

# 通督活血汤对大鼠脊髓损伤后内质网应激信号表达的影响

鄢来军<sup>1</sup> 颜浪辉<sup>1</sup> 林庆宾<sup>1</sup> 唐焕章<sup>2△</sup>

**[摘要]** 目的:观察通督活血汤对大鼠脊髓损伤(SCI)后肢体运动功能恢复与内质网应激 p-PERK/ATF4/CHOP 信号通路表达的影响。方法:56 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、实验组,利用改良 Allen 打击法建立脊髓损伤动物模型,分别于术后 1,3,7 d 后采用 BBB 评分和苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠后肢功能与脊髓组织形态变化,Western Blot 检测 p-PERK,ATF4,CHOP 表达情况。结果:自干预第 3 天起,实验组行为学评分优于模型组,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。苏木精-伊红染色提示实验组神经细胞水肿较轻,神经细胞形态较好,空泡样改变较少,损伤神经细胞恢复中,部分神经细胞细胞核肿大,核仁消失。Western Blot 检测结果示:假手术组 p-PERK,ATF4,CHOP 表达较低;模型组和实验组 p-PERK,ATF4 和 CHOP 在第 3 天达到高峰;与模型组比较,实验组各时间点 p-PERK,ATF4,CHOP 的表达显著减少,差异有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。结论:通督活血汤治疗 SCI 的作用机制可能与该方调控 SCI 后 p-PERK/ATF4/CHOP 信号表达有关。

**[关键词]** 通督活血汤;脊髓损伤;内质网应激;凋亡

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)05-0001-04

## Effects of Tongduhuoxue Decoction on Expression of Endoplasmic Reticulum Stress Pathway of Rats with Spinal Cord Injury

YAN Laijun<sup>1</sup> YAN Langhui<sup>1</sup> LIN Qingbin<sup>1</sup> TANG Huanzhang<sup>2△</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of the Ministry of Education of the People's Republic of China, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

<sup>2</sup> 900th Hospital of the Joint Logistics Support Force of PLA, Fuzhou 350025, China.

**Abstract Objective:** To observe the effects of Tongduhuoxue decoction on limb motor function recovery and expression of endoplasmic reticulum stress related p-PERK/ATF4/CHOP pathway after spinal cord injury(SCI) in rats. **Methods:** 56 SD rats were randomly divided into control group, model group and experimental group. The Allen method was used to establish the animal model. The hind limb function and spinal cord histomorphology were detected by BBB and HE staining at 1, 3 and 7 d after intervention. The expressions of p-PERK, ATF4 and CHOP were detected by Western Blot. **Results:** The behavioral score of the experimental group was better than that of the model group after 3 d intervention ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). HE staining revealed that the experimental group had less edema of nerve cells, better morphology of nerve cells and vacuolization with damaged nerve cells recovery, and some nerve cells showed enlarged nucleus and the nucleolus disappears. Western Blot revealed that the expression of p-PERK, ATF4 and CHOP in the sham operation group was lower. The model group and the experimental group p-PERK, ATF4 and CHOP reached the peak values on the 3rd day. Compared with the model group, the expression of p-PERK, ATF4, CHOP in experimental group were significantly reduced at each time point ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). **Conclusion:** The mechanism of the treatment of SCI by Tongduhuoxue decoction may be related to the expression of p-PERK/ATF4/CHOP pathway after SCI regulation.

**Keywords:** Tongduhuoxue decoction; spinal cord injury; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

基金项目:南京军区联勤部卫生部重点项目(14ZX26)

福建省自然科学基金(2018J01891)

<sup>1</sup> 福建中医药大学中医骨伤及运动康复教育部重点实验室(福州, 350122)

<sup>2</sup> 中国人民解放军联勤保障部队第 900 医院

△通信作者 E-mail: tanghz@126.com

脊髓损伤(SCI)是指由于内外因素导致的脊髓组织损害,其主要临床表现为损害脊髓节段支配区域的神经功能障碍<sup>[1-2]</sup>。随着社会经济的发展以及人口老龄化<sup>[3]</sup>,SCI 年患病率已上升到 13~60 人次/10<sup>6</sup>[4]。

因其病理机制复杂,目前临床上未见完善的治疗方案。内质网途径在细胞凋亡中扮演重要角色<sup>[5]</sup>,当内外刺激引发机体过度应激反应(ERS)诱导内质网应激反应时,其下游 PERK 磷酸化从而介导 ERS 凋亡通路<sup>[5-7]</sup>。通督活血汤(TDHXD)临床应用广泛<sup>[8-9]</sup>,但其具体作用机制不明。本研究通过观察通督活血方对大鼠脊髓损伤后脊髓组织内质网应激 PERK/ATF4/CHOP 信号通路表达的影响,探讨该方促进 SCI 后肢体功能恢复的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

