

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000484

miR-124-3p 通过负调控 Caveolin-1 表达 N2a/APPswe 细胞凋亡率及细胞内钙离子浓度

向 月, 张 雄, 杨 军, 戴颂阳, 李 昱

(重庆医科大学神经科学中心、重庆市神经生物学重点实验室、重庆医科大学基础医院病理学教研室, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨在阿尔茨海默病(Alzheimer's diseases, AD)细胞模型中 miR-124-3p 通过调控 Caveolin-1 的表达对细胞凋亡率及钙离子浓度的影响。**方法:**体外培养野生型 N2a(N2a/WT)和 N2a/APPswe 细胞, real-time PCR 及 Western blot 分别检测 miR-124-3p 与 β -淀粉样蛋白前体蛋白(β -amyloid precursor protein, APP)mRNA 及蛋白的表达。双荧光素酶报告实验分析 miR-124-3p 与 Caveolin-1 之间靶向调控关系。N2a/APPswe 细胞瞬时转染 miR-124-3p 模拟物(mimics), real-time PCR、Western blot 分别检测 Caveolin-1 mRNA 和蛋白的表达。N2a/APPswe 细胞分别瞬时转染 miR-124-3p 模拟物(mimics)、pcDNA-Caveolin-1、Caveolin-1-siRNA, 流式细胞仪分析细胞凋亡水平, 测定细胞内游离钙离子浓度。**结果:**与 WT 组相比, APPswe 组 APP mRNA 和蛋白水平表达都明显升高(分别为 $P=0.000$, $P=0.000$), miR-124-3p 表达明显降低($P=0.000$)。双荧光素酶报告实验表明, 与突变型载体(pGL3-Caveolin-1 3'UTR MUT)共转染组相比, 与野生型载体(pGL3-Caveolin-1 3'UTR WT)共转染组的相对荧光素酶活性和明显减弱($P=0.004$); 转染 miR-124-3p mimics 后, 与空载体组比较, miR-124-3p mimics 转染组的 Caveolin-1 mRNA 和蛋白的表达明显下调(分别为 $P=0.000$, $P=0.000$); 分别转染 miR-124-3p mimics、Caveolin-1-siRNA 后, 与空载体组比较, 细胞凋亡率降低(分别为 $P=0.000$, $P=0.000$), 游离钙离子浓度降低(分别为 $P=0.000$, $P=0.000$); 转染 pcDNA-Caveolin-1 后, 得到与上述相反的结果(分别为 $P=0.000$, $P=0.000$)。**结论:**miR-124-3p 可以通过靶向下调 Caveolin-1 的表达, 抑制 AD 细胞凋亡, 降低细胞中游离钙离子浓度, 从而发挥神经保护作用, 为 AD 的防治提供新的思路和靶点。

【关键词】miR-124-3p; Caveolin-1; N2a/APPswe 细胞; 凋亡; 钙离子浓度**【中图分类号】**R741.02**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-09-29

miR-124-3p inhibits N2a/APPswe cell apoptosis and cellular calcium ion concentration via down-regulating Caveolin-1

Xiang Yue, Zhang Xiong, Yang Jun, Dai Songyang, Li Yu

(Institute of Neuroscience, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology, Department of Pathology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of miR-124-3p on the apoptosis and the concentration of free calcium in cell by regulating the expression of Caveolin-1 in Alzheimer's diseases(AD) cell model of N2a/APPswe cells. **Methods:** N2a/APPswe and wild type N2a(N2a/WT) cells were cultured *in vitro*; real-time fluorescence quantitative PCR(real-time PCR) and Western blot(WB) were respectively used to detect the expression levels of miR-124-3p and amyloid precursor protein(APP) mRNA and protein. Dual luciferase report experiments were used to detect targeting regulation relationship between miR-124-3p and Caveolin-1. N2a/APPswe cells were transiently transfected by miR-124-3p mimics; real-time PCR and WB were respectively used to detect the expression levels of Caveolin-1 mRNA and protein. N2a/APPswe cells were transiently transfected by miR-124-3p mimics, pcDNA-Caveolin-1, Caveolin-1-siRNA and the rate of cell apoptosis was analyzed by flow cytometry. The intracellular free calcium concentration was measured. **Results:** Compared with those of WT group, APP mRNA and protein levels were significantly increased($P=0.000$, $P=0.000$) in APPswe group, miR-124-3p expression was obviously decreased($P=0.000$). Dual luciferase report experiment showed that compared with those of co-transfection with the mutant vector(pGL3-Caveolin-1 3'UTR MUT) group, relative luciferase activities in co-transfection with the wild type vector(pGL3-Caveolin-1 3'UTR WT) group were significantly decreased($P=0.004$). After

