

· 综述 ·

微RNAs在脊髓缺血再灌注损伤中的研究进展

刘智明,宗缘,章鼎,尹飞*

吉林大学中日联谊医院脊柱外科,长春 130033

【关键词】微RNAs;脊髓;再灌注损伤;文献综述

【中图分类号】R 651.21 【文献标志码】A 【文章编号】1672-2957(2022)04-0268-05

【DOI】10.3969/j.issn.1672-2957.2022.04.010

Research progress of microRNAs in spinal cord ischemia-reperfusion injury

Liu Zhiming, Zong Yuan, Zhang Ding, Yin Fei*

Department of Spinal Surgery, China-Japan Union Hospital of Jilin University, Changchun 130033, Jilin, China

【Key Words】MicroRNAs; Spinal cord; Reperfusion injury; Review literature

J Spinal Surg, 2022, 20(4): 268-272

脊髓缺血再灌注损伤(SCII)是胸、腹主动脉术后最严重的并发症之一,可导致严重的神经功能障碍,甚至瘫痪^[1]。SCII主要包括缺血和再灌注2个阶段,缺血发生在体内大动脉阻断或循环停止期间,再灌注包括活性氧和炎症细胞因子的释放以及细胞凋亡^[2]。SCII的具体发生机制目前尚不清楚,近年来,对SCII的病因和发生机制的研究主要包括氧自由基介导的脂质过氧化损伤、炎症反应^[3-5]、细胞内Ca²⁺超载^[6-7]、以谷氨酸盐为主的兴奋性氨基酸的毒性作用^[8]、细胞凋亡^[9-10]和细胞自噬^[11-12]等。微RNA(miRNA)是一类长度为19~25个核苷酸的非编码单链RNA,可以通过和其靶mRNA的3'非编码区(3'-UTR)上的互补核苷酸配对来抑制mRNA或蛋白质的合成,调控靶基因的表达,从而进一步调节细胞的生长、增殖、分化和凋亡^[13]。靶基因的抑制或降解主要取决于miRNA与其靶基因的互补程度,如miRNA与目标mRNA部分配对,会抑制蛋白质合成;如miRNA与其靶mRNA完美(或接近完美)配对,则会导致mRNA降解。单个miRNA可以靶向数百个mRNA,并影响许多基因的表达。据统计,miRNAs能够调节人类基因组中多达30%的编

码基因^[14]。此外,miRNAs的作用机制涉及多种重要过程,包括凋亡、分化、发育、增殖和信号转导等。miRNAs已被证实与许多疾病的发生有关,包括自身免疫性疾病(如哮喘、嗜酸性食管炎、过敏性鼻炎和湿疹)^[15]、癌症^[16]、糖尿病及心血管疾病^[17-18]、骨骼肌肉疾病^[19]。miRNAs因在细胞液中的稳定性、在人类和哺乳动物之间的保守性和组织特异性成为重要的生物标志物,在调节神经系统疾病(包括SCII)中发挥着至关重要的作用^[20-21]。

有研究发现,多种miRNA参与了SCII的发生,并通过不同的作用机制对SCII产生不同的影响。其中有些miRNA在SCII发生后表达上调,促进SCII的发生和发展,被称作负性调控miRNA,包括miR-372、miR-124、miR-204、miR-30c和miR-448^[22-26];有些miRNA在SCII发生后表达下调,抑制SCII的发生和发展,被称作正性调控miRNA,包括miR-22-3p、miR-199a-5p、miR-129-5p、miR-27a、miR-186-5p、miR-221和miR-497^[27-33]。本文查阅了近年国内外miRNA对SCII影响的相关研究,分析不同miRNA对SCII的正向和负向调控作用,为治疗SCII提供新思路。

1 负性调控 miRNAs

1.1 miR-372

Li等^[22]建立大鼠SCII模型,取脊髓组织观察

*通信作者(Corresponding author)

基金项目 吉林省卫生与健康技术创新项目(2020J045)

