

本文引用:卢青青,范婷婷,万彩云,张伟,谢梦洲,李亮.基于 Ca^{2+} 浓度及线粒体氧化应激探讨补阳还五汤对脊髓损伤大鼠受损红核神经元的保护作用[J].湖南中医药大学学报,2023,43(4):598-604.

基于 Ca^{2+} 浓度及线粒体氧化应激探讨补阳还五汤对脊髓损伤大鼠受损红核神经元的保护作用

卢青青^{1,2},范婷婷^{1,2},万彩云^{1,2},张伟³,谢梦洲^{1,2},李亮^{1,2*}

1.湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学中医心肺病证辨证与药膳食疗重点研究室,湖南长沙 410208;3.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南长沙 410208

〔摘要〕目的 从 Ca^{2+} 浓度及线粒体氧化应激的角度探讨补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)对脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)气虚血瘀证红核神经元的影响。**方法** 将大鼠随机分为5组:对照组、模型组、BYHWD低剂量组(BL组)、BYHWD中剂量组(BM组)和BYHWD高剂量组(BH组)。除对照组外,其余4组均采用游泳力竭法联合红核脊髓束(rubrospinal tract, RST)横断术制备SCI气虚血瘀证模型。BL组、BM组、BH组大鼠分别以BYHWD生药12.825、25.650、51.300 g/kg的剂量灌胃,对照组和模型组以生理盐水灌胃。采用斜板实验检测大鼠的肢体运动功能,血液流变学检测血液的状态,氧化应激和抗氧化能力检测红核超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,原子分光光度法测定红核 Ca^{2+} 浓度,透射电子显微镜观察红核线粒体的状态。**结果** 术后第1、第14、第28天,模型组斜板实验角度均明显低于对照组($P<0.01$)。术后第14、第28天,BL组、BM组、BH组斜板实验角度均明显高于模型组($P<0.01$);BL组斜板实验角度明显低于BH组($P<0.01$)。与术后第1天比较,术后第14、第28天BL组、BM组、BH组斜板实验角度均明显升高($P<0.01$)。与对照组比较,模型组全血低切黏度、全血中切黏度、全血高切黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度、MDA含量和 Ca^{2+} 浓度均明显升高($P<0.01$),SOD含量明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,BL组、BM组、BH组全血低切黏度、全血中切黏度、全血高切黏度、红细胞聚集指数、卡松黏度和 Ca^{2+} 浓度均明显降低($P<0.01$),BM组、BH组MDA含量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),BH组SOD含量明显升高($P<0.05$)。与BH组比较,BL组、BM组卡松黏度均明显升高($P<0.05$)。模型组出现线粒体结构模糊、排列紊乱、染色质边集的典型凋亡现象。BL组、BM组、BH组线粒体结构变得清晰,数目增多,染色质边集现象改善,其中,BH组改善最为明显。**结论** BYHWD对SCI气虚血瘀证大鼠受损红核神经元有保护作用,促进肢体运动功能的恢复,其机制可能与BYHWD调节血液微循环,改变线粒体形态,增强线粒体抗氧化应激能力,降低 Ca^{2+} 浓度有关。

〔关键词〕 脊髓损伤;补阳还五汤; Ca^{2+} ;线粒体;氧化应激;红核神经元;气虚血瘀证

〔中图分类号〕 R274.9

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.04.004

Protective effects of Buyang Huanwu Decoction on damaged rubrospinal neurons in rats after spinal cord injury based on Ca^{2+} concentration and mitochondrial oxidative stress

LU Qingqing^{1,2}, FAN Tingting^{1,2}, WAN Caiyun^{1,2}, ZHANG Wei³, XIE Mengzhou^{1,2}, LI Liang^{1,2*}

1. Provincial Key Laboratory of TCM Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

2. Key Laboratory of TCM Heart and Lung Syndrome Differentiation & Medicated Diet and Dietotherapy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 Objective To discuss the effects of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) on rubrospinal neurons after spinal

