

· 实验研究 ·

# 益气化痰方联合干细胞移植促进 脊髓损伤修复的实验研究<sup>※</sup>

● 周瑞娟<sup>1</sup> 卢晓惠<sup>1</sup> 张秋萍<sup>1</sup> 陈海鹏<sup>1</sup> 徐浩<sup>2</sup> 刘书芬<sup>2</sup> 徐乐勤<sup>1▲</sup>

**摘要** 目的:观察益气化痰方联合过表达 Mash-1 修饰的胚胎干细胞对小鼠脊髓损伤的修复作用。方法:采用钳夹法建立小鼠急性脊髓损伤模型,于造模后第3天将 Mash-1 修饰的胚胎干细胞移植到脊髓损伤部位,并给予益气化痰方干预。通过观察小鼠的后肢功能评分、脊髓的剩余面积以及神经营养因子、炎症因子和凋亡相关基因的表达改变;并采用免疫荧光检测 OCT3/4、nestin、 $\beta$ -tubulin III、GFAP 的阳性细胞数目,分析移植细胞在体内的存活和分化情况。结果:与模型组比较,益气化痰方可减少炎症因子 TNF- $\alpha$  和凋亡基因 caspase-3 的表达,轻微提高小鼠运动功能。与单纯干细胞移植组比较,益气化痰方联合 Mash-1 修饰胚胎干细胞移植能减少炎症因子 TNF- $\alpha$  的基因表达水平,提高移植细胞的存活数量,进而改善小鼠的后肢运动评分。结论:益气化痰方能减轻脊髓损伤的炎症反应,增加移植细胞在脊髓损伤部位的存活数量,促进脊髓损伤的修复。

**关键词** 脊髓损伤;益气化痰方;胚胎干细胞;Mash-1;细胞移植;细胞存活

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统损伤,全球范围每年平均每百万人口中约有 10.4~83 人发生 SCI<sup>[1]</sup>。该疾病可导致严重的运动、感觉和自主神经功能障碍,给患者日常生活带来极大的痛苦,同时也给家庭和社会带来沉重的负担。细胞移植是目前神经再生领域研究热点之一,也是最有希望治愈 SCI 的方法之一<sup>[2]</sup>。当前可用于移植的细胞种类有诱导性多潜能干细胞(induced pluripotent

stem cells, IPS)、神经干细胞、间充质干细胞、胚胎干细胞、嗅鞘细胞、雪旺细胞等<sup>[2-3]</sup>。本课题组前期实验表明,过表达 Mash-1 基因可促进胚胎干细胞(CE3 小鼠胚胎干细胞)在体外<sup>[4]</sup>和脊髓损伤部位向神经细胞分化<sup>[5]</sup>。在实验中,本课题组也观察到移植细胞在脊髓损伤部位的存活数量较少。文献报道,移植细胞的存活数量多少与脊髓损伤的炎症环境密切相关<sup>[6]</sup>。

在既往的研究中,本课题组观察到益气化痰方可减轻慢性脊髓损伤的炎症反应<sup>[7]</sup>;促进背根节细胞表达 BDNF<sup>[8]</sup>,抑制 caspase-3 和 bax 的表达<sup>[9-10]</sup>,进而减少背根节细胞的凋亡。由此可见,益气化痰方具有改善炎症反应,促进周围神经损伤修复的作用。因此,本实验拟在前期研究基础上,进一步观察益气化痰方联合移植过表达 Mash-1 基因的胚胎干细胞对脊髓损伤的修复作用。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** KM 种小鼠 60 只,雄性,无特殊病原体

**※基金项目** 1. 国家自然科学基金青年科学基金项目(No.81603642);2. 福建省卫生计生中青年骨干人才培养项目(No.2018-ZQN-89)

**▲通讯作者** 徐乐勤,男,副主任医师,医学博士。研究方向:中医药促进脊髓神经损伤修复的研究。E-mail:xuleqin@163.com

**• 作者单位** 1. 福建中医药大学附属厦门中医院(福建 厦门 361009);2. 上海中医药大学脊柱病研究所/上海中医药大学附属龙华医院(上海 200032)

(specific pathogen free, SPF)级, 6~8周龄, 体重(20±2)g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号: SCXK(沪)2017-0005。

**1.2 试剂** DMEM、L-gul、 $\beta$ -mercaptoethanol、胰酶(GIBCO公司, 美国); FBS(BIOCHROM公司, 英国); LIF 细胞因子(CHEMICON公司, 美国); nestin 抗体、 $\beta$ -tubulin III 抗体(Abcam公司, 英国); 荧光二抗(KPL公司, 美国); 逆转录试剂盒、荧光素酶(TAKARA公司, 日本)。益气化痰汤剂由上海中医药大学附属龙华医院提供(组成: 黄芪 15g, 党参 12g, 丹参 9g, 川芎 9g, 人工麝香 0.03g。煎煮浓度为 1g 生药/mL)。

