

miR-146a-3p 抑制胰岛素样生长因子 1 表达调控星形胶质细胞增殖、迁移和凋亡

叶嘉鹏¹, 王建伟², 吴毛², 李绍烁², 汪国澎¹, 王浩渊¹, 唐志¹, 邵阳²

<https://doi.org/10.12307/2024.174>

投稿日期: 2023-05-12

采用日期: 2023-06-25

修回日期: 2023-07-14

在线日期: 2023-07-29

中图分类号:

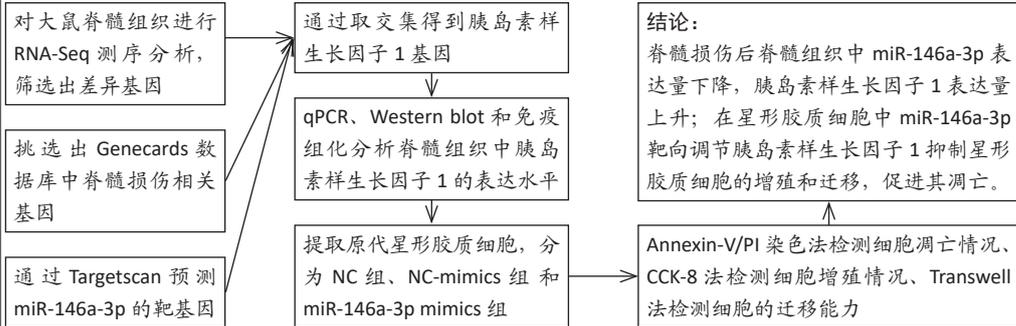
R459.9; R364.3; Q25

文章编号:

2095-4344(2024)25-04048-06

文献标识码: B

文章快速阅读: miR-146a-3p 通过胰岛素样生长因子 1 调控星形胶质细胞的增殖、迁移和凋亡



文题释义:

反应性星形胶质细胞: 是由星形胶质细胞通过特定信号调节活化而来, 分为2种亚型, 一种为神经毒性反应型A1, 另一种为神经保护性反应型A2。

胰岛素样生长因子1: 也被称作促生长因子, 是一种在分子结构上与胰岛素类似的多肽蛋白质, 发挥促进细胞生长和抑制凋亡等作用。

摘要

背景: miR-146a-3p水平改变是大多数神经系统疾病发病机制中的常见事件, miR-146a-3p调节星形胶质细胞的具体机制尚未被研究。

目的: 验证miR-146a-3p通过胰岛素样生长因子1调控星形胶质细胞的增殖、迁移和凋亡。

方法: 将12只SD大鼠随机分为假手术组和脊髓损伤组, 每组6只。术后2周对大鼠脊髓组织进行了RNA-Seq测序分析, 筛选出差异基因($\log_2FC > 2$), 同时挑选出Genecards数据库中脊髓损伤相关基因(Score > 20), 再通过Targetscan预测miR-146a-3p的靶基因, 取这3个基因交集, 筛选出胰岛素样生长因子1为其中一个重要的目的基因。qPCR、Western blot和免疫组化分析脊髓组织中胰岛素样生长因子1的表达水平。将原代星形胶质细胞分为NC组、NC-mimics组和miR-146a-3p mimics组, 用Annexin-V/PI染色法检测细胞凋亡情况、CCK-8法检测细胞增殖情况、Transwell法检测细胞的迁移能力。

结果与结论: 脊髓损伤组大鼠脊髓组织中miR-146a-3p的表达较假手术组下降($P < 0.05$), 胰岛素样生长因子1的表达较假手术组上升($P < 0.05$)。与NC组和NC-mimics组比较, miR-146a-3p mimics组星形胶质细胞凋亡率增加($P < 0.01$), 增殖能力下降($P < 0.01$), 迁移数量减少($P < 0.01$)。结果表明, 脊髓损伤后脊髓组织中miR-146a-3p表达量下降, 胰岛素样生长因子1表达量上升; 在星形胶质细胞中miR-146a-3p靶向调节胰岛素样生长因子1抑制星形胶质细胞的增殖和迁移, 促进其凋亡。

关键词: 脊髓损伤; miR-146a-3p; 胰岛素样生长因子1; 星形胶质细胞; 胶质瘢痕

miR-146a-3p regulates astrocyte proliferation, migration and apoptosis by inhibiting insulin-like growth factor 1 expression

Ye Jiapeng¹, Wang Jianwei², Wu Mao², Li Shaoshuo², Wang Guopeng¹, Wang Haotian¹, Tang Zhi¹, Shao Yang²

¹Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China; ²Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi 214071, Jiangsu Province, China

Ye Jiapeng, Doctoral candidate, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Shao Yang, MD, Associate chief physician, Wuxi Traditional Chinese Medicine Hospital, Wuxi 214071, Jiangsu Province, China

Abstract

BACKGROUND: The alteration of miR-146a-3p level is a common event in the pathogenesis of most neurological diseases, and the specific mechanism of miR-146a-3p regulation of astrocytes has not been studied.

OBJECTIVE: To verify that miR-146a-3p regulates astrocyte proliferation, migration and apoptosis through insulin-like growth factor 1.

¹南京中医药大学, 江苏省南京市 210023; ²无锡市中医医院, 江苏省无锡市 214071

第一作者: 叶嘉鹏, 男, 1993年生, 江苏省常州市人, 汉族, 南京中医药大学中医骨伤科学在读博士, 主要从事中医药治疗脊髓损伤的研究。

通讯作者: 邵阳, 博士, 副主任中医师, 无锡市中医医院, 江苏省无锡市 214071

<https://orcid.org/0000-0003-0639-5827> (叶嘉鹏)

基金资助: 江苏省中医药科技发展计划项目(YB2020042), 项目负责人: 邵阳; 无锡市科学技术局医疗卫生指导性项目(SKJZD19), 项目负责人: 邵阳;

无锡市卫生健康委科研项目(Q201945), 项目负责人: 邵阳; 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX22_2061), 项目负责人:

叶嘉鹏

引用本文: 叶嘉鹏, 王建伟, 吴毛, 李绍烁, 汪国澎, 王浩渊, 唐志, 邵阳. miR-146a-3p 抑制胰岛素样生长因子 1 表达调控星形胶质细胞增殖、迁移和凋亡 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(25):4048-4053.



