

【DOI】 10.3969 / j.issn.1671-6450.2025.12.018

论著 · 基础

C1QB 通过调控 PI3K/AKT 信号通路对脊髓损伤大鼠神经修复的影响

张家诚, 叶双, 李从文, 薛淮, 权笑宇, 许铁, 刘筱



基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2019M651966); 徐州市卫生健康委科技项目(XWKYHT20220142); 徐州医科大学附属医院院级科研项目(2021ZA22)

作者单位: 221004 江苏徐州, 徐州医科大学急诊医学(张家诚、李从文、薛淮); 225003 江苏扬州, 扬州大学附属医院重症医学科(叶双); 221006 江苏徐州, 徐州医科大学附属医院急诊科(权笑宇、许铁、刘筱)

通信作者: 刘筱, E-mail: docliuxiao@163.com

【摘要】 目的 探讨补体成分 1q 子成分 B(C1QB)对脊髓损伤(SCI)大鼠神经修复及磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT)信号通路的影响。**方法** 2024 年 3—10 月于徐州医科大学实验室进行实验。构建 SCI 大鼠模型, 将造模成功大鼠随机分为模型组(SCI 组)、si-NC 组、si-C1QB 组、si-C1QB+PI3K/AKT 信号通路抑制剂组(si-C1QB+LY294002 组)并进行相应干预, 每组 12 只, 另取 12 只正常健康 SD 大鼠作为空白对照组(Control 组)。干预结束后进行 BBB 评分; 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测脊髓组织炎性因子水平; 苏木精—伊红(HE)染色观察脊髓组织病理损伤; 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)染色检测脊髓神经元凋亡; 免疫组化检测离子化钙结合适配分子 1(IBA-1)与胶质酸性蛋白(GAEP)表达; 免疫印迹(Western blot)检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与 Control 组比较, SCI 组大鼠脊髓组织结构紊乱, 其完整性破坏形成大量空洞, 神经元破坏严重, 神经纤维排列紊乱, 炎性细胞浸润明显, BBB 评分、IL-10 水平及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达降低($q/P = 23.859/ < 0.001$ 、 $13.739/ < 0.001$ 、 $13.418/ < 0.001$ 、 $13.191/ < 0.001$)、TNF- α 、IL-6 水平及神经元凋亡率、裂解型胱天蛋白酶(C-caspase)-3、C-caspase-9、IBA-1、GAEP 表达升高($q/P = 14.325/ < 0.001$ 、 $14.820/ < 0.001$ 、 $18.653/ < 0.001$ 、 $13.191/ < 0.001$ 、 $12.269/ < 0.001$ 、 $13.168/ < 0.001$ 、 $14.795/ < 0.001$)、si-C1QB 组较 si-NC 组脊髓组织结构形态修复良好, 空洞化明显改善, 灰质白质界限相对清晰, 神经纤维排列相对整齐, 炎性细胞浸润减少, BBB 评分、IL-10 水平及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达升高($q/P = 21.430/ < 0.001$ 、 $11.692/ < 0.001$ 、 $11.393/ < 0.001$ 、 $13.182/ < 0.001$)、TNF- α 、IL-6 水平及神经元凋亡率、C-caspase-3、C-caspase-9、IBA-1、GAEP 表达降低($q/P = 11.889/ < 0.001$ 、 $12.385/ < 0.001$ 、 $3.846/ 0.003$ 、 $12.187/ < 0.001$ 、 $9.242/ < 0.001$ 、 $12.050/ < 0.001$ 、 $11.900/ < 0.001$)、si-C1QB+LY294002 组较 si-C1QB 组脊髓组织破坏严重, BBB 评分、IL-10 水平及 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达降低($q/P = 14.543/ < 0.001$ 、 $9.647/ < 0.001$ 、 $10.735/ < 0.001$ 、 $12.187/ < 0.001$)、TNF- α 、IL-6 水平及神经元凋亡率、C-caspase-3、C-caspase-9、IBA-1、GAEP 表达升高($q/P = 10.708/ < 0.001$ 、 $10.678/ < 0.001$ 、 $3.149/ 0.010$ 、 $10.694/ < 0.001$ 、 $8.832/ < 0.001$ 、 $10.681/ < 0.001$ 、 $10.614/ < 0.001$)。**结论** 沉默 C1QB 可促进脊髓损伤大鼠神经修复, 其与激活 PI3K/Akt 信号通路相关。

【关键词】 脊髓损伤; 补体成分 1q 子成分 B; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 神经修复; 大鼠

【中图分类号】 R744 **【文献标识码】** A

Effect of C1QB on neural repair in rats with spinal cord injury by regulating PI3K/AKT signaling pathway Zhang Jiacheng*, Ye Shuang, Li Congwen, Xue Huai, Quan Xiaoyu, Xu Tie, Liu Xiao. * Xuzhou Medical University, Jiangsu, Xuzhou 221004, China

Funding program: China Postdoctoral Science Foundation General Project (2019M651966); Science and Technology Project of Xuzhou Municipal Health Commission (XWKYHT20220142); The Hospital-level Scientific Research Project of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University (2021ZA22)

Corresponding author: Liu Xiao, E-mail: docliuxiao@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of complement component 1q subcomponent B (C1QB) on neural repair and the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway in rats with spinal cord injury (SCI). **Methods** From March 2024 to October 2024, experiments were conducted in the laboratory of Xuzhou Medical Uni-