**1.3 细胞悬液的制备** 按前期的实验方法培养 Mash-1 基因修饰的小鼠胚胎干细胞(CE3-Mash-1 细胞)<sup>[5]</sup>。细胞移植注射前, 采用 0.125% 胰酶消化, 终止后吹打成单个细胞悬液, 离心, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 2 次, 通过计数板计数确定细胞总数, 然后用生理盐水重悬细胞, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^4$  个/ $\mu$ L 备用, 移植前将细胞悬液置于冰上保存。

**1.4 小鼠急性脊髓损伤模型建立、分组及治疗给药** 小鼠购买后适应性喂养 3 天。按体重随机分为假手术组、模型组、益气化痰方组(以下简称中药组)、Mash-1 修饰胚胎干细胞移植组(以下简称干细胞组)、益气化痰方联合 Mash-1 修饰胚胎干细胞移植组(以下简称联合组)。假手术组只暴露脊髓不予 Dumont 5 号镊夹持损伤脊髓。其余各组按 Plemel JR 报道<sup>[11]</sup>的方法建立急性脊髓损伤模型, 具体步骤如下: 采用氯胺酮腹腔注射麻醉小鼠(给药剂量 0.05 mL/10g 体重), 麻醉后将小鼠固定于俯卧位, 逐层暴露 T13 节段脊髓, 随后采用 Dumont 5 号镊从前后方向夹持脊髓 15s, 无菌纱布轻轻压迫止血, 逐层缝合。术后第 1 天, 采用小鼠后肢运动功能(Basso mouse scale, BMS)评分<sup>[8]</sup>验证模型是否成功。所有动物术后连续 3 天给予腹腔注射 50,000U/kg 的青霉素; 挤压膀胱辅助排尿至自身排尿反射恢复。

术后第 3 天, 根据小鼠体重, 采用氯胺酮麻醉小鼠, 固定于俯卧位, 碘伏常规消毒, 拆除背部的缝线, 直接暴露损伤的脊髓节段。暴露完成后, 干细胞组及联合组用 10 $\mu$ L 的微量进样器抽取之前准备好的细胞悬液, 移植的细胞数目为  $1 \times 10^5$  个, 即 2 $\mu$ L 的细胞悬液, 注射到脊髓损伤部位中心, 垂直进针, 进针深度为 1.5mm, 以缓慢的速度注射, 注射后留针 2min; 假手术

组、模型组、中药组给予注射 2 $\mu$ L 生理盐水。

待小鼠苏醒后, 中药组、联合组给予益气化痰汤剂(0.1mL/10g 体重)灌胃; 假手术组、模型组、干细胞组给予等体积生理盐水灌胃。每天灌胃 1 次, 连续给药 4 周。各组小鼠分别于建模后的 1、7、14、21、28 天进行 BMS 评分。

**1.5 脊髓标本的取材与固定** 分别于脊髓损伤建模后的 14 和 28 天, 采用 10% 水合氯醛麻醉, 每组处死 6 只小鼠。其中, 3 只小鼠的脊髓标本放置于 4% 多聚甲醛中固定, 另 3 只小鼠脊髓标本放置于液氮中保存, 择期抽提总 RNA。小鼠脊髓标本经 4% 多聚甲醛固定 16h 后倒去固定液, 清水冲洗 2h 后, 将标本放置于 15% 和 25% 蔗糖溶液中各脱水 24h, 最后去除蔗糖溶液, 经 OCT 胶包埋, 冰冻切片将小鼠脊髓切成 5 $\mu$ m 厚度组织切片, 用防脱载玻片粘取组织。切片完成后放置于室温通风 1 天, 晾干切片, 装入切片盒中, 放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

**1.6 HE 染色** 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱取出切片, 室温放置 10min; 将切片放置于清水中 5min; 苏木素 2min; 清水冲洗; 0.04% 的盐酸酒精分化 5s; 清水冲洗; 2% 氨水返蓝 10min; 清水冲洗; 伊红 2min; 清水冲洗; 85%、95%、100% 梯度乙醇各 2min; 二甲苯 I、二甲苯 II、二甲苯 III 各 2min; 中性树胶封片; 60 $^{\circ}$ C 烤箱烘烤过夜; Olympus 相差显微镜采片。

**1.7 免疫荧光染色** 从 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中取出切片, 放置于 PBS 中浸泡 5min, 取出切片放置于湿盒中, 用纸巾擦除组织周围的水分, 蛋白酶 K 消化 10min(修复抗原), PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 0.5% PBST 通透 20min, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 加入 5% BSA 封闭 20min, 加一抗 OCT3/4、nestin、 $\beta$ -tubulin III、GFAP(1:500 稀释), 4 $^{\circ}$ C 过夜。37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 1h, PBS 洗 5min $\times$ 3 次, 红色荧光标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1h, PBS 洗 5min $\times$ 3 次, 加入 1 $\mu$ g/mL 的 DAPI 室温避光孵育 10min, PBS 洗 2min $\times$ 3 次, 荧光显微镜下采片。阴性对照用 PBS 代替一抗。

