

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.16.002  
文章编号: 1005-8982(2020)16-0007-08

## MicroRNA-92a 对大鼠脊髓损伤后 运动功能恢复的影响

黄伟, 钱锦锋, 蔡执中, 姜叶飞

(武警海警总队医院 骨四科, 浙江 嘉兴 314000)

**摘要: 目的** 分析 microRNA-92a (miR-92a) 对脊髓损伤大鼠运动功能恢复的影响及可能的作用机制。**方法** 第一步, 复制大鼠脊髓损伤模型, 将 30 只大鼠分为假手术组和脊髓损伤组, 筛选目标 miRNA。第二步, 分析 miR-92a 对脊髓损伤大鼠的影响, 将剩余 54 只大鼠分为假手术组、对照组 (脊髓损伤 + miR-92a mimics negative control) 和实验组 (脊髓损伤 + miR-92a mimics)。采用 BBB 评分评估大鼠运动功能, TUNEL 染色检测细胞凋亡, qRT-PCR 和 Western blotting 检测相关基因和蛋白的表达, 双荧光素酶验证人第 10 号染色体缺失的磷酸酶 (PTEN) 与 miR-92a 的靶向关系。**结果** ①脊髓损伤组与假手术组大鼠第 1、3、7、14、21 和 28 天的 BBB 评分在不同时间、不同组间及变化趋势上有差异 ( $P < 0.05$ ), 假手术组 BBB 评分高于脊髓损伤组 ( $P < 0.05$ )。脊髓损伤组与假手术组大鼠细胞凋亡率、Caspase-3、Bax、Bcl-2 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。脊髓损伤组与假手术组大鼠 miR-92a、miR-132、miR-128、miR-107、miR-202、miR-451、miR-17 表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。②假手术组、对照组、实验组大鼠第 7、14 和 28 天的 miR-92a 表达水平在不同时间、不同组间及变化趋势上有差异 ( $P < 0.05$ ), 实验组 miR-92a 表达水平最高 ( $P < 0.05$ )。假手术组、对照组、实验组大鼠第 1、3、7、14、21 和 28 天 BBB 评分在不同时间、不同组间及变化趋势上有差异 ( $P < 0.05$ ), 假手术组 BBB 评分最高 ( $P < 0.05$ )。3 组大鼠细胞凋亡率、Caspase-3、Bax、Bcl-2 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。③对照组与实验组大鼠 PTEN-WT 荧光活性比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两组 PTEN-MUT 荧光活性比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。对照组与实验组大鼠 PTEN mRNA 和蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。PTEN 与 miR-92a 表达水平呈负相关 ( $P < 0.05$ )。**结论** 大鼠脊髓损伤后 miR-92a 表达下调。过表达 miR-92a 可促进大鼠运动功能恢复, 抑制细胞凋亡。

**关键词:** 脊髓损伤; microRNA-92a/microRNA; 功能恢复; PTEN/基因; 细胞凋亡; 大鼠

**中图分类号:** R651.2

**文献标识码:** A

## The mechanism of miR-92a promoting locomotor functional recovery in rats after spinal cord injury

Wei Huang, Jin-feng Qian, Zhi-zhong Cai, Ye-fei Jiang

(The No.4 Department of Orthopedics, General Hospital of Armed Police and Marine Police, Jiaxing, Zhejiang 314000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of miR-92a on locomotor functional recovery in rats after spinal cord injury and explore the related mechanisms. **Methods** First, the model of spinal cord injury in rats was established to screen the target miRNA with 30 rats divided into sham operation group and spinal cord injury group. Second, the effects of miR-92a on spinal cord injury in rats were analyzed, where 54 rats were divided into sham operation group, control group (spinal cord injury + miR-92a mimics negative control) and experimental group

(spinal cord injury + miR-92a mimics). Then BBB score was used to evaluate the motor function of rats, TUNEL staining was used to detect apoptosis, qRT-PCR and Western blotting were used to determine the expression of related genes and proteins, and dual luciferase was used to verify the targeting relationship between phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) and miR-92a. **Results** ① The BBB scores of the rats in the spinal cord injury group and the sham operation group on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day were all different ( $P < 0.05$ ), and the BBB scores in the sham operation group were higher than those in the spinal cord injury group ( $P < 0.05$ ). There were significant differences in apoptosis rate, Caspase-3, Bax and Bcl-2 expression between the spinal cord injury group and the sham operation group ( $P < 0.05$ ). The expression of miR-92a, miR-132, miR-128, miR-107, miR-202, miR-451 and miR-17 in spinal cord injury group was significantly different from that in sham operation group ( $P < 0.05$ ). ② The expression of miR-92a in sham operation group, control group and experimental group at 7th, 14th and 28th day was compared, and it was found to be different among groups and altered at different time points with distinct changing trends ( $P < 0.05$ ), in which that of experimental group was the highest ( $P < 0.05$ ). The BBB scores of these three groups on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day were also compared, and those of experimental group were the highest ( $P < 0.05$ ), with the changing trend of BBB scores in three groups being statistically significant ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate and the expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in sham operated group, control group and experimental group were significantly different ( $P < 0.05$ ). ③ The difference of PTEN-WT but not PTEN-MUT fluorescence intensity between the control group and the experimental group was statistically significant (PTEN-WT,  $P < 0.05$ ; PTEN-MUT,  $P > 0.05$ ). The expression of PTEN protein and mRNA in the control group was significantly higher than that in the experimental group ( $P < 0.05$ ), and PTEN expression was negatively correlated with miR-92a expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** The expression of miR-92a was down-regulated after spinal cord injury, while overexpression of miR-92a could facilitate locomotor functional recovery in rats and suppress apoptosis.

