

· 实验研究 ·

补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞外泌体
治疗大鼠脊髓损伤的机制研究王敬业¹ 徐诗嘉¹ 张晓² 段嘉豪² 范瑜洁³ 高鑫¹ 李硕夫² 杨雷² 聂颖^{2△}

[摘要] 目的:探讨补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞外泌体对大鼠脊髓损伤神经功能恢复作用及其机制研究。方法:SD 雄性大鼠 40 只随机分为正常组、模型组、补阳还五汤组(BYHWD 组)、骨髓间充质干细胞外泌体组(BMSCs-Exos 组)及补阳还五汤+骨髓间充质干细胞外泌体组(BYHWD+BMSCs-Exos 组)。脊髓损伤后第 7, 14, 28 天进行 BBB 神经功能评分,取脊髓组织进行苏木精-伊红(HE)染色和尼氏染色;Western Blot 法测定脊髓组织核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、突触素(Syn)蛋白表达;荧光染色检测活性氧(ROS)的表达量。结果:神经功能评分:与正常组比较,模型组、BYHWD 组、BMSCs-Exos 组、BYHWD+BMSCs-Exos 组神经功能评分均不同程度下降,脊髓损伤后第 14 天和第 28 天 BYHWD+BMSCs-Exos 组神经功能评分优于 BYHWD 组、BMSCs-Exos 组及模型组,差异有统计学意义($P<0.05$)。HE 染色和尼氏染色显示:模型组大鼠神经元细胞数量减少,脊髓损伤区域内大量空洞坏死, BYHWD 组、BMSCs-Exos 组及 BYHWD+BMSCs-Exos 组神经元数量和周边空洞坏死有不同程度改善, BYHWD+BMSCs-Exos 组改善最为明显。Western Blot 法测定 Nrf2、HO-1、Syn 蛋白表达与正常组比较,模型组 Nrf2 及 HO-1 的蛋白表达均明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$), Syn 的蛋白表达明显下调;与模型组比较,各给药组 Nrf2、HO-1 及 Syn 的蛋白表达均明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$);与 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组比较, BYHWD+BMSCs-Exos 组 Nrf2、HO-1 及 Syn 的蛋白表达均明显上调,差异有统计学意义($P<0.05$)。荧光染色检测活性氧氧化应激损伤显示: BYHWD 组、BMSCs-Exos 组及 BYHWD+BMSCs-Exos 组大鼠脊髓组织活性氧荧光强度高于正常组,低于模型组($P<0.05$),与 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组比较, BYHWD+BMSCs-Exos 组活性氧表达显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞外泌体能改善脊髓损伤大鼠的神经功能,可能与加速激活 Nrf2/HO-1 信号通路上调 Syn 的蛋白表达、抑制活性氧的生成有关。

[关键词] 补阳还五汤;外泌体;骨髓间充质干细胞;脊髓损伤;氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)11-0001-08

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.251101

Effect of Buyang Huanwu Decoction Combined with Bone Marrow
Mesenchymal Stem Cell Exosomes on Spinal Cord Injury in RatsWANG Jingye¹ XU Shijia¹ ZHANG Xiao²DUAN Jiahao² FAN Yujie³ GAO Xin¹LI Shuofu² YANG Lei² NIE Ying^{2△}

基金项目:湖南省自然科学基金项目(2023JJ30472)

湖南省教育厅重点项目(22A0261)

湖南省卫生健康委科研项目(B202304078103)

湖南省中医药管理局课题(B2023028)

湖南中医药大学研究生创新课题(2024CX054)

¹ 湖南中医药大学第一中医临床学院(长沙, 410021)

² 湖南中医药大学第一附属医院

³ 湖南省第二人民医院

△通信作者 E-mail: gkny222@163.com(聂颖)

¹ First Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410021, China;

² The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410021, China;

³ The Second People's Hospital of Hunan Province, Changsha 410007, China.

Abstract Objective: To investigate the effect of Buyang Huanwu decoction (BYHWD) combined with bone marrow mesenchymal stem cell exosome (BMSCs-Exos) on the

recovery of neurological function of spinal cord injury in rats and its mechanism. **Methods:** 40 SD male rats were randomly divided into normal group, model group, BYHWD group, BMSCs-Exos group, BYHWD+BMSCs-Exos group. BBB neurological function scores were performed at 7, 14, and 28 d after spinal cord injury, and spinal cord tissues were taken for Hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining. Nrf2, HO-1, and Syn protein expression were determined by Western Blot with fluorescence staining for reactive oxygen species (ROS). Nrf2, HO-1, and Syn protein expression were determined by Western Blot. Fluorescence staining was used to detect the expression of ROS. **Results:** Neurological function scores: compared with the normal group, the neurological function scores of the model group, BYHWD group, BMSCs-Exos group, and BYHWD+BMSCs-Exos group decreased to different degrees, and the neurological function scores of the BYHWD+BMSCs-Exos group were better than those of the BYHWD group, the BMSCs-Exos group, and the model group after 14 d and 28 d after the operation ($P < 0.05$). HE staining and Nissl staining showed that: the number of neuronal cells decreased in the model group, and a large number of cavities were necrotic in the area of spinal cord injury. The number of neurons and peripheral cavities necrotic were improved to different degrees in the BYHWD group, the BMSCs-Exos group, the BYHWD+BMSCs-Exos group, and most obviously in the BYHWD+BMSCs-Exos group. The improvement was most obvious in the BYHWD+BMSCs-Exos group. The protein expression of Nrf2, HO-1, and Syn was significantly up-regulated in the model group compared with that in the normal group by Western Blot ($P < 0.05$), and down-regulated in the model group, and significantly up-regulated in each of the drug-delivered groups compared with that in the model group ($P < 0.05$). The protein expression of Nrf2, HO-1, and Syn was significantly up-regulated in the BYHWD+BMSCs-Exos group compared with the BYHWD and BMSCs-Exos groups ($P < 0.05$). Fluorescence staining to detect the oxidative stress damage of ROS showed that the spinal cord tissues of rats in the BYHWD group, the BMSCs-Exos group, the BYHWD+BMSCs-Exos group, and the BYHWD+BMSCs-Exos group were significantly down-regulated ($P < 0.05$). BMSCs-Exos group was higher than the normal group and lower than the model group ($P < 0.05$), and the expression of ROS in BYHWD+BMSCs-Exos group was significantly lower than that in BYHWD group and BMSCs-Exos group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwu decoction combined with bone marrow mesenchymal stem cell exosomes can improve the neurological function of rats with spinal cord injury, which may be related to the activation of Nrf2/HO-1 signalling pathway to up-regulate the protein expression of Syn and inhibit the generation of ROS.

