

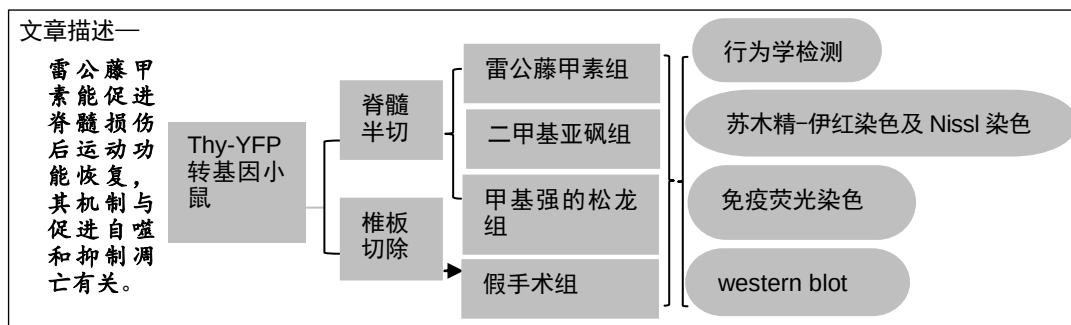
雷公藤甲素干预脊髓损伤模型Thy-YFP转基因小鼠调节自噬及抑制细胞凋亡

朱 宁, 杨新明, 阮建伟(河北北方学院附属第一医院, 河北省张家口市 075000)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344. 0000

ORCID: /.....(? ? ? ?)

文章快速阅读:



朱宁, 女, 1993 年生, 浙江省余姚市, 汉族, 河北北方学院在读硕士, 医师, 主要从事脊髓损伤研究。

通讯作者: 杨新明, 博士, 教授, 河北北方学院附属第一医院, 河北省张家口市 075000

文献标识码:B

投稿日期: 2019-12-10

送审日期: 2019-12-14

采用日期: 2020-03-03

在线日期:



文题释义:

细胞自噬: 自噬是一种细胞的自我保护机制,通过自噬体-溶酶体途径降解和再循环受损细胞器、有毒物质、错误折叠蛋白质等,在维持细胞稳态方面具有重要作用

转基因小鼠: 1974 年, Rudolf Jaenisch 通过将 SV40 病毒的 DNA 注射到小鼠的囊胚中,创造了第一只携带外源基因的小鼠。后来又有研究人员把 Murine leukemia 病毒注射到小鼠胚胎得到了能通过生殖系统稳定遗传的小鼠,并且外源基因能在后代中稳定表达。这些能稳定遗传且表达外源基因的小鼠即现在一般意义上所说的转基因小鼠。

摘要

背景: 研究表明,在脑卒中大鼠模型中,雷公藤甲素治疗减少了缺血性病变区域面积、水含量和神经细胞死亡。此外,雷公藤甲素能通过抑制星形胶质细胞增生、小胶质细胞活化和抑制炎症反应促进脊髓损伤修复。

目的: 研究雷公藤甲素对 Thy-YFP 转基因小鼠脊髓损伤后细胞自噬和细胞凋亡的影响,探讨雷公藤甲素对脊髓损伤的保护作用及机制。

方法: 将 60 只 Thy-YFP 转基因小鼠随机分为 4 组,分别是假手术组、二甲基亚砷组、甲基强的松龙组和雷公藤甲素组。假手术组只进行椎板切除术,不损伤脊髓;其他 3 组建立脊髓损伤模型。雷公藤甲素组、二甲基亚砷及假手术组小鼠术后立即分别腹腔注射雷公藤甲素 [0.2 mg/(kg · d)]或等量 5%二甲基亚砷-生理盐水溶液,连续给药 7 d;甲基强的松龙组小鼠于术后 30 min、6 h、24 h 腹腔注射甲基强的松龙溶液(30 mg/kg)。BMS 评分检测小鼠运动功能恢复情况,苏木精-染色及 Nissl 染色法检测各组脊髓组织恢复情况,免疫印迹及免疫荧光染色检测各脊髓组织中自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3B、p62 及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-3 的蛋白水平。动物伦理获得河北北方学院批准(W20200002)。

结果与结论: ①雷公藤甲素及甲基强的松龙组脊髓损伤后运动功能改善,神经细胞死亡减少;②雷公藤甲素处理后自噬相关蛋白 LC3B 上调, p62 降低,细胞凋亡相关蛋白 caspase-3 和 Bax 降低,抗凋亡蛋白 Bcl-2 升高;③结果表明,雷公藤甲素能促进脊髓损伤后运动功能恢复,其机制与促进自噬和抑制凋亡有关。结果提示雷公藤甲素可能对脊髓损伤具有潜在的神经保护作用。

关键词:

雷公藤甲素; 自噬; 凋亡; 脊髓损伤

中图分类号: R446; R496; R318

基金资助:

河北省卫生厅 2011 年医学科学研究重点项目计划(20110176), 项目负责人: 杨新明; 2013 年度河北北方学院创新人才培养基金项目(CXRC1322), 项目负责人: 杨新明

Triptolide improves spinal cord injury recovery via upregulation of autophagy and inhibition of apoptosis in Thy-yfp transgenic mice

Zhu Ning, Yang Xinming, Ruan Jianwei (First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies have shown that treatment with triptolide reduces ischemic lesion area, water content, and nerve cell death in a rat model of stroke. In addition, triptolide can promote the repair of spinal cord injury by inhibiting astrocyte hyperplasia, microglia activation and inflammatory response.

