

吴军,关涛,田峰,等. 瑞香素对脊髓损伤大鼠运动功能改善作用的 TRL4/NF- κ B 信号通路机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(4): 84-90.

Wu J, Guan T, Tian F, et al. Effects of daphnetin on motor function of spinal cord injury based on the TRL4/NF- κ B signaling pathway in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(4): 84-90.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.04.013

瑞香素对脊髓损伤大鼠运动功能改善作用的 TRL4/NF- κ B 信号通路机制研究

吴 军,关 涛,田 峰,刘学起,马 剑,王庆峰,赵芬芬*

(宁夏回族自治区人民医院骨科,银川 750021)

【摘要】 目的 探讨瑞香素激活 Toll 样受体 4/核转录因子 kappa B(Toll like receptor 4/NF- κ B, TRL4/NF- κ B)信号通路对大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后神经再生及功能恢复的影响,为促进 SCI 的分子机制研究提供依据。**方法** 建立脊髓损伤实验大鼠模型,并分别于术后 1 d、8 d、14 d、21 d 和 30 d,采用 Basso Beattie Bresnahan(BBB)运动功能评分和联合行为评分法(combine behavioral score, CBS)评分测试评价各组 SCI 大鼠治疗后的神经功能;采用相关试剂盒检测脊髓组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性及丙二醛(maleicdialdehyde, MDA)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白介素-6(interleukin 6, IL-6)、白介素-10(interleukin 10, IL-10)的表达量变化;并采用蛋白质印迹法(Western blot)检测术后各组脊髓组织中对实验大鼠脊髓组织中 BCL2-Associated X 的蛋白质(BCL2-Associated X Protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Caspase-3、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-c)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、酪氨酸激酶受体 B(tyrosine kinase receptor B, TrkB)、磷酸化酪氨酸激酶受体 B(phospho-tyrosine kinase receptor B, p-TrkB)、TOLL 样受体 4 重组蛋白(recombinant toll like receptor 4, TRL4)和核因子- κ B p65(nuclear factor-kappa b p65, NF- κ B p65)水平的影响。**结果** 瑞香素能够显著性改善实验大鼠 BBB 评分和 CBS 评分结果,且联合用药治疗组效果优于单一药物的疗效。此外,瑞香素能够改善实验大鼠脊髓组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量,能够降低脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 含量;Western blot 实验结果表明瑞香素对脊髓损伤诱发的凋亡相关蛋白异常表达具有显著的调节作用,并能够显著性调节 BDNF/TrkB 信号通路和 TRL4/NF- κ B 信号通路。**结论** 瑞香素改善脊髓损伤的作用机制与是激活 TRL4/NF- κ B 信号密切相关。

【关键词】 脊髓损伤;瑞香素;TRL4/NF- κ B 信号通路;炎症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2021) 04-0084-07

Effects of daphnetin on motor function of spinal cord injury based on the TRL4/NF- κ B signaling pathway in rats

WU Jun, Guan Tao, TIAN Feng, LIU Xueqi, MA Jian, WANG Qingfeng, ZHAO Fenfen*

(Department of Orthopedics, People's Hospital of Ningxia Hui Autonomous Region, Yinchuan 750021, China)

[基金项目] 宁夏回族自治区重点研发项目(2018BEG03046)。

[作者简介] 吴军(1980—),男,副主任医师,研究方向:脊柱脊髓损伤。E-mail:chiye7624328070@163.com

[通信作者] 赵芬芬(1980—),女,主治医师,研究方向:脊柱脊髓损伤。E-mail:dugaishi592@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of daphnetin on the TRL4/NF- κ B signaling pathway involved in nerve regeneration and functional recovery after spinal cord injury (SCI) in rats. This study aimed to provide a basis for study of the molecular mechanism of SCI. **Methods** A laminectomy was performed at the T9 level and the exposed dorsal surface of the spinal cord was subjected to a contusion injury as established a spinal cord injury model. On the 1st, 8th, 14th, 21st, and 30th days after the operation, the Basso Beattie Bresnahan motor function score and combine behavioral score were used to evaluate neurological function of rats with SCI in each group. The activity of SOD, CAT, and GSH PX enzymes, and MDA, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 expression were detected by kits. Western blotting was used to determine protein levels of Bax, Bcl-2, caspase-3, Cyt-C, BDNF, TrkB, and p-TrkB in the spinal cord tissue of experimental rats. **Results** The BBB and CBS scores were significantly improved by daphnetin ($P < 0.05$), and the effect of the high daphnetin group was better than that in the low daphnetin group. Additionally, daphnetin improved the activity of SOD, CAT, and GSH PX and MDA levels in the spinal cord of experimental rats ($P < 0.05$), and reduced TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-10 levels in the spinal cord ($P < 0.05$). Western blot showed that daphnetin significantly regulated abnormal expression of apoptosis-related proteins and the BDNF/TrkB signaling pathway. **Conclusions** Daphnetin may play a role in spinal cord injury by activating TRL4/NF- κ B signaling.

