补阳还五汤最佳剂量为3倍剂量, 痿证方最佳剂量为5倍剂量, 故将药液浓缩至目标浓度。

大鼠饲养1周后开始用灌胃器灌胃药物。每只大鼠每天灌胃2次, 每天早9点、晚4点各1次, 每次1.5 mL, 对照组灌服等量生理盐水。自由进食水, 及时更换大鼠垫料。连续给药3 d, 采血前禁食12 h。末次给药2 h后, 无菌环境下乙醚麻醉大鼠, 采用腹主动脉采血法收集大鼠全血, 以3 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心15 min, 用0.22  $\mu$ m微孔滤膜无菌分离血清, 56  $^{\circ}$ C水浴, 30 min灭活, -20  $^{\circ}$ C冰箱保存备用。

**原代嗅鞘细胞的分离、培养及纯化<sup>[16-17]</sup>:** 预备好2个35 mm玻皿, 装入少许无血清DMEM培养基。每次取2只新生3 d内乳鼠, 断头处死, 用眼科剪剪开乳鼠颅骨, 暴露嗅球, 眼科镊小心取出嗅球组织, 置于无血清DMEM培养基, 在显微镜下用显微眼科镊小心剥离脑膜。用巴氏吸管将剥膜后的嗅球组织转移至另一无血清DMEM培养基, 并轻柔吹打、冲洗组织数遍。吸去清洗用培养基, 用眼科弯剪将嗅球组织锐性剪切成0.5-1.0 mm<sup>3</sup>小组织块, 移至盛有DMEM液的离心管中, 吹打均匀, 1 200 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min, 弃

除上清, 加入已制备的含体积分数为10%胎牛血清培养基2 mL, 并吹散均匀。用巴氏吸管转移至2个已用多聚赖氨酸“包板”的25 cm<sup>2</sup>培养瓶中, 分布均匀(0.5 cm间隔), 倒置或直立培养瓶约15 min后, 从培养瓶非种植面加含体积分数为10%胎牛血清培养基至每培养瓶4 mL, 缓慢放正培养瓶, 使组织块贴壁, 拧紧瓶盖。置于37.0  $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的细胞培养箱中培养。48 h后, 用限定性培养基(由河南省正骨研究院提供)每隔2 d半量换液培养、纯化。于倒置显微镜下观察细胞生长情况, 至细胞长满为止传代, 细胞培养期间间断摄片。

**中药方剂含药血清干预嗅鞘细胞:** 嗅鞘细胞铺满培养瓶后, 选择生长状态良好的细胞, 制备单细胞悬液。取100  $\mu$ L单细胞悬液移至1.5 mL离心管中, 加入100  $\mu$ L 0.08%锥虫蓝溶液后轻摇混匀。在3 min内倒置显微镜下用血球计数板、计数器计数细胞。镜下观察见死细胞被染成淡蓝色, 而活细胞拒染。依次计算细胞悬液密度, 用0.125%胰蛋白酶消化液将嗅鞘细胞消化下来后, 根据锥虫蓝排斥实验调节细胞浓度为2.5 $\times$ 10<sup>7</sup> L<sup>-1</sup>。将此浓度的细胞悬液按组别以每孔200  $\mu$ L接种于2块96孔培养板, 经含体积分数为10%胎牛血清培养基培养24 h后, 更换不含血清的DMEM/F12培养液培养24 h(饥饿细胞使细胞在同一水平增殖), 然后分别加入补阳还五汤含药血清培养液、痿证方含药血清培养液及生理盐水组培养液, 胎牛血清组(含体积分数为10%胎牛血清)于培养板上继续培养, 每组48孔。