选择体质量范围在 200~240 g 之间的 SPF 级 SD 大鼠(雌雄各半),许可证号码为 SCXK(沪)2017-0005。于实验前将其置于福建中医药大学实验动物中心实验室适应性喂养 1 周(包括适应性灌胃刺激等),并于此期间观察大鼠生命活动状况以排除不健康的大鼠。

### 1.2 实验药物及试剂

通督活血汤按照李强等<sup>[10]</sup>所用剂量称取(黄芪 18 g,丹参 18 g,当归 9 g,赤芍 9 g,泽兰叶 9 g,杜仲 9 g,苏木 9 g,地龙 9 g,金毛犬脊 12 g,鹿角片 18 g)。SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(天津佰思诺 G2003),磷酸化蛋白酶抑制剂(天津佰思诺 G2007),一抗:p-PERK(美国 AffinityAF4499),ATF4(美国 AffinityAF5416),CHOP(美国 AffinityAF6277)。

### 1.3 主要实验仪器

显微镜(CIC,XSP-C204),垂直电泳槽(伯乐,164-8001),转印槽(伯乐,Trans-blot),脱色摇床(奥华,TY80B),低温离心机(Thermo,Heraeus Fresco),酶标仪(Thermo,Multiskan FC)。

### 1.4 方法

**1.4.1 造模及分组** 将 56 只 SD 大鼠戊巴比妥钠麻醉后行椎板剥离术后按分层随机方法分为假手术组( $n=8$ )、模型组( $n=24$ )和实验组( $n=24$ )。假手术组行椎板切除术后,不损伤脊髓,其余两组均使用改良 Allen 脊髓打击器建立脊髓损伤动物模型并进行模型鉴定<sup>[12]</sup>。造模成功后以 0.9%氯化钠溶液冲洗伤口,之后分层缝合伤口、碘伏消毒清理。术后大鼠置于笼中饲养,注意保暖,人工按摩膀胱,每日 2 次,以帮助大鼠排便,直至大鼠恢复自主排便。每日给予青霉素  $4 \times 10^4$  U/只,预防感染。模型组与实验组按照造模后的脊髓取材、行为学评分时间的不同再随机分为 3 个亚组,每组 8 只大鼠。本动物实验的过程与方法均符合实验动物伦理委员会的要求。

**1.4.2 干预方法** 通督活血汤按照标准计量称取后由福建中医药大学附属第三人民医院制剂室提供并加工成颗粒制剂(符合最新药典规定)。在实验室用沸腾

后的纯水将颗粒制剂在烧杯中溶解后使用(即配即用)。术后第 1 天即给予实验组大鼠通督活血汤灌胃,1 次/d,按体表面积法确定给药剂量为 10.8 g/kg/d,连续干预至取材。假手术组及模型组给予生理盐水灌胃,用量及用法同实验组。

**1.4.3 实验动物取材** 以 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后迅速取出脊髓。以脊髓打击处为中点将其分为上下两个部分,共长约 2 cm,标记脊髓组织头尾朝向后一部分迅速放入液氮中,待取材完毕后放入 -80℃冰箱中储存,用于蛋白检测。另一部分则置于 EP 管中以多聚甲醛固定保存,后续做常规石蜡包埋及切片染色。

### 1.5 主要实验指标

**1.5.1 行为学分析** 按照大鼠脊髓损伤行为学评分(BBB)评估肢体运动功能,在术前和术后 1,3,7 d 对大鼠进行行为学评分。由一位非研究课题的实验人员依据评价标准独立评分。

**1.5.2 苏木精-伊红染色** 将 4%多聚甲醛固定后的脊髓组织包埋后制成厚约 5  $\mu$ m 切片,二甲苯透明后梯度酒精入水,之后行苏木精-伊红染色,风干后中性树脂封片,显微镜下观察脊髓组织细胞形态的变化并拍照保存。

**1.5.3 Western Blot 检测** 组织块用预冷 TBS 洗涤后剪碎,加入 10 倍于组织体积的裂解液,充分研磨,离心 5 min,取上清液后检测蛋白浓度。灌胶后每个组织取 50  $\mu$ g 样品蛋白上样,之后加入浓缩胶。采用 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至聚偏二氟乙烯膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别加入稀释后的 p-PERK,ATF4,CHOP 一抗(1:1 000),其中磷酸化蛋白使用 TBST 溶解的 5%BSA 稀释。置于 4℃冰箱中过夜后,TBST 洗膜 3 次,加入二抗后于室温孵育 1 h 后于脱色摇床上浸洗。避光配制显色液并覆盖聚偏二氟乙烯膜反应后成像。应用 Image-lab 图像分析系统计算蛋白条带光密度。以 GADPH 为内参,分别计算 p-PERK,ATF4,CHOP 与其比值。

