

基础研究

坐骨神经预损伤后背根神经节中 miRNomes 改变对大鼠脊髓后索损伤修复的影响

王天仪^{1,2}, 原文琦¹, 刘勇¹, 张衍军¹, 张亮³, 王志杰⁴, 曹建刚¹, 冯世庆¹

(1 天津医科大学总医院骨科 300052 天津市; 2 解放军 266 医院骨一科 067000 河北省承德市;

3 天津医科大学第二附属医院骨科 300211 天津市; 4 承德医学院附属医院儿内科 067000 河北省承德市)

【摘要】目的:研究大鼠坐骨神经预损伤后背根神经节中 miRNomes 改变对脊髓后索损伤修复的影响。**方法:**39 只雌性 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C、D 组。A 组($n=12$)坐骨神经损伤造模后 7d 进行 T10 节段脊髓后索损伤造模, B 组($n=12$)仅进行 T10 节段脊髓后索损伤造模, C 组($n=12$)仅进行坐骨神经损伤造模, D 组($n=3$)不进行任何造模操作。A 组和 B 组分别于脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d 取背根神经节行总 RNA 提取和 Western blot 检测, 于脊髓后索损伤造模后 14d 取损伤中心脊髓组织行神经丝蛋白 200(NF-200)免疫组织化学染色和 HE 染色; C 组于 A 组各时间点取材的同时取背根神经节行总 RNA 提取和 Western blot 检测; D 组取背根神经节行总 RNA 提取和 Western blot 检测。对 A、B 两组各时间点背根神经节 miRNA 表达谱进行微阵列芯片分析和生物信息学分析, 观察与坐骨神经预损伤促进脊髓后索损伤修复有关的 miRNA, 选出 A 组中与 B 组相比变化倍数明显、经过生物信息学分析靶蛋白为 Dusp4 的 miR-199a-5p 进行研究。并用 RT-qPCR 技术对各组 miR-199a-5p 及 A、B 和 D 组 Dusp4 mRNA 表达进行检测, 用 Western blot 技术检测各组 Dusp4 蛋白以及 A、D 组 p38 蛋白和 p-p38 蛋白, 对 A 组和 B 组脊髓后索损伤中心脊髓组织用 NF-200 免疫组织化学染色及 HE 染色观察损伤脊髓的恢复情况。**结果:**芯片分析结果显示 miR-199a-5p 在 A 组各个时间点表达与 D 组相比明显下调, B 组 miR-199a-5p 在脊髓后索损伤后 4h 表达与 D 组相比上调, 3d、7d 和 14d 的表达量无明显变化。RT-qPCR 结果显示 A 组各时间点 miR-199a-5p 表达与 D 组相比下调 ($P<0.05$), B 组 miR-199a-5p 在脊髓后索损伤后 4h 表达与 D 组相比上调 ($P<0.05$), 3d、7d 和 14d 的表达量与 D 组比较无明显变化, C 组各时间点 miR-199a-5p 表达与 D 组比较无明显变化。A 组和 B 组各时间点 Dusp4 mRNA 表达与 D 组相比无明显变化。A 组 Dusp4 蛋白在脊髓后索损伤后各个时间点与 D 组比较均有上调且存在统计学差异 ($P<0.05$)。B 组 Dusp4 蛋白在脊髓后索损伤后 4h 表达与 D 组相比显著下调 ($P<0.05$), 脊髓后索损伤后 3d、7d、14d 与 D 组比较无明显差异。C 组 Dusp4 蛋白在各时间点的表达水平与 D 组比较无明显差异。A 组 p38 蛋白及 p-p38 蛋白的表达变化趋势与 miR-199a-5p 趋势一致。在脊髓后索损伤后 14d, 与 B 组比较 A 组损伤中心尾端脊髓 NF-200 表达明显增加, 且损伤中心尾端脊髓白质纤维束形态规整、后索纤维束排列有序。**结论:**大鼠坐骨神经预损伤后背根神经节中 miR-199a-5p 表达下调可以促进脊髓后索损伤的修复。

【关键词】坐骨神经预损伤; 脊髓后索损伤; miRNA; Dusp4; p38 蛋白; 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2014.12.07

中图分类号: R683.2, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2014)-12-1090-09

Effect of alteration of miRNomes in rat dorsal root ganglia after sciatic nerve conditioning injury on the repairment of dorsal column lesion/WANG Tianyi, YUAN Wenqi, LIU Yong, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2014, 24(12): 1090-1098

【Abstract】Objectives: To study the effect of alteration of miRNomes after sciatic nerve conditioning injury on the repairment of dorsal column lesion. **Methods:** Thirty-nine female Wistar rats were divided randomly into four groups, group A, B, C and D. Group A($n=12$) underwent dorsal column lesion on the 10th thoracic

基金项目:全军医学科技青年培育项目(编号:13QNP017);国家自然科学基金重点项目(编号:81330042);国家自然科学基金面上项目(编号:81371957);国家自然科学基金面上项目(编号:81171714)

