

# 基于 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路考察木瓜提取物对脊髓损伤大鼠的保护作用

杨彬, 黄俊卿\*, 张继伟  
(河南省中医院, 郑州 450000)

**[摘要]** **目的:**探讨木瓜醇提取物对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)大鼠神经功能的保护作用,并初步探讨其可能机制。**方法:**制备 SCI 大鼠模型,根据处理方式分为假手术组(Sham 组),模型组(SCI 组),木瓜提取物治疗组(Pap 组);重组高迁移率族蛋白 B<sub>1</sub>(high mobility group histone B<sub>1</sub>, HMGB<sub>1</sub>)处理组(rHMGB<sub>1</sub> 组);重组 HMGB<sub>1</sub> + 木瓜提取物处理组(rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组)。应用 basso beattie bresnahan(BBB)评分评估大鼠后肢运动功能;检测脊髓组织含水量评估脊髓水肿情况;应用苏木素-伊红(HE)染色进行组织学评估;运用酶联免疫吸附检测白细胞介素-1 $\beta$ (interleuki-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ),白细胞介素-6(interleuki-6, IL-6)水平;原位末端转移酶标记法(TUNEL)检测脊髓组织细胞凋亡情况;应用免疫组织化学和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测组织中 HMGB<sub>1</sub>, Toll 样受体 4(Toll-like receptors 4, TLR4),核转录因子  $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) p65 蛋白表达情况;Western blot 检测半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3 蛋白;应用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 表达情况。**结果:**与 Sham 组比较,SCI 组大鼠 BBB 评分明显降低( $P < 0.05$ )。SCI 组和 rHMGB<sub>1</sub> 组脊髓组织松散,呈现嗜中性粒细胞浸润的组织学损伤;而 Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组中组织学损伤情况得到明显改善。与 Sham 组比较,SCI 组大鼠脊髓组织含水量, HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达水平, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平, 凋亡阳性细胞数, Caspase-3 蛋白表达水平均明显增加( $P < 0.05$ )。Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组含水量, HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达水平, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平, 凋亡阳性细胞数, Caspase-3 蛋白表达水平均明显低于 SCI 组( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组含水量, HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达水平, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平, 凋亡阳性细胞数, Caspase-3 蛋白表达水平明显低于 rHMGB<sub>1</sub> 组, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论:**木瓜提取物能够通过抑制 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B p65 信号通路活化,减轻 SCI 后的炎症反应、减少脊髓组织细胞凋亡,从而诱导脊髓组织修复和运动功能恢复。

**[关键词]** 木瓜提取物; 脊髓损伤; 高迁移率组蛋白 B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>); Toll 样受体 4; 转录因子- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0167-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181330

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.1320.028.html>

**[网络出版时间]** 2018-04-12 17:50

## Chaenomeles Fructus Extracts Protects Spinal Cord Injury in Rats by Regulating HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway

YANG Bin, HUANG Jun-qing\*, ZHANG Ji-wei

(Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect of Chaenomeles Fructus extracts on neurological function in rats with spinal cord injury (SCI), and explore its possible mechanism. **Method:** SCI rat model was prepared and was divided into sham operation group (Sham group), model group (SCI group), Chaenomeles

**[收稿日期]** 20180105(010)

**[基金项目]** 河南省医学科技攻关计划项目(201503093)

**[第一作者]** 杨彬, 硕士, 主治医师, 从事脊柱相关疾病的基础与临床研究, E-mail: yangbin19791002@sina.com

**[通信作者]** \* 黄俊卿, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事脊柱相关疾病的基础与临床研究, E-mail: 13939003396@139.com

Fructus alcohol extracts treatment group (Pap group), recombinant high mobility group histone B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>) treatment group (rHMGB<sub>1</sub> group), and recombinant HMGB1 + Chaenomelis Fructus extracts treatment group (rHMGB<sub>1</sub> + Pap group) according to the treatment methods. Rat hindlimb motor function was evaluated by Basso Beattie Bresnahan (BBB) score; water content in spinal cord tissue was detected to assess the spinal cord edema; Histological evaluation was performed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Terminal dextrynucleotidyl transferase (TdT) -mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of spinal cord cells. The protein expression levels of HMGB<sub>1</sub>, Toll-like receptors 4 (TLR4) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 were detected by immunohistochemistry and Western blot, and their mRNA expression levels were detected by real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Cysteine aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) was detected by Western blot. **Result:** As compared with the Sham group, the BBB score of the SCI group was significantly lower ( $P < 0.05$ ); spinal cord tissue was loose in SCI group and rHMGB<sub>1</sub> group, showing histological damage of neutrophil infiltration; and histological damage was significantly improved in Pap group and rHMGB<sub>1</sub> + Pap group. As compared with Sham group, the water content in spinal cord tissue, mRNA and protein expression levels of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein, and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels, count of apoptosis-positive cells, and Caspase-3 protein expression level were significantly increased in SCI group ( $P < 0.05$ ). The water content in spinal cord tissue, mRNA and protein expression levels of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein, and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels, count of apoptosis-positive cells, and Caspase-3 protein expression level in Pap and rHMGB<sub>1</sub> + Pap group were significantly lower than the SCI group ( $P < 0.05$ ). The water content in spinal cord tissue, mRNA and protein expression levels of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA and protein, and IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  levels, count of apoptotic-positive cells and Caspase-3 protein expression level in rHMGB<sub>1</sub> + Pap group were significantly lower than those in rHMGB<sub>1</sub> group, with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Chaenomelis Fructus extracts can induce spinal cord tissue repair and motor function recovery by inhibiting the activation of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 signaling pathway, reducing the inflammatory response after SCI and reducing the apoptosis of spinal cord tissue.