Keywords: Buyang Huanwu decoction; exosomes; bone marrow mesenchymal stem cells; spinal cord injury; oxidative stress

脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)作为一种严重的神经系统创伤,往往会导致患者出现不同程度的运动、感觉及自主神经功能障碍^[1]。由于神经细胞的再生能力较低,损伤后微环境改变等,使脊髓损伤的治疗成为世界性的医学难题^[2]。补阳还五汤(Buyang Huanwu Decoction, BYHWD)通过多靶点调控微环境,营养供应等方面干预效果显著,为轴突再生提供物质代谢基础^[3]。另一方面,骨髓间充质干细胞外泌体(Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes, BMSC-Exos)具有低免疫原性、高稳定性及无致癌风险等特性^[4-5],使其成为再生医学极具前景的治疗载体。基于此,将补阳还五汤与骨髓间充质干细胞外泌体联合应用于脊髓损伤,能否发挥其协同增效作用?其机制是否与核因子 E₂ 相关因子 2/血红素加氧酶-1(Nrf2/HO-1)信号通路、突触素(Syn)蛋白表达及活性氧(ROS)生成有关?

1 材料和方法

1.1 实验细胞及动物

骨髓间充质干细胞(BMSCs)购自长沙维赞生物科技有限公司(货号为 RASM-X-01001),检测报告显

示:CD34 阳性率为 0.95%,CD45 阳性率为 0.35%,CD44 阳性率为 95.81%,CD90 阳性率为 98.52%,符合实验要求。

SD 大鼠:本研究用 8 周龄无特定病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠 40 只,体重为(220±20)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(许可证号为 SYXK(湘)2021-0002)。相关动物实验在湖南中医药大学第一附属医院动物实验中心实施,并获伦理委员会批准(审批号为 ZYFY20221111-44),符合规范要求。

1.2 实验药物

补阳还五汤参考《中华人民共和国药典》规定的剂量标准,选取临床常用量称取药材,药物组成如下:生黄芪 60 g,当归尾 10 g,赤芍 10 g,地龙 10 g,川芎 10 g,红花 10 g,桃仁 10 g。所用中药由湖南中医药大学第一附属医院中药房提供,按照既定配比准确称量各味药材,采用水提法制备。首次提取加入 10 倍量蒸馏水,持续加热回流 2 h;二次提取加入 8 倍量蒸馏水,回流时间控制在 1.5 h。合并两次提取液,经过滤处理后浓缩至含生药 2 g/mL 的有效浓度。制备完成的

药液置于 4 ℃ 下冷藏保存,临用前以蒸馏水稀释至所需浓度。

1.3 主要试剂

DMEM/F12(1:1)培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清、青链霉素、胰蛋白酶购自长沙优加生物科技有限公司;细胞上清外泌体提取试剂盒 T20 和牛血清白蛋白(BSA)购自长沙维赞生物科技有限公司;RIPA 裂解液、HO-1、Nrf2、Syn 抗体购自长沙皮诺飞生物科技有限公司。

1.4 主要仪器

脱水机(武汉俊杰电子有限公司, JT-12S),病理切片机(LEICA, RM2016),包埋机(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5),冻台(武汉俊杰电子有限公司, JB-L5),组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司, KD-P),正置光学显微镜(日本尼康, Nikon Eclipse E100),高速组织研磨仪(Jingxin, JXFSTPRP-48),高速离心机(科析仪器, TGL-16),台式冷冻离心机(SCILOGEX, CF1524R)。

1.5 方法

1.5.1 骨髓间充质干细胞培养及传代 从-80 ℃ 冰箱取出骨髓间充质干细胞,立即置于 37 ℃ 水浴锅快速晃动解冻。用移液器将细胞悬液转移至 15 mL 离心管内,加入预温至 37 ℃ 的培养基适量,轻柔混匀后,以 250g 的相对离心力离心分离 5 min;随后小心移除上清液,加入 1 mL 完全培养基,吹打混匀,按 $(2.5 \sim 4.0) \times 10^4$ /mL 的细胞密度进行传代培养;细胞复苏 24 h 后进行首次培养基更换,随后维持每 48 h 更换 1 次。通过倒置显微镜监测细胞增殖,当培养皿中细胞融合率达 80%~90% 时进行传代;弃培养基,用 2 mL 磷酸盐缓冲液洗涤细胞,加 1 mL 0.25% 胰酶消化,镜下见细胞变圆即加培养基终止消化,滴管吹打使细胞脱落。收集培养液离心(250g, 5 min),弃上清,加 1 mL 新鲜增殖培养基吹打混匀,按 $(2.5 \sim 4.0) \times 10^4$ /mL 密度传代。

1.5.2 骨髓间充质干细胞外泌体分离 当第 3 代骨髓间充质干细胞生长至 80% 融合度时,移除原有培养基,更换为添加双抗(青霉素-链霉素)及 10% 无外泌体胎牛血清的低糖达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)培养液进行后续培养,对生长状态异常的细胞培养皿予以整体废弃;更换新鲜培养基后继续培养 48 h,随后收集培养上清用于后续实验,将收集的样品转移至离心管,在 4 ℃ 下以 3 000g 离心 10 min 以去除细胞碎片。向上清液中加入外泌体分离试剂,充分振荡 1 min 后,置于 4 ℃ 下静置 2 h。随后在 4 ℃ 环下以 10 000g 离心 60 min,弃上清,沉淀物用 200 μ L 磷酸盐缓冲液重悬,最后在 4 ℃ 下以 12 000g 离心

