

黄连素对脊髓损伤大鼠染色病理、骨形态发生蛋白表达及神经元活性的影响

吴建军^{1△} 梁珪清¹ 郑昌坤¹ 徐强² 徐佳隆²

[摘要] 目的:研究黄连素对脊髓损伤大鼠苏木精-伊红(HE)病理、骨形态发生蛋白 4(BMP-4) mRNA 表达及神经元活性的影响。方法:将广东省医学 SD 大鼠中心的大鼠随机分为脊髓损伤组(S 组)、健康对照组(H 组)、黄连素组(B 组),每组 6 只。采用流式细胞法、TUNEL 法、HE 染色法、免疫组化法、qRT-PCR 法检测 S 组、B 组、H 组大鼠脊髓细胞凋亡数量、脊髓细胞病变程度、脊髓细胞中 BMP-4 蛋白阳性表达、脊髓细胞中 BMP-4 mRNA 的表达量、脊髓细胞凋亡率的差异性来探究黄连素对脊髓损伤大鼠 HE 病理、BMP-4 mRNA 表达及神经元活性的影响。结果:S 组脊髓细胞凋亡数量显著多于 B 组($P<0.05$),与 H 组相比较,B 组脊髓细胞凋亡数量显著多于 H 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。B 组神经元细胞的凋亡情况与 S 组相比较显著减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 S 组比较,B 组大鼠脊髓水肿减轻,损伤程度有好转趋势,细胞坏死数目有所减少。与 S 组相比较,B 组脊髓细胞中 BMP-4 阳性数显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 B 组相比较,H 组细胞 BMP-4 阳性数显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 S 组相比较,B 组大鼠 BMP-4 mRNA 表达量显著降低,BMP-2 mRNA 表达量显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$);与 B 组相比较,H 组 BMP-4 mRNA 表达量显著降低,BMP-2 mRNA 表达量显著上升,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:黄连素对脊髓损伤大鼠具有一定治疗作用,黄连素干预后能够显著减少大鼠脊髓细胞的凋亡数量,降低凋亡率,同时改善大鼠脊髓细胞的病理形态,促进康复,黄连素对脊髓损伤大鼠的作用机制可能与下调脊髓细胞中 BMP-4 的表达有关。

[关键词] 黄连素;神经元活性;骨形态发生蛋白 4(BMP-4);脊髓损伤

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2021)02-0005-05

Study of BBR on HE Pathology, BMP-4 mRNA Expression and Neuronal Activity in Rats with Spinal Cord Injury

WU Jianjun^{1△} LIANG Guiqing¹ ZHENG Changkun¹ XU Qiang² XU Jialong²

¹Fuzhou Second Hospital Affiliated of Xiamen University, Fuzhou 350007, China;

²Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.

Abstract Objective: To study the effects of berberine (BBR) on hematoxylin eosin (HE) pathology, bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) mRNA expression and neuronal activity in rats with spinal cord injury. **Methods:** The rats in the Guangdong medical SD rat center were randomly divided into spinal cord injury group (S group); healthy control group (H group); berberine group (B group), each with 6 rats. Flow cytometry, TUNEL method, HE staining method, immunohistochemistry method, and qRT-PCR method were used to detect the number of spinal cord cell apoptosis, the degree of spinal cord cytopathy, the expression BMP-4 protein and mRNA in spinal cord cells and the difference in the apoptosis rate of spinal cord cells in groups S, B, and H to explore the effects of berberine (BBR) on HE pathology, BMP-4 mRNA expression and neuronal activity in rats with spinal cord injury. **Results:** The number of apoptotic cells in B group was significantly more than that in S group ($P<0.05$). The apoptosis of neurons in B group was significant less than that in H

group ($P<0.05$). Compared with S group, the spinal cord edema in B group was alleviated, the degree of injury tended to improve, and the number of cell necrosis decreased. Compared with S group, the number of BMP-4 positive cells in B group was significantly lower than S group ($P<0.05$).

