

脑挫裂伤致 miR-9 升高促进神经干细胞分化 *

张儒有 郑永日[△] 郭 薇 胡韶山 林宏伟 沈大伟

(哈尔滨医科大学附属第二医院神经外科 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要 目的 探讨颅脑损伤后 miR-9 表达的变化和对神经干细胞分化和增值的影响,为颅脑损伤后神经功能修复治疗提出新的思路。方法 通过 RT-PCR 技术检测 miR-9 在挫裂伤脑组织中的表达情况,培养胚胎来源神经干细胞,并通过免疫荧光鉴定神经干细胞及其分化。转染 miR-9 后,通过 MTT 测定神经干细胞的增殖情况,和流式细胞仪检测分化神经元所占比例。结果 miR-9 在挫裂伤脑组织中表达显著上升。对神经干细胞过表达 miR-9 可显著促进细胞增殖,并诱导分化成神经元。结论 脑挫裂伤时 miR-9 显著升高,并具有促进神经干细胞增值和诱导分化的作用,可为伤后神经功能修复提供新的治疗方法。

关键词 miR-9 脑挫裂伤 神经干细胞 增殖 分化

中图分类号 R739.41 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)20-3888-03

Up-regulation of miR-9 Regulates Adult Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation in Traumatic Brain Injury*

ZHANG Ru-you, ZHENG Yong-ri, GUO Wei, HU Shao-shan, LIN Hong-wei, SHEN Da-wei

(Department of Neurosurgery, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Heilongjiang, Harbin, 150086 China)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of miR-9 in traumatic brain injury and the impact of miR-9 for proliferation and differentiation of neural stem cells; to propose new ideas for neurological functions repair in traumatic brain injury. **Methods:** The expression of miR-9 was detected by RT-PCR in traumatic brain tissues; the embryonic neural stem cells were cultured and identified by immunofluorescence; After miR-9 transfection, the proliferation of neural stem cells were measured by MTT, and the proportion of differentiated neurons were measured by flow cytometry. **Results:** The expression of miR-9 was significantly up-regulated in traumatic brain injury. Overexpressing miR-9 can significantly promote neural stem cells proliferation and induced them to differentiate into neurons. **Conclusion:** Overexpressing of miR-9 could promote neural stem cell proliferation and induce differentiation, that provide new treatments for the restoration of neurological function after traumatic brain injury.

Key words: miR-9; Neural stem cells; Proliferation; Differentiation

Chinese Library Classification: R739.41 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)20-3888-03

颅脑损伤临床救治的难题之一是创伤性脑损伤后神经功能修复。由于中枢神经干细胞可以补充、替代颅脑损伤后脑组织中受损神经元,重建部分环路和功能,因此神经干细胞在修复受损神经组织中可以发挥重要作用。MicroRNA 是一种可以调控基因表达的非编码小 RNA 分子^[1]。近期的研究证明,颅脑损伤后,脑组织内 microRNA 的表达发生特性的改变,可以促进神经干细胞诱导分化为神经元和胶质细胞,从而起到神经功能修复作用^[2-3]。本研究探讨颅脑损伤后 miR-9 表达的变化和对神经干细胞分化和增值的影响,希望为颅脑外伤的神经功能修复治疗提出新的思路。

1 材料和方法

1.1 组织来源

胚胎来源于孕 12 周米非司酮药物流产的人胚(哈尔滨医科大学第二附属医院妇产科,已通过哈尔滨医科大学伦理道德

委员会备案,并以征得孕妇同意)。人脑挫伤组织来源于脑挫裂伤病人,正常人脑组织来源于颅脑手术入路废弃脑组织(哈尔滨医科大学第二附属医院神经外科,已通过哈尔滨医科大学伦理道德委员会备案,并以征得患者或其家属同意)。

1.2 原代神经干细胞分离、培养传代

无菌条件下分离出胎脑组织并剪碎,120 目铜网过滤后制成单细胞悬液,接种于培养瓶中,加入含碱性成纤维细胞生长因子(bFGF, Gibco) 30ng/ml、表皮生长因子(EGF, Gibco) 20ng/ml、B27(Gibco)的 DMEM/F12(1:1, Gibco)无血清培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待镜下见大量悬浮细胞球形成后进行传代,每 7~8d 传代一次。