**1.8 RNA 抽提及 real-time PCR** 从液氮中取出脊髓组织, 用分析天平称取 100mg 脊髓组织, 用去酶的眼科剪将脊髓组织剪碎, 加入 1mL TRIZOL, 常规抽提总 RNA, 经紫外分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度后, 采用 TAKARA 逆转录试剂盒按试剂盒实验步骤将 RNA 转录成 cDNA, 随后进行实时荧光定量 PCR 检测 BDNF、CNTF、NGF、NT3、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MIP2、

caspase-3、bax、bcl-2及β-actin的基因表达情况。

根据 GenBank 检索目的基因序列设计引物,采用 primer 5 软件设计扩增引物序列,由华大基因公司合

成引物序列。各基因名称和序列见表1。PCR结果采用 ΔCt 法进行分析(Ct 为循环阈值)和 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示各组间各基因的表达差异。

表1 神经营养因子、炎症因子和凋亡相关基因名称和引物序列

基因名称	pubmedNM号	上、下游引物序列5'→3'	产物长度
神经营养因子相关基因	BDNF	NM_007540.4 AAGCAACAAGTTCCCCAGCGGT CACGCCGATCCTTTGCCCACTG	145
	CNTF	NM_170786.2 TCCACAGCCAGGAATTTGCTGCC TGCTCTGCCAAAGCCATCCCCTA	194
	NGF	NM_013609.2 TCCACAGCCAGGAATTTGCTGCC TGCTCTGCCAAAGCCATCCCCTA	104
	NT3	NM_008742.3 TCCTCAGCCATTGACATTC AAGTCAGTGCTCGGACATAG	199
炎症因子相关基因	IL-1	NM_010554.4 TCCAGGATGAGGACATGAGCAC GAACGTCACACACCAGCAGGTTA	105
	IL-6	NM_031168.1 CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA GCAAGTGCATCATCCTTGTTTCATAC	112
	TNF-α	NM_013693.2 GTTCTATGGCCCAGACCCTCAC GGCACCAGTCTGCTGCTCTTTG	175
	MIP2	NM_009140.2 CCAACCACCAGGCTACAGG GCTTCAGGCTCAAGGCAA	187
凋亡相关基因	caspase-3	NM_009810.2 TCTGACTGGAAAAGCCGAAACT GACTGGATGAACCACGACCC	204
	bax	NM_007527.3 GGATGCGTCCACCAAGAAG CAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC	194
	bcl-2	NM_009741.3 TGAACCGGCATCTGCACACCTG GCCCAGGTATGCACCCAGAGTGA	170
内参基因	β-actin	NM_007393.3 GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG	150

**1.9 统计方法** 应用 SPSS 20.0 统计分析软件处理数据,计量资料数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。先对各组数值变量进行正态性分析,不符合正态分布的数据采用非参数检验。符合正态分布的数据,进一步检验方差齐性。方差齐时两组间数据比较采用独立样本 *t* 检验,多组数据间的比较采用单因素方差分析 *LSD-t* 法检验。方差不齐时,组间数据比较采用非参数 *Mann-Whitney U* 检验。

## 2 结果

**2.1 功能评分** 术后第1天,假手术组的小鼠后肢的运动功能均为正常,评分值为9分;造模后各造模

组的小鼠后肢出现明显运动功能障碍,评分均为0。术后第7天,即细胞注射和给药后第4天,干细胞组和联合组的小鼠后肢运动功能有部分恢复,与模型组和中药组比较均具有统计学差异( $P < 0.05$ )。在造模后的第14、21和28天,干细胞组和联合组的小鼠后肢运动功能进一步恢复,与模型组和中药组比较均具有统计学差异( $P < 0.01$ )。在造模后第21和28天时,联合组小鼠后肢运动功能明显优于单纯细胞移植的干细胞组,比较具有统计学差异( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。中药组小鼠的后肢运动功能评分略高于模型组,但无明显的统计学差异( $P > 0.05$ )。见图1、表2。



注:由图可见,假手术组小鼠后肢着地有力,足趾分开,尾巴抬起;模型组小鼠后肢不能弯曲;中药组小鼠的后肢可轻微弯曲;干细胞组和联合组小鼠后肢功能明显改善,可弯曲后肢使足掌着地

