

实验研究

DOI: 10. 13288/j. 11-2166/r. 2023. 03. 013

脊髓康含药血清联合 SOX-2 对星形胶质细胞重编程诱导为神经元细胞的影响

王浩阔¹, 王建伟², 吴毛², 汪国澎¹, 李绍烁², 戎毅¹, 邵阳²✉

1. 南京中医药大学, 江苏省南京市仙林大道 138 号, 210023; 2. 江苏省无锡市中医医院

[摘要] **目的** 研究脊髓康联合 SRY 转录盒因子 2 (SOX-2) 治疗脊髓损伤的作用机制。**方法** 成年 SD 大鼠随机分为空白组和给药组各 5 只。给药组大鼠以生药量 20 g/(kg·d) 脊髓康灌胃, 空白组给予 16 ml/(kg·d) 生理盐水灌胃, 均连续灌胃 3 天后腹主动脉采血制备含药血清和空白血清。体外培养 1~4 日龄大鼠幼仔皮层脑组织三代星形胶质细胞, 分为空白血清组、SOX-2 组、SOX-2+脊髓康血清组。SOX-2 组加入 10 mmol/L SOX-2; SOX-2+脊髓康血清组加入 2.5% 脊髓康含药血清和 10 mmol/L SOX-2, 使培养基中血清终浓度为 10%; 空白血清组加入 10% 空白血清。诱导培养 21 天后, 光镜下观察 3 组神经元样细胞形态改变, 细胞免疫荧光检测神经元轴突标志物微管相关蛋白 2 (MAP2) 的表达, Western-Blot 检测细胞中下游代谢产物 S 腺苷甲硫氨酸 (SAM)、乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 表达, PCR 定量分析星形胶质细胞中糖酵解相关基因己糖激酶 1 (HK1)、己糖激酶 2 (HK2)、磷酸果糖激酶 1 (PFK1)、磷酸果糖激酶 2 (PFK2)、M2 型丙酮酸激酶同工酶 (PKM2) 基因表达。细胞能量代谢分析仪比较 SOX-2 组、SOX-2+脊髓康血清组细胞外酸化率 (EACR) 和耗氧率 (OCR)。**结果** 光镜下见 SOX-2+脊髓康血清组大量具有两极且长轴突的神经元样细胞, 较 SOX-2 组明显增多; 空白血清组见星形胶质细胞, 未见神经元样细胞。与空白血清组和 SOX-2 组比较, SOX-2+脊髓康血清组 MAP2、SAM、acetyl-CoA 表达均升高, HK1、HK2、PFK1、PFK2、PKM2 基因表达亦显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。SOX-2+脊髓康血清组 ECAR 和 OCR 亦高于 SOX-2 组。空白血清组和 SOX-2 组 MAP2、SAM、acetyl-CoA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 脊髓康含药血清联合 SOX-2 可以将星形胶质细胞重编程诱导为神经元细胞, 其机制可能是通过提高糖酵解能力从而提升星形胶质细胞重编程。

[关键词] 脊髓损伤; 星形胶质细胞; 重编程神经元; 有氧糖酵解; 表观遗传学; 脊髓康

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种中枢神经严重受损的疾病, 目前尚缺乏有效的修复治疗方法^[1]。一方面, SCI 造成病变区域大量神经元死亡, 而成人脊髓缺乏神经元再生能力可导致神经支配环路中断, 神经元新生成为 SCI 的一个治疗难题; 另一方面, SCI 后反应性星形胶质细胞增生, 小胶质细胞和星形胶质细胞激活形成致密瘢痕而阻碍轴突的再生^[2]。如何在破坏胶质瘢痕保护作用的前提下尽量降低致密瘢痕的阻碍作用, 逆转成为神经元, 成为治疗 SCI 的一个难题, 目前中枢神经

原位再生技术将胶质细胞重编程转化为神经元已经取得了一定进展^[3]。

SCI 属于中医学“痿证”“痿痹”范畴。中医理论认为, 急性 SCI 后所产生的各种临床症状, 多因瘀滞督脉、枢机统率失职, 导致督脉与其他经络、脏腑、气血功能紊乱所致^[4]。我们认为 SCI 的病机为肾督虚损, 瘀阻督脉, 枢机统率失职, 进而筛选出具有祛瘀通督、补益肝肾、调和气血功效的中药复方脊髓康。脊髓康是南京中医药大学无锡附属医院院内制剂, 已获国家发明专利 (ZL200910026193.7)。前期临床验证, 脊髓康对于脊髓损伤具有促进疾病康复、改善运动行为的作用^[5-6]。实验研究^[7]发现, 脊髓康具有促进胶质细胞向神经元分化的效应。另有研究发现, SRY 转录

