DOI: 10.11844/cjcb.2026.11.0007
中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2026, 48(11): 2575–2586 CSTR: 32200.14.cjcb.2026.11.0007

· 临床细胞生物学 ·

miR-9-5p靶向抑制IGF2激活小胶质细胞促进抽动障碍模型的神经炎症反应

袁现英* 王香香 李杰 宋亚宇 张琳 贾姣姣
(邯郸市妇幼保健院, 邯郸 056001)

摘要 该文探讨miR-9-5p对抽动障碍模型大鼠神经炎症的作用机制。82只SD大鼠通过腹腔注射亚氨基二丙腈(IDPN)溶液构建抽动障碍模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组(Model组)、抑制剂阴性对照组(Inhibitor NC组)、miR-9-5p抑制剂组(miR-9-5p inhibitor组)、miR-9-5p inhibitor+胰岛素样生长因子2(IGF2)抑制剂组(miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组), 每组18只。另取18只健康大鼠作为对照组(Control组)。利用Starbase工具和双荧光素酶实验验证miR-9-5p与*IGF2*之间的靶向关系。RT-qPCR检测大鼠纹状体组织miR-9-5p、*IGF2* mRNA表达水平; Western blot检测大鼠纹状体组织IGF2蛋白表达水平; 对大鼠进行行为学检测; HE、Nissl染色分别观察大鼠纹状体组织病理改变和神经元形态变化; ELISA检测大鼠纹状体组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)、IL-10、转化生长因子-β(TGF-β)水平; 免疫荧光共染检测大鼠纹状体组织小胶质细胞标志蛋白离子钙接头蛋白分子1(Iba-1)、CD86、CD206的表达; Western blot检测大鼠纹状体组织磷酸化-磷脂酰肌醇激酶(p-PI3K)、磷酸化-蛋白激酶B(p-AKT)蛋白表达水平。结果显示, 与Control组相比, Model组大鼠miR-9-5p水平以及运动行为评分、刻板行为评分明显升高(P<0.05), IGF2 mRNA和蛋白表达水平明显下降(P<0.05), 纹状体组织病理损伤程度加重, Nissl小体稀疏, 神经元细胞数量明显减少(P<0.05), TNF-α、IL-6、Iba-1、CD86水平明显升高(P<0.05), IL-10、TGF-β、CD206水平及p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT值明显降低(P<0.05)。与Model组相比, miR-9-5p inhibitor组大鼠miR-9-5p水平以及运动行为评分、刻板行为评分明显降低(P<0.05), IGF2 mRNA和蛋白表达水平明显升高(P<0.05), 纹状体组织病理损伤程度减轻, 神经元细胞数量明显增加(P<0.05), TNF-α、IL-6、Iba-1、CD86水平明显降低(P<0.05), IL-10、TGF-β、CD206水平及p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT值明显升高(P<0.05)。下调IGF2部分逆转了miR-9-5p抑制剂对模型大鼠行为学评分、纹状体组织病理损伤、小胶质细胞活化以及神经炎症的抑制作用。综上, 抑制miR-9-5p可能通过靶向调控IGF2并激活PI3K/AKT信号通路, 抑制小胶质细胞M1型极化、促进M2型极化, 从而减轻神经炎症反应, 改善大鼠抽动障碍。

关键词 miR-9-5p; IGF2; 抽动障碍; 小胶质细胞; 神经炎症; PI3K/AKT信号通路

miR-9-5p Targets and Inhibits IGF2 to Activate Microglia and Promote Neuroinflammatory Responses in a Tic Disorder Model

YUAN Xianying*, WANG Xiangxiang, LI Jie, SONG Yayu, ZHANG Lin, JIA Jiaojiao

收稿日期: 2025-10-15 接受日期: 2026-01-08
2025年度河北省医学科学研究课题计划(批准号: 20251313)资助的课题
*通信作者。Tel: 17713095081, E-mail: yxy19830819@126.com
Received: October 15, 2025 Accepted: January 8, 2026
This work was supported by the 2025 Medical Science Research Program of Hebei Province (Grant No.20251313)
*Corresponding author. Tel: +86-17713095081, E-mail: yxy19830819@126.com

(*Handan Maternity and Child Health Hospital, Handan 056001, China*)

Abstract This study was to investigating the mechanism of action of miR-9-5p on neuroinflammation in rats with tic disorder models. A tic disorder model was established in 82 SD rats via intraperitoneal injection of an IDPN (iminodipropionitrile) solution. The successfully modelled rats were randomly allocated to the Model group, Inhibitor negative control group (Inhibitor NC group), miR-9-5p inhibitor group, and miR-9-5p inhibitor+IGF2 (insulin-like growth factor 2) inhibitor group (miR-9-5p inhibitor+si-IGF2 group), with 18 rats in each group. Additionally, 18 healthy rats were designated as the control group (Control group). Verification of the miR-9-5p-*IGF2* targeting relationship using Starbase tools and dual luciferase assays. RT-qPCR was employed to detect miR-9-5p and *IGF2* mRNA expression levels in rat striatal tissue; Western blot analysis was conducted to assess IGF2 protein expression levels in rat striatal tissue; behavioural testing was performed on rats; HE (haematoxylin and eosin) and Nissl staining were used to observe pathological alterations and neuronal morphological changes in rat striatal tissue respectively; ELISA was employed to measure TNF-α (tumour necrosis factor-α), IL-6 (interleukin-6), IL-10 and TGF-β (transforming growth factor-β) levels in rat striatal tissue. Immunofluorescence co-staining was used to detect expression of the microglial marker proteins Iba-1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1), CD86, and CD206 in rat striatal tissue. Western blot analysis of p-PI3K (phosphorylated phosphoinositide 3-kinase) and p-AKT (phosphorylated protein kinase B) protein expression levels in rat striatal tissue. The results show that compared with the Control group, rats in the Model group exhibited significantly elevated levels of miR-9-5p alongside markedly increased motor behaviour scores and stereotypy scores (P<0.05). IGF2 mRNA and protein expression levels were markedly reduced (P<0.05), while striatal histopathological damage worsened, characterised by sparse Nissl bodies and a significant reduction in neuronal cell numbers (P<0.05). Levels of TNF-α, IL-6, Iba-1, and CD86 were markedly elevated (P<0.05), while levels of IL-10, TGF-β, and CD206, along with p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT values, were significantly reduced (P<0.05). Compared with the Model group, rats in the miR-9-5p inhibitor group exhibited significantly reduced levels of miR-9-5p, motor behaviour scores, and stereotypy scores (P<0.05). IGF2 mRNA and protein expression levels were markedly elevated (P<0.05), with reduced pathological damage in striatal tissue and a significant increase in neuronal cell numbers (P<0.05). Levels of TNF-α, IL-6, Iba-1, and CD86 were markedly reduced (P<0.05), while levels of IL-10, TGF-β, and CD206, along with p-PI3K/PI3K and p-AKT/AKT values, were significantly elevated (P<0.05). Downregulation of IGF2 partially reversed the inhibitory effects of miR-9-5p inhibitors on behavioural scores, striatal histopathological damage, microglial activation, and neuroinflammation in model rats. In summary, inhibition of miR-9-5p may suppress M1-type glial cell polarisation and promote M2-type polarisation by targeting IGF2 regulation and activating the PI3K/AKT signalling pathway, thereby alleviating neuroinflammation and improving tic disorders in rats.

