

徐纪伟,孙丹华,陈旭东,等. 吲哚-3-丙酸对大鼠急性脊髓损伤的神经保护作用及机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(8): 1012-1020.

Xu JW, Sun DH, Chen XD, et al. Neuroprotective effect and mechanism of indole-3-propionic acid in acute rat spinal cord injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(8): 1012-1020.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.08.006

吲哚-3-丙酸对大鼠急性脊髓损伤的神经保护作用及机制研究

徐纪伟¹, 孙丹华^{1*}, 陈旭东¹, 王宁¹, 孙壕烨²

(1. 漯河医学高等专科学校基础医学部, 河南 漯河 462000; 2. 漯河医学高等专科学校第三附属医院, 河南 漯河 462000)

【摘要】 目的 观察吲哚-3-丙酸治疗大鼠脊髓损伤后降钙素基因相关肽(CGRP)、突触素(Syn)、神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、细胞凋亡因子3(Caspase3)、白细胞介素1 β (IL-1 β)蛋白表达水平的变化,探讨吲哚-3-丙酸改善大鼠肢体运动功能及感觉功能的作用和机制。**方法** 105只SD大鼠随机分为3组:假手术组、生理盐水组和吲哚-3-丙酸组,其中对后两组大鼠使用重物击打脊髓制作顿挫损伤模型,并且分别通过腹腔注射给予生理盐水和吲哚-3-丙酸。在术后第1、3天、1周、2周、3周、4周,进行斜板实验、BBB评分和甩尾实验评估大鼠运动及感觉功能变化,采用免疫荧光及蛋白质印迹法检测各组各时间点大鼠脊髓组织中CGRP、Syn、GFAP、Caspase3、IL-1 β 表达水平,通过免疫荧光双标观察CGRP与神经生长蛋白43(GAP43)、神经元型钙结合蛋白(Necab2)共表达的情况。**结果** (1)术后吲哚-3-丙酸组的斜板实验与BBB评分均明显高于生理盐水组($P < 0.05$);术后第3天起吲哚-3-丙酸组甩尾实验检测潜伏期明显高于生理盐水组,且到术后第2周基本恢复正常($P < 0.05$)。(2)到术后第2周生理盐水组和吲哚-3-丙酸组CGRP、Syn阳性细胞达到高峰,且吲哚-3-丙酸组明显高于生理盐水组($P < 0.05$);术后第2周生理盐水组和吲哚-3-丙酸组GFAP阳性细胞达到高峰,之后表达水平才有所下降,但吲哚-3-丙酸组明显低于生理盐水组($P < 0.05$);术后吲哚-3-丙酸组和生理盐水组Caspase3阳性细胞出现逐渐减少,且吲哚-3-丙酸组明显少于生理盐水组($P < 0.05$)。(3)术后第2周发现CGRP与GAP43明显共表达,CGRP与Necab2在邻近细胞呈现互补表达。(4)术后第2周吲哚-3-丙酸组的CGRP、Syn蛋白表达已明显高于生理盐水组,而GFAP、Caspase3、IL1 β 蛋白表达则明显低于生理盐水组($P < 0.05$)。**结论** 脊髓损伤后大剂量应用吲哚-3-丙酸能明显增强CGRP、Syn表达水平,且CGRP与Necab2互补表达、而与GAP43共表达,有利于钙离子平衡、突起再生和突触重塑,通过抑制脊髓内GFAP、Caspase3、IL1 β 表达水平,减轻组织炎症损伤反应、抑制星形胶质细胞活性、减少脊髓内细胞凋亡现象,利于损伤区域内神经细胞存活、阻止脊髓组织内形成神经胶质瘢痕,恢复动物肢体感觉及运动功能,重建脊髓组织形态结构。

【关键词】 吲哚-3-丙酸;脊髓损伤;降钙素基因相关肽;突触素;保护

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 08-1012-09

Neuroprotective effect and mechanism of indole-3-propionic acid in acute rat spinal cord injury

XU Jiwei¹, SUN Danhua^{1*}, CHEN Xudong¹, WANG Ning¹, SUN Haoye²

【基金项目】 河南省科技厅科技攻关项目(182102310083),漯河医学高等专科学校2022年度科技创新项目(2022KJZD19)。

Funded by the Science and Technology Project of Henan Science and Technology Department (182102310083), 2022 Annual Science and Technology Innovation Project of Luohe Medical College (2022KJZD19).

【作者简介】 徐纪伟(1984—),男,副教授,研究方向:脊髓损伤与修复。Email: xjwabc@163.com

【通信作者】 孙丹华(1983—),女,副教授,研究方向:脊髓损伤与修复。Email: danhua6699@126.com

(1. Faculty of Basic Medicine, Luohe Medical College, Luohe 462000, China.
2. Third Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462000)
Corresponding author: SUN Danhua. E-mail: danhua6699@126.com