作者介绍: 向 月, Email: 544532166@qq.com,

研究方向: 神经病理学。

通信作者: 李 昱, Email: liyu100@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81271426)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150308.2202.010.html>

(2015-03-08)

the transfection of miR-124-3p mimics, Caveolin-1 mRNA and protein levels were significantly decreased ($P=0.000$, $P=0.000$) in transfection group than in control group. After the transfection of miR-124-3p mimics and Caveolin-1-siRNA, the cell apoptosis rate and free calcium concentration were decreased ($P=0.000$) in transfection group than in control group ($P=0.000$). After the transfection of pcDNA-Caveolin-1, the opposite results were obtained ($P=0.000$, $P=0.000$). **Conclusion:** miR-124-3p can inhibit the apoptosis of cell and reduce the concentration of free calcium in cell by targeted down-regulation of Caveolin-1 expression, which plays a neuro-protective role in prevention and cure of AD and provides new ideas and targets for AD.

【Key words】miR-124-3p; Caveolin-1; N2a/APPswe cell; apoptosis; calcium ion concentration

阿尔茨海默病 (Alzheimer's diseases, AD) 是一种年龄相关的慢性进行性神经系统退行性病变^[1]。迄今为止, AD 的病因与发病机制仍未充分阐明。 β -淀粉样蛋白 (β -amyloid protein, A β) 的异常聚集被认为是 AD 发生的共同通路, 研究发现其毒性机理与细胞内钙稳态失调和神经细胞凋亡有关^[2-3]。

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一种内源性的长度约 19~24 个核苷酸的单链非编码小 RNA。有许多异常表达的 miRNA 可以通过调控靶基因的表达进而参与调节 AD 等神经退行性疾病的发生发展^[4]。miR-124 在神经系统中特异性高表达^[5], 且其表达的改变与多种神经系统疾病的发生发展相关, 有望成为该类疾病诊断、治疗和判断预后的重要指标。

研究发现, 一些 miRNA 可以通过靶向调控 Caveolin-1 的表达调节肿瘤的增殖和侵袭等过程^[6]。然而, 在 AD 中 miR-124 是否对 Caveolin-1 的表达具有调控作用, 并对 AD 的发生发展产生影响目前尚未见报道。因此, 本研究探讨在 AD 中 miR-124-3p 对细胞凋亡率、钙离子浓度的影响是否通过调控 Caveolin-1 实现, 从而为寻找防治 AD 的新策略和靶点提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 野生型 N2a 细胞 (Wildtype, N2a/WT) 和稳定表达 Swedish 家族性突变的人 APP695 的 N2a 细胞 (N2a/APP695swe)。

1.1.2 主要试剂 APP 抗体 (Cell Signaling Technology 公司); Caveolin-1 抗体 (BD 公司); β -actin 抗体购自北京四正柏生物科技公司; DMEM、Opti-MEM、标准胎牛血清 (Gibco 公司); G418 (Amresco 公司); 脂质体 Lipfectamine™ 2000 (Invitrogen 公司); RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara 公司); Annexin-V-FITC 凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技公司); Fluo3/AM、PluronicF-127 (Sigma 公司); HRP 标记的 IgG 二抗 (北京鼎国生物技术公司); 过表达成熟

miR-124-3p 的小分子 RNA (miR-124-3p mimics) 及其阴性对照 (广州锐博生物科技公司); pRL-TK、Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega 公司); pGL3-Control-Mouse Caveolin-1 3' UTR WT, pGL3-Control-Mouse Caveolin-1 3' UTR MUT, pcDNA-Caveolin-1 及其空载体 (pcDNA3.1) 和 Caveolin-1-siRNA 及其空载体 (NC-siRNA) (上海英骏生物技术公司); 所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 WT 组: N2a/WT 细胞; APPswe 组: N2a/APP695swe 细胞; 空载体组: N2a/APP695swe 细胞分别转染 miR-124-3p mimics 的空载体或 pcDNA-Caveolin-1 的空载体 (pcDNA3.1) 或 Caveolin-1-siRNA 的空载体 (NC-siRNA); 转染组: N2a/APP695swe 细胞分别转染 miR-124-3p mimics 或 pcDNA-Caveolin-1 或 Caveolin-1-siRNA。

1.2.2 细胞培养 N2a/WT 细胞培养于含有 47% DMEM、47% Opti-MEM、5% 胎牛血清、1% 双抗的培养液中; N2a/APP695swe 细胞培养于含有 47% DMEM、47% Opti-MEM、5% 胎牛血清、1% 双抗、20 mg G418 的培养液中。

