

DOI:10.13350/j.cjpb.250809

• 论著 •

丹参酮 IIA 通过调控 PI3K/AKT/GIT1 通路对脊髓损伤大鼠运动功能及肠道菌群的影响*

王雪莹, 温明圆, 张晶, 程越, 李晓龙, 徐明远**

(黑龙江中医药大学附属第一医院药剂科, 黑龙江哈尔滨 150040)

【摘要】 **目的** 探究丹参酮 IIA 对脊髓损伤(SCI)大鼠运动功能及肠道菌群的影响及其具体作用机制。 **方法** 将大鼠分为假手术(Sham)组、SCI组、丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组,除 Sham 组外,其他各组均通过改良的 Allen 法构建大鼠 SCI 模型。Basso、Beattie、Bresnahan(BBB)运动功能评分量表、斜板实验评估各组大鼠运动功能;试剂盒检测各组大鼠血清中内毒素(LSP)、D-乳酸(D-LA)、二胺氧化酶(DAO)水平;HE 染色法和 PAS 染色法观察大鼠脊髓和小肠组织病理变化情况;TUNEL 法检测大鼠脊髓组织细胞凋亡情况;ELISA 法检测各组大鼠脊髓组织中白细胞介素(IL)-1 β 、白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;肠道内容物培养实验检测各组大鼠肠道菌群数量;Western blot 实验检测磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/G 蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白 1(GIT1)通路相关蛋白表达。 **结果** Sham 组大鼠脊髓神经元及小肠黏膜结构均正常;与 Sham 组相比,SCI 组大鼠脊髓神经元减少伴空洞形成及炎性浸润,同时小肠绒毛萎缩、杯状细胞减少,BBB 评分、滑落的最大角度、乳酸杆菌数量、p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量明显降低($P<0.05$),细胞凋亡率、LSP、D-LA、DAO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、大肠埃希菌和肠球菌数量均明显升高($P<0.05$);与 SCI 组相比,丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组大鼠脊髓和小肠组织损伤显著改善,炎性浸润缓解,杯状细胞数量增加;BBB 评分、滑落的最大角度、乳酸杆菌数量、p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量明显升高($P<0.05$),细胞凋亡率、LSP、D-LA、DAO、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、大肠埃希菌和肠球菌数量均明显降低($P<0.05$);丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组以上各指标变化趋势与丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组相反($P<0.05$)。 **结论** 丹参酮 IIA 通过激活 PI3K/AKT/GIT1 通路增强 SCI 大鼠运动功能,改善肠道屏障受损和肠道菌群紊乱。

【关键词】 丹参酮 IIA;PI3K/AKT/GIT1 通路;脊髓损伤;肠道菌群

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2025)08-1016-06

[Journal of Pathogen Biology. 2025 Aug.;20(08):1016-1021,1027.]

The effect of tanshinone IIA on motor function and gut microbiota in rats with spinal cord injury by regulating the PI3K/AKT/GIT1 pathway

WANG Xueying, WEN Mingyuan, ZHANG Jing, CHENG Yue, LI Xiaolong, XU Mingyuan

(Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)***

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects and specific mechanisms of salvianolic acid IIA on motor function and gut microbiota in rats with spinal cord injury (SCI). **Methods** Rats were assigned into sham surgery (Sham) group, SCI group, tanshinone IIA group, tanshinone IIA + pLVX-sh-NC group, and tanshinone IIA + pLVX-sh-PI3K group. Except for the Sham group, all other groups constructed rat SCI models using the modified Allen method. The Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) motor function rating scale and inclined plate test were used to evaluate the motor function of rats. The reagent kit was used to detect the levels of endotoxin (LSP), D-lactate (D-LA), and diamine oxidase (DAO) in the serum of rats in each group. HE staining and PAS staining were used to observe the pathological changes in the spinal cord and small intestine tissues of rats. TUNEL staining was used to detect apoptosis in rat spinal cord tissue cells. ELISA method was used to detect the interleukin (IL)-1 β , interleukin-6, and tumor necrosis factor- α in the spinal cord tissues of rats in each group. Detecting the number of gut microbiota in each group of rats by cultivating gut contents. Western blot experiments were used to detect the proteins related to the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein

* **【基金项目】** 黑龙江省中医药经典普及化研究专项课题(No. ZYW-2022-059)。

** **【通信作者】** 徐明远, E-mail: xumingyuan@hljucm.edu.cn

【作者简介】 王雪莹(1982-), 女, 黑龙江大庆人, 硕士研究生, 主管药师, 从事药物新剂型及新药研发方面工作研究。E-mail: wangxueying89006@163.com

