

抑制 miR-429 促进 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白表达改善血脊髓屏障通透性的体外实验研究



孙瑞^{1,2}, 于德水¹

1. 锦州医科大学附属第一医院骨创伤科 (辽宁锦州 121000)

2. 辽宁省健康产业集团阜新矿业集团总医院骨科 (辽宁阜新 123000)

【摘要】 目的 探讨抑制 miR-429 改善体外血脊髓屏障 (blood spinal cord barrier, BSCB) 通透性的可行性及机制, 为改善脊髓微环境提供新的基因治疗靶点。方法 首先, 取永生化人脑微血管内皮细胞系 (hCMEC/D3), 应用 miR-429 拮抗剂 antagomiR-429 及其阴性对照 antagomiR-429-NC 进行转染, 通过荧光显微镜观察以及实时荧光定量 PCR 检测 miR-429 表达, 验证 antagomiR-429 转染效率。然后观察 miR-429 对体外 BSCB 通透性的影响。实验分为 4 组, 其中空白对照组 (A 组) 为正常 hCMEC/D3 细胞、Ha-sc 细胞构建 BSCB 模型, 低氧诱导组 (B 组)、低氧诱导+antagomiR-429-NC 组 (C 组)、低氧诱导+antagomiR-429 组 (D 组) 分别采用正常、antagomiR-429-NC 转染以及 antagomiR-429 转染的 hCMEC/D3 细胞, 与 Ha-sc 细胞构建 BSCB 模型并低氧处理 12 h。通过辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 通量测定体外 BSCB 通透性, 实时荧光定量 PCR、Western blot 和免疫荧光染色观测内皮细胞中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin、Claudin-5 的表达水平。**结果** 荧光显微镜下观察 antagomiR-429 及 antagomiR-429-NC 成功转染至 hCMEC/D3 细胞, 转染效率约为 90%; 实时荧光定量 PCR 检测 antagomiR-429 组 miR-429 相对表达量为 0.109 ± 0.013 , 明显低于 antagomiR-429-NC 组的 0.956 ± 0.004 ($P < 0.05$)。HRP 通透性测量、实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测显示, B、C 组 HRP 通透性明显高于 A、D 组, ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白及 mRNA 相对表达量均明显低于 A、D 组 ($P < 0.05$); B、C 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), D 组尚未达 A 组水平 ($P < 0.05$)。免疫荧光染色观察示 D 组 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白在细胞膜边界免疫荧光较 B、C 组增强, 但尚未达 A 组强度。**结论** 通过抑制 miR-429 表达可促进微血管内皮细胞中 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白表达, 进而改善因低氧导致的 BSCB 通透性增高。

【关键词】 血脊髓屏障; miR-429; 脊髓损伤; 紧密连接蛋白; 脊髓微环境

Inhibitory effect of miR-429 on expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 proteins to improve the permeability of blood spinal cord barrier *in vitro*

SUN Rui^{1,2}, YU Deshui¹

1. Department of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou Liaoning, 121000, P.R.China

2. Department of Orthopedics, General Hospital of Fuxin Mining Group, Liaoning Health Industry Group, Fuxin Liaoning, 123000, P.R.China

Corresponding author: YU Deshui, Email: gkyudeshui@163.com

【Abstract】 Objective To explore the feasibility and mechanism of inhibiting miR-429 to improve the permeability of the blood spinal cord barrier (BSCB) *in vitro*, and provide a new gene therapy target for enhancing the spinal cord microenvironment. **Methods** First, the immortalized human brain microvascular endothelial cell line (hCMEC/D3) was transfected with the anti-miR-429 antagonist (antagomiR-429) and its negative control (antagomiR-429-NC), respectively. The miR-429 expression of hCMEC/D3 cells was observed by fluorescence microscopy and real-time fluorescence quantitative PCR to verify the transfection efficiency of antagomiR-429. Then the effect of miR-429 on BSCB permeability was observed *in vitro*. The experiment was divided into 4 groups. The blank control group (group A)

DOI: 10.7507/1002-1892.202001097

基金项目: 辽宁省科学技术计划项目 (2019-ZD-0797)

