

# miR-124-1 促进大鼠骨髓间充质干细胞神经分化的实验研究

周燕<sup>1,2</sup> 陈奎生<sup>2</sup> 高剑波<sup>1</sup> 韩瑞<sup>3</sup> 鲁晶晶<sup>3</sup> 彭涛<sup>3</sup> 贾延劼<sup>3</sup>

(1. 郑州大学第一附属医院放射科, 河南 郑州 450052;  
2. 郑州大学基础医学院, 河南 郑州 450052;  
3. 郑州大学第一附属医院神经内科, 河南 郑州 450052)

**[摘要]** **目的** 探讨 miR-124-1 在大鼠骨髓间充质干细胞(MSCs)神经分化中的作用。**方法** 构建大鼠 miR-124-1 慢病毒载体及 Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor 载体, 体外感染大鼠 MSCs, 筛选最适感染复数(MOI)。实验分为对照组(未行感/转染组)、miR-124-1<sup>+</sup>组(感染 miR-124-1 慢病毒)及 miR-124-1<sup>-</sup>组(转染 Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor)。采用 β-巯基乙醇诱导 MSCs 分化为神经细胞。倒置荧光显微镜下观察感染后荧光表达情况, MTT 法检测感/转染后各组细胞存活率; 免疫细胞化学法、RT-PCR 法、Western blot 法检测各组诱导 6 d 后神经细胞标记物 β3 微管蛋白(β3 tubulin)、神经微管结合蛋白(MAP-2)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)的表达变化。**结果** 倒置荧光显微镜下观察大鼠 miR-124-1 慢病毒感染成功, MOI 值为 30。miR-124-1<sup>+</sup>组慢病毒载体感染 MSCs 2 d 后, 实时定量 PCR 显示 miR-124-1 的表达显著上调( $P < 0.01$ ); Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor 载体转染 24 h 后, 细胞存活率下降, 实时荧光定量 PCR 显示转染后 miR-124-1 的表达显著下降( $P < 0.01$ )。β-巯基乙醇可诱导 MSCs 分化为神经细胞, miR-124-1<sup>+</sup>组诱导 6 d 后细胞的 β3 tubulin、MAP-2 表达率显著高于其他两组( $P < 0.01$ ), miR-124-1<sup>-</sup>组 β3 tubulin、MAP-2 的表达率显著低于对照组( $P < 0.01$ ); 各组 GFAP 表达率均较低( $< 1\%$ )。**结论** miR-124 可能促进大鼠 MSCs 的神经分化。  
[中国当代儿科杂志, 2012, 14(3): 215-220]

**[关键词]** miR-124; 神经分化; 神经细胞; 骨髓间充质干细胞  
**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2012)03-0215-06

## miR-124-1 promotes neural differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells

ZHOU Yan, CHEN Kui-Sheng, GAO Jian-Bo, HAN Rui, LU Jing-Jing, PENG Tao, JIA Yan-Jie. Department of Radiology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Jia Y-J, Email: jiayanjie1971@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the effects of miR-124-1 on neuronal differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). **Methods** MSCs cells were assigned into three groups: control (uninfected and untransfected), miR-124-1<sup>+</sup> (infected with miR-124-1), and miR-124-1<sup>-</sup> (transfected with Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor). MSCs were induced by β-mercaptoethanol (β-ME) to differentiate into neurons. The fluorescence expressed by infected MSCs was observed under an inverted fluorescence microscope. MTT method was used to measure cell survival rate after transfection or infection. Immunocytochemistry, RT-PCR and Western blot methods were used to detect the expression of β3 tubulin, MAP-2 and GFAP 6 days after β-ME induction. **Results** The expression of miR-124-1 in the miR-124-1<sup>+</sup> group was significantly higher 2 days after infection of lentivirus vector compared with the control group ( $P < 0.01$ ). In the miR-124-1<sup>-</sup> group, the cell survival rate and the miR-124-1 expression level decreased significantly 24 hrs after transfection of anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> inhibitor ( $P < 0.01$ ). After 6 days of β-ME induction, the protein and mRNA expression levels of β3 tubulin and MAP-2 in the miR-124-1<sup>+</sup> group were much higher than the other two groups ( $P < 0.01$ ); while the expression levels of β3 tubulin and MAP-2 in the miR-124-1<sup>-</sup> group were lower than the control group ( $P < 0.01$ ). The expression of GFAP in the three groups was weak ( $< 1\%$ ). **Conclusions** miR-124 might promote neuronal differentiation of rat MSCs.  
[Chin J Contemp Pediatr, 2012, 14(3): 215-220]

