DOI:10.16016/j.2097-0927.202202025

MicroRNA-124 通过调控 PTEN 促进脑缺血损伤小鼠神经轴突生长和运动功能恢复

张敬炟[1],戴舒惠[2] 571199 海南,海南医学院公共卫生学院[1]; 710032 西安,空军军医大学西京医院神经外科[2]

[摘要] **目的** 探究 MicroRNA-124(miR-124)对脑缺血损伤小鼠神经功能的改善作用及其内在机制。**方法** ①取 32 只 C57 小鼠随机分为假手术组和脑缺血组($n=16$),TTC 染色和神经行为学评分检测小鼠脑损伤后 3 天脑梗死面积和运动情况,RT-qPCR 检测 miR-124 在两组间的表达变化。②培养原代神经元细胞,通过氧糖剥夺模拟缺血再灌注损伤,观察氧糖剥夺后 0、72 h miR-124 的变化趋势。③另取 32 只 C57 小鼠随机分为脑缺血组和脑缺血+miR-124 组($n=16$),TTC 染色、转棒实验和肢体放置实验检测小鼠的运动功能改善情况。④细胞实验分为氧糖剥夺组和氧糖剥夺+miR-124 组,通过免疫荧光实验检测两组神经元轴突的生长情况。Targetscan 数据库预测 miR-124 下游靶基因,双荧光素酶基因报告和 Western blot 在原代神经元等上验证对照组和 miR-124 组下游靶基因第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因(the phosphate and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN)的表达变化。上调 PTEN,检测氧糖剥夺+miR-124 和氧糖剥夺+miR-124+PTEN 两组神经元轴突的生长情况。⑤在体实验中检测脑缺血+miR-124 组和脑缺血+miR-124+Pten 组($n=8$)转棒实验和肢体放置情况。**结果** 脑缺血再灌注后,小鼠脑梗死面积约达到 40%($P<0.001$),小鼠的神经认知功能显著降低($P<0.001$),已达到重度认知功能损害;miR-124 的表达较对照组明显升高($P<0.05$);而进一步过表达 miR-124 能够促进氧糖剥夺后神经元轴突的生长($P<0.05$),显著缩小脑梗死面积($P<0.05$),且促进动物运动能力的恢复和改善($P<0.05$);Targetscan 数据库预测 miR-124 下游靶基因为 PTEN,双荧光素酶基因报告和 Western blot 都证实 miR-124 能有效下调 PTEN 的表达($P<0.05$);最后,上调 PTEN 逆转了 miR-124 促进神经元轴突的生长以及改善小鼠运动能力的效应($P<0.05$)。**结论** miR-124 通过下调 PTEN 促进脑缺血小鼠神经元轴突生长,且有助于小鼠运动功能的恢复。

[关键词] miR-124;PTEN;脑缺血损伤;神经元轴突;运动功能

[中图法分类号] R363.22; R394.1; R743.31 [文献标志码] A

MicroRNA-124 promotes neurite elongation and motor function recovery in mice with cerebral ischemia injury by targeting PTEN

ZHANG Jingda[1], DAI Shuhui[2] [1]School of Public Health, Hainan Medical University, Haikou, Hainan Province, 571199; [2]Department of Neurosurgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi Province, 710032, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of microRNA-124 (miR-124) on the improvement of neurological function in mice with cerebral ischemia injury and its underlying mechanism. **Methods** ① A total of 32 C57 mice were randomly divided into sham group and cerebral ischemia group ($n=16$). The cerebral infarction area was detected by TTC staining and motor status of the mice was evaluated with neurobehavioral scoring in 3 d after brain injury. The expression change of miR-124 was detected by RT-qPCR and compared between the 2 groups. ② Primary neurons were isolated from fetal mice and cultured, and ischemia-reperfusion injury was simulated by oxygen glucose deprivation. The changes of miR-124 at 0 and

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81901186)

[通信作者] 戴舒惠,E-mail:dsh20012004@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

72 h after oxygen glucose deprivation were observed. ③ Another 32 C57 mice were randomly divided into cerebral ischemia group and cerebral ischemia+miR-124 group ($n=16$). TTC staining, rotating rod test and limb placement test were performed respectively to detect whether the motor function of the mice was improved. ④ The primary neurons were divided into oxygen-glucose deprivation group and oxygen-glucose deprivation+miR-124 group. The neurite elongation in the 2 groups was detected by immunofluorescence assay. The downstream target gene of miR-124 was predicted with Targetscan database. Double luciferase gene reporter assay and Western blotting were used to verify the effectiveness of miR-124 regulation on phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) in the control and miR-124 groups. Then, the effect of PTEN up-regulation on neurite elongation was observed in the oxygen glucose deprivation+miR-124 cells and oxygen glucose deprivation+miR-124+PTEN groups. ⑤ Rotating rod test and limb placement test were performed again for motor functions in the mice of cerebral ischemia+miR-124 group and cerebral ischemia+miR-124+PTEN group ($n=8$). **Results** Cerebral ischemia-reperfusion resulted in the area of cerebral infarction about 40% ($P<0.001$) and significantly reduced neurocognitive function in mice ($P<0.001$), reaching the condition of severe cognitive impairment. The expression of miR-124 was significantly higher in the cerebral ischemia group than the control group ($P<0.05$). Overexpression of miR-124 could promote the growth of neuronal axons after oxygen glucose deprivation ($P<0.05$), reduce the area of cerebral infarction ($P<0.05$), and thus promote the recovery and improvement of animal motor ability ($P<0.05$). With the aid of Targetscan database, PTEN was predicted as the downstream target of miR-124, and double luciferase gene reporter assay and Western blotting confirmed that miR-124 could effectively down-regulate the expression of PTEN ($P<0.05$); Finally, up-regulation of PTEN reversed the effect of miR-124 on promoting the growth of neuronal axons and improving the motor ability of mice ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-124 promotes neuronal axonal growth and contributes to the recovery of motor function in mice with cerebral ischemia by down-regulating PTEN.

