

miR-125b-5p 对创伤性脑损伤诱发大鼠认知功能障碍的干预作用及其机制*

王 勇^{1△}, 赵 伟¹, 姜正林², 陈振华¹, 张 欢¹

(1. 南通大学第二附属医院神经外科, 2. 南通大学特种医学研究院, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的: 研究 miR-125b-5p 对创伤性脑损伤(TBI)引起的大鼠认知功能障碍的影响及其分子机制。**方法:** 将大鼠随机分为 Control 组、TBI 组(模型组)、NC agomir 组(假阴性组)、miR-125b-5p agomir 组(高表达组), 每组 5 只。假阴性组和高表达组分别脑室注射 NC agomir 和 miR-125b-5p agomir, 除 Control 组外各组均用改良 Feeney 法建立脑损伤模型。通过行为学实验对大鼠的运动协调、学习记忆、神经损伤程度等进行评估。通过 ELISA 和 Western blot 对各组大鼠海马组织中 miR-125b-5p、炎症因子, 以及神经相关因子的表达水平进行检测。最后使用生物信息学结合 RT-PCR 和 Western blot 对 miR-125b-5p 的下游靶基因进行预测和验证。**结果:** 与对照组相比, 模型组和假阴性组大鼠 miR-125b-5p 的表达水平显著下调、mNSS 评分显著升高、运动协调能力及学习记忆能力显著下降、白介素(IL-1 β 、IL-6)及肿瘤坏死因子(TNF- α)表达水平显著升高、BDNF 和 NGF 的表达水平显著下降、GFAP 的表达水平显著升高($P < 0.01$); 与模型组和假阴性组相比, 高表达组大鼠的 miR-125b-5p 的表达水平显著升高、mNSS 评分显著降低、运动协调能力及学习记忆能力明显增高、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 表达水平显著下降、BDNF 及 NGF 的表达水平升高、GFAP 的表达水平显著下降($P < 0.01$)。生信分析显示, MMP-15 为 miR-125b-5p 的下游靶标基因, 与对照组相比, 模型组和假阴性组 MMP-15 表达显著升高($P < 0.01$); 与模型组和假阴性组相比, 高表达组 MMP-15 的表达显著降低($P < 0.01$)。**结论:** miR-125b-5p 可改善 TBI 引起的大鼠认知功能障碍, 这可能与调控 MMP-15 的表达水平, 进而抑制 TBI 后神经炎症反应, 促进神经元再生相关。

【关键词】 大鼠; miR-125b-5p; MMP-15; 认知功能障碍; 创伤性脑损伤; 炎症因子

【中图分类号】 R651.1+5

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-040-007

【DOI】 10.12047/j.cjap.6313.2022.079

Intervention effects of miR-125b-5p on cognitive dysfunction induced by traumatic brain injury in rats and its mechanisms

WANG Yong^{1△}, ZHAO Wei¹, JIANG Zheng-lin², CHEN Zhen-hua¹, ZHANG Huan¹

(1. Neurosurgery Department, The Second Affiliated Hospital of Nantong University, 2. Institute of Special Environmental Medicine, Nantong University, Nantong 226001, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate the effects and molecular mechanisms of miR-125b-5p on cognitive dysfunction caused by traumatic brain injury (TBI). **Methods:** The rats were randomly divided into control group, TBI group (model group), NC Agomir group (false negative group) and miR-125b-5p agomir group (high expression group), with 5 rats in each group. The false negative group and the high expression group were injected with NC agomir and miR-125b-5p agomir, respectively. The brain injury model was established by modified Feeney method except control group. Animal behavioral experiments were utilized for evaluation of the motor coordination, learning and memory and the degree of nerve damage in rats; and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and Western blot (WB) were used for determination of the expression levels of inflammatory factors and nerve-related factors in the hippocampus of rats in each group respectively. Finally, combined with bioinformatics, downstream target genes of miR-125b-5p were predicted and verified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and WB. **Results:** Compared with control group, miR-125b-5p expression level, motor coordination ability, learning and memory ability, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) expression levels of rats in model group and false negative group were decreased significantly, the mNSS score, the expressions of interleukins (IL-1 β , IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and glial fibrillary acid protein (GFAP) were increased significantly ($P < 0.01$); However, compared with model group and false negative group, the above situation of rats in high expression group was opposite ($P < 0.01$). Bioassay showed that MMP-15 was the downstream target gene of miR-125b-5p. Compared with the control group, the expression of MMP-15 in model group and false negative group was increased significantly ($P < 0.01$); Compared with model group and false negative group, the expression of MMP-15 in high expression group was decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion:** miR-125b-5p can improve cognitive dysfunction induced by TBI in rats, which may be related to regulating the expression level of MMP-15, thereby inhibiting the neuroinflammatory response after TBI and promoting neuronal regeneration.