基金项目: 国家自然科学基金 (82174400); 江苏省中医药科技发展计划项目 (YB2020041, YB2020042); 无锡市科学技术局医疗卫生指导性项目 (SKJJZD19); 无锡市卫生健康委科研项目 (Q201945)

✉ 通讯作者: shaoyang2284@163.com

盒因子 2 (SOX-2) 能将体细胞转化为神经元细胞, 但效率较低^[8]。本研究观察脊髓康含药血清联合 SOX-2 转录因子对星形胶质细胞直接重编程诱导为神经元细胞的影响, 为其临床治疗脊髓损伤提供依据。本研究经无锡市中医医院医学伦理委员会批准 (批准号 SZYYKJFZJH2020111810)。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 5 只, 出生 1~4 天, 体质量 5~15 g; 清洁级成年雄性 SD 大鼠 10 只, 7~8 周龄, 体质量 210~230 g。均由无锡市血吸虫病防治研究所提供, 实验动物使用许可证号: SYXK (苏) 2017-0050。饲养环境: 温度 (23±2) °C, 相对湿度 50%~70%, 光照 12 h 的普通清洁环境, 所有大鼠均可自由获得食物和水。

1.2 药物

脊髓康药物组成: 黄芪 30 g, 枳实 10 g, 当归尾 12 g, 川芎 10 g, 丹参 20 g, 淫羊藿 10 g, 赤芍 12 g, 土鳖虫 10 g, 水蛭 10 g, 蜈蚣 1 条, 厚朴 10 g, 肉苁蓉 10 g, 益智仁 10 g, 泽泻 10 g, 车前子 15 g (包煎), 茯苓 10 g。以上诸药经无锡市中医医院药剂科煎制成含生药浓度为 1.25 g/ml 的溶液, 4 °C 冷藏。

1.3 主要试剂及仪器

胎牛血清 (YOSHi 公司, 批号 A1005); 多聚-D-赖氨酸 (Absin 公司, 批号 abs9173); 平衡盐溶液 PBS (Solarbio 公司, 批号 P1020); 碱性成纤维细胞生长因子 (Peprotech 公司, 批号 96-400-29); 胰蛋白酶-EDTA (0.25%, 批号 25200056)、B27 添加剂 (批号 17504-044)、N2 添加剂 (批号 17502-048)、表皮生长因子 (批号 PH60311)、Neurobasal 培养基 (批号 21103049)、DMEM 高糖培养基 (批号 11965092), Gibco 公司; 免疫染色封闭液 (凯诗源生物科技有限公司, 批号 SH-0687); Triton X-100 (伊塔生物科技有限公司, 批号 YT2185); 抗荧光淬 DAPI (XYBio 公司, 批号 XY4082); cDNA 逆转录试剂盒 (TOYOBO 公司, 批号 FSQ-101); RIPA 细胞裂解液 (碧云天生物科技有限公司, 批号 MT0068); 寡霉素 (普利莱基因技术有限公司, 批号 C1509), 线粒体解偶联剂 (Biovision 公司, 批号 2398-25); 多聚甲醛 (批号 672002-0500)、山羊血清 (批号 E510009-0100), BBI 公司; 抗 GFAP 抗体 (批号 ab7260)、山羊抗兔 IgG (批号

ab150077), Abcam 公司; 抗微管相关蛋白 2 (MAP2) 抗体 (批号 AF4081)、S 腺苷甲硫氨酸 (SAM) 抗体 (批号 DF12822)、乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 抗体 (批号 AF6421), Affinity 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG (Servicebio 公司, 批号 GB23303)。

TaqMan 基因表达分析系统 (型号 AriaMx)、7900HT 快速实时 PCR 仪 (型号 AriaMx)、细胞能量代谢分析仪 (型号 102342-100), Agilen 公司; 光学显微镜 (型号 BX60)、荧光显微镜 (型号 CKX53), Olympus 公司; 细胞恒温培养箱 (PHChi 公司, MC0-170AICL); 常温低速离心机 (Eppendorf 公司, 型号 Centrifuge5702RH)。

1.4 星形胶质细胞的提取、培养、鉴定

取新生 1~4 天内 SD 大鼠, 断头取脑组织, 分离出大脑皮质, 仔细剥离软脑膜和血管后剪成微小组织块, 室温 1200 r/min 离心 5 min, 离心半径 8 cm, 用 0.25% 胰酶消化 30 min, 加入胎牛血清后混匀, 终止消化, 室温 1200 r/min 离心 5 min, 离心半径 8 cm, 弃去上清, 加入含胎牛血清的 DMEM 吹打混匀, 使用 200 目筛网过滤, 接种于 T25 培养瓶中, 置于细胞恒温培养箱中培养, 保持温度 37 °C、CO₂ 浓度为 5%, 每 3 天进行 1 次换液, 细胞融合至 90% 可以进行传代。选取第三代星形胶质细胞进行下一步实验。第三代细胞接种在聚 D-赖氨酸涂层的盖玻片 24 孔板上, 用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 每孔适量加入提前预冷的多聚甲醛室温固定 20 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; Triton-X100 室温透化 15 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 使用体积分数为 10% 山羊血清室温进行封闭 30 min 后, 每孔滴加提前稀释好的一抗 (GFAP 1 : 200), 以覆盖为宜, 4 °C 孵育过夜。第 2 天回收一抗, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加提前稀释好的二抗 (山羊抗兔 IgG 1 : 300), 室温避光孵育 60 min, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 沥干液体, 滴加含有 DAPI 的封片剂进行封固, 在荧光显微镜下采集图片。

