

## • 实验研究 •

脊髓损伤大鼠体内存在的非编码核糖核酸  
调控神经递质的调控途径梁国辉<sup>1</sup> 周英杰<sup>1△</sup> 谢艳<sup>1</sup> 柴旭斌<sup>1</sup> 嵇汉杰<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:验证脊髓损伤(SCI)大鼠体内存在的一条与 lncRNA H19/miR-185-5p/5-HT 轴相关的调控途径。方法:将 20 只 SD 大鼠分为模型组与实验组,实验组采用 T<sub>2</sub> 节段脊髓半横断法制作脊髓损伤大鼠模型,BBB 评分法确定造模成功后,取两组脊髓组织测定 5-HT 含量和 lncRNA H19 与 miR-185-5p 的表达,然后双荧光素酶报告基因实验证实 lncRNA H19 调控 miR-185-5p 的表达,而 miR-185-5p 调控 5-HT 的合成酶 Tph1 的表达。进而体外培养脊髓神经元细胞并进行免疫荧光鉴定,然后观察 lncRNA H19 和 miR-185-5p 对脊髓损伤大鼠神经元细胞 Tph1 和 5-HT 表达的影响。最后通过对模型组、实验组和 lncRNA H19 敲基因大鼠组的对比,确定模型组和 lncRNA H19 敲基因大鼠体内上调的 miR-185-5p 的含量和下调的 Tph1 的表达丰度。结果:脊髓损伤大鼠体内存在 lncRNA H19/miR-185-5p/Tph1 调控途径。结论:可以以 lncRNA H19/miR-185-5p/Tph1 通路中任何一个重要因子作为治疗靶点进行精准治疗或直接以调控 lncRNA H19 或 miR-185-5p 为治理手段,进行针对大鼠脊髓损伤的治疗。

**[关键词]** 脊髓损伤;长链非编码核糖核酸 H19;微小核糖核酸 185-5p;色氨酸羟化酶 1;5-羟色胺;调控途径

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)07-0006-06

**DOI:**10.20085/j.cnki.issn1005-0205.230702

A Regulatory Pathway of Non-Coding Ribonucleic Acid Regulating  
Neurotransmitters in Spinal Cord Injury RatsLIANG Guohui<sup>1</sup> ZHOU Yingjie<sup>1△</sup> XIE Yan<sup>1</sup> CHAI Xubin<sup>1</sup> ZHUO Hanjie<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Henan Luoyang Orthopedic Hospital (Henan Orthopedic Hospital), Luoyang 471002, Henan China.

**Abstract Objective:** To investigate a novel regulatory pathway involving lncRNA H19/miR-185-5p/5-HT axis in rats with spinal cord injury. **Methods:** Twenty SD rats were divided into two groups: the model group and the experimental group. Spinal cord injury (SCI) rat models were created in the experimental group using T<sub>2</sub> segmental spinal cord semi-transection. After confirming the modeling results using the BBB score, the levels of 5-HT and the expression of lncRNA H19 and miR-185-5p were measured in the spinal cord tissues of both groups. Subsequently, a double luciferase reporter assay was performed to confirm the regulation of miR-185-5p expression by lncRNA H19 and the regulation of 5-HT synthase Tph1 expression by miR-185-5p established and. In vitro cultures of spinal cord neurons were then identified using immunofluorescence. The effects of lncRNA H19 and miR-185-5p on the expression of Tph1 and 5-HT in spinal cord neurons of rats with spinal cord injury were observed. Finally, by comparing the model group, experimental group, and lncRNA H19 knockout rats, the levels of up-regulated miR-185-5p and down-regulated Tph1 expression were determined. **Results:** The lncRNA H19/miR-185-5p/Tph1 pathway was identified in rats with spinal cord injury. **Conclusion:** The components of the lncRNA H19/miR-185-5p/Tph1 pathway could serve as potential therapeutic targets for precision therapy in spinal cord injury. Directly regulating the expression of lncRNA H19 or miR-185-5p could be a potential therapeutic approach for spinal cord injury in rats.

