

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.06.004

MiRNA-125a-5p 对于脊髓损伤后炎症反应、细胞凋亡及促进神经再生的作用机制研究*

孙天宇¹ 鲁学良¹ 段利颖² 李家驹¹ 熊明月^{1△}

(1 河南科技大学第一附属医院新区医院骨科 河南 洛阳 471000; 2 郑州大学第五附属医院消化内科 河南 郑州 450052)

摘要 目的:探讨 MiRNA-125a-5p 对于脊髓损伤(SCI)后炎症反应、细胞凋亡及促进神经再生的作用机制。**方法:**建立 6 周龄大鼠 SCI 模型,将 60 只大鼠随机分为对照组(n=20)、SCI 组(n=20)和 MiRNA-125a-5p 组(n=20),对照组仅行椎板切除术,SCI 组大鼠鞘内注射等量生理盐水,MiRNA-125a-5p 组大鼠鞘内注射 MiRNA-125a-5p agomir。采用定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)检测各组大鼠 MiRNA-125a-5p 和核因子 kB(NF-kB)的相对 RNA 表达水平。酶联免疫吸附法(ELISA)检测炎症因子白细胞介素 1(IL-1)、趋化因子受体-4(CXCR-4)和单核细胞趋化因子-1(MCP-1)水平的表达。采用蛋白免疫印迹试验检测细胞凋亡蛋白和神经调节因子蛋白的表达情况。采用 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)运动能力评定量表评价大鼠神经运动功能。**结果:**与对照组比较,SCI 组 MiRNA-125a-5p 表达均降低,NF-kB 表达均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组 MiRNA-125a-5p 表达均升高,NF-kB 表达均降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,SCI 组 IL-1、CXCR-4、MCP-1 水平均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组 IL-1、CXCR-4、MCP-1 水平均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,SCI 组半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(cleaved PARP)蛋白和原癌基因(bcl-2)蛋白表达均升高,神经细胞粘分子 1(NCAM1)、神经胶质蛋白 1(NL1)和神经调节蛋白-1(NRG1)蛋白表达均降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组 caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达均降低,bcl-2、NCAM1、NL1 和 NRG1 蛋白表达均升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,SCI 组大鼠神经运动功能评分在第 7 d 以后显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组大鼠神经运动功能评分在第 7 d 以后均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:**MiRNA-125a-5p 抑制 NF-kB 信号通路,降低炎症反应和细胞凋亡,促进神经再生,改善大鼠神经运动功能恢复。

关键词:脊髓损伤;NF-kB;MiRNA-125a-5p;炎症反应;细胞凋亡;神经再生

中图分类号:R-33;R651.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2022)06-1018-06

Study on the Mechanism of MiRNA-125a-5p on Inflammatory Response, Apoptosis and Nerve Regeneration after Spinal Cord Injury*

SUN Tian-yu¹, LU Xue-liang¹, DUAN Li-ying², LI Jia-ju¹, XIONG Ming-yue^{1△}

(1 Department of Orthopaedics, New Area Hospital, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan, 471000, China; 2 Department of Gastroenterology, The Fifth Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan, 450052, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism of MiRNA-125a-5p on inflammatory response, apoptosis and nerve regeneration after spinal cord injury (SCI). **Methods:** The SCI model of 6-week-old rats was established. 60 rats were randomly divided into control group (n=20), SCI group (n=20) and MiRNA-125a-5p group (n=20). Only laminectomy was performed in the control group, rats in SCI group were injected with the same amount of normal saline, and rats in MiRNA-125a-5p group were injected with MiRNA-125a-5p agomir. The relative RNA expression levels of MiRNA-125a-5p and nuclear factor kB (NF-kB) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The expressions of inflammatory factors interleukin-1 (IL-1), chemokine receptor-4 (CXCR-4) and monocyte chemokine-1 (MCP-1) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expressions of apoptosis protein and neuroregulatory factor protein were detected by Western blot. Basso Beattie Bresnahan (BBB) motor ability rating scale was used to evaluate the neuromotor function of rats. **Results:** Compared with the control group, the expression of MiRNA-125a-5p decreased and the expression of NF-kB increased in SCI group ($P<0.05$); Compared with SCI group, the expression of MiRNA-125a-5p increased and the expression of NF-kB decreased in MiRNA-125a-5p group ($P<0.05$). Compared with the control group, the levels of IL-1, CXCR-4 and MCP-1 in SCI group were significantly higher ($P<0.05$). Compared with SCI group, the levels of IL-1, CXCR-4 and MCP-1 in MiRNA-

