

持续游泳训练模式下大鼠脑部 miRNA 的深度测序及其调控功能分析

张瑞萍¹, 赵彦宏², 张安民^{1*}

摘要: 目的: 拟鉴定出持续游泳训练模式刺激下大鼠脑部差异表达的 miRNA, 从 miRNA 调控基因表达的角度进一步分析持续有氧游泳运动影响脑部功能的遗传应答机制。方法: 将 124 只大鼠随机均分为持续游泳训练组 (CST) 和对照组 (NC), 建立大鼠持续游泳模型。分别构建两组大鼠脑部组织 sRNA 文库, 通过 Illumina Solexa 测序平台进行高通量测序, 使用 EXPR_SIG 3.0 程序对 miRNA 的表达进行差异性分析。采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测两组组织中有显著差异的 miRNA 的表达水平。结果: 两组样品共筛选出 2 419 个已知 miRNA, 新预测 miRNA 共 114 个。与 NC 组相比, CST 组鉴定出 512 个响应持续游泳训练而差异表达的 miRNA, 其中 397 个表达显著上调, 115 个表达显著下调 ($P < 0.005$)。通过靶基因预测发现, 差异表达的 miRNA 参与了脑部 362 个基因的表达调控。结论: 持续有氧训练可使大鼠脑部 miR-379-5p、miR-139-3p、miR-125b-5p、miR-30e、miR-128、miR-101 等多个 miRNA 出现显著差异性表达, 差异表达的 miRNA 靶基因可涉及脑细胞的多种代谢调节功能, 但具体调控机制及其在疾病防治中的作用还有待进一步验证。

关键词: 持续训练; 脑部; 深度测序; 靶基因; 调控功能

中图分类号: G804 文献标志码: A 文章编号: 1006-1207(2025)01-0077-09

DOI: 10.12064/ssr.2024040902

Deep Sequencing and Regulatory Functional Analysis of miRNA in Rat Brain Under Continuous Swimming Training Mode

ZHANG Ruiping¹, ZHAO Yanhong², ZHANG Anmin^{1*}

(1. Institute of Physical Education, Yantai University, Yantai 264005, China; 2. Agricultural College, Ludong University, Yantai 264025, China)

Abstract: Objective: To identify the differentially expressed miRNA in rat brain stimulated by continuous swimming training mode, predict their target genes and explore their potential regulatory functions. Methods: 124 rats were randomly divided into continuous swimming training group (CST) and control group (NC), and the model of continuous swimming was established. After constructing the sRNA libraries of two groups of rat brain tissues respectively, high-throughput sequencing was carried out through Illumina Solexa sequencing platform, and the difference of miRNA was analyzed by EXPR_SIG 3.0 program. Real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the significant difference in miRNA expression between the two groups. Results: A total of 2 419 known miRNA were screened out and 114 new ones were predicted. Compared with NC, 512 differentially expressed miRNA in response to continuous swimming training were identified in CST group, of which 397 were significantly up-regulated and 115 down regulated ($P < 0.005$). The target gene prediction showed that differentially expressed miRNA were involved in the expression regulation of 362 genes in the brain. Conclusion: Continuous aerobic training could significantly differentially express miR-379-5p, miR-139-3p, miR-125b-5p, miR-30e, miR-128, miR-101 and other miRNAs in the brain of rats, and the differentially expressed miRNA target genes were involved in various metabolic regulatory functions of brain cells. However, the specific regulatory mechanism and its role in disease prevention and treatment need to be further verified.

Keywords: continuous training; brain; deep sequencing; target gene; regulatory function

收稿日期: 2024-04-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31540030)。

第一作者简介: 张瑞萍, 女, 硕士, 副教授。主要研究方向: 运动与脑健康。E-mail: zrp076@163.com。

* 通信作者简介: 张安民, 男, 学士, 教授, 硕士生导师。主要研究方向: 运动康复。E-mail: zam088@163.com。

作者单位: 1. 烟台大学 体育学院, 山东 烟台 264005; 2. 鲁东大学 农学院, 山东 烟台 264025。



近年来,很多研究证实,运动锻炼可改善脑部神经的可塑性,从而改善大脑的学习、记忆能力,延缓脑衰老,促进大脑健康,减少阿尔茨海默病、帕金森等疾病的发病风险^[1-3]。进一步研究发现,运动对大脑的这些积极作用与脑部基因表达模式的改变密切相关,如运动可以明显诱发脑部胰岛素样生长因子、脑源性神经营养因子、N-甲基-D-天门冬氨酸受体、血管内皮生长因子及其受体和神经肽等基因的表达水平上调,但其调控机制尚未明确^[4-8]。micro RNA(miRNA)是一类长度在19~25个核苷酸(nt)左右的内源性非编码小分子单链RNA。目前,人类表观基因组中已发现5 000多种miRNA,且数目还在不断增加^[9]。miRNA在基因表达的表观遗传学调控中起着重要作用,部分miRNA通过调控脑部基因表达在脑的发育、功能维系等过程中发挥着重要作用^[10]。已知大脑控制着人类所有的生命活动,除了运动、感觉功能以外,还与认知、情感、语言、行为等高级活动有关。而小脑作为锥体外系的重要结构,可通过复杂的调节和反馈机制,维持身体平衡和肌张力,使人体肌肉系统完成精细的技术动作。在功能方面,小脑和大脑可共同控制肌肉的运动,借以调节姿势与身体的平衡。那么在运动干预下,大脑、小脑区有哪些miRNA进行响应,又是通过何种途径调控脑部基因的,miRNA表达谱又会产生什么样的运动应激反应,是值得关注的问题。本研究建立了大鼠持续游泳训练模型,以大脑、小脑区为研究对象,结合生物信息分析技术,对大鼠脑部miRNA基因组表达谱进行深度测序,拟鉴定出持续游泳训练模式刺激下差异表达的miRNA,并预测这些miRNA的目标基因和调控功能,以期为揭示运动影响脑部功能的基本分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

