

• 论 著 •

藏红花素对脊髓损伤大鼠运动功能、炎症的影响及机制研究*

矫秀环¹,赵桂欣¹,徐莉¹,马建林^{2△}
青岛市城阳区人民医院:1. 药学部;2. 骨科,山东青岛 266000

摘要:**目的** 探讨藏红花素对脊髓损伤大鼠运动功能、炎症及 Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)/Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)信号通路的影响。**方法** 构建脊髓损伤大鼠模型,将建模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、藏红花素低(25 mg/kg)、高(50 mg/kg)剂量组、甲泼尼龙琥珀酸钠(30 mg/kg)组,每组 12 只;另取 12 只大鼠作为假手术组。各组给予对应药物干预 14 d(每天 1 次)。评估大鼠运动功能,并采用苏木素-伊红和脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法染色分别观察脊髓组织病理变化和细胞凋亡,酶联免疫吸附试验法检测脊髓组织肿瘤坏死因子(TNF)-α、白细胞介素(IL)-1β、IL-6 水平;荧光定量 PCR 和蛋白质印迹法分别检测脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 信使 RNA(mRNA)和蛋白水平。**结果** 假手术组大鼠脊髓组织结构正常,无明显变化;与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织出现坏死灶,伴随嗜伊红色素颗粒生成,可见较多胶质瘢痕及空洞,BBB 评分显著降低($P<0.05$),脊髓组织细胞凋亡率、TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,藏红花素低、高剂量组大鼠脊髓组织病理损伤程度依次减轻,BBB 评分依次升高($P<0.05$),脊髓组织细胞凋亡率、TNF-α、IL-1β、IL-6、RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白水平依次降低($P<0.05$);甲泼尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠脊髓组织病理变化程度及各项指标比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 藏红花素能改善脊髓损伤大鼠运动功能,抑制脊髓组织细胞凋亡和炎症反应,其机制可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路的激活有关。

关键词:藏红花素; 脊髓损伤; Ras 同源基因家族成员 A; Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶; 运动功能; 炎症反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.08.005 中图法分类号:R285.5
文章编号:1673-4130(2024)08-0920-06 文献标志码:A

Effect and mechanism of crocin on motor function and inflammation
in rats with spinal cord injury*

JIAO Xiuhuan¹, ZHAO Guixin¹, XU Li¹, MA Jianlin^{2△}

1. Department of Pharmacy; 2. Department of Orthopedics, Qingdao Chengyang
People's Hospital, Qingdao, Shandong 266000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of crocin on motor function, inflammation and Ras homolog gene family member A (RhoA)/Rho-associated coiled-coil protein kinase (ROCK) signaling pathway in rats with spinal cord injury. **Methods** A rat model of spinal cord injury was established, forty-eight rats with successful spinal cord injury were randomly divided into model group, crocin low (25 mg/kg), high (50 mg/kg) dose groups and methylprednisolone sodium succinate (30 mg/kg) group, with 12 rats in each group. Another 12 rats were selected as sham operation group. Each group was given corresponding medication intervention for 14 days (once a day). The motor function of rats was evaluated, and the pathological changes and apoptosis of spinal cord were observed by hematoxylin-eosin and deoxyribonucleotide end-transferase mediated notch end labeling, respectively. The levels of tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-1β and IL-6 in the spinal cord tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA and protein levels of RhoA, ROCK1 and ROCK2 in spinal cord were detected by fluorescence quantitative PCR and Western blotting, respectively. **Results** In the sham operation group, the spinal cord tissue structure was normal, and there was no significant change. Compared with sham operation group, necrotic lesions appeared in the spinal cord tissue of rats in the model group, accompanied by the formation of eosinophilic pigment particles, and more glial scars and cavities were observed, and the BBB score was significantly decreased ($P<0.05$), while the apoptosis rate of spinal cord tissue cells, the levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA and

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2021WS094)。
作者简介:矫秀环,女,主管药师,主要从事药理学和医院药学相关研究。 △ 通信作者, E-mail: milcyrmyy@163.com。

protein were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, the pathological injury degree of spinal cord tissue of rats in crocin low and high dose groups was reduced successively, and the BBB score was increased in turn ($P < 0.05$), the apoptosis rate of spinal cord tissue cells, TNF- α , IL-1 β , IL-6 levels, RhoA, ROCK1, ROCK2 mRNA and protein levels were decreased in turn ($P < 0.05$). There was no significant difference in the pathological changes of spinal cord between methylprednisolone sodium succinate group and safron high dose group ($P > 0.05$). **Conclusion** Crocin can improve motor function, inhibit apoptosis and inflammation of spinal cord tissue in rats with spinal cord injury, and its mechanism may be related to inhibiting the activation of RhoA/ROCK signaling pathway.

