

基础研究

阿托伐他汀预处理对脊髓缺血再灌注损伤大鼠
损伤脊髓 microRNA 表达的影响

胡嘉瑞, 吕国华, 李 晶, 王 冰, 邓幼文, 康意军

(中南大学湘雅二医院脊柱外科 410011 湖南省长沙市)

【摘要】目的:检测他汀类药物预处理对脊髓缺血再灌注损伤大鼠损伤脊髓组织中 microRNA(miRNA, miR)表达谱的影响,探讨他汀神经保护作用的机制。**方法:**18 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、手术组和药物组,每组 6 只,其中手术组和药物组以阻断腹主动脉的方法建立大鼠急性脊髓缺血再灌注损伤模型,假手术组在开腹后于腹主动脉上绕线而不阻断动脉。药物组大鼠给予胃内灌注 10mg/kg/d 阿托伐他汀 14d 后再行建模手术,手术组在建模术前仅给予等容量生理盐水。对各组分别在术后 6、12、24 和 48h 应用 BBB 评分评价脊髓神经功能。在术后 48h 处死动物,取腰骶段脊髓组织。对组织切片后采用 HE 染色和 2,3,5,-triphenyltetrazolium chloride(TTC)染色明确神经组织病理变化及损伤情况,对缺血面积和脊髓横断面面积行定量检测并计算缺血百分比;应用 miRNA 芯片检测组织中 miRNA 表达谱;分别用假手术组和手术组 RNA 为模板,采用实时定量 PCR 对芯片结果进行验证。**结果:**手术组在术后各时间点的 BBB 评分较假手术组显著下降($P<0.05$),药物组在术后各时间点的 BBB 评分均较手术组明显增高($P<0.05$)但仍低于假手术组($P<0.05$)。HE 染色显示手术组和药物组均存在脊髓缺血性损伤,但药物组较手术组减轻。TTC 染色显示假手术组、手术组和药物组的缺血百分比分别为 $(2.1\pm 0.1)\%$ 、 $(77.3\pm 5.1)\%$ 和 $(43\pm 3.2)\%$,手术组缺血百分比比较假手术组显著增大($P<0.05$),而药物组缺血百分比与手术组比较显著缩小($P<0.05$)但仍显著高于假手术组($P<0.01$)。芯片检测 miRNA 表达谱显示,手术组与假手术组相比,其中 48 种 miRNA 表达明显改变,38 种上调 1.6~4.9 倍,另有 10 种 miRNA 表达下调;与手术组相比,药物组有 13 种 miRNA 表达发生改变,并可逆转缺血再灌注损伤后的 8 种 miRNA,包括 miR-365、miR-323、miR-672*、miR-760-5p、miR-376b-5p、miR-369-5p、miR-210 和 miR-199a。miRNA 表达的实时定量 PCR 结果和芯片结果比较无显著性差异($P>0.05$)。**结论:**阿托伐他汀预处理可对大鼠脊髓缺血再灌注损伤发挥神经保护作用,其机制可能与其对 miRNA 的调控有关。

【关键词】脊髓;缺血再灌注损伤;阿托伐他汀;微小 RNA

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.09.07

中图分类号:R683.2,Q786 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2014)-09-0802-07

MicroRNA expression in spinal cord ischemia-reperfusion injury after atorvastatin preconditioning in rats/HU Jiarui, LÜ Guohua, LI Jing, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(9): 802-808

【Abstract】Objectives: To explore microRNA(miRNA, miR) expression in spinal cord ischemia-reperfusion(I/R) injury and the regulatory mechanism involving microRNA with statins precondition in rats. **Methods:** 18 male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into three groups. Experimental groups($n=6$ per group) were as follows: sham, control (receiving only normal saline) and atorvastatin-pretreated (10mg/kg/day for 2 weeks before occlusion). Spinal cord I/R injury was induced in SD rats by occluding the descending thoracic aorta in control and atorvastatin-pretreated group, the sham group did not receive aorta occluding in operation. Neurological function was assessed by using BBB scores at 6, 12, 24 and 48h after operation. In 48h after operation, animals were sacrificed. In order to identify pathological changes and damage of the nervous tissue, lumbosacral spinal cord tissues were harvested for hematoxylin-eosin(HE) and 2, 3, 5, -triphenyltetrazolium chloride(TTC) staining, followed by quantitative measurement of ischemic area and cross-sectional area of spinal cord, and then calculation of ischemic percentages. MiRNA profile was also determined from isolated

