

甜叶悬钩子苷对脊髓损伤小鼠运动功能障碍和神经炎症的改善作用及其机制

杨爽^{1,2}, 许娜³, 张剑旭¹, 孙成彪¹, 王燕¹, 董明鑫¹, 刘文森^{1,2}

(1. 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所, 吉林 长春 130117; 2. 延边大学医学院生理学病理生理学教研室, 吉林 延吉 133002; 3. 吉林医药学院, 吉林 吉林 132000)

[摘要] **目的:** 探讨甜叶悬钩子苷(RUB)对小鼠脊髓损伤(SCI)和神经炎症的影响, 并阐明其作用机制。**方法:** 将48只雌性昆明小鼠随机分为假手术组、SCI组、SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组, 每组12只; 采用脊髓损伤行为学(BBB)评分法评估SCI小鼠后肢运动功能, 脊髓组织含水量法检测SCI小鼠脊髓水肿情况, 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测各组小鼠促炎细胞因子环氧合酶2(COX-2)、白细胞介素1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) mRNA表达水平, ELISA法检测各组小鼠血清中炎症因子水平, HE染色观察各组小鼠脊髓组织病理形态学, 免疫荧光法检测各组小鼠脊髓组织中小胶质细胞活化情况, Western blotting法检测SCI小鼠脊髓组织中相关蛋白表达水平。**结果:** BBB评分, 与假手术组比较, SCI组小鼠评分低至0分; 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠BBB评分逐步升高。脊髓组织含水量法检测, 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织含水量明显升高($P<0.01$); 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织含水量明显降低($P<0.01$)。RT-qPCR法检测, 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中COX-2、IL-1 β 和TNF- α mRNA表达水平明显升高($P<0.001$); 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织中COX-2、IL-1 β 和TNF- α mRNA表达水平明显降低($P<0.001$)。ELISA法检测, 与假手术组比较, SCI组小鼠血清中IL-1 β ($P<0.01$)和TNF- α ($P<0.001$)水平升高; 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠血清中IL-1 β 和TNF- α 水平降低($P<0.001$); Western blotting法检测, 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中核因子 κ B(NF- κ B)抑制因子 α (I κ B- α)、磷酸化I κ B- α (p-I κ B- α)、磷酸化p65(p-p65)、p-65、磷酸化p38(p-p38)、磷酸化细胞外调节蛋白激酶(p-ERK)和磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)蛋白表达水平明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.001$); 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织中I κ B- α 、p-I κ B- α 、p-p65、p-65、p-p38、p-ERK和p-JNK蛋白表达水平明显降低($P<0.001$)。HE染色观察, 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中可见组织疏松, 有空泡形成, 脊髓中间有一较大的坏死空洞区域; 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓中央坏死空洞区域明显减小($P<0.05$)。免疫荧光法检测, 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中小胶质细胞阳性细胞数明显增加($P<0.001$); 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织中小胶质细胞阳性细胞数明显减少($P<0.001$)。**结论:** RUB可改善SCI小鼠运动功能障碍, 减轻脊髓组织神经炎症, 抑制小胶质细胞活化, 其机制可能与下调脊髓组织中NF- κ B和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关蛋白表达有关。

[关键词] 甜叶悬钩子苷; 脊髓损伤; 神经炎症; 核因子 κ B; 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R363.1 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2023-03-27

[基金项目] 吉林省教育厅科学研究项目(JJKH20210503KJ)

[作者简介] 杨爽(1997—), 女, 吉林省辽源市人, 医学硕士, 主要从事神经生理学方面的研究。

[通信作者] 刘文森, 研究员, 博士研究生导师(E-mail: liuws85952@163.com);

董明鑫, 助理研究员(E-mail: realdmx311@163.com)

Improvement effect of rubusoside on motor dysfunction and neuroinflammation in mice with spinal cord injury and its mechanism

YANG Shuang^{1,2}, XU Na³, ZHANG Jianxu¹, SUN Chengbiao¹, WANG Yan¹,
DONG Mingxin¹, LIU Wensen^{1,2}

(1. Military Veterinary Research Institute, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Changchun 130117, China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Medical Sciences, Yanbian University, Yanji 133002, China; 3. Jilin Medical College, Jilin 132000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of rubusoside (RUB) on the spinal cord injury (SCI) and neuroinflammation in the mice, and to clarify its mechanism. **Methods:** A total of 48 female Kunming mice were randomly divided into sham operation group, SCI group, SCI+low dose of RUB group, and SCI+high dose of RUB group, and there were 12 mice in each group. Spinal cord injury behavior (BBB) scoring method was used to assess the motor function of the hind limbs of the SCI mice; water content method was used to detect the spinal cord edema of the SCI mice; real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) method was used to detect the expression levels of pro-inflammatory cytokines cyclooxygenase-2 (COX-2), interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA of the mice in various groups; ELISA method was used to detect the levels of inflammatory factors in serum of the mice in various groups; HE staining was used to observe the pathomorphology of spinal cord tissue of the mice in various groups; immunofluorescence was used to detect the activation of microglia in spinal cord tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of related proteins in spinal cord tissue of the mice in various groups. **Results:** The BBB score analysis results showed that compared with sham operation group, the score of the mice in SCI group was decreased to 0; compared with SCI group, the BBB scores of the mice in SCI+low dose of RUB group and SCI+high dose of RUB group were gradually increased. The spinal cord tissue water content detection results showed that compared with sham operation group, the water content in spinal cord tissue of the mice in SCI group was significantly increased ($P<0.01$); compared with SCI group, the water contents in spinal cord tissue of the mice in SCI+ low dose of RUB group and SCI+ high dose of RUB group were significantly decreased ($P<0.01$). The RT-qPCR results showed that compared with sham operation group, the expression levels of COX-2, IL-1 β , and TNF- α mRNA in spinal cord tissue of the mice in SCI group were significantly increased ($P<0.001$). Compared with SCI group, the expression levels of COX-2, IL-1, and TNF- α mRNA in spinal cord tissue of the mice in SCI+ low dose of RUB group and SCI+ high dose of RUB group were significantly decreased ($P<0.001$). The ELISA results showed that compared with sham operation group, the levels of IL-1 β ($P<0.01$) and TNF- α ($P<0.001$) in serum of the mice in SCI group were increased; compared with SCI group, the levels of IL-1 β and TNF- α in spinal cord tissue of the mice in SCI+ low dose of RUB group and SCI+ high dose of RUB group were decreased ($P<0.001$). The Western blotting results showed that compared with sham operation group, the expression levels of nuclear factor kappa B (NF- κ B) inhibitor protein- α (I κ B- α), phosphorylated I κ B- α (p-I κ B- α), phosphorylated p65 (p-p65), p65, phosphorylated p38 (p-p38), phosphorylated extracellular regulated protein kinase (p-ERK), and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) proteins in spinal cord tissue of the mice in SCI group were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.001$); compared with