通信作者: 于德水, Email: gkyudeshui@163.com

was constructed of normal hCMEC/D3 cells and Ha-sc cells to prepare the BSCB model, the hypoxia-induced group (group B), the hypoxia-induced+antagomiR-429-NC group (group C), and the hypoxia-induced+antagomiR-429 group (group D) were constructed of normal, antagomiR-429-NC transfected, and antagomiR-429 transfected hCMEC/D3 cells and Ha-sc cells to prepare the BSCB models and hypoxia treatment for 12 hours. The permeability of BSCB *in vitro* was measured by horseradish peroxidase (HRP) permeability. Real-time fluorescence quantitative PCR, Western blot, and immunofluorescence staining were used to observe the expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5. **Results** The antagomiR-429 and antagomiR-429-NC were successfully transfected into hCMEC/D3 cells under a fluorescence microscope, and the transfection efficiency was about 90%. Real-time fluorescence quantitative PCR results showed that the relative expression of miR-429 in antagomiR-429 group was 0.109 ± 0.013 , which was significantly lower than that of antagomiR-429-NC group (0.956 ± 0.004 , $P<0.05$). HRP permeability measurement, real-time fluorescence quantitative PCR, and Western blot results showed that the HRP permeability of groups B and C were significantly higher than those of groups A and D ($P<0.05$), and the relative expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 proteins and mRNAs were significantly lower in groups B and C than in groups A and D ($P<0.05$) and in group D than in group A ($P<0.05$); there was no significant difference between groups B and C ($P>0.05$). Immunofluorescence staining showed that the immunofluorescence of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 at the cell membrane boundary in group D were stronger than those in groups B and C, but not as strong as that in group A. **Conclusion** Inhibition of miR-429 expression can promote the expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 proteins in microvascular endothelial cells, thereby improving the increased permeability of BSCB due to hypoxia.

【Key words】 Blood spinal cord barrier; miR-429; spinal cord injury; tight junction protein; spinal microenvironment

Foundation item: Science and Technology Plan Project of Liaoning (2019-ZD-0797)

脊髓损伤是一类严重的中枢神经创伤性疾病^[1-2], 主要临床表现为不同程度截瘫, 给患者和家庭带来沉重负担^[3]。在原发性脊髓损伤基础上, 因继发性脊髓损伤导致的组织局部缺氧会进一步加重脊髓损伤程度^[4]。相关研究证明, 血脊髓屏障 (blood spinal cord barrier, BSCB) 在继发性脊髓损伤中起着至关重要的作用^[5-6], 修复 BSCB 是减轻继发性脊髓损伤的关键步骤之一^[7-8]。ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 是 BSCB 中重要的紧密连接蛋白, 研究发现上述蛋白含量升高后, BSCB 通透性下降^[9-11]。而 BSCB 通透性降低, 继发性脊髓损伤严重程度也会大幅度下降^[12]。

各细胞中 miRNA 是通过靶向下游基因发挥调节功能的重要分子之一^[13]。例如, miR-429 可通过介导下游基因 Bcl-2 mRNA 促进动脉粥样硬化内皮细胞凋亡下调^[14]。近期研究表明, miR-429 参与内皮细胞的迁移和紧密连接蛋白的表达, 同时还可以在一定程度逆转因低氧导致的人羊膜 MSCs 损伤^[15-16]。本研究通过将 miR-429 拮抗剂 antagomiR-429 转染的人微血管内皮细胞, 与脊髓细胞构建体外 BSCB 模型并进行低氧处理, 观察内皮细胞中紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin、Claudin-5 表达以及 BSCB 通透性变化, 探讨 miR-429 对 BSCB 通透性的作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及培养

永生化人脑微血管内皮细胞系 (hCMEC/D3) 和人星形胶质细胞-脊髓细胞系 (Ha-sc) 由锦州医科大学曹阳教授提供。hCMEC/D3 细胞采用含 10%FBS、1%青/链霉素、1%VEGF 的内皮细胞培养基培养; Ha-sc 细胞采用含 10%FBS、1%青/链霉素的 DMEM/F12 培养; 置于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养, 每 48 小时更换 1 次培养基。

1.2 主要试剂及仪器

内皮细胞培养基、VEGF、FBS、青/链霉素 (ScienCell 公司, 美国); DMEM/F12、胰蛋白酶 (HyClone 公司, 美国); antagomiR-429 及其阴性对照 antagomiR-429-NC、siRNA Mate Plus、TRIzol 试剂 (江苏吉玛基因股份有限公司); 兔抗 ZO-1 多克隆抗体、兔抗 Occludin 多克隆抗体、兔抗 Claudin-5 多克隆抗体 (Affinity 公司, 美国); 兔抗 GAPDH 多克隆抗体、山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 二抗 (Earthox 公司, 美国); HRP (北京索莱宝科技有限公司); 四甲基联苯胺 (Sigma 公司, 美国); 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶试剂盒、ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公