* 基金项目:河南省科技厅基础与前沿技术研究计划项目(132300410469)

作者简介:孙天宇(1994-),男,硕士研究生,研究方向:脊柱外科,E-mail: bluesky2123@163.com

△ 通讯作者:熊明月(1967-),男,博士,主任医师,研究方向:骨关节、脊柱,E-mail: mingyuexiong2018@sina.com

(收稿日期:2021-08-06 接受日期:2021-08-28)

NA-125a-5p group were significantly lower ($P<0.05$). Compared with the control group, the expressions of caspase-3, cleaved PARP and bcl-2 protein in SCI group were increased, and the expressions of NCAM1, NLI and NRG1 protein were decreased ($P<0.05$); Compared with SCI group, the expression of caspase-3 and cleaved PARP protein in MiRNA-125a-5p group decreased, and the expression of bcl-2, NCAM1, NLI and NRG1 protein increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the neuromotor function score of SCI group decreased significantly after the 7th day ($P<0.05$); Compared with SCI group, the neuromotor function scores of rats in MiRNA-125a-5p group increased after the 7th day, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion:** MiRNA-125a-5p inhibits NF-kB signaling pathway, reduces inflammatory response and apoptosis, promotes nerve regeneration and improves the recovery of neuromotor function in rats.

Key words: Spinal cord injury; NF-kB; MiRNA-125a-5p; Inflammatory response; Apoptosis; Nerve regeneration

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R651.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)06-1018-06

前言

脊髓损伤(Spinal cord injury, SCI)是一种严重的中枢神经系统疾病,可导致不可逆的神经损伤、自主神经功能障碍,甚至损害病灶下方的感觉和运动功能,具有较高的发病率及致残率^[1-3]。SCI后产生的继发性反应是导致神经通路受损及功能丧失的重要原因,这类继发性反应主要有炎症反应、神经元坏死和凋亡、轴突脱髓鞘以及胶质瘢痕形成等,在SCI的病理生理学机制中处于重要地位^[4-6]。由于血脊髓屏障(BSCB)的破坏,组织缺血,循环系统内炎症细胞趋化因子诱导损伤组织周围发生炎症反应,导致炎症反应介导周围组织坏死和凋亡,这是影响SCI严重程度和面积扩大的主要因素^[7]。核因子kB(NF-kB)是Rel家族的一种转录因子,是导致疼痛的重要蛋白转录因子,是参与调节与免疫、炎症反应和细胞分化相关的基因,在炎症反应中具有重要作用^[8,9]。Xu J等^[10]和Chen S等^[11]证实在SCI后,NF-kB信号通路具有减轻炎症反应,改善神经功能恢复的功能。因此,SCI后神经功能的恢复取决于NF-kB信号通路的调节。微小核糖核酸(miRNA)是一种由非编码基因转录而来的核酸,长度约为20-25个核苷酸,参与体内多种生物活性的调节,能有效控制特异性mRNA表达,从而调节SCI继发性损伤中蛋白和信号通路分子,进而控制继发性损伤,从而达到治疗的目的^[12]。因此,本研究探讨MiRNA-125a-5p对于SCI后炎症反应、细胞凋亡及促进神经再生的作用机制,以明确MiRNA-125a-5p是否具有改善SCI后大鼠后肢运动功能恢复的作用,以期为SCI的治疗提供新的分子机制及治疗靶点。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和分组

选取雄性SD大鼠60只,大鼠周龄为6周左右,体重(210 ± 10)g,由郑州大学实验动物中心提供,合格证号为SCXK(豫)2020-0132。提供大鼠常规的食物和饮用水,室温20-25℃,12 h/12 h人工昼夜周期,通风良好。并将所有大鼠随机分为对照组(n=20)、SCI组(n=20)和MiRNA-125a-5p组(n=20)。对照组仅行椎板切除术。SCI组大鼠鞘内注射等量生理盐水。MiRNA-125a-5p组大鼠鞘内注射MiRNA-125a-5p agomir。MiRNA-125a-5p agomir是根据MiRNA-125a-5p成熟体设计并针对提高体内稳定性而进行修饰合成的双链miRNA模拟物,由江苏吉玛生物公司提供。本研究获得我院医学伦理

