

长链非编码RNA *Mirt2*靶向CCR1通路缓解创伤性脑损伤后的继发性神经炎症

马志兵¹, 孙凯凯¹, 李楠¹, 李泽明¹, 王瑞奇¹, 张鹏帅¹, 康志文¹, 王洋¹, 韩振峰¹, 宁卓慧², 杨光辉^{1*}

¹太原市中心医院(山西医科大学第九临床医学院)神经外科, 山西 太原

²山西医科大学第一医院疼痛科, 山西 太原

收稿日期: 2026年7月13日; 录用日期: 2026年8月6日; 发布日期: 2026年8月14日

摘要

目的: 长链非编码RNA (lncRNA)的表达失调在创伤性脑损伤(TBI)引发的继发性病理损害与组织修复过程中发挥关键作用。本研究旨在探讨lncRNA心肌梗死相关转录因子2 (*Mirt2*)在TBI后的生物学功能, 并阐明其调控小胶质细胞介导的神经炎症的潜在分子机制。方法: 通过构建小鼠控制性皮质撞击(CCI)体内TBI模型及脂多糖(LPS)诱导的原代小胶质细胞体外炎症模型, 系统评估*Mirt2*对神经炎症的调控作用。采用转录组测序(RNA-Seq)筛选下游靶基因, 并通过蛋白质印迹法(Western Blot)与实时荧光定量PCR (RT-qPCR)对关键信号通路进行验证。结果: 体内与体外实验均证实, TBI或LPS刺激可显著下调*Mirt2*的转录表达。RNA-Seq结合定量分析表明, 敲低*Mirt2*可打破小胶质细胞的转录稳态, 导致趋化因子受体CCR1及其衔接蛋白TPR1异常上调, 进而激活下游ERK1/2信号通路, 显著增加促炎细胞因子IL-1 β 和IL-6的释放。结论: lncRNA *Mirt2*是TBI后小胶质细胞介导神经炎症的关键负调控因子。*Mirt2*下调可通过激活CCR1/TPR1/ERK信号通路促进促炎因子释放; 上调*Mirt2*可抑制小胶质细胞过度活化, 本研究完善了TBI继发神经炎症的分子调控网络, 为相关基础机制探究提供实验支撑。

关键词

创伤性脑损伤, 长链非编码RNA *Mirt2*, 小胶质细胞, 神经炎症, CCR1, ERK信号通路

Alleviation of Secondary Neuroinflammation after Traumatic Brain Injury by Long-Chain Non-Coding RNA *Mirt2* via Targeting the CCR1 Pathway

*通讯作者。

文章引用: 马志兵, 孙凯凯, 李楠, 李泽明, 王瑞奇, 张鹏帅, 康志文, 王洋, 韩振峰, 宁卓慧, 杨光辉. 长链非编码RNA *Mirt2* 靶向 CCR1 通路缓解创伤性脑损伤后的继发性神经炎症[J]. 临床医学进展, 2026, 16(8): 1043-1053.

DOI: 10.12677/acm.2026.1682878

Zhibing Ma¹, Kaikai Sun¹, Nan Li¹, Zeming Li¹, Ruiqi Wang¹, Pengshuai Zhang¹,
Zhiwen Kang¹, Yang Wang¹, Zhenfeng Han¹, Zhuohui Ning², Guanghui Yang^{1*}

¹Department of Neurosurgery, Taiyuan Central Hospital (The Ninth Clinical Medical School of Shanxi Medical University), Taiyuan Shanxi

²Department of Pain Medicine, First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan Shanxi

Received: July 13, 2026; accepted: August 6, 2026; published: August 14, 2026

Abstract

Objective: Dysregulation of long non-coding RNAs (lncRNAs) plays a vital role in secondary pathological injury and tissue repair after traumatic brain injury (TBI). This study aimed to investigate the biological function of lncRNA myocardial infarction-associated transcript 2 (*Mirt2*) following TBI, and to elucidate its potential molecular mechanism in regulating microglia-mediated neuroinflammation. **Methods:** A controlled cortical impact (CCI)-induced TBI mouse model *in vivo* and a lipopolysaccharide (LPS)-stimulated primary microglial inflammatory model *in vitro* were established to systematically evaluate the regulatory effect of *Mirt2* on neuroinflammation. RNA sequencing (RNA-Seq) was performed to screen downstream target genes, and Western Blotting and real-time quantitative PCR (RT-qPCR) were used to verify the key signaling pathways. **Results:** Both *in vivo* and *in vitro* experiments verified that TBI or LPS stimulation markedly downregulated the transcriptional level of *Mirt2*. Combined RNA-Seq and quantitative analyses revealed that *Mirt2* knock-down disrupted the transcriptional homeostasis of microglia, abnormally upregulated chemokine receptor CCR1 and its adaptor protein TPR1, further activated the downstream ERK1/2 signaling pathway, and drastically boosted the secretion of pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-6. **Conclusion:** lncRNA *Mirt2* acts as a crucial negative regulator of microglia-mediated neuroinflammation post TBI. Downregulation of *Mirt2* promotes the release of pro-inflammatory cytokines via activating the CCR1/TPR1/ERK signaling axis, while upregulating *Mirt2* can suppress excessive microglial activation. This study enriches the molecular regulatory network of secondary neuroinflammation after TBI and provides experimental evidence for relevant basic mechanistic research.

