

miR-124修饰的骨髓间充质干细胞 对大鼠脊髓损伤的作用研究

孙孟坊 王丰 金孟浩 吴挺前 徐强

[摘要] 目的 探讨miR-124修饰的骨髓间充质干细胞对大鼠脊髓损伤的作用。方法 通过构建miR-124重组质粒,导入骨髓间充质干细胞(BMSCs)诱导其向神经干细胞(NSCs)转变。SD大鼠造模成功后分为miR-124a-BMSCs-D-NSCs组、BMSCs-D-NSCs组和对照组,每组10只。miR-124a-BMSCs-D-NSCs组和BMSCs-D-NSCs组分别注射miR-124a-BMSCs-D-NSCs和BMSCs-D-NSCs细胞悬液($1 \times 10^6/\text{ml}$) 1 ml,对照组注射等量0.9%氯化钠注射液。造模后第8天,采用RT-PCR检测miRNA-124 mRNA表达水平。造模后第8、12、16天,采用Western blotting检测Nogo-A蛋白表达水平。造模后1周、3周和6周,采用BBB评分法标准评价脊髓神经功能情况。结果 miR-124a-BMSCs-D-NSCs组miR-124 mRNA表达水平明显高于BMSCs-D-NSCs组和对照组(t 分别=2.25、2.16, P 均 < 0.05)。造模后第8、12、16天,miR-124a-BMSCs-D-NSCs组Nogo-A蛋白表达水平明显低于BMSCs-D-NSCs组和对照组(t 分别=2.32、2.12、2.30、2.08、2.26、2.31, P 均 < 0.05)。造模后1周、3周和6周,miR-124a-BMSCs-D-NSCs组BBB评分均明显高于BMSCs-D-NSCs组和对照组(t 分别=2.16、2.14、2.26、2.16、2.11、2.31, P 均 < 0.05)。结论 miR-124可能主要通过抑制Nogo-A表达从而起到促进神经功能的恢复的作用。

[关键词] miR-124; Nogo-A; 脊髓损伤

Effects of bone marrow mesenchymal stem cells modified by miR - 124 on spinal cord injury in rats SUN Mengfang, WANG Feng, JIN Menghao, et al. Neurosurgery, Wenzhou Traditional Chinese Medicine Hospital, Wenzhou 325000, China.

[Abstract] Objective To investigate the effect of bone marrow mesenchymal stem cells modified by miR - 124 on spinal cord injury in rats. **Methods** Bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs) were induced to construct neural stem cells (NSCs) by constructing miR-124 recombinant plasmids. SD rats were divided into miR-124a-BMSCs-D-NSCs group, BMSCs-D-NSCs group and the control group. The miR-124a-BMSCs-D-NSCs group and BMSCs-D-NSCs group were injected with 1 ml of miR-124a-BMSCs-D-NSCs and BMSCs-D-NSCs cell suspension ($1 \times 10^6/\text{ml}$) respectively, and the control group was given the equal amount of saline. The expression of miRNA-124 mRNA was detected by RT-PCR on the 8th day after modeling. Nogo-A protein was detected by Western blotting on the 8th, 12th, and 16th day after modeling. At 1 week, 3 weeks and 6 weeks after modeling, the neurological function of the spinal cord was evaluated by BBB score. **Results** The expression of miR-124 mRNA in miR-124a-BMSCs-D-NSCs group was significantly higher than that in BMSCs-D-NSCs group and control group ($t=2.25, 2.16, P < 0.05$). The expression levels of Nogo-A protein in miR-124a-BMSCs-D-NSCs group were significantly lower than those in BMSCs-D-NSCs group and control group on the 8th, 12th and 16th day after modeling ($t=2.32, 2.12, 2.30, 2.08, 2.26, 2.31, P < 0.05$). The BBB scores of miR-124a-BMSCs-D-NSCs group were significantly higher than those of BMSCs-D-NSCs group and control group at 1 week, 3 weeks and 6 weeks after modeling ($t=2.16, 2.14, 2.26, 2.16, 2.11, 2.31, P < 0.05$). **Conclusion** MiR-124 may promote the recovery of

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2017.04.004

基金项目:温州市科技计划项目(2015Y0364)

作者单位:325000 浙江温州,温州市中西医结合医院神经外科

neurological function mainly by inhibiting Nogo-A expression.