1.3 细胞的诱导分化

将细胞球吹打成单个细胞,含 10%胎牛血清(Invitrogen, USA)的 DMEM 于 37℃、5% CO₂ 培养箱培养。

1.4 免疫荧光染色

* 基金项目 黑龙江省教育厅基金(11521135)

作者简介 张儒有(1973) 男,博士,主治医师。研究方向 神经外科急诊创伤。哈尔滨医科大学附属二院神经外科。

Email: ruyou_zhang@126.com。Tel: 15904605518

[△]通讯作者 郑永日(1962) 男,教授,主任医师, Email: zhengyongri1962@126.com。Tel: 0451-86605040

(收稿日期 2011-08-10 接受日期 2011-08-30)

将培养的细胞用 PBS 洗 2 遍后,用 4%多聚甲醛固定 30min。PBS 洗 3 次,每次 10min ;之后放入封闭液(0.1% triton + 10% 山羊血清 +PBS)中打孔封闭 1h ,后孵一抗 4℃过夜。少突胶质细胞 O4 抗体 ,抗胶质纤维酸性蛋白(GFAP)抗体和抗神经元 3 型微管蛋白 -β (Tuj1)抗体均购于 Sigma 公司。次日 ,用 PBS 洗 ,每次 10min ,洗 3 次后避光孵育荧光二抗(1 :200 ,用 PBS 配置) ,室温 1h ,之后再用 PBS 洗 ,每次 10 min ,3 次后孵育 DAPI(室温 5 min 避光 ,1 :10 ,用 PBS 配置) ,最后再用 PBS 洗 3 次 ,每次 10min ,然后用盖玻片封片 ,用于激光共聚焦仪器扫描。

1.5 四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法

将原代细胞种植于 96 孔板内 ,使用 Lipofectamine 2 000 试剂(Invitrogen, USA)转染 miRNA。连续 6d ,每间隔 24h 加入 20 μ l 的 MTT(0.5 mg/mL, Sigma, USA) ,在 37℃孵育 4h ,吸出培养液后加入 200μ l 二甲基亚砷 ,放置摇床晃动 15min。使用酶标仪在 570nm 波长测定吸光度值。

1.6 实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)

RT-PCR 使用 ABI 7500HT Fast Real-Time PCR System 测定。miR-9 水平使用 TaqMan microRNA assay kit (Applied Biosystems, USA)检测。U6 作为内参 ,正常脑组织作为对照。

1.7 统计学方法

统计分析采用 SPSS13.0 软件 ,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,组间差异比较采用 ANOVA 分析 ,*P<0.05 为有统计学差异。

2 结果

2.1 miR-9 在挫裂伤脑组织中显著升高

通过 RT-PCR 比较挫裂伤脑组织和正常脑组织中 miR-9 的表达 ,结果表明 miR-9 相对于正常脑组织在挫裂伤脑组织中显著升高。如图 1 所示 ,miR-9 在挫裂伤脑组织中较正常脑组织表达上升 6.32± 0.34 倍。

2.2 胚胎来源神经干细胞及分化情况

胚胎来源原代神经细胞通过无血清培养基培养到 7~8 天 ,呈神经球样生长 ,神经球由数十或数百个细胞组成 ,呈悬浮生长 ,未见明显细胞突起。将部分神经干细胞球加入血清分化培养 1 周后 ,神经干细胞开始分化为形态不一、分散成片的多突起星形胶质细胞或神经元。通过免疫荧光证实分别分化为

GFAP 染色阳性的星形胶质细胞 (图 2.a) ,Tuj1 染色阳性的神经元(图 2.b) 和 O4 阳性的少突胶质细胞(图 2.c)。

2.3 MiR-9 促进神经干细胞增殖和分化

为了明确 miR-9 在脑挫裂伤时对神经干细胞增殖和分化的影响 ,我们通过 Lipofectamine 2000 将锁核苷酸处理的 miR-9 (LNA-miR-9) 的模拟体转染进培养中的神经干细胞球中。通过 MTT 分析 ,我们发现神经干细胞的增殖率明显增加 (图 3)。