**MTT法测定中药方剂含药血清对嗅鞘细胞的增殖情况:** 倒置显微镜下观察至培养第5天, 各孔细胞汇合率达70%以上, 说明细胞生长达到对数期。超净工作台下, 用巴氏吸管吸尽各孔培养基并用DMEM液清洗2次后每孔加入180  $\mu$ L DMEM/F12培养液, 取已配制好的5 g/L的MTT试剂20  $\mu$ L加入其中。在37  $^{\circ}$ C、体积分数为5%CO<sub>2</sub>饱和培养箱中培养5 h, 吸尽废液后加入150  $\mu$ L的二甲基亚砜, 电动摇床上100 r/min(离心半径13.5 cm)振荡混匀10 min, 使甲臞结晶充分溶解后用酶联检测仪在490 nm波长下测定各孔的吸光度值。

**Western-Blot测定神经生长因子、脑源性神经营养因子表达:** 经含PMSF蛋白抑制剂的RIPA裂解液裂解各组嗅鞘细胞, PBS漂洗后用细胞刮刀刮下嗅鞘细胞, 移至100 mm培养皿中, 并用细针头吹打。移至15 mL无菌离心管, 高速冷冻离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 离心半径13.5 cm)15 min, 取上清转移至另一15 mL无菌离心管。采用BCA法测定蛋白含量, 得出蛋白质量浓度为

2.95 g/L。稀释调整到2 g/L, 分装, -70 °C 贮存。测完蛋白含量后, 取2 g/L的蛋白样品溶液约60  $\mu$ L至1.5 mL离心管中, 参照试剂盒说明书, 并参考文献得知目标蛋白神经生长因子、脑源性神经营养因子的相对分子质量均在13 000左右<sup>[18]</sup>, 故按1:1的比例将蛋白样品加入Tricine蛋白上样缓冲液。经100 °C变性5 min后, 迅速高速离心, 12 000 r/min(离心半径13.5 cm)离心5 min。取做为加样用的上清备用。采用低分子多肽凝胶电泳, 故配制15%的SDS-PAGE分离胶, 每次配制5 mL, 并配制5%SDS-PAGE浓缩胶, 每次配制1 mL。灌胶后, 按预定顺序使用微量注射器进行加样, Marker 10  $\mu$ L, 各组蛋白样品每泳道10  $\mu$ L, 每组8道, 加样时将针尖伸到加样孔底部, 缓慢小心加入。连接电源, 浓缩胶部分50 V电压使样品浓缩成一条窄带, 到分离胶选择100 V电压, 直至溴酚蓝到达底部停止电泳。从电泳装置上卸下玻璃板, 放在纸巾上撬开玻璃板, 取下凝胶, 置于盛有纯水的洁净托盘中, 切胶并凝胶切角做记号。

采用Bio-Rad转移装置, 进行蛋白质转移。转移结束后, 将硝酸纤维素膜放置一平皿中, 加丽春红染料染膜5 min, 用双蒸水冲洗直至有条带显出, 在蛋白质标准泳道边, 标上相对分子质量, 然后将染色后的硝酸纤维素膜置于平皿中, 在摇床上用TBST摇荡洗涤30 min, 洗去染色剂。将硝酸纤维素膜放置一平皿中, 加浸没膜量的封闭液室温振摇1 h。封闭结束后, 将膜放入一塑料袋中, 加入一抗, 封口, 4 °C轻轻振摇6 h; 取出膜, 用TBST洗30 min; 将膜转入另一塑料袋中, 加入二抗, 封口, 4 °C轻轻振摇2 h; 取出膜, 用TBST洗30 min。

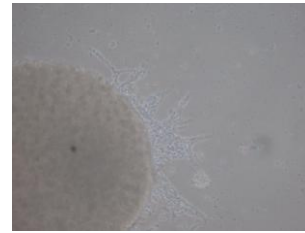
将硝酸纤维素膜放于暗盒中, 放上X射线胶片, 显影、定影、洗片。将X射线胶片置于Gel Doc-XR图像分析系统, 通过Quantity One软件测定目的蛋白条带的平均吸光度值。