1.2.3 脂质体介导细胞转染 取 N2a/APP695swe 细胞接种于 6 孔板中用 Opti-MEM 培养液培养至细胞汇合度达到 50%~60%, 参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行转染, miR-124-3p mimics、pcDNA-Caveolin-1、Caveolin-1-siRNA 终浓度分别为: 100 pmol/孔、4 μ g/孔、100 pmol/孔。荧光素酶活性检测时转染比例为: miR-124-3p mimics:pGL3:pRL-TK=100 pm:400 ng:200 ng。培养 48 h 后收集细胞, 进行实验。

1.2.4 双荧光素酶报告实验 参照 Promega 公司的 Dual-Luciferase Reporter Assay System 说明书进行操作, 每次试剂加入后重复测量 3 次。加入 50 μ l Luciferase Assay Reagent II, 检测试剂产生的本底值, 加入 20 μ l PLB 裂解液, 检测萤火虫荧光素酶信号 (代表 Caveolin-1 活性), 加入 50 μ l Stop & Glo Reagent, 检测海肾荧光素酶信号 (作为内参)。Caveolin-1 相对活性=萤火虫荧光素酶信号/海肾荧光素酶信号。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 收集各组细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 个/ml, 取 1 ml 细胞悬液用 PBS 离心洗涤 2 次。加入 500 μ l 结合缓冲液使细胞悬浮, 加入 5 μ l 膜联蛋白-V (Annexin-V) 混匀后, 加入 5 μ l 碘化丙啶, 混匀后避光室温染色 15 min, 立即在流式细胞仪上进行检测 (激发波长为 488 nm)。

1.2.6 细胞钙离子浓度测定 收集各组细胞, 用温浴的 Kreb's-

HEPES溶液洗3次,加入Kreb's-HEPES 1 ml、pluronic F-127 10 μ l 和 Fura-3/AM 3 μ l,终浓度分别为 0.04%和 4 μ mol/L,置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min,用 Kreb's-HEPES 洗 3 次,用流式细胞仪检测各组荧光强度(激发波长 488 nm)。

1.2.7 real-time PCR 检测 miR-124-3p、Caveolin-1 的表达 收集各组细胞提取细胞中的总 RNA,测定 RNA 浓度和纯度,按照逆转录试剂盒操作程序进行逆转录反应合成 cDNA(miR-NA 逆转录反应时特异性引物序列如下:miR-124-3p:5'-CTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGCATTC-3';U6 snRNA:5'-AAAATATGGAACGCTT-CACGAATT-3'。以等量的 cDNA 为模板进行反应。引物序列如下:miR-124-3p 引物正义链:5'-GCTTAAGGCACGCGGT-3',反义链:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3';U6 引物正义链:5'-CTCGTTCGGCAGCAGCATATACT-3',反义链:5'-ACGC-TTCACGAATTTGCGTGTTC-3';Caveolin-1 引物正义链:5'-TCTGAACCCAACTGAGGAAT-3',反义链:5'-GTGCGCAA-GACTGAAGGAGA-3'; β -actin 引物正义链:5'-ATATCGCT-GCGCTGGTCGTC-3',反义链:5'-AGGATGGCGTAGGGAG-AGC-3'。反应程序:94 $^{\circ}$ C 变性 5 min;94 $^{\circ}$ C,10 s;58 $^{\circ}$ C,30 s;40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法,计算统计分析目的基因 mRNA 相对内参基因表达水平的差异。

1.2.8 Western blot 检测 APP、Caveolin-1 表达 收集各组细胞提取细胞中的总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,Caveolin-1 取 70 μ g,APP 取 40 μ g 蛋白样品进行凝胶电泳,经转膜、封闭一抗(APP:1:1 000;Caveolin-1:1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,室温下二抗(1:5 000)孵育 2 h,洗膜,X 胶片曝光,经显影定影处理后,胶片用扫描仪扫描,采用 Quantity One 软件测定条带的灰度值,以 β -actin 为内参,以各组条带与内参的吸光度的比值表示 APP、Caveolin-1 蛋白的相对含量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 方法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 利用生物学软件进行靶基因预测

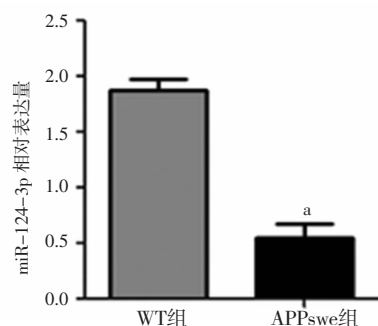
采用 TargetScanMouse 6.2 (<http://www.targetscan.org>) 和 PicTar (pictar.mdc-berlin.de) 两种在线预测软件对 Caveolin-1 mRNA 的 3' UTR 可能结合的 miRNAs 进行生物信息学测序,结果发现 miR-124-3p 是能结合到 mice 物种 Caveolin-1 的 miRNA 之一。预测的匹配序列如图 1 所示。

