

综述

miRNA在急性脊髓损伤病理生理调节机制中的作用研究进展

Role of miRNA in the pathophysiology of acute spinal cord injury

宋庆鑫, 张帆, 王琨, 沈洪兴

(第二军医大学附属长海医院骨科 200433 上海市)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2013.11.13

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2013)-11-1022-03

急性脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是中枢神经系统的严重损伤,是一种严重威胁人类生命健康的疾患。早期、全面的医疗干预和康复治疗对减轻脊髓损伤程度和提高患者的生活质量有着极其重要的影响。急性SCI存在两种机制:机械压迫导致的初次损伤和其后多种生物机制导致的二次损伤^[1],受伤当时的暴力性质决定初次损伤的程度,随后启动包括自由基损伤、细胞凋亡、炎症反应等二次损伤,其具体分子机制、如何减轻并逆转二次损伤一直是近年来的研究热点^[2]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类长度约为22个碱基、真核生物内源性非编码单链RNA。通过与靶mRNA的3'非翻译区相应碱基配对,导致靶mRNA的降解或者抑制其翻译过程,从而对基因表达进行转录后调控。近年来研究发现miRNA广泛参与炎症、发育、凋亡、肿瘤等多种病理生理过程的调节^[3,4],且有相关文献报道在急性SCI后可继发多种miRNA的表达失调^[5],提示miRNA可能参与急性SCI病理过程的调节。Liu等^[6]通过对撞击性SCI小鼠模型进行基因芯片及qRT-PCR等方法进行分析,发现269种miRNA在SCI后出现表达改变,主要可分为三类:(1)表达上调;(2)表达下调;(3)损伤后早期(4h内)出现表达上调,而晚期(1~7d内)又转为表达下调。miRNA调节脊髓二次损伤具体机制的研究报道日益增多,为探究急性SCI的分子机制及治疗干预措施提供了重要依据。现将与急性SCI密切相关的miRNA(miR-133b、miR-223、miR-486、miR-20a及其他相关miRNA)最新研究进展综述如下。

1 miR-133b

Yu等^[7]通过构建斑马鱼脊髓横断损伤模型并通过对损伤脊髓进行免疫组化、原位免疫杂交、western blot等方法检测发现miR-133b在正常斑马鱼脊髓灰质中表达,并在SCI后6h开始出现表达上调,损伤后24h及7d时其表达出现显著上调,进一步研究通过在损伤脊髓局部注入

siRNA下调miR-133b的表达后可观察到斑马鱼运动功能恢复及神经元轴突的再生较对照组显著减少,提示miR-133b参与脊髓二次损伤的调节。通过生物信息靶基因预测发现RhoA蛋白为miR-133b的可能靶基因。RhoA蛋白是Ras家族中的一个小分子鸟苷三磷酸酶,已被报道在中枢神经系统损伤后可抑制轴突生长及受损神经系统的功能恢复,并且在中枢神经系统纤维化中起重要作用^[8]。Sung等^[9]发现RhoA在斑马鱼SCI后出现基因表达上调且可抑制损伤后运动功能的恢复。通过下调SCI后miR-133b的表达可导致RhoA基因表达水平较对照组明显升高,从而抑制斑马鱼SCI后轴突再生,减缓运动功能的恢复。相反,上调miR-133b的表达则可显著下调RhoA在损伤脊髓的基因表达从而有助于SCI后修复。证明斑马鱼SCI后miR-133b的表达上调是一种保护机制。另有报道发现在小鼠SCI后4h,miR-133b表达明显上调,但在1d后又迅速下调^[6]。这与在斑马鱼上的结果相反,表明哺乳动物在SCI后尝试抑制对损伤修复的不利因素,然而因为某种原因这种尝试失败了。总之,SCI后miR-133b可通过对RhoA蛋白的调控影响轴突再生从而在损伤后修复过程中发挥作用。