【KEY WORDS】 rat; miR-125b-5p; MMP-15; cognitive dysfunction; traumatic brain injury (TBI); inflammatory factors

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是指由创伤所引起的脑组织损害。不同程度的 TBI 均会导致一定程度的认知障碍, 严重的可能导致长期的神经退行性疾病, 如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)^[1], 给患者的生活带来极大的隐患。

认知功能与神经元的生长和再生密切相关。脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 作为两个主要的脑内神经营养因子, 在神经元的存活、分化和再生中发挥重要的作用^[2]。研究发现, 脑损伤早期, BDNF 释放量显著增加以保护神经功能, 但当损伤因素持续且大量存在时会导致生物体内 BDNF 水平降低^[3]。当脑组织受损时, NGF 能通过促进神经纤维生长保护损伤神经元从而减轻继发性颅脑损伤^[4]。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acid protein, GFAP) 是存在于中枢神经系统中的一种星形胶质细胞中间丝蛋白, 研究发现 TBI 后 GFAP 的表达持续上调^[5]。此外, Xu 等人的研究还发现, 脑损伤患者的炎症细胞因子较多, 一些细胞因子如 IFN- α 、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的水平与记忆力下降有关^[6]。

微小 RNA (MicroRNAs, miRNAs) 几乎参与所有神经系统的损伤机制, 如神经系统的轴突再生、神经炎症、神经细胞凋亡等过程^[7]。miR-125b 是 miRNAs 中的重要一员, miR-125b 在阿尔兹海默症 (AD) 中显著低表达, 是 AD 的诊断生物标志物^[8]。miR-125b 的表达与 APP/PS1 转基因小鼠的认知功能呈正相关^[9]。这些研究证实, miR-125b 参与调控认知功能障碍。但有关于 miR-125b-5p 在创伤性脑损伤引起的认知功能障碍方面的研究鲜有报道。因此, 本研究通过建立 TBI 大鼠模型, 探讨 miR-125b-5p 的表达对 TBI 大鼠运动协调、学习记忆、神经功能损伤修复对炎症因子调节等能力的影响及其可能机制, 以期对 TBI 诱导的认知功能障碍评估和治疗提供科学依据和线索。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立及分组

20 只 6~8 周龄体重 180~220 g 雄性 SD 大鼠

购自南通大学动物实验中心, 所有实验均在南通大学伦理委员会审核批准后开展。将大鼠随机分为四组, 每组 5 只。Control 组 (对照组): 无任何处理的大鼠; TBI 组 (模型组): 采用 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉后, 采用改良 Feeney 法^[10] 建立自由落体撞击造成闭合性 TBI 的大鼠模型; 致伤后大鼠出现四肢抽搐, 呼吸暂停数秒和昏迷 2~10 h 的现象证明模型建立成功; NC agomir 组 (假阴性组): 大鼠麻醉后固定于 WDT-V 型鼠脑立体定位仪上, 将 0.1 nmol 的 NC agomir 稀释至 10 μ l 后进行脑室注射 (前囟后 0.8 mm, 中缝右侧 1.5 mm, 深 3.5 mm), 注入后微量注射器仍在原位保持 1 min, 以避免液体回流, 12 h 后重复一次, 2 d 后进行 TBI 建模; miR-125b-5p agomir 组 (高表达组): 同样的方法将 0.1 nmol 的 miR-125b-5p agomir (广州市锐博生物科技有限公司) 稀释至 10 μ l 后输注至大鼠脑室, 12 h 后重复一次, 2 d 后进行 TBI 建模。

1.2 mNSS 评分

在建立 TBI 受伤前以及受伤后 1、3、7 d 采用神经功能缺损严重程度评分量表分别对各组大鼠以下特征进行评分: 运动、感觉、平衡和反射。神经功能总分为 18 分, 完全正常为 0 分, 1~6 分为轻度功能缺损, 7~12 分为中度功能缺损, 13~18 分为重度功能缺损, 分数越高表示神经功能损伤越严重。由两名研究者在不同时间点测试小鼠的各项行为特征并记录平均值。

1.3 行为学检测

1.3.1 平衡木测试 将大鼠放在平衡木 (由一长约 100 cm、宽度 1.7 cm、距地面高度约为 100 cm 的方形水平横梁构成) 一侧, 方形平衡木另一侧放在黑色方盒内, 记录大鼠在 60 s 内通过平衡木进入黑色方盒内的时间和打滑次数, 若超过 60 s 未能到达黑色方盒, 时间则记录为 60 s, 每天进行三次, 间隔时间为 2 h, 实验为期 3 d, 前两天为训练期, 最后 1 d 为测试期。

