

MMiR-134在MA诱导神经元损伤中的表达及其对神经 诱发动作电位的影响

李涛¹, 王洪杰¹, 刘桂阳¹, 张博¹, 赵文博², 刘天蔚², 朱凯文², 孙晋浩²

(1. 济南市第四人民医院神经外科, 山东 济南 250031; 2. 山东大学医学部解剖与组胚研究所, 山东 济南 250012)

摘要:【目的】探讨微小非编码RNA分子miR-134在甲基苯丙胺(MA)诱导PC12神经细胞损伤中的表达变化及其对神经兴奋性的影响,为理解MA导致神经损伤的机制提供实验基础。【方法】将处于对数生长期的PC12细胞分为对照组和MA组。MA组应用800 μmol/L MA处理,建立体外神经损伤模型,观察培养神经细胞损伤及细胞凋亡情况;采用实时荧光定量PCR技术测定miR-134的表达水平变化;并构建miR-134干扰载体,抑制miR-134后分析神经诱发动作电位的变化。【结果】MA可明显诱导PC12细胞损伤,神经突起变短,细胞凋亡数目增多;荧光定量PCR结果显示miR-134表达升高;电生理学检测结果显示,干扰miR-134后诱发动作电位增多。【结论】高浓度MA诱导神经细胞损伤、诱发神经元凋亡并升高miR-134表达,沉默miR-134表达,可增加神经兴奋性。本实验为阐明MA的神经损伤机制,以及miR-134在神经毒性损伤及神经兴奋性中的可能作用提供了实验依据。

关键词: miR-134; 甲基苯丙胺; 神经毒性; 动作电位

中图分类号: R741.02

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2017)01-0036-06

Expression of miR-134 in Methamphetamine-induced Neuronal Injury and Its Effect on Evoked Action Potential

LI Tao¹, WANG Hong-jie¹, LIU Gui-yang¹, ZHANG Bo¹, ZHAO Wen-bo², LIU Tian-wei², ZHU Kai-wen²,
SUN Jin-hao²

(1. Department of Neurosurgery of Jinan No.4 People's Hospital, Jinan, 250031, China; 2. Department of Anatomy and Histology & Embryology, Shandong University, Jinan 250012, China)

Corresponding to: SUN Jin-hao, E-mail: sunjinhao@sdu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the expression change of miR-134 in methamphetamine (MA)-induced neuronal injury in PC12 cells and its effect on neuronal excitability and understand the pathogenesis of methamphetamine-induced neuronal injury. 【Methods】 PC12 cells in the logarithmic phase were divided into control group and MA group. The MA group was treated with 800 μmol/L MA to establish the model of neuronal injury. The cellular injury was observed under microscope. The neuronal apoptosis was detected by Hoechst3342/PI double staining, and miR-134 expression was measured by using real-time quantitative PCR (Real time-PCR). Furthermore, we constructed miR-134 interference vector and observed its effect on evoked action potential. 【Results】 The cultured PC12 cells were damaged under the 800 μmol/LMA treatment, and neurites became shorter, the apoptotic cells were evidence. Real time-PCR showed that miR-134 expression was increased after MA treatment. Electrophysiological data showed that the evoked action potential increased after miR-134 interference. 【Conclusions】 High concentration of MA can induce neuronal damage and apoptosis and also increase miR-134 expression. While silence miR-134 expression can increase neuronal excitability.

收稿日期: 2016-09-28

基金项目: 山东省医药卫生科技发展项目(2013WS008); 山东省重点研发计划(2016GSF201054)

作者简介: 李涛, 外科学硕士, 主治医师, 研究方向: 神经系统退行性疾病, E-mail: litao961@163.com; 孙晋浩, 通信作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 神经发育和再生, E-mail: sunjinhao@sdu.edu.cn

Our study provides an experimental basis for elucidating the possible mechanism of MA-induced neuronal injury and the role of miR-134 in neurotoxicity and neuronal excitability.