1.5 含药血清制备

将成年 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白组和给药组各 5 只。给药组大鼠以 20 g / (kg·d) 脊髓康溶液 (生药浓度为 1.25 g/ml) 灌胃, 早晚各灌胃 1 次, 连续给药 3 天; 空白组给予 16 ml / (kg·d) 生理盐水灌胃, 连续给药 3 天。两组大鼠末次灌胃后 1 h 腹主动脉采血, 4 °C 静置 1 h, 室温 4000 r/min 离心 6 min, 离心半径 8 cm, 分离血清, 56 °C 水浴 30 min 灭活补体, 经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后

分装, -20 °C 保存备用。

1.6 细胞分组及干预方法

在 24 孔板中将第三代星形胶质细胞接种在聚 D-赖氨酸涂层的盖玻片 (12 mm) 上, 分为空白血清组、SOX-2 组、SOX-2+脊髓康血清组, 每组 3 个复孔, 每孔 1×10^4 个细胞。铺板培养 2 天后, 仔细将培养基吸出, 用 PBS 轻柔地洗 3 次, 吸干 PBS, 每孔加入 800 μ l 含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。SOX-2 组: 将 10 mmol/L SOX-2 溶入培养基中, 每孔加入 800 μ l, 连续刺激星形胶质细胞 7 天, 随后更换含有生长因子脑源性神经营养因子 (BDNF)、神经营养因子 3 (NT-3) (含 B27N2 添加剂) 的神经元培养基培养至 21 天。SOX-2+脊髓康血清组: 将 2.5% 脊髓康含药血清 (课题组前期实验得出的最佳效应浓度^[9])、10 mmol/L SOX-2 溶入培养基中, 并使培养基中血清终浓度为 10%, 每孔加入 800 μ l, 连续刺激星形胶质细胞 7 天, 随后更换含有生长因子 BDNF、NT-3 (B27N2) 的神经元培养基培养至 21 天。空白血清组: 将空白血清融入培养基中, 并使培养基中血清终浓度为 10%, 每孔加入 800 μ l, 并于 7 天后更换含有生长因子 BDNF、NT-3 (B27N2) 的神经元培养基培养至 21 天。

1.7 观察指标与方法

1.7.1 光镜下观察重编程神经元 21 天后在光镜下观察各组细胞形态并拍照。

1.7.2 免疫荧光多标染色验证重编程神经元 通过免疫荧光多标染色神经元轴突标志物 MAP2, DAPI 染色细胞核双链 DNA 验证重编程的神经元。使用红色标记 MAP2、蓝色标记 DAPI, 检测 MAP2 表达和 DAPI 染色情况, 荧光显微镜下观察并拍照。

1.7.3 细胞能量代谢分析仪检测细胞胞外酸化率 (ECAR) 和耗氧率 (OCR) 为了研究 SOX-2+脊髓康血清组和 SOX-2 组细胞代谢以及功能的改变, 本研究评估了两组细胞糖酵解细胞 ECAR 和 OCR。干预 21 天后, SOX-2 组、脊髓康+SOX-2 组细胞以 1×10^4 个在无 CO₂ 培养箱孵育 1 h 上机检测, 根据试剂盒的说明进行细胞 ECAR 测量, ECAR 基线平衡后, 每隔 7 min 测量 3 次后, 机器按照时间点分别加入寡霉素 62 μ l, 线粒体解偶联剂 62 μ l。根据说明进行 OCR 测量, OCR 基线平衡后, 机器按照时间点分别加入寡霉素 56 μ l, 线粒体解偶联剂 62 μ l。实验数据由 Seahorse XFe 24 Wave software 处理。

1.7.4 Western blot 法检测 SAM 和 acetyl-CoA 表达 以 RIPA 细胞裂解液提取 3 组细胞总蛋白,

BCA 测定蛋白浓度。垂直电泳分离, 将蛋白转至 PVDF 膜, 室温封闭 1 h 后, 孵育一抗 (SAM 1: 1000, acetyl-CoA 1: 1000) 4 °C 过夜, 室温孵育二抗 (HRP 标记的山羊抗兔 IgG 1: 5000) 2 h, 于暗室中曝光和显影。所用内参为 β -actin, 条带灰度分析使用 Quantity One 4.6.2 软件系统, 结果以灰度值表示。