【Abstract】 Objective To measure the expression levels of CGRP, Syn, GFAP, Caspase 3, and IL-1 β after indole-3-propionic acid treatment of rats with spinal cord injury, and investigate the effect and mechanism of indole-3-propionic acid in motor and sensory functions in rats. **Methods** A total of 105 SD rats were randomly divided into three groups: sham operation, normal saline, and indole-3-propionic acid. The spinal cord injury model was established by striking the spinal cord with heavy objects, and then indole-3-propionic acid was injected into the abdomen. On days 1 and 3 day, and weeks 1 ~ 4, an incline plate test, BBB score, and tail dump test were performed to evaluate changes in motor and sensory functions of rats. Expression of CGRP, Syn, GFAP, Caspase 3, and IL-1 β in the spinal cord of rats at each time point was detected by immunofluorescence and Western Blot. Coexpression of CGRP with GAP43 and Necab2 was observed by double immunofluorescence. **Results** (1) The inclined plate test and BBB scores of the indole-3-propionic acid group were significantly higher than those of the normal saline group ($P < 0.05$). The latency of the tail flick test in the indole-3-propionic acid group was significantly higher than that in the normal saline group from day 3 after the operation, and returned to almost normal at week 3 after the operation ($P < 0.05$). (2) CGRP and Syn-positive cells reached a peak in normal saline and indole-3-propionic acid groups at week 2 after the operation, and significantly more cells were observed in the indole-3-propionic acid group than in the normal saline group ($P < 0.05$). GFAP-positive cells in saline and indole-3-propionic acid groups reached a peak at week 2 after the operation and then decreased, but the number of cells in the indole-3-propionic acid group was significantly lower than that in the normal saline group ($P < 0.05$). Caspase 3-positive cells in indole-3-propionic acid and normal saline groups decreased gradually after the operation, and the number of caspase 3-positive cells in the indole-3-propionic acid group was significantly lower than that in the normal saline group ($P < 0.05$). (3) At week 2 after the operation, CGRP and GAP43 were obviously coexpressed, and CGRP and Necab2 were complementary in adjacent cells. (4) At week 2 after the operation, CGRP and Syn expression in the indole-3-propionic acid group was significantly higher than that in the normal saline group, while GFAP, Caspase 3, and IL-1 β protein expression was significantly lower than that in the normal saline group ($P < 0.05$). **Conclusions** A high dose of indole-3-propionic acid after spinal cord injury significantly enhanced the expression levels of CGRP and Syn, and CGRP was complementary to Necab2 and coexpressed with GAP43, which is beneficial to the calcium ion balance, regeneration, and synaptic remodeling. By inhibiting expression of GFAP, Caspase 3, and IL-1 β in the spinal cord, the tissue inflammatory response to injury was reduced, astrocyte activity was inhibited, and apoptosis in the spinal cord was reduced, which was beneficial to the survival of nerve cells in the injured area, preventing the formation of glial scars in spinal cord tissue, restoring the sensory and motor functions of limbs, and rebuilding the morphological structure of spinal cord tissue.

【Keywords】 IPA; spinal cord injury; CGRP; Syn; protect
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

脊髓一旦损伤就会造成神经传导功能的部分或完全丧失,导致患者出现截瘫、四肢瘫等症状,累及呼吸、泌尿等系统,甚至危及生命。吲哚-3-丙酸(indole-3-propionic acid, IPA)是一种肠道菌群产生的代谢产物,可通过细胞膜蛋白转运或直接扩散至血液、外周组织和大脑中,减轻炎性浸润、增强病原菌抗性、改善胰岛素抵抗、抑制氧化应激等方式,对肿瘤发生、肠道疾病、代谢性疾病、辐射损伤、肝疾病有重要意义^[1-3]。近年来研究发现 IPA 能够穿透神经系统血脑屏障、促进细胞增殖分化、调节胶质细胞活性,在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,

AD)、亨廷顿病(Huntington's disease, HD)、抑郁症、脑缺血缺氧损伤等神经系统疾病中也有重要作用^[4-5],但尚未见将其应用于急性脊髓损伤的研究报道。根据 IPA 对神经系统具有减轻组织炎症反应、促进细胞增殖分化、调节胶质细胞活性的作用,通过制作大鼠急性脊髓损伤模型,然后腹腔注射给予 IPA 观测动物模型的变化,检查脊髓内 CGRP、Syn、GFAP、Caspase3、IL-1 β 表达变化,对大鼠进行 BBB 运动功能评分、斜板实验和甩尾实验评估,探讨 IPA 改善大鼠肢体运动功能及感觉功能的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

105 只 SPF 级的健康雌性大鼠,7 周龄,体重 180 ~ 200 g,在河南省实验动物中心提供【SCXK(豫)2022-0001】,动物饲养条件:每只大鼠提供 12 h 光照与 12 h 黑暗昼夜光照变化周期,自由获取高压消毒灭菌水和固态食物,饲养环境保持安静、防止噪音、整洁干净,(20 ± 2)℃ 和 $60\% \pm 5\%$ 湿度,由河南省实验动物中心饲养【SYXK(豫)2018-0007】。严格遵循实验动物使用的 3R 原则,并经漯河医学高等专科学校医学伦理委员会批准(LYZLLSC2022032602)。

1.1.2 主要试剂与仪器

IPA(源叶生物科技公司,830966);CGRP 抗体(博士德生物公司,M04247);GFAP 抗体(Santa Cruz,sc33673);Caspase3 抗体(Bioss,bsm33199M);IL-1 β 抗体(博奥森生物公司,AH11087750);Necab2 抗体(Proteintech Group,122571AP);GAP43 抗体(博士德生物公司,BA0878)。荧光显微镜(尼康 TS-100F,日本),垂直凝胶电泳仪(六一仪器 DY CZ-24D,中国),低温高速离心机(赛默飞 IECCL31R,美国)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

105 只 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组、生理盐水组和吡啶-3-丙酸组,每组 35 只,注意选取的大鼠体重均匀、单独鼠笼饲养、环境基本相同。动物实验操作处置符合国家科技主管部门制定的实验动物护理和使用指导意见。

1.2.2 造模及给药

采用腹腔注射戊巴比妥钠(按照 30 mg/kg 计算)麻醉大鼠,然后呈俯卧位趴在动物手术台上,四肢和牙齿用橡皮筋固定,剪除背毛、消毒及铺巾,沿背部正中剪开皮肤,逐层钝性分离皮下组织、骨膜组织及肌肉组织,暴露胸 9 ~ 10 节段,用咬骨钳去除胸椎棘突和椎板,露出硬脊膜和脊髓。对生理盐水组和吡啶-3-丙酸组的大鼠,使用 10 g 冲击棒从 30 mm 高处自由坠落击打暴露脊髓节段,成功实施钝挫伤大鼠脊髓操作,而对假手术组的大鼠,只咬

