

丹参酮 II A 对大鼠急性脊髓损伤 SOCS3/STAT3 信号通路的影响

聂宇¹ 周纳新¹ 刘健¹ 万峰¹ 傅德皓²

(1 湖北省宜昌市中心人民医院骨科,宜昌,443000; 2 华中科技大学同济医学院附属协和医院,武汉,430022)

摘要 目的:通过观察丹参酮 II A 对大鼠急性脊髓损伤后细胞因子信号抑制因子 3 (Suppressors of Cyto-kine Signaling-3, SOCS3)/信号转导与转录激活子 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3, STAT3) 信号通路表达的影响,探讨丹参酮 II A 对大鼠急性脊髓损伤炎症反应的影响。方法:60 只健康 SD 大鼠随机分为脊髓损伤组(对照组)、脊髓损伤/丹参酮 II A 治疗组(观察组)2 组,每组 30 只。制作脊髓损伤动物模型。各组分别在脊髓损伤后 8 h、1 d、3 d、7 d、14 d 取材。分析大鼠脊髓损伤后运动诱发电位 (MEP) 的潜伏期及波幅;RT-PCR 半定量分析脊髓组织中 SOCS3 mRNA、STAT3 mRNA 的表达;TUNEL 法行神经细胞凋亡检测。结果:与对照组比较,观察组 MEP 潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$),MEP 波幅则明显增高 ($P < 0.05$);SOCS3 mRNA 表达明显增高、STAT3 mRNA 表达明显下降;神经细胞凋亡有所减少 ($P < 0.05$)。结论:丹参酮 II A 可提高 SOCS3 表达,抑制 STAT3 表达,抑制神经细胞的凋亡,减轻神经功能缺失,对急性脊髓损伤大鼠有一定的保护作用。

关键词 丹参酮 II A;急性脊髓损伤;细胞因子信号抑制因子 3;信号转导与转录激活子 3

Effects of Tanshinone II A on SOCS3/STAT3 Signaling Pathway in Rats with Acute Spinal Cord Injury

Nie Yu¹, Zhou Naxin¹, Liu Jian¹, Wan Feng¹, Fu Dehao²

(1 Department of Orthopedics, Yichang Central Hospital, Yichang 443000, China; 2 Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Tanshinone II A on the expression of suppressors of cytokine signaling-3, (SOCS3)/signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in rats with acute spinal cord injury. **Methods:** A total of 60 healthy adult Sprague-Dawley rats were randomly divided into two groups: control group and Tanshinone II A group. The acute spinal cord injury model was built in rats. At 8 h, 1 d, 3 d, 7 d, and 14 d after spinal cord injury, we analyzed latency and amplitude of MEP (Motion Evoked Potential), and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expressions of SOCS3 and STAT3 in spinal cord tissues. Apoptosis neurons were labeled with TUNEL dyeing. **Results:** There were no changes in the latencies of MEPs in both groups, and the mean amplitudes of MEPs were higher in Tanshinone II A group than those in control group. The expressions of SOCS3 mRNA and STAT3 mRNA were increased in Tanshinone II A group compared with control group. The number of TUNEL staining positive cells in the Tanshinone II A group was less than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinone II A may enhance the expression of SOCS3 and inhibit the expression of STAT3, inhibit neurocyte apoptosis and palliate loss of neural function. It has certain protective effects on rats with acute spinal cord injury.

Key Words Tanshinone II A; Acute spinal cord injury; Suppressors of cytokine signaling-3; Signal transducer and activator of transcription-3

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.10.046

脊髓损伤 (Spinal Cord Injury, SCI) 是一种以损伤平面以下感觉、运动功能完全丧失和大小便失禁为主要临床表现的中枢神经系统严重创伤^[1]。目前没有有效的治疗手段能恢复 SCI 的神经功能。细胞因子信号抑制因子 (Suppressors of Cytokine Signaling, SOCS) 家族是一类对细胞因子信号通路具有负

反馈调节作用的蛋白分子,参与多种细胞因子、生长因子和激素的信号调节^[2]。近年来细胞因子信号抑制因子 3 (Suppressors of Cyto-kine Signaling-3, SOCS3)/信号转导与转录激活子 3 (Signal Transducer and Activator of Transcription-3, STAT3) 信号通路在神经系统中的作用倍受关注。一般认为,该途径