第一作者简介:男(1981-),主治医师,医学博士,研究方向:脊柱脊髓基础和临床研究

电话:(0731)85295125 E-mail:hujr21@aliyun.com

通讯作者:吕国华 E-mail:spinelv@163.com

RNA by using miRNA microarrays, followed by validation with quantitative real-time PCR(qRT-PCR) in both sham and control group. **Results:** The BBB score in control group decreased significantly at each time point compared with that in sham group($P<0.05$). However, atorvastatin pretreatment induced a markedly improved BBB score at each time point compared with control group($P<0.05$), but had obviously lower score than sham group ($P<0.05$). Spinal cord ischemic injury was identified by HE staining in both control and atorvastatin-pretreated group. However, the injury in atorvastatin-pretreated group was alleviated compared with that in control group. The ischemic percentage, characterized by pale TTC stains, was $(2.1\pm0.1)\%$, $(77.3\pm5.1)\%$ and $(43\pm3.2)\%$ in sham, control and atorvastatin-pretreated group, respectively. The infarction in control group increased significantly compared with that in sham group ($P<0.05$). Pretreatment with atorvastatin remarkably attenuated the infarction compared with control($P<0.05$). However, compared with sham group, the infarction in atorvastatin-pretreated group was significantly higher($P<0.01$). MiRNA microarrays showed a total of 48 types of miRNAs was significantly different from control group compared with sham group. Among those, 38 miRNAs were up-regulated, with a 1.6-to 4.9 fold change, whereas 10 miRNAs were down-regulated. Compared with control group, a total of 13 types of miRNA levels was significantly different in atorvastatin-pretreated group. I/R injury samples pretreated with atorvastatin reversed the up or down regulation in control of 8 miRNAs, including miR-365, miR-323, miR-672*, miR-760-5p, miR-376b-5p, miR-369-5p, miR-210 and miR-199a. The miRNA expressions validated by qRT-PCR were similar to those in miRNA microarrays ($P>0.05$). **Conclusions:** Atorvastatin precondition can protect spinal cord against I/R injury. Altered expression of miRNAs may contribute to the mechanism of neuroprotection of statins in spinal cord I/R injury.

[Key words] Spinal cord; Ischemia-reperfusion injury; Atorvastatin; MicroRNA

[Author's address] Department of Spine Surgery, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410011, China

脊髓缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 损伤是一种临床常见的临床病理生理过程, 在脊髓创伤和主动脉瘤手术、脊柱外科手术的并发症中都扮演着重要的角色^[1,2]。目前对脊髓 I/R 损伤的机制研究缺乏上游调控机制的探讨。微小 RNA (microRNA, miRNA, miR) 能调节信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 从而在 mRNA 翻译的上游调控多种蛋白质的表达。近年发现 miRNA 参与哺乳动物的多种中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 创伤或变性疾病的病理生理过程^[3]。但尚不清楚 miRNA 在脊髓 I/R 损伤过程中是否发挥了重要的调控作用。他汀类药物对 I/R 损伤的保护作用已在脊髓、脑、心、肺、肾等组织器官中得到证实^[4], 但其促进脊髓 I/R 损伤后神经功能恢复的确切机制却鲜见报道, 他汀类药物是否通过调控 miRNA 而发挥在脊髓 I/R 损伤中的神经保护作用值得进一步探讨。本研究通过 miRNA 芯片技术检测大鼠脊髓 I/R 损伤后脊髓 miRNA 的表达以及阿托伐他汀预处理对 miRNA 表达谱的影响, 以 miRNA 为切入点探讨阿托伐他汀对脊髓 I/R 损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂和仪器

SD 大鼠 (湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供); 阿托伐他汀 (辉瑞公司); TTC 试剂 (Sigma 公司); TRIzol 试剂 (Invitrogen 公司); RNasey Mini Kit 试剂 (Qiagen 公司); miRCURYTM V16.0 LNA Array (Exiqon 公司); NanoDrop 分光光度计 (Nano Drop Technologies); Axon GenePix 4000B microarray 扫描仪 (Axon Instruments 公司); 7300 Real-time PCR 仪 (Applied Biosystems 公司); Taqman MicroRNA RT Kit 试剂 (Applied Biosystems 公司)。

1.2 实验动物与分组

健康成年雄性 SD 大鼠 18 只, 体重 220~280g。随机分为 3 组 ($n=6$): 假手术组, 开腹但不行脊髓 I/R 建模手术; 手术组, 单纯行脊髓 I/R 建模手术; 药物组, 脊髓 I/R 建模术前给予阿托伐他汀。药物组大鼠于建模术前第 14 天胃内灌注 10mg/kg/d 阿托伐他汀, 连续 14d; 手术组在建模术前行等容量生理盐水灌胃。

