·基础研究·

三七总皂苷调节金属基质蛋白酶9表达促进脊髓损伤大鼠运动功能恢复的研究*

何文娟[1] 孙 伟[1] 谢 辉[1] 余 敏[2,3]

摘要

目的:检测三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)对脊髓损伤大鼠金属基质蛋白酶-9(matrix metalloproteinases 9,MMP9)、谷氨酰氨合成酶(glutamine synthetase,GS)及胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)表达的影响,探讨PNS与SCI大鼠运动功能恢复的关系。

方法:将54只SD大鼠随机分为正常组、生理盐水(NS)处理组和三七总皂苷(PNS)治疗组,后两组经脊髓半横断造模。通过行为学检测确定运动功能恢复情况,通过免疫荧光组织化学法检测GS和GFAP的表达情况,Western Blot检测MMP9的表达改变。

结果:PNS治疗组BBB评分、斜板试验平均角度、步长均明显高于NS处理组($P<0.05$);PNS治疗组MMP9表达水平明显高于NS处理组($P<0.05$);PNS治疗组GS阳性细胞数明显高于NS处理组($P<0.05$),PNS治疗组GFAP表达明显低于NS处理组($P<0.05$),GS和GFAP双标不明显。

结论:PNS治疗能促进运动功能恢复,其机制可能与PNS促进MMP9和GS表达、减少炎性递质释放有关。

关键词 脊髓损伤;金属基质蛋白酶-9;三七总皂苷;谷氨酰氨合成酶;运动功能

中图分类号:R651,R493 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-1242(2017)-06-0689-05

脊髓损伤(spinal cord injury,SCI)是脊柱损伤最严重的并发症,常导致损伤节段以下肢体严重的功能障碍,轻微的SCI也会给患者本人带来身体和心理的严重伤害[1—2]。神经病理性痛是SCI的主要伴随症状之一,可能是SCI后影响神经再生,加剧运动功能障碍的原因,也是临床上运动功能康复的一大挑战[3]。金属基质蛋白酶9(matrix metalloproteinases 9,MMP9)属于锌依赖型内肽酶家族,可降解细胞外基质和其他细胞外蛋白,其表达上调是血脊髓屏障破坏和炎症发展的诱因,是神经病理性痛的关键因素,构成SCI后功能恢复的巨大障碍;同时,也可能是SCI修复中神经元再生微环境调节的关键因素[4]。但MMP9的表达与SCI治疗和运动功能恢复的相关性研究仍没有明显进展[4—5]。

三七总皂苷(panax notoginseng saponins, PNS)是传统中药三七根茎提取物的主要成分,具有活血化瘀,治疗心血管疾病的功能[6]。能调节胶质细胞的活化[7],抑制白细胞介素1β(Interleukine-1 beta, IL-1β)等[8]炎症因子的释放,缓解SCI神经病理性痛。PNS是否调节MMP9的表达,进而影响SCI后动物运动功能的恢复尚未见报道。本研究拟通过检测PNS对MMP9表达的影响以及神经元再生微环境的调节,探讨其对脊髓半横断大鼠运动功能的影响。

1 材料与方法

试验动物:54只SD大鼠,SPF级雌雄各半。购自南华大学动物部【试验动物使用许可证:SYXK(湘)2015-0001】。随机分为正常组6只,不做处理,常规饲养;生理盐水(normal saline, NS)处理组24只,PNS治疗组24只,后两组大鼠行第9胸髓(T9)右侧脊髓部分切断损伤后,分别腹腔注射NS和PNS。两组大鼠按存活时间分为7d、14d、21d及28d组,每组6只SD大鼠。

脊髓半横断模型制作:SD大鼠用10%水合氯醛(0.4ml/100g)腹腔注射麻醉后,备皮,双人双目显微镜下小心去除T8椎板,暴露T9节段脊髓。用虹膜侧切刀沿着脊髓中线向外侧切断右侧脊髓,止血后缝合伤口。

PNS给药方式:PNS组模型成功后,每天8:00,腹腔注射PNS(广西梧州制药集团,药品名:血栓通。规格:70mg/2ml)200mg/kg,每天1次,直到相应存活时间。

