

· 基础研究 ·

吡拉西坦通过 MAPK 通路治疗大鼠脊髓损伤的疗效观察与机制研究

董博¹, 李越², 李迎春², 王桐², 梁壮², 贺西京¹

(1. 西安交通大学第二附属医院骨科, 陕西 西安 710048; 2. 陕西中医药大学第一临床医学院, 陕西 咸阳 712000)

【摘要】 目的: 探讨吡拉西坦通过丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路治疗脊髓损伤大鼠的作用机制。方法: 将 54 只体重为 80~100 g 的 6 周龄 SD 雌性健康大鼠采用随机数字表法分为假手术组、脊髓损伤组、吡拉西坦组, 每组 18 只。脊髓损伤组、吡拉西坦组使用打击器建立脊髓损伤模型, 假手术组不损伤脊髓。吡拉西坦组按照 5 ml·kg⁻¹ 标准予尾静脉注射吡拉西坦, 连续干预 3 d, 每日 1 次; 其他 2 组注射等剂量、等次数、等时长的生理盐水。分别于术后 1、3、7 d 处死大鼠并取材, 观察并比较大鼠脊髓损伤行为学评分(Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale, BBB)的变化, 使用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测脊髓炎症因子白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-1β(interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)水平变化, HE 染色观察脊髓损伤大鼠的形态学变化, 免疫组化观察水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP4)表达水平, 蛋白质免疫印迹法(western blotting, WB)观察脊髓损伤后 MAPK 信号通路在大鼠脊髓中的激活状态。结果: 假手术组 1、3、7 d 的 BBB 评分均为 21 分; 脊髓损伤组分别为(1±1)、(4±1)、(7±2)分; 吡拉西坦组分别为(1±1)、(5±1)、(9±2)分; 脊髓损伤组与假手术组比较, 差异有统计学意义(P<0.05); 吡拉西坦组与脊髓损伤组比较, 差异有统计学意义(P<0.05)。HE 染色结果显示, 假手术组形态未见异常。脊髓损伤组在术后 1 d 时, 脊髓组织出现出血、变性; 术后 3 d, 脊髓组织内出现片状坏死区; 术后 7 d, 脊髓组织开始缓慢修复。吡拉西坦组术后 1 d, 脊髓损伤出血面积较脊髓损伤组减小; 术后 3 d, 坏死区域较脊髓损伤组减少, 细胞核消失范围较脊髓损伤组缩小; 术后 7 d, 脊髓开始缓慢恢复。假手术组大鼠造模后 1、3、7 d 脊髓组织中 AQP4 染色较淡; 脊髓损伤组 AQP4 染色加深, 面积增大; 吡拉西坦组 AQP4 染色较脊髓损伤组变淡, 较假手术组阳性细胞略增多, 染色微深。造模第 1、3、7 天, 脊髓损伤组 IL-6, IL-10, IL-1β 和 TNF-α 水平高于手术组和吡拉西坦组(P<0.05)。与脊髓损伤组比, 吡拉西坦组 HE 染色脊髓出血及坏死区域面积减小, 免疫组化显示 AQP4 染色变淡。WB 结果显示, 造模第 3 天, 脊髓损伤组 p-ERK, p-JNK 和 p-p38 水平高于假手术组和吡拉西坦组(P<0.05)。结论: 吡拉西坦不仅在促进脊髓损伤后的运动功能恢复方面表现出显著效果, 而且在减少病变面积、调节 AQP4 表达以减轻水肿, 以及通过调控 MAPK 信号通路降低炎症反应方面均显示出积极的治疗潜力。

【关键词】 吡拉西坦; 脊髓损伤; MAPK 信号通路

中图分类号: R741

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.20230540

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Therapeutic effect and mechanism of piracetam for the treatment of spinal cord injury in rats through MAPK pathway

DONG Bo¹, LI Yue², LI Ying-chun², WANG Tong², LIANG Zhuang², HE Xi-jing¹ (1. Department of Orthopaedics, the Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710048, Shaanxi, China; 2. The First Clinical College of Medicine, Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, Shaanxi, China)

ABSTRACT Objective To explore mechanism of piracetam for the treatment of spinal cord injury in rats through mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Methods** Fifty-four healthy 6-week-old SD female rats with body weight of 80 to 100 g were divided into sham operation group, spinal cord injury group and piracetam group by random number table method, with 18 rats in each group. Spinal cord injury model was established in spinal cord injury group and piracetam group

基金项目: 陕西省重点研发计划项目“两链”融合重点专项(编号: 2021LLRH-08); 陕西省教育厅青年创新团队计划(编号: 22JP018); 秦都区 2022 年科技计划项目(编号: QK2022sf04)

Fund program: Shaanxi Provincial Key Research and Development Program; Key Project on 'Two Chains' Integration (No.2021LLRH-08)