基金项目:福建省自然科学基金项目(2018J01364)

¹ 厦门大学附属福州第二医院(福州, 350007)

² 福建中医药大学

△通信作者 E-mail: wjj7101522@163.com

Compared with B group, the number of BMP-4 positive cells in H group was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with S group, the expression of BMP-4 mRNA and BMP-2 mRNA in B group were significantly lower than S group ($P < 0.05$). Compared with B group, the expression of BMP-4 mRNA and BMP-2 mRNA in H group were significantly decreased and significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Berberine (BBR) has a certain therapeutic efficacy for spinal cord injury of rats. The number of rat spinal cord apoptosis can be significantly reduced after BBR intervention, and the rate of apoptosis is reduced. At the same time, berberine (BBR) can improve the pathological morphology of rat spinal cord cells and promote recovery. The mechanism of BBR on spinal cord injury rats may be related to down-regulation of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) expression in spinal cord cells.

Keywords: berberine (BBR); neuronal activity; bone morphogenetic protein 4 (BMP-4); spinal cord injury

脊髓损伤 (SCI) 是临床中常见的疾病之一, 该病的主要发病原因为外力损伤, 例如车祸、打击伤、坠落伤等^[1]。近年来 SCI 的发病率逐年上升, 给患者带来巨大的影响, 同时给社会造成严重经济负担^[2]。骨形态发生蛋白 4 (BMP-4) 是 TGF- β 家族中的一员, 研究表明 BMP-4 与神经系统的修复有着密切的关联^[3]。研究人员通过免疫组化法发现在整个中枢神经系统的星形胶质细胞、灰质的神经纤维、多巴胺能神经元、去甲肾上腺素能神经元中均观察到 BMP-4 表达, 说明 BMP-4 在中枢神经系统发育过程中具有重要作用^[4]。黄连素又名小檗碱, 属于活性生物碱的一种, 是从植物中提取的。研究表明黄连素有抗菌、抗氧化等诸多药理作用, 该药物能够对临床常见疾病有一定治疗效果。近年来黄连素在神经系统疾病中的作用日益被重视。本研究探究黄连素对脊髓损伤大鼠 HE 病理、BMP-4 mRNA 表达及神经元活性的影响。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

在广东省医学 SD 大鼠中心购买 18 只雄性 SD 大鼠, 体质量 224~292 g, 鼠龄接近。将所购买的大鼠随机分为脊髓损伤组 (S 组), 该组大鼠制作脊髓损伤大鼠模型; 健康对照组 (H 组), 该组大鼠在脊椎做切口后不做任何处理; 黄连素组 (B 组), 该组大鼠制作脊髓损伤模型后腹腔注射黄连素; 每组各 6 只。

1.2 模型制备

大鼠禁食 12 h 后, 麻醉, 大鼠面部向下, 剔除背毛并用酒精消毒, 消毒后在肋骨下缘找到椎骨, 在后背正中开刀, 划开皮肤, 暴露出脊髓。将大鼠固定在打击器基座上, 调试相应参数, 打击脊髓, 造成脊髓损伤后, 常规冲洗伤口, 缝合。造模完成后, 维持大鼠正常生命, 正常进食、饮水, 并按摩大鼠腹部, 协助排尿、排便。同时, 给予 B 组大鼠腹腔注射黄连素治疗, 1 次/d, 根据体质量给药, 每次 10 mg/kg, 持续治疗 1 周。在此期间所有大鼠在相同环境下生活, 并保持鼠笼清洁卫生。

将三组大鼠分别断头处死, 完整切取受损脊髓组

织, 以损伤点为中心切取脊髓 1 cm 制成 10% 脊髓匀浆, 1 600 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 取脊髓细胞为材料进行后续试验。

1.3 仪器与试剂

黄连素 (宁陕国圣生物科技公司); 荧光显微镜 (上海万衡精密仪器公司); 苏木精 (宝鸡市辰光生物公司); DBA (上海晶抗生物工程公司)。

1.4 观察指标

1.4.1 流式细胞法 利用 Annexin-V-FITC 试剂盒对脊髓细胞凋亡情况进行检测, 选取 1×10^6 个细胞, 震荡, 静止 15 min, 加入 1 mL HEPES 缓存液再次震荡混匀。以 488 nm 波长对 FITC 及 PI 荧光进行检测以观察脊髓细胞凋亡情况。

