

· 基础研究 ·

调节青少年特发性脊柱侧凸患者椎旁肌改变的关键微RNA

张珂[△], 姜横[△], 孟怡辰, 周许辉*

海军军医大学附属长征医院骨科, 上海 200003

【摘要】目的 探寻调节青少年特发性脊柱侧凸(AIS)患者椎旁肌改变的关键微RNA(miRNA)。方法 对3例女性AIS患者凹侧与凸侧椎旁肌组织进行RNA高通量测序, 获得差异表达miRNA。使用27例AIS手术患者的椎旁肌组织采用实时荧光定量PCR法验证测序的质量和差异, 并将miRNA的相对差异表达量与患者临床参数进行相关性分析。结果 AIS患者凹侧与凸侧椎旁肌组织存在18个差异表达miRNA。实时荧光定量PCR法检测结果显示, miR-516、miR-517、miR-495的表达差异具有统计学意义($P < 0.05$)。两侧椎旁肌miR-516相对表达量差值与患者发病年龄呈负相关($r = -0.452$), miR-517相对表达量差值与侧凸Cobb角呈负相关($r = -0.378$)。结论 AIS患者两侧椎旁肌miR-516、miR-517、miR-495存在不对称表达, 其中miR-516、miR-517的不对称表达与发病年龄和侧凸角度相关。

【关键词】青少年; 脊柱侧凸; 微RNAs; 肌, 骨骼

【中图分类号】R 682.3 【文献标志码】A 【文章编号】1672-2957(2018)06-0354-04

【DOI】10.3969/j.issn.1672-2957.2018.06.008

Key microRNA for regulation of paraspinal muscles in patients with adolescent idiopathic scoliosis

ZHANG Ke[△], JIANG Heng[△], MENG Yi-chen, ZHOU Xu-hui*

Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Navy Medical University, Shanghai 200003, China

【Abstract】Objective To identify key microRNAs(miRNAs) for adolescent idiopathic scoliosis(AIS)-associated paravertebral muscle changes. Methods RNA high-throughput sequencing was performed on 3 pairs of paravertebral muscle tissues from 3 AIS patients to obtain differentially expressed miRNAs. Paravertebral muscle tissues of 27 AIS patients were used to verify the quality and difference of miRNAs by real-time fluorescence quantitative PCR. The correlation between the relative differential expression of miRNAs and clinical parameters was analyzed. Results There were 18 differentially expressed miRNAs were found between concave and convex paravertebral muscles in the 3 AIS patients. The results of real-time fluorescence quantitative PCR showed that there were significant differences in the expression of miR-516, miR-517 and miR-495 between 2 sides of the paravertebral muscles($P < 0.05$). Correlation test suggested that the difference of miR-516 expression between bilateral paraspinal muscles was negatively correlated with the age of onset($r = -0.452$), while the difference of miR-516 expression was negatively correlated with the Cobb's angle($r = -0.378$). Conclusion MiR-516, miR-517 and miR-495 would be asymmetric expression between 2 sides of paravertebral muscle in AIS patients, and the asymmetric expression of miR-516 and miR-517 might be correlated with age and Cobb's angle.

【Key Words】Adolescent; Scoliosis; MicroRNAs; Muscle, skeletal

J Spinal Surg, 2018, 16(6): 354-357

青少年特发性脊柱侧凸(AIS)是最常见的脊柱畸形, 其病因未明^[1]。椎旁肌的不平衡在AIS的发生和进展中具有重要作用^[2]。有文献报道, AIS患者两侧椎旁肌的肌电活动和肌纤维类型存在差异, 且与患者的侧凸角度进展相关^[3]。本研究组前期通过影像学测量发现, AIS患者两侧椎旁肌的肌容积

和脂肪浸润率不对称^[4]。另有研究显示, AIS患者两侧椎旁肌褪黑素受体和转化生长因子- β 信号通路相关分子表达不对称, 但对于上述椎旁肌的复杂改变的分子机制仍鲜有报道^[5-6]。