随后 ,我们还将转染后的神经干细胞球加入血清分化培养 7 天 ,通过免疫荧光检测我们发现转染组的 Tuj1 染色阳性的神经元细胞相对于对照组显著增加 ,由占细胞总数的 0.4%上升到 1.1%(图 4)。这表明 miR-9 可以促进神经干细胞向神经元进行分化。

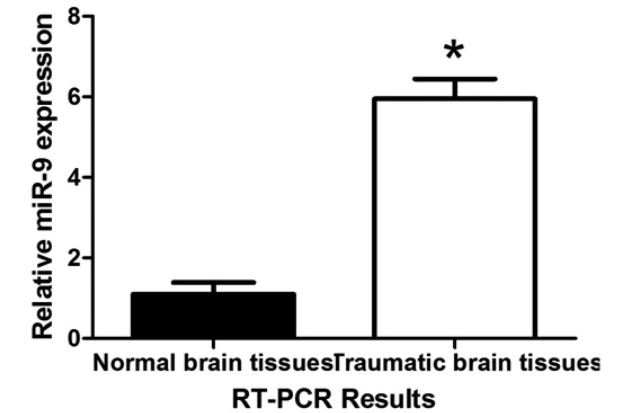


图 1 RT-PCR 显示 miR-9 在挫裂伤脑组织中较正常脑组织表达明显上升。*p<0.05

Fig.1 RT-PCR showed the expression of miR-9 in traumatic brain tissues was significantly higher than that in normal brain tissues

3 讨论

随着现代交通的发展和人类活动的增加 ,颅脑损伤的发生率也逐渐提高。而中枢神经系统组织结构与功能密切相关 ,所以颅脑损伤后不但应关注脑神经组织在创伤后发生的病理改变 ,也应注意这些改变与神经功能预后的整体关系。虽然 ,目前

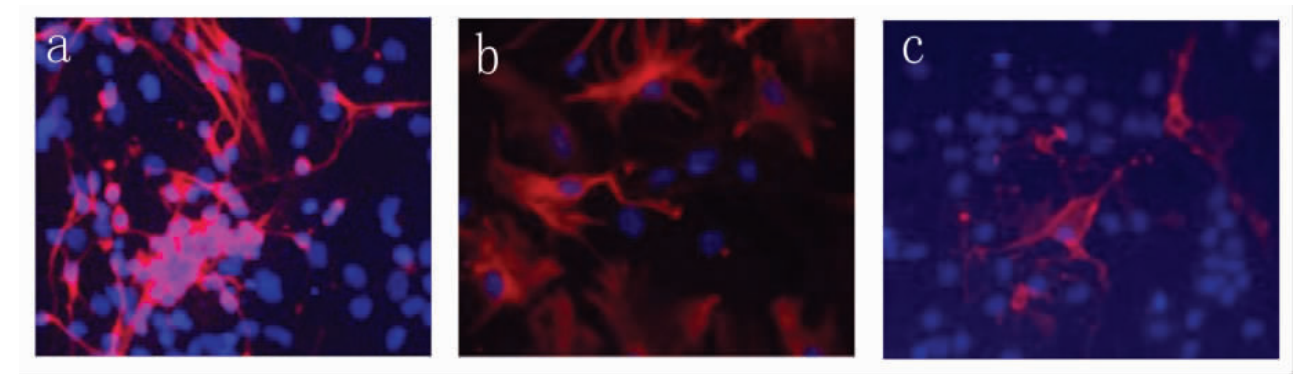


图 2 神经干细胞分化培养 1 周后 ,诱导分化免疫荧光染色图(x400 倍)。
a 诱导分化神经元样细胞 ,Tuj1 染色阳性。b 诱导分化星形胶质细胞样细胞 ,GFAP 染色阳性。c 诱导分化少突胶质细胞样细胞 ,O4 染色阳性。
Fig.2 The results of immunofluorescence showed neural stem cells were grown in differentiation conditions after one week(x400).
a, neurons, Tuj1 stain positive. b, astrocytes, GFAP stain positive. c, oligodendrocytes, O4 stain positive.

