

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.02.006
文章编号: 1005-8982 (2023) 02-0035-08

实验研究·论著

MicroRNA-155/Nrf2对体外培养雪旺细胞增殖和迁移的影响及作用机制*

赵飞¹, 姚忠军¹, 曹洪², 朱必涛¹, 张弥³

(1. 湖北医药学院附属太和医院 骨2科, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院附属人民医院 创伤骨科, 湖北 十堰 442000; 3. 湖北医药学院附属太和医院 皮肤科, 湖北 十堰 442000)

摘要: **目的** 探讨microRNA-155 (miR-155) /Nrf2对雪旺细胞增殖和迁移的影响及作用机制, 为坐骨神经慢性卡压损伤等临床诊断和治疗策略提供科学依据。**方法** 将大鼠雪旺细胞(RSC96)作为研究对象, 转染miR-155 mimics、miR-155 inhibitor、si-Nrf2及其阴性对照质粒(miR-NC、inhibitor NC、si-NC)。为验证miR-155过表达/抑制质粒转染效果, 探究miR-155对雪旺细胞增殖、迁移的影响, 将细胞分为inhibitor NC组(细胞转染inhibitor NC质粒)、miR-155 inhibitor组(细胞转染miR-155 inhibitor质粒)、miR-NC组(细胞转染miR-NC质粒)、miR-155 mimics组(细胞转染miR-155 mimics质粒)。为了验证Nrf2沉默效果, 将细胞分为si-NC组(细胞转染si-NC质粒)、si-Nrf2(1)组[细胞转染si-Nrf2(1)质粒]、si-Nrf2(2)组[细胞转染si-Nrf2(2)质粒]。为证实靶向Nrf2可实现miR-155对细胞增殖、迁移的影响和Nrf2、Ngf、Laminin mRNA相对表达量的调控作用, 拟抑制miR-155表达的同时选取Nrf2沉默效果较好的质粒(si-Nrf2)转染细胞行挽救实验, 探讨miR-155的作用是否会部分逆转, 将细胞分为miR-155 inhibitor+si-NC组(细胞转染miR-155 inhibitor和si-NC质粒)、miR-155 inhibitor+si-Nrf2组(细胞转染miR-155 inhibitor和si-Nrf2质粒)。通过CCK-8法检测miR-155对细胞增殖的影响, Transwell实验检测细胞迁移情况, 实时荧光定量聚合酶链反应检测miR-155、神经生长因子(Ngf)、层粘连蛋白(Laminin)和核因子E2相关因子2(Nrf2)的基因水平, Western blotting检测Nrf2蛋白表达, 双荧光素酶报告实验验证miR-155与Nrf2的结合关系。**结果** miR-155 inhibitor组miR-155相对表达量较inhibitor NC组降低($P < 0.05$), miR-155 mimics组较miR-NC组升高($P < 0.05$)。inhibitor NC组、miR-155 inhibitor组、miR-NC组、miR-155 mimics组0 h、24 h、48 h、72 h的吸光度值比较, 经重复测量设计的方差分析, 结果显示: ①不同时间点的细胞增殖有差异($P < 0.05$); ②各组细胞增殖有差异($P < 0.05$); ③细胞增殖的变化趋势有差异($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor组细胞迁移数较inhibitor NC组减少($P < 0.05$), miR-155 mimics组较miR-NC组增加($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor组Ngf、Laminin mRNA相对表达量较inhibitor NC组高($P < 0.05$), miR-155 mimics组较miR-NC组低($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor组Nrf2 mRNA和蛋白相对表达量较inhibitor NC组升高($P < 0.05$), miR-155 mimics组较miR-NC组降低($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor野生型Nrf2细胞荧光素酶活性较inhibitor NC组升高($P < 0.05$), miR-155 mimics组较miR-NC组降低($P < 0.05$)。si-Nrf2(1)组和si-Nrf2(2)组沉默效果验证实验中Nrf2 mRNA相对表达量较si-NC组降低($P < 0.05$), 且si-Nrf2(2)组效果更好。miR-155 inhibitor组挽救实验中Nrf2 mRNA相对表达量较inhibitor NC组高($P < 0.05$), miR-155 inhibitor+si-Nrf2组较miR-155 inhibitor+si-NC组低($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor组挽救实验中细胞吸光度值较inhibitor NC组高($P < 0.05$), miR-155 inhibitor+si-Nrf2组较miR-155 inhibitor+si-NC组低($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor组挽救实验中细胞迁移数量较inhibitor NC组增加($P < 0.05$), miR-155 inhibitor+si-Nrf2组较miR-155 inhibitor+si-NC组减少($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor组挽救实验中Ngf、Laminin mRNA相对表达量较inhibitor NC组高($P < 0.05$), miR-155 inhibitor+si-Nrf2组较miR-155 inhibitor+si-NC组低($P < 0.05$)。**结论** miR-155通过调控Nrf2通路活化, 抑制雪旺细胞的增殖和迁移。

