论著

文章编号:1000-5404(2008)21-2034-03

肌肉特异性 microRNAs 在失神经肌肉萎缩中表达变化的研究

赵文勇[1],王 涛[2],王军平[2],邹仲敏[2],冉新泽[2],万立华[1],粟永萍[2] ([1]重庆医科大学法医学教研室,重庆 400016;[2]第三军医大学军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨 miR-1、miR-133 和 miR-206 等 3 种肌肉特异性 microRNAs 在失神经支配所致骨骼肌萎缩中的表达变化情况。**方法** 采用坐骨神经离断术建立小鼠腓肠肌失神经支配模型,采用失神经前后腓肠肌湿质量、肌纤维横截面积百分比对模型进行评价,应用 Northern blot 方法检测失神经支配不同时间点肌肉特异性 microRNAs 的表达变化。**结果** 成功建立小鼠腓肠肌失神经萎缩模型,在该过程中,随着失神经支配时间的延长,骨骼肌特异性 miR-206 表达明显上调,miR-1、miR-133 表达先快速下调后逐渐回升。**结论** 随着失神经支配时间的延长,骨骼肌特异性 microRNAs 表达发生明显变化,骨骼肌特异性 microRNAs 可能在失神经介导的骨骼肌萎缩中发挥了一定作用。

关键词: 失神经;骨骼肌;萎缩;microRNAs

中图法分类号: R-33; R394.3; R746.402 **文献标识码:** A

Expressions of muscle specific microRNAs in denervated skeletal muscle in mice

ZHAO Wen-yong[1], WANG Tao[2], WANG Jun-ping[2], ZOU Zhong-min,[2] RAN Xin-ze[2], WAN Li-hua[1], SU Yong-ping[2] ([1]Department of Forensic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expression changes of muscle special microRNAs (miR-1, miR-133 and miR-206) in the atrophying skeletal muscle induced by the denervation in order to establish a basis for further study on their roles in the denervated atrophying muscle. Methods The mouse model of sciatic nerve resection was prepared and evaluated by comparing the wet weight percentage of muscle before and after denervation and the cross section area (CSA) of the muscle fibers. Northern blotting was used to examine the levels of muscle special microRNAs expressions in the atrophying mouse gastrocnemius muscle at different time points after denervation. Results The mouse model of sciatic nerve resection was successfully established. The expressions of miR-206 was obviously up-regulated with the time of denervation, however, those of miR-1 and miR-133 was decreased firstly and then gradually recovered with the time elapse. Conclusion The changes of the expressions of the skeletal muscle special microRNAs is very striking, so we presume that they may play certain roles in the atrophying skeletal muscle resulted from denervation.

Key words: denervation; skeletal muscle; atrophy; microRNAs

功能学研究表明,microRNAs(miRNAs)参与调节包括细胞的增殖分化、凋亡、肿瘤发生等许多病理生理过程[1]。其中 3 个在种族上高度保守的肌肉特异性 miRNAs 即 miR-1、miR-133、miR-206 参与了骨骼肌和心肌的增殖、分化和功能调控,发挥了较为重要的作用。然而,肌肉特异性 miRNAs 是否在失神经骨骼肌萎缩过程中发生变化和发挥一定程度的作用目前鲜见报道。本实验检测肌肉特异性 miRNAs 随失神经支配时间的延长在骨骼肌萎缩过程中的表达变化情况,为探索它们在失神经骨骼肌萎缩过程中的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康清洁级 12 周龄 C57 小鼠 30 只,体质量约 20 g,雄性,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 总 RNA 提取试剂 RNAiso、T_4 多核苷酸激酶(PNK)购自日本 TaKaRa 公司。DNA 探针由上海英骏公司合成,序列与对应 microRNA 完全互补。γ-^{32}P-ATP 购自北京福瑞生物工程公司;尼龙膜为 Roche 公司产品;杂交液购自 Clon-

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2005CB522605)
Supported by the National Basic Research and Development Plan of China (973 Program, 2005CB522605)

作者简介: 赵文勇,男,重庆市人,硕士研究生,主要从事肌肉萎缩方面的研究。电话:(023)67073145, E-mail: robert_90099@sina.com