作者简介 刘智明(1994—),硕士在读,医师;ming941226@163.com

通信作者 尹飞 yinfei999@jlu.edu.cn

发现, SCII 模型组大鼠脊髓组织 miR-372 水平明显升高, Beclin-1 蛋白水平降低; 采用 miR-372 抑制剂转染 SCII 细胞后发现, 促凋亡调节因子 Bax 的蛋白水平降低。采用双荧光素酶报告实验研究 miR-372 与 Beclin-1 的关系, 结果表明, miR-372 抑制了损伤细胞 Beclin-1 的荧光素酶活性, miR-372 抑制剂则增强了 Beclin-1 的荧光素酶活性, 即 miR-372 负调控 Beclin-1 表达。为了进一步证实了 miR-372 抑制剂对动物模型的保护作用, 在大鼠 SCII 模型脊髓损伤区注射 miR-372 抑制剂, 结果显示, 与对照组相比, 注射 miR-372 抑制剂能更好地促进 SCII 大鼠的运动功能恢复。综上, miR-372 抑制剂可通过上调 Beclin-1 减少神经细胞凋亡。

1.2 miR-124

Liu 等^[23]的研究发现, 与假手术组相比, SCII 组脊髓组织中 miR-124 的表达略有提高, 转染 miR-124 反义寡核苷酸 (antagomiR-124) 后 miRNA-124 和 p53 的表达显著降低, 而细胞有丝分裂标志物 Beclin-1 和 LC3-II 的表达增高。具体表现为, 与对照组比较, anagomiR-124 转染组 SCII 发生 6、12、24 和 48 h 后的运动缺陷指数 (MDI) 明显降低, 大鼠腰段脊髓运动神经元增加, 凋亡细胞减少。综上, 抑制 miRNA-124 对 SCII 的抑制作用, 可能是通过诱导细胞有丝分裂和抗细胞凋亡作用实现的。

1.3 miR-204

Yan 等^[24]的研究发现, SCII 发生 6、12 和 24 h 后, miR-204 的表达明显增强, 而 LC3-II 与 LC3-I 比值和 Bcl-2 表达明显下调。与对照组相比, 鞘内注射 antagomiR-204 可显著抑制缺血后脊髓 miR-204 和 caspase-3 的表达, 显著上调 Beclin-1、Bcl-2 的表达以及 LC3-II 与 LC3-I 比值。此外, 鞘内注射 antagomiR-204 显著降低 SCII 发生 6、12、24 和 48 h 后的 MDI, 增加神经元数量, 减少神经元凋亡。综上, 抑制 miR-204 对 SCII 的抑制作用, 可能是通过促进细胞自噬和抗细胞凋亡作用实现的。

1.4 miR-30c

Wang 等^[25]通过大鼠 SCII 模型和 P12 细胞氧糖剥夺 (OGD) 模型研究发现, 与假手术组相比, SCII 后 miR-30c 的表达上调, SIRT1 的表达下调, 具体表现为 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分降低, P12 细胞凋亡增加, 白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达增加。miR-30c 基因敲除组与假手术组相比, 大鼠血清和脊髓组织中 IL-6 和 TNF- α

蛋白和 mRNA 水平大幅降低。与对照组相比, 转染 miR-30c 的 PC12 OGD 细胞模型中 SIRT1 的荧光素酶活性显著下降; 在转染了抗 miR-30c 的 PC12 OGD 模型中 IL-6 表达水平降低, 说明下调 miR-30c 基因表达可以通过 SIRT1 途径来抑制大鼠 SCII, 还可减少 OGD 处理后 PC12 细胞的凋亡和炎症反应。综上, miR-30c 可能是 SCII 的致病因素之一, 也是判断 SCII 预后的生物标志物和潜在的治疗靶点。