**统计学分析:**用SPSS 16.0软件包进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多个样本均数间的比较若符合正态分布则采用成组 $t$ 检验; 若不符合正态分布则采用Kruskal-Wallis  $H$ 检验及Nemenyi检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义,  $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

## 2 结果

**2.1 嗅鞘细胞形态观察及鉴定** 原代培养的嗅鞘细胞每隔2 d限定性培养液半量换液培养、纯化。培养至第3天可见组织团块透亮且周围大量扁圆形胞体, 见图1。第6天可见3种细胞形态, 即双极样、三极样和扁圆形,

双极样和三极样细胞是嗅鞘细胞的典型形态, 见图2。培养至第9天时, 较多细胞聚集生长并以对称突起的双极样细胞和三极样细胞为主。经P75鉴定, 嗅鞘细胞呈红色, 见图3。培养至第12天时, 细胞透亮并以双极样、三极样为主, 轴突细长, 细胞聚集成簇生长。培养至第15天时, 细胞透亮度一般, 生长旺盛且细胞数目增多, 双极样与三极样细胞接连成片, 见图4。



注: 原代培养第3天可见组织团块透亮、且周围有大量扁圆形胞体。

图1 原代培养第3天时嗅鞘细胞形态( $\times 100$ )

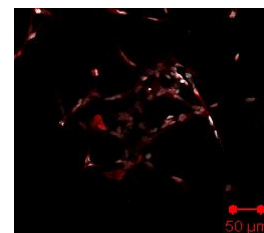
Figure 1 After primary culture for 3 d, translucent tissue mass could be seen and surrounded by a large number of flat circular cell bodies ( $\times 100$ )



注: 原代培养第6天可见3种细胞形态, 即双极样、三极样和扁圆形。

图2 原代培养第6天时嗅鞘细胞形态( $\times 100$ )

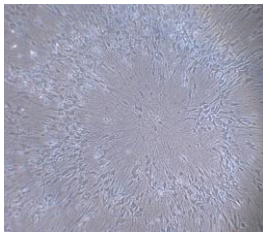
Figure 2 After primary culture for 6 d, cells exhibit bipolar, three-pole or flat circular appearance ( $\times 100$ )



注: 培养至第9天时P75染色鉴定嗅鞘细胞呈红色。

图3 嗅鞘细胞培养至第9天时P75染色鉴定( $\times 100$ )

Figure 3 After culture for 9 d, P75 staining of olfactory ensheathing cells was red ( $\times 100$ )



注: 原代培养第 15 天时嗅鞘细胞生长旺盛且细胞数目增多, 双极样与三极样细胞接连成片。

图 4 原代培养第 15 天时嗅鞘细胞形态(x100)

Figure 4 After primary culture for 15 d, the olfactory ensheathing cells exhibit vigorous growth and the number was increased, bipolar and three-pole cells grew into pieces (x100)

2.2 经MTT染色处理后490 nm波长下各组细胞的吸光度值 不同中药血清直接作用于嗅鞘细胞体系5 d后(镜下观察细胞汇合率达70%)吸光度值情况, 见表1。可见与生理盐水对照组比较, 胎牛血清组及含药血清各组吸光度值均有增加( $P < 0.01$ ), 其中补阳还五汤组、痿证方组吸光度值较胎牛血清组增加明显( $P < 0.01$ ), 而补阳还五汤组、痿证方组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。提示2个中药组含药血清均能促进嗅鞘细胞增殖, 且两者间增殖作用无差异。

表 1 不同中药血清直接作用于嗅鞘细胞体系 5 d 后吸光度值比较

Table 1 Absorbance value of olfactory ensheathing cells after treatment with different drugs- containing serum for 5 d ( $\bar{x} \pm s, n=48$ )