委员会批准开展实施。

1.2 建立 SCI 模型

首先,用10%多聚甲醛(4 mL/kg)麻醉大鼠。然后对大鼠背皮,手术区域皮肤进行消毒。随后定位胸10椎体(T10)棘突,切开皮肤,分离筋膜和肌肉组织,暴露出完整的椎板结构。行椎板切除术剥离脊髓上椎板,完全显示出脊髓。采用重物坠落法建立SCI模型。在成功建模后,可观察到大鼠脊髓出血,后肢延迟伸展和尾巴摆动。然后,进行鞘内注射,缝合切口,再次消毒。在脊髓损伤后每天进行一次辅助排尿,直到排尿反射恢复。

1.3 实时定量聚合酶链反应(qRT-PCR)

采用qRT-PCR检测SCI后MiRNA-125a-5p和NF-kB的相对RNA表达水平,具体方法如下:将TRIzol加入脊髓组织,剪切后均质化。室温5 min后,核酸-蛋白复合物完全分离。每1 mL TRIzol中加入0.2 mL氯仿,剧烈震荡15 s,室温静置3 min。离心15 min(10000 rpm,4℃),抽出上部水相加入异丙醇。将混合物在室温下振荡10 min。将混合物离心10 min(10000 rpm,4℃),取RNA沉淀,弃掉上清。75%乙醇洗涤RNA沉淀后,4℃,10000 rpm离心5 min。丢弃上清液,加入30 μ L RNase游离水溶解。RNA浓度用微量分光光度计在260 nm、230 nm和280 nm处测定吸光度。如果A260/A280在1.8-2.0之间,则认为RNA质量是标准的,可以在后续实验中使用。PCR条件为:95℃变性10 min,95℃变性15 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,40个循环。数据用SDS软件分析,结果输出到EXCEL中进行进一步分析。采用内源性GAPDH标准化数据。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各样本的RNA相对表达水平,实验重复三次。

1.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)

采用ELISA检测炎症因子白细胞介素-1(IL-1)、趋化因子受体4(CXCR-4)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平的表达情况,具体方法如下:从大鼠体内提取脊髓组织。在脊髓组织中加入适量的磷酸盐缓冲液(PBS),匀浆,离心10 min,收集上清。将标准品孔设置在96孔板上,分别加入不同浓度的标准品。将待测样品加入相应孔板中,用封膜封板,室温孵育30 min。然后弃掉液体,用洗涤液灌满每孔30 s,重复5次。除空白孔外,每孔均加入酶标试剂。然后,将着色剂加入到每个孔中,转移到暗室中15 min。加入终止溶液终止反应,在空白孔中取零,在450 nm波长处依次测量各孔的吸光度(OD值)。以标准品浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘制标准曲线,计算样品浓度。

1.5 蛋白免疫印迹试验

采用蛋白免疫印迹试验检测细胞凋亡蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(cleaved PARP)蛋白和原癌基因(bcl-2)]和神经调节因子蛋白[神经细胞粘附分子 1(NCAM1)、神经胶质蛋白 1(NL1)和神经调节蛋白-1(NRG1)]的表达情况,具体方法如下:使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的总蛋白提取试剂盒将各组脊髓组织转化为冰蛋白。将蛋白质化合物置于高速离心机(13000 rpm, 15 min)中,4℃下离心,以获得蛋白质上清液。蛋白质溶液的浓度采用 BCA 法测定。将不同组蛋白的浓度平衡,用 10%的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白,然后将分散的蛋白低温转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。置于 5%脱脂奶粉中封闭 1h, TBST 冲洗。TBST 冲洗 3 次后,用一抗孵育膜在 4℃孵育过夜。将膜从一抗中分离并洗涤 3 次。随后加入二抗与膜室温孵育 2 h,再次冲洗 3 次。利用增强化学发光(ECL)在曝光机上显示目标蛋白。

1.6 神经功能评价

采用 Basso-Beattie-Bresnahan(BBB)运动能力评定量表^[13]