Key words: miR-134; methamphetamine; neurotoxicity; action potential

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(1):36-41]

甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)是一种常见的具有精神刺激作用的兴奋剂^[1],可直接作用中枢神经系统,引起神经元损伤并影响神经元的兴奋性,MA还具有抑制食欲、拟交感神经作用等药理学效应。已往的研究表明,MA可导致神经元毒性伤害,线粒体功能下降。低剂量的MA可增强神经元的兴奋性,但高剂量的MA及低剂量MA的长期作用均最终导致神经元形态及兴奋性损伤。MA还可针对性损伤黑质内多巴胺能神经元末梢,耗竭纹状体内多巴胺,引起帕金森病的类似症状。但具体MA诱导神经元损伤,及其与神经源性疾病的关系还需要进一步研究。微小非编码RNA(microRNA)是近年来新发现的小片段RNA分子,可从转录后调控机制调节基因的表达。往往一个microRNA分子同时调控数十乃至数百个靶基因,对生物个体生长、发育及相关疾病的进程起着重要的调控作用。我们在前期的实验中发现,miR-133b在甲基苯丙胺致神经毒性中起至关重要的作用,MA可抑制miR-133b的表达,增加细胞外磷酸激酶的活性,从而造成神经毒性损伤^[2]。miR-134同属小分子非编码RNA,在脑内表达最丰富,与神经元发育、神经突触可塑性变化密切相关。但miR-134在MA诱导神经元损伤中的表达变化及其对神经元的兴奋性作用不清。miR-134是否也与MA引起的神经毒性有关目前尚不明确。本实验以PC12细胞作为DA神经元细胞模型,该神经细胞体外生长稳定,可长出突起,并可表达多巴胺转运体。我们以往曾通过6-OHDA毁损PC12细胞,检测了CXCL12及其受体CXCR4的表达变化^[3],分析了其与帕金森病的相关性。为揭示miR-134在MA神经毒性损伤中的作用机制,本研究拟培养高分化PC细胞,给以MA处理,建立体外神经元损伤细胞模型,应用实时荧光定量PCR技术检测miR-134的表达变化,并分析miR-134与神经兴奋性的关系,为揭示MA神经毒性的分子机制提供实

验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

由山东省公安厅提供MA,实验用高分化PC12细胞株购于中国科学院上海细胞库。DMEM培养基(高糖)、胎牛血清(FBS)、0.25% Trypsin-EDTA均购自Gibco公司。cDNA合成试剂盒及real-timePCR试剂盒均购自美国Fermentas公司。GV249表达载体由上海吉凯公司提供。

1.2 方法

1.2.1 PC12细胞培养及分组 根据我们前期的研究^[2],选取800 μmol/L MA损伤PC12细胞作为MA实验组。将处于对数生长期的PC12细胞接种于含10% FBS的高糖DMEM培养基中,于37℃、体积分数为5% CO₂的条件下在培养箱中孵育24 h,然后分为对照组和MA组,MA组中加入800 μmol/L的MA。**1.2.2 PC12细胞突起分析** 以3×10⁴/孔细胞种于6孔板,按照以上分组,使用MA药物处理24 h后,荧光显微镜下观察并拍照,每组随机选取5张图,经IPP图像分析软件分别测量每张图片中所有PC12突起的总长度及神经元的总数目。然后计算PC12神经元的平均突起长度。对获得的数据进行统计学分析。

1.2.3 Hoechst33342/PI双染检测细胞凋亡情况 将对照组和实验组PC12细胞培养24 h后,吸弃原来的培养液,用PBS溶液轻轻漂洗细胞一次,同时加入0.5 mL终浓度为10 μg/mL Hoechst334和PI工作液,然后置于培养箱内孵育15 min。再次经PBS溶液漂洗后,置荧光显微镜下观察并分析。

1.2.4 qRT-PCR法检测miR-134的表达 收集每组细胞,采用Trizol法进一步提取RNA,行Real-time PCR。以U6为内参检测miR-134的表达量,所用引物如下:miR-134上游引物为:5'-ACACTC CAGCTGGGTGTGACTGGTTCCAGAGG-3',U6上游

引物为:5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3',下游引物均为通用引物。逆转录反应程序是42℃ 60 min,70℃ 10 min。PCR反应程序是:预变性(95℃、10 min),变性(95℃、10 s),退火(60℃、20 s),延伸(70℃、20 s),进行40个循环扩增,延伸阶段收集荧光信号。每组实验重复3次,记录每个反应管中的荧光信号到达阈值时所经历的循环数即Ct值,按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各组miR-134的相对表达量。

