

脱细胞异体神经移植通过 Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 信号通路保护 SNI 大鼠脊髓前角运动神经元的机制

郑梦圆^{1,2}, 郝梓彤^{1,2}, 朱清华^{1,2}, 田壮壮¹, 锅兴达¹, 郑宇荷¹, 李成¹, 付秀美^{1,3}

(承德医学院¹ 基础医学院人体解剖学教研室,² 基础医学研究所, 承德 067000;

³ 河北省神经损伤与修复重点实验室, 承德 067000)

摘要 **目的** 探讨脱细胞异体神经移植(ANA)对坐骨神经损伤(SNI)大鼠脊髓前角运动神经元的保护作用及其机制。**方法** 将 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、ANA 桥接组(桥接组)和自体神经移植组(自转组),每组 6 只。切除右侧坐骨神经 10 mm 制备 SNI 大鼠模型。桥接组将 ANA 桥接于损伤神经的两断端处,自转组将自体神经首尾翻转后桥接于两断端处。应用紫外光吸收法测定正常神经与 ANA 中 DNA 含量,足迹试验测定各组大鼠坐骨神经功能指数(SFI),计算胫前肌湿重比率,HE 染色观察各组大鼠脊髓前角运动神经元的形态结构,免疫荧光和 Western blot 检测 L₄₋₆ 脊髓中 Apaf-1、Caspase-3、Bcl-2、Bax 和 Cyt-C 蛋白的表达。**结果** 所制备的 ANA 中 DNA 含量低于正常神经($P < 0.05$)。与正常组相比,模型组 SFI 和胫前肌湿重比率降低($P < 0.001$);与模型组相比,桥接组和自转组 SFI 和胫前肌湿重比率均升高($P < 0.001$, $P < 0.05$),且自转组高于桥接组($P < 0.001$, $P < 0.01$)。HE 染色结果显示,正常组大鼠脊髓前角运动神经元结构完整,胞体边界清晰;模型组神经元溶解坏死,胞体边界模糊;桥接组神经元溶解坏死减少,仍可见核移位现象;自转组神经元形态结构相对完整,胞体边界清晰。与正常组相比,模型组 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达增加($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组相比,桥接组和自转组 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达减少($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$);Bcl-2 蛋白表达增加($P < 0.05$)。并且自转组 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达低于桥接组($P < 0.001$, $P < 0.05$, $P < 0.05$, $P < 0.05$)。**结论** ANA 可通过改善 SNI 大鼠脊髓前角运动神经元的形态结构,增加脊髓中 Bcl-2 蛋白表达,减少 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达,对 SNI 大鼠脊髓前角运动神经元发挥保护作用,其机制可能与 Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 介导的线粒体凋亡信号通路相关。

关键词 脱细胞异体神经移植;坐骨神经损伤;Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 信号通路;脊髓;运动神经元;大鼠

中图分类号 R322

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2035-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.007

周围神经损伤(peripheral nerve injury, PNI)是临床常见的神经系统损伤性疾病之一^[1]。目前临床上修复长距离神经损伤最好的方法是自体神经移植^[2],但存在二次创伤、供体选择受限、供区功能障碍等缺点^[3]。脱细胞异体神经移植物(acellular nerve allografts, ANA)保留了施万细胞的基底层结构,且具有较好的组织相容性和低免疫原性,在长距离 PNI 修复中具有良好的桥接性能^[4]。然而其作用机制尤其是在线粒体凋亡方面尚不明确。该研

究建立 SNI 模型,制备 ANA 以桥接损伤的神经,通过检测各组大鼠坐骨神经功能指数(sciatic functional index, SFI)、胫前肌湿重比率以及观察脊髓前角运动神经元的形态结构,阐明 ANA 对 SNI 大鼠脊髓前角运动神经元的保护作用;通过检测脊髓中凋亡蛋白酶活化因子 1(apoptotic protease-activating factor 1, Apaf-1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)和细胞色素 C(Cytochrome C, Cyt-C)蛋白的表达,探讨 ANA 发挥保护 SNI 大鼠脊髓前角运动神经元的机制,以期为 ANA 修复 PNI 提供理论基础和实验支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只(购自

2025-09-23 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2021406056);河北省高等学校科学技术研究项目(编号:ZD2020178);承德医学院大学生创新创业训练计划项目(编号:2022014、2024074)

作者简介:郑梦圆,女,本科生;

付秀美,女,教授,硕士生导师,通信作者, E-mail: fuxiumei@cdmc.edu.cn

北京华阜康科技有限公司), 体质量(200 ± 20) g, 动物生产许可证号: SCXK(京)2019-0008。实验动物置于承德医学院实验动物中心实验室饲养, 大鼠饲养在温度为 $22 \sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 $40\% \sim 60\%$ 的舒适环境中, 12 h/12 h 光暗循环, 自由摄食饮水, 动物实验内容经承德医学院实验动物伦理委员会批准(批准号: CDMULAC-20221005)。