Key words: crocin; spinal cord injury; Ras homolog gene family member A; Rho-associated coiled-coil protein kinase; motor function; inflammatory response

脊髓损伤会诱发患者运动功能障碍,表现为损伤平面下感觉消失,会出现慢性、顽固性疼痛^[1]。研究显示,脊髓损伤患者预后一般较差,大部分患者术后无法完全康复且感觉功能、运动功能均会出现一定损伤^[2-3]。脊髓损伤后会使得炎症因子活性增强,伴随着剧烈的炎症反应^[4]。因此减轻脊髓损伤患者炎症反应,改善其运动功能,对于改善患者预后极为重要。藏红花素是中药藏红花的主要有效成分,具有抗炎、抗氧化应激等方面的作用^[5]。研究表明,藏红花素可减轻卵清蛋白诱导的小鼠肺组织炎症性损伤^[6]。Ras 同源基因家族成员 A (RhoA)在多种疾病的发生发展过程中起着重要作用,Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶(ROCK)是其下游信号因子^[7]。RhoA/ROCK 是在脊髓变性和再生过程中起重要作用的信号通路,同时也能调节炎症反应,以及炎症细胞的侵袭和浸润,有研究发现,在脊髓损伤后,抑制 RhoA/ROCK 通路活性可显著减少脊髓组织细胞凋亡^[8]。但藏红花素是否对脊髓损伤有治疗作用鲜见报道。故本研究拟基于 RhoA/ROCK 信号通路,探究藏红花素对脊髓损伤大鼠运动功能、炎症的影响,以期对脊髓损伤开发新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠,10~11 周龄,体重 326~351 g,购自湖北天勤生物科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2020-0011。大鼠饲养环境为温度(25±1)℃,相对湿度 54%±6%,12 h 明/暗循环。期间自由饮水进食。本研究经医院伦理委员会批准。

1.1.2 主要药物与试剂 藏红花素(批号:DL15850,原料药,纯度≥98.59%,溶于生理盐水制成质量浓度分别为 2.5、5 mg/mL 的溶液)、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色试剂盒(批号:DL25990)、肿瘤坏死因子(TNF)- α (批号:DL45822)、白细胞介素(IL)-1 β (批号:DL58292)、IL-6(批号:DL24691)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒、蛋白裂解液(批号:DL52902)均购自广州东林生物科技有限公司;注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(批号:20220725,溶于生理盐水制成质量浓度为 3 mg/mL 的溶液)购自天津金耀药业有限公司;苏木素-伊红