1.2.5 miR-134的shRNA表达载体的构建 根据GenBank小鼠miR-134全长序列,以CCCCTCTGTCAACCGATCACA为靶序列,设计合成shRNA干扰序列,由T4 DNA连接酶插入至BamHI和HindIII双酶切的GV249表达载体,构建shRNA-miR-134干扰载体。经筛选、扩增后,提取质粒,经测序确认。用质粒抽提试剂盒(天根)提取质粒,根据实验要求,将shRNA-miR-134质粒浓度浓缩为5 μg/μL,备用于细胞转染。

1.2.6 神经元转染及诱发动作电位检测 取新生鼠脑皮层神经元,接种在6孔板内,在含B27的Neurobasal培养基内纯化培养5 d。更换无血清Neurobasal培养基继续培养4 h后,按照转染试剂盒说明,经lipofectamine 2000介导shRNA-miR-134质粒转染6 h,换成含10%血清的DMEM培养基,在37℃、体积分数为5%的CO₂培养箱中培养24~36 h后,在荧光显微镜下检测转染水平(表达质粒含荧光蛋白GFP)。对照组转染空载体。经Axon700B膜片钳系统,在电流钳制模式下,给与-200 pA至200 pA范围,相隔20 pA的步阶电流注射,脉冲时程为500 ms。检测细胞诱发动作电位。数据由pClamp10.2及Igor4.0软件分析。

1.2.7 统计学方法 采用SPSS 19.0统计学软件进行分析,计量资料均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组独立样本均数比较,采用 t 检验, $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。实时定量PCR结果由荧光定量分析仪自动采集给出目的基因和参比基因的Ct值,样本中目的基因相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行计算,其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{目的} - Ct_{参比})_{实验} - (Ct_{目的} - Ct_{参比})_{对照}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 所计算的相对表达量表示实验样本中目的基因的表达量相对对照样本中目的基因表达量的倍数。

2 结果

2.1 PC12细胞形态及突起长度

正常PC12细胞胞体呈表面光滑的梭形、黄绿色、颜色均匀,且有呈橙红色较长的突起(图1A)。给予MA毁损后,胞体变圆偏黄,绝大部分细胞突起缩短甚至消失,细胞突起近侧断端呈球状,并可见细胞脱壁浮离(图1B)。测量对照组及MA组PC12细胞突起长度,采用独立样本 t 检验比较进行数据分析,结果显示,和对照组比较,MA损伤组PC12细胞突起明显变短,差异显著,有统计学意义(图1C)。

2.2 Hoechst33342/PI双染色检测细胞凋亡结果

Hoechst33342/PI双染结果显示,对照组细胞的细胞核大小均一,呈圆形或椭圆形,呈均匀淡蓝色荧光,只出现个别凋亡细胞(图2A);加入MA处理后,部分细胞的细胞核出现碎裂,呈不规则的亮蓝色和红色,凋亡和坏死细胞较对照组明显增多(图2B)。实验结果显示,对照组细胞凋亡率为11%,MA组为25%,统计学分析差异有统计学意义($P < 0.01$,图2C)。

2.3 PC12细胞中miR-134的表达变化

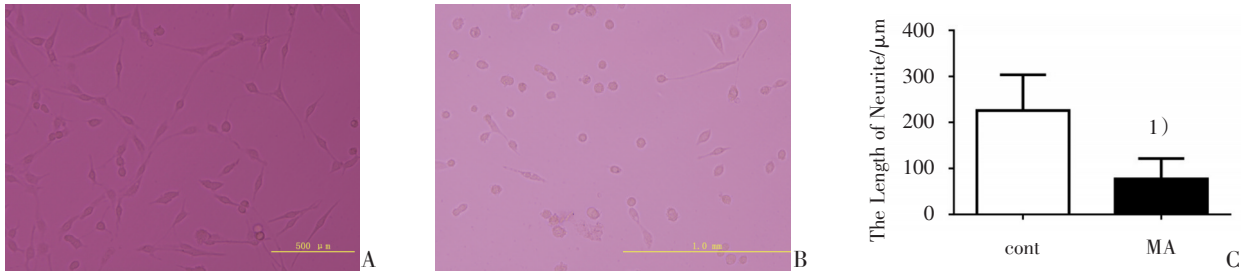
miR-134及U6的Real-time PCR扩增产物的溶解曲线显示均为单峰,表明扩增产物单一,无非特异性扩增;扩增曲线显示miR-134呈指数增长并进入平台期,说明扩增效率高(图3A)。通过检测了两组miR-134的表达量,给予800 μmol/L MA处理后,细胞内的miR-134表达量比对照组明显升高(图3B, $P < 0.05$)。

