

中药黄芪对脊髓星形胶质细胞单核细胞趋化蛋白-1 分泌的影响

马永刚¹, 刘世清¹, 刘敏², 彭昊¹

(1. 武汉大学人民医院骨科, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉大学医学院免疫学教研室)

摘要 目的: 研究黄芪对体外培养的脊髓星形胶质细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 分泌的影响。方法: 自 Wistar 大鼠脊髓组织分离、纯化星形胶质细胞, 体外培养, 分别予以 TNF- α 及 TNF- α + 黄芪处理, ELISA 方法检测培养上清液中 MCP-1 的表达。结果: TNF- α 可以显著刺激星形胶质细胞合成、释放 MCP-1, 而黄芪可下调其刺激作用。结论: 受炎症因子刺激活化的星形胶质细胞可能是损伤脊髓局部 MCP-1 的来源之一, 黄芪可以减少脊髓损伤后内源性 MCP-1 的产生, 从而缓解继发性脊髓损伤, 发挥脊髓保护作用。

关键词 黄芪; 单核细胞趋化蛋白-1; 脊髓损伤; 星形胶质细胞

Effects of astragalus root on the secretion of MCP-1 by astrocytes in vitro from spinal cord of adult rats

MA Yong-gang, LIU Shi-qing, LIU Min, PENG Hao. Department of Orthopaedics, Renmin Hospital of Wuhan University (Hubei Wuhan, 430060, China)

Abstract Objective: To study the secretion of MCP-1 by astrocytes cultured in vitro and the possible influence of astragalus root (AR). **Methods:** Astrocytes were separated and purified from spinal cord of adult Wistar rats. The expression of MCP-1 was detected by ELISA when the astrocyte were cultured in vitro with TNF- α or combined with AR. **Results:** TNF- α markedly increase the secretion of astrocyte-derived MCP-1 which could be down-regulated by AR to some extent. **Conclusion:** Astrocytes activated by some inflammatory factors may be one of the sources of MCP-1 secreted in the local injured spinal cord. AR probably can decrease the endogenous expression of MCP-1 and thus show a neuroprotective effects.

Key words Astragalus root; Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); Spinal injuries; Astrocyte

星形胶质细胞分泌的单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 在脑损伤中的可能作用, 近年来已得到广泛研究^[1,2]。炎症反应是继发性脊髓损伤的诸多机制之一, 新近发现损伤脊髓局部释放的 MCP-1 参与介导外周炎症细胞向损伤部位的募集。本实验体外研究了成年大鼠脊髓星形胶质细胞 MCP-1 的分泌及中药黄芪的影响, 探讨脊髓继发性损伤的机制, 并为临床治疗脊髓损伤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 星形胶质细胞的分离与纯化

6~8 周龄 Wistar 大鼠 6 只, 无菌条件下取胸腰段脊髓, 置入 D-

Hank 液, 显微镜下剔除硬脊膜; 脊髓标本机械研碎, 37℃ 条件下用 0.125% 的胰蛋白酶消化 15 min, 吹打分散, 1 000 r/min 离心 10 min; 弃上清液, 加入 DMEM 培养基, 以 1×10^6 /ml 密度接种于 75 cm² 培养瓶中, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养; 每周更换 1 次培养液, 2 周后停止, 置于摇床中 250 r/min 摇动 12~18 h; 弃上清, 收集贴壁细胞, 即所需星形胶质细胞。

1.2 星形胶质细胞的鉴定

采用 S-ABC 法, 兔抗大鼠多克隆胶质纤维酸蛋白 (GFAP) 抗体, S-ABC 显色试剂盒 (均购自北京中山公司)。

1.3 MCP-1 水平的检测

将纯化的星形胶质细胞制备成 1.5×10^4 /ml 浓度的悬液, 放入 96 孔培养板中, 按实验设计分为 A、B、C、D 四组, 分别加入 PBS、TNF- α (肿瘤坏死因子- α , 100 u/ml)、TNF- β (100 u/

ml) + 黄芪注射液 (30 μg/ml, 成都地奥九鸿制药厂, 黄芪含量为 2 g/ml)、TNF- (100 u/ml) + 黄芪注射液 (60 μg/ml), 于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养 24 h, 收集上清, 用 ELISA 方法检测其中 MCP-1 的水平 (兔抗大鼠 MCP-1 单克隆抗体购自晶美生物公司)。

