

丹参注射液对大鼠脊髓损伤后 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性及后肢运动功能的影响

刘杨, 高玉亭, 苗宇船*
(山西中医学院, 山西 晋中 030619)

[摘要] **目的:**探讨脊髓损伤(SCI)后丹参注射液促进大鼠脊髓神经功能恢复的机制。**方法:**大鼠(清洁级)随机分为正常组、模型组、给药组、信号通路阻断组和空白组($n = 10$)。除正常组外,其余各组大鼠均建立重力打击SCI模型。模型组伤后常规饲养;给药组伤后1 h腹腔注射丹参注射液($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$);信号通路阻断组伤后1 h腹腔注射丹参注射液($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 含雷帕霉素 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);空白组伤后给予腹腔注射生理盐水($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)。上述各组均按1次/d注射。14 d后处死动物,处死前采用联合行为评分法(CBS)评价大鼠脊髓神经功能恢复情况,并取损伤节段上下1 cm的脊髓组织。分别采用免疫组化SP法,蛋白质免疫印迹(Western blot)和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测各实验组大鼠PI3K, Akt和mTOR蛋白及mRNA的表达水平。**结果:**与模型组、信号通路阻断组和空白组大鼠比较,给药组大鼠CBS评分显著降低($P < 0.05$);与正常组比较,模型组大鼠PI3K, Akt, mTOR mRNA的含量,以及PI3K, Akt, mTOR蛋白免疫阳性细胞数和表达量均升高($P < 0.05$);与模型组比较,给药组大鼠的上述指标均显著升高($P < 0.05$);与给药组比较,信号通路阻断组大鼠的上述指标均显著降低($P < 0.05$);上述指标在模型组与空白组大鼠之间的差异不具有统计学意义。**结论:**丹参注射液有助于大鼠SCI后脊髓神经功能的恢复,其机制可能与升高PI3K/Akt/mTOR信号转导通路的活性有关。

[关键词] 脊髓损伤; 丹参注射液; PI3K/Akt/mTOR; 雷帕霉素; 信号转导通路

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)14-0152-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017140152

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170427.1114.034.html>

[网络出版时间] 2017-04-27 11:14

Effect of Danshen Injection on PI3K/Akt/mTOR Pathway and Lower Extremity Motor Function in Rats With Spinal Cord Injury

LIU Yang, GAO Yu-ting, MIAO Yu-chuan
(Shanxi University of Traditional Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danshen injection on promoting the recovery of spinal nerve function in rats after spinal cord injury (SCI) and investigate its action mechanism. **Method:** Fifty SPF SD rats were divided into five groups randomly: normal control group, injury group, treatment group, inhibition group and blank control group ($n = 10$ in each group). All the rats except those in normal control group received modified Allen's method to establish SCI models. The rats in injury group were fed routinely after injury; Danshen injection ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) was intraperitoneally injected 1 h after injury in treatment group; Danshen injection ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, including rapamycin $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was intraperitoneally injected 1 h after injury in inhibition group; and normal saline ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) was intraperitoneally injected into the rats in blank control group after injury, once

[收稿日期] 20170219(004)

[基金项目] 山西中医学院博士科研启动基金项目(2014)

[第一作者] 刘杨, 博士, 副教授, 从事脊髓损伤及中西医结合治疗的机制研究, Tel: 0351-3179702, E-mail: syfy2004@163.com

[通讯作者] * 苗宇船, 博士, 教授, 从事脊髓损伤及中西医结合治疗的机制研究, Tel: 0351-3179702, E-mail: myc65@163.com

a day respectively. The rats in all groups were killed on 14 d, and the combine behavioral scores (CBS) of rats in all groups were detected before being killed to evaluate the recovery of spinal nerve function; and then the spinal cord tissues 1 cm above and below the injured segments were taken. Immunohistochemical SP method, Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used respectively to detect PI3K, Akt and mTOR protein and mRNA expression levels. **Result:** After treatment, the motor function of posterior limbs (CBS score) in treatment group was better than that in injury group, inhibition group and blank control group ($P < 0.05$); PI3K, Akt and mTOR mRNA expression levels, immunoreactive cells count and relative expression levels in treatment group were also significantly higher than those in other groups ($P < 0.05$). **Conclusion:** Danshen injection could promote the recovery of nerve function after SCI probably by elevating the activity of PI3K/Akt/mTOR signaling-pathway.