METHODS: 12 SD rats were divided into a sham operation group and a spinal cord injury group, with six rats in each group. RNA sequencing analysis was performed on the spinal cord tissues of all groups 2 weeks after surgery to screen out the differential genes ($\log_2FC > 2$), and to select spinal cord injury-related genes (Score > 20) in the Genecards database, and then to predict the target genes of miR-146a-3p by Targetscan. The intersection of three gene sets was obtained to screen out insulin-like growth factor 1 as one of the important target genes. qPCR, western blot assay and immunohistochemistry were performed to analyze the expression level of insulin-like growth factor 1 in spinal cord tissues. The primary astrocytes were divided into NC group, NC-mimics group and miR-146a-3p mimics group. Annexin-V/PI staining was used to detect cell apoptosis. CCK-8 assay was used to detect cell proliferation. Transwell assay was used to detect cell migration ability.

RESULTS AND CONCLUSION: The expression of miR-146a-3p in the spinal cord tissue of the spinal cord injury group was lower than that of the sham operation group ($P < 0.05$). The expression of insulin-like growth factor 1 in the spinal cord tissue of the spinal cord injury group was higher than that of the sham operation group ($P < 0.05$). Compared with the NC group and NC-mimics group, the apoptotic rate of astrocytes was increased ($P < 0.01$); the proliferation of astrocytes was decreased ($P < 0.01$) and the number of migration was decreased ($P < 0.01$) in the miR-146a-3p mimics group. To conclude, the expression of miR-146a-3p decreased and the expression of insulin-like growth factor 1 increased in spinal cord tissue after spinal cord injury. miR-146a-3p targeted regulation of insulin-like growth factor 1 in astrocytes, inhibited the proliferation and migration of astrocytes and promoted their apoptosis.

Key words: spinal cord injury; miR-146a-3p; insulin-like growth factor 1; astrocyte; glial scar

Funding: Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Science and Technology Development Project, No. YB2020042 (to SY); Wuxi Science and Technology Bureau Medical and Health Guidance Project, No. SKJJZD19 (to SY); Scientific Research Project of Wuxi Health Commission, No. Q201945 (to SY); Jiangsu Graduate Research and Practice Innovation Program, No. KYCX22_2061 (to YJP)

How to cite this article: YE JP, WANG JW, WU M, LI SS, WANG GP, WANG HT, TANG Z, SHAO Y. miR-146a-3p regulates astrocyte proliferation, migration and apoptosis by inhibiting insulin-like growth factor 1 expression. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2024;28(25):4048-4053.

0 引言 Introduction

脊髓损伤是世界范围内最常见的死亡和致残原因之一。全球脊髓损伤发病率为每年每百万人中有 8-246 人^[1]。脊髓损伤患者的平均年龄为 39.4-50.1 岁,男女比例为 (3-3.4) : 1, 主要原因是跌倒, 其次是机动车事故, 最常见的损伤部位是颈髓^[2-4]。

脊髓损伤的病理过程分 2 个阶段: 第 1 阶段为神经实质的破坏、轴突网络的破坏、出血和神经胶质膜的破坏, 第 2 阶段是继发性损伤^[5]。胶质瘢痕阻碍轴突再生和功能恢复, 被认为是导致中枢神经系统再生能力受限的主要原因^[6]。在脊髓损伤之后, 星形胶质细胞被激活为不可逆的反应性星形胶质细胞, 并形成瘢痕抑制损伤后炎症的发展, 形成轴突再生的物理和化学屏障。脊髓损伤后通过抑制反应性星形胶质细胞的发生和发展可以影响损伤恢复过程^[7]。反应性星形胶质细胞表现出增生的功能, 细胞体和突起的特征性肥大, 对脊髓损伤同时存在有益和不利的影 响^[8]。最新的一项研究发现至少 3 个星形胶质细胞亚群存在于正常未受伤的脊髓中, 受伤后不同的星形胶质细胞亚群汇聚成反应性星形胶质细胞的特征, 波形蛋白、胶质纤维酸性蛋白和巢蛋白呈阳性并且细胞正在分裂^[9]。

越来越多的证据表明 miRNAs 已经成为脊髓损伤的重要调控分子^[10-13]。miRNAs 对星形胶质细胞有着重要的调控作用, 例如过表达 miR-29a 能抑制水通道蛋白 4 的表达, 抑制星形胶质细胞凋亡^[14], 反应性星形胶质细胞内的 miR-130a-5p 通过沉默母体表达基因 3 来加重神经性疼痛^[15], miR-210 对星形胶质细胞有抗炎和促糖酵解作用^[16]。同样其他细胞来源 miRNAs 也能调控星形胶质细胞的功能^[17-18]。该研究通过生物信息学方法筛选出脊髓损伤过程中胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)mRNA 是 miR-146a-3p 的一个靶分子, 并验证 miR-146a-3p 通过 IGF-1 调控星形胶质细胞的增殖、迁移和凋亡。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验, 运用 t 检验进行组间比较。

1.2 时间及地点 实验于 2021 年 1-12 月在无锡市中医医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 新生 1-3 d 的雌性 SD 大鼠 5 只, 体质量 5-15 g; 6 周龄雌性 SD 大鼠 12 只, 体质量 180-200 g, 均购自青龙山动物养殖场, 实验动物许可证编号为 SCXK 2019-0002, 饲养于江苏省血吸虫病防治研究所。