[ **Key words** ] Chaenomelis Fructus extracts; spinal cord injury; high mobility group histone B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>); Toll-like receptor 4; transcription factor- $\kappa$ B

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种严重的神经系统损伤,其发病率、致残率极高,且常伴多种并发症,可导致身体运动、感觉及自主神经功能障碍,严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。药物、手术和高压氧干预在一定程度上能够缓解 SCI 损伤,使其副作用和继发性损伤仍然对 SCI 患者产生巨大影响<sup>[2]</sup>。SCI 后引起的继发性损伤可导致组织出血、水肿、细胞凋亡、免疫炎症等级联反应进一步扩大,因此,探究新的治疗方式以有效地抑制继发性损伤,对 SCI 的治疗具有重要意义。炎症反应在继发性 SCI 中扮演重要角色,过度炎症反应能够阻碍神经修复和再生<sup>[3]</sup>。减轻 SCI 后的早期炎症反应,具有神经保护和促进功能恢复的作用<sup>[4]</sup>。木瓜是蔷薇科植物贴梗海棠的果实,作为传统中药,有平肝舒筋、和胃化湿的功效,主治风湿痹痛、肢体酸痛、水肿、痢疾等。现代药理学研究发现,木瓜主要含有黄酮、萜类、有

机酸类、维生素、氨基酸等多种化合物,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤、抗氧化等多种药理和生物学作用<sup>[5]</sup>。有研究显示,野木瓜注射液及其提取物能够有效促进离体培养的小鼠脊髓神经元氧化受损的修复,同时对提高神经元存活率及胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活力也具有显著的作用<sup>[6]</sup>。但是关于木瓜提取物在 SCI 中的作用尚未见报道。本研究重点分析木瓜提取物对 SCI 大鼠神经功能的保护作用及其可能机制,为木瓜提取物的开发利用提供一定理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级成年雄性 SD 大鼠,购自北京生命科学研究所以,许可证号 SYXK(京)2015-0002,体质量 280 ~ 320 g,8 ~ 10 周龄。本实验经本院伦理委员会批准进行,动物伦理委员会编号 IACUC-04 (20160523)。

**1.2 药物及试剂** 木瓜购自湖北长阳资丘木瓜基地,经河南省中医院制剂室主管药师李轩鉴定为蔷薇科植物贴梗海棠 *Chaenomeles speciosa* 的干燥近成熟果实。重组高迁移率族蛋白 B<sub>1</sub> (HMGB<sub>1</sub>) 蛋白(美国 Abcam 公司,批号 ab167718);水合氯醛(美国 Sigma 公司,批号 47335);总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 PA115-03);PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白浓度测定试剂盒(美国 Solarbio 公司,批号 PC0030);IP 细胞裂解液(碧云天生物技术研究所,货号 P0013);HMGB<sub>1</sub>, Toll 样受体 4 (Toll-like receptors, TLR4), 核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) p65, 半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体及内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 H9539, SAB130, SAB4502609, BS2605, G8795);白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-6 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒(上海沪震实业有限公司,批号均为 hz-0011c)。

**1.3 仪器** RM2235 型石蜡切片机(德国莱卡公司);T100 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);CKX53 型荧光显微镜及成像系统(日本 Olympus 公司);ELx800 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Experion 型蛋白印迹电泳系统(美国 Bio-Rad 公司);L5S 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);DYCP-31DN 型水平电泳系统(北京六一仪器厂);Light Cycler® 96 型实时荧光定量 PCR 仪(瑞士罗氏公司)。

## 2 方法

**2.1 木瓜有效成分的提取及处理** 木瓜提取物采用醇提方式制备,粉碎木瓜,置于烧瓶中,加入 10 倍量 75% 乙醇,浸泡后 2 h 后,加热回流提取 3 次,每次 2 h,冷却后经 100 目滤布过滤,合并提取液。将提取液减压回收乙醇,挥尽乙醇并水浴浓缩。取浓缩液,以正丁醇-浓缩液(1:2)进行正丁醇萃取,萃取 3 次。合并萃取液,经浓缩、干燥后得到木瓜提取物后,得率 10.58%,采用高效液相色谱(HPLC)分析木瓜醇提取物成分。

**2.2 SCI 模型制备** 采用改良的 Allen's 法<sup>[7]</sup>制作 SCI 模型。大鼠腹腔内注射 10% 水合氯醛溶液(3 mL·kg<sup>-1</sup>)麻醉后俯卧位于木板上,于 T10 脊椎区域周围制作约 5 cm 中背切口,依次取出椎旁肌肉,T10 棘突和椎板,暴露下方硬膜。以损伤力度 25 g·cm(10 g×2.5 cm)行重物打击法,致伤后迅速

移开打击物,逐层缝合。模型成功判定标准,脊髓组织水肿、出血,硬膜呈紫色但仍完整;大鼠出现摆尾反射、双侧下肢收缩、后肢痉挛性摆动;清醒后大鼠双侧下肢呈弛缓性瘫痪,即为造模成功。假手术动物仅切除椎板暴露 T10 脊椎区域,脊髓无损伤。清醒后,将大鼠置于单个饲养笼中饲养,环境温度为 21~24℃,湿度为 40%~50%,自由饮水、进食。术后即刻腹腔注射青霉素 8×10<sup>4</sup> U,1 次/d,持续 3~4 d。术后膀胱按摩再次辅助排尿。

