

酸枣仁提取物靶向 5-羟色胺 1A 受体影响骨骼增长的微小核糖核酸的筛选及功能验证

梁国辉¹ 王桂芝^{1△} 谢艳¹ 毛雯正¹ 罗石任¹ 张丽¹ 吴晓龙¹

[摘要] **目的:**筛选由酸枣仁提取物调控的靶向 5-羟色胺 1A 受体(5-HT1AR)影响骨骼增长的微小核糖核酸(miRNA),并阐明酸枣仁提取物通过该 miRNA 调控 5-HT1AR 影响骨骼增长的作用机制。**方法:**将大小鼠分别分为正常对照组、用药组、阳性对照组和五羟色胺 1A 受体选择性抑制剂组,并用不同溶液灌胃。一段时间后观察药物对小鼠体长、血清生长激素和脑组织五羟色胺 1A 受体表达以及对大鼠慢波睡眠的影响。筛选骨骼增长的小鼠与普通小鼠脑组织差异表达 miRNAs,优选以五羟色胺 1A 受体为靶基因的 miRNA 并进行 qRT-PCR 验证。通过双荧光素酶报告基因实验验证 miR-200c-3p 与 5-HT1AR 之间的调控关系,进而培养小鼠脑皮层细胞并鉴定。通过给予高剂量和低剂量药物和过表达及沉默 miR-200c-3p,ELISA 法观察 5-HT1AR 的表达,并通过 qRT-PCR 法观察给药后细胞内 miR-200c-3p 的表达。**结果:**用药组小鼠血清生长激素、体长及脑组织五羟色胺 1A 受体表达均高于其他组;慢波睡眠时长用药组与阳性对照组长于正常对照组和抑制剂组;药物对异相睡眠时期无影响;两个实验组有 13 个 miRNAs 表达上调,3 个 miRNAs 表达下调;经 qRT-PCR 验证调控五羟色胺 1A 受体的为下调的 miR-200c-3p,且双荧光素酶报告基因实验证明 miR-200c-3p 可以调控 5-HT1AR 表达。体外培养小鼠脑皮层细胞,过表达 miR-200c-3p 引起 5-HT1AR 表达下降,而沉默 miR-200c-3p 后则 5-HT1AR 表达升高,且药物对体外培养的脑皮层细胞中 miR-200c-3p 的表达有调控作用。**结论:**小鼠体内可能存在酸枣仁提取物,通过调控 miR-200c-3p 的表达上调五羟色胺 1A 受体的表达,延长慢波睡眠,进而促进生长激素的分泌,最终促进体长增长。

[关键词] 酸枣仁提取物;五羟色胺 1A 受体;小鼠;骨骼增长;微小核糖核酸;筛选

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2023)12-0007-08

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.231202

Screening and Functional Verification of miRNA on the Effect of 5-HT1AR Targeted by Jujube Kernel Extract on Bone Growth

LIANG Guohui¹ WANG Guizhi^{1△} XIE Yan¹ MAO Wenzheng¹
LUO Shiren¹ ZHANG Li¹ WU Xiaolong¹

¹ Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital of Henan Province (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Luoyang 471002, Henan China.

Abstract Objective: To screen for micro ribonucleic acids (miRNAs) targeting the serotonin 1A receptor (5-HT1AR) that affect bone growth regulated by jujube kernel extract, and elucidating the mechanism by which jujube kernel extract regulates the effect of 5-HT1AR on bone growth through this miRNA. **Methods:** Rats and mice were divided into normal control group, drug treatment group, positive control group and selective inhibitor group of serotonin 1A receptor, and gavage with corresponding solution in each group. After a period of time, the effects of the drug on the body length of mice, the expression of serum growth hormone, serotonin-1A receptor in brain tissue and the slow-wave sleep of rats were observed. The differential expression of miRNAs in the brain tissues of mice with bone growth and ordinary mice was screened, and the miRNA with serotonin-1A receptor as the target gene was selected and verified by qRT-PCR. The regulatory relationship between miR-200c-3p and 5-HT1AR was verified by dual-luciferase reporter assay, and then the mouse

基金项目:河南省中医药科学研究专项(2018ZY2114, 2022ZY2051)

¹ 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)(河南 洛阳, 471002)

[△]通信作者 E-mail:redapple1996@163.com

cerebral cortex cells were cultured and identified. The expression of 5-HT1AR was observed by ELISA by giving high-dose and low-dose drugs, overexpressing and silencing miR-200c-3p. The expression of miR-200c-3p was observed by qRT-PCR. **Results:** The expression of serum growth hormone, body length and serotonin-1A receptor in brain tissue of the treated group were higher than those of the other groups. The duration of slow-wave sleep in medication group and positive control group was longer than that in normal control group and inhibitor group. Drugs had no effect on the phase of sleep. The expression of 13 miRNAs was up-regulated and 3 miRNAs was down-regulated in the two groups. The regulation of serotonin 1A receptor was verified by qRT-PCR as down-regulated miR-7b-3p. The dual-luciferase reporter assay showed that miR-200c-3p can regulate the expression of 5-HT1AR. The overexpression of miR-200c-3p in cultured mouse cortical cells caused a decrease in 5-HT1AR expression, while silencing miR-200c-3p led to an increase in 5-HT1AR expression. Moreover, drugs can regulate the expression of miR-200c-3p in cultured cortical cells in vitro. **Conclusion:** It is possible that the jujube kernel extract may upregulate the expression of 5-HT1A receptor by regulating miR-200c-3p in mice, prolong slow-wave sleep and promote growth hormone secretion, ultimately promoting body growth.

