

表皮生长因子受体抑制剂对氧糖剥夺/复氧诱导的血脊髓屏障损伤的保护作用研究

李在望¹, 姜冬梅², 韩晶¹, 涂景梅¹, 王倩¹

摘要 目的:探讨表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂PD168393对体外氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的血脊髓屏障(BSCB)损伤的保护作用及其可能的机制。方法:体外培养大鼠来源的脊髓微血管内皮细胞和混合胶质细胞,应用transwell培养体系建立体外BSCB模型;将培养的细胞分为3组:对照组(正常培养)、损伤组(OGD/R处理)和治疗组(OGD/R后给予10 nM PD168393干预)。损伤组和治疗组复氧3 h、6 h和12 h后,应用荧光素渗漏实验及内皮细胞跨膜电阻值(TEER)测定来评估各组BSCB通透性变化;应用免疫荧光、Western Blot技术检测各组内皮细胞间紧密连接蛋白ZO-1、Occludin表达的差异;应用ELISA法检测各组细胞分泌致炎因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的差异。结果:损伤组在各个时间点的荧光素渗漏量均高于对照组(均 $P<0.05$),而治疗组荧光素渗漏量均低于损伤组(均 $P<0.05$);损伤组TEER值显著低于对照组(均 $P<0.01$),而治疗组TEER值显著高于损伤组(均 $P<0.05$);损伤组紧密连接蛋白ZO-1和Occludin的表达量低于对照组(均 $P<0.05$),而治疗组ZO-1和Occludin的表达量较损伤组显著提高(均 $P<0.05$);损伤组分泌的致炎因子IL-6、iNOS、TNF- α 均显著高于对照组,治疗组在各时间点致炎因子IL-6、iNOS、TNF- α 的分泌均低于损伤组(均 $P<0.05$)。结论:EGFR抑制剂PD168393有助于维持OGD/R损伤后BSCB的完整性;其机制可能与抑制致炎因子的表达及减少BSCB紧密连接蛋白的破坏有关。

关键词 血脊髓屏障;表皮生长因子受体抑制剂;致炎因子;紧密连接蛋白

中图分类号 R741;R741.02 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20201240

本文引用格式:李在望, 姜冬梅, 韩晶, 涂景梅, 王倩. 表皮生长因子受体抑制剂对氧糖剥夺/复氧诱导的血脊髓屏障损伤的保护作用研究[J]. 神经损伤与功能重建, 2021, 16(2): 63-66, 89.

Protective Effect of EGFR Inhibitor on Blood Spinal Barrier Damage Induced by Oxygen Glucose Deprivation/Re-Oxygenation LI Zai-wang¹, JIANG Dong-mei², HAN Jing¹, TU Jing-mei¹, WANG Qian¹. 1. Department of Neurology, Shenzhen People's Hospital (Second Clinical Medical College of Ji'nan University, First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology), Guangdong Shenzhen 518020, China; 2. Department of Neurology, Nantong Haimen People's Hospital, Jiangsu Yancheng 226100, China

Abstract Objective: To investigate the protective effect and possible mechanism of epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor PD168393 on the blood spinal cord barrier (BSCB) damage induced by oxygen glucose deprivation/re-oxygenation (OGD/R) *in vitro*. **Methods:** Primary microvascular endothelial cells and mixed glial cells from the rat spinal cord were cultured using the transwell culture system to establish the *in vitro* BSCB model. The cultured cells were divided into three groups: control group (untreated), injury group (BSCB damage induced by OGD/R), and treatment group (10 nM PD168393 intervention after OGD/R). The permeability of endothelial cells in the injury and treatment groups was evaluated by the fluorescein leakage test and transepithelial electrical resistance (TEER) at 3 h, 6 h, and 12 h after reoxygenation. The expression of tight junction proteins ZO-1 and Occludin in the endothelial cells of each group was determined by immunofluorescence and Western blot. The differences in proinflammatory factors interleukin-6 (IL-6), tissue necrosis factor- α (TNF- α), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) secreted by each group of cells were measured by ELISA. **Results:** The fluorescein leakage test showed that the amount of fluorescein leakage in the injury group was higher than that in the control group at every time point (all $P<0.05$), while the amount of fluorescein leakage in the treatment group was significantly lower than that in the injury group (all $P<0.05$). TEER value of the injury group was significantly lower than that of the control group (all $P<0.01$), while TEER value of the treatment group was significantly higher than that of the injury group (all $P<0.05$). The expression of ZO-1 and Occludin in the injury group was significantly lower than those in the control group (both $P<0.05$), and the expression of these proteins in the treatment group was significantly higher than those in the injury group (both $P<0.05$). The expression levels of IL-6, TNF- α , and iNOS in the injury group were significantly higher than those in the control group at every time point, and the levels in the treatment group were lower than those in the injury group at every time point (all $P<0.05$). **Conclusion:** The EGFR inhibitor PD168393 can preserve the integrity of the