通讯作者: 贺西京 E-mail: xijing_h@vip.tom.com

Corresponding author: HE Xi-jing E-mail: xijing_h@vip.tom.com

using percussion apparatus, while sham operation group did not damage spinal cord. Piracetam group was injected with piracetam injection through tail vein according to $5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ standard, once a day for 3 days; the other two groups were injected with normal saline at the same dose, the same frequency and the same duration. The rats were sacrificed at 1, 3, and 7 days after surgery, and changes of Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) locomotor rating scale was observed and compared. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect spinal cord inflammatory factors, such as interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 β (interleukin-1 β), necrosis factor- α (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α); HE staining was used to observe morphological changes of rats with spinal cord injury, and immunohistochemistry was used to observe expression level of aquaporin 4 (AQP4). The activation of MAPK signaling pathway in spinal cord of rats after spinal cord injury was observed by western blotting (WB). **Results** BBB scores of sham operation group on 1, 3 and 7 day were 21 points. In spinal cord injury group, the scores were (1 \pm 1), (4 \pm 1) and (7 \pm 2); piracetam group was (1 \pm 1), (5 \pm 1), (9 \pm 2), respectively; the difference between spinal cord injury group and sham operation group was statistically significant ($P < 0.05$). HE staining showed that no abnormality was found in sham operation group. In spinal cord injury group, bleeding and degeneration of spinal cord tissue appeared at 1 day after operation; flaky necrotic areas were appeared in spinal cord at 3 days after surgery, and spinal cord tissue began to slowly repair at 7 days after surgery. In piracetam group, the bleeding area was less than that of spinal cord injury group at 1 day after surgery; at 3 days after operation, the necrotic area was reduced and the range of nuclear disappearance was reduced; and the spinal cord began to recover slowly at 7 days after surgery. AQP4 staining of spinal cord of rats in sham operation group was weak at 1, 3 and 7 days after modeling, AQP4 staining was deepened and area increased in spinal cord injury group, AQP4 staining of piracetam group was lighter than that of spinal cord injury group, and the positive cells were slightly increased and the staining was slightly darker than that of sham operation group. At 1, 3 and 7 days, the level of IL-6, IL-10, IL-1 β and TNF- α in spinal cord injury group were higher than those in sham operation group and piracetam group ($P < 0.05$). Compared with spinal cord injury group, the area of spinal cord bleeding and necrosis were decreased by HE staining in piracetam group, and AQP4 staining was decreased by immunohistochemistry. WB results showed that P-ERK, P-JNK and P-P38 levels in spinal cord injury group at 3 days were higher than those in sham operation group and piracetam group ($P < 0.05$). **Conclusion** Piracetam not only showed significant effect in promoting motor function recovery after spinal cord injury, but also showed positive therapeutic potential in reducing lesion area, regulating AQP4 expression to reduce edema, and reducing inflammatory response by regulating MAPK signaling pathway.

KEYWORDS Piracetam; Spinal cord injury; MAPK signaling pathway

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是由外伤等多种因素损伤脊髓神经导致的神经系统创伤性疾病^[1]。原发性损伤主要由物理压迫或局部血供中断引起^[2]。继发性 SCI 包括 SCI 后一段时间内发生的所有机体损伤^[3],它可能是神经组织出血、水肿,也可以是细胞凋亡和或免疫炎症级联反应^[4]。丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路可以调控 SCI 的进程^[5],在抑制炎症反应与细胞凋亡等方面有重要的影响。SCI 后可引起损伤脊髓局部的氧化应激反应^[6-7]。SCI 主要机制为损伤后出现脊髓水肿与炎症反应,抑制神经修复再生^[8]。炎症反应和微血管衰竭等因素使水通道蛋白-4(aquaporin 4, AQP4)表达水平升高,进一步加重脊髓水肿,诱发细胞凋亡^[9]。吡拉西坦(piracetam)可改善神经细胞的兴奋传导能力^[10]。吡拉西坦是否可以治疗 SCI,目前还没有确切的临床证据。本研究通过构建大鼠 SCI 模型并应用吡拉西坦干预,观察 SCI 大鼠运动功能、脊髓内炎症因子、HE 染色、免疫组织化学染色和 MAPK 信号通路变化,旨在探讨吡拉西坦对 SCI 的治疗效果以及吡拉西坦与 MAPK 通路在 SCI 的治疗过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

1.1.1 实验仪器 高速低温离心机(Eppendorf AG 公司,型号 Centrifuge 5430 R);电热恒温水浴箱(上海美普达仪器有限公司,型号 HWS-24);-20 °C 冰箱(伊莱克斯公司,型号 EHE6879SA);-80 °C 冰箱(SANYO 公司,型号 MDF-U76VC);-4 °C 冰箱(海尔);倒置显微镜(Olympus Life Science 公司,型号 OLYMPUSBX-60);Western Blot 仪器(Bio-Rad Laboratories 公司,型号 ChemiDoc);微量加样器(Eppendorf AG 公司,型号 Xplorer);电子天平(Mettler-Toledo International 公司,型号 ME204 /02);水平摇床(IKA-Werke GmbH 公司,型号 KS 130 basic);石蜡轮转切片机(Leica Biosystems Nussloch GmbH,型号 HistoCore BIOCUT);脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号 JT-12H);NYU-III 型打击器(W. M. Keck Center for Collaborative Neuroscience, Rutgers University, USA)。

1.1.2 实验试剂 戊巴比妥钠溶液(北京化学试剂公司,批号 30037517);无水乙醇(廊坊拓迪化工有限公司,批号 TD-2023-001); β -巯基乙醇(Amresco

LLC 公司,批号 0482);苏木精(Amresco LLC 公司,批号 517-28-2);伊红(国药集团);二甲苯(国药集团,批号 100092683);中性树胶(国药集团,批号 10023418);4%多聚甲醛(Solarbio 公司,批号 P1110);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)试剂(Solarbio 公司生产,批号 P1000);白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(Invitrogen 公司,批号 KHC0061、KAC1331、KAC1811、KHC3011);包埋石蜡(国药集团,批号 10004160);放射免疫沉淀法(radioimmuno-precipitation assay buffer, RIPA)裂解液(武汉博士德公司,批号 AR0105);ECL(武汉博士德公司,批号 AR1173);二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid, BCA)试剂盒(武汉博士德公司,批号 AR0146);5%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)封闭液(武汉博士德公司,批号 AR0030);Anti-Erk1/2、JNK、p38(北京博奥森公司,批号 bs-0012R);Goat Anti-Rabbit IgG(武汉博士德公司,批号 BA1054);Rabbit Anti-AQP4 抗体(英国 Abcam 公司);兔 IgG-SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德公司,批号 SA1022);4',6-二亚甲基-2-苯并噻唑并吡啶(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液(武汉博士德公司,批号 AR1176);抗荧光衰减封片剂(武汉博士德公司,批号 AR1108);3,3'-二氨基苯基脒(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(武汉博士德公司,批号 AR1022);抗体稀释液(北京索莱宝公司,批号 A1800)。

1.2 实验动物

本研究动物饲养及处置符合陕西中医药大学动物实验中心实验动物饲养标准和实验动物 3R 原则(伦理批号:SUCMDL20211101001)。从成都达硕生物科技有限公司购买的 54 只 6 周龄成年 SPF 级 SD 雌性大鼠,体重为 80~100 g。实验动物合格证号:SYXK(川)2021-030;使用许可证号:SYXK(川)2021-189。动物保持 12 h 的光/暗循环,18~25 $^{\circ}$ C,可以自由接触食物和水。

