

基于PI3K/Akt信号通路探究补阳还五汤联合骨髓间质干细胞移植治疗脊髓损伤的作用机制

许洋¹, 吴成林¹, 郭德华¹, 喻胤祺¹, 张国福^{2*}

(1. 江西中医药大学, 南昌 330004; 2. 江西中医药大学附属医院, 南昌 330006)

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤联合骨髓间质干细胞(BMSCs)移植治疗脊髓损伤(SCI)的作用机制。方法:用不同浓度(12.5、25、50 g·kg⁻¹)的补阳还五汤灌胃,通过改良Tarlov评分测定大鼠脊髓功能,筛选出补阳还五汤最合适的浓度。再将SD大鼠分为6组,即假手术组(灌胃等体积生理盐水)、模型组(灌胃等体积生理盐水)、补阳还五汤组(灌胃25 g·kg⁻¹补阳还五汤)、BMSCs移植组(尾静脉注射BMSCs 1 mL)、补阳还五汤+BMSCs组(灌胃25 g·kg⁻¹补阳还五汤同时尾静脉注射BMSCs 1 mL)、补阳还五汤+BMSCs+LY294002组(灌胃25 g·kg⁻¹补阳还五汤,同时尾静脉注射BMSCs 1 mL和LY294002 40 mg·kg⁻¹),各10只。改良Tarlov评分、斜板试验和皮层体感诱发电位波潜伏期测定大鼠脊髓功能;免疫组化法检测脊髓组织中5-溴-2-脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记的阳性细胞数;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脊髓组织中磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、糖蛋白130(gp130)、白细胞介素-6(IL-6)蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组的Tarlov评分和倾斜平面临界角度明显降低($P<0.05$),皮层体感诱发电位波潜伏期和p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达均明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,假手术组和各治疗组的Tarlov评分和倾斜平面临界角度均明显升高($P<0.05$),皮层体感诱发电位波潜伏期和p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达均明显降低($P<0.05$)。和BMSCs组比较,补阳还五汤+BMSCs组Tarlov评分和倾斜平面临界角度明显升高($P<0.05$),皮层体感诱发电位波潜伏期和p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达明显降低($P<0.05$)。移植5周后,补阳还五汤+BMSCs组BrdU标记阳性细胞数明显增多($P<0.05$)。和补阳还五汤+BMSCs组比较,补阳还五汤+BMSCs+LY294002组Tarlov评分和倾斜平面临界角度明显升高($P<0.05$),皮层体感诱发电位波潜伏期和p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达明显降低($P<0.05$)。移植5周后,补阳还五汤+BMSCs+LY294002组BrdU标记阳性细胞数明显增多($P<0.05$)。结论:补阳还五汤通过抑制磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号促进BMSCs迁移进而恢复脊髓功能。

[关键词] 脊髓损伤; 补阳还五汤; 骨髓间充质干细胞; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)04-0009-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221805

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220919.1513.003.html>

[网络出版日期] 2022-09-20 09:19:45

Mechanism of Buyang Huanwutang Combined with Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Treatment of Spinal Cord Injury Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

XU Yang¹, WU Chenglin¹, GUO Dehua¹, YU Yinzhen¹, ZHANG Guofu^{2*}

(1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of Buyang Huanwutang combined with bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) transplantation in the treatment of spinal cord injury (SCI). **Method:** Different concentrations (12.5, 25, 50 g·kg⁻¹) of Buyang Huanwutang were administrated to rats by gavage. The spinal cord function of rats was measured by modified Tarlov score, and the most suitable concentration of

[收稿日期] 2022-07-11

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860856,81960880)

[第一作者] 许洋,在读硕士,从事创伤骨科相关疾病的研究,E-mail:461725589@qq.com

[通信作者] *张国福,博士,主任中医师,从事中医药治疗脊髓损伤相关机制研究,E-mail:zgf8613@163.com

Buyang Huanwutang was screened out. SD rats were then divided into 6 groups, namely, the sham operation group (gavage of equal amount of normal saline), the model group (gavage of equal amount of normal saline), the Buyang Huanwutang group (gavage of 25 g·kg⁻¹ Buyang Huanwutang), the BMSC transplantation group (tail vein injection of BMSCs 1 mL), the Buyang Huanwutang+BMSC group (gavage of 25 g·kg⁻¹ Buyang Huanwutang and tail vein injection of BMSCs 1 mL), the Buyang Huanwutang+BMSC+LY294002 group (gavage of 25 g·kg⁻¹ Buyang Huanwutang and tail vein injection of BMSCs 1 mL and 40 mg·kg⁻¹ LY294002), with 10 rats in each group. The spinal cord function was measured by the modified Tarlov score, inclined plate test, and latency of cortical somatosensory evoked potential. Immunohistochemistry was used to detect the number of 5-bromo-2-deoxyuracil nucleoside (BrdU)-labeled positive cells in the spinal cord tissue. The protein expression levels of phosphorylated protein kinase B (p-Akt), glycoprotein 130 (gp130), and interleukin-6 (IL-6) in spinal cord were detected by Western blot. **Result:** As compared with the sham operation group, the Tarlov score and the critical angle of tilt plane in the model group were significantly decreased ($P<0.05$), and the latency of cortical somatosensory evoked potential wave and the protein expression levels of p-Akt, gp130, and IL-6 were significantly increased ($P<0.05$). As compared with the model group, the Tarlov score and the critical angle of tilt plane in the sham operation group and each treatment group were significantly increased ($P<0.05$), and the latency of cortical somatosensory evoked potential wave and the protein expression levels of p-Akt, gp130, and IL-6 were significantly decreased ($P<0.05$). As compared with the BMSC group, the Tarlov score and the critical angle of inclined plane in the Buyang Huanwutang+BMSC group increased ($P<0.05$), the latency of cortical somatosensory evoked potential wave and the protein expression levels of p-Akt, gp130, and IL-6 decreased ($P<0.05$), and the number of BrdU-labeled positive cells increased 5 weeks after transplantation ($P<0.05$). As compared with the Buyang Huanwutang+BMSC group, the Tarlov score and the critical angle of the inclined plane in the Buyang Huanwutang+BMSC+LY294002 group increased ($P<0.05$), and the latency of cortical somatosensory evoked potential wave and the protein expression levels of p-Akt, gp130, and IL-6 decreased significantly ($P<0.05$). Five weeks after transplantation, the number of BrdU-labeled positive cells increased significantly in the Buyang Huanwutang+BMSC+LY294002 group ($P<0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwutang can promote BMSCs migration and restore spinal cord function by inhibiting phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signal.