**Key words:** miR-124; Neural differentiation; Neuron; Marrow mesenchymal stem cell

[收稿日期] 2011-11-18; [修回日期] 2011-12-18  
[基金项目] 国家自然科学基金(批准号: 30770758, 81071114)。  
[作者简介] 周燕, 女, 硕士研究生, 主管技师。  
[通信作者] 贾延劼, 教授。

骨髓间充质干细胞 (marrow mesenchymal stem cells, MSCs) 是一类具有多项分化潜能的干细胞, 在组织工程、细胞移植、基因治疗等领域有十分广阔的应用前景, 尤其是 MSCs 神经分化为临床治疗新生儿缺血缺血性脑损伤、神经系统遗传代谢性疾病提供了新的思路, 成为了干细胞的研究热点之一。

近年发现, miRNAs 作为一类具有调控功能的非编码 RNA, 可以通过转录水平、转录后水平、表观遗传学水平等方式调控 MSCs 基因组的表达, 参与 MSCs 分化中一系列的重要进程<sup>[1]</sup>。而且, 对哺乳动物脑发育过程中高度表达的 miRNAs 的研究表明, 在发育起始的 miRNAs 和特异性分化后表达的 miRNAs 有显著的不同<sup>[2]</sup>。因此, 通过探讨 MSCs 神经分化中的 miRNAs 的变化规律, 有助于深入了解 MSCs 分化的复杂过程, 提高 MSCs 神经分化效率。miR-124 是脑组织中表达最为丰富的一类 miRNAs, 约占脑组织 miRNAs 总量的 25% ~ 48%<sup>[2]</sup>。但是, miR-124 是否在 MSCs 神经分化中起作用尚未见报道。本研究分别采用慢病毒过表达载体或小干扰 RNA (small interfering RNA; siRNA) 影响 miR-124-1, 观察增强或减弱 miRNAs 的基因沉默效应后大鼠 MSCs 神经分化规律, 并初步探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年 Wistar 雄性大鼠, 体重 150 ~ 200 g, 雌雄不限, 由郑州大学动物实验中心提供, 许可证号: SCXK (豫) 2005-0001。

1.2 主要试剂

DMEM 液体培养基、胎牛血清购自 Invitrogen 公司; 神经细胞标记蛋白  $\beta 3$  tubulin (3H3091, sc-69966)、神经微管结合蛋白 MAP-2 (AP20, sc-32791)、胶质纤维酸性蛋白 GFAP (F-7, sc-166458)、小鼠抗 IgG1 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG1 (sc-2969) 购自 Santa Cruz 公司; 凝聚胺、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、 $\beta$ -巯基乙醇购自 Sigma 公司; XbaI、HpaI、T4 DNA ligase 购自 New England Biolabs 公司; pFU-GW-iRNA Vector、Helper 1.0、pHelper 2.0 载体购自上海吉凯基因技术有限公司; 大鼠 Rn\_miR-124a\_1 miScript Primer Assay (MS00005593)、Anti-rno-miR-124\* miScript miRNA Inhibitor (MIN0004728)、HiPerFect 转染试剂 (301705)、RNeasy Mini 试剂盒 (217004)、OneStep RT-PCR 试剂盒 (210212)、miScript Reverse Tran-

scription 试剂盒 (218061)、miScript SYBR Green PCR 试剂盒 (218073) 均为 Qiagen 公司产品; AEC 底物显色试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司; 其他生化试剂均为国产分析纯级别。

引物由上海吉凯基因技术有限公司根据设计合成, 见表 1。

表 1 引物序列

| 引物名称              |         | 引物序列                                     | 片段长度   |
|-------------------|---------|------------------------------------------|--------|
| $\beta 3$ tubulin | Forward | 5'-TGCCTGTGTACAGGTGAATGC-3'              | 240 bp |
|                   | Reverse | 5'-GGCTGCATAGTCATTTC CAAG-3'             |        |
| MAP-2             | Forward | 5'-CCCAAGAACCAACAAGATGAA-3'              | 710 bp |
|                   | Reverse | 5'-AATCAAGGCAAGACATAGCGA-3'              |        |
| $\beta$ -actin    | Forward | 5'-TGACGGGGTCACCCAACTGTGC-<br>CCATCTA-3' | 105 bp |
|                   | Reverse | 5'-CTAGAAGCATTGCGGACGATG-<br>-GAGGG-3'   |        |