1.1.1 实验动物的饲养与分组

132只健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠(35月龄),常规分笼饲养,每笼5只。饲养房间有自然光照,室内温度(18.6±2.4)℃,相对湿度(58.0±12.5)%,大鼠饮食和饮水不受限。首先让大鼠适应新环境3d,然后开始为期3d的适应性游泳训练,每天一次,由10min逐渐延长至15min,再至30min。适应性训练后,大鼠损失8只,将剩下的大鼠随机分为对照组62只(Normal Control, NC)和持续训练组62只(Continuous Swimming Training, CST)。实验期间NC组和CST组大鼠在相同的环境中饲养,休息期间外界环境相对安静。

1.1.2 大鼠游泳训练模型建立

NC组正常饲养,可自由活动,不参与训练。CST组则需要塑钢玻璃游泳池(规格150cm×70cm×60cm)中进行为期6周的持续性游泳训练:水深40cm,每次训练前均匀预热至33~36℃。游泳方案与相似研究所用方案一致^[11-12],即每周训练6d,每天上午、下午各训练1次,每次低强度无负重持续游泳150min,中间休息120min。由于大鼠天生善于游泳,有时还会出现在水中漂浮不动或吸附于游泳池边缘躲避运动的现象,游泳训练期间,随时观察记录大鼠的运动能力及活动状态,当出现以上情况时,用木棒搅动水面以驱赶大鼠,使其保持运动状态。训练结束后迅速用毛巾擦拭大鼠身体,并吹干毛发,放回笼中。

1.2 实验取材

6周期满,结束最后一次游泳训练后即刻,用2%戊巴比妥钠(40mg/kg)对训练组大鼠进行腹腔注射麻醉,然后颈椎脱位致死放置于冰盘上,打开颅腔,剥离大脑和小脑组织,液氮罐中速冻,后期置于-80℃冰箱保存。NC组麻醉和取脑同时、同样进行。

1.3 总RNA提取

从NC组和CST组各随机抽取15只大鼠的大脑脑区组织,在液氮中研磨成粉末,采用TRIzol试剂(Invitrogen,美国)提取总RNA, GeneQuant™ 100分光光度计(GE Healthcare Life Science,美国)分别测定总RNA的浓度和纯度,按对照组和训练组等量混合得到两个RNA样品池,用于构建小RNA(sRNA)文库。

1.4 sRNA文库构建与高通量测序

先用15%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳从RNA样品池中分离纯化出16-30nt的sRNA,再用T4RNA连接酶将每个sRNA的5'端和3'端加上接头,然后用SuperScript II转录酶(Invitrogen)合成cDNAs,并进行RT-PCR扩增,最后用10%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进一步分离、回收和纯化PCR扩增后的双链cDNAs,以构建sRNA测序文库。本研究委托深圳华大基因(BGI)使用Illumina Solexa测序平台对sRNA样本进行深度测序。

1.5 深度测序数据预处理

获得sRNA高通量测序原始数据后,在读段定位之前,出现以下情况的reads还需去除掉:测序质量低、有5'接头污染、无3'接头、无插入片段、包含polyA以及长度小于18nt等,最后得到18~30nt的



高质量干净序列(clean reads)。再采用高通量基因组测序数据定位分析软件 SOAP(BGI, 中国)将测得的序列与 Rfam 和 Genbank 基因数据库进行序列比对, 利用程序 tag2 annotation (BGI, 中国) 识别和注释 clean reads, 过滤掉 tRNA、rRNA、mRNA、snRNA、snoRNA、scRNA、srpRNA 以及重复序列(repeat associate sRNA)等。

1.6 已知 miRNA 的鉴定和新 miRNA 的预选识别

通过 BLAST 程序将筛选出的 sRNA 序列与现有的 miRNA 数据库 miRBase (v18.0) 中存放的大鼠或其他动物的已知 miRNA 进行比对, 匹配者称为已知 miRNA 或保守 miRNA。

在鉴定新的 miRNA 时, 先将剩余的没有被注释的 sRNAs 序列比对到大鼠的基因组, 找出与此相匹配的基因组序列, 以便确定其在基因组上的位置。然后以此位置为基准, 向两侧扩展, 抽取出长度在 60~100 bp 左右的基因组序列, 假定其为 miRNA 的前体序列, 然后用 MIREAP 软件(BGI, 中国)识别它是否具有颈环结构(或称发夹结构), 如果一切都符合 miRNA 前体的结构特征, 就可以认为其是一个候选的新 miRNA。