2 min,所得上清即为外泌体悬液,取适量样品进行二辛可宁酸(BCA)法蛋白定量检测,根据测定结果调整外泌体悬液浓度至 200 μ L/mL。将制备好的骨髓间充质干细胞来源外泌体分装后,置于-80 ℃ 超低温冰箱中长期保存,供后续实验使用。

1.5.3 骨髓间充质干细胞外泌体鉴定 采用透射电子显微镜观察外泌体的形态;采用纳米颗粒追踪分析检测外泌体的粒径分布和浓度;Western Blot 法检测外泌体标志蛋白 CD63、CD9、TSG101 及 Calnexin 的表达。

1.5.4 大鼠分组及给药方式 40 只大鼠随机分为 5 组,每组 8 只;正常组灌胃等体积蒸馏水溶液;模型组灌胃等体积蒸馏水溶液,尾部注射等体积的磷酸盐缓冲液;BYHWD 组灌胃补阳还五汤,剂量为生药 12.5 g/kg,按照体表面积药物剂量换算公式计算,相当于 70 kg 成人剂量的 2 倍;BMSCs-Exos 组灌胃等体积的蒸馏水,尾部注射骨髓间充质干细胞外泌体质量浓度为 200 μ g/mL,治疗剂量为 200 μ L 外泌体溶液;BYHWD+BMSCs-Exos 组灌胃补阳还五汤溶液,按生药 12.5 g/kg 剂量,尾部注射治疗剂量为 200 μ L 骨髓间充质干细胞外泌体。各给药干预组从第 2 天开始灌胃补阳还五汤溶液 28 d,1 次/d,尾部静脉注射骨髓间充质干细胞外泌体 3 d,1 次/d,常规饲养至处死;正常组按上述方法给药干预 28 d 后检测。

1.5.5 模型制备 实验动物经过 7 d 适应性饲养后进入正式实验阶段。采用改良 Allen's 重物坠落法^[6] 制作脊髓损伤模型,造成大鼠脊髓重度损伤致完全性截瘫。实验大鼠经腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉后,俯卧位固定。以 T₁₀ 椎体为中心作 3 cm 背部正中切口,充分显露 T₁₀ 节段脊髓。将直径 3 mm 圆形垫片置于脊髓表面,采用 10 g 重物从 12.5 cm 高度自由坠落撞击垫片,建立 T₁₀ 节段脊髓冲击伤模型,随后逐层缝合切口。模型成功判定标准:撞击瞬间观察到大鼠躯体明显抖动,后肢快速回缩并伴有弹动反应,尾部呈现短暂翘起后迅速下垂。局部脊髓组织可见明显瘀血,术后大鼠后肢运动功能完全丧失^[7];将大鼠置于保温垫上直至苏醒。

1.5.6 术后护理 术后每日实施 2 次人工辅助排尿,并用 75% 酒精进行局部消毒,持续至大鼠自主排尿功能恢复。同时,每 48 h 更换 1 次饲养垫料,维持笼内环境清洁干燥。

1.6 实验指标测定

1.6.1 后肢运动功能评估 在脊髓损伤后第 7, 14, 28 天,采用 BBB 评分量表评估各组大鼠后肢运动功能恢复情况。由两名经过培训且不了解分组情况的观察者,在标准观察平台上对大鼠进行 5 min 的行为学

观察,重点评估后肢各关节活动度、躯干运动能力及协调性。最终取两位观察者评分的平均值作为该时间点的 BBB 评分结果。

1.6.2 苏木精-伊红(HE)染色组织学观察 从烤箱染色架取出烤好的石蜡切片,先放入二甲苯 I 浸泡 20 min,再移入二甲苯 II 浸泡同样时间。待石蜡完全溶解,依次将切片转入无水乙醇 I、II 各浸泡 5 min,用无水乙醇快速刷洗 20 s 后,置于水盆中用自来水冲净乙醇残留。

接着把切片浸入染色缸的 HE 染液 1 中染色 3~5 min,取出后水洗至无色。随后,将切片先后浸入 HE 染色液 2 和 3 中,分别染色 3~5 s,并立即流水冲洗。完成染色步骤后,按顺序将切片放入 85%乙醇、95%乙醇、HE 染色液 4、3 次无水乙醇、正丁醇,以及 2 次二甲苯中进行梯度处理,每个环节保持 3~5 min。最后将染色完毕的切片放在通风处晾干,用中性树脂封片,借助光学显微镜观察并记录损伤区域神经元形态变化、空洞形成状况和炎症细胞浸润分布特点。

1.6.3 尼氏(Nissl)染色组织学观察 将烤箱中烤好的石蜡切片样本放入二甲苯 I、II 各浸泡 20 min 脱蜡,无水乙醇 I、II 各 5 min 脱水,刷洗后流水洗净。切片入 HE 染液 1 中染色 3~5 min,水洗至无色,依次浸入 HE 染液 2 和 3 中各 3~5 s,立即水洗。随后依次经 85%乙醇、95%乙醇,HE 染液 4、3 次无水乙醇,正丁醇,二甲苯 I、II 梯度处理,各 3~5 min。染色完成后通风干燥,用中性树脂封片,在光学显微镜下观察损伤区域神经元形态、空洞形成及炎症细胞浸润情况。