司); GoScript™ Reverse Transcription System 逆转录试剂盒、GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒、Dual Luciferase® Reporter Assay System 试剂盒 (Promega 公司, 美国)。

6 孔 Transwell 小室 (Corning 公司, 美国)。倒置荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本); 紫外分光光度计 (Tecan 公司, 美国); 全自动电泳仪、凝胶成像系统、实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国); YCP 系列三气培养箱 (深圳市华曦达科技股份有限公司)。

1.3 antagomiR-429 转染 hCMEC/D3 细胞方法及观测

1.3.1 antagomiR-429 转染细胞方法 实验分为空白对照组、antagomiR-429-NC 组及 antagomiR-429 组。取内皮细胞培养基培养 12 h 的 hCMEC/D3 细胞, 按照说明书采用 siRNA Mate Plus 转染试剂, 将 antagomiR-429、antagomiR-429-NC 分别转染至细胞 (antagomiR-429 组、antagomiR-429-NC 组) 中, 无菌培养箱中孵育 4~6 h, 更换内皮细胞培养基后观测。以内皮细胞培养基正常培养的 hCMEC/D3 细胞作为空白对照组。

1.3.2 观测方法 ① 荧光显微镜下观察两转染组细胞内有无荧光, 如呈绿色荧光表示转染成功。② 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 miR-429 表达水平。取 3 组细胞, 使用 TRIzol 试剂及氯仿提取总 RNA, 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA; 按照 GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行定量 PCR 分析, 引物序列见表 1。反应条件: 95℃、3 min, 95℃、12 s, 40 个循环; 60℃、40 s。以 U6 作为内参。使用 2^{-ΔΔCt} 法计算 miR-429 相对表达量。实验重复 3 次。

1.4 miR-429 对体外 BSCB 通透性的影响

1.4.1 实验分组 实验分为 4 组, 其中空白对照组 (A 组) 为正常 hCMEC/D3 细胞、Ha-sc 细胞构建 BSCB 模型; 低氧诱导组 (B 组) 为正常 hCMEC/D3 细胞、Ha-sc 细胞构建 BSCB 模型并低氧处理; 低氧诱导+antagomiR-429-NC 组 (C 组) 为 antagomiR-429-NC 转染 hCMEC/D3 细胞、Ha-sc 细胞构建 BSCB 模型并低氧处理; 低氧诱导+antagomiR-429 组 (D 组) 为 antagomiR-429 转染 hCMEC/D3 细胞、Ha-sc 细胞构建 BSCB 模型并低氧处理。

1.4.2 体外 BSCB 模型制备及低氧处理 先将 Ha-sc 细胞以 1×10⁴ 个/cm² 密度接种于 6 孔 Transwell 上室背面, 于 37℃、5%CO₂ 孵箱中培养; 当 Ha-sc 细胞黏附后将 Transwell 上室直立并插入 6 孔板

中, 并将 hCMEC/D3 细胞以 1×10⁴ 个/cm² 密度接种在上室内面; 37℃、5%CO₂ 孵箱中继续培养, 待融合至 90% 左右时置于低氧室中, 混合气体中含 94% N₂ 和 5% CO₂, 低氧诱导处理 12 h。各组取相应细胞参考上述方法对应处理后进行观测。

1.4.3 观测指标 ① HRP 通透性测量: 将浓度为 0.5 μmol/L 的 HRP 添加至各组 Transwell 上室中, 2 h 后从下部收集样品, 添加 0.5 mmol/L 四甲基联苯胺, 于酶标仪中检测波长 562 nm 处吸光度 (A) 值, 评价 HRP 通透性。

② 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 ZO-1、Occludin、Claudin-5 mRNA 表达水平: 同 1.3.2 中方法提取细胞总 RNA, 使用 GoScript™ Reverse Transcription System 逆转录试剂盒逆转录为 cDNA。按照 GoTaq® qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行定量 PCR 分析。引物序列见表 1。反应条件: 95℃、2 min, 95℃、15 s, 60℃、1 min, 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 计算 ZO-1、Occludin、Claudin-5 mRNA 相对表达量。实验重复 3 次。

③ Western blot 检测细胞中 ZO-1、Occludin、Claudin-5 蛋白表达水平: 各组细胞以 4℃ PBS 洗涤 2 次, 用含 1%PMSF 的 RIPA 缓冲液提取细胞蛋