1.7 miRNA 的差异表达分析

使用 EXPR_SIG3.0 程序(BGI, 中国)进行差异性分析。分析步骤:①首先将每个 miRNA 在两个样品

(NC 组和 CST 组)中的表达量标准化。标准化后的表达量 = 某 miRNA 的表达量 / 该样品的总 read 数 × 1 000 000; ②计算出两组样品间的表达量差异倍数 (Fold-Change, FC)。FC=log₂(CST/NC), 即 FC=log₂(CST 组中某 miRNA 的标准表达量 / NC 组中某 miRNA 的标准表达量)。如果 FC=1, 则表示处理样品表达量上调了 2 倍; 如果 FC=-1, 则表示处理样品表达量下调了 2 倍; ③计算差异显著 P 值; 如 P<0.005, 表示差异显著; 如果 P>0.005, 差异不显著。在两个组别样品间, 凡是 P<0.005 且 |FC|≥1 的 miRNA, 可视为差异表达的 miRNA, 即响应持续游泳运动而差异表达的 miRNA。

1.8 差异表达 miRNA 的 RT-qPCR 验证

采用 mirVana miRNA Isolation 试剂盒 (Applied-Biosystems 公司, 美国) 分离提取大鼠脑组织 sRNA (< 200 nt), 测定其浓度和纯度, 按逆转录试剂盒 (RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher 公司, 美国) 操作说明逆转录合成 cDNA, 然后以此 cDNA 为模板进行 miRNA 荧光定量检测。引物由 BGI 公司合成 (表 1), 以 U6 为内参基因。美国 Biorad iCycler 扩增仪的反应参数如下: 95℃ 3 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 40 个循环。每个反应重复 3 次, 采用 2-ΔΔCT 法计算 CST 组和 NC 组 miRNA 的相对表达量。采用 SPSS 进行统计分析, 当 P<0.005 时, 视为差异显著。

表 1 基因上下游引物序列

Table1 Primer sequences upstream and downstream of genes

miRNA	上游引物(F:5'-3')	下游引物(R:5'-3')
miR-379-5p	GCGCTGGTAGACTATGGAA	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-29b	GGTACCGGTTGTCTTGGGTTTATTG	GAATTCAAATACTTCAGAGCTG
miR-125b-5p	ACTGATAAAATCCCTGAGACCCTAAC	TATGGTTTTGACGACTGTGTGAT
miR-4510	CAGAGTGTGAGGGAGTAGGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-93	TGCGGTCAAAGTGCTGTTC	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-34c	CGTGAGGCAGTGTAGTTAGC	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-182	TTGGCAATGGTAGAACTCAC	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-7b	GCGTGTGGAAGACTTGTGAT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-429	AGCCGCTAATACTGTCTGGT	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR-1839	CCAGCGTGAAGGTAGATAGA	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	CTCGCTTCGGCAGCAC	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.9 差异表达 miRNA 的靶基因预测

通过预测 miRNA 的靶基因可以更好地了解 miRNA 的调控功能。生物信息学方法作为预测 miRNA 靶点的一种有效途径, 已在前期研究中得到应用^[13]。本研究使用靶基因预测软件 Target Scan、

RNAhybrid 和 miRanda 从 NCBI 数据库中找到大鼠基因对应的 cDNA 序列 (ftp://ftp.ncbi.nih.gov/gene/ DATA/GENE_INFO/Mammalia/Rattus_norvegicus.gene_info), 预测出每个差异表达的 miRNA 对应的目标基因, 然后注释其功能。整体研究技术路线见图 1。

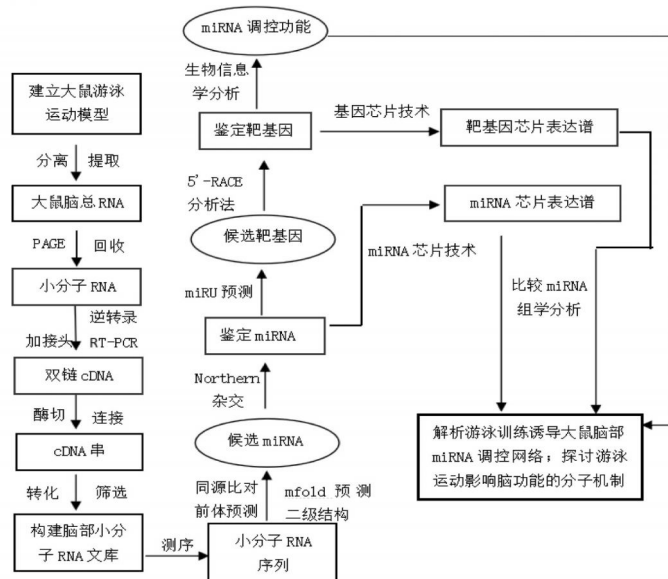


图1 研究技术路线

Figure1 Research technology route

2 结果与分析

2.1 miRNA 深度测序数据分析

通过 Illumina Solexa 测序平台,将 CST 组和 NC 组 sRNA 样本分别进行深度测序,得到 11 932 211 条和 21 372 487 条原始数据(raw reads),经过过滤处理,CST 组和 NC 组分别获得 9 439 802 条和 20 658 317 条

clean reads,各包括 537 311 种和 1 056 485 种 sRNA。采用 SOAP 分析软件将这些序列与 Rfam 和 Genbank 基因数据库进行序列比对,CST 组有 71.16%的 total sRNA 和 47.77%的 unique sRNA 可定位到大鼠基因组上,NC 组则有 70.13%的 total sRNA 和 56.28%的 unique sRNA 定位成功(表 2)。