OBJECTIVE: To investigate the effect of triptolide on the autophagy and apoptosis in the spinal cord of Thy-YFP transgenic mice after spinal cord injury.

Zhu Ning, Master candidate, Physician, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

Corresponding author: Yang Xinming, MD, Professor, First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

METHODS: Sixty Thy-YFP transgenic mice were randomly divided into four groups: sham, dimethyl sulfoxide (DMSO), triptolide and methylprednisolone groups. Following the establishment of the spinal cord injury models, mice in the triptolide, DMSO and sham group were immediately intraperitoneally injected with triptolide (0.2 mg/kg·d) or 5% DMSO-normal saline solution (0.2 mg/kg·d) for 7 days, whereas mice in the methylprednisolone group were intraperitoneally injected with methylprednisolone (30 mg/kg) at 30 minutes, 6 hours and 24 hours after surgery. BMS score was used to detect the recovery of motor function; hematoxylin-eosin staining and Nissl staining were used to explore tissue recovery after spinal cord injury; western blot and immunofluorescence staining were employed to assess the levels of autophagy-associated proteins, Beclin-1, LC3B, p62, and apoptosis-associated proteins, Bcl-2, Bax and caspase-3. An ethic approval for animal experiments was obtained from Hebei North University with an approval No. W20200002.

RESULTS AND CONCLUSION: Treatments with triptolide or methylprednisolone after spinal cord injury significantly improved motor function and reduced neuronal cell death. In addition, autophagy-associated protein LC3B was upregulated and p62 downregulated following triptolide treatment, apoptosis-associated proteins caspase-3 and Bax were reduced, while anti-apoptosis protein Bcl-2 was increased after triptolide treatment. To conclude, triptolide improves the motor function after spinal cord injury, which is related to upregulation of autophagy and inhibition of apoptosis. Triptolide may be a potential neuroprotective agent for spinal cord injury.

Key words: triptolide; autophagy; apoptosis; spinal cord injury

Funding: 2011 Medical Science Research Key Project of Hebei Provincial Department of Health, No. 20110176 (to YXM); 2013 Innovative Talent Cultivation Foundation of Hebei North University, No. CXRC1322 (to YXM)

0 引言 Introduction

脊髓损伤是由于外伤、炎症、肿瘤等原因引起脊髓破坏而导致运动、感觉、括约肌和自主神经功能障碍的神经系统疾病,是临床常见损伤性疾病^[1]。因缺乏有效的治疗方式,病死率及致残率高。引起继发性损伤的主要原因包括局部缺血、兴奋毒性及氧化应激等,有研究表明脊髓损伤后大量神经细胞发生凋亡,因此明确减轻继发性损伤的有效疗法可以显著改善脊髓损伤后的恢复^[2]。

自噬是一种细胞的自我保护机制,通过自噬体-溶酶体途径降解和再循环受损细胞器、有毒物质、错误折叠蛋白质等,在维持细胞稳态方面具有重要作用。在脊髓的继发性损伤过程中,细胞自噬是重要环节,越来越多的研究发现自噬与脊髓损伤后的恢复密切相关,但至今尚未得到明确的结论^[3-4]。

雷公藤甲素从传统中药雷公藤中提取,具有抗炎、神经保护、抗肿瘤等药理作用。在脑卒中大鼠模型中,雷公藤甲素治疗减少了缺血性病变区域面积、水含量和神经细胞死亡^[5]。此外,雷公藤甲素通过抑制星形胶质细胞增生、小胶质细胞活化和抑制炎症反应促进脊髓损伤修复^[6]。甲基强的松龙是一种有争议的急性脊髓损伤药物。高剂量甲基强的松龙可能增加伤口感染、败血症、肺栓塞、胃肠道出血和死亡的风险^[7]。尽管高剂量甲基强的松龙的治疗仍存在争议,但在许多与脊髓损伤相关的试验表明甲基强的松龙具有神经保护作用^[8-9]。实验是在甲基强的松龙具有神经保护作用的相关研究基础上,探究雷公藤甲素与甲基强的松龙相比促进脊髓损伤恢复的疗效。

但雷公藤甲素通过调节自噬促进脊髓损伤恢复的相关研究尚未见报道。大剂量甲基强的松龙在大量脊髓损伤试验中显示出神经保护作用,在此用于评价雷公藤甲素的治疗效果^[9-11]。此次研究检测了雷公藤甲素对Thy-YFP转基因小鼠脊髓损伤后运动功能恢复的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学实验观察。

1.2 时间及地点 实验于2018年4月至2019年4月在浙江大学完成。

1.3 材料

1.3.1 动物 8-10周雌性Thy-YFP转基因小鼠60只,体质

量(20±2)g鼠由浙江大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(浙)2018-0006。Thy-YFP转基因小鼠运动神经元及感觉神经元高度表达黄色荧光。动物伦理获得河北北方学院批准(W20200002)。

1.3.2 试剂、药品及仪器设备 雷公藤甲素、甲基强的松龙(上海阿拉丁生物化学技术公司),二甲基亚砷(Sigma公司);抗体:GAPDH、LC3B、Beclin-1及caspase-3(Cell Signal Technology),p62(NOVUS),Bax(BOSTER),Bcl-2(Abcam),Dylight 649山羊抗兔IgG抗体(Earthox),山羊抗兔/抗小鼠IgG抗体(宝科);BCA试剂盒及RIPA裂解液(艾佳生物科技股份有限公司);蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂(ROCHE公司);化学发光成像仪及电泳仪(伯乐生命医学产品有限公司),水平高速离心机(赛默飞世尔科技中国有限公司),体式显微镜(美佳朗),共聚焦显微镜(日本尼康),NanoZoomer显微镜;ImageJ Pro PLUS 图像分析软件(美国Meyer Instruments 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物分组 将60只小鼠随机分成4组:假手术组,二甲基亚砷组,甲基强的松龙组和雷公藤甲素组。每组各15只小鼠,各组中随机选取6只用于行为学检测,3只进行组织学染色,3只进行免疫荧光分析,3只进行western blot分析。

