

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.18.005
文章编号: 1005-8982 (2022) 18-0032-07

中枢神经系统损伤专题·论著

外泌体源性microRNA-124对急性创伤性脊髓损伤大鼠脊髓小胶质细胞活化及炎症反应的影响*

高迎吉¹, 朱中蛟², 杨秀玲³

(1. 临沂市人民医院 脊柱外科, 山东 临沂 276002; 2. 滕州市中心医院 脊柱外科, 山东 滕州 277599; 3. 山东大学齐鲁医院 肿瘤内科, 山东 济南 250012)

摘要: 目的 观察外泌体(Exos)源性microRNA-124(miR-124)对急性创伤性脊髓损伤(ASCI)大鼠脊髓小胶质细胞(MG)活化及炎症反应的影响。**方法** 取对数期HEK239细胞,分为空白组、转染组。空白组不处理,转染组转染miR-124-mimics质粒。从35只大鼠中随机选取10只仅咬除椎板显露脊髓,不进行损伤处理,设为假手术组;其余25只复制ASCI模型,模型复制成功20只,随机分为ASCI组、实验组,每组10只。分离含有miR-124的Exos,鉴定后用于后续实验。模型复制成功后24 h,实验组经尾静脉注射Exos 3×10^9 个微粒,假手术组及ASCI组注射等量PBS溶液。实时荧光定量聚合酶链反应检测脊髓组织miR-124的表达;流式细胞术检测脊髓组织MG占比;酶联免疫吸附试验检测脊髓组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)水平;Western blotting检测脊髓组织核苷酸结合寡聚化结构域样受体3(NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1(Caspase-1)、P2X7蛋白的表达。**结果** 转染组miR-124相对表达量高于空白组($P < 0.05$)。与假手术组、ASCI组比较,实验组脊髓组织miR-124相对表达量升高($P < 0.05$)。与假手术组比较,ASCI组脊髓组织Iba-1⁺/CD32⁺、Iba-1⁺/CD206⁺占比均升高($P < 0.05$);与ASCI组比较,实验组脊髓组织Iba-1⁺/CD32⁺占比降低($P < 0.05$),Iba-1⁺/CD206⁺占比升高($P < 0.05$)。与假手术组比较,ASCI组脊髓组织TNF- α 、IL-6、IL-8升高($P < 0.05$);与ASCI组比较,实验组脊髓组织TNF- α 、IL-6、IL-8降低($P < 0.05$)。与假手术组比较,ASCI组脊髓组织NLRP3、Caspase-1、P2X7蛋白相对表达量升高($P < 0.05$);与ASCI组比较,实验组脊髓组织NLRP3、Caspase-1、P2X7蛋白相对表达量降低($P < 0.05$)。**结论** Exos源性miR-124可促进ASCI大鼠脊髓M1型MG转化为M2型,减轻炎症反应,推测其作用机制与抑制P2X7-NLRP3/Caspase-1信号通路活性有关。

关键词: 急性创伤性脊髓损伤;脊髓小胶质细胞活化;炎症反应;大鼠

中图分类号: R651.2

文献标识码: A

Effects of exosomal miR-124 on microglial activation and inflammation of spinal cord in rats with acute traumatic spinal cord injury*

Ying-ji Gao¹, Zhong-jiao Zhu², Xiu-ling Yang³

(1. Department of Spine Surgery, Linyi People's Hospital, Linyi, Shandong 276002, China; 2. Department of Spine Surgery, Tengzhou Central Hospital, Tengzhou, Shandong 277599, China; 3. Department of Oncology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

Abstract: Objective To observe the effects of exosomal microRNA (miR)-124 on microglial activation and inflammation of spinal cord in rats with acute traumatic spinal cord injury (ASCI). **Methods** Ten of the 35 rats were

收稿日期: 2022-05-23

* 基金项目: 山东省自然科学基金(No: ZR2019PH092)