表 2 高能量测序及基因组定位信息统计

Table2 Statistics of high-energy sequencing and genome localization information

	组别	raw reads(n)	total sRNAs(n)	百分比 /%	unique sRNAs(n)	百分比 /%
sRNA 总量	CST 组	11 932 211	9 439 802	100	537 311	100
	NC 组	21 372 487	20 658 317	100	1 056 485	100
比对上基因组部分	CST 组	—	6 717 516	71.16	256 666	47.77
	NC 组	—	14 488 689	70.13	594 634	56.28

对 clean reads 的长度分布分析显示,CST 组和 NC 组分别有 80.97%和 78.52%的 reads 长度集中在 20~24 nt 之间,其中长度为 22 nt 的 reads 最多,比例明显高于其他 reads,在 CST 组和 NC 组中分别占 31.71%和 30.61%(图 2)。由此可见,测序得到的两组 sRNA reads 长度分布趋势与动物成熟 miRNA 的典型长度分布趋势一致。

注释的序列,可备接下来作进一步 miRNA 分析。

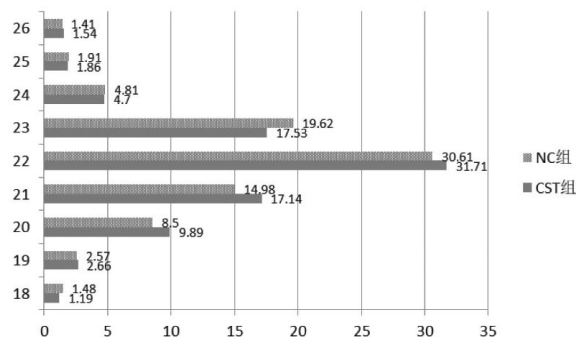


图 2 CST 组和 NC 组 clean reads 长度分布

Figure2 Length distribution of clean reads in CST and NC groups

将所得 clean reads 与 Rfam 和 Genbank 数据库进行序列比对,以交叉检查其中有些序列是否为其他已知 RNA 序列,如 tRNA、rRNA、mRNA、snRNA、snoRNA、scRNA 等,不同 RNA 类别的数量和比例见表 3。将这些非 miRNA 序列过滤后,CST 组和 NC 组分别筛选出 7 739 289 条和 15 774 525 条尚未被



表 3 CST 组和 NC 组中 sRNA 的分类注释

Table3 Classification annotations of sRNA in CST and NC groups

分类	CST 组 sRNAs				NC 组 sRNAs			
	unique	%	total	%	unique	%	total	%
rRNA	75 265	14.01	1 071 961	11.36	151 074	14.30	3 330 834	16.12
tRNA	30 028	5.59	345 097	3.66	34 900	3.30	789 023	3.82
scRNA	592	0.11	4 178	0.04	777	0.07	6 108	0.03
snRNA	3 057	0.57	13 241	0.14	6 648	0.63	59 169	0.29
snoRNA	3 748	0.70	73 983	0.78	7 049	0.67	236 933	1.15
srpRNA	805	0.15	5 190	0.05	1 633	0.15	22 995	0.11
exon_antisense	2 116	0.39	2 673	0.03	2 999	0.28	3 922	0.02
exon_sense	74 020	13.78	95 917	1.02	179 548	16.99	219 397	1.06
intron_antisense	4 955	0.92	6 160	0.07	10 414	0.99	12 811	0.06
intron_sense	33 192	6.18	53 333	0.56	93 129	8.81	128 385	0.62
repeat	21 501	4.00	28 780	0.30	57 451	5.44	74 215	0.36
Unannotated	288 032	53.61	7 739 289	81.99	510 863	48.35	15 774 525	76.36
Total clean reads	537 311	100	9 439 802	100	1 056 485	100	20 658 317	100

2.2 已知miRNA 鉴定与新 miRNA 预测

2.2.1 已知 miRNA 的鉴定

通过 BLAST 程序将两组筛选出的 sRNA 序列与 miRBase 数据库中现有的 90 多种动物的已知 miRNA 进行序列比对,共鉴定出 2 419 个已知 miRNA,

CST 组 1 713 个,NC 组 1 691 个,其中两组共有 985 个已知 miRNA,CST 组特有 728 个,NC 组特有 706 个。表达量大于 80 000 reads 且两组共有的 miRNA 为 8 种,其中 mir-9 和 let-7 是两组数据中表达量最高的 miRNA 家族(表 4)。

表 4 两组共有的表达量大于 80 000 reads 的已知 miRNA

Table4 Known miRNAs with a shared expression level greater than 80 000 reads between the two groups

miRNA	序列	长度 /nt	表达量		miRNA 家族	miRNA 同源系列
			CST	NC		
miR-30d	TGTAACATCCCCGACTGGAAGC	23	106 052	413 656	mir-30	oan pma bta hsa
miR-143	TGAGATGAAGCACTGTAGCT	20	522 375	1 139 450	mir-143	pma rno xtr mmu
let-7c	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT	22	986 859	1 205 674	let-7	hsa odi pma csa cin
miR-9	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATG	22	340 899	751 193	mir-9	egr sko aca bma xtr
let-7-5p	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT	22	308 332	220 610	let-7	dme tca cel
miR-378	ACTGGACTTGGAGTCAGAAGGC	22	416 545	1 452 656	mir-378	hsa ppy cfa
miR-9a-5p	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA	23	574 982	1 416 714	mir-9	dme
let-7b	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT	22	129 813	307 685	let-7	hsa odi pma xtr cin

