

# MicroRNAs参与调控中枢神经系统的发育及脊髓损伤修复

邹红军<sup>1</sup> 高鑫<sup>1</sup> 张健<sup>1</sup> 丁亚<sup>1</sup> 龚爱华<sup>2</sup> 刘锦波<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>苏州大学附属第三人民医院骨科, 常州 213003; <sup>2</sup>江苏大学基础医学与医学技术学院, 镇江 212013)

**摘要** microRNAs(miRNAs)不仅参与神经系统的生长发育、功能完善, 还参与脊髓损伤病理及损伤后修复过程。miRNAs能使中枢神经系统按正确的时序性和空间性顺序进行发育和分化, 在维持生物体记忆及生物钟方面起着重要作用。miRNAs异常表达同脊髓损伤病理过程相关。目前, 体内及体外实验均已证实, miRNAs不仅能够维持神经干细胞增殖, 而且可以促进神经元轴突伸长, 从而为脊髓损伤的治疗带来新的治疗策略。

**关键词** microRNAs; 中枢神经发育; 干细胞增殖; 轴突伸长; 脊髓损伤

## The Roles of MicroRNAs in CNS Development and Regeneration of Spinal Cord Injury

Zou Hongjun<sup>1</sup>, Gao Xin<sup>1</sup>, Zhang Jian<sup>1</sup>, Ding Ya<sup>1</sup>, Gong Aihua<sup>2</sup>, Liu Jingbo<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Orthopedics, the Third Affiliated Hospital of Suzhou University, Changzhou 213003, China;

<sup>2</sup>School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract** MicroRNAs (miRNAs) are RNA molecules composed of 20~24 nucleotides which have key roles in normal CNS development and functions, as well as in diseases. miRNAs express in temporal and spatial patterns during the development and differentiation of CNS, and play key roles in maintaining biological memory and clock. Moreover, the abnormal expression of miRNAs may be related to pathological process of spinal cord injury. Emerging evidences suggest that miRNAs can not only maintain neural stem cell proliferation, but also promote neuron axon elongation. So, miRNAs can provide new treatment strategies for the spinal cord injury.

**Key words** microRNAs; CNS development; stem cell proliferation; neuron regeneration; spinal cord injury

miRNAs是近年来发现的一类长度为22~24 nt的内源、单链、非编码小RNA。初次转录时, Drosha酶(一种RNAIII酶)将数百碱基的基因转录序列切割成pre-miRNA, 随后被Dicer酶加工, 切除茎环结构, 剩下长约22个核苷酸的双链miRNAs<sup>[1-2]</sup>, 解开为单链, 与RNA诱导沉默复合物(RNA-induced silencing com-

plex, RISC)结合, 通过与靶mRNA(s)的特定序列结合, 诱导靶mRNA(s)剪切或者阻遏其翻译<sup>[3]</sup>。miRNAs可以调控基因的表达, 日渐成为研究重点和热点, 本文就microRNAs在中枢神经系统发育及脊髓损伤(spinal cord injury, 以下简称SCI)中的作用作简要综述。

## 1 miRNAs调控中枢神经系统生长发育及功能完善

### 1.1 miRNAs调控中枢神经系统发育

miRNAs参与调控中枢神经系统的发育, 使中枢神经系统按正确的时序性和空间性顺序进行发育和分化, 其不仅在细胞分化开始时调控祖细胞向

收稿日期: 2013-11-22 接受日期: 2014-02-18

常州市自然科学基金(批准号: CJ20122027)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0519-68871318, E-mail: czliblib@126.com

Received: November 22, 2013 Accepted: February 18, 2014

This work was supported by the Changzhou Science & Technology Bureau (Grant No. CJ20122027)

