

京尼平苷酸通过稳定微管促进脊髓损伤后轴突生长

胡振鑫[#], 刘娅妮[#], 叶 蓁[#], 吴志炫, 赖嘉新, 黄蕾蕾, 朱宇航,
储非凡, 沈 未, 黄 溶, 施梦芸, 郑绿珍^{*}, 吴爱琴^{*}

(温州医科大学附属第二医院, 育英儿童医院放射影像科, 浙江 温州 325027)

摘要 脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统最严重的创伤之一,其可造成患者感觉和运动功能障碍,并且引发一系列严重的并发症。促进轴突再生是修复脊髓损伤后功能恢复的关键因素。京尼平苷酸(geniposidic acid, GA)具有神经保护作用,但其在脊髓损伤后轴突生长的作用及机制方面尚未见报道。本研究通过提取原代神经元,并建立糖氧剥夺模型(oxygen glucose deprivation, OGD)。通过 RT-PCR、Western 印迹、免疫荧光等方法,探讨 GA 对神经元轴突的促进作用及其机制。结果发现,GA 可以显著促进神经元轴突生长,并呈剂量依赖性。与 OGD 组神经元轴突长度($22\pm5.788\text{ }\mu\text{m}$)相比,给予 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 的 GA 可使神经元轴突长度显著增加($68\pm17.73\text{ }\mu\text{m}$)。同时,轴突生长相关蛋白(GAP43, MAP2)的基因和蛋白质水平都显著上升。不仅如此,我们发现,GA 促进轴突生长与稳定神经元轴突微管相关,可使 A/T 的比值增加约 1.5 倍。同时,通过建立大鼠急性脊髓损伤模型评价 GA 在体内的效果,与对照组相比,每天腹腔注射 GA(10 mg/kg)的大鼠在术后 28 d 的 BBB 评分(11.8 分)和斜板试验(41.7°)均显著增高。上述结果表明,GA 可能通过稳定微管从而促进轴突再生,最终促进脊髓损伤后运动功能的恢复。因此,GA 可能成为治疗脊髓损伤的有前景的候选药物。

关键词 脊髓损伤; 京尼平苷酸; 轴突再生; 微管稳定

中图分类号 Q819

Geniposidic Acid Enhances Axonal Regeneration after Spinal Cord Injury by Stabilizing Microtubule

HU Zhen-Xin[#], LIU Ya-Ni[#], YE Zhen[#], WU Zhi-Xuan, LAI Jia-Xin, HUANG Lei-Lei, ZHU Yu-Hang,
CHU Fei-Fan, SHEN Wei, HUANG Rong, SHI Meng-Yun, ZHENG Lv-Zhen^{*}, WU Ai-Qin^{*}

(The Second Affiliated Hospital and Yuying Children's Hospital of Wenzhou Medical University,
Wenzhou 325027, Zhejiang, China)

Abstract Spinal cord injury (SCI) is one of the most devastating diseases in the central nervous system that causes sensory and motor dysfunction and a series of severe complications. Promoting axonal regeneration plays a crucial role in locomotor recovery after SCI. Geniposidic acid (GA) has a good neuroprotective effect, however, its effect and mechanism in axonal growth after SCI remains unreported. In vitro, we established oxygen glucose deprivation (OGD) model in primary cortical neurons. The effect

收稿日期: 2018-10-12; 修回日期: 2019-03-15; 接受日期: 2019-03-25
浙江省大学生科技创新活动计划暨新苗人才计划(No.2018R413061); 国家级大学生创新创业训练计划项目(No.201810343002)资助
^{*} 通讯作者 Tel: 13566244111; E-mail: waq6147@126.com; Tel: 13705883389; E-mail: 1196593455@qq.com
[#] 共同第一作者
Received: October 12, 2018; Revised: March 15, 2019; Accepted: March 25, 2019
Supported by College Students in Zhejiang Province Science and Technology Plan Research and Xinniao Talent Program (No.2018R413061); National College Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (No.201810343002)
^{*} Corresponding author Tel: 13566244111; E-mail: waq6147@126.com; Tel: 13705883389; E-mail: 1196593455@qq.com
[#] Co-first author

and molecular mechanism of GA on neuronal axon was studied by RT-PCR, Western blotting and immunofluorescence analysis. The results showed that GA could markedly promote axonal regeneration in a dose-dependent manner. Compared with the axon length of the OGD group ($22 \pm 5.788 \mu\text{m}$), administration of $10 \mu\text{mol/L}$ of GA significantly increased the length of neuronal axon ($68 \pm 17.73 \mu\text{m}$). At the same time, the mRNA and protein levels of axon growth-associated proteins (GAP43, MAP2) increased significantly. Furthermore, we found that GA facilitated axonal regeneration and was associated with regulating the stability of microtubule and increasing the A/T ratio by approximately 1.5 times. In this study, we evaluated the effect of GA in vivo by establishing a rat model of acute SCI. Compared to the sham group, rats with intraperitoneal injection of GA (10 mg/kg/day) had a significant increase in BBB score (11.8 points) and the inclined plate test (41.7°) at 28 days postoperatively. These results suggest that GA may facilitate axonal regeneration by improving microtubule stability, ultimately improve functional recovery after SCI. GA may therefore be a promising candidate for the treatment of spinal cord injury.

