

胸腺肽 $\beta 4$ 对氧化应激诱导的脊髓源性神经干/祖细胞损伤的作用及机制

李宏维, 张海鸿

(兰州大学第二医院脊柱外科, 甘肃 兰州 730030)

【摘要】 目的: 探讨胸腺肽 $\beta 4$ (thymosin beta 4, T $\beta 4$) 在过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂) 诱导的脊髓源性神经干/祖细胞 (neural stem/progenitor cells, NSPCs) 氧化应激损伤中的作用及机制。方法: 分离 Sprague-Dawley (SD) 成年雄性大鼠中的原代 NSPCs, 将其分为对照组 (未处理的 NSPCs 细胞), H₂O₂ 处理组 (500 μ M H₂O₂ 损伤的 NSPCs 细胞), T $\beta 4$ 处理 3 组 (H₂O₂ 处理组基础上分别用 1、2.5、5 μ g/ml T $\beta 4$ 处理的 NSPCs 细胞), TAK-242 处理组 [H₂O₂ 处理组基础上用 T $\beta 4$ (5 μ g/ml) 和 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 抑制剂 TAK-242 处理的 NSPCs 细胞]。采用髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 过表达慢病毒感染 NSPCs 细胞, 构建 MyD88 过表达细胞系, 并经 H₂O₂ 和 T $\beta 4$ 处理。qRT-PCR 和 Western blot 检测 T $\beta 4$, TLR4, MyD88 的表达水平; MTT 法和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒检测细胞活力; 采用 Fluo-3/AM 探针法检测细胞内 Ca²⁺ 水平; 流式细胞术和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 和 Caspase-9 试剂盒检测细胞凋亡水平; 相应试剂盒分别检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量。酶联免疫吸附测定法检测白细胞介素 (interleukin, IL)-6 和 IL-1 β 的含量。结果: H₂O₂ 损伤的 NSPCs 中 T $\beta 4$ 的表达降低 ($P < 0.05$)。与 H₂O₂ 处理组相比, T $\beta 4$ 处理 3 组和 TAK-242 处理组 NSPCs 的细胞活力、Ca²⁺ 浓度显著增加 ($P < 0.05$), LDH 释放量、细胞凋亡显著减少 ($P < 0.05$), ROS 和促炎细胞因子的生成显著减少 ($P < 0.05$), TLR4 和 MyD88 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。MyD88 过表达后 NSPCs 细胞活力, SOD 活性和 GSH 含量降低, LDH 释放量、细胞凋亡显著增加 ($P < 0.05$); 而 MyD88 过表达后 NSPCs 经 T $\beta 4$ 处理后, 细胞活力、SOD 活性和 GSH 含量升高, LDH 释放量以及细胞凋亡降低 ($P < 0.05$)。结论: T $\beta 4$ 通过抑制 TLR4, MyD88 途径减轻 H₂O₂ 诱导的 NSPCs 氧化应激、凋亡和炎症等损伤。

【关键词】 胸腺肽 $\beta 4$; 神经干细胞; 祖细胞; 氧化应激损伤; 髓样分化因子 88

中图分类号: R34

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.08.012

开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):



Effect and mechanism of thymosin beta 4 on spinal cord-derived neural stem/progenitor cell injury induced by oxidative stress LI Hong-wei and ZHANG Hai-hong. Department of Spine Surgery, Lanzhou University Second Hospital, Lanzhou 730030, Gansu, China

ABSTRACT Objective: To investigate the role and mechanism of thymosin beta 4 (T $\beta 4$) in oxidative stress injury of spinal cord-derived neural stem/progenitor cells (NSPCs) induced by hydrogen peroxide (H₂O₂). **Methods:** NSPCs were isolated from Sprague-Dawley (SD) adult male rats, and divided into control group (untreated NSPCs cells), H₂O₂ group (NSPCs cells damaged by 500 μ M H₂O₂), T $\beta 4$ -3 groups (NSPCs were treated with 1, 2.5, 5 μ g/ml T $\beta 4$ on the basis of H₂O₂ treatment) and TAK-242 group [NSPCs were treated with 5 μ g/ml T $\beta 4$ and Toll-like receptor 4 (TLR4) inhibitor TAK-242 on the basis of H₂O₂ treatment]. NSPCs were transfected with lentivirus vector of myeloid differentiation factor 88 (MyD88) to construct MyD88-overexpressing cell lines, which were treated with H₂O₂ and T $\beta 4$. The expression of T $\beta 4$, TLR4, MyD88 were detected by qRT-PCR and Western blot. Cell viability was detected by MTT assay and lactate dehydrogenase (LDH) assay kit. Ca²⁺ concentration was detected by Fluo-3/AM probe method. The apoptosis of NSPCs was detected by flow cytometry and Caspase-3 and Caspase-9 kits; reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) activity and glutathione (GSH) content were detected by corresponding kits. Interleukin (IL)-6 and IL-1 β were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. **Results:** The expression of T $\beta 4$ was decreased in H₂O₂ injured NSPCs ($P < 0.05$). Compared with H₂O₂ group, the cell viability and Ca²⁺ concentration was significantly increased, release of LDH and apoptosis were significantly de-

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31960175)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (No. 31960175)

通讯作者: 张海鸿 E-mail: haihongzhlz@163.com

Corresponding author: ZHANG Hai-hong E-mail: haihongzhlz@163.com

creased, production of ROS and pro-inflammatory cytokines were significantly decreased, and the expression levels of TLR4 and MyD88 protein were significantly decreased in T β 4-3 groups and TAK-242 group ($P < 0.05$). After overexpression of MyD88, cell viability, SOD activity and GSH content of NSPCs decreased, LDH release and apoptosis increased significantly ($P < 0.05$), while after treatment with T β 4, cell viability, SOD activity and GSH content increased, LDH release and apoptosis decreased ($P < 0.05$). **Conclusion:** T β 4 attenuates H $_2$ O $_2$ -induced NSPCs oxidative stress, apoptosis and inflammation in NSPCs via inhibiting TLR4 and MyD88 pathways.

KEYWORDS Thymosin β 4; Neural stem cells; Progenitor cells; Oxidative stress injury; Myeloid differentiation factor 88

脊髓损伤是指一种慢性损伤状态, 它会扩张并维持脱髓鞘^[1]。脊髓损伤部位的轴突很难再生, 导致不可逆的运动无力、感觉障碍和自主神经功能障碍^[2]。脊髓损伤是一种严重的神经系统疾病, 脊髓损伤会给患者带来沉重的身体负担和心理伤害^[3]。氧化应激是脊髓损伤继发性损伤的重要标志和病理过程, 因此减轻氧化应激成为干预治疗脊髓损伤的有效途径^[4]。神经干/祖细胞(neural stem/progenitor cells, NSPCs)是存在于脊髓中央管室周区域的神经干细胞, 在神经损伤后的功能和组织学恢复中发挥着重要作用^[5-6]。脊髓损伤中氧化应激导致的继发性损伤中 NSPCs 的活力较差, 不能促进脊髓的充分再生^[7]。脊髓损伤诱导的氧化损伤可导致神经元凋亡, 进而引起凋亡相关表达蛋白的改变^[8-9]。相关研究发现, 脊髓损伤后坏死星形胶质细胞中 Toll 样受体 4 (Toll-like receptors 4, TLR4) 和髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 的表达量增加, 而抑制 TLR4, MyD88 通路是治疗氧化应激相关疾病的一种潜在的治疗策略^[10]。胸腺肽 β 4 (thymosin beta 4, T β 4) 最初是从小牛胸腺中分离出来的, 是一种普遍存在的细胞内蛋白和主要的 G-肌动蛋白整合分子^[11]。Cheng 等^[12]研究发现 T β 4 对脊髓损伤的大鼠有较好的安全性和治疗效果。T β 4 有抗炎、血管生成、伤口愈合和保护心脏等功能, 可以调节氧化应激所造成的相关疾病^[13-14]。T β 4 可抑制细胞内氧化应激所产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 减轻氧化应激诱导的细胞损伤^[15]。因此, 本研究旨在探索 T β 4 在氧化应激损伤中的作用和 T β 4 在 TLR4, MyD88 通路的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、质粒、仪器和动物

