

MiRNA-106a 参与 β -淀粉样蛋白致 AD 的相关研究

从 静,王超君,浦丹华,张 敏,谭容容,吴 洁*

(南京医科大学第一附属医院妇产科,南京医科大学生殖医学国家重点实验室,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 miR-106a 参与老年性痴呆(Alzheimer's disease, AD) 的发生及可能机制。方法:应用 β 淀粉样蛋白(amyloid beta protein, A β)处理小鼠原代海马神经元及大鼠嗜铬细胞系(PC12 细胞)建立 AD 细胞模型,分别采用 RT-PCR 及 Western blot 检测 AD 细胞模型中 miR-106a、STAT3、JAK2 mRNA 及 STAT3、p-STAT3、JAK2 蛋白水平的表达情况。结果:miR-106a 在 2 种 AD 细胞模型中的表达量均明显低于对照组($P < 0.05$),同时 miR-106a 的靶基因 STAT3 mRNA 和蛋白水平表达量均明显高于对照组($P < 0.05$),而 JAK2 mRNA 和蛋白水平与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$)。结论:miR-106a 负性调节 STAT3 表达而参与 AD 的发生。

[关键词] miR-106a; β 淀粉样蛋白; 痴呆; 原代海马神经元; PC12 细胞

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)11-1493-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20131102

The effect of miR-106a on amyloid beta protein-induced Alzheimer's disease in primary cultured hippocampus neurons and PC 12 cells

Cong Jing, Wang Chaojun, Pu Danhua, Zhang Min, Tan Rongrong, Wu Jie*

(Department of Obstetrics and Gynecology, The State Key Laboratory of Reproductive Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of miR-106a on the development of Alzheimer's disease (AD) induced by amyloid beta protein (A β) in primary cultured hippocampus neurons and PC12 cells. **Methods:** The primary cultured hippocampus neurons and PC12 cells were treated with A β . The expression of miR-106a, STAT3 and JAK2 mRNA were detected by RT-PCR, while the expression of STAT3, p-STAT3 and JAK2 protein were evaluated by Western blot. **Results:** The expression of miR-106a was lower in A β -treated primary cultured hippocampus neurons and PC12 cells than that of controls ($P < 0.05$). In addition, the expression of STAT3 mRNA and protein was higher in A β -treated cells than that of controls ($P < 0.05$), while the expression of JAK2 showed no significant difference whether A β -treated was used or not ($P > 0.05$). **Conclusion:** This study suggested that miR-106a might contribute to the pathogenesis of AD by negatively regulating the expression of STAT3.

[Key words] miR-106a; A β ; dementia; primary cultured hippocampus neurons; PC12 cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1493-1496, 1507]

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是中枢神经系统一种常见的进行性神经退行性疾病,主要表现为缓慢发展的学习记忆障碍、定向障碍、语言功能障碍、不同程度的认知功能障碍等^[1]。AD 的发病与 β 淀粉样蛋白(amyloid beta protein, A β)的代谢

存在着直接的关系^[2]。已有证据表明 A β 在认知障碍及 AD 发病过程中起到至关重要的起始及枢纽作用^[3]。流行病学资料显示,绝经女性因雌激素水平的下降易发生认知障碍,并进而发展为严重的阿尔茨海默病。有研究报道,miRNAs 在认知障碍和 AD 等退行性病变中发挥着重要作用^[4]。本课题组的前期研究结果也显示 miR-106a 在去卵巢鼠认知功能减退中的作用及其分子机制^[5]。表明 miRNA 和女性内分泌因素均可能参与 AD 的发生,并已成为当今的研究热点之一。

[基金项目] 国家自然科学基金(81170540);江苏省自然科学基金(BK2011846)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jie.wuyale@gmail.com