Key words spinal cord injury (SCI); geniposidic acid (GA); axonal regeneration; microtubule stability

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 具有高致残率、高致死率、高耗费等特点,使患者的感觉、运动功能以及自主支配能力丧失,严重影响其生活质量^[1, 2]。据估计,全世界脊髓损伤患者人数约为 300 万,每年有 130 000 名新患者^[3]。中枢神经具有不可再生性,脊髓损伤后神经元轴突破坏是导致机体功能永久性障碍的主要原因^[4]。脊髓损伤的病理特征主要包括原发性损伤和继发性损伤。当前研究的热点主要集中于脊髓损伤后继发性损伤的恢复,如何提高脊髓损伤后轴突再生能力是促进功能性恢复的关键。大量的研究表明^[4-6],脊髓损伤后轴突再生受到抑制主要是由于(1)神经元本身受损使其再生能力变弱;(2)外部微环境(如胶质瘢痕、炎症)阻碍生长;(3)中枢神经系统提供的轴突生长所需的营养因子、生长因子等受到抑制。神经元本身轴突再生的能力十分有限,加之脊髓损伤后轴突脱髓鞘和阻断轴索,是轴突再生能力受抑制的主要原因。但是到目前为止,未见一种特别有效的药物能达到满意的治疗效果。最新的研究表明,通过对神经元细胞骨架的动态性调控可以促进轴突再生^[7]。微管和微丝是细胞骨架的主要成分,微管的正确排列和运动具有特定的方向性和稳定性,微管通过组装、去组装和转运促使轴突向指定方向生长^[8]。在轴突的延伸和迁徙过程当中,稳定微管主要依靠微管稳定蛋白 (microtubule-stabilizing proteins, MSPs), 例如乙酰化微管蛋白 (aceylated tubulin, ace-tubulin)、微管相关蛋白 (microtubule-associated proteins, MAPs), 其主要在神经的早期迁徙阶段有着重要的作用^[9, 10]。京尼平苷酸 (geniposidic acid, GA) 是环烯醚萜类化合物,主要从中药栀子、杜仲叶与皮中提取,具有神经营养、神经保护、抗炎、抗氧化和保肝利

胆等重要作用,具有广泛的应用价值,在近几年受到极大关注^[11-14]。但京尼平苷酸在脊髓损伤后神经轴突生长中的作用仍未见报道,对恢复脊髓损伤后的功能机制仍待进一步探究。在本研究中,通过检测京尼平苷酸在脊髓损伤中对轴突再生的作用以及微管稳定的机制,发现京尼平苷酸能通过稳定微管从而显著促进轴突再生,同时使大鼠运动功能得到改善。表明京尼平苷酸可以作为脊髓损伤治疗的一个新的突破口。

1 材料与方法

1.1 脊髓损伤模型建立及药物处理

于上海动物科学研究中心购置 36 只 SPF 级 220~250 g SD 雌性大鼠,并参照《实验动物饲养管理和使用指南》进行饲养照料,并将大鼠随机分成 3 组:假手术 (Sham) 组、单纯损伤 (SCI) 组、给药 (SCI+GA) 组,每组 12 只。大鼠适应 1 周后,进行脊髓损伤手术,术前 8 h 禁食限饮,用 8% 水合氯醛 3.5 mL/kg 麻醉,胸背部备皮并进行常规消毒。取后,在背部最高凸起处 T9 节段沿脊柱后正中线,切开皮肤,并将脊柱两侧肌肉分离,充分暴露 T8-T10 棘突和椎板。打开椎管,完全暴露出背侧面脊髓。假手术组 (Sham) 仅暴露脊髓不夹闭,单纯损伤组 (SCI) 和给药组 (SCI+GA),用血管动脉夹 (30 g) 夹闭脊髓 1 min。若大鼠双后肢出现回缩,尾巴摆动等现象,则说明造模成功。最后,缝合肌肉和皮肤,并消毒。术后 3 d,肌注头孢唑林钠 (50 mg/kg) 以预防感染,予以卡洛芬皮下注射 (5 mg/kg),并每日早晚人工挤压膀胱进行排尿,直至大鼠自主排尿功能完全恢复。SCI+GA 组每 d 腹腔注射 GA (10 mg/kg),持续 28 d。

1.2 行为学评分

BBB (Basso, Beattie, and Bresnahan locomotor rating scale) 评分:取术后 0 d、3 d、7 d、14 d 和 28 d 的造模大鼠进行 BBB 评分,来评价脊髓损伤后大鼠的后肢运动功能恢复情况。将各组大鼠放置在空旷场地,两位观察者对侧站立,观察大鼠后肢关节活动度、躯干运动及其协调性、足态步伐等情况。观察时间 5 min,评分范围 0~21 分。在此期间,观察者进行评分。0 分表示大鼠后肢完全丧失运动功能,21 分表示大鼠后肢功能完全正常。在评分过程中,采用双盲、双人独立观察评分,最后取平均值。

斜板试验评分:将大鼠横放在改良的 Rivlin 斜板上,固定其中一端,另一端由 0°逐渐增大角度,直至大鼠不能在斜板上原有位置停留 5 s 而跌落的最大角度作为评分标准,记录此时斜板与水平面角度。本试验采用双盲、双人独立观察记录,每只大鼠重复 3 次并取其平均值。

