

酸枣仁提取物靶向调控促进骨骼增长的 miRNA 筛选

https://doi.org/10.12307/2022.886

罗石任, 谢艳, 张丽, 殷娜

投稿日期: 2021-10-11

采用日期: 2021-11-29

修回日期: 2022-02-19

在线日期: 2022-03-11

中图分类号:

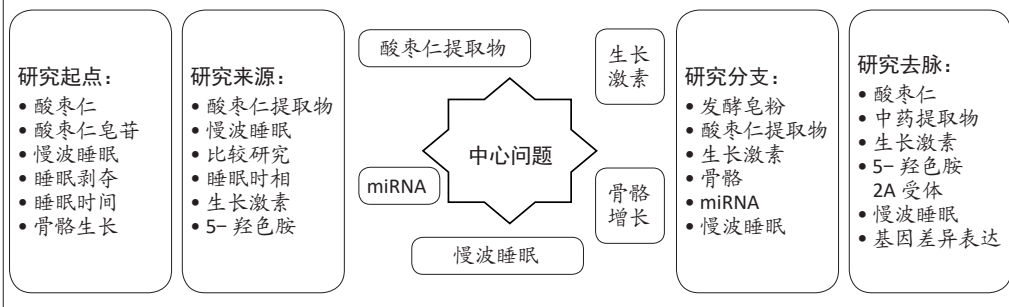
R459.9; R336; R318

文章编号:

2095-4344(2022)35-05658-07

文献标识码: A

文章快速阅读:



文题释义:

骨骼增长: 此文的骨骼增长是指长骨及脊柱的生长, 会促进人体及动物的身高增长。促进身高增长主要有两种手段, 一是促进骨的更快生长, 包括以中医药疗法, 激素疗法、针灸、穴位按摩等; 再一个手段是延迟骨骼的闭合, 给骨更多的生长时间。此文涉及的是中药疗法通过调控miRNA, 抑制5-羟色胺2A受体的表达, 从而延长慢波睡眠, 促进生长激素分泌, 进而促进骨的生长, 是一种基本无毒副作用的方法。

MicroRNA (miRNA): 是一类内生的、长度为20-26个核苷酸的小RNA, 其在细胞内具有多种重要的调节作用。每个miRNA可以有多个靶基因, 而几个miRNA也可以调节同一个基因。这种复杂的调节网络既可以通过一个miRNA来调控多个基因的表达, 也可以通过几个miRNA的组合来精细调控某个基因的表达。据推测, miRNA调节着人类1/3的基因, miRNA最重要的一个功能是在动植物中以负调控方式参与转录后基因表达调控。

摘要

背景: 生长激素大部分在慢波睡眠期间分泌, 而慢波睡眠启动和延长的一个决定因素是5-羟色胺。作者前期研究发现, 酸枣仁提取物可以通过升高5-羟色胺1A受体的表达, 使其与5-羟色胺结合, 延长慢波睡眠, 从而促进生长激素的分泌, 促进骨骼增长。同时发现, 酸枣仁提取物可以下调脑组织5-羟色胺2A受体的表达, 会使5-羟色胺1A受体失去竞争抑制与5-羟色胺更好地结合, 从而促进慢波睡眠的延长, 促进生长激素的分泌, 引发骨骼增长。

目的: 证明酸枣仁提取物可以通过降低5-羟色胺2A受体促进小鼠骨骼增长, 并筛选由酸枣仁提取物调控靶向5-羟色胺2A受体促进骨骼增长的miRNA。

方法: ①昆明种小鼠分为空白对照组、酸枣仁提取物高、低剂量组、阳性对照组和5-羟色胺2A受体选择性抑制剂组(以下简称抑制剂组), 每组10只。空白对照组小鼠每日灌胃去离子水, 酸枣仁提取物高、低剂量组分别灌胃酸枣仁提取物混悬液0.16、0.32 mg/g, 阳性对照组灌胃酸枣仁皂苷A标准品溶液, 抑制剂组灌胃酸枣仁提取物水溶液0.32 mg/g, 同时灌胃最后3 d每天侧脑室注射10 μg M100907。灌胃后第25天观察药物对小鼠体长的影响, ELISA法观察药物对血清生长激素、脑组织5-羟色胺2A受体表达的影响。②SD大鼠分为空白对照组、酸枣仁提取物组、阳性对照组和5-羟色胺2A受体选择性抑制剂组(以下简称抑制剂组), 于灌胃第3天开始, 观察药物对慢波睡眠的影响。③然后用芯片法检测药物引起骨骼增长的小鼠与普通小鼠脑组织差异表达的miRNAs, 并优选以5-羟色胺2A受体为靶基因的miRNA, 同时进行qRT-PCR验证。

结果与结论: ①用药25 d后, 高剂量组小鼠体长明显长于空白对照组($P < 0.01$); 小鼠血清生长激素水平明显高于空白对照组和抑制剂组($P < 0.01$, $P < 0.01$); 酸枣仁提取物组脑组织5-羟色胺2A受体表达水平明显降低, 低于抑制剂组($P < 0.01$); ②酸枣仁提取物组和阳性对照组慢波睡眠期时长均大于空白对照组($P < 0.01$, $P < 0.01$), 也大于抑制剂组($P < 0.05$, $P < 0.05$); 药物对异相睡眠时期无影响; ③符合筛选条件的差异表达miRNAs共16个, 其中表达上调13个, 表达下调3个; ④经qRT-PCR验证调控5-羟色胺2A受体的为上调的miR-34a-5p; ⑤提示酸枣仁提取物可以通过抑制5-羟色胺2A受体的表达延长慢波睡眠, 从而促进生长激素分泌引起小鼠骨骼增长, 其可能的机制为药物上调了miR-34a-5p的表达从而引起5-羟色胺2A受体的低表达。