〔收稿日期〕 2022-11-07

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30435, 2018JJ2289)。

〔第一作者〕 卢青青,女,硕士研究生,研究方向:中医药修复中枢神经系统损伤。

〔通信作者〕 *李亮,男,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail: superliliang@126.com。

cord injury (SCI) of qi deficiency and blood stasis pattern from Ca^{2+} concentration and mitochondrial oxidative stress. **Methods** The rats were randomly divided into 5 groups: control, model, low-dose BYHWD (BL) group, medium-dose BYHWD (BM) group and high-dose BYHWD (BH) group. The SCI models of qi deficiency and blood stasis pattern were established in model, BL, BM and BH groups with swimming exhaustion method combined with rubrospinal tract (RST) transection, except for the control group. The BL, BM and BH groups were intragastrically perfused with crude BYHWD 12.825, 25.650, 51.300 g per kilogram of bodyweight, respectively. The control and model groups were given normal saline. The motor function of limbs was determined by inclined plate test, the blood state was tested by hemorheology, the superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level in nucleus ruber was measured by oxidative stress and antioxidative ability, and the Ca^{2+} concentration in rubrospinal neurons was determined by atomic spectrophotometry. The morphological changes of mitochondria in nucleus ruber were observed by transmission electron microscope. **Results** On the 1st, 14th and 28th day after operation, the angle of inclined plate in model group was significantly lower than that in control group ($P<0.01$). On the 14th and the 28th day after surgery, the angle of inclined plate in BL, BM and BH groups was significantly higher than that in model group ($P<0.01$). The angle of inclined plate in BL group was significantly lower than that in the BH group ($P<0.01$). Compared with the 1st day after surgery, the angle of inclined plate test in BL, BM and BH group was significantly higher on the 14th and 28th day after surgery ($P<0.01$). Compared with control group, the whole blood low viscosity, whole blood middle viscosity, whole blood high viscosity, red blood cell aggregation index, Casson viscosity, MDA content and Ca^{2+} concentration were significantly higher in the model group ($P<0.01$), while the SOD content was significantly lower ($P<0.01$). Compared with model group, the whole blood low tangential viscosity, whole blood tangential viscosity, whole blood high tangential viscosity, red blood cell aggregation index, Casson viscosity and Ca^{2+} concentration in BL group, BM group and BH group were significantly lower ($P<0.01$). MDA content in BM group and BH group was significantly lower ($P<0.05$ or $P<0.01$). SOD content in BH group was significantly higher ($P<0.05$). Compared with BH group, Casson viscosity in BL group and BM group was significantly higher ($P<0.05$). The model group showed typical apoptotic phenomena of fuzzy mitochondrial structure, disordered arrangement and chromatin edge set. In BL, BM and BH groups, the mitochondrial structure was clear, the number increased, and the chromatin margination phenomenon improved. Among the three groups, BH group showed the most obvious improvement. **Conclusion** BYHWD has protective effects on damaged rubrospinal neurons of rats after SCI with qi deficiency and blood stasis pattern, and helps recover the limb motor function. The possible mechanism is that BYHWD can regulate blood microcirculation, change the morphology of mitochondria, improve its anti-oxidative stress capability and decrease Ca^{2+} concentration.

[**Keywords**] spinal cord injury; Buyang Huanwu Decoction; Ca^{2+} ; mitochondria; oxidative stress; rubrospinal neurons; qi deficiency and blood stasis pattern

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是常见的神经系统损伤性疾病^[1]。每年约有 100 万人遭受 SCI, 对患者、家庭和社会产生重大的心理、身体和社会经济后果^[2]。SCI 常表现为截瘫或四肢瘫, 致残率高且治愈率低^[3]。目前的治疗手段可以在一定程度上缓解脊髓受压或损伤的状况, 但对神经功能恢复的作用仍然有限。因此, 如何有效降低 SCI 后伤残率, 缓解疼痛, 促进其神经功能快速恢复仍是巨大挑战^[4]。

SCI 在中医学属于“痿证”范畴, 常伴气虚血瘀证^[5]。SCI 患者多长期卧床, 久卧伤气。气为血之帅, 气行则血行, 气伤则虚, 气虚则血行无力, 从而病情经久不愈, 痿软无力^[6]。本课题组前期研究发现, 采用游泳力竭法联合红核脊髓束(rubrospinal tract, RST)横断手术制备 SCI 气虚血瘀证大鼠模型后, 补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)可防止

红核神经元发生逆行性溃变、促进神经元的再生, 改善大鼠肢体运动功能^[7-10], 但是其具体机制尚不完全清楚。

中医学认为, “气”是维持人体生命活动的精微物质, 包含生命活动所需的物质和能量等, 而物质能量代谢和呼吸作用的主要场所是线粒体^[11]。线粒体参与机体氧化还原反应, 对保护神经元, 促进神经元再生都有着至关重要的作用, 细胞存活与否、状态好坏都会随着线粒体功能结构的变化而受到影响^[12], 而线粒体功能结构的变化与 Ca^{2+} 的稳态密切相关。因此, 本课题组假设中医学中的“气虚”可能与线粒体功能下降相关, 拟从红核线粒体形态改变、 Ca^{2+} 浓度变化的影响去阐释 BYHWD 修复 SCI 的机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 90 只, 8~10 周龄, SPF 级, 体重(200±20) g, 由湖南中医药大学实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(湘)2019-0004。本实验由湖南中医药大学动物实验伦理委员会批准, 伦理审批号: LL2021030503。实验动物在环境清洁、温度为(21±2)℃、相对湿度为 30%~70% 的饲养环境中分笼喂养, 按时等量供给高温高压灭菌的饲料和水。动物饲养和实验操作均遵循湖南中医药大学制定的科研动物和实验室使用规范。