versity. An SCI rat model was established, and successfully modeled rats were randomly assigned to the model group (SCI group), si-NC group, si-C1QB group, and si-C1QB+PI3K/AKT signaling pathway inhibitor group (si-C1QB+LY294002 group), with 12 rats in each group. Additionally, 12 normal healthy SD rats were used as the blank control group (Control group). At the end of the treatment, the BBB score was assessed. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect inflammatory factors in spinal cord tissue. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe pathological damage in spinal cord tissue. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining was used to detect apoptosis of spinal cord neurons. Immunohistochemistry was used to detect the expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP). Western blot was used to detect the expression of proteins related to the PI3K/AKT signaling pathway. **Results** Compared with the Control group, the spinal cord tissue structure in the SCI group was more disordered, with extensive cavitation due to loss of integrity, severe neuronal damage, disorganized nerve fiber arrangement, and prominent inflammatory cell infiltration. The BBB score, IL-10 level, and p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT expression were decreased ($t/P=23.859/0.001, 13.739/0.001, 13.418/0.001, 13.191/0.001$), while TNF- α and IL-6 levels, neuronal apoptosis rate, and expression of C-caspase-3, C-caspase-9, IBA-1, and GFAP were increased ($t/P=14.325/0.001, 14.820/0.001, 18.653/0.001, 13.191/0.001, 12.269/0.001, 13.168/0.001, 14.795/0.001$). Compared with the si-NC group, the si-C1QB group showed better structural and morphological repair of spinal cord tissue, with noticeable reduction in cavitation, relatively clear gray and white matter boundaries, orderly nerve fiber arrangement, and reduced inflammatory cell infiltration. The BBB score, IL-10 level, and p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT expression were increased ($t/P=21.430/0.001, 11.692/0.001, 11.393/0.001, 13.182/0.001$), while TNF- α and IL-6 levels, neuronal apoptosis rate, and expression of C-caspase-3, C-caspase-9, IBA-1, and GFAP were decreased ($t/P=11.889/0.001, 12.385/0.001, 3.846/0.003, 12.187/0.001, 9.242/0.001, 12.050/0.001, 11.900/0.001$). Compared with the si-C1QB group, the si-C1QB+LY294002 group showed more severe spinal cord tissue damage. The BBB score, IL-10 level, and p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT expression were decreased ($t/P=14.543/0.001, 9.647/0.001, 10.735/0.001, 12.187/0.001$), while TNF- α and IL-6 levels, neuronal apoptosis rate, and expression of C-caspase-3, C-caspase-9, IBA-1, and GFAP were increased ($t/P=10.708/0.001, 10.678/0.001, 3.149/0.010, 10.694/0.001, 8.832/0.001, 10.681/0.001, 10.614/0.001$). **Conclusion** Silencing C1QB can promote neural repair in rats with spinal cord injury, which is associated with activation of the PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] Spinal cord injury; Complement component 1q subcomponent B; PI3K/AKT signaling pathway; Neural repair; Rat

脊髓损伤属于常见的中枢神经损伤疾病,具有高致残率及致死率,给社会及个人家庭带来沉重经济负担,威胁患者生命安全^[1]。随着交通事故的频发及老龄化加剧,脊髓损伤的发病率持续上升且年轻化明显^[2]。目前主要通过手术减压辅以物理、康复治疗以促进神经功能恢复,但神经功能并未得到根本性改善,寻求新的治疗策略促进神经功能恢复是治疗脊髓损伤的关键^[3]。补体系统属于免疫系统,其在脊髓损伤后可参与炎性反应、介导神经干细胞增殖分化、清除髓鞘碎片等多种病理途径,影响脊髓损伤的发生发展^[4]。其中补体系统的关键蛋白补体成分 1q 子成分 B (C1QB) 在脊髓损伤患者血清中高表达,与脊髓损伤的严重程度密切相关^[5]。另外磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路的激活可减轻脊髓损伤后的神经炎性反应、小胶质细胞的活化和氧化应激,并促进轴突再生和改善功能恢复^[6-7]。本研究拟通过探究 C1QB 对脊髓损伤大鼠的神经修复及 PI3K/AKT 信号通路的影响,丰富脊髓损伤的治疗机制,报道

如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 动物: 成年 SD 大鼠购自江西中医药大学 [SCXK(赣) 2023-0001], 7 周龄, 体质量 (200 ± 20) g。饲养环境: 温度 25 ± 2°C, 湿度 50% ~ 65%, 每隔 12 h 光暗交替, 自由饮食能水, 无菌干燥。本研究已获得医院动物伦理委员审批 (202306T034)。(2) 试药、试剂: 戊巴比妥钠购自上海榕柏生物技术有限公司 (57-33-0); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、IL-10 ELISA 试剂盒购自上海吉泰依科赛生物科技有限公司 (ER006、ER003-96、ER004-96); 兔源裂解的胱天蛋白酶 (C-caspase)-3、C-caspase-9 抗体购自武汉博欧特生物科技有限公司 (orb106556、orb1730717); 兔源离子化钙结合适配分子 1 (IBA-1) 抗体购自英国 Abcam 公司 (ab7260); 兔源胶质酸性蛋白 (GAPF) 抗体购自 Proteintech 中国公司 (10904-1-AP); 兔源磷酸化 PI3K (p-PI3K) 抗体购自上海碧云天生物公司 (AF5905); 兔源 PI3K 抗体购自美国 Santa Cruz Bio-

technology 公司 (sc-365404); 兔源 磷酸化 AKT (p-AKT)、AKT 抗体购自上海研卉生物科技有限公司 (AF3263、10176-2-AP)。(3) 仪器设备: BX51 光学显微镜购自日本 Olympus 公司; EnVision 多功能酶标仪购自瑞孚迪生物医学(上海)有限公司; BZ-X800 荧光显微镜购自基恩士(中国)有限公司; GelDoc Go 凝胶成像系统购自伯乐生命医学产品(上海)有限公司。

1.2 实验方法 2024 年 3—10 月于徐州医科大学实验室进行实验。

1.2.1 SCI 大鼠模型构建: 戊巴比妥钠麻醉大鼠后俯卧位固定, 备皮消毒, 然后在 T_{11} 椎体棘突处背部正中切口, 暴露 T_{8-11} 棘突及椎板, 咬去 T_{8-11} 棘突及 T_9 椎板充分暴露脊髓, 采用 15 g 撞锤从 20 cm 高度下落撞击直径 2.5 mm 撞针进而对 T_9 节段造成撞击, 若大鼠表现出身体扭曲、后肢回缩扑动、尾部痉挛性摆动, 表示造模成功, 然后冲洗伤口, 逐层缝合, 术后每天 3 次挤压大鼠膀胱直至恢复自主排尿^[8]。空白对照组大鼠未进行 T_9 节段撞击, 其余操作相同。