表 1 实时荧光定量 PCR 各基因引物序列

Tab.1 Primer sequence of real-time fluorescence quantitative PCR

基因 Gene	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
miR-429	上游 UAAUACUGUCUGUAAAACCGU Forward
	下游 CGCCGGCCGAUGGGCGUCUUACCAGACAUG GUUAGACCUGGCCUCUGUCUAAUACUGUCUGG UAAAACCGUCCAUCGCGUCG Reverse
U6	上游 CGCTTCGGCAGCATATAC Forward
	下游 TTCACGAATTTGCGTGTGCATC Reverse
ZO-1	上游 CAACATACAGTGACGCTTCACA Forward
	下游 CACTATTGACGTTTCCCCACTC Reverse
Occludin	上游 ACAAGCGGTTTTATCCAGAGTC Forward
	下游 GTCATCCACAGGCGAAGTTAAT Reverse
Claudin-5	上游 CTCTGCTGGTTCGCCAACAT Forward
	下游 CAGCTCGTACTTCTGCGACA Reverse
GAPDH	上游 CATCTTCTTTTGCCTCGCCA Forward
	下游 TTAAGAGCAGCCCTGGTGACC Reverse

白质；4℃，以 12 000×g 离心 30 min。取上清，参照 BCA 蛋白定量试剂盒确定蛋白浓度。收集裂解物，通过 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离，然后将其印迹至聚偏二氟乙烯膜，置于 TBST 中用 5% 脱脂奶粉密封 3 h；分别加入兔抗 ZO-1 (1 : 500)、兔抗 Occludin (1 : 1 000)、兔抗 Claudin-5 (1 : 1 000) 一抗，4℃ 过夜；TBST 洗涤 3 次后加入二抗 (1 : 5 000)，37℃ 孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次，将膜与 ECL 于暗室孵育后，用化学成像仪将蛋白条带可视化。以 GAPDH 作为内参，以目的蛋白条带与内参条带灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

④ 免疫荧光染色观察 ZO-1、Occludin 及 Claudin-5 蛋白表达：各组细胞以 4℃ PBS 洗涤 3 次后，于 4% 多聚甲醛固定 15 min；室温下置于含 0.1% Triton X-100 的 PBS 中 5 min，PBS 浸渍 3 次。加入兔抗 ZO-1 (1 : 100)、兔抗 Occludin (1 : 200) 和兔抗 Claudin-5 (1 : 200)，4℃ 湿箱中孵育过夜；与荧光二抗 (1 : 500) 孵育 1 h。将样品与 DAPI 在黑暗中孵育 3 min，PBST 冲洗多余 DAPI，抗荧光淬灭封片剂密封样品。荧光显微镜下观察，ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白为红色荧光标记，DAPI 为蓝色荧光标记。实验重复 3 次。

1.5 统计学方法

采用 GraphPad 6.0 统计软件进行分析。数据以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 SNK 检验；检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 antagomiR-429 的转染效率

荧光显微镜下观察可见 antagomiR-429 及 antagomiR-429-NC 均成功转染至 hCMEC/D3 细胞，转染效率约为 90% (图 1)。实时荧光定量 PCR 检测显示，antagomiR-429 组 miR-429 相对表达量为 0.109 ± 0.013 ，明显低于 antagomiR-429-NC 组 (0.956 ± 0.004) 及空白对照组 (1.005 ± 0.072)，差异有统计学意义 ($P<0.05$)；antagomiR-429-NC 组与空白对照组比较，差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 miR-429 对体外 BSCB 通透性的影响

2.2.1 HRP 通透性测量 A、B、C、D 组 A 值分别为 0.171 ± 0.002 、 0.206 ± 0.006 、 0.214 ± 0.003 、 0.185 ± 0.003 。B、C 组明显高于 A、D 组，差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。B、C 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)；D 组尚未达 A 组水平，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2.2 实时荧光定量 PCR 及 Western blot 检测

B、C 组 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白及 mRNA 相对表达量明显低于 A、D 组，差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。B、C 组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)；D 组尚未达 A 组水平，差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2、3。

2.2.3 免疫荧光染色观察 荧光显微镜下见 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白定位于细胞膜及细胞膜与细胞膜之间连接处，其中 D 组以上 3 种蛋白在细胞膜边界荧光染色较 B、C 组增强，但尚未达 A 组强度。见图 4。

3 讨论

研究表明，脊髓微环境动态平衡是维持中枢神经系统中神经元正常功能的重要因素之一^[17]。BSCB 是脊髓组织与血液之间物质代谢的物理屏障，在维持中枢神经系统稳态和内部微环境稳定性中起重要作用^[5-6]。既往研究重点关注脊髓损伤后