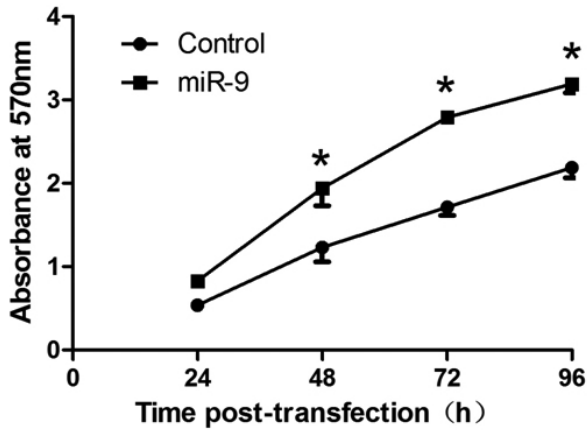


图3 MTT 结果显示过表达 miR-9 可导致神经干细胞增殖率明显上升。*P<0.05

Fig.3 MTT assay results revealed overexpression of miR-9 could significantly promote neural stem cells proliferation. *P<0.05

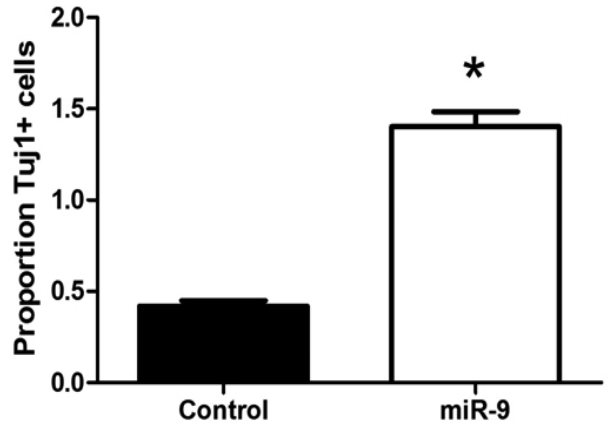


图4 流式细胞仪结果显示过表达 miR-9 可导致神经干细胞分化 Tuj1 染色阳性的神经元细胞显著增加。*P<0.05

Fig. 4 Flow cytometer results showed overexpression of miR-9 could significantly increase the proportion of Tuj1-positive cells

尚未发现正常生理状态下灵长类动物大脑皮质存在神经细胞再生^[4]。但 Nakagomi 等^[5]通过小鼠脑损伤模型发现, nestin 阳性神经干细胞细胞会出现在损伤皮质内,并能向包括神经细胞在内的多个方向分化。Itoh 等^[6]在将大鼠创伤的大脑皮质组织分离并进行培养时,也发现该组织中存在能够向神经细胞和胶质细胞分化的神经前体细胞。因此,研究提示脑损伤可能通过一定通路激活了大脑皮质内静息状态的神经前体细胞,从而诱发了皮质神经细胞再生,这为脑损伤后神经功能的回复开辟了一扇希望的大门。

microRNA 作为生物体内的重要基因调控分子,在生物发育和疾病转归等方面有着重要作用。通过翻译抑制或 mRNA 降解的方式, microRNA 影响着体内基因转录后的调控过程,也是疾病病理状况下生物反应的上游物质^[7-8]。目前已经证明 MicroRNAs 在人类发育和肿瘤过程中发挥着重要的作用,并且相关研究也显示出 microRNA 在 TBI 所以引发的病理过程发挥了重要的调控作用,像凋亡和神经修复^[9-11]。

miR-9 保守地存在于飞蝇到人类的广泛物种,虽然其不同物种上有着不同的表达模式,但是其在进化过程中所发挥恒定的重要作用却是毋庸置疑^[12]。最近的研究表明, miR-9 可通过作用于神经或非神经细胞系起到调控神经发生的作用。在脊椎动物中, miR-9 依靠调控不同的靶向 mRNA,对神经前体细胞的增值、迁移和分化等发挥着多种作用^[13-16]。同时,也发现 miR-9 在多种癌症中出现表达失调,并影响肿瘤细胞的增值和迁移。此外,在神经系统退行性病变中, miR-9 在有丝分裂后神经元中下调。因此, miR-9 是神经系统发育和疾病过程中一个重要的调控因素^[17-19]。