Position 604-610 of Caveolin-1 3' UTR 5'...GAGAAUAGACCUACGCGCCUUC...3'
Mmu-miR-124 3' CCGUAAGUGGCGCAGCGAAU 5'

图 1 Caveolin-1 3' UTR 和 miR-124-3p 配对序列预测

Fig.1 Predicted consequential pairing of Caveolin-1 3' UTR and mmu-miR-124-3p

2.2 N2a/APPswe 细胞中 APP 以及 miR-124-3p 表达的变化 real-time PCR 结果发现,APP RNA 相对表达量 APPswe 组 (1.76 ± 0.07) 与 WT 组 (0.70 ± 0.07) 比较明显增高 ($F=0.914, P=0.000$);WB 结果发现,APP 蛋白表达量 APPswe 组 (0.54 ± 0.06) 与 WT 组 (1.53 ± 0.03) 比较明显增高 ($F=0.402, P=0.000$);如图 2 结果所示,与 WT 组 miR-124-3p 表达量是 (1.88 ± 0.11),与 APP 空白组 (0.56 ± 0.12) 比较明显下降 ($F=0.105, P=0.000$)。



a: $P < 0.05$, WT 组与 APP 组比较

图 2 N2a/APPswe 细胞中 miR-124-3p 的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.2 Expression of miR-124-3p in N2a/APPswe cells

($n=3, \bar{x} \pm s$)

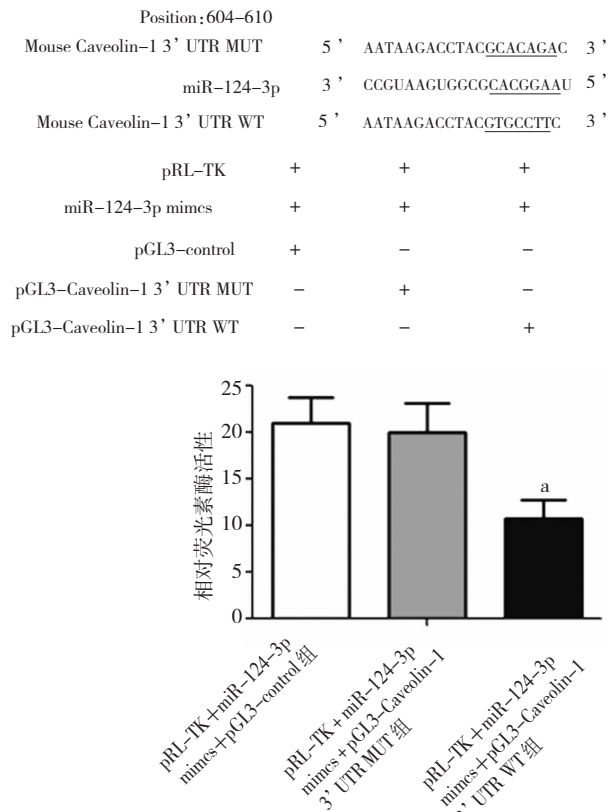
2.3 miR-124-3p 对 Caveolin-1 3' UTR 具有靶向调控作用

如图 3 结果所示,分别共转染 pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-control 组、pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-Caveolin-1 3' UTR MUT 组、pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-Caveolin-1 3' UTR WT 组相对荧光素酶活性值分别是 (21.03 ± 2.72)、(20.06 ± 3.08) 及 (10.72 ± 2.07),3 组间差异具有统计学意义 ($F=15.883, P=0.004$);其中两两比较结果显示,转染 pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-Caveolin-1 3' UTR WT 组的相对荧光素酶活性与 pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-control 组、pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-Caveolin-1 3' UTR MUT 组比较明显减弱(分别为 $P=0.002, P=0.004$),而转染 pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-control 组与 pRL-TK+miR-124-3p mimics+pGL3-Caveolin-1 3' UTR MUT 组比较差异无统计学意义 ($P=6.48$)。