微小RNA(miRNAs)是一类长20~23个核苷酸的小分子非编码核苷酸,可以通过与靶基因mRNA 3'非编码区(3'UTR)的特定位点结合,诱导mRNA的降解和(或)抑制mRNA翻译,在转录后水平负调控靶基因的表达,参与细胞的分化发育、增殖、凋亡等一系列重要生命活动^[6]。本研究拟通过 β 淀粉样蛋白诱导原代海马神经元及PC12细胞系建立AD的细胞模型^[7-8],探讨miR-106a参与AD的发生及可能机制,为临床上AD的防治策略提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

孕16~18 d的ICR小鼠,由南京医科大学动物中心提供;PC12细胞购自上海生化细胞研究所。多聚赖氨酸、A β 25-35(Sigma公司,美国);Neurabasal A、B27(Gibco公司,美国);胎牛血清(杭州四季青生物工程公司,中国);TRIzol(大连宝生物公司,中国);蛋白提取试剂盒、BCA蛋白测定试剂盒(南京凯基公司,中国);兔p-STAT3抗体、鼠STAT3抗体和兔JAK2抗体(Abcam公司,美国);HRP标记的羊抗鼠和HRP标记的羊抗兔(中杉公司,中国);显影液(Millipore公司,美国),DMEM高糖培养基(Hyclone公司,美国);其余为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 原代海马神经元及PC12细胞系的培养

孕16~18 d的ICR小鼠,无菌条件下取出胚胎,断头、分离海马组织并剪碎。加入0.125%的胰蛋白酶溶液,37℃消化6~9 min,加种植培养液中止消化,吹打混匀,200目不锈钢筛网过滤2次,细胞计数后,制成密度为 20×10^4 个/ml细胞悬液,接种于预先用多聚赖氨酸包被的6孔培养板中,在37℃含5%CO₂和95%空气的细胞培养箱中培养。培养6 h后换成无血清神经元培养基,之后每隔3 d换液1次,每次更换一半的培养液;培养至7 d,用于实验。PC12细胞接种于含10%胎牛血清的高糖DMEM中,37℃,5%CO₂培养箱中培养,培养至对数生长期用于实验。

1.2.2 A β 25-35准备及处理

A β 25-35用三蒸水配制成100 μ mol/L的储存液,过滤、分装、-20℃冻存待用。实验前放入37℃温箱孵育72 h,使其变成丝状聚集状态,然后参照本课题组前期的研究结果^[7-8],应用20 μ mol/L A β 25-35将其加入预先接种7 d的成熟原代海马神经元及PC12细胞中。培养48 h后收获细胞,检测相关指标。

1.2.3 RT-PCR测定

分别从A β 25-35处理48 h后的原代海马神经元及PC12细胞中提取总RNA,依次经液相分离、RNA沉淀、RNA清洗及RNA溶解等步骤,最终得到细胞总RNA。取1 000 ng总RNA构建20 μ l RT反应体系,经37℃ 15 min,85℃ 5 s反应之后4℃保存。取1 μ l RT产物构建20 μ l PCR体系扩增miR-106a、STAT3和JAK2 mRNA(miR-106a-forward primer 5'-ACACTCCAGCTGGGCAAAGTGCTA-ACAGTGC-3',miR-106a-reverse-primer 5'-CTCAAC-TGGTGTCCGTGGAGTCCGCAATTCAGTTGAGCTACC-TGCCG-3';JAK2-forward primer -5'-ACACTCCAG-CTGGGTATGGCTTTTTTATTCCT-3',JAK2-reverse primer 5'-TCGTGGAGTCCGCAA-3';STAT3-forward primer 5'-CACCTTGATTGAGAGTCAAGAC-3',STAT3-reverse primer 5'-AGGAA-TCGGCTATATTGCTGGT-3')。扩增参数为95℃预变性5 min,95℃变性15 s,60℃延伸1 min,扩增40个循环,最后72℃延伸5 min,4℃保存。实验在相同的条件下重复3次。