2 miR-223

Izumi等^[10]发现miR-223在小鼠SCI区域头端及尾端2mm内大量表达,同时炎症因子IL-1 β 、IL-6及TNF- α 在相同区域表达亦显著提高。通过原位免疫组化分析发现大量中性粒细胞在SCI后12h出现在损伤区域。进一步通过双重原位免疫组化发现约60% miR-223阳性细胞是中性粒细胞。有文献报道脊髓二次损伤过程可能由中性粒细胞、小胶质细胞迁移至损伤区域介导的炎症反应引起^[11]。SCI区域在伤后3~4h开始出现中性粒细胞的浸润,1~3d可观察到其渗入脊髓灰质及白质。miR-223的调控是包含两个已知的转录因子C/EBP α 、NFI-A的调节体系,这两个转录因子竞争miR-223启动子上的结合位点^[12]。在脊髓神经祖细胞分化前,NFI-A结合并抑制miR-223的表达,而在其分化过程中,C/EBP α 逐渐取代NFI-A,并促进miR-223的表达上调。Izumi等^[10]通过免疫组化确认在损伤区域

C/EBP α 的表达,并发现在损伤区域存在表达 miR-223 的中性粒细胞,二者的表达在空间上重合,然而并未发现 NFI-A 的表达。这表明,SCI 后 miR-223 可能参与中性粒细胞介导的炎症反应从而介导脊髓二次损伤的过程。

3 miR-486

Jee 等^[13]发现了在鼠急性 SCI 后 miR-486 出现表达上调,重复实验证实 miR-486 可稳定的由 SCI 诱导而出现表达上调,而神经源分化因子 6(neurogenic differentiation factor 6, NeuroD6)则是表达下调的,并且 miR-486 的表达上调伴随着损伤区域炎症反应中活性氧的增多。NeuroD6 是一种神经保护基因,通过直接上调运动神经元中谷氨酸过氧化物酶 3(glutathione peroxidase 3, GPx3)及类硫氧还蛋白 1(thioredoxin-like 1, TXNL1)的基因表达,调节与活性氧清除相关基因的表达,并可抑制运动神经元的凋亡过程。研究发现对正常脊髓通过基因敲除下调 NeuroD6 的基因表达,可促进细胞毒性作用,促进炎症因子如 IL-6、TNF、IL-1 β 及环氧化酶 2(Cox-2)的基因表达,促进炎症反应的发生并导致运动神经元的凋亡^[14]。通过体外培养神经祖细胞转染特异 simiR-486,并应用 qRT-PCR 及 western-blot 检测 miR-486 的表达,发现其抑制率达 90%,同时对小鼠损伤脊髓局部注射 antisense-miR-486 后局部出现 NeuroD6 的基因表达上调,证明 miR-486 可调节 NeuroD6 的基因表达。SCI 后通过 RNA 干扰下调 NeuroD6 基因表达,可导致 GPx3 及 TXNL1 的表达下调,导致活性氧的积聚。而同法下调 miR-486 的表达则促进 NeuroD6 的基因表达,有利于 SCI 修复及运动功能恢复。在 SCI 区域直接补充外源性 NeuroD6 同样可抑制凋亡并改善运动功能。这表明 SCI 后 miR-486 的上调可抑制 NeuroD6 的基因表达导致 GPx3 及 TXNL1 的基因表达下调,从而导致活性氧清除系统功能紊乱,加重运动神经元的退变。进一步研究发现在损伤脊髓组织中及培养的神神经祖细胞内活性氧的浓聚也可诱导 miR486 的表达,二者是正反馈的关系,SCI 后活性氧活化积聚,并启动 miR-486 正反馈机制,进入这一恶性循环,导致神经元细胞加速退变。因此通过下调损伤后 miR-486 的表达可促进 SCI 后运动功能的恢复并可能成为 SCI 新的药物治疗靶点。

4 miR-20a

Jee 等^[15]发现了在鼠 SCI 区域 miR-20a 呈高度表达且可导致运动神经元发生持续性退变。在鼠损伤脊髓中通过 RNA 干扰下调 miR-20a 的表达可促进神经源素-1(neurogenin 1, Ngn1)的基因表达并促进运动神经元再生,最终提高运动神经元的存活率改善小鼠运动功能。研究发现 Ngn1 及 Ngn2 对神经元再生起积极作用,并且 Ngn1 在神经系统发育中影响细胞分化过程,可促进皮层前体细胞向神经元方向分化^[16]。通过对小鼠正常脊髓组织中局部导入 siNgn1 来下调 Ngn1 的基因表达可诱导类似

