

miRNA-29a 在神经细胞的表达特征

陆瑜 菅敏钰 李晔 韩如泉

【摘要】 目的 观察微小RNA(miRNA)-29a在小鼠神经系统内的表达特征。方法 实时定量聚合酶链反应检测经原代培养第3、7、15、21天星形胶质细胞、神经元和出生后相应时间点小鼠大脑皮质miRNA-29a表达变化。结果 随着小鼠生长发育,miRNA-29a在神经系统内的表达逐渐增强,与体外原代培养第3天相比,第7、15、21天时神经元和星形胶质细胞miRNA-29a相对表达量均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与饲养第3天小鼠相比,饲养第7、15、21天小鼠大脑皮质miRNA-29a相对表达量亦升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);同一观察时间点星形胶质细胞miRNA-29a相对表达量是神经元的20~40倍($P = 0.000$),而大脑皮质miRNA-29a相对表达量仅为星形胶质细胞的1/3($P = 0.000$)。结论 miRNA-29a在小鼠大脑皮质发育过程中呈现的高丰度特异性表达,主要表现为星形胶质细胞miRNA-29a表达上调。

【关键词】 微RNAs; 星形细胞; 神经元; 大脑皮质; 聚合酶链反应; 细胞,培养的

Expression profile of miRNA-29a in neural cells

LU Yu, JIAN Min-yu, LI Ye, HAN Ru-quan

Department of Anesthesia, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Corresponding author: HAN Ru-quan (Email: ruquan.han@gmail.com)

【Abstract】 Objective To investigate the expression profile of microRNA (miRNA)-29a in mice neural cells. **Methods** Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to analyze miRNA-29a expression changes of neurons and astrocytes after 3, 7, 15, 21 d of primary culture *in vitro*, and cortex tissue of 3, 7, 15, 21 d old mice. **Results** miRNA-29a expression increased in nervous system with the growth of mice. Compared with the 3th day, miRNA-29a relative expression on the 7th, 15th, 21th days in neurons, astrocytes and cortex tissue were obviously higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At each time point, the relative expression levels of miRNA-29a in cultured astrocytes were 20–40 times higher than in cultured neurons ($P = 0.000$), and levels in cortex tissue were about 1/3 that seen in cultured astrocytes ($P = 0.000$). **Conclusions** With the growth and development of brain cortex of mice, miRNA-29a is highly expressed in astrocytes, reflecting its abundant and specific expression.

【Key words】 MicroRNAs; Astrocytes; Neurons; Cerebral cortex; Polymerase chain reaction; Cells, cultured

This study was supported by National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (No. 81201027).

微小RNA(miRNA)是包含约22个核苷酸的小分子RNA,调节基因转录后的表达。miRNA-29家族共有3个成员,分别为miRNA-29a、miRNA-29b和miRNA-29c,编码基因定位于第1和6号染色体。miRNA-29在多种脊椎动物基因组内呈高度保守,提示其具有十分重要的生物学作用。许多miRNA

均具有细胞特异性表达特点,miRNA-29a在星形胶质细胞的表达较高,被认为是其特异性miRNA^[1]。目前认为,星形胶质细胞在脑缺血后神经功能保护中起重要作用^[2]。本研究对体外培养小鼠不同发育阶段星形胶质细胞、神经元和大脑皮质miRNA-29a表达变化进行分析,以为进一步探讨miRNA-29a在脑缺血中的作用提供理论基础。

doi:10.3969/j.issn.1672-6731.2015.01.009

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金资助项目(项目编号:81201027)

作者单位:100050 首都医科大学附属北京天坛医院麻醉科

通讯作者:韩如泉(Email:ruquan.han@gmail.com)

材料与amp;方法

一、实验材料

1. 实验动物 本项研究中所用的Swiss Webster

乳鼠(16只)、Swiss Webster小鼠(24只),以及E16孕鼠(6只)均由首都医科大学实验动物中心提供,雌雄不限,均于实验前经实验室同化24h。本研究经首都医科大学附属北京天坛医院动物实验伦理委员会批准。

