

丹酚酸B对脂多糖诱导许旺细胞损伤的保护作用机制

毕连涌(北京中医药大学东直门医院, 北京市 100700)

文章亮点:

- 1 研究表明, 脊髓损伤后炎症反应下 Wnt/ β -catenin 与核因子 κ B 信号通路负调控是脊髓损伤的重要机制之一, 目前未见丹酚酸 B 干预脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子 κ B 和 β -catenin 表达的文献报道。
- 2 实验设计的特点在于发现丹酚酸 B 能明显降低大鼠核因子 κ B 基因和蛋白的表达, 促进 β -catenin 基因和蛋白的表达, 可能是其许旺细胞保护作用机制之一。

关键词:

组织构建; 骨组织工程; 脊髓损伤; 许旺细胞; 丹参; 丹酚酸 B; 神经修复; 脂多糖; 核因子 κ B; Wnt/ β -catenin; β -catenin; 中药单体

主题词:

组织工程; 丹参; 脊髓损伤; 脂多糖

基金资助:

北京中医药大学自主选题资助项目(2014-JYBZZ-JS-035)

毕连涌, 男, 副主任医师。

通讯作者: 毕连涌, 北京中医药大学东直门医院, 北京市 100700

中图分类号: R318

文献标识码: B

文章编号: 2095-4344

(2015)42-06813-06

稿件接受: 2015-08-23

http://www.crter.org

摘要

背景: 丹酚酸 B 是中药丹参的有效单体成分, 近年已被证实有保护神经、促进神经损伤恢复的作用, 但其机制尚未清楚。

目的: 探讨丹酚酸 B 对脊髓损伤大鼠许旺细胞的保护机制。

方法: 实验分为正常组、模型组、10 μ mol/L 甲强龙组、丹酚酸 B 组(0.1, 1, 10, 100 μ mol/L)。除正常组外, 其他 3 组建立脂多糖诱导建立许旺细胞损伤模型, 后 2 组进行对应的药物干预。以此观察丹酚酸 B 对脊髓损伤大鼠许旺细胞生长曲线、增殖活性、 β -catenin 和核因子 κ B 蛋白与基因的表达情况。

结果与结论: 干预 48, 72, 96 h, 模型组细胞活性与正常组比较显著减低($P < 0.01$), 与模型组比较, 干预 72, 96 h, 丹酚酸 B 组(10 μ mol/L)细胞活性较模型组显著升高($P < 0.05$)。干预 72 h 时, 与模型组比较, 甲强龙组和丹酚酸 B 组许旺细胞核因子 κ B mRNA 和蛋白表达显著降低($P < 0.01$), 丹酚酸 B 组 β -catenin mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。说明丹酚酸 B 能够改善脂多糖刺激的大鼠许旺细胞活性损伤; 同时抑制脂多糖诱导的大鼠许旺细胞核因子 κ B 基因和蛋白的表达, 促进 β -catenin 基因和蛋白的表达, 这可能是其许旺细胞保护作用机制之一。

毕连涌. 丹酚酸 B 对脂多糖诱导许旺细胞损伤的保护作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(42):6813-6818.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.42.017

Neuroprotective effects of salvianolic acid B against Schwann cell injury induced by lipopolysaccharide

Bi Lian-yong (Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract

BACKGROUND: Salvianolic acid B is an effective monomer component of *Salvia miltiorrhiza*, which has been shown in recent years to have neuroprotective role and to promote nerve recovery, but its mechanism is not clear.

OBJECTIVE: To explore the protective mechanism of salvianolic acid B on Schwann cells in rats with spinal cord injury.

METHODS: Schwann cells of Sprague-Dawley rats were cultured and divided into normal control group, model group, 10 μ mol/L methylprednisolone group and salvianolic acid B group (0.1, 1, 10, 100 μ mol/L). Models of Schwann cell injury induced by lipopolysaccharide were established in all the groups except the normal control group. After intervention, growth curve and proliferative activity of Schwann cells were detected, and protein and gene expressions of β -catenin and nuclear factor- κ B were observed.