关键词: 坐骨神经慢性卡压损伤; 雪旺细胞; miR-155; Nrf2; 增殖和迁移

中图分类号: R745.42

文献标识码: A

收稿日期: 2021-11-10

*基金项目: 湖北省自然科学基金面上项目(No:2018CFB524); 湖北医药学院附属太和医院院级项目[No: 十太医办发(2021)43号]
[通信作者] 张弥, E-mail: zhangmi9066@163.com

Effects and mechanism of microRNA-155/Nrf2 on proliferation and migration of Schwann cells *in vitro**

Zhao Fei¹, Yao Zhong-jun¹, Cao Hong², Zhu Bi-tao¹, Zhang Mi³

(1. Department of Orthopedics, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Department of Orthopedics and Traumatology, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Department of Dermatology, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of microRNA-155 (miR-155)/Nrf2 on proliferation and migration of Schwann cells and its underlying mechanisms, thus providing evidence for clinical diagnosis and treatment of chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Methods** Rat Schwann cells (RSC96) were used for this study and were transfected with miR-155 mimics/inhibitor, si-Nrf2 and their control plasmids (miR-NC, inhibitor NC and si-NC). To testify the efficacy of miR-155 overexpression and inhibition plasmids and the effects of miR-155 on the proliferation and migration of Schwann cells, the cells were divided into inhibitor NC group, miR-155 inhibitor group, miR-NC group and miR-155 mimics group. To determine the efficacy of Nrf2 silencing, the cells were divided into si-NC group, si-Nrf2(1) group and si-Nrf2(2) group. To confirm the effects of miR-155 on cell proliferation and migration and the regulation of the relative mRNA expressions of Nrf2, Ngf, and Laminin by targeting Nrf2, rescue experiment was performed with si-Nrf2 with better silencing efficacy while inhibiting the expression of miR-155. To investigate whether the effects of miR-155 was reversible, the cells were divided into miR-155 inhibitor + si-NC group and miR-155 inhibitor + si-Nrf2 group. CCK-8 assay was utilized to detect the effect of miR-155 on cell proliferation, while the transwell assay was used to assess cell migration. qRT-PCR was performed to measure the levels of miR-155, Ngf, Laminin and Nrf2. The protein expression of Nrf2 was determined via Western blotting. Dual-luciferase reporter assay was performed to verify the interaction between miR-155 and Nrf2. **Results** The relative expression of miR-155 in miR-155 inhibitor group was relatively lower than that in inhibitor NC group ($P < 0.05$), while that in miR-155 mimics group was higher compared with the miR-NC group ($P < 0.05$). The optical density in the inhibitor NC group, miR-155 inhibitor group, miR-NC group and miR-155 mimics group at 0 h, 24 h, 48 h and 72 h was compared via repeated measures ANOVA. The results revealed that cell proliferation was different among the time points ($P < 0.05$) and between the transfection groups and according negative control groups ($P < 0.05$), and that the change trends of cell proliferation were also different among the groups ($P < 0.05$). The cell migration in the miR-155 inhibitor group was decreased compared with the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while that was increased in the miR-155 mimics group compared with the miR-NC group ($P < 0.05$). The relative mRNA expressions of Ngf and Laminin in the miR-155 inhibitor group were higher than those in the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while they were lower in the miR-155 mimics group than in miR-NC group ($P < 0.05$). The relative mRNA and protein expression of Nrf2 in the miR-155 inhibitor group were higher than those in the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while they were lower in the miR-155 mimics group than in miR-NC group ($P < 0.05$). The luciferase activity in the miR-155 inhibitor group was higher than that in the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while that in the miR-155 mimics group was lower than that in the miR-NC group ($P < 0.05$). The decreases in the relative mRNA expression of Nrf2 in the si-Nrf2(1) group and si-Nrf2(2) group indicated the success in silencing Nrf2 ($P < 0.05$), and the silencing effect of si-Nrf2(2) was better. In the rescue experiments, the relative mRNA expression Nrf2 in the miR-155 inhibitor was higher than that in the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while that in the miR-155 inhibitor + si-Nrf2 group was lower than that in the miR-155 inhibitor + si-NC group ($P < 0.05$). The optical density in the miR-155 inhibitor group was higher than that in the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while that in the miR-155 inhibitor + si-Nrf2 group was lower than that in the miR-155 inhibitor + si-NC group ($P < 0.05$). The cell migration in the miR-155 inhibitor group was increased compared with the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while that in the miR-155 inhibitor + si-Nrf2 group was decreased compared with the miR-155 inhibitor + si-NC group ($P < 0.05$). In addition, the relative mRNA expressions of Ngf and Laminin in the miR-155 inhibitor group were higher than those in the inhibitor NC group ($P < 0.05$), while those in the miR-155 inhibitor + si-Nrf2 group were

lower than those in the miR-155 inhibitor + si-NC group ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-155 inhibits the proliferation and migration of Schwann cells by regulating the activation of Nrf2 pathway.