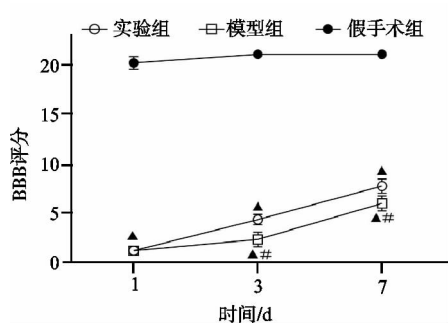
### 1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。BBB 肢体运动功能评分若不符合正态分布,则采用非参数检验;若数据符合正态分布,则采用单因素方差分析。其余计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验对各组进行组间比较。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 BBB 肢体运动功能评分

各组大鼠术后行为学评分见图 1。与假手术组比较,实验组和模型组的 BBB 肢体运动功能评分显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );随着治疗时间延长,



注:同期与假手术组比较,▲ $P<0.01$ ;同期与模型组比较,△ $P<0.05$ 。实验组、模型组与假手术组在术后 1,3,7 d 比较, $P<0.001$ 。实验组与模型组在术后 1,3,7 d 比较, $P=0.264,0.000,0.001$ 。

图 1 各组大鼠术后行为学评分

实验组和模型组的 BBB 肢体运动功能评分逐渐升高,

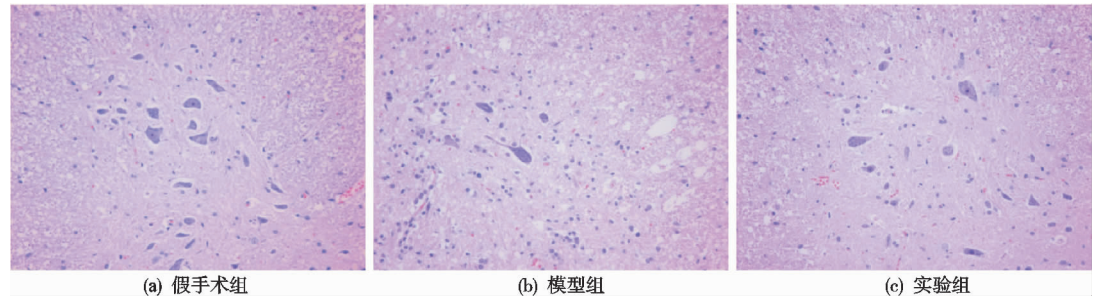


图 2 术后 7 d 各组大鼠脊髓形态学变化(200×)  
注:假手术组脊髓组织中神经元胞质内细胞核大,核仁明显,部分可见斑块状或虎斑样尼氏体;模型组与假手术组脊髓组织中出现不同程度神经元形态改变

### 2.3 Western Blot 检测结果

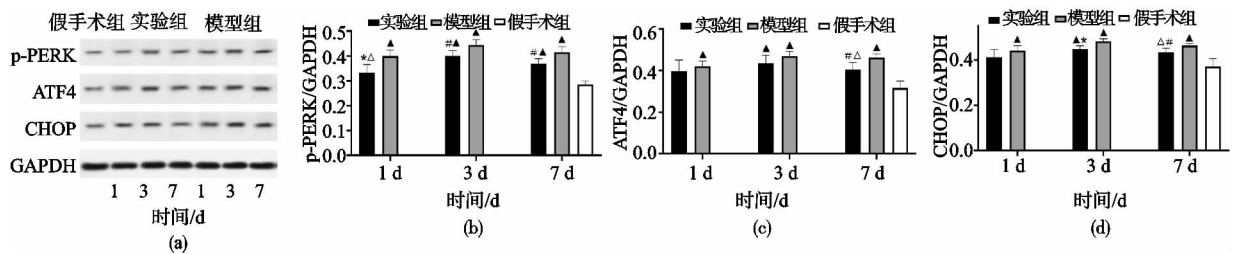
从下图表可以看出,各组大鼠脊髓组织中 p-PERK、ATF4 和 CHOP 蛋白均有不同程度表达,在损伤后 3 d,模型组与实验组大鼠脊髓组织各蛋白表达量达到峰值。实验组与模型组大鼠脊髓组织中 p-PERK,ATF4 和 CHOP 蛋白表达量在 SCI 后各个时间节点表达量均高于假手术组 7 d 后表达量。实验组大鼠脊髓组织中 p-PERK 蛋白表达量在药物干预 1 d 后与模型组相比,两