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠 MSCs 的分离培养及鉴定 参考文献和本课题组以往的方法<sup>[3,4]</sup>, 分离、培养大鼠 MSCs, 每隔 48 h 换液, 倒置显微镜动态观察 MSCs 生长情况, 连续传至 10 代 (P10) 后备用, 流式细胞仪检测 MSCs 表达的标记蛋白。

1.3.2 大鼠 miR-124-1 慢病毒载体构建 根据 miRBase 数据库的 rno-miR-124-1 序列 (MI0000893), 本研究合成了双链 DNA oligo 和 pFU-GW-iRNA 载体, 其结构分别如下: 5'-TAG GCC TCT CTC TCC GTG TTC ACA GCG GAC CTT GAT TTA AAT GTC CAT ACA ATT AAG GCA CGC GGT GAA TGC CAA GAA TGG GGC TGC-3'; 以及 5'-TCG AGC AGC CCC ATT CTT GGC ATT CAC CGC GTG CCT TAA TTG TAT GGA CAT TTA AAT CAA GGT CCG CTG TGA ACA CGG AGA GAG AGG CCT A-3'。首先将 pFU-GW-iRNA 载体经 Hpa I 和 Xho I 双酶切, 使其线性化; 将双酶切慢病毒载体和克隆好的双链 DNA oligo 进行连接; 再转化至感受态细胞, 37℃ 培养 16 h。转化后挑选克隆产物进行 PCR 和测序鉴定。构建后的 pGC-LV 载体与慢病毒包装质粒载体 pHelper 1.0、pHelper 2.0 通过 Lipofectamine 2000 共转染至 293T 包装细胞, 产生病毒液并采用孔释法测定滴度。最后将制备好的慢病毒载体放至 -80℃ 冰箱冻存备用。

1.3.3 miR-124-1 慢病毒载体感染大鼠 MSCs 在预实验中, 已经测定了 miR-124-1 慢病毒载体的最适感染复数值 (multiply of infection, MOI) 为 30。将 P10 的大鼠 MSCs 接种至 96 孔板, 待细胞融合度达

到 30% ~ 50%。感染前吸去细胞上清液,在完全培养基中加入含有 MOI = 30 的慢病毒载体和终浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的 Polybrene,于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中共感染 24 h 后,弃去感染液,重新加入新鲜的完全培养基。在倒置荧光显微镜下观察感染后绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 荧光表达情况,评价细胞感染效率。

### 1.3.4 Anti-rno-miR-124\* Inhibitor 转染大鼠 MSCs

为了证明 miR-124-1 在 MSCs 神经分化中的作用,本研究还采用 siRNA 抑制 miR-124-1。按照操作说明将 P10 的大鼠 MSCs 接种至 96 孔板,在每孔加入 175  $\mu\text{L}$  培养基 (DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清 + 青、链霉素),同时,将 0.75  $\mu\text{L}$  HiPerFect 转染试剂溶于 24.25  $\mu\text{L}$  无血清 DMEM 培养基中,再加入 0.5  $\mu\text{L}$  Anti-rno-miR-124\* Inhibitor 混匀,室温孵育 8 min 后,将转染复合物均匀滴入含 MSCs 孔内,使 Anti-rno-miR-124\* Inhibitor 的终浓度达到 50 nM,置于 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内;孵育 24 ~ 48 h。实时定量 PCR 法评价细胞转染效率。

1.3.5 实验分组 根据感/转染情况将同时时间点的 MSCs 细胞分为 3 组,①对照组:不进行感/转染,其他培养条件同其他两组。②miR-124-1<sup>+</sup> 组:感染过表达的 miR-124-1 慢病毒。③miR-124-1<sup>-</sup> 组:转染 Anti-rno-miR-124\* Inhibitor。

1.3.6 体外诱导 MSCs 分化为神经细胞 参照 Woodbury 等<sup>[5]</sup> 和本课题组前期研究方法<sup>[3]</sup> 并略改进。诱导剂为 5 mM  $\beta$ -巯基乙醇,诱导时间为 6 d。