[**Key words**] spinal cord injury; Danshen injection; PI3K/Akt/mTOR; rapamycin; signaling-pathway

脊髓损伤(SCI)是一种发生率很高的中枢神经系统(CNS)损伤,多由外伤造成,最主要的原因是交通事故,其次是高坠伤(多见于建筑工程作业)。因为SCI的病生理机制非常复杂,目前仍缺乏治疗有效手段,可使患者产生严重的神经功能障碍(截瘫或四肢瘫)。前期研究表明,磷脂酰肌醇3激酶/苏氨酸激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号转导通路在SCI后的活性会升高,可在脊髓神经功能的重建过程中发挥重要作用,如何升高该信号通路的活性,可以作为临床治疗SCI的一条思路^[1]。丹参作为一种传统的中药材,具有活血化瘀的功效,其现代药理学功效包括清除氧自由基、保护线粒体、改善能量代谢以及保护神经元等^[2]。其中,丹参对神经元的保护作用机制目前尚未完全阐明。有研究显示,丹参及其有效成分可以在组织的缺血性损伤中,通过激活PI3K/Akt/mTOR信号转导通路来抑制细胞凋亡的发生^[3-4]。因此,本文拟通过观察丹参注射液对大鼠SCI后PI3K/Akt/mTOR信号转导通路活性的影响,以及在该信号通路被特异性阻断剂雷帕霉素抑制的情况下,丹参注射液是否还可以发挥神经保护作用,以揭示丹参注射液参与促进脊髓神经功能恢复的机制,为其应用于临床SCI的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性SD大鼠50只由中国食品药品检定研究所提供,体重(200±20)g,合格证号SCXK(京)2014-0013。本研究获得山西中医学院实验动物伦理委员会批准,开始实验前大鼠经7d适应性饲养。

1.2 药物及试剂 丹参注射液(四川升和药业,国药准字Z51021303);RNA提取试剂盒(美国Invitrogen公司,批号15596-026);RNA PCR试剂盒

(AMV) Ver. 3.0 试剂盒(日本Takara公司,批号DRR019A);PI3K单克隆抗体,Akt单克隆抗体,mTOR单克隆抗体(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-1332,sc-135829,sc-1550-R);SP试剂盒,DAB试剂盒(北京中杉金桥公司,批号分别为SP9001,PAB180021);RIPA(强)组织细胞快速裂解液,BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(北京Bioswamp公司,批号分别为PAB180006,PAB180007);PVDF转移膜,化学发光试剂(美国Millipore公司,批号分别为IPVH00010,WBKL50010);其他相关试剂均购自美国Sigma公司。

1.3 仪器 Mini protean 3 cell型电泳仪(美国Bio-Rad公司),MK3型酶标仪(芬兰雷勃公司),Centrifuge 5424 R型离心机(德国Eppendorf公司),Tanon-5200型全自动化学发光分析仪(上海天能公司),RM2235型石蜡切片机(德国徕卡公司),ABI 7500型PCR仪(美国ABI公司),UPT型优普特实验室超纯水器(法国MilliPORE公司)。

2 方法

2.1 SCI模型的建立 大鼠经3%戊巴比妥钠(体重按30 mg·kg⁻¹)腹腔麻醉后,咬除T12~L1棘突和椎板,暴露硬脊膜。参照Freeman的方法^[5],采用自制重力打击装置,以50 g·cm致伤能量打击T13节段脊髓。术后恒温(23~25℃)常规饮食,腹腔注射青霉素(100 U·d⁻¹)以抗感染,每日按摩膀胱2次至大鼠出现自主排尿为止。

2.2 分组处理 上述50只大鼠随机分为正常组、模型组、给药组、信号通路阻断组和空白组($n = 10$)。正常组:常规饲养;模型组:模型建立后常规饲养,按摩膀胱至可自主排尿为止;给药组:伤后即刻腹腔内注射丹参注射液(1 mL·kg⁻¹),自伤后第2天起,按上述剂量1次/d腹腔注射;信号通路