1.3 原代神经元培养及处理分组

从新生 SD 乳鼠的脑中提取原代皮质神经元,皮质与大脑分离,置于预冷的 Hank 缓冲液中冲洗。再用 0.125%胰蛋白酶-EDTA 在 37 ℃下消化组织 25 min。将细胞悬浮液以 1 000 r/min 离心 5 min。然后将细胞沉淀物首先置于含聚-D-赖氨酸预涂盖玻片的培养基中(DMEM/F-12,含 10%胎牛血清,100 mg/L 链霉素,100 U/mL 青霉素和 0.5 mmol/L 谷氨酰胺)。并在含 5%CO₂ 浓度的 37 ℃培养箱中

培养。4 h 时,将培养基更换为神经元基础培养基,包括 2%B27 和 0.5 mmol/L L-谷氨酰胺,并且每 2~3 d 更换 1 次。将细胞置于糖氧剥夺(OGD)环境中作用 6 h,同给予或不给予 10 μmol/L GA 处理。根据以上处理因素将细胞分为 3 组:Control 组,OGD 组和 OGD+GA 组。各组细胞进行 CCK-8 细胞增殖-毒性检测、定量 RT-PCR、免疫荧光染色和 Western 印迹检测等分析。

1.4 CCK-8 细胞增殖-毒性检测

本实验用 CCK-8 试剂盒进行检测。将经 OGD 刺激后的原代神经元细胞铺于 96 孔板中(1×10⁵ 个/孔),将培养板放在含 5%CO₂ 浓度的 37 ℃培养箱中培养 24 h。再向培养板中加入不同浓度梯度的 GA(0、2.5、5、10、20、40 和 80 μmol/L)。在培养箱分别孵育 24 h 或 48 h。再向每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,并将培养板置于培养箱内孵育 4 h。最后,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.5 定量 RT-PCR 检测

为检测 3 组细胞中的 *Nefh*、*MAP2* 和 *GAP43* 的 mRNA 水平。根据 PCR 试剂盒说明书,使用 TRIzol 试剂提取总 RNA。使用 Prime Script™ RT 试剂盒和具有 0.5 μg RNA 模板的 Bio-Rad MyCycler™热循环仪合成 cDNA^[15]。使用以下引物(Table 1),并参照之前的文献使用实时定量 PCR 和 bio-radiQ™ SYBR® Green Supermix 进行扩增,最后根据 Ct 值进行计算。

Table 1 Primer sequences used in qRT-PCR

Gene	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	Tm (°C)
<i>Nefh</i>	CTGCTCGGTCAGATTCAGGG	TCGGTCCAATCTCACTCGGA	60
<i>Map2</i>	CTGCACTGGAAGAAGCAACA	GGGAGGATGGAGGAAGGTCT	60
<i>Gap43</i>	CTGAGGAGGAGAAAGAAGCTGTA	GTCCGGGCACTTTCCTTAGGT	59

Nefh, neurofilament heavy; Map2, microtubule-associated protein 2; Gap43, growth associated protein 43

1.6 细胞免疫荧光

将 3 组细胞用 4%多聚甲醛固定 15 min,用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。用 5%BSA 封闭细胞,置于 37 ℃恒温箱 30 min。滴加一抗(ace-tubulin, 1:1 000, Abcam; tyr-tubulin, 1:500, Abcam; Tuj-1, 1:1 000, Abcam),置于 4 ℃冰箱中过夜。第 2 d,用 PBST 漂洗 3 次,滴加相应的二抗,置于 37 ℃恒温箱孵育 60 min。用 PBST 清洗,用 DAPI 染细胞核 7 min,抗荧光猝灭剂封片。尼康共聚焦荧光显微镜进行拍照。用 Image J 软件测量体外神经元轴突的长度(每张图像中,平均选取 9 个具有代表性的神经元,每个片子拍 4

张有代表性的图像)。

1.7 细胞 Western 印迹检测

将经过处理的 3 组细胞按比例加入细胞裂解液,在冰上用刮刀刮下细胞并转移到 1.5 mL EP 管中。在离心机 4 ℃,以转速为 12 000 r/min 离心 10 min,取细胞上清液,用考马斯亮蓝法测细胞蛋白质浓度。将配好后的样品放于沸水中煮 10 min 后置于-20 ℃保存,准备 WB 实验。将样品加入 10%的分离胶,开始用 80 V 电压电泳,蛋白质样品在胶上跑平后,改为 120 V 电泳,直至电泳到胶的最低点。接下来进行转膜,用 300 mA 恒流湿转 90 min。将转膜后的膜用脱脂牛奶封闭 1.5 h。再用 TBST 漂

洗后,用一抗 (ace-tubulin, 1 : 1 000, Abcam; tyr-tubulin, 1 :500, Abcam) 孵育过夜。第 2 d,回收一抗,将膜放在摇床上 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。用二抗孵育 1 h,取出膜后用 TBST 清洗。最后,用 ECL 试剂 A、B 液等体积混合制作成曝光液。拍摄条带,利用 Image Lab 软件分析条带。用目的蛋白质的灰度值与内参 GAPDH 的灰度值的比值以校正误差,所得结果代表某样品的目的蛋白质相对含量。

