

# 利拉鲁肽通过抑制线粒体依赖性凋亡及缺氧诱导因子 1 $\alpha$ 表达对脊髓损伤的保护作用及其机制

洪建仁<sup>1</sup> 任翠花<sup>2</sup> 姜砚劼<sup>1</sup> 柯利平<sup>1△</sup>

**[摘要]** 目的:探索利拉鲁肽(Lir)对脊髓损伤(SCI)大鼠的保护作用及相关机制。方法:36 只 SD 大鼠随机分为对照组、SCI 组和 SCI+Lir 组,每组各 12 只,术后利用 BBB 评分评价大鼠下肢运动功能,ELISA 法检测脊髓组织中 Smac/Diablo、细胞色素 c(Cyt-c)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、凋亡相关因子配体(FASL)、肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及 Caspase3 表达,Western Blot 法检测凋亡相关蛋白 Smac/Diablo,Cyt-c,P53,Caspase3,Bax,Bcl-2 以及 HIF-1 $\alpha$ ,FASL,利用组织学染色观察脊髓组织变化。结果:BBB 评分显示利拉鲁肽 14 d 后开始能明显改善大鼠下肢运动功能;ELISA 结果显示利拉鲁肽能显著抑制脊髓损伤后 Smac/Diablo,Cyt-c,P53,HIF-1 $\alpha$ ,FASL,TNF- $\alpha$  及 Caspase3 表达;Western Blot 法检测结果显示利拉鲁肽能明显逆转脊髓损伤后凋亡蛋白 Smac/Diablo,Cyt-c,P53,Caspase3,Bax,Bcl-2 表达,抑制 HIF-1 $\alpha$  及 FASL 表达。结论:利拉鲁肽可通过抑制线粒体依赖性凋亡及 HIF-1 $\alpha$  表达促进脊髓损伤的恢复。

**[关键词]** 利拉鲁肽;脊髓损伤;线粒体依赖性凋亡;缺氧诱导因子 1 $\alpha$

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2020)11-0001-05

## Liraglutide Protects Spinal Cord Injury via Suppressing Mitochondrial-dependent Apoptosis and HIF-1 $\alpha$ Expression

HONG Jianren<sup>1</sup> REN Cuihua<sup>2</sup> JIANG Yanjie<sup>1</sup> KE Liping<sup>1△</sup>

<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the Fourth Hospital of Huangshi, Huangshi 435006, Hubei China;

<sup>2</sup>Department of Functional, the Fourth Hospital of Huangshi, Huangshi 435006, Hubei China.

**Abstract Objective:** To explore the protective effect of Liraglutide (Lir) on spinal cord injury (SCI) in rats and its related mechanism. **Methods:** 36 SD rats were divided into 3 groups: the control group ( $n=12$ ), SCI group ( $n=12$ ) and SCI+Lir group ( $n=12$ ). Lower limb motor function was valued via BBB score, and the content of Smac/Diablo, Cytochrome C (Cyt-c), hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), apoptosis-related factor ligand (FASL), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and caspase-3 were detected by ELISA. Western Blot was used to detect the apoptosis-related proteins, such as Smac/Diablo, Cyt-c, p53, caspase-3, Bax, Bcl-2 and HIF-1 $\alpha$ , FASL were also valued. Changes of the spinal cord were observed by histological staining. **Results:** BBB score revealed that Liraglutide could significantly improve the lower limb motor function since 14th day. ELISA demonstrated that Liraglutide could markedly suppress the protein expression of Smac/Diablo, Cyt-c, p53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$  and caspase-3. Western Blot revealed that Liraglutide could significantly decrease the apoptosis-related proteins, such as Smac/Diablo, Cyt-c, p53, caspase-3, Bax, Bcl-2 and HIF-1 $\alpha$ , FASL expression. **Conclusion:** Liraglutide can protect spinal cord injury probably via suppressing mitochondrial-dependent apoptosis and HIF-1 $\alpha$  expression.

