

慢病毒介导白介素-1 β siRNA 对脊髓 钝挫伤大鼠运动功能的影响

曾 茜¹, 彭 硕¹, 汪剑涛¹, 冯鲁乾²

(1 贵州医科大学 550004 贵阳市; 2 贵州医科大学附属医院神经外科 550004 贵阳市)

【摘要】目的:观察白介素-1 β (IL-1 β)小干扰 RNA(siRNA)对脊髓钝挫伤(spinal cord contusion, SCC)大鼠运动功能的影响,并探讨其相关机制。**方法:**98 只雌性 SD 大鼠随机分为 4 组:假手术组(Sham 组)、单纯 SCC 组(SCC 组)、空载体组(Vector 组)和慢病毒干扰组(IL-1 β SH 组)。IL-1 β SH 组和空载体组术前 48h 在拟损伤脊髓节段局部注射 IL-1 β siRNA 或空载体。Sham 组大鼠只剥离椎板不实施 SCC,其余 3 组大鼠均造成 T10 SCC。每组各取大鼠 5 只,于术前当天以及术后 1d、3d、5d、7d、14d 采用 Basso Beattie & Bresnahan(BBB)评分评估大鼠后肢运动功能。Sham 组术后 28d 处死大鼠,取 T10 段脊髓,用实时荧光定量聚合酶链式反应技术(qRT-PCR)检测 IL-1 β 和 γ -突触核蛋白(SNCG)mRNA 相对表达水平。SCC 组于术后 6h、12h、1d、3d、5d、7d、14d 取损伤段脊髓,检测 IL-1 β 和 SNCG mRNA 相对表达水平。Vector 组和 IL-1 β SH 组在术后 7d 取损伤段脊髓检测 SNCG mRNA 相对表达水平;在术后 3d、7d、28d 行心脏灌注、固定损伤脊髓,用免疫组织化学染色技术观察 SNCG 的免疫阳性细胞计数,并测定平均积分光密度(IOD)值。应用 GeneMANIA 分析 IL-1 β 和 SNCG 的理论关系。**结果:**Sham 组各时间点 BBB 评分均为 21 分,SCC 后,SCC 组评分各时间点均显著低于 Sham 组($P < 0.05$),IL-1 β SH 组评分在 3d、5d、7d、14d 时均显著高于 Vector 组($P < 0.05$)。SCC 组术后 6h、12h、7d 时 IL-1 β mRNA 表达量较 Sham 组显著性上调($P < 0.05$),SNCG mRNA 表达量较 Sham 组显著性下调($P < 0.05$)。术后 7d,IL-1 β SH 组 SNCG mRNA 表达水平显著高于 Vector 组($P < 0.05$)。IL-1 β SH 组损伤脊髓前角 SNCG 免疫阳性细胞数和 IOD 值在术后 3d、7d、28d 均优于 Vector 组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。GeneMANIA 分析发现 IL-1 β 和 SNCG 通过 Cfd 存在亚细胞定位关系。**结论:**IL-1 β siRNA 可改善 SCC 大鼠后肢运动功能,上调 SNCG 蛋白和 mRNA 的表达,这可能与调节神经元可塑性、抑制线粒体凋亡途径有关。

【关键词】脊髓损伤;白介素-1 β ; γ -突触核蛋白;运动功能;大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2019.08.08

中图分类号:Q426,R683.2 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2019)-08-0725-07

The effect of lentivirus-mediated interleukin-1 β siRNA on motor function in spinal cord contused rats/ZENG Xi, PENG Shuo, WANG Jiantao, et al//Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2019, 29(8): 725-731

【Abstract】 Objectives: To observe the effect of interleukin-1 β (IL-1 β) small interfering RNA(siRNA) on motor function in rats after spinal cord contusion(SCC), and to investigate the corresponding mechanism. **Methods:** A total of 98 female SD rats was randomly divided into four groups: Sham group, SCC group, Vector group and IL-1 β SH group. Rats in IL-1 β SH group and Vector group were locally injected with IL-1 β siRNA or vector in spinal cord at 48 hours before surgery. The vertebra resection was only performed in Sham group and the T10 contusion was prepared in other three groups. Basso Beattie & Bresnahan (BBB) score was recorded for five rats in each group at the day of surgery and 1d, 3d, 5d, 7d and 14d after surgery. In Sham group, rats were sacrificed at 28d after surgery, and the relative expression levels of IL-1 β and synuclein gamma(SNCG) mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR). In SCC group, the relative expression levels of IL-1 β and SNCG mRNA were detected at 6h, 12h, 1d, 3d, 5d, 7d and 14d after SCC. In Vector group and IL-1 β SH group, the relative expression

