国家项目点击

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.06.007

补阳还五汤调控颈髓损伤后小胶质细胞表型极化的实验研究

许卢春[1],姜国正[1],高誉珊[2],马昱堃[1],宋佳伟[1],王冠龙[1],范娇娇[1],杨永栋[1],唐向盛[3],俞兴[1]
(1.北京中医药大学东直门医院,北京 100700;2.北京中医药大学中医学院,北京 100029;
3.中日友好医院,北京 100029)

摘要:目的 探索补阳还五汤对于颈髓损伤后小胶质细胞表型极化的调控作用。方法 随机将96只雌性斯普拉格-道利(Sprague-Dawley,SD)大鼠分为假手术、模型、补阳还五汤低剂量和补阳还五汤高剂量组,构建急性颈髓损伤模型。通过前肢运动量表(Forelimb Locomotor Scale,FLS)评分、前肢抓力实验和巴索-比蒂-布雷斯纳汉(Basso-Beattie-Bresnahan,BBB)评分分别于术前及术后1、3、7、14、21、28 d评估大鼠运动功能恢复情况。术后7、28 d动物取材,通过苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin,HE)染色评估损伤区域的大体情况,通过尼氏染色评估神经元存活情况,通过免疫荧光染色观察损伤后7 d离子钙结合适配器分子1(Ionized Calcium Binding Adapter Molecule,Iba1)、诱导型一氧化氮合酶(Inducible Nitric Oxide Synthase,iNOS)、精氨酸酶1(Arginase 1,Arg1)和损伤后28 d微管相关蛋白2(Microtubule-Associated Protein 2,MAP2)的表达,通过Western blot评估损伤后7 d Iba1、CD86、Arg1和CD206的表达情况,酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay,ELISA)检测肿瘤坏死因子-α(Tumor Necrosis Factor-alpha,TNF-α)、白细胞介素-6(Interleukin-6,IL-6)和白细胞介素-1β(Interleukin-1β,IL-1β)水平。结果 术后3~28 d,补阳还五汤组运动功能开始较模型组显著恢复($P<0.05$);HE染色显示,与模型组相比,补阳还五汤组较模型组脊髓组织结构更为致密,水肿减轻,空泡形成和组织间隙较模型组减少,免疫/炎性细胞浸润程度降低;尼氏染色显示,补阳还五汤组灰质内神经元数量较模型组增加,可见部分未凋亡的神经元;免疫荧光染色显示,补阳还五汤组较模型组神经元标记物(MAP2)荧光强度显著升高,M1型小胶质细胞标记物(iNOS)荧光强度减少,M2型小胶质细胞标记物(Arg1)荧光强度增加($P<0.05$);Western blot显示,补阳还五汤组iNOS、CD86的表达量较模型组显著降低,Arg1、CD206的表达量较模型组显著升高($P<0.05$)。ELISA显示,补阳还五汤组TNF-α、IL-6和IL-1β显著低于模型组($P<0.05$)。结论 补阳还五汤可以有效促进大鼠颈髓损伤后小胶质细胞表型从M1型转换为M2型,减轻神经炎症反应,抑制继发性损伤,从而改善颈髓损伤后运动功能障碍。

关键词:颈髓损伤;补阳还五汤;小胶质细胞;表型极化;神经炎症
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)06-0040-09

Experimental Study on Regulation of Phenotypic Polarization of Microglia by Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤) in Cervical Spinal Cord Injury

XU Luchun[1], JIANG Guozheng[1], GAO Yushan[2], MA Yukun[1], SONG Jiawei[1],
WANG Guanlong[1], FAN Jiaojiao[1], YANG Yongdong[1], TANG Xiangsheng[3], YU Xing[1]
(1. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China;
2. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract: *Objective* To explore the regulatory effect of Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤) on phenotypic polarization of microglia in cervical spinal cord injury. *Methods* Ninety-six female Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into sham operation, model, low-dose Buyang Huanwu Decoction and high-dose Buyang Huanwu Decoction groups to establish an

基金项目:国家自然科学基金面上项目(82074218,81973882);国家自然科学基金青年科学基金项目(81804119);北京中医药大学科技创新专项(DZMKJCX-2023-010)

作者简介:许卢春(1995-),男,江西南昌人,博士在读,研究方向:脊髓损伤的中医药防治。
通讯作者:唐向盛(1978-),男,湖南邵东人,副教授、主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:脊柱脊髓疾病的基础与临床。E-mail:spinetang@hotmail.com。
俞兴(1972-),男,江苏南通人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:脊髓损伤、脊柱退行性疾病的中医药防治。E-mail:yuxingbucm@163.com。

acute cervical spinal cord injury model. Motor function recovery of rats was assessed using the Forelimb Locomotor Scale(FLS) score and forelimb grip strength experiment Basso - Beattie - Bresnahan(BBB) score before surgery and at 1, 3, 7, 14, 21 and 28 d postoperatively. Animals were sacrificed at 7,28 d postoperatively. Hematoxylin and Eosin(HE) staining was used to evaluate the gross morphology of the injury site. Nissl staining was used to assess neuronal survival, and immunofluorescence staining was used to observe the expression of ionized calcium binding adapter molecule 1(Iba1), inducible nitric oxide synthase(iNOS), arginase 1(Arg1) at 7 days post - injury, and microtubule - associated protein 2(MAP2) at 28 days post - injury. Western blot was used to evaluate the expressions of Iba1, CD86, Arg1 and CD206 at 7 days post - injury, and Enzyme - Linked Immunosorbent Assay(ELISA) was used to measure the levels of tumor necrosis factor - alpha(TNF - α), interleukin - 6(IL - 6) and interleukin - 1β(IL - 1β). *Results* From day 3 to day 28 postoperatively, the motor function in the Buyang Huanwu Decoction groups began to recover significantly compared to the model group($P<0.05$). HE staining showed that compared with that in the model group, the spinal cord tissue structure in the Buyang Huanwu Decoction group was denser, with reduced edema, fewer vacuoles and reduced interstitial spaces, and decreased infiltration of immune/inflammatory cells. Nissl staining showed that the number of neurons in the gray matter was increased in the Buyang Huanwu Decoction groups compared with that in the model group, with some surviving neurons visible. The immunofluorescence staining showed that the fluorescence intensity of MAP2 was significantly increased, the fluorescence intensity of M1 - type iNOS was decreased, and the fluorescence intensity of M2 - type Arg1 was increased in the Buyang Huanwu Decoction groups compared with those in the model group($P<0.05$). Western blot showed that the expression levels of iNOS and CD86 were significantly decreased, while the expression levels of Arg1 and CD206 were significantly increased in the Buyang Huanwu Decoction groups compared with those in the model group($P<0.05$). ELISA showed that the levels of TNF - α, IL - 6 and IL - 1β were significantly lower in the Buyang Huanwu Decoction groups than those in the model group($P<0.05$). *Conclusion* Buyang Huanwu Decoction can effectively promote the phenotypic transition of microglia from M1 to M2 in rats with cervical spinal cord injury, alleviate neuroinflammatory responses, inhibit secondary injury, and thereby improve motor dysfunction after cervical spinal cord injury.

