

丹参注射液对大鼠脊髓损伤后 Olig-2 和 OX-42 表达的影响

刘杨, 高玉亭, 苗宇船*

(山西中医药大学, 山西 晋中 030619)

[摘要] **目的:**通过检测丹参注射液对大鼠脊髓损伤(SCI)后少突胶质细胞(Olig-2)和Ⅲ型补体受体(OX-42)系转录因子-2表达的影响,探讨其促进脊髓神经功能恢复的机制。**方法:**SPF大鼠50只随机分为正常组、模型组、丹参治疗组、丹参加雷帕霉素组和甲泼尼龙琥珀酸钠组($n=10$)。采用Allen's法建立SCI模型(正常组除外)后,模型组:腹腔注射生理盐水($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),1次/d;丹参治疗组:腹腔注射丹参注射液($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$),1次/d;丹参加雷帕霉素组:腹腔注射同等剂量丹参注射液(含雷帕霉素 $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),1次/d;甲泼尼龙琥珀酸钠组:尾静脉推注甲泼尼龙琥珀酸钠($30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),1次/d。伤后1,3,7,14 d时采用联合行为评分法(CBS)评价大鼠脊髓神经功能恢复情况。伤后14 d处死动物,采用免疫荧光和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠脊髓内Olig-2和OX-42的表达。**结果:**至伤后14 d时,与模型组、丹参加雷帕霉素组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠CBS评分显著降低($P<0.05$);与正常组比较,模型组大鼠Olig-2表达(免疫阳性细胞数及蛋白相对表达量)降低,而OX-42表达升高($P<0.05$);与模型组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组Olig-2表达升高,而OX-42表达降低($P<0.05$);与丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组比较,丹参加雷帕霉素组大鼠Olig-2表达降低,而OX-42表达升高($P<0.05$);上述指标在丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组之间的差异不具有统计学意义。**结论:**丹参注射液可通过升高磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/mTOR信号转导通路的活性以调节Olig-2和OX-42的表达,从而表明其参与大鼠脊髓神经功能恢复的机制可能与通过参与少突胶质细胞和小胶质细胞增殖有关。

[关键词] 脊髓损伤;丹参注射液;少突胶质细胞系转录因子-2;Ⅱ型补体受体(OX-42);磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/mTOR

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)20-0102-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017200102

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170731.1028.028.html>

[网络出版时间] 2017-07-31 10:28

Effect of Danshen Injection on Expression of Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor-2 and OX-42 in Rats After Spinal Cord Injury

LIU Yang, GAO Yu-ting, MIAO Yu-chuan*

(Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danshen injection on expression of oligodendrocyte lineage transcription factor-2 (Olig-2) and OX-42 (markers of proliferation of oligodendrocyte and microglia) in rats after spinal cord injury (SCI), in order to explore its mechanism of promoting spinal cord functional recovery. **Method:** Fifty SPF SD rats were randomly divided into five groups ($n=10$), namely normal control group, model group, Danshen injection treatment group, Danshen injection + rapamycin group and methylprednisolone sodium group. All of the rats, except for normal control group, were included in the weight-drop SCI model by the Allens' method. Then, normal saline ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$), Danshen injection ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) and Danshen injection ($1\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, containing rapamycin $3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were intraperitoneally injected into model group, Danshen injection treatment

[收稿日期] 20170604(001)

[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,从事脊髓损伤机制及中西医结合治疗研究, Tel:13703587447, E-mail:syfy2004@163.com