评价大鼠 SCI 后 1 个月内后肢运动协调功能的恢复情况。由两位不同的研究人员进行评分,分数范围在 0-21 之间,后肢全瘫为 0 分,运动功能完全正常为 21 分。分别在建模后 1 d、3 d、7 d、14 d、21 d、28 d 进行评价。

1.7 统计学方法

采用 SPSS22.0 统计分析软件,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示及 t 检验,计数资料以频数和百分率表示及 χ^2 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCI 后 MiRNA-125a-5p 和 NF- κ B 的相对 RNA 表达水平

与对照组比较,SCI 组 MiRNA-125a-5p 表达均降低,NF- κ B 表达均升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组 MiRNA-125a-5p 表达均升高,NF- κ B 表达均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。如表 1 所示。

表 1 三组 SCI 后 1 周内 MiRNA-125a-5p、NF- κ B 的相对 RNA 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relative RNA levels of MiRNA-125a-5p and NF- κ B in three groups within 1 week after SCI($\bar{x} \pm s$)

Groups	MiRNA-125a-5p				NF- κ B			
	1 d	3 d	5 d	7 d	1 d	3 d	5 d	7 d
Control group	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01
SCI group	0.90± 0.09*	0.81± 0.08*	0.74± 0.06*	0.44± 0.04*	3.67± 0.14*	3.02± 0.14*	2.73± 0.14*	2.05± 0.14*
MiRNA-125a-5p group	2.58± 0.16 [△]	2.06± 0.14 [△]	1.68± 0.09 [△]	1.27± 0.07 [△]	2.94± 0.14 [△]	2.43± 0.14 [△]	1.86± 0.10 [△]	1.40± 0.10 [△]
F value	52.017	64.085	50.148	53.018	91.745	66.325	74.087	85.542
P value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the SCI group, [△] $P < 0.05$.

2.2 MiRNA-125a-5p 对炎症因子水平的影响

与对照组比较,SCI 组 IL-1、CXCR-4、MCP-1 水平均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p

组 IL-1、CXCR-4、MCP-1 水平均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),如表 2 所示。

表 2 三组 SCI 后 3 d IL-1、CXCR-4、MCP-1 水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of IL-1, CXCR-4 and MCP-1 levels in three groups 3 d after SCI($\bar{x} \pm s$)

Groups	IL-1(pg/mL)	CXCR-4(pg/mL)	MCP-1(pg/mL)
Control group	1.52± 0.22	27.51± 3.34	201.61± 24.36
SCI group	4.16± 0.38*	65.07± 6.55*	624.01± 72.38*
MiRNA-125a-5p group	1.88± 0.25 [△]	47.84± 5.61 [△]	416.91± 53.52 [△]
F value	38.051	85.612	41.035
P value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the SCI group, [△] $P < 0.05$.

2.3 MiRNA-125a-5p 对细胞凋亡蛋白和神经调节因子蛋白表达的影响

与对照组比较,SCI 组 caspase-3、cleaved PARP 和 bcl-2 蛋白表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组 caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达均降

低,bcl-2 蛋白表达升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),如表 3、图 1 所示。与对照组比较,SCI 组 NCAM1、NL1 和 NRG1 蛋白表达均降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组 NCAM1、NL1 和 NRG1 蛋白表达均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),如表 4、图 2 所示。

表 3 三组 SCI 后 7 d caspase-3、cleaved PARP 和 bcl-2 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Protein expression of caspase-3, cleaved PARP and bcl-2 in three groups 7 d after SCI($\bar{x} \pm s$)

Groups	caspase-3	cleaved PARP	bcl-2
Control group	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01
SCI group	4.62± 0.37*	5.08± 0.41*	4.05± 0.36*
MiRNA-125a-5p group	2.18± 0.24 [△]	3.26± 0.33 [△]	6.71± 0.46 [△]
F value	82.364	111.086	93.647
P value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the SCI group, [△] $P < 0.05$.

表 4 三组 SCI 后 2 周 NCAM1、NL1 和 NRG1 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Protein expression of NCAM1, NL1 and NRG1 in three groups 2 weeks after SCI($\bar{x} \pm s$)

Groups	NCAM1	NL1	NRG1
Control group	1.00± 0.01	1.00± 0.01	1.00± 0.01
SCI group	0.66± 0.05*	0.45± 0.05*	0.37± 0.04*
MiRNA-125a-5p group	1.46± 0.08** [△]	0.81± 0.08** [△]	0.79± 0.06** [△]
F value	67.708	71.684	30.254
P value	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the SCI group, [△] $P < 0.05$.