(HE)染色试剂盒(批号:YQ49503)、Trizol 试剂(批号:YQ24816)、逆转录试剂盒(批号:YQ73927)、PCR 试剂盒(批号:YQ63931)、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(批号:YQ25600)、化学发光试剂(批号:YQ42955)均购自南京有晴生物科技有限公司;鼠源 RhoA(批号:SM20454)、ROCK1(批号:SM52144)、ROCK2(批号:SM27554)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)(批号:SM31056)一抗、羊抗鼠二抗(批号:SM54200)均购自广州苏玛生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 显微镜(型号 CX41)、酶标仪(型号 PR4100)、荧光定量 PCR 仪(型号 CFX-96)、凝胶成像系统(型号 OmegaLum C)均购自宁波重鼎生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脊髓损伤大鼠模型的建立及分组给药 构建脊髓损伤大鼠模型^[9]:麻醉大鼠,俯卧位固定大鼠于操作台上,背部备皮,去除 T₉~T₁₀ 椎板,10 g 的砝码从 6 cm 高度落下撞击 T₉~T₁₀ 椎板去除处,若大鼠出现摇尾反射、双后肢及身体回缩扑动后双后肢瘫痪则表示大鼠脊髓损伤模型构建成功^[10]。将建模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、藏红花素低(25 mg/kg)、高(50 mg/kg)剂量组^[11]、甲泼尼龙琥珀酸钠(30 mg/kg)组^[12],每组 12 只;另取 12 只健康大鼠作为假手术组(假手术组大鼠仅去除 T₉~T₁₀ 椎板,不进行脊髓损伤造模)。藏红花素低、高剂量组大鼠分别给予 25、50 mg/kg 藏红花素腹腔注射给药^[11](藏红花素溶于生理盐水制成浓度为 2.5、5 mg/mL 的溶液,注射体积 10 mL/kg);甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠给予 30 mg/kg 甲泼尼龙琥珀酸钠腹腔注射给药^[12](甲泼尼龙琥珀酸钠溶于生理盐水制成浓度为 3 mg/mL 的溶液,注射体积 10 mL/kg);假手术组、模型组大鼠给予等量生理盐水腹腔注射。各组给药每天 1 次,连续 14 d,其间无大鼠死亡。

1.2.2 大鼠运动功能评估 于建模结束后(给药前)和末次给药结束后 24 h,按巴索-贝蒂-布雷斯纳汉(BBB)评分法^[10]评估大鼠运动功能:由 2 名实验观察者进行盲检并评分(若两名实验观察者评分不一致则协商后确定),BBB 量表总分 21 分,0 分为无任何肢体功能,21 分为正常运动功能,评分越低代表大鼠运动

功能受损越严重。

1.2.3 大鼠脊髓组织病理观察及脊髓组织细胞凋亡率检测 评分结束后,处死大鼠,收集大鼠撞击处脊髓组织,取部分脊髓组织置于-70℃冰箱中保存;其余脊髓组织迅速置于4%多聚甲醛中固定24 h后,制成5 μm切片,取切片按照HE及TUNEL染色试剂盒进行染色、脱水、透明后封片。观察各组大鼠脊髓组织病理改变情况,随机选取6个视野计算脊髓组织细胞凋亡率,细胞凋亡率=TUNEL阳性染色细胞(阳性细胞被染为棕黄色)数目/细胞总数目×100%。

1.2.4 大鼠脊髓组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的检测 取冻存的大鼠脊髓组织样本,研磨匀浆,4℃下6 400 r/min离心21 min,收集上清液,ELISA法检测上清液中TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

1.2.5 大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 信使 RNA(mRNA)水平的测定 取冻存的大鼠脊髓组织样本,充分研磨,Trizol试剂提取脊髓组织总RNA,逆转录为cDNA,荧光定量PCR法检测脊髓组织

RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA水平,以GAPDH为内参。反应体系共30 μL:cDNA 2 μL,缓冲液5 μL,dNTPs 4 μL,正、反向引物各1 μL、DNA聚合酶1 μL、ddH₂O 16 μL。扩增条件:94℃12 min,94℃15 s,62℃21 s,72℃23 s,共40个循环,72℃延伸10 min。所用引物由广州东林生物科技有限公司设计合成。mRNA水平采用相对定量法(2^{-ΔΔC_t}法)计算,引物序列见表1。

1.2.6 蛋白质印迹法检测大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白表达水平 取冻存的大鼠脊髓组织样本,充分研磨匀浆,蛋白裂解液裂解,BCA法定量总蛋白,取适量蛋白电泳后转膜,5%脱脂牛奶封膜2 h,加入稀释好的鼠源RhoA(1:600)、ROCK1(1:800)、ROCK2(1:700)、GAPDH(1:1 000)一抗,4℃下孵育过夜,加入羊抗鼠二抗(1:1 400),室温孵育2 h,化学发光试剂显影,Image J软件分析蛋白质条带,以GAPDH为内参,计算RhoA、ROCK1、ROCK2蛋白表达水平。

表 1 引物序列

基因名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
RhoA	TGCCTGGTGAACAAGACCA	ACGTACAACCTCTACCGTTG
ROCK1	GTGCAACGCACTGTGCCACA	AGCTGGGTTTTCGAAGGCTG
ROCK2	TGCCATGACAATGCGTGCG	ACGTGCCCTGGGTGACAGA
GAPDH	GATGCGCGTGAGACAGCG	ATGTTCTACACTGTTAGA

