

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.07.013

实验研究

脊髓康对脊髓损伤模型大鼠血清外泌体中 miRNA 表达的影响

吴承杰^{1,2}, 马勇^{1,2}, 郭杨^{1,2✉}, 周雨昕², 涂鹏程^{1,2}, 杨光露^{1,2}, 孙杰^{1,2}, 潘娅岚³

1. 南京中医药大学附属医院, 江苏省南京市秦淮区汉中中路 155 号, 210029; 2. 南京中医药大学骨伤修复与重建新技术实验室; 3. 南京中医药大学慢性病中医护理干预实验室

摘要 目的 探讨脊髓康治疗脊髓损伤的可能作用机制。方法 将 80 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、强的松组和脊髓康组, 每组 20 只。除假手术组外其余各组大鼠采用改进 Allen's 方法建立脊髓损伤模型, 假手术组大鼠脊髓暴露但未受伤。造模后假手术组和模型组大鼠给予生理盐水 20 ml/(kg·d) 灌胃, 强的松组大鼠给予强的松溶液 60 mg/(kg·d) 灌胃, 脊髓康组大鼠给予脊髓康溶液 25 g/(kg·d) 灌胃。各组大鼠分别于术后 7、14、21 和 28 天进行指标观察, 每个时间点 5 只。大鼠的运动功能采用双后肢运动功能评分 (BBB 评分) 和斜板试验评价, 采集血清后提取外泌体并用外泌体标志蛋白 (Tsg101、CD63、CD9) 进行鉴定, 检测损伤区 RhoA、ROCK 蛋白及 mRNA 表达, 并检测外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 表达。结果 与假手术组同时间比较, 模型组大鼠斜板试验角度和 BBB 评分均降低, 模型组在术后 7、28 天时 RhoA 蛋白及 mRNA 表达升高, 术后 28 天时 ROCK 蛋白及 mRNA 表达升高, 术后 7、28 天时外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 表达降低 ($P < 0.05$); 与模型组同时间比较, 脊髓康组和强的松组大鼠在术后 21、28 天时斜板试验角度和 BBB 评分增加, 术后 28 天时 RhoA、ROCK 蛋白及 mRNA 表达均降低, 外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 表达均升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 脊髓康可能通过促进急性脊髓损伤模型大鼠血清外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 表达, 进而抑制 RhoA/ROCK 通路, 从而修复脊髓损伤, 改善大鼠的运动功能, 在 28 天时作用最明显。

关键词 脊髓损伤; 脊髓康; 运动功能; 外泌体; 微小 RNA

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种中枢神经系统严重受损的疾病, 病理过程复杂, 而且后期康复困难, 其发病率逐年攀升, 亟待找到降低致残率的治疗方法^[1-2]。《难经》记载, 督脉“起于下极之俞, 并于脊里, 上至风府, 入属于脑”, 故督脉循行路线与脊髓解剖位置关系密切, 而督脉虚损并非是独立存在的, 常与肾脉亏虚互相关联, 故我们认为 SCI 的病机核心为“肾督虚损, 瘀阻督脉, 枢机统率失职”。脊髓康即是在该理论指导下创立的中药复方, 临床上治疗 SCI 卓有成效^[3-4]。

近年来, 作为细胞间信号传导者的外泌体不仅在局部起作用, 而且在全身发挥作用^[5-6]。外泌体来源的 miR-21、miR-126 和 miR-133b 可促进脊髓损伤修复, 是治疗 SCI 的潜在新靶标^[7-10]。本实验将探究脊髓康对 SCI 模型大鼠外泌体中微小 RNA (miRNA) 的影响, 探讨脊髓康促进 SCI 大鼠修复的可能作用机制。本研究方案经南京中医药大学动物伦理委员会批准 (201909A004)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 体质量 180 ~ 200 g, 购自南京市青龙山动物繁殖场, 实验动物许可证号 SYXK (苏) 2018-0049, 饲养于南京中医药大学动物实验中心恒温恒湿动物房, 给予足量普通饲料与饮用水, 每笼 5 只, 每 3 日换 1 次垫料。

基金项目: 国家自然科学基金 (81704100, 81973885); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX20_1533); 江苏高校优势学科 (中西医结合) 建设工程资助项目 (苏政办发 [2018] 87 号); 江苏高校“青蓝工程”资助项目 (苏教师 [2018] 12 号)