Keywords

Traumatic Brain Injury, Long Non-Coding RNA *Mirt2*, Microglia, Neuroinflammation, CCR1, ERK Signaling Pathway

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

1.1. 研究背景

创伤性脑损伤(TBI)是全球范围内导致患者高死亡率和长期致残的主要病因之一[1]。TBI的病理演变过程极其复杂,临床上主要分为原发性机械损伤与继发性病理损伤两个阶段。在机械应力造成的原发性损伤发生后,数分钟内即可触发一系列级联式细胞与生化病理事件,进而引发继发性损伤;这些事件包括

氧化应激、神经炎症、线粒体功能障碍以及细胞凋亡,其病理病程可持续数小时、数天甚至数月之久[2]。

在诸多继发性病理改变中,神经炎症被公认为是驱动 TBI 后病程进展的关键机制,并在中枢神经系统(CNS)损伤与修复过程中发挥着促炎损害与抗炎修复的双重作用[3]。CNS 炎症本质上是一种强烈的无菌性免疫反应,其典型病理特征表现为 CNS 内源性常驻胶质细胞的激活、外周免疫细胞向损伤区域的募集,以及大量促炎细胞因子和趋化因子的释放[4]。尽管适度且平衡的炎症反应对于清除细胞碎片和促进组织重塑至关重要,但持续且失控的过度炎症则会显著加剧 TBI 后的神经元凋亡与继发性神经功能障碍[5][6]。近期研究表明,长链非编码 RNA (lncRNA) *Mirt2* 被证实是一种重要的炎症抑制因子,能够有效阻断由脂多糖(LPS)等核心炎症介质触发的级联免疫反应。然而,现有研究证实 *Mirt2* 可广谱抑制 LPS 诱导的全身炎症,但该分子在中枢神经系统,尤其是创伤性脑损伤介导的小胶质细胞炎症中的调控作用尚未明确,且其下游靶通路未见报道。

1.2. 创伤性脑损伤中的小胶质细胞应答

小胶质细胞作为 CNS 内主要的专职免疫细胞,是启动和维持脑内炎症及免疫应答的核心。在 TBI 发生后,小胶质细胞迅速活化并向损伤灶聚集、迁移,在调控早期神经炎症反应中发挥着主导作用[7]。最新观点表明,TBI 后小胶质细胞的作用表现出高度的复杂性与表型异质性,犹如一把“双刃剑”,这源于它们具有极化为两种截然不同功能表型的潜能:即促炎型(M1 样)和抗炎型(M2 样)表型[8]。因此,调控小胶质细胞过度活化、抑制炎症因子释放是 TBI 干预的重要研究方向,目前仍缺少特异性内源性调控靶点。虽然现有研究发现某些内源性分子(如 IL-4、IL-10 和 TGF- β)能够选择性增强 M2 型极化[9],但目前在临床上依然缺乏针对该靶点的有效干预手段。

2. 材料与方法

2.1. 动物 TBI 模型及实验分组

本研究选用 24 只 8 周龄、体重 25~27 克的健康雄性 C57BL/6 小鼠,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号:SYXK(北京)2022-0021]。所有小鼠均饲养于温度与湿度适宜、维持 12 小时明/暗循环的标准环境中。实验前给予小鼠至少 3 天的适应性驯养,其间自由进食与饮水。

2.2. 实验性 TBI 模型建立

采用控制性皮质撞击(CCI)法建立小鼠中度 TBI 模型。核心装置采用美国 Custom Design & Fabrication 公司生产的 eCCI-6.3 型控制性皮质撞击仪。小鼠经腹腔注射 10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)深度麻醉后,将其头部牢固固定于立体定位仪上,术中通过医用加热垫维持其体温恒定。随后小心切开头皮并剥离颅骨表面筋膜,在前囟后 2.0 mm、中线旁开 2.0 mm 处的右侧大脑半球钻取一直径为 3.5 mm 的骨窗,完整暴露硬脑膜。使用直径为 3 mm 的平面撞击头实施定量撞击,撞击参数设定为:撞击速度 4.5 m/s,撞击深度 2 mm,留空停留时间 200 ms。CCI 术后逐层缝合头皮,并将小鼠移至加热垫上直至其完全苏醒。假手术组(Sham 组)小鼠接受除实际 CCI 撞击之外的所有相同的麻醉、开颅及骨窗暴露等手术准备操作[10]。所有小鼠造模完成后正常饲养 24 h,麻醉后快速分离损伤侧大脑皮层组织,液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于 RNA 及总蛋白提取。

2.3. *Mirt2* 模拟物细胞转染及侧脑室注射

Mirt2 模拟物(*Mirt2* mimics)、阴性对照模拟物(NC mimics)及 *Mirt2* 激动剂均采购于广州锐博生物科技有限公司。体外细胞实验采用 RiboFECT™ CP 转染试剂,参照厂商操作说明书,将终浓度 100 nM 的

Mirt2 mimics 或 NC mimics 转染至原代小胶质细胞；原代小胶质细胞由混合胶质细胞经震荡分离法纯化获得，经 Iba1 免疫荧光染色鉴定细胞纯度 > 95%，纯化后细胞用于后续转染及 LPS 炎症刺激处理。

体内干预实验配置 Mirt2 激动剂溶液，室温静置 15 min 充分溶解备用；采用 Hamilton 微量注射器，在 RWD 立体定位仪引导下完成小鼠侧脑室微量注射，注射坐标：前囟后 0.5 mm、中线旁 1.0 mm、硬脑膜下 3.0 mm。CCI 造模结束 20 min 后，于小鼠右侧脑室单次注射 5 nM Mirt2 激动剂；同步设置溶剂对照组，侧脑室注射等体积溶解激动剂的无菌缓冲液，其余手术流程、动物饲养条件与给药模型组完全保持一致。

2.4. 转录组测序

2.4.1. RNA 提取与高通量测序文库制备

利用 Invitrogen 公司的 TRIzol 试剂一步法提取组织或细胞总 RNA。采用 Thermo Scientific 公司的 NanoDrop 分光光度计对提取的 RNA 进行浓度测定、纯度检测及完整性评估。每组样本精确称取包含 3 μ g 总 RNA 的样本作为后续高通量测序文库构建的起始材料。