1.3.2 旷场实验 将大鼠置于黑色的方形装置 (100 cm \times 100 cm \times 45 cm) 的中心区域, 通过安装在大鼠上方的摄像机和 SMART 软件记录 5 min 内大鼠的自由活动。记录大鼠总的移动距离和区域中央持续时间。

1.3.3 Morris 水迷宫测试 Morris 水迷宫由圆形水池、摄像头及分析系统组成, 圆形水池直径 150 cm, 高 60 cm, 水池中注水深度 50 cm, 温度 24~26 $^{\circ}$ C。

*【基金项目】南通市科技局基础研究项目 (JC2020061)

【收稿日期】2022-04-12 【修回日期】2022-08-08

Δ 【通讯作者】Tel: 13861904209; E-mail: 1950914065@qq.com

将水池分为四个象限,贴上标签,任选一象限正中放置平台,训练时随机选取一个象限入水点处面向池壁将大鼠放入水中,每个时间段从4个不同的入水点入水,记录大鼠从入水点入水至爬上水下平台的时间(逃避潜伏期),同时记录游泳距离、游泳时间、穿过平台交叉点的次数以及在平台所在目标象限的停留时间。

1.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)

使用 Trizol (Thermo Fisher Scientific, 美国) 法提取组织总 RNA, 然后通过 NanoDrop ND-2000 测定提取 RNA 的质量和浓度, 再按照反转录 PCR 试剂盒 (Takara, 日本) 说明书反转录合成 cDNA。根据 RT-PCR 定量试剂盒 (Takara, 日本) 的说明书检测 MMP-15 和 miR-125b-5p 的表达水平, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据分析, 所使用的引物序列如下:

MMP-15: F'CGCTTCAATGAGGAGACACA, R'CCAGTACTTGGTGCCCTTGT; miR-125b-5p: F'GGTCCCTGAGACCCTAACT, R'CTCAACTGGT-GTCGTGGA; U6: F'GCTTCGGCAGCACATATACTAAAT a, R'CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT; GAPDH: F'CTGGCATTGCTCTCAATGACAAC, R'CTTGCTCAGTTTATCCGCTGGCTG。

1.5 ELISA 检测

收集的大鼠海马组织, 根据 ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 中国) 说明书对组织进行处理收集上清液, 并对其中的 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 进行测定。

1.6 Western blot

用 RIPA 裂解液 (碧云天, 中国) 冰上裂解组织 30 min, 再冰浴超声破碎, 10 000 r/min, 20 min, 4 $^{\circ}$ C 离心收集上清蛋白并使用 BCA 试剂盒 (碧云天, 中国) 定量。取 25 μ g 蛋白液加入 5 \times 蛋白上样缓冲液煮沸备用。通过 SDS-PAGE 凝胶分离蛋白, 随后将蛋白转到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 将膜与一抗 (BDNF, ab108319, Abcam; NGF, ab52918, Abcam; GFAP, G3893, Millipore Sigma; MMP-15, TA321486, OriGene; GAPDH, G8795, Millipore Sigma) 一起在 4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。第 2 日, PBST 震荡漂洗 3 次, 膜与二抗 (ZB2301, ZB2305, 中杉金桥, 中国) 在室温下孵育 1 h。PBST 清洗后均匀滴加 ECL 发光剂 (碧云天, 中国), FliorchemHD2 凝胶成像系统进行分析。采用 Image J 软件分析目的蛋白和内

参蛋白条带 (GAPDH) 的灰度值, 并以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值之比作为蛋白相对表达量。

1.7 统计学处理

数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析, 多组数据间两两比较采用 SNK- q 检验。

2 结果

2.1 miR-125b-5p 在 TBI 大鼠海马组织的表达水平

本研究前期成功构建 TBI 大鼠模型。为了检测 miR-125b-5p 对 TBI 海马组织的影响, 通过 qRT-PCR 对各组大鼠海马组织中 miR-125b-5p 的表达水平进行检测。结果表明, 与对照组 (1.037 ± 0.084) 比较, 模型组 (0.467 ± 0.144) 和假阴性组 (0.478 ± 0.173) 表达显著下降 ($P < 0.01, n = 5$); 与模型组 (0.467 ± 0.144) 和假阴性组 (0.478 ± 0.173) 比较, 高表达组 (0.930 ± 0.138) 表达显著升高 ($P < 0.01, n = 5$), 而对照组和高表达组比较无明显差异, 模型组和假阴性组比较无明显差异。