B-27 神经基础培养基, 白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β (IL-1 β) 酶联免疫吸附测定 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒, IL-6 ELISA 试剂盒, 购自美国 Invitrogen; 肝素 (H3393)、二甲基亚砜 (D4540)、分散酶 (D4818-2MG)、脱氧核糖核酸酶 (E1014-5KU)、木瓜蛋白酶 (P4762-25MG)、TLR4 抑制剂 TAK-242 (614316-5MG), 购自

Sigma; 嘌呤霉素, 购自美国 ThermoFisher; 成纤维细胞生长因子-2 (3339-FB), 购自美国 R&D 公司; T β 4 重组蛋白, 购自美国 KALANG 公司; ROS 测定试剂盒 (S0033S), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (S0101S), 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 活性检测试剂盒 (C1115), Caspase-9 活性检测试剂盒 (C1157), MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (C009s), 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒 (C0016), 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (S0053), 购自上海碧云天生物技术有限公司; 细胞内 Ca $^{2+}$ 钙离子检测试剂盒 (HR0943-QSK), 购自北京百奥莱博; 抗 T β 4 兔多克隆抗体 (ab14334), TLR4 兔多克隆抗体 (ab13867), MyD88 抗体 (ab212021) 山羊多克隆抗体, β -actin 小鼠单克隆抗体 (ab6276), 购自英国 Abcam; 阴性对照、MyD88-过表达慢病毒, 购自湖南丰晖生物科技有限公司; PrimeScript RT Master Mix, 购自 TaKaRa; SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II, 购自 QIAGEN; 酶标仪 680, 购自美国 Bio-Rad 公司产品; 多功能 M200 酶标仪, 购自瑞士 Tecan; 荧光倒置显微镜, 购自北京 Olympus; CytoFLEX 流式细胞仪, 购自美国 Beckman Coulter。2 月龄 400 g 雄性 SD 大鼠, 购自成都达硕实验动物有限公司。

1.2 原代细胞的分离和培养

在含有 0.45% 葡萄糖的汉克斯平衡盐溶液中加入分散酶 (0.1%)、脱氧核糖核酸酶 (0.01%)、木瓜蛋白酶 (0.1%)、硫酸镁 (12.4%), 在其溶液中剥离 Sprague-Dawley (SD) 成年雄性大鼠脊髓, 并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 分离原代 NSPCs。分离的原代 NSPCs 在含有成纤维细胞生长因子-2 (20 ng/ml), 青霉素和链霉素 (0.1 g/ml), 肝素 (2 mg/ml) 和 L-谷氨酰胺 (2 mmol/L) 的 B-27 神经基础培养基中培养 7 d 后传代。用流式细胞仪筛选 5~20 代次的 NSPCs 中巢蛋白和性别决定区 Y 框蛋白 2 的阳性表达。本实验所涉及的实验动物方案均按照兰州大学第二医院动物实验基本原则进行, 并得到了兰州大学第二医院实验动物管理委员会的许可, 许可证号 SYXK (甘) 2018-0003。

1.3 MyD88 过表达细胞系的构建

将约 4×10^4 /ml 的 NSPCs 细胞接种到细胞 6 孔板中。第 2 天,将培养液换为新鲜培养基,分别用阴性对照(negative control, NC)慢病毒和 MyD88 过表达(overexpression, OE)慢病毒感染 NSPCs 细胞,构建 MyD88-NC 细胞系和 MyD88-OE 细胞系,感染 24 h 后,将含慢病毒的培养基替换为正常培养基。感染 48 h 后在荧光倒置显微镜下观察荧光表达。用 $5 \mu\text{M}$ 嘌呤霉素筛选细胞,1 周后用于后续试验。

1.4 细胞处理及实验分组

1.4.1 细胞处理 将细胞接种至 96 孔细胞培养板,待细胞长至 80%后,分别加入 0、50、100、200、500、1 000 μM 浓度的 H_2O_2 至每个孔中诱导 NSPCs 损伤。在 37°C 培养箱中培养 12 h 后确定 H_2O_2 的最适损伤浓度。

1.4.2 实验分组 (1)在 T β 4 对 NSPCs 作用的研究分组:对照组,未处理的 NSPCs 细胞; H_2O_2 处理组,500 μM H_2O_2 损伤的 NSPCs 细胞;T β 4 处理 3 组,包括 T β 4 1 组(1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T β 4+500 μM H_2O_2 处理的 NSPCs),T β 4 2.5 组(2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T β 4+500 μM H_2O_2 处理的 NSPCs),T β 4 5 组(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T β 4+500 μM H_2O_2 处理的 NSPCs)。(2)在 TLR4 抑制剂 TAK-242 对 NSPCs 作用的研究分组:对照组,未处理的 NSPCs 细胞; H_2O_2 处理组,500 μM H_2O_2 损伤的 NSPCs 细胞;TAK-242 处理组,500 μM H_2O_2 + 5 μM TAK-242 处理的 NSPCs 细胞。(3)在 MyD88 过表达对 NSPCs 作用的研究分组:对照组,未处理的 NSPCs 细胞;MyD88-NC 对照组,500 μM H_2O_2 +MyD88-NC 处理 NSPCs 细胞;MyD88-OE 组,500 μM H_2O_2 + MyD88-OE 处理 NSPCs 细胞;T β 4 处理的 MyD88-OE 组,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ T β 4+500 μM H_2O_2 处理的 MyD88-OE 细胞系。

1.5 观察项目与方法

1.5.1 MTT 法和 LDH 法检测细胞活力 各组细胞经相应的处理后,在 96 孔板中每孔加入 100 μl 含有 NSPCs(约 2×10^4 /ml)的细胞悬液在神经基础培养基中养 24 h,然后每孔加入 20 μl MTT, 37°C 孵育 3 h。加入 200 μl 二甲基亚砜,在 570 nm 波长处使用酶标仪测量其吸光度。根据 LDH 检测试剂盒说明书检测 NSPCs 中 LDH 的释放量。

1.5.2 qRT-PCR 检测 T β 4 和 MyD88 mRNA 水平 收集 NSPCs 细胞,加入 TRIzol 裂解液提取总 RNA。根据 PrimeScript RT Master Mix 的说明书,将 1 μg RNA 逆转录到 cDNA 中。使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 检测 T β 4、MyD88 基因的 mRNA 水平。qRT-PCR 引物如下。

T β 4-F: ATGTCTGACAAACCCGATATG;

T β 4-R: GCTAGCCAGACCATCAGATG;

MyD88-F: TTGAAAGGGTCTTAACGGAGTG;

MyD88-R: TTGAAAGGGTCTTAACGGAGTG。

所有引物由生工生物技术有限公司(中国上海)合成。

1.5.3 Western blot 检测 T β 4、TLR4、MyD88 蛋白水平 用 RIPA 裂解缓冲液裂解 NSPCs 制备总蛋白裂解液,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后电转印到聚偏二氟乙烯膜上。加入 T β 4、TLR4、MyD88 和 β -actin 一抗稀释液,在 4°C 孵育过夜后,加入辣根过氧化物酶标记二抗稀释液,室温孵育 2 h。加入增强化学发光液观察蛋白条带,使用 ImageLab[™] 软件进行灰度值分析, β -actin 作为内参。