SCI group, the expression levels of I κ B- α , p-I κ B- α , p-p65, p65, p-p38, p-ERK, and p-JNK proteins in spinal cord tissue of the mice in SCI+ low dose of RUB group and SCI+ high dose of RUB group were significantly decreased ($P<0.001$). The HE staining results showed that compared with sham operation group, the spinal cord tissue of the mice in SCI group had loose organization with the formation of vacuoles, and a large necrotic cavity was present in the center of the spinal cord; compared with SCI group, the central necrotic cavity area of the mice in SCI+ low dose of RUB group and SCI+ high dose of RUB group was significantly decreased ($P<0.05$). The immunofluorescence results showed that compared with sham operation group, the number of positive microglia cells in spinal cord tissue of the mice in SCI group was significantly increased ($P<0.001$); compared with SCI group, the numbers of positive microglia cells in spinal cord tissue of the mice in SCI+ low dose of RUB group and SCI+ high dose of RUB group were significantly decreased ($P<0.001$). **Conclusion:** Rubusoside can improve the motor function impairment in the SCI mice, mitigate the neuroinflammation in spinal cord tissue, and inhibit the activation of microglia. The mechanism may be related to the downregulation of expression of proteins associated with the NF- κ B and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in spinal cord tissue.

KEYWORDS Rubusoside; Spinal cord injury; Neuroinflammation; Nuclear factor kappa-B; Mitogen-activated protein kinase

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 可导致不可逆的神经功能障碍^[1], 约90%的SCI患者将面临截瘫甚至四肢瘫痪^[2]。我国为SCI疾病的高发国家, 并且SCI发病率呈逐年快速上升趋势^[3]。根据病理过程, SCI可分为原发性SCI和继发性SCI^[4]。原发性SCI是瞬时的、不可逆的, 而继发性SCI由原发性SCI损伤的基础上发展, 其病理过程包括脱髓鞘、轴突和神经元坏死, 以及其他可逆的细胞组织损伤^[5]。研究^[6]显示: 继发期损伤阶段是关键的治疗时期, 可以通过实施神经保护治疗以阻止神经进一步坏死, 促进运动功能恢复。到目前为止, 尚无有效的临床治疗策略能够改善SCI引起的长期功能缺陷^[7]。因此, 探索有效的方法和药物将成为治疗SCI的研究重点。甜叶悬钩子苷 (rubusoside, RUB) 是从蔷薇科悬钩子属中分离提取出来的一种天然非营养型甜味剂, 具有丰富的药用价值^[8]。自1980年该物质被发现以来, 我国许多研究人员^[9-10]对其开展了比较完整的分子机制和药理活性等方面的分析, 明确RUB在抗氧化和糖尿病的辅助治疗方面具有较强功效。RUB可以正常化高脂饮食诱导的血糖代谢变化^[11], 还可以抑制血浆促炎细胞因子的释放, 包括肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6) 和单核细胞趋化蛋白1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1), 同时恢复脂联素的产生, 以增强宿主的整体健康^[11-12]。然而, RUB对SCI的神经保护作用尚未见相关报道。

本研究通过灌胃天然小分子药物RUB治疗SCI小鼠, 观察SCI小鼠神经炎症反应、小胶质细胞活化和核因子 κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路蛋白的表达情况, 以期对SCI的防治和药物研发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 48只8周龄雌性SPF级昆明小鼠购自辽宁长生生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (辽) 2022-0001; 在室温 ($24\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) 和相对湿度 ($50\%\pm 10\%$) 的条件下, 将小鼠饲养在通风良好的笼子中, 12h有规律的明暗循环, 并自由取食和饮水。RUB购自上海士锋生物科技有限公司, 实时荧光定量PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司, 内参 β -actin抗体和Anti-rabbit IgG购自美国Proteintech公司, NF- κ B抑制因子 α (NF- κ B inhibitor protein- α , I κ B- α) 抗体、磷酸化I κ B- α (p-I κ B- α) 抗体、磷酸化p65 (phosphorylated p65, p-p65) 抗体和离子钙接头蛋白分子1 (ionized calcium-binding adapter molecule-1, Iba-1) 抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 磷酸化p38 (phosphorylated p38, p-p38) 抗体、磷酸化细胞外调节蛋白激酶 (phosphorylated extracellular regulated protein kinase, p-ERK) 抗体和磷酸化c-Jun氨基末端激酶 (phosphorylated c-Jun

N-terminal kinase, p-JNK) 抗体购自美国 BD Bioscience 公司, 小鼠 TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购自深圳达科为生物技术有限公司, ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司; 石蜡切片机 (型号: LEICA RM2255, 北京长恒荣创公司), 紫外分光光度计 (型号: Nano Vue Plus, 美国 GE 公司), 荧光显微镜 (型号: IX-70, 日本 Olympus 公司), 多功能高端酶标仪 (型号: Infinite F500, 奥地利 TECAN 公司), 垂直电泳槽 (型号: 1658004, 美国 Bio-Rad 公司), 转膜仪 (型号: Power Blotter, 美国 Thermo Fisher 公司), 高端凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司), RT-qPCR 仪 (型号: QuantStudio3, 美国 Thermo Fisher 公司)。