1.3 实验分组及处理

1.3.1 实验分组 将 54 只 SD 雌性大鼠采用随机数字表法分为假手术组、SCI 组和吡拉西坦组,每组 18 只。考虑吡拉西坦对 SCI 的相关文献研究较少,文献证据不充分,故本实验未设立阳性对照组。已有文献报道^[11-12]关于吡拉西坦对雄性 SD 大鼠的干预实验,而暂缺雌性大鼠的研究,故选用雌性大鼠以探讨雌雄性别差异对药物疗效的影响。

1.3.2 模型制备 采用 CHERIYAN 等^[13]提出的打击器建立 SCI 模型。将 SD 大鼠称重后按照 300 mg \cdot kg⁻¹的麻醉剂量腹腔注射 3%的戊巴比妥钠溶液,在大鼠背部脊柱两侧触摸最下肋与软组织分界处,以此为中点上、下 5 cm 范围备皮,碘伏消毒,纵向切开大鼠背部皮肤 3 cm,逐层切开皮下组织,暴露棘突,定位 T₁₀ 棘突,用手术刀分离椎旁肌肉,使背部脊柱充分暴露,咬骨钳咬除 T₁₀ 棘突,从小关节突开始将 T₁₀ 椎板咬除,向上进一步咬除 T₉ 棘突和 T₉ 椎板的一半,形成 1 个略呈长方形的窗口,充分暴露脊髓。应用 NYU-III 型打击器固定大鼠,将打击器的打击杆自 25 mm 高度处自由落下垂直打击暴露的脊髓背部,当落杆撞击到脊髓瞬间时可观察到大鼠双下肢及尾巴抽搐,随后出现双下肢瘫痪,表明造模成功。小心抬起打击杆,剪一小块软组织铺在暴露的脊髓处,依次缝合肌肉、皮下筋膜、皮肤,在切口处再次给予常规消毒。假手术组仅单纯咬除 T₉-T₁₁ 段椎板、棘突,显露而不损伤脊髓。

1.3.3 干预措施 假手术组和 SCI 组造模后 1 h,尾静脉注射生理盐水,随后每天注射 1 次,连续用药 3 d;吡拉西坦组在 SCI 造模后 1 h,标准尾静脉注射吡拉西坦注射液,随后每天注射 1 次,连续用药 3 d。吡拉西坦规格为 5 ml \cdot g⁻¹,成人给药剂量为 8 g,按照 70 kg 体重计算,按照《药理实验方法学》^[14]大鼠的等效剂量为 6.3 倍,给药剂量为:8 000/70 \times 6.3=720 mg \cdot kg⁻¹,所以给药体积为 3.6 ml \cdot kg⁻¹,生理盐水注射体积同吡拉西坦。

1.4 检测项目与方法

1.4.1 运动功能评价 造模后 1、3、7 d 按照 SCI 行为学评分^[15](Basso, Beattie and Bresnahan locomotor rating scale, BBB)对大鼠进行后肢运动功能评价,总分 21 分。将大鼠放入一开口盆,轻敲盆壁,使其爬行,观察其爬行时臀、膝、踝的行走、躯干运动及整体协调情况,并进行评分。整个过程采用双人独立、双盲评估的方法进行,取其平均值作为最终评分。

1.4.2 形态学变化 分别于造模后 1、3、7 d 对大鼠进行异氟烷吸入麻醉,取材,腹主动脉取血,4 $^{\circ}$ C 静置 1 h 后以 3 000 r \cdot min⁻¹离心 15 min,后取上清,EP 管分装后于-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备检。截取脊髓组织,收集于 2 ml 冻存管中,冻存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用,每组取部分脊髓组织置于固定液中(4%多聚甲醛)备后续组织病理学及影像学检测。将固定液中脊髓组织转移至乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)脱钙液中进行脱钙,脱钙完成后用再进行常规脱水。依次使用不同浓度的乙醇进行脱水,使用乙醇:二甲苯混合液进行组织透明。再进行浸蜡和

包埋, 使用切片机切取 4 μm 组织切片并进行烤片。使用二甲苯和不同浓度的乙醇将石蜡切片脱蜡、水化, 然后分别使用苏木素和伊红染液进行染色, 脱水、透明、风干后封片, 与显微镜下观察。

1.4.3 脊髓内炎症因子的变化 采用 ELISA 检测造模后 1、3、7 d 脊髓内炎症因子 IL-6、IL-10、IL-1β、TNF-α 的表达水平。

1.4.4 AQP4 蛋白表达水平 将脊髓组织切片进行脱蜡脱水处理, 用 PBS 冲洗切片 2 次, 每次 5 min 后放入 3% 过氧化氢溶液(碧云天生物科技公司, 中国)中浸泡 10 min, 取出, 用双蒸水清洗 2 min, 再次放入 PBS 中浸泡 5 min。加入枸橼酸钠抗原修复液, 使用微波加热至沸腾, 持续沸腾 15 min, 随后冷却修复 10 min 后取出, 使用 PBS 冲洗 10 min。晾干后, 加 10% 山羊血清, 在室温下静置 30 min, 滴加稀释过的一抗, 4℃ 冰箱孵育 24 h。PBS 冲洗 10 min; 晾干切片, 滴加二抗, 室温下静置 30 min。双蒸水冲洗 6 min, 滴加 DAB 显色剂, 室温孵育后用 PBS 冲洗 5 min, 苏木精染色 5 min, 双蒸水冲洗。分别使用 70%、80%、90% 的乙醇各浸泡 5 min, 纯乙醇 I、II 中各浸泡 10 min 脱水; 再使用二甲苯 I、II 溶液各浸泡 5 min 透明、封片后镜下观察结果, 采用 Image-ProPlus 软件分析。