作者单位

1. 暨南大学第二临床医学院/南方科技大学第一附属医院/深圳市人民医院神经内科
广东 深圳 518020
2. 南通市海门区人民医院神经内科
江苏 盐城 226100
基金项目
国家自然科学基金
(No. 81671219, No. 82071364);
深圳市自然科学基金项目(No. JCYJ20190806145812589)
收稿日期
2020-12-08
通讯作者
王倩
21324667@qq.com

BSCB after OGD/R. The mechanism may involve reducing the expression of proinflammatory factors and suppressing the destruction of tight junction proteins in the BSCB.

Key words blood spinal cord barrier; epidemical growth factor receptor inhibitor; proinflammatory factor; tight junction protein

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)后往往会造成受损伤平面以下肢体和躯干严重的运动、感觉功能缺损,大小便及性功能障碍,且这些缺损往往不可逆^[1]。SCI后的神经功能缺损由原发性损伤和继发性损伤所造成。原发性损伤是指原发疾病对脊髓造成的直接损伤,而继发性损伤与SCI后过度炎症反应及血脊髓屏障(blood-spinal cord barrier, BSCB)的破坏密切相关^[2]。因此,SCI后如何控制炎症反应和保护BSCB结构和功能的完整是减轻继发性损伤的关键环节。

BSCB是中枢神经系统(central nervous system, CNS)特有的屏障结构,与血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)类似,其主要由脊髓微血管内皮细胞、星形胶质细胞、血管周围的小胶质细胞、周细胞及基膜组成,是维持脊髓神经组织微稳态的高选择性屏障结构^[3]。目前有研究证实,在SCI后,BSCB结构的主要组成细胞(微血管内皮细胞、星形胶质细胞及小胶质细胞)出现表皮生长因子受体(epidemical growth factor receptor, EGFR)的大量活化^[4-6]。EGFR是位于细胞质膜上的受体酪氨酸蛋白激酶(tyrosine-protein kinase, TPK),在细胞存活、生长、分化、增生及凋亡等信号转导通路中起着关键性调节作用^[7]。研究发现,EGFR信号通路参与细胞屏障功能的调节,而微血管损伤、肺损伤及肠道内膜的通透性异常改变均与EGFR活化相关^[8]。

有研究证实EGFR抑制剂能改善SCI后神经功能缺损症状^[5,6,9],推测其机制可能与维持SCI后BSCB完整性,减轻脊髓继发性损伤有关。本实验通过建立BSCB体外模型,给予氧糖剥夺/复氧(oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)处理,应用EGFR抑制剂PD168393对损伤的BSCB进行干预,观察内皮细胞通透性、紧密连接蛋白的表达及BSCB细胞分泌炎症因子的变化,以探讨EGFR抑制剂PD168393对BSCB通透性的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

①实验动物:新生24 h内SD大鼠10只,购自常州卡文斯实验动物有限公司。②主要试剂:PD168393购于德国Calbiochem公司;异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)-右旋糖酐(dextranum)(F-D)购

于美国Sigma公司;兔抗Occludin、小鼠抗ZO-1抗体均购于Invitrogen公司;白细胞介素(interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α ELISA试剂盒均购于美国R&D公司;诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)ELISA试剂盒购于AVIVA公司。

1.2 方法

1.2.1 建立体外BSCB模型 培养原代大鼠来源的脊髓微血管内皮细胞和混合胶质细胞,细胞95%融合后进行消化,重悬后以 5×10^4 /mL密度取1 mL接种在12孔板Transwell(聚酯膜,直径12 mm,孔径0.4 μ m)下室,作为滋养层;脊髓微血管内皮细胞取200 μ L接种在上室(Transwell嵌套内),建立上下双层细胞共培养体系。贴壁后每2天换液1次。常规培养约7 d后,Transwell嵌套内脊髓微血管内皮细胞即可形成内皮细胞屏障样组织,模拟BSCB组成细胞间的相互作用,建立体外BSCB模型^[10]。

