

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2023.22.012

实验研究

温肾通督方对脊髓损伤模型小鼠脾脏 B 细胞影响的蛋白组学研究

石磊^{1,2}, 吴承杰², 陈思娴^{1,2}, 潘娅岚², 王礼宁^{1,2}, 赵瑞华^{1,2}, 吴毛³, 马勇^{1,2,3}, 郭杨^{2,3}✉

1. 南京中医药大学中医学学院·中西医结合学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室; 3. 南京中医药大学无锡附属医院

[摘要] **目的** 探讨温肾通督方对脊髓损伤的影响及可能机制。**方法** 36 只 C57BL/6 雌性小鼠随机分为假手术组、模型组、温肾通督方组, 每组 12 只。模型组、温肾通督方组小鼠采用改良 Allen's 法建立小鼠脊髓损伤模型, 假手术组仅进行脊髓暴露。温肾通督方组从术后第 1 天按 50 g/(kg·d) 给予温肾通督方溶液灌胃, 假手术组及模型组给予生理盐水 20 ml/(kg·d) 灌胃, 各组均连续灌胃 14 天。在术前及术后第 1、7、14 天, 利用斜板试验及后肢运动功能 (BMS) 评分对小鼠运动功能进行评估; 术后第 3 天通过肌电图及运动诱发电位检测小鼠神经电生理, 测量各组小鼠脾脏长度, 利用磁珠分选脾脏中的 B 细胞, 通过蛋白组学技术分析蛋白差异表达情况, 采用 Western blot 法检测脾脏 B 细胞中线粒体外膜转运孔蛋白 20 (Tom20) 及下游剪切化半胱氨酸蛋白酶 3 (Cleaved Caspase-3) 蛋白表达; 术后第 14 天采用核磁共振观察小鼠脊髓恢复情况。**结果** 与假手术组同时间比较, 模型组在术后 1、7、14 天 BMS 主评分、副评分及斜板试验角度均降低, 术后 3 天小鼠肌电图和运动诱发电位峰峰值降低、脾脏长度减少, 脾脏 B 细胞中 Tom20 和 Cleaved Caspase-3 表达量升高 ($P<0.05$)。与模型组同时间比较, 温肾通督方组小鼠术后 14 天时 BMS 副评分及术后 7、14 天时斜板试验角度升高, 术后 3 天小鼠肌电图和运动诱发电位峰峰值升高、脾脏长度增加, Tom20 和 Cleaved Caspase-3 表达量降低 ($P<0.05$)。蛋白组学结果显示, 温肾通督方组与模型组相比共有 100 个差异蛋白, 其中 37 个上调, 63 个下调。GO 富集显示差异蛋白主要在氧结合、外源性凋亡负反馈、锌离子相应、氧输送等方面发挥作用。KEGG 富集显示差异蛋白主要集中在代谢途径、亨廷顿病、氧化磷酸化等通路。亚细胞定位显示差异蛋白与线粒体相关。术后 14 天磁共振成像显示, 假手术组小鼠脊髓结构完整, 节段清晰, 脊髓信号无异常; 模型组小鼠脊髓损伤区域低信号区域增加, 脊髓明显变细; 温肾通督方组损伤节段有明显凹陷, 但较模型组结构要完整。**结论** 温肾通督方可能通过调节免疫功能促进脊髓损伤修复, 其机制可能与抑制脾脏 B 细胞焦亡等相关。

[关键词] 脊髓损伤; 免疫功能; 蛋白组学; 线粒体外膜转运孔蛋白 20; 细胞焦亡; 温肾通督方

脊髓损伤多数是由高空坠落、车祸等高能损伤引起脊髓结构破坏, 导致运动感觉功能严重损害的神经系统病变。炎症和免疫应答被认为在脊髓损伤后的病理发展中起到重要作用, 损伤带来剧烈的全身免疫性反应, 继而影响损伤部位的修复和再

生^[1]。脾脏作为免疫系统的核心器官, 在脊髓损伤后伴随发生的交感神经回路受损和反射亢进也会导致脾脏功能失衡^[2-3]。近年来研究证实, 中医药能显著促进脊髓损伤患者运动功能的恢复, 对其并发症的改善也有明显效果^[4-5]。

本课题组结合中医理论和多年临床经验, 以健脾温肾、化痰通督为治法, 通过化裁小承气汤和补阳还五汤拟定温肾通督方 (脊髓康), 临床验证其疗效显著^[6-7]。前期基础研究显示, 温肾通督方可促进中枢神经系统中的驻留免疫细胞-小胶质细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (81973885, 82174400); 江苏省高等学校基础科学 (自然科学) 面上项目 (21KJB360006); 江苏省中医临床医学创新中心资助项目 (苏中医科教 [2021] 4 号); 江苏省研究生科研与实践创新计划 (KYCX23_2207, KYCX23_2205); 南京中医药大学自然科学基金 (NZY81704100)

✉ 通讯作者: drguoyang@njucm.edu.cn

活化来吞噬神经元碎片,并提升小胶质细胞迁移率以促进神经元修复、改善轴突损伤^[8-9],提示温肾通督方作用机制可能与免疫功能相关。因此,本研究构建脊髓损伤小鼠模型后采用磁珠分选脾脏B细胞,并通过蛋白质组学技术探究温肾通督方通过调节免疫功能改善脊髓损伤的可能作用机制。本研究通过南京中医药大学动物伦理委员会审核,实验伦理编号:202210A083。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级C57BL/6雌性小鼠36只,6~8周龄,体质量18~20 g,均由杭州医学院提供,实验动物合格证编号:20230220Abzz0100000417。饲养于南京中医药大学动物实验中心,室温22~23℃,相对湿度60%~70%,光照12 h/12 h明暗交替,食物与饮水自由获取。