第一作者简介:男(1980-),主治医师,博士研究生,研究方向:脊柱、脊髓与关节损伤

电话:(022)6036393 E-mail:jjandt@sina.com

通讯作者:冯世庆 E-mail:professorfengsq@163.com

vertebra at the 7th day after sciatic nerve conditioning injury. Group B($n=12$) underwent only dorsal column lesion. Group C($n=12$) underwent only sciatic nerve injury. Group D($n=3$) was used as blank control. The dorsal root ganglia of group A and B were excised for total RNA isolation and western blot at 4 hours, 3 days, 7 days and 14 days after dorsal column lesion. The spinal cord tissues of lesion sited in group A and B were harvested at 14 days after dorsal column lesion for immunohistochemistry of neurofilament-200 (NF-200) and hematoxylin-eosin staining. The dorsal root ganglia of group C were harvested at same time points for total RNA isolation and Western blot. The dorsal root ganglia of group D were harvested for total RNA isolation and Western blot. To study its mechanism, the miRNA profiles of dorsal root ganglia in group A and B were investigated by Microarray and bioinformatics. The significantly changed miRNA miR-199a-5p whose target was Dusp4 was screened out. RT-qPCR was used to detect the expression of miR-199a-5p in each group and the expression of Dusp4 mRNA in group A, B and D. Western blot was applied to test the expression of Dusp4 protein in each group and the expression of p38 protein and p-p38 protein in group A and D. Immunohistochemistry of NF-200 and hematoxylin-eosin staining were used to investigate the repairment of dorsal column lesion. **Results:** Microarray revealed that miR-199a-5p downregulated at each time point of group A and upregulated at 4h of group B, however the expression of miR-199a-5p in group B did not alter significantly at 3d, 7d, and 14d after dorsal column lesion compared with that of group D. RT-qPCR showed that miR-199a-5p downregulated at each time point of group A($P<0.05$) and upregulated at 4h of group B($P<0.05$), while the expression of miR-199a-5p at 3d, 7d and 14d of group B and the expression at each time point of group C showed no statistical difference compared with that of group D. The Dusp4 mRNA expressions of group A and B showed no statistical difference at each time point compared with that of group D. Statistical difference was noted for Dusp4 protein at each time point of group A with group D($P<0.05$). Compared with group D, the Dusp4 protein downregulated significantly at 4h of group B($P<0.05$) and then raised to the level of group D at 3d, 7d and 14d. Compared with group D, there was no statistical difference regarding to the expression of Dusp4 protein at each time point of group C. p38 protein and phosphorylated p38 protein level was consistent with the level of miR-199a-5p in group A. At 14 days, compared with group B, the expression level of neurofilament protein increased significantly and the shape of nerve fiber bundle was more regular in caudal lesion site of group A. **Conclusions:** The downregulation of the expression of miR-199a-5p after sciatic nerve conditioning injury can promote the repairment of dorsal column lesion.

【Key words】 Sciatic nerve conditioning injury; Dorsal column lesion; miRNA; Dusp4; p38 protein; Rat

【Author's address】 Department of Orthopedics, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, 300052, China

1984年, Richardson 等^[1]首次报道在脊髓损伤造模前 7d 切断实验动物的坐骨神经能够促进脊髓后索损伤的修复。此后, 有学者^[2,3]报道了单独或联合应用前置性坐骨神经切断对于脊髓上行感觉传导通路损伤的修复有积极作用。但脊髓损伤前 7d 这一时间点临床上是无法预测的, 并且切断患者坐骨神经违背伦理道德, 因此, 极大限制了其在临床治疗中的应用。所以研究坐骨神经预损伤促进脊髓后索损伤修复的机理, 寻找替代方法具有一定的必要性。微小 RNA (microRNA, miRNA) 对信使 RNA (mRNA) 的调控作用已被证实与生物体的生长、发育和疾病发生等过程有重要关系^[4]。基于微阵列实验技术的 miRNA 组学

(miRNomes) 能够在基因组调控水平上以系统的、全局的视角去研究疾病的发生发展, 并找到精确的治疗靶点。本研究旨在运用 miRNomes 技术, 以背根神经节中 miRNA 表达谱的改变为切入点, 探讨坐骨神经预损伤对脊髓后索损伤修复影响的机理, 试图寻找起到关键生物学作用的 miRNA, 为其在临床应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雌性 Wistar 大鼠 39 只 (天津市放射研究所动物中心提供), 体重 $250\pm 10\text{g}$, 随机分为 A、B、C、D 组。A 组 (坐骨神经预损伤干预组, 12 只),

坐骨神经损伤造模后 7d 进行脊髓后索损伤造模。B 组(单纯脊髓后索损伤组, 12 只), 仅进行脊髓后索损伤造模。C 组(单纯坐骨神经损伤组, 12 只), 与 A 组同时进行坐骨神经损伤造模, 不进行脊髓后索损伤。D 组(空白对照, 3 只), 不进行任何造模操作。

1.2 动物模型制作及取材

1.2.1 坐骨神经损伤造模 应用 10%水合氯醛腹腔麻醉 A 组和 C 组大鼠(0.33ml/100g), 备皮、消毒, 于股骨后方约 0.5cm 作与股骨长轴平行约 2cm 长的皮肤切口, 分离皮下筋膜后可见大腿后群肌肉表面有一较为明显的白线, 沿此白线钝性分离肌肉, 分离满意后即可见以疏松结缔组织附着于深层肌肉表面的坐骨神经干, 小心分离坐骨神经后, 以眼科剪去除梨下孔远端 0.5cm 处以远的坐骨神经 2mm。然后逐层缝合伤口, 腹腔注射头孢哌酮 0.3ml 预防伤口感染(1g 头孢哌酮溶解在 40ml 生理盐水中)^[1]。

1.2.2 脊髓后索损伤造模 应用 10%水合氯醛腹腔麻醉 A 组和 B 组的大鼠(0.33ml/100g)后常规备皮、消毒, 以 T10 棘突为中心作 3cm 长的皮肤切口, 暴露腰背筋膜上“倒三角”解剖标志, 其尖端指向 T13 棘突。以 T13 棘突为计数标志, 逐一向上定位至 T10^[5], 钝性分离椎旁肌。椎板暴露满意后, 以微型咬骨钳小心咬除 T10 棘突及椎板, 暴露脊髓背侧, 仔细剪开脊髓硬膜, 找到脊神经后根, 根据文献报道, 在手术显微镜下确定同一节段两侧后根入脊髓处后以此为左右边界, 用微型眼科剪向下分离至中央管处^[2,6], 明胶海绵压迫止血, 逐层关闭伤口。腹腔注射头孢哌酮 0.3ml 预防感染(1g 头孢哌酮溶解在 40ml 生理盐水中)。