1.4.2 脊髓损伤动物模型制备方法 实验采用右侧脊髓半切模型^[12]。含体积分数1.5%异氟烷的氧气麻醉小鼠,取俯卧位固定在手术台上。以T₁₂段背部正中为中心消毒并做切口,长30 mm,切开皮肤下组织,沿椎体逐层暴露至椎板,在T₁₂段水平行椎板切除术后暴露脊髓,使用显微外科剪横断右侧脊髓,然后选用11号刀片划过脊髓切口确保右侧脊髓彻底离断,最后逐层缝合皮肤并消毒。以上操作均在体式显微镜下进行,假手术组只进行椎板切除术,不损伤脊髓(图1A, B)。

YANG等^[5]探讨了雷公藤甲素(剂量为0.2 mg/kg)对大脑中动脉闭塞的神经保护作用,实验参照该剂量,雷公藤甲素组术后立即腹腔注射雷公藤甲素溶液[0.2 mg/(kg·d)],二甲基亚砷及假手术组小鼠术后立即腹腔注射等量5% 二甲基亚砷-生理盐水溶液,连续处理7 d;根据国家急性脊髓损伤研究(NASCIS)脊髓损伤后激素冲击治疗指南和以前报道的剂量给药,甲基强的松龙组小鼠在术后30 min, 6 h和

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	研究雷公藤甲素对 Thy-YFP 转基因小鼠脊髓损伤后细胞自噬和细胞凋亡的影响,探讨雷公藤甲素对脊髓损伤的保护作用及机制
借鉴已有标准实施动物造模:	参考文献[12]的方法采用右侧脊髓半切建立脊髓损伤模型
动物来源及品系:	Thy-YFP 转基因小鼠由浙江大学实验动物中心提供
造模技术描述:	麻醉小鼠后,以 T ₁₂ 段背部正中切开皮肤下组织,暴露至椎板,在 T ₁₂ 段水平椎板切除术后暴露脊髓,使用显微外科剪横断右侧脊髓
动物数量及分组方法:	将 60 只小鼠随机分成 4 组:假手术组 $n=15$; 二甲亚砜组 $n=15$; 甲基强的松龙组 $n=15$; 雷公藤甲素组 $n=15$
造模成功评价指标:	使用显微外科剪横断右侧脊髓,选用 11 号刀片划过脊髓切口确保右侧脊髓彻底离断
造模后实验观察指标:	①各组小鼠脊髓损伤后运动功能;②小鼠脊髓组织学观察;③免疫印迹及免疫荧光检测 LC3B、p62、Beclin-1、Bcl-2、caspase-3、Bax 的表达。
如何补充造模过程中缺失的动物:	造模失败或小鼠死亡 2 只,重新按实验要求选取小鼠,并按实验步骤操作进行了补充
造模后动物处理:	分别于术后第 0, 1, 3, 7, 14, 30 和 60 天,评估小鼠右侧后肢运动功能;术后第 7 天取材。麻醉小鼠,用手术剪及镊子快速剥取小鼠脊髓,待检测
伦理委员会批准:	动物伦理获得河北北方学院批准(W20200002)。

24 h 腹腔注射甲基强的松龙(30 mg/kg)^[5, 12]。术后每天膀胱按摩 2 次,直至小鼠自主排尿功能恢复,术后 3 d 给予青霉素 1 万 U/100 g/d 腹腔注射防止感染。除行为学检测的小鼠外,其余小鼠均在术后第 7 天取材,以损伤处为中心取直径约 0.5 cm 的脊髓组织用于后续实验(图 1C)。

1.4.3 行为学检测 分别于术后第 0, 1, 3, 7, 14, 30 和 60 天,将各组小鼠放置于空旷平面,采用 Basso Mouse Scale(BMS)评分评估脊髓损伤后小鼠右侧后肢运动功能的恢复情况[13]。无踝关节运动、后肢完全瘫痪为 0 分;轻微踝关节运动为 1 分;轻微躯干不稳定为 8 分和无运动功能障碍得分 9 分。所有实验均以双盲方式进行。

1.4.4 蛋白质提取和 western blot 检测 术后第 7 天取材。注射体积分数 5% 水合氯醛溶液麻醉小鼠,0.4 mL/20 g (20 μ L/g) 鼠质量,用手术剪及镊子快速剥取小鼠脊髓,取材范围如图 1 所示。高压灭菌研钵、研锤及镊子等实验用器具并干燥。将新鲜小鼠脊髓放入研钵,按照 500 μ L RIPA/0.05 g 脑组织的剂量加入约 500 μ L 裂解液(含 1% 蛋白酶抑制剂、1% 磷酸酶抑制剂),加入少量液氮,充分研磨至无大块颗粒,转入 1.5 mL 离心管,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 30 min,取上清至新的 1.5 mL 离心管。使用 BCA 试剂盒定量蛋白质浓度。取新的 1.5 mL 离心管,将各组蛋白浓度稀释为 2 g/L,然后按照比例加入蛋白上样缓冲液(5 $\times$ SDS Loading Buffer),充分混匀,100 $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min 使蛋白变性,短暂离心后-20 $^{\circ}$ C 保存。实验采用一步制胶法(购自弗德生物)配置。在 15% SDS-PAGE 凝胶上电泳,电压为 200 V,电泳时间为 70 min。将转膜槽放置在冰盒中,并倒入预冷的转移缓冲液,将蛋白转移至 PVDF 膜,转膜为恒流 300 mA,时间为 70 min