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.06.016

*基金项目:湖南省医药卫生科研计划课题(C23013-062);湖南省中医药科研计划项目(201482)

1 郴州市第一人民医院康复医学科,423000; 2 郴州市第一人民医院药剂科; 3 通讯作者

作者简介:何文娟,女,主治医师; 收稿日期:2015-12-11

行为学检测：应用BBB (Basso, Beatti, Bresnahan)评分法评分，将脊髓半横断SD大鼠置于平地，观测其后肢髋、膝、踝关节等在运动中的协调情况，根据BBB评分标准积分。0分时，后肢无可见自主运动，21分时，可见损伤侧后肢持续掌面运动，运动协调，尾巴翘起，表现近似正常，双盲法检测评分值。

斜板(incline plate，IP)试验评分：将脊髓半横断SD大鼠置于有一定粗糙木板上，逐渐增大倾斜度，记录其能保持五分钟不下滑的角度，以此评价大鼠肌力。

灌注固定及取材切片：各组大鼠存活相应时间点后，过量的水合氯醛麻醉，经心脏灌注NS 150ml后快灌100ml 4% PF，最后滴灌4%PF约250ml，取损伤近端0.5cm长脊髓，后固定，-20℃冰冻切片，厚20μm，贴片后备用。

免疫荧光组织化学法：取备好的切片，室温放置30min，0.01MPBS润洗15min；加入5%小牛血清孵育30min后加入一抗谷氨酰氨合成酶(glutamine synthetase，GS)和(或) 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein，GFAP)；切片经含0.1%triton X-100的0.01M PBS洗涤3次(每次10min)后，滴加Alexa-488或Alexa-594标记的驴抗小鼠或兔IgG(1∶200，Invitrogen，Carlsbad，CA，USA)在室温下避光孵育2h，甘油封片。40倍物镜下摄片，image J处理图片并分析图像。

Western Blot检测：脱颈椎处死各组大鼠，冰上迅速取下目标段脊髓，快速称重，冷冻并保存于-80℃冰箱。用时按照常规步骤裂解变性蛋白。蛋白质凝胶电泳后转膜，准备后续的免疫组织化学检测。将目标硝酸纤维膜修剪好后浸入5%的脱脂奶粉室温孵育1h以封闭非特异性结合，转入含有一抗的杂交袋中，4℃匀速震荡过夜。PBST洗涤4次，再用辣根过氧化物酶(HRP-)标记的羊抗兔IgG(1∶10000，Bio-Rad，CA，USA)或羊抗小鼠IgG(1∶1000，Bio-Rad，CA，USA)室温孵育1h，0.01M PBST洗涤10 min×4次，蒸馏水最后一次洗膜后以ECL化学发光试剂(GE Inc，NJ，USA)显影，吸除多余的ECL化学发光试剂，保鲜膜包好，暗盒中使胶片感光，经显影定影后，扫描仪扫描结果并保存。

ELISA法：利用IL-1β ELISA试剂盒检测脊髓背角炎症因子IL-1β的含量。

采用PASW statistic 18.0统计软件进行统计学分析，计量数据用均数 标准差表示，组间比较采用t检验、组内比较采用单因素方差分析，显著性水平α=0.05。

2 结果

2.1 行为学结果

BBB评分：正常大鼠BBB评分值为21±0分，脊髓半横断损伤SD大鼠损伤后肢运动功能丧失，BBB评分值降至1.3±0.04分。随着存活时间的延长，3d、7d、14d、21d及28d PNS治疗组和NS处理组伤侧后肢的运动功能逐渐恢复，其中7d、14d、21d及28d时，与NS处理组相比，PNS治疗组BBB评分值显著增高，差异有显著性意义(P<0.05，表1)。

表1 正常组、NS处理组和PNS治疗组大鼠右后肢运动功能BBB评分 ($\bar{x}\pm s$,n=6)