1.1.2 主要试剂和仪器 兔抗 Bcl-2 抗体、兔抗 Bax 抗体、兔抗 Caspase-3 抗体、兔抗 Apaf-1 抗体、兔抗 Cyt-C 抗体、兔抗 β -actin 抗体、HRP 标记山羊抗兔 IgG、花青素 3 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体, 均购自美国 Abclonal 公司; Triton X-100、脱氧胆酸钠购自美国 Sigma 公司; RIPA 组织细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、快速凝胶试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。ECL 化学发光底物试剂盒购自兰杰柯科技有限公司。BX43 光学显微镜、荧光显微镜及图像采集分析系统购自日本 Olympus 公司; 电泳仪、转印仪购自美国 Bio-Rad 公司; 冰冻切片机购自美国 Thermo 公司; Tanon 全自动化学发光仪购自上海天能科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 ANA 制备 参考文献^[5], 随机选取 8 只大鼠, 采用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射法麻醉大鼠。在无菌条件下, 用显微剪切取双侧约 15 mm 长的坐骨神经, 剥除覆于神经外膜上的脂肪组织后将其置于蒸馏水中浸泡 12 h, 随后置于 4% Triton X-100 内消化 12 h, 用蒸馏水清洗 3 h 进行脱细胞处理, 再使用 3% 脱氧胆酸钠溶液进行脱色处理, 摇床持续震荡 12 h 并维持 100 次/分的速度, 重复以上操作 1 次, 蒸馏水清洗过夜, 最后放置于含抗生素的 PBS 缓冲液 (0.01 mol/L) 中, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下储存。

1.2.2 实验分组及处理 将 24 只大鼠随机分为正常组、模型组、ANA 桥接组(桥接组)、自体神经移植组(自转组), 每组 6 只。正常组不做任何处理。模型组采用离断坐骨神经 10 mm 制备 SNI。桥接组皮肤肌肉切开位置同模型组, 切除 10 mm 坐骨神经, 将制备好的 ANA 使用显微缝合技术, 吻合于断端处。自转组切口位置同上, 切除 10 mm 坐骨神经, 将其首尾翻转后吻合于断端处。

1.2.3 DNA 含量测定 将正常神经和制备的 ANA 用组织研磨仪充分研磨, 根据 DNA 含量提取试剂盒的说明进行组织 DNA 提取, 超微量分光光度计测定 DNA 含量。

1.2.4 大鼠 SFI 测定 自制长 70 cm、宽 10 cm、高 12 cm 的纸箱跑道, 底部放入一张白纸, 大鼠两足均匀沾满黑色墨水后放入跑道内, 让大鼠通过跑道, 以双足留有清晰足印为宜。选取最为清晰的足印进行测量, 测量指标包括: 患侧足趾宽度 (experimental toe spread, ETS)、正常足趾宽度 (normal toe spread, NTS)、患侧足印长度 (experimental print length, EPL)、正常足印长度 (normal print length, NPL)、患侧中间三趾宽度 (experimental intermediary toe spread, EIT)、正常三趾宽度 (normal intermediary toe spread, NIT)。测量数值需精确到毫米, 测量结束后代入公式计算, 公式为: $\text{SFI} = 109.5 \times (\text{ETS} - \text{NTS}) / \text{NTS} - 38.3 \times (\text{EPL} - \text{NPL}) / \text{NPL} + 13.3 \times (\text{EIT} - \text{NIT}) / \text{NIT} - 8.8$ 。SFI 值越小则坐骨神经功能越差: 0 代表坐骨神经功能完全正常, -100 代表坐骨神经功能完全损伤。

1.2.5 大鼠胫前肌湿重比率计算 使用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 生理盐水灌注取材。取大鼠跟腱近止点至股骨内、外髁的胫前肌, 用电子分析天平称量患侧和健侧胫前肌质量。根据公式: 胫前肌湿重比率 = 患侧胫前肌质量 / 健侧胫前肌质量 $\times 100\%$ 计算各组大鼠胫前肌湿重比率。

1.2.6 HE 染色实验 每组取 3 只大鼠, 将 L_{4-6} 节段的脊髓置于多聚甲醛中固定后, OCT 包埋并制成厚度约 $30\text{ }\mu\text{m}$ 的切片, 依次放入苏木精染液 18 ~ 25 min, 分化液 (1% 盐酸乙醇溶液: 70% 乙醇 99 ml、盐酸 1 ml 配制而成) 分化 5 s, 氢氧化胺水溶液 3 ~ 5 min, 伊红染液 1 min, 水洗 2 min, 放入纯水中 20 s。后续依次放入 75% 乙醇溶液, 80% 乙醇溶液, 85% 乙醇溶液, 95% 乙醇溶液 I、II、III, 100% 乙醇溶液 I、II、III 中进行脱水处理, 每次 20 s。放入二甲苯溶液 I、II、III, 每次 2 min 进行透明, 中性树脂封片后待其自然晾干即可置于显微镜下拍照观察。

1.2.7 免疫荧光实验 每组 3 只大鼠, 取 L_{4-6} 节段脊髓进行冰冻切片, 0.2% Triton X-100 透膜处理 25 min, 放入 0.01 mol/L 枸橼酸 - 枸橼酸钠抗原修复液持续间断微波修复 10 min, 用 5% BSA 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内封闭孵育 1 h, 加入 Apaf-1 抗体 (1 : 100)、Caspase-3 抗体 (1 : 100)、Bcl-2 抗体 (1 : 100)、Bax 抗体 (1 : 100)、Cyt-C 抗体 (1 : 100), 放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。次日将切片取出复温后滴加 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 200)、FITC 标记的山羊抗兔 IgG (1 : 200), 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴箱内孵育 1 h, 防荧光淬灭剂进行封片, 置于荧光显微镜下观