2.2.2 新 miRNA 的预测

采用 MIREAP 软件,共预测出 114 个新 miRNA,其中 CST 组 96 个,NC 组 28 个,两组共有 10 个(表 5),CST 组特有 86 个,NC 组特有 18 个新 miRNA。这 114 种新的候选 miRNA 的长度范围为 20~24 nt,与其他已知的动物 miRNA 相似。新的候选 miRNA 暂时被命名为 rno-mir-n001 到 rno-mir-n114。其中,“rno-mir-”后面的字母“n”表示新 miRNA(novel miRNA),而“n”后面连续数字是根据比对到大鼠基因组 miRNA 的位置而排列的。以表中 10 个新 miRNA 为例分析可知,其前体序列的发夹结构的最小自由能介于-57.6~-31.3 kcal/mol 之间,平均值为-43.06 kcal/mol,最小自由能指数介于

0.86~1.86,平均值为 1.2,显著高于 mRNAs(0.62~0.66)、rRNAs(0.59)和 tRNAs(0.64)。

2.3 miRNA 的差异表达分析

使用 EXPR_SIG3.0 程序对已鉴定出的 miRNA 进行差异性分析,结果显示,与 NC 组相比,CST 组共有 512 个 miRNA 出现了显著性的差异表达,其中 397 个表达显著上调,115 个表达显著下调(图 3),由此可知,长时间持续游泳训练能够明显诱导大鼠脑部 miRNA 的差异表达。两组表达量(标准化前)均大于 10 000 reads 的显著上调和下调的 miRNA 共有 20 种,如表 6 所示。



表 5 持续训练组和对照组共有的新 miRNA

Table5 New miRNAs shared by continuous training group and control group

miRNA	序列	长度 /nt	reads		前体序列 位置	自由能/ (kcal·mol ⁻¹)	自由能 指数
			CST	NC			
rno-miR-n002_3p	CATAAGTGTAGAGAGTCTGTAGT	23	30	59	1:131079839:131079925:+	-31.3	0.95
rno-miR-n012_5p	AGGCAGAACTCTGAAAGAGGC	22	19	38	3:151927526:151927610:+	-47.2	1.03
rno-miR-n014_5p	TACAGTTAGACGTAGAGACCAT	22	9	31	3:153140628:153140705:-	-35.0	1.21
rno-miR-n017_5p	TGAGGATTACGAAGAGGATGGT	22	10	9	5:130346817:130346905:+	-47.6	1.44
rno-miR-n022_3p	AAGGGCAAGCTCTCTTCGAGG	21	30	36	6:134405230:134405322:+	-42.7	1.07
rno-miR-n024_3p	GGTGACAGTAAGCTGTAGTTGC	22	10	23	7:141082914:141082992:+	-38.7	0.99
rno-miR-n025_3p	ATGGTAATGGTGGTGGTGATGG	22	56	108	8:64686682:64686763:+	-46.0	1.44
rno-miR-n027_5p	AGGGCTAGTTAACAGTTTAGGT	22	14	42	9:45537650:45537727:+	-44.9	1.10
rno-miR-n031_3p	TCAGTAGGCCAGACAGCAAGC	21	301	453	11:36339323:36339403:-	-39.6	0.86
rno-miR-n038_3p	TAAGCTTGCCTTAGGATTGTTG	22	9	9	15:96354938:96355021:-	-57.6	1.86

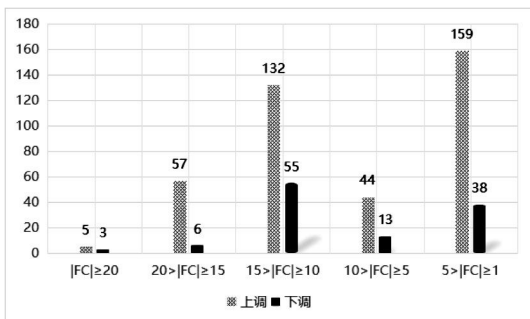


图 3 持续游泳训练后 miRNA 的差异表达

Figure3 Differential expression of miRNA after continuous swimming training

2.4 RT-qPCR 验证

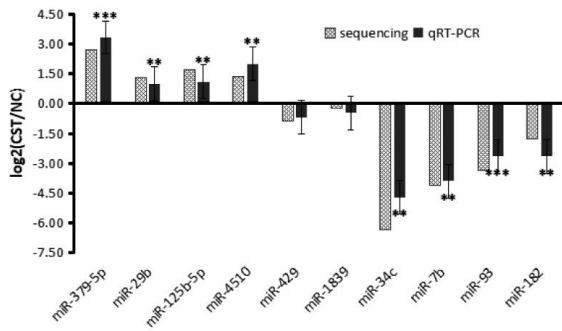
为了进一步验证深度测序结果的可靠性,选择 10 个差异表达的 miRNA 进行 RT-qPCR 检测,分别是 miR-379-5p、miR-29b、miR-125b-5p、miR-4510、miR-93、miR-34c、miR-182、miR-7b、miR-429、miR-1839。结果显示,这 10 种 miRNA 都成功被检测到了,其中 8 种 miRNA 在两组大鼠脑部均有显著差异性表达,miR-379-5p、miR-29b、miR-125b-5p、miR-4510 显著上调,miR-93、miR-34c、miR-182、miR-7b 显著下调,miR-429、miR-1839 的表达则在两组间无差异(图 4),此结果与深度测序数据变化趋势一致。