1.3.7 MTT 比色法检测细胞存活率 在各组加入 MTT (5.0 mg/mL) 50  $\mu\text{L}$ /孔,置于培养箱孵育 4 h,离心弃上清液,加入二甲基亚砷 200  $\mu\text{L}$ ,采用酶联免疫检测仪测定各孔吸光度值,评价细胞存活率。

1.3.8 免疫细胞化学染色检测神经细胞标记物的表达 将各组细胞经 4% 多聚甲醛固定后,用 0.2% Triton X-100 处理 10 min,并用封闭液封闭 1 h。然后分别用  $\beta 3$  tubulin 抗体 (2.0  $\mu\text{g/mL}$ )、MAP-2 (1.0  $\mu\text{g/mL}$ )、GFAP (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 4℃ 孵育 24 h。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG1 (1:400) 在 37℃ 孵育 1 h、AEC 显色、DAPI 复染。采用双人双盲法随机计数阳性细胞,计算阳性细胞百分率。

### 1.3.9 Western blot 检测神经细胞标记蛋白的表达

收集各组细胞,在细胞裂解液 (50 mM Tris-Cl、pH 6.8、10 mM EDTA、2% SDS、5 mM DTT、0.5 mM PMSF) 100  $\mu\text{L}$  中裂解、变性、离心、收集蛋白。根据 Bradford 法对蛋白进行定量分析。蛋白裂解液加入 10  $\times$  凝胶上

样缓冲液进行 SDS-丙烯酰胺凝胶电泳。电泳后,转移到硝酸纤维膜上。以含 5% 脱脂牛奶的 TBST 室温封闭 1 h,然后相应抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜。辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG1 室温反应 1 h, TBST 洗膜。然后进行 ECL 反应,曝光显影。

1.3.10 逆转录聚合酶链反应检测神经细胞标记物 mRNA 的表达 采用 RNeasy Mini 试剂盒分离纯化各组细胞的总 RNA,分光光度法测定提取的总 RNA 含量及浓度。参照 OneStep RT-PCR 试剂盒实验操作说明进行逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测,总反应体积 50.0  $\mu\text{L}$ ,其中 5  $\times$  RT-PCR Buffer 10.0  $\mu\text{L}$ , dNTP Mix 2.0  $\mu\text{L}$ , RT-PCR Enzyme Mix 2.0  $\mu\text{L}$ , 5  $\times$  Q-Solution 10.0  $\mu\text{L}$ , RNase inhibitor 10 U, RNA 1.0  $\mu\text{g}$ , 引物 (表 1) 0.6  $\mu\text{mol/L}$ 。扩增条件为: 50℃ 逆转录 30 min; 95℃ 初始 15 min; 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 30 ~ 35 个循环; 72℃ 最后延伸 10 min。然后,取 RT-PCR 产物 10.0  $\mu\text{L}$ , 行 2% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.11 实时定量 PCR 检测 miR-124-1 表达量 首先,参考 miScript Reverse Transcription Kit 操作手册制备 cDNA,冰上保存备用。其次,参考 miScript SYBR Green PCR Kit 操作手册进行实时定量 PCR,总反应体系为 50  $\mu\text{L}$ ,包括 3.0  $\mu\text{L}$  cDNA, 5.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Rn\_miR-124a\_1 miScript Primer Assay, 5.0  $\mu\text{L}$  10  $\times$  Universal Primer, 25.0  $\mu\text{L}$  2  $\times$  QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 12.0  $\mu\text{L}$  RNase-free water。于荧光定量 PCR 仪 (ABI Prism7300) 上进行扩增,设置反应条件为 95℃ 预热 15 min; 94℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 30 s, 70℃ 延伸 30 s, 共 35 ~ 40 个循环。采用仪器自带 ABI Prism7300 SDS Software 分析,记录相应的 CT 值,基因相对表达量采用公式  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  计算,以此判定 miR-124-1 表达量的差异。

## 1.4 统计学分析

图像由 ImagePro Express 6.0 采集和处理,图表采用 GraphPad Prism 5.01 制作,统计处理采用 SPSS 13.0 软件分析。数据采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD 法),  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 miR-124-1 慢病毒载体感染大鼠 MSCs  
pFU-GW-iRNA 载体经测序结果证明大鼠 miR-