Keywords: cervical spinal cord injury; Buyang Huanwu Decoction(补阳还五汤); microglia; phenotypic polarization; neuroinflammation

脊髓损伤是一种致残率及病死率高的创伤性中枢神经系统疾病[1-3]。在外力创伤瞬间直接作用于脊髓导致的原发性损伤发生后,炎症、氧化应激和神经细胞凋亡等进一步造成广泛而严重的继发性损伤,导致神经功能持续损害[4-5]。继发性损伤导致损伤向周围神经组织进一步扩散蔓延,是脊髓损伤后神经功能障碍进行性加重的主要原因,故目前临床上防治脊髓损伤多聚焦于继发性损伤[6-8]。

小胶质细胞是脊髓组织内常驻的单核-吞噬细胞,在组织监测和损伤反应中发挥作用[9-10]。其在生理状态下以M0表型存在于脊髓组织内,通过高度活跃的分枝状突起以持续监测脊髓内微环境的改变[11-12]。脊髓损伤发生后,小胶质细胞被激活成为两种表型,M1型产生扩大神经炎症范围以及加重神经组织损伤等神经毒性作用,而M2型主要发挥抑制神经炎症反应、促进神经再生修复以及坏死物质清除等神经保护作用[13-14]。故在脊髓损伤后适度对M1表型小胶质细胞进行抑制并且促进M2表型的激活,可减轻继发性损伤、加速脊髓功能恢复。

与传统的胸髓损伤模型相比,颈髓损伤动物模型病死率更高、护理更为困难,故在脊髓损伤的基础实验研究中,颈髓损伤的研究开展远少于胸髓损伤[15]。然而,颈髓与胸髓在生理结构、损伤后病理改变与损伤后修复再生等方面均有着一定区别,故针对颈髓的研究也需大量开展[16]。补阳还五汤是益气活血通络的代表方剂,近些年来,多个研究证实该方剂在减轻脊髓损伤和神经再生修复等方面有其独特的效果,但其对脊髓损伤后小胶质细胞的作用尚无文献报道[17]。基于此,本研究通过allen法构建颈髓损伤模型,观察脊髓组织中小胶质细胞活化情况,从而探讨补阳还五汤对脊髓损伤大鼠小胶质细胞极化的影响。

1 材料与方法

1.1 *动物* 清洁级成年雌性斯普拉格-道利(Sprague - Dawley,SD)大鼠96只,8周龄,体质量200~250 g,购自北京维通利华实验动物有限公司。所购大鼠均在北京中医药大学实验动物中心内进行饲养,鼠房环境为温度21~25 ℃,相对湿度40%~60%,保持12 h/12 h光照黑暗交替,自由饮食。北京中医药大学动物实验伦理委员会批准本实验研究,批件号:BUCM-2023072503-3067。

1.2 *药物* 补阳还五汤(药用:生黄芪60 g,地龙10 g,当归10 g,川芎10 g,赤芍10 g,桃仁10 g,红花10 g),由中日友好医院中药房提供。将以上药物置于砂锅容器中,再加入相当于药材体积5倍的纯净自来水浸泡2 h后煮沸30 min,过滤,再加入药材体积3倍量的纯净自来水继续煮沸20 min,滤过药液,最后合并2次滤液,浓缩至约为100 mL备用,此相当于临床等效药物质量浓度1.2 g/mL。补阳还五汤按照不同剂量(12.5、25 g/kg)进行灌胃给药(给药浓度为参考前期的研究[18]);假手术组、模型组行生理盐水灌胃,每天进行2次灌胃。

1.3 *试剂和仪器* 苏木精-伊红(Hematoxylin and Eosin,HE)染色液(索莱宝生物技术有限公司,北京,G1120),尼氏染色液(索莱宝生物技术有限公司,北京,G1436),兔源抗微管相关蛋

白2(Microtubule - Associated Protein 2, MAP2)多克隆抗体(proteintech,美国,17490 - 1 - AP),小鼠源抗离子钙结合适配器分子1(Ionized Calcium Binding Adapter Molecule, Iba1)单克隆抗体(Santa,美国,sc - 32725),兔源抗诱导型一氧化氮合酶(Inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS)多克隆抗体(proteintech,美国,18985 - 1 - AP),兔源抗精氨酸酶1(Arginase 1, Arg1)多克隆抗体(proteintech,美国,16001 - 1 - AP),兔源抗CD86多克隆抗体(proteintech,美国,13395 - 1 - AP),兔源抗 - CD206单克隆抗体(proteintech,美国,18704 - 1 - AP),小鼠源抗 - beta Actin单克隆抗体(abcam,美国,ab6276),大鼠肿瘤坏死因子 - α(Tumor Necrosis Factor - alpha, TNF - α)、白细胞介素 - 6(Interleukin - 6, IL - 6)、白细胞介素 - 1β(Interleukin - 1β, IL - 1β)ELISA试剂盒(江苏酶免实业有限公司,中国,MM - 0180R1、MM - 0190R1、MM - 0047R1)。NYU脊髓打击器(NYU,美国,model - Ⅱ manual),电子抓力仪(上海普辛仪器科技有限公司,ZR - 08),病理切片机(Leica,德国,RM2245),倒置荧光显微镜(Olympus,日本,IX51)。

1.4 模型和分组给药 将96只大鼠按照随机数字表法进行分组,分为假手术、模型、补阳还五汤低剂量、补阳还五汤高剂量组共4组,每组24只。使用NYU脊髓打击器采用Allen法构建颈髓损伤模型。使用1%戊巴比妥钠将大鼠麻醉后,俯卧位固定,在颈部以C5为中心,纵向切一长约3 cm的切口,分离椎旁肌肉后使用微型椎板钳行C5椎板切除术,充分暴露C5段颈髓。应用NYU打击器建立不完全颈髓损伤模型(高度12.5 mm,重量10 g),逐层缝合大鼠皮肤。假手术组仅对C5椎板进行切除,不对颈髓进行损伤。在颈髓损伤术后第一天开始给药,假手术组和模型组给予生理盐水灌胃,补阳还五汤低、高剂量组分别按照12.5 g/kg和25 g/kg进行灌胃给药,连续7 d。

1.5 行为学评价 在术前和术后1、3、7、14、21、28 d共7个时间点采用前肢运动量表(Forelimb Locomotor Scale, FLS)评分、前肢抓力实验和巴索 - 比蒂 - 布雷斯纳汉(Basso - Beattie - Bresnahan, BBB)评分评价大鼠的前肢运动、前肢抓力和后肢运动功能。采用双盲和双人独立观察记录,以平均值作为最终评分。FLS评分共17分,侧重于观察肩、肘、腕等主要关节的协调,以及足爪和爪的屈伸功能。评分越高,说明前肢运动功能越好[19]。进行前肢抓力实验时实验人员使用电子握力计测量前肢握力,将大鼠的前肢放在金属板上缓慢地拉动,记录每只大鼠前肢松开时的最大读数以评估前肢抓力。BBB评分共21分,该量表评估了跨步能力、双侧关节活动度、协调性和躯干稳定性,评分越高表示运动功能越好[20]。