除胸 9 ~ 10 节段的棘突和椎板,充分露出硬脊膜和脊髓组织^[6],随即药物止血并逐层缝合手术切口。术后大鼠放置在加热垫上苏醒恢复,每天 3 次膀胱护理,一直到能自主排尿功能恢复,随后改为常规护理喂养。术后 1 周内,每天注射青霉素(按照 2×10^4 U/kg 计算),每天 2 次。手术后 1 周内,吡啶-3-丙酸组按 25 mg/kg 剂量腹腔注射 IPA^[7],生理盐水组按照同等的量腹腔注射 0.9% NaCl 溶液,每天 1 次。

1.2.3 运动及感觉功能评价

术后第 1、3 天、1 周、2 周、3 周、4 周,取大鼠进行 BBB 运动功能评分、斜板实验和甩尾实验。BBB 是评估后肢关节的活动度、爪的精细动作、肢体的协调性及稳定性,术后第 1、3 天、1 周、2 周、3 周、4 周大鼠放在直径为 1 m 的圆形开放空间,观察评定大鼠肢体的运动功能情况,完全瘫痪的大鼠记为 0 分,正常为 21 分^[8]。斜板实验是大鼠头朝前,身体纵轴与斜板纵轴垂直放置,升高或降低斜板 5°,同时大鼠能够停留 5 s,记录出现此种情况最大斜板角度。甩尾实验是将大鼠放入固定器,暴露尾部用光辐照,辐照部位固定在尾部的中、下 1/3 处,记录从光照射开始到出现甩尾反应的时间^[9]。

1.2.4 免疫荧光染色观察

术后各小组在第 1、3 天、1 周、2 周、3 周、4 周均取 5 只大鼠,麻醉后,依次分别灌注 250 mL 的生理盐水和 4% 多聚甲醛,收集胸 9 ~ 10 节段的神经组织,进行石蜡切片。切片分别滴加 CGRP、Syn、GFAP 等特异性蛋白标记抗体,置 4℃ 冰箱过夜,PBS 缓冲液漂洗 3 次 $\times$ 5 min,加对应的 TRITC 或 FITC 标记荧光二抗,置 37℃ 温箱避光孵育 1 h,PBS 缓冲液漂洗 3 次 $\times$ 5 min,滴加缓冲甘油封片剂后,在荧光显微镜下观察计数。

1.2.5 免疫蛋白印迹检测

术后 2 周各小组均取 5 只大鼠,取胸 9 ~ 10 段上下各 0.5 cm 脊髓组织,放置冰上充分研磨匀浆,随即低温高速离心 15 min,弃沉淀物取上清液,置入 EP 管待用。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳 SDS-PAGE 分离蛋白,并转移至 PVDF 膜上等待检测。先分别滴加 CGRP 抗体、Syn 抗体、GFAP 抗体、Caspase3 抗体、IL-1 β 抗体,4℃ 冰箱过夜,PBS 缓冲液漂洗 3 次,再滴加对应的生物素化二抗,放置室温 20℃ 孵育

2 h, PBS 缓冲液漂洗 3 次 × 5 min, 滴加 ABC 试剂在暗环境下显色, 重复操作 3 次, 测定目的蛋白/ β -actin 的吸光度值。

1.3 统计学分析

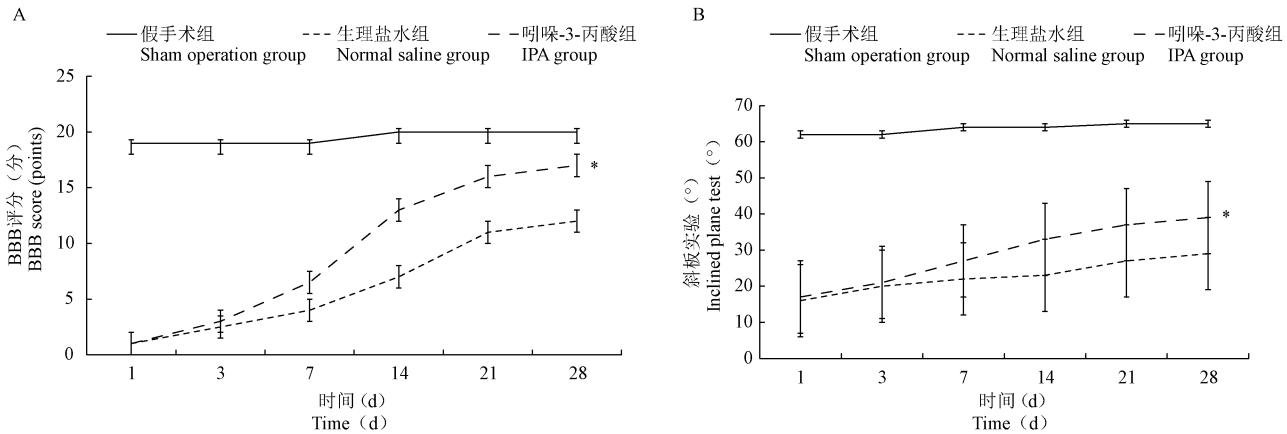
应用 SPSS 20.0 统计软件分析处理。多组间数据比较采用单因素方差分析, 组内数据比较采用配对 t 检验, 实验结果以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表

示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 运动功能评价

斜板实验与 BBB 评分结果表明, 从术后第 1 周到术后第 4 周 IPA 组的两种运动功能测试结果均明显高于生理盐水组 ($P < 0.05$) (见图 1)。



注: 与生理盐水组相比, * $P < 0.05$ 。(下同图)

图 1 三组运动功能评价结果比较 ($n = 30$)

Note. Compared with normal saline group, * $P < 0.05$. (The same in the following figures)

Figure 1 Comparison of motor function among the three groups ($n = 30$)

2.2 感觉功能评价

甩尾实验检测结果表明, 从术后第 3 天起 IPA 组潜伏期明显高于生理盐水组, 且到术后第 2 周 IPA 组潜伏期基本恢复正常 ($P < 0.05$) (见图 2)。

