

miR-124a通过抑制神经元细胞凋亡促进脊髓损伤运动功能的修复

赵帅帅^{1,2} 刘文涵¹ 马佳蕊¹ 申宇哲^{1,3} 孙瑞欣^{1,4} 梁家兴^{1,5} 杨彦玲^{1*}

(¹延安大学延安医学院, 延安 716000; ²宝鸡市中医医院检验科, 宝鸡 721000; ³西安医学院, 西安 710021;

⁴西安医学院第二附属医院康复医学科, 西安 710003; ⁵宝鸡职业技术学院中医药学院, 宝鸡 721000)

摘要 该研究阐明过表达miR-124a对大鼠脊髓损伤后神经元细胞凋亡的影响。将SD大鼠随机分为四组, 假手术(sham)组、脊髓损伤(SCI)组、脊髓损伤+空白病毒对照(SCI+AAV-NC)组和脊髓损伤+过表达病毒(SCI+AAV-miR-124a)组。采用BBB评分对各组大鼠运动功能进行评估, HE染色、Tunel染色与免疫荧光染色观察损伤局部细胞凋亡情况, Western blot、qRT-PCR技术检测miR-124a、Bax、Bcl-2、Caspase-3等的表达水平。SCI组脊髓损伤后大鼠运动功能丧失, 脊髓神经元细胞大量凋亡, 脊髓组织受损严重, miR-124a水平短暂升高后持续降低, Bax mRNA与蛋白表达水平增高, Bcl-2 mRNA及蛋白表达水平下降, Caspase-3蛋白表达水平升高; NeuN与MBP相对荧光强度显著降低, GFAP和Iba 1相对荧光强度显著增强; SCI+AAV-miR-124a组过表达miR-124a后逆转上述mRNA及蛋白的表达水平, NeuN与MBP的相对荧光强度较SCI组明显增强, 而GFAP与Iba 1水平明显降低, 脊髓神经元细胞凋亡减少, 大鼠运动功能逐渐恢复。过表达miR-124a可抑制神经元细胞凋亡, 从而改善大鼠运动功能, 促进脊髓损伤的修复。

关键词 脊髓损伤; miR-124a; 细胞凋亡; 运动功能修复

miR-124a Promotes the Repair Motor Function of Spinal Cord Injury by Inhibiting Neuronal Apoptosis

ZHAO Shuaishuai^{1,2}, LIU Wenhan¹, MA Jiarui¹, SHEN Yuzhe^{1,3}, SUN Ruixin^{1,4}, LIANG Jiaying^{1,5}, YANG Yanling^{1*}

(¹Yan'an Medical School of Yan'an University, Yan'an 716000, China; ²Department of Clinical Laboratory, Baoji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji 721000, China; ³Xi'an Medical University, Xi'an 710000, China; ⁴Rehabilitation Medicine Department, Second Affiliated Hospital of Xi'an Medical University, Xi'an 710000, China; ⁵School of Traditional Chinese Medicine, Baoji Vocational and Technical College, Baoji 721000, China)

Abstract This study was designed to investigate the effect of miR-124a overexpression on neuronal apoptosis after spinal cord injury in rats. SD rats were randomly divided into four groups: sham group, SCI (spinal cord injury) group, SCI+AAV-NC group and SCI+AAV-miR-124a group. BBB score was used to evaluate the motor function of rats in each group. H&E staining, Tunel staining and immunofluorescence staining were used to observe the apoptosis of injured local cells. The expression levels of miR-124a, Bax, Bcl-2 and Caspase-3 were detected by Western blot and qRT-PCR. After spinal cord injury, the motor function of SCI rats was lost, a large number of spinal cord neurons underwent apoptotic, causing serious damage to the spinal cord tissue. miR-124a levels increased

收稿日期: 2025-03-13

接受日期: 2025-07-18

国家自然科学基金(批准号: 81760235、82560280)和陕西省科技厅资助项目(批准号: 2024SF-YBXM-037)资助的课题

*通信作者。Tel: 13891184889, E-mail: yangyanling8889@163.com

Received: March 13, 2025

Accepted: July 18, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81760235, 82560280), and the Department of Science and Technology of Shaanxi Province (Grant No.2024SF-YBXM-037)

*Corresponding author. Tel: +86-13891184889, E-mail: yangyanling8889@163.com

briefly and then decreased continuously. The expression of Bax mRNA and protein increased, the expression of Bcl-2 mRNA and protein decreased, and the expression of Caspase-3 protein increased. The relative fluorescence intensity of NeuN and MBP decreased significantly, while the relative fluorescence intensity of GFAP and Iba 1 increased significantly overexpression of miR-124a reversed the aforementioned mRNA and protein expression levels, the relative fluorescence intensity of NeuN and MBP was significantly higher than that of SCI group, while GFAP and Iba 1 were significantly lower, reduced the apoptosis of spinal cord neurons, and gradually restored the motor function of rats. Overexpression of miR-124a can inhibit neuronal apoptosis, improve motor function in rats, and promote the repair of spinal cord injury.

Keywords spinal cord injury; miR-124a; cell apoptosis; motor function repair

脊髓损伤是一种高度致残的中枢神经系统(central nervous system, CNS)损伤,会导致脊髓神经纤维束的损伤,并伴随低于损伤水平的运动、感觉和自主功能的损害。由于“原发损伤”是不可逆的,因此临床治疗更重视继发性损伤^[1-2]。以往大量的研究者对SCI的研究应用于临床后已经初见成效。目前对SCI的治疗主要是通过保守治疗和手术治疗来减轻疼痛和控制症状,通过一些康复手段促进患者的功能恢复^[3-6]。然而,由于神经元再生能力差,脊髓损伤的治疗在临床上仍有一定难度。

神经细胞进行性凋亡是脊髓损伤治疗的主要困难,它在生理和功能缺陷中起着重要作用。以往的研究表明,缺氧、缺血、脂质过氧化和ROS参与了脊髓损伤诱导神经细胞凋亡的基本病理生理学过程^[7]。过表达miR-124可能通过抑制大鼠脊髓损伤后Bax、Cleaved Caspase 9和Cleaved Caspase 3的表达来阻断线粒体的凋亡途径,抑制神经细胞的凋亡,从而促进脊髓损伤大鼠的功能恢复^[8]。

微小核糖核酸124a(microRNA-124a, miR-124a)是中枢神经系统中表达较丰富的miRNA之一。近年来,miR-124a在代谢、肿瘤等相关方面的研究较为广泛^[9-10]。有研究表明,在小鼠鞘内给药miR-124a可以逆转卡拉胶诱导的持续性痛敏并抑制机械性超敏。此外,应用miR-124a抑制剂可以加重小鼠的疼痛行为,相反,给予miR-124a模拟物则减轻了伤害反应^[11]。miR-124a也被认为与突触可塑性有关,并可能通过改变神经胶质细胞和脑外周信号来同时调节免疫和神经元过程。此外,在多种疾病和动物模型中miR-124a已被证实可以抑制相关的细胞凋亡而发挥保护作用,并且在神经系统中也极具意义^[10]。