2.4 神经元转染后动作电位变化情况

为进一步分析miR-134对神经元兴奋性的影响,本实验中培养了脑皮层原代神经元,通过构建shRNA-miR134并进行细胞转染,应用脑片钳系统检测了诱发动作电位情况(图4A,B)。结果显示,shRNA-miR-134转染后,神经元的诱发动作电位较空载体转染对照组明显增多。显示miR-134明显调控神经元的兴奋性(图4C)。

3 讨论

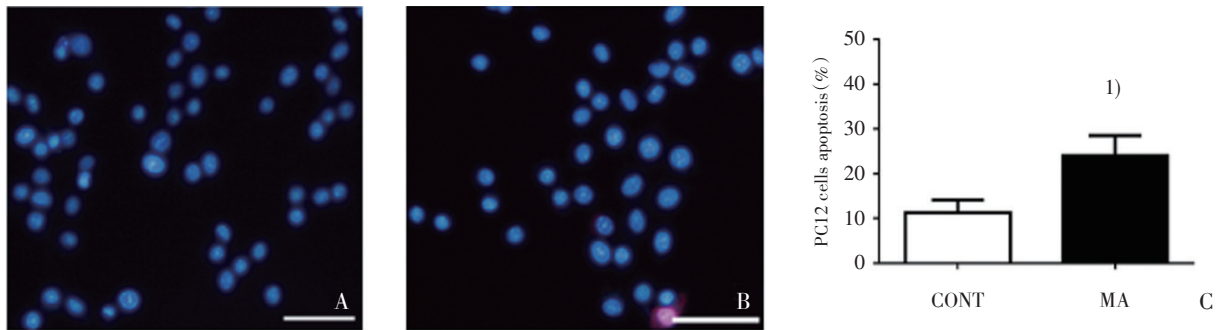
MA长期滥用已经成为目前严重的公共卫生



A: Control groups; B: PC12 cells treated with 800 μmol/L MA; C: Analysis of neurites of PC12 cells treated with MA, 1) $P=0.00029$ vs control groups ($t = 11.982, n = 5$)

图1 MA处理PC12细胞的形态及突起分析

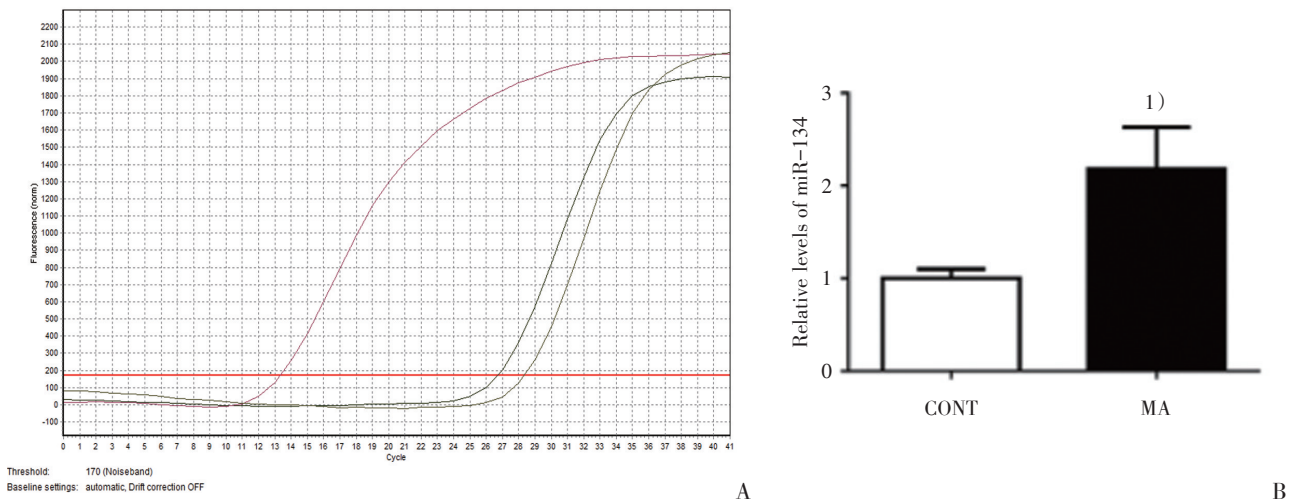
Fig.1 Analysis of morphology and neurites of PC12 cells treated with MA