1.2.3 取材 A 组(CT1~CT4)和 B 组(T1~T4)分别于脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d, 以 PBS 灌注后取双侧坐骨神经对应的背根神经节以供总 RNA 提取和 Western blot 检测, 于脊髓后索损伤造模后 14d 取背根神经节的同时取以 T10 为中心的 2cm 长脊髓组织以供免疫组织化学染色和 HE 染色。C 组与 A 组同时进行坐骨神经损伤造模, 于 A 组各时间点取材的同时取双侧坐骨神经对应的背根神经节以供总 RNA 提取和 Western blot 检测。A、B、C 三组每个时间点 3 只大鼠。D 组取双侧坐骨神经对应背根神经节以供总 RNA 提取和 Western blot 检测。每次取出的背根神经节

分别置于液氮中冻存, 脊髓组织置于 4%多聚甲醛溶液中固定。

1.3 总 RNA 抽提

使用 mirVana™ RNA 提取工具箱提取 A、B、C 三组各个时间点及 D 组 50mg 背根神经节组织中的总 RNA。在塑料试管中放入相当于背根神经节组织块 10 倍体积的裂解/结合缓冲液并放在冰上, 利用预冷的金属铲将碎组织放入裂解/结合缓冲液, 迅速混匀并转移到另一个容器。加入 1/10 体积的 miRNA 匀浆添加剂, 涡旋匀浆, 并在冰上孵育 10min。加入与裂解/结合缓冲液等体积的氯仿, 涡旋 30~60s, 10000rpm 离心 5min 取上清液置于另一管中, 并记录体积。加入 1.25 倍体积 100%乙醇, 涡旋混匀, 反复过纯化柱, 10000rpm 离心 15s。用 700μl 冲洗缓冲液 1 清洗纯化柱, 然后用 500μl 冲洗缓冲液 2/3 清洗纯化柱二次。将离心柱放置到新的收集管中, 柱中心加入 100μl 95℃预热的洗脱液, 室温最高转速离心 20~30s, 收集管中液体即为提取的总 RNA, 放置在 -70℃保存。提取的总 RNA 用于 miRNA 表达谱检测及实时定量逆转录聚合酶链式反应(real-time quantitative reverse transcription-PCR, RT-qPCR)检测。

1.4 miRNA 表达谱的数据分析

应用 Affymetrix miRNA 3.0 芯片检测 A 组和 B 组大鼠各时间点背根神经节样本中 miRNA 表达谱的改变。样品总 RNA 利用 NanoDrop ND-2100 (Thermo Scientific) 定量并经 Agilent 2100 (Agilent Technologies)检测 RNA 完整性。RNA 质检合格后, 样本的标记、芯片的杂交及洗脱参照芯片标准流程。首先, 总 RNA 经过 Poly A 加尾, 再进一步用生物素标记。标记好的 RNA 和芯片杂交, 洗涤和染色后利用 Affymetrix Scanner 3000 (Affymetrix)扫描得到原始图像。应用 Expression Console (version 1.3.1, Affymetrix)数据分析软件分析芯片扫描图像, 将所得原始数据转化为 RMA 标准化算法信号值, 得出 A、B 组各时间点分别相对于 D 组的变化倍数, 并应用层次聚类分析对样本间 miRNA 表达模式进行分析。将候选 miRNA 在 B 组背根神经节同一时间点样本中的表达数据作为筛选条件, 挑选 A 组中与之差异较大的 miRNA 作为研究对象。由于 miR-199a-5p 在 A 组和 B 组表达差异明显, Target Scan 数据库预测其靶蛋白双特异性磷酸酶 4 (dual specificity

phosphatase 4, Dusp4) 可以通过抑制 p38 蛋白的磷酸化从而抑制神经元凋亡, 所以我们决定在本研究中进一步验证 miR-199a-5p 的生物学意义。

1.5 miR-199a-5p 和 Dusp4 mRNA 表达量的检测

运用 RT-qPCR 技术对 miR-199a-5p 和 Dusp4 mRNA 的表达量进行检测。按照 miScript II Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany) 说明书分别对 A 组、B 组和 C 组各时间点及 D 组大鼠背根神经节中 miR-199a-5p 和 U6 进行检测, 用 U6 对 miR-199a-5p 表达量进行标准化。按照 Primer Script RT reagent Kit (TaKaRa, Japan) 说明书分别对 A 组和 B 组各时间点及 D 组大鼠背根神经节中 Dusp4 mRNA 和 GAPDH 进行检测, 用 GAPDH 对 Dusp4 mRNA 表达量进行标准化。

1.6 Dusp4 蛋白、p38 蛋白及 p-p38 蛋白表达量的检测

应用 Western blot 技术对 Dusp4 蛋白、p38 蛋白及 p-p38 蛋白表达量进行检测。将 A、B 和 C 组各时间点及 D 组背根神经节样本分别放入即用型总蛋白提取裂解液(RIPA)中, 加入蛋白酶抑制剂并进行离心以分离蛋白。蛋白样品通过十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并被转膜到硝酸纤维素膜上。封膜以降低非特异性抗体的结合, 随后加入一抗(Dusp4 抗体、p38 抗体、p-p38 抗体和 β -Actin 抗体, 购自 Cell Signaling Technology Inc.), 4℃孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 然后加入二抗(辣根过氧化物酶标记抗体), 孵育 2h 后洗膜, 之后电化学发光试剂(ECL)检测(Santa Cruz)相应蛋白表达情况。以 D 组的相对表达量均数为标准, 计算各组各时间点相对于 D 组相对表达量均数的相对表达量。