**2.3 动物分组及干预方法** 将 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 8 只。假手术组(Sham 组)仅切除椎板,无 SCI,腹腔注射生理盐水;模型组(SCI 组)SCI 后,自损伤平面下 0.5 cm 处,腹腔注射生理盐水;木瓜提取物治疗组(Pap 组)致 SCI 15 min 后,腹腔注射木瓜提取物,根据参考文献[8],选择剂量为 300 mg·kg<sup>-1</sup>;重组 HMGB<sub>1</sub> 处理组(rHMGB<sub>1</sub> 组)SCI 15 min 后,腹腔注射重组 HMGB<sub>1</sub> 8 μg·kg<sup>-1</sup>;重组 HMGB<sub>1</sub> + 木瓜提取物处理组(rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组)SCI 15 min 后,腹腔注射重组 HMGB<sub>1</sub> 8 μg·kg<sup>-1</sup>,间隔 15 min 后,腹腔注射木瓜提取物 300 mg·kg<sup>-1</sup>。

**2.4 运动功能评估** 采用 BBB(Basso, Beattie 和 Bresnahan)评分法进行行为评估。采用双人双盲法,术后 24,48,72 h 对各组大鼠进行 BBB 评分,评分系统包括后肢各关节活动、后肢步态和协调功能、运动时爪子的精细动作,每只大鼠观察时间为 4 min。正常大鼠术前 BBB 评分为 21 分,全瘫大鼠为 0 分。

**2.5 标本采集** SCI 72 h 后,大鼠腹腔注射过量 10% 水合氯醛(6 mL·g<sup>-1</sup>)麻醉后,迅速取出脊髓节段,一部分脊髓组织作为水肿检测标本,直接进行测量;一部分脊髓组织于 4℃ 12 000×g 离心 10 min 分离样品,置于 -80℃ 保存,拟进行酶联免疫吸附测定;一部分脊髓组织置于 -80℃ 保存,拟用于实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹检测;一部分脊髓组织经磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤后,于 4% 多聚甲醛中固定、脱钙、脱水、透明、浸蜡及包埋,行免疫组织化学检测。

**2.6 脊髓组织含水量检测** 分离的脊髓组织立即称重,获得标本湿重值后,将标本置于 80℃ 烤箱中 24 h 后称得干重值,脊髓组织水肿程度根据公式计算。

$$\text{含水量} = (1 - \text{干重}/\text{湿重}) \times 100\%$$

**2.7 苏木素-伊红(HE)染色观察脊髓组织学变化** 将脊髓组织切片(4 μm)用二甲苯脱蜡,梯度乙醇

水合,行常规 HE 染色后,于显微镜下观察组织学变化,并进行定性分析。

**2.8 ELISA 检测 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 水平** 根据 ELISA 试剂盒说明书,检测脊髓组织匀浆中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 水平。将每孔中加入 100  $\mu$ L 样本稀释液,再加入对照品或样品 100  $\mu$ L,所有样品和对照品均一式两份,于 450 nm 处测量吸光度 *A*。根据标准曲线计算样品中各分析物浓度。脊髓组织中 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 的水平。

**2.9 免疫组化检测脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达** 将脊髓组织切片(4  $\mu$ m)用二甲苯脱蜡,梯度乙醇水合。将样品在 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠(pH 6.0)中孵育 20 min,3% 过氧化氢中孵育 10 min,10% 正常山羊血清中孵育 30 min。使用 HMGB<sub>1</sub> (1:200), TLR4 (1:200), NF- $\kappa$ B p65 (1:500)的一抗将切片在 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 PBS 孵育的切片作为阴性对照。将切片与生物素化的二抗孵育 30 min,然后用链霉亲和素过氧化物酶孵育 15 min。每个孵育步骤均在 37  $^{\circ}$ C 下进行,然后用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。除去 PBS,加入 DAB 溶液 100  $\mu$ L,于显微镜下观察,直到显色。自来水冲洗后,用苏木精进行复染,氨水反蓝后用自来水冲洗。最后,将切片在乙醇中脱水并在二甲苯中透明。于光学显微镜( $\times$ 400)对阳性细胞采用 Image-Pro-Plus 软件分析图片,用积分吸光度(*IA*)表示。

**2.10 原位末端转移酶标记(TUNEL)法检测细胞凋亡** 按照一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行脊髓组织中的细胞凋亡检测。切片脱蜡,经蛋白酶 K 于 37  $^{\circ}$ C 下行抗原恢复 15 min, PBS 洗涤后,加入 TUNEL 检测液 50  $\mu$ L 避光孵育 60 min 后, PBS 洗涤。抗荧光猝灭剂封片后,于荧光显微镜下观察,计数每个脊髓横切面的阳性细胞总数。

**2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65, Caspase-3 蛋白表达** 使用补充有 PMSF 的 RIPA 蛋白提取试剂从组织中提取蛋白质。4  $^{\circ}$ C 下 12 000  $\times$  *g* 离心 10 min, 10% SDS-PAGE 分离上清液,将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。将膜在 PBS 和 5% 脱脂乳中封闭 1 h,并用 HMGB<sub>1</sub> (1:100), TLR4 (1:100), NF- $\kappa$ B p65 (1:200), Caspase-3 (1:100)和内参对照 GAPDH (1:200) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。将膜用 HRP 缀合的二抗在室温下孵育 1 h。使用 Quantity One 软件评估相对蛋白表达水平蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

**2.12 Real-time PCR 检测 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B**

p65 mRNA 的表达 使用 trizol 试剂从组织中提取总 RNA。使用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 试剂盒进行实时 PCR 分析。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)作为内参。利用 ABI7500 系统进行 Real-time PCR 反应。用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法计算 mRNA 相对表达水平。反应条件为 95  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环。引物设计见表 1。