Keywords: chronic constriction injury of the sciatic nerve; Schwann cell; miR-155; Nrf2; proliferation and migration

坐骨神经慢性卡压损伤是临床上较常见的周围神经损伤,易致组织破坏和痛觉过敏^[1-2]。研究发现,雪旺细胞是周围神经系统中特有的胶质细胞,在周围神经损伤后促进神经自发再生^[3-5]。神经生长因子可促进神经再生,但该因子在临床应用上受到限制^[6]。因此,迫切需要寻找新的方法保护雪旺细胞并提高其增殖、迁移等功能,促进神经再生,对治疗坐骨神经慢性卡压损伤等周围神经损伤具有重要意义。miRNA是一类小的内源性非编码RNA,在周围神经损伤后表达失调,并影响雪旺细胞表型^[7-8]。有研究显示,miR-155在坐骨神经慢性卡压损伤大鼠中高表达,抑制其表达可缓解神经损伤引起的痛感和炎症反应^[9-10]。然而,miR-155在雪旺细胞中的功能与机制尚不明确。生物信息学在线工具starBase预测发现核因子E2相关因子2(Nrf2)可能是miR-155的下游靶标,Nrf2与细胞的增殖、迁移密切相关。神经生长因子(Ngf)、层粘连蛋白(Laminin)是介导细胞增殖和迁移的关键成分,但miR-155是否靶向Nrf2调控Ngf和Laminin表达,介导雪旺细胞增殖、迁移仍不清楚。故本研究以体外培养的雪旺细胞作为研究对象,进一步探讨miR-155对雪旺细胞增殖、迁移的调控作用与潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞和材料

大鼠雪旺细胞(RSC96,中国科学院细胞库),DMEM培养基、胎牛血清(美国Gibco公司),RNA提取试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒、逆转录试剂盒(北京全式金生物工程技术有限公司),CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),miR-155 mimics、miR-155 inhibitor、小干扰RNA Nrf2 [si-Nrf2、si-Nrf2(1)、si-Nrf2(2)](苏州吉诺瑞生物科技有限公司),Lipofectamine 3000细胞转染试剂(美国Invitrogen公司),蛋白酶抑制剂混合液、RIPA细胞裂解液(湖南艾佳生物科技股份有限公司),

ECL发光试剂盒(江苏凯基生物技术有限公司),兔抗Nrf2抗体(1:1000,武汉博士德生物工程有限公司),TransZol™ UP试剂(北京全式金生物技术有限公司),PVDF膜(美国Millipore公司),pmirGLO载体(上海生工生物工程股份有限公司),倒置相差显微镜(日本Olympus公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将大鼠雪旺细胞RSC96置于含10%胎牛血清的DMEM培养基培养,在条件为37℃、5%二氧化碳的培养箱中培养,每2天换液1次。细胞达到80%融合,传代培养。为验证miR-155过表达/抑制质粒转染效果,探究miR-155对雪旺细胞增殖、迁移的影响,将细胞分为inhibitor NC组(细胞转染inhibitor NC质粒)、miR-155 inhibitor组(细胞转染miR-155 inhibitor质粒)、miR-NC组(细胞转染miR-NC质粒)、miR-155 mimics组(细胞转染miR-155 mimics质粒)。为了验证Nrf2沉默效果,将细胞分为si-NC组(细胞转染si-NC质粒)、si-Nrf2(1)组[细胞转染si-Nrf2(1)质粒]、si-Nrf2(2)组[细胞转染si-Nrf2(2)质粒]。为证实靶向Nrf2可实现miR-155对细胞增殖、迁移的影响和Nrf2、Ngf、Laminin mRNA相对表达量的调控作用,拟抑制miR-155表达的同时选取Nrf2沉默效果较好的质粒(si-Nrf2)转染细胞行挽救实验,探讨miR-155的作用是否会部分逆转,将细胞分为miR-155 inhibitor+si-NC组(细胞转染miR-155 inhibitor和si-NC质粒)、miR-155 inhibitor+si-Nrf2组(细胞转染miR-155 inhibitor和si-Nrf2质粒)。探究miR-155对细胞增殖、迁移的作用以及miR-155靶向Nrf2,要想证实miR-155是通过调控Nrf2发挥其作用,需要做挽救实验。