在本研究中,首先通过 RT-PCR 技术明确脑外伤后 miR-9 表达的变化,发现脑挫裂伤患者脑组织中的 miR-9 显著升高。为了分析 miR-9 在脑挫裂伤中的作用,我们分离培养了胚胎来源神经干细胞。在过表达 miR-9 后,我们发现神经干细胞的增值速度显著上升,并向神经元分化的比例显著升高。这表明在脑挫裂伤时升高的 miR-9 具有促进神经干细胞增值和诱导分化的作用,为伤后神经功能的修复奠定基础。

对 microRNAs 在神经系统疾病和损伤中的作用已经成为神经科学研究的新的热点。虽然 microRNAs 对颅脑损伤的作

用研究才刚刚开始,但不断出现的新的证据表明 microRNAs 对颅脑损伤后的多种神经生物学进程发挥着重要的调节作用^[14]。更为重要的,鉴定其发生作用的靶向基因和信号通路已成为进一步研究的重中之重。而这些对 microRNAs 在颅脑损伤中的作用机制的研究将会为损伤后脑神经组织的修复提供新的治疗^[20-21]。

参考文献(References)

- [1] Kuss, A.W. & Chen, W. MicroRNAs in brain function and disease[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2008, 8:190-197
- [2] Zhang, Y., et al. Altered expression levels of miRNAs in serum as sensitive biomarkers for early diagnosis of traumatic injury[J]. *Journal of cellular biochemistry*, (2011)
- [3] Liu, N.K. & Xu, X.M. MicroRNA in central nervous system trauma and degenerative disorders [J]. *Physiological genomics*, 2011,43: 571-580
- [4] Redell, J.B., Zhao, J. & Dash, P.K. Altered expression of miRNA-21 and its targets in the hippocampus after traumatic brain injury [J]. *Journal of neuroscience research*, 2011, 89: 212-221
- [5] Nakagomi, T., et al. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells from post-stroke cerebral cortex in mice [J]. *The European journal of neuroscience*, 2009, 29: 1842-1852
- [6] Itoh, T., Satou, T., Hashimoto, S. & Ito, H. Isolation of neural stem cells from damaged rat cerebral cortex after traumatic brain injury[J]. *Neuroreport*, 2005, 16: 1687-1691
- [7] Pecot, C.V., Calin, G.A., Coleman, R.L., Lopez-Berestein, G. & Sood, A.K. RNA interference in the clinic: challenges and future directions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11: 59-67
- [8] Sun, W., Julie Li, Y.S., Huang, H.D., Shyy, J.Y. & Chien, S. microRNA: a master regulator of cellular processes for bioengineering systems[J]. *Annu Rev Biomed Eng*, 2010, 12: 1-27
- [9] Jeyaseelan, K., Lim, K.Y. & Armugam, A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2008,39: 959-966
- [10] Redell, J.B., Liu, Y. & Dash, P.K. Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes [J]. *Journal of neuroscience research*, 2009, 87: 1435-1448

(下转第 3953 页)

的含噪 sEMG 信号,分别利用数字带通滤波器、频谱插值法和
小波分析法对肌电信号带外噪声、工频干扰和肌电信号带内噪
声进行处理,获得了满意的降噪效果。实验结果表明,所采用方
法能够有效提高信号质量,sEMG 信号中的动作活动段信息得
到了明显增强。通过该降噪处理,能够方便地对 sEMG 信号进
行进一步的分析研究。

参考文献(References)