第一作者简介:男(1990-),在读研究生,研究方向:神经外科

电话:(0851)86770192 E-mail:461527830@qq.com

通讯作者:冯鲁乾 E-mail:fengluguan@126.com

level of SNCG mRNA was detected at 7d after surgery, and the contused spinal cord was also perfused and fixed at 3d, 7d and 28d after surgery. Immunohistochemistry (IHC) was used to observe the SNCG immune-positive cells. The cells were then counted, and the average integrated optical density (IOD) values were determined. GeneMANIA analyzed the theoretical relationship between IL-1 β and SNCG. **Results:** The BBB score in Sham group was always 21 at each time point. After SCC, the score of SCC group were significantly lower than that of Sham group ($P < 0.05$). The score of IL-1 β SH group was significantly higher than that of Vector group at 3d, 5d, 7d and 14d after SCC ($P < 0.05$). The expression of IL-1 β mRNA in SCC group was significantly more up-regulated than that in Sham group at 6h, 12h and 7d after surgery respectively ($P < 0.05$), while the expression of SNCG mRNA at each time point was significantly more down-regulated than that in Sham group ($P < 0.05$). The level of SNCG mRNA in IL-1 β SH group was significantly higher than that in Vector group at 7d after surgery ($P < 0.05$). In IL-1 β SH group, SNCG immunoreactive cells and IOD values in the anterior horn of injured spinal cord were significantly better than those in Vector group at 3d, 7d and 28d after surgery ($P < 0.05$). The subcellular localization between IL-1 β and SNCG through Cfd was predicted by GeneMANIA. **Conclusions:** IL-1 β siRNA improves the hindlimb motor function in rats, and upregulated the expression of SNCG protein and mRNA, which may be related to regulation of neuronal plasticity and inhibition of mitochondrial apoptosis pathways.

【Key words】 Spinal cord injury; Interleukin-1 β ; Synuclein gamma; Motor function; Rat

【Author's address】 1. Guizhou Medical University, Guiyang, 550004, China; 2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, 550004, China

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)多因机械外力的原因导致损伤平面以下的运动功能部分或者全部丧失。在继发性 SCI 中,炎症反应被认为是关键的病理过程,并最终导致损伤组织微环境恶化、神经元的坏死和凋亡^[1]。因此,减少 SCI 区的炎症反应被认为是保护神经元的关键环节之一。白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)是一种由巨噬细胞/小胶质细胞分泌的具有多种生物功能的炎性细胞因子,不仅激活了 SCI 区炎症反应^[2],而且还与 SCI 相关基因相互作用导致脊髓组织不可逆损伤^[3]。 γ -突触核蛋白(synuclein gamma, SNCG)基因编码的蛋白 SNCG 是突触核蛋白家族成员之一,是一种在突触前及细胞核表达的可溶性蛋白质,主要在感觉神经元、交感神经元和运动神经元中表达^[4],早期被认为参与了神经退行性疾病的发病机理,后亦被发现其通过线粒体凋亡途径参与了神经元保护作用^[5]。但是,SNCG 在正常和损伤脊髓的细胞学定位以及功能并不清楚,而且 IL-1 β 与 SNCG 在 SCI 后的关系尚待阐明。本研究以 SD 大鼠为研究对象,建立脊髓钝挫伤(spinal cord contusion, SCC)模型,体外构建 IL-1 β 小干扰 RNA (siRNA)并在损伤脊髓局部注射,探讨其对 SCC 大鼠 SNCG 以及运动功能的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

选取 98 只健康成年 Sprague-Dawley (SD) 雌性大鼠,体重 220~250g,由成都达硕实验动物有限公司提供。293T 细胞(广州 Gene Copoeia)。主要试剂:IL-1 β siRNA 序列、慢病毒包装质粒、红色荧光蛋白 (red fluorescent protein, RFP)(广州 Gene Copoeia)。磷酸缓冲液(PBS)、山羊血清原液、兔链霉卵白素-生物素法检测系统(SP-9001)(北京中杉金桥)。IL-1 β 抗体(Rabbit,武汉博士德);SNCG 抗体(Rabbit,武汉三鹰)。实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)逆转录试剂盒和 cDNA 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 实验动物分组