自术后 3 d 起,通督活血汤组 BBB 肢体运动功能评分显著优于模型组同期,差异有统计学意义( $P<0.05$ , $P<0.01$ )。

### 2.2 苏木精-伊红染色

苏木精-伊红染色结果显示:术后 7 d 假手术组脊髓形态完好,灰、白质交界明显,灰质内神经元数量较多;模型组与实验组脊髓形态出现不同程度的破坏、病理改变,灰质内神经元数量较少。高倍镜下显示假手术组神经元胞体较大,核仁呈嗜碱性染色,核仁显色清晰,尼氏体染色呈斑块样。模型组与实验组均可见不同程度的神经元胞体萎缩,核固缩、溶解,神经元周围空泡样改变,见图 2。

者之间的差异有统计学意义( $P=0.006$ )。实验组大鼠脊髓组织中 ATF4 蛋白表达量在药物干预 1 d 和 3 d 后与模型组相比,两者之间的差异无统计学意义( $P=0.399,0.170$ ),但是术后 7 d 两组之间蛋白表达差异有统计学意义( $P=0.027$ )。干预 1 d 后,实验组大鼠脊髓组织中 CHOP 蛋白表达量与模型组相比差异无统计学意义( $P=0.143$ ),但在 3 d 和 7 d 后,两者差异有统计学意义( $P=0.008,0.023$ )。



注:与假手术组相比,△ $P<0.05$ ,▲ $P<0.01$ ;与模型组相比,# $P<0.05$ ,\* $P<0.01$ 。

图 3 各组大鼠脊髓组织中相关蛋白表达

模型组与假手术组在术后 1,3,7 d p-PERK 蛋白表达量进行比较, $P$  分别为 $<0.01,0.021,0.022$ ;术后 1,3,7 d ATF4 蛋白表达量进行比较, $P$  分别为 $0.001,<0.01,<0.01$ ;术后 1,3,7 d CHOP 蛋白表达量进行比较, $P$  分别为 $0.009,<0.01,<0.01$ 。

实验组与假手术组在术后 1,3,7 d p-PERK 蛋白表达量进行比较, $P$  分别为 $<0.012,<0.01,<0.01$ ;

术后 1,3,7 d ATF4 蛋白表达量进行比较, $P=0.073,0.003,0.011$ ;术后 1,3,7 d CHOP 蛋白表达量进行比较, $P=0.035,0.006,0.021$ 。

### 3 讨论

SCI 具有高发病率及高致残致死率,随着我国社会经济发展以及老龄化程度的加剧,其发病率会有较大的上升趋势<sup>[12-13]</sup>。目前由于诊疗手段的局限,临床

上关于该病的治疗方案并不完善,如何促进 SCI 患者早日康复,恢复其肢体感觉与运动功能一直是临床医学亟待解决的难点问题,也是医务工作者首先考虑的问题。

作为维持细胞的正常生理功能和内环境稳态的内质网,其在机体的表达含量十分稳定。SCI 后内质网功能失常导致未折叠蛋白反应,继而引发内质网应激,其后 PERK 与 GRP78 解离从而磷酸化<sup>[14]</sup>,p-PERK 介导的内质网应激信号通路可通过其转录因子 ATF4 与 CHOP 启动子上的 AARE 域结合,从而诱导 CHOP 的表达,介导凋亡相关因子的表达从而调控脊髓神经细胞凋亡的发生发展<sup>[15]</sup>。中医理论认为督脉为阳脉之海,诸阳之会,贯通脊髓上下,主司一身之阳气。SCI 后因瘀血阻滞督脉,枢机统率失职致使三阳经气血逆乱,其主要病因为“瘀血”,基本病机为“气滞血瘀,督脉枢机不利”,故总体来说内治须以活血、祛瘀、通督为要点<sup>[16]</sup>。通督活血汤全方由丹参、黄芪、当归等十余味药物组成,根据“君、臣、佐、使”的原则严密配伍,具有行气活血、通督化瘀、补肾益髓之效。现代药理学研究发现该方本身包含诸如丹参酮、黄芪甲苷等中药活性成分<sup>[17-18]</sup>。虽然前期研究亦表明中药通督活血治法具有减轻炎症反应、改善脊髓损伤微环境,从而促进损伤后神经组织修复的作用<sup>[19-20]</sup>,但关于损伤后凋亡和调控 ERS 之间的作用机制未见报道。