[**Key words**] MiR-124; PTEN; cerebral ischemic injury; neuronal axon; motor function

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81901186). Corresponding author: DAI Shuhui; E-mail: dsh20012004@163.com

脑卒中是世界上第二大致死病因[1],严重威胁人类健康。据统计,每 6 个人中就会有 1 个发生脑卒中[2]。尤其在我国,脑卒中是导致居民死亡的头号“杀手”[3]。在我国每年新增脑卒中患者超过 200 万例,是导致患者生活质量下降最严重的一类疾病[4],而缺血性脑卒中又占到所有脑卒中的 60%以上[5]。大量研究表明脑缺血会诱发一系列病理生理改变,如果缺血区不能在短暂时间内得到有效恢复,会引发不可逆的神经元凋亡。尽管科学家不断致力于探索缺血性脑卒中的内在机制,但仍有大量空白区域尚未完全阐明。

非编码 RNA 约占真核基因中转录表达的 98%,被认为是决定器官和细胞蛋白质特异性的主要控制器[6]。其中 miRNAs 是一类长度为 18~25 个核苷酸的非编码 RNA,是所有类型的非编码 RNA 中研究最多的一种。miRNAs 通过与靶基因 mRNA 结合互补,导致它们的降解或抑制翻译[7]。已发现超过 20%的 miRNAs 在缺血性脑中发生改变,表明 miRNAs 可能是缺血性脑卒中发病过程中的重要介质,鉴别这些 miRNAs 可能为防治缺血性脑卒中提供新的潜在治疗靶点。

miR-124 是一种在大脑丰富表达的非编码 RNA[8],它在神经发育起始阶段表达量很低,其表达量从神经元开始分化直至成熟达到峰值[9],这表明 miR-124 在神经元分化成熟过程中扮演重要角色。此外,miR-124 能够在脑缺血损伤过程中通过调控神经炎症[10],促进神经元分化[11],改变神经突触可塑性[12]等途径发挥神经保护效应。然而,针对 miR-124 促进轴突生长的研究少见报到。本研究拟采用局灶性脑缺血模型,通过 Western blot、免疫荧光和生物信息学预测等方法探索 miR-124 对脑缺血损伤小鼠神经轴突的生长以及运动功能改善是否有效,并进一步探索其内在机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~12 周龄,体质量为 22~26 g 的雄性 C57 小鼠 80 只,以及怀孕 15~17 d 的孕鼠

7 只。动物饲养环境温度维持在在(21±2) ℃之间,湿度控制在 60%~70%之间,每 12 h 进行一次昼夜循环。以上动物均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物批号:21052415889。实验①:在体实验将小鼠分为假手术组和脑缺血组(n=16);细胞实验分组为对照组,氧糖剥夺 0、72 h 组(n=8)。实验②:细胞实验分为氧糖剥夺组和氧糖剥夺+miR-124 组(n=7);在体实验将小鼠分为脑缺血组和脑缺血+miR-124 组(n=16)。实验③:细胞实验分为对照组和 miR-124 组,双荧光素酶基因报告实验每组 9 孔细胞,Western blot 每组 6 孔细胞。实验④:细胞实验分为氧糖剥夺+miR-124 和氧糖剥夺+miR-124+Pten(n=7);在体实验将小鼠分为脑缺血+miR124 和脑缺血+miR-124+Pten(n=8)。

1.1.2 试剂和药品 BCA 蛋白定量试剂盒(康为世纪有限公司),DMEM 培养基(Hyclone 公司),Neurobasal 培养基(Gibco 公司),B27(Gibco 公司),青-链霉素(北京索莱宝科技有限公司),谷氨酰胺(Hyclone 公司)蛋白酶,Tau 蛋白一抗(Millipore 公司),actin 一抗(GeneTex 公司),miR-124 模拟物(mimics)及其对照物(NC)(上海吉玛),mRNA 反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒均购自日本 TaKaTa 公司;AAV-hSyn-PTEN-EYFP-WPRE-pA(上海泰尔图生物有限公司),Tris 碱,冰醋酸,EDTA,RIPA 裂解液均购自碧云天生物技术有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自 Bioworld 公司;PVDF 膜、ECL 发光液、电泳凝胶试剂盒购自 BioRad 公司,去离子水,EP 管均购自碧云天生物技术有限公司。

1.2 *实验方法*

1.2.1 小鼠大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型制作 将小鼠随机分为假手术组和 MCAO 组,每组小鼠 16 只,其中行为学和检测脑梗死面积共用 8 只,RT-qPCR 检测 miR-124 的表达使用 8 只,具体方法为将 C57 小鼠适应饲养环境至少 1 周后进行 MCAO 手术,术前 4 h 禁水、12 h 禁食。使用 2%的异氟烷吸入进行麻醉诱导,待小鼠体动反应消失取小鼠仰卧位固定在动物手术台上,将颈部使用碘伏充分消毒后作一纵形切口,然后钝性分离各层组织,直至右侧颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉分叉后一段。此时将颈内动脉和颈总动脉夹闭,并将颈外动脉近心端和远心端结扎,在结扎后的血管中间剪一条小口,将线栓从颈外动脉插入到颈内动脉直至大脑前动脉,感觉有阻力时停止,然后结扎固定并松开颈总动脉夹。最后逐层缝合,将手术操作完的小鼠放入动物保温箱中,在小鼠缺血后 1.5 h 后拔出线栓恢复再灌注。假手术组只进行术前麻醉和暴露血管等操作,但不结扎动脉也不放入线栓,此过程中保持恒温台 37 ℃。