1.2 药物

温肾通督方(脊髓康),国家发明专利:ZL200910026193.7,组成:黄芪30 g,丹参20 g,川芎10 g,赤芍12 g,当归12 g,水蛭10 g,蜈蚣1条,熟地黄10 g,泽泻10 g,茯苓10 g,枳实10 g,厚朴10 g,肉苁蓉10 g,淫羊藿10 g,土鳖虫10 g,车前子15 g,益智仁10 g,所用药物均购于江苏省中医院。10倍水量常规煎煮两次,旋蒸仪浓缩至生药含量为1.25 g/ml,-20℃冻存。

1.3 试剂和仪器

淋巴细胞分离试剂盒(Solarbio公司,货号:P8860);CD19磁珠(Miltenyi公司,货号:130-121-301);RPMI-1640培养基(Viva cell公司,货号:C3010-0500);红细胞裂解液(碧云天生物技术有限公司,货号:C3702);4%多聚甲醛(Biosharp公司,货号:BL539A);蛋白上样缓冲液(苏州新赛美生物科技有限公司,货号:WB2001);RIPA裂解液(苏州新赛美生物科技有限公司,货号:WB3100); β -actin抗体(Proteintech公司,货号:66009-1-Ig);剪切化半胱氨酸蛋白酶3(Cleaved Caspase-3)抗体(货号:9961);线粒体外膜转运孔蛋白20(Tom20)抗体(货号:42406S),CST公司;羊抗兔IgG(H+L)HRP(货号:S0001)、羊抗鼠IgG(H+L)HRP(货号:S0002),Affinity公司;三溴乙醇(南京爱贝生物科技有限公司,货号:M2910);ECL超敏显影液(翌圣生物科技有限公司,货号:36208ES76)。

脊髓打击器(深圳RWD公司,型号:68097);微量分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司,型号:Nano-300);游标卡尺(上海恒量量具有限公司,型号:IP54);小型垂直电泳转印系统(Bio-Rad公司,型号:1658033);全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司,型号:Tanon5200CE);质谱仪(型号:timsTOF Pro)、NanoElute色谱系统(型号:nanoElute),德国布鲁克公司;电子分析天平(上海奥豪斯仪器有限公司,型号:CP114);扫描仪(美国GE公司,型号:Architect 3.0 TMR);信息化生物信号采集与处理系统(成都泰盟软件有限公司,型号:BL-420N);超声波细胞破碎仪(南京先欧仪器制造有限公司,型号:ATPIO-650D)。

1.4 动物分组、造模及药物干预

将36只小鼠采用分层抽样法,按体重从18~20 g,每0.5 g分为一层,从每层随机挑选出3只,编为假手术组、模型组、温肾通督方组,每组12只。采用改良Allen's法建立小鼠脊髓损伤模型^[10]:用1.25%三溴乙醇0.2 ml/10 g腹腔注射麻醉小鼠,切开T9—T11椎板棘突及两侧棘突旁肌群,掀开T10椎板并暴露脊髓。使用脊髓打击器打击T10段脊髓,打击直径2.5 mm、深度2 mm,下落重物质量10 g,下落高度为10 cm。打击后小鼠双下肢痉挛并出现张力消失现象表示造模成功^[10]。假手术组仅进行脊髓暴露,其余组进行脊髓打击。温肾通督方组从术后第1天按临床等效剂量50 g/(kg·d)^[11]灌胃给药,假手术组及模型组给予生理盐水20 ml/(kg·d)灌胃,各组均连续灌胃14天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 小鼠后肢运动功能(BMS)评分及斜板试验 BMS评分包括主评分和副评分^[12]。将小鼠置于开放场地,观察小鼠后肢运动及精细动作的发生并根据评分表进行相应的评分。整个过程采用双盲法,于术前及术后第1、7、14天对所有小鼠进行运动功能的评估。

斜板试验:准备一个水平的木板,将归零后的电子角度器固定在木板侧面。将小鼠置于木板中心,缓慢增加木板的倾斜角度,观察并记录小鼠停留在木板上超过5 s的最大倾斜角度。每只小鼠进行3次测试,计算出平均值作为最后评分结果。于术前及术后第1、7、14天采用随机数字表法选取4只小鼠进行测试。

1.5.2 肌电图及运动诱发电位 前期研究^[13]发现,在术后3天时脊髓损伤模型小鼠体内炎症水平

有明显改变,所以本研究选择在术后第3天时,每组采用随机数字表法取4只进行检测。在术后第3天采用信息化生物信号采集与处理系统进行肌电图采集。小鼠按0.2 ml/10 g腹腔注射1.25%三溴乙醇溶液进行麻醉,麻醉后俯卧位固定,从右侧股骨大转子隆起与骶骨裂孔连线的外1/3和内2/3交界处进针,扎至坐骨神经以小鼠腿部抽搐为刺激电极,同侧腿部腓肠肌扎入接受电极,尾部连接接地电极,两耳接辅助电极,施加刺激强度为1 V,刺激频率为0.3 Hz,采集肌电图相关数据,每次至少收集12个波形。从矢状缝向左侧进针1.5 mm扎至左侧大脑感觉皮层为刺激电极,右侧腿部腓肠肌扎入接受电极,尾部连接接地电极,两耳接辅助电极,刺激强度为1 V,刺激频率为0.3 Hz,采集运动诱发电位,收集并储存运动诱发电位信号,每次至少收集12个波形。

1.5.3 小鼠脾脏形态观察 术后第3天灌胃2 h后,每组采用随机数字表法选取3只小鼠,小鼠按0.2 ml/10 g腹腔注射1.25%三溴乙醇溶液进行麻醉,打开胸腔使用恒流泵进行心脏灌注。先用0.9%氯化钠溶液排净血液后,灌注4%多聚甲醛溶液固定,取下脾脏用游标卡尺测量长度并进行分析。