2. 实验仪器与试剂 (1)主要仪器与设备: Leica DMI6000 倒置显微镜购自德国 Leica 公司。PTC-100 型聚合酶链反应(PCR)仪购自美国 Gene 公司。384 孔 7500-Applied 实时定量 PCR 仪和 5000 型二氧化碳培养箱分别为美国 Applied Biosystems 公司和 Thermo Fisher 公司产品。(2)试剂与药品: DMEM 培养基和质量分数为 100% 胎牛血清 500 ml 均由美国 Gibco 公司提供。多聚-L-赖氨酸和胰蛋白酶购自美国 Sigma 公司, Trizol 试剂由美国 Invitrogen 公司提供。miRNA-29a 引物(No.002112)、逆转录 PCR 试剂盒(No.4366596)和 PCR 试剂盒(No.4324020)均购自美国 Applied Biosystems 公司。

二、实验方法

1. 原代细胞培养 (1)星形胶质细胞组:参照文献[3]方法,选择4只出生1~2d的Swiss Webster乳鼠制备原代星形胶质细胞。小鼠经体积分数为2%七氟醚麻醉,无菌分离大脑皮质,4℃、D-Hank液漂洗3次,垫冰袋清除脑膜及表面血管等杂质,剪刀分解为碎块,37℃、0.25g/L胰蛋白酶消化15min,制备单细胞悬液;含体积分数为15%胎牛血清的DMEM完全培养液终止消化,细胞密度调整至 5×10^6 /ml,接种于预铺多聚-L-赖氨酸的24孔板,37℃、二氧化碳培养箱连续培养21d,光学显微镜观察细胞核呈圆形且突起完整,即为星形胶质细胞。(2)神经元组:参照文献[4]方法,选择孕19~21d的E16孕鼠1~2只(8~10个胚胎)制备原代神经元。实验方法同星形胶质细胞组,但单细胞悬液经无血清DMEM完全培养液终止消化后,于37℃、二氧化碳培养箱连续培养至第3天,以终浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 阿糖胞苷抑制星形胶质细胞增殖,24h后更换培养液,光学显微镜观察细胞形态完整,突起光滑,胞核大而清晰即为神经元。两组均于体外培养第3、7、15、21天时收集细胞,每组重复4次。

2. 大脑皮质标本制备 分别于实验室饲养第3、7、15、21天时随机选择雄性Swiss Webster小鼠各4只,2%七氟醚麻醉后经心脏穿刺、脑组织内灌注4℃生理盐水断头处死,切取完整大脑皮质,-80℃冻存,作为脑皮质组。

3. 实时定量聚合酶链反应检测 miRNA-29a 相对表达量 采用 Trizol 法制备总 RNA。分别于星形胶质细胞、神经元或大脑皮质中加入 Trizol 试剂,室温下放置 5 min 充分裂解; $12 \times 10^3 \times g$ 高速离心 5 min,取上清液。氯仿抽提、异丙醇沉淀、体积分数为 75% 乙醇清洗、室温晾干,波长 260 和 280 nm 处的吸光度比值($A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$)于 1.80~2.00 之间的 RNA 样本方符合后续实验要求。逆转录 PCR 反应严格按照试剂盒说明书进行,反应体系:200 ng 总 RNA、1.30 mmol/L dNTPs、50 U 逆转录酶、10 U RNA 酶抑制剂和 miRNA-29a 引物;反应条件:16℃ 30 min,42℃ 30 min,85℃ 5 min。PCR 反应严格按照试剂盒说明书进行,反应体系:0.75 μl 逆转录 PCR 产物、5 μl 混合试剂,然后加入焦碳酸二乙酯(DEPC)溶液至 10 μl ;反应条件:95℃ 10 min,95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。以脑组织内稳定表达的 miRNA-U6 为内参照物,每一样本循环阈值(Ct)与 miRNA-U6 Ct 值相减获得 ΔCt ,所有样本的 miRNA 相对表达量以 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值的负对数表示。PCR 反应重复 3 次,取平均值。