[Keywords] spinal cord injury; Buyang Huanwutang; bone marrow mesenchymal stem cells; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

随着现代交通和建筑业的快速发展,脊髓损伤(SCI)的发病率逐年升高^[1]。SCI通常导致不同程度的感觉功能和肢体运动障碍,严重者甚至瘫痪、排便障碍,严重危害患者的身心健康。目前在SCI的治疗上主要以积极预防治疗继发性损伤为主,虽然在一定程度上可缓解病情,但解决不了病患的根本问题。因此探寻并开发一种新的有效的治疗方式仍然是神经科学领域学者们研究的热点。研究发现^[2-3],骨髓间充质干细胞(BMSCs)、神经干细胞、脐血干细胞等干细胞移植有望成为治疗SCI的最佳方法。和其他移植细胞相比,由于BMSCs易取材、具有多向分化潜能,且体内移植不良反应和免疫排斥少、不存在伦理道德问题等优点,被学者们认为是基因治疗的理想靶细胞,被广泛用于神经系统损

伤修复领域中^[4-5]。补阳还五汤出自著名医家王清任的《医林改错》,具有补气活血、化瘀通络的功效,主治“半身不遂,遗尿不禁”^[6]。研究显示,补阳还五汤对脊髓神经损伤修复的作用显著,具有减少神经细胞凋亡,减少瘢痕、促进神经恢复等作用^[7],并且作用机制可能与其激活磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路有关^[8]。本课题前期研究发现,补阳还五汤能促进通过静脉注射移植的BMSCs在体内的迁移,从而起到治疗SCI的作用。但BMSCs在体内迁移机制尚未得到证实,其引导因子尚未明确,值得深入研究^[9]。因此,本研究通过观察脊髓组织中BMSCs迁移并向神经元方向分化的情况及磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、糖蛋白130(gp130)、白细胞介素-6(IL-6)蛋白表达,从而探讨

补阳还五汤促进 BMSCs 趋化迁移和改善脊髓功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 SPF级8周龄SD雌性大鼠60只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004,体质量200~250 g,饲养于江西中医药大学实验动物科技中心,许可证号SYXK(赣)2018-0003,饲养于洁净环境中,温度(23±2)℃,湿度40%~70%,自由饮食饮水,12 h光暗交替。正常饲养7 d以适应环境,第14天开始进行实验。本研究经江西中医药大学动物福利与伦理委员会批准(伦理编号JZLLSC20210023)。

1.2 试剂 鼠抗人尿嘧啶脱氧核苷(BrdU)单克隆抗体、DAB显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司,批号分别为5292、CW0125);兔多克隆抗体p-Akt抗体、gp130抗体、IL-6抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为ab32101、af6291、BS-6309r);小鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为TA-08、ZB-2305);抑制剂LY294002(美国MedChemexpress生物科技公司,批号51598)。

1.3 仪器 DYY-6C型蛋白垂直电泳仪(北京市六一仪器厂),1703930型转膜仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司],TC-100B型恒温摇床(上海颂成生物科技有限公司),HH-2型数显恒温水浴锅(郑州宏朗仪器设备有限公司),MF53型倒置荧光显微镜(广州市明美光电有限公司)。

1.4 中药制备 补阳还五汤药物按照2020年版《中华人民共和国药典》规定剂量范围内的临床常用剂量称取组成,药物具体如下:生黄芪60 g(批号210606),当归10 g(批号210419),地龙10 g(批号210226),赤芍10 g(批号020410),川芎10 g(批号210722),桃仁10 g(批号210427),红花10 g(批号210526),以上饮片均购于江西中医药大学附属医院中药房,均为江西江中中药饮片有限公司产品,经江西中医药大学附属医院中药库李晓芳副主任中药师鉴定为合格药材。将以上药物置于砂锅容器中,加入相当于药材体积5倍的纯净自来水浸泡1~2 h,煮沸30 min,滤过药液,再加入3倍量的纯净自来水继续煮沸20 min,过滤,合并2次滤液,将药液浓缩至总量200 mL备用,相当于临床等效药物质量浓度0.6 g·mL⁻¹。补阳还五汤按照不同剂量(12.5、25、50 g·kg⁻¹)进行灌胃给药;手术组、模型组

行生理盐水灌胃,每天进行2次灌胃。在术后5周采用改良Tarlov评分测定各组大鼠脊髓神经功能情况。筛选出合适的补阳还五汤浓度用于后续试验。

2 方法

2.1 BMSCs的制备与鉴定 麻醉6周龄大鼠并处死,取大鼠双侧下肢胫骨骨髓,将单核细胞单独分离,接种单核细胞于培养瓶中,培养箱培养细胞3 d,将未贴壁的细胞弃掉,流式细胞仪检测细胞表面标记物。将证实的BMSCs细胞扩增培养,取第3代BMSCs细胞用于体内移植。移植前1 d,将BrdU标记加入到20 μmol·L⁻¹细胞中,细胞中BrdU标记率≥70%。洗涤细胞后,在细胞中加入0.25%胰蛋白酶消化,离心细胞,将磷酸盐缓冲液(PBS)溶液加入到细胞中重悬,调整细胞密度为1×10⁶个/mL备用。