察并采集图像。使用 Image J 分析各组平均荧光强度,每组重复 3 次。

1.2.8 Western blot 实验 每组 3 只大鼠,取 L₄₋₆ 节段脊髓组织,使用裂解液裂解后提取蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定每组蛋白浓度。在 95 ℃ 下使用干式孵育器煮沸 10 min 使蛋白充分变性,将蛋白冷却后放入 -20 ℃ 冰箱用于后续实验。取 20 μg 的蛋白进行垂直电泳分离蛋白,将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后分别加入一抗 Caspase-3 (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000)、Cyt-C (1 : 1 000)、β-actin (1 : 1 0000),在 4 ℃ 下孵育过夜,次日取出加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1 : 8 000),常温摇床孵育 1 h,加入适量超敏发光液,成像。使用 Image J 图像分析软件进行蛋白条带的灰度值分析,以目的蛋白条带与对应内参条带的灰度值之比作为目的蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism8.0 软件进行统计学分析,以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组样本间的比较采用独立样本 *t* 检验,多组样本的组间比较采用单因素方差分析法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANA 与正常神经中 DNA 含量变化 与正常神经相比,ANA 中的 DNA 含量减少 ($P < 0.05$)。说明制备的 ANA 细胞脱除良好。见图 1。

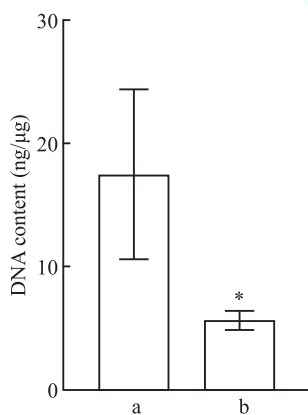


图1 正常神经与 ANA 中 DNA 含量

Fig.1 DNA content in normal nerve and ANA

a: normal nerve; b: ANA; * $P < 0.05$ vs normal nerves.

2.2 ANA 对大鼠 SFI 值的影响 各组大鼠 SFI 值见图 2。与正常组相比,模型组 SFI 值降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,桥接组、自转组 SFI 值均升

高 ($P < 0.001$);与桥接组比较,自转组 SFI 值升高 ($P < 0.001$)。说明 ANA 可提高大鼠 SFI 值。

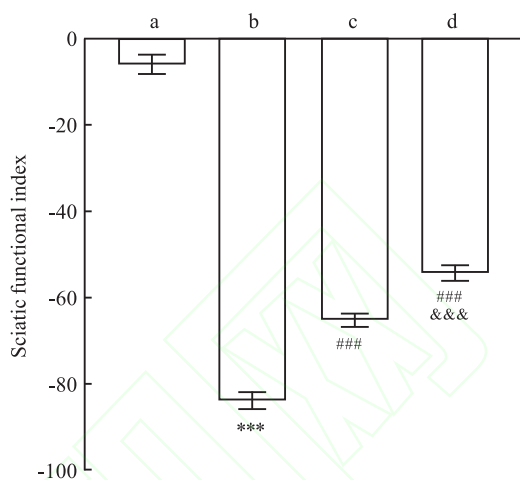


图2 各组大鼠 SFI 比较

Fig.2 Comparison of SFI of rats in each group

a: normal group; b: model group; c: bridge group; d: autograft group; *** $P < 0.001$ vs normal group; ### $P < 0.001$ vs model group; &&& $P < 0.001$ vs bridge group.

2.3 ANA 对大鼠胫前肌湿重比率的影响 正常组、模型组、桥接组和自转组胫前肌湿重比率见图 3。与正常组比较,模型组大鼠胫前肌湿重比率降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,桥接组与自转组大鼠胫前肌湿重比率升高 ($P < 0.05$, $P < 0.001$),自转组大鼠胫前肌湿重比高于桥接组 ($P < 0.01$)。说明 ANA 可增加大鼠胫前肌湿重比率。

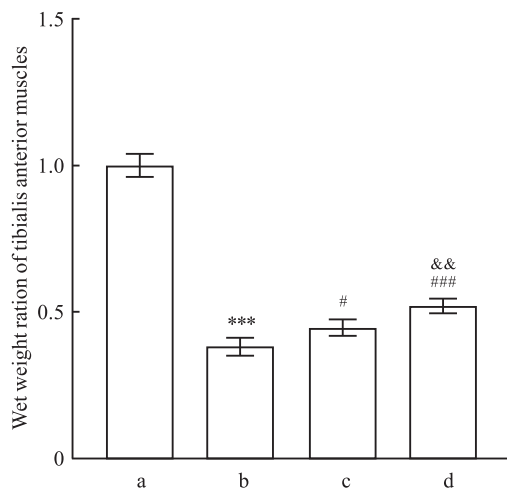


图3 各组大鼠胫前肌湿重比率

Fig.3 Wet weight ratio of anterior tibial muscle of rats in each group

a: normal group; b: model group; c: bridge group; d: autograft group; *** $P < 0.001$ vs normal group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs model group; && $P < 0.01$ vs bridge group.