组别	术后时间					P值
	1天	7天	14天	21天	28天	
正常组	21±0	21±0	21±0	21±0	21±0	1
NS处理组	1±0.06	6.67±0.41	11.21±1.03	13.29±1.18	16.31±1.31	<0.001
PNS治疗组	1±0.08	11.07±0.62	15.67±0.89	18.90±3.21	20.3±0.98	0.013
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

IP试验评分：IP试验评分结果显示，正常组大鼠倾斜角度平均为73°，术后1d时平均角度降低至35°，随后逐渐上升，NS处理组在2—4周时趋于稳定，平均角度在55°—60°之间，较正常组低，具有显著性意义，P<0.05。PNS治疗组与NS处理组相比较，1d、3d评分结果略有升高，没有显著性意义；但7d、14d、21d及28d平均角度有显著提高，21d、28d接近正常组(图1)，P<0.01。

足迹分析：分析损伤后2周时SD大鼠足迹，测量计算步长。正常大鼠足迹清晰，基础步长达到108±9.03mm，脊髓半横断损伤后NS处理组足迹拖拉变长，步长降低至47±5.30mm，PNS治疗组与NS处理组相比，足迹变得清晰，步长(78±4.56mm)显著增加(P<0.05)。

2.2 免疫荧光组织化学法结果

GS表达变化：免疫荧光结果显示，GS主要表达于灰质神经元及胶质细胞胞体，我们特别关注了损伤侧L4节段脊髓Ⅸ板层中GS的表达强度(图2A、B)。正常组前角内侧运动核区域仅有少量GS阳性细胞，随时间延长，NS处理组GS阳性细胞数逐渐增加，至14d时，阳性细胞数(75±5.35)显著高于正常组(49±4.87)，21d时最高；PNS治疗组GS阳性细胞数也逐渐增加，7d时，阳性细胞数(76±3.55)即显著高于正常组(49±4.87)，21d时最高(233±11.39)。与NS处理组比较，7d、14d及21d时GS阳性细胞数显著增高(P<0.05)。

GFAP表达变化：GFAP是星形胶质细胞的特异性标记物，我们检测损伤侧L4节段脊髓Ⅸ板层中GFAP的表达强度(图3A、B)。正常组前角内侧运动核区域有少量GFAP表达，随时间延长，SCI 7d时，NS处理组GFAP明显激活，表达显著高于正常组，至14d、21d时恢复正常水平；PNS治疗组GFAP表达显著减少，且显著低于正常组，21d时最低。与NS处理组比较，7d、21d时GFAP表达显著降低(P<0.05)。

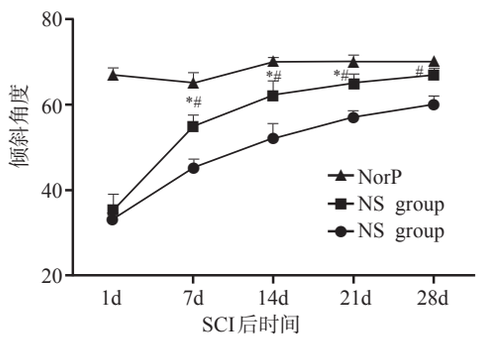
2.3 Western Blot检测结果

正常组表达少量MMP9,SCI后,NS处理组MMP9少量增加,14d、21d逐渐恢复,与正常组比较,差异无显著性意义;PNS治疗组MMP9显著增加,14d、21d逐渐恢复,与正常组比较,差异有显著性意义(P<0.05,图4)。与NS处理组相同时间点比较,7d、14d及21d,PNS治疗组MMP9表达显著增高,差异有显著性意义(P<0.05,图4)。