Keywords: jujube kernel extract; serotonin 1A receptor; mice; bone growth; miRNA; screen

随着经济发展及生活水准的提高,外貌、身高被赋予了更高的关注度,身材高挑也是体格健全和发育良好的标志。研究发现市售的酸枣仁皂甙(实为酸枣仁提取物,其皂甙含量为5%)0.32 mg/g灌胃可以提高脑组织五羟色胺1A受体(Serotonin 1A Receptor, 5-HT1AR)表达,延长小鼠的慢波睡眠,从而促进生长激素分泌及小鼠骨骼的增长^[1-2]。5-HT1AR作为一种蛋白质受miRNA调控,而miRNA研究的重要性在于其一方面可以作为疾病的治疗靶标和手段,另一方面可以作为疾病早期诊断的标志物^[3-8]。本研究筛选给予酸枣仁提取物后干预5-HT1AR表达的miRNA并对其生物学功能的证明,为研究多靶点调控骨骼增长提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性SPF级昆明种小鼠60只,25 d龄,体重为(16±1)g,动物许可证号为SCXK(豫)2010-0002。SPF级昆明种出生3 d的小鼠6只(动物许可证号为SCXK(豫)2019-0002,雄性,买来即处死)。SPF级SD大鼠24只,雌雄各半,2.5个月龄,体重为(220±20)g,动物许可证号为SCXK(豫)2015-0001。室温环境中饲养,保持湿度在50%~70%之间,光照12 h,噪音<50 dB。

1.2 药物及试剂

酸枣仁提取物(由陕西斯诺特生物技术有限公司提供,批号为201406),P-MPPF(北京盛科博源生物科技有限公司);小鼠5-HT1AR ELISA试剂盒(上海纪宁实业有限公司,批号为201510)等。

1.3 仪器

酶标仪(Labsystems Multiskan MS,芬兰,352型),电泳槽(上海天能科技有限公司,上海,VE-180型),电泳仪(上海天能科技有限公司,上海,EPS300型),基因

芯片微阵列扫描仪(Agilent,美国,SureScan),荧光定量PCR仪(Bio-rad公司,美国,CFX)。

1.4 方法

1.4.1 酸枣仁提取物促进小鼠骨骼增长及对血清生长激素(GH)的影响 同一时期出生的10胎小鼠,每胎4只,随机分配每胎的4只小鼠到4个不同的组,分别为正常对照组、用药组、阳性对照组和五羟色胺1A受体选择性抑制剂组(以下简称抑制剂组),每组10只,以最大限度减小遗传的影响。分组后以乙醚麻醉小鼠,然后将小鼠身体伸直平卧于实验台上,将头部最前端(唇部)至臀尾交界处(身体与尾巴交界没有体毛处)确定为小鼠总体长,其体长用直尺测量并记录(精确度为1 mm)。实验由三位医师分别进行,求平均值以减小误差。给药前各组小鼠体长差异无统计学意义($P>0.05$)。第7天开始给各组小鼠灌胃,1次/d。给予用药组小鼠酸枣仁提取物混悬液,用药标准为0.320 mg/g;给予正常对照组小鼠去离子水;给予阳性对照组小鼠酸枣仁皂甙A标准品溶液,用药标准为0.013 mg/g;在最后3 d给予抑制剂组小鼠酸枣仁提取物水溶液,且每日同时侧脑室注射8 μ g P-MPPF。共灌胃25 d,末次灌胃40 min后,在麻醉状态下用直尺测定小鼠体长。心脏采血后室温静置20 min,3 000 r/min离心20 min,留取上清,ELISA法检测血清生长激素含量。

1.4.2 酸枣仁提取物对小鼠脑组织5-HT1AR表达的影响 取小鼠脑组织称重并提取蛋白,以RIPA裂解液充分裂解,BCA法测定蛋白浓度。然后1:1加入2×SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液,并于沸水浴中加热10 min致蛋白变性。待温度降至室温,上样,每孔12 μ L,以GAPDH为内参。然后进行电泳、转膜、封闭、洗膜,最后进行曝光成像、分析。

1.4.3 药物引起大鼠慢波睡眠的改变 将 SD 大鼠随机分为 4 组(正常对照组、用药组、抑制剂组、阳性对照组),每组各 6 只,正常对照组去离子水灌胃;用药组酸枣仁提取物水溶液灌胃,标准为 0.220 mg/g;抑制剂组酸枣仁提取物灌胃,且每天给予 56 μ g P-MPPF 侧脑室注射;阳性对照组酸枣仁皂甙 A 标准品灌胃,标准为 0.009 mg/g。1 次/d,从灌胃第 3 天开始,末次灌胃 30 min 后,记录脑电(EEG),采用 WXL 睡眠自动分析系统测定慢波睡眠时长,每天计算 6 h 内觉醒期(W 期)、慢波睡眠期(SWS 期)、异相睡眠期(PS 期)及总睡眠期(TS 期)时长,取 3 d 的均值。