1.2 主要试剂、药品

电子显微镜固定液(北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20170727); BCA 蛋白定量试剂盒(赛默飞世尔科技有限公司, 批号: 23227); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(批号: A001-3-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号: A003-1-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司; 钙标准贮备液(国家有色金属及电子材料分析测试中心, 批号: 20A034-5); 苯巴比妥钠注射液(天津金耀药业有限公司, 批号: 1906061, 0.1 g/mL); 阿莫西林胶囊(海南先声药业有限公司, 批号: 02-190503)。

1.3 主要仪器

强迫游泳桶(型号: Smart 3.0)、手术显微镜(型号: 77002)均购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司; 血液流变仪(北京赛科希德科技股份有限公司, 型号: SA-6600); 透射电子显微镜(北京捷欧路科贸有限公司, 型号: JEM1230); 原子吸收光谱仪(赛默飞世尔科技有限公司, 型号: ICE3000)。

2 实验方法

2.1 实验药物制备

BYHWD 处方: 黄芪 120 g, 当归尾 6 g, 赤芍 4.5 g, 川芎 3 g, 地龙 3 g, 桃仁 3 g, 红花 3 g。以上中药饮片均购于湖南三湘中药饮片有限公司, 请湖南中医药大学药学院专家鉴定, 符合《中华人民共和国药典》^[13]要求。在湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室, 将每种药物饮片用电子天平进行精确称量, 每份 BYHWD 处方均加自身重量的 10 倍量水浸泡 30 min, 用武火煮至药液沸腾后改为文火保持 30 min, 再用无菌纱布过滤药液, 将所得药液用滤纸过滤得滤液备用。继续向第 1 次煎煮过药液

的药渣加入 8 倍量水, 进行相同步骤得第 2 次滤液。将两次滤液合并一同放入旋转蒸发仪浓缩, 浓缩至浓度为生药 2 g/g 的膏剂, 待冷却后放入灭菌玻璃罐中, 在 4℃ 冰箱保存备用。后续使用时用蒸馏水稀释成浓度为生药 2 g/mL 的药液。

2.2 动物模型制备

采用游泳力竭法联合 RST 横断术^[14]进行 SCI 气虚血瘀证大鼠模型制备。水温 22~25℃, 将大鼠分组依次进行游泳, 直到出现身体无法支撑、摇晃欲倒等, 表明游泳导致力竭。连续游泳 21 d, 建立气虚状态模型。在 21 d 的强迫游泳运动结束后, 注射苯巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠, 将大鼠固定于鼠台, 在手术显微镜下逐层分离大鼠颈背部肌肉组织, 暴露第 3、第 4 颈椎之间的脊髓, 用手术刀的尖端迅速横断右侧 RST, 建立局部“血瘀”状态, 逐层缝合, 涂阿莫西林以预防感染。大鼠苏醒后, 可见右侧前肢呈屈曲无力状, 且右前爪无法自由伸展, 表明 SCI 气虚血瘀证大鼠模型制备成功^[14]。术后注意护理清洁大鼠, 保持干爽, 每日更换垫料。

2.3 动物分组与干预

将 90 只大鼠随机分为对照组、模型组、BYHWD 低剂量组(BL 组)、BYHWD 中剂量组(BM 组)、BYHWD 高剂量组(BH 组), 每组 18 只。除对照组外, 其余 4 组均进行游泳力竭法联合 RST 横断术制备 SCI 气虚血瘀证模型。BL 组、BM 组、BH 组大鼠分别以 BYHWD 生药 12.825、25.650、51.300 g/kg 的剂量(按照体表面积药物剂量换算公式^[15]计算, 分别相当于 70 kg 成人剂量的 1、2、4 倍)进行灌胃干预, 对照组和模型组以生理盐水灌胃, 均 1 次/d, 持续干预 28 d 后进行取材。

