

大鼠脊髓损伤后miR-146a表达及其对炎症反应的调控

周玉兰¹, 闫守泉², 江莲英¹, 王家丰^{2*} (广东医科大学附属第一医院 1. 临床医学研究中心; 2. 干细胞研发与临床转化中心, 广东湛江 524001)

摘要: 目的 探讨miR-146a在脊髓损伤炎症反应中作用机制。方法 脊髓损伤大鼠模型静脉注射miR-146a抑制剂/激动剂, 并检测IRAK1和TRAF6及下游炎症因子表达, 利用萤光素酶实验验证miR-146a是否直接作用于IRAK1和TRAF6基因。结果 阴性对照组miR-146a表达在脊髓损伤后明显上调($P<0.01$)。大鼠IRAK1和TRAF6基因及下游炎症因子表达在静脉注射miR-146a抑制剂后显著增加($P<0.01$), 而在注射miR-146a激动剂后显著减少($P<0.01$)。miR-146a明显抑制含有IRAK1和TRAF6基因3'UTR区萤光素酶载体表达($P<0.01$)。结论 miR-146a可靶向下调IRAK1和TRAF6基因表达, 在脊髓损伤恢复过程中发挥积极作用。

关键词: 脊髓损伤; miR-146a; 炎症反应

中图分类号: R 651.15

文献标识码: A

文章编号: 2096-3610(2017)06-0596-06

miR-146a expression and its regulation of inflammatory response in rats with spinal cord injury

ZHOU Yu-lan¹, YAN Shou-quan², JIANG Lian-ying¹, WANG Jia-feng^{2*} (1. Clinical Research Center; 2. Stem Cell Research and Clinical Translation Center; Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the action mechanism of miR-146a on spinal cord injury (SCI)-induced inflammation response. **Methods** miR-146a inhibitors/mimics were intravenously injected into rat SCI model. Expression of IRAK1, TRAF6 and downstream inflammatory cytokines was detected. The direct effect of miR-146a on IRAK1 and TRAF6 genes was testified by luciferase reporter assay. **Results** miR-146a was over-expressed after SCI in negative control group ($P<0.01$). Expressions of IRAK1, TRAF6 and downstream inflammatory cytokines was increased after injection of miR-146a inhibitors ($P<0.01$), but decreased after injection of miR-146a mimics ($P<0.01$). miR-146a remarkably inhibited expression of luciferase vector incorporating 3'UTR of IRAK1 and TRAF6. **Conclusion** miR-146a can downregulate expression of target genes IRAK1 and TRAF6, which plays a positive role in SCI recovery.

Key words: spinal cord injury; miR-146a; inflammatory response

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指由于外力直接或间接作用于脊髓导致的损伤。SCI一般愈后较差, 给患者及其家庭造成巨大的痛苦和沉重的负担。实验研究已经开发有多种不同的脊髓损伤治疗途径^[1-7], 但到目前为止, 临床上尚未找到任何一种可以完全治愈或具有显著疗效的SCI治疗方法。研究表明很多基因的表达以及转录后调控在SCI后发挥重要的作用^[8-10], 同时, miRNA因为可以抑制mRNA的翻译逐渐成为重要的转录后调控方式, 受到越来越

多研究者的关注^[11-13]。SCI引起miRNA的差异表达可能具有调控基因表达的潜力而在此过程中发挥重要作用^[14]。研究发现miR-146a参与调控炎症反应相关基因而与机体炎症过程关系密切^[15-18]。我们前期借助RNA-seq技术检测SCI患者miRNAs和mRNA表达变化时发现miR-146a表达量显著变化。本研究拟利用SCI动物模型初步探索miR-146a通过调控其靶基因而参与SCI炎症反应的机制, 为临床SCI治疗寻找良好的理论依据和治疗靶点。

基金项目: 国家自然科学基金(No.81600445), 广东省医学科研基金(No.A2016522), 广东医科大学附属第一医院博士科研基金(No.528B20150012), 广东医科大学科研基金(No.2XJ14006, 2XJ14040)