[Key words] miR-124; Nogo-A; spinal cord injury

脊髓损伤是一类高致残的中枢神经系统疾病,随着工业的飞速发展,发病率呈上升趋势^[1]。miRNAs是一种小的内源性非编码RNA分子,大约由21~25个核苷酸组成,具有在转录、翻译水平调节基因表达的作用。有研究显示miR-124的过表达可以明显促进神经干细胞(neural stem cells, NSCs)向神经元方向转变,miR-124转染的神经干细胞具有提高脊髓损伤后大鼠的运动功能的作用^[2]。Nogo髓鞘相关蛋白(Nogo-A)是一种神经轴突生长抑制因子,目前已有研究证明miR-124在神经分化过程中可促进神经轴突的生长^[3,4]。因此,通过研究miR-124修饰的骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)与Nogo-A在大鼠脊髓损伤修复治疗中的相互作用,可为目前脊髓损伤治疗的方式提供新的思路,以更好地提高脊髓损伤治疗效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2016年12月,选取由中国科学院实验动物中心提供的清洁级成年SD大鼠80只,体重200~250 g。饲养环境为恒温、恒湿环境,室内温度控制在20℃~24℃,湿度控制在50%~60%,动物自由进食饮水,室内采用日光灯光照12 h,然后关灯,模拟白天黑夜周期。

1.2 主要试剂 DMEM培养基、胎牛血清(由Gibco公司生产);磷酸盐缓冲液(由美国sigma公司生产);聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液(由碧云天生物技术研究所生产);辣根酶标记山羊抗兔Ig G;内参抗体 β -actin(由北京康为世纪生物科技有限公司生产);蛋白质免疫印迹(Western-blotting)一抗稀释液(由碧云天生物技术研究所生产);Western-blotting二抗稀释液(由碧云天生物技术研究所生产);二氨基联苯胺染色试剂盒(由北京康为生物科技有限公司生产);牛血清蛋白定量试剂盒(由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司生产);总核糖核酸提取试剂盒(由天根生化科技有限公司生产)。

1.3 方法

1.3.1 干细胞的制备及移植 大鼠颈椎脱臼处死后,在无菌条件下取出双侧股骨,剪断两端露出骨髓腔,注射器吸取骨髓制成细胞悬液,提取BMSCs。然后用DMEM液(含青霉素、链霉素及10%胎牛血清)冲洗骨髓腔,经2 000 r/min离心10 min,吸取中层云雾状细胞层。吹打制成细胞悬液,计数并调整密度 $1 \times 10^6/L$ 接种于25 cm²培养瓶,置于37℃、5%二氧化碳培养箱中,48 h后第一次换液,去除未贴壁

和死亡的细胞,以后每72小时换液一次,观察细胞形态,至第10~12天待贴壁细胞融合成单层时,用胰酶按1:2消化传代。传至第3代制备成悬液备用。加入生物诱导培养液,诱导9 d,促使BMSCs向神经细胞方向分化,得到BMSCs-D-NSCs。

1.3.2 miR-124重组载体的构建及转染 参照文献[5]方法,利用OligoEngine RNAi设计软件,设计出针对miR-124的特异性靶序列(5'-UAAGGCACGCGGUGAAUGCC-3'),采用相同的限制性内切酶来酶切慢病毒载体pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP和PCR产物。采用T4连接酶连接酶切片段。培养293T细胞24 h,将构建的miR-124重组载体转染转入293T细胞中,培养制备并分离得到miR-124a的病毒液。用病毒液转染BMSCs-D-NSCs 36 h,检测转染率达到85%后获取病毒上清液感染BMSCs。qRT-PCR检测miR-124表达情况和诱导成NSCs后的表达情况。

1.3.3 大鼠脊髓损伤模型的构建及分组 实验动物术前禁食6 h,先采用腹腔内注射10%水合氯醛进行麻醉,然后大鼠取俯卧,定位手术切口位置,以胸10棘突为切口中心切开皮肤和肌肉,暴露脊柱胸8节段,显微镜下去除胸8脊椎椎板,将镊子深入两侧的脊髓并夹住,持续20 s^[6]。术毕缝合切口。正常饲养。将脊髓损伤模型大鼠分为对照组、miR-124a-BMSCs-D-NSCs组和BMSCs-D-NSCs组,每组10只。自损伤处中心,miR-124a-BMSCs-D-NSCs组和BMSCs-D-NSCs组分别注射miR-124a-BMSCs-D-NSCs和BMSCs-D-NSCs细胞悬液($1 \times 10^6/ml$) 1 ml,对照组注射等量0.9%氯化钠注射液。