✉ 通讯作者: drguoyang@126.com, 13451918933

1.2 药物

脊髓康方已获得国家发明专利, 专利号: ZL200910026193.7, 组成: 黄芪 30 g, 丹参 20 g, 川芎 10 g, 赤芍 12 g, 当归 12 g, 水蛭 10 g, 蜈蚣 1 条, 酒大黄 10 g, 泽泻 10 g, 茯苓 10 g, 枳实 10 g, 厚朴 10 g, 肉苁蓉 10 g, 淫羊藿 10 g, 土鳖虫 10 g, 车前子 15 g, 益智仁 10 g。药物购自江苏省中医院, 称取单倍处方量药材, 加 10 倍水量, 常规煎煮, 滤液浓缩至 1.25 g/ml, 4℃ 保存备用。强的松片 (5 mg/片, 辰欣药业股份有限公司, 批号: H37021900), 取 900 mg 研成粉末溶于 300 ml 生理盐水, 4℃ 保存备用。

1.3 主要试剂及仪器

1% 戊巴比妥钠 (中国医药集团上海化学试剂公司, 批号: F20020915); Exo-spin™ 外泌体试剂盒 (Cell Guidance 公司, 批号: EX02-25); Tsg101 (批号: ab125011)、CD63 (批号: ab217345)、CD9 (批号: ab92726) 一抗, Abcam 公司; RhoA (批号: 2117)、Rho 相关激酶 (ROCK, 批号: 4035) 一抗, CST 公司; HRP 标记山羊抗鼠二抗 (批号: GB23303)、HRP 标记山羊抗兔二抗 (批号: GB23301), 谷歌生物科技有限公司; RNAiso for Small RNA (批号: 9753)、RNAiso Plus (批号: 9109)、TB Green Premix Ex Taq™ II (批号: 820A)、MiR-X miRNA qRT-PCR TB Green 试剂盒 (批号: 638314), Takara 公司。

脊髓打击器 (RWD 公司, 型号: 68097); 实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher 公司, 型号: QuantStudio™ 3); 免疫印迹装置 (Bio-Rad 公司, 型号: PowerPac Basic)。

1.4 造模、分组及干预方法

将 80 只大鼠采用随机数字表法分为假手术组、模型组、强的松组和脊髓康组, 每组 20 只。除假手术组外其余各组大鼠采用改进 Allen's 方法建立急性 SCI 模型^[1]: 大鼠均用 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 进行腹腔内麻醉。手术暴露脊髓节段 T9-T11, 采用脊髓打击器打击 T10 段脊髓, 落物质量和直径分别为 10 g 和 2.5 mm, 下落高度和深度分别为 10 cm 和 2 mm, 大鼠双后肢的张力立即消除, 表明模型建立成功。假手术组大鼠脊髓暴露但未打击。造模后假手术组和模型组大鼠给予生理盐水 20 ml/(kg·d) 灌胃, 强的松组大鼠给予强的松溶液 60 mg/(kg·d) 灌胃, 脊髓康组大鼠给予脊髓康溶液 25 g/(kg·d) 灌胃。各组大鼠分别于术后第 7、

14、21 和 28 天进行指标观察及取材, 每个时间点 5 只。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 双后肢运动功能评分 (BBB 评分)^[2] 根据对后肢运动的观察, 特别是步态和协调性, 通过双盲、双独立观察, 在术前及术后 1、7、14、21 和 28 天进行评估。

1.5.2 斜板试验^[3] 术前及术后 1、7、14、21 和 28 天对所有大鼠进行斜板试验。将大鼠置于垂直于斜道纵轴的矩形斜道上, 升高板的高度, 并记录大鼠在板上停留超过 5s 的最大角度。每只大鼠测试 3 次, 取平均值。