1.3.2 实验试剂 戊巴比妥钠 (中国医药集团上海化学试剂有限公司); RIPA 缓冲液 (含蛋白酶和磷酸酶抑制剂)(Sigma-Aldrich); BCA 蛋白测定试剂盒 (Beyotime); 一抗 IGF-1 (Abcam) 和一抗 GAPDH (Abcam) 用于 Western blot 实验; 一抗 IGF-1 (Thermo) 用于免疫组化实验; 一抗胶质纤维酸性蛋白 (Proteintech) 用于免疫荧光实验; 辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的抗兔二抗 (Abcam); CoraLite488- 偶联的抗兔 IgG (H+L) (Proteintech); ECL 蛋白印迹检测试剂 (Tanon Science and Technology); 质粒 (GenePharma)。

1.4 方法

1.4.1 动物实验 该研究方案获得无锡市中医院动物伦理委员会批准 (伦理号 SZYYKJFZJH2020111810)。将 6 周龄 SD 大鼠随机分为假手术组和脊髓损伤组, 每组 6 只, 使用基于改进的 Allen 法构建急性脊髓损伤模型^[15]。所有大鼠均腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 用手从大鼠的肋骨向脊柱摸动, 确定 T₁₃ (与第 13 肋骨连接) 的位置, 再沿脊柱棘突向前, 确定 T₁₀ 的位置, 手术暴露脊髓 T_{9,11} 节段, 用脊髓叩击器 (RWD 公司) 撞击脊髓 T₁₀ 节段, 坠物质量和直径分别为 10 g 和 2.5 mm, 坠落高度和深度分别为 10 cm 和 2 mm, 大鼠后肢张力立即消除, 无可观察到的后肢运动, 表明模型建立成功。假手术组仅暴露脊髓, 但不损伤脊髓。肌肉和皮肤缝合后, 应用红霉素预防感染。在受伤后的第 14 天予以安乐死, 采集损伤处的脊髓组织, 保存至 -80 °C 冰箱。

1.4.2 转录组测序和生物信息学分析 对假手术组、脊髓损伤组脊髓组织 RNA-Seq 测序后的数据进行聚类分析, 利用 DESeq2 计算差异基因, 以 \log_2FC 绝对值大于 2 且 $P\text{-adj} < 0.05$ 为标准筛选差异基因, 得到上调基因、下调基因。利用

TargetScan 数据库预测 miR-146a-3p 的潜在靶基因。将这些潜在靶基因与测得的差异基因和 Genecards 数据库中脊髓损伤的靶基因进行交集得到 miR-146a-3p 可能调控的目的基因。

1.4.3 qPCR 检测 脊髓组织样本从 -80 °C 冰箱取出后转移至 1.5 mL 离心管中，加入 200 μ L Trizol，用小剪刀将组织剪碎，再往其中加入 800 μ L Trizol 并混匀，置于冰上静置 5 min，加入 200 μ L 氯仿，振荡混匀，冰上静置 3 min，4 °C，12 000 \times g 离心 15 min，将上清层转移到一干净的 1.5 mL 离心管中，加入等体积冰浴的异丙醇，颠倒振荡混匀，将混合的样品在 -20 °C 条件下孵育 10 min 以上，4 °C，12 000 \times g 离心 10 min，弃去上清，加入冰浴的 1 mL 体积分数 75% 乙醇，颠倒洗涤离心管管壁，并旋涡振荡样品，尽可能让沉淀悬浮，4 °C，12 000 \times g 离心 5 min，再次去除上清，在阴凉处晾干沉淀，加 50 μ L DEPC 水溶解 RNA，反转录后根据试剂盒说明进行 qPCR。数据使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算分析。表 1。

表 1 | 引物序列

Table 1 | Primer sequences

| 基因 | 引物序列 (5' 端到 3' 端) |
|---------------|--|
| miR-146a-3p-R | CTC AAC TGG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TCA GTT GAG AAA GAA CT |
| miR-146a-3p-F | GCC GAG ACC TGT GAA GTT C |
| IGF-1-F | CAG TTC GTG TGT GGA CCA AG |
| IGF-1-R | TGA GTC TTG GGC ATG TCA G |
| GAPDH-F | CTG AGC ACT CTC CCT CAC AAT TC |
| GAPDH-R | GTG CAG CGA ACT TTA TTG ATG GT |

表注：IGF-1 为胰岛素样生长因子 1。

1.4.4 Western blot 检测 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 缓冲液从脊髓组织中提取总蛋白，用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度，用 10% SDS-PAGE 分离组织蛋白，转移到 PVDF 膜上，用 5% 脱脂牛奶和 0.1% Tween-20 在 tris 缓冲盐水中室温封闭 2 h，加入一抗 IGF-1 (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 2 500) 在 4 °C 下孵育过夜，随后在 PBST (0.5% Tween-20) 中清洗 3 次，将印迹与辣根过氧化物酶偶联的抗兔二抗 (1 : 5 000) 在室温下孵育 1 h，用 ECL 蛋白印迹检测试剂观察信号，用 Image J 软件 (version 1.50; National Institutes of Health) 定量蛋白表达水平。