[通信作者] 杨秀玲, E-mail: yxl18560087069@163.com; Tel: 18560087069

randomly selected as the sham operation group, where excision of vertebral plates was performed to expose the spinal cord. The rest 25 rats were used to establish the ASCI models, and the 20 rats successfully modeled were randomly divided into ASCI group and experimental group, each with 10 rats. Exosomes containing miR-124 were isolated and used for subsequent experiments after identification. Twenty-four hours after modeling, the experimental group was injected with 3×10^9 particles of exosomes via the tail vein, and the sham group and the ASCI group were injected with the same amount of PBS solution. The expression of miR-124 in spinal cord tissues was detected by quantitative real-time polymerase chain reaction. The proportion of microglia in spinal cord tissues was detected by flow cytometry. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in spinal cord tissues were detected by ELISA. The protein expression levels of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3), Caspase-1, and P2X7 in the spinal cord tissues were detected by Western blotting. **Results** The relative expression of miR-124 was higher in the transfection group than that in the blank group ($P < 0.05$). Compared with the sham group and the ASCI group, the expression of miR-124 in the spinal cord of the experimental group was increased ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the proportions of Iba-1⁺/CD32⁺ and Iba-1⁺/CD206⁺ cells in the spinal cord tissues of the ASCI group were increased ($P < 0.05$). Compared with the ASCI group, the proportion of Iba-1⁺/CD32⁺ cells in the spinal cord tissues was decreased ($P < 0.05$), while the proportion of Iba-1⁺/CD206⁺ cells in the spinal cord tissues was increased in the experimental group ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the levels of TNF- α , IL-6, and IL-8 in the spinal cord of the ASCI group were increased ($P < 0.05$). Compared with the ASCI group, the levels of TNF- α , IL-6, and IL-8 in the spinal cord of the experimental group were decreased ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the expressions of NLRP3, Caspase-1 and P2X7 in the spinal cord of the ASCI group were increased ($P < 0.05$). Compared with the ASCI group, the expressions of NLRP3, Caspase-1, and P2X7 in the spinal cord of the experimental group were decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Exosomal miR-124 can promote the conversion of M1 microglia to M2 microglia and ameliorate the inflammation in the spinal cord of ASCI rats. It is speculated that its mechanism is related to the inhibition of P2X7-NLRP3/Caspase-1 signaling pathway.

Keywords: acute traumatic spinal cord injury; spinal microglial activation; inflammation; rats

急性创伤性脊髓损伤 (acute spinal cord injury, ASCI) 是一种突发性中枢神经系统创伤, 可导致脊髓中血管破裂, 神经元迅速死亡^[1]。神经炎症是 ASCI 重要的病理生理机制, 其中小胶质细胞 (Microglia, MG) 发挥重要作用, 活化 MG 中的 M1 型可释放炎症因子, M2 型可释放抑炎因子^[2]。因此, 促进 ASCI 后 M1 型 MG 向 M2 型转化是改善预后的重要措施。有研究发现, microRNA-124 (miR-124) 特异性表达于 MG 中, 上调其表达可促进 M1 型 MG 向 M2 型转化, 但裸露 miR-124 易被降解, 无法稳定地在中枢神经系统发挥作用, 故探究可完整递送 miRNA 的方式具有必要性^[3]。外泌体 (Exosomes, Exos) 是一种由自体细胞分泌的纳米级囊泡样小体, 通过转运 RNA、生物活性磷脂、蛋白质等参与细胞与内环境的信号传递及物质运输, 已逐渐用于递送载体、参与器官间联系及组织稳态维持^[4]。本研究通过复制 ASCI 大鼠模型, 观察 Exos 源性 miR-124 对其脊髓 MG 活化及炎症反应的影响, 并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系、实验动物 人源胚胎肾 (human embryonic kidney, HEK) 239 细胞系购自南京森贝伽生物科技有限公司。SPF 级 SD 大鼠 35 只, 6 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自上海灵畅生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2018-0003, 实验动物使用许可证号: SYXK (沪) 2022-0004。

1.1.2 主要试剂 miR-124-mimics 过表达质粒 (上海汉恒生物科技有限公司), Lipofectamine™ 3000 试剂盒 (上海吉玛制药技术有限公司), Exos 提取试剂盒 (上海贝博生物科技公司), 兔抗人 CD9、CD63 一抗, 兔抗鼠核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3, NLRP3)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、P2X7 一抗、小鼠抗大鼠 Iba-1、CD32、CD206 抗体 (美国 Abcam 公司), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-8 (interleukin-8,