2.2 SCI模型制备 将60只大鼠分为假手术组10只和造模组50只。本研究采用改良Allen重物打击法制备SCI模型^[10],具有保持硬膜完整性,造成大鼠脊髓重度损伤,即完全性截瘫。各组大鼠均腹腔注射60 mg·kg⁻¹氯胺酮麻醉,俯卧位固定大鼠,在背部以T10为中心,纵向切一3 cm的小口,充分暴露T10段脊髓。在T10脊髓的表面放置一个直径为3 mm的圆形薄片,用10 g重砝码自由坠落12.5 cm打击该垫片,造成T10段脊髓的冲击伤,逐层缝合大鼠皮肤。当撞击脊髓时大鼠出现身体抖动,打击局部脊髓表面迅速呈瘀紫色,术后双下肢出现完全瘫痪时视为SCI模型制备成功。手术结束后,将所有大鼠均置于25℃的动物房内统一饲养,将垫有锯末的平板置于大鼠笼中,以防肢体或骶部压疮及吸收排尿,并及时更换。手术结束后人工排尿,2次/d,各大鼠均连续排尿14 d,直至大鼠恢复自主排尿时停止。假手术组大鼠只暴露T10段脊髓并不打击脊髓,其他步骤和其他各组大鼠相同。50只大鼠均成功制备SCI大鼠模型。

2.3 分组和给药 将60只大鼠随机分为6组,即假手术组(灌胃等体积生理盐水)、模型组(灌胃等体积生理)、补阳还五汤组(分上、下午2次灌胃25 g·kg⁻¹补阳还五汤)、BMSCs移植组(尾静脉注射1×10⁶个/mL BMSCs 1 mL)、补阳还五汤+BMSCs组(灌胃25 g·kg⁻¹补阳还五汤,同时尾静脉注射1×10⁶个/mL BMSCs 1 mL)、补阳还五汤+BMSCs+PI3K/Akt信号通路抑制剂(LY294002)组(灌胃25 g·kg⁻¹补阳还五汤,尾静脉注射LY294002 40 mg·kg⁻¹,1 h后尾静脉注射1×10⁶个/mL BMSCs

1 mL), 每组 10 只。

2.4 行为学观察 本实验采用改良 Tarlov 评分和斜板试验对大鼠行为学进行观察, 分别于术后 1、3、5 周时对大鼠进行检测。改良 Tarlov 评分: 0、1 分, 没有髌、膝关节的非反射性运动; 2 分, 仅有髌、膝、踝关节运动; 3 分, 能主动支持体质量和不协调步态或偶尔出现协调步态; 4 分, 前肢和后肢协调的步态, 行走时有趾间关节运动; 5 分, 步态正常。斜板试验: 取一块长方形木板, 将 2 mm 厚的橡胶垫垫于木板上, 将大鼠头向前, 身体纵轴与斜面板纵轴垂直放置, 将木板与水平面之间的角度逐渐增大, 直至大鼠在原定位置上刚好可以维持 5 s, 将这—个角度称为倾斜平面临界角度。

2.5 皮层体感诱发电位检测 大鼠麻醉固定后, 在腓肠肌中部置入刺激电极, 用 1.5~4 mA 刺激强度, 1.9 Hz 刺激频率刺激大鼠。在头顶部中线与冠状缝交点处头皮下置入记录电极, 在其后方 0.5 cm 处置入参考电极, 将动物的尾部用 0.9% 氯化钠浸湿并连接地线。于术后 1、3、5 周时, 用肌电图诱发电位仪检测大鼠的感觉诱发电位(SEP), 观察皮层体感诱发电位波潜伏期变化。

2.6 免疫组织化学染色检测 取除模型组和补阳还五汤组外的其余组, 分别于移植造模完后 1、3、5 周麻醉大鼠并开胸, 大鼠心脏用 4% 多聚甲醛灌注固定, 将损伤区的脊髓组织切取 1.5 cm, 用中性的多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋后制成 3 μm 的切片, 再经脱蜡、水化、抗原修复、封闭后, 用吸水纸吸掉组织周围的封闭液, 不洗, 每张玻片滴加足够量的稀释好的一抗 Brdu(1:200), 放入湿盒中, 4 °C 孵育过夜。取出湿盒, 室温静置 45 min, PBS 浸洗玻片 3 次, 每次 5 min, 滴加二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(1:2 000), 37 °C 孵育 30 min, PBS 充分淋洗。染色后用显微镜观察。取各 BMSCs 移植组大鼠 5 周后的样本, 观察 Brdu 的阳性细胞数量。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脊髓组织中 p-Akt、gp130、IL-6 蛋白表达 处死各组大鼠, 取脊髓组织 20 mg, 将在冰上研磨组织呈粉末状, 将裂解液加入到组织中, 制成组织悬液后 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min(离心半径 12 cm), 对蛋白样本总浓度进行测定。转移蛋白样品至 PVDF 膜, 将入 5% 脱脂奶粉, 封闭样品 2 h。蛋白样品中分别加入一抗 p-Akt、gp130、IL-6(1:1 000) 和内参蛋白 GAPDH(1:2 000), 孵育后洗涤蛋白样品, 将二抗(1:2 000) 加入到蛋白样品中, 室温孵育 1 h。用 ECL 液显色,