A: Control groups; B: PC12 cells treated with 800 μmol/L MA; C: Analysis of apoptosis rate, 1) $P = 0.000014$ vs control groups ($t = 6.984, n = 5$)

图2 Hoechst3342/PI双染色细胞凋亡变化

Fig.2 The neuronal apoptosis by Hoechst3342/PI double staining



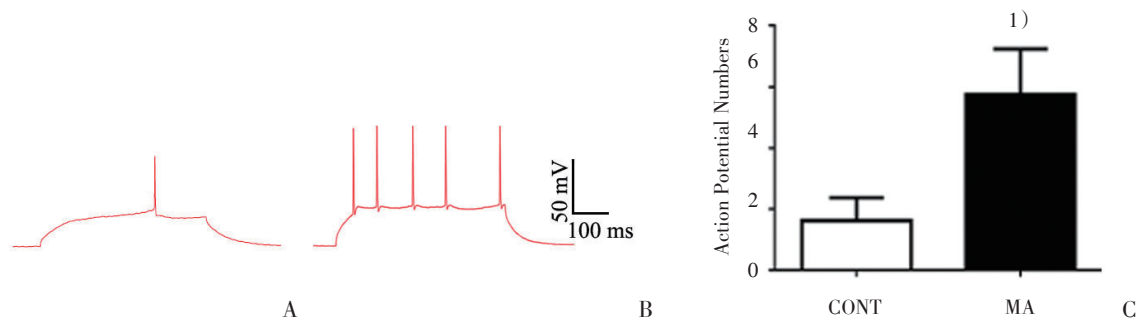
A: Dissolution curve of RT PCR amplified products; B: Analysis of miR-134 relative expression, 1) $P = 0.027$ vs control groups ($t = 4.126, n = 5$)

图3 PC12细胞中miR-134的表达变化

Fig.3 Changes of miR-134 expression in PC12 cells

问题和社会问题。MA和DA的分子结构非常相似,能够通过多巴胺能神经元轴突细胞膜的多巴

胺转运体(DAT)进入胞内,引起突触小泡内所储存的DA和5-羟色胺(5-HT)大量释放进入细胞



A: Control groups; B: MiR-134 interference groups; C: Analysis of the evoked action potential, 1) $P = 0.000037$ vs control groups ($t = 7.013$, $n = 3$)

图4 shRNA-miR-134转染神经元的诱发动作电位变化

Fig.4 Changes of the evoked action potential after miR-134 interference

质内和突触间隙内,从而引发一系列的神经毒性作用^[4]。目前的国内外的研究结果显示,包括氧化应激、兴奋性毒性、神经元凋亡、线粒体功能障碍等^[5-6]多种机制参与了MA的神经毒性损害。探索MA神经毒性的分子机制,有助于理解其神经损伤机制。本实验采用高分化的PC12细胞作为体外神经元模型,探讨了MA的神经元损伤及其可能的分子机制。PC12细胞是来源于大鼠的肾上腺嗜铬细胞瘤,是常用的神经元细胞系,该细胞可分泌DA,也可用于细胞移植实验。细胞性质稳定,便于观察MA的神经元毒性作用。故本实验选用该细胞系。研究发现,给予800 $\mu\text{mol/L}$ MA处理PC12细胞后,细胞数目减少,胞体逐渐变圆变黄,细胞突起变短、断裂甚至消失,神经细胞损伤较重。Hoechst33342/PI双染结果显示,凋亡和坏死细胞较对照组明显增多。

MicroRNA (miRNA) 是广泛存在于真核生物中的一类小分子非编码RNA,长约20个核苷酸,由发卡状的单链RNA前体经Dicer酶加工而成,是目前研究最为广泛和深入的非编码RNA。MiRNA在脑内丰富表达,是神经可塑、神经再生以及神经发育等过程的关键调控分子,也是树突生长的关键调控因素^[7]。miR-134定位于人类染色体14q32.31,在大脑组织中的表达丰度比较高,参与了多种生理和病理过程,已经在体外实验中证明活性依赖的miR-134可以通过对Pum2的调控促进树突的生长^[8]。miR-134通过与脑中高表达的骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein, BMP)拮抗剂Chrdl-1(Chordin-like 1)及有丝分裂