\*Corresponding author. Tel: +86-519-68871318, E-mail: czliblib@126.com

网络出版时间: 2014-05-29 17:43

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.06.0385.html>

某种神经细胞分化,而且也能维持已分化的某种神经细胞的固有特征,同时还参与维持各种不同神经细胞的正常形态结构。目前发现的miRNAs中大部分可在脑组织中表达,其中约20%~40%的miRNAs参与脑组织的发育<sup>[4-5]</sup>。Yoo等<sup>[6]</sup>在人和小鼠中发现,一些miRNAs在大脑组织有特异性表达,如:miR-9、miR-124a、miR-124b、miR-135、miR-153、miR-183及miR-219;而另一些则在大脑中富集性表达,如:miR-9、miR-125a、miR-125b、miR-128、miR-132、miR-137及miR-139。这些miRNAs参与调控大脑皮层的发育及神经细胞的分化。一方面,在脑皮层发育时,一些miRNAs的表达会随着皮层形成过程中的细胞增殖、区域性分化和传导通路的建立而变化<sup>[7-8]</sup>。Krichevsky等<sup>[9]</sup>在研究大鼠脑发育过程中发现,miRNAs在脑发育的不同阶段中具有不同的表达形式:(1)出生后表达,如miR-128;(2)出生前表达,如miR-19b;(3)在胚胎期第21天表达至高峰,如miR-9、miR-125b、miR-131、miR-178;(4)在胚胎期表达逐渐增加而在出生后处于平稳状态表达,如miR-124a和miR-266;(5)表达逐渐增加,如miR-103和miR-128。另一方面,在脑组织中不同类型的细胞有着不同的miRNAs表达谱:miR-124、miR-128在神经元细胞中高表达,miR-23、miR-26、miR-29在星形胶质细胞中高表达,miR-9、miR-125在这两种细胞中均有表达<sup>[10-11]</sup>。

此外,miRNAs在神经系统中不仅可调控神经元树突形成、轴突伸长,而且在维持脊髓正常形态中也具有重要作用。目前的研究已经证实,miRNAs在交感神经元、皮层神经元、海马神经元中均能调控轴突伸长。条件性地敲除中枢神经系统中的*Dicer*基因后,miRNAs表达异常,小鼠树突精细化调控减少,脊髓长度增加,轴突伸长轨迹异常<sup>[12]</sup>。Schratt等<sup>[13]</sup>报道,miR-134可以调控LIM区域激酶1(LIM-domain kinase 1, *Limk1*),进而在海马神经元中调控树突棘形成。研究表明,miR-134在轴突生长锥中也表达,并在生长锥的导向蛋白合成中也具有重要作用<sup>[14]</sup>。

## 1.2 miRNAs参与完善中枢神经系统的功能

神经元之间通过突触传导信号,进而发挥相应功能。突触结构的稳定尤为重要,突触的可塑性在维持其稳定中起着关键作用,而树突棘的形成和降解的动态变化是突触可塑性的标志。Schratt等<sup>[13]</sup>研

究发现,miR-134可在海马区表达,而在成熟的脑组织中表达增多,miR-134通过调控*Limk1*的mRNA,从而抑制肌动蛋白解聚因子来调控肌动蛋白丝的动态平衡,引起树突棘变小。目前已经证实,miRNAs同记忆痕迹的结构基础<sup>[15]</sup>及生物钟<sup>[16]</sup>有关。

miRNAs不仅参与生理条件下神经系统的发育及功能完善,而且还参与病理条件下SCI过程。目前研究证实,miRNAs可能在治疗SCI中也起着重要作用。

## 2 miRNAs参与了SCI的病理及损伤修复过程

与周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)不同,以脊髓为代表的中枢神经系统(central nervous system, CNS)在损伤后轴突不能再生。过去几十年的研究认为,CNS损伤后,抑制因子、受损区域胶质瘢痕等外源性抑制因素是抑制神经元再生的主要原因<sup>[17]</sup>。然而,通过药理学以及遗传学等手段消除外源性抑制因素的影响后,观察到仅有少量的轴突再生,大量的轴突并没有获得再生能力<sup>[18]</sup>。因此,相比较外界环境中的抑制因素而言,研究损伤后神经元内在调控机制显得尤为重要。miRNAs作为内源性调控因子,能调控超过1/3的人类基因的调控性非编码小分子RNA<sup>[19]</sup>,有证据表明其参与SCI的病理发展过程,因此,靶向miRNAs调控可以有效地促进SCI的修复。