RESULTS AND CONCLUSION: At 48, 72, 96 hours after intervention, the cell viability of the model group was significantly lower than that of the normal control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the cell viability of salvianolic acid B group (10 μ mol/L) was significantly increased at 72 and 96 hours ($P < 0.05$); the expressions of nuclear factor- κ B protein and mRNA in the methylprednisolone group and salvianolic acid B group were declined significantly ($P < 0.01$), but the expressions of β -catenin mRNA and protein in the salvianolic acid B group significantly increased ($P < 0.05$). These results suggest that salvianolic acid B improves the viability of Schwann cells which are stimulated with lipopolysaccharide, suppresses expression of nuclear factor- κ B mRNA

Bi Lian-yong, Associate chief physician, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: Bi Lian-yong, Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Accepted: 2015-08-23

and protein, and promotes the expression of β -catenin mRNA and protein. Above may be one of the mechanisms which salvianolic acid B protects Schwann cells.

Subject headings: Tissue Engineering; Salvia miltiorrhiza; Spinal Cord Injuries; Lipopolysaccharides

Funding: Fundamental Research Funds for the Central Universities of Beijing University of Chinese Medicine, No. 2014-JYBZZ-JS-035

Bi LY. Neuroprotective effects of salvianolic acid B against Schwann cell injury induced by lipopolysaccharide. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2015;19(42):6813-6818.

0 引言 Introduction

脊髓损伤是临床常见病、多发病，能够引起多种并发症，常常引起肢体严重的功能障碍。随着人们生活水平的提高，脊髓损伤发病率不断升高，伴随高致残率和高死亡率的出现，给患者和社会造成了巨大经济负担^[1-2]。

脊髓损伤发病原因大体分为包括创伤性脊髓损伤和非创伤性脊髓损伤2种，其中又以创伤性脊髓损伤为主。脊髓损伤病理过程可分为原发性损伤和继发性损伤两个过程，原发性损伤一般不可逆且难以干预，而继发性损伤后果更为严重但可干预。脊髓损伤的发病机制较多，主要包括血管、兴奋毒性、再灌注、细胞凋亡及自由基损伤等机制，它们引起神经元坏死、神经轴突断裂以及微环境变化加重损伤。神经细胞是高度分化细胞，自我再生和功能恢复能力较差，因此，神经修复研究一直是脊髓损伤治疗领域的难点。

炎症反应是继发性损伤发生发展的一个重要因素。在去除原发致伤因素的同时，有效的控制脊髓损伤后早期炎症免疫反应，尽可能使继发性损伤的程度降到最低、最小，是保存脊髓功能，改善预后的关键。许旺细胞是脊髓损伤后先天免疫反应的主要细胞^[3]，其作为周围神经的胶质细胞，不仅形成髓鞘，而且还分泌各种神经因子促进神经元存活以及轴突再生，在神经再生修复中起着重要作用，被视为神经再生工程领域中的种子细胞^[4-6]。研究证实，Wnt经典信号通路Wnt/ β -catenin信号转导通路是脊髓损伤的关键修复机制，与核因子 κ B信号相互作用调控许旺细胞状态，促进神经元功能恢复和再生^[7]。可见，刺激Wnt信号调节许旺细胞功能对脊髓损伤修复有重要意义。

脊髓损伤属于中医学“痿痹”和“截瘫”范畴^[8]，已有临床和实验研究表明中医药是治疗脊髓损伤的一个重要有效手段^[9]。应用常用活血化瘀中药丹参治疗脊髓损伤的临床和实验报道证实了丹参的有效性，其机制主要包括抑制凋亡、调节血流量、调节钙离子和抗炎等。丹酚酸B是丹参的水溶性有效单体成分，味微苦，具有抗炎、抗氧化的作用^[10]，已被证实具有改善心脑血管缺血再灌注、肝纤维化的作用^[11]。近年发现其有保护神经、促进神经损伤恢复的作用，如有学者采用了丹酚酸B治疗急性脊髓损伤疗效观察，发现治疗脊髓损伤有明显效果。实验研究也发现丹酚酸对大鼠急性脊髓损伤后神经再生有作用，同时丹酚酸B对脂多糖诱导核因子 κ B活性有抑制作用。目前，未见

丹酚酸B刺激Wnt信号调节许旺细胞功能的相关报道。

实验用原代培养的大鼠许旺细胞作为观察对象，建立许旺细胞炎症损伤模型，探索丹酚酸B对脊髓损伤神经修复细胞许旺细胞炎症反应的作用机制，从而为脊髓损伤药物干预提供新的思路。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2014年5月至2015年2月在北京中医药大学中医养生研究所实验室完成。

1.3 材料

实验动物: 实验使用新生1 d的SD乳鼠若干只，购自北京维通利华实验动物公司，合格证号：SCXK(京)2007-0001，乳鼠饲养于清洁级北京中医药大学动物实验中心。

