

脊髓损伤中相关 microRNA 的研究进展

刘伟¹ 祁雷² 李庆宁¹ 综述 荆珏华¹ 审校

摘要 脊髓损伤(SCI)是一种严重的中枢神经系统(CNS)外伤,是脊柱损伤最严重的并发症。治疗难,预后差,一直困扰着临床医师和相关学者。微小核糖核酸(miRNA)是一类非编码小 RNAs,在细胞内具有多种重要的调节作用。它在脊髓发育和 SCI 等过程的基因表达中起着重要的作用,可能为促进 SCI 后神经修复和再生的治疗提供新靶点。本文从 miRNA 在 SCI 中的机制及相关 miRNA 方面做一总结。

关键词 脊髓损伤; miRNA; 基因表达; 发病机制; 综述

中图分类号 R 651.2

文献标志码 A 文章编号 1000 - 1492(2019) 01 - 0154 - 04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2019.01.032

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是一种死亡率高、致残率高、医疗花费高的中枢神经系统(central nervous system, CNS)疾病^[1]。随着现代社会经济和交通建筑事业的发展,其发病率逐年上升,我国每年新增病例超过 6 万人,给患者家庭以及社会带来沉重的经济负担,已经引起医师和学者的高度重视^[2-3]。近 20 年来,随着分子生物学的发展和人类基因组计划的完成,临床上发现了一类新的由内源基因编码的长度约为 24 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子(microRNA, miRNA),它们在动植物体内参与转录后基因的表达调控^[4]。研究^[5]表明,miRNA 在 SCI 后的病理生理发展过程中发挥着重要的调节作用。因此研究 miRNA 在 SCI 病理发展过程中的功能及作用,可以给 SCI 的诊疗与康复提供新的治疗靶点和干预计策。

1 miRNA 机制

1.1 miRNA 的形成机制 miRNA 是由 20 ~ 24 个核苷酸组成的单链非编码 RNA,其在表观遗传水平

上调蛋白质的表达。它们最初从基因组 DNA 转录,主要是通过 RNA 聚合酶 II 以初级 miRNA 转录物的形式转录。初级 miRNA 长度可以是数千个碱基对,形成含有由反向重复组成的茎环的功能性二级结构^[6],这些茎环被核糖核酸酶 III 识别和切割,导致从初级 miRNA 中释放前体 miRNA^[7]。通过输出蛋白 5 (export protein 5, exportin-5) (参与核内 RNA 输出的蛋白质) ,前体 miRNA 被从细胞核转运到细胞质中,经过一种核糖核酸内切酶 Dicer 和一种 RNA 结合蛋白 TAR 的 RNA 结合蛋白处理,形成成熟 miRNA 和相似长度的互补链^[8],成熟的 miRNA 链一般具有生物活性,而互补链不具有生物活性,见图 1。

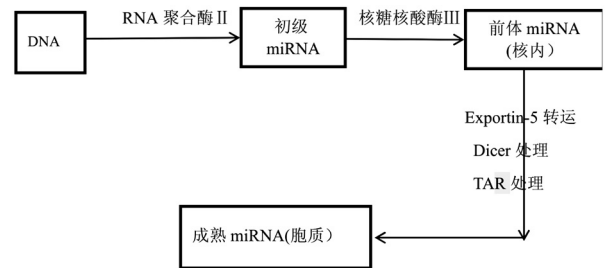


图1 成熟 miRNA 的形成

1.2 miRNA 对 SCI 后的作用机制 RNA 诱导的沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC)中包含 Argonaute 家族的蛋白质在促进 miRNA 对 mRNA 的靶向和结合起到关键作用^[9],两者结合后由于 mRNA 的稳定性下降,miRNA-mRNA 复合物的最终效果是降低蛋白质产量,见图 2。定量蛋白质组学研究^[10]显示,在生理条件下,单个 miRNA 可以下调数百种蛋白质的表达,但是变化的幅度很小(< 4 倍)。此外,降低蛋白质水平主要是由于 mRNA 不稳定而不是抑制翻译。这些发现表明,虽然特定的 miRNA 可能具有广泛的作用,但是在对细胞中引起功能相关变化相对较小。靶向类似途径基因的多个 miRNA 在细胞中引起功能相关的变化较大。miRNA 靶向含有与 miRNA 种子序列互补的 mRNA,miRNA 种子序列是在 miRNA 的 5 端包含 2 ~ 7 个核