kinase B (AKT)/G protein coupled receptor kinase interacting protein 1 (GIT1) pathway. **Results** The Sham group had normal spinal cord neurons and small intestinal mucosal structures. Compared with the Sham group, the SCI group showed decreased spinal cord neurons, with cavity formation, inflammatory infiltration, atrophy of small intestinal villi and decreased goblet cells. The BBB score, maximum sliding angle, number of lactobacilli, p-PI3K, p-AKT, and p-GIT1 proteins were prominently reduced ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, LSP, D-LA, DAO, IL-1 β , IL-6, TNF-sh- α , and the numbers of *Escherichia coli* and *Enterococcus* were clearly raised ($P < 0.05$). Compared with the SCI group, the tanshinone IIA group and tanshinone IIA + pLVX-sh-NC group showed clear improvement in spinal cord and small intestine tissue injury, alleviation of inflammatory infiltration, and raise in goblet cell count. The BBB score, maximum sliding angle, number of lactobacilli, p-PI3K, p-AKT, and p-GIT1 proteins were prominently increased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, LSP, D-LA, DAO, IL-1 β , IL-6, TNF-sh- α , and the numbers of *Escherichia coli* and *Enterococcus* were prominently decreased ($P < 0.05$). The trend of changes in the above indicators in the tanshinone IIA + pLVX-sh-PI3K group was opposite to that in the tanshinone IIA + pLVX-sh-NC group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tanshinone IIA can enhance the motor function of SCI rats, improve intestinal barrier damage and gut microbiota disorders, which may be achieved by activating the PI3K/AKT/GIT1 pathway.

【Keywords】 Tanshinone IIA; PI3K/AKT/GIT1 pathway; Spinal cord injury; Gut microbiota

脊髓损伤(SCI)是由外部机械力导致的急性创伤性中枢神经系统(CNS)疾病,其特征为损伤平面以下运动功能丧失、感觉障碍及自主神经功能失调,并伴随炎症、氧化应激、胃肠道功能障碍等继发性病理级联反应^[1]。其中胃肠道功能障碍主要是由肠道和CNS之间的轴线紊乱导致胃自主神经控制丧失而引起的^[2]。有研究表明,SCI后肠道菌群紊乱,通过破坏菌群与免疫或代谢平衡,并经由肠-脑轴加剧神经炎症与并发症的发生^[3]。因此,探究CNS-肠道轴分子机制对于SCI的研究具有重要价值。丹参酮IIA作为丹参的主要脂溶性活性成分,具有广泛的药理作用。临床研究表明,该化合物可通过多靶点机制干预心血管疾病、恶性肿瘤、脑血管障碍及神经退行性疾病^[4]。有研究报道,丹参酮IIA磺酸钠促进内源性神经干细胞的增殖和分化,通过过度激活Notch通路修复大鼠SCI^[5]。此外,丹参酮IIA还可通过抑制铁死亡和炎症反应来减轻氟化物诱导的大鼠SCI^[6]。磷酸肌醇3-激酶(PI3K)是一种脂质激酶,通过激活下游靶蛋白激酶B(AKT)在创伤性SCI、神经退行性疾病等多种疾病中发挥重要作用^[7]。G蛋白偶联受体激酶相互作用蛋白1(GIT1)是一种GTP酶激活蛋白,具有促进脊柱成熟、调节神经元代谢、影响突触后神经元的兴奋性等多种功能^[8]。研究显示,异丙酚可通过激活PI3K/AKT信号通路以提高GIT1表达水平,从而缓解大鼠脊髓缺血再灌注损伤^[9]。在SCI大鼠模型中,过度表达GIT1,不仅抑制了SCI后神经胶质瘢痕形成和神经炎症,还降低了细胞凋亡并促进了受伤病变区域的轴突再生^[10]。但关于丹参酮IIA是否可通过调控PI3K/AKT/GIT1轴影响SCI发展尚未有研究阐明。因此,本研究旨在探讨丹参酮IIA对SCI发展的影响及其具体机制。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 60只雄性SPF级大鼠,180~220 g,6~8周龄,购自广州明迅生物科技有限责任公司,生产许可证号为:SCXK(粤)2024-0070。本研究已获得本院伦理委员会审核批准。

1.2 主要试剂 丹参酮IIA(YLK-B0849D)购自上海优利科生命科学公司;HE染色试剂盒(F4713)、PAS染色试剂盒(F4714)、TUNEL法细胞凋亡检测试剂盒(F4708-50G)购自上海远慕生物;大鼠白细胞介素(IL)-1 β 检测试剂盒(CSB-E08055r)、大鼠白细胞介素(IL)-6检测试剂盒(CSB-E11876r)、大鼠肿瘤坏死因子(TNF)- α 检测试剂盒(CSB-E11987r)、内毒素(LSP)检测试剂盒(CSB-E14247r)、D-乳酸(D-LA)检测试剂盒(E-BC-K002-M)、二胺氧化酶(DAO)检测试剂盒(E-BC-K524-M)购自武汉益普生物;蛋白一抗:PI3K(GD-CZ0128P)、p-PI3K(GD-KT8569)、AKT(gd-b3537R)、p-AKT(gd-b3346R)、GIT1(GD-CZ4110R)、p-GIT1(GD-CZ5372R)、GAPDH(GD-CZ0835R)、山羊抗兔二抗(GD-CZ0295G-PE)购自上海古朵生物。

2 方法

2.1 模型构建 将大鼠适应性喂养3 d,随机选取48只大鼠,通过改良的Allen法构建大鼠SCI模型^[11]。大鼠经3%戊巴比妥钠麻醉后,俯卧位固定于立体定位仪,脊椎T9-T11节段剃毛消毒;沿中线纵行切口暴露T10椎板,使用显微咬骨钳行椎板切除术显露脊髓,采用改良的Allen打击装置(10 g重锤从25 mm高度垂直坠落)造成T10脊髓中度挫伤,肉眼观察可见脊髓瞬时凹陷伴轻微出血;逐层缝合肌肉和皮肤,术后人工排尿3次/天,直至自主排尿恢复,并以50 mg/kg的量注射抗生素头孢曲松3天,预防感染。剩余12