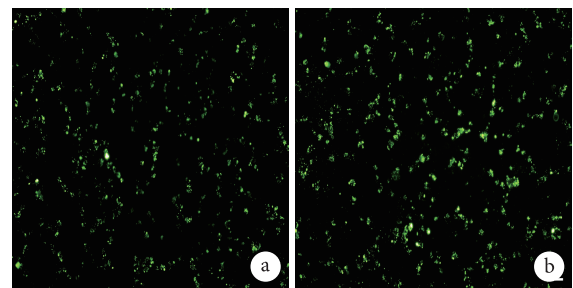


图 1 细胞转染后荧光显微镜观察 (×40) a. antagomiR-429-NC 组；b. antagomiR-429 组

Fig.1 Observation under fluorescence microscope after cell transfection (×40) a. antagomiR-429-NC group; b. antagomiR-429 group

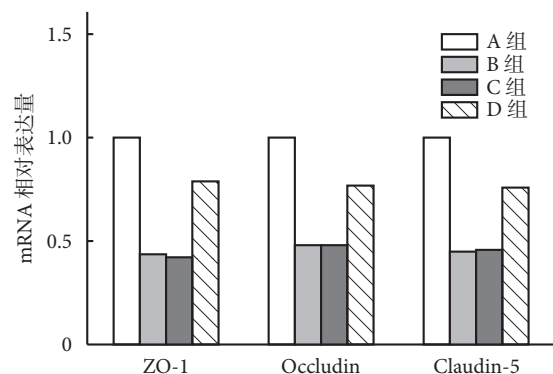


图 2 实时荧光定量 PCR 检测各组 ZO-1、Occludin、Claudin-5 mRNA 相对表达量

Fig.2 The relative expressions of ZO-1, Occludin, Claudin-5 mRNAs in each group by real-time fluorescence quantitative PCR

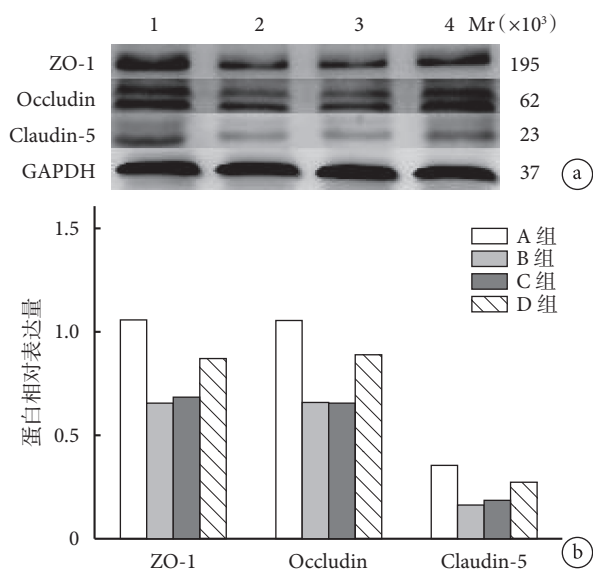


图3 Western blot 检测各组 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白表达 a. 电泳图 Mr: 相对分子质量 1: A 组 2: B 组 3: C 组 4: D 组; b. 各组目的蛋白相对表达量

Fig.3 The expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 proteins in each group detected by Western blot a. Electrophoresis diagram Mr: Relative molecular mass 1: Group A 2: Group B 3: Group C 4: Group D; b. The relative expressions of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 proteins

神经元凋亡和自噬以及炎症反应^[18], 对通过改善 BSCB 通透性来减轻脊髓继发性损伤的研究较少, 为此我们进行了本次研究。BSCB 类似血脑屏障, 主要由脊髓血管内皮细胞、基底膜和星形胶质细胞足突组成^[9]。因为国内外尚未分离培养出稳定的脊髓血管内皮细胞系, 而脊髓血管内皮细胞在结构上与脑血管内皮细胞相似, 因此本研究用永生化人脑微血管内皮细胞系代替脊髓血管内皮细胞^[19], 选择 hCMEC/D3 细胞和 Ha-sc 细胞复合培养体外构建 BSCB。