124-1 慢病毒载体构建成功。经 293T 细胞包装后,测定病毒的滴度为  $2 \times 10^9$  TU/mL。

倒置荧光显微镜观察发现,miR-124-1<sup>+</sup> 组慢病毒载体感染 MSCs 2 d 后,部分细胞脱落死亡;而且,感染 7 d 时慢病毒载体自身携带的 GFP 表达最为理想,随时间延长,荧光减弱,见图 1。随着 MOI 值的递增,GFP 表达依次增加,MOI 值为 30 时,GFP 表达最为理想。MTT 检测结果显示,miR-124-1<sup>+</sup> 组 MTT 值( $0.738 \pm 0.023$ )较对照组( $0.825 \pm 0.016$ )显著下降( $P < 0.05$ ),但是与预实验中仅感染空病毒的 MSCs( $0.736 \pm 0.022$ )之间相比差异无统计学意义,提示慢病毒载体感染后可以导致 MSCs 细胞存活率下降,与 miR-124-1 过表达无关。实时定量 PCR 结果显示,miR-124-1<sup>+</sup> 组感染 MSCs 2 d 后,miR-124-1 的表达量为  $6.03 \pm 0.23$ ,较对照组( $0.98 \pm 0.05$ )显著上调( $P < 0.01$ )。

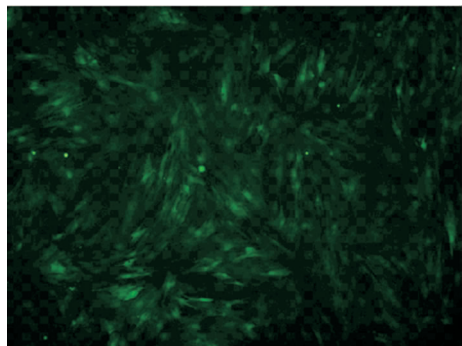


图1 miR-124-1<sup>+</sup> 组慢病毒载体感染 MSCs 7d 时 GFP 表达情况(倒置荧光显微镜,×200,MOI=30)

## 2.2 Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor 转染大鼠 MSCs

Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor 转染 MSCs 24 h 后,部分细胞脱落死亡。miR-124-1<sup>-</sup> 组 MTT 值

( $0.750 \pm 0.052$ ) 较对照组( $0.825 \pm 0.016$ )显著下降( $P < 0.05$ ),提示 Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor 可以导致 MSCs 存活率下降。实时定量 PCR 结果显示, Anti-rno-miR-124<sup>\*</sup> Inhibitor 转染 MSCs 24 h 后,miR-124-1 的表达量为  $0.16 \pm 0.02$ ,较对照组显著下降( $P < 0.01$ )。

## 2.3 大鼠 MSCs 诱导分化为神经细胞

β-巯基乙醇诱导后,对照组部分 MSCs 出现神经细胞样改变,胞体收缩呈多角形或圆形,突起细长,有数个分支,部分在局部形成网络。miR-124-1<sup>+</sup> 组诱导后,细胞形态变化更为迅速和显著,诱导 6 d 时多数细胞胞体收缩呈圆形、锥形,细胞突起细长,交织成网,形成较典型的神经细胞结构,少量细胞脱落、死亡。miR-124-1<sup>-</sup> 组诱导后,细胞形态改变不明显,只有部分区域、少数细胞出现神经细胞样的改变。见图 2。

miR-124-1<sup>+</sup> 组诱导 6 d 后细胞的 β3 tubulin、MAP-2 表达率分别为 ( $73 \pm 8$ )%、( $81 \pm 6$ )%,显著高于其他两组( $P < 0.01$ ),同时,miR-124-1<sup>-</sup> 组 β3 tubulin、MAP-2 的表达率显著低于对照组( $P < 0.01$ )。见图 3~4。各组 GFAP 表达率均小于 1%,差异无统计学意义。

Western blot 结果显示,miR-124-1<sup>+</sup> 组诱导后 6 d 细胞的 β3 tubulin、MAP-2 表达率显著高于其他两组( $P < 0.01$ ),同时,miR-124-1<sup>-</sup> 组 β3 tubulin、MAP-2 的表达率显著低于对照组( $P < 0.01$ )。见图 5。

RT-PCR 结果与 Western blot 结果相似,各组诱导 6 d 后均有 β3 tubulin、MAP-2 mRNA 表达,miR-124-1<sup>+</sup> 组诱导后细胞的 β3 tubulin、MAP-2 mRNA 表达率显著高于其他两组( $P < 0.01$ ),同时,miR-124-1<sup>-</sup> 组 β3 tubulin、MAP-2 mRNA 的表达率显著低于对照组( $P < 0.01$ )。见图 6。