阻断组:伤后即刻腹腔内注射含雷帕霉素的丹参注射液($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,其中含雷帕霉素 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),自伤后第 2 天起,按上述剂量 1 次/d 腹腔注射;空白组:伤后腹腔内注射等量生理盐水,1 次/d。伤后 14 d 时处死动物,并提取损伤节段上下 1 cm 节段的脊髓组织,4% 多聚甲醛固定或 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱内保存。

2.3 大鼠脊髓神经功能恢复情况检测 各组实验组大鼠分别于处死前采用联合行为评分法(CBS)检测和评价大鼠脊髓神经功能的恢复情况。CBS 评分方法见参考文献[1]。

2.4 逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 脊髓组织液氮中匀浆后,使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。将提取的总 RNA ($8 \text{ } \mu\text{L}$) 加入逆转录反应体系混合(共 $20 \text{ } \mu\text{L}$) 以合成 cDNA。PI3K 引物序列上游 $5' \text{-CTACCTGGCACTCTGCTTGC-3'}$, 下游 $5' \text{-CTTGGGCATGTCAGTGTGGC-3'}$, 片段长度 146 bp; Akt 引物序列上游 $5' \text{-TCACCTCTGAGACCGACACC-3'}$, 下游 $5' \text{-ACTGGCTGAGTAGGAGAACTGG-3'}$, 片段长度 155 bp; mTOR 引物序列上游 $5' \text{-TCGGCACATCACTCCCTTCA-3'}$, 下游 $5' \text{-AACAACGGCTTTCCACCAGA-3'}$, 片段长度 167 bp; β -actin 引物序列上游 $5' \text{-GTTCGCCATGGATGACGATATC-3'}$, 下游 $5' \text{-GCCAGATCTTCTCCATGTCGTC-3'}$, 片段长度 230 bp。反应条件设定如下 PI3K: $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 35 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; Akt: $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min; mTOR: $45 \text{ }^\circ\text{C}$ 30 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $5 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。将合成的 cDNA ($1 \text{ } \mu\text{L}$) 加入 PCR 反应体系(共 $25 \text{ } \mu\text{L}$), 反应条件设定如下: PI3K: $96 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $92 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 45 s, $57 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 25 个循环; $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。Akt: $96 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 35 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $74 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 25 个循环; $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。mTOR: $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $54 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 共 25 次循环; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min。凝胶结果由 Tanon-2500 凝胶图像分析系统分析后录入电脑, BI-2000 图像分析系统计算 PI3K, Akt, mTOR 与 β -actin mRNA 的积分吸光度 IA 比值, 作为其相对含量。

2.5 免疫组织化学检测 各实验组脊髓组织经固定后制成石蜡切片($5 \text{ } \mu\text{m}$), 常规脱蜡、抗原修复, $3\% \text{ H}_2\text{O}_2$ 孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶。一抗($1:300$ 稀释)均在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保湿盒内孵育过夜, 其余步骤参见 SP 试剂盒说明书进行操作。采用 BI-2000 医学图像分析系统对各张切片进行分析(5 个

高倍视野/切片), 统计各组目的蛋白(PI3K, Akt, mTOR)表达的阳性细胞数。

2.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 低温条件下将脊髓组织剪碎, 按每 20 mg 组织加入 $150 \sim 250 \text{ } \mu\text{L}$ RIPA(强)组织细胞快速裂解液的比例加入裂解液, 裂解后的样品 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ $12\ 000 \times g$ 15 min, 取上清, 采用 BCA 法进行蛋白质定量(最终质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。配置 12% 的 SDS-PAGE 凝胶, 每孔上样 $10 \text{ } \mu\text{L}$, 进行电泳(浓缩胶 80 V 40 min, 分离胶 120 V , 50 min)。采用湿转法将蛋白质转至 PVDF 膜(90 V 转膜 50 min)。PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入相应抗体($1:1\ 000$ 稀释, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜), 洗膜缓冲液(TBST)洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次, 后加入 HRP 标记的二抗($1:1\ 000$ 稀释, 室温孵育 1 h), TBST 洗涤 $5 \text{ min} \times 3$ 次后, 加入 ECL 化学发光液后将膜置于全自动化学发光分析仪中检测。采用 BI-2000 图像分析系统计算 PI3K, Akt, mTOR 与 β -actin 的灰度值比值, 作为其相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析和 SNK 检验, 各实验组所得数据(计量数据)以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CBS 评分结果 SCI 发生后, 与正常组大鼠比较[CBS 评分为(0.0 ± 0.0)分], 模型组、给药组、信号通路阻断组和空白组大鼠的脊髓神经功能均出现不同程度受损, 至伤后 14 d 时, CBS 评分分别为(50.8 ± 6.1), (35.6 ± 6.5), (60.3 ± 7.2) 和 (49.8 ± 8.2)分($P < 0.05$); 其中给药组大鼠的脊髓神经功能恢复情况优于其他实验组, 而信号通路阻断组大鼠显著差于其他实验组($P < 0.05$)。