1.4.4 药物引起骨骼增长的小鼠与普通小鼠脑组织差异表达 miRNAs 的筛选 分别取来自 10 胎 25 d 龄的昆明种雄性小鼠 20 只,每胎均为 2 只。随机将同一胎的 2 只分配到正常对照组和用药组中,每组 10 只。测量并记录各小鼠入组时体长,差异无统计学意义,饲养 1 周后给予对照组常规饲养,给予用药组酸枣仁提取物混悬液灌胃(0.320 mg/g),于 25 d 后测量并记录各小鼠体长。挑选用药组体长最长和对照组体长最短的来源于同一胎的原 4 对小鼠,取其脑组织(小鼠死亡后及时取材),经过胎牛血清(PBS)缓冲液清洗、Trizol 溶液匀浆等严格操作以彻底裂解小鼠脑组织。芯片法检测差异表达的 miRNAs,收集所有用药组倍数变化值(FC) ≥ 1.5 且 $P < 0.05$ 的差异表达 miRNAs,建立差异表达 miRNAs 库。

1.4.5 确定筛选的 miRNAs 与 5-HT1AR 结合能力 通过生物信息学网站 miRDB(<http://www.mirdb.org/>)、TargetScan (<https://www.targetscan.org/vert-80/>)及 miRWalk(<http://129.206.7.150/>)数据库筛选可以调控 5-HT1AR mRNA 的 miRNAs,与芯片法筛选的 miRNAs 取交集,确定目标 miRNA。将目标 miRNA 和 5-HT1AR 的基因序列输入到 RNAhybrid 网站中,通过两者结合的力度和碱基配对情况,确定两者的结合力强度和结合位点。

1.4.6 以 5-HT1AR 为靶基因的 miRNA 的 qRT-PCR 验证 提取所需小鼠脑组织总 RNA,并测定提取的 RNA 浓度及纯度。将提取的 RNA 逆转录成 cDNA,然后以 U6 为内参进行实时聚合酶链式反应,引物序列见表 1。

表 1 miRNA 及内参引物序列

基因名	双向引物序列
U6	下游:5'GCTTCGGCAGCACATATACTAAA-AT3'
	反向:5'CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT3'
mmu-miR-200c-3p	下游:5'CGCGCCTATACAACCTACTGC3'
	反向:5'GTGCAGGTTCCGAGGT3'

1.4.7 双荧光素酶报告基因实验验证目标 miRNA 与 5-HT1AR 的调控关系 聚合酶链式反应(PCR)合成目标片段 5-HT1AR'UTR 野生型(WT)和突变型(MUT),并克隆到 pmirGLO 载体中。分别将确定的目标 miR-200c-3p mimics 与 pmirGLO-5-HT1AR-WT/MUT 重组质粒共转染 293T 细胞。用 miR-200c-3p Scramble 阴性对照,与 5-HT1AR 的野生型或突变型重组质粒共转染。转染完成后,在 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 条件下培养 48 h,更换 1 mL 含 10%胎牛血清、无抗生素的常规 DMEM 培养基后,继续培养 48 h,裂解细胞。按荧光素酶活性检测试剂盒操作说明检测荧光相对强度,以海肾荧光值作为内参,以各组荧光强度除以内参作为各组的相对荧光强度,观察突变组较野生组荧光强度是否提高,证实 miR-200c-3p 与 5-HT1AR 具有直接调控关系。

1.4.8 体外培养小鼠脑神经细胞并鉴定 用 75%乙醇浸泡出生 3 d 的新生小鼠,在冰浴的 PBS 中分离脑皮层,去除脑膜等,PBS 洗涤 3 次,剪碎,用 0.25% Trypsin + 0.1% I 型胶原酶 37 $^{\circ}$ C 水浴震荡消化 30 min,用含 FBS 的培养基终止消化,轻轻吹打,过 100 μ m 滤网,收集滤液,300g 离心 5 min,用完全培养基重悬沉淀,铺瓶。取 3 片盖玻片,于 24 孔板中每孔加入培养液 1 mL,加入细胞 2×10^4 个/孔。置培养箱 2 h 或过夜。细胞爬片后,吸出培养基,用 PBS 洗 1 遍,加入 4%组织细胞固定液(PFA)于 4 $^{\circ}$ C 固定 30 min。用 PBS 洗 3 \times 5 min/次,将玻片除去水分,置于培养皿支撑物上,再加 10%血清,取 50 μ L 破膜封闭液滴于防水膜上,将玻片上有细胞的一面盖上 2 h。取 50 μ L 一抗于防水膜上(湿盒中),将玻片(有细胞的一面)盖上置于 4 $^{\circ}$ C 室温避光孵育二抗(二抗:PBS=1:500)2 h 后,PBS 洗 3 \times 5 min/次,染 DAPI(DAPI:PBS=1:1 000)5 min,PBS 洗 3 \times 5 min/次。玻片上各滴 1 滴 Fluoromount-G,将有细胞的一面盖上。

1.4.9 药物对体外培养的脑细胞中 5-HT1AR 表达的影响 将以上方法培养的脑细胞分为正常对照组、药物低剂量组、药物高剂量组、miR-200c-3p inhibitor 组、miR-200c-3p mimics 组和阳性对照组。正常对照组加入常规培养基,药物低剂量组和高剂量组在常规培养基中分别加入溶解后灭菌的酸枣仁提取物溶液(50 μ g/mL 和 200 μ g/mL),miR-200c-3p inhibitor 组和 miR-200c-3p mimics 组在常规培养基中分别加入 miR-200c-3p inhibitor 和 miR-200c-3p mimics 50 μ mol/L 和 30 μ mol/L,阳性对照组在常规培养基中加入酸枣仁皂苷灭菌水溶液(5 μ g/mL),每组重复 4 个孔。培养 3 d 后取上清液,按照 ELISA 试剂盒操作说明检测 5-HT1AR 表达。