2.4 miR-124-3p 对 Caveolin-1 mRNA 及蛋白表达的影响

如图 4A 结果所示,荧光定量 PCR 结果发现,APPswe 组、转染 mimics 空载体组、miR-124-3p mimics 转染组的 Caveolin-1 mRNA 表达量分别是 (4.46 ± 0.32)、(4.40 ± 0.12)、(0.65 ± 0.29),3 组间差异具有统计学意义 ($F=4.347, P=0.000$);其中两两比较结果显示,mimics 转染组细胞中 Caveolin-1 mRNA 表达量较 APPswe 组及转染 mimics 空载体组明显减少(分别为 $P=0.000, P=0.000$),而转染 mimics 空载体组与 APPswe 组比较差异无统计学意义 ($P=0.729$);如图 4B 结果所示,APPswe 组、转染 mimics 空载体组、miR-124-3p mimics 转染组的 Caveolin-1 蛋白表达量分别是 (1.54 ± 0.08)、(1.47 ± 0.12)、(0.42 ± 0.03),3 组间差异具有统计学意义 ($F=94.17, P=0.000$);其中两两比较结果显示,mimics 转染组细胞中 Caveolin-1 蛋

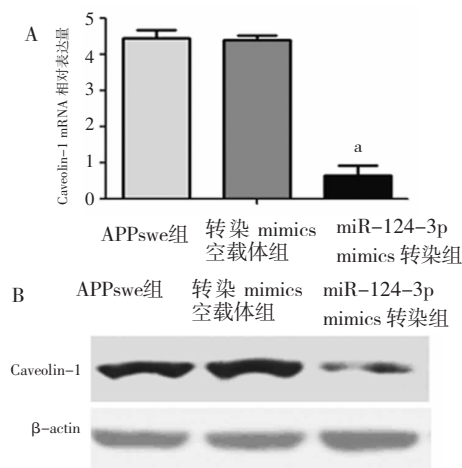
白表达量较 APPswe 组及转染 mimics 空载体组明显减少(分别为 $P=0.000, P=0.000$), 而转染 mimics 空载体组与 APPswe 组比较差异无统计学意义($P=0.390$)。



a: $P < 0.05$, pRL-TK + miR-124-3p mimics + pGL3-Caveolin-1 3' UTR WT 组与 pRL-TK + miR-124-3p mimics + pGL3-control 组或与 pRL-TK + miR-124-3p mimics + pGL3-Caveolin-1 3' UTR MUT 组比较

图 3 转染后各组相对荧光素酶活性变化 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.3 Changes in relative luciferase activity in each group after transfection ($n=3, \bar{x} \pm s$)



a: $P < 0.05$, 转染 miR-124-3p mimics 组与转染 mimics 空载体组比较

图 4 miR-124-3p 对 Caveolin-1 mRNA 及蛋白表达的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

Fig.4 Effect of miR-124-3p on the expression of Caveolin-1 at mRNA and protein levels ($n=3, \bar{x} \pm s$)

2.5 miR-124-3p 对细胞凋亡率、细胞内钙离子浓度的影响

如图 5 与表 1 结果所示, miR-124-3p mimics 转染组的细胞凋亡率以及细胞内钙离子浓度明显低于其他 2 组, 差异具有统计学意义 (分别为 $P=0.000, P=0.000$), 转染 mimics 空载体组与 APPswe 组之间无明显差异 (分别为 $P=0.788, P=0.155$)。

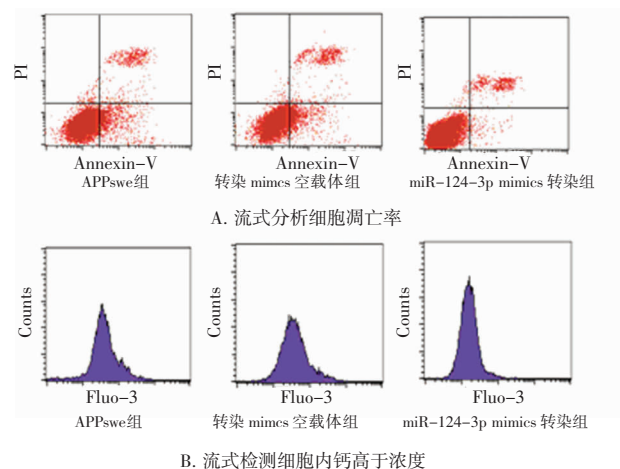


图 5 miR-124-3p 对细胞凋亡率与钙离子浓度的影响

Fig.5 Effect of miR-124-3p on cell apoptosis and calcium ion concentration

表 1 miR-124-3p 对细胞凋亡率与钙离子浓度的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab.1 Effect of miR-124-3p on cell apoptosis and calcium ion concentration ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

分组	凋亡率	钙离子浓度
APPswe 组	11.04 ± 0.50	50.83 ± 0.68
转染 mimics 空载体组	10.90 ± 0.79 ^a	50.73 ± 1.15 ^a
miR-124-3p mimics 转染组	1.63 ± 0.35 ^b	16.52 ± 0.82 ^b
F 值	262.512	1430.544
P 值	0.000	0.000

