

• 论 著 •

地塞米松对小鼠选择性脊神经后根切断后脊髓 Robo2 表达的影响

李双容 孙建永 易西南*

长沙医学院基础医学院 湖南长沙 410219

【摘要】目的 观察地塞米松对小鼠神经损伤后脊髓 Robo2 基因表达的影响。**方法** 用 48 只小鼠,雌雄不限,随机分成 3 组,神经损伤组:16 只裸鼠选择性切断 C6 ~ T2 脊神经后根;对照组:16 只裸鼠,假手术处理,不损伤 C6 ~ T2 脊神经;地塞米松组:16 只裸鼠选择性切断 C6 ~ T2 脊神经后根,于神经损伤后局部肌肉间隙内注射地塞米松 0.5mg/(kg·d),应用 qPCR 技术分别检测神经损伤组、地塞米松组小鼠术后 1d、3d、7d、14d,以及同时段对照组 Robo2mRNA 基因表达。**结果** 小鼠选择性脊神经后跟切断后 1d、3d、7d、14d,神经损伤组、地塞米松组 Robo2 基因表达上调,7d 时达到高峰;与同时段神经损伤组相比,地塞米松组 Robo2mRNA 表达明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 地塞米松可能通过上调 Robo2 基因表达,参与周围神经损伤的修复过程。

【关键词】 脊神经;损伤;地塞米松;Robo2 基因

【中图分类号】 R651

【文献标识码】 A

【文章编号】 1009-3179 (2019) 05-001-03

【基金项目】 湖南省教育厅项目, (11C0147)

0 引言

神经系统的生长发育和损伤修复是一个复杂有序的过程,有 4 种重要的轴突生长导向分子家族参与其中,包括 Netrins、Slits、Semaphorins 和 Ephrins 家族,通过吸引和排斥来调节轴突靶向生长,实现轴突引导^[1]。Slits 为代表性排斥因子,对神经轴突生长方向具有排斥导向、控制神经细胞的迁移,以及影响神经细胞的分裂和分化^[2,3],Slit 蛋白的受体是 Roundabout (Robo) 的跨膜蛋白,介导 Slit 的生物学作用^[4]。我们既往研究发现周围神经损伤后可导致 Slit、Robo 表达变化^[5,6],同时课题组研究发现,地塞米松可显著减轻利多卡因对家兔神经毒性与感觉神经元损伤^[7],另课题组的前期实验结果表明,地塞米松可通过影响神经轴突导向因子 Slit1 基因的表达,发挥神经保护效应,那么地塞米松是否同时也影响 Robo2 的表达,目前尚未见报道。本文采用脊神经后根切断模型,观察地塞米松预处理对脊髓 Robo2 基因表达的影响,旨在揭示地塞米松能否通过影响“Slit-Robo”信号通路,调控周围神经损伤修复。

1 材料和方法

1.1 材料及动物模型构建

选用 48 只裸鼠,雌雄不限,4 ~ 6 周龄,体重 16~20g,饲养于长沙医学院无菌实验动物房。随机分成三组。神经损伤组:16 只裸鼠切断 C6 ~ T2 脊神经后根;对照组:16 只裸鼠,假手术处理;地塞米松组:16 只裸鼠采用神经损伤组同样的手术,并给予局部肌注地塞米松;神经损伤组裸鼠用 20% 乌拉坦 0.6 ml/100 g 腹腔注射麻醉后,从颈背正中处切开皮肤,行椎板切开术,暴露颈部脊髓,在镜下切断双侧 C6 ~ T2 脊神经后根,注意保护脊神经节。对照组采用相同实验步骤,行假手术处理,不切断双侧 C6 ~ T2 脊神经后根,作为空白对照;地塞米松组,于神经损伤后局部肌肉间隙内注射地塞米松 0.5 mg/(kg·d);术后各组均缝合肌肉和皮肤。分别检测神经损伤组、地塞米松组小鼠术后 1d、3d、7d、14d,以及同时段对照组 Robo2 mRNA 基因表达。