1.5.4 脾脏B细胞蛋白组学检测 术后第3天行心脏灌注后,每组剩余小鼠采用随机数字表法选取3只,脱颈处死后取出脾脏,置于200目细胞滤网上,用5 ml注射器尾部研磨脾脏,同时滴加RPMI-1640培养基。收集滤液后使用淋巴细胞分离试剂盒分离淋巴细胞,4℃、300×g离心10 min(半径13.5 cm),弃上清后重悬,加入10 μl CD19磁珠于4℃避光孵育10 min。利用分选柱及磁具进行磁珠分选,离心后弃上清重悬,所得即B细胞。部分进行蛋白组学分析:1)取样品加入适量SDT裂解液后取上清,采用BCA法进行蛋白质定量,步骤按照试剂盒说明书操作。2)色谱分离和质谱分析。样品采用纳升流速NanoElute系统进行分离,该系统和装有CaptiveSpray离子源的质谱仪连用。样品由自动进样器上样到分析柱分离,流速为300 nl/min。经色谱分离后用timsTOF Pro质谱仪的PASEF模式进行质谱分析。分析时长为90 min,收集数据并保存为原始格式。3)生物信息学分析。质谱数据采用Maxquant 1.9.6软件分析,在Uniprot蛋白质序列数据库(<http://www.uniprot.org/>)中检索,对质谱数据进行蛋白质定性分析。然后进行双样本双尾 t 检验方法计算 P 值,鉴定差异蛋白。通过Fisher

精确检验,比较各个基因本体论(GO)分类或京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路在目标蛋白质集合和总体蛋白质集合中的分布情况,表达差异倍数大于1.2倍(上下调),且 $P \leq 0.05$ 作为筛选标准。

1.5.5 Western Blot 法检测脾脏B细胞中Tom20、Cleaved Caspase-3蛋白表达 使用含1%磷酸酶和蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液将脾脏B细胞裂解,置于冰上裂解30 min后使用超声波细胞破碎仪破碎,4℃、12 000 r/min离心30 min(半径13.5 cm)。蛋白定量后加缓冲液、蛋白上样缓冲液,沸水煮10 min后冰上冷却保存于-20℃待测。使用预制胶进行电泳,160 V恒压电泳30 min,使用PVDF膜400 mA转30 min,5%的脱脂奶粉室温封闭1.5 h,按比例配制 β -actin(1:10 000)、Tom20(1:1000)、Cleaved Caspase-3(1:1000)抗体,4℃过夜孵育。次日按比例配制羊抗兔二抗(1:10 000)、羊抗小鼠二抗(1:10 000),室温孵育2 h。滴加ECL超敏显影液,凝胶成像系统显影,计算Tom20、Cleaved Caspase-3蛋白相对表达量。

1.5.6 磁共振成像检测小鼠脊髓损伤后脊髓恢复情况 术后第14天,各组剩余小鼠按0.2 ml/10 g腹腔注射1.25%三溴乙醇溶液进行麻醉,注射5 min小鼠麻醉后将其按俯卧位置于Architect 3.0 TMR扫描仪中,行矢状位的T2WI成像及横轴位成像,采用Radiant(2023.1)软件对图像进行分析。

1.6 统计学方法

使用SPSS 20.0软件进行统计学分析,使用GraphPad Prism 9.0软件进行图形分析。计量资料符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据经 t 检验均符合正态分布,方差齐性者采用方差分析,两组间比较采用LSD检验;方差不齐者采用Welch检验。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间BMS评分及斜板试验结果比较

表1示,与假手术组同时间比较,模型组和温肾通督方组在术后1、7、14天BMS主评分、副评分及斜板试验角度均显著降低($P < 0.05$)。与模型组同时间比较,温肾通督方组在术后14天时BMS副评分显著升高,在术后7天、14天斜板试验角度均显著升高($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠不同时间 BMS 评分及斜板试验结果比较

Table 1 Comparison of BMS scores and inclined plane test results in each group at different times (x̄±s)					
组别	时间	鼠数	BMS 主评分/分	BMS 副评分/分	斜板试验/°
假手术组	术前	4	9.00±0.00	11.00±0.00	40.92±0.50
	术后 1 天	4	9.00±0.00	11.00±0.00	39.08±1.48
	术后 7 天	4	9.00±0.00	11.00±0.00	39.36±2.00
	术后 14 天	4	9.00±0.00	11.00±0.00	41.17±0.58
模型组	术前	4	9.00±0.00	11.00±0.00	40.17±3.00
	术后 1 天	4	0.50±0.58 ^{a)}	0.25±0.50 ^{a)}	26.25±2.54 ^{a)}
	术后 7 天	4	0.25±0.50 ^{a)}	0.25±4.00 ^{a)}	29.17±1.75 ^{a)}
	术后 14 天	4	0.50±1.00 ^{a)}	0.75±0.96 ^{a)}	30.33±0.61 ^{a)}
温肾通督方组	术前	4	9.00±0.00	11.00±0.00	40.08±1.03
	术后 1 天	4	0.75±0.96 ^{a)}	0.25±0.50 ^{a)}	24.58±1.90 ^{a)}
	术后 7 天	4	2.00±1.15 ^{a)}	1.75±0.96 ^{a)}	34.27±5.00 ^{a)} b)
	术后 14 天	4	2.75±3.20 ^{a)}	2.75±0.96 ^{a)} b)	35.67±2.05 ^{a)} b)

注：BMS，后肢运动功能评分。
a) 与假手术组同时时间比较， $P<0.05$ ；b) 与模型组同时时间比较， $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠术后 3 天肌电图及运动诱发电位比较

图 1、图 2 示，脊髓损伤后小鼠肌电图和运动诱发电位均出现波形幅度减小，最值波动增大，在温肾通督方干预后趋于平稳。表 2 示，与假手术组比较，模型组小鼠肌电图和运动诱发电位峰峰值降低 ($P<0.05$)。与模型组比较，温肾通督方组小