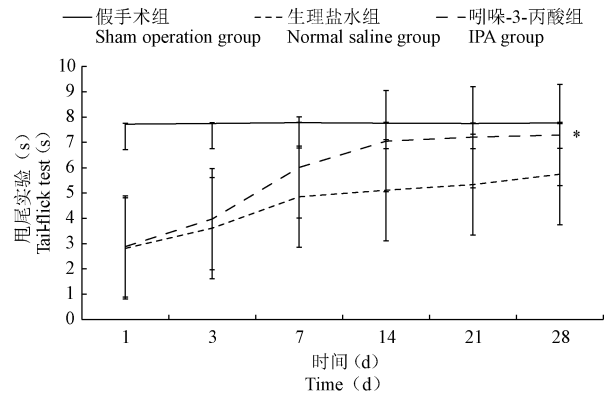


图 2 三组甩尾实验结果比较 ($n = 30$)

Figure 2 Comparison of tail dump test among the three groups ($n = 30$)

2.3 免疫荧光染色观察

免疫荧光染色结果表明, 假手术组发现大量 CGRP、Syn 阳性细胞和少量 Caspase3、GFAP 阳性细

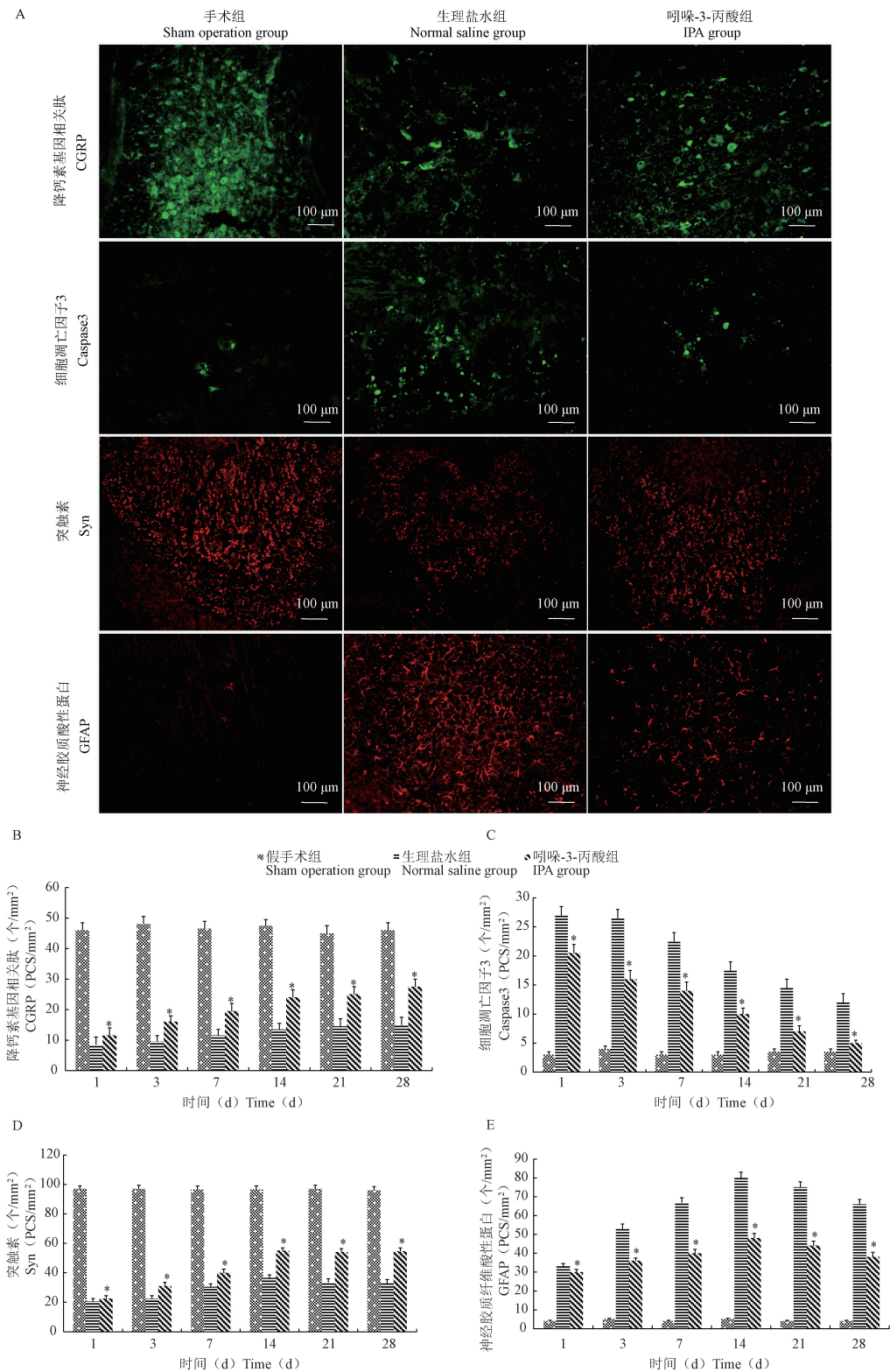
胞; 术后生理盐水组和 IPA 组 CGRP、Syn 阳性细胞均出现大量减少, 随后两组 CGRP、Syn 阳性细胞开始逐渐增多, 到术后第 2 周就已达高峰, 且 IPA 组 CGRP、Syn 表达水平明显高于生理盐水组 ($P < 0.05$); 生理盐水组和 IPA 组 GFAP 阳性细胞随时间延长逐渐增多, 且到术后第 2 周就已达高峰, 之后表达水平才有所下降, 但 IPA 组 GFAP 表达水平明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$); 术后第 1 天 IPA 组和生理盐水组均大量出现 Caspase3 阳性细胞, 随后两组表达出现逐渐减少, 且 IPA 组明显少于生理盐水组 ($P < 0.05$) (见图 3)。

