

高脂膳食对小鼠脊髓损伤预后的影响及其机制的初步研究

陈淳^{1,2} 尤涛^{1,2}

(¹ 中国科学技术大学附属第一医院骨科, 合肥 230001;

² 中国科学技术大学生命科学与医学部临床医学院, 合肥 230001)

摘要 目的 阐明高脂膳食(HFD)与脊髓损伤(SCI)的病理进程以及预后间的内在联系,并初步探讨其可能机制。方法 分别建立常规膳食(RD)和HFD小鼠脊髓T₉~T₁₂节段打击损伤的模型。苏木精-伊红(HE)染色、马松(Masson)染色和尼氏(Nissl)染色观察SCI局部的组织学变化。BBB评分、足迹试验评估比较RD和HFD小鼠SCI后后肢功能的恢复情况。体外细胞实验筛选HFD中加重神经元损伤的关键成分脂肪酸,体内检测棕榈酸的抑制剂2-溴棕榈酸(2-BP)治疗SCI的HFD小鼠的效应。结果 与RD小鼠相比,HFD小鼠SCI后损伤区域显著增大,神经元损伤增多,小鼠后肢功能恢复较差。实验也证明神经元损伤加重的关键脂肪酸是棕榈酸,并进一步验证抑制棕榈酸的棕榈酰化修饰有助于HFD小鼠SCI后神经元的存活,促进组织修复和后肢功能的恢复。结论 HFD通过棕榈酸加重了小鼠SCI后的病理性损伤,影响其预后,而棕榈酸介导的棕榈酰化修饰可能是这一效应的主要机制。

关键词 高脂饮食; 脂肪酸; 棕榈酸脂; 棕榈酰化修饰; 脊髓损伤; 预后

中图分类号 R 651.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)03-0422-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.006

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)常见于工农业生产中的意外事件,导致机体功能障碍,给患者带来极大的痛苦,给家庭和社会带来沉重的经济负担^[1]。人类神经组织缺乏可再生性,导致SCI治疗困难,难以治愈^[2],是影响人们生命健康的重大疾患。目前研究^[3]表明,继发性炎症微环境加重了SCI的脊髓组织损害,抑制继发性炎症是治疗SCI的有效策略,但缺乏有效的方法。

高脂膳食(high fat diet, HFD)当前已成为我国较为普遍的社会现象,它会引发肥胖,增加人们罹患心血管疾病的风险^[4];激发炎症反应,导致肝脏损伤;以及造成机体代谢的紊乱^[5],HFD已经成为众多疾患的致病或重要促进因素。然而HFD是否影响脊髓损伤的预后还未见报道,且哪种成分脂肪酸主要参与SCI的病理进程及可能机制也尚未证实。该研究旨在初步探讨HFD对小鼠脊髓损伤预后的

影响及其可能的机制研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 使用SPF的雄性C57BL/6小鼠,其中常规膳食(regular diet, RD)小鼠12只,HFD小鼠24只。6~8周龄,体质量为(25±5)g,均由中国科学技术大学附属第一医院动物实验中心提供,所有小鼠均饲养在标准明暗循环下的SPF环境(24±2)℃中,随意进食和饮水。所有动物实验均经中国科学技术大学附属第一医院动物伦理委员会批准[审批号:2023-N(A)-0138]。运用随机数字表对各组实验小鼠进行分组,每组6只。

1.1.2 主要试剂与仪器 胎牛血清购自美国Corning公司;胰酶细胞消化液、青霉素-链霉素-两性霉素溶液(×100)、Triton X-100购自上海Beyotime公司;1640培养基购自加拿大Wisent公司;PC12细胞购自武汉procell公司;四孔腔室载玻片购自上海甄选(LABSELECT)公司;4%多聚甲醛购自合肥Biosharp公司;10%一步法凝胶制备试剂盒(批号:FD341-100)购自杭州弗德生物科技有限公司;白细胞介素1β(interleukin-1β, IL-1β;批号:P5106-10 μg)、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号:C0105M)、Masson三色染色试剂盒(批号:C0189S)、

2024-12-25 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重大项目(编号:2023AH040394);合肥国家科学中心先导医学与前沿技术项目(重点)(编号:2023IHM01073);安徽省自然科学基金面上项目基金(编号:2008085MH246)

作者简介:陈淳,男,硕士研究生;

尤涛,男,博士后,主任医师、研究员,硕士生导师,博士后合作导师,通信作者, E-mail: youtao@ustc.edu.cn

Nissl 染色液(批号: C0117)和 BCA 蛋白定量试剂盒(批号: P0012)购自上海 Beyotime 公司; Western blot 用二抗抗鼠(批号: 7076)、二抗抗兔(批号: 7074)购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 神经元核蛋白(neuronal nuclei, NeuN)抗体(批号: 26975-1-AP)、重组人微管解聚蛋白样-2(recombinant human stathmin like-2, STMN2)抗体(批号: 10586-1-AP)、微管相关蛋白 2(microtubule associated protein-2, MAP2)抗体(批号: 17490-1-AP)、GAPDH 抗体(批号: 60004-1-Ig)、HRP 标记羊抗兔二抗(批号: PR30011)及 HRP 标记羊抗鼠二抗(批号: PR30012)均购自武汉三鹰(Proteintech)生物技术有限公司; 2-溴十六烷酸(2-bromopalmitate acid, 2-BP, 批号: 21604)、棕榈酸(批号: P0500-10G)、油酸(批号: O1383-1G)、亚油酸(批号: L1012-1G)和戊巴比妥钠(批号: 57-33-0)均购自美国 Sigma-Aldrich St Louis 公司。光学显微镜(型号: Axio Imager 2)、激光共聚焦显微镜(型号: Zeiss LSM800)均购自德国蔡司公司; 化学发光凝胶成像系统(型号: FluorChem R)购自美国 Proteinsimple 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 SCI 模型的建立 小鼠被分为假手术的 RD-Sham 组, 实施 SCI 手术的 RD-SCI 组和 HFD-SCI 组, 2-BP 治疗的 HFD-SCI + 2-BP 组。Sham 组小鼠仅进行椎板切除术, SCI 小鼠根据课题组已有的方法建模。0.3% 戊巴比妥钠麻醉后, 切除 T₉ ~ T₁₂ 脊髓水平的椎板, 暴露小鼠脊髓组织, 随后将 10 g 的杆从约 8 cm 的高度掉落到脊髓背部表面产生创伤性 SCI, 最后将切口部位分层闭合, 并在切口局部涂抹抗生素。2-BP 治疗组的 SCI 小鼠, 手术后每隔 3 d 通过腹腔注射 5 μmol 剂量的 2-BP, 持续 28 d。所有小鼠均予以术后镇痛, 且 SCI 小鼠每天固定时间进行 1 次人工膀胱排尿, 同时收集残余尿量, 直到膀胱反射改善。足迹实验和 BBB 评分评估小鼠后肢运动功能情况, 一直到实验周期结束, 然后取各组小鼠脊髓进行组织检测。