基于此,本课题通过过表达miR-124a干预脊髓损伤大鼠,观察其对脊髓损伤大鼠后肢运动功能恢复的

影响,探讨miR-124a对脊髓损伤大鼠的神经修复作用,为临床应用miR-124a治疗脊髓损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Tunel试剂盒、DAPI染色液购自上海碧云天生物技术有限公司;大鼠miR-124a过表达腺相关病毒及对照病毒购自上海汉恒生物科技有限公司;TriQuick总RNA提取试剂购自北京索莱宝科技有限公司;miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒、miRcute增强型miRNA荧光定量检测试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Evo M-MLV反转录预混型试剂盒购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;PerfectStart®Green qPCR SuperMix购自北京全式金生物技术有限公司;抗-β-actin抗体(货号:BM3873)、抗-CASP3抗体(货号:BM3957)、抗-Bcl-2抗体(货号:BA04012)、HRP标记山羊抗兔/小鼠IgG(H+L)购自武汉博士德生物工程有限公司。

HI-0400脊髓打击器购自美国Precision公司;石蜡切片机2245购自湖北徕克医疗设备有限公司;荧光显微镜、数码摄像显微图像系统DP70 CK40-F200购自日本Olympus公司;冷冻切片机KH-LQ型购自湖北孝感阔海医疗设备有限公司;常规PCR仪购自德国Eppendorf AG公司;实时定量PCR检测仪购自瑞士Roche公司等。

1.2 实验动物及分组

自西安交通大学实验动物中心购买SPF级雌性SD大鼠75只,体质量为(180±20)g,实验动物质量合格证号为SCXK(陕)2018-001。将SD大鼠随机分为四组,分别为假手术(sham)组、脊髓损伤(SCI)组、脊髓损伤+空白病毒对照(SCI+AAV-NC)组、脊髓损伤+过表达病毒(SCI+AAV-miR-124a)组;sham组

9只, SCI组29只, SCI+AAV-NC组与SCI+AAV-miR-124a组各16只, 若有大鼠在实验过程中意外死亡, 及时给予补充。动物实验均遵照《中华人民共和国实验动物管理条例》的相关规定, 并已通过延安大学附属医院医学伦理委员会审查批准(伦理批件号为A-2025002号)。

1.3 模型构建

将2%戊巴比妥钠按0.3 mL/100 g腹腔注射进行轻度麻醉。将大鼠俯卧位置于平板上, 腹部用一圆管垫起, 固定大鼠, 用手触及L4、L5间隙, 手持针头缓慢插入, 大鼠尾巴轻微摆动即停止进针, 固定针头, 用微量注射器缓慢注入10 μ L病毒原液。注射完毕, 留针5 min后缓缓拔出针头, 等待大鼠苏醒, 苏醒后大鼠后肢功能未受到影响。放回笼中饲养, 等待进一步实验。

将2%戊巴比妥钠按0.3 mL/100 g腹腔注射麻醉大鼠, 制备急性脊髓损伤模型, 采用HI-0400脊髓打击器, 以T10为中心造成大鼠脊髓不完全损伤, 打击力为200 kdyn/cm²。脊髓损伤模型制备成功标准: 打击后, 脊髓打击处充血水肿, 大鼠随即出现摆尾反射和躯体、双下肢回缩样扑动, 双下肢呈弛缓性瘫痪。术后腹腔注射青霉素钠 2 $\times$ 10⁵ U/kg, 每日按摩膀胱3次至大鼠可自主排尿。

1.4 获取脊髓组织

深度麻醉大鼠, 迅速暴露心脏; 灌注针从心尖进针, 沿着左心室长轴进针至升主动脉, 用止血钳夹紧; 于右心耳处剪一小口, 50 mL注射器快速推注0.9%生理盐水。在背部损伤部位逐层剪开皮肤、肌肉等, 暴露相应脊柱节段; 从T10上下方各2 cm处剪断脊柱, 生理盐水冲出脊髓组织。

1.5 冰冻切片制作、组织蛋白及RNA提取

按照需要分别将部分脊髓组织置于4%多聚甲醛中并于4 $^{\circ}$ C条件下固定24 h。15%、30%蔗糖溶液梯度脱水(4 $^{\circ}$ C)。冷冻包埋剂包埋组织于包埋盒中, 置于-20 $^{\circ}$ C直至完全成块。用冷冻切片机进行切片, 厚度约为13 μ m;

用电子天平称取0.1 g脊髓组织, 置于1.5 mL加厚Eppendorf试管中。管中加入预冷的1 $\times$ PBS溶液, 用眼科剪充分剪碎组织, 4 $^{\circ}$ C、4 000 $\times$ g离心5 min后弃去上清, 重复两次。加入提前配好的裂解液(RIPA:PMSF=100:1)(10 mL/g)。将组织匀浆仪设置在4 $^{\circ}$ C条件下匀浆, 参数设置为120 Hz、30 s, 冰上静置

20 min。4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心30 min后, 吸取上清液将其转移至新离心管中, 并记录体积。取10 μ L用于蛋白定量, 余下部分按比例加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 通过涡旋充分混匀, 99 $^{\circ}$ C煮沸10 min, 待其冷却以后放置于-20 $^{\circ}$ C冰箱备用。

各组称量约0.1 g脊髓组织放入1.5 mL无菌无酶加厚Eppendorf管中, 加入适量预冷的1 $\times$ PBS, 用眼科剪剪碎后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心5 min, 重复两次。加入1 mL TriQuick总RNA提取试剂, 加入研磨珠后, 在组织匀浆仪中60 Hz、30 s匀浆两次; 于冰上静置20 min后加入200 L的氯仿, 上下颠倒混匀(可剧烈摇晃), 冰上静置10 min后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心10 min; 然后轻柔地从离心机中取出离心管, 吸取上层水相至新的离心管中, 并且记录体积; 然后加入等体积的预冷的异丙醇, 轻柔地上下颠倒几次充分混匀, 于冰上静置10 min后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心10 min; 弃去上清, 加入1 mL预冷的75%乙醇, 4 $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g离心5 min, 弃去上清。在通风橱内倒置离心管晾干RNA。加入适量无菌超纯水(20 L), 充分溶解RNA后测定RNA浓度, 用于后续实验。

1.6 检测方法

神经功能评分采用BBB(Basso Beattie Bresnahan)评分量表^[12], 满分21分, 用以评判大鼠下肢各关节活动情况; Western blot、qRT-PCR技术检测miR-124a、Bax、Bcl-2、Caspase-3等的表达水平; 缺口原位末端标记测定法(TdT mediated-dUTP nick end labeling, TUNEL)及免疫荧光染色检测脊髓细胞凋亡情况; HE染色观察损伤节段脊髓组织形态改变。

1.7 统计学方法

本研究采用Microsoft Office Excel整理数据, 采用GraphPad Prism 8软件进行统计分析。数据用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示, 两组实验数据之间的比较采用独立样本 t 检验, 多组实验数据之间的比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 所有实验均至少独立重复三次。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 脊髓损伤大鼠神经元细胞凋亡严重