1.4.10 药物对体外培养的脑细胞中 miR-200c-3p 表达的影响 对 1.4.9 节中收集的正常对照组、低剂量组和高剂量组的上清液,按照 1.4.6 节中方法测定 miR-200c-3p 的含量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件分析数据,定量资料采用单因素方差分析,以 LSD 法行组间比较。qRT-PCR 法验证采取两独立样本的 *t* 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 药物对小鼠体长的影响

发现用药 25 d 后,用药组小鼠体长明显长于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),阳性对照组体长明显长于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),抑制剂组体长也明显长于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 药物对小鼠体长的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 /只	药物剂量 /(mg·g ⁻¹)	抑制剂 剂量/μg	体长 /cm
正常对照组	10			9.7±0.3
用药组	10	0.320		10.3±0.4 ¹⁾
阳性对照组	10	0.013		10.2±0.4 ²⁾
抑制剂组	10	0.320	8	10.2±0.6
<i>F</i>			3.635	
<i>P</i>			0.022	

注:与正常对照组比较,1) $P<0.01$;2) $P<0.05$ 。

2.2 药物对血清生长激素的影响

用药组小鼠血清生长激素水平明显高于正常对照组和抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.01$);阳性对照组小鼠血清生长激素水平明显高于正常对照组和抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.01$);抑制剂组小鼠血清生长激素与正常对照组差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3。

表 3 药物对血清生长激素的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 /只	药物剂量 /(mg·g ⁻¹)	抑制剂 剂量/μg	生长激素 /(ng·mL ⁻¹)
正常对照组	10			43.36±6.62
用药组	10	0.320		58.91±9.37 ¹⁾²⁾
阳性对照组	10	0.013		55.87±8.48 ¹⁾²⁾
抑制剂组	10	0.320	8	41.90±5.30
<i>F</i>			12.871	
<i>P</i>			<0.001	

注:1)与正常对照组比较, $P<0.01$;2)与抑制剂组比较, $P<0.01$ 。

表 4 酸枣仁提取物对大鼠慢波睡眠的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	药物剂量/(mg·g ⁻¹)	抑制剂剂量/μg	W 期/min	SWS 期/min	PS 期/min	TS 期/min
正常对照组	0		180.3±36.2	131.5±28.4	48.2±13.0	179.7±36.2
用药组	0.220		133.0±27.1 ¹⁾²⁾	178.8±28.3 ¹⁾²⁾	48.2±9.6	227.2±27.1 ¹⁾²⁾
阳性对照组	0.009		134.8±15.5 ¹⁾²⁾	174.8±25.1 ¹⁾²⁾	50.3±14.3	225.2±15.6 ¹⁾²⁾
抑制剂组		8	175.0±18.8	139.3±22.4	45.7±8.8	185.0±18.8
<i>F</i>			5.861	5.130	0.161	5.861
<i>P</i>			0.005	0.009	0.922	0.005

注:1)与正常对照组比较, $P<0.01$;2)与抑制剂组比较, $P<0.05$ 。

2.3 药物对脑组织 5-HT1AR 的影响

脑组织 5-HT1AR 在用药后较正常对照组和抑制剂组表达明显增高,其作用的与阳性对照组相当,抑制剂组与正常对照组表达丰度相似,见图 1。

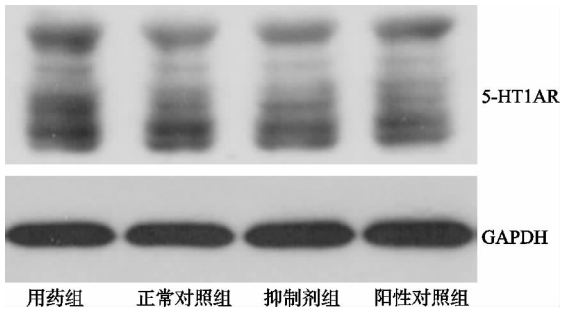


图 1 药物对大白鼠脑组织 5-HT1AR 含量的影响

2.4 给予酸枣仁提取物后对大鼠慢波睡眠的影响

如表 4 所示,用药组慢波睡眠时长大于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$);也大于抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.05$);阳性对照组慢波睡眠时长大于正常对照组和抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.01$, $P<0.05$);异相睡眠时期不受药物影响;用药组和阳性对照组总睡眠期大于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),同时大于抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.05$);用药组和阳性对照组觉醒期小于正常对照组,差异有统计学意义($P<0.01$),同时小于抑制剂组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 基因芯片筛选用药组和对照组差异表达的 miRNAs

共有差异表达的 420 个 miRNAs 显示上调,453 个显示下调。共有 16 个差异表达的 miRNAs 符合差异倍数 ≥ 1.5 , $P<0.05$,其中 13 个表达上调,3 个表达下调。图 2 和表 5 显示了这些符合要求的差异表达的 miRNAs。

2.6 RNAhybrid 网站筛查考查筛选的 miRNAs 与 5-HT1AR 结合能力

小鼠在用药后出现体长增长时 5-HT1AR 呈现高表达,因此笔者观察的目标是干扰 5-HT1AR 表达且在用药组中下调的 miRNAs,主要为 miR-200c-3p、miR-7a-2-3p 及 miR-7b-3p。生物信息学网站 miRDB、TargetScan、miRWalk 共同筛选的 miRNA 与芯片法