1.5 miR-448

Wang 等^[26]的研究发现, miR-448 在 SCII 组织中表达显著增加, SIRT1 表达显著降低。流式细胞仪检测结果发现缺氧可明显促进细胞凋亡, PC12 细胞经过缺氧处理后 miR-448 表达上调, SIRT1 表达明显下调。而 miR-448 抑制剂通过上调 SIRT1 逆转缺氧诱导的细胞凋亡, 改善神经功能, 缓解 SCII。

2 正性调控 miRNAs

2.1 miR-22-3p

Fang 等^[27]的研究发现, SCII 发生 12 h 后, miR-22-3p 表达明显下调, 干扰素调节因子 5 (IRF5) 表达上调。双荧光素酶报告基因检测表明 IRF5 是 miR-22-3p 的靶基因, 可以被 miR-22-3p 负调控。过表达 miR-22-3p 或沉默 IRF5 可减轻脊髓组织的炎症反应, 提高 Tarlov 评分, 减轻 SCII 的程度。有研究^[28]发现, 巨噬细胞是 SCII 重要的效应细胞, SCII 脊髓组织来源的巨噬细胞中 IRF5 的表达显著提高, 上调 miR-22-3p 表达可促进巨噬细胞极化, 并通过抑制 IRF5 抑制组织炎症反应, 从而减轻脊髓 SCII。综上, 上调 miR-22-3p 表达可抑制巨噬细胞内 IRF5 的表达, 从而抑制 SCII 的发展, 为治疗 SCII 提供了新的靶点。

2.2 miR-199a-5p

Bao 等^[29]的研究发现, 与假手术组比较, SCII 组脊髓组织中 miR199a-5p 的表达显著下调。将 miR-199a-5p 模拟物、miR-199a-5p 抑制剂和生理盐水分别注入 SCII 组大鼠髓鞘内 5 d 后检测 miR-199a-5p 的表达水平, 结果显示, SCII 组大鼠 BBB 评分较假手术组明显降低, miR-199a-5p 模拟物组较生理盐水组显著升高, miR-199a-5p 抑制剂组较生理盐水组显著降低。此外, 在 SCII 发生 24 h 后, 与假手术组比较, 生理盐水组和 miR-199a-5p 抑制剂组神经元数量明显减少、细胞凋亡率明显增高; miR-199a-5p 模拟物组神经元数量显著增加, 细胞凋亡率明显降低, 证明 miR-199a-5p 对大鼠 SCII 有抑制作用。

2.3 miR-129-5p

Li等^[30]的研究发现,与假手术组相比,SCII发生12、48 h后,miR-129-5p表达均明显下调,高迁移率族蛋白-1(HMGB1)水平从SCII发生12 h后开始显著升高。荧光素酶报告实验发现miR-129-5p负向调节HMGB1。SCII发生后,损伤细胞立即释放HMGB1,并通过趋化因子和细胞因子募集大量的炎性细胞因子,损伤脊髓组织。此外,HMGB1在损伤脊髓中的表达随着时间的推移而增加。与假手术组相比,鞘内注射miR-129-5p模拟物可显著抑制HMGB1和TLR3的表达。综上所述,miR-129-5p通过抑制HMGB1来减轻SCII后神经炎性反应。

2.4 miR-27a

Li等^[31]通过溴化乙锭(EB)染色渗出法观察血-脊髓屏障(BSCB)的通透性。结果显示,与假手术组相比,SCII发生24、72 h时,SCII组EB渗出明显增加;鞘内注射miR-27a模拟物可减轻BSCB功能障碍,表现为SCII发生24、72 h时EB渗出和荧光染料含量减少;鞘内注射抗miR-27a寡核苷酸(AMO-27a)却加重了BSCB的EB渗漏。与SCII组和阴性对照组相比,鞘内注射miR-27a可减轻SCII诱导的TLR4激活和炎性损伤,表现为SCII发生24、72 h时EB渗出减少,核因子- κ B(NF- κ B)和IL-1 β 水平降低。综上,miR-27a通过抑制TLR4信号通路和NF- κ B/IL-1 β 通路来减轻SCII诱导的脊髓组织炎性损伤,为SCII的治疗提供了新的治疗靶点。