Image J 软件观察条带灰度值并计算蛋白表达。

2.8 统计学分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据采用单因素方差分析, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 补阳还五汤浓度的筛选 为了选择合适的补阳还五汤的浓度, 通过改良 Tarlov 评分测定不同浓度补阳还五汤灌胃 SCI 大鼠模型的脊髓功能恢复情况。与假手术组比较, 模型组大鼠改良 Tarlov 评分明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤低、中、高剂量组大鼠改良 Tarlov 评分明显升高($P < 0.05$)。与补阳还五汤高剂量组比较, 补阳还五汤低剂量组灌胃后明显提高了大鼠改良 Tarlov 评分($P < 0.05$), 因此选择 25 g·kg⁻¹ 补阳还五汤进行后续实验。见表 1。

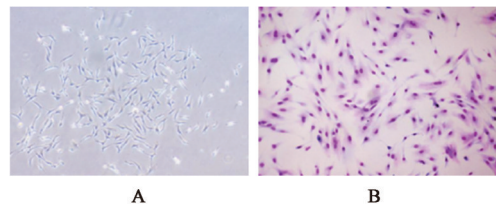
表 1 补阳还五汤对 SCI 大鼠脊髓功能恢复的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Buyang Huanwutang on spinal cord function recovery of SCI rat model ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	改良 Tarlov 评分/分
假手术组		4.81±0.32
模型组		0.17±0.09 ¹⁾
补阳还五汤低剂量组	12.5	1.41±0.12 ²⁾
补阳还五汤中剂量组	25	2.63±0.18 ^{2,3)}
补阳还五汤高剂量组	50	1.86±0.13 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$; 与补阳还五汤高剂量组比较³⁾ $P < 0.05$

3.2 BMSCs 培养和鉴定 BMSCs 原代细胞多呈星形和多角型, 细胞集落样生长。后继续生长, 直至细胞融合率为 80%, 姬姆萨染色显示, 传 3 代 BMSCs 细胞呈短梭形, 以旋涡状或放射状排列分布。显微镜下可见图 1。



注: A. 无染色; B. 姬姆萨染色

图 1 大鼠原代 BMSCs 形态(倒置显微镜, ×40)

Fig. 1 Morphology of primary BMSCs in rats (inverted microscope, ×40)

3.3 鉴定 BMSCs 表面标志物 取生长良好的第 3 代 BMSCs 表面标志, BMSCs 表达间充质干细胞标

志 CD90、CD105,不表达造血干细胞标志 CD14,具有 BMSCs 特性。见表 2。

表 2 流式细胞术鉴定第 3 代 BMSCs 细胞表面标志物

Table 2 Identification of cell surface markers in third generation BMSCs by flow cytometry

BMSCs 表面标志物	阳性率/%
CD90	99.95
CD105	97.32
CD14	1.35

表 3 补阳还五汤联合 BMSCs 移植对 SCI 大鼠 Tarlov 评分的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of Buyang Huanwutang combined with BMSCs transplantation on Tarlov score of SCI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1周	3周	5周
假手术组		4.20±0.42	4.50±0.53	4.83±0.41
模型组		0.10±0.05 ¹⁾	0.13±0.07 ¹⁾	0.17±0.09 ¹⁾
补阳还五汤组	25	1.50±0.12 ²⁾	1.89±0.15 ²⁾	2.63±0.17 ²⁾
BMSCs 组		1.60±0.13 ²⁾	2.56±0.18 ²⁾	3.25±0.21 ²⁾
补阳还五汤+BMSCs 组	25	1.96±0.10 ^{2,3)}	3.39±0.21 ^{2,3)}	4.13±0.25 ^{2,3)}
补阳还五汤+BMSCs+LY294002 组	25	2.63±0.26 ^{2,3,4)}	3.91±0.29 ^{2,3,4)}	4.62±0.32 ^{2,3,4)}

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05;与 BMSCs 组比较³⁾P<0.05;与补阳还五汤+BMSCs 组比较⁴⁾P<0.05(表 4-表 7 同)

3.5 补阳还五汤联合 BMSCs 移植对 SCI 大鼠倾斜平面临界角度的影响 与假手术组比较,模型组倾斜平面临界角度明显降低(P<0.05);与模型组比较,在 1、3、5 周时各治疗组倾斜平面临界角度明显升高(P<0.05)。与 BMSCs 组比较,补阳还

3.4 补阳还五汤联合 BMSCs 移植对 SCI 大鼠 Tarlov 评分的影响 与假手术组比较,在 1、3、5 周时模型组 Tarlov 评分均明显降低(P<0.05);与模型组比较,在 1、3、5 周时各治疗组 Tarlov 评分均明显升高(P<0.05)。与 BMSCs 组比较,在 1、3、5 周时补阳还五汤+BMSCs 组 Tarlov 评分明显升高(P<0.05)。与补阳还五汤+BMSCs 组比较,在 1、3、5 周时补阳还五汤+BMSCs+LY294002 组评分明显升高(P<0.05)。见表 3。

五汤联合 BMSCs 移植后,补阳还五汤+BMSCs 组倾斜平面临界角度明显升高(P<0.05);与补阳还五汤+BMSCs 组比较,补阳还五汤+BMSCs+LY294002 组倾斜平面临界角度明显升高(P<0.05)。见表 4。

