基于 mTOR 自噬信号通路探讨竹节参对脊髓损伤的保护作用

卜献忠[1]，卜保献[2]，郭晓辉[2]，李寒曦[2]，钟远鸣[3*]，张冠鹏[4]
（1. 广西中医药大学研究生院，广西 南宁　530001；
2. 河南省洛阳正骨医院河南省骨科医院，河南 洛阳　471002；
3. 广西中医药大学第一附属医院，广西 南宁　530023；　4. 湖南中医药大学，湖南 长沙　410208）

摘要：目的 探讨竹节参对脊髓损伤（SCI）大鼠神经元的保护作用是否通过抑制 mTOR 信号通路激活细胞自噬而实现的。**方法** 64 只 SPF 级 SD 雄性大鼠，随机分为假手术组、SCI 组、雷帕霉素组、竹节参组。除假手术组外，其余 3 组均采用 Allen's 打击方法制备 SCI 模型。假手术组及 SCI 组给予生理盐水灌胃，竹节参组给予竹节参水煎液灌胃，在造模前各组分别给予相应处理持续 3 天，雷帕霉素组在造模后 0.5h 内给予腹腔注射给药；造模 3h、6h 后采用改良 Tarlov 评分、HE 染色、免疫组化、Western blot 方法，观察竹节参对运动功能、脊髓前角区神经元的形态结构及 mTOR 自噬信号通路的影响。**结果** 与模型组比，同一时间段内竹节参组运动功能得到改善（$P < 0.05$），神经元细胞形态破坏减轻，脊髓神经元 Beclin1、LC3 表达均升高（$P < 0.05$），mTOR 表达均降低（$P < 0.05$），且竹节参组与雷帕霉素组 Beclin1、LC3 的差异均存在统计学意义（$P < 0.05$）。**结论** 竹节参能够改善 SCI 模型大鼠下肢运动功能，其保护作用可能是通过抑制 mTOR 信号通路激活细胞自噬而实现的。

关键词：竹节参；　脊髓损伤；　雷帕霉素；　神经元细胞
DOI 标识：doi：10.3969/j.issn.1008-0805.2021.11.02
中图分类号：R285.5　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**1008-0805（2021）11-2565-05

Study on the protective effect of *Panax japonicus* on spinal cord injury based on mTOR autophagy signal pathway

BU Xian-zhong[1], BU Bao-xian[2], GUO Xiao-hui[2], LI Han-xi[2], ZHONG Yuan-ming[3*], ZHAN Guan-peng[4]
(1. *Graduate School*, *Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530001, *China*; 2. *Luoyang Zhenggu Hospital of Henan Province/ Orthopedic Hospital of Henan Province*, *Luoyang* 471002 *China*; 3. *First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine*, *Nanning* 530023 *China*; 4. *Hunan University of Chinese Medicine*, *Changsha* 410208 *China*)

Abstract: Objective In order to investigate investigate the protective effect of *Panax japonicus* on neurons in SCI rats, whether its protective effect was achieved by inhibiting mTOR signaling pathway and activating autophagy. **Methods** 64 male Sprague - Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, rapamycin and *Panax japonicus* treatment group. Except for the sham operation group, the other three groups were treated with Allen's method to copy the SCI model. Then, the model group and the sham operation group were given saline daily, *Panax japonicus* treatment group were given *Panax japonicus* daily. Before operation, each group was given corresponding treatment for 3 days. Rapamycin group was given intraperitoneal injection within 0.5h after operation. The treatment effect was evaluated by modified Tarlov scores 3 and 6 hours after operation. The rats were killed and the spinal cord was taken, which the morphological changes of spinal cord neurons were observed by HE staining. The expression of Beclin1, LC3 and mTOR positive cells in spinal cord was detected by immunohistochemistry. The expression of Beclin and mTOR in spinal cord was detected western blot. **Results** In 3 and 6 hours periods, compared with the model group, the improved Tarlov of *Panax japonicus* group and rapamycin group increased in the same period ($P < 0.05$); The morphology of neurons was complete, nucleolus and nuclear membrane were fuzzy, and the number of neurons was increased; The expression of Beclin1, LC3 positive cells in spinal cord decreased, while the expression of mTOR positive cells increased ($P < 0.05$); The expression of Beclin1 protein was up - regulated in spinal cord tissues, while the expression of mTOR protein was down - regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** *Panax japonicus* can improve the motor function of lower limbs in SCI model rats, and its protective effect may be achieved by inhibiting mTOR signaling pathway and activating autophagy.