2.2 miR-125b-5p 对 TBI 诱导的神经功能缺损的影响

为了解 miR-125b-5p 对 TBI 大鼠神经功能缺损的影响, 通过神经严重程度评分 (mNSS) 对各组大鼠神经功能缺损情况进行评估。结果显示, 在整个测定周期内与对照组比较, 模型组 mNSS 评分显著升高 ($P < 0.01$, 表 1); 与模型组和假阴性组相比, 高表达组大鼠在受伤后第 3 ~ 7 日表现出 mNSS 的显著降低 ($P < 0.01$)。提示过表达 miR-125b-5p 能够促进 TBI 诱导的神经功能缺损恢复。

进一步通过平衡木测试和旷场测试对大鼠的平衡能力、肌力、运动协调能力等进行评估。结果显示, 与对照组相比, 模型组和假阴性组大鼠横穿横梁的潜伏期和后爪打滑次数显著增加, 而总移动距离和中央区域持续时间显著减少 ($P < 0.01$, 表 2); 与模型组和假阴性组比较, 高表达组大鼠横穿横梁的潜伏期和后爪打滑次数显著减少, 总的移动距离和中央区域持续时间显著增加 ($P < 0.01$); 与对照组比较, 高表达组大鼠横穿横梁的潜伏期延长 ($P < 0.01$)。这些结果进一步提示 miR-125b-5p 能够显著改善大鼠神经功能缺损。

Tab. 1 The mNSS scores of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Group	0 d	1 d	3 d	7 d
Control	1.0±0.0	0.6±0.2	0.8±0.2	0.7±0.3
TBI	1.0±0.0	14.6±0.6**	13.2±1.5**##	11.8±0.8**##
NC agomir	1.0±0.0	15.0±0.7**	13.6±0.6**##	11.4±0.9**##
miR-125b-5p agomir	1.0±0.0	14.8±1.5**	9.8±0.8	8.6±0.6

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

Tab. 2 Effect of miR-125b-5p on TBI-induced neurological deficit ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Group	Icubation period(s)	Paw slips(n)	Total distance(cm)	Time in zone center(%)
Control	6.40±2.07	0.40±0.55	60.60±14.08	8.81±1.16
TBI	20.20±3.96**##	1.60±0.55**##	31.56± 7.21**##	5.10±0.56**##
NC agomir	20.80±2.17**##	1.80±0.45**##	33.54± 4.09**##	4.78±0.77**##
miR-125b-5p agomir	14.40±2.90**	0.60±0.55	53.80± 6.72	8.63±0.92

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

2.3 miR-125b-5p 对 TBI 诱导的学习与记忆障碍的影响

通过水迷宫实验对各组大鼠学习和记忆能力进行评估。结果显示,第 1~2 日,与对照组相比,其他三组大鼠的逃逸潜伏期均显著延长($P<0.01$,表 3),第 3~4 日,与模型组和假阴性组相比,高表达组大鼠的逃逸潜伏期显著缩短($P<0.01$)。此外,与对照组比较,模型组和假阴性组大鼠穿过平台象限

交叉点的次数以及目标象限停留时间显著降低($P<0.01$,表 4);与模型组和假阴性组相比,高表达组大鼠穿过平台象限交叉点的次数和目标象限停留时间显著升高($P<0.01$,表 4);与对照组比较,高表达组大鼠目标象限停留时间降低($P<0.01$);但是各组大鼠游泳速度相比较没有显著差异。这些结果说明 miR-125b-5p 能够改善 TBI 诱导的学习与记忆障碍。

Tab. 3 The escape latency (1-4 days) ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Group	1 d	2 d	3 d	4 d
Control	38.4±2.1	27.0±2.2	21.6±2.2	18.4±3.4
TBI	55.6±2.1**	50.6±5.8**	48.2±1.5**##	45.0±3.1**##
NC agomir	55.2±2.3**	49.6±2.1**	48.6±1.5**##	45.4±3.7**##
miR-125b-5p agomir	56.0±3.4**	46.8±1.9**	31.4±1.5	23.2±1.6

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

Tab. 4 Effect of miR-125b-5p on TBI-induced learning and memory impairment ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Group	Number of crossing time	Quadrant time(s)	Swimming speed(cm/s)
Control	4.00±0.41	49.78±3.07	18.39±1.46
TBI	1.50±0.27**##	25.34±3.87**##	17.69±1.73
NC agomir	1.56±0.29**##	24.96±4.73**##	17.71±4.11
miR-125b-5p agomir	3.46±0.42	40.96±3.47**	18.27±1.22