1.2.2 神经行为学评分 为了验证脑缺血对小鼠神经功能的影响,在缺血再灌注 3 d 后,分别将 8 只假手术组和 MCAO 组小鼠进行神经行为学评分。采用双盲法,由一位熟悉评分规则但不清楚动物分组的实验人员按照 Garcia 评分标准[13]进行神经行为学评分并记录。3~7 分为重度神经功能障碍,8~11 分为中度神经功能障碍;12~18 分为轻度神经功能障碍;此评分法最低 3 分,最高 18 分;得分越高表明动物的神经行为学状况越好。

1.2.3 TTC 染色及脑梗死体积计算 将假手术组、脑缺血组和脑缺血+miR-124 组小鼠在术后 3 d 麻醉下断头处死,每组 8 只,在冰上迅速取出完整大脑,并在-20 ℃冰箱速冻 30 min,然后将脑置于脑槽内沿冠状面切成 2.0 mm 厚的切片。切片完成后立即置于 2%的 TTC 溶液中,确保使脑片能够充分且均匀接触到 2% TTC 染液,在 37 ℃避光条件下温浴 30 min,待着色完全后放入 4%多聚甲醛固定过夜。假手术组和脑缺血组在检测完神经行为学评分后,即脑缺血后 3 d 断头染色;脑缺血组和脑缺血+miR-124 组在脑缺血后 7 d 断头染色;染色完成后将脑片摆放好拍照。

1.2.4 RT-qPCR 检测 miR-124 的表达 使用 RNAiso Plus (TaKaRa) 从假手术组和脑缺血组脑组织中提取总 RNA,每组动物 8 只。根据试剂盒说明,使用 SuperScript Ⅲ返转录酶制备 cDNA。每个样品做 3 个复孔进检测,miR-124(上海吉玛,中国)的引物序列为:UAAGGCACGCGGUGAAUGCC,使用 Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, Burlington, Canada) 检测成熟 miRNAs 的表达,同时使用 U6 作为内参进行标化。

1.2.5 miR-124 mimics 及 Pten 立体定位注射 8 只 miR-124+Pten 组小鼠使用 2%的异氟烷吸入进行麻醉诱导,待小鼠体动反应消失固定在立体定位仪上。剔除小鼠头部毛发,碘伏消毒,红霉素软膏保护小鼠眼睛,切开小鼠头部皮肤,H_2O_2 擦拭颅骨表面清除软组织。调平后定位,右侧脑室的坐标为 bregma:向后 0.1 mm,向右旁开 1 mm,深度 2 mm。钻头打孔后埋入套管,然后用牙科水泥固定。将 1 pmol/g 的 miR-124 mimics(2 μL)与脂质体(4 μL)混合后或 100 μL AAV-hSyn-PTEN-EYFP-WPRE-pA 缓慢注射入右侧脑室,在 MCAO 后当天开始注射,连续注射 7 d。

1.2.6 原代神经元培养 提前将培养皿进行多聚赖氨酸包被,37 ℃过夜;次日取孕鼠 7 只,用 10%水合氯醛麻醉,待体动反应消失后打开孕鼠腹腔,分离子宫

后剪断胎鼠脐带并将完整胎鼠置于预冷的 DF12 液体中;将胎鼠断头并放入预冷的 DMED 培养基中,显微镜下分离小鼠大脑皮层,并将脑膜剥离干净后将大脑皮层放入另一个含预冷 DMEM 培养基的皿中,冰上操作;将脑组织剪成乳糜状后加入胰酶消化,37 ℃孵育 10 min 后将完全消化的组织吸入含 5 mL 完全培养基的离心管中,静置 5 min 后再转移至另一个含 5 mL 完全培养基的离心管中进行吹打,直至组织块消失为止;最后将细胞悬液通过 200 目筛网滤过组织块并收集细胞悬液,离心去除细胞碎片 1 000 r/min,10 min,弃掉上清液,重悬细胞后计数,使细胞悬液达到 2.5~3.0×10^6/mL接种到对应培养皿上。

1.2.7 氧-糖剥夺模型 原代神经元培养到第 6 天,将细胞培养基吸除,然后用无糖培养基轻柔洗涤细胞 3 遍,然后加入无糖培养基,将细胞放入氧糖剥夺装置内,用 95% N_2+5% CO_2 混合气体充氮去氧 15 min,关闭双侧阀门后放入 37 ℃孵箱培养 1 h。氧糖剥夺完成给细胞换成正常培养基,在 37 ℃,5% CO_2 培养箱内继续培养,氧糖剥夺后 3 d 进行检测。

1.2.8 Western Blot 检测 PTEN 的表达 氧糖剥夺后 3 d 的神经元按 1∶10 的比例加入 RIPA 裂解液,同时加入蛋白酶抑制剂防止蛋白降解。冰上将贴壁细胞吹打成细胞悬液,置于 4 ℃低温高速离心机中以 12 000 r/min 离心 20 min,有效离心半径为 10 cm,然后取上清备用。使用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白样品进行定量。然后将蛋白样品与上样缓冲液按 1∶4的比例混合,96 ℃加热 5 min 后室温冷却备用;按配胶试剂盒说明书配制 SDS-PAGE 凝胶,按分组向上样孔分别加入彩虹 Marker 和 20 μg 蛋白样品,电压 100V,时间为 2 h 转膜完成后,将带有蛋白的 PVDF 膜浸入 5% 脱脂牛奶进行封闭 1 h 后放入一抗孵育盒中(PTEN,1∶1 000),4 ℃过夜后 TBST 洗涤 3 遍,每遍 10 min,在进行二抗孵育,室温摇床孵育 1 h;二抗孵育结束后 TBST 洗涤 3 遍,每遍 10 min,将条带置于凝胶成像系统成像,并分析条带灰度值。

