

参考文献:

- [1] Zilberman D E, Tsivian M, Mor Y, *et al.* The trues behind TRUS in the setting of chronic prostatitis/chronic pelvic pain syndrome[J]. *Urol Sci*, 2016, 27(1): 40-44.
- [2] 黄宇烽, 李宏军. 实用男科学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 268-269.
- [3] 李海松, 王 彬, 赵 冰. 慢性前列腺炎中医诊治专家共识[J]. 北京中医药, 2015, 34(5): 412-415.
- [4] 张敏建, 宾 彬, 商学军, 等. 慢性前列腺炎中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 933-941.
- [5] Liang C Z, Li H J, Wang Z P, *et al.* The prevalence of prostatitis-like symptoms in China[J]. *J Urol*, 2009, 182(2): 558-563.
- [6] 牛俊豪, 张 莹, 王朝阳. 美洛昔康应用于慢性前列腺炎治疗中的临床探讨[J]. 临床研究, 2019, 27(7): 42-43.
- [7] Magri V, Perletti G, Cai T, *et al.* Levofloxacin for NIH category II chronic bacterial prostatitis: a real-life study[J]. *Chemotherapy*, 2019, 64(1): 8-16.
- [8] 刘佳阳, 吴秋莲, 梁啦迪, 等. 盐酸坦索罗新联合地奥司明治疗慢性前列腺炎的疗效分析[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(1): 116-119.
- [9] 唐 硕, 李云祥. 观察盐酸坦索罗辛与抗感染药物结合治疗慢性前列腺炎的疗效[J]. 中国性科学, 2018, 27(8): 25-28.
- [10] Zhao W P, Zhang Z G, Li X D, *et al.* Celecoxib reduces symptoms in men with difficult chronic pelvic pain syndrome (Category IIIA) [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2009, 42(10): 963-967.
- [11] 刘晋宏, 方克伟. 塞来昔布治疗Ⅲb型前列腺炎的临床疗效观察[J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34(7): 72-74.
- [12] 王 平, 袁 敏. 淋必通颗粒对慢性前列腺炎细胞因子的影响[J]. 中成药, 2012, 34(12): 2418-2420.
- [13] 徐淑云, 卞如濂, 陈 修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1557-1560.
- [14] 朱向东, 王 燕. 敦煌辅行诀大泻肾汤治疗大鼠非细菌性前列腺炎的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(15): 4254-4256.
- [15] 何 颖, 沈先荣, 蒋定文, 等. 前摄宁颗粒对大鼠慢性前列腺炎的治疗作用[J]. 中成药, 2011, 33(4): 583-586.
- [16] 张 琳, 赵梓邯, 于冰莉, 等. 甘草地上部分对慢性前列腺炎大鼠的影响[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1407-1410.
- [17] 刘 宾, 刘文礼. 抵当汤对慢性前列腺炎大鼠组织匀浆 TNF- α , IL-6, IgG 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(9): 281-283.
- [18] 孙海波, 汪 敏, 刘元忠, 等. 游泳运动与药物综合治疗对慢性非细菌性前列腺炎大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平的影响[J]. 中华男科学杂志, 2017, 23(1): 21-26.
- [19] 甘 进, 王晓荣. IL-6 和 IL-8 在慢性前列腺炎患者精液中的表达及临床意义[J]. 江西医药, 2020, 55(8): 1050-1051; 1060.
- [20] 郝丽亚, 刘 丽, 白现广, 等. P 物质及其神经激肽-1 受体在慢性非细菌性前列腺炎大鼠 L5~S2 脊段的表达[J]. 中华男科学杂志, 2016, 22(7): 602-607.