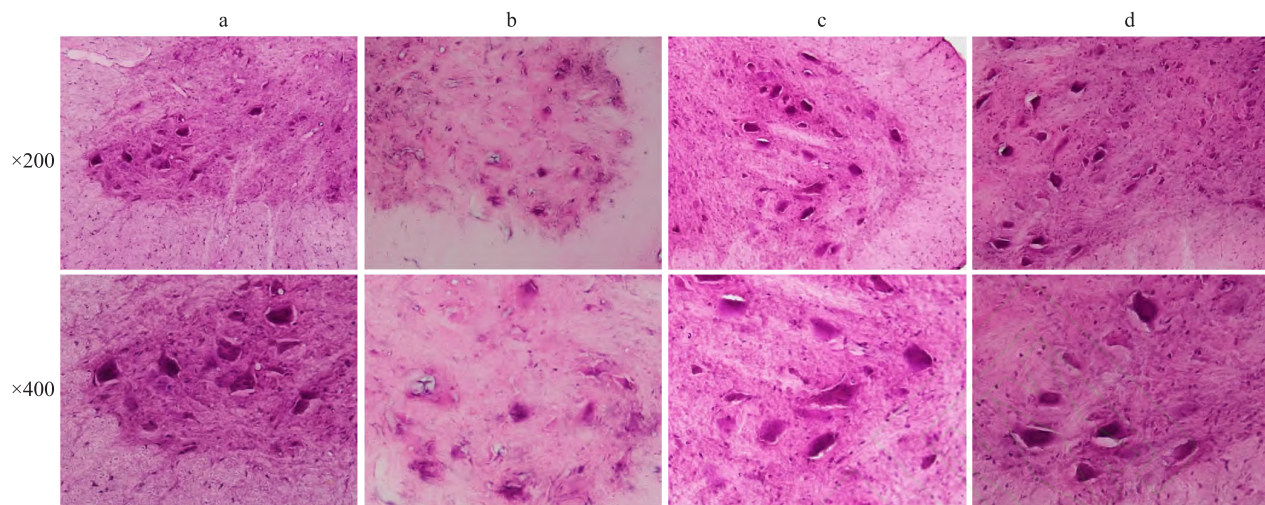


图4 各组大鼠脊髓 HE 染色结果 ×400

Fig.4 HE staining results of spinal cord of rats in each group ×400

a: normal group; b: model group; c: bridge group; d: autograft group.

2.4 ANA 可改善大鼠脊髓前角运动神经元的形态结构 HE 染色结果显示:正常组大鼠脊髓前角运动神经元细胞结构完整,细胞排列整齐,胞体边界清楚,染色均匀;模型组脊髓前角运动神经元胞体边界不清楚,细胞核碎裂,出现细胞溶解、坏死,细胞排列紊乱;桥接组脊髓前角运动神经元细胞溶解坏死明显减少,细胞边界比较清楚,染色均匀;自转组脊髓前角运动胞体相对边界清楚,染色较均匀,细胞结构相对完整。说明 ANA 可改善大鼠脊髓前角运行神经元的形态结构。见图 4。

2.5 免疫荧光染色法和 Western blot 法检测脊髓中 Apaf-1、Caspase-3、Bcl-2、Bax、Cyt-C 蛋白的表达情况 免疫荧光染色后大鼠脊髓中的 Apaf-1、Caspase-3、Bcl-2 蛋白被标记为绿色,Bax 和 Cyt-C 蛋白被标记为红色;结果显示,阳性产物主要位于脊髓前角运动神经元的细胞核。进一步荧光定量分析结果显示:与正常组比较,模型组大鼠脊髓中 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达增高 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达降低 ($P < 0.001$);与模型组比较,桥接组与自转组大鼠脊髓中 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达减少 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达增加 ($P < 0.001$);与桥接组比较,自转组大鼠脊髓中 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达量减少 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达增加 ($P < 0.001$)。Western blot 检测结果显示:与正常组比较,模型组大鼠脊髓中 Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达增高 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意

义;与模型组比较,桥接组与自转组大鼠脊髓中 Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达减少 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达增加 ($P < 0.05$);与桥接组比较,自转组大鼠脊髓中 Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达量减少 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达差异无统计学意义。见图 5、6。

3 讨论

SNI 后远端神经纤维发生 Wallerian 变性,轴突和髓鞘碎裂、崩解,轴突与其神经元胞体断开连接,轴浆运输受到阻碍,使得神经元胞体的功能状态发生变化,继而引起神经元的坏死或者凋亡^[6-7]。课题组前期研究^[5,8-9]已经证明,ANA 可通过促进神经营养因子的表达,改善脊髓神经元中尼氏体的形态以及增加其数量等方式有效促进 SNI 的修复,可作为长距离神经损伤中良好的桥接支架。Smail et al^[10]研究发现,ANA 搭载骨桥蛋白可以促进巨噬细胞的极化,从而减少促炎细胞因子的分泌,增强轴突生长,以促进损伤神经的修复。本研究应用紫外光吸收法检测 ANA 的 DNA 含量,结果显示,ANA 中的 DNA 含量显著低于正常神经,说明制备的 ANA 脱细胞效果良好,引发组织间排异反应低或者无,因而具有较好的组织相容性和较低的免疫原性,是后续实验研究良好的桥接物。