98 只大鼠随机分为假手术组 (Sham 组, $n=11$)、SCC 组($n=47$)、空载体组(Vector 组, $n=20$)和慢病毒干扰组(IL-1 β SH 组, $n=20$)。Sham 组大鼠只打开椎板,不损伤脊髓。SCC 组、Vector 组以及 IL-1 β SH 组均制备 SCC 模型。其中,SCC 组进一步分为 6h、12h、1d、3d、5d、7d、14d、28d 时间点。Vector 组和 IL-1 β SH 组进一步分为 3d、7d、28d 时间点。大鼠具体情况见表 1。

1.3 慢病毒载体的制备

将 IL-1 β siRNA 序列克隆到 RFP 标记的载

表 1 大鼠使用统计表 (n=98)
Table 1 All rats in this experiment

	Sham组 Sham group	SCC组 SCC group								Vector组 Vector group			IL-1β SH 组 IL-1β SH group		
		6h	12h	1d	3d	5d	7d	14d	28d	3d	7d	28d	3d	7d	28d
BBB评分 BBB scores	5								5			5			5
免疫组化检查 Immunohistochemistry										3	3	3	3	3	3
qRT-PCR 检测 qRT-PCR detection	6	6	6	6	6	6	6	6		6				6	

体中。再将该载体(5 μ g)和慢病毒包装质粒(1 μ l)共转染到 293T 细胞生成慢病毒颗粒。48h 后取含有慢病毒细胞的上清液,将其置于 0.45 μ m 的醋酸纤维素过滤器中过滤,取 5ml 滤液 3500r/min 离心 25min,除去上清液,将沉淀重新溶解在 500 μ l 无菌 PBS 中。置于-80℃冰箱冻存。同时制备只包被慢病毒空壳的空载体(Vector)。

1.4 慢病毒及 Vector 注射

采用立体微量注射技术注射。先用 3.6%水合氯醛对大鼠实施腹腔麻醉(35mg/kg),俯卧位固定,在 T9~T11 的位置沿背部正中段纵行切开皮肤,依次分离筋膜、肌肉,剥除 T9 棘突及其椎板,充分暴露 T10 节段脊髓,使用脑立体定位仪(DW-5,成都泰盟)于脊髓拟打击点左右两侧等体积注射 5 μ m 的慢病毒质粒,进针 3~5 μ m,进针角度大鼠尾侧方向 45℃(与水平角度),依次缝合肌肉、筋膜及皮肤。Vector 组只注射 Vector,余方法不变。消毒及抗感染处理后采用独立笼具饲养大鼠。

1.5 动物模型制备和运动功能评价

IL-1 β SH 组和 Vector 组分别在慢病毒质粒和 Vector 注射 48h 后采用改良 Allen's 打击法制备大鼠 SCC(T10)模型。具体手术操作:采用 3.6%水合氯醛实施腹腔麻醉(35mg/kg),俯卧位固定,依次拆开皮肤、筋膜及肌肉缝合线,用自制脊髓钝挫伤打击仪从 30mm 高处自由下落,使脊髓损伤,缝合伤口。SCC 组单纯实施模型制备,Sham 组只剥离椎板不损伤脊髓。术后消毒及抗感染处理,采用独立笼具饲养大鼠,正常饮食,每天早晚各一次按摩膀胱排尿直至可以恢复自主排尿为止。每组取 5 只大鼠于术前当天以及术后 1d、3d、5d、7d、14d 进行 BBB 评分^[6]。

1.6 组织取材

取 Sham 组(6只),SCC 组术后 6h、12h、1d、3d、5d、7d、14d(每个时间点 6只),Vector 组和 IL-1 β SH 组术后 7d(每组 6只)大鼠,直接用生理盐水(4℃)快速心脏灌注,以脊髓损伤点为中心取 1cm 脊髓,于-80℃冻存备用。Vector 组和 IL-1 β 组剩余大鼠于术后 3d、7d、28d(每个时间点每组 3只)先用生理盐水(4℃)快速心脏灌注,接着用 4%多聚甲醛溶液(pH 值 7.3、4℃)缓慢灌注内固定,然后取出脊髓进行外固定,48h 后常规脱水、包埋及制备石蜡切片(厚度 5 μ m)备用。各组用于 BBB 评分的大鼠在评分结束后直接处死弃用。

