

统招研究生学术学位硕士学位论文

分类号: R681.5

单位代码: 10678

密 级:

学 号: 20200405

解密日期: 年 月 日

昆明医科大学

硕士学位论文



lncRNA MALAT1 靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制脊髓损伤后神经元凋亡的机制研究

院 (系)、所 昆明医科大学第一附属医院

研究生姓名 田新鹏

学 科 专 业 外科学

学 位 类 型 学术学位

指 导 教 师 陈凌强 副教授

二〇二三年五月

昆明医科大学

硕士学位论文

lncRNA MALAT1 靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制脊髓损伤后神经元凋亡的机制研究

院 (系)、所 昆明医科大学第一附属医院

研究生姓名 田新鹏

学 科 专 业 外科学

学 位 类 型 学术学位

指 导 教 师 陈凌强 副教授

指导小组成员 杨晋 主治医师

龚志强 主治医师

基 金 项 目 云南省科技厅基础研究专项

(202101AT070226)

完 成 日 期 二〇二三年五月

目 录

缩略词表(以字母顺序排列)	1
中文摘要	2
英文摘要	5
正 文	8
前 言	8
材料与方 法	13
结 果	30
讨 论	41
结 论	46
参考文献	47
综 述	55
攻读学位期间获得的学术成果	69
致 谢	70

缩 略 词 表

英文缩写	英文全称	中文全称
AP	Apoptosis	凋亡
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CAPN1	Calpain 1	钙蛋白酶 1
DMSO	Dimethylsulfoxide	二甲基亚砷
FBS	Fetal bovin serum	胎牛血清
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide	过氧化氢
lncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
miRNA	Micro RNA	微小 RNA
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
miR-124-3p	miR-124-3p	微小 RNA-124-3p
NC	Negative control	阴性对照
OD	Optical density	光度值
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
RT-qPCR	Quantitative reverse transcription PCR	定量逆转录 PCR
SCI	Spinal cord injury	脊髓损伤
Si	Silence	沉默
WB	Western Blot	蛋白印迹

lncRNA MALAT1 靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制脊髓损伤后神经元凋亡的机制研究

研究生：田新鹏

导师：陈凌强（副）教授

中文摘要

【目的】

脊髓损伤（spinal cord injury, SCI）常引起患者永久性感觉和运动功能部分障碍甚至全部障碍。目前尚无有效方式治疗 SCI，需要进一步探索 SCI 的发生、进展与转归，为 SCI 的诊断与治疗提供新的靶点和方向。竞争性内源 RNA (ceRNA) 在中枢神经系统性疾病中发挥重要作用，但在 SCI 中的研究尚不明确。本实验研究了由 lncRNA MALAT1、miR-124-3p 和 calpain 1 构成的 ceRNA 互作网络对 SCI 的影响，并探讨它们之间的相互作用关系，希望为 SCI 的治疗提供新的靶点与方向。

【方法】

1. 建立大鼠 SCI 动物模型后，BBB 行为学评分评价建模是否成功，RT-qPCR 检测各组大鼠 lncRNA MALAT1、miR-124-3p 及 calpain 1 的变化量。

2. 通过“starbase”预测 miR-124-3p 和 lncRNA MALAT1 的关系，双荧光素酶实验验证 miR-124-3p 和 lncRNA MALAT1 的靶向关系。

3. 不同浓度的 H₂O₂ 作用于 PC12 细胞 24h，通过 CCK8 细胞活力检测寻找 SCI 的最适造模条件。使用最适浓度的 H₂O₂ 刺激 PC12，RT-qPCR 测定 miR-124-3p、lncRNA MALAT1 及 calpain 1 的表达量，WB 测定 CAPN1 和 cleaved caspase 3 的变化。

4. PC12 细胞转染 miR-124-3p 后，RT-qPCR 测定 miR-124-3p 的表达量，设置分组为 control 组、H₂O₂ 组、miR-124-3p+H₂O₂ 组和 miR-NC+H₂O₂ 组，运用 CCK8、

流式细胞术和 WB,测定并计算各分组的细胞活力、凋亡率以及 CAPN1 和 cleaved caspase 3 的变化。

5.构建了 3 个不同的 lncRNA MALAT1 干扰片段, RT-qPCR 检测干扰效率并进行最适干扰片段的筛选, 设置分组为 control 组、H₂O₂ 组、si-MALAT1+H₂O₂ 组和 si-NC+H₂O₂ 组, 通过 CCK8 和流式细胞术分析干扰 lncRNA MALAT1 对细胞活力及凋亡率的影响。

6.同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p, 设置实验分组为: control 组、H₂O₂ 组、si-NC+H₂O₂ 组、si-MALAT1+H₂O₂ 组、si-MALAT1+inhibitor-NC+ H₂O₂ 组和 si-MALAT1+miR-inhibitor+ H₂O₂ 组, 通过 CCK8、流式细胞术及 WB 测定并计算各个分组的细胞活力、凋亡率及 CAPN1 和 cleaved caspase 3 的变化。

【结 果】

1. lncRNA MALAT1、miR-124-3p 和 calpain 1 在 SCI 大鼠动物模型中差异性表达。

2. “starbase”预测结果显示 miR-124-3p 为 lncRNA MALAT1 的靶标, 双荧光素酶实验证明 lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p 之间存在相互关联。

3.CCK8 结果表明当 H₂O₂ 浓度为 200 μM 时, 刺激 PC12 细胞 24h 后得到细胞半数致死量, 以此作为模拟 SCI 体外细胞凋亡模型的条件。WB 和 RT-qPCR 结果显示 SCI 细胞模型中 miR-124-3p 的表达量显著下降, 而 calpain 1、lncRNAMALAT1 和 cleaved caspase 3 的表达量明显升高。

4.转染 miR-124-3p 后, RT-qPCR 结果显示 miR-124-3p 的表达量明显上调, CCK8 和流式细胞术检测发现 miR-124-3p 能够促进 SCI 后细胞活力并抑制细胞凋亡, WB 结果提示 miR-124-3p 明显抑制 CAPN1 和 cleaved caspase 3 的表达量。

5.构建了 3 个 lncRNA MALAT1 干扰片段 (si-1、si-2 和 si-3), RT-qPCR 筛选出最佳片段 si-1, CCK8 和流式细胞术发现干扰 lncRNA MALAT1 能抑制 SCI 引起的细胞凋亡并促进细胞增殖。

6.200 μM 的 H₂O₂ 诱导共转染 si-lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p inhibitor 的细胞 24h, RT-qPCR 结果提示干扰 lncRNA MALAT1 能促进 miR-124-3p 表达, 而 miR-124-3p inhibitor 可以阻断此效果, CCK8 和流式细胞术结果提示 miR-124-3p inhibitor 使干扰 lncRNA MALAT1 挽救的细胞减少, 从而抑制细胞活力。WB

检测还发现 miR-124-3p inhibitor 抑制了 si-lncRNA MALAT1 对 CAPN1 和 cleaved caspase 3 蛋白水平的影响。

【结 论】

- 1.过表达 miR-124-3p 通过靶向 calpian 1 抑制 SCI 后神经元凋亡；
- 2.干扰 lncRNA MALAT1 能抑制 SCI 后神经元凋亡；
- 3.lncRNA MALAT1 通过靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制 SCI 后神经元凋亡。

关键词： 脊髓损伤； 神经元凋亡； lncRNA MALAT1； miRNA-124-3p

Mechanism of lncRNA MALAT1 targeting miR-124-3p regulating calpain 1 inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury

Postgraduate: Tian Xinpeng

Supervisor: Assoc Prof. Chen Lingqiang

ABSTRACT

Objective

Spinal cord injury (SCI) often causes permanent partial or even complete impairment of sensory and motor functions in patients. Currently, there is no effective way to treat SCI, and further exploration of the occurrence, progression, and outcome of SCI is needed to provide new targets and directions for the diagnosis and treatment of SCI. Competitive endogenous RNA (ceRNA) plays an important role in central nervous system diseases, but its research in SCI is unclear. In this experiment, we investigated the effects of the ceRNA interaction network composed of lncRNA MALAT1, miR-124-3p, and calpain 1 on SCI, and explored the interaction between them, hoping to provide new targets and directions for the treatment of SCI.

Method

1. After establishing a rat SCI animal model, the BBB behavioral score was used to evaluate the success of the modeling. RT-qPCR was used to detect the changes in lncRNA MALAT1, miR-124-3p, and calpain 1 in each group of rats.

2. The relationship between miR-124-3p and lncRNA MALAT1 was predicted by "starbase", and the targeting relationship between miR-124-3p and lncRNA MALAT1 was verified by double luciferase experiment.

3. Different concentrations of H₂O₂ acted on PC12 cells for 24 hours, and the best conditions for SCI modeling were found through CCK8 cell viability test. The optimal

concentration of H₂O₂ was applied to PC12 cells for 24 hours, and the expression of miR-124-3p, lncRNA MALAT1 and calpain 1 were measured by RT-qPCR. Then the changes of CAPN1 and cleaved caspase 3 were measured by WB.

4. PC12 cells were directly transfected with miR-124-3p, and the expression of miR-124-3p was determined by RT-qPCR. The cells were divided into control group, H₂O₂ group, miR-124-3p+H₂O₂ group and miR-NC+H₂O₂ group. The cell viability, apoptosis rate and changes of CAPN1 and cleaved caspase 3 were measured and calculated by CCK8, flow cytometry and WB.

5. Three different interference fragments of lncRNA MALAT1 were constructed. RT-qPCR was used to detect the interference efficiency and screen the most suitable interference fragments. They were divided into control group, H₂O₂ group, si-MALAT1+H₂O₂ group and si-NC+H₂O₂ group. The effects of interference with lncRNA MALAT1 on cell viability and apoptosis rate were analyzed by CCK8 and flow cytometry.

6. The lncRNA MALAT1 and miR-124-3p were simultaneously interfered, and the experiment was divided into control group, H₂O₂ group, si-NC+H₂O₂ group, si-MALAT1+H₂O₂ group, si-MALAT1+inhibitor NC+H₂O₂ group, and si-MALAT1+miR-inhibitor+H₂O₂ group. The cell viability, apoptosis rate, and changes in CAPN1 and cleaved caspase 3 were measured and calculated by CCK8, flow cytometry and WB.

Results

1. lncRNA MALAT1, miR-124-3p, and calpain 1 are differentially expressed in SCI rat animal models.

2. The prediction result of "starbase" shows that miR-124-3p is the target of lncRNA MALAT1. The double luciferase experiment verifies the correlation between lncRNA MALAT1 and miR-124-3p.

3. CCK8 experiment screened the best conditions for modeling, and the results showed that when the concentration of H₂O₂ was 200 μM, PC12 cells were stimulated for 24 hours to obtain the median lethal dose, which was used as the condition for

simulating the apoptosis model of SCI in vitro. WB and RT-qPCR results showed that the expression of miR-124-3p in SCI cell model decreased significantly, while the expression of calpain 1, lncRNA MALAT1 and cleaved caspase 3 increased significantly.

4. After miR-124-3p transfection, the RT-qPCR results showed that the expression of miR-124-3p was significantly up-regulated. The results of CCK8 and flow cytometry showed that miR-124-3p could promote cell viability and inhibit cell apoptosis after SCI. WB results suggested that miR-124-3p significantly inhibited the expression of CAPN1 and cleaved caspase 3.

5. Three interference fragments of lncRNA MALAT1 (si-1, si-2 and si-3) were constructed, and the best fragment si-1 was screened by RT-qPCR. Through CCK8 and flow cytometry, it was found that knockdown of lncRNA MALAT1 could inhibit cell apoptosis induced by SCI and promote cell proliferation.

6. 200 μM H_2O_2 induced co-transfection of si-lncRNA MALAT1 and miR-124-3p inhibitor cells for 24h. RT-qPCR results suggested that interfering with lncRNA MALAT1 could promote the expression of miR-124-3p, while miR-124-3p inhibitor could block this effect. Then, CCK8 and flow cytometry detection showed that miR-124-3p inhibitor reduced the number of cells rescued by interfering with lncRNA MALAT1, thus inhibiting cell viability. WB test also found that miR-124-3p inhibitor inhibited the effect of si-lncRNA MALAT1 on CAPN1 and cleaved caspase 3 protein levels.

Conclusion

1. Overexpression of miR-124-3p inhibits neuronal apoptosis after SCI by targeting calpain 1;

2. Knockdown of lncRNA MALAT1 can inhibit neuronal apoptosis after SCI;

3. lncRNA MALAT1 can inhibit SCI-induced neuronal apoptosis by targeting miR-124-3p to regulate calpain 1.

Key words

Spinal cord injury; Neuronal apoptosis; lncRNA MALAT1; miRNA-124-3p

lncRNA MALAT1 靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制脊髓损伤后神经元凋亡的机制研究

前 言

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种严重损害中枢神经系统的疾病, 常引起患者永久性感觉和运动功能部分障碍甚至全部障碍^[1]。SCI 通常由外界或机体自身的多种因素引起, 使患者损伤平面以下感觉、运动及肌力显著下降, 是导致患者瘫痪的主要因素之一^[2]。SCI 主要分为原发性损伤和继发性损伤, 原发性损伤常由机械性损伤引起, 导致脊髓神经受到急性压迫, 常见原因包括高能量创伤, 如车祸和高处坠落伤等, 此后引起相对应的信号级联和细胞渗透反应导致急性细胞凋亡, 除此之外血管功能障碍、炎症、出血、水肿形成、细胞毒性物质和脊髓常驻胶质细胞激活等病理生理反应参与到后续的 SCI 过程中, 继而进入继发性损伤阶段^[3]。丧失独立性和持续增加的死亡率是 SCI 的标志。SCI 因其高致残率、高负担和难以治疗的疾病特点, 对患者的身心健康、生活质量和预期寿命造成严重影响, 每年约有 50 万人遭受 SCI 损伤, 据估计, 美国每年有超过 17000 例 SCI 新发病例^[4]。目前针对 SCI 的处理和治疗已有多种方案, 如手术减压、稳定、康复、药物治疗和细胞移植等, 但这些治疗方式的疗效却总是达不到人们的预期, 目前仍然缺乏治疗 SCI 的有效治疗措施。因此, 进一步了解 SCI 的分子机制是必要的。非编码 RNA 在 SCI 后由低氧、炎症和氧化应激等原因所致的细胞凋亡中发挥重要作用, 但其具体机制不清, 因此, 阐明非编码 RNA 在 SCI 后细胞凋亡的具体机制及作用, 可以为 SCI 的诊疗提供新思路和方向。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种仅由 19-23 个核苷酸组成的单链非编码小分子 RNA, 成熟的 miRNA 拥有直接或间接控制基因表达的能力^[5]。最新的实验结果表明, 在人类所有蛋白编码基因中, 至少有三分之一由 miRNA 直接调控^[6]。现有的研究证实, 相对于其他系统或者器官, 许多 miRNA 在包括脊髓和脑部的中枢神经系统中差异性表达, 它们与中枢神经的出现和演变密切相关^[7]。尽管目前尚不清楚 miRNA 在神经系统中的功能和机理, 但研究发现 miRNA 参

与神经系统损伤、神经退行性疾病和颅内肿瘤的发生。据报道,在大鼠脊髓挫伤模型中发现损伤后有 97 种表达于脊髓组织中的 miRNA 发生了差异性表达,其中有大约三分之二的 miRNA 变化趋势明显,然后采用生物信息学分析法研究后得出结果: miR-411^[8]、miR-34a^[9]、miR-99a^[10]、miR-30b^[11]和 miR-384^[12]可能影响某些炎性介质的表达,如 IL-13、IL-2 和 TNF- α 等。除此之外 miR-16^[13]、miR-7a^[14]、miR-21^[15]等 miRNA 也参与 SCI 后细胞凋亡。这些研究结果表明 miRNA 在 SCI 后的变化可能与病理生理学过程密切相关。

本课题组前期的研究发现,SCI 后 miR-124-3p 的表达在损伤部位的神经元中显著降低,同时通过生物信息学分析发现 miR-124-3p 靶向 calpain 1 基因 3'UTR,过表达 miR-124-3p 通过抑制 calpain 1 的表达抑制 SCI 后神经元细胞的凋亡,从而减轻 SCI,该结果提示 miR-124-3p 通过靶向 calpain 1 参与 SCI 的修复过程^[16]。基于他人的研究内容及本课题组前期的研究,本团队认为 miR-124-3p 广泛参与神经细胞的凋亡过程及修复过程,但其上游机制尚不清楚,针对 miR-124-3p 在 SCI 病理生理过程中的作用及分子机制的进一步研究将有助于为 SCI 的治疗提供新思路。

最初,miR-124-3p 发现于哺乳动物的成熟神经元中,并持续存在,这表明 miR-124-3p 在神经发育中发挥关键作用^[17]。已有研究发现,与其它系统和器官相比,miR-124-3p 在大脑皮层、小脑和脊髓等中枢神经系统中高表达^[18]。另外的研究发现,SCI 后大鼠脊髓组织中 miR-124-3p 的表达水平降低,进一步的研究发现,在 SCI 后第 7 天损伤神经元中 miR-124-3p 的表达量较正常组明显降低,表明 miR-124-3p 对维持正常脊髓神经通路的传导具有一定作用,并且可能反映了 SCI 的严重程度,同时,在神经元生长过程中,miR-124-3p 以不可检测或非常低的水平存在于神经祖细胞中,而高表达于高度分化或者成熟的神经元^[19]。现有的研究表明,miR-124-3p 在 SCI 后发挥多种重要作用。例如,突触足蛋白是伤害感受途径的关键要素,在癌性疼痛大鼠模型的脊髓中由于 miR-124-3p 显著降低,进而导致突触足蛋白上调,而脊髓鞘内注射 miR-124-3p 模拟物后,突触足蛋白的表达正常化,进而明显缓解动物模型的癌性疼痛,因此 miR-124-3p 可能具有恢复 SCI 后痛觉超敏的作用^[20]。也有研究发现,miR-124-3p 可以缓解炎症性疼痛并降低脊髓中炎症因子的表达,例如,miR-124-3p 可以减轻炎症并降低脊髓中

IL6R 的表达, 双荧光素酶的结果表明 IL6R 是 miR-124-3p 的靶基因, 并且这种相互作用可以调节炎症性疼痛的发展^[21]。中枢神经系统病变引起的炎症反应通过抑制神经轴突的再生影响神经修复, TNF- α 是抑制炎症反应的主要参与者(巨噬细胞)发挥作用的效应成分^[22]。研究发现, 转染 miR-124-3p 的 PC12 细胞可以抵消 TNF- α 和巨噬细胞介导的神经轴突的生长抑制作用(其中 PC12 细胞是一种用于模拟神经元的常用细胞), 因此, miR-124-3p 的作用机制可能有助于抑制 SCI 病理生理所引起的炎症反应^[23]。

二十二碳六烯酸(DHA)在SCI后具有明显的神经保护功能, 可以直接影响神经性疾病模型中的小胶质细胞, 在鼠类脊髓小胶质细胞中, miR-124-3p 抑制剂通过显著降低 DHA 的表达而增加髓磷脂的吞噬反应, 进而损伤神经^[24]。目前已知, 脊髓的生理环境存在大量巨噬细胞, 这些存在于中枢系统的巨噬细胞被称为小胶质细胞, 这些细胞具有三个表型, 分别是 M0 (未分化型)、M1 (促炎型) 和 M2 (抗炎型), 正常生理状态下, M1 型和 M2 型小胶质细胞的数量维持在相对恒定的水平, 当机体处于病理生理情况下, 大量 M1 型的小胶质细胞被活化, 进而造成严重的炎症环境^[25]。最新的研究发现, miR-124-3p 作用于小胶质细胞并使其定向分化为 M2 型, 抑制 SCI 后的炎症, 从而创造一个良好的神经再生环境, 同时, miR-124-3p 通过抑制小胶质细胞向 M1 极化的转录因子 C/EBP- α 减轻炎症损伤及 M1 型小胶质细胞在体内外对神经元的毒性。此外, 研究发现, 过表达 miR-124-3p 通过靶向 BV-2 细胞中的 3'-非翻译区抑制凋亡蛋白 Bax 的表达, 使凋亡的神经元减少, 从而恢复 SCI 大鼠双下肢的运动能力^[26]。综上所述, miR-124-3p 在 SCI 后细胞凋亡及炎性反应等病理过程中发挥重要功能。因此, 对 miR-124-3p 上游的进一步研究有助于寻找治疗 SCI 的新靶点和新方向。