注: a, $P > 0.05$, APPswe 组与 mimics 空载体组比较; b, $P < 0.05$, miR-124-3p mimics 转染组与转染 mimics 空载体组比较

2.6 过表达 Caveolin-1 对细胞凋亡率、细胞内钙离子浓度的影响

如图 6 与表 2 结果所示, pcDNA-Caveolin-1 转染组的细胞凋亡率以及细胞内钙离子浓度明显低于其他 2 组, 差异具有统计学意义 (分别为 $P=0.000, P=0.000$), 转染 pcDNA3.1 空载体组与 APPswe 组之间无明显差异 (分别为 $P=0.752, P=0.227$)。

2.7 干扰 Caveolin-1 表达对细胞凋亡率、细胞内钙离子浓度的影响

如图 7 与表 3 结果所示, Caveolin-1-siRNA 转染组的细胞凋亡率以及细胞内钙离子浓度明显低于其他 2 组, 差异具有统计学意义 (分别为 $P=0.000, P=0.000$), 转染 siRNA 空载体组与 APPswe 组之间无明显差异 (分别为 $P=0.155, P=0.072$)。

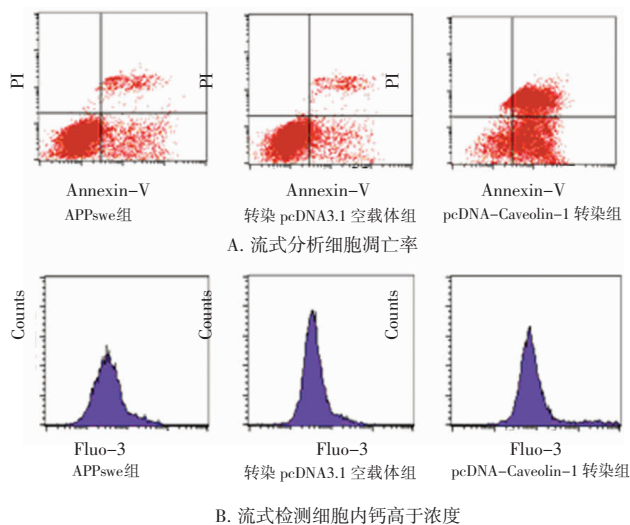


图 6 过表达 Caveolin-1 对细胞凋亡率与钙离子浓度的影响

Fig.6 Effect of overexpression of Caveolin-1 on cell apoptosis and calcium ion concentration

表 2 过表达 Caveolin-1 对细胞凋亡率与钙离子浓度的影响
($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab.2 Effect of overexpression of Caveolin-1 on cell apoptosis and calcium ion concentration ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

分组	凋亡率	钙离子浓度
APPswe组	11.22 ± 0.99	45.5 ± 0.65
转染 pcDNA3.1 空载体组	10.92 ± 1.24^a	44.80 ± 0.46^a
pcDNA-Caveolin-1 转染组	33.16 ± 1.01^b	128.92 ± 0.77^b
F 值	412.810	17 158.612
P 值	0.000	0.000

注:a, $P > 0.05$,APPswe 组与转染 pcDNA3.1 空载体组比较;b, $P < 0.05$,pcDNA-Caveolin-1 转染组与转染 pcDNA3.1 空载体组比较

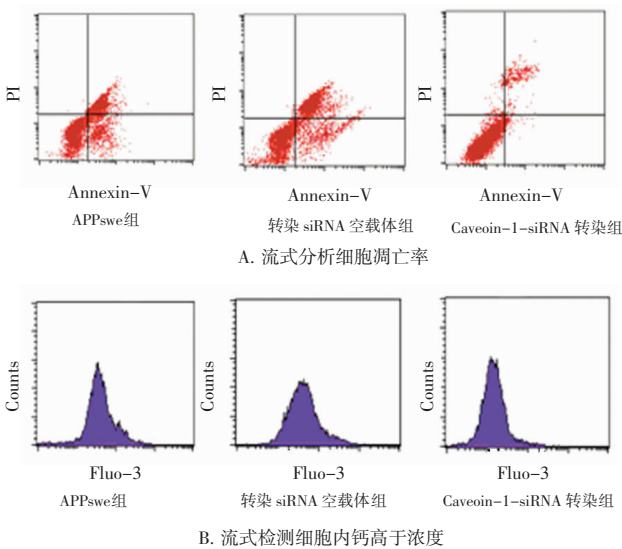


图 7 干扰 Caveolin-1 的表达对细胞凋亡率与钙离子浓度的影响

Fig.7 Effect of interference Caveolin-1 expression on cell apoptosis and calcium ion concentration

表 3 干扰 Caveolin-1 的表达对细胞凋亡率与钙离子浓度的影响
($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