1.8 统计学方法

实验数据用平均值±标准误表示,用 IMB SPSS Statistics 21.0 统计软件做统计分析,用 GraphPad 软件作图。组间比较采用单因素方差分析 ANOVA

法, $P<0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 京尼平苷酸对原代神经元细胞无增殖毒性

京尼平苷酸是环烯醚萜类化合物,具有 1 个环戊烷和 1 个 6 元环烯醚结构,易溶于水,易提取 (Fig.1A)。本文采用 CCK-8 检测京尼平苷酸对神经元细胞的毒性作用。检测结果 (Fig.1B、1C) 显示,原代神经元细胞经不同浓度的药物分别作用 24 h 和 48 h,吸光度与相应对照组相比均无显著差异。表明京尼平苷酸在 80 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对原代神经元细胞无增殖毒性。

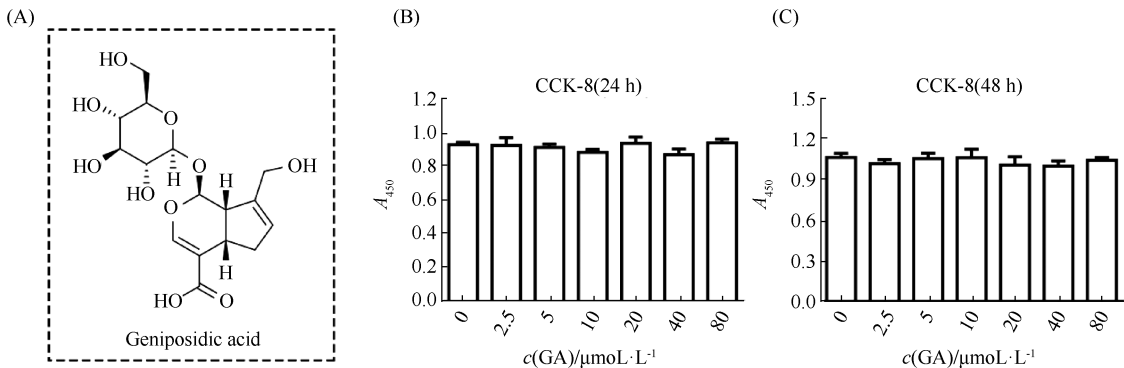


Fig.1 GA is nontoxic to neurons by cytotoxicity assays (A) The molecular structure of GA. (B) Viability of neurons after incubation in different concentrations of GA for 24 h (CCK-8 assay). (C) Viability of neurons after incubation in different concentrations of GA for 48 h (CCK-8 assay). All experiments were repeated three times. Data are presented as the mean \pm SD

2.2 京尼平苷酸促进神经元轴突生长的最适浓度

重肽神经丝蛋白 (neurofilament heavy, Nefh)、生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP43)、微管相关蛋白-2 (microtubule-associated protein-2, MAP2) 是轴突再生中的关键蛋白质。本文通过检测这些神经生长相关蛋白质来探究京尼平苷酸对轴突生长的作用及其最适浓度。结果表明,当京尼平苷酸浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, Nefh 的 mRNA 水平升高最显著,与对照组相比分别升高 1.708 和 2.559 倍;GAP43 和 MAP2 的 mRNA 水平和蛋白质水平的检测结果也表明,京尼平苷酸可以促进其表达。在 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下,该作用最为显著 (Fig. 2A-2F)。本文的结果提示,京尼平苷酸可以促进神经元轴突生长,且该作用在药物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 20 $\mu\text{mol/L}$ 时最显著,而两个浓度在作用上的差异无统计学意义。考虑到药物在临床应用时,剂量不能过高,因此选择 10 $\mu\text{mol/L}$ 作为京尼平苷酸作用于神经元细胞的最适浓度,并进行后续的体内外研究。为了进一步证实药物的作用,

本文通过对 β 微管蛋白 III 型 (Tuj-1, 神经元轴突特异性标记物) 的荧光染色,直观反应其促进神经元轴突生长的作用。结果 (Fig. 2G、2H) 显示,与 OGD 组 ($22\pm 5.788 \mu\text{m}$) 相比,OGD+GA 组 ($68\pm 17.73 \mu\text{m}$) 神经元轴突长度显著增加。综上所述,10 $\mu\text{mol/L}$ 京尼平苷酸能显著促进神经元相关蛋白质的基因和蛋白质水平的表达,并促进轴突生长。

2.3 京尼平苷酸调节神经元微管稳定促进轴突生长

微管是构成神经元轴突细胞骨架的主要成分,正确的微管排列和运动具有特定的方向性和稳定性。微管通过组装、去组装和不断的运动,促使轴突向特定方向生长。微管的稳定对神经元轴突生长非常重要。为了确定京尼平苷酸促进轴突生长的具体机制,本文通过 Western 印迹对乙酰化微管蛋白 (ace-tubulin) 和酪氨酸微管蛋白 (tyrosinated tubulin, tyr-tubulin) 的表达量进行检测。结果 (Fig. 3A-3D) 显示,相比于 OGD 组的微管聚合蛋白的相对灰度值 (0.76 ± 0.06),给予京尼平苷酸后,代表蛋