PNI 后会导致神经元变性凋亡,神经元轴突与远端靶器官失去连接,由于神经再生缓慢,肌肉长时间失神经支配,导致肌肉萎缩,神经运动功能障碍,

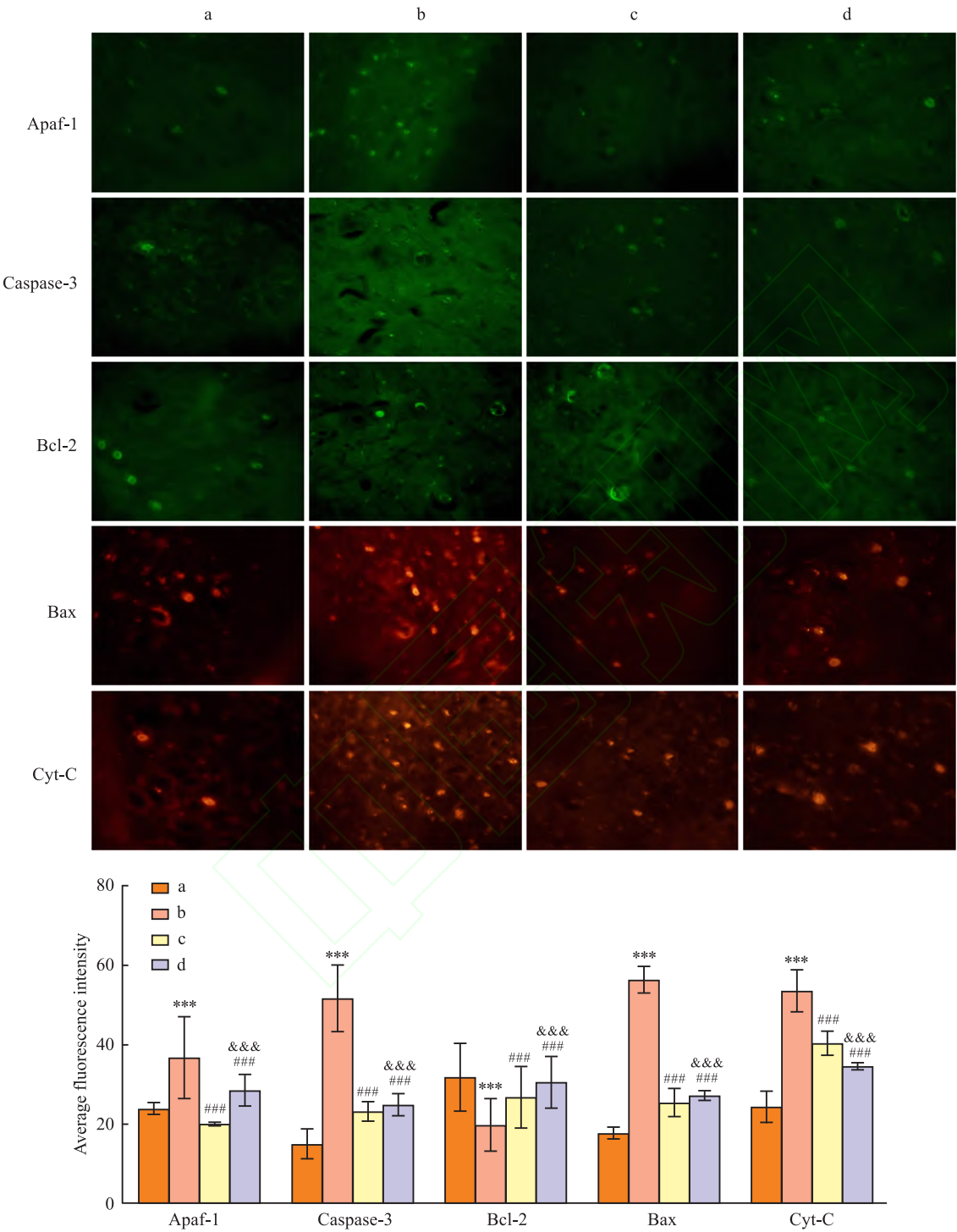


图5 各组大鼠脊髓 Apaf-1、Caspase-3、Bcl-2、Bax、Cyt-C 蛋白免疫荧光图 ×400

Fig. 5 Immunofluorescence of Cyt-C, Bax, Bcl-2, Caspase-3, and Apaf-1 proteins in the spinal cord of rats in each group ×400

a: normal group; b: model group; c: bridge group; d: autograft group. *** $P < 0.001$ vs normal group; ### $P < 0.001$ vs model group; &&& $P < 0.001$ vs bridge group.