2018 - 10 - 15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81671204)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院骨科,合肥 230601

²南京市浦口医院骨科,南京 211800

作者简介: 刘伟,男,硕士研究生;

荆珏华,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-

mail: jhpaper@sina.com

苷酸的区域,其在 miRNA-mRNA 结合中具有关键作用^[11]。mRNA 上的 miRNA 结合位点通常在物种间保守,并且在 3 非翻译区(untranslated region, UTR) 中发现。特定的 miRNA 可以在同一 mRNA 中具有多个结合位点,由此增强其整体效果。然而,并不是所有的 mRNA 都被 miRNA 靶向。估计只有 1/3 的 mRNA 含有 miRNA 结合位点^[12]。一些缺乏 miRNA 结合位点的 mRNA 转录物含有短的 3'UTR,因此缺少 miRNA 结合域。这种转录物逃避 miRNA 介导的抑制,许多这些“短”mRNA 调节细胞的关键功能(DNA 修复,蛋白质合成和增殖)。

1.3 miRNA 调控模式 利用 PicTar、MiRanda 和 TargetScan 等生物信息学算法,可以预测 miRNA 的 mRNA 靶标。如上所述,一个 miRNA 可以结合许多不同的 mRNA,并且相同的 mRNA 可以被不同的 miRNA 结合。因此,相同 miRNA 可以调节功能上相关的基因家族的许多成员,由此增强 miRNA 介导的抑制的整体效应。相反,同时上调靶向 mRNA 的多个 miRNA,可以强烈抑制单个 mRNA。miRNAs 能调控基因网络的各种模式,突出了这些分子的效能。

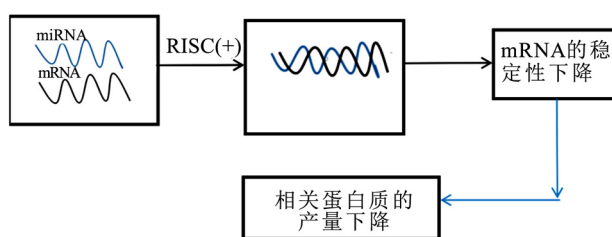


图2 miRNA 的作用机制

2 相关 miRNA

尽管 miRNA 在人类疾病中的功能与作用尚需进一步阐明,但是越来越多的研究表明,miRNA

可以作为一种全新的药物靶点。本部分重点阐述 SCI 研究领域的热点 miRNA 及其可能的分子机制,见表 1。

2.1 miRNA-21 相关文献^[13]报道了在人类许多不同的疾病(主要是癌症)中 miRNA-21 异常的表达现象,并且发现 miRNA-21 表达上调与延长细胞存活、促进细胞生长、增殖以及减少细胞凋亡相关。研究^[14]已证实 miRNA-21 的表达在许多 CNS 疾病如外伤性脑损伤(traumatic braininjury, TBI)中显著上调,并且与 TBI 诱导的细胞凋亡和神经元可塑性有关。Hu et al^[3]通过 miRNA-21 拮抗剂抑制神经元中的 miRNA-21 的表达,导致大鼠后肢运动功能恢复减弱,损伤部位范围增大和正常组织范围减少。与阴性对照组相比,用 miRNA-21 拮抗剂处理显著增加了 SCI 后的细胞凋亡。促凋亡基因 Fas 配体(Fas ligand, FasL)、磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)和程序性细胞死亡蛋白 4(programmed cell death protein 4, PD-CD4)被证明是 miRNA-21 在许多疾病和细胞类型中的直接靶点,使用 miRNA-21 拮抗剂可增加体内 FasL 和 PTEN 的表达,但不影响 PDCD4 的表达。这些结果表明,miRNA-21 在限制 SCI 后继发性细胞死亡中发挥着重要作用,并且 miRNA-21 的保护作用可能是其对促凋亡基因的调节的结果^[15]。