表 4 补阳还五汤联合 BMSCs 移植对 SCI 大鼠倾斜平面临界角度的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of Buyang Huanwutang combined with BMSCs transplantation on critical angle of inclined plane in SCI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1周	3周	5周
假手术组		62.60±2.27	62.75±2.32	64.67±3.89
模型组		21.90±2.23 ¹⁾	20.50±3.07 ¹⁾	20.00±4.05 ¹⁾
补阳还五汤组	25	29.55±3.93 ²⁾	32.22±4.18 ²⁾	32.06±4.34 ²⁾
BMSCs 组		30.70±2.15 ²⁾	34.22±3.26 ²⁾	33.81±5.41 ²⁾
补阳还五汤+BMSCs 组	25	32.25±2.17 ^{2,3)}	37.17±3.82 ^{2,3)}	41.50±5.76 ^{2,3)}
补阳还五汤+BMSCs+LY294002 组	25	35.45±4.05 ^{2,3,4)}	40.72±4.07 ^{2,3,4)}	45.32±5.87 ^{2,3,4)}

3.6 补阳还五汤联合 BMSCs 移植对 SCI 大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期的影响 与假手术组比较,模型组大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期明显升高(P<0.05);与模型组比较,各治疗组大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期明显降低(P<0.05)。假手术组大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期为 17~18 ms,各治疗组大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期在 1、3、5 周时均明显升高(P<0.05)。与 BMSCs 组比较,补阳还五汤联合 BMSCs 移植后,补阳还五汤+BMSCs 组大鼠皮层

体感诱发电位波潜伏期明显降低(P<0.05)。与补阳还五汤+BMSCs 组比较,补阳还五汤+BMSCs+LY294002 组大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期明显降低(P<0.05)。见表 5。

3.7 补阳还五汤联合 BMSCs 移植对 SCI 大鼠 Brdu 标记阳性细胞的影响 假手术组脊髓组织无 Brdu 标记的阳性细胞;各 BMSCs 移植组脊髓组织中均可见棕黄色 Brdu 标记的阳性细胞;在 BMSCs 移植 1 周后迁移细胞数量大量成活,移植 3~5 周时脊髓

表5 补阳还五汤联合BMSCs移植对SCI大鼠皮层体感诱发电位波潜伏期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 5 Effect of Buyang Huanwutang combined with BMSCs transplantation on latency of cortical somatosensory evoked potentials in SCI rats ($\bar{x}\pm s, n=10$) ms

组别	剂量/g·kg ⁻¹	1周	3周	5周
假手术组		17.62±1.13	18.00±1.15	17.72±1.18
模型组		46.81±3.02 ¹⁾	43.76±2.26 ¹⁾	38.42±2.01 ¹⁾
补阳还五汤组	25	43.52±2.45 ²⁾	40.12±2.36 ²⁾	35.21±1.86 ²⁾
BMSCs组		43.57±2.46 ²⁾	40.15±2.37 ²⁾	35.24±1.87 ³⁾
补阳还五汤+BMSCs组	25	39.18±2.21 ^{2,3)}	36.24±2.25 ^{2,3)}	31.43±1.73 ^{2,3)}
补阳还五汤+BMSCs+LY294002组	25	35.15±1.87 ^{2,3,4)}	32.16±1.74 ^{2,3,4)}	28.43±1.63 ^{2,3,4)}

组织中仍有较多BMSCs存活。移植5周时,与BMSCs组比较,补阳还五汤+BMSCs组BrdU标记阳性细胞数明显增加($P<0.05$)。与补阳还五汤+BMSCs组比较,补阳还五汤+BMSCs+LY294002组BrdU标记阳性细胞数明显增加($P<0.05$)。见表6、图2。

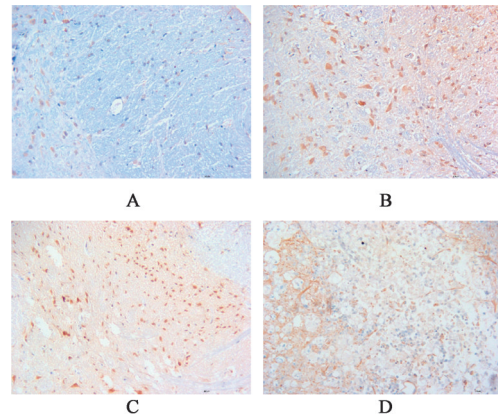
表6 各BMSCs移植组术后5周免疫组化阳性细胞计数比较 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 6 Comparison of immunohistochemical positive cell count of BMSCs transplantation groups at 5 weeks after operation ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BrdU标记阳性细胞数/个
BMSCs组		8.64±0.92
补阳还五汤+BMSCs组	25	9.87±0.25 ¹⁾
补阳还五汤+BMSCs+LY294002组	25	12.54±0.37 ^{1,2)}

注:与BMSCs组比较¹⁾ $P<0.05$;与补阳还五汤+BMSCs组比较²⁾ $P<0.05$

3.8 补阳还五汤联合BMSCs移植对SCI大鼠脊髓组织中p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠脊髓组织中p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达水平明显增加($P<0.05$);与模型组比较,假手术组和各治疗组大鼠脊髓组织中p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达水平明显下调($P<0.05$);与BMSCs组比较,补阳还五汤+BMSCs组中p-Akt、



注:A.假手术组;B. BMSCs组;C.补阳还五汤+BMSCs组;

D.补阳还五汤+BMSCs+LY294002组

图2 各BMSCs移植组术后5周免疫组化阳性细胞染色(免疫组化,×200)

Fig. 2 Immunohistochemical positive cell staining diagram of BMSCs transplantation groups at 5 weeks after operation (IHC, ×200)

gp130、IL-6蛋白表达水平明显下调($P<0.05$);与补阳还五汤+BMSCs组比较,补阳还五汤+BMSCs+LY294002组中p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达水平明显下调($P<0.05$)。见表7、图3。

