

赵美英, 史文倩, 汪桂青. 长链非编码 RNA 生长抑制特异因子 5 调控微小 RNA-137 对 A β 诱导大鼠海马神经元损伤的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(9): 64–71.

Zhao MY, Shi WQ, Wang GQ. Effects of microRNA-137, regulated by long non-coding RNA growth arrest-specific 5, on A β -induced hippocampal neuronal damage in rats [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(9): 64–71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2021. 09. 010

长链非编码 RNA 生长抑制特异因子 5 调控微小 RNA-137 对 A β 诱导大鼠海马神经元损伤的影响

赵美英, 史文倩, 汪桂青*

(郑州大学附属郑州中心医院老年科, 郑州 450007)

【摘要】 目的 探究长链非编码 RNA(LncRNA)生长抑制特异因子 5(GAS5)调控微小 RNA(miR)-137 对淀粉样 β 蛋白(A β)诱导的大鼠海马神经元损伤的影响。**方法** 实验分为对照(control)组、A β 组、A β +si-NC 组、A β +si-GAS5 组、A β +si-GAS5+anti-miR-NC组、A β +si-GAS5+anti-miR-137 组, 每组 10 只。Y 迷宫法检测大鼠学习记忆力;实时荧光定量逆转录多聚酶链反应(RT-qPCR)检测海马 CA1 区 GAS5、miR-137 水平;蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测海马 CA1 区 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白(BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase3)蛋白水平;尼氏染色观察神经元形态;Tunel 染色观察大鼠神经元凋亡情况;双荧光素酶鉴定 miR-137 与 GAS5 的靶向关系。**结果** 与对照组相比,A β 组、A β +si-NC 组海马 CA1 区 GAS5 mRNA 水平,BAX、caspase3 蛋白水平,神经元死亡率、凋亡率升高($P<0.05$),正确反应次数比例、学会次数比例,miR-137 水平、Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与 A β 组、A β +si-NC 组相比,A β +si-GAS5 组、A β +si-GAS5+anti-miR-NC组海马 CA1 区 GAS5 mRNA 水平,BAX、caspase3 蛋白水平,神经元死亡率、凋亡率降低($P<0.05$),正确反应次数比例、学会次数比例,miR-137 水平、Bcl2 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 A β +si-GAS5 组、A β +si-GAS5+anti-miR-NC组相比,A β +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CA1 区 GAS5 mRNA 水平,BAX、caspase3 蛋白水平,神经元死亡率、凋亡率升高($P<0.05$),正确反应次数比例、学会次数比例,miR-137 水平、Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$)。经验证,miR-137 与 GAS5 之间存在靶位点。**结论** 干扰 GAS5 可上调 miR-137 从而保护 A β 诱导的大鼠海马神经元损伤,缓解神经元凋亡过程;而进一步下调 miR-137 可逆转上述过程。

【关键词】 长链非编码 RNA 生长抑制特异因子 5;微小 RNA-137;淀粉样 β 蛋白;大鼠;海马神经元损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 09-0064-08

Effects of microRNA-137, regulated by long non-coding RNA growth arrest-specific 5, on A β -induced hippocampal neuronal damage in rats

ZHAO Meiyang, SHI Wenqian, WANG Guiqing*

(Department of Geriatrics, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microRNA (miR)-137, regulated by long non-coding RNA (LncRNA) growth arrest-specific 5 (GAS5), on amyloid- β (A β)-induced hippocampal neuronal damage in rats.

Methods Rats were divided into the control group, A β group, A β +Si-NC group, A β +si-GAS5 group, A β +si-GAS5+

