

doi: 10.3969/j.issn.1672-4933.2025.02.026

基于KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2轴的内耳干细胞定向神经分化作用机制

The Mechanism of Targeted Neural Differentiation of Inner Ear Stem Cells Based on Klf3-As1/Mir-83-5p/Tcf7l2 Axis

蒋迪 毛志强 傅明

JIANG Di, MAO Zhi-qiang, FU Ming

【摘要】目的 探究基于KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2轴的内耳干细胞定向神经分化的作用机制。**方法** 选取30只SD健康大鼠,分为12只空白组,9只蛋白培养组、9只蛋白培养+LY294002组,对比3组大鼠神经元轴突长度、凋亡率、细胞活性、KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2轴相关蛋白表达量。**结果** 与空白组、蛋白培养+LY294002组相比,蛋白培养组凋亡率、miR-83-5p蛋白表达量、神经元轴突长度低,KLF3-AS1、细胞活性、TCF7L2蛋白表达量高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2下调可促进内耳干细胞活性,减少凋亡情况,同时在定向神经分化中具有重要作用。

【关键词】 转录因子7类似物2基因; Kruppel样因子3-反义转录物1; 微小RNA-83-5p; 内耳干细胞; 定向神经分化

【中图分类号】 R764.43+1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1672-4933(2025)02-0221-04

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of targeted neural differentiation of inner ear stem cells based on KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 axis. **Methods** Thirty healthy SD rats were selected and divided into 12 blank groups, 9 protein culture groups and 9 protein culture +LY294002 groups. The neuronal axon length, apoptosis rate, cell activity and axon-related protein expression levels of KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 were compared among the three groups. **Results** Compared with the blank group and the protein culture +LY294002 group, apoptosis rate, miR-83-5p protein expression, neuron axon length were lower in the protein culture group, and KLF3-AS1, cell activity and TCF7L2 protein expression were higher. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Downregulation of KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 can promote the activity of inner ear stem cells, reduce apoptosis, and play an important role in targeted neural differentiation.

【Key words】 Transcription factor 7 analogue 2 gene; Kruppel-like factor 3-antisense transcript 1; MicroRNA-83-5p; Inner ear stem cells; Directed neural differentiation

内耳干细胞是毛细胞再生的重要来源,在体内自我更新分化成毛细胞,在受损内耳组织中,可使特定毛细胞标记物再生^[1]。在耳蜗发育过程中,信号及转录因子调控毛细胞形成及程度,成年鼠内存在内耳干细胞特征,最终分化成毛细胞样细胞^[2]。因此,说明内耳干细胞发病机制,建立治疗手段及方法,意义重大。本研究分析基于KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2轴的内耳干细胞定向神经分化的作用机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取健康SD大鼠30只,不限雌雄,体重350~405 g,

购自北京维通达生物技术有限公司,生产批号:SCXK(京)2023-0014,操作过程严格按照实验管理与保护的相关规定。

研究试剂及仪器:水合氯醛(深圳子科生物科技有限公司)、LY294002(北京百奥莱博科技有限公司)、FP7000流式细胞仪(索尼生命科学中国)、一抗(miR-83-5p、KLF3-AS1、TCF7L2及GAPDH)(上海镜像点细胞技术有限公司)。

1.2 研究方法

大鼠使用水合氯醛麻醉,无菌条件分离内耳蜗,消毒,固定,取外膜,立体显微镜下剪内耳道、耳廓,暴露鼓膜,剪至听骨链,用钉钩钩住下鼓室,摘除鼓膜、颞骨乳

基金项目:广东省自然科学基金“miR-124上调BDNF-TrkB信号通路在内耳干细胞定向分化中的作用及机制研究”(2019A1515110158);广东省自然科学基金“CSF1/CCL22反馈环介导鼻咽癌细胞与TAMs相互作用促鼻咽癌转移的分子机制”(2021B1515140070)