研究表明, 脊髓损伤后 BSCB 的紧密连接结构受损, 导致其通透性增加, 从而加重了脊髓的继发性损伤^[20]。紧密连接结构主要由紧密连接蛋白和黏附因子组成^[21], 其中紧密连接蛋白含量降低是脊髓损伤后 BSCB 的一种特殊表现^[20]。为此, 本研究通过低氧诱导处理体外模拟脊髓损伤后 BSCB, 观察 ZO-1、Occludin、Claudin-5 蛋白水平变化。结果显示, 低氧处理可使细胞中 ZO-1、Occludin、Claudin-5 蛋白降低, 进而使紧密连接蛋白结构遭到破坏, 间接地解释了脊髓损伤后间歇性低氧导致的慢性脊髓损伤和因颈椎管狭窄导致的低氧缺血性脊髓损伤中的继发性损伤机制。

miR-429 与其余 4 个成员 (miR-200a、miR-200b、miR-200c 和 miR-141) 结合在一起, 形成了

miR-200 家族^[22]。miR-429 广泛存在于人类各种系统肿瘤中。据报道, miR-429 参与了各种癌症的发展, 例如膀胱癌、肾细胞癌和软组织肉瘤^[23-25], 还参与保护心肌细胞免受低氧诱导导致的凋亡^[26]。同时, 在透明细胞肾细胞癌中 miR-429 可以靶向 VEGF 调节细胞功能^[27]。最近研究证实, miR-429 可以直接或通过其下游靶基因靶向负调控紧密连接蛋白, 并参与血肿瘤屏障和血肠屏障通透性的调节^[16, 28]。相比 DNA 及 mRNA, miRNA 拥有分子量小、更易转染的生物优势, 且目前没有文献证明 miR-429 对 BSCB 低氧损伤修复的作用, 本研究将 miR-429 抑制剂 antagomiR-429 加入体外 BSCB 模型, 模拟抑制脊髓微血管内皮细胞中 miR-429 表达, 以此为 miRNA 用于临床脊髓损伤基因治疗提供前期基础及理论依据。

本研究结果显示, 通过抑制 miR-429 的表达可以改善低氧诱导的体外 BSCB 通透性, 提示抑制 BSCB 中微血管内皮细胞内 miR-429 可以改善因低氧导致的继发性脊髓损伤。与此同时, 通过 Western blot、免疫荧光染色及实时荧光定量 PCR 检测, 发现抑制 miR-429 可以一定程度恢复因低氧导致的 ZO-1、Occludin 和 Claudin-5 蛋白降低, 提示抑制微血管内皮细胞中 miR-429 表达对低氧导致的继发性脊髓损伤的修复机制。但是不能排除 antagomiR-429 也可能影响其他结合蛋白进而调节 BSCB 的通透性。

综上所述, 抑制 miR-429 可以增加体外 BSCB 中紧密连接蛋白含量, 进而逆转因低氧诱导所导致的 BSCB 通透性增加, 提示 miR-429 可以作为改善脊髓微环境的基因治疗靶点。

作者贡献: 孙瑞负责实验设计及实施、数据收集整理及统计分析、文章撰写; 于德水负责实验设计及实施、起草文章、对文章的知识性内容作批评性审阅。

利益冲突: 所有作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。项目经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

参考文献

- 1 Gee CM, Currie KD, Phillips AA, et al. Spinal cord injury impairs cardiovascular capacity in elite wheelchair rugby athletes. Clin J Sport Med, 2020, 30(1): 33-39.
- 2 Aghayan HR, Arjmand B, Yaghoobi M, et al. Clinical outcome of autologous mononuclear cells transplantation for spinal cord injury: a systematic review and meta-analysis. Med J Islam Repub Iran, 2014, 28: 112.