1.7 免疫组织化学染色

取石蜡切片,常规脱蜡、水化、高压抗原修复 10min,3% H_2O_2 去离子水 37℃孵育 10min 灭活内源性过氧化物酶,用 0.01mol/L PBS 漂洗后 10%的羊血清 37℃、10min 封闭非特异性抗原,滴加一抗后 4℃过夜,次日取出复温,用 0.01mol/L PBS 漂洗后依次滴加试剂盒 B 液与 C 液于 37℃孵育,间隔用 0.01mol/L PBS 漂洗,DAB- H_2O_2 显色,然后复染,分色,脱水,透明及中性树胶封片。Motic 光学显微镜下进行观察和拍照,放大 400 倍下采集图片,每张石蜡切片随机选取 3 个不同的视野,计数视野中观察到的阳性细胞数并采集照片,根据 Image pro plus 软件操作说明对平均积分光密度值(integrated optical density,IOD)进行检测。

1.8 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平

设计大鼠内参 β 肌动蛋白(β -action)和 IL-1 β 、SNCG 的引物序列(表 2)。取冻存的脊髓组织,按照试剂盒说明,进行 qRT-PCR。反应条件:95℃、2min 后,95℃变性 15s、退火 20s、60℃延伸 40s,循环 40 次。最后得到 S 形动力学曲线,读出

Ct值,人工校正后按 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算出相对表达量。

1.9 生物信息学

应用 GeneMANIA 生物信息学 (<http://www.genemania.org/>) 预测 IL-1 β 与 SNCG 的关系。

1.10 统计学分析

所有统计数据结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,用 SPSS 17.0 软件分析实验结果,根据数据特征,组内采用单因素方差分析,组间比较采用独立样本 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 2 引物序列信息

Table 2 Primer sequence information

引物名称 Sense	引物序列 Primer sequences
β -actin	正义链 Sense 5'-GAAGATCAAGATCATTTGCTCT-3' 反义链 Anti-sense 5'-TACTCCTGCTTGCTGATCCA-3'
IL-1 β	正义链 Sense 5'-TCTCAGCTCTTCACTTCTGCT-3' 反义链 Anti-sense 5'-CATCATTTTGATGAGTATGA-3'
SNCG	正义链 Sense 5'-AGCAGCCACAGCATCAATATTT-3' 反义链 Anti-sense 5'-AACCTGAGTCCCTAATCCACCTG-3'

2 结果

2.1 BBB 评分

术前大鼠 BBB 评分均为 21 分。术后 Sham 组大鼠各时间点评分无明显变化;SCC 组于 SSC 术后 1d、3d、5d、7d、14d 时的 BBB 评分均显著性低于 Sham 组 (表 3, $P<0.05$);SCC 后 1d, IL-1 β SH 组和 Vector 组 BBB 评分无统计学差异 ($P>0.05$), 3d、5d、7d、14d 时 IL-1 β SH 组 BBB 评分均显著性高于 Vector 组 (表 3, $P<0.05$)。

2.2 IL-1 β 和 SNCG mRNA 在各组相对表达情况

IL-1 β mRNA 在 SCC 后表达上调, 在 6h 达到峰值, 与 Sham 组相比有统计学差异 (图 1a, $P<$

0.05)。随后, IL-1 β mRNA 表达水平迅速下调, 在 3d 达到最低值, 接着又逐渐上调, 在 7d 达到一个小峰值 ($P<0.05$)。SNCG mRNA 的表达水平在脊髓未损伤时呈现高表达水平, 在 SCI 后表达水平迅速下调, 并在 3d 达到最低值, 然后缓慢上升, 在 14d 达到损伤后的最高水平。与 Sham 组相比, SCI 后各个时间点的 SNCG mRNA 表达均降低, 具有统计学意义 (图 1b, $P<0.05$)。术后 7d, IL-1 β SH 组和 Vector 组的 SNCG mRNA 表达分别为 0.38 ± 0.08 和 0.14 ± 0.03 , 两组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$), IL-1 β SH 组的表达明显上调。

2.3 IL-1 β siRNA 对脊髓前角 SNCG 免疫阳性产物表达的影响

SNCG 免疫阳性细胞呈棕黄色, 质地均匀, 在不同组别颜色深浅不一。IL-1 β SH 组 SNCG 免疫阳性细胞肉眼观察颜色深于 Vector 组 (图 2)。IL-1 β SH 组的 SNCG 免疫阳性细胞数在 3d、7d、28d 时均高于 Vector 组 (表 4, $P<0.05$)。IL-1 β SH 组的 SNCG 免疫阳性产物 IOD 值在 3d、7d、28d 亦均高于 Vector 组 (表 4, $P<0.05$)。