1.6 组织学染色观察 术后28 d每组各取6只大鼠,1%戊巴比妥钠麻醉后,使用4%多聚甲醛对心脏进行灌注。以损伤区域为中心取1.0 cm长颈髓组织,应用4%多聚甲醛浸泡过夜之后,进行修块、脱水以及石蜡包埋,制备5 μm厚石蜡切片,行HE和尼氏染色观察。HE染色观察颈髓大体情况;尼氏染色观察神经元情况。

1.7 免疫荧光染色观察 颈髓损伤7 d和28 d同上法取材,首先制备脊髓切片,在切片进行脱蜡、乙醇梯度脱水后,使用抗原修复液对抗原进行修复。双氧水阻断,室温下孵育30 min;10%山羊血清孵育30 min。清除封闭液后滴加MAP2(1∶500)、iNOS(1∶100)、Arg1(1∶100)、Iba1(1∶50)一抗4 ℃过夜。PBS漂洗3次,滴加对应二抗,湿盒内孵育1 h。再次冲洗后滴入含有DAPI的固封剂封片,倒置荧光显微镜下观察,并通过Image J软件进行半定量分析。

1.8 Western blot检测 术后7 d每组取3只大鼠同上法麻醉后,经过低温取材、组织研磨裂解,使用BCA法评估浓度,最后进行上样、转膜及封闭。分别在术后7 d切片滴加相应一抗:iNOS(1∶1000稀释度)、CD86(1∶1000稀释度)、Arg1(1∶2000稀释度)、CD206(1∶2000稀释度)、β - Actin(1∶3000稀释度),过夜后二抗室温孵育。再次洗膜后浸入ECL染色液,最后在暗室中进行曝光、显影以及定影,Image J软件分析目的条带灰度,获得目的蛋白相对表达量(目的蛋白和β - actin比值)。

1.9 酶联免疫吸附测定(Enzyme - Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 术后7 d检测损伤颈髓TNF - α、IL - 6和IL - 1β水平。根据ELISA试剂盒中的说明,将离心收集到的上清液分别与相应细胞因子工作液共同反应20 min。吸光度值在450 nm处用酶标仪测定。

1.10 统计学分析 采用SPSS 24.0版统计分析软件对数据进行分析,用"均数 ± 标准差"($\bar{x} \pm s$)来描述计量资料。符合正态分布者采用单因素方差分析方法进行多组间比较,方差齐则采取LSD法进行组间两两比较,其他用非参数检验进行比较,$P<0.05$时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补阳还五汤促进颈髓损伤后运动功能恢复 采用FLS评分、抓力实验和BBB评分评估行为学功能。除假手术组外,其余各组在术后第1天均表现出严重的运动功能缺陷。在术后3~28 d,补阳还五汤组的FLS评分、前肢抓力和BBB评分开始逐渐恢复,较模型组具有统计学意义($P<0.05$)。见表1 - 表3。

2.2 补阳还五汤改善损伤颈髓病理形态学表现 HE染色显示,在术后4周假手术组大鼠脊髓组织结构正常完整,结构紧密,无水肿。模型组大鼠脊髓组织结构重度异常,水肿严重,视

表1 补阳还五汤对SCI大鼠前肢运动功能的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	n	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
假手术组	8	17.00 ± 0.00	16.75 ± 0.46	16.88 ± 0.35	17.00 ± 0.00	17.00 ± 0.00	17.00 ± 0.00	17.00 ± 0.00
模型组	8	17.00 ± 0.00	3.13 ± 0.83*	4.13 ± 0.83*	5.88 ± 1.13*	7.13 ± 0.83*	8.38 ± 0.92*	9.75 ± 1.28*
补阳还五汤低剂量组	8	17.00 ± 0.00	3.25 ± 1.04	4.63 ± 0.92	7.00 ± 0.93#	8.13 ± 0.83#	9.63 ± 1.06#	11.25 ± 1.28#
补阳还五汤高剂量组	8	17.00 ± 0.00	3.38 ± 0.52	5.13 ± 0.83#	8.00 ± 0.76#△	9.25 ± 0.71#△	10.88 ± 0.83#△	12.63 ± 1.30#△

注:* 与假手术组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与补阳还五汤低剂量组比较,$P<0.05$。

表 2 补阳还五汤对 SCI 大鼠前肢抓力的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:N·m

组别	n	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
假手术组	8	657.50 ± 12.19	634.25 ± 8.76	654.13 ± 7.85	663.88 ± 9.73	670.75 ± 7.59	677.88 ± 8.69	689.88 ± 6.01
模型组	8	652.75 ± 11.22	96.25 ± 9.63 *	147.75 ± 9.38 *	201.25 ± 24.03 *	225.13 ± 22.86 *	334.50 ± 22.97 *	382.50 ± 18.90 *
补阳还五汤低剂量组	8	656.13 ± 10.71	97.88 ± 7.83	153.38 ± 8.25	229.63 ± 23.50#	296.50 ± 23.50#	365.13 ± 24.09#	410.75 ± 19.50#
补阳还五汤高剂量组	8	654.63 ± 14.93	99.38 ± 6.61	162.75 ± 8.15#△	269.38 ± 11.53#△	361.25 ± 18.74#△	402.25 ± 26.77#△	450.63 ± 19.00#△

注:* 与假手术组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与补阳还五汤低剂量组比较,$P<0.05$。

表 3 补阳还五汤对 SCI 大鼠后肢运动功能的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:分

组别	n	0 d	1 d	3 d	7 d	14 d	21 d	28 d
假手术组	8	21.00 ± 0.00	20.75 ± 0.46	20.88 ± 0.35	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00
模型组	8	21.00 ± 0.00	7.13 ± 0.83 *	8.13 ± 0.83 *	9.88 ± 1.13 *	11.25 ± 1.04 *	12.25 ± 1.04 *	13.88 ± 1.55 *
补阳还五汤低剂量组	8	21.00 ± 0.00	7.13 ± 0.92	8.63 ± 0.92	11.00 ± 1.07#	12.38 ± 1.06#	13.75 ± 1.16#	15.50 ± 1.51#
补阳还五汤高剂量组	8	21.00 ± 0.00	7.25 ± 0.71	9.25 ± 1.04#	12.13 ± 0.83#△	13.50 ± 0.93#△	14.88 ± 0.83#△	17.13 ± 1.13#△

注:* 与假手术组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与补阳还五汤低剂量组比较,$P<0.05$。

野内面积组织糜烂,密布神经元死亡后形成的空泡,组织间隙明显增大,免疫/炎性细胞广泛浸润。与模型组相比,补阳还五汤组在 4 周较模型组脊髓组织结构更为致密,水肿减轻,空泡形成和组织间隙较模型组减少,免疫/炎性细胞浸润程度降低。见插页Ⅸ图 1。

尼氏染色显示,在术后 4 周假手术组结构完整,灰质内存在大量神经元,尼氏体呈虎斑状且形态规则;模型组脊髓周围组织溶解,神经元严重变性,表现为尼氏体溶解、大量缺失且形态严重异常;补阳还五汤组灰质内神经元数量较模型组增加,可见部分未凋亡的神经元。见插页Ⅸ图 2。

2.3 补阳还五汤减少颈髓损伤后神经元死亡、抑制颈髓继发性损伤 免疫荧光染色显示,术后 28 d 模型组 MAP2 荧光强度较假手术组显著下降($P<0.05$),补阳还五汤组较模型组 MAP2 荧光强度显著升高,具有统计学意义($P<0.05$)。见插页Ⅹ图 3、表 4。