通信作者: 万立华,电话:(023)68486811,E-mail: ccsw@cqmu.edu.cn
粟永萍,电话:(023)68752279,E-mail: suyp2003@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-06-10;**修回日期:** 2008-07-24

tech 公司。

1.2　方法

1.2.1　小鼠腓肠肌失神经萎缩模型的制备　　30 只 C57 小鼠分为：正常对照组不做任何处理（$n=6$，以术后 0 d 表示）；实验组（$n=24$，分为 4 个时间点即术后 3、7、14、28 d，每个时间点为 6 只小鼠），采用 1% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉后在无菌条件下手术：右后肢背侧部纵向切口，于股二头肌与股外侧肌之间钝性分离，游离坐骨神经，切除距梨状肌下缘 2 mm 以下长约 5 mm 的坐骨神经，逐层缝合，建立小鼠失神经腓肠肌萎缩模型；左后肢游离坐骨神经后不做手术处理，设为假手术组。分别于手术后 0（术前取材）、3、7、14、28 d 断颈处死小鼠并取双侧腓肠肌，分别称肌肉湿质量后，每个标本取 0.03 g 肌肉用于提取总 RNA，作为 Northern blot 分析的样品，余下标本用 4% 多聚甲醛固定并切片，用于腓肠肌形态学观察的样品。

1.2.2　腓肠肌形态学计量　　于腓肠肌肌腹部切取组织块（约 0.5 cm ×0.5 cm ×0.5 cm）浸入 4% 多聚甲醛中固定，经脱水、透蜡、包埋，石蜡切片机切片（厚约 7 μm），HE 染色，光镜观察，每个标本于高倍视野下至少测量 30 个肌细胞的横截面积（cross section area，CSA），取其均值。

采用湿质量百分比 =（实验组右侧肌湿质量/左侧肌湿质量）/（正常对照组右侧肌湿质量/左侧肌湿质量）×100% 进行评价，更客观地反映腓肠肌萎缩程度。

1.2.3　Northern blot　　采用 RNAiso 提取细胞总 RNA，具体方法参照说明书进行。以 miR-1、miR-133、miR-206 和 U6 等分子的反向互补 DNA 序列为探针（miR-1：5′-TACATACTTCTTTACATTCCA-3′；miR-133：5′-CAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA-3′；miR-206：5′-CCACACACTTCCTTACATTCCA-3′；U6：5′-ATATGGAACGCTTCACGAATTT-3′），采用 γ-^{32}P-ATP 末端转移法标记探针。取 20 μg 总 RNA 上样，行 20% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离，半干转印恒流 0.4 A 转尼龙膜 1 h。紫外交联 1 min，而后 80 ℃烘烤 1 h。加入放射性探针后于 42 ℃杂交过夜，洗膜后，−70 ℃放射自显影 48 h。成像结果以 Quantity One 软件进行灰度扫描，3 分子不同时相点的灰度与内参照 U6 进行比对，以去神经支配第 0 天结果为 1，各分子各时相点的量化值以其为去神经支配第 0 天的倍数表示。

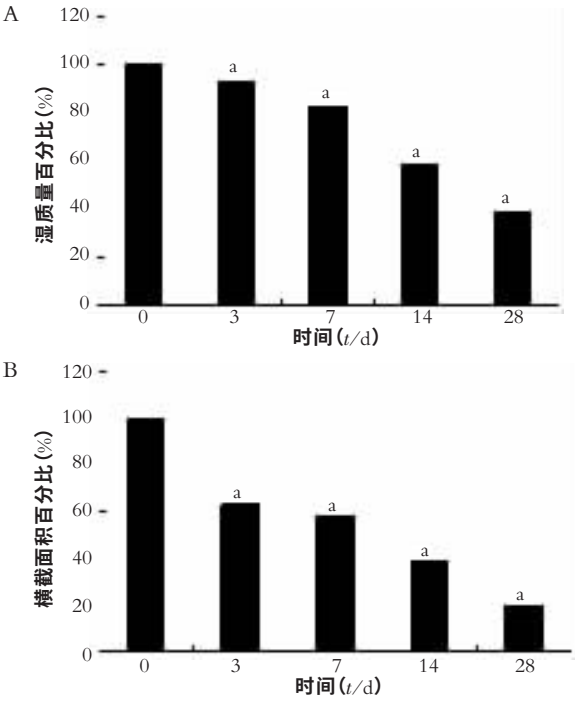
1.3　统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计分析软件对数据进行统计分析。通过配对样本均数 t 检验，比较实验组各时间点和对照组之间的差；通过两独立样本均数 t 检验，比较正常对照组左右侧腓肠肌之间的差异。

2　结果

2.1　失神经支配对腓肠肌湿质量及肌细胞横截面积的影响

正常对照组每只小鼠右侧腓肠肌均较左侧质量重（$P<0.05$），湿质量百分比结果见图 1A，神经离断 3 d 后肌肉湿质量百分比明显下降（$P<0.01$），其比值随着失神经支配时间的延长，呈逐渐下降的趋势（$P<0.01$），表明小鼠坐骨神经离断后，随着失神经支配时间的延长，腓肠肌萎缩程度逐渐加重。同理，腓肠肌肌细胞横截面积的百分比也随着失神经支配时间的延长逐渐下降，其下降程度与肌肉湿质量百分比的下降程度基本一致（$P<0.01$），见图 1B。