关键词: 酸枣仁提取物; 5-羟色胺2A受体; 小鼠; 骨骼增长; miRNA; 大鼠; 慢波睡眠

缩略语: 5-羟色胺1A受体: serotonin 1A receptor, 5-HT1AR; 5-羟色胺2A受体: serotonin 2A receptor, 5-HT2AR

miRNA screening for targeted regulation of bone growth by semen ziziphi spinosae extract

Luo Shiren, Xie Yan, Zhang Li, Yin Na

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

河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院), 河南省洛阳市 471002

第一作者: 罗石任, 女, 1986年生, 广西壮族自治区梧州市人, 汉族, 2013年河南中医药大学毕业, 硕士, 主管药师, 主要中药制剂的质量标准研究。

通讯作者: 谢艳, 副研究员, 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院), 河南省洛阳市 471002

https://orcid.org/0000-0002-0456-4319 (罗石任)

基金资助: 河南省中医药科学研究专项课题(2018ZY1023), 项目参与人: 谢艳, 罗石任

引用本文: 罗石任, 谢艳, 张丽, 殷娜. 酸枣仁提取物靶向调控促进骨骼增长的 miRNA 筛选 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(35):5658-5664.



Luo Shiren, Master, Pharmacist-in-charge, Henan Provincial Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Luoyang 471002, Henan Province, China

Corresponding author: Xie Yan, Associate researcher, Henan Provincial Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Luoyang 471002, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Growth hormone is secreted during slow-wave sleep in large proportion, and the initiation and prolongation of slow-wave sleep is closely linked with serotonin. Previous studies have shown that semen ziziphi spinosae extract can increase the expression of serotonin 1A receptor. The combination of serotonin 1A receptor and serotonin can prolong slow-wave sleep, thereby promoting the secretion of growth hormone and bone growth. In addition, semen ziziphi spinosae extract can down-regulate the expression of serotonin 2A receptor in brain tissue, which can promote the combination of serotonin 1A receptor and serotonin, thereby promoting the prolongation of slow-wave sleep, the secretion of growth hormone, and bone growth.

OBJECTIVE: To prove that semen ziziphi spinosae extract can promote bone growth in mice by down-regulating the expression of serotonin 2A receptor and to screen miRNAs targeting serotonin 2A receptor and promoting bone growth.

METHODS: (1) Kunming mice were divided into blank control group, high- and low-dose groups of semen ziziphi spinosae extract (hereinafter referred to as high- and low-dose groups), positive control group, and serotonin 2A receptor selective inhibitor group (hereinafter referred to as inhibitor group), with 10 mice in each group. Mice in the blank control group were gavaged with deionized water every day, the high- and low-dose groups were gavaged with 0.16 and 0.32 mg/g semen ziziphi spinosae extract suspension respectively, the positive control group was gavaged with semen ziziphi spinosae saponin A standard solution, and the inhibitor group was gavaged with semen ziziphi spinosae extract aqueous solution. Gavage was administered to each group at the same period, and 10 μ g of M100907 was injected into the lateral ventricle of each mouse once a day for the last 3 days. Changes in the body length of mice were observed, and changes in the expression of serum growth hormone and brain tissue serotonin 2A receptor were observed by ELISA. (2) Sprague-Dawley rats were divided into blank control group, medication group (given semen ziziphi spinosae extract), positive control group and serotonin 2A receptor selective inhibitor group (hereinafter referred to as the inhibitor group). The effects of drugs on slow-wave sleep were observed at the 3rd day after intragastric administration. (3) The chip method was used to detect the differentially expressed miRNAs in the brain tissues of mice with bone growth and ordinary mice. The miRNAs targeting serotonin 2A receptor were selected and verified by real-time fluorescent quantitative PCR.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) After 25 days of treatment, the body length of mice in the high-dose group was significantly longer than that in the blank control group ($P < 0.01$). The serum growth hormone level of mice was significantly higher in the high-dose group than the blank control and inhibitor groups ($P < 0.01$, $P < 0.01$). Compared with the inhibitor group, semen ziziphi spinosae extract significantly lowered the expression of serotonin 2A receptor in brain tissue ($P < 0.01$). (2) The duration of slow-wave sleep in the medication and positive control groups was longer than that in the blank control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$) and in the inhibitor group ($P < 0.05$, $P < 0.05$). There was no difference in the effects of drugs on paradoxical sleep periods. (3) A total of 16 differentially expressed miRNAs met the screening conditions, 13 of which were up-regulated and 3 were down-regulated. (4) It was verified by real-time fluorescent quantitative PCR that the up-regulated miR-34a-5p could regulate serotonin 2A receptor. (5) All these findings indicate that semen ziziphi spinosae extract can inhibit the expression of serotonin 2A receptor and prolong slow-wave sleep, thereby increasing the secretion of growth hormone and promoting bone growth in mice. The possible mechanism is that semen ziziphi spinosae extract up-regulates the expression of miR-34a-5p which results in the lowered expression of serotonin 2A receptor.

Key words: semen ziziphi spinosae extract; serotonin 2A receptor; mouse; bone growth; microRNA; rat; slow-wave sleep

Funding: Henan Provincial Scientific Research Special Project for Traditional Chinese Medicine, No. 2018ZY1023 (to XY and LSR [project participants])

How to cite this article: LUO SR, XIE Y, ZHANG L, YIN N. miRNA screening for targeted regulation of bone growth by semen ziziphi spinosae extract. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(35):5658-5664.