表 4 补阳还五汤对 SCI 大鼠 MAP2、iNOS、Arg1 荧光强度的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MAP2	iNOS	Arg1
假手术组	6	41.99 ± 2.56	1.60 ± 0.37	0.68 ± 0.15
模型组	6	6.79 ± 0.79 *	35.82 ± 3.42 *	1.77 ± 0.26 *
补阳还五汤低剂量组	6	14.74 ± 0.86#	16.65 ± 1.91#	4.44 ± 0.39#
补阳还五汤高剂量组	6	26.04 ± 2.10#△	8.13 ± 1.02#△	9.90 ± 0.69#△

注:* 与假手术组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与补阳还五汤低剂量组比较,$P<0.05$。

2.4 补阳还五汤调控小胶质细胞表型极化、神经炎症反应 免疫荧光染色显示,术后 7 d 假手术组颈髓组织内散见标记红色荧光(Iba1$^+$ + iNOS/Arg1$^-$ + DAPI$^+$)的 M0 未激活的小胶质细胞,呈梭形,处于分支静息状态。模型组、补阳还五汤组可见红绿色荧光共同标记(Iba1$^+$ + iNOS/Arg1$^+$ + DAPI$^+$)的阳性细胞(激活的 M1/M2 小胶质细胞)。与模型组相比,补阳还五汤组颈髓内 M1 型小胶质细胞标记物(iNOS)荧光强度减少,同时颈髓内 M2 型小胶质细胞标记物(Arg1)荧光强度增加($P<0.05$)。见插页Ⅹ图 4、插页Ⅺ图 5、表 4。Western blot 显示,术后 7 d 补阳还五汤组 M1 型小胶质细胞标志物(iNOS 和 CD86)的表达量显著低于模型组,M2 型小胶质细胞标志物(Arg1 和 CD206)的表达量相较模型组显著升高($P<0.05$)。ELISA 显示,补阳还五汤组促炎因子(TNF-α、IL-6 和 IL-1β)水平较模型组显著降低($P<0.05$)。见图 6、表 5-表 6。

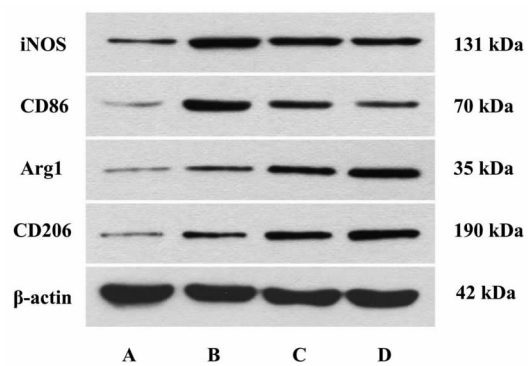


图 6 各组大鼠 iNOS、CD86、Arg1 和 CD206 的蛋白表达条带

表 5 补阳还五汤对 SCI 大鼠 iNOS、CD86、Arg1、CD206 蛋白相对表达量表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	iNOS	CD86	Arg1	CD206
假手术组	3	0.35 ± 0.13	0.15 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.19 ± 0.06
模型组	3	1.13 ± 0.10 *	1.10 ± 0.07 *	0.53 ± 0.14 *	0.45 ± 0.18 *
补阳还五汤低剂量组	3	0.95 ± 0.03#	0.73 ± 0.13#	0.82 ± 0.08#	0.79 ± 0.11#
补阳还五汤高剂量组	3	0.71 ± 0.10#△	0.51 ± 0.03#△	1.13 ± 0.15#△	1.10 ± 0.13#△

注:* 与假手术组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与补阳还五汤低剂量组比较,$P<0.05$。

表 6 补阳还五汤对 SCI 大鼠炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 的影响($\bar{x} \pm s$) 单位:pg/mL

组别	n	TNF-α	IL-6	IL-1β
假手术组	6	132.14 ± 10.42	68.79 ± 3.57	23.25 ± 1.11
模型组	6	288.91 ± 5.92 *	164.77 ± 5.31 *	56.92 ± 2.58 *
补阳还五汤低剂量组	6	260.07 ± 10.08#	151.08 ± 5.55#	51.91 ± 1.99#
补阳还五汤高剂量组	6	230.05 ± 9.09#△	133.17 ± 3.63#△	46.96 ± 2.80#△

注:* 与假手术组比较,$P<0.05$;# 与模型组比较,$P<0.05$;△ 与补阳还五汤低剂量组比较,$P<0.05$。

3 讨论

脊髓损伤是一个极具挑战性的临床问题,迄今为止,尚无有效和可行的治疗策略来彻底解决这一难题[21-22]。脊髓损伤中原发性损伤由于脊髓结构不可逆性的损害而难以进行针对

性治疗;同时继发性损伤使原发病灶向周围的白质和灰质逐渐扩展,从而导致脊髓损伤后神经功能障碍进行性加重[23-25]。故对脊髓继发性损伤进行防治可有效地遏制脊髓损伤的进一步发展,为神经修复提供机会,成为近年来脊髓损伤防治的研究重点。

越来越多的研究发现在脊髓损伤后小胶质细胞独立或与其他神经胶质细胞(星形胶质细胞、少突胶质细胞)、炎症细胞以及其他免疫细胞配合共同发挥着巨大的作用,有望成为脊髓损伤基础与临床研究的关键突破口之一[26-27]。目前研究认为,继发性损伤中的级联反应在抑制脊髓损伤后过度免疫/炎症反应后被减缓,可控制损伤范围继续扩大、尽可能保留残存神经功能,同时可以提供合适的微环境以供神经修复和再生[28-29]。免疫系统作为人体 3 大调节系统(神经系统、免疫系统、内分泌系统)之一,在清除有害物质及坏死组织、维持机体内环境稳定、损伤修复的过程中发挥了重要作用[30-31]。在脊髓中,小胶质细胞是主要的常驻免疫细胞,是构建脊髓免疫网络的重要组成[32]。

在脊髓损伤后的继发性损伤中,小胶质细胞活化并向损伤区域内募集,和血源性的巨噬细胞一起参与脊髓组织内免疫/炎症反应[33]。活化的小胶质细胞被分为 M1 和 M2 型。其中 M1 型小胶质细胞在受到损伤后会释放大量有害细胞因子,在参与氧自由基形成的同时产生兴奋毒性,加重神经元病变[34];M2 型小胶质细胞分泌大量抗炎细胞因子及神经营养因子,在脊髓损伤中发挥抗炎与神经支持作用,提高脊髓组织对外来伤害的耐受力,有助于控制炎症、重建血脊髓屏障、再生血管与神经、恢复内环境稳态[35-36]。同时,两种亚型的吞噬能力也各不相同,M1 型小胶质细胞在吞噬坏死组织后会形成酸性较弱成熟慢的吞噬小体,这一过程形成相应抗原并呈递给 T 细胞,触发下游一系列免疫反应;而 M2 型小胶质细胞吞噬后产生酸性强成熟快的吞噬小体,高效清除有害坏死物质[37]。故在脊髓损伤后适度对 M1 表型小胶质细胞进行抑制并且促进 M2 表型的激活,可有效抑制神经炎症、减轻颈髓继发性损伤、促进颈髓功能恢复。