2.5 miR-186-5p

Chen等^[32]的研究发现,SCII发生后miR-186-5p水平显著降低。鞘内注射miR-186-5p模拟物、AMO-186-5p或生理盐水24 h后,miR-186-5p模拟物组miR-186-5p表达显著增加,AMO-186-5p组则相反。与生理盐水组比较,miR-186-5p模拟物组大鼠神经元明显增多,而AMO-186-5p组大鼠神经元坏死或死亡明显增多。术前用miR-186-5p预处理可改善神经功能和组织学评分,减轻脊髓水肿,降低IL-15、IL-6、IL-1 β 和TNF- α 的表达。综上,miR-186-5p可通过减轻脊髓水肿来抑制SCII。

2.6 miR-221

Zhao等^[33]采集20例SCII患者的血样,并以20名健康人群的血样作为对照。AGE1.HN和SY-SH-5Y神经细胞系在OGD条件下进行实验。结果显示,SCII患者miR-221的表达水平低于健康对照组,TNFAIP2的表达水平高于健康对照组。在AGE1.HN

和SY-SH-5Y神经细胞SCII模型中,miR-221表达明显下调,TNFAIP2和炎性细胞因子TNF- α 和IL-6水平均升高,细胞凋亡百分比增加。以上结果证明,TNFAIP2是miR-221的靶基因,受miR-221的负调控,miR-221过表达可抑制炎症反应和细胞凋亡,敲除miR-221基因后炎症反应和细胞凋亡增加。综上,miR-221过表达可逆转TNFAIP2诱导的炎症反应和细胞凋亡。

2.7 miR-497

Xu等^[34]的研究发现,与SCII组相比,miR-497模拟物预处理组上调了miR-497表达,IL-1受体相关激酶(IRAK1)和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)的表达显著降低。miR-497转染后,作为miR-497潜在靶点的Toll样受体4(TLR4)、NF- κ B和Caspase-3被显著抑制,从而阻止了炎性细胞因子和凋亡调节因子的产生。ERK、Bax、Bcl-2和Bcl-xl等促凋亡相关基因的表达均随着IRAK1和CREB的下调而降低。综上,miR-497通过抑制IRAK1和CREB信号通路减轻脊髓的炎症反应和细胞凋亡来抑制SCII。

3 结语与展望

目前对SCII的治疗包括药物治疗,如激素冲击联合神经营养药物、他汀类药物、米诺环素和中药,还包括缺血预处理、低温预处理和高压氧疗法等。miRNA作为非编码单链RNA,可负性调控靶基因的表达,在抑制SCII方面发挥了至关重要的作用。在SCII发生后,正性调控miRNAs表达量下降,若高表达此类正性调控miRNAs,其对应的靶基因表达量将下降,从而抑制SCII;负性调控miRNA在SCII发生后表达量升高,对应的靶基因表达量下降,而这些靶基因的翻译产物却对SCII有抑制作用,而抑制负性调控miRNAs表达,使靶基因表达量升高,可抑制SCII。总之,2种不同类型的miRNAs主要是通过减少细胞凋亡和自噬、抑制炎症反应和减轻脊髓水肿发挥抑制SCII的作用,为临床治疗SCII提供了新思路。

虽然近年来已经进行了相当多涉及miRNA疗法的临床研究,但到目前为止只有一小部分miRNA进入临床开发阶段。miRNA疗法的挑战:①确定不同疾病的最佳miRNA靶点。②设计miRNA递送载体。③使候选治疗药物具有更高的稳定性,实现组织特异性靶向。④避免潜在的毒性和靶外效应。