1.7.5 PCR 定量分析星形胶质细胞糖酵解相关基因的表达 提取细胞 RNA, 沉淀 RNA。cDNA 逆转录试剂盒合成 cDNA。用 Prime6 设计引物, 由上海生工生物工程有限公司合成, 己糖激酶 1 (HK1): 上游: GGAGATGAAGAATGTGGAGATGG, 下游: CTTGGTGAAGTCAATCAGGATGT, 扩增产物长度: 226 bp; 己糖激酶 2 (HK2): 上游: CTGGTGCCTGTGCGTAATG, 下游: TGAGGAGGATGCTCTGTCTA, 扩增产物长度: 229 bp; 磷酸果糖激酶 1 (PFK1): 上游: CGACGAGAGGCAGTGAGTTA, 下游: TGGTAGTGTGGTGGCATCA, 扩增产物长度: 166 bp; 磷酸果糖激酶 2 (PFK2): 上游: TC-CATCCTCGCACCATCTATC, 下游: CACGCCAG-CATCAATCTCATT, 扩增产物长度: 254 bp; M2 型丙酮酸激酶同工酶 (PKM2): 上游: TGAATGTGGCTCGGCTGAA, 下游: GCAACAGGTCGGTAG-AGAATG, 扩增产物长度: 121 bp; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 上游: ATGCCATCACTGCCA-CTCA, 下游: CCTGCTTCACCACCTTCTTG, 扩增产物长度: 258 bp。每个样品设立 3 个复孔, 取均值, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行均一化处理, 所有实验结果至少重复 3 次。

1.8 统计学方法

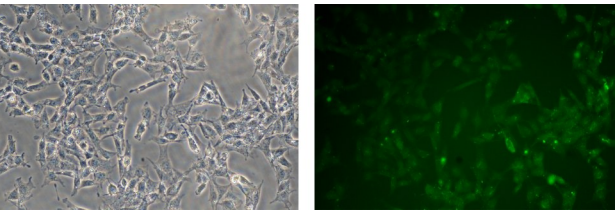
使用 SPSS 19.0 软件对数据进行处理, 计量资料符合正态分布者采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 总体方差相等时用单因素方差分析组间差异, 总体方差不等时, 采用 K-W 检验。P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 星形胶质细胞的形态及其纯度鉴定结果

镜下可见细胞生长状态良好, 胞体突起增大, 透光度较低, 细胞间连接密切, 呈现铺路石样, 无小胶质细胞或少突胶质细胞。在 24 孔板中将第三代星形胶质细胞培养在聚 D-赖氨酸涂层的盖玻片 (12 mm) 上, 用星形胶质细胞特异性抗体 GFAP 染色, 荧光显微镜下发绿色荧光 (见图 1), 星形胶

质细胞的纯度大于95%，达到后期实验对于此细胞纯度的要求。



光镜下观察 GFAP染色后光镜下观察

图1 星形胶质细胞鉴定结果 (×100)

2.2 各组星形胶质细胞形态学比较

21天后光镜下观察到SOX-2+脊髓康血清组、SOX-2组胞体明显缩小变得细长，两端伸出较长轴突，呈现两极形态，且SOX-2+脊髓康血清组神经元样细胞数量明显多于SOX-2组；空白血清组细胞只观察到饱满的星形胶质细胞，未观察到神经元样细胞（见图2）。

2.3 各组细胞免疫荧光多标染色结果

使用玫红色标记MAP2、蓝色标记DNA (DAPI)，对各组细胞进行免疫荧光多标染色。图3示，SOX-2+脊髓康血清组及SOX-2组细胞核染色

发生形态变化，成熟神经元轴突标志物MAP2表达阳性，且SOX-2+脊髓康血清组MAP2明显较SOX-2组增加，空白血清组细胞未见明显核染色形态变化及MAP2表达。表1示，SOX-2+脊髓康血清组MAP2表达较空白血清组和SOX-2组明显上调 ($P<0.05$)，而空白血清组和SOX-2组差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表1 各组细胞神经元轴突核标志物MAP2平均荧光强度比较 (AU, $\bar{x}\pm s$)		
组别	样本数	MAP2
空白血清组	3	10.57±0.64 ^{a)}
SOX-2组	3	12.11±1.05 ^{a)}
SOX-2+脊髓康血清组	3	25.37±5.01