【基金项目】河南省医学科技攻关计划项目(2018020782, 201504078)。

【作者简介】赵美英(1977—)女,硕士,副主任医师,研究方向:认知障碍、脑血管病。E-mail:zmy_work77@163.com

【通信作者】汪桂青(1973—)女,本科,主任医师,研究方向:老年认知障碍、心脑血管病。E-mail:964301668@qq.com

anti-miR-NC group and A β +si-GAS5+anti-miR-137 group ($n = 10$ rats per group). The Y maze was used to detect learning and memory in rats. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the levels of GAS5 and miR-137 in the hippocampal CA1 area. The protein levels of B-lymphoma-2 gene (Bcl2), Bcl2-related X protein (BAX), caspase-3 were detected by Western blot and neuronal morphology was observed using Nissl staining. In addition, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (Tunel) staining was used to observe neuronal apoptosis and the relationship between miR-137 and GAS5 was identified using double luciferase. **Results** Compared with the control group, the levels of GAS5 mRNA, BAX, caspase-3 protein, neuronal mortality, and neuronal apoptosis rate were higher in the A β and A β +Si-NC groups ($P < 0.05$), whereas the proportion of correct response times, the proportion of learning times, the levels of miR-137 and Bcl2 protein were lower ($P < 0.05$). Compared with the A β and A β +Si-NC groups, the levels of GAS5 mRNA, BAX, caspase-3 protein, neuronal mortality and neuronal apoptosis rate were lower in the A β +si-GAS5 and A β +si-GAS5+anti miR-NC groups ($P < 0.05$), whereas the proportion of correct response times, the proportion of learning times, the levels of miR-137 and Bcl2 protein were higher ($P < 0.05$). In addition, compared with the A β +si-GAS5 and A β +si-GAS5+anti-miR-NC groups, the levels of GAS5 mRNA, BAX, caspase-3 protein, neuronal mortality, and neuronal apoptosis rate were higher in the A β +si-GAS5+anti-miR-137 group ($P < 0.05$), whereas the proportion of correct response times, the proportion of learning times, the levels of miR-137 and Bcl2 protein were lower ($P < 0.05$). It was also confirmed that there was a target site between miR-137 and GAS5. **Conclusions** Interference of GAS5 can upregulate miR-137, thus protecting against A β -induced hippocampal neuronal damage and alleviating the process of neuronal apoptosis. In contrast, further downregulation of miR-137 can reverse this process.

【**Keywords**】 long non-coding RNA growth arrest-specific 5; microRNA-137; A β ; rat; hippocampal neuron damage

阿尔兹海默症(alzheimer's disease,AD)日益成为全球性疾病,影响患者个人健康,淀粉样蛋白假说是目前主流的 AD 发病理论,淀粉样 β 蛋白(amyloid- β protein,A β)聚集影响神经元功能,是导致认知功能障碍和痴呆的诱因,且临床上尚无根治药物^[1]。靶向分子治疗成为近年来研究热点,长链非编码 RNA(long non-coding RNA,LncRNA)参与神经元发育、增殖、凋亡、神经可塑性、认知、运动等多种功能^[2];生长抑制特异因子 5(growth arrest-specific 5,GAS5)作为一种 LncRNA,最早在增殖抑制的细胞中被发现,且可促进多种细胞凋亡,在胶质瘤细胞中表达升高可促进胶质瘤细胞的凋亡,但其在 AD 中发挥何种作用,尚未发现研究^[3]。研究报道,GAS5 可以靶向微小 RNA(microRNA,miRNA)影响疾病^[4-5]。miR-137 可抑制细胞外 A β 沉积,从而调控下游靶基因,抑制神经元死亡、缓解凋亡过程,从而缓解 AD^[6]。且研究发现,GAS5 可靶向 miR-137 影响缺血再灌注损伤,但在神经元损伤中尚未发现相关研究^[7]。因此,本研究采用 A β 诱导大鼠构建 AD 模型,探讨 GAS5 调控 miR-137 对大鼠神经元损伤的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

60 只 6 周龄 SPF 级雄性健康 SD 大鼠购自中科

院上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2017-0005],体重(160 ± 10)g。大鼠在温度(24 ± 1)℃、湿度(50 ± 5)%、12 h 昼夜节律。黑暗条件下自由摄食饮水,正常饲养,饲养于郑州大学(药物研究院)[SYXK(豫)2018-0004],1 周后开始实验。本研究经本院伦理协会审核并通过(IACUC-20190106),实验动物符合 3R 原则。

1.1.2 细胞

大鼠海马神经元购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器

A β 购自美国 Sigma 公司;si-NC、si-GAS5、anti-miR-NC、anti-miR-137、GAS5 MUT、GAS5 WT、miR-137 mimic、miR-137 mimic NC 均购自广州锐博生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;一抗 B 淋巴瘤-2 基因(B-cell lymphoma-2,Bcl2)、Bcl2 相关 X 蛋白(Bcl2 associated X protein,BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(cystein-aspartate protease 3,caspase3)均购自英国 abcam 公司,货号 ab194583、ab32503、ab184787。7500 实时荧光定量逆转录多聚酶链反应(Real-time quantitative PCR,RT-qPCR)仪购自美国 ABI 公司;Tanon 4100 全自动凝胶成像分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组及处理

实验分为对照 (control) 组、Aβ 组、Aβ+si-NC 组、Aβ+si-GAS5 组、Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组、Aβ+si-GAS5+anti-miR-137 组, 每组 10 只。对照组和 Aβ 组海马 CAI 区 (具体位置: Bregma 后 3 mm、中线旁开 2.2 mm、深度 2.5 mm) 注射 10 μL PBS 液, Aβ+si-NC 组注射 10 μL si-NC, Aβ+si-GAS5 组注射 10 μL si-GAS5, Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC 组注射 si-GAS5、anti-miR-NC 各 10 μL, Aβ+si-GAS5+anti-miR-137 组注射 si-GAS5、anti-miR-137 各 10 μL, 15 min 后除对照组外将 10 nmol/μL Aβ₃₁₋₃₅ 注入海马 CAI 区^[8], 对照组注射等量生理盐水。14 d 后进行研究。