1.4.5 p-ERK, p-JNK 和 p-p38 蛋白表达 采用预冷的组织均质器进行组织匀浆, 加入适量的冷冻的 RIPA 裂解缓冲液裂解 0.5 h, 4℃ 离心 5 min 收集上清液, 采用 BCA 试剂盒检测总蛋白含量, 然后将蛋白溶液稀释放在沸水中煮 10 min 使蛋白变性。样品用 10% SDS-PAGE 分离, 转移到 PVDF 膜上。将 PVDF 膜封闭, 并与 anti-Erk1/2、JNK 和 p38 孵育过夜。用 PBS 冲洗 2 次后, 用二抗孵育 1 h。再用 PBS 冲洗 2 次, 用 ECL 底物检测。使用 Image J 软件对条带进行定量分析。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。先采用 Kolmogorov-Smirnov 检验对定量资料进行正态性检验, 符合正态分布的定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用方差分析, 采用 Tukey 事后检验进行两两比较。重复测量比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 运动功能状态比较

假手术组第 1、3、7 天 BBB 评分均为 21 分; 第 3、7 天, 脊髓损伤组与假手术组 BBB 评分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 吡拉西坦组与脊髓损伤组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠脊髓损伤后不同时间点运动功能状态 BBB 评分($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 BBB scores of motor function status in each rat groups after spinal cord injury($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 天	第 3 天	第 7 天
假手术组	18	21	21	21
脊髓损伤组	18	1±1	4±1 ^{a1}	7±2 ^{a2}
吡拉西坦组	18	1±1	5±1 ^{a3a1}	9±2 ^{a4a2}
F 值		600	513.7	354.8
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注: 与假手术组比较, ^{a1}t=24.65, $P < 0.05$; ^{a2}t=28.43, $P < 0.05$; ^{a3}t=77.48, $P < 0.05$; ^{a4}t=24.37 $P < 0.05$ 。与脊髓损伤组比较, ^{b1}t=2.193, $P < 0.05$; ^{b2}t=2.872, $P < 0.05$

2.2 炎症因子比较

造模第 1 天, SCI 组大鼠脊髓内 IL-6、IL-10、IL-1β 和 TNF-α 的水平高于假手术组 ($P < 0.05$), 吡拉西坦组水平低于 SCI 组 ($P < 0.05$)。造模第 3 天, SCI 组 IL-6、IL-10、IL-1β 和 TNF-α 水平高于假手术组 ($P < 0.05$), 吡拉西坦组水平低于 SCI 组 ($P < 0.05$); 造模第 7 天, SCI 组 IL-6、IL-10、IL-1β 和 TNF-α 水平高于假手术组 ($P < 0.05$), 吡拉西坦组水平低于 SCI 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 形态学变化

HE 染色显示, 假手术组在不同时期灰质和白质结构未见明显异常, 各级神经元分布规整, 形态未见异常, 可观察到个别神经元变性, 伴随嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞轻度增多; 间质未见明显改变。SCI 组术后 1 d, 脊髓组织出现出血、变性, 伴随神经元组织的水肿, 结构不清晰; 术后 3 d, 脊髓组织内出现片状坏死区, 内有大量小胶质细胞增生, 神经元细胞结构不清晰, 细胞核消失; 术后 7 d, 脊髓组织开始缓慢修复, 病变面积逐渐缩小, 灰质区的嗜酸性细胞数量增多。吡拉西坦组术后 1 d, SCI 出血面积较 SCI 组减小, 神经元存在水肿, 结构不清晰; 术后 3 d, 脊髓组织出现片状坏死, 坏死区域较 SCI 组减少, 细胞结构不清晰, 细胞核消失范围较 SCI 组缩小; 术后 7 d, 脊髓开始缓慢恢复, 病变面积逐渐缩小, 细胞结构逐渐重建, 灰质区的嗜酸性细胞数量增多。见图 1。

2.4 AQP4 蛋白表达水平比较

造模后 1、3、7 d, 假手术组脊髓组织中 AQP4 染色较淡; SCI 组造模后 AQP4 染色加深, 面积增大; 吡拉西坦组 AQP4 染色较 SCI 组变淡, 较假手术组阳性细胞略增多, 染色微深。见图 2。

2.5 MAPK 信号通路在 SCI 中的表达

造模第 3 天, SCI 组 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 表

表 2 各组大鼠不同时间点脊髓内炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)
Tab.2 Inflammatory factors among different groups at different time points ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	术后 1 d				术后 3 d				术后 7 d			
		IL-6	IL-10	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10	IL-1 β	TNF- α
假手术组	18	23.81 \pm	21.15 \pm	22.63 \pm	14.52 \pm	24.31 \pm	23.77 \pm	21.13 \pm	16.76 \pm	23.31 \pm	24.21 \pm	20.35 \pm	18.29 \pm
		0.61	1.37	1.53	1.42	0.53	1.15	1.42	1.65	0.76	1.52	1.65	1.31
脊髓损伤组	18	65.27 \pm	56.13 \pm	78.62 \pm	33.61 \pm	55.63 \pm	42.63 \pm	74.36 \pm	42.41 \pm	45.33 \pm	38.46 \pm	58.53 \pm	36.88 \pm
		1.65 ^{e1}	1.82 ^{e2}	2.38 ^{e3}	1.53 ^{e4}	2.13 ^{e1}	1.42 ^{e2}	1.52 ^{e3}	1.61 ^{e4}	1.31 ^{e1}	2.07 ^{e2}	1.97 ^{e3}	1.34 ^{e4}
吡拉西坦组	18	36.24 \pm	30.23 \pm	43.61 \pm	28.62 \pm	40.09 \pm	35.44 \pm	39.88 \pm	24.81 \pm	34.08 \pm	30.11 \pm	32.47 \pm	20.52 \pm
		0.78 ^{f1}	1.7 ^{f2}	1.45 ^{f3}	0.88 ^{f4}	1.13 ^{e1}	1.37 ^{e2}	1.21 ^{e3}	0.42 ^{e4}	0.72 ^{h1}	1.74 ^{h2}	2.09 ^{h3}	0.49 ^{h4}
F 值		1 100	359.4	712.4	171.9	362.14	156.33	1 132.95	282.05	388.02	47.95	312.23	247.17
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