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

2.4 miR-125b-5p 对 TBI 诱导的神经炎症的影响

通过 ELISA 对大鼠大脑海马组织中的细胞因子水平进行检测。结果表明,与对照组相比,模型组和假阴性组大鼠海马组织中促炎因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的水平显著升高($P<0.01$,表 5);与模型组和假阴性组相比,高表达组大鼠海马组织中 IL-6、

TNF- α 和 IL-1 β 的水平显著降低($P<0.01$);与对照组相比,高表达组大鼠 IL-6 水平显著升高($P<0.01$);与对照组相比,高表达组大鼠 IL-1 β 水平升高($P<0.05$,表 5)。这些结果说明 miR-125b-5p 能够通过降低大鼠海马组织中炎症因子水平缓解 TBI 诱导的神经炎症。

Tab. 5 Effect of miR-125b-5p on TBI-induced neuroinflammation (ng/L, $\bar{x}\pm s, n=5$)

Group	IL-6	TNF- α	IL-1 β
Control	13.08±0.38	11.64±1.88	24.50±1.63
TBI	21.92±0.95**##	18.01±1.24**##	35.54±1.60**##
NC agomir	21.60±2.13**##	18.61±1.87**##	34.78±1.62**##
miR-125b-5p agomir	17.20±1.49**	12.34±1.86	28.37±4.50**

** $P<0.01$ vs control group; ## $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

2.5 miR-125b-5p 对大鼠海马组织中 BDNF、NGF、GFAP 表达的影响

为进一步探讨 miR-125b-5p 在 TBI 大鼠神经系统中的功能,通过 Western blot 对神经修复和再生中发挥关键作用的 BDNF、NGF 和 GFAP 的表达水平进行检测。结果显示,与对照组相比,模型组和假阴性组大鼠海马组织中 BDNF、NGF 的蛋白表达显著降低,而 GFAP 的蛋白表达显著升高($P<0.01$,表 6,图 1);与模型组和假阴性组相比,高表达组大鼠海马组织中 BDNF、NGF 的表达显著升高,GFAP 的蛋白表达显著降低($P<0.01$);与对照组相比,高表达组大鼠 BDNF 水平显著下降($P<0.05$)。

Tab. 6 Effect of miR-125b-5p on the expressions of BDNF, NGF and GFAP in hippocampus of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Group	BDNF	NGF	GFAP
Control	1.01±0.06	1.01±0.02	1.04±0.10
TBI	0.29±0.05 ^{**##}	0.21±0.00 ^{**##}	1.47±0.17 ^{**##}
NC agomir	0.25±0.05 ^{**##}	0.32±0.03 ^{**##}	1.45±0.09 ^{**##}
miR-125b-5p agomir	0.81±0.06 ^{**}	0.92±0.04	1.18±0.45

^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

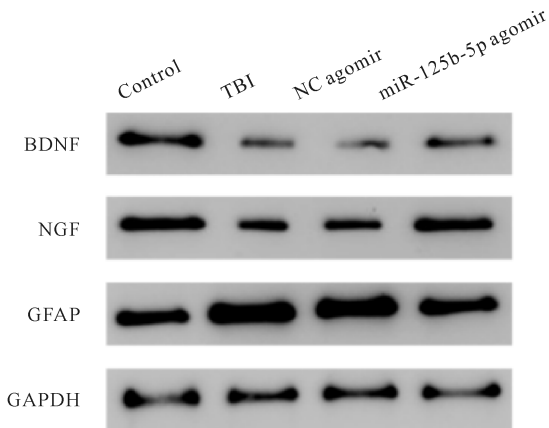


Fig. 1 Effect of miR-125b-5p on the expression of BDNF, NGF and GFAP in hippocampus of rats

2.6 miR-125b-5p 对 MMP-15 表达的影响

最后,为了对 miR-125b-5p 在 TBI 大鼠中发挥作用的机制进行初步探索,利用 TargetScan 数据库 (<http://www.targetscan.org/>) 预测 miR-125b-5p 的下游靶标基因。预测结果显示, MMP-15 为 miR-125b-5p 推定的靶标基因(图 2)。进一步对各组大鼠海马组织中 MMP-15 的 mRNA 和蛋白表达水平进行检测。结果显示,与对照组相比,模型组和假阴性组大鼠海马组织中 MMP-15 的 mRNA 和蛋白质表达均显著升高($P<0.01$,表 7,图 3);与模型组和假阴性组相比,高表达组大鼠海马组织中 MMP-15 的表达显著降低($P<0.01$)。以上结果提示 miR-125b-5p 可靶向调节 MMP-15 的表达。