1.2 小鼠 SCI 模型的制备、动物分组及处理 采用改良的 Allen's 法^[13-14] 制备小鼠 SCI 模型, 腹腔注射水合氯醛 (1.5 mL·kg⁻¹) 麻醉小鼠, 用有齿镊子夹持小鼠尾巴根部, 若无明显反应, 开始手术。使用干净无菌的手术器械钝性剥离暴露脊髓组织; 使用眼科镊子轻轻夹住暴露出来的脊髓 30 s, 此过程可见小鼠出现身体痉挛扭动、双下肢回缩、尾部摇动; 随后进行分层缝合伤口并用碘伏消毒; 为避免感染, 术后使用无菌垫料, 做好日常消毒工作。随机选取 36 只建模成功小鼠分为 SCI 组、SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组, 每组 12 只。另取 12 只小鼠仅暴露 T9 脊髓, 不对脊髓进行破坏, 作为假手术组。建模成功后 SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组在 SCI 小鼠灌胃给予 30 和 90 mg·kg⁻¹ RUB, 此后每日 2 次, 直至第 14 天。

1.3 脊髓损伤行为学 (Basso-Beattie-Breanahan, BBB) 评分法^[14] 检查各组小鼠运动功能 采用 BBB 评分法检测各组小鼠的运动恢复情况, 以确定从损伤初期到后期运动功能的恢复和差异变化 (评分越高, 运动功能恢复越好)。分别于脊髓损伤后即刻, 第 1、3、5、7 和 14 天进行 BBB 评分, 评分范围为 0~21 分。

1.4 各组小鼠脊髓组织含水量测定 使用过量水合氯醛腹腔注射法统一处死各组小鼠。沿手术切口暴露 T9 脊髓, 以 T9 脊髓为中心, 取上下脊髓组织各 0.5 cm, 置于电子天平称取湿重; 将脊髓组织放入 70℃ 的烘箱, 连续烘烤处理 2~3 d (夜转 37℃) 后再次称质量, 即为干重。脊髓组织含水

量 = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.5 RT-qPCR 法检测各组小鼠脊髓组织中环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α) mRNA 表达水平 收集各组小鼠脊髓组织, 检测脊髓组织中促炎细胞因子 COX-2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平, 利用总 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA 并逆转录为 cDNA 作为反应模板。以 SYBR Green 作为检测信号, 向反应体系加入相应的扩增引物 (表 1), 采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各组小鼠脊髓组织中 COX-2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

| Name | Primer sequence |
|----------------|--------------------------------|
| IL-1 β | 5'-CTTCAGGCAGGCAGTATC-3' |
| | 5'-CAGCAGGTTATCATCATCATC-3' |
| TNF- α | 5'-GTGGAAGCTGGCAGAAGAG-3' |
| | 5'-TAGACAGAAGAGCGTGGT-3' |
| COX-2 | 5'-GAACTGTAGCACAGCACAGGAAAT-3' |
| | 5'-CGTACCGGATGAGCTGTGAAT-3' |
| β -actin | 5'-AACAGTCCGCCTAGAAGCAC-3' |
| | 5'-CGTTGACATTAAGACC-3' |

1.6 ELISA 法检测各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平 将各组小鼠眼球取血, 3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 提取血清, 用超纯水将待测样品 4 倍稀释, 分别加入检测抗体和显色剂, 终止反应后 15 min 内在 450 nm 处检测各孔吸光度 (A) 值, 绘制标准曲线, 计算待测样品中 TNF- α 和 IL-1 β 水平。

1.7 HE 染色检测各组小鼠脊髓组织病理形态表现 收集各组小鼠脊髓组织, 进行 HE 染色。4% 多聚甲醛固定后进行脱水, 石蜡包埋后于前索 2~3 mm 连续切片, 切片厚度 6 μ m, 用于 HE 染色。光学显微镜下观察脊髓组织的形态结构并拍照。

1.8 免疫荧光法检测各组小鼠脊髓组织中 Iba-1 蛋白阳性表达强度 收集各组小鼠脊髓组织, 进行荧光染色。4% 多聚甲醛固定后进行脱水, 石蜡包埋后于前索 2~3 mm 连续切片, 切片厚度 8 μ m, 用于荧光染色。使用 1% BSA 室温下封闭 1 h, Iba-1 一抗 (1:500), 4℃ 过夜, 二抗 (1:300), 室温

孵育 90 min, DAPI 室温避光 10~15 min。不同试剂孵育前用 PBS 缓冲液清洗 3 次。封片后使用共聚焦荧光成像系统观察小胶质细胞活化情况, 使用 Image J 软件进行荧光强度分析。

1.9 Western blotting 法检测各组小鼠脊髓组织中 NF- κ B 和 MAPK 通路相关蛋白表达水平 使用全蛋白提取试剂盒抽提各组细胞总蛋白, BCA 法进行蛋白浓度定量, 加入 1 \times SDS-PAGE loading buffer, 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min 使蛋白变性, 按照 80 μ g 蛋白上样量进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜。使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜, 二抗室温孵育 1 h 后, 进行 ECL 显影。采用 Image J 软件分析条带灰度值并计算 p-I κ B- α 、I κ B- α 、p-p65、p65、p-p38、p-ERK1 和 p-JNK 蛋白的表达水平。抗体溶液使用 PBST 溶液稀释, 具体稀释比例: p-I κ B- α (1:1 000)、I κ B- α (1:1 000)、p-p65 (1:1 000)、p65 (1:1 000)、p-p38 (1:5 000)、p-ERK1 (1:1 000)、p-JNK (1:250)、 β -actin (1:2 000) 和二抗 (1:5 000)。