⑤miRNA 治疗的特异性差,可能会损伤其他不需要治疗的正常组织和器官,达不到预期的治疗效果。例如为了克服癌症中 miRNA 表达异质性带来的障碍,需要在疾病进展过程中对各种组织在不同时间进行多次活检,以确定该 miRNA 调控的 mRNA,然后对其进行治疗操作。为了解决这些难题,近年来,科学家们正在积极探索其可能的解决方案,包括结合并参考 TargetScan 等预测网站预测 miRNA 的靶点,识别与疾病相关的 miRNA 和 mRNA。此外,在疾病特异性过程中寻找关键调控 miRNA 的另一个策略是使用 miRNA 模拟物或抑制剂进行全基因组功能筛选。目前,基因组和蛋白质组数据的激增有助于识别药物开发的关键 miRNA 靶点,应该能够使 miRNA 疗法成为现实。

参考文献

- [1] Li R, Zhao K, Ruan Q, *et al.* The transcription factor Foxd3 induces spinal cord ischemia-reperfusion injury by potentiating microRNA-214-dependent inhibition of Kenk2[J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(1): 118-129.
- [2] Balsam LB. Spinal cord ischemia-reperfusion injury: microRNAs and mitophagy at a crossroads[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2017, 154(5): 1509-1510.
- [3] Mazani M, Argani H, Rashtchizadeh N, *et al.* Effects of zinc supplementation on antioxidant status and lipid peroxidation in hemodialysis patients[J]. *J Ren Nutr*, 2013, 23(3): 180-184.
- [4] Fu J, Sun H, Zhang Y, *et al.* Neuroprotective effects of luteolin against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *J Med Food*, 2018, 21(1): 13-20.
- [5] Gokce EC, Kahveci R, Gokce A, *et al.* Curcumin attenuates inflammation, oxidative stress, and ultrastructural damage induced by spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(5): 1196-1207.
- [6] Sun Z, Zhao T, Lv S, *et al.* Dexmedetomidine attenuates spinal cord ischemia-reperfusion injury through both anti-inflammation and anti-apoptosis mechanisms in rabbits[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 209.
- [7] Sun JF, Yang HL, Huang YH, *et al.* CaSR and calpain contribute to the ischemia reperfusion injury of spinal cord[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 646: 49-55.
- [8] Paquot F, Huart J, Defraigne JO, *et al.* Implications of the calcium-sensing receptor in ischemia/reperfusion[J]. *Acta Cardiol*, 2017, 72(2): 125-131.
- [9] Chang CH, Chen HX, Yü G, *et al.* Curcumin-protected PC12 cells against glutamate-induced oxidative toxicity[J]. *Food Technol Biotechnol*, 2014, 52(4): 468-478.
- [10] Fang B, Qin M, Li Y, *et al.* Electroacupuncture preconditioning and postconditioning inhibit apoptosis and neuroinflammation induced by spinal cord ischemia reperfusion injury through enhancing autophagy in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 642: 136-141.
- [11] Xie L, Wang Z, Li C, *et al.* Protective effect of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) against spinal cord ischemia-reperfusion injury *via* reducing oxidative stress-induced neuronal apoptosis[J]. *J Clin Neurosci*, 2017, 36: 114-119.
- [12] Yin J, Yin Z, Wang B, *et al.* Angiopoietin-1 protects spinal cord ischemia and reperfusion injury by inhibiting autophagy in rats[J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(12): 2746-2754.
- [13] Lan H, Lu H, Wang X, *et al.* MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 125094.
- [14] Bernardo BC, Ooi JY, Lin RC, *et al.* miRNA therapeutics: a new class of drugs with potential therapeutic applications in the heart[J]. *Future Med Chem*, 2015, 7(13): 1771-1792.
- [15] Lu TX, Rothenberg ME. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [16] Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer[J]. *Annu Rev Pathol*, 2009, 4: 199-227.
- [17] Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 93(4): 583-593.
- [18] Ding Y, Sun X, Shan PF. MicroRNAs and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *biomed res int* [J]. 2017, 2017: 4080364.
- [19] Winbanks CE, Ooi JY, Nguyen SS, *et al.* MicroRNAs differentially regulated in cardiac and skeletal muscle in health and disease: potential drug targets?[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2014, 41(9): 727-737.
- [20] Huang C, Yu M, Yao X. MicroRNA-17 and the prognosis of human carcinomas: a systematic review and meta-analysis[J]. *BMJ Open*, 2018, 8(5): e018070.
- [21] Tigchelaar S, Gupta R, Shannon CP, *et al.* MicroRNA biomarkers in cerebrospinal fluid and serum reflect injury severity in human acute traumatic spinal cord injury[J].