1.4.2 TUNEL 法 将盖玻片置于 6 孔板内, 种入细胞培养过夜, 使约为 70%~80% 满。随后严格按照厂家说明书进行 TUNEL 染色。加 Vectashield Hard Set 封固涂片样本, 标记反应, 于荧光显微镜下观察染色结果并拍照。

1.4.3 苏木精-伊红 (HE) 染色法 取三组大鼠脊髓细胞, 固定 15 min, 石蜡包埋, 5 μ m 切片, 用山羊血清进行封闭处理, 苏木精染色液复染分别为 6~8 min, 观察脊髓细胞形态。

1.4.4 免疫组化法 切片常规脱蜡、水化, 加阻断过氧化物酶, PBS 漂洗, 加一抗 BMP-4 (1:150), 孵育, 漂洗, 加二抗, 重复以上步骤, 甩干后滴加 DBA 显色剂, 苏木素, 脱水、透明、封片, 观察。

1.4.5 qRT-PCR 法 把保存在 -80 $^{\circ}$ C 环境中脊髓细胞取出, 研磨, 提取总 RNA, 进行逆转录。所有反应严格按照反应的条件进行扩增, 内参采用 GAPDH, 变性 3 min 95 $^{\circ}$ C, 变性 5 s 95 $^{\circ}$ C, 退火 1 min 60 $^{\circ}$ C, 共进行 40 次。取平均值后得到 Ct 值, 计算方法用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。引物序列见表 1。

1.5 统计学方法

通过 SPSS22.0 软件进行结果整理, S 组、B 组、H 组大鼠脊髓神经元细胞凋亡情况、BMP-4 mRNA 的表达量、BMP-4 蛋白阳性表达情况、细胞病变程度的

表 1 引物序列

基因	方向	引物序列
BMP-2	F	5'-CAGAGACCCACCCCAGCA-3'
	R	5'-CTGTTTGTGTTTGGCTTGAC-3'
BMP-4	F	5'-GGCGAACGCACGTTG-3'
	R	5'-GAGACACGCGCGCGT-3'
GAPDH	F	5'-TGGACTCTACTGGCGTCTT-3'
	R	5'-TGTCATATTTCTCGTGGTTCA-3'

