仙茅苷对脊髓损伤大鼠的神经保护作用研究Δ

刘　娜[1*]，黄培培[2]，杨　静[1]，李亚菲[1]（1.濮阳医学高等专科学校基础医学部，河南 濮阳　457000；2.郑州大学第一附属医院神经重症病区，郑州　450052）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）12-1469-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.12.10

摘　要　目的　基于人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因诱导的假定激酶1（PINK1）/E3泛素连接酶Parkin信号通路探讨仙茅苷（CUR）对脊髓损伤（SCI）大鼠的神经保护作用。**方法**　以雄性SD大鼠为对象，随机选取15只作为假手术组，其余大鼠以脊髓撞击法建立SCI模型并将造模成功的大鼠分为模型组、CUR低剂量组（36 mg/kg CUR，灌胃）、CUR高剂量组（72 mg/kg CUR，灌胃）、CUR高剂量+3-甲基腺嘌呤（3-MA）组（72 mg/kg CUR，灌胃+20 mg/kg自噬抑制剂3-MA，腹腔注射），每组15只。各组大鼠给予相应药液/生理盐水，每天1次，持续28 d。于给药后第14、28天对各组大鼠进行Basso-Beattie-Bresnahan（BBB）评分和Rivlin斜板实验；观察各组大鼠脊髓组织的病理学变化，检测其脊髓组织的细胞凋亡情况、氧化应激因子[丙二醛（MDA）、超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽（GSH）]水平以及脑源性神经营养因子（BDNF）、胶质细胞原纤维酸性蛋白（GFAP）、PINK1、Parkin、p62、微管相关蛋白轻链3（LC3）蛋白的表达水平。**结果**　与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织可见明显的水肿和出血，并伴有大量炎症细胞浸润，其BBB评分和斜板角度，SOD和GSH水平，BDNF、PINK1、Parkin蛋白的表达水平和LC3Ⅱ/Ⅰ比值均显著降低，脊髓组织的细胞凋亡率、MDA水平和GFAP、p62蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组大鼠脊髓组织水肿、出血、炎症细胞浸润均有所减少，上述各定量指标均显著改善（$P<0.05$）；3-MA可显著逆转CUR对上述指标的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　CUR能促进SCI大鼠神经功能和运动功能的恢复，改善其脊髓组织病理损伤并抑制细胞凋亡，上述作用可能与CUR可激活PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬有关。

关键词　仙茅苷；脊髓损伤；神经保护；PINK1/Parkin信号通路；线粒体自噬

Study on the neuroprotective effect of curculigoside on rats with spinal cord injury

LIU Na[1], HUANG Peipei[2], YANG Jing[1], LI Yafei[1] (1. School of Basic Medicine, Puyang Medical College, Henan Puyang 457000, China; 2. Neurological Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the neuroprotective effect of curculigoside (CUR) on rats with spinal cord injury (SCI) based on phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten gene-induced putative kinase 1 (PINK1)/E3 ubiquitin ligase Parkin signaling pathway. **METHODS** Taking male SD rats as subjects, 15 rats were randomly selected as sham operation group; the rest rats were chosen to establish SCI model by spinal cord impact method, and then were divided into model group, CUR low-dose group (36 mg/kg CUR, gavage), CUR high-dose group (72 mg/kg CUR, gavage) and CUR high-dose+3-methyladenine (3-MA) group (72 mg/kg CUR, gavage+20 mg/kg autophagy inhibitor 3-MA, intraperitoneal injection), with 15 rats in each group. Rats in each group were given corresponding liquid/normal saline, once a day, for 28 consecutive days. Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score and Rivlin inclined plate experiment were performed on the 14th and 28th day after administration; the pathological changes of spinal cord tissue in rats were observed in each group; the apoptosis of spinal cord tissue, the levels of oxidative stress factors [malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH)], and the protein expressions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial fibrillary acidic protein (GFAP), PINK1, Parkin, p62 and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) were all determined. **RESULTS** Compared with the sham operation group, obvious edema and bleeding in the spinal cord tissue of rats were observed in the model group, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration; BBB score and inclined plate angle, SOD and GSH levels, the protein expressions of BDNF, PINK1 and Parkin, and LC3Ⅱ/Ⅰ ratio were significantly reduced; the apoptosis rate, MDA level, the protein expressions of GFAP and p62 in spinal cord tissue were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the model group, the edema, bleeding and infiltration of inflammatory cells in the spinal cord tissue of rats were

Δ**基金项目**　2022年河南省医学教育研究项目（No.Wjlx2022278）

＊**第一作者**　讲师，硕士。研究方向：脊柱脊髓损伤再生修复。E-mail：pyyzln@126.com

reduced in the administration groups, and the above quantitative indicators had been significantly improved ($P<0.05$); 3-MA could significantly reverse the improvement effects of the above indexes by CUR ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** CUR can promote the recovery of neurological and motor functions in SCI rats, improve the pathological injury of the spinal cord and inhibit apoptosis, which may be related to mitochondrial autophagy mediated by activating the PINK1/Parkin signaling pathway.