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

group and Danshen injection + rapamycin group rats once a day, respectively, and methylprednisolone sodium solution ($30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) was injected into the methylprednisolone sodium group rats through tail vein at the dosage of $1 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ once a day. The rats in normal control group were fed with routine foods, with no injection. The combine behavioral score (CBS) of rats in all group were detected on 1, 3, 7, 14 d after SCI. All of these rats were put to death on 14 d after SCI, and the expressions of Olig-2 and OX-42 were detected with immunofluorescence staining and Western blot technique. **Result:** Compared with the model group and the Danshen injection + rapamycin group, CBS significantly declined in treatment group on 14 d after SCI ($P < 0.05$). Compared with the normal control group, the expressions (including relative content and immunes histochemistry positive cells number) of Olig-2 declined, and OX-42 elevated in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the expressions of Olig-2 elevated and OX-42 declined in Danshen injection treatment group and methylprednisolone sodium group ($P < 0.05$). Compared with the Danshen injection treatment group, the expressions of Olig-2 declined and OX-42 elevated in Danshen injection + rapamycin group ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in these indicators between Danshen injection treatment group and methylprednisolone sodium group. **Conclusion:** Danshen injection could promote the recovery of nerve function after SCI by elevating the proliferation of OLS and inhibiting the activation of microglia, and the mechanism may be related to the activity of the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) /Akt/mTOR signaling pathway.

[**Key words**] Spinal cord injury; Danshen injection; oligodendrocyte lineage transcription factor-2; OX-42; phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) /Akt/mTOR

前期研究发现,大鼠脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后给与丹参注射液治疗,不仅可以有效促进脊髓神经功能的恢复[与升高磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/mTOR 信号转导通路活性有关],而且会引起大量神经胶质细胞的增生^[1-2]。神经胶质细胞主要包括星形胶质细胞(astrocyte, AS),少突胶质细胞(oligodendrocytes, OLS)和小胶质细胞等,其标志性蛋白分别为胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic portein, GFAP),少突胶质细胞系转录因子(oligodendrocyte lineage transcription factor, Olig)-2 和 III 型补体受体(OX-42)^[3-5]。丹参对 AS 增生的影响机制较为明确,主要以抑制其中枢神经系统内的免疫炎症反应为主^[6-7]。但丹参对小胶质细胞和 OLS 增生的影响及其机制目前还不甚清楚。本文拟通过观察丹参注射液对大鼠 SCI 后脊髓组织 Olig-2 和 OX-42 的表达变化,以探讨其对 OLS 和小胶质细胞增生的影响,为丹参注射液用于临床 SCI 的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂 丹参注射液(四川升和药业,国药准字 Z51021303);Olig-2 单克隆抗体,OX-42 单克隆抗体, β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-293163, sc-18862, sc-1616);羊抗兔绿色荧光二抗,羊抗小鼠蓝色荧光二抗,抗荧光衰减封片剂,RIPA(强)组织细胞快速裂

解液,BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型),羊抗小鼠二抗(Bioswamp 公司,批号分别为 PAB160312, PAB160016, PAB180018, PAB180006, PAB180007, PAB160013);PVDF 转移膜、化学发光试剂(美国 Millipore 公司,批号分别为 IPVH00010, WBKLS0010);雷帕霉素(Absin 公司,批号 abs810030a,为 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路的特异性阻断剂);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(比利时 Pfizer Manufacturing Belgium NV 公司,批号 H 201320301);其他相关生化试剂或耗材均购自美国 Sigma 公司和北京中杉公司。

1.2 仪器 RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司),CX41 型荧光显微镜(德国 Olympus 公司),DFC295 IMS 型图象分析系统(上海研吉生物科技有限公司),MK3 型酶标仪(芬兰雷勃公司),Mini protean 3 型 cell 电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 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(上海天能科技有限公司)。

1.3 动物 SPF 级 SD 大鼠 50 只,体重(200 ± 20)g,由中国食品药品检定研究院提供,合格证号 SCXK(京)2014-0013。本实验已获山西中医药大学实验动物伦理委员会批准,大鼠经 7 d 常规适应性饲养后开始实验。