【Keywords】 spinal cord injury; daphnetin; TRL4/NF- κ B signaling pathway; inflammation

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是由外力导致的中枢神经系统疾病,会导致运动功能障碍与慢性疼痛综合征等^[1-2]。近年来 WHO 数据表明脊髓损伤呈现高发趋势,全世界每年大约有 25000 ~ 50000 名脊髓损伤患者^[3]。依据脊髓损伤的发病原因、病理变化过程和特征等特点,可将其分为原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤。研究认为,脊髓损伤诱发的神经功能缺损不仅是由于初始的实质性损伤,而是损伤后的一系列级联分子反应,导致神经元受损。继发性脊髓损伤是一种机体在细胞和分子水平的主动调控过程,包括一系列的病理性生理变化,如脊髓组织发生的自噬、炎症、氧化损伤、凋亡、坏死和水肿等,都会严重影响神经功能、胶质细胞活化与白质恢复等。多种因素的联合作用进而诱发永久的病理生理性改变,最终导致肢体运动功能和感觉能力丧失等^[4-7]。

TRL4/NF- κ B 信号通路广泛参与调控机体多种生理和病理变化过程,与机体免疫调节和炎症反应具有密切关系。当机体脊髓组织受到损伤后诱发机体炎症反应,诱导 TRL4 激活 NF- κ B 信号通路,介导下游炎症因子的释放和表达。瑞香素 (daphnetin, DAP) 是从瑞香科类中草药中提取的香豆素类活性成分。既往研究表明,瑞香素具有抗氧化、抗癌、抗炎和神经保护等多种药理活性,能够通过抑制机体炎症和氧化应激损伤进而改善机体损伤^[8-9]。因此,本研究采用脊髓损伤大鼠模型,以探究瑞香素对脊髓损伤模型大鼠的氧化应激损伤、炎症水平及 TRL4/NF- κ B 信号通路的调节作用,并探究其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本研究选择 75 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,8 周龄,均购买自宁夏医科大学实验动物中心 [SCXK (宁)2016-0003],动物饲养于宁夏回族自治区人民医院动物实验室 [SYXK (宁)2016-0012],体重为 (180 $\pm$ 20) g,均饲养恒温 (25 $^{\circ}$ C)、恒湿 (50 $\pm$ 5)% 条件下,并保持饲养间长期保持通风、干燥和安静的环境,以 12 h 的昼夜循环。本研究经宁夏回族自治区人民医院动物伦理委员会批准 (IACUC-NY2018AC04)。本实验的所有动物实验操作均遵循 3R 原则,以最大程度保证实验福利。

1.2 主要试剂与仪器

瑞香素购买自上海吉至生化科技有限公司 (纯度 $\geq$ 97%,批号:SIG-D5564,上海,中国);SOD (批号:A001-3-2)、CAT (批号:A007-1-1)、GSH-Px (批号:A005-1-2)、MDA (批号:A003-1-2) 均购买自南京建成生物工程研究所 (南京,中国);TNF- α (批号:TNA-H82E3)、IL-1 β (批号:IL2-H4256)、IL-6 (批号:CD6-H82E8)、IL-10 (批号:TRL-H5259) 均购买自 ACRO Biosystems 公司 (美国);Bax (批号:5023S)、Bcl-2 (批号:3498S)、Caspase-3 (批号:14220S)、Cyt-c (批号:11940S)、BDNF (批号:47808S)、TrkB (批号:4603S) 和 p-TrkB (批号:4619S) 一抗、荧光二抗 (批号:5366) 均购买自 Cell Signaling Technology (US);BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号:A045-4-2) 购买自南京建成生物工程研究所 (南京,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 给药及分组和实验大鼠模型的制备