1.3.2 Y 迷宫实验检测大鼠行为

14 d 实验结束后, Y 型迷宫刺激器检测大鼠学习能力。根据 Martyn 等^[9]方法, 对大鼠重复测试, 大鼠连续 10 次测试中出现 9 次及以上做出正确反应即作为学会标准。实验结束后记录大鼠正确反应次数; 计算正确反应次数比例 (%) = (正确反应次数) / 总实验次数 × 100%, 重复 Y 迷宫实验, 20 次实验中达到正确反应次数作为记忆成绩, 学会次数比例 (%) = (达到正确反应次数的次数) / 总实验次数 × 100%。

1.3.3 样本收集

结束后立即收集海马 CAI 区组织, 部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 部分置于 -80℃ 冰箱保存待检。

1.3.4 RT-qPCR 法检测海马 CAI 区 GAS5、miR-137 水平

部分海马 CAI 区组织 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, cDNA 第一链合成试剂盒将其逆转录成第一链 cDNA。设计上下游引物, 引物序列见表 1。20 μL 反应体系: 2 × SYBR qPCR Mix 10 μL, cDNA (50 ng/μL) 1 μL, F/R (10 μmol/L) 0.5 μL/0.5 μL, ddH₂O 8 μL; 反应条件: 94℃、60 s; 95℃、30 s (GAS5: 61℃、40 s, miR-137: 59℃、35 s), 40 个循环。2^{-ΔΔCt}法计算 GAS5、miR-137 相对表达水平。

1.3.5 尼氏染色观察神经元形态

4% 多聚甲醛中固定的海马 CAI 区组织经石蜡包埋后切片, 切片厚度 6 μm, 石蜡切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇浸润, 切片进入 A 液 (Cresyl violet Stain) 56℃ 染色 60 min, PBS 漂洗, 置于 B 液 (Nissl Differentiation) 分色数秒至 2 min 直至背景色接近无

色, 显微镜下观察神经元形态、尼氏小体情况。

1.3.6 TUNEL 染色观察大鼠神经元凋亡的影响

切片脱蜡处理, 加 2% 蛋白酶 K 室温孵育 20 min, PBS 清洗后滴加 50 μL TUNEL 反应混合溶液, 湿盒孵育 60 min, 抗荧光猝灭液 (含 DAPI) 封片后荧光显微镜下观察, 其中绿色荧光显示凋亡阳性细胞。

1.3.7 Western blot 实验检测海马 CAI 区 Bcl2、BAX、caspase3 蛋白水平

-80℃ 取部分海马 CAI 区组织, 蛋白裂解液冰上裂解, 4℃ 10000 r/min 离心 20 min, 上清为总蛋白。凝胶电泳分离蛋白、NC 转膜; 5% 脱脂奶粉室温封闭; 对应加入一抗 Bcl2、BAX、caspase3、GAPDH, 4℃ 孵育过夜; 加入对应二抗, 室温孵育 1 h; DAB 显色试剂盒避光显色, 全自动凝胶成像分析系统拍照和定量分析。

1.3.8 双荧光素酶鉴定 miR-137 与 GAS5 的靶向位点

Starbase 分析发现 miR-137 与 GAS5 存在互补的结合位点; 将 miR-137 与 GAS5 结合位点及突变位点的序列克隆重组至 pGL3-basic 荧光素酶报告载体上构建 GAS5 野生型 (GAS5 WT) 及突变型 (GAS5 MUT) 荧光素酶报告载体, 分别与 miR-137 mimic 或 miR-137 mimic NC 共转染海马神经元中, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒检测各组荧光素酶相对活性。

1.4 统计学方法

采用统计学软件 GraphPad Prism 8 进行数据分

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence
GAS5	上游引物 Forward primer GGATAACAGAGCGAGCGAGCGCAAT
	下游引物 Reverse primer CCAGCCAAATGAACAAGCATG
GAPDH	上游引物 Forward primer GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	下游引物 Reverse primer GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
miR-137	上游引物 Forward primer GCGCGCTTATTGCTTAAGAATAC
	下游引物 Reverse primer GTGCAGGCTCCGAGGT
U6	上游引物 Forward primer GCTTCGGCAGCACATATACTAA
	下游引物 Reverse primer AACGCTTCACGAATTTGCCT

析,计量数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步采用 *SNK-q* 法进行两两比较。 $P<0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Y 迷宫检测大鼠行为

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组、 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组大鼠正确反应次数比例、学会次数比例降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组大鼠正确反应次数比例、学会次数比例升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组大鼠正确反应次数比例、学会次数比例降低($P<0.05$)。见图 1。