IL-8) 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器 StepOne Puls 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 仪 (美国 ABI 公司), JEM-2100Plus 透射电子显微镜 (日本电子株式会社), Stat Fax-4200 酶标仪 (美国 Awareness 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染 HEK239 细胞置于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂、饱和湿度的 DMEM 培养基中 (含 10% 胎牛血清、L-谷氨酰胺、1% 非必需氨基酸、青霉素 100 u/mL、链霉素 100 μg/mL)。取对数期 HEK239 细胞, PBS 洗涤, 按 1 × 10⁵ 个/mL 接种至 6 孔板, 待细胞再次融合达 75%, 分为空白组、转染组。空白组不处理, 转染组按照 Lipofectamine™ 3000 试剂盒说明书步骤, 转染 miR-124-mimics 质粒。每组设置 5 个复孔, 每 2 天更换 1 次培养基, 2 ~ 3 周后形成单克隆细胞系用于后续实验。

1.2.2 qRT-PCR 检测转染后细胞 miR-124、Exos 源性 miR-124、脊髓组织 miR-124 的表达 取空白组、转染组细胞, 用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 按照荧光定量试剂盒说明书操作, 反应体系: 双倍核酸染料 12 μL, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 cDNA 2 μL, 补充 dd H₂O 至总体积 20 μL。反应条件: 90℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 20 s, 62℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 25 s, 共 40 个循环。以 U6 为内参基因, 2^{-ΔΔCt} 为目的基因相对表达强度, 引物序列见表 1。取空白组、转染组 Exos, 检测 Exos 源性 miR-124 相对表达量。取冷冻保存的脊髓组织, 眼科剪剪碎, PBS 匀浆, 注入离心管内, 离心后取上清液, 检测脊髓组织中 miR-124 相对表达量。

1.2.3 分离含 miR-124 的 Exos 并鉴定 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 12 000 r/min 离心 15 h, 取上

清液。空白组、转染组细胞置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的 DMEM 培养基中 (含 10% 胎牛血清、1% 青霉素) 培养 5 d。3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用 Exos 提取试剂盒提取 Exos, 根据试剂盒说明书步骤进行操作。取 Exos 10 μL, 滴至载样铜网并静置 2 min, 去除浮液, 1% 磷钨酸溶液染色 5 min, 去除染液, 自然晾干, 在透射电镜下观察其形态。

1.2.4 Western blotting 检测空白组、转染组 Exos 膜表面特异性标志蛋白的表达和脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白的表达 取 Exos 50 μL, 加入裂解液 50 μL (含蛋白酶抑制剂), 4℃ 振荡 25 min。离心取上清液, BCA 蛋白定量试剂盒定量, 加入上样缓冲液, 沸水浴变性 5 min。每孔 40 μg 上样, 电泳后湿转至硝酸纤维素膜上, 封闭液封闭 2 h, 加入兔抗人 CD9、CD63 一抗 (1:500), 4℃ 孵育过夜, 洗涤, 加入山羊抗兔二抗 (1:2 000), 室温孵育 2 h, 洗涤、曝光、显影, 凝胶成像系统分析, 以 CD9、CD63 与内参 GAPDH 的灰度值比值表示蛋白相对表达量。

取冷冻保存的脊髓组织, 操作方法同上, 加入兔抗大鼠 NLRP3、Caspase-1、P2X7 一抗 (1:500), 检测脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量。

1.2.5 ASCI 大鼠模型的复制及分组 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠, 保持其俯卧体位, 将 T₁₀ 椎体作为中心行矢状切口, 显露 T₉ ~ T₁₁ 椎板, 去除 T₁₀ 椎板和韧带, 显露硬脊膜。采用纽约大学脊髓损伤打击器固定大鼠, 将撞击棒 (直径 2.5 mm, 重量 10 g) 从 25 mm 位置自由下落撞击脊髓, 自撞击棒下落到抬起时间间隔 10 s。模型复制成功标准: 脊髓被击打后表面迅速淤血、水肿, 击打瞬间大鼠表现为后肢放射性迅速收回、抖动^[5]。模型复制成功后清洗周围组织, 常规缝合、抗感染。

从 35 只大鼠中随机选取 10 只仅咬除椎板显露脊髓, 不进行损伤处理, 设为假手术组, 其余 25 只复制 ASCI 模型, 模型复制成功 20 只, 随机分为 ASCI 组、实验组, 每组 10 只。模型复制成功后 24 h, 实验组经尾静脉注射 Exos 3 × 10⁹ 个微粒 (通过纳米颗粒跟踪分析仪 Nanosight NS300 system 控制 Exos 量), 假手术组及 ASCI 组注射等量 PBS 溶液^[6]。