1.10 统计学分析 采用 Graphpad Prism 9.0 统计软件进行统计学分析。各组小鼠脊髓组织含水量, 各组小鼠脊髓组织中 COX-2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平, 各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平, 各组小鼠脊髓组织中 Iba-1 蛋白荧光强度, 各组小鼠脊髓组织中 I κ B- α 、p-I κ B- α 、p65、p-p65、p-p38、p-ERK 和 p-JNK 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠 BBB 评分 在术后即刻, 第 1、3、5、7 和 14 天分别对假手术组、SCI 组、SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组小鼠进行 BBB 评分, SCI 组小鼠 BBB 评分降到 0 分, 术后第 1 天开始, SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组小鼠的 BBB 评分开始高于 SCI 组, 并且随着时间的推移, 这种优势越来越明显 (图 1)。

2.2 各组小鼠脊髓组织含水量 与假手术组比较, SCI 组小鼠脊髓组织出现明显水肿, 加剧组织炎症损伤。术后第 7 天, SCI 组小鼠脊髓组织含水量明显高于假手术组 ($P<0.01$), 而 SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组小鼠的脊髓组织含水量较 SCI 组明显降低 ($P<0.01$) (图 2)。

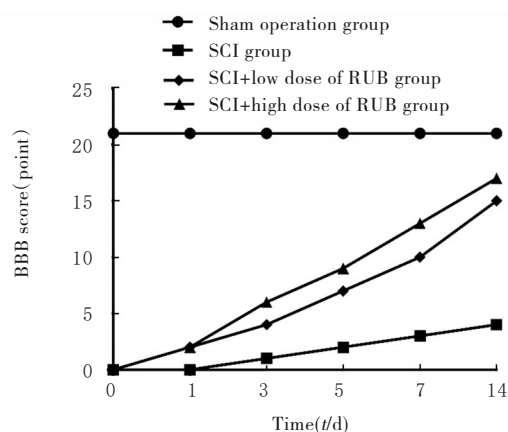
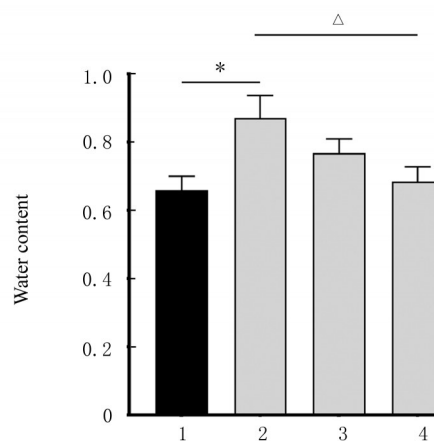


图 1 各组小鼠 BBB 评分

Fig. 1 BBB scores of mice in various groups



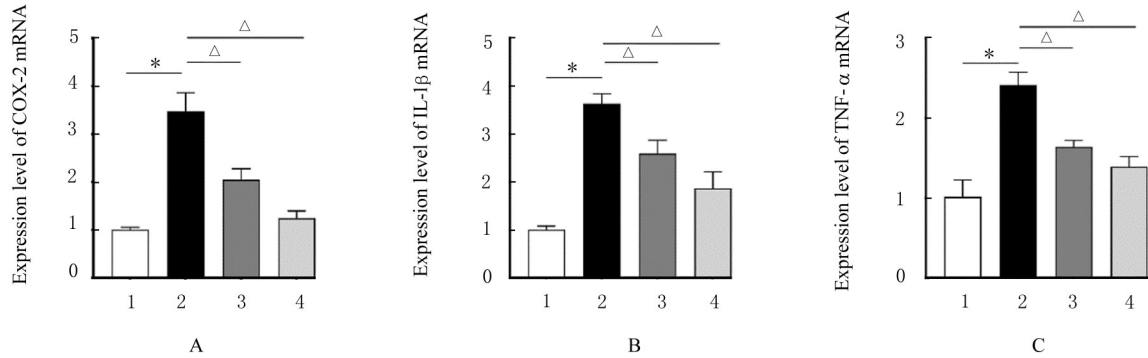
1: Sham operation group; 2: SCI group; 3: SCI+low dose of RUB group; 4: SCI+high dose of RUB group. * $P<0.01$ vs sham operation group; $^{\Delta}P<0.01$ vs SCI group.

图 2 各组小鼠脊髓组织含水量

Fig. 2 Water contents of spinal cord of mice in various groups

2.3 各组小鼠脊髓组织中 COX-2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平 与假手术组比较, SCI 组小鼠脊髓组织中 COX-2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.001$); 与 SCI 组比较, SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组小鼠脊髓组织中 COX-2、IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.001$) (图 3)。

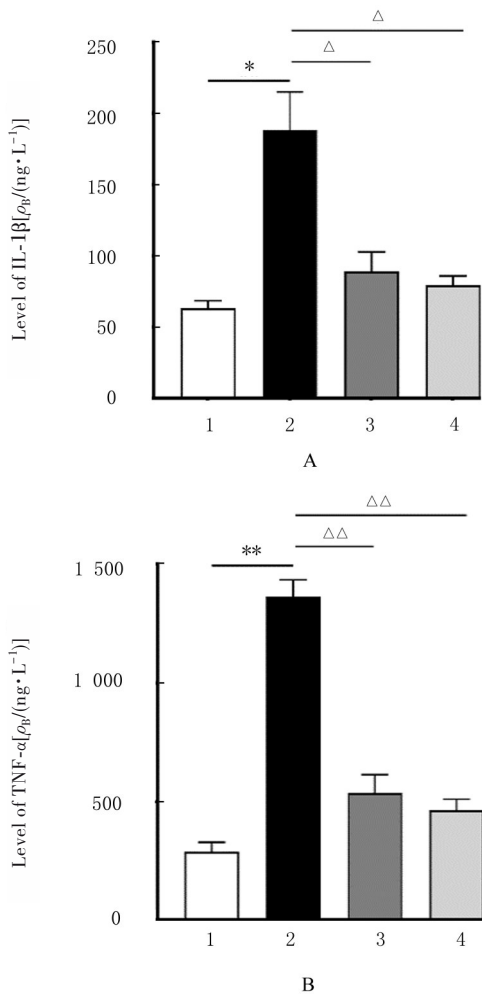
2.4 各组小鼠血清中 TNF- α 和 IL-1 β 水平 与假手术组比较, SCI 组小鼠血清中 IL-1 β ($P<0.01$) 和 TNF- α ($P<0.001$) 水平升高; 与 SCI 组比较, SCI+低剂量 RUB 组和 SCI+高剂量 RUB 组小鼠血清中 IL-1 β ($P<0.01$) 和 TNF- α ($P<0.001$) 水平降低 (图 4)。



1:Sham operation group;2:SCI group;3:SCI+low dose of RUB group;4:SCI+high dose of RUB operation group.* $P<0.001$ vs sham operation group;^Δ $P<0.01$ vs SCI group.