0 引言 Introduction

随着生活水平不断提高,人们普遍认为身高较高者有更多机遇、更受重视,一些特殊职业,如空乘、体育、播音主持、模特专业等,对身高也有一定要求。还有研究表明,身高会影响人们的社会知觉、人格、择偶行为和心理健康水平^[1]。作者前期研究发现酸枣仁提取物(市售,含皂甙3%~5%,市场名称为酸枣仁皂甙,实为提取物,天然酸枣仁中含皂甙0.1%~0.04%;是由酸枣仁粉末用60%~70%乙醇回流提取3次,2h/次,然后浓缩喷雾干燥而成)可以通过提高小鼠脑组织Gi/o蛋白的表达,通过cAMP-PKA途径提高5-羟色胺1A受体(serotonin 1A receptor, 5-HT1AR)在脑内的表达水平和活性,还可延长慢波睡眠,进而促进生长激素的分泌,发挥促进骨骼增长的生物学效应^[2-7];同时发现药物会降低5-羟色胺2A受体(serotonin 2A receptor, 5-HT2AR)在脑组织中的表达。5-HT2AR与5-HT1AR同为5-羟色胺受体,也是目前关注较多的5-羟色胺受体,5-HT2AR作为蛋白质也受microRNA(miRNA)调控。作者进一步对酸枣仁提取物调控靶向5-HT2AR促进骨骼增长的miRNA进行了筛选研究。

miRNA是一类存在于动植物体内的内源性非编码单链小分子RNA,对生物体转录后的基因表达调控起关键作用^[8]。miRNA以何种方式与目的基因作用和miRNA与目的基因的

配对程度有关,miRNA与目的基因配对不完全时,miRNA就以抑制目的基因的表达发挥作用;miRNA与目的基因某段序列配对完全时,就可能引起目的基因在互补区断裂而导致基因沉默。很多报道将之形象地称为miRNA对mRNA的海绵吸附作用^[9-13],因此机体也可以通过影响miRNA的表达对5-HT2AR的表达水平进行调控。作者此次筛选由酸枣仁提取物调控5-HT2AR引起与普通小鼠身长差异有显著性意义的小鼠差异表达的miRNA,进一步为今后多靶点调控骨骼增长提供实验依据。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,计量资料比较采用单因素方差分析。

1.2 时间及地点 实验于2019年10月至2020年12月在河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)医学实验中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 雄性昆明种小鼠60只,SPF级,25d龄,体质量15~17g,动物许可证号SCXK(豫)2010-0002;SD大鼠24只,SPF级,雌雄各半,体质量200~240g,动物许可证号SCXK(豫)2015-0001,均由河南省实验动物中心提供。动物饲养环境温度20~24℃,湿度50%~70%,12h明暗交替,

噪声 < 50 dB。实验方案经河南省洛阳正骨医院 (河南省骨科医院) 动物实验伦理委员会批准, 批准号: KY2019-004-05。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

1.3.2 药物与试剂 酸枣仁提取物, 由陕西斯诺特生物技术有限公司提供 (批号: 201406); 酸枣仁皂甙 A (纯度 >98%, 批号: A0274), 购于中国食品药品检定研究院, 以上药物使用时药物用纯净水溶解; 5-HT2AR 阻断剂 M100907 (美国 SIGMA 公司, 货号: M3324); 小鼠 5-HT2AR ELISA 试剂盒 (上海纪宁实业有限公司, 批号: 201510); RNA 提取液 (武汉谷歌生物科技有限公司, 货号: G3013); 三氯甲烷 (国药集团化学试剂有限公司, 货号: 10006818); 异丙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 货号: 80109218); 无水乙醇 (国药集团化学试剂有限公司, 货号: 10009218); HyPure™ Molecular Biology Grade Water (HyClone 公司, 货号: SH30538.02); RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo 公司, 货号: #K1622); FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) (Roche 公司, 货号: 04913914001)。

1.3.3 仪器 荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 美国, 型号: Stepone plus); 超微量分光光度计 (Thermo 公司, 美国, 型号: NanoDrop2000); 台式高速冷冻型微量离心机 (DragonLab 公司, 美国, 型号: D3024R); 酶标仪 (Labsystems Multiskan MS, 芬兰, 352 型); 超微量核酸蛋白浓度测定仪 (Thermo Fisher, 美国, 型号: nanodropone); 基因芯片微阵列扫描仪 (Agilent, 美国, 型号: SureScan)。

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和脑组织 5-HT2AR 表达的影响 选取同时期出生的 10 胎昆明种小鼠, 每胎 5 只, 每胎的 5 只按随机数字表法分到空白对照组、酸枣仁提取物高、低剂量组 (以下简称高、低剂量组)、阳性对照组和 5-HT2AR 选择性抑制剂组 (以下简称抑制剂组), 以规避遗传因素的影响, 每组 10 只。5 组小鼠给药前测量原始体长 (从头部最顶端到小鼠臀尾交接处), 测量结果显示各组差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠适应环境 1 周后开始灌胃, 1 次/d; 空白对照组灌胃去离子水; 高、低剂量组每日灌胃酸枣仁提取物混悬液 0.32 mg/g 及 0.16 mg/g; 阳性对照组灌胃酸枣仁皂甙 A 标准品溶液 0.013 mg/g; 抑制剂组灌胃酸枣仁提取物水溶液 (高剂量 0.32 mg/g), 最后 3 d 给予 5-HT2AR 阻断剂 M100907 侧脑室注射 [10 μg/(只·d)]。灌胃后第 25 天用直尺测定小鼠体长, 精确到 1 mm。

用浸泡乙醚的棉球三四个, 放入烧杯中, 将小鼠放入烧杯内, 盖上培养皿做为盖子, 一两分钟即可麻倒小鼠。麻醉小鼠后眼眶取血, 自然凝固 20 min 后离心取上清液; 取脑组织, 称质量, 加入 9 倍 PBS, 冰浴上匀浆, 以离心半径 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液, 采用 ELISA 试剂盒测定血清生长激素水平和脑组织 5-HT2AR 水平。

1.4.2 酸枣仁提取物对大鼠慢波睡眠的影响 选用头部稍大

组织工程实验动物造模过程中的相关问题:

造模目的	观察药物干预对正常动物体长、血清生长激素、脑组织中 5-HT2AR 表达水平及慢波睡眠时长的影响, 评估给药后对骨骼增长的促进作用
选择动物的条件	选择同时期出生的同一胎的动物随机分到各组, 以最大程度避免遗传对动物体长的影响
模型与所研究疾病的关系	模型即为正常发育的动物, 代表了正常发育没有基因突变与遗传疾病的人体, 旨在观察药物对骨骼增长的促进作用
动物来源及品系	SD 大鼠和昆明种小鼠均购自河南省实验动物中心
造模技术描述	此实验并未造模
动物数量及分组方法	(1) 选取同时期出生的 10 胎小鼠, 每胎 5 只, 共 50 只。每胎的 5 只随机分到 5 个组 (空白对照组、酸枣仁提取物高、低剂量组、阳性对照组和 5-HT2AR 选择性抑制剂组), 每组 10 只, 观察动物体长、血清生长激素及脑组织中 5-HT2AR 表达水平; (2) SD 大鼠 24 只, 随机分为 4 组 (空白对照组、酸枣仁提取物组、阳性对照组、5-HT2AR 选择性抑制剂组), 观察给药后对大鼠慢波睡眠的影响
观察指标	观察小鼠体长、血清生长激素表达水平、脑组织中 5-HT2AR 表达水平及脑组织差异表达的 miRNA; 观察大鼠各睡眠时相的变化
动物处理	空白对照组小鼠灌胃去离子水; 酸枣仁提取物高、低剂量组每日灌胃酸枣仁提取物混悬液 0.32 mg/g 及 0.16 mg/g; 阳性对照组灌胃酸枣仁皂甙 A 标准品溶液 0.013 mg/g, 抑制剂组灌胃 0.32 mg/g 酸枣仁提取物水溶液, 最后 3 d 给予 M100907 侧脑室注射 10 μg/(只·d); 大鼠酸枣仁提取物组、阳性对照组和抑制剂组均按照体表比以小鼠酸枣仁提取物高剂量组、阳性对照组和抑制剂组用药剂量换算而来
伦理委员会批准	实验方案经河南省洛阳正骨医院 (河南省骨科医院) 动物实验伦理委员会批准, 批准号为 KY2019-004-05

表注: 5-HT2AR 为 5-羟色胺 2A 受体

的 SD 大鼠饲养 1 周适应环境后, 按随机数字表法分为空白对照组、酸枣仁提取物组、阳性对照组、抑制剂组, 后 3 组均按照体表比以小鼠酸枣仁提取物高剂量组、阳性对照组和抑制剂组用药剂量换算而来, 每组 6 只。用 3% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 进行腹腔注射麻醉, 颅顶脱毛后沿矢状线切开, 暴露颅骨并打孔, 在枕叶和颞叶放置电极记录脑电, 将电极导线连接于微型插座上, 用自凝牙托水拌牙托粉固定, 术后给予大鼠青霉素肌内注射预防感染。大鼠恢复 1 周后, 开始记录脑电并存储于微硬盘上, 共记录 6 h。分析时, 将脑电复原, 以每 15 s 为一单位, 采用 WXL 睡眠自动分析系统判断慢波睡眠时长, 慢波睡眠时期的特征为: 脑电波频率变慢, 成同步化, α 波减少, “梭形”波消失, 出现 θ 波, 最后出现高振幅的 δ 波。计算 6 h 内觉醒期、慢波睡眠期、异相睡眠期及总睡眠期时长, 连续记录 3 d, 取平均值。4 组动物慢波睡眠时长进行统计差异无显著性意义后开始灌胃给药。空白对照组灌胃去离子水; 酸枣仁提取物组按照 0.22 mg/g 灌胃酸枣仁提取物水溶液; 阳性对照组灌胃酸枣仁皂甙 A 标准品 0.009 mg/g; 抑制剂组灌胃酸枣仁提取物的同时, 每天给予 5-HT2AR 阻断剂 M100907 侧脑室注射, 70 μg/只, 1 次/d, 于灌胃第 3 天开始, 末次灌胃及注射 30 min 后, 同样记录脑电, 分析用药后 4 组大鼠睡眠情况。

1.4.3 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 选择出生 25 d 左右、来自于同一时期 10 胎的昆明种小鼠，雄性，每胎 2 只，每胎的 2 只随机分为空白对照组和用药组，每组 10 只。测量原始体长，统计无差异下，适应环境饲养 1 周，然后空白对照组正常饲养，酸枣仁提取物组每日灌胃酸枣仁提取物混悬液 0.320 mg/g，25 d 后测量 2 组小鼠体长，统计两组小鼠平均体长有无统计学差异。挑选酸枣仁提取物组体长最长和空白对照组体长最短的来源于同一胎的原 4 对小鼠，麻醉后取其脑组织 (小鼠死亡后 10 min 内取材并保存好)，组织块以 PBS 清洗干净，每 50 mg 组织加 2 mL 左右 Trizol 溶液彻底匀浆裂解组织样品，操作在冰上进行。芯片法检测差异表达的 miRNAs，Agilent 小鼠 miRNA 微阵列目录来源于 miRBase 数据库 v21.0(<https://www.mirbase.org/>)。靶向 1 881 个小鼠的 miRNAs，样品标记和芯片杂交根据 Agilent miRNA Microarray Systemwith miRNA Complete Labeling and Hyb Kit 实验方案 (Agilent Technology) 执行，具体步骤为：①来自每个样品的 miRNA 在 T₄ RNA ligase 作用下用 Cyanine 3-pCp 标记；②标记产物浓缩干燥后用水重溶；③芯片杂交；④杂交芯片被洗涤，固定并扫描 (Agilent Microarray Scanner(part number G2505C)。收集所有用药组倍数变化值 (FC) ≥ 1.5，且 P 值 ≤ 0.05 的差异表达 miRNAs，建立差异表达 miRNAs 库。