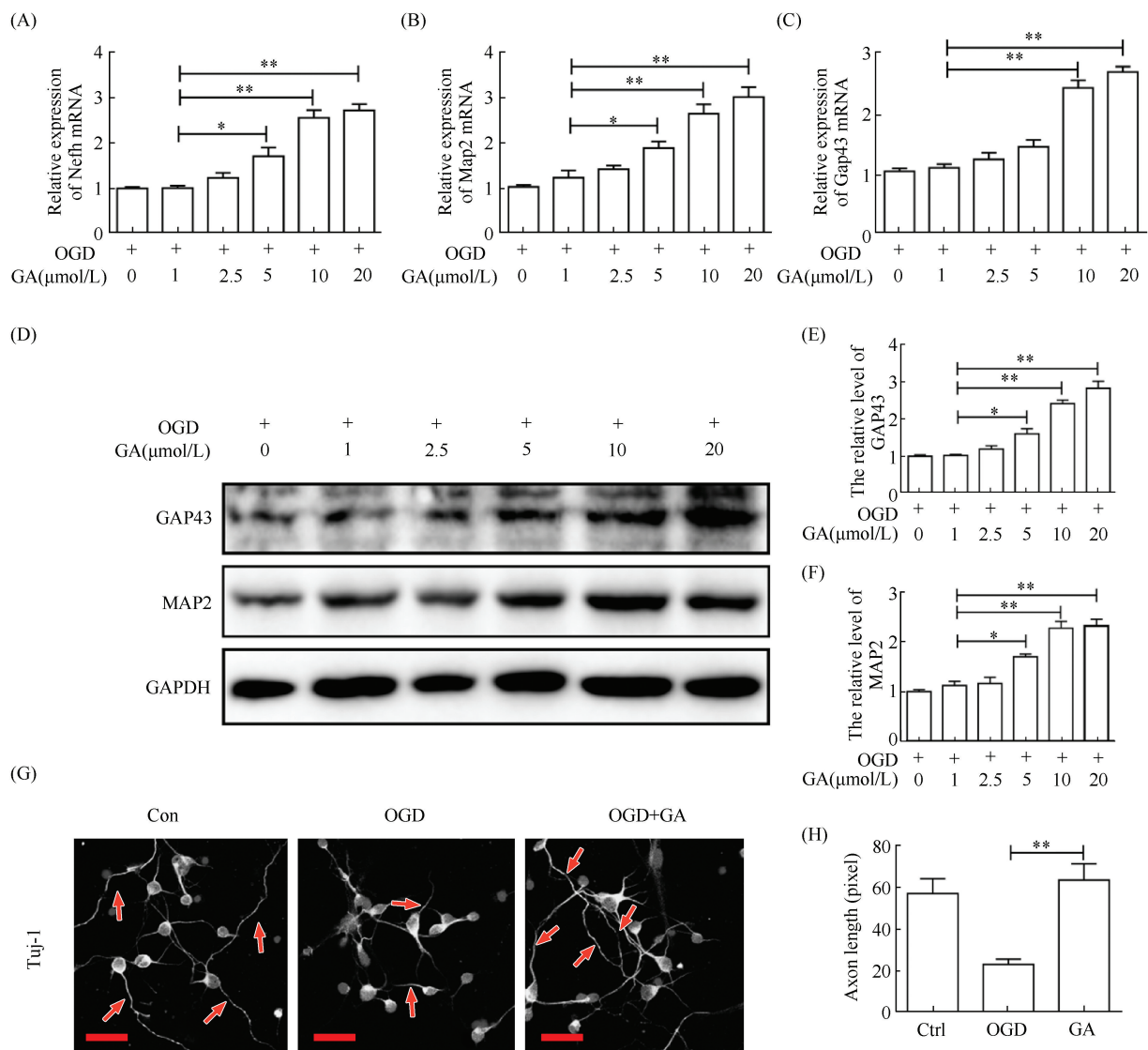


Fig.2 The optimum concentration for GA to facilitate axonal regeneration is 10 μmol/L (A-C) The relative mRNA expression levels of Nefh, Map2 and Gap43 in each group are presented as values normalized to those in the OGD-only cells. (D) Western blot analysis of GAP43 and MAP2 levels in neurons of each group. GAPDH served as a protein loading control. (E, F) Quantification of GAP43 and MAP2 levels from (D), the values are shown relative to those in the OGD-only cells. (G) Representative images of immunostained neurons in each group. Scale bar=25 μm. (H) Quantification of the mean axon length in each group from (G). All experiments were repeated three times. Data are presented as mean ± SD. * P < 0.05. ** P<0.01

白质相对含量灰度值明显增高(1.12±0.16),而微管解聚蛋白的相对表达量由1.63±0.09降低到0.97±0.04。通过免疫荧光也获得了类似结果($P<0.05$)。给予京尼平苷酸后,微管聚合蛋白的荧光强度显著增加,并且A/T比值也增加约1.5倍(Fig. 3E-3G)。本研究结果提示,京尼平苷酸可以促进神经元微管聚合蛋白的表达,同时抑制微管解聚蛋白的表达,它能通过调节微管之间的平衡稳定,从而促进神经元轴突的生长。