2.4 IL-1 β 和 SNCG 的生物信息学分析

GeneMANIA 发现与 IL-1 β 、SNCG 有共表达、共定位关系的基因有: Snca、Il1a、S100a8、Cxcl1、Cxcl10、Il1rn、Ccl3、Cfd、Icam1、Hck、Fabp4、Car3、Mmp8、S100a9、Scd、Il36b、S100b、Ripk3、Cxcl2 (图 3), 其中 IL-1 β 与 Cfd 存在共定位关系, 而 SNCG 与 Cfd 存在共表达关系。提示 IL-1 β 与 SNCG 可能存在共表达或者共定位关系 (图 3)。

3 讨论

IL-1 β 是一种典型的炎性细胞因子, 在神经

表 3 各组大鼠术前与术后不同时间点的 BBB 评分

($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 3 BBB scores in each group

	术前 Preoperation	术后 Postoperation				
		1d	3d	5d	7d	14d
Sham组 Sham group	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00	21.00 $\pm$ 0.00
SCC组 SCC group	21.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00 ^①	0.67 $\pm$ 0.16 ^①	2.00 $\pm$ 0.89 ^①	8.00 $\pm$ 0.89 ^①	14.83 $\pm$ 1.72 ^①
Vector组 Vector group	21.00 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.02	0.55 $\pm$ 0.09	0.91 $\pm$ 0.21	2.00 $\pm$ 0.60	8.30 $\pm$ 1.02
IL-1 β SH 组 IL-1 β SH group	21.00 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.03	1.28 $\pm$ 0.34 ^②	5.43 $\pm$ 1.05 ^②	7.45 $\pm$ 1.62 ^②	11.675 $\pm$ 2.01 ^②