**Keywords:** spinal cord injury; lncRNA H19; miR-185-5p; Tph1; 5-HT; regulatory pathway

基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2019ZY1036)

<sup>1</sup> 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)(河南 洛阳, 471002)

<sup>△</sup>通信作者 E-mail: xy17737203229@163.com

神经损伤难以恢复,尤其是脊髓损伤(Spinal Cord Injury, SCI)是全世界的难题,往往造成患者终生残疾

及经济负担,并引起很多社会心理问题<sup>[1-3]</sup>,因此国家支持有关脊髓损伤治疗的技术创新和研究。

脊髓损伤后可以通过抑制脊髓组织细胞凋亡、减小损伤部位及周围的炎症反应及促进神经再生几个方面进行治疗。而关于其损伤的机理及各调控路径相关报道也很多<sup>[4-5]</sup>,其中与非编码 RNA 相关的也有一些相关报道<sup>[6-7]</sup>,均是微小 RNA(miRNA)或长链非编码 RNA(lncRNA)调控了细胞凋亡、焦亡,或相关炎症因子等。笔者在研究中发现脊髓损伤后肌痉挛大鼠体内存在一个和 lncRNA H19 调控神经递质相关的作用途径,检索资料尚未见报道,现详述如下,希望为脊髓损伤的治疗提供新的作用靶点和治疗手段。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SPF 级 SD 大鼠 40 只(动物许可证号为 SCXK(豫)2019-0002),雄性,体重为 200~240 g,由河南省实验动物中心提供。动物的饲养环境温度为 20~24 ℃,湿度为 50%~70%,12 h/12 h 明暗交替,环境噪音<50 dB。出生 3 d 的 SPF 级 SD 大鼠 4 只(动物许可证号为 SCXK(豫)2019-0002),购回即处死;lncRNA H19 敲基因大鼠 4 只(动物许可证号为 SCXK(粤)2020-0055),SPF 级,雄性,体重为 200~240 g,由广州赛业百沐生物科技有限公司提供。

### 1.2 药物和试剂

三氯甲烷(国药集团化学试剂有限公司,货号为 10006818);RNA 提取液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G3013);无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司,货号为 10009218);异丙醇(国药集团化学试剂有限公司,货号为 80109218);2×SYBR Green qPCR Master Mix (None ROX)(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G3320);Servicebio® RT First Strand cDNA Synthesis Kit(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G3330);RIPA 裂解液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G2002);BCA 蛋白定量检测试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G2026);磷酸化蛋白酶抑制剂(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G2007);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为 G2003)。

### 1.3 仪器和分析软件

荧光定量 PCR 仪(Bio-rad 公司,美国,型号为 CFX);超微量分光光度计(Thermo 公司,美国,型号为 NanoDrop2000);台式高速冷冻型微量离心机(DragonLab 公司,美国,型号为 D3024R);数显钟摆摇床(Servicebio,美国,型号为 DS-S100);垂直电泳仪(Servicebio,美国,型号为 SVE-2);超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物,型号为 JY92-11N);超微量核酸蛋白

浓度测定仪(Thermo Fisher,美国,型号为 nanodropone);化学发光仪(上海勤翔科学仪器有限公司,批号为 6100);灰度分析软件(Alpha Innotech,澳大利亚, alphaEaseFC);图像分析软件(Adobe,美国, Adobe PhotoShop)。

### 1.4 方法

**1.4.1 动物造模及给药** 20 只 SD 大鼠随机分为正常对照组和模型组,每组 10 只。模型组动物采用 3% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行腹腔麻醉,采用 T<sub>2</sub> 节段脊髓半横断法制作脊髓损伤大鼠模型<sup>[8]</sup>,缝合伤口,肌注 12 U 青霉素钠抗感染,动物麻醉清醒后即刻出现摆尾、双下肢抽搐或尿失禁等现象。手术 3 d 后模型组存活 7 只大鼠,正常对照组大鼠全部存活,根据 BBB 评分法对肌痉挛程度进行判断和记录,确定造模成功。

**1.4.2 脊髓组织内 5-HT 测定** 大鼠麻醉后脱颈椎全部处死,取手术部位脊髓组织,取一部分称重,加入 9 倍量 PBS,匀浆器匀浆。然后放入离心机,离心速率为 3 000 r/min,离心时间为 20 min,收取上清液,用 ELISA 试剂盒测定 5-HT 水平。