2.4 免疫荧光双标观察

IPA 组发现脊髓损伤后第 2 周 CGRP 与 GAP43 明显共表达, CGRP 与 Necab2 在邻近细胞呈现互补表达 (见图 4)。

2.5 Western Blot 检测

免疫印记结果显示, 术后第 2 周 IPA 组的 CGRP、Syn 表达明显高于生理盐水组 ($P < 0.05$), 术后第 2 周 GFAP、Caspase3、IL-1 β 表达明显低于生理盐水组 ($P < 0.05$) (见图 5)。

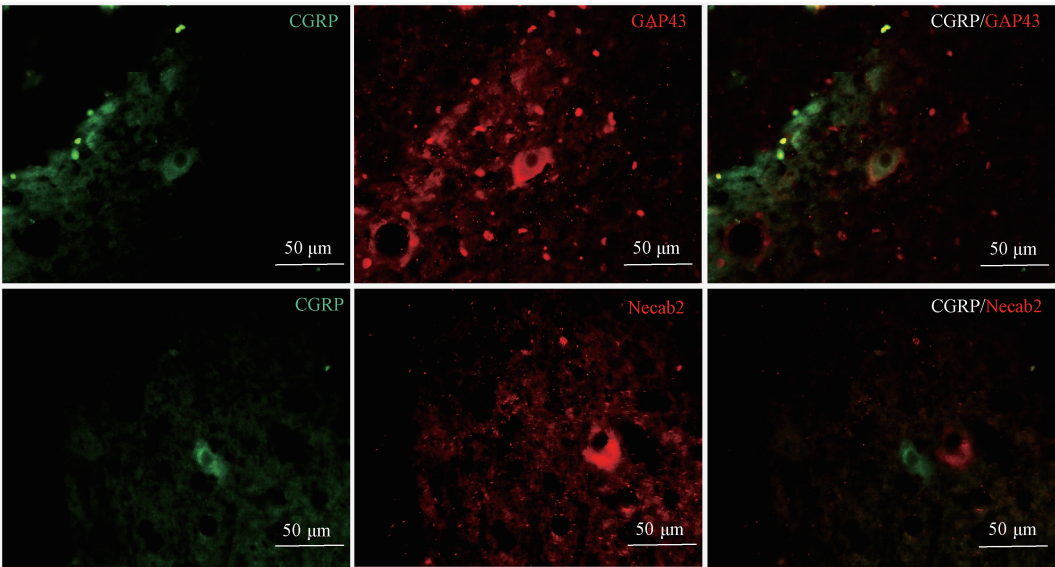


注：A：CGRP、Syn、GFAP、Caspase3 免疫荧光染色；B：CGRP 阳性细胞比较；C：Caspase3 阳性细胞比较；D：Syn 阳性细胞比较；E：GFAP 阳性细胞比较。

图 3 术后 2 周 CGRP、Syn、GFAP、Caspase3 蛋白表达变化($n = 30$)

Note. A. CGRP, Syn, GFAP, Caspase3 immunofluorescence staining. B. Comparison of CGRP positive cells. C. Comparison of Caspase3 positive cells. D. Comparison of Syn positive cells. E. Comparison of three groups of GFAP positive cells.

Figure 3 Changes of CGRP, Syn, GFAP, Caspase3 protein expression at 2 weeks($n = 30$)



注:CGRP:细胞质内呈绿色;GAP43,Necab2:细胞质内呈红色。
图 4 术后 2 周 CGRP/GAP43、CGRP/Necab2 免疫荧光双标染色观察

Note. CGRP. Cytoplasm is green. GAP43, Necab2. Cytoplasmic is red.
Figure 4 CGRP/GAP43 and CGRP/Necab2 immunofluorescence double staining were observed after SCC at 2 weeks

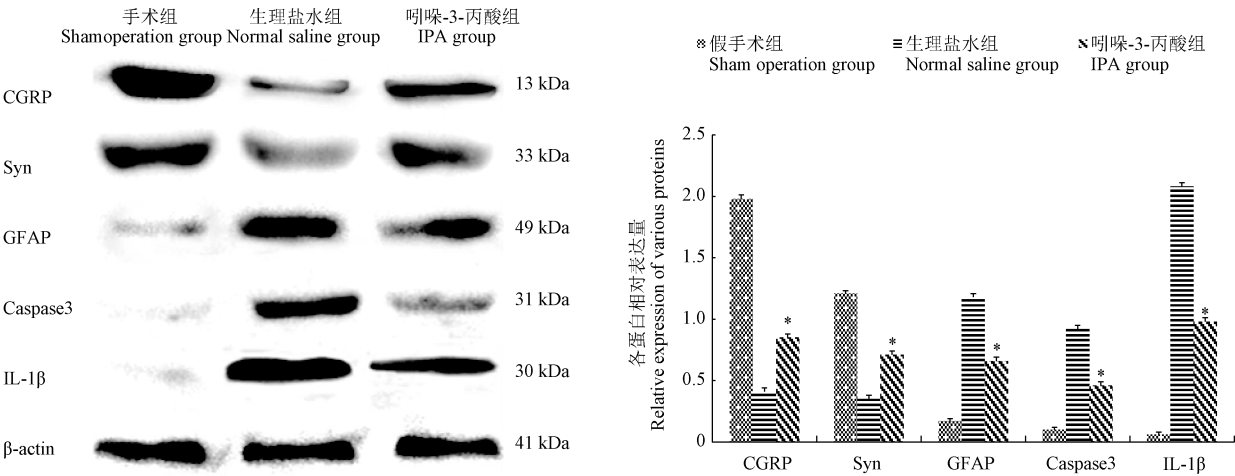


图 5 免疫印迹检测术后 2 周 CGRP、Syn、GFAP、Caspase3、IL-1β 蛋白表达
Figure 5 CGRP, Syn, GFAP, Caspase3 and IL-1β expression by Western Blot after SCC at 2 weeks