然后用 5% 脱脂奶粉封闭膜 3 h。孵育一抗,4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。次日回收一抗,并用 TBST 清洗条带 4 次,每次 5 min。孵育二抗(山羊抗兔/抗小鼠 IgG 抗体,1:5 000),室温摇床孵育 2.5 h。二抗孵育结束后,用 TBST 洗条带 4 次,每次 5 min。膜表面滴加超敏 ECL(Electro-Chemi-Luminescence)反应液后用 Bio-Rad 化学发光成像仪采集图像,并用 Image-Lab 软件分析图片。抗体: GAPDH(1:1 000); LC3B(1:1 000)、p62(1:1 000)、Beclin-1(1:1 000)、caspase 3(1:1 000)、Bax(1:500)、Bcl-2(1:1 000)、山羊抗兔/抗小鼠 IgG 抗体(1:5 000)。自噬相关蛋白 LC3II/LC3I 可表示自噬泡数目,Beclin-1 表达与自噬体活性相关,LC3B 表达水平降低同时 p62 升高通常被认为是自噬活性受到抑制。Caspase 3、Bax 表达升高,Bcl-2 表达降低通常被认为是凋亡激活。

1.4.5 免疫荧光检测 LC3B 及 caspase-3 小鼠麻醉后心脏灌注生理盐水直至流出液澄清,然后用 40 g/L 多聚甲醛进行灌注直至小鼠颈部强直、四肢及尾部僵硬。取材后浸泡于 40 g/L 多聚甲醛,48 h 后于浸泡于 30% 蔗糖溶液直至悬浮的组织沉底。脊髓组织用 OTC 包埋后,脊髓取冠状面切片,厚度为 15 μ m。冰冻切片在 37 $^{\circ}$ C 烘箱中加热 1 h,在破膜液中孵育 20 min,继而用 5% BCA 封闭 1.5 h,然后滴加一抗(LC3B /caspase-3 Rabbit mAb, 1:500)以及二抗(Dylight 649 山羊抗兔 IgG, 1:500)孵育。最后用含 DAPI 染液的封片剂封固,并通过尼康共聚焦显微镜观察脊髓前角区域。通过 Image J Pro PLUS 软件分析荧光表达情况。

1.4.6 组织学染色 术后 7 d,腹腔注射体积分数 5% 水合氯醛过量麻醉(20 μ L/g)鼠质量,心脏灌注后取材,40 g/L 多聚甲醛固定 24 h 后石蜡包埋。每个蜡块标本从损伤中心向头端、尾端方向分别各自连续切片 6 张,厚度为 7 μ m。每个标本蜡块共计切取 12 张,每 2 张连续的切片定为一组,共计 12 组;每组第 1 张为尼氏染色,第 2 张苏木精-伊红染色。

(1)尼氏染色:石蜡切片去石蜡化和再水合后,用 0.1% 甲酚紫溶液中染色。切片在蒸馏水中洗涤后浸入体积分数 95% 乙醇中 30 s,在无水乙醇,无水乙醇,二甲苯和二甲苯中各 5 min。最后用中性树脂封闭并在 NanoZoomer 显微镜下观察脊髓前角运动神经元。ImageJ Pro PLUS 软件计数两侧脊髓前角运动神经元数目。

(2)苏木精-伊红染色:石蜡切片去石蜡化和再水合后,用苏木精溶液染色 6 min,然后浸入 1% 酸性乙醇(1% HCl 的体积分数 70% 乙醇溶液)中几秒钟,继而在水中漂洗 10 min。将切片用伊红溶液染色 5 min,梯度脱水后二甲苯透明。最后用中性树脂封闭并在 NanoZoomer 显微镜下观察脊髓前角区域。

1.5 主要观察指标 ①各组小鼠脊髓损伤后运动功能;②小鼠脊髓组织学观察;③免疫印迹及免疫荧光检测 LC3B、p62、Beclin-1、Bcl-2、caspase-3、Bax 的表达。

1.6 统计学分析 使用 SPSS 进行统计分析。数据表示为 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 。组间差异比较采用 Fisher's LSD 单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用小鼠60只,实验过程死亡2只,重新按实验要求选取小鼠,并按实验步骤操作补充2只,进入结果分析60只。

2.2 雷公藤甲素促进脊髓损伤后运动功能 采用Basso Mouse Scale(BMS)评分评估术后不同时间点(0, 1, 3, 7, 14, 30和60d)各组小鼠脊髓损伤后的右后肢功能恢复情况(图2)。组内比较:假手术组小鼠在手术后显示正常功能(BMS评分为9);二甲基亚砷组、甲基强的松龙组及雷公藤甲素组损伤后不同时间点BMS评分均明显降低,随着时间延长,BMS评分逐渐升高,组内不同时间点比较差异有显著性意义(P 值均 < 0.001)。组间比较:二甲基亚砷,雷公藤甲素和甲基强的松龙组中的小鼠术后1天显示右下肢完全瘫痪(BMS评分为0)。术后第3天,甲基强的松龙组有少量小鼠能够进行轻微踝关节活动,但各组间BMS评分差异无显著性意义($P > 0.05$)。术后第7, 14, 30和60天,甲基强的松龙和雷公藤甲素组的BMS评分显著高于二甲基亚砷组(P 均 < 0.05),但甲基强的松龙组和雷公藤甲素组的小鼠之间评分差异无显著性意义(表1)。BMS评分结果提示,脊髓损伤后运动功能明显降低,肢体运动障碍明显;甲基强的松龙及雷公藤甲素治疗均有助于脊髓损伤后神经功能恢复。