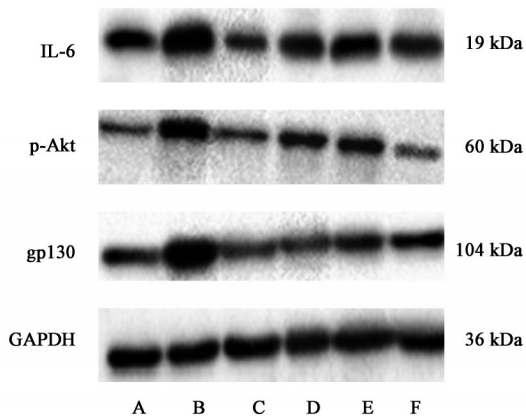
4 讨论

SCI是中枢神经系统常见疾病之一,其致残率高,严重威胁患者的身心健康^[11]。目前对SCI的治疗主要以手术为主,但治疗效果不明显,且治疗成

表7 补阳还五汤联合BMSCs移植对p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Buyang Huanwutang combined with BMSCs transplantation on protein expression of p-Akt, gp130 and IL-6 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-Akt/GAPDH	gp130/GAPDH	IL-6/GAPDH
假手术组		0.50±0.03	0.73±0.01	0.53±0.03
模型组		2.54±0.09 ¹⁾	2.11±0.08 ¹⁾	5.06±0.14 ¹⁾
补阳还五汤组	25	0.87±0.06 ²⁾	1.30±0.06 ²⁾	3.16±0.14 ²⁾
BMSCs组		1.07±0.06 ²⁾	1.62±0.04 ²⁾	2.01±0.08 ²⁾
补阳还五汤+BMSCs组	25	0.77±0.05 ^{2,3)}	1.22±0.04 ^{2,3)}	1.67±0.08 ^{2,3)}
补阳还五汤+BMSCs+LY294002组	25	0.62±0.07 ^{2,3,4)}	1.05±0.06 ^{2,3,4)}	1.26±0.13 ^{2,3,4)}



注:A.假手术组;B.模型组;C.补阳还五汤组;D. BMSCs组;
E.补阳还五汤+BMSCs组;F.补阳还五汤+BMSCs+LY294002组
图3 各组大鼠中p-Akt、gp130、IL-6的表达水平电泳

Fig. 3 Electrophoresis of p-Akt, gp130 and IL-6 expression levels in rats in each group

本高,增加患者经济负担。现有研究发现,BMSCs移植是治疗SCI的可能机制之一^[12]。BMSCs可分化为神经元细胞和神经胶质细胞,并有促进神经再生、促进血管新生和抑制炎症等生物学作用^[13]。研究表明,BMSCs可以通过促进轴突再生改善SCI的功能恢复^[14-15]。SCI在祖国医学中属于“体惰”“痿症”的范畴^[16]。多项研究证实,中药方剂补阳还五汤在临床的应用中取得良好的成效^[17-18]。张国福等^[9]通过前期实验研究发现,补阳还五汤可以促进移植的BMSCs迁移,进而有效的恢复脊髓功能,但目前关于其迁移的具体机制尚不清楚。

在本研究中,通过补阳还五汤联合BMSCs干预SCI大鼠模型,结果发现补阳还五汤和BMSCs均能增加SCI大鼠Tralov评分和倾斜平面临界角度,降低体感诱发电位波潜伏期,且二者联合使用效果更明显。这与聂颖等^[19]研究结果一致,补阳还五汤联合BMSCs对SCI大鼠改善前肢运动功能可产生协同增效作用。

研究发现,用大鼠的BMSCs并利用BrdU标记注射到大鼠颈内动脉,发现BMSCs能迁移到海马、大脑皮质等神经元分布丰富的部位^[20]。本研究将BrdU标记的BMSCs尾静脉注射SCI大鼠体内,结果表明带BrdU标记移植的BMSCs在术后1周可通过血液循环在宿主体内迁移至SCI部位,5周后补阳还五汤可明显促进移植的BMSCs迁移成活。本实验中假手术组未检测到BMSCs,说明移植的BMSCs不向正常的脊髓组织迁移,而各治疗组中就能检测到BMSCs,说明BMSCs能向损伤后的脊髓组织迁移,猜测这与创伤部位的炎症或修复等因素相关。

目前BMSCs体外迁移的信号通路有多种^[21-23],其中PI3K/Akt信号通路可介导SCI的发生发展。PI3K/Akt信号转导通路作为受体信号向细胞内转导的重要途径,在细胞凋亡、血管生成以及细胞增殖和向体内稳态迁移等许多机制过程中起着关键作用^[24-25]。在PI3K/Akt信号通路中,Akt是PI3K的直接靶基因,可通过激活PI3K而磷酸化Akt而发挥生物学作用,因此,磷酸化的Akt常常被作为衡量PI3K活性的指标。IL-6在神经细胞的形成和分化、神经保护、神经轴突再生等作用中扮演重要角色^[26]。IL-6在正常脑组织中表达较少,当神经系统疾病发生时候,其在脑组织中的表达明显增加,可见IL-6充当着神经元细胞的重要信号调节者^[27]。研究表明,IL-6可通过PI3K/Akt信号通路参与介导神经元细胞的凋亡,进而发挥生物学作用^[28]。gp130是IL-6细胞因子家族的主要 β 受体,在免疫和神经系统的多种细胞类型中均有表达,但gp130本身并不具有酪氨酸激酶活性,在IL-6家族细胞因子作用下才能进行信号转导^[29]。而PI3K/Akt信号通路正是位于IL-6细胞因子家族共用信号传导亚单位gp130下游的信号传导通路^[30]。本研究结果显示,补阳还五汤和BMSCs抑制SCI大鼠脊髓组织中p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达,且补阳还五汤能促进BMSCs移植更明显的抑制p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达。因此猜测补阳还五汤能促进BMSCs移植改善SCI是通过调控PI3K/Akt实现的。为了进一步探究补阳还五汤通过促进BMSCs移植对SCI的治疗作用,本研究采用PI3K/Akt信号通路抑制剂干预SCI大鼠,结果发现SCI大鼠Tralov评分和倾斜平面临界角度均增加,体感诱发电位波潜伏期降低,脊髓组织中p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达均明显减少;通过联合补阳还五汤、BMSCs和PI3K/Akt信号通路抑制剂联合干预SCI大鼠后发现,Tralov评分和倾斜平面临界角度增加明显,体感诱发电位波潜伏期降低明显,且p-Akt、gp130、IL-6蛋白表达明显减少,提示补阳还五汤促进BMSCs迁移,并通过抑制PI3K/Akt信号恢复脊髓功能。