3 讨论

IPA 主要是由肠道细菌产生的一种色氨酸代谢产物,还是孕烷 X 受体 (PXR) 或芳烃受体 (AhR) 的内源性配体^[10],具有穿透神经系统血脑屏障、减轻组织炎症反应、促进细胞增殖分化、调节胶质细胞活性、抑制氧化应激的作用,对肿瘤发生、肠道疾病、代谢性疾病、辐射损伤、肝疾病及神经系统疾病有重要意义。

本实验发现脊髓损伤后大剂量应用 IPA 能明显增强 CGRP、Syn 蛋白表达水平,同时发现 CGRP

与 GAP43 出现共表达现象,而 CGRP 与 Necab2 在邻近细胞呈现互补表达,BBB 评分、斜板实验和甩尾实验均表明动物肢体感觉及运动功能出现明显恢复。推测这是因为 IPA 可以通过结合转录因子孕烷 X 受体,促使乙酰辅酶 A 结合蛋白 (ACBP, 又称 DBI) 表达,不仅促进神经细胞增殖分化,增强神经轴突再生修复能力^[11-15],还可促进 Syn 大量表达有利于神经突触分化发育,提升突触信号传递及神经冲动传导效率;已有研究发现 IPA 可以通过激活 MTR1/PGC-1α 信号通路,明显上调 UCP2 基因转录水平、显著抑制 ROS 大量生成,积极改善线粒体结

构与维持内稳态^[16],促进神经生长蛋白 GAP43 大量表达,增强神经细胞轴突再生修复功能,重建脊髓内神经纤维形态结构,抑制由氧化应激所引发的细胞凋亡现象。已有实验表明脑和脊髓损伤后采取针刺康复介入治疗后 CGRP 出现大量表达,通过抑制兴奋性谷氨酸的释放,改变细胞膜钙通道蛋白结构,降低对低钙离子的通透性,进而阻止谷氨酸介导的钙离子内流,从而维持细胞内外钙离子的平衡,阻止脊髓组织出现钙超载现象^[17-18],另外研究还发现脊髓损伤后 NECAB2 与 CGRP 发挥协同作用,共同调节神经突触内谷氨酸转运平衡,以免谷氨酸过度释放造成兴奋性中毒,进而有利于神经突触发育重塑,提升神经突触传递信息效率,增强神经细胞的突起生长率及神经细胞轴浆运输能力,与其他营养因子共同调节轴突再生修复^[19]。

此外现有研究还发现高浓度的 IPA 可以减少中枢神经系统 S100b 表达,降低神经胶质细胞中钙离子的浓度,促进神经细胞增殖与分化,抑制星形胶质细胞活化,上调抗细胞凋亡因子 Bcl-2 水平,抑制神经 NLRP3 炎性小体激活,减少神经组织内炎症介质 IL-1 β 分泌水平^[20-22]。IPA 已被证明是 β -淀粉样蛋白原纤维形成的抑制剂,显著抑制内质网应激和随后的神经元细胞死亡,是针对多种氧化毒素的有效神经保护剂^[23-24]。在大脑皮层神经元中应用 nAChR 和 L 型 HVCC 拮抗剂抑制可以减少 DBI 表达,观察到 DBI (ACBP) 表达与钙离子变化有关联性^[25]。大剂量使用 IPA 治疗有机磷杀虫剂 CPF 引起的神经损伤,明显增强 GST、CAT、SOD、GPX、TSH 及 GSH 水平,通过提高动物大脑和小脑组织中的硫氧还蛋白水平和硫氧还蛋白还原酶活性,增强体内胆碱能和氧化还原调节系统功能,抑制炎症应激、半胱天冬酶激活和 DNA 损伤^[7]。IPA 不仅能够大量清除体内的活性氧,而且还可以与抗氧化剂谷胱甘肽在细胞内协同发挥作用,更不会转化为具有促氧化作用的反应性中间体^[26]。IPA 还能减轻由缺血缺氧所引起的神经细胞损伤,有效缓解辐射造成的胃肠道损伤和肠道菌群变化^[2]。糖氧剥夺离体脑缺血模型中 IPA 通过激活 PXR/ACBP 信号,显著抵消连接蛋白的减少,并下调 p-I κ B- α 、p-NF- κ B 水平,减轻脑内炎症反应引发的组织损伤^[27-28]。根据目前研究及本实验进一步表明,脊髓损伤后大剂量应用 IPA,不仅通过 PXR/ACBP 信号通路促进神经细胞增殖与分化,还可通

过 MTR1/PGC1 α 途径稳定线粒体功能,明显有利于 CGRP、Syn 大量表达,且 CGRP 能够与 GAP43 共表达、与 Necab2 互补表达,稳定了细胞内外的钙离子浓度,利于神经突起的再生修复,诱导神经突触分化发育,最终能够恢复肢体感觉及运动功能。

本实验发现脊髓损伤后大剂量应用 IPA 能明显降低 GFAP、Caspase3、IL-1 β 蛋白表达水平,减轻组织内的炎症损伤反应、减少细胞发生凋亡现象、阻止脊髓形成神经胶质瘢痕。推测这是 IPA 通过促进抗炎细胞因子 IL-10 的大量释放,抑制 A1 型反应性星形胶质细胞的活化,降低肿瘤坏死因子 TNF- α 、白细胞介素 IL-1 α 和血清补体 C1q 表达水平,减少神经胶质纤维酸性蛋白 GFAP 表达^[29-30],进而阻止脊髓组织形成神经胶质瘢痕;IPA 还可以通过抑制脂质过氧化,降低谷胱甘肽及其过氧化物酶的表达水平,进而减少凋亡因子 Caspase 3 和 Bax 的表达水平^[5],阻止神经细胞出现大量凋亡现象,有利于损伤区域内神经细胞存活;IPA 通过抑制核转录因子 NF- κ B 信号传导途径,下调白细胞、巨噬细胞促炎性基因转录水平,减少白细胞介素 IL-1 β 和 IL-18 大量产生,抑制损伤区域氧化应激、减轻组织细胞炎症反应^[31-32]。现有研究发现 IPA 治疗自身免疫性脑脊髓炎小鼠降低星形胶质细胞中的 Ccl2、Nos2 表达,通过与 I 型干扰素联合作用激活 AHR 信号以控制神经炎症^[33]。IPA 在短暂性前脑缺血模型鼠的海马 CA1 区,通过降低神经胶质纤维酸性蛋白 GFAP、酸性钙结合蛋白 S100、小胶质细胞 Iba1 和植物凝集素 IB4 的表达水平,进而发挥神经保护作用及其抗氧化作用^[20]。