2.4 京尼平苷酸提高脊髓损伤大鼠的行为学功能
上述结果提示,京尼平苷酸在体外具有显著

的促进神经元轴突生长作用。神经元轴突生长是脊髓损伤恢复的关键。因此使用脊髓损伤模型,在体内评价京尼平苷酸是否具有促进脊髓损伤恢复的作用。经造模后的0、3、7、14和28 d,分别进行BBB行为学评分和斜板评分。经过统计,得到Fig.4的结果。Sham组作为空白对照,大鼠运动功能正常,BBB评分均为21分。术后0 d,SCI和GA组大鼠BBB评分约为0分,说明大鼠双后肢完全瘫痪,造模成功。SCI组大鼠本身具有一定的恢复功能,术后开始逐渐恢复。但在造模的第7 d、14 d、28 d后,BBB平均评分分别

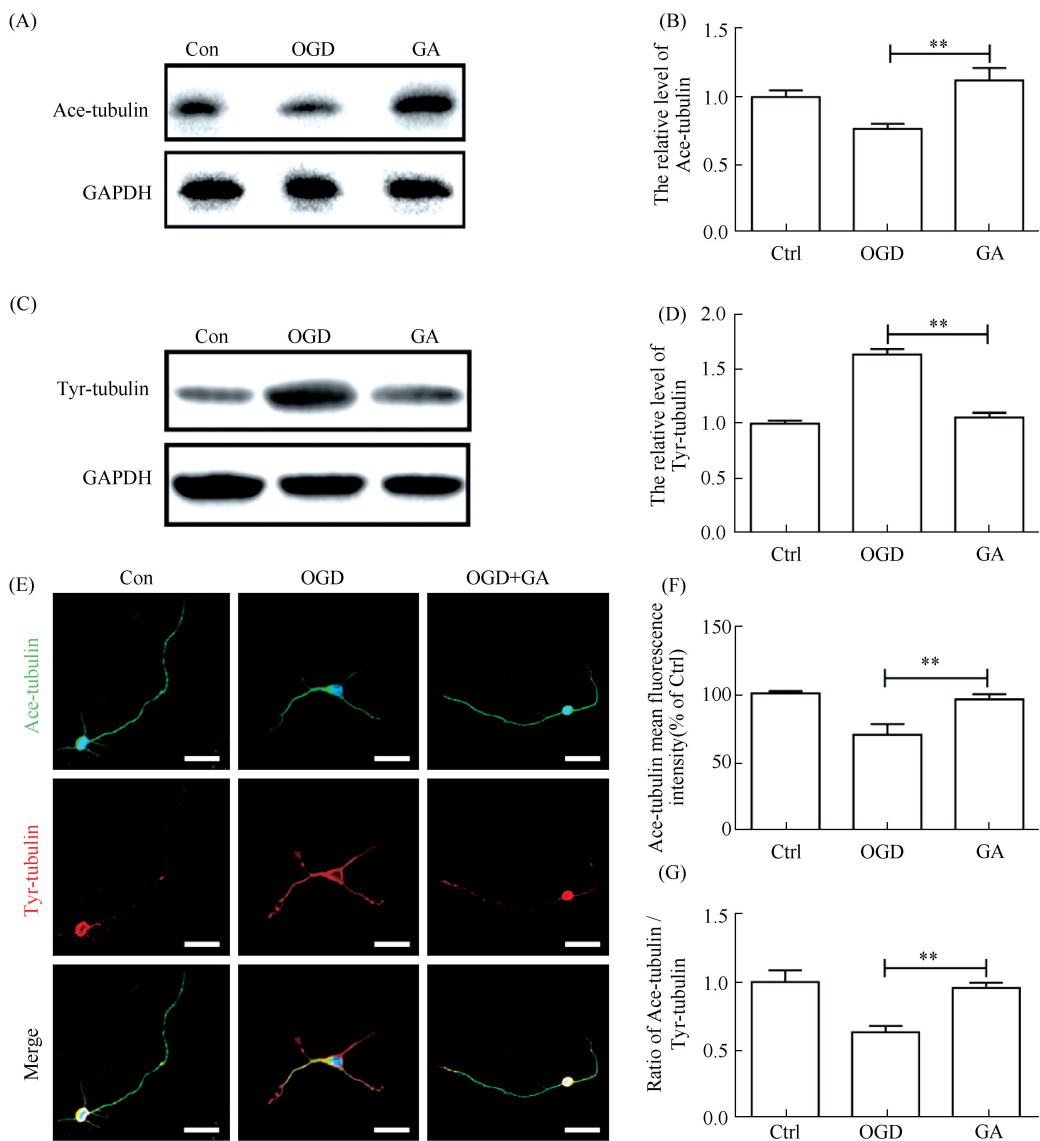


Fig.3 GA stabilizes microtubule to improve axonal growth (A) Western blot analysis of ace-tubulin levels in each group. GAPDH was used as a protein loading control. (B) Quantification of ace-tubulin levels from (A). The values are shown relative to those in the control cells. (C) Western blot analysis of tyr-tubulin in each group. GAPDH was used as a protein loading control. (D) Quantification of tyr-tubulin levels from (C). The values are shown relative to those in the control cells. (E) Representative images of neurons co-stained with ace-tubulin (green) and tyr-tubulin (red). Scale bar = 25 μm . (F) Quantification of ace-tubulin levels from (E). The values are shown relative to those in the control cells. (G) The ratio of the relative intensity of ace-tubulin to tyr-tubulin from (E). The values are shown relative to those in the control group. All experiments were repeated three times. Data are presented as mean \pm SD. ** $P < 0.05$