行为异常,如钩状足或足下垂。胫前肌湿重比率用来检测胫前肌萎缩情况,其值越低,代表萎缩越明显。Hong et al^[11]研究发现 SNI 大鼠给予 FK-506 治疗后大鼠肌肉重量增加,坐骨神经功能得到恢复。

SFI 可作为判断坐骨神经损伤运动功能恢复情况的指标。本研究结果显示,桥接组大鼠胫前肌湿重比率和 SFI 显著高于模型组,说明在 ANA 建立的通道下,损伤神经得以再生,远端胫前肌重新建立起神经

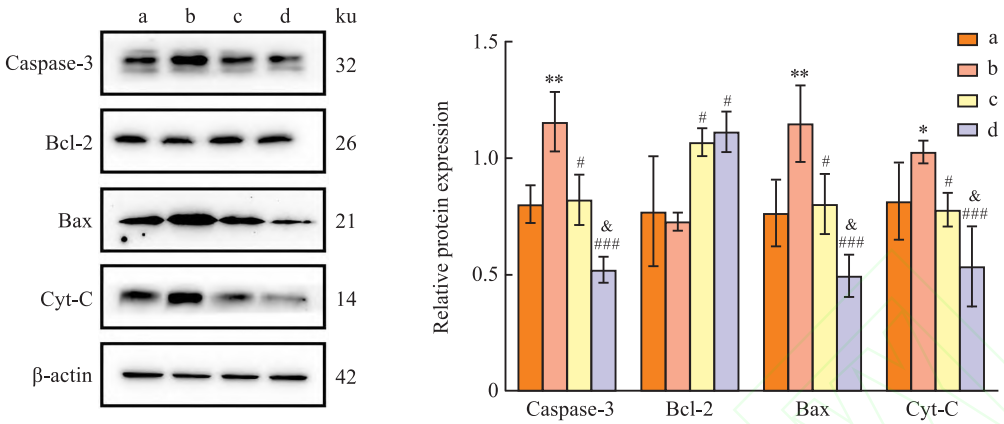


图6 各组大鼠脊髓 Caspase-3、Bcl-2、Bax、Cyt-C 蛋白表达

Fig. 6 The expression of Cyt-C, Bax, Bcl-2, and Caspase-3 proteins in spinal cord of rats in each group

a: normal group; b: model group; c: bridge group; d: autograft group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs model group; & $P < 0.05$ vs bridge group.

支配,因此大鼠的运动功能得到恢复。SNI 后,近端神经元因缺乏营养支持而发生凋亡或者死亡,阻碍神经再生的进程。Gu et al^[12] 研究发现神经损伤后脊髓前角运动神经元数量减少,尼氏体变小甚至溶解,髓鞘神经纤维排列疏松。李安特 等^[5] 研究发现 SNI 后脊神经节中尼氏体溶解,排列紊乱,神经元胞核移位,数量减少,ANA 组脊神经节中尼氏体有所改善,尼氏体数量增加,形态相对完整,表明 ANA 可改善脊神经节中尼氏体形态。本研究通过 HE 染色观察脊髓前角运动神经元的形态,结果显示桥接组脊髓前角运动神经元形态完整,细胞边界相对清楚,这可能因为一方面 ANA 搭建了损伤神经与近端神经元间的连接,使得神经再生得以实现;另一方面,ANA 为神经修复提供了良好的微环境,使神经营养因子等能够运输到神经元胞体,从而使神经元的形态结构得到改善。

细胞凋亡在各种疾病发生发展中有着重要作用,主要分为线粒体凋亡、内质网凋亡和死亡受体三种通路,其中线粒体凋亡通路是哺乳动物常见的凋亡方式。在线粒体凋亡中 Bcl-2 家族是其中重要的一类蛋白,主要包括促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白两种类型^[13]。正常状态下,促凋亡蛋白和抑制凋亡蛋白维持平衡,保障正常的生理功能^[14]。但在病理条件下,抑制凋亡蛋白和促凋亡蛋白蛋白在线粒体上形成离子通道,改变了线粒体的通透性,从而导致线粒体内促凋亡蛋白 Cyt-C 的释放,Cyt-C 释放到细胞质中与 Apaf-1 等凋亡因子组成凋亡小体,引起下游

Caspase 级联激活反应,最终引起细胞凋亡^[15-16]。Xu et al^[17] 研究发现重复磁刺激可使 DRG 神经元中 Bax 蛋白表达降低,Bcl-2 蛋白表达增加,减少神经元的凋亡,加速神经的再生。谭慧敏 等^[18] 证明栀子苷可通过降低脑缺血再灌注损伤大鼠神经元中 Bax、Cyt-C 蛋白的表达来抑制神经元凋亡,减轻组织损伤程度。本研究免疫荧光和 Western blot 结果显示,模型组的 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达明显升高,表明 SNI 后脊髓前角运动神经元发生了凋亡。桥接组 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 蛋白表达明显下降,Bcl-2 蛋白表达明显升高,提示桥接组脊髓前角运动神经元凋亡得到缓解。说明在 ANA 搭建的有效再生通道下,轴浆流动得以维持,为近端神经元的存活提供了营养支持,为神经的再生修复提供了保证。

综上所述,SNI 大鼠在给予 ANA 桥接后,胫前肌湿重比、SFI 以及脊髓前角运动神经元的形态结构得到了改善,促凋亡蛋白 Apaf-1、Caspase-3、Bax、Cyt-C 表达减少,抗凋亡蛋白 Bcl-2 增加。ANA 对 SNI 大鼠脊髓运动神经元发挥了保护作用,其机制可能与 Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 介导的线粒体凋亡通路相关,即 ANA 可通过 Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 信号通路保护 SNI 大鼠脊髓运动神经元。