### 2.1 miRNA异常表达同SCI病理过程相关

研究表明,创伤性脊髓损害是由两种机制引起的,即原发损伤和继发损伤。原发损伤是指创伤本身对神经细胞的损伤,主要包括神经细胞坏死、轴索断裂等。继发损伤是在原发损伤后逐渐形成的,并伴随着一系列的细胞内代谢和基因的改变,包括水肿、炎症反应、局部缺血、兴奋性氨基酸的释放、脂质过氧化和钙离子超载等,最终导致神经细胞的凋亡<sup>[20]</sup>。而损伤后miRNAs的异常表达促进了脊髓的继发损伤<sup>[21]</sup>。以大鼠脊髓冲击伤为研究模型,Liu等<sup>[22]</sup>研究了Sanger miRBase 11.0中350种miRNAs,有269种miRNAs在大鼠脊髓中被发现,经统计学分析,97种miRNAs在SCI后表达发生改变,分别有30种miRNAs表达升高(如miR-21、miR-1和miR-221)、16种miRNAs表达下降(如miR-137、miR-181a、miR-219-2-3p和miR-7a)、14种miRNAs表达在损伤后4 h升高却在损伤后1~7 d中下降(如miR-100、miR-127和miR-128),剩余的37种miRNAs表达水平很低。依据生物信息学软件miRanda预测miRNAs下游调控的基因,发现表达增

高的miRNAs(如miR-1和miR-221)和可以结合抗炎及抗氧化的mRNAs(如annexin A1和annexin A2等),使其翻译减少;相反,表达下降的miRNAs,如miR-181a、miR-127,可以结合一些促炎性mRNAs(如TNF、IL-1 $\beta$ 、ICAM1、sPLA2和cPLA2等),使其翻译增加,进而参与脊髓继发损伤的病理过程<sup>[23]</sup>。另一项关于小鼠SCI的模型的研究显示,SCI后有5种miRNAs升高(miR-1、miR-133a、miR-133b、miR-223和miR-451)及5种miRNAs降低(miR-124a、miR-129-3p、miR-342、miR-495和miR-541)。随机选择miRNA-223、miR-124a为研究对象进行研究,结果表明,miRNA-223表达在损伤后12 h及3 d达到高峰,这同损伤后炎症反应时间相一致,miR-124a的表达在损伤后1~7 d持续降低,而神经元继发损伤通常在损伤后12 h已完全发生<sup>[24]</sup>。

## 2.2 miRNAs可能参与SCI修复过程

SCI具有高致残率、低死亡率的特点,目前尚无有效的治疗方法<sup>[25]</sup>。SCI治疗策略包括神经干细胞增殖、分化以及神经元轴突伸长,而miRNAs不仅能够维持神经干细胞增殖,还可以促进神经元轴突伸长。

在干细胞增殖方面,miRNAs在维持干细胞自我更新、分化中起着重要的作用<sup>[26]</sup>。目前已经证实,miR-302-367簇、miR-290-295簇和miR-17-92簇可以促进神经干细胞增殖。以miR-302-367簇为例,Suh等<sup>[27]</sup>认为,Oct4、Sox2和Nanog可以调控miR-302-367簇表达。miR-302-367能够促进G<sub>1</sub>期向S期转化从而调控细胞增殖过程,将miR-302a抑制后人多能干细胞停留在G<sub>1</sub>期,细胞减缓增殖<sup>[28]</sup>。此外,Oct4、Sox2和Nanog的表达还需miR-302-367簇的参与,而Oct4、Sox2和Nanog等转录因子在维持干细胞自我增殖中发挥着巨大作用<sup>[29]</sup>。miRNAs还能够促使干细胞分化为神经元样细胞,如miR-126在胆碱乙酰转移酶阳性的神经元中高表达。进一步研究显示,miR-126可以调控Hox基因家族表达<sup>[30]</sup>,而Hox蛋白在脊髓运动神经元的成熟中具有决定性作用<sup>[31]</sup>。Xu等<sup>[32]</sup>的研究同样证实,miR-145能够促使多能干细胞分化成为神经上皮细胞。

关于miRNAs同神经元轴突间的研究已经很多,体内及体外实验均证实,miRNAs在轴突伸长方面具有重要的作用。SCI后胶质瘢痕增生阻止了损伤范围进一步扩大,但另一方面,胶质瘢痕的增生却阻碍了轴突伸长。Sofroniew等<sup>[33]</sup>在撞击引起的小鼠SCI模型中发现,星形胶质细胞肥大形成胶质瘢痕,中