丹酚酸B对脂多糖诱导的大鼠许旺细胞损伤的保护作用机制观察实验相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
胎牛血清	杭州四季青公司
DMEM培养基、体积分数0.25%胰蛋白酶、D-Hank液	Gibco公司
MTT试剂盒	Sigma公司
丹酚酸B	北京百诺威生物科技有限公司
甲强龙	Pfizer公司
RIPA裂解液、Bradford法蛋白质定量试剂盒、ECL发光液	北京普利莱基因技术有限公司
核因子 κ B抗体、GAPDH抗体	Cell Signaling公司
BIO-RAD XRS凝胶成像仪	Bio-Rad公司
RNA反转录试剂盒、分光光度计	Promega公司

1.4 实验方法

大鼠许旺细胞生长曲线的测定: 脱颈处死乳鼠，用体积分数75%乙醇浸泡消毒10 min后以D-Hanks毒用液冲洗，无菌条件下以俯卧位固定在取材板上。用眼科剪剪开皮肤，于股骨干后外侧切取双侧坐骨神经，显微镜下剥离神经外膜，尽可能去除束膜，漂洗后将组织剪碎至0.5–1.0 mm²，均匀接种于T25培养瓶中，培养4–6 h后体积分数5%CO₂ 37 °C的CO₂培养箱中培养。培养48 h后首次换液，每隔两三天换液1次。倒置显微镜下观察细胞生长

情况,当细胞数目较多、融合成片时,加入体积分数0.05%胰蛋白酶及0.02%EDTA 1.0–2.0 mL消化、孵育。细胞种植三四天后,吸净原培养液,加入含G418(100 mg/L)的纯化培养液培养四五天后,更换为工作培养基继续培养。当细胞铺满培养瓶底的80%–90%时即可进行传代,48 h后首次换液,以后每隔两三天换液1次,每日在倒置显微镜下观察细胞生长情况。

许旺细胞在培养后的11 d内每日分别各取1个培养板吸出培养基(勿弃),D-Hanks液冲洗2次,加体积分数0.25%的胰蛋白酶消化,并于显微镜下观察,待贴壁的细胞收缩、变圆(尚未脱落)后,移去消化液,把原培养液倒回,充分吹打,镜下观察,待所有细胞从培养瓶壁脱落,取细胞悬液于计数板上计数,算出每毫升的细胞数,并绘制成曲线图。

MTT比色法检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞增殖的影响:取第3代许旺细胞进行消化,调整细胞悬液浓度,按7 000/孔的浓度接种于96孔板。

培养到第5天时进行实验分7组:①正常组:体积分数10%胎牛血清DMEM。②模型组:体积分数10%胎牛血清DMEM+100 mg/L 脂多糖。③甲强龙组:10 μ mol/L甲强龙+体积分数10%胎牛血清DMEM+100 mg/L 脂多糖。④丹酚酸B组:0.1, 1, 10, 100 μ mol/L丹酚酸B+体积分数10%胎牛血清DMEM+100 mg/L脂多糖,共分4个亚组。上述7组每组设6个复孔。

培养24, 48, 72, 96 h后行MTT比色实验:于96孔板每孔加入MTT溶液(5 g/L) 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C避光孵育4 h后,弃孔内上清液,再加入DMSO 150 μ L/孔,室温静置30 min。酶标仪比色(紫外线波长选择490 nm)测定各孔的吸光度值(A值)。

RT-PCR检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子 κ B mRNA表达:取第3代许旺细胞分为:①正常组:体积分数10%胎牛血清DMEM。②模型组:体积分数10%胎牛血清DMEM+100 mg/L 脂多糖。③甲强龙组:10 μ mol/L甲强龙+体积分数10%胎牛血清DMEM+100 mg/L 脂多糖。④丹酚酸B组:10 μ mol/L丹酚酸B+体积分数10%胎牛血清DMEM+100 mg/L 脂多糖。每组6个复孔。

培养48 h洗去培养基,细胞消化下后加入到盛有1 mL Trizol的离心管裂解,室温静置5 min, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心5 min。取上清,加入200 μ L氯仿,剧烈震荡,室温静置5 min, 4 $^{\circ}$ C以12 000 r/min离心15 min。取上层液体于EP管加入等体积异丙醇,混匀,–80 $^{\circ}$ C过夜。次日冰上融化后,4 $^{\circ}$ C以12 000 r/min离心10 min,弃上清,加入体积分数80%乙醇1 mL, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min离心5 min。弃上清,室温干燥处理3–5 min,加入DEPC水溶解,即为总RNA。以ABI7500机器检测核因子 κ B和 β - κ B00燥处理匀加入表达, GAPDH为内参基因,每个样品3个平行孔。