1.4.5 免疫组化检测 将大鼠脊髓组织样本固定包埋并切片进行免疫组化实验检测 IGF-1 蛋白的表达，用 Olympus CKX53 倒置显微镜拍照。

1.4.6 原代脊髓星形胶质细胞提取、鉴定与培养 在无菌条件下取新生 SD 大鼠脊髓组织，机械吹打后用 0.25% 胰酶消化 30 min，加入胎牛血清后混匀，终止消化，室温 1 200 r/min 离心 5 min，弃去上清，加入含体积分数 10% 胎牛血清、1% 青霉素 - 链霉素的高糖 DMEM 培养基吹打混匀，使用 200 目筛网过滤，利用差速贴壁法去除杂细胞，接种于 T25 培养瓶中，显微镜下观察细胞形态，并进行胶质纤维酸性蛋白免疫荧光染色，鉴定为脊髓星形胶质细胞。原代细胞长满 90% 进行传代，取第 3 代对数生长期的细胞进行后续实验。

1.4.7 双荧光素酶报告实验 将培养好的第 3 代脊髓星形胶质细胞接种于 24 孔培养板中 (1×10^5 / 孔)，分为 IGF1-WT+NC-

mimics 组 (野生型 IGF1 质粒 + mimics 阴性对照)、IGF1-WT+miR-146a-3p mimics 组 (野生型 IGF1 质粒 + miR-146a-3p)、IGF1-MUT+NC-mimics 组 (突变型 IGF1 质粒 + mimics 阴性对照) 和 IGF1-MUT+miR-146a-3p mimics 组 (突变型 IGF1 质粒 + miR-146a-3p)，置于细胞培养箱中培养过夜。待细胞贴壁后吸弃培养基，用 PBS 清洗 2 遍，再加入 500 μ L 无血清高糖 DMEM 培养基待用，根据转染试剂说明书按每组加入 1 μ g WT 质粒 (含有荧光素酶报告基因的野生型 IGF1 质粒) 或 MUT 质粒 (含有荧光素酶报告基因的突变型 IGF1 质粒)、20 pmol miR-146a-3p mimics 或 mimics 阴性对照共转染入细胞中。转染 5 h 后，加入体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基继续培养 48 h，收集细胞并用荧光素酶报告基因检测试剂盒进行荧光素酶活性分析。

1.4.8 细胞增殖检测 将第 3 代脊髓星形胶质细胞分为 NC 组、NC-mimics 组和 miR-146a-3p mimics 组，根据转染试剂说明书加入 20 pmol miR-146a-3p mimics 或 mimics 阴性对照转染 5 h，将转染好的脊髓星形胶质细胞以每孔 1×10^4 个细胞密度接种于 96 孔细胞培养板，用含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基，放入 37 °C 细胞培养箱中过夜培养，去除旧培养液，加入 100 μ L 含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基；在换液后 0，24，48，72 h 每孔加入 95 μ L 无血清高糖 DMEM 培养基和 5 μ L CCK-8，37 °C 孵育 2 h，使用酶标仪测定 450 nm 波长处的吸光度值。

1.4.9 细胞凋亡检测 将第 3 代脊髓星形胶质细胞分为 NC 组、NC-mimics 组和 miR-146a-3p mimics 组，根据转染试剂说明书加入 20 pmol miR-146a-3p mimics 或 mimics 阴性对照转染 5 h，将转染好的脊髓星形胶质细胞以每孔 1×10^5 个细胞密度接种于 24 孔培养板中，放入 37 °C 细胞培养箱中培养 48 h；加入 0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化收集细胞；PBS 润洗细胞 2 次，用结合液洗涤细胞 1 次；加入结合液重悬细胞，调整细胞浓度为 1×10^6 L⁻¹；取 100 μ L 细胞悬液，加入 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L Propidium Iodide，混匀；室温、避光反应 15-20 min；加入结合液至 500 μ L，混匀，上流式细胞仪观察和检测。

1.4.10 细胞迁移实验 将第 3 代脊髓星形胶质细胞分为 NC 组、NC-mimics 组和 miR-146a-3p mimics 组，根据转染试剂说明书加入 20 pmol miR-146a-3p mimics 或 mimics 阴性对照转染 5 h，将转染好的脊髓星形胶质细胞以 5×10^4 / 孔的密度用不含血清的高糖 DMEM 培养基接种于 24 孔板 Transwell 上室，下室加入 500 μ L 含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基，于 37 °C 培养 48 h，擦除未迁移的细胞，5% 戊二醛室温固定 10 min，用 0.5% 结晶紫染色，Olympus CKX53 倒置显微镜拍照。

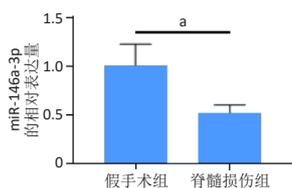
1.5 主要观察指标 ① 各组脊髓组织中 miR-146a-3p 的表达；② 转录组测序和生物信息学分析结果；③ qPCR、Western blot 和免疫组化检测脊髓组织中 IGF-1 表达变化；④ 双荧光素酶报告实验验证 miR-146a-3p 与 IGF-1 的靶向关系；⑤ 各

组脊髓星形胶质细胞的凋亡情况；⑥各组脊髓星形胶质细胞的增殖情况；⑦各组脊髓星形胶质细胞的迁移情况。

1.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布及方差齐时，多组间差异采用单因素方差分析，两组间差异采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。文章统计学方法已经通过无锡市中医医院生物统计学专家审核。

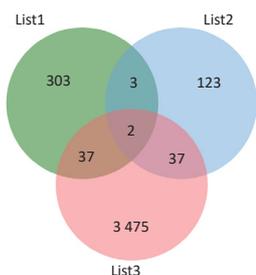
2 结果 Results

2.1 miR-146a-3p 在脊髓损伤后的表达 qPCR 结果显示：与假手术组相比，脊髓损伤组 miR-146a-3p 表达水平显著下降 ($P < 0.05$)，见图 1。



图注：^a $P < 0.05$ 。
图 1 | 脊髓损伤后脊髓组织中 miR-146a-3p 的表达量变化
Figure 1 | Changes in miR-146a-3p expression in the spinal cord tissue after spinal cord injury