广泛参与神经细胞的生长发育、分化及衰老等过程,并与脑肿瘤、缺血损伤等神经系统病理过程密切相关^[3]。丹参酮ⅡA是从丹参中提取的脂溶性有效成分之一,对细胞的生物学效应已成为研究热点^[4]。为探讨丹参酮ⅡA对大鼠急性脊髓损伤炎症反应的影响,建立大鼠急性脊髓损伤模型,采用丹参酮ⅡA对大鼠进行干预,研究其对SOCS3/STAT3信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SD大鼠60只,雌雄不限,体重220~250 g,由华中科技大学同济医学院动物中心提供。动物房温度18~25℃,湿度50%~75%,12 h交替光照,分笼饲养,自由饮水,普通饲料喂养,每日观察动物进食情况,称体重,及时清理粪便。本研究中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.1.2 药物 丹参酮ⅡA磺酸钠注射液粉(杭州正大青春宝药业有限公司,10 mg/瓶,国药准字GR0532)。

1.1.3 试剂与仪器 大鼠细胞SOCS3 ELISA试剂盒(上海研盟生物科技有限公司,产品货号:YMR30908),大鼠细胞STAT3 ELISA试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,产品货号:E-EL-R1226c),提取mRNA试剂及反转录试剂(美国Invitrogen公司),Viking神经电生理仪(美国尼高利公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将SD大鼠60只按照随机数字表随机分为脊髓损伤组(对照组)、脊髓损伤/丹参酮ⅡA治疗组(观察组)2组,每组各30只。每组按时相分为5小组($n=6$)。后正中切口,将T8-10椎板全部切除,显露硬脊膜并保持其完整性。在硬膜表面放置一曲度相似的直径为3.0 mm的圆形铜制垫片,用5 g的铜制重物在玻璃试管的引导下从8 cm处垂直自由落下,打击垫片,致伤脊髓^[5]。致伤冲量为40 gcf,造成中度脊髓损伤。术后见大鼠出现摆尾反射,双下肢及躯体回缩扑动,双下肢瘫痪表明撞击成功。生理盐水冲洗伤口,逐层缝合伤口。术后青霉素5万U/只/d,注射3 d。损伤后每天10:00、17:00点2次人工膀胱排尿,直至建立反射性膀胱排空。各组大鼠在脊髓损伤后8 h、1 d、3 d、7 d、14 d取材,每组取6只。大鼠俯卧位置于特制台上,背部剪毛,无菌操作,腰椎取背部正中切口,切除L2-L4双侧椎板,充分显露L3-L4节段硬脊膜,背部正

中腰椎部分切开,钝性剥离腰椎周围的肌肉,剪下腰椎,用咬骨钳轻轻咬掉脊髓周围的骨组织,快速取下脊髓组织,液氮保存。PBS液清洗,放入液氮罐中,备用。

1.2.2 给药方法 脊髓损伤后30 min内,观察组大鼠经腹腔注射丹参酮ⅡA磺酸钠注射液,给药剂量计算方法:人的给药剂量 $\times$ 人的转换因子(36.8)/大鼠的转换因子(6.9)=人的给药剂量 $\times$ 5.3478。对照组注入等量生理盐水。连续给药10 d。

1.2.3 观察指标 HE染色组织形态学观察;采用Viking神经电生理仪,行MEP检测;用RT-PCR半定量分析脊髓组织中SOCS3mRNA、STAT3mRNA的表达;TUNEL法行神经细胞凋亡检测。

1.3 统计学方法 采用SPSS 14.0软件包进行数据统计,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组组间差异采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组大鼠大致观察 术后所有动物均存活,饮食活动正常,未见手术部位破溃、红肿等不良反应。

2.2 2组大鼠组织形态学表现 损伤后1 d损伤对照组脊髓灰质部有广泛灶性出血,大量红细胞渗出,神经元核浓缩,染色增强,随时间推移逐渐出现神经元固缩、坏死、溶解,细胞体积变小,有大量小胶质细胞增生和中性粒细胞浸润;白质中也见较多红细胞渗出,髓鞘肿胀和大量空泡,周围有炎性细胞浸润和胶质细胞增生。观察组损伤部位脊髓灰质部肿胀变形、出血、炎性细胞浸润较对照组轻,白质点状出血,白质中有较多的正常轴突。