本研究通过经典的 Allen 打击法制作 SCI 动物模型,虽然椎板剥离术在实验初期对动物的行为学评分存在影响,但观察到空白组大鼠术后 BBB 评分 1 d 后完全恢复,说明并不影响整个实验的观察结论。而模型组和实验组大鼠脊髓损伤后其后肢感觉和运动功能均出现不同程度的障碍,但随着时间推移,实验组大鼠在灌胃后双下肢感觉及运动功能的恢复优于模型组,初步证明 TDHDX 能促进大鼠脊髓损伤后下肢功能的恢复。HE 染色发现模型组与实验组脊髓形态出现不同程度的破坏、病理改变,但是实验组组织形态优于模型组,说明 TDHDX 能够在 SCI 后维护神经细胞形态的完整性,对于神经组织的修复起到积极的作用。体内实验研究已经证实 ERS 是治疗 SCI 的重要靶点<sup>[21-22]</sup>,本研究利用 Western Blot 检测发现 p-PERK, ATF4 与 CHOP 在脊髓组织中的表达水平实验组相较于空白组明显增加,验证了脊髓损伤后 ERS 途径被激活。而实验组大鼠脊髓组织中相应蛋白表达明显低于模型组,说明 TDHDX 能抑制大鼠脊髓损伤后 p-PERK, ATF4, CHOP 蛋白的表达,提示该方促进脊髓损伤的修复与抑制 SCI 后 p-PERK 介导的 ERS 细胞凋亡通路有关。值得注意的是,在干预后第 1 天,实验组大鼠脊髓组织中 p-PERK 蛋白含量与模型组差异

明显,而 ATF4 及 CHOP 蛋白含量在两组之间差异无统计学意义,这应该与 ATF4/CHOP 非依赖 p-PERK 途径调控 SCI 后细胞凋亡有关<sup>[23]</sup>。本研究还存在一定的局限性:没有对大鼠脊髓组织中 ERS 相关蛋白在损伤初期的通路表达情况进行研究,反映 TDHDX 调控 ERS 信号通路存在时效上的不足。此外,剂量趋势尚不能确定,还有待后续深入研究。

综上所述,TDHDX 治疗 SCI 的作用机制之一是该方能够抑制 SCI 后损伤脊髓组织中 PERK 的磷酸化以及 ATF4 与 CHOP 的表达,抑制损伤后凋亡水平,促进受损脊髓神经细胞的修复,从而促进大鼠 SCI 后后肢肢体功能的恢复。本研究为 TDHDX 的临床应用和推广提供了理论基础和依据。

### 参考文献

- [1] 杨俊松,郝定均,刘团江,等.急性脊髓损伤的临床治疗进展[J].中国脊柱脊髓杂志,2018,28(4):368-373.
- [2] SIDDALL P J, MIDDLETON J W. Spinal cord injury-induced pain: mechanisms and treatments[J]. Pain Manag, 2015, 5(6):493-507.
- [3] BARBARA-BATALLER E, MENDEZ-SUAREZ J L, ALEMAN-SANCHEZ C, et al. Change in the profile of traumatic spinal cord injury over 15 years in Spain[J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2018, 26(1):27.
- [4] 杨泉雄,于前进,秦江,等.脊髓损伤住院患者 1 027 例流行病学分析[J].脊柱外科杂志,2016,14(5):301-305.
- [5] SONG S, TAN J, MIAO Y, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: involvement of the dual role of autophagy under ER stress[J]. J Cell Physiol, 2017, 232(11):2977-2984.
- [6] MCQUISTON A, DIEHL J A. Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum[J]. F1000Res, 2017, 6:1897.
- [7] WU H, NG B H, THIBAUT G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans[J]. Bioscience Reports, 2014, 34(4):321-330.
- [8] 梁平,周绍稳.通督活血汤治疗退行性腰椎管狭窄症 112 例[J].中国中医骨伤科杂志,2014,22(8):55-56.
- [9] 孟祥琨.通督活血汤配合后路椎板减压螺钉置入治疗胸腰椎段骨折合并脊髓损伤疗效观察[J].现代中西医结合杂志,2017,26(19):2154-2156.
- [10] 李强,汤耿民.通督活血汤治疗退行性腰椎管狭窄症[J].中国中医骨伤科杂志,1990,6(3):19-21.
- [11] DUNHAM K A, FLOYD C L. Contusion models of spinal cord injury in rats[M]//Animal Models of Movement Disorders, Humana Press, 2011:345-362.
- [12] QIU J. China spinal cord injury network: changes from within[J]. Lancet Neurol, 2009, 8(7):606-607.