1.6.4 Western Blot 法测定脊髓组织 Nrf2、HO-1 及 Syn 蛋白表达 准确称取组织剪碎入离心管,加预冷含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液。低速匀浆(30 s/次,冰浴 1 min)至完全裂解,超声破碎后 4℃下 15 000g 离心 10 min。上清液与 5 倍上样缓冲液混合,沸水浴 5 min 变性,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳后转膜至聚偏氟乙烯(PVDF)。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加 Nrf2(1:2 000)、HO-1(1:6 000)、Syn(1:50 000)一抗 4℃下孵育过夜。TBST 洗 3 次(10 min/次),加 1:15 000 二抗室温孵育 1 h 后再洗 3 次。ECL 化学发光检测(每组重复 3 次),滴加新鲜 ECL 显色液后优化曝光,完成显影定影。

1.6.5 荧光染色检测活性氧氧化应激损伤 冰冻切片需先进行复温处理,用组化笔在组织周边画圈,添加自发荧光淬灭剂后,用流水冲洗 10 min。接着在画圈内滴加活性氧染液,放入避光恒温箱中于 37℃下孵育 30 min。随后将玻片洗涤 3 次,加入 DAPI 染液,在避光环境下室温孵育 10 min。最后采集图像,并对活性

氧荧光强度进行分析。

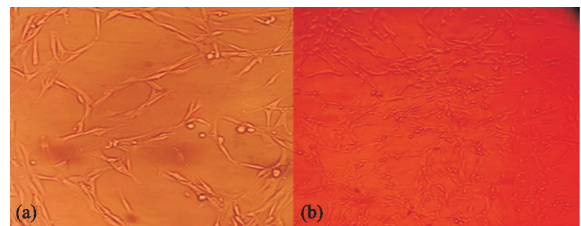
1.7 统计学方法

采用 SPSS 27.0 统计软件进行分析。组间多重比较采用单因素方差分析,并进行 LSD 多重比较,同时进行方差齐性检验。数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨髓间充质干细胞形态观察

第三代骨髓间充质干细胞呈现典型的纺锤状形态,细胞生长状态良好,具有典型的骨髓间充质干细胞形态学特征。细胞排列规则,胞体饱满,折光性良好,显示出理想的增殖状态,见图 1。



注:(a)复苏1 d后,骨髓间充质干细胞呈现长梭形或多边形外观,有序排列,贴附生长,覆盖率为50%~60%;(b)培养至第3天,细胞覆盖率增至80%~90%,倍增时间约1 d,此时细胞状态理想,适宜后续实验操作

图1 骨髓间充质干细胞形态观察($\times 100$)

2.2 骨髓间充质干细胞外泌体鉴定

骨髓间充质干细胞外泌体颗粒平均粒径约为 100 nm,颗粒物浓度为 6.0×10^6 个/mL,透射电镜观察显示外泌体呈现典型的双凹圆盘状结构。Western Blot 法检测结果表明,与对照组相比,给药干预组外泌体标志物 CD63、CD9 和 TSG-101 的表达水平显著上调,见图 2。透射电镜观察显示,骨髓间充质干细胞外泌体形态为圆形、椭圆形或茶托状,具备完整囊泡结构,内部含低电子密度物质。Western Blot 法检测到特征性标志蛋白 CD63、CD9 及 TSG-101 阳性表达。上述结果提示所提取外泌体符合鉴定要求,具备开展后续实验的条件。

2.3 大鼠后肢运动功能评分

脊髓损伤后各组大鼠不同时间点脊髓功能评分见表 1。各组大鼠不同时间点脊髓功能评价经单因素方差分析比较,结果显示第 7、14、28 天时 B 组、C 组、D 组、E 组 BBB 评分均明显低于 A 组,差异有统计学意义($P<0.05$);第 7 天时 B 组 BBB 评分明显低于 E 组,差异有统计学意义($P<0.05$);第 14 天和第 28 天时 B 组、C 组、D 组 BBB 评分均明显低于 E 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1 及图 3。

2.4 HE 染色结果

脊髓损伤后第 28 天,正常组神经元形态正常,脊髓中央灰质区域内见大量神经元细胞,无明显空洞及

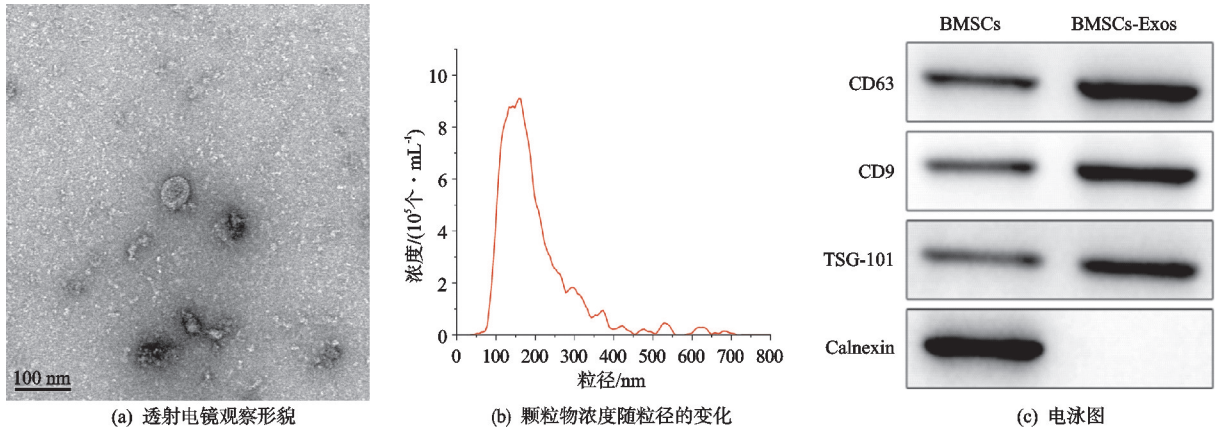


图 2 骨髓间充质干细胞外泌体鉴定

表 1 各组大鼠不同时间点脊髓功能评价
BBB 评分 (n=8, $\bar{x} \pm s$, 分)