**Keywords:** Liraglutide; spinal cord injury; mitochondrial-dependent apoptosis; HIF-1 $\alpha$

脊髓损伤(SCI)多为外伤损伤脊柱引起,由于神经损伤具有不可逆性和尚未发现有效治疗药物,目前

SCI已成为临床治疗的难点。脊髓损伤包括原发性和继发性损伤,继发性SCI后脊髓微循环破坏,组织血供不足,常导致脊髓氧稳态的失衡,诱导神经细胞凋亡。并且HIF-1 $\alpha$ 是细胞适应低氧环境的重要调控因子之一,HIF-1 $\alpha$ 参与SCI后缺血缺氧的继发损害过程,与创伤后凋亡之间有着密切的关系<sup>[1-3]</sup>。因此,如

<sup>1</sup> 湖北黄石市第四医院骨科(湖北 黄石,435006)

<sup>2</sup> 黄石市第四医院功能科

<sup>△</sup>通信作者 E-mail:1871646288@qq.com

何减轻 SCI 后神经细胞凋亡,促进受损部位的结构重建和功能恢复,是现代医学研究的重点。利拉鲁肽是胰高糖素样肽 1 (GLP1) 类似物,临床常用于控制血糖,研究表明利拉鲁肽可与受体结合,激活下游 cAMP 信号通路,发挥抗炎及抗神经细胞凋亡等作用<sup>[4]</sup>。在脊髓损伤中,Chen 等<sup>[5]</sup>发现利拉鲁肽能通过抑制炎症因子释放从而发挥抗炎、抗凋亡的作用,而利拉鲁肽对神经细胞凋亡的具体作用机制目前仍缺乏研究。本研究利用利拉鲁肽干预建立的大鼠脊髓损伤模型,通过检测线粒体相关蛋白表达,阐明利拉鲁肽抗凋亡的具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

36 只 8 周龄雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g,购自华中科技大学同济医学院实验动物中心,根据《关于善待实验动物的指导性意见》(中华人民共和国科学技术部颁发)处理实验动物。

### 1.2 材料和试剂

Allen 脊髓损伤打击器(由武汉大学人民医院骨科提供),利拉鲁肽(Sigma 公司,美国),大鼠 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$  及 Caspase3 ELISA 试剂盒(南京建成有限公司,中国),抗大鼠 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, Caspase3, Bax, Bcl-2 以及 HIF-1 $\alpha$ , FASL 单克隆抗体,内参 GAPDH 以及 DAB 显色试剂盒(Santa Cruz 公司,美国)。

### 1.3 脊髓损伤模型的建立

参考文献<sup>[6]</sup>的方法利用 Allen 法进行 SCI 造模,使用 10% 水合氯醛(0.4 mL/100 g)腹腔注射麻醉,大鼠麻醉后,切除 T<sub>9</sub>-T<sub>11</sub> 椎板并暴露 T<sub>10</sub> 节段脊髓,将质量为 10 g 打击锤固定在 5 cm 垂直高度,致伤量为 50 g/cm,松开打击锤打击 T<sub>10</sub> 节段脊髓,大鼠出现摆尾反射,双后肢迟缓性痉挛,视为造模成功。术后所有大鼠进行人工辅助排尿。

### 1.4 实验分组

36 只大鼠随机等分为对照组、SCI 组及 SCI+Lir 组,SCI+Lir 组术后即刻在硬膜内给予利拉鲁肽 12  $\mu$ g/100 g,对照组和 SCI 组给予等量生理盐水,术后单笼饲养,防止感染。对照组组只行椎板切除;SCI 组和干预组采用 Allen 法制作脊髓损伤模型。

### 1.5 下肢运动功能评分

根据文献<sup>[7]</sup>大鼠后肢运动功能评分在 0(完全瘫痪)和 21(完全正常活动)之间。采用双盲法,评分者熟练掌握 BBB 评分标准,每只大鼠评定 3 次。

### 1.6 ELISA 测定脊髓组织 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$ 及 Caspase3 含量

3 d 后将取出 3 只大鼠损伤节段脊髓约 10 mm,

标准稀释液进行稀释,按照 ELISA 试剂盒说明书进行加样操作,加终止液后混匀,450 nm 波长酶标仪进行检测,计算 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$  及 Caspase3 浓度。