2.2 RT-qPCR 检测海马 CAI 区 GAS5、miR-137 水平

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平升高($P<0.05$)、miR-137 水平降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平降低($P<0.05$)、miR-137 水平升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平升高($P<0.05$)、miR-137 水平降低($P<0.05$)。见图 2A、B。

2.3 尼氏染色观察海马 CAI 区神经元形态

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区神经元死亡率升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区神经元死亡率降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CAI 区神经元死亡率升高($P<0.05$)。见图 3A、B。

2.4 TUNEL 染色观察海马 CAI 区神经元凋亡情况

与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区神经元凋亡率升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区神经元凋亡率降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海

马 CAI 区神经元凋亡率升高($P<0.05$)。见图 4A、B。

2.5 Western blot 实验检测海马 CAI 区 Bcl2、BAX、caspase3 蛋白表达情况

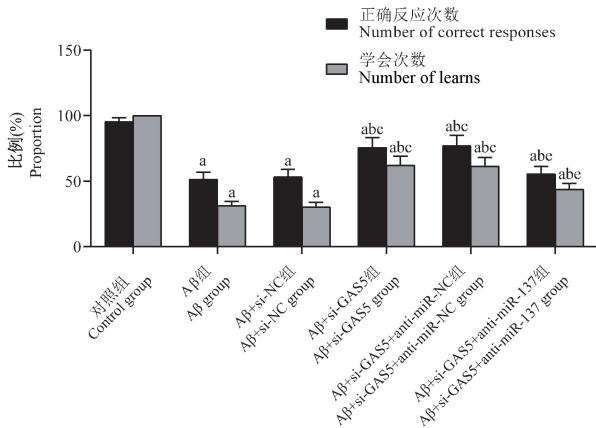
与对照组相比, $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$), BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 $A\beta$ 组、 $A\beta$ +si-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平升高($P<0.05$), BAX、caspase3 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与 $A\beta$ +si-GAS5 组、 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比, $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平降低($P<0.05$)、BAX、caspase3 蛋白水平升高($P<0.05$)。见图 5A、B。

2.6 miR-137 与 GAS5 的靶向关系

miR-137 与 GAS5 之间存在靶位点。见图 6A。与 miR-137 NC+GAS5 WT 相比, miR-137 mimic+GAS5 WT 荧光素酶相对活性下降($P<0.05$);与 miR-137 NC+GAS5 MUT 相比 miR-137 mimic+GAS5 MUT 荧光素酶相对活性差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 6B。

3 讨论

AD 中 $A\beta$ 沉积是作用机制之一, $A\beta$ 沉积造成神经元损伤,可加速神经细胞凋亡,导致神经元损伤

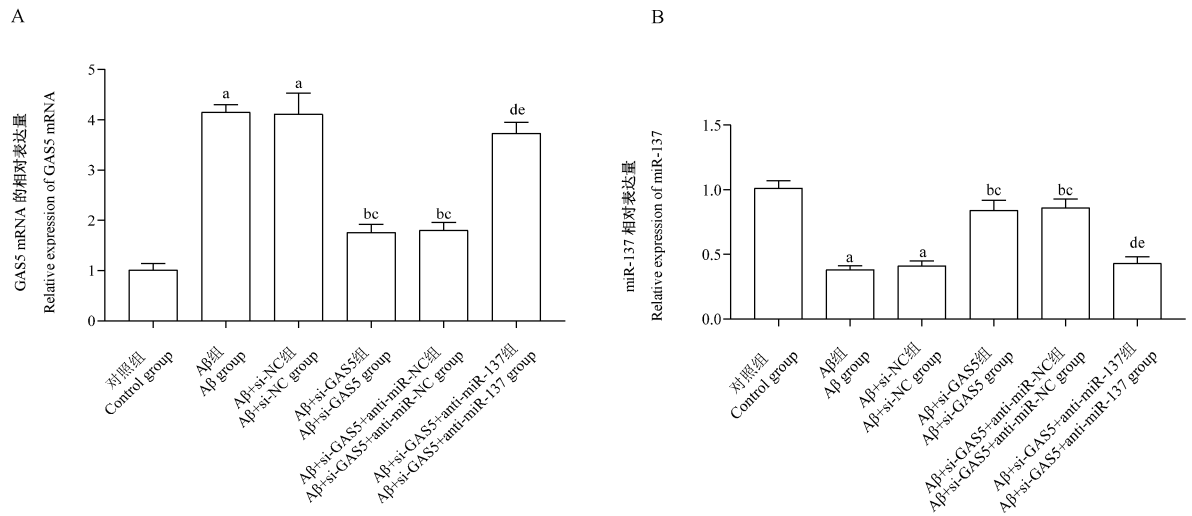


注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与 $A\beta$ 组相比,^b $P<0.05$;与 $A\beta$ +si-NC 组相比,^c $P<0.05$;与 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC 组相比,^{abc} $P<0.05$;与 $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 组相比,^{abe} $P<0.05$ 。

图 1 Y 迷宫检测大鼠行为

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with $A\beta$ group, ^b $P<0.05$. Compared with $A\beta$ +si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-NC group, ^{abc} $P<0.05$. Compared with $A\beta$ +si-GAS5+anti-miR-137 group, ^{abe} $P<0.05$.