竞争性内源 RNA (competing endogenous RNA, ceRNA) 假说由 Salmena 等人在 2011 年首次提出, 该假说指出, 一些 RNA 作为 ceRNA 靶向 miRNA 调节下游 mRNA 的表达, 同时描述了 ceRNA 通过竞争 miRNA 上 mRNA 的共同结合位点改变 miRNA 的功能^[27]。ceRNA 的核心概念是通过 miRNA 反应元件与靶 miRNA 相互作用, 以大规模控制转录组。越来越多的研究表明, lncRNA 可以作为 ceRNA 通过竞争 miRNA 调节 mRNA 的表达, 如淋巴瘤^[28]、结直肠癌^[29]和胃癌^[30]等。这些研究证明了 ceRNA 在疾病中发挥重要作用, 但关于 lncRNA 相关

ceRNA 互作网络在 SCI 中的研究尚少，因此阐明 lncRNA 相关 ceRNA 网络在 SCI 中的机制对于 SCI 的治疗和诊断是必要的。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 是一种长链非编码 RNA (ncRNA)，由超过两百个核苷酸组成，主要存在于染色体的外显子和启动子区域，同时具备很强的进化保守能力^[31]。一直以来，lncRNA 被看作是人类基因组中转录的“噪音”，由于基因组学的进展，逐渐发现 lncRNA 通过发挥多种功能影响基因的表达和转录，这些的功能作用包括：(1) 作用于基因上游启动子，影响基因表达；(2) 抑制 RNA 聚合酶 II 或者介导染色质重构以及蛋白修饰，影响下游基因的表达；(3) 通过影响 mRNA 的剪切，影响蛋白质的翻译；(4) 产生内源性 siRNA；(5) 作用于特定靶向的蛋白质，从而影响蛋白质的功能；(6) 与蛋白质结合，形成核酸蛋白结合体；(7) 与某些特殊的蛋白质结合，改变该蛋白质在细胞中的定位；(8) 作为小分子 RNA 的前体核苷酸片段^[32]。

2003 年，Ji 及其同事从非小细胞肺癌患者的肿瘤细胞中筛选出了一个基因转录物，以肺癌转移相关转录本 1 (MALAT1) 作为其特有的名称，lncRNA MALAT1 是存在于不同基因间的转录本，由多个启动子共同控制其转录^[33]。目前已有大量关于 lncRNA MALAT1 的研究，发现其在卵巢癌^[34]、乳腺癌^[35]、前列腺癌^[36]、帕金森病^[37]以及骨关节炎^[38]等疾病的病理生理过程中发挥重要作用。同时，lncRNA MALAT1 也参与 SCI 后细胞凋亡及炎症反应中。例如，在脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 诱导的炎性细胞损伤模型中，IKK β /NF- κ B 信号通路被激活，导致促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 大量释放，同时 lncRNA MALAT1 的表达量较对照组明显升高，进一步的研究发现，敲低 lncRNA MALAT1 后，大幅度降低了 TNF- α 、IL-1 β 的表达，使 LPS 诱导的小胶质细胞从原本应该向 M1 型转化变为了向 M2 型转化，进而明显抑制 SCI 后的炎症反应^[39]。现有的研究表明，lncRNA MALAT1 作用于 miR-124-3p 影响不同疾病的发生和演变过程，例如，miR-124-3p 在非小细胞肺癌中的表达量被 lncRNA MALAT1 影响，从而对非小细胞肺癌细胞的生长、集落形成和凋亡发挥重要作用^[40]；在鼻咽癌细胞中发现 lncRNA MALAT1 通过海绵 miR-124-3p 提高 CAPN4 基因的表达，其中，CAPN4 过表达可逆转干扰 lncRNA MALAT1 在鼻咽癌中的效应^[41]；在帕金森疾病 (Parkinson's disease, PD) 模型小鼠和 SH-SY5Y 细胞中发现，干扰 lncRNA

MALAT1 的表达可以减少 PD 小鼠多巴胺能神经元凋亡^[42]。除此之外，lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p 也参与到小细胞肺癌^[43]和宫颈癌^[44]等疾病的凋亡过程中。综上所述，lncRNA MALAT1 对细胞凋亡发挥一定功能，但目前有关 lncRNA MALAT1 调控 SCI 后细胞凋亡及相关病理生理过程的研究内容有限，关于其调控凋亡时相互作用的蛋白网络及具体机制的研究尚少，lncRNA MALAT1 在 SCI 中的作用及机制有待我们进行更深入的研究。

本课题组前期研究发现 miR-124-3p 和 calpain 1 之间的靶向关系，并进行验证。在本次研究中，通过生物信息学分析选择了 SCI 中的重要基因分子 lncRNA MALAT1，猜测 miR-124-3p 与 lncRNA MALAT1 存在转录或转录后 ceRNA 相互作用关系，二者共同作用对 SCI 的凋亡发挥重要作用，因此，本研究探讨了 lncRNA MALAT1/miR-124-3p/calpain 1 轴对 SCI 后神经元凋亡的具体作用机制，希望为 SCI 的临床分子生物学检测奠定理论基础，从而为 SCI 的治疗提供新的靶点和新的治疗方向。

材料和方法

1 实验仪器以及试剂

1.1 细胞株: 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞株 (PC12), 购买于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 实验主要仪器

仪器名称	生产公司	产地
电子天平	Mettler	中国
电泳仪	Bio-Rad	美国
转膜仪	Bio-Rad	美国
生物安全柜	上海博讯	中国
倒置显微镜	Leica DM1L	德国
酶标仪	BIO-RAD iMark	美国
高速冷冻离心机	GL-21MC	中国
低温离心机	GH-15MC	中国
高压灭菌器	HIRAYAMA	日本
细胞培养箱	SANYO	日本
超声波细胞破碎仪	宁波新芝生物公司	中国
移液枪	Eppendorf 公司	德国
PCR 仪	赛默飞	美国
流式细胞仪	BD	美国
磁力搅拌器	雷磁仪器厂	中国
恒温水浴锅	金坛荣华仪器厂	中国
荧光显微镜	ZEISS	德国
冰箱	海尔	中国
WB 成像分析系统	天能科技有限公司	中国
烤箱	莱玻璃	中国
液氮罐	Thermo Fisher	美国
超低温保存箱	Thermo Fisher	美国
光学显微镜	ZEISS	德国

1.3 实验主要试剂及耗材

试剂或耗材名称	生产厂家	产地
PBS	Sigma	美国
75%酒精	中国国药生物	中国
RIPA 裂解液	索莱宝	中国
牛血清白蛋白	全式金	中国
RPMI-1640 培养基	Gibco	美国
X-tremegene HP	Roche	中国
Opti-MEM	Gibco	美国
胰蛋白酶	Gibco	美国
DMSO	Sigma	美国
流式凋亡试剂盒	伊莱瑞特	中国
miR-124-3p mimics	锐博	中国
NC mimics	锐博	中国
miRNA 转染试剂	锐博	中国
双抗	碧云天	中国
CCK-8	碧云天	中国
miRNA Kit	全式金	中国
miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Mix	全式金	中国
Green qPCR Mix	全式金	中国
BCA 蛋白浓度测定盒	雅酶	中国
SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒	雅酶	中国
蛋白上样缓冲液	雅酶	中国
磷酸酶抑制剂混合液	雅酶	中国
蛋白酶抑制剂混合液	雅酶	中国
蛋白预染 marker	雅酶	中国
细胞蛋白抽提试剂盒	雅酶	中国

封闭液	雅酶	中国
Tween20	Amresco	美国
电泳液	碧云天	中国
转膜液	碧云天	中国
PVDF 膜	雅酶	中国
一抗稀释液	雅酶	中国
二抗稀释液	雅酶	中国
β -actin 兔多克隆抗体 (一抗)	雅酶	中国
GAPDH (一抗)	博奥龙	中国
calpain 1 (一抗)	亲科	中国
HRP 标记山羊抗小鼠/兔 IgG (二抗)	博奥龙	中国
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher	美国
DEPC 水	Sigma	美国
PCR-总 RNA 提取试剂 盒	Takara	日本
PCR-第一链 cDNA 合成 试剂盒	Takara	日本
PCR-荧光反应试剂盒	Takara	日本
miRNA-124 引物	生工	中国
lncRNA MALAT1 引物	生工	中国
calpain 1 引物	生工	中国
U6 引物	生工	中国
GAPDH 引物	生工	中国
DMEM, low glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Gibco	美国
细胞冻存管	康宁	中国

细胞培养板	康宁	中国
移液墙头	康宁	中国
DMEM, high glucose, GlutaMAX Supplement, pyruvate	Gibco	美国
离心管	康宁	中国

1.4 实验主要试剂配制

1.4.1 完全培养基的配制:

取适量胎牛血清与双抗（100 U/mL 青霉素及 100 U/mL 链霉素）先后加入 RPMI-1640 培养基中，配置成完全培养液（其中胎牛血清占比 10%，双抗占比 1%），分装后冷藏储存。

1.4.2 细胞冻存液的配制:

将胎牛血清与 DMSO 按照 9: 1 的比例配制，现配现用。

1.4.3 实验用 H₂O₂ 浓度的配制:

分两次稀释:首先，取 30 μL 浓度为 30%的 H₂O₂ 定容于 2.5 mL 的完全培养基中，得到 100 mM 的 H₂O₂，标记为溶液 A。然后，将溶液 A 中的液体再次进行稀释得到实验所需的终浓度（如 0、100 μM、200 μM、400 μM 以及 800 μM），标记为溶液 B。例如：取 A 液中的液体 4 μL 定容于 2 mL 的完全培养基中，则得到 200 μM 终浓度的 H₂O₂。

1.4.4 电泳液的配制:

取 10×电泳液 100 mL 均匀混入 900 mL 的纯水中，冻存于 4 °C 冰箱。每次新配电泳液使用之后进行回收，使用 3-4 次。

1.4.5 转膜液的配制:

向量筒中注入 10×转膜液 100 mL，再向其注入 200 mL 甲醇，震荡混合后，再向烧杯中加入足量的纯水使总体积达到 1000 mL，置于 4°C 冰箱中冷冻保存。每次新配转膜液使用之后进行回收，使用 3-4 次。

1.4.6 蛋白印迹 TBST 缓冲液的制备

取 10×TBST 缓冲液 100mL，加入 900mL 的纯水定容至 1000mL，冻存于 4°C 冰箱。

1.5 引物序列 2 实验方法

名称	序列
lncRNA MALAT1	正向: AAAGCAAGGTCCCCACAAG 反向: GGTCTGTGTTAGATCAAAGGCA
calpain 1	正向: CTCATGGATCGAGACGGTAATG 反向: CTTTCGGAAGATGGTCAGGTAA
miR-124-3p	正向: GCGGTTCTCTTGTGGAGGGG 反向: AGAAGGGGAAACGGCAGAC
U6	正向: CGGGTTTGTTCATTCT 反向: AGTCCCAGCATGAACAGCTTGA
GAPDH	正向: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 反向: AGATGGTGATGGGATTC

2 实验方法

2.1 实验动物

本实验使用了 12 只成年雌性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, (12W 龄, 250±15g), 这些大鼠动物实验均在昆明医科大学动物伦理委员会下进行, 并由其提供, 喂养在昆明医科大学动物实验部动物房。这些大鼠分为 4 个组, 每个组三只, 分别为 control、3 天 SCI、7 天 SCI 和 14 天的 SCI。

2.2 SCI 模型的建立

- (1) 使用异氟烷将大鼠麻醉后, 剔除大鼠背部手术毛发;
- (2) 将麻醉好的大鼠四肢固定于手术台上, 使用碘伏来回消毒手术区域;
- (3) 找到背部最突出的位置, 手术刀切开 3cm 左右切口, 逐层分离组织, 直到暴露 T10 棘突, 打开关节突和椎板, 暴露脊髓;
- (4) 使用动脉夹夹闭脊髓 45-60s, 当大鼠尾巴迅速摆动则证明 SCI 模型建立成功;
- (5) 术后消毒缝合, 于恒温箱中复苏, 并于单笼中喂养;
- (6) 术后大鼠出现尿潴留, 于早晚人工按压腹部排尿一次。

2.3 BBB 行为学评分

分别于术前、3 天、7 天及 14 天对各组大鼠进行 BBB 行为学评分。BBB

行为学评分满分为 21 分，代表大鼠运动功能良好，评分越低表明神经受损情况约严重。将大鼠放于平台，观察其各指标的运动能力。评分标准如下：

BBB 评分标准

分数	特征
第一部分 恢复早期的后肢关节运动	
0	未见后肢运动
1	一个或两个关节轻微运动
2	一个关节广泛运动；一个关节广泛运动且另一个关节轻度运动
3	两个关节广泛运动
4	三个关节轻度运动
5	两个关节轻度运动，第三个关节广泛运动
6	两个关节广泛运动，第三个关节轻度运动
7	三个关节广泛运动
第二部分 恢复中期的步态和协调运动	
8	无负重拖动或足置于无负重位
9	足底仅位于负重位，或偶尔/频繁/持续的足背负重步行，无足底步行
10	偶尔负重步行，无前后肢协调运动
11	频繁到持续的负重步行，无前后肢协调运动
12	频繁到持续的负重步行，偶有前后肢协调运动
13	持续的负重步行，频繁前后肢协调运动
第三部分 运动中爪的精细部分	
14	持续协调步态，持续前后肢协调运动；运动时优势爪旋转或频繁足底步行，持续前后肢运动协调和偶尔的足背步行
15	持续协调步态；当前肢前进时无或偶有伸趾；优势爪接触地时与身体平行

16	持续协调步态；频繁伸趾；优势爪接触地时 与身体平行，提起时旋转
17	持续协调步态；频繁伸趾；优势爪在触地及 提起时均与身体平行
18	持续协调步态；持续伸趾；优势爪接触地时 与身体平行，提起时旋转
19	持续协调步态；持续伸趾；优势爪在触地及 提起时均与身体平行
20	持续协调步态；持续伸趾；优势爪在触地及 提起时均与身体平行，但躯体不稳定，尾巴 持续上翘
21	持续协调步态；持续伸趾；优势爪在触地及 提起时均与身体平行，躯体稳定，尾巴持续 上翘

2.4 细胞培养

2.4.1 细胞复苏

(1) 将所需使用物品（如移液枪头、离心管等）放入细胞超净台，利用紫外灯消毒杀菌 30 分钟；

(2) 将 PC12 细胞从液氮取出，于预热好的 37℃ 水浴箱反复来回摇晃，直至冻存细胞液溶解；

(3) 撕去细胞冻存管封口条，将其中已液化的细胞冻存液移入到已被紫外消毒的离心管内，然后向其中加入适量的完全培养液；

(4) 把移入细胞液的离心管放进离心机，并取相同规格以及液体量的离心管作为配平管，配平后，将离心机的工作速度设定为 1000-1500 转/分钟，工作 5-10 分钟；

(5) 使用移液枪移除上清液，留下细胞的沉降物，再向离心管中注入适量完全培养液，来回抽吸使细胞重新漂浮于完全培养液中，然后将细胞液注入 T25 细胞培养瓶，使用“8”字法来回晃荡培养瓶；

(6) 使用记号笔于培养瓶侧面做好标记（如细胞种类、处理时间以及操作

者名字等), 消毒后, 放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。

2.4.2 细胞换液

(1) 将所需物品(如 1 mL 移液枪头、15 mL 移液管等)放入超净台紫外灯消毒杀菌 30 分钟;

(2) 取出细胞培养瓶, 使用吸液器将瓶中液体全部抽出, 用少许 PBS 润洗三次(注意润洗过程中不要使细胞脱落), 最后加入适量完全培养液;

(3) 使用记号笔于培养瓶侧面做好标记(如细胞种类、处理时间以及操作者名字等), 消毒后, 放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。

2.4.3 细胞传代

(1) 将细胞培养瓶从恒温培养箱中拿出, 并放于倒置显微镜下检查细胞的发育状态(如形状、大小等), 在细胞汇合度达到 80%及其以上后, 进行细胞传代;

(2) 将所需物品喷洒酒精后, 放入超净台中, 打开紫外灯消毒杀菌 30 分钟;

(3) 将细胞培养瓶放入超净台, 将培养瓶中液体用吸液器吸尽, 少许 PBS 润洗, 加入胰酶, 微微晃动细胞培养瓶让胰酶与细胞充分接触, 然后置于恒温培养箱中孵育 30 秒到 2 分钟, 敲击细胞培养瓶的侧壁和底部, 让细胞从培养瓶底部掉落, 最后使用倒置显微镜查看细胞是否掉落;

(4) 加入足量培养液停止消化反应, 并用移液枪吹击瓶底, 使细胞脱落, 然后注入离心管中;

(5) 将含细胞液的离心管放入离心机, 并取相同规格以及液体量的离心管作为配平管, 配平后, 将离心机的工作速度设定为 1000-1500 转/分钟, 工作 5-10 分钟;

(6) 先将上清液用吸液器吸弃, 留下大量细胞沉降物, 使用适量完全培养液重悬细胞, 然后将细胞液均匀注入 3 个细胞培养瓶中, 最后使用“十”字法使细胞均匀的分布, 并排列在培养瓶底部;

(7) 使用记号笔于培养瓶侧面做好标记(如细胞种类、处理时间以及操作者名字等), 消毒后, 放入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。

2.4.4 细胞冻存

(1) 将细胞培养瓶从恒温培养箱中拿出, 使用吸液器将培养液吸弃, 用少

许 PBS 润洗三次，使用胰酶将细胞从培养瓶上分离出来，加入足量的完全培养液以停止胰酶的消化反应，微微晃动细胞培养瓶让胰酶与细胞充分接触，然后置于恒温培养箱中孵育 30 秒到 2 分钟，敲击细胞培养瓶的侧壁和底部，让细胞脱落，然后把细胞悬液移入事先准备好的离心管中；

(2) 将含细胞液的离心管放入离心机，并取相同规格以及液体量的离心管作为配平管，配平后，将离心机的工作速度设定为 1000-1500 转/分钟，工作 5-10 分钟；

(3) 使用吸液器吸弃上清液，留下细胞沉降物，以 1:9 的比例将 DMSO 和血清混合配置成细胞冻存液，在离心管中加入 1 mL 细胞冻存液，并来回抽吸使细胞漂浮于冻存液中，然后转移到事先准备好的细胞冻存管中，盖上瓶盖，贴上封口贴，使用记号笔于冻存管侧面做好标记（如细胞种类、处理时间以及操作者名字等）；

(4) 将细胞冻存管放入恢复室温的细胞冻存盒后，置于 -80℃ 保存。

2.5 使用 H₂O₂ 刺激 PC12，建立 SCI 细胞模型

(1) 取生长状态较好的 PC12 细胞种植于细胞培养板中；

(2) 细胞铺满培养板后，使用 PBS 润洗细胞 3 次，注意不要将细胞冲走；

(3) 将按照一定比例稀释好的 H₂O₂ 沿壁缓慢注入细胞培养板；

(4) 将细胞培养板做好标记后（如细胞种类、处理时间以及操作者名字等），消毒后，放入 37℃、5%CO₂ 的培养箱中；

(5) 24h 后，使用 CCK8 检测细胞活力，细胞活力达到 50-60% 左右，即建立体外 SCI 模型。

2.6 细胞转染

(1) 显微镜下观察六孔板中每个孔的细胞密度，待细胞汇合度达到 60-70% 左右，进行转染处理；

(2) 使用 Lipo fectamine 2000 前将其来回摇动，将 5 μL Lipo fectamine 2000 加入 1.5 mL 离心管中，然后向离心管中加入 250 μL 的 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 进行稀释。来回颠倒离心管混匀后，置于室温 5 分钟，标记为管 1；