1.2.2 分组与处理: 将造模成功大鼠随机分为模型组 (SCI 组)、si-NC 组、si-C1QB 组、si-C1QB+PI3K/AKT 信号通路抑制剂组 (si-C1QB+LY294002 组), 每组 12 只, 另取 12 只正常健康 SD 大鼠作为空白对照组 (Control 组)。SCI 组、Control 组尾静脉注射等量生理盐水。si-NC 组、si-C1QB 组分别尾静脉注射 si-NC、si-C1QB 慢病毒 10 μ l。si-C1QB+LY294002 组尾静脉注射 si-C1QB 慢病毒 10 μ l 及 LY294002 40 mg/kg^[9]。2 周后进行后续实验研究。

1.3 观测指标与方法

1.3.1 BBB 评分: 给药结束后将大鼠置于空旷场地, 观察双下肢肢体活动 5 min, 然后进行 BBB 评分, 评分标准: 0 分后肢瘫痪, 21 分正常。其中 0~7 分观察双下肢各个关节的活动状态; 8~13 分观察双下肢步态是否协调; 14~21 分观察运动中爪的精细动作水平。

1.3.2 脊髓组织炎性因子水平检测: BBB 评分结束麻醉处死各组大鼠, 取脊髓组织, 各组任选其中 6 个脊髓组织制成匀浆, ELISA 检测脊髓组织中 TNF- α 、IL-6、IL-10 水平。

1.3.3 脊髓组织病理损伤观察: 将各组剩余的 6 个脊髓组织用 4% 多聚甲醛固定, 浸蜡包埋制成 4 μ m 石蜡切片, 然后脱蜡至水后进行 HE 染色, 再次脱水封片, 显微镜下观察脊髓组织病理情况。

1.3.4 脊髓神经元凋亡检测: 取上述脊髓组织石蜡切片, 常规处理后, 参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书依次进行 TUNEL、DAPI 染色, 荧光显微镜下观察

阳性细胞数并计算细胞凋亡率。

1.3.5 免疫组化检测脊髓组织 IBA-1、GAFP 表达: 取上述脊髓组织石蜡切片常规处理后, 加入枸橼酸缓冲盐溶液反应, 然后封闭液封闭, 加入 IBA-1、GAFP 一抗低温孵育, 次日加入二抗室温孵育 1 h, 并进行 DAB 显色, 苏木精复染, 然后清洗后干燥封片, 荧光显微镜下观察并分析 IBA-1、GAFP 的平均光密度值。

1.3.6 Western blot 检测脊髓组织 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达: 取上述脊髓组织匀浆与蛋白裂解液充分反应提取总蛋白定量, 然后沸水浴变性, 变性蛋白依次进行 SDS-PAGE 电泳, 湿转 PVDF 膜然后血清封闭, 再将封闭膜与一抗低温反应, 次日与二抗室温反应, 最后进行可视化处理后, 采集图像并用 Image 软件分析各蛋白灰度值, 计算相对表达量。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 25.0 进行数据统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 描述, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 沉默 C1QB 对 SCI 大鼠 BBB 评分的影响 与 Control 组 (20.42 ± 2.11) 比较, SCI 组 (5.33 ± 0.59) BBB 评分降低 ($q/P = 23.859 / < 0.001$); 与 SCI 组比较, si-NC 组 (5.83 ± 0.63) BBB 评分升高, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC 组比较, si-C1QB 组 (17.92 ± 1.85) BBB 评分升高 ($q/P = 21.430 / < 0.001$); 与 si-C1QB 组比较, si-C1QB+LY294002 组 (9.17 ± 0.96) BBB 评分降低 ($q/P = 14.543 / < 0.001$)。

2.2 沉默 C1QB 对 SCI 大鼠脊髓组织炎性因子水平的影响 与 Control 组比较, SCI 组 TNF- α 、IL-6 水平升高, IL-10 水平降低 ($q/P = 14.325 / < 0.001, 14.820 / < 0.001, 13.739 / < 0.001$); SCI 组与 si-NC 组 3 项指标降低/升高幅度比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC 组比较, si-C1QB 组 TNF- α 、IL-6 水平降低, IL-10 水平升高 ($q/P = 11.889 / < 0.001, 12.385 / < 0.001, 11.692 / < 0.001$); 与 si-C1QB 组比较, si-C1QB+LY294002 组较 TNF- α 、IL-6 水平升高, IL-10 水平降低 ($q/P = 10.708 / < 0.001, 10.678 / < 0.001, 9.647 / < 0.001$), 见表 1。

2.3 沉默 C1QB 对 SCI 大鼠脊髓组织病理损伤的影响 Control 组脊髓组织结构完整, 神经元形态正常且分布均匀, 神经纤维走向连续规则; SCI 组脊髓组织结构紊乱, 其完整性破坏形成大量空洞, 神经元破坏严重, 神经纤维排列紊乱, 炎性细胞浸润明显; si-NC 组与 SCI 组病理形态表现一致; si-C1QB 组脊髓组织结构形态修复良好, 空洞化明显改善, 灰质白质界限相对

清晰, 神经纤维排列相对整齐, 炎性细胞浸润减少; si-C1QB+LY294002 组脊髓组织破坏严重, 见图 1。

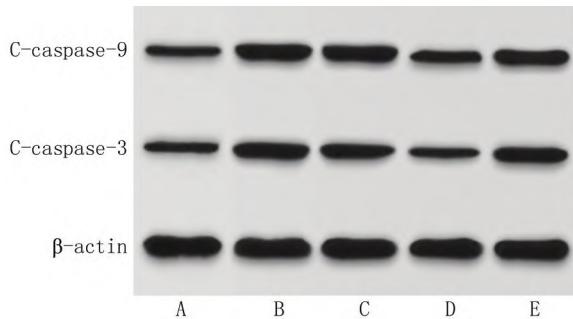
表 1 各组大鼠脊髓组织炎性因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/g)