鼠肌电图和运动诱发电位峰峰值升高 ($P<0.05$)。
2.3 各组小鼠术后 3 天脾脏长度比较

表 3 示，与假手术组比较，模型组小鼠脾脏长度显著减少 ($P<0.05$)。与模型组比较，温肾通督方组小鼠脾脏长度显著增加 ($P<0.05$)。

2.4 各组小鼠术后 3 天脾脏蛋白组学分析结果
采用 t 检验进行蛋白差异筛选，将表达差异倍

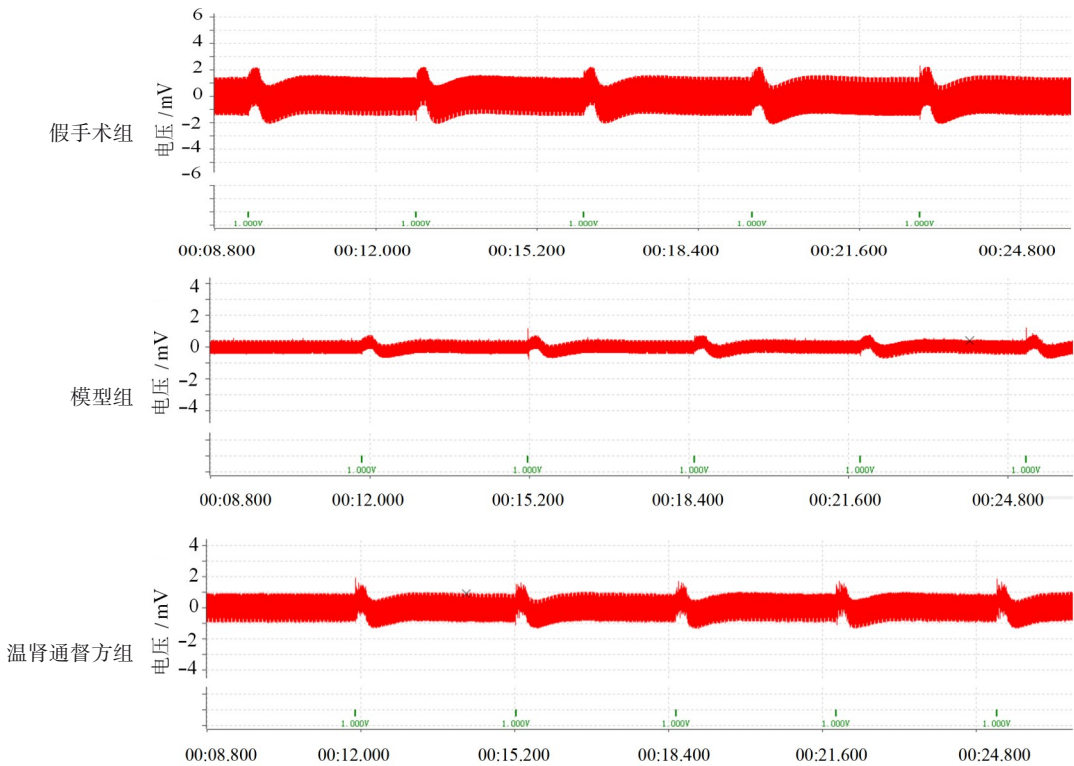


图 1 各组小鼠术后 3 天肌电图结果
Figure 1 Electromyogram of mice in each group on the 3rd day after surgery

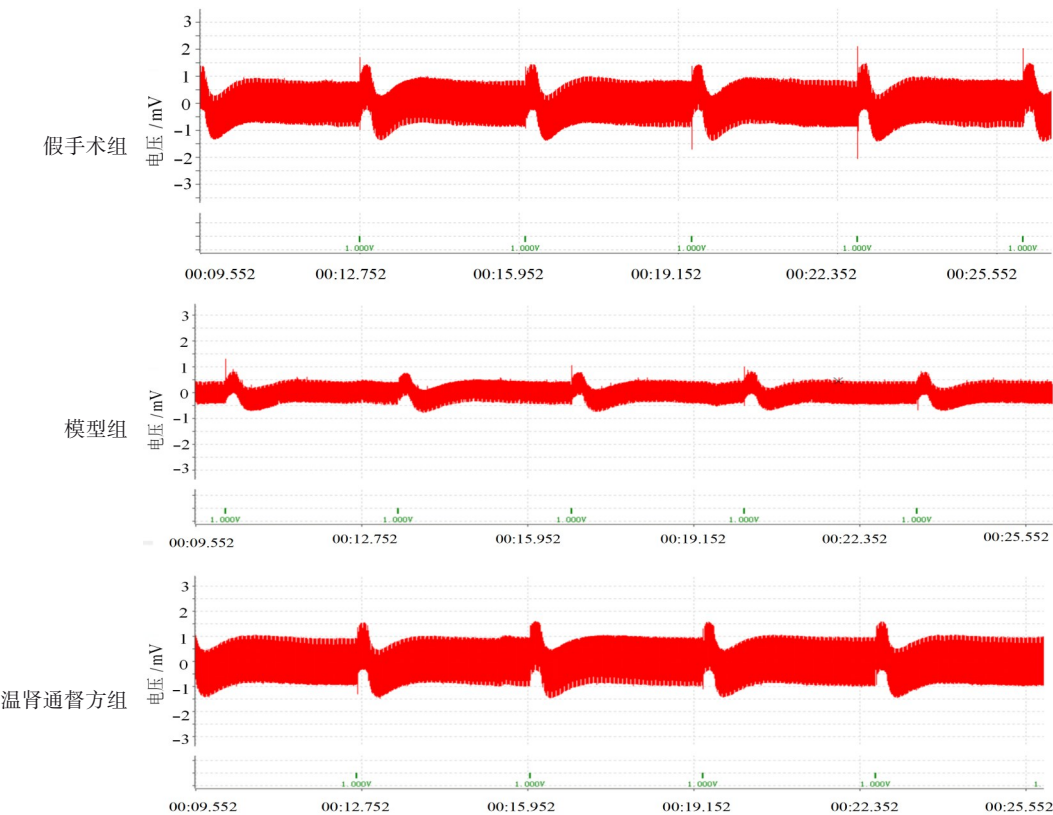


图2 各组小鼠术后3天运动诱发电位检查结果
Figure 2 Motor evoked potential monitoring in each group on the 3rd day after surgery