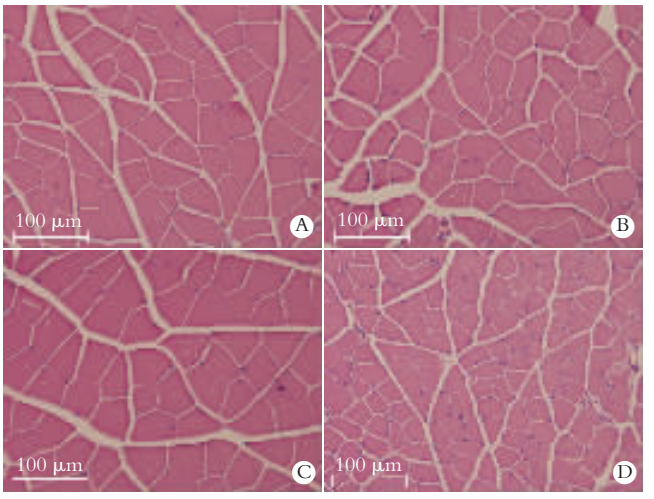
a：$P<0.01$，与正常对照组（0 d）比较

A：失神经支配不同时间点腓肠肌湿质量百分比的变化；B：失神经支配不同时间点腓肠肌肌纤维横截面积百分比的变化

图 1　失神经支配对腓肠肌湿质量及肌细胞横截面积的影响

2.2　失神经支配对腓肠肌形态学的影响

病理切片结果显示：失神经早期肌细胞细胞质开始丧失，直径减少；细胞核表现出代谢活跃的征象，如细胞核变大、核仁清晰等，此现象可能为失神经支配后肌细胞的代偿性反应。随着损伤时间的延长，细胞质明显固缩，核内移现象愈来愈普遍，细胞核变性（核染色质异染、缺失、核变小、甚至固缩）增多。见图 2。



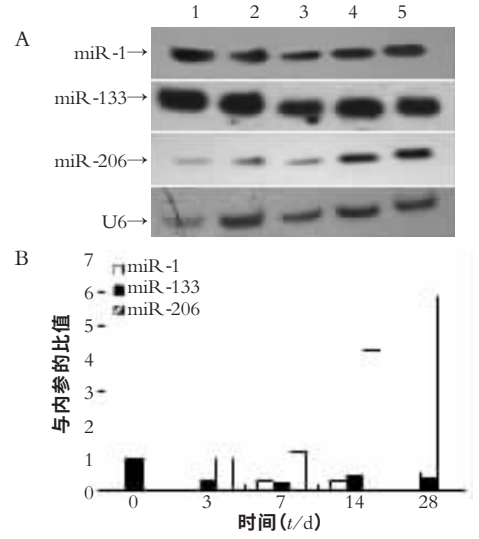
A：正常对照组右侧腓肠肌；B：正常对照组左侧腓肠肌；C：失神经支配第 28 天假手术组腓肠肌；D：失神经支配第 28 天实验组腓肠肌

图 2　失神经支配后腓肠肌形态学变化　（S-P）

2.3　失神经支配对肌肉特异性 microRNAs 的表达的的影响

由图 3 可见，肌肉特异性 microRNAs 随失神经支配的时间发生一系列改变。我们研究表明，与正常对照组和假手术组相

比,miR-206 随着失神经支配时间的延长其表达明显上调,第 28 天其丰度达到正常的 5 倍以上;miR-1、miR-133 随着失神经支配时间的延长其表达先迅速下调,而后逐渐回升,但至失神经支配后第 28 天仍明显低于正常水平。



A:Northern blot 检测 miR-1、miR-133、miR-206 等 3 分子随着失神经支配时间的延长的表达变化 1-5:失神经支配后第 0、3、7、14、28 天,其中 0 d 为正常对照组,U6 为内参 B:miRNAs 失神经支配后的表达改变(定量分析)

图 3 失神经支配对肌肉特异性 microRNAs 的表达的影响

3 讨论

miRNAs 具有明显的组织表达特异性及发育阶段特异性,其中肌肉特异性 microRNAs 包括 miR-1、miR-133 和 miR-206,前两者在心肌和骨骼肌均呈现高表达,而后者则只在骨骼肌表达。已有研究表明,它们参与了骨骼肌和心肌的增殖与分化[2,3],并与心肌肥大、心律失常等疾病密切相关[4,5]。那么它们在骨骼肌萎缩这一病理过程中有无表达变化,这种变化有何作用,本研究进行了初步探讨。