1.2 方法

qPCR 检测:神经损伤组、对照组、地塞米松组小鼠分别于术后 1d、3d、7d、14d 取出对应脊神经后根切断的 C6 ~ T2 脊髓节段,采用 Trizol 方法并在液氮研磨组织提取脊髓 RNA,应用大连宝生物公司逆转录试剂盒,获得 cDNA,分装后 -80℃ 备用。按照 qPCR 引物设计原则,自行设计 Robo2 引物,上游序列:5'-GTGTGTTCTGTACTGTAAGCTAGGTG3',下游序列:3'-ATTCCTTCATACCGCCACCG5',以 GAPDH 作为内参对照,其上游引物为:5'-TGCTGGTGCTGAGTATGTCG-3',下游引物为:5'-GCATGTCAGATCCACAACGG-3',上述引物均通过 NCBI 验证特异性,并由上海博尚公司合成,采用大连宝生物公司 SYBR® Premix Ex Taq™ II 进行定量 PCR 扩增;于罗氏 Lightcycler® 96 PCR 仪中进行反应;热循环条件为:预变性:95℃ 6 分钟,变性:95℃ 5 秒,退火:58℃ 30 秒,45 个循环;采用相对定量方法分析地塞米松对 Robo2 基因表达的影响。

1.3 数据收集及统计分析

数据采用 SPSS 22.0 软件分析,实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较均采用 student t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 Robo2 与内参 GAPDH 的 qPCR 溶解曲线

应用罗氏公司 Light Cycler96 荧光 PCR 仪进行 Robo2 及 GAPDH 基因扩增,两种基因溶解曲线均为单峰,表明基因扩增特异性较好,数据分析同质化,见图 1。

2.2 Robo2 mRNA 在三组中的表达水平差异

较之同时段对照组,小鼠术后 1d、3d、7d、14d 神经损伤组、地塞米松组 Robo2 基因表达量逐渐升高,但术后 1d 表达量较同期对照组,神经损伤组、地塞米松组小鼠脊髓 Robo2 mRNA 表达无统计学差异,3d 后基因表达明显升高,7d 达到高峰,具有显著性差异(见图 2),可能机体启动神经损伤修复需要一定的实效性;另单独与同时段神经损伤组相比,地塞米松组 Robo2 mRNA 表达也呈逐渐升高趋势,7d 达高峰,约增加 1 倍以上, ($P < 0.01$),14d 表达虽出现下降趋势,但 Robo2 mRNA 表达量仍较之同时段神经损伤组高,且差异仍具

作者简介:李双容(1986-)女,实验师,汉族,湖南邵阳人,从事人体组织胚胎学教学与应用研究。

* 通讯作者:易西南

有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 3), 本实验结果表明地塞米松可明显增加周围神经损伤后脊髓 Robo2 基因表达, 可能通过上调 Robo2 基因表达, 促进神经修复。

3 讨论

神经轴突导向因子 Slit 蛋白参与神经系统生长发育、损伤修复过程, 并发挥了重要的作用^[8]。作为 Slit1 作为神经轴突排斥性因子, 主要通过 Robo2 受体, 即“Slit1-Robo2”轴调控神经突的生长, 促进神经修复^[9]。地塞米松是临床上常用的糖皮质激素之一, 具有抗炎、免疫调节、神经保护等作用; 本课题组的前期实验结果表明, 地塞米松可通过影响神

经轴突导向因子 Slit1 基因的表达, 发挥神经保护效应, 那么地塞米松是否同时也影响 Robo2 的表达, 是否双重影响“Slit1-Robo2”信号通路? 本研究结果显示, 本次实验结果, 随着神经损伤时间的延长, 较之对照组, 神经损伤组、地塞米松组脊髓 Robo2 mRNA 表达水平逐渐升高, 7d 达峰, 14d 开始降低, 但仍高于对照组, 证实神经损伤后, 脊髓 Robo2 基因表达会上调, 启动神经损伤修复。同时本研究结果发现, 与同时段神经损伤组相比, 地塞米松组均能显著升高 Robo2 基因表达, 表明地塞米松可能通过双重影响“Slit-Robo”信号通路, 促进神经修复。