1.2.9 免疫荧光染色 Tau 蛋白 检测氧糖剥夺后 3 d 神经元 Tau 蛋白表达情况,实验分为氧糖剥夺组和氧糖剥夺+miR-124 组。Tau 蛋白广泛表达与神经元轴突,因此被用来作为神经元轴突的标记物[14]。使用 4% 的多聚甲醛固定处理后的细胞 4 h,PBS 洗涤 3 遍,每遍 10 min。0.3% triton 破膜处理 1 h 候,5%山羊血清,室温封闭 1 h。孵育一抗:每个共聚焦皿里加入约 100 μL 一抗(Tau,1∶500),4 ℃过夜;PBS 洗涤 3 遍,每遍 10 min,进行二抗孵育:山羊抗兔二抗(Alexa Fluor 488,1∶500)室温避光孵育 2 h;二抗孵育结束前 10 min 进行 DAPI 染色,最后封片,并在共聚焦显微镜下观察和拍照。

1.2.10 转棒实验 通过转棒实验评估脑缺血组、脑缺血+miR-124 组脑缺血+miR-124+PTEN 组小鼠平衡能力和协调能力,每组小鼠 8 只。实验分两个阶段:①适应性训练,小鼠在 MCAO 造模前放在滚轴上,训练其在滚轴转动时的平衡运动能力,滚轴始速为 4 r/min,最大速度为 40 r/min,每组测试时间为 3 min,每天训练 3 次,连续 3 d,作为基础值。② MCAO 造模后的测试,同样记录小鼠从放在轴上到掉下的持续时间,时间越长代表得分越高。

1.2.11 肢体放置实验 通过肢体放置实验评估脑缺血组、脑缺血+miR-124 组、脑缺血+miR-124+PTEN 组实验动物的运动、反射和平衡功能,每组小鼠 8 只,缓慢放低小鼠至桌前,通过检测小鼠双侧前肢能否正常伸展、前肢能否支撑桌子边缘、一侧前后肢伸展至桌面、能否抓牢桌面等几个维度各测试 8 次,每次测试得分如下:0 分,无反应;1 分,完成不完整和/或延迟超过 2 s;2 分,立即正确放置。每侧测试的最大得分是 16 分[15]。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多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。

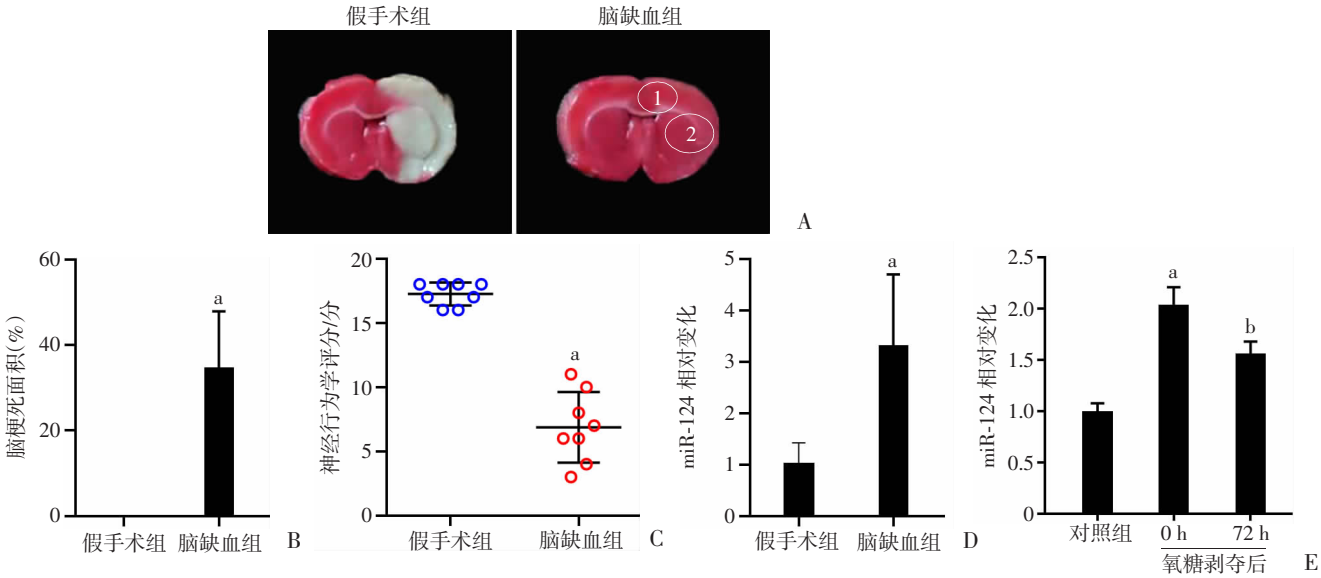
2 结果

2.1 脑缺血损伤后 miR-124 表达增加

通过构建 MCAO 模型模拟脑缺血再灌注损伤,发现在 MCAO 后 3 d,小鼠脑梗死面积约达到 40%($P<0.001$,图 1A、B),同时小鼠的神经认知功能显著降低($P<0.001$,图 1C),脑缺血组平均得分为 6.8 分,按照 Garcia 评分标准已达到重度认知功能损害。检测缺血半暗带发现 miR-124 表达显著上调($P<0.001$,图 1D),离体实验也得到了类似的结果,在氧糖剥夺后即刻和 72 h 后,miR-124 表达较对照组均显著上调($P<0.05$,图 1E),提示 miR-124 可能在脑损伤过程中发挥重要作用。