**1.4.3 脊髓组织内 H19 和 miR-185-5p 的测定** 采用 Trizol 试剂提取各组脊髓组织中总 RNA,超纯水(无 RNA 酶、DNA 酶)溶解,检测浓度和纯度。使用 Taqman microRNA RT Kit,以管家基因 U6 和  $\beta$ -actin 作为内参,检测 miR-185-5p 和 H19 的相对表达量,引物序列见表 1。先逆转录成 cDNA,使用 SYBR Green PCR MasterMix 作为核酸染料,配制好反应体系:cDNA 1  $\mu$ L,上游引物(5  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L,下游引物(5  $\mu$ mol/L) 2  $\mu$ L,SYBR Green PCR MasterMix 10  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L。用 ABI Stepone Plus 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,反应条件为:95 ℃,10 min;40 个 PCR 循环(95 ℃,10 s;60 ℃,60 s);记录循环阈值(Cycle Threshold,Ct),采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法比较样品间的表达差异。

**1.4.4 双荧光素酶报告基因实验验证 H19 与 miR-185-5p,miR-185-5p 与 Tph1 之间的调控关系** 采用 miRNA 靶基因预测网站预测 miR-185-5p 与 H19 的结合位点,根据结合位点设计好突变序列和靶序列,并添加酶切位点,PCR 合成目标片段 H19-3'UTR 野生型(WT)和突变型(MUT),然后克隆到 pmirGLO 载体中。分别将 miR-185-5p mimics 与 pmirGLO-H19-WT/MUT 重组质粒共转染 293 T 细胞。对照用 miR-185-5p Scramble 阴性对照与 H19 的野生型或突变型重组质粒共转染。转染过程完成后,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48 h,更换 1 mL 含 10% 胎牛血清、无抗生素的常规 DMEM 培养基,继续培养 48 h 裂解细胞。每组取用 5  $\mu$ L 细胞裂解液,按荧光素酶活性检测

表 1 PCR 法检测脊髓组织内 H19 和 miR-185-5p 表达的引物序列

引物		引物序列	产物尺寸/bp
miR-185-5p	正向	5'-GGTGGAGAGAAAGGCAGTTC-3'	78
	反向	5'-GTCGGTGTCGTGGAGTCG-3'	
U6	正向	5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'	89
	反向	5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'	
H19	正向	5'-GGCCTTCCTGAACACCTTAG-3'	141
	反向	5'-AGCTGGGTAGCACCATTCT-3'	
β-actin	正向	5'-CGAGTACAACCTTCTTGCAGC-3'	202
	反向	5'-ACCCATACCCACCATCACAC-3'	

试剂盒(Promage)的操作说明书检测荧光相对强度,将海肾荧光值做为内参,使用荧光仪测定荧光强度,以各组荧光强度除以内参作为各组的相对荧光强度。观察突变组较野生组荧光强度是否提高,证实 H19 可以直接调控 miR-185-5p 表达。同样的方法证明 miR-185-5p 调控 Tph1 的表达。

**1.4.5 脊髓神经元细胞的培养及鉴定** 取 3 d 的新生大鼠,用 75%的乙醇浸泡,冰上解剖,在冰浴的 PBS 中分离脊髓, PBS 洗涤 2~3 次,剪碎,用 0.25% Trypsin + 0.1% I 型胶原酶 37℃水浴振荡消化 30 min,每隔 10 min 取出离心管,轻轻吹打组织,用含 FBS 的培养基终止消化,过 100 μm 滤网,收集滤液,300g 离心 5 min,用完全培养基重悬沉淀,铺瓶。待细胞生长至对数期,取 3 片玻璃片于 24 孔板中,每孔加入培养基 1 mL,加入细胞 2×10<sup>4</sup> 个/孔,置培养箱过夜。细胞爬片后,吸出培养基,用 PBS 洗 1 遍,加入 4% PFA 于 4℃固定 30 min。用 PBS 洗 3 次,5 min/次。然后将玻片除去水分,取 50 μL 破膜封闭液滴于防水膜上,将玻片上有细胞的一面盖上 2 h 进行破膜封闭。取 50 μL 一抗于防水膜上(湿盒中),将玻片(有细胞的一面)盖上于 4℃进行二抗孵育,室温避光孵育二抗(二抗:PBS=1:500)2 h 后, PBS 洗 3 次,5 min/次,染 DAPI(DAPI:PBS=1:1 000)5 min, PBS 洗 3 次,5 min/次。然后玻片上各滴 1 滴 Fluoromount-G,将有细胞的一面盖上进行包埋。免疫荧光鉴定特异性蛋白。