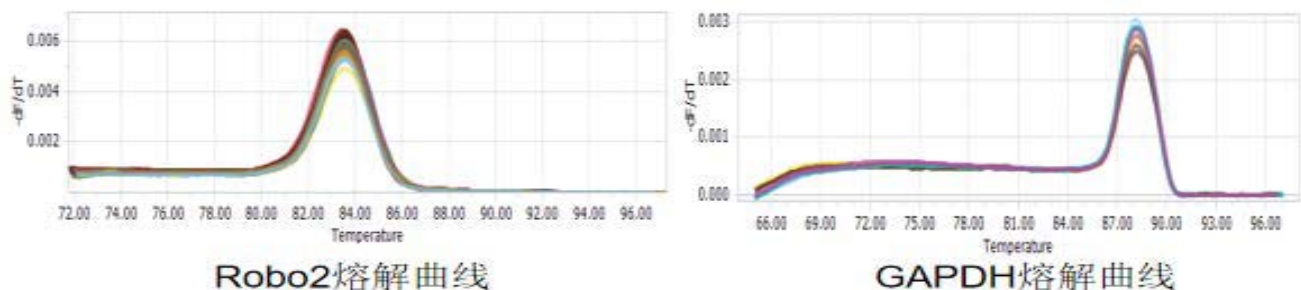


图 1: Robo2 和 GAPDH 熔解曲线

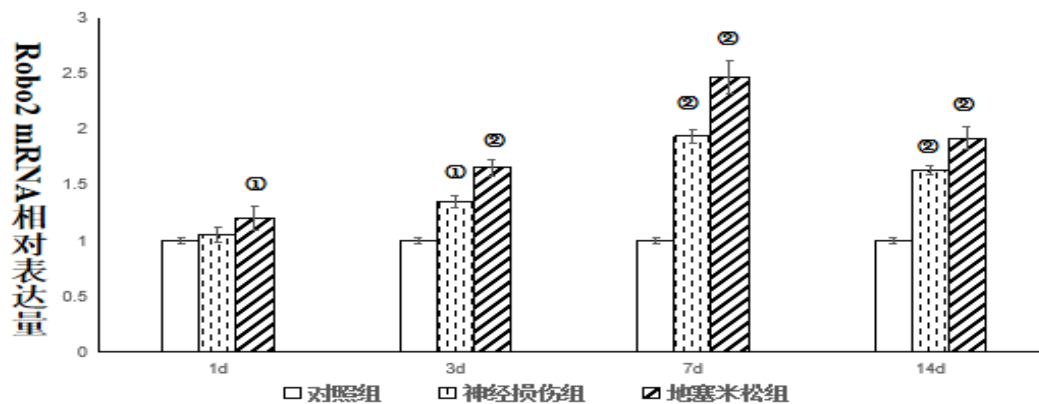


图 2: 对照组、神经损伤组及地塞米松组小鼠脊髓 Robo2 mRNA 表达差异

注: ①表示与同时段对照组比较, 神经损伤组 Robo2 基因表达差异显著, $P < 0.05$; ②表示与同时段对照组比较, 地塞米松组 Robo2 基因表达差异显著, $P < 0.01$;

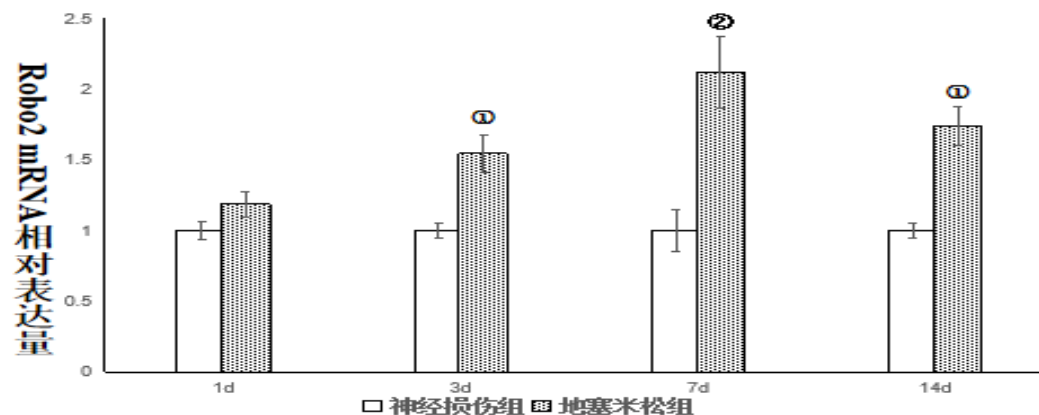


图 3: 地塞米松组与神经损伤组 Robo2 基因表达比较

注: ①表示与同时段神经损伤组相比, 地塞米松组 Robo2 基因表达差异显著, $P < 0.05$; ②表示与同时段神经损伤组相比, 地塞米松组 Robo2 基因表达差异显著, $P < 0.01$;