(3) 在 1.5 mL 离心管中加入 10 μl 所需转染的 miRNA 或 lncRNA，然后加入 250 μL 的 Opti-MEM I Reduced Serum Medium，来回颠倒离心管混匀后标记为

管 2;

(4) 将管 1 和管 2 中的液体混合, 标记为管 3;

(5) 将管 3 中混合 1.5 mL 无血清的培养基后注入六孔板;

(6) 将六孔板移入培养箱后, 培养 4-6 h, 使用含血清的完全培养基进行换液, 转染结束。

2.7 CCK8 法测定细胞活力

(1) 将 PC12 细胞按照每个孔 20000 个细胞的数量接种于 96 孔板培养, 直至达到转染条件;

(2) 待细胞汇合度达到转染条件后, 吸弃培养基, 用 PBS 润洗 1 次, 然后进行细胞转染;

(3) 转染结束后, 待细胞铺满培养板后, 使用 H_2O_2 刺激细胞 24 h 建造 SCI 模型;

(4) 每孔加入 10 μ L CCK8 试剂 (注意不要有气泡), 放置于培养箱 2 h (整个过程需要在黑暗环境下操作), 在设置为 450nm 的酶标检测吸光度 (OD 值);

(5) 计算细胞活力: 细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白组 OD 值) \times 100%;

(6) 注意: 在种板时, 单独设置一组无细胞只有完全培养液的分组为空白组, 每组设置 3-5 个复孔。

2.8 细胞蛋白的提取

(1) 以六孔板的一个孔为例。向离心管中加入 200 μ L RIPA 裂解液, 然后先后向其注入少许蛋白酶抑制剂混合液和磷酸酶抑制剂混合液 (最终浓度为 1:100);

(2) 将培养板放于冰上, PBS 润洗三次, 加入上述已制备好的裂解液, 反复吹打细胞, 使裂解液与细胞充分接触;

(3) 使用刮刀按照 1 次/10 分钟的频率反复刮磨细胞 30 分钟, 使细胞充分裂解;

(4) 将细胞裂解液转移至已消毒的无菌 EP 管中, 于事先预冷的高速离心机中, 按照 12000 rpm/min, 离心 15 分钟。

(5) 保留 EP 管的上清液，即可得到细胞蛋白，按照雅酶 BCA 蛋白定量试剂盒的说明书操作，进行定量。

(6) 蛋白定量结束加入上样缓冲液及无酶水后，将其放入温度达到 90°C 的水浴锅中加热 15 分钟，-80°C 冰箱保存。

2.9 Western Blot 蛋白印迹法检测

2.9.1 制胶：

(1) 使用自来水将需要使用的玻璃胶板、梳子清洗干净，滤纸擦拭后吹风机吹干，喷洒 75% 消毒酒精；

(2) 将两块玻璃胶板对齐，插入玻璃板内，用大拇指轻推玻璃板，并轻轻敲击桌面，使胶板底部对齐胶条，防止漏胶；

(3) 将下层胶溶液和下层胶缓冲液各 2.5 mL 依次加入离心管中，并向其加入 50 μ l 促凝剂，在振荡器上混和均匀，将混匀后的液体使用 1 mL 的移液枪缓慢、均匀的注入玻璃胶板中，等待 15 分钟；

(4) 下层胶凝固成胶冻状后，将上层胶溶液和上层胶缓冲液各 1 mL 依次加入到离心管中，并向其加入 20 μ L 的促凝剂，混匀，将混匀后的液体使用 1 mL 的移液枪缓慢、均匀的注入玻璃胶板中，并插入梳子；

(5) 待胶凝固后，即可使用。

2.9.2 电泳：

(1) 将制备好的胶板取下，安装于电泳槽上，并放于电泳盒中；

(2) 双手分别捏住梳子轻轻拔出（注意过程中用力均匀，防止上样口弯曲，并检查胶口是否被堵住），向电泳槽中加入事先配制好的电泳液直到溢出为止；

(3) 在样本的左右两端各加入 3 μ L 的 marker，并按照实验设置的分组先后加入蛋白样本，然后向电泳槽内持续加入事先准备好的电泳液，直至溢出，电压 120 V，电泳时间 60 min，观察 Marker 分出所需位置后即可停止电泳。

2.9.3 转膜：

(1) 取适合大小的水槽，倒入适当的转膜液，将转膜夹浸入转膜液中，随后取出。将玻璃板在梳子口这侧撬开，切到适合大小。将厚滤纸（黑板侧）盖在胶上，翻转。小心将胶转到厚滤纸上，将厚滤纸放于海绵（黑板侧）上，调整胶

块，使 marker 与厚滤纸底边垂直。随后在胶上确定加样方向，后期将 PVDF 膜一角在加第一样侧，方便后期显影确定加样顺序。

(2) 将 PVDF 膜浸入甲醇中 1min 左右，将 PVDF 膜放于胶上适合位置。剪掉一角边在加第一样侧，盖在胶上，用滚轮排出气泡，盖上另一侧滤纸，海绵，透明板。将转膜板放于转膜槽内，黑板对黑边。倒入转膜液，放入冰袋。电流 200 mA，时间 120 min。

2.9.4 封闭:

转膜结束后，将整块 PVDF 膜放入孵育盒中，TBST 润洗 5 min，倒入封闭液，于摇床上室温封闭 2 h。

2.9.5 切膜:

将洗好的膜放在塑料薄膜上，盖上塑料薄膜，防止切割时损坏条带。

2.9.6 孵一抗:

切膜后的条带使用 TBST 清洗 5 min，倒入一抗，置于冰箱一晚，次日早晨回收抗体，一抗一般用 3 次后丢弃。

2.9.7 孵二抗:

用 TBST 洗 PVDF 膜 3 次，每次 5 分钟（均于摇床上操作），倒入二抗，于摇床上室温孵育 2 h。2 h 后，将孵育盒中的二抗回收，TBST 清洗膜 3 次，每次 5min。

2.9.8 显色反应:

按照 1: 1 比例将 A 与 B 显影液配制于片盒中，使用滤纸将膜轻轻擦拭后放入片盒中浸泡 1-2 min，立即放入显影仪显影，曝光 1-5 分钟。

2.10 细胞 RNA 的提取

2.10.1 暴露 RNA

(1) 用吸液器将细胞培养板中的液体吸去，用少许 1×PBS 清洗一次；

(2) 在每个细胞孔中加入 1 mL 的 LB 10，来回晃动细胞板，使裂解液完全接触到细胞，然后用移液枪来回抽吸使细胞脱落；

(3) 将细胞孔内的液体全部转移至事先标记好的离心管中，盖上盖子来回晃动，然后放于室温下 5 分钟。

(4) 每使用 1 mL LB 10，加入 0.2 mL 氯仿，剧烈震荡 30 秒，室温孵育 3 分钟；

(5)将离心机的工作速度设定为 10000×g, 温度设定为 4℃, 工作 15 分钟。此时样品由上到下依次分为 3 层, 分别是水相、中间层及有机物层。RNA 都集中在上层, 上层体积约为 500 mL;

(6) 转移无色水相于新的离心管中, 进行不同处理得到 miRNA 或者 Total RNA。

2.10.2 miRNA 的纯化:

(1) 在离心管中加入 150 mL 的无水乙醇, 充分混合。

(2) 然后转移到 RNA Spin Column 中, 将离心机的工作速度设置为 12000×g, 室温工作 30 秒, 将流出液转移到 1.5 mL 的无酶离心管中。

(3) 加入 750 mL 的无水乙醇到离心管中, 来回颠倒。

(4) 把液体转移到 miRNA Spin Column 中, 将离心机的工作速度设置为 12000×g, 室温工作 30 秒, 弃掉流出液。

(5) 加入 500 μL 的 WB 10 (已加入无水乙醇), 将离心机设置为 12000×g, 室温工作 30 秒, 弃掉流出液。再次离心一次。

(6) 将离心机的工作速度设置为 12000×g, 室温工作 2 分钟, 弃掉流出液, 完全分离剩下的乙醇。

(7) 将 miRNA Spin Column 放入 1.5 mL 无酶离心管, 向其中心加入 40 μL 无酶水, 常温放置 1 分钟。将离心机设置为 12000×g, 室温工作 60 秒, 得到 miRNA。

(8) 把所得的 miRNA 放在-80℃冰箱冷冻保存。

2.10.3 Total RNA 的纯化:

(1) 在离心管中加入 650 mL 的无水乙醇, 充分混合。

(2) 把离心管中的液体转移到 RNA Spin Column 中, 将离心机的工作速度设置为 12000×g, 室温工作 30 秒, 弃掉流出液。

(3) 加入 500 μL 的 WB 10 (已加入无水乙醇), 将离心机的工作速度设置为 12000×g, 室温工作 30 秒, 弃掉流出液。再次离心一次。

(4) 设置离心机为 12000×g, 工作 2 分钟, 弃掉流出液, 分离剩下的乙醇。

(5) 将 miRNA Spin Column 放入 1.5 mL 无酶离心管, 加入 40 μL 无酶水到离心柱的中央, 放置 1 分钟。设置离心机为 12000×g, 室温工作 60 秒, 得到 Total

RNA。

(6) 把所得的 Total RNA 放在-80℃冰箱冷冻保存。

2.11 RT-qPCR 检测

2.11.1 逆转录反应:

2.11.1.1 miRNA 逆转录反应

逆转录试剂组成

成分	用量
miRNA	x μL
miRNA RT Enzyme Mix	1 μL
2 \times TS miRNA Reaction Mix	10 μL
RNase-free Water	Variable
Total volume	20 μL

上述配比及操作均在冰上进行。接下来轻轻混匀, 37 °C 孵育 1 h; 85 °C 加热 5 s。

2.11.1.2 Total RNA 逆转录反应:

逆转录试剂组成

成分	用量
5 \times PrimeScript RT Master Mix	2 μL
Total RNA	x μL
RNase Free dH ₂ O	8-x μL
Total volume	10 μL

接下来轻轻混匀后, 37°C 15 分钟; 85°C 5 秒。

2.11.2 RT-qPCR 反应:

成分	用量
cDNA	Variable
Forward Primer	0.4 μL
Reverse Primer	0.4 μL
2 \times Green qPCR SuperMix	10 μL
Passive Reference Dyell	0.4 μL

Nuclease-free Water	Variable	
Total volume	20 μ L	
PCR 反应条件:		
温度	时间	循环数
94 $^{\circ}$ C	30 sec	1
94 $^{\circ}$ C	5 sec	40-45
60 $^{\circ}$ C	30 sec	40-45

2.12 双荧光素酶基因报告检测

2.12.1 准备目的细胞

(1) 将所需使用物品（如移液枪头、离心管等）放入细胞超净台，利用紫外灯消毒杀菌 30 分钟；

(2) 将目的细胞从液氮取出，于预热好的 37 $^{\circ}$ C 水浴箱反复来回摇晃，直至冻存细胞液溶解；

(3) 撕去细胞冻存管封口条，将其中已液化的细胞冻存液移入到已被紫外消毒的离心管内，然后向其中加入适量的完全培养液；

(4) 把移入细胞液的离心管放进离心机，并取相同规格以及液体量的离心管作为配平管，配平后，将离心机的工作速度设定为 1000-1500 转/分钟，工作 5-10 分钟；

(5) 使用移液枪移除上清液，留下细胞的沉降物，再向离心管中注入适量完全培养液，来回抽吸使细胞重新漂浮于完全培养液中，然后将细胞液注入 T25 细胞培养瓶，使用“8”字法来回晃荡培养瓶；

(6) 使用记号笔于培养瓶侧面做好标记（如细胞种类、处理时间以及操作者名字等），消毒后，放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中。

2.12.2 目的细胞质粒转染

(1) 在 24 孔板的每个孔中接种 10 万个细胞，继续培养，使细胞密度达到 60% 左右。

(2) 使用 ROCHE: X-tremegene HP 转染试剂转染：

1) 每使用 1 μ g 质粒，需要使用 2 μ L 的转染试剂，以此比例将转染试剂和所需质粒同时溶解于 100 μ L opti-MEM 中，放置于室温下 20 分钟；

- 2) 将细胞孔中的培液用吸液器吸弃 300 μL ;
- 3) 将步骤 1) 所配置的混合液加入到细胞孔中放入温度设定为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、 CO_2 浓度设定为 5% 的细胞培养箱培养后, 向每个细胞孔中加入 300 μL 完全培养液;
- 4) 1-2 天后于荧光显微镜下查看荧光标记的情况, 以此判断是否转染成功;
- 5) 细胞转染 48 小时后进行 luciferase 检测。

2.12.3 Luciferase 检测

(1) 使用 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System, 需将 Luciferase Assay Buffer II 融化 (首次使用); 将 Luciferase Assay Buffer II 注入 Luciferase Assay Substrate, 震荡溶解后, 变为 Luciferase Assay Reagent, 放在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。

(2) 用 D-Hanks 稀释 Passive Lysis Buffer; 用吸液器吸弃培养板中的培养基, 每个孔注入 300 μL 的 Passive Lysis Buffer, 置于冰箱 20 分钟, 使细胞完全破碎裂解, 在振板机上适当震动 3 分钟立即可进行检测。

(3) 将 Stop & Glo[®] Buffer 从冰箱中拿出, 恢复室温, 把 Stop & Glo[®] Substrate 注入 Stop & Glo[®] Buffer 中, 进行稀释。

(4) 在检测板中先注入 40 μL Lockwell maxisorp, 随后注入 20 μL Luciferase Assay Reagent, 震荡混匀, 使用酶标仪测定 firefly luminescence (萤火虫荧光酶荧光值), 需在 5 分钟内完成。

(5) 向每个孔中注入 20 μL Stop & Glo[®] Reagent, 震荡混匀, 常温反应 3 分钟, 于酶标仪测定 Renilla luminescence (海肾荧光酶荧光值)。

(6) 数据处理: Firefly/Renilla luminescence, 即同一样品孔内 Firefly Luciferase 值与 Renilla Luciferase 值的比值, 代表 luciferase 相对表达量。

2.13 流式细胞术检测细胞凋亡

(1) 细胞处理结束后, 将细胞培养板中的培养液转移到事先标记好的离心管, 向每个孔中加入适量胰酶, 细胞脱落后收集于之前的离心管, 将离心机的工作速度设定 300 $\times g$, 工作 5 分钟, 离心结束后使用吸液器吸弃上清, 使用少许 PBS 洗涤细胞, 然后再次以 300 g 离心 5 分钟, 弃上清;

(2) 向离心管中加入 Annexin V Binding Buffer, 反复抽吸, 先后注入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 PI 试剂, 于震荡机上震荡混匀, 放置于室温下 15 分钟 (整个过程应在黑暗环境下进行);

(3) 上机检测：于流式细胞仪进行检测；

(4) 四个象限中，左下象限为活细胞，右下象限为早凋细胞，右上象限为晚凋细胞，左上象限为坏死细胞或细胞碎片；

(5) 数据分析：凋亡率=右下象限的早凋细胞率+右上象限晚凋细胞率。

2.14 统计学分析

实验获得的数据经计算和分析后以均数±标准差表示，并通过 Graph Pad Prism 8.0 软件进行分析。Western blot 所得条带的灰度值用 image J 进行计算和分析。将 $P < 0.05$ 视为有统计意义。

结 果

1 lncRNA MALAT1、miR-124-3p 和 calpain 1 在 SCI 大鼠动物模型中差异性表达

本研究首先建立了 SCI 动物模型，通过 BBB 行为学评分评估 SCI 动物模型的建立是否成功。结果表明，与对照组相比，实验组大鼠 BBB 行为学评分明显低于对照组 ($p < 0.0001$)，表明 SCI 动物模型成功建立。随后用 RT-qPCR 对各组大鼠 SCI 部位进行检测，结果显示 lncRNA MALAT1 和 calpain 1 在 SCI 后表达上调，miRNA-124-3p 在 SCI 后表达下降 (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$) (图 1)。

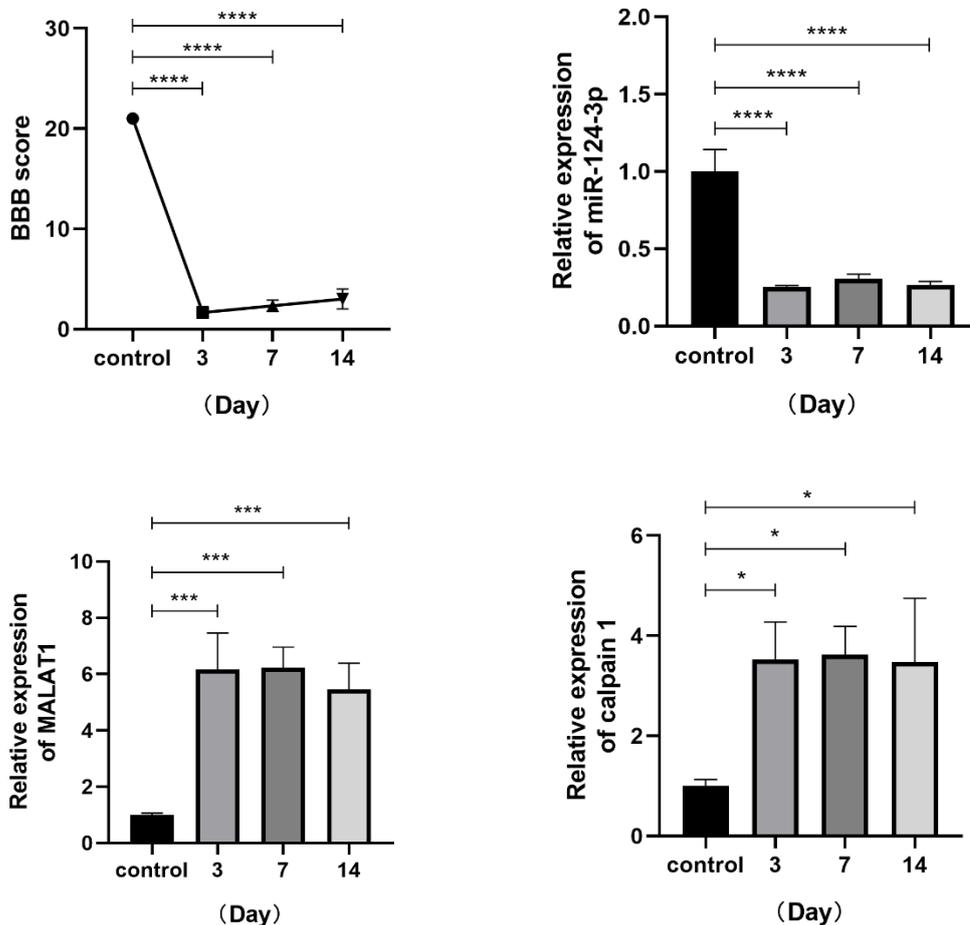


图 1: BBB 评分法评估 SCI 动物模型的建立; RT-qPCR 检测 SCI 后 3、7 和 14 天 lncRNA miR-124-3p、lncRNA MALAT1 和 calpain 1 的变化量 (**** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$)

2 lncRNA MALAT1 与 miR-124-3p 之间存在靶向关系

基因预测网站“starbase.sysu.edu.cn”结果显示 lncRNA MALAT1 是 miR-124-3p 的上游靶点，两者之间存在相互结合的碱基位点（图 2）。