1.4 观察指标

1.4.1 miR-124表达水平 截取各组大鼠损伤区段的新鲜脊髓组织,采用Trizol法分别提取各组大鼠总RNA。目的基因引物序列:GADPH(305bp)上游引物:5'-TGGTGAAGGTCGGTGTGAAC-3',下游引物:5'-GGTGGTGAAGACGCCAGTAG-3'。miR-124(141bp)上游引物:5'-GAATTCATCGCGTTCCC-CAAACCCC-3',下游引物:5'-GGATCCAGGGATGAAGGTGCTGGCCT-3'。逆转录为cDNA,应用RT-PCR检测miR-124水平,以GADPH作为内参照。

1.4.2 Western-blotting检测Nogo-A蛋白表达水平 取出各组大鼠损伤区段的新鲜脊髓组织,用剪刀剪碎,用预冷的组织裂解液提取总蛋白,Bradford法测定样品的蛋白含量,12%的凝胶分离蛋白质,利用转膜仪(湿转)在100V1.5 h的条件下将凝胶上的蛋白

转移到PVDF膜上,脱脂奶粉封闭2 h,洗膜后与Nogo-A单克隆抗体(1:1 000)过夜结合,同样方法准备二抗稀释液并与膜接触,室温下孵育1~2 h后,室温下脱色摇床上洗两次,二氨基联苯胺显色,凝胶成像和化学发光分析系统收集显色条带,运用 Quantity One 软件进行蛋白条带数据分析。

1.4.3 脊髓神经功能 采用BBB (basso-beattie-bresnahan score, BBB)评分法^[7]标准评价脊髓神经功能情况。

1.5 统计学方法 采用SPSS 18.00进行分析处理。计数资料采用χ²检验,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示并行t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组大鼠 miR-124 mRNA表达水平比较见图1

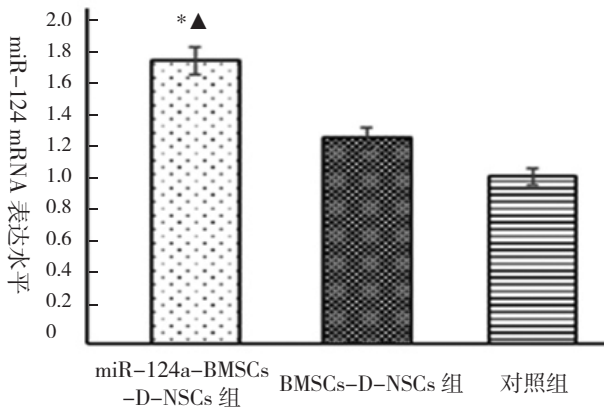


图1 各组大鼠miR-124 mRNA表达水平

注:*,与BMSCs-D-NSCs组比较,P<0.05;▲:与对照组比较,P<0.05。

由图1可见,miR-124a-BMSCs-D-NSCs组miR-124 mRNA表达水平明显高于BMSCs-D-NSCs组和对照组(*t*分别=2.25、2.16,*P*均<0.05)。

2.2 三组大鼠 Nogo-A蛋白表达水平比较见图2

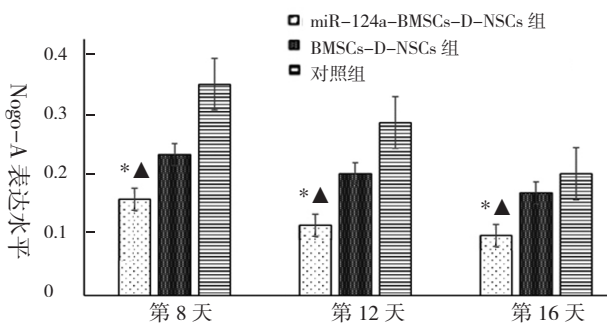


图2 造模后三组大鼠Nogo-A蛋白表达水平

注:*,与BMSCs-D-NSCs组比较,P<0.05;▲:与对照组比较,P<0.05。

由图2可见,造模后第8、12、16天,miR-124a-BM-

SCs-D-NSCs组Nogo-A蛋白表达水平均明显低于BMSCs-D-NSCs组和对照组(*t*分别=2.32、2.12、2.30、2.08、2.26、2.31,*P*均<0.05)。