表1 各组小鼠损伤前后 BMS 评分 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	假手术组	二甲基亚砷组	甲基强的松龙组	雷公藤甲素组	F 值	P 值
损伤前	9	9	9	9		
损伤后 1 d	9±0	0±0	0±0	0±0		
损伤后 3 d	9±0	0±0	0.17±0.17	0±0	2881.000	< 0.001
损伤后 7 d	9±0 ^c	0±0	0.67±0.33 ^a	0.67±0.21 ^a	473.095	< 0.001
损伤后 14 d	9±0 ^c	1.33±0.21	2.33±0.21 ^b	2.00±0.26 ^a	329.524	< 0.001
损伤后 30 d	9±0 ^c	2.50±0.22	4.50±0.22 ^c	4.00±0.36 ^c	134.286	< 0.001
损伤后 60 d	9±0 ^c	4.00±0.26	7.17±0.30 ^c	6.67±0.33 ^c	62.687	< 0.001
F 值		467.414	275.424	244.896		
P 值		< 0.001	< 0.001	< 0.001		

表注:一观察时间点的 Fisher's LSD 单因素方差分析,与二甲基亚砷组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.001$

2.3 雷公藤甲素促进脊髓损伤后组织恢复 苏木精-伊红染色和Nissl染色用于检测脊髓损伤后第7天各组间组织恢复情况。苏木精-伊红染色显示与假手术组相比,雷公藤甲素、甲基强的松龙和二甲基亚砷组小鼠脊髓组织结构紊乱。与二甲基亚砷组相比,甲基强的松龙组和雷公藤甲素组损伤脊髓组织区域结构改善。Nissl染色显示与假手术组相比,脊髓半切后小鼠脊髓前角运动神经元数量明显减少($P < 0.001$)。此外,与二甲基亚砷组相比,甲基强的松龙和雷公藤甲素治疗组小鼠的神经元数量显著增加($P < 0.01$)(图3A, B)。

2.4 雷公藤甲素促进脊髓损伤后自噬表达 为探究雷公藤甲素对脊髓损伤后自噬的影响,研究了自噬相关蛋白Beclin-1, LC3B和p62的表达。结果表明,雷公藤甲素和甲基强的松龙组的LC3B蛋白表达水平高于二甲基亚砷组($P < 0.01$),雷公藤甲素组的p62表达低于二甲基亚砷组($P <$

0.01);假手术组、二甲基亚砷组、雷公藤甲素组和甲基强的松龙组的Beclin-1表达水平差异无显著性意义($P > 0.05$)(图4A, B)。免疫荧光分析显示雷公藤甲素治疗组LC3B蛋白表达上调($P < 0.05$),该结果与免疫印迹实验结果一致,雷公藤甲素可能促进脊髓损伤后自噬表达(图4C, D)。

2.5 雷公藤甲素可降低脊髓损伤后细胞凋亡 与假手术组相比,二甲基亚砷组凋亡相关蛋白Bcl-2, caspase-3和Bax的表达增加。雷公藤甲素和甲基强的松龙治疗显著抑制Bax和caspase-3表达增加,同时促进脊髓损伤诱导的Bcl-2表达($P < 0.05$)(图5A, B)。在脊髓切片中进行caspase-3的免疫荧光染色,结果显示雷公藤甲素和甲基强的松龙组的caspase-3表达低于二甲基亚砷组($P < 0.05$)(图5C, D)。雷公藤甲素可能降低脊髓损伤后细胞凋亡。

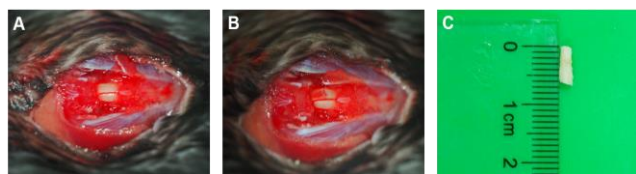
3 讨论 Discussion

急性脊髓损伤可引起细胞死亡、轴突损伤、促炎介质释放,进而加重组织损伤。继发性损伤的病理过程通常持续数天甚至数月,减轻继发性损伤是促进脊髓损伤恢复的有效方式。自噬和细胞凋亡是脊髓损伤后的重要病理生理过程,因此,调节自噬、凋亡可以潜在地改善运动功能恢复^[14-15]。

最近的研究表明雷公藤甲素在中枢神经系统疾病中可以通过调节自噬发挥神经保护作用。在帕金森氏病,雷公藤甲素通过上调自噬活性清除因代谢异常升高的 α 突触核蛋白^[16]。局灶性脑缺血大鼠中,雷公藤甲素可减少梗死面积,并通过适度上调自噬和减轻细胞凋亡,促进脑缺血后小鼠运动功能的恢复^[5]。这些结果表明,自噬参与了中枢神经系统疾病病理过程,且雷公藤甲素可能通过调节自噬起到神经保护作用。在此次研究中,发现雷公藤甲素和甲基强的松龙改善脊髓损伤后运动功能。作者进一步探讨雷公藤甲素的保护作用是否通过调控细胞自噬和凋亡介导的。