于脊髓二次损伤过程,并导致小鼠出现后肢运动功能障碍。miR-20a 已被报道可介导运动神经元凋亡、髓磷脂的破坏及一系列其他病理生理过程从而阻碍损伤脊髓的修复过程^[17]。通过下调小鼠 SCI 区域 miR20a 的表达可有效地促进运动神经元的存活及再生,同时模型动物的运动功能也得到了明显改善。进一步通过构建带荧光素酶标记的 Ngn1 mRNA 3'UTR,并在运动神经元内共转染 pre-miR-20a 及 anti-miR-20a 后检查荧光素酶活性证实 miR-20a 直接结合于 Ngn1 的 mRNA,从而起到调控 Ngn1 基因表达的作用。通过对正常小鼠脊髓导入 miR20a 后发现可诱发神经元细胞的凋亡及炎症反应,其与创伤性 SCI 极其相似。同时,发现 Ngn1、Ngn2、生长相关蛋白 43(growth associated protein43, GAP-43)的 mRNA 表达水平下降,而 GAP43 与神经元细胞再生相关^[18]。相反,细胞凋亡相关蛋白 Bax 及细胞色素 C(cytochrome C)^[19]则出现明显基因表达上调。而对 SCI 小鼠导入 simiR-20a 下调 miR-20a 的基因表达可抑制凋亡相关基因的表达上调。同时在蛋白水平检测,发现一些神经元标记物及神经元再生标记物的表达均显示提高。表明 miR-20a 在急性 SCI 后通过对 Ngn1、Ngn2、GAP43 的基因表达调节影响运动神经元再生,并调控细胞凋亡相关蛋白进一步影响运动神经元凋亡过程,从而影响损伤脊髓的修复及运动功能的恢复。

5 其他 miRNA

Strickland 等^[20]通过对脊髓撞击伤 4d 及 14d 后小鼠的脊髓组织进行基因芯片筛查发现与对照组小鼠相比,32 种 miRNA 出现显著的表达下调,3 种 miRNA 出现显著表达上调;miR-21 在损伤初期表达上调,后期转为表达下调;miR-21 的表达下调可导致细胞凋亡的发生。因此,在 SCI 4d 时 miR-21 的表达上调可能是一种保护机制,后期这种保护机制丢失了。miR-146a 在 SCI 后出现表达上调,miR-146a 已被证实具有抗炎作用^[21],其在 SCI 后抑制损伤后炎症反应。miR-1 与 miR-124 在损伤后均出现显著的表达下调。二者在 SCI 中同时出现表达抑制可能是细胞重塑的表现,这种损伤部位的神经细胞重塑可能会协同 miR-21/miR-129 表达下调所介导的细胞凋亡、细胞周期反应最终导致神经元细胞的凋亡^[22]。miRNA 的表达平衡如 miR-21、miR-146a 及 miR-129 等对 SCI 后神经细胞存活起重要作用。有研究发现 SCI 程度与 miR-146a 及 miR-129-2 的表达存在相关关系,轻度 SCI 伤后 4~14d 二者均出现表达上调,中、重度 SCI 伤后二者出现不同程度的表达失衡^[23]。SCI 程度与 miRNA 的表达相关性可以解释不同伤后 miRNA 的表达变异,并且意味着 miRNA 不仅可以成为有效的治疗靶点也可以作为判断损伤程度的手段。对 SCI 后 miRNA 的表达研究发现 miRNA 的表达改变是特异而局限的,大部分的表达改变局限于损伤部位^[24],这些数据表明大量 miRNA 的表达改变及其所调控的蛋白表达网络局限于损伤区域。

miRNA在急性SCI中起着重要的基因调控作用, miR-133b、miR-223、miR-486、miR-20a等分别参与了SCI后炎症、运动神经元再生、轴突再生、活性氧清除、凋亡等多种病理生理过程的调控。目前miRNA在急性SCI中的具体作用机制仍待进一步研究,还存在很多分子生物学技术难点需要突破,但已有相关研究证实通过体外及体内导入miRNA来抑制相应基因表达的作用^[25]。因此以上调或下调的miRNA作为干预靶点,将为SCI的治疗带来了新的策略,开发出新的治疗药物。