1.3 统计学处理 应用SPSS 25.0软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用SNK-*q*检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 藏红花素对脊髓损伤大鼠 BBB 评分的影响 建模结束后(给药前),与假手术组相比,模型组、藏红花素低、高剂量组、甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠BBB评分显著降低($P<0.05$);但模型组、藏红花素低、高剂量组、甲泼尼龙琥珀酸钠组大鼠BBB评分两两比较差异无统计学意义($P>0.05$)。末次给药结束后24 h,与假手术组相比,模型组大鼠BBB评分显著降低($P<0.05$);与模型组相比,藏红花素低、高剂量组大鼠BBB评分依次升高($P<0.05$);尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠BBB评分差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.2 藏红花素对脊髓损伤大鼠脊髓组织病理学变化的影响 假手术组大鼠脊髓组织结构正常,无明显变化;模型组大鼠脊髓组织出现坏死灶,伴随嗜伊红色素颗粒生成,可见较多胶质瘢痕及空洞;藏红花素低、高剂量组大鼠脊髓组织病理损伤程度依次减轻;甲泼尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠脊髓组织病理变化程度相似。见图1。

表 2 各组大鼠 BBB 评分的比较($\bar{x}\pm s$,分)

组别	<i>n</i>	建模结束后 (给药前)	末次给药 结束后 24 h
假手术组	12	21.00±0.00	21.00±0.00
模型组	12	2.26±0.31 ^a	5.09±0.71 ^a
藏红花素低剂量组	12	2.44±0.36 ^a	9.43±1.26 ^b
藏红花素高剂量组	12	2.35±0.29 ^a	12.78±2.59 ^{bc}
甲泼尼龙琥珀酸钠组	12	2.42±0.34 ^a	13.03±2.42 ^{bc}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与藏红花素低剂量组相比,^c $P<0.05$ 。

2.3 藏红花素对脊髓损伤大鼠脊髓组织细胞凋亡率的影响 假手术组、模型组、藏红花素低剂量组、藏红花素高剂量组、甲泼尼龙琥珀酸钠组细胞凋亡率分别为1.29%±0.19%、42.74%±5.96%、21.54%±3.12%、11.17%±2.14%、10.70%±2.12%;与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与模型组相比,藏红花素低、高剂量组大鼠脊髓组织细胞凋亡率依次降低($P<0.05$);甲泼尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠脊髓组织细胞凋亡率差异无统计学意义($P>0.05$)。见图2。

2.4 藏红花素对脊髓损伤大鼠脊髓组织 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平的影响 与假手术组相比,模型组大鼠

脊髓组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,藏红花素低、高剂量组大鼠脊髓组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平依次降低 ($P < 0.05$);甲泼尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠脊髓组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