此外还有研究发现 IPA 对大鼠脂肪性肝炎有明显治疗效果:一是诱导紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达,维持肠道粘膜上皮细胞的稳态,降低血浆内毒素水平;二是抑制 NF- κ B 信号传导途径,减少炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达水平,减轻肝炎炎症反应程度,最终通过抑制肠道菌群失调和内毒素渗漏,缓解脂肪性肝炎造成的损伤^[34]。脓毒症脑病中 IPA 通过 AHR 介导的机制,显著抑制脂多糖刺激的小胶质细胞中 NLRP3 炎性体激活,减少 IL-1 β 分泌,减轻了小鼠的焦虑和空间记忆障碍^[35]。IPA 可以穿过血脑屏障并调节星形胶质细胞激活和神经炎症,还可以抑制内质网应激诱导的神经元死亡,减少脑脊髓炎小鼠的神经炎症,这些研究表明 IPA 对神经元具有保护作用^[36]。根据目

前研究及本实验进一步证实,脊髓损伤后大剂量应用 IPA,一是可以通过抑制核转录因子 NF- κ B 信号传导途径,阻止脊髓内出现脂质过氧化现象,减轻神经组织内的炎症损伤反应程度,抑制神经细胞出现大量凋亡的现象,二是可以通过抑制 A1 型反应性星形胶质细胞的活化,防止脊髓内部形成神经胶质瘢痕,改善了脊髓损伤部位的微环境,利于神经细胞存活及增殖,促进神经突起再生修复,进而重建脊髓组织形态结构。

总之,脊髓损伤后大剂量应用吲哚-3-丙酸能明显增强 CGRP、Syn 表达水平,且 CGRP 与 Necab2 互补表达、而与 GAP43 共表达,有利于钙离子平衡、突起再生和突触重塑,通过抑制脊髓内 GFAP、Caspase3、IL-1 β 表达水平,减轻组织炎症损伤反应、抑制星形胶质细胞活性、减少脊髓内细胞凋亡现象,利于损伤区域内神经细胞存活、阻止脊髓组织内形成神经胶质瘢痕,恢复动物肢体感觉及运动功能,重建脊髓组织形态结构。但是目前关于 IPA 对急性脊髓损伤治疗只是处于实验研究阶段,免疫荧光双标 CGRP 与 Necab2、GAP43 的表达结果,提示其有利于突起再生及突触重建,但还需要免疫沉淀进一步证实蛋白之间的协同作用,同时对于脊髓损伤的临床应用效果仍需后续进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Alexeev EE, Lanis JM, Kao DJ, et al. Microbiota-derived indole metabolites promote human and murine intestinal homeostasis through regulation of interleukin-10 receptor [J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(5): 1183–1194.
- [2] Dodd D, Spitzer MH, van Treuren W, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites [J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 648–652.
- [3] Carpino G, Del Ben M, Pastori D, et al. Increased liver localization of lipopolysaccharides in human and experimental NAFLD [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 470–485.
- [4] Roager HM, Licht TR. Microbial tryptophan catabolites in health and disease [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3294.
- [5] 刘菲. 吲哚丙酸 (IPA) 对四氯化碳 (CCl₄) 诱导的小鼠肝纤维化的作用及机制研究 [D]. 泸州: 西南医科大学; 2021.
Liu F. The effect and mechanism of indole propionic acid (IPA) on carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver fibrosis in mice [D]. Luzhou: Southwest Medical University; 2021.
- [6] 李沁轩, 王一枝, 徐艳, 等. 地塞米松联合雌激素干预脊髓钝挫伤大鼠白细胞介素 6、Caspase3 和 Bcl-2 的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(17): 2680–2685.
Li QX, Wang YZ, Xu Y, et al. Effects of dexamethasone combined with estrogen on the expression of interleukin-6, Caspase3 and Bcl-2 after spinal cord contusion in rats [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2020, 24(17): 2680–2685.
- [7] Owumi SE, Adedara IA, Oyelere AK. Indole-3-propionic acid mitigates chlorpyrifos-mediated neurotoxicity by modulating cholinergic and redox-regulatory systems, inflammatory stress, apoptotic responses and DNA damage in rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2022, 89: 103786.
- [8] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1–21.
- [9] 黄帅杰. 督脉电针联合跑台训练对脊髓损伤大鼠功能恢复的研究 [D]. 昆明: 云南师范大学; 2020.
Huang SJ. Investigation on the functional recovery of spinal cord injury in rats by du meridian electroacupuncture combined with treadmill training [D]. Kunming: Yunnan Normal University; 2020.
- [10] 林俊, 杜蕾, 齐仁立. 色氨酸及其代谢物调控肌肉生长发育的研究进展 [J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58(6): 21–25.
Lin J, Du L, Qi RL. Research progress of tryptophan and its metabolites in regulating muscle growth and development [J]. *Chin J Anim Sci*, 2022, 58(6): 21–25.
- [11] 肖惠文. 肠道微生物代谢产物吲哚丙酸缓解放电离辐射损伤的机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院; 2020.
Xiao HW. Gut microbiota-derived indole 3-propionic acid protects against ionizing radiation-induced toxicity [D]. Beijing: Peking Union Medical College; 2020.
- [12] Venkatesh M, Mukherjee S, Wang H, et al. Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4 [J]. *Immunity*, 2014, 41(2): 296–310.
- [13] Dumitru I, Neitz A, Alfonso J, et al. Diazepam binding inhibitor promotes stem cell expansion controlling environment-dependent neurogenesis [J]. *Neuron*, 2017, 94(1): 125–137.
- [14] Bloksgaard M, Neess D, Færgeman NJ, et al. Acyl-CoA binding protein and epidermal barrier function [J]. *Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipids*, 2014, 1841(3): 369–376.
- [15] Serger E, Luengo-Gutierrez L, Chadwick JS, et al. The gut metabolite indole-3 propionate promotes nerve regeneration and repair [J]. *Nature*, 2022, 607(7919): 585–592.
- [16] Li S, Zhao X, Lin F, et al. Gut flora mediates the rapid tolerance of electroacupuncture on ischemic stroke by activating melatonin receptor through regulating indole-3-propionic acid [J]. *Am J Chin Med*, 2022, 50(4): 979–1006.
- [17] 郭蜜, 向建琴, 魏连海, 等. 电针督脉对脊髓损伤大鼠脊髓损伤区降钙素基因相关肽与 Nod 样受体蛋白 3 表达的影响 [J]. *针刺研究*, 2021, 46(8): 679–683.
Guo M, Xiang JQ, Wei LH, et al. Effect of electroacupuncture of “Zhiyang” (GV9) and “Jizhong” (GV6) on expression of CGRP and NLRP3 in rats with spinal cord injury [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(8): 679–683.
- [18] 全莉娟, 陈晓, 王珺, 等. 早期康复介入对脑损伤幼鼠的行为学及其体内降钙素基因相关肽表达的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32(10): 1114–1118.