2.3 2组大鼠电生理学检测结果比较 记录术后各时点MEP波幅、潜伏期与术前比较所占的百分比,MEP波幅(%)=术后MEP波幅/术前MEP波幅 $\times 100\%$ MEP潜伏期(%)=术后MEP潜伏期/术前MEP潜伏期 $\times 100\%$ 。1)观察组在术后8 h、1 d、3 d、7 d、14 d时点MEP波幅(%)较对照组明显增高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。术后14 d,对照组MEP波幅为(77.00 $\pm$ 5.16)%,观察组为(89.27 $\pm$ 6.02)%。2)观察组和对照组各时点MEP潜伏期(%)比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);随着时间的推移2组MEP潜伏期均逐渐趋向正常,术后14 d,对照组MEP潜伏期为(101.05 $\pm$ 1.18)%,观察组为(100.33 $\pm$ 1.25)%。见图1、图2。

2.4 2组大鼠SOCS3mRNA、STAT3mRNA的表达比较 对照组、观察组SOCS3mRNA表达均增高,STAT3 mRNA表达均下降。但观察组SOCS3mRNA

表 1 2 组大鼠脊髓损伤不同时点的 SOCS3mRNA、STAT3mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

指标	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
SOCS3mRNA					
对照组	0.56 ± 0.04	0.58 ± 0.09	0.63 ± 0.11	0.66 ± 0.06	0.76 ± 0.08
观察组	0.64 ± 0.03 [△]	0.72 ± 0.05 [△]	1.01 ± 0.09 [△]	1.23 ± 0.12 ^{△△}	1.62 ± 0.05 ^{△△}
STAT3mRNA					
对照组	0.78 ± 0.03	1.23 ± 0.09	1.52 ± 0.01	1.82 ± 0.10	1.94 ± 0.07
观察组	0.72 ± 0.09 [△]	0.84 ± 0.03 [△]	1.02 ± 0.10 [△]	1.01 ± 0.06 ^{△△}	1.34 ± 0.11 ^{△△}

注:与对照组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

表 2 2 组大鼠脊髓损伤不同时点的凋亡细胞数比较($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	8 h	1 d	3 d	7 d	14 d
对照组	21.35 ± 4.52	30.83 ± 3.91	39.85 ± 3.44	42.83 ± 3.54	27.70 ± 4.45
观察组	17.08 ± 4.43 [△]	23.60 ± 5.74 ^{*△}	35.53 ± 4.18 ^{△△}	31.17 ± 4.95 ^{△△}	19.42 ± 1.88 [△]

注:与对照组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$

表达明显增高、STAT3mRNA 表达明显下降,与对照组比较,差异有统计学意义,提示丹参酮ⅡA 具有促进 SOCS3mRNA 表达,抑制 STAT3mRNA 表达的作用。见表 1。

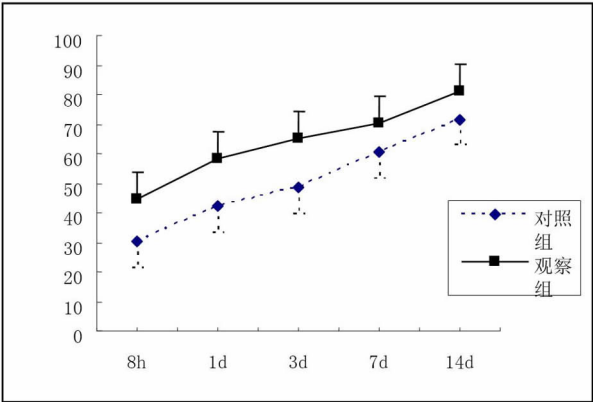


图 1 脊髓损伤后 MEP 波幅%的时程变化
(横轴:时间;纵轴:MEP 波幅%)