2.4 动物样本采集与制备

每组先随机选取 6 只大鼠进行取血, 将大鼠称量麻醉后, 打开大鼠的腹腔, 使用一次性采血针刺入腹主动脉采集 5 mL 血液, 在 4 h 内完成血液流变学检测。采完血后的大鼠, 用止血钳缓慢地将大鼠颅骨拨开, 暴露大脑组织, 定位中脑红核组织所在区域, 红核位于脑桥上丘的腹侧, 用镊子将红核组织完整地分离, 将红核组织样本放置在洁净的 EP 管中并立即投入液氮中, 转存至 -80℃ 冰箱。每组再随机选取 6 只大鼠, 以上同方式取红核组织转存至 -80℃ 冰箱。这 12 个红核组织样本中, 6 个样本用于后续的线粒体氧化应激相关检测, 其余 6 个样本用于 Ca²⁺浓度检测。

每组其余 6 只大鼠以上述方式取完整中脑放入含电子显微镜固定液的 EP 管中,暂时置于 4 ℃冰箱内保存,用于后续切片染色进行电子显微镜检测。

2.5 指标检测

2.5.1 宏观表征观察 术后第 28 天,在自然光线下观察每组大鼠精神状态、爪甲黏膜和舌色,并记录。

2.5.2 行为学检测 每组随机抽取 6 只大鼠,在 RST 横断术前和术后第 1、第 14、第 28 天进行斜板实验。将大鼠身体轴线与斜板纵轴垂直放置,检测大鼠能够停留的最大角度。从水平开始增加斜板角度,每次升高 5°,检测能够持续停留 5 s 而不下滑的最大角度,每只实验大鼠测量 3 次,取其平均值为其运动功能值^[16]。

2.5.3 血液流变学检测 使用血液流变仪进行检测,测定全血高切黏度、全血中切黏度、全血低切黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度,了解血液流变学情况。

2.5.4 氧化应激水平和抗氧化能力的检测 从-80 ℃冰箱中取出新鲜红核组织样本等待其恢复至室温,10%的样品溶液,4000 r/min、半径 11 cm 在高速离心机中持续离心 10 min,取出离心管,取上清液备用。用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,且严格按照 SOD、MDA 测定试剂盒说明,配制反应体系,制备测试管、对照管、测定管。放置在 37 ℃水浴箱中水浴 40 min,然后分别加入显色剂 400 μL,混匀,室温放置 10 min。将可见光分光光度计分别调至 550 nm 和 532 nm 处,测定各管吸光度值,按照试剂盒说明所提供公式计算红核组织样本 SOD 活力、MDA 含量。

2.5.5 原子分光光度法测定 Ca^{2+} 浓度 将红核组织样品放置在 50 mL 坩埚内,加入硝酸 8 mL、高氯酸 2 mL,浸泡放置一夜,盖上坩埚盖,在电热板上加热 60 min,打开盖子,继续加热至红棕色蒸气挥发干净,冷却再加蒸馏水转入离心管中,稀释至 50 mL,混匀。制备钙标准贮备液,取钙标准贮备液,用 2% 硝酸溶液不同 Ca^{2+} 浓度下溶液的吸光度,绘制标准曲线。根据标准曲线的制备方法测定待测样品中 Ca^{2+} 的浓度。

2.5.6 红核区透射电子显微镜观察 将电子显微镜固定液中的中脑组织用 0.1 mol 磷酸漂洗液漂洗 3 次,每次 15 min。红核组织浸泡于 1% 锇酸溶液中,4 ℃固定 2 h。双蒸水冲洗 3 次,每次 15 min。依次浸泡于 50%、70%、90% 乙醇中各 15 min;100% 无水乙醇和环氧丙烷各浸泡 3 次,每次 15 min,进行梯度脱水。在环氧丙烷和包埋液中进行包埋渗透。

纯包埋剂包埋红核组织后置于包埋模板内,电热恒温干燥箱内进行聚合。超薄切片机切片,片厚 70 nm,定位选取红核组织区域,用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色,使用透射电子显微镜观察记录并拍片。

2.6 统计学分析处理

实验数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析,采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘图。数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,满足正态性和方差齐性后,多组间比较采用单因素方差分析,不满足正态性采用 *Kruskal-Wallis* 法,不符合方差齐性则采用 *Dunnnett's T3* 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 宏观表征观察结果

对照组精神状态良好、活泼好动,爪甲淡红、毛发有光泽,舌质淡红柔软;模型组大鼠精神萎靡、不爱活动,且爪甲呈深红或紫红状,舌质深红,毛发黯淡。与模型组比较,BL 组、BM 组、BH 组出现气虚血瘀症状的程度较轻,部分大鼠爪甲呈深红状,部分无爪甲改变,可自由活动,且 BH 组气虚血瘀症状程度最轻。在游泳联合手术造模以及给药干预过程中均无大鼠死亡。