2 方法

2.1 模型建立 各组大鼠(正常组除外)参照文献

[8]的方法建立 Allens' 重力打击 SCI 模型:3% 戊巴比妥钠 (30 mg·kg⁻¹) 腹腔麻醉大鼠,逐层分离背部皮肤及肌肉,并咬除 T12 ~ L1 棘突和椎板,暴露硬脊膜。在打击部位预先放置与暴露脊髓形态相似的塑料垫片(保证打击受力均匀),以 5 g 的冲击杆沿中空的垂直冲击通道自 10 cm 高度打击 T13 节段脊髓。打击后大鼠可出现痉挛性身体颤动及尾巴摆动,双下肢呈回缩样扑动;麻醉苏醒后可出现双下肢弛缓性瘫痪,伴尿潴留或尿失禁;且各实验组大鼠的术后基本情况基本一致,表明模型建立成功。各实验组大鼠术后常规饮食,注意保暖,青霉素(剂量 100 U·d⁻¹)腹腔注射以抗感染,膀胱按摩致大鼠可自主排尿为止。

2.2 分组 50 只 SD 大鼠,随机分为正常组、模型组、丹参治疗组、丹参加雷帕霉素组和甲泼尼龙琥珀酸钠组(*n* = 10)。正常组,常规饲养;模型组,生理盐水(1 mL·kg⁻¹)腹腔注射,1 次/d;丹参治疗组,丹参注射液(1 mL·kg⁻¹)^[2]腹腔注射,1 次/d;丹参加雷帕霉素组,丹参注射液(1 mL·kg⁻¹,含雷帕霉素 3 mg·kg⁻¹)腹腔注射,1 次/d;甲泼尼龙琥珀酸钠组,30 g·L⁻¹甲泼尼龙琥珀酸钠溶液(1 mL·kg⁻¹)尾静脉推注,1 次/d。伤后 14 d 处死动物,提取 T13 节段上下各 1 cm 脊髓组织,4% 多聚甲醛固定或液氮内保存。

2.3 联合行为评分法(CBS)检测 分别于伤后 1,3,7 d 及处死前采用 CBS 评价大鼠脊髓神经功能恢复情况。CBS 评分参照文献[9]的方法进行,主要包括开放空间中运动能力、脚趾伸展能力、触地反应能力、回缩反应能力、端正体位能力、斜坡试验和游泳试验等。正常者为 0 分,全瘫者为 100 分。采用双盲法,即双人独立观察记录,最后取其均值。

2.4 免疫荧光(immunofluorescence assay, IFA)检测 组织经固定后常规制成石蜡切片,并经脱蜡水化后,在 0.1 mol·L⁻¹枸橼酸钠缓冲溶液中微波加热修复抗原;封闭血清室温孵育 30 min 后,分别滴加 Olig-2 单克隆抗体和 OX-42 单克隆抗体(1:500),

4 ℃ 保湿盒内孵育过夜;0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液(phosphate buffer, PBS)冲洗 3 次,每次 5 min 后,滴加羊抗兔绿色荧光二抗和羊抗小鼠蓝色荧光二抗(1:500 稀释),37 ℃ 避光孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次,每次 5 min,滴抗荧光淬灭封片液,甘油封片。CX41 型荧光显微镜观察并拍照,采用 IMS 图像分析系统统计 Olig-2 和 OX-42 免疫阳性细胞数。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 低温条件研碎脊髓组织(约 0.5 g),加入 RIPA(强)1 mL 组织细胞快速裂解液,裂解后 10 min 后,样品 4 ℃ 12 000 × *g*, 15 min,取上清,BCA 法进行蛋白质定量(总蛋白 1 g·L⁻¹)。蛋白质分离采用 12% SDS-PAGE 凝胶电泳(其中浓缩胶 80 V 40 min,分离胶 120 V 50 min),转膜采用湿转法(90 V 50 min)。PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后加入相应抗体(1:500 稀释,4 ℃ 过夜),洗膜缓冲液(tris buffered saline tween, TBST)洗涤 3 次,每次 5 min,后加入二抗(1:500 稀释,室温 1 h),TBST 洗涤 3 次,每次 5 min 后,加入化学发光液后将膜置于 Tanon-5200 全自动化学发光分析仪中检测,采用 IMS 图象分析系统计算 Olig-2, OX-42 与 β-actin 的灰度值比值,作为其各自的相对表达量。