Tab. 7 Effects of miR-125b-5p on the mRNA and protein expressions of MMP-15 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Group	mRNA MMP-15	Protein MMP-15
Control	1.02±0.09	1.01±0.06
TBI	1.42±0.16 ^{**##}	1.46±0.10 ^{**##}
NC agomir	1.41±0.12 ^{**##}	1.36±0.05 ^{**##}
miR-125b-5p agomir	1.16±0.20	1.09±0.11

^{**} $P<0.01$ vs control group; ^{##} $P<0.01$ vs miR-125b-5p agomir group

性组大鼠海马组织中 BDNF、NGF 的蛋白表达显著降低,而 GFAP 的蛋白表达显著升高($P<0.01$,表 6,图 1);与模型组和假阴性组相比,高表达组大鼠海马组织中 BDNF、NGF 的表达显著升高,GFAP 的蛋白表达显著降低($P<0.01$);与对照组相比,高表达组大鼠 BDNF 水平显著下降($P<0.05$)。

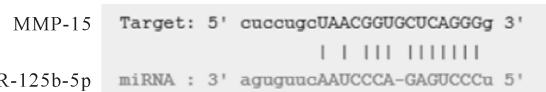


Fig. 2 Target Scan database was applied for predicting the target relationship between miR-125b-5p and MMP-15

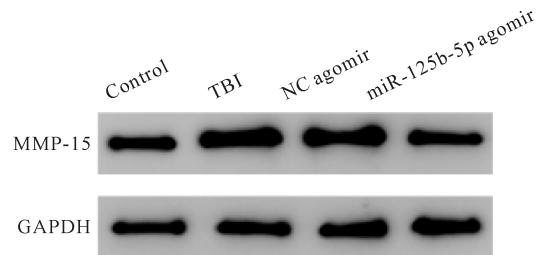


Fig. 3 The protein expression level of MMP-15 detected by WB in the hippocampus of the rats in each group

3 讨论

TBI 患者多存在注意力、记忆力及智力不同程度损害的认知障碍问题,严重影响生存质量。近年来 TBI 发生率逐渐升高,其以高致残率和致死率居各类创伤之首。虽然医疗技术的进步使得 TBI 病死率下降,但对生存患者的认知功能障碍的有效治疗仍然存在一些问题^[11]。因此,深入研究 TBI 引起认知功能障碍的因素与其机制并探讨合理可行的治疗策略对改善和评估认知功能障碍,以及促进患者康复具有重要意义。

大量研究表明,miRNA 在中枢神经系统的发育、信号传导通路的调节,以及神经功能保护等过程中发挥关键作用。miR-132 能够被转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白激活进而诱导皮质神经元轴突生长,对神经突触的形成和功能具有调节作用^[12]。Huang 等发现,miR-124-3p 能够抑制 TBI 后的神经炎症和促进神经轴的生长^[13]。Hu 等发现,TBI 大鼠海马组织中多种 miRNA 在受伤后的不同时间出现显著变化^[14],因而 miRNA 有可能作为潜在分子标记物用以评估 TBI 的分级。以往研究表

明,miR-125b-5p 可通过靶向 BACE1 减弱 Abeta 诱导的神经毒性^[17]。Xiong 等人的研究发现,miR-125b-5p 在七氟醚麻醉大鼠和七氟醚处理的 SH-SY5Y 细胞中均上调,miR-125b-5p 的降低可以通过靶向 LIMK1 预防七氟醚诱导的大鼠海马细胞凋亡、炎症以及学习记忆认知障碍^[15]。本研究利用改良 Feeney 自由落体撞击法构建大鼠 TBI 模型,通过 mNSS 神经功能缺损评分、平衡木测试、旷场实验以及 Morris 水迷宫测试实验证实 TBI 可引起大鼠运动、感觉、反射等神经功能障碍,以及学习记忆等认知功能障碍。但是过表达 miR-125b-5p 后能显著改善 TBI 诱导的神经功能缺损及学习记忆障碍。提示 miR-125b-5p 能够减轻 TBI 诱导的神经功能损伤和记忆功能障碍。这与以上 Xiong 等人报道的有关 miR-125b-5p 对认知功能障碍的影响不同,出现这种情况的原因可能是在两种不同的受伤情况下 miR-125b-5p 作用的靶基因不同有关,具体原因还有待进一步实验验证。