表2 各组小鼠术后3天肌电图和运动诱发电位峰峰值比较
Table 2 Comparison of electromyogram and motor evoked potential peak values of mice in each group on the 3rd day after surgery ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	肌电图峰峰值/V	运动诱发电位峰峰值/mV
假手术组	4	4.72±0.14 ^{a)}	4.24±0.02 ^{a)}
模型组	4	2.55±0.05	2.02±0.05
温肾通督方组	4	3.37±0.14 ^{a)}	4.09±0.15 ^{a)}

注: a) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

表3 各组小鼠术后3天脾脏长度比较

Table 3 Comparison of spleen length of mice in each group on the 3rd day after surgery (mm, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	脾脏长度
假手术组	3	14.20±1.30 ^{a)}
模型组	3	10.80±1.30
温肾通督方组	3	13.00±0.71 ^{a)}

注: a) 与模型组比较, $P<0.05$ 。

数大于1.2倍,且 $P\leq 0.05$ 作为筛选标准。温肾通督方组和模型组比较,共有100个差异蛋白,其中37个上调,63个下调。下调最为明显的有血红蛋白亚基 β -1、Tom20、血红蛋白等。GO分析结果(见附图1,请扫描本文二维码获取)显示,功能

注释显示差异蛋白主要在细胞进程、生物调节、代谢过程、应激反应等方向发挥作用,对分子结合、催化活性、分子功能调节剂、转运蛋白活性等影响较大。同时结合富集分析(图3),可见差异蛋白主要在氧结合、外源性凋亡负反馈、锌离子相应、氧输送等方面差异最为显著。对比较差异蛋白进行亚细胞定位发现其主要定位于细胞核(33%)、细胞质(36%)、细胞膜(11%)以及线粒体(8%)。

差异蛋白显著富集KEGG通路结果显示(见附图2,请扫描本文二维码获取),温肾通督方干预后与模型组相比,差异蛋白主要集中在代谢途径、亨廷顿病、次生代谢物的生物合成、活性氧化学致癌作用等,其中最为集中的是代谢途径。富集分析结果(图4)显示,在氧化磷酸化、肌动蛋白细胞骨架调节、MAPK信号通路、铁死亡等方面发挥作用向也有较为显著差异。

2.5 各组小鼠术后3天脾脏B细胞中Tom20和Cleaved Caspase-3蛋白表达比较

表4示,与假手术组比较,模型组小鼠脾脏B细胞中Tom20和Cleaved Caspase-3表达量显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,温肾通督方组小鼠Tom20

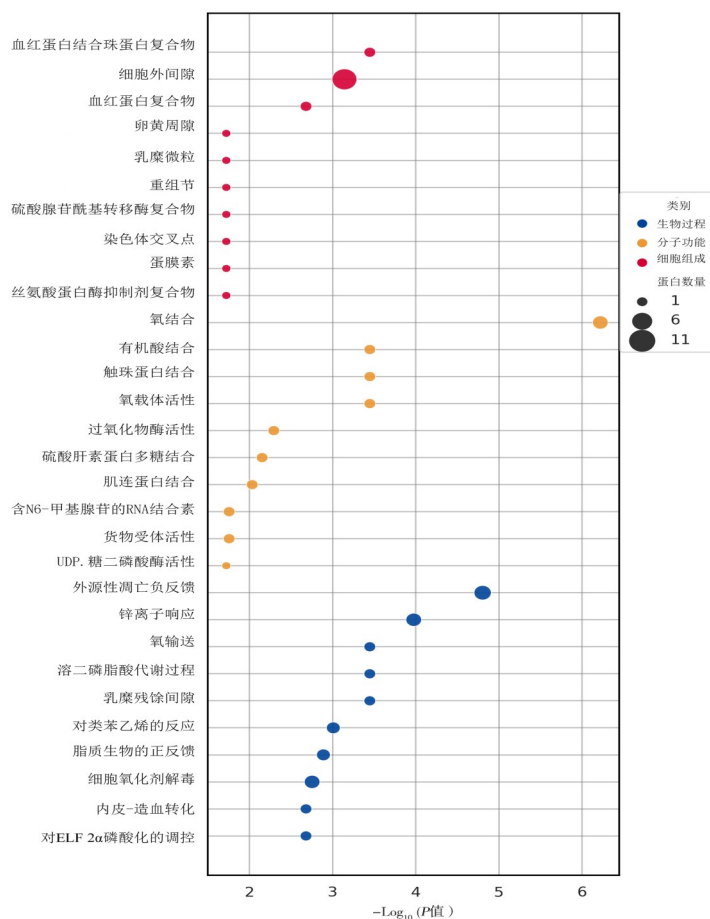


图3 温肾通督方干预脊髓损伤小鼠脾脏差异蛋白的GO富集分析结果
Figure 3 GO enrichment analysis of differential proteins in the spleen of mice with spinal cord injury treated by Wenshen Tongdu Formula

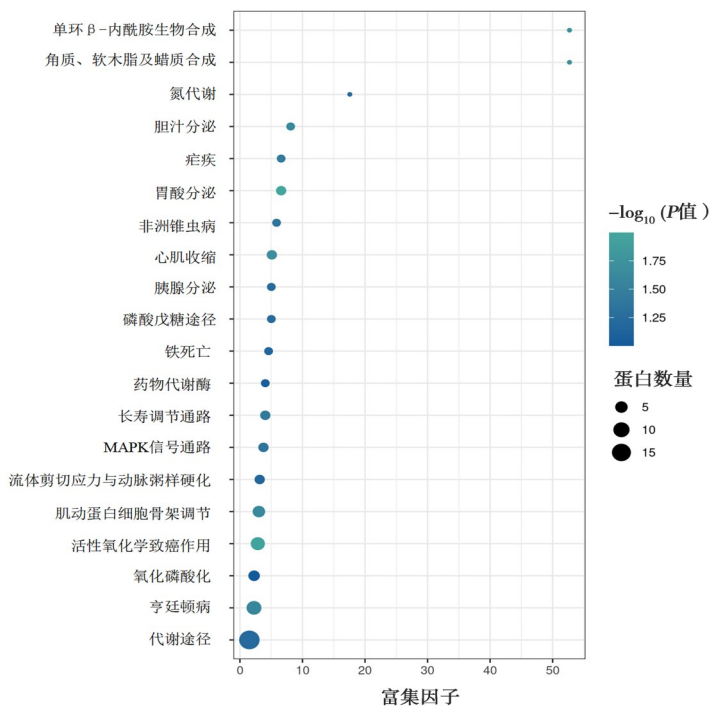


图4 温肾通督方干预脊髓损伤小鼠脾脏差异蛋白的KEGG富集分析结果
Figure 4 KEGG enrichment analysis of differential proteins in the spleen of mice with spinal cord injury treated by Wenshen Tongdu Formula