1.2.2 神经元细胞培养和处理 小鼠神经元 PC12 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司。PC12 细胞在含有 10% FBS、100 单位/ml 青霉素-链霉素-两性霉素的 1640 培养基中培养, 培养温度为 37 °C、含 5% CO₂。每天更换 1640 培养基, 并在细胞密度达到 80% 时进行传代。接着, 更换培养基并加入 IL-1β (10 ng/ml) 刺激神经元细胞至少 4 h, 在体外模拟 SCI 继发性炎症的神经元损害^[5]。

1.2.3 Western blot 检测蛋白的表达 提取神经元 PC12 细胞的总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒对各组细胞的蛋白进行定量。经上样、SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育、洗膜、显色等步骤观察目标蛋白表达情况。其中一抗(NeuN、STMN2)浓度为 1:1 000, 二抗(抗鼠或抗兔)浓度为 1:10 000, 室温条件下摇床上孵育 2 h。使用 ECL 试剂进行可视化, 蛋白质条带图像由化学发光凝胶成像系统获得。使用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.2.4 免疫荧光检测 ① 对于小鼠脊髓组织的免疫荧光染色, 常规方法制作石蜡切片, 在切片脱蜡和再水化后, 使用 EDTA 抗原修复缓冲液(pH 8.0)进行抗原回收。用 10% 牛血清白蛋白 BSA 封闭如上所述处理的组织切片。随后用一抗(MAP2、STMN2)在 4 °C 下孵育过夜。第二天, 将切片与第二抗体(对应种属)一起孵育, 接着用 DAPI 复染细胞核。最后, 通过共聚焦显微镜获得免疫荧光图像。② 对于神经元细胞 PC12 的免疫荧光染色, 将细胞种植在腔室载玻片上, 使其贴壁生长(如 1.2.2 步骤所示), 随后经 4% 的多聚甲醛固定爬片, 0.5% Triton X-100(1 × PBS 配制)室温通透细胞操作后, BSA 封闭, 滴加稀释后的一抗(iNOS)并放入湿盒, 4 °C 孵育过夜。浸洗爬片, 暗处滴加稀释后的荧光二抗(对应种属), 湿盒中 37 °C 避光孵育 1 h, 滴加 DAPI(复染核)避光孵育, 滴加抗荧光淬灭剂封片, 在荧光显微镜下观察采集图像。

1.2.5 小鼠后肢功能的评估

1.2.5.1 BBB 评分方法 使用 BBB 量表评估后肢运动功能^[6]。在测试之前, 将小鼠放在开阔地中, 让其自由活动 5 min。然后, 两名独立且有经验的观察者使用 BBB 量表对小鼠的后肢功能进行双盲评估。根据关节运动和爬行协调, BBB 分值的范围从 0(完全瘫痪)到 21(正常运动)。每组小鼠(n=6)在术前以及术后第 1、3、5、7、14、21、28 天进行评估。

1.2.5.2 足迹试验 评估 SCI 后小鼠的后肢运动协调能力^[7]。造模后第 28 天, 将小鼠的后肢涂抹红色和蓝色墨水, 放在一张平整的白纸上让其自主爬行, 记录小鼠后肢的足迹状态, 并对小鼠步长和步宽进行测量及统计分析。

1.2.6 小鼠脊髓的灌注与固定 小鼠腹腔注射 30 mg/kg 0.3% 戊巴比妥钠麻醉显效后, 仰卧位固定, 剪开胸廓暴露跳动的心脏。将静脉导管针插入左心尖部, 进入左心室, 取出针心, 向中线沿室间隔, 将留置针推向主动脉。剪开右心耳, 让血流出, 可用纱布

在周围吸取流出的血液,同时开放生理盐水约注入 15 ml 后,可见右心耳处流出澄清液体,再缓慢的注入 4% 多聚甲醛 15 ~ 20 ml,时间约 5 ~ 10 min。开始灌注时小鼠剧烈抽动,后小鼠后肢绷直,尾部竖起成一直线。尽量多地去脊柱周围的软组织及大部分脊柱骨,解剖出损伤的脊髓节段,4% 多聚甲醛浸泡固定。