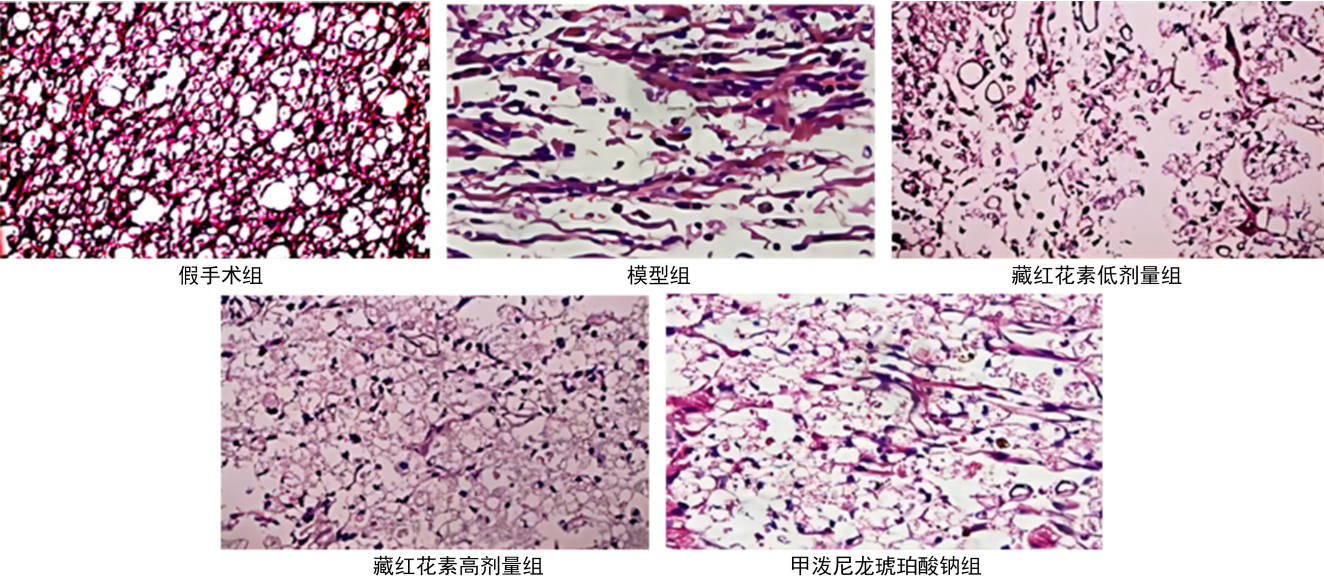


图 1 各组大鼠脊髓组织病理变化图(HE 染色,×200)

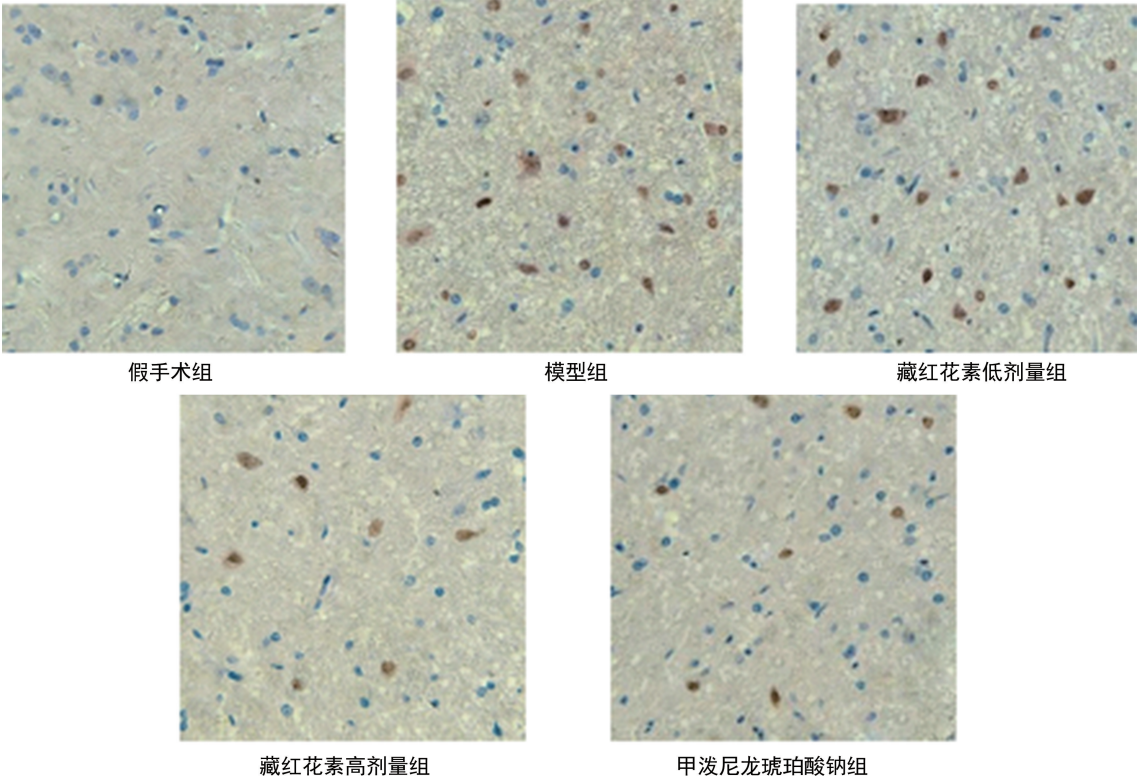


图 2 各组大鼠脊髓组织细胞凋亡图(TUNEL 染色,×200)