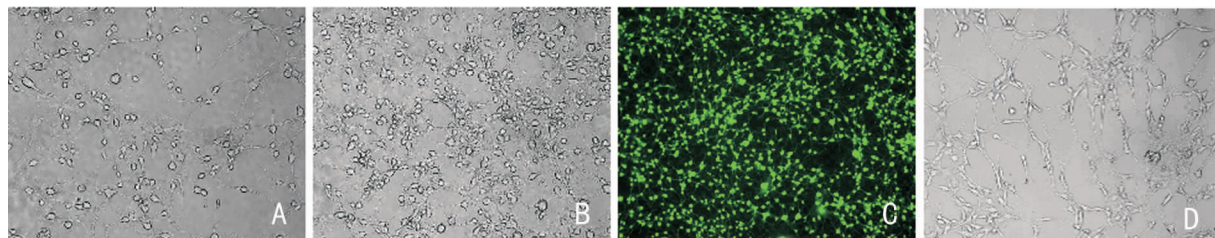


图2 各组细胞在诱导 6 d 时形态学变化 A 为对照组(倒置显微镜,×200),部分细胞出现神经细胞样改变;B(倒置显微镜,×200)和 C(倒置荧光显微镜,×100)均为 miR-124-1<sup>+</sup> 组,形成较典型的神经细胞结构;D 为 miR-124-1<sup>-</sup> 组(倒置显微镜,×200),部分区域、少数细胞出现神经细胞样改变。

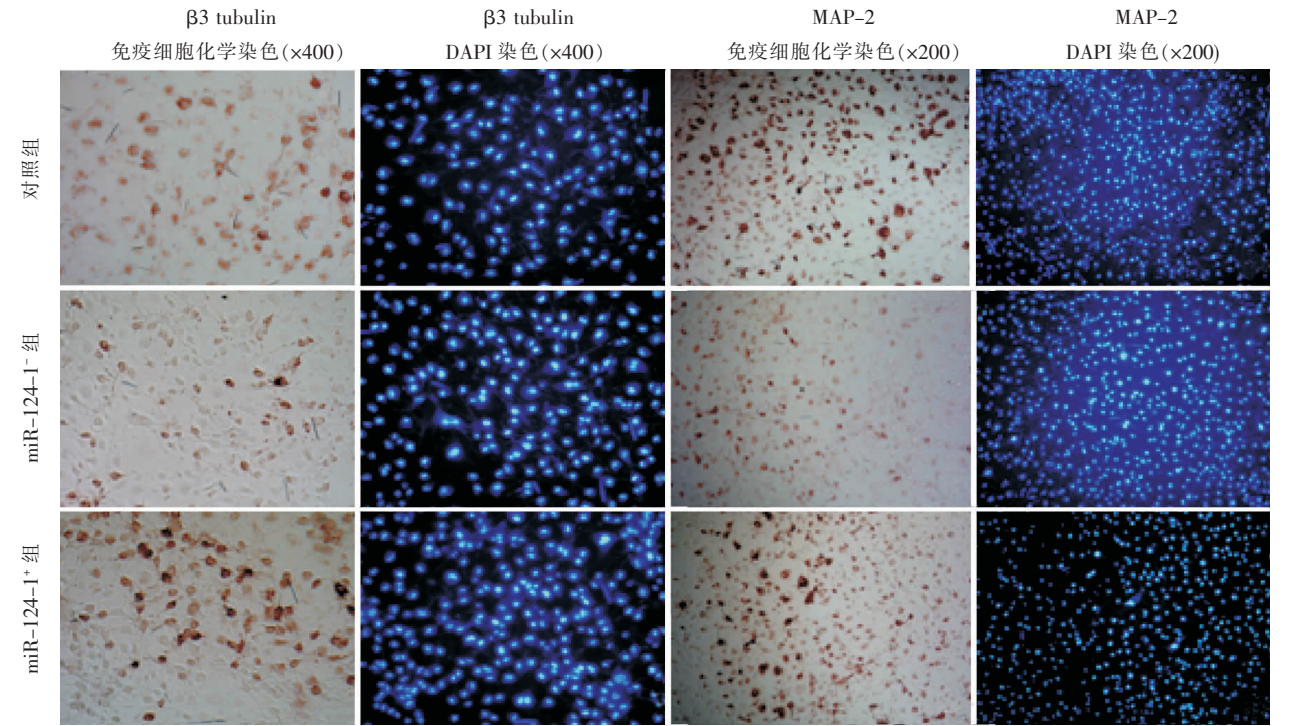


图 3 3 组细胞在诱导 6 d 时神经细胞标记物的表达 miR-124-1<sup>+</sup> 组细胞的  $\beta 3$  tubulin 及 MAP-2 的表达显著高于对照组和 miR-124-1<sup>-</sup> 组;miR-124-1<sup>-</sup> 组细胞的  $\beta 3$  tubulin 及 MAP-2 的表达显著低于对照组。