1.7 脊髓神经丝蛋白-200 (neurofilament-200, NF-200)免疫组织化学染色及数据采集分析

将 A 组和 B 组脊髓后索损伤后 14d 取材的脊髓组织于 4%多聚甲醛溶液中固定后石蜡包埋, 以 10 μ m 厚度纵向连续切片, 每只大鼠选靠近背侧中线 3 张切片进行 NF-200 免疫组织化学染色。常规脱蜡, 枸橼酸盐缓冲液抗原修复; 滴加 3% H₂O₂ 去离子水; 滴加 5% 正常山羊血清封闭液; 滴加一抗(NF-200 抗体 1:200)80 μ l, 4℃冰箱内过夜; 次日以 PBS 液洗涤 3min $\times$ 3 次, 滴加 80 μ l 生物素标记山羊抗兔 IgG, 37℃恒温箱孵育

15min; 滴加 50 μ l S-ABC, 37℃恒温箱孵育 15min; 滴加 50 μ l 新配制的 DAB 溶液显色; 滴加苏木素工作液; 脱水透明处理, 中性树脂封片。采用 Image-pro plus 分析软件处理所得图像, 以免疫染色的 NF-200 的累积光密度值(integrated optical density, IOD)进行 A 组和 B 组脊髓后索损伤 14d 后脊髓中的 NF-200 表达比较。

1.8 大鼠脊髓 HE 染色

对 A 组和 B 组脊髓后索损伤后 14d 取材的脊髓组织于 4%多聚甲醛溶液中固定后石蜡包埋, 以 10 μ m 厚度纵向连续切片, 每只大鼠选靠近背侧中线 3 张切片进行 HE 染色。常规脱蜡, 浓度梯度乙醇依次浸泡 1min, 蒸馏水冲洗 3min, 苏木素浸 5min, 蒸馏水冲洗 3min; 盐酸乙醇分行 30s, 蒸馏水浸泡 10min, 伊红浸泡 3min; 中性树脂封片。以光学显微镜观察脊髓白质纤维束形态并采集图像。

1.9 统计学处理

应用 SPSS 18.0 软件对所得数据进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。miR-199a-5p、Dusp4 mRNA、Dusp4 蛋白和 p-p38 蛋白的 A、B、C 组与 D 组的比较采用方差分析(ANOVA)和 SNK 检验。NF-200 染色 IOD 值的组间比较采用 Student *t* 检验。 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 坐骨神经预损伤后脊髓后索损伤大鼠背根神经节的 miRNA 表达谱分析

生物信息分析显示, 与 D 组相比, A 组与 B 组大鼠背根神经节中共有 681 个 miRNA 在不同的时间点发生表达变化(图 1)。其中 miR-199a-5p 在 A 组各个时间点与 D 组相比表达明显下调, 而 B 组大鼠脊髓后索损伤后 4h 与 D 组相比表达上升, 3d、7d 和 14d miR-199a-5p 的表达量与 D 组相比并无明显变化(表 1, 正值代表上升, 负值代表下降)。对 miR-199a-5p 在各个时间点样本中表达量进行聚类分析, 发现 A 组的 miR-199a-5p 的表达量在 4h、3d、7d(CT1、CT2、CT3)被聚为一类, 而 B 组大鼠背根神经节中 miR-199a-5p 的表达量在 3d、7d(T2、T3)被聚为一类(图 2)。RT-qPCR 检测结果显示, A 组各个时间点 miR-199a-5p 表达与 D 组比较明显下调 ($P<0.05$), B 组大鼠脊髓后索损伤后 4h 表达与 D 组比较上升

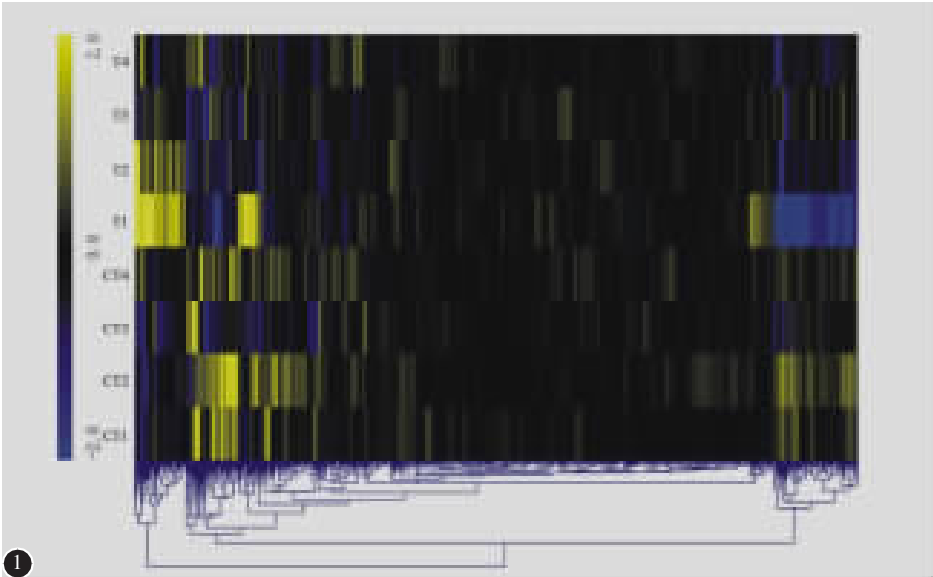


图 1 A 组和 B 组背根神经节的 miRNA 表达谱;横列表示差异表达的 miRNA,纵列表示不同组别及时间点;蓝色表示表达下调,黄色表示表达上调,其余颜色所代表的表达变化如上方颜色标尺所示,标尺是色阶,正值代表上升,负值代表下降;CT1~CT4 表示 A 组脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d,T1~T4 表示 B 组脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d