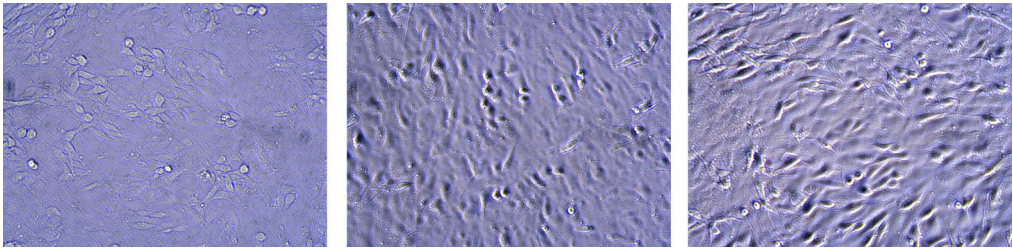
注：MAP2，抗微管相关蛋白2。
a) 与SOX-2+脊髓康血清组比较， $P<0.05$ 。

2.4 各组细胞ECAR和OCR比较

图4示，SOX-2+脊髓康血清组较SOX-2组ECAR和OCR均升高。

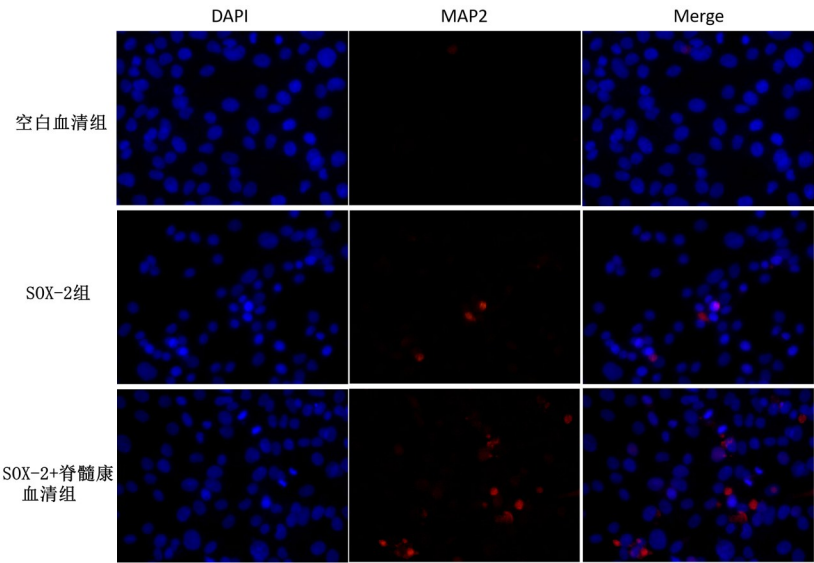
2.5 各组细胞中SAM、acetyl-CoA蛋白表达比较

表2示，SOX-2+脊髓康血清组SAM、acetyl-CoA蛋白表达均较空白血清组和SOX-2组明显升高



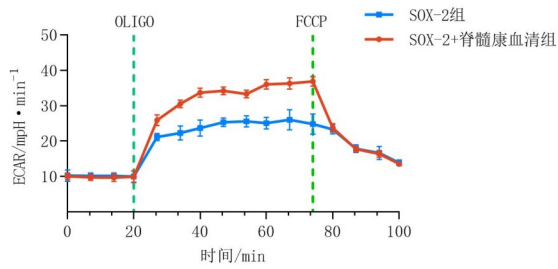
空白血清组 SOX-2组 SOX-2+脊髓康血清组

图2 各组星形胶质细胞光镜下形态结果 (×100)



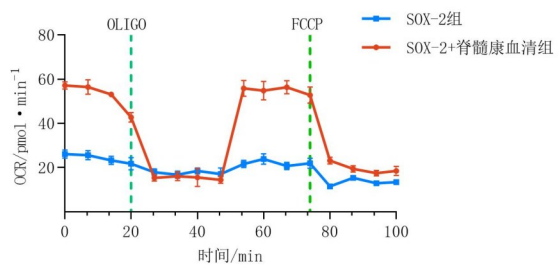
注：MAP2，抗微管相关蛋白2。

图3 各组神经元轴突及核标志物的表达 (免疫荧光染色, ×100)

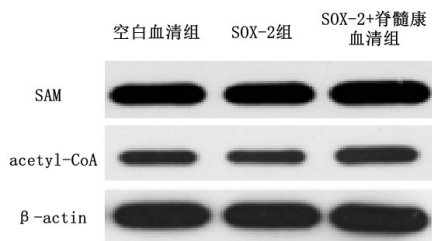


注: ECAR, 胞外酸化率; OCR, 耗氧率。

图4 SOX-2+脊髓康血清组和SOX-2组细胞 ECAR、OCR 比较



($P < 0.05$), 空白血清组和 SOX-2 组 SAM、acetyl-CoA 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组细胞中 SAM 和 acetyl-CoA 蛋白电泳图见图 5。