1.5.4 Fluo-3/AM 探针法检测细胞内 Ca^{2+} 水平 根据 Ca^{2+} 检测试剂盒说明书,各组的 NSPCs 中加入 5 μM Fluo-3/AM 钙离子荧光探针并在 37°C 孵育。在 Krebs 缓冲液中培养 30 min 后。酶标仪测定 Fluo-3 的放射量,通过计算各曲线下的综合面积计算细胞内的钙离子浓度。

1.5.5 细胞凋亡检测 NSPCs 细胞用 Annexin V-FITC 和碘化丙啶双重染色, 37°C 暗箱孵育 1 h。流式细胞术检测细胞凋亡水平。根据氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)和氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)活性试剂盒说明测定各组 NSPCs 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 活性。

1.5.6 氧化应激水平检测 采用 DCFH-DA 荧光法,根据 ROS 检测试剂盒说明方法测定细胞内 ROS 的产生。使用 SOD 活性检测试剂盒、GSH 检测试剂盒测量各组 NSPCs 的 SOD 活性和 GSH 含量。

1.5.7 炎症因子 IL-6 和 IL-1 β 的水平检测 收集各组 NSPCs 培养上清,ELISA 试剂盒测定细胞培养上清中 IL-6 和 IL-1 β 的水平。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。定量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H_2O_2 处理降低 NSPCs 细胞活力

为确定 H_2O_2 的最适损伤浓度,用不同浓度的 H_2O_2 处理细胞,结果如图 1 所示,500 μM 的 H_2O_2 为最适损伤浓度。

2.2 H_2O_2 处理降低 NSPCs 细胞中 T β 4 水平

随着 H_2O_2 浓度的增加,T β 4 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。见图 2。

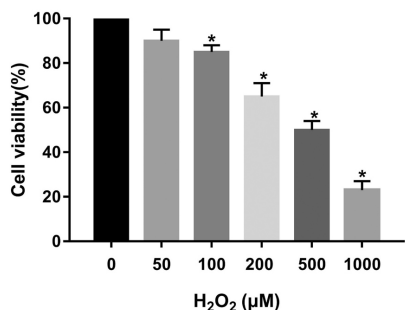


图 1 不同浓度 H₂O₂ 处理的 NSPCs 细胞活力检测。注：与对照组比较，**P*<0.05。对照组为未经 H₂O₂ 处理的 NSPCs 细胞(H₂O₂ 浓度为 0 μM,最左侧的柱状图为对照组)

Fig.1 Cell viability of NSPCs treated with different concentrations of H₂O₂. Note: Compared with control group, **P*<0.05. The control group was NSPCs without H₂O₂ treatment (H₂O₂ concentration was 0 μM, the left-most bar was the control group)

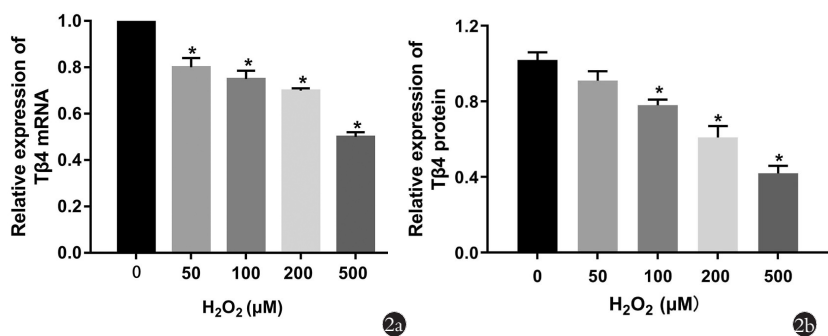


图 2 不同浓度 H₂O₂ 处理的 NSPCs 细胞中 TB4 水平。注：与对照组比较，**P*<0.05。对照组为未经 H₂O₂ 诱导和 TB4 处理的 NSPCs 细胞 (H₂O₂ 浓度为 0 μM, 最左侧的柱状图为对照组) 2a. NSPCs 细胞中 TB4 的 mRNA 水平 2b. NSPCs 细胞中 TB4 的蛋白水平

Fig.2 TB4 expression in NSPCs treated with different concentrations of H₂O₂. Note: Compared with control group, **P*<0.05. The control group was NSPCs without H₂O₂ treatment (H₂O₂ concentration was 0 μM, the leftmost bar was the control group) 2a. Relative expression of TB4 mRNA in NSPCs 2b. Relative expression of TB4 protein in NSPCs

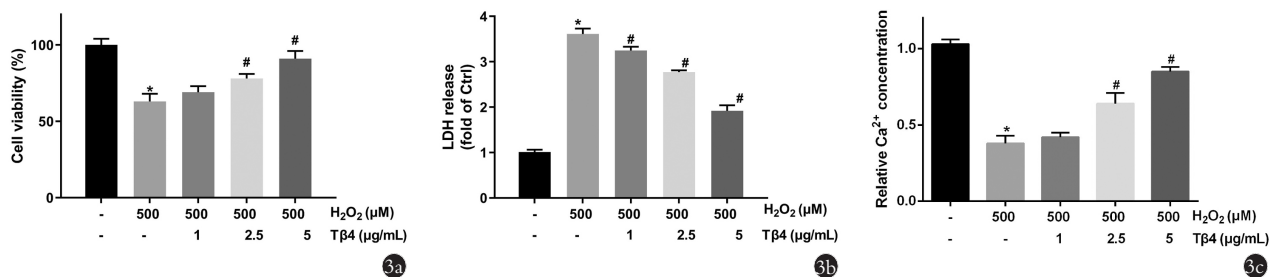


图 3 不同浓度 TB4 对 500 μM H₂O₂ 诱导的 NSPCs 细胞活力影响。注：与对照组比较，**P*<0.05；与 H₂O₂ 处理组比较，#*P*<0.05。对照组为未经 H₂O₂ 诱导和 TB4 处理的 NSPCs 细胞(最左侧的柱状图为对照组),H₂O₂ 处理组为经 H₂O₂ 诱导但未经 TB4 处理的 NSPCs 细胞(从左侧数第 2 个柱状图为 H₂O₂ 处理组) 3a. MTT 法检测 NSPCs 细胞活力 3b. NSPCs 细胞内 LDH 水平 3c. NSPCs 细胞内 Ca²⁺ 浓度

Fig.3 Effect of different concentrations of TB4 on 500 μM of H₂O₂-induced NSPCs cell viability. Note: Compared with control group, **P*<0.05; compared with H₂O₂ group, #*P*<0.05. Control group was NSPCs without H₂O₂ and TB4 treatment (the leftmost bar was the control group). H₂O₂ group was NSPCs with H₂O₂-induced and without TB4 treatment (the left second bar was H₂O₂ group) 3a. Cell viability was analyzed by MTT assay 3b. LDH levels in NSPCs 3c. Intracellular Ca²⁺ concentration in NSPCs

2.3 TB4 增强 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 细胞活力及 Ca²⁺ 浓度

为测定 TB4 对 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 影响,用 TB4 处理 H₂O₂ 损伤的 NSPCs。MTT 结果表明,与对照组相比,H₂O₂ 处理组的 NSPCs 活力降低、LDH 释放量显著增加(*P*=0.012)、Ca²⁺ 浓度显著减少(*P*=0.022)。与 H₂O₂ 处理组相比,TB4 处理 3 组中随着 TB4 浓度的增加 NSPCs 活力显著性增加(*P*<0.05)、LDH 释放量显著降低、Ca²⁺ 浓度显著增加(*P*<0.05)。见图 3。