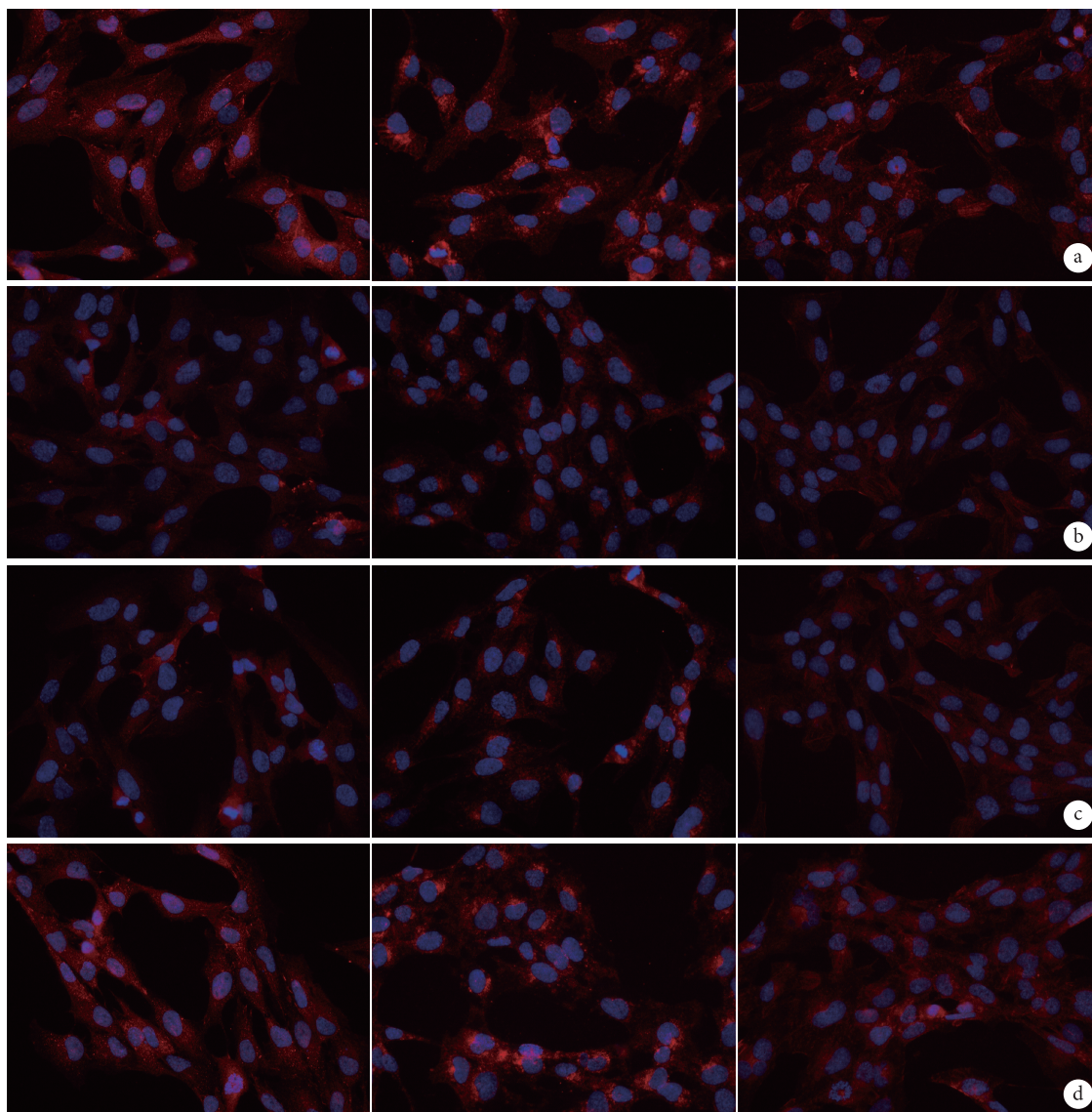


图4 各组免疫荧光染色观察 (荧光显微镜×400) 从左至右分别为 ZO-1/DAPI、Occludin/DAPI 和 Claudin-5/DAPI a. A 组; b. B 组; c. C 组; d. D 组

Fig.4 Immunofluorescence staining observation of each group (Fluorescence microscope×400) From left to right for ZO-1/DAPI, Occludin/DAPI, and Claudin-5/DAPI a. Group A; b. Group B; c. Group C; d. Group D

- 3 Figueiredo N. Motor exam of patients with spinal cord injury: a terminological imbroglio. *Neurol Sci*, 2017, 38(7): 1159-1165.
- 4 Li S, Ou Y, Li C, *et al*. Therapeutic effect of methylprednisolone combined with high frequency electrotherapy on acute spinal cord injury in rats. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4682-4688.
- 5 Kumar H, Ropper AE, Lee SH, *et al*. Propitious therapeutic modulators to prevent blood-spinal cord barrier disruption in spinal cord injury. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(5): 3578-3590.
- 6 Bartanusz V, Jezova D, Alajajian B, *et al*. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol*, 2011, 70(2): 194-206.
- 7 Lee JY, Choi HY, Na WH, *et al*. Ghrelin inhibits BSCB disruption/hemorrhage by attenuating MMP-9 and SUR1/TrpM4 expression and activation after spinal cord injury. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(12 Pt A): 2403-2412.
- 8 Lee JY, Choi HY, Na WH, *et al*. 17β-estradiol inhibits MMP-9 and SUR1/TrpM4 expression and activation and thereby attenuates BSCB disruption/hemorrhage after spinal cord injury in male rats. *Endocrinology*, 2015, 156(5): 1838-1850.
- 9 Sharma HS. Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Curr Pharm Des*, 2005, 11(11): 1353-1389.
- 10 Arhart RW. A possible haemodynamic mechanism for amyotrophic lateral sclerosis. *Med Hypotheses*, 2010, 75(4): 341-346.
- 11 Tong M, He Z, Lin X, *et al*. Lithium chloride contributes to blood-spinal cord barrier integrity and functional recovery from spinal cord injury by stimulating autophagic flux. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(4): 2525-2531.
- 12 He Z, Zhou Y, Wang Q, *et al*. Inhibiting endoplasmic reticulum stress by lithium chloride contributes to the integrity of blood-spinal cord barrier and functional recovery after spinal cord injury. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3): 1012-1024.
- 13 Gong M, Yu B, Wang J, *et al*. Mesenchymal stem cells release

- exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget*, 2017, 8(28): 45200-45212.
- 14 Zhang T, Tian F, Wang J, *et al.* Atherosclerosis-associated endothelial cell apoptosis by miR-429-mediated down regulation of Bcl-2. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 37(4): 1421-1430.
- 15 Ge L, Wang Y, Cao Y, *et al.* MiR-429 improved the hypoxia tolerance of human amniotic cells by targeting HIF-1 α . *Biotechnol Lett*, 2018, 40(11-12): 1477-1486.
- 16 Chen L, Xue Y, Zheng J, *et al.* MiR-429 regulated by endothelial monocyte activating polypeptide- II (EMAP- II) influences blood-tumor barrier permeability by inhibiting the expressions of ZO-1, Occludin and Claudin-5. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 35.
- 17 Fan B, Wei Z, Yao X, *et al.* Microenvironment imbalance of spinal cord injury. *Cell Transplant*, 2018, 27(6): 853-866.
- 18 Fang B, Qin M, Li Y, *et al.* Electroacupuncture preconditioning and postconditioning inhibit apoptosis and neuroinflammation induced by spinal cord ischemia reperfusion injury through enhancing autophagy in rats. *Neurosci Lett*, 2017, 642: 136-141.
- 19 曲林, 李刚, 毕云龙, 等. 缺氧损伤后血红素加氧酶 1 截短体 (HO-1C δ 23) 上调 miR-125a-5p 降低血脊髓屏障的通透性. *细胞与分子免疫学杂志*, 2018, 34(8): 725-731.
- 20 He Z, Zou S, Yin J, *et al.* Inhibition of endoplasmic reticulum stress preserves the integrity of blood-spinal cord barrier in diabetic rats subjected to spinal cord injury. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 7661.
- 21 Kuntner C, Bankstahl JP, Bankstahl M, *et al.* Dose-response assessment of tariquidar and elacridar and regional quantification of P-glycoprotein inhibition at the rat blood-brain barrier using (R)-[¹¹C]verapamil PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010, 37(5): 942-953.
- 22 Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 2005, 132(21): 4653-4662.
- 23 Wu CL, Ho JY, Hung SH, *et al.* miR-429 expression in bladder cancer and its correlation with tumor behavior and clinical outcome. *Kaohsiung J Med Sci*, 2018, 34(6): 335-340.
- 24 Machackova T, Mlcochova H, Stanik M, *et al.* MiR-429 is linked to metastasis and poor prognosis in renal cell carcinoma by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Tumour Biol*, 2016, 37(11): 14653-14658.
- 25 Samantarrai D, Mallick B. miR-429 inhibits metastasis by targeting KIAA0101 in soft tissue sarcoma. *Exp Cell Res*, 2017, 357(1): 33-39.
- 26 Xu H, Jin L, Chen Y, *et al.* Downregulation of microRNA-429 protects cardiomyocytes against hypoxia-induced apoptosis by increasing Notch1 expression. *Int J Mol Med*, 2016, 37(6): 1677-1685.
- 27 Chen DQ, Li YC, Li YF, *et al.* Tumor suppressive microRNA-429 regulates cellular function by targeting VEGF in clear cell renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 13(2): 1361-1366.
- 28 Yu T, Lu XJ, Li JY, *et al.* Overexpression of miR-429 impairs intestinal barrier function in diabetic mice by down-regulating occludin expression. *Cell Tissue Res*, 2016, 366(2): 341-352.

收稿日期: 2020-01-21 修回日期: 2020-05-18

本文编辑: 刘丹