反应体系为20 μ L:无核酸酶水7.2 μ L,上下游引物各0.4 μ L,实时定量PCR预混液10 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C, 2 min; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 1 min, 40个循环; 95 $^{\circ}$ C, 15 s, 60 $^{\circ}$ C, 15 s, 95 $^{\circ}$ C, 15 s。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析基因相对表达量。

Western blot法检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子 κ B和 β -catenin蛋白表达:细胞分组同上,浆细胞消化、收集,RIPA裂解缓冲液裂解,提取总蛋白;Bradford法测定蛋白质浓度。

适量样品加5 \times SDS-PAGE非还原性蛋白上样缓冲液,沸水煮5 min,蛋白变性。将标准蛋白Marker和样品蛋白分别5 μ L加入10%十二烷基硫酸钠–聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中电泳分离;分离后转移至PVDF膜上,体积分数5%脱脂奶粉(TBST配制)封闭1 h,分别于特异性抗体一抗:小鼠核因子 κ B p65, β -catenin单克隆抗体、兔抗GAPDH多克隆抗体(1:1 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜,充分洗净;再与二抗(1:5 000–1:10 000)室温作用1 h,充分洗涤洗涤, ECL发光液(1:1配制)静置1 min显色,凝胶成像仪显影,并扫描成灰度图像,用Image J软件分析条带灰度值,比较各组目的条带灰度值/内参灰度值的差异。

1.5 主要观察指标 ①许旺细胞生长曲线。②丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞活性的影响。③丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子 κ B和 β -catenin mRNA表达的影响。④丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子 κ B和 β -catenin蛋白表达的影响。

1.6 统计学分析 所得数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用SPSS 17.0软件进行数据处理,组间数据差异的比较采用单因素方差分析和LSD法, $P < 0.05$ 时差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 许旺细胞生长曲线变化 从图1可见,细胞在第2天之后开始进入快速(对数)生长期,第9天时生长明显减慢。

2.2 MTT比色法检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞活性的影响 从表1可见,干预24 h,各组间比较无显著性差异。干预48, 72, 96 h,模型组细胞活性与正常组比较显著减低($P < 0.01$)。与模型组比较,干预72, 96 h,丹酚酸B(10 μ mol/L)组细胞活性显著升高($P < 0.05$)。因此,干预72 h, 10 μ mol/L丹酚酸B抗脂多糖诱导的大鼠许旺细胞损伤作用最好。

2.3 RT-PCR检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子 κ B和 β -catenin mRNA表达的影响 从表2可见,干预72 h,与正常组比较,模型组大鼠许旺细胞NF- κ B mRNA表达显著升高($P < 0.01$), β -catenin mRNA显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,甲强龙组和丹酚酸B组(10 μ mol/L)干预72 h时许旺细胞核因子 κ B mRNA表达显著降低($P < 0.01$),丹酚酸B组 β -catenin mRNA表达显著升高($P < 0.05$)。

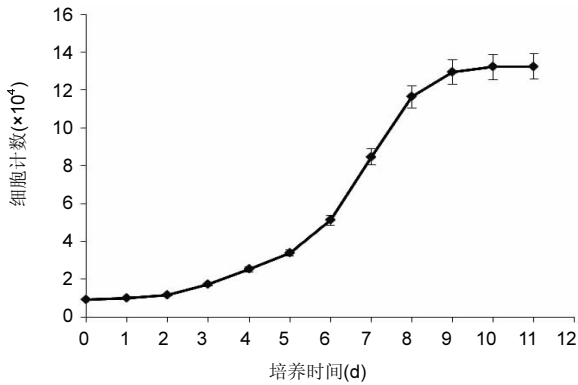


图1 许旺细胞的生长曲线

Figure 1 Growth curve of Schwann cells

图注: 细胞在培养第2天后开始进入快速(对数)生长期, 培养第9天生长明显减慢。

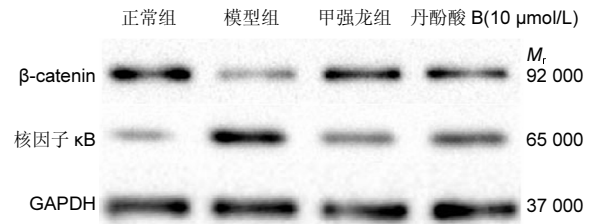


图2 丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子κB和β-catenin蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of salvianolic acid B on protein expressions of β-catenin and nuclear factor-κB in rat Schwann cells induced by lipopolysaccharide