**Keywords:** microRNA; spinal cord injury; locomotor functional recovery

脊髓损伤是一种毁灭性的疾病, 通常导致患者终身残疾<sup>[1]</sup>。据统计, 全球约有 250 万人受脊髓损伤的影响<sup>[2]</sup>。脊髓损伤后, 脊髓回路下行通路断开, 导致其失去运动相关突触输入<sup>[3]</sup>, 严重影响患者对运动的控制<sup>[4]</sup>。目前, 脊髓损伤的治疗仍是临床和基础科学研究的最大挑战之一<sup>[5]</sup>, 迫切需要开发新疗法。MicroRNA (miRNA) 在多种疾病中起重要调控作用, 已有多项研究证实其在脊髓损伤中的表达及功能<sup>[6]</sup>。WANG 等<sup>[7]</sup>研究表明, miR-21-5p 介导脊髓损伤后纤维瘢痕的形成, 促进脊髓损伤恢复。YANG 等<sup>[8]</sup>研究表明, 少突胶质细胞前体细胞移植可促进大鼠脊髓损伤后的功能恢复, 进一步检测发现其功能恢复与 miR-375-3p、miR-1-3p、miR-363-3p 等表达水平改变有关。ZHAO 等<sup>[9]</sup>研究表明, miR-124 促进骨髓间充质干细胞分化为神经源性细胞, 加速脊髓损伤恢复。miRNA 的异常表达被认为与大鼠脊髓损伤功能恢复相关, miR-92a、miR-202、miR-132、miR-451、miR-27b、miR-208、miR-17、miR-128、miR-107、miR-223 等被报道在大鼠脊髓损伤组织中表达异常<sup>[2, 5-6, 10-12]</sup>。然而, miRNA 在脊髓损伤后运动功能恢复中的作用报道较少。

本研究复制大鼠脊髓损伤模型, 采用实时荧光定

量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 在大鼠脊髓损伤组织中筛选出目标 miRNA, 进一步研究该 miRNA 在大鼠脊髓损伤后运动功能恢复中可能的分子机制, 为脊髓损伤的精准治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 6 周龄清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 84 只, 体重 200 ~ 250 g, 动物许可证号: SCXK (京) 2011-0001, 由昆明医科大学实验动物中心提供。所有实验程序获昆明医科大学动物保护与使用委员会批准。24℃ 恒温环境饲养, 12 h 明暗交替, 自由饮水进食。按照随机对照动物实验方法, 将 84 只实验大鼠随机分为 2 批, 第一批 30 只分为假手术组和脊髓损伤组, 每组 15 只; 第二批 54 只分为假手术组、对照组 (脊髓损伤 + miR-92a mimics negative control) 和实验组 (脊髓损伤 + miR-92a mimics), 每组 18 只。本实验 2017 年 4 月—2018 年 7 月在昆明医科大学科研实验中心完成。

**1.1.2 实验细胞** 大鼠小胶质细胞 BV-2 (货号: RAT-CELL-0077) 购自武汉原生原代生物医药科技有限公司。将细胞置于添加 10% 胎牛血清、100 u/ml

青霉素和链霉素的 DMEM/F12 培养基中, 37℃、5% 二氧化碳条件下常规培养。

**1.1.3 主要仪器及试剂** 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), qRT-PCR 仪 (美国赛默飞世尔公司)。多聚甲醇 (美国 Hyclone 公司), Triton (美国远慕生物公司), TUNEL 染色混合液 (瑞士 Roche 公司), RIPA 裂解液、BCA 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司), PTEN 抗体、Caspase-3 抗体、Bax 抗体、Bcl-2 抗体和  $\beta$ -actin 抗体 (英国 Abcam 公司), Trizol (日本 TaKaRa 公司), 水合氯醛、TaqMan™ MicroRNA 逆转录试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司), miR-92a mimics、miR-92a mimics negative control (广州锐博生物科技有限公司), Lipofectamine® 2000、双荧光素酶报告基因试剂盒 (美国赛默飞世尔公司)。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 复制大鼠脊髓损伤模型** 第一批大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉后, 脊髓损伤组在 T<sub>9</sub> ~ T<sub>10</sub> 水平进行椎板切除手术, 在不破坏硬脑膜的情况下暴露脊髓, 随后夹紧 T<sub>8</sub> 和 T<sub>11</sub> 的棘突以稳定脊柱, 使用纽约大学冲击器<sup>[5]</sup>对暴露在外的脊髓背侧表面进行挫伤损伤 (10 g × 25 mm); 假手术组大鼠采用 T<sub>10</sub> 椎板切除术, 未出现体重下降。