2.4.2. 文库构建与质控

在测序文库构建过程中，引入严格的大小选择(Size selection)步骤，以特异性富集长度在 400~500 碱基对(bp)之间的 cDNA 片段。采用 Beckman Coulter 公司的 AMPure XP 磁珠系统对文库进行纯化。两端成功连接测序接头的 DNA 片段利用 Illumina PCR 引物混合物进行 15 个循环的 PCR 富集扩增。扩增产物再次通过 AMPure XP 系统进行纯化洗脱。最后，利用 Agilent Technologies 2100 生物分析仪的高灵敏度 DNA 测定试剂盒对纯化后的 DNA 文库进行定量与质控。质控合格的测序文库交由上海派森诺生物科技有限公司，在 Illumina NovaSeq 6000 测序平台上实施双端(Paired-end)高通量测序。

测序原始数据过滤后 Q30 > 90%，样本间基因表达相关性良好；差异基因 GO、KEGG 富集结果显示，显著差异基因集中于趋化因子信号、MAPK 炎症通路，据此筛选核心靶基因 CCR1 开展后续验证。

2.5. 蛋白质印迹法(Western Blotting)

采用标准 RIPA 裂解液提取组织或细胞总蛋白，经 BCA 法定量后行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜(Bio-Rad)。膜经 5%脱脂奶粉室温封闭 1 小时后，置于相应的一抗(CCR1, TPR1, ERK1/2, p-ERK1/2, IL-1 β , IL-6, β -actin)稀释液中，于 4℃恒温摇床上温和振荡孵育过夜。次日回收一抗，用 TBST 缓冲液洗膜 3 次(每次 5 分钟)，以清除未结合的一抗。随后将膜置于用 1:10,000 稀释的 Alexa Fluor790 和 Alexa Fluor 680 荧光标记二抗(Invitrogen 公司，货号分别为 A11357 和 A21109)中，室温避光孵育 1 hour。二抗孵育结束后，再次用 TBST 缓冲液避光洗膜 3 次(每次 5 分钟)。最后，利用近红外激光扫描成像系统(Cytiva 公司，Amersham Typhoon™)对膜进行双色荧光信号检测与定量扫描。采用 ImageJ 软件(NIH, Bethesda, MD)对各目标蛋白条带的光密度值进行定量分析，并以 β -actin 作为内部加载内参进行归一化校准。

2.6. 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

采用 Invitrogen TRIzol 试剂提取细胞/脑组织总 RNA；屹普 DS-500 NanoDrop 分光光度计检测 RNA 浓度与纯度，合格标准：A260/A280 = 1.8~2.1，A260/A230 $\geq$ 1.8。

合格 RNA 按照艾科瑞 AG11728 反转录试剂盒说明书完成基因组 DNA 去除与 cDNA 合成；qPCR 采用 AG11739 荧光定量试剂盒，10 μ L 扩增体系：2 $\times$ SG Green qPCR Mix 5 μ L、上下游引物各 0.2 μ L、cDNA 模板 1 μ L、无酶水 3.6 μ L。

PCR 扩增程序：95℃预变性 2 min；95℃变性 5 s，60℃退火延伸 30 s，共计 40 个循环。以 β -actin 为

内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 *Mirt2* 相对表达量, 引物序列见表 1。

Table 1. Information of qPCR amplification primers

表 1. qPCR 扩增引物信息

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	扩增产物长度
<i>Mirt2</i>	TCCTGACACGCCCTTCTCTT	CCTCAGCTCCACTCTACCAG	198 bp
β -actin	TGTACCCAGGCATTGCTGAC	AACGCAGCTCAGTAACAGTCC	238 bp

注: 表内 *Mirt2* 与内参 β -actin qPCR 扩增引物序列, 引物由上海生工生物合成, 扩增片段特异性经熔解曲线验证。

2.7. 统计学分析

所有实验数据均以均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM)或均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)的形式表示。利用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学处理。组间整体多重比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)或双因素方差分析(Two-way ANOVA), 事后两两比较采用 Bonferroni 检验。所有统计学显著性水准统一设定为 $P < 0.05$ 。

3. 结果

3.1. *Mirt2* 表达在模型中显著下调及敲低沉默效率验证

为了明确 *Mirt2* 在脑损伤及神经炎症中的表达特征, 我们首先建立体外 LPS 诱导的小胶质细胞炎症模型。RT-qPCR 结果显示(图 1), 与正常对照组(Control)相比, LPS 刺激可导致小胶质细胞中 *Mirt2* mRNA 的转录水平发生极显著下调(相对表达量降至 0.66 ± 0.01 ; $P < 0.001$)。随后, 为了通过功能丧失(Loss-of-function)实验探讨其分子机制, 我们利用 siRNA 成功构建了 *Mirt2* 敲低(*Mirt2* KD)细胞模型。定量结果证实, 转染后小胶质细胞中 *Mirt2* 的转录水平成功被沉默约 60%(表达量显著降至 0.40 ± 0.02 ; 与 Control 组相比 $P < 0.001$, 与 LPS 组相比 $P < 0.001$), 证明该敲低工具具有极高的沉默效率与特异性(图 1)。