1.2.2 细胞转染 取对数生长期、生长状态良好的雪旺细胞,按照 2.5×10^5 个/孔的密度接种于6孔板中,培养24 h。细胞达到60%~80%融合后,换成无血清培养基培养。根据Lipofectamine 3000转染试剂说明书要求,取2 μL Lipofectamine 3000加入198 μL无血清培养基,混匀,静置5 min获得Lipofectamine 3000稀释液。将miR-155 mimics(50 nmol/L)、miR-155

inhibitor (50 nmoL)、si-Nrf2 (1) (100 nmoL) 和 si-Nrf2 (2) (100 nmoL) 及阴性对照质粒 (miR-NC、inhibitor NC、si-NC) 分别加入 200 μ L 无血清培养基中, 混匀, 获得质粒稀释液。然后, 将上述两种稀释液混合, 静置 15 min 后取 100 μ L 加入到含 1 mL 无血清培养基的细胞中, 混匀, 于培养箱中孵育 6 h, 更换正常培养基培养 24 h 用于后续实验。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞, 以 3 000 个/孔的密度接种至 96 孔板中, inhibitor NC 组、miR-155 inhibitor 组、miR-NC 组、miR-155 mimics 组均转染相应质粒, 细胞培养 24 h、48 h、72 h; inhibitor NC 组、miR-155 inhibitor 组、miR-155 inhibitor+si-NC 组、miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组转染相应质粒, 均培养 48 h。然后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 孵育 2 h, 测定 450 nm 波长吸光度值。每组设置 3 个复孔, 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞迁移 Transwell 小室下室加入 600 μ L 含 10% 血清的培养基, 取相应处理组细胞悬液 150 μ L 加入 Transwell 小室中, 3×10^4 个细胞/孔, 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中培养 24 h。然后取出 Transwell 小室, 弃掉每孔中的培养液、用无钙的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2 遍, 4% 多聚甲醛固定 30 min。用 0.1% 结晶紫染色 20 min 后, 使用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞。使用 PBS 洗涤 3 遍, 于显微镜 ($\times 100$) 下拍照, 并用 Image J 软件分析。

1.2.5 qRT-PCR 测定 mRNA 表达 将按分组处理好的雪旺细胞 (1×10^5 个/孔) 接种于 24 孔板中, 培养 24 h。细胞转染处理后加入预冷的 PBS 润洗 2 次, 吸弃 PBS, 每孔加入 1 mL 的 TransZolTM UP 试剂提取总 RNA, 并以 RNA 作为模板使用逆转录试剂盒获得 cDNA, 反应体系: RNA 1 μ L, Oligo(dT) 1 μ L, Reaction Mix 10 μ L, Enzyme Mix 1 μ L, RNase-free Water 7 μ L, 42 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 85 $^{\circ}$ C 加热 5 s。然后, 以此 cDNA 为模板参照引物序列进行 qRT-PCR 扩增, 扩增体系: Green qPCR Supermix 10 μ L, 正向引物 0.4 μ L, 反向引物 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, Nuclease-free Water 8.2 μ L; 反应体系: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量, 将 U6 作为 miR-155 内参, GAPDH 作为其他基因内参。基因引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
GAPDH	正向: 5'-GCAAGTCAACGGCAG-3'	18
	反向: 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'	20
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	17
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20
miR-155	正向: 5'-GGCCCTTTAATGCTAATCGTGA-3'	22
	反向: 5'-GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGGCACCAGAGGAGACACCCCT-3'	50
Nrf2	正向: 5'-CCCTCAGCATGATGGACTTGG-3'	21
	反向: 5'-GGGAGGAATTTCTCCGGTCTC-3'	20
Ngf	正向: 5'-CATCGCTCTCCTTCACAGATT-3'	22
	反向: 5'-ATTACGCTATGCACCTCAGAGT-3'	22
Laminin	正向: 5'-GCCGAAAGGAAGACACGAA-3'	20
	反向: 5'-GTGCCCCATAGGGCTAGGA-3'	19

1.2.6 Western blotting 测定蛋白表达 将按分组处理好的雪旺细胞 (3×10^6 个/mL) 接种于 6 孔板中并培养过夜。细胞转染质粒后, 预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 提取雪旺细胞总蛋白, 测定每组蛋白样品浓度。取 5 μ L 蛋白预染 Marker 和 30 μ g 蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转至 PVDF 膜。转膜后封闭 1 h, 剪下 Marker 目的条带和内参条带所在区域的膜。将膜放入相应的一抗稀释液中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后再结合二抗 1 h。最后, 使用 ECL 化学发光液于多功能凝胶成像系统进行曝光成像, 其中 Actin 作为内参。

