

. 实验研究 .

大鼠颅脑损伤后脑组织 miR-122-5p 含量变化 及其对神经功能的影响

刁 波 杨 前 王 刚 袁紫林 陈 力 王 方

【摘要】目的 探讨大鼠颅脑损伤后脑组织 miR-122-5p 含量变化及其对神经功能的影响。**方法** 将 40 只成年 SD 大鼠随机分为假手术组, TBI 模型组, 乱序 miRNA 组, miR-122-5p 模拟物组。采用 Feeney 法制备 TBI 大鼠模型; 乱序 miRNA 组造模 24 h 后, 立体定向注射乱序 miRNA 5 μ l (20 μ mol/L); miR-122-5p 模拟物组造模 24 h 后, 立体定向注射 miR-122-5p 模拟物组 5 μ l (20 μ mol/L)。qRT-PCR 法检测大鼠脑组织 miR-122-5p 的表达变化; 免疫印迹法检测 p53 蛋白表达水平; 水迷宫法检测学习记忆功能; TUNEL 法检测脑组织细胞凋亡情况; 流式细胞术检测脑细胞线粒体膜电位的变化。**结果** 与假手术组大鼠比较, 模型组和乱序 miRNA 组大鼠脑组织 miR-122-5p 表达明显减少, p53 蛋白显著上调, 脑组织细胞凋亡数明显增多, 线粒体膜电位下降显著, 水迷宫测试大鼠寻找隐形平台时间显著延长; 与模型组大鼠比较, miR-122-5p 模拟物组大鼠 miR-122-5p 表达明显增加, 并伴随 p53 蛋白低表达, 细胞凋亡水平下降, 神经功能障碍得到明显逆转。**结论** 颅脑损伤后 miR-122-5p 的表达下调可能导致 p53 蛋白的表达升高, 促进神经细胞凋亡。

【关键词】 颅脑损伤; miR-122-5p; p53 蛋白; 神经功能障碍; 大鼠
【文章编号】 1009-153X(2018)04-0250-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 651.1*5
Abnormal expression of miR-122-5p in brain tissues and its effects on neurological functions after traumatic brain injury in rats

DIAO Bo¹, YANG Qian¹, WANG Gang¹, YUAN Zilin¹, CHEN Li¹, WANG Fang². 1. Department of Medical Experiment, Wuhan General Hospital, PLA, Wuhan 430070, China; 2. External Medical Office, Wuhan General Hospital, PLA, Wuhan 430070, China

【Abstract】 Objective To study the effects of the changes in miR-122-5p expression in brain tissues on the neurological functions after traumatic brain injury (TBI). **Method** Forty rats were randomly divided into 4 groups, i.e. group A, in which 10 animals received sham operation, group B, in which 10 animals underwent TBI, group C, in which 10 animals were treated by scrambled miRNA after IBI, and group D, in which 10 animals were treated by miR-122-5p mimics after TBI. The changes in memory were determined by Water Maze method in all the rats. The expression of miR-122-5p in the injured brain tissues was detected by qRT-PCR. The expression of p53 protein in the injured brain tissues was determined by Western Blot method. Cells apoptosis in the injured brain tissues and the change in brain cell mitochondrial membrane potential (MMP) were determined respectively by TUNEL method and Flow cytometry. **Results** The level of miR-122-5p expression in the injured brain tissues was significantly lower and the level of p53 protein expression was significantly higher in groups B and C than those in group A ($P<0.05$). The number of cells of apoptosis was significantly more and brain cell MMP was significantly lower in the injured brain tissues in groups B and C than those in group A ($P<0.05$). The time needed to find hidden platform was significantly longer in group B and C than that in group A ($P<0.05$). In the injured brain tissues the levels of miR-122-5p expression was significantly enhanced and the level of p53 protein expression and the number of cells apoptosis was significantly decreased and the time needed to find the hidden platform was significantly shortened in group D compared to those in group B ($P<0.05$). **Conclusions** The decrease in level of miR-122-5p expression might promote the expression of p53 protein in the injured brain tissues, in which the upregulation of p53 protein expression might cause the increase in the level of apoptosis of the cerebral cells after TBI. The miR-122-5p mimics can inhibit the expression of p53 protein, reducing the apoptosis of the cerebral cells and effectively relieve the damaged neurological function in the rats with TBI.