益母草碱通过调节 cAMP/PKA 信号通路抑制脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡

赵曼云, 郭蔚虹, 张 霞

(海口市 120 急救中心急救科, 海南 海口 570208)

摘要:目的 探讨益母草碱对脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡的影响及其作用机制。方法 采用改良 Allen's 法建立脊髓损伤大鼠模型, 造模成功后即开始腹腔注射给药, 每天 1 次, 连续 4 周。采用 BBB 评分和斜板实验评估各组大鼠运动功能, HE 染色观察脊髓组织病理学变化, TUNEL 染色观察脊髓组织神经细胞凋亡情况, ELISA 检测脊髓组织中 caspase-3 和 cAMP 水平, RT-qPCR 检测脊髓组织中 PKAc 和 BDNF mRNA 表达, Western blot 检测脊髓组织中 cleaved-caspase-3、Bax、Bcl-2、PKAc、CREB、p-CREB (Ser133) 和 BDNF 蛋白表达。结果 脊髓损伤大鼠经高剂量益母草碱干预后, 脊髓组织损伤减轻, BBB 评分及斜板角度增加 ($P<0.01$), 脊髓神经细胞凋亡率和 caspase-3 活性降低 ($P<0.01$), 脊髓组织中 cAMP 水平、PKAc、BDNF mRNA 表达以及 PKAc、p-CREB、BDNF 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。然而, PKA 抑制剂 H-89 干预可抑制高剂量益母草碱对脊髓损伤大鼠各项指标的改善作用 ($P<0.05$)。结论 益母草碱可促进脊髓损伤大鼠后肢运动功能的恢复, 抑制脊髓神经细胞的凋亡, 改善脊髓组织病理损伤, 其机制可能与激活 cAMP/PKA 信号通路相关。

关键词: 益母草碱; 脊髓损伤; 神经细胞凋亡; cAMP/PKA 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)07-2315-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.046

收稿日期: 2021-06-08

作者简介: 赵曼云 (1981—), 女, 主治医师, 研究方向为急救医学。Tel: (0898) 36633559, E-mail: zhaomanyun9556@163.com

脊髓损伤是临床上常见的高致残率中枢神经系统疾病,当脊髓被直接或间接暴力损伤后会出现组织水肿、血管-脊髓屏障损伤和神经元坏死等现象,使神经再生被抑制,进而使神经系统功能受到破坏^[1]。脊髓损伤后的再生修复是当前神经科学领域的研究热点之一,中和或阻断髓鞘组织中的抑制成分或相关信号通路是目前治疗脊髓损伤及促进其修复的主要策略^[2-3]。环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)是细胞内重要的信使,在哺乳动物中枢神经系统干细胞分化和增殖过程中起着重要作用,可以通过激活蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA) 促进神经再生,且 cAMP/PKA 信号通路被证明是神经再生、神经重塑的重要调节因子^[4-6]。益母草碱是唇形科植物益母草的主要有效成分之一,具有保护心血管、神经系统、肾脏、生殖系统的作用及抗糖尿病等药理用途^[7],并对 cAMP/PKA 信号通路介导的中枢神经系统功能障碍具有预防和治疗作用^[8],可能通过调节 cAMP/PKA 信号通路对脊髓损伤后的神经细胞凋亡有一定的抑制作用。因此,本研究探讨益母草碱对脊髓损伤后神经功能的保护作用及可能机制,为相关防治提供新思路 and 依据。

1 材料

1.1 动物 75 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6~8 周龄,体质量(220±20) g,由海南省疾病预防控制中心提供,实验动物使用许可证号 SYXK(琼)2020-0012,常规饲养于安静通风环境下,室内温度 20~24℃,相对湿度 50%~65%,循环照明 12 h/12 h,适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 试剂与药物 益母草碱(纯度≥98%,成都瑞芬思生物科技有限公司,批号 190225)。PKA 通路抑制剂 H-89(美国 MedChemExpress 公司,批号 633210);caspase-3、环磷酸腺苷(cAMP)ELISA 检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);cleaved-caspase-3、Bax、Bcl-2、蛋白激酶 A(PKA)、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)、磷酸化的 CREB [p-CREB (Ser133)]、脑源性神经营养因子(BDNF)、GAPDH 抗体(美国 Santa Cruz 公司);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);TUNEL 凋亡试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 仪器 电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);RT-qPCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药 75 只 SD 大鼠随机分为假手术组,模型组,益母草碱低、高剂量组,高剂量益母草碱+PKA 抑制剂 H-89 组(益母草碱+H-89 组),每组 15 只。采用改良 Allen's 打击法建立脊髓损伤模型^[9],以 T10 为中心剃毛,消毒后作手术切口暴露 T9-T11 棘突,暴露 T10 对应的脊髓,用 20 g 击打棍从 3 cm 高度自由落体撞击 T10 骨窗对应的脊髓,当大鼠尾巴出现痉挛性摆动、双下肢迅速回缩并挥动,受撞击的脊髓组织水肿、出血,硬脊膜完整呈紫红色的现象时,认为模型制备成功;假手术组仅暴露