1.4.4 利用生物学网站预测与 5-HT2AR 结合的 miRNAs 在 miRNADB 网站 (<http://mirdb.org/>) 预测可以调控 5-HT2AR 的 miRNAs，与芯片法筛选的 miRNAs 取交集。同时在 RNAhybrid 网站中 (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) 输入筛选的 miRNA 和 5-HT2AR 的基因序列，预测两者结合位点。通过结合的能量和碱基配对情况，确定两者的结合力强度和结合位点。

1.4.5 以 5-HT2AR 为靶基因的 miRNA 的 qRT-PCR 验证 采用 Trizol 试剂一步法提取小鼠脑组织细胞总 RNA，并用紫外分光光度计测定提取的 RNA 浓度及通过 A_{260 nm}/A_{280 nm} 比值检测 RNA 的纯度。按照 miScript II RT Kit 反转录试剂盒说明书进行操作，以提取的 RNA 为模板反转录成 cDNA。用所得 cDNA 为模板进行 qRT-PCR，引物序列见表 1。每个标本都用 U6 做内参照，反应体积 20 μL，反应条件：95 °C，10 min；95 °C，10 s；59 °C，50 s；共 40 个循环。

表 1 | miRNA 及内参引物序列
Table 1 | miRNA and internal reference primer sequences

基因名	双向引物序列
U6	L: 5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3' R: 5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'
mmu-miR-34a-5p	L: 5'-UGA GAU GAA GCA CUG UAG CUC-3' R: 通用下游引物

1.5 主要观察指标 直尺测量小鼠体长；ELISA 法检测血清生长激素及脑组织中 5-HT2AR 表达水平；基因芯片法检测脑组织差异表达的 miRNA；插入脑电极法观察大鼠各睡眠时相。

1.6 统计学分析 文章统计学方法已经河北医科大学生物统计学专家审核。以 EXCEL 录入数据，SPSS 22.0 软件进行统计分析。药物对小鼠体长、生长激素和 5-HT2AR 的影响采用单因素方差分析，组间比较采用 LSD 法；qRT-PCR 法验证差异表达的 miRNA 用两独立样本的 t 检验。P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 小鼠每组纳入 10 只，共 5 组；大鼠每组纳入 6 只，共 4 组 (因为小鼠实验证明高剂量组疗效更好，大鼠实验酸枣仁提取物只设计了用药高剂量组)。全部进入结果分析，无脱失。

2.2 药物对小鼠体长的影响 用药 25 d 后，酸枣仁提取物高剂量组小鼠体长明显大于空白对照组 (P < 0.01)，酸枣仁提取物高剂量组小鼠体长大于低剂量组 (P < 0.01)，阳性对照组体长明显长于对照组 (P < 0.05)，抑制剂组由于一直灌胃药物，只有最后 3 d 使用了抑制剂，其体长也明显长于空白对照组 (P < 0.05)，见表 2。

表 2 | 药物对小鼠体长的影响 (x̄±s, n=10)
Table 2 | Effects of drugs on the body length of mice

组别	体长 (cm)
空白对照组	9.6±0.4
酸枣仁提取物低剂量组	9.9±0.4
酸枣仁提取物高剂量组	10.2±0.4 ^{bc}
阳性对照组	10.1±0.4 ^a
抑制剂组	10.0±0.6 ^a
F 值	3.033
P 值	0.027

表注：与空白对照组比较，^aP < 0.05，^bP < 0.01；与低剂量组比较，^cP < 0.01

2.3 药物对血清生长激素和脑组织 5-HT2AR 的影响 酸枣仁提取物高剂量组小鼠血清生长激素水平明显高于空白对照组和抑制剂组 (P < 0.01，P < 0.01)，酸枣仁提取物高剂量组小鼠血清生长激素水平高于低剂量组 (P < 0.01)，阳性对照组小鼠血清生长激素水平明显高于空白对照组和抑制剂组 (P < 0.01，P < 0.01)，抑制剂组小鼠血清生长激素水平与空白对照组无差异。与抑制剂组相比，酸枣仁提取物高剂量组、阳性对照组、空白对照组脑组织 5-HT2AR 水平均有所降低 (P < 0.01)，见表 3。

表 3 | 药物对血清生长激素、脑组织 5-羟色胺 2A 受体表达水平的影响 (x̄±s, n=10, μg/L)
Table 3 | Effects of drugs on the levels of serum growth hormone and serotonin 2A receptor

组别	生长激素	5-羟色胺 2A 受体
空白对照组	42.18±6.06	30.45±11.83 ^c
酸枣仁提取物低剂量组	40.64±4.48	43.25±4.72
酸枣仁提取物高剂量组	57.90±8.87 ^{abc}	29.91±6.58 ^c
阳性对照组	54.80±8.39 ^{bc}	28.72±12.12 ^c
抑制剂组	41.32±4.44	44.69±10.21
F 值	15.204	6.768
P 值	0.000	0.000

表注：与空白对照组比较，^aP < 0.05；与低剂量组比较，^bP < 0.01；与抑制剂组比较，^cP < 0.01

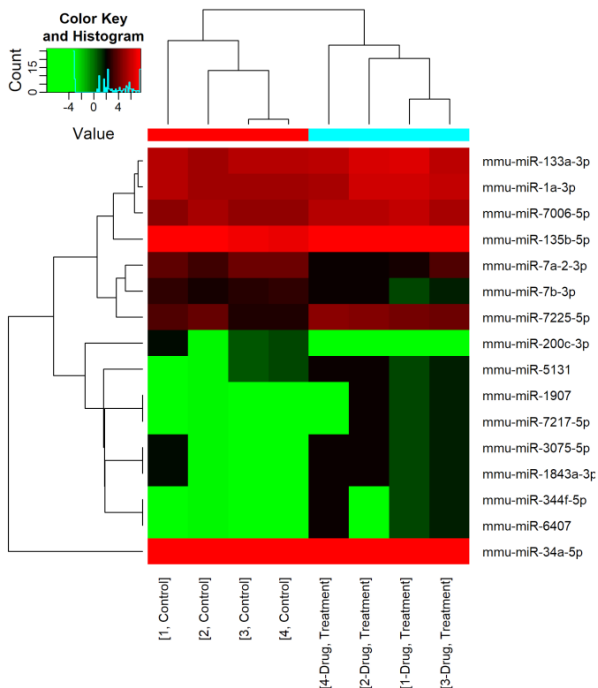
2.4 给予酸枣仁提取物后对大鼠慢波睡眠的影响 酸枣仁提取物组和阳性对照组慢波睡眠时长均大于空白对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 也大于抑制剂组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); 药物对异相睡眠时期无影响; 酸枣仁提取物组和阳性对照组总睡眠期由于慢波睡眠期间的延长, 也大于空白对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 同时大于抑制剂组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); 从而造成觉醒期酸枣仁提取物组和阳性对照组小于空白对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 同时小于抑制剂组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$), 见表 4。