1.3 脊髓 I/R 损伤模型的建立

参照文献^[5-6]介绍的方法制备大鼠脊髓 I/R 损伤模型。制备模型前大鼠禁食 8h。10%水合氯醛 300mg/kg 腹腔注射麻醉后,大鼠仰卧位固定,腹部常规备皮脱毛,消毒,沿腹白线进腹,用温盐水纱布包住肠管并轻柔推开,显露并分离腹主动脉。假手术组仅在右肾动脉起始部下方的腹主动脉上绕线一圈但不结扎;手术组和药物组用 10g 标准无创动脉夹在左肾动脉和右肾动脉起始部之间紧邻右肾动脉起始端下方夹闭腹主动脉,触及夹闭部位远端的腹主动脉搏动消失表明阻断成功。60min 后松开动脉夹进行再灌注,触及夹闭部位以下血管搏动恢复后表明再灌注成功,检查腹腔内无出血以及血管无明显损伤后逐层关闭伤口。模型制备过程中,以烤灯保温,维持直肠温度 36.5℃~37.5℃。

1.4 大鼠后肢运动功能的评价

分别在再灌注后 6h、12h、24h 和 48h,采用 Basso Beattie Bresnahan (BBB) 运动功能评分法对 3 组大鼠进行后肢神经功能评分并记录。

1.5 脊髓组织学检查和缺血面积测定

3 组大鼠均于术后 48h 处死,取腰骶段脊髓组织。每组取 3 个样本,在 4%多聚甲醛中固定后行石蜡包埋,以 10μm 厚度横向连续切片,每只选 3 张切片行 HE 染色后在光学显微镜下观察脊髓组织病理变化以及是否存在缺血性损伤。按照文献^[4]的方法进行 2,3,5, -triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色,每组取 3 个样本于 -20℃冰冻 10min,取出后横向切成 2.0mm 厚的薄片,每个样本切片 5 张,置于 2%的 TTC 溶液中于 37℃孵育 30min 后,取出采用 5%的多聚甲醛溶液固定。采用 PC-Based Image Tool software 测量每块薄片的缺血面积及脊髓横断面面积并计算缺血百分比。缺血百分比=样本所有薄片的缺血面积之和/所有薄片脊髓横断面面积之和。

1.6 miRNA 表达谱的检测和验证

每组 6 只,均将长 10mm 腰骶段脊髓组织冰冻粉碎,使用 TRIzol 试剂和 RNasey Mini Kit 试剂分别提取 RNA。使用 NanoDrop ND-1000 分光光度计测定 RNA 在 260nm、280nm 和 230nm 的吸收值,计算浓度并评估纯度良好。用甲醛电泳试剂进行变性琼脂糖凝胶电泳,检测 RNA 未发生降解。使用 miRCURY™ Array Power 标记试剂盒,用标记酶将 Hy3™ 或 Hy5™ 荧光基团标记 miRNA,

制备用于与芯片杂交的荧光探针。中止标记后,将 Hy3™ 标记好的探针和 miRCURY™ (v.16.0) 芯片杂交:将 25μl 标记混合溶液与 25μl 杂交缓冲液混合后 95℃变性 2min,于冰上孵育 2min 后开始置于 12-Bay Hybridization Systems 中 56℃杂交 16~20h。杂交结束后用缓冲液洗涤数次,400r/min 离心干燥 5min。使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪扫描芯片的荧光强度,将扫描图像输入 GenePix Pro 6.0 软件,将实验结果转换成数字型数据保存,使用配套软件对原始数据进行分析运算。

在假手术组和手术组 RNA 中每组各取 6 个样本,按照 TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit 说明书进行操作,分别进行各种 miRNA 和 U6 的逆转录反应。在荧光定量 PCR 仪上进行 miRNA 和 U6 的 PCR 扩增检测,整个操作过程在冰上进行。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, BBB 评分组间比较采用非参数检验(先行 Kruskal-Wallis 检验,再行 Mann-Whitney 秩和检验), miRNA 表达实时定量 PCR 验证与芯片数据比较采用 Student *t* 检验,余实验数据组间比较采用方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评价

3 组术后 6h、12h、24h 和 48h 的 BBB 评分见表 1。假手术组各个时间点的 BBB 评分无明显改变。手术组术后各时间点 BBB 评分均较假手术组明显下降 ($P < 0.05$), 12h 和 24h 时下降至最低点。药物组在术后各时间点的 BBB 评分均较手术组明显增高 ($P < 0.05$) 但仍低于假手术组 ($P < 0.05$)。

表 1 3 组术后 48h 内 BBB 评分情况 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 BBB scores in each group during 48h after operation