**1.2.2 miR-92a mimics 干预** 第二批实验组大鼠在脊髓损伤后立即髓鞘内注射 miR-92a mimics (1  $\mu$ l/h, 20 nmol/ml), 持续 3 d; 对照组大鼠脊髓损伤后鞘内注射等量 miR-92a mimics negative control, 方法同实验组。

**1.2.3 BBB 评分评估大鼠术后行为** 在脊髓损伤后第 1、3、7、14、21 和 28 天, 采用 BBB 评分评估大鼠后肢运动功能。评分采用双盲法, 由 3 位经验丰富的评分人独立完成, 最终取 3 人评分的均值。

**1.2.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况** 取脊髓组织

切片于室温下固定 20 min, PBS 清洗 30 min, 随后 4℃、0.1% Triton X-100 透化 2 min。PBS 清洗 2 次, 加入 TUNEL 染色混合液, 37℃ 条件下避光孵育 1 h, 加入 1  $\mu$ g/ml DAPI, 室温下避光孵育 10 min。清洗后甘油封片, 在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

**1.2.5 Western blotting 检测 PTEN 和凋亡相关蛋白** 术后第 28 天取脊髓, 截取包含损伤中心的 1 cm 脊髓段, 使用 RIPA 裂解液提取脊髓组织或 BV-2 细胞中总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度, 配制 12% 分离凝胶, 每个泳道加入 30  $\mu$ g 蛋白样品。电泳后, 转膜至 PVDF 膜上, 室温封闭 2 h。加入一抗: PTEN 抗体 (1 : 1 000)、Caspase-3 抗体 (1 : 1 000)、Bax 抗体 (1 : 1 000)、Bcl-2 抗体 (1 : 1 000)、 $\beta$ -actin 抗体 (1 : 1 000), 4℃ 孵育过夜。次日, 加入抗大鼠 IgG 辣根过氧化物酶偶联二抗 (1 : 2 000), 4℃ 孵育 90 min。使用 UVP 凝胶成像系统成像、Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 实验重复 3 次。

**1.2.6 qRT-PCR 检测 miRNAs 和 PTEN mRNA** 术后第 28 天取脊髓, 使用 Trizol 提取脊髓损伤组织总 RNA 并确定总 RNA 的纯度和浓度, 使用逆转录试剂盒将 miRNAs 和 PTEN mRNA 逆转录为 cDNA, 取适量 cDNA 配置 PCR 反应体系, miRNAs 以 U6 为内参, PTEN mRNA 以 GAPDH 为内参, 引物序列见表 1。实验重复 3 次, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法计算基因相对表达量。

**1.2.7 双荧光素酶报告基因验证 miR-92a 与 PTEN 的靶向关系** 构建包含 miR-92a 和 PTEN-3' UTR 结合位点的 PTEN-3' UTR (PTEN-WT), 以及不含该结合位点的 PTEN-3' UTR (PTEN-MUT) 载体质粒。将 BV-2 细胞接种于 24 孔板中 (2 × 10<sup>5</sup> 个 / 孔), 使用 Lipofectamine 2000 试剂共转染, 分为对照组 (载体质粒 + miR-92a mimics negative control) 和实验组 (载体

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	长度 /bp
miR-92a	正向: 5'-CTGTCCTGTTATTGAGCACTGGTCTATGG-3'	29
	反向: 5'-AAGACATTAGTAACCCACCCCATTC-3'	27
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCCT-3'	20
PTEN	正向: 5'-CTAGTTGTTTAAACGAGCTCTCTGACACCACTGACTCTGATCCA-3'	44
	反向: 5'-GACTCGAGGCTAGCGAGCTCACTAGGCTTTGAAGGACAGCAGGA-3'	44
GAPDH	正向: 5'-TGGTATCGTGAAGGACTCAT-3'	21
	反向: 5'-GTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC-3'	21

质粒 +miR-92a mimics)。转染 48 h 后测定荧光素酶活性, 实验重复 3 次。

### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较采用 *t* 检验或单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 方差分析的两两比较用 LSD-*t* 检验; 相关性分析用 Pearson 法, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠脊髓损伤模型评估

脊髓损伤组与假手术组大鼠第 1、3、7、14、

21、28 天 BBB 评分比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的 BBB 评分有差异 ( $F = 103.273, P = 0.000$ ); ②假手术组与脊髓损伤组的 BBB 评分有差异 ( $F = 93.474, P = 0.000$ ), 假手术组 BBB 评分较高; ③两组 BBB 评分变化趋势有差异 ( $F = 59.057, P = 0.000$ )。见表 2。