为观察大鼠脊髓损伤后神经细胞的凋亡情况, 我们通过免疫荧光染色和TUNEL染色观察神经元细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞的标志物及髓鞘

碱性蛋白与Tunel共定位表达情况,结果如图1所示。与sham组相比,SCI组NeuN阳性细胞数量减少,且与Tunel共标;相对于sham组,SCI组GFAP、Iba 1阳性细胞数量增加,MBP阳性细胞数量减少,且均不与Tunel共定位。这说明脊髓损伤后脊髓组织神经元凋亡严重,星形胶质细胞与小胶质细胞数量增多,脊髓组织脱髓鞘严重。

2.2 脊髓损伤大鼠miR-124a表达水平下调

我们通过qPCR检测对照组以及脊髓损伤后6 h、12 h、1天、3天、5天、7天的miR-124a表达水平,损伤后6 h相比于对照组,miR-124a的表达水平升高,

差异具有统计学意义;12 h后呈现下降趋势,且具有时间依赖性(图2A)。尤其是7天时,其表达量显著降低($P<0.01$)。我们分析认为,该变化可能是损伤后机体启动自我修复,导致miR-124a水平显著升高,随着自我修复的进程其消耗增加,表达量开始下降。据此,我们给予miR-124a过表达腺相关病毒预处理,于造模前14天于鞘内注射病毒;造模7天后取材,通过qRT-PCR检测miR-124a的表达量,结果显示SCI组及SCI+AAV-NC组相较于sham组,其表达量显著下降,SCI+AAV-NC组相较于SCI组无差异,而SCI+AAV-miR-124a组表达量显著上升($P<0.01$)(图2B),表明病

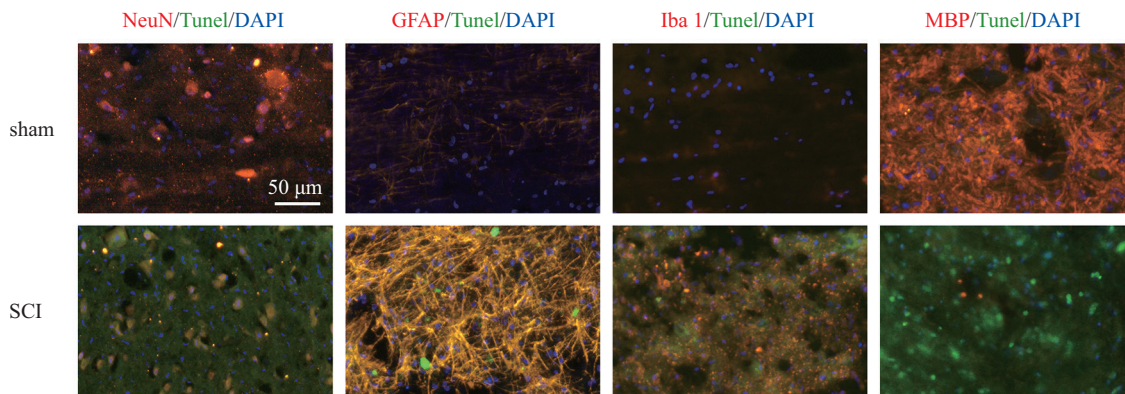
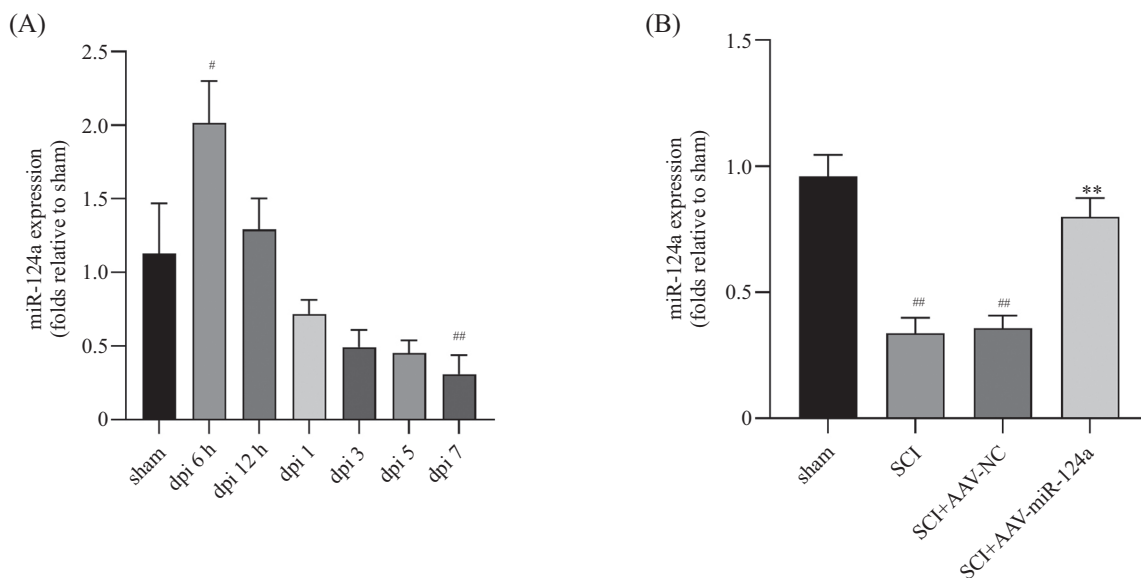


图1 神经细胞标志物与Tunel共定位表达情况

Fig.1 The co-localization expression of neuronal markers and Tunel



A: SCI后不同时间点miR-124a的表达水平。n=3, $^{\#}P<0.05$,与sham组比较; $^{##}P<0.01$,与sham组比较; B: 各组大鼠miR-124a的表达水平。n=5, $^{##}P<0.01$,与sham组比较; $^{**}P<0.01$,与SCI组比较。dpi: 损伤后天数。

A: miR-124a expression levels at different time after SCI. n=3, $^{\#}P<0.05$ compared with sham. $^{##}P<0.01$ compared with sham group; B: miR-124a expression levels in rats of each group. n=5, $^{##}P<0.01$ compared with sham group; $^{**}P<0.01$ compared with SCI. dpi: days after injury.