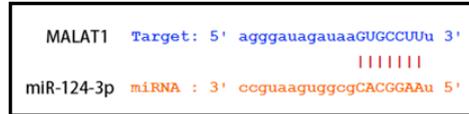


图 2：生信分析预测 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 之间的结合位点

为了验证该预测是否准确，通过双荧光素酶实验进行了 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 之间的靶点验证，实验结果显示 WT+miR-124-3p 组对比于 WT+NC 组具有统计学意义 ($p < 0.0001$)；MUT+miR-124-3p 组对比于 MUT+NC 组无统计学意义 ($p > 0.05$)。表明 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 之间存在基因结合位点，与预测结果一致（图 3）。

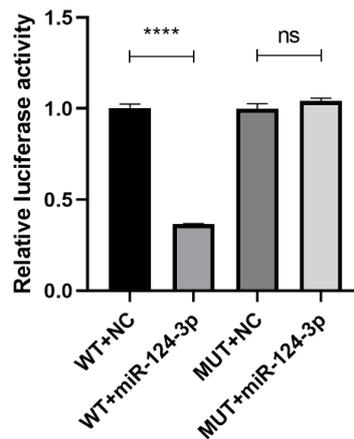


图 3：双荧光素酶实验验证 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 之间的靶点关系

(**** $p < 0.0001$; ns $p > 0.05$)

3 H₂O₂ 诱导 PC12 建立 SCI 凋亡模型，SCI 影响 lncRNA MALAT1、miR-124-3p 及 calpain 1 的表达

为了找寻模拟 SCI 氧化应激引起细胞凋亡的最佳 H₂O₂ 浓度，本实验使用不同 H₂O₂ 浓度（0、100 μM、200 μM、400 μM 以及 800 μM）刺激 PC12 细胞 24 h，模拟 SCI 后氧化应激的体外细胞凋亡模型。CCK8 检测得到结果：细胞存活率随着 H₂O₂ 浓度增加而降低，呈现负相关趋势 ($p < 0.0001$)，当 H₂O₂ 浓度为 200 μM 时，细胞活力下降到 50%左右得到半数致死量 IC₅₀，因此，后续实验以 200 μM H₂O₂ 刺激细胞 24 h 作为建立 SCI 体外细胞凋亡模型的最适条件（图 4）。

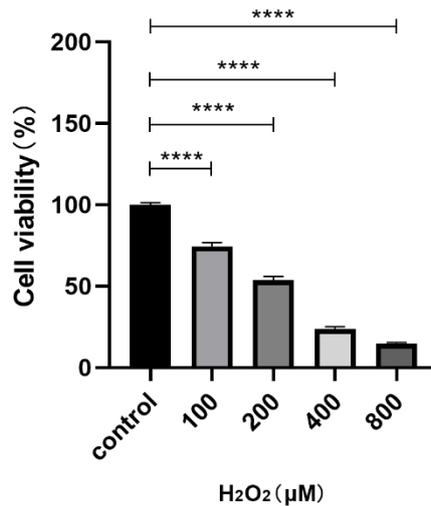


图 4: CCK8 检测结果显示: 当 H₂O₂ 浓度为 200 μM 时, 细胞活力在 50% 左右 (**** $p < 0.0001$)

WB 测定 SCI 后凋亡执行蛋白 cleaved caspase 3 的变化, 相比于 control 组, H₂O₂ 刺激显著增加了 cleaved caspase 3 的表达 ($p < 0.0001$)。表明 SCI 后细胞明显凋亡 (图 5)。

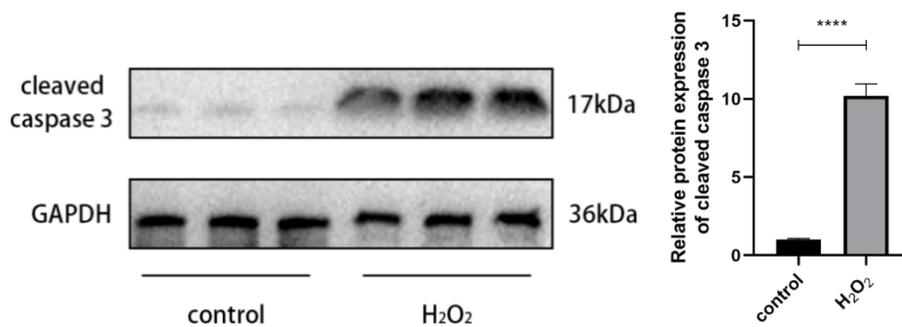


图 5: WB 测定 SCI 后 cleaved caspase 3 的变化量 (**** $p < 0.0001$)

RT-qPCR 测定 SCI 后 miR-124-3p、lncRNA MALAT1 及 calpain 1 的变化量, 与 control 组比较, SCI 后 miR-124-3p 的表达量明显降低 ($p < 0.001$), 而 calpain 1 和 lncRNA MALAT1 的表达量明显升高 ($p < 0.001$, $p < 0.0001$), 与 miR-124-3p 的表达量呈负相关的趋势 (图 6)。

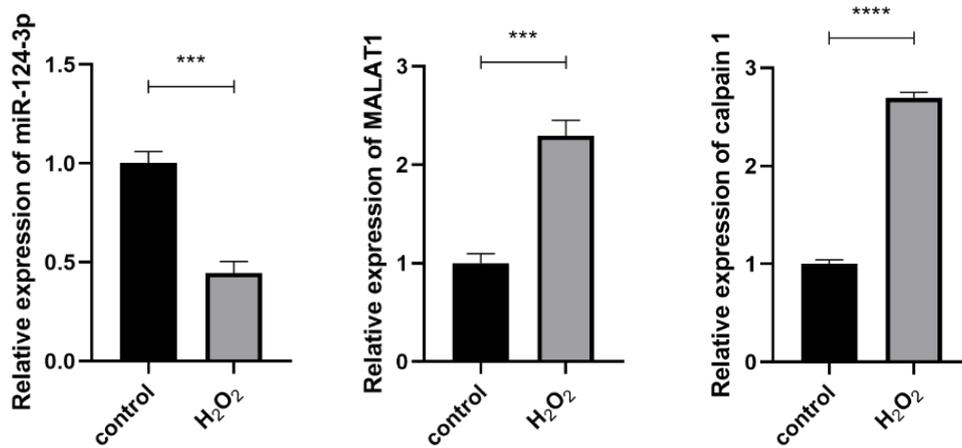


图 6: RT-qPCR 测定 SCI 后, miR-124-3p、lncRNA MALAT1 和 calpain 1 的变化量 (***) $p < 0.001$, **** $p < 0.001$)

为了验证上述 RT-qPCR 得到的结果, 本团队通过 WB 检测 SCI 后 CAPN1 蛋白表达改变量, 相比于 control 组, CAPN1 在 SCI 后的表达量明显升高 ($p < 0.01$), 与上述 RT-qPCR 的结果一致 (图 7)。

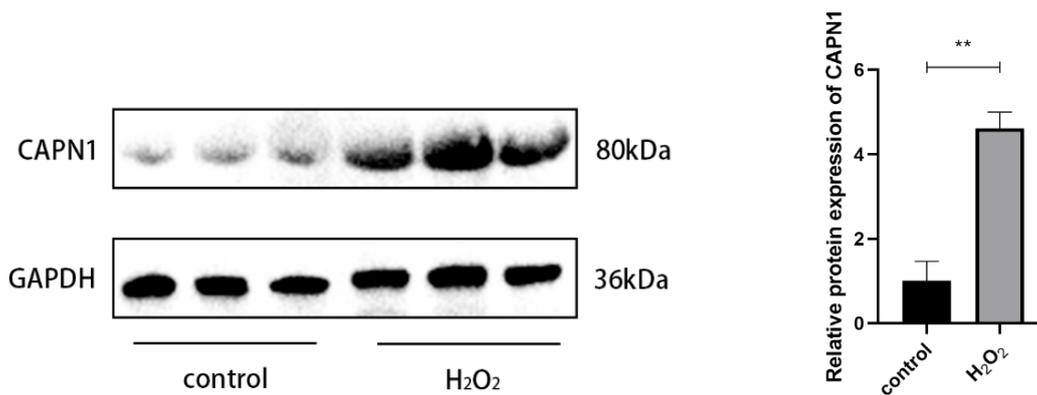


图 7: WB 检测 SCI 后 CAPN1 蛋白表达量的变化 (** $p < 0.01$)

4 过表达 miR-124-3p 能对抗 SCI 后神经元的凋亡

为了证明 miR-124-3p 对 SCI 的影响, 将 miR-124-3p 化合模拟物转染到 PC12 细胞, RT-qPCR 测定 miR-124-3p 的转染效率, 结果显示, 相比于 control 组, 转染组 miR-124-3p 的表达量明显上调 ($p < 0.01$), 表明 miR-124-3p 转染成功 (图 8)。

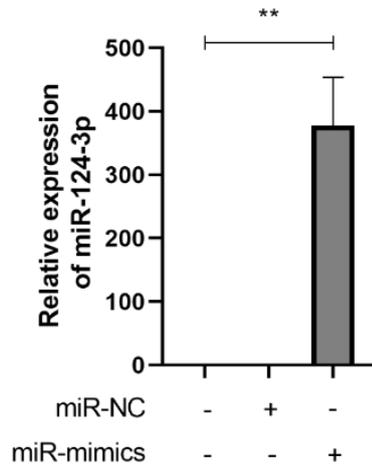


图 8: RT-qPCR 测定转染 miR-124-3p mimics 后, miR-124-3p 的变化量 (** $p < 0.01$)

随后, 将实验分组设置为: control 组、 H_2O_2 组、miR-124-3p+ H_2O_2 组和 miR-NC+ H_2O_2 组, 再以 200 μM 浓度的 H_2O_2 刺激 PC12 细胞建立 SCI 细胞模型, 然后采用 CCK8 测定 SCI 后细胞活力, 结果表明: 与 control 组比较, H_2O_2 组细胞活力明显下降 ($p < 0.0001$); 与 miR-NC+ H_2O_2 组比较, 转染 miR-124-3p 后细胞活力升高 ($p < 0.0001$)。表明 miR-124-3p 可以明显提高 SCI 后细胞的活力 (图 9)。

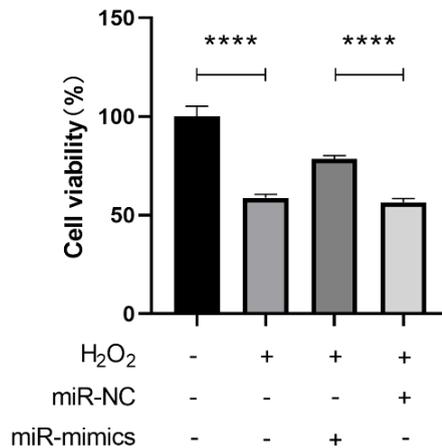


图 9: CCK8 检测转染 miR-124-3p 对 SCI 后细胞活力的影响 (**** $p < 0.0001$)

WB 测定转染 miR-124-3p 对凋亡执行蛋白 cleaved caspase 3 的影响, 结果显示: control 组和 H_2O_2 组比较具有统计学意义 ($p < 0.0001$); miR-124-3p+ H_2O_2 组和 miR-NC+ H_2O_2 组比较具有统计学意义 ($p < 0.01$)。表明 miR-124-3p 能抑制

cleaved caspase 3 的表达 (图 10)。

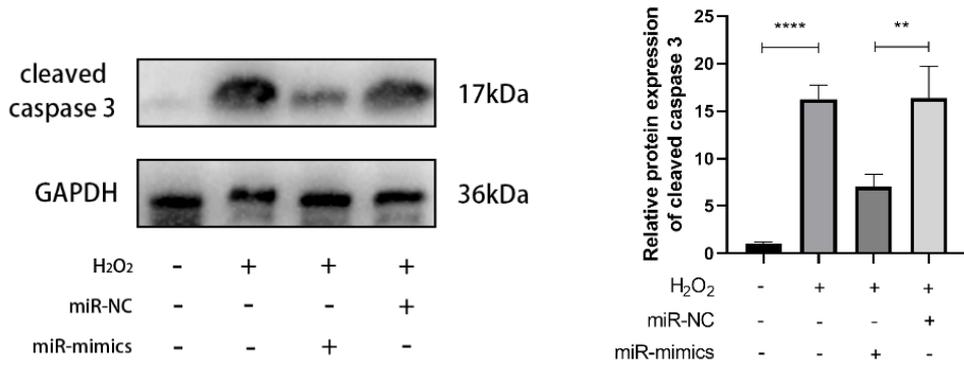


图 10: WB 检测转染 miR-124-3p 对 SCI 后 cleaved caspase 3 的影响
(**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$)

随后,本研究使用流式细胞术验证上述得到的实验结果,同样发现,H₂O₂组较 control 组凋亡率明显增高 ($p < 0.0001$); miR-124-3p+H₂O₂ 组较 miR-NC+H₂O₂ 组细胞凋亡率明显降低 ($p < 0.01$)。表明过表达 miR-124-3p 抑制 SCI 后细胞凋亡 (图 11)。

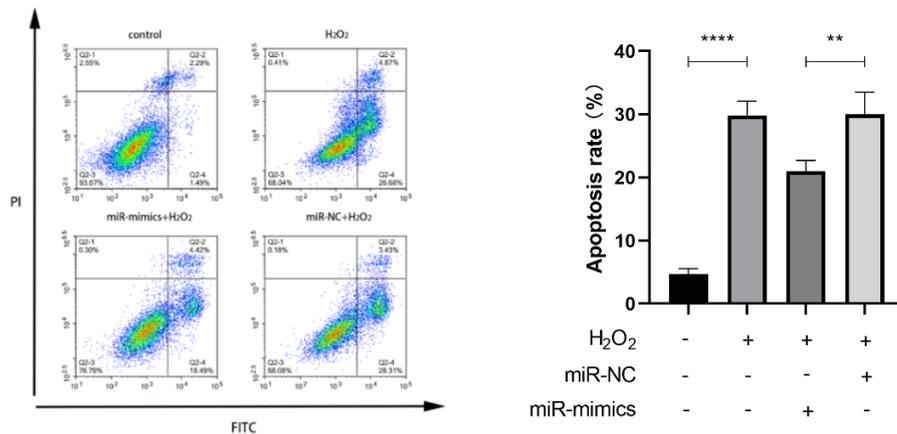


图 11: 流式细胞术检测转染 miR-124-3p 对 SCI 后细胞凋亡的影响
(**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$)

WB 检测 miR-124-3p 对 SCI 后 CAPN1 的影响,结果显示:与 control 组比较,SCI 体外细胞模型中 CAPN1 的表达量明显增加 ($p < 0.001$);与 miR-NC+H₂O₂ 组比较,过表达 miR-124-3p 能抑制 CAPN1 的蛋白表达量 ($p < 0.05$)。这些结果表明,过表达 miR-124-3p 通过抑制 CAPN1 的表达量减弱 SCI 后细胞凋亡 (图 12)。

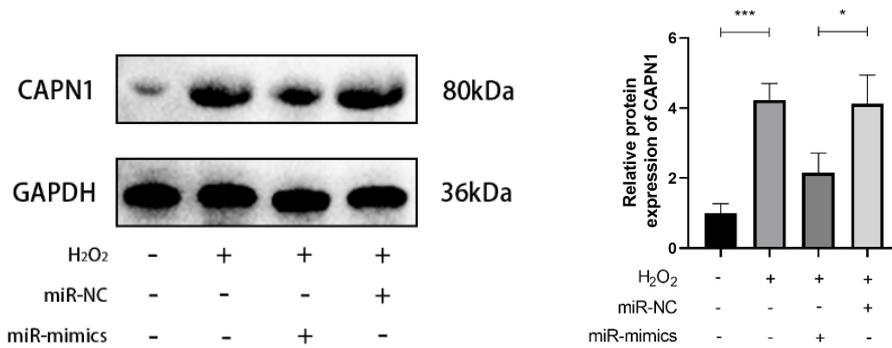


图 12: WB 测定转染 miR-124-3p 对 SCI 后 CAPN1 的影响

(*** $p < 0.001$, * $p < 0.05$)

5 干扰 lncRNA MALAT1 可以对抗 SCI 导致的神经元凋亡

SCI 后 lncRNA MALAT1 的表达量显著上调, 因此, 为了探讨干扰 lncRNA MALAT1 是否对 SCI 后神经元的凋亡具有影响, 本实验构建了 3 个 lncRNA MALAT1 干扰片段, 分别标记为 si-1、si-2 和 si-3, 并转染细胞, RT-qPCR 检测 3 个片段的转染效率, 同时进行最适 si-lncRNA MALAT1 筛选, 结果显示: si-1 与 control 组具有明显统计学差异 ($p < 0.001$), 表明 si-1 转染效率最高。因此, 后续实验选用 si-1 作为 lncRNA MALAT1 的干扰片段 (图 13)。

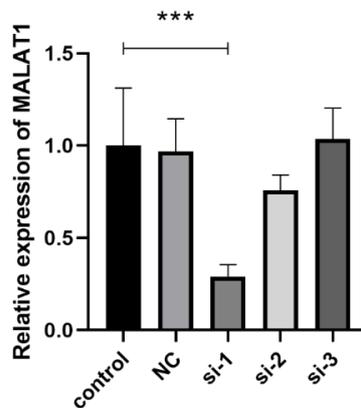


图 13: RT-qPCR 检测 lncRNA MALAT1 的转染效率及最佳片段的筛选

(*** $p < 0.001$)

随后将实验分组划分为: control 组、H₂O₂ 组、si-MALAT1+H₂O₂ 组和 si-NC+H₂O₂ 组, CCK8 测定干扰 lncRNA MALAT1 对 SCI 后细胞活力的影响, 结果显示: 与 control 组相比, H₂O₂ 组细胞活力显著降低 ($p < 0.0001$); 与 si-NC+H₂O₂ 组相比, si-MALAT1+H₂O₂ 组细胞活力明显增加 ($p < 0.0001$)。这些结果表明干扰 lncRNA MALAT1 促进 SCI 后细胞活力 (图 14)。

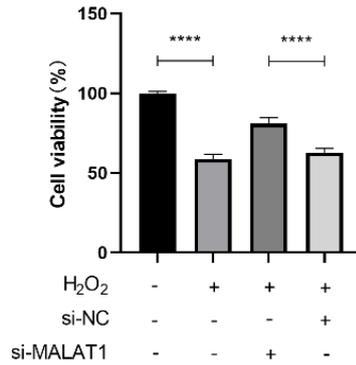


图 14: CCK8 测定干扰 lncRNA MALAT1 对 SCI 后细胞活力的影响

(**** $p < 0.0001$)

最后, 通过流式细胞术验证上述 CCK8 所得的结果, 结果显示: control 组和 H₂O₂ 组细胞凋亡率的差异具有统计学意义 ($p < 0.0001$); si-NC+H₂O₂ 组与 si-MALAT1 组细胞凋亡率的差异具有统计学意义 ($p < 0.0001$)。因此, 得出结论, 干扰 lncRNA MALAT1 能抑制 SCI 后细胞凋亡 (图 15)。

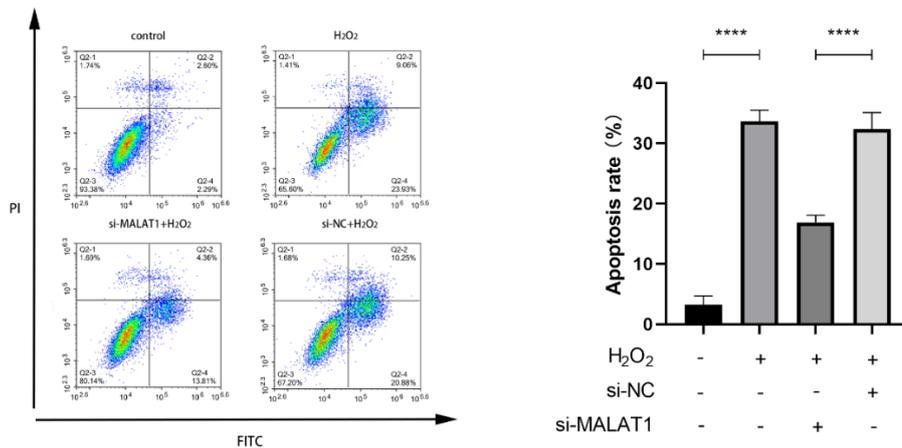


图 15: 流式细胞术检测干扰 lncRNA MALAT1 对 SCI 后细胞凋亡的影响

(**** $p < 0.0001$)