单位: pg·ml⁻¹

注: 与假手术组相比, ^{e1}t=42.11, P<0.001; ^{e2}t=34.46, P<0.001; ^{e3}t=56.18, P<0.001; ^{e4}t=19.09, P<0.001; ^{d1}t=31.3, P<0.001; ^{d2}t=19.86, P<0.001; ^{d3}t=53.23, P<0.001; ^{d4}t=25.65, P<0.001; ^{c1}t=22.02, P<0.001; ^{c2}t=14.25, P<0.001; ^{c3}t=38.18, P<0.001; ^{c4}t=18.59, P<0.001。与脊髓损伤组比较, ^{f1}t=29.03, P<0.001; ^{f2}t=25.90, P<0.001; ^{f3}t=35.01, P<0.001; ^{f4}t=5.48, P<0.001; ^{h1}t=15.54, P<0.001; ^{h2}t=7.19, P<0.001; ^{h3}t=34.48, P<0.001; ^{h4}t=17.60, P<0.001; ^{g1}t=11.25, P<0.001; ^{g2}t=8.35, P<0.001; ^{g3}t=26.06, P<0.001; ^{g4}t=16.36, P<0.001

达水平与假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。吡拉西坦组 p-ERK、p-JNK 和 p-p38 表达水平与 SCI 组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3、表 3。

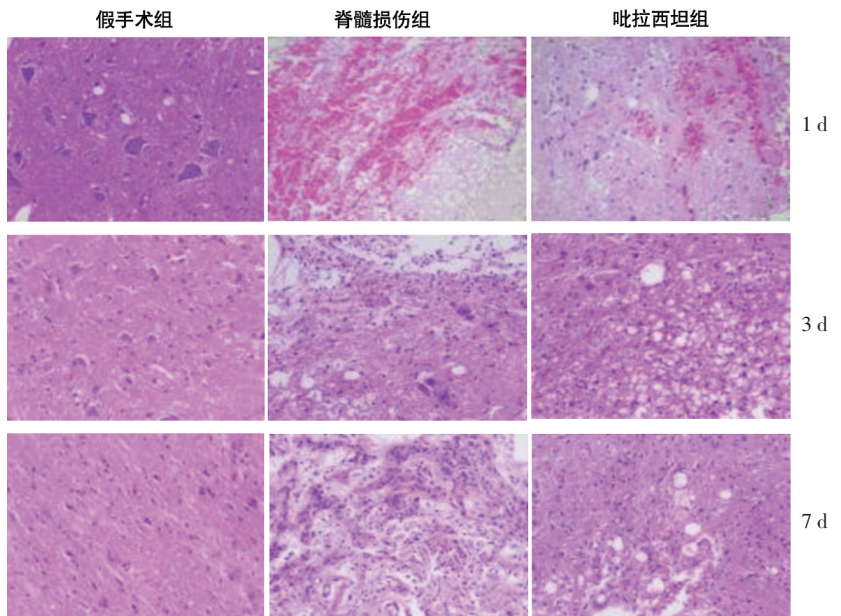
3 讨论

吡拉西坦属于 γ -氨基丁酸的环形衍生物, 可以改善因物理原因或化学原因诱发的脑细胞功能损伤, 加强神经兴奋性的传递, 改善神经细胞的兴奋传导能力, 促进大脑内能量的生成, 改善神经元单胺类递质的释放^[16], 并提高神经细胞的新陈代谢功效, 从而发挥修复、保护神经细胞功能^[17]。吡拉西坦是否可以治疗 SCI, 目前还没有确切的临床证据。本研究通过构建大鼠 SCI 模型并应用吡拉西坦干预, 观察 SCI 大鼠运动功能、脊髓内炎症因子、HE 染色、免疫组织化学染色和 MAPK 信号通路变化, 探究吡拉西坦与 MAPK 通路在 SCI 的治疗过程中的作用机制。

3.1 吡拉西坦在 SCI 后可能加速神经修复以促进运动功能恢复

BBB 评分是一种用于评估运动功能恢复的标准化方法, 广泛应用于 SCI 研究领域。该评分系统包括 21 个等级, 可以反映 SCI 后动物的运动能力和改变, 被视为评估 SCI 后运动功能的实用工具^[18]。本

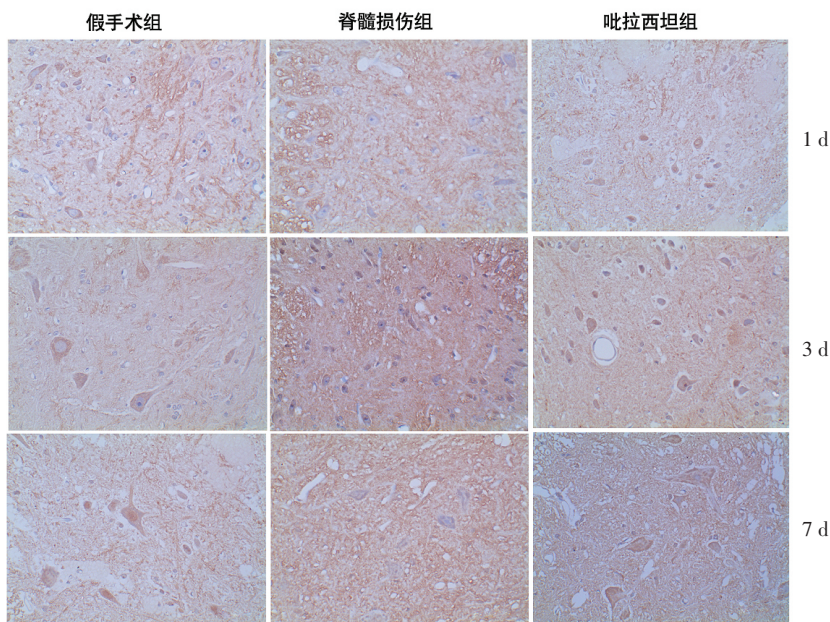
研究结果显示, 吡拉西坦组与 SCI 组在第 3、7 天的 BBB 评分均存在显著差异 ($P<0.05$), 结果表明吡拉西坦能显著促进 SCI 后的运动功能恢复。这可能是因为吡拉西坦能改善神经细胞的兴奋传导能力和新陈代谢, 从而加速神经修复。这为吡拉西坦用于临床 SCI 后神经功能恢复提供了实验依据, SCI 后运动功能的恢复需要神经网络的重建, 吡拉西坦展示出促进神经突触重建的潜能。