参考文献:

- [1] Dickson B J, Kirsten-André Senti. Axon Guidance: Growth Cones Make an Unexpected Turn[J]. Current Biology, 2002, 12(6):218-220.
- [2] Evans TA, Bashaw GJ. Axon guidance at the midline:

of mice and flies. Curr Opin Neurobiol 2010; 20(1): 79-85.

- [3] Andrews W, Barber M, Hernandez-Miranda LR, et al. The role of Slit-Robo signaling in the generation, migration and
- (下转第 5 页)

3 讨论

认知功能障碍是脑卒中患者的常见并发症,与脑组织损伤有关。认知功能障碍的形成,会对患者的康复治疗形成妨碍,损害其生存质量。在脑卒中的康复治疗期间,有效开展肢体运动功能训练的同时,也需要关注患者的认知功能恢复情况^[3]。认知功能的良好改善,能够恢复患者的记忆力、注意力以及语言功能,健康教育和康复指导工作的开展,进而影响其行为。为了帮助患者尽快摆脱认知功能障碍的困扰,需要采取针对性的治疗方法^[4]。根据脑卒中患者认知功能障碍的形成原因,应用具有神经保护功效的治疗药物,用于修复脑组织损伤,减轻神经缺损。临床治疗中,一般选用奥拉西坦与吡拉西坦作为治疗药物。奥美西坦和吡拉西坦的应用,在修复神经功能缺损和促进认知功能恢复方面具有良好的作用效果。

吡拉西坦属于促思维记忆药,适用于脑缺氧损伤的治疗。在认知功能障碍的临床治疗中使用吡拉西坦。患者在服用药物后,药物能够作用于脑组织,对于脑细胞产生活化作用,ATP/ADP 比值显著增加,进而促进大脑对于营养和能量的吸收,进而改善脑代谢,维持脑组织血氧供应的正常与稳定,有效修复脑损伤。奥拉西坦的药理性质与吡拉西坦相似,具有修复、保护神经元的作用,进而提高患者的认知功能^[5]。在奥拉西坦的临床应用中,药物可以透过血脑屏障,直接参与大脑的生理过程中,作用于海马体和皮质,刺激拟胆碱能神经元。该过程中会大量生成磷酸胆碱、磷酸乙醇胺,激活腺苷酸激酶。同时修复神经纤维,恢复正常的神经传导,促进其认知功能的恢复。在临床用药期间,药物并不会产生镇静或精神兴奋作用,可以有效预防不良反应的发生,保障药物治疗的安全性。奥拉西坦与吡拉西坦的临床应用,在认知功能障碍临床治疗中具有良好的应用效果。从整体的应用疗效来看,奥拉西坦的应用效果显著优于吡拉西坦^[6]。在脑血管疾病所引发记忆

和认知障碍的临床治疗中,奥拉西坦是更好的用药选择。

本组研究结果显示,应用奥拉西坦治疗后,观察组患者的 MMSE 评分由 (17.16±2.06) 分提升至 (26.02±1.85) 分,NIHSS 评分由 (22.12±2.17) 分提升至 (14.71±1.17) 分。而应用吡拉西坦治疗后,对照组患者的 MMSE 评分由 (17.24±2.13) 分提升至 (23.94±1.05) 分,NIHSS 评分由 (21.88±3.94) 分提升至 (17.02±2.34) 分。相比之下,观察组患者的认知功能恢复效果优于对照组,说明奥拉西坦的临床疗效比吡拉西坦更优。而在用药安全性方面,4.88% 的观察组患者出现并发症,低于对照组的 21.95%,进一步说明奥拉西坦是更为安全、有效的治疗药物。

综上所述,在脑卒中患者的康复治疗期间,应用奥拉西坦与吡拉西坦作为药物,利用其在神经保护方面的药理作用,促进患者认知功能的恢复。该过程中,奥拉西坦具有更好的临床疗效与安全性。