3.2 对 SCI 大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的相对含量的影响 SCI 后 14 d 时, 与正常组比较, 模型组内 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的相对含量升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 给药组内 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的相对含量明显升高($P < 0.05$); 而与给药组比较, 信号通路阻断组内 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的相对含量明显降低($P < 0.05$); PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的相对含量在模型组与空白组之间的差异不具有统计学意义。见表 1 及图 1。

3.3 对 SCI 大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR 阳性细胞数表达的影响 在正常组大鼠脊髓组织内, PI3K, Akt 和 mTOR 免疫阳性细胞主要为少量脊髓神经元, 而在其他实验组大鼠脊髓组织内, 上述 3 种蛋白的免疫阳性细胞则主要为胶质细胞。与正常组比较, 模型

表 1 丹参注射液对 SCI 大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的相对含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Danshen injection on relative content of PI3K, Akt and mTOR mRNA in rat of spinal cord injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	PI3K/ β -actin	Akt/ β -actin	mTOR/ β -actin
正常	-	0.280 ± 0.035	0.261 ± 0.029	0.220 ± 0.045
模型	-	0.431 ± 0.132 ¹⁾	0.400 ± 0.102 ¹⁾	0.471 ± 0.139 ¹⁾
空白	-	0.441 ± 0.102 ^{1,3)}	0.432 ± 0.147 ^{1,3)}	0.462 ± 0.121 ^{1,3)}
丹参注射液	1	0.769 ± 0.198 ^{2,3)}	0.751 ± 0.168 ^{2,3)}	0.812 ± 0.148 ^{2,3)}
信号通路阻断	1(含雷帕霉素 3 mg·kg ⁻¹)	0.269 ± 0.098	0.251 ± 0.108	0.272 ± 0.168

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与信号通路阻断组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

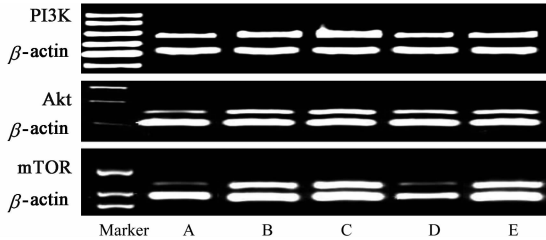


图 1 各组 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的表达
A. 正常组; B. 模型组; C. 给药组; D. 信号通路阻断组; E. 空白组(图 2,3 同)

图 1 各组 PI3K, Akt 和 mTOR mRNA 的表达

Fig. 1 Expression of PI3K, Akt and mTOR mRNA in all groups

组内上述 3 种蛋白的阳性细胞数升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 给药组内上述 3 种蛋白的阳性细胞

数明显升高 ($P < 0.05$); 而与给药组比较, 信号通路阻断组内 3 种蛋白的阳性细胞数明显降低 ($P < 0.05$); 模型组与空白组之间的差异不具有统计学意义。见表 2 和图 2。

3.4 对 SCI 大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR 蛋白的相对表达量的影响 与正常组比较, 模型组内上述 3 种蛋白的相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 给药组内上述 3 种蛋白的相对表达量明显升高 ($P < 0.05$); 而与给药组比较, 信号通路阻断组内 3 种蛋白的相对表达量明显降低 ($P < 0.05$); 3 种蛋白的相对表达量在模型组与空白组之间的差异不具有统计学意义。见表 3 及图 3。