### 1.7 Western Blot 法检测

Smac/Diablo, Cyt-c, P53, Caspase3, Bax, Bcl-2 以及 HIF-1 $\alpha$ , FASL 蛋白表达:3 d 后将取出 3 只大鼠损伤节段脊髓约 10 mm,充分研磨,3 mL/g 蛋白裂解液充分裂解后,10 000g 离心 30 min。总蛋白浓度通过 BCA 法测定。并进行 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,Smac/Diablo, Cyt-c, P53, Caspase3, Bax, Bcl-2 以及 HIF-1 $\alpha$ , FASL 单克隆抗体孵育过夜,二抗 1:5 000 孵育 3 h,加入显色剂显色,内参 GAPDH。凝胶成像系统成像,Image J 软件计算灰度值。相对灰度值=(所测蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值) $\times$ 100%。

### 1.8 组织学观察

28 d 后取出每组剩余 6 只大鼠损伤节段脊髓约 10 mm,利用 10% 甲醛浸泡并石蜡包埋,切片切取厚度为 3 mm 石蜡切片,行常规苏木精-伊红(HE)染色和 TUNEL 染色,并进行 HIF-1 $\alpha$  及 FASL 蛋白免疫组织化学染色。

### 1.9 统计学方法

采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,配对组间单因素方差分析或  $t$  检验进行分析。 $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 利拉鲁肽对大鼠下肢运动功能的影响

BBB 评分显示,脊髓损伤后大鼠下肢运动功能评分明显降低,而利拉鲁肽干预后第 14 天开始,BBB 评分较 SCI 组明显改善,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

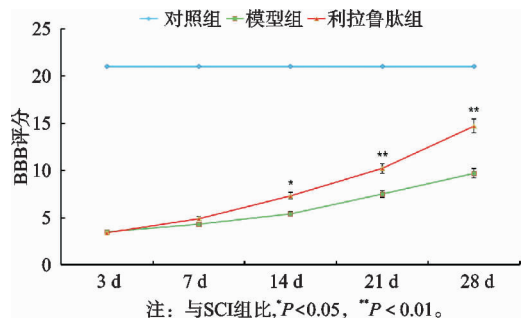


图 1 各组大鼠 BBB 评分

### 2.2 利拉鲁肽对脊髓损伤后 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$ 及 Caspase3 表达的影响

脊髓损伤后各组大鼠脊髓组织 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$  及 Caspase3 含量明显提高,利拉鲁肽能显著降低脊髓损伤后 Smac/

Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$  及 Caspase3 含量( $P<0.05$ ),见图 2。

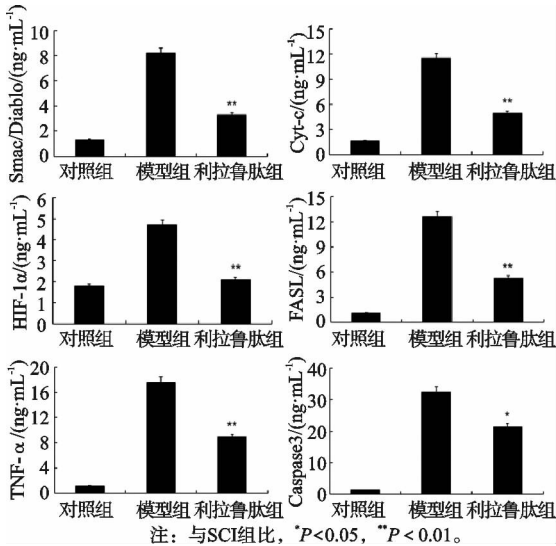
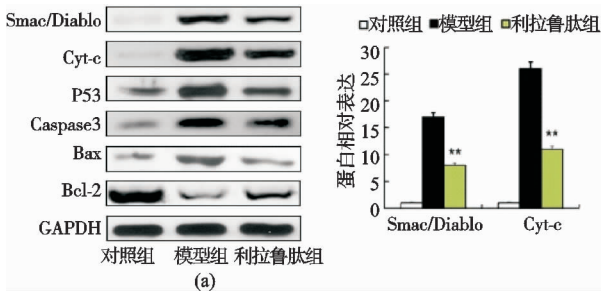