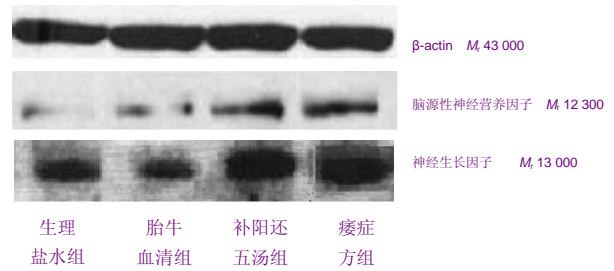
组别	吸光度值
生理盐水组	0.067±0.008
胎牛血清组	0.086±0.008 <sup>a</sup>
补阳还五汤组	0.118±0.015 <sup>ab</sup>
痿证方组	0.108±0.011 <sup>ab</sup>

与生理盐水组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与胎牛血清组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

注: 补阳还五汤组和痿证方组含药血清均能促进嗅鞘细胞增殖, 且两者间增殖作用无差异。

2.3 Western blot检测神经生长因子、脑源性神经营养因子蛋白水平 见图5。结果显示胎牛血清组与生理盐水对照组比较差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 中药血清两组神经生长因子、脑源性神经营养因子蛋白表达量与生理盐水对照组比较, 差异有显著性意义( $P < 0.01$ ), 而中药血清组间差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见表2。提示补阳还五汤药物血清及痿证方药物血清均能促进

嗅鞘细胞分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子。



注: 补阳还五汤药物血清及痿证方药物血清均能促进嗅鞘细胞分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子。

图 5 Western-Blot 检测细胞蛋白上清液中神经生长因子、脑源性神经营养因子蛋白水平

Figure 5 Detection of protein content of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in cellular protein supernatant by western blot assay

表 2 Western-Blot 检测细胞蛋白上清液中神经生长因子、脑源性神经营养因子蛋白的表达

Table 2 Protein expression of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in cellular protein supernatant as detected by western blot assay

( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	神经生长因子	脑源性神经营养因子
生理盐水组	210.57±4.92	89.97±3.54
胎牛血清组	207.72±4.35	89.14±2.32
补阳还五汤组	358.19±7.35 <sup>a</sup>	149.68±2.28 <sup>a</sup>
痿证方组	365.54±2.94 <sup>a</sup>	151.43±3.34 <sup>a</sup>

与生理盐水组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

注: 补阳还五汤药物血清及痿证方药物血清均能促进嗅鞘细胞分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子。

### 3 讨论

脊髓损伤在中医学属于“腰痛”、“痿痹”、“体惰”、“癱闭”等范畴, 是长久以来悬而未决的医学难题之一。四肢痿软, 步履艰难, 肢体无力是为“痿”表现, 明·李梴《医学入门》: 痹者, 气闭塞不流通也, 或痛痒, 或麻痹, 或手足缓弱, 与痿相类。但痿属内因, 血虚火盛, 肺焦而成; 痹属风寒湿三气侵入而成, 然外邪非气血虚则不入, 此所以痹久亦能成痿。明·方隅《医林绳墨》: 痿者, 气之软弱也, 肢体沉重而痿弱难行者也。其病因为“瘀血”, 病机为“督脉枢机不利”。中医学认为脊髓损伤后所产生的各种临床症状, 乃因疾而阻滞督脉, 枢机统帅失职, 三阳经气血逆乱而致。《内经》指

出调理气血应该“疏其气血，令其调达，以致和平”。痿证方是上海中医药大学施杞教授的经验方，他根据《内经》等中医药理论，结合大量临床实践和基础研究，认为痿证包括肾精亏损、痰滞于内和脾胃虚弱、肌肉失养。治疗前者当补益肾精，化痰通络，地黄饮子加减。后者当补益脾胃，益气和营，人参养营汤加减，并据此衍生出“痿证方”，经临床应用，疗效显著。而补阳还五汤作为治疗脊髓损伤的效方，源自清代医家王清任《医林改错·卷下·瘫痿论》，由生黄芪、川芎、桃仁、红花、赤芍、当归尾、地龙组成，有补气行气、养血活血化瘀的功效，调气机，通经络，主治半身不遂，遗尿不禁等<sup>[19]</sup>。目前已有较多研究发现，补阳还五汤对晚期脊髓损伤改善症状、脊髓功能恢复有积极效果<sup>[20-23]</sup>。