1.2.2 细胞分组 ①将体外培养的BSCB模型分为3组:对照组、损伤组和治疗组。②损伤组和治疗组细胞用PBS清洗上、下室3次,加入无糖无血清DMEM培养基;将Transwell及校准的测氧仪放入预缺氧小室中,通入95% N_2 ,5% CO_2 直至测氧仪调至0.0~0.2,制造无氧环境。在培养箱内培养6 h后,将2组细胞取出,更换为正常糖、血清的培养基,放入饱和湿度、正常含氧细胞培养箱中进行复氧(此时氧浓度约20%),复氧时间分别为3 h、6 h和12 h;其中治疗组在复氧开始时即给予10 nM PD168393进行干预(给药浓度参照既往研究报道)^[11]。对照组细胞用含糖、含血清的DMEM/F-12完全培养基洗涤3次,然后继续放入正常温度和含氧度的培养箱中培养。

1.2.3 荧光染料渗漏实验 将上述处理3组的上室培养液除去,在Transwell嵌套中加入200 μ L FITC-右旋糖酐(F-D)(1 mg/mL),置于培养箱中30 min。从各组底室分别取100 μ L(每孔取3次)置于96孔板,加入不同已知浓度的F-D,用荧光检测仪在540 nm处读取各孔溶液的荧光强度。根据标准曲线,计算各组渗透到底室的F-D浓度,评估通透性随时间的变化趋势。

1.2.4 跨膜电阻(trans epithelial electrical resistance, TEER)测量 使用来自美国EMD Millipore公司的

Millicell ERS-2 电阻仪测量 3 组在不同复氧时间点的 TEER 值。单位面积电阻/($\Omega \times \text{cm}^2$)=(所测得电阻值-空白电阻值)×有效膜面积(本实验采用 12 孔板 Tranwell 系统,有效生长膜 1.13 cm^2)。

1.2.5 免疫荧光染色 当各组细胞爬片的细胞长至 95% 融合时,取出爬片,常规 4% 多聚甲醛固定 15 ~ 20 min,0.2% Triton/PBS 液室温透膜 15 min,山羊血清白蛋白室温封闭 1 h,加预先用抗体稀释液稀释的一抗,于 4 °C 冰箱中孵育过夜,用 PBS 替代一抗作为阴性对照;滴加二抗(1:300),室温避光孵育 1 h;加核染料 DAPI 工作液(1 mg/mL),室温复染 5 min;50%甘油封片;于荧光显微镜下观察并照相;上述每一步操作间均用 PBS 洗 5 min/次×3 次。

1.2.6 Western Blot 法 OGD/R 后 6 h,收集各组细胞,加入裂解液冰上孵育并彻底匀浆,离心后留取上清,BCA 法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白;全湿式电转法转移到 PVDF 膜上;5%封闭液封闭 2 h,分别加入一抗兔抗 Occludin、小鼠抗 ZO-1(1:1000);内参为 GAPDH(1:500),4 °C 孵育过夜。用 TBST 溶液洗涤 10 min/次×3 次;加入 HRP 标记羊抗鼠、羊抗兔 IgG 二抗(1:1000),4 °C 过夜;TBST 洗膜 10 min/次×3 次,加 ECL 发光显示液在暗室中摄像,凝胶成像分析系统进行分析。

1.2.7 ELISA 法 ELISA 法测定各组细胞分泌的致炎因子 IL-6、TNF- α 、iNOS,具体操作步骤按 ELISA 试剂盒的说明进行。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件处理数据。符合正态分布以及方差齐性的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EGFR 抑制剂对 OGD/R 诱导的 BSCB 损伤模型通透性的影响

对照组渗透到底室 F-D 的平均浓度为(230 ± 34) nmol/L;损伤组的 F-D 浓度在复氧 3 h、6 h 和 12 h 分别为(280 ± 53) nmol/L、(300 ± 57) nmol/L 和(270 ± 42) nmol/L,均高于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);治疗组的 F-D 浓度在复氧 3 h、6 h 和 12 h 分别为(240 ± 39) nmol/L、(250 ± 40) nmol/L 和(238 ± 33) nmol/L,均低于损伤组(均 $P < 0.05$),见图 1 A。损伤组的 TEER 值在复氧 3 h、6 h、12 h 后均低于对照组(均 $P < 0.01$),而治疗组在这 3 个时间点,所测 TEER 值均高于损伤组(均 $P < 0.05$),见