Tab.3 Effect of interference Caveolin-1 expression on cell apoptosis and calcium ion concentration ($n=3, \bar{x} \pm s, \%$)

分组	凋亡率	钙离子浓度
APPswe 组	13.00 ± 0.56	52.40 ± 1.22
转染 siRNA 空载体组	12.11 ± 0.90^a	54.59 ± 1.74^a
Caveolin-1-siRNA 转染组	1.65 ± 0.46^b	17.04 ± 0.23^b
F 值	268.413	876.227
P 值	0.000	0.000

注:a, $P > 0.05$,APPswe 组与转染 siRNA 空载体组比较;b, $P < 0.05$,Caveolin-1-siRNA 转染组与转染 siRNA 空载体组比较

3 讨 论

AD是一种常见的慢性进行性神经系统退行性病变,是老年期最常见的痴呆病症。研究发现,特定 miRNAs 的表达或者功能异常参与了 AD 的发病。Lukiw 等^[7]发现某些 miRNAs 在 AD 患者的颞叶皮层中异常高表达或者低表达,提示这些 miRNAs 可能参与 AD 的病理过程。随着研究的广泛展开,目前已发现脑组织中具有 AD 特异性改变的 miRNAs 包括 miR-29、miR-15、miR-181、miR-146、miR-101 和 miR-106 等^[8]。但大部分此类 miRNAs 的特定靶基因还并不明确,在 AD 发生发展过程中发挥的作用也需要进一步的研究。

miR-124 是哺乳动物神经系统中表达非常丰富的 miRNA^[9],研究发现其可作用于数百个 mRNA,这些 mRNA 翻译的蛋白质涉及神经发生、神经分化和学习记忆等多种生物过程^[9-10]。目前,已经有研究者提出了 miR-124 导致 AD 发生的可能机制:① miR-124 通过调节 tau 蛋白亚型 4R:3R 比例从而使 tau 蛋白失调导致相关疾病的发生,如 AD^[11]。② miR-124 靶作用于 PTBPI 的 mRNA,从而调节淀粉样前体蛋白 mRNA 的选择性剪切,异常的选择性剪切与 A β 沉积有关^[12]。③ miR-124 可调节 BACE1(A β 生成的一种关键酶)基因的表达,从而调控 A β 的生成^[13]。

Caveolin-1 是大多数哺乳动物细胞膜上小凹结构(caveolae)的基本组成成分,Gaudreault 等^[14]通过对比分析 AD 患者和年龄相仿的对照组发现,在 AD 病人脑组织中 Caveolin-1 的蛋白及 mRNA 表达上调,大约是对照组的 2 倍。近年来的研究发现,Caveolin-1 与 AD 中 A β 的产生和神经毒性相关。Hattori 等^[15]研究发现,Caveolin-1 能够与 β 淀粉样前体蛋白分泌酶 1(β -site amyloid precursor protein

cleaving enzyme 1, BACE1) 相互作用而调控 APP 的 β 裂解。Yang 等^[16]在猪的肾上皮 PK15 细胞中研究发现, miR-124 可以通过靶向调节 Caveolin-1 减少 caveolar 的密度, 但在 AD 中 miR-124 与 Caveolin-1 是否存在靶向关系目前还未见报道。采用 PicTar (pictar.mdc-berlin.de) 和 TargetScanMouse6.2 (<http://www.targetscan.org>) 2 种在线预测软件对 Caveolin-1 mRNA 的 3'UTR 可能结合的 miRNAs 进行生物信息学测序, 结果发现 miR-124-3p 是能结合到 mice 物种 Caveolin-1 的 miRNA 之一。通过双荧光素酶报告实验发现, miR-124-3p 可能是通过降解 Caveolin-1 mRNA 从而使得其蛋白表达量下调, 说明 miR-124-3p 对 Caveolin-1 具有靶向负调控作用。

研究发现, 在 AD 患者的脑中有典型的核凋亡小体并发现有特征性凋亡基因的表达, 证明 AD 的发生发展与神经细胞的凋亡相关。一些组织病理方面的研究发现, AD 患者脑细胞凋亡率与同龄正常人相比其凋亡率高出 30~50 倍^[17]。Conforti 等^[18]的研究发现, 在 AD 中凋亡的发生与 A β 大量的产生、APP 及早老蛋白基因的突变、氧化应激损伤、线粒体功能的缺陷等具有一定的相关性。因此, 明确凋亡参与 AD 发生发展的相关机制对制定 AD 的防治方案具有重要意义。本实验结果发现, 在 AD 中 miR-124-3p 可以通过调控 Caveolin-1 的表达发挥凋亡抑制作用。