脊髓损伤作为一种危害重、病理机制复杂的中枢系统疾病,大量针对脊髓损伤的基础动物实验被开展,而目前进行脊髓损伤研究的节段通常位于胸髓[38]。作为临床上损伤占比最多、损伤后危害最重的颈髓却由于模型动物死亡率高、护理困难等因素开展远少于胸髓[39]。然而,颈髓与胸髓在生理结构上不完全一样,在受到损伤后的病理改变也不尽相同,其恢复和再生的潜力也有着一定区别,在胸髓开展的相关动物实验无法完全替代颈髓,针对颈髓的相应研究也需要大量开展。基于此,本研究采用 NYU 打击器通过 Allen 法构建了颈髓损伤模型,探究颈髓损伤后相关神经功能和组织形态及分子等水平的改变。

中医学将脊髓损伤归属为“体堕”和“痿证”,认为脊髓损伤后导致督脉气血逆乱,瘀血阻络,可辨为“血瘀气滞”,治宜活血行气,久则“实损及虚”,辨为“血瘀气虚”,治宜补气活血[40]。脊髓损伤的主要病理特点为“虚”和“瘀”,当属本虚标实。由于“气为血之帅”,“气行则血行”,故益气活血可以贯穿颈髓损伤治疗的整个过程。补阳还五汤是益气活血通络的代表方,全方益气、活血、化瘀、通络,通过活血祛瘀以治标,补气通络以治本,可用于脊髓损伤的治疗[41]。本实验为证明补阳还五汤对颈髓损伤大鼠小胶质细胞极化的影响,在模型构建成功后通过免疫荧光染色及 Western blot 检测了颈髓损伤后各组大鼠的 M1/M2 型小胶质细胞的标记物,通过 ELISA 检测了颈髓损伤后的神经炎症反应,同时采用免疫荧光检测了神经元标记物。结果显示,补阳还五汤能够在颈髓损伤后促进小胶质细胞向抗炎 M2 表型的极化,并抑制了向促炎 M1 表型的极化,证实了补阳还五汤通过调控颈髓损伤后小胶质细胞表型极化减轻神经炎症反应,从而抑制继发性损伤,减少颈髓损伤后神经元死亡。同时,行为学和病理形态学的结果均证实了补阳还五汤治疗颈髓损伤的有效性。

综上所述,补阳还五汤可以有效促进大鼠颈髓损伤后小胶质细胞表型从 M1 型转换为 M2 型,减轻神经炎症反应,抑制继发性损伤,从而改善颈髓损伤后运动功能障碍。

参考文献

[1] GRIJALVA - OTERO I, DONCEL - PÉREZ E. Traumatic human spinal cord injury: are single treatments enough to solve the problem? [J]. Arch Med Res, 2024,55(1):102935.

[2] SKINNIDER M A, GAUTIER M, TEO AYY, et al. Single - cell and spatial atlases of spinal cord injury in the Tabulae Paralytica[J]. Nature, 2024,631(8019):150 - 163.

[3] MORITZ C, FIELD - FOTE E C, TEFERTILLER C, et al. Non - invasive spinal cord electrical stimulation for arm and hand function in chronic tetraplegia: a safety and efficacy trial[J]. Nat Med, 2024,30(5):1276 - 1283.

[4] YU T, YANG L L, ZHOU Y, et al. Exosome - mediated repair of spinal cord injury: a promising therapeutic strategy[J]. Stem Cell Res Ther, 2024,15(1):6.

[5] 许卢春,杨永栋,赵赫,等. 非编码 RNA 调控脊髓损伤后神经元细胞凋亡的作用和机制[J]. 中国组织工程研究,2023,27(33):5404 - 5412.

[6] GAO J, KHANG M, LIAO Z, et al. Therapeutic targets and nanomaterial - based therapies for mitigation of secondary injury after spinal cord injury[J]. Nanomedicine (Lond), 2021,16(22):2013 - 2028.

[7] JAFFER H, ANDRABI S S, PETRO M, et al. Catalytic antioxidant nanoparticles mitigate secondary injury progression and promote functional recovery in spinal cord injury model[J]. J Control Release, 2023,364:109 - 123.

[8] ORTEGA M A, FRAILE - MARTINEZ O, GARCÍA - MONTERO C, et al. A comprehensive look at the psychoneuroimmunoendocrinology of spinal cord injury and its progression: mechanisms and clinical opportunities[J]. Mil Med Res, 2023,10(1):26.

[9] PANG Q M, CHEN S Y, XU Q J, et al. Effects of astrocytes and microglia on neuroinflammation after spinal cord injury and related immunomodulatory strategies[J]. Int Immunopharmacol, 2022,108:108754.