注: SAM, S 腺苷甲硫氨酸; acetyl-CoA, 乙酰辅酶 A。

图5 各组细胞中 SAM 和 acetyl-CoA 表达电泳图

表2 各组细胞中 SAM 和 acetyl-CoA 相对表达水平比较
(/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	SAM	acetyl-CoA
空白血清组	3	$0.84 \pm 0.03^a)$	$0.35 \pm 0.04^a)$
SOX-2 组	3	$0.83 \pm 0.02^a)$	$0.36 \pm 0.03^a)$
SOX-2+脊髓康血清组	3	0.97 ± 0.06	0.48 ± 0.03

注: SAM, S 腺苷甲硫氨酸; acetyl-CoA, 乙酰辅酶 A。

a) 与 SOX-2+脊髓康血清组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 各组细胞中糖酵解相关基因表达比较

表 3 示, 与空白血清组比较, SOX-2 组 PFK1、PFK2、PKM2 基因表达显著升高, SOX-2+脊髓康血清组 HK1、HK2、PFK1、PFK2、PKM2 基因表达均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 SOX-2 组比较, SOX-2+脊髓康血清组 HK1、HK2、PFK1、PFK2、PKM2 基因表达均显著升高 ($P < 0.01$)。

表3 各组细胞糖酵解相关基因表达水平比较
($2^{-\Delta\Delta ct}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	HK1	HK2	PFK1	PFK2	PKM2
空白血清组	3	1.00 ± 0.13	0.99 ± 0.07	1.01 ± 0.05	0.99 ± 0.06	0.99 ± 0.08
SOX-2 组	3	1.15 ± 0.07	1.19 ± 0.15	$1.23 \pm 0.02^a)$	$1.50 \pm 0.11^a)$	$1.24 \pm 0.06^b)$
SOX-2+脊髓康血清组	3	$2.63 \pm 0.14^a) c)$	$2.69 \pm 0.11^a) c)$	$2.36 \pm 0.02^a) c)$	$3.15 \pm 0.08^a) c)$	$7.35 \pm 0.27^a) c)$

注: HK1, 己糖激酶 1; HK2, 己糖激酶 2; PFK1, 磷酸果糖激酶 1; PFK2, 磷酸果糖激酶 2; PKM2, M2 型丙酮酸激酶同工酶。

a) 与空白血清组比较, $P < 0.01$; b) 与空白血清组比较, $P < 0.05$; c) 与 SOX-2 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

SCI 病理过程复杂, 造成病灶区域大量神经元死亡, 损伤后星形胶质细胞逐渐迁移到病变周围, 沉积富含硫酸软骨素蛋白多糖的细胞外基质, 形成星形胶质细胞瘢痕, 阻碍轴突再生^[10-11]。干细胞移植被认为是一种行之有效的治疗手段, 但其缺少稳定的细胞来源, 成瘤风险较高, 诱导分化过程可能错过脊髓损伤功能修复的最佳时期等, 使得干细胞移植技术存在一定的风险和限制条件^[12]。重编程是细胞从一种基因表达谱转换为另一套不相关表达谱的过程, 但目前重编程效率仍然不理想^[8], 迫切需要找到一种高效诱导重编程的办法。如何在损伤区域补充充足的神经元, 使之兼具较高的安全性又符合伦理, 又能具有较高的可行性是研究的难点。

《灵枢·寒热病》记载:“身有所伤, 血出多, 若有所堕坠, 四肢懈惰不收, 名曰体惰”, 这里描述的症状与 SCI 引起的瘫痪、半身不遂等症状较为接近, 被认为是中医学对 SCI 的最早描述。现代中医学认为, SCI 多由肝肾不足、督脉不通、气血不和导致^[4], 脊髓康是在“肾督同治”理论^[13]指导下筛选出的中药复方。方中黄芪善于补益脾气, 气足则促血行, 祛瘀而不伤正; 当归、川芎和营养血, 行气止痛; 赤芍、丹参祛瘀通络, 清热凉血; 水蛭、土鳖虫、蜈蚣破瘀消癥, 续筋接骨, 通络止痛; 淫羊藿、肉苁蓉、益智仁补益肝肾, 培本固元; 枳实、厚朴泻热通便, 行气散瘀; 车前子、泽

泻、茯苓清热利湿通淋；全方共奏补益肝肾、利湿清热、通利督脉、祛瘀通络、调和气血之功。前期临床研究显示，脊髓康可以改善 SCI 患者损伤局部微循环、延缓脊髓继发性损伤，能够促进其运动行为改善^[14]。实验研究发现，脊髓康具有改善脊髓损伤后局部微环境、控制胶质瘢痕形成、改善轴突再生微环境的作用，可以支持、保护和营养神经元细胞并促进神经再生，减少继发损伤，并对脊髓继发性损伤引起的神经元凋亡具有明显的抑制作用^[15-17]。本研究提取大鼠星形胶质细胞进行体外研究，研究脊髓康对星形胶质细胞重编程的作用效果以及内在机制。光镜下发现干预后 SOX-2+脊髓康血清组、SOX-2 组细胞形态发生改变，SOX-2+脊髓康组相较 SOX-2 组存在大量有长轴突的神经元样细胞，而空白血清组只观察到饱满的星形胶质细胞，未见神经元样细胞。免疫荧光检测结果显示，空白血清组细胞几乎无神经元轴突标记物 MAP2 表达，细胞核染色呈圆球状未见明显细胞核形态变化；而 SOX-2+脊髓康血清组 MAP2 表达阳性，细胞核发生形态改变。而 SOX-2 干预神经元再生效果不理想，这与目前研究^[8]一致，说明脊髓康可促进神经元再生。