差异性采用方差分析,组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

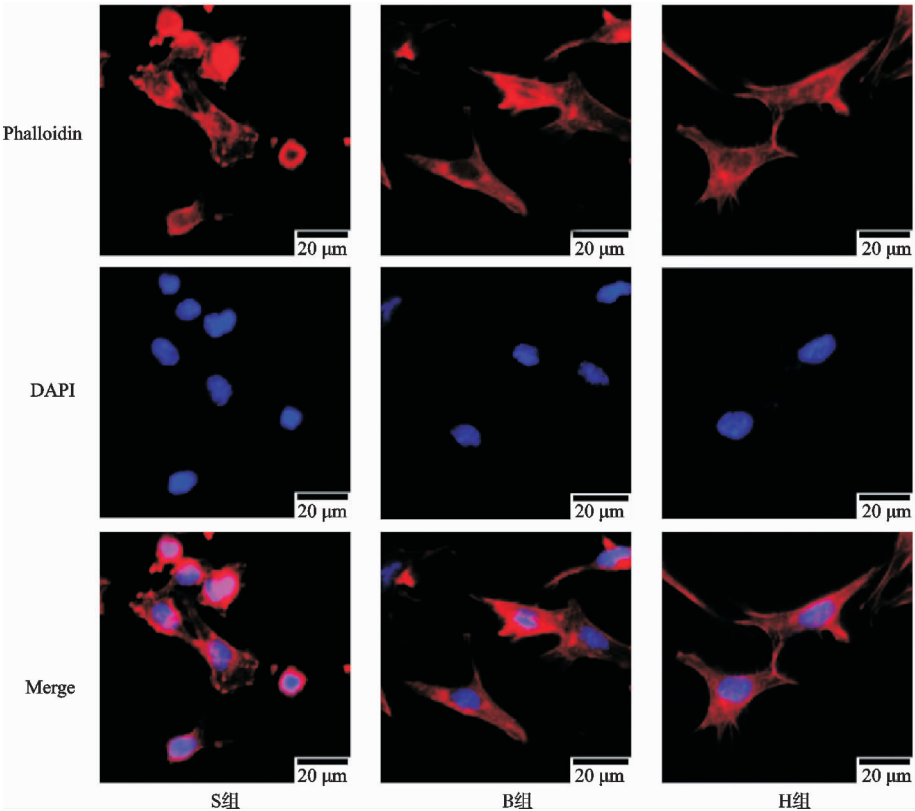


图 1 神经元细胞凋亡情况(×200)

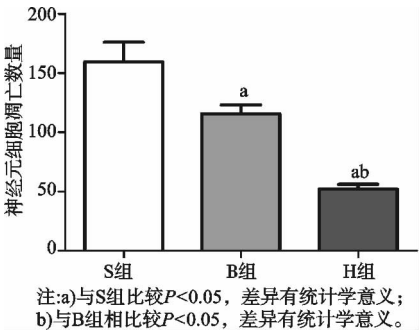


图 2 神经元细胞凋亡数量

2.2 S 组、B 组、H 组大鼠脊髓神经元细胞凋亡率

S 组、B 组、H 组大鼠神经元细胞凋亡率为 $37.36\% \pm 5.38\%$, $28.09\% \pm 3.75\%$, $28.09\% \pm 3.75\%$ 。S 组大鼠神经元细胞凋亡数量最多,H 组大鼠神经元细胞凋亡数量最少;B 组与 S 组相比较,B 组神经元细胞的凋亡情况显著减少,差异有统计学意义

2.1 S 组、B 组、H 组大鼠脊髓中神经元细胞凋亡数量比较

结果显示:S 组、B 组、H 组大鼠脊髓神经元细胞凋亡数量分别为 158.43 ± 43.64 , 112.63 ± 31.42 , 59.49 ± 15.74 ;H 组神经元细胞凋亡数量最少,S 组神经元细胞凋亡最多;S 组与 B 组相比较,S 组神经元细胞凋亡数量显著多于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$);B 组与 H 组相比较,B 组神经元细胞凋亡数量显著多于 H 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。大鼠脊髓神经元细胞凋亡情况见图 1-2。

($P<0.05$),结果见图 3。

2.3 S 组、B 组、H 组大鼠脊髓细胞病变程度

H 组大鼠脊髓细胞正常,未见明显变化,无胶质细胞增生;S 组大鼠脊髓细胞出现明显异常,灰白质内有大量出血,有轻度水肿现象,结构疏松化,胞元坏死数目大量增加;与 S 组比较,B 组大鼠脊髓水肿减轻,损伤程度有好转趋势,细胞坏死数目有所减少,结果见图 4。

2.4 S 组、B 组、H 组大鼠脊髓细胞中 BMP-4 蛋白阳性表达

由图 5 可知:S 组脊髓细胞中 BMP-4 阳性数最多,H 组脊髓细胞中 BMP-4 阳性数最少;与 S 组相比较,B 组脊髓细胞中 BMP-4 阳性数显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 B 组相比较,H 组细胞 BMP-4 阳性数显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