只大鼠作为假手术(Sham)组,只进行脊髓暴露不进行打击。

2.2 分组及处理 将 SCI 模型构建成功的大鼠分为:SCI 组、丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组。其中丹参酮 IIA 组大鼠从术后第 1~7 d,每天通过尾静脉注射给予 20 mg/kg 的丹参酮 IIA^[12]。丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组大鼠在 20 mg/kg 丹参酮 IIA 处理的基础上分别尾静脉注射 2.5 μ L 慢病毒质粒 pLVX-sh-NC、pLVX-sh-PI3K(1×10^9 TU/mL)。Sham 组、SCI 组大鼠分别使用等量生理盐水处理。

2.3 运动功能评估 Basso, Beattie, Bresnahan (BBB)运动功能评分量表:将大鼠置于开阔平地,观察 5 min 内后肢关节运动、躯干稳定性及协调性,按 21 分制量表评分,分值越低表明大鼠脊髓损伤越严重^[13]。

斜板实验:将大鼠置于可调节角度的粗糙斜板上(0° 起始),以 $1^\circ/\text{s}$ 的速度缓慢增大倾斜角度,记录其能维持姿势不滑落的最大角度,每组重复 3 次取均值。测试前适应性训练 3 天,正式实验于术后 4 周进行,环境保持安静避光^[14]。

2.4 样本采集 将运动功能评估后的大鼠注射戊巴比妥钠溶液进行麻醉,取大鼠腹主动脉取血,之后通过吸入过量 CO_2 处死,无菌条件下分离肠道内容物于无菌冻存管中,将其保存于液氮中;随后取 6 只大鼠分离脊髓组织保存于 -80°C 条件下用于后续检测,剩余 6 只大鼠,分离脊髓、小肠组织,通过甲醛固定,之后进行脱水透明、石蜡包埋,制作石蜡切片,用于后续染色实验。

2.5 肠道黏膜屏障指标 LSP、D-LA、DAO 水平检测

将 2.4 中保存的全血离心后,取上清,之后按照 LSP、D-LA、DAO 试剂盒说明检测各组大鼠肠道黏膜屏障指标 LSP、D-LA、DAO 表达水平。

2.6 HE 染色、PAS 染色观察大鼠组织病理变化 分别取 2.4 中保存的脊髓组织石蜡切片和小肠组织石蜡切片,通过 HE 染色试剂盒和 PAS 染色试剂盒对切片进行染色,最后在显微镜下观察大鼠组织病理变化情况。

2.7 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况 将 2.4 中的脊髓组织石蜡切片进行脱蜡、水化,加入蛋白酶 K 通透,PBS 完全冲洗掉蛋白酶 K 后,加入 TUNEL 检测液 37°C 下避光孵育 1 h,PBS 冲洗后,加入抗荧光淬灭剂封片,最后在显微镜下观察脊髓组织细胞凋亡情况,并计算细胞凋亡率。

2.8 ELISA 法检测 大鼠脊髓组织中 IL- 1β 、IL-6、

TNF- α 水平 取部分 2.4 中保存的脊髓组织,加入生理盐水,研磨后离心取上清,之后按照 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 试剂盒说明书操作,并根据标准曲线计算 IL- 1β 、IL-6、TNF- α 表达水平。

2.9 肠道菌群数量检测 取 200 mg 肠道内容物,加入 1 mL 无菌 PBS 均质后梯度稀释至 10^{-7} ,之后取稀释液(100 μL /皿)分别接种于 EMB、EC、LBS 三种选择性培养基中。培养后通过典型菌落形态学特征和生化反应进行菌种鉴定,最终以 CFU/g 为单位统计各菌群数量。

2.10 Western blot 实验检测 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、GIT1、p-GIT1 蛋白表达量 将 2.4 中剩余的脊髓组织在 RIPA 裂解缓冲液中匀浆提取蛋白。使用 Bradford 试剂检测蛋白质浓度。通过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离等量的蛋白质(每条泳道 50 μg 总蛋白),然后转移到 PVDF 膜上。封闭后膜与蛋白一抗(PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、GIT1、p-GIT1、GAPDH)在 4°C 下过夜孵育,次日与山羊抗兔二抗孵育。最后在成像仪下观察条带,并用 Image J 量化蛋白灰度值。

3 统计分析

本研究数据均通过 GraphPad Prism 9 分析,均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。多组间比较采用单因素方差分析法,进一步两两比较采用 SNK- q 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠运动功能的影响

SCI 组与 Sham 组相比,BBB 评分明显降低,斜板滑落的最大角度明显缩小($P < 0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组与 SCI 组相比,BBB 评分明显升高,斜板滑落的最大角度明显变大($P < 0.05$);丹参酮 IIA-H+pLVX-sh-NCPI3K 组与丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组相比,BBB 评分明显降低,斜板滑落的最大角度明显缩小($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 BBB 评分、斜板滑落的最大角度($\bar{x} \pm s, n = 12$)
Table 1 BBB scores and maximum angle of inclined plate sliding in each group of rats