2.4 TB4 降低 H₂O₂ 诱导的 NSPCs 细胞的凋亡

通过流式细胞术检测 TB4 对 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 细胞凋亡的影响,与 H₂O₂ 处理组相比,TB4 处理 3 组随着 TB4 浓度的增加细胞凋亡显著性减少(*P*<0.05)。见图 4。与对照组(1.01±0.06)相比,H₂O₂ 处理组 Caspase-3 (3.37±0.02) 和 Caspase-9 (3.75±0.18) 显著性增加(*P*<0.05)。与 H₂O₂ 处理组相比,TB4

处理 3 组中随着 TB4 浓度的增加 Caspase-3 和 Caspase-9 显著减少(*P*<0.05)。见图 5。这些结果表明 TB4 减少 H₂O₂ 诱导的 NSPCs 细胞凋亡。

2.5 TB4 减轻 H₂O₂ 诱导的 NSPCs 氧化应激及炎症因子水平

检测 TB4 对 H₂O₂ 诱导的氧化应激损伤的影响,与对照组(100±15)相比,H₂O₂ 处理组的 NSPCs 中 ROS 水平显著升高(463±14,*P*=0.022)。与 H₂O₂ 处理组相比,TB4 处理 3 组随着 TB4 浓度的升高 ROS 显著降低(*P*<0.05)。见图 6a。与对照组相比,H₂O₂ 处理组的 NSPCs 中 SOD 活

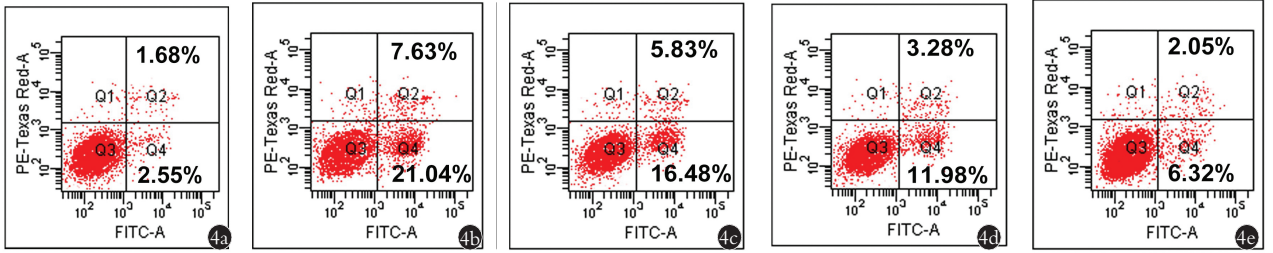


图 4 不同浓度 Tβ4 处理 500 μM H₂O₂ 诱导的 NSPCs 凋亡及凋亡率 4a. 对照组 4b. H₂O₂ 处理组 4c. Tβ4 1 组 4d. Tβ4 2.5 组 4e. Tβ4 5 组
Fig.4 Effect of different concentrations of Tβ4 on 500 μM H₂O₂- induced NSPCs cell apoptosis 4a. Control group 4b. H₂O₂ group 4c. Tβ4 1 group 4d. Tβ4 2.5 group 4e. Tβ4 5 group

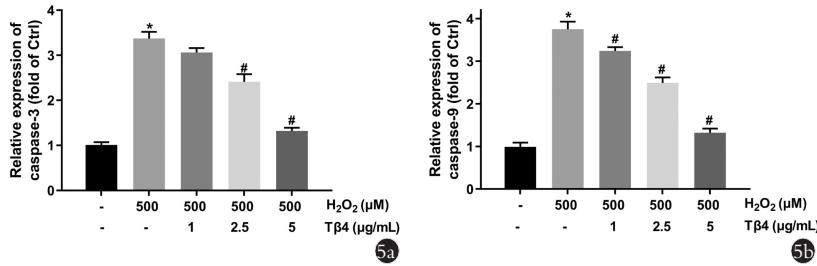


图 5 不同浓度 Tβ4 处理 500 μM H₂O₂ 诱导的 NSPCs 细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 活性。注:与对照组比较, **P*<0.05;与 H₂O₂ 处理组比较, #*P*<0.05 对照组为未经 H₂O₂ 诱导和 Tβ4 处理的 NSPCs 细胞(最左侧的柱状图为对照组);H₂O₂ 处理组为经 H₂O₂ 诱导但未经 Tβ4 处理的 NSPCs 细胞(从左侧数第 2 个柱状图为 H₂O₂ 处理组) 5a. Caspase-3 试剂盒测定 Caspase-3 活性 5b. Caspase-9 试剂盒测定 Caspase-9 活性

Fig.5 Caspase-3 and Caspase-9 activity in NSPCs induced by 500 μM H₂O₂ and treated with different concentrations of Tβ4. Note:Compared with control group, **P*<0.05;compared with H₂O₂ group, #*P*<0.05. Control group was NSPCs without H₂O₂ and Tβ4 treatment (the leftmost bar was the control group). H₂O₂ group was NSPCs with H₂O₂-induced and without Tβ4 treatment (the left second bar was H₂O₂ group) 5a. Levels of Caspase-3 was analyzed by Caspase-3 activity assay kit 5b. Levels of Caspase-9 was analyzed by Caspase-9 activity assay kit