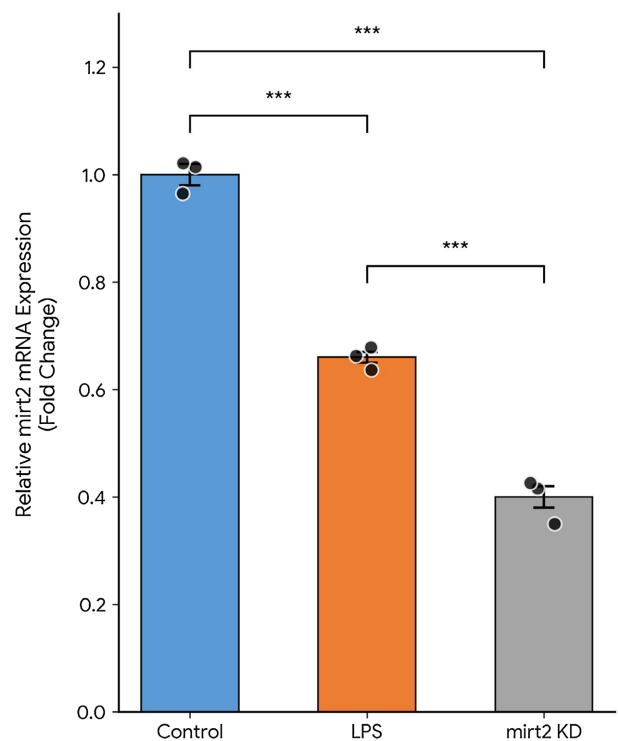
同时, 体内 Western Blot 检测进一步证实了 TBI 介导的继发性炎症反应: 在体内 TBI 发生后, 受损大脑皮层组织中的衔接蛋白 TPR1 (34 kDa)以及关键促炎细胞因子 IL-1 β (31 kDa)和 IL-6 (24 kDa)的蛋白水平皆表现出剧烈的表达上调(图 2), 提示神经炎症与脑损伤的高度相关性。

3.2. 转录组测序筛选 *Mirt2* 调控的下游差异表达基因

为了进一步系统性筛查 *Mirt2* 维持小胶质细胞稳态的下游分子网络, 我们对各组细胞进行了高通量 RNA-Seq 测序。差异表达基因(DEGs)筛选结果显示, 与未处理的 Control 组相比, 单纯 LPS 诱导的小胶质细胞中仅有 8 个基因显著上调, 17 个基因显著下调(图 3(a), 图 3(c))。然而, 在 LPS 诱导的基础上实施 *Mirt2* 敲低(si-*Mirt2* + LPS 组)则引发了转录谱的剧烈级联反应: 与单纯 LPS 组相比, 共有 543 个基因表达显著上调, 542 个基因表达显著下调(图 3(b), 图 3(d))。这一鲜明对比提示, LncRNA *Mirt2* 在维持小胶质细胞转录稳态及抑制炎症过度激活中发挥了关键的“分子开关”作用。

3.3. *Mirt2* 表达缺失介导小胶质细胞 CCR1/TPR1/ERK 信号轴的激活及下游炎症因子的释放

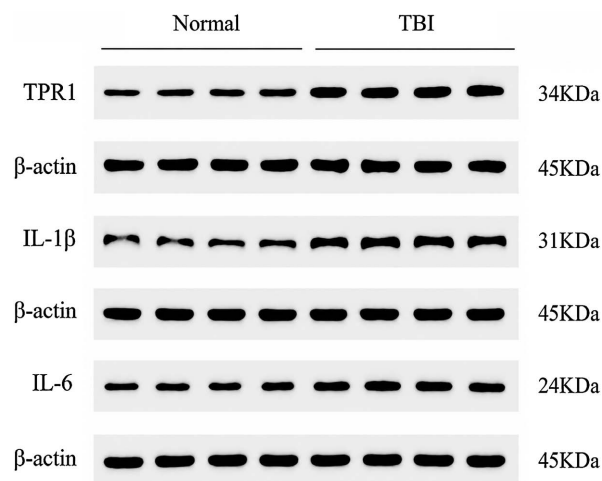
为了进一步阐明 *Mirt2* 调控小胶质细胞介导的神经炎症的下游分子机制, 我们根据转录组测序提示, 重点聚焦了趋化因子受体及其介导的信号通路。趋化因子是一类广泛表达的低分子量碱性细胞因子, 其核心功能在于介导特定免疫细胞的定向迁移与病理活化[3]-[7]。其中, CC 趋化因子受体 1 (CCR1)作为



利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术检测不同处理组中 *Mirt2* 基因的转录水平, 以内参基因 β -actin 的表达量进行归一化校正。图中有色柱状图高度代表表达量均值, 误差线代表标准误 (Mean $\pm$ SEM), 柱面上的黑色实心圆点代表 3 次独立的生物学重复具体数值 ($n=3$)。Control: 正常对照组; LPS: LPS 诱导的炎症/损伤模型组; *Mirt2* KD: *Mirt2* 基因敲低组。组间差异采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及 Bonferroni 双重比较校正进行统计学检验。*** $P < 0.001$ 表示差异具有极显著的统计学意义。

Figure 1. Quantitative analysis of *Mirt2* mRNA transcript levels in cells from different treatment groups by RT-qPCR