[10] BROCKIE S, ZHOU C, FEHLINGS M G. Resident immune responses to spinal cord injury: role of astrocytes and microglia[J]. Neural Regen Res, 2024,19(8):1678-1685.
[11] LEE J Y, PARK C S, SEO K J, et al. IL-6/JAK2/STAT3 axis mediates neuropathic pain by regulating astrocyte and microglia activation after spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2023,370:114576.
[12] AKHMETZYANOVA E R, ZHURAVLEVA M N, TIMOFEEVA A V, et al. Severity- and time-dependent activation of microglia in spinal cord injury[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(9):8294.
[13] SUN C, DENG J, MA Y, et al. The dual role of microglia in neuropathic pain after spinal cord injury: Detrimental and protective effects[J]. Exp Neurol, 2023,370:114570.
[14] RAMOS D, CRUZ C D. Involvement of microglia in chronic neuropathic pain associated with spinal cord injury-a systematic review[J]. Rev Neurosci, 2023,34(8):933-950.
[15] 许卢春,杨永栋,赵赫,等.颈髓损伤动物模型的研究进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2023,33(9):836-842.
[16] WEBB A A, MUIR G D. Sensorimotor behaviour following incomplete cervical spinal cord injury in the rat[J]. Behav Brain Res, 2005,165(2):147-159.
[17] 苏文硕,安忠诚,陈晨,等.补阳还五汤治疗脊髓损伤作用机制的研究进展[J].中医正骨,2022,34(8):49-53.
[18] 齐英娜,谭明生,王延雷,等.补阳还五汤对大鼠急性上颈脊髓损伤后血小板活化因子的影响[J].中国骨伤,2018,31(2):170-174.
[19] SINGH A, KRISA L, FREDERICK K L, et al. Forelimb locomotor rating scale for behavioral assessment of recovery after unilateral cervical spinal cord injury in rats[J]. J Neurosci Methods, 2014,226:124-131.
[20] BASSO D M, BEATTIE M S, BRESNAHAN J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995,12(1):1-21.
[21] LUO W, LI Y, XIANG C, et al. Nanomaterials as therapeutic agents to modulate astrocyte-mediated inflammation in spinal cord injury[J]. Mater Today Bio, 2023,23:100888.
[22] LORACH H, GALVEZ A, SPAGNOLO V, et al. Walking naturally after spinal cord injury using a brain-spine interface[J]. Nature, 2023,618(7963):126-133.
[23] SHULTZ R B, ZHONG Y. Minocycline targets multiple secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury[J]. Neural Regen Res, 2017,12(5):702-713.
[24] XU L, YANG Y, ZHONG W, et al. Comparative efficacy of five most common traditional Chinese medicine monomers for promoting recovery of motor function in rats with blunt spinal cord injury: a network meta-analysis[J]. Front Neurol, 2023,14:1165076.
[25] XU L, ZHAO H, YANG Y, et al. The application of stem cell sheets for neuronal regeneration after spinal cord injury: a systematic review of pre-clinical studies[J]. Syst Rev, 2023,12(1):225.
[26] ST-PIERRE M K, GONZÁLEZ IBÁÑEZ F, KRONER A, et al. Microglia/macrophages are ultrastructurally altered by their proximity to spinal cord injury in adult female mice[J]. J Neuroinflammation, 2023,20(1):273.
[27] XU A H, YANG Y, SHAO Y, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase family member 14 promotes functional recovery after spinal cord injury through regulating microglia M1/M2 polarization via STAT1/6 pathway[J]. Neural Regen Res, 2023,18(8):1809-1817.
[28] ZHU D, PENG T, ZHANG Z, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing XIST induce macrophage M2 polarization and improve neural stem cell homeostatic microenvironment, alleviating spinal cord injury[J]. J Tissue Eng, 2024,15:20417314231219280.
[29] LIU J, QI L, BAO S, et al. The acute spinal cord injury microenvironment and its impact on the homing of mesenchymal stem cells[J]. Exp Neurol, 2024,373:114682.
[30] HE N, MAO X J, DING Y M, et al. New insights into the biological roles of immune cells in neural stem cells in post-traumatic injury of the central nervous system[J]. Neural Regen Res, 2023,18(9):1908-1916.
[31] VALIDO E, BOEHL G, KREBS J, et al. Immune status of individuals with traumatic spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(22):16385.
[32] POPPELL M, HAMMEL G, REN Y. Immune regulatory functions of macrophages and microglia in central nervous system diseases[J]. Int J Mol Sci, 2023,24(6):5925.
[33] 李传鸿,俞兴,杨永栋,等.脊髓损伤中的小胶质细胞:M1/M2表型极化发挥神经毒性/神经保护作用[J].中国组织工程研究,2022,26(14):2265-2272.
[34] GUO H, DU M, YANG Y, et al. Sp1 regulates the M1 polarization of microglia through the HuR/NF-κB axis after spinal cord injury[J]. Neuroscience, 2024,544:50-63.
[35] GUAN P, FAN L, ZHU Z, et al. M2 microglia-derived exosome-loaded electroconductive hydrogel for enhancing neurological recovery after spinal cord injury[J]. J Nanobiotechnology, 2024,22(1):8.
[36] GUO J, TANG X, DENG P, et al. Interleukin-4 from curcumin-activated OECs emerges as a central modulator for increasing M2 polarization of microglia/macrophage in OEC anti-inflammatory activity for functional repair of spinal cord injury[J]. Cell Commun Signal, 2024,22(1):162.
[37] HELLENBRAND D J, QUINN C M, PIPER Z J, et al. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration[J]. J Neuroinflammation, 2021,18(1):284.
[38] VERSTAPPEN K, AQUARIUS R, KLYMOV A, et al. Systematic evaluation of spinal cord injury animal models in the field of biomaterials[J]. Tissue Eng Part B Rev, 2022,28(6):1169-1179.
[39] GOULÃO M, GHOSH B, URBAN M W, et al. Astrocyte progenitor transplantation promotes regeneration of bulbospinal respiratory axons, recovery of diaphragm function, and a reduced macrophage response following cervical spinal cord injury[J]. Glia, 2019,67(3):452-466.
[40] 边明真,包安,王海腾,等.脊髓损伤中西医疗法的研究进展[J].现代中西医结合杂志,2023,32(1):133-138.
[41] 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.

补阳还五汤调控颈髓损伤后小胶质细胞表型极化的实验研究

(正文见 40 – 45 页)