图 2 ELISA 法检测各组大鼠 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, HIF-1 $\alpha$ , FASL, TNF- $\alpha$  及 Caspase3 表达



### 2.3 利拉鲁肽对凋亡相关蛋白的影响

脊髓损伤后各组大鼠脊髓组织中凋亡相关蛋白,如 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, Caspase3, Bax, Bcl-2 蛋白表达显著提高,利拉鲁肽能显著抑制脊髓组织中 Smac/Diablo, Cyt-c, P53, Caspase3, Bax, Bcl-2 蛋白表达,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。

### 2.4 利拉鲁肽对 HIF-1 $\alpha$ 及 FASL 表达的影响

Western Blot 结果显示,脊髓损伤后各组大鼠脊髓组织中 HIF-1 $\alpha$  及 FASL 表达显著提高,而利拉鲁肽能显著抑制脊髓组织中 HIF-1 $\alpha$  及 FASL 表达,差异有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ),见图 4。

### 2.5 组织学变化

苏木精-伊红染色显示脊髓损伤后脊髓组织外观形态不规则,出现脊髓空洞现象,并可见淋巴细胞浸润,SCI+Lir 组脊髓空洞较少,可见少量淋巴细胞浸润。TUNEL 染色显示 SCI 组可见凋亡小体,并可见较多的神经凋亡细胞,SCI+Lir 组凋亡小体较少,视

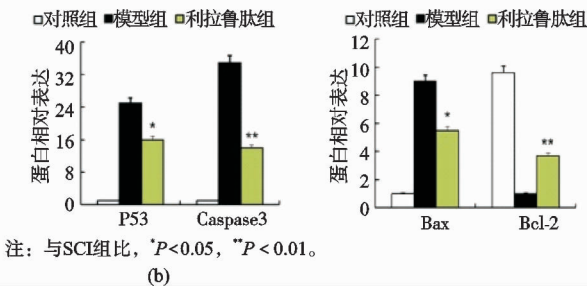


图 3 Western Blot 检测各组大鼠凋亡相关蛋白表达

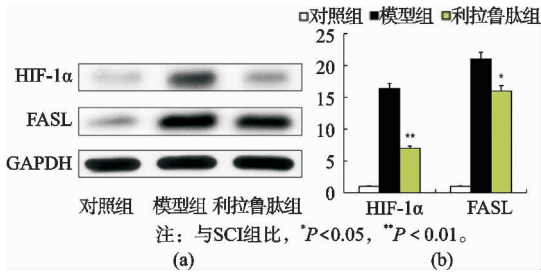


图 4 Western Blot 检测各组大鼠 HIF-1 $\alpha$  及 FASL 表达  
野内未见明显的神经凋亡细胞。HIF-1 $\alpha$  和 FASL 免疫组织化学染色显示脊髓损伤后脊髓组织中棕色深染的 HIF-1 $\alpha$  和 FASL 大量表达,而利拉鲁肽显著抑制了 HIF-1 $\alpha$  和 FASL 表达,见图 5。

### 3 讨论

SCI 包括原发性 SCI 和继发性 SCI,相比于原发性 SCI,继发性损伤可引起血-脊液屏障破坏,继而血液中的免疫细胞(如中性粒细胞、单核细胞、T 淋巴细胞)进入中枢神经系统,激活并释放白介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、一氧化氮(NO)和氧自由基等,破坏神经元细胞,继发性 SCI 也是目前医学研究的难点<sup>[8]</sup>。利拉鲁肽是一种 GLP1 类似物,主要通过激活 cAMP 信号通路发挥抗炎及抗凋亡作用。各种证据表明,利拉鲁肽可缓解神