收稿日期: 2017-07-10; **修订日期:** 2017-10-10

作者简介: 周玉兰(1983-), 女, 硕士, 助教。

***通信作者:** 王家丰(1983-), 男, 博士, 助理研究员, E-mail: wangjiafeng_gz@163.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2.5月龄成年雌性Wistar大鼠(约300 g)被用于SCI模型的构建和后续miR-146a表达规律和作用机制的研究。Wistar大鼠购自广东省医学实验动物中心，大鼠采用笼养方式饲养，自由获取饲料和饮用水。

1.2 模型构建与实验分组

大鼠脊髓夹伤SCI动物模型制作参照Plemel等^[19]的方法，实验动物分为以下4组(每组12只)：假手术组(Sham)、对照组(SCI+NC)、抑制剂组(SCI+antagomir)、激动剂组(SCI+mimics)。Sham组除了椎板去除术外不做任何处理；其余3组正常进行SCI动物模型建立，建模后在第1、3、5天通过尾静脉分别注射80 mg/kg(参考瑞博动物实验angomir/antagomir用量说明)的miR-146a-antagomir的阴性对照物、miR-146a-antagomir和miR-146a-mimics。所有分组老鼠经过实验处理后进行如下顺序取样：第1天处死3只，第3天处死3只，第7天全部处死剩余的老鼠。

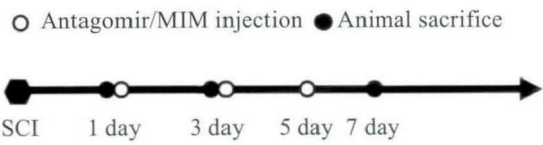


图1 动物实验处理与取样时间轴

1.3 荧光定量PCR检测

实验利用荧光定量PCR检测miR-146a以及其候选靶基因IRAK1和TRAF6转录水平在不同分组间的差异，mRNA水平检测采用GAPDH作为内参基因，miRNAs水平检测采用U6作为内参基因。

表1 荧光定量PCR扩增引物列表

引物名称	引物序列
IRAK1 Forward	TACCTGCCCCGAGGAGTACATCAA
IRAK1 Reverse	TCCTCTTCCACCAGGTCTTTCAGA
TRAF6 forward	TCA TTA TGA TCT GGA CTG CCC AAC
TRAF6 reverse	TGC AAG TGT CGT GCC AAG TG
GAPDH forward	TGT TCC TAC CCC CAA TGT G
GAPDH reverse	GTG TAG CCC AAG ATG CCC T
miR-146a forward	TGA GAA CTG AAT TCC ATG GGT
U6 forward	GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA A
U6 reverse	CGA ATT TGC GTG TCA TCC TT

1.4 免疫印迹检测

利用WB技术检测不同分组候选靶基因IRAK1和

TRAF6的蛋白表达量水平在不同分组的差异。

1.5 ELISA

利用酶联免疫反应检测不同分组炎症反应的下游炎症因子表达水平(包括IL-1 β ，IL-6，IL-8，TNF- α 以及RANTES)，具体操作参考实验试剂盒说明书。

1.6 BBB评分

根据BBB评分原则^[20]，对不同时间段的不同分组的动物模型进行运动能力评分，以此来反映动物模型SCI恢复程度和效率。每组实验动物分别在SCI术后的第1、3、7天随机选取5只动物，进行BBB评分。

2 结果

2.1 miR-146a的表达

(SCI+NC)组的miR-146a表达量在SCI术后第3天较第1天显著上调($P<0.01$)，亦高于(SCI+antagomir)组($P<0.01$)；(SCI+antagomir)组术后第3天miR-146a水平较第1天显著降低($P<0.05$)；两组术后第7天与第3天差异无统计学意义。见图2。