组别	BBB 评分 (分)	斜板滑落的 最大角度($^\circ$)
Sham 组	21.00 ± 0.00	61.33 ± 7.01
SCI 组	3.19 ± 0.62^a	22.17 ± 2.83^a
丹参酮 IIA 组	12.16 ± 1.98^b	47.16 ± 5.19^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组	11.93 ± 1.72^b	44.26 ± 4.93^b
丹参酮 IIA-H+pLVX-sh-PI3K 组	6.43 ± 0.94^c	26.31 ± 3.25^c

注:^a $P < 0.05$ vs Sham 组;^b $P < 0.05$ vs SCI 组;^c $P < 0.05$ vs 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组。

2 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠肠道黏膜屏障指标 LSP、D-LA、DAO 水平的影响

各组大鼠肠道黏膜屏障指标 LSP、D-LA、DAO 水平比较,SCI 组较 Sham 组明显升高($P<0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组较 SCI 组明显降低($P<0.05$);丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组较丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组明显升高($P<0.05$)。见表 2。

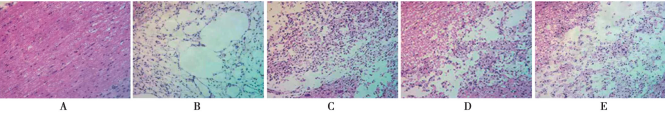
表 2 各组大鼠小肠组织中 LSP、D-LA、DAO 水平
($\bar{x}\pm s, n=12$)
Table 2 LSP, D-LA, DAO levels in small intestine tissues
of rats in each group

组别	LSP(EU/L)	LA(μ mol/mL)	DAO(ng/mL)
Sham 组	58.15 $\pm$ 6.87	0.17 $\pm$ 0.02	29.81 $\pm$ 0.21
SCI 组	96.68 $\pm$ 10.34 ^a	0.24 $\pm$ 0.03 ^a	35.96 $\pm$ 0.31 ^a
丹参酮 IIA 组	80.46 $\pm$ 8.56 ^b	0.21 $\pm$ 0.02 ^b	33.14 $\pm$ 0.25 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组	62.43 $\pm$ 7.11 ^b	0.19 $\pm$ 0.02 ^b	31.56 $\pm$ 0.28 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组	87.26 $\pm$ 9.14 ^c	0.23 $\pm$ 0.03 ^c	34.76 $\pm$ 0.33 ^c

注:^a $P<0.05$ vs Sham 组;^b $P<0.05$ vs SCI 组;^c $P<0.05$ vs 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组。

3 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠脊髓组织病理变化的影响

Sham 组大鼠脊髓组织运动神经元排列紧密,胞体饱满,核仁明显,未见炎性细胞浸润、出血或空泡变性,血管周围间隙正常;SCI 组大鼠脊髓组织神经元数量减少,残存神经元核固缩,炎症浸润,空洞扩大;与 SCI 组相比,丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组大鼠脊髓组织神经元数量增加,炎症减轻,空洞面积缩小;与丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组相比,丹参酮 IIA-H+pLVX-sh-PI3K 组大鼠神经元数量减少,炎症浸润加重,空洞面积扩大。见图 1。



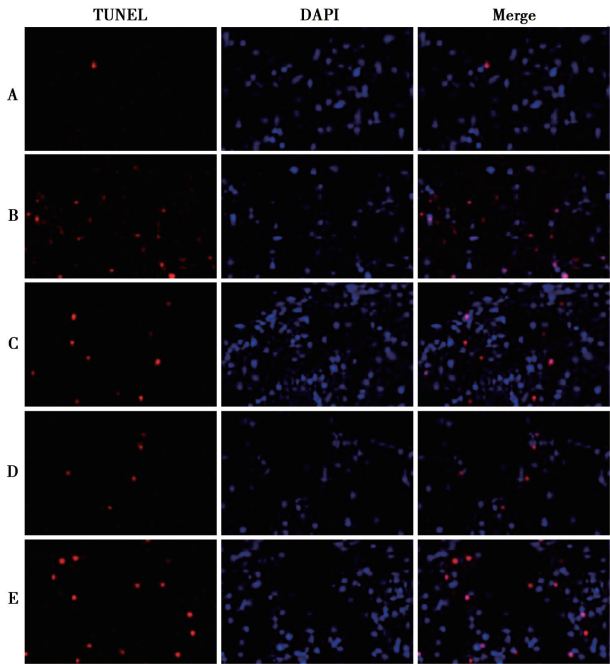
A Sham 组 B SCI 组 C 丹参酮 IIA 组 D 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组 E 丹参酮 IIA-H+pLVX-sh-PI3K 组

图 1 HE 染色法观察各组大鼠脊髓组织病理变化情况(100 $\times$)
Fig. 1 Observation of pathological changes in spinal cord tissue
of rats in each group using HE staining method(100 $\times$)

4 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠脊髓组织细胞凋亡情况的影响

Sham 组、SCI 组、丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组细胞凋亡率分别为(2.04 $\pm$ 0.96)%、(32.14 $\pm$ 3.87)%、(11.34 $\pm$ 1.71)%、(12.65 $\pm$ 2.10)%、(27.31 $\pm$ 3.14)%。SCI 组与 Sham 组相比,大鼠脊髓组织细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组与 SCI 组相比,大鼠脊髓组织细胞凋亡率明显降低($P<0.05$);丹参酮 IIA-H+pLVX-sh-PI3K 组与丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组相

比,大鼠脊髓组织细胞凋亡率明显升高($P<0.05$)。见图 2。



A Sham 组 B SCI 组 C 丹参酮 IIA 组 D 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组 E 丹参酮 IIA-H+pLVX-sh-PI3K 组