T10 对应的脊髓,不进行打击。造模成功后即开始腹腔注射给药干预,益母草碱低、高剂量组分别注射 4、16 mg/kg 益母草碱,益母草碱+H-89 组在注射 16 mg/kg 益母草碱的基础上再注射 5 mg/kg 的 H-89,假手术组和模型组注射等量生理盐水,每天 1 次,连续 4 周。

2.2 运动功能评价 分别于造模后第 7、14、21、28 天进行 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分和斜板角度评估各组大鼠运动功能。BBB 运动评分^[10]方法为早期以无或极少的后肢关节运动为特征,中期出现几次共济失调步态,晚期表现为拖着脚趾和尾巴、躯干不稳定以及爪子交替轮转。将大鼠后肢运动分为 22 个等级,后肢全瘫为 0 分,完全正常为 21 分,记录 2 次有效评分,取均值。斜板角度^[11]检测方法为,将大鼠头朝左横放在 Rivlin 斜板上,并从水平位置逐步增大倾斜角度,以大鼠在斜板上停留 5 s 不掉落为标准,测定斜板角度,获取 5 次有效角度,取平均值。

2.3 HE 染色观察脊髓组织病理学变化 药物干预 28 d 后,10%水合氯醛以 0.3 mL/100 g 的剂量腹腔注射麻醉大鼠后开胸,从左心室插管至主动脉,自心尖灌注生理盐水和 4%多聚甲醛固定 2 h,取以脊髓损伤点为中心的上下各 5 mm 节段的脊髓组织,置于 4%多聚甲醛固定 24 h,脱水,石蜡包埋,切片(片厚 4 μm),按照试剂盒说明书进行 HE 染色,于光镜下观察脊髓组织结构、炎症细胞浸润。

2.4 TUNEL 染色检测脊髓组织神经细胞凋亡情况 取“2.3”项下制备的切片,按照 TUNEL 染色试剂盒说明书进行透化、PBS 漂洗、封闭、标记、苏木素复染、脱水、透明、封片等步骤后,于显微镜下观察细胞凋亡情况。每张切片随机取 5 个视野进行计数统计,凋亡率=[凋亡细胞核数(阳性细胞数)/总细胞核数(总细胞数)]×100%。

2.5 ELISA 检测脊髓组织中 caspase-3 和 cAMP 水平 取各组大鼠损伤的脊髓组织,加入裂解液冰浴超声匀浆,4℃、10 000 r/min 离心 15 min,吸取等量上清液和不同浓度的标准品,根据 ELISA 检测试剂盒说明说进行操作,通过酶标仪检测 450 nm 波长处各孔光密度(OD_{450})值,以阴性对照孔调零,根据标准液的检测结果得出标准曲线,计算各组脊髓组织中 caspase-3 和 cAMP 水平。