2.2 转录组测序和生物信息学方法预测脊髓损伤后 miR-146a-3p 的靶基因 利用 TargetScan 数据库预测 miR-146a-3p 的潜在靶基因，并与脊髓损伤后 345 个 $\log_2FC > 2$ 的上调差异基因和 Genecards 数据库中 Score > 20 的脊髓损伤靶基因取交集得到 IGF-1 和 Serpine1 两个基因，见图 2。



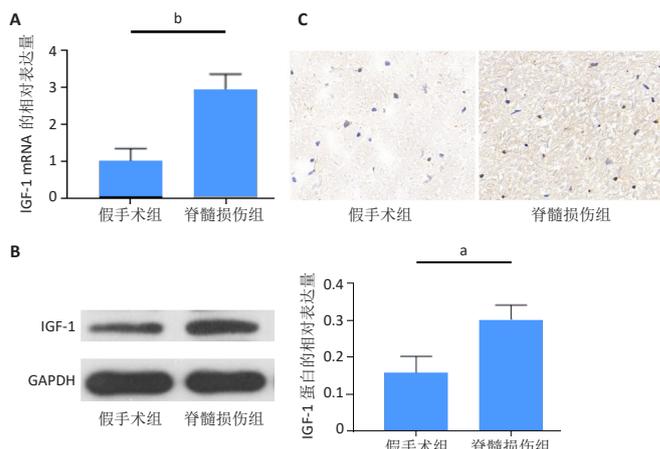
图注：List1 为脊髓损伤后 $\log_2FC > 2$ 的上调差异基因；List2 为 Genecards 数据库中脊髓损伤相关基因；List3 为 Targetscan 预测 miR-146a-3p 的靶基因。
图 2 | 绘制韦恩图预测脊髓损伤模型中 miR-146a-3p 可能的靶基因
Figure 2 | Possible target genes of miR-146a-3p in the spinal cord injury model predicted by drawing Venn diagram

2.3 脊髓损伤后 IGF-1 的表达 qPCR 结果显示：与假手术组相比，脊髓损伤组 IGF-1 表达水平显著上升 ($P < 0.05$)，见图 3A。Western blot 结果显示：与假手术组相比，脊髓损伤组 IGF-1 蛋白表达量显著上升 ($P < 0.05$)，见图 3B。免疫组化结果显示：与假手术组相比，脊髓损伤组 IGF-1 蛋白表达量上升，见图 3C。

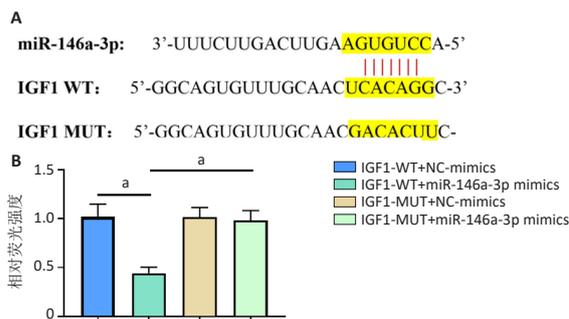
2.4 双荧光素酶报告基因检测结果 查找 Starbase 数据库发现 miR-146a-3p 的 5' 端和 IGF-1 的 3' 端存在互补序列，见图 4A。双荧光素酶报告基因检测结果表明，与 NC 组相比，miR-146a-3p mimics 显著抑制了 IGF1-WT 报告分子的荧光素酶活性 ($P < 0.01$)，见图 4B，对 IGF1-MUT 报告分子的荧光素酶活性无显著影响。

2.5 miR-146a-3p 影响脊髓星形胶质细胞增殖、迁移、凋亡 免疫荧光结果显示：脊髓星形胶质细胞呈现出星形和梭形，胶质纤维酸性蛋白阳性细胞数 > 95%，见图 5A。流式细胞仪检测表明 miR-146a-3p 会明显促进脊髓星形胶质细胞凋亡

($P < 0.001$)，见图 5B。同样，CCK-8 检测结果表明 miR-146a-3p 会显著抑制脊髓星形胶质细胞增殖 (48 h, $P < 0.01$; 72 h, $P < 0.001$)，见图 5C。Transwell 结果显示 miR-146a-3p 会显著抑制脊髓星形胶质细胞的迁移能力 ($P < 0.01$)，见图 5D。



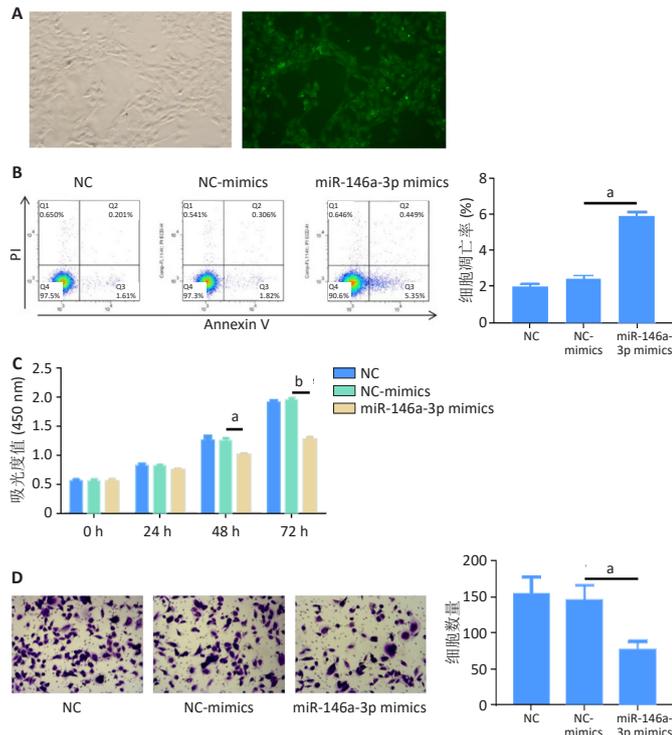
图注：图 A 为 PCR 检测脊髓组织中 IGF-1 mRNA 表达；B 为 Western blot 检测脊髓组织中 IGF-1 蛋白表达；C 为免疫组化检测脊髓组织中 IGF-1 的表达 ($\times 200$)。^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.01$ 。
图 3 | 脊髓组织中胰岛素样生长因子 1(IGF-1) 的表达情况
Figure 3 | Expression of insulin-like growth factor 1 in spinal cord tissue