图注: 干预72 h, 模型组大鼠许旺细胞核因子κB蛋白表达量较正常组显著升高, 而β-catenin蛋白表达显著降低; 与模型组比较, 干预72 h时甲强龙组和丹酚酸B组大鼠许旺细胞核因子κB蛋白表达量显著降低, β-catenin蛋白表达显著降低。

表1 MTT比色法检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞活性的影响

($\bar{x} \pm s$, $n=6$, 吸光度值)

Table 1 Effect of salvianolic acid B on the viability of lipopolysaccharide-stimulated Schwann cells in rats

组别	干预时间(h)			
	24	48	72	96
正常组	0.201±0.008	0.247±0.009	0.285±0.021	0.336±0.022
模型组	0.202±0.010	0.206±0.009 ^b	0.232±0.037 ^b	0.245±0.033 ^b
甲强龙组	0.199±0.008	0.229±0.024 ^c	0.275±0.019 ^c	0.278±0.026 ^a
丹酚酸B(0.1 μmol/L)组	0.202±0.012	0.204±0.013 ^b	0.248±0.023 ^a	0.283±0.063 ^a
丹酚酸B(1 μmol/L)组	0.205±0.005	0.218±0.018 ^b	0.280±0.028 ^c	0.290±0.044
丹酚酸B(10 μmol/L)组	0.198±0.009	0.212±0.020 ^b	0.291±0.024 ^c	0.307±0.023 ^c
丹酚酸B(100 μmol/L)组	0.200±0.013	0.205±0.009 ^b	0.259±0.023	0.283±0.072

表注: 与正常组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, 模型组相比, ^c $P < 0.05$ 。

表2 干预72 h各组许旺细胞核因子κB和β-catenin mRNA表达

($\bar{x} \pm s$, $n=3$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

Table 2 Expression of nuclear factor-κB mRNA and β-catenin mRNA in Schwann cells at 72 hours after intervention

组别	核因子κB	β-catenin
正常组	0.475±0.004	3.719±0.365
模型组	2.136±0.345 ^a	0.663±0.327 ^a
甲强龙组	0.896±0.402 ^c	1.643±0.699
丹酚酸B(10 μmol/L)组	0.983±0.280 ^c	1.882±0.877 ^b

表注: 与正常组相比, ^a $P < 0.01$, 模型组相比, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

表3 各组许旺细胞核因子κB和β-catenin蛋白表达情况

($\bar{x} \pm s$, $n=3$, 相对灰度值)

Table 3 Protein expression of nuclear factor-κB and β-catenin in Schwann cells

组别	β-catenin	核因子κB
正常组	1.091±0.169	0.794±0.410
模型组	0.544±0.167 ^a	1.409±0.419 ^b
甲强龙组	0.864±0.224 ^c	0.585±0.202 ^c
丹酚酸B(10 μmol/L)组	0.866±0.015 ^c	0.622±0.168 ^c

表注: 与正常组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与模型组相比, ^c $P < 0.05$ 。

2.4 Western blot检测丹酚酸B对脂多糖刺激大鼠许旺细胞核因子κB和β-catenin蛋白表达的影响 从表3、图2可见, 干预72 h, 模型组大鼠许旺细胞核因子κB蛋白表达量较正常组显著升高($P < 0.01$), 而β-catenin蛋白表达显著降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 干预72 h时甲强龙组和丹酚酸B组大鼠许旺细胞核因子κB蛋白表达量显著降低($P < 0.05$), β-catenin蛋白表达显著降低($P < 0.05$)。

3 讨论 Discussion

丹参为唇形科植物丹参Salvia miltiorrhiza Bge.的干燥

根和根茎, 具有活血祛瘀, 通经止痛的功效, 临床上丹参及其注射液常用于治疗脊髓损伤^[12-13]。丹酚酸B是传统中药丹参的有效提取物, 具有抗炎抗氧化、保护神经的药理作用, 目前已广泛应用于神经疾病的治疗, 前景广阔。实验研究表明, 丹酚酸B还能够改善双氧水刺激的神经干细胞损伤, 修复神经组织, 恢复神经功能^[14]。丹酚酸B能够清除超氧阴离子、自由基, 抑制细胞氧化而发挥抗氧化作用^[15]。丹酚酸B作用于缺血缺氧再灌注后的大鼠神经元细胞, 能抑制活性氧产生并且提高细胞超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等抗氧化酶的活性, 发挥神经保护作用^[16]。腹腔