Figure 1 miRNA profile of dorsal root ganglion in group A and B. The rows show individual miRNAs, while the columns show individual check points of group A and B. As shown in color gradation, blue denotes downregulation and yellow denotes upregulation. CT1~CT4, 4h, 3d, 7d and 14d post dorsal column lesion in group A. T1~T4, 4h, 3d, 7d and 14d post dorsal column lesion in group B

表 1 坐骨神经预损伤干预组与单纯脊髓后索损伤组各个时间点 miR-199a-5p 表达情况

Table 1 The expression of miR-199a-5p in each check point

	坐骨神经预损伤干预组(A组) Sciatic nerve conditioning injury group				单纯脊髓后索损伤组(B组) Simple dorsal column lesion group			
	CT1	CT2	CT3	CT4	T1	T2	T3	T4
变化倍数 Fold change	-4.82	-6.44	-6.76	-2.68	10.59	1.11	-1.10	-1.62
RMA 标准化信号值 RMA normalization signal value	4.16	3.74	3.67	5.01	9.83	6.59	6.29	5.73

注:CT1~CT4 表示 A 组脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d;T1~T4 表示 B 组脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d
Note: CT1~CT4, 4h, 3d, 7d and 14d post dorsal column lesion in group A. T1~T4, 4h, 3d, 7d and 14d post dorsal column lesion in group B

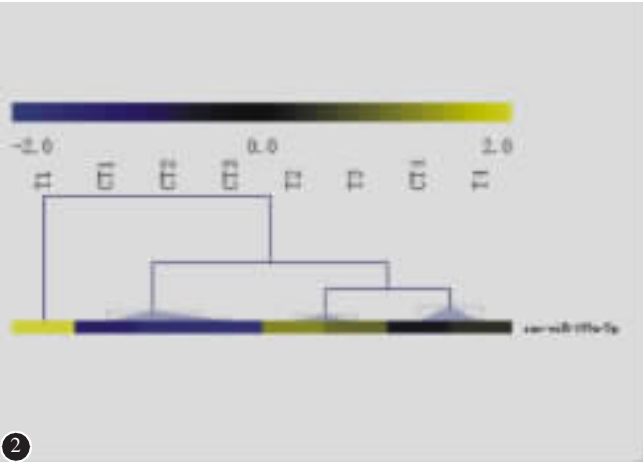


图 2 A 组和 B 组 miR-199a-5p 的各个时间点聚类分析图;蓝色表示表达下调,黄色表示表达上调,其余颜色所代表的表达变化如上方颜色标尺所示;CT1~CT4 表示 A 组脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d,T1~T4 表示 B 组脊髓后索损伤造模后 4h、3d、7d、14d

Figure 2 Hierarchical Clustering of miR-199a-5p at each check points of group A and B. As shown in color gradation, blue denotes downregulation and yellow denotes upregulation. CT1~CT4, 4h, 3d, 7d and 14d post dorsal column lesion in group A. T1~T4, 4h, 3d, 7d and 14d post dorsal column lesion in group B

($P<0.05$), 3d、7d 和 14d miR-199a-5p 的表达量与 D 组比较无明显变化 ($P>0.05$), C 组各时间点 miR-199a-5p 表达与 D 组比较无明显变化 ($P>0.05$, 表 2)。

2.2 Dusp4 基因的表达变化

RT-qPCR 检测 A 组及 B 组样本中 Dusp4 mRNA 的表达水平, 发现各时间点表达与 D 组相比无统计学差异 ($P>0.05$, 表 2)。进一步应用 Western blot 检测 Dusp4 蛋白的表达变化, 发现 A 组 Dusp4 蛋白在脊髓后索损伤后各时间点与 D 组比较均有上调且存在统计学差异 ($P<0.05$, 表 2)。

与 D 组比较 B 组 Dusp4 蛋白在脊髓后索损伤后 4h 表达显著下调 ($P<0.05$, 表 2), 脊髓后索损伤后 3d、7d、14d 与 D 组比较无明显差异 ($P>0.05$)。C 组各时间点 Dusp4 蛋白的表达与 D 组比较无统计学差异 ($P>0.05$, 表 2)。

2.3 p38 蛋白及磷酸化的 p38 蛋白变化与脊髓后索损伤的修复

用 Western blot 检测 A 组背根神经节样本中磷酸化的 p38(p-p38)蛋白的表达变化(表 2), 发现其变化趋势与 miR-199a-5p 趋势一致, 在脊髓后索损伤后各个时间点均有下调 ($P<0.05$), 其中

损伤后 3d 和 7d 下调最明显。miR-199a-5p 和 p-p38 蛋白的整体变化规律见图 3。对脊髓后索损伤后 14d 大鼠的脊髓后索损伤中心尾端组织进行 NF-200 免疫组织化学染色发现, A 组阳性染色面积较 B 组大, 且着色较深(图 4a、b); 采用 image-pro plus 分析软件处理所得图像, 测定 NF-200 免疫染色强度以 IOD 值表示, A 组 IOD 值 (45491.81 ± 3533.93) 明显高于 B 组 (18593.90 ± 2727.36), 且差异有统计学意义 ($P<0.05$)。HE 染色显示 A 组(图 4c)在脊髓后索损伤后 14d 时损伤中心尾端脊髓白质纤维束较 B 组(图 4d)形态规整, 后索纤维束排列有序。

3 讨论

脊髓损伤是高致残率、高死亡率的严重创伤性疾病, 其修复一直是世界医学界的难题。坐骨神经损伤对脊髓损伤修复的研究报道最早发表于 Nature 杂志, 作者发现在脊髓损伤前 7d 切断大鼠双侧坐骨神经能抑制神经元凋亡、促进轴突再生和脊髓损伤修复^[1]。此后, 大量实验研究从转录因子 3(activating transcription factor-3, ATF-3)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、生长关联蛋白-43(growth-associated protein-43, GAP-43)等角度