表 4 各组大鼠脊髓组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/g, $n = 12$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
假手术组	69.36 $\pm$ 12.61	78.98 $\pm$ 11.17	147.84 $\pm$ 20.56
模型组	289.06 $\pm$ 42.14 ^a	316.21 $\pm$ 44.51 ^a	414.65 $\pm$ 62.69 ^a
藏红花素低剂量组	200.61 $\pm$ 29.97 ^b	224.43 $\pm$ 35.85 ^b	302.67 $\pm$ 41.56 ^b
藏红花素高剂量组	122.70 $\pm$ 21.69 ^{bc}	145.21 $\pm$ 22.64 ^{bc}	219.56 $\pm$ 27.12 ^{bc}
甲泼尼龙琥珀酸钠组	119.99 $\pm$ 18.28 ^{bc}	148.03 $\pm$ 19.05 ^{bc}	215.06 $\pm$ 29.04 ^{bc}

注:与假手术组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与藏红花素低剂量组相比,^c $P < 0.05$ 。

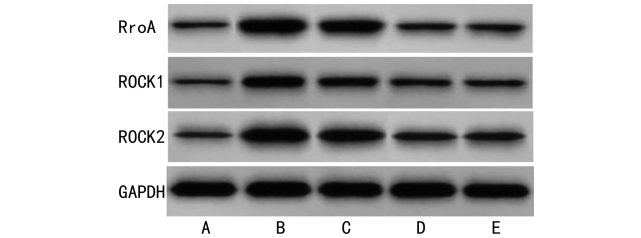
2.5 藏红花素对脊髓损伤大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 水平的影响 与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,藏红花素低、高剂量组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 水平依次降低($P<0.05$);甲泼尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 5 各组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	RhoA mRNA	ROCK1 mRNA	ROCK2 mRNA
假手术组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	2.56±0.44 ^a	2.74±0.57 ^a	3.41±0.61 ^a
藏红花素低剂量组	2.01±0.31 ^b	2.07±0.41 ^b	2.41±0.44 ^b
藏红花素高剂量组	1.42±0.16 ^{bc}	1.56±0.31 ^{bc}	1.85±0.34 ^{bc}
甲泼尼龙琥珀酸钠组	1.45±0.18 ^{bc}	1.51±0.34 ^{bc}	1.89±0.29 ^{bc}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与藏红花素低剂量组相比,^c $P<0.05$ 。

2.6 藏红花素对脊髓损伤大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白水平的影响 与假手术组相比,模型组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白水平显著升高($P<0.05$);与模型组相比,藏红花素低、高剂量组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白水平依次降低($P<0.05$);甲泼尼龙琥珀酸钠组和藏红花素高剂量组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3、表 6。



注:A为假手术组;B为模型组;C为藏红花素低剂量组;D为藏红花素高剂量组;E为甲泼尼龙琥珀酸钠组。

图 3 各组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白质印迹图

表 6 各组大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 蛋白水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	RhoA	ROCK1	ROCK2
假手术组	0.16±0.03	0.15±0.02	0.19±0.04
模型组	0.98±0.16 ^a	0.87±0.11 ^a	1.09±0.17 ^a
藏红花素低剂量组	0.70±0.09 ^b	0.54±0.05 ^b	0.74±0.10 ^b
藏红花素高剂量组	0.35±0.07 ^{bc}	0.29±0.04 ^{bc}	0.43±0.05 ^{bc}
甲泼尼龙琥珀酸钠组	0.37±0.06 ^{bc}	0.27±0.03 ^{bc}	0.41±0.04 ^{bc}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与藏红花素低剂量组相比,^c $P<0.05$ 。