间丝蛋白表达增加,修复受损血脑屏障(blood-brain barrier, BBB),却阻滞了轴突伸长。研究人员通过转基因技术使小鼠中miR-21沉默,星形胶质细胞修复BBB功能增强,其功能持续到星形胶质细胞形态恢复正常之后,而且神经元轴突数量在损伤后形成的胶质瘢痕中增加。无独有偶,Zhang等<sup>[34]</sup>在大鼠SCI模型中发现,轴突内源性的miR-19a通过调控轴突内部PTEN的表达来影响轴突的伸长。PTEN已被证实是miR-19a的下游调控基因<sup>[35]</sup>,将miR-19a抑制剂选择性地导入轴突内,PTEN蛋白表达增加,PI3K/Akt通路中pmTOR和pGSK-3蛋白表达减少,轴突伸长受限。而过表达miR-19a后,PTEN蛋白表达下降,mTOR通路激活,最终引起轴突伸长。Obernosterer等<sup>[36]</sup>也报道,miR-138在神经系统中高表达,并在神经生长和神经再生过程中起着重要作用。

在SCI动物模型中,miRNAs更是通过多途径调控来实现其功能。Jee等<sup>[37]</sup>将miR-20a注射到正常小鼠的脊髓之后,小鼠脊髓发生炎症反应,进而神经元死亡,其病程同人在外伤引起的SCI相似;随后,将miR-20a抑制剂注射到SCI部位,小鼠后肢活动恢复,神经元死亡减少。miR-20a主要与神经元分化相关的转录因子(protein neurogenin-1, NGN-1)的3' UTRs结合发挥作用<sup>[38]</sup>。Bertrand等<sup>[35]</sup>在脊髓横切的小鼠损伤模型中,注入NGN-1后miR-20a下降,髓磷脂和神经元标记物增加。miR-20a下游调控基因还有STAT3,调控该基因目前已经被证实可以缓解SCI<sup>[39]</sup>。

综上,miRNAs不仅参与SCI后病理过程,而且在干细胞增殖、神经元轴突伸长方面也具有重要作用,在体内及体外实验中也已经证实miRNAs能够修复SCI。

## 3 展望

随着基因调控研究的深入,miRNAs作为mRNAs的调控分子在SCI中发挥着重要的作用。目前已证实,特异性地改变某些miRNAs的表达可以维持干细胞增殖、分化以及促进神经元轴突伸长。我们认为,SCI的治疗策略应该包括神经干细胞增殖分化来补充损伤减少的神经元、神经元轴突的伸长及相关结构的形成来维持神经元的功能。我们相信,miRNAs有可能给SCI这一世界性难题带来新的曙光。