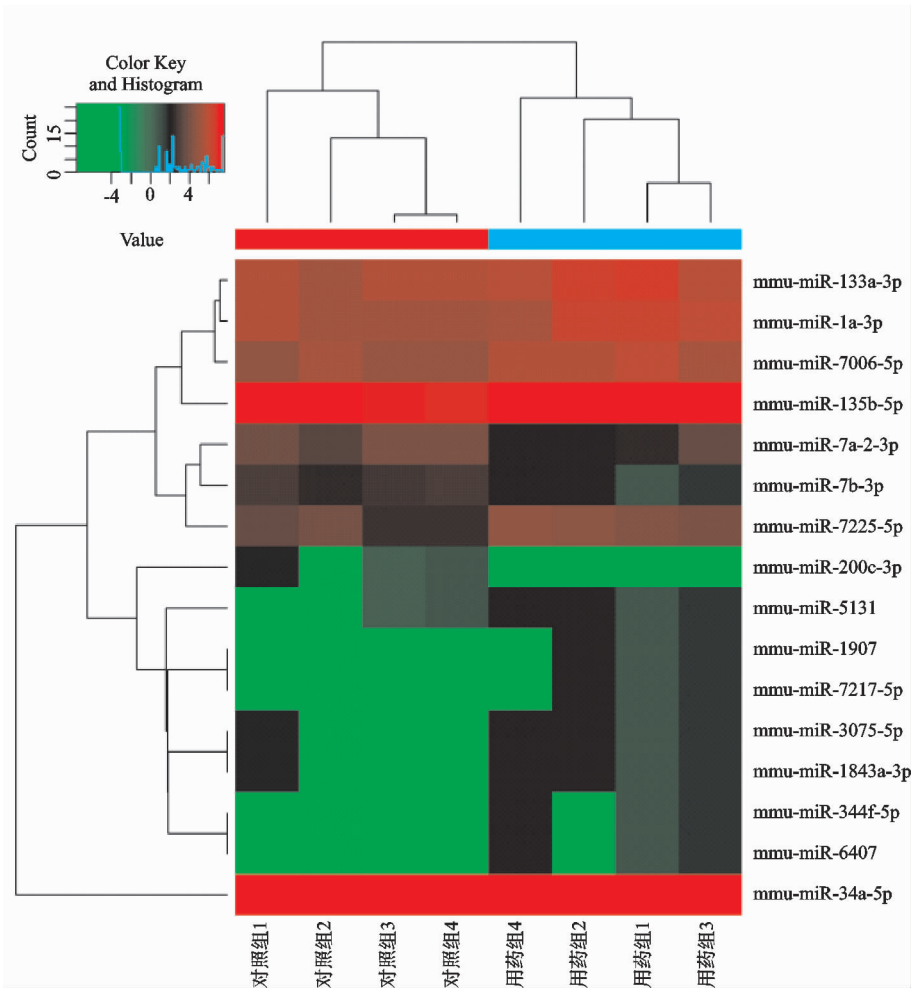


图 2 用药组与对照组差异表达 miRNAs 的聚类图

表 5 基因芯片筛选出的符合要求的差异表达 miRNAs

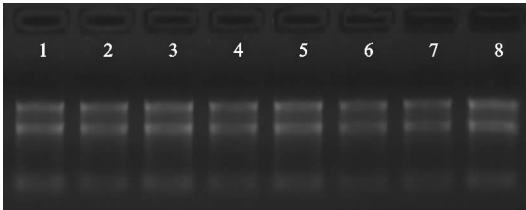
miRNA	差异倍数	P
mmu-miR-1843a-3p	12.861 500 6	0.034 285 052
mmu-miR-3075-5p	12.861 500 6	0.034 285 052
mmu-miR-344f-5p	12.515 935 9	0.024 367 840
mmu-miR-6407	12.515 935 9	0.024 367 840
mmu-miR-1907	12.461 565 6	0.025 598 887
mmu-miR-7217-5p	12.461 565 6	0.025 598 887
mmu-miR-5131	7.948 228 1	0.039 532 084
mmu-miR-7225-5p	2.469 325 0	0.014 537 200
mmu-miR-1a-3p	1.643 729 2	0.031 542 943
mmu-miR-34a-5p	1.619 606 4	0.005 046 709
mmu-miR-7006-5p	1.611 236 3	0.009 114 669
mmu-miR-133a-3p	1.553 795 2	0.034 042 220
mmu-miR-135b-5p	1.538 643 7	0.022 991 398
mmu-miR-200c-3p	0.099 990 0	0.022 069 876
mmu-miR-7a-2-3p	0.415 904 1	0.017 505 483
mmu-miR-7b-3p	0.490 508 6	0.020 600 599

筛选的 miRNA 取交集后优选 miR-200c-3p,且 RNA-hybrid 网站筛查结果显示 miR-200c-3p 与 5-HT1AR

有很好的结合性能。

2.7 qRT-PCR 法验证 miR-200c-3p 在用药组和对照组差异表达

RNA 的纯度检验结果显示(D(260)/D(280)比值 ≥ 1.8 且 ≤ 2.0 ,表明提取的 RNA 合格,见图 3。qRT-PCR 结果显示用药组 miR-200c-3p 的表达较正常对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$),见表 6。



1-4 为实验组, 5-8 为正常对照组

图 3 RNA 纯度检测结果

表 6 qRT-PCR 法测定用药组和正常对照组 miR-200c-3p 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数/只	miR-200c-3p
用药组	4	0.49 \pm 0.13
正常对照组	4	1.08 \pm 0.17
t		5.542
P		0.001