3.2 各组大鼠行为学检测结果

术前各组间斜板实验角度比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。术后第 1、第 14、第 28 天,模型组斜板实验角度均明显低于对照组($P < 0.01$)。术后第 14、第 28 天,BL 组、BM 组、BH 组斜板实验角度均明显高于模型组($P < 0.01$);BL 组斜板实验角度明显低于 BH 组($P < 0.01$)。与术后第 1 天比较,术后第 14、第 28 天 BL 组、BM 组、BH 组斜板实验角度均明显升高($P < 0.01$)。模型组斜板实验角度术后第 14、第 28 天与术后第 1 天比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组大鼠的斜板实验角度($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分组	术前	术后第 1 天	术后第 14 天	术后第 28 天
对照组	61.67±6.05	61.67±6.06	60.83±8.61	59.17±8.61
模型组	60.00±8.94	20.83±5.85**	24.17±3.76**	25.83±5.85**
BL 组	60.83±8.61	20.83±5.85	35.00±6.32 ^{###} △△	40.83±4.92 ^{###} △△
BM 组	61.67±9.83	21.67±5.16	46.67±5.16 ^{###} △△	50.00±6.32 ^{###} △△
BH 组	60.83±5.85	20.00±7.07	47.50±4.18 ^{###} △△	58.33±10.80 ^{###} △△

注:与对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,^{###} $P < 0.01$;与 BH 组比较,^{##} $P < 0.01$;与术后第 1 天比较,△△ $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠血液流变学指标比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	全血低切黏度/(mPa·s)	全血中切黏度/(mPa·s)	全血高切黏度/(mPa·s)	红细胞聚集指数	卡松黏度/(mPa·s)
对照组	47.26±17.00	6.65±1.31	5.02±0.56	9.73±1.32	3.52±0.35
模型组	260.40±99.33**	19.13±4.93**	12.18±2.57**	22.39±4.53**	6.01±0.99**
BL 组	88.48±12.46 [#]	9.69±0.39 [#]	6.78±0.33 [#]	13.48±1.92 [#]	4.34±0.52 [#]
BM 组	84.14±20.02 [#]	9.53±1.52 [#]	6.98±0.78 [#]	13.05±0.83 [#]	4.35±0.46 [#]
BH 组	61.58±34.55 [#]	7.35±2.43 [#]	5.21±1.13 [#]	11.75±2.06 [#]	3.53±0.62 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与 BH 组比较,^s $P<0.05$ 。

3.3 血液流变学检测结果

与对照组比较,模型组全血低切黏度、全血中切黏度、全血高切黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度均明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,BL 组、BM 组、BH 组全血低切黏度、全血中切黏度、全血高切黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度均明显降低($P<0.01$)。与 BH 组比较,BL 组、BM 组卡松黏度均明显升高($P<0.05$)。详见表 2。

3.4 红核氧化应激和抗氧化检测结果

与对照组比较,模型组 MDA 含量明显升高($P<0.01$),SOD 含量明显降低($P<0.01$)。与模型组比较,BM 组、BH 组 MDA 含量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),BH 组 SOD 含量明显升高($P<0.05$)。BL 组与模型组间 MDA 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。BL 组、BM 组与模型组间 SOD 含量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表 3 红核线粒体氧化应激和抗氧化检测($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)
对照组	2.92±1.61	431.17±108.95
模型组	5.87±1.28**	265.44±43.10**
BL 组	3.97±2.32	340.92±81.20
BM 组	3.34±2.04 [#]	341.04±84.14
BH 组	2.75±1.75 [#]	396.42±101.51 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^s $P<0.01$ 。

3.5 红核 Ca^{2+} 浓度检测结果

与对照组比较,模型组 Ca^{2+} 浓度明显升高($P<0.01$)。与模型组比较,BL 组、BM 组、BH 组 Ca^{2+} 浓度明显降低($P<0.01$)。详见表 4。

表 4 各组大鼠红核组织中 Ca^{2+} 浓度($\bar{x}\pm s, n=6$)

分组	Ca^{2+} 浓度/($\mu\text{g}/\text{mg}$)
对照组	40.41±33.18
模型组	299.99±158.71**
BL 组	95.31±151.95 [#]
BM 组	72.00±43.92 [#]
BH 组	58.61±25.02 [#]