和 Cleaved Caspase-3 表达量显著降低($P<0.05$)。

表 4 各组小鼠脾脏 B 细胞中 Tom20 及 Cleaved caspase-3 蛋白相对表达量比较

Table 4 Comparison of relative expression levels of Tom20 and Cleaved caspase-3 proteins in spleen B cells of mice in each group ($/\beta$ -actin, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	Tom20	Cleaved Caspase-3
假手术组	3	0.7428 $\pm$ 0.1485 ^{a)}	0.0203 $\pm$ 0.0041 ^{a)}
模型组	3	1.4605 $\pm$ 0.1830	0.1973 $\pm$ 0.0247
温肾通督方组	3	0.5830 $\pm$ 0.0997 ^{a)}	0.0414 $\pm$ 0.0071 ^{a)}

注：Tom20，线粒体外膜转运孔蛋白 20；Cleaved Caspase-3，剪切化半胱氨酸蛋白酶 3。

a) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

2.6 各组小鼠术后 14 天磁共振成像脊髓结构比较

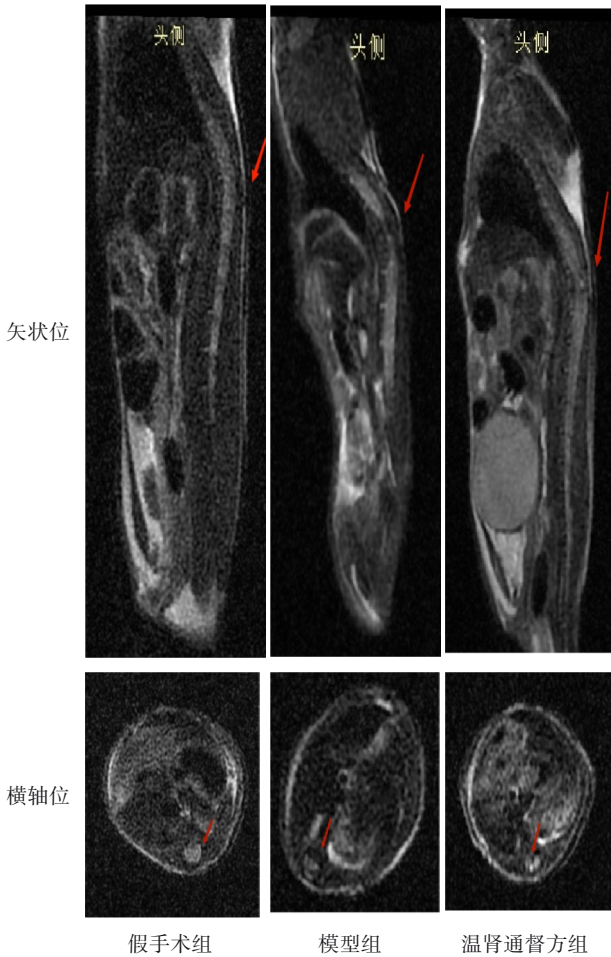
图 5 示，假手术组小鼠脊髓结构完整，节段清晰，脊髓信号无异常。模型组小鼠脊髓损伤区域低信号区域增加，脊髓明显变细，提示脊髓受损后血

流减少，出现脊髓萎缩情况，同时横轴位显示损伤位置与周围低信号区域界限不清，脊髓有明显缺损。温肾通督方组损伤节段有明显凹陷，但较模型组结构要完整。

3 讨论

脊髓损伤属中医学“体惰”“痿证”范畴，《灵枢·寒热病篇》中记载：“身有所伤，血出多，及中风寒，若有所堕坠，四肢懈惰不收，名曰体惰”。《难经·二十八难》曰：“督脉者，起于下极之俞，并于脊里，上至风府，入属于脑”，可以看出督脉循行路线与脊髓生理结构相似。中医学认为，阳气是维持人正常生理功能的重要元素，《素问·生气通天论篇》言：“阳气者，若天与日，失其所则折寿而不彰”，强调阳气的强弱与人体健康与否具有密切的关系。督脉为阳脉之海，体内各脏腑均与背腧穴相通，伴督脉而行，脊髓损伤致督脉瘀阻，其阳气不通则致脏腑功能紊乱。我们认为，脊髓损伤病机为“脾肾阳虚，瘀阻督脉”，以健脾温肾、化瘀通督为治法构建温肾通督方。方中黄芪大补元气、气旺则血行；茯苓、泽泻、车前子健脾利水；肉苁蓉、淫羊藿温补肾阳，益智仁温脾暖肾；熟地黄、枳实、厚朴行气导滞；赤芍、丹参、当归、川芎祛瘀通督，土鳖虫、水蛭逐瘀通经；蜈蚣通络止痛，引药达脊柱、四肢。全方共奏健脾温肾、化瘀通督之功。本研究结果显示，斜板试验和 BMS 评分表明温肾通督方对小鼠脊髓损伤后运动功能恢复有促进作用；肌电图和运动诱发电位表明温肾通督方在小鼠脊髓损伤后起到神经保护作用；核磁共振结果显示温肾通督方对损伤部位的修复有明显疗效。