Key words: *Panax japonicus*;　Spinal cord injury;　Rapamycin;　Neuron cell

收稿日期：2021-03-21；　**修订日期：**2021-10-30
基金项目：国家自然科学基金（81760874）；广西重点研发计划（桂科 AB20159018）；河南省中医药科学研究专项课题（20－21ZY2083）；广西中医药大学 2021 年博士研究生科研创新项目（YCBXJ2021009）

作者简介：卜献忠（1989-），男（汉族），河南开封人，广西中医药大学研究生院在读博士研究生，主要从事脊柱脊髓损伤、脊柱相关疾病的基础与临床研究工作.
*通讯作者简介：钟远鸣（1963-），男（壮族），广西南宁人，广西中医药大学第一附属医院主任医师，教授，博士研究生导师，硕士学位，主要从事脊柱脊髓疾病的诊治研究工作.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)指脊柱遭受不同作用外力促使其发生爆裂、椎体移位、严重者伤及椎管内脊髓组织,从而导致脊髓神经损伤性疾病[1]。SCI 不仅包括急性原发性损伤,还包括迟发性和持续性脊髓组织损伤,即原发性损伤后的继发性损伤[2,3]。其特征性病理改变包括:SCI 后,脊髓水肿或出血[4,5]和椎管内容积变小与硬脊膜内容物增多增加了髓内压力[5~7]。这一系列继发性损伤扩大了神经组织损伤的范围,并加重了神经功能损伤的程度[8,9]。SCI 是一个严重的世界性健康问题,给人类社会带来沉重的负担[10],当前尚缺乏有效的临床治疗策略[11]。

竹节参又名"竹节三七",被土家医誉为"草药之王"[12],土家族民间认为其功效如同三七、人参,主要用于虚弱之体,具有补气、止血之功[13]。相关研究表明,竹节参具有潜在防治 SCII(spinal cord ischemia/reperfusion injury,SCII)作用,但尚未开展其直接作用于 SCI 的研究。本研究采用竹节参水煎液治疗 SCI 大鼠,探讨 mTOR 信号通路对 SCI 发病机制的影响及竹节参对 SCI 的干预靶点,为今后开发与利用此类中药治疗 SCI 提供实验基础与理论依据。

1　材料与仪器

1.1　实验动物　雄性 SPF 级 SD 大鼠 64 只,体重(200 ± 20)g,由郑州天池生物集团提供,实验动物使用许可证号:SCXK(豫)2020 - 0004,实验动物合格证:No. 410975200100023816。实验动物自然进食、饮水,分笼饲养,自然光照,室温 23℃左右,湿度 56% 左右。

1.2　实验试剂　苏木素染色剂(批号:H9627,Sigma),二甲苯(批号:10023418,国药集团),包埋石蜡(批号:69019361,国药集团),无水乙醇(批号:10009218,国药集团),中性树胶(批号:10004160,国药集团),彩虹蛋白 Marke(10 - 250KD)(批号:PM302,promoton),PMSF(批号:P105539,阿拉丁公司),Tris - base(批号:1115GR500,Biofroxx),SDS(批号:30166428,国药集团),PVDF 膜(0.45μm)(批号:IPVH00010,Millipore),RIPA 裂解液(批号:P00138,中国碧云天),BCA 蛋白测定试剂(批号:P0010,中国碧云天),磷酸化蛋白酶抑制剂(批号:S1873,中国碧云天),30% Acr - Bis(批号:BL531b,Biosharp)、TEMED(批号:80125336,国药集团),兔多抗 Beclin1(批号:14600 - 1 - AP,武汉三鹰公司)、兔多抗 LC3(批号:11306 - 1 - AP,武汉三鹰公司)、小鼠单抗 mTOR(批号:66888 - 1 - Ig,武汉三鹰公司),HRP 标记羊抗小鼠二抗(批号:BA1051,武汉博士德),HRP 标记羊抗兔二抗(批号:BA1054,武汉博士德),ECL 底物液(批号:P1050,北京普利莱基因有限公司),兔多抗 GAPDH(批号:AB - P - R001,杭州贤至生物有限公司)。

1.3　实验药物制备　竹节参购买于湖北民族大学附属民大医院。取 30g 竹节参切片放入煎药壶中,在添加 10 倍于竹节参切片重量的水于煎药壶中,浸泡 24h,先武火煮沸,后文火继续煮 30 min,滤出药液;在添加约 5 倍竹节参切片重量的水,按前法再次煎药及滤出药液。取出 2 次煎煮的竹节参水煮液及混合,再次过滤,离心,取上清液,浓缩上清液,定容至 10ml 获得浓度为 0.30g/ml 的竹节参水煎液;雷帕霉素购买于武汉斯尔曼有限责任公司,按说明书将其制备成 0.1mg/ml 的溶剂,无菌封瓶,放入 4℃冰箱保存,备用。

1.4　实验器械　自由落体脊髓损伤模型打击器(安徽正华生物仪器设备有限公司),脱水机(武汉俊杰 JT - 12J 电脑生物组织脱水机有限公司),组织摊烤片机(武汉俊杰 JT - 12J 电脑生物组织脱水机有限公司),病理切片机(德国 Leica 公司),显微镜(奥林巴斯 BX53 型生物显微镜),电泳仪电源(北京六一仪器厂),垂直电解槽(北京六一仪器厂),电转仪(北京六一仪器厂),酶标仪(Thermo 有限公司),离心机(湖南湘仪实验仪器开发有限公司)。