2.6 RT-qPCR 检测脊髓组织中 PKAc 和 BDNF mRNA 表达 脊髓组织在冰上匀浆器中剪碎,加入 TRIzol 研磨混匀提取样本总 RNA,紫外分光光度计检测各样本总 RNA 浓度。取 2 μg 总 RNA 采用逆转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 扩增。反应条件为 95℃预变性 10 s,95℃变性 5 s,60℃退火延伸 31 s,共 40 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各基因的 mRNA 相对表达量。PKAc 正向引物序列 5'-GCTGGCTTTGATTTACGG-3',反向引物序列 5'-GATGTTTCGCTTGAGGATA-3';BDNF 正向引物序列 5'-CATCTTAGGAGTGGAAAGGGTG-3',反向引物序列 5'-TATGAAGCCACCTAATCGACCT-3'; β -actin 正向引物序列 5'-GATGACCCAGATCATGTTTGA-3',反向引物序列 5'-TTGGCATAGAGGTCTTTACGG-3'。

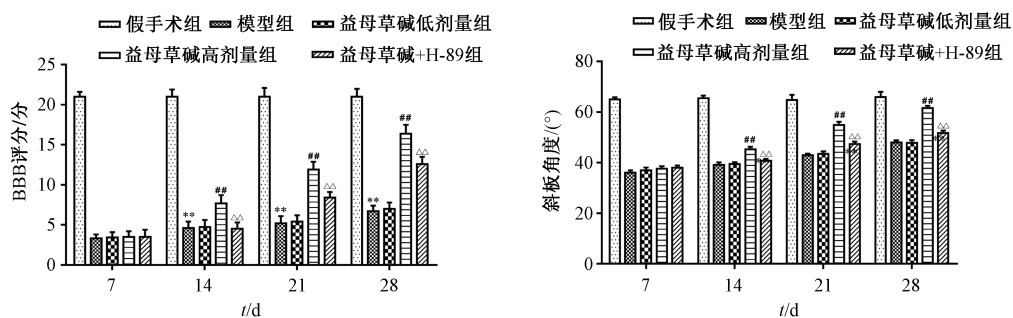
2.7 Western blot 检测脊髓组织中 PKAc、CREB、p-CREB (Ser133)、BDNF 及凋亡相关蛋白表达 取脊髓组织剪碎匀浆,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,BCA 法定量后使蛋白变性,取等量蛋白进行凝胶电泳分离并转膜至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,4 ℃ 孵育稀释后的一抗 [cleaved-caspase-3、Bax、Bcl-2、PKAc、CREB、p-CREB (Ser133)、BDNF、 β -actin, 1 : 1 000] 过夜,次日清洗后加入相应 HRP 标记的二抗孵育 2 h,洗涤后,加入显影液显影成像。使用 β -actin 抗体进行内参校正,采用 Image J 软件对条带灰度值进行分析,用目的蛋白与 β -actin 灰度值比表示目的蛋白的相对表达量。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 10.0 软件进行处理,数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析 (One-way

ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益母草碱对脊髓损伤大鼠运动功能的影响 如图 1 所示,除假手术组外,给药 7 d 时各组大鼠 BBB 评分和斜板角度无显著性差异 ($P > 0.05$)。给药 14、21、28 d 时,与假手术组比较,模型组大鼠 BBB 评分和斜板角度降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱高剂量组 BBB 评分和斜板角度增加 ($P < 0.01$),益母草碱低剂量组无显著性差异 ($P > 0.05$);与益母草碱高剂量组比较,益母草碱+H-89 组 BBB 评分和斜板角度降低 ($P < 0.01$)。给药时间越长,益母草碱高剂量组大鼠后肢功能恢复越好。



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与益母草碱高剂量组比较, $\Delta \Delta P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠的 BBB 评分和斜板角度 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

3.2 益母草碱对脊髓损伤大鼠脊髓组织病理损伤的影响 如图 2 所示,假手术组脊髓组织结构完整、致密整齐,细胞结构完好,核大而圆且核仁清晰;模型组和益母草碱低剂量组脊髓组织结构破坏严重,细胞核出现明显固缩,伴有大量炎性细胞浸润;益母草碱高剂量组和益母草碱+H-89 组脊髓组织结构紊乱情况有明显改善,炎性细胞浸润减少。