为 4.7,7.2 和 9.5 分;而 GA 组大鼠评分明显高于 SCI 组,在第 7 d(6.7 分)时就出现差异,在术后 14 d(9.7 分)、28 d(11.8 分)差异明显,并具有统计学意义($P < 0.05$)。斜板评分结果与 BBB 评分结果一致。GA 给药组所测得的斜板角度(41.7°)明显大于 SCI 组(33.3°),在 28 d 时显示出显著差异,具有统计学意义($P < 0.05$)。说明京尼平苷酸可以促进脊髓损伤后大鼠运动功能的恢复。

3 讨论

脊髓损伤是一种难以治愈的中枢退行性疾病,可导致严重的神经功能障碍,影响人们的身心健康。京尼平苷酸(GA)是一种具有神经营养、神经保护和抗氧化的中药栀子的衍生物^[11, 14]。有文献报道,京尼平苷酸在阿尔兹海默等疾病中能促进神经生长,修复受损神经元^[11]。然而,其对脊髓损伤的影响尚未见报道,并且其发挥的具体机制还需进一步

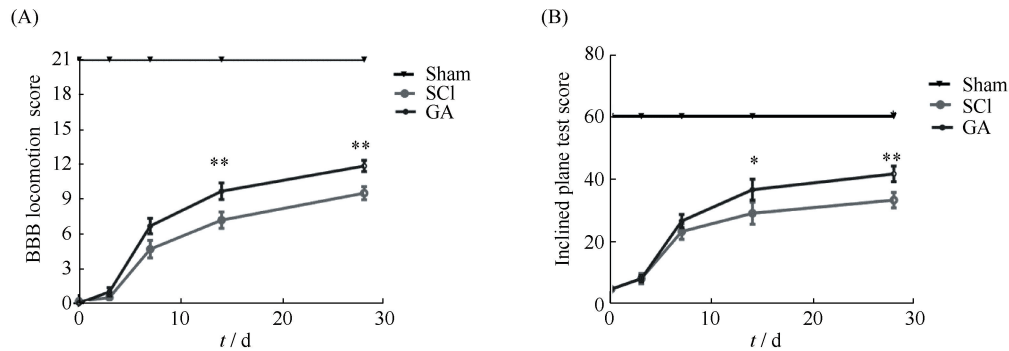


Fig.4 GA improves the motor function recovery in SCI rats After SCI at 0, 3, 7, 14 and 28 days, recovery was assessed by the BBB locomotion scale and the inclined plane test. (A) The BBB scores of the Sham, SCI and GA groups. (B) The inclined plane test scores of the different groups. All experiments were repeated three times. Data are presented as mean ± SD, n = 12 per group. * P < 0.05, ** P < 0.01 versus the SCI group

探索。本研究显示,京尼平苷酸可以显著促进神经轴突生长,改善大鼠运动功能。同时,因其主要是通过促进微管聚合来发挥增加轴突生长的作用,这为治疗脊髓损伤提供了新的策略。

脊髓损伤后,神经轴突再生是当前临床上迫切需要解决的难题。受损神经元无法再生可能发挥了决定性的作用。目前的治疗主要集中在改善细胞内在生长能力和局部细胞外微环境,虽然取得一定效果,但仍不能完全根治并且还具有副作用^[4, 16, 17]。轴突再生是一个非常复杂的过程,需要多种因素相互作用。其中,微管的动态变化在轴突生长和神经元极化方面发挥至关重要的作用^[7, 17, 18]。脊髓损伤后,轴突受到破坏,导致微管排列杂乱无章且分布不均匀,严重限制了轴突生长^[10]。最近的研究表明,微管稳定剂紫杉醇、多西他赛和埃坡霉素 B 可以通过微管稳定来促进轴突再生^[19-22]。因此,增加微管稳定性有助于轴突再生,这是一种有效的机制。另一方面,神经元是高度极化的细胞,其发育过程包括轴突-树突作用与轴突的延伸和成熟。神经元极化是诱导轴突再生的关键内在因素,它主要由微管建立和维持,特别是微管稳定在神经元极化、延伸以及物质的定向运输中扮演着重要的作用^[23, 24]。有研究^[18, 25]表明,促进微管稳定可以诱导神经元从多极形态向单极或双极形态转化,并且提高神经元的生长能力。本研究发现,京尼平苷酸可以明显上调微管聚合蛋白的表达,同时下调微管解聚蛋白的表达,增加 A/T 比值。京尼平苷酸还能够促进 OGD 刺激后的轴突再生。因此,京尼平苷酸在轴突再生和微管稳定方面有很大的应用前景。

本研究通过免疫荧光、RT-PCR、Western 印迹检

测等技术,探索了京尼平苷酸对脊髓损伤的具体作用。由研究结果可知,京尼平苷酸可以通过促微管稳定从而促进轴突生长,最终改善运动功能的恢复。

参考文献 (References)