1.2.7 组织学评估方法 石蜡切片在二甲苯中脱蜡,再通过乙醇梯度重新水化,并用蒸馏水进行多次洗涤。接下来按照以下步骤进行染色。
 ① HE 染色:切片首先用苏木精染色 5 min,然后在 1% 的酸性醇中孵育并用氨水蓝化;随后,用 0.5% 的伊红染色 1 min。
 ② Masson 染色:首先使用染色试剂盒中的 Weigert's 铁苏木精染色 5 min;自来水冲洗后,用 1% 盐酸乙醇分化数秒,然后用自来水冲洗,流水冲洗数分钟返蓝;随后,使用丽春红酸性品红液染 5 ~ 10 min,蒸馏水快速漂洗。磷钼酸水溶液处理约 3 ~ 5 min;不用水洗,直接用 Masson 染色试剂盒内苯胺蓝液复染 5 min;之后再 1% 冰醋酸处理 1 min 使之分化。
 ③ Nissl 染色:组织切片入染液浸泡 2 ~ 5 min,水洗,用 0.1% 冰醋酸轻微分化,并用自来水冲洗以停止反应。在显微镜下监测分化程度,自来水冲洗后,将切片放入烘箱中晾干;然后,在 40 °C 下用 0.05% 甲酚紫染色 10 min。染色后,所有切片用分级乙醇脱水,用干净的二甲苯透明处理 10 min,并用中性胶密封。最后,在光学显微镜下观察脊髓组织变化。

1.2.8 脊髓空洞体积的测定 标本经 0.4% 多聚甲醛固定后,以损伤区中心每间隔 100 μm 切片行 HE 染色,取第 3 个切片来测定脊髓空洞,顺序取 3 个样本,用 ImageJ 软件测量空洞的区域并计算相对空洞表达量。

1.3 统计学处理 数据统计分析工作由 Microsoft Excel 2021 版本和 GraphPad Prism 8.0.2 版本完成,蛋白条带灰度值、免疫荧光及组织化学染色强度分析由 ImageJ 1.53t 完成,蛋白条带作图和荧光作图由 Photoshop 及 Adobe Illustrator 2020 版本完成,各组实验数据均录入 SPSS 25.0 软件中。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间比较,事后两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HFD 小鼠 SCI 后脊髓出血及水肿更加明显

造模后,对小鼠的脊髓组织进行大体观察。如图 1A 所示,RD-SCI 组较 RD-Sham 组小鼠脊髓组织明显充血水肿,表明造模成功。4 周后,与 RD-Sham 组相比,RD-SCI 小鼠的脊髓组织中仍有水肿及红色出血区域;而 HFD-SCI 小鼠的脊髓水肿及出血区域较 RD-SCI 小鼠更大(图 1B)。这显示 HFD 小鼠较 RD 小鼠的脊髓在遭受打击损伤后产生更为严重的病理反应。

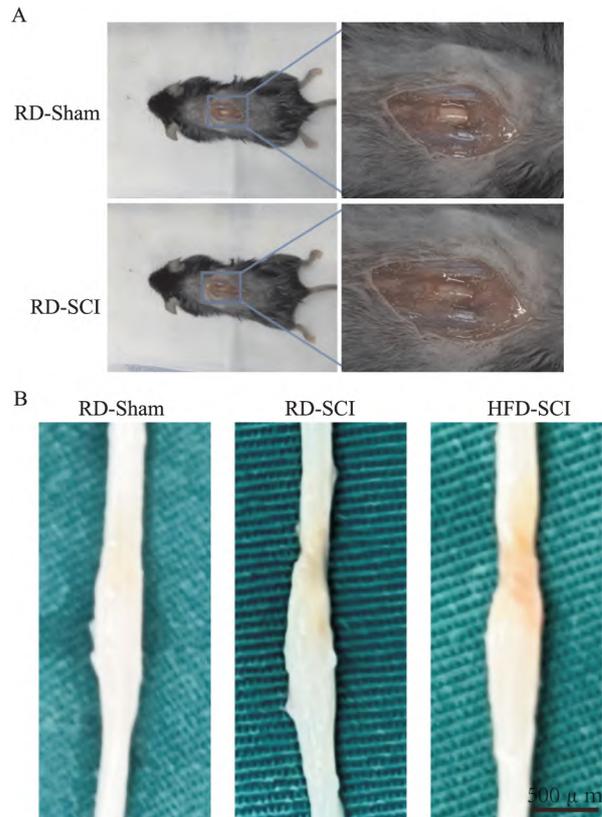


图 1 RD 和 HFD 小鼠 SCI 造模后脊髓组织
 Fig. 1 Spinal cord tissue images of RD and HFD mice after SCI modeling

A: Schematic representation of sham and SCI modeling in mice; B: Gross images of spinal cord tissue from three groups of mice at 4 weeks post-SCI modeling.

2.2 HFD 小鼠 SCI 后的后肢功能损伤更加严重

在 SCI 前,RD、HFD 组小鼠的后肢 BBB 评分均为 21 分。SCI 后,RD-SCI 及 HFD-SCI 组小鼠的后肢活动能力均立刻丧失,肌力降为 0 级,呈卧位拖行,BBB 评分降至 0 分。随损伤后天数的增加,RD-SCI 及 HFD-SCI 组小鼠的后肢活动均有所恢复,BBB 评分均有提高;但从第 1 天起,HFD-SCI 小鼠的 BBB 评分始终低于 RD-SCI 组小鼠;且两组之间的差异均有统计学意义(表 1)。

表1 各组小鼠造模后 BBB 评分比较(分 $n=6 \bar{x} \pm s$)Tab. 1 Comparison of BBB Scores among groups of mice after modeling (scores, $n=6 \bar{x} \pm s$)

Time (d)	RD-Sham	RD-SCI	HFD-SCI	F value	P value
1	21	1.67 ± 0.52	0.67 ± 0.52	11.250	0.007
3	21	2.67 ± 0.52	1.67 ± 0.52	11.250	0.007
5	21	3.67 ± 0.52	2.67 ± 0.52	11.250	0.007
7	21	4.67 ± 0.52	2.67 ± 0.52	45.000	<0.001
14	21	7.00 ± 0.89	4.00 ± 0.89	33.750	<0.001
21	21	8.50 ± 0.55	5.50 ± 1.05	38.571	<0.001
28	21	10.83 ± 0.75	6.83 ± 1.17	49.655	<0.001