组别	第 7 天	第 14 天	第 28 天
A	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00	21.00 ± 0.00
B	2.63 ± 1.06 ¹⁾²⁾	3.50 ± 0.93 ¹⁾²⁾	3.88 ± 0.83 ¹⁾²⁾
C	7.13 ± 0.84 ¹⁾	7.63 ± 1.06 ¹⁾²⁾	7.88 ± 1.13 ¹⁾²⁾
D	7.50 ± 0.93 ¹⁾	8.38 ± 1.85 ¹⁾²⁾	8.50 ± 1.31 ¹⁾²⁾
E	7.75 ± 1.04 ¹⁾	10.13 ± 1.13 ¹⁾	10.38 ± 1.60 ¹⁾

注: A 组-正常组; B 组-模型组; C 组-BYHWD 组; D 组-BMSCs-Exos 组; E 组-BYHWD + BMSCs-Exos 组(下同)。

1)与 A 组相比, $P < 0.05$; 2)与 E 组相比, $P < 0.05$ 。

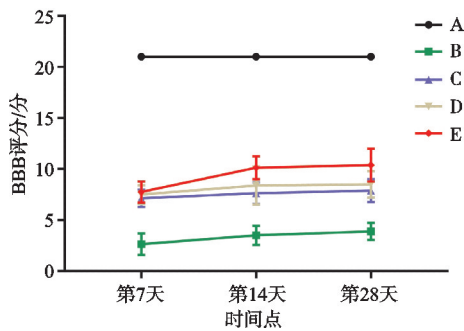


图 3 各组大鼠不同时间点 BBB 评分

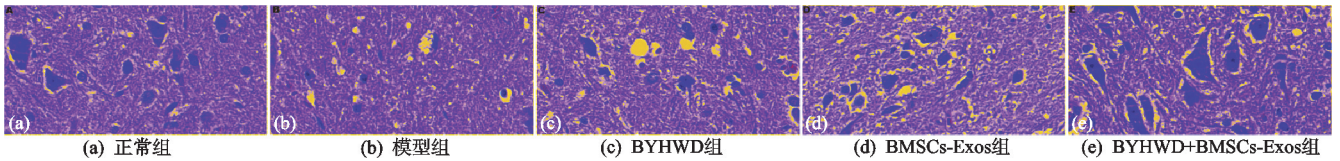


图 4 各组大鼠脊髓损伤后第 28 天脊髓组织 HE 染色 (×100)

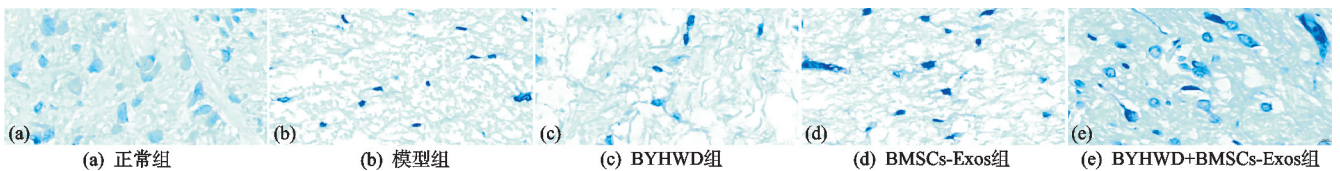


图 5 各组大鼠脊髓损伤后第 28 天脊髓组织尼氏染色 (×100)

2.6 Western Blot 法测定脊髓组织 Nrf2、HO-1、Syn 蛋白表达结果

脊髓损伤后第 28 天与正常组比较, 模型组 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达均明显上调, Syn 蛋白表达明显下

调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药干预组中 Nrf2、HO-1、Syn 蛋白表达均明显上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组比较, BYHWD + BMSCs-Exos 组

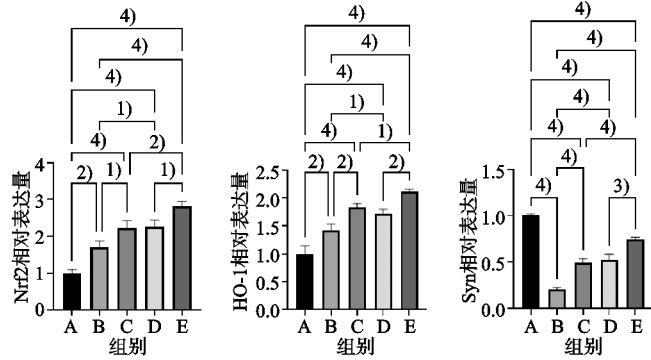
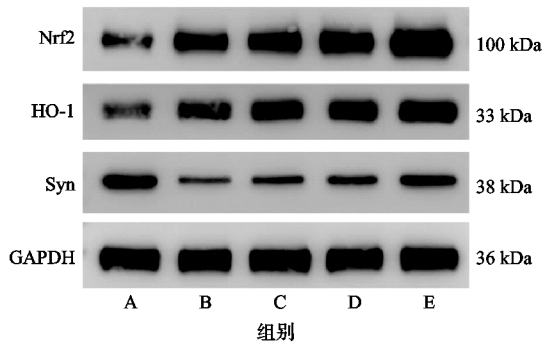
2.5 尼氏染色结果

脊髓损伤后第 28 天, 正常组有大量正常神经元分布, 而模型组神经损伤较为严重, 观察区域内神经元分布最少, BYHWD + BMSCs-Exos 组神经元分布优于 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组, 见图 5。也即: 正常组神经元细胞完整且数量较多, 而模型组视野区域内有大量空洞, 神经元分布较少, BYHWD + BMSCs-Exos 组神经元细胞数量优于 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组。