脊髓损伤组与假手术组大鼠细胞凋亡率比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 1。

脊髓损伤组与假手术组大鼠 Caspase-3、Bax、Bcl-2 相对表达量比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 3 和图 2。

表 2 两组大鼠各时间点 BBB 评分比较 ( $n = 15, \bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
脊髓损伤组	1.07 ± 0.33	3.95 ± 1.35	6.23 ± 1.97	11.41 ± 4.02	12.28 ± 4.27	12.87 ± 4.55
假手术组	20.32 ± 6.65	17.04 ± 5.61	24.18 ± 7.89	16.73 ± 5.17	18.86 ± 6.28	18.32 ± 5.98

表 3 两组大鼠细胞凋亡率及 Caspase-3、Bax、Bcl-2 表达水平比较 ( $n = 15, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率 /%	Caspase-3	Bax	Bcl-2
脊髓损伤组	29.37 ± 4.42	2.86 ± 0.72	2.25 ± 0.56	2.04 ± 0.52
假手术组	16.18 ± 3.07	1.94 ± 0.51	1.62 ± 0.41	3.85 ± 0.97
<i>t</i> 值	9.493	4.038	3.516	6.369
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

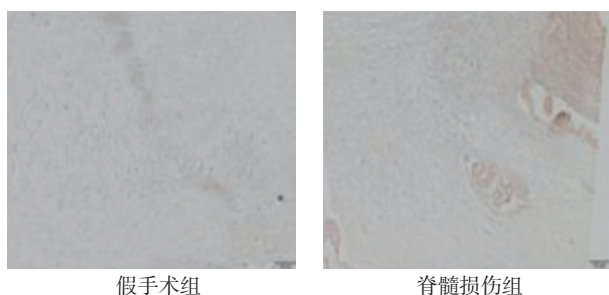


图 1 两组大鼠脊髓组织中细胞凋亡情况 (TUNEL 染色 × 200)

### 2.2 大鼠脊髓组织中 miRNAs 的异常表达

脊髓损伤组与假手术组大鼠 miR-92a、miR-132、miR-128、miR-107、miR-17、miR-202、miR-451 表达水平比较, 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); miR-27b、miR-208、miR-223 表达水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 4 和图 3。

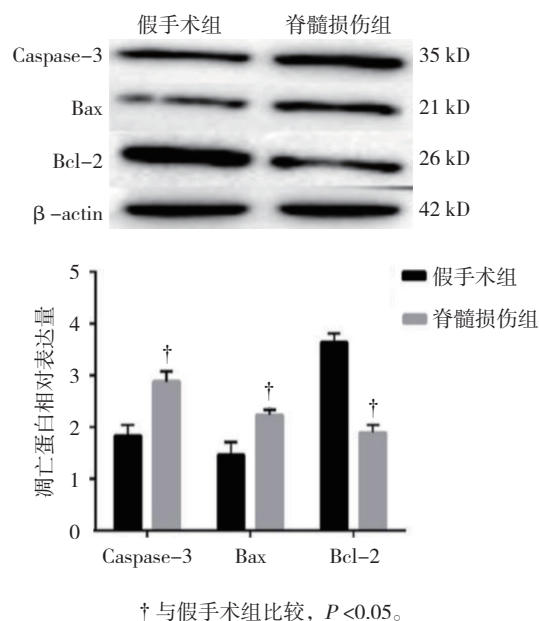


图 2 两组凋亡相关蛋白相对表达量比较 ( $n = 15, \bar{x} \pm s$ )

表 4 两组大鼠脊髓组织中 miRNAs 的表达水平比较 (n=15,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	miR-92a	miR-132	miR-128	miR-107	miR-27b	miR-17	miR-208	miR-223	miR-202	miR-451
脊髓损伤组	-4.03 ± 1.12	-3.25 ± 1.08	-2.84 ± 1.02	-2.21 ± 1.02	-1.06 ± 0.34	1.79 ± 0.98	1.11 ± 0.36	1.14 ± 0.37	3.39 ± 1.24	4.12 ± 1.55
假手术组	-1.04 ± 0.32	-1.02 ± 0.31	-1.03 ± 0.32	-1.03 ± 0.31	-1.03 ± 0.33	1.09 ± 0.37	1.09 ± 0.35	1.10 ± 0.35	1.08 ± 0.35	1.10 ± 0.37
t 值	9.942	7.687	6.558	4.287	0.245	2.366	0.154	0.304	6.944	7.340
P 值	0.000	0.000	0.000	0.001	0.808	0.030	0.879	0.763	0.000	0.000