图注：图 A 为 miR-146a-3p 的 5' 端和 IGF1 的 3' 端存在互补序列；B 为 miR-146a-3p mimic 对野生型和突变型 IGF1 双荧光素酶活性的影响。IGF-1：胰岛素样生长因子 1。^a $P < 0.01$ 。
图 4 | 双荧光素酶报告实验
Figure 4 | Dual luciferase reporter assay

3 讨论 Discussion

miR-146a 水平改变是大多数神经系统疾病发病机制中的常见事件，无论内源性 miR-146a 的表达如何变化，外源性增加 miR-146a 水平都会逆转大多数神经系统疾病的过程^[19]。miR-146a 靶向一些星形胶质细胞特异性 mRNA，促进神经干细胞向星形胶质细胞分化^[20]。抑制 miR-146a 可防止星形胶质细胞诱导的运动神经元丢失^[21]。星形胶质细胞内的 miR-146a-3p 与水通道蛋白 4 相互作用促进脑出血后的损伤修复^[22]。然而，现有研究没有证据表明 miR-146a-3p 调节星形胶质细胞的具体机制。因此，作者推测 miR-146a-3p 下调一些 mRNA 来调控星形胶质细胞的功能。为了验证这一假设并确定 miR-146a-3p 对神经功能恢复的影响，通过 RNA-Seq 测序筛选出脊髓损伤的差异基因，并结合 Genecards 数据库探索 miR-146a-3p 调控星形胶质细胞的具体机制，见图 6。



图注：图 A 为脊髓星形胶质细胞胶质纤维酸性蛋白免疫荧光染色（左侧为明场图像，右侧为免疫荧光图像， $\times 200$ ）；B 为 miR-146a-3p 对脊髓星形胶质细胞凋亡的影响；C 为 miR-146a-3p 对脊髓星形胶质细胞增殖的影响；D 为 miR-146a-3p 对脊髓星形胶质细胞迁移的影响 ($\times 100$)。* $P < 0.01$, ^b $P < 0.001$ 。

图 5 | miR-146a-3p 对脊髓星形胶质细胞凋亡、增殖和迁移的影响
Figure 5 | Effects of miR-146a-3p on apoptosis, proliferation and migration of astrocytes

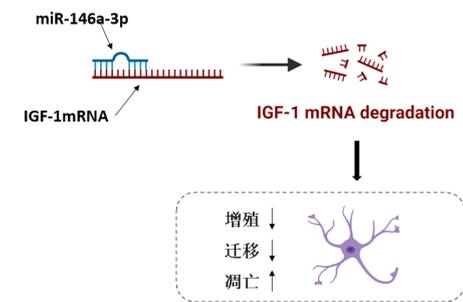


图 6 | miR-146a-3p 调控脊髓星形胶质细胞的具体机制
Figure 6 | Specific mechanism of miR-146a-3p on regulating astrocytes

脊髓损伤后，与氧化应激、炎症、自噬和细胞凋亡等继发性损伤相关的非编码 RNAs 出现显著差异表达，导致靶基因表达差异和细胞功能发生变化。星形胶质细胞中的 miR-146a-3p 参与许多神经系统疾病的发生发展，然而其对星形胶质细胞的具体作用尚未明确。此次实验研究 miR-146a-3p 在脊髓损伤中的具体作用及其相关机制，qPCR 结果提示脊髓损伤后脊髓组织中的 miR-146a-3p 表达量降低，通过 RNA-Seq 测序、生物信息学方法发现纤溶酶原激活物抑制因子 1 (plasminogen activator inhibitor 1/serpin family E member 1, Serpine1) 和 IGF-1 可能是 miR-146a-3p 调控的靶基因。目前鲜有研究报道 Serpine1 与脊髓损伤和脊髓星形胶质细胞的关系，而 IGF-1 对脊髓损伤和脊髓星形胶质细胞的功能有重要的影响。

IGF-1 信号通路是一种高度保守的调节模块，可协调

生长、发育和代谢，它调节多种细胞过程，包括增殖、分化、能量代谢等。IGF-1 作为配体与细胞膜中的 IGF-1 受体相互作用，激活下游的磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路，促进一系列转录因子的表达，参与多种细胞过程，包括蛋白质合成、葡萄糖代谢和细胞存活等^[23]。IGF-1 过表达可改善脊髓损伤后的运动功能^[24]。IGF-1 的局部递送显著促进运动功能恢复，增加损伤部位的神经元数量^[25]。IGF-1 通过 PI3K/Akt/ 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路抑制自噬促进脊髓损伤后神经功能恢复^[26]。双荧光素酶报告基因实验发现并验证 IGF-1 是 miR-146a-3p 调控的靶基因，qPCR、Western blot 和免疫组化结果均发现 IGF-1 在脊髓损伤后表达上升。由此可以证明脊髓损伤后 miR-146a-3p 表达下降，并靶向调节 IGF-1，使得 IGF-1 表达量上升。