图1 术后第28天各组小鼠的后肢运动功能照片

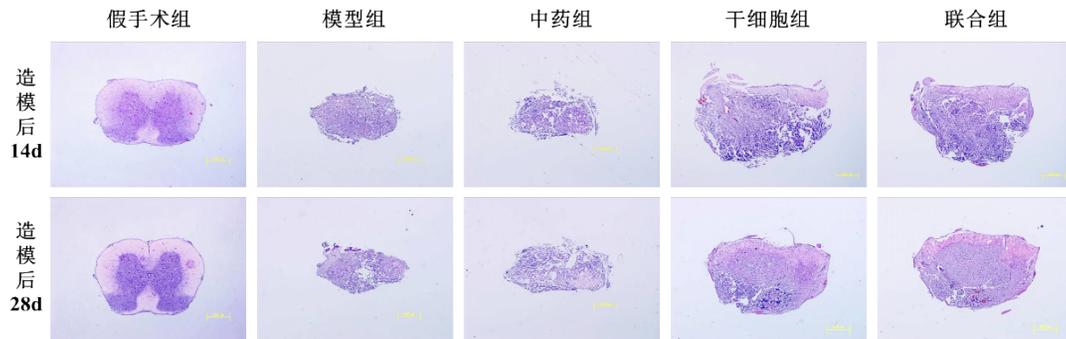
表2 BMS评分(分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	0d(n=12)	1d(n=12)	7d(n=12)	14d(n=12)	21d(n=6)	28d(n=6)
假手术组	9.00±0.00	9.00±0.00	9.00±0.00	9.00±0.00	9.00±0.00	9.00±0.00
模型组	9.00±0.00	0.00±0.00	0.15±0.38	0.31±0.48	0.29±0.49	0.43±0.53
中药组	9.00±0.00	0.00±0.00	0.23±0.44*	0.38±0.51**	0.57±0.53**	1.00±0.58**
干细胞组	9.00±0.00	0.00±0.00	0.93±0.83*	1.58±0.67***	2.33±0.52***	3.83±0.75***
联合组	9.00±0.00	0.00±0.00	0.92±0.76*^	2.15±0.69***	3.86±0.69*****	5.14±0.69*****

注:与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与中药组比较,^ $P < 0.05$ ,^^ $P < 0.01$ ;与干细胞组比较,\*\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.01$

**2.2 脊髓横切面 HE 染色** 从脊髓横切面 HE 染色可见,在造模后的14天和28天时,模型组和中药组小鼠的脊髓横切面剩余面积明显减少,与假手术组比较存在统计学差异( $P < 0.01$ )。干细胞组和联合组的小

鼠脊髓剩余面积均有明显的恢复,与模型组和中药组比较具有统计学差异( $P < 0.01$ )。假手术组、干细胞组和联合组三组间的脊髓剩余面积无明显差异( $P > 0.05$ )。见图2、表3。



注:假手术组脊髓横切面结构完整,白质与灰质界限清楚;各造模组的脊髓横切面结构破坏,灰白质边界不清楚,空洞形成,脊髓剩余面积减少。其中,模型组的剩余面积减少最严重,干细胞组和联合组的脊髓剩余面积得到明显恢复(40×)

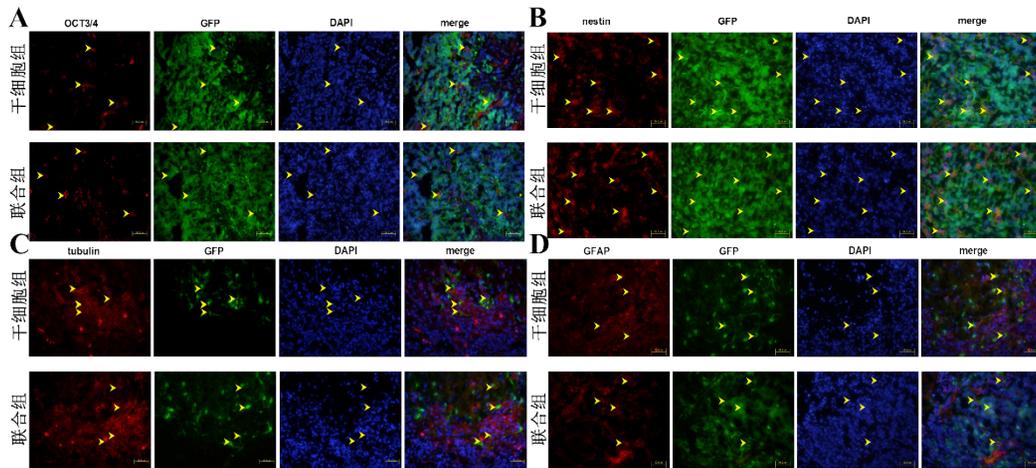
图2 造模后14d和28d时各组脊髓横切面HE染色图

表3 脊髓横切面剩余面积( $\mu\text{m}^2, \bar{x} \pm s$ )

	视野数(N)	剩余面积	
		14d	28d
假手术组	6	3875412±153194***	3662351±385243***
模型组	6	1389964±330025	984183±174695
中药组	6	1232627±321714	1392189±425541
干细胞组	6	3416964±456603***	3337663±491618***
联合组	6	3518813±427436***	3652260±465623***