表 1 引物序列

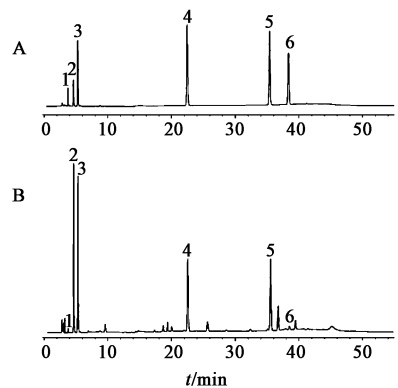
Table 1 Primer sequence

引物名称	引物序列 5'-3'	片段长度 /bp
HMGB <sub>1</sub>	上游 GCCCTAGCACCATCTGAAAT	181
	下游 GTGCAGGGTCCGAGG	
TLR4	上游 CTCGCCAGATATACGAATGG	140
	下游 GCCGAGCTGTTGCTGTCA	
NF- $\kappa$ B p65	上游 GCACTCGAGACCATGAATTTT CAACAGAGGCTGCA	153
	下游 GCTTCTAGATCAGAGCTTGTGA GAATTTCTG	
$\beta$ -actin	上游 TGTTTGAGACCTTGAACACCC	116
	下游 AGGAAGGCTGGAAGACTGC	

**2.13 统计学分析** 本研究所有数据均采用统计学软件 SPSS 21.0 进行分析,计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  进行描述,两组间比较行 *t* 检验,多组间比较行 *F* 检验,采用双变量相关分析法进行相关性分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 木瓜提取物主要成分** 经 HPLC 分析发现,木瓜提取物的主要成分为奎尼酸、苹果酸、莽草酸、原儿茶酸、绿原酸、咖啡酸等,见图 1。



A. 混合对照品; B. 木瓜提取物; 1. 奎尼酸; 2. 苹果酸; 3. 莽草酸; 4. 原儿茶酸; 5. 绿原酸; 6. 咖啡酸

图 1 木瓜醇提取物的 HPLC

Fig.1 HPLC chart of Chaenomeles Fructus alcohol extract

**3.2 对大鼠 BBB 评分的影响** 与 Sham 组比较, SCI 组大鼠 BBB 评分明显降低 ( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> 组大鼠 BBB 评分明显低于 SCI 组 ( $P <$

0.05), Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组明显高于 SCI 组, 且 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组明显高于 rHMGB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 木瓜提取物对 SCI 大鼠 BBB 评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of Chaenomelis Fructus extracts on BBB score in SCI rats after operation ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
Sham	-	19.11 ± 1.03	20.12 ± 1.01	20.10 ± 1.02
SCI	-	3.13 ± 0.34 <sup>1)</sup>	3.35 ± 0.68 <sup>1)</sup>	3.29 ± 0.73 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	2.04 ± 0.33 <sup>2)</sup>	2.17 ± 0.24 <sup>2)</sup>	2.25 ± 0.36 <sup>2)</sup>
Pap	300	8.41 ± 1.06 <sup>2,3)</sup>	10.12 ± 1.58 <sup>2,3)</sup>	12.17 ± 2.16 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	6.19 ± 1.24 <sup>2,3,4)</sup>	7.13 ± 1.18 <sup>2,3,4)</sup>	8.20 ± 2.01 <sup>2,3,4)</sup>

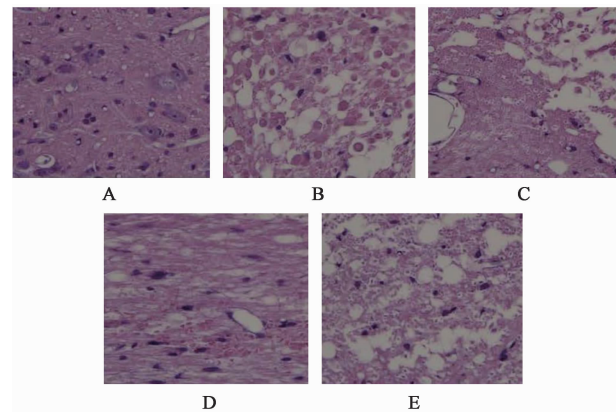
注:与 Sham 组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与 SCI 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 rHMGB<sub>1</sub> 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与 Pap 组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ (表 3~8 同)。

**3.3 对 SCI 大鼠脊髓组织病理学的影响** HE 染色发现,SCI 组和 rHMGB<sub>1</sub> 组脊髓组织松散,呈现嗜中性粒细胞浸润的组织学损伤;而 Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组中组织学损伤情况得到明显改善。见图 2。

表 3 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中含水量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of Chaenomelis Fructus extracts on water content of spinal cord tissue in SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	含水量/%
Sham	-	78.23 ± 1.08
SCI	-	94.76 ± 1.57 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	96.31 ± 1.19 <sup>2)</sup>
Pap	300	80.14 ± 1.73 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	82.05 ± 1.32 <sup>2,3,4)</sup>



A. Sham 组; B. SCI 组; C. rHMGB<sub>1</sub> 组; D. Pap 组; E. rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 (图 3~6 同)

图 2 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织病理学的影响 (HE, ×400)  
Fig. 2 Effect of Chaenomelis Fructus extracts on spinal cord tissue of SCI rats (HE, ×400)

**3.4 对 SCI 大鼠脊髓组织中含水量的影响** 与 Sham 组比较,SCI 组大鼠脊髓组织中含水量明显增加 ( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> 组含水量明显高于 SCI 组 ( $P < 0.05$ )。Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组含水量均明显低于 SCI 组,且 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组含水量明显低于 rHMGB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

p65 阳性细胞数均有所减少。Western blot 和 Real-time PCR 分析显示,与 Sham 组比较,SCI 组大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达水平均明显增加 ( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> 组 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 mRNA 和蛋白表达水平明显高于 SCI 组 ( $P < 0.05$ )。Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 mRNA 和蛋白表达水平均明显低于 SCI 组,且 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 mRNA 和蛋白表达水平明显低于 rHMGB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )。见图 3,4 及表 4,5。

