

# miRNA-125 在噪声性耳聋大鼠耳蜗组织中的表达变化

牛健, 吴硕, 丛珊, 刘冰, 闫加兴, 曲学华

哈尔滨医科大学附属第四医院耳鼻咽喉头颈外科, 黑龙江 哈尔滨 150001

**摘要:** **目的** 探讨微小核糖核酸(miRNA)-125 在噪声性耳聋(NID)大鼠耳蜗组织中的表达水平及其变化。**方法** 40 只健康成年 SD 大鼠随机分为 NID 组和正常组两组, 每组 20 只。NID 组每天给予 100 dB 声压水平、噪声频率为 3 000 Hz 的窄带噪声 6 h, 持续 3 d, 用来建立 NID 大鼠模型; 正常组大鼠不予处理。14 d 后断头处死大鼠, 取出耳蜗组织。应用 RT-PCR 方法检测 miRNA-125 在两组大鼠耳蜗组织中的表达水平。**结果** NID 组大鼠耳蜗组织 miRNA-125 的相对表达量为  $0.12 \pm 0.05$ , 正常组大鼠耳蜗组织 miRNA-125 的相对表达量为  $1.11 \pm 0.51$ 。NID 组大鼠耳蜗组织 miRNA-125 的表达较正常组明显下调( $P < 0.01$ )。**结论** miRNA-125 在 NID 大鼠耳蜗组织中表达下调; miRNA-125 表达量的下调可能促进了 NID 的发生发展。

**关键词:** 噪声性耳聋; 微小核糖核酸-125; 耳蜗; 大鼠

**中图分类号:** R 764.43 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2015)08-1062-02

噪声性耳聋(noise induced deafness, NID)亦称噪声性听力损失(noise induced hearing loss, NIHL), 是常见职业病之一。在工业化国家中, 约有 10% 的工人可能患有此病<sup>[1]</sup>。NID 多因长期在噪声比较强烈的环境下而发生的一种缓慢的进行性耳聋, 主要症状为听觉疲劳。初期可恢复, 但时间太久便很难恢复, 最终演变成为 NID<sup>[2-3]</sup>。NID 约占听力损失患者的 1/3, 其发病率有逐年上升的趋势<sup>[4]</sup>。因此, 研究其病理病机已经成为一项重要课题。本实验通过对微小核糖核酸(miRNA)-125 在 NID 小鼠和正常小鼠耳蜗组织的表达测定, 探讨 miRNA-125 在 NID 发病中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及模型** 40 只健康成年 SD 大鼠随机分为两组, 分别为 NID 组( $n=20$ )和正常组( $n=20$ ), NID 组每天给予 100 dB 声压水平(SPL)、频率约 3 000 Hz 的窄带噪声 6 h, 持续 3 d 用来建立 NID 模型; 正常组不予处理。两组均自由喂养。14 d 后断头处死, 取出耳蜗组织, 用来测定 miRNA-125 的表达水平。

**1.2 试剂与仪器** ABI7500 荧光定量 PCR 仪、分光光度仪、超低温冰箱、手持式匀浆器、SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒(上海研谨生物科技有限公司)、实时荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Green)。

## 1.3 方法

**1.3.1 RNA 的提取** 取出大鼠耳蜗组织标本并在低温下使用手持式匀浆器碾碎, 放入 EP 管, 采用 Trizol 法提取小鼠耳蜗组织并按比例加入 Trizol 液, 每个样品在加入 Trizol 液之后再反复吹打几次, 使其充分的裂解。在室温下放置 5 min, 使其蛋白核酸复合物完全分离。吸取氯仿 0.2 ml 加入管中剧烈震荡, 室温下静置 5 min, 4℃ 离心机中 1 200 r/min 离心 4 min。取新的 EP 管加入约 300  $\mu$ l 上清液; 加入 500  $\mu$ l 异丙醇在碎冰中混匀放置 20 min。4℃ 离心机中 1 200 r/min 离心 80 min, 取出沉淀, 使用 75% 的乙醇 1 ml 进行洗涤; 4℃ 离心机中 1 200 r/min 离心 4 min; 吸尽乙醇, 打开盖子在室温下晾干, 然后加入 20  $\mu$ l 经二乙基焦碳酸酯(DPEC)处理过的水进行溶解, 充分震荡混合均匀。待用。

**1.3.2 miRNA-125 表达检测** 采用逆转录 PCR(RT-PCR)方法, 严格按照试剂盒的说明书进行实验, miRNA-125 的相对表达量分析以 U6 作为内参, 逆转录时取 2  $\mu$ g 用 SuperRT cDNA 第一链合成试剂盒进行实验, 漩涡震荡充分混匀, 然后进行短暂离心以使所有溶液集中到管底。在 42℃ 条件下孵育约 0.5 h, 然后在 85℃ 下孵育 5 min。反应结束后进行短暂离心, 再将其放在冰上进行冷却。反应结束后逆转录产物在 -20℃ 冰箱保存, 待用。引物设计序列如表 1。

**1.3.3 荧光定量 PCR** 大鼠耳蜗组织逆转录所得的 cDNA, 详细参照 SYBR Green 荧光实时定量 PCR 试剂盒的说明书进行实验, 实验反应条件为 95℃、10 min, 每个样品做 3 个复孔, 使用 PCR 仪测定循环