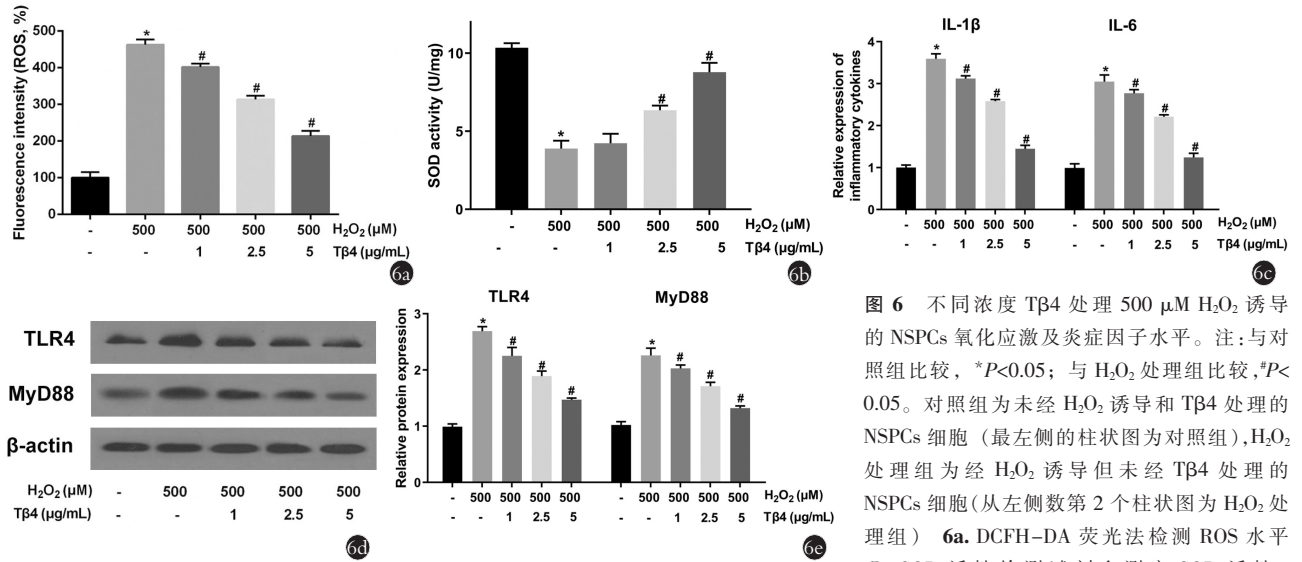


图 6 不同浓度 Tβ4 处理 500 μM H₂O₂ 诱导的 NSPCs 氧化应激及炎症因子水平。注:与对照组比较, **P*<0.05;与 H₂O₂ 处理组比较, #*P*<0.05。对照组为未经 H₂O₂ 诱导和 Tβ4 处理的 NSPCs 细胞(最左侧的柱状图为对照组),H₂O₂ 处理组为经 H₂O₂ 诱导但未经 Tβ4 处理的 NSPCs 细胞(从左侧数第 2 个柱状图为 H₂O₂ 处理组) 6a. DCFH-DA 荧光法检测 ROS 水平 6b. SOD 活性检测试剂盒测定 SOD 活性 6c. ELISA 试剂盒检测 IL-1β 和 IL-6 水平 6d, 6e. Western blot 检测 TLR4 和 MyD88 的蛋白水平,以及相对蛋白表达量统计
Fig.6 Effect of different concentrations of Tβ4 on oxidative stress and inflammatory factor levels in 500 μM H₂O₂-induced NSPCs. Note:Compared with control group, **P*<0.05; compared with H₂O₂ group, #*P*<0.05. Control group was NSPCs without H₂O₂ and Tβ4 treatment (the leftmost bar was the control group). H₂O₂ group was NSPCs with H₂O₂-induced and without Tβ4 treatment (the left second bar was H₂O₂ group) 6a. ROS levels were detected by DCFH-DA method 6b. SOD activity was analyzed by SOD assay kit 6c. Levels of IL-1β and IL-6 were detected by corresponding ELISA kit 6d, 6e. The expression of TLR4 and MyD88 was detected by Western blot, and relative protein expression was counted

性显著降低 (10.34 ± 0.30 vs 3.89 ± 0.50), 促炎性细胞因子 IL-1β (1.00 ± 0.06 vs 3.59 ± 0.12) 和 IL-6 (1.00 ± 0.06 vs 3.05 ± 0.16) 显著升高 (*P*<0.05), Tβ4 处理 3 组与 H₂O₂ 处理组相比, 随着 Tβ4 浓度的增加 SOD 活性显著增加、促炎性细胞因子 IL-1β 和 IL-6 水平显著降低 (*P*<0.05)。见图 6b, 6c。与对照组相比 (0.99 ± 0.05), H₂O₂ 处理组 NSPCs 中 TLR4 (2.69 ± 0.08) 和 MyD88 (2.26 ± 0.13) 蛋白表达量显著增加 (*P*<0.05)。与 H₂O₂ 处理组相比, Tβ4 处理 3 组随着 Tβ4 浓度的增加, TLR4 和 MyD88 的蛋白表达量显著减少 (*P*<0.05)。见图 6d, 6e。

这些结果表明 Tβ4 减轻氧化应激,抑制了 H₂O₂ 损伤 NSPCs 细胞中的 TLR4/MyD88 通路。

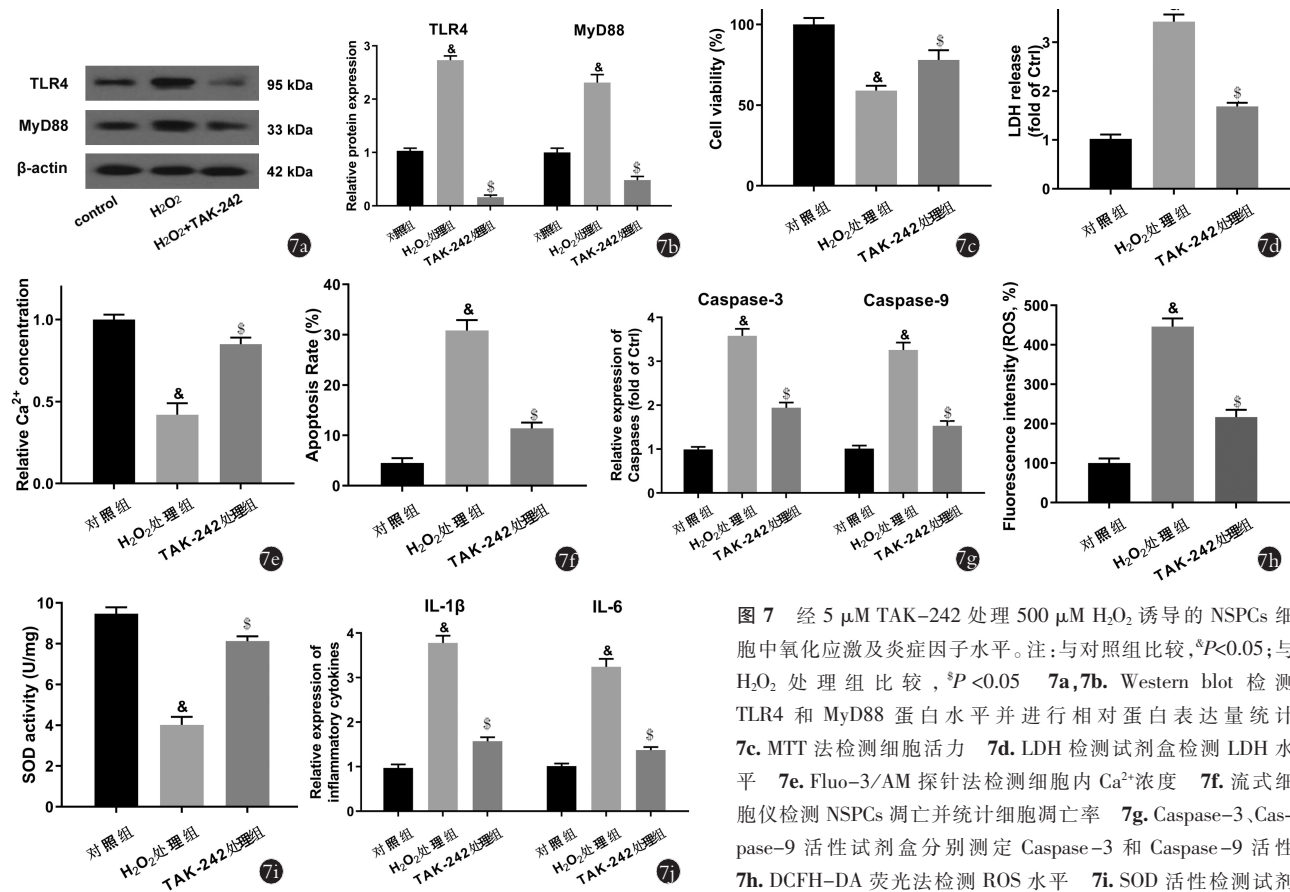
2.6 抑制 TLR4/MyD88 通路减轻氧化应激损伤

为了解 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 中 TLR4/MyD88 通路与 Tβ4 分子机制的关系,用 TLR4 抑制剂 TAK-242 处理 H₂O₂ 损伤的 NSPCs。经 Western blot 检测结果显示,与 H₂O₂ 处理组相比,TAK-242 处理组的 TLR4 (2.73±0.08 vs 0.16±0.04, P=0.011) 和 MyD88 (2.31±0.15 vs 0.48±0.07, P=0.011) 的蛋白表达量显著降低(图 7a,7b)。TLR4 抑制剂 TAK-242 抑制 TLR4/MyD88 通路,与 H₂O₂ 处理组相比,TAK-242 处理组的细胞活力 (59±3 vs 78±6, P=0.041) 显著增加,LDH 的释放显著性降低 (3.42±0.15 vs 1.69±0.07, P=0.031),细胞内 Ca²⁺ 浓度显著增加 (0.42±0.07 vs 0.85±0.04, P=0.021)。见图 7c,7d,7e。与 H₂O₂ 处理组相比,TAK-242 处理组的 NSPCs 的凋亡率 (30.86±2.04 vs 11.37±1.18, P=0.022) 和 Caspase-3 (3.58±0.16 vs 1.94±0.12, P=0.032) 及 Caspase-9 (3.26±0.17 vs