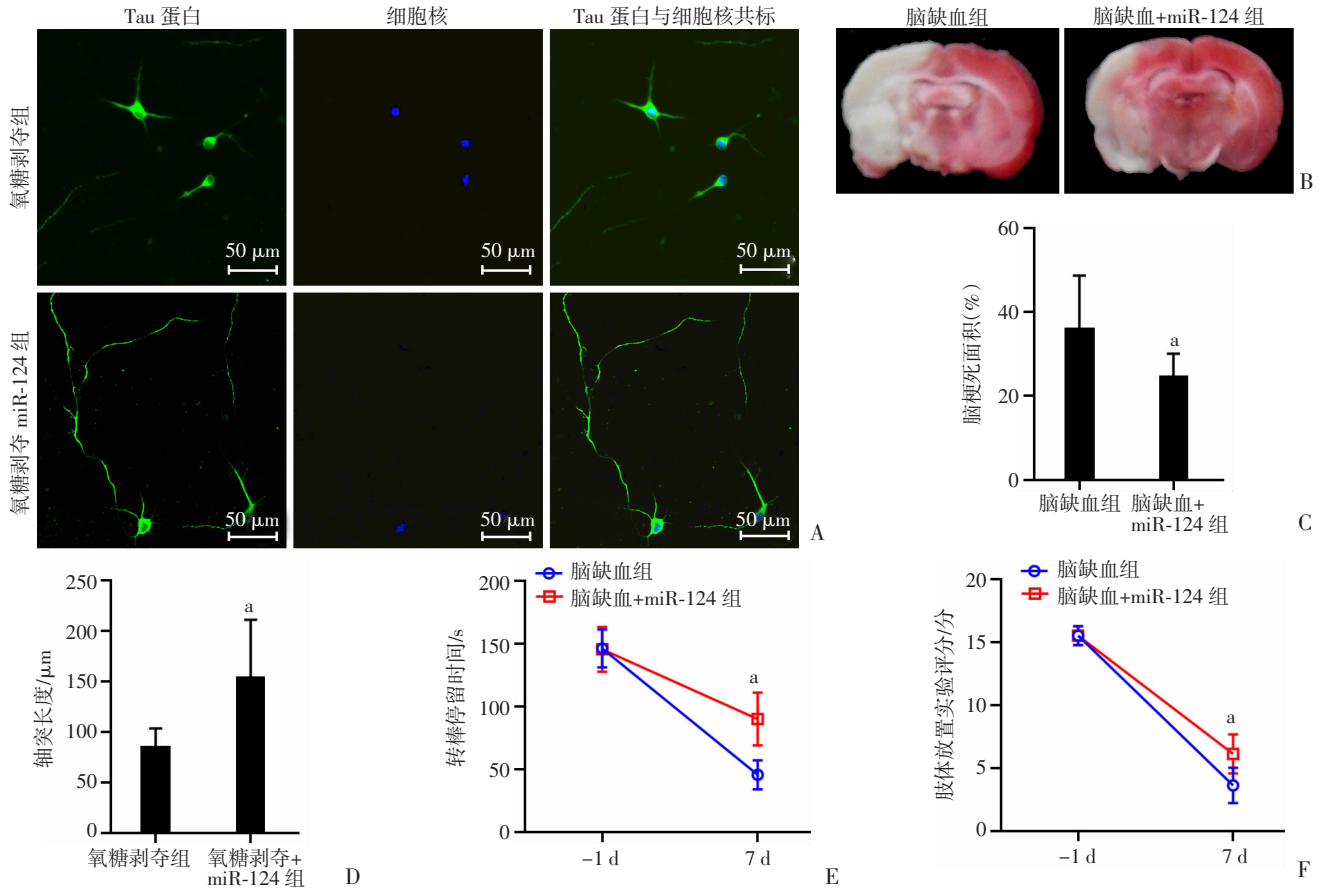
2.2 调控 miR-124 影响神经元轴突生长和小鼠运动功能

氧糖剥夺模后神经元轴突明显缩短(图 2A),当给予 10 nmol 的 miR-124 mimics 后则能显著增加神经元轴突长度($P<0.05$,图 2A、D);并且在体注射 miR-124 mimics 后显著缩小脑梗死面积($P<0.05$,图 2B、C),7 d 能显著延长 MCAO 小鼠在转棒实验中的停留时间($P<0.05$,图 2E),提高小鼠在肢体放置实验中的成功率($P<0.05$,图 2F)。



A:脑缺血后 3 d 小鼠脑组织 TTC 染色大体观察　①示缺血半暗带,②示缺血核心区;B:脑梗死面积统计　a:$P<0.001$,与假手术组比较;C:两组小鼠神经行为学评分　a:$P<0.001$,与假手术组比较;D:MCAO 后小鼠半暗带区 miR-124 表达情况　a:$P<0.001$,与假手术组比较;E:原氧糖剥夺 miR-124 表达情况 a:$P<0.001$,b:$P<0.05$,与对照组比较

图 1　脑缺血后小鼠半暗带 miR-124 表达增加　($n=8$,$\bar{x}\pm s$)



A:氧糖剥夺组和氧糖剥夺+miR-124 组 Tau 蛋白免疫荧光染色;B:脑缺血 7 d 小鼠脑组织 TTC 染色大体观察;C:脑梗死面积统计图($n=8$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与脑缺血组比较;D:神经元轴突长度统计结果($n=7$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.001$,与氧糖剥夺组比较;E:两组小鼠在转棒上停留的时间($n=8$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与脑缺血组比较;F:两组小鼠肢体放置的得分情况($n=8$,$\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与脑缺血组比较