时间 time	假手术组 Shan group	手术组 Control group	药物组 Atorvastatin- pretreated group
0h	21	21	21
6h	20.5±0.5	8.0±0.5	15.0±0.8
12h	20.5±0.2	6.0±0.8	16.0±0.8
24h	20.2±0.5	6.0±0.5	17.0±0.7
48h	20.0±0.5	9.0±0.4	17.0±0.4

2.2 组织学检查

假手术组可见神经元胞核清楚,胞浆丰富,间质空泡稀少,为正常脊髓组织(图 1a);手术组术后 48h 可见神经元稀少,有大量间质空泡,表现为明显的脊髓缺血性损伤(图 1b);药物组术后 48h 可见神经元较假手术组减少,有少量间质空泡,表现为一定程度的脊髓缺血性损伤,但和手术组比较则明显减轻(图 1c)。

2.3 脊髓缺血面积

术后 48h 对各组脊髓组织行 TTC 染色(图 2),缺血区呈白色,非缺血区呈红色。假手术组、手术组和药物组的缺血百分比分别为 $(2.1 \pm 0.1)\%$ 、 $(77.3 \pm 5.1)\%$ 和 $(43 \pm 3.2)\%$,手术组较假手术组显著增大($P < 0.05$),而药物组与手术组比较显著缩小($P < 0.05$)但仍显著高于假手术组($P < 0.01$)。

2.4 miRNA 表达谱

术后 48h, 各组均检测到大鼠脊髓组织中有 270 种 miRNA 表达,手术组与假手术组相比较,其中有 48 种 miRNA 在缺血再灌注后表达明显改变,38 种上调 1.6~4.9 倍,10 种 miRNA 表达下调。药物组与手术组相比,13 种 miRNA 表达发生改变(图 3),并且阿托伐他汀预处理可逆转缺血再灌注损伤后的 8 种 miRNA,包括 miR-365、miR-323、miR-672*、miR-760-5p、miR-376b-5p、miR-369-5p、miR-210 和 miR-199a。表达改变在平均 2 倍以上的 miRNA 见表 2。

2.5 miRNA 表达的实时定量 PCR(qRT-PCR)验证

选取变化较明显的 miR-365、miR-323、miR-760-5p 和 miR-210,以 U6 为内源性对照,分别用假手术组和手术组 RNA 为模板,采用 qRT-PCR 检测,手术组 miR-365、miR-323 和