KEYWORDS curculigoside; spinal cord injury; neuroprotection; PINK1/Parkin signaling pathway; mitochondrial autophagy

脊髓损伤（spinal cord injury，SCI）是由直接或间接施加到脊髓的外力所致。SCI发生后，损伤部位的神经元损失、轴突变性和脱髓鞘将进一步导致脊髓发生功能性或器质性变化，从而引起原发性和继发性损伤[1]。其中，继发性损伤又可通过炎症细胞浸润、氧化应激和凋亡信号级联启动等一系列生物学过程来加剧神经元的损伤，故在此过程中及时进行神经保护干预可抑制神经元的进一步坏死，促进神经功能的恢复[2]。由此可见，恢复SCI神经功能可能是SCI治疗的潜在途径之一。

天然化合物具有安全性高、作用靶点多等特点，是药物开发的重要来源[3]。仙茅苷（curculigoside，CUR）是从中药仙茅中提取的一种天然抗氧化剂，具有抗炎、抗抑郁、抗骨质疏松等作用，可保护阿尔茨海默病大鼠的神经系统并有效抑制其海马区神经元的凋亡[4]。研究指出，线粒体自噬可清除受损线粒体，对维持线粒体稳态和神经元存活具有关键作用[5]。人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因诱导的假定激酶1（phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten gene-induced putative kinase 1，PINK1）/E3泛素连接酶Parkin信号通路是神经退行性疾病相关线粒体自噬的重要靶点之一。其中，PINK1主要定位于受损线粒体的外膜，可将细胞质中的Parkin蛋白招募到线粒体内并激活Parkin蛋白下游信号的转导，从而激活线粒体自噬，进而有利于SCI神经元损伤的恢复[6]。基于此，本研究拟基于PINK1/Parkin信号通路，初步探讨CUR对SCI大鼠神经损伤的保护作用，以期为CUR的进一步开发利用和SCI的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

LW100V型光学显微镜购自西安测维光电技术有限公司；CKX 53型倒置荧光显微镜购自日本Olympus公司；Multiskan™ FC型酶标仪购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司；ChemiDoc MP型凝胶成像系统购自伯乐生命医学产品（上海）有限公司；SpectraMax® QuickDrop™型超微量分光光度计购自美谷分子仪器（上海）有限公司。

1.2 主要药品和试剂

CUR对照品（批号YT63684，纯度≥98%）和丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、谷胱甘肽（glutathione，GSH）检测试剂盒（批号分别为SY6486、YK-08006、YK-08694）均购自北京伊塔生物科技有限公司；自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤（3-methyladenine，3-MA）原料药（批号HY-19312，纯度99.91%）购自美国MedChemExpress公司；苏木精-伊红（HE）混合染色液（批号R22179）购自上海源叶生物科技有限公司；TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（批号KGA7072）购自江苏凯基生物技术股份有限公司；兔脑源性神经营养因子（brain-derived neurotrophic factor，BDNF）单克隆抗体、兔胶质细胞原纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）多克隆抗体、兔微管相关蛋白轻链3（microtubule-associated protein light chain 3，LC3）多克隆抗体、兔p62单克隆抗体、鼠PINK1单克隆抗体、鼠Parkin、鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）单克隆抗体（批号分别为ab108319、ab7260、ab128025、ab207305、ab186303、ab77924、ab8245）均购自英国Abcam公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗、山羊抗鼠IgG二抗（批号分别为AP31L014、AP31L025）均购自和元李记（上海）生物技术有限公司。

1.3 实验动物

SPF级SD雄性大鼠80只，体重（220±20）g，购自郑州大学（河南省实验动物中心），动物生产许可证号为SCXK（豫）2022-0001。所有大鼠均饲养于温度26 ℃、相对湿度60%的环境中，自由摄食、饮水。本研究方案经濮阳医学高等专科学校伦理委员会批准，批号PY20230122。

2 方法

2.1 SCI大鼠模型的制备

所有大鼠适应性喂养1周后，随机选取15只大鼠作为假手术组，其余65只大鼠均参照文献[7]的方法建立SCI模型：大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉，于胸椎T9处行椎板切除术，暴露脊髓；以稳定夹支撑脊柱和暴露的T10脊髓，将10 g的金属棒从25 mm的高度垂直落下撞击脊髓，造成损伤；随后，缝合肌肉并用金属夹夹闭皮肤；术后，每天手动排空大鼠膀胱2次，直