注: 假手术组结构正常, 少量神经元变性; 脊髓损伤组术后 1 d 出血和水肿, 3 d 出现坏死和胶质细胞增生, 7 d 开始修复; 吡拉西坦组术后 1 d 出血和水肿减轻, 3 d 坏死区减少, 7 d 修复加速和细胞结构重建

图 1 各组大鼠造模后不同时间点脊髓 HE 染色变化($\times 100$)

Fig.1 Changes in HE staining of spinal cord in each rat groups at different time points after modeling ($\times 100$)



注:假手术组 AQP4 染色较淡;脊髓损伤组 AQP4 染色加深,面积增大;吡拉西坦组 AQP4 染色相对减淡,但比假手术组略深

图 2 各组大鼠造模后不同时间点脊髓内 AQP4 蛋白表达水平(×100)

Fig.2 Expression of AQP4 protein in spinal cord of each rat group at different time points after modeling (×100)

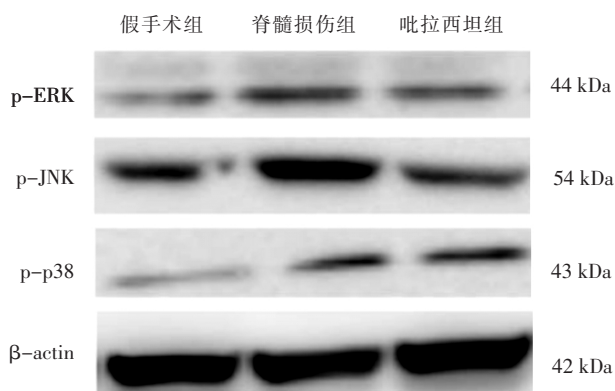


图 3 各组大鼠 MAPK 信号通路蛋白表达图

Fig.3 MAPK signaling pathway protein expression in each rat group

表 3 各组大鼠 p-ERK、p-JNK、p-p38 表达比较(̄x±s)

Tab.3 Comparison of p-ERK, p-JNK, and p-p38 expression levels in each rat groups(̄x±s)

组别	鼠数	p-ERK	p-JNK	p-p38
假手术组	18	0.20±0.02	0.39±0.05	0.17±0.03
脊髓损伤组	18	0.35±0.03 ⁱ	0.80±0.10 ^j	0.29±0.05 ^k
吡拉西坦组	18	0.27±0.02 ^l	0.49±0.04 ^m	0.25±0.02 ⁿ
F 值		29.82	29.17	8.84
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,ⁱt=10,P<0.05;^jt=8,P<0.05;^kt=4.67,P<0.05;与脊髓损伤组比较,^lt=6.67,P<0.05;^mt=6.667,P<0.05;ⁿt=2.4,P<0.05

3.2 吡拉西坦可缩小脊髓病变面积,促进 SCI 修复

本研究 HE 染色结果显示吡拉西坦组在造模第 7 天的脊髓病变面积显著缩小,表明吡拉西坦对 SCI 具有修复作用。尤其对脊髓出血和坏死的减轻作用,可能与它对血管内皮细胞的保护作用 and 微循环改善能力密切相关。这种假设基于 WINBLAD^[19]的研究。另一种解释是吡拉西坦可能通过抑制炎症反应和减少氧化应激来达到对脊髓的保护效果。这种观点基于 KALKAN 等^[20]的研究。不过,无论是哪种机制,都表明了吡拉西坦对 SCI 的潜在治疗价值。但仅仅依靠形态学的改变来判断其作用机制是不足够的,为了更全面地了解吡拉西坦在 SCI 中的作用,进一步研究了它对 MAPK 信号通路和 AQP4 水通道蛋白的影响,以

期为后续的研究提供更丰富的理论依据。

3.3 吡拉西坦可改善 AQP4 表达和减轻脊髓水肿

一般情况下,AQP4 对于维持大脑和脊髓内部的水平衡起到关键作用,帮助调节细胞间和细胞内的水分流动^[4]。损伤后脊髓经常出现水肿,即水分在受损区域的积聚^[21]。SCI 导致了一系列的炎症反应,这种炎症反应可能会刺激 AQP4 的过度表达,从而导致水分的过度积聚,即 AQP4 可能在 SCI 后的炎症反应中扮演了“放大器”的角色。表明吡拉西坦可能与 AQP4 的某些调控因子有交互作用,从而抑制 AQP4 的过度表达;或者吡拉西坦可能直接与 AQP4 结合,改变其活性,阻止其促进水分的过度积聚。这就是吡拉西坦减轻 SCI 后的水肿的机制^[22-23]。除了调节水分平衡,AQP4 还可能参与到其他与 SCI 相关的生理或病理过程中,如神经递质的传递、炎症介质的释放等,这为吡拉西坦的治疗效果提供了另一种可能的解释。

本研究强调了吡拉西坦在 SCI 治疗中的潜在价值,特别是通过调节 AQP4 的表达来减轻脊髓水肿。然而,本研究结果主要基于免疫组化来评估 AQP4 的表达,还不足以揭示吡拉西坦的所有作用机制。未来可进一步探讨吡拉西坦如何在分子层面上调节 AQP4 的表达,以及它在 SCI 治疗中的其他机制。