2.3 HFD 小鼠 SCI 后的后肢步态协调能力明显低于 RD 小鼠 为了评价 SCI 后小鼠后肢的协调能力,在造模后 28 d,观察小鼠后肢的步态。如图 2A 所示,HFD-SCI 小鼠后肢呈现外展位、拖拽爬行状态,步长变短,步宽变大。如图 2B,HFD-SCI 小鼠较 RD-SCI 小鼠的后肢步长明显变短,且步宽明显变大。这表明 HFD-SCI 小鼠的步态协调能力的恢复差于 RD-SCI 小鼠。

2.4 HFD 小鼠较 RD 小鼠 SCI 后脊髓组织损伤更重 在 SCI 后 4 周,取小鼠的脊髓标本进行组织学染色。HE 染色显示 HFD-SCI 小鼠较 RD-SCI 小鼠脊髓损伤组织更加紊乱,有更大的损伤范围,且脊髓空洞也更为明显;相对脊髓空洞体积的定量分析可见,HFD-SCI 小鼠的脊髓空洞体积较 RD-SCI 小鼠明显更大,且差异有统计学意义。Masson 染色显示 HFD-SCI 小鼠较 RD-SCI 小鼠在脊髓损伤区域呈现绿色或蓝色的胶原纤维增多,而呈现红色的肌原纤维减少;说明 HFD-SCI 小鼠的组织损伤更为严重。Nissl 染色显示神经元细胞中存在的 Nissl 小体;神经元受到损伤时 Nissl 小体数量减少。Nissl 染色显

示与 RD-SCI 小鼠相比,HFD-SCI 小鼠的 Nissl 小体数量减少,证明 HFD-SCI 小鼠的神经元损伤更加严重。见图 3。

2.5 棕榈酸是加重神经元损伤的关键脂肪酸 本实验体外培养 PC12 神经元细胞,并利用 IL-1 β (10 ng/ml) 模拟 SCI 神经元的炎症微环境。免疫荧光染色显示 IL-1 β 刺激后炎症相关的诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在神经元中急剧增多;定量分析证实 IL-1 β 可有效模拟 SCI 神经元的炎症微环境。随后分别加入日常 HFD 中最为主要的 3 种成分脂肪酸(油酸、亚油酸和棕榈酸)各 50 μ mol(在正常人体血液的生理范围,避免本身的脂肪毒性),Western blot 检测神经元的标志物。显示成熟神经元细胞的标志物 NeuN 和神经元生长相关蛋白 STMN2 的表达均减少,且棕榈酸组的减少最为显著。这些实验结果表明在人体摄入常见的成分脂肪酸中,棕榈酸是加重 SCI 后神经元损伤的关键脂肪酸。见图 4。

2.6 2-BP 减轻 HFD-SCI 小鼠脊髓损伤促进后肢功能的恢复 棕榈酸是蛋白质棕榈酰化修饰重要的物质基础,棕榈酸过多的体外摄取或自身合成会显著提高组织细胞中棕榈酰化修饰的水平,为了探讨 HFD-SCI 小鼠损伤的加重、预后的欠佳是否与棕榈酸介导的棕榈酰化修饰有关。将 HFD 小鼠随机分为 3 组,分别为 HFD-Sham 组、HFD-SCI 组以及 HFD-SCI + 2-BP 治疗组(12.5 μ mol)。4 周后取小鼠的脊髓组织大体标本进行观察,如图 5 所示,HFD-SCI 小鼠脊髓组织明显充血红肿,而经过 2-BP 治疗后脊髓充血红肿区域明显缩小,这证明 2-BP 可有效减轻 HFD-SCI 小鼠的组织损伤。随着天数的增加,各组的 BBB 评分均有恢复趋势;而 2-BP 治疗

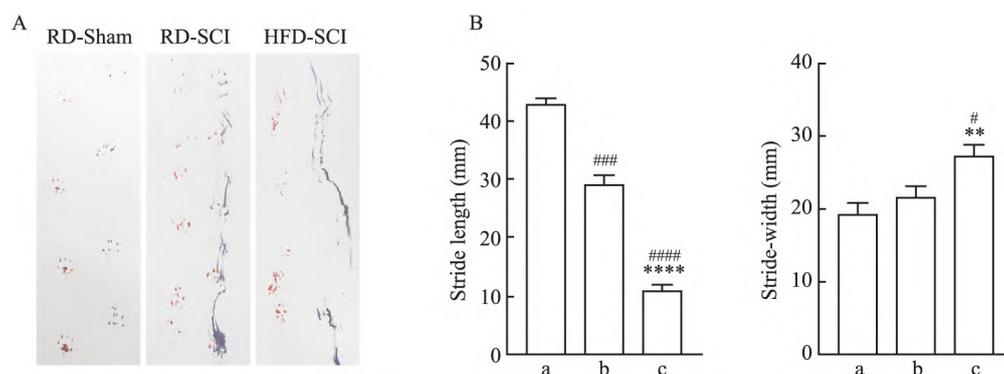


图2 RD-Sham、RD-SCI 和 HFD-SCI 3 组小鼠的后肢功能评价

Fig. 2 Hind limb functional assessment of RD-Sham, RD-SCI, and HFD-SCI mice

A: Footprint analysis images; B: Quantitative analysis of stride length and step width from the footprint analysis; a: RD-Sham group; b: RD-SCI group; c: HFD-SCI group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, #### $P < 0.0001$ vs RD-Sham group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs RD-SCI group.