图2 脊髓损伤后大鼠脊髓组织miR-124a表达水平

Fig.2 miR-124a expression level post SCI of rat's spinal cord

毒注射成功, 可以进行后续实验。

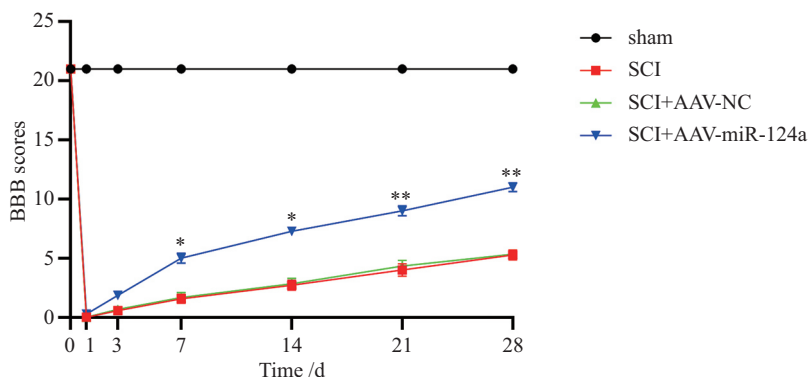
2.3 过表达miR-124a脊髓损伤大鼠运动功能逐渐恢复

为观察大鼠运动功能恢复情况, 在术后第1、3、7、14、21、28天采用BBB评分对各组大鼠后肢运动情况进行评估, 评分结果如图3所示。术后1天, SCI组、SCI+AAV-NC组与SCI+AAV-miR-124a组均接近0分, 大鼠后肢运动功能完全丧失。术后3天, 各组评分较术后1天均稍有升高, 但仍无明显差异。术后7天、14天, SCI+AAV-miR-124a组大鼠与SCI组与SCI+AAV-NC组相比, 其BBB评分升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 21天至28天SCI+AAV-miR-124a组大鼠评分呈现逐渐上升趋势, 而且与SCI组与SCI+AAV-NC组相比, 统计学分析有显著性差异($P<0.01$)。此外, 自术后3天开始, SCI组与SCI+AAV-NC组大鼠的评分较之前有所上升, 但评分明显低于

SCI+AAV-miR-124a组。这表明过表达miR-124a可以改善大鼠脊髓损伤后的运动功能。

2.4 过表达miR-124a可促进脊髓损伤后组织形态的修复

为进一步观察各组大鼠脊髓的形态学变化, 对各组大鼠脊髓切片进行HE染色, 结果如图4所示。sham组脊髓结构正常, 无明显损伤、出血, 炎性细胞浸润极少, 神经元基本存活。SCI组和SCI+AAV-NC组打击部位脊髓青紫、充血明显。镜下见打击部位存在大片空洞, 内有大量炎性细胞浸润, 存在少量红细胞, 损伤部位大部分神经元凋亡、坏死, 存活神经元数量明显减少。与sham组相比, SCI组与SCI+AAV-NC组损伤局部脊髓破损严重, 面积较大, 存活神经元数量极少。相较于SCI组与SCI+AAV-NC组, SCI+AAV-miR-124a组损伤面积明显减小, 在损伤局部存活神经元数量更多, 组织结构相对完整。



$n=6$; * $P<0.05$, 与SCI组比较; ** $P<0.01$, 与SCI组比较。

$n=6$; * $P<0.05$ compared with SCI group; ** $P<0.01$ compared with SCI group.