瘢痕组织生成; 模型组神经元数量少于正常组, 同时周围大量空洞; BYHWD 组及 BMSCs-Exos 组神经元数量和坏死区域较模型组有所改善, BYHWD + BMSCs-Exos 组神经元结构较为完整, 损伤恢复良好, 胶质空洞坏死区域较少, 见图 4。也即: 正常组和 BYHWD + BMSCs-Exos 组神经元结构较为完整, 脊髓空洞较少, 模型组神经损伤较为严重, 胶质区域内大量空洞, 无存活神经元; BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组脊髓空洞介于模型组和联合治疗组之间, 神经元结构明显优于 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组。

Nrf2、HO-1、Syn 蛋白表达均明显上调, 差异有统计学

意义($P < 0.05$), 见图 6。



注: 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.001$; 3) $P < 0.0015$; 4) $P < 0.0002$

图 6 各组大鼠脊髓损伤后第 28 天脊髓组织 Nrf2、HO-1、Syn 蛋白相对表达

2.7 荧光染色脊髓组织活性氧表达结果

脊髓损伤后第 28 天, BYHWD 组、BMSCs-Exos 组和 BYHWD+BMSCs-Exos 组大鼠脊髓组织活性氧 (ROS) 荧光强度高于正常组, 低于模型组, 差异有统计

学意义($P < 0.05$); 与 BYHWD 组和 BMSCs-Exos 组比较, BYHWD+BMSCs-Exos 组活性氧表达显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 7。

3 讨论

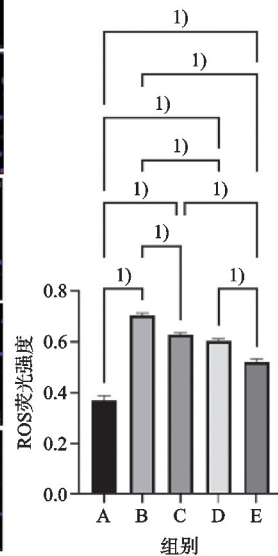
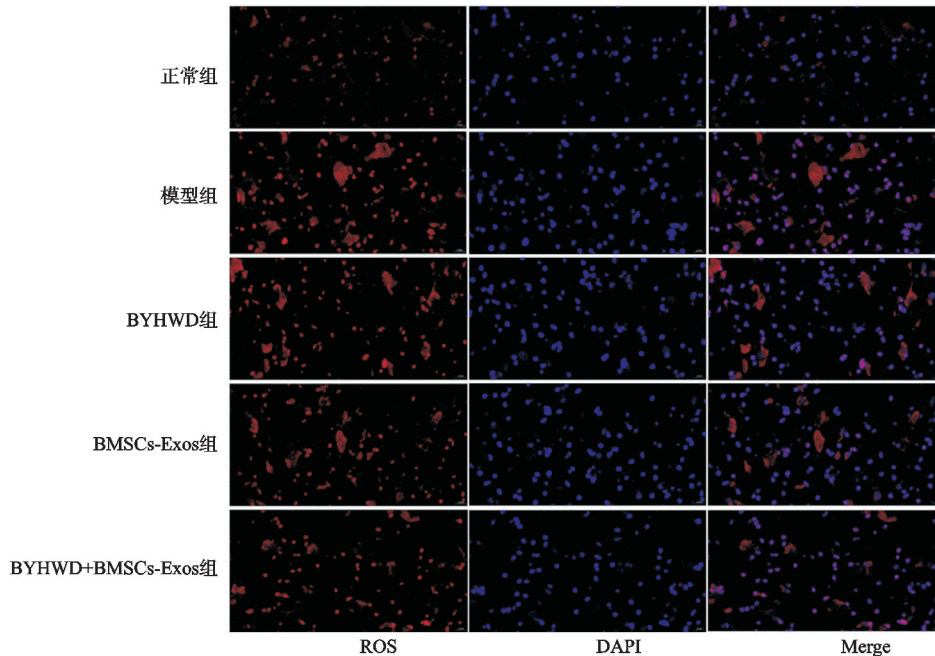


图 7 各组大鼠脊髓损伤后第 28 天脊髓组织活性氧表达比较(1) $P < 0.0002$

脊髓损伤作为一类严重的神经系统创伤性疾病, 往往伴随复杂的病理生理改变, 主要包括原发性脊髓损伤与继发性脊髓损伤两个阶段, 而继发性脊髓损伤对脊髓损伤的最终转归起决定性作用^[8]。继发性脊髓损伤属于多种因素相互作用介导的主动进程^[9]。脊髓损伤发生后引发的一系列细胞、分子层面的生化级联反应, 主要涉及脊髓缺血性损伤、内环境稳态失衡及神经细胞凋亡坏死这三大关键病理过程^[10]。首先, 广泛的小血管损伤会引发脊髓周围组织产生缺血、血栓形成、缺氧及营养匮乏等病理改变^[11]; 其次, 在损伤过程中活性氧(ROS)大量生成, 继而引发氧化应激与炎症级联反应, 致使细胞代谢功能紊乱, 超氧阴离子(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)及羟基产物(-OH)等活性氧代谢产

物出现过量蓄积^[12]。

作为 Cap'n'Collar(CNC)转录因子家族的重要成员, 核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2)属于碱性亮氨酸拉链类转录因子^[13]。在生理稳态条件下, 该转录因子通过与细胞质中的 Keap1(Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1)形成复合物, 以非活性状态存在于胞质中; 这种相互作用机制维持了 Nrf2 在正常生理状态下的活性调控^[14]。在氧化应激或亲电性物质等外界刺激作用下, Keap1 分子中的半胱氨酸残基会发生化学修饰, 这种修饰显著降低了其与 Nrf2 的亲合力, 促使 Nrf2 从复合物中释放并快速转移至细胞核内^[15]。进入细胞核后, Nrf2 会与 sMaf(小 Maf 蛋白)结合形成异源二聚体复合物^[16], 这种复合物能够特异性识别并结合基因