表 2 丹参注射液对 SCI 大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR 阳性细胞数表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Danshen injection on number of postive cells expression of PI3K, Akt and mTOR protein in rat of spinal cord injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	PI3K	Akt	mTOR
正常	-	18.0 ± 4.5	11.1 ± 2.9	10.1 ± 5.4
模型	-	85.3 ± 23.7 ¹⁾	77.1 ± 19.7 ¹⁾	70.5 ± 11.9 ¹⁾
空白	-	78.1 ± 15.2 ^{1,3)}	75.3 ± 20.2 ^{1,3)}	68.6 ± 10.7 ^{1,3)}
丹参注射液	1	121.8 ± 23.2 ^{2,3)}	140.0 ± 21.2 ^{2,3)}	116.3 ± 20.5 ^{2,3)}
信号通路阻断	1(含雷帕霉素 3 mg·kg ⁻¹)	26.9 ± 9.8	37.5 ± 10.8	30.8 ± 10.1

表 3 丹参注射液对 SCI 大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR 蛋白的相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Danshen injection on relative content of PI3K, Akt and mTOR protein in rat of spinal cord injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mL·kg ⁻¹	PI3K	Akt	mTOR
正常	-	0.221 ± 0.038	0.291 ± 0.054	0.310 ± 0.065
模型	-	0.482 ± 0.145 ¹⁾	0.521 ± 0.162 ¹⁾	0.518 ± 0.176 ¹⁾
空白	-	0.462 ± 0.156 ^{1,3)}	0.522 ± 0.141 ^{1,3)}	0.502 ± 0.152 ^{1,3)}
丹参注射液	1	0.868 ± 0.248 ^{2,3)}	0.951 ± 0.268 ^{2,3)}	0.972 ± 0.244 ^{2,3)}
信号通路阻断	1(含雷帕霉素 3 mg·kg ⁻¹)	0.239 ± 0.113	0.351 ± 0.128	0.314 ± 0.188

4 讨论

SCI 发生后, 继发性的缺血缺氧以及凋亡机制可以在原发性损伤的基础上进一步加重对脊髓结构

和功能的破坏, 在其病情的发展过程中发挥重要作用^[6]。而根据中医的基础理论, SCI 属“痿证”, 系“督脉受伤, 气乱血逆, 瘀阻经络”所致, 故“瘀血”为