经系统疾病,包括脊髓损伤、颅脑损伤等<sup>[9]</sup>。利拉鲁肽能与 GLP-1 受体结合而产生构象变化并激活,活性复合物能进一步激活下游 cAMP 通路,引起一系列信号通路(诸如 PKA, PI3K 和 MAPK)信号变化,通过抑制 Caspase-3 和 Bax 的表达,同时提高 Bcl-2 表达,最终抑制细胞凋亡<sup>[10]</sup>。脊髓损伤后大鼠下肢瘫痪,随时间能逐渐恢复。本研究发现利拉鲁肽能显著提高脊髓损伤大鼠下肢运动功能,与文献报道一致<sup>[5]</sup>。虽然利拉鲁肽对脊髓损伤的保护作用已有研究报道,但对创伤性脊髓损伤后 FASL 介导的神经细胞凋亡和 HIF-1 $\alpha$  的影响尚不清楚。

线粒体凋亡被认为是继发性 SCI 神经元凋亡的主要方式,因此本研究以线粒体凋亡为线索开展实验。线粒体凋亡程序的启动和释放因子(如 Cyt-c 和 Smac/Diablo)可通过半胱天冬酶介导细胞凋亡或通过调节线粒体跨膜电位和钙摄取阻断直接介导线粒体凋亡。FAS 是受体凋亡途径的调控分子,与 FASL 识别后通过 Fas 相关死亡域蛋白(FADD)来激活 P53, P53 能激活并启动凋亡的级联放大反应,并且能够抑制 Bcl-2 并促使具有促凋亡活性的 Bax 大量表达<sup>[11]</sup>。此