1.53±0.11, P=0.035) 水平显著降低(图 7f,7g),ROS (446±21 vs 217±18, P=0.036),促炎细胞因子 IL-1β (3.78±0.16 vs 1.57±0.09, P=0.029) 和 IL-6 (3.24±0.18 vs 1.37±0.07, P=0.026) 生成水平显著降低,SOD 活性显著增加 (4.02±0.39 vs 8.13±0.23, P=0.034)。见图 7h,7i,7j。在 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 中,TLR4 抑制剂与 Tβ4 作用一致,结果表明 Tβ4 通过 TLR4/MyD88 途径减轻 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 中诱导的 NSPCs 氧化应激损伤。

2.7 Tβ4 抑制 TLR4/MyD88 通路减轻氧化应激损伤

为进一步确定 Tβ4 是否通过抑制 TLR4/MyD88 通路减轻氧化应激损伤,本研究构建了 MyD88 过表达细胞系 MyD88-OE,并用 5 μg/ml 的 Tβ4 处理细胞。与 MyD88-NC 组相比,MyD88-OE 组中 MyD88 的 mRNA 含量 (0.9±0.05 vs 1.58±0.06, P=0.031) 和蛋白表达水平显著增加(图 8)。与 MyD88-NC 组相比,MyD88-OE 组的细胞活性 (63±3 vs 40±6, P=0.038) 显著下降(图 9a);LDH 释放量 (3.80±0.15 vs 6.97±



盒测定 SOD 活性 7j. ELISA 试剂盒检测 IL-1β 和 IL-6 水平

Fig.7 Oxidative stress and inflammatory factor levels in NSPCs induced by 500 μM H₂O₂ and treated with 5 μM TAK-242. Note: Compared with control group, &P<0.05; compared with H₂O₂ group, §P<0.05 7a,7b. TLR4 and MyD88 protein levels and relative protein expressions were determined by Western blot 7c. Cell viability was analyzed by MTT assay 7d. LDH levels were detected by LDH cytotoxicity assay kit 7e. Intracellular Ca²⁺ concentration was detected by Fluo-3/AM probe method 7f. Flow cytometry to detect apoptosis in NSPCs and count apoptosis rate 7g. Levels of Caspases-3 and Caspases-9 were analyzed by corresponding Caspase kits 7h. ROS levels were detected by DCFH-DA method 7i. SOD activity was analyzed by SOD activity assay kit 7j. Levels of IL-1β and IL-6 were detected by corresponding ELISA kit

图 7 经 5 μM TAK-242 处理 500 μM H₂O₂ 诱导的 NSPCs 细胞中氧化应激及炎症因子水平。注:与对照组比较, &P<0.05;与 H₂O₂ 处理组比较, §P<0.05 7a,7b. Western blot 检测 TLR4 和 MyD88 蛋白水平并进行相对蛋白表达量统计 7c. MTT 法检测细胞活力 7d. LDH 检测试剂盒检测 LDH 水平 7e. Fluo-3/AM 探针法检测细胞内 Ca²⁺ 浓度 7f. 流式细胞仪检测 NSPCs 凋亡并统计细胞凋亡率 7g. Caspase-3、Caspase-9 活性试剂盒分别测定 Caspase-3 和 Caspase-9 活性 7h. DCFH-DA 荧光法检测 ROS 水平 7i. SOD 活性检测试剂盒

0.07, $P=0.031$) (图 9b); Caspase-3 (4.23 ± 0.15 vs 8.88 ± 1.00 , $P=0.022$) 和 Caspase-9 (2.75 ± 0.18 vs 5.30 ± 0.09 , $P=0.037$) 水平显著增加 (图 9c, 9d); GSH 水平 (28.0 ± 1.5 vs 11.7 ± 2.9 , $P=0.035$) 和 SOD 的活性 (4.02 ± 0.39 vs 2.03 ± 0.23 , $P=0.029$) 显著下降 (图 9e, 9f)。与 MyD88-OE 组相比, Tβ4 处理的 MyD88-OE 组细胞活性 (40 ± 6 vs 56.7 ± 4.3 , $P=0.039$) 显著上升 (图 9a); LDH 的释放 (6.97 ± 0.07 vs 4.23 ± 0.06 , $P=0.021$) (图 9b); Caspase-3 (8.88 ± 1 vs 4.56 ± 0.17 , $P=0.042$) 和 Caspase-9 (5.30 ± 0.09 vs 2.98 ± 0.13 , $P=0.039$) 水平显著降低 (图 9c, 9d); GSH 水平 (11.66 ± 2.9 vs 23.44 ± 2.60 , $P=0.027$) 和 SOD 活性 (2.13 ± 0.23 vs 5.1 ± 0.4 , $P=0.014$) 显著上升 (图 9e, 9f)。

3 讨论

脊髓损伤是一种严重的神经系统疾病, 会给患者带来沉重的身体负担和心理伤害^[16]。因此, 研究促进功能恢复和减轻神经功能缺损和继发性损伤的方法至关重要^[17-18]。脊髓损伤后在神经功能缺损的恢

复中 NSPCs 起着重要作用^[6,19]。

3.1 Tβ4 可以抑制 H₂O₂ 诱导的炎症因子的表达减少氧化应激反应

脊髓损伤引起的 ROS 产生和氧化应激是继发性损伤的重要病理生理过程。Liu 等^[20]使用 BML-111 通过减轻炎症和氧化应激反应治疗脊髓损伤的大鼠。在本研究中, 用 H₂O₂ 损伤 NSPCs 模拟体外脊髓损伤, 重点研究了 H₂O₂ 损伤的神经干细胞的氧化应激反应, 目的是寻找这个过程的保护分子。Tβ4 是一种内源性 43 氨基酸肽, 分布在所有血小板和白细胞水平较高的细胞中^[21]。外源性 Tβ4 的内化对于细胞的关键功能是至关重要的^[22]。Tβ4 可减少炎症介质和炎症细胞浸润促进神经和血管的恢复^[23-24]。Tβ4 已被证实可通过调节抗氧化酶如 Cu/Zn-SOD 和过氧化氢酶能减少 ROS 的产生^[25]。由于 Tβ4 具有抗氧化应激和抗炎作用, 推测 Tβ4 在脊髓损伤期间有对 NSPCs 有调节的作用。而在 H₂O₂ 损伤的小鼠胚胎神经球中发现了 Tβ4 表达的降低^[26]。在本研究中,