表 1 U6 的 RT 及 PCR 引物序列

基因	引物名称	序列(5'-3')	产物大小
U6	茎环 RT 引物	5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'	
	正向引物	5'-GCT TCG GCA GCA CAT ATA CTA AAA T-3'	101 bp
	反向引物	5'-CGC TTC ACG AAT TTG CGT GTC AT-3'	

表 2 PCR 反应体系

试剂	50 $\mu$ l 反应体系
2 $\times$ UltraSYBR Mixture	25 $\mu$ l
Forward Primer	1 $\mu$ l
Reverse Primer	1 $\mu$ l
Template DNA	2 $\mu$ l
RNase-Free Water	up to 20 $\mu$ l

阈值(Ct)并记录。PCR 反应体系如表 2。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析。计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较用成组  $t$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

根据 PCR 仪的测定结果统计各组织 miRNA-125 的 Ct 值,计算出各组大鼠耳蜗组织中 miRNA-125 的相对表达量。NID 组大鼠耳蜗组织 miRNA-125 的相对表达量为  $0.12 \pm 0.05$ ,正常组大鼠耳蜗组织 miRNA-125 的相对表达量为  $1.11 \pm 0.51$ 。NID 组大鼠耳蜗组织 miRNA-125 的表达明显下调,与正常组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

miRNA 是一类重要的具有调控功能的、非蛋白质编码的、长约 22 个核苷酸的内源性极小分子 RNA,其主要是通过目标 mRNA 的结合影响目标 mRNA 的翻译或降解,进而影响目标表达蛋白<sup>[5]</sup>。miRNA-125 在多种疾病的组织中表现出明显的异常表达,参与调控细胞代谢、个体发育、细胞凋亡、分化和增殖等多种生物学过程。有报道称,其家族可以作为启动子或阻遏物参与许多疾病如肿瘤等的发生与发展,既有发挥癌基因的作用,也有抑制癌基因的作用。因报道的疾病不同,其表达也不同<sup>[6-8]</sup>。随着分子生物学技术的不断发展,对 miRNA 的功能的认识越来越深刻,很多研究发现其在很多疾病中起着重要的调节作用。据文献报道,miRNA-125 在人体的调控作用上对于不同的疾病表达不同,miRNA-125 在人体中共有两种亚型:miRNA-125a 和 miRNA-125b,两种亚型所发挥的作用也不同,值得进一步研究。越来越多的实验证明,miRNA-125 在不同的细胞和许多疾病中起着重要作用。由于 miRNA-125 的表达异常几

乎存在于大多数的疾病中,因此,miRNA-125 可以作为一个强有力的预后指标用来诊断某些疾病。本实验主要是研究 miRNA-125 在 NID 病变组织的表达情况,结果表明 miRNA-125 在 NID 大鼠较正常大鼠表达量明显下降,说明 miRNA-125 在噪声性耳聋大鼠的耳蜗组织出现了表达异常,miRNA-125 表达量的下调可能促进了 NID。

随着经济社会的发展,人们的生活环境中噪声越来越多,严重影响了人们的身心健康。噪声除了对听力产生损伤外,还能影响内分泌、神经、消化、心血管等系统,引起高血压、头昏、头痛、失眠、消化不良等症状,严重者可出现心理、精神上的疾病,仅次于老年性聋成为致聋的第二位原因。其在很多国家的工伤抚恤上位居第一<sup>[9]</sup>。NID 已经明确被定为公共卫生防治的重点疾病,成为世界上发病率最高的职业病。

有研究显示,某些基因可影响动物对噪声的易感性<sup>[10]</sup>。因此,研究易感基因对 NID 诊断和治疗具有重要意义。若能够确认引起 NID 的易感基因,便可以使暴露在高噪声环境下 NID 的易感人群有效地筛选出来,从而达到预防的目的。NID 易感相关基因的研究尚处于起始阶段。因此,希望通过深入研究 miRNA-125 在 NID 发生发展中的作用,为阐明 NID 发病的生物学机制和诊断、治疗提供依据。

## 参考文献

- [1] 沈欢喜,张正东,徐艳琼,等.噪声性耳聋易感基因的研究进展[J].中国工业医学杂志,2011,24(5):353-356.
- [2] 刘彩霞.探讨噪声性耳聋及防护措施研究[J].中国实用医药,2012,7(23):62-63.
- [3] 胡正兴.非稳态噪声对作业工人健康危害调查[J].中国热带医学,2008,8(6):1007-1008.
- [4] 杨卫平.基因的改变与噪声性聋的易感性[J].中华耳科学杂志,2007,5(3):338-341.
- [5] Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(9):597-610.
- [6] 姜飞洲,万小平,陈晓悦,等. miRNA-125b 在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J].现代生物医学进展,2010,10(8):1570-1572.
- [7] 郭晓东,张璇,刘树红,等. miRNA-125b 在肝癌中表达变化的研究[J].现代生物医学进展,2013,13(7):1253-1255.
- [8] 任玉欣,赵松,付英梅,等. miRNA-125b 在膀胱癌中的表达和意义[J].现代生物医学进展,2014,14(12):2251-2254.
- [9] 王新中.您了解噪声性耳聋吗[J].人人健康,2012(7):23.
- [10] 沈欢喜,张正东,徐艳琼,等.噪声性耳聋易感基因的研究进展[J].中国工业医学杂志,2011,24(5):353-356.