各组实验用大鼠均需在适应一周后开始进行以下试验。脊髓损伤模型的建立:采用电磁力驱动冲击器(10 g, 12.5 mm)进行 T10 挫伤性脊髓损伤;而空白组则只接受椎板切除术。术后各实验鼠在加热垫灯下维持体温在 36℃~37℃,直至其完全苏醒^[1-2,5]。术后给予大鼠相应剂量的镇痛(50 mg/kg Temgesic,皮下)和生理盐水(0.5 mL,皮下)以防止疼痛和脱水,然后在饮用水中加入抗生素使其接受抗生素 1 周。创伤后 6 h 进行 BBB 运动功能评分和 CBS 评分测试,并将 75 只大鼠随机均分为 5 组($n=15$):空白组(Sham),模型组(Model),瑞香素低剂量组(30 mg/kg)、中剂量组(60 mg/kg)和高剂量组(90 mg/kg);术后第 4 天开始连续给予瑞香素,连续给药 4 周。

1.3.2 运动功能评价

采用 BBB 评分法和 CBS 评分法以评价各组试验大鼠的脊髓功能的恢复情况。在造模前 1 d、造模后第 1、8、15、22 和 30 天对各组实验大鼠分别进行 BBB 评分和 CBS 评分,以评价各组实验大鼠后肢的运动功能状况。在 BBB 评分中分为 0~21 分:其中,0 分表示后肢完全无运动能力,21 分为后肢能力完全正常;若 BBB 评分在 5 分以下则表示脊髓损伤大鼠造模成功。在 CBS 评分中分为 0~100 分:其中,正常为 0 分,全瘫为 100 分。

1.3.3 各组实验大鼠脊髓组织中氧化应激相关酶与细胞因子的测定

大鼠分组和处理同上。各组大鼠连续给药 4 周后,经腹腔注射戊巴比妥钠(40~60 mg/kg)麻醉后,处死,快速抽取脊髓组织样本,然后采用冷生理盐水进行冲洗,以后续实验。在脊髓组织中加入适量的 PNS 缓冲液,采用液氮进行研磨、匀浆,在 4℃、3500 r/min 条件下离心 15 min 后取上清。所有实验操作均严格按照相应试剂盒说明书进行,检测 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性及 MDA 含量,以及细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10 的表达量。

1.3.4 Western blot 检测炎症相关蛋白的表达量

大鼠分组和处理同上。将实验大鼠麻醉、处死后迅速抽取各组实验大鼠的脊髓组织样本,采用液氮猝灭并在液氮条件下进行研磨成粉末状,再加入适量的 RIPA 裂解液使得蛋白组织充分裂解后,在冰浴条件下放置 1h,并且在此期间对样本溶液进行适当的震

荡、摇匀;然后在 4℃ 条件下,以 12000 r/min 离心 15 min 后取上清。然后使用 BCA 试剂盒法测定其上清液中的总蛋白浓度。在 10% SDS-PAGE 上分离提取的蛋白,并转移到 PVDF 膜上,37℃ 条件下封闭 1h。然后加入相应的一抗在 4℃ 条件下孵育过夜,后将其在 TBST 中洗涤 3 次。然后加入二抗,在 37℃ 条件下孵育 1h 后进行洗膜。以 β -actin 为内参。凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值。

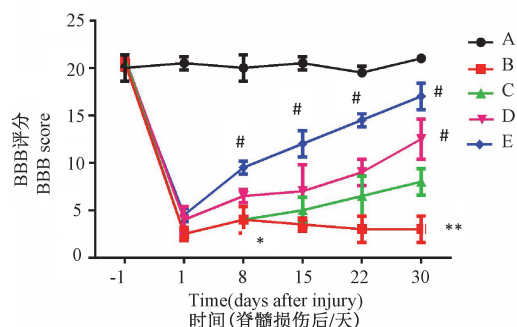
1.4 统计学方法

本实验中实验数据的统计分析采用 SPSS 26.0 软件,图表的制作采用 GraphPad 5.0 软件,计量数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示;实验数据中多组间实验数据的比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 认为具有显著性统计学差异;BBB 评分和 CBS 评分等实验数据的分析则采用方差分析进行比较。

2 结果

2.1 SCI 大鼠 BBB 评分

BBB 评分结果如图 1 所示;造模前各组实验大鼠的 BBB 评分无统计学差异,表明各组实验大鼠的运动功能均无障碍。然而,当实验大鼠开始接受脊髓损伤后,各模型大鼠的运动功能均明显降低,表明造模成功。假手术组中各实验大鼠的 BBB 评分在术前、术后均无显著性差异($P>0.05$),表明手术对实验大鼠的活动并无明显影响。当给予瑞香素