表 4 | 药物对睡眠各时相的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, s)
Table 4 | Effects of drugs on sleep phases

组别	觉醒期	慢波睡眠期	异相睡眠期	总睡眠期
空白对照组	175.2±32.4	135.8±25.3	49.0±13.8	184.8±32.4
酸枣仁提取物组	128.5±23.5 ^{ab}	181.7±26.5 ^{ab}	49.8±8.8	231.5±23.5 ^{ab}
阳性对照组	133.8±17.6 ^{ab}	174.8±28.3 ^{ab}	51.3±15.3	226.2±17.6 ^{ab}
抑制剂组	174.3±19.4	139.0±23.9	46.7±9.4	185.7±19.4
F 值	6.690	4.991	0.154	6.690
P 值	0.003	0.010	0.926	0.003

表注: 与空白对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与抑制剂组比较, ^b $P < 0.01$

2.5 基因芯片筛选酸枣仁提取物组和对照组差异表达的 miRNAs 筛选出表达上调的 miRNAs 有 420 个, 表达下调的 miRNAs 453 个。其中符合差异倍数 ≥ 1.5 、 $P < 0.05$ 的差异表达 miRNAs 共 16 个, 表达上调 13 个, 表达下调 3 个。获得符合要求的差异表达的 miRNA, 见图 1 及表 5。



图注: 左侧 1-4 为空白对照组, 右侧 1-4 为酸枣仁提取物组, 图中红色表示此基因表达上调, 绿色表示此基因表达下调, 而黑色表示上调或下调的幅度介于两者之间。通过酸枣仁提取物组和空白对照组颜色的变化判断相应基因在实验组上调或下调表达

图 1 | 酸枣仁提取物组与对照组差异表达 miRNAs 的聚类图
Figure 1 | Cluster diagram of differentially expressed miRNAs between the medication group and the control group

表 5 | 基因芯片筛选出的符合要求的差异表达 miRNAs
Table 5 | Differentially expressed genes screened by gene chip that meet the requirements

miRNA	差异倍数	P 值
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-344-5p	12.515 935 9	0.024 367 84
mmu-miR-6407	12.515 935 9	0.024 367 84
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	0.014 537 2
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 22
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

2.6 生物信息学网站预测与芯片筛选的调控 5-HT2AR 的优选 miRNA 由于给药后小鼠体长增长时 5-HT2AR 低表达, 所以观察影响 5-HT2AR 表达并在酸枣仁提取物组中上调的 miRNAs。结果 miRNADB 网站预测 mmu-miR-34a-5p 可以调控 5-HT2AR 表达, 与芯片法筛选结果相同。作者用 RNAhybrid 网站筛选结果显示 mmu-miR-34a-5p 与 5-HT2AR 有很好的结合性。

2.7 qRT-PCR 法验证 mmu-miR-34a-5p 在酸枣仁提取物组和对照组之间的差异表达 RNA 的纯度结果显示, $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ 比值介于 1.8-2.0 之间, 说明提取的 RNA 合格。qRT-PCR 结果显示酸枣仁提取物组 mmu-miR-34a-5p 的表达水平较空白对照组明显升高 ($P < 0.05$), 见表 6。

表 6 | qRT-PCR 法测定用药组和空白对照组 miR-34a-5p 的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)
Table 6 | The expression of miR-34a-5p in the medication group and the blank control group detected by qRT-PCR

组别	miR-34a-5p
酸枣仁提取物组	0.22±0.70
空白对照组	0.13±0.21
t 值	2.672
P 值	0.037

3 讨论 Discussion

酸枣仁为鼠李科植物酸枣的种子, 功能为养肝、宁心、安神、敛汗, 具有镇静、催眠作用。作者的前期研究发现酸枣仁提取物可以促进小鼠体长增长, 其作用为引起脑组织 5-HT1AR 表达上调进而促进了 5-HT1AR 与 5-羟色胺的结合, 从而促进了慢波睡眠, 引起生长激素分泌增多。进一步研究发现, 酸枣仁提取物可以调控 5-HT2AR 的表达, 且 5-HT2AR 的高表达会竞争性抑制 5-HT1AR 与 5-羟色胺的结合, 抑制生长激素的分泌。酸枣仁提取物降低 5-HT2AR 的表达也直接促进了 5-HT1AR 与 5-羟色胺的结合, 而 5-HT2AR 作为一种蛋白受 miRNA 调控, 因此作者进一步研究酸枣仁提取物是否通过干预 miRNA 而调控 5-HT2AR 的表达丰度。对酸枣

仁提取物灌胃后小鼠差异表达的 miRNAs 进行筛选, 其中符合差异倍数 ≥ 1.5 、 $P < 0.05$ 上调的 miRNA 共 13 个, 下调的 miRNA 有 3 个。由于小鼠给予酸枣仁提取物后 5-HT2AR 较空白对照组呈现低表达趋势, 所以作者关注上调的 miRNAs, 经过生物信息学网站筛选, 将目标确定为 miR-34a-5p; 而且对 miR-34a-5p 在酸枣仁提取物组和空白对照组中的表达进行了 qRT-PCR 检测, 证明其确实在酸枣仁提取物组表达升高。