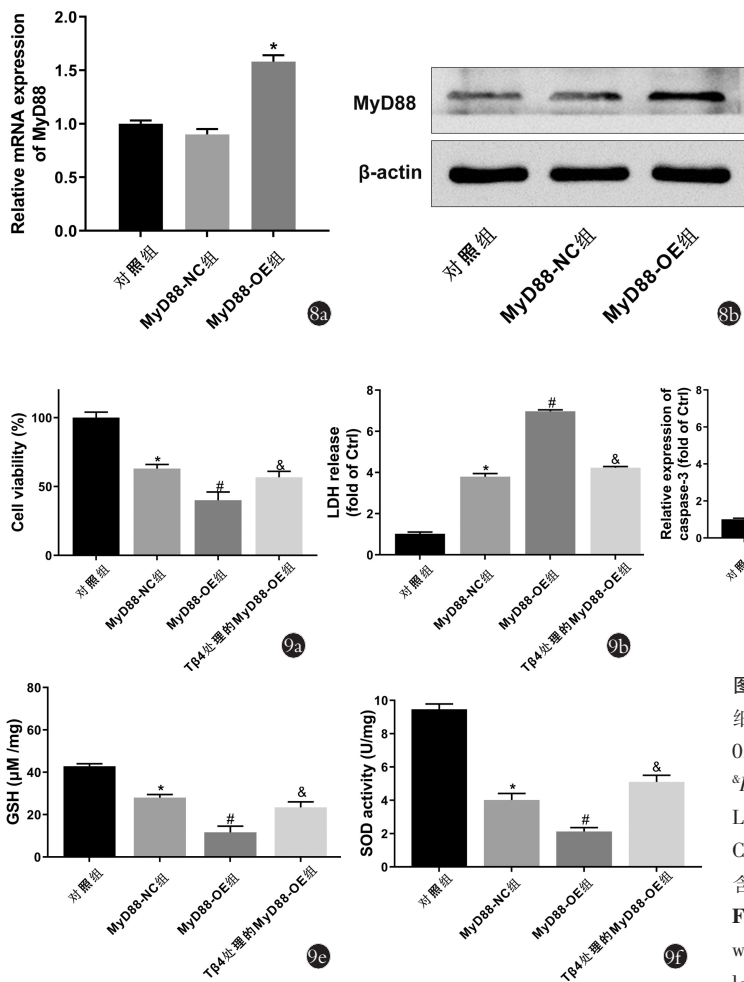


图 8 MyD88-NC 或 MyD88-OE 慢病毒感染 NSPCs 并检测 MyD88 过表达效率。注: 与 MyD88-NC 组比较, $*P < 0.05$ **8a**. qRT-PCR 检测 MyD88 的 mRNA 表达水平 **8b**. Western blot 检测 MyD88 的蛋白表达水平 **Fig.8** Transfected NSPCs with lentivirus vector of MyD88-NC or MyD88-OE and detected MyD88-overexpressing efficiency. Note: Compared with MyD88-NC group, $*P < 0.05$ **8a**. The mRNA expression of MyD88 was detected by qRT-PCR **8b**. The protein expression of MyD88 was detected by Western blot

图 9 5 μg/ml Tβ4 处理 MyD88 过表达慢病毒感染的 NSPCs 细胞中氧化应激和细胞凋亡水平。注: 与对照组比较, $*P < 0.05$; 与 MyD88-NC 组比较, $#P < 0.05$; 与 MyD88-OE 组比较, $&P < 0.05$ **9a**. MTT 法检测细胞活力 **9b**. LDH 检测试剂盒检测 LDH 水平 **9c, 9d** Caspase-3、Caspase-9 活性试剂盒分别测定 Caspase-3 和 Caspase-9 活性 **9e**. GSH 检测试剂盒检测 GSH 含量 **9f**. SOD 活性检测试剂盒测定 SOD 活性

Fig.9 Oxidative stress and apoptosis levels in NSPCs treated with 5 μg/ml Tβ4 and infected by MyD88-overexpressing lentivirus. Note: Compared with control group, $*P < 0.05$; compared with MyD88-NC group, $#P < 0.05$; compared with MyD88-OE group, $&P < 0.05$ **9a**. Cell viability was analyzed by MTT assay **9b**. LDH levels were detected by LDH cytotoxicity assay kit **9c, 9d**. Levels of Caspases-3 and Caspases-9 were analyzed by corresponding Caspase kits **9e**. GSH release amount was analyzed by GSH assay kit **9f**. SOD activity was analyzed by SOD activity assay kit

with MyD88-NC group, $#P < 0.05$; compared with MyD88-OE group, $&P < 0.05$ **9a**. Cell viability was analyzed by MTT assay **9b**. LDH levels were detected by LDH cytotoxicity assay kit **9c, 9d**. Levels of Caspases-3 and Caspases-9 were analyzed by corresponding Caspase kits **9e**. GSH release amount was analyzed by GSH assay kit **9f**. SOD activity was analyzed by SOD activity assay kit

同样发现随着 H₂O₂ 损伤的 NSPCs 中 Tβ4 的表达水平降低。TNF-α、IL-1β 和 IL-6 是常见的促炎细胞因子。有研究证实,脊髓损伤后 TNF-α、IL-1β、IL-6 和其他促炎细胞因子显著增加,促进炎性细胞浸润,进一步加重脊髓损伤^[27]。IL-1β 可以通过激活 NF-κB 促进脊髓损伤的进展^[28]。在本研究中 H₂O₂ 氧化损伤的 NSPCs 中炎性细胞因子、ROS 生成水平、细胞凋亡水平升高,抗氧化酶 SOD 活性降低。Jia 等^[29]证明淫羊藿苷通过抑制 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 的水平来保护脊髓损伤。而相关研究报道发现 Tβ4 可以治疗氧化应激相关疾病^[15]。在本研究中发现,Tβ4 处理 NSPCs,可降低细胞中的炎性细胞因子表达(IL-1β 和 IL-6)和氧化应激反应,减少 H₂O₂ 对 NSPCs 的氧化应激损伤,提示 Tβ4 可以抑制炎症因子的表达减少氧化应激反应,对脊髓损伤有一定的保护作用。

3.2 Tβ4 抑制 TLR4/MyD88 通路减轻氧化应激损伤

脊髓损伤引发氧化应激并诱导 NSPCs 损伤,导致继发性脑损伤脊髓损伤^[21]。据报道,脊髓损伤后坏死的星形胶质细胞中 TLR4 和 MyD88 的表达增加^[30]。在本研究 H₂O₂ 氧化应激损伤的 NSPCs 中 TLR4 和 MyD88 的表达增加。而 TLR4 启动先天免疫反应,可以激活 MyD88 依赖性通路和 MyD88 非依赖性通路^[24,31]。激活的 TLR4/MyD88 信号通路可能增加下游基因转录因子的水平,导致炎症相关基因水平升高^[32]。因此,抑制 TLR4/MyD88 通路是一种潜在的治疗氧化应激相关疾病的方法。在本研究中使用 TLR4 抑制剂 TAK-242,能够抑制 TLR4/MyD88 信号通路,并抑制 TLR4 和 MyD88 的表达,进而减轻了 H₂O₂ 诱导的 NSPCs 氧化应激损伤,这些结果说明 Tβ4 与 TAK-242 作用一致,Tβ4 对 H₂O₂ 诱导的 NSPCs 氧化应激损伤的保护作用与 TLR4/MyD88 通路有关。在 MyD88 过表达 NSPCs 细胞中研究发现,Tβ4 能够减少 MyD88 过表达 NSPCs 细胞系的氧化应激损伤,进一步确定 Tβ4 是通过抑制 TLR4/MyD88 通路减轻氧化应激损伤。

综上所述,H₂O₂ 损伤的 NSPCs 可用于模拟脊髓损伤后的 NSPCs。H₂O₂ 损伤后的 NSPCs 中 Tβ4 表达下调,Tβ4 可以逆转 H₂O₂ 对 NSPCs 增殖、凋亡、促炎细胞因子和 ROS 的产生的影响并呈剂量依赖性。Tβ4 与 TLR4 的抑制剂有相同的作用效果,其对脊髓损伤中 NSPCs 的保护作用与抑制 TLR4/MyD88 通路有关。这些发现对提高脊髓损伤后 NSPCs 的存活率提供了重要的潜在机制和见解。