**1.4.6 lncRNA H19/miR-185-5p 轴对体外培养的大鼠脊髓神经元细胞中 Tph1 表达的影响** 取脊髓损伤大鼠和正常大鼠的脊髓神经元细胞按照以上方法进行培养,待到对数生长期,分为正常对照组(正常大鼠脊髓神经元细胞加入培养液)、模型组(脊髓损伤大鼠脊髓神经元细胞加入正常培养液)、H19 Inhibitor 组(脊髓损伤大鼠脊髓神经元细胞在培养液里加入 H19 inhibitor 50 μmol/L)、H19 mimics 组(脊髓损伤大鼠脊髓神经元细胞在培养液里加入 H19 mimics 30 μmol/L)和 miR-185-5p inhibitor 组(脊髓损伤大

鼠脊髓神经元细胞在培养液里加入 miR-185-5p inhibitor 50 μmol/L),每组重复 6 个孔。2 d 后提取总蛋白,按照 BCA 试剂盒法定量后,进行电泳:上层胶使用低电压恒压电泳,80 V,30 min;下层胶使用高电压恒压电泳,120 V,1 h。停止电泳后进行转膜,转膜结束后,断开电源将膜取出,剪取待测膜,用 1×TBST 漂洗 10 min,加入 5%脱脂奶粉进行非特异性抗体封闭,室温 1 h。加入兔抗鼠一抗,4℃反应过夜,加入羊抗兔二抗,室温反应 2 h,弃去二抗,1×TBST 漂洗 3 次,每次 10 min,振荡。加入 ECL 发光剂,与带辣根过氧化物酶的二抗进行反应,用 Bio-Rad 凝胶成像系统分析条带的信号灰度。

**1.4.7 培养的脊髓神经元细胞内 5-HT ELISA 检测** 同以上方法分组及处理的脊髓神经元细胞,2 d 后 3 000 r/min 离心 10 min,取上清,按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行操作,检测每个孔中 5-HT 表达水平。

**1.4.8 H19 敲基因鼠对脊髓组织 miR-185-5p 和 Tph1 表达的影响** 正常对照组、模型组和敲基因大鼠各 4 只,取一半脊髓组织,按照 1.4.3 节方法测定脊髓组织内 miR-185-5p 的相对表达量。然后取另一半脊髓组织,BCA 法测蛋白浓度,根据蛋白浓度取用合适量蛋白,加 5×SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)上样缓冲液煮沸 5 min,SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜上,用含 70 g/L 脱脂奶粉的含 0.1% Tween-20 的 Tris-Hcl 缓冲盐溶液(TBST)封闭液置摇床上封闭 2 h,经 1×TBST 充分漂洗(5 min/次,3 次),加入兔抗鼠 Tph1 多克隆抗体(稀释度为 1:1 000),4℃摇床过夜,充分漂洗后再加入山羊抗兔二抗(稀释度为 1:1 000),室温摇床上孵育 2 h,充分漂洗,采用化学发光法显色。然后采用 Actin 做内参重复以上的步骤。用 Image-Pro Plus6.0 软件分析图像,观察脊髓损伤大鼠脊髓组织内 Tph1 表达情况。

2 结果

**2.1 造模成功的鉴定与大鼠脊髓组织 5-HT 的含量** 正常对照组一切活动正常,BBB 评分均为 20 分。模型组下肢活动不力,评分为 2~4 分,与正常对照组

的差异有统计学意义( $P<0.01$ ),证明造模成功,见表 2。

表 2 造模 3 d 后各组大鼠 BBB 评分及脊髓组织 5-HT 含量( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数 /例	BBB 评分 /分	5-HT 含量 /(pg·mL <sup>-1</sup> )
正常对照组	10	20±0	6.953±1.263
模型组	7	3.286±1.113	5.216±0.876
F		48.195	3.136
P		<0.001	0.007

2.2 模型组与正常对照组 H19 及 miR-185-5p 表达

PCR结果显示,造模 3 d 后模型组脊髓组织内 H19 含量较正常对照组降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );而 miR-185-5p 表达量较正常对照组升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 1 及图 2。