Figure 1 Y maze to detect rat behavior

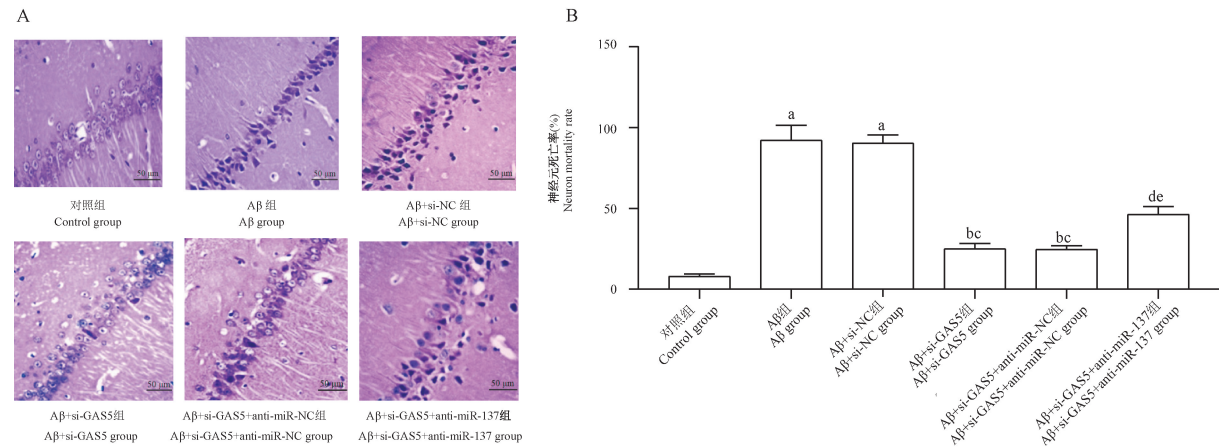


注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与Aβ组相比,^b $P<0.05$;与Aβ+si-NC组相比,^c $P<0.05$;与Aβ+si-GAS5组相比,^d $P<0.05$;与Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC组相比,^e $P<0.05$ 。

图2 RT-qPCR检测海马CA1区GAS5、miR-137表达水平

Note. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with Aβ group, ^b $P<0.05$. Compared with Aβ+si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 2 Expression of GAS5 and miR-137 in hippocampal CA1 area by RT-qPCR



注:A:尼氏染色观察海马CA1区神经元情况;B:神经元死亡情况。与对照组相比,^a $P<0.05$;与Aβ组相比,^b $P<0.05$;与Aβ+si-NC组相比,^c $P<0.05$;与Aβ+si-GAS5组相比,^d $P<0.05$;与Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC组相比,^e $P<0.05$ 。

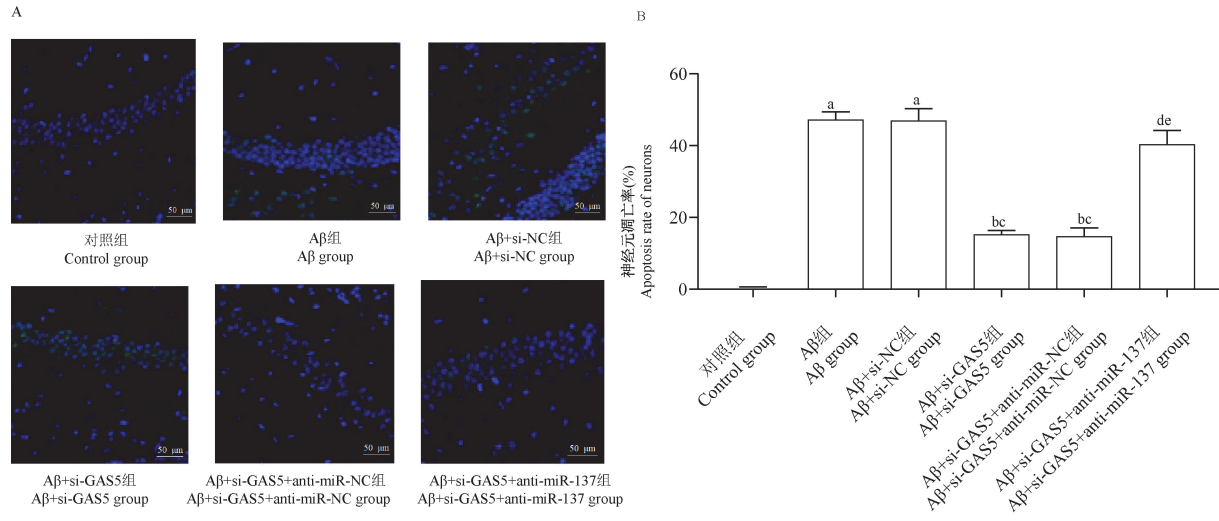
图3 海马CA1区神经元情况

Note. A, Nissl staining was used to observe the neurons in hippocampus CA1 area. B, Neuronal death was observed. Compared with the control group, ^a $P<0.05$. Compared with Aβ group, ^b $P<0.05$. Compared with Aβ+si-NC group, ^c $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d $P<0.05$. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e $P<0.05$.

