

Elevated miRNA Expression Induced by Electrical Stimulation Promotes Schwann Cell Migration

Hongwei Yu¹ Bo Gao² Pei Wang^{3*}

1. Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

2. Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China

3. Department of Hand and Foot Surgery, Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei, 067000, China

Abstract

Objective: To study the effect of miRNA induced by electrical stimulation on the biological function of Schwann cells. **Methods:** The rat sciatic nerve crush model was established and divided into an electrical stimulation group and a non-electric stimulation group. The electrical stimulation group was given electrical stimulation for 1 hour a day. On day 7, the expression levels of miR-365-3p, miR-19a-3p, and miR-19-3p at the crush site were detected by real-time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR). RSC96 cells were divided into mock control, miR-365-3p mimic, miR-19a-3p and miR-19b-3p mimic, and the changes of RSC96 cell migration ability were detected by Transwell chamber experiment. The number of target genes of miR-365-3p, miR-19a-3p and miR-19-3p was predicted by TargetScan, miRWalk and miRDB. **Results:** The expressions of miR-365-3p, miR-19a-3p, and miR-19-3p were increased after electrical stimulation for sciatic nerve injury. After transfecting Schwann cells with miR-365-3p, miR-19a-3p, miR-19-3p and their control, Transwell migration assay showed that compared with miR-NC group, miR-365-3p group, miR-19a-3p group and miR-19-3p group promote the migration of Schwann cells. TargetScan, miRWalk and miRDB three databases predicted the number of target gene collections of miR-365-3p, miR-19a-3p and miR-19-3p to be 69, 78 and 56 respectively. **Conclusion:** Electrical stimulation changes the expression of miR-365-3p, miR-19a-3p, and miR-19-3p in the process of nerve injury repair, and promotes the migration of Schwann cells. The function of promoting migration may be related to the target genes predicted by the database.

Keywords

electrical stimulation; miRNA; schwann cells

电刺激诱导 miRNA 表达升高促进雪旺细胞的迁移

于鸿伟¹ 高博² 王培^{3*}

1. 承德医学院, 中国·河北承德 067000

2. 承德医学院附属医院, 中国·河北承德 067000

3. 承德医学院附属医院手足外科, 中国·河北承德 067000

摘要

目的: 研究电刺激诱导miRNA对雪旺细胞生物学功能的影响。**方法:** 建立大鼠坐骨神经挤压模型, 分为电刺激组和不电刺激组, 电刺激组每天给予1小时电刺激。于第7天通过实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测挤压伤处的miR-365-3p、miR-19a-3p、miR-19-3p的表达水平。将RSC96细胞分成模拟物对照、miR-365-3p模拟物、miR-19a-3p和miR-19b-3p模拟物, 通过Transwell小室实验检测RSC96细胞迁移能力的变化。并通过TargetScan、miRWalk与miRDB三个数据库预测miR-365-3p、miR-19a-3p、miR-19-3p的靶基因数量。**结果:** 电刺激治疗坐骨神经损伤后, miR-365-3p、miR-19a-3p、miR-19-3p的表达升高。将与miR-365-3p、miR-19a-3p、miR-19-3p及其对照转染进雪旺细胞后, Transwell迁移实验显示, 与miR-NC组相比, miR-365-3p组, miR-19a-3p组和miR-19-3p组的促进雪旺细胞的迁移数。TargetScan、miRWalk与miRDB三个数据库预测miR-365-3p、miR-19a-3p、miR-19-3p的靶基因合集数分别为69、78、56。**结论:** 电刺激改变神经损伤修复过程中miR-365-3p、miR-19a-3p、miR-19-3p表达, 并且其促进雪旺细胞迁移, 实现促进迁移功能可能与数据库预测靶基因相关。

关键词

电刺激; miRNA; 雪旺细胞

1 引言

周围神经损伤是临床常见病, 主要表现为神经支配区的感觉障碍、神经支配肌的萎缩无力, 严重者可出现畸形,

导致严重的功能障碍^[1,2]。周围神经损伤后具有一定的再生能力^[3,4]。周围神经损伤后发生瓦勒变性, 产生大量的轴突和髓磷脂碎片, 雪旺细胞在c-Jun、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等控制下向去分化雪旺细胞转变^[5-7]。去分化的雪旺细胞开始大量增殖, 聚集在神经断端附近, 通过吞噬作用清除神经损伤后产生的碎片^[8,9]。神经损伤后, 神经残端的两侧的雪旺细胞向中间迁移参与形成神经桥以引导轴突再生^[10-12], 神经桥形成雪旺细胞是周围神经损伤后成功修复的关键。

【作者简介】于鸿伟(1996-), 男, 中国山东威海人, 在读硕士, 从事手足显微外科、周围神经损伤修复研究。

【通讯作者】王培(1975-), 男, 中国河北承德人, 博士, 教授, 主任医师, 从事手足显微外科、周围神经损伤修复研究。

电刺激已被证实可以促进周围神经损伤的修复^[13]。在临床研究中,对因腕部韧带压迫而导致腕管综合征的患者中,接受腕管松解术后以每次强度20Hz,持续60min的电刺激方案也证实了疗效^[14]。miRNA是一种小的由高等真核生物基因组转录的非编码RNA。miRNA通过和靶基因mRNA碱基配对引导沉默复合体(RISC)降解mRNA或阻碍其翻译^[15]。已有大量的研究证实miRNA在神经系统损伤修复过程中发挥重要的调控作用^[16]。有学者在前期的研究中对大鼠损伤模型的坐骨神经电刺激后进行了高通量测序,结果显示电刺激组与对照组坐骨神经残端中出现了大量差异表达的miRNAs^[17]。本研究旨在探讨电刺激是否可以改变坐骨神经损伤修复过程中miRNA表达变化,相应的miRNA与雪旺细胞迁移的关系。

2 材料

RSC96雪旺细胞细胞系,购自武汉普诺赛生命科技有限公司;Lipofectamine2000,购自美国Invitrogen公司;mimics control、miR-365-3p mimics、miR-19a-3p mimics和miR-19-3p mimics均由广州锐博生物科技有限公司构建而成。Transwell小室购自美国Corning公司。

3 实验方法

3.1 动物实验

雄性SD大鼠,体重180~220g。将大鼠随机分为电刺激组和不电刺激组,每组6只。麻醉后手术区域碘伏消毒,沿后肢大腿中部的外侧进行切口,完全暴露坐骨神经,使用持针器挤压坐骨神经分叉处上方8mm位置,挤压10s,松开5s,反复3次。在挤压伤处上下各5mm处加入纯银导线,保证导线不挤压神经。缝合肌肉和皮肤。术后第一天开始给予电刺激连续7天,7天后取材挤压伤处的神经并保存在液氮中。

3.2 细胞转染

转染前24h,取对数生长期的细胞,接种 2×10^5 个雪旺细胞于500ul的无抗培养基中,转染开始时细胞融合度达到50%~70%。置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱中继续培养,严格按照转染试剂说明书进行细胞转染,将mimics con、miR-365-3p mimics、miR-19a-3p mimics和miR-19-3p mimics分别用Opti-MEM培养基稀释,同时将Lipo2000转染试剂用Opti-MEM培养基稀释,分别将二者混合均匀,室温静置20min,将混合液加入各孔细胞中,转染8小时后更换新鲜的完全培养基继续培养20小时后收集细胞进行细胞迁移实验。

3.3 细胞迁移

收集细胞:在Transwell小室上室内加入100ul无血清培养基中含有 2.5×10^4 个转染后的雪旺细胞,在下室内加入500ul相应细胞完全培养液。常规培养36小时后取出小室,磷酸缓冲盐溶液洗涤,用棉签小心擦去小室上层细胞,4%

的多聚甲醛固定10min,0.1%结晶紫染色20min。染色后在倒置显微镜(20倍)进行观察并拍照,随机选取5个视野进行细胞计数。

3.4 以实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测miRNA的表达水平

取出神经组织0.1g,加入1ml预冷的TRIZOL,提取RNA。测定RNA浓度,根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法检测miR-365-3p mimics、miR-19a-3p mimics和miR-19-3p mimics的表达水平。

3.5 靶基因预测

通过TargetScan、miRWalk、miRDB三个数据库对miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p进行靶基因预测,最后取三者预测结果的交集,制作韦恩图。

3.6 统计学分析

使用SPSS 26.0统计学软件进行分析,数据以均值±标准差表示,组间比较采用独立样本t检验,P<0.05具有统计学意义。

4 结果

①电刺激可以促进miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p的表达。

有学者在前期的研究中对大鼠损伤模型的坐骨神经电刺激后进行了高通量测序,结果显示电刺激组与对照组坐骨神经残端中出现了大量差异表达的miRNAs。其中电刺激组干预后miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p的表达显著上调,提示了miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p可能是电刺激促进神经再生重要的调控因子。为此,我们运用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应验证并确定了大鼠坐骨神经挤压伤后电刺激组与不电刺激miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p的表达差异。如图1所示,与不电刺激相比较,电刺激组的miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p表达水平升高。数据比较P<0.05,具有统计学意义。提示在大鼠坐骨神经损伤7天后,电刺激升高了miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p的表达。

②miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p促进雪旺细胞的迁移。

雪旺细胞是周围神经的胶质细胞,周围神经的再生需要雪旺细胞迁移形成神经桥,促进雪旺细胞迁移可以加快损伤神经的修复。为确定miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p对雪旺细胞迁移的影响,分别将其的mimic及对照转染到雪旺细胞中,将转染后的雪旺细胞接种到Transwell小室中,分析miR-365-3p、miR-19a-3p和miR-19-3p对雪旺细胞迁移的影响。结果如图2、图3所示,与对照组相比,miR-365-3p mimics组、miR-19a-3p mimics组和miR-19-3p mimics组的雪旺细胞表现出了更强的迁移能力,组间比较P<0.05,有统计学意义。

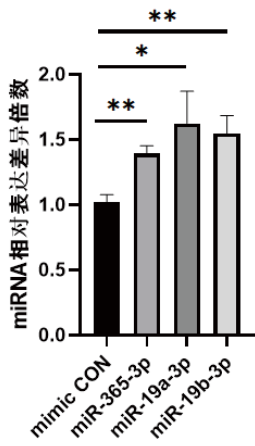


图 1 miRNA 的表达水平

库对 miR-365-3p、miR-19a-3p 和 miR-19-3p 的靶基因进行预测，因三个数据库的靶基因预测原理不同，最后取三个数据库的交集作为靶基因的最终预测结果可以获得更高的准确率并制作韦恩图。如图 4 所示，三个数据库基因取交集后 miR-365-3p、miR-19a-3p 和 miR-19b-3p 靶基因个数分别为 69、78、15。

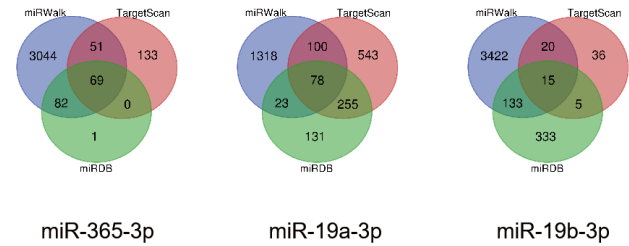


图 4 预测靶基因的韦恩图

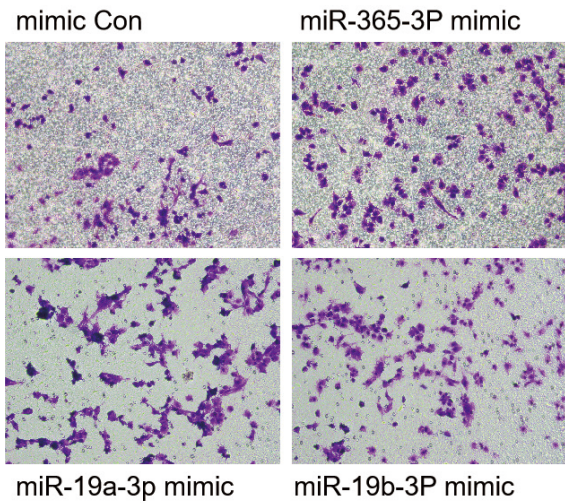


图 2 细胞迁移数代表图

5 讨论

周围神经损伤是常见临床疾病。随着外科显微缝合技术的发展，临床治疗效果取得了一定的进步，但是并不理想，尤其是神经的功能恢复。电刺激已经用于临床治疗神经损伤的修复，但其促进周围神经损伤修复的机制研究较少。miRNA 是一种长度为 20~22 的小分子非编码 RNA。在人体内的作用极为广泛，调控免疫反应、发育、炎症反应、细胞衰老、细胞凋亡等病理生理过程。在周围神经损伤后 miRNA 表达发生变化并参与雪旺细胞的迁移、增殖、凋亡和髓鞘的形成。雪旺细胞 (Schwann cell, SCs) 是周围神经的胶质细胞，参与周围神经再生的各个方面。周围神经损伤修复取决于雪旺细胞的再生能力，此点已达成共识。本研究表明，电刺激治疗坐骨神经损伤可以升高 miR-365-3p、miR-19a-3p 和 miR-19-3p 的表达，将其转染进雪旺细胞促进雪旺细胞的迁移。

miRNA 虽然没有编码蛋白质的功能，但其可通过碱基互补的方式与靶基因结合，影响靶蛋白表达，进而发挥广泛的生物学作用。本研究运用 TargetScan、miRWalk、miRDB 三个数据库对 miR-365-3p、miR-19a-3p 和 miR-19-3p 的靶基因进行预测，最后取三个数据库的交集作为靶基因的预测结果，分别预测到 69、78、15 个靶基因。蛋白质是细胞功能的重要体现者，miR-365-3p、miR-19a-3p 和 miR-19-3p 促进雪旺细胞的迁移可能是其中某个基因编码蛋白质执行的，有待通过挽救实验和双荧光素酶报告基因实验进一步验证。

参考文献

- [1] Wang Z Z, Sakiyama-Elbert S E. Matrices, scaffolds & carriers for cell delivery in nerve regeneration[J]. Experimental Neurology, 2019(319):112837.
- [2] Jones S, Eisenberg H M, Jia X. Advances and Future Applications of Augmented Peripheral Nerve Regeneration[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016,17(9):1494.

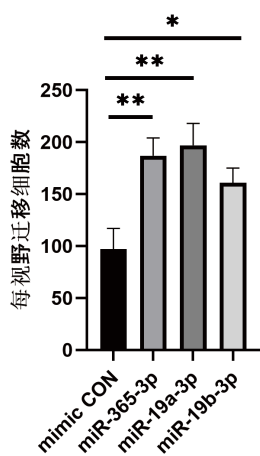


图 3 细胞迁移统计

③数据库预测靶基因。

由于 miRNAs 是通过调控靶基因的表达发挥生物学功能，因此识别 miR-365-3p、miR-19a-3p 和 miR-19b-3p 的靶标十分重要。运用 TargetScan、miRWalk、miRDB 三个数据

- [3] Boerboom A, Dion V, Chariot A, et al. Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2017(10):38.
- [4] Carr M J, Johnston A P. Schwann cells as drivers of tissue repair and regeneration[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2017(47):52-57.
- [5] Jessen K R, Arthur-Farraj P. Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves[J]. *Glia*, 2019, 67(3):421-437.
- [6] Arthur-Farraj P J, Latouche M, Wilton D K, et al. c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration[J]. *Neuron*, 2012,75(4):633-647.
- [7] Jacob C. Chromatin-remodeling enzymes in control of Schwann cell development, maintenance and plasticity[J]. *Current Opinion in Neurobiology*, 2017(47):24-30.
- [8] Gomez-Sanchez J A, Carty L, Iruarrizaga-Lejarreta M, et al. Schwann cell autophagy, myelinophagy, initiates myelin clearance from injured nerves[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2015,210(1):153-168.
- [9] Jessen K R, Mirsky R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves[J]. *The Journal of Physiology*, 2016,594(13):3521-3531.
- [10] Chen B, Chen Q, Parkinson D B, et al. Analysis of Schwann Cell Migration and Axon Regeneration Following Nerve Injury in the Sciatic Nerve Bridge[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*,2019(12):308.
- [11] Dun X P, Parkinson D B. Classic axon guidance molecules control correct nerve bridge tissue formation and precise axon regeneration[J]. *Neural Regeneration Research*,2020,15(1):6-9.
- [12] Dun X P, Carr L, Woodley P K, et al. Macrophage-Derived Slit3 Controls Cell Migration and Axon Pathfinding in the Peripheral Nerve Bridge[J]. *Cell Reports*, 2019,26(6):1458-1472.
- [13] Geremia N M, Gordon T, Brushart T M, et al. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression[J]. *Experimental Neurology*, 2007,205(2):347-359.
- [14] Gordon T, Amirjani N, Edwards D C, et al. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle regeneration without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients[J]. *Experimental Neurology*, 2010,223(1):192-202.
- [15] 杜玉青,刘亚莉,李友山,等.三七、黄芪总皂苷联合骨髓干细胞移植对糖尿病溃疡miRNA-146a的影响[J].*世界中医药*,2020,15(19):2882-2887.
- [16] 赵庭琪,薛秋爽,董姝妍,等.MicroRNA对周围神经损伤施万细胞调控的研究进展[J].*牡丹江医学院学报*,2019,40(5):127-129.
- [17] 田冲.电刺激诱导的microRNA对周围神经损伤修复的影响[D].承德:承德医学院,2021.