图 1B。

2.2 EGFR 抑制剂对 OGD/R 诱导的 BSCB 损伤模型紧密连接蛋白表达的影响

与对照组相比,损伤组紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 的表达量显著降低(均 $P < 0.05$),而治疗组 ZO-1 和 Occludin 的表达量较损伤组显著升高(均 $P < 0.05$),见图 2A、B。免疫荧光染色结果显示,对照组细胞排列紧密,呈条索状排列,符合正常内皮细胞生长形式,紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 在细胞间呈连续性的线条样外观,见图 2C1、D1;损伤组 ZO-1 和 Occludin 表达量显著下调,线条显著变细,部分线条断裂或部分缺损,见图 2C2、D2;治疗组 ZO-1 和 Occludin 荧光线条虽仍有缺损,但较损伤组的断裂和缺损均明显减少,表达均有所增加,见图 2C3、D3。

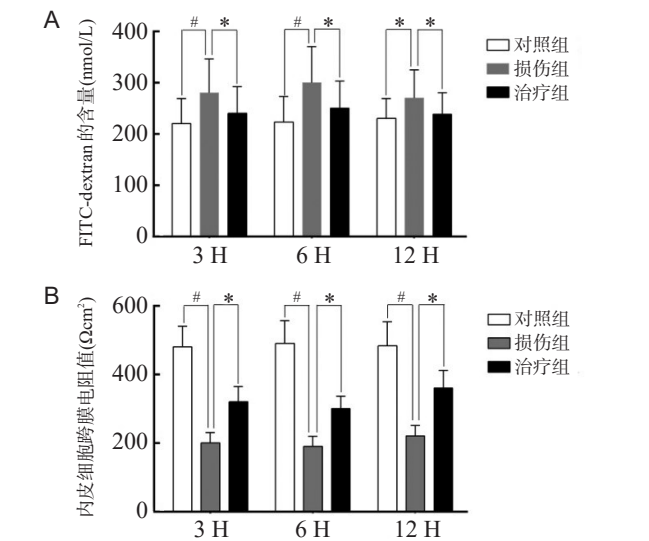
2.3 EGFR 抑制剂对 OGD/R 诱导的 BSCB 损伤模型致炎因子表达的影响

ELISA 结果显示,与对照组相比,损伤组分泌的致炎因子 IL-6、iNOS、TNF- α 均显著上调。IL-6 在 OGD/R 6 h 时表达量增幅最大,见图 3A。iNOS、TNF- α 在 OGD/R 后的表达也增加,呈缓慢上升的趋势,见图 3B、C。OGD/R 12 h 时,损伤组 IL-6、iNOS 分泌逐渐减少,而 TNF- α 仍有持续的高表达。治疗组在各时间点致炎因子 IL-6、iNOS、TNF- α 的分泌均较损伤组显著下调(均 $P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

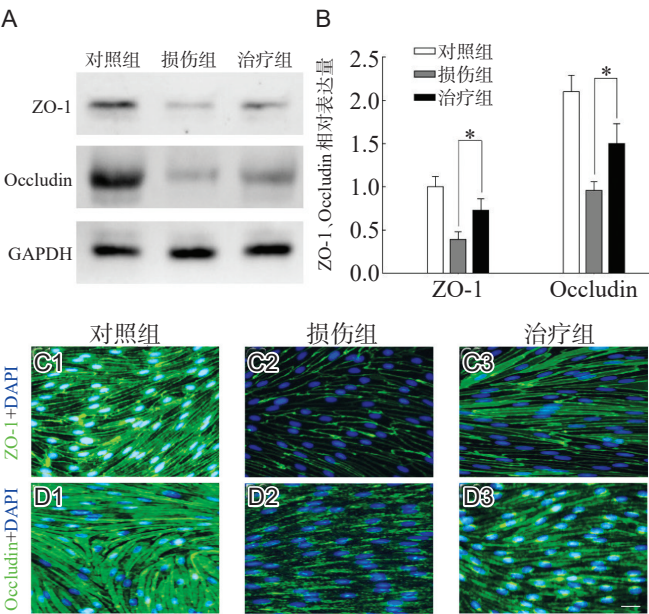
BSCB 是 CNS 高度分化的神经血管特殊化内皮结构,而微血管内皮细胞是 BSCB 重要组成细胞^[3]。紧密连接蛋白是微血管内皮细胞分泌的一种特殊蛋白,可填补内皮细胞间隙,使内皮细胞形成紧密连接状态,对 BSCB 的功能维持有极其重要的意义^[12]。ZO-1 和 Occludin 是紧密连接的主要蛋白质,也被认为是 CNS 屏障结构正常或损坏时的敏感标记物^[12]。Occludin 是第 1 个被发现的完整的紧密连接膜蛋白,分子量 56 kDa,可以通过羧基与 ZO-1 连接^[12]。Occludin 在 CNS 血管内皮上的表达较非神经组织的高,这是 BBB 与 BSCB 通透性明显低于其它血组织屏障的重要原因之一^[12]。ZO-1 蛋白不仅作为细胞内多个信号通路的支架,也涉及紧密连接蛋白的调节功能^[12]。在 SCI 的过程中,ZO-1 通过辅助紧密连接装配、传递相邻细胞间的信号、影响血管内皮细胞的基因表达等途径,参与 BSCB 通透性变化的过程^[13]。