- Quan LJ, Chen X, Wang J, et al. Effects of early rehabilitation on the behavior and expression of calcitonin gene-related peptide in neonatal rats with brain damage [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2017, 32(10): 1114–1118.
- [19] 徐纪伟, 孙丹华, 陈旭东. 神经元型钙结合蛋白 2 在大鼠脊髓损伤后表达及神经修复功能 [J]. *中国老年学杂志*, 2022, 42(19): 4774–4778.
- Xu JW, Sun DH, Chen XD. Expression of neuronal calcium-binding protein 2 and its neural repair function after spinal cord injury in rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(19): 4774–4778.
- [20] 段科科, 刘时璋. S100 β 蛋白与脊髓损伤相关性研究进展 [J]. *陕西医学杂志*, 2020, 49(6): 766–769.
- Duan KK, Liu SZ. Research progress on correlation between S100 β protein and spinal cord injury [J]. *Shaanxi Med J*, 2020, 49(6): 766–769.
- [21] Hwang IK, Yoo KY, Li H, et al. Indole-3-propionic acid attenuates neuronal damage and oxidative stress in the ischemic hippocampus [J]. *J Neurosci Res*, 2009, 87(9): 2126–2137.
- [22] Fernández-López L, Molina-Carballo A, Cubero-Millán I, et al. Indole tryptophan metabolism and cytokine S100B in children with attention-deficit/hyperactivity disorder: daily fluctuations, responses to methylphenidate, and interrelationship with depressive symptomatology [J]. *J Child Adolesc Psychopharmacol*, 2020, 30(3): 177–188.
- [23] Bendheim PE, Poeggeler B, Neria E, et al. Development of indole-3-propionic acid (OXIGON) for Alzheimer's disease [J]. *J Mol Neurosci*, 2002, 19(1–2): 213–217.
- [24] Mimori S, Kawada K, Saito R, et al. Indole-3-propionic acid has chemical chaperone activity and suppresses endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 517(4): 623–628.
- [25] Katsura M, Ohkuma S. Functional proteins involved in regulation of intracellular Ca²⁺ for drug development: chronic nicotine treatment upregulates L-type high voltage-gated calcium channels [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 97(3): 344–347.
- [26] Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation [J]. *Nature*, 2012, 487(7408): 477–481.
- [27] Zhao Q, Chen T, Ni C, et al. Indole-3-propionic acid attenuates HI-related blood-brain barrier injury in neonatal rats by modulating the PXR signaling pathway [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2022, 13(19): 2897–2912.
- [28] Xiao HW, Cui M, Li Y, et al. Gut microbiota-derived indole 3-propionic acid protects against radiation toxicity via retaining acyl-CoA-binding protein [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 69.
- [29] Xie Y, Zou X, Han J, et al. Indole-3-propionic acid alleviates ischemic brain injury in a mouse middle cerebral artery occlusion model [J]. *Exp Neurol*, 2022, 353: 114081.
- [30] Aoki R, Aoki-Yoshida A, Suzuki C, et al. Indole-3-pyruvic acid, an aryl hydrocarbon receptor activator, suppresses experimental colitis in mice [J]. *J Immunol*, 2018, 201(12): 3683–3693.
- [31] Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 8(2): 108–118.
- [32] Beaumont M, Neyrinck AM, Olivares M, et al. The gut microbiota metabolite indole alleviates liver inflammation in mice [J]. *FASEB J*, 2018, 32(12): 201800544.
- [33] Rothhammer V, Mascalfroni ID, Bunse L, et al. Type I interferons and microbial metabolites of tryptophan modulate astrocyte activity and central nervous system inflammation via the aryl hydrocarbon receptor [J]. *Nat Med*, 2016, 22(6): 586–597.
- [34] Zhao ZH, Xin FZ, Xue Y, et al. Indole-3-propionic acid inhibits gut dysbiosis and endotoxin leakage to attenuate steatohepatitis in rats [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(9): 1–14.
- [35] Fang H, Wang Y, Deng J, et al. Sepsis-induced gut dysbiosis mediates the susceptibility to Sepsis-associated encephalopathy in mice [J]. *mSystems*, 2022, 7(3): e0139921.
- [36] Morita I, Kawamoto M, Yoshida H. Difference in the concentration of tryptophan metabolites between maternal and umbilical foetal blood [J]. *J Chromatogr*, 1992, 576(2): 334–339.

[收稿日期] 2023-02-23