三、统计分析方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理与分析。计量资料以均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两比较行 SNK-*q* 检测。以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

为明确 miRNA-29a 在神经元内特异性表达之特点,分别制备经原代培养第 3、7、15、21 天的鼠星形胶质细胞、神经元,以及出生后第 3、7、15、21 天小鼠大脑皮质,实时定量 PCR 反应显示,随着小鼠生长发育,miRNA-29a 在神经系统内的表达呈逐渐升高趋势,且组间差异具有统计学意义(均 $P < 0.05$,表 1)。与体外原代培养第 3 天比较,神经元组培养第 7、15、21 天时,miRNA-29a 相对表达量升高($P = 0.041, 0.000, 0.000$);星形胶质细胞组第 7、15、21 天时,miRNA-29a 相对表达量升高($P = 0.039, 0.000, 0.000$);脑皮质组第 7、15、21 天时,miRNA-29a 相对表达量亦升高($P = 0.037, 0.000, 0.000$)。同一观察时间点星形胶质细胞 miRNA-29a 相对表达量为神经元的 20~40 倍($P = 0.000$),而脑皮质 miRNA-29a 相对表达量仅为星形胶质细胞的 1/3($P = 0.000$,表 1),提示大脑皮质发育过程中 miRNA-29a 表达水平

表 1 不同处理组小鼠各观察时间点神经系统 miRNA-29a 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s$)**Table 1.** Comparison of miRNA-29a relative expression levels in mice neurons, astrocytes and cortex at different time points ($\bar{x} \pm s$)

Group	N	3 d	7 d	15 d	21 d	F value	P value
Neuron	4	1.00 ± 0.06	1.69 ± 0.17	11.88 ± 1.31	14.14 ± 1.87	305.100	0.000
Astrocyte	4	20.83 ± 1.27	39.99 ± 2.50	295.16 ± 29.78	441.88 ± 66.03	76.180	0.000
Cortex	4	5.26 ± 1.47	8.45 ± 1.84	73.62 ± 8.72	142.39 ± 14.32	278.400	0.000
F value		246.123	387.028	297.134	114.509		
P value		0.000	0.000	0.000	0.000		

的上调,主要表现为星形胶质细胞 miRNA-29a 表达水平升高。

讨 论

心脏骤停复苏后脑缺血是神经功能缺损的主要原因。我国每年约有 544×10^3 例患者死于心脏骤停,而神经功能缺损是复苏后的主要后遗症。低温治疗是目前公认的能够改善心脏骤停患者预后的有效方法^[5]。但在临床实际工作中往往不能对大多数患者实施有效的低温治疗,以往针对神经功能保护的研究主要关注神经元存活状态和功能的调节,目前,有研究显示,星形胶质细胞对缺血后神经元的保护具有重要作用^[2,6]。然而,单纯关注神经元保护而缺少对星形胶质细胞功能的重视,往往是导致脑缺血治疗策略失败的原因^[7]。星形胶质细胞线粒体功能抑制^[8]或谷氨酸摄取功能障碍^[9]均可影响神经元毒性损伤后的修复,并于脑缺血致海马 CA1 区神经元死亡前数天或数小时的再灌注早期即出现星形胶质细胞谷氨酸转运功能降低。对大鼠短暂性脑缺血模型的研究发现,海马 CA1 区神经元死亡前、再灌注最初数小时内,星形胶质细胞即出现谷氨酸转运活性降低和谷氨酸转运体 1 (GLT-1) 免疫活性下降^[10-11]。大鼠海马 CA1 区星形胶质细胞活性氧(ROS)产生增加及线粒体功能障碍使缺血后谷氨酸转运体 1 活性降低,并最终导致海马 CA1 区神经元迟发性死亡^[12]。近期研究显示,海马星形胶质细胞的两种保护性蛋白热休克蛋白 72 (Hsp72) 和过氧化物酶过表达,可明显提高海马 CA1 区神经元存活率^[13]。由此可见,心脏骤停复苏后针对星形胶质细胞功能进行的神经元保护是一条有效途径。