有研究证实,在 SCI 后 BSCB 通透性增大,紧密连接



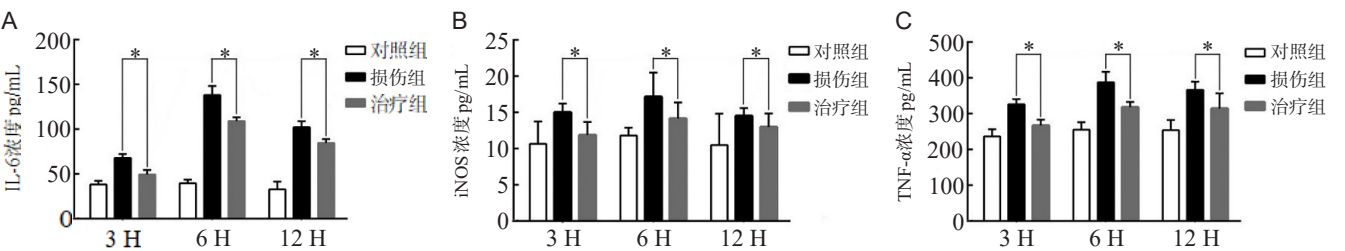
注：(A)体外BSCB模型在OGD/R后各个时间点荧光素F-D渗漏到底室的浓度；(B)体外BSCB模型在OGD/R后各个时间点内皮细胞TEER；* $P<0.05$, # $P<0.01$

图1 各组BSCB在OGD/R处理后的通透性



注：(A)ZO-1和Occludin蛋白Western Blot图片；(B)ZO-1和Occludin蛋白相对表达量的统计条图，* $P<0.05$ ；(C1-C3)3组的ZO-1和DAPI免疫荧光双标图片；(D1-D3)3组Occludin和DAPI免疫荧光双标图片；bar=20 μm

图2 EGFR抑制剂对OGD/R处理后BSCB紧密连接蛋白ZO-1和Occludin表达量的影响



注：(A)各组在不同时间点分泌的IL-6的浓度；(B)各组在不同时间点分泌iNOS的浓度；(C)各组在不同时间点分泌TNF-α的浓度；* $P<0.05$

图3 EGFR抑制剂对OGD/R处理后BSCB分泌致炎因子的影响

蛋白表达减少^[14,15]。本研究构建体外BSCB模型OGD/R损伤后,免疫荧光显示损伤后的BSCB紧密连接蛋白表达减少,荧光染料渗漏实验及内皮细胞跨膜电阻检测均证实BSCB在损伤后通透性明显增加,说明BSCB的结构破坏、屏障功能受损。在western blot和免疫荧光检测中发现,治疗组紧密连接蛋白的表达较损伤组增加,说明EGFR抑制剂有助于减轻BSCB损伤后紧密连接蛋白的破坏。本研究结果还显示,体外BSCB在OGD/R损伤后致炎因子(TNF-α、IL-6、iNOS)分泌明显增加,而应用EGFR抑制剂干预后致炎因子的表达明显下调。有研究证实致炎因子的表达与紧密连接蛋白表达呈负性相关,抑制过度的炎症反应可减少紧密连接蛋白缺失,保护BSCB完整性^[10]。