中药血清药理学研究方法是将中药给予动物灌胃后在一定时间采集动物血液、无菌分离血清并用含药血清加入到某种体系中进行体外试验的一种实验方法。本实验运用该方法，并通过MTT检测细胞生长增殖情况，探讨中药复方补阳还五汤和痿证方对体外培养嗅鞘细胞增殖的影响，实验结果表明：益气化瘀类代表方剂补阳还五汤和痿证方均能促进大鼠嗅鞘细胞增殖，且两组作用一致。

嗅鞘细胞表达的神经营养因子在促进脊髓功能恢复中起着重要作用。神经生长因子、脑源性神经营养因子、神经营养素3、神经营养素4/5以及神经营养素6和神经营养素7这几种因子，是主要由神经支配的皮肤、肌肉、腺体和神经元等细胞所分泌的小分子多肽<sup>[24]</sup>。这些多肽经突触后神经元摄取并通过突触前神经元逆行运送至中枢神经元胞体，与特异的神经元受体结合并激活细胞代谢，调节细胞生长而发挥作用<sup>[25-26]</sup>。神经生长因子与脑源性神经营养因子均是神经营养因子家族中主要成员，两者有50%同源性，对中枢和周围神经系统均有广泛作用。不仅在中枢神经系统发育过程中对神经元的生存、分化、生长和维持神经元正常的生理功能等方面起重要作用，还具有抗损伤性刺激，促进神经元的再生，保护缺血缺氧的神经元，维持神经元功能和再生修复及防止神经元细胞进行性病变，刺激诱导轴突再生以及促进神经通路、抑制神经细胞凋亡的重要作用<sup>[27]</sup>。脊髓损伤后内源性神经生长因子的表达即上调。通过Northern blot杂交分析大鼠胸髓挤压伤后，脊髓中神经生长因子受体mRNA含量在损伤后4 d胸髓中(包括损伤区)含量显著增加，7 d达高峰，为正常的5-7倍，且在损

伤后14 d和28 d，仍保持较正常高4倍的水平<sup>[28]</sup>。提示脊髓中神经生长因子水平的变化可能与脊髓自身修复能力有关。而脊髓损伤后给予外源性神经生长因子(包括直接给予神经生长因子和转基因导入神经生长因子)，发现神经生长因子在脊髓外伤治疗中有明显的生物学效应<sup>[29]</sup>。脑源性神经营养因子在脊髓可塑性中具有重要作用，可促进神经元的存活，神经纤维的延长，阻止损伤神经元胞体的萎缩，促进受损的红核脊髓神经元和皮质脊髓神经元轴突再生<sup>[30]</sup>。实验用补阳还五汤含药血清、痿证方含药血清干预培养嗅鞘细胞5 d，镜下观察见嗅鞘细胞汇合率达70%，然后运用Western-Blot，并用Gel Doc-XR成像分析仪及Quantity-One软件测得嗅鞘细胞上清液中，补阳还五汤含药血清组和痿证方含药血清组M<sub>12 300</sub>处及M<sub>13 000</sub>处的脑源性神经营养因子、神经生长因子表达较对照组明显强烈。这提示益气化瘀类代表方剂补阳还五汤和痿证方均能够促进大鼠嗅鞘细胞分泌神经生长因子、脑源性神经营养因子，结合MTT试验提示补阳还五汤不仅能促进嗅鞘细胞增殖、提高其存活，还能促进嗅鞘细胞分泌神经营养因子从而能够促进神经功能恢复。