2.4 Elisa检测结果

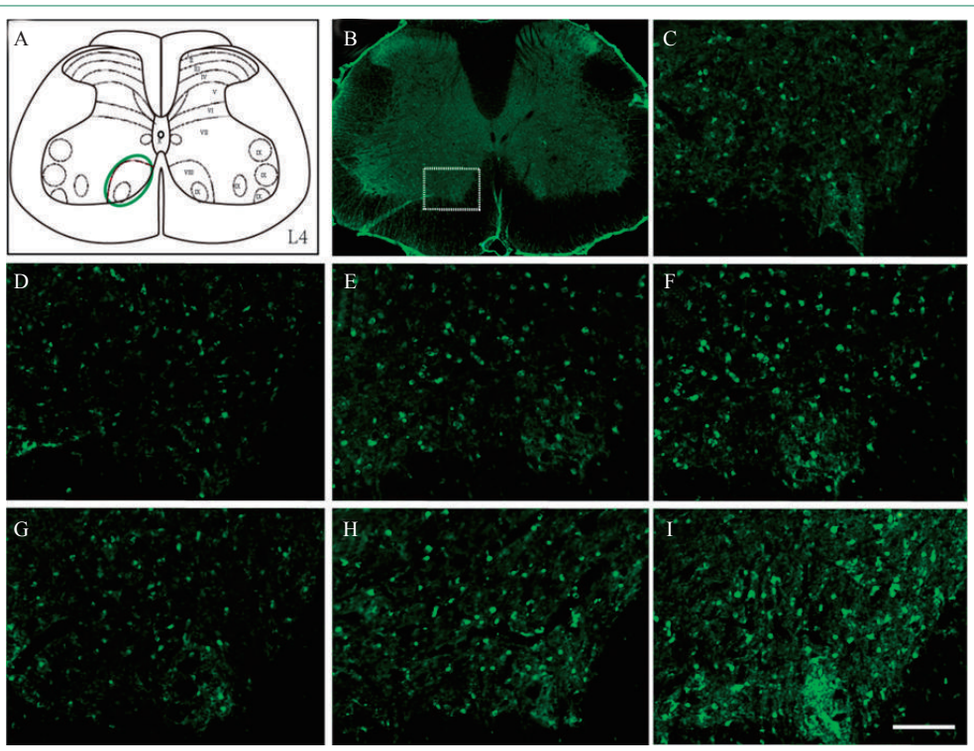
结果显示,正常组表达少量IL-1β(15±3.4 pg/ml),SCI后,NS处理组IL-1β迅速增加(480±43.5 pg/ml),14d、21d持续较高水平,与正常组比较,差异有显著性意义(P<0.01);PNS治疗组7d时IL-1β也显著增加(350±33.4 pg/ml),14d、21d逐渐恢复,仍高于正常组,差异有显著性意义(P<0.05)。与NS处理组相同时间点比较, 14d、21d,PNS治疗组IL-1β表达显著降低,差异有显著性意义(P<0.05)。

图1 损伤侧后肢运动功能斜板试验评分



*与正常组比较P<0.05;#与生理盐水处理组比较P<0.01

图2 SCI后脊髓前角Ⅸ板层中一抗谷氨酰氨合成酶的表达(免疫荧光组化法,Bar=100μm,×40)



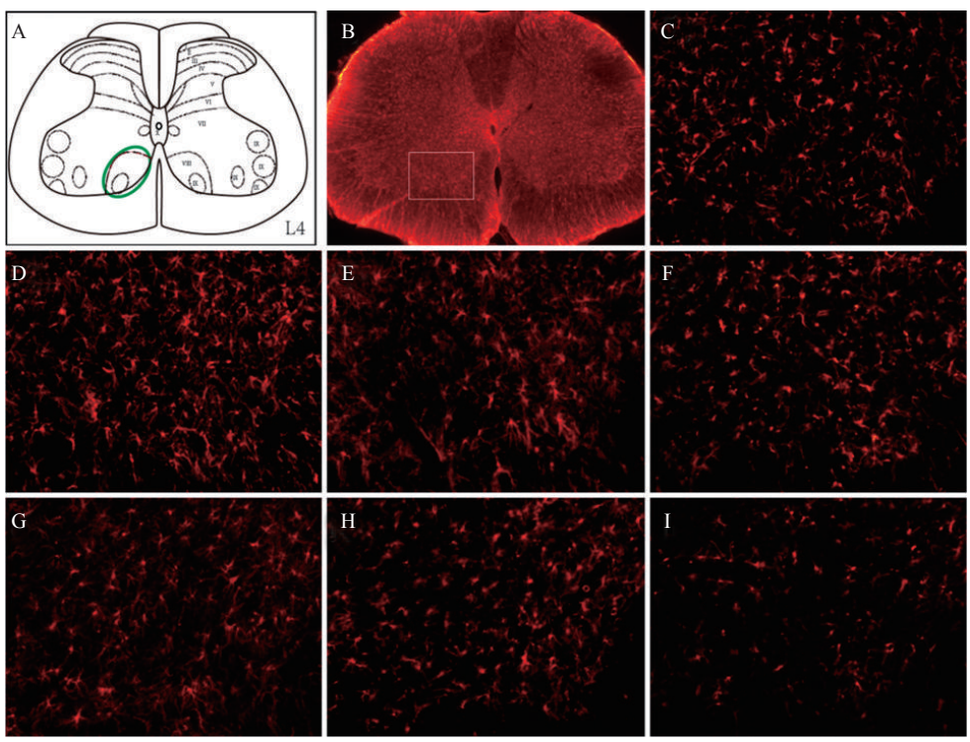
A为L4脊髓分层示意图,B为摄像部位,C为正常组,D、E、F分别为NS处理组7d、14d及21d,G、H、I分别为PNS治疗组7d、14d及21d,