## 参考文献 (References)

- 1 Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ,



- Carthew RW. Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 2004; 117(1): 69-81.
- 2 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 2010; 11(9): 597-610.
- 3 Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- 4 Kosik KS. The neuronal microRNA system. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(12): 911-20.
- 5 Petri R, Malmekiv J, Fasching L, Akerblom M, Jakobsson J. miRNAs in brain development. *Exp Cell Res* 2014; 321(1): 84-9.
- 6 Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR. MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development. *Nature* 2009; 460(7255): 642-6.
- 7 Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Townsend M, Yoshii A, Sestan N, Rakic P, *et al.* Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol* 2004; 5(9): R68.
- 8 Mao S, Li H, Sun Q, Zen K, Zhang CY, Li L. miR-17 regulates the proliferation and differentiation of the neural precursor cells during mouse corticogenesis. *FEBS J* 2013; doi: 10.1111/febs.12680.
- 9 Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 2003; 9(10): 1274-81.
- 10 Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci* 2005; 21(6): 1469-77.
- 11 Ouyang YB, Xu L, Lu Y, Sun X, Yue S, Xiong XX, *et al.* Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia* 2013; 61(11): 1784-94.
- 12 Davis TH, Cuellar TL, Koch SM, Barker AJ, Harfe BD, McManus MT, *et al.* Conditional loss of Dicer disrupts cellular and tissue morphogenesis in the cortex and hippocampus. *J Neurosci* 2008; 28(17): 4322-30.
- 13 Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, *et al.* A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006; 439(7074): 283-9.
- 14 Han L, Wen Z, Lynn RC, Baudet ML, Holt CE, Sasaki Y, *et al.* Regulation of chemotropic guidance of nerve growth cones by microRNA. *Mol Brain* 2011; 4: 40.
- 15 Benfenati F. Synaptic plasticity and the neurobiology of learning and memory. *Acta Biomed* 2007; 78 Suppl 1: 58-66.
- 16 Shende VR, Goldrick MM, Ramani S, Earnest DJ. Expression and rhythmic modulation of circulating microRNAs targeting the clock gene *Bmal1* in mice. *PLoS One* 2011; 6(7): e22586.
- 17 Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5(2): 146-56.
- 18 Aguayo AJ, Bray GM, Carter DA, Villegas-Perez MP, Vidal-Sanz M, Rasminsky M. Regrowth and connectivity of injured central nervous system axons in adult rodents. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 1990; 50(4/5): 381-9.
- 19 Bhalala OG, Srikanth M, Kessler JA. The emerging roles of microRNAs in CNS injuries. *Nat Rev Neurol* 2013; 9(6): 328-39.
- 20 Diaz-Ruiz A, Alcaraz-Zubeldia M, Maldonado V, Salgado-Ceballos H, Mendez-Armenta M, Rios C. Differential time-course of the increase of antioxidant thiol-defenses in the acute phase after spinal cord injury in rats. *Neurosci Lett* 2009; 452(1): 56-9.
- 21 Chan CS, Elemento O, Tavazoie S. Revealing posttranscriptional regulatory elements through network-level conservation. *PLoS Comput Biol* 2005; 1(7): e69.
- 22 Liu NK, Wang XF, Lu QB, Xu XM. Altered microRNA expression following traumatic spinal cord injury. *Exp Neurol* 2009; 219(2): 424-9.
- 23 Liu NK, Zhang YP, Tittsworth WL, Jiang X, Han S, Lu PH, *et al.* A novel role of phospholipase A2 in mediating spinal cord secondary injury. *Ann Neurol* 2006; 59(4): 606-19.
- 24 Dusart I, Schwab ME. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 1994; 6(5): 712-24.
- 25 DeVivo MJ, Go BK, Jackson AB. Overview of the national spinal cord injury statistical center database. *J Spinal Cord Med* 2002; 25(4): 335-8.
- 26 Choi E, Choi E, Hwang KC. MicroRNAs as novel regulators of stem cell fate. *World J Stem Cells* 2013; 5(4): 172-87.
- 27 Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, *et al.* Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 2004; 270(2): 488-98.
- 28 Card DA, Hebbard PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, *et al.* Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 2008; 28(20): 6426-38.
- 29 Catena R, Tiveron C, Ronchi A, Porta S, Ferri A, Tatangelo L, *et al.* Conserved POU binding DNA sites in the Sox2 upstream enhancer regulate gene expression in embryonic and neural stem cells. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 41846-57.
- 30 Shen WF, Hu YL, Uttarwar L, Passegue E, Largman C. MicroRNA-126 regulates HOXA9 by binding to the homeobox. *Mol Cell Biol* 2008; 28(14): 4609-19.
- 31 Wei H, Wang C, Zhang C, Li P, Wang F, Zhang Z. Comparative profiling of microRNA expression between neural stem cells and motor neurons in embryonic spinal cord in rat. *Int J Dev Neurosci* 2010; 28(6): 545-51.
- 32 Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell* 2009; 137(4): 647-58.
- 33 Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist* 2005; 11(5): 400-7.
- 34 Zhang Y, Ueno Y, Liu XS, Buller B, Wang X, Chopp M, *et al.* The MicroRNA-17-92 cluster enhances axonal outgrowth in embryonic cortical neurons. *J Neurosci* 2013; 33(16): 6885-94.
- 35 Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, *et al.* miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev* 2009; 23(24): 2839-49.
- 36 Obernosterer G, Leuschner PJ, Alenius M, Martinez J. Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *RNA* 2006; 12(7): 1161-7.
- 37 Jee MK, Jung JS, Im YB, Jung SJ, Kang SK. Silencing of miR20a is crucial for Ngn1-mediated neuroprotection in injured spinal cord. *Hum Gene Ther* 2012; 23(5): 508-20.
- 38 Bertrand N, Castro DS, Guillemot F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* 2002; 3(7): 517-30.
- 39 Yan H, Wu J, Liu W, Zuo Y, Chen S, Zhang S, *et al.* MicroRNA-20a overexpression inhibited proliferation and metastasis of pancreatic carcinoma cells. *Hum Gene Ther* 2010; 21(12): 1723-34.