脾脏是重要的淋巴器官，在免疫调节过程中发挥重要作用。有研究表明，脊髓损伤后，脾脏的自主神经控制出现紊乱，进而导致免疫功能障碍^[1,14]。脾脏 B 细胞水平在损伤后 24 h 内急剧降低，在 168 h 后才开始恢复^[15]。脾脏 B 细胞产生的抗体可以减缓中枢神经系统的损伤，其释放的 IgM 可以刺激神经元生长并抑制其凋亡，IgM 还可以作用于少突胶质细胞的祖细胞来改善脱髓鞘疾病中的髓鞘再生功能^[16]。本研究发现，模型组小鼠术后 3 天脾脏长度明显减少，而温肾通督方干预后脾脏长度显著增加，可能温肾通督方对脊髓损伤后小鼠脾脏功能恢复具有促进作用。另外，提取小鼠脾脏进行 B 细胞磁珠分选，通过蛋白组学和生物信息学技术对获得样品进行分析。结果显示，温肾通督方组



注：红色箭头指示位置为主要观察部位。

图 5 各组小鼠术后 14 天脊髓核磁共振影像学检查结果

Figure 5 Spinal cord MRI examination results of mice in each group on the 14th day after surgery

与模型组对比,共有 100 个差异蛋白,其中 37 个上调,63 个下调,下调最为明显的有血红蛋白亚基 β -1、Tom20、血红蛋白等,其中与免疫及神经系统疾病关联度最高的为 Tom20。亚细胞定位发现,在细胞器中占比例最高的为线粒体,约为 8%,Tom20 是线粒体中表达差异最明显的蛋白。对 GO 富集和 KEGG 富集结果进行分析,发现均与转运、结合过程联系紧密,且与氧化磷酸化、活性氧、铁死亡等密切相关。综上,脊髓损伤后脾脏易出现免疫功能障碍,且我们通过筛选脾脏 B 细胞后采用组学方法进行检测发现 Tom20 是损伤后主要出现变化的蛋白之一,且其与神经系统疾病关联度较高,故我们认为 Tom20 是脊髓损伤后脾脏 B 细胞中的关键靶点。

Tom20 是温肾通督方组与模型组中差异蛋白表达量下调排名第二的蛋白。Tom20 是线粒体外膜的一个蛋白通道,主要作用是在线粒体蛋白转运系统中,将新合成的蛋白质引导到线粒体内部^[17]。Tom20 还参与线粒体中其他一些重要功能的调节,如线粒体膜蛋白的合成、质控和代谢调节^[18]。脊髓损伤后带来的继发性损伤常造成线粒体供能障碍,而线粒体会通过调节膜通透性来释放细胞凋亡诱导因子如细胞色素 c、活化蛋白 1 等,导致神经元凋亡^[19]。线粒体向受损部位转移、增强呼吸链供能可以增加受损部位轴突密度,促进神经修复^[20]。有研究发现 Tom20 在脊髓损伤后可被活性氧激活,从而带来下游 B 淋巴细胞瘤 2(Bcl-2)基因关联 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)及 Gasdermin E(GSDME)高表达,导致细胞焦亡^[21]。前期研究结果显示,脊髓损伤可损害脾功能,导致 B 细胞水平下降,同时激活 Tom20/Bax/Caspase/GSDME 通路诱导 B 细胞焦亡,加重损伤^[22]。本研究结果发现,温肾通督方干预后的小鼠脾脏 B 细胞中 Tom20 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量较模型组显著降低,提示温肾通督方可能通过抑制 Tom20/Caspase-3 通路减少脊髓损伤后 B 细胞焦亡,进而促进神经修复和功能恢复。

综上,温肾通督方可以促进受损脊髓的组织形态修复,保护神经的传导功能并改善运动能力,其机制可能与抑制 B 细胞焦亡及恢复免疫功能相关。本实验不足之处在于仅检测 Caspase 关键蛋白表达,下游机制中 Bax、GSDME 等焦亡通路还需进一步研究。

参考文献

- [1]GAO TY, HUANG FF, XIE YY, et al. Dynamic changes in the systemic immune responses of spinal cord injury model mice[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(2):382-387.
- [2]ULNDREAJ A, TZEKOU A, SIDDIQUI AM, et al. Effects of experimental cervical spinal cord injury on peripheral adaptive immunity[J]. *PLoS One*, 2020, 15(10): e241285.
- [3]WU F, DING XY, LI XH, et al. Correlation between elevated inflammatory cytokines of spleen and spleen index in acute spinal cord injury[J]. *J Neuroimmunol*, 2020, 344: 577264. doi: 10.1016/j.jneuroim.2020.577264.
- [4]王晓丹,冯晓东,刘承梅,等. 脐灸治疗脊髓损伤后神经源性膀胱 30 例临床观察[J]. *中医杂志*, 2014, 55(1): 45-47.
- [5]余芳菲,贾新燕,李雯昕,等. 电针对不完全性脊髓损伤患者运动功能和大脑皮层运动区兴奋性的影响[J]. *中医杂志*, 2018, 59(21):1848-1852.
- [6]邵阳. “脊髓康”治疗脊髓损伤的临床观察及其促进脊髓损伤后神经再生的实验研究[D]. 南京:南京中医药大学,2020.
- [7]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,2007.
- [8]WU C, ZHOU Y, TU P, et al. JisuiKang promotes the repair of spinal cord injury in rats by regulating NgR/RhoA/ROCK signal pathway[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:9542359. doi: 10.1155/2020/9542359.
- [9]GUO Y, MA Y, PAN YL, et al. JisuiKang, a Chinese herbal formula, increases neurotrophic factor expression and promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(9): 1519-1528.
- [10]KHAN T, HAVEY RM, SAYERS ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries[J]. *Lab Anim Sci*, 1999, 49(2): 161-172.
- [11]陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:1103.
- [12]BASSO DM, FISHER LC, ANDERSON AJ, et al. Basso mouse scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains[J]. *J Neurosci*, 2006, 23(5):635-659.
- [13]吴承杰,马勇,郭杨,等. 基于 HDAC6 介导的自噬-溶酶体途径探究温肾通督方对微血管内皮细胞吞噬髓鞘碎片的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2022, 42(5): 589-596.
- [14]RODGERS KA, KIGERL KA, SCHWAB JM, et al.