3 讨论

SCI的运动功能恢复一直是临床康复亟待解决的疑难问题[1,3,5,9]。损伤进程的发展可导致一系列特色体系的激活,这些系统的激活是把双刃剑,炎症反应正是这些特色体系之一[7]。近年来的研究表明,SCI神经病理性痛过程中炎症反应起着至关重要的作用,其中细胞因子,趋化因子,MMPs等炎症因子发挥的作用尤为重要[5,10—11]。SCI后促进运动功能恢复的药物种类繁多,但缺乏疗效显著,副作用小,而机制明确促运动功能恢复药[9]。

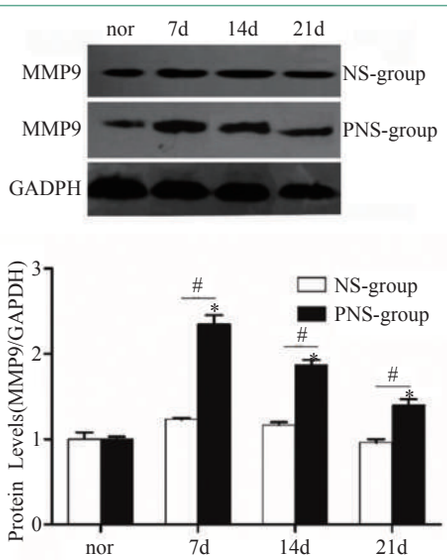
PNS是我国传统中药三七的主要提取成分,具有活血化瘀作用,主要用于心血管疾病[12—13]。通过对其有效成分的研究表明,PNS也能有效抑制炎症反应[14—15],并能通过上调

图3　SCI后脊髓前角Ⅸ板层中GFAP的表达　（免疫荧光组化法，Bar=100μm，×40）



A为L4脊髓分层示意图，B为摄像部位，C为正常组，D、E、F分别为NS处理组7d、14d、21d，G、H、I分别为PNS治疗组7d、14d、21d，Bar=100μm

图4　Western Blot检测SCI后脊髓中MMP9的表达



*与正常组比较$P<0.05$；#与生理盐水处理组比较$P<0.01$

MMP的表达，抑制肝纤维化的进程[16]。PNS促进神经营养因子的释放，对神经元具有保护作用[17]。PNS对SCI后胶质细胞的激活也有调节作用，可影响胶质瘢痕的形成[17—18]。本试验行为学结果表明，PNS能有效增加BBB评分，IP试验评分以及步态等评价运动功能指标[17,19—20]，意味着PNS能有效改善SCI后运动功能恢复。其机制是通过影响炎症反应，促进神经元存活，还是抑制纤维化，减少瘢痕的形成，促进神经再生，尚不清楚。