组中的抗氧化反应元件,从而激活下游多种抗氧化酶和解毒酶相关基因的转录过程^[15]。

作为 Nrf2 信号通路的关键效应分子,血红素加氧酶-1(HO-1)在细胞防御机制中起重要作用^[6]。在代谢过程中,胆绿素会在胆绿素还原酶的催化下发生转化,生成具有显著抗氧化活性的胆红素;这种代谢产物能够中和细胞内过量的活性氧,从而降低氧化应激对细胞造成的损伤^[17]。吴兵等^[18]研究发现,激活 Nrf2 与 HO-1 的表达,可明显减轻脊髓组织氧化损伤,减少脊髓神经元凋亡,提升大鼠的神经运动功能。陶经纬等^[16]研究表明,模型组大鼠脊髓组织 Nrf2 及 HO-1 蛋白表达显著高于假手术组,川芎嗪能够通过 Nrf2/HO-1 信号通路调控抗氧化作用,发挥神经保护作用。本研究中模型组大鼠 Nrf2 及 HO-1 的蛋白表达较正常组升高,各给药干预组的蛋白表达均明显上调,且结合活性氧的表达下降,其中联合治疗组尤为明显,这表明联合治疗组能够促进 Nrf2/HO-1 通路的抗氧化作用,从而治疗大鼠脊髓损伤。

突触核蛋白(Syn)属于小分子可溶性无序的细胞内蛋白,在生理状态下中枢神经系统中突触核蛋白呈广泛表达^[19],其主要参与突触囊泡转运、神经递质合成与释放、细胞膜稳态维持等生理过程^[20]。有研究发现在脊髓横断损伤模型中,体外给予突触核蛋白干预后,可通过调控凋亡相关基因及神经营养因子(NT),改善损伤后的运动及感觉功能^[21]。另有研究发现脊髓损伤后突触核蛋白在脊髓前角与后角均有表达,且其基因与蛋白水平呈下调趋势,提示突触核蛋白可能参与神经元及神经胶质细胞存活与凋亡的调控,进而影响大鼠脊髓损伤后感觉与运动功能的恢复进程^[22]。这与本研究的结果相似,在本研究中脊髓损伤大鼠给予治疗后,脊髓组织突触核蛋白明显上调,并且大鼠的运动功能得到改善。

由于中医疗法的特色优势,中药干预脊髓损伤的作用机制已成为当前研究的热点领域。历代医家主要采用益气活血、扶正固本、通络祛瘀等治疗原则,其中以益气活血化瘀类中药的应用最为广泛^[23]。这类药物通过多靶点、多途径的作用机制,在促进神经功能恢复方面展现出独特优势。清代著名医家王清任所著《医林改错》云“半身不遂,亏损元气,是其本源”,“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留而瘀”,针对“气虚血瘀”这一病机特点,清代医家王清任提出了“益气活血”的治疗原则,并据此创制了经典名方补阳还五汤。该方充分体现了“气为血之帅,血为气之母”的中医理论精髓,通过补气与活血的双重作用,达到标本兼治的效果,逐渐成为临床治疗中枢神经系统损伤的经典方^[24-26],广泛应用于中风后遗症、截瘫等神经系统损

伤疾病^[27]。许卢春等^[28]研究发现,补阳还五汤可以通过 GPX4/ACSL4 轴抑制铁死亡,减少神经元和髓鞘继发性损伤和氧化应激反应,最终促进神经功能的恢复。郭德华等^[29]研究发现,补阳还五汤可促进脊髓损伤大鼠脊髓星形胶质细胞增殖,抑制胶质瘢痕的形成,促进大鼠脊髓损伤后运动功能恢复。

外泌体(Exosomes, Exos)内含丰富的生物活性成分,包括功能性蛋白质、脂质分子、核酸物质以及 microRNA 等多种非编码 RNA^[30]。这些成分能够精确调控靶细胞基因表达谱和生理活动,影响细胞的迁移、增殖和分化等关键生物学过程,尤其在炎症调控和神经再生等领域展现出显著的治疗潜力^[31],为脊髓损伤后的神经功能重建提供了新的思路。在干细胞的选择上,骨髓间充质干细胞因其不仅获取途径相对简便,还可实现自体移植,避免了社会伦理、免疫排斥反应等优点,成为脊髓损伤细胞治疗的理想种子细胞^[32]。而相较于骨髓间充质干细胞本身,由于其纳米级的微小尺寸,外泌体能够更有效地穿越血脑屏障和血脊髓屏障,这一特性大大提高了其对中枢神经系统疾病的治疗潜力^[31]。已有研究证实骨髓间充质干细胞通过靶向递送生物活性成分,在脊髓损伤修复中实现多维度调控^[33]。因此,理论上用补阳还五汤联合骨髓间充质干细胞外泌体治疗大鼠脊髓损伤有望发挥协同效应。

综上所述,本试验围绕补阳还五汤与骨髓间充质干细胞外泌体联合治疗脊髓损伤展开研究,HE 染色及尼氏染色结果从形态学角度直观证实,联合治疗组展现出卓越的神经保护效能,能够减少损伤区域空洞形成,突破阻碍神经元及轴突再生的生理屏障。在分子层面,联合治疗显著上调 Nrf2、HO-1、突触核蛋白表达水平,同时伴随活性氧表达量显著降低。基于上述实验数据,推测该联合疗法的作用机制可能为:加速激活 Nrf2/HO-1 信号通路,进而上调突触核蛋白表达,同时抑制活性氧生成,减轻氧化应激对神经细胞造成的损伤,从而改善大鼠神经功能。

参考文献

- [1] ONG B, WILSON J R, HENZEL M K. Management of the patient with chronic spinal cord injury[J]. The Medical Clinics of North America, 2020, 104(2): 263-278.
- [2] 韩佃晖, 牟青春, 陈晓丰, 等. 创伤性脊髓损伤治疗方式的研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2024, 18(6): 81-84.
- [3] 邓建雄, 李亮, 张亦辉, 等. 补阳还五汤治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 中国当代医药, 2024, 31(26): 188-193.
- [4] CHAI M, SU G, CHEN W, et al. Effects of bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes in central nervous system diseases[J]. Molecular Neurobiology, 2024, 61(10): 7481-7499.