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

3 结果

3.1 CBS 评分 各实验组大鼠伤后不同时间 CBS 评分结果见表 1。至伤后 14 d 时,与模型组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠 CBS 评分降低(*P* < 0.05),与丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组比较,丹参加雷帕霉素组大鼠的 CBS 评分降低(*P* < 0.05)。表明各实验组大鼠的脊髓神经功能均出现不同程度受损,但丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠的脊髓神经功能恢复情况优于模型组,而丹参加雷帕霉素组大鼠显著差于丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组(*P* < 0.05)。

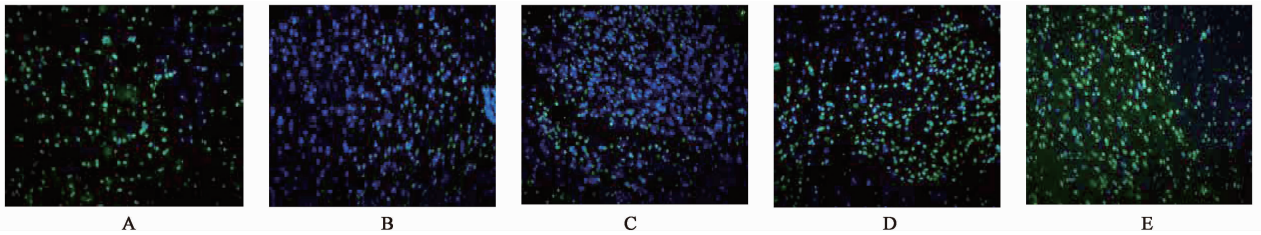
表 1 各实验组大鼠 CBS 评分($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Combine behavioral score of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 7 d	伤后 14 d
正常	-	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
模型	-	90.2 ± 10.1 ¹⁾	82.1 ± 9.2 ¹⁾	68.2 ± 8.8 ¹⁾	50.8 ± 6.1 ¹⁾
丹参注射液	1 mL·kg ⁻¹	89.4 ± 11.0 ¹⁾	76.2 ± 8.1 ¹⁾	48.1 ± 7.7 ^{1,2,3)}	35.6 ± 6.5 ^{1,2,3)}
丹参加雷帕霉素	1 mL·kg ⁻¹ + 3 mg·kg ⁻¹	91.1 ± 11.7 ¹⁾	88.1 ± 10.5 ¹⁾	79.6 ± 10.1 ¹⁾	60.3 ± 7.2 ¹⁾
甲泼尼龙琥珀酸钠	1 mL·kg ⁻¹	90.0 ± 9.6 ¹⁾	74.1 ± 8.9 ¹⁾	44.3 ± 7.1 ^{1,2,3)}	34.8 ± 6.2 ^{1,2,3)}

注:伤前各组大鼠 CBS 评分均为 0 ± 0。与正常组比较¹⁾*P* < 0.05;与模型组比较²⁾*P* < 0.05;与丹参加雷帕霉素组比较³⁾*P* < 0.05(表 2, 3 同)。

3.2 对大鼠 Olig-2 和 OX-42 免疫阳性细胞数变化的影响 在正常组大鼠脊髓组织内,可见一定量的 Olig-2 免疫阳性细胞及少量 OX-42 免疫阳性细胞;SCI 后 14 d 时,与正常组比较,模型组大鼠 Olig-2 免疫阳性细胞数减少,而 OX-42 免疫阳性细胞增多 ($P < 0.05$);与模型组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠 Olig-2 免疫阳性细胞数升高,而 OX-42 免疫阳性细胞数降低 ($P < 0.05$);与丹参加雷帕霉素组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠 Olig-2 免疫阳性细胞数增多,而 OX-42 免疫阳性细胞减少 ($P < 0.05$)。上述指标在丹参治疗组与甲泼尼龙琥珀酸钠组间比较,差异不具有统计学意义。见表 2,图 1。