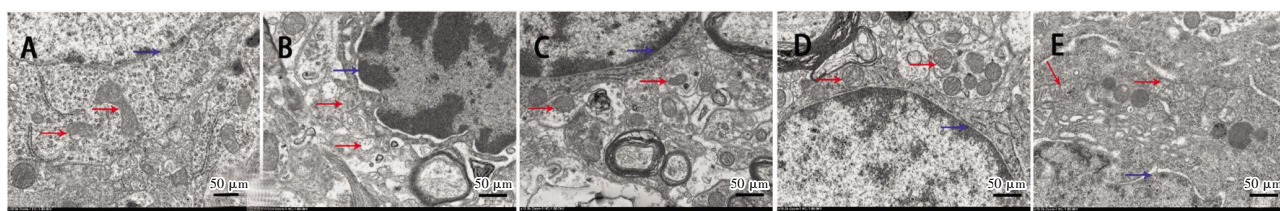
注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

3.6 红核透射电子显微镜观察结果

对照组红核组织中线粒体为椭圆形或卵圆形,线粒体结构清晰完整,线粒体嵴排列有序紧密,核膜完整且细胞核呈饱满圆形;模型组红核组织中线粒体结构模糊呈肿胀空泡状,线粒体嵴碎裂溶解状,伴有髓样化改变且数目减少,核膜内陷变形且有明显的染色质凝边集现象,为典型的凋亡现象;BL 组红核组织中线粒体空泡现象减少,肿胀减轻,可以看到卵圆形线粒体结构和少量线粒体嵴排列,核膜变形减轻且染色质边集程度减轻;BM 组线粒体结构和线粒体嵴更加清晰,染色质边集现象明显好转;BH 组改善最为明显,有椭圆形和卵圆形线粒体,结构清晰,嵴的数量增多,核膜附近基本无染色质边集。详见图 1。

4 讨论

根据中医理论“劳则气耗”理论,本课题组选择游泳力竭法模拟建立“气虚”状态。在中枢神经系统中,红核通过 RST 将小脑和大脑皮质等处的冲动传递到脊髓前角神经元,在调节体态和维持运动协调

图 1 透射电子显微镜观察结果($\times 10\ 000$)

注:A.对照组;B.模型组;C. BL 组;D. BM 组;E. BH 组。红色箭头指向线粒体,蓝色箭头指向核膜。

上具有重要作用^[17]。为保证造模方式简便有效,选择横断第3、第4颈椎之间的脊髓右侧RST进行造模,此方式损伤范围小,部位较为精确,易于术后护理,可达到模拟SCI后运动功能受损明显又不威胁生命安全的良好效果。除此以外,气为血之帅,血为气之母,横断处的局部血瘀亦可导致气运不利。因此,游泳力竭法联合RST横断术的造模方式都可以较好模拟SCI气虚血瘀证。

斜板实验结果可知,术前各组斜板实验角度无差异,说明实验大鼠术前运动功能水平相同。而模型制备术后第1天,模型组、BL组、BM组和BH组的斜板实验角度均大幅下降,说明造模大鼠的运动功能明显受损,造模成功。术后第14、第28天,与模型组比较,BL组、BM组和BH组的斜板角度均明显上升,且在第2天,BH组的斜板实验角度大于BL组,其运动功能恢复接近对照组水平,说明BYHWD对SCI大鼠的运动功能有明显的改善作用,且BH组的疗效优于BL组,提示疗效可能与治疗时间成正比。宏观表征观察结果显示,模型组气虚血瘀症状最为明显,大多表现为爪甲深红或紫红、精神萎靡,BL组、BM组大鼠爪甲颜色转淡,但精神状态一般,而BH组大鼠爪甲血呈粉色,精神状态良好,说明BYHWD可改善SCI大鼠气虚血瘀症状且BH组效果最好,与斜板实验结果相符,故BYHWD可以改善SCI气虚血瘀证的表现,体现其益气养血的功效。

SCI后血管内皮细胞损伤和组织水肿形成了缺血缺氧的微环境,不利于神经元的存活,故改善SCI后微循环障碍有助于脊髓修复^[18]。血液流变学检测血液中的细胞变形性和血浆流动性,这些指标可反映血液循环的状态。本研究采用血液流变学检测评价BYHWD对SCI后血液微循环的影响,结果显示,与对照组比较,模型组不同切变率下的全血黏度、红细胞聚集指数和卡松黏度明显升高($P<0.01$),而这些指标的值越高,说明全血的流动性越差,更易发生高黏滞血症,而BYHWD治疗组各指标值均明显下降,说明BYHWD可减轻血液微循环障碍,缓解血瘀状态,且BH组的卡松黏度明显低于BL组和BM组($P<0.05$),说明BH组的血液微循环改善效果优于BL组与BM组,提示一定剂量范围内,血液微循环的改善可能与BYHWD的剂量具有正相关性。