图3 各组大鼠BBB评分结果

Fig.3 BBB score results of rats in each group

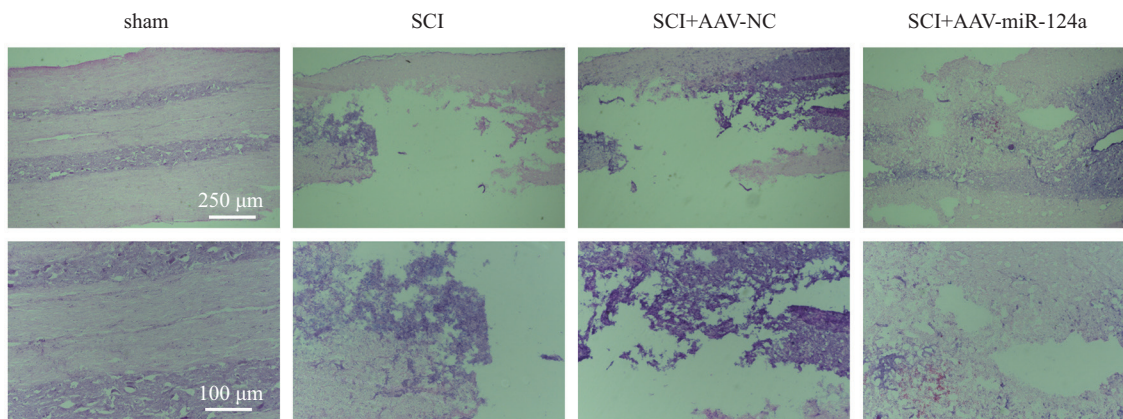


图4 脊髓损伤7日后大鼠脊髓组织形态学变化

Fig.4 Morphological change of rats spinal cord past spinal cord injury 7 days

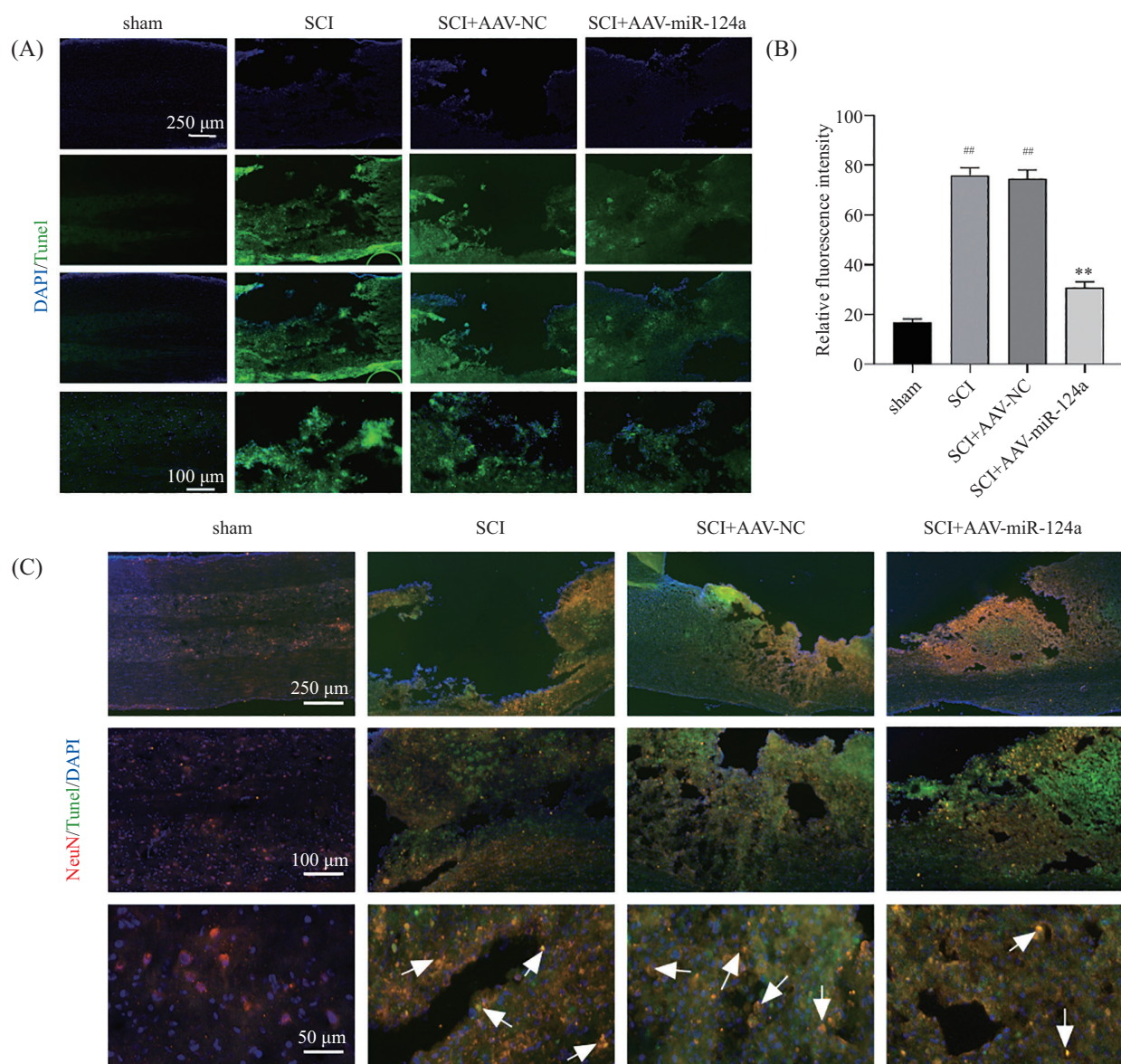
2.5 过表达miR-124a脊髓损伤大鼠神经元细胞凋亡减少

为进一步观察损伤部位神经元凋亡情况,我们对组织切片进行Tunel染色,选择相同部位进行放大。结果显示,sham组脊髓组织完整,阳性细胞很少;而SCI组与SCI+AAV-NC组打击部位损伤明显,组织形态紊乱,存在大量阳性细胞,神经元凋亡严重,且两组间相比无明显差异。与SCI组和SCI+AAV-NC组比较,SCI+AAV-miR-124a组Tunel阳性细胞较少,

神经元凋亡现象不明显,组织形态较整齐(图5)。对染色结果进行定量分析发现,SCI组与SCI+AAV-NC组相较于sham组,其相对荧光强度显著增强,差异具有统计学意义($P<0.01$);而SCI+AAV-miR-124a组相较于SCI组其Tunel相对荧光强度显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。

2.6 过表达miR-124a抑制脊髓损伤大鼠神经元细胞凋亡

Western blot和qRT-PCR技术检测凋亡相关蛋



A: 免疫荧光法检测脊髓损伤后各组Tunel表达; B: 脊髓损伤后各组Tunel信号强度相对于DAPI表达量的变化; C: 脊髓损伤后Tunel与NeuN的共表达状态对比。箭头标记为荧光标记dUTP与NeuN共染色。 $n=3$; ^{##} $P<0.01$, 与sham组比较; ^{**} $P<0.01$, 与SCI组比较。

A: immunofluorescence detect Tunel expression in groups post SCI; B: relative Tunel density over DAPI in groups post SCI; C: co-localization between Tunel and NeuN post SCI group. Arrow indicated that co-localization of fluorescence labeled dUTP with NeuN. $n=3$; ^{##} $P<0.01$ compared with sham group; ^{**} $P<0.01$ compared with SCI group.

图5 脊髓损伤7日后大鼠脊髓组织Tunel染色

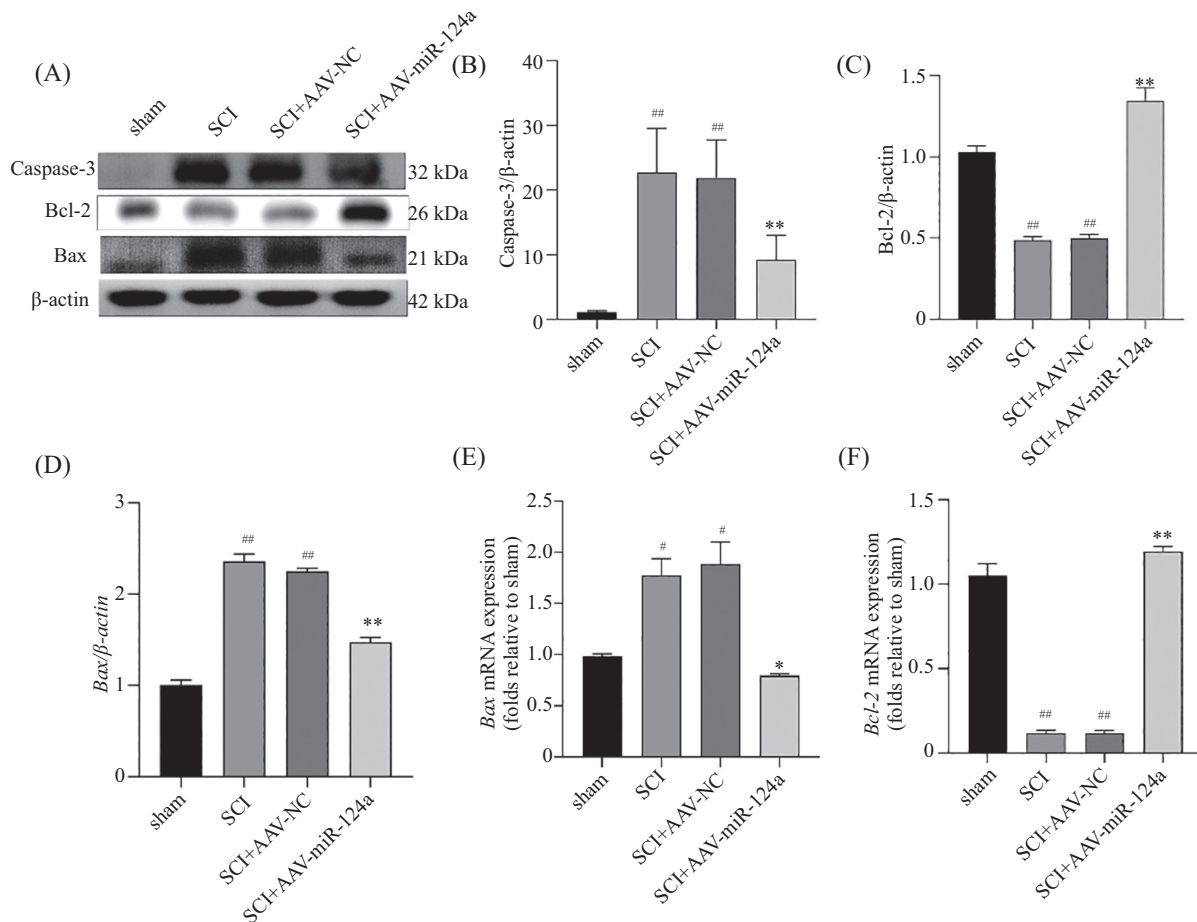
Fig.5 Tunel staining of rats spinal cord past spinal cord injury 7 days