表 6 响应持续游泳训练而显著差异表达且两组表达量均大于 10 000 的 miRNA

Table6 miRNAs with significant differential expression in response to continuous swimming training and expression levels greater than 10 000 in both groups

miRNA	CST_Std	NC_Std	log ₂ (CST/NC)	P	Mark
miR-379-5p	10 425.22	1 626.51	2.68	0.00	Up
miR-139-3p	4 532.40	1 128.46	2.01	0.00	Up
miR-125b-5p	6 512.21	2 029.01	1.68	0.00	Up
let-7-5p	32 662.97	10 678.99	1.61	0.00	Up
miR-30e-5p	2 150.36	821.03	1.39	0.00	Up
miR-1224-5p	1 414.75	569.07	1.31	0.00	Up
miR-30c	1 944.00	842.23	1.21	0.00	Up
miR-137	1 523.97	700.35	1.12	0.00	Up
miR-30e	3 040.42	6 464.66	-1.09	0.00	Down
miR-191	1 508.29	3 253.94	-1.11	0.00	Down
miR-128	2 284.48	4 990.34	-1.13	0.00	Down
miR-101	2 409.90	5 317.76	-1.14	0.00	Down
miR-100	1 365.18	3 090.18	-1.18	0.00	Down
miR-24	4 023.71	10 276.39	-1.35	0.00	Down
miR-29a	1 617.19	4 478.44	-1.47	0.00	Down
let-7i	1 109.77	3 611.38	-1.70	0.00	Down
miR-182	4 585.58	15 810.92	-1.79	0.00	Down
miR-30a	6 766.35	23 650.96	-1.81	0.00	Down
miR-183	1 500.03	6 087.04	-2.02	0.00	Down
let-7g	1 980.66	8 991.29	-2.18	0.00	Down

注: CST_Std 和 NC_Std 表示持续训练组和对照组中 miRNA 的标准化表达量,在标准化前其值均大于 10 000 reads; Down 和 Up 表示下调和上调的 miRNA。



注：与 NC 组相比，CST 组中的 miR-379-5p、miR-29b、miR-125b-5p、miR-4510 表达显著上调，** 表示 $P \leq 0.01$ ，*** 表示 $P \leq 0.001$ ；miR-93、miR-34c、miR-182、miR-7b 显著下调，** 表示 $P \leq 0.01$ ；*** 表示 $P \leq 0.001$ 。

图 4 差异表达 miRNA 的 RT-qPCR 验证

Figure4 RT-qPCR validation of differentially expressed miRNAs

2.5 差异表达 miRNA 的靶基因预测及其功能分析

运用靶基因预测软件,512 个差异表达的 miRNA 中有 453 个被预测到 8 760 个靶基因,其它差异表达的 miRNA 未预测到对应靶基因。通过预测结果可以发现,同一种 miRNA 可调控多个靶基因,不同种 miRNA 也可调控同一种靶基因,如 miR-214 可调控 Nmu、Bean1、Cmas、Cntfr 等多个靶基因,而 miR-106b-3p、miR-1188-5p、miR-1224-5p、miR-150-3p、miR-1587 等 30 个 miRNA 均可调控靶基因 Agrp。功能注释后发现 362 个靶基因与脑功能有关,也即本研究中响应持续游泳训练而差异表达的 miRNA 参与了脑部 362 个基因的表达调控,表 7 列出部分靶基因,其他还有 Ncan、Ncdn、Ncs1、Nefh、Negr1、Nenf、Nepro、Neto2、Neu1、Ngfr、Neurog3 等。

表 7 差异表达的 miRNA 部分靶基因及其功能分析

Table7 Differential expression of miRNA target genes and their functional analysis

miRNA	靶基因	geneID	编码蛋白	功能分析
miR-183	Bdnf	24225	brain-derived neurotrophic factor	增加突触可塑性,促进神经元的发育分化与生长
miR-1224-5p	Bri3	304284	brain protein I3	促进轴突形成、细胞增殖和形态发生
miR-2881	Baspl	64160	brain abundant, membrane attached signal protein 1	促进轴突生长、再生和可塑性
let-7b-5p	Bex3	117089	brain expressed X-linked 3	参与神经元的发育过程,与神经退行性变有关
let-7e*	Bsx	500982	brain specific homeobox	对于下丘脑多种神经调节细胞类型的终末分化至关重要
miR-1224-5p	Caly	192349	calcyon neuron-specific vesicular protein	参与调节轴突晚期核内体和溶酶体相关细胞器的轴突转运,是提供突触物质和清除受损大分子的关键
miR-1224-5p	Cbln3	501998	cerebellin 3 precursor	与阿尔茨海默病(AD)发病机制有关
miR-1188-5p	Meox1	363684	mesenchyme homeobox 1	促进脑神经发育
miR-1224	Manf	315989	mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor	营养和保护脑神经,与缺血性脑损伤有关,对帕金森病患者有益
miR-103a-2-5p	Mnx1	682076	motor neuron and pancreas homeobox 1	抑制脑细胞的凋亡
miR-1188-5p	Negr1	59318	neuronal growth regulator 1	与抑郁症的发生高度相关
miR-149-3p	Neto2	307757	neuropilin and tolloid like 2	参与焦虑和恐惧情绪的调节
miR-182	Nfasc	116690	neurofascin	促进神经系统的发育和脑功能的发挥
miR-1224	Nrxn3	116508	neurexin 3	与自闭症谱系障碍和精神分裂症有关