绿色荧光. Olig-2 免疫阳性细胞;蓝色荧光. OX-42 免疫阳性细胞;A. 正常组;B. 模型组;C. 丹参加雷帕霉素组;D. 丹参治疗组;E. 甲泼尼龙琥珀酸钠组(图 2 同)

图 1 各实验组 Olig-2 和 OX-42 免疫阳性细胞数变化 (IFA, $\times 200$)

Fig. 1 Numbers of immunoreactive cells of Olig-2 and OX-42 (IFA, $\times 200$)

3.3 丹参注射液对 Olig-2 和 OX-42 相对表达量的影响 SCI 后 14 d 时,与正常组比较,模型组大鼠 Olig-2 的相对表达量降低,而 OX-42 的相对表达量升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠 Olig-2 的相对表达量升高,而 OX-42 的相对表达量降低 ($P < 0.05$);与丹参加雷帕霉素组比较,丹参治疗组和甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠 Olig-2 的相对表达量升高,而 OX-42 的相对表达量降低 ($P < 0.05$)。上述指标在丹参治疗组与甲泼尼龙琥珀酸钠组间比较,差异不具有统计学意义。见表 3,图 2。

4 讨论

OLS 是中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 内唯一成髓鞘神经胶质细胞,具有形成髓鞘以营养和保护轴突,分泌神经营养因子以形成并维护功能性神经营养环路等作用^[10]。Olig-2 属转录因子家族,定位于小鼠的第 16 号染色体,主要在 OLS 及其前体细胞中表达,可参与少突胶质细胞分化增殖,以及 CNS 脱髓鞘损伤后的修复^[11]。小胶质细胞来源于骨髓单核细胞,但在正常生理条件下,小胶质细胞无吞噬能力,在 CNS 损伤后,小胶质细胞由

表 2 丹参注射液对 Olig-2 和 OX-42 免疫阳性细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Danshen injection on numbers of immunoreactive cells of Olig-2 and OX-4 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) 个

组别	剂量	Olig-2 免疫阳性细胞	OX-42 免疫阳性细胞
正常	-	67.1 \pm 9.2	6.7 \pm 1.2
模型	-	34.4 \pm 6.2 ¹⁾	127.1 \pm 13.2 ¹⁾
丹参加雷帕霉素	1 mL·kg ⁻¹ + 3 mg·kg ⁻¹	48.1 \pm 5.1 ¹⁾	134.1 \pm 17.2 ¹⁾
丹参注射液	1 mL·kg ⁻¹	181.1 \pm 17.8 ^{2,3)}	37.1 \pm 4.2 ^{2,3)}
甲泼尼龙琥珀酸钠	1 mL·kg ⁻¹	192.7 \pm 15.2 ^{2,3)}	40.1 \pm 6.5 ^{2,3)}

表 3 丹参注射液对 Olig-2 和 OX-42 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Danshen injection on relative expression quantity of Olig-2 and OX-42 in all groups ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量	Olig-2 / β -actin	OX-42 / β -actin
正常	-	0.330 \pm 0.031	0.114 \pm 0.016
模型	-	0.243 \pm 0.023 ¹⁾	0.527 \pm 0.069 ¹⁾
丹参加雷帕霉素	1 mL·kg ⁻¹ + 3 mg·kg ⁻¹	0.291 \pm 0.025 ¹⁾	0.509 \pm 0.061 ¹⁾
丹参注射液	1 mL·kg ⁻¹	0.614 \pm 0.088 ^{2,3)}	0.220 \pm 0.031 ^{2,3)}
甲泼尼龙琥珀酸钠	1 mL·kg ⁻¹	0.622 \pm 0.102 ^{2,3)}	0.228 \pm 0.029 ^{2,3)}