2　方法

2.1　分组及 SCI 模型制作　64 只 SD 雄性大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为假手术组、模型组、竹节参组和雷帕霉素组,每组 16 只,每组分 3、6h 两个亚组,每个亚组 8 只。假手术组仅咬除椎板,暴露脊髓,但不打击脊髓。模型组、竹节参组、雷帕霉素组咬除椎板,打击 T9 - T10 脊髓,建立 SCI 模型。10% 水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射,麻醉后,采用改良 Allen's 重物打击法复制 SCI 模型[11]。大鼠俯卧位于操作台,备皮,消毒,铺巾,在后背部 T9 - T10 棘突做正中切口,咬除 T9 - T10 棘突、椎板,暴露硬脊膜,采用 5g 重物从 5cm 高度自由落下打击 T9 - T10 硬脊膜。造模成功标准是:T9 - T10 脊髓水肿或出血,硬脊膜紧张,膨大,大鼠尾巴呈现痉挛性抽动,双下肢、躯体回缩样扑动,双下肢呈迟缓性瘫痪。术后采用生理盐水、庆大霉素冲洗切口,缝线闭合切口,敷料覆盖伤口,肌注注射庆大霉素[30mg/(kg·d)]。

2.2　动物给药　参考黄继汉《药理实验中动物间和动物和人体间的等效剂量换算》,竹节参的标准剂量为 30g/kg,换算后大鼠的灌胃剂量为 2.67mg/kg,假手术组、模型组于术前 3 天给予 l0 ml/(kg·d)生理盐水等体积灌胃;竹节参组术前 3 天给予 2.67g/(kg·d)竹节参水煮液灌胃,持续 3 天直至取材当天。雷帕霉素组在术后 0.5h 内给予 3mg/(kg·d)雷帕霉素腹腔注射 1 次。

2.3　改良 Tarlov 评分　各组随机取术后 3 只大鼠,在 3、6h 时间段内,采用盲评方式对 SCI 模型进行改良 Tarlov 行为学评分[14],其评分标准如下:下肢完全软瘫,难以察觉得下肢活动为 0 分;下肢稍微挪动,但无法抵抗地心引力为 1 分;下肢水平面可以活动,但不可抵抗肢体重量为 2 分;下肢能行走或跳跃,但有明显共济失调为 3 分;下肢步态健康,能轻松地蹦跳为 4 分。0 ~ 3 分即造模成功。所有大鼠的评分在建模后和安乐死前进行评估,最终取平均值。

2.4　组织灌注及取材　每组选取 4 只取材新鲜脊髓组织,4 只脊髓组织进行 10% 甲醛固定。采用上述麻醉方式对动物进行麻醉,动物麻醉起效后打开胸腔,从心尖位置灌注 300 ~ 400ml 生理盐水,待有右心耳液体呈澄清时以 T10 为中心,切取 1cm 新鲜脊髓组织,存入 - 80℃冰箱,以用于完成免疫印迹实验。或待有右心耳液体呈澄清时,采用 10% 甲醛灌注直至四肢、尾巴僵硬,以 T10 为中心,切取 1cm 脊髓组织,放入 10% 甲醛液中固定,脱水包埋,石蜡切片 5μm。

2.5　蛋白样品制备　脊髓组织称重后,按 1mg 脊髓组织加入 6μl 裂解液(含 1m M PMSF)的标准进行组织匀浆、超声、离心(12000 r/min 5min),取上清。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书要求调整各组蛋白浓度。

2.6　Western Blot 检测　制备 SDS - PAGE 聚丙烯酰胺凝胶(12% 分离胶,5% 积层胶),加入样品蛋白、电泳 120V 1.5h,取目的区域凝胶,湿转法 200mA 1.5h,5% 脱脂牛奶封闭 2h,TBST 清洗 5min 3 次,一抗(兔抗鼠单克隆抗体 Beclin - 1 1:1000,LC - 3 1:1000,mTOR 1:5000)4℃ 过夜,TBST 清洗 3 次,5min/次,二抗(HRP 标记羊抗小鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗 均 1: 50000)室温孵育 2h,TBST 清洗 5 次,5min/次,显色曝光,晾干胶片,扫描胶片,用 image - pro - plus 分析胶片灰度值。

2.7　HE 染色及免疫组织化学　术后 3、6h 每组随机取 4 只,石蜡浸蜡包埋,切片,片厚 5μm、贴片、45℃烘干。切片在二甲苯、无水乙醇、梯度乙醇(95%、80%、70%)中脱蜡,依次侵入苏木素液 10 min,1% 盐酸酒精 3s,蒸馏水洗 3min,碳酸锂 10min,蒸馏水洗 3min,伊红 2min,蒸馏水洗 2 次,70% 乙醇 min,90% 乙醇 1 min,无水乙醇Ⅱ 1 min,无水乙醇Ⅰ1 min,二甲苯Ⅱ 1 min,二甲苯Ⅰ 1 min,烘干,封片,光学显微镜观察损伤区形态学改变。免疫组织化学的切片、脱蜡、脱水等过程同前,脱蜡后 60℃ 烘片 2h,枸橼酸盐高压修复 3min,3% H_2O_2 清除内源性过氧化物酶 10min,PBS 清洗,5% BSA 封闭 10 min,滴加一抗(Beclin - 1 1: 100,LC