3 讨论

脊髓损伤属于中枢神经系统损伤,具有不可逆性,目前临床上尚无治疗脊髓损伤的有效方法^[13]。脊髓损伤造成的神经功能障碍对患者的生活质量产生较大影响^[14]。BBB 评分是一种神经运动功能评分,常用于脊髓损伤大鼠运动恢复过程的评价,能够反映脊髓损伤的病情严重程度^[15]。发生脊髓损伤时,脊髓组织中的小胶质细胞、巨噬细胞会激活并释放 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症细胞因子,促进炎症反应,加重脊髓的继发性损伤,所以,减轻炎症反应可能有益于治疗脊髓损伤^[16]。此外,在脊髓损伤期间还会存在脊髓空腔病变、脊髓神经元细胞凋亡等情况,从而阻碍中枢神经系统正常功能及修复^[17]。本研究构建脊髓损伤大鼠模型,结果发现假手术组大鼠脊髓组织结构正常,无明显变化;模型组大鼠脊髓组织出现坏死灶,伴随嗜伊红色素颗粒生成,可见较多胶质瘢痕及空洞,BBB 评分显著降低,脊髓组织细胞凋亡率、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平显著升高,提示脊髓损伤大鼠运动功能受损,脊髓组织发生炎症反应、病变且伴随细胞凋亡。

藏红花素是一种传统药材,提取于藏红花,具有抗炎、抗癌等药理活性,同时广泛用于神经保护、免疫功能调节等方面^[18]。VAF AEI 等^[19]研究表明,藏红花素的抗炎特性使其在骨关节炎、类风湿性关节炎和关节疼痛方面具有较大的治疗潜力,且藏红花素的抗凋亡及对破骨细胞的抑制作用使其在骨质疏松症和软骨退行性疾病中表现出一定的疗效。AHMED 等^[20]研究发现,藏红花素的抗炎、抗凋亡活性能够抑制神经退行性疾病中神经元细胞凋亡及结构功能改变。本研究使用藏红花素处理脊髓损伤大鼠,结果发现,藏红花素干预后的脊髓损伤大鼠脊髓组织病理损伤程度得到改善,BBB 评分升高,脊髓组织细胞凋亡率、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平降低,与 AHMED 等^[20]研究结果一致,提示藏红花素能改善脊髓损伤大鼠运动功能和脊髓损伤,抑制大鼠炎症反应。

RhoA/ROCK 信号通路与多种疾病的发生发展密切相关。据报道,中枢神经系统的损伤和疾病能够诱导 RhoA 及其下游效应分子 ROCK 的激活,而 ROCK 活化可以通过激活小胶质细胞和星形胶质细胞释放炎症细胞因子来促进神经炎症反应^[21]。同时 RhoA/ROCK 信号通路的激活会促进细胞死亡以及神经突触的收缩和丧失^[22]。YING 等^[23]研究表明,RhoA/ROCK 信号通路还参与了脊髓损伤的病理过程,脊髓损伤区域的神经细胞含有高活性的 RhoA、ROCK,抑制 RhoA/ROCK 信号通路可以促进轴突的生长。本研究发现,脊髓损伤大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白水平均显著升高,藏红花素处理后的脊髓损伤大鼠脊髓组织 RhoA、ROCK1、ROCK2 mRNA 和蛋白水平均显著降低,结合 YING 等^[23]的研究,猜测藏红花素对脊髓损伤大鼠

运动功能的改善作用,对大鼠脊髓组织细胞凋亡和炎症反应的抑制作用可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路的激活有关。

综上所述,藏红花素能改善脊髓损伤大鼠运动功能,抑制脊髓组织细胞凋亡和炎症反应,其机制可能与抑制 RhoA/ROCK 信号通路的激活有关。下一步将通过 RhoA/ROCK 信号通路激活剂干预藏红花素治疗的脊髓损伤大鼠,进一步验证本研究结果。