Keywords miR-9-5p; IGF2; tic disorder; microglia; neuroinflammation; PI3K/AKT signalling pathway

抽动障碍作为一种常见于儿童和青少年时期的神经精神障碍性疾病, 其主要临床特征为不自主、反复且快速的肌肉运动性和发声性抽动, 严重影响患者的生活质量与心理健康[1]。目前, 该病的病因和发病机制尚未被完全阐明。但近年来, 神经炎症作为多种神经系统疾病的共同病理基础, 日益受到关注[2]。作为中枢神经系统固有免疫细胞的小胶质细胞, 其过度激活会使M2抗炎表型向M1促炎表型极化, 该过程被认为是驱动神经炎症、破坏神经元微环境平衡的关键环节[3]。在抽动障碍中, 抑制小胶质细胞极化可减轻神经炎症, 从而改善模型大鼠抽动行为[4]。

微小核糖核酸(microRNA, miRNA)是一类内源性非编码小分子RNA, 能够通过与靶mRNA的互补配对结合, 在转录后水平对基因表达进行调控, 进而参与生物体的多种生理和病理过程[5]。其中, miR-9-

5p在大脑发育及神经免疫调节中作用显著, 并被报道在多种神经炎症模型中高表达[6-7]。生物信息学预测显示, miR-9-5p的种子序列与*IGF2* mRNA的3′非翻译区存在高度互补性。胰岛素样生长因子2(insulin-like growth factor 2, IGF2)作为一种多效性多肽, 广泛分布于各种组织/器官中, 包括中枢神经系统[8]。近期研究发现, IGF2可通过抑制海马小胶质细胞过度激活减轻抑郁小鼠的神经炎症[9]。在细胞实验中miR-9-5p已被证实可通过靶向IGF2BP1调控IGF2/磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)信号通路[10], 但miR-9-5p/IGF2轴在抽动障碍中的作用尚不明确。因此, 本研究通过构建抽动障碍大鼠模型, 探究miR-9-5p、IGF2与小胶质细胞激活及神经炎症之间的相互作用关系, 以期为开发新的治疗策略提供潜在的靶点。

1 材料与方法

1.1 实验动物

100只4周龄SPF级SD大鼠, 体质量80~100 g, 购自广东至远生物医药科技有限公司SCXK(粤) 2021-0057。大鼠在温度为(25±2) ℃、相对湿度(50±5)%的环境中适应性饲养1周, 自由摄食和饮水, 保持12 h光照/12 h黑暗的昼夜节律。本研究按照我国实验动物管理条例要求进行, 所有动物实验均经过邯郸市妇幼保健院动物委员会批准(批准号为20251125-013)。

1.2 主要药物与试剂

亚氨基二丙腈(iminodipropionitrile, IDPN)(货号: E7750)购自德国Merck KGaA公司; miR-9-5p inhibitor、miR-9-5p mimic及其阴性对照(货号: B03001、A09001)购自上海吉玛制药技术有限公司; si-IGF2(货号: A101231)购自台湾生工有限公司; RNA提取、逆转录实时定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)试剂盒(货号: R1200、KM11259659)购自温州科淼生物科技有限公司; 兔源抗IGF2、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、GAPDH抗体(货号: ab317490、ab191606、ab302958、ab38449、ab8805、ab181602)购自英国Abcam公司; HE染色试剂盒(货号: AS11L011)购自上海和元李记生物技术有限公司; Nissl染色试剂盒(货号: G1430)购自北京索莱宝科技有限公司; 肿瘤坏死因子-α(tumour necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、IL-10、转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β) ELISA试剂盒(货号: J20223、J20252、J24126、J23652)购自武汉吉立德生物科技有限公司; 离子钙接头蛋白分子1(ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba-1)、CD86、CD206抗体(货号: 10904-1-AP、31449-1-AP、18704-1-AP)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 人293T细胞系(货号: SNL-015)购自武汉尚恩生物科技有限公司; pmirGLO质粒(货号: E1330)购自湖南丰晖生物科技有限公司。荧光定量PCR仪购自上海臻诺生物科技有限公司; JY200E型电泳仪购自北京君意东方电泳设备有限公司; RM2016冷冻切片机购自德国Leica公司; Synergy H1型酶标仪购自美国BioTek公司; Axio Observer A1型倒置荧光显微镜购自德国Zeiss公司。

1.3 模型建立与处理

大鼠适应性饲养1周后, 随机选取18只健康大鼠作为对照组(Control组), 其余大鼠采取腹腔注射IDPN溶液构建抽动障碍模型[11]。每只大鼠腹腔注射150 mg/kg的IDPN, 每天1次, 连续1周。对大鼠进行运动行为和刻板行为评分, 评分≥2证明模型构建成功。82只参与造模的大鼠有74只构建成功。在建模成功的74只大鼠中挑选72只, 将其随机分为模型组(Model组)、抑制剂阴性对照组(Inhibitor NC组)、miR-9-5p抑制剂组(miR-9-5p inhibitor组)、miR-9-5p inhibitor+IGF2抑制剂组(miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组), 每组18只。将大鼠固定在脑立体定位仪上, 于颅顶正中备皮消毒, 切开头部皮肤暴露前囟, 牙钻钻通颅骨, 以前囟为原点, 在前囟后8 mm、冠状线右侧1.3 mm、深3 mm处, Inhibitor NC组、miR-9-5p inhibitor组、miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组使用显微注射器分别注射10 nmol/kg的Inhibitor NC或miR-9-5p inhibitor[12], miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组注射miR-9-5p inhibitor的同时在侧脑室(前囟为原点, 前囟后0.8 mm, 右侧1.5 mm, 深2.5 mm)注射10 nmol/kg的si-IGF2[9], 均注射1次。注射完成后, 使用骨蜡封住钻孔, 清洁并缝合伤口。Control组、Model组在同样位置注射等体积的生理盐水。

1.4 样品采集

干预结束24 h后, 各组分别随机挑选6只大鼠, 麻醉处死后迅速断头取脑, 收集纹状体组织于−80 ℃冰箱, 供RT-qPCR和Western blot检测使用。各组

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	正向引物(5′→3′) Forward primer (5′→3′)	反向引物(5′→3′) Reverse primer (5′→3′)
miR-9-5p	GTG CAG GGT CCG AGG T	GCG CTC TTT GGT TAT CTA GC
IGF2	CCC AGC GAG ACT CTG TGC GGA	GGA AGT ACG GCC TGA GAG GTA
U6	CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT	AGC ATG TAG ACT GCT GGG GCA A
β-actin	CAC AGC TGA GAG GGA AAT C	TCA GCA ATG CCT GGG TAC

剩余12只大鼠在其行为学检测结束后, 麻醉处死采集纹状体组织, 各组随机选取6份置于−80 ℃冰箱, 用于ELISA检测, 剩余6份置于4%多聚甲醛中室温固定24 h, 用于HE染色、Nissl染色以及免疫荧光检测。

1.5 指标检测与方法

1.5.1 RT-qPCR 采用Trizol试剂提取纹状体组织总RNA, 按照逆转录试剂盒说明书将RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板, 使用SYBR Green PCR Master Mix进行qPCR扩增。引物序列见表1。