至膀胱功能恢复。当造模大鼠受撞击处的脊髓出现水肿、出血且硬脊膜呈紫红色时，表示SCI模型制备成功[7]。假手术组大鼠仅暴露脊髓，不进行撞击实验。

2.2 动物分组与给药

将造模成功的60只大鼠（造模过程中死亡5只）随机分为模型组、CUR低剂量组、CUR高剂量组、CUR高剂量+3-MA组，每组15只。CUR低、高剂量组大鼠分别灌胃CUR 36、72 mg/kg（以生理盐水为溶剂）[4]，同时腹腔注射生理盐水；CUR高剂量+3-MA组大鼠先灌胃CUR 72 mg/kg，30 min后再腹腔注射3-MA 20 mg/kg（以生理盐水为溶剂）[8]；每天1次，持续28 d。假手术组和模型组大鼠均以灌胃和腹腔注射的方式给予等体积生理盐水。

2.3 大鼠神经功能和运动功能评估

分别在给药后第14、28天对各组大鼠进行Basso-Beattie-Bresnahan（BBB）评分和Rivlin斜板实验，以分别评估其神经功能和运动功能。（1）BBB评分共有22个等级（即0～21分），0分表示后肢完全瘫痪，21分表示后肢完全正常。评分前，将各组大鼠置于空旷平地上适应性活动3 min，然后观察其后肢情况，分别对左、右后肢进行评分，取平均值。（2）Rivlin斜板实验的具体操作如下：将各组大鼠横向放置于水平的木板上，以5°为梯度值逐渐增大木板的倾斜角度，测量其在木板上停留5 s且不掉落的最大斜板角度，重复测量3次并取平均值。

2.4 大鼠脊髓组织病理学观察

采用HE染色法观察。末次运动功能测试结束后，各组大鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉并断颈处死，剖开背部并以脊髓损伤部位为中心取1 cm^3的脊髓组织（假手术组大鼠取相同部位脊髓组织，下同）。每组取5只大鼠的脊髓组织固定于4%多聚甲醛中；另10只大鼠的脊髓组织冻存于－80 ℃下，备用。取固定于4%多聚甲醛（24 h）中的大鼠脊髓组织，脱水后制备石蜡切片（厚度4 μm）；切片经常规脱蜡、水化后进行HE染色，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗后行乙醇梯度脱水和二甲苯透明，清洗、晾干并以中性树脂封片，使用光学显微镜观察各组大鼠脊髓组织的病理学变化。

2.5 大鼠脊髓组织中细胞凋亡情况检测

采用TUNEL染色法检测。取“2.4”项下各组大鼠的脊髓组织切片，经脱蜡、水化后按照TUNEL细胞凋亡检测试剂盒说明书方法操作，加入现配的TUNEL工作液50 μL，于37 ℃下孵育1 h；用PBS清洗，再加入4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染液适量，避光孵育5 min；用PBS清洗，以含抗荧光淬灭剂的封片剂封片，使用倒置荧光显微镜观察神经元染色情况并按下式计算凋亡率：凋亡率（%）＝凋亡阳性细胞（呈绿色）数/细胞总数×100%。每张切片任选5个视野观察、计数，取平均值。

2.6 大鼠脊髓组织中氧化应激因子水平检测

取“2.4”项下冻存的各组5只大鼠的脊髓组织适量，以PBS匀浆，在4 ℃下以1 000×g离心10 min，取上清液，按相应试剂盒说明书方法操作，采用TBA微板法以酶标仪检测其脊髓组织中MDA水平，采用微量法以超微量分光光度计检测SOD、GSH水平。

2.7 大鼠脊髓组织中BDNF、GFAP蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.4”项下各组大鼠的脊髓组织切片，脱蜡、水化后进行抗原修复，然后以5%牛血清白蛋白封闭30 min；洗涤后，分别加入BDNF、GFAP一抗（稀释比例均为1∶500），于4 ℃下孵育过夜；洗涤后，加入相应二抗（稀释比例为1∶500），于室温下孵育1 h；经DAB显色、脱水透明后以中性树脂封片，使用光学显微镜观察大鼠脊髓组织中BDNF、GFAP蛋白的表达情况。每张切片任选5个视野，利用Image-Pro Plus 6.0软件分析并检测阳性区域（呈棕色或深棕色）的光密度值（取平均值），用以表示BDNF、GFAP蛋白的表达水平，结果以假手术组为参照进行归一化处理。

2.8 大鼠脊髓组织中通路及自噬相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取“2.4”项下冻存的各组剩余5只大鼠的脊髓组织适量，以RIPA蛋白裂解液裂解、匀浆，以8 000×g离心15 min，收集上清液，以BCA法测定蛋白浓度后将其煮沸变性。取变性蛋白样品适量，进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯凝胶电泳分离并转移到聚偏二氟乙烯膜上，用5%脱脂牛奶封闭1 h；洗膜后，加入通路相关蛋白（PINK1、Parkin）、自噬相关蛋白（p62、LC3）、内参蛋白（GAPDH）一抗（稀释比例分别为1∶1 000、1∶1 000、1∶1 000、1∶500、1∶2 500），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例均为1∶500），于室温下孵育2 h；经ECL显影后于凝胶成像系统成像。使用Image J软件分析各蛋白的条带灰度值，以PINK1、Parkin、p62与内参蛋白的条带灰度值比值表示PINK1、Parkin、p62蛋白的表达水平，以LC3Ⅱ与LC3Ⅰ蛋白的条带灰度值比值（LC3Ⅱ/Ⅰ比值）表示LC3蛋白的表达情况。