1.2.7 双荧光素酶报告实验测量荧光素酶活性 分别将 Nrf2 的 3'-UTR 全长和 Nrf2 突变体克隆到 pmirGLO 载体中, 获得野生型 Nrf2 和突变型 Nrf2 报告载体。将细胞以 1×10^5 个/孔的密度接种于 24 孔板中, 并通过 lipofectamine 3000 将报告载体和 miR-155 mimics、miR-155 inhibitor 或阴性对照 miR-NC、inhibitor NC 共转染细胞。转染 48 h 后, 收集各组细胞, 通过荧光素酶报告实验测定荧光素酶活性以评估 miR-155 与 Nrf2 的关系。

1.3 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 8 和 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 Tukey post hoc test 法。P < 0.05 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 各组 miR-155 相对表达量比较

inhibitor NC 组 miR-155 相对表达量为 (1.00 ± 0.08) 、miR-155 inhibitor 组为 (0.29 ± 0.04) 、miR-NC 组为 (1.00 ± 0.14) 、miR-155 mimics 组为 (2.63 ± 0.18) ,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 188.200, P = 0.000$)。miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组降低,miR-155 mimics 组较 miR-NC 组升高,表明转染成功。

2.2 各组不同时间点吸光度值比较

inhibitor NC 组、miR-155 inhibitor 组、miR-NC 组、miR-155 mimics 组 0 h、24 h、48 h、72 h 的吸光度值比较,经重复测量设计的方差分析,结果显示:①不同时间点间的细胞增殖有差异 ($F = 554.000, P = 0.000$);②各组细胞增殖有差异 ($F = 147.500, P = 0.000$);③细胞增殖的变化趋势有差异 ($F = 32.100, P = 0.000$)。见表 2 和图 1。

表 2 各组不同时间点吸光度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	24 h	48 h	72 h
inhibitor NC 组	0.23 ± 0.03	0.40 ± 0.02	0.55 ± 0.05	0.89 ± 0.04
miR-155 inhibitor 组	0.22 ± 0.04	0.54 ± 0.03	0.84 ± 0.06	1.07 ± 0.05
miR-NC 组	0.23 ± 0.02	0.40 ± 0.04	0.59 ± 0.03	0.84 ± 0.03
miR-155 mimics 组	0.25 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.46 ± 0.06

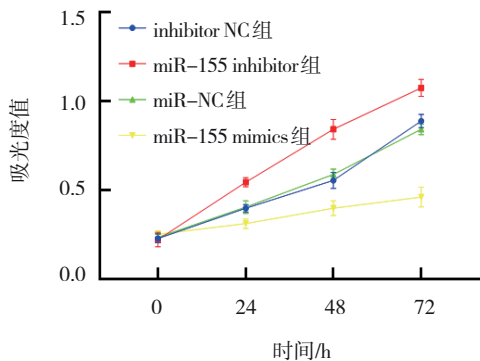


图 1 各组不同时间点吸光度值的变化趋势 ($\bar{x} \pm s$)

2.3 各组细胞迁移数比较

miR-NC 组细胞迁移数为 (278 ± 9) 个/视野、miR-155 mimics 组为 (523 ± 5) 个/视野、inhibitor NC 组为 (274 ± 21) 个/视野、miR-155 inhibitor 组为 $(153 \pm$

$14)$ 个/视野,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($F = 394.300, P = 0.000$)。miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组减少,miR-155 mimics 组较 miR-NC 组增加。表明 miR-155 抑制雪旺细胞迁移。见图 2。

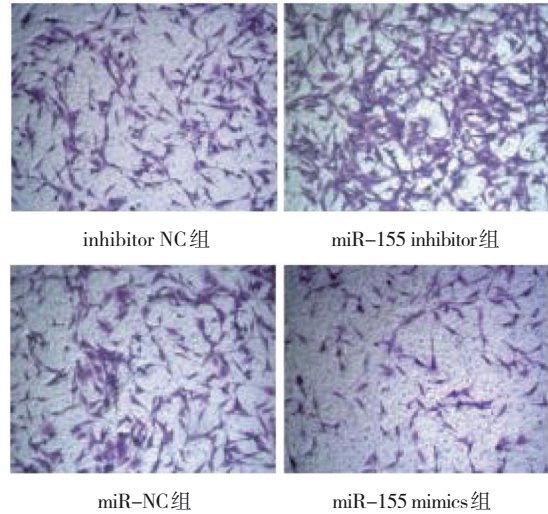


图 2 miR-155 抑制雪旺细胞迁移 ($\times 100$)

2.4 各组 Ngf、Laminin mRNA 相对表达量比较

各组 Ngf、Laminin mRNA 相对表达量比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组高,miR-155 mimics 组较 miR-NC 组低。表明 miR-155 抑制 Ngf、Laminin mRNA 相对表达。见表 3。

表 3 各组 Ngf、Laminin mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Ngf mRNA	Laminin mRNA
inhibitor NC 组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.09
miR-155 inhibitor 组	2.01 ± 0.16	2.21 ± 0.14
miR-NC 组	0.99 ± 0.14	1.00 ± 0.12
miR-155 mimics 组	0.51 ± 0.07	0.52 ± 0.07
F 值	78.450	134.300
P 值	0.000	0.000