1.5.2 Western blot 取适量纹状体组织, 加入RIPA裂解液, 冰上裂解30 min, 4 ℃、12 000 r/min离心15 min, 取上清, 采用BCA法测定蛋白浓度。将蛋白样品与上样缓冲液混合, 煮沸变性5 min, 进行SDS-PAGE电泳。电泳结束后, 将蛋白转移至PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h。分别加入IGF2、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、GAPDH一抗(稀释比例均为1:1 000), 4 ℃孵育过夜。次日, TBST洗膜3次, 每次10 min, 加入HRP标记的二抗(1:5 000), 室温孵育1 h。TBST再次洗膜3次, 每次10 min, 化学发光法显影。利用ImageJ软件对目的蛋白的灰度值进行分析, 并将结果以Control组为参照进行归一化处理。

1.5.3 生物信息学分析及双荧光素酶报告基因检测 miR-9-5p和*IGF2*之间的结合位点通过Starbase (http://starbase.sysu.edu.cn/index.php)进行预测。含有miR-9-5p结合位点的*IGF2*片段被克隆到pmirGLO载体中, 随后构建了pmirGLO-*IGF2*野生型(*IGF2*-WT)和pmirGLO-*IGF2*突变型(*IGF2*-MUT)质粒。构建的载体转染至293T细胞后, 再分别转染miR-9-5p mimic或miR-NC(即miR-9-5p mimic组和miR-NC组), 将不进行任何处理的pmirGLO载体转染至293T细胞作为空白对照(pmir-Blank)。转染48 h后采用双荧光素酶报告基因检测系统检测荧光素酶活性。

1.5.4 行为学检测 各组大鼠进行运动行为评分[13]评估其活动能力。将大鼠置于安静避光的环境中适应5 min, 之后记录大鼠5 min内的活动状态。0分代表安静和正常活动; 1分代表兴奋过度; 2分代表大鼠探究行为增加, 且出现不连续的吸鼻; 3分代表大鼠不停跑动; 4分代表大鼠不停跑动, 且带有惊跳。运动行为评分结束后进行刻板行为评分[14]评估大鼠抽动症状严重程度。将大鼠置于安静避光的环境中适应5 min, 之后观察大鼠在5 min内的刻板行为, 如反复舔毛、转圈、咬笼等, 并根据行为的严重程度进行评分。0分代表无刻板行为; 1分代表大鼠出现躯体旋转行为; 2分代表大鼠头部和颈部疯狂上下运动; 3分代表大鼠头部和颈部疯狂上下运动, 且躯体旋转; 4分代表大鼠头部和颈部疯狂上下运动跳, 且头部侧摆。

1.5.5 HE染色 取经4%多聚甲醛室温固定24 h后的纹状体组织, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 制成4 μm厚的切片。切片脱蜡至水后, 将其分成三份, 取其中一份用苏木精室温染色5 min, 自来水冲洗, 1%盐酸乙醇分化3~5 s, 自来水冲洗返蓝, 伊红染色3 min, 再次自来水冲洗, 分别置于70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇和无水乙醇中梯度脱水5 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片。在光学显微镜下观察纹状体组织病理变化, 并从组织结构、细胞核染色、细胞质染色和细胞活性四个维度对其进行组织学评分, 0分表示组织结构完整、神经元排列整齐、核膜清晰、染色质均匀、细胞形态正常; 1~5分表示上述发生不同程度病理变化, 且分数越高, 病变越严重。

1.5.6 Nissl染色 取一份脱蜡水化后的纹状体组织切片, 蒸馏水冲洗后将其浸入0.5%甲苯胺蓝溶液, 60 ℃恒温箱染色30 min, 在0.1%冰醋酸中分化30 s, 分别置于70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇和无水乙醇中梯度脱水5 min、二甲苯透明, 滴加中性树胶封片。室温晾干后在光学显微镜下观察Nissl小体形态, ImageJ软件统计特定视野中的神经

元数量(神经元胞体呈深蓝色)。

1.5.7 ELISA检测 按照ELISA试剂盒说明书操作。将大鼠纹状体组织匀浆离心(4 ℃、3 000 r/min离心10 min), 取上清, 加入对应的酶标板孔中。依次加入生物素标记的抗体工作液、酶结合物工作液, 37 ℃孵育1 h。洗板后加入底物溶液, 37 ℃避光孵育15~20 min, 最后加入终止液, 检测酶标仪波长450 nm处的吸光度(*D*)值。根据标准曲线计算样品中TNF-α、IL-6、IL-10、TGF-β的水平。

1.5.8 免疫荧光共染 取剩余一份脱蜡水化后的纹状体组织切片, 置于抗原修复盒中, 加入预热的柠檬酸钠缓冲液(pH6.0, 0.01 mol/L), 使用水浴锅95 ℃加热20 min, 自然冷却至室温, 加入3%过氧化氢溶液, 室温避光孵育30 min。PBS洗涤后, 加入Iba-1与CD86或CD206一抗(稀释比例均为1:200), 4 ℃过夜孵育。次日, 加入荧光标记的二抗(稀释比例为1:400), 室温避光孵育1 h, PBS洗涤后, 使用DAPI对切片进行核染5 min, 再次洗涤切片, 在切片上滴加抗荧光淬灭封片剂封片。使用倒置荧光显微镜观察并采集图像, 通过ImageJ软件对阳性荧光强度进行定量分析。

1.6 统计分析

采用SPSS 23.0统计学软件进行数据分析, 所有数据均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组数据的正态性和方差齐性分别使用Shapiro-Wilk、Levene检验, 结果均符合正态分布, 两组间数据比较使用*t*检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用LSD-*t*检验, 并使用Bonferroni法进行校正。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抽动障碍模型大鼠中miR-9-5p的表达水平

为探究miR-9-5p在抽动障碍中的表达趋势, 使用RT-qPCR检测了正常大鼠和模型大鼠纹状体组织中miR-9-5p的相对表达水平。结果显示, 与Control组相比, Model组大鼠纹状体组织中miR-9-5p的表达水平明显升高(*P*<0.05)(表2), 说明miR-9-5p在抽动障碍模型中高表达, 抑制其表达可能有利于该病的改善。

2.2 miR-9-5p与*IGF2*的靶向结合位点预测

利用生物信息学在线工具Starbase(http://starbase.sysu.edu.cn/index.php)预测miR-9-5p与*IGF2*存在结合位点(图1A)。双荧光素酶实验进一步验证二者之间的靶向关系, 结果显示, 与miR-NC组相比, miR-9-5p mimic组的*IGF2*-WT表达水平明显降低(*P*<0.05), *IGF2*-MUT则无明显变化(图1B)。这说明miR-9-5p可靶向抑制*IGF2*的表达。

2.3 各组大鼠miR-9-5p、IGF2的表达水平

与Control组相比, Model组大鼠纹状体组织中miR-9-5p的相对表达水平明显升高(*P*<0.05), IGF2 mRNA和蛋白相对表达水平明显降低(*P*<0.05)。与Inhibitor NC组相比, miR-9-5p inhibitor组的miR-9-5p的相对表达水平明显降低(*P*<0.05), IGF2 mRNA和蛋白相对表达水平明显升高(*P*<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组miR-9-5p的相对表达水平无显著变化(*P*>0.05), IGF2 mRNA和蛋白相对表达水平明显降低(*P*<0.05)(图2和表3)。这进一步说明miR-9-5p可靶向抑制IGF2的表达。

2.4 各组大鼠行为学评分变化

与Control组相比, Model组大鼠的运动和刻板行为评分均明显升高(*P*<0.05)。与Inhibitor NC组相比, miR-9-5p inhibitor组的运动和刻板行为评分均明显降低(*P*<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组的运动和刻板行为评分均明显升高(*P*<0.05)(表4)。这说明抑制miR-9-5p可明显改善大鼠抽动障碍行为, 抑制IGF2则可部分逆转抑制miR-9-5p对大鼠抽动障碍行为的影响。