目前细胞重编程能否成功关键就在于表观遗传学是否得以重建^[18]。有研究表明，糖酵解可能是重编程中组蛋白乙酰化的主要调控信号，并且在诱导多能性转变以及之后的重编程过程中，即使处于富氧条件下，糖酵解基因表达也保持上调^[19-20]。OCR 和 ECAR 分别反映线粒体呼吸能力和糖酵解能力^[21]，本研究发现，SOX-2+脊髓康血清组相比 SOX-2 组糖酵解能力明显增强，并且 SOX-2+脊髓康血清组糖酵解能力在 ECAR 曲线后续片段继续增强，联系 OCR 曲线对应片段耗氧率提升，结果表明糖酵解在此阶段持续上调，并且 SOX-2+脊髓康血清组有氧糖酵解能力显著提升。同时，SOX-2+脊髓康血清组有氧糖酵解中间代谢产物 SAM、acetyl-CoA 表达明显较 SOX-2 组增强，进一步说明有氧糖酵解促进了重编程过程。定量 PCR 分析星形胶质细胞糖酵解相关基因 HK1、HK2、PFK1、PFK2、PKM2 基因表达，发现 SOX-2+脊髓康血清组各基因表达亦明显增强，推测脊髓康可能通过促进有氧糖酵解进而促进了重编程，这种效应可能与促进组蛋白乙酰化和组蛋白甲基化有关。

综上所述，脊髓康含药血清联合 SOX-2 可以诱导星形胶质细胞直接重编程为神经元细胞，并且提

升神经元再生效率，为其临床治疗 SCI 提供科学依据。但本研究仅为体外实验，还需后续体内实验进一步证实。

利益冲突声明：所有作者声明无利益冲突。

参考文献

- [1]程黎明. 脊髓损伤分子病理机制研究进展与思考[J]. 中华创伤杂志, 2020, 36(5): 403-407.
- [2]HARA M, KOBAYAKAWA K, OHKAWA Y, et al. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury [J]. Nat Med, 2017, 23(7): 818-828.
- [3]杨拓. 星形胶质细胞重编程技术治疗脊髓损伤的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [4]殷杰, 邵阳, 张旭斌, 等. 脊髓康联合电针夹脊穴对脊髓损伤大鼠诱发电位及脊髓组织结构的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(11): 2395-2400.
- [5]吴毛. 中药“脊髓康”治疗脊髓损伤的临床研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2005.
- [6]马勇, 吴毛, 王建伟. 脊髓康治疗脊髓损伤 28 例[J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(4): 309.
- [7]吴承杰, 郭杨, 马勇, 等. 脊髓康对脊髓损伤小鼠小胶质细胞活化及组蛋白乙酰化水平的影响[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 790-794.
- [8]李鑫, 王加强, 周琪. 体细胞重编程研究进展[J]. 中国科学(生命科学), 2016, 46(1): 4-15.
- [9]潘妮岚, 马勇, 郭杨, 等. 脊髓康对脊髓损伤大鼠脊髓组织结构及神经生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 144-149.
- [10]YANG T, DAI Y, CHEN G, et al. Corrigendum: dissecting the dual role of the glial scar and scar-forming astrocytes in spinal cord injury [J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 270. doi: 10.3389/fncel.2020.00270.
- [11]黄腾立, 郑宪友. 脊髓损伤后自我修复的细胞与分子机制[J]. 国际骨科学杂志, 2019, 40(6): 348-352.
- [12]徐磊, 王晓冬. 星形胶质细胞诱导分化为神经细胞的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2018, 34(3): 409-412.
- [13]张素, 邵阳, 华臻, 等. 脊髓康对大鼠脊髓损伤后胶质瘢痕形成及硫酸软骨素蛋白多糖表达的影响[J]. 西部中医药, 2022, 35(8): 26-29.
- [14]王建伟, 吴毛, 马勇. 自拟中药方治疗脊髓损伤的实验及临床观察[J]. 中国临床康复, 2006, 10(35): 16-19.
- [15]殷杰, 邵阳, 张旭斌, 等. 脊髓康联合电针夹脊穴对脊髓损伤大鼠诱发电位及脊髓组织结构的影响[J]. 中医学报, 2021, 36(11): 2395-2400.
- [16]吴承杰, 马勇, 郭杨, 等. 脊髓康对脊髓损伤模型大鼠