图 2 TUNEL 染色观察各组大鼠脊髓组织细胞凋亡情况(200 $\times$)
Fig. 2 Observation of apoptosis of spinal cord tissue cells
in each group of rats by TUNEL staining(200 $\times$)

5 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平的影响

各组大鼠脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平比较,SCI 组较 Sham 组明显升高($P<0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组较 SCI 组明显降低($P<0.05$);丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组较丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组明显升高。见表 3。

表 3 各组大鼠脊髓组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平
($\bar{x}\pm s, n=6$)
Table 3 Levels of IL-1 β , IL-6, and TNF- α in spinal cord tissues
of rats in each group

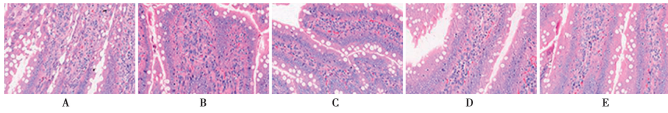
组别	IL-1 β (pg/mg)	IL-6(pg/mg)	TNF- α (pg/mL)
Sham 组	25.17 $\pm$ 3.07	94.27 $\pm$ 6.24	36.54 $\pm$ 4.02
SCI 组	63.47 $\pm$ 5.46 ^a	145.24 $\pm$ 12.08 ^a	96.11 $\pm$ 5.47 ^a
丹参酮 IIA 组	33.31 $\pm$ 3.08 ^b	103.14 $\pm$ 7.24 ^b	51.28 $\pm$ 5.83 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组	34.35 $\pm$ 3.68 ^b	105.31 $\pm$ 8.52 ^b	47.25 $\pm$ 5.21 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组	48.14 $\pm$ 5.24 ^c	134.74 $\pm$ 11.26 ^c	78.34 $\pm$ 8.05 ^c

注:^a $P<0.05$ vs Sham 组;^b $P<0.05$ vs SCI 组;^c $P<0.05$ vs 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组。

6 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠肠道组织病理变化的影响

Sham 组大鼠小肠黏膜结构完整,绒毛排列整齐,隐窝形态正常,无明显炎症细胞浸润和上皮损伤,杯状细胞分布均匀;SCI 组大鼠小肠黏膜损伤,绒毛萎缩、断裂,部分区域上皮细胞脱落,炎症浸润,黏膜下层血管扩张,间质水肿,杯状细胞明显减少;丹参酮 IIA 组和丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组大鼠黏膜损伤明显缓

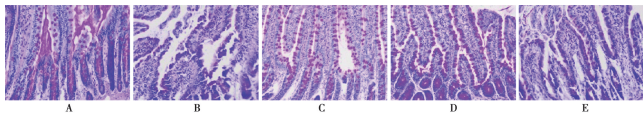
解,炎性浸润程度减轻,杯状细胞数量增加;与丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组相比,丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组大鼠小肠黏膜损伤加重,炎性浸润程度加深,杯状细胞数量减少。见图 3 和图 4。



A Sham 组 B SCI 组 C 丹参酮 IIA 组 D 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组 E 丹参酮 IIA+H+pLVX-sh-PI3K 组

图 3 HE 染色观察各组大鼠小肠组织病理变化(100×)

Fig. 3 Observation of Pathological Changes in Small Intestine Tissue of Rats in Each Group by HE Staining(100×)



A Sham 组 B SCI 组 C 丹参酮 IIA 组 D 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组 E 丹参酮 IIA+H+pLVX-sh-PI3K 组

图 4 PAS 染色观察各组大鼠小肠组织中杯状细胞变化(200×)

Fig. 4 Observation of changes in goblet cells in small intestine tissues of rats in each group by PAS staining(200×)

7 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠肠道大肠埃希菌、肠球菌、乳酸杆菌数量的影响

各组大鼠肠道内大肠埃希菌、肠球菌数量比较,SCI 组较 Sham 组明显升高($P<0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组较 SCI 组明显降低($P<0.05$);丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组较丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组明显升高($P<0.05$)。各组大鼠肠道内乳酸杆菌数量比较,SCI 组较 Sham 组明显降低($P<0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组较 SCI 组明显升高($P<0.05$);丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组较丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组明显降低($P<0.05$)。见表 4。

表 4 各组大鼠大肠埃希菌、肠球菌、乳酸杆菌及双歧杆菌数量
($\bar{x}\pm s, n=12, CFU/g$)

Table 4 Quantity of Escherichia coli, Enterococcus, Lactobacillus, and Bifidobacterium in each group of rats

组别	大肠埃希菌	肠球菌	乳酸杆菌
Sham 组	4.12±0.61	3.43±0.45	8.64±0.51
SCI 组	8.37±0.93 ^a	8.49±0.91 ^a	2.34±0.27 ^a
丹参酮 IIA 组	6.21±0.71 ^b	6.10±0.66 ^b	6.46±0.71 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组	6.02±0.64 ^b	5.76±0.64 ^b	6.33±0.67 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组	7.68±0.91 ^c	7.89±0.85 ^c	3.72±0.44 ^c

注:^a $P<0.05$ vs Sham 组;^b $P<0.05$ vs SCI 组;^c $P<0.05$ vs 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组。

8 丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠脊髓组织中 PI3K、AKT、GIT1 蛋白表达量的影响