神经元炎症反应是 TBI 的特征性病理改变,miR-125b-5p 能够有效缓解炎症,如 Zhang 等人的研究中发现,miR-125b-5p 能够通过降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达水平缓解结肠炎炎症^[16]。在本研究结果表明 miR-125b-5p 显著降低 TBI 大鼠海马组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平,从而减轻 TBI 诱导的神经炎症,与前人的研究结果一致。BDNF 是一种具有神经营养作用的蛋白质,NGF 是一种调节神经元生长的蛋白,而 GFAP 是一种星形胶质细胞活化的标志物。有研究发现,BDNF 和 NGF 的表达水平在 TBI 损伤后显著降低^[3,4],而激活大鼠海马中的 BDNF 可改善大鼠的认知功能障碍^[17],TBI 患者脑损伤以后 GFAP 表达并持续升高,伴有进行性出血患者的 GFAP 表达水平更高,而且其表达水平与颅内压变化情况相关^[5]。本研究中也检测到 TBI 大鼠中 BDNF、NGF 的表达水平显著降低,而 GFAP 的表达水平显著提高,而且 miR-125b-5p 能够通过提高 BDNF、NGF 的表达和抑制 GFAP 的表达以改善 TBI 诱导的神经元损伤。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是降解细胞外基质的蛋白酶类中最重要的一类,作为 MMPs 家族成员 MMP-15 参与调控肿瘤炎症反应和血管生成^[18]。Minta 等人对 TBI 中脑脊液中 MMP (MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-9、MMP-10 和 MMP-12) 的表达进行测定,并观察到不同 MMP 浓度变化的可变模式,他们认为特定的 MMP 在 TBI 后的病理生理学中发挥不同的作用,并且与临床结果相关^[19]。还有研究

发现,MMP-9 表达水平的升高是引起脑损伤后脑水肿的原因^[20]。本研究通过生信分析、RT-PCR 和 Western blot 实验发现,miR-125b-5p 能够靶向抑制 MMP-15 表达,而且 MMP-15 在 TBI 大鼠海马组织中的表达水平显著上调,综上推测 miR-125b-5p 能减轻 TBI 诱导的神经功能缺损、炎症反应及行为认知障碍,可能是通过靶向抑制 MMP-15 表达得以实现,而且 MMP-15 可能在 TBI 的炎症、神经功能障碍及认知障碍中发挥促进作用。由于目前关于 MMP-15 在 TBI 中功能及其机制的研究鲜有报道,而且本研究中也未对 MMP-15 在 TBI 中的功能进行进一步的探索,因此,对上述推测还需要进一步研究。另外本研究中虽然通过体内实验证明 MMP-15 是 miR-125b-5p 的下游调控基因,但是未通过细胞实验来对它们之间的靶向关系进行验证,所以也有待进一步的研究。

综上所述,本研究结果表明,miR-125b-5p 能够改善 TBI 诱导的大鼠的神经功能缺损、学习记忆障碍、炎症水平提高,以及神经相关因子表达异常,其发挥作用的机制可能与靶向调控 MMP-15 相关。本研究为 miR-125b-5p 作为 TBI 诱导的认知功能障碍诊治的新靶标奠定重要科学基础,这对研发改善 TBI 所诱导的认知功能障碍措施具有重要指导意义。

【参考文献】

- [1] George E, Ines M-G, Claudio S, *et al.* Amyloid-beta and tau pathology following repetitive mild traumatic brain injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(4): 1137-1142.
- [2] Luisa BL, Maria EDS. NGF in early embryogenesis, differentiation, and pathology in the nervous and immune systems [J]. *Curr Top Behav Neurosci*, 2016, 29: 125-152.
- [3] 秦 维,王妹妹,吴海珠,等. 血清 BDNF 与颅脑损伤患者病情及预后的相关性分析 [J]. *中南医学科学杂志*, 2021, 49(6): 721-724.
- [4] 高玉帅,步星耀,闫兆月,等. 带肌蒂颅脑修复成形术联合 NGF 经鼻脑靶向治疗颅脑损伤 临床观察 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2020, 23(17): 1497-1502.
- [5] Kochis RM, Ahota A, Garcia HB, *et al.* Modeling the dynamics of a secondary neurodegenerative injury following a mild traumatic brain injury [J]. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2021, 2021: 4469-4472.
- [6] Xu WD, Yue ShL, Wang P, *et al.* Systemic inflammation in traumatic brain injury predicts poor cognitive function [J]. *Immun Inflamm Dis*, 2021, 10: 577-581.