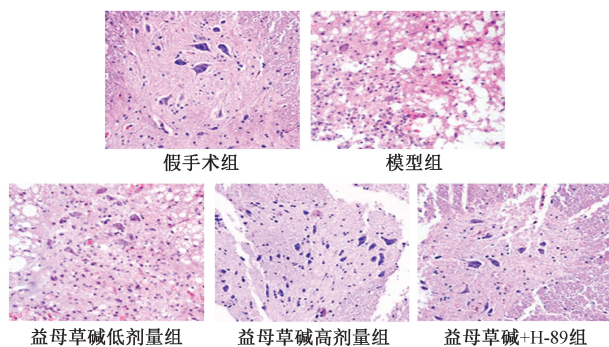
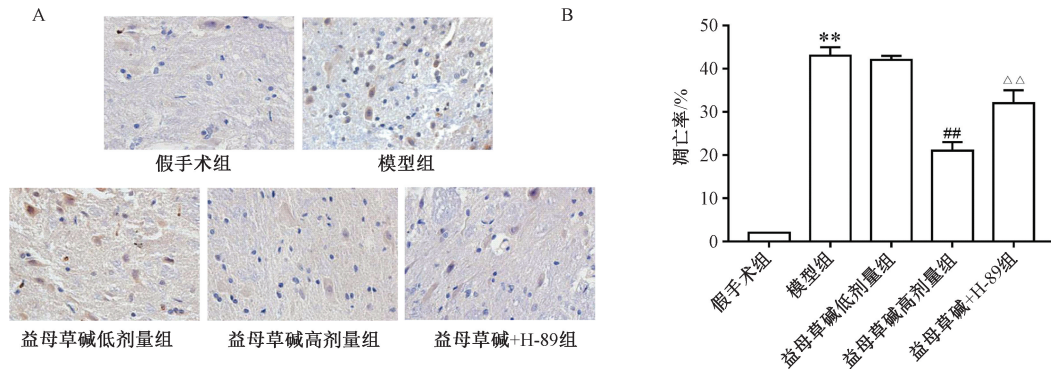


图 2 各组大鼠脊髓组织的病理学 (HE 染色, $\times 200$)

3.3 益母草碱对脊髓损伤大鼠脊髓组织神经细胞凋亡的影响 假手术组、模型组、益母草碱低剂量组、益母草碱高剂量组和益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织中 caspase-3 水平分别为 (16.5 ± 1.3)、(66.8 ± 2.0)、(67.0 ± 1.5)、(32.5 ± 1.0)、(48.3 ± 1.2) $\mu\text{g/L}$ 。与假手术组比较,模型组大鼠脊髓组织中 caspase-3 水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱高剂量组大鼠脊髓组织中 caspase-3 水平降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱低剂量组无显著性差异 ($P > 0.05$);与益母草碱高剂量组比较,益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织中 caspase-3 水平降低 ($P < 0.01$)。如图 3~4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱高剂量组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$);与益母草碱高剂量组比较,益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

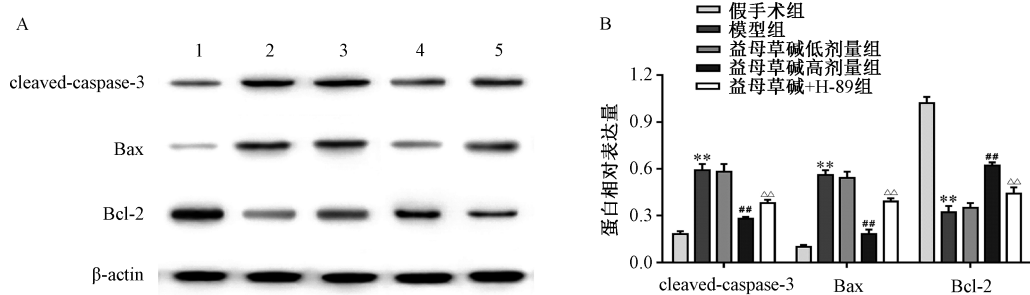
0.01),益母草碱低剂量组无显著性差异 ($P > 0.05$);与益母草碱高剂量组比较,益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织中 caspase-3 水平升高 ($P < 0.01$)。如图 3~4 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱高剂量组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达均降低 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$);与益母草碱高剂量组比较,益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡率和 cleaved-caspase-3、Bax 蛋白表达均升高 ($P < 0.01$),Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