综上所述,在SCI后,补阳还五汤联合BMSCs对SCI有治疗作用,其机制通过抑制PI3K/Akt信号通路促进BMSCs的迁移,从而恢复脊髓神经功能。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] ALGAHTANY M, MCFAULL S, CHEN L, et al. The

- changing etiology and epidemiology of traumatic spinal injury: A population-based study [J]. *World Neurosurg*, 2021, 149: e116-e127.
- [2] FU X, LIU G, HALIM A, et al. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair [J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2019, 8(8): 784.
- [3] LIAU L L, LOOI Q H, CHIA W C, et al. Treatment of spinal cord injury with mesenchymal stem cells [J]. *Cell Biosci*, 2020, 10: 112.
- [4] JING W, ZUO D, CAI Q, et al. Promoting neural transdifferentiation of BMSCs via applying synergetic multiple factors for nerve regeneration [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 375(2): 80-91.
- [5] KAMINSKA A, RADOSZKIEWICZ K, RYBKOWSKA P, et al. Interaction of neural stem cells (nscs) and mesenchymal stem cells (MSCs) as a promising approach in brain study and nerve regeneration [J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(9): 1464.
- [6] 牛雯颖, 毕悦, 张玉昆, 等. 补阳还五汤适应证研究进展 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(8): 29-33.
- [7] 覃浩然, 钟远鸣, 廖俊城, 等. 补阳还五汤治疗继发性脊髓损伤作用机制研究进展 [J]. *山西中医*, 2021, 37(8): 60-62.
- [8] 吴晓光, 李蒙蒙, 仇志富, 等. 补阳还五汤对脑出血大鼠 PI3K/Akt 信号通路的影响及其神经保护作用的机制 [J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2016, 43(2): 119-123.
- [9] 张国福, 王和鸣. 补阳还五汤对骨髓间质干细胞移植治疗大鼠脊髓损伤的影响 [J]. *中国骨伤*, 2006, 19(8): 452-454.
- [10] VIJAYAPRAKASH K M, SRIDHARAN N. An experimental spinal cord injury rat model using customized impact device: A cost-effective approach [J]. *J Pharmacol Pharmacother*, 2013, 4(3): 211-213.
- [11] ECKERT M J, MARTIN M J. Trauma: Spinal cord injury [J]. *Surg Clin North Am*, 2017, 97(5): 1031-1045.
- [12] CAI S, SHUM D, CHAN Y S. Human induced pluripotent stem cell-derived sensory neurons for fate commitment of bone marrow stromal cell-derived schwann cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1739: 149-160.
- [13] LIU G Y, WU Y, KONG F Y, et al. BMSCs differentiated into neurons, astrocytes and oligodendrocytes alleviated the inflammation and demyelination of EAE mice models [J]. *PLoS One*, 2021, 16(5): e243014.
- [14] LIN L, LIN H, BAI S, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) improved functional recovery of spinal cord injury partly by promoting axonal regeneration [J]. *Neurochem Int*, 2018, 115: 80-84.
- [15] LIN X, CHEN H, CHEN M, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve post-ischemia neurological function in rats via the PI3K/Akt/GSK-3 β /CRMP-2 pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(5): 2193-2201.
- [16] 赵继荣, 蔡毅, 陈文, 等. 中药治疗脊髓损伤相关机制研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(8): 5-9.
- [17] 叶承莉, 唐勇, 漆伟, 等. 补阳还五汤加麝香治疗脊髓损伤临床研究 [J]. *实用中医药杂志*, 2015, 31(12): 1090-1092.
- [18] 林晓敏, 潘伟滨, 吴玉琼, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤后 I 型胶原蛋白和 IV 型胶原蛋白表达的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(31): 4986-4991.
- [19] 聂颖, 范瑜洁, 王泉治, 等. 补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞移植对脊髓损伤气虚血瘀证的疗效 [J]. *神经损伤与功能重建*, 2021, 16(12): 714-718.
- [20] 王昌铭, 李华信, 姚永杰, 等. BMSCs 颈内动脉移植在 VD 大鼠脑内存活迁移及其对海马细胞凋亡的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2014, 30(3): 215-219.
- [21] MENG Z, FENG G, HU X, et al. SDF factor-1 α promotes the migration, proliferation, and osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells through the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Stem Cells Dev*, 2021, 30(2): 106-117.
- [22] ZHAN J, HE J, CHEN M, et al. Fasudil promotes BMSC migration via activating the MAPK signaling pathway and application in a model of spinal cord injury [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 9793845.
- [23] LV C, YANG S, CHEN X, et al. MicroRNA-21 promotes bone mesenchymal stem cells migration *in vitro* by activating PI3K/Akt/MMPs pathway [J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 46: 156-162.
- [24] FAKHRI S, IRANPANAH A, GRAVANDI M M, et al. Natural products attenuate PI3K/Akt/mTOR signaling pathway: A promising strategy in regulating neurodegeneration [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153664.
- [25] 童星丽, 谈勇, 殷燕云, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨丹参酮 II_A 调控血管内皮细胞活化因子表达的实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(13): 3589-3596.
- [26] DING C P, XUE Y S, YU J, et al. The red nucleus interleukin-6 participates in the maintenance of neuropathic pain induced by spared nerve injury [J].