表2 抽动障碍模型大鼠中miR-9-5p的表达水平

Table 2 Expression levels of miR-9-5p in tics disorder model rats

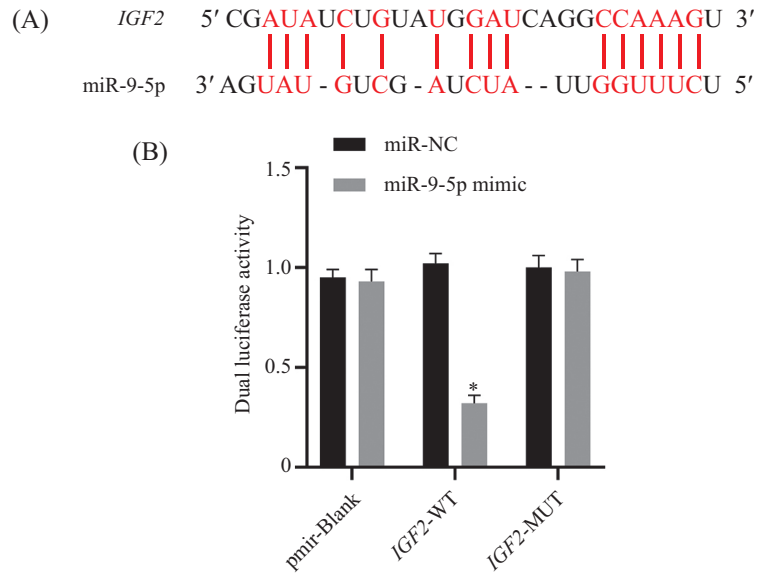
组别 Group	miR-9-5p
Control	1.00±0.00
Model	3.05±0.41*

*P<0.05, 与Control组相比。$\bar{x}\pm s$, n=6。

*P<0.05 compared with the Control group. $\bar{x}\pm s$, n=6.

2.5 各组大鼠纹状体组织病理改变和神经元形态变化

HE染色结果显示, Control组大鼠纹状体组织细胞排列整齐, 形态正常, 细胞核清晰可见, 胞质均匀。与Control组相比, Model组的纹状体组织细胞排列紊乱, 细胞间隙增大, 部分细胞核固缩、深染, 组织学评分明显升高(P<0.05)。与Inhibitor NC组相比, miR-9-5p inhibitor组的纹状体组织细胞排列相对有序, 组织学评分明显降低(P<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组的上述病理变化加重, 组织学评分明显升高(P<0.05)(图3A和图3C)。这说明抑制miR-9-5p可减轻抽动障碍

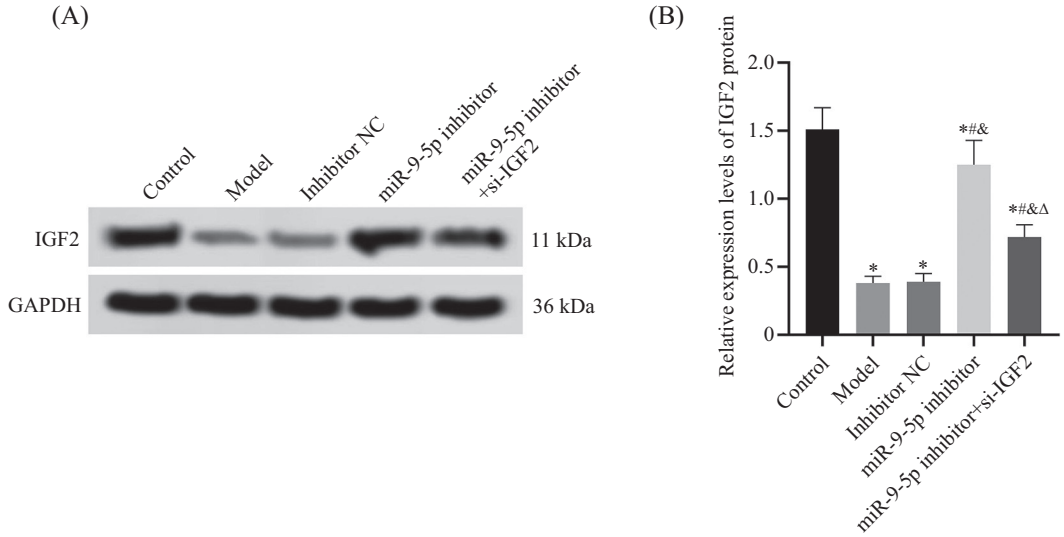


A: miR-9-5p与*IGF2*的靶向结合位点; B: 双荧光素酶实验结果。n=3; *P<0.05, 与miR-NC组相比。

A: target binding site of miR-9-5p with *IGF2*; B: results of the dual luciferase assay. n=3; *P<0.05 compared with the miR-NC group.

图1 miR-9-5p与*IGF2*的靶向关系验证

Fig.1 Validation of the target relationship between miR-9-5p and *IGF2*



A: 各组大鼠纹状体组织IGF2蛋白电泳图; B: 各组大鼠纹状体组织IGF2蛋白表达水平。n=6; *P<0.05, 与Control组相比; $^{\#}P$<0.05, 与Model组相比; $^{\&}P$<0.05, 与Inhibitor NC组相比; $^{\triangle}P$<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。

A: electrophoresis images of IGF2 protein in striatal tissues of rats from each group; B: expression levels of IGF2 protein in striatal tissues of rats from each group. n=6; *P<0.05 compared with the Control group; $^{\#}P$<0.05 compared with the Model group; $^{\&}P$<0.05 compared with the Inhibitor NC group; $^{\triangle}P$<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group.

图2 各组大鼠IGF2蛋白相对表达水平

Fig.2 Relative expression levels of IGF2 protein in each group of rats

表3 各组大鼠miR-9-5p和*IGF2* mRNA相对表达水平的比较

Table 3 Comparison of relative expression levels of miR-9-5p and *IGF2* mRNA among groups of rats

组别 Group	miR-9-5p	*IGF2* mRNA
Control	1.00±0.01	1.00±0.02
Model	3.19±0.55*	0.29±0.04*
Inhibitor NC	3.25±0.60*	0.32±0.04*
miR-9-5p inhibitor	1.58±0.17#&	0.88±0.10*#&
miR-9-5p inhibitor+si-IGF2	1.46±0.22#&	0.45±0.06*#&△

*P<0.05, 与Control组相比; #P<0.05, 与Model组相比; &P<0.05, 与Inhibitor NC组相比; △P<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。$\bar{x}\pm s$, n=6。

*P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with the Model group; &P<0.05 compared with the Inhibitor NC group; △P<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group. $\bar{x}\pm s$, n=6.

表4 各组大鼠运动行为和刻板行为评分

Table 4 Scores for motor behaviour and stereotyped behaviour in each group of rats

组别 Group	运动行为评分 Physical activity score	刻板行为评分 Stereotyped behavior score
Control	0.00±0.00	0.00±0.00
Model	3.42±0.51*	3.44±0.50*
Inhibitor NC	3.49±0.32*	3.47±0.38*
miR-9-5p inhibitor	0.83±0.09*#&	0.75±0.09*#&
miR-9-5p inhibitor+si-IGF2	2.35±0.39*#&△	2.19±0.26*#&△

*P<0.05, 与Control组相比; #P<0.05, 与Model组相比; &P<0.05, 与Inhibitor NC组相比; △P<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。$\bar{x}\pm s$, n=12。

*P<0.05 compared with the Control group; #P<0.05 compared with the Model group; &P<0.05 compared with the Inhibitor NC group; △P<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group. $\bar{x}\pm s$, n=12.