3.4 益母草碱对脊髓损伤大鼠脊髓组织中 PKAc、CREB、p-CREB (Ser133)、BDNF 表达及 cAMP 水平的影响 假手术组、模型组、益母草碱低剂量组、益母草碱高剂量组和益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织中 cAMP 水平分别为 (33.2 ± 1.8)、(11.1 ± 0.8)、(11.9 ± 1.2)、(24.2 ± 1.3)、(23.7 ± 0.9) $\mu\text{g/L}$ 。与假手术组比较,模型组大鼠脊髓组织中 cAMP 水平降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱高剂量组大鼠脊髓组织中 cAMP 水平升高 ($P < 0.01$),益母草碱低剂量组无显著性差异 ($P > 0.05$);与益母草碱高剂量组比较,益母草碱+H-89 组大鼠脊髓组织中 cAMP 水平降低 ($P < 0.01$)。如图 5 所示,与假手术组比较,模型组大鼠脊髓组织中 PKAc、p-CREB (Ser133)、BDNF 的 mRNA 和蛋白表达均降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,益母草碱



注: A 为 TUNEL 染色 ($\times 200$), B 为神经细胞凋亡率统计。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与益母草碱高剂量组比较, △△ $P < 0.01$ 。

图 3 各组大鼠脊髓组织神经细胞凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

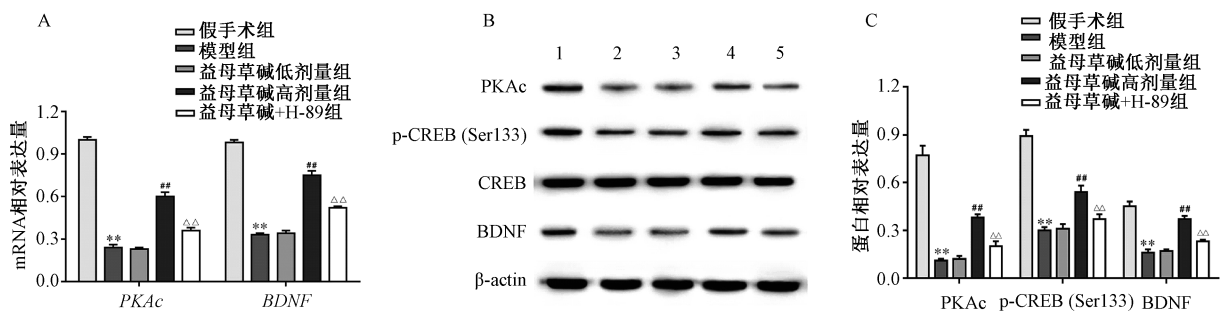


注: A 为蛋白电泳条带图, B 为蛋白相对表达统计。1~5 分别为假手术组, 模型组, 益母草碱低、高剂量组, 益母草碱+H-89 组。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与益母草碱高剂量组比较, △△ $P < 0.01$ 。

图 4 各组大鼠脊髓组织中凋亡蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

高剂量组大鼠脊髓组织中 PKAc、p-CREB (Ser133)、BDNF 的 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.01$), 益母草碱低剂量组无显著性差异 ($P > 0.05$); 与益母草碱高剂量组比较, 益

母草碱+H-89 组脊髓组织中 PKAc、p-CREB (Ser133)、BDNF 的 mRNA 和蛋白表达均降低 ($P < 0.01$)。



注: A 为 PKAc 和 BDNF 的 mRNA 表达统计, B 为蛋白电泳条带图, C 为蛋白相对表达统计。1~5 分别为假手术组, 模型组, 益母草碱低、高剂量组, 益母草碱+H-89 组。与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$; 与益母草碱高剂量组比较, △△ $P < 0.01$ 。