参考文献

[1] Saulino M. Spinal cord injury pain[J]. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2014, 25(2):397-410.
[2] Shao A, Tu S, Lu J, et al. Crosstalk between stem cell and spinal

cord injury: pathophysiology and treatment strategies[J]. Stem Cell Res Ther, 2019, 10(1):238.
[3] Karsy M, Hawryluk G. Modern medical management of spinal cord injury[J]. Curr Neurol Neurosci Rep, 2019, 19(9):65.
[4] Li Z, Wu F, Xu D, et al. Inhibition of TREM1 reduces inflammation and oxidative stress after spinal cord injury (SCI) associated with HO-1 expressions[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 2014-2021.
[5] Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Garcia-Rosello M, et al. Activated spinal cord ependymal stem cells rescue neurological function[J]. Stem Cells, 2009, 27(3):733-743.
[6] Liu W, Xu B, Xue W, et al. A functional scaffold to promote the migration and neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells for spinal cord injury repair[J]. Biomaterials, 2020, 243:119941.
[7] Kim KT, Kim HJ, Cho DC, et al. Substance P stimulates proliferation of spinal neural stem cells in spinal cord injury via the mitogen-activated protein kinase signaling pathway[J]. Spine J, 2015, 15(9):2055-2065.
[8] Li X, Zhan J, Hou Y, et al. Coenzyme Q10 regulation of apoptosis and oxidative stress in H₂O₂ 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.
[9] Kanno H, Ozawa H, Tateda S, et al. Upregulation of the receptor-interacting protein 3 expression and involvement in neural tissue damage after spinal cord injury in mice[J]. BMC Neuroscience, 2015, 16(1):62.
[10] Laird MH, Rhee SH, Perkins DJ, et al. TLR4/MyD88/PI3K interactions regulate TLR4 signaling[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(6):966-977.
[11] Goldstein AL, Hannappel E, Kleinman HK. Thymosin beta4: actin-sequestering protein moonlights to repair injured tissues[J]. Trends Mol Med, 2005, 11(9):421-429.
[12] Cheng P, Kuang F, Zhang H, et al. Beneficial effects of thymosin beta4 on spinal cord injury in the rat[J]. Neuropharmacology, 2014, 85:408-416.
[13] Shah R, Reyes-Gordillo K, Cheng Y, et al. Thymosin beta4 prevents oxidative stress, inflammation, and fibrosis in ethanol- and LPS-induced liver injury in mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2018, 2018:9630175.
[14] Zhang Z, Liu S, Huang S. Thymosin beta4 prevents oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury in rat cortical neurons[J]. Neuropsychiatr Dis Treat, 2019, 15:2385-2393.
[15] Choi BD, Lim DS, Lee SY, et al. Thymosin beta4 reduces H₂O₂ induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells on titanium surface[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2018, 18(2):893-897.
[16] Ahuja CS, Nori S, Tetreault L, et al. Traumatic spinal cord injury-repair and regeneration[J]. Neurosurgery, 2017, 80(3S):S9-S22.
[17] Lee BB, Cripps RA, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate[J]. Spinal Cord, 2014, 52(2):110-116.
[18] Lo V, Esquenazi Y, Han MK, et al. Critical care management of patients with acute spinal cord injury[J]. J Neurosurg Sci, 2013, 57(4):281-292.
[19] Hwang K, Jung K, Kim IS, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing human neural stem/progenitor cells enhance therapeutic efficiency in rat with traumatic spinal cord injury[J].

- Exp Neurobiol, 2019, 28(6): 679-696.
- [20] Liu J, Peng L, Li J. The lipoxin A4 receptor agonist BML-111 alleviates inflammatory injury and oxidative stress in spinal cord injury[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e919883.
- [21] Hachem LD, Mothe AJ, Tator CH. Glutamate increases in vitro survival and proliferation and attenuates oxidative stress-induced cell death in adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells via non-NMDA ionotropic glutamate receptors[J]. Stem Cells Dev, 2016, 25(16): 1223-1233.
- [22] Ho JH, Chuang CH, Ho CY, et al. Internalization is essential for the antiapoptotic effects of exogenous thymosin beta-4 on human corneal epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(1): 27-33.
- [23] Sosne G, Christopherson PL, Barrett RP, et al. Thymosin-beta4 modulates corneal matrix metalloproteinase levels and polymorphonuclear cell infiltration after alkali injury[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(7): 2388-2395.
- [24] Shomali N, Baradaran B, Deljavanghodrat M, et al. A new insight into thymosin beta4, a promising therapeutic approach for neurodegenerative disorders[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3270-3279.
- [25] Wei C, Kumar S, Kim IK, et al. Thymosin beta 4 protects cardiomyocytes from oxidative stress by targeting anti-oxidative enzymes and anti-apoptotic genes[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42586.
- [26] Mollinari C, Ricci-Vitiani L, Pieri M, et al. Downregulation of thymosin beta4 in neural progenitor grafts promotes spinal cord regeneration[J]. J Cell Sci, 2009, 122 (Pt 22): 4195-4207.
- [27] Zhu Y, Zhu H, Wang Z, et al. Wogonoside alleviates inflammation induced by traumatic spinal cord injury by suppressing NF-kappaB and NLRP3 inflammasome activation[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 3304-3308.
- [28] Zhou W, Yuan T, Gao Y, et al. IL-1beta-induces NF-kappaB and upregulates microRNA-372 to inhibit spinal cord injury recovery[J]. J Neurophysiol, 2017, 117(6): 2282-2291.
- [29] Jia G, Zhang Y, Li W, et al. Neuroprotective role of icariin in experimental spinal cord injury via its antioxidant, antineuroinflammatory and antiapoptotic properties[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(4): 3433-3439.
- [30] Fan H, Zhang K, Shan L, et al. Reactive astrocytes undergo M1 microglia/macrophages-induced necroptosis in spinal cord injury[J]. Mol Neurodegener, 2016, 11: 14.
- [31] Bloom O, Herman PE, Spungen AM. Systemic inflammation in traumatic spinal cord injury[J]. Exp Neurol, 2020, 325: 113143.
- [32] Pandey SC. TLR4-MyD88 signalling: a molecular target for alcohol actions[J]. Br J Pharmacol, 2012, 165(5): 1316-1318.

(收稿日期:2022-01-20 本文编辑:王宏)

• 病例报告 •

不典型老年极外侧腰椎间盘突出症合并椎管狭窄症脊柱内镜翻修 1 例

李炳奇¹, 刘钦毅², 任杰¹, 张志宏¹, 卢伟达¹, 金立夫¹, 朱玉辉¹

(1.吉林中西医结合医院, 吉林 吉林 132012; 2.吉林大学第二医院, 吉林 长春 130033)

关键词 内窥镜外科手术; 翻修手术; 腰椎; 椎间盘移位; 椎管狭窄症

中图分类号: R681.5+3

DOI: 10.12200/j.issn.1003-0034.2022.08.013

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Spinal endoscopic revision for atypical extreme-lateral lumbar disc herniation complicated with spinal stenosis in elderly patient: a case report LI Bing-qi, LIU Qin-yi*, REN Jie, ZHANG Zhi-hong, LU Wei-da, JIN Li-fu, and ZHU Yu-hui.

*The Second Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin, China

KEYWORDS Endoscopic surgical procedures; Revision surgery; Lumbar vertebrae; Intervertebral disk displacement; Spinal stenosis

女性患者, 74 岁, 因“腰部间断疼痛、间歇性跛行 1 年, 加重伴右下肢疼痛 1 个月”, 于 2020 年 8 月 24 日在当地医院骨科住院, 主要症状为腰痛伴右小

腿前外侧疼痛, 2020 年 8 月 29 日, 当地医院按“腰椎椎管狭窄症”“腰椎间盘突出症”诊断在局部麻醉下行经皮椎间孔脊柱内镜手术, 术后患者腰痛及右小腿前外侧疼痛明显缓解, 但右小腿胫前侧出现剧烈疼痛并进行性加重, 严重影响患者睡眠, 期间予以脱水、止痛、预防感染等治疗, 症状未见缓解, 患者为

通讯作者: 刘钦毅 E-mail: qinyi@jlu.edu.cn

Corresponding author: LIU Qin-yi E-mail: qinyi@jlu.edu.cn