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型(SCI)组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

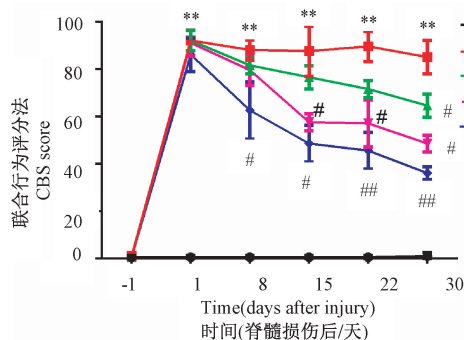
图 1 给予治疗后 SCI 大鼠在造模前、造模后的 BBB 评分图
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with SCI group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 1 BBB score map of SCI rats before and after treatment

30 d 后,实验大鼠的下肢运动功能得到了明显得到提升,其 BBB 评分也得到显著性升高 ($P<0.05$),呈现剂量-时间依赖性关系。

2.2 Combine behavioral score (CBS) 评分

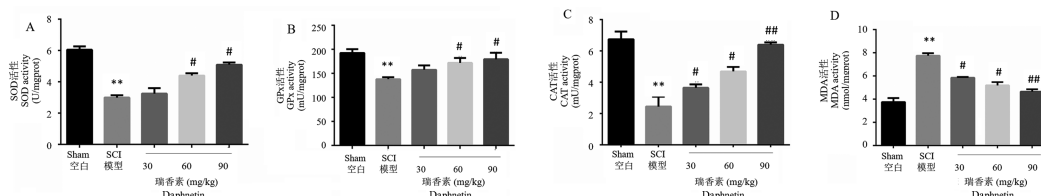
CBS 评分结果如图 2 所示;造模前各组实验大鼠的 CBS 评分无统计学差异,表明各组实验大鼠的运动功能均无障碍。然而,当实验大鼠开始接受脊髓损伤后,各模型大鼠的运动功能均明显降低。当大鼠接受脊髓损伤后 1 d,模型组与空白组出现显著性差异 ($P<0.05$),表明模型建立成功,当模型大鼠各给药组给予相应药物治疗后,各给药组实验大鼠的 CBS 评分较模型组实验大鼠的 CBS 评分均明显降低 ($P<0.05$),表明瑞香素对于实验大鼠的脊髓损伤均具有一定的改善作用,且高剂量治疗组效果优于低剂量组的治疗效果。



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型(SCI)组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 2 给予治疗后 SCI 大鼠在造模前、造模后的 CBS 评分图
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with SCI group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 2 CBS score map of SCI rats before and after treatment



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。与模型(SCI)组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 3 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓中 SOD(A)、GSH-Px(B)、CAT(C) 活性和 MDA(D) 含量的影响
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with SCI group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

Figure 3 Effect of daphnetin on the activity of SOD (A), GSH-Px (B), CAT (C) and MDA (D) in spinal cord of rats were affected by treatment

2.3 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓组织氧化应激状态的影响

机体氧化应激水平严重影响脊髓损伤后恢复。本研究结果显示,与假手术组实验大鼠相比,模型组实验大鼠脊髓组织中 SOD(图 3A)、GSH-Px(图 3B)与 CAT(图 3C)活性较空白实验大鼠显著性降低 ($P<0.05$),MDA(图 3D)含量显著性升高;然而,当给予实验大鼠相应剂量的瑞香素治疗之后,其脊髓组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性和 MDA 含量均有显著性回调,表明给予药物治疗后脊髓损伤大鼠的氧化应激状态具有显著的改善作用。其中,高剂量组的治疗效果优于低剂量组的疗效。

2.4 瑞香素对 GM1 对 SCI 大鼠脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 含量的影响

炎症在脊髓损伤的发生、发展过程中也具有重要作用。因此,本研究测定了各组实验大鼠脊髓组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IL-10 炎症因子水平的变化,具体如下图所示。与假手术组实验大鼠相比,模型组实验大鼠脊髓组织中 TNF- α (图 4A)、IL-1 β (图 4B)、IL-10(图 4C)和 IL-6(图 4D)含量均显著性升高 ($P<0.05$),表明机体处于过炎症状态。当给予药物治疗后,机体内细胞因子水平均有所回调 ($P<0.05$),表明瑞香素对脊髓损伤诱发的机体炎症具有显著性的调节作用。