自噬对再生至关重要,许多研究表明,基础或生理自噬有助于维持细胞内稳态和蛋白质及亚细胞器的稳定,然而,自噬的异常增加可能导致细胞死亡。自噬在中枢神经系统损伤后可能增加或减少,取决于神经元损伤和应激的位置和严重程度。LC3参与自噬体形成,LC3 II/LC3 I可表示自噬泡数目。Beclin-1参与自噬前体结构形成,其表达与自噬体活性相关。P62是自噬降解的底物,也被广泛用作自噬通量的标记物。在大鼠创伤性脑损伤模型中的研究表明,自噬可以减少细胞损伤^[17]。此外,自噬的保护作用已在创伤脊髓损伤的实验模型中得到证实^[18-20]。此次研究发现,雷公藤甲素治疗组小鼠LC3B表达增加且p62表达降低,免疫荧光实验进一步证实了研究,在现有研究结果的基础上,作者认为在脊髓损伤中雷公藤甲素可能通过激活自噬发挥神经保护作用。

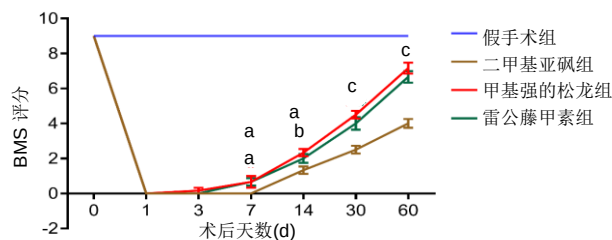
细胞凋亡是通过信号转导途径调节程序性细胞死亡的过程,BCL-2, Bax和caspase-3是凋亡途径的关键蛋白质。Bcl-2具有抗细胞凋亡作用,而Bax和caspase-3参与诱导和介导细胞凋亡^[21]。自噬与凋亡之间的关系复杂,尚未被阐明。首先,自噬可以通过处理受损细胞器例如线粒体,抑



图注: 图 A 为小鼠切除椎板, 暴露脊髓; B 为小鼠右侧脊髓半切损伤后; C 为造模 7 d 后小鼠脊髓取材范围

图 1 小鼠脊髓损伤模型制备

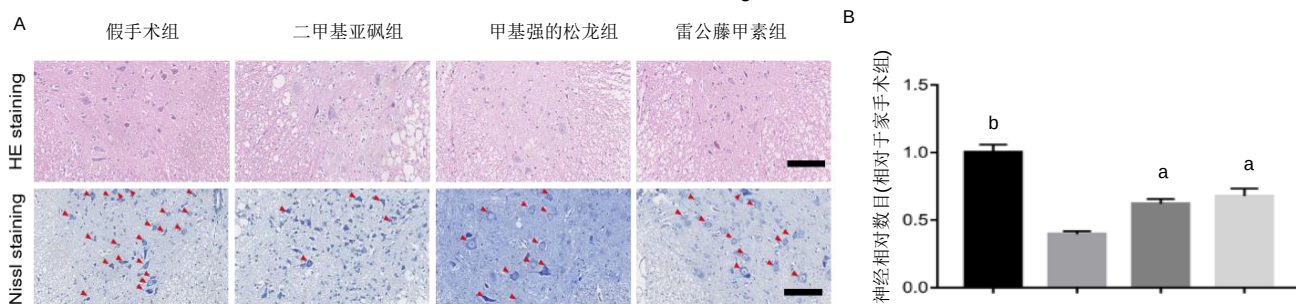
Figure 1 Preparation of a mouse model of spinal cord injury



图注: 与二甲亚砜组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.01$ ($X \pm SEM$, $n=6$)

图 2 各组小鼠运动功能恢复状态 BMS 评分

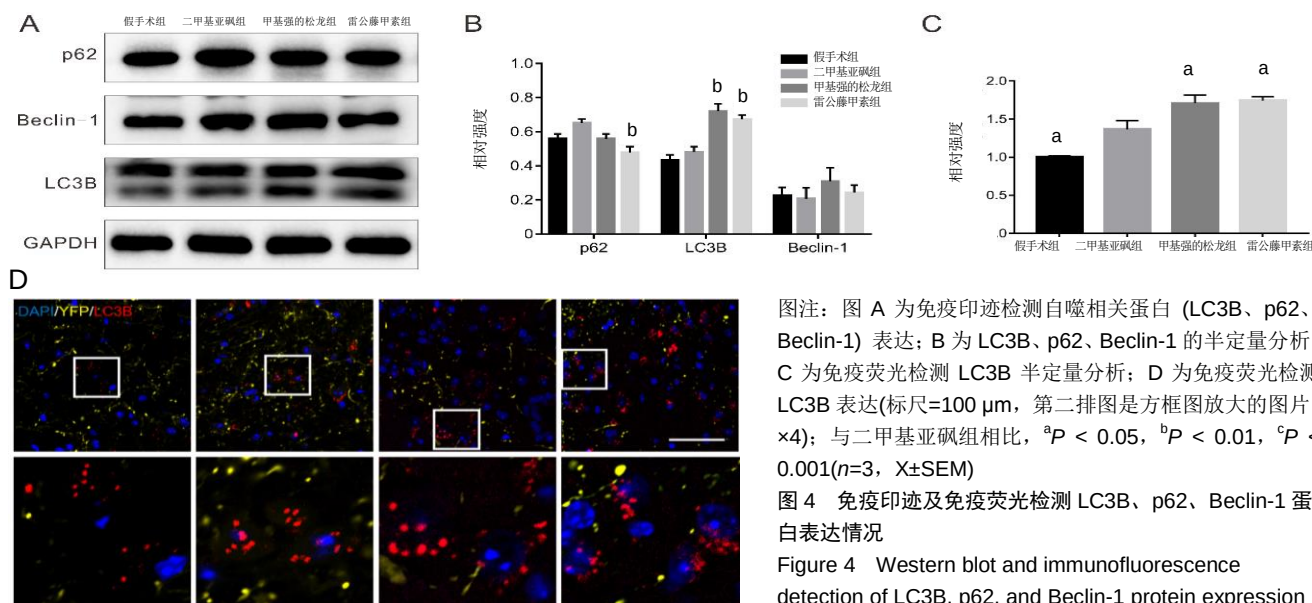
Figure 2 BMS score on the recovery of motor function of mice in each group