大鼠纹状体组织的病理变化, 抑制IGF2则可部分逆转抑制miR-9-5p对纹状体组织病理变化的影响。

Nissl染色结果显示, Control组大鼠纹状体组织的Nissl小体完整, 排列紧密, 神经元细胞数量较多。与Control组相比, Model组的Nissl小体稀疏, 排列紊乱, 神经元细胞数量明显减少(P<0.05)。与Inhibitor NC组相比, miR-9-5p inhibitor组的神经元细胞数量明显增加(P<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组的神经元细胞数量明显减少(P<0.05)(图3B和图3D)。这说明抑制miR-9-5p可增加抽动障碍大鼠纹状体组织的神经元细胞, 抑制IGF2则可部分逆转抑制miR-9-5p对纹状体组织神经元的影响。

2.6 各组大鼠纹状体组织炎症因子水平变化

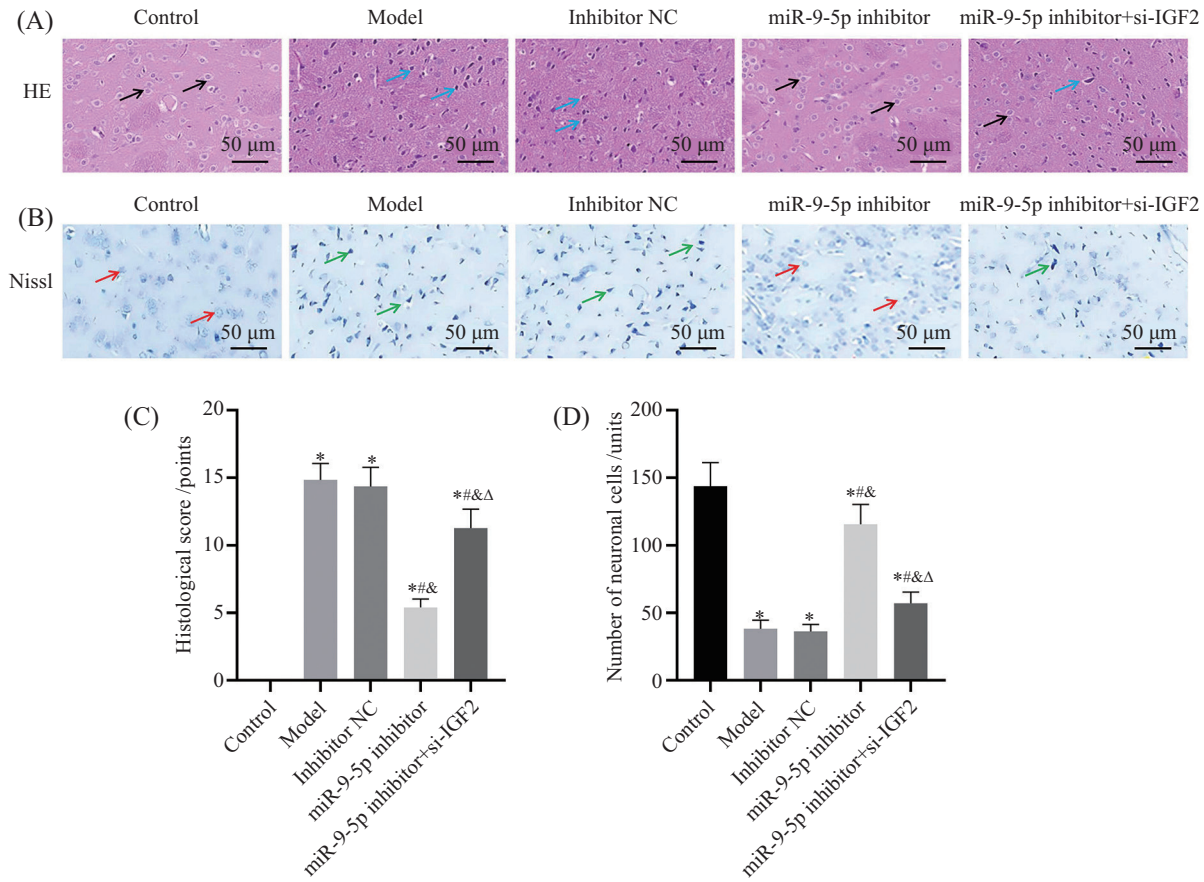
与Control组相比, Model组大鼠纹状体组织的TNF-α、IL-6水平明显升高(P<0.05), IL-10、TGF-β水平明显降低(P<0.05)。与Inhibitor NC组相比, miR-9-5p inhibitor组的TNF-α、IL-6水平明显降低(P<0.05), IL-10、TGF-β水平明显升高(P<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组的TNF-α、IL-6水平明显升高(P<0.05), IL-10、TGF-β水平明显降低(P<0.05)(表5)。这说明抑制miR-9-5p可减轻抽动障碍大鼠的炎症反应, 抑制IGF2则可部分逆转抑制miR-9-5p对其炎症反应的改善作用。

2.7 各组大鼠纹状体组织小胶质细胞活化水平

与Control组相比, Model组大鼠纹状体组织的CD86/Iba-1相对荧光强度明显升高(P<0.05), CD206/Iba-1相对荧光强度明显降低(P<0.05)。与Inhibitor NC组相比, miR-9-5p inhibitor组的CD86/Iba-1相对荧光强度明显降低(P<0.05), CD206/Iba-1相对荧光强度明显升高(P<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组的CD86/Iba-1相对荧光强度明显升高(P<0.05), CD206/Iba-1相对荧光强度明显降低(P<0.05)(图4)。这说明抑制miR-9-5p可阻止抽动障碍大鼠纹状体组织小胶质细胞的活化, 抑制IGF2则可部分逆转抑制miR-9-5p对小胶质细胞活化的影响。

2.8 各组大鼠纹状体组织PI3K/AKT通路相关蛋白表达水平

与Control组相比, Model组大鼠的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT值明显降低(P<0.05)。与Inhibitor NC组相



A: 各组大鼠纹状体组织HE染色结果, 黑色箭头代表完整细胞, 蓝色箭头代表细胞核固缩、深染; B: 各组大鼠纹状体组织Nissl染色结果, 红色箭头代表完整神经元细胞, 绿色箭头代表损伤神经元细胞; C: 各组大鼠组织学评分比较; D: 各组大鼠纹状体组织神经元细胞数量比较。n=6; *P<0.05, 与Control组相比; $^{\#}P$<0.05, 与Model组相比; $^{\&}P$<0.05, 与Inhibitor NC组相比; $^{\triangle}P$<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。

A: HE staining results of striatal tissue from each group of rats. Black arrows indicate intact cells; blue arrows indicate cells with condensed, deeply stained nuclei. B: Nissl staining results of striatal tissue from each group of rats, with red arrows indicating intact neuronal cells and green arrows indicating damaged neuronal cells; C: comparison of histological scores across rat groups; D: comparison of neuronal cell counts in striatal tissue across rat groups. n=6; *P<0.05 compared with the Control group; $^{\#}P$<0.05 compared with the Model group; $^{\&}P$<0.05 compared with the Inhibitor NC group; $^{\triangle}P$<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group.

图3 各组大鼠纹状体组织病理改变和神经元形态变化

Fig.3 Histopathological alterations and neuronal morphological changes in the striatal tissue of rats across each group

表5 各组大鼠纹状体组织炎症因子水平的比较

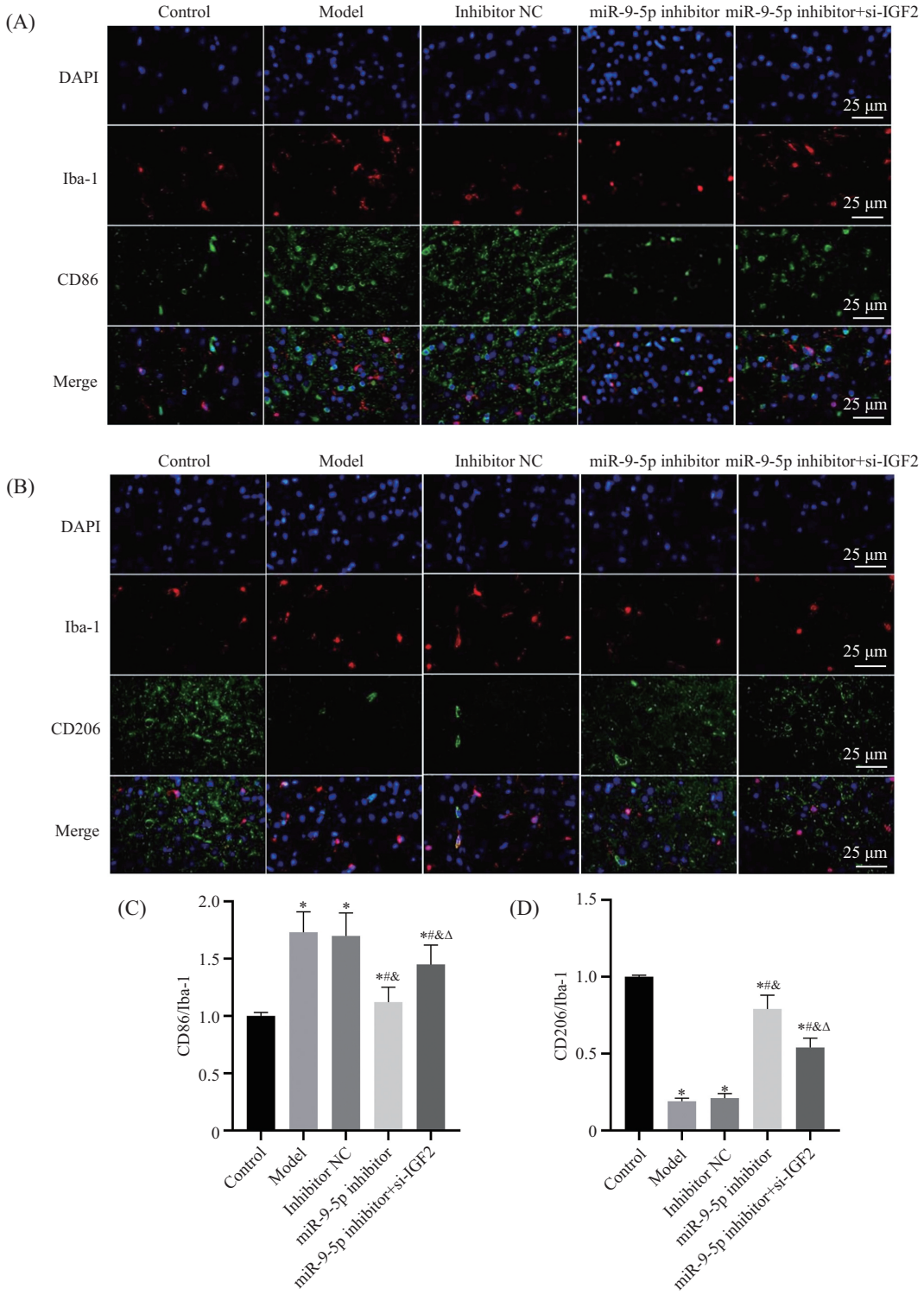
Table 5 Comparison of inflammatory cytokine levels in striatal tissue across groups

组别 Group	TNF-α /pg·mL^{-1}	IL-6 /pg·mL^{-1}	IL-10 /pg·mL^{-1}	TGF-β/pg·mL^{-1}
Control	225.64±31.39	95.62±9.98	255.83±30.26	884.90±97.33
Model	791.23±82.91*	160.44±17.51*	123.12±14.61*	311.18±34.30*
Inhibitor NC	803.20±81.65*	157.38±17.14*	120.25±13.91*	315.83±33.46*
miR-9-5p inhibitor	460.32±50.16*$^{\#\&}$	108.51±13.80$^{\#\&}$	197.11±22.18*$^{\#\&}$	628.08±71.60*$^{\#\&}$
miR-9-5p inhibitor+si-IGF2	633.21±69.72*$^{\#\&\triangle}$	132.69±15.24*$^{\#\&\triangle}$	160.35±17.56*$^{\#\&\triangle}$	474.10±52.03*$^{\#\&\triangle}$

*P<0.05, 与Control组相比; $^{\#}P$<0.05, 与Model组相比; $^{\&}P$<0.05, 与Inhibitor NC组相比; $^{\triangle}P$<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。$\bar{x}\pm s$, n=6。

*P<0.05 compared with the Control group; $^{\#}P$<0.05 compared with the Model group; $^{\&}P$<0.05 compared with the Inhibitor NC group; $^{\triangle}P$<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group. $\bar{x}\pm s$, n=6.

比, miR-9-5p inhibitor组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT值明显升高(P<0.05)。与miR-9-5p inhibitor组相比, miR-9-5p inhibitor+si-IGF2组的p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT值明显降低(P<0.05)(图5)。这说明抑制miR-9-5p可激活PI3K/AKT信号通路, 抑制IGF2则可部分逆转抑制miR-9-5p对PI3K/AKT信号通路的激