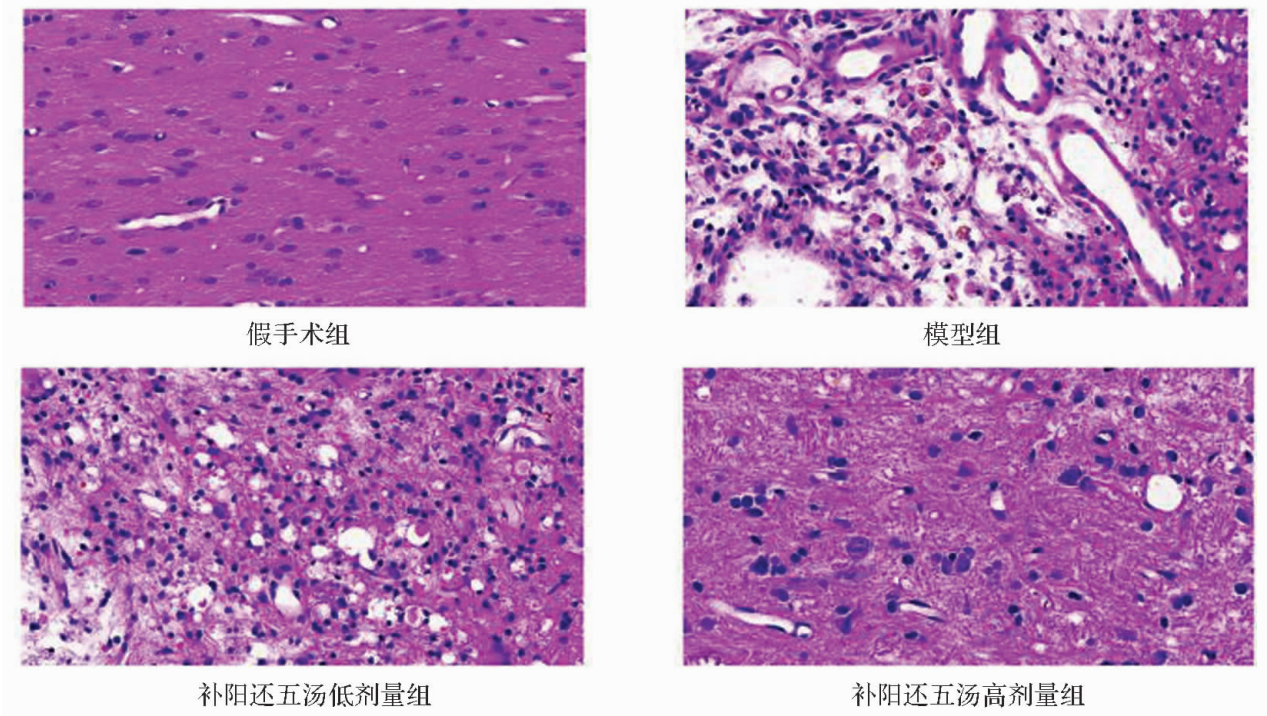


图 1 各组大鼠 HE 染色的比较

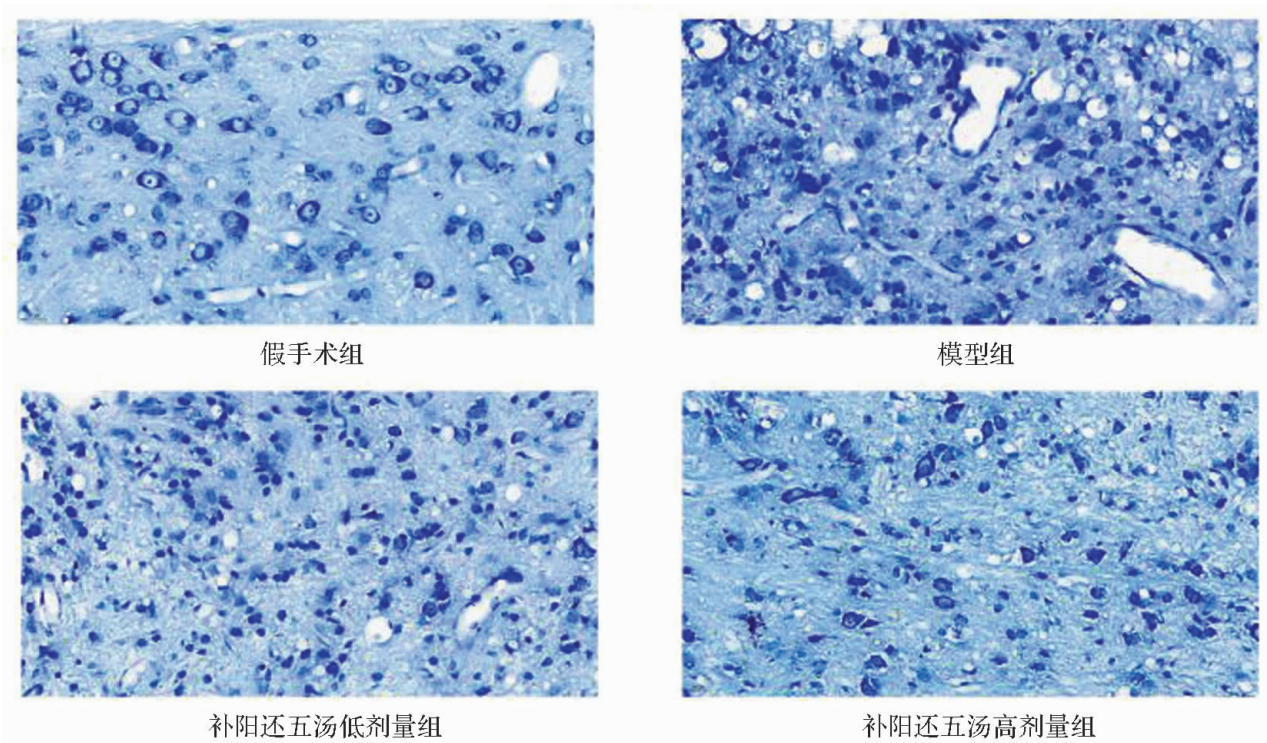


图 2 各组大鼠尼氏染色的比较

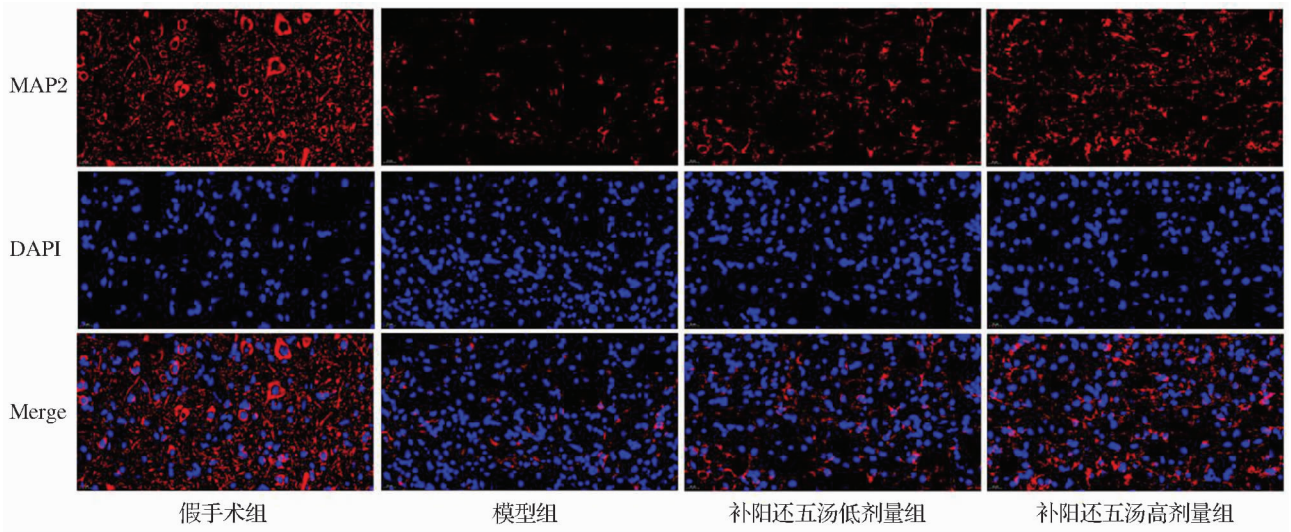


图 3 各组大鼠 MAP2 免疫荧光染色

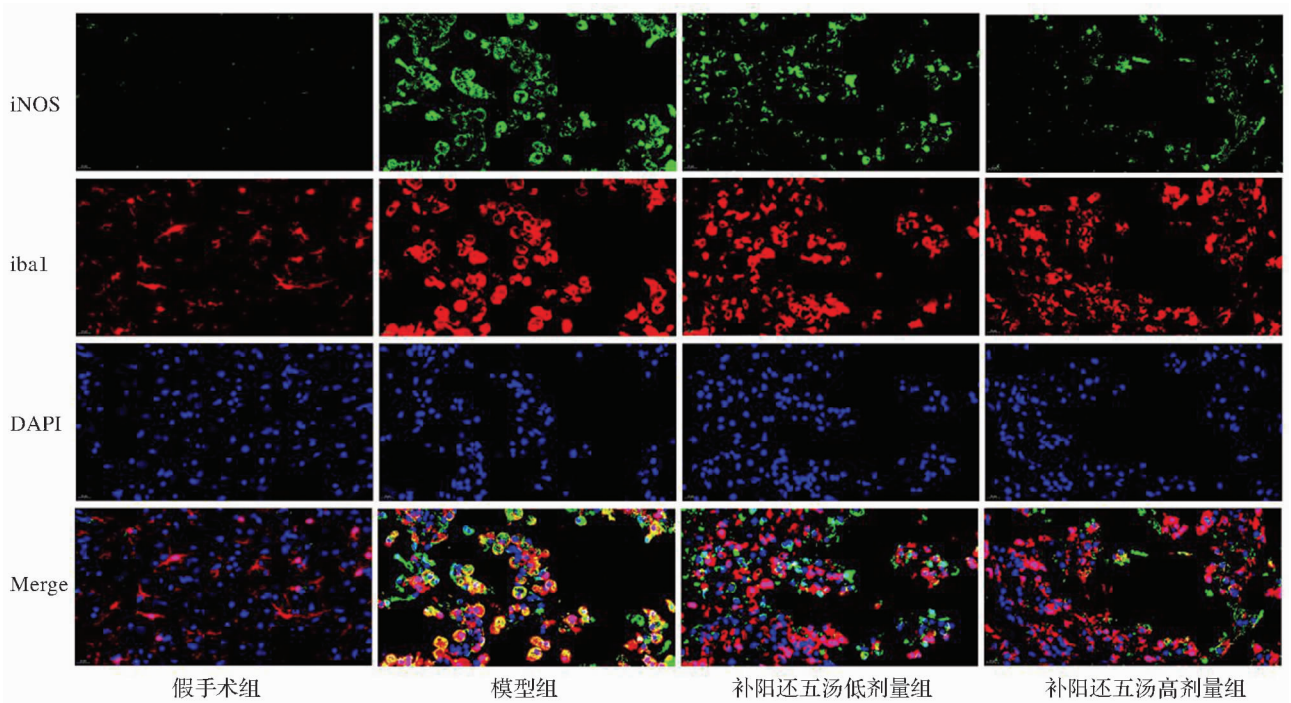