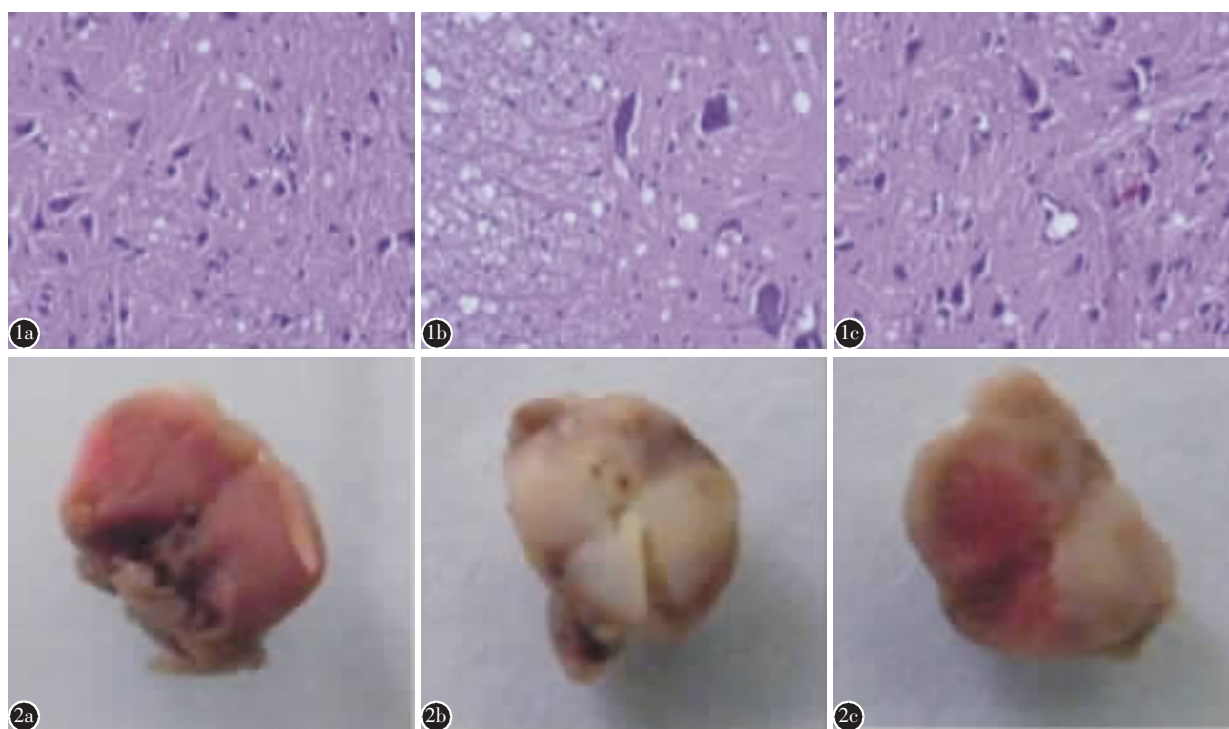


图 1 各组术后 48h 脊髓病理组织学改变(HE 染色 $\times 400$) **a** 假手术组脊髓神经元胞体大,胞核清楚,胞浆丰富,间质空泡少 **b** 手术组神经元稀少,间质含有较多空泡 **c** 药物组神经元数目减少,间质可见少量空泡,与手术组比较损伤程度明显减轻 **图 2** 各组术后 48h 脊髓组织 TTC 染色图 **a** 假手术组脊髓呈红色 **b** 手术组脊髓大部分呈白色 **c** 药物组脊髓部分染成红色、部分呈白色

Figure 1 Pathological images of spinal cord of each group in 48h after operation(original magnification, $\times 400$; HE stain) **a** Sham group, nuclei are clear, cytoplasm abundant, vacuoles scarce **b** Control group, neurons are scarce, and many vacuoles within mesenchyma **c** Atorvastatin-pretreated group, the number of neurons decreased, and some vacuoles are visible within mesenchyma, the damage degree alleviated significantly compared with control **Figure 2** Photographs of TTC-stained spinal cord tissue of each group in 48h after operation **a** The tissue was dyed red in sham group **b** Most part of the tissue was pale in control group **c** Part of the tissue was dyed red, and another part was pale in atorvastatin-pretreated group

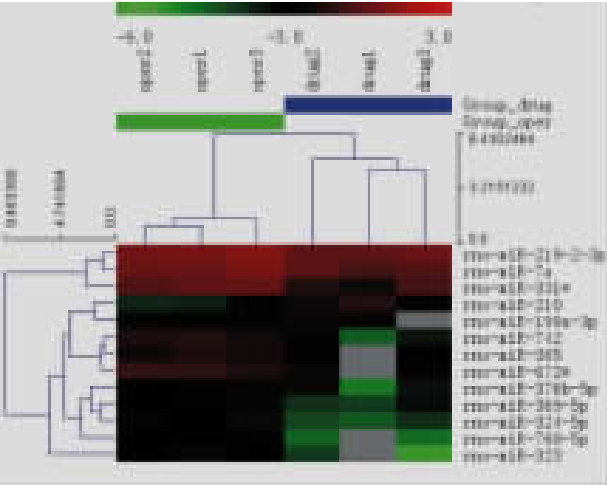


图3 药物组与手术组 miRNA 表达谱改变的聚类分析图。横列代表差异表达的基因,纵列代表不同的组织样品(药物组和手术组的各样本)。图中标示:oper 为手术组样本,drug 为药物组样本,rno 为大鼠;红色为高表达,绿色为低表达,其余颜色所代表的表达倍数如图上方颜色标尺所示($n=3, P<0.05$)

Figure 3 Hiereracheal clustering of differentially expressed miRNAs in drug group versus operation group. The rows show individual genes, while the columns show individual tissue samples. Red denotes a high expression and green denotes a low expression ($n=3, P<0.05$)

表 2 miRNA 表达谱改变 (n=3, $\bar{x}\pm s$)		
Table 2	Altered expression of miRNAs	
	手术组/假手术组 Control vs. sham	药物组/手术组 Atorvastatin-pretreatment vs. control
大鼠-miR-204* rno-miR-204*	上调 up 2.0±0.25	
大鼠-miR-365 rno-miR-365	上调 up 2.0±0.48	下调 down 2.0±0.43
大鼠-miR-323 rno-miR-323	上调 up 7.1±0.58	下调 down 9.1±0.78
大鼠-miR-672* rno-miR-672*	上调 up 2.3±0.18	下调 down 2.4±0.35
大鼠-miR-760-5p rno-miR-760-5p	上调 up 4.3±0.31	下调 down 7.8±0.69
大鼠-miR-376b-5p rno-miR-376b-5p	上调 up 2.3±0.30	下调 down 2.4±0.56
大鼠-miR-369-5p rno-miR-369-5p	上调 up 2.5±0.27	下调 down 2.1±0.39
大鼠-miR-133a rno-miR-133a	上调 up 2.5±0.45	
大鼠-miR-505* rno-miR-505*	上调 up 2.5±0.23	
大鼠-miR-466d rno-miR-466d	上调 up 2.6±0.31	
大鼠-miR-132* rno-miR-132*	上调 up 2.9±0.45	
大鼠-miR-665 rno-miR-665	上调 up 3.1±0.53	
大鼠-miR-463 rno-miR-463	上调 up 4.8±0.49	
大鼠-miR-210 rno-miR-210	下调 down 2.2±0.21	上调 up 3.4±0.68
大鼠-miR-146a rno-miR-146a	下调 down 2.9±0.34	
大鼠-miR-199a rno-miR-199a	下调 down 2.0±0.17	上调 up 1.6±0.27