2.3 三组大鼠BBB评分比较见图3

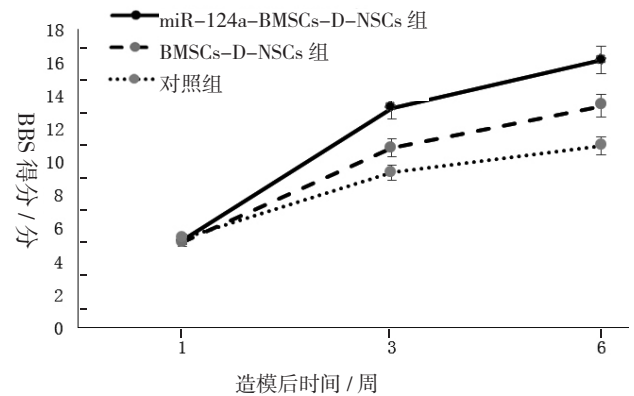


图3 各组大鼠术后各个时间点的神经功能BBB评分

由图3可见,造模后1周、3周和6周,miR-124a-BMSCs-D-NSCs组BBB评分均明显高于BMSCs-D-NSCs组和对照组(*t*分别=2.16、2.14、2.26、2.16、2.11、2.31,*P*均<0.05)。

3 讨论

脊髓损伤的治疗一直是医学界的难点。目前,临床上对脊髓损伤的治疗主要是针对脊髓损伤的继发性损伤进行功能修复治疗。20世纪,Cajal发现游离周围神经植入脊髓后,一些损伤的神经元轴突能够出芽,以及近年NSCs从成年哺乳动物室下区和海马的成功分离,彻底推翻了哺乳动物主动脉夹层术后中枢神经系统损伤后不能再生的观点^[7,8]。干细胞既可以在体外分离、扩增和冷冻保存,具有自我增殖、更新能力,在一定的条件下又可被诱导分化为多种细胞和组织,为一些组织缺陷疾病、神经损伤性疾病和代谢性疾病的细胞替代治疗开辟一条新途径^[9]。随着科学家对轴突再生理解地不断深入,学者们开始从NSCs的角度对脊髓损伤治疗技术进行研究。

虽然NSCs在一定程度上参与了脊髓损伤功能修复,但这种功能修复并却不是很理想^[10]。近年新发现的miRNA及其功能特点为有脊髓损伤的治疗提供了研究的突破口。miRNA是一类非编码的单链小分子。miRNA参与调节细胞周期、分化、发育、免疫调控以及肿瘤发生等许多重要生物学过程。多个研究证实,miRNA的差异性表达和脊髓的发育密切相关,呈高表达水平的miRNA与CNS的相关功能存在一定关系,miR-124是其中研究较为广泛的一种^[11,12]。本

次研究通过构建miR-124的慢病毒重组体转染进入BMSCs-D-NSCs, 结果数据显示, miR-124a-BMSCs-D-NSCs组miR-124 mRNA表达水平明显高于BMSCs-D-NSCs组和对照组($P < 0.05$), 表明构建成功, miR-124成功导入BMSCs-D-NSCs。