**3.5 木瓜提取物抑制 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路活化** 免疫组化结果显示,与 Sham 组比较,SCI 组,rHMGB<sub>1</sub> 组大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 阳性细胞数均有所增加;与 SCI 组比较, Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B

**3.6 对 SCI 大鼠脊髓组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平的影响** 与 Sham 组比较,SCI 组大鼠脊髓组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平均明显增加 ( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> 组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平明显高于 SCI 组 ( $P < 0.05$ )。Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平均明显低于 SCI 组,且 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平明显低于 rHMGB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

**3.7 对 SCI 大鼠脊髓组织中细胞凋亡的影响** Sham 组仅显示很少的凋亡阳性细胞数。与 Sham 组比较,SCI 组大鼠脊髓组织中凋亡阳性细胞数明显

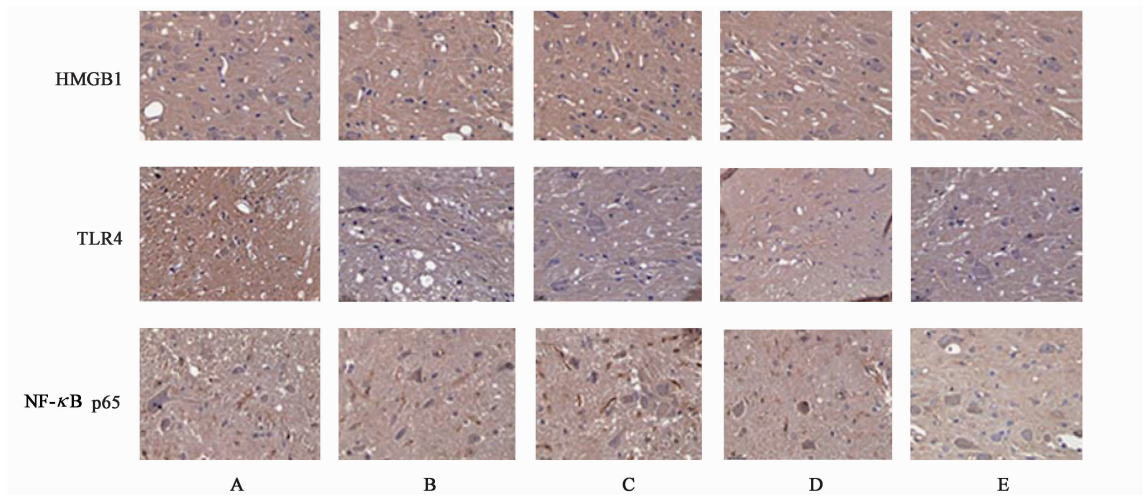


图 3 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB p65 蛋白表达免疫组织的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Chaenomelis Fructus extracts on expression of HMGB<sub>1</sub>, TLR4 and NF-κB p65 protein in SCI rats (IHC, ×400)

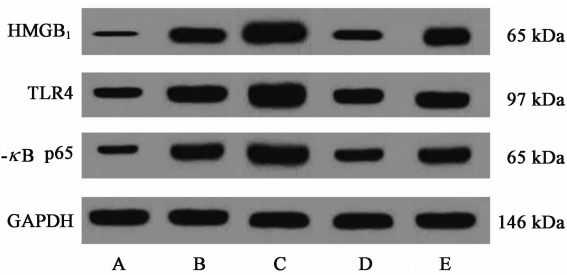


图 4 各组大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB p65 蛋白的表达  
Fig. 4 Expression of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB p65 protein in spinal cord of each group

增加 ( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> 组凋亡阳性细胞数明显高于 SCI 组 ( $P < 0.05$ )。Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组

凋亡阳性细胞数明显低于 SCI 组, 且 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组凋亡阳性细胞数明显低于 rHMGB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )。见图 5, 表 7。

**3.8 对 SCI 大鼠脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达水平的影响** 蛋白免疫印迹分析显示, 与 Sham 组比较, SCI 组大鼠脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达水平明显增加 ( $P < 0.05$ )。rHMGB<sub>1</sub> 组 Caspase-3 蛋白表达水平明显高于 SCI 组 ( $P < 0.05$ )。Pap 组和 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 Caspase-3 蛋白表达水平明显低于 SCI 组, 且 rHMGB<sub>1</sub> + Pap 组 Caspase-3 蛋白表达水平明显低于 rHMGB<sub>1</sub> 组 ( $P < 0.05$ )。见图 6, 表 8。

表 4 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB p65 mRNA 和蛋白相对表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effects of Chaenomelis Fructus extracts on relative expression level of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB p65 mRNA and protein in SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	HMGB <sub>1</sub>		TLR4		NF-κB p65	
		mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
Sham	-	0.46 ± 0.04	0.32 ± 0.02	0.63 ± 0.05	0.51 ± 0.02	0.51 ± 0.04	0.35 ± 0.02
SCI	-	1.12 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.03 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.24 ± 0.08 <sup>1)</sup>	1.15 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.18 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.01 ± 0.05 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	1.69 ± 0.08 <sup>2)</sup>	2.01 ± 0.09 <sup>2)</sup>	2.41 ± 0.12 <sup>2)</sup>	2.31 ± 0.10 <sup>2)</sup>	2.01 ± 0.09 <sup>2)</sup>	1.96 ± 0.08 <sup>2)</sup>
Pap	300	0.74 ± 0.05 <sup>2,3)</sup>	0.65 ± 0.02 <sup>2,3)</sup>	0.95 ± 0.07 <sup>2,3)</sup>	0.86 ± 0.06 <sup>2,3)</sup>	0.94 ± 0.06 <sup>2,3)</sup>	0.78 ± 0.03 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	1.02 ± 0.06 <sup>2,3,4)</sup>	0.91 ± 0.04 <sup>2,3,4)</sup>	1.06 ± 0.07 <sup>2,3,4)</sup>	0.93 ± 0.05 <sup>2,3,4)</sup>	1.03 ± 0.08 <sup>2,3,4)</sup>	0.93 ± 0.04 <sup>2,3,4)</sup>