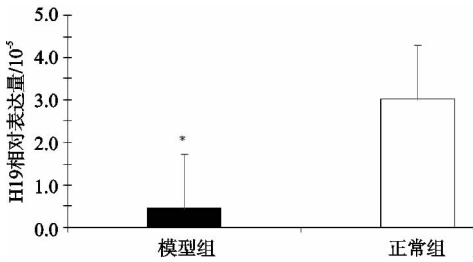


图 1 造模 3 d 后脊髓组织 H19 相对表达量

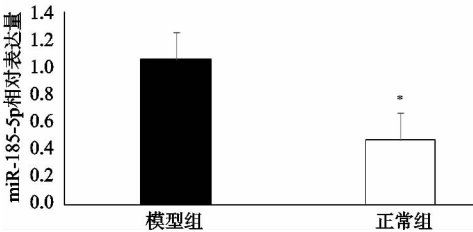


图 2 造模 3 d 后脊髓组织 miR-185-5p 相对表达量

2.3 双荧光素酶报告基因实验结果

双荧光酶报告基因实验结果显示,突变后 H19 与 Tph1 同 miR-185-5p 的结合活性较突变前均下降, H19 与 Tph1 的相对荧光表达强度均提高,说明突变前由于 H19 与 Tph1 同 miR-185-5p 的结合活性较高,所以荧光表达较低;而突变后两者降低了与 miR-185-5p 的结合从而被释放,使得标记的荧光被较强地检测出,提示 H19 与 Tph1 同 miR-185-5p 之间分别存在直接调控关系,见图 3 及图 4。

2.4 H19 敲基因鼠对脊髓组织 miR-185-5p 表达的影响

PCR的结果显示,模型组 miR-185-5p 表达量较正常对照组高,差异有统计学意义( $P<0.01$ );H19 敲基因大鼠 miR-185-5p 的表达较正常组高,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),见图 5。

2.5 脊髓神经元的培养及鉴定结果

刚接种的细胞分散呈圆形、胞质均匀、胞体透亮、

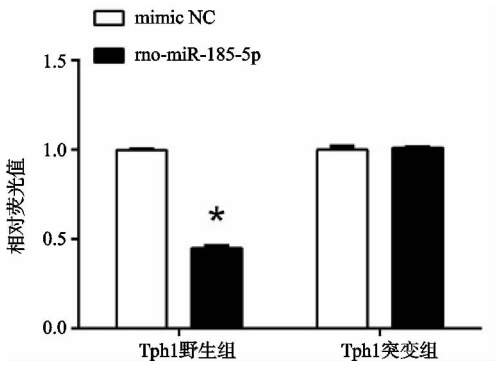


图 3 双荧光素酶报告基因实验验证 miR-185-5p 调控 Tph1 的表达

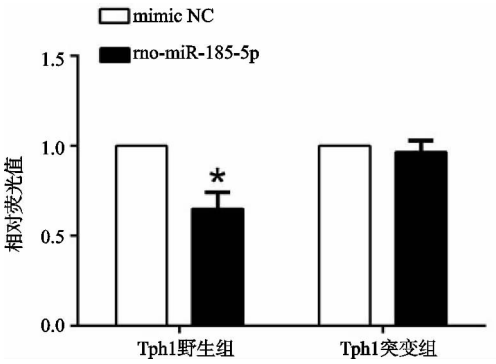


图 4 双荧光素酶报告基因实验验证 H19 调控 miR-185-5p 的表达

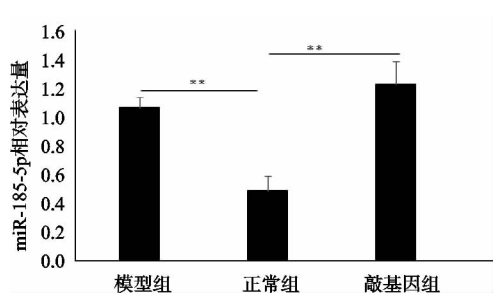


图 5 脊髓组织中 miR-185-5p 的相对表达量

周围有光晕,48 h 后突起变长,表现为明显的神经细胞形态(见图 6)。经免疫荧光染色后,神经元树突标志物 MAP2 和神经干细胞分子标志物 nestin 染色均为阳性(见图 7 及图 8),表明培养的细胞为神经细胞。

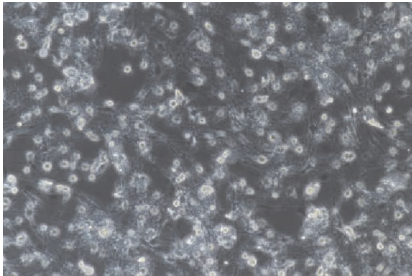


图 6 脊髓神经元培养 48 h 后形状(×200)