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

-3 1∶ 200 ,mTOR 1∶ 100) 4℃ 过夜,PBS 清洗,滴加 HRP 抗兔 Ig G37℃ 30min,PBS 清洗,光镜下观察 DAB 染色,苏木素复染,PBS 清洗,脱水、封片、晾干。每组切取 5 张,光学显微镜下拍摄每张切片神经前角区,蓝色为细胞核,棕黄色或棕褐色为目标蛋白,采用 Motic 软件对神经元数目及 Beclin1、LC3 、mTOR 神经元进行统计,最终取平均值。

2.8　统计学处理 采用 SPSS25.0 软件对数据进行统计分析。计量资料数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布采用多个样本均数比较的方差分析,组间比较采用单因素方差分析和 SNK 检验,两两比较采用 LSD - t 检验。$P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3　结果

3.1　改良 Tarlov 评分 在 3h、6h 时间段内,假手术组相比,同一时段内模型组的 Tarlov 评分均明显降低($P < 0.05$),差异有统计学意义;与模型组相比,同一时段内竹节参组、雷帕霉素组的 Tarlov 评分均明显增高,且竹节参组和高雷帕霉素组差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

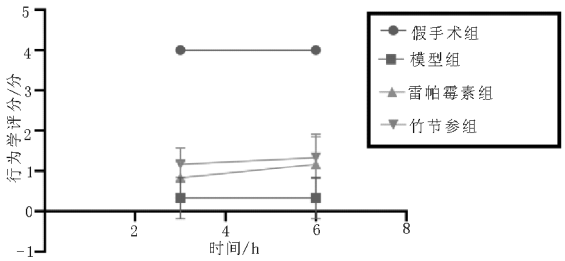


图 1　各组大鼠改良 Tarlov 评分

3.2　各组小鼠脊髓组织病理改变 假手术组具有完整的细胞结构,神经元微肿胀,核仁、核膜较清晰可见。术后 3h、6h 模型组细胞肿胀严重,细胞间隙明显增大,细胞核固缩严重、核仁、核膜消失。雷帕霉素组细胞肿胀程度减轻,细胞间隙缩小,细胞核固缩、核仁、核膜消失,偶尔可见正常神经元细胞。竹节参组细胞肿胀程度明显减轻,细胞间隙明显缩小,细胞核固缩、核仁、核膜模糊可见,正常神经元显著增多,见图 2。

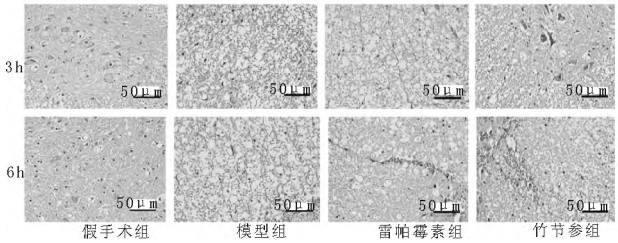
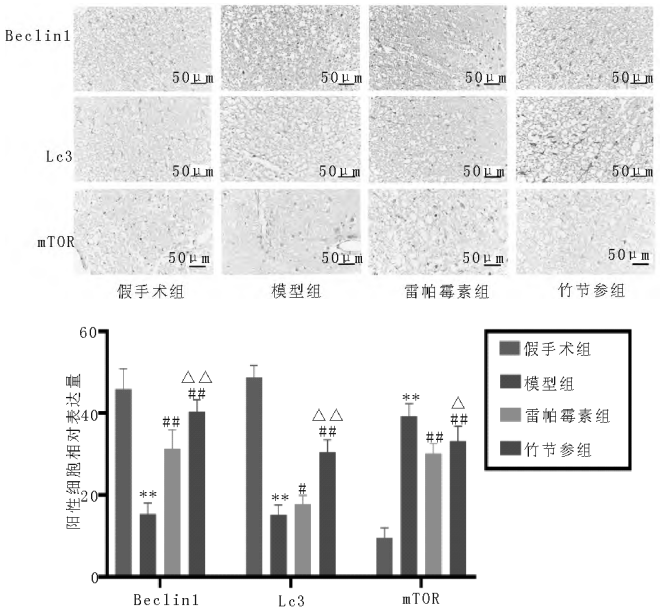


图 2　大鼠脊髓组织病理显微结构(HE 染色,400 ×)