表 5 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB p65 IA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 5 Effect of Chaenomelis speciosa extracts on relative expression level of HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF-κB IA in SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	HMGB <sub>1</sub>	TLR4	NF-κB p65
sham	-	87.73 ± 9.54	35.34 ± 4.33	42.47 ± 6.05
SCI	-	201.57 ± 15.48 <sup>1)</sup>	85.17 ± 7.43 <sup>1)</sup>	148.34 ± 11.22 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	312.44 ± 20.26 <sup>2)</sup>	102.59 ± 8.62 <sup>2)</sup>	164.73 ± 14.51 <sup>2)</sup>
Pap	300	156.89 ± 14.73 <sup>2,3)</sup>	59.81 ± 5.24 <sup>2,3)</sup>	92.51 ± 10.03 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	178.67 ± 13.42 <sup>2,3,4)</sup>	72.26 ± 6.19 <sup>2,3,4)</sup>	112.36 ± 10.18 <sup>2,3)</sup>

表 6 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 6 Effect of Chaenomeles Fructus extracts on levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

ng · g<sup>-1</sup>

组别	剂量/mg · kg <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
Sham	-	10.13 ± 1.26	3.06 ± 0.17	94.44 ± 17.96
SCI	-	65.43 ± 8.33 <sup>1)</sup>	60.31 ± 5.46 <sup>1)</sup>	266.51 ± 21.17 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	75.19 ± 6.26 <sup>2)</sup>	67.57 ± 6.39 <sup>2)</sup>	292.35 ± 23.48 <sup>2)</sup>
Pap	300	22.34 ± 3.87 <sup>2,3)</sup>	20.26 ± 3.84 <sup>2,3)</sup>	153.81 ± 19.78 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	34.68 ± 4.94 <sup>2,3,4)</sup>	31.71 ± 5.22 <sup>2,3,4)</sup>	200.75 ± 23.24 <sup>2,3,4)</sup>

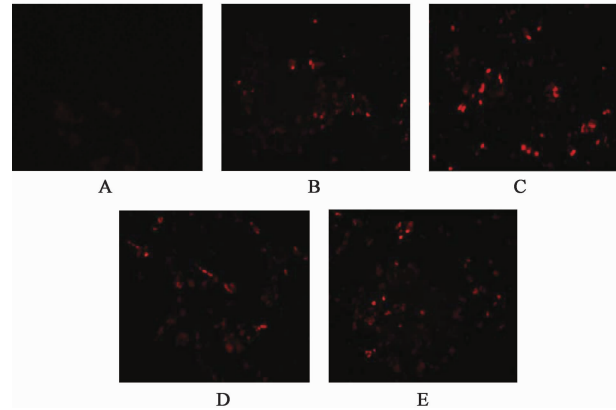


图 5 各组大鼠脊髓组织中凋亡的细胞 (TUNEL, × 200)

Fig. 5 Apoptotic cells in spinal cord of rats in each group (TUNEL, × 200)

表 7 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 7 Effects of Chaenomeles Fructus extracts from papaya on cell apoptosis in SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg · kg <sup>-1</sup>	细胞凋亡数目/个
Sham	-	1.03 ± 0.01
SCI	-	50.14 ± 5.13 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	55.72 ± 5.06 <sup>2)</sup>
Pap	300	15.64 ± 2.41 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	30.59 ± 3.36 <sup>2,3,4)</sup>

表 8 木瓜提取物对 SCI 大鼠脊髓组织中 Caspase-3 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 8 Effect of Chaenomeles Fructus extracts on expression of Caspase-3 protein in SCI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg · kg <sup>-1</sup>	Caspase-3/GAPDH
Sham	-	0.33 ± 0.01
SCI	-	1.53 ± 0.04 <sup>1)</sup>
rHMGB <sub>1</sub>	8 × 10 <sup>-3</sup>	1.86 ± 0.09 <sup>2)</sup>
Pap	300	1.01 ± 0.04 <sup>2,3)</sup>
rHMGB <sub>1</sub> + Pap	8 × 10 <sup>-3</sup> + 300	1.12 ± 0.05 <sup>2,3,4)</sup>

有机酸具有镇痛、抗炎活性。本研究结果发现,松散、嗜中性粒细胞浸润等组织学损伤,而经木瓜提取物治疗后,其运动功能、组织修复功能均发生明显改善,提示,木瓜提取物能够改善 SCI 后的神经功能恢复,可能成为 SCI 潜在治疗药物之一。然而,木瓜提取物对改善 SCI 后神经功能恢复的病理生理机制尚不清楚。鉴于木瓜提取物的抗炎作用,本研究拟探讨木瓜提取物能否通过其抗炎机制治疗 SCI,以其为 SCI 的治疗提供新的思路。