**结论：**益气活血类中药方剂在治疗脊髓损伤的临床应用中有着肯定功效，代表方补阳还五汤及痿证方均以补气药黄芪为君药，按“治痿独取阳明”，充实阳明气血，“气行则血行”，故其应用范围越来越广泛。本实验针对益气活血类中药方剂对嗅鞘细胞增殖及其分泌神经营养因子的影响，并以益气活血类中药方剂的代表方补阳还五汤及痿证方进行了初步探讨，证明两方均能够促进嗅鞘细胞增殖并能有效促进其分泌神经营养因子，提示益气活血类中药方剂通过增强细胞分泌、表达达到“补气行气”之功。

**致谢：**感谢河南省正骨研究院给予支持和帮助。

**作者贡献：**实验设计为饶耀剑，实验实施为马文虎，实验评估为朱文潇，资料收集为朱文潇。饶耀剑成文，王拥军审校，饶耀剑对文章负责。

**利益冲突：**课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求：**实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**作者声明：**文章为原创作品，数据准确，内容不涉及泄密，无一稿两投，无抄袭，无内容剽窃，无作者署名争议，无与他人课题以及专利技术的争执，内容真实，文责自负。

#### 4 参考文献

- [1] Xu M. Suzhou Univesity,2004:1-5.  
徐明.大鼠嗅鞘细胞移植治疗脊髓损伤的实验研究[D].苏州:苏州大学,2004:1-5.
- [2] Barnett SC, Riddell JS. Olfactory ensheathing cell transplantation as a strategy for spinal cord repair--what can it achieve. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007;3(3):152-161.
- [3] Chuah MI, Choi-Lundberg D, Weston S, et al. Olfactory ensheathing cells promote collateral axonal branching in the injured adult rat spinal cord. *Exp Neurol.* 2004;185(1):15-25.
- [4] Deumens R, Koopmans GC, Lemmens M, et al. Neurite outgrowth promoting effects of enriched and mixed OEC/ONF cultures. *Neurosci Lett.* 2006;397(1-2):20-24.
- [5] Au E, Richter MW, Vincent AJ, et al. SPARC from olfactory ensheathing cells stimulates Schwann cells to promote neurite outgrowth and enhances spinal cord repair. *J Neurosci.* 2007;27(27):7208-7221.
- [6] Li Y, Field PM, Raisman G. Regeneration of adult rat corticospinal axons induced by transplanted olfactory ensheathing cells. *J Neurosci.* 1998;18(24):10514-10524.
- [7] Santos-Silva A, Fairless R, Frame MC, et al. FGF/heparin differentially regulates Schwann cell and olfactory ensheathing cell interactions with astrocytes: a role in astrocytosis. *J Neurosci.* 2007;27(27):7154-7167.
- [8] van den Pol AN, Santarelli JG. Olfactory ensheathing cells: time lapse imaging of cellular interactions, axonal support, rapid morphologic shifts, and mitosis. *J Comp Neurol.* 2003;458(2):175-194.
- [9] Zhi CS, Xie L. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi.* 2009;17(18):1404-1406.  
智春升,谢林.骨髓基质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后BDNF与GAP-43基因表达的影响[J].中国矫形外科杂志, 2009, 17(18):1404-1406.
- [10] Zhang NS. Nanjing:Nanjing University of Chinese Medicine. 2010:15-16.  
张农山.黄芪注射液对嗅鞘细胞增殖及分泌神经营养因子的影响[D].南京:南京中医药大学,2010:15-16.
- [11] Li YK. Shanghai:Shanghai Science & Technology Press. 2006:38-39.  
李仪奎.中药药理实验方法学[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2006:38-39.
- [12] He SL, Wang J, Wang JJ. Changsha:Hunan Science & Technology Press,2008:48-49.  
贺石林,王健,王净净.中医科研设计与统计学[M].长沙:湖南科学技术出版社,2008:48-49.
- [13] Ma YH, Hu ZJ, Wang YJ, et al. *Zhongyi Zhenggu.* 2008;20(8): 1-3.  