6 参考文献

- David S, Zarruk JG, Ghasemlou N. Inflammatory pathways in spinal cord injury[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2012, 106(2): 127-152.
- Lonjon N, Perrin FE, Lonjon M, et al. Acute traumatic spinal cord injuries: Epidemiology and prospects[J]. *Neurochirurgie*, 2012, 58(5): 293-299.
- Tokarz P, Blasiak J. The role of MiRNA in metastatic colorectal cancer and its significance in cancer prognosis and treatment[J]. *Acta Biochim Pol*, 2012, 59(4): 467-474.
- Amiel J, de Pontual L, Henrion-Caude A. miRNA, Development and Disease[J]. *Adv Genet*, 2012, 80(1): 1-36.
- Li J, Huang J, Dai L, et al. miR-146a, an IL-1 β responsive miRNA, induces vascular endothelial growth factor and chondrocyte apoptosis by targeting Smad4 [J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(2): 112-114.
- Liu NK, Wang XF, Lu QB, et al. Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2009, 219(2): 424-429.
- Yu YM, Gibbs KM, Davila J, et al. MicroRNA miR-133b is essential for functional recovery after spinal cord injury in adult zebrafish[J]. *Eur J Neurosci*, 2011, 33(9): 1587-1597.
- Care A, Catalucci D, Felicetti F, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. *Nat Med*, 2007, 13(5): 613-618.
- Sung JK, Miao L, Calvert JW, et al. A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat[J]. *Brain Res*, 2003, 959(1): 29-38.
- Izumi B, Nakasa T, Tanaka N, et al. MicroRNA-223 expression in neutrophils in the early phase of secondary damage after spinal cord injury[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 492(2): 114-118.
- Carlson SL, Parrish ME, Springer JE, et al. Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury[J]. *Exp Neurol*, 1998, 151(1): 77-88.
- Starnes LM, Sorrentino A, Ferracin M, et al. A transcriptome-wide approach reveals the key contribution of NFI-A in promoting erythroid differentiation of human CD34(+) progenitors and CML cells[J]. *Leukemia*, 2010, 24(6): 1220-1223.
- Jee MK, Jung JS, Choi JJ, et al. MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury [J]. *Brain*, 2012, 135(4): 1237-1252.
- Uittenbogaard M, Baxter KK, Chiaramello A. The neurogenic basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD6 confers tolerance to oxidative stress by triggering an antioxidant response and sustaining the mitochondrial biomass [J]. *ASN Neuro*, 2010, 2(2): e00034.
- Jee MK, Jung JS, Im YB, et al. Silencing of miR20a is crucial for Ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord[J]. *Hum Gene Ther*, 2012, 23(5): 508-520.
- Madelaine R, Blader P. A cluster of non-redundant Ngn1 binding sites is required for regulation of deltaA expression in zebrafish[J]. *Dev Biol*, 2011, 350(1): 198-207.
- Bak M, Silahtaroglu A, Moller M, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system [J]. *RNA*, 2008, 14(3): 432-444.
- Kusik BW, Hammond DR, Udvardi AJ. Transcriptional regulatory regions of gap43 needed in developing and regenerating retinal ganglion cells[J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(2): 482-495.
- Mondal S, Bhattacharya K, Mallick A, et al. Bak compensated for Bax in p53-null cells to release cytochrome c for the initiation of mitochondrial signaling during Withanolide D-induced apoptosis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e34277.
- Strickland ER, Hook MA, Balaraman S, et al. MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair[J]. *Neuroscience*, 2011, 186(1): 146-160.
- Lukiw WJ, Dua P, Pogue AI, et al. Upregulation of micro RNA-146a (miRNA-146a), a marker for inflammatory neurodegeneration, in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease (sCJD) and Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2011, 74(22-24): 1460-1468.
- Yunta M, Nieto-Diaz M, Esteban FJ, et al. MicroRNA dysregulation in the spinal cord following traumatic injury [J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34534.
- Risbud RM, Lee C, Porter BE. Neurotrophin-3 mRNA a putative target of miR21 following status epilepticus [J]. *Brain Res*, 2011, 1424(2): 53-59.
- Liu G, Detloff MR, Miller KN, et al. Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/mTOR pathway in rats after spinal cord injury[J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 447-456.
- Gandellini P, Folini M, Zaffaroni N. Emerging role of microRNAs in prostate cancer: implications for personalized medicine[J]. *Discov Med*, 2010, 9(46): 212-218.

(收稿日期:2012-12-31 修回日期:2013-04-01)

(本文编辑 彭向峰)