- [7] Ghibaudi M, Boido M, Vercelli A. Functional integration of complex miRNA networks in central and peripheral lesion and axonal regeneration[J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 158: 69-93.
- [8] Li PX, Xu Y, Wang BP, et al. miR-34a-5p and miR-125b-5p attenuate A β -induced neurotoxicity through targeting BACE1[J]. *J Neurol Sci*, 2020, 413: 116793.
- [9] Zhang LY, Dong H, Si YW, et al. miR-125b promotes tau phosphorylation by targeting the neural cell adhesion molecule in neuropathological progression[J]. *Neurobiol Aging*, 2019, 73: 41-49.
- [10] Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, et al. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat[J]. *Brain Res*, 1981, 211(1): 67-77.
- [11] 贾颜锋, 陈伟. 羟基积雪草苷对大鼠创伤性颅脑损伤后神经功能障碍的改善作用及机制研究[J]. *创伤外科杂志*, 2021, 23(7): 546-550.
- [12] Hannah W, Sriram B, Sarah S, et al. Restoring miR-132 expression rescues adult hippocampal neurogenesis and memory deficits in Alzheimer's disease[J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28(10): 1805-1821.
- [13] Huang Sh, Ge XT, Yu JW, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons[J]. *FASEB J*, 2018, 32(1): 512-528.
- [14] Hu ZhH, Yu DN, Camila A-S, et al. Expression of miRNAs and their cooperative regulation of the pathophysiology in traumatic brain injury[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): 39357-39367.
- [15] Xiong J, Wang HJ, Mu F, et al. MiR-125b-5p inhibitor might protect against sevoflurane-induced cognitive impairments by targeting LIMK1[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2019, 16(4): 382-391.
- [16] Zhang XJ, Ma LZ, Zhang Ch, et al. Silencing LncRNA-DANCR attenuates inflammation and DSS-induced endothelial injury through miR-125b-5p[J]. *Gastroenterol Hepatol*, 2021, 44(9): 644-653.
- [17] 朱责梅, 阳际花, 杨丝丝, 等. 二氢杨梅素对2型糖尿病小鼠认知功能障碍的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2017, 33(4): 323-328.
- [18] Wang YZh, Zhang LP, Wei N, et al. Silencing LINC00482 inhibits tumor-associated inflammation and angiogenesis through down-regulation of MMP-15 via FOXA1 in bladder cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 13(2): 2264-2278.
- [19] Minta K, Brinkmalm G, Faiez AN, et al. Dynamics of cerebrospinal fluid levels of matrix metalloproteinases in human traumatic brain injury[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 18075-18085.
- [20] 周建光, 单连标, 周颖奇, 等. 快速减压失事对大鼠血脑屏障及MMP-9 mRNA表达的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2021, 37(3): 324-326.

大鼠海马神经细胞 VDAC1 基因 shRNA 慢病毒表达载体的构建及干扰效果评价*

郑刘晔^{1,2}, 奚用勇³, 张 晗^{1,4}, 蒋与刚^{1Δ}

(1. 军事科学院军事医学研究院环境医学与作业医学研究所, 天津 300050; 2. 蚌埠医学院, 蚌埠 233000; 3. 杭州医学院临床学院, 杭州 310000; 4. 郑州大学, 郑州 450001)

【摘要】 目的: 构建线粒体电压依赖性阴离子通道(VDAC1)短发卡样RNA重组慢病毒(LV)载体, 沉默海马神经细胞VDAC1基因表达, 观察所构建的慢病毒载体对海马神经细胞的干扰效果。方法: 根据基因库提供的大鼠VDAC1基因的核苷酸序列(序列号为: AB039662.1), 设计合成3条LV3-VDAC1-shRNA及1条无义的阴性表达载体; 将构建好的慢病毒载体转染到海马神经细胞, 按照不同的转染条件对细胞分为空载组、对照(NC)组、病毒组, 分别在病毒感染复数(MOI)值在100和10的条件下进行转染; 采用荧光定量PCR和Western blot的方法分别检测VDAC1基因在mRNA水平和蛋白水平的表达。结果: 与空载组相比, 慢病毒感染组的扩增倍数均大于1, VDAC1基因在mRNA水平与蛋白水平表达均明显升高($P < 0.05$); 与对照组相比, 病毒感染复数(MOI) = 10与MOI = 100之间没有显著差异($P > 0.05$); PCR结果与Western blot结果综合来看, VDAC1转录水平表达越高, 蛋白水平表达越低, 呈现反向关联的状态。结论: 三种慢病毒对海马神经细胞都有干扰效果, VDAC1基因的mRNA表达和蛋白表达是一种反向关联的状态。

【关键词】 VDAC1; 慢病毒; 转染; 海马神经细胞; 大鼠

【KEY WORDS】 VDAC1; lentivirus; transfection; hippocampus neuron; rats

【中图分类号】 R365

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-046-004

【DOI】 10.12047/j.cjap.6308.2022.080