1.4 统计学分析 数据资料以“均数 ± 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异以方差分析检验, $P < 0.05$ 说明差异具有显著性。

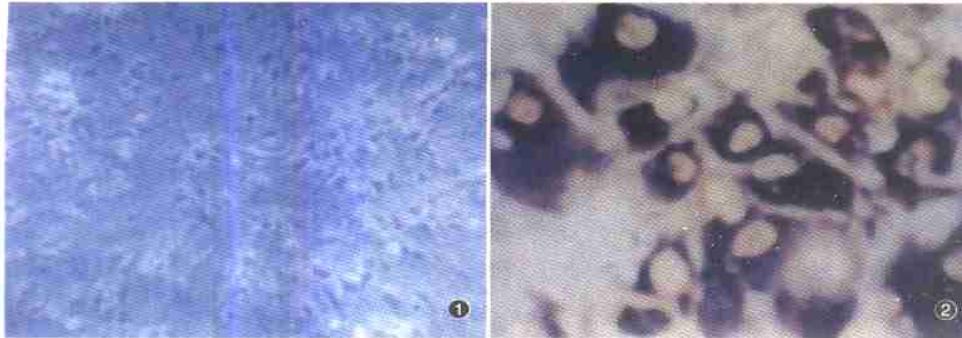


图 1 星形胶质细胞倒置显微镜下形态 (电子显微镜 × 400) 图 2 星形胶质细胞 S-ABC 免疫组化染色 (电子显微镜 × 400)

Fig. 1 Astrocyte form on invert microscope (EMS × 400) Fig. 2 Astrocyte of S-ABC immune staining (EMS × 400)

2.2 MCP-1 水平的检测 未被刺激的成年大鼠脊髓星形胶质细胞在体外培养时可分泌 MCP-1, 但量极低; 经炎性介质 TNF- 刺激后, MCP-1 的表达量显著增加, 达 110 ng/ml。而这种刺激作用可以被黄芪注射液所抑制, 细胞培养环境中不同浓度的黄芪注射液 (30、60 μg/ml) 分别将 MCP-1 水平下调至 82、64 ng/ml, $P < 0.05$ 。

3 讨论

MCP-1 是迄今研究较为清楚的趋化因子之一, 其在体内外对单核细胞均有趋化作用, 刺激细胞内游离钙水平升高, 产生和释放超氧阴离子, 释放溶酶体酶以及调节黏附分子的表达和细胞因子的产生。Le 等^[3]制备了大鼠脊髓损伤模型, 通过 RT-PCR 和免疫组化技术分析了损伤脊髓内 MCP-1 表达, 结果发现 MCP-1 mRNA 的分泌在伤后 1 h 即上调, 直至 14 d 时回降到基础水平; MCP-1 染色在损伤后 1 ~ 7 d 增强, 而且这种染色在坏死区和损伤周围组织存在明显差异。

当前对损伤脊髓局部释放的 MCP-1 的细胞来源尚无统一认识^[4,5], 但脊髓损伤后各种炎症因子如 TNF- 的表达上调已是不争的事实^[6,7], 而且炎症因子如 IL-1, TNF-^[8]可以明显促进 MCP-1 的表达。本实验体外培养脊髓来源的星形胶质细胞, 并用 TNF- 刺激 (模拟脊髓创伤信号), 发现有相当水平的 MCP-1 表达, 提示受炎症因子刺激活化的星形胶