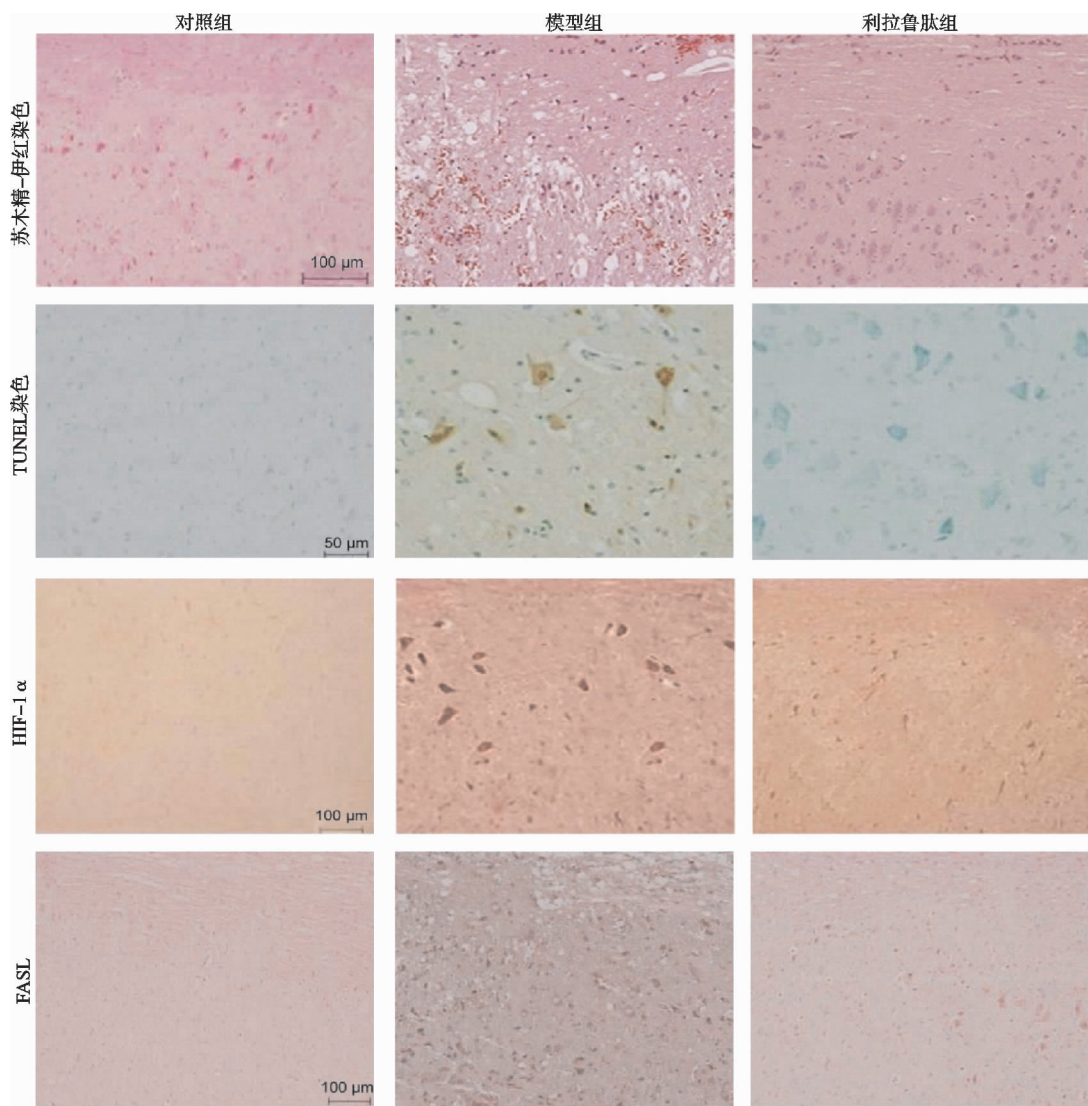


图5 各组大鼠脊髓组织组织学观察(倒置相差显微镜,400 $\times$ ),苏木精-伊红染色显示利拉鲁肽能明显改善脊髓损伤,抑制脊髓炎症;TUNEL染色显示利拉鲁肽显著抑制脊髓损伤后神经细胞凋亡;HIF-1 $\alpha$ 和FASL免疫组织化学染色显示利拉鲁肽显著抑制了HIF-1 $\alpha$ 和FASL表达

外,Caspase3是凋亡的“分子开关”,Cyt-c能够通过凋亡酶激活因子1(APAF-1)来引起Caspase9活化,激活Caspase3程序并引起细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本研究发现脊髓损伤后脊髓组织中Smac/Diablo,Cyt-c,P53,HIF-1 $\alpha$ ,FASL,TNF- $\alpha$ 及Caspase3含量明显提高,而利拉鲁肽则能显著抑制Smac/Diablo,Cyt-c,P53,HIF-1 $\alpha$ ,FASL,TNF- $\alpha$ 及Caspase3含量,提示利拉鲁肽能有效抑制脊髓组织中凋亡及炎症因子表达。为进一步从蛋白水平验证实验可靠性,本研究通过Western Blot检测脊髓组织凋亡蛋白表达,结果发现脊髓损伤后脊髓组织凋亡蛋白(如Smac/Diablo,Cyt-c,P53,Caspase3,Bax,Bcl-2)大量表达,而利拉鲁肽则能明显逆转这些凋亡因子表达,提示利拉鲁肽能通过抑制神经元凋亡保护大鼠脊髓损伤。

此外,FASL可通过促进炎症因子分泌和释放介导细胞凋亡,已有研究表明抑制FASL活性能显著改

善脑缺血和脊髓损伤动物模型的神经运动功能恢复,因此如何降低FASL活性是治疗继发性SCI的靶点<sup>[13]</sup>。HIF-1 $\alpha$ 主要参与细胞凋亡、肿瘤转移、血管生成以及能量代谢等生理活动,其主要通过调控下游靶基因来提高组织对氧的耐受性<sup>[14]</sup>。研究显示SCI后脊髓组织中HIF-1 $\alpha$ 表达增高,其表达随时间延长增加,在损伤2周后达到高峰。此外,HIF-1 $\alpha$ 也参与脊髓损伤的病程进展,有报道显示脊髓损伤后HIF-1 $\alpha$ 表达呈时间依赖性,在促进细胞存活方面起重要作用,而在脊髓损伤中其负性作用<sup>[15]</sup>。本研究发现脊髓损伤后大鼠脊髓组织中FASL和HIF-1 $\alpha$ 大量表达,而利拉鲁肽则能有效抑制FASL和HIF-1 $\alpha$ 表达,提示利拉鲁肽可能通过FASL和HIF-1 $\alpha$ 途径抑制脊髓组织神经元凋亡。