1.2.4 Western blot分析

A β 25-35处理PC12细胞48 h后,用冰TBS洗2~3遍,加入细胞裂解液30 min后,冰上提取细胞总蛋白,所有样本均用BCA蛋白测定试剂盒进行蛋白定量,煮沸变性后进行SDS-PAGE电泳,经电转移至PVDF膜上,5% BSA或5%脱脂奶粉37℃封闭1 h,加入磷酸化STAT3单克隆抗体(1:10 000)或STAT3单克隆抗体(1:5 000)或JAK2多克隆抗体(1:500)4℃过夜,TBST洗膜后加羊抗兔抗体(1:5 000)或羊抗鼠(1:5 000)室温孵育90 min,再行TBST洗膜,加入显影液孵育曝光。实验在相同的条件下重复3次。

1.3 统计学方法

所有数据采用SPSS17.0处理,进行统计学分析。两组之间比较用*t*检验,以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 原代海马神经元培养及A β 25-35处理

培养的海马神经元,接种4~6 h后开始贴壁,培养至第2天,可见短小轴突长出;至第3天可见轴突伸长,并开始互相连接;至第7天,可见神经元胞体饱满,轴突成熟,相互交织成网。经20 μ mol/L A β 25-35处理后,可观察到神经元胞体萎缩,轴突出现断裂。

2.2 A β 处理后原代海马神经元中miR-106a、

STAT3、JAK2 mRNA 的表达

A β 处理后的原代海马神经元中 miR-106a 的表达水平明显低于对照组 ($P < 0.05$, 图 1); 而 STAT3 mRNA 的表达明显高于对照组 ($P < 0.05$, 图 2); JAK2 mRNA 水平与对照组比较无明显统计学差异 ($P > 0.05$, 图 2)。

2.3 A β 处理后 PC 12 细胞系中 miR-106a、STAT3、JAK2 mRNA 及蛋白的表达

A β 处理后的 PC12 细胞系中 miR-106a 表达水

平明显低于对照组 ($P < 0.01$, 图 3); STAT3 及 JAK2 mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.01$, 图 4), 且 p-STAT3、STAT3 蛋白水平也明显高于对照组 ($P < 0.05$, 图 5), 而 JAK2 蛋白水平与对照组相比无明显统计学差异 ($P > 0.05$, 图 5)。

3 讨论

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 主要病理特征是大脑皮质、海马、嗅球、基底前脑神经元表

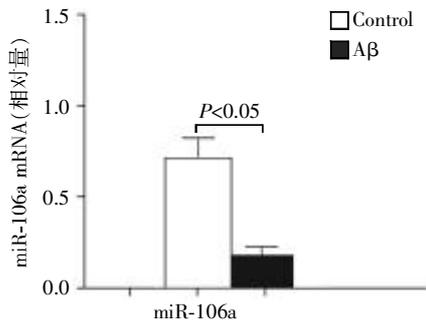


图 1 原代海马神经元中 miR-106a 的表达

Figure 1 Expression of miR-106a mRNA in primary cultured hippocampus neurons with A β -treated and controls

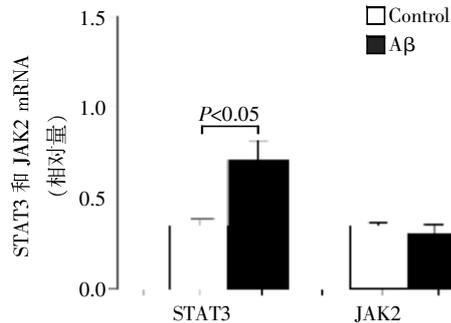


图 2 原代海马神经元中 STAT3 与 JAK2 mRNA 的表达

Figure 2 Expression of STAT3 and JAK2 mRNA in primary cultured hippocampus neurons with A β -treated and controls