我们建立了小鼠失神经支配腓肠肌萎缩的模型,并对其进行了评价。结果显示小鼠坐骨神经离断后,随着失神经支配时间的延长,腓肠肌萎缩程度逐渐加重,表现为肌肉湿质量逐渐减轻,肌纤维横截面积减少明显。横截面积的减少幅度较湿质量减轻幅度更为敏感,在失神经后第 3 天即减少至正常对照的 60%,这一结果与邵晨听等[6]所观察到的结果基本一致,说明我们所建立的小鼠腓肠肌失神经支配模型是成功的。值得提出的是,我们研究发现正常对照组的小鼠右侧腓肠肌湿质量、肌纤维横截面积均分别较左侧重、粗,如果单纯使用肌肉湿质量及肌纤维横截面积比来反应肌肉萎缩程度,则可能忽略了小鼠左右侧腓肠肌本身存在的差异,这可能使研究所得数据不准确,从而导致研究反映出的腓肠肌萎缩程度比实际萎缩程度偏轻,使用腓肠肌湿质量及肌细胞横截面积百分比来反映腓肠肌萎缩程度,更能客观反映腓肠肌的萎缩程度。

本研究采用 Northern blot 检测了肌肉特异性 miRNAs 在失神经支配所致腓肠肌萎缩过程中的表达变化情况。结果表明,miR-1 和 miR-133 随着失神经支配时间的延长其表达迅速下调,分别于检测的第 3 天和 7 天达到最低,而后逐渐有所恢复,但至 28 d 仍明显低于正常水平。有研究表明,小鼠基因组含有 2 个miR-1(miR-1-1 和 miR-1-2)拷贝和 3 个 miR-133(miR-133a-1、miR-133a-2 和 miR-133b)拷贝,其中 miR-1-1、miR-133a-2 和 miR-1-2、miR-133a-1 存在明显的藕联转录表达[2]。这种共同的表达调控方式可以解释二者在肌肉萎缩过程中呈现相似的变化趋势。

与 miR-1 和 miR-133 在骨骼肌萎缩过程中的变化截然相反,miR-206 随着失神经支配时间的延长其表达明显上调,第 28 天其丰度达到正常的 5 倍以上。作为骨骼肌高度特异性表达的 miR-206,这一结果可能更具有意义。Velleca 等[7]研究发现在骨骼肌发育过程中,运动终板的突触形成区域的基因转录与肌纤维的其他部分不同,由此在鉴定出 miR-206 分子之前即发现其前体在运动终板形成区域呈现优势表达分布。其进一步研究证明,这种前体分子在体外细胞模型随肌管分化成熟表达上调,在失神经支配后表达明显增高。这一结果与我们在本模型中得到的数据相符。既然 miR-206 的前体分子与运动终板突触形成相关,其本身与前体在失神经支配后均表达上调,提示miR-206 分子可能参与了骨骼肌萎缩的病理生理过程。

本研究表明,失神经支配骨骼肌萎缩后,这些肌肉特异性 miRNAs 发生了一些表达变化,尤其是 miR-206 呈现明显的上调表达,由此我们推测骨骼肌特异性 miRNAs 可能在失神经支配骨骼肌萎缩演化过程中发挥了一定的调控作用。miR-206 等分子在这个过程中变化的意义何在,有待进一步的实验探讨。

参考文献:

[1] Wang Y, Stricker H M, Gou D, *et al*. MicroRNA, past and present[J]. Front Biosci, 2007, 12: 2316-2329.

[2] Chen J F, Mandel E M, Thomson J M, *et al*. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation [J]. Nat Genet, 2006, 38(2): 228-233.

[3] Kim H K, Lee Y S, Sivaprasad U, *et al*. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation[J]. J Cell Biol, 2006, 174(5):677-687.

[4] Yang B, Lin H, Xiao J, *et al*. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2[J]. Nat Med, 2007, 13(4): 486-491.

[5] Care A, Catalucci D, Felicetti F, *et al*. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy[J]. Nat Med, 2007, 13(5): 613-618.

[6] 邵晨听,吴 欣,刘 梅,等. Myostatin 在小鼠腓肠肌失神经支配萎缩过程中的表达[J]. 解剖学杂志, 2006, 29(2):146-149.

[7] Velleca M A, Wallace M C, Merlie J P. A novel synapse-associated noncoding RNA[J]. Mol Cell Biol, 1994, 14(11): 7095-7104.

(编辑 吴培红)