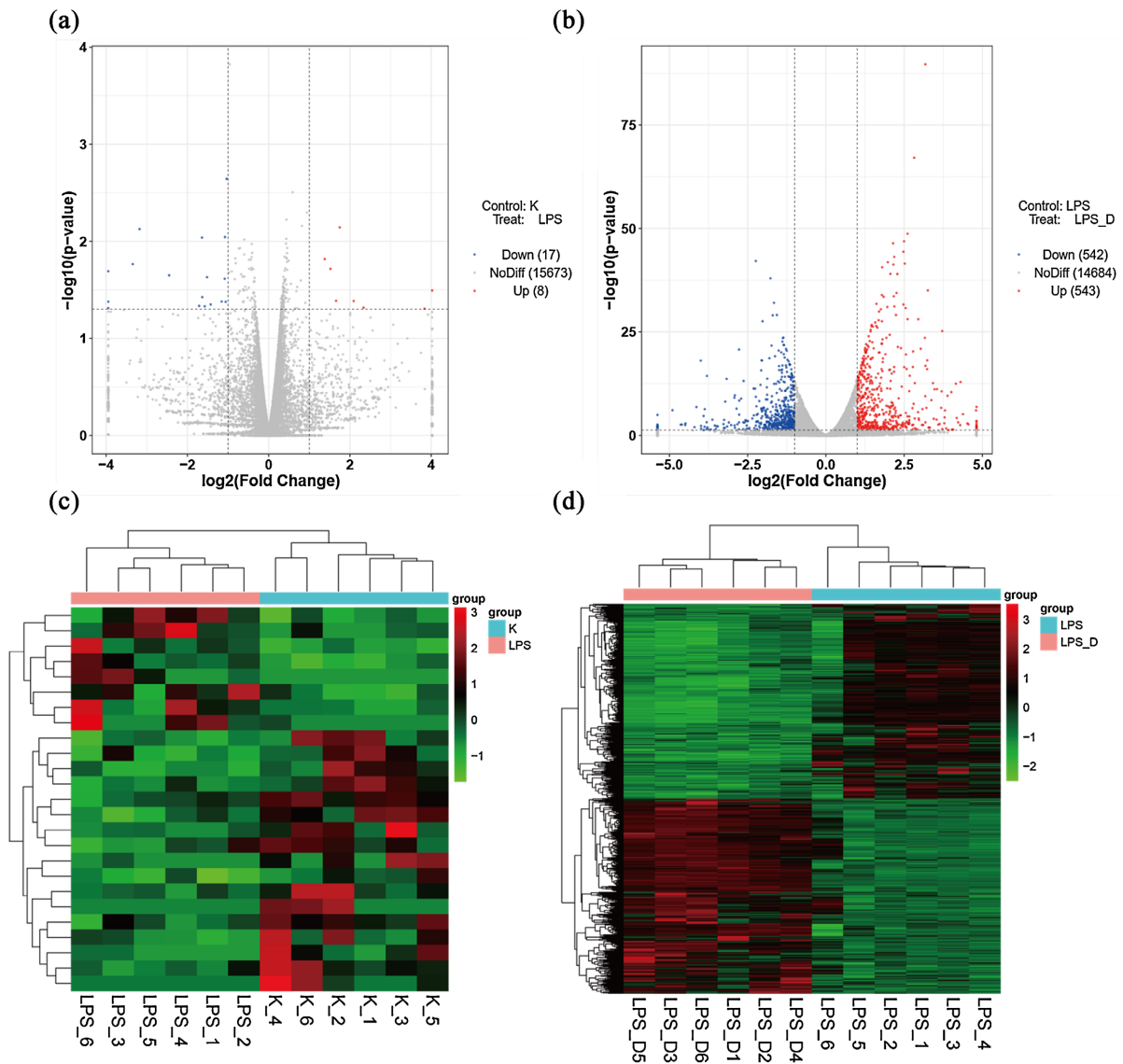
图 1. 利用 RT-qPCR 对不同处理组细胞中 *Mirt2* mRNA 的转录水平进行了定量分析



采用蛋白质印迹法 (Western Blot) 检测正常对照组 (Normal) 与创伤性脑损伤组 (TBI) 小鼠在损伤后皮层组织中的靶蛋白水平。展示了衔接蛋白 TPR1 (34 kDa) 以及关键促炎细胞因子 IL-1 β (31 kDa) 和 IL-6 (24 kDa) 的条带变化。 β -actin (45 kDa) 用作内部加载内参, 以保证各加样孔的总蛋白载量均一。

Figure 2. Early neuroinflammatory response and upregulated expression of related pathway proteins in the cerebral cortex of mice induced by traumatic brain injury (TBI)

图 2. 创伤性脑损伤 (TBI) 引发的小鼠大脑皮层早期神经炎症反应及相关通路蛋白表达上调



(a) LPS 组相比于对照(Control)组差异表达基因(DEGs)的火山图(包含 8 个上调基因和 17 个下调基因); (b) *Mirt2* 敲低(si-*Mirt2* + LPS)组相比于单纯 LPS 组 DEGs 的火山图(包含 543 个上调基因和 542 个下调基因); (c) LPS 组 vs Control 组显著差异基因的分层聚类热图; (d) si-*Mirt2* + LPS 组 vs LPS 组显著差异基因的分层聚类热图(阈值设定: $|\log_2 \text{FC}| > 1$, $P < 0.05$)。

Figure 3. Effects of *Mirt2* knockdown on gene-expression profiles in LPS-induced primary microglia revealed by transcriptome sequencing (RNA-Seq)