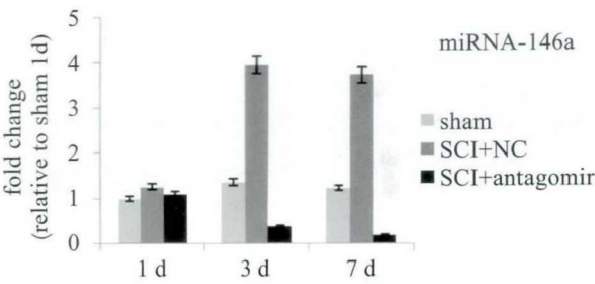


图2 SCI动物模型miR-146a在不同时间点表达量变化

2.2 IRAK1与TRAF6基因的转录与蛋白水平检测

SCI+antagomir组的TRAF6与IRAK1在术后3、7 d转录水平较术后1 d均显著升高($P<0.01$)，亦高于其余3组($P<0.01$)；SCI+NC组与SCI+mimics组的TRAF6与IRAK1在术后3、7 d转录水平较术后1 d均有下降，亦低于Sham组。见图3。利用Western Blot检测SCI手术7 d后，IRAK1和TRAF6基因蛋白表达量在不同分组中的变化。结果显示：SCI+antaomir组IRAK1和TRAF6基因蛋白表达量显著高于Sham组和SCI+NC组($P<0.05$)。SCI+mimics组IRAK1和TRAF6基因蛋白表达量变化不显著。见图4。

2.3 荧光素酶检测miR-146a靶向结合IRAK1和TRAF6基因

荧光素酶实验结果显示含有IRAK1和TRAF6基因3'UTR区的载体细胞在受到miR-146a mimics刺激

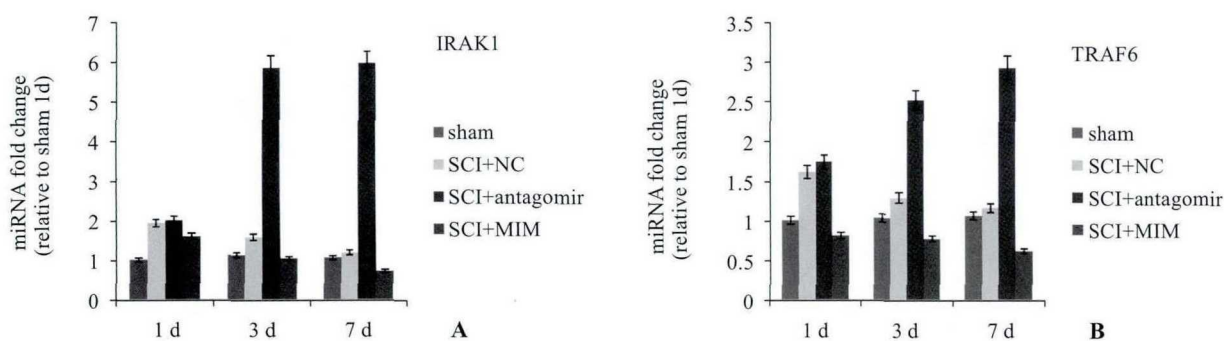
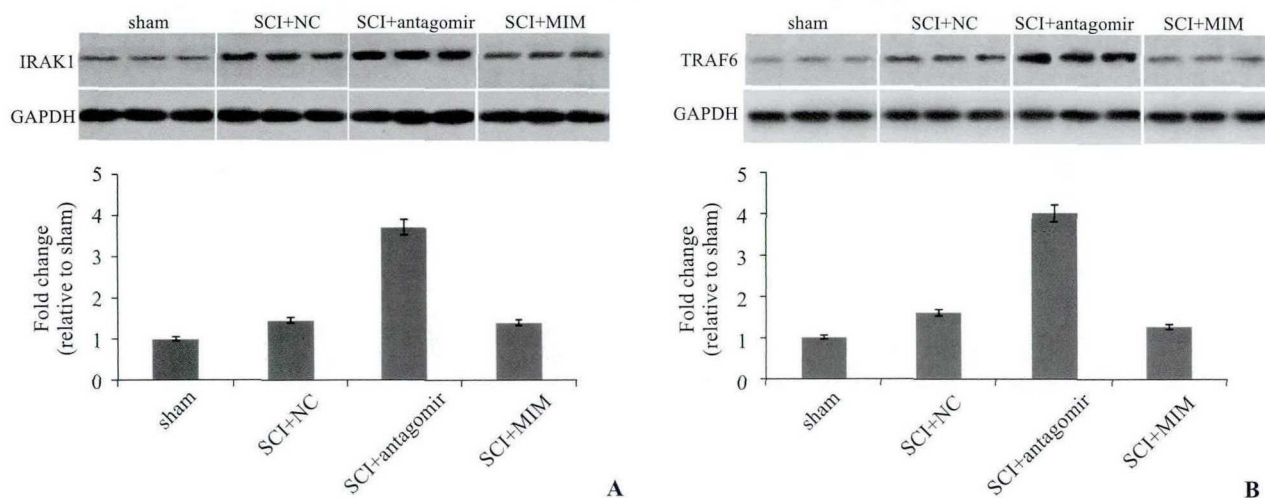


图3 SCI动物模型TRAF6(A)与IRAK1(B)基因在不同分组不同时间段转录水平变化



A: western检测IRAK1基因表达蛋白水平; B: western检测TRAF6基因表达蛋白水平

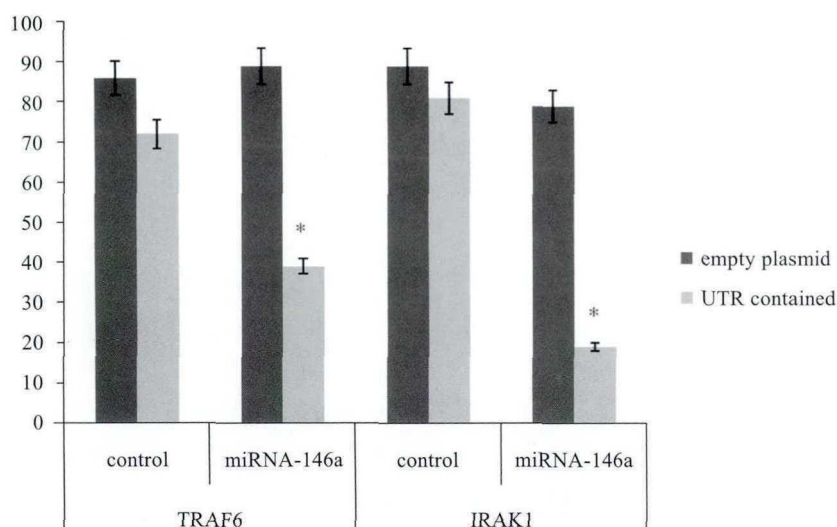
图4 SCI动物模型IRAK1与TRAF6基因在不同时间段的蛋白水平

后, 萤光素酶活性受到显著的抑制($P < 0.05$), 而对照组则没有显著变化(图5)。

2.4 酶联免疫检测炎症因子水平

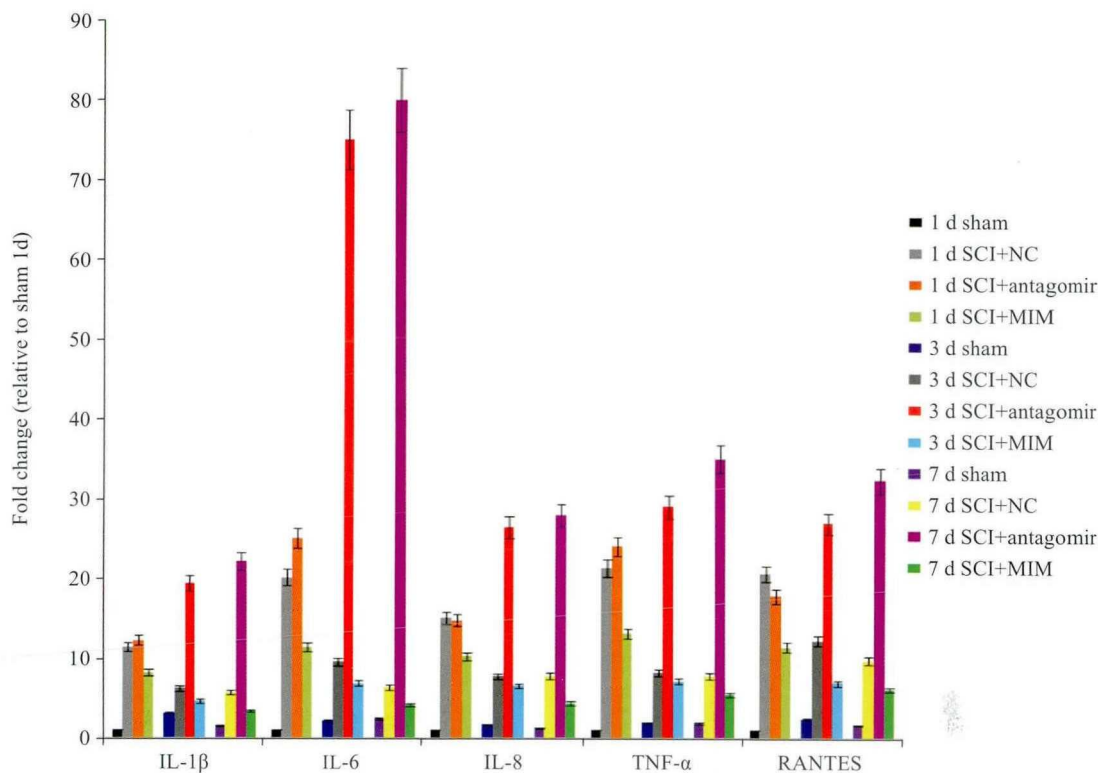
在SCI术后第1天, 引入SCI的分组中候选各种炎症因子水平较Sham组已经显著上升($P < 0.05$); 而在

第3天, SCI+NC组炎症因子水平反而相对第1天有所回落。但在SCI+antagomir组, 各种炎症因子水平异常高, 均达到显著水平($P < 0.05$)。而SCI+mimics组则相对变化较小, 在SCI后第3、7天反而有所下降, 甚至显著低于SCI+NC组水平($P < 0.05$)。