表 2 4 组大鼠背根神经节中 miR-199a-5p、Dusp4 mRNA、Dusp4 蛋白、p38 蛋白和 p-p38 蛋白的相对表达量

Table 2 The relative expression of miR-199a-5p, Dusp4 mRNA, Dusp4 protein, p38 protein and p-p38 protein in 4 groups

	miR-199a-5p	Dusp4 mRNA	Dusp4 蛋白 Dusp4 protein	p38 蛋白 p38 protein	p-p38 蛋白 p-p38 protein
A组(Group A)					
4h	0.21±0.16 ^①	1.03±0.12	3.19±0.15 ^①	0.64±0.11 ^①	0.81±0.21 ^①
3d	0.16±0.14 ^①	1.10±0.12	5.17±0.35 ^①	0.64±0.12 ^①	0.64±0.19 ^①
7d	0.15±0.13 ^①	0.99±0.23	5.27±0.10 ^①	0.67±0.13 ^①	0.60±0.13 ^①
14d	0.37±0.14 ^①	0.97±0.26	2.75±0.21 ^①	0.83±0.12 ^①	0.85±0.17 ^①
B组(Group B)					
4h	10.59±0.27 ^①	1.02±0.05	0.37±0.22 ^①	—	—
3d	1.11±0.28	0.99±0.04	0.93±0.19	—	—
7d	0.91±0.27	0.94±0.07	0.98±0.22	—	—
14d	0.62±0.13	1.02±0.03	0.96±0.22	—	—
C组(Group C)					
4h	0.98±0.12	—	1.01±0.21	—	—
3d	1.03±0.13	—	0.98±0.33	—	—
7d	1.09±0.11	—	1.08±0.15	—	—
14d	1.00±0.17	—	0.99±0.14	—	—
D组(Group D)					
	1.00±0.29	1.00±0.08	1.00±0.13	1.00±0.09	1.00±0.11

注: ①与 D 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with group D, $P<0.05$

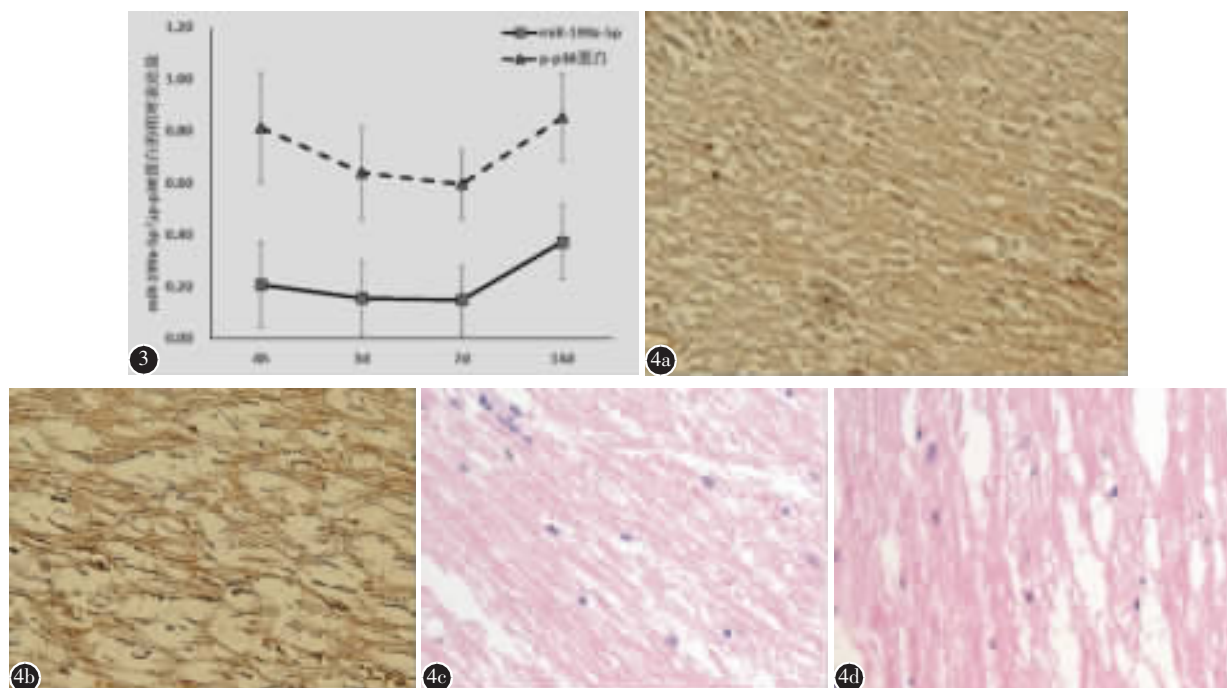


图 3 A 组的 miR-199a-5p 和磷酸化 p38 蛋白(p-p38)的变化趋势一致 **图 4** A 组和 B 组脊髓后索损伤后 14d, 脊髓后索损伤中心尾端 NF-200 免疫组化染色和 HE 染色 (×100) **a** A 组脊髓后索损伤后 14d, 脊髓后索损伤中心尾端 NF-200 表达。染色面积大, 且着色较深 **b** B 组脊髓后索损伤后 14d, 脊髓后索损伤中心尾端 NF-200 表达。染色面积小, 且着色较浅 **c** A 组脊髓后索损伤后 14d, 脊髓后索损伤中心尾端 HE 染色可见脊髓白质纤维束形态规整, 空泡较少 **d** B 组脊髓后索损伤后 14d 脊髓后索损伤中心尾端 HE 染色可见脊髓白质纤维束形态混乱, 且有较多空泡