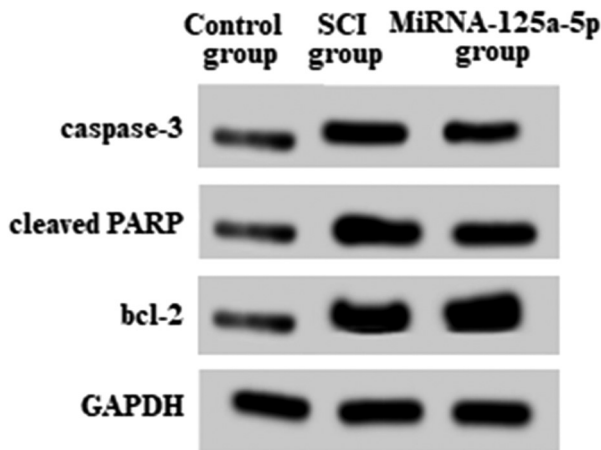


图 1 SCI 后 7 d caspase-3、cleaved PARP 和 bcl-2 的蛋白表达

Fig.1 Protein expression of caspase-3, cleaved PARP and bcl-2 7 d after SCI

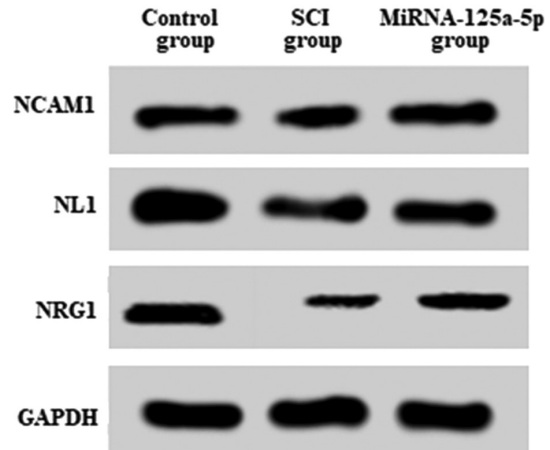


图 2 SCI 后 2 周 NCAM1、NL1 和 NRG1 蛋白表达

Fig.2 Protein expression of NCAM1, NL1 and NRG1 2 weeks after SCI

2.4 MiRNA-125a-5p 对 SCI 大鼠神经功能的影响

对照组大鼠的神经运动功能评分在整个测试期间保持不变;与对照组比较,SCI 组大鼠神经运动功能评分在第 7 d 以后

显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 SCI 组比较,MiRNA-125a-5p 组大鼠神经运动功能评分在第 7 d 以后均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),如表 5 所示。

表 5 三组 SCI 后第 1 d、7 d、14 d、21 d 和 28 d 神经运动功能评分比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of neuromotor function score of the three groups at 1 d, 7 d, 14 d, 21 d and 28 d after SCI($\bar{x} \pm s$)

Groups	1 d	7 d	14 d	21 d	28 d
Control group	19.35± 0.41	18.93± 0.52	19.68± 0.41	20.14± 0.37	19.77± 0.41
SCI group	0	2.51± 0.24*	4.63± 0.33*	5.10± 0.40*	5.71± 0.40*
MiRNA-125a-5p group	0	4.16± 0.33 [△]	6.05± 0.36 [△]	9.11± 0.40 [△]	8.54± 0.38 [△]
F value	/	121.864	108.567	97.821	88.256
P value	/	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Compared with the control group, * $P < 0.05$; Compared with the SCI group, [△] $P < 0.05$.

3 讨论

SCI 后,神经细胞会不可逆的死亡,此时代谢紊乱、炎症反应和神经毒素增多,使神经细胞死亡增加,最终导致轴突束断裂并引起运动或感觉功能障碍^[14,15]。虽然临床上目前具有较多治疗 SCI 的方法,如药物治疗、手术减压、干细胞移植等,但其疗效仍然不理想^[16],因此,选择更佳有效可行的治疗方案来治疗 SCI,对于改善 SCI 后患者的预后极为重要。