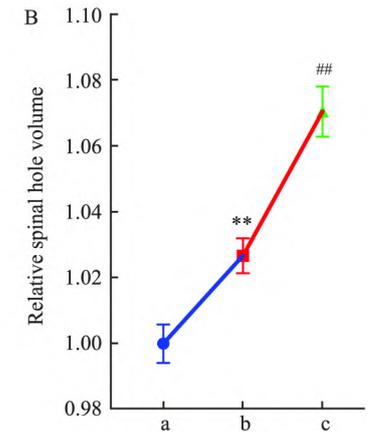
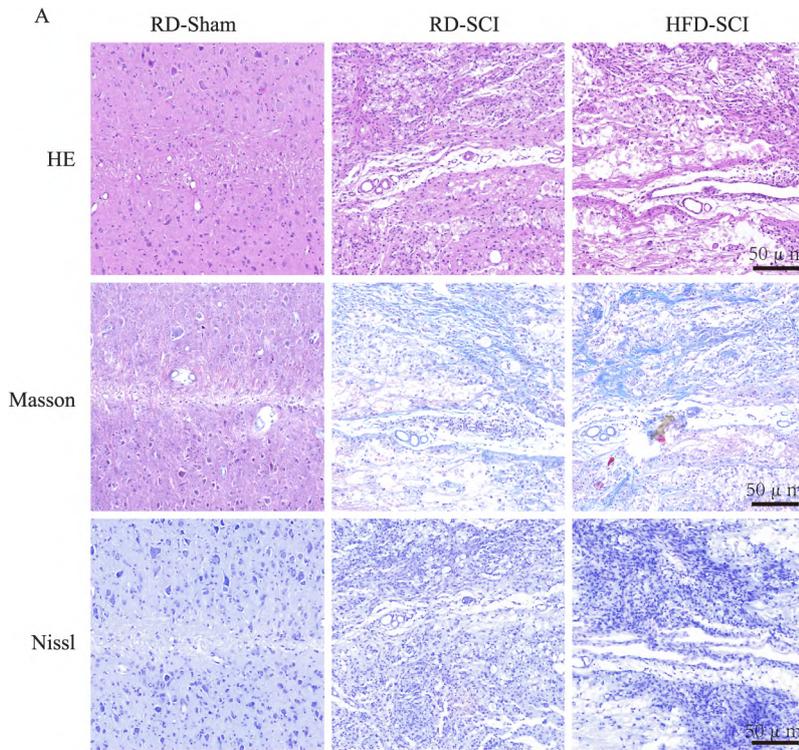


图3 3组小鼠造模4周后脊髓的组织染色结果 ×40 (n=3)

Fig. 3 Spinal cord histological staining results at 4 weeks post modeling in three groups ×40 (n=3)

A: Staining results; B: Quantitative analysis of relative spinal hole volume by HE staining; a: RD-Sham group; b: RD-SCI group; c: HFD-SCI group; ** $P < 0.01$ vs RD-Sham group; ## $P < 0.01$ vs RD-SCI group.

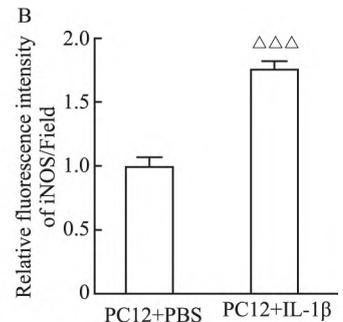
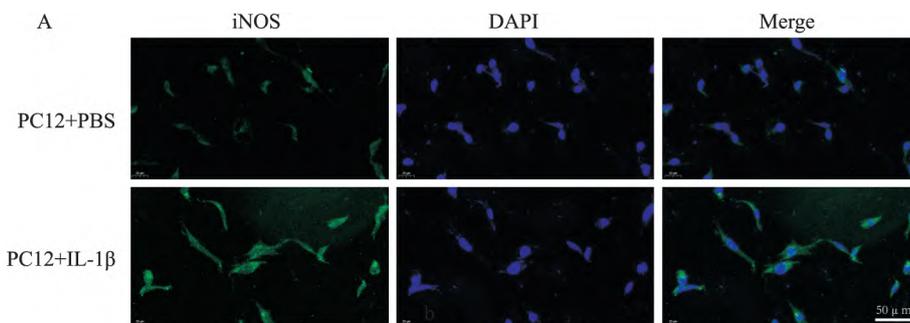
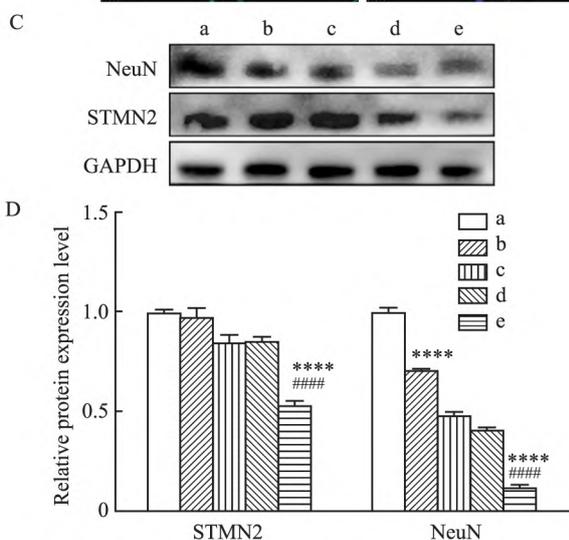


图4 SCI神经元损伤关键成分脂肪酸的筛选 (n=3)

Fig. 4 Screening of fatty acids as key components of SCI neuronal injury (n=3)

A: Immunofluorescence of iNOS in PC12 neuronal cells before and after IL-1β stimulation ×40; B: Quantitative analysis of relative fluorescence intensity; C: Western blot analysis of neuronal cell markers; a: Control group; b: IL-1β group (10 ng/ml); c: IL-1β + oleic acid group (50 μmol); d: IL-1β + linoleic acid group (50 μmol); e: IL-1β + palmitic acid group (50 μmol); $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs PC12 + PBS group; **** $P < 0.0001$ vs Control group; ##### $P < 0.0001$ vs IL-1β group.