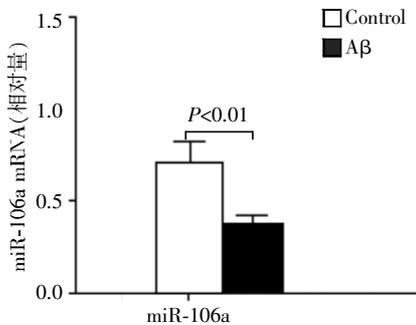


图 3 PC12 细胞系中 miR-106a 的表达

Figure 3 Expression of miR-106a in PC12 cells with A β -treated and controls

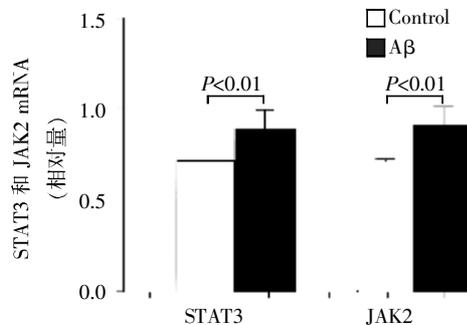


图 4 PC12 细胞中 STAT3 与 JAK2 mRNA 的表达

Figure 4 Expression of STAT3 and JAK2 mRNA in PC12 cells with A β -treated and controls

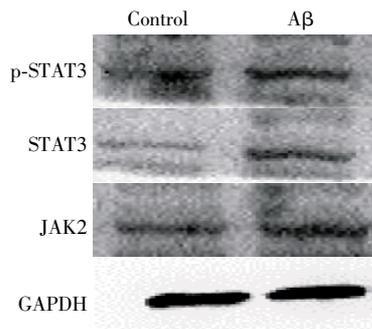
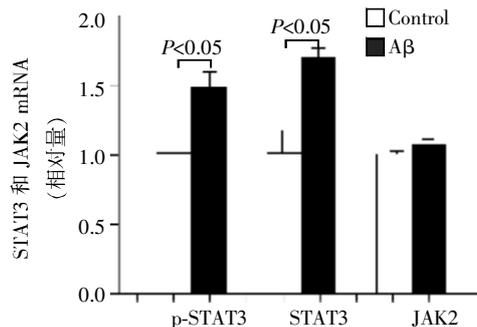


图 5 PC12 细胞系中 p-STAT3、STAT3 和 JAK2 蛋白的表达

Figure 5 Expression of p-STAT3, STAT3 and JAK2 protein in PC12 cells with A β -treated and controls



失、神经突触减少,细胞外存在大量由 β -淀粉样蛋白组成的老年斑(senile plaques,SP)和细胞内神经纤维丝缠结(neuro-fibrillary tangles,NFTs)^[3]。绝经女性易发生认知障碍,进而发展为AD,其发病率为男性的1.5~3.0倍。目前去卵巢鼠(OVX)已成为公认的模拟绝经研究的动物模型,本课题前期研究了OVX的认知功能减退,并证实miR-106a参与其发生。在细胞系的相应研究中,一般常采用PC12或原代海马神经元进行观察研究,且多采用毒性片段 $A\beta$ 处理^[9-10],所以本文采用同样的细胞系及 $A\beta$ 处理后来模拟AD细胞模型进行相关研究。 $A\beta_{25-35}$ 是 $A\beta$ 的生物学活性片段,具有类似 $A\beta$ 功能及神经毒性作用^[11]。本课题组前期实验结果显示,与对照组比较, $A\beta_{25-35}$ 处理海马神经元24h后,神经元凋亡率由 $(9.0 \pm 0.6)\%$ 升高到 $(31.5 \pm 1.9)\%$ ($P < 0.01$),而神经元活力明显降低 ($P < 0.01$);相同条件下处理PC12细胞系后,细胞活力下降了33.19%^[7-8]。本研究在前期研究的基础上,采用 $A\beta_{25-35}$ 诱导原代海马神经元损伤、处理PC12细胞系建立AD细胞模型,进行微小RNA参与AD的发病及其可能机制的探讨。