Tab.1 Comparison of inflammatory factor levels in spinal cord tissues among groups of rats

组别	n	TNF- α	IL-6	IL-10
Control 组	6	120.67 \pm 13.44	94.82 \pm 9.96	193.56 \pm 20.26
SCI 组	6	355.62 \pm 37.86 ^a	277.53 \pm 28.51 ^a	71.34 \pm 8.02 ^a
si-NC 组	6	349.18 \pm 35.92	262.31 \pm 27.03	74.25 \pm 8.57
si-C1QB 组	6	157.39 \pm 16.47 ^b	112.47 \pm 12.15 ^b	170.92 \pm 18.35 ^b
si-C1QB+LY294002 组	6	314.88 \pm 32.04 ^c	236.75 \pm 25.79 ^c	89.16 \pm 9.71 ^c

注: 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 si-C1QB 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

2.4 沉默 C1QB 对 SCI 大鼠脊髓神经元凋亡的影响
与 Control 组比较, SCI 组神经元凋亡率、C-caspase-3、C-caspase-9 表达升高 ($q/P = 18.653/ < 0.001, 13.191/ < 0.001, 12.269/ < 0.001$); SCI 组与 si-NC 组比较 3 项指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC 组比较, si-C1QB 组 3 指标显著降低 ($q/P = 3.846/0.003, 12.187/ < 0.001, 9.242/ < 0.001$); 与 si-C1QB 组比较, si-C1QB+LY294002 组 3 指标显著升高 ($q/P = 3.149/0.010, 10.694/ < 0.001, 8.832/ < 0.001$), 见图 2、3 和表 2。



注: A. Control 组; B. SCI 组; C. si-NC 组; D. si-C1QB 组; E. si-C1QB+LY294002 组。

图 3 Western blot 检测各组大鼠脊髓 C-caspase-3、C-caspase-9 表达

Fig.3 Western blot analysis of C-caspase-3 and C-caspase-9 expression in spinal cord tissues of rats in each group

2.5 沉默 C1QB 对 SCI 大鼠脊髓组织 IBA-1 与 GAFP 表达的影响
与 Control 组比较, SCI 组 IBA-1、GAFP 表达升高 ($q/P = 13.168/ < 0.001, 14.795/ < 0.001$); 与 SCI 组比较, si-NC 组 IBA-1、GAFP 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC 组比较, si-C1QB 组 IBA-1、GAFP 表达降低 ($q/P = 12.050/ < 0.001, 11.900/ <$

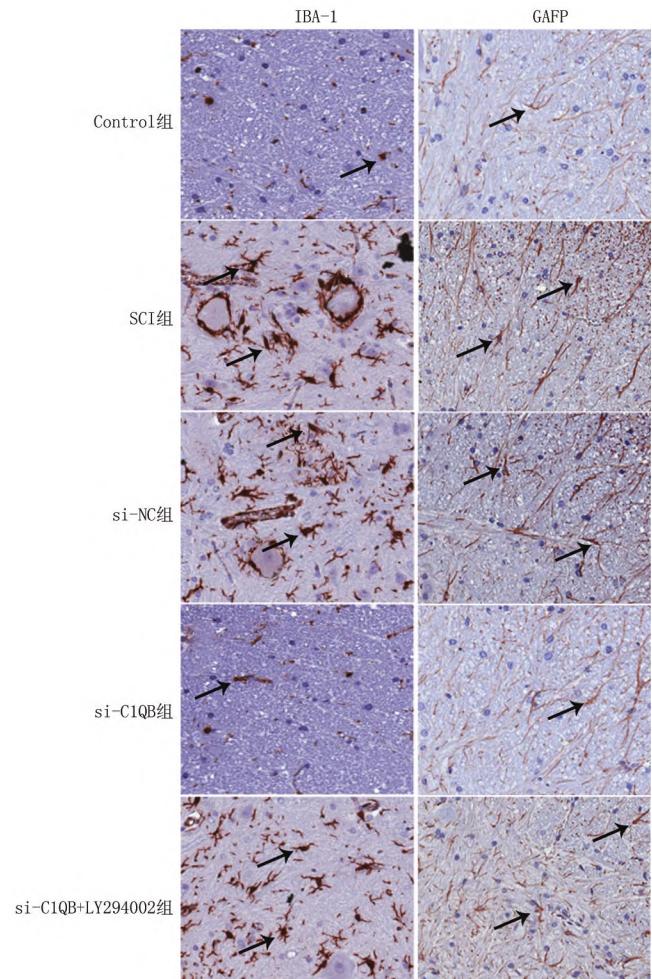
0.001); 与 si-C1QB 组比较, si-C1QB+LY294002 组 IBA-1、GAFP 表达升高 ($q/P = 10.681/ < 0.001, 10.614/ < 0.001$), 见图 4、表 3。

表 2 各组大鼠脊髓神经元凋亡及凋亡相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Comparison of spinal neuron apoptosis and apoptosis-related protein expression among groups of rats

组别	n	神经元凋亡率 (%)	C-caspase-3	C-caspase-9
Control 组	6	5.12 \pm 0.57	0.31 \pm 0.04	0.39 \pm 0.05
SCI 组	6	26.73 \pm 2.78 ^a	0.89 \pm 0.10 ^a	0.95 \pm 0.10 ^a
si-NC 组	6	25.96 \pm 2.64	0.84 \pm 0.09	0.90 \pm 0.10
si-C1QB 组	6	9.34 \pm 10.25 ^b	0.35 \pm 0.04 ^b	0.46 \pm 0.06 ^b
si-C1QB+LY294002 组	6	22.87 \pm 2.39 ^c	0.78 \pm 0.09	0.85 \pm 0.09 ^c