作者单位:南方医科大学第十附属医院(东莞市人民医院) 东莞 523000

作者简介:蒋迪 博士 副主任医师;研究方向:耳神经外科

通讯作者:蒋迪, E-mail: shaouzhixing@163.com

突部,暴露鼓岬、蜗锥,摘除听骨,刺破圆窗、卵圆窗,剪开薄层骨,取内耳标本,剪除颞肌,在毛细胞下方、螺旋钩区域取材,冲洗,剪碎,加0.125%胰蛋白酶,37℃下消化30 min,反应终止,加0.01%DNA酶,轻柔捶打,制成悬液,按 1×10^8 /L接种培养,7 d后置入离心管,离心处理,洗涤,舍上清,吹散细胞,24 h培养,待细胞完全贴壁,舍弃培养液,在分化培养基中培养,分为3组空白组(DMEM/F12基础培养液及1%青/链霉素溶液)12只、蛋白培养组(DMEM/F12基础培养液,加10 ng/mL KLF3-AS1蛋白、10 ng/mL miR-83-5p蛋白、10 ng/mL TCF7L2蛋白及1%青/链霉素溶液)9只、蛋白培养+LY294002组9只,在蛋白培养组基础上加入LY294002 40 μ mol/L,待到分化第7 d,随后进行其他实验。

1.3 检测指标

1.3.1 组织学特征 取大鼠内耳组织切片,在二甲苯中浸泡2次,10 min/次;置入100%乙醇,10 min/次,共2次;依次浸泡90%、80%、70%酒精、蒸馏水中,各5 min,用苏木素染色8 min,清洗,20 s分化,5 min蒸馏水浸泡,依次浸泡70%、80%乙醇中5 min,再浸入90%伊红醇溶液中10 min,浸入100%乙醇中,5 min/次,共2次,浸入二甲苯中,5 min/次,共2次,封片,显微镜观察。

1.3.2 定向神经分化免疫荧光染色 取细胞爬片,吸去培养液,用PBS清洗,用4%多聚甲醛固定30 min,清洗,0.5%Triton作用30 min,清洗,加神经元标记物抗体,4℃过夜孵育,清洗,加二抗,室温2 h反应,清洗,加Hoechst33342,45 min室温反应,清洗,封片,覆盖盖玻片,显微镜观察并拍照。

1.3.3 神经元轴突长度检测 随机选择荧光显微镜低倍视野下上、下、左、右、中15视野拍照,细胞总数>4000,计算所占细胞总数比例;取分化12、24、36 h的随机100个神经元测量轴突长度。

1.3.4 细胞活力 利用CCK-8法测量,在96孔板接种,密度: 5×10^3 个细胞/孔,37℃下12、24、36 h,混合细胞、CCK-8 10 μ L,37℃孵育2 h,酶标仪测量光密度值,评估细胞活力。

1.3.5 凋亡率 收集各组内耳干细胞,预冷,用PBS清洗,离心处理,采集沉淀,加结合缓冲液,调整细胞浓度,之后加PI、AnnexinV-FITC,黑暗反应15 min,流式细胞仪测定凋亡情况。

1.3.6 KLF3-AS1、miR-83-5p、TCF7L2相关蛋白表达量检测 取内耳干细胞加蛋白裂解液反应30 min,离心取上清,提取总蛋白,用BAC试剂盒检测,取配置的分离胶及浓缩胶,用凝胶电泳分离,转移PVDF膜中,1 h冰上反应,用TBST清洗,5%脱脂奶粉封闭1 h,再次清洗,加一

抗(KLF3-AS1、miR-83-5p、TCF7L2及GAPDH),4℃过夜孵育,加二抗2 h孵育,用灰度分析软件定量分析。

1.4 统计学分析

利用SPSS 20.0版本软件分析数据,符合正态分布的计量资料两组间比较行独立样本*t*检验,多组间比较行*F*检验。*P*<0.05被视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对比3组组织学特征

空白组毛细胞状态平整,呈现正常线粒体形态,胞质均匀;蛋白培养组毛细胞呈现不规则状态,细胞器损伤较为严重,线粒体破裂,空泡化;蛋白培养+LY294002组毛细胞状态较为平整,线粒体正常,胞质均匀,见图1。

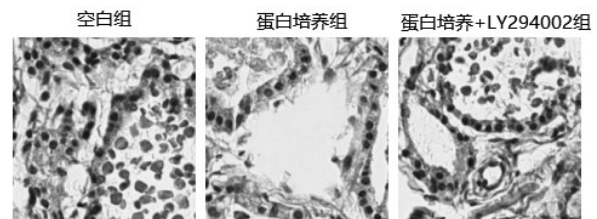


图1 对比3组组织学特征(HE染色,200×)

2.2 对比3组定向神经分化

空白组干细胞球少量游离,呈椭圆形;蛋白培养组分化神经生长旺盛,呈网状,两端神经突起,向外生长;蛋白培养+LY294002组分化神经数目增加,突出长短各不相同,分化细胞所扩散范围小,见图2。