微RNA(miRNA)通过调控基因表达在多种生物过程中发挥重要作用^[7]。研究显示, 一些肌肉特异性miRNAs能调节肌肉的各项功能, 包括成肌细胞增殖、分化、收缩性能和压力反应等^[8-9]。另外, 肌肉特异性miRNA也与心脏肥大、心力衰竭、心律失常、先天性心脏病和肌营养不良等肌肉相关性疾

[△]共同第一作者作者简介: 张珂(1988—), 硕士在读, 医师; zhangke2003@126.com
姜横(1991—), 硕士, 医师; hjiangspine@163.com

*通信作者: 周许辉 xhzhouspine@163.com

病密切相关^[10-11]。因此,本研究欲探寻调节患者椎旁肌改变的关键 miRNA 及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选择2014年1月—2016年9月本院收治的汉族女性 AIS 患者30例。纳入标准:① AIS 诊断明确;②侧凸 Cobb 角 >40°;③临床资料和影像学资料完整;④不伴椎间盘突出、峡部裂等其他脊柱疾病,既往无针对肌肉功能治疗史或其他脊柱手术史。所有患者均被告知研究内容并签署知情同意书。凹侧与凸侧椎旁肌组织为尽量远离电刀处理过的多裂肌组织 500~1 000 mg(约黄豆大小),去除坏死组织和残留血渍后置入冻存管,并迅速置于液氮罐内保存。

1.2 影像学测量和临床数据

所有患者术前拍摄标准站立位脊柱全长正侧位 X 线片,测量侧凸 Cobb 角并记录顶椎位置。使用电子病历收集患者临床信息,包括手术年龄、月经初潮时间、是否进行过支具或牵引等治疗。

1.3 miRNA 高通量测序

取其中3例在发病年龄、手术年龄、Lenke 分型、角度大小、Risser 征等参数相匹配的患者凹侧和凸侧椎旁肌组织,提取总 RNA,测定 RNA 纯度与质量,在 5' 和 3' 端分别连接接头序列,形成带有接头的单链 RNA,反转录生成 RNA/DNA 杂交链,PCR 扩增构建 small RNA-seq cDNA 文库,采用 illumina Hiseq 测序平台(上海晶能生物有限公司,中国)单端测序模式进行高通量测序。

1.4 实时荧光定量 PCR

取其余27例患者的椎旁肌组织,验证高通量测序的质量及差异 miRNAs 的表达情况。使用 TRIzol (Invitrogen 公司,美国)提取椎旁肌组织总 RNA,用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo 公司,美国)测定 RNA 浓度与纯度。采用 SYBR Green II 20 μL 体系扩增 miRNA。具体反应体系、反应程序根据试剂盒说明书设定(TaKaRa 公司,日本),以 U6 snRNA 作为内参。实时荧光定量 PCR 反应条件:95℃起始激活 3 min;95℃变性 12 s、62℃退火 40 s、72℃延伸 45 s,40 个循环;最终 72℃延伸 5 min。采用 ΔCt 法计算 miRNA 的相对表达量。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件对数据进行统计学分析。两侧椎旁肌组织相关 miRNA 表达水平的比较采用配对样本的 Wilcoxon 符号秩检验。采用 Pearson 相

关性分析对两侧 miRNAs 相对表达量的差值与患者临床信息(手术年龄、术前侧凸 Cobb 角)的关系进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

由 miRNAs 聚类热图(图1)可知, AIS 患者凹侧和凸侧椎旁肌存在差异表达 miRNA。共有18个 miRNA 表达有差异,其中凹侧较凸侧表达量增加的12个,增加倍数最大的是 miR-424;凸侧较凹侧表达量增加的6个,增加倍数最大的是 miR-517(表1)。

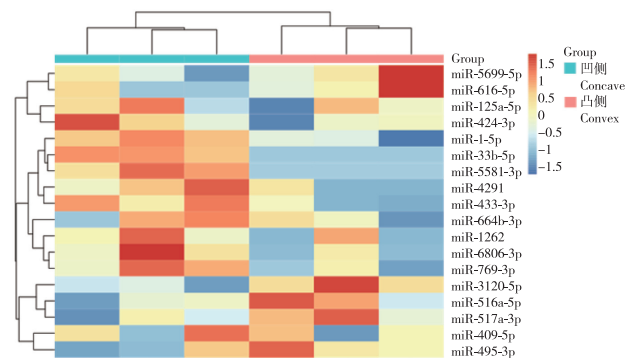


图1 AIS患者两侧椎旁肌组织差异 miRNA 聚类热图($n=3$)

Fig. 1 MiRNAs clustering thermal map of bilateral paraspinal muscles in AIS patients($n=3$)

表1 AIS患者两侧椎旁肌 miRNA 表达差异

Tab. 1 Differences in miRNAs expression between bilateral paraspinal muscles in AIS patients

miRNA	差异表达倍数($\log_2$) Fold change($\log_2$)
miR-424-3p	-2.125 481 273
miR-433-3p	-1.386 542 565
miR-769-3p	-1.138 925 934
miR-1-5p	-0.663 470 135
miR-33b-3p	-0.639 249 08
miR-664b-3p	-0.622 662 423
miR-5581-3p	-0.538 228 256
miR-6806-3p	-0.523 358 311
miR-1262	-0.517 696 593
miR-4291	-0.493 879 637
miR-125a-5p	-0.479 827 674
miR-409-5p	-0.151 710 401
miR-616-5p	0.467 794 895
miR-5699-5p	0.767 449 126
miR-3120-5p	0.863 716 838
miR-495-3p	1.144 057 413
miR-516a-5p	1.234 467 298
miR-517a-3p	1.419 123 987

为验证高通量测序的质量和测序筛选获得差异 miRNAs 的表达情况, 在 27 例 AIS 患者两侧椎旁肌组织中对测序结果中变化倍数最大的 6 个 miRNA 进行表达验证, 分别为凹侧含量较高的 miR-424、miR-433、miR-769 和凸侧含量较高 miR-516、miR-517、miR-495。目标 miRNA 的相对表达量 (ΔCt) = Ct 目标

miRNA 表达量 - CtU6。实时荧光定量 PCR 结果显示仅 miR-516、miR-517 和 miR-495 的表达差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

相关性分析显示, 两侧椎旁肌 miR-516 相对表达量差值与患者发病年龄呈负相关 ($r = -0.452$), miR-517 相对表达量差值与侧凸 Cobb 角呈负相关 ($r = -0.378$)。

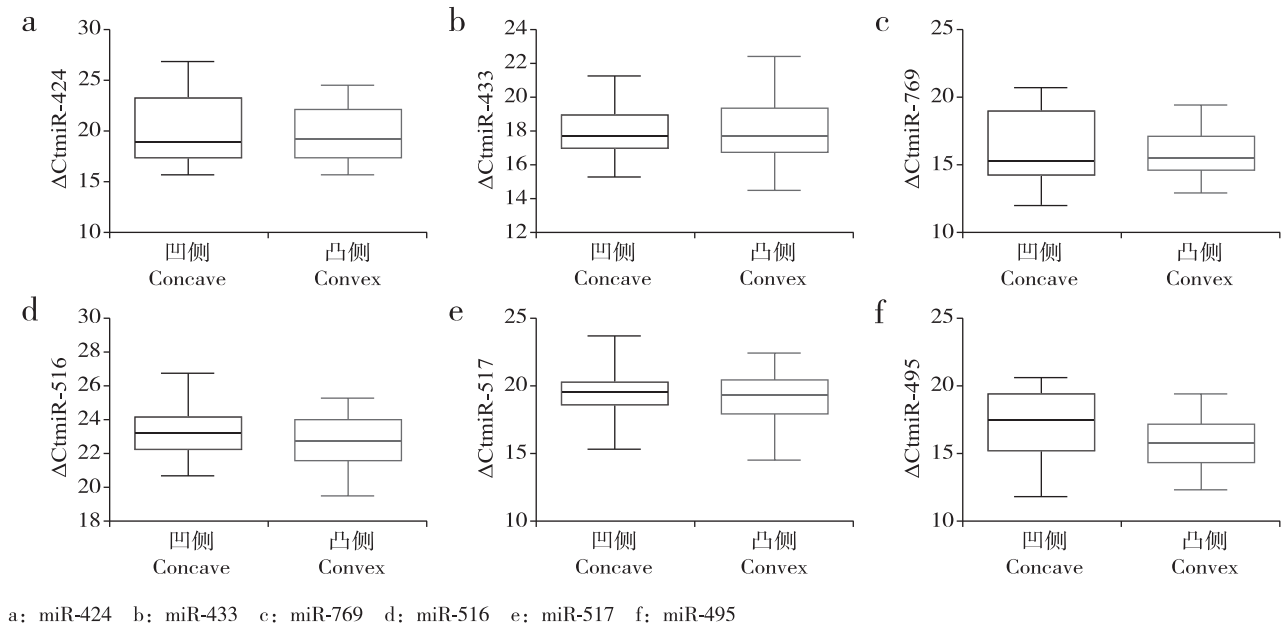


图 2 AIS 患者两侧椎旁肌差异表达 miRNA 验证 ($n=27$)

Fig. 2 Verification of differential expression of miRNAs in bilateral paraspinal muscles of AIS patients ($n=27$)

3 讨 论

AIS 患者侧凸角度有进展风险, 目前临床上主要处理措施是佩戴支具预防角度进展, 针对大角度的侧凸进行手术矫形。患者随访检查接受的辐射、高昂的手术费用和继发的心肺功能障碍造成了巨大的社会负担^[12]。对 AIS 发生机制的深入研究有助于更好地为疾病的诊断、治疗甚至预防提供新思路。由于遗传异质性和缺乏合适可靠的动物模型, 目前 AIS 的病因和病理机制尚未明确^[13]。有学者认为, 在 AIS 的发生和进展中, 椎旁肌组织的代偿性功能维持脊柱的稳定性, 当肌肉力量不足时, 椎体内在的旋转不稳定导致侧凸角度增大^[2, 14-15]。上述研究主要从功能学和形态学方面阐述 AIS 患者两侧椎旁肌的不对称, 却未对产生这种改变的分子机制进行阐述。本研究通过 RNA 高通量测序发现 AIS 患者两侧椎旁肌 miR-516、miR-517、miR-495 存在差异表达, 且 miR-516 的相对表达差值与患者手术年龄呈负相关, miR-517 的相对表达差值与患者侧凸 Cobb 角呈负相关。

有研究报道, 在凹侧椎旁肌表达升高的 miR-495 与骨骼肌的再生关系密切^[16]。miR-495 位于 *Gtl2-Dio3* 基因座^[17], *Gtl2-Dio3* 编码的 miRNA 能抑制分泌型卷曲相关蛋白 (sFRP) 的分泌, 后者是 Wnt 信号转导通路的抑制剂。动物实验表明 *Gtl2-Dio3* 编码的 miRNA (包括 miR-495) 在再生 MEF2A 敲除肌组织中表达下调, 导致 sFRP 的表达上调和 Wnt 信号通路的活性减弱^[18]。因此, miR-495 在 MEF2A 的调控下对 Wnt 信号转导的调节在骨骼肌的再生过程中发挥重要作用。

miR-516 和 miR-517 共同位于 *C19MC* 基因簇内^[19-20]。有研究表明, 该基因簇内的 miRNA 在成体组织中的表达量均较小^[21], 而在早期胚胎发育过程中显著高表达^[22]。该基因簇内的 miRNA 的调控功能大多与肿瘤的发生相关^[23]。目前 miR-516 和 miR-517 在骨骼肌发育或 AIS 的发生、发展过程中的作用尚未见报道。

本研究组前期发现 AIS 患者两侧椎旁肌的肌容积和脂肪浸润率不对称^[4], 本研究结果提示两侧椎旁肌中与骨骼肌再生相关的 miRNA 表达存在

差异,推测在应力或青春期各种内外因素的作用下,两侧椎旁肌的miRNA表达发生改变,异常表达的miRNA通过调控特异性靶基因的表达而引起肌细胞生长发育和其他功能的变化,导致两侧椎旁肌收缩性能出现差异,最终引起侧凸的出现或加重。miRNA在AIS患者两侧椎旁肌中差异表达的机制仍需进一步研究,以解释其介导椎旁肌不平衡改变的作用机制。