SCI 组与 Sham 组相比,大鼠脊髓组织中 p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量明显下降($P<0.05$);丹参酮 IIA 组、丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组与 SCI 组

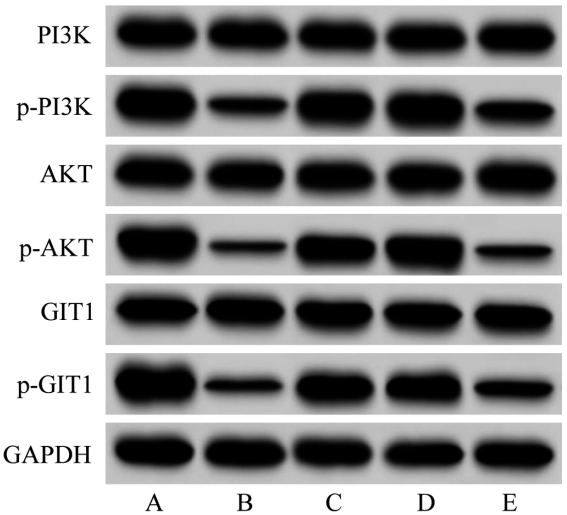
相比较,大鼠脊髓组织中 p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量明显上升($P<0.05$);丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组与丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组相比,大鼠脊髓组织中 p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量明显下降($P<0.05$)。见图 5,表 5。

表 5 各组大鼠脊髓组织中 p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量
($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Expression levels of p-PI3K, p-AKT, and p-GIT1 proteins in spinal cord tissues of rats in each group

组别	p-PI3K	p-AKT	p-GIT1
Sham 组	1.71±0.19	1.53±0.17	1.47±0.17
SCI 组	0.71±0.09 ^a	0.43±0.06 ^a	0.54±0.06 ^a
丹参酮 IIA 组	1.33±0.16 ^b	1.02±0.12 ^b	1.18±0.13 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组	1.24±0.14 ^b	1.15±0.13 ^b	1.12±0.13 ^b
丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组	0.82±0.09 ^c	0.64±0.08 ^c	0.79±0.10 ^c

注:^a $P<0.05$ vs Sham 组;^b $P<0.05$ vs SCI 组;^c $P<0.05$ vs 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组。



A Sham 组 B SCI 组 C 丹参酮 IIA 组 D 丹参酮 IIA+pLVX-sh-NC 组 E 丹参酮 IIA+pLVX-sh-PI3K 组

图 5 各组大鼠脊髓组织中 PI3K、AKT、GIT1 蛋白表达

Fig. 5 Expression of PI3K, AKT, and GIT1 proteins in spinal cord tissues of rats in each group

讨论

近年来,肠道-CNS 轴在 SCI 病理生理机制中的作用日益受到重视。研究表明,CNS 与肠道菌群之间存在双向调控机制^[15]。一方面,CNS 功能紊乱可改变肠道内环境,从而影响微生物群落结构;另一方面,肠道菌群失调已被证实与多种神经系统疾病的发生相关,例如多发性硬化症、帕金森病及自闭症谱系障碍等^[16]。本研究通过改良 Allen 法建立大鼠 SCI 模型,旨在揭示 SCI 后肠道菌群的特异性改变和丹参酮 IIA 对 SCI 发展的影响及具体作用机制。

丹参酮 IIA 是丹参中最活跃的二萜类奎宁色素,具有抗炎、抗细胞凋亡、神经保护等多种作用^[17]。研究指出,丹参酮 IIA 在心血管、脑血管、内分泌和神经

系统疾病方面的具有重要的药用作用^[18]。在 SCI 大鼠模型中,丹参酮 IIA 通过调节反应性星形胶质细胞表型,促进其向 A2 型极化,并减轻脊髓病理损伤,从而显著改善大鼠的运动功能^[19]。丹参酮 IIA 还可通过改善微循环、抑制炎症反应从而有效修复 SCI^[20]。在本研究中,SCI 大鼠运动功能严重受损;脊髓和小肠组织出现严重损伤,脊髓组织中细胞凋亡率、炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平、大肠埃希菌、肠球菌数量以及肠道黏膜屏障指标 LSP、D-LA、DAO 水平均明显升高,乳酸杆菌数量显著降低;经丹参酮 IIA 治疗后,SCI 大鼠运动功能得到改善;脊髓和小肠组织损伤程度明显减轻;脊髓组织细胞凋亡率、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、LSP、D-LA、DAO 水平显著降低,肠道菌群数量改善。提示丹参酮 IIA 可增强 SCI 大鼠运动功能,减轻肠道组织损伤,改善肠道菌群紊乱。