2.5 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓组织中凋亡信号通路的影响

如图 5 所示,与假手术组相比较,模型组的 Bax/Bcl-2(图 5A、5B)、Caspase-3(图 5C、5D)和 Cyt-c(图 5E、5F)含量均显著性升高,表明脊髓损伤导致了大鼠脊髓组织促凋亡相关蛋白显著性增加;当给予瑞香素后,其 Bax/Bcl-2(图 5A、5B)、Caspase-3(图 5C、5D)和 Cyt-c(图 5E、5F)含量的变化均发生

显著性回调,表明瑞香素对脊髓损伤诱发的凋亡相关蛋白异常表达具有显著的调节作用,且高剂量组治疗效果优于低剂量组。

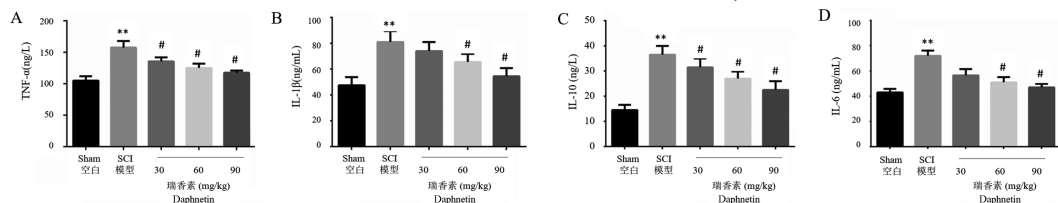
2.6 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓组织中 BDNF/TrkB 和 TRL4/NF- κ B 信号通路的影响

如图 6 所示,与假手术组相比较,模型组的 BDNF(图 6A、6B)、TrkB(图 6C、6D)、p-TrkB(图 6E、6F)、TRL4(G/H)和 NF- κ B p65(I/K)含量均显著性升高,表明脊髓损伤导致了大鼠脊髓组织 BDNF/TrkB 信号通路和 TRL4/NF- κ B 信号通路相关蛋白异常表达;当给予瑞香素后,其 BDNF(图 6A、6B)、TrkB(图 6C、6D)、p-TrkB(图 6E、6F)、TRL4(G/H)和 NF- κ B p65(I/K)含量的变化均发生显著性回调,且呈现剂量依赖性,表明瑞香素能够显著性调节 BDNF/TrkB 信号通路和 TRL4/NF- κ B 信号通路。

3 讨论

脊髓损伤是由脊柱损伤后诱发的严重并发症之一,包括原发性脊髓损伤与继发性脊髓损伤。其中继发性脊髓损伤是损伤后机体细胞和分子水平的一种主动调节过程,具有可逆性和可控性;这也是目前脊髓损伤治疗的主要阶段^[10-11]。目前,药物治疗是降低脊髓损害程度最为快捷和有效的方法之一。然而,目前临床治疗中,尚无一种安全有效的药物。因此,寻找一种安全、有效、多靶点的抗脊髓损伤药物,已成为脊髓损伤相关疾病及其药物研发的新热点和难点。

大量研究表明,脊髓损伤过程中伴随着氧化应激损伤^[12-13]。抗氧化剂能够有效降低损伤脊髓组织中乳酸脱氢酶活性,减少超氧阴离子对机体的损害和继发性水肿,继而达到治疗 SCI 的目的。瑞香素是一种天然抗氧化剂,能够激活并促进机体内抗氧化酶活

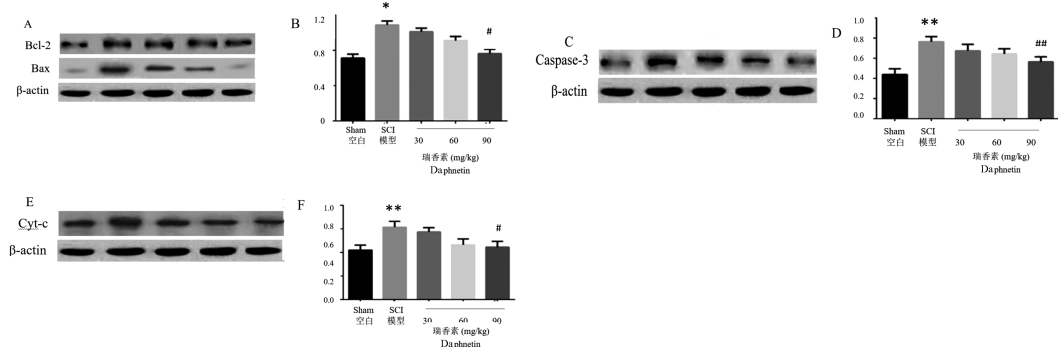


注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型(SCI)组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 瑞香素对 SCI 大鼠脊髓中 TNF- α (A)、IL-1 β (B)、IL-10 (C) 和 IL-6 (D) 含量的影响