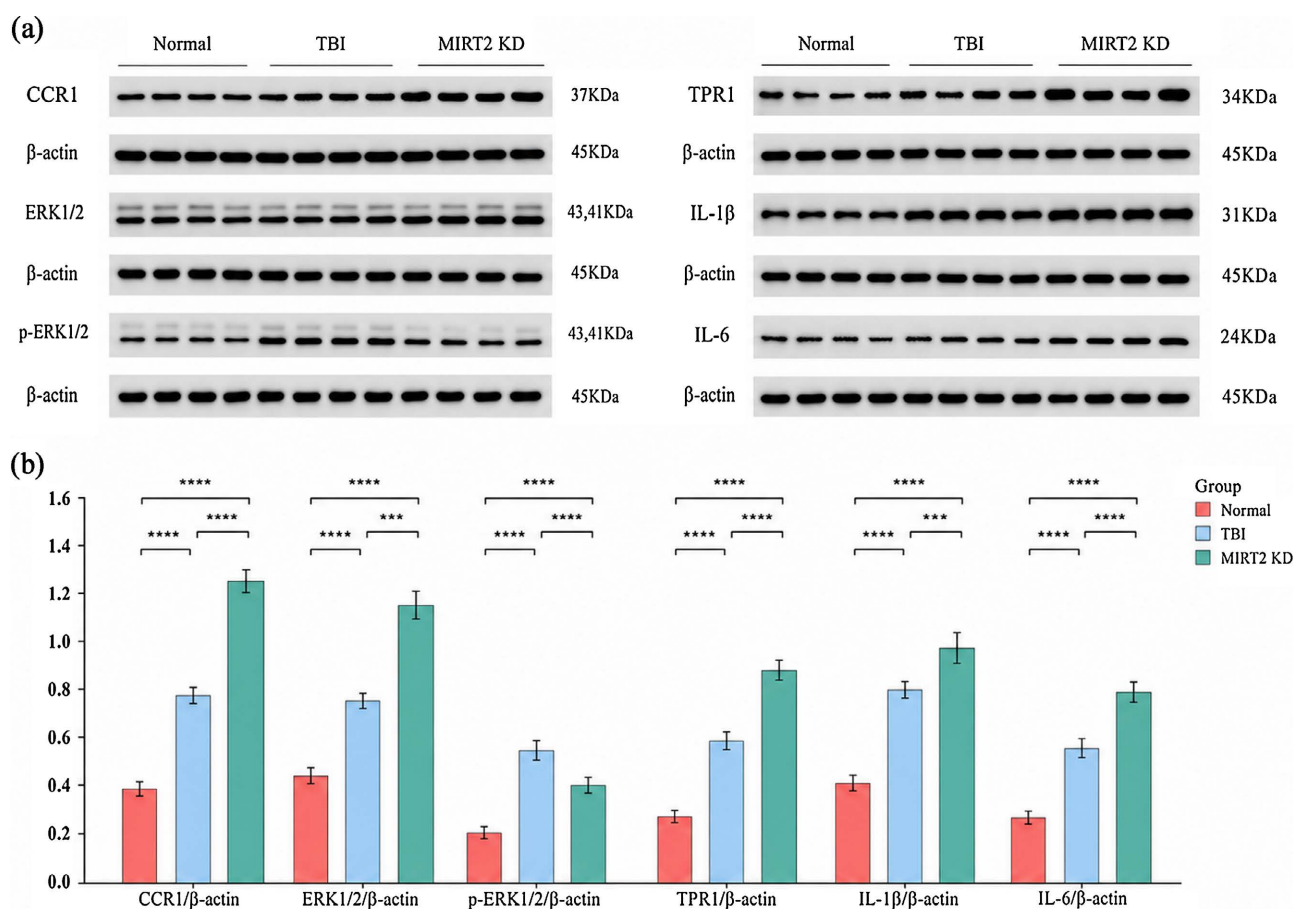
图 3. 转录组测序(RNA-Seq)揭示 *Mirt2* 敲低对 LPS 诱导的原代小胶质细胞基因表达谱的影响

一种经典的 G 蛋白偶联受体,被证实广泛表达于 CNS 固有的免疫细胞——小胶质细胞表面[10]-[12]。

在本研究中, Western Blot 结果显示(图 4(a), 图 4(b)), 在正常状态下(Normal), 膜受体 CCR1、衔接蛋白 TPR1 以及促炎因子(IL-1 β 、IL-6)均维持在极低基线表达水平。当受到炎症刺激(LPS/TBI 组)后, 这些蛋白的表达均显著上升($P < 0.001$), 同时伴随着关键通路蛋白 ERK1/2 磷酸化水平(p-ERK1/2)的剧烈激活($P < 0.001$)。

最重大的发现在于: 当特异性敲低 *Mirt2* (*Mirt2* KD 组)后, CCR1、TPR1、IL-1 β 和 IL-6 的表达在原有高丰度基础上发生了进一步的剧烈飙升(与 LPS 组相比均 $P < 0.001$)。与之平行的是, 总 ERK1/2 的水

平在各组间保持稳定,但敲低组中 p-ERK1/2 的激活比例呈现出特征性改变(图 4(b)),这提示 *Mirt2* 低表达可解除其对 CCR1/TPR1/ERK 通路的上游抑制作用。



(a) 采用蛋白质印迹法(Western Blot)检测正常对照组(Normal)、创伤性脑损伤组(TBI)以及 *Mirt2* 敲低组(*Mirt2* KD)中膜受体 CCR1、衔接蛋白 TPR1、总 ERK1/2、磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2)以及经典促炎因子 IL-1 β 和 IL-6 的蛋白条带变化。各靶蛋白下方均配有相应的 β -actin 作为上样内参。(b) 对应靶蛋白与内参 β -actin 灰度比值的定量统计柱状图。数据以均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示;组间多重比较采用两因素方差分析(Two-way ANOVA)及 Bonferroni 事后检验(**P < 0.01、***P < 0.001、****P < 0.0001 表示差异具有极显著的统计学意义)。

Figure 4. Mediation of CCR1/TPR1/ERK signaling axis activation and downstream inflammatory-factor release in microglia by loss of *Mirt2* expression

图 4. *Mirt2* 表达缺失介导小胶质细胞中 CCR1/TPR1/ERK 信号轴的激活及下游炎症因子的释放

刺激可下调 *Mirt2* 表达,进而解除对 CCR1/TPR1 信号轴的抑制,引起 ERK1/2 通路过度活化,促进 IL-1 β 、IL-6 等促炎因子大量释放,加重中枢继发性神经炎症;上调 *Mirt2* 可逆转上述炎症级联反应,如图 5 所示。

综上所述,本研究证实 lncRNA *Mirt2* 是限制中枢神经炎症过度激活的关键内源性抑制因子。*Mirt2* 表达下调与 CCR1/TPR1/ERK 信号通路的异常活化密切相关,我们推测该分子可在转录层面抑制通路靶基因的转录。随着 *Mirt2* 表达的降低,CCR1/TPR1 信号轴被持续激活,通过衔接蛋白 TPR1 进一步放大下游 ERK 炎症级联反应,最终加重创伤性脑损伤(TBI)或体外炎症刺激诱发的早期继发性脑炎性损伤。本研究明确了 *Mirt2* 在 TBI 后继发性神经炎症中的调控作用,并锁定了下游 CCR1/TPR1/ER 信号轴,进一步完善了创伤性脑损伤炎症调控的分子网络,为后续 TBI 炎症机制的基础研究提供了坚实的实验数据支撑。