6 lncRNA MALAT1 靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制 SCI 后神经元凋亡

为了评估 lncRNA MALAT1/miR-124-3p/calpain 1 轴对 SCI 后神经元凋亡的影响, 本团队同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 进行挽救实验, 转染结束后建立 SCI 细胞模型, RT-qPCR 测定各组 miR-124-3p 的表达量, 结果显示: 与 control 组相比, H₂O₂ 组 miR-124-3p 的表达量显低 ($p < 0.0001$); 与 si-NC+H₂O₂ 组相比, si-MALAT1+H₂O₂ 组 miR-124-3p 的表达量升高 ($p < 0.0001$); 与 si-MALAT1+inhibitor-NC+H₂O₂ 组相比, si-MALAT1+miR-inhibitor+H₂O₂ 组 miR-124-3p 的表达量下降 ($p < 0.05$)。表明干扰 lncRNA MALAT1 促进 miR-124-3p 的

表达，而 miR-124-3p inhibitor 阻断了这个效果（图 16）。

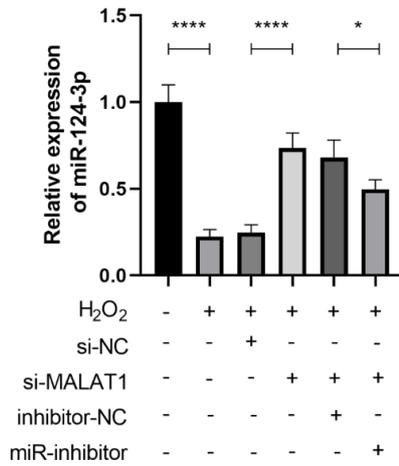


图 16: RT-qPCR 检测同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 后，miR-124-3p 的变化量 (**** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$)

CCK8 结果显示：H₂O₂ 组与 control 组相比，细胞活力降低 ($p < 0.0001$)；si-MALAT1+H₂O₂ 组与 si-NC+ H₂O₂ 组相比，细胞活力升高 ($p < 0.0001$)；si-MALAT1+inhibitor-NC+H₂O₂ 组与 si-MALAT1+miR-inhibitor +H₂O₂ 组相比，细胞活力升高($p < 0.0001$)。这些结果表明干扰 lncRNA MALAT1 显著增加细胞活力，而 miR-124-3p inhibitor 抑制了干扰 lncRNA MALAT1 对细胞活力的作用，表现为 miR-124-3p inhibitor 使干扰 lncRNA MALAT1 所挽救的细胞减少，从而抑制细胞活力（图 17）。

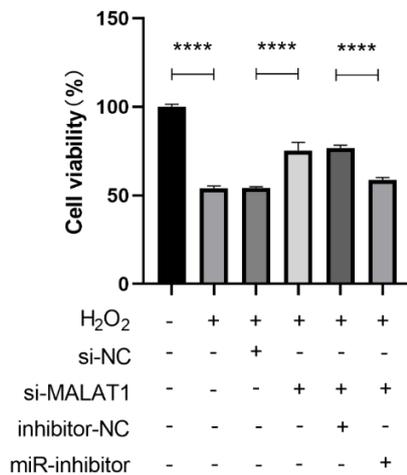


图 17: CCK8 检测同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 后细胞活力的变化 (**** $p < 0.0001$)

WB 检测凋亡执行蛋白 cleaved caspase 3 的表达量，结果显示：与 control 组相比，H₂O₂ 组 cleaved caspase 3 的表达量升高 ($p < 0.0001$)；与 si-NC+H₂O₂ 组相比，si-MALAT1+H₂O₂ 组 cleaved caspase 3 的表达量降低 ($p < 0.0001$)；与 si-MALAT1+inhibitor-NC+H₂O₂ 组相比 si-MALAT1+miR-inhibitor+H₂O₂ 组 cleaved caspase 3 的表达量升高 ($p < 0.01$)。表明 miR-124-3p inhibitor 减弱了干扰 lncRNA MALAT1 对 cleaved caspase 3 的抑制作用 (图 18)。

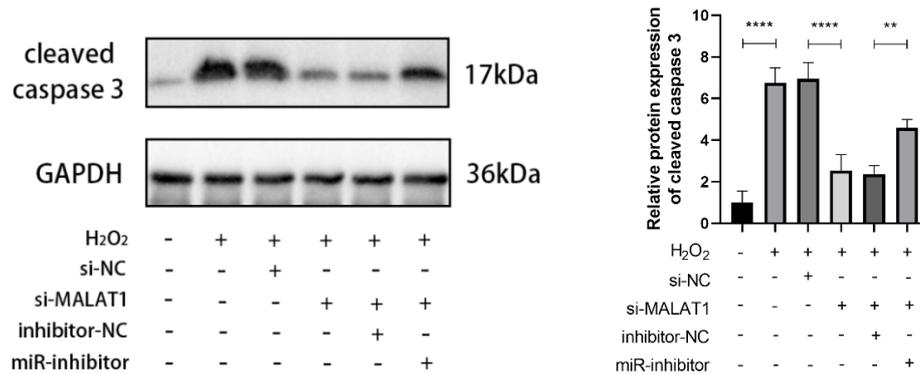


图 18: WB 检测同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 后 cleaved caspase 3 蛋白的变化量 (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$)

流式细胞术的结果显示：H₂O₂ 组与 control 组相比，细胞凋亡率显著升高 ($p < 0.0001$)；与 si-NC+H₂O₂ 组相比，si-MALAT1+H₂O₂ 组细胞凋亡率下降 ($p < 0.0001$)；与 si-MALAT1+inhibitor-NC+H₂O₂ 组相比，si-MALAT1+miR-inhibitor+H₂O₂ 组凋亡率升高 ($p < 0.05$)。这些结果与上述 CCK8 的结果一致 (图 19)。

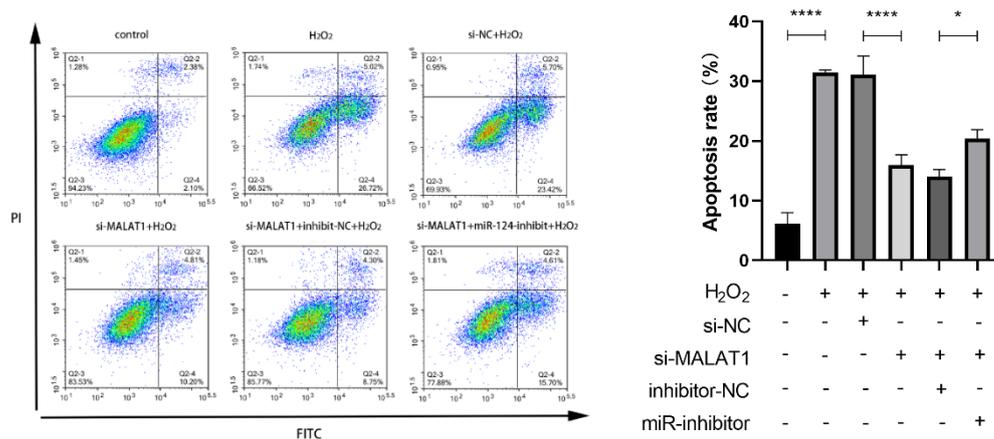


图 19: 流式细胞术检测同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 后细胞凋亡率的变化 (**** $p < 0.0001$, * $p < 0.05$)

WB 检测 CAPN1 的改变量, 结果显示: H₂O₂ 组与 control 组相比, CAPN1 蛋白表达量的差异具有统计学意义 ($p < 0.0001$); si-NC+H₂O₂ 组与 si-MALAT1+H₂O₂ 组相比, CAPN1 蛋白表达量的差异具有统计学意义 ($p < 0.01$); si-MALAT1+inhibitor-NC+H₂O₂ 组与 si-MALAT1+miR-inhibitor+H₂O₂ 组相比, CAPN1 蛋白表达量的差异具有统计学意义 ($p < 0.05$)。表明干扰 lncRNA MALAT1 能够抑制 CAPN1 的蛋白表达量, 而 miR-124-3p inhibitor 抑制了干扰 lncRNA MALAT1 对 CAPN1 蛋白水平的影响, 因为 CAPN1 的表达再次增加 (图 20)。

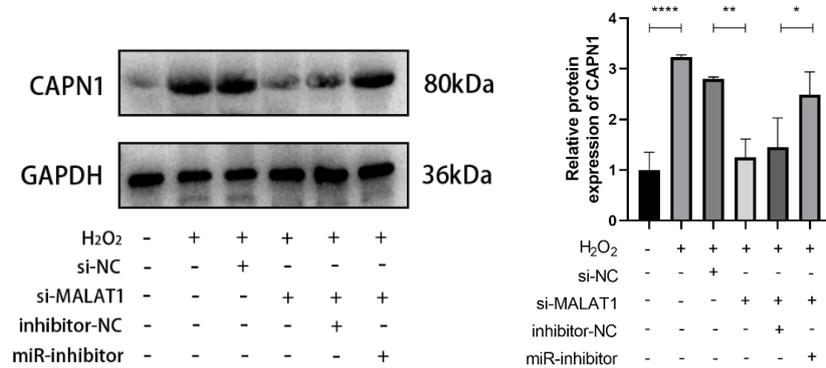


图 20: WB 检测同时干扰 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 后 CAPN1 蛋白的变化量 (**** $p < 0.0001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

讨 论

SCI 是长久以来困扰世界卫生组织的难题，常导致患者残疾甚至瘫痪。据 Lo 等人统计，在美国约有 260 万人患有 SCI，预估用于治疗 and 护理 SCI 的直接成本为 17 亿美元左右，间接成本约为每人 7 万美元^[4]。虽然有诸多治疗 SCI 的方法，如手术减压、稳定、康复、药物治疗和细胞移植等，但由于 SCI 复杂的病理生理机制，这些治疗方式的疗效都不尽人意。抑制 SCI 后神经元凋亡是治疗的关键，非编码 RNA 通过调控基因层面参与 SCI 的发生、发展和转归，并由于特殊的生物源性，目前已经被人们广泛关注。清楚非编码 RNA 对 SCI 的影响及作用机制有助于 SCI 患者的治疗和诊断。

本实验用于研究 SCI 的细胞是来源于大鼠嗜铬细胞瘤的 PC12 细胞系，是一种永生细胞系，类似于胎儿神经元的原代培养物，它们更容易传代和培养。通过人工诱导，PC12 常用于中枢神经系统性疾病中神经元保护和再生的研究，因为它们表现出成熟神经元的一些重要特征，如神经细胞的形态以及轴突等^[45]。例如，可以使用 1-甲基-4-苯基吡啶鎓或 6-羟基多巴胺诱导 PC12 建立 PD 疾病细胞模型^[46]；可以使用转染突变 SOD1 基因 (G93A) 的 PC12 研究肌萎缩侧索硬化症^[47]；也可以通过氧糖剥夺刺激 PC12 建立缺血性脑卒中体外疾病模型^[48]。PC12 细胞同样是研究 SCI 常用的细胞，Zhao 及同事通过氧糖剥夺刺激 PC12 用于探究锂对 SCI 修复的影响^[49]；类似的，Wang 等人使用 LPS 刺激 PC12 模拟 SCI 后炎症反应^[10]。基于现有的研究，PC12 细胞是用于研究中枢神经系统性疾病的常用细胞，因此本研究选用 PC12 作为研究 SCI 的实验细胞。

SCI 后产生大量的活性氧 (ROS)，ROS 通过一系列病理生理机制激活氧化应激途径，导致神经元进一步凋亡，从而加重损伤^[50]。H₂O₂ 是一种强氧化剂，分解后产生大量的氧可以作为模拟 SCI 后氧化应激的条件，目前已被广泛用于研究 SCI 氧化应激引起的凋亡研究中^[51]。因此，本研究选用 H₂O₂ 诱导 PC12 作为模拟 SCI 体外细胞实验的模型。但是在过往的研究中，研究者们使用 H₂O₂ 刺激 PC12 建立 SCI 模型的条件各不相同，例如，Zhou 使用 300 μM 的浓度刺激 PC12 建立 SCI 模型^[52]，Luo 等人使用 250 μM 的浓度作为诱导剂^[53]，因此，为了探寻建立 SCI 体外细胞模型的适合条件，本研究设置了不同浓度梯度的 H₂O₂ (0、100 μM、200 μM、400 μM 及 800 μM) 用于刺激细胞，诱导时间为 24 小

时,通过 CCK8 测定发现,随着浓度的不断增加,细胞活力逐渐下降,当浓度为 200 μM 时,细胞活力在 50%-60%之间,得到 IC 50,同时,通过 WB 检测发现该条件下凋亡执行蛋白 cleaved caspase 3 的表达量明显增加,因此,本研究以浓度为 200 μM 的 H_2O_2 刺激 PC12 细胞 24 h 作为 SCI 体外凋亡模型的建立条件,进一步研究非编码 RNA 对 SCI 的具体作用机制。

miR-124-3p 是一种短链非编码 RNA,目前普遍认为 miR-124-3p 在中枢神经系统中高度表达,包括神经细胞的成熟与分化,这些发现有助于对神经疾病的治疗和诊断^[54]。例如,在阿尔兹海默症 (Alzheimer's disease, AD) 中,miR-124-3p 能够直接将人脑血管周细胞 (HBVPs) 转化为胆碱能神经元细胞,进而治疗周围神经病变^[55]。在缺血性脑卒中患者中,血浆 miR-124-3p 已被证明在缺血后 24 h 内迅速减少,并在 48-72 h 内以及缺血后第七天逐渐增加^[56]; miR-124-3p 还作为脑缺血再灌注损伤的保护剂广泛参与缺血性脑卒中后的病理生理中^[57]; Wang 等人观察到,miR-124-3p 通过激活磷酸肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (PKB/AKT) 在缺血性脑卒中中发挥抗凋亡作用,其通过影响 Bcl-2 的表达,进一步减轻缺血性脑卒中的细胞凋亡^[58];此外,miR-124-3p 还可以通过抑制氧化应激保护 PC12 细胞免受 OGD/R (氧糖剥夺/复氧) 诱导的损伤,这与通过激活 PI3K/AKT/Nrf2 途径增加热休克蛋白表达相关^[59],其中 OGD/R 是用于建立缺血性脑卒中体外细胞模型的重要方法之一; miR-124-3p 通过影响 iASPP 的表达,抑制缺血性脑卒中神经元凋亡,并有效减少了梗死体积^[60]。这些研究提示 miR-124-3p 是缺血性脑卒中时间敏感性诊断和治疗靶点的候选生物标志物。此外,miR-124-3p 在癫痫中发挥着双重作用,miR-124-3p 可通过抑制 CREB1^[61]、C/EBP α ^[62] 和 Bcl2L13^[63] 的表达来抑制凋亡、神经元兴奋性和延长发作潜伏期,从而抑制癫痫发生;相反,miR-124-3p 又通过激活小胶质细胞和炎症反应促进癫痫的发生^[62]。

以上研究表明,miR-124-3p 在中枢神经系统中占有重要地位。本团队前期的体内动物实验发现,SCI 后 miR-124-3p 的表达在损伤部位的神经元中显著降低,同时通过生物信息学分析发现 miR-124-3p 和 calpain 1 基因之间存在结合位点,并通过双荧光素酶实验验证了 miR-124-3p 和 calpain 1 之间的靶向关系,此外,过表达 miR-124-3p 通过抑制 calpain 1 的表达抑制 SCI 后神经元细胞的凋亡,从而减轻 SCI^[16]。其中,calpain 1 是一种依赖钙离子的钙蛋白酶,具有调控细胞周

期、基因表达和细胞凋亡的作用^[64]。例如, miR-140-5p 通过靶向 calpain 1 缓解小鼠肝缺血/再灌注损伤^[65]; 干扰 lncRNA NEAT1 通过调节 miR-124-3p 的表达和下游的 calpain 1 基因来减弱小鼠系膜细胞的活力、炎症和纤维化^[66]。本研究通过 RT-qPCR 检测 SCI 体外细胞模型中 miR-124-3p 和 calpain 1 的表达, 结果显示 miR-124-3p 表达显著减低, 而 calpain 1 与 miR-124-3p 的表达量呈负相关的趋势, 同时, WB 的结果显示, CAPN1 和 cleaved caspase 3 的表达量都显著升高。随后, 本研究为了探究 miR-124-3p 对 SCI 体外机制的影响, 构建了 miR-124-3p mimics 用于转染细胞, 通过 CCK8 和流式细胞术检测发现, 过表达 miR-124-3p 提高了 SCI 后细胞的活力并抑制细胞凋亡, WB 检测发现, 过表达 miR-124-3p 通过抑制 CAPN1 和 cleaved caspase 3 的表达减轻 SCI 后神经元凋亡。本研究得到 miR-124-3p 的作用与他人的研究及本团队前期体内研究的结果一致, 表明 miR-124-3p 在中枢神经系统中发挥重要作用。但是, 根据 ceRNA 假说, calpain 1 除了受到 miR-124-3p 调控外, 可能还存在其它调控因子。因此, 本实验对 miR-124-3p 的上游做了进一步的研究。通过在线网站预测, 发现 lncRNA MALAT1 和 miR-124-3p 之间存在靶向关系, 同时, 双荧光素酶实验结果证实了这一预测。基于此, 本研究进一步探索了 lncRNA MALAT1/miR-124-3p/calpain 1 轴对 SCI 后神经元凋亡的影响。

lncRNA 因其对生物体功能复杂的调控机制, 参与各种疾病的发生、发展和转归, 已经被人们广泛研究。最初, 关于 lncRNA 的报道主要集中于肿瘤相关性的研究中。例如, Kong 等人发现, lncRNA CDC6 海绵 miR-215 靶向 CDC6 调控乳腺癌的进展^[67]; Zong 及其同事研究得出结论, lncRNA SNHG1 促进巨噬细胞向 M2 型极化, 进而促进乳腺癌生长和转移^[68]; Chen 等人在肝癌疾病中发现, lncRNA CDKN2BAS 靶向 miR-153-5p 调控 ARHGAP18 促进肝癌细胞的转移^[69]。随后的研究发现, lncRNA 在神经系统性疾病中也发挥着重要功能。例如, lncRNA-MEG3 靶向 miR-147 降低缺氧损伤后神经细胞的凋亡^[70]; 干扰 lncRNA PVT1 通过靶向 miR-186-5p 调节 CXCL13/CXCR5 信号通路, 从而减轻神经性疼痛的炎症反应^[71]; lncRNA H19^[72]和 lncRNA SNHG16^[73]通过促进施旺细胞迁移修复大鼠坐骨神经的损伤; 干扰 lncRNA NEAT1 通过促进 miR-374c-5p 的表达抑制神经细胞的自噬和凋亡^[74]。另一方面, lncRNA MALAT1 也广泛参与神经系统性