大量研究证实炎症反应与继发性 SCI 损伤的发病机制密切相关,在 SCI 的病理生理学发展中起重要作用<sup>[11-12]</sup>。SCI 能够引起炎症性级联反应,引起脊髓组织和浸润的炎症细胞释放包括 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6 等在内的多种炎症细胞因子,诱导炎症因子介导的炎症细胞在损伤后脊髓组织中浸润,导致神经元细胞的凋亡和星形胶质细胞激活,从而抑制神经功能恢复<sup>[13]</sup>。另外,SCI 引起的炎症进一步扩大脊髓坏死和细胞凋亡区域,造成相邻区域病变,加重脊髓功能障碍<sup>[14]</sup>。本研究中发现,SCI 组大鼠脊髓组织中含水量明显增加,脊髓组织中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎症细胞因子水平升高。已有研究发现,木瓜提取物能够通过降低促炎因子分泌,并通过改善内质网应激偶联炎症反应,抑制脂肪肝纤维化,从而发挥肝脏保护作用<sup>[8]</sup>。本研究中,木瓜提取物治疗可明显减轻 SCI 后的组织水肿,同时降

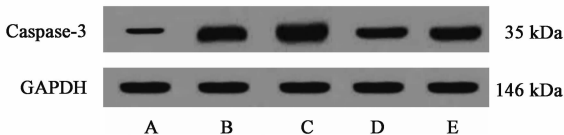


图 6 各组大鼠脊髓组织中 Caspase-3 蛋白的表达

Fig. 6 Expression of Caspase-3 protein in spinal cord of rats in each group

#### 4 讨论

木瓜作为传统中药之一,其提取物中含氨基酸、黄酮类、萜类等多种有效成分,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种药物作用。本研究经 HPLC 分析发现,木瓜提取物富含奎尼酸、苹果酸、莽草酸等多种有机酸,与过往研究一致<sup>[9]</sup>。李娜等<sup>[10]</sup>证实,木瓜

低组织中 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6 等炎症细胞因子的水平,提示木瓜提取物能够减轻 SCI 后的组织水肿,且这一作用可能与其抑制炎症细胞因子分泌、减轻炎症反应有关。

HMGB<sub>1</sub> 是抑制炎症反应的新干预因子,是激活炎症反应的重要介质,在巨噬细胞和单核细胞的活化中起重要作用,并能够引发炎症免疫应答反应<sup>[15]</sup>。HMGB<sub>1</sub> 主要分布于细胞核中,在损伤或炎症反应后, TNF- $\alpha$  和 IL-1 的激活诱导 HMGB<sub>1</sub> 从细胞核转移至细胞质中,随后其释放进入细胞外。HMGB<sub>1</sub> 与其胞外膜结合受体 TLR4 结合,通过跨膜信号通路激活下游信号分子 NF- $\kappa$ B<sup>[16]</sup>。NF- $\kappa$ B 作为 TLR4 介导的信号传导中的关键转录因子,被认为是与 SCI 中先天免疫反应和炎症等多种表现相关的关键调节因子之一,能够调节与炎症反应相关的多种因子和信号通路<sup>[17]</sup>。NF- $\kappa$ B 通过调控多种细胞因子,调节巨噬细胞和淋巴细胞的细胞分化,从而调节炎症反应。研究发现, NF- $\kappa$ B 的活化能够诱导白细胞黏附分子上调,导致炎症细胞分泌 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎症细胞因子,从而促进炎症反应<sup>[18]</sup>。因此,作为促炎反应的特征性信号通路, HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路成为神经系统疾病治疗的新靶标<sup>[19]</sup>。

过往研究证实, HMGB<sub>1</sub> 可以通过与继发性 SCI 损伤中的 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的相互作用来激活炎症反应<sup>[20]</sup>。与过往研究一致,本研究发现 SCI 组大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B 表达水平明显增加,提示 SCI 中炎症反应的发生与 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活有关。近来研究表明,木瓜的醇提取物和乙酸乙酯提取物能够抑制脂多糖引起的 NF- $\kappa$ B 激活和 TLR2 活化,从而抑制其下游相关炎症因子的表达,从而发挥抗炎作用<sup>[21]</sup>。本研究中,经木瓜提取物治疗后, SCI 大鼠脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 表达水平明显降低,推测,木瓜提取物诱导的组织修复及炎症反应的降低可能与其对 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的抑制有关。为证实这一推测,本研究使用重组 HMGB<sub>1</sub> 处理 SCI 大鼠发现,经 rHMGB<sub>1</sub> 干预后, SCI 大鼠运动功能和组织学损伤更严重,且脊髓水肿程度、炎症因子水平、中性粒细胞浸润均明显高于 SCI 组,脊髓组织中 HMGB<sub>1</sub>, TLR4, NF- $\kappa$ B p65 表达水平明显高于 SCI 组,提示 HMGB<sub>1</sub> 过表达能够促进 SCI 后脊髓组织炎症反应,激活 NF- $\kappa$ B 炎症通路,加重 SCI 大鼠神经功能损伤并抑制进一步组织修复。进一步

采用木瓜提取物治疗 rHMGB<sub>1</sub> 处理的 SCI 大鼠能够明显缓解运动功能损伤,并促进组织学修复,且脊髓组织中的炎症浸润减少,炎症因子表达降低。提示,木瓜提取物能够通过抑制 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,调节 SCI 中的炎症反应,改善神经功能。