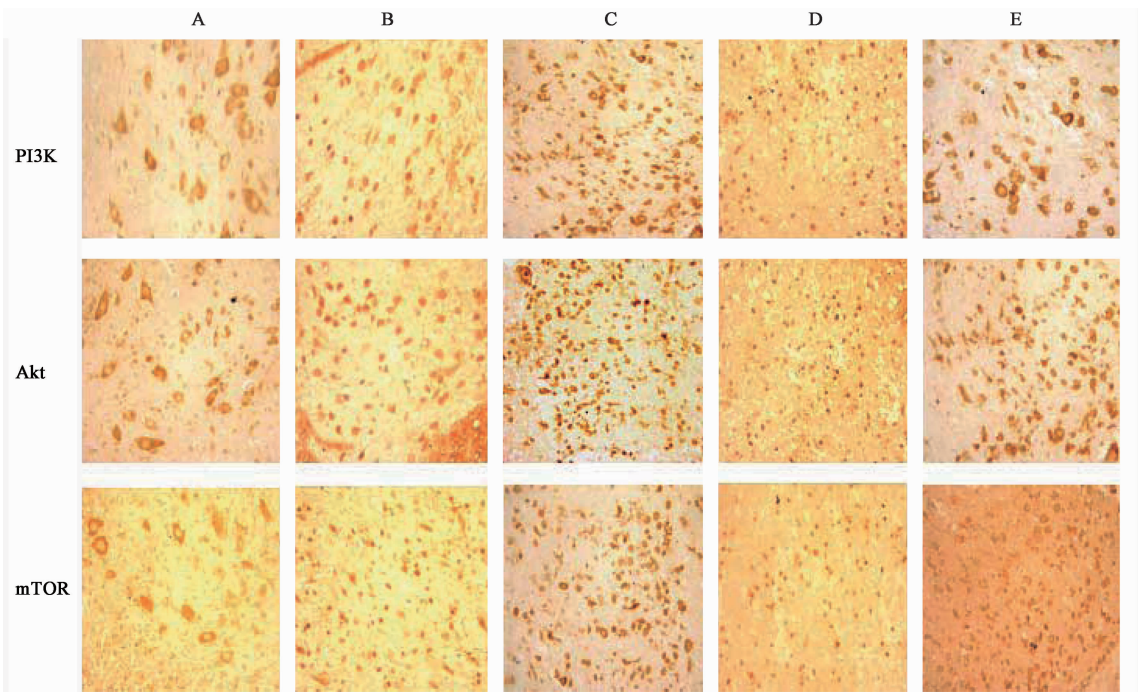


图 2 各组 PI3K, Akt 和 mTOR 蛋白的阳性细胞数变化(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Postive cells of PI3K, Akt and mTOR protein in all groups(IHC, ×200)

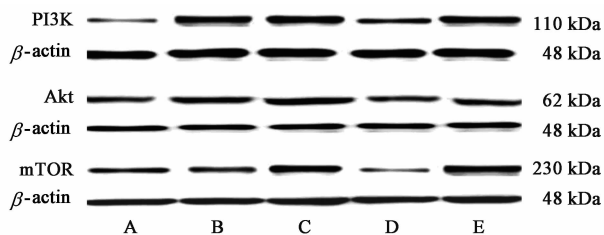


图 3 各组大鼠 PI3K, Akt 和 mTOR 蛋白的表达

Fig. 3 Expression of PI3K, Akt and mTOR in all groups

其病因,“督脉枢机不利”为其病机,而“督脉贯脊络肾,肾司二便,故督脉受损必致伤肾,肾伤则二便失司”,故其治疗的主要原则为“祛瘀,通督,补肾,益气”,而内治则须以“祛瘀通督”为要点^[7]。因此,如何改善受损脊髓组织局部的微循环,促进神经功能的重建,是 SCI 治疗的重要环节。

据报道,PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路除可以有效抑制细胞凋亡外,还可以通过调节下游的靶蛋白的表达(包括 HIF1- α , VEGF 等),从而影响组织局部的微循环血液供应(该作用可以被特异性阻断剂雷帕霉素所阻断)^[8-9],目前备受关注。而前期研究发现,大鼠发生 SCI 后,随着 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性的升高,大鼠双后肢运动功能逐渐好转,证实激活 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路,有助于 SCI 早期神经功能的重建^[1]。但该通路的内源性激活机制在 SCI 后神经元的自我修复过程的作用十分有限,因此,如何外源性升高该信号转导通路的

活性,可以作为临床治疗 SCI 的一条思路。而丹参作为一种唇形科植物,属传统中药材,中医理论认为丹参苦、微寒,入心、心包及肝经,具有活血、祛瘀、养血、安神的功效^[10],常常作为某些具有活血化瘀功效的中药方剂中的主要成分,用于治疗包括 SCI 在内的众多缺血损伤性疾病(如脊髓康、血府逐瘀汤等)^[11-12];同时现代药理学研究发现,丹参及其主要成分(包括丹参酮、丹参素、丹参乙酸等)具有降低血液黏稠度、改善局部微循环、提高超氧化物歧化酶活性和清除氧自由基等作用,对心脑血管系统、消化系统、呼吸系统、中枢神经系统、免疫系统等均有明显的保护作用^[13-15]。而且有研究发现,丹参及其主要成分的缺血保护作用多与激活 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关^[3-4]。

前期研究已表明随着 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性的升高,大鼠脊髓神经功能开始逐渐好转^[1],故本次实验重点对丹参注射液对 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性的影响,以及在阻断上述信号通路的情况下,丹参注射液是否还可以有效地在 SCI 后发挥神经保护功能进行了研究。结果显示,SCI 发生后,模型组大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性的升高,与前期研究结果一致,表明 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路参与 SCI 后脊髓神经功能自我修复;而给药组大鼠给予腹腔注射丹参注射液治疗 14 d 后,PI3K/Akt/mTOR 信号转导通