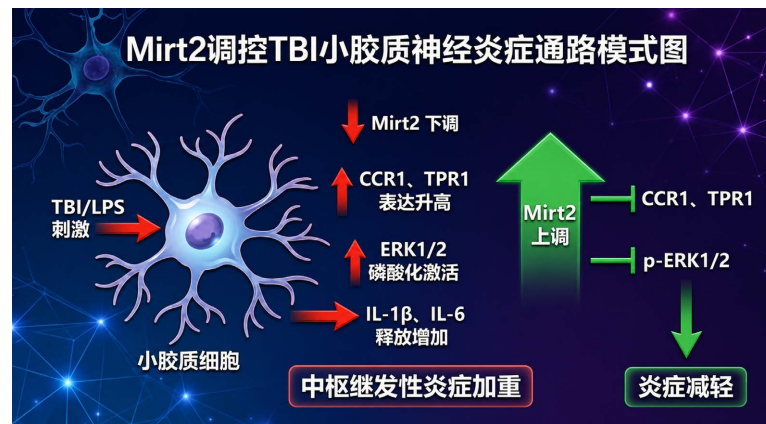


Figure 5. Schematic diagram illustrating the mechanism by which lncRNA *Mirt2* regulates microglial neuroinflammation under TBI or LPS stimulation

图 5. lncRNA *Mirt2* 调控小胶质细胞神经炎症的作用机制示意图 TBI 或 LPS

4. 讨论

4.1. *Mirt2* 在 TBI 诱导小胶质细胞炎症中的负向调控作用

创伤性脑损伤后的继发性神经炎症是加重脑组织损伤、阻碍神经功能修复的核心病理环节，小胶质细胞作为中枢固有免疫细胞，其过度活化会大量释放 IL-1 β 、IL-6 等促炎因子，放大局部炎症级联反应，持续损伤神经元[7] [8]。既往研究证实 lncRNA *Mirt2* 是广谱炎症抑制分子，可缓解 LPS 诱导的全身炎症反应，但该分子在中枢神经系统，尤其是 TBI 介导的小胶质细胞炎症中的作用及下游调控通路尚未阐明。本研究同时构建体外 LPS 原代小胶质细胞炎症模型与体内小鼠 CCI 创伤性脑损伤模型，结果一致证实：LPS 刺激或 TBI 造模均可显著下调 *Mirt2* 转录水平；在此基础上敲低 *Mirt2* 会进一步加剧小胶质细胞炎症活化，促炎因子表达显著升高，提示 *Mirt2* 是 TBI 后小胶质细胞介导神经炎症的关键内源性负调控分子，填补了 *Mirt2* 在创伤性脑损伤领域的研究空白。

本研究采用 siRNA 敲低、外源性激动剂干预两种方式实现 *Mirt2* 得失功能调控，实验结果相互印证，证实上调 *Mirt2* 能够有效抑制小胶质细胞炎症应答。现有研究多聚焦 IL-4、IL-10 等细胞因子调控小胶质极化，而靶向 lncRNA 调控神经炎症的内源性干预靶点仍较为稀缺，本研究明确 *Mirt2* 的抗炎功能，可为 TBI 炎症相关基础研究提供新的分子研究对象。

4.2. CCR1/TPR1/ERK 信号轴介导 *Mirt2* 对神经炎症的调控效应

为解析 *Mirt2* 调控炎症的下游分子网络，本研究借助 RNA-Seq 转录组测序对比 LPS 处理、LPS 联合 *Mirt2* 敲低两组细胞的转录谱差异，发现敲低 *Mirt2* 会引发数百个基因显著差异表达，提示 *Mirt2* 参与维持小胶质细胞转录稳态。结合 GO、KEGG 通路富集结果，筛选趋化因子通路核心分子 CCR1 及其衔接蛋白 TPR1 开展后续验证。

CCR1 是小胶质细胞膜表面经典 G 蛋白偶联趋化因子受体，激活后可通过衔接蛋白 TPR1 启动下游 MAPK 家族 ERK 信号通路，促进促炎因子转录与释放[11] [13]。本研究 Western Blot 结果显示，LPS、TBI 刺激可同步上调 CCR1、TPR1 蛋白表达，提升 ERK1/2 磷酸化水平，增加 IL-1 β 、IL-6 分泌；而敲低 *Mirt2* 会进一步放大该通路活化程度，反向印证 *Mirt2* 可负向调控 CCR1/TPR1/ERK 信号轴。现有实验仅能证实 *Mirt2* 表达水平与该通路活化程度存在显著相关性，暂未明确二者直接分子结合模式，推测 *Mirt2* 可能在转录水平抑制 *Ccr1*、*Tpr1* 基因表达，进而阻断下游 ERK 炎症级联反应。ERK 通路持续激活是中

枢无菌性炎症的标志性事件, 本研究将 lncRNA *Mirt2* 与 CCR1/TPR1/ERK 通路关联, 完善了创伤性脑损伤小胶质炎症的分子调控网络。

4.3. 本研究局限性

本研究仍存在一定局限性。第一, 实验仅在体外原代小胶质细胞与小鼠 CCI 模型开展表型验证, 未设计通路挽救实验反向验证 CCR1/TPR1 是 *Mirt2* 调控炎症的必需下游介质, 因果论证完整性有限; 第二, 未收集临床创伤人脑组织样本, 无法验证人体 TBI 病灶中 *Mirt2*、CCR1 的表达变化, 研究转化参考价值受限; 第三, 本研究仅检测 IL-1 β 、IL-6 两种促炎因子, 未进一步观察小胶质细胞 M1/M2 极化标志物, 无法明确 *Mirt2* 对小胶质细胞表型转化的调控作用; 第四, 暂未开展 RNA 荧光原位杂交、RNA pull-down、RIP 等分子互作实验, 尚不能阐明 *Mirt2* 调控 Ccr1、Tpr1 的具体分子机制(ceRNA 吸附 miRNA 或蛋白结合调控转录)。