Figure 3 The overall trends of miR-199a-5p and p-p38 in group A is accordant **Figure 4** The immunohistochemistry of NF-200 and hematoxylin-eosin staining in caudal lesion site of group A and B at 14th day after dorsal column lesion (×100) **a** The expression of NF-200 in caudal lesion site of group A at 14th day after dorsal column lesion. Staining area was large, and the color was deep **b** The expression of NF-200 in caudal lesion site of group B at 14th day after dorsal column lesion. Staining area was small, and color was light **c** Hematoxylin-eosin staining stain of caudal lesion site of group A at 14th day after dorsal column lesion. The shape of nerve fiber bundle was regular, and the number of vacuoles was few **d** Hematoxylin-eosin staining stain of caudal lesion site of group B at 14th day after dorsal column lesion. The shape of nerve fiber bundle was tangle, and the number of vacuoles was large

论证了坐骨神经预损伤对脊髓损伤修复的促进作用^[6-8]。2011 年, Lin 等^[9]通过实验证实坐骨神经预损伤能够促进损伤脊髓局部灰质后角突触增加, 对坐骨神经预损伤只能促进后索轴突增长的传统理论进行了补充。但上述研究大多只停留在单一因素的“干预-现象-结果”观察层面, 深层机制不明确, 使得坐骨神经预损伤的替代疗法一直无法应用于临床实践。

本研究运用 Microarray (Affymetrix miRNA 3.0 芯片) 的方法对坐骨神经预损伤后脊髓后索损伤大鼠的 miRNA 表达谱进行分析, 发现 miR-199a-5p 在 A 组脊髓后索损伤后 4h、3d 和 7d 与 D 组比较表达明显下调, 到损伤后 14d 表达有所

回升, 但仍未恢复到正常水平。而 B 组 miR-199a-5p 表达除在脊髓后索损伤后 4h 以外的其他时间点与 D 组相比均无明显变化, 脊髓后索损伤后 3d、7d 和 14d 三个时间点 A、B 两组 miR-199a-5p 的表达差异明显。生物信息学分析认为, 在 A 组和 B 组间相同时间点表达差异明显的变化倍数大的 miRNA 可能具有独特的生物学意义, miR-199a-5p 在 A 组和 B 组的具体表达水平见表 1。因此, miR-199a-5p 可能是坐骨神经预损伤促进脊髓后索损伤修复的关键调控者。我们对 miR-199a-5p 的表达量进行 RT-qPCR 验证发现, 在 RT-qPCR 的结果中 miR-199a-5p 也表现出相似的变化, 即 A 组脊髓后索损伤后 4h、3d 和

7d 明显下调,到损伤后 14d 表达有所回升,B 组 miR-199a-5p 表达除在脊髓后索损伤后 4h 以外的其他时间点与 D 组相比均无明显变化,说明芯片的结果是可靠的,值得进一步进行生物学验证。同时,我们又检测了 C 组 miR-199a-5p 的表达,与 A 组相同时间取材的背根神经节中 miR-199a-5p 的表达并没有明显的改变。因此,我们认为 A 组 miR-199a-5p 的表达变化是坐骨神经损伤和脊髓后索损伤共同作用的结果。B 组在脊髓后索损伤后 4h 的表达上调可能是损伤刺激造成的,而这一上升很有可能是阻碍损伤的脊髓后索修复的原因,但具体机制目前还不明了,我们将在今后的实验中进行进一步的分析。

由于 miRNA 主要通过抑制靶基因的 mRNA 行使功能,我们应用 Target Scan 数据库预测 miR-199a-5p 的靶基因,并通过 Gene Ontology 及 KEGG 数据库以及相关文献查询 miR-199a-5p 及其靶基因在神经系统中的功能,发现 miR-199a-5p 的靶基因 Dusp4 表达能够抑制 p38 蛋白的磷酸化从而抑制神经元凋亡^[10]。Dusp4 是双效特异性磷酸酶家族的一个成员,可以通过去磷酸化调节包括 p38 蛋白在内的丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated kinase-like protein, MAPK) 超家族的多个成员^[11-14]。已有研究发现 p38 蛋白促分裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK, p38) 是诱导细胞凋亡的通路中的一个关键酶,并认为抑制 p38 蛋白的表达是治疗脊髓损伤后神经元缺失的潜在靶点^[15]。其表达的强弱预示了神经细胞的存活与否,是细胞对不同损伤的应激反应表现。而 Dusp4 不但能够通过负调控 p38 蛋白的磷酸化抑制细胞凋亡^[16];还能够通过调控 p38 蛋白的磷酸化,克服损伤局部炎症和水肿对神经元轴突的破坏^[17-20]。我们对 miR-199a-5p 的靶基因 Dusp4 进行研究发现,A 组样本中 Dusp4 mRNA 的表达未发生明显改变而 Dusp4 蛋白的表达在各时间点均有明显上调,说明 miR-199a-5p 对于 Dusp4 基因表达的调控方式是翻译抑制。虽然翻译被抑制, Dusp4 mRNA 只有与 miR-199a-5p 高度互补才会被降解^[21,22]。A 组 Dusp4 蛋白在脊髓后索损伤后 4h 开始升高,在损伤后 3d、7d 升高最明显,在损伤后 14d 开始下降,而 p-p38 蛋白在脊髓后索损伤后 3d 和 7d 表达下降明显,这一趋势在时间点上与 Dusp4 蛋白的表达变化相吻合。这种时间点上

的吻合印证了 Liu 等^[23]报道的 Dusp4 可以抑制 p38 蛋白的磷酸化。本研究中 A 组 Dusp4 蛋白和 p-p38 蛋白在脊髓后索损伤后 3d 明显下降,这一现象与 Richardson 和 Issa^[1]报道的坐骨神经预损伤发挥作用的时间点相符合。