2.8 双荧光素酶报告基因实验结果

图4结果显示:将5-HT1AR突变后荧光强度较野生型升高,说明野生型5-HT1AR可以与miR-200c-3p很好结合,两者之间存在调控关系。

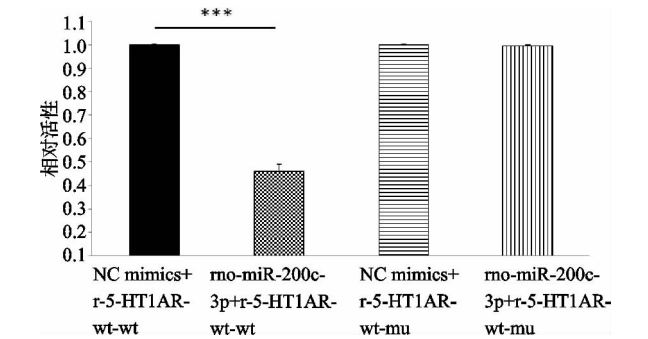


图4 双荧光素酶报告基因实验结果

2.9 小鼠脑皮层细胞的培养及鉴定

刚接种的细胞分散呈圆形、胞质均匀、胞体透亮、

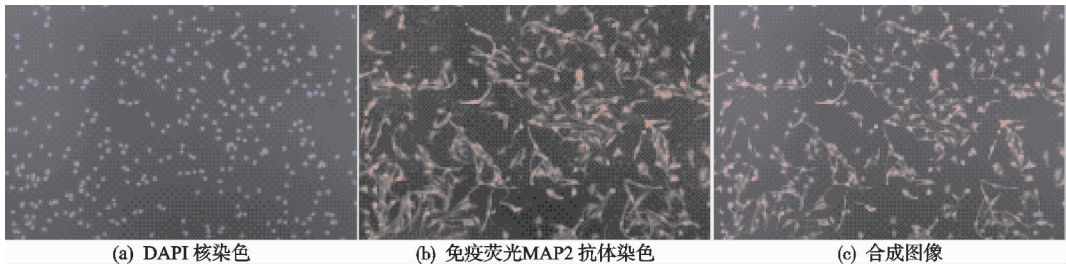


图6 神经元树突标志性蛋白MAP2免疫荧光染色(×200)

2.10 酸枣仁提取物对培养的小鼠脑细胞中5-HT1AR表达的影响

ELISA结果显示:药物高剂量组、miR-200c-3p inhibitor组和阳性对照组较正常对照组5-HT1AR呈现高表达,差异有统计学意义($P<0.01$);而药物高剂量组5-HT1AR表达情况较低剂量组显著升高,差异有统计学意义($P<0.01$);miR-200c-3p mimics组5-HT1AR表达较正常对照组明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。高剂量组与阳性对照组作用相当,而低剂量组5-HT1AR表达低于阳性对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表7。

表7 ELISA法测定各组5-HT1AR表达($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	5-HT1AR/(ng·mL ⁻¹)
正常对照组	4	37.84±4.21
低剂量组	4	44.87±4.18 ¹⁾
高剂量组	4	60.24±8.21 ²⁾³⁾
miR-200c-3p inhibitor组	4	56.98±6.69 ²⁾⁴⁾
miR-200c-3p mimics组	4	20.26±3.06 ²⁾³⁾⁵⁾
阳性对照组	4	55.51±7.70 ²⁾⁴⁾
F		25.434
P		<0.001

注:与正常对照组比较,2) $P<0.01$;与低剂量组比较,3) $P<0.01$,4) $P<0.05$;与阳性对照组比较,1) $P<0.05$,5) $P<0.01$ 。

周围有光晕;2 d后突起变长,表现为明显的神经细胞形态,见图5。微管相关蛋白(MAP2)是组成神经元细胞骨架的重要组成成分,在神经系统发育、形成和再生的不同时期扮演重要角色。经免疫荧光染色后,细胞核呈现蓝色荧光,细胞质呈现红色荧光,表现出明显的神经细胞特点,见图6。

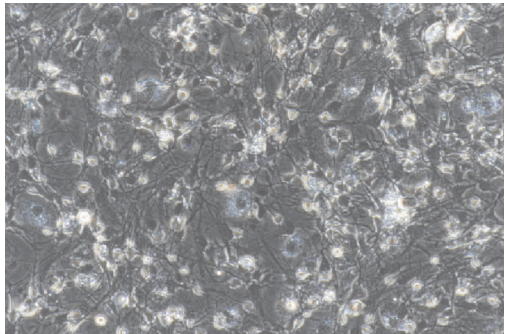


图5 培养48 h的脑细胞(×200)

2.11 高剂量组和低剂量组药物对miR-200c-3p表达的影响

如表8所示,高剂量组miR-200c-3p的表达量较正常对照组和低剂量组均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表8 qRT-PCR法测定高低剂量用药组和正常对照组miR-200c-3p表达($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数/只	miR-200c-3p相对表达量
正常对照组	4	1.27±0.13
低剂量组	4	1.25±0.22
高剂量组	4	0.92±0.12 ¹⁾²⁾
F		6.013
P		0.022

注:1)与正常对照组比较, $P<0.05$;2)与低剂量组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

酸枣仁具有养肝、宁心安神、生津敛汗的作用^[9-11]。笔者前期实验证明酸枣仁提取物有助于小鼠骨骼增长,其机制为上调脑组织5-HT1AR的表达,加强5-HT1AR与5-HT的结合,通过延长慢波睡眠时间,进而增加生长激素分泌量^[1]。由于5-HT1AR为蛋白,其表达一定会受到miRNA调控,笔者推测酸枣仁提取物是否有通过影响miRNA进而影响5-