MMP9是MMPs的一员，能降解细胞外基质，增加组织通透性，促进炎症反应，可促进损伤神经元凋亡，不利于功能恢复[5,21]；但同时参与组织的重塑，解除或抑制瘢痕的形成，有利于损伤神经的轴突再生；并且破坏血脊髓屏障，引起炎症、免疫反应，这些反应有利于损伤细胞残屑的清除和受损神经元的再生修复[22]。MMP9在SCI后表达改变与运动功能恢复的关系越来越受到人们的重视，但机制尚不完全清楚。试验结果表明，MMP9在损伤后激活并不明显，随时间的延长，与正常组比较，差异无显著性意义，可能在SCI进程中，其促炎作用不明显。但在PNS治疗组中，MMP9表达在7d时明显增加，后虽在14d、21d均逐步降低，仍高于同时间点NS处理组。而相应时间点行为学结果提示，PNS治疗组与NS处理组相比，运动功能明显增强。因此，我们推测，PNS可能通过增强MMP9表达，促进损伤细胞残屑的清除和受损

神经元的再生修复,进而促进运动功能恢复。

SCI后,受损轴突的近远侧端肿胀,损伤使得谷氨酸等兴奋性氨基酸释放增加,天门冬氨酸受体激活,钙离子内流,Ca^{2+}作为细胞内第二信使,触发一系列级联反应,激活多种蛋白酶,加重二次损伤,影响运动功能恢复[23]。谷氨酸可被GS催化合成谷氨酰胺并转化为γ氨基丁酸等抑制性递质[24],因此GS可能是机体对抗损伤导致的炎症关键性的酶。此外,也有文献报道,谷氨酰胺能有效减少炎症因子的表达,从而减轻炎症反应[21]。本试验中PNS能随时间延长,逐渐增加GS表达,且GS的表达与脊髓中IL-1β含量呈负相关, MMP9与GS的表达一致性,表明PNS可能通过MMP9促进GS表达,抑制IL-1β释放,促进SCI大鼠运动功能恢复。

有研究报道,SCI后星形胶质细胞的激活与损伤后胶质瘢痕的形成关系密切,胶质瘢痕的形成会阻碍神经轴突的再生,进而影响运动功能恢复。也有报道称PNS能调节GFAP表达,促进SCI的恢复[15]。因此,GFAP作为胶质细胞活化的标记物,其表达水平与SCI后大鼠的运动功能恢复有密切的联系。

本研究表明,PNS能一定程度恢复SCI大鼠运动功能恢复,其机制可能通过促进MMP9和GS表达,抑制炎症因子IL-1β的释放,改善神经元再生微环境,进而促进运动功能恢复。

参考文献

[1] Lee JY, Choi HY, Na WH, et al. 17beta-estradiol inhibits MMP-9 and SUR1/TrpM4 expression and activation and thereby attenuates BSCB disruption/hemorrhage after spinal cord injury in male rats[J]. Endocrinology, 2015, 156(5): 1838—1850.

[2] 张鸿日, 郭孝龙, 彭静华, 等. 2-甲氧基雌二醇对脊髓损伤大鼠运动功能及神经细胞凋亡的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2015(08):761—764.

[3] Yan M, Liu YW, Shao W, et al. EGb761 improves histological and functional recovery in rats with acute spinal cord contusion injury[J]. Spinal Cord, 2015, doi: 10.1038/sc.2015.156.

[4] Calderon-Vallejo D, Quintanar-Stephano A, Hernandez-Jasso I, et al. Functional and structural recovery of the injured spinal cord in rats treated with gonadotropin-releasing hormone [J]. Neurochem Res, 2015, 40(3):455—462.

[5] Schreiber R, Paim LR, de Rossi G, et al. Matrix metalloproteinases and left ventricular function and structure in spinal cord injured subjects[J]. Clin Chim Acta, 2014, 437(1):136—140.

[6] 杜淑伟, 刘树迎, 李朝红. 三七总皂苷对心血管细胞信号转导影响的研究进展[J]. 解剖学研究,2008,3:220—224.