疾病的发展中。例如, lncRNA MALAT1 通过抑制 NRF2 的表达, 从而诱导 PD 小鼠和小胶质细胞中的炎性小体活化和活性氧产生, 影响疾病的发展^[75]。同样, lncRNA MALAT1 通过海绵 miR-129-5p 提高 BDNF 促进施旺细胞的增殖和迁移, 进而促进周围神经损伤的修复^[76]。在缺血性脑卒中疾病中, lncRNA MALAT1 通过抑制内皮细胞死亡和炎症, 进而保护脑微血管系统和脑实质等神经组织免受脑缺血引起的损伤^[77]。Wu 等人发现, lncRNA MALAT1 通过靶向 miR-154-5p 抑制 AQP9 的表达, 进而抑制大鼠神经性疼痛^[78]。在脑损伤后, 发芽生成的血管能促进创伤后脑损伤的神经修复, 而 lncRNA MALAT1 可以通过 EZH2-NOTCH1 轴促进脑血管的生成, 进而促进脑损伤的修复^[79]。这些研究表明 lncRNA MALAT1 在神经系统性疾病中发挥着重要作用, 但在 SCI 中的具体作用机制仍不够清楚。因此, 本研究探究了 SCI 后 lncRNA MALAT1 是否差异性表达, 结果显示 lncRNA MALAT1 在 SCI 后呈高表达的趋势, 表明 lncRNA MALAT1 在 SCI 中可能扮演重要角色, 同时发挥着一定的功能。接下来, 本团队构建了三个不同的 lncRNA MALAT1 干扰片段, 通过 RT-qPCR 筛选了干扰效率最高的片段进行转染, 进行 CCK8 和流式细胞术检测后, 结果提示干扰 lncRNA MALAT1 提高了 SCI 后细胞活力并抑制细胞凋亡。这些结果和之前专家们的发现一致, 都表明 lncRNA MALAT1 在中枢神经系统发挥重要作用。

最后, 为了探讨 lncRNA MALAT1 是否通过靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 轴抑制 SCI 后神经元凋亡, 本团队将 lncRNA MALAT1 干扰片段和 miR-124-3p inhibitor 同时转染细胞, 进行挽救实验, RT-qPCR 检测发现干扰 lncRNA MALAT1 能促进 miR-124-3p 表达, CCK8 结果显示干扰 lncRNA MALAT1 明显增加细胞活力, 而 miR-124-3p inhibitor 减弱了干扰 lncRNA MALAT1 对细胞活力的作用, 表现为 miR-124-3p inhibitor 使干扰 lncRNA MALAT1 挽救的细胞减少, 从而抑制细胞活力。流式细胞术的结果与 CCK8 的结果一致。最后通过 WB 检测凋亡执行蛋白 cleaved caspase 3 和 CAPN1 的表达量, 发现 miR-124-3p inhibitor 还抑制了干扰 lncRNA MALAT1 对 cleaved caspase 3 和 CAPN1 蛋白水平的影响, 因为它们的表达再次增加。这些结果说明 lncRNA MALAT1/miR-124-3p/calpain 1 轴在 SCI 中发挥重要作用。

综上所述, 本研究的结果表明 lncRNA MALAT1 和 calpain 1 在 SCI 体外细

胞模型中高表达，而 miR-124-3p 低表达。过表达 miR-124-3p，通过降低 calpain 1 和 cleaved caspase 3 蛋白水平，减轻 SCI 所引起的细胞凋亡。单独干扰 lncRNA MALAT1 后，细胞的凋亡率有所下降，同时细胞活力升高。此外，在体外 SCI 模型中，干扰 lncRNA MALAT1 通过增加 miR-124-3p 的表达量，降低 calpain 1 及 cleaved caspase 3 的表达减轻细胞凋亡，与此同时，miR-124-3p inhibitor 抑制剂能够抵消干扰 lncRNA MALAT1 对 SCI 发挥的作用。本研究基于前期的研究基础，进一步探讨了 lncRNA MALAT1 在 SCI 中的作用，首次提出并发现 lncRNA MALAT1/miR-124-3p/calpain 1 轴对 SCI 的影响。本团队相信此次研究的结果能够对未来治疗 SCI 提供一定的方向和思路。但本研究依然存在一定的不足之处，因为实验主要是基于细胞实验，体外细胞实验相比于体内动物实验缺乏一定的说服力，因此，在未来本团队依然需要做更深入的体内动物研究去验证这一结果。

结 论

本研究发 现 lncRNA MALAT1 对 SCI 的治疗作用是通过靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 来实现的，以下是本研究的结论：

- 1.过表达 miR-124-3p 通过靶向 calpain 1 抑制 SCI 后神经元凋亡；
- 2.干扰 lncRNA MALAT1 能抑制 SCI 后神经元凋亡；
- 3.lncRNA MALAT1 通过靶向 miR-124-3p 调控 calpain 1 抑制 SCI 后神经元凋亡。

参考文献

- [1] Fan B, Wei Z, Yao X, Shi G, Cheng X, Zhou X, Zhou H, Ning G, Kong X, Feng S. Microenvironment Imbalance of Spinal Cord Injury[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(6): 853-66.
- [2] Karsy M, Hawryluk G. Modern Medical Management of Spinal Cord Injury[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(9): 65-72.
- [3] Eli I, Lerner D P, Ghogawala Z. Acute Traumatic Spinal Cord Injury[J]. *Neurol Clin*, 2021, 39(2): 471-488.
- [4] Lo J, Chan L, Flynn S. A Systematic Review of the Incidence, Prevalence, Costs, and Activity and Work Limitations of Amputation, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Back Pain, Multiple Sclerosis, Spinal Cord Injury, Stroke, and Traumatic Brain Injury in the United States: A 2019 Update[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2021, 102(1): 115-31.
- [5] Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools[J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20(5): 1836-52.
- [6] Correia de Sousa M, Gjorgjieva M, Dolicka D, Sobolewski C, Foti M. Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24).
- [7] Sun P, Liu D Z, Jickling G C, Sharp F R, Yin K J. MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(7): 1125-1148.
- [8] 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): 501-506.
- [9] Zhou J, Li Z, Wu T, Zhao Q, Zhao Q, Cao Y. LncGBP9/miR-34a axis drives macrophages toward a phenotype conducive for spinal cord injury repair via STAT1/STAT6 and SOCS3[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 134-141.
- [10] Wang R, Liu Y, Jing L. MiRNA-99a alleviates inflammation and oxidative stress in lipopolysaccharide-stimulated PC-12 cells and rats post spinal cord injury[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 4248-4259.
- [11] Shao J, Cao J, Wang J, Ren X, Su S, Li M, Li Z, Zhao Q, Zang W. MicroRNA-30b regulates expression of the sodium channel Nav1.7 in nerve injury-induced neuropathic pain in the rat[J]. *Mol Pain*, 2016, 12-21.
- [12] Yao Y, Zhang X, Xu J, Gao F, Wu Y, Cui X, Wei L, Jiang J, Wang X. circ_014260/miR-

- 384/THBS1 aggravates spinal cord injury in rats by promoting neuronal apoptosis and endoplasmic reticulum stress[J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(1): 518-533.
- [13] Li T, YingchunSun, LijuanTao, ShoujunChen, PengLiu, CaihuaWang, KeZhou, ChangyuZhao, Guoqing. Inhibition of MicroRNA-15a/16 Expression Alleviates Neuropathic Pain Development through Upregulation of G Protein-Coupled Receptor Kinase 2[J]. *Biomolecules & therapeutics*, 2019, 27(4) : 414-422.
- [14] Ding L Z, Xu J, Yuan C, Teng X, Wu Q M. MiR-7a ameliorates spinal cord injury by inhibiting neuronal apoptosis and oxidative stress[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(1): 11-17.
- [15] Li M, Jiang W T, Li J, Ji W C. Exercise protects against spinal cord injury through miR-21-mediated suppression of PDCD4[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(9): 5708-5718.
- [16] 李昊天, 陈凌强, 王兵, 龚志强, 董俊杰, 杨晋, 赵石好. miR-124-3p 靶向作用于 calpain 1 抑制氧化应激对脊髓损伤后神经元凋亡的影响[J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2019, 29(12): 1109-1118.
- [17] Li Q, Liu S, Yan J, Sun M Z, Greenaway F T. The potential role of miR-124-3p in tumorigenesis and other related diseases[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(4): 3579-3591.
- [18] Xu J, Zheng Y, Wang L, Liu Y, Wang X, Li Y, Chi G. miR-124: A Promising Therapeutic Target for Central Nervous System Injuries and Diseases[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2022, 42(7): 2031-2053.
- [19] Zhao J, He Z, Wang J. MicroRNA-124: A Key Player in Microglia-Mediated Inflammation in Neurological Diseases[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15: 881-898.
- [20] Elramah S, López-González M J, Bastide M, Dixmérias F, Roca-Lapirot O, Wielanek-Bachelet A C, Vital A, Leste-Lasserre T, Brochard A, Landry M, Favereaux A. Spinal miRNA-124 regulates synaptopodin and nociception in an animal model of bone cancer pain[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 109-121.
- [21] Strickland E R, Woller S A, Hook M A, Grau J W, Miranda R C. The association between spinal cord trauma-sensitive miRNAs and pain sensitivity, and their regulation by morphine[J]. *Neurochem Int*, 2014, 77: 40-49.
- [22] Yang M, Dang X, Gao K, Li Z, Liu M, He K. The relationship between macrophage polarization and glial scar formation in mouse model of spinal cord injury[J]. *Neuro Endocrinol*

Lett, 2020, 41(7-8): 385-391.

- [23] Hartmann H, Hoehne K, Rist E, Louw A M, Schlosshauer B. miR-124 disinhibits neurite outgrowth in an inflammatory environment[J]. Cell Tissue Res, 2015, 362(1): 9-20.
- [24] Yip P K, Bowes A L, Hall J C E, Burguillos M A, Ip T H R, Baskerville T, Liu Z H, Mohamed M, Getachew F, Lindsay A D, Najeeb S U, Popovich P G, Priestley J V, Michael-Titus A T. Docosahexaenoic acid reduces microglia phagocytic activity via miR-124 and induces neuroprotection in rodent models of spinal cord contusion injury[J]. Hum Mol Genet, 2019, 28(14): 2427-2448.
- [25] Orr M B, Gensel J C. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses[J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(3): 541-553.
- [26] Xu Z, Zhang K, Wang Q, Zheng Y. MicroRNA-124 improves functional recovery and suppresses Bax-dependent apoptosis in rats following spinal cord injury[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(4): 2551-2560.
- [27] Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi P P. A ceRNA hypothesis: The rosetta stone of a hidden RNA language? [J]. Cell, 2011, 146(3): 353-358.
- [28] The BRAF pseudogene functions as a competitive endogenous RNA and induces lymphoma in vivo[J]. Cell, 2015, 161(2): 319-332.
- [29] Feng W, Gong H, Wang Y, Zhu G, Xue T, Wang Y, Cui G. circIFT80 Functions as a ceRNA of miR-1236-3p to Promote Colorectal Cancer Progression[J]. Molecular Therapy Nucleic Acids, 2019, 18(3): 375-387.
- [30] Yang X Z, Cheng T T, He Q J, Lei Z Y, Chi J, Tang Z, Liao Q X, Zhang H, Zeng L S, Cui S Z. LINC01133 as ceRNA inhibits gastric cancer progression by sponging miR-106a-3p to regulate APC expression and the Wnt/ β -catenin pathway[J]. Molecular Cancer, 2018, 17(1):126-135.
- [31] Bridges M C, Daulagala A C, Kourtidis A. LNCcation: lncRNA localization and function[J]. The Journal of Cell Biology, 2021, 220(2) :226-237.
- [32] Nojima T, Proudfoot N J. Mechanisms of lncRNA biogenesis as revealed by nascent transcriptomics[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2022, 23(6): 389-406.
- [33] Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider P M, Tidow N, Brandt B, Buerger

- H, Bulk E, Thomas M, Berdel W E, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2003, 22(39): 8031-8041.
- [34] Sun Q, Li Q, Xie F. LncRNA-MALAT1 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting miR-503-5p[J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 6297-6307.
- [35] Li J, Liu H, Lin Q, Chen H, Liu L, Liao H, Cheng Y, Zhang X, Wang Z, Shen A, Chen G. Baicalin suppresses the migration and invasion of breast cancer cells via the TGF- β /lncRNA-MALAT1/miR-200c signaling pathway[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(46): 293-308.
- [36] Mu X, Shen Z, Lin Y, Xiao J, Xia K, Xu C, Chen B, Shi R, Zhu A, Sun X, Tao T, Song X, Xuan Q. LncRNA-MALAT1 Regulates Cancer Glucose Metabolism in Prostate Cancer via MYBL2/mTOR Axis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022(7): 32-39.
- [37] Abrishamdar M, Jalali M S, Rashno M. MALAT1 lncRNA and Parkinson's Disease: The role in the Pathophysiology and Significance for Diagnostic and Therapeutic Approaches[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(9): 5253-5262.
- [38] Zhang Y, Wang F, Chen G, He R, Yang L. LncRNA MALAT1 promotes osteoarthritis by modulating miR-150-5p/AKT3 axis[J]. *Cell Biosci*, 2019, 9(2): 54-61.
- [39] Zhou H J, Wang L Q, Wang D B, Yu J B, Zhu Y, Xu Q S, Zheng X J, Zhan R Y. Long noncoding RNA MALAT1 contributes to inflammatory response of microglia following spinal cord injury via the modulation of a miR-199b/IKK β /NF- κ B signaling pathway[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(1): 52-61.
- [40] Li S, Mei Z, Hu H B, Zhang X. The lncRNA MALAT1 contributes to non-small cell lung cancer development via modulating miR-124/STAT3 axis[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(9): 6679-6688.
- [41] Shi B, Wang Y, Yin F. MALAT1/miR-124/Capn4 axis regulates proliferation, invasion and EMT in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(10): 792-800.
- [42] Lu Y, Gong Z, Jin X, Zhao P, Zhang Y, Wang Z. LncRNA MALAT1 targeting miR-124-3p regulates DAPK1 expression contributes to cell apoptosis in Parkinson's Disease[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 12(1): 92-103.
- [43] Wu J, Weng Y, He F, Liang D, Cai L. LncRNA MALAT-1 competitively regulates miR-124 to

- promote EMT and development of non-small-cell lung cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2018, 29(7): 628-636.
- [44] Liu S, Song L, Zeng S, Zhang L. MALAT1-miR-124-RBG2 axis is involved in growth and invasion of HR-HPV-positive cervical cancer cells[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 633-640.
- [45] Duan X, Wang W L, Dai R, Yan H W, Liu L S. Current Situation of PC12 Cell Use in Neuronal Injury Study[J]. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2015, 4(2): 61-66.
- [46] Grau C M, Greene L A. Use of PC12 cells and rat superior cervical ganglion sympathetic neurons as models for neuroprotective assays relevant to Parkinson's disease[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 846: 201-211.
- [47] Zhang W, Benmohamed R, Arvanites A C, Morimoto R I, Ferrante R J, Kirsch D R, Silverman R B. Cyclohexane 1,3-diones and their inhibition of mutant SOD1-dependent protein aggregation and toxicity in PC12 cells[J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(2): 1029-1045.
- [48] Hillion J A, Takahashi K, Maric D, Ruetzler C, Barker J L, Hallenbeck J M. Development of an ischemic tolerance model in a PC12 cell line[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(2): 154-162.
- [49] Zhao Y J, Qiao H, Liu D F, Li J, Li J X, Chang S E, Lu T, Li F T, Wang D, Li H P, He X J, Wang F. Lithium promotes recovery after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(6): 1324-1333.
- [50] Anjum A, Yazid M D, Fauzi Daud M, Idris J, Ng A M H, Selvi Naicker A, Ismail O H R, Athi Kumar R K, Lokanathan Y. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20) : 324-333.
- [51] 黄宇, 林晋, 林仁钦, 陈宣维, 林建华, 范纯泉. 一种改良方法构建大鼠脊髓损伤体外细胞模型[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2021, 36(03): 252-255.
- [52] Hou Y, Luan J, Huang T, Deng T, Li X, Xiao Z, Zhan J, Luo D, Hou Y, Xu L, Lin D. Tauroursodeoxycholic acid alleviates secondary injury in spinal cord injury mice by reducing oxidative stress, apoptosis, and inflammatory response[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 216-227.
- [53] Luo W, Wang Y, Lin F, Liu Y, Gu R, Liu W, Xiao C. Selenium-Doped Carbon Quantum Dots

- Efficiently Ameliorate Secondary Spinal Cord Injury via Scavenging Reactive Oxygen Species[J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15: 10113-10125.
- [54] Hamzei Taj S, Kho W, Riou A, Wiedermann D, Hoehn M. MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia[J]. *Biomaterials*, 2016, 91: 151-165.
- [55] Liang X G, Tan C, Wang C K, Tao R R, Huang Y J, Ma K F, Fukunaga K, Huang M Z, Han F. Myt1l induced direct reprogramming of pericytes into cholinergic neurons[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2018, 24(9): 801-809.
- [56] Sun M, Hou X, Ren G, Zhang Y, Cheng H. Dynamic changes in miR-124 levels in patients with acute cerebral infarction[J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(7): 649-653.
- [57] Chen S H, Sun H, Zhang Y M, Xu H, Yang Y, Wang F M. Effects of acupuncture at Baihui (GV 20) and Zusanli (ST 36) on peripheral serum expression of MicroRNA 124, laminin and integrin β 1 in rats with cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(1): 49-55.
- [58] Wang C, Wei Z, Jiang G, Liu H. Neuroprotective mechanisms of miR-124 activating PI3K/Akt signaling pathway in ischemic stroke[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(6): 3315-3328.
- [59] Shu K, Zhang Y. Protodioscin protects PC12 cells against oxygen and glucose deprivation-induced injury through miR-124/AKT/Nrf2 pathway[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2019, 24(6): 1091-1099.
- [60] Liu X, Li F, Zhao S, Luo Y, Kang J, Zhao H, Yan F, Li S, Ji X. MicroRNA-124-mediated regulation of inhibitory member of apoptosis-stimulating protein of p53 family in experimental stroke[J]. *Stroke*, 2013, 44(7): 1973-1980.
- [61] Wang W, Wang X, Chen L, Zhang Y, Xu Z, Liu J, Jiang G, Li J, Zhang X, Wang K, Wang J, Chen G, Luo J. The microRNA miR-124 suppresses seizure activity and regulates CREB1 activity[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2016, 18: 4-13.
- [62] Brennan G P, Dey D, Chen Y, Patterson K P, Magnetta E J, Hall A M, Dube C M, Mei Y T, Baram T Z. Dual and Opposing Roles of MicroRNA-124 in Epilepsy Are Mediated through Inflammatory and NRSF-Dependent Gene Networks[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(10): 2402-2412.
- [63] Schouten M, Fratantoni S A, Hubens C J, Piersma S R, Pham T V, Bielefeld P, Voskuyl R A,

- Lucassen P J, Jimenez C R, Fitzsimons C P. MicroRNA-124 and -137 cooperativity controls caspase-3 activity through BCL2L13 in hippocampal neural stem cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 124-138.
- [64] Li W, Yang J, Lyu Q, Wu G, Hu J. Taurine prevents cardiomyocyte apoptosis by inhibiting the calpain-1/cytochrome c pathway during RVH in broilers[J]. *Amino Acids*, 2020, 52(3) : 24-31.
- [65] Yu Q, Chen S, Tang H, Yang H, Zhang J, Shi X, Li J, Guo W, Zhang S. miR-140-5p alleviates mouse liver ischemia/reperfusion injury by targeting CAPN1[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3) : 34-39.
- [66] Zhao N, Du L, Ma Y, Wang Y, Ma J, Fang Z. LncRNA NEAT1/microRNA-124 regulates cell viability, inflammation and fibrosis in high-glucose-treated mesangial cells[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(2): 507-514.
- [67] Kong X, Duan Y, Sang Y, Li Y, Zhang H, Liang Y, Liu Y, Zhang N, Yang Q. LncRNA-CDC6 promotes breast cancer progression and function as ceRNA to target CDC6 by sponging microRNA-215[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(6): 9105-9117.
- [68] Zong S, Dai W, Guo X, Wang K. LncRNA-SNHG1 promotes macrophage M2-like polarization and contributes to breast cancer growth and metastasis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(19): 23169-23181.
- [69] Chen J, Huang X, Wang W, Xie H, Li J, Hu Z, Zheng Z, Li H, Teng L. LncRNA CDKN2BAS predicts poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma and promotes metastasis via the miR-153-5p/ARHGAP18 signaling axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(11): 3371-3381.
- [70] Han L, Dong Z, Liu N, Xie F, Wang N. Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Enhances PC12 Cell Hypoxia Injury by Targeting MiR-147[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(6): 2457-2469.
- [71] Zhang P, Sun H, Ji Z. Downregulating lncRNA PVT1 Relieves Astrocyte Overactivation Induced Neuropathic Pain Through Targeting miR-186-5p/CXCL13/CXCR5 Axis[J]. *Neurochemical Research*, 2021, 46(6): 1457-1469.
- [72] Li Y, Cai M, Feng Y, Yung B, Wang Y, Gao N, Xu X, Zhang H, Huang H, Yao D. Effect of lncRNA H19 on nerve degeneration and regeneration after sciatic nerve injury in rats[J]. *Developmental Neurobiology*, 2022, 1(6): 98-111.
- [73] Chen Y, Fan Z, Dong Q. LncRNA SNHG16 promotes Schwann cell proliferation and migration

- to repair sciatic nerve injury[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2021, 12(16) : 38-47.
- [74] Dong L I, Zheng Y, Gao L, Luo X. lncRNA NEAT1 prompts autophagy and apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease by impairing miR-374c-5p[J]. *Acta biochimica et biophysica Sinica* vol, 2021, 53(7): 870-82.
- [75] Cai L J, Tu L, Huang X M, Huang J, Tian J Y. lncRNA MALAT1 facilitates inflammasome activation via epigenetic suppression of Nrf2 in Parkinson's disease[J]. *Molecular Brain*, 2020, 13(1): 130-141.
- [76] Gw A, Xi B, Mi C, Zhan Z A. Long non-coding RNA MALAT1 promotes the proliferation and migration of Schwann cells by elevating BDNF through sponging miR-129-5p[J]. *Experimental Cell Research*, 2020, 390(1) : 29-41.
- [77] Hamblin, Milton, H., Liu, Kai, Zhang, Xuejing, Tang, Xuelian, Yin. Long Noncoding RNA Malat1 Regulates Cerebrovascular Pathologies in Ischemic Stroke[J]. *Journal of Neuroscience the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2017, 37(7) : 1797-1806.
- [78] Wu J, Wang C, Ding H. lncRNA MALAT1 promotes neuropathic pain progression through the miR-154-5p/AQP9 axis in CCI rat models[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2020, 21(1) : 291-303.
- [79] Wu N, Cheng C J, Zhong J J, He J C, Zhang Z S, Wang Z G, Sun X C, Liu H. Essential role of MALAT1 in reducing traumatic brain injury[J]. *Neural regeneration research* vol, 2022, 17(8): 1776-1784.