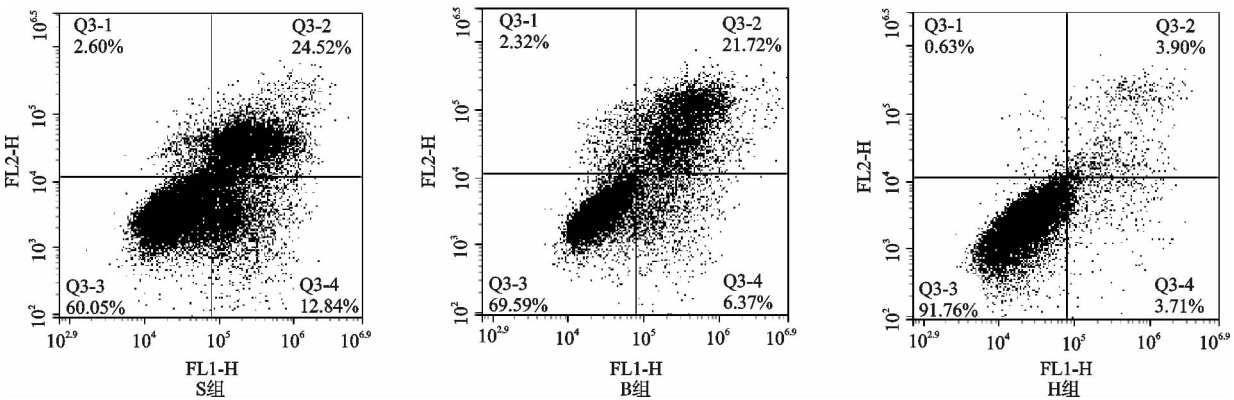


图 3 神经元细胞凋亡率

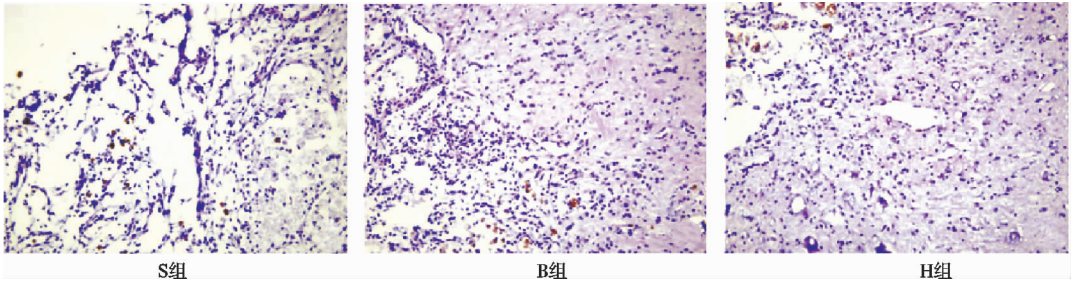


图 4 脊髓细胞病变程度(×400)

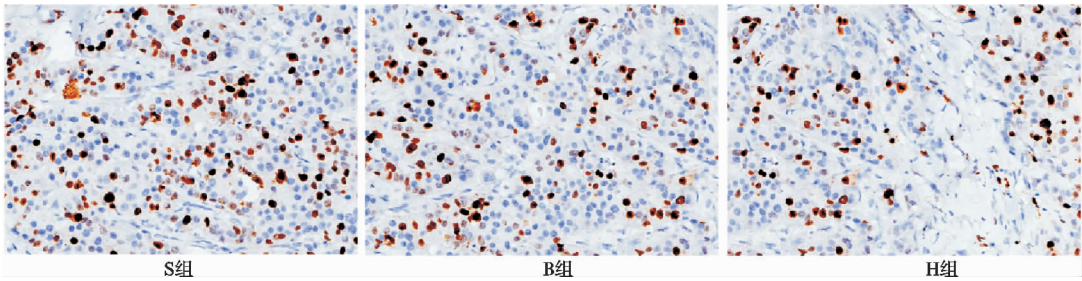


图 5 BMP-4 蛋白阳性表达(×200)

2.5 S 组、B 组、H 组大鼠脊髓细胞中 BMP-4/BMP-2 mRNA 的表达量比较

qRT-PCR 检测结果显示:S 组、B 组、H 组脊髓细胞中 BMP-4 mRNA 表达量分别为 1.01 ± 0.14 , 0.67 ± 0.09 , 0.32 ± 0.07 ; S 组、B 组、H 组脊髓细胞中 BMP-2 mRNA 表达量分别为 0.37 ± 0.08 , 0.69 ± 0.10 , 0.89 ± 0.12 ; H 组脊髓细胞内的 BMP-4 mRNA 表达量最低, BMP-2 mRNA 表达量最高; S 组脊髓细胞内的 BMP-4 mRNA 表达量最高, BMP-2 mRNA 表达量最低; B 组与 S 组相比较, B 组大鼠 BMP-4 mRNA 表达量显著降低, BMP-2 mRNA 表达量显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); H 组与 B 组相比较, H 组 BMP-4 mRNA 表达量显著降低, BMP-2 mRNA 表达量显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见图 6。