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SCI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of daphnetin on the contents of TNF- α (A), IL-1 β (B), IL-10 (C) and IL-6 (D) in spinal cord of SCI rats



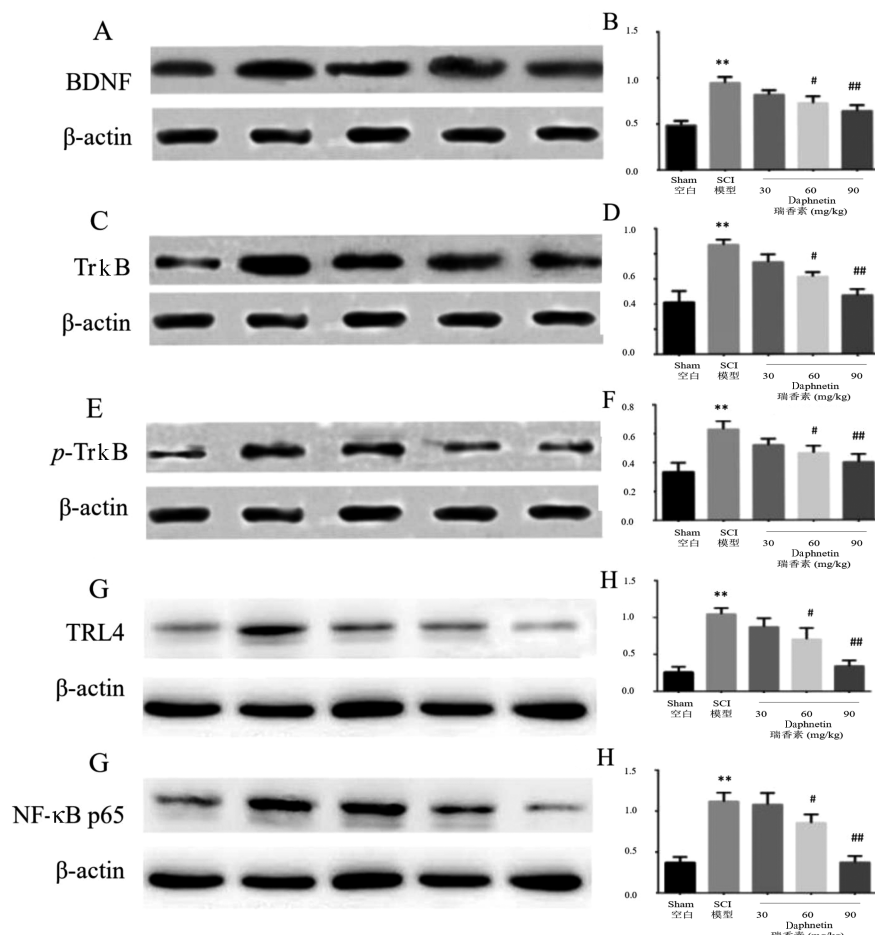
注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型(SCI)组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 5 瑞香素对实验大鼠脊髓组织中 Bax/Bcl-2 (A/B)、Caspase-3 (C/D) 和 Cyt-c (E/F) 水平的影响

Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SCI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of daphnetin on Bax/Bcl-2 (A/B), Caspase-3 (C/D) and Cyt-C (E/F)

levels in spinal cord tissue of experimental rats



注:A:假手术组;B:模型组;C:脊髓损伤+瑞香素 30 mg/kg;D:脊髓损伤+瑞香素 60 mg/kg;E:脊髓损伤+瑞香素 90 mg/kg;与假手术(Sham)组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。与模型(SCI)组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 6 瑞香素对实验大鼠脊髓组织中 BDNF (A/B)、TrkB (C/D)、p-TrkB (E/F)、TrkA (G/H) 和 NF-κB p65 (I/K) 水平的影响
Note. A, Normal group. B, Model group. C, Spinal cord injury + daphnetin 30 mg/kg. D, Spinal cord injury + daphnetin 60 mg/kg. E, Spinal cord injury + daphnetin 90 mg/kg. Compared with sham group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with SCI group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 6 Effect of daphnetin on the levels of BDNF (A/B), TrkB (C/D), p-TrkB (E/F), TrkA (G/H) and NF-κB p65 (I/K) in spinal cord tissue of experimental rats