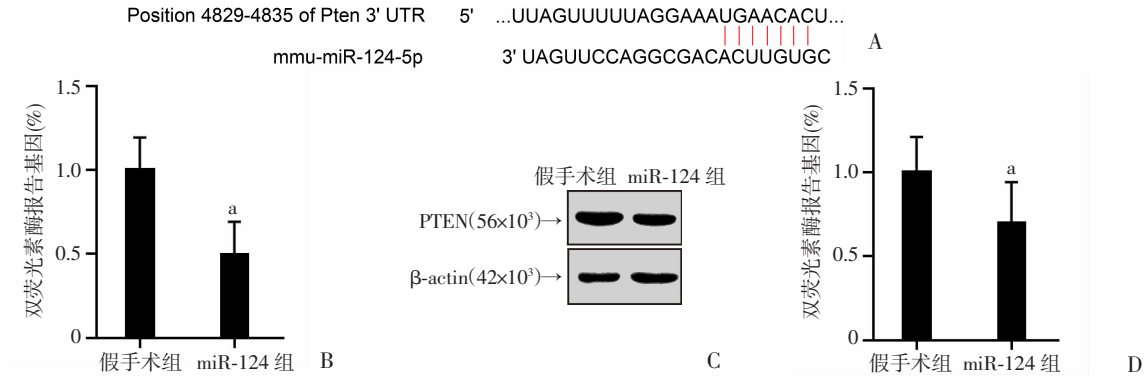
图 2　脑缺血后小鼠半暗带 miR-124 表达增加

2.3　miR-124 的作用靶基因是 PTEN

为了验证 miR-124 是作用于哪个基因发挥效应,通过 Targetscan 生物信息学数据库(TargetScanHuman 8.0)预测 miR-124 的下游靶基因,发现 miR-124 与 PTEN 有着重要的互补结合区域(图 3A)。为了进一步明确它们之间是否存在相互作用的关系,双荧光素酶报告基因实验发现 miR-124 能有效降低 PTEN mRNA 的转录,其有效性达到 50%($P<0.05$,图 3B);Western blot 也进一步证实 miR-124 能有效降低 PTEN 蛋白的合成($P<0.05$,图 3D)。

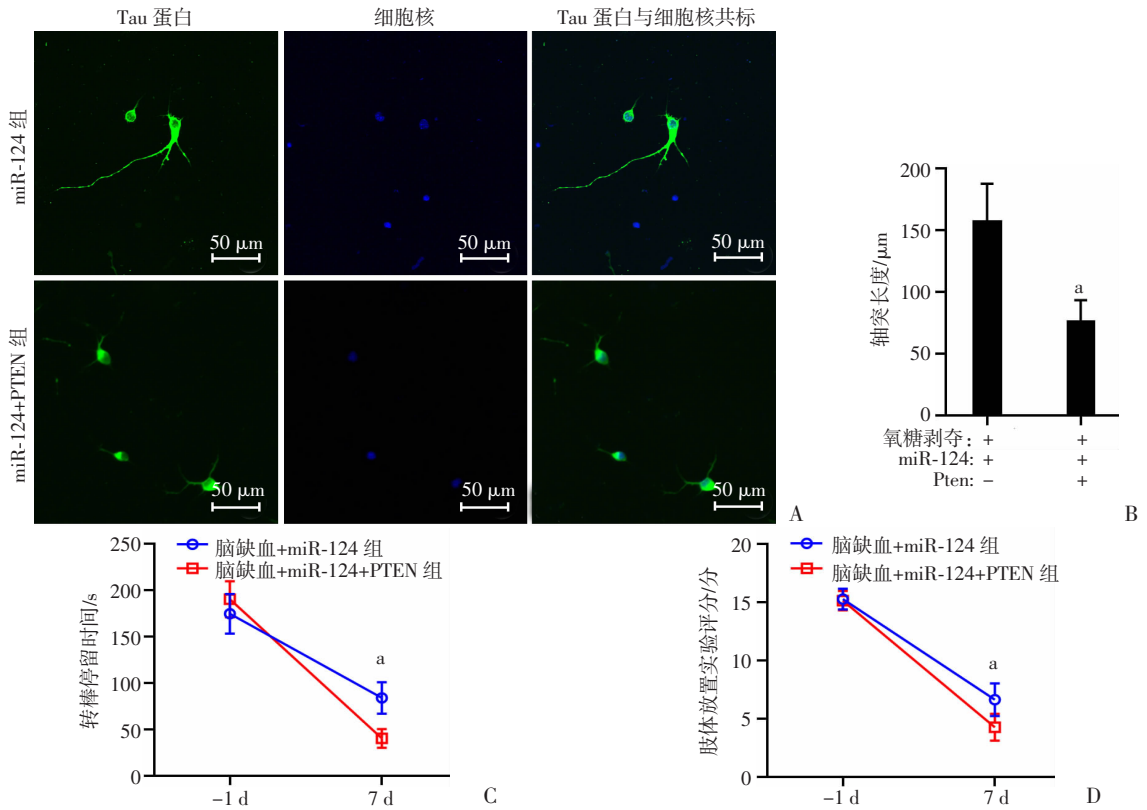
2.4　miR-124 通过下调 PTEN 改善小鼠神经运动功能

离体氧糖剥夺实验中过表达 PTEN 结果显示:与 miR-124 组比较,PTEN 过表达组神经元轴突明显缩短(图 4A、B);并且过表达 PTEN 还缩短了 MCAO 小鼠在转棒上的停留时间($P<0.05$,图 4C),降低小鼠在肢体放置实验中的成功率($P<0.05$,图 4D)。



A:Targetscan 预测 miR-124 下游靶基因及其结合位点;B:双荧光素酶基因报告($n=9,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与假手术组比较;C:加入 miR-124 后 PTEN 蛋白表达情况;D:加入 miR-124 后 PTEN 蛋白表达统计结果($n=6,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与假手术组比较

图 3　miR-124 作用的下游靶基因可能是 PTEN



A:miR-124 组和 miR-124+PTEN 组 Tau 蛋白免疫荧光染色;B:miR-124 组和 miR-124+PTEN 组神经元轴突长度统计结果($n=7,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与氧糖剥夺+miR-124 组比较;C:两组小鼠在转棒上停留的时间($n=8,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.01$,与脑缺血+miR-124 组比较;D:两组小鼠前肢放置的得分情况($n=8,\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与脑缺血+miR-124 组比较