3.4 吡拉西坦通过调控 MAPK 信号通路治疗 SCI

MAPK 信号通路是调控 SCI 进程中重要的信号

通路之一^[24]。在众多信号转导通路中,ERK、JNK、p38 是 MAPK 信号通路家族的重要成员^[25]。此外,MAPK 信号通路与其他信号通路之间存在交互作用,共同参与 SCI 的病理过程^[26]。本研究结果发现吡拉西坦治疗 SCI 后,降低了脊髓内 p-ERK、p-JNK、p-38 的蛋白水平,这可能与其结构或分子特性有关,使其能够与某些关键的酶或受体结合,进而调控 MAPK 通路的活性。它可能通过抑制某些特定的激酶,或增强某些特定的磷酸酶的活性,从而导致 p-ERK、p-JNK 和 p-38 的蛋白水平降低。其次,考虑到 ERK、JNK 的激活与神经保护、轴突生长和炎症反应有关^[27],可以进一步推测吡拉西坦可能通过调节 MAPK 信号通路,进而影响神经元的存活、轴突的再生以及炎症的进展。本研究结果发现吡拉西坦显著降低了炎症因子的表达,这可能与 MAPK 信号通路的调控密切相关。然而,仍有许多问题有待解决,如吡拉西坦是否还通过其他信号通路发挥作用?它与其他治疗策略相结合会产生怎样的效果?未来的研究可以进一步探讨它在 SCI 治疗中的潜在机制。

3.5 吡拉西坦可降低炎症反应

本研究结果显示吡拉西坦能够显著抑制炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达。吡拉西坦可能通过对 MAPK 信号通路的调控,进而改善脊髓内的氧化应激反应和减缓继发的全身炎症反应。根据文献^[28],吡拉西坦确实显示了在神经损伤后的保护作用,但其具体机制仍是一个值得探索的领域。结合本研究结果,笔者认为吡拉西坦可能通过影响 MAPK 信号通路来发挥其治疗效果。此通路已知可以对脊髓细胞的分化、生存和凋亡信号进行传导^[29],还与炎症反应进程密切相关。神经细胞的修复不仅仅与炎症因子有关,还与细胞的新陈代谢、自由基的清除等过程密切相关。那么,吡拉西坦是否具有促进细胞新陈代谢或提高细胞对自由基的清除能力的作用?还有待进一步研究。结合上述推理,笔者认为吡拉西坦是通过对 MAPK 信号通路的调控,特别是对 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达的抑制,来为神经细胞的恢复提供有利条件。

3.6 本研究的局限性

虽然研究观察了 MAPK 信号通路的变化,但对于吡拉西坦如何影响这些分子通路的具体机制并未进行深入探讨。并且,本研究所有接受吡拉西坦治疗的大鼠都接受了相同剂量的吡拉西坦,未进行剂量-反应关系的研究,不同剂量的吡拉西坦可能会产生不同的效果,有待进一步试验验证。本研究缺乏阳性药物对照的设计,今后研究计划引入阳性药物对照组,以便更准确地评估吡拉西坦在 SCI 治疗中的

相对效用。

本研究结果表明吡拉西坦在 SCI 治疗中具有显著的作用。首先,吡拉西坦能显著提高 SCI 大鼠的运动功能恢复。这可能源于吡拉西坦对神经细胞兴奋性传导和新陈代谢的改善,促进了神经修复和神经突触的重建。其次,吡拉西坦在缩小脊髓病变面积方面展现出积极作用,特别是在减轻脊髓出血和坏死方面。这可能归功于吡拉西坦对血管内皮细胞的保护作用及其改善微循环的能力。此外,还发现吡拉西坦能有效改善 AQP4 的表达,减轻脊髓水肿,表明吡拉西坦通过调节水分平衡,可能减轻了由过度 AQP4 表达引起的炎症反应和水肿。在 MAPK 信号通路方面,吡拉西坦通过降低 p-ERK、p-JNK、p-38 的蛋白水平,显示出其调节该通路活性的潜能,这可能与神经保护、轴突生长和炎症反应的调控有关。此外,吡拉西坦显著抑制了炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达,表明了其在减轻脊髓内氧化应激反应和控制继发全身炎症反应中的作用。本研究揭示了吡拉西坦可能具有临床治疗 SCI 的潜力,为进一步的研究和开发奠定了一定的实验基础。

参考文献

- [1] 李京,李嘉熙,贺西京,等. Notch 信号通路在脊髓损伤中的研究进展[J]. 中国骨伤,2022,35(2):194-198.
LI J, LI J X, HE X J, et al. Research progress of Notch signaling pathway in spinal cord injury[J]. China J Orthop Traumatol, 2022, 35(2):194-198. Chinese.
- [2] XU H X, ZHAO W H, ZHOU Y M, et al. Multi-omics in spinal cord injury: diagnosis, prognosis, and treatment[J]. Cell Mol Biol, 2022, 68(11):58-70.
- [3] LOZADA-MARTÍNEZ I D, RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ M M, OSPINA-RIOS J, et al. Neurogenic pulmonary edema in subarachnoid hemorrhage: relevant clinical concepts[J]. Egypt J Neurosurg, 2021, 36(1):27.
- [4] GARCIA T A, JONAK C R, BINDER D K. The role of aquaporins in spinal cord injury[J]. Cells, 2023, 12(13):1701.
- [5] 敬聪, 王志刚, 王君, 等. 脊髓损伤相关信号通路在脊髓损伤修复过程中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(16):52-55, 60.
JING C, WANG Z G, WANG J, et al. Research progress of spinal cord injury related signaling pathways in the repair of spinal cord injury[J]. China Med Her, 2021, 18(16):52-55, 60. Chinese.
- [6] GUAN B, ANDERSON D B, CHEN L X, et al. Global, regional and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. BMJ Open, 2023, 13(10):e075049.
- [7] MELIN J, AXWALTER E, ÅHRÉN G, et al. Research priorities to enhance life for people with spinal cord injury: a Swedish priority setting partnership[J]. Spinal Cord, 2023, 61:570-577.
- [8] 宋洁菲, 周雨昕, 张宇, 等. 炎症因子及其相关信号通路在脊髓损伤调控机制中的研究进展[J]. 中国医药导报, 2021, 18(32):38-41.