HT1AR 的表达、发挥药物作用的途径。笔者筛选了用酸枣仁提取物灌胃后差异表达的小鼠 miRNAs,其中符合差异倍数 ≥ 1.5 、 $P < 0.05$ 上调的 miRNA 有 13 个,下调的有 3 个。因为给予小鼠酸枣仁提取物后 5-HT1AR 较正常对照组呈现高表达趋势,所以笔者关注下调的 miRNA。经过生物信息学网站筛选,将目标确定为 miR-200c-3p。而且对 miR-200c-3p 在用药组和正常对照组中的表达进行了 qRT-PCR 检测,证明其确实在用药组表达降低。后续双荧光素酶报告基因实验证实二者存在调控关系。且体外培养的脑皮层细胞给予药物和 miR-200c-3p inhibitor 后,5-HT1AR 呈现高表达,而 miR-200c-3p mimics 却可以使 5-HT1AR 低表达。同时药物可以使细胞中 miR-200c-3p 低表达,说明药物可以通过降低 miR-200c-3p 从而使后者失去对 5-HT1AR 的沉默作用。因此,生长中的小鼠给药酸枣仁提取物后体内存在通过降低 miR-200c-3p 促进 5-HT1AR 表达从而促进慢波睡眠最终促进骨骼增长的途径。

笔者的前期实验还发现 5-HT2AR 在小鼠给予酸枣仁提取物后,用药组和正常对照组也呈差异表达,其表达下调有助于小鼠体长的增长,所以笔者此次筛查差异表达的 miRNAs 也为今后研究调控 5-HT2AR 的 miRNA 奠定了基础。而且一个 miRNA 可以调控多个蛋白的 mRNA,经过对所筛选的 miRNAs 的进一步考察研究,会发现其他促进骨骼增长的因子。由于生物体的骨骼增长 70%~75% 受基因影响,25%~30% 由后天生活决定^[12-13],为减少生物基因对实验的影响,特别选取同一胎的小鼠进行分组。

当前多以以下几种方法促进非疾病性矮小青少年的身高增长^[14-15]:1)加强营养,即加强青少年对蛋白质、钙、磷等营养的吸收。2)多晒太阳,以促进身体对维生素 D 和钙的吸收。3)多进行运动,例如打篮球、跳绳等。4)药物辅助,大多是通过外用激素达到增高的效果^[16]。5)针灸、理疗等。6)肢体延长术,此种方法风险较大,有可能出现骨不愈合等情况,不仅达不到预期效果还有可能留下病残^[17-18]。家长主要通过补充营养和加强运动等简单易行的方式促进孩子生长,但我国青少年繁重的学习压力使得他们难有足够的时间和精力进行配合。使用生长激素等药物不仅费用昂贵,且会产生诸如血糖升高等副作用^[19]。针灸、理疗等治疗周期长,亦难以持续。骨科延长术更是不建议使用。由此可见目前最有效且无害、有助增长的方式似乎只有加强营养。研究证明生长激素和雄激素都促进骨骼生长,雄性激素可以短期见效,但可致骨骺提前闭合^[20];所以生长激素对身高的增长起着决定性作用,而通过服用毒副作用

很小的中药提取物,以改善睡眠、促进身高的增长,无疑是一种简单易行的方法。

对于酸枣仁促进睡眠的研究不少,绝大多数都是用来改变失眠状况的^[21-22],而且研究多集中在其能促进睡眠,但是具体到延长慢波睡眠时长的研究,国内除了笔者的研究外,尚未见报道。而且有报道慢波睡眠的启动与 5-HT 有关^[23],本研究实验证实 5-HT 与 5-HT1AR 结合也可以延长慢波睡眠时长,且 5-HT 与其 1A 受体结合可以延长慢波睡眠,而与其 2A 受体结合就抑制慢波睡眠。关于酸枣仁促进睡眠的研究具有双重意义,一方面解决越来越多的失眠人群问题,另一方面可以为青少年骨骼增长提供有力支持,提高整个国民健康水平,意义深远。

参考文献

- [1] 谢艳,张云芳,孙墨渊,等.酸枣仁提取物促进慢波睡眠引起身体增高的实验研究[J].世界中西医结合杂志,2018,13(6):798-801.
- [2] 谢艳,张云芳,宁桃丽,等.酸枣仁提取物调控 cAMP-PKA 通路促进小鼠体长增长及大鼠慢波睡眠的机制研究[J].上海中医药杂志,2021,55(5):77-83.
- [3] 吴晓莉,刘丽旭,张通.小脑在睡眠-觉醒调控中作用的研究[J].脑与神经疾病杂志,2021,29(12):781-785.
- [4] 黄婉仪,张又祥.miRNA 在中枢神经系统发育中的作用机制及临床应用研究进展[J].国际医药卫生导报,2021,27(4):625-627.
- [5] ZHANG J S, HE W F, ZHENG D N, et al. Exosomal-miR-1184 derived from mesenchymal stem cells alleviates cisplatin-associated acute kidney injury[J]. Mol Med Rep, 2021,24(5):124-127.
- [6] WANG Q, SUN H, WEN D, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of miRNA based on polymerization signal amplification[J]. Talanta, 2021,23(5):744-745.
- [7] XUE Y, GUO Y, YU M, et al. Monodispersed bioactive glass nanoclusters with ultralarge pores and intrinsic exceptionally high mirna loading for efficiently enhancing bone regeneration[J]. Adv Health Mat, 2021,10(8):e2101616.
- [8] WANG Y, YANG L, CHEN T, et al. A novel LncRNA-CM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/foxa1[J]. Mol Cancer, 2019,18(1):28.
- [9] 振华,张文明,唐静月,等.基于血清代谢组学和网络药理学研究酸枣仁提取物治疗失眠的效应物质及作用机制[J].中国中药杂志,2022,47(1):188-202.
- [10] LUO H, SUN S J, WANG Y, et al. Revealing the sedative-hypnotic effect of the extracts of herb pair Semen Ziziphi spinosae and Radix Polygalae and related mechanisms through experiments and meta-bolomics approach[J]. BMC Complement Medicine and Therapies, 2020,20(1):

186-188.