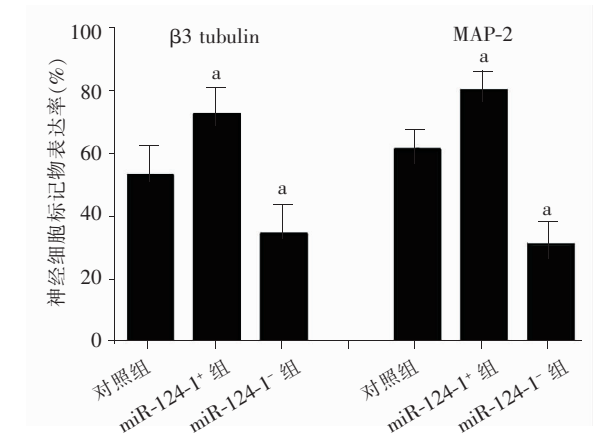


图 4 各组细胞在诱导 6 d 时神经细胞标记物表达率 ( $n=15$ ) a; 与对照组比较,  $P<0.01$ 。

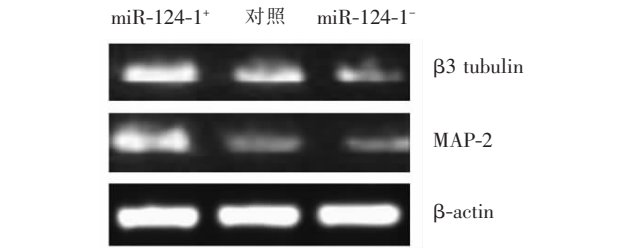


图 6 RT-PCR 检测各组细胞在诱导 6 d 时神经细胞标记物 mRNA 的表达率 ( $n=8$ )

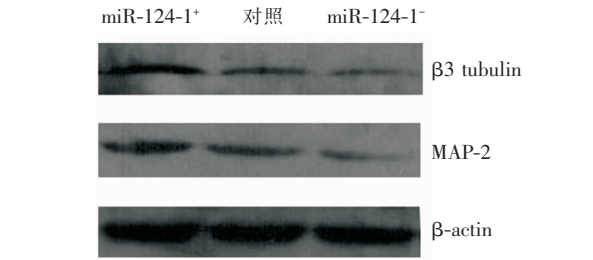


图 5 Western blot 检测各组细胞在诱导 6 d 时神经细胞标记物的表达 ( $n=8$ )

### 3 讨论

miRNAs 是一类长约 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,参与了细胞活动中一系列的重要进程,包括早期发育、增殖分化、细胞凋亡、信号转导等<sup>[6]</sup>。

miR-124 是脑组织中表达最为丰富的一类 microRNA,主要限于在已经分化的和成熟的神经元中表达。如果将 miR-124 感染到多种细胞中,可导致一系列非神经元转录物的表达受到抑制,诱导这些细胞的基因组表达模式向神经方向转化<sup>[7-8]</sup>。最新研究发现,在 miR-124 参与下,可以将成纤维细胞重新编程,直接诱导分化为神经细胞<sup>[9-10]</sup>,这些结果提

示在干细胞神经分化过程中,miR-124 可能起到重要作用。本研究发现大鼠 MSCs 体外诱导神经分化前后,miR-124-1 表达量显著增加,神经细胞标记物  $\beta 3$  tubulin、MAP-2 表达量也显著增加。进一步研究发现,过表达 miR-124-1 可以促进大鼠的 MSCs 神经分化,而抑制 miR-124-1 不仅降低了 MSCs 神经分化效率,同时也降低了细胞存活率,提示 miR-124 参与了 MSCs 神经分化的过程,干预 miR-124 的表达可以影响 MSCs 向神经细胞分化。