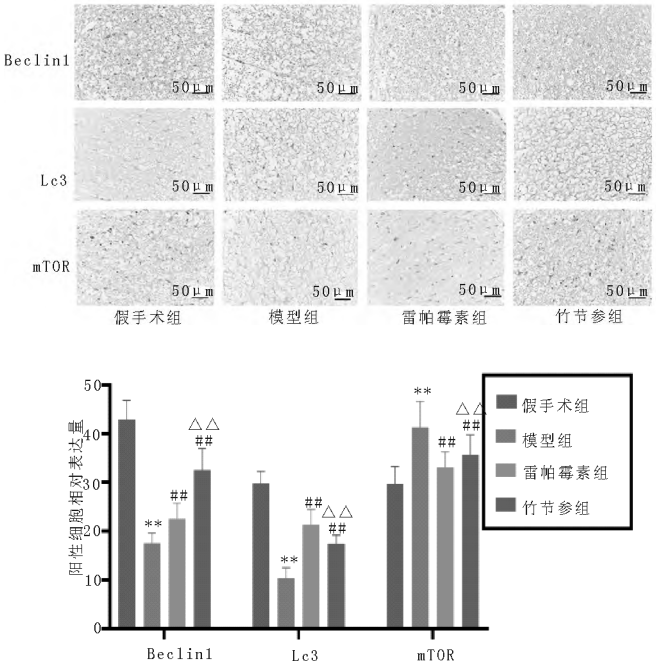
3.3　免疫组化学结果 在 3h 时间段内,与假手术组比,模型组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞表达明显减少($P < 0.01$),mTOR 阳性细胞表达明显增加($P < 0.01$)。与模型组比,竹节参组、雷帕霉素组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞表达均明显增加($P < 0.05$),mTOR 阳性细胞的表达明显减少($P < 0.05$)。竹节参组 Beclin1 、LC3、mTOR 阳性细胞表达均高于雷帕霉素组($P < 0.01$,$P < 0.05$),见图 3。

在 6h 时间段内,与假手术组比,模型组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞的表达明显减少(P < 0.01)),mTOR 阳性细胞的表达明显增加($P < 0.01$))。与模型组比,竹节参组、雷帕霉素组脊髓组织中 Beclin1 、LC3 阳性细胞的表达均明显增加($P < 0.01$),mTOR 阳性细胞的表达明显减少($P < 0.01$)。竹节参组 Beclin1、mTOR 阳性细胞表达高于雷帕霉素组($P < 0.01$),LC3 阳性细胞表达低于雷帕霉素组($P < 0.01$),见图 4。



与假手术组比,$^{**}P < 0.01$;$^{*}P < 0.05$;
与模型组比,$^{\#\#}P < 0.01$;$^{\#}P < 0.05$;
与雷帕霉素组比,$^{\triangle\triangle}P < 0.01$,$^{\triangle}P < 0.05$

图 3　免疫组织化学检测 3h 后各组大鼠脊髓组织中 Beclin1、LC3、mTOR 阳性细胞的表达(400 ×)



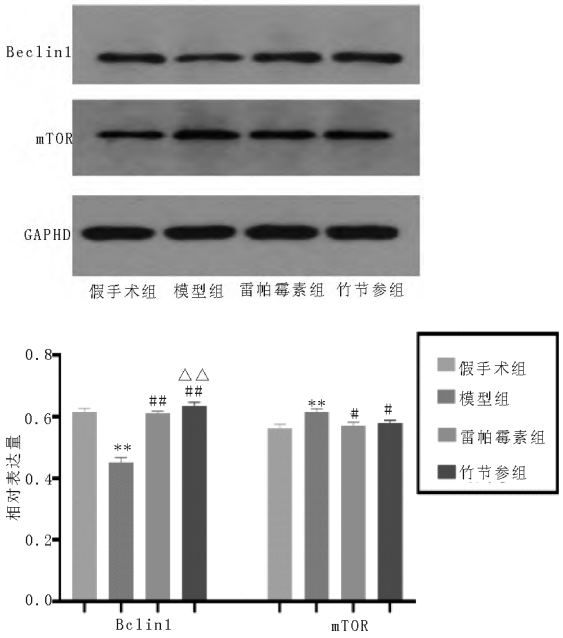
与假手术组比,$^{**}P < 0.01$;$^{*}P < 0.05$;
与模型组比,$^{\#\#}P < 0.01$;$^{\#}P < 0.05$;
与雷帕霉素组比,$^{\triangle\triangle}P < 0.01$,$^{\triangle}P < 0.05$

图 4　免疫组织化学检测 6h 后各组大鼠脊髓组织中 Beclin1、LC3、mTOR 阳性细胞的表达(400 ×)

3.4　免疫印迹实验结果 在 3h 时间段内,与假手术组比,模型组脊髓组织中 Beclin1 蛋白表达显著下调($P < 0.01$),mTOR 蛋白表达明显上调($P < 0.01$)。与模型组比,竹节参组、雷帕霉素组脊髓组织中 Beclin1 蛋白表达均上调($P < 0.01$),mTOR 蛋白表达均下调($P < 0.05$)。竹节参组 Beclin1 蛋白表达高于雷帕霉素组($P < 0.01$),但 mTOR 蛋白与雷帕霉素组比差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 5。