图 5 各组大鼠脊髓组织中 PKAc、CREB、p-CREB (Ser133)、BDNF 的 mRNA 和蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 15$)

4 讨论

前期研究显示, 提高神经元内 cAMP/PKA 水平或激活该通路信号分子可增强其内在的再生能力, 有效地促进脊髓再生^[12-15]。益母草碱是从中药益母草中提取的具有显著生物活性的生物碱, 在心脑血管病、糖尿病、肾病、生殖等方面有许多新用途^[16-17], 但益母草碱对脊髓损伤后的神经细胞是否具有保护作用, 尚未有文献报道。

本研究采用改良 Allen's 打击法建立脊髓损伤大鼠模型, 并连续 4 周腹腔注射给予不同剂量益母草碱, 以探究其对脊髓损伤的作用。研究结果显示, 模型大鼠的 BBB 评分和斜板实验评分均降低, 大鼠后肢运动功能受到影响, 与前人研究一致^[18], 说明模型复制成功。同时, HE 病理染色结果显示, 模型大鼠脊髓组织出现明显水肿, 细胞核明显固缩, 伴有大量炎性细胞浸润; 给予高剂量益母草碱

干预给药后,大鼠脊髓组织水肿和炎性细胞浸润程度明显减轻,后肢运动功能得到明显改善,表明益母草碱对脊髓损伤大鼠有明显的保护作用。

脊髓损伤导致的神经功能永久或长期丧失与脊髓组织的水肿、变性、坏死,以及神经细胞的凋亡是紧密相关^[10]。caspase 家族蛋白介导细胞凋亡,下调 caspase-3 在大鼠脊髓损伤神经元中表达,抑制神经细胞凋亡,对损伤后神经组织再生和修复有积极的治疗作用^[19]。本研究结果显示,模型大鼠脊髓组织凋亡细胞增多, caspase-3 蛋白表达升高;给予高剂量益母草碱干预能抑制模型大鼠神经细胞凋亡,说明它能通过调节脊髓损伤大鼠脊髓组织中凋亡因子的表达抑制细胞凋亡,减轻脊髓损伤程度。

BDNF 是一种具有促进神经生长活性的蛋白质,在维持神经元功能、防止神经元退行性变以及神经元损伤后再修复过程中发挥重要的作用。CREB 磷酸化后形成的 p-CREB 可作为调控因子诱导 BDNF 基因的表达,而 PKAc 蛋白可通过促进 CREB 蛋白磷酸化 (Ser133) 激活,促进靶基因 BDNF 的转录,进而促进神经细胞存活^[20]。本研究结果显示,脊髓损伤大鼠脊髓组织中 PKAc、p-CREB (Ser133) 和 BDNF 的 mRNA 及蛋白表达均降低,说明脊髓损伤后 cAMP/PKA 信号通路被抑制;高剂量益母草碱干预能够逆转脊髓损伤对 cAMP/PKA 信号通路的抑制程度,表明它可能是通过激活 cAMP/PKA 信号通路来抑制神经细胞凋亡、减轻脊髓组织损伤,从而改善大鼠后肢运动功能,促进脊髓损伤的修复。

综上所述,益母草碱能通过激活 cAMP/PKA 信号通路,减轻脊髓组织病理损伤,减少神经细胞凋亡,促进脊髓损伤大鼠后肢运动功能的恢复。此研究首次探究了益母草碱对脊髓损伤的作用,可为其治疗提供新的潜在药物。

参考文献:

[1] Anjum A, Yazid M D, Fauzi Daud M, *et al.* Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7533.
[2] 坊爱红, 张 婷, 孙 丽, 等. 脊髓损伤治疗的研究进展[J]. *中国综合临床*, 2018, 34(1): 75-78.
[3] Fan B Y, Wei Z J, Yao X, *et al.* Microenvironment imbalance of spinal cord injury [J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(6): 853-866.
[4] Zyuz'kov G N, Miroshnichenko L A, Polyakova T Y, *et al.* Participation of cAMP/PKA-mediated signaling pathways in functional activity of regeneration-competent cells in the nervous tissue under conditions of ethanol-induced neurodegeneration [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2019, 167(6): 723-727.
[5] Wang T Y, Li B, Wang Z J, *et al.* Sorafenib promotes sensory conduction function recovery via miR-142-3p/AC9/cAMP axis post dorsal column injury[J]. *Neuropharmacology*, 2019, 148: 347-357.

[6] Gao X, Zhang X J, Cui L L, *et al.* Ginsenoside Rb1 promotes motor functional recovery and axonal regeneration in post-stroke mice through cAMP/PKA/CREB signaling pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 154: 51-60.
[7] 梁博志, 罗建华, 杨冬花, 等. 益母草碱作用及机制研究进展[J]. *贵阳中医学院学报*, 2017, 39(4): 93-96; 101.
[8] Li L, Fan X, Zhang X T, *et al.* The effects of Chinese medicines on cAMP/PKA signaling in central nervous system dysfunction[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 132: 109-117.
[9] 李一帆, 陈 东, 张大威, 等. 急性大鼠脊髓损伤 Allen's 法模型的改良及电生理评价[J]. *中国实验诊断学*, 2010, 14(8): 1169-1172.
[10] 吕 威, 李 冰, 景泉凯, 等. 电针“大椎”“命门”对脊髓损伤大鼠神经元细胞凋亡及 JNK 信号通路相关蛋白表达的影响[J]. *针刺研究*, 2017, 42(1): 14-19.
[11] 刘 伟, 赵宝辉, 王建忠, 等. 丹参酮 II A 通过 PI3K/AKT 信号通路调节脊髓神经元凋亡的实验研究[J]. *中华骨科杂志*, 2019, 39(10): 622-629.
[12] Kjell J, Olson L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies [J]. *Dis Model Mech*, 2016, 9(10): 1125-1137.
[13] Ohtake Y, Sami A, Jiang X P, *et al.* Promoting axon regeneration in adult CNS by targeting liver kinase B1 [J]. *Mol Ther*, 2019, 27(1): 102-117.
[14] Wang T, Li B, Wang Z, *et al.* miR-155-5p promotes dorsal root ganglion neuron axonal growth in an inhibitory microenvironment via the cAMP/PKA pathway[J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(7): 1557-1570.
[15] 贺 丰, 朱立国, 赵 赫, 等. 基于网络药理学探讨丹参酮 II A 治疗脊髓损伤的可能机制及相关通路[J]. *世界中医药*, 2019, 14(11): 2864-2869.
[16] Loh K P, Qi J, Tan B K H, *et al.* Leonurine protects middle cerebral artery occluded rats through antioxidant effect and regulation of mitochondrial function[J]. *Stroke*, 2010, 41(11): 2661-2668.
[17] Hong Z Y, Yu S S, Wang Z J, *et al.* SCM-198 ameliorates cognitive deficits, promotes neuronal survival and enhances CREB/BDNF/TrkB signaling without affecting A β burden in A β PP/PS1 mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(8): 18544-18563.
[18] 成建平, 李 华, 李雄杰. 胡椒叶提取物干预可减轻急性脊髓损伤模型大鼠的氧化应激及炎症反应[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(31): 5010-5016.
[19] Zhao W, Li H X, Hou Y, *et al.* Combined administration of Poly-ADP-Ribose polymerase-1 and Caspase-3 inhibitors alleviates neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats[J]. *World Neurosurg*, 2019, 127: e346-e352.
[20] 张列亮, 应 俊, 华福洲, 等. 柴胡皂苷 A 通过 cAMP/CREB 信号通路对脑损伤大鼠认知功能的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(5): 484-487.