- [5] 江朔轩,邓强,张彦军,等. 间充质干细胞源性外泌体治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 神经损伤与功能重建, 2024, 19(5): 282-284.
- [6] CATANEO A H D, TOMIOTTO-PELLISSIER F, MIRANDA-SAPLA M M, et al. Quercetin promotes anti-promastigote effect by increasing the ROS production and anti-amastigote by upregulating Nrf2/HO-1 expression, affecting iron availability[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 113: 108745.
- [7] 龙智生,龚飞鹏,温家宾,等. 骨髓间充质干细胞外泌体联合茶多酚治疗大鼠脊髓缺血再灌注损伤[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(19): 2953-2959.
- [8] HU X, XU W, REN Y L, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 245.
- [9] 陈漳鑫,余铃,郭卫春. 2024 国际脊柱研究学会/Praxis 脊髓研究所急性脊髓损伤管理临床实践指南解读[J]. 临床外科杂志, 2025, 33(1): 52-56.
- [10] HWANG B Y, MAMPRE D, AHMED A K, et al. Ultrasound in traumatic spinal cord injury: a wide-open field[J]. *Neurosurgery*, 2021, 89(3): 372-382.
- [11] TANG R Z, BOTCHWAY B O A, MENG Y F, et al. The inhibition of inflammatory signaling pathway by secretory leukocyte protease inhibitor can improve spinal cord injury[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2020, 40(7): 1067-1073.
- [12] VAN S, BAREYRE F. Chemogenetic approaches to unravel circuit wiring and related behavior after spinal cord injury[J]. *Experimental Neurology*, 2021, 345: 113839.
- [13] O'ROURKE S A, SHANLEY L C, DUNNE A. The Nrf2-HO-1 system and inflammaging[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1457010.
- [14] DODSON M, DE LA VEGA M R, CHOLANIANS A B, et al. Modulating NRF2 in disease; timing is everything[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 59: 555-575.
- [15] HE F, RU X L, WEN T. NRF2, a transcription factor for stress response and beyond[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(13): 4777.
- [16] 陶经纬,周婧雅,刘奕扬,等. 川芎嗪对脊髓损伤大鼠 Nrf2/HO-1 通路及氧化应激的调控作用[J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(5): 2575-2581.
- [17] ZHAO W Y, GASTERICH N, CLARNER T, et al. Astrocytic Nrf2 expression protects spinal cord from oxidative stress following spinal cord injury in a male mouse model[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 134.
- [18] 吴兵,生梦飞,张想旺,等. 木犀草素对脊髓损伤大鼠 Nrf2/HO-1 通路的影响[J]. 中国药师, 2021, 24(10): 1833-1837.
- [19] ZENG H, LIU N, LIU X X, et al. α -Synuclein in traumatic and vascular diseases of the central nervous system[J]. *Aging*, 2020, 12(21): 22313-22334.
- [20] GAUGLER M N, GENCO O, BOBELA W, et al. Nigrostriatal overabundance of α -synuclein leads to decreased vesicle density and deficits in dopamine release that correlate with reduced motor activity[J]. *Acta Neuropathologica*, 2012, 123(5): 653-669.
- [21] WANG Y C, FENG G Y, XIA Q J, et al. Knockdown of α -synuclein in cerebral cortex improves neural behavior associated with apoptotic inhibition and neurotrophin expression in spinal cord transected rats[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(4): 404-420.
- [22] 钟占琼,薛清彩,刘晓芬,等. α -突触核蛋白在大鼠脊髓损伤后的表达及意义[J]. 中国医药导刊, 2019, 21(3): 170-176.
- [23] 侯智颖,陈明良. 补阳还五汤治疗中医骨伤科疾病研究进展[J]. 河南中医, 2023, 43(3): 468-474.
- [24] 任思思,张赞,李娟,等. 补阳还五汤治疗脑病的系统评价和 Meta 分析[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(3): 745-750.
- [25] 李旭,杨阳. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓功能修复及 gp130、IL-6 的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(10): 2350-2353.
- [26] 高鹏宇,潘汉升,王火福,等. 补阳还五汤治疗骨伤科疾病及药理研究进展[J]. 光明中医, 2023, 38(4): 782-785.
- [27] 张维平,常雯茜,朱换平,等. 加味补阳还五汤联合电针治疗创伤性脊柱脊髓损伤气虚血瘀证的临床疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 88-93.
- [28] 许卢春,姜国正,马昱堃,等. 基于 GPX4-ACSL4 轴探讨补阳还五汤抑制铁死亡促进脊髓损伤后神经功能恢复的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(5): 20-30.
- [29] 郭德华,吴成林,许洋,等. 补阳还五汤对脊髓损伤大鼠脊髓星形胶质细胞增殖的影响[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(4): 835-838.
- [30] JOHNSEN K B, GUDBERGSSON J M, DUROUX M, et al. On the use of liposome controls in studies investigating the clinical potential of extracellular vesicle-based drug delivery systems - A commentary [J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 269: 10-14.
- [31] GANGADARAN P, RAJENDRAN R L, LEE H W, et al. Extracellular vesicles from mesenchymal stem cells activates VEGF receptors and accelerates recovery of hind-limb ischemia [J]. *Journal of Controlled Release*, 2017, 264: 112-126.
- [32] 梁朝鑫,周安远,王伟,等. 骨髓间充质干细胞治疗骨科疾病研究进展[J]. 陕西医学杂志, 2022, 51(1): 121-124.
- [33] YE Z D, ZHENG Y K, LI N N, et al. Repair of spinal cord injury by bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes: a systematic review and meta-analysis based on rat models[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2024, 17: 1448777.

(收稿日期:2025-06-17)