图3 各组小鼠脊髓组织中COX-2、IL-1β和TNF-α mRNA表达水平

Fig. 3 Expression levels of COX-2, IL-1β, and TNF-α mRNA in spinal cord tissue of mice in various groups



1:Sham operation group;2:SCI group;3:SCI+low dose of RUB group;4:SCI+high dose of RUB group.* $P<0.01$,** $P<0.001$ vs sham operation group;^Δ $P<0.01$,^{ΔΔ} $P<0.001$ vs SCI group.

图4 各组小鼠血清中IL-1β(A)和TNF-α(B)水平

Fig. 4 Levels of IL-1β and TNF-α in serum of mice in various groups

2.5 各组小鼠脊髓组织病理形态表现 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织出现明显的坏死区, 组织松散, 伴有大量炎性细胞浸润; 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织脊髓坏死区域减小, 炎性细胞浸润情况得到改善(图5)。

2.6 各组小鼠脊髓组织中Iba-1蛋白荧光强度 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中Iba-1蛋白荧光强度明显增强($P<0.001$); 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织中Iba-1蛋白荧光强度明显降低($P<0.001$)(图6和7)。

2.7 各组小鼠脊髓组织中IκB-α、p-IκB-α、p65、p-p65、p-p38、p-ERK和p-JNK蛋白表达水平 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中p-IκB-α($P<0.05$)和p-p65($P<0.001$)蛋白表达水平升高, 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织中p-IκB-α($P<0.05$)和p-p65($P<0.001$)蛋白表达水平降低; 与假手术组比较, SCI组小鼠脊髓组织中p-p38($P<0.001$)、p-ERK($P<0.001$)和p-JNK($P<0.001$)蛋白表达水平升高; 与SCI组比较, SCI+低剂量RUB组和SCI+高剂量RUB组小鼠脊髓组织中p-p38($P<0.001$)、p-ERK($P<0.05$ 或 $P<0.001$)和p-JNK($P<0.001$)蛋白表达水平降低(图8和9)。

3 讨论

SCI后神经功能遭到破坏, 神经功能难以自发恢复, 主要归因于中枢神经系统的再生能力非常有限^[15]。此外, 病变部位的感染和炎症反应会

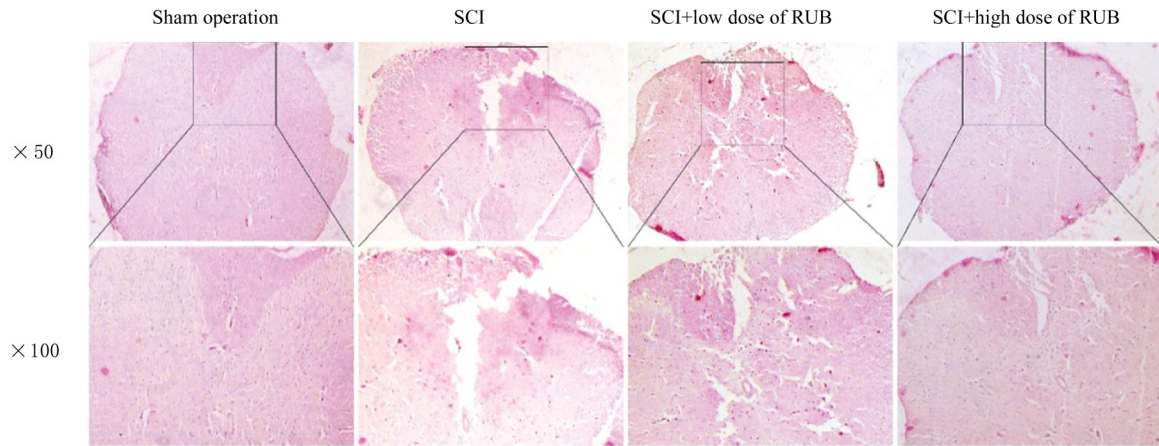
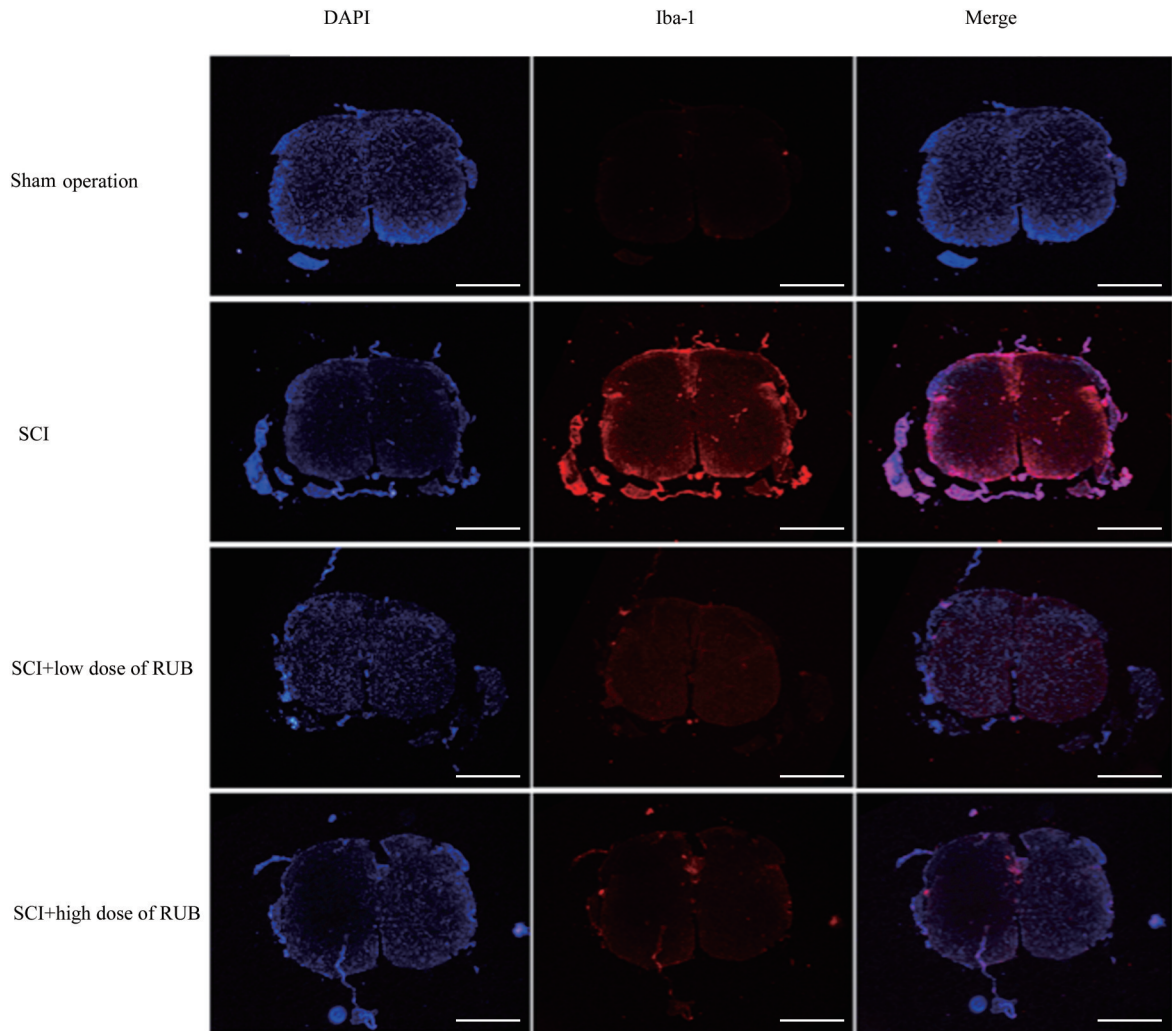