PI3K/AKT 信号通路至关重要,与 SCI 的病理过程密切相关,该通路的激活可以延缓炎症反应,防止神经胶质瘢痕形成,并促进神经功能恢复^[21]。大量研究报道,PI3K/AKT 信号通路参与 SCI 细胞凋亡^[22]。GIT1 是一种具有多种生物学功能的穿梭蛋白,其不同结构域结合不同的蛋白质并调节其活性。研究表明,GIT1 主要在脊髓的神经元中表达,在 CNS 内,GIT1 蛋白表现出显著的神经保护作用^[23]。有研究发现,在 SCI 大鼠模型中,Euxanthone 通过激活 PI3K/Akt 通路和抑制 TLR4/NF- κ B/p38 信号级联,显著缓解 SCI 症状,并减轻神经炎症、氧化损伤和神经元凋亡^[24]。此外,GIT1 还可通过抑制 TNF α 表达促进少突胶质细胞分化和髓鞘再生,改善 SCI 修复^[25]。在本研究中,SCI 组与 Sham 组相比,p-PI3K、p-AKT、p-GIT1 蛋白表达量明显降低,经丹参酮 IIA 治疗后,三者蛋白表达量明显回升,猜测丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠的治疗作用可能与 PI3K/AKT/GIT1 轴相关。因此,在丹参酮 IIA 治疗基础上,进一步干扰 PI3K 表达发现,丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠的治疗作用被明显削弱。提示丹参酮 IIA 可能通过 PI3K/AKT/GIT1 通路缓解 SCI 大鼠运动功能障碍,肠道组织受损和肠道菌群紊乱。

综上所述,丹参酮 IIA 对 SCI 大鼠运动障碍、肠道屏障受损、肠道菌群紊乱的改善作用可能是通过调控 PI3K/AKT/GIT1 轴实现的。本研究为 SCI 治疗方法创新提供了理论基础,但关于丹参酮 IIA 调控 PI3K/AKT/GIT1 轴对 SCI 的治疗作用还需进一步深入研究验证。

【参考文献】

- [1] Bernardi M, Fedullo AL, Bernardi E, et al. Diet in neurogenic bowel management: A viewpoint on spinal cord injury[J]. World J Gastroenterol, 2020, 26(20): 2479-2497.
- [2] Ojeda J, Avila A, Vidal PM. Gut microbiota interaction with the central nervous system throughout life[J]. J Clin Med, 2021, 10(6): 1299.
- [3] Huang Z, Gong J, Lin W, et al. Catalpol as a component of rehmannia glutinosa protects spinal cord injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 860757.
- [4] Ding B, Lin C, Liu Q, et al. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- κ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1): 302.
- [5] Zhong W, Xu L, Jiang G, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate promotes proliferation and differentiation of endogenous neural stem cells to repair rat spinal cord injury via the Notch pathway[J]. J Transl Med, 2025, 23(1): 367.
- [6] Shen Q, Ma S, Li L, et al. Tanshinone IIA attenuates fluoride-induced spinal cord injury by inhibiting ferroptosis and inflammation[J]. Heliyon, 2024, 10(23): e40549.
- [7] He X, Li Y, Deng B, et al. The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: Mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Cell Prolif, 2022, 55(9): e13275.
- [8] Xu T, Gao P, Huang Y, et al. Git1-PGK1 interaction achieves self-protection against spinal cord ischemia-reperfusion injury by modulating Keap1/Nrf2 signaling[J]. Redox Biol, 2023, 62: 102682.
- [9] Zhou Y, Bai Y, Zhang P, et al. Propofol alleviates spinal cord ischemia-reperfusion injury by preserving PI3K/AKT/GIT1 axis[J]. J Investig Med, 2024, 72(7): 705-714.
- [10] Luo Y, Xu T, Liu W, et al. Exosomes derived from GIT1-overexpressing bone marrow mesenchymal stem cells promote traumatic spinal cord injury recovery in a rat model[J]. Int J Neurosci, 2021, 131(2): 170-182.
- [11] Ren J, Zhu B, Gu G, et al. Schwann cell-derived exosomes containing MFG-E8 modify macrophage/microglial polarization for attenuating inflammation via the SOCS3/STAT3 pathway after spinal cord injury[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(1): 70.
- [12] Yang YD, Yu X, Wang XM, et al. Tanshinone IIA improves functional recovery in spinal cord injury-induced lower urinary tract dysfunction[J]. Neural Regen Res, 2017, 12(2): 267-275.
- [13] Poongodi R, Yang TH, Huang YH, et al. Stem cell exosome-loaded Gelfoam improves locomotor dysfunction and neuropathic pain in a rat model of spinal cord injury[J]. Stem Cell Res Ther, 2024, 15(1): 143.
- [14] 史阔源, 李俊杰, 饶耀剑. 羽扇豆醇通过极化 M1/M2 巨噬细胞改善大鼠脊髓损伤后功能恢复[J]. 热带医学杂志, 2025, 25(1): 29-32, 38.
- [15] Liu P, Peng G, Zhang N, et al. Crosstalk between the gut microbiota and the brain: an update on neuroimaging findings[J]. Front Neurol, 2019, 10: 883.
- [16] Hamad I, Van Broeckhoven J, Cardilli A, et al. Effects of recombinant IL-13 treatment on gut microbiota composition and functional recovery after hemisection spinal cord injury in mice[J]. Nutrients, 2023, 15(19): 4184.