参考文献

[1] Singh V K, Haq A, Tiwari M, et al. Approach to management of nerve gaps in peripheral nerve injuries[J]. Injury, 2022, 53(4):

- 1308–18. doi:10.1016/j.injury.2022.01.031.
- [2] Kornfeld T, Vogt P M, Radtke C. Nerve grafting for peripheral nerve injuries with extended defect sizes[J]. *Wien Med Wochenschr*, 2019, 169(9–10): 240–51. doi:10.1007/s10354–018–0675–6.
- [3] Broeren B O, Hundepool C A, Kumas A H, et al. The effectiveness of acellular nerve allografts compared to autografts in animal models: a systematic review and meta-analysis[J]. *PLoS One*, 2024, 19(1): e0279324. doi:10.1371/journal.pone.0279324.
- [4] Allgood J E, Santos Roballo K C, Sparks B B, et al. The effects of graft source and orientation on outcomes after ablation of a branched peripheral nerve[J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 1055490. doi:10.3389/fncel.2022.1055490.
- [5] 李安特, 周泽宇, 马蕴涵, 等. 电针联合脱细胞异体神经移植对坐骨神经损伤大鼠脊神经节的保护机制[J]. *针刺研究*, 2023, 48(4): 372–7. doi:10.13702/j.1000–0607.20220080.
- [5] Li A T, Zhou Z Y, Ma Y H, et al. Protective mechanism of electroacupuncture combined with acellular nerve allografts on spinal ganglia in rats with sciatic nerve injury[J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(4): 372–7. doi:10.13702/j.1000–0607.20220080.
- [6] Yi S, Tang X, Yu J, et al. Microarray and qPCR analyses of wallerian degeneration in rat sciatic nerves[J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 22. doi:10.3389/fncel.2017.00022.
- [7] Panzer K V, Burrell J C, Helm K V T, et al. Tissue engineered bands of Büngner for accelerated motor and sensory axonal outgrowth[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020, 8: 580654. doi:10.3389/fbioe.2020.580654.
- [8] Fu X M, Wang Y, Fu W L, et al. The combination of adipose-derived schwann-like cells and acellular nerve allografts promotes sciatic nerve regeneration and repair through the JAK2/STAT3 signaling pathway in rats[J]. *Neuroscience*, 2019, 422: 134–45. doi:10.1016/j.neuroscience.2019.10.018.
- [9] 李想, 毕佳璇, 孙秋霞, 等. 脑源性神经营养因子通过PI3K/Akt信号通路促进大鼠坐骨神经再生修复的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2023, 52(1): 51–6. doi:10.12007/j.issn.0258–4646.2023.01.010.
- [9] Li X, Bi J X, Sun Q X, et al. Brain-derived neurotrophic factor promotes regeneration and repair of rat sciatic nerve through PI3K/Akt signaling pathway[J]. *J China Med Univ*, 2023, 52(1): 51–6. doi:10.12007/j.issn.0258–4646.2023.01.010.
- [10] Smail S W, Abdulqadir S Z, Alalem L S S, et al. Enhancing sciatic nerve regeneration with osteopontin-loaded acellular nerve allografts in rats: effects on macrophage polarization[J]. *Tissue Cell*, 2024, 88: 102379. doi:10.1016/j.tice.2024.102379.
- [11] Hong J W, Lim J H, Kang E H, et al. A novel approach to peripheral nerve regeneration: local FK-506 delivery using a reservoir flap model[J]. *Yonsei Med J*, 2024, 65(12): 718–26. doi:10.3349/ymj.2024.0351.
- [12] Gu J, Liu H, Zhang N, et al. Effect of transgenic human insulin-like growth factor-I on spinal motor neurons following peripheral nerve injury[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1): 19–24. doi:10.3892/etm.2015.2472.
- [13] Chen M, Xiong H R, Hu Y, et al. Electroacupuncture alleviates sciatic nerve injury and inhibits autophagy in rats[J]. *Acupunct Med*, 2024, 42(5): 268–74. doi:10.1177/09645284241280074.
- [14] 冯卓, 刘学谦, 赵晓君, 等. 益肾调督针法对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能及大脑皮质凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(16): 3942–9.
- [14] Feng Z, Liu X Q, Zhao X J, et al. Effect of yishen tiaodu acupuncture on nerve function and expression of apoptosis-related proteins in cerebral cortex of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Chin J Gerontol*, 2024, 44(16): 3942–9.
- [15] 曾健, 蒋斌, 黄果, 等. 沉默CTHRC1调控p53介导的线粒体凋亡诱导乳腺癌MCF-7细胞凋亡[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(12): 1833–9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2020.12.004.
- [15] Zeng J, Jiang B, Huang G, et al. Silencing CTHRC1 induces apoptosis of breast cancer MCF-7 cells by regulating p53-mediated mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2020, 55(12): 1833–9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2020.12.004.
- [16] 陆海青, 李艳丽, 华兹涵, 等. 扁桃酸对肺腺癌H1299细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响及其机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(5): 742–7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.05.007.
- [16] Lu H Q, Li Y L, Hua Z H, et al. Effect of mandelic acid on the proliferation, apoptosis and migration ability of lung adenocarcinoma H1299 cells and its mechanism[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(5): 742–7. doi:10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2023.05.007.
- [17] Xu S, Ito A, Zhao Z, et al. Repetitive magnetic stimulation prevents dorsal root ganglion neuron death and enhances nerve regeneration in a sciatic nerve injury rat model[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 19016. doi:10.1038/s41598–024–69251–4.
- [18] 谭慧敏, 周亮, 邹慧禅. 栀子苷介导GLP-1R/Akt信号通路改善大鼠脑缺血再灌注损伤和神经元凋亡的研究[J]. *药物评价研究*, 2022, 45(9): 1822–9. doi:10.7501/j.issn.1674–6376.2022.09.017.
- [18] Tan H M, Zhou L, Zou H S. Geniposide-mediated GLP-1R/Akt signaling pathway improves cerebral ischemia-reperfusion injury and neuronal apoptosis in rats[J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(9): 1822–9. doi:10.7501/j.issn.1674–6376.2022.09.017.