图5 HE染色观察各组小鼠脊髓组织病理形态表现

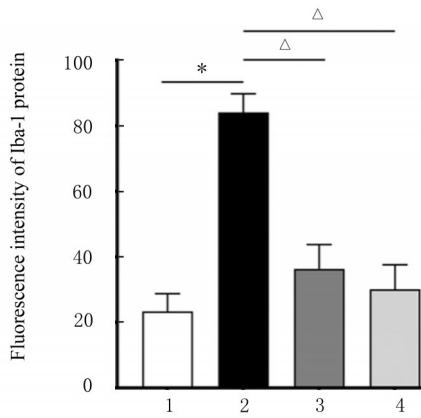
Fig. 5 Pathomorphology of spinal cord tissue of mice in various groups observed by HE staining



Red:Iba-1 protein.

图6 各组小鼠Iba-1蛋白荧光强度(Bar=50 μm)

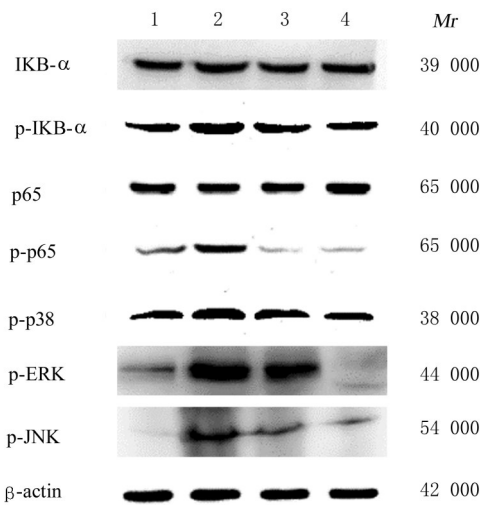
Fig.6 Fluorescence intensity of Iba-1 protein in mice in various groups(Bar=50 μm)



1:Sham operation group;2:SCI group;3:SCI+low dose of RUB group;4:SCI+high dose of RUB group.* $P < 0.001$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.001$ vs SCI group.

图7 各组小鼠Iba-1蛋白荧光强度

Fig. 7 Fluorescence intensity of Iba-1 protein in mice in various groups



Lane 1:Sham operation group;Lane 2:SCI group;Lane 3:SCI+low dose of RUB group;Lane 4:SCI+high dose of RUB group.

图8 各组小鼠脊髓组织中IκB-α、p-IκB-α、p65、p-p65、p-p38、p-ERK和p-JNK蛋白表达电泳图

Fig. 8 Electrophoresis of expressions of IκB-α, p-IκB-α, p65, p-p65, p-p38, p-ERK, and p-JNK proteins in spinal cord tissue of mice in various groups