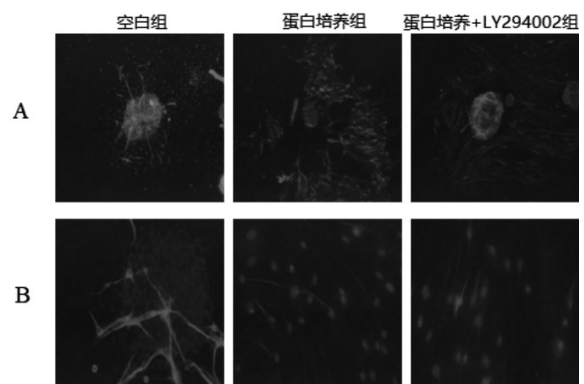


图2 3组定向神经分化(TUJ1Green A10×B40×)

2.3 对比3组12、24、36 h神经元轴突长度

如图3所示,对比蛋白培养+LY294002组与空白组12、24、36 h神经元轴突长度,差异无统计学意义(*P*>0.05)。与空白组相比,蛋白培养组12、24、36 h神经元轴突长度低,且蛋白培养+LY294002组12、24、36 h神经元

轴突长度高于蛋白培养组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

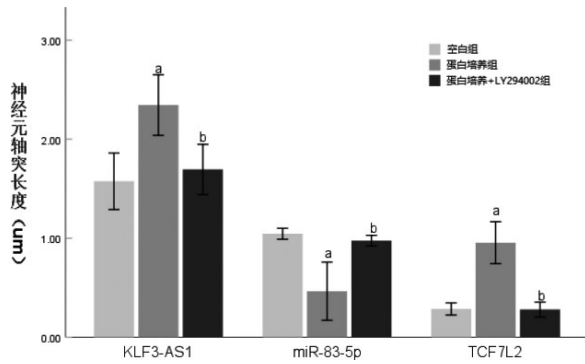


图3 3组12、24、36h神经元轴突长度对比图
注:a:蛋白培养组;b:蛋白培养+LY294002组

2.4 对比3组不同时间细胞活性

如图4所示,对比空白组、蛋白培养+LY294002组12、24、36 h细胞活性,差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白培养组12、24、36 h细胞活性高于空白组,且蛋白培养+LY294002组12、24、36 h细胞活性低于蛋白培养组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

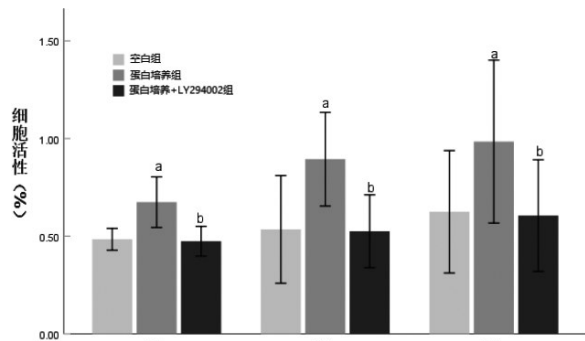


图4 3组不同时间细胞活性对比图
注:a:蛋白培养组;b:蛋白培养+LY294002组

2.5 对比3组凋亡率

如图5所示,对比空白组、蛋白培养+LY294002组凋亡率,差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白培养组凋亡率低于空白组,且蛋白培养+LY294002组凋亡率高于蛋白培养组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.6 对比3组 KLF3-AS1、miR-83-5p、TCF7L2 相关蛋白表达量

如图6所示,蛋白培养+LY294002组、空白组 miR-83-5p、KLF3-AS1、TCF7L2 相关蛋白表达量相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白培养组 KLF3-AS1、TCF7L2 蛋白表达量高于空白组,miR-83-5p 蛋白表达量低于空白

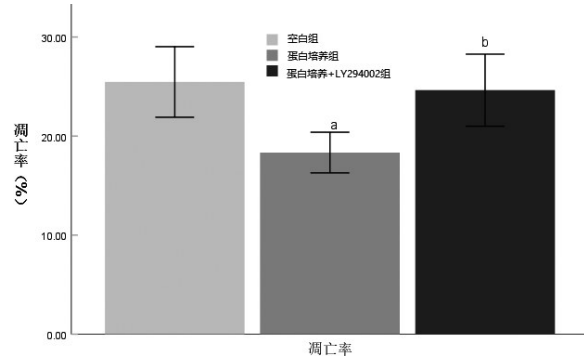


图5 3组凋亡率对比图
注:a:蛋白培养组;b:蛋白培养+LY294002组

组;而蛋白培养+LY294002组 TCF7L2、KLF3-AS1 蛋白表达量低于蛋白培养组,miR-83-5p 蛋白表达量高于蛋白培养组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