路活性的显著升高,表现为 PI3K, Akt 和 mTOR 的转录水平以及表达量的升高,并且免疫阳性表达的神经胶质细胞增多,并且随着该信号转导通路活性的升高,大鼠的脊髓神经功能(CBS 评分)得以明显恢复,与模型组比较,差异具有统计学意义;同时,信号通路阻断组大鼠在给与 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路特异性抑制剂雷帕霉素后,即使同样通过腹腔注射丹参静脉注射治疗,但该组大鼠的脊髓神经功能并未得以明显恢复,与给药组比较,差异具有统计学意义。这提示丹参注射液在 SCI 后的确可以有助于促进脊髓神经功能的恢复,与在其他组织器官类似,其作用机制同样与激活 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关,并且该神经保护作用可以被该信号通路的特异性阻断剂雷帕霉素所阻断。丹参注射液激活该信号转导通路的机制可能是丹参注射液中的主要成分丹参酮所引起的一系列蛋白质磷酸化的改变,即丹参酮可以引起 PI3K 发生磷酸化,形成磷酸化 PI3K(p-PI3K),在 p-PI3K 的作用下又可引起 Akt 磷酸化,使其转变为磷酸化 Akt(p-Akt),p-Akt 又可磷酸化 mTOR 的 Ser2448 位点,从而活化 mTOR。mTOR 属丝/苏氨酸蛋白激酶,活化后可以通过调节其下游靶蛋白(包括 HIF1- α , VEGF 以及 Bcl-2, Bax 等)的转录和表达,不仅可以发挥抑制凋亡的作用,同时还可以共同参与 SCI 局部微环境的改善(如改善缺氧、促进血管生成等)^[3-4]。至于丹参注射液通过 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路又可调节哪些靶蛋白的转录表达,将是下一步研究的重点。

综上所述,丹参注射液可以参与 SCI 后脊髓神经功能的恢复,该保护作用的现代分子生物学机制可能与通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路有关。

[参考文献]

[1] 刘杨,苗宇船.大鼠脊髓损伤早期 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路的活性改变及其与后肢运动功能恢复的关系[J].上海交通大学学报,2015,35(6):804-808.

[2] Diaz-Ruiz A, Alcaraz Z M, Maldonado V, et al. Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2009,452(1):56-59.

[3] LI Q, SHEN L, WANG Z, et al. Tanshinone IIA protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:106-114.

[4] HUANG W, YANG Y, ZENG Z, et al. Effect of Danshen and ligustrazine injection on myocardial ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation injury [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5):4537-4544.

[5] Freeman L W, Wright T W. Experimental observations of concussion and contusion of the spinal cord [J]. Ann Surg, 1953, 137(4):433-443.

[6] Gensel J C, ZHANG B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury [J]. Brain Res, 2015, 1619:1-11.

[7] 王明新,汪茜,姚共.中医对脊髓损伤病机的认识[J].湖南中医药导报,2004,10(6):7-11.

[8] Granato M, Rizzello C, Montani M S, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. J Nutr Biochem, 2017, 41:124-136.

[9] Miyasaka A, Oda K, Ikeda Y, et al. PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1- α /VEGF pathway in endometrial cancer [J]. Gynecol Oncol, 2015, 138(1):174-180.

[10] 邓爱平,郭兰萍,詹志来,等.丹参本草考证[J].中国中药杂志,2016,41(22):4274-4279.

[11] 王建伟,吴毛,马勇.中药“脊髓康”对脊髓损伤后运动变化的临床研究[J].中国新医学论坛,2008,8(6):5-6.

[12] 刘汝专,潘汉升,唐晓菊,等.血府逐瘀汤对兔颈髓急性损伤减压术后神经元及血管灌注的干预效果[J].中国临床康复,2006,10(19):53-55.

[13] Diaz-Ruiz A, Alcaraz Z M, Maldonado V, et al. Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2009, 452(1):56-59.

[14] XUE L, WU Z, JI X P, et al. Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Asian Pac J Trop Med, 2014,7(4):280-284.

[15] LI Y H, WANG F Y, Feng C Q, et al. Studies on the active constituents in radix salviae miltiorrhizae and their protective effects on cerebral ischemia reperfusion injury and its mechanism [J]. Pharmacogn Mag, 2015, 11(41):69-73.

[责任编辑 周冰冰]