miRNA 基因在转录并从胞核向胞质移行的成熟过程中至少包括 3 种 RNA 形式,分别为长序列的原始 miRNA (pri-miRNA),约包含 70 个核苷酸的

miRNA 前体 (pre-miRNA) 和约包含 22 个核苷酸的成熟 miRNA;成熟 miRNA 是一种含 21 ~ 23 个核苷酸的 RNA 分子,通过完全或部分结合靶蛋白 mRNA 的 3' 非翻译区 (UTR) 使 mRNA 降解或抑制 mRNA 翻译;miRNA 内含 5 ~ 7 个核苷酸的短序列决定 miRNA 与 mRNA 结合的特异性,其特性决定 miRNA 可与多种蛋白质的 mRNA 相结合,一种蛋白质 mRNA 亦可结合多种 miRNA。这一理念为蛋白质组学的研究提供了转录后调控的全新多层次调节网络。

miRNA-29 在神经系统内呈高表达,与多种神经系统疾病的发生与发展密切相关。研究显示,原发性阿尔茨海默病患者脑组织 miRNA-29a 表达水平降低,其靶蛋白 NAV3 在阿尔茨海默病患者脑组织中的表达水平显著升高,与 miRNA-29a 表达下调和神经变性病的发生密切相关^[14]。目前,各项有关脑缺血后 miRNA-29 表达变化的研究存在较大差异,miRNA-29 在脑组织局部缺血皮质区表达水平降低^[15-16],而在前脑缺血的海马区则表达升高^[17]。我们认为,上述研究结果不一致的原因是由于不同研究者未对局部脑缺血模型的缺血核心区和缺血周围区进行界定,即缺血相对敏感的 CA1 区和相对耐受的齿状回。许多 miRNA 均具有细胞特异性,miRNA-29a 被认为是星形胶质细胞的特异性 miRNA^[1]。本研究首次测定 miRNA-29a 在神经系统不同发育阶段的表达变化,证实 miRNA-29a 可随着神经细胞的成熟表达水平逐渐升高。而且,进一步确定了 miRNA-29a 在星形胶质细胞内高丰度表达的特异性;并探讨 miRNA-29a 与靶蛋白之间的相互作用,为 miRNA-29a 在脑缺血和神经保护中的重要作用提供了前期基础,阐明了 miRNA-29a 在神经系统内的变化规律,为星形胶质细胞功能保护、改善复苏后神经功能提供思路。