另一个动物模型中,SCI 后 5 周,miRNA-21 的表达也显著增加,miRNA-21 主要在培养的星形胶质细胞中表达^[16-17],提示 miRNA-21 在星形胶质细胞中的作用可能是 SCI 后修复的关键点。Bhalala et al^[16]在小鼠的星形胶质细胞中通过转基因过度表达了 miRNA-21,结果显示星形胶质细胞中 miRNA-21 的过度表达一方面降低了对 SCI 的肥大反应。另一方面,星形胶质细胞中 miRNA-21 的抑制可导致病变部位的轴突密度增加。

表 1 相关 miRNA 的相关信息

miRNA 种类	作用靶点	SCI 后的变化	变化后的结局
miRNA-21	FasL	增加	在神经元细胞中限制 SCI 后继发性细胞死亡
	PTED		在星形胶质细胞中增加病变部位轴突和降低肥大反应
	PDCD4		
miRNA-486	NeuroD6	增加	降低运动功能和增加神经元死亡
miRNA-124	PDXK	增加	加速了骨髓间充质干细胞向神经细胞的分化,促进了 SCI 的修复
miRNA-133b	RhoA	减少	运动恢复减弱和轴突再生减少
miRNA-219	Lingo1	减少	抑制 CNS 中的髓鞘修复
	Etv5		
miRNA-338	Sox9	减少	miRNA-338 促进 miRNA-219 在 SCI 后髓鞘的形成

这些发现共同证明了 miRNA-21 在 SCI 恢复中的新作用,这种 miRNA-21 对细胞增殖和生长的影响因细胞类型而异。在星形胶质细胞中有抑制作用,但在神经元中有促进作用。因此为了最大化发挥 miRNA-21 的治疗潜力,有必要对这些细胞特异性进行调节。

2.2 miRNA-124 CNS 中特异性表达最为丰富的是 miRNA-124。miR-124 有 3 种亚型,其中以 miRNA-124a 最为常见。miRNA-124 在急性脊椎外伤所致急性 SCI 中可能具有确诊价值。陈聚伍等^[18]研究发现脊髓完全损伤组、脊髓不完全损伤组患者外伤后 24 h 内的外周静脉血的 miRNA-124、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平都高于神经功能正常组,表明以上两项指标对于脊椎外伤患者的急性 SCI 的确诊均有指导意义,其中 miRNA-124 诊断急性 SCI 的特异度 (90%) 和灵敏度 (90%) 均高于 TNF- α 的特异度 80% 和灵敏度 76.7%。所以有望将 miRNA-124 作为确诊脊椎外伤后急性 SCI 的潜在检测标志物。Song et al^[19] 在 SCI 大鼠模型中研究了 miR-124 修饰的骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cell, BMSCs) 移植修复大鼠 SCI 的机制。研究^[19]发现,miR-124 加速了 BMSCs 向神经细胞的分化,促进了 SCI 的修复。miRNA-124 的过度表达抑制吡哆醛激酶 (pyridoxal kinase, PDXK) 的表达,这可能是 miRNA-124 如何促进 BMSCs 分化的一个可能的机制,这项发现可能为 SCI 治疗提供了一个新的目标。

2.3 miRNA-133-b miRNA-133-b 通过降低 ras 同源蛋白 A (ras homology protein A, RhoA) 的表达来作为成年斑马鱼脊髓再生的重要决定因素^[20]。Conrad et al^[21] 发现成年斑马鱼的 SCI 模型在脊髓横断后的再生脑干神经元中的 miRNA-133-b 表达被极度上调,反义吗啉代诱导的 miRNA-133-b 表达下调导致运动恢复减弱并轴突再生减少。miRNA-133-b 靶向调节 RhoA,其表达在 SCI 后显著上调,而 RhoA 的抑制促进了皮质脊髓束的修复,并通过减少 SCI 后组织损伤来发挥神经保护作用^[22]。这些研究使得 miRNA-133-b 和 RhoA 成为在 SCI 中具有吸引力的治疗靶点。