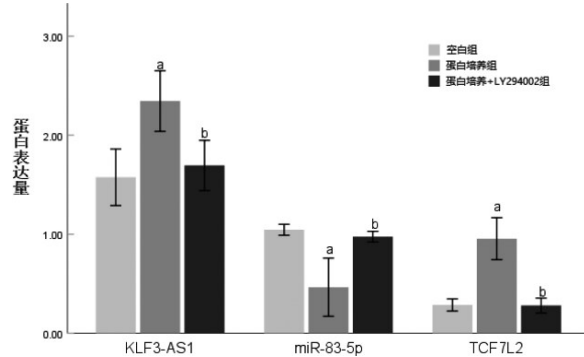


图6 KLF3-AS1、miR-83-5p、TCF7L2 相关蛋白表达量

3 讨论

在 KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 轴中,KLF3-AS1 过表达、miR-83-5p 抑制可增强细胞活力,防止细胞凋亡,促进细胞外基质合成,降低 miR 水平^[3]。miR-83-5p 过表达,会产生大量异位毛细胞,在毛细胞发育及生物听觉发生过程中发挥重要作用^[4]。TCF7L2 单独或结合全少突胶质细胞谱系标记物使用,识别新分化或新再生细胞生成率^[5]。利用 LY294002 处理后,能够抑制 KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 轴可使蛋白培养组失去其作用机制,升高凋亡蛋白表达,降低抗凋亡蛋白表达^[6]。内耳神经干细胞可高效诱导其分化成神经元,经免疫荧光染色检测后,比例至 40% 之上,生长状态好,突起交织成网,KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 轴可对其进行调控。故本研究中蛋白培养组大鼠内耳干细胞 KLF3-AS1、细胞活性、神经元轴突长度、TCF7L2 呈较高水平,miR-83-5p 水平、凋亡率低。说明经体外培养后,加入 KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2 轴培养液的内皮干细胞 TCF7L2、细胞活性、KLF3-AS1 水

平、神经元轴突长度呈上升趋势,miR-83-5p水平、凋亡率呈下降趋势,进而改善内耳干细胞病理特征。

综上所述,下调KLF3-AS1/miR-83-5p/TCF7L2轴可增加内耳干细胞活性,促进其凋亡,增加神经元轴突长度。但本研究仅进行体外实验,需进一步探究其具体作用及分子机制,并开展体内实验,验证结果,为该疾病的新治疗靶点提供参考依据。

参考文献

- [1] Connolly K, Gonzalez-Cordero A. Modelling inner ear development and disease using pluripotent stem cells-a pathway to new therapeutic strategies [J]. *Dis Model Mech*, 2022, 15(11): 49593.
- [2] Chen F, Yang Y, Chen J, et al. Promotion of In Vitro Hair Cell-like Cell Differentiation from Human Embryonic Stem Cells through the Regulation of Notch Signaling [J]. *Metabolites*, 2021, 11(12): 873.
- [3] Chen S, Zhuang Q, Li P, et al. The long non-coding RNAKLF3-AS1/miR-10a-3p/ZBTB20 axis improves the degenerative changes in human nucleus pulposus cells [J]. *Cell Tissue Res*, 2023, 393(1): 97-109.
- [4] 袁佳添, 谢奇伟, 王玥, 等. 微小RNA通过SIRT1调控小鼠耳蜗老化HEL-OC1细胞凋亡的研究[J]. *中国耳鼻咽喉头颈外科*, 2023, 30(2): 84-88.
- [5] Guo F, Wang Y. TCF7L2, a nuclear marker that labels premyelinating oligodendrocytes and promotes oligodendroglial lineage progression [J]. *Glia*, 2023, 71(2): 143-154.
- [6] 李丽, 许翀, 柴若楠. LY294002对过敏性鼻炎-哮喘综合征大鼠氧自由基、TRPV1神经元敏感性及TSLP表达的影响[J]. *西部医学*, 2023, 35(9): 1276-1281.

收稿日期 2024-07-30
责任编辑 蒋 春

《中国听力语言康复科学杂志》淘宝店铺

本刊讯 为了方便读者通过便捷的渠道订阅杂志,《中国听力语言康复科学杂志》开设了淘宝店铺。欢迎广大读者通过此平台购买杂志。

收藏店铺方式:

- 1、淘宝首页搜索账号名称“中国听力语言康复科学杂志”
- 2、扫描下方二维码:

