

miR-214-3p在骨质疏松大鼠弓状核表达变化中的初步研究

张 标¹, 卢得林^{1,2}, 阮文滔^{1,2}, 徐 羽^{1,2}, 林立坤^{1,2}, 廖 原^{1,2}, 黄金辉^{1,2}, 赵千里^{1,2}, 佟 琳^{2*} (1. 广东医科大学基础医学院, 广东湛江 524023; 2. 广东医科大学第一临床医学院, 广东湛江 524001)

摘 要: **目的** 研究 miR-214-3p 在骨质疏松大鼠弓状核的表达, 初步揭示其在骨质疏松发生发展中的作用。 **方法** 将 4 月龄雌性 SD 大鼠随机分为实验组和对照组, 每组 6 只, 实验组行切除卵巢手术, 对照组行假手术, 常规饲养 8 周。应用苏木精-伊红染色法和骨形态计量学检测大鼠胫骨干骺端骨密度; 生物信息学分析弓状核 miR-214-3p 作用的靶基因; 荧光定量聚合酶链反应法测定大鼠弓状核阿黑皮素原 mRNA 表达水平以及弓状核、血清 miR-214-3p 表达水平; 免疫组织化学染色法测定大鼠下丘脑弓状核阿黑皮素原表达强度。 **结果** 与对照组比较, 实验组大鼠胫骨干骺端骨小梁数量、骨小梁厚度和骨小梁面积百分比均明显减小 (均 $P < 0.01$), 骨小梁分离度明显升高 ($P < 0.01$); 实验组弓状核 miR-214-3p 表达水平升高 ($P < 0.05$), 同时血清 miR-214-3p 表达水平明显升高 ($P < 0.01$); 生物信息学分析显示 miR-214-3p 与阿黑皮素原具有良好的靶向关系; 与对照组相比较, 实验组弓状核阿黑皮素原 mRNA 的表达水平降低 ($P < 0.05$), 弓状核阿黑皮素原蛋白表达强度明显降低 ($P < 0.01$)。 **结论** 骨质疏松大鼠弓状核 miR-214-3p 表达水平升高, 可通过其自身或调控阿黑皮素原影响骨质疏松的发生发展。

关键词: miR-214-3p; 大鼠弓状核; 骨质疏松; 阿黑皮素原

中图分类号: R 589

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 03-0241-05

Study on changes of miR-214-3p expression in the arcuate nucleus of osteoporotic rats

ZHANG Biao¹, LU De-lin^{1,2}, RUAN Wen-tao^{1,2}, XV Yu^{1,2}, LIN Li-kun^{1,2}, LIAO Yuan^{1,2}, HUANG Jin-hui^{1,2}, ZHAO Qian-li^{1,2}, TONG Lin^{2*} (1. School of Basic Medical Science, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of the First Clinical Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of miR-214-3p in the arcuate nucleus of osteoporotic rats its role in the development of osteoporosis. **Methods** 4-month-old female SD rats were randomly divided into experimental and control groups, 6 rats in each group. The rats in experimental group and the rats in control group were treated with ovariectomy and sham operation, respectively for indicated times. Hematoxylin-Eosin (HE) staining and bone morphometrics were used to detect the bone density of rat tibial metaphysis. Bioinformatics analysis was used to analyze the targeted gene of miR-214-3p in the arcuate nucleus. RT-qPCR was used to determine the expression level of proopiomelanocortin (POMC) mRNA in the arcuate nucleus, as well as the expression level of miR-214-3p in the arcuate nucleus and serum. Immunohistochemistry assay was used to determine the expression level of POMC in the arcuate nucleus of rats. **Results** The number thickness and the percentage of trabecular area in the tibial metaphysis of rats in the experimental group were all significantly reduced (all $P < 0.01$), whereas the separation of trabeculae was significantly increased ($P < 0.01$), compared with controls. The expression levels of miR-214-3p in the arcuate nucleus of the experimental group were increased ($P < 0.05$), while the expression levels of miR-214-3p in the serum ($P < 0.01$) were also significantly increased. The result of bioinformatic analysis showed that miR-214-3p had a good targeting relationship with POMC. Compared with the control group, the expression levels of POMC mRNA in the arcuate nucleus were reduced in the experimental group ($P < 0.05$), and the intensity of POMC expression in the arcuate nucleus was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** The results showed that elevated expression levels of miR-214-3p in the arcuate nucleus of osteoporotic rats, which would affect the development of osteoporosis by itself or its regulation for POMC.

收稿日期: 2024-02-16

基金项目: 国家自然科学基金(81873885), 广东省大学生创新创业训练计划项目(S202210571104, S202210571051), 广东医科大学大学生创新实验项目(ZCZF002)

作者简介: 张 标(1977-), 男, 博士, 副教授, E-mail: zhangbiao@gdmu.edu.cn

卢得林(2001-), 男, 本科, 学生, E-mail: 1970949739@qq.com

通信作者: 佟 琳(1979-), 女, 硕士, 主任医师, E-mail: lutl16@126.com

Key words: miR-214-3p; the arcuate nucleus of rat; osteoporosis; proopiomelanocortin (POMC)

下丘脑弓状核与骨质疏松发生发展相关,但具体机制尚不明确^[1-2]。微小RNA (microRNA, miRNA) 在细胞功能、组织稳态和疾病发生等方面发挥着重要调节作用^[3]。最近研究发现,下丘脑弓状核存在丰富的miRNA^[4],且脑内miRNA可以内分泌^[5]或旁分泌^[6]的方式影响靶细胞或靶器官。近年的研究发现,骨组织来源的miR-214-3p通过影响破骨细胞、成骨细胞的增殖和分化,对骨代谢过程发挥重要调控作用^[7-8];同时证明,miR-214-3p也参与骨质疏松的发生发展^[8]。那么,miR-214-3p在弓状核是否表达?是否与弓状核对骨质疏松的影响相关呢?目前尚未见文献报道。

本研究旨在探讨骨质疏松大鼠弓状核miR-214-3p的表达情况,并初步分析弓状核miR-214-3p对骨质疏松发生发展的作用,以期为进一步研究弓状核对骨质疏松的作用奠定实验基础,为骨质疏松的防治提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 4月龄Sprague-Dawley (SD) 雌性大鼠,身体质量(200±50) g,购于广州维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证SCXK9 (粤) 2022-0063。各项操作符合广东医科大学实验动物伦理要求(编号GDMU-2023-000011)。

1.1.2 主要试剂 新鲜组织和细胞总RNA分离纯化试剂盒(批号:E18002)、石蜡包埋组织样品总RNA分离纯化试剂盒(批号:E19002) 购于苏州吉玛基因股份有限公司。血清血浆microRNA提取试剂盒(批号:B1804B) 购于哈尔滨新海基因检测有限公司。TAKARA反转录试剂盒(批号:RR047A)、实时荧光PCR试剂盒(批号:RR820A) 购于上海百赛生物技术股份有限公司。前阿黑皮质素原(POMC)抗体(批号:AB_572220) 购于北京盛科博源生物科技有限公司。引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 主要仪器 分光光度计, BioTek公司, 美国; PCR仪 AB2720、Real-Time PCR仪, Thermo SCIENTIFIC公司, 美国; 正立荧光显微镜, Olympus公司, 日本; 石蜡切片机, Leica公司, 德国; 生物组织自动包埋机, Huida公司, 中国。

1.2 方法

1.2.1 骨质疏松大鼠造模 实验动物测量身体质量

后,将12只健康雌性4月龄未孕SD大鼠随机分为实验组与对照组。实验组切除双侧卵巢,对照组仅切除卵巢周围部分脂肪组织。标准饲料饲养8周,保持环境温度23~25℃、相对湿度40%,每隔12h光暗交替。

1.2.2 检测胫骨干骺端骨形态计量学静态参数 取大鼠右侧胫骨,4%多聚甲醛固定,脱钙后制作骨组织蜡块,经切片、HE染色等操作。用半自动图像数字分析仪测量及计算各组大鼠胫骨干骺端骨小梁面积百分数(the percentage of trabecular area, Tb·Ar)、骨小梁数(the number of trabeculae, Tb·N)、骨小梁厚度(the thickness of trabeculae, Tb·Th)和骨小梁分离度(the separation of trabeculae, Tb·SP)。测量范围为距近端胫骨干骺端生长板最下缘0.5~3.5 mm。

1.2.3 免疫组织化学染色检测弓状核POMC阳性表达强度 截取大鼠由视交叉至乳头体的脑组织制作石蜡包块,经切片、脱蜡、水化、高压热修复抗原、H₂O₂ 孵育,滴加POMC一抗(1:500),4℃孵育过夜,加入二抗(1:2000),37℃孵育20 min, DAB显色,苏木素复染,蒸馏水冲洗后脱水、透明、封片。参照Pacinos&Watson大鼠脑图谱^[9]定位弓状核,显微镜下观察POMC的阳性表达,并拍照。Image J检测在正中隆起切面紧邻第3脑室底部弓状核内一定范围(31415.93 μm², r=100.0 μm) POMC阳性表达强度。

1.2.4 生物信息学分析 应用TargetScan、TargetMiner、miRPathDB、miRWalk、PITA网站预测分析miR-214-3p的靶基因及其结合位点。

1.2.5 RT-qPCR检测miR-214-3p及POMC mRNA表达水平 参照Pacinos & Watson大鼠脑图谱^[9]定位弓状核,毛细管打孔脑组织石蜡包块获取弓状核组织。RNA提取试剂盒提取弓状核组织及胫血清样本的10 μL RNA。核酸检测仪分析A260/A280比率和RNA质量后,反转录为cDNA。按照实时荧光PCR试剂盒说明书分别对miR-214-3p和POMC进行RT-qPCR扩增。miR-214-3p、POMC以U6为内参根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算目的基因表达水平。引物设计如下,miR-214-3p上游:5'-GCGACAGCAGGCACAGACA-3'和下游:5'-AGTGCAGGGTCCGAGG TATT-3'; POMC上游:5'-AAGATGCCGAGATTCTGCTACA-3'和下游:5'-TTGCTTCCGTGGTGAGGT-3'; U6上游:5'-CTCGCTTCGCGAGCACA-3'和下游:5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.3 统计学处理

所有数据采用 GraphPrism 8.0 软件进行统计学分析及作图。数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。若方差齐,采用 t 检验;若方差不齐,采用校正 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 骨质疏松大鼠弓状核 miR-214-3p 的表达水平

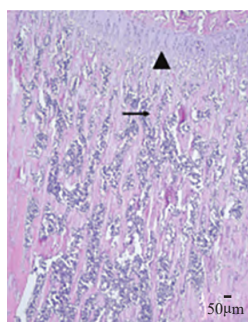
术后 8 周,骨形态计量学检测表明:与对照组比较,实验组大鼠胫骨干骺端 Tb·Ar、Tb·N、Tb·Th 均明显减少(均 $P<0.01$),而 Tb·Sp 明显增加($P<0.01$),详见表 1。实验组大鼠胫骨干骺端组织 HE 染色切片显示骨小梁减少、间隙变宽且骨量丢失(图 1)。

表 1 骨质疏松大鼠胫骨干骺端骨组织形态计量学静态参数的测量 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

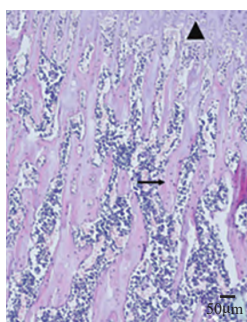
组 别	Tb·Ar/%	Tb·N/(1/mm)	Tb·Th/ μ m	Tb·Sp/ μ m
对照组	30.11 $\pm$ 3.72	64.68 $\pm$ 10.85	5.75 $\pm$ 0.79	124.20 $\pm$ 23.78
实验组	9.15 $\pm$ 2.45 ^a	37.12 $\pm$ 9.06 ^a	2.00 $\pm$ 0.64 ^a	382.08 $\pm$ 54.03 ^a

与对照组比较:^a $P<0.01$

对照组

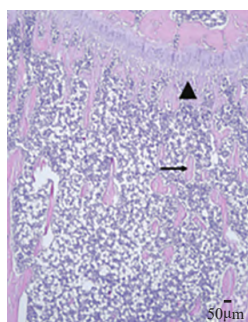


40×

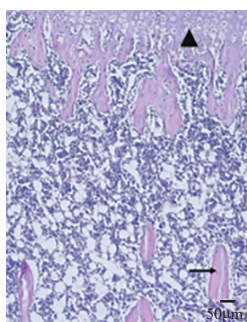


100×

实验组



40×



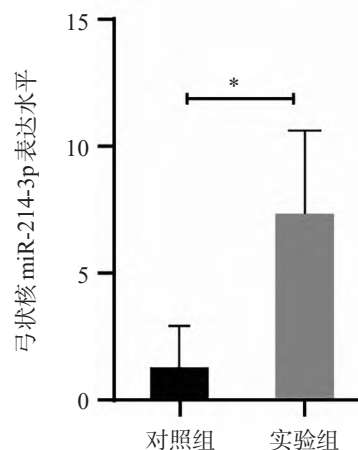
100×

▲: 生长板; →: 骨小梁

图 1 骨质疏松大鼠胫骨干骺端组织切片(HE 染色)

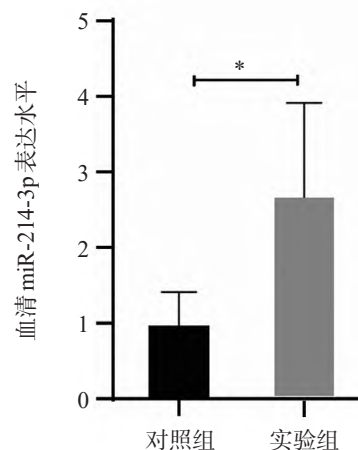
术后 8 周对弓状核 miR-214-3p 的检测结果显示, miR-214-3p 在弓状核表达显著;而且与对照组(1.406 $\pm$ 1.626)比较,骨质疏松大鼠弓状核 miR-214-3p 的表达水平(7.264 $\pm$ 3.284)明显升高($P<0.05$),见图 2。

同时,术后 8 周检测血清 miR-214-3p 的水平发现,与对照组(1.005 $\pm$ 0.445)比较,骨质疏松大鼠血清 miR-214-3p 的表达水平(2.659 $\pm$ 1.257)升高($P<0.05$),见图 3。



与对照组相比: * $P<0.05$

图 2 骨质疏松大鼠弓状核 miR-214-3p 表达水平



与对照组相比: * $P<0.05$

图 3 骨质疏松大鼠血清 miR-214-3p 的表达水平

2.2 骨质疏松大鼠弓状核 POMC mRNA 与 POMC 蛋白的表达

通过 TargetScan、TargetMiner、miRPathDB、miRWalk、PITA 等 miRNA 数据库分析发现: miR-214-3p 能够结合在弓状核表达的 POMC 的 3' 端非编码区域,提示其可能具有调节弓状核 POMC 的作用(图 4)。

```

Position                               70      76
POMC 3' UTR 5' ...CUUGCUCUCCCCUGCCCUGCUGC...
                    |||||
hsa-miR-214-3p 3' UGACGGACAGACACGGACGACA
  
```

图 4 miR-214-3p 与 POMC 的靶向结合位点

检测大鼠弓状核 POMC mRNA,结果显示:与对照组(7.805 $\pm$ 5.655)比较,骨质疏松大鼠弓状核 POMC mRNA 表达水平(0.576 $\pm$ 0.365)降低($P<0.05$),见图 5。

同时,免疫组织化学分析大鼠下丘脑弓状核 POMC 表达发现:与对照组(0.197 ± 0.018)比较,骨质疏松大鼠弓状核 POMC 蛋白(0.132 ± 0.015)表达减少($P < 0.01$),见图 6、7。

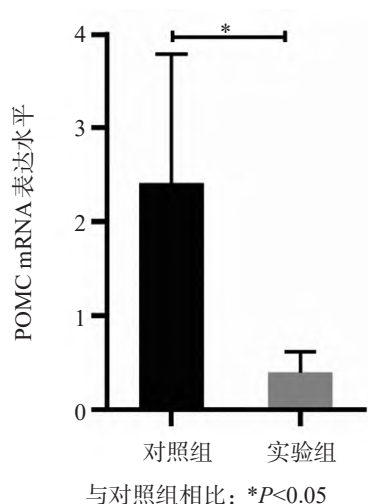
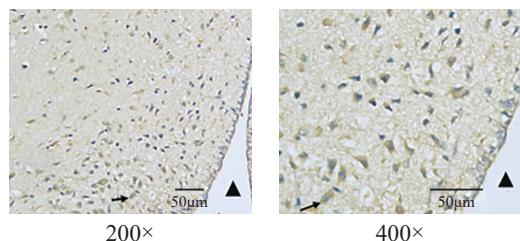
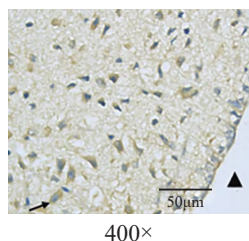


图5 骨质疏松大鼠弓状核 POMC mRNA 表达水平

对照组

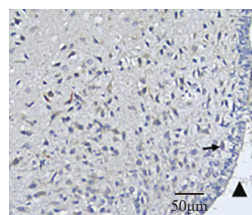


200×

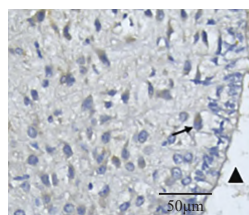


400×

实验组



200×



400×

▲: 第3脑室 →: POMC 阳性表达

图6 免疫组织化学检测骨质疏松大鼠弓状核 POMC 表达

3 讨论

3.1 外周 miR-214-3p 促进骨质疏松的发生

大量研究已证明,外周的 miR-214-3p 可以通过磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)–磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)–蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/AKT) 信号通路激活破骨细胞^[7]或通过降低转录活化因子 4(activating transcription factor 4, ATF4)、成骨细胞特异性转录因子(osteoblast-specific transcription

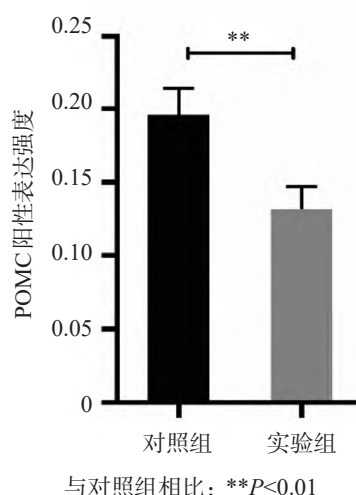


图7 骨质疏松大鼠弓状核 POMC 阳性表达强度

factor, Osterix) 的表达抑制成骨细胞^[10-11],导致骨量减少,诱发骨质疏松的发生。

3.2 弓状核 miR-214-3p 以内分泌方式直接参与骨质疏松的发生发展

本研究首次发现,骨质疏松大鼠弓状核 miR-214-3p 的表达水平升高。弓状核是下丘脑重要的神经核团,其合成分泌的神经递质和肽类物质通过神经内分泌方式调节机体多种生理活动,包括骨代谢^[2,12]。国内外研究发现脑内 miRNA 可以跨越血脑屏障,通过内分泌进入外周^[5,13]。因此,骨质疏松大鼠弓状核中表达升高的 miR-214-3p 可以内分泌的方式由中枢进入血液。临床研究发现:骨质疏松患者血清 miR-214-3p 的表达水平升高^[14]。本研究也发现:骨质疏松大鼠血清 miR-214-3p 表达水平明显升高。这些结果提示,弓状核 miR-214-3p 可以从中枢进入外周参与骨质疏松发生发展。

3.3 弓状核 miR-214-3p 通过调控 POMC 的表达间接影响骨质疏松的发生发展

本研究还发现,在骨质疏松大鼠弓状核中 miR-214-3p 的靶向基因 POMC 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低。POMC 是一种主要表达在下丘脑弓状核的神经肽,有研究结果表明, POMC 本身可以通过转录因子激活蛋白 1(activator protein, AP1) 调节骨量^[15];此外, POMC 衍生的生物活性物质包括 α -黑素细胞刺激激素(melanocyte stimulating hormone, MSH)、 β -内啡肽和促肾上腺皮质激素(adrenocortico-tropic-hormone, ACTH)等,通过与骨细胞上相应的阿黑皮素受体结合,进而影响骨代谢^[16]。例如, α -MSH 通过增加 Runt 相关转录因子 2(runt related transcription factor 2, Runx-2) 的表达,促进成骨分

化^[17]; 弓状核 β -内啡肽表达减少与骨质疏松的发生相关^[1]; ACTH通过促进人成骨细胞分化转录因子Runx2、Osterix和胶原蛋白I的表达,对骨骼维持起重要作用^[18]。因此,弓状核miR-214-3p也可以通过调控局部POMC表达的方式,由POMC或其衍生物影响骨质疏松的发生发展。

综上所述,大鼠弓状核miR-214-3p表达水平升高,可以通过直接或间接的方式影响骨质疏松的发生发展。本实验为研究弓状核对骨质疏松影响提供了新的实验依据,为骨质疏松临床诊断和治疗提供了新思路。

参考文献:

- [1]刘锡仪,刘浩宇.大鼠弓状核 β -内啡肽神经元数量变化与骨质疏松的相互关系[J].广东医学院学报,2015,33(1):18-27.
- [2]李淑桢,李长兴,代冬芳.下丘脑与绝经后骨质疏松症的潜在关系[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(10):1512-1515.
- [3]DIENER C, KELLER A, MEESE E. Emerging concepts of miRNA therapeutics: From cells to clinic[J]. Trends Genet, 2022, 38(6): 613-626.
- [4]MEISTER B, HERZER S, SILAHTAROGLU A. MicroRNAs in the hypothalamus[J]. Neuroendocrinology, 2013, 98(4): 243-253.
- [5]XIAO Q, YAN X, SUN Y, et al. Brain-derived exosomal miRNA profiles upon experimental SAE rats and their comparison with peripheral exosomes[J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(2): 772-782.
- [6]RIANCHO J, VÁZQUEZ-HIGUERA J L, POZUETA A, et al. MicroRNA profile in patients with Alzheimer's disease: Analysis of miR-9-5p and miR-598 in raw and exosome enriched cerebrospinal fluid samples[J]. J Alzheimers Dis, 2017, 57(2): 483-491.
- [7]AMIN M M J, TREVELYAN C J, TURNER N A. MicroRNA-214 in health and disease[J]. Cells, 2021, 10(12): 3274.
- [8]ZHONG D, XU G Z, WU J Z, et al. Circ-ITCH sponges miR-214 to promote the osteogenic differentiation in osteoporosis via upregulating YAP1[J]. Cell Death Dis, 2021, 12(4): 340.
- [9]PAXINOS G, WATSON G. 诸葛启钊主译.大鼠脑立体定位图谱[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [10]WANG X, GUO B, LI Q, et al. miR-214 targets ATF4 to inhibit bone formation[J]. Nat Med, 2013, 19(1): 93-100.
- [11]MOHAMAD N, NABIH E S, ZAKARIA Z M, et al. Insight into the possible role of miR-214 in primary osteoporosis via osterix[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(9): 15518-15526.
- [12]刘锡仪,刘浩宇.损毁弓状核对大鼠骨微结构学的影响[J].广东医学院学报,2008,26(3):233-236.
- [13]刘辰庚,郝婷,杨婷婷,等.外泌体内microRNA-135a跨血脑屏障转运的初步研究[J].中国医药导报,2017,14(33):22-25,30.
- [14]LI D, LIU J, GUO B, et al. Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation[J]. Nat Commun, 2016, 7: 10872.
- [15]IDELEVICH A, SATO K, AVIHAI B, et al. Both NPY-expressing and CART-expressing neurons increase energy expenditure and trabecular bone mass in response to AP1 antagonism, but have opposite effects on bone resorption[J]. J Bone Miner Res, 2020, 35(6): 1107-1118.
- [16]ZHONG Q, SRIDHAR S, RUAN L, et al. Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells[J]. Bone, 2005, 36(5): 820-831.
- [17]WANG L, CHENG J, HUA Z, et al. α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) promotes osteoblast differentiation of MC3T3-E1 cells[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 844: 1-8.
- [18]TOURKOVA I L, LIU L, SUTJARIT N, et al. Adrenocorticotrophic hormone and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 enhance human osteogenesis in vitro by synergistically accelerating the expression of bone-specific genes[J]. Lab Invest, 2017, 97(9): 1072-1083.

(责任编辑:刘建滔)