后神经元特异性微管相关蛋白Dcx(doublecortin)相互作用,促进神经元祖细胞增殖,抑制细胞凋亡、分化以及迁移,具有相对独立的阶段性特异调节作用^[9]。迟文英等^[10]研究显示,抑制miR-134的表达可使HSPA12B蛋白表达水平升高,并能减轻氧-糖缺失(OGD)致皮层神经元的缺血损伤,而过表达miR-134则可加重OGD致神经细胞的缺血损伤,其机制可能与miR-134负性调控HSPA12B蛋白的表达水平有关。本实验检测MA毁损的PC12发现,miR-134表达明显升高,达对照组的2倍,与其研究结果相似。

MA是一种被广泛滥用的精神兴奋剂,它对中脑多巴胺神经元的作用是双向的,除抑制作用外,近期研究发现苯丙胺类中的甲基苯丙胺可通过作用于DAT对多巴胺神经元产生兴奋的作用^[11]。我们的前期研究也发现,MA可抑制中脑边缘多巴胺神经元的自发动作电位频率和超极化激活阳离子电流^[12]。为研究miR-134的表达升高是否与MA的神经损伤有关,我们利用膜片钳技术检测了shRNA-miR-134转染原代脑皮层神经元后动作电位的变化。由于miR-134干扰后可用脑片钳技术分析单个神经元的特性,且神经元直接取材于脑组织,不需要均质的PC12细胞。故本实验应用shRNA载体转染皮层神经元。研究显示,shRNA-miR-134转染原代脑皮层神经元后诱发动作电位数增多,较对照组增多,表明抑制miR-134可增加神经元的兴奋性,这与高浓度的MA增加miR-134表达并诱导神经元损伤的结果相一致。

本实验研究首次发现了高浓度MA诱导神经细胞损伤、诱发神经元凋亡并升高miR-134表达,沉默miR-134表达,可增加神经兴奋性。本实验为阐明MA的神经损伤机制,以及miR-134在神经元毒性损伤及神经兴奋性中的可能作用提供了实验依据。但MA的神经毒性机制复杂,涉及大量分子信号通路及神经递质变化,尚需要进一步的研究。

参考文献

- [1] Meconell SE, O'banion MK, Cory-Slechta DA, et al. Characterization of binge-dosed methamphetamine-induced neurotoxicity and neuroinflammation [J]. *Neurotoxicology*, 2015, 15(50): 131-141.
- [2] 刘海莉,李涛,朱德晓,等. MiR-133b在甲基苯丙胺诱导神经元损伤中的表达变化及调控作用 [J/OL]. 中国科技论文在线. [2014-09-23] <http://www.paper.edu.cn>
- [3] 王辉,暴丽华,李涛,等. 6-OHDA损伤神经细胞CXCR4/CXCL12表达变化的实验研究[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2014, 32(6): 680-684.
- [4] Iversen L. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 147(Suppl 1): S82-88.
- [5] Kita T, Wagner GC, Nakashima T. Current research on methamphetamine-induced neurotoxicity: animal models of monoamine disruption [J]. *J Pharmacol Sci*, 2003, 92(3): 178-195.
- [6] 徐静涛,张付,杨幸怡,等. 甲基苯丙胺所致的大鼠神经毒性损伤及nNOS抑制剂的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(8): 1101-1106.
- [7] 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.
- [8] Fiore R, Khudayberdiv S, Christensen M, et al. Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels [J]. *EMBO J*, 2009, 28(6): 697-710.
- [9] Gaughwin P, Ciesla M, Yang H, et al. Stage-specific modulation of cortical neuronal development by Mmu-miR-134 [J]. *Cereb Cortex*, 2011, 21(8): 1857-1869.
- [10] 迟文英,李燕,王桂芝,等. miR-134在氧-糖缺失神经元损伤中的作用 [J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(3): 274-277.
- [11] Branch SY, Beckstead MJ. Methamphetamine produces bidirectional, concentration-dependent effects on dopamine neuron excitability and dopamine-mediated synaptic currents [J]. *J Neurophysiol*, 2012, 108(3): 802-809.
- [12] 岳庆伟,朱晓德,吴金涛,等. 甲基苯丙胺对中脑边缘投射多巴胺神经元自发动作电位频率和Ih电流的影响 [J]. *山东大学学报(医学版)*, 2014, 52(5): 10-14.

(编辑 徐杰)