白和 mRNA 的表达水平,选取 7 天作为观察时间点。蛋白电泳结果显示,相较于 sham 组,SCI 组以及 SCI+AAV-NC 组 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平增高,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),而 SCI+AAV-miR-124a 组 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达量较 SCI 组以及 SCI+AAV-NC 组显著下降 ($P<0.01$) (图 6B 和图 6D 所示);与 sham 组相比,SCI 组与 SCI+AAV-NC 组 Bcl-2 蛋白表达水平下降,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),但 SCI+AAV-miR-124a 组的表达量相较于 SCI 组及 SCI+AAV-NC 组显著上升 ($P<0.01$) (图 6C)。qRT-PCR 结果如图 6E 和图 6F 所示,与 sham 组相比,SCI 组和 SCI+AAV-NC 组 *Bax* mRNA 表达量升高 ($P<0.05$),SCI 组和 SCI+AAV-NC 组组间无

差异,相较于前两组,SCI+AAV-miR-124a 组 *Bax* mRNA 表达量下降 ($P<0.05$);相较于 sham 组,SCI 组及 SCI+AAV-NC 组 *Bcl-2* mRNA 的表达水平显著下降 ($P<0.01$),而 SCI+AAV-miR-124a 组相较于 SCI 组及 SCI+AAV-NC 组 *Bcl-2* mRNA 的表达水平显著上升 ($P<0.01$)。

2.7 表达 miR-124a 促进脊髓损伤大鼠神经功能恢复

为观察过表达 miR-124a 大鼠脊髓损伤后恢复情况,我们对神经元、星形胶质细胞、小胶质细胞的标志物及髓鞘碱性蛋白进行免疫荧光染色。结果如图 7~图 10 所示,脊髓损伤后,相对于 sham 组,SCI 组与 SCI+AAV-NC 组 NeuN 与 MBP 相对荧光强度显著降低,GFAP 和 Iba 1 相对荧光强度显著增

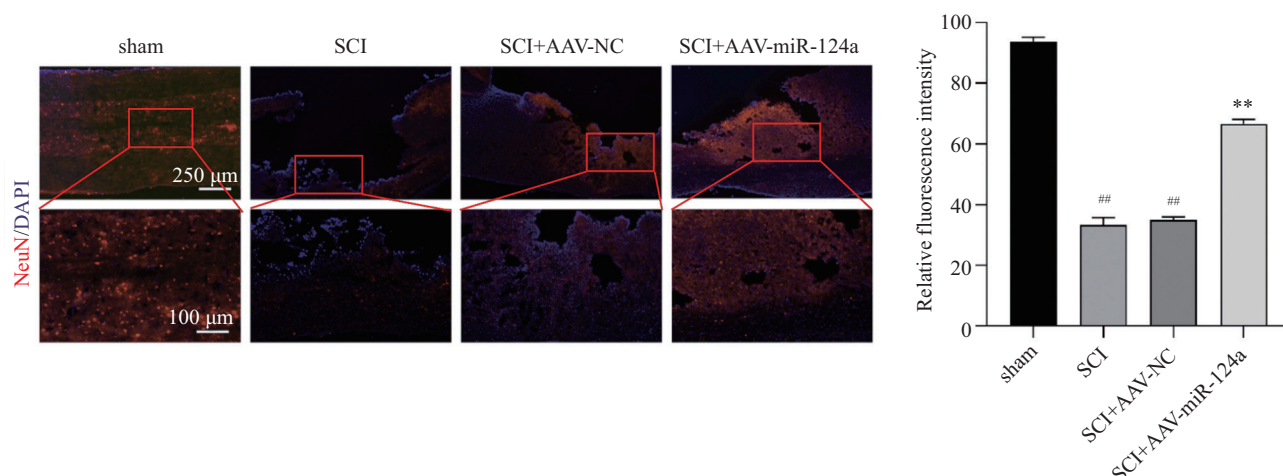


A: 蛋白印迹检测脊髓损伤大鼠脊髓中Caspase-3、Bcl-2、Bax; B: 脊髓损伤大鼠脊髓中Caspase-3表达情况; C: 脊髓损伤大鼠脊髓中Bcl-2表达情况; D: 脊髓损伤大鼠脊髓中Bax表达情况; E: 脊髓损伤大鼠脊髓中Bax表达情况; F: 脊髓损伤大鼠脊髓中Bcl-2表达情况。n=5; ** $P<0.01$, 与SCI组比较; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与sham组比较; * $P<0.05$, 与SCI组比较。

A: Western blot qualify Caspase-3, Bcl-2, Bax levels in spinal tissue of SCI rats; B: Caspase-3 expression in spinal tissue of SCI rats; C: Caspase-3 expression in spinal tissue of SCI rats; D: Bax expression in spinal tissue of SCI rats; E: Bax transcription in spinal tissue of SCI rats; F: Bcl-2 transcription in spinal tissue of SCI rats. n=5; ** $P<0.01$ compared with SCI group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ compared with sham group; * $P<0.05$ compared with SCI group.

图6 脊髓损伤后7日大鼠脊髓组织凋亡相关蛋白及mRNA水平变化

Fig.6 Apoptosis-associated proteins and mRNA levels of rats' spinal cord past spinal cord injury 7 days

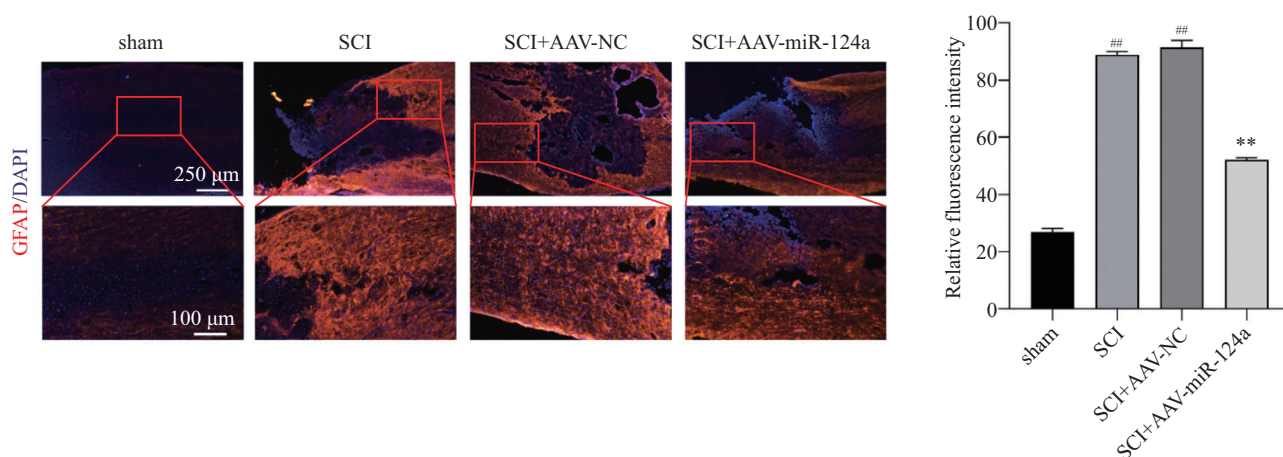


A: 免疫荧光法检测脊髓损伤后各组NeuN表达情况; B: 脊髓损伤后各组NeuN表达量相对于DAPI表达量的变化。n=3; ## $P < 0.01$, 与sham组比较; ** $P < 0.01$, 与SCI组比较。

A: immunofluorescence detect NeuN expression in groups post SCI; B: relative NeuN expression over DAPI in groups post SCI. n=3; ## $P < 0.01$ compared with sham group; ** $P < 0.01$ compared with SCI group.