注射10 mg/kg剂量的丹酚酸B即可大幅度抑制脊髓损伤大鼠白介素-6和肿瘤坏死因子- α 的转录,改善运动神经功能^[17]。因此,丹酚酸B可以通过抗氧化、抗炎而保护神经细胞^[18]。

脊髓损伤病理过程包括复杂的分子、细胞反应通路,这些通路是其继发性损伤发生发展的重要因素。炎症反应是脊髓损伤继发性损伤发生发展的核心环节,发挥着神经保护和细胞毒性双重作用,因此调节炎症反应是脊髓损伤防治的重要途径。糖皮质激素甲强龙是临床上脊髓损伤抗炎治疗上应用最广的药物,疗效确切^[19, 20]。甲强龙疗效可能与其缓解脊髓损伤神经轴突进行性损伤,增加血流量,减少钙离子内流,并减少小胶质细胞和巨噬细胞聚集有关^[15]。然而,高剂量应用甲强龙其副作用明显,容易发生严重的并发症,所以目前只作为一种可选择的治疗方案^[21],寻找新的或联合治疗方法十分必要。许旺细胞是脊髓损伤后先天免疫反应的主要细胞,能够分泌多种神经营养因子、细胞外基质以及细胞黏附因子,对脊髓损伤修复有重要意义^[22]。因此,实验中运用脂多糖诱导大鼠许旺细胞炎症模型^[23],以甲强龙为阳性对照药,探索丹酚酸B对于大鼠许旺细胞炎症反应的调节作用。通过测定生长曲线,找出细胞对数生长期。通过第一次分组分时实验,发现72 h时10 $\mu\text{mol/L}$ 丹酚酸B抗脂多糖诱导的大鼠许旺细胞损伤作用最好,便于进一步基因和蛋白检测。

最新研究表明,脊髓损伤病变时 Wnt/ β -catenin和核因子 κB 信号存在负向调控关系^[24]。观察核因子 κB 和 β -catenin信号在许旺细胞炎症反应的变化以及药物干预对于脊髓损伤防治具有一定的实际意义。Wnt/ β -catenin信号是脊髓损伤神经放射状再生的关键信号通路^[25]。 β -catenin是位于细胞膜和胞浆的多功能蛋白,介导细胞的黏附运动,同时作为的Wnt/ β -catenin信号通路的中心环节,具有调节细胞生长、增殖的作用^[26]。研究表明,中枢神经系统中 β -catenin能控制神经前体细胞的生长以及细胞增殖与分化的平衡,在封闭 β -catenin以后,神经前体细胞数量显著减少^[27]。核因子 κB 是调控炎症反应的关键转录因子^[28]。核因子 κB 与I κB 以复合体形式存在于胞浆中,脊髓损伤时多条途径激活IKK/核因子 κB 介导的信号通路,调节细胞基因转录,进而促进细胞形成大量的自由基和促炎因子,引起炎症反应的发生、进展,造成炎症细胞浸润、神经细胞凋亡等。研究表明,抑制核因子 κB 的活性表达,能够减轻IKK/核因子 κB 介导的炎症反应^[29]。实验结果显示,脂多糖刺激后大鼠许旺细胞中核因子 κB 基因和蛋白表达明显增强,说明炎症反应抑制了细胞增殖,与以往文献描述一致^[30];甲强龙和丹酚酸B治疗后能有效缓解炎症反应,降低核因子 κB 基因和蛋白表达。同时,丹酚酸B能够上调大鼠许旺细胞 β -catenin基因和蛋白的表达,促进许旺细胞增殖分化,有利于其分泌多种神经营养因子、细胞外基质、细胞黏附分子改善脊髓损伤。

综上所述,炎症反应是引起脊髓损伤后继发性损伤的重要因素,有效的抑制炎症反应发生,减轻继发性损伤的危害^[31-46]。丹酚酸B是中药丹参的有效提取成分,具有抗炎、抗氧化、修复神经的作用,实验证实通过抑制核因子 κB 基因和蛋白的表达,促进 β -catenin基因和蛋白的表达可能是其许旺细胞保护作用机制之一,从而为脊髓损伤的干预提供新的思路和实验依据。