本研究显示,SCI 后 MiRNA-125a-5p 的 RNA 表达水平降低,NF- κ B 的 RNA 表达水平增加,而注射 MiRNA-125a-5p agomir 后 MiRNA-125a-5p 的 RNA 表达水平升高,NF- κ B 的 RNA 表达水平降低,表明 MiRNA-125a-5p 的增加与 NF- κ B 的降低呈负相关。炎症反应被认为是导致 SCI 病理生理变化的重要因素,是 SCI 后继发性损伤级联反应的关键点,主要包括炎症细胞浸润、趋化因子聚集、损伤脊髓局部胶质细胞的激活等,进一步加重了 SCI 的远期影响,增加了修复受损神经的难度^[17]。因此,减少 SCI 后的炎症反应是治疗 SCI 的重点。SCI 后炎症因子主要来源于活化的小胶质细胞和浸润的巨噬细胞,如 IL-1、CXCR-4、MCP-1 等炎症因子在 SCI 后早期即可发生变化^[18]。caspase-3、cleaved PARP、bcl-2 分别为凋亡因子、凋亡产物和抗凋亡因子。caspase-3 是 caspase 家族中执行凋亡最重要的关键蛋白酶,在细胞凋亡早期具有极其重要的作用^[19]。cleaved PARP 蛋白是一个多功能蛋白质翻译后修饰酶,是 caspase-3 细胞凋亡的主要切割底物,是细胞凋亡的重要标志^[20]。bcl-2 是 bcl-2 原癌基因的编码产物,是细胞存活促进因子,能抑制细胞凋亡^[21]。本研究显示,人工注射 MiRNA-125a-5p agomir 后炎症因子 IL-1、CXCR-4、MCP-1 表达水平均下调,细胞凋亡关键因素 caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达降低,bcl-2 蛋白表达增加;提示 MiRNA-125a-5p 可能通过 NF- κ B 信号通路减轻炎症反应,抑制细胞凋亡,促进抗凋亡因子表达,从而促进大鼠 SCI 后的功能恢复。此外,炎症反应将诱导细胞启动凋亡过程,从而使更多存活神经元在炎症的诱导下自毁^[22]。因此在某些层面上减轻炎症反应的同时在一定程度上也使更多神经元得以存活。

SCI 后的功能恢复一直是迫切需要解决的问题,损伤后神经丝的再生和突触结构的重塑有助于神经功能的恢复^[23,24]。然而,神经结构的重塑是一个多因素的复杂过程,神经细胞再生能力弱,损伤后大量胶质细胞激活,导致神经炎症反应和胶质瘢痕增生,严重限制了 SCI 后神经系统的重塑^[25,26]。由于 BSCB 的破坏,进入脊髓组织的炎症趋化因子通过受体结合途径影响神经再生,胶质细胞群也产生阻碍神经再生的阻断因子^[27]。诱导神经发生、促进神经元分化、保护神经细胞在 SCI 后神经功能恢复中起决定性作用,损伤后期神经修复因子水平在一定程度上促进了神经的结构重塑。神经细胞黏附分子(NCAM)可促进神经损伤如 SCI 和外伤性脑损伤后的再生和修复^[28]。NCAM 属于免疫球蛋白超家族细胞粘附点,主要表达于神经元和胶质细胞的表面,NCAM 异常表达会导致新生神经元生长受阻,阻断神经细胞之间的连接,影响神经系统的发育^[29]。缺乏 NCAM 可促进损伤部位神经细胞凋亡,而 NCAM 的存在可诱导神经分化、神经保护和抗炎作用^[30]。神经胶质蛋白 1(NL1)是神经胶质蛋白家族成员,是神经元合成的突触后跨膜蛋白,通过 C 端

PDZ 结构域结合序列与细胞内兴奋性突触后膜上的突触后密度蛋白 95 结合,并通过胞内结构域中间的一致性序列与桥尾蛋白结合^[31]。Pan 等^[32]研究表明 NL1 参与了兴奋性突触后结构的形成,以及突触发生和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体的形成。同时,NL1 不仅是形成突触的结构蛋白,也是影响突触形成和信息传递的功能蛋白,在突触的发生和成熟中发挥重要作用。NRG1 是 ErbB 受体的配体家族,在多种内皮细胞中呈高表达状态,如脊髓神经元中高表达,是一种特定的生长因子,在轴突表面表达,能决定是否产生髓鞘以及产生髓鞘的多少^[33]。本研究显示,人工注射 MiRNA-125a-5p agomir 后 NCAM1、NL1 和 NRG1 蛋白表达增高,且大鼠神经运动功能得到改善,表明 MiRNA-125a-5p 治疗阻止了 NCAM1、NL1 和 NRG1 的下降,MiRNA-125a-5p 抑制 NF- κ B 信号通路从而促进大鼠 SCI 后的功能恢复。