2.5 各组 Nrf2 mRNA、蛋白相对表达量比较

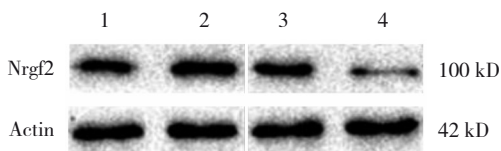
各组 Nrf2 mRNA、蛋白相对表达量比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组升高,miR-155 mimics 组较 miR-NC 组降低。见表 4、图 3。

2.6 Nrf2 与 miR-155 的关系

在线生物信息学工具 starBase 预测发现,miR-155 与 Nrf2 存在潜在结合位点,并构建了突变序列

表 4 各组 Nrf2 mRNA、蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2 mRNA	Nrf2 蛋白
inhibitor NC 组	1.00 ± 0.08	0.63 ± 0.10
miR-155 inhibitor 组	1.78 ± 0.13	0.95 ± 0.08
miR-NC 组	1.00 ± 0.07	0.69 ± 0.09
miR-155 mimics 组	0.51 ± 0.06	0.36 ± 0.08
F 值	105.800	24.500
P 值	0.000	0.000



1: inhibitor NC 组; 2: miR-155 inhibitor 组; 3: miR-NC 组; 4: miR-155 mimics 组。

图 3 各组 Nrf2 蛋白水平比较

(见图 4)。各组野生型 Nrf2 细胞荧光素酶活性比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组升高, miR-155 mimics 组较 miR-NC 组降低。各组突变型 Nrf2 细胞的荧光素酶活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明, miR-155 与 Nrf2 存在靶向关系。见表 5。



图 4 miR-155 与 Nrf2 的结合位点的预测结果

表 5 各组荧光素酶相对活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	野生型 Nrf2 细胞	突变型 Nrf2 细胞
inhibitor NC 组	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.08
miR-155 inhibitor 组	2.21 ± 0.23	0.94 ± 0.05
miR-NC 组	0.96 ± 0.12	0.99 ± 0.14
miR-155 mimics 组	0.44 ± 0.07	1.03 ± 0.15
F 值	80.640	0.376
P 值	0.000	0.773

2.7 沉默效果验证实验中各组 Nrf2 mRNA 相对表达量比较

沉默效果验证实验中 si-NC 组 Nrf2 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.07)、si-Nrf2 (1) 组为 (0.46 ± 0.07)、si-Nrf2 (2) 组为 (0.34 ± 0.09), 经单因素方差

分析, 差异有统计学意义 ($F = 47.140, P = 0.000$), si-Nrf2 (1) 组和 si-Nrf2 (2) 组较 si-NC 组降低, 且 si-Nrf2 (2) 组效果更好。

2.8 挽救实验中各组 Nrf2 mRNA 相对表达量比较

挽救实验中各组 Nrf2 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.14)、miR-155 inhibitor 组为 (1.97 ± 0.12)、miR-155 inhibitor+si-NC 组为 (1.89 ± 0.10)、miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组为 (1.23 ± 0.08), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 55.410, P = 0.000$), miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组高, miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组较 miR-155 inhibitor+si-NC 组低。表明 si-Nrf2 可部分逆转 miR-155 inhibitor 对 Nrf2 表达的调控。

2.9 挽救实验中各组细胞吸光度值比较

挽救实验中 inhibitor NC 组细胞吸光度值为 (0.40 ± 0.05)、miR-155 inhibitor 组为 (0.80 ± 0.06)、miR-155 inhibitor+si-NC 组为 (0.85 ± 0.06)、miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组为 (0.52 ± 0.06), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 44.370, P = 0.000$), miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组高, miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组较 miR-155 inhibitor+si-NC 组低。表明 si-Nrf2 可部分逆转 miR-155 inhibitor 对雪旺细胞增殖的调控。

2.10 挽救实验中各组细胞迁移数量比较

挽救实验中 inhibitor NC 组细胞迁移数量为 (262 ± 19) 个/视野、miR-155 inhibitor 组为 (493 ± 28) 个/视野、miR-155 inhibitor+si-NC 组为 (487 ± 23) 个/视野、miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组为 (304 ± 37) 个/视野, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 57.160, P = 0.000$), miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组增加, miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组较 miR-155 inhibitor+si-NC 组减少。表明 si-Nrf2 可部分逆转 miR-155 inhibitor 对雪旺细胞迁移的调控。