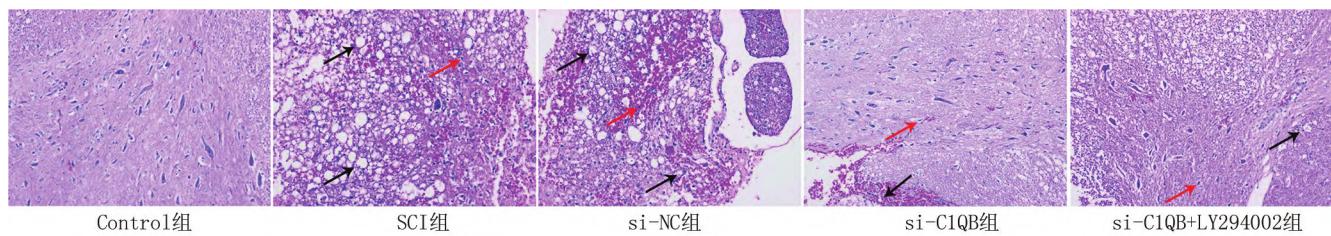
注: 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 si-C1QB 组比较, ^c $P < 0.05$ 。



注: 箭头指向阳性表达

图 4 免疫组化检测各组大鼠脊髓组织 IBA-1、GAFP 表达 (免疫组化染色, $\times 200$)

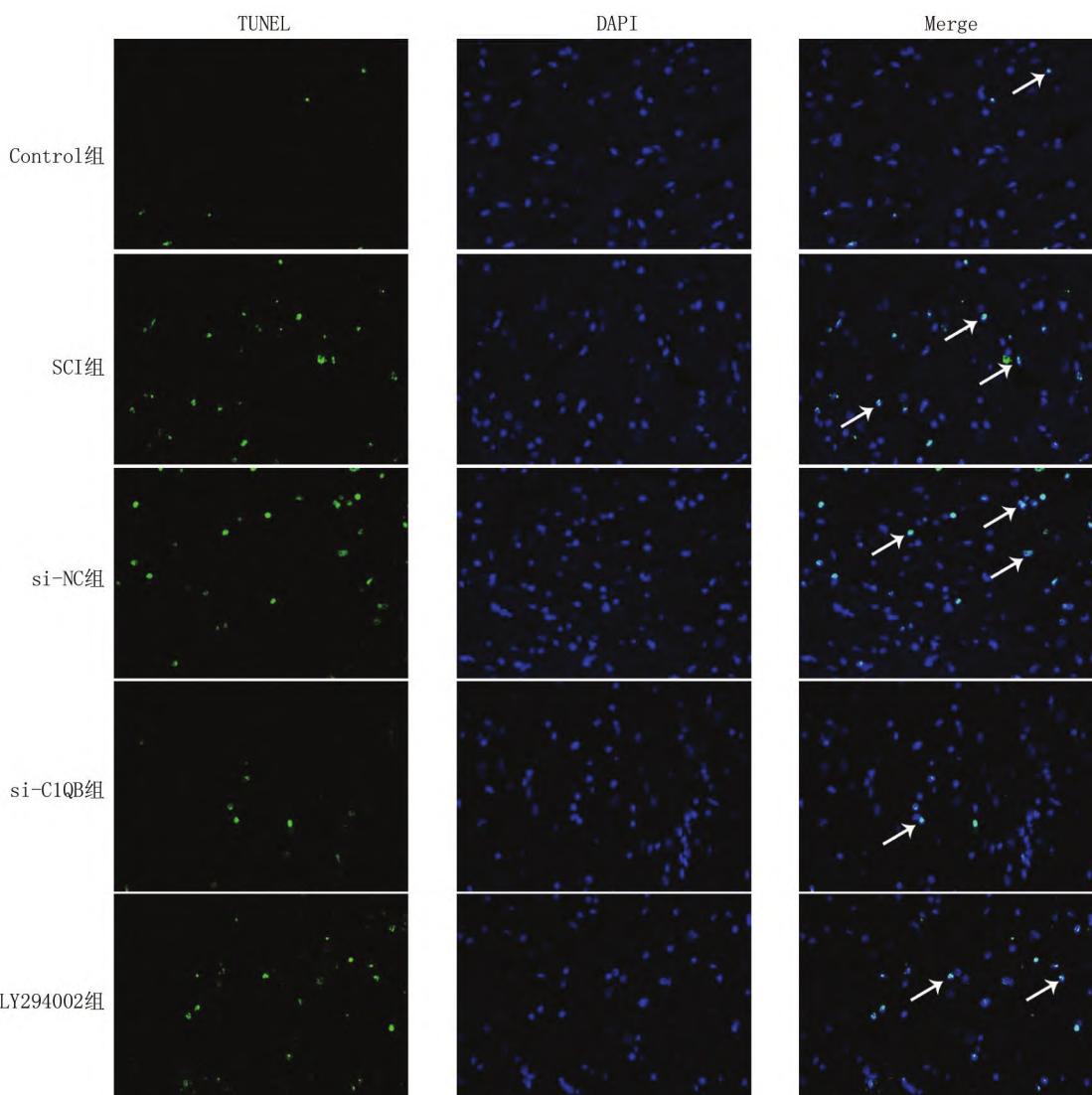
Fig.4 Immunohistochemical detection of IBA-1 and GFAP expression in spinal cord tissues of each group (IHC staining, $\times 200$)



注:黑色箭头指向空洞;红色箭头指向炎性细胞。

图 1 各组大鼠脊髓组织病理情况(HE 染色, $\times 100$)

Fig.1 Pathological conditions of spinal cord tissues in each group (HE staining, $\times 100$)



注:箭头指向凋亡神经元

图 2 TUNEL 染色检测各组大鼠脊髓神经元凋亡($\times 200$)

Fig.2 TUNEL staining for detection of spinal neuron apoptosis in each group ($\times 200$)

2.6 沉默 C1QB 对 SCI 大鼠 PI3K/AKT 信号通路的影响 与 Control 组比较, SCI 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达降低 ($q/P = 13.418/ < 0.001, 13.191/ <$

0.001) ;与 si-NC 组比较, SCI 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ;与 si-NC 组比较, si-C1QB 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达升高