- SONG J F, ZHOU Y X, ZHANG Y, et al. Research progress of inflammatory factors and their related signaling pathways in the regulation of spinal cord injury[J]. *China Med Her*, 2021, 18(32):38-41. Chinese.
- [9] GUO F L, ZHENG X L, HE Z Y, et al. Nimodipine promotes functional recovery after spinal cord injury in rats[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:733420.
- [10] 刘淑嘉, 戴丹, 王国军. 吡拉西坦注射液治疗对血管性认知障碍患者血清氧化应激指标、神经递质水平及生活质量的影响[J]. *医学理论与实践*, 2022, 35(23):4001-4004. Chinese.
- LIU S J, DAI D, WANG G J. Effect of piracetam injection on serum oxidative stress index, neurotransmitter level and quality of life in patients with vascular cognitive impairment[J]. *J Med Theory Pract*, 2022, 35(23):4001-4004. Chinese.
- [11] 罗红梅, 崔燎, 吴铁. 吡拉西坦抗 D-半乳糖性骨质疏松的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(18):3564-3566. Chinese.
- LUO H M, CUI L, WU T. Effect of piracetam on D-galactose-induced osteoporosis[J]. *Chin J Gerontol*, 2011, 31(18):3564-3566. Chinese.
- [12] 郝小娇, 程丽霞, 程秀臻. 急性乙醇中毒大鼠大脑皮层氨基酸类递质的变化及吡拉西坦的干预研究[J]. *潍坊医学院学报*, 2009, 31(5):376-378. Chinese.
- HAO X J, CHENG L X, CHENG X Z. The change of amino acids in the cerebral cortex of the rats with acute alcoholism and the intervention of piracetam on it[J]. *Acta Acad Med Weifang*, 2009, 31(5):376-378. Chinese.
- [13] CHERIYAN T, RYAN D J, WEINREB J H, et al. Spinal cord injury models: a review[J]. *Spinal Cord*, 2014, 52(8):588-595.
- [14] 徐叔云. *药理实验方法学*[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002. Chinese.
- XU S Y. *Pharmacological Experimental Methodology*[M]. 3rd Edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002. Chinese.
- [15] CHEN R Y, CHANG H S, HUANG H C, et al. Comorbidity of cardiorespiratory and locomotor dysfunction following cervical spinal cord injury in the rat[J]. *J Appl Physiol*, 2023, 135(6):1268-1283.
- [16] WU Q L, LIU G D, XU L X, et al. Repair of neurological function in response to FK506 through CaN/NFATc1 pathway following traumatic brain injury in rats[J]. *Neurochem Res*, 2016, 41(10):2810-2818.
- [17] ZHANG C Y, ZHANG K, CHEN B, et al. Meningitis as a recurrent manifestation of anti-AQP4/anti-MOG negative neuromyelitis optica spectrum disorder: a case report[J]. *BMC Neurol*, 2021, 21(1):109.
- [18] SCHEFF S W, SAUCIER D A, CAIN M E. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score[J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(10):1251-1260.
- [19] WINBLAD B. Piracetam: a review of pharmacological properties and clinical uses[J]. *CNS Drug Rev*, 2005, 11(2):169-182.
- [20] KALKAN E, KESKIN F, KAYA B, et al. Effects of iloprost and piracetam in spinal cord ischemia-reperfusion injury in the rabbit[J]. *Spinal Cord*, 2011, 49(1):81-86.
- [21] PAN Q L, LIN F X, LIU N, et al. The role of aquaporin 4 (AQP4) in spinal cord injury[J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2022, 145:112384.
- [22] MEYER H S, WAGNER A, RAUFER A, et al. Surgery in acute metastatic spinal cord compression: timing and functional outcome[J]. *Cancers*, 2022, 14(9):2249.
- [23] KITCHEN P, SALMAN M M, HALSEY A M, et al. Targeting aquaporin-4 subcellular localization to treat central nervous system edema[J]. *Cell*, 2020, 181(4):784-799. e19.
- [24] 王惟达, 蒋林. miR-495 调控 MAPK/ERK 信号通路对大鼠脊髓损伤后神经元自噬的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(8):1605-1610. Chinese.
- WANG W D, JIANG L. Effect of miR-495 regulating MAPK/ERK signaling pathway on neuronal autophagy after spinal cord injury in rats[J]. *Chin J Immunol*, 2023, 39(8):1605-1610. Chinese.
- [25] 刘建, 叶玉军, 刘树民, 等. 基于 p38MAPK 信号通路分析咪达唑仑对腰椎间盘突出症模型大鼠疼痛的影响[J]. *中国骨伤*, 2023, 36(1):55-60. Chinese.
- LIU J, YE Y J, LIU S M, et al. Analysis of the effect of midazolam on pain in a rat model of lumbar disc herniation based on the p38 MAPK signaling pathway[J]. *China J Orthop Traumatol*, 2023, 36(1):55-60. Chinese.
- [26] CHEN J B, ZHOU R, FENG Y, et al. Molecular mechanisms of exercise contributing to tissue regeneration[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1):383.
- [27] 张晓阳, 牛晓波, 张彦昌. 吡拉西坦联合甘露醇对脑出血后脑水肿患者神经功能的影响[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2023, 33(6):69-71. Chinese.
- ZHANG X Y, NIU X B, ZHANG Y C. Effect of piracetam combined with mannitol on neurological function in patients with cerebral edema after cerebral hemorrhage[J]. *Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 33(6):69-71. Chinese.
- [28] 孙忠人, 王瑞琪, 卢英琦, 等. 基于 MAPK 信号通路调控探究针灸治疗脊髓损伤的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(3):1172-1175. Chinese.
- SUN Z R, WANG R Q, LU Y Q, et al. Research progress on acupuncture treatment of spinal cord injury based on the regulation of MAPK signaling pathway[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2023, 38(3):1172-1175. Chinese.
- [29] HIRSCH-REINSHAGEN V, VELENOSI A, MORRIS S R, et al. International spinal cord injury biobank: a biorepository and resource for translational research[J]. *J Neurotrauma*, 2022, 39(23/24):1708-1715.

(收稿日期:2024-03-04 本文编辑:李宜)