- Immune dysfunction after spinal cord injury: a review of autonomic and neuroendocrine mechanisms [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2022, 64: 102230. doi: 10.1016/j.coph. 2022. 102230.
- [15] WU F, DING XY, LI XH, et al. Cellular inflammatory response of the spleen after acute spinal cord injury in rat [J]. *Inflammation*, 2019, 42(12): 1630–1640.
- [16] WOOTLA B, DENIC A, WATZLAWIK JO, et al. Anti-body-mediated oligodendrocyte remyelination promotes axon health in progressive demyelinating disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(8): 5217–5228.
- [17] BHAGAWATI M, ARROUM T, WEBELING N, et al. The receptor subunit Tom20 is dynamically associated with the TOM complex in mitochondria of human cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2021, 32(20): br1. doi: 10.1091/mbc. E21-01-0042.
- [18] SU J, LIU D, YANG F, et al. Structural basis of Tom20 and Tom22 cytosolic domains as the human TOM com-plex receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2022, 119(26): e2200158119. doi: 10.1073/pnas. 2200158119.
- [19] WU KL, HSU C, CHAN JY. Nitric oxide and super-oxide anion differentially activate poly (ADP-ribose) polymerase-1 and Bax to induce nuclear translocation of apoptosis-inducing factor and mitochondrial release of cytochrome c after spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(7): 965–977.
- [20] 缪鑫, 林俊卿, 郑宪友. 线粒体功能障碍在脊髓损伤中的作用及相关治疗研究进展 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2022, 36(7): 902–907.
- [21] ZHOU B, ZHANG JY, LIU XS, et al. Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis [J]. *Cell Res*, 2018, 28(12): 1171–1185.
- [22] WU C, WANG L, CHEN S, et al. Iron induces B cell pyroptosis through Tom20-Bax-caspase-gasdermin E sig-naling to promote inflammation post-spinal cord injury [J]. *J Neuroinflammation*, 2023, 20(1): 171.

Proteomic Study on the Effect of *Wenshen Tongdu Formula* (温肾通督方) on Spleen B Cells in Spinal Cord Injury Model Mice

SHI Lei^{1,2}, WU Chengjie², CHEN Sixian^{1,2}, PAN Yalan², WANG Lining^{1,2}, ZHAO Ruihua^{1,2}, WU Mao³, MA Yong^{1,2,3}, GUO Yang^{2,3}

1. School of Traditional Chinese Medicine & School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. Laboratory for New Techniques of Restoration & Reconstruction of Orthopedics and Traumatology, Nanjing University of Chinese Medicine; 3. Wuxi TCM Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the effects and possible mechanism of *Wenshen Tongdu Formula* (温肾通督方, WTF) on spinal cord injury. **Methods** Thirty-six C57BL/6 female mice were randomly divided into sham operation group, model group and WTF group, with 12 mice in each group. The spinal cord injury model was established in the model group and the WTF group using the modified Allen's method, while in the sham operation group the spinal cord was only exposed. Since the 1st day after surgery, 50 g/(kg·d) of WTF solution was given to the WTF group by gavage, while 20 ml/(kg·d) of normal saline was given to the sham operation and model group by gavage, all for 14 days. Before surgery and on the 1st, 7th, and 14th days after surgery, the motor function of the mice was evaluated using the inclined plane test and hind limb motor function score (by BMS). On the 3rd day after surgery, the nerve electrophysiology was detected through electromyography and motor evoked potential; the spleen length was measured, and B cells in the spleen were sorted by magnetic beads; the differential expression of proteins were detected through proteomics technology; and the protein expression of mitochondrial outer membrane transport porin 20 (Tom20) and downstream cleaved caspase-3 in spleen B cells were measured using Western blotting. On the 14th day after surgery, MRI was used to observe the recovery of the spinal cord. **Results** Compared to those in the sham operation group at the same time, the BMS scores and subscores and the inclined plane test angle in the model group were reduced on the 1st, 7th and 14th days after surgery; the peak value of electromyogram and motor evoked potential were reduced, and the spleen length was shortened, while the expression of Tom20 and cleaved caspase-3 increased in splenic B cells increased ($P < 0.05$). Compared to those in the model group at the same time, the BMS subscores on the 14th day and the angle of the inclined plane test on the 7th and 14th days after surgery increased in the WTF group; the peak value of electromyography and motor evoked potential, as well as the length of spleen increased, and

the expression of Tom20 and cleaved caspase-3 decreased ($P < 0.05$). The proteomics results showed that there were 100 differential proteins in the WTF group versus the model group, of which 37 were up-regulated and 63 were down-regulated. GO enrichment analysis showed that differential proteins mainly played their roles in oxygen binding, exogenous apoptosis negative feedback, zinc ion response, and oxygen transport. KEGG enrichment analysis showed that differential proteins were mainly concentrated in metabolic pathways, Huntington's disease, oxidative phosphorylation and other pathways. Subcellular localization showed that differential proteins were associated with mitochondria. Magnetic resonance imaging on the 14th day after surgery showed that the spinal cord structure of the mice in the sham operation group was intact, and the segments were clear, with normal spinal cord signal; the low signal area in the spinal cord injury area increased in the model group, and the spinal cord became significantly thinner; the injured segment had obvious depression in the WTF group, but the structure was more complete than that in the model group.

Conclusion WTF may promote spinal cord injury repair by regulating immune function, and its mechanism may be related to inhibiting pyroptosis of spleen B cells.

Keywords spinal cord injury; immune function; proteomics; mitochondrial outer membrane transport porin 20; pyroptosis; Wenshen Tongdu Formula (温肾通督方)

(收稿日期: 2023-05-24; 修回日期: 2023-08-30)

[编辑: 邓 媛]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址:北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,邮政编码:100700

电话:(010) 64035632 联系人:杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘)480 元

1987—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘)260 元

1995—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘)280 元

2005—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘)300 元

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5—《中医杂志》(1987—1994)

工系统工具 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助

检索 检索结果 检索设置 桌面设置 帮助



欢迎关注《中医杂志》公众号