1.2.6 标本采集 干预后 3 d, 颈椎脱臼法处死大鼠, 于冰盘上迅速分离大鼠 T₉ ~ T₁₁ 节段脊髓, 转移

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
miR-124	正向: 5'-AGGCCTCTCTCTCCGTGTTCA-3'	21
	反向: 5'-GCATTCACCGCGTGCCTTA-3'	19
U6	正向: 5'-ACTACTAAAAATCTGTGCGTTTCCT-3'	24
	反向: 5'-TTCAGCAATCTGTCTCTCAAAG-3'	24

至 EP 管中封闭保存, 取 5 只大鼠的脊髓组织 -80°C 冷冻保存, 用于 miR-124 相对表达量、MG 占比、脊髓组织炎症因子水平的检测, 另外 5 只大鼠的脊髓组织分成两份, 一份固定于 4% 多聚甲醛 24 h, 另一份置入 -80°C 冰箱冷冻保存用于检测蛋白相对表达量。

1.2.7 流式细胞术检测脊髓组织 MG 占比 取脊髓组织, 胰蛋白酶消化后离心, 经密度梯度离心法分离出单个核细胞, 用 10% 胎牛血清重悬, 在单核细胞悬液中加入小鼠抗大鼠 Iba-1、CD32、CD206 抗体, 避光孵育 30 min, 离心弃上清液, PBS 洗涤, 1% 多聚甲醛定容, 300 目细胞滤网过滤, 4°C 遮光保存, 以阴性对照管设门, 采用多参数流式细胞术检测脊髓组织 MG 中 Iba-1⁺/CD32⁺、Iba-1⁺/CD206⁺ 占比。

1.2.8 ELISA 检测脊髓组织 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平 取冷冻保存的脊髓组织, 匀浆后采用 ELISA 检测 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平, 根据试剂盒说明书操作步骤, 经酶标仪测定 570 nm 波长处吸光度值, 画出曲线, 计算样本浓度。

1.2.9 苏木精-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色观察脊髓组织病理学变化 取脊髓组织切片, 常规水化, 冲洗, 苏木精染液染色 5 min, 冲洗, 分化液分化, 冲洗, 蓝化液反蓝, 伊红染色 2 min, 漂洗, 常规脱水、透明, 滴入中性树脂封固, 显微镜下观察脊髓组织病理学变化。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验或方差分析, 进一步两两比较用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组细胞转染后 miR-124 相对表达量比较

空白组与转染组 miR-124 相对表达量分别为 (0.95 ± 0.12) 和 (2.38 ± 0.27) , 经 t 检验, 差异有统计学意义 ($t = 10.822, P = 0.000$), 转染组高于空白组。

2.2 Exos 形态

透射电镜观察结果显示, Exos 膜结构完整, 大小不一, 大部分呈杯形或圆形, 直径 30 ~ 100 nm, 与 Exos 特征相符。见图 1。

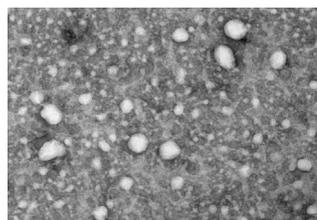


图 1 透射电镜观察 Exos 形态 ($\times 70\,000$)

2.3 含 miR-124 的 Exos 鉴定结果

空白组与转染组 CD9、CD63 蛋白及 miR-124 相对表达量的比较, 经 t 检验, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 转染组 CD9、CD63 蛋白及 miR-124 相对表达量升高。见表 2 和图 2。

表 2 两组细胞 CD9、CD63 蛋白、miR-124 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CD9 蛋白	CD63 蛋白	miR-124
空白组	0.38 ± 0.04	0.32 ± 0.04	1.22 ± 0.18
转染组	0.67 ± 0.07	0.61 ± 0.08	2.57 ± 0.29
t 值	8.043	7.250	8.844
P 值	0.000	0.000	0.000

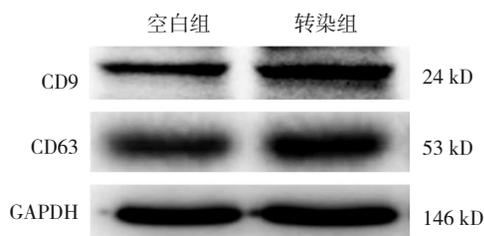


图 2 空白组、转染组 CD9、CD63 蛋白的表达

2.4 3 组大鼠脊髓组织 miR-124 相对表达量比较

假手术组、ASCI 组、实验组大鼠脊髓组织 miR-124 相对表达量分别为 (1.02 ± 0.17) 、 (1.04 ± 0.15) 、 (2.10 ± 0.34) , 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 34.287, P = 0.000$)。进一步两两比较结果: 与假手术组、ASCI 组比较, 实验组脊髓组织 miR-124 相对表达量升高 ($P < 0.05$); 假手术组与 ASCI 组脊髓组织 miR-124 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 3 组大鼠脊髓组织 MG 占比比较