- Neurochem Res, 2016, 41(11):3042-3051.
- [27] TRAUTZ F, FRANKE H, BOHNERT S, et al. Survival-time dependent increase in neuronal IL-6 and astroglial GFAP expression in fatally injured human brain tissue[J]. Sci Rep, 2019, 9(1):11771.
- [28] HE F, ZHANG N, LV Y, et al. Low-dose lipopolysaccharide inhibits neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway in rats [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(3):1443-1452.
- [29] MALSCH P, ANDRATSCH M, VOGL C, et al. Deletion of interleukin-6 signal transducer gp130 in small sensory neurons attenuates mechanonociception and down-regulates TRPA1 expression[J]. J Neurosci, 2014, 34(30):9845-9856.
- [30] LI X, HE S, TIAN Y, et al. Synergistic inhibition of GP130 and ERK signaling blocks chemoresistant bladder cancer cell growth [J]. Cell Signal, 2019, 63: 109381.
- [责任编辑 周冰冰]

·书讯·

健康教育能够提高脊柱骨折患者对疾病的认知能力

——评《临床常见疾病护理健康教育路径参考》

随着医学模式从传统的生物医学模式转变为生物—心理—社会医学模式,现代医学教育应进一步加强医学心理健康教育。脊柱骨折是骨科常见的创伤之一。多发生于脊柱活动度较大、应力相对集中的部位,其发生率由高到低依次为胸腰段、颈椎、腰椎和胸椎。脊柱骨折常并发脊髓或马尾神经的损伤。任何引起脊柱过度屈曲、过度伸展、旋转或侧屈的暴力,都可能造成脊柱骨折。由于脊髓位于椎骨构成的椎管中,因而脊柱骨折时常会并发脊髓损伤,严重影响脊柱骨折患者的自理能力和生活质量,甚至危及生命。健康教育指的是帮助对象人群或个体改善健康相关行为的系统的社会活动,医生根据患者病史、病程、疗程阶段、是否出现不良反应、预后等具体情况开展治疗依从性、预防脊柱骨折不良反应、生活注意事项等相关知识的面对面宣传。

《临床常见疾病护理健康教育路径参考》蒲亨萍,杨平主编,由贵州科技出版社2016年出版。全书贯穿了现代护理的理念,主要介绍的是一种新的临床护理模式,内容包括了临床常见的健康教育路径。健康教育路径对脊柱骨折患者的健康状况进行全面的监测、分析、评估,然后进行健康的咨询和指导,对于发现的健康风险因素进行干预。健康教育路径是我国公共卫生服务的组成部分,在提高脊柱骨折患者健康素养、预防疾病不良反应、保护和促进健康方面发挥着重要作用。通过健康教育干预后,患者的心理担忧均有明显的缓解,说明科学的健康教育路径干预可以有效改善脊柱骨折患者的愈合和心理状态,明显加快康复进程。开展脊柱骨折患者的健康教育路径,首先加强对患者的支持,主动关心患者;建立良好护患关系,增加医患信任感;对患者家属进行家庭支持相关知识的教育,通过各种方式开展卫生宣教;鼓励患者说出自身感受,了解心理状态。坚持以健康教育路径改善脊柱骨折患者健康问题的原则,从良好习惯、合理膳食、心理平衡、适量运动、充足睡眠、保健养生等多个方面,提供一套有效的方案体系,进行日常生活行为指导和管理,通过科学生活改善脊柱骨折患者的健康问题,改善患者情绪状态,提升生存质量,稳定生命安全。采用健康信息传播等干预措施,促使疗养员自觉采纳有利于健康的行为和生活方式,从而避免或减少暴露于危险因素,帮助实现疾病预防控制、治疗康复、提高健康水平的目的。健康教育路径贯穿护理过程,能够使人们自觉地采纳有益于健康的行为和生活方式,帮助脊柱骨折愈合,促进健康。倡导脊柱骨折患者掌握常见病的护理知识,提高了脊柱骨折患者的意识,健康教育路径旨在帮助并鼓励脊柱骨折患者提升健康信念,让患者知道在何时、何处能获得助力。其次,接受教育的患者将获取到必要的医学知识,提高个人健康素养能力,从而选择有益于自身健康的行为和生活方式。健康教育路径是通过有计划、有组织、有系统的对脊柱骨折患者进行教育活动,促使患者改变不良的健康行为和影响健康行为的相关因素,减少抑郁或焦虑心理的发生。将健康促进的理念和标准融入业务行为和组织文化,通过制定实施有利于健康的政策、创造有益于医患身心健康的环境、强化社区健康行动、开展健康教育与健康促进活动等举措,进一步提高患者及其家属、社区居民和医务人员的疾病防治、健康管理等知识和技能,提升其健康素养和健康水平。

《临床常见疾病护理健康教育路径参考》书中的常见疾病临床护理路径均是以特定疾病的患者为群体,通过健康教育唤起患者的健康意识,建立有利于健康的行为,掌握自我保健的方法和技术。对脊柱骨折患者进行健康教育路径,将患者健康教育内容贯穿于整个临床护理活动之中,为患者提供必要的医学护理知识和健康指导,有目的、有计划的为患者解决更多的健康和心理问题,增强脊柱骨折患者健康获得感和满意度,为患者建立健康之基。

(作者岳晓香,王一公,管炎鹏,许昌市中心医院,河南 许昌 461000)