1.5.3 外泌体标志蛋白 (Tsg101、CD63、CD9) 鉴定及脊髓损伤区 RhoA、ROCK 蛋白检测 采用 Western blot 法检测, 术后 7、14、21、28 天分别使用真空促凝采血管进行腹主动脉采血, 4℃、3500 r/min (半径为 13.5 cm), 离心 5 min, 并按 Exo-spin™ 外泌体试剂盒说明书提取外泌体, 分装冻存于 -80℃; 同时暴露大鼠脊髓节段 T9-T11, 取出受损脊髓, 研磨后滴加 150 μl 含 1% PMSF 的裂解液, 4℃、15000 r/min (半径为 13.5 cm), 离心 30 min 后取上清, 分装冻存于 -80℃。BCA 法进行蛋白定量, 配平后沸水煮 10 min, 保存于 -20℃ 待测。配制胶后, 100V 恒压电泳 90 min, 使用 PVDF 膜 100 V 转 60 min, 5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h, 按 1:1000 比例配制 GAPDH、RhoA、ROCK、Tsg101、CD63、CD9 抗体, 4℃ 过夜孵育。次日, 按 1:10000 比例配制二抗, 室温孵育 2 h。滴加 ECL 显影液, 凝胶成像系统显影, 利用 Image J 1.52a 图像分析系统分析条带。

1.5.4 脊髓损伤区 RhoA、ROCK mRNA 及血清外泌体 miR-21、miR-126、miR-133b 表达 使用 RNAiso Plus 提取脊髓中的 RNA, 检测浓度后使用反转录试剂盒进行逆转录, 冻存于 -20℃。在 Genbank 上查找序列, 设计并于上海生工进行引物合成, 使用 PCR 试剂盒对 RhoA、ROCK 进行 qRT-PCR 检测; 使用 RNAiso for Small RNA 试剂提取外泌体中的 miRNA, 检测浓度后使用 miRNA 反转录试剂盒进行逆转录, 冻存于 -20℃。在 Genbank 上查找序列, 设计并于上海生工进行引物合成, 使用 miRNA qRT-PCR 试剂盒检测 miR-21、miR-126、miR-133b 表达。以 GAPDH 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行相对表达量的计算。

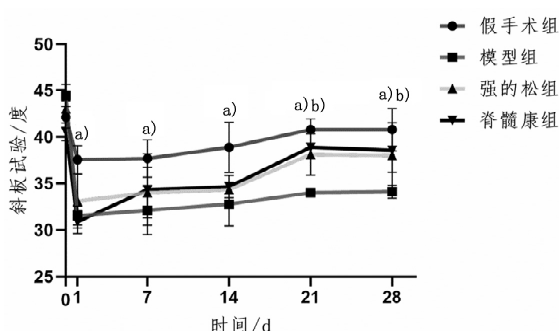
1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析, 所有数据符合正态分布用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析和 SNK- q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

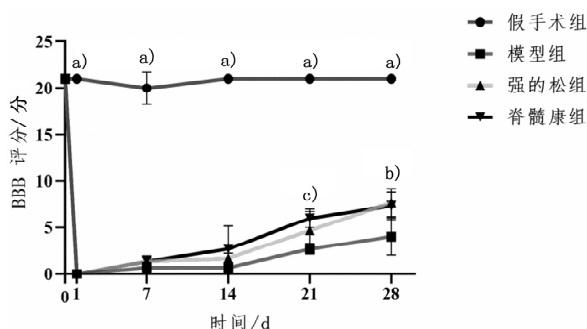
2.1 各组大鼠不同时间斜板试验结果和 BBB 评分比较

图 1、图 2 示, 与假手术组同时时间比较, 模型组大鼠斜板试验角度和 BBB 评分均降低 ($P < 0.05$); 与模型组同时时间比较, 脊髓康组和强的松组大鼠在第 21 天和 28 天时斜板试验角度和 BBB 评分增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注: a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠斜板试验结果比较



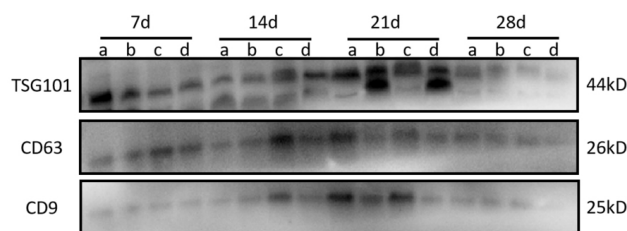
注: BBB 评分, 双后肢运动功能评分。

a) 与假手术组比较, $P < 0.01$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与模型组比较, $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠 BBB 评分比较