由于生物体的骨骼增长 70%–75% 受到父母双方基因的影响, 25%–30% 受到后天环境及各种因素的干扰^[14-17], 所以作者为了尽量避免父辈基因对实验的干扰, 特别选取了来自同一时期同一胎的小鼠分在各个组, 规避遗传干扰的风险; 而且几次预实验发现这种干预也确实降低了组间的离散程度。

此次研究在观察药物促进小鼠体长实验中设立了酸枣仁提取物高、低剂量组, 结果发现高剂量组促进小鼠体长的作用明显, 为了减少实验的复杂性, 在给予大鼠药物观察对慢波睡眠的影响及筛选药物引起差异表达的 miRNA 时, 均选取了高剂量酸枣仁提取物; 且大鼠的给药剂量是按照小鼠给药剂量通过体表比换算的。

miRNA 是一类存在于动植物体内、大小为 21–25 nt 的内源性非编码单链小分子 RNA, 对生物体转录后的基因表达调控起关键作用。miRNA 通常靶向 1 个或者多个 mRNA, 通过抑制翻译或降解靶 mRNA 而调节基因的表达^[18]。人类基因组中存在超过 1 000 条 miRNA, 其在多种人体细胞类型中大量表达, 估计其调节超过 60% 的哺乳动物基因^[19]。miRNA 不仅可以作为治疗疾病的手段, 由于其极低的表达量可以通过 PCR 实验扩增, 所以可以作为疾病诊断的早期诊断物, 因此对于 miRNA 的研究意义重大。

目前促进非疾病性矮小青少年身高增长主要有以下几种方法^[20-21]: ①营养的补充: 即在青少年生长期补充适量的蛋白质、钙、磷、维生素等; ②多接受阳光照射: 可促进新陈代谢, 对维生素 D 的合成与钙的吸收有促进作用, 从而加速骨的生长发育; ③体育锻炼和劳动; ④药物治疗: 目前的药物治疗大多都是外用激素促进身高的增长; ⑤针灸、理疗等; ⑥骨科矫形肢体延长术: 此种方法患者痛苦大, 而且手术延伸操之过急会使骨不愈合, 必须重新接骨, 使得骨比原来更短^[22-23]。其中前 3 条都是父母经常运用的, 且青少年学习比较紧张, 多晒太阳和进行体育锻炼就显得心有余而时间不足; 药物治疗使用生长激素会升高血糖^[24-30], 且价格昂贵, 针灸、理疗耗费时间, 学生们一般无法长时间进行; 骨科延长术更不建议使用。因此, 对目前的青少年而言, 能够促进身高增长的有效且无害的方式似乎只有从营养上补充而已, 仅此一项, 手段单一。研究证明, 生长激素和雄激素都促进骨骼生长^[31-40], 但雄性激素虽可以短期见效, 却可致骨骺提前闭合, 骨龄增加, 导致青少年提前停止生长^[41], 因此, 人体身高的决定性因素还是生长激素, 而利用毒副作用小的中药提取物

通过改善睡眠促进身高的增长无异是一种简单易行的方法, 且其作用为提高了 miR-34a-5p 的表达, 从而下调了对于慢波睡眠延长有负调控作用的 5-HT2AR, 这为今后用 miRNA 治疗骨骼增长提供了可能性, 且其方法简单直接地给予前体既可, 同时也为身材矮小者在未出现趋势前即可进行诊断提供了帮助。此次研究为今后探索促进骨骼增长的方向提供了新思路。

致谢: 向河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)中心实验室的谢文老师和夏华玲老师表示感谢, 给予了小鼠脑组织取样的指导工作。

作者贡献: 谢艳负责实验设计, 罗石任负责实验实施, 张丽负责指标测定, 殷娜负责实验统计。

利益冲突: 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

版权转让: 文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

出版规范: 该文章撰写遵守了国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审, 同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

4 参考文献 References

- [1] 杨小莉, 刘潇肖, 白宝玉. 身高的心理效应及其内在机制 [J]. 心理科学进展, 2017, 25(5): 857-865.
- [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] LUO H, SUN SJ, 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 metabolomics approach. BMC Complement Med Ther. 2020; 20(1): 186-188.
- [4] 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. Chin J Biochem Mol Biol. 2021; 39(9): 989-997.
- [5] DU C, YAN Y, SHEN C, et al. Comparative pharmacokinetics of six major compounds in normal and insomnia rats after oral administration of Ziziphi Spinosae Semen aqueous extract. J Pharm Anal. 2020; 10(4): 385-395.
- [6] LI LB, KIM YW, WANG YH, et al. Methanol extract of semen Ziziphi Spinosae attenuates ethanol withdrawal anxiety by improving neuropeptide signaling in the central amygdala. BMC Complement Altern Med. 2019; 19(1): 147.
- [7] YAN Y, LI Q, DU HZ, et al. Determination of five neurotransmitters in the rat brain for the study of the hypnotic effects of Ziziphi Spinosae Semen aqueous extract on insomnia rat model by UPLC-MS/MS. Avian Res. 2019; 17(7): 551-560.
- [8] 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.
- [9] WANG Y, YANG L, CHEN T, et al. A novel lncRNAMCM3AP-AS1 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by targeting miR-194-5p/FOXA1 axis. Mol Cancer. 2019; 18(1): 28.