- [1] 李强. 表面肌电信号的运动单位动作电位检测[D]. 合肥:中国科学技术大学,2008
Li Qiang. Study on the detection of motor unit action potentials in surface electromyography[D]. Hefei: University of Science and Technology of China, 2008(In Chinese)
- [2] Clancy EA, Morin EL, Merletti R. Sampling, noise-reduction and amplitude estimation issues in surface electromyography [J]. Journal of Electromyography and Kinesiology, 2002, 12(1): 1-16
- [3] Mello RGT, Oliveira LF, Nadal J. Digital Butterworth filter for subtracting noise from low magnitude surface electromyogram [J]. Computer Methods and Programs in Biomedicine, 2007, 87(1): 28-35
- [4] Ortolan RL, Mori RN, Pereira RR, etc. Evaluation of adaptive/nonadaptive filtering and wavelet transform techniques for noise reduction in EMG mobile acquisition equipment [J]. IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation, 2003, 11(1): 60-69
- [5] Jiang CF, Kuo SL. A comparative study of wavelet denoising of surface electromyographic signals [C]. Proceedings of the 29th annual international conference of the IEEE EMBS, 2007: 1868-1871
- [6] Ascherio G, Gizdulich P. Denoising of surface EMG with a modified Wiener filtering approach [J]. Journal of Electromyography and Kinesiology, 2010, 20(2): 366-373
- [7] 李强, 李博, 杨基海. 基于谱插值与经验模态分解的表面肌电信号

降噪处理[J]. 计算机应用研究, 2010, 27(9): 3326-3328

- Li Qiang, Li Bo, Yang Ji-hai. Noise reduction of surface electromyography signal using spectrum interpolation and empirical mode decomposition [J]. Application Research of Computers, 2010, 27(9): 3326-3328(In Chinese)
- [8] Mewett DT, Reynolds KJ, Nazeran H. Reducing power line interference in digitised electromyogram recordings by spectrum interpolation[J]. Medical and Biological Engineering and Computing, 2004, 42(4): 524-531
- [9] 席旭刚, 加玉涛, 罗志增. 基于独立成分分析的表面肌电信号工频去噪[J]. 传感技术学报, 2009, 22(5): 675-679
Xi Xu-gang, JIA Yu-tao, LUO Zhi-zeng. Power frequency noise-reduction of SEMG based on independent component analysis [J]. Chinese Journal of Sensors and Actuators, 2009, 22 (5): 675-679(In Chinese)
- [10] 罗志增, 任晓亮. 肌电信号的拾取和预处理 [J]. 传感技术学报, 2004, 17(2): 220-223
LUO Zhi-zeng, REN Xiao-liang. Detection and pretreatment of electromyography[J]. Chinese Journal of Sensors and Actuators, 2004, 17(2): 220-223(In Chinese)
- [11] Hardalac F, Canal R. EMG Circuit Design and AR Analysis of EMG Signs[J]. Journal of Medical Systems, 2004, 28(6): 633-642
- [12] 杜浩藩, 丛爽. 基于 MATLAB 小波去噪方法的研究 [J]. 计算机仿真, 2003, 20(7): 119-122
DU Hao-fan, CONG Shuang. The study on wavelet de-noising under the environment of MATLAB[J]. Computer Simulation, 2003, 20(7): 119-122(In Chinese)
- [13] Flanders M. Choosing a wavelet for single-trial EMG [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2002, 116(2): 165-177

(上接第 3890 页)

- [11] Liu, N.K., Wang, X.F., Lu, Q.B. & Xu, X.M. Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury[J]. Experimental neurology, 2009, 219: 424-429
- [12] Yuva-Aydemir, Y., Simkin, A., Gascon, E. & Gao, F.B. MicroRNA-9: Functional evolution of a conserved small regulatory RNA [J]. RNA biology, 2011, 8: 45-51
- [13] Delaloy, C., et al. MicroRNA-9 coordinates proliferation and migration of human embryonic stem cell-derived neural progenitors[J]. Cell Stem Cell, 2010, 6: 323-335
- [14] Ziu, M., Fletcher, L., Rana, S., Jimenez, D.F. & Digicaylioglu, M. Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury, PloS one, 2011, 6: 47-54
- [15] Zhao C, Sun G, Li S, MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 7(5): 1876-1881
- [16] Zhou H, Guo JM, Lou YR, et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA

as a marker [J]. J Mol Med, 2010, 88(7): 709-717

- [17] T Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers [J]. Br J Cancer, 2010, 102 (7): 1174-1179
- [18] Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(7): 1766-1774
- [19] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma [J]. JAMA, 2008, 299(4): 425-436
- [20] Wang B, Hsu SH, Majumder S, et al. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3 [J]. Oncogene, 2010, 29(12): 1787-1797
- [21] Nakajima G, Hayashi K, Xi Y, et al. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2006, 3(5): 317-324