2.6 培养的脊髓神经元细胞内 Tph1 Western Blot 检测结果

H19mimics 组和 miR-185-5pinhibitor 组均引起

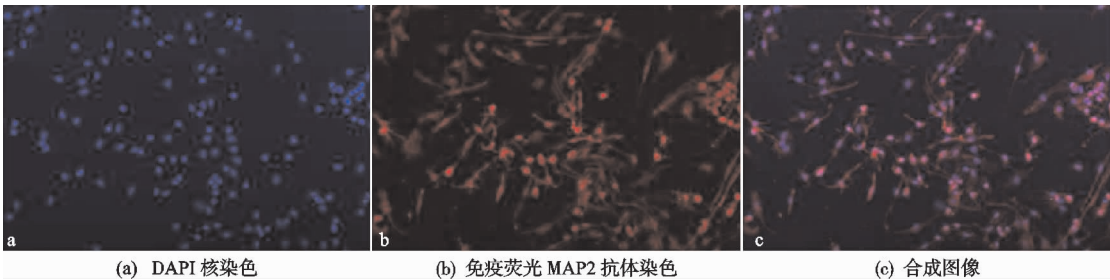


图 7 神经元树突标志性蛋白 MAP2 免疫荧光染色(×200)

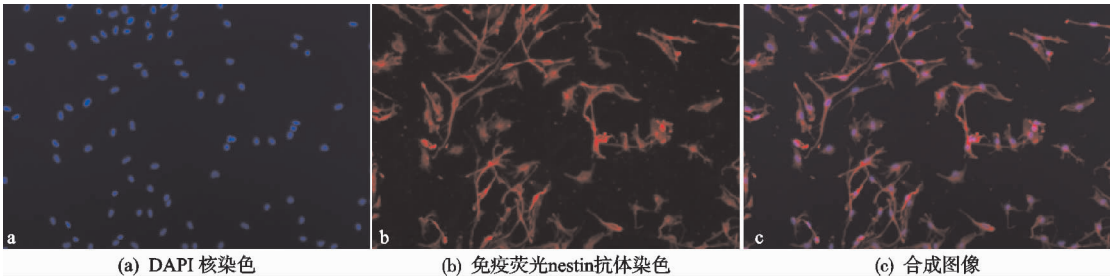


图 8 神经干细胞标志性蛋白 nestin 免疫荧光染色(×200)

Tph1 的高表达,与正常对照组的表达丰度相当;而 H19 inhibitor 组和模型组 Tph1 表达相当(均下调),见图 9。

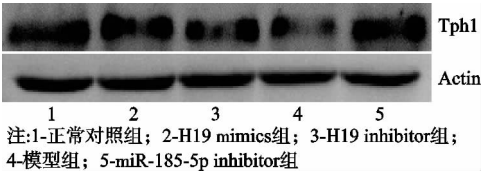


图 9 各组培养的细胞内 Tph1 表达情况

2.7 培养的脊髓神经元细胞内 5-HT ELISA 检测结果

培养的脊髓神经元细胞内 5-HT ELISA 检测结果见表 3,模型组 5-HT 含量较正常对照组明显减少,差异有统计学意义( $P<0.01$ );而 H19 mimics 和 miR-185-5p inhibitor 可以逆转这一现象,H19 innibitor 则降低了 5-HT 的表达。

表 3 培养的脊髓神经元细胞内 5-HT ELISA 检测结果( $\bar{x}\pm s$ )

组别	例数/例	5-HT/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
正常对照组	6	$7.789\pm1.102^{1)}$
H19 mimics 组	6	$8.001\pm1.256^{1)}$
H19 inhibitor 组	6	$4.982\pm1.099^{2)}$
模型组	6	$4.665\pm0.884^{2)}$
miR-185-5p inhibitor 组	6	$7.510\pm1.859^{1)}$
<i>F</i>		9.634
<i>P</i>		$<0.001$