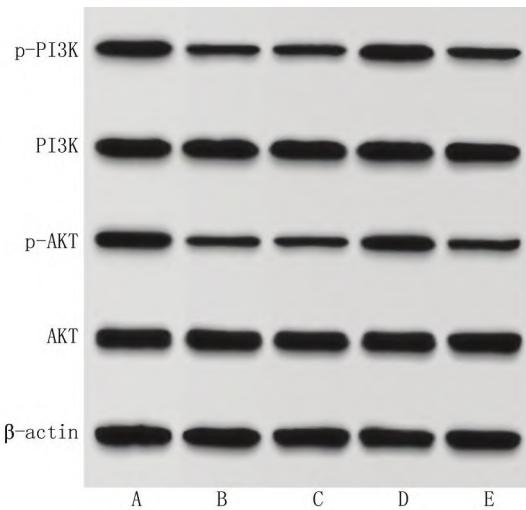
($q/P = 11.393/ < 0.001, 13.182/ < 0.001$)；与 si-C1QB 组比较, si-C1QB + LY294002 组 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达降低 ($q/P = 10.735/ < 0.001, 12.187/ < 0.001$), 见图 5、表 4。

表 3 各组大鼠脊髓 IBA-1、GFAP 平均光密度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Comparison of mean optical density values of IBA-1 and GFAP in spinal cord tissues among groups of rats

组 别	n	IBA-1	GFAP
Control 组	6	0.26±0.03	0.20±0.03
SCI 组	6	0.77±0.09 ^a	0.66±0.07 ^a
si-NC 组	6	0.74±0.08	0.62±0.07
si-C1QB 组	6	0.30±0.04 ^b	0.25±0.03 ^b
si-C1QB+LY294002 组	6	0.69±0.08 ^c	0.58±0.07 ^c

注: 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 si-C1QB 组比较, ^c $P < 0.05$ 。



注: A. Control 组; B. SCI 组; C. si-NC 组; D. si-C1QB 组; E. si-C1QB + LY294002 组。

图 5 Western blot 检测各组大鼠脊髓 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT 表达

Fig.5 Western blot analysis of p-PI3K, PI3K, p-AKT, and AKT expression in spinal cord tissues of rats in each group

表 4 各组大鼠脊髓 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Comparison of p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT protein expression in spinal cord tissues among groups of rats

组 别	n	p-PI3K/PI3K	p-AKT/AKT
Control 组	6	0.93±0.10	0.88±0.10
SCI 组	6	0.34±0.04 ^a	0.30±0.04 ^a
si-NC 组	6	0.38±0.05	0.32±0.04
si-C1QB 组	6	0.90±0.10 ^b	0.85±0.09 ^b
si-C1QB+LY294002 组	6	0.41±0.05 ^c	0.36±0.04 ^c

注: 与 Control 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 si-C1QB 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

3 讨 论

脊髓损伤是最常见的致残性神经系统损伤, 可促使患者出现运动、感觉功能障碍, 甚至危害患者生命。其发病机制较复杂, 与神经炎性反应、神经细胞凋亡及免疫系统等均有关, 另外脊髓损伤后仍具备轴突再生潜能, 促进损伤处神经修复与再生, 对于治疗脊髓损伤至关重要。而在脊髓损伤后免疫系统可被广泛激活, 其中包括补体系统, C1QB 是补体系统中的重要蛋白, 已有研究表明 C1QB 在脊髓损伤患者血清中高表达, 而本研究对 C1QB 进行沉默, 发现脊髓损伤大鼠的 BBB 评分升高, 其脊髓组织病理损伤得到显著改善。而且 C1QB 是与神经病理性疼痛发生发展密切相关的枢纽基因之一, 在坐骨神经损伤大鼠中高表达^[10]。另外有研究显示, 抑制 C1QB 表达可提高免疫功能, 促进大鼠脊髓损伤后运动功能的恢复^[11]。另外研究显示, 抑制 C1QB 表达可抑制 Iba-1 阳性小胶质细胞进而抑制炎性反应, 改善实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠葡萄膜炎^[12]。抑制 C1QB 表达可增强免疫调节功能, 抑制神经炎性反应, 对阿尔茨海默病小鼠具有神经保护作用^[13]。表明沉默 C1QB 可促进脊髓损伤大鼠神经修复, 可作为脊髓损伤的潜在治疗机制。

神经炎性反应及神经细胞凋亡是脊髓损伤进程中的重要病理途径, 也是加剧脊髓继发性损伤的重要原因。当脊髓组织受到外部撞击等致病因素的影响时, 可激活小胶质细胞释放大量炎性因子, 加剧炎性损伤, 促进神经细胞凋亡, 进而促进脊髓损伤的发生发展。本研究发现, 脊髓损伤大鼠体内 TNF- α 、IL-6 水平及 C-caspase-3、C-caspase-9 表达显著升高, IL-10 水平显著降低, 而沉默 C1QB 可降低 TNF- α 、IL-6 水平及 C-caspase-3、C-caspase-9 表达, 升高 IL-10 水平。TNF- α 、IL-6、IL-10 作为参与炎性反应的重要调节因子, 研究显示, 抑制 TNF- α 和 IL-6 的分泌, 促进 IL-10 的分泌, 可减少小胶质细胞 M1/M2 极化介导的炎性反应, 改善小鼠脊髓损伤后的功能恢复^[14]。降低炎性因子 TNF- α 、IL-6 水平可抑制炎性反应, 改善脊髓损伤后小鼠的运动功能^[15]。另外 C-caspase-3、C-caspase-9 是促进神经细胞凋亡的关键蛋白, 在大鼠脊髓损伤后显著上调, 抑制 C-caspase-3、C-caspase-9 表达可抑制神经细胞凋亡, 改善神经细胞活力和运动功能, 减轻大鼠脊髓损伤后线粒体途径介导的细胞凋亡和运动功能障碍^[16]。抑制 C-caspase-3、C-caspase-9 表达可抑制大鼠脊髓损伤后神经细胞的凋亡, 增强神经元的存活, 促进损伤部位神经功能和病理形态学的恢复^[17]。表明沉默 C1QB 可通过抑制神经炎性反应及神经细胞凋亡,