注:与模型组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与中药组比较,^^ $P < 0.01$

**2.3 免疫荧光结果** 由于CE3胚胎干细胞带有GFP,因此可在荧光显微镜下通过绿色荧光跟踪移植细胞在体内的存活数量和所在位置,进一步通过带红色荧光的二抗与不同的一抗结合可观察到移植的细胞在体内的存活和分化情况。免疫荧光染色结果显示,干细胞组与联合组的OCT3/4、nestin、 $\beta$ -tubulin III、GFAP四种细胞标记蛋白的阳性细胞比例无明显差别,见图3和表4。但在造模后的第28天,联合组的细胞存活数目明显多于干细胞组。见图4、表5。



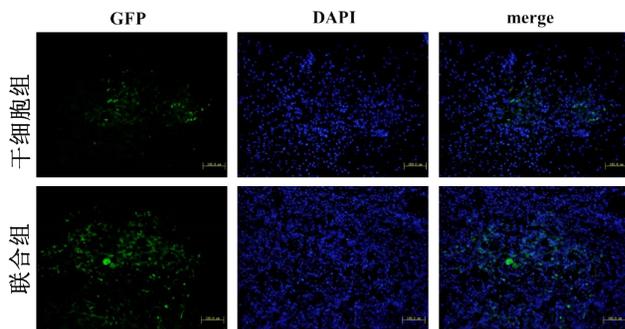
注: A 为 OCT3/4, B 为 nestin, C 为  $\beta$ -tubulin III, D 为 GFAP; GFP 为移植细胞发出的绿色荧光, DAPI 为所有细胞核的染色, 三者重叠则为移植细胞在体内表达 OCT3/4、nestin、 $\beta$ -tubulin III、GFAP 的阳性细胞, 分别标示为未分化的 CE3 细胞、神经干细胞、神经元细胞和胶质细胞, 如▶所示( $\times 400$ )

图3 术后第 14d 和 28d, 脊髓组织免疫荧光染色图

表4 移植细胞在损伤脊髓部位的分化情况( $\%, \bar{x} \pm s$ )

组别	造模后第 14d		造模后第 28d	
	OCT3/4	nestin	$\beta$ -tubulin III	GFAP
干细胞组	50.51 $\pm$ 9.67	50.57 $\pm$ 7.52	60.39 $\pm$ 12.49	39.21 $\pm$ 4.85
联合组	45.09 $\pm$ 8.43	51.27 $\pm$ 9.77	54.83 $\pm$ 7.16	43.83 $\pm$ 14.05

注: 两各细胞移植组的 OCT3/4、nestin、 $\beta$ -tubulin III、GFAP 四种细胞标记蛋白的阳性细胞比例无明显差别( $P > 0.05$ )



注: 联合组 GFP 阳性的细胞数量明显多于干细胞组( $\times 200$ )

图4 造模 28d 后干细胞组和联合组的移植细胞在脊髓损伤部位的存活情况图

表5 造模 14 和 28d 后两组移植细胞的存活数量(个,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	14d	28d
干细胞组	1400 $\pm$ 345	170 $\pm$ 78
联合组	1519 $\pm$ 336	513 $\pm$ 171 <sup>##</sup>

注: 与干细胞组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$

**2.4 基因表达改变情况** 本实验主要检测各组小鼠损伤脊髓的神经营养因子(BDNF、CNTF、NGF、NT-3)、炎症因子(IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MIP-2)和凋亡相关基因

(caspase-3、bax、bcl-2)的表达情况。在造模 14 天时, 模型组的炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MIP-2 和凋亡相关基因 caspase-3 的表达明显增高; 中药组的炎症因子 IL-1、TNF- $\alpha$  和凋亡相关基因 caspase-3 的表达相对模型组减少, 同时神经营养因子 BDNF 的表达略微升高; 干细胞组和联合组小鼠的炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MIP-2 和凋亡相关基因 caspase-3 的表达明显降低, 同时神经营养因子的 BDNF、CNTF、NGF、NT-3 表达均有升高。此时, 干细胞组和联合组在以上几种基因的表达无明显差别(见图 5 A)。在脊髓损伤 28 天时, 模型组小鼠脊髓的炎症因子 TNF- $\alpha$  和神经营养因子 BDNF、NT-3 的表达相对假手术组均有升高; 中药组的炎症因子 TNF- $\alpha$  表达相对模型组降低, 同时略微增加神经营养因子 BDNF 的表达; 干细胞组小鼠的炎症因子 TNF- $\alpha$  和神经营养因子 BDNF、CNTF、NT-3 的表达均升高; 而联合组的神经营养因子 BDNF、CNTF、NT-3 的表达上升, 且相对模型组和干细胞组其炎症因子 TNF- $\alpha$  表达明显下降(见图 5 B)。