图注: 图 A 为苏木精-伊红染色和 Nissl 染色(红色箭头所指为脊髓前角运动神经元)($\times 20$); B 为 Nissl 染色测定脊髓前角运动神经元数目, 与二甲亚砜组相比, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ 。标尺=100 μm 。(n=3, $X \pm SEM$)

图 3 苏木精-伊红染色及尼氏染色观察脊髓损伤后组织恢复情况

Figure 3 Hematoxylin-eosin staining and Nissl staining to observe the tissue recovery after spinal cord injury



图注: 图 A 为免疫印迹检测自噬相关蛋白 (LC3B、p62、Beclin-1) 表达; B 为 LC3B、p62、Beclin-1 的半定量分析; C 为免疫荧光检测 LC3B 半定量分析; D 为免疫荧光检测 LC3B 表达(标尺=100 μm , 第二排图是方框图放大的图片, $\times 4$); 与二甲亚砜组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.001$ ($n=3$, $X \pm SEM$)

图 4 免疫印迹及免疫荧光检测 LC3B、p62、Beclin-1 蛋白表达情况

Figure 4 Western blot and immunofluorescence detection of LC3B, p62, and Beclin-1 protein expression

制细胞凋亡的激活进而抑制细胞凋亡的发生。其次, 自噬和凋亡之间存在一个复杂的信号分子网络, 如Bcl-2、p53和PTEN^[15]。激活自噬可保护神经元、减少丢失, 清除细胞内受损蛋白, 并通过抑制细胞凋亡促进神经功能的恢复, 而抑制自噬加剧神经元的凋亡, 引起小鼠神经变性^[22]。在这项研究中, 发现雷公藤甲素治疗组小鼠Bcl-2表达增加, Bax及caspase-3表达减少。综上所述, 雷公藤甲素可能促进脊髓损伤后自噬表达并抑制细胞凋亡。然而, 雷公藤甲素调节自噬及凋亡的相关机制有待深入研究。

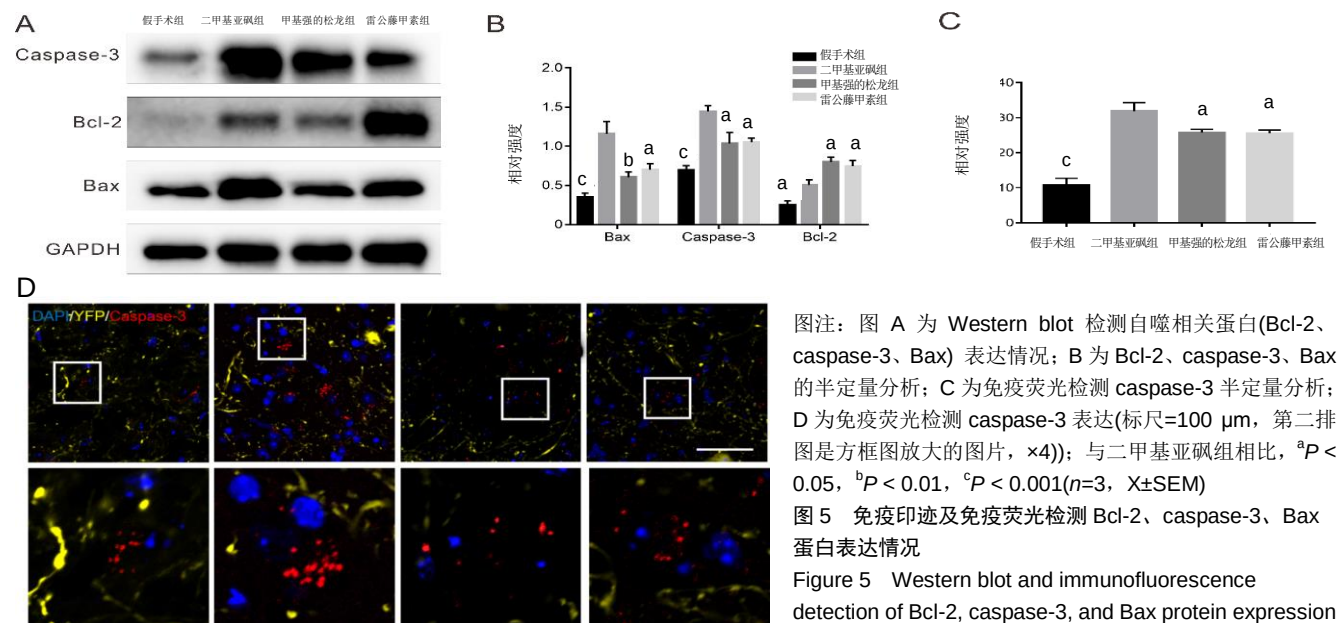
总之, 实验发现雷公藤甲素能通过上调自噬、抑制凋亡进而促进脊髓损伤后运动功能恢复。在今后的研究中,