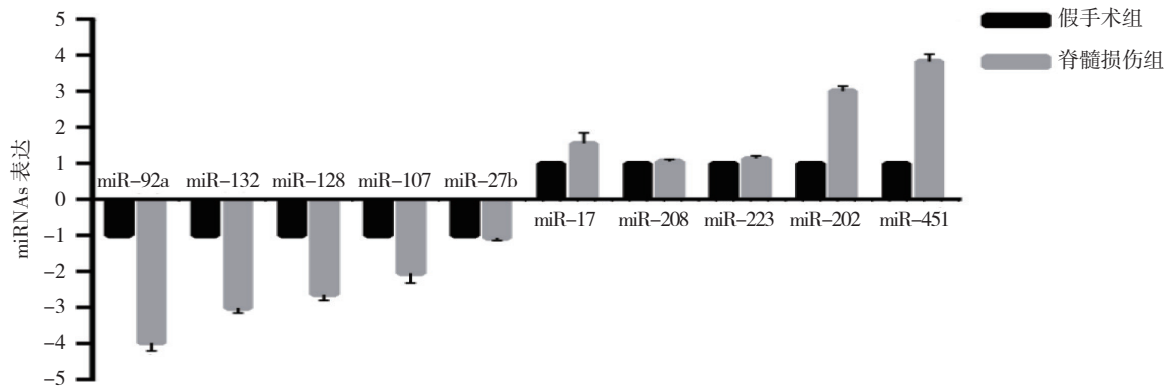


图 3 两组大鼠脊髓组织中 miRNAs 表达水平比较 (n=15,  $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 miR-92a 促进大鼠脊髓损伤运动功能恢复并抑制细胞凋亡

假手术组、对照组、实验组大鼠第 1、7、14 和 28 天的 miR-92a 表达水平比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的 miR-92a 表达水平有差异 ( $F=78.341, P=0.000$ );②3 组 miR-92a 表达水平有差异 ( $F=53.409, P=0.000$ ),实验组 miR-92a 表达水平最高 ( $P<0.05$ );③3 组 miR-92a 表达水平

变化趋势有差异 ( $F=31.351, P=0.000$ )。见表 5。

假手术组、对照组、实验组大鼠第 1、3、7、14、21 和 28 天的 BBB 评分比较,采用重复测量设计的方差分析,结果:①不同时间点的 BBB 评分有差异 ( $F=44.751, P=0.000$ );②3 组 BBB 评分有差异 ( $F=76.832, P=0.000$ ),假手术组 BBB 评分最高 ( $P<0.05$ );③3 组 BBB 评分变化趋势有差异 ( $F=52.059, P=0.000$ )。见表 6。

表 5 3 组大鼠各时间点 miR-92a 表达水平比较 (n=18,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天
假手术组	0.96 ± 0.31	0.83 ± 0.24	0.92 ± 0.29	0.77 ± 0.23
对照组	0.95 ± 0.31	0.96 ± 0.31	0.95 ± 0.32	0.96 ± 0.33
实验组	0.97 ± 0.32	1.94 ± 0.65	3.94 ± 1.31	2.86 ± 0.98

表 6 3 组大鼠各时间点 BBB 评分比较 (n=18,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天
假手术组	20.32 ± 6.65	17.04 ± 5.61	24.18 ± 7.89	16.73 ± 5.17	18.86 ± 6.28	18.32 ± 5.98
对照组	0.96 ± 0.32	2.58 ± 0.86	4.18 ± 1.36	7.32 ± 2.37	9.25 ± 3.08	10.84 ± 3.62
实验组	0.95 ± 0.31	3.04 ± 1.01	7.13 ± 2.34	11.43 ± 3.84	12.84 ± 4.28	14.27 ± 4.35

3 组大鼠细胞凋亡率比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $F=23.015, P=0.000$ );对照组高于假手术组和实验组。见表 7 和图 4。

3 组大鼠 Caspase-3、Bax、Bcl-2 水平比较,经

方差分析,差异有统计学意义 ( $F=26.909、33.417$  和  $29.053$ , 均  $P=0.000$ );对照组 Caspase-3、Bax 高于假手术组和实验组, Bcl-2 低于假手术组和实验组。见表 7 和图 5。

表 7 3 组大鼠细胞凋亡率及 Caspase-3、Bax、Bcl-2 表达水平比较 (n=18,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	细胞凋亡率 /%	Caspase-3	Bax	Bcl-2
假手术组	16.18 ± 3.07	1.94 ± 0.51	1.62 ± 0.41	3.66 ± 0.91
对照组	64.91 ± 9.77	3.49 ± 0.87	3.68 ± 0.92	1.37 ± 0.39
实验组	21.38 ± 7.14	2.17 ± 0.54	1.64 ± 0.41	2.04 ± 0.52
F 值	23.015	26.909	33.417	29.053
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