### 3 讨论

益气化痰方能轻微改善小鼠脊髓损伤后的神经功能, 可能通过减少炎症因子 IL-1、TNF- $\alpha$  和凋亡相关基因 caspase-3 的表达, 促进神经营养因子 BDNF、NT-3 的表达, 进而减轻脊髓的继发性损伤。文献报道, 益气化痰方可以减轻慢性脊髓损伤和椎间盘退变引起的炎症反应<sup>[7,12]</sup>。在之前的实验中, 益气化痰方可减少的背根节神经细胞<sup>[9]</sup>和椎间盘纤维环细胞<sup>[13-14]</sup>、软

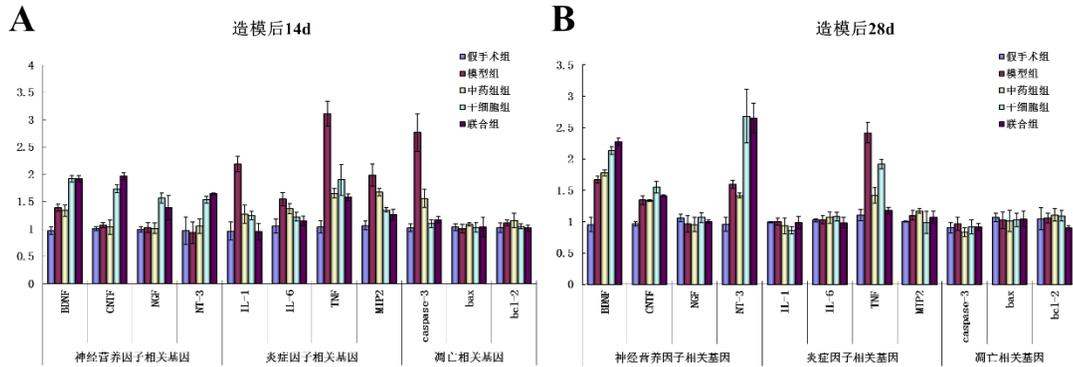


图5 造模后 14 d 和 28d 各组神经营养因子、炎症因子和凋亡相关基因的表达情况图

骨细胞<sup>[15]</sup>表达 caspase-3 和 bax 基因。本研究表明,益气化痰方联合干细胞移植能显著保留脊髓的横切面剩余面积,减少炎症因子 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MIP-2 和凋亡相关基因 caspase-3 的表达,同时增加神经营养因子的 BDNF、CNTF、NGF、NT-3 表达,增加移植细胞在损伤脊髓部位的存活,进而提高小鼠后肢运动功能。

益气化痰方由黄芪、党参、川芎、丹参、人工麝香组成。方中重用黄芪,其味甘,性微温,入脾、肺,具有补中益气、利水消肿之功,可大补脾胃之元气,使气旺血行、瘀去络通而为君。党参补中益气,健脾益肺为臣,与黄芪合用以增强健脾益气之功。川芎辛、温,行气开郁、活血止痛,善行血中之气;丹参活血化瘀、行气止痛,配合川芎则有行气活血、祛瘀生新之效,共为佐药。使以麝香辛香走窜,活血通络、散瘀止痛,以助黄芪、丹参行气化痰之功。全方共奏益气化痰通络之效。

脊髓损伤后炎症因子的表达明显上升,实验研究表明通过减轻脊髓损伤后的炎症反应具有一定的治疗作用。中药黄芪、丹参和川芎均具有提高 SOD 活性,减少继发性损伤,促进神经功能恢复<sup>[16-18]</sup>。而且,中药有效组分麝香提取物、丹参酮 IIA 和黄芪总苷对神经损伤后的多条信号通路进行调节,进而起到提高神经元存活、促进轴突再生、抑制细胞凋亡和抗炎等作用<sup>[19-22]</sup>。神经营养因子主要由少突胶质细胞和星形胶质细胞分泌,具有营养神经元、促进轴突生长等作用。文献报道,中药复方(痉证方<sup>[23]</sup>、补阳还五汤<sup>[24]</sup>、活血通督汤<sup>[25]</sup>、通窍活血汤<sup>[26]</sup>、桃红四物汤<sup>[27]</sup>)、单味中药(黄芪<sup>[28-29]</sup>、丹参<sup>[16]</sup>)和中药有效组分(川芎嗪<sup>[30]</sup>、麝香酮<sup>[31]</sup>)具有促进神经营养因子 NGF、BDNF、CNTF 和 NT-3 的基因表达。脊髓损伤后的凋亡相关基因高表