上述血液流变学检测结果表明,SCI后易导致

血液微循环障碍,增加缺血缺氧的发生概率,而神经系统具有高耗氧量、高代谢的特点^[19],神经元在缺血缺氧状态下会产生和释放大氧自由基,这些产物可破坏细胞膜,造成细胞损伤从而影响神经细胞的功能^[20-22],且神经系统在处于缺血缺氧的微环境时,易发生氧化应激反应,氧化终产物为MDA。MDA可影响线粒体呼吸链复合物及相关酶活性,加剧细胞膜和细胞器的损伤,是反映自由基对细胞损害程度的重要标志^[23]。自由基损伤作用最早的靶点为线粒体,SOD为氧自由基清除剂,代表机体清除自由基的能力^[24],故MDA含量与SOD活力可反映组织线粒体氧化应激与抗氧化能力的变化。因此,维持线粒体氧化应激-抗氧化轴的动态平衡对抑制细胞的氧化损伤有着重要意义。红核MDA与SOD检测结果显示,与对照组比较,模型组的MDA含量上升($P<0.01$),SOD含量下降($P<0.01$),提示SCI后出现明显的氧化应激反应,红核抗氧化能力减弱,细胞过氧化损伤程度较重;与模型组比较,BM组、BH组的MDA含量下降($P<0.01$),BH组的SOD含量上升($P<0.05$),说明BYHWD可改善红核线粒体氧化应激水平,增强抗氧化能力,降低自由基对细胞过氧化的损伤程度,且BH组效果最好。

细胞线粒体氧化磷酸化受阻,将会导致ATP合成受阻,从而使细胞膜上依赖ATP的钙泵功能受损,继而影响 Ca^{2+} 稳态^[25]。本研究中 Ca^{2+} 浓度检测结果显示,与对照组比较,模型组的 Ca^{2+} 浓度明显上升($P<0.01$),说明SCI后,线粒体形态发生改变,影响氧化应激反应可引起 Ca^{2+} 浓度上升。 Ca^{2+} 浓度上升一方面可加速自由基的生成,加重对线粒体的损伤,另一方面还可影响膜的流动性,使线粒体膜形态发生改变,形成恶性循环,加重SCI症状。而与模型组比较,BL组、BM组与BH组的 Ca^{2+} 浓度均下降($P<0.01$),说明BYHWD可以抑制 Ca^{2+} 浓度上升,维持 Ca^{2+} 平衡,防止形成恶性循环来保护线粒体。本研究中透射电子显微镜结果也验证了这一点,电子显微镜下对照组红核神经元超微结构非常清晰,胞核形态饱满,核膜清晰,线粒体嵴排列整齐均匀,结构清晰,数量较多;而模型组的红核神经元胞核出现凝集现象,线粒体嵴肿胀且排列散乱,伴空泡化,数量明显减少,染色质边集明显,说明 Ca^{2+} 浓度增加后,线粒体膜结构明显受到影响。与模型组比较,BL组、

BM 组与 BH 组电子显微镜下红核神经元的超微结构也发生了改变,胞核凝集现象减轻,核膜变形减轻,线粒体形态逐渐恢复,且 BH 组恢复情况最好,说明BYHWD 可以保护线粒体的形态结构,且 BH 组优于 BL 组、BM 组。

综上所述,通过游泳力竭法联合 RST 横断术制备大鼠气虚血瘀证模型后应用 BYHWD 进行治疗,实验结果验证了 BYHWD 对 SCI 气虚血瘀证大鼠的神经细胞有保护作用,有利于 SCI 气虚血瘀证大鼠运动功能的恢复,其机制可能与 BYHWD 调节血液微循环、增强线粒体抗氧化能力、降低 Ca^{2+} 浓度有关,提示我们可以从保护红核神经元、改善线粒体抗氧化能力和调节 Ca^{2+} 浓度等方面寻求更为有效的 SCI 治疗策略。然而,关于 BYHWD 调节线粒体氧化应激的蛋白通道和 Ca^{2+} 的具体分子机制,有待进一步研究,以便更加完善地阐述其作用机制。