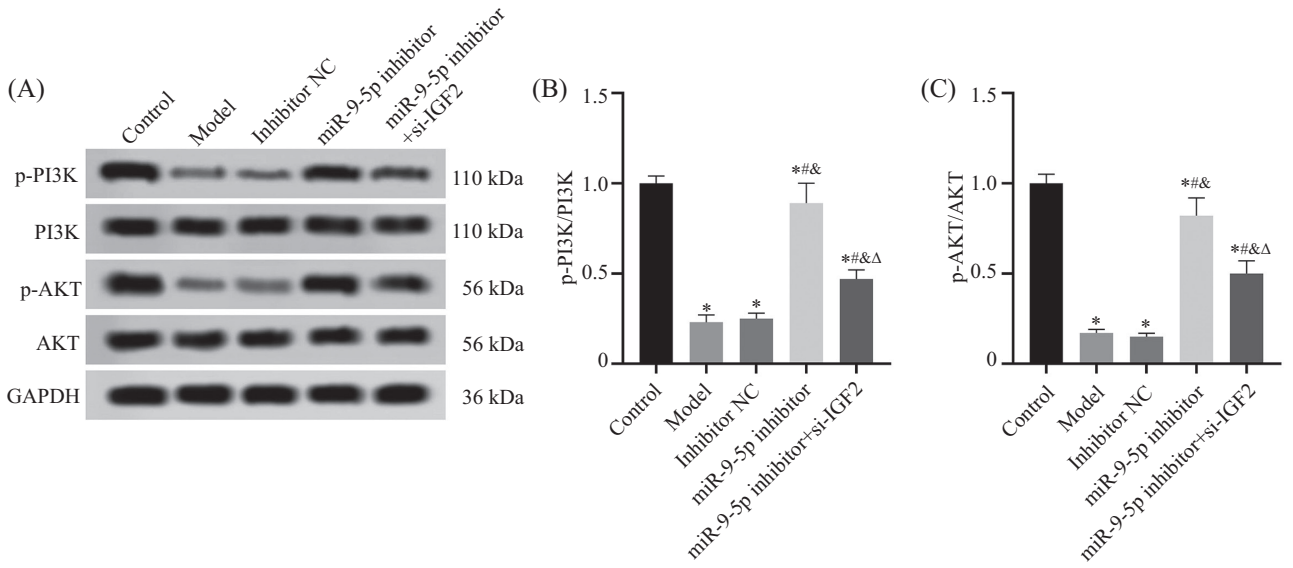


A: 各组大鼠纹状体组织Iba-1、CD86的免疫荧光共染结果; B: 各组大鼠纹状体组织Iba-1、CD206的免疫荧光共染结果; C、D: 各组大鼠纹状体组织Iba-1与CD86、CD206的相对免疫荧光强度比较。n=6; *P<0.05, 与Control组相比; $^{\#}P$<0.05, 与Model组相比; $^{\&}P$<0.05, 与Inhibitor NC组相比; $^{\triangle}P$<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。

A: immunofluorescence co-staining results for Iba-1 and CD86 in striatal tissue from each group of rats; B: immunofluorescence co-staining results for Iba-1 and CD206 in striatal tissue from each group of rats; C,D: comparison of relative immunofluorescence intensities for Iba-1 versus CD86 and CD206 in striatal tissue from each group of rats. n=6; *P<0.05 compared with the Control group; $^{\#}P$<0.05 compared with the Model group; $^{\&}P$<0.05 compared with the Inhibitor NC group; $^{\triangle}P$<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group.

图4 免疫荧光共染检测各组大鼠纹状体组织Iba-1与CD86、CD206的相对表达

Fig.4 Immunofluorescence co-staining analysis of the relative expression of Iba-1, CD86, and CD206 in striatal tissue from rats across different groups



A: 各组大鼠纹状体组织PI3K/AKT通路相关蛋白电泳图; B、C: 各组大鼠纹状体组织PI3K/AKT通路相关蛋白相对表达水平。n=6; *P<0.05, 与Control组相比; $^{\#}P$<0.05, 与Model组相比; $^{\&}P$<0.05, 与Inhibitor NC组相比; $^{\triangle}P$<0.05, 与miR-9-5p inhibitor组相比。

A: electrophoretic patterns of PI3K/AKT pathway-related proteins in striatal tissue from each group of rats; B,C: relative expression levels of PI3K/AKT pathway-related proteins in striatal tissue from each group of rats. n=6; *P<0.05 compared with the Control group; $^{\#}P$<0.05 compared with the Model group; $^{\&}P$<0.05 compared with the Inhibitor NC group; $^{\triangle}P$<0.05 compared with the miR-9-5p inhibitor group.

图5 各组大鼠纹状体组织PI3K/AKT通路相关蛋白表达

Fig.5 Expression of proteins associated with the PI3K/AKT pathway in striatal tissue from rats in each group

活作用。

3 讨论

抽动障碍的发病机制复杂, 涉及遗传、神经生物学及环境等多因素交互作用[15]。现有治疗以行为干预和药物为主[16], 但药物治疗可能伴随代谢综合征等不良反应。因此, 深入了解抽动障碍的发病机制, 对于开发新型安全疗法具有重要意义。miRNAs作为关键的转录后调控因子, 在神经稳态中扮演核心角色。其中, 脑富集的miR-9-5p功能失调与多种神经系统疾病相关[17], 但其在不同神经系统疾病中发挥的作用不同。例如miR-9-5p在癫痫[18]、阿尔茨海默病[19]中高表达能加快病理进程, 而在帕金森病中却能通过SCRIB/β-catenin信号通路发挥神经保护作用[20]。本研究首次发现, 在抽动障碍模型大鼠中, miR-9-5p表达显著上调。行为学测试表明, 抑制miR-9-5p可有效改善抽动障碍大鼠的异常抽动行为。组织病理学分析进一步显示, 抑制miR-9-5p能减轻纹状体神经元损伤并增加健康神经元数量, 这些结果均证实了miR-9-5p在抽动障碍中的神经损害作用。因此, 抑制miR-9-5p可能成为治疗抽动障碍的潜在途径。

近年来, 神经炎症在抽动障碍发病中的作用日益收到重视, 其核心特征是小胶质细胞等免疫细胞的异常激活及促炎介质的释放。小胶质细胞作为中枢神经系统的固有免疫细胞, 其功能状态在神经免疫稳态中至关重要, 促炎M1型和抗炎M2型之间的动态平衡一旦被打破将导致神经炎症失控[21]。Iba-1表达水平是反映小胶质细胞活化的的经典指标[22]。已有研究发现, 促进小胶质细胞向M2型极化、抑制M1型活化, 能够有效缓解抽动障碍大鼠神经炎症与行为症状[23]。值得注意的是, miR-9-5p可以促进M1型小胶质细胞极化, 加重抑郁症小鼠的神经元损伤[24]。本研究发现, 在抽动障碍大鼠纹状体中, 小胶质细胞M1型相关分子CD86、IL-6、TNF-α上调, M2型相关分子CD206、TGF-β下降, 这表明在抽动障碍模型中存在小胶质细胞向促炎M1型的极化失衡, 与先前研究[23]揭示的抽动障碍神经炎症病理特征一致。抑制miR-9-5p表达能逆转上述变化, 这说明抑制miR-9-5p可能通过抑制小胶质细胞M1极化并促进M2极化来抑制促炎因子的释放, 从而促进抽动障碍大鼠神经免疫稳态的恢复。

IGF2作为一种多效性生长因子, 广泛参与神经发育与稳态维持, 其异常表达与神经炎症进程密切

相关[25]。研究证实, IGF2可减轻帕金森病模型中的神经炎症反应[26], 也可促进小胶质细胞M2型极化改善小鼠抑郁样行为[27]。同时, IGF2能够通过与细胞膜表面的IGF受体结合, 触发受体酪氨酸激酶的二聚化及自磷酸化, 进而招募并激活PI3K。激活的PI3K催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸转化为磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸, 后者作为第二信使招募AKT至细胞膜, 在细胞生长、存活、代谢以及炎症反应进程中发挥关键作用[28]。程申等[29]认为激活PI3K/AKT信号通路可通过降低炎症因子水平改善抽动障碍大鼠的异常行为。但IGF2在抽动障碍中的表达及作用尚不清楚。本研究发现, 在抽动障碍模型大鼠中, IGF2的表达显著下调。生物信息学分析与双荧光素酶实验验证共同确认, *IGF2*是miR-9-5p的直接靶基因。抑制miR-9-5p能够有效上调IGF2的表达, 并同时增强其下游PI3K/AKT信号通路的活性, 而下调IGF2可部分逆转抑制miR-9-5p对抽动障碍模型大鼠的全部改善作用, 提示抑制miR-9-5p可能解除了其对靶基因*IGF2*的靶向抑制, 激活下游的PI3K/AKT信号通路, 从而抑制抽动障碍大鼠小胶质细胞活化和神经炎症, 改善其异常行为。

综上所述, 抑制miR-9-5p可能通过靶向调控IGF2并激活PI3K/AKT信号通路, 抑制小胶质细胞M1型极化、促进M2型极化, 从而减轻神经炎症反应, 改善大鼠抽动障碍。本研究主要在动物水平探究了miR-9-5p的作用机制, 未来可通过增加样本量或体外培养小胶质细胞进一步明确miR-9-5p对小胶质细胞活化、神经元功能的直接影响, 以及IGF2/PI3K/AKT信号通路在其中的调控作用, 并通过高通量测序结合生物信息学分析, 筛选miR-9-5p在抽动障碍模型中的其他潜在靶基因, 构建更完整的miR-9-5p调控网络, 进一步丰富抽动障碍的发病机制研究。

参考文献 (References)

[1] Sapozhnikov Y, Mink J W, Adams H R, et al. Anxiety disorders are associated with greater tic severity in youth with chronic tic disorder [J]. Pediatric Neurology, 2025, 166: 7-15.