促进脊髓损伤大鼠神经修复。

另外脊髓损伤后中枢神经系统中胶质细胞活化也是引发脊髓继发性损伤的重要因素。本研究发现,胶质细胞标志性蛋白 IBA1、GFAP 在脊髓损伤大鼠体内高表达,沉默 C1QB 可抑制 IBA1、GFAP 表达。其中 IBA1 是小胶质细胞的标志蛋白,脊髓损伤后,小胶质细胞被激活释放大量炎性因子 TNF- α 、IL-6 等,可导致神经细胞凋亡及神经功能永久性障碍^[18]。GFAP 是星形胶质细胞的标志蛋白,脊髓损伤后,其被激活可产生反应性星形胶质细胞,阻碍神经元生长及轴突再生^[19]。研究显示,抑制 IBA1、GFAP 表达可减少炎性细胞浸润和星形胶质细胞活化,并增加神经元存活,对脊髓损伤小鼠发挥神经保护作用^[20]。另外抑制 IBA1 表达,促进脊髓小胶质细胞自噬,可抑制小胶质细胞的促炎活性,恢复小鼠的运动功能^[21]。表明沉默 C1QB 可抑制小胶质细胞及星形胶质细胞活化,促进脊髓损伤大鼠神经修复。

PI3K/AKT 信号通路在中枢神经系统中参与调控神经细胞的生长、轴突发育、凋亡等多种生理病理过程。当脊髓组织受到刺激,PI3K 被激活并磷酸化,然后促进磷酸化 AKT,进而调控下游靶向基因,抑制神经炎性反应及神经细胞凋亡,促进脊髓损伤后神经功能恢复^[22]。本研究发现,脊髓损伤后 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达降低,沉默 C1QB 可升高 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 表达,推测沉默 C1QB 可通过激活 PI3K/AKT 通路促进脊髓损伤大鼠神经修复。而且有研究显示,激活 PI3K/AKT 信号通路可抑制小胶质细胞及星形胶质细胞分化,增强局部神经干细胞募集,促进神经元和轴突再生,促进脊髓损伤小鼠早期阶段的功能恢复^[23]。激活 PI3K/AKT 通路可减轻小胶质细胞的活化,减轻炎性反应并促进内源性神经干细胞分化为功能性神经元和突触,促进脊髓损伤小鼠的行为和电生理恢复^[24]。另外研究发现,LY294002 处理可部分逆转沉默 C1QB 变化,对沉默 C1QB 可激活 PI3K/AKT 通路促进脊髓损伤大鼠神经修复。

4 结 论

综上所述,沉默 C1QB 可促进脊髓损伤大鼠神经修复,其与激活 PI3K/AKT 信号通路相关。另外脊髓损伤的发病机制较复杂,本研究仅从免疫、炎性反应、凋亡进行论述,后续将增设实验内容,全方位进行论证探讨。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

张家诚、叶双:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;李从文、刘筱:提出研究思路,分析实验数据,论文审核;薛淮:课题设计,论文撰写;权笑宇:实施研究过程,资料搜集整理,论文修改;许铁:进行统计学分析

参 考 文 献

- [1] Ding W, Hu S, Wang P, et al. Spinal cord injury: The global incidence, prevalence, and disability from the global burden of disease study 2019 [J]. Spine (Phila Pa 1976), 2022, 47 (21): 1532-1540. DOI: 10.1097/BRS.0000000000004417.
- [2] GBD Spinal Cord Injuries Collaborators. Global, regional, and national burden of spinal cord injury, 1990-2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. Lancet Neurol, 2023, 22 (11): 1026-1047. DOI: 10.1016/S1474-4422(23)00287-9.
- [3] Hu X, Xu W, Ren Y, et al. Spinal cord injury: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8 (1): 245-272. DOI: 10.1038/s41392-023-01477-6.
- [4] 龚元晋,王岩松. 补体系统在脊髓损伤中作用的研究进展 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2022, 32 (3): 274-279. DOI: 10.3969/j.issn.1004-406X.2022.03.11.
- [5] 叶双,张家诚,刘筱,等. 基于蛋白质组学研究和生信分析的 C1QB 在脊髓损伤中的表达及意义 [J]. 徐州医科大学学报, 2023, 43 (5): 325-330. DOI: 10.3969/j.issn.2096-3882.2023.05.003.
- [6] Xiao CL, Yin WC, Zhong YC, et al. The role of PI3K/Akt signalling pathway in spinal cord injury [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156 (1): 113881-113891. DOI: 10.1016/j.bioph.2022.113881.
- [7] Hu Z, Xuan L, Wu T, et al. Taxifolin attenuates neuroinflammation and microglial pyroptosis via the PI3K/Akt signaling pathway after spinal cord injury [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 114 (1): 109616-109626. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109616.
- [8] 夏宇,孙佳,齐争艳,等. 缓释神经营养因子 3 和神经节苷脂 GD1a 的聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米微球修复大鼠脊髓损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27 (16): 2518-2524. DOI: 2095-4344(2023)16-02518-07.
- [9] 许洋,吴成林,郭德华,等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探究补阳还五汤联合骨髓间质干细胞移植治疗脊髓损伤的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29 (4): 9-17. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20221805.
- [10] Wang K, Yi D, Yu Z, et al. Identification of the hub genes related to nerve injury-induced neuropathic pain [J]. Front Neurosci, 2020, 14 (1): 488-494. DOI: 10.3389/fnins.2020.00488.
- [11] Wang QL, Li TT, Fang CL, et al. Bioinformatics analysis of the wheel treadmill test on motor function recovery after spinal cord injury [J]. Ibrain, 2021, 7 (4): 265-277. DOI: 10.1002/ibra.12006.
- [12] Hong S, Jung K, Ahn M, et al. Eugenol ameliorates uveitis in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis through the suppression of key inflammatory genes [J]. Anim Cells Syst (Seoul), 2024, 28 (1): 37-44. DOI: 10.1080/19768354.2024.2304557.