2 结果

2.1 星形胶质细胞的分离、纯化与鉴定 倒置显微镜下观察, 接种后 1 ~ 2 h 分离的胶质细胞开始贴壁, 之后部分细胞 (最后分化为星形胶质细胞) 形态由圆形变为卵圆形或多角形, 并渐伸出突起 (图 1); 星形胶质细胞 S-ABC 染色呈紫蓝色, 阳性染色定位于胞浆和突起内 (图 2)。

质细胞可能是脊髓损伤后局部合成的 MCP-1 的来源之一。

鉴于 MCP-1 的上述作用, 减少其产生或应用特异性单克隆抗体封闭其活性^[9], 可能能够抑制后续的炎症细胞趋化、活化及细胞毒性因子的释放, 发挥神经保护作用。黄芪是传统中药, 现代药理研究证明其可双向调节炎症因子的分泌, 提高单核巨噬细胞的吞噬、杀伤能力^[10,11], 而且具有调节免疫的功能。本研究也发现黄芪注射液在体外培养中能下调星形胶质细胞分泌的 MCP-1, 并且在一定范围内具有浓度依赖性, 提示其可能减少脊髓损伤后内源性 MCP-1 的产生, 缓解继发性损伤, 这也为临床治疗脊髓损伤, 改善预后提供了新的思路^[12]。

参考文献

- 1 Jong SK, Subhash CG, Michael C, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage in inflammatory protein-1 after focal cerebral ischemia in the rat. *J Neuroimmunol*, 1994, 56:127-134.
- 2 Jonathan MW, Joan WB. Astrocyte expression of monocyte chemoattractant protein-1 is differentially regulated by transforming growth factor beta. *J Neuroimmunol*, 1998, 91:190-197.
- 3 Le YL, Shih K, Bao P, et al. Cytokine chemokine expression in contused rat spinal cord. *Neurochem Int*, 2000, 36(4-5):417-425.
- 4 Che X, Ye W, Panga L, et al. MCP-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res*, 2001, 902(2):106-107.
- 5 Cougalan CM, Mcmanus CM, Sharron M, et al. Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neurosci*, 2000, 97(3):591-600.

- 6 Wang CX, Reece C, Wrathal JR, et al. Expression of TNF α and its mRNA in the spinal cord following a weight-drop injury. *Neuroreport*, 2002, 13(11): 1391-1393.
- 7 Yan P, Li Q, Kim GM, et al. Cellular localization of TNF α following acute spinal cord injury in adult rats. *J Neurotrauma*, 2001, 18(5): 563-568.
- 8 De Keulenaer GW. Convergence of redox-sensitive and mitogen-activated protein kinase signaling pathways in tumor necrosis factor- α -mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in vascular smooth muscle cells. *Arterioscl Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(2): 385-391.
- 9 Schluger NW, Rom WN. Early responds to infection: Chemokines as mediators of inflammation. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9(4): 504-508.
- 10 单俊杰, 王顺春, 刘涤, 等. 黄芪多糖的化学和药理研究进展. *上海中医药大学学报*, 2000, 3: 162-164.
- 11 Jin R, Kurashing S. Effects of Chinese herbs on macrophage function in N-butyl-N²-butanolnitrosoamine treated mice. *Immunopharmacol and Immunotoxicol*, 1996, 18(1): 105-114.
- 12 Ghirnikar RS, Lee YL, Eng LF. Chemokine antagonist infusion promotes axonal sparing after spinal cord contusion injury in rat. *Neurosci Res*, 2001, 64(6): 582-589.