2.11 挽救实验中各组 Ngf、Laminin mRNA 相对表达量比较

挽救实验中各组 Ngf、Laminin mRNA 相对表达量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), miR-155 inhibitor 组较 inhibitor NC 组高, miR-155 inhibitor+si-Nrf2 组较 miR-155 inhibitor+si-NC 组低。表明 si-Nrf2 可部分逆转 miR-155 inhibitor 对 Ngf、Laminin mRNA 相对表达量的调控。见表 6。

表6 挽救实验中各组Ngf、Laminin mRNA相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Nrf2 mRNA	Laminin mRNA
inhibitor NC组	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.16
miR-155 inhibitor组	2.06 ± 0.17	2.49 ± 0.14
miR-155 inhibitor +si-NC组	2.15 ± 0.14	2.36 ± 0.14
miR-155 inhibitor +si-Nrf2组	1.35 ± 0.08	1.32 ± 0.14
F值	37.410	79.820
P值	0.000	0.000

3 讨论

近年来,miRNAs的研究引起了人们的关注,旨在为神经再生提供更深入的机制研究和可靠的生物靶点。越来越多的研究发现,miRNAs在神经发育和神经再生过程中调节各种复杂的细胞行为和生物活性^[11-12]。有证据显示,抑制miR-155可以减轻糖尿病周围神经病变的坐骨神经损伤,突显了作为神经损伤治疗靶点的潜力^[13]。这也提示,miR-155可能参与了周围神经再生和修复的过程。

雪旺细胞是外周神经系统中独特的胶质细胞,其主要参与建立周围神经再生的有利微环境。周围神经损伤后,雪旺细胞发生如去分化、增殖、迁移和髓鞘形成等一系列表型的改变^[14-16]。在这些表型中,增殖和迁移能力对雪旺细胞的自发再生和神经损伤部位的修复具有重要意义^[17]。雪旺细胞在周围神经损伤后期能沿受损轴突迁移,促进轴突长距离再生^[18]。因此,增加雪旺细胞数量和提升雪旺细胞迁移能力是损伤治疗的主要任务。近年来的研究表明,MiR-3099促进雪旺细胞增殖和迁移^[19];miR-148b通过调控其靶基因的表达影响雪旺细胞的增殖与迁移能力^[20]。尽管已有研究初探了miR-155在神经损伤中的作用,但miR-155是否是雪旺细胞增殖和迁移的关键分子尚不清楚。本研究首次证实了miR-155对雪旺细胞增殖和迁移调控作用,抑制miR-155的表达可促进雪旺细胞增殖、迁移。

Ngf是神经细胞生长、维持和存活的重要蛋白质,也是神经元存活途径中的关键信号分子^[21]。层黏连蛋白Laminin是基底膜的重要组成部分,支持细胞的分化、迁移、黏附、表型和存活。实验发现,雪旺细胞转染miR-155 inhibitor后Ngf和Laminin表达水平显著升高,而转染miR-155 mimics的细胞Ngf和

Laminin表达水平显著降低。这些证据表明,miR-155调控雪旺细胞增殖可能是通过影响Ngf和Laminin表达介导的。

已有文献报道,在损伤的周围神经中Nrf2通路失活,且过表达Nrf2能够促进周围神经损伤后雪旺细胞介导的功能修复^[22-23]。也有文献报道,Nrf2参与调控细胞的增殖和迁移^[24]。在本研究中,miR-155过表达明显抑制Nrf2的表达,而抑制miR-155显著促进Nrf2的表达,且沉默Nrf2能部分逆转miR-155 inhibitor对雪旺细胞增殖和迁移的调控作用。这些结果提示,miR-155靶向调控Nrf2通路的活化,影响雪旺细胞功能。

综上所述,抑制miR-155可能通过激活Nrf2通路,上调Ngf、Laminin的表达,促进雪旺细胞的增殖和迁移。本研究将有助于加深对非编码RNA在周围神经修复和再生中的生物学功能的理解,并为坐骨神经慢性卡压损伤等临床诊断和治疗策略提供科学依据。

参 考 文 献 :

- [1] 黎琴文,梁杰,王冬梅,等.坐骨神经慢性卡压损伤模型大鼠背根神经节纤维化改变[J].中国组织工程研究,2020,24(29):4686-4691.
- [2] XU L H, LIU Y B, SUN Y H, et al. Analgesic effects of TLR4/NF- κ B signaling pathway inhibition on chronic neuropathic pain in rats following chronic constriction injury of the sciatic nerve[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 107: 526-533.
- [3] CHEN J, REN S, DUSCHER D, et al. Exosomes from human adipose-derived stem cells promote sciatic nerve regeneration via optimizing Schwann cell function[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(12): 23097-23110.
- [4] JIANG X W, WANG Y, ZHANG B Q, et al. Acetyl-11-keto- β -boswellic acid regulates the repair of rat sciatic nerve injury by promoting the proliferation of Schwann cells[J]. Life Sci, 2020, 254: 116887.
- [5] 段晓英,杜珍武,丁宏,等.金雀异黄素对大鼠雪旺细胞生长与凋亡影响的体外研究[J].中国老年学杂志,2021,41(17):3762-3765.
- [6] MANNI L, ROCCO M L, BIANCHI P, et al. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications[J]. Growth Factors, 2013, 31(4): 115-122.
- [7] LIN Y F, JIANG X, YIN G, et al. Syringic acid promotes proliferation and migration of Schwann cells via down-regulating miR-451-5p[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2019, 51(12): 1198-1207.
- [8] ZOU D X, ZHOU X B, LIU J Q, et al. MiR-34a regulates