打算探讨雷公藤甲素治疗在不同术后时期的时间效应, 也将利用Thy-YFP转基因小鼠自带黄色荧光的优势尝试使用活体成像技术来可视化小鼠脊髓轴突。

作者贡献: 朱宁进行试验实施、数据分析及成文, 课题设计、论文撰写、修改、文章润色、审校及试验评估为杨新明, 试验指导、资料收集为阮建伟。双盲评估。

经费支持: 该文章接受了“河北省卫生厅 2011 年医学科学研究重点项目计划(20110176)”“2013 年度河北北方学院创新人才培养基金项目(CXRC1322)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。



机构伦理问题: 动物伦理获得河北北方学院批准(W20200002)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] ZHOU J, HUO X, BOTCHWAY BOA, et al. Beneficial Effects of Resveratrol-Mediated Inhibition of the mTOR Pathway in Spinal Cord Injury. *Neural Plast.* 2018;2018:7513748.
- [2] GUO Y, WANG F, LI H, et al. Metformin Protects Against Spinal Cord Injury by Regulating Autophagy via the mTOR Signaling Pathway. *Neurochem Res.* 2018;43(5):1111-1117.
- [3] RONG Y, LIU W, LV C, et al. Neural stem cell small extracellular vesicle-based delivery of 14-3-3t reduces apoptosis and neuroinflammation following traumatic spinal cord injury by enhancing autophagy by targeting Beclin-1. *Aging (Albany NY).* 2019;11(18):7723-7745.
- [4] LI Y, JONES JW, MC CHOI H, et al. cPLA2 activation contributes to lysosomal defects leading to impairment of autophagy after spinal cord injury. *Cell Death Dis.* 2019;10(7):531.
- [5] LI W, YANG Y, HU Z, et al. Neuroprotective effects of DAHP and Triptolide in focal cerebral ischemia via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR pathway activation. *Front Neuroanat.* 2015;9:48.
- [6] SU Z, YUAN Y, CAO L, et al. Triptolide Promotes Spinal Cord Repair by Inhibiting Astroglial Inflammation. *Glia.* 2010;58(8):901-915.
- [7] SEIRA O, LIU J, ASSINCK P, et al. KIF2A characterization after spinal cord injury. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(21):4355-4368.
- [8] PIA M, VIDAL, ANTIGONA ULNDREAJ, ANNA BADNER, et al. Methylprednisolone treatment enhances early recovery following surgical decompression for degenerative cervical myelopathy without compromise to the systemic immune system. *Journal of Neuroinflammation.* 2018 15:222.
- [9] TANG P, ZHANG Y, CHEN C, et al. In Vivo Two-Photon Imaging of Axonal Dieback, Blood Flow and Calcium Influx with Methylprednisolone Therapy after Spinal Cord Injury. *Sci Rep.* 2015;5:9691.
- [10] DRUSCHEL C, SCHASER KD, SCHWAB JM. Current practice of methylprednisolone administration for acute spinal cord injury in Germany: a national survey. *Spine (Phila Pa 1976).* 2013;38(11):E669-E677.
- [11] LIN Y, LI C, LI J, et al. NEP1-40-modified human serum albumin nanoparticles enhance the therapeutic effect of methylprednisolone against spinal cord injury. *J Nanobiotechnology.* 2019;17(1):12.
- [12] TANG P, ZHANG Y, CHEN C, et al. In Vivo Two-Photon Imaging of Axonal Dieback, Blood Flow and Calcium Influx with Methylprednisolone Therapy after Spinal Cord Injury. *Sci Rep.* 2015;5:9691.
- [13] ALLAHDAI KJ, DE SANTANA TA, SANTOS GC, et al. IGF-1 overexpression improves mesenchymal stem cell survival and promotes neurological recovery after spinal cord injury. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):146.
- [14] SILVA NA, SOUSA N, REIS RL, et al. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol.* 2014;114:25-57.
- [15] WU J, LIPINSKI MM. Autophagy in Neurotrauma: Good, Bad, or Dysregulated. *Cells.* 2019;8(7): pii: E693.
- [16] HU G, GONG X, WANG L, et al. Triptolide Promotes the Clearance of alpha-Synuclein by Enhancing Autophagy in Neuronal Cells. *Mol Neurobiol.* 2017;54(3):2361-2372.
- [17] ERLICH S, SHOHAMI E, PINKAS-KRAMARSKI R. Neurodegeneration Induces Upregulation of Beclin 1. *Autophagy.* 2006;2(1):49-51.
- [18] RONG Y, LIU W, WANG J, et al. Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy. *Cell Death Dis.* 2019;10(5):340.
- [19] RONG Y, LIU W, LV C, et al. Neural stem cell small extracellular vesicle-based delivery of 14-3-3t reduces apoptosis and neuroinflammation following traumatic spinal cord injury by enhancing autophagy by targeting Beclin-1. *Aging (Albany NY).* 2019;11(18):7723-7745.
- [20] SARASWAT OHRI S, BANKSTON AN, MULLINS SA, et al. Blocking Autophagy in Oligodendrocytes Limits Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2018;38(26):5900-5912.
- [21] ZHAO H, CHEN S, GAO K, et al. Resveratrol protects against spinal cord injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the SIRT1/AMPK signaling pathway. *Neuroscience.* 2017;348:241-251.
- [22] LI Z, CHEN T, CAO Y, et al. Pros and Cons: Autophagy in Acute Spinal Cord Injury. *Neurosci Bull.* 2019;35(5):941-945.