- [10] 张小琴,朱智显,蔡虎志,等.长链非编码RNA-微小RNA-信使RNA调控轴在高血压靶器官损害中的作用机制[J].中华高血压杂志,2021,29(1):18-24.
- [11] ZHANG J, HE W, ZHENG D, et al. Exosomal miR1184 derived from mesenchymal stem cells alleviates cisplatin-associated acute kidney injury. *Mol Med Rep.* 2021;24(5):124-127.
- [12] WANG Q, SUN H, WEN D, et al. Ultrasensitive electrochemical detection of miRNA based on polymerization signal amplification. *Talanta.* 2021;23(5):744-745.
- [13] 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. *Adv Health Mat.* 2021; 10(8):e2101616.
- [14] 武华红,李阳,郭佳运,等.基于初潮时骨龄预测女童初潮后身高剩余生长潜力的横断面调查[J].中国循证儿科杂志,2021,16(2):99-103.
- [15] 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. *Healthcare.* 2020;8(3):77-78.
- [16] 赵心田,何晶晶,房爱萍,等.蛋白质摄入对男孩身高影响的调查研究[J].中国食物与营养,2021,27(8):5-8.
- [17] ZHUANG J, NING H, WANG M, et al. Downregulated fat mass and obesity-associated protein inhibits bone resorption and osteoclastogenesis by nuclear factor-kappa B inactivation. *Onkologija.* 2021;8(7):13-15.
- [18] 肖潇.短链非编码RNA的转运及功能[D].南京:南京大学,2019.
- [19] 王军,姜利明,皮杨威,等.脊髓损伤后血清miRNA-21表达与损伤程度的相关性分析[J].中国实验诊断学,2021,25(2):264-267.
- [20] 张飞鹏.影响青少年身高生长因素分析[J].西安文理学院学报:社会科学版,2011,14(1):92-93.
- [21] 肖爱,吴艳红,江霞.早期干预在身高矮偏离儿童中的作用[J].中国现代医生,2021,59(17):57-59.
- [22] ARAB-ZOZANI M, KHEYRANDISH S, RASTGAR A, et al. A Systematic Review and Meta-Analysis of Stature Growth Complications in β -thalassemia Major Patients. *Ann Glob Health.* 2021;87(1):48.
- [23] 宋逸,闫晓晋,张京舒,等.1985-2014年中国汉族18岁青少年身高长期趋势的性别差异变化中华流行病学杂志,2021,42(5):801-806.
- [24] 丁亚,董磊,崔西龙,等.可调节式骨科手术架在强直性脊柱炎伴脊柱后凸畸形矫形中的应用[J].中国脊柱脊髓杂志,2021,31(1):91-94.
- [25] 朱欢叶,李波,简月奎,等.选择性置钉固定在青少年特发性脊柱侧弯矫形中的研究进展安徽医药,2019,23(7):1277-1280.
- [26] 杨华清,夏和桃,彭爱民,等.不同类型延长器在胫骨延长术治疗双小腿不等长及身材矮小症的效果比较[J].中国临床康复,2006,10(32):23-26.
- [27] HAJZADEH G, GHAEMI N, HADJZADEH MA, 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. *Adv Biomed Res.* 2019;8:57.
- [28] SPRINCHUK NA. Assessment of somatotrophic function in children with syndrome of biologically inactive growth hormone against a background of clonidine and insulin stimulation tests. *Int J Endocrinol.* 2019;15(2):148-151.
- [29] NATALIJA S, OLENA B. Influence of recombinant growth hormone treatment on the state of pituitary-thyroid and pituitary-adrenal systems in children with syndrome of biologically inactive growth hormone. *Med Sci.* 2019;2(5):19-22.
- [30] BRIGANTE G, RICCETTI L, LAZZARETTI C, et al. Abacavir, nevirapine, and ritonavir modulate intracellular calcium levels without affecting GHRH-mediated growth hormone secretion in somatotrophic cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2019;48(2):37-44.
- [31] 李桂梅,王倩.重组人生长激素治疗对儿童甲状腺功能和骨骼的影响[J].实用儿科临床杂志,2011,26(20):1546-1548.
- [32] 刘甜,刘世平,谢坤霞,等.重组人生长激素在矮小儿童生长方面的应用进展[J].世界最新医学信息文摘(连续型电子期刊),2021,21(18):125-126,129.
- [33] 姚海波.重组人生长激素注射液联合注射用曲普瑞林治疗68例青春非生长激素缺乏身材矮小患儿的短中期随访研究[J].中国药物与临床,2019,19(6):957-959.
- [34] 张涤清,李明. Ghrelin 对骨及软骨生长作用研究进展[J].国际骨科学杂志,2010,31(1):45-46.
- [35] BRIGHT GM, FIERRO-RENOY JF. A rationale for the treatment of short stature in children with the combination of recombinant human growth hormone (rhGH) and recombinant human insulin-like growth factor-I (rhIGF-I). *Growth Horm IGF Res.* 2020;52:101318.
- [36] RICHMOND E, ROGOL AD. Treatment of growth hormone deficiency in children, adolescents and at the transitional age. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(6):749-755.
- [37] THORNTON PS, MANIATIS AK, AGHAJANOVA E, et al. Weekly Lonapegsomatropin in Treatment-Naive Children With Growth Hormone Deficiency: The Phase 3 heiGHT Trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(11):3184-3195.
- [38] GRIMBERG A, ALLEN DB. Growth hormone treatment for growth hormone deficiency and idiopathic short stature: new guidelines shaped by the presence and absence of evidence. *Curr Opin Pediatr.* 2017;29(4):466-471.
- [39] PALTOGLOU G, DIMITROPOULOS I, KOURLABA G, et al. The effect of treatment with recombinant human growth hormone (rhGH) on linear growth and adult height in children with idiopathic short stature (ISS): a systematic review and meta-analysis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2020;33(12):1577-1588.
- [40] HOU L, LIANG Y, WU W, et al. Comparison of the efficacy and safety of recombinant human growth hormone in treating idiopathic short stature and growth hormone deficiency in children. *Growth Horm IGF Res.* 2020;53-54:101331.
- [41] BERTELLONI S, MASSART F, MICCOLI M, et al. Adult height afterspontaneous pubertal growthor GnRHanalog treatment ingirls withearlypuberty: ameta-analysis. *Eur J Pediatr.* 2017; 176(6):697-704.

(责任编辑:GD, ZN, ZJP)