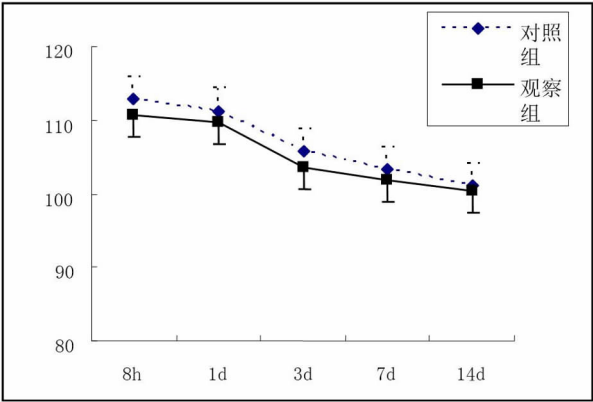


图 2 脊髓损伤后 MEP 潜伏期%的时程变化
(横轴:时间;纵轴:MEP 潜伏期%)

2.5 TUNEL 法神经细胞凋亡检测 2 组 TUNEL 阳性细胞可见具有典型的凋亡特征性的改变,染色质固缩,呈斑块状聚集于核膜周边,胞质浓染。对照组

术后 8 h 开始有少量阳性细胞出现,1 d 后逐渐增高,3 d 增多显著,7 d 到达高峰,高峰时主要发生在白质中胶质细胞,以后呈下降趋势。而观察组 TUNEL 阳性细胞的数目明显少于损伤对照组,3 d 达到高峰,3 ~ 7 d 维持在较高的水平,然后逐渐回落各时点凋亡指数分别进行比较,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 2。

3 讨论

丹参中主要包括水溶性酚酸类、脂溶性丹参酮类等有效成分^[6]。丹参酮是中药丹参根的乙醚提取物中的成分,为丹参主要有效成分,经过大量药理、毒理、有效成分及临床研究证明,该药对多种疾病尤其是有确切的疗效,且毒性较小^[7-8]。丹参酮ⅡA 为丹参酮中主要有效成分之一,为脂溶性樱红色针状结晶,可参与机体的多种生化反应而有多种生物活性。具有抗炎、抑制细胞凋亡、降低氧自由基等作用,用于冠状动脉粥样硬化性心脏病及缺血性脑血管病的治疗取得了较好疗效。现代医学研究亦证实丹参酮丹参酮注射液可能通过促进血管内皮生长因子表达,减少低氧诱导因子 1- α 的表达,改善脊髓缺血再灌注损伤组织局部缺氧环境,对减轻脊髓缺血再灌注损伤起到积极的防治作用^[9]。

原发性脊髓损伤是指创伤本身造成的灰质和白质受损,神经通路中断;继发性脊髓损伤是指创伤引起了局部一系列生化改变,使组织缺血、缺氧,膜脂质过氧化,最终导致脊髓细胞死亡、退变、上行下行纤维传导中断^[10]。凋亡以延迟的形式出现,研究证实,凋亡在 SCI 后继发性损伤中扮演重要的角色,特别是大量白质损伤致神经缺失^[11]。TUNEL 阳性神经元在原发性损伤后 4 ~ 24 h 观测到,在伤后 7 d 出现继发性少突胶质细胞的凋亡^[12]。因为少突胶质

细胞对髓鞘形成和保护这些长的透射纤维非常重要,SCI 后少突胶质细胞的丢失,导致余下神经纤维束的变形,从而引起脊髓损伤平面以下的运动失控和感觉缺失。在本实验中,丹参酮 II A 观察组神经细胞凋亡率明显比损伤对照组低。电生理检测表明,MEP 在观察组较对照组有明显恢复,这说明脊髓前部的运动传导通路经过治疗后有所恢复,通过丹参酮 II A 治疗可以显著降低急性脊髓损伤后神经细胞凋亡的发生,减轻 SCI 所致的神经功能的缺失。

SOCS3/STAT3 信号通路主要作用机制是通过细胞因子细胞内信号转导通路 Janus 激酶/信号转导与转录激活子途径 (Janus Kinase/signal Transducer and Activator of Transcription, JAK/STAT) 途径的负性调控而发挥作用^[13]。这种负反馈作用主要通过以下 3 种途径完成:1) 利用和 STAT 相似的 SH2 结构域,竞争结合细胞因子受体胞质区的磷酸化 tyr 位点,阻碍 STAT 与受体结合位点结合,从而阻止 STAT 的活化;2) SOCS3 可以抑制 JAK 激酶活性,阻断 JAK/STAT 通路^[14]。多个实验表明,SOCS3 可通过其结构中的 SH2 部分,竞争性的与 JAK2 中 JH1 的酪氨酸残基直接结合,实现其抑制 JAK 激酶活性的作用。也有反向实验证实,如果去除 N 端靠近 SH2 结构域的 12 个氨基酸结构,SOCS3 则失去此作用,因此间接证明 SOCS3 是通过 SH2 结构实现其抑制 JAK 激酶,阻断 STAT 磷酸化的作用的;3) 通过 C2 末端同源区即 SOCS 盒与延伸蛋白复合体相互作用。延伸蛋白是一种泛酸酶的组成部分,将 SOCS3 结合的信号因子(如 JAK 和 STAT 等)通过泛酸化途径降解,从而阻断细胞因子的信号传递,调节神经元的生长与分化。从而促进了兴奋性神经元凋亡中的作用。STAT3 在中枢神经系统中亦广泛分布^[15]。

本实验中,丹参酮 II A 观察组与对照组比较,SOCS3mRNA 表达明显增高,STAT3mRNA 表达明显下降,提示丹参酮 II A 可通过 SOCS3/STAT3 信号通路,抑制炎症反应,改善急性损伤脊髓组织的原发损

害,改善病灶缺血、水肿,促进神经细胞功能恢复,减轻脊髓继发性损伤而起到急性脊髓损伤的保护作用。

参考文献

- [1] 王涛丽,顾兵,李华南,等. 急性脊髓损伤后的炎症反应及其抗炎治疗[J]. 中国药理学通报,2015,31(4):452-457.
- [2] Liu X, Williams PR. SOCS3: A common target for neuronal protection and axon regeneration after spinal cord injury[J]. Experimental neurology, 2015, 263:364-367.
- [3] 罗显华,宋锦宁. SOCS 在神经系统的研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志,2016,15(3):280-283.
- [4] 曹慧敏,吴瑾,贾连群,等. 丹参酮 II A 对心血管系统药理作用的研究进展[J]. 世界中医药,2017,12(7):1718-1722.
- [5] 张军,陈晓,张荣佳,等. 脊髓损伤动物模型的研究进展[J]. 中华全科医学,2017,15(3):144-147.
- [6] 刘慧颖,姜长涛,冯娟,等. 丹参酮类化合物研究进展[J]. 中国药理学通报,2016,32(12):1643-1647.
- [7] 李建恒,乔亚君,侯力峰,等. 丹参脂溶性有效成分丹参酮研究进展[J]. 河北大学学报,2015,35(2):217-224.
- [8] 张金明,陈建军,张艳红,等. 丹参多酚酸盐对缺血再灌注损伤大鼠心肌的保护作用及机制[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2017,31(11):1055-1058.
- [9] 伏勇,黄志高,张俐,等. 丹参酮对脊髓缺血再灌注损伤 HIF1-1 α 和 VEGF 的作用及机制[J]. 中国中医骨伤科杂志,2010,5(1):5-7.
- [10] Losey P, Young C, Krimholtz E, et al. The role of hemorrhage following spinal cord injury[J]. Brain Res, 2014, 1569:9-18.
- [11] 董源基,喻志源,谢敏杰,等. 脊髓损伤和炎症[J]. 神经损伤与功能重建杂志,2018,13(3):142-145.
- [12] Liu XZ, Xu XM, Hu R, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury[J]. J Neurosci, 1997, 17(14):5395-5406.
- [13] Park KW, Lin CY, Benveniste EN, et al. Mitochondrial STAT3 is negatively regulated by SOCS3 and upregulated after spinal cord injury[J]. Experimental Neurology, 2016, 284(Pt A):98-105.
- [14] Bergamin E, Wu J, Hubbard SR. Structural basis for phosphotyrosine recognition by suppressor of cytokine signaling-3[J]. Structure, 2006, 14(8):1285-1292.
- [15] 杨柳,陈蓓蕾,于海龙,等. JAK2/STAT3 信号通路与脑缺血-再灌注损伤相关性的研究进展[J]. 东南大学学报:医学版,2018,37(1):169-173.

(2018-09-03 收稿 责任编辑:张雄杰)