综上所述,本研究证实,SCI 后 MiRNA-125a-5p 的异常下调,以及 NF- κ B 表达的降低介导了 MiRNA-125a-5p 治疗后的炎症抑制,MiRNA-125a-5p 降低细胞凋亡水平,促进神经修复因子的释放,促进大鼠 SCI 后的功能恢复,为 SCI 新的治疗策略和 miRNA 在 SCI 疾病模型中的应用提供了理论依据。

参考文献(References)

- [1] Shen Z, Zhou Z, Gao S, et al. Melatonin Inhibits Neural Cell Apoptosis and Promotes Locomotor Recovery via Activation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway After Spinal Cord Injury [J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(8): 2336-2343
- [2] 冯世庆. 脊髓损伤基础研究的现状和展望 [J]. *中华实验外科杂志*, 2021, 38(7): 1193-1198
- [3] 施玉博, 余铃, 郭卫春. 急性脊髓损伤的治疗进展[J]. *中国医药导报*, 2021, 18(1): 36-39
- [4] Wan G, An Y, Tao J, et al. MicroRNA-129-5p alleviates spinal cord injury in mice via suppressing the apoptosis and inflammatory response through HMGB1/TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(3): BSR20193315
- [5] 方超, 孙健, 魏来福, 等. 振荡电场刺激脊髓损伤模型大鼠抑制神经炎症反应促进功能恢复 [J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(11): 1717-1722
- [6] 柴乐, 吕建兰, 胡劲涛, 等. 诱导急性脊髓损伤模型大鼠炎症反应信号通路的变化[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(8): 1218-1223
- [7] 余正然, 王晓波, 龙厚清. 血-脊髓屏障修复在脊髓损伤治疗中的作用的研究进展[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(2): 179-184
- [8] Liu Z, Yao X, Jiang W, et al. Advanced oxidation protein products induce microglia-mediated neuroinflammation via MAPKs-NF- κ B signaling pathway and pyroptosis after secondary spinal cord injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 90
- [9] Zhou W, Yuan T, Gao Y, et al. IL-1 β -induces NF- κ B and upregulates microRNA-372 to inhibit spinal cord injury recovery[J]. *J Neurophysiol*, 2017, 117(6): 2282-2291
- [10] Xu J, He J, He H, et al. TWEAK-Fn14 Influences Neurogenesis Status via Modulating NF- κ B in Mice with Spinal Cord Injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(9): 7497-7506
- [11] Chen S, Ye J, Chen X, et al. Valproic acid attenuates traumatic spinal cord injury-induced inflammation via STAT1 and NF- κ B pathway dependent of HDAC3[J]. *J Neuroinflammation*, 2018, 15(1): 150