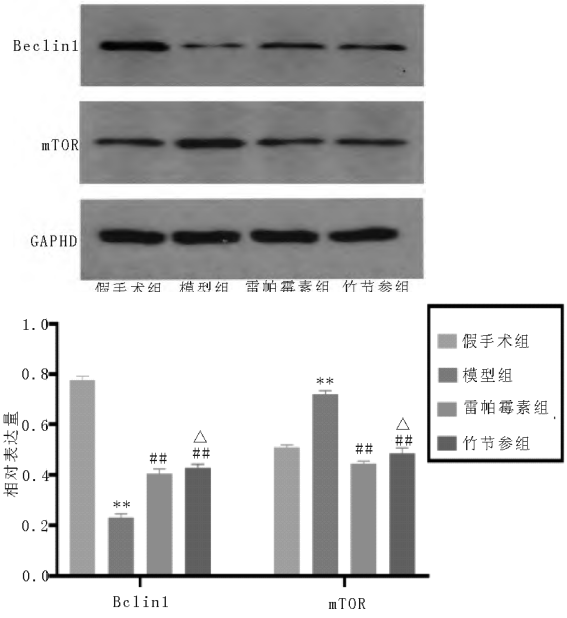
(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

在 6h 时间段内，与假手术组比，模型组脊髓组织中 Beclin1 蛋白表达显著下调（$P<0.01$），mTOR 蛋白表达明显上调（$P<0.01$）。与模型组比，竹节参组、雷帕霉素组脊髓组织中 Beclin1 蛋白的表达均上调（$P<0.01$），mTOR 蛋白的表达明显下调（$P<0.01$）。竹节参组对 Beclin1 蛋白的上调作用优于雷帕霉素组（$P<0.05$），但雷帕霉素组对 mTOR 蛋白的下调作用优于竹节参组（$P<0.05$），见图 6。



与假手术组比，$^{**}P<0.01$；$^{*}P<0.05$；
与模型组比，$^{\#\#}P<0.01$；$^{\#}P<0.05$；
与雷帕霉素组比，$^{\triangle\triangle}P<0.01$，$^{\triangle}P<0.05$

图 5　免疫印迹法检测 3h 各大鼠脊髓组织中蛋白 Beclin1、mTOR 的表达



与假手术组比，$^{**}P<0.01$；$^{*}P<0.05$；
与模型组比，$^{\#\#}P<0.01$；$^{\#}P<0.05$；
与雷帕霉素组比，$^{\triangle\triangle}P<0.01$，$^{\triangle}P<0.05$

图 6　免疫印迹法检测 6h 后各大鼠脊髓组织中蛋白 Beclin1、mTOR 的表达

4　讨论

4.1　竹节参具有抗自噬、促进神经修复的作用　竹节参又名竹节人参，系五加科人参属植物竹节参（*Panax japonicus* C. A. Mey）的根茎，其性温，味甘、微苦，主要功效为滋补强壮、散瘀止痛、止血祛痰[15]，其功效既类人参，又似三七。竹节参主要活性成分为皂苷类[16]。最新发现，竹节参的药理作用可能与其对细胞自噬的调控作用有关，竹节参总皂苷（total saponins of *Panax japonicus*，Pjs）预处理脑缺血再灌注损伤大鼠海马组织能显著降低 LC3－Ⅱ/LC3－Ⅰ比值，上调 P62 蛋白表达，从而抑制脑神经细胞自噬的过度激活[17]。邓丽丽等[18]通过在 SH－SY5Y 细胞中预孵育竹节参总皂苷发现，竹节参总皂苷逆转 H_2O_2 处理引起 LC3－Ⅱ和 Beclin1 蛋白的下调，其机制可能与调节线粒体功能及自噬相关蛋白有关。本课题前期研究观察到，竹节参水煮液预处理 SCII 大鼠模型能够抑制 SCII 脊髓组织中 C－fos、C－jun、Bax 蛋白表达，同时促进 Bcl－2 蛋白表达，其作用可能是通过抑制细胞过度凋亡而达到的[19]。由此可见，竹节参具有较好的抗自噬、抗凋亡、促进神经修复的作用。但是竹节参水煮液对 SCI 的保护作用是否通过调控自噬实现的，仍尚未有报道。