达,引起神经细胞凋亡也是导致脊髓神经功能障碍的主要原因之一。活血通督汤<sup>[32]</sup>、补阳还五汤<sup>[33]</sup>、活血醒脑方<sup>[34]</sup>、血府逐瘀汤<sup>[35]</sup>等活血化瘀复方均具有减少神经凋亡的作用。黄芪配伍丹参或配伍川芎可减少大鼠出血或缺血模型的脑细胞凋亡<sup>[36-37]</sup>。在中药单体方面,丹酚酸 B<sup>[38]</sup>和川芎嗪<sup>[39-40]</sup>能调节自噬、氧化应激反应,减少脊髓损伤后 caspase-3 的表达,保护线粒体,从而减少神经细胞凋亡。现代药理还表明黄芪、丹参、党参和川芎可以保护血管内皮、调节血流状态、改善局部微循环、清除氧自由基、减轻脂质过氧化损害,并具有一定的调节免疫、抗炎镇痛的作用<sup>[18,41-44]</sup>。脊髓损伤后,上述中药一方面可以通过减轻炎症反应、清除自由基、调节免疫等保护正常的神经元和髓鞘,另一方面可以通过改善损伤微环境、增加血供,为存活的神经细胞提供营养物质,为移植细胞提供有利的微环境,增加移植细胞的存活,从而促进轴突和髓鞘的再生,最终达到促进脊髓神经功能修复的作用。

### 参考文献

- [1] KARSY M, HAWRYLUK G. Modern Medical Management of Spinal Cord Injury [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(9): 65.
- [2] ASSINCK P, DUNCAN G J, HILTON B J, et al. Cell transplantation therapy for spinal cord injury [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(5): 637-647.
- [3] SHAO A, TU S, LU J, et al. Crosstalk between stem cell and spinal cord injury: pathophysiology and treatment strategies [J]. *Stem cell research & therapy*, 2019, 10(1): 238.
- [4] 徐乐勤, 丁道芳, 李晓锋, 等. 过表达 Mash-1-1 基因促进小鼠胚胎干细胞向神经细胞分化的研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2015, 29(12): 1553-1559.
- [5] 徐乐勤, 李晓锋, 施 杞, 等. Mash-1 转染对胚胎干细胞在小鼠脊髓损伤部位向神经细胞分化的促进作用 [J]. *中国康复理论与实践*, 2016, 22(1): 46-52.
- [6] WILEMS T S, PARDIECK J, IYER N, et al. Combination therapy of stem cell derived neural progenitors and drug delivery of anti-inhibitory