综 述

lncRNA 影响脊髓损伤修复机制的研究进展

田新鹏 综述，陈凌强 审校

摘要：脊髓损伤（SCI）涉及严重的中枢神经系统损伤，可导致患者损伤平面以下运动和感觉功能异常或缺失以及自主神经功能紊乱，并且在损伤后发生一系列病理反应导致患者瘫痪。lncRNA 在 SCI 后病情发展及转归中扮演重要角色，具体表现为促进 SCI 后神经细胞的改变、调节炎症、抑制凋亡、减缓神经性疼痛以及促进血管的再生。本文旨在探讨近年来 lncRNA 对 SCI 修复的作用机制以及应用，同时评价 lncRNA 对于治疗 SCI 的潜力以及前景。

关键词：脊髓损伤；长链非编码 RNA；神经修复；基因表达；基因调控。

Research progress in the mechanism of lncRNA affecting the repair of spinal cord injury

Abstract: Spinal cord injury (SCI) involves serious central nervous system injury, which can lead to abnormal or missing motor and sensory functions below the injury level and dysfunction of autonomic nervous system, and a series of pathological reactions occur after the injury, leading to paralysis. LncRNA plays an important role in the development and outcome of the disease after SCI, which is manifested in promoting the change of nerve cells after SCI, regulating inflammation, inhibiting apoptosis, alleviating neuropathic pain and promoting the regeneration of blood vessels. This article aims to explore the mechanism and application of lncRNA in the repair of SCI in recent years, and evaluate the potential and prospect of lncRNA in the treatment of SCI.

Key words: spinal cord injury; lncRNA; nerve repair; gene expression; gene regulation.

脊髓损伤（spinal cord injury, SCI）是最具破坏性的疾病之一，已被公认为重要的全球健康重点。每年约有 50 万人遭受 SCI 损伤，据估计，美国每年有超过 17000 例 SCI 新发病例^[1]。跌倒和道路交通事故是 SCI 的主要促成因素，另外，其他的非创伤性疾病，如血流不足、炎性损伤、脊柱肿瘤和骨关节炎等，都

可以引起 SCI^[2]。但是, SCI 的幸存者也往往会碰到许多困难和问题, 包括瘫痪、感觉功能障碍、中枢神经性疼痛以及其他机能失调的并发症等, 这将给自身、家庭以及社会造成巨大的情感和经济负担。尽管已知 SCI 的主要病理生理机制都与初始机械损伤和继发性损伤有关, 但该疾病的具体机制目前仍不明确。而且, 继发性损伤往往发生在 SCI 后数分钟至数月内, 并引起持续性的神经损害。但总的来说, 常见的继发性损伤主要为血管功能障碍、炎症、水肿、缺血、兴奋性毒性、自由基产生和抑制性细胞死亡^[3]。目前, 对于 SCI 的治疗策略主要包括减压、稳定、康复、药物治疗和细胞移植等, 这些治疗策略根据疾病的分期而有所不同^[4]。虽然有诸多治疗方式, 但其治疗效果不尽人意, 目前仍然缺乏治疗 SCI 以及相关继发性损伤的及时策略和有效的治疗措施。对此, 进一步了解原发性和继发性损伤的细胞和分子机制对于找到促进 SCI 患者受损神经功能恢复的新型治疗策略是必要的。在这方面, 长链非编码 RNA (lncRNA) 可以为 SCI 的治疗策略提供新方向。清楚 SCI 后 lncRNA 的具体作用机制将有助于为 SCI 的预测、治疗以及并发症的防治提供新的靶点与方向。本文综述了现有的 lncRNA 在 SCI 中的最新研究。

1 lncRNA 简介

在生物整个基因组中, 大约只有 2% 的基因被转录及翻译进而编码蛋白, 大多数非编码 RNA 不编码任何蛋白质^[5]。其中 lncRNA 是一种长链非编码 RNA, 一种非转录物, 长度超过 200 个核苷酸, 在整个细胞周期中高度表达, 并且在基因表达的几乎每个阶段都起着重要的调节作用, 包括细胞周期, 分化和新陈代谢以及疾病^[6]。最近的证据还表明, lncRNA 在病毒感染中起一定作用。作为表观遗传修饰的重要介质, lncRNA 已经成为调控基因表达和细胞生物学功能的关键因子。

lncRNA 最初被认为是由 RNA 聚合酶 II 复合物转录的“转录噪声”^[7]。但随着微阵列和高通量序列技术的发展, lncRNA 的功能和种类有了进一步的认识。它们在细胞增殖、存活和迁移以及通过引导、诱饵、支架和信号分子维持基因组稳定性方面起着不同的作用^[8]。虽然, 目前对于 lncRNA 的研究不够透彻, 但现有研究表明, 高达约 40% 的已知 lncRNA 在中枢神经系统的损伤后会出现差异性的表达^[9]。大量的研究证实, lncRNA 对于生物体基因的调控具有重要影响, 并

且已经成为疾病发生、发展、治疗以及转归的重点研究对象。

2 lncRNA 的常见功能

lncRNA 的表达具有时间和空间特异性,并且在不同的组织中含量有所不同,此外,同一组织中 lncRNA 的表达也可能不同。基于 lncRNA 的特性,导致了其复杂的作用机制。目前, lncRNA 所有的功能作用尚未完全阐明,但根据现有的研究,大致分为四类。

2.1 修饰染色质

部分 lncRNA 作用机制涉及表观遗传修饰的调节,其将染色质重塑和修饰的复合物招募到特定位点^[10]。以这种方式,改变 DNA / RNA 的甲基化状态,同时对染色体的结构和修饰状态进行调整,这种功能让下游基因表达通过介导染色体重塑以及组蛋白修饰来调节^[11]。例如, lncRNA SOX21-AS1 启动子区域的低甲基化可以使其过表达,从而增强 lncRNA SOX21 对 lncRNA SOX2 的抑制作用并抑制宫颈癌的进展^[12]。

2.2 调节转录表达

lncRNA 也参与调节转录表达。在真核细胞中,转录因子对基因转录至关重要,它们与基因转录产生的 RNA 结合,以控制 RNA 的转录、定位和稳定性^[13]。一些 lncRNA 充当配体并与转录因子结合以形成复合物,通过影响启动子区域或相邻基因来控制基因转录活性^[14]。例如, lncRNA GATA3-AS1 是与 lncRNA GATA3 相邻的发散性 lncRNA,仅 lncRNA GATA3-AS1 转录本就足以诱导 GATA3 表达的增加^[15]。

2.3 转录后调控

转录后调控是 lncRNA 参与的一个重要过程。lncRNA 参与剪切,编辑,蛋白质翻译和 mRNA 转录后的转录等过程^[16]。通过与 mRNA 形成互补的双链,干扰 mRNA 的剪切以产生调节作用^[17]。

2.4 海绵 miRNA

lncRNA 作为竞争性内源性 RNA(ccRNA)发挥作用,像海绵一样结合 miRNA,从而阻止 miRNA 与靶 mRNA 结合^[18]。例如, lncRNA Gm4419 的转录本可以起到 miR-4661 海绵的作用,并通过上调炎症细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达来促进星形胶质细胞的创伤性损伤诱导的凋亡^[19]。

3 lncRNA 对 SCI 的机制研究

3.1 lncRNA 对 SCI 后神经细胞的调节作用

3.1.1 神经元

神经元作为神经传导中的基础元件，当 SCI 发生时，神经元会经历永久性的损伤与丢失，导致神经冲动无法继续传导，从而引起患者运动功能的瘫痪。因此，对于 SCI 后神经元存活率的提高是治疗 SCI 的关键。目前对于 SCI 的治疗很难避免神经元的丢失，但最近的研究发现，在 SCI 后的继发性损伤期间，lncRNA 对 SCI 表观遗传的调控可以逆转部分神经元的丢失。lncRNA Vof-16 已被证明在神经退行性疾病、中枢神经系统血管炎和其他与神经元炎症相关的神经病变中发挥作用。为了证明 lncRNA Vof-16 是否参与 SCI 后的病理生理过程，Zhang 等人进行了一项实验，发现 lncRNA Vof-16 在大鼠 SCI 后过表达，随后发现干扰 lncRNA Vof-16 能显著增加 SCI 大鼠损伤区域的脊髓神经元数量^[20]。这项发现揭示了 lncRNA 对 SCI 后神经元再生和保护的重要性，针对 SCI 后神经元变化的治疗有开创意义，值得更深入的研究。

3.1.2 小胶质细胞

目前已知，脊髓的生理环境下存在大量的巨噬细胞，而这些存在于中枢神经系统的巨噬细胞又被称为小胶质细胞^[21]。这些小胶质细胞具有三种表型：M0（待分化型）、M1（促炎型）和 M2（抗炎型），正常生理状态下，M1 型与 M2 型小胶质细胞的数量维持在相对一致的水平，共同保持微环境的相对稳定，当机体处于病理生理情况下，大量 M1 型的小胶质细胞被活化，进而造成严重的炎症环境^[22]。因此，抑制小胶质细胞 M1 表型的激活促进 M2 表型的增加将会成为治疗 SCI 的一个方式。lncRNA 已被证实参与 SCI 后小胶质细胞的活化过程。Zhou 等人的研究发现，过表达 lncRNA MEG3 通过 HUR/A20/NF- κ B 轴调节小胶质细胞的 M1 极化，其中，HUR 是一种 RNA 结合蛋白，星形胶质细胞中 HUR 表达的增强加剧了神经元损伤和脊髓损伤，lncRNA MEG3 与 HUR 结合并负调控 HUR 的表达；A20 是一种锌指蛋白，并且是激活 NF- κ B 的关键因子，而 NF- κ B 激活后能够促进小胶质细胞向 M1 的极化，进而导致组织损伤^[23]。Krüppel 样因子 4 (KLF4) 是一种保守的含锌指转录因子，被认为是多种细胞过程的多效调节因子，例如生长停滞、增殖和凋亡^[24]。在 M1 型小胶质细胞中，lncRNA SNHG5 和 KLF4

水平上调, 而敲低 lncRNA SNHG5 后 KLF4 表达也下调, 随后小胶质细胞的活力降低^[25]。Zhou 等人检测了 lncRNA GBP9 和细胞因子信号抑制因子 3(SOCS3) 对小胶质细胞极化的影响, 发现沉默 lncRNA GBP9 通过海绵 miR-34a 靶向 SOCS3 抑制小胶质细胞 M1 型的活化, 同时 SCI 小鼠在沉默 lncRNA GBP9 4 周后双下肢运动能力较为改善并且在脊髓组织中检测到大量 M2 表型的小胶质细胞^[26]。这些研究结果表明, lncRNA 能通过调控基因进而改变小胶质细胞的极化方向促进 SCI 的修复, 为 SCI 的治疗提供新的见解。

3.2 lncRNA 对 SCI 后炎症的调节作用

SCI 产生细胞碎片并释放细胞内蛋白质, 这些物质通过一系列病理生理的反应导致常驻炎性细胞快速活化, 同时释放多种氧化应激调节因子、细胞因子、趋化因子、生长因子和其他炎症介质^[27]。这种 SCI 后产生的炎症反应极大的加重了 SCI 后的继发性损伤。不过近期的研究表明 lncRNA 调控 SCI 后的炎症刺激是一个非常潜力的方向。之前的一项研究表明, miR-30a-5p 在抗炎中起重要作用^[28]。而在大鼠 SCI 模型中, lncRNA 00707 通过海绵 miR-30a-5p 抑制 miR-30a-5p 表达, 沉默 lncRNA 00707 可以逆转 miR-30a-5p 的降低, 减少 TNF- α 和 IL-1 β 等炎症因子的释放, 进而减少 SCI 后的炎症^[29]。SCI 后, lncRNA MALAT1 的表达显著增加伴随着 IKK β /NF- κ B 信号通路的激活和促炎细胞因子表达的增加^[30]。IKK β 是 IKK 复合物的关键催化亚基, 是核因子- κ B (NF- κ B) 的活化中的关键角色, 而核因子是炎症的主要诱发因子^[31]。中枢神经系统中, NF- κ B 活化的抑制阻止免疫细胞表达某些促炎细胞因子, 例如白细胞介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 或 IL-1 β 。miR-199b 的下调已被证明可以通过 IKK β /NF- κ B 信号通路介导的小胶质细胞活化来促进急性 SCI 的过程^[32]。而 lncRNA MALAT1 也被证实可以通过 miR-199b/IKK β /NF- κ B 信号通路控制 SCI 后的炎症反应。此外, 抑制 lncRNA Airsci 在 SCI 后的表达, 也被证实是通过调节 NF- κ B 信号通路介导的炎症^[33], 抑制 lncRNA H19 则是通过靶向 miR-370-3p 调控 SCI 后 NF- κ B 信号通路介导的炎症^[34]。此外, 研究发现, lncRNA TUG1 的下调通过抑制抑制 SCI 后 Toll 样受体 4 (TLR4) 介导的炎症损伤^[35]。TLR4 也参与 SCI 后激活的 NF- κ B 信号通路。SCI 后所释放的炎症细胞因子在抑制 TLR4 后减少^[36]。TRIL 是 TLR4 的一种受体辅助蛋白, 在调节 TLR4 的激活及其下游炎症细胞因子 IL-1 的释放

中起重要作用^[37]。因此，lncRNA TUG1 对 TLR4 的抑制会减少 SCI 后炎症细胞因子的释放。在另一个大鼠 SCI 实验中发现，上调 lncRNA TUSC7 后，通过靶向 miR-449a 影响 PPAR- γ 的水平，进而使免疫细胞的活化能力减弱，同时降低炎症因子的表达^[38]。综上所述，lncRNA 在创伤性或非创伤性 SCI 相关的神经炎症过程中发挥重要作用。

3.3 lncRNA 与 SCI 后细胞凋亡的关系

细胞凋亡 (Apoptosis)，也称为程序性细胞死亡，是导致 SCI 后继发性损伤的重要原因之一，脊髓中所有的细胞在 SCI 后都可能会发生凋亡，比如神经元、少突胶质细胞和小胶质细胞等。近年来，多项研究表明，lncRNA 通过直接或间接调控促凋亡蛋白或抗凋亡蛋白的表达，进而在细胞凋亡中发挥作用。Gu 等人评估了 lncRNA XIST 在 SCI 发病机制中的作用。他们发现，下调 lncRNA XIST 抑制 SCI 细胞凋亡的作用机制依赖于海绵 miR-494，并进一步调控了 PTEN/PI3K/AKT 信号通路^[39]。而 PTEN 通过限制 AKT 与质膜的结合，从而降低其活性^[40]。PI3K/AKT 信号通路是控制包括 SCI 在内的多种细胞过程的主要决定因素^[41]。该途径对于神经细胞凋亡至关重要。Wang 等人对 SCI 大鼠进行检测后发现，lncRNA GAS5 在 SCI 后表达上调，敲低 lncRNA GAS5 通过靶向 VAV1 修复 SCI^[42]；随后 Cao 等人发现 lncRNA GAS5 可以直接与 miR-93 结合，并通过直接影响下游 PTEN 蛋白的表达量抑制 SCI 后细胞的凋亡^[43]。最近研究发现，lncRNA DGCR5 在 SCI 后上调，下调 lncRNA DGCR5 通过与 PRDM5 蛋白直接结合并对其负调控，进而对 SCI 后神经元凋亡表现出抑制作用。PRDM5 是辛指蛋白中表征不佳的亚家族成员，影响着各种生理过程，例如修饰染色体、影响角膜的发育以及肺癌进展等过程，同时，PRDM5 与一些 miRNA 的相互作用显著降低了凋亡蛋白的水平并抑制了神经元凋亡^[44]。同样，lncRNA BDNF-AS 的敲低已被鉴定为通过海绵化 miR-130b-5p 调控 PRDM5 来抑制神经元细胞凋亡^[45]。lncRNA LEF1-AS1 已被发现在肿瘤性疾病中具有重要地位，此外，研究发现，lncRNA LEF1-AS1 也影响着 SCI 的整个过程，Cui 等人基于体外细胞实验、体内动物实验得出结果 lncRNA LEF1-AS1 在 SCI 组织中上调，并且敲除 lncRNA LEF1-AS1 通过靶向 miR-222-5p 减少 RAMP3 的表达，进而减轻 SCI 后细胞凋亡和炎症损伤。而 RAMP3 可以诱导活性氧物激活和细胞凋亡^[46]。与上述敲低特定 lncRNA

引起的保护作用不同, 过表达 lncRNA Map2k4 通过调节 miR-199a/FGF1 通路抑制 SCI 后神经元的凋亡^[47]。FGF1 是一种多功能肽生长因子, 主要分布在中枢神经系统中^[48]。FGF1 通路对神经元的存活至关重要, 在中枢神经系统损伤修复中起重要作用。过表达 lncRNA TCTN2 通过增强细胞自噬来保护 SCI 后神经元免受凋亡^[49]。上调 lncRNA MIAT 通过与 Rbfox2 蛋白结合提高 Rbfox2 蛋白水平, 导致 Rbfox2 介导的 MCL-1 前体 mRNA 剪接模式转变为抗凋亡 MCL-1L, 减少神经细胞凋亡, 促进 SCI 的恢复。其中, Rbfox2 是组织特异性和信号响应选择性剪接的重要调节因子, 通过与碱基序结合发挥作用^[50]。虽然需要进一步的研究来验证 lncRNA 的治疗价值, 但这些研究表明 lncRNA 对抑制 SCI 后神经元的凋亡具有重要意义。