- Schwann cell proliferation and migration by targeting CNTN2[J]. *Neuroreport*, 2020, 31(17): 1180-1188.
- [9] LIU S X, ZHU B, SUN Y, et al. MiR-155 modulates the progression of neuropathic pain through targeting SGK3[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11): 14374-14382.
- [10] 赵飞, 张弥, 姚忠军, 等. miR-155 通过 Nrf2 通路调控 CCI 大鼠坐骨神经病理性疼痛和炎症反应[J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(10): 845-853.
- [11] CATTANE N, MORA C, LOPIZZO N, et al. Identification of a miRNAs signature associated with exposure to stress early in life and enhanced vulnerability for schizophrenia: new insights for the key role of miR-125b-1-3p in neurodevelopmental processes[J]. *Schizophr Res*, 2019, 205: 63-75.
- [12] ARTHUR-FARRAJ P J, MORGAN C C, ADAMOWICZ M, et al. Changes in the coding and non-coding transcriptome and DNA methylome that define the Schwann cell repair phenotype after nerve injury[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(11): 2719-2734.
- [13] CHEN J, LI C, LIU W J, et al. miRNA-155 silencing reduces sciatic nerve injury in diabetic peripheral neuropathy[J]. *J Mol Endocrinol*, 2019, 63(3): 227-238.
- [14] JESSEN K R, MIRSKY R. The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves[J]. *J Physiol*, 2016, 594(13): 3521-3531.
- [15] 姚阳, 车敏, 滕松龄, 等. miR-124 在大鼠坐骨神经损伤后的表达及对雪旺细胞增殖与迁移的影响[J]. *解剖科学进展*, 2020, 26(2): 158-161.
- [16] XIA W Z, ZHU J, WANG X Y, et al. ANXA1 directs Schwann cells proliferation and migration to accelerate nerve regeneration through the FPR2/AMPK pathway[J]. *FASEB J*, 2020, 34(10): 13993-14005.
- [17] YI S, LIU Q Y, WANG X H, et al. Tau modulates Schwann cell proliferation, migration and differentiation following peripheral nerve injury[J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(6): jcs222059.
- [18] HYUNG S, IM S K, LEE B Y, et al. Dedifferentiated Schwann cells secrete progranulin that enhances the survival and axon growth of motor neurons[J]. *Glia*, 2019, 67(2): 360-375.
- [19] LIU Q Y, MIAO Y, WANG X H, et al. Increased levels of miR-3099 induced by peripheral nerve injury promote Schwann cell proliferation and migration[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(3): 525-531.
- [20] ZHOU Z Y, ZHANG N, SHI P L, et al. Mechanism of miR-148b inhibiting cell proliferation and migration of Schwann cells by regulating CALR[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1978-1983.
- [21] RYDÉN M, HEMPSTEAD B, IBÁÑEZ C F. Differential modulation of neuron survival during development by nerve growth factor binding to the p75 neurotrophin receptor[J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(26): 16322-16328.
- [22] TANG W, CHEN X F, LIU H Q, et al. Expression of Nrf2 promotes Schwann cell-mediated sciatic nerve recovery in diabetic peripheral neuropathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(5): 1879-1894.
- [23] QIU J Y, YANG X M, WANG L B, et al. Isoquercitrin promotes peripheral nerve regeneration through inhibiting oxidative stress following sciatic crush injury in mice[J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7(22): 680.
- [24] HWANG A R, HAN J H, LIM J H, et al. Fluvastatin inhibits AGE-induced cell proliferation and migration via an ERK5-dependent Nrf2 pathway in vascular smooth muscle cells[J]. *PLoS One*, 2017, 12(5): e0178278.

(李科 编辑)

本文引用格式: 赵飞, 姚忠军, 曹洪, 等. MicroRNA-155/Nrf2 对体外培养雪旺细胞增殖和迁移的影响及作用机制[J]. *中国现代医学杂志*, 2023, 33(02): 35-42.

Cite this article as: ZHAO F, YAO Z J, CAO H, et al. Effects and mechanism of microRNA-155/Nrf2 on proliferation and migration of Schwann cells in vitro[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2023, 33(02): 35-42.