注:1)与模型组比较, $P<0.01$ ;2)与正常对照组比较, $P<0.01$ 。

2.8 H19 敲基因鼠对脊髓组织 Tph1 表达的影响

Western Blot 结果显示,模型组和敲基因组大鼠脊髓组织内 Tph1 表达均较正常对照组降低,见图 10。

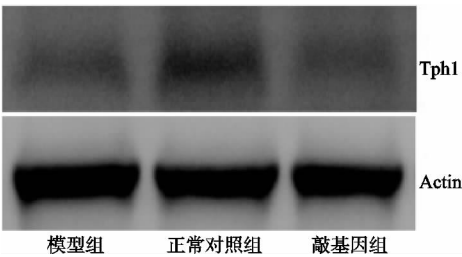


图 10 各组大鼠脊髓组织内 Tph1 的表达

3 讨论

主流观点认为 5-HT 在大鼠脊髓损伤后脊髓组织中的表达降低<sup>[9]</sup>,实施各种治疗手段时会升高,从而对脊髓损伤产生疗效,而有小部分研究认为其在脊髓损伤后会升高,笔者的实验符合主流观点。5-HT 含量的降低有两个因素,一是其合成酶含量降低,二是其降解酶含量升高。笔者进一步的实验发现,脊髓损伤后其合成酶 Tph1 降低,这是导致 5-HT 含量降低的直接原因。

Tph1 作为合成酶的一种,其结构为蛋白质,表达受到 miRNA 的调控<sup>[10]</sup>。因此,笔者分析了大鼠脊髓损伤后体内非编码 RNA 的调控网络,miRNA 在对靶基因的调控中起着很重要的作用,这也是近年生命科学研究的热点领域之一。近几年的研究表明,miRNA 在脊髓损伤后的病理变化中充当了重要角色<sup>[11]</sup>。基于 miRNA 的疗法主要包括两种:1)抑制疗法。人工合成某种 miRNA 的抑制剂(miRNA inhibitor),其序列与内源性 miRNA 互补,投入体内后通过特异性靶向作用结合某一内源性 miRNA,削弱内源性 miRNA 对有利基因的沉默作用,促进有利基因的表达。2)替代疗法。人工合成某种 miRNA 的模拟物(miRNA mimics)投放到体内后,可以模拟该内源性 miRNA 的功能,以达到治疗效

果<sup>[12]</sup>。脊髓损伤后有多种miRNA有不同程度的上调或下降,其中一些miRNA已被确认为脊髓损伤的重要调控因子,可以通过多种方式影响脊髓损伤的病理生理过程,如参与神经修复、细胞凋亡、氧化应激反应、炎症反应及血管再生等<sup>[13]</sup>。研究结果显示<sup>[14]</sup>,人脊髓损伤后的脑脊液中有 204 个 miRNA 与损伤的严重程度显著相关,其中 139 个表达和损伤程度成正相关,65 个表达负相关。检索生物信息学网站发现一些可以调控 Tph1 的 miRNA,其中包括 miR-185-5p,而笔者的前期研究发现脊髓损伤后 miR-185-5p 表达发生变化。笔者检索文献发现 H19 可以调控 miR-185-5p 表达<sup>[15]</sup>,所以笔者推测脊髓损伤后体内存在 H19/miR-185-5p/Tph1 调控网络,通过该网络调节 5-HT 的表达,从而对脊髓损伤产生影响。

lncRNA H19 很可能作为 ceRNA 对 miR-185-5p 起到竞争性抑制作用。H19 基因是很早被发现具有功能的 lncRNA 之一,H19 基因序列高度保守,它可以通过多种模式参与调控疾病的发生发展和生物学过程<sup>[16]</sup>。大鼠体内只发现一种 H19 转录本,H19 发挥调控功能的多样化分子机制主要包括:1) H19 可编码生成 miR-675-5p/3p,通过 miR-675-5p/3p 发挥调控功能。2) H19 可作为 ceRNA,通过竞争性结合 miRNA 发挥其调控功能。3) H19 可通过与蛋白质结合形成复合体,这可作为桥梁介导蛋白质之间的相互作用<sup>[17]</sup>。笔者利用 Targetscan 和 miRDB 数据库发现 miR-675-5p/3p 与 Tph1 之间没有调控关系<sup>[18]</sup>,所以排除了第一种可能;而 H19 与 miR-185-5p 之间有 6 个结合位点,提示 H19 可能以 ceRNA 机制调控 miR-185-5p 的表达。所以有理由推测大鼠体内存在 lncRNA H19/miR-185-5p/Tph1 调控途径,H19 可以通过竞争性抑制作用吸附 miR-185-5p 从而解除 miR-185-5p 对 Tph1 的抑制作用,升高脊髓损伤后损伤部位组织中 5-HT 的表达,达到治疗脊髓损伤后肌痉挛的目的。一方面为各种治疗手段提供新的作用靶点,另一方面调控 lncRNA H19 或 miR-185-5p 的表达可以直接起到治疗脊髓损伤的作用。