注: ①与同时时间点 Sham 组比较 $P<0.05$; ②与同时时间点 Vector 组比较 $P<0.05$

Note: ①Compared with Sham group, $P<0.05$; ②Compared with Vector group, $P<0.05$

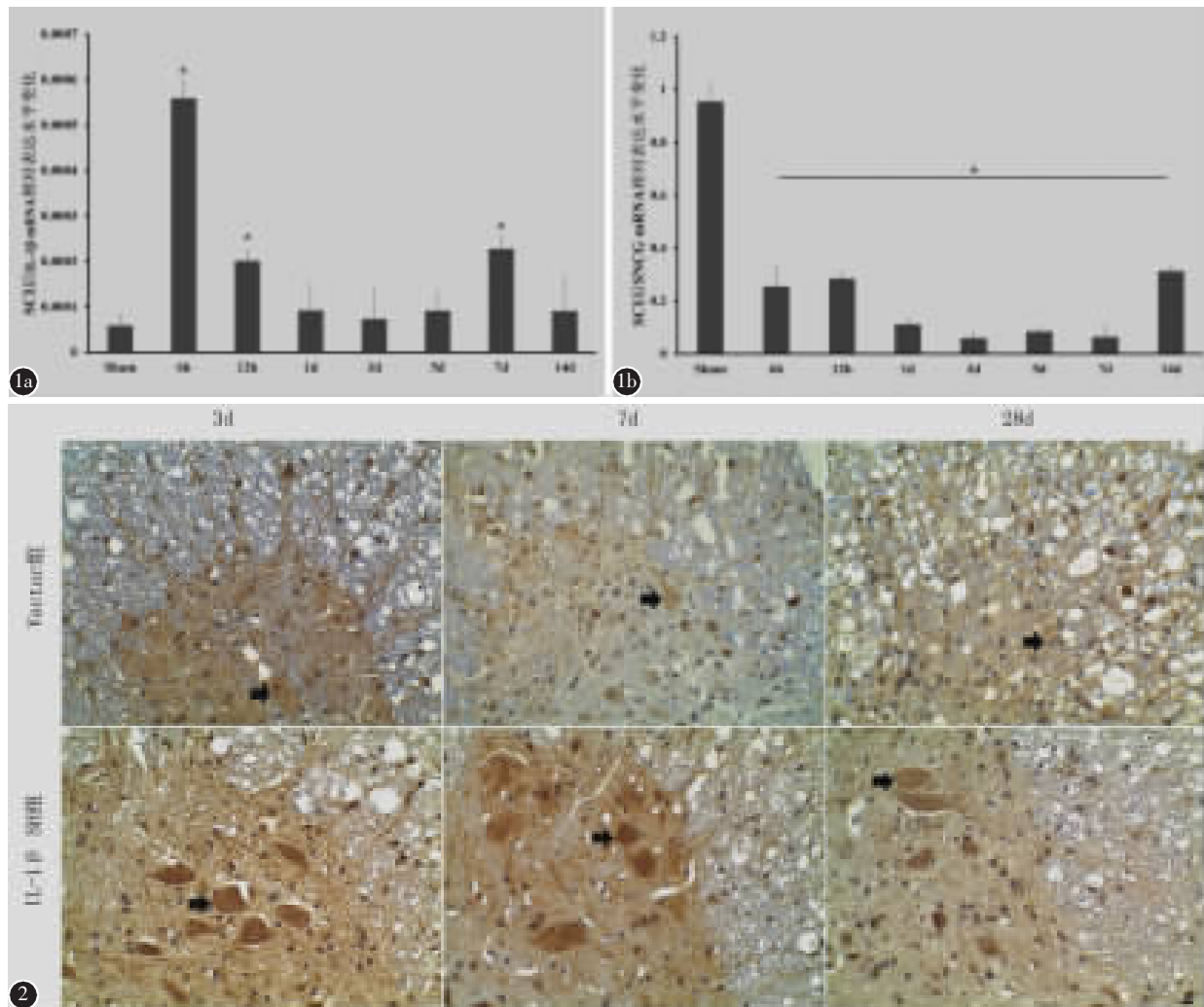


图 1 a SCC 后不同时间点 IL-1 β mRNA 的表达情况, 6h, 12h, 7d 与 Sham 组比较 $P<0.05$ b SCC 后不同时间点 SNCG mRNA 的表达情况, 与 Sham 组比较 $P<0.05$ **图 2** IL-1 β SH 组和 Vector 组 SNCG 的免疫组织化学染色结果 (脊髓前角, 黑色箭头: SNCG 免疫阳性细胞, 400 $\times$) Vector 组在 3d, 7d, 28d SNCG 阳性表达细胞数较少、染色较浅; IL-1 β SH 组在 3d, 7d, 28d SNCG 阳性表达的细胞数较 Vector 组增多、染色较 Vector 组深

Figure 1 a The expression of IL-1 β mRNA at different time points after SCC, 6h, 12h, 7d compared with Sham group, $P<0.05$ b The expression of SNCG mRNA at different time points after SCC, each time point compared with Sham group, $P<0.05$ **Figure 2** Immunohistochemical staining of SNCG in IL-1 β SH group and Vector group (anterior horn of spinal cord, black arrow: SNCG immunopositive cells, $\times 400$) Vector group had fewer cells and lighter staining at 3d, 7d, 28d; the SNCG positive cells in the IL-1 β SH group at 3d, 7d, and 28d were higher than that in the Vector group, and the staining was deeper than that in the Vector group

表 4 IL-1 β siRNA 干扰与对照组 SNCG 免疫阳性细胞数及 IOD 值 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of IL-1 β siRNA on positive cells and IOD of SNCG

	3d		7d		28d	
	阳性细胞数 Positive cells	IOD值 IOD value	阳性细胞数 Positive cells	IOD值 IOD value	阳性细胞数 Positive cells	IOD值 IOD value
Vector组 Vector group	9.14 $\pm$ 1.63	101.21 $\pm$ 17.69	10.75 $\pm$ 1.26	79.88 $\pm$ 7.61	11.12 $\pm$ 1.00	78.93 $\pm$ 5.30
IL-1 β SH 组 IL-1 β SH group	11.67 $\pm$ 1.37 ^①	157.01 $\pm$ 3.00 ^①	14.43 $\pm$ 1.67 ^①	154.10 $\pm$ 3.59 ^①	15.25 $\pm$ 1.71 ^①	113.53 $\pm$ 12.50 ^①