参考文献:

- [1] 张娟. 奥拉西坦与吡拉西坦的药理分析及临床比照观察 [J]. 中国医药指南, 2019, 17 (12): 178-179.
- [2] 杨春伍. 奥拉西坦与吡拉西坦治疗急性脑梗死的临床比较 [J]. 中外医疗, 2018, 37 (27): 116-118.
- [3] 董光杰. 奥拉西坦和吡拉西坦对老年人脑出血后认知功能障碍的改善效果 [J]. 北方药学, 2018, 15 (07): 148-149.
- [4] 陈启沃. 奥拉西坦与吡拉西坦治疗脑卒中后认知功能障碍的随机对照研究 [J]. 吉林医学, 2018, 39 (06): 1095-1097.
- [5] 董永娥. 奥拉西坦与吡拉西坦治疗动脉粥样硬化性脑梗死急性期认知功能障碍的疗效与安全性的对比分析 [J]. 中国社区医师, 2018, 34 (10): 44-45.
- [6] 阮世旺. 奥拉西坦与吡拉西坦治疗血管性痴呆的疗效及安全性对比分析 [J]. 中国卫生标准管理, 2016, 7 (04): 113-114.

(上接第 2 页)

morphological differentiation of cortical interneurons. Dev Biol 2008, 313(2): 648-658.

[4] Lauren C, Parkinson D B, Xin-Peng D, et al. Expression patterns of Slit and Robo family members in adult mouse spinal cord and peripheral nervous system [J]. PLOS ONE, 2017, 12(2): e0172736.

[5] 郑林丰, 张建伟, 易西南, et al. 大鼠坐骨神经切断后 Robo2 在脊髓及背根节的表达变化 [J]. 解剖学杂志, 2007, 30(2): 200-202.

(上接第 3 页)

表 2: 观察组患者水通道蛋白表达情况分析 ($\bar{x} \pm s$)

治疗情况	水通道蛋白表达	
	AQP4 蛋白	AQP9 蛋白
治疗前 (n=30)	0.110±0.013	0.201±0.015
治疗后 (n=30)	0.096±0.024	0.183±0.017
t	2.809	4.349
P	<0.05	<0.05

3 讨论

AQPs 分布在人体内重要的器官与组织中,对水液等小分子在体内的疏布中起着重要作用,糖尿病足也与之密切相关。本次研究采取中药干预+常规治疗与常规治疗对照,观察组患者治疗总有效率 (86.67%) 显著提高, $P < 0.05$, 说明两种

[6] 赵久红, 劳梅丽. 大鼠脊神经前根切断后脊髓内 Slit1 表达的变化 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2016, 26(5): 441-446.

[7] 李双容, 徐四元, 付辉, et al. 地塞米松对利多卡因神经毒性与感觉神经元损伤的影响 [J]. 饮食保健, 2018, 5(40): 98-99.

[8] Blockus H, Chedotal A. The multifaceted roles of Slits and Robos in cortical circuits: from proliferation to axon guidance and neurological diseases [J]. Curr Opin Neurobiol, 2014, 27(1): 82-88.

[9] 于奇, 周启升, 赵晓, et al. 神经轴突导向分子 Slit 的功能及其分子作用机制研究进展 [J]. 生理学报, 2012(2): 220-230.

方式联合显著;经治疗,观察组患者血清的 AQP4、AQP9 蛋白表达水平有所下降,与治疗前相比 $P < 0.05$,说明中药干预治疗能影响水通道蛋白家族的表达高低。

综上所述,水通道蛋白在糖尿病足患者神经改变中发挥了致病作用,而中药可以干预 AQPs 水通道蛋白家族的表达高低的变化,对糖尿病足发生发展起到一定的控制和预防作用。

参考文献:

- [1] 冯宝勤, 陈金京, 李振东, 等. 糖尿病足中医护理干预的研究概况 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(14): 55-58.
- [2] 周园园, 李卫国. 水通道蛋白的发现历程及与人类疾病的关系概述 [J]. 生物学教学, 2017, 42(12): 2-3.
- [3] 李辉. 中药足浴联合穴位按摩护理干预对早期糖尿病足的效果观察 [J]. 中国医药指南, 2018, 16(28): 263.