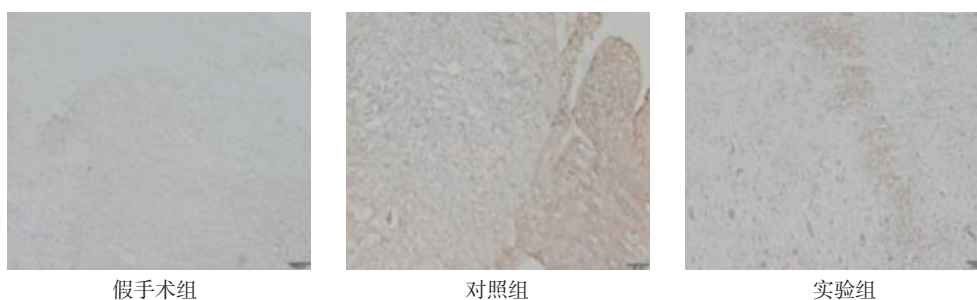
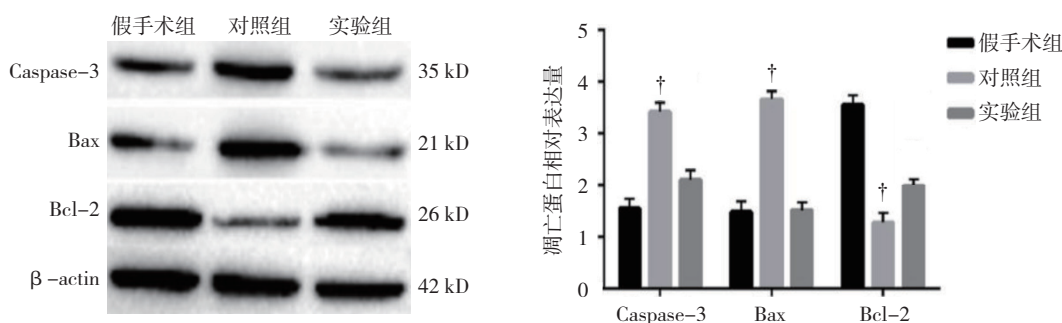


图 4 3 组大鼠脊髓组织中细胞凋亡情况 (TUNEL 染色 × 200)



† 与假手术组、实验组比较, P < 0.05。

图 5 3 组大鼠凋亡相关蛋白相对表达量比较 (n=18,  $\bar{x} \pm s$ )

#### 2.4 PTEN 是 miR-92a 的靶基因

对照组与实验组大鼠 PTEN-WT 荧光活性比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 (t = 4.816, P = 0.000), 实验组低于对照组; 两组 PTEN-MUT 荧光活性比较, 差异无统计学意义 (t = 0.173, P = 0.864)。见表 8。

对照组与实验组大鼠 PTEN mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经 t 检验, 差异有统计学意义 (t = 5.654 和 3.058, P = 0.000 和 0.004), 实验组低于对照组 (见表 8 和图 6)。PTEN 与 miR-92a 表达水平呈负相关 (r = -0.876, P = 0.000) (见图 7)。

表 8 两组大鼠 PTEN-WT 和 PTEN-MUT 荧光活性以及 PTEN mRNA 和蛋白相对表达量比较 (n=18,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	PTEN-WT 荧光活性	PTEN-MUT 荧光活性	PTEN mRNA	PTEN 蛋白
对照组	1.09 ± 0.52	1.11 ± 0.53	3.02 ± 0.54	1.36 ± 0.51
实验组	0.43 ± 0.26	1.08 ± 0.51	2.10 ± 0.43	0.91 ± 0.36
t 值	4.816	0.173	5.654	3.058
P 值	0.000	0.864	0.000	0.004

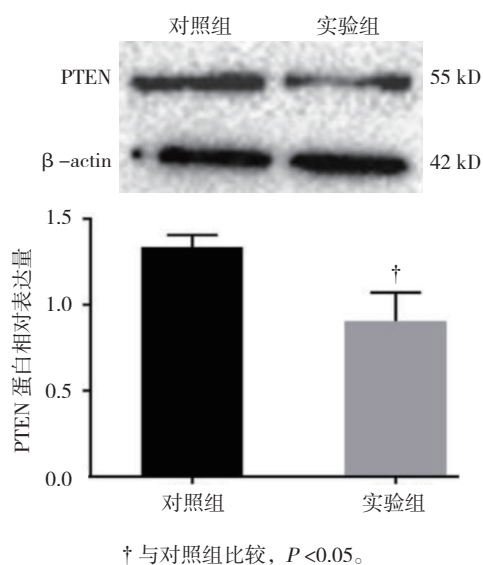


图 6 两组大鼠 PTEN 蛋白相对表达量比较 ( $n=18$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