2.2 各组大鼠不同时间外泌体标志蛋白鉴定结果

图 3 示, 提取血清外泌体后进行纳米颗粒追踪分析及外泌体标志蛋白 Tsg101、CD63、CD9 检测, 结果表明所提取物质为外泌体。



注: a 为模型组, b 为强的松组, c 为脊髓康组, d 为假手术组。

图 3 各组大鼠不同时间外泌体标志蛋白鉴定结果

2.3 各组大鼠不同时间脊髓损伤区 RhoA、ROCK 蛋白及 mRNA 表达比较

表 1—表 4 示, 与假手术组同时时间比较, 模型组在术后 7、14、28 天时 RhoA 蛋白表达和在术后 7、14、21、28 天时 RhoA mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 模型组在术后 7、28 天时 ROCK 蛋白表达和在术后 14、21、28 天时 ROCK mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组同时时间比较, 强的松组大鼠在术后 7、14、28 天时 RhoA 蛋白表达和在术后 7、14、21 天时 RhoA mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 脊髓康组在术后 21、28 天时 RhoA 蛋白表达和在术后 7、14、21、28 天时 RhoA mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 强的松组大鼠在术后 21、28 天时 ROCK 蛋白表达和在术后 7、21、28 天时 ROCK mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 脊髓康组在术后 28 天时 ROCK 蛋白表达和在术后 7、14、21、28 天时 ROCK mRNA 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 各组大鼠不同时间血清外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 表达比较

表 5—表 7 示, 与假手术组同时时间比较, 模型组术后 7、28 天外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 表达降低, 术后 21 天时外泌体中 miR-133b mRNA

表 1 各组大鼠不同时间脊髓损伤区 RhoA 蛋白相对表达量比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	0.172 $\pm$ 0.008	0.720 $\pm$ 0.100	0.386 $\pm$ 0.025	0.073 $\pm$ 0.010
模型组	5	0.502 $\pm$ 0.056 ^{a)}	0.463 $\pm$ 0.001 ^{a)}	0.358 $\pm$ 0.011	0.498 $\pm$ 0.059 ^{a)}
强的松组	5	0.206 $\pm$ 0.002 ^{b)}	0.205 $\pm$ 0.002 ^{b)}	0.532 $\pm$ 0.008	0.129 $\pm$ 0.012 ^{b)}
脊髓康组	5	0.386 $\pm$ 0.002	0.348 $\pm$ 0.023	0.624 $\pm$ 0.076 ^{b)}	0.165 $\pm$ 0.005 ^{b)}

注: a) 与假手术组同时时间比较, $P < 0.05$; b) 与模型组同时时间比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组大鼠不同时间脊髓损伤区 ROCK 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	0.104 ± 0.005	0.080 ± 0.011	0.088 ± 0.006	0.024 ± 0.003
模型组	5	0.059 ± 0.007 ^{a)}	0.120 ± 0.001	0.051 ± 0.002	0.101 ± 0.012 ^{a)}
强的松组	5	0.067 ± 0.001	0.053 ± 0.001	0.139 ± 0.002 ^{b)}	0.037 ± 0.003 ^{b)}
脊髓康组	5	0.090 ± 0.001	0.122 ± 0.008	0.050 ± 0.006	0.034 ± 0.001 ^{b)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P < 0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$ 。

表 3 各组大鼠不同时间脊髓损伤区 RhoA mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	1.017 ± 0.206	1.017 ± 0.217	1.037 ± 0.358	1.017 ± 0.208
模型组	5	14.017 ± 1.075 ^{a)}	3.270 ± 0.637 ^{a)}	5.663 ± 0.343 ^{a)}	2.533 ± 0.411 ^{a)}
强的松组	5	1.333 ± 0.189 ^{b)}	9.667 ± 2.677 ^{b)}	0.823 ± 0.067 ^{b)}	1.690 ± 0.244
脊髓康组	5	3.073 ± 0.486 ^{b)}	0.193 ± 0.031 ^{b)}	1.477 ± 0.527 ^{b)}	0.857 ± 0.084 ^{b)}

注: 与假手术组同时间比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时间比较, # $P < 0.05$

表 4 各组大鼠不同时间脊髓损伤区 ROCK mRNA 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	0.997 ± 0.038	1.003 ± 0.119	1.003 ± 0.110	1.003 ± 0.115
模型组	5	1.663 ± 0.300	2.173 ± 0.476 ^{a)}	9.517 ± 2.263 ^{a)}	3.993 ± 0.376 ^{a)}
强的松组	5	0.107 ± 0.021 ^{b)}	1.453 ± 0.127	3.297 ± 1.054 ^{b)}	0.720 ± 0.096 ^{b)}
脊髓康组	5	0.013 ± 0.006 ^{b)}	0.973 ± 0.142 ^{b)}	0.560 ± 0.035 ^{b)}	1.320 ± 0.229 ^{b)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P < 0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$ 。