Figure 3 Neurons in the hippocampal CA1 area

严重,对动物行为和认知功能产生影响^[10]。神经元病变与细胞凋亡关系异常密切,在AD发生发展过程中,Aβ的诱导可导致神经凋亡,因此,抗神经元凋亡已经成为AD研究的重要方向^[11-12]。在公认的内源性凋亡通路中,Aβ可诱导抗凋亡蛋白Bcl2

蛋白水平降低,促凋亡蛋白BAX、caspase3蛋白水平升高,从而激活内源性凋亡途径^[13]。而在本研究中大鼠正确反应次数比例、学会次数比例降低,相比正常大鼠,Aβ大鼠学习和记忆功能出现明显抑制,存在认知障碍。尼氏染色检测海马CA1区神经元

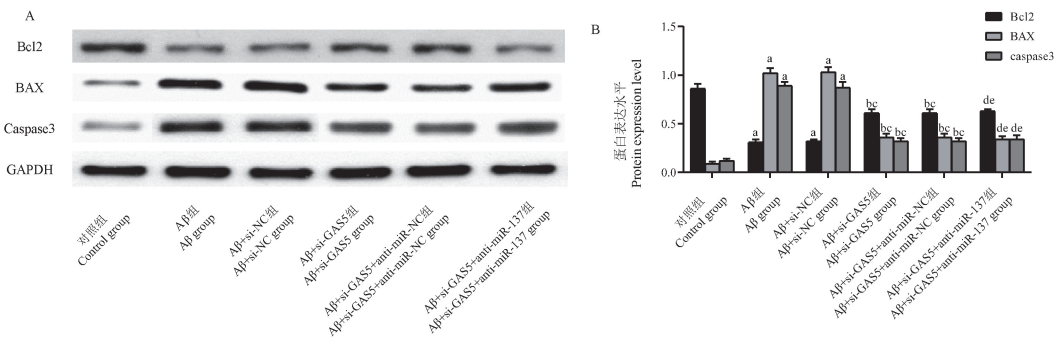


注:A;Tunel 染色观察海马 CA1 区神经元凋亡情况;B:神经元凋亡情况。与对照组相比,^a*P*<0.05;与 Aβ 组相比,^b*P*<0.05;与 Aβ+si-NC 组相比,^c*P*<0.05;与 Aβ+si-GAS5 组相比,^d*P*<0.05;与 Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC组相比,^e*P*<0.05。

图 4 海马 CA1 区神经元凋亡情况

Note. A, TUNEL staining was used to observe the neuronal apoptosis in hippocampus CA1 area. B, Neuronal apoptosis. Compared with the control group, ^a*P*<0.05. Compared with Aβ group, ^b*P*<0.05. Compared with Aβ+si-NC group, ^c*P*<0.05. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d*P*<0.05. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e*P*<0.05.

Figure 4 Apoptosis of hippocampal CA1 Neurons

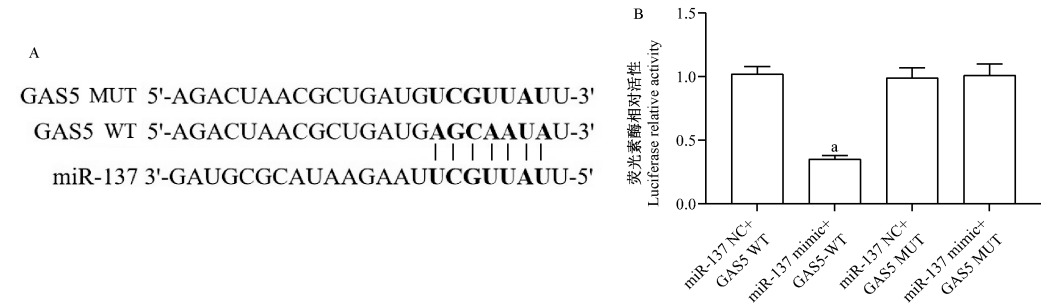


注:与 Aβ 组相比,^b*P*<0.05;与 Aβ+si-NC 组相比,^c*P*<0.05;与 Aβ+si-GAS5 组相比,^d*P*<0.05;与 Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC组相比,^e*P*<0.05。

图 5 Western blot 检测海马 CA1 区 Bcl2、BAX、caspase3 蛋白表达水平

Note. Compared with the control group, ^a*P*<0.05. Compared with Aβ group, ^b*P*<0.05. Compared with Aβ+si-NC group, ^c*P*<0.05. Compared with Aβ+si-GAS5 group, ^d*P*<0.05. Compared with Aβ+si-GAS5+anti-miR-NC group, ^e*P*<0.05.