3 讨论

脊髓损伤为临床中脊柱损伤最严重的并发症之一, SCI 发病原因有多种, 可能是暴力外伤引起的, 例如暴力压迫、撕裂等, 也可能是机体出现异常变化或疾

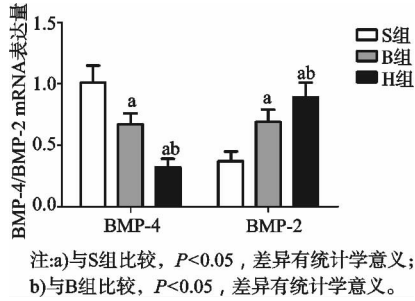


图 6 BMP-4/BMP-2 mRNA 表达量

病而引起的^[5]。SCI 的临床表现为脊髓震荡、休克等。脊髓受伤部位不同, 所造成的伤害也不尽相同, 例如若第一、二脊髓出现损伤, 则受伤患者多数立即死亡, 救治希望渺茫^[6]。SCI 对机体造成危害较大, 预后差, 因此发病时的早期治疗在整个治疗过程中占重要地位, 可通过现场救护、急诊救治等专业操作来为患者提供救治。临床中常采用皮质类固醇、神经节苷脂等药物治疗 SCI^[7]。

黄连素是一种重要的生物碱, 是我国应用很久的中药, 可从黄连、黄柏、三颗针等植物中提取, 具有显著的抑菌作用。黄连素能对抗病原微生物, 对多种细菌

如结核杆菌、肺炎球菌等都有抑制作用。黄连素是临床的常用药物之一,近年来发现黄连素在神经系统疾病中具有一定的效果,例如 AD、癫痫及缺血性脑血管病等,猜测其作用机制可能与其抗炎、抗氧化的药理作用有关^[8]。黄连素具有显著的抗心力衰竭、抗心律失常、降低胆固醇、抑制血管平滑肌细胞增殖、改善胰岛素抵抗、抗血小板、抗炎等作用,因而在心血管系统和神经系统疾病方面可能有广泛、重要的应用前景,日益受到重视。本研究结果表明 S 组脊髓细胞凋亡数量显著多于 B 组,B 组脊髓细胞凋亡数量显著多于 H 组。与 S 组比较,B 组大鼠脊髓水肿减轻,损伤程度有好转趋势,细胞坏死数目有减少。表明黄连素能够治疗脊髓损伤大鼠,改善大鼠脊髓细胞的病变程度,缓解大鼠神经元细胞的凋亡速率,提高大鼠的神经功能。文献报道,黄连素可以保护血脑屏障的完整性,减少炎症细胞渗透入脑内,也可通过直接抑制胶质细胞的激活,减少炎症细胞因子的分泌,这两种途径可能都参与了黄连素治疗神经系统疾病^[9]。动物实验表明^[10]在脊髓损伤大鼠体内检测到神经元细胞增殖的活性显著降低,由此猜想脊髓损伤的发生发展可能通过神经元细胞的活性来展现。在实验中发现,黄连素作用于患病大鼠时,大鼠体内神经元细胞的活性随之上升,且随着作用时间的增长,大鼠的运动功能、神经功能等评分都有显著上升,表明黄连素对脊髓损伤大鼠有一定的治疗效果^[11]。大量研究表明,黄连素能够抑制脊髓神经损伤大鼠的脊髓细胞凋亡,促进脊髓细胞增殖,显著改善脊髓细胞形态学变化。给予脊髓损伤大鼠黄连素进行治疗后,试验结果显示黄连素可以上调大鼠脊髓损伤组织的自噬活性,降低损伤部位细胞的死亡率,从而促进神经功能恢复,且实验结果显示黄连素是通过降低 Caspase-3 的表达水平进而减少细胞凋亡的。实验结果表明黄连素在 SCI 小鼠脊髓组织的康复过程中占重要地位,黄连素能够抑制神经细胞凋亡的速率,促进其再生功能,黄连素这一作用机制可能与其抑制线粒体氧化损伤、降低凋亡蛋白表达有关。黄连素与脊髓损伤的关系为脊髓损伤的诊断和治疗发展提供新的科研方向^[12]。