miR-760-5p 表达显著增加,分别为假手术组的 2.3、6.8 和 5.2 倍;相反,miR-210 表达显著下降,较假手术组下调 2.5 倍(表 3)。miRNA 表达的 qRT-PCR 结果和

表 3 miRNA 表达的实时定量 PCR 结果与芯片结果比较 (n=6, $\bar{x}\pm s$)		
Table 3	Comparison of miRNA expression between miRNA microarray and qRT-PCR	
	miRNA 芯片 miRNA microarray	实时定量 PCR qRT-PCR
miR-365	2.00±0.48	2.30±0.45
miR-323	7.10±0.58	6.80±0.40
miR-760-5p	4.30±0.31	5.20±0.60
miR-210	-2.20±-0.21	-2.50±-0.26

芯片结果无显著性差异($P>0.05$)。说明本基因芯片研究结果可靠。

3 讨论

3.1 大鼠脊髓 I/R 损伤模型的评价

采用腹主动脉血流阻断建立脊髓 I/R 损伤模型的方法最先由 Zivin 等^[5]于 1980 年报道,采用动脉夹在左肾动脉水平阻断主动脉血流,缺血 1h 后行再灌注,可导致腰骶段脊髓 I/R 损伤。目前,国内普遍沿用 Zivin 等^[5]的方法,但做了一定程度改进。张俐等^[6]采用数字减影(DSA)和血管铸型两种技术建立及鉴定大鼠脊髓 I/R 损伤模型,发现在右肾动脉上方阻断腹主动脉可造成第 2~5 对腰动脉供血的相应腰骶段脊髓完全缺血,为最佳的脊髓缺血模型的阻断部位。但在此部位阻断会造成双侧肾动脉同时缺血而带来双肾的损伤,且可能误伤紧邻右肾动脉上方的肠系膜前动脉而导致内脏损伤。因此本研究选择在左右两肾动脉之间、紧邻右肾动脉下方阻断腹主动脉。此方法既保证了单侧肾脏的血供、避免伤及肠系膜前动脉,又能通过人为控制夹闭时间长短,实现不同程度的腰骶段脊髓缺血性损伤和后肢运动功能的障碍。

适合于科学研究的脊髓 I/R 最佳时间尚无定论。本研究采用腹主动脉夹闭时间为 1h, 在该时间窗内, 大鼠在行为上表现出后肢运动功能的障碍, BBB 评分下降, TTC 染色明确腰骶段脊髓存在缺血性损伤, 同时 HE 染色病理表现为部分神经元坏死、适度炎症反应。采用阿托伐他汀预处理后, BBB 评分较手术组升高, HE 染色和 TTC 染色显示缺血病理改变减轻。说明本模型导致的脊髓损伤为部分可逆, 较为适用药物疗效及机制的研究, 还明确了阿托伐他汀预处理对脊髓 I/R 损伤的神经保护作用。

3.2 脊髓 I/R 损伤的 miRNA 调控机制

miRNA 是近年发现的一类长度约为 20~24 个核苷酸的非编码的 RNA 分子, 通常通过抑制 mRNA 而发挥对多种蛋白质的调控作用。目前已在动物 CNS 损伤模型中发现一些 miRNA 能在上游对神经元凋亡、炎症反应、细胞增殖等相关的分子信号途径进行重要的调控, 对中下游反应产生广泛深远的影响。炎症反应、神经元凋亡等是脊髓 I/R 损伤的重要机制, 但目前尚不清楚 miRNA 在脊髓 I/R 损伤中扮演的角色。miRNA 芯片技术在探讨 miRNA-mRNA 相互作用调节细胞生理过程的研究中被广泛应用。本研究首次采用 miRNA 芯片技术检测大鼠脊髓 I/R 损伤后 miRNA 表达谱改变, 以揭示脊髓 I/R 损伤的 miRNA 调控机制。结果显示, 大鼠脊髓 I/R 48h 后, 48 种 miRNA 表达明显改变, 且以上调为主, 仅有小部分 miRNA 表现为下调。这些表达改变的 miRNA 可能从多个方面参与调控脊髓 I/R 损伤的病理生理过程。为明确其具体的调控通路, 我们通过 Target Scan Database 搜索这些改变明显的 miRNA 的可能靶基因, 发现其可能通过炎症、神经元凋亡、增殖、神经修复、氧化应激等多个途径参与脊髓 I/R 损伤的调控。从本研究筛选出的多种表达有明显差异的 miRNA 中, 通过靶基因筛查和文献检索选取以下 3 种在 I/R 损伤中有一定靶基因研究基础的 miRNA 分别进行讨论。