图7 脊髓损伤后7日大鼠脊髓组织NeuN水平变化

Fig.7 NeuN levels of rats' spinal cord past spinal cord injury 7 days



A: 免疫荧光法检测脊髓损伤后各组GFAP表达; B: 脊髓损伤后各组GFAP表达量相对于DAPI表达量的变化。n=3; ## $P < 0.01$, 与sham组比较; ** $P < 0.01$, 与SCI组比较。

A: immunofluorescence detect GFAP expression in groups post SCI. B: relative GFAP expression over DAPI in groups post SCI. n=3; ## $P < 0.01$ compared with sham group; ** $P < 0.01$ compared with SCI group.

图8 脊髓损伤后7日大鼠脊髓组织GFAP水平变化

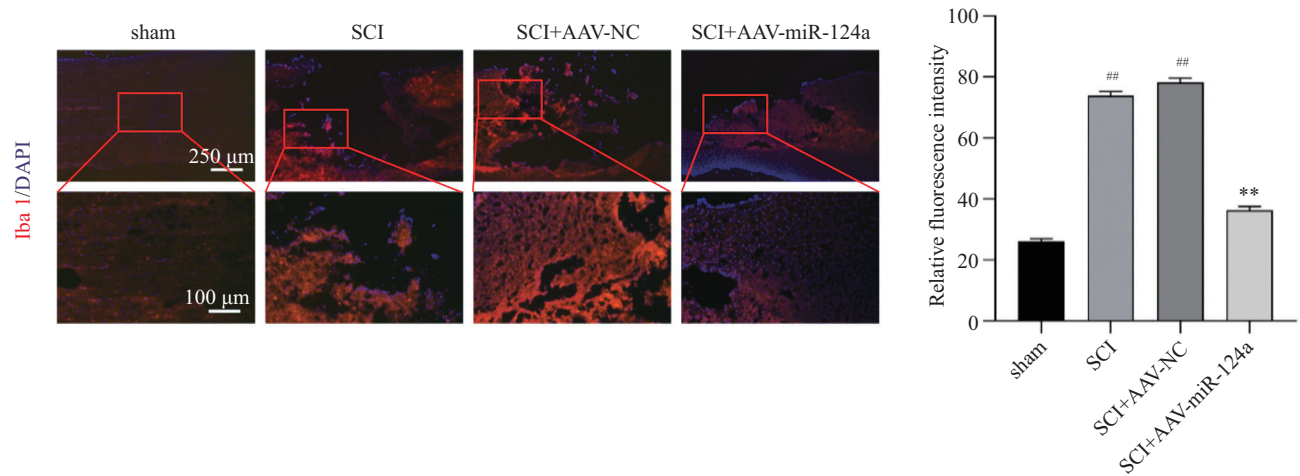
Fig.8 GFAP levels of rats' spinal cord past spinal cord injury 7 days

强, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 上调miR-124a后, NeuN与MBP的相对荧光强度较SCI组明显增强, 而GFAP与Iba 1水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。以上结果说明过表达miR-124a后可以抑制神经元凋亡, 促进其生长; 而且星形胶质细胞与小胶质细胞数量较损伤组减少, 髓鞘碱性蛋白表达量增加, 表明过表达miR-124a可以抑制炎症的发生发展以及轴突脱髓鞘, 从而促进脊髓损伤的恢复。

3 讨论

脊髓损伤作为神经系统较为严重的一种疾病, 在我国有较高的患病率和发病率, 致残率及致死率也高居不下。目前, 研究人员对脊髓损伤已进行了大量的实验研究, 也采用了手术、药物、免疫疗法等多种治疗方法的尝试, 但临床治疗效果依然不佳。因此, 寻找新的靶点或治疗策略来促进脊髓损伤的修复迫在眉睫^[13]。

细胞凋亡会影响脊髓损伤后神经元组织损伤

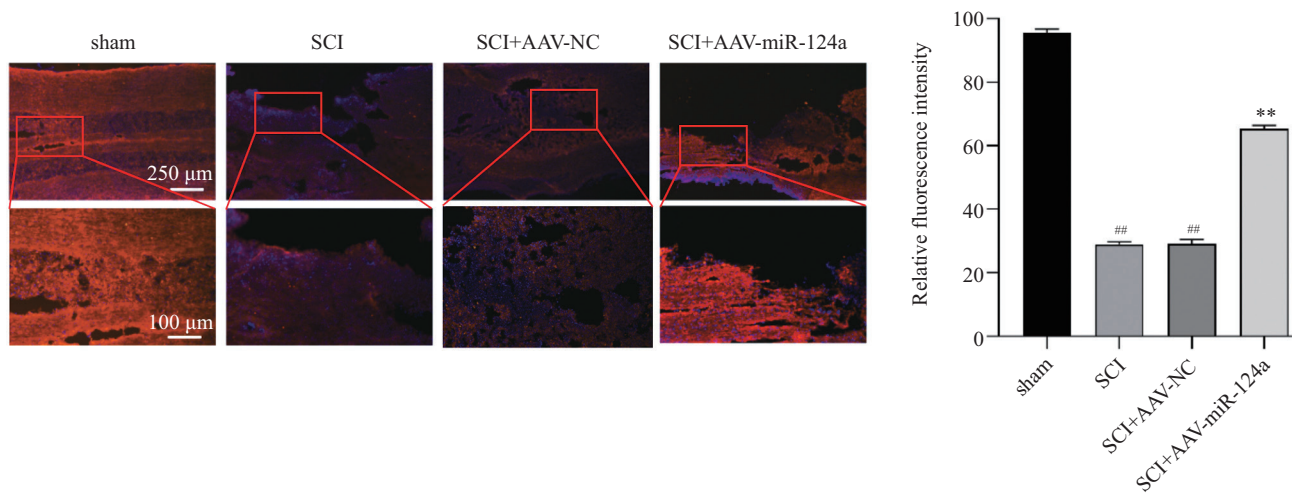


A: 免疫荧光法检测脊髓损伤后各组Iba 1表达; B: 脊髓损伤后各组Iba 1表达量相对于DAPI表达量的变化。n=3; ^{##}P<0.01, 与sham组比较; ^{**}P<0.01, 与SCI组比较。

A: immunofluorescence detect Iba 1 expression in groups post SCI. B: relative Iba 1 expression over DAPI in groups post SCI. n=3; ^{##}P<0.01 compared with sham group; ^{**}P<0.01 compared with SCI group.