- J Neurotrauma, 2019, 36(15): 2358-2371.
- [22] Li X, Lou X, Xu S, *et al.* Knockdown of miR-372 inhibits nerve cell apoptosis induced by spinal cord ischemia/reperfusion injury *via* enhancing autophagy by up-regulating beclin-1 [J]. J Mol Neurosci, 2018, 66(3): 437-444.
- [23] Liu K, Yan L, Jiang X, *et al.* Acquired inhibition of microRNA-124 protects against spinal cord ischemia-reperfusion injury partially through a mitophagy-dependent pathway [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2017, 154(5): 1498-1508.
- [24] Yan L, Shi E, Jiang X, *et al.* Inhibition of microRNA-204 conducts neuroprotection against spinal cord ischemia [J]. Ann Thorac Surg, 2019, 107(1): 76-83.
- [25] Wang X, Su X, Gong F, *et al.* MicroRNA-30c abrogation protects against spinal cord ischemia reperfusion injury through modulating SIRT1 [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 851: 80-87.
- [26] Wang Y, Pang QJ, Liu JT, *et al.* Down-regulated miR-448 relieves spinal cord ischemia/reperfusion injury by up-regulating SIRT1 [J]. Braz J Med Biol Res, 2018, 51(5): e7319.
- [27] Fang H, Yang M, Pan Q, *et al.* MicroRNA-22-3p alleviates spinal cord ischemia/reperfusion injury by modulating M2 macrophage polarization *via* IRF5 [J]. J Neurochem, 2021, 156(1): 106-120.
- [28] Zhao J, Wang L, Li Y. Electroacupuncture alleviates the inflammatory response *via* effects on M1 and M2 macrophages after spinal cord injury [J]. Acupunct Med, 2017, 35(3): 224-230.
- [29] Bao N, Fang B, Lv H, *et al.* Upregulation of miR-199a-5p protects spinal cord against ischemia/reperfusion-induced injury *via* downregulation of ECE1 in rat [J]. Cell Mol Neurobiol, 2018, 38(6): 1293-1303.
- [30] Li XQ, Chen FS, Tan WF, *et al.* Elevated microRNA-129-5p level ameliorates neuroinflammation and blood-spinal cord barrier damage after ischemia-reperfusion by inhibiting HMGB1 and the TLR3-cytokine pathway [J]. J Neuroinflammation, 2017, 14(1): 205.
- [31] Li XQ, Lv HW, Wang ZL, *et al.* MiR-27a ameliorates inflammatory damage to the blood-spinal cord barrier after spinal cord ischemia: reperfusion injury in rats by downregulating TICAM-2 of the TLR4 signaling pathway [J]. J Neuroinflammation, 2015, 12: 25.
- [32] Chen F, Li X, Li Z, *et al.* Altered expression of MiR-186-5p and its target genes after spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Neurosci Lett, 2020, 718: 134669.
- [33] Zhao D, Deng SC, Ma Y, *et al.* miR-221 alleviates the inflammatory response and cell apoptosis of neuronal cell through targeting TNFAIP2 in spinal cord ischemia-reperfusion [J]. Neuroreport, 2018, 29(8): 655-660.
- [34] Xu M, Wang HF, Zhang YY, *et al.* Protection of rats spinal cord ischemia-reperfusion injury by inhibition of MiR-497 on inflammation and apoptosis: possible role in pediatrics [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 81: 337-344.

(接受日期: 2021-05-31)

(本文编辑: 张建芬)