马迎辉,胡志俊,王拥军,等.痿症方对嗅鞘细胞增殖影响的药理学研究[J].中医正骨,2008,20(8):1-3.
- [14] Hu ZJ, Wang YJ, Li CG, et al. *Zhongguo Zhongyi Gushangke Zazhi.* 2005;13(3):10-13.  
胡志俊,王拥军,李晨光,等.痿、痿证方对大鼠脊髓持续性压迫损伤局部NGF、BDNF的调节作用[J].中国中医骨伤科杂志,2005, 13(3):10-13.
- [15] Ma YH, Hu ZJ, Zhou CJ, et al. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2008;12(47):9210-9213.  
马迎辉,胡志俊,周重建,等.痿症方联合嗅鞘细胞移植对脊髓慢性压迫损伤后神经营养因子3表达的影响[J].中国组织工程研究与临床康复, 2008,12(47):9210-9213.
- [16] Situ ZQ, Wu JZ. Xi'an:Xi'an World Publishing Corporation, 2007: 121-122.  
司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版社西安公司, 2007:121-122.
- [17] Barnett SC, Roskams AJ. Olfactory ensheathing cells: isolation and culture from the neonatal olfactory bulb. *Methods Mol Biol.* 2008;438:85-94.
- [18] Chen CJ, He YS. *Bengbu Yixueyuan Xuebao.* 2000;25(3): 231-233.  
陈昌杰,何蕴韶.神经生长因子家族[J].蚌埠医学院学报,2000, 25(3): 231-233.
- [19] Jin YL, Dong LY, Wu CQ, et al. Buyang Huanwu Decoction fraction protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the inflammatory response and cellular apoptosis. *Neural Regen Res.* 2013; 8(3): 197-207.
- [20] Chen A, Wang H, Wu XQ, et al. *Shenjing Jiepouxue Zazhi.* 2007; 23(6):587-590.  
陈安,王慧,武校琼,等.补阳还五汤对大鼠脊髓损伤后红核脊髓束再生及功能修复的影响[J].神经解剖学杂志,2007,23(6):587-590.
- [21] Chen An, Liao J, Xiong AJ, et al. *Shijie Zhongxiyi Jiehe Zazhi.* 2007;2(10):570-572.  
陈安,廖君,熊艾君,等.补阳还五汤对脊髓损伤后胶质瘢痕及GFAP表达的影响[J].世界中西医结合杂志, 2007,2(10):570-572.
- [22] Zhang JP, Lin AH, Li SG, et al. *Guangzhou Zhongyiyao Daxue Xuebao.* 2009;26(3):256-259.  
张继平,林爱华,李蜀光,等.补阳还五汤对脊髓损伤大鼠血浆血小板活化因子含量的影响[J].广州中医药大学学报, 2009,26(3): 256-259.
- [23] Wang W, Xie J, Fang J, et al. *Zhongguo Kangfu.* 2005; 20(1):3-5.  
王伟,谢杰,方坚,等.补阳还五汤对实验性脊髓损伤大鼠水通道蛋白-4表达的影响[J].中国康复, 2005, 20(1):3-5.
- [24] Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987;237(4819):1154-1162.
- [25] Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:453-501.
- [26] Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol.* 2003;69(5):341-374.
- [27] Zhi CS, Xie L. *Zhongguo Jiaoxing Waike Zazhi.* 2009; 17(18): 1404-1406.  
智春升,谢林.骨髓基质干细胞移植对大鼠脊髓损伤后BDNF与GAP-43基因表达的影响[J].中国矫形外科杂志, 2009, 17(18):1404-1406.
- [28] Brunello N, Reynolds M, Wrathall JR, et al. Increased nerve growth factor receptor mRNA in contused rat spinal cord. *Neurosci Lett.* 1990;118(2):238-240.
- [29] Grill RJ, Blesch A, Tuszynski MH. Robust growth of chronically injured spinal cord axons induced by grafts of genetically modified NGF-secreting cells. *Exp Neurol.* 1997;148(2):444-452.
- [30] Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. Acute up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. *Acta Neuropathol.* 2001;102(3):239-245.