[7] 黄金兰, 陆璐, 黄丹, 等. 三七总皂苷对快速老化痴呆模型小鼠SAMP8炎症因子及小胶质细胞的影响[J]. 中国试验方剂学杂志,2013,8:171—174.

[8] 任周新, 孙建宁, 赵辉, 等. 三七总皂苷对MCAO大鼠脑组织中性粒细胞浸润及相关炎性因子的抑制作用[J]. 中成药,2009, 9:1345—1347.

[9] 杨俊锋, 张亚峰, 马勇, 等. Nogo-A在脊髓损伤大鼠脊髓组织中的动态表达[J]. 中国康复医学杂志, 2015,(9):867—871.

[10] Jayasooriya RG, Choi YH, Kim GY. Glutamine-free condition inhibits lipopolysaccharide-induced invasion of BV2 microglial cells by suppressing of matrix metalloproteinase-9 expression[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2013, 36(3): 1127—1132.

[11] Rojewska E, Makuch W, Przewlocka B, et al. Minocycline prevents dynorphin-induced neurotoxicity during neuropathic pain in rats[J]. Neuropharmacology, 2014, 86:301—310.

[12] 刘丽星. 三七总皂苷调节MCAO大鼠Nogo-A/RhoA通路及保护Aβ25-35诱导SH-SY5Y细胞损伤的机制[D]. 北京中医药大学, 2014.

[13] 江小萍, 曾凡鹏, 刘首明, 等. 三七总皂苷对动脉粥样硬化患者血管炎症因子及颈动脉内膜中层厚度和斑块的影响[J]. 中国中医急症, 2015, 24(10):1753—1754.

[14] Hu Y, He K, Wang X. Role of Chinese herbal medicinal ingredients in secretion of cytokines by PCV2-induced endothelial cells[J]. J Immunotoxicol, 2015, 27:1—7.

[15] Peng XX, Zhang SH, Wang XL, et al. Panax Notoginseng flower saponins (PNFS) inhibit LPS-stimulated NO overproduction and iNOS gene overexpression via the suppression of TLR4-mediated MAPK/NF-kappa B signaling pathways in RAW264.7 macrophages[J]. Chin Med, 2015, 10:1—11.

[16] Jiang H, Xia LZ, Li Y, et al. Effect of Panax notoginseng saponins on expressions of MMP-13 and TIMP-1 in rats with hepatic fibrosis[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2013, 38(8):1206—1210.

[17] Wang B, Li Y, Li XP, et al. Panax notoginseng saponins improve recovery after spinal cord transection by upregulating neurotrophic factors[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(8): 1317—1320.

[18] 李花, 赵子进, 潘丁, 等. 三七总皂苷对脊髓损伤后的保护作用及GFAP相关机制[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(10): 1825—1827.

[19] Yanez-Mo M, Siljander PR, Andreu Z, et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions[J]. J Extracell Vesicles, 2015, 4:27066.

[20] Babu R S, Namasivayam A. Recovery of bipedal locomotion in bonnet macaques after spinal cord injury: footprint analysis[J]. Synapse, 2008,62(6):432—447

[21] Cai C, Qiu G, Gong X, et al. Effects of erythromycin on gamma-glutamyl cysteine synthetase and interleukin-1beta in hyperoxia-exposed lung tissue of premature newborn rats [J]. J Pediatr (Rio J), 2014,90(5):493—499.

[22] 阴瑞红, 李彬, 王金菊, 等. 复方谷氨酰胺活动期溃疡性结肠炎肠道屏障功能及外周血中MMP-2、MMP-9水平的研究[J]. 中国现代药物应用, 2015, 11(11):149—150.

[23] Keilhoff G, Schroder H, Peters B, et al. Time-course of neuropathic pain in mice deficient in neuronal or inducible nitric oxide synthase[J]. Neurosci Res, 2013,77(4):215—221.

[24] Qiu XC,Jin H, Zhang RY, et al. Donor mesenchymal stem cell-derived neural-like cells transdifferentiate into myelin-forming cells and promote axon regeneration in rat spinal cord transection[J]. Stem Cell Res Ther, 2015, 6(1):1—17.