参考文献

- [1] CHIO J C T, PUNJANI N, HEJRATI N, et al. Extracellular matrix and oxidative stress following traumatic spinal cord injury: physiological and pathophysiological roles and opportunities for therapeutic intervention[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2022, 37(1/2/3): 184-207.
- [2] CAMPOS J, SILVA N A, SALGADO A J. Nutritional interventions for spinal cord injury: preclinical efficacy and molecular mechanisms[J]. *Nutr Rev*, 2022, 80(5): 1206-1221.
- [3] RENEHAN J R, YE I B, THOMSON A E, et al. Intraoperative sensory signals predict prognosis for patients with traumatic cervical spinal cord injury[J]. *World Neurosurg*, 2022, 168(1): 393-398.
- [4] HELLENBRAND D J, QUINN C M, PIPER Z J, et al. Inflammation after spinal cord injury: a review of the critical timeline of signaling cues and cellular infiltration[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 284-294.
- [5] YARIBEYGI H, ATKIN S L, BARRETO G E, et al. Crocin improves oxidative stress in testicular tissues of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1308(1): 273-281.
- [6] ASLANI M R, AMANI M, MASRORI N, et al. Crocin attenuates inflammation of lung tissue in ovalbumin-sensitized mice by altering the expression of endoplasmic reticulum stress markers[J]. *Biofactors*, 2022, 48(1): 204-215.
- [7] ROY A, PATHAK Z, KUMAR H. Strategies to neutralize RhoA/ROCK pathway after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2021, 343(1): 113794-113802.
- [8] WANG X, LI B, WANG Z, et al. miR-30b promotes spinal cord sensory function recovery via the Sema3A/NRP-1/PlexinA1/RhoA/ROCK pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(21): 12285-12297.
- [9] 夏宇, 马琳, 齐争艳, 等. 缓释 NT-3 的 PLGA 纳米微球对大鼠脊髓损伤的修复作用[J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38(6): 618-624.
- [10] 王义, 牛延坪, 戴俊. X 线照射治疗脊髓损伤大鼠的效果及其可能机制[J]. *广西医学*, 2022, 44(6): 616-621.

- [11] 余淑华, 刘肫, 吴倩倩, 等. 藏红花素对自发性高血压大鼠血管内皮功能障碍及动脉粥样硬化的作用及其 ROCK/JNK 信号通路机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(6): 1481-1489.
- [12] 孙建威, 杨新明, 张瑛. 丙戊酸钠联合甲强龙对大鼠脊髓损伤的影响及其机制[J]. *中华解剖与临床杂志*, 2021, 26(2): 214-222.
- [13] LIU X, ZHANG Y, WANG Y, et al. Inflammatory response to spinal cord injury and its treatment[J]. *World Neurosurg*, 2021, 155(1): 19-31.
- [14] DUAN R, QU M, YUAN Y, et al. Clinical benefit of rehabilitation training in spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis[J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2021, 46(6): 398-410.
- [15] 黄旭东, 倪佰荷, 李琦, 等. 山茱萸对大鼠脊髓损伤后细胞凋亡的影响及其机制[J]. *中药材*, 2022, 45(3): 710-714.
- [16] FREYERMUTH-TRUJILLO X, SEGURA-URIBE J J, SALGADO-CEBALLOS H, et al. Inflammation: a target for treatment in spinal cord injury[J]. *Cells*, 2022, 11(17): 2692-2707.
- [17] HARKEMA S, ANGELI C, GERASIMENKO Y. Historical development and contemporary use of neuromodulation in human spinal cord injury[J]. *Curr Opin Neurol*, 2022, 35(4): 536-543.
- [18] KERMANSHAHI S, GHANAVATI G, ABBASI-MES-RABADI M, et al. Novel neuroprotective potential of crocin in neurodegenerative disorders: an illustrated mechanistic review[J]. *Neurochem Res*, 2020, 45(11): 2573-2585.
- [19] VAFAEI S, WU X, TU J, et al. The effects of crocin on bone and cartilage diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 12(1): 830331.
- [20] AHMED S, HASAN M M, HEYDARI M, et al. Therapeutic potentials of crocin in medication of neurological disorders[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 145: 111739.
- [21] LU W, CHEN Z, WEN J. RhoA/ROCK signaling pathway and astrocytes in ischemic stroke[J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(6): 1101-1108.
- [22] MULHERKAR S, TOLIAS K F. RhoA-ROCK signaling as a therapeutic target in traumatic brain injury[J]. *Cells*, 2020, 9(1): 245-257.
- [23] YING X, YU X, ZHU J, et al. Water treadmill training ameliorates neurite outgrowth inhibition associated with NGR/RhoA/ROCK by inhibiting astrocyte activation following spinal cord injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 1724362.

(收稿日期: 2023-09-16 修回日期: 2024-02-21)