参考文献

- [1] Boswell CW, Ciruna B. Understanding idiopathic scoliosis: a new zebrafish school of thought[J]. Trends Genet, 2017, 33(3): 183-196.
- [2] Wong C. Mechanism of right thoracic adolescent idiopathic scoliosis at risk for progression; a unifying pathway of development by normal growth and imbalance[J]. Scoliosis, 2015, 10: 2.
- [3] Stetkarova I, Zamecnik J, Bocek V, et al. Electrophysiological and histological changes of paraspinal muscles in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Eur Spine J, 2016, 25(10): 3146-3153.
- [4] Jiang J, Meng Y, Jin X, et al. Volumetric and fatty infiltration imbalance of deep paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 2089-2095.
- [5] Nowak R, Kwiecien M, Tkacz M, et al. Transforming growth factor-beta (TGF- β) signaling in paravertebral muscles in juvenile and adolescent idiopathic scoliosis[J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 594287.
- [6] Wu L, Qiu Y, Wang B, et al. Asymmetric expression of melatonin receptor mRNA in bilateral paravertebral muscles in adolescent idiopathic scoliosis[J]. Stud Health Technol Inform, 2006, 123: 129-134.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [8] van Rooij E, Liu N, Olson EN. MicroRNAs flex their muscles[J]. Trends Genet, 2008, 24(4): 159-166.
- [9] van Rooij E, Quiat D, Johnson BA, et al. A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance[J]. Dev Cell, 2009, 17(5): 662-673.
- [10] McCarthy JJ, Esser KA. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy[J]. J Appl Physiol (1985), 2007, 102(1): 306-313.
- [11] Cacchiarelli D, Incitti T, Martone J, et al. MiR-31 modulates dystrophin expression: new implications for Duchenne muscular dystrophy therapy[J]. EMBO Rep, 2011, 12(2): 136-141.
- [12] Altaf F, Gibson A, Dannawi Z, et al. Adolescent idiopathic scoliosis[J]. BMJ, 2013, 346: f2508.
- [13] Burwell RG, Dangerfield PH, Moulton A, et al. Adolescent idiopathic scoliosis (AIS), environment, exposome and epigenetics: a molecular perspective of postnatal normal spinal growth and the etiopathogenesis of AIS with consideration of a network approach and possible implications for medical therapy[J]. Scoliosis, 2011, 6(1): 26.
- [14] 吴亮, 邱勇, 王斌, 等. 脊柱侧凸椎旁肌纤维不对称性分布的研究[J]. 脊柱外科杂志, 2004, 2(5): 276-279.
- [15] 沈晓龙, 周许辉, 刘洋, 等. 椎旁肌力量失衡与双足鼠脊柱侧凸模型的建立[J]. 脊柱外科杂志, 2012, 10(3): 176-180.
- [16] Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates[J]. Curr Opin Genet Dev, 2006, 16(5): 525-532.
- [17] Kircher M, Bock C, Paulsen M. Structural conservation versus functional divergence of maternally expressed microRNAs in the Dlk1/Gtl2 imprinting region[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 346.
- [18] Snyder CM, Rice AL, Estrella NL, et al. MEF2A regulates the Gtl2-Dio3 microRNA mega-cluster to modulate WNT signaling in skeletal muscle regeneration[J]. Development, 2013, 140(1): 31-42.
- [19] Grimwood J, Gordon LA, Olsen A, et al. The DNA sequence and biology of human chromosome 19[J]. Nature, 2004, 428: 529-535.
- [20] Bortolin-Cavaillé ML, Dance M, Weber M, et al. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol- II , non-protein-coding transcripts[J]. Nucleic Acids Res, 2009, 37(10): 3464-3473.
- [21] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell, 2007, 129(7): 1401-1414.
- [22] Ren J, Jin P, Wang E, et al. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells[J]. J Transl Med, 2009, 7: 20.
- [23] Flor I, Bullerdiek J. The dark side of a success story: microRNAs of the C19MC cluster in human tumours[J]. J Pathol, 2012, 227(3): 270-274.

(收稿日期: 2017-10-28)

(本文编辑: 于倩)