Mechanism of protection of motor neurons in spinal cord anterior horn of SNI rats by acellular nerve allografts *via* the Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 signalling pathway

Zheng Mengyuan^{1,2}, Hao Zitong^{1,2}, Zhu Qinghua^{1,2}, Tian Zhuangzhuang¹,

Guo Xingda¹, Zheng Yuhe¹, Li Cheng¹, Fu Xiumei^{1,3}

(¹*Dept of Human Anatomy, School of Basic Medical Sciences,* ²*Institute of Basic Medical Sciences, Chengde Medical University, Chengde 067000;* ³*Hebei Key Laboratory of Nerve Injury and Repair, Chengde 067000)*

Abstract Objective To investigate the protective effects and mechanisms of acellular nerve allografts (ANA) on motor neurons in the spinal cord anterior horn of sciatic nerve injury (SNI) rats. **Methods** SPF grade male SD rats were randomly divided into normal, model, ANA-bridged (bridge group), and autologous nerve transplantation groups (autograft group), with 6 rats in each group. The SNI rat model was established using the right sciatic nerve clamp method for 10mm. In the bridge group, the ANA was bridged to the two severed ends of the injured sciatic nerve, and in the autograft group, the autologous nerves were flipped head to tail and then bridged to the two severed ends. A spectrophotometer was applied to determine the DNA content in normal nerves and ANA. The footprint test was used to determine the sciatic nerve function index (SFI) of the rats in each group, the wet weight ratio of the anterior tibialis muscle was calculated. The morphology and structure of the anterior horn motor neurons of the spinal cord of each group were observed by HE staining. The immunofluorescence and Western blot were used to detect Apaf-1, Caspase-3, Bcl-2, Bax, and Cyt-C proteins expression in the L4-6 segment of the spinal cord.

Results The DNA content in the ANA prepared in this study was significantly lower than that in normal nerves ($P < 0.05$). Compared with the normal group, the SFI and wet weight ratio of the anterior tibialis muscle were reduced in the model group ($P < 0.001$); compared with the model group, both SFI and wet weight ratio of the anterior tibialis muscle significantly increased in the bridge group and the autografts group ($P < 0.05$, $P < 0.001$), and the SFI and wet weight ratio of the anterior tibialis muscle in the autograft group were higher than those in the bridge group ($P < 0.001$, $P < 0.01$). The results of HE staining showed that the motor neurons in the anterior horn of the spinal cord of the normal group were structurally intact and had clear cytosolic boundaries; the neurons in the model group were lysed and necrotic, with blurred cytosolic boundaries; the neurons in the bridge group were less lysed and necrotic, but the nuclear translocation phenomenon could still be seen; the neurons in the autograft group were morphologically and structurally intact with clear cytosolic boundaries. Compared with the normal group, the expression of Apaf-1, Caspase-3, Bax and Cyt-C proteins significantly increased in the model group ($P < 0.001$, $P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$), but the difference of Bcl-2 protein expression was not statistically significant. Compared with the model group, the expression of Apaf-1, Caspase-3, Bax, and Cyt-C proteins significantly decreased ($P < 0.001$, $P < 0.05$); but the expression of Bcl-2 protein significantly increased in the bridge group and the autograft group ($P < 0.05$). The expression of Apaf-1, Caspase-3, Bax and Cyt-C proteins in the autografts group was lower than that in the bridge group ($P < 0.001$, $P < 0.05$). **Conclusion** ANA can exert a protective effect on motor neurons in the anterior horn of the spinal cord of SNI rats by improving the morphology and structure of neurons, increasing the expression of Bcl-2 protein, but decreasing the expression of Cyt-C, Bax, Caspase-3, and Apaf-1 proteins in the spinal cord. The mechanism of ANA may be related to the Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1-mediated mitochondrial apoptosis signaling pathway.

Key words acellular nerve allografts; sciatic nerve injury; Bcl-2/Cyt-C/Apaf-1 signalling pathway; spinal cord; motor neurons; rats

Fund programs Natural Science Foundation of Hebei Provincial (No. H2021406056); Scientific and Technological Research Project for Higher Education Institutions in Hebei Province (No. ZD2020178); College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project in Chengde Medical University (No. 2022014, 2024074)

Corresponding author Fu Xiumei, E-mail: fuxiumei@cdmc.edu.cn