MiR-106a位于染色体Xq26.2,属于miR-17家族,由23个核苷酸组成。研究发现miRNA(包括miR-106a)在脑的海马组织中表达丰富,参与了神经系统不同生理学过程、不同信号通路的基因表达调控,如神经系统发生和发育、神经干细胞分化、突触联系、树突棘形成和神经保护等^[12]。有文献报道miR-106a的表达量过低可导致神经细胞的损伤,与AD的发生密切相关^[13]。Patel等^[14]研究证实miR-106a的种子区序列与APP基因3'UTR靶位点完全互补配对,且有靶向关系。本研究发现 $A\beta$ 处理的原代海马神经元及PC12细胞系中miR-106a的表达较低,与Satoh等^[13]学者的研究结果一致。另外,miR-106a还参与调节自体吞噬相关蛋白SQSTM1/p62^[15],自体吞噬活性的降低会导致神经元中错误折叠蛋白的积累从而参与AD的发病机制^[16]。

信号转导和转录活化因子3(signal transducers and activators of transcription3,STAT3)是一类能被生长因子受体和非受体酪氨酸激酶激活的转录因子,是STAT家族及JAK/STAT信号途径的重要成员,在中枢神经系统发育中起重要作用,参与神经元的增殖、分化过程^[17];此外,活化形式的STAT3(p-STAT3)转移到细胞核内,作用于特定基因启动区域的DNA元件,从而调节下游基因的表达。P-STAT3的蛋白水平在APP/PS1转基因鼠的皮质和海马中

表达增加,在老年APP/PS1鼠中增加尤其显著。Wan等^[18]观察到STAT3表达水平在AD患者尸检的脑组织中较高。本研究结果显示AD细胞模型中STAT3 mRNA及STAT3、p-STAT3蛋白水平均高表达,与上述文献报道一致。

另有文献报道^[19]海马神经元中 $A\beta$ 的沉积通过干扰JAK2/STAT3信号通路导致AD的发生。Chiba等学者进行了研究,在脑内注射 $A\beta$ 药物诱导AD发生的鼠脑中STAT3被激活,体外培养 $A\beta$ 处理的胶质神经元中STAT3表达水平增加。在大鼠嗜铬瘤细胞系中,沉默STAT3和抑制STAT3活性均能抑制 $A\beta$ 诱导的细胞凋亡^[20]。本课题组前期进行了miR-106a及STAT3参与去卵巢鼠动物模型认知减退的机制研究,利用生物信息学数据库预测miR-106a与STAT3的靶向关系,并发现miR-106a通过转录后调节STAT3的表达参与去卵巢小鼠认知功能障碍的发生过程,确认了STAT3作为miR-106a的功能靶基因。本实验的研究结果则说明miR-106a负性调节STAT3表达而参与AD的发生,此可为临床上绝经妇女认知障碍及AD的防治提供新线索和潜在的干预靶标。

[参考文献]

- [1] Galvin JE, Sadowsky CH. NINCDS-ADRDA. Practical guidelines for the recognition and diagnosis of dementia [J]. Am Board Fam Med, 2012, 25(3): 367-382
- [2] Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease [J]. Nature, 1999, 399(6738 Suppl): 23-31
- [3] Heese K, Akatsu H. Alzheimer's disease-an interactive perspective [J]. Curr Alzheimer Res, 2006, 3(2): 109-121
- [4] Wang WX, Huang Q, Hu Y, et al. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex; white matter versus gray matter [J]. Acta Neuropathol, 2011, 121(2): 193-205
- [5] Zhang M, Ye Y, Cong J, et al. Regulation of STAT3 by miR-106a is linked to cognitive impairment in ovariectomized mice [J]. Brain Res, 2013, 1503(1): 43-52
- [6] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [7] 戴雪, 吴洁, 崔毓桂, 等. 雷洛昔芬可减弱 β -淀粉样蛋白对原代海马神经元的毒性作用 [J]. 江苏医药, 2011, 37(13): 1511-1514
- [8] Dai X, Wu J, Sun XP, et al. Neuroprotective effects of Raloxifene on $A\beta_{25-35}$ induced damages in PC12 cells

(下转第1507页)