性,对自由基有着高效的清除作用^[14-16]。此外,脊髓损伤过程中伴随着炎症反应的发生。TNF-α 是炎症早期机体释放的促炎因子,其表达水平的变化与机体的损伤程度密切相关。IL-1β 参与机体脊髓损伤的过程可能与其能够损伤血脑屏障的完整性密切相关。脊髓损伤诱发大量炎症因子产生,最终导致机体组织处于过度炎症反应和损伤状态^[17-19]。本研究结果显示,瑞香素能够抑制 IL-1β 分泌,减少由 IL-1β 刺激成骨细胞所产生的 NO、PGE2 含量,进而抑制 TNF-α 含量,进而发挥抗炎作用。

神经元细胞凋亡程序的启动对继发性脊髓损伤有直接的促进作用,Bax 蛋白具有促进细胞凋亡,并拮抗 Bcl-2 的抑制凋亡作用,并能够激活 Caspase 蛋白酶家族,最终加速细胞凋亡。Caspase-3 是评价细胞凋亡的重要指标之一,可介导多种细胞凋亡途

径。此外,TNF-α 又可激活凋亡相关蛋白 Caspase-3 的活化,进而促进机体细胞凋亡^[20-23]。为了进一步探究瑞香素对脊髓损伤诱发的凋亡作用的改善作用,本实验检测了瑞香素对脊髓组织的凋亡蛋白表达的改善作用,结果显示,瑞香素能够降低脊髓组织中 Bax、Caspase-3、Cyt-c 凋亡蛋白的表达,进而减少或抑制脊髓神经元细胞凋亡,修复中枢神经系统,并发挥神经保护作用。

研究表明,脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)可诱导和促进多种神经元的存活和分化,并能够改善受损神经元的修复作用。然而,当机体脊髓组织发生损伤后,可诱导 BDNF 活化,并促进其与高亲和力酪氨酸蛋白激酶受体 B (tyrosine kinase B, TrkB) 相互作用并发生结合,促进机体受损神经细胞的生存和发育,进而发

挥神经保护作用,有效促进机体脊髓组织损伤后的轴突修复和肢体运动功能的恢复等作用^[24],在调节神经节生长和神经再生过程中起着至关重要的作用。TLR4 信号转导通路是目前发现的重要的炎性通路之一,TLR4 高表达时,激活 NF- κ B,进而启动细胞因子 TNF- α 、IL-6 激活 TLR4,最终引起级联反应^[25-26]。此外,NF- κ B 的活化还可进一步激活 Caspase-3 信号通路介导细胞凋亡。细胞异常凋亡在继发性脊髓损伤过程中起着重要作用。本研究发现,瑞香素能够调节模型大鼠凋亡相关蛋白的异常表达,这一作用可能与其能够抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路的活化有关。因此,TLR4/NF- κ B 信号通路同脊髓损伤后的恢复具有密切关系。

综上所述,瑞香素能够改善 SCI 大鼠的运动功能,减轻 SCI 大鼠的氧化应激损伤和炎症水平,并能够抑制脊髓组织的凋亡,进而改善脊髓损伤,其作用机制可能是通过调节 TLR4/NF- κ B 信号通路来发挥作用的。

参考文献:

- [1] Emon ST, Uslu S, Aydinlar EI, et al. Effects of ozone on spinal cord recovery via the wnt/ β -catenin pathway following spinal cord injury in rats [J]. Turk Neurosurg, 2017, 27(6): 946-951.
- [2] Bezdudnaya T, Hornigo KM, Marchenko V, et al. Spontaneous respiratory plasticity following unilateral high cervical spinal cord injury in behaving rats [J]. Exp Neurol, 2018, 305: 56-65.
- [3] Spejo AB, Lawrence DF. An intriguing way to enhance rehabilitation of grasping in rats after spinal cord injury [J]. Brain, 2018, 141(7): 1888-1899.
- [4] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic spinal cord injury repair and regeneration [J]. Neurosurgery, 2017, 80(3S): S9-S22.
- [5] Elmelund M, Klarskov N, Biering-Sørensen F, et al. Fecal incontinence and neurogenic bowel dysfunction in women with traumatic and nontraumatic spinal cord injury [J]. Dis Colon Rectum, 2019, 62(9): 1095-1104.
- [6] Karsy M, Hawryluk G. Modern medical management of spinal cord injury [J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2019, 19(9): 65.
- [7] Assinck P, Duncan GJ, Hilton BJ, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury [J]. Nat Neurosci, 2017, 20(5): 637-647.
- [8] Chen X, Kuang N, Zeng X, et al. Effects of daphnetin combined with Bcl2-siRNA on antiapoptotic genes in synovial fibroblasts of rats with collagen-induced arthritis [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 884-890.
- [9] Zhi J, Duan B, Pei J, et al. Daphnetin protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4132-4139.
- [10] Zhu Y, Zhang L, Fu R, et al. The change tendency of endoplasmic reticulum stress associated proteins in rats with spinal cord injury [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(4): 1938-1947.
- [11] Yildirim T, Okutan O, Akpinar E, et al. Neuroprotective effects of high-dose human albumin against traumatic spinal cord injury in rats [J]. Bratisl Lek Listy, 2018, 119(2): 86-91.
- [12] Torres-Espín A, Forero J, Fenrich KK, et al. Eliciting inflammation enables successful rehabilitative training in chronic spinal cord injury [J]. Brain, 2018, 141(7): 1946-1962.
- [13] Pal A, Kumar S, Jain S, et al. Neuroregenerative effects of electromagnetic field and magnetic nanoparticles on spinal cord injury in rats [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2018, 18(10): 6756-6764.
- [14] Zhi J, Duan B, Pei J, et al. Daphnetin protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4132-4139.
- [15] Witaicenis A, Seito LN, da Silveira Chagas A, et al. Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives [J]. Phytomedicine, 2014, 21(3): 240-246.
- [16] Shao J, Xu R, Li M, et al. Glucocorticoid receptor inhibit the activity of NF- κ B through p38 signaling pathway in spinal cord in the spared nerve injury rats [J]. Life Sci, 2018, 208: 268-275.
- [17] Lv R, Du L, Zhang L, et al. Polydatin attenuates spinal cord injury in rats by inhibiting oxidative stress and microglia apoptosis via Nrf2/HO-1 pathway [J]. Life Sci, 2019, 217: 119-127.
- [18] Bi J, Chen C, Sun P, et al. Neuroprotective effect of omega-3 fatty acids on spinal cord injury induced rats [J]. Brain Behav, 2019, 9(8): e01339.
- [19] Li Y, Gu R, Zhu Q, et al. Changes of spinal edema and expression of aquaporin 4 in methylprednisolone-treated rats with spinal cord injury [J]. Ann Clin Lab Sci, 2018, 48(4): 453-459.
- [20] Gouriou Y, Demareux N, Bijlenga P, et al. Mitochondrial calcium handling during ischemia-induced cell death in neurons [J]. Biochimie, 2011, 93(12): 2060-2067.
- [21] Yang R, Cai X, Li J, et al. Protective effects of mir-129-5p on acute spinal cord injury rats [J]. Med Sci Monit, 2019, 25: 8281-8288.
- [22] Chen XG, Chen LH, Xu RX, et al. Effect evaluation of methylprednisolone plus mitochondrial division inhibitor-1 on spinal cord injury rats [J]. Childs Nerv Syst, 2018, 34(8): 1479-1487.
- [23] Tian ZR, Yao M, Zhou LY, et al. Effect of docosahexaenoic acid on the recovery of motor function in rats with spinal cord injury: a meta-analysis [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(3): 537-547.
- [24] Yuan B, Liu D, Liu X. Spinal cord stimulation exerts analgesia effects in chronic constriction injury rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway [J]. Neurosci Lett, 2014, 581: 63-68.
- [25] Kang N, Hai Y, Yang J, et al. Hyperbaric oxygen intervention reduces secondary spinal cord injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1141-1153.
- [26] Jia H, Ma H, Li Z, et al. Downregulation of lncRNA TUG1 inhibited TLR4 signaling pathway-mediated inflammatory damage after spinal cord ischemia reperfusion in rats via suppressing TRIL expression [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2019, 78(3): 268-282.

[收稿日期]2020-08-20