NF-200 是神经细胞轴突富含的中间丝,可反映轴突再生的情况。对于免疫组织化学染色照片进行 NF-200 的 IOD 分析发现,A 组明显高于 B 组,且 HE 染色照片中可以看出 A 组损伤中心尾端脊髓白质纤维束形态更加规整,后索纤维束排列更加有序,说明 A 组轴突再生明显优于 B 组,进而证明了坐骨神经预损伤对于脊髓后索损伤的修复具有积极意义。

本研究发现坐骨神经预损伤后背根神经节中 miR-199a-5p 表达下调可以促进脊髓后索损伤的修复。但在 miRNomes 研究过程中,每个时间点只用了 3 只实验动物作为生物学重复,又用 PCR 的方法作为技术重复,存在着单一时间点样本量较小的缺点。虽然存在样本量较小这一缺点,本研究仍为研究脊髓损伤的修复提供了新的角度。在随后的研究中,我们将在背根神经节中发生变化的 681 个 miRNA 中继续寻找其他调控靶点,并进一步扩大样本量以期进一步了解坐骨神经预损伤促进脊髓后索损伤修复这一复杂生物学现象的机制。

4 参考文献

1. Richardson PM, Issa VM. Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones[J]. Nature, 1984, 309 (5971): 791-793.
2. Neumann S, Woolf CJ. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury [J]. Neuron, 1999, 23(1): 83-91.
3. Lu P, Yang H, Jones LL, et al. Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2004, 24(28): 6402-6409.
4. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, et al. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels [J]. Nature, 2010, 466(7308): 835-840.
5. 张超, 冯世庆, 刘桑, 等. 改良 ALLEN 法胸椎开窗制备大鼠脊髓损伤模型 [J]. 中华实验外科杂志, 2013, 30(7): 1529-1531.
6. Qiu J, Cafferty WB, McMahon SB, et al. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation[J]. J Neurosci, 2005,

- 25(7): 1645–1653.
7. Cafferty WB, Gardiner NJ, Das P, et al. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin -6 knock-out mice [J]. J Neurosci, 2004, 24(18): 4432–4443.
8. Seijffers R, Allchorne AJ, Woolf CJ. The transcription factor ATF-3 promotes neurite outgrowth [J]. Mol Cell Neurosci, 2006, 32(1–2): 143–154.
9. Lin JY, Peng B, Yang ZW, et al. Number of synapses increased in the rat spinal dorsal horn after sciatic nerve transection: a stereological study [J]. Brain Res Bull, 2011, 84(6): 430–433.
10. Al-Mutairi M, Al-Harhi S, Cadalbert L, et al. Over-expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-2 enhances adhesion molecule expression and protects against apoptosis in human endothelial cells [J]. Br J Pharmacol, 2010, 161(4): 782–798.
11. Black EJ, Walker M, Clark W, et al. Cell transformation by v-Jun deactivates ERK MAP kinase signalling [J]. Oncogene, 2002, 21(42): 6540–6548.
12. Camps M, Nichols A, Arkinstall S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function [J]. FASEB J, 2000, 14(1): 6–16.
13. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. Nature, 2001, 410(6824): 37–40.
14. Keyse SM. Dual-specificity MAP kinase phosphatases(MKPs) and cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(2): 253–261.
15. Horiuchi H, Ogata T, Morino T, et al. Continuous intrathecal infusion of SB203580, a selective inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase, reduces the damage of hind-limb function after thoracic spinal cord injury in rat [J]. Neurosci Res, 2003, 47(2): 209–217.
16. Franklin RA, McCubrey JA. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis [J]. Leukemia, 2000, 14(12): 2019–2034.
17. Barone FC, Irving EA, Ray AM, et al. SB 239063, a second-generation p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, reduces brain injury and neurological deficits in cerebral focal ischemia [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001, 296(2): 312–321.
18. Park SY, Lee H, Hur J, et al. Hypoxia induces nitric oxide production in mouse microglia via p38 mitogen-activated protein kinase pathway [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2002, 107(1): 9–16.
19. Namgung U, Xia Z. Arsenic induces apoptosis in rat cerebellar neurons via activation of JNK3 and p38 MAP kinases [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 174(2): 130–138.
20. Nath R, McGinnis K, Dutta S, et al. Inhibition of p38 kinase mimics survival signal-linked protection against apoptosis in rat cerebellar granule neurons [J]. Cell Mol Biol Lett, 2001, 6(2): 173–184.
21. Hou J, Lin L, Zhou W, et al. Identification of miRNomes in human liver and hepatocellular carcinoma reveals miR-199a/b-3p as therapeutic target for hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2011, 19(2): 232–243.
22. Williams AE. Functional aspects of animal microRNAs [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(4): 545–562.
23. Liu Y, Du F, Chen W, et al. Knockdown of dual specificity phosphatase 4 enhances the chemosensitivity of MCF-7 and MCF-7/ADR breast cancer cells to doxorubicin [J]. Exp Cell Res, 2013, 319(20): 3140–3149.

(收稿日期: 2014-06-25 末次修回日期: 2014-10-31)

(英文编审 蒋欣/贾丹彤)

(本文编辑 李伟霞)

消息

欢迎购阅《中国脊柱脊髓杂志》合订本

《中国脊柱脊髓杂志》2013 年合订本已装订完成, 为精装本(上、下册), 定价为 110 元/册, 全年共 220 元; 另外还有少量 2006~2012 年合订本, 均为精装本(上、下册), 2006 年定价 180 元/套, 2007~2010 年定价 200 元/套, 2011~2013 年定价 220 元/套。2014 年合订本即将装订(上、下册), 定价为 220 元/套。有需要者请与本刊经理部联系。

联系地址: 北京市朝阳区中日友好医院内《中国脊柱脊髓杂志》经理部, 邮编: 100029。

电话: (010)84205510; E-mail 地址: cspine@263.net.cn。

汇款时请在汇款单上填写收件人详细地址, 并注明所需物品及数量。