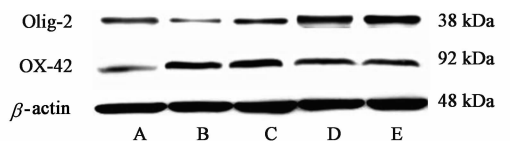


图 2 各实验组 Olig-2 和 OX-42 蛋白的表达

Fig. 2 Expression of Olig-2 and OX-42 in all groups

“休眠状态”被激活,除可引细胞免疫反应外,还可发挥着巨噬细胞的吞噬效应^[12]。该效应在损伤早期可清除损伤局部的坏死组织成分,有助于神经

功能的恢复;而到损伤中晚期,小胶质细胞与损伤神经元接触后可导致神经轴突营养不良性回缩,形成轴突球,从而在物理空间上影响轴突的再生,并和星形胶质细胞共同构成反应性胶质化,影响中枢神经系统的损伤和修复过程^[13]。OX-42 是小胶质细胞表面补体Ⅲ型受体,为活化的小胶质细胞的特异性标记,激活小胶质细胞可导致的显著增加^[5]。本次实验结果显示,SCI 后 14 d 时,随着脊髓组织内 Olig-2 免疫阳性细胞的显著减少和 OX-42 免疫阳性细胞的显著增多,模型组大鼠的脊髓神经功能受到明显的影响。表明在 SCI 发生后,OLS 的死亡以及小胶质细胞的增生在脊髓神经功能的损害过程中扮演重要角色。因此,如何能在 SCI 发生后有效地促进 OLS 的增生,并抑制小胶质细胞的增生,可以作为一个潜在的、能够有效促进 SCI 损伤后组织保护和修复的治疗手段。

中药丹参为唇形科鼠尾草属多年生草本植物,在我国应用历史悠久,具有活血、祛瘀、养血、安神的功效,常被用于某些具有活血化瘀功效的中药方剂中^[14]。

现代药理学研究认为,丹参具有改善局部微循环、降低血液黏稠度、提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和清除氧自由基(oxygen free radical, OFR)等作用^[15-16]。本次实验结果显示,SCI 后 14 d 时,丹参治疗组大鼠的脊髓神经功能恢复情况优于模型组(CBS 评分),表明丹参注射液可有助于脊髓神经功能的恢复,并且该效应与提高 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性有关,表现为与丹参治疗组比较,丹参加雷帕霉素组大鼠的 CBS 评分升高,这与前期研究结果一致^[1-2]。同时,与模型组比较,丹参治疗组大鼠脊髓组织内 Olig-2 免疫阳性细胞数及相对表达量显著升高,而与丹参治疗组比较,丹参加雷帕霉素组大鼠脊髓组织内 Olig-2 免疫阳性细胞数及相对表达量显著降低。提示丹参注射液可以有效的促进 OLS 的增生,从而有助于神经元之间信号传导的恢复。其作用机制可能是丹参可以有效提高 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性,该信号通路被激活后,可以通过磷酸化其下游靶分子(包括核糖体 S6 蛋白激酶和 S6 核糖体蛋白),升高 Olig-2 的翻译和转录水平,从而最终促进 OLS 的增殖分化;同时,PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路还可以调节髓磷脂的翻译和转录,从而有助于髓鞘的形成^[17-19]。

此外,本次实验结果还显示,丹参注射液除还可

以抑制小胶质细胞的活化增殖,并且该效应也与提高 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路活性有关,表现为与模型组比较,丹参治疗组大鼠脊髓组织内 OX-42 免疫阳性细胞数及相对表达量显著降低,同时与治疗组比较,丹参加雷帕霉素组大鼠脊髓组织内 OX-42 免疫阳性细胞数及相对表达量明显升高。有研究表明,小胶质细胞活化的机制可能与神经组织缺血后局部微环境的变化(如钾离子内外流动方式)以及神经元缺血性的信号传递等有关^[20-21]。而丹参注射液激活 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路后,该通路又可以通过调节其下游靶蛋白,如低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)-1 α ,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等,改善损伤局部微循环,从而阻断小胶质细胞的活化途径,减轻其对脊髓神经组织的破坏^[22]。