## 参考文献

- [1] 白广超,金宏亮,雷堃,等.骨形态发生蛋白 7 促进大鼠急性脊髓损伤后神经功能修复的研究[J].新疆医学,2018,48(11):1153-1157.
- [2] 万然,史旭,刘京松,等.间充质干细胞分泌组治疗脊髓损伤的研究进展[J].中国组织工程研究,2021,25(7):1088-1095.
- [3] FLETT H,WIEST M J,MUSHAHWAR V,et al. Development of tissue integrity indicators to advance the quality of spinal cord injury rehabilitation:SCI-high project[J].J Spinal Cord Med,2019,42(Suppl 1):196-204.

- [4] LIU H T,ZHANG J J,XU X X,et al. SARM1 promotes neuroinflammation and inhibits neural regeneration after spinal cord injury through NF- $\kappa$ B signaling[J].Theranostics,2021,11(9):4187-4206.
- [5] WU C Y,CHEN H W,ZHUANG R,et al. Betulinic acid inhibits pyroptosis in spinal cord injury by augmenting autophagy via the AMPK-mTOR-TFEB signaling pathway[J].Int J Biol Sci,2021,17(4):1138-1152.
- [6] GE X H,TANG P Y,RONG Y L,et al. Exosomal miR-155 from M1-polarized macrophages promotes EndoMT and impairs mitochondrial function via activating NF- $\kappa$ B signaling pathway in vascular endothelial cells after traumatic spinal cord injury[J].Redox Biol,2021,41:101932.
- [7] XU S,WANG J,JIANG J Y,et al. TLR4 promotes microglial pyroptosis via lncRNA-F630028O10Rik by activating PI3K/AKT pathway after spinal cord injury [J].Cell Death Dis,2020,11(8):693.
- [8] 胡炜,关方霞,孙剑瑞,等.定量半横断刀改进大鼠脊髓半横断块状缺损模型[J].中国修复重建外科杂志,2012,26(4):416-420.
- [9] 孟鑫,张向,张超,等.大鼠脊髓损伤致痉挛后五羟色胺 1D 受体的表达[J].中国老年学杂志,2022,42(13):3260-3264.
- [10] 陈云,周小龙,王恩多.苏氨酰-tRNA 合成酶的功能及其在药物开发中的应用[J].生命科学,2018,30(11):1236-1243.
- [11] 晓颖,华玮,浦清,等.神经元特异性烯醇化酶在急性脊髓损伤中的研究进展[J].浙江医学,2021,43(14):1589-1592.
- [12] 徐博扬,胡长龙.miRNA 药物的发展前景[J].中国医药导刊,2022,24(2):122-126.
- [13] 段昭远,吴明莉,罗萌,等.脊髓损伤后神经元铁死亡:谷胱甘肽过氧化物酶 4 的调控[J].中国组织工程研究,2022,26(12):1956-1962.
- [14] 华威天,赵跃军,张磊,等.脊髓损伤相关的微小 RNA[J].中华实验外科杂志,2020,37(11):2177-2180.
- [15] 李峰,刘翠中,伍媛.lncRNA-H19 通过抑制 miR-185-5p 的表达促进成骨细胞的增殖[J].湖南师范大学学报(医学版),2021,18(4):13-17.
- [16] 龚翠兰,杨仁义,傅馨莹,等.lncRNA-H19 靶向 miR-145-5p 通过 JAK2/STAT3 调节大鼠脑血管平滑肌细胞增殖和迁移[J].湖南中医药大学学报,2022,42(3):373-379.
- [17] 李发靖,陈鹏,杨仁华,等.lncRNA 调控细胞自噬的分子机制及在神经系统疾病中的研究进展[J].中国比较医学杂志,2021,31(3):111-116.
- [18] 于士柱,王虔.I 级神经上皮组织起源肿瘤的特征及分子遗传学研究进展[J].中国神经肿瘤杂志,2008,6(2):79-84.

(收稿日期:2022-11-17)