(下转 1027 页)

- 2020,53(2):81-88.
- [8] Eichenfield LF, Tom WL, Chamlin SL, et al. Guidelines of care for the management of atopic dermatitis; section 1. Diagnosis and assessment of atopic dermatitis[J]. J Am Acad Dermatol, 2014,70(2):338-351.
- [9] Yamaguchi HL, Yamaguchi Y, Peeva E. Role of innate immunity in allergic contact dermatitis; An update[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(16):12975.
- [10] Zhang BW, Roesner LM, Traidl S, et al. Single-cell profiles reveal distinctive immune response in atopic dermatitis in contrast to psoriasis[J]. Allergy, 2023, 78(2):439-453.
- [11] Ogulur I, Mitamura Y, Yazici D, et al. Type 2 immunity in allergic diseases[J]. Cell Mol Immunol, 2025, 22(3):211-242.
- [12] Ashraf M, El-Sawy HS, El Zaafarany GM, et al. Eucalyptus oil nanoemulsion for enhanced skin deposition of fluticasone propionate in psoriatic plaques: A combinatorial anti-inflammatory effect to suppress implicated cytokines[J]. Arch Pharm (Weinheim), 2025, 358(1):e2400557.
- [13] 周星, 栗玉珍. 序贯外用克立硼罗软膏与丙酸氟替卡松乳膏联合治疗轻中度老年特应性皮炎的临床疗效及安全性分析[J]. 中国医刊, 2024, 59(9):1033-1035.
- [14] Husein-ElAhmed H, Steinhoff M. Effects of probiotic supplementation in adult with atopic dermatitis; a systematic review with meta-analysis[J]. Clin Exp Dermatol, 2023, 49(1):46-52.
- [15] Fijan S, Kolc N, Hra ovec M, et al. Single-strain probiotic lactobacilli for the treatment of atopic dermatitis in children; A systematic review and meta-analysis[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(4):1256.
- [16] Herbert S, Haughton R, Nava J, et al. A review of topical probiotic therapy for atopic dermatitis[J]. Clin Exp Dermatol, 2023, 48(4):319-324.
- [17] Hulpusch C, Rohayem R, Reiger M, et al. Exploring the skin microbiome in atopic dermatitis pathogenesis and disease modification[J]. J Allergy Clin Immunol, 2024, 154(1):31-41.
- [18] Jin QB, Ren FH, Dai D, et al. The causality between intestinal flora and allergic diseases; Insights from a bi-directional two-sample Mendelian randomization analysis[J]. Front Immunol, 2023, 14(9):1121273.
- [19] Rygula I, Pikiewicz W, Grabarek BO, et al. The role of the gut microbiome and microbial dysbiosis in common skin diseases [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(4):1984.
- [20] 李妍, 李明, 徐薇, 等. 丙酸氟替卡松乳膏单独或联合卡泊三醇软膏治疗轻中度斑块状银屑病的随机自身对照研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2022, 55(3):260-263.
- [21] Husein-ElAhmed H, Steinhoff M. Meta-analysis on preventive and therapeutic effects of probiotic supplementation in infant atopic dermatitis[J]. J Dtsch Dermatol Ges, 2023, 21(8):833-843.
- [22] Wrzesniewska M, Woloszczak J, Swirkosz G, et al. The role of the microbiota in the pathogenesis and treatment of atopic dermatitis-a literature review[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(12):6539.
- [23] Feito-Rodriguez M, Ramirez-Bosca A, Vidal-Asensi S, et al. Randomized double-blind placebo-controlled clinical trial to evaluate the effect of a mixture of probiotic strains on symptom severity and use of corticosteroids in children and adolescents with atopic dermatitis[J]. Clin Exp Dermatol, 2023, 48(5):495-503.
- 【收稿日期】 2025-03-14 【修回日期】 2025-06-05

(上接 1021 页)

- [17] Chi MC, Lin ZC, Lee CW, et al. Tanshinone IIA suppresses burning incense-induced oxidative stress and inflammatory pathways in astrocytes[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2023, 258:114987.
- [18] Gong Y, Zhang YL, Wang Z, et al. Tanshinone IIA alleviates brain damage in a mouse model of neuromyelitis optica spectrum disorder by inducing neutrophil apoptosis [J]. J Neuroinflammation, 2020, 17(1):198.
- [19] 饶江文, 刘向春, 贺丰, 等. 丹参酮 II A 通过调控星形胶质细胞表型极化促进脊髓损伤修复[J]. 贵州医科大学学报, 2024, 49(11):1622-1630, 1638.
- [20] 蒋昇源, 邓博文, 刘港, 等. 川芎嗪与丹参酮 II A 对脊髓损伤的保护作用及机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(9):1176-1182.
- [21] Chen Y, Wei Z, Liu J, et al. Long noncoding RNA ZFAS1 aggravates spinal cord injury by binding with miR-1953 and regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Neurochem Int, 2021, 147:104977.
- [22] Ma Z, Liu T, Liu L, et al. Epidermal neural crest stem cell conditioned medium enhances spinal cord injury recovery via PI3K/AKT-mediated neuronal apoptosis suppression [J]. Neurochem Res, 2024, 49(10):2854-2870.
- [23] Russ DE, Cross RBP, Li L, et al. A harmonized atlas of mouse spinal cord cell types and their spatial organization[J]. Nat Commun, 2021, 12(1):5722.
- [24] Yao R, Ren L, Wang S, et al. Euxanthone inhibits traumatic spinal cord injury via anti-oxidative stress and suppression of p38 and PI3K/Akt signaling pathway in a rat model[J]. Transl Neurosci, 2021, 12(1):114-126.
- [25] Liu H, Yi J, Zhang C, et al. Macrophage GIT1 promotes oligodendrocyte precursor cell differentiation and remyelination after spinal cord injury[J]. Glia, 2024, 72(9):1674-1692.
- 【收稿日期】 2025-03-08 【修回日期】 2025-05-30