[2] Gorji A. Neuroinflammation: the pathogenic mechanism of neurological disorders [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(10): 5744.

[3] Ramírez Hernández E, Alanis Olvera B, Carmona González D, et al. Neuroinflammation and galectins: a key relationship in neurodegenerative diseases [J]. Glycoconjugate Journal, 2022, 39(5): 685-699.

[4] Sun K X, Wei X, Feng P, et al. Neuroinflammatory mechanism of Volatile oil from Acori graminei Rhizoma in tourette syndrome: GC-MS, network pharmacology and experimental validation [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2025, 265: 117057.

[5] Li Y, Chen S J, Rao H, et al. MicroRNA gets a mighty award [J]. Advanced Science, 2025, 12(7): e2414625.

[6] Wang M L, Yang Y T, Guo Y L, et al. Xiaoxuming decoction cutting formula reduces LPS-stimulated inflammation in BV-2 cells by regulating miR-9-5p in microglia exosomes [J]. Frontiers in Pharmacology, 2023, 14: 1183612.

[7] Wang Z B, Sun L, Jia K X, et al. miR-9-5p modulates the progression of Parkinson's disease by targeting SIRT1 [J]. Neuroscience Letters, 2019, 701: 226-233.

[8] Pardo M, Cheng Y, Sitbon Y H, et al. Insulin growth factor 2 (IGF2) as an emergent target in psychiatric and neurological disorders [J]. Neuroscience Research, 2019, 149: 1-13.

[9] Guo D M, Xu Y, Liu Z H, et al. IGF2 inhibits hippocampal overactivated microglia and alleviates depression-like behavior in LPS- treated male mice [J]. Brain Research Bulletin, 2023, 194: 1-12.

[10] Yin H D, He H R, Shen X X, et al. miR-9-5p inhibits skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by targeting IGF2BP3 through the IGF2-PI3K/Akt signaling pathway [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5): 1655.

[11] 张南, 朱沁泉, 何炜星, 等. 健脾柔肝息风汤联合针刺对抽动障碍模型大鼠纹状体区细胞自噬及凋亡的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2023, 40(7): 1741-1748.
Zhang N, Zhu Q Q, He W X, et al. Effect of jianpi rougan xifeng decoction combined with acupuncture on autophagy and apoptosis in the striatal area of model rats with tic disorder [J]. Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, 2023, 40(7): 1741-1748.

[12] Zhao Y J, Li T, Jiang Z G, et al. The miR-9-5p/CXCL11 pathway is a key target of hydrogen sulfide-mediated inhibition of neuroinflammation in hypoxic ischemic brain injury [J]. Neural Regeneration Research, 2024, 19(5): 1084-1094.

[13] 柯钟灵, 陈燕惠. 抽动障碍动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 416-422.
Ke Z L, Chen Y H. Research advances in animal models of tic disorder [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2020, 28(3): 416-422.

[14] 冯鹏, 史正刚, 杨欢, 等. 抽动障碍动物模型的研究进展及在中医药研究中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(15): 207-213.
Feng P, Shi Z G, Yang H, et al. Research progress of animal model of tic disorder and its application in traditional chinese medicine [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2020, 26(15): 207-213.

[15] Zhang M Y, Zhang Y H, Chen Y, et al. Mechanistic insights and therapeutic approaches in tic disorders: the distinctive role of ethnomedicine and modern medical interventions [J]. Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2025, 172: 106130.

[16] Kohler K, Rosen N, Piacentini J. Description, implementation, and efficacy of the comprehensive behavioral intervention for tics as first-line treatment for tourette and other tic disorders [J]. Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology, 2025,

35(3): 126-134.

[17] Bezerra D P, de Aguiar J P, Keasey M P, et al. MiR-9-5p regulates genes linked to cerebral calcification in the osteogenic differentiation model and induces generalized alteration in the ion channels [J]. Journal of Molecular Neuroscience, 2021, 71(9): 1897-1905.

[18] Wang S L, He X Z, Bao N N, et al. Potentials of miR-9-5p in promoting epileptic seizure and improving survival of glioma patients [J]. Acta Epileptologica, 2022, 4(1): 33.

[19] Chen M L, Hong C G, Yue T, et al. Inhibition of miR-331-3p and miR-9-5p ameliorates Alzheimer's disease by enhancing autophagy [J]. Theranostics, 2021, 11(5): 2395-2409.

[20] Xiao Z Y, Yan Z X, Sun X, et al. MiR-9-5p inhibits the MMP^{+}-induced neuron apoptosis through regulating SCRIB/β-catenin signaling in Parkinson's disease [J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2022, 2022: 9173514.

[21] Guo Y P, Xu S, Pan X H, et al. Psoralen protects neurons and alleviates neuroinflammation by regulating microglial M1/M2 polarization via inhibition of the Fyn-PKCδ pathway [J]. International Immunopharmacology, 2024, 137: 112493.

[22] Wang K, Liu J, Xie J L, et al. Sleep deprivation from mid-gestation leads to impaired of motor coordination in young offspring mice with microglia activation in the cerebellar vermis [J]. Sleep Medicine, 2024, 115: 193-201.

[23] 赵梦洁. 加味泻黄散经TLR4/NF-κB通路调控小胶质细胞极化治疗抽动障碍的机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2023.

[24] Xian X, Cai L L, Li Y, et al. Neuron secrete exosomes containing miR-9-5p to promote polarization of M1 microglia in depression [J]. Journal of Nanobiotechnology, 2022, 20(1): 122.

[25] Alberini C M. IGF2 in memory, neurodevelopmental disorders, and neurodegenerative diseases [J]. Trends in Neurosciences, 2023, 46(6): 488-502.

[26] Grunenwald F, Huerta T J, Sepulveda D, et al. IGF2-reprogrammed macrophages ameliorate the inflammatory response and protect against the neuroinflammatory process in Parkinson's disease models [J]. Aging Cell, 2025, 24(6): e70020.

[27] 张圆. 甜菜碱通过调节小胶质细胞M1/M2表型极化改善小鼠抑郁样行为[D]. 衡阳: 南华大学, 2022.

[28] Mu Q C, Wang L J, Yu F, et al. Imp2 regulates GBM progression by activating IGF2/PI3K/Akt pathway [J]. Cancer Biology & Therapy, 2015, 16(4): 623-633.

[29] 程申, 郎旭东, 方芳, 等. 天麻钩藤饮对抽动障碍模型大鼠行为改善及神经保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(11): 1475-1480.

Cheng S, Lang X D, Fang F, et al. Behavior improvement and neuroprotective effect of tianma gouteng decoction on tic disorder model rats [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2023, 40(11): 1475-1480.