多项研究发现 IGF-1 对星形胶质细胞的凋亡、增殖等方面有着多重的调控作用^[27-31]。由于 miR-146a-3p 可以抑制 IGF-1 的表达，在体外实验中通过流式细胞术检测发现 miR-146a-3p 可以促进脊髓星形胶质细胞凋亡，通过 Transwell 实验发现 miR-146a-3p 抑制脊髓星形胶质细胞的迁移，通过 CCK-8 研究发现 miR-146a-3p 抑制脊髓星形胶质细胞的增殖。

脊髓损伤后星形胶质细胞增殖导致局部组织增生性反应、炎症反应以及随后形成胶质瘢痕，这些瘢痕可能是轴突再生的物理屏障^[32]。抑制 I 型胶原蛋白生成的药物可阻断反应性星形胶质细胞产生瘢痕^[33]。然而最近有研究表明星形胶质细胞增殖在脊髓损伤后可能起积极作用^[34]。在小鼠脊髓损伤模型中消融反应性星形胶质细胞会阻碍胶质瘢痕的形成，并导致炎症细胞的广泛浸润，增加神经元损失和组织退化^[35]，可见星形胶质细胞对脊髓损伤的进展有着双重作用，有研究认为胶质瘢痕 2 周内达到最大的保护作用，此后其抑制作用逐渐加强^[36]。与亚急性期的瘢痕星形胶质细胞相比，慢性期星形胶质细胞性别决定区域 Y 相关的高迁移率转录因子 9 (SRY-related HMG box family of transcription factor 9, Sox9) 的表达显著增加。此外，慢性期星形胶质细胞中硫酸软骨素蛋白多糖相关基因的表达显著低于亚急性期的星形胶质细胞^[37]。有研究使用单细胞 RNA 测序发现了 6 种星形胶质细胞亚型 Atp1b2⁺、S100a4⁺、Gpr84⁺、C3⁺/G0s2⁺、GFAP⁺/Tm4sf1⁺、Gss⁺/Cryab⁺，并确定损伤部位形态和生理上不同的星形胶质细胞群的分布，确定了脊髓损伤后每个星形胶质细胞亚型的动态进化过程^[38]。此外，星形胶质细胞可以分化成 2 种形式的反应性星形胶质细胞，称为 A1 和 A2 星形胶质细胞。A1 星形胶质细胞释放细胞毒性化学物质，导致神经元和少突胶质细胞死亡并发挥有害作用；A2 星形胶质细胞可以产生神经营养因子并充当神经保护剂^[39]，调节 A1/A2 反应性星形胶质细胞的转化可促进脊髓损伤后的修复^[40]。而 A2 星形胶质细胞移植可能是一种很有前途的脊髓损伤治疗方法^[41]。

综上，该研究发现脊髓损伤后 miR-146a-3p 的表达量

下降, miR-146a-3p 通过下调 IGF-1 抑制脊髓星形胶质细胞的增殖和迁移, 并促进凋亡。由于脊髓损伤后星形胶质细胞活化产生的胶质瘢痕在早期限制炎症的浸润, 但后期增生的胶质瘢痕会抑制轴突再生。因此脊髓星形胶质细胞内 miR-146a-3p 通过调节 IGF-1 对脊髓损伤预后的具体影响以及是否在脊髓损伤的不同阶段发挥不同的作用, 这需要进一步的实验研究。

作者贡献: 叶嘉鹏负责实验实施、论文撰写, 李绍烁和汪国澎负责实验数据分析处理, 王浩润和唐志负责细胞培养、指标检测, 王建伟和吴毛负责论文的审阅和修改, 邵阳负责实验设计、数据和文章的校对。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

出版规范: 该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》; 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次文字和图表查重; 文章经小同行外审专家双盲审稿, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- FAN Q, CAVUS O, XIONG L, et al. Spinal Cord Injury: How Could Acupuncture Help? *J Acupunct Meridian Stud.* 2018;11(4):124-132.
- FENG H, XU H, ZHANG H, et al. Epidemiological profile of 338 traumatic spinal cord injury cases in Shandong province, China. *Spinal Cord.* 2022; 60(7):635-640.
- CHEN J, CHEN Z, ZHANG K, et al. Epidemiological features of traumatic spinal cord injury in Guangdong Province, China. *J Spinal Cord Med.* 2021; 44(2):276-281.
- KHADOUR FA, KHADOUR YA, MENG L, et al. Epidemiological features of traumatic spinal cord injury in Wuhan, China. *J Orthop Surg Res.* 2023;18(1):72.
- ANJUM A, YAZID MD, FAUZI DAUD M, et al. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2020;21(20):7533.
- SILVER J, MILLER JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(2):146-156.
- ORR MB, GENSEL JC. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses. *Neurotherapeutics.* 2018;15(3):541-553.
- LI X, LI M, TIAN L, et al. Reactive Astroglia: Implications in Spinal Cord Injury Progression and Therapy. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:9494352.
- LI C, WU Z, ZHOU L, et al. Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):65.
- ZHANG C, WANG MM, ZHANG Y, et al. Downregulation of miRNA-127-5p aggravates spinal cord injury through activating MAPK1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(24):10617-10622.
- PINCHI E, FRATI A, CANTATORE S, et al. Acute Spinal Cord Injury: A Systematic Review Investigating miRNA Families Involved. *Int J Mol Sci.* 2019;20(8):1841.
- GUO XD, HE XG, YANG FG, et al. Research progress on the regulatory role of microRNAs in spinal cord injury. *Regen Med.* 2021;16(5):465-476.
- YU DS, LV G, MEI XF, et al. MiR-200c regulates ROS-induced apoptosis in murine BV-2 cells by targeting FAP-1. *Spinal Cord.* 2015;53(3):182-189.
- 朱琳, 郭世武, 刘锦波, 等. miR-29a 调控水通道蛋白 4 抑制过氧化氢诱导的星形胶质细胞凋亡 [J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(19):2993-2998.
- DONG J, XIA R, ZHANG Z, et al. lncRNA MEG3 aggravated neuropathic pain and astrocyte overreaction through mediating miR-130a-5p/CXCL12/CXCR4 axis. *Aging (Albany NY).* 2021;13(19):23004-23019.
- KIERAN NW, SURESH R, DORION MF, et al. MicroRNA-210 regulates the metabolic and inflammatory status of primary human astrocytes. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):10.
- NAKANO M, KUBOTA K, KOBAYASHI E, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells improve cognitive impairment in an Alzheimer's disease model by increasing the expression of microRNA-146a in hippocampus. *Sci Rep.* 2020;10(1):10772.