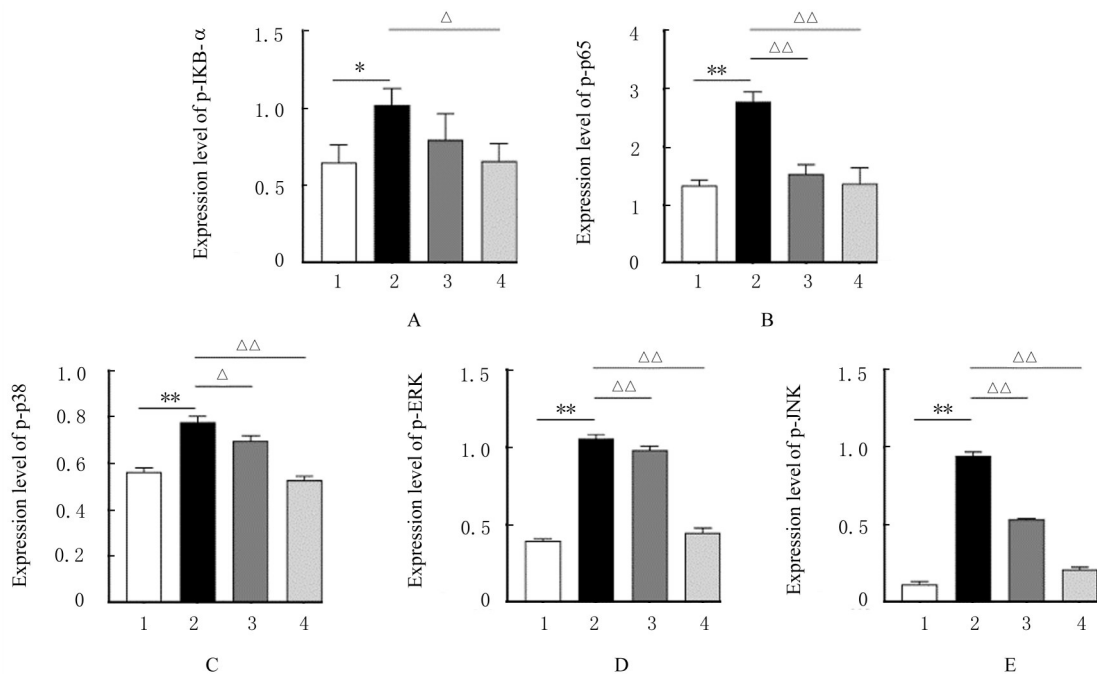
导致损伤部位的微环境恶化加剧神经损害, 并可能导致严重的并发症和永久性残疾^[16]。因此, 阐明SCI的发病机制并寻找有效的治疗药物尤为迫切。

研究^[17-18]显示: SCI导致的神经炎症可能会长期连续性存在, 甚至伴随患者余生, 特别是神经炎症驱动的过度活化的小胶质细胞会加重SCI进展。

生理情况下, 中枢神经系统小胶质细胞免疫活性较低, 细胞因子分泌较少, 但这种稳态表型并不阻碍其改变胞质的运动性, 从而对微环境进行持续的监测, 这使得小胶质细胞能够对微环境的变化做出快速反应^[19]。研究^[20]表明: 在SCI后3 h, 活化的小胶质细胞清除坏死神经元和细胞碎片。这些细胞由谷氨酸和反应性物质激活, 促进一系列促炎细胞因子的表达, 如基质金属蛋白酶12 (matrix metalloproteinase-12, MMP-12)、IL-1β、TNF-α和NF-κB等, 以募集外周免疫细胞迁移到病变部位。本课题组前期研究^[21-22]结果显示: RUB能够减轻LPS诱导的BV-2小胶质细胞神经炎症。因此, 根据本课题组的前期研究^[21-22]工作和相关报道, 本研究通过实验动物体内实验探讨RUB对SCI小鼠神经炎症及运动功能恢复情况的影响, 并对其相关机制进行研究。

WANG等^[23]研究显示: 黄连可以通过抑制NF-κB和MAPK信号通路的活化, 减轻LPS诱导的氧化应激和炎症损伤。YUAN等^[24]研究显示: 柴胡皂苷A具有明显的抗炎作用, 可抑制细胞因子COX-2和TNF-α的表达, 并具有免疫调节和神经调节活性。由于NF-κB和MAPK信号通路在调控炎症反应、氧化应激和细胞凋亡方面发挥重要作用, NF-κB和MAPK信号通路的激活有助于SCI后神经炎症驱动的胶质细胞破坏及神经元凋亡, 从而加重SCI进展^[25-27]。通过免疫荧光法观察到SCI小鼠脊髓组织中Iba1蛋白表达水平升高, 小胶质细胞被活化, 且炎症因子分泌量增加。因此, 本文作者推测活化的小胶质细胞会促进炎症因子释放, 活化NF-κB和MAPK信号通路, 进一步促进炎症因子基因的转录, 从而形成一个正反馈环, 引发严重的神经炎症损伤, 导致小鼠运动功能难以恢复。然而, RUB灌胃可改善SCI小鼠后肢运动功能, 减轻脊髓组织水肿情况, 抑制小胶质细胞的过度活化, 并观察到NF-κB和MAPK信号通路的活化被抑制。上述结果表明: RUB可能阻断了小胶质细胞活化NF-κB/MAPK正反馈环, 从而抑制炎症因子的释放, 减轻神经炎症。

综上所述, RUB通过抑制NF-κB和MAPK信号通路抑制小胶质细胞活化, 减轻SCI引发的神经炎症并改善小鼠运动功能。因此, 本文作者推测RUB可能对SCI具有一定的治疗效果, 在临床应用方面, 具有潜在应用价值, 仍需要深入探索。



1:Sham operation group;2:SCI group;3:SCI+low dose of RUB group;4:SCI+high dose of RUB group.* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.001$ vs SCI group.