表 5 各组大鼠不同时间血清外泌体中 miR-21 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	1.003 ± 0.068	1.001 ± 0.010	1.010 ± 0.187	1.003 ± 0.121
模型组	5	0.567 ± 0.055 ^{a)}	0.430 ± 0.062	0.710 ± 0.052	0.030 ± 0.001 ^{a)}
强的松组	5	6.820 ± 1.005 ^{b)}	0.353 ± 0.154	0.383 ± 0.032 ^{b)}	1.837 ± 0.376 ^{b)}
脊髓康组	5	4.313 ± 0.608 ^{b)}	1.003 ± 0.225	0.427 ± 0.055	2.413 ± 0.185 ^{b)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P < 0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$ 。

表 6 各组大鼠不同时间血清外泌体中 miR-426 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	1.030 ± 0.277	1.007 ± 0.110	1.001 ± 0.066	1.020 ± 0.229
模型组	5	0.130 ± 0.044 ^{a)}	0.663 ± 0.076	0.713 ± 0.123	0.057 ± 0.006 ^{a)}
强的松组	5	4.003 ± 0.693 ^{b)}	2.160 ± 0.320 ^{b)}	0.307 ± 0.045	4.003 ± 1.210 ^{b)}
脊髓康组	5	21.970 ± 2.217 ^{b)}	9.697 ± 2.081 ^{b)}	0.330 ± 0.030	4.003 ± 0.411 ^{b)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P < 0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$ 。

表 7 各组大鼠不同时间血清外泌体中 miR-133b 相对表达量比较 ($2^{-\Delta\Delta CT}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
假手术组	5	1.013 ± 0.194	1.007 ± 0.154	1.003 ± 0.115	1.007 ± 0.169
模型组	5	0.050 ± 0.010 ^{a)}	1.020 ± 0.295	3.137 ± 0.528 ^{a)}	0.067 ± 0.006 ^{a)}
强的松组	5	4.417 ± 0.336 ^{b)}	0.380 ± 0.053 ^{b)}	2.217 ± 0.523	1.793 ± 0.140 ^{b)}
脊髓康组	5	4.937 ± 0.570 ^{b)}	1.907 ± 0.477 ^{b)}	0.717 ± 0.031 ^{b)}	6.453 ± 0.715 ^{b)}

注: a) 与假手术组同时间比较, $P < 0.05$; b) 与模型组同时间比较, $P < 0.05$ 。

表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组同时间比较, 强的松组和脊髓康组术后 7、28 天时外泌体中 miR-21 表达升高, 强的松组 21 天时 miR-21 表达降低; 术后

7、14、28 天时强的松组和脊髓康组 miR-426 表达均升高; 术后 7、28 天时强的松组和脊髓康组 miR-133b 表达均升高, 强的松组术后 14 天时 miR-

133b 表达降低, 脊髓康组术后 14 天时 miR-133b 表达升高、术后 21 天则降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

中医药治疗 SCI 的研究越来越受到关注, 我们认为, SCI 病机可概括为脾肾阳虚、瘀阻督脉, 并以健脾温肾、化瘀通督兼疏肝理气为治则。脊髓康方中黄芪、茯苓、泽泻、车前子健脾利水, 肉苁蓉、淫羊藿、益智仁温补肾阳, 枳实、厚朴疏肝理气, 大黄、土鳖虫、水蛭、蜈蚣、赤芍、丹参、当归、川芎活血化瘀, 共奏健脾温肾、化瘀通督之功。有研究表明, 黄芪对 SCI 小鼠存在神经保护作用^[4], 黄芪多糖能减轻 SCI 后病理损害并促进运动功能改善^[5]; 在脂多糖介导的 PC-12 细胞损伤模型中当归多糖具有抗炎作用, 而且当归多糖可通过下调 miRNA-223 的表达阻断核因子 κ B (NF- κ B) 通路来保护 PC-12 细胞^[6]; 大黄素对脊髓急性损伤后神经细胞具有保护作用, 可能与激活 Nrf2-ARE 通路等有关^[7]; 丹参酮 II A 可通过激活 PI3K/Akt 通路来抑制受压脊髓组织中的细胞凋亡, 减轻脊髓压迫大鼠模型的脊髓损伤程度^[8]。

外泌体是直径为 30 ~ 100 nm 的小膜囊泡, 来自多细胞体的腔膜, 并从多种类型的细胞中分泌出来^[9]。这些细胞外小泡可通过细胞之间直接转移的 miRNA、mRNA、DNA 和蛋白质介导细胞间的通讯, 并不需要细胞间的直接接触而传导信息^[6,20]。外泌体中有表达共同标记的蛋白, 包括 CD9、CD63、CD81、Tsg101 等, 可用来鉴别外泌体^[21]。miRNA 是内源性的长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA, 可通过结合其靶 mRNA 的 3'-非翻译区的互补位点来调节蛋白质编码基因的表达^[22]。研究^[7-10]表明, miRNA 在中枢神经系统的突触活性、轴突再生和神经修复中起重要作用, 包括 miR-21、miR-126、miR-133b 和 miR-486 等。

外泌体是一种新型的细胞间通讯工具, 可作为生物载体用于局部或全身递送 miRNA, 治疗多种疾病, 例如中风^[23]、帕金森病^[24]及 SCI^[10]等。Hu 等^[8]研究发现, miR-21 可减少 SCI 后神经元的凋亡, 并能促进运动功能的恢复。Lu 等^[25]研究表明, miR-133b 通过 RhoA 抑制 ERK1/2 和 PI3K/Akt 信号传导途径调节神经轴突的生长。另有研究^[26]表明, 急性脊髓损伤后, RhoA/ROCK 信号通路在神经元的死亡中起关键作用。RhoA 是 miR-133b 的直接靶标, 其可下调脊髓损伤大鼠 RhoA 蛋白的表

达, 并对下游效应器 ROCK 起作用, 抑制胞体内信号传递, 防止生长锥塌陷, 从而促进轴突再生^[27]。

本研究结果显示, 在术后第 28 天与模型组相比, BBB 评分和斜板试验均表明脊髓康可促进 SCI 大鼠运动功能的恢复, 可抑制 SCI 大鼠损伤区 RhoA、ROCK 的表达, 可促进外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达。此外, 在第 7 天与模型组相比, 脊髓康组 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达均明显增加, 其中 miR-126 增加最为显著, 表明脊髓康在 SCI 早期促进 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达, 尤其是 miR-126, 并为后期的修复提供良好的微环境。在 7 ~ 21 天, 模型组 miR-21、miR-126 的表达量低且较为稳定, 而脊髓康组 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达均呈现下降趋势, 其可能由于细胞的双向调节或其他信号通路的干预等作用, 提示此阶段为机体适应脊髓康的刺激作用, 可适当调节脊髓康的剂量浓度等来维持 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达, 加速脊髓损伤的修复。在第 28 天, 脊髓康组 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达出现反弹增长而且大鼠的运动功能明显改善, RhoA、ROCK 表达减少, 表明脊髓康可促进外泌体中 miR-21、miR-126、miR-133b 的表达, 进而抑制 RhoA/ROCK 通路改善 SCI 大鼠的运动功能, 在 28 天后具有显著差异, 而且脊髓康对外泌体中 miR-133b 的表达具有明显促进作用。

综上所述, 脊髓康可能通过调控外泌体来源的部分 miRNA, 促进神经细胞轴突再生, 修复脊髓损伤, 进而改善运动功能。然而本实验样本量较少, 应进行多样本重复实验来证明结论; 另外脊髓康可能对多种 miRNA 都有调控作用, 应通过高通量测序进行筛选检测多种 miRNA 的表达, 并联系相关信号通路的作用具体分析其机制。

参考文献

- [1] HAYTA E, ELDEN H. Acute spinal cord injury: a review of pathophysiology and potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs for pharmacological intervention [J]. J Chem Neuroanat, 2018, 87: 25 - 31. doi: 10.1016/j.jchemneu.2017.08.001.
- [2] JAIN NB, AYERS GD, PETERSON EN, et al. Traumatic spinal cord injury in the United States, 1993 - 2012 [J]. JAMA, 2015, 313(22): 2236 - 2243.
- [3] 马勇, 吴毛, 王建伟. 脊髓康治疗脊髓损伤 28 例 [J]. 辽宁中医杂志, 2004, 31(4): 309.

- [4] 马勇, 吴毛, 王建伟. “脊髓康”治疗脊髓损伤后排尿障碍 19 例 [J]. 江苏中医药, 2004, 25(4): 32.
- [5] KATAKOWSKI M, BULLER B, ZHENG X, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth [J]. Cancer Lett, 2013, 335(1): 201–204.
- [6] LOU G, SONG X, YANG F, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma [J]. J Hematol Oncol, 2015, 8:122. doi: 10.1186/s13045-015-0220-7.
- [7] JEE MK, JUNG JS, CHOI JI, et al. MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury [J]. Brain, 2012, 135(Pt 4): 1237–1252.
- [8] HU JZ, HUANG JH, ZENG L, et al. Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats [J]. J Neurotrauma, 2013, 30(15): 1349–1360.
- [9] HU J, ZENG L, HUANG J, et al. miR-126 promotes angiogenesis and attenuates inflammation after contusion spinal cord injury in rats [J]. Brain Res, 2015, 1608:191–202. doi: 10.1016/j.brainres.2015.02.036.
- [10] LI D, ZHANG P, YAO X, et al. Exosomes derived from miR-133b-modified mesenchymal stem cells promote recovery after spinal cord injury [J]. Front Neurosci, 2018, 12:845. doi: 10.3389/fnins.2018.00845.
- [11] KHAN T, HAVEY RM, SAYERS ST, et al. Animal models of spinal cord contusion injuries [J]. Lab Anim Sci, 1999, 49(2): 161–172.
- [12] BASSO DM, BEATTIE MS, BRESNAHAN JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma, 1995, 12(1): 1–21.
- [13] GUO Y, MA Y, PAN YL, et al. Jisui kang, a Chinese herbal formula, increases neurotrophic factor expression and promotes the recovery of neurological function after spinal cord injury [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(9): 1519–1528.
- [14] 张秀真, 程田, 寇红伟, 等. 黄芪对脊髓损伤小鼠的神经修复作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36(4): 718–721.
- [15] 郑利强, 伍亚民, 石永江, 等. 黄芪多糖对大鼠脊髓损伤后运动功能和脊髓病理的效果 [J]. 中国康复理论与实践, 2016, 22(11): 1269–1275.
- [16] LI R, YIN F, GUO Y, et al. Angelica polysaccharide protects PC-12 cells from lipopolysaccharide-induced injury via down-regulating microRNA-223 [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108:1320–1327. doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.147.
- [17] 曾欢欢, 黄英如, 李子健, 等. 大黄素对大鼠急性脊髓损伤后氧化应激和炎症反应的影响研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(9): 1886–1893.
- [18] 刘伟, 赵宝辉, 王建忠, 等. 丹参酮 II A 通过 PI3K/AKT 信号通路调节脊髓神经元凋亡的实验研究 [J]. 中华骨科杂志, 2019, 39(10): 622–629.
- [19] THERY C, ZITVOGEL L, AMIGORENA S. Exosomes: composition, biogenesis and function [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(8): 569–579.
- [20] UMEZU T, TADOKORO H, AZUMA K, et al. Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1 [J]. Blood, 2014, 124(25): 3748–3757.
- [21] ROCCARO AM, SACCO A, MAISO P, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression [J]. J Clin Invest, 2013, 123(4): 1542–1555.
- [22] BARTEL DP, CHEN CZ. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs [J]. Nat Rev Genet, 2004, 5(5): 396–400.
- [23] XIN H, LI Y, CUI Y, et al. Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2013, 33(11): 1711–1715.
- [24] HANEY MJ, KLYACHKO NL, ZHAO Y, et al. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy [J]. J Control Release, 2015, 207:18–30. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.03.033.
- [25] LU XC, ZHENG JY, TANG LJ, et al. MiR-133b Promotes neurite outgrowth by targeting RhoA expression [J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(1): 246–258.
- [26] WU X, WALKER CL, LU Q, et al. RhoA/Rho kinase mediates neuronal death through regulating cPLA2 activation [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(9): 6885–6895.
- [27] SCHWAB JM, CONRAD S, MONNIER PP, et al. Spinal cord injury-induced lesional expression of the repulsive guidance molecule (RGM) [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(6): 1569–1576.

Effect of *Jisui Kang* (脊髓康) on the Expression of Serum Exosomal mRNAs in Spinal Cord Injury Model Rats WU Chengjie^{1,2}, MA Yong^{1,2}, GUO Yang^{1,2}, ZHOU Yuxin², TU Pengcheng^{1,2}, YANG Guanglu^{1,2}, SUN Jie^{1,2}, PAN Yalan³

1. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210029; 2. Bone Repair and Reconstruction New Technology Laboratory, Nanjing University of Chinese Medicine; 3. Chronic Disease Traditional Chinese Medicine Nursing Laboratory, Nanjing University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Jisui Kang* (JSK, 脊髓康) in the treatment of spinal cord injury (SCI) . **Methods** Eighty SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, prednisone group, and *Jisui Kang* group, with 20 rats in each group. Except for the sham operation group, the rats in the other groups used the modified Allen's method to establish the acute SCI model. The spinal cord of the rats in the sham operation group were exposed but not injured. After modeling, rats in the sham operation group and model group were administered with 20 ml/ (kg · d) normal saline by gavage, while rats in the prednisone group and JSK group received 60 mg/ (kg · d) prednisone solution and 25 g/ (kg · d) JSK solution by gavage, respectively. The outcomes were assessed at the 7th, 14th, 21st and 28th day after operation, with five rats at each time point. The motor function of hindlimbs determined by BBB score and oblique plate test were evaluated. After collecting the serum, the exosomes were extracted and identified by the exosome's marker proteins (Tsg101, CD63, CD9) . The expression of RhoA, ROCK protein and mRNA in the injured area, and the expression of miR-21, miR-126, miR-133b mRNA in exosomes were detected. **Results** Compared with the sham operation group at the same time point, the model group had significantly reduced angle of the oblique plate test and the BBB score at all time points, higher expression of RhoA protein and mRNA at the 7th and 28th day, higher expression of ROCK protein and mRNA at the 28th day, and lower expression of miR-21, miR-126, miR-133b mRNA in exosomes at the 7th and 28th day ($P < 0.05$) . Compared with the outcomes in the model group at the same time point, the angle of the oblique plate test and the BBB score significantly increased at the 7th and 21st day in the JSK group and prednisone group; the expression of RhoA, ROCK protein and mRNA decreased at the 28th day; and the expression of miR-21, miR-126, and miR-133b mRNA increased in exosomes at all time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) . **Conclusion** JSK may promote the expression of miR-21, miR-126, miR-133b mRNA in serum exosomes of acute SCI model rats, thereby inhibiting the RhoA/ROCK pathway, repairing spinal cord injury and improving the motor function of rats. The effect works best at 28 days.

Keywords spinal cord injury; *Jisui Kang* (脊髓康); motor function; exosomes; microRNAs

(收稿日期: 2020 - 05 - 25; 修回日期: 2020 - 07 - 30)

编辑: 邓 媛

《中医杂志》(英文版) 欢迎投稿

Journal of Traditional Chinese Medicine [《中医杂志》(英文版)] (ISSN 0255 - 2922, CN 11 - 2167/R, 双月刊)

由中华中医药学会与中国中医科学院联合主办, 是我国中医药界具有权威的中医药英文科技期刊, 现发行和交换 90 多个国家和地区。

《中医杂志》(英文版) 自 1981 年创刊以来一直坚持正确的办刊宗旨, 国际影响力不断提升。2010 年入选 SCI-E (《科学引文索引》扩刊版), 2011 年获得中国中医科学院自主选题项目资助, 2013 年获得“中国科技期刊国际影响力提升计划”资助, 自 2012 年起连续被评为“中国最具国际影响力学术期刊”。本刊先后被国际知名文献数据库 MEDLINE、《化学文摘》(CA)、《医学文摘》(EM) 等收录, 是 MEDLINE 收录的第一份中国出版的中医药期刊, 是 SCI 收录的 30 余种全科医学和替代医学期刊中唯一的中国传统医学综合性学术期刊。

《中医杂志》(英文版) 主要栏目包括循证研究、理论研究、基础研究、临床观察、中药研究、文献研究、思路与方法、综述等。内容以报道中医药基础、临床研究成果和科研前沿进展为主, 覆盖中医药学科各个领域。欢迎广大专家学者积极投稿。作者可直接登录本刊网站 <http://www.journaltcn.com> 投稿。

联系邮箱: jtcmen@126.com。电话: 010 - 64089190。

本社地址: 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 邮政编码: 100700。