- [11] GUO X, LI H, FENG H, et al. Quality analysis of Ziziphi Spinosae Semen extracts based on high performance liquid chromatography quantitative fingerprint and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantification[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2021, 39(9): 989-997.
- [12] 张亚钦, 李辉, 武华红, 等. 父母身高对 7 岁以下儿童身高影响效应的研究[J]. 中国儿童保健杂志, 2021, 29(6): 584-588.
- [13] NONAKA K, MURATA S, NAKANO H, et al. Association of low bone mass with decreased skeletal muscle mass: a cross-sectional study of community dwelling older women[J]. Healthcare, 2020, 8(3): 77-78.
- [14] 闻亮, 汪灏. 个体化营养教育在 0~6 岁儿童生长发育中的应用效果观察[J]. 中国妇幼保健, 2021, 36(2): 419-421.
- [15] 李子昂, 赵瑞兰, 赵芳芳, 等. 北京学龄儿童青少年身高增长与血压变化性别差异的 10 年纵向研究[J]. 中华预防医学杂志, 2020(12): 1378-1382.
- [16] 卫海燕. 从循证医学证据看生长激素促生长治疗的收益及风险[J]. 中国实用儿科杂志, 2021, 36(8): 607-612.
- [17] ARABZOZANI M, KHEYRANDISH S, RASTGAR A, et

al. A systematic review and meta-analysis of stature growth complications in β -thalassemia major patients[J]. Ann Glob Health, 2021, 87(1): 48.

- [18] 臧建成, 秦泗河. 下肢延长术并发症的分类与治疗策略[J]. 中华骨科杂志, 2021, (11): 728-736.
- [19] HAJZADEH G, GHAEMI N, HADJZADEHM A, et al. The effects of gonadotropin releasing hormone analog and a combination of gonadotropin-releasing hormone analog and recombinant human growth hormone on adult height in girls with early puberty[J]. Adv Biomed Res, 2019, 8: 57.
- [20] BERTELLONI S, MASSART F, MICCOLI M, et al. Adult height after spontaneous pubertal growth or Gn R Hanalog treatment in girls with early puberty: a meta-analysis[J]. Eur J Pediatr, 2017, 176(6): 697-704.
- [21] 卞振华, 张文明, 唐静月, 等. 基于血清代谢组学和网络药理学研究酸枣仁提取物治疗失眠的效应物质及作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(1): 188-202.
- [22] 郭海波, 王慧. 酸枣仁汤治疗失眠现代机制研究进展与探讨[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(12): 2963-2966.
- [23] 林如意, 吴林, 赵瑾. 引气归元针法联合涌泉穴艾灸治疗围绝经期失眠症疗效及对患者血清白细胞介素-1 β 、5-HT、FSH 的影响[J]. 陕西中医, 2020, 41(6): 811-814.

(收稿日期: 2023-05-03)

(上接第 6 页)

- [13] OLAYANJU A, COPPLE I M, BRYAN H K, et al. Brusatol provokes a rapid and transient inhibition of Nrf2 signaling and sensitizes mammalian cells to chemical toxicity-implications for therapeutic targeting of NRF2[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 78: 202-212.
- [14] MAURI F, SCHEPKENS C, LAPOUGE G, et al. NR2F2 controls malignant squamous cell carcinoma state by promoting stemness and invasion and repressing differentiation[J]. Nat Cancer, 2021, 2(11): 1152-1169.
- [15] JIA X B, ZHANG Q, XU L, et al. Lotus leaf flavonoids induce apoptosis of human lung cancer A549 cells through the ROS/p38 MAPK pathway[J]. Biol Res, 2021, 54(1): 7-21.
- [16] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.
- [17] SHAO L, HE Q, WANG J, et al. MicroRNA-326 attenu-

ates immune escape and prevents metastasis in lung adenocarcinoma by targeting PD-L1 and B7-H3 [J]. Cell Death Discov, 2021, 7(1): 145-154.

- [18] YAN J, ZHU J, ZHU X, et al. Circ_0092012 knockdown restrains non-small cell lung cancer progression by inhibiting cell malignant phenotype and immune escape through microRNA-635/programmed death ligand 1 axis[J]. Bio-engineered, 2022, 13(5): 13929-13943.
- [19] CHEN Z, CHEN Z, XU S, et al. LncRNA SOX2-OT/miR-30d-5p/PDK1 regulates PD-L1 checkpoint through the mTOR signaling pathway to promote non-small cell lung cancer progression and immune escape[J]. Front Genet, 2021, 12: 674856.
- [20] LIU C, YANG Y, CHEN C, et al. Environmental eustress modulates β -ARs/CCL2 axis to induce anti-tumor immunity and sensitize immunotherapy against liver cancer in mice[J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 5725-5739.

(收稿日期: 2023-04-15)