miR-124 影响 MSCs 向神经细胞分化的机制尚不清楚,可能有以下几种原因:1) miR-124 的靶目标可以编码羧基端小结构域磷酸酶 1 (SCP1/CTDSP1),SCP1/CTDSP1 是 RE1-沉默转录阻遏物(RE1-silencing transcription repressor, REST/NRSF)的组成之一。REST 在非神经元细胞中阻遏大量神经元特异基因的转录。因此,在分化的神经元中,miR-124a 可以通过减少 SCP1 的表达量,解除 SCP1 对神经元转录程序的阻遏作用,促进神经细胞分化<sup>[11]</sup>;2)在神经分化过程中,miR-124 能够与位于多聚嘧啶核苷酸序列结合蛋白(PTBP)mRNA 3' UTR 的同源靶标位点结合,抑制 PTBP1 的表达,而 PTBP1 可以抑制 PTBP2 的表达,PTBP2 可以精确调节 mRNA 前体向神经系统方向选择性剪切<sup>[12]</sup>;3) miR-124 可以在转录后水平调节 Hes-1 基因的表达,在维甲酸诱导 P19 细胞向神经元样细胞分化过程中起一定作用<sup>[13]</sup>;4)本课题组以往的研究发现,miR-9 可以通过下调 Notch1,促进 MSCs 神经分化<sup>[14]</sup>。miR-124 是否也可以通过 Notch 信号通路参与 MSCs 神经分化有待进一步研究。

值得注意的是,本研究的结果与王晶晶等<sup>[15]</sup>研究报道不甚一致,后者认为 MSCs 体外诱导神经分化前后,miR-124-1 表达量下降。造成这种差异的原因可能是诱导方法的不一致,其 MAP-2 阳性细胞仅为 20%,远低于本研究的诱导效率。

综上所述,本研究发现 miR-124-1 可以增加 MSCs 向神经细胞的分化效率,提示 miR-124 在 MSCs 神经分化过程中可能起促进作用。

[参 考 文 献]

[1] Yi R, Fuchs E. MicroRNAs and their roles in mammalian stem cells[J]. J Cell Sci, 2011, 124(Pt 11):1775-1783.

[2] Papagiannakopoulos T, Kosik KS. MicroRNA-124: micromanager of neurogenesis[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(5):375-376.

[3] 王明闯,贾延劼,文全庆,关文娟,赵二义,王留东,等. DSCAM 在大鼠骨髓间质干细胞分化为神经细胞中的表达变化[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(6): 486-489.

[4] 谭艳芳,殷小成,熊玉娟,王艳. 黄芩甲甙对骨髓间充质干细胞分泌干细胞因子的影响[J]. 中国当代儿科杂志, 2010, 12(4): 290-292.

[5] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. J Neurosci Res, 2000, 61(4): 364-370.

[6] Shi Y, Zhao X, Hsieh J, Wichterle H, Impey S, Banerjee S, et al. MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis [J]. J Neurosci, 2010, 30(45): 14931-14936.

[7] Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(4):399-408.

[8] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs[J]. Nature, 2005, 433(7027): 769-773.

[9] Yoo AS, Sun AX, Li L, Shcheglovitov A, Portmann T, Li Y, et al. MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons[J]. Nature, 2011, 476(7359): 228-231.

[10] Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions[J]. Cell Stem Cell, 2011, 9(2): 113-118.

[11] Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G. Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(7): 2422-2427.

[12] Boutz PL, Stoilov P, Li Q, Lin CH, Chawla G, Ostrow K, et al. A post-transcriptional regulatory switch in polypyrimidine tract-binding proteins reprograms alternative splicing in developing neurons[J]. Genes Dev, 2007, 21(13):1636-1652.

[13] Wang C, Yao N, Lu CL, Li D, Ma X. Mouse microRNA-124 regulates the expression of Hes1 in P19 cells[J]. Front Biosci (Elite Ed), 2010, 2:127-132.

[14] Jing L, Jia Y, Lu J, Han R, Li J, Wang S, et al. MicroRNA-9 promotes differentiation of mouse bone mesenchymal stem cells into neurons by Notch signaling[J]. Neuroreport, 2011, 22(5): 206-211.

[15] 王晶晶,王春芳,党雯,李鹏飞,蔚洪恩. 骨髓基质干细胞诱导分化为神经元过程中 miR-124 和 miR-128 的表达[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2010, 19(3):221-224.

(本文编辑:王庆红)