作者贡献: 实验设计、干预实施、结果评估均由第一作者完成,经过系统培训,未使用盲法评估。

利益冲突: 所有作者共同认可文章无相关利益冲突。

伦理问题: 实验过程中对动物处置符合中华人民共和国科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

学术术语: 丹酚酸B的作用?丹酚酸B是中药丹参的有效单体成分,具有抗炎、抗氧化的作用,已被证实具有改善心脑血管缺血再灌注、肝纤维化的作用。近年发现其有保护神经、促进神经损伤恢复的作用,但其机制尚未清楚。

作者声明: 文章第一作者对研究和撰写的论文中出现的不良行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁,可接受核查。

4 参考文献 References

- [1] Stephan K, Huber S, Haberle S, et al. Spinal cord injury-incidence, prognosis, and outcome: an analysis of the Trauma Register DGU. *Spine J.* 2015;15(9):1994-2001.
- [2] Jazayeri SB, Beygi S, Shokraneh F, et al. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *Eur Spine J.* 2015;24(5):905-918.
- [3] Ydens E, Lornet G, Smits V, et al. The neuroinflammatory role of Schwann cells in disease. *Neurobiol Dis.* 2013;55:95-103.
- [4] Terenghi G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat.* 1999;194(Pt 1):1-14.
- [5] Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999;49(6):377-391.
- [6] Richner M, Ulrichsen M, Elmegaard SL, et al. Peripheral nerve injury modulates neurotrophin signaling in the peripheral and central nervous system. *Mol Neurobiol.* 2014; 50(3):945-970.
- [7] Grigoryan T, Birchmeier W. Molecular signaling mechanisms of axon-glia communication in the peripheral nervous system. *Bioessays.* 2015;37(5):502-513.
- [8] 时素华,李志刚,秦丽娜,等.脊髓损伤相关信号通路及中医药治疗研究[J].北京中医药,2014,33(4):308-310.
- [9] 吴俊哲,王伟群,曾元桂,等.中医药治疗脊髓损伤及骨质疏松的研究进展[J].中药材,2014,37(9):1699-1702.
- [10] 赵先,王婧雯,陆杨,等.丹酚酸B药理作用的研究进展[J].西北药学杂志,2015,30(1):107-110.
- [11] 马萌萌,郭虹,张晗,等.丹酚酸B对脑损伤神经细胞的保护作用[J].天津中医药大学学报,2015,34(1):55-58.
- [12] 杨春壮,刘长发,杨春佳.丹参注射液治疗急性脊髓损伤疗效观察[J].中医药信息,2003,20(6):36.
- [13] 侯建雄,马海燕,李莉.前后路联合手术配合丹参注射液治疗颈椎骨折伴脊髓损伤临床观察[J].河北医药,2013,35(12):1872-1874.