目前有多项研究证实EGFR抑制剂对CNS损伤有保护作用^[5-7,9],但其作用机制一直未完全明确。目前有研究证实SCI后活化的星形胶质细胞和小胶质细胞均出现EGFR大量活化,EGFR抑制剂既能有效抑制星形胶质细胞和小胶质细胞EGFR活化,又能明显抑制过度的胶质增生^[5,6,9]。SCI后BSCB的破坏和胶质细胞活化引发的炎症反应是导致脊髓继发损伤的2个关键病理改变^[16]。SCI后BSCB破坏导致血液中白细胞和致炎因子进入神经组织,激活星形胶质细胞、小胶质细胞^[2]。胶质细胞活化后引发炎症损伤反应,不仅导致神经元和少突胶质细胞损伤,还进一步破坏BSCB的完整性,使脊髓继发性损伤作用不断放大,形成脊髓组织炎症损伤的恶性循环(即正反馈损伤)^[10,17]。阻断这一炎症损伤的恶性循环是治疗SCI的一个重要策略。根据本研究结果,我们推测在BSCB损伤后应用EGFR抑制剂,可能通过抑制胶质细胞EGFR的活化而减缓胶质细胞的过度增生,减少过度的炎症反应所造成的炎症损伤,起到保护BSCB的作用。

综上所述,EGFR抑制剂PD168393可减少BSCB在OGD/R损伤后致炎因子的表达,并减少BSCB紧密连接蛋白的脱失,维护BSCB的完整性。

扰了研究结果的准确性。

综上所述,本研究结果提示,在H型高血压患者中,血浆Hcy水平可能是促进和加重认知功能障碍的重要因素,PI值可考虑作为反映深部小血管病变及认知障碍的重要指标,应用TCD探测MCA的PI可能具有重大意义,积极控制高血压病患者血浆Hcy水平、运用药物降低PI值可能推迟脑小血管认知功能障碍的发生或延缓其发展。

参考文献

[1] 胡大一, 徐希平. 有效控制“H型”高血压-预防卒中的新思路[J]. 中华内科杂志, 2008, 47: 976-977.

[2] Russo E, Leo A, Scicchitano F, et al. Cerebral small vessel disease predisposes to temporal lobe epilepsy in spontaneously hypertensive rats [J]. Brain Res Bull, 2017, 130: 245-250.

[3] 中华医学会老年医学分会老年神经病学组, 脑小血管病认知功能障碍诊疗指南(2019)[J]. 中华老年医学杂志, 2019, 38: 345-354.

[4] Wardlaw JM, Smith C, Dichgans M. Small vessel disease: mechanisms and clinical implications[J]. Lancet Neurol, 2019, 18: 684-696.

[5] 伏兵, 李敏, 陈皆春, 等. 高半胱氨酸及MTHFR基因C677T多态性与中国汉族人群脑白质病变的关系[J]. 国际脑血管病杂志, 2017, 25: 813-817.

[6] Li T, Liu X, Diao S, et al. H-Type Hypertension Is a Risk Factor for

Cerebral Small-Vessel Disease[J]. Biomed Res Int, 2020, 7: 2020: 6498903.

[7] 彭炳蔚, 李小晶, 李嘉铃, 等. 急性期至稳定期的经颅多普勒超声动态评估在急性重症脑病中的应用研究[J]. 中国小儿急救医学, 2016, 23: 604-608.

[8] Beard RS Jr, Reynolds JJ, Bearden SE. Metabotropic glutamate receptor 5 mediates phosphorylation of vascular endothelial cadherin and nuclear localization of β -catenin in response to homocysteine[J]. Vascu Pharmacol, 2012, 56: 159-167.

[9] 赵静, 常文龙, 宋伟丽, 等. 脑小血管病患者认知功能障碍与脑白质完整性及脑血流灌注的关系[J]. 神经损伤与功能重建, 2019, 14: 433-436.

[10] Chung CP, Lee HY, Lin PC, et al. Cerebral Artery Pulsatility is Associated with Cognitive Impairment and Predicts Dementia in Individuals with Subjective Memory Decline or Mild Cognitive Impairment[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 60: 625-632.

[11] Marianne Altmann, Bente Thommessen, Ole Morten Rønning, et al. Middle Cerebral Artery Pulsatility Index is Associated with Cognitive Impairment in Lacunar Stroke[J]. J Neuroimaging, 2016, 26: 431-435.