综上所述,脊髓损伤神经元线粒体凋亡途径显著激活,利拉鲁肽能显著抑制脊髓损伤后凋亡因子表达,

可能是通过抑制线粒体依赖性凋亡及 HIF-1 $\alpha$  表达发挥效应。

## 参考文献

- [1] WANG J Y, LI H Y Z, REN Y C, et al. Local delivery of  $\beta$ -elemene improves locomotor functional recovery by alleviating endoplasmic reticulum stress and reducing neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(2): 595-609.
- [2] 刘伟, 陈武桂, 孙靖, 等. 完全性脊髓损伤后脊髓组织病理学变化及其意义[J]. *中华创伤杂志*, 2018, 34(2): 138-144.
- [3] 汪九龄, 何波, 储瑞亮, 等. 大鼠急性脊髓损伤后肾脏的病理变化及其意义[J]. *中华创伤杂志*, 2017, 33(5): 459-464.
- [4] KANEKO S, UEDA Y, TAHARA Y. GLP1 receptor agonist Liraglutide is an effective therapeutic option for perioperative glycemic control in type 2 diabetes within enhanced recovery after surgery (ERAS) protocols[J]. *Eur Surg Res*, 2018, 59(5/6): 349-360.
- [5] CHEN J, WANG Z, MAO Y, et al. Liraglutide activates autophagy via GLP-1R to improve functional recovery after spinal cord injury[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 85949-85968.
- [6] MENG X L, HAI Y, ZHANG X N, et al. Hyperbaric oxygen improves functional recovery of rats after spinal cord injury via activating stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine receptor 4 axis and promoting brain-derived neurotrophic factor expression[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(6): 699-706.
- [7] KARAOZ E, TEPEKOY F, YILMAZ I, et al. Reduction of inflammation and enhancement of motility after pancreatic islet derived stem cell transplantation following spinal cord injury[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2019, 62(2): 153-165.
- [8] ZHANG H, LI D, ZHANG Y, et al. Knockdown of lncRNA BDNF-AS suppresses neuronal cell apoptosis via downregulating miR-130b-5p target gene PRDM5 in acute spinal cord injury[J]. *RNA Biol*, 2018, 15(8): 1071-1080.
- [9] LI Y, DU J, ZHU E, et al. Liraglutide suppresses proliferation and induces adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells via the Hippo-YAP signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 4499-4507.
- [10] ZHU H, ZHANG Y, SHI Z, et al. The neuroprotection of Liraglutide against ischaemia-induced apoptosis through the activation of the PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 26859.
- [11] YU W R, FEHLINGS M G. Fas/FASL-mediated apoptosis and inflammation are key features of acute human spinal cord injury: implications for translational, clinical application[J]. *Acta Neuropathol*, 2011, 122(6): 747-761.
- [12] YIN V, MIAN S H, KONERMANN L. Lysine carbonylation is a previously unrecognized contributor to peroxidase activation of cytochrome c by chloramine-T[J]. *Chem Sci*, 2019, 10(8): 2349-2359.
- [13] GONG Z M, TANG Z Y, SUN X L. miR-411 suppresses acute spinal cord injury via downregulation of Fas ligand in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 501(2): 501-506.
- [14] CHEN H, ZHENG J, MA J. Vanillin ameliorates changes in HIF-1 $\alpha$  expression and neuronal apoptosis in a rat model of spinal cord injury[J]. *Restor Neurol Neurosci*, 2019, 37(1): 21-29.
- [15] CHEN H, LI J, LIANG S, et al. Effect of hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor signaling pathway on spinal cord injury in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(3): 861-866.

(收稿日期: 2020-04-17)