图 4　过表达 PTEN 减弱 miR-124 的神经保护效应

3 讨论

3.1 miRNAs 在脑缺血过程中扮演重要角色

脑卒中以每年超过 200 万新增病例的速度不断攀升,严重威胁国民健康[4]。由脑卒中带来的高死亡和高致残率严重降低患者及其家人生活质量,给社会也带来沉重的负担。脑缺血会引发一系列病理事件,包括几分钟内发生的兴奋性毒性、几小时内的强烈炎症反应以及脑卒中发作后数小时和数天内的细胞凋亡,最终导致脑组织出现不可逆的神经元损伤。越来越多的证据表明神经元细胞轴突崩解破坏是脑卒中后观察到的一个突出特征。研究表明,神经元轴突再生对脑功能重塑发挥着至关重要的作用[16],而目前已发现超过 20% 的 miRNAs 在缺血性脑中发生改变[2],说明 miRNAs 在脑缺血过程中扮演重要角色。因此,鉴别参与调控脑卒中相关神经元轴突破坏和细胞凋亡的 miRNAs,可能是防治脑缺血损伤的新策略和新途径。

3.2 脑缺血后 miR-124 表达升高有助于神经元轴突生长

我们的研究发现,在脑缺血损伤后 miR-124 的表达显著增加,这与其他类似的研究报道一致[2]。以往研究发现 miR-124 发挥神经保护的机制非常广泛,包括自噬[17]、神经炎症[10]、氧化应激[18]、神经递质兴奋失衡[11]以及改变神经突触可塑性[12]等方面,但是缺少对神经元轴突生长的关注。脑缺血损伤后永久的残疾是由于受伤的轴突无法再生并与其原始目标重建进行功能连接,这种再生反应需要在受损神经元中诱导广泛的转录和表观遗传改变。近年来,在外周轴突损伤如何通过转录因子和表观遗传修饰,尤其在 miRNAs 对疾病进展调控方面取得了巨大进展。尽管 miRNAs 能够调节超过 60%的转录组,但 miRNAs 在轴突再生中的重要性才刚刚开始被发现和认可[19]。miRNAs 变得有活性必须经过一系列生理过程,而这一生理过程中至少有一个关键酶 Dicer,其已被确定为外周神经再生所必需的。当缺乏关键合成酶 Dicer 时小鼠在体外表现出轴突生长受抑和在体功能恢复受损。目前已经证实的有 miR-21、miR-30b、miR-26a、miR-133 等广泛参与神经元轴突的再生[20]。在我们的研究过程中,发现 miR-124 能够显著延长神经元轴突的长度。轴突延长带来的益处是在脑缺血再灌注后 7 d,小鼠能部分恢复其运动功能。这提示 miR-124 的神经保护机制很可能是通过促进神经元轴突生长或免遭破坏,最终使小鼠的运动功能得以部分保留。

3.3 miR-124 通过下调 PTEN 发挥神经保护效应

为进一步探究 miR-124 产生此效应的可能机制,我们通过 Targetscan 生物信息学数据库预测了 miR-124 下游可能作用的靶基因。通过双荧光素基因报告实验和 Western blot 两种手段确定 miR-124 下游靶基因是 PTEN。PTEN 是神经系统重塑的一个重要调控蛋白[16],一方面,PTEN 能够抑制 PI3K/AKT 信号通路,这有助于神经元生长和蛋白的合成[21];另一方面,PTEN 通过影响 PI3K 磷酸化抑制了糖原合酶激酶 3β 的活性,进一步促进轴突微管重塑[22]。另外也有研究报道条件敲除 PTEN 能够刺激轴突生长,甚至可以使轴突跨过损伤的脊髓[16]。有的研究也发现在培养的背根节神经元中,miR-222 能够通过抑制 PTEN 而从发挥促进神经元轴突生长的效应[23],同样在体下调 PTEN 也能促进外周神经损伤的恢复[24]。与之类似的是,我们的研究发现 miR-124 下调 PTEN 后促进了轴突生长,相反,过表达 PTEN 抵消了 miR-124 促进轴突生长的效应,且不能改善脑缺血损伤小鼠的运动功能。

尽管近些年来越来越多的研究关注利用 miRNAs 作为治疗靶点,但目前它们尚未发现能改善在体的神经元轴突再生,这主要是由于 miRNAs 的在体操作技术问题导致的。另外,科学家们对于 miRNAs 影响神经元轴突再生的重要性缺乏共识。不同研究间的异质性也应该被重视,有些研究即使是在疾病损伤后同一时间点检测,但他们发现的差异表达 miRNAs 却往往不尽相同,导致这种异质性的原因可能是实验物种属的差异、不同的造模方式甚至是造模严重程度不同、以及测序技术本身带来的一些局限性。尽管神经元轴突损伤的机制研究已经取得长足的进展,但是受损的神经元如何重新编程以使其轴突获得再生能力,同时保持其形成突触的能力,以及一旦再生完成后它们如何停止生长等,这些复杂的病理生理调控过程目前尚不清楚。未来还需要更多高质量研究专注于长时间观察神经元损伤修复的动态变化,这才可能揭开这一复杂而神秘生命现象的真正面纱。

3.4 总结

本研究通过脑缺血再灌注损伤和氧糖剥夺两个模型模拟脑卒中的发生发展,从微观 miR-124 变化入手,借助生物信息学预测,抽丝剥茧找到 miR-124 的靶基因 PTEN,将在体实验与离体实验相结合,证实 miR-124 可以通过下调 PTEN 的表达,促进神经元轴突的生长,最终影响小鼠神经行为的改变。本实验的不足之处是尚未探明是什么原因导致 miR-124 发生变化,以及 PTEN 变化导致的下游信号通路是如何变化的。因此,在未来的研究中,还需进一步为揭示导致 miR-124 变化的始动因素并改进观测手段,从而提供更加完备和坚实的证据链。综上,miR-124 可以作为改善脑缺血损伤患者的潜在治疗靶点,为改善脑缺血损伤

患者运动功能甚至认知功能具有重要意义。

参考文献:

[1] COLLABORATORSG B D 2 S. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. Lancet Neurol, 2021, 20(10): 795-820. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00252-0.