- receptor[J]. *Immunology*,2012,136(4):376-379
- [13] Hua Z,Hou B. TLR signaling in B-cell development and activation[J]. *Cell Mol Immunol*,2013,10(2):103-106
- [14] Robert A,Laura R,Joseph U,et al. Protective immune mechanisms in helminth infection[J]. *Nat Rev Immunol*,2007,7(12):975-987
- [15] Kawai T,Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity:update on Toll-like receptors[J]. *Nat Immunol*,2010,11(5):373-384
- [16] Xu H,Liew LN,Kuo IC,et al. The modulatory effects of lipopolysaccharide-stimulated B cells on differential T-cell polarization[J]. *Immunology*,2008,125(2):218-228
- [17] 钱 莉,佟大可,潘兴元,等. 脂多糖对 B 细胞的活化作用及机制的初步研究[J]. *第二军医大学学报*,2011,32(11):1231-1234
- [18] La Flamme AC,MacDonald AS,Pearce EJ. Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome egg[J]. *J Immunol*,2000,164(5):2419-2426
- [19] Couper KN,Blount DG,Riley EM,IL-10:the master regulator of immunity to infection [J]. *J Immunol*,2008,180(9):5771-5777
- [20] Lampropoulou V,Hoehlig K,Roch T,et al. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity[J]. *J Immunol* 2008,180(7),4763-4773
- [21] David JR,Marc AS,Shaun WJ,et al. Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors[J]. *Nat Rev Immunol*,2012,12(4):282-294
- [22] Lu YC,Yeh WC,Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. 2008,42(2):145-151
- [23] Kane CM,Jung E,Pearce EJ. Schistosoma mansoni egg antigen-mediated modulation of Toll-like receptor (TLR)-induced activation occurs independently of TLR2,TLR4, and MyD88[J]. *Infect Immun*,2008,76(12):5754-5759
- [收稿日期] 2013-05-13

(上接第 1496 页)

- via Mitogen-activated protein Kinase Signaling pathway [J]. *J Reproduction Contraception*,2012,23(1):1-16
- [9] 谢桂琴,孙秀兰,田苏平,等. 红景天素,褪黑素抑制实验性老化大鼠海马注射 A β 1-40 毒性作用[J]. *南京医科大学学报:英文版*,2004,18(4):203-206,214
- [10] 程 虹,丁新生,张雪玲,等. 脑脊液中 Tau 蛋白及 A β 检测对老年痴呆早期诊断的意义[J]. *南京医科大学学报:自然科学版*,2004,24(1):69-71
- [11] Giunta S,Galeazzi R,Valli MB,et al. Transferrin neutralization of amyloid beta 25-35 cytotoxicity [J]. *Clin Chim Acta*,2004,350(1-2):129-136
- [12] Wang WX,Huang Q,Hu Y,et al. Patterns of microRNA expression in normal and early Alzheimer's disease human temporal cortex:white matter versus gray matter[J]. *Acta Neuropathol*,2011,121(2):193-205
- [13] Satoh J. Molecular network of microRNA targets in Alzheimer's disease brains [J]. *Exp Neurol*,2012,235(2):436-446
- [14] Patel N,Hoang D,Miller N,et al. MicroRNAs can regulate human APP levels [J]. *Mol Neurodegener*,2008,3(1):10
- [15] Meenhuis A, van Veelen PA, de Looper H, et al. MiR-17/20/93/106 promote hematopoietic cell expansion by targeting sequestosome 1-regulated pathways in mice [J]. *Blood*,2011,118(4):916-925
- [16] Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease[J]. *J Cell Sci*,2007,120(Pt 23):4081-4091
- [17] Yu H,Jove R. The STATs of cancer new molecular targets come age[J]. *Nat Rev Cancer*,2004,4(2):97-105
- [18] Wan J,Fu AK,Ip FC,et al. Tyk2/STAT3 signaling mediates beta-amyloid induced neuronal cell death; implications in Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*,2010,30(20):6873-6881
- [19] Chiba T,Yamada M,Aiso S,et al. Targeting the JAK2/STAT3 axis in Alzheimer's disease[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2009,13(10):1155-1167
- [20] Schwab C,McGeer PL. Inflammatory aspects of Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders [J]. *J Alzheimers Dis*,2008,13(4):359-369
- [收稿日期] 2013-05-17