后的BBB评分则明显提高,表明2-BP可促进HFD-SCI小鼠后肢功能的恢复。见表2。

2.7 2-BP有助于HFD-SCI小鼠神经元的存活 为了探讨2-BP对HFD-SCI小鼠神经元存活的影响

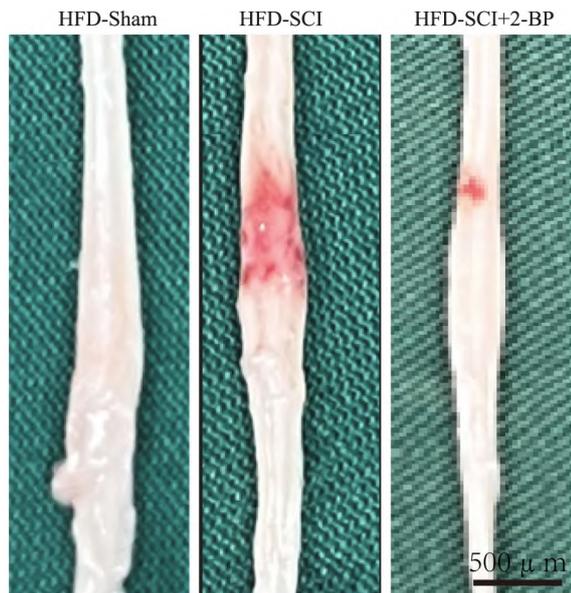


图5 3组高脂膳食小鼠SCI造模后脊髓组织(n=6)
Fig. 5 Spinal cord tissue after SCI modeling of three groups of high-fat dietary mice(n=6)

表2 各组小鼠造模后BBB评分比较(分 n=6, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of BBB scores among groups of mice after modeling (scores, n=6, $\bar{x} \pm s$)

Time (d)	HFD-Sham	HFD-SCI	HFD-SCI + 2-BP	F value	P value
1	21	0.50 ± 0.55	1.67 ± 0.52	14.412	0.004
3	21	1.50 ± 0.55	2.67 ± 0.52	14.412	0.004
5	21	2.33 ± 0.52	3.67 ± 0.52	20.000	0.001
7	21	2.83 ± 0.75	5.17 ± 0.75	28.824	<0.001
14	21	4.67 ± 0.82	7.00 ± 0.89	22.273	<0.001
21	21	6.00 ± 0.89	8.83 ± 0.75	35.244	<0.001
28	21	7.00 ± 0.89	10.83 ± 0.75	64.512	<0.001

HFD-SCI 小鼠神经元的存活。

3 讨论

膳食脂肪对人体正常机能的维护至关重要,但过量则会对人体产生不良影响^[8]。长期 HFD 会引起高脂血症,从而导致动脉硬化,诱发冠心病和脑血管病^[9];过量的脂肪会在肠道内形成胆酸,刺激肠黏膜分泌大量胆汁并进入小肠中,造成肠道黏膜损伤而引发消化系统炎症^[10];此外,HFD 还可引起体内代谢紊乱,导致胰腺细胞功能异常和胰岛素抵抗,促进糖尿病的发生、发展^[11];代谢紊乱也会引起骨矿物质代谢异常,骨密度下降进而引起骨质疏松^[12];由此可见 HFD 可影响诸多疾患。研究^[13]报道,SCI 后体内血脂代谢会发生变化,且高脂血症在 SCI 患者中较为常见,然而,HFD 是否影响 SCI 的相

响,本实验在脊髓组织中对神经元细胞标志物行免疫荧光共染色。SCI 造模 4 周后采集 HFD 小鼠的脊髓组织,以 MAP2 和 STMN2 分别标记脊髓损伤区域的神经元。如图 6A 所示,2-BP 治疗后神经元标志物的荧光相对表达强度明显升高,且接近于 HFD-Sham 组小鼠,与未治疗组相比,差异有统计学意义(图 6B)。这表明棕榈酰化抑制剂 2-BP 有助于

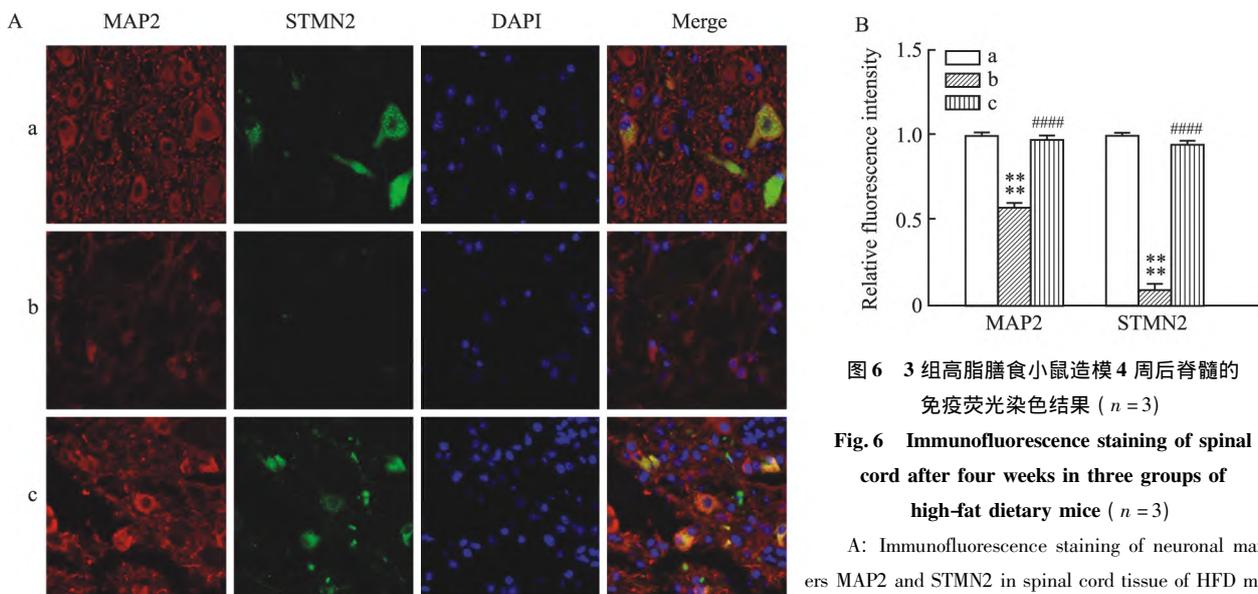


图6 3组高脂膳食小鼠造模4周后脊髓的免疫荧光染色结果(n=3)