Figure 5 Expression of Bcl2, BAX, caspase3 protein in hippocampal CA1 area by Western blot



注:A;miR-137 与 GAS5 的结合位点;B:荧光素酶相对活性。与 miR-137 NC+GAS5 WT 组相比,^a*P*<0.05。

图 6 miR-137 与 GAS5 的靶向关系

Note. A, Binding site of miR-137 with GAS5. B, Relative activity of luciferase. Compared with miR-137 NC+GAS5 WT group, ^a*P*<0.05.

Figure 6 Targeting relationship between miR-137 and GAS5

形态时发现, A β 导致神经元死亡严重; Tunel 染色发现, A β 导致神经元凋亡严重, 蛋白检测发现海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平降低, BAX、caspase3 蛋白水平升高, 提示在大鼠脑组织中注射 A β 导致 A β 沉积, 从而促进神经元凋亡、死亡, 影响认知功能。

LncRNA 广泛存在于神经系统中, 在神经元损伤中可观察到 LncRNA 显著变化, 并参与转录、翻译过程从而调控基因组印迹、染色体修饰、mRNA 的翻译等过程, 从而影响神经损伤及修复过程^[14]。GAS5 在缺血性脑卒中中呈高表达, 具有神经毒性作用, 下调 GAS5 可以减轻神经元损伤, 从而实现对脑缺血性卒中的保护作用^[15]; 敲除 GAS5 可以抑制创伤性脑损伤导致的 Bax 升高从而发挥对神经元的保护, 因此有望成为治疗神经元损伤的治疗靶点^[16]。在本研究中, 发现添加 A β 后导致海马 CAI 区 GAS5 mRNA 水平平均升高, 提示海马 CAI 区 GAS5 转录和翻译受 A β 沉积的影响均处于激活状态, 而高表达的 GAS5 具有神经毒性作用, 加重神经元损伤。与 A β 组相比, A β +si-GAS5 组正确反应次数比例、学会次数比例升高, 神经元死亡、神经元凋亡率均降低, 海马 CAI 区 Bcl2 蛋白水平升高, Bax、caspase3 蛋白水平降低, 提示干扰 GAS5 后可通过抑制神经元凋亡减少神经死亡, 实现对神经元损伤的保护, 学习和记忆功能有所缓解。

miRNA 作为非编码小 RNA, LncRNA 上存在 miRNA 结合位点, miRNA 又可沉默靶基因, 从而影响生物学功能^[17-18]。脑神经元中富含 miR-137, 特别是在皮层区和海马区, A β 经过淀粉样前体蛋白分解成蛋白质, 而 miR-137 可调控该类蛋白质从而降低 A β 水平, 且 miR-137 与 A β 在脑神经元中呈负相关关系^[19]。在 A β 积累和神经炎症导致的 AD 中 miR-137 水平降低, 可能是诱导蛋白 1 的水平从而诱导细胞毒性、凋亡, 促进 caspase3 活化^[20]。本研究发现, 添加 A β 可降低 miR-137 水平, 而 miR-137 水平降低对 A β 的降解作用减弱, 导致 A β 在神经元处积累, 诱发神经元损伤。而 GAS5 与 miR-137 关系密切, 且 GAS5 下调可明显增加 miR-137 表达^[21], 干扰 GAS5 后 miR-137 水平升高, 而升高后的 miR-137 实现对神经元的保护作用加强, 减缓神经元凋亡降低。添加 anti-miR-137 后可逆转干扰 GAS5 对神经元的保护作用。

综上所述, 干扰 GAS5 后可上调 miR-137 表达来降低 A β 诱导的神经元损伤, 实现对神经元的保护作用, 下调 miR-137 可逆转上述过程。本研究首

次验证了 GAS5 在 A β 诱导的神经元损伤中起促进作用, 且进一步发现高表达 GAS5 可下调 miR-137 促进神经元凋亡进而引发神经元损伤, 但 miR-137 靶基因较多, 通过哪些具体信号通路发挥作用尚需进一步验证。

参考文献:

- [1] Maia MA, Sousa E. Bace-1 and γ -secretase as therapeutic targets for alzheimer's disease [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2019, 12(1):41-79.
- [2] 张真, 包金凤. 长链非编码 RNA 在神经系统中的研究进展 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(1):104-108.
- [3] Li G, Cai Y, Wang C, et al. LncRNA GAS5 regulates the proliferation, migration, invasion and apoptosis of brain glioma cells through targeting GSTM3 expression. the effect of LncRNA GAS5 on glioma cells [J]. J Neurooncol, 2019, 143(3):525-536.
- [4] Dong Z, Li S, Wang X, et al. LncRNA GAS5 restrains CCl4-induced hepatic fibrosis by targeting miR-23a through the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2019, 316(4): G539-G550.
- [5] Toraih EA, Alghamdi SA, El-Wazir A, et al. Dual biomarkers long non-coding RNA GAS5 and microRNA-34a co-expression signature in common solid tumors [J]. PLoS One, 2018, 13(10): e0198231-e0198252.
- [6] 姜扬, 徐冰, 隋轶, 等. miR-137 参与阿尔茨海默病分子机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(36): 100-102.
- [7] Liu Z, Hou L, Liu Y, et al. LncRNA GAS5 exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury through regulating serpin3 by targeting miR-137 [J]. Int J Cardiol, 2020, 306(1): 9-21.
- [8] 赵芳, 王昭君, 张升校, 等. 脑神经肽类似物 Rattin 对 β -淀粉样蛋白所致大鼠海马神经元损伤的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(4): 357-364.
- [9] Martyn AC, De Jaeger X, Magalhães AC, et al. Elimination of the vesicular acetylcholine transporter in the forebrain causes hyperactivity and deficits in spatial memory and long-term potentiation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(43): 17651-17656.
- [10] 杨依, 唐晓丽, 刘悦, 等. 细胞自噬在 A β ₂₅₋₃₅ 损伤 SH-SY5Y 细胞中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(11): 2028-2034.
- [11] 姚兵, 侯斌, 李文燕, 等. 四氢紫堇萨明对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导 AD 细胞模型凋亡的影响及其机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(1): 49-54, 43.
- [12] Anthony Jalin AMA, Jin R, Wang M, et al. EPPS treatment attenuates traumatic brain injury in mice by reducing A β burden and ameliorating neuronal autophagic flux [J]. Exp Neurol, 2019, 314(4): 20-33.
- [13] Karimi-Sales R, Ashiri M, Hafizi M, et al. Neuroprotective effect of new nanochelating-based nano complex, ALZc3, against A β ₍₁₋₄₂₎-induced toxicity in rat: a comparison with memantine

[J]. Pharm Res, 2020, 37(3): 48-61.

[14] 罗选翔, 冯虎, 经历, 等. 非编码 RNA 在周围神经损伤修复中的重要角色和作用 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(14): 2271-2276.

[15] Deng Y, Chen D, Gao F, et al. Silencing of long non-coding RNA GAS5 suppresses neuron cell apoptosis and nerve injury in ischemic stroke through inhibiting dnmt3b-dependent map4k4 methylation [J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(5): 950-966.

[16] 陈旭, 张永安, 余斌, 等. 敲减 lncRNA GAS5 减轻小鼠脑外伤继发性脑水肿及神经元损伤 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(4): 331-338.

[17] Bouba I, Kang Q, Luan YS, et al. Predicting miRNA-lncRNA interactions and recognizing their regulatory roles in stress response of plants [J]. Math Biosci, 2019, 312(6): 67-76.

[18] Bai H, Guo J, Chang C, et al. Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA during proliferative phase of rat liver regeneration [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(10): 18897-18905.

[19] Jiang Y, Xu B, Chen J, et al. Micro-RNA-137 inhibits tau hyperphosphorylation in alzheimer's disease and targets the CACNA1C gene in transgenic mice and human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. Med Sci Monit, 2018, 24(1): 5635-5644.

[20] He D, Tan J, Zhang J. miR-137 attenuates Aβ-induced neurotoxicity through inactivation of NF-κB pathway by targeting TNFAIP1 in Neuro2a cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(3): 941-947.

[21] 孙越晨, 许岚, 谈鹰. 长链非编码 RNA GAS5 通过调节 miR-137/IGFBP-5 促进 PDGF-BB 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移 [J]. 免疫学杂志, 2018, 34(10): 856-862.

[收稿日期] 2020-10-26

勘误声明

本刊对下述论文进行勘误:

出版信息	2021 年 31 卷 7 期,页码为 106-111
论文标题	使用一次性硬膜外麻醉导管进行无创小鼠气管插管的方法建立
稿次	☐ 录用定稿 ☐ 排版定稿 ☐ 整期定稿 ☒ 印刷版 ☐ 其它
作者	赵聪慧,王妍,周禹,袁晓红
DOI	10. 3969 /j.issn.1671-7856. 2021. 07. 016
勘误内容	英文作者单位处 原为:(1. Department of Pathology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. 2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 2. Institute of Liver Diseases and Organ Transplantation, Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050) 更改为:(1. Department of Pathology, Beijing Stomatological Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China. 2. First Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 3. Institute of Liver Diseases and Organ Transplantation, Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001. 4. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050)
其他说明	