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用SNK-q检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 CUR对SCI大鼠神经功能和运动功能的影响

给药后第14、28天，与假手术组比较，模型组大鼠的BBB评分和斜板角度均显著降低或减小（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组大鼠的BBB评分和斜板角度均显

著升高或增大（$P<0.05$）；与CUR高剂量组比较，CUR高剂量+3-MA组大鼠的BBB评分和斜板角度均显著降低或减小（$P<0.05$）。结果见表1。

表1　各组大鼠BBB评分和斜板角度比较（$\bar{x}\pm s$，$n=15$）

组别	BBB评分/分		斜板角度/°	
	第14天	第28天	第14天	第28天
假手术组	21.37±2.11	21.62±1.97	63.45±4.87	65.72±5.11
模型组	5.84±0.53[a]	6.36±0.69[a]	31.83±2.46[a]	33.98±2.74[a]
CUR低剂量组	9.96±1.24[b]	11.35±1.13[b]	45.61±2.75[b]	49.37±3.82[b]
CUR高剂量组	13.75±1.42[b]	15.84±1.26[b]	54.23±3.47[b]	60.86±4.67[b]
CUR高剂量+3-MA组	7.28±0.64[bc]	8.17±0.90[bc]	36.26±2.14[bc]	39.19±2.43[bc]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与CUR高剂量组比较，$P<0.05$。

3.2　CUR对SCI大鼠脊髓组织病理学的影响

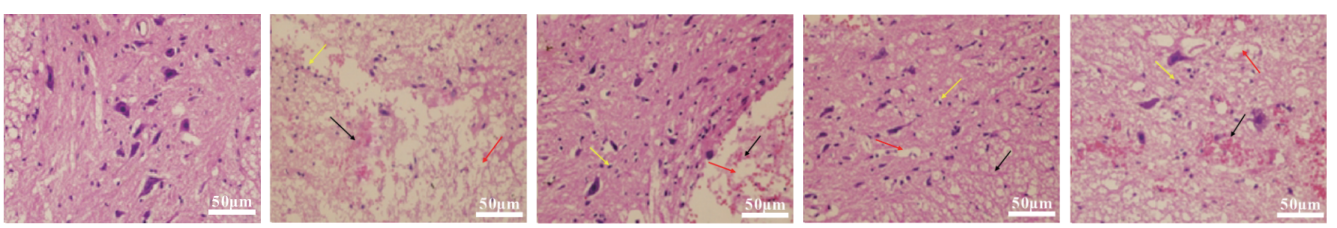
假手术组大鼠脊髓组织结构完整，无炎症细胞浸润；与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织损伤严重，组织水肿和出血明显，且伴随大量炎症细胞浸润；与模型组比较，各药物组大鼠脊髓组织水肿和出血均有不同程度好转，炎症细胞浸润减少，结构逐渐恢复正常；与CUR高剂量组比较，CUR高剂量+3-MA组大鼠脊髓组织出现水肿和出血，炎症细胞浸润明显。结果见图1。

3.3　CUR对SCI大鼠脊髓组织中细胞凋亡的影响

与假手术组[（4.28±0.35）%]比较，模型组大鼠脊髓组织中细胞凋亡明显增多，其凋亡率[（48.63±2.94）%]显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，CUR低、高剂量组和CUR高剂量+3-MA组大鼠脊髓组织中细胞凋亡明显减少，其凋亡率[（32.72±2.15）%、（20.57±1.86）%、（43.69±2.47）%]均显著降低（$P<0.05$）；与CUR高剂量组比较，CUR高剂量+3-MA组大鼠脊髓组织中细胞凋亡明显增多，其凋亡率显著升高（$P<0.05$）。结果见图2。