假手术组、ASCI 组、实验组大鼠脊髓组织 Iba-1⁺/CD32⁺、Iba-1⁺/CD206⁺ 占比比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与假手术组比较, ASCI 组脊髓组织 Iba-1⁺/

CD32⁺、Iba-1⁺/CD206⁺ 占比均升高 ($P < 0.05$)；与 ASCI 组比较, 实验组脊髓组织 Iba-1⁺/CD32⁺ 占比降低 ($P < 0.05$), Iba-1⁺/CD206⁺ 占比升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 3 组大鼠脊髓组织 MG 占比比较 ($n=5, \%, \bar{x} \pm s$)

组别	Iba-1 ⁺ /CD32 ⁺	Iba-1 ⁺ /CD206 ⁺
假手术组	20.19 ± 3.57	25.47 ± 4.21
ASCI 组	44.28 ± 5.31 ^①	39.65 ± 5.07 ^①
实验组	29.36 ± 4.92 ^②	54.87 ± 6.39 ^②
F 值	34.039	38.484
P 值	0.000	0.000

注：①与假手术组比较, $P < 0.05$ ；②与 ASCI 组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 3 组大鼠脊髓组织 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平比较

假手术组、ASCI 组、实验组大鼠脊髓组织 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与假手术组比较, ASCI 组脊髓组织 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平升高

($P < 0.05$); 与 ASCI 组比较, 实验组脊髓组织 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 3 组大鼠脊髓组织 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平比较

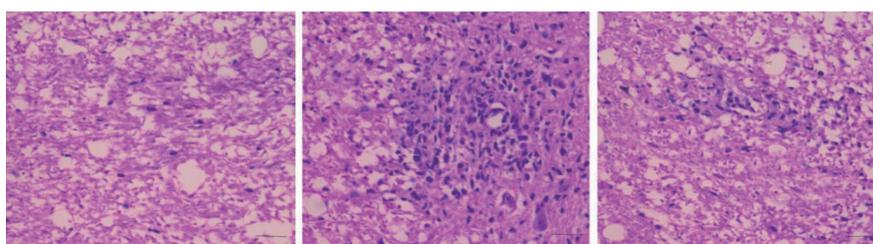
($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α /(ng/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-8/(ng/mL)
假手术组	4.21 ± 0.96	106.85 ± 12.68	79.63 ± 10.25
ASCI 组	7.59 ± 1.12 ^①	179.74 ± 23.57 ^①	156.38 ± 19.64 ^①
实验组	6.23 ± 0.74 ^②	142.28 ± 19.96 ^②	129.97 ± 16.69 ^②
F 值	15.930	17.878	29.643
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与假手术组比较, $P < 0.05$ ；②与 ASCI 组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 3 组大鼠脊髓组织病理学改变

假手术组大鼠脊髓组织未观察到明显的炎症细胞浸润。ASCI 组可观察到大量炎症细胞浸润, 表现为典型的“血管袖套样”, 且部分炎症细胞浸润至脑实质中。实验组血管周围与脑实质中有炎症细胞浸润, 但不及 ASCI 组炎症细胞数量多, 程度较轻。见图 3。



假手术组

ASCI 组

实验组

图 3 3 组大鼠脊髓组织病理切片 (HE 染色 × 200)

2.8 3 组大鼠脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量比较

假手术组、ASCI 组、实验组大鼠脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两

比较结果: 与假手术组比较, ASCI 组脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与 ASCI 组比较, 实验组脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

表 5 3 组大鼠脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量比较 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组别	NLRP3	Caspase-1	P2X7
假手术组	0.35 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03
ASCI 组	0.72 ± 0.08 ^①	0.99 ± 0.12 ^①	0.92 ± 0.11 ^①
实验组	0.53 ± 0.06 ^②	0.62 ± 0.07 ^②	0.40 ± 0.05 ^②
F 值	44.267	91.064	119.645
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与假手术组比较, $P < 0.05$ ；②与 ASCI 组比较, $P < 0.05$ 。