Fig. 6 Immunofluorescence staining of spinal cord after four weeks in three groups of high-fat dietary mice (n=3)

A: Immunofluorescence staining of neuronal markers MAP2 and STMN2 in spinal cord tissue of HFD mice from three groups ×40; B: Quantitative analysis of relative fluorescence intensity;

a: HFD-Sham group; b: HFD-SCI group; c: HFD-SCI + 2-BP group; #### $P < 0.0001$ vs HFD-SCI group; **** $P < 0.0001$ vs HFD-Sham group.

关研究目前仍鲜有报道。

在本研究中,HFD小鼠在SCI后4周脊髓出血水肿消退较慢,BBB评分和步态协调能力均显著下降。组织学染色显示HFD小鼠的脊髓损伤区域增大,胶原纤维增生更多,Nissl小体数量减少,同时损伤区域的脊髓空洞面积增加。这些实验结果表明HFD与SCI的组织损伤、功能预后之间存在很强的相关性,HFD加重了小鼠SCI的组织学损伤,影响了肢体功能的恢复,而降低HFD可能有助于SCI的治疗,是SCI研究的新方向。

HFD的成分脂肪酸主要包括油酸(C18:1)、亚油酸(C18:2)和棕榈酸(C16:0)。其中棕榈酸又称软脂酸,是一种饱和高级脂肪酸,广泛存在于自然界中,几乎所有的油脂中都含有数量不等的棕榈酸组分。以前棕榈酸的研究主要集中在脂质代谢相关的疾患上,近年来棕榈酸在其他疾患中的显著作用被广泛报道。Pascual et al^[14]在Nature上发表文章揭示了是棕榈酸而不是油酸、亚油酸促进小鼠口腔癌和黑色素瘤的转移。本研究通过IL-1 β 刺激PC12神经元细胞模拟SCI炎症微环境,在加入不同脂肪酸成分后各组神经元标志物的表达均下调,其中尤以棕榈酸组下降最为明显,且与油酸、亚油酸组比较差异有统计学意义。这表明棕榈酸是HFD-SCI小鼠神经元损伤的关键成分脂肪酸,HFD可能通过棕榈酸影响SCI的预后。有学者^[15]证明棕榈酸相较于油酸及亚油酸,能更显著增加体外神经元损伤性标志物的表达,这从另外一个角度有力支持了本实验现有的实验结果和观点。

棕榈酸影响SCI预后的机制是另一个关键的科学问题。众所周知,棕榈酸是蛋白质棕榈酰化修饰的基本原料,棕榈酸的多少直接影响棕榈酰化修饰的水平^[16]。棕榈酰化修饰通过增加蛋白质的疏水性,对蛋白质的转运、细胞器定位和功能发挥重要作用;赋予蛋白质多样化的生理功能,调控免疫及代谢等一系列重要生命活动^[17]。本研究用棕榈酰化特异性抑制剂2-BP治疗HFD-SCI小鼠,结果表明2-BP治疗组显示出更好的后肢运动功能恢复效果。组织免疫荧光也显示2-BP治疗组的神经活性标志物显著增强,表明2-BP能够改善HFD-SCI小鼠神经元存活,有助于肢体功能的恢复。这提示HFD中的棕榈酸可能是通过提高棕榈酰化修饰水平影响SCI的预后,而抑制棕榈酰化修饰可能是SCI治疗研究的另一个方向。

参考文献

- [1] Mohammadi F, Oshvandi K, Bijani M, et al. Perception of facing life's challenges in patients with spinal cord injury in Iran: a qualitative study [J]. *BMC Psychol*, 2022, 10(1): 202. doi: 10.1186/s40359-022-00909-2.
- [2] 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. doi: 10.1038/s41392-023-01477-6.
- [3] Liu X, Zhang Y, Wang Y, et al. Inflammatory response to spinal cord injury and its treatment [J]. *World Neurosurg*, 2021, 155: 19-31. doi: 10.1016/j.wneu.2021.07.148.
- [4] Battineni G, Sagaro G G, Chintalapudi N, et al. Impact of obesity-induced inflammation on cardiovascular diseases (CVD) [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4798. doi: 10.3390/ijms22094798.
- [5] Yasmin T, Rahman M M, Khan F, et al. Metformin treatment reverses high fat diet-induced non-alcoholic fatty liver diseases and dyslipidemia by stimulating multiple antioxidant and anti-inflammatory pathways [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2021, 28: 101168. doi: 10.1016/j.bbrep.2021.101168.
- [6] 杨祝歆, 黄思琴, 唐成林, 等. 基于转录组测序技术探讨电针对脊髓损伤小鼠的抗炎作用及相关分子机制 [J]. *针刺研究*, 2023, 48(7): 672-80. doi: 10.13702/j.1000-0607.20220620.
- [6] Yang Z X, Huang S Q, Tang C L, et al. The anti-inflammatory effect of electroacupuncture in mice with spinal cord injury and molecular mechanism based on transcriptome sequencing technology [J]. *Acupunct Res*, 2023, 48(7): 672-80. doi: 10.13702/j.1000-0607.20220620.
- [7] 魏江曼, 安郁坤, 胡梦萱, 等. 夹脊电针通过抑制Notch信号通路对脊髓损伤大鼠运动功能的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(8): 1280-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.006.
- [7] Wei J M, An Y K, Hu M X, et al. The effect of electroacupuncture at Jiaji points on motor function of spinal cord injury rats by inhibiting Notch signal pathway [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(8): 1280-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.006.
- [8] Li J, Chen Z, Cheng Y, et al. Ligamentous injury-induced ankle instability causing posttraumatic osteoarthritis in a mouse model [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2022, 23(1): 223. doi: 10.1186/s12891-022-05164-5.
- [9] 吴立桐, 李保超, 姚波, 等. 高脂饮食诱导的肥胖及其脂肪细胞外泌体对年轻小鼠创伤性膝关节炎的影响及机制研究 [J]. *药理学报*, 2023, 58(8): 2415-23. doi: 10.16438/j.0513-4870.2023-0036.
- [9] Wu L T, Li B C, Yao B, et al. Effect of obesity induced by high-fat diet and adipose exosomes on knee post-traumatic osteoarthritis caused by destabilization of medial Meniscus surgery in young mice [J]. *Acta Pharm Sin*, 2023, 58(8): 2415-23. doi: 10.16438/j.0513-4870.2023-0036.
- [10] Prasad M, Rajagopal P, Devarajan N, et al. A comprehensive review on high-fat diet-induced diabetes mellitus: an epigenetic view [J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 107: 109037. doi: 10.1016/j.jnut-