[12] Berman SE, Rivera-Rivera LA, Clark LR, et al. Intracranial arterial 4D-flow is associated with metrics of brain health and Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement(Amst), 2015, 1: 420-428.

[13] 刘芳芳, 刘自双, 陈珊珊, 等. 脑血流动力学与缺血性脑卒中患者脑白质病变严重程度的相关性分析[J]. 神经损伤与功能重建, 2020, 15: 6-9.

[14] Tomek A, Urbanova B, Hort J. Utility of transcranial ultrasound in predicting Alzheimer's disease risk[J]. J Alzheimers Dis, 2014, 42: s365-374.

(本文编辑:唐颖馨)

(上接第66页)

参考文献

[1] Tang R, Botchway BOA, Meng Y, et al. The Inhibition of Inflammatory Signaling Pathway by Secretory Leukocyte Protease Inhibitor can Improve Spinal Cord Injury[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40: 1067-1073.

[2] Soares S, von Boxberg Y, Nothias F. Repair strategies for traumatic spinal cord injury, with special emphasis on novel biomaterial-based approaches[J]. Rev Neurol (Paris), 2020, 176: 252-260.

[3] Kumar H, Ropper AE, Lee SH, et al. Propitious Therapeutic Modulators to Prevent Blood-Spinal Cord Barrier Disruption in Spinal Cord Injury[J]. Mol Neurobiol, 2017, 54: 3578-3590.

[4] Yan P, Wu X, Liu X, et al. A Causal Relationship in Spinal Cord Injury Rat Model Between Microglia Activation and EGFR/MAPK Detected by Overexpression of MicroRNA-325-3p[J]. J Mol Neurosci, 2019, 68: 181-190.

[5] Zhang S, Ju P, Tjandra E, et al. Inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor Improves Myelination and Attenuates Tissue Damage of Spinal Cord Injury[J]. Cell Mol Neurobiol, 2016, 36: 1169-1178.

[6] Qu WS, Tian DS, Guo ZB, et al. Inhibition of EGFR/MAPK signaling reduces microglial inflammatory response and the associated secondary damage in rats after spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9: 178.

[7] Chen YJ, Hsu CC, Shiao YJ, et al. Anti-inflammatory effect of afatinib (an EGFR-TKI) on OGD-induced neuroinflammation[J]. Sci Rep, 2019, 9: 2516.

[8] Tang X, Liu H, Yang S, et al. Epidermal Growth Factor and Intestinal Barrier Function[J]. Mediators Inflamm, 2016, 2016: 1927348.

[9] Li ZW, Li JJ, Wang L, et al. Epidermal growth factor receptor inhibitor ameliorates excessive astrogliosis and improves the regeneration microenvironment and functional recovery in adult rats following spinal cord injury[J]. J Neuroinflammation, 2014, 11: 71.

[10] Cai XJ, Zhao JJ, Lu Y, et al. The microenvironment following oxygen glucose deprivation/re-oxygenation-induced BSCB damage in vitro[J]. Brain Res Bull, 2018, 143: 171-180.

[11] Koprivica V, Cho KS, Park JB, et al. EGFR activation mediates inhibition of axon regeneration by myelin and chondroitin sulfate proteoglycans[J]. Science, 2005, 310: 106-110.

[12] Reinhold AK, Rittner HL. Barrier function in the peripheral and central nervous system-a review[J]. Pflugers Arch, 2017, 469: 123-134.

[13] Bartanusz V, Jezova D, Alajajian B, et al. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications[J]. Ann Neurol, 2011, 70: 194-206.

[14] Yu DS, Wang YS, Bi YL, et al. Salvianolic acid A ameliorates the integrity of blood-spinal cord barrier via miR-101/Cul3/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. Brain Res, 2017, 1657: 279-287.

[15] Zhou Y, Wu Y, Liu Y, et al. The cross-talk between autophagy and endoplasmic reticulum stress in blood-spinal cord barrier disruption after spinal cord injury[J]. Oncotarget, 2017, 8: 1688-1702.

[16] Haggerty AE, Maldonado-Lasuncion I, Oudega M. Biomaterials for revascularization and immunomodulation after spinal cord injury[J]. Biomed Mater, 2018, 13: 044105.

[17] Li T, Xu R, Xia H, et al. ASK1 phosphorylation regulates astrocytic reactive gliosis in vitro and in vivo[J]. Neurosci Lett, 2020, 716: 134675.

(本文编辑:唐颖馨)