注: ①与同时时间点 Vector 组比较, $P<0.05$

Note: ①Compared with Vector group at the same time, $P<0.05$

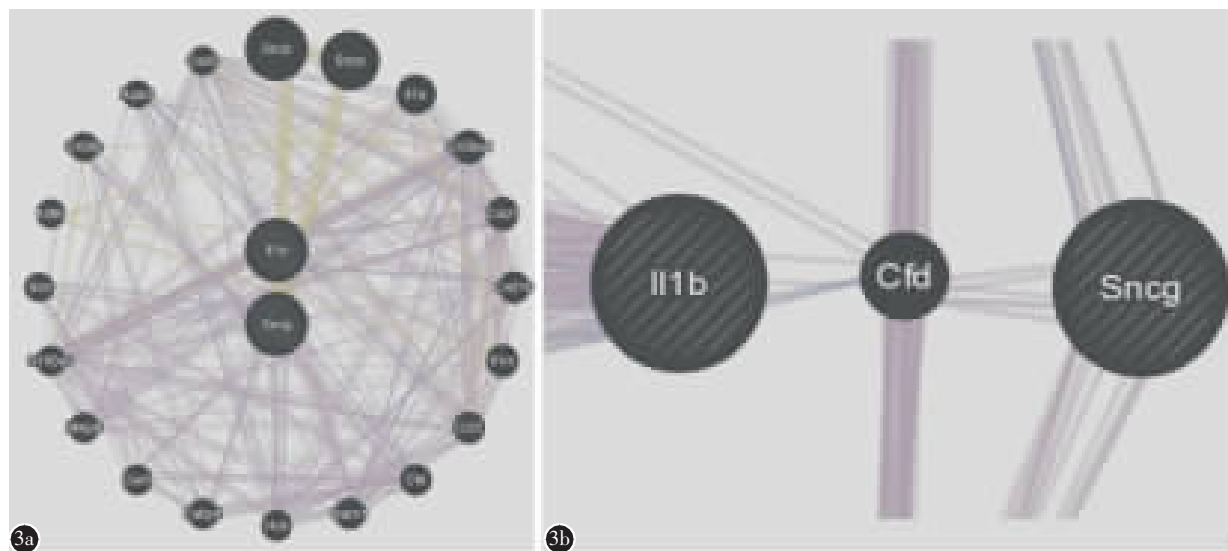


图 3 IL-1 β 和 SNCG 生物信息学预测关系网络图 a IL-1 β 和 SNCG 在 GeneMANIA 中分析发现的共表达、共定位基因 b IL-1 β 与 Cfd 存在共定位关系,而 SNCG 与 Cfd 存在共表达关系

Figure 3 IL-1 β and SNCG bioinformatics prediction relationship network map a The co-expression and co-localization genes between IL-1 β and SNCG found in GeneMANIA b The co-localization was performed between IL-1 β and Cfd, and the co-expression was performed between SNCG and Cfd

系统中主要是由活化的小胶质细胞合成,关注 IL-1 β 在 SCI 中的作用以及 IL-1 β 相关基因调节对临床干预 SCI 的策略可能是关键环节^[7]。急性 SCI 后,IL-1 β 的表达水平可在早期快速上调^[8]。IL-1 β 可使外源性巨噬细胞聚集并表达细胞间粘附分子,诱导肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6 等炎症细胞因子的释放,进而加重损伤区的炎症反应,从而影响神经元和神经组织的功能^[9]。从本研究结果可以看到,在 SCI 后 6h,IL-1 β mRNA 表达即呈现一个极高峰值,此时大鼠的运动功能是完全丧失的。在 6h 之后的各个时间点,虽然 IL-1 β mRNA 表达水平迅速下降,但是和 Sham 组相比还是高水平,且 BBB 评分低水平。这提示 IL-1 β 在 SCI 后的继发反应中起到重要作用,影响了大鼠后肢运动功能的恢复。Liu 等^[10]报道 IL-1 β 在 SCI 后有助于谷氨酸损伤,而且阻断 IL-1 β 可有效地抵消谷氨酸毒性。Sato 等^[2]发现在 IL-1 β 基因敲除小鼠建立 SCI 模型后小鼠运动功能得到改善,而且小胶质细胞/巨噬细胞的活化也受到抑制。SCI 后,如果不在早期实施积极干预炎症反应,后期星形细胞增生,轴突间隙稍增大,髓鞘结构破坏^[11],甚至形成胶质瘢痕,这将会导致永久的运动或者感觉功能丧失。而本研究是在术前 48h 注射慢病毒介导的 IL-1 β siRNA,待病毒充分转