- bio. 2022. 109037.
- [11] Yin P, Xie S, Zhuang Z, et al. Chlorogenic acid improves health in juvenile largemouth bass (*micropterus salmoides*) fed high-fat diets: involvement of lipid metabolism, antioxidant ability, inflammatory response, and intestinal integrity [J]. *Aquaculture*, 2021, 545: 737169. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737169.
- [12] 唐 辉, 姚志浩, 罗道文, 等. 高脂高糖饮食结合链脲佐菌素建立2型糖尿病性骨质疏松症大鼠模型[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(8): 1207-11. doi: 10.3969/j.issn.2095-4344.3048.
- [12] Tang H, Yao Z H, Luo D W, et al. High fat and high sugar diet combined with streptozotocin to establish a rat model of type 2 diabetic osteoporosis [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2021, 25(8): 1207-11. doi: 10.3969/j.issn.2095-4344.3048.
- [13] Wu P, Feng Q, Kerchberger V E, et al. Integrating gene expression and clinical data to identify drug repurposing candidates for hyperlipidemia and hypertension [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 46. doi: 10.1038/s41467-021-27751-1.
- [14] Pascual G, Domínguez D, Elosúa-Bayes M, et al. Dietary palmitic acid promotes a prometastatic memory *via* Schwann cells [J]. *Nature*, 2021, 599: 485-90. doi: 10.1038/s41586-021-04075-0.
- [15] 宋洁菲, 周雨昕, 张 宇, 等. 炎症因子及其相关信号通路在脊髓损伤调控机制中的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2021, 18(32): 38-41. doi: 10.20047/j.issn1673-7210.2021.32.009.
- [15] Song J F, Zhou Y X, Zhang Y, et al. Research progress of inflammatory factors and their related signaling pathways in the regulation of spinal cord injury [J]. *China Med Her*, 2021, 18(32): 38-41. doi: 10.20047/j.issn1673-7210.2021.32.009.
- [16] Xiong W, Sun K Y, Zhu Y, et al. Metformin alleviates inflammation through suppressing FASN-dependent palmitoylation of Akt [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(10): 934. doi: 10.1038/s41419-021-04235-0.
- [17] Chen Y, Li Y, Wu L. Protein S-palmitoylation modification: implications in tumor and tumor immune microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1337478. doi: 10.3389/fimmu.2024.1337478.

A preliminary study on the effect of high-fat diet on the prognosis of post-spinal cord injury mice and its mechanism

Chen Chun^{1,2}, You Tao^{1,2}

(¹Dept of Orthopaedics, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001; ²School of Clinical Medicine, School of Life Sciences and Medicine, University of Science and Technology of China, Hefei 230001)

Abstract Objective To clarify the intrinsic link between a high-fat diet (HFD) and the pathological progression and prognosis of spinal cord injury (SCI) while preliminarily exploring the potential underlying mechanisms. **Methods** SCI models were established in mice that were fed either a regular diet (RD) or HFD, with injury inflicted specifically on the T₉-T₁₂ segments. Hematoxylin-Eosin (HE) staining, Masson staining, and Nissl staining were used to observe the local histological changes in SCI tissues. The basso, beattie, and bresnahan (BBB) score and footprint analysis were used to evaluate and compare hindlimb functional recovery after SCI in both RD and HFD mice. *In vitro* experiments were conducted to identify key fatty acids in the HFD that exacerbate neuronal damage, while *in vivo* experiments assessed the effects of 2-bromopalmitate (2-BP), a palmitic acid inhibitor, on HFD-fed mice with SCI. **Results** Compared to RD-fed mice, HFD-fed mice exhibited significantly larger lesion areas, more severe neuronal damage, and poorer hindlimb functional recovery after SCI. Palmitic acid was identified as the key fatty acid aggravating neuronal damage. Further more, inhibition of palmitoylation, mediated by palmitic acid, enhanced neuronal survival, promoted tissue repair, and improved hindlimb functional recovery in HFD-fed mice post-SCI. **Conclusion** HFD exacerbates pathological damage following SCI in mice through palmitic acid, impairing recovery. Palmitic acid-mediated palmitoylation is likely the main mechanism underlying this effect.

Key words high-fat diet; fatty acid; palmitic acid ester; palmitoylation modification; spinal cord injury; prognosis

Fund programs Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH040394); Key Project of Leading Medicine and Frontier Technology of Hefei National Science Center (No. 2023IHM01073); Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2008085MH246)

Corresponding author You Tao, E-mail: youtao@ustc.edu.cn