4.4. 研究价值与后续展望

综上, 本研究证实 lncRNA *Mirt2* 为 TBI 后继发性神经炎症的负调控因子, *Mirt2* 低表达可通过激活 CCR1/TPR1/ERK 信号通路促进小胶质细胞释放促炎因子, 加重中枢炎症损伤。本研究仅从细胞与动物层面揭示 *Mirt2* 的抗炎表型及下游信号通路, 虽暂不具备直接临床转化条件, 但丰富了创伤性脑损伤神经炎症的分子调控理论, 为后续 TBI 炎症干预相关基础研究提供实验依据。

后续可围绕本研究不足进一步完善实验: 一是开展细胞、动物通路挽救实验, 反向验证 CCR1/TPR1/ERK 通路的介导作用; 二是补充 FISH、RNA pull-down 等实验, 明确 *Mirt2* 调控靶基因的分子模式; 三是检测 Iba1、CD86、CD206 极化标志物, 探究 *Mirt2* 对小胶质细胞表型极化的影响; 四是纳入临床 TBI 脑组织样本, 验证 *Mirt2* 的临床表达特征, 探索其作为脑损伤炎症标志物的潜在价值。

声 明

本动物实验方案严格遵循动物福利原则, 并获得实验动物福利伦理委员会的批准(审批号: HYSD2023-10)。

基金项目

太原市科技局 2022 年区域医疗中心科技创新计划项目(项目名称: lncRNA *Mirt2* 调控 TRAF6/Fas 在颅脑创伤后小胶质细胞神经炎症反应中的作用及机制研究; 项目编号: 202262); 太原市科技局 2022 年区域医疗中心科技创新计划项目(项目名称: 自发性脑出血后的脑动脉基因表达及其对炎症调控的作用机制研究; 项目编号: 202240)。

参考文献

- [1] Dong, T., Zhi, L., Bhayana, B. and Wu, M.X. (2016) Cortisol-Induced Immune Suppression by a Blockade of Lymphocyte Egress in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroinflammation*, **13**, Article No. 197. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0663-y>
- [2] Wang, Z.G., Cheng, Y., Yu, X.C., Ye, L., Xia, Q., Johnson, N.R., *et al.* (2015) BFGF Protects against Blood-Brain Barrier Damage through Junction Protein Regulation via PI3K-Akt-Rac1 Pathway Following Traumatic Brain Injury. *Molecular Neurobiology*, **53**, 7298-7311. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9583-6>
- [3] Mishra, S.K., Kumar, B.S.H., Khushu, S., Singh, A.K. and Gangenahalli, G. (2017) Early Monitoring and Quantitative Evaluation of Macrophage Infiltration after Experimental Traumatic Brain Injury: A Magnetic Resonance Imaging and Flow Cytometric Analysis. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **78**, 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2016.11.008>
- [4] Simon-O'Brien, E., Gauthier, D., Riban, V. and Verleye, M. (2016) Etifoxine Improves Sensorimotor Deficits and Reduces Glial Activation, Neuronal Degeneration, and Neuroinflammation in a Rat Model of Traumatic Brain Injury.

- Journal of Neuroinflammation*, **13**, Article No. 203. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0687-3>
- [5] Shi, H., Wang, H.L., Pu, H., Shi, Y., Zhang, J., Zhang, W., *et al.* (2015) Ethyl Pyruvate Protects against Blood-Brain Barrier Damage and Improves Long-Term Neurological Outcomes in a Rat Model of Traumatic Brain Injury. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, **21**, 374-384. <https://doi.org/10.1111/cns.12366>
- [6] Lee, J., Costantini, T.W., D'Mello, R., Eliceiri, B.P., Coimbra, R. and Bansal, V. (2014) Altering Leukocyte Recruitment Following Traumatic Brain Injury with Ghrelin Therapy. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, **77**, 709-715. <https://doi.org/10.1097/ta.0000000000000445>
- [7] Faden, A.I., Wu, J., Stoica, B.A. and Loane, D.J. (2016) Progressive Inflammation-Mediated Neurodegeneration after Traumatic Brain or Spinal Cord Injury. *British Journal of Pharmacology*, **173**, 681-691. <https://doi.org/10.1111/bph.13179>
- [8] Loane, D.J. and Kumar, A. (2016) Microglia in the TBI Brain: The Good, the Bad, and the Dysregulated. *Experimental Neurology*, **275**, 316-327. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.08.018>
- [9] Xia, C., Zhang, S., Gao, Y., Wang, Z. and Chen, N. (2015) Selective Modulation of Microglia Polarization to M2 Phenotype for Stroke Treatment. *International Immunopharmacology*, **25**, 377-382. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.02.019>
- [10] Xu, X., Gao, W., Cheng, S., Yin, D., Li, F., Wu, Y., *et al.* (2017) Anti-Inflammatory and Immunomodulatory Mechanisms of Atorvastatin in a Murine Model of Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroinflammation*, **14**, Article No. 167. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0934-2>
- [11] White, G.E., Iqbal, A.J. and Greaves, D.R. (2013) CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. *Pharmacological Reviews*, **65**, 47-89. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005074>
- [12] Lee, M.M.K., Chui, R.K.S., Tam, I.Y.S., Lau, A.H.Y. and Wong, Y.H. (2012) CCR1-Mediated STAT3 Tyrosine Phosphorylation and CXCL8 Expression in THP-1 Macrophage-Like Cells Involve Pertussis Toxin-Insensitive Gα14/16 Signaling and IL-6 Release. *The Journal of Immunology*, **189**, 5266-5276. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103359>
- [13] Liu, A.M.F., Lo, R.K.H., Lee, M.M.K., Wang, Y., Yeung, W.W.S., Ho, M.K.C., *et al.* (2010) Gα16 Activates Ras by Forming a Complex with Tetratricopeptide Repeat 1 (TPR1) and Son of Sevenless (SOS). *Cellular Signalling*, **22**, 1448-1458. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.05.013>