- 血清外泌体中 miRNA 表达的影响[J]. 中医杂志, 2021, 62(7): 615-621.
- [17] 邵阳, 杨俊峰, 马勇, 等. 中药复方脊髓康促进脊髓损伤大鼠神经功能恢复的实验研究[J]. 环球中医药, 2020, 13(9): 1479-1483.
- [18] 习佳飞, 岳文, 裴雪涛. 细胞重编程与表观遗传学调控[J]. 生命科学, 2009, 21(3): 357-362.
- [19] XU J, FANG S, WANG N, et al. Dual-specificity Tyrosine Phosphorylation-regulated kinase inhibitor ID-8 promotes human somatic cell reprogramming by activating PDK4 expression[J]. Stem Cell Rev Rep, 2022, 18(6): 2074-2087.
- [20] ISHIDA T, NAKAO S, UHEYAMA T, et al. Metabolic remodeling during somatic cell reprogramming to induced pluripotent stem cells: involvement of hypoxia-inducible factor 1[J]. Inflamm Regen, 2020, 40: 8. doi: 10.1186/s41232-020-00117-8.
- [21] HOQUE A, SIVAKUMARAN P, BOND ST, et al. Mitochondrial fission protein Drp1 inhibition promotes cardiac mesodermal differentiation of human pluripotent stem cells[J]. Cell Death Discov, 2018, 4: 39. doi: 10.1038/s41420-018-0042-9.

Effect of *Jisuikang*-containing Serum Combined with SOX-2 on Astrocyte Being Reprogrammed and Induced into Neurons

WANG Haotian¹, WANG Jianwei², WU Mao², WANG Guopeng¹, LI Shaoshuo², RONG Yi¹, SHAO Yang²

1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Jiangsu Province

ABSTRACT Objective To study the effect and mechanism of *Jisuikang* (脊髓康) combined with SRY transcription box factor 2 (SOX-2) on spinal cord injury (SCI). **Methods** Adult SD rats were randomly divided into blank group and medication group with five rats in each. Rats in the medication group were given 20 g/(kg·d) of *Jisuikang* by gavage, while those in the control group received 18 ml/(kg·d) of normal saline by gavage, both for three days. After that, blood was collected from the abdominal aorta to prepare *Jisuikang*-containing serum and blank serum. Three generations of astrocytes were cultured in vitro in the cerebral cortex of 1~4 day newborn rats, and were divided into three groups including blank serum group, SOX-2 group, and combination of *Jisuikang*-containing serum plus SOX-2 group (SOX-2+JSK group). Add 10 mmol/L of SOX-2 to the SOX-2 group, and 2.5% *Jisuikang*-containing serum plus 10 mmol/L of SOX-2 to the SOX-2 + JSK group, making the final serum concentration in the medium to 10%; blank serum group was added with 10% of blank serum. After 21 days of induction and culture, the morphology of neuron-like cells in the three groups were observed under light microscope. The expression of neuronal axon marker microtubule-associated protein 2 (MAP2) was detected by cellular immunofluorescence, and the expression of downstream metabolites S-adenosylmethionine (SAM) and acetyl-CoA (acetyl-CoA) were detected by Western Blot. Quantitative PCR analysis was performed for the glycolysis-related genes expression including hexokinase 1 (HK1), hexokinase 2 (HK2), phosphofructokinase 1 (PFK1), phosphofructokinase 2 (PFK2), and M2-type pyruvate kinase isozyme (PKM2). The cell energy metabolism analyzer was used to compare the extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) of the SOX-2 group and the SOX-2+JSK serum group. **Results** Under the light microscope, a large number of neuron-like cells with bipolar and long axons were found in the SOX-2+JSK group, which was significantly more than that in the SOX-2 group; in the blank serum group, astrocytes were found, but with no neuron-like cells. The expression of MAP2, SAM and acetyl-CoA significantly increased in the SOX-2+JSK group compared to those in the blank serum group and the SOX-2 group, while the gene expressions of HK1, HK2, PFK1, PFK2, and PKM2 significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Higher ECAR and OCR were found in the SOX-2+JSK group than the SOX-2 group. There was no significant difference in the expressions of MAP2, SAM, and acetyl-CoA between the blank serum group and the SOX-2 group ($P > 0.05$). **Conclusion** *Jisuikang*-containing serum combined with SOX-2 can induce astrocyte reprogramming into neurons, and the mechanism of astrocyte reprogramming may be improved through glycolysis.

Keywords spinal cord injury; astrocytes; neurons reprogramming; aerobic glycolysis; epigenetics; *Jisuikang* (脊髓康)

(收稿日期: 2022-08-08; 修回日期: 2022-11-21)

[编辑: 邓媛]