综上所述,丹参注射液可通过升高 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路的活性以调节 Olig-2 和 OX-42 的表达,从而表明其参与大鼠脊髓神经功能恢复的机制可能与通过促进或抑制少突胶质细胞和小胶质细胞增殖有关。

[参考文献]

- [1] 赵然,宋春阳,王会丹,等.参与脊髓损伤后神经元自我修复机制的实验研究[J].中国药物与临床,2016,16(9):1260-1282.
- [2] 刘杨,高玉亭,苗宇船.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[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(14):182-187.
- [3] Ahadi R, Khodagholi F, Daneshi A, et al. Diagnostic value of serum levels of GFAP, pNF-H, and NSE compared with clinical findings in severity assessment of human traumatic spinal cord injury [J]. Spine, 2015, 40(14):E823-E830.
- [4] YAO R, WANG B, REN C, et al. Olig2 overexpression accelerates the differentiation of mouse embryonic stem cells into oligodendrocyte progenitor cells *in vitro* [J]. Dev Growth Differ, 2014, 56(7):511-517.
- [5] Aloisi F. Immune function of microglia [J]. Gllia, 2001, 36(2):165-179.
- [6] HUANG X, LI Y, LI J, et al. Tanshinone II_A dampens the cell proliferation induced by ischemic insult in rat astrocytes *via* blocking the activation of HIF-1 α /SDF-1 signaling [J]. Life Sci, 2014, 112(1/2):59-67.
- [7] YIN X, YIN Y, CAO FL, et al. Tanshinone II_A attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats [J].

- PLoS One, 2012, 7(6):e38381.
- [8] TIAN D S, JING J H, QIAN J, et al. Effect of oscillating electrical field stimulation on motor function recovery and myelin regeneration after spinal cord injury in rats [J]. *J Phys Ther Sci*, 2016, 28(5):1465-1471.
- [9] 殷铭, 徐又佳. 大鼠脊髓损伤后 CBS 和 BBB 评分比较研究 [J]. *中国血液流变学杂志*, 2012, 22(3):398-400.
- [10] Tsenkina Y, Ricard J, Runko E, et al. EphB3 receptors function as dependence receptors to mediate oligodendrocyte cell death following contusive spinal cord injury [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(10):e1922.
- [11] MacDonald S C, Simcoff R, Jordan L M, et al. A population of oligodendrocytes derived from multipotent neural precursor cells expresses a cholinergic phenotype in culture and responds to ciliary neurotrophic factor [J]. *J Neurosci Res*, 2002, 68(3):255-264.
- [12] Kalla R, LIU Z, XU S, et al. Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice [J]. *J Comp Neurol*, 2001, 36(2):182-201.
- [13] Horn K P, Busch S A, Hawthorne A L, et al. Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(38):9330-9341.
- [14] 柳丽, 张洪泉. 丹参活性成分的现代中药药理研究进展 [J]. *中国野生植物资源*, 2003, 22(6):1-4.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] LI Q, SHEN L, WANG Z, et al. Tanshinone II_A protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84:106-114.
- [18] Narayanan S P, Flores A I, WANG F, et al. Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(21):6860-6870.
- [19] Kearns C A, Ravanelli A M, Cooper K, et al. Fbxw7 limits myelination by inhibiting mTOR Signaling [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(44):14861-14871.
- [20] Kettenmann H, Hoppe D, Gottmann K, et al. Cultured microglial cells have a distinct pattern of membrane channels different from peritoneal macrophages [J]. *J Neurosci Res*, 1990, 26(3):278-287.
- [21] Streit W J, Morioka T, Kolehua A N. MK-801 prevents microglial reaction in rat hippocampus after forebrain ischemia [J]. *Neuroreport*, 1992, 3(2):146-148.
- [22] Goodman C A, Miu M H, Frey J W, et al. A phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-independent activation of mammalian target of rapamycin signaling is sufficient to induce skeletal muscle hypertrophy [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(18):3258-3268.

[责任编辑 邹晓翠]