(下转 1515 页)

- DOI:10.3969/j.issn.1673-7202.2020.03.006.
- [7] 贾振华.心肺同治理论与临床[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(19):11-17. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20250936.
- [8] 贾振华.“新感入络”概念的提出及其临床应用价值[J].中医杂志,2025,66(8):775-779. DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.08.003.
- [9] 吴以岭.络病治疗原则与通络药物[J].疑难病杂志,2005,4(4):213-15. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2005.04.008.
- [10] 贾振华.络病理论指导新型冠状病毒肺炎证治探讨[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(12):18-22. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20201146.
- [11] 斯培培,王同兴,常丽萍,等.基于数据挖掘的古代疫病治疗用药规律分析[J].中国实验方剂学杂志,2025,31(11):287-294. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20250467.
- [12] 贾振华.肺疫证治规律探讨与连花清瘟组方新解[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(17):203-210. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20241247.
- [13] 尹玉洁,常丽萍.中药连花清瘟胶囊/颗粒在呼吸系统疾病中的药理研究及临床应用进展[J].中国临床药理学与治疗学,2021,26(10):1174-1180. DOI:10.12092/j.issn.1009-2501.2021.10.010.
- [14] 贾振华.连花清咳“化痰止咳”改善通气换气功能的科学内涵和临床价值解析[J].中国实验方剂学杂志,2021,27(23):190-194.
- DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20211563.
- [15] Hao Y, Wang T, Hou Y, et al. Therapeutic potential of LianhuaQingke in airway mucushypersecretion of acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chin Med, 2023, 18(1): 145. DOI: 10.1186/s13020-023-00851-4.
- [16] Wang X, Hao Y, Yin Y, et al. LianhuaQingke preserves mucociliary clearance in rat with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease by maintaining ciliated cells proportion and protecting structural integrity and beat function of cilia[J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2024, 19: 403-418. DOI: 10.2147/COPD.S436323.
- [17] 胡珍,项艳,杨群菲,等.连花清咳片辅助治疗急性支气管炎(痰热壅肺证)临床疗效及对血清炎性细胞因子水平的影响[J].中华中医药学刊,2024,42(12):201-205. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2024.12.041.
- [18] Jin P, Qi H, Zhao J, et al. Lianhua Qingke Tablet in severe pneumonia: Clinical efficacy and immunoregulatory mechanisms[J]. J Ethnopharmacol, 2025, 342: 119420. DOI: 10.1016/j.jep.2025.119420.
- [19] 贾振华.慢性阻塞性肺疾病稳定期心肺气虚病机探讨[J].疑难病杂志,2025,24(8):998-1002. DOI:10.3969/j.issn.1671-6450.2025.08.019.

(收稿日期:2025-10-23)

(上接 1509 页)

- [13] Faridar A, Vasquez M, Thome AD, et al. Ex vivo expanded human regulatory T cells modify neuroinflammation in a preclinical model of Alzheimer's disease[J]. Acta Neuropathol Commun, 2022, 10(1):144-154. DOI: 10.1186/s40478-022-01447-z.
- [14] Xu A, Yang Y, Shao Y, et al. FHL2 regulates microglia M1/M2 polarization after spinal cord injury via PARP14-dependent STAT1/6 pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2023, 124 (Pt A): 110853-110863. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110853.
- [15] Gao ZS, Zhang CJ, Xia N, et al. Berberine-loaded M2 macrophage-derived exosomes for spinal cord injury therapy[J]. Acta Biomater, 2021, 126(1):211-223. DOI: 10.1016/j.actbio.2021.03.018.
- [16] Zhang Q, Li G, Kong J, et al. miR222-3p reduces neuronal cell apoptosis and alleviates spinal cord injury by inhibiting Bbc3 and Bim [J]. Neurosci Res, 2023, 188(1):39-50. DOI: 10.1016/j.neures.2022.10.008.
- [17] He X, Guo X, Deng B, et al. HSPA1A ameliorated spinal cord injury in rats by inhibiting apoptosis to exert neuroprotective effects [J]. Exp Neurol, 2023, 361(1):114301. DOI: 10.1016/j.expneurol.2022.114301.
- [18] Xue H, Ran B, Li J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell exosomes-derived microRNA-216a-5p on locomotor performance, neuronal injury, and microglia inflammation in spinal cord injury[J]. Front Cell Dev Biol, 2023, 11(1):1227440-1227450. DOI: 10.3389/fcell.2023.1227440.
- [19] Xiang Z, Zhang S, Yao X, et al. Resveratrol promotes axonal regen-

eration after spinal cord injury through activating Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(20):23603-23619. DOI: 10.18632/aging.203628.

- [20] Goldshmit Y, Shalom M, Ruban A. Treatment with pulsed extremely low frequency electromagnetic field (PELF-EMF) exhibit anti-inflammatory and neuroprotective effect in compression spinal cord injury model[J]. Biomedicines, 2022, 10(2):325-337. DOI: 10.3390/biomedicines10020325.
- [21] Li Y, Lei Z, Ritzel RM, et al. Impairment of autophagy after spinal cord injury potentiates neuroinflammation and motor function deficit in mice[J]. Theranostics, 2022, 12(12):5364-5388. DOI: 10.7150/thno.72713.
- [22] Lv X, Liang J, Wang Z. MiR-21-5p reduces apoptosis and inflammation in rats with spinal cord injury through PI3K/AKT pathway [J]. Panminerva Med, 2024, 66(3):256-265. DOI: 10.23736/S0031-0808.20.03974-9.
- [23] Fan L, Liu C, Chen X, et al. Exosomes-loaded electroconductive hydrogel synergistically promotes tissue repair after spinal cord injury via immunoregulation and enhancement of myelinated axon growth [J]. Adv Sci (Weinh), 2022, 9(13):e2105586-e2105607. DOI: 10.1002/advs.202105586.
- [24] Liu M, Zhang W, Han S, et al. Multifunctional conductive and electrogenic hydrogel repaired spinal cord injury via immunoregulation and enhancement of neuronal differentiation[J]. Adv Mater, 2024, 36(21):e2313672-e2313682. DOI: 10.1002/adma.202313672.

(收稿日期:2025-02-24)