4.2　自噬与 SCI　SCI 后的再生是其功能修复的主要表现。自噬在 SCI 后的作用研究在国内外尚处于起步阶段[20]。在 SCI 继发性损伤过程中，往往伴随着一个重要的病理特征，即自噬底物的降解过程发生障碍，过度堆积的自噬底物具有十分严重的神经毒性。作为中枢神经系统的常驻运动细胞，运动神经元细胞无处不在地分布在脊髓中。SCI 后脊髓神经元细胞结构发生破坏及功能出现障碍，初期轻微损伤时脊髓神经元细胞通过自身代偿作用促进自噬底物的降解，从而对神经元运动细胞具有保护作用[21~23]，后期细胞自噬过度激活导致自噬底物的过度堆积，超出了神经元运动细胞对自噬底物降解的能力，因而对神经元运动细胞具有损伤作用[24]。越来越多的研究表明，随着病程的延长，自噬在 SCI 中是突出的，其由神经元细胞的损伤程度和脊髓组织中的自噬底物的堆积水平呈正相关性[25,26]。自噬体膜上的微管相关蛋白Ⅰ轻链 3（LC3），是自噬的特征性标志物，研究表明 LC3－Ⅱ含量的表达水平与自噬泡的数量多少呈正相相关性[27,28]。Beclin 1 作为自噬活化的关键因子，它在自噬体前体的形成中起重要作用，Beclin1 在 SCI 发生后促进自噬的发生与其表达的升高有关[29,30]。雷帕霉素靶蛋白（mammalian target of rapamycin，mTOR）是氨基酸和三磷酸腺（adenosine－triphosphate，ATP）的感受器，其活性对自噬体形成及成熟具有重要作用，其激活后细胞自噬被抑制[31]；相反，抑制该通路可诱导细胞自噬[32]。mTOR 信号通路是细胞自噬的经典调节通路，也是 PI3K/AKT 下游蛋白激酶，存在于 mTOR 复合物 1（mTORC1）和 mTOR 复合物 2（mTORC2）中[33]；mTORC2 与细胞骨架的构建和细胞的运动有关。mTORC1 是细胞增殖、凋亡和自噬的主要调节因子[34]。正常情况下，通过 mTOR 信号通路的 mTOR 复合体 1（m TORC1）直接与自噬相关因子丝氨酸/苏氨酸激酶 1（ULK1）相互作用或使之磷酸化，影响 ULK 复合体的形成对自噬的发生形成负调控[35]。Sekiguchi 等[23]研究结果表明雷帕霉素通过抑制 mTOR 信号通路促进自噬，从而减少 SCI 后神经组织损伤和运动损伤。PI3K/AKT/mTOR 是自噬的关键上游信号通路，被公认为一系列细胞过程的调节者，调节细胞存活于死亡，营养不良、缺氧、外部压力或抑制细胞增殖的其他应激条件能够抑制此信号通路，促进细胞自噬的发生，最终导致细胞死亡[36,37]。

4.3　竹节参调控 mTOR 信号通路发挥保护脊髓的作用　本研究观察到 SCI 模型大鼠改良 Tarlov 评分降低，竹节参、雷帕霉素可以提高改良 Tarlov 评分；病理结果表明，SCI 破坏脊髓组织中神经元细胞正常的形态结构，竹节参可以改善 SCI 脊髓组织中神经元细胞的形态结构，减轻神经元细胞受损的程度；免疫组化、免疫

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

印迹结果表明,SCI 模型大鼠脊髓组织中 Beclin1 、LC3 蛋白表达下调,mTOR 蛋白表达上调。竹节参可以上调脊髓组织中 Beclin1、LC3 蛋白表达,下调 mTOR 蛋白表达。有研究表明[38],雷帕霉素能够促进急性脊髓损伤后脊髓组织中 LC3、Beclin1、Bcl－2 蛋白表达,降低 Bax 蛋白表达,损伤后神经细胞可能的自我保护机制是由于雷帕霉素增强了神经元细胞的自噬功能。Sekiguchi 等[23]研究表明雷帕霉素显著降低 P70S6K 蛋白的磷酸化水平,导致损伤脊髓中 LC3 和 Beclin1 的表达水平升高,激活细胞自噬。其实验结果与本研究一致。

综上所述,mTOR 自噬通路可能参与了 SCI 的发病过程,竹节参可在一定程度上改善 SCI 脊髓神经元细胞的损伤程度,并提高 SCI 模型大鼠下肢运动功能,其作用机制可能与良性调控 mTOR 信号通路,从而激活细胞自噬有关。

参考文献:

[1] Kim YH, Ha KY, Kim SI. Spinal cord injury and related clinical trials [J]. Clin Orthop Surg, 2017, 9(1): 1.

[2] Li S, Stys PK. Mechanisms of ionotropic glutamate receptor－mediated excitotoxicity in isolated spinal cord white matter[J]. J Neurosci, 2000,20(3):1190.

[3] Nakamura M, Houghtling RA, MacArthur L, et al. Differences in cytokine gene expression profile between acute and secondary injury in adult rat spinal cord[J]. Exp Neurol, 2003 184(1):313.

[4] Kurland D, Hong C, Aarabi B, etal. Hemorrhagic progression of a contusion after traumatic brain injury: a review[J]. J Neurotrauma, 2012,29(1):19.

[5] Simard JM, Tsymbalyuk O, Ivanov A, et al. Endothelial sulfonylurea receptor 1－regulated NC Ca－ATP channels mediate progressive hemorrhagic necrosis following spinal cord injury[J]. J Clin Invest,2007, 117(8):2105.

[6] Batchelor PE, Kerr NF, Gatt AM, et al. Intracanal pressure in compressive spinal cord injury: reduction with hypothermia[J]. J Neurotrauma, 2011 ,28(5):809.

[7] Werndle MC, Saadoun S, Phang I, et al . Monitoring of spinal cord perfusion pressure in acute spinal cord injury: initial findings of the injured spinal cord pressure evaluation study[J]. Crit Care Med,2014 , 42(3):646.

[8] Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems[J]. J Neurotrauma,2004,21(4):429.

[9] Yip PK, Malaspina A. Spinal cord trauma and the molecular point of no return[J]. Mol Neurodegener,2012 ,7(1):6.

[10] GBD 2016 Neurology Collaborators. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990－2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. Lancet Neurol,2019 ,18 (5):459.