[2] SUN Y, GUI H, LI Q, *et al*. MicroRNA-124 protects neurons against apoptosis in cerebral ischemic stroke[J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19(10): 813-819. DOI: 10.1111/cns.12142.

[3] CHEN W Q, XIA C F, ZHENG R S, *et al*. Disparities by province, age, and sex in site-specific cancer burden attributable to 23 potentially modifiable risk factors in China: a comparative risk assessment[J]. Lancet Glob Health, 2019, 7(2): e257-e269. DOI: 10.1016/S2214-109X(18)30488-1.

[4] WU S M, WU B, LIU M, *et al*. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management[J]. Lancet Neurol, 2019, 18(4): 394-405. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30500-3.

[5] EKKERT A, ŠLIACHTENKO A, GRIGAIT J, *et al*. Ischemic stroke genetics: what is new and how to apply it in clinical practice? [J]. Genes, 2021, 13(1): 48. DOI: 10.3390/genes13010048.

[6] JACQUIER A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(12): 833-844. DOI: 10.1038/nrg2683.

[7] MAHJOUBIN-TEHRAN M, REZAEI S, JESMANI A, *et al*. New epigenetic players in stroke pathogenesis: from non-coding RNAs to exosomal non-coding RNAs[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140: 111753. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111753.

[8] LIU X L, FENG Z T, DU L P, *et al*. The potential role of microRNA-124 in cerebral ischemia injury[J]. Int J Mol Sci, 2019, 21(1): 120. DOI: 10.3390/ijms21010120.

[9] AKERBLOM M, SACHDEVA R, BARDE I, *et al*. MicroRNA-124 is a subventricular zone neuronal fate determinant[J]. J Neurosci, 2012, 32(26): 8879-8889. DOI: 10.1523/jneurosci.0558-12.2012.

[10] HAMZEI TAJ S, KHO W, RIOU A, *et al*. MiRNA-124 induces neuroprotection and functional improvement after focal cerebral ischemia[J]. Biomaterials, 2016, 91: 151-165. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.025.

[11] WANG W, WANG X F, CHEN L, *et al*. The microRNA miR-124 suppresses seizure activity and regulates CREB1 activity[J]. Expert Rev Mol Med, 2016, 18: e4. DOI: 10.1017/erm.2016.3.

[12] RAJASETHUPATHY P, FIUMARA F, SHERIDAN R, *et al*. Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB[J]. Neuron, 2009, 63(6): 803-817. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.05.029.

[13] GARCIAJ H, WAGNER S, LIU K F, *et al*. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation[J]. Stroke, 1995, 26(4): 627-634; discussion635. DOI: 10.1161/01.str.26.4.627.

[14] ZHAO X Y, BAI F H, ZHANG E F, *et al*. Electroacupuncture improves neurobehavioral function through targeting of SOX2-mediated axonal regeneration by microRNA-132 after ischemic stroke[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 471. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00471.

[15] LIU H, HONMOU O, HARADA K, *et al*. Neuroprotection by PlGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia[J]. Brain, 2006, 129(Pt 10): 2734-2745. DOI: 10.1093/brain/awl207.

[16] CHEN Z X, LI Z, JIANG C, *et al*. MiR-92b-3p promotes neurite growth and functional recovery via the PTEN/AKT pathway in acute spinal cord injury[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23043-23052. DOI: 10.1002/jcp.28864.

[17] WANG H Q, YE Y Y, ZHU Z Y, *et al*. MiR-124 regulates apoptosis and autophagy process in MPTP model of Parkinson's disease by targeting to bim[J]. Brain Pathol, 2016, 26(2): 167-176. DOI: 10.1111/bpa.12267.

[18] KANAGARAJ N, BEIPING H, DHEENS T, *et al*. Down-regulation of miR-124 in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease and MPP iodide-treated MN9D cells modulates the expression of the calpain/cdk5 pathway proteins[J]. Neuroscience, 2014, 272: 167-179. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2014.04.039.

[19] GHIBAUDI M, BOIDO M, VERCELLI A. Functional integration of complex miRNA networks in central and peripheral lesion and axonal regeneration[J]. Prog Neurobiol, 2017, 158: 69-93. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.07.005.

[20] WENGY L, JOSEPH J, AN R, *et al*. Epigenetic regulation of axonal regenerative capacity[J]. Epigenomics, 2016, 8(10): 1429-1442. DOI: 10.2217/epi-2016-0058.

[21] YOUNG W. Spinal cord regeneration[J]. Cell Transplant, 2014, 23(4/5): 573-611. DOI: 10.3727/096368914X678427.

[22] BERRY M, AHMED Z, MORGAN-WARREN P, *et al*. Prospects for mTOR-mediated functional repair after central nervous system trauma[J]. Neurobiol Dis, 2016, 85: 99-110. DOI: 10.1016/j.nbd.2015.10.002.

[23] MAHAR M, CAVALLI V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration[J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19(6): 323-337. DOI: 10.1038/s41583-018-0001-8.

[24] CHRISTIEK J, WEBBER C A, MARTINEZ J A, *et al*. PTEN inhibition to facilitate intrinsic regenerative outgrowth of adult peripheral axons[J]. J Neurosci, 2010, 30(27): 9306-9315. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6271-09.2010.

(收稿:2021-02-10;修回:2021-03-05)

(编辑 刘秋池)