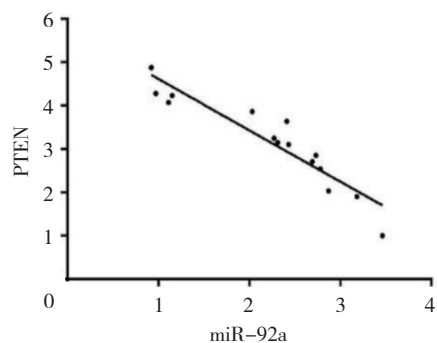


图 7 PTEN 与 miR-92a 的相关性散点图

### 3 讨论

脊髓损伤常导致患者运动功能受损, 严重时可导致残疾、瘫痪甚至死亡<sup>[13]</sup>。然而, 目前尚未有一种疗法可以有效地阻止脊髓损伤的发展进程<sup>[14]</sup>。近年来, 对 miRNAs 的研究提示其可能在脊髓损伤恢复中扮演着重要角色<sup>[15]</sup>, 为脊髓损伤恢复的分子机制研究提供了新思路。YU 等<sup>[16]</sup>研究表明, miR-133b 在成年斑马鱼脊髓损伤组织中高表达, 对其脊髓损伤后的功能恢复至关重要。miR-133b 靶向轴突生长抑制剂 RhoA, 使用吗啉反义寡核苷酸抑制 miR-133b 的表达, 导致脊髓损伤的成年斑马鱼运动功能恢复, NMLF、SRF 和 IMRF 神经元轴突减少。YI 等<sup>[17]</sup>研究表明, miR-155 缺乏会抑制 Th17 细胞分化, 促进脊髓损伤后的运动功能恢复。BHALALA 等<sup>[18]</sup>研究表明, 小鼠脊髓损伤后, miR-21 呈时间依赖性升高, 病变区域的星形胶质细胞表达高水平 miR-21。敲除 miR-21 可促进脊髓损伤后胶质瘢痕形成, 从而促进脊髓损伤恢复。

WANG 等<sup>[19]</sup>研究表明, cAMP 是 3 条参与坐骨神经损伤调节、促进神经突触生长的信号通路的上游调控因子。miR-142-3p 可通过 AC9 诱导 cAMP 升高, 促进神经突生长, 有助于脊髓损伤后的感觉功能恢复。本研究发现 miR-92a 在大鼠脊髓损伤组织中低表达, 过表达 miR-92a 有助于脊髓损伤大鼠运动功能恢复并抑制细胞凋亡。

PTEN 作为一个脊髓损伤后负调节因子, 可抑制脊髓损伤后的神经新生<sup>[20]</sup>和轴突再生<sup>[21]</sup>, 同时 PTEN 在细胞增殖、凋亡和神经元分化方面也发挥重要作用。YAN 等<sup>[22]</sup>研究表明, PTEN 通过激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路, 抑制胰腺炎细胞增殖和迁移。MATSUDA 等<sup>[23]</sup>报道, 过表达 PTEN 通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 抑制细胞凋亡。LEE 等<sup>[24]</sup>研究表明, PTEN 可通过抑制 ERK 信号与 S6K 信号的相互作用, 促进神经元分化。有研究表明, PTEN 在脊髓损伤组织中高表达<sup>[25]</sup>, 敲除 PTEN 可促进脊髓损伤大鼠的运动功能恢复<sup>[26-27]</sup>。HU 等<sup>[28]</sup>研究表明, miR-21 靶向 PTEN 抑制脊髓损伤大鼠细胞凋亡。本研究发现, PTEN 是 miR-92a 的一个靶基因, 在大鼠脊髓损伤组织中表达上调。大鼠脊髓损伤组织中, PTEN 与 miR-92a 表达水平呈负相关。

综上所述, miR-92a 可能通过调节 PTEN 促进大鼠脊髓损伤后的运动功能恢复。PTEN 是 miR-92a 的靶基因, miR-92a 可能通过调节 PTEN 从而促进大鼠脊髓损伤后运动功能恢复。受实验设备、研究时长等因素影响, 本研究有不足之处, 后期将进一步完善。

#### 参 考 文 献:

- [1] KJELL J, OLSON L. Rat models of spinal cord injury: from pathology to potential therapies[J]. Disease Models Mechanisms, 2016, 9(10): 1125-1137.
- [2] ZHU H G, XIE R, LIU X D, et al. MicroRNA-494 improves functional recovery and inhibits apoptosis by modulating PTEN/AKT/mTOR pathway in rats after spinal cord injury[J]. Biomedicine Pharmacotherapy, 2017, 92: 879-887.
- [3] TAKEOKA A, VOLLENWEIDER I, COURTINE G, et al. Muscle spindle feedback directs locomotor recovery and circuit reorganization after spinal cord injury[J]. Cell, 2014, 159(7): 1626-1639.
- [4] SCHIAVETO-de-SOUZA A, da-SILVA C A, DEFINO H L A, et al. Effect of melatonin on the functional recovery from experimental traumatic compression of the spinal cord[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2013, 46(4): 348-358.
- [5] XU Z Y, ZHANG K F, WANG Q, et al. MicroRNA-124 improves