参 考 文 献

- [1] He M, Liu Y, Wang X, Zhang MQ, Hannon GJ, Huang ZJ. Cell-type-based analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron*, 2012, 73:35-48.
- [2] Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke*, 2009, 40(3 Suppl):8-12.
- [3] Ouyang YB, Xu LJ, Emery JF, Lee AS, Giffard RG. Overexpressing GRP78 influences Ca²⁺ handling and function of mitochondria in astrocytes after ischemia-like stress. *Mitochondrion*, 2011, 11:279-286.
- [4] Xu L, Chock VY, Yang EY, Giffard RG. Susceptibility to apoptosis varies with time in culture for murine neurons and astrocytes: changes in gene expression and activity. *Neurol Res*, 2004, 26:632-643.
- [5] Constantine M. Current evidence in therapeutic hypothermia for postcardiac arrest care. *Emerg Med Pract*, 2011, 13:1-22.
- [6] Swanson RA, Ying W, Kauppinen TM. Astrocyte influences on ischemic neuronal death. *Curr Mol Med*, 2004, 4:93-205.
- [7] Sidoryk - Wegrzynowicz M, Wegrzynowicz M, Lee E, Bowman AB, Aschner M. Role of astrocytes in brain function and disease. *Toxicol Pathol*, 2011, 39:115-123.
- [8] Voloboueva LA, Suh SW, Swanson RA, Giffard RG. Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection. *J Neurochem*, 2007, 102:1383-1394.
- [9] Liu YX, Zhang M, Liu LZ, Cui X, Hu YY, Li WB. The role of glutamate transporter - 1a in the induction of brain ischemic tolerance in rats. *Glia*, 2012, 60:112-124.
- [10] Liu AJ, Hu YY, Li WB, Xu J, Zhang M. Cerebral ischemic preconditioning enhances the binding characteristics and glutamate uptake of glial glutamate transporter - 1 in hippocampal CA1 subfield of rats. *J Neurochem*, 2011, 119:202-209.
- [11] Zhang M, Li WB, Liu YX, Liang CJ, Liu LZ, Cui X, Gong JX, Gong SJ, Hu YY, Xian XH. High expression of GLT - 1 in hippocampal CA3 and dentate gyrus subfields contributes to their inherent resistance to ischemia in rats. *Neurochem Int*, 2011, 59:1019-1028.
- [12] Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG. Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci*, 2007, 27:4253-4260.
- [13] Xu L, Emery JF, Ouyang YB, Voloboueva LA, Giffard RG. Astrocyte targeted overexpression of Hsp72 or SOD2 reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia. *Glia*, 2010, 58:1042-1049.
- [14] Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, Arima K, Saito Y, Ishida T, Satoh J. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR - 29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, 36:320-330.
- [15] Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29: 675-687.
- [16] Jeyaseelan K, Lim KY, Arumugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 2008, 39:959-966.
- [17] Yuan Y, Wang JY, Xu LY, Cai R, Chen Z, Luo BY. MicroRNA expression changes in the hippocampi of rats subjected to global ischemia. *J Clin Neurosci*, 2010, 17:774-778.

(收稿日期:2014-11-12)

· 小 词 典 ·

中英文对照名词词汇(五)

上腔静脉综合征 superior vena cava syndrome(SVCS)
 社区动脉粥样硬化危险因素研究
 Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study
 神经元型一氧化氮合酶
 neuronal nitric oxide synthase(nNOS)
 肾上腺脑白质营养不良 adrenoleukodystrophy(ALD)
 肾素-血管紧张素系统 renin-angiotensin system(RAS)
 生长激素 growth hormone(GH)
 世界心脏病联盟 World Heart Federation(WHF)
 嗜铬素 A chromogranin A(CgA)
 收缩压 systolic blood pressure(SBP)
 首届国家健康与营养调查
 the First National Health and Nutrition Examination Survey
 (NHANES I)
 舒张压 diastolic blood pressure(DBP)
 数字广度测验 Digit Span Test(DS)
 丝裂原活化蛋白激酶
 mitogen-activated protein kinase(MAPK)

糖链抗原 carbohydrate antigen(CA)
 梯度回波序列 gradient echo sequence(GRE)
 体重指数 body mass index(BMI)
 突触素 synaptophysin(Syn)
 无先兆性偏头痛 migraine without aura(MO)
 无症状性多血管病变社区研究
 Asymptomatic Polyvascular Abnormalities in Community
 (APAC) study
 先兆性偏头痛 migraine with aura(MA)
 30项一般健康问卷
 30-Item General Health Questionnaire(GHQ-30)
 心肌缺血与偏头痛研究
 Myocardial Ischemia and Migraine Study(MIMS)
 选择性雌激素受体调节剂
 selective estrogen receptor modulator(SERM)
 血管紧张素 II 受体阻断剂
 angiotensin II receptor blocker(ARB)