图9 脊髓损伤后7日大鼠脊髓组织Iba 1表达情况

Fig.9 Iba 1 levels of rats' spinal cord past spinal cord injury 7 days



A: 免疫荧光法检测脊髓损伤后各组MBP表达情况; B: 脊髓损伤后各组MBP表达量相对于DAPI表达量的变化。n=3; ^{##}P<0.01, 与sham组比较; ^{**}P<0.01, 与SCI组比较。

A: immunofluorescence detect MBP expression in groups post SCI. B: relative MBP expression over DAPI in groups post SCI. n=3; ^{##}P<0.01 compared with sham group; ^{**}P<0.01 compared with SCI group.

图10 脊髓损伤后7日大鼠脊髓组织MBP表达情况

Fig.10 MBP levels of rats' spinal cord past spinal cord injury 7 days

的发展。以往的研究表明, Bcl-2家族成员可能通过细胞凋亡调节因子和抗凋亡蛋白如 Bcl-2来调控细胞凋亡信号。而 miRNA可以通过调控凋亡相关分子修复大鼠脊髓损伤^[14]。例如, 过表达miR-124可能通过抑制大鼠脊髓损伤后 Bax、Cleaved Caspase-9 和 Cleaved Caspase-3的表达来阻断线粒体的凋亡途径, 抑制神经细胞的凋亡, 从而促进脊髓损伤大鼠的功能恢复^[15]。过表达 miR-411通过抑制 Caspase和

NF- κ B而抑制细胞的凋亡进而促进大鼠脊髓损伤的恢复^[16]。2022年有研究表明通过 Notch途径下调 miR-124a的表达可显著减轻 SD大鼠心肌缺血再灌注 24 h的损伤^[17]。HEYIN等^[11]发现, 在神经病理性疼痛中, miR-124a对沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1, SIRT1)的靶向增强诱导了 CD4⁺T 细胞分化为调节性 T 细胞(regulatory T cells, Treg)的偏向, 从而减轻了疼痛引起的炎症^[11]。SANUKI等^[18]

发现 *Lhx2* 是 miR-124a 的体内靶基因, miR-124a 通过下调 *Lhx2* 抑制视网膜细胞凋亡, 保证海马神经元正常轴突发育, 而且观察到在胚胎和成年小鼠的中枢神经系统中, miR-124a 广泛且相对较强的表达。这表明 miR-124a 对神经发生、分化、成熟和/或功能具有重要作用。

本研究通过 Allen's 打击法构建 T10 脊髓损伤模型, 通过 BBB 评分结果的变化对各组大鼠的运动功能进行评估。结果显示, 相较于 SCI 组、SCI+AAV-NC 组, SCI+AAV-miR-124a 组的评分同期更高, 表明过表达 miR-124a 可以通过某些机制减轻脊髓所受到的损伤, 促进神经功能的恢复, 且作用时间较长。

在本研究中, 我们的实验结果说明了过表达 miR-124a 通过下调脊髓损伤后 Caspase-3、Bax 的表达, 上调 Bcl-2 的表达, 从而抑制神经元的凋亡, 促进脊髓损伤的修复。有研究显示 miR-124a 可调控 Notch 信号通路的活性, 并且可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 保护氧化应激所导致的足细胞损伤。同时, miR-124a 可以靶向 SIRT1 诱导 CD4⁺T 细胞向调节性 T 细胞分化, 从而减轻疼痛引起的炎症。然而在脊髓损伤中它是通过哪些信号通路亦或者通过靶向某些分子对神经元的凋亡进行调控的我们尚不可知, 这就需要我们接下来进行更深一步的研究, 为脊髓损伤的修复提供新的靶标, 为临床提供新的思路以及策略, 为开展临床试验提供较为坚实的基础。

参考文献 (References)

- [1] ISA T. The brain is needed to cure spinal cord injury [J]. Trends Neurosci, 2017, 40(10): 625-36.
- [2] TOHDA C. Pharmacological intervention for chronic phase of spinal cord injury [J]. Neural Regen Res, 2025, 20(5): 1377-89.
- [3] HU X, XU W, REN Y, et al. Spinal cord injury: molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Signal Transduct Target Ther, 2023, 8(1): 245.
- [4] RALPH P C, CHOI S W, BAEK M J, et al. Regenerative medicine approaches for the treatment of spinal cord injuries: progress and challenges [J]. Acta Biomater, 2024, 189: 57-72.
- [5] TIAN T, ZHANG S, YANG M. Recent progress and challenges in the treatment of spinal cord injury [J]. Protein Cell, 2023, 14(9): 635-52.
- [6] FAKHRI S, ABBASZADEH F, JORJANI M. On the therapeutic targets and pharmacological treatments for pain relief following spinal cord injury: a mechanistic review [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111563.
- [7] NAGATA S. Apoptosis and clearance of apoptotic cells [J]. Annu Rev Immunol, 2018, 36: 489-517.
- [8] XU Z, ZHANG K, WANG Q, et al. MicroRNA-124 improves functional recovery and suppresses Bax-dependent apoptosis in rats following spinal cord injury [J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 2551-60.
- [9] LANG F M, HOSSAIN A, GUMIN J, et al. Mesenchymal stem cells as natural biofactories for exosomes carrying miR-124a in the treatment of gliomas [J]. Neuro Oncol, 2018, 20(3): 380-90.
- [10] CHAYA T, MAEDA Y, SUGIMURA R, et al. Multiple knockout mouse and embryonic stem cell models reveal the role of miR-124a in neuronal maturation [J]. J Biol Chem, 2022, 298(9): 102293.
- [11] HEYN J, LUCHTING B, HINSKE L C, et al. MiR-124a and miR-155 enhance differentiation of regulatory T cells in patients with neuropathic pain [J]. J Neuroinflammation, 2016, 13(1): 248.
- [12] SCHEFF S W, SAUCIER D A, CAIN M E. A statistical method for analyzing rating scale data: the BBB locomotor score [J]. J Neurotrauma, 2002, 19(10): 1251-60.
- [13] CAO L, CHEN S, WANG S, et al. Multi-target neural circuit reconstruction and enhancement in spinal cord injury [J]. Neural Regen Res, 2026, 21(3): 957-71.
- [14] ZHANG C, TALIFU Z, XU X, et al. MicroRNAs in spinal cord injury: a narrative review [J]. Front Mol Neurosci, 2023, 16: 1099256.
- [15] 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): 1498-508.
- [16] GONG Z M, TANG Z Y, SUN X L. MiR-411 suppresses acute spinal cord injury via downregulation of Fas ligand in rats [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(2): 501-6.
- [17] XU W, JIANG S, LIU Q. MicroRNA-124a protects the myocardium against ischemia reperfusion injury through regulation of the Notch signaling pathway [J]. Braz J Cardiovasc Surg, 2022, 37(4): 447-53.
- [18] SANUKI R, ONISHI A, KOIKE C, et al. MiR-124a is required for hippocampal axogenesis and retinal cone survival through *Lhx2* suppression [J]. Nat Neurosci, 2011, 14(9): 1125-34.