- [14] Shu T, Pang M, Rong L, et al. Protective effects and mechanisms of salvianolic acid B against H₂O₂-induced injury in induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells. *Neurochem Res*. 2015;40(6):1133-1143.
- [15] 苟翀. 丹酚酸B在脊髓损伤中的作用及其相关机制的实验研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [16] Wang Y, Jiang YF, Huang QF, et al. Neuroprotective effects of salvianolic acid B against oxygen-glucose deprivation/reperfusion damage in primary rat cortical neurons. *Chin Med J (Engl)*. 2010;123(24):3612-3619.
- [17] Xun C, Hu Y, Lu M, et al. Study of effect of salvianolic acid B on motor function recovery in rats with spinal cord injury. *Biomed Res Int*. 2014;2014:931850.
- [18] Tao YY, Wang QL, Shen L, et al. Salvianolic acid B inhibits hepatic stellate cell activation through transforming growth factor beta-1 signal transduction pathway in vivo and in vitro. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2013;238(11):1284-1296.
- [19] 谭志强. 甲强龙冲击疗法对急性颈脊髓损伤的临床研究[J]. 中国医学创新, 2014, 11(34):73-76.
- [20] Costa DD, Beghi E, Carignano P, et al. Tolerability and efficacy of erythropoietin (EPO) treatment in traumatic spinal cord injury: a preliminary randomized comparative trial vs. methylprednisolone (MP). *Neurol Sci*. 2015;36(9):1567-1574.
- [21] 朱庄臣, 焦伟, 蔡国栋, 等. 大剂量甲强龙治疗急性脊髓损伤后早期并发症的研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2014, 22(16):1454-1457.
- [22] 周孝斌, 李志忠, 孙国栋. 许旺细胞在脊髓损伤中的研究进展[J]. 海南医学, 2014, 25(7):1004-1007.
- [23] Cameron AA, Vansant G, Wu W, et al. Identification of reciprocally regulated gene modules in regenerating dorsal root ganglion neurons and activated peripheral or central nervous system glia. *J Cell Biochem*. 2003;88(5):970-985.
- [24] Sun L, Pan J, Peng Y, et al. Anabolic steroids reduce spinal cord injury-related bone loss in rats associated with increased Wnt signaling. *J Spinal Cord Med*. 2013;36(6):616-622.
- [25] Briona LK, Poulain FE, Mosimann C, et al. Wnt/ss-catenin signaling is required for radial glial neurogenesis following spinal cord injury. *Dev Biol*. 2015;403(1):15-21.
- [26] 梁新军, 吴燕峰, 唐勇, 等. 大鼠脊髓损伤后Wnt信号分子的表达变化[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2009, 19(12):931-934.
- [27] 李雪鹏. 脊髓损伤后肌成束蛋白(FSCN1)的表达与功能分析[D]. 长春: 吉林大学, 2014.
- [28] 韦屹宇, 梁立. 他莫昔芬对大鼠脊髓损伤后炎症反应及细胞凋亡的影响[J]. 中国医药导报, 2014, 11(34):23-26.
- [29] 陈凯, 张俐. 丹参及其制剂对脊髓损伤的保护作用及机制研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11):2887-2890.
- [30] 周秀梅, 陈龙, 邵一叶, 等. microRNA-146a在LPS诱导的大鼠许旺细胞损伤模型中的表达[J]. 中国临床医学, 2015, 22(3):288-290.
- [31] Witcher KG, Eiferman DS, Godbout JP. Priming the Inflammatory Pump of the CNS after Traumatic Brain Injury. *Trends Neurosci*. 2015;38(10):609-620.
- [32] Lee DH, Steinacker P, Seubert S, et al. Role of glial 14-3-3 gamma protein in autoimmune demyelination. *J Neuroinflammation*. 2015;12(1):187.
- [33] Alkatie S, Boileau AJ. The role of therapeutic hypothermia after traumatic spinal cord injury—a systematic review. *World Neurosurg*. 2015.
- [34] Kabu S, Gao Y, Kwon BK, et al. Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury. *J Control Release*. 2015.
- [35] Sanna MD, Stark H, Lucarini L, et al. Histamine H4 receptor activation alleviates neuropathic pain through differential regulation of ERK, JNK and P38 MAPK phosphorylation. *Pain*. 2015.
- [36] Madathil SK, Saatman KE. IGF-1/IGF-R Signaling in Traumatic Brain Injury: Impact on Cell Survival, Neurogenesis, and Behavioral Outcome. In: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press. 2015.
- [37] Zhang B, Bailey WM, Braun KJ, et al. Age decreases macrophage IL-10 expression: Implications for functional recovery and tissue repair in spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;273:83-91.
- [38] Xu J, E XQ, Liu HY, et al. Angelica Sinensis attenuates inflammatory reaction in experimental rat models having spinal cord injury. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(6):6779-6785.
- [39] Alawieh A, Sabra M, Sabra Z, et al. Molecular Architecture of Spinal Cord Injury Protein Interaction Network. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135024.
- [40] Bastien D, Bellver Landete V, et al. IL-1 α Gene Deletion Protects Oligodendrocytes after Spinal Cord Injury through Upregulation of the Survival Factor Tox3. *J Neurosci*. 2015; 35(30):10715-10730.
- [41] Wang J, Pearse DD. Therapeutic hypothermia in spinal cord injury: the status of its use and open questions. *Int J Mol Sci*. 2015;16(8):16848-16879.
- [42] Quinzanos-Fresnedo J, Sahagún-Olmos RC. Micro RNA and its role in the pathophysiology of spinal cord injury—a further step towards neuroregenerative medicine. *Cir Cir*. 2015; 83(5):442-447.
- [43] Ansari MA. Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma. *J Neurol Sci*. 2015;357(1-2):41-49.
- [44] Impellizzeri D, Ahmad A, Di Paola R, et al. Role of Toll like receptor 4 signaling pathway in the secondary damage induced by experimental spinal cord injury. *Immunobiology*. 2015;220(9):1039-1049.
- [45] Guo L, Quan ZX, Zhao ZH, et al. Effects of musk ketone on nerve recovery after spinal cord injury. *Genet Mol Res*. 2015; 14(2):2958-2963.
- [46] Goldshmit Y, Kanner S, Zacs M, et al. Rapamycin increases neuronal survival, reduces inflammation and astrocyte proliferation after spinal cord injury. *Mol Cell Neurosci*. 2015; 68:82-91.