(收稿日期: 2004 - 01 - 13 本文编辑: 王宏)

短篇报道

人工全膝关节置换术的康复锻炼

施卓娅, 陈妙仙

(萧山中医院, 浙江 萧山 311200)

我科自 1997 年 10 月 - 2002 年 11 月行人工膝关节置换 11 例, 在实践中我们体会到正确的患肢功能锻炼是手术取得满意效果的重要条件之一。

1 临床资料

本组 11 例, 男 4 例, 女 7 例; 年龄 34 ~ 68 岁, 平均 52 岁。类风湿性关节炎 5 例, 骨性关节炎 6 例。膝关节 HSS 评分 17 ~ 56 分(平均 41.4 分)。术前关节活动度(ROM) 30° ~ 100°(平均 65°), 屈膝畸形 0° ~ 60°(平均 46°), 均使用进口骨水泥全髁型人工全膝关节。出院随访 4 个月 ~ 3 年, 膝关节伸屈 0° ~ 130°, 步态明显改善, 病人满意。

2 术前护理及术后康复锻炼

术前加强与患者及家属之间的沟通, 介绍同类手术术后关节功能恢复良好的病例, 使病人树立信心, 并强调术后积极有效的康复锻炼是极其重要的环节。与患者及家属一起共同制定康复目标与训练计划。

术后立即抬高患肢, 使患肢屈膝 20°, 进行主动或被动的踝关节伸屈及环绕运动(20 次/h), 能有效防止深静脉血栓的形成。术后第 1 天, 可进行股四头肌等长收缩运动, 每次保持收缩状态 5 ~ 10 s, 每组 20 次, 每日 3 次。并可进行下肢持续被动活动器练习(CPM) 0° ~ 40°, 伸屈 1 次 2 min, 每日 2 ~ 3 次, 每次至少 1 h, 对疼痛敏感者留置硬膜外止痛泵或每次锻炼前 15 min 服用镇痛药, 以保证在基本无痛状态下进行锻炼。锻炼时需夹紧负压引流管, 停止后开放引流管。术后 2 ~ 3 d, 拔除引流管后, 开始行患肢直腿抬高练习和主动关节活动度(ROM) 练习。可配合理疗, 理疗在促进伤口愈合、防止并发症等方面起到良好作用, 可用红外线或周林频谱仪照

射 30 min, 每日 3 次。术后第 4 天至出院, CPM 锻炼每天增加 5° ~ 10°, 出院至少达到 95°。增加肌力和 ROM 练习的次数和强度, 当肌力达到 3 ~ 4 级时需增加阻力于患肢, 可在患肢踝部放一沙袋嘱患者做抬腿运动。并逐渐在双拐的支持下练习行走。初下床每次 10 ~ 20 min, 每日 2 次, 以后逐渐增至每次 20 ~ 30 min, 每日 3 ~ 4 次。出院后只要坚持锻炼, 活动范围将继续增加, 到术后 1 年, 运动弧才不再变化[中华骨科杂志, 1996, 16: 298-300.]。可选择屈膝坐位起立、下蹲位起立、上下楼梯、静态自行车等锻炼方式, 并定期复诊。为了减少关节磨损, 延长人工膝关节的使用寿命, 要减少膝关节负荷, 避免搬运重物及长时间站立或步行; 保持姿势正确, 不坐矮椅及跪下或蹲下, 不穿高跟鞋等。

3 讨论

人工膝关节置换术是人体较大的关节重建手术, 进行早期功能锻炼, 可减少并发症的发生, 术后通过 ROM 锻炼, 牵拉挛缩软组织, 避免粘连, 促进下肢血液循环, 防止深静脉血栓形成和栓塞。CPM 使关节活动比较容易, 缩短术后恢复时间, 增强患者康复信心。但是 CPM 可能引起膝关节伸展滞缺和屈曲受限, 这一问题可以通过将患者大腿和小腿紧缚于 CPM 机上加以避免。康复训练量要由小到大, 循序渐进, 以不引起患膝明显不适为宜, 与其过量, 不如小量增速, 尽可能均匀分配运动量。全膝关节置换术后患者的康复训练是必需的, 且为长期的。术后的康复包括肌力及关节活动度的训练, 二者是相辅相成, 缺一不可的, 而且全膝关节置换术后正确的康复治疗是一个长期的过程, 许多患者需要终生维持以保持或增进关节功能[中国康复医学杂志, 1994, 9(2): 49-51.]。

(收稿日期: 2003 - 08 - 19, 本文编辑: 王宏)