- JIANG D, GONG F, GE X, et al. Neuron-derived exosomes-transmitted miR-124-3p protect traumatically injured spinal cord by suppressing the activation of neurotoxic microglia and astrocytes. *J Nanobiotechnology.* 2020;18(1):105.
- FAN W, LIANG C, OU M, et al. MicroRNA-146a Is a Wide-Reaching Neuroinflammatory Regulator and Potential Treatment Target in Neurological Diseases. *Front Mol Neurosci.* 2020;13:90.
- JOVIČIĆ A, ROSHAN R, MOISOI N, et al. Comprehensive expression analyses of neural cell-type-specific miRNAs identify new determinants of the specification and maintenance of neuronal phenotypes. *J Neurosci.* 2013;33(12):5127-5137.
- SISON SL, PATITUCCI TN, SEMINARY ER, et al. Astrocyte-produced miR-146a as a mediator of motor neuron loss in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2017;26(17):3409-3420.
- ZHANG H, WANG Y, LIAN L, et al. Glycine-Histidine-Lysine (GHK) Alleviates Astrocytes Injury of Intracerebral Hemorrhage via the Akt/miR-146a-3p/AQP4 Pathway. *Front Neurosci.* 2020;14:576389.
- JUNG HJ, SUH Y. Regulation of IGF-1 signaling by microRNAs. *Front Genet.* 2015;5:472.
- TALIFU Z, QIN C, XIN Z, et al. The Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 and Neurotrophin-3 Promote Functional Recovery and Alleviate Spasticity After Spinal Cord Injury. *Front Neurosci.* 2022;16:863793.
- PAN S, QI Z, LI Q, et al. Graphene oxide-PLGA hybrid nanofibres for the local delivery of IGF-1 and BDNF in spinal cord repair. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2019;47(1):651-664.
- ZHANG D, YUAN Y, ZHU J, et al. Insulin-like growth factor 1 promotes neurological functional recovery after spinal cord injury through inhibition of autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2021;22(5):1265.
- ZHAO Z, ZHANG L, GUO XD, et al. Rosiglitazone Exerts an Anti-depressive Effect in Unpredictable Chronic Mild-Stress-Induced Depressive Mice by Maintaining Essential Neuron Autophagy and Inhibiting Excessive Astrocytic Apoptosis. *Front Mol Neurosci.* 2017;10:293.
- BURKHARDT U, WOJCIK B, ZIMMERMANN M, et al. Phospholipase D is a target for inhibition of astroglial proliferation by ethanol. *Neuropharmacology.* 2014;79:1-9.
- ZHAO L, ZHANG B, HUANG S, et al. Insulin-Like Growth Factor-1 Enhances Motoneuron Survival and Inhibits Neuroinflammation After Spinal Cord Transection in Zebrafish. *Cell Mol Neurobiol.* 2022;42(5):1373-1384.
- YUAN LJ, ZHANG M, CHEN S, et al. Anti-inflammatory effect of IGF-1 is mediated by IGF-1R cross talk with GPER in MPTP/MPP+ induced astrocyte activation. *Mol Cell Endocrinol.* 2021;519:111053.
- ACAZ-FONSECA E, ORTIZ-RODRIGUEZ A, AZCOITIA I, et al. Notch signaling in astrocytes mediates their morphological response to an inflammatory challenge. *Cell Death Discov.* 2019;5:85.
- OKADA S, HARA M, KOBAYAKAWA K, et al. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neurosci Res.* 2018;126:39-43.
- HARA M, KOBAYAKAWA K, OHKAWA Y, et al. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med.* 2017;23(7):818-828.
- ANDERSON MA, BURDA JE, REN Y, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature.* 2016;532(7598):195-200.
- GU Y, CHENG X, HUANG X, et al. Conditional ablation of reactive astrocytes to dissect their roles in spinal cord injury and repair. *Brain Behav Immun.* 2019;80:394-405.
- 杨拓. 星形胶质细胞重编程技术治疗脊髓损伤的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- TAMARU T, KOBAYAKAWA K, SAIWAI H, et al. Glial scar survives until the chronic phase by recruiting scar-forming astrocytes after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2023;359:114264.
- HOU J, BI H, GE Q, et al. Heterogeneity analysis of astrocytes following spinal cord injury at single-cell resolution. *FASEB J.* 2022;36(8):e22442.
- WANG J, CHENG C, LIU Z, et al. Inhibition of A1 Astrocytes and Activation of A2 Astrocytes for the Treatment of Spinal Cord Injury. *Neurochem Res.* 2023;48(3):767-780.
- WANG X, ZHANG Z, ZHU Z, et al. Photobiomodulation Promotes Repair Following Spinal Cord Injury by Regulating the Transformation of A1/A2 Reactive Astrocytes. *Front Neurosci.* 2021;15:768262.
- CHANG J, QIAN Z, WANG B, et al. Transplantation of A2 type astrocytes promotes neural repair and remyelination after spinal cord injury. *Cell Commun Signal.* 2023;21(1):37.

(责任编辑: ZM, MZH, ZN, QY)