MiR-146a 为一种炎症相关的 miRNA, 参与先天免疫反应的调节, 被认为可预测炎症免疫性疾病的发生发展。miR-146a 参与免疫炎症反应的机制在于 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 信号通路的关键因子 IL-1 受体相关激酶 1 (Interleukin-1 receptor-associated kinase 1, IRAK1) 和

TNF 受体相关因子 6 (TRAF6) 为 miR-146a 的靶基因^[7]。TLR 信号通路及其介导的炎症因子释放在脑 I/R 损伤中的作用已被证实^[8,9]。在该信号通路中, IRAK1 参与的 TRAF6 的磷酸化和活化是 TLR 信号转导的必须途径。miR-146a 可通过作用于 IRAK1 和 TRAF6 的 3'-非编码区的区域, 抑制两者的表达, 从而抑制 TLR 信号通路及其介导的炎症介质产生。此外, syntaxin-3、神经连接蛋白-1 (neuroligin-1) 和神经纤毛蛋白 2 (neuropilin 2) 等参与神经损伤的分子均为 miR-146a 的靶基因, 提示除参与炎症信号通路调控外, miR-146a 还可能通过其他机制调控脊髓 I/R 损伤。在本研究中, 脊髓 I/R 48h 后, miR-146a 的表达是降低的, 与肾脏 I/R 损伤中 miR-146a 的表达趋势^[10]不一致, 可能与不同的研究器官和 I/R 时间有关。

MiR-199a 可能通过多种途径参与 I/R 损伤调控: (1) 与 miR-146a 相似, miR-199a 也参与对炎症反应信号通路的调控。但不同的是, miR-199a 可能作用于 TLR-NF- κ B 信号通路的另一环节, 即通过调节 IKK β 影响 NF- κ B 活性, 进而抑制炎症因子分泌^[11]; (2) miR-199a 可通过下调细胞外信号调节激酶 2 (extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2), 抑制卵巢癌细胞增殖和凋亡^[12]。而有研究表明, ERK 信号通路在脊髓 I/R 损伤中同样发挥关键作用, 通过特异性抑制剂 U0126 抑制 ERK 磷酸化从而抑制细胞凋亡, 可发挥神经保护作用^[13]。因此, 可以推测, miR-199a 可能通过抑制 ERK 信号通路在脊髓 I/R 损伤中发挥保护神经保护作用。此外, 在缺氧所致的心肌细胞损伤中, miR-199a 作用于缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α), 从而抑制心肌细胞凋亡^[14]。本研究中 miR-199a 表达在 I/R 损伤后下调, 与此研究一致。但 miR-199a 是否可通过 HIF-1 α 在脊髓 I/R 损伤中发挥保护作用还需进一步探讨。

本研究发现, miR-210 的表达同样在 I/R 损伤后下调, 但文献中 miR-210 在 I/R 损伤中的研究较少。在外周动脉疾病所致的肢体缺血情况下, miR-210 被证实可通过参与氧化应激和代谢而发挥细胞保护作用^[15]; 此外, 信号转导与转录活化因子 6 (STAT6) 为 miR-210 的靶基因^[16], 而 STAT6 在脊髓损伤中的作用已在 STAT6 基因敲除鼠中得到证实^[17]。