- [12] 符策岗, 曾艳, 赵红卫, 等. 微小 RNA 及 RNA 干扰治疗脊髓损伤的研究进展[J]. 广东医学, 2016, 37(2): 305-308
- [13] Duan HQ, Wu QL, Yao X, et al. Nafamostat mesilate attenuates inflammation and apoptosis and promotes locomotor recovery after spinal cord injury[J]. CNS Neurosci Ther, 2018, 24(5): 429-438
- [14] 刘莹莹, 刘伟. 不同频率督脉电针促进不完全脊髓损伤大鼠运动功能重建的比较研究 [J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(4): 191-194
- [15] 强子耘, 陈凤收, 贾慧, 等. 舒芬太尼预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤中炎症因子 MPO, IL-6, IL-15 的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(16): 3013-3017
- [16] Huynh V, Rosner J, Curt A, et al. Disentangling the Effects of Spinal Cord Injury and Related Neuropathic Pain on Supraspinal Neuroplasticity: A Systematic Review on Neuroimaging[J]. Front Neurol, 2020, 10(2): 1413
- [17] 彭成, 刘佩雷, 陶钧, 等. 急性脊髓损伤后炎症反应、自噬和凋亡相关因子的变化以及 JAK2/STAT3 信号通路研究[J]. 转化医学杂志, 2021, 10(2): 83-88
- [18] 孙超, 李波, 郭巍, 等. 炎症因子对脊髓损伤作用的研究进展[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(7): 1877-1880
- [19] 于丰铭, 徐扬. Caspase-3 的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(11): 2072-2078
- [20] 姚荣彦, 韩永卿, 缪时英, 等. TRIM69 可抑制紫外线和依托泊苷刺激 HeLa 和 HEK293T 细胞系内活化型 caspase7 和剪切型 PARP 的表达[J]. 基础医学与临床, 2016, 36(7): 956-961
- [21] Zhao D, Zhang M, Yuan H, et al. Ginsenoside Rb1 protects against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats by downregulating the Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 and p-Ask-1 levels[J]. Exp Mol Pathol, 2018, 105(3): 229-235
- [22] 张娟, 吴伟. REM 睡眠剥夺对小鼠海马 IL-21 介导的炎症反应及 Fas/FasL 介导的神经元凋亡的影响 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2020, 27(5): 373-377
- [23] Dai J, Yu GY, Sun HL, et al. MicroRNA-210 promotes spinal cord injury recovery by inhibiting inflammation via the JAK-STAT pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(20): 6609-6615
- [24] 杨云, 许光旭. 脊髓损伤的神经修复与再生[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2021, 43(4): 375-379
- [25] Park KS, Kim JB, Keung M, et al. Chronic Hyperglycemia before Spinal Cord Injury Increases Inflammatory Reaction and Astrogliosis after Injury: Human and Rat Studies [J]. J Neurotrauma, 2020, 37(9): 1165-1181
- [26] Okada S, Hara M, Kobayakawa K, et al. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury[J]. Neurosci Res, 2018, 126: 39-43
- [27] Fan ZK, Lv G, Wang YF, et al. The protective effect of salvianolic acid B on blood-spinal cord barrier after compression spinal cord injury in rats[J]. J Mol Neurosci, 2013, 51(3): 986-993
- [28] 郭艳, 靳令经. 神经细胞黏附分子在神经损伤及修复中的研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2012, 39(2): 177-180
- [29] 辜刚凤, 彭红艳, 雷蕊绮, 等. 核因子 κ B 和神经细胞黏附分子在急性一氧化碳中毒迟发性脑病大鼠海马的表达变化[J]. 中国急救医学, 2019, 39(3): 264-268
- [30] 毕佳佳, 王磊, 李静, 等. 神经细胞黏附分子对小鼠骨髓间充质干细胞黏附、迁移及细胞形态的影响[J]. 基础医学与临床, 2017, 37(8): 1082-1087
- [31] Tian M, Zhou Y, Qiu L, et al. NL1 expression level in Nr1 β and the excitability of PV interneurons in mice with POCD[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(4): 3117-3123
- [32] Pan W, Zhang GF, Li HH, et al. Ketamine differentially restores diverse alterations of neuroligins in brain regions in a rat model of neuropathic pain-induced depression [J]. Neuroreport, 2018, 29(10): 863-869
- [33] 王倩, 朱薇. 电刺激对脊髓损伤大鼠神经再生及 NRG-1/ErbB-PI3K/Akt 通路的影响[J]. 中国中医急症, 2020, 29(2): 210-213, 229

(上接第 1055 页)

- [28] Klinjampa R, Sitticharoon C, Souvannavong-Vilivong X, et al. Placental Neuropeptide Y (NPY) and NPY receptors expressions and serum NPY levels in preeclampsia [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2019, 244(5): 380-388
- [29] Onatsu J, Vanninen R, JÄk Äl Ä P, et al. Tau, S100B and NSE as Blood Biomarkers in Acute Cerebrovascular Events[J]. In Vivo, 2020, 34(5): 2577-2586
- [30] Hu L, Dong MX, Zhao H, et al. Fibulin-5: a novel biomarker for evaluating severity and predicting prognosis in patients with acute intracerebral haemorrhage[J]. Eur J Neurol, 2016, 23(7): 1195-201
- [31] 程创, 秦新月, 郭佳, 等. 过表达 Fibulin-5 对大鼠脑缺血再灌注损伤后血脑屏障的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(13): 1386-1389