【Key words】 Traumatic brain injury; miR-122-5p; P53 protein; Expression; Neurological dysfunction; Rat

颅脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是导致 45 岁以下人群死亡的主要原因。TBI 后 12 h, 神经细胞显著高表达 p53 蛋白^[1], 显著增加神经细胞的凋亡率。研究发现微小 RNA (microRNA, miRNA) 是调控基因表达的重要因素, 直接参与细胞的增殖、凋亡、迁移、分化等过程, 具有重要的生理作用^[2]。通过 Ensembl 基因数据库预测发现 p53 基因的相关

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2018.04.009
基金项目: 武汉市第三批青年医学骨干人才基金
作者单位: 430070 武汉, 中国人民解放军武汉总医院医学实验科(刁波、杨前、王刚、袁紫林、陈力), 对外医疗办(王方)
通讯作者: 王方, E-mail: dpitao@163.com

miRNA 为 miR-122-5p。因此,我们推测 TBI 后神经细胞凋亡可能通过 miR-122-5p/p53 进行调控。本文探讨大鼠 TBI 后脑组织 miR-122-5p 含量变化及其对神经功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理 将 40 只雄性 SPF 级 SD 大鼠(湖北省实验动物研究中心提供)随机分为假手术组(A 组),TBI 模型组(B 组),乱序 miRNA 对照组(C 组),miR-122-5p 模拟物组(D 组),每组 10 只。A 组进行假手术处理,B、C、D 组采用 Feeney 法制备 TBI 大鼠模型;B 组造模后,不进行任何处理;C 组造模 24 h 后,立体定向注射乱序 miRNA 5 μl(20 μmol/L);D 组造模 24 h 后,立体定向注射 miR-122-5p 模拟物 5 μl(20 μmol/L)。完成注射后 7 d,进行后续实验。

1.2 Morris 水迷宫实验 用于测试各组大鼠学习与记忆能力。前 4 天,每天上午训练 5 次,每次间隔 15 min,每次将大鼠面向池壁分别从 4 个象限的 4 个入水点入水,记录其在 60 s 内寻找平台的时间,即逃避潜伏期。如果 60 s 仍未找到平台,则引导其到达平台,停留 30 s,本次成绩计为 60 s,然后进行下次训练。第 5 天进行测试。测试时取消平台,同法观察各组大鼠寻找隐蔽平台所需的时间(潜伏期)。

1.3 动物取材 完成 Morris 水迷宫实验后第二天断颈处死大鼠,取出完整脑组织,以受损部位为中心,将脑组织以冠状切面分为两部分。一部分脑组织浸入 4%多聚甲醛内 4 ℃固定 48 h,修成厚 4 mm 块,常规酒精脱水,石蜡包埋用于 TUNEL 检测;另一部分脑组织分为三部分,分别用于 Western blot、qRT-PCR 和线粒体膜电位检测。

1.4 miR-122-5p 模拟物和乱序 miRNA 序列的合成 根据 miR-122-5p 成熟体序列(UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G)设计 miR-122-5p 模拟物和乱序 miRNA 序列。miR-122-5p 模拟物正义序列 5'-UGG AGU GUG ACA AUG GUG UUU G-3',反义序列 5'-UUA CCU CAC ACU GUU ACC ACA A-3'。乱序 miRNA 正义序列 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3',反义序列 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3';序列交由吉玛基因公司合成。

1.5 qRT-PCR 检测脑组织 miR-122-5p 水平 提取脑组织全 RNA,使用逆转录酶 RevertAid Reverse Transcriptase(Thermo scientific EP0442),采用颈环引物逆转录。miR-122-5P 逆转录引物:GTC GTA TCC AGT GCG TGT CGT GGA GTC GGC AAT TGC

ACT GGA TAC GAC CAA ACA,内参 U6 逆转录引物:AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT。按说明书混合各组分,42 ℃孵育 60 min 后立即置于 70 ℃变性 10 min。使用 qPCR Master Mix 试剂(Fermentas, K0221)按说明书混合各组分,miR-122-5p 正向引物 5'-GGG TGG AGT GTG ACA ATG G-3',反向引物 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'。U6 正向引物 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3',反向引物 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'。按说明书混合各组分,反应条件:95 ℃,10 min;95 ℃,15 s;60 ℃,1 min;40 个循环。采用 2^{-ΔΔCT}法进行分析。

1.6 脑组织 p53 蛋白检测 Western blot 检测 p53 蛋白。提取脑组织全蛋白,取 15 μg 蛋白上样电泳后将凝胶上蛋白转移至 PVDF 膜,室温下封闭 2 h,将 PVDF 膜放入杂交袋,分别加入一抗(p53,1:800 稀释;美国 Abcam 公司)4 ℃过夜,加辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1500 稀释;武汉博士德公司),室温下振荡孵育 1 h,滤膜漂洗后加入显影液显色,放入 X-光片夹中曝光。结果经计算机扫描后,自动图像分析系统进行半定量分析,计算各组样品目标条带与内参(β-actin)的灰度比值。

1.7 TUNEL 法检测脑组细胞凋亡 脑组织蜡块作 5 μm 冠状切片,根据 TUNEL 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书行 TUNEL 染色,BX51 显微镜观察各组脑组织细胞凋亡情况,随机选择 10 个视野,计数阳性细胞数。

1.8 流式细胞术检测线粒体膜电位 根据线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)说明书,将脑组织破碎,获取单个细胞悬液,将细胞浓度稀释至 1×10⁶ 个/ml,将试剂盒中的染色探针与细胞悬液在胞培养箱中 37 ℃孵育 20 min。洗涤后上机检测,激发波长为 488 nm,进行荧光强度分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件分析,定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑组织 miR-122-5p 表达变化 TBI 后,大鼠脑组织 miR-122-5p 表达水平显著下降($P < 0.05$,图 1),miR-122-5p 模拟物干预后,大鼠脑组织 miR-122-5p 水平明显上升($P < 0.05$,图 1)。

2.2 大鼠脑组织 p53 蛋白表达变化 TBI 后,大鼠脑组织 p53 蛋白表达显著增高($P < 0.05$,图 2);miR-122-5p 模拟物干预后,大鼠脑组织 p53 蛋白表

达水平明显下降($P<0.05$,图2),而乱序 miRNA 干预未观察到此现象($P>0.05$,图2)。

2.3 大鼠脑细胞凋亡变化 TBI 后,大鼠脑细胞凋亡数量明显增加($P<0.05$,图3);miR-122-5p 模拟物干预后,凋亡细胞数明显下降($P<0.05$,图3),但乱序 miRNA 干预未能观察到该现象($P>0.05$,图3)。

2.4 大鼠脑细胞线粒体膜电位变化 TBI 后,大鼠脑细胞线粒体膜电位显著下降($P<0.05$,图4);miR-122-5p 模拟物干预后,线粒体膜电位明显恢复($P<0.05$,图4),但乱序 miRNA 干预大鼠未出现该现象($P>0.05$,图4)。

2.5 大鼠学习记忆功能的变化 TBI 后,大鼠潜伏期

明显延长($P<0.01$,图5);miR-122-5p 模拟物干预后,大鼠潜伏期明显缩短($P<0.01$,图5)。

3 讨论

TBI 会导致神经功能障碍,严重影响病人的生活质量甚至危及病人生命^[3,4]。TBI 主要病理表现在神经细胞的生理功能异常,正常的生物学行为紊乱^[5-7]。研究表明,TBI 后神经细胞凋亡是导致神经功

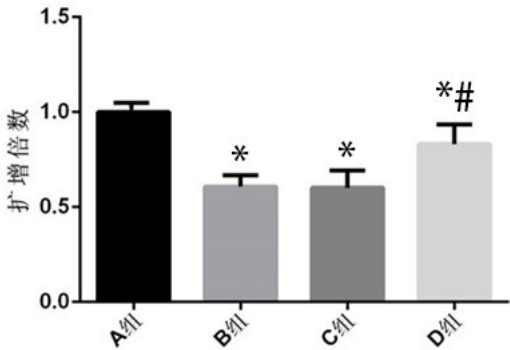


图1 大鼠TBI后脑组织 miR-122-5p 变化
与 A 组相比, * $P<0.01$; 与 B 组比, # $P<0.01$; A. 假手术组; B. TBI 模型组; C 组. 乱序 miRNA 组; D 组. miR-122-5p 模拟物组; TBI. 颅脑损伤

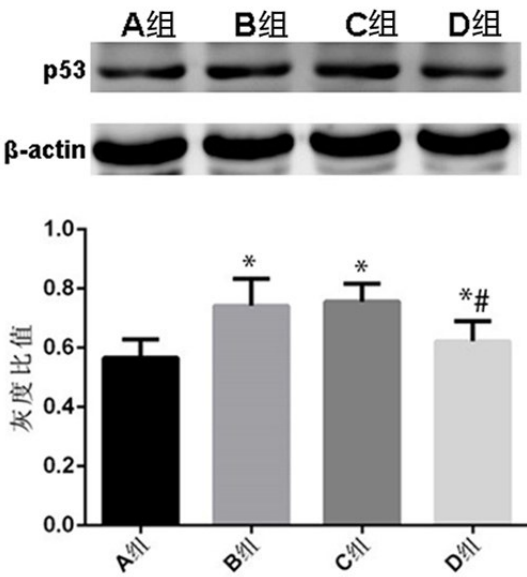


图2 大鼠TBI后脑组织 p53 蛋白表达变化
与 A 组相比, * $P<0.01$; 与 B 组比, # $P<0.01$; A. 假手术组; B. TBI 模型组; C 组. 乱序 miRNA 组; D 组. miR-122-5p 模拟物组; TBI. 颅脑损伤

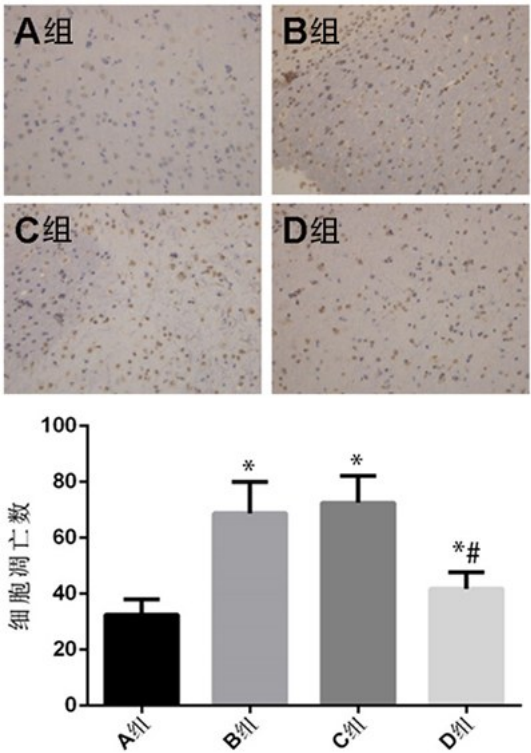


图3 大鼠TBI后脑细胞凋亡变化
与 A 组相比, * $P<0.01$; 与 B 组比, # $P<0.01$; A. 假手术组; B. TBI 模型组; C 组. 乱序 miRNA 组; D 组. miR-122-5p 模拟物组; TBI. 颅脑损伤

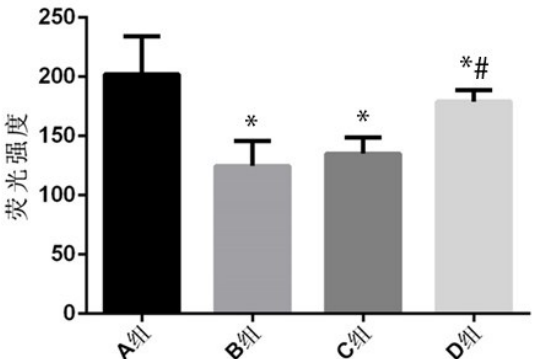


图4 大鼠TBI后脑细胞线粒体膜电位变化
与 A 组相比, * $P<0.01$; 与 B 组比, # $P<0.01$; A. 假手术组; B. TBI 模型组; C 组. 乱序 miRNA 组; D 组. miR-122-5p 模拟物组; TBI. 颅脑损伤

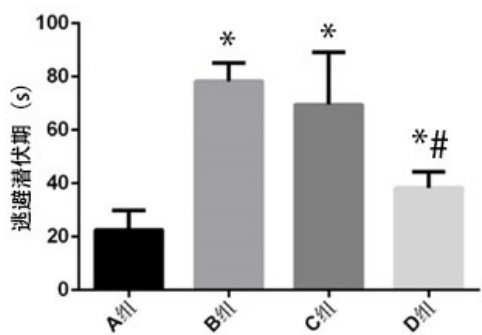


图 5 大鼠 TBI 后 Morris 水迷宫测试逃避潜伏期变化与 A 组相比, * $P<0.01$; 与 B 组比, # $P<0.01$; A. 假手术组; B. TBI 模型组; C 组. 乱序 miRNA 组; D 组. miR-122-5p 模拟物组; TBI. 颅脑损伤

能障碍的重要原因,因此,有效阻断神经细胞凋亡进程对治疗 TBI 具有重要的意义。

近年来发现 miRNA 在表观遗传学中具有重要作用^[8-12]。miRNA 是一种内源性、非编码小 RNA,由 20~22 个核苷酸组成^[13-15],参与调控细胞的分化、增殖、凋亡等发展过程^[16]。miRNA 模拟物是体外合成的与对应 miRNA 序列相同的双链 RNA,能在体内模拟细胞中内源性成熟 miRNA 的高水平表达,且双链结构更具稳定性。本研究结果表明,大鼠 TBI 后脑组织 miR-122-5p 表达下降,同时 p53 蛋白表达上升,神经元凋亡增加,神经功能受损;miR-122-5p 模拟物干预后,脑组织 miR-122-5p 水平显著升高,p53 蛋白表达随之下降,脑细胞凋亡数也同步下降,神经功能明显恢复。这提示 TBI 后 miR-122-5p 表达下降会直接引起 p53 蛋白的高表达,从而导致神经元发生凋亡,加剧神经功能障碍。

综上所述,miR-122-5p 在 TBI 的病理发生发展过程中具有重要作用,可通过靶向抑制 p53 蛋白的表达,减少脑细胞凋亡,维持正常的神经功能。

【参考文献】

[1] Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2000, 17(10): 927-938.

[2] Oyesiku NM, Evans CO, Houston S, et al. Regional changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors following acute traumatic brain injury in the adult rat brain [J]. Brain Res, 1999, 833(2): 161-172.

[3] Tüfekci KU, Meuwissen RL, Genâş S. The role of micro-RNAs in biological processes [J]. Method Mol Biol, 2014,

1107(1107): 15-31.

[4] Ma DK, Bonaguidi MA, Ming GL, et al. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system [J]. Cell Res, 2009, 19(6): 672-682.

[5] Hsu YC, Lee DC, Chiu IM. Neural stem cells, neural progenitors, and neurotrophic factors [J]. Cell Transplant, 2007, 16(2): 133-150.

[6] Bonaguidi MA, Peng CY, McGuire T, et al. Noggin expands neural stem cells in the adult hippocampus [J]. J Neurosci, 2008, 28(37): 9194-9204.

[7] Nakashima K, Kohyama J, Namihira M, et al. Epigenetic mechanisms regulating neural cell fate determination [J]. No To Hattatsu, 2009, 41(6): 411-414.

[8] Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Neural stem cell niches and homeing: recruitment and integration into functional tissues [J]. ILAR J, 2009, 51(1): 3-23.

[9] Chen YX, Huang KJ, Niu KX. Recent advances in signal amplification strategy based on oligonucleotide and nanomaterials for microRNA detection—a review [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 18(99): 612-624.

[10] Albanese M, Tagawa T, Buschle A, et al. MicroRNAs of Epstein-Barr virus control innate and adaptive antiviral immunity [J]. J Virol, 2017, 1(16): e01667-16.

[11] Morais M, Dias F, Teixeira AL, et al. MicroRNAs and altered metabolism of clear cell renal cell carcinoma: Potential role as aerobic glycolysis biomarkers [J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1861(9): 2175-2185.

[12] Yan H, Ma F, Zhang Y, et al. miRNAs as biomarkers for diagnosis of heart failure: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2017, 96(22): e6825.

[13] Singh A, Sen D. MicroRNAs in Parkinson's disease [J]. Exp Brain Res, 2017, 235(8): 2359-2374.

[14] Li G, Morris-Blanco KC, Lopez MS, et al. Impact of micro-RNAs on ischemic stroke: From pre- to post-disease [J]. Prog Neurobiol, 2017: 30033-3.

[15] Djami-Tchatchou AT, Sanan-Mishra N, Ntushelo K, et al. Functional roles of microRNAs in agronomically important plants—potential as targets for crop improvement and protection [J]. Front Plant Sci, 2017, 22: 8: 378.

[16] Sun T, Dong YH, Du W, et al. The role of MicroRNAs in myocardial infarction: from molecular mechanism to clinical application [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4): 1-17.