凋亡是 SCI 的重要组成部分之一,神经元和少突胶质细胞的凋亡能够引起轴突变性、白质脱髓鞘等多种改变,导致运动和感觉神经功能损伤<sup>[22]</sup>。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶,是多种凋亡途径的共同下游效应部分,在细胞凋亡的启动和执行过程中起重要作用<sup>[23]</sup>。据报道, NF- $\kappa$ B 的活化可进一步激活 Caspase-3 信号转导途径介导细胞凋亡<sup>[24]</sup>。本研究发现, SCI 大鼠脊髓组织内细胞大量凋亡,且 Caspase-3 表达水平明显升高,而木瓜提取物治疗能够明显减少 SCI 大鼠和 rHMGB<sub>1</sub> 处理 SCI 大鼠脊髓组织中的细胞凋亡、抑制 SCI 后 Caspase-3 激活,提示木瓜提取物具有神经保护作用,在 SCI 中具有抗凋亡作用,这一作用可能与调节 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B/Caspase-3 信号级联有关。

综上所述,木瓜提取物能够通过抑制 HMGB<sub>1</sub>/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路活化,减轻 SCI 后的炎症反应、减少脊髓组织细胞凋亡,从而诱导脊髓组织修复和运动功能恢复。木瓜提取物的这一新发现可能为 SCI 的治疗提供新思路。

#### [参考文献]

- [1] 吕威. 脉冲电针对脊髓损伤大鼠受损局部 Mash1, NeuroD2 表达的影响 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [2] 李顺国, 王猛. 继发性脊髓损伤的药物治疗进展 [J]. 现代医药卫生, 2015, 31(3): 368-371.
- [3] ZHAO H, CHENG L, DU X, et al. Transplantation of cerebral dopamine neurotrophic factor transduced BMSCs in contusion spinal cord injury of rats: promotion of nerve regeneration by alleviating neuroinflammation [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(1): 187-199.
- [4] 戴晨. 弱激光对骨髓来源巨噬细胞极化水平的调控研究及对大鼠脊髓损伤的影响 [D]. 西安: 第四军医大学, 2016.
- [5] 尹继庭, 姜力, 姜永新, 等. 白花木瓜营养成分分析 [J]. 营养学报, 2013, 35(2): 201-202.
- [6] 周丽娜, 叶文博. 野木瓜注射液及其提取物对脊髓神经元的氧化保护和生长促进作用 [J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2011, 40(5): 540-545.

- [ 7 ] LIU D, HUANG Y, JIA C, et al. Administration of antagomir-223 inhibits apoptosis, promotes angiogenesis and functional recovery in rats with spinal cord injury [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(4):1-9.
- [ 8 ] 向婷婷, 霍元秀, 刘朝奇, 等. 木瓜提取物对脂肪性肝纤维化的预防保护作用及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(4):489-494.
- [ 9 ] 况作品, 周亚菁, 谢晓梅, 等. 高效液相色谱法测定木瓜水溶性有机酸含量的样品处理方法研究[J]. *安徽医药*, 2016, 20(1):54-57.
- [ 10 ] 李娜, 金敬红, 姜洪芳, 等. 宣木瓜总有机酸的纯化及镇痛抗炎作用[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(1):113-116.
- [ 11 ] 高梦丹, 林敬铨, 童亮, 等. 姜黄素抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路对脊髓损伤修复作用的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(3):272-277.
- [ 12 ] 张芬. MicroRNA-124a 对 SCI 继发性损伤的影响及相关机制研究[J]. *郑州大学学报:理学版*, 2016, 48(1):73-80.
- [ 13 ] WANG T L, GU B, LI H N, et al. Inflammatory response and anti-inflammatory therapy after acute spinal cord injury [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(4):452-457.
- [ 14 ] XU J, E X Q, LIU H Y, et al. *Angelica sinensis* attenuates inflammatory reaction in experimental rat models having spinal cord injury [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(6):6779-6785.
- [ 15 ] LI L, YAN L, MIN H, et al. Heparin inhibits the inflammatory response induced by LPS and HMGB1 by blocking the binding of HMGB1 to the surface of macrophages [J]. *Cytokine*, 2015, 72(1):36-42.
- [ 16 ] WANG Y S, LI Y Y, WANG L H, et al. Tanshinone IIA attenuates chronic pancreatitis-induced pain in rats *via* downregulation of HMGB1 and TLR4 expression in the spinal cord [J]. *Pain Physician*, 2015, 18(4):E615.
- [ 17 ] MA B, Hottiger M O. Crosstalk between Wnt/ $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B signaling pathway during inflammation [J]. *Front Immunol*, 2016, 7(3):378-388.
- [ 18 ] WANG Y, SUN L, SONG Z, et al. Maspain inhibits macrophage phagocytosis and enhances inflammatory cytokine production *via* activation of NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Mol Immunol*, 2017, 82(12):94-103.
- [ 19 ] Maeda T, Ozaki M, Kobayashi Y, et al. HMGB1 as a potential therapeutic target for neuropathic pain [J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 123(4):301-305.
- [ 20 ] KANG N, HAI Y, YANG J, et al. Hyperbaric oxygen intervention reduces secondary spinal cord injury in rats *via* regulation of HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(2):1141-1153.
- [ 21 ] 田慧群, 崔倩倩, 任东明, 等. 木瓜提取物的抗炎活性研究[J]. *华西药学杂志*, 2015, 30(3):287-288.
- [ 22 ] 吕静波, 陈强. 少突胶质细胞凋亡与脑白质脱髓鞘病变发病机制关系的研究进展[J]. *浙江医学*, 2014, 36(23):1965-1968.
- [ 23 ] 韩晓三, 梁高林. 自组装纳米荧光探针用于 Caspase-3 的检测 [J]. *中国科学技术大学学报*, 2015, 45(8):643-648.
- [ 24 ] SUN L, CHEN S, GAO H, et al. Visfatin induces the apoptosis of endothelial progenitor cells *via* the induction of pro-inflammatory mediators through the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3):637-646.

[责任编辑 周冰冰]