参考文献

- [1] LIU X Y, ZHANG Y W, WANG Y T, et al. Inflammatory response to spinal cord injury and its treatment[J]. *World Neurosurgery*, 2021, 155: 19–31.
- [2] WILES M D. Airway management in patients with suspected or confirmed traumatic spinal cord injury: A narrative review of current evidence[J]. *Anaesthesia*, 2022, 77(10): 1120–1128.
- [3] 田 婷,李晓光.脊髓损伤再生修复中的问题与挑战[J].*中国组织工程研究*,2021,25(19):3039–3048.
- [4] CHEN X K, WANG Y Y, ZHOU G, et al. The combination of nanoscaffolds and stem cell transplantation: Paving a promising road for spinal cord injury regeneration[J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2021, 143: 112233.
- [5] 宋汉秋.补阳还五汤治疗急性缺血性脑梗塞 46 例[J].*陕西中医*, 2013,34(2):158–160.
- [6] 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.
- [7] 周 彬,范瑜洁,聂 颖,等.补阳还五汤联合 BMSCs 移植对脊髓损伤气虚血瘀证红核神经元的影响[J].*湖南中医药大学学报*, 2019,39(5):568–572.
- [8] 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.
- [9] YANG P, CHEN A, QIN Y, et al. Buyang Huanwu Decoction combined with BMSCs transplantation promotes recovery after spinal cord injury by rescuing axotomized red nucleus neurons[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 228: 123–131.
- [10] NIE Y, FAN Y J, ZHANG X, et al. Buyang Huanwu Decoction improves neural recovery after spinal cord injury in rats through the mTOR signaling pathway and autophagy[J]. *The Journal of Spinal Cord Medicine*, 2023, 46(1): 99–106.
- [11] 林 飞,郭丽丽,王 阶.基于线粒体的功能阐释中医“气”的作用[J].*中国中西医结合杂志*,2014,34(8):903–906.
- [12] 范婷婷,万彩云,卢青青,等.补阳还五汤改善脊髓损伤的抗氧化功能及作用机制[J].*世界中医药*,2021,16(12):1818–1823.
- [13] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].北京:中国医药科技出版社,2020:42,127,139,165,315.
- [14] LI L, LI F, YIN J, et al. Establishment and evaluation of a rat model of spinal cord injury with the pathopattern of qi-deficiency and blood-stasis in traditional Chinese medicine[J]. *Digital Chinese Medicine*, 2018, 1(1): 102–112.
- [15] 陈 安,张建伟,伍校琼,等.补阳还五汤对红核脊髓束横断后神经元的保护作用[J].*中国临床解剖学杂志*,2007(6):665–668.
- [16] 陈 萌,马 泉,郑小影,等.大鼠脊髓横断模型的建立及米诺环素对胶质纤维酸性蛋白表达的影响[J].*解剖学杂志*,2014,37(3): 352–355.
- [17] MARTINEZ-LOPEZ J E, MORENO-BRAVO J A, MADRIGAL M P, et al. Red nucleus and rubrospinal tract disorganization in the absence of Pou4f1[J]. *Frontiers in Neuroanatomy*, 2015, 9: 8.
- [18] FIGLEY S A, KHOSRAVI R, LEGASTO J M, et al. Characterization of vascular disruption and blood-spinal cord barrier permeability following traumatic spinal cord injury[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2014, 31(6): 541–552.
- [19] 谭荣镑,魏 波,李广盛. Nrf2-ARE 调控神经-血管交互作用参与脊髓损伤后的神经修复[J].*中国组织工程研究*,2021,25(35): 5694–5701.
- [20] 郭志强,刘云峰,王 佳,等.安宫牛黄丸联合亚低温对心脏骤停心肺复苏后患者脑氧代谢率及氧化应激损伤的影响[J].*湖北中医药大学学报*,2022,24(5):20–23.
- [21] 肖玉焕,韩 丽,李浩然,等.灵芝多糖防治中枢神经系统疾病的研究进展[J].*中草药*,2020,51(24):6391–6395.
- [22] 孙忠人,徐思禹,李 全,等.近 5 年中药治疗脊髓损伤相关机制研究进展[J].*中国中医药信息杂志*,2019,26(11):132–135.
- [23] 汪湛东,毛忠南,张 娜,等.基于氧化应激损伤和炎症反应探讨中风康复膏对脑缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用[J].*中国民族民间医药*,2022,31(16):15–19,52.
- [24] BUOSI P, BORGHI F A, LOPES A M, et al. Oxidative stress biomarkers in treatment-responsive and treatment-resistant schizophrenia patients[J]. *Trends in Psychiatry and Psychotherapy*, 2021, 43(4): 278–285.
- [25] 金晓雪,焦 凯,刘德敏.线粒体功能障碍与血管平滑肌细胞钙化[J].*中华高血压杂志*,2022,30(7):633–637.

(本文编辑 黎志清)