- functional recovery and suppresses Bax-dependent apoptosis in rats following spinal cord injury[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2019, 19(4): 2551-2560.
- [6] NIETO-DIAZ M, ESTEBAN F J, REIGADA D, et al. MicroRNA dysregulation in spinal cord injury: causes, consequences, and therapeutics[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014, 8: 53.
- [7] WANG W Z, LIU R H, SU Y L, et al. MicroRNA-21-5p mediates TGF- $\beta$ -regulated fibrogenic activation of spinal fibroblasts and the formation of fibrotic scars after spinal cord injury[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, 14(2): 178-188.
- [8] YANG J, XIONG L L, WANG Y C, et al. Oligodendrocyte precursor cell transplantation promotes functional recovery following contusive spinal cord injury in rats and is associated with altered microRNA expression[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018, 17(1): 771-782.
- [9] ZHAO Y, JIANG H, LIU X W, et al. miR-124 promotes bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neurogenic cells for accelerating recovery in the spinal cord injury[J]. *Tissue Cell*, 2015, 47(2): 140-146.
- [10] MAO X J, JIANG Z Y, SHI C H, et al. MicroRNA-92a relieves oxidative stress and inflammation via modulating PI3K/AKT/ERK pathway after spinal cord injury[J]. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2018, 8(11): 1622-1628.
- [11] WEI G J, AN G, SHI Z W, et al. Suppression of microRNA-383 enhances therapeutic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in treating spinal cord injury via GDNF[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2017, 41(4): 1435-1444.
- [12] HE Y X, LV B K, HUAN Y Q, et al. Zhenbao pill protects against acute spinal cord injury via miR-146a-5p regulating the expression of GPR17[J]. *Bioscience Reports*, 2018, 38:1-12.
- [13] ZHOU W, YUAN T Z, GAO Y S, et al. IL-1 $\beta$ -induces NF- $\kappa$ B and upregulates microRNA-372 to inhibit spinal cord injury recovery[J]. *Journal of Neurophysiology*, 2017, 117(6): 2282-2291.
- [14] WANG Y, SUN J C, WANG H B, et al. Effects of microRNA-494 on astrocyte proliferation and synaptic remodeling in the spinal cord of a rat model of chronic compressive spinal cord injury by regulating the Nogo/Ngr signaling pathway[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 48(3): 919-933.
- [15] GAUDET A D, MANDREKAR C S, HALL J C E, et al. miR-155 Deletion in mice overcomes neuron-intrinsic and neuron-extrinsic barriers to spinal cord repair[J]. *Journal of Neuroscience*, 2016, 36(32): 8516-8532.
- [16] YU Y M, GIBBS K M, DAVILA J, et al. MicroRNA miR-133b is essential for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2011, 33(9): 1587-1597.
- [17] YI J, WANG D, NIU X, et al. MicroRNA-155 deficiency suppresses Th17 cell differentiation and improves locomotor recovery after spinal cord injury[J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2015, 81(5): 284-290.
- [18] BHALALA O G, PAN L, SAHNI V, et al. MicroRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury[J]. *Journal of Neuroscience*, 2012, 32(50): 17935-17947.
- [19] WANG T Y, YUAN W Q, LIU Y, et al. miR-142-3p is a potential therapeutic target for sensory function recovery of spinal cord injury[J]. *Medical Science Monitor*, 2015, 21: 2553-2556.
- [20] WEI Z, ZHAO W J, SCHACHNER M. Electroacupuncture restores locomotor functions after mouse spinal cord injury in correlation with reduction of PTEN and p53 expression[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 411.
- [21] KIM J, SAJID M S, TRAKHTENBERG E F. The extent of extra-axonal tissue damage determines the levels of CSPG upregulation and the success of experimental axon regeneration in the CNS[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1):9839-9849.
- [22] YAN H T, JIANG L, ZOU H, et al. PTEN suppresses the inflammation, viability, and motility of AP-AR42J cells by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway[J]. *Rsc Advances*, 2019, 9(10): 5460-5469.
- [23] MATSUDA S, IKEDA Y, MURAKAMI M, et al. Roles of PI3K/AKT/GSK3 pathway involved in psychiatric illnesses[J]. *Diseases*, 2019, 7(1): 22-33.
- [24] LEE J E, LIM M S, PARK J H, et al. PTEN promotes dopaminergic neuronal differentiation through regulation of ERK-dependent inhibition of S6K signaling in human neural stem cells[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2016, 5(10): 1319-1329.
- [25] WALKER C L, WU X, LIU N K, et al. Bisperoxovanadium mediates neuronal protection through inhibition of PTEN and activation of PI3K/AKT-mTOR signaling after traumatic spinal injuries[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2019, 36: 1-12.
- [26] XU G H, AO R G, ZHI Z Z, et al. miR-21 and miR-19b delivered by hMSC-derived EVs regulate the apoptosis and differentiation of neurons in patients with spinal cord injury[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(7): 10205-10217.
- [27] DANILOV C A, STEWARD O. Conditional genetic deletion of PTEN after a spinal cord injury enhances regenerative growth of CST axons and motor function recovery in mice[J]. *Experimental Neurology*, 2015, 266: 147-160.
- [28] HU J Z, HUANG J H, ZENG L, et al. Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats[J]. *Journal of Neurotrauma*, 2013, 30(15): 1349-1360.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 黄伟, 钱锦锋, 蔡执中, 等. MicroRNA-92a 对大鼠脊髓损伤后运动功能恢复的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(16): 7-14.