- molecules for spinal cord injury [J]. *Acta biomaterialia*, 2015, 95 (28): 23-32.
- [7] 谢兴文, 施 杞, 王拥军. 益气化痰补肾方对大鼠慢性脊髓损伤后影响的实验研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2009, 43(8): 61-63.
- [8] 舒 冰, 李晓锋, 徐乐勤, 等. 益气化痰方对大鼠腰神经根损伤后脑源性神经营养因子表达的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(3): 280-286.
- [9] 徐乐勤, 李晓锋, 张有为, 等. 益气化痰方对腰神经压迫模型大鼠背根节神经细胞凋亡和 caspase-3 表达的影响 [J]. *中西医结合学报*, 2010, 8(12): 1174-1179.
- [10] 徐乐勤, 张有为, 李晓锋, 等. 益气化痰方对腰神经压迫模型大鼠神经根组织 Bax 和 Bcl-2 的表达影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2011, 19(4): 1-4.
- [11] PLEMEL J R, DUNCAN G, CHEN K W, et al. A graded forceps crush spinal cord injury model in mice [J]. *Journal of neurotrauma*, 2008, 25(4): 350-370.
- [12] 施 杞, 李晨光, 王拥军, 等. 益气化痰补肾方延缓椎间盘退变机制研究 [J]. *医学研究杂志*, 2007, 36(8): 76-77.
- [13] 周 泉, 王拥军, 施 杞, 等. 益气化痰方对椎间盘纤维环细胞凋亡的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2005, 39(4): 50-52.
- [14] 周 泉, 王拥军, 施 杞, 等. 益气化痰方及其拆方对大鼠椎间盘纤维环细胞凋亡相关因子的作用 [J]. *中西医结合学报*, 2005, 3(6): 51-54.
- [15] 孙 鹏, 王拥军, 施 杞, 等. 益气化痰方对椎间盘软骨细胞凋亡相关因子的作用 [J]. *中国骨伤*, 2006, 19(8): 449-451.
- [16] 刘 杨, 高玉亭, 苗宇船. 丹参注射液对大鼠脊髓损伤后脑源性神经营养因子及胰岛素样生长因子-1 表达的影响 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2018, 38(3): 272-275.
- [17] 罗俊普, 王志国, 吴一凡. 黄芪对脊髓损伤大鼠 SOD 活性及 GFAP 表达的影响及意义 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2016, 3(31): 6267.
- [18] 王小菊, 苏 军. 丹参川芎嗪对大鼠脊髓损伤后神经功能恢复的作用 [J]. *西南国防医药*, 2018, 28(11): 1063-1066.
- [19] LIN J, PAN X, HUANG C, et al. Dual regulation of microglia and neurons by Astragaloside IV-mediated mTORC1 suppression promotes functional recovery after acute spinal cord injury [J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2020, 24(1): 671-685.
- [20] YIN X, YIN Y, CAO F-L, et al. Tanshinone IIA attenuates the inflammatory response and apoptosis after traumatic injury of the spinal cord in adult rats [J]. *Public Library of Science (PLoS)*, 2017, 7(6): e38381.
- [21] 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.
- [22] 刘 磊, 卫 昊, 徐立. 不同剂量麝香、冰片对大鼠脑 IR 模型神经功能缺损评分、脑 COX-2 和 5-LOX 活性及海马 CysLT2 表达的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2018, 17(12): 1241-1214.
- [23] 马迎辉, 胡志俊, 周重建, 等. 痿症方联合嗅鞘细胞移植对脊髓慢性压迫损伤后神经营养因子表达的影响 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(47): 9210-9215.
- [24] YANG P, CHEN A, QIN Y, et al. Buyang huanwu decoction combined with BMSCs transplantation promotes recovery after spinal cord injury by rescuing axotomized red nucleus neurons [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2019, 22(8): 123-131.
- [25] 范 筱, 汪今朝, 刘 宇, 等. 活血通督汤促进脊髓损伤大鼠肢体运动功能恢复的神经营养机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(10): 4611-4615.
- [26] 江 颖, 王凯华, 方 兴, 等. 中药通窍活血汤对脑缺血再灌注大鼠神经营养因子及氧自由基的影响 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(7): 3085-3093.
- [27] 吴欢茹. 桃红四物汤对脑缺血再灌注大鼠脑源性神经营养因子的调节作用研究 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2018.
- [28] 谷新怡, 刘爱伟, 苏 艳, 等. 黄芪注射液对视神经牵拉伤大鼠 NGF、TrkA 表达的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(1): 26-29.
- [29] 孙 丽, 刘英北, 王 岭, 等. 黄芪注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤后 BDNF 表达的影响 [J]. *世界中医药*, 2016, 11(4): 686-689.
- [30] 孙丹丹, 王丹巧. 川芎嗪对脑、脊髓损伤的保护作用及其机制研究进展 [J]. *中国生化药物杂志*, 2014, 34(4): 179-183.
- [31] 姜 涛, 黄李法, 周水晶, 等. 麝香酮对脑损伤大鼠脑保护作用的研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(6): 724-728.
- [32] 林庆宾, 张 俐. 活血通督汤对脊髓缺血再灌注损伤神经细胞凋亡的影响 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2014, 22(8): 1-3, 8.
- [33] 仇志富, 吴晓光. 补阳还五汤对脑损伤大鼠脑组织凋亡信号通路的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(16): 3979-3982.
- [34] 王 墨, 梁兴波, 刘佳文, 等. 活血醒脑方对颅脑损伤大鼠模型神经细胞凋亡的影响 [J]. *四川中医*, 2019, 37(10): 29-33.
- [35] 王学敏, 安 聪, 黄宗轩, 等. 血府逐瘀汤对重型颅脑损伤大鼠脑细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax 的影响 [J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(2): 166-169.
- [36] 蒋迎佳, 张 怡. 黄芪丹参 1:1 配伍对缺氧缺血性脑损伤乳鼠脑组织神经细胞凋亡的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(6): 1300-1303.
- [37] 张 梅, 李 平. 黄芪、川芎及其配伍对脑缺血后凋亡相关基因表达影响的实验研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2002, 8(7): 16-17.
- [38] HONGMING Z, YI L, LEI S, et al. Salvianolic acid B activates Wnt/ $\beta$ -catenin signaling following spinal cord injury [J]. *Pubmed*, 2020, 19(2): 825-832.
- [39] 都芳涛, 方继峰, 李兴晶, 等. 川芎嗪通过抗氧化及抗炎作用改善脊髓损伤 [J]. *中医药学报*, 2018, 46(6): 95-98.
- [40] 郑怀亮, 郭晓辉, 李艳侠, 等. 川芎嗪对脊髓缺血再灌注损伤自噬相关蛋白影响的实验研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2019, 27(12): 5-8, 12.
- [41] 陈冬梅, 蒙 洁, 刘佳佳, 等. 基于网络药理学的党参增强免疫功能机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(2): 184-187, 288-289.
- [42] 吕 琴, 赵文晓, 王世军, 等. 黄芪活血功效及现代药理学研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(9): 215-224.
- [43] 朱天碧, 张 钊, 罗 飘, 等. 党参药理学作用的相关研究进展 [J]. *神经药理学*, 2018, 8(6): 46.
- [44] 李海刚, 胡晒平, 周 意, 等. 川芎主要药理活性成分药理研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2018, 23(11): 1302-1308.

(收稿日期: 2020-04-21)

(本文编辑: 金冠羽)