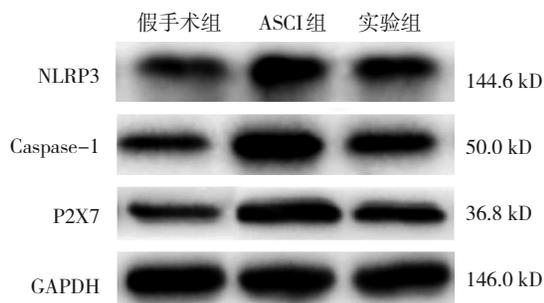


图 4 各组大鼠脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白的表达

3 讨论

ASCI 引发的局部病理损伤表现为区域性、不完全性, 并造成血管痉挛、局部炎症、组织水肿缺血、离子失衡、代谢紊乱及氨基酸毒性等复杂级联反应, 进而损伤神经细胞并致其脱髓鞘, 生成胶质瘢痕影响轴突正常生长, 最终导致不可逆性神经功能损害^[7-8]。MG 广泛分布于神经系统, 其作为巨噬细胞具有呈递抗原、吞噬病原体、为神经元提供营养支持等作用, 与炎症产生关系密切。ASCI 后中枢系统感受到强烈刺激, MG 转变为 M1、M2 两种极化类型, M1 型通过分泌蛋白酶、炎症因子等加剧脊髓损伤, 并诱导炎症细胞迁移至损伤区域, 而 M2 型可分泌抗炎因子从而减轻炎症反应及组织损伤^[9]。由此可见, 活化 MG 在调控 ASCI 后的炎症反应中占据重要地位。

miR-124 被证实大量表达于哺乳动物脑及脊髓神经元中, 在癫痫、帕金森病及脑缺血等中枢神经系统疾病中起关键作用, 并可促进 MG 从促炎 M1 型转化为抑炎 M2 型^[10-12]。李昊天等^[13]发现, 上调 miR-124 可抑制脊髓损伤大鼠氧化应激导致的神经元凋亡, 减轻脊髓损伤, 提示其在治疗脊髓损伤方面的潜能。将 Exos 作为将 miR-124 输送至中枢神经系统的载体与自然生理学状态更为接近, 且体积微小、容易获取及保存、无免疫排斥、免疫原性低。此外, 该基因修饰方式可促进 Exos 表面表达特定的受体和配体, 从而使其具有结合特定细胞的功能。杨永祥等^[14]研究发现, Exos 源性 miR-146a 可提高 N9 型 MG 中 miR-146a 相对表达量, 进而调控下游靶点因子抑制 N9 型 MG 介导的炎症反应, 表明 Exos 可作为将 miRNA 递送给受体细胞的有效载体。本研究结果显示, 与 ASCI 组比较, 实验组脊髓组织 Iba-1⁺/CD32⁺ 占比降低, Iba-1⁺/CD206⁺ 占比升高, 且 TNF- α 、IL-6、IL-8 水平降低, 提示 Exos 源性 miR-124 可促进 ASCI 大鼠脊髓 M1 型 MG 转化为 M2 型, 从而减轻脊髓炎症反应。

NOD 样受体是机体重要的模式识别受体, NLRP3 是其中主要类型之一, 被激活后与 Caspase-1、ASC 组成炎症小体。NLRP3 炎症小体是一种可激活炎症反应的多蛋白复合物, 在先天性免疫及炎症相关疾病进程中发挥重要作用, 可响应微生物感染与细胞损伤, 具有抗微生物及免疫调节作用, 通过介

导 Caspase-1 激活和促炎 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症因子分泌, 导致细胞焦亡^[15-16]。ZHAO 等^[17]发现, 通过抑制 NLRP3 炎症小体激活、调节巨噬细胞极化可有效减少神经胶质瘢痕形成并促进轴突生长, 从而治疗急性脊髓损伤, 提示 NLRP3 炎症小体可作为脊髓损伤治疗中的有效靶点。本研究结果显示, 与假手术组比较, ASCI 组脊髓组织 NLRP3、Caspase-1、P2X7 蛋白相对表达量升高, 经实验组干预后均有所降低, 提示 P2X7-NLRP3/Caspase-1 信号通路在 ASCI 中被异常激活, Exos 源性 miR-124 可能通过抑制该通路活性发挥治疗 ASCI 的作用。