[11] Zhang X, Jing Y, Qin C, et al. Mechanical stress regulates autophagic flux to affect apoptosis after spinal cord injury[J]. J Cell Mol Med, 2020 ,24(21):12765.

[12] 陈龙全,刘杰书,黄　琼. 竹节参的主要药效与作用机制[J]. 中华中医药杂志,2009,24(2):197.

[13] 邹海艳,赵　晖,邱　葵,等. 竹节参皂苷类化学成分的研究[J]. 世界中医药,2012,7(6):565.

[14] Eser O, Fidan H, Sahin O, et al. The influence of dexmedetomidine on ischemic rat hippocampus[J]. Brain Res,2008 ,1218:250.

[15] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 化学工业出版社,2005: 93.

[16] 左　锐,袁　丁. 竹节参化学成分和药理活性研究进展[J]. 时珍国医国药,2005,16(9):838.

[17] 黄亚光,欧炳金,冯家腾,等. 竹节参总皂苷调节大鼠海马区自噬减轻脑缺血再灌注损伤[J]. 中成药,2020,42(7):1721.

[18] 邓丽丽,万静枝,袁　丁,等. 竹节参总皂苷通过线粒体途径保护 H2O2 诱导的 SH－SY5Y 神经细胞损伤[J]. 中药材,2015,38(8): 1690.

[19] 卜献忠. 基于益气活血法探讨竹节参干预脊髓缺血再灌注损伤后细胞凋亡相关蛋白的影响研究[D]. 湖北民族大学硕士学位论文, 2019.

[20] 张　滨,黄旭明,张明兴,等. 大鼠脊髓损伤后自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3 表达的变化[J]. 中国老年学杂志,2017,37(5):1071.

[21] Chen HC, Fong TH, Hsu PW, et al. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti－inflammation, and neuroprotection[J]. J Surg Res, 2013,179(1):e203.

[22] Lipinski MM, Wu J, Faden AI, et al. Function and Mechanisms of Autophagy in Brain and Spinal Cord Trauma[J]. Antioxid Redox Signal, 2015,23(6):565.

[23] Sekiguchi A, Kanno H, Ozawa H, et al. Rapamycin promotes autophagy and reduces neural tissue damage and locomotor impairment after spinal cord injury in mice[J]. J Neurotrauma, 2012 ,29(5):946.

[24] Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease[J]. Nat Med,2013,19(8):983.

[25] Fujita S, Sakurai M, Baba H, et al. Autophagy－mediated stress response in motor neurons after hypothermic spinal cord ischemia in rabbits[J]. J Vasc Surg, 2015 ,62(5):1312.

[26] Kuo SY, Castoreno AB, Aldrich LN, et al . Small－molecule enhancers of autophagy modulate cellular disease phenotypes suggested by human genetics[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2015 ,112(31):E4281.

[27] Sou YS, Tanida I, Komatsu M, et al. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE－16[J]. J Biol Chem,2006 ,281(6):3017.

[28] Taguchi－Atarashi N, Hamasaki M, Matsunaga K, et al. Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy[J]. Traffic,2010 ,11(4):468.

[29] Chen G, Li J, Wang Z, et al. Ezetimibe protects against spinal cord injury by regulating autophagy and apoptosis through inactivation of PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(6): 2685.

[30] Rong Y, Liu W, Lv C, et al. Neural stem cell small extracellular vesicle－based delivery of 14－3－3t reduces apoptosis and neuroinflammation following traumatic spinal cord injury by enhancing autophagy by targeting Beclin－1[J]. Aging (Albany NY),2019 ,11(18):7723.

[31] Tanabe F, Yone K, Kawabata N, et al. Accumulation of p62 in degenerated spinal cord under chronic mechanical compression: functional analysis of p62 and autophagy in hypoxic neuronal cells [J]. Autophagy,2011,7(12):1462.

[32] Chen A, Xiong LJ, Tong Y, et al. Neuroprotective effect of brain－derived neurotrophic factor mediated by autophagy through the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(4): 1011.

[33] Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, et al. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity[J]. FEBS Lett,2017,591 (19):3089.

[34] Jhanwar－Uniyal M, Amin AG, Cooper JB, et al. Discrete signaling mechanisms of mTORC1 and mTORC2: Connected yet apart in cellular and molecular aspectsy[J]. Adv Biol Regul,2017 ,64:39.

[35] Russell RC, Yuan HX, Guan KL. Autophagy regulation by nutrient signalingy[J]. Cell Res,2014 ,24(1):42.

[36] Zhou J, Jiang YY, Chen H, et al. Tanshinone I attenuates the malignant biological properties of ovarian cancer by inducing apoptosis and autophagy via the inactivation of PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Cell Prolif, 2020,53(2):e12739.

[37] Xu Z, Han X, Ou D, et al. Targeting PI3K/AKT/mTOR－mediated autophagy for tumor therapy[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2020 ,104 (2):575.

[38] 李喜功,陆　洋,林向进,等. 雷帕霉素增强自噬表达对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡影响的实验研究[J]. 中国科技论文,2018, 13(6):621.

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net