本次研究结果显示, 造模后1周、3周和6周, miR-124a-BMSCs-D-NSCs组BBB评分均明显高于BMSCs-D-NSCs组和对照组(P 均 < 0.05), 表明在大鼠脊髓损伤的治疗过程中miR-124可以明显促进神经功能的恢复。研究显示, 成年哺乳动物外周神经系统损伤后可有效再生, 而中枢神经系统损伤后其再生功能非常有限^[13]。目前, 已经发现了3种神经轴突生长抑制因子, 其中Nogo-A可能是阻止中枢神经再生的关键因素^[14]。而Western-blotting检测结果显示, 造模后第8、12和16天, miR-124a-BMSCs-D-NSCs组Nogo-A蛋白表达水平平均明显低于BMSCs-D-NSCs组和对照组($P < 0.05$), 表明miR-124可能通过下调Nogo-A的表达水平, 从而达到改善神经功能的作用。Nogo-A存在两个抑制性功能域, 一个是胞内的氨基端, 另一个是位于胞外。Nogo-A主要通过参与信号转导的p75、LINGO-1介导和Nogo受体配体复合物的方式抑制轴突生长。周治来等^[15]报道也认为, Nogo-A是一种抑制CNS再生的神经轴突生长抑制因子, 可抑制神经元突起的延伸并导致生长锥塌陷, 通过运动训练可以有效减低大鼠脊髓损伤后Nogo-A的表达水平, 促进后肢运动功能的恢复。

综上所述, miR-124可能主要通过抑制Nogo-A表达从而起到促进神经功能的恢复作用。因此, miR-124具有成为细胞替代治疗脊髓损伤的潜力。

参考文献

- Zhao Y, Jiang H, Liu XW, et al. MiR-124 promotes bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neurogenic cells for accelerating recovery in the spinal cord injury[J]. Cell Tissue Res, 2015, 47(2): 140-146.
- 邓斌, 李俊钢, 张颖, 等. 轴突生长抑制因子 Nogo-A 及其抗体在脊髓损伤修复中的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2012, 28(5): 531-534.
- Louw AM, Kolar MK, Novikova LN, et al. Chitosan polyplex mediated delivery of miRNA-124 reduces activation of microglial cells in vitro and in rat models of spinal cord injury[J]. Nanomed-Nanotechnol, 2016, 12(3): 643-653.
- 张芬. MicroRNA-124 a 对 SCI 继发性损伤的影响及相关机制研究 [J]. 郑州大学学报 (理学版), 2016, 48(1): 73-80.
- Ziu M, Fletcher L, Savage J G, et al. Spatial and temporal expression levels of specific microRNAs in a spinal cord injury mouse model and their relationship to the duration of compression[J]. Spine J, 2014, 14(2): 353-360.
- 徐伟伟. miR-124 调节骨髓源神经干细胞在大鼠脊髓损伤中的治疗作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.
- Strickland ER, Woller SA, Garraway SM, et al. Regulatory effects of intermittent noxious stimulation on spinal cord injury-sensitive microRNAs and their presumptive targets following spinal cord contusion [J]. Front Neural Circuit, 2014, 16(8): 117.
- 路坦, 尉娜, 张超, 等. 微小 RNA-124 在骨髓间充质干细胞分化为神经源性细胞的作用及其对脊髓损伤修复的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2016, 16(1): 179-181.
- Yang H, Liu C, Wang CY, et al. Therapeutic strategies for spinal cord injury and a promising autologous astrocyte-based therapy using efficient reprogramming techniques[J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(5): 2826-2842.
- Guzik-Kornacka AM, Vajda F, Schwab ME. Blocking the Nogo-A Signaling Pathway to Promote Regeneration and Plasticity After Spinal Cord Injury and Stroke [M]. Trans Neuro, 2016, 16(6): 369-397.
- Zhao RR, Andrews MR, Wang D, et al. Combination treatment with anti-Nogo-A and chondroitinase ABC is more effective than single treatments at enhancing functional recovery after spinal cord injury [J]. Eur J Neurosci, 2013, 38(6): 2946-2961.
- Freund P, Weiskopf N, Ashburner J, et al. MRI investigation of the sensorimotor cortex and the corticospinal tract after acute spinal cord injury: a prospective longitudinal study[J]. Lancet Neurol, 2013, 12(9): 873-881.
- 周贵勤, 陈新寿, 师宁, 等. 颅脑损伤患者外周血 miRNA-124 与 Treg 细胞和 IL-10 表达的关系 [J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11(6): 518-520.
- Mar FM, da Silva TF, Morgado MM, et al. Myelin lipids inhibit axon regeneration following spinal cord injury: a novel perspective for therapy [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2): 1052-1064.
- 周治来, 陈银海, 靳安民, 等. 运动训练对脊髓损伤大鼠 Nogo-A, NgR mRNA 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2011, 26(2): 143-147.

(收稿日期 2017-04-25)

(本文编辑 蔡华波)