3.4　CUR对SCI大鼠脊髓组织中氧化应激因子水平的影响

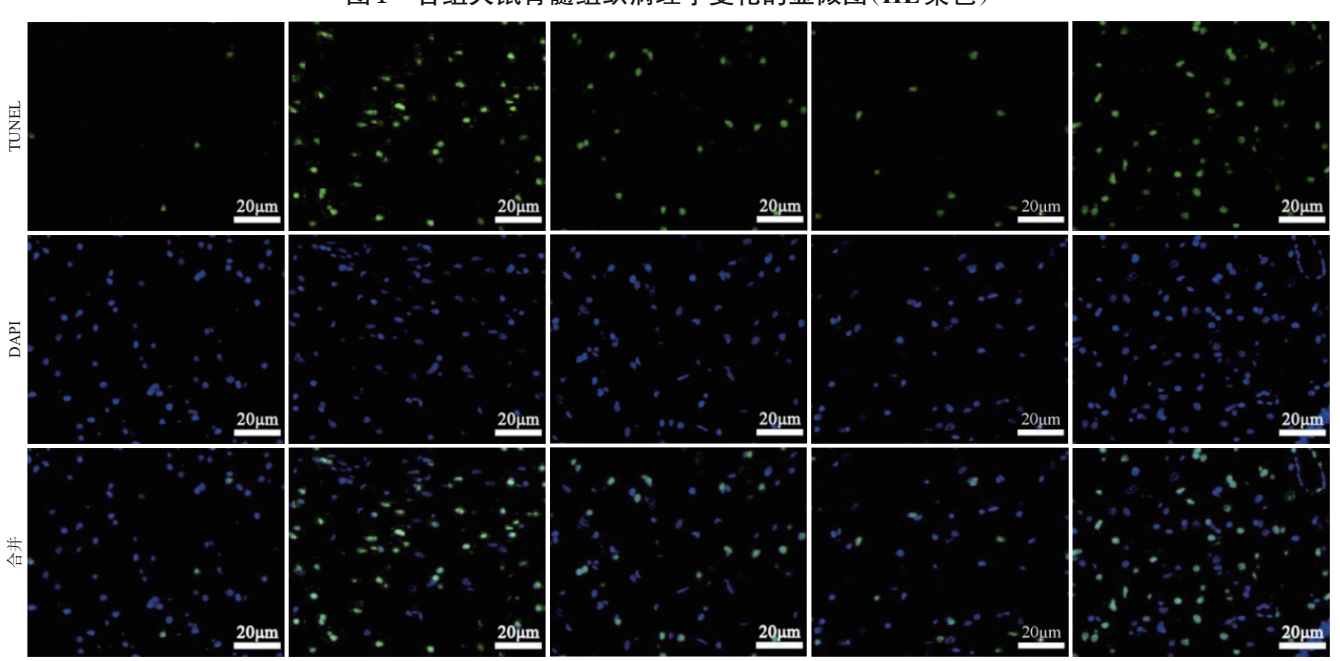
与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中MDA水平显著升高，SOD、GSH水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组大鼠脊髓组织中MDA水平均显著降低，SOD、GSH水平均显著升高（$P<0.05$）；与CUR高剂量组比较，CUR高剂量+3-MA组大鼠脊髓组织中MDA水平显著升高，SOD、GSH水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。



A. 假手术组　B. 模型组　C. CUR低剂量组　D. CUR高剂量组　E. CUR高剂量+3-MA组

红色箭头：组织水肿；黑色箭头：组织出血；黄色箭头：炎症细胞浸润。

图1　各组大鼠脊髓组织病理学变化的显微图（HE染色）



A. 假手术组　B. 模型组　C. CUR低剂量组　D. CUR高剂量组　E. CUR高剂量+3-MA组

图2　各组大鼠脊髓组织中细胞凋亡的显微图（TUNEL染色）

表2　各组大鼠脊髓组织中氧化应激因子水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	MDA/（nmol/mg）	SOD/（U/mg）	GSH/（nmol/mg）
假手术组	3.36±0.24	96.47±6.21	0.61±0.02
模型组	8.67±0.62[a]	32.62±2.78[a]	0.17±0.02[a]
CUR低剂量组	5.82±0.46[b]	57.81±4.23[b]	0.34±0.02[b]
CUR高剂量组	4.23±0.27[b]	82.19±5.34[b]	0.52±0.03[b]
CUR高剂量+3-MA组	7.76±0.51[bc]	43.05±3.11[bc]	0.25±0.02[bc]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与CUR高剂量组比较，$P<0.05$。

3.5　CUR对SCI大鼠脊髓组织中BDNF和GFAP蛋白表达的影响

与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白的表达水平显著降低，GFAP蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白的表达水平均显著升高，GFAP蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与CUR高剂量组比较，CUR高剂量+3-MA组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白的表达水平显著降低，GFAP蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见图3、表3。

3.6　CUR对SCI大鼠脊髓组织中通路及自噬相关蛋白表达的影响

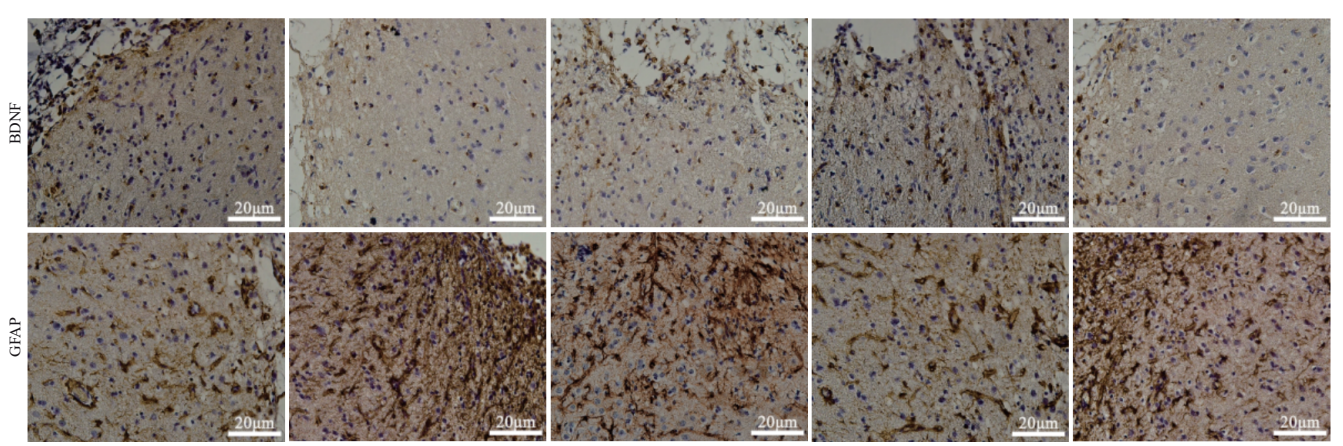
与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中PINK1、Parkin蛋白的表达水平和LC3Ⅱ/Ⅰ比值均显著降低，p62蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各药物组大鼠脊髓组织中PINK1、Parkin蛋白的表达水平和LC3Ⅱ/Ⅰ比值均显著升高，p62蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与CUR高剂量组比较，CUR高剂量+3-MA组大鼠脊髓组织中PINK1、Parkin蛋白的表达水平和LC3Ⅱ/Ⅰ比值均显著降低，p62蛋白的表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见图4、表4。

4　讨论

SCI是一种严重致残的创伤性疾病，通常会导致患者神经功能障碍，降低其生活质量，甚至威胁其生命。目前，临床尚无有效治疗方法来促进SCI后的神经恢复。因此，寻找新的有效药物迫在眉睫。CUR是中药仙茅的主要活性成分之一，具有较强的抗炎、抗氧化、保护心血管和神经等作用。研究报道，CUR能够促进海马区内BDNF蛋白的表达[9]，但该成分对SCI神经损伤是否具有改善作用尚未可知。本研究利用脊髓撞击法建立SCI大鼠模型，结果显示，模型组大鼠的BBB评分和斜板角度均显著降低或减小，表明大鼠的神经功能和后肢运动功能在脊髓受到撞击后遭到了破坏；HE染色结果显示，模型组大鼠的脊髓组织损伤严重，可见明显的水肿和出血，并伴随大量炎症细胞浸润，提示大鼠SCI模型复制成功。经CUR干预后，大鼠的BBB评分和斜板角度均显著升高或增大，脊髓组织病理改变有所恢复，水肿、出血和炎症细胞浸润均明显减少，提示CUR能够改善SCI大鼠的神经功能和运动功能障碍，减轻脊髓组织的病理性损伤。

SCI的进展包括原发性损伤和继发性损伤，其中继发性损伤包括神经元和神经胶质细胞的进一步受损，提示SCI能导致损伤部位的细胞凋亡[10]。与此同时，氧化应激也在SCI进展过程中发挥了重要作用，其中MDA作为脂质过氧化的最终产物可发挥氧化剂功能，直接诱发组织损伤；而SOD和GSH具有清除自由基的能力，具有抗氧化剂的活性[11]。本研究通过TUNEL染色实验和氧化应激因子检测实验发现，模型组大鼠脊髓组织的细胞凋亡率和MDA水平均显著升高，SOD和GSH水平均显著降低；经CUR干预后，各药物组大鼠脊髓组织的细胞凋亡率和MDA水平均显著降低，SOD和GSH水平均显著升高，提示CUR具有抗细胞凋亡和抗氧化应激的作用，可减轻SCI大鼠脊髓的神经损伤。

BDNF是神经营养因子家族中最重要的成员之一，在促进神经生长、维持神经元功能、防止神经元退化、神



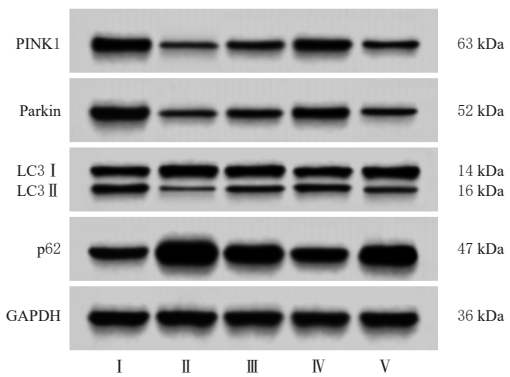
A. 假手术组　B. 模型组　C. CUR低剂量组　D. CUR高剂量组　E. CUR高剂量+3-MA组

图3　各组大鼠脊髓组织中BDNF和GFAP蛋白表达的显微图（免疫组化染色）

表3　各组大鼠脊髓组织中BDNF、GFAP蛋白表达水平比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	BDNF蛋白	GFAP蛋白
假手术组	1	1
模型组	0.32±0.02[a]	1.82±0.12[a]
CUR低剂量组	0.56±0.03[b]	1.48±0.09[b]
CUR高剂量组	0.89±0.06[b]	1.17±0.06[b]
CUR高剂量+3-MA组	0.40±0.02[bc]	1.65±0.10[bc]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与CUR高剂量组比较，$P<0.05$。



Ⅰ：假手术组；Ⅱ：模型组；Ⅲ：CUR低剂量组；Ⅳ：CUR高剂量组；Ⅴ：CUR高剂量+3-MA组。

图4　各组大鼠脊髓组织中通路及自噬相关蛋白表达的电泳图

表4　各组大鼠脊髓组织中通路及自噬相关蛋白表达情况比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	PINK1	Parkin	LC3Ⅱ/Ⅰ比值	p62
假手术组	0.94±0.05	0.96±0.06	0.87±0.05	0.85±0.06
模型组	0.28±0.02[a]	0.32±0.02[a]	0.23±0.02[a]	2.13±0.14[a]
CUR低剂量组	0.51±0.03[b]	0.57±0.03[b]	0.46±0.03[b]	1.62±0.10[b]
CUR高剂量组	0.85±0.04[b]	0.88±0.05[b]	0.75±0.04[b]	1.21±0.08[b]
CUR高剂量+3-MA组	0.36±0.02[bc]	0.41±0.02[bc]	0.32±0.02[bc]	1.86±0.12[bc]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与CUR高剂量组比较，$P<0.05$。

经元损伤后再修复过程中具有重要作用[12]。GFAP是活化的星形胶质细胞的标志物，过度激活的胶质细胞会释放炎症介质，后者可造成邻近神经元的进一步损伤，故有效抑制胶质细胞的过度激活是抑制神经炎症和炎症相关继发性SCI的有效途径之一[13]。本研究免疫组化实验结果显示，模型组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白的表达水平显著降低，GFAP蛋白的表达水平显著升高；经CUR干预后，各药物组大鼠脊髓组织中BDNF蛋白的表达水平均显著升高，GFAP蛋白的表达水平均显著降低，提示CUR能够有效抑制胶质细胞的过度活化，促进神经元生长，从而缓解继发性损伤引起的神经元受损。

据报道，在SCI的继发性损伤阶段，功能障碍的线粒体可通过增加活性氧的生成来诱导细胞凋亡[5]。目前，自噬已被证实可清除受损细胞器、毒性物质、长寿命蛋白等多种底物，与线粒体依赖性凋亡密切相关[14]。研究表明，PINK1/Parkin信号通路是经典的线粒体自噬途径，当线粒体受损时，PINK1蛋白的降解被破坏，导致线粒体外膜上PINK1蛋白的积累和Parkin蛋白的募集；随后，活化的Parkin蛋白进一步泛素化线粒体外膜蛋白，并招募泛素结合自噬受体（如p62）转移至线粒体内，使受损的线粒体被自噬体吞噬，并最终与溶酶体融合降解[15-16]。LC3是自噬标志物，当自噬发生时，胞浆型LC3Ⅰ会被酶解掉一小段多肽，转变为膜型（LC3Ⅱ），故LC3Ⅱ/Ⅰ比值是反映自噬通量的生物标志物之一[15]。目前已有研究表明，麦芽酚可通过激活核转录因子红系2相关因子2/PINK1/Parkin通路来促进自噬，从而阻断氧化应激信号转导和凋亡介导的神经元死亡；红景天苷可通过增加缺血再灌注后脊髓组织中PINK1、Parkin蛋白的表达来抑制线粒体依赖性神经凋亡[4,17]。本研究结果显示，模型组大鼠脊髓组织中PINK1、Parkin蛋白的表达水平和LC3Ⅱ/Ⅰ比值均显著低于假手术组，p62蛋白的表达水平显著高于假手术组；经CUR干预后，各药物组大鼠脊髓组织中PINK1、Parkin蛋白的表达水平和LC3Ⅱ/Ⅰ比值均显著高于模型组，p62蛋白的表达水平均显著低于模型组，提示CUR可能通过激活PINK1/Parkin信号通路来促进线粒体自噬。为证实上述假设，本研究在高剂量CUR的基础上进一步加用了自噬抑制剂3-MA，结果显示，3-MA能逆转高剂量CUR对SCI大鼠神经损伤的改善作用以及对PINK1/Parkin信号通路的激活作用，提示CUR对SCI大鼠相关症状的改善作用可能是通过激活PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬而实现的。

综上所述，CUR能促进SCI大鼠神经功能和运动功能的恢复，改善其脊髓组织病理损伤并抑制细胞凋亡，上述作用可能与CUR可激活PINK1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬有关。本研究虽为SCI的治疗提供了潜在理论依据，但线粒体自噬相关机制比较复杂，其在SCI神经损伤中的作用还需进一步深入探究。

参考文献

[1] ZENG H, LIU N, YANG Y Y, et al. Lentivirus-mediated downregulation of α-synuclein reduces neuroinflammation and promotes functional recovery in rats with spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 283.

[2] HONG Y R, LEE E H, PARK K S, et al. Ultrasound stimulation improves inflammatory resolution, neuroprotection, and functional recovery after spinal cord injury[J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 3636.

[3] DU Y, CAI X. Therapeutic potential of natural compounds from herbs and nutraceuticals in spinal cord in-

jury: regulation of the mTOR signaling pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2023, 163: 114905.

[4] 李若淳,曾明燕,苏艳丽,等. 仙茅苷对阿尔茨海默病大鼠行为学及海马神经元凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(7): 654-656, 670.
LI R C, ZENG M Y, SU Y L, et al. Effect of curculigoside on the behavior and hippocampal neuronal apoptosis of Alzheimer's rats[J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(7): 654-656, 670.

[5] LI N, SHU J, YANG X Y, et al. Exosomes derived from M2 microglia cells attenuates neuronal impairment and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease through the PINK1/parkin pathway[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 874102.

[6] MAO Y Q, DU J Q, CHEN X H, et al. Maltol promotes mitophagy and inhibits oxidative stress via the Nrf2/PINK1/parkin pathway after spinal cord injury[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1337630.

[7] IKEFUAMA E C, KENDZIORSKI G E, ANDERSON K, et al. Improved locomotor recovery in a rat model of spinal cord injury by bioluminescent-optogenetic (BL-OG) stimulation with an enhanced luminopsin[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(21): 12994.

[8] 张驰昊,郑迪,张成,等. 虾青素通过上调PINK1/parkin通路增强线粒体自噬并减轻大鼠对比剂急性肾损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(8): 1430-1439.
ZHANG C H, ZHENG D, ZHANG C, et al. Astaxanthin enhances mitophagy through PINK1/parkin pathway to attenuate contrast-induced acute kidney injury in rats[J]. Chin J Pathophysiol, 2022, 38(8): 1430-1439.

[9] YANG S J, SONG Z J, WANG X C, et al. Curculigoside facilitates fear extinction and prevents depression-like behaviors in a mouse learned helplessness model through increasing hippocampal BDNF[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(10): 1269-1278.

[10] ABDANIPOUR A, NIKFAR A, NIKBAKHT RAD M, et al. Neuroprotective effect of L-deprenyl on the expression level of the Mst1 gene and inhibition of apoptosis in rat-model spinal cord injury[J]. Iran J Basic Med Sci, 2022, 25(1): 53-59.

[11] LI X, ZHAN J H, HOU Y, et al. Coenzyme Q10 regulation of apoptosis and oxidative stress in H_2O_2 induced BMSC death by modulating the Nrf-2/NQO-1 signaling pathway and its application in a model of spinal cord injury[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 6493081.

[12] 赵曼云,郭蔚虹,张霞. 益母草碱通过调节cAMP/PKA信号通路抑制脊髓损伤大鼠神经细胞凋亡[J]. 中成药, 2022, 44(7): 2315-2319.
ZHAO M Y, GUO W H, ZHANG X. Leonurine inhibits neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury by regulating cAMP/PKA signaling pathway[J]. Chin Tradit Pat Med, 2022, 44(7): 2315-2319.

[13] LI Z H, WU F R, XU D F, et al. Inhibition of TREM1 reduces inflammation and oxidative stress after spinal cord injury (SCI) associated with HO-1 expressions[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 109: 2014-2021.

[14] ZHOU K L, CHEN H W, XU H Z, et al. Trehalose augments neuron survival and improves recovery from spinal cord injury via mTOR-independent activation of autophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 8898996.

[15] LI R R, CHEN J Z. Salidroside protects dopaminergic neurons by enhancing PINK1/Parkin-mediated mitophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 9341018.

[16] KANG L, LIU S W, LI J C, et al. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ protects against intervertebral disc degeneration by ameliorating mitochondrial dysfunction and redox imbalance[J]. Cell Prolif, 2020, 53(3): e12779.

[17] GU C J, LI L W, HUANG Y F, et al. Salidroside ameliorates mitochondria-dependent neuronal apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury partially through inhibiting oxidative stress and promoting mitophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3549704.

(收稿日期:2023-11-20 修回日期:2024-04-27)
(编辑:张元媛)