3 讨论

本研究中训练前 CST 组和 NC 组大鼠混合饲养,一起进行适应性游泳训练,月龄和生长环境相同。随机分组后,CST 组经过 6 周的游泳训练,体重有所增加,说明实验中大鼠喂养得当,发育正常,但体重增长幅度明显小于 NC 组,且腹膜后肾周脂肪组织较少,这与大鼠训练中主要以脂肪氧化为主要供能形式有关,说明游泳训练模型的建立较成功。

持续规律的有氧运动可改善脑结构,促进脑区的可塑性变化,对于其具体机制人们也一直在尝试从不同角度、不同领域进行探讨阐述。miRNA 作为一种内源性非编码 sRNA,对基因表达有重要的调控功能。本研究以 miRNA 为切入点,可能为揭示有氧运动对脑功能的改善机制提供新视角。

本研究筛选出的上调和下调 miRNA,部分在脑发育中的重要作用已被证实。如上调的 miR-30c-5p, Kumar 等^[14]研究人类多能干细胞(iPSCs)的分化机



制时,发现其可通过调节与神经元分化、突触生长和形成相关的几个基因,进而促进未分化神经干细胞的自我更新;再如下调的 miR-30a,可参与轴突导向因子和神经信号传递因子的形成,其下调对神经发育障碍的预防非常重要^[15]。除此之外,本研究还发现,有氧运动还可通过调节 miR-183、miR-1224-5p、miR-2881、let-7b-5p 以及 let-7e* 等 miRNA 而靶向调控 Bdnf、Bri3、Basp1、Bex3、Bsx 等基因,而有关研究已证实,这些基因可参与神经元的发育分化与生长,促进轴突生长与再生,增强其可塑性,对于下丘脑多种神经调节细胞类型的终末分化起着至关重要的作用^[16-19],这些发现无疑在提示“有氧运动-miRNA-脑神经发育”三者之间可能存在的紧密联系。

有氧运动是否可通过调节 miRNA 而减少神经细胞凋亡,减轻神经结构破坏,防止脑神经发生退行性变或抑制脑组织癌细胞增殖也是值得探讨的问题。本研究结果显示,在持续游泳训练刺激下,大鼠脑组织中 miR-125b-5p、miR-30c、miR-139-3p、miR-30c、miR-137、miR-379-5p 及 miR-30e-5p 表达显著上调,miR-30e、miR-24、miR-182、miR-191、miR-30a 和 let-7i 表达则均出现明显下调,而这些 miRNA 的调节作用已在胶质瘤、阿尔茨海默病、帕金森病等相关疾病的研究中被证实。如 miR-139-3p、miR-30c-5p、miR-137、miR-30e-5p 的高表达可显著抑制脑胶质瘤细胞的增殖、迁移和侵袭^[20-24];阿尔茨海默病患者神经元线粒体功能发生障碍后,miR-30e 的上调可能导致神经元能量供给不足同时释放大量自由基,诱发氧化应激损伤,钙调节失衡,最终触发神经元凋亡^[9,25];对 1-甲基-4-苯基-吡啶离子(MPP⁺)诱导的 SH-SY5Y 细胞帕金森病模型进行实验研究发现,可通过上调 miR-125b-5p 而提高 SH-SY5Y 细胞活力,抑制其自噬和凋亡^[26]。在帕金森病患者脑组织中,miR-24 表达增加,miR-30c 表达则有所下降^[27]。除此之外,本研究还发现,持续有氧游泳训练还可以通过调节 miR-1188-5p、miR-149-3p、miR-1224 来靶向调控 Negr1、Neto2、Nrxn3 等基因,而这些基因与抑郁、焦虑、恐惧等情绪调节相关,尤其是 Negr1,与抑郁症的发生高度相关^[28-30]。

4 结论

持续有氧训练可使大鼠脑部 miR-379-5p、miR-139-3p、miR-125b-5p、miR-30e、miR-128、miR-101 等多个 miRNA 出现显著差异性表达,差异表达的 miRNA 靶基因可涉及脑细胞的多种代谢调节功能,但这些差异表达的 miRNA 及其靶基因之间的调控机

制还有待进一步探讨。本研究为进一步揭示有氧运动应激模式下 miRNA 在大鼠脑基因表达调控网络中的作用机制奠定了基础,对慢性疾病的防治具有潜在的指导作用。

参考文献:

- [1] 金其贯,吴尚琳,王云峰,等.低氧和运动训练对大鼠学习记忆能力的影响及其与海马突触可塑性的关系[J].体育科学,2015,35(1):54-59.
- [2] 付燕,谢攀,李雪,等.长期有氧运动对大鼠脑衰老过程中学习记忆与海马 BDNF 表达的影响[J].中国运动医学杂志,2015,34(8):750-756.
- [3] 路毅,邓文冲.不同运动方式对大脑结构及认知功能的调节作用及差异[J].中国组织工程研究,2021,25(20):3252-3258.
- [4] 温佩彤,徐平,虎力,等.电针结合有氧运动对自然衰老大鼠骨骼肌 IGF-I/Akt 通路的作用[J].中国骨伤,2021,34(3):275-281.
- [5] 李博文,冯丽丽,田振军.胰岛素样生长因子-1 与代谢性疾病及运动干预的研究进展[J].生理学报,2021,73(2):342-352.
- [6] 王友华,陈伟,马美,等.不同强度有氧运动对大鼠房室结形态结构及 VEGF、VIP、Syn 表达的影响[J].中国应用生理学杂志,2021,37(3):287-292.
- [7] BARBATO C, GIORGI C, CATALANOTTO C, et al. Thinking about RNA? MicroRNAs in the brain [J]. Mammalian Genome, 2008, 19(7-8):541-551.
- [8] LOU S J, LIU J Y, CHANG H, et al. Hippocampal neurogenesis and gene expression depend on exercise intensity in juvenile rats[J]. Brain Research, 2008, 1210: 48-55.
- [9] NUNOMURA A, PERRY G. RNA and oxidative stress in Alzheimer's disease: Focus on microRNAs[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 2638130.
- [10] 张瑞萍,张波,钱帅伟,等.运动干预改善脑学习记忆功能分子机制的研究进展[J].中国体育科技,2017,53(2): 119-124,138.
- [11] 张瑞萍,钦少君,赵振军,等.不同游泳训练对大鼠海马蛋白激酶 C 表达的影响[J].体育科学,2011,31(3):63-67.
- [12] 张安民,张青元,于芳,等.不同方式游泳训练对大鼠纹状体 cAMP 浓度影响的实验研究[J].体育科学,2010, 30(1):62-65,97.
- [13] XU Z, CHEN J, LI X, et al. Identification and characterization of microRNAs in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) by using Solexa sequencing technology [J]. PLoS One, 2013, 8(1):e54174.



- [14] KUMAR S, CURRAN J E, DELEON E, et al. Role of miRNA-mRNA interaction in neural stem cell differentiation of induced pluripotent stem cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(19):E6980.
- [15] CATTANEO A, SUDERMAN M, CATTANE N, et al. Long-term effects of stress early in life on miR-30a and its network: Preventive effects of lurasidone and potential implications for depression vulnerability[J]. *Neurobiology of Stress*, 2020, 13:100271.
- [16] SCHREDELSEKER T, VEIT F, DORSKY R I, et al. Bsx is essential for differentiation of multiple neuromodulatory cell populations in the secondary prosencephalon [J]. *Frontiers in Neuroscience*, 2020, 14:525.
- [17] SULTAN N, AMIN L, ZAHER A, et al. Dental pulp stem cells stimulate neuronal differentiation of PC12 cells [J]. *Neural Regeneration Research*, 2021, 16(9):1821-1828.
- [18] DO AMARAL M J, ARAUJO T S, DÍAZ N C, et al. Phase separation and disorder-to-order transition of Human Brain Expressed X-Linked 3 (hBEX3) in the presence of small fragments of tRNA [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(7):2319-2348.
- [19] CHUNG D, SHUM A, CARAVEO G. GAP-43 and BASP1 in axon regeneration: Implications for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8:567537.
- [20] XUE J, YANG M, HUA L H, et al. MiRNA-191 functions as an oncogene in primary glioblastoma by directly targeting NDST1 [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2019, 23(14):6242-6249.
- [21] TIAN W, WU W, LI X, et al. MiRNA-139-3p inhibits the proliferation, invasion, and migration of human glioma cells by targeting MDA-9/syntenin [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(1):295-301.
- [22] YUAN L Q, ZHANG T, XU L, et al. MiR-30c-5p inhibits glioma proliferation and invasion via targeting Bcl2 [J]. *Translational Cancer Research*, 2021, 10(1):337-348.
- [23] LI D M, CHEN Q D, WEI G N, et al. Hypoxia-induced miR-137 inhibition increased glioblastoma multiforme growth and chemoresistance through LRP6 [J]. *Frontiers in Oncology*, 2020, 10:611699.
- [24] ZHANG K, FU G, PAN G Z, et al. Demethylzeylasteral inhibits glioma growth by regulating the miR-30e-5p/MYBL2 axis [J]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9:1035.
- [25] 邝程斌, 夏杰, 徐波. IRE1 α -miRNA 信号通路介导运动干预阿尔茨海默病 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2021, 37(9):1155-1166.
- [26] FAN Y, ZHAO X, LU K, et al. LncRNA BDNF-AS promotes autophagy and apoptosis in MPTP-induced Parkinson's disease via ablating microRNA-125b-5p [J]. *Brain Research Bulletin*, 2020, 157:119-127.
- [27] ARDASHIROVA N S, FEDOTOVA E Y, ILLARIOSHKIN S N. The role of microRNA in the pathogenesis and diagnostics of Parkinson's disease [J]. *Neurochemical Journal*, 2020, 14(2):127-132.
- [28] DALL'AGLIO L, LEWIS C M, PAIN O. Delineating the genetic component of gene expression in major depression [J]. *Biological Psychiatry*, 2021, 89(6):627-636.
- [29] MENNESSON M, RYDGREN E, LIPINA T, et al. Kainate receptor auxiliary subunit NETO2 is required for normal fear expression and extinction [J]. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 2019, 44(4):1855-1866.
- [30] TROMP A, MOWRY B, GIACOMOTTO J. Neurexins in autism and schizophrenia: A review of patient mutations, mouse models and potential future directions [J]. *Molecular Psychiatry*, 2021, 26:747-760.

(责任编辑:刘畅)