2.4 miRNA-486 与 miR-21 相类似,在鼠挫伤模型中 SCI 后第 7 天,同样检测到 miRNA-486 表达的增加。Jee et al^[23] 研究已经证明,将 miRNA-486 输注到健康小鼠的脊髓中会降低运动功能并增加神经元死亡。相反,在小鼠 SCI 模型中敲除 miRNA-486

可以改善后肢功能恢复^[24]。运动神经元中 miRNA-486 的主要靶点是神经原性分化 6 (neurogenic differentiation 6, NeuroD6),它是神经元分化和氧化应激反应的重要蛋白质^[25]。NeuroD6 诱导 SCI 后谷胱甘肽过氧化物酶 3 (glutathione peroxidase 3, GPx3) 和硫氧还蛋白样 1 (thioredoxin-like 1, TXNL1) 的表达,可以有效清除 SCI 中过度活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 并减轻炎症^[24]。基于这些发现,有希望的 SCI 治疗策略是可以通过上调 NeuroD6 表达来抑制 miRNA-486,从而达到降低细胞凋亡并改善 SCI 后的功能缺陷的目的。

2.5 miRNA-219 和 miRNA-338 由脊髓 CNS 中的少突胶质细胞 (oligodendrocytes, OLs) 形成的髓鞘使轴突绝缘,从而加快动作电位传播。OLs 损伤后髓鞘修复失败使衰弱性疾病中的脱髓鞘持续存在,如多发性硬化和脑白质营养不良^[26]。miRNA-219 和 miRNA-338 在成熟 OLs 中优先和大量表达^[27-30],两种 miRNA 在从脊椎动物到人类的基因组进化中相对保守。Wang et al^[31] 研究发现 miRNA-219 缺陷不影响少突胶质前体细胞 (oligodendrocytes precursor, OPC) 形成,但是在发育过程中抑制它们的分化,miRNA-338 对于 CNS 中的正常 OLs 髓鞘形成不是必要的,但是 miRNA-219 在髓鞘形成中与 miRNA-338 协同能促进 CNS 中的髓鞘修复。

3 总结与展望

到目前为止,已能证实单一 miRNA 能够调节 SCI 后的关键过程,例如调控细胞炎症、死亡和凋亡。这些结果表明 miRNA 可以参与调控 SCI 后的继发损伤,促进损伤后的再生过程,从而有助于减轻 SCI 后的功能障碍。然而,CNS 损伤后发生的细胞和分子变化是多种多样的,这就使单靶点治疗的疗效大大降低。由于众多 miRNA 可通过多种机制作用于靶 RNA,参与 SCI 疾病的预后,因此针对各种途径中的多种 miRNA 组合进行相关研究是必要的。开发基于 miRNA 治疗是实现这一目标的有吸引力的手段。这篇综述讨论了 SCI 后 miRNA 的变化以及这些变化的生理和病理效应。然而,目前对 SCI 发病机制的了解仍然有限,需要做更多的研究来探索 SCI 相关 miRNA 的功能和靶点。

参考文献

- [1] Wang H, Liu X, Zhao Y, et al. Incidence and pattern of traumatic spinal fractures and associated spinal cord injury resulting from

- motor vehicle collisions in China over 11 years: An observational study[J]. *Medicine*, 2016, 95(43): e5220.
- [2] Bhalala O G, Srikanth M, Kessler J A. The emerging roles of microRNAs in CNS injuries[J]. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(6): 328–39.
- [3] Hu J Z, Huang J H, Zeng L, et al. Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2013, 30(15): 1349–60.
- [4] Xu M, Wang H F, Zhang Y Y, et al. Protection of rats spinal cord ischemia-reperfusion injury by inhibition of MiR-497 on inflammation and apoptosis: Possible role in pediatrics[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 81: 337–44.
- [5] Strickland E R, Hook M A, Balaraman S, et al. MicroRNA dysregulation following spinal cord contusion: implications for neural plasticity and repair[J]. *Neuroscience*, 2011, 186(186): 146–60.
- [6] Lee Y, Jeon K, Lee J T, et al. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization[J]. *EMBO J*, 2002, 21(17): 4663–70.
- [7] Basyuk E, Suavet F, Doglio A, et al. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(22): 6593–7.
- [8] Lau N C, Lim L P, Weinstein E G, et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 858–62.
- [9] Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, et al. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi [J]. *Cell*, 2002, 110(5): 563–74.
- [10] Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, et al. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs[J]. *Nature*, 2008, 455(7209): 58–63.
- [11] Lewis B P, Shih I H, Jones-Rhoades M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets [J]. *Cell*, 2003, 115(7): 787–98.
- [12] Esquela-Kerscher A, Slack F J. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(4): 259–69.
- [13] Meng F, Henson R, Lang M, et al. Involvement of human microRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(7): 2113–29.
- [14] Redell J B, Zhao J, Dash P K. Altered expression of miRNA-21 and its targets in the hippocampus after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(2): 212–21.
- [15] Sayed D, He M, Hong C, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects *via* suppression of Fas ligand[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(26): 20281–90.
- [16] Bhalala O G, Pan L, Sahni V, et al. microRNA-21 regulates astrocytic response following spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(50): 17935–47.
- [17] Sahni V, Mukhopadhyay A, Tysseling V, et al. BMP1a and BMP1b signaling exert opposing effects on gliosis after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(5): 1839–55.
- [18] 陈聚伍, 谢冕, 任佳等. 微小RNA-124在急性脊柱创伤所致急性SCI中的诊断价值[J]. *中国全科医学*, 2017, 20(12): 1506–10.
- [19] Song J L, Zheng W, Chen W, et al. Lentivirus-mediated microRNA-124 gene-modified bone marrow mesenchymal stem cell transplantation promotes the repair of spinal cord injury in rats [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(5): e332.
- [20] Hu B, Zhou Y J, Liu Y Y, et al. Impact of metabolic syndrome on clinical outcomes after drug-eluting stent implantation in patients with coronary artery disease [J]. *Angiology*, 2011, 62(6): 440–6.
- [21] Conrad S, Schluesener H J, Trautmann K, et al. Prolonged lesion expression of RhoA and RhoB following spinal cord injury [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 487(2): 166–75.
- [22] Dergham P, Ellezam B, Essagian C, et al. Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(15): 6570–7.
- [23] Jee M K, Jung J S, Choi J I, et al. MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury [J]. *Brain*, 2012, 135(4): 1237–52.
- [24] Hölte M, Djalali S, Hofmann F, et al. A 29-amino acid fragment of Clostridium botulinum C3 protein enhances neuronal outgrowth, connectivity, and reinnervation [J]. *FASEB J*, 2009, 23(4): 1115–26.
- [25] Uittenbogaard M, Baxter K K, 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.
- [26] Franklin R J, Gallo V. The translational biology of remyelination: Past, present, and future [J]. *Glia*, 2014, 62(11): 1905–15.
- [27] Dugas J C, Cuellar T L, Scholze A, et al. Dicer1 and miR-219 are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination [J]. *Neuron*, 2010, 65(5): 597–611.
- [28] Lau P, Verrier J D, Nielsen J A, et al. Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(45): 11720–30.
- [29] Zhao X, He X, Han X, et al. MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation [J]. *Neuron*, 2010, 65(5): 612–26.
- [30] 黄先甲, 张坤坤, 钱军等. 振荡电场刺激治疗脊髓损伤的研究进展 [J]. *安徽医科大学学报* 2016, 51(11): 1710–2.
- [31] Wang H, Moyano A L, Ma Z, et al. MiR-219 cooperates with miR-338 in myelination and promotes myelin repair in the CNS [J]. *Dev Cell*, 2017, 40(6): 566–82.