骨形态发生蛋白(BMPs)是一类 TGF- β 超家族蛋白,不仅参与胚胎时期骨组织的发育,对成年骨缺损修复及机体某些骨疾患的发生过程均有重要意义,而且在脂肪、肾脏、肝脏及神经系统发育中起一定作用。有研究表明 BMPs 在神经系统发育的不同时期、不同部位,均起着相当重要的作用,且对神经干细胞的作用相当复杂。研究发现通过将标记的 BMP-4 移植治疗大鼠脑中动脉闭塞的卒中小鼠模型中,发现梗塞面积明显缩小,说明 BMP-4 具有神经保护功能^[13]。实验结果

发现:与 S 组相比较,B 组大鼠 BMP-4 mRNA 表达量显著降低,BMP-2 mRNA 表达量显著上升;与 B 组相比较,H 组 BMP-4 mRNA 表达量显著降低,BMP-2 mRNA 表达量显著上升。实验结果表明:在正常大鼠脊髓中 BMP-4 mRNA 的表达水平与脊髓损伤大鼠脊髓中 BMP-4 mRNA 的表达水平存在显著差异,其中后者 BMP-4 mRNA 的表达水平明显升高,说明 BMP-4 在脊髓损伤的过程中占重要地位^[14]。研究表明下调 BMP-4 的表达能够促进脑缺血大鼠神经树突的生长,同时促进大鼠神经功能恢复,推测 BMP-4 在脊髓损伤的早期起到了保护作用^[15-17]。实验结果表明:成年 SD 大鼠脊髓损伤原代培养的细胞中 BMP-2 的表达水平显著低于健康大鼠脊髓细胞中 BMP-2 的表达水平,同时在给予相应治疗后的脊髓损伤大鼠脊髓细胞中 BMP-2 的表达水平出现显著上升趋势,说明 BMP-2 可刺激反应性星形胶质细胞的增殖,同时在脊髓细胞的恢复过程中起重要作用^[18-19],本实验研究结果与上述结论相符。

综上所述,黄连素对脊髓损伤大鼠具有一定治疗作用,黄连素干预后能够显著减少大鼠脊髓细胞的凋亡数量,降低凋亡率,同时改善大鼠脊髓细胞的病理形态,促进康复。黄连素对脊髓损伤大鼠的作用机制可能与下调脊髓细胞中 BMP-4 的表达有关。

参考文献

- [1] MA J K, MCCracken L A, VOSS C, et al. Physical activity measurement in people with spinal cord injury: comparison of accelerometry and self-report (the physical activity recall assessment for people with spinal cord injury)[J]. Disability & Rehabilitation, 2020, 42(2): 240-246.
- [2] PRZYDACZ M, CHLOSTA P, CORCOS J. Recommendations for urological follow-up of patients with neurogenic bladder secondary to spinal cord injury [J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50: 1005-1016.
- [3] 王军建, 刘鑫, 刘方娜, 等. 孕期尼古丁暴露所致子代成骨细胞 BMP-4/Smad 信号通路的变化[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(11): 63-67.
- [4] 李珏丹, 王敏, 代泉, 等. 骨形态发生蛋白-4 和-7 对人牙周膜干细胞增殖和成骨分化的影响[J]. 山西医科大学学报, 2019, 50(5): 614-620.
- [5] ZHANG T, NI S F, LUO Z X, et al. The protective effect of microRNA-21 in neurons after spinal cord injury[J]. Spinal Cord, 2019, 57: 141-149.
- [6] SUN G D, LI G Q, LI D H, et al. hucMSC derived exosomes promote functional recovery in spinal cord injury mice via attenuating inflammation [J]. Materials Science