[1] Squair JW, Ruiz I, Phillips AA, *et al.* Minocycline reduces the severity of autonomic dysreflexia after experimental spinal cord injury[J]. J Neurotrauma, 2018, **35**(24): 2861-2871

[2] Zhu LL, Li MQ, He F, *et al.* Mitochondria targeted peptide attenuates mitochondrial dysfunction, controls inflammation and protects against spinal cord injury-induced lung injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, **44**(1): 388-400

[3] Wang J, Li H, Ren Y, *et al.* Local delivery of β -elemene improves locomotor functional recovery by alleviating endoplasmic reticulum stress and reducing neuronal apoptosis in rats with spinal cord injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, **49**(2): 595-609

[4] Kumamaru H, Lu P, Rosenzweig ES, *et al.* Activation of intrinsic growth state enhances host axonal regeneration into neural progenitor cell grafts[J]. Stem Cell Reports, 2018, **11**(4): 861-868

[5] Anderson MA, O'shea TM, Burda JE, *et al.* Required growth facilitators propel axon regeneration across complete spinal cord injury[J]. Nature, 2018, **561**(7723): 396-400

[6] O'shea TM, Burda JE, Sofroniew MV. Cell biology of spinal cord injury and repair[J]. J Clin Invest, 2017, **127**(9): 3259-3270

[7] Hapak SM, Ghosh S, Rothlin CV. Axon regeneration: antagonistic signaling pairs in neuronal polarization[J]. Trends Mol Med, 2018, **24**(7): 615-629

[8] Stuessi M, Bradke F. Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way[J]. Dev Neurobiol, 2011, **71**(6): 430-444

[9] Yamamoto H, Demura T, Morita M, *et al.* Differential neurite outgrowth is required for axon specification by cultured hippocampal neurons[J]. J Neurochem, 2012, **123**(6): 904-910

[10] Baas PW, Ahmad FJ. Beyond taxol: microtubule-based treatment of disease and injury of the nervous system[J]. Brain, 2013, **136**(Pt 10): 2937-2951

[11] Zhou Y, Liang M, Li W, *et al.* Protective effects of Eucommia ulmoides Oliv. bark and leaf on amyloid β -induced cytotoxicity[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2009, **28**(3): 342-349

[12] Chen H, Huang X, Min J, *et al.* Geniposidic acid protected against ANIT-induced hepatotoxicity and acute intrahepatic cholestasis, due to Fxr-mediated regulation of Bsep and Mrp2[J]. J Ethnopharmacol, 2016, **179**: 197-207

- [13] Gong N, Fan H, Ma AN, *et al.* Geniposide and its iridoid analogs exhibit antinociception by acting at the spinal GLP-1 receptors[J]. *Neuropharmacology*, 2014, **84**: 31-45
- [14] Kim SJ, Kim KM, Park J, *et al.* Geniposidic acid protects against D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic failure in mice[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, **146**(1): 271-277
- [15] Ye LB, Yu XC, Xia QH, *et al.* Regulation of caveolin-1 and junction proteins by bFGF contributes to the integrity of blood-spinal cord barrier and functional recovery [J]. *Neurotherapeutics*, 2016, **13**(4): 844-858
- [16] Zhang G, Rodemer W, Lee T, *et al.* The Effect of Axon Resealing on Retrograde Neuronal Death after Spinal Cord Injury in Lamprey[J]. *Brain Sci*, 2018, **8**(4).pii: E65
- [17] He Z, Jin Y. Intrinsic control of axon regeneration[J]. *Neuron*, 2016, **90**(3): 437-451
- [18] Jaglin XH, Chelly J. Tubulin-related cortical dysgeneses; microtubule dysfunction underlying neuronal migration defects [J]. *Trends Genet*, 2009, **25**(12): 555-566
- [19] Ruschel J, Hellal F, Flynn KC, *et al.* Axonal regeneration. Systemic administration of epothilone B promotes axon regeneration after spinal cord injury [J]. *Science*, 2015, **348** (6232): 347-352
- [20] Hellal F, Hurtado A, Ruschel J, *et al.* Microtubule stabilization reduces scarring and causes axon regeneration after spinal cord injury[J]. *Science*, 2011, **331**(6019): 928-931
- [21] Mohapatra S, Saha A, Mondal P, *et al.* synergistic anticancer effect of peptide - docetaxel nanoassembly targeted to tubulin: toward development of dual warhead containing nanomedicine [J]. *Adv Health Mater*, 2017, **6** (2). doi: 10.1002/adhm.201600718
- [22] Li X, Fan C, Xiao Z, *et al.* A collagen microchannel scaffold carrying paclitaxel-liposomes induces neuronal differentiation of neural stem cells through Wnt/ β -catenin signaling for spinal cord injury repair[J]. *Biomaterials*, 2018, **183**: 114-127
- [23] Wu QF, Yang L, Li S, *et al.* Fibroblast growth factor 13 is a microtubule-stabilizing protein regulating neuronal polarization and migration[J]. *Cell*, 2012, **149**(7): 1549-1564
- [24] Conde C, Cáceres A. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, **10**(5): 319-332
- [25] Kahn OI, Baas PW. Microtubules and growth cones: motors drive the turn[J]. *Trends Neurosci*, 2016, **39**(7): 433-440