染后,IL-1 β 组大鼠在术后 3d 就观察到运动功能的改善,提示早期干预炎症反应是保护神经功能的重要环节。

本研究发现 IL-1 β 和 SNCG 之间有一个包含 20 个基因的关系网络,而且 IL-1 β 与 SNCG 通过 Cfd 有共定位共表达的关系。提示在 SCI 后 IL-1 β 可能参与多种基因相互调节,从而形成了一个以 IL-1 β 为主导的 SCI 继发性反应。也有许多研究表明 IL-1 β 存在协同或者拮抗基因的表达变化。Ellman 等^[12]的研究发现 SCI 后促炎和抗炎细胞因子 (IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-5、IL-2、CXCL1、CCL2 或 CCL5) 显著变化,而且因为小胶质细胞和白细胞浸润,Iba1、CD11b、CD11c、CD45 和 MHCII 的表达也在早期上调。Hu 等^[13]报道,采用 CCL20 干预 SCI 模型后,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平下调。Didangelos 等^[14]通过转录组学和蛋白质组学数据集的网络分析,发现在触发炎症反应后 TLR4、RAGE 以及 HMGB1 的激活。He 等^[3]采用基因芯片技术检测也发现 GSK3 β 、ODC1 和 OAT 等转录因子的变化。陈颖等^[15]利用 RNA-Seq 筛选 SCI 后的差异基因发现了 Hmox1、Plau、Serpine1 以及 Ncf2。这些分子不仅在氧化应激损伤中有作用,而且有的还参与白细胞活化、趋化反应、纤维溶解以及组织机化,在炎症反应中发挥必不可少

的作用。

综上所述,本研究发发现 IL-1 β siRNA 可促进大鼠 SNCG mRNA 表达水平和蛋白的表达,提示其可能通过 SNCG 干预 SCC 早期的炎症反应,从而促进了运动功能的恢复。这为未来应用 siRNA 治疗 SCI 提供了治疗时机上的参考和理论依据。

4 参考文献

- McIntyre A, Benton B, Janzen S, et al. A mapping review of randomized controlled trials in the spinal cord injury research literature[J]. Spinal Cord, 2018, 56(8): 725-732.
- Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 65.
- He X, Fan L, Wu Z. Gene expression profiles reveal key pathways and genes associated with neuropathic pain in patients with spinal cord injury[J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 2120-2128.
- George JM. The synucleins[J]. Genome Biol, 2002, 3(1): Reviews3002.
- Wilding C, Bell K, Beck S, et al. γ -Synuclein antibodies have neuroprotective potential on neuroretinal cells via proteins of the mitochondrial apoptosis pathway[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e90737.
- Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1-21.
- Dinarello CA, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans[J]. Semin Immunol, 2013, 25(6): 469-484.
- 蒋恺焜, 于博, 劳立峰, 等. 急性脊髓损伤脊髓与脑脊液中炎症因子相关性的实验研究[J]. 中国矫形外科杂志, 2016, 24(14): 1308-1313.
- Yang T, Wu L, Wang H. Inflammation level after decompression surgery for a rat model of chronic severe spinal cord compression and effects on ischemia-reperfusion injury [J]. Neurol Med Chir(Tokyo), 2015, 55(7): 578-586.
- Liu S, Xu GY, Johnson KM, et al. Regulation of interleukin-1beta by the interleukin-1 receptor antagonist in the glutamate-injured spinal cord: endogenous neuroprotection[J]. Brain Res, 2008, 1231: 63-74.
- 樊旭辉, 杨波, 胡祥, 等. 脊髓损伤模型大鼠胶质细胞反应性增生的变化规律及意义[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(40): 6001-6006.
- Ellman DG, Degn M, Lund MC. Genetic ablation of soluble TNF does not affect lesion size and functional recovery after moderate spinal cord injury in mice [J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 2684098.
- Hu J, Yang Z, Li X. C-C motif chemokine ligand 20 regulates neuroinflammation following spinal cord injury via Th17 cell recruitment[J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 162.
- Didangelos A, Puglia M, Iberl M. High-throughput proteomics reveal alarmins as amplifiers of tissue pathology and inflammation after spinal cord injury[J]. Sci Rep, 2016, 22(6): 21607.
- 陈颖, 王迪, 牛学英, 等. RNA-Seq 筛选脊髓损伤后的差异基因及部分基因功能分析 [J]. 解剖学报, 2017, 48(2): 128-134.

(收稿日期:2019-04-07 末次修回日期:2019-06-24)

(英文编审 唐翔宇/贾丹彤)

(本文编辑 卢庆霞)