综上所述, Exos 源性 miR-124 可促进 ASCI 大鼠脊髓 M1 型 MG 转化为 M2 型, 减轻炎症反应, 推测其作用机制与抑制 P2X7-NLRP3/Caspase-1 信号通路活性有关。

参 考 文 献 :

- [1] DHALL S S, KURPAD S N, HURLBERT R J, et al. Introduction. Acute spinal cord injury[J]. *Neurosurg Focus*, 2019, 46(3): E1.
- [2] KISUCKÁ A, BIMBOVÁ K, BAČOVÁ M, et al. Activation of neuroprotective microglia and astrocytes at the lesion site and in the adjacent segments is crucial for spontaneous locomotor recovery after spinal cord injury[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1943.
- [3] YIP P K, BOWES A L, HALL J C E, et al. Docosahexaenoic acid reduces microglia phagocytic activity via miR-124 and induces neuroprotection in rodent models of spinal cord contusion injury [J]. *Hum Mol Genet*, 2019, 28(14): 2427-2448.
- [4] VIGNARD V, LABBÉ M, MAREC N, et al. MicroRNAs in tumor exosomes drive immune escape in melanoma[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8(2): 255-267.
- [5] 吴杨鹏, 范筱, 张俐. 急性脊髓损伤动物模型的建立与评估[J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(49): 7341-7348.
- [6] LI Q C, LIANG Y, SU Z B. Prophylactic treatment with MSC-derived exosomes attenuates traumatic acute lung injury in rats[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(6): L1107-L1117.
- [7] ANJUM A, YAZID M D, FAUZI DAUD M, et al. Spinal cord injury: pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7533.
- [8] VENKATESH K, GHOSH S K, MULLICK M, et al. Spinal cord injury: pathophysiology, treatment strategies, associated challenges, and future implications[J]. *Cell Tissue Res*, 2019, 377(2): 125-151.
- [9] ZHANG Y, LIU Z J, ZHANG W X, et al. Melatonin improves functional recovery in female rats after acute spinal cord injury by modulating polarization of spinal microglial/macrophages[J]. *J Neurosci Res*, 2019, 97(7): 733-743.

- [10] WANG R L, AN X L, ZHAO S Z. Effect of miR-124 on PI3K/Akt signal pathway in refractory epilepsy rats[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2020, 66(2): 146-152.
- [11] YAO L P, ZHU Z Y, WU J Y, et al. MicroRNA-124 regulates the expression of p62/p38 and promotes autophagy in the inflammatory pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *FASEB J*, 2019, 33(7): 8648-8665.
- [12] LIU X L, FENG Z T, DU L P, et al. The potential role of MicroRNA-124 in cerebral ischemia injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1): 120.
- [13] 李昊天, 陈凌强, 王兵, 等. miR-124-3p 靶向作用于 calpain1 抑制氧化应激对脊髓损伤后神经元凋亡的影响[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(12): 1109-1118.
- [14] 杨永祥, 崔效玮, 叶玉勤, 等. 外泌体 miR-146a 对 N9 型小胶质细胞介导炎症反应的作用[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2018, 17(6): 500-503.
- [15] TENG J F, MEI Q B, ZHOU X G, et al. Polyphyllin VI induces caspase-1-mediated pyroptosis via the induction of ROS/NF- κ B/NLRP3/GSDMD signal axis in non-small cell lung cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(1): 193.
- [16] TANG Y S, ZHAO Y H, ZHONG Y, et al. Neferine inhibits LPS-ATP-induced endothelial cell pyroptosis via regulation of ROS/NLRP3/Caspase-1 signaling pathway[J]. *Inflamm Res*, 2019, 68(9): 727-738.
- [17] ZHAO T F, XU K, WU Q H, et al. Duraplasty of PHBV/PLA/Col membranes promotes axonal regeneration by inhibiting NLRP3 complex and M1 macrophage polarization in rats with spinal cord injury[J]. *FASEB J*, 2020, 34(9): 12147-12162.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 高迎吉, 朱中蛟, 杨秀玲. 外泌体源性 microRNA-124 对急性创伤性脊髓损伤大鼠脊髓小胶质细胞活化及炎症反应的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(18): 32-38.

Cite this article as: GAO Y J, ZHU Z J, YANG X L. Effects of exosomal miR-124 on microglial activation and inflammation of spinal cord in rats with acute traumatic spinal cord injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(18): 32-38.