3.3 阿托伐他汀对脊髓 I/R 损伤的保护作用及其机制

他汀类药物独立于降胆固醇作用以外还具有抗炎、抗氧化、保护内皮、抑制血栓等多重效应,这些效应越来越受到重视。在本研究中,阿托伐他汀显示了对脊髓 I/R 损伤的良好保护作用,这与既往少数其他他汀类药物的研究结果^[4,18,19]一致。既往研究^[4,18,19]发现,他汀类药物可从不同方面发挥对 I/R 脊髓组织的保护作用,包括抗氧化、调节一氧化氮合酶(NOS)、抑制炎症反应等。但是这些机制的探讨只是研究中下游分子信号途径,技术方法有限。本研究以 miRNA 为出发点,采用芯片技术探讨他汀类药物发挥脊髓保护作用的机制。结果显示,阿托伐他汀预处理可以部分逆转脊髓 I/R 损伤中发生改变的 miRNA,提示 miRNA 可能介导阿托伐他汀的神经保护作用。对 miRNA 的靶基因进行分析显示,miR-199a、miR-323、miR-365、miR-210 和 miR-760-5p 参与细胞凋亡和炎症反应,miR-199a 和 miR-210 则可能参与轴突定位、神经元存活和轴突生长,因此,可以推测阿托伐他汀可能通过调节 miRNA 而调控多条途径参与脊髓 I/R 情况下的神经保护作用。在这些复杂的机制中,存在怎样的相互作用,又是何种机制占主导作用,有待进一步探讨。

总之,尽管缺乏深入的分子水平的探讨,本研究仍为脊髓 I/R 损伤的机制研究提供了以 miRNA 为切入点的新思路,并为他汀类药物抗脊髓 I/R 损伤提供了新的证据。

4 参考文献

- Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade[J]. Acta Neurobiol Exp(Wars), 2011, 71(2): 281-299.
- Wan IY, Angelini GD, Bryan AJ, et al. Prevention of spinal cord ischaemia during descending thoracic and thoracoabdominal aortic surgery[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2001, 19(2): 203-213.
- Hutchison ER, Okun E, Mattson MP. The therapeutic potential of microRNAs in nervous system damage, degeneration, and repair[J]. Neuromolecular Med, 2009, 11(3): 153-161.
- Saito T, Tsuchida M, Umehara S, et al. Reduction of spinal cord ischemia/reperfusion injury with simvastatin in rats [J]. Anesth Analg, 2011, 113(3): 565-571.
- Zivin JA, DeGirolami U. Spinal cord infarction: a highly reproducible stroke model[J]. Stroke, 1980, 11(2): 200-202.
- 张俐, 刘臻博, 李长征, 等. 采用血管铸型技术和数字减影技术建立及鉴定脊髓缺血再灌注损伤模型[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(40): 8193-8195.
- Hou J, Wang P, Lin L, et al. MicroRNA-146a feedback inhibits RIG-I-dependent Type I IFN production in macrophages by targeting TRAF6, IRAK1, and IRAK2[J]. J Immunol, 2009, 183(3): 2150-2158.
- Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain[J]. Nat Med, 2012, 18(6): 911-917.
- Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, et al. Post-ischemic inflammation in the brain[J]. Front Immunol, 2012, 3: 132.
- Godwin JG, Ge X, Stephan K, et al. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(32): 14339-14344.
- Chen R, Alvero AB, Silasi DA, et al. Regulation of IKKbeta by miR-199a affects NF-kappaB activity in ovarian cancer cells[J]. Oncogene, 2008, 27(34): 4712-4723.
- Kim S, Lee UJ, Kim MN, et al. MicroRNA miR-199a* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2)[J]. J Biol Chem, 2008, 283(26): 18158-18166.
- Lu K, Liang CL, Liliang PC, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinases 1/2 provides neuroprotection in spinal cord ischemia/reperfusion injury in rats: relationship with the nuclear factor-kappaB-regulated anti-apoptotic mechanisms[J]. J Neurochem, 2010, 114(1): 237-246.
- Rane S, He M, Sayed D, et al. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes [J]. Circ Res, 2009, 104(7): 879-886.
- Zaccagnini G, Maimone B, Di Stefano V, et al. Hypoxia-induced miR-210 modulates tissue response to acute peripheral ischemia: antioxidant redox signal[J/OL]. 2013 Oct 16. [Epub ahead of print].
- Kopriva SE, Chiasson VL, Mitchell BM, et al. TLR3-induced placental miR-210 down-regulates the STAT6/interleukin-4 pathway[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e67760.
- Fraidakis MJ, Kiyotani T, Pernold K, et al. Recovery from spinal cord injury in tumor necrosis factor-alpha, signal transducers and activators of transcription 4 and signal transducers and activators of transcription 6 null mice [J]. Neuroreport, 2007, 18(2): 185-189.
- Ucak A, Onan B, Guler A, et al. Rosuvastatin, a new generation 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, reduces ischemia/reperfusion-induced spinal cord tissue injury in rats[J]. Ann Vasc Surg, 2011, 25(5): 686-695.
- Die J, Wang K, Fan L, et al. Rosuvastatin preconditioning provides neuroprotection against spinal cord ischemia in rats through modulating nitric oxide synthase expressions[J]. Brain Res, 2010, 1346: 251-261.

(收稿日期:2014-06-30 修回日期:2014-08-18)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)