图9 各组小鼠脊髓组织中p-IκB-α(A)、p-p65(B)、p-p38(C)、p-ERK(D)和p-JNK(E)蛋白表达水平

Fig. 9 Expression levels of p-IκB-α(A), p-p65(B), p-p38(C), p-ERK(D), and p-JNK(E) proteins in spinal cord tissue of mice in various groups

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

杨爽负责论文设计、撰写和修改,许娜、张剑旭、孙成彪和王燕负责实验数据的获取及分析,董明鑫和刘文森负责实验设计。

[参考文献]

- [1] XIA M J, ZHANG Y N, WU H H, et al. Forsythoside B attenuates neuro-inflammation and neuronal apoptosis by inhibition of NF-κB and p38-MAPK signaling pathways through activating Nrf2 post spinal cord injury[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109120.
- [2] XU S, WANG J, ZHONG J J, et al. CD73 alleviates GSDMD-mediated microglia pyroptosis in spinal cord injury through PI3K/AKT/Foxo1 signaling [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(1): e269.
- [3] MI J Y, YANG Y, YAO H, et al. Inhibition of heat shock protein family A member 8 attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury via astrocyte NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway: HSPA8 inhibition protects spinal ischemia-reperfusion injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 170.
- [4] CHEN K Y, LU C S, PANG C Y, et al. Equilibrative nucleoside transporter 1 is a target to modulate neuroinflammation and improve functional recovery in mice with spinal cord injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(1): 369-381.
- [5] CHEN K Z, LIU S X, LI Y W, et al. Vimentin as a potential target for diverse nervous system diseases[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(5): 969-975.
- [6] 邵明昊, 靳明明, 周萍, 等. CD73通过AMPK/mTOR信号通路调控脊髓损伤机制研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(19): 2357-2360.
- [7] DUTTA D, KHAN N, WU J F, et al. Extracellular vesicles as an emerging frontier in spinal cord injury pathobiology and therapy [J]. *Trends Neurosci*, 2021, 44(6): 492-506.
- [8] MAO Y P, CHEN Z, REN Y H, et al. Whole-cell biocatalyst for rubusoside production in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Agric Food Chem*, 2021, 69(44): 13155-13163.
- [9] ZHANG F, KOH G Y, HOLLINGSWORTH J, et al. Reformulation of etoposide with solubility-enhancing rubusoside[J]. *Int J Pharm*, 2012, 434(1/2): 453-459.
- [10] CHEN J Z, KHISTE S K, FU X M, et al. Rubusoside-assisted solubilization of poorly soluble C(6)-Ceramide

- for a pilot pharmacokinetic study [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2020, 146: 106402.
- [11] ZIPSER C M, CRAGG J J, GUEST J D, et al. Cell-based and stem-cell-based treatments for spinal cord injury: evidence from clinical trials [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(7): 659-670.
- [12] ZHANG H, QI R L, ZENG Y H, et al. Chinese sweet leaf tea (*Rubus suavissimus*) mitigates LPS-induced low-grade chronic inflammation and reduces the risk of metabolic disorders in a C57BL/6J mouse model [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(1): 138-146.
- [13] HU X, ZHANG Y F, WANG L, et al. Microglial activation in the motor cortex mediated NLRP3-related neuroinflammation and neuronal damage following spinal cord injury [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 956079.
- [14] JIANG F, XIA M J, ZHANG Y N, et al. Cannabinoid receptor-2 attenuates neuroinflammation by promoting autophagy-mediated degradation of the NLRP3 inflammasome post spinal cord injury [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 993168.
- [15] CHANG J, QIAN Z Y, WANG B Y, et al. Transplantation of A2 type astrocytes promotes neural repair and remyelination after spinal cord injury [J]. *Cell Commun Signal*, 2023, 21(1): 37.
- [16] ZHAO X N, LI X X, GUO H L, et al. Resolvin D1 attenuates mechanical allodynia after burn injury: involvement of spinal glia, p38 mitogen-activated protein kinase, and brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B signaling [J]. *Mol Pain*, 2023, 19: 17448069231159970.
- [17] 刘冬, 朱志杰, 张昭, 等. 脊髓损伤中坏死性凋亡关键基因的筛选与验证 [J]. *解放军医学杂志*: 1-14 [2023-11-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1056.R.20231023.1334.002.html>.
- [18] SUN Q Y, HU T T, ZHANG Y R, et al. IRG1/itaconate increases IL-10 release to alleviate mechanical and thermal hypersensitivity in mice after nerve injury [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1012442.
- [19] LIAO C L, ZHOU H, CHEN H J, et al. DUSP8/TAK1 signaling mediates neuropathic pain through regulating neuroinflammation and neuron death in a spinal nerve ligation (SNL) rat model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109284.
- [20] HONG X, XIA M J, ZHANG Q Y, et al. Deficiency of CD93 exacerbates inflammation-induced activation and migration of BV2 microglia by regulating the TAK1/NF- κ B pathway [J]. *Neurosci Lett*, 2022, 791: 136914.
- [21] YIN X Y, WANG C C, DU P, et al. Muse cells decrease the neuroinflammatory response by modulating the proportion of M1 and M2 microglia *in vitro* [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(1): 213-218.
- [22] ZHANG X Q, ZHANG Q, HUANG L L, et al. Pien-Tze-Huang attenuates neuroinflammation in cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats through the TLR4/NF- κ B/MAPK pathway [J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 828-839.
- [23] WANG J, RAN Q, ZENG H R, et al. Cellular stress response mechanisms of *Rhizoma coptidis*: a systematic review [J]. *Chin Med*, 2018, 13: 27.
- [24] YUAN B C, YANG R, MA Y S, et al. A systematic review of the active saikosaponins and extracts isolated from *Radix Bupleuri* and their applications [J]. *Pharm Biol*, 2017, 55(1): 620-635.
- [25] KIM J K, YANG H J, GO Y. *Quercus acuta* thub suppresses LPS-induced neuroinflammation in BV2 microglial cells via regulating MAPK/NF- κ B and Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(10): 1851.
- [26] KIM O H, JEON K O, JANG E Y. Alpha-pyrrolidinopentiothiophenone (α -PVT) activates the TLR-NF- κ B-MAPK signaling pathway and proinflammatory cytokine production and induces behavioral sensitization in mice [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2022, 221: 173484.
- [27] GUO L, LI Y Y, LI W N, et al. Shikonin ameliorates oxidative stress and neuroinflammation via the Akt/ERK/JNK/NF- κ B signalling pathways in a model of Parkinson's disease [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2022, 49(11): 1221-1231.