已经有许多实验证据支持 AD 细胞模型的钙信号紊乱学说^[19]。Niu 等^[20]研究发现, 在转入了 Swedish 突变型的 APP695 基因的细胞中容量性钙内流会增加。近年来的研究报道, 钙离子浓度改变和淀粉样变的形成具有双向关系; 钙离子浓度的增高能够刺激 APP 代谢导致 A β 产生增多, 并且淀粉样病变可以导致神经元钙离子相关信号通路发生改变导致线粒体中钙离子水平增高^[21]。本实验结果表明, 在 AD 中 miR-124-3p 可以通过调控 Caveolin-1 的表达使细胞内钙离子浓度下调。

综上所述, 可以提出, miR-124-3p 可以通过与 Caveolin-1 的 3'UTR 特异性的结合, 调控 Caveolin-1 的表达, 使细胞凋亡率下降, 胞内钙离子浓度降低, 进而发挥神经保护作用, 说明 miR-124-3p 的下调可以促进 AD 的进展, 那么上调 miR-124-3p 的水平可能具有抑制 AD 发生发展的作用, 可以为 AD 的早期诊断与治疗提供新的方法和靶点。

参 考 文 献

- [1] Reitz C, Mayeux R. Alzheimer's disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 640-651.
- [2] Holscher C. Possible cause of Alzheimer's disease: amyloid fragments, free radicals, and calcium homeostasis[J]. *Neurobiology Dis*, 1998, 5(3): 129-141.
- [3] 顾明, 周慧芳, 薛冰, 等. 雷公藤单体 T10 对 A β 1-42 所致 PC12 细胞凋亡的抑制作用[J]. *生理学报*, 2004, 56(1): 73-78.
- [4] Lau P, de Strooper B. Dysregulated microRNAs in neurodegenerative disorders[J]. *Cell Dev Biol*, 2010, 21(7): 768-773.
- [5] Lagos-Quitana M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(9): 735-739.
- [6] Nohata N, Hanazawa T, Kikkawa N, et al. Caveolin-1 mediates tumor cell migration and invasion and its regulation by miR-133a in head and neck squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(1): 209-217.
- [7] Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus[J]. *Neuroreport*, 2007, 18(3): 297-300.
- [8] Delay C, Mandemakers W, Hébert SS. MicroRNAs in Alzheimer's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 46(2): 285-290.
- [9] Franke K, Otto W, Johannes S, et al. miR-124-regulated RhoG reduces neuronal process complexity via ELMO/Dock180/Rac1 and Cdc42 signaling[J]. *EMBO J*, 2012, 31(13): 2908-2921.
- [10] Rajasethupathy P, Fiumara F, Sheridan R, et al. Characterization of small RNAs in Aplysia reveals a role for miR-124 in constraining synaptic plasticity through CREB[J]. *Neuron*, 2009, 63(6): 803-817.
- [11] Ambasudhan R, Tralantova M, Coleman R, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions[J]. *Cell Stem Cell*, 2011, 9(2): 113-118.
- [12] Smith P, Al Hashimi A, Girard J, et al. In vivo regulation of amyloid precursor protein neuronal splicing by microRNAs[J]. *J Neurochem*, 2011, 116(2): 240-247.
- [13] Fang M, Wang J, Zhang X, et al. The miR-124 regulates the expression of BACE1/ β -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 209(1): 94-105.
- [14] Gaudreault SB, Dea D, Poirier J. Increased caveolin-1 expression in Alzheimer's disease brain[J]. *Neurobiol Aging*, 2004, 25(6): 753-759.
- [15] Hattori C, Asai M, Onishi H, et al. BACE1 interacts with lipid raft proteins[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(4): 912-917.
- [16] Yang S, Liu X, Li X, et al. MicroRNA-124 reduces caveolar density by targeting caveolin-1 in porcine kidney epithelial PK15 cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 384(1-2): 213-219.
- [17] Behl C. Apoptosis and Alzheimer's diseases[J]. *J Neural Transm*, 2000, 107(11): 1325-1344.
- [18] Conforti L, Adalbert R, Coleman MP. Neuronal death: where does the end begin?[J]. *Trends Neurosci*, 2007, 30(4): 159-166.
- [19] Mattson MP, LaFerla FM, Chan SL, et al. Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders[J]. *Trends Neurosci*, 2000, 23(5): 222-229.
- [20] Niu Y, Su Z, Zhao C, et al. Effect of amyloid beta on capacitive calcium entry in neural 2a cells[J]. *Brains Res Bull*, 2009, 78(4-5): 152-157.
- [21] Berridge MJ. Calcium hypothesis of Alzheimer's diseases[J]. *Eur J Physiol*, 2010, 459(3): 441-449.

(责任编辑: 关蕴良)