图 4 各组大鼠 iNOS 和 Iba1 免疫荧光双染色的比较

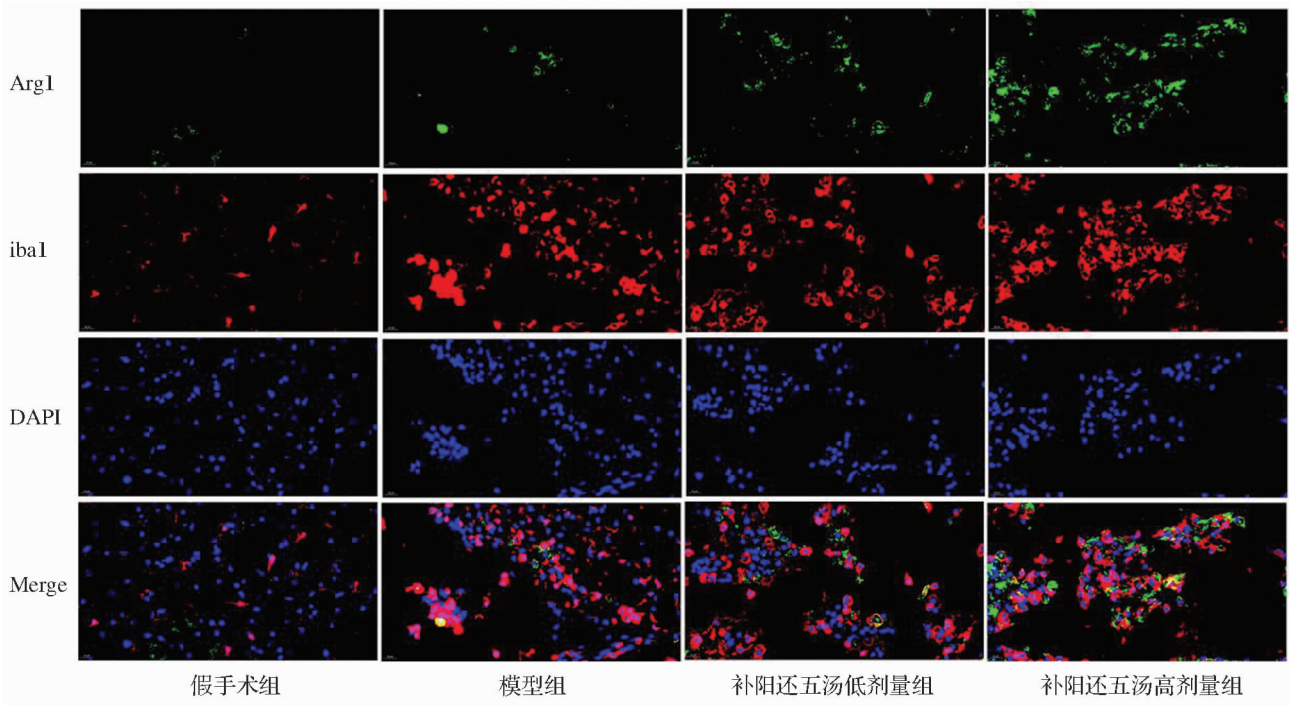


图 5　各组大鼠 Arg1 和 Iba1 免疫荧光双染色的比较

薤白及其经典配伍抗动脉粥样硬化作用机制的概述

（正文见 46－51 页）

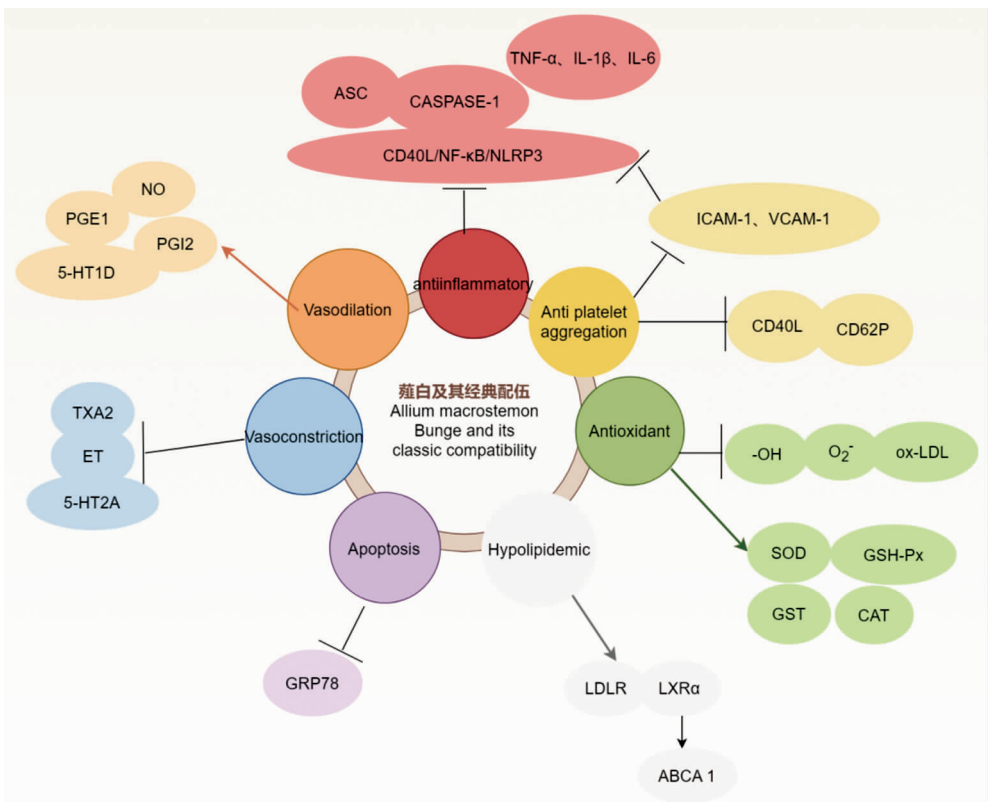


图 1　薤白及其经典配伍抗动脉粥样硬化机制