3.4 lncRNA 与 SCI 后神经性疼痛

神经性疼痛 (NP) 往往发生在神经损伤后的数天至数月, 主要表现为神经受损或神经性疾病所引起的疼痛^[51]。需要找寻治疗 SCI 后神经性疼痛的治疗方案或方向。据报道, lncRNA 的表达水平在 NP 动物模型的脊髓中发生了显著改变。趋化因子配体 13(CXCL13)和趋化因子受体 5(CXCR5)是外周和中枢神经系统病理反应的重要调节剂, Zhang 等人发现 NP 大鼠 lncRNA PVT1、CXCL13 和 CXCR5 的表达显著上调, 干扰 lncRNA PVT1 后可以通过 miR-186-5p/CXCL13/CXCR5 轴减少 SCI 大鼠的 NP 进展^[52]。Wen 等人报道, lncRNA FIRRE 的下调通过减少 HMGB1 的表达来缓解小鼠的神经病理性疼痛^[53]。此外, Zhang 等人构建了 SCI 后神经性疼痛的大鼠模型, 与对照组相比 lncRNA SNHG12 的表达成倍增加, 同时发现 lncRNA SNHG12 表达可由 Kruppel 样因子 2 (KLF2) 转录调节, 并且下调 lncRNA SNHG12 可以通过海绵 miR-494-3p 调节 RAN23D 的表达进而减缓大鼠的神经病理性疼痛^[54]。这些结果可能为将来 SCI 后的神经病理性疼痛的诊断或治疗药物的开发提供理论支持。

3.5 lncRNA 与 SCI 后血管生成

SCI 后的血管损伤不仅影响继发性组织损伤的进展, 而且还建立了一个新的环境, 可能促进慢性损伤脊髓的发生, 并且, SCI 后血管生成的程度和损伤神经功能的恢复密切相关据报道, 在小鼠 SCI 后, 恶劣的微环境阻止损伤范围内血管生成, 损害内源性修复。一种使用鞘内抗 Nogo-A 抗体的疗法目前正在进行 SCI

的实验,因为它可能会改善血管萌发和修复,并减少神经缺陷^[55]。这一证据证实,血管生成在 SCI 后的神经修复过程中起着关键作用,尤其是在慢性损伤阶段,许多因子和途径已被证明在调节血管生成中起重要作用。lncRNA 同样被发现参与 SCI 后血管的生成。Notch1 是一种常见的细胞因子,可以通过调节下游基因改变各种疾病的血管生成水平^[56]。lncRNA XIST 除了在 SCI 后神经细胞的凋亡中发挥作用,其被发现在 SCI 后血管的修复方面也发挥着功能。研究者们构建了 SCI 的大鼠模型,发现 lncRNA XIST 通过 miR-32-5p 和调节 Notch1 表达促进血管生成和提高微血管密度来增强内源性神经修复,而缺失 lncRNA XIST 则抑制血管生成和细胞发芽和迁移^[57]。这项发现说明 lncRNA 可能在内源性修复中发挥一定作用,并通过调控 miRNA 来促进 SCI 后血管的再生。

4.总结

在经济与工业高速发展的当下,SCI 的发生率逐年增高,并且由于 SCI 尚无有效的治疗方式,因此 SCI 依然是困扰全球医疗卫生的一大难题,迫切需要更深入的研究去寻找治疗方案。lncRNA 作为调控基因表观遗传的分子,如前所述,其在 SCI 后失调,从调控机制来看,lncRNA 可能在神经细胞凋亡、局部微环境的炎症、神经病理性疼痛以及血管再生等方面发挥作用,能够为 SCI 提供一种具有潜力的治疗方向。

但是,虽然目前对于 lncRNA 的研究有了一定进展,但对于 lncRNA 分子功能的研究依然是非常有限。首先,目前对于 lncRNA 的研究主要基于动物以及细胞实验,并且对 SCI 分子性质的研究主要集中在蛋白质编码基因上,想要具体实施到人体尚有较长的一段路要走;其次,虽然已经报道了 SCI 后 lncRNA 表达的改变,但是现在我们仍然需要将更多的研究重点聚焦于 lncRNA 的相互作用上,因为这些相互作用不应该只是限于它们作为 ceRNA 的功能,还必须更全面的研究它们的表达谱,比如涉及它们与环状 RNA 偶联的分析;最后,lncRNA 的应用还需要更合适的递送体系,包括怎样选用恰当的载体,实现高效、有针对性的递送目标以及更为完善的实验结构和系统。总之,lncRNA 已经被认为在 SCI 中起了许多复杂的功能和作用,并且可以在未来成为检测、评价、和治疗 SCI 的有希望的生物标志物。

参考文献

- [1] Lo J, Chan L, Flynn S. A Systematic Review of the Incidence, Prevalence, Costs, and Activity and Work Limitations of Amputation, Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, Back Pain, Multiple Sclerosis, Spinal Cord Injury, Stroke, and Traumatic Brain Injury in the United States: A 2019 Update[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2021, 102(1): 115-31.
- [2] Murphy O C, Messacar K, Benson L, Bove R, Carpenter J L, Crawford T, Dean J, DeBiasi R, Desai J, Elrick M J, Farias-Moeller R, Gombolay G Y, Greenberg B, Harmelink M, Hong S, Hopkins S E, Oleszek J, Otten C, Sadowsky C L, Schreiner T L, Thakur K T, Van Haren K, Carballo C M, Chong P F, Fall A, Gowda V K, Helfferich J, Kira R, Lim M, Lopez E L, Wells E M, Yeh E A, Pardo C A. Acute flaccid myelitis: cause, diagnosis, and management[J]. *Lancet*, 2021, 397(10271): 334-46.
- [3] Sun X, Jones Z B, Chen X M, Zhou L, So K F, Ren Y. Multiple organ dysfunction and systemic inflammation after spinal cord injury: a complex relationship[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 260-269.
- [4] Anjum A, Yazid M D, Fauzi Daud M, Idris J, Ng A M H, Selvi Naicker A, Ismail O H R, Athi Kumar R K, Lokanathan Y. Spinal Cord Injury: Pathophysiology, Multimolecular Interactions, and Underlying Recovery Mechanisms[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20) : 51-59.
- [5] Kyritsis N, Torres-Espín A, Schupp P G, Huie J R, Chou A, Duong-Fernandez X, Thomas L H, Tsolinas R E, Hemmerle D D, Pascual L U, Singh V, Pan J Z, Talbott J F, Whetstone W D, Burke J F, DiGiorgio A M, Weinstein P R, Manley G T, Dhall S S, Ferguson A R, Oldham M C, Bresnahan J C, Beattie M S. Diagnostic blood RNA profiles for human acute spinal cord injury[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(3):231-239.
- [6] Tan Y T, Lin J F, Li T, Li J J, Xu R H, Ju H Q. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2021, 41(2): 109-120.
- [7] Ali T, Grote P. Beyond the RNA-dependent function of LncRNA genes[J]. *Elife*, 2020, 9(2):9-18
- [8] Robinson E K, Covarrubias S, Carpenter S. The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(4): 194-209.

- [9] Lukowski S W, Lo C Y, Sharov A A, Nguyen Q, Fang L, Hung S S, Zhu L, Zhang T, Grünert U, Nguyen T, Senabouth A, Jabbari J S, Welby E, Sowden J C, Waugh H S, Mackey A, Pollock G, Lamb T D, Wang P Y, Hewitt A W, Gillies M C, Powell J E, Wong R C. A single-cell transcriptome atlas of the adult human retina[J]. *Embo j*, 2019, 38(18): 100-111.
- [10] Kopp F, Mendell J T. Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 393-407.
- [11] Herman A B, Tsitsipatis D, Gorospe M. Integrated lncRNA function upon genomic and epigenomic regulation[J]. *Mol Cell*, 2022, 82(12): 2252-2266.
- [12] Wang R, Li Y, Du P, Zhang X, Li X, Cheng G. Hypomethylation of the lncRNA SOX21-AS1 has clinical prognostic value in cervical cancer[J]. *Life Sci*, 2019, 233(2): 116-128.
- [13] Zhang X, Cui Y, Ding X, Lliu S, Han B, Duan X, Zhang H, Sun T. Analysis of mRNA-lncRNA and mRNA-lncRNA-pathway co-expression networks based on WGCNA in developing pediatric sepsis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1457-1470.
- [14] He Z, Yang D, Fan X, Zhang M, Li Y, Gu X, Yang M. The Roles and Mechanisms of lncRNAs in Liver Fibrosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(4) : 55-63.
- [15] Zhang M, Wang N, Song P, Fu Y, Ren Y, Li Z, Wang J. LncRNA GATA3-AS1 facilitates tumour progression and immune escape in triple-negative breast cancer through destabilization of GATA3 but stabilization of PD-L1[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(9): 128-135.
- [16] Statello L, Guo C J, Chen L L, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 96-118.
- [17] Panni S, Lovering R C, Porras P, Orchard S. Non-coding RNA regulatory networks[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2020, 1863(6): 194-207.
- [18] Zhang Z K, Li J, Guan D, Liang C, Zhuo Z, Liu J, Lu A, Zhang G, Zhang B T. A newly identified lncRNA MAR1 acts as a miR-487b sponge to promote skeletal muscle differentiation and regeneration[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(3): 613-26.
- [19] Yu Y, Cao F, Ran Q, Wang F. Long non-coding RNA Gm4419 promotes trauma-induced astrocyte apoptosis by targeting tumor necrosis factor α [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 491(2): 478-485.
- [20] Zhang X M, Zeng L N, Yang W Y, Ding L, Chen K Z, Fu W J, Zeng S Q, Liang Y R, Chen G

- H, Wu H F. Inhibition of LncRNA Vof-16 expression promotes nerve regeneration and functional recovery after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(1): 217-227.
- [21] Zhou X, Wahane S, Friedl M S, Kluge M, Friedel C C, Averampou K, Zachariou V, Guo L, Zhang B, He X, Friedel R H, Zou H. Microglia and macrophages promote corraling, wound compaction and recovery after spinal cord injury via Plexin-B2[J]. *Nat Neurosci*, 2020, 23(3): 337-350.
- [22] Kohno K, Shirasaka R, Yoshihara K, Mikuriya S, Tanaka K, Takanami K, Inoue K, Sakamoto H, Ohkawa Y, Masuda T, Tsuda M. A spinal microglia population involved in remitting and relapsing neuropathic pain[J]. *Science*, 2022, 376(6588): 86-90.
- [23] Zhou H J, Wang L Q, Zhan R Y, Zheng X J, Zheng J S. lncRNA MEG3 restrained the M1 polarization of microglia in acute spinal cord injury through the HuR/A20/NF- κ B axis[J]. *Brain Pathol*, 2022, 32(5): 130-137.
- [24] Wang X, Xia S, Li H, Wang X, Li C, Chao Y, Zhang L, Han C. The deubiquitinase USP10 regulates KLF4 stability and suppresses lung tumorigenesis[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(6):1747-1764.
- [25] Jiang Z S, Zhang J R. LncRNA SNHG5 enhances astrocytes and microglia viability via upregulating KLF4 in spinal cord injury[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 120(Pt A): 66-72.
- [26] Zhou J, Li Z, Wu T, Zhao Q, Zhao Q, Cao Y. LncGBP9/miR-34a axis drives macrophages toward a phenotype conducive for spinal cord injury repair via STAT1/STAT6 and SOCS3[J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 134-141.
- [27] Kigerl K A, De Rivero Vaccari J P, Dietrich W D, Popovich P G, Keane R W. Pattern recognition receptors and central nervous system repair[J]. *Exp Neurol*, 2014, 258: 516-524.
- [28] Weale C J, Matshazi D M, Davids S F G, Raghubeer S, Erasmus R T, KENGNE A P, Davison G M, Matsha T E. Circulating miR-30a-5p and miR-182-5p in Prediabetes and Screen-Detected Diabetes Mellitus[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13: 5037-5047.
- [29] Zhu S, Zhou Z, Li Z, Shao J, Jiao G, Huang Y E, Lin Y. Suppression of LINC00707 alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation and apoptosis in PC-12 cells by regulated miR-30a-5p/Neurod 1[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(11): 2049-2056.
- [30] Zhou H J, Wang L Q, Wang D B, Yu J B, Zhu Y, Xu Q S, Zheng X J, Zhan R Y. Long

- noncoding RNA MALAT1 contributes to inflammatory response of microglia following spinal cord injury via the modulation of a miR-199b/IKK β /NF- κ B signaling pathway[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(1): 52-61.
- [31] Perkons N D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(1): 49-62.
- [32] Zhou H J, Wang L Q, Xu Q S, Fan Z X, Zhu Y, Jiang H, Zheng X J, Ma Y H, Zhang R Y. Downregulation of miR-199b promotes the acute spinal cord injury through IKK β -NF- κ B signaling pathway activating microglial cells[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(1): 60-67.
- [33] Zhang T, Li K, Zhang Z L, Gao K, Lv C L. LncRNA Airsci increases the inflammatory response after spinal cord injury in rats through the nuclear factor kappa B signaling pathway[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(4): 772-777.
- [34] Li X, Qian Y, Tang K, Li Y, Tao R, Gong C, Hhang L, Zou K, Liu L. Inhibition of lncRNA H19/miR-370-3p pathway mitigates neuronal apoptosis in an in vitro model of spinal cord injury (SCI) [J]. *Transl Neurosci*, 2021, 12(1): 103-113.
- [35] Jia H, Ma H, Li Z, Chen F, Fang B, Cao X, Chang Y, Qiang Z. Downregulation of LncRNA TUG1 Inhibited TLR4 Signaling Pathway-Mediated Inflammatory Damage After Spinal Cord Ischemia Reperfusion in Rats via Suppressing TRIL Expression[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2019, 78(3): 268-282.
- [36] Li X Q, Wang J, Fang B, Tan W F, Ma H. Intrathecal antagonism of microglial TLR4 reduces inflammatory damage to blood-spinal cord barrier following ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Mol Brain*, 2014, 7(3): 28-36.
- [37] Wochal P, Rathinam V A, Dunne A, Carlson T, Kuang W, Serdl K J, Hall J P, Lin L L, Collins M, Schattgen S A, Mackay C R, Fagundes C T, Carpenter S, Fitzgerald K A, O'neill L A. TRIL is involved in cytokine production in the brain following Escherichia coli infection[J]. *J Immunol*, 2014, 193(4):1911-1919.
- [38] Yu Y, Zhu M, Zhao Y, Xu M, Qiu M. Overexpression of TUSC7 inhibits the inflammation caused by microglia activation via regulating miR-449a/PPAR- γ [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(2): 1020-1026.
- [39] Gu S, Xie R, Liu X, Shou J, Gu W, Che X. Long Coding RNA XIST Contributes to Neuronal

- Apoptosis through the Downregulation of AKT Phosphorylation and Is Negatively Regulated by miR-494 in Rat Spinal Cord Injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(4) : 103-109.
- [40] Stambolic V, Suzuki A, De La Pompa J L, Brothers G M, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger J M, Siderovski P, Mak T W. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN[J]. *Cell*,1998, 95(1): 29-39.
- [41] Luan Y, Chen M, Zhou L. MiR-17 targets PTEN and facilitates glial scar formation after spinal cord injuries via the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Brain Res Bull*, 2017, 128: 68-75.
- [42] Wang D, Xu X, Pan J, Zhao S, Li Y, Wang Z, Yang J, Zhang X, Wang Y, Liu M. GAS5 knockdown alleviates spinal cord injury by reducing VAV1 expression via RNA binding protein CELF2[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3628-3633.
- [43] Cao Y, Jiang C, Lin H, Chen Z. Silencing of Long Noncoding RNA Growth Arrest Specific 5 Alleviates Neuronal Cell Apoptosis and Inflammatory Responses Through Sponging microRNA-93 to Repress PTEN Expression in Spinal Cord Injury[J]. *Front Cell Neurosci*, 2021, 15(16): 646-653.
- [44] Zhang H, Wang W, Li N, Li P, Liu M, Pan J, Wang D, Li J, Xiong Y, Xia L. LncRNA DGCR5 suppresses neuronal apoptosis to improve acute spinal cord injury through targeting PRDM5[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(16): 1992-2000.
- [45] Zhang H, Li D, Zhang Y, Li J, Ma S, Zhang J, Xiong Y, Wang W, Li N, Xia L. Knockdown of lncRNA BDNF-AS suppresses neuronal cell apoptosis via downregulating miR-130b-5p target gene PRDM5 in acute spinal cord injury[J]. *RNA Biol*, 2018, 15(8): 1071-1080.
- [46] Cui S Y, Zhang W, Cui Z M, Yi H, Xu D W, Liu W, Zhu X H. Knockdown of long non coding RNA LEF1-AS1 attenuates apoptosis and inflammatory injury of microglia cells following spinal cord injury[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 6-13.
- [47] Lv H R. lncRNA-Map2k4 sequesters miR-199a to promote FGF1 expression and spinal cord neuron growth[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(3): 948-954.
- [48] Delmas E, Jah N, Pirou C, Bouleau S, Le Floch N, Vayssière J L, Mignotte B, Renaud F. FGF1 C-terminal domain and phosphorylation regulate intracrine FGF1 signaling for its neurotrophic and anti-apoptotic activities[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(2): 2079-2088.
- [49] Ren X D, Wan C X, Niu Y L. Overexpression of lncRNA TCTN2 protects neurons from

- apoptosis by enhancing cell autophagy in spinal cord injury[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(7): 1223-1231.
- [50] He X, Zhang J, Guo Y, Yang X, Huang Y, Hao D. LncRNA MIAT Promotes Spinal Cord Injury Recovery in Rats by Regulating RBFOX2-Mediated Alternative Splicing of MCL-1[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(8): 4854-4868.
- [51] Shiao R, Lee-kubli C A. Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury: Challenges and Research Perspectives[J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(3): 635-653.
- [52] Zhang P, Sun H, Ji Z. Downregulating lncRNA PVT1 Relieves Astrocyte Overactivation Induced Neuropathic Pain Through Targeting miR-186-5p/CXCL13/CXCR5 Axis[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(6): 1457-1469.
- [53] Wen Y, Fan X, Bu H, Ma L, Kong C, Huang C, Xu Y. Downregulation of lncRNA FIRRE relieved the neuropathic pain of female mice by suppressing HMGB1 expression[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(2): 841-852.
- [54] Zhang J, Zhao H, Zhang A, Zhao C, Mei Z, Yao H, Fan Z, Liang D. Identifying a novel KLF2/lncRNA SNHG12/miR-494-3p/RAD23B axis in Spare Nerve Injury-induced neuropathic pain[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 272-283.
- [55] Yang Y, Kimura-ohba S, Thompson J F, Salayandia V M, Cossé M, Raz L, Jalal F Y, Rosenberg G A. Vascular tight junction disruption and angiogenesis in spontaneously hypertensive rat with neuroinflammatory white matter injury[J]. *Neurobiol Dis*, 2018, 114: 95-110.
- [56] Gharaibeh L, Elmadany N, Alwosaibai K, Alshaer W. Notch1 in Cancer Therapy: Possible Clinical Implications and Challenges[J]. *Mol Pharmacol*, 2020, 98(5): 559-576.
- [57] Cheng X, Xu J, Yu Z, Xu J, Long H. LncRNA Xist Contributes to Endogenous Neurological Repair After Chronic Compressive Spinal Cord Injury by Promoting Angiogenesis Through the miR-32-5p/Notch-1 Axis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8(3): 744-753.