含IRAK1和TRAF6基因3'UTR的质粒在miR-146a mimics刺激下表达显著下调

图5 IRAK1和TRAF6基因3'UTR区萤光素酶实验检测

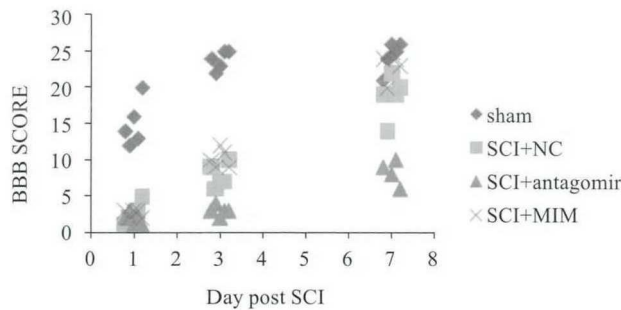


每种炎症因子从左到右3组依次为SCI术后第1、3、7天，每组4种颜色柱状图为不同处理组。均以sham组SCI后第1天的表达量为1作为参照标准。

图6 SCI动物模型在不同分组不同时间段炎症因子水平

2.5 运动能力评分

Sham组在术后第1天表现出轻微的后肢运动影响，术后第3天肢体运动能力已经基本正常。其余3组术后第1天基本丧失后肢运动能力，后肢处于完全麻痹状态，对疼痛刺激无反应或反应迟钝，仅能够靠前肢运行取食和饮水。术后第3天，SCI+NC组后肢运动能力恢复程度显著高于SCI+antagomir组 ($P<0.05$)，术后第7天，SCI+NC组与SCI+mimics组基本恢复后肢运动能力；SCI+antagomir组仍然存在后肢运动障碍，后肢受力不均匀，运动轨迹不规则等现象，运动能力显著低于另外3组动物。



因SCI+antagomir组实验动物SCI术后第1、3天各有1只动物可能因为过度炎症反应或者感染导致先后死亡，以至于在SCI术后第7天，在SCI+antagomir组仅有4只动物的BBB评分。

图7 不同分组SCI动物模型BBB评分结果散点图

3 讨论

SCI的发病率逐年递增，统计数据显示在美国每年新增1.1万SCI患者^[21]，而在我国每年新增SCI患者超过6万人。20世纪80年代科学家发现在适当条件下脊髓有神经细胞再生，SCI存在恢复的可能^[22-23]。因此SCI后恢复研究也成为热点。

目前已经有诸多实验研究发现miRNA在SCI后的表达规律和功能特点^[24-25]。SCI引起miRNA的差异表达可能具有调控基因表达的潜力而在此过程中发挥重要作用^[26]。大量研究表明miR-146a是炎症反应的重要调节因子，但是不同研究报道中miR-146a在SCI后的表达量却依然存在一些差异。Yunta等^[26]发现miR-146a与SCI具有显著相关性，而综合统计多种脊椎动物SCI相关miRNAs的研究报道后发现，miR-146a在另外多项研究报道中没有出现差异表达。在详细比较分析对SCI相关miRNA的研究后发现，研究取样在SCI早期，miR-146a则没有明显的上调表达；而取样在在SCI损伤后的第7天(甚至更长)时，miR-146a表达量显著上调。我们的研究结果与上述分析一致：在SCI术后第1天，miR-146a的表达量实际上并没有上调；而在SCI术后的第3、7天，miR-146a的表达水平则显著上调表达。同时，

我们还发现炎症反应在SCI术后很短时间内(第1天)就已经启动;Xie等^[15]发现miR-146a在参与炎症反应过程中,其转录表达可能受到NF- κ B的驱动。因此我们推测miR-146a在SCI后的上调表达与炎症因子相比较,很可能具有一定时间滞后性。miR-146a的上调表达可能是受到炎症因子的激活作用,所以在炎症因子升高之前(SCI术后第1天之前)miR-146a的上调表达还没有被激活启动,miR-146a的表达水平仅仅在正常水平;随后受到上调表达的炎症因子的刺激miR-146a启动上调表达。

miR-146a可能抑制细胞的炎症反应^[15,26]。但是在SCI后miR-146a是否参与调控其炎症反应及其主要的靶基因都不明确。本研究发现miR-146a确实与SCI炎症反应具有明显的负相关,可能在SCI恢复过程中对炎症反应的调控具有重要的作用。萤光素酶实验确定在SCI动物模型中miR-146a能够直接作用于IRAK1和TRAF6基因的3'UTR区;抑制miR-146a后IRAK1和TRAF6基因表达量显著上调,下游炎症因子表达量也明显升高,证明出现了更加严重的炎症反应。反之,miR-146a-mimics也明显降低IRAK1和TRAF6基因的表达,炎症因子水平也进一步降低。这与以往的研究结果相一致。

本研究首次提出miR-146a参与SCI过程的炎症反应,发现SCI后miR-146a上调表达相对于炎症因子存在时间滞后性,推测miR-146a上调表达可能依赖炎症因子升高的刺激。炎症因子刺激细胞受体(TLR等)后引起通路上基因(IRAK1和TRAF6基因)上调表达,并通过激活MAPK等途径引起核内基因转录上调,同时引起miR-146a的转录上调。miR-146a的转录上调又反过来通过抑制IRAK1和TRAF6基因表达而制约该通路的过度激活,从而调控平衡炎症反应。miR-146a在SCI模型中参与一种反馈机制维持的稳定平衡体系,避免脊髓损伤后出现过度的炎症反应,对SCI后运动机能的恢复具有重要意义,miR-146a也为SCI干预治疗提供新的策略与靶点。

参考文献:

- [1] Tobias C A, Shumsky J S, Shibata M, et al. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially rescues axotomized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration[J]. *Exp Neurol*, 2003, 184(1): 97-113.
- [2] Geisler F H, Dorsey F C, Coleman W P. GM1 gangliosides in the treatment of spinal cord injury: report of preliminary data analysis[J]. *Acta Neurobiol Exp*, 1990, 50(4-5): 515-521.
- [3] Hauben E, Agranov E, Gothilf A, et al. Post-traumatic immunization for spinal cord recovery: benefit without risk of pathogenicity[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 591-599.
- [4] Coutts M, Keirstead H S. Stem cells for the treatment of spinalcord injury[J]. *Exp Neurol*, 2008, 209(2): 368-377.
- [5] Sykova E, Jendelova P. Migration, fate and in vivo imaging of adult stem cells in the CNS[J]. *Cell Death & Differ*, 2007, 14(7): 1336-1342.
- [6] Raineteau O. Plastic responses to spinal cord injury[J]. *Behav Brain Res*, 2008, 192 (1): 114-123.
- [7] Dinh P, Bhatia N, Rasouli A, et al. Transplantation of preconditioned Schwann cells following hemisection spinal cord injury[J]. *Spine*, 2007, 32(9): 943-949.
- [8] Nesic O, Svrakic N M, Xu G Y, et al. DNA microarray analysis of the contused spinal cord: effect of NMDA receptor inhibition[J]. *Neurosci Res*, 2002, 68(4): 406-423.
- [9] Bareyre F M, Schwab M E. Inflammation, degeneration and regeneration in the injured spinal cord: insights from DNA microarrays[J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(10): 555-563.
- [10] De Biase A, Knobloch S M, Di Giovanni S, et al. Gene expression profiling of experimental traumatic spinal cord injury as a function of distance from impact site and injury severity[J]. *Physiol Genomics*, 2005, 22(3): 368-381.
- [11] Yunta M, Nieto-Díaz M, Esteban F J, et al. MicroRNA dysregulation in the spinal cord following traumatic injury[J]. *PloS one*, 2012, 7(4): e34534.
- [12] Alvarez-Garcia I, Miska E A. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development*, 2005, 132(21): 4653-4662.
- [13] Zamore P D, Haley B. Ribo-gnome:the big world of small RNAs[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1519-1524.
- [14] Liu G, Detloff M R, Miller K N, et al. Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233: 447-456.
- [15] Xie Y F, Shu R, Jiang S Y, et al. miRNA-146 negatively regulates the production of pro-inflammatory cytokines via NF- κ B signalling in human gingival fibroblasts[J]. *J Inflamm*, 2014, 11(1):38.
- [16] Wang X Q. MiR-146a inhibits oxidized low-density lipoprotein-induced lipid accumulation and inflammatory response via targeting toll-like receptor 4[J]. *Febs Letters*, 2011, 585(6):854-860.
- [17] Aronica E, Fluiter K, Iyer A, et al. Expression pattern of miR-146a, an inflammation-associated microRNA, in experimental and human temporal lobe epilepsy[J]. *Eur J of Neurosci*, 2010, 31(6): 1100-1107.

(下转第605页)

小体识别分子NLRP3、AIM2基因及蛋白表达水平均明显上升,表明NLRP3和AIM2炎症小体可能同时被激活,同时诱导IL-1 β 表达增加。RA患者关节中炎症小体激活介导的IL-1 β 和TNF- α 可能协同作用于关节软骨及滑膜组织。后续研究需进一步阐明TNF- α 诱导滑膜细胞炎症小体的激活机制,并利用动物模型加以验证。

参考文献:

- [1] Huang Q Q, Birkett R, Doyle R, et al. The role of macrophages in the response to TNF inhibition in experimental arthritis[J]. *J Immunol*, 2017, doi: 10.4049/jimmunol.1700229.
- [2] 代宇, 范小琴, 史玉朋, 等. 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞诱导成熟树突状细胞TIM4表达[J]. *广东医学院学报*, 2016, 34(6): 602-605.
- [3] 黄蓓, 汪庆童, 刘亢亢, 等. 类风湿关节炎发生发展中TNF- α 信号通路与CD4+T细胞的关系[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(7): 900-903.
- [4] Smith J A. Update on ankylosing spondylitis: current concepts in pathogenesis[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(1): 489.
- [5] McKellar G E, McCarey D W, Sattar N, et al. Role for TNF in atherosclerosis? Lessons from autoimmune disease[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2009, 6(6): 410-417.
- [6] Sharma D, Kanneganti T D. The cell biology of inflammasomes: mechanisms of inflammasome activation and regulation[J]. *J Cell Biol*, 2016, 213(6): 617-629.
- [7] Zheng S C, Zhu X X, Xue Y, et al. Role of the NLRP3 inflammasome in the transient release of IL-1 β induced by monosodium urate crystals in human fibroblast-like synoviocytes[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2015, 12: 30.
- [8] Mathews R J, Robinson J I, Battellino M, et al. Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3-inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment[J]. *Ann Rheum Dis*, 2014, 73(6): 1202-1210.
- [9] Sommerfelt R M, Feuerherm A J, Jones K, et al. Cytosolic phospholipase A2 regulates TNF-induced production of joint destructive effectors in synoviocytes[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83555.
- [10] Mirza F, Lorenzo J, Drissi H, et al. Dried plum alleviates symptoms of inflammatory arthritis in TNF transgenic mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2018, 52: 54-61.
- [11] Walle L V, Van Opdenbosch N, Jacques P, et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis[J]. *Nature*, 2014, 512(7512): 69-73.
- [12] Suschak J J, Wang S, Fitzgerald K A, et al. Identification of Aim2 as a sensor for DNA vaccines[J]. *J Immunol*, 2015, 194(2): 630-636.
- [13] Mengshol J A, Vincenti M P, Coon C I, et al. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(4): 801-811.
- [14] (上接第600页)
- [18] Iyer A, Zurolo E, Prabowo A, et al. MicroRNA-146a: a key regulator of astrocyte-mediated inflammatory response[J]. *Plos One*, 2012, 7(9): e44789.
- [19] Plemel J R, Duncan G, Chen K W, et al. Graded forceps crush spinal cord injury model in mice[J]. *J Neurotrauma*, 2008; 25(4): 350-370.
- [20] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.
- [20] Fu E S, Tummala R P. Neuroprotection in brain and spinal cord trauma[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2005, 18(2): 181-187.
- [21] 汪红林, 徐祝军. 脊髓损伤后细胞凋亡基因调控研究进展[J]. *国际骨科杂志*, 2010, 31(3): 187-189.
- [22] Lee B B, Cripps R A, Fitzharris M, et al. The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate[J]. *Spinal Cord*, 2013, 52(2): 110-116.
- [23] Strickland E R, Hook M A, Balaraman S, et al. MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair[J]. *Neuroscience*, 2011, 186(186): 146-160.
- [24] Scheff S W, Rabchevsky A G, Fugaccia I, et al. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a forcedefined injury device[J]. *J Neurotrauma*, 2003, 20(2): 179-193.
- [25] Liu G, Detloff M R, Miller K N, et al. Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233: 447-456.
- [26] Yunta M, Nietodiaz M, Esteban F J, et al. MicroRNA Dysregulation in the Spinal Cord following Traumatic Injury[J]. *Plos One*, 2012, 7(4): e34534.