

miR-9 通过调控 β -tubulin III、GFAP 对神经干细胞增殖的影响

王煜,赵岚,阚伯红,史慧妍

摘要 目的 探究 miR-9 是否通过调控 β -微管蛋白-III (β -tubulin III)、胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 影响神经干细胞 (NSCs) 的增殖。方法 对健康孕鼠进行 NSCs 分离培养并将分离出的细胞均分为 NO 组 (无转染 NSCs 细胞株)、NN 组 (NSCs 转染 miR-9-NC)、NM 组 (NSCs 转染 miR-9 mimics)、NI 组 (转染 miR-9 inhibitor)。通过免疫荧光鉴定巢蛋白 (Nestin), qRT-PCR 法检测 miR-9、 β -tubulin III、GFAP 含量, MTT 法检测 NSCs 增殖情况, 流式细胞术检测 NSCs 凋亡情况, Western blot 检测 miR-9、 β -tubulin III、GFAP 蛋白表达。结果 Nestin 在 90% 的 NSCs 中呈现阳性, 且与细胞核共定位, 提示 NSCs 分离成功。NM 组 NSCs 中 miR-9 mRNA 表达量在四组中最高, 说明转染成功。四组中 NM 组 β -tubulin III mRNA、蛋白表达量最高, GFAP mRNA 和蛋白表达量最低, NI 组与之相反 ($P < 0.05$)。24 h 后四组中 NM 组 NSCs 活性最强且呈现随时间延长而逐渐增强的趋势 ($P < 0.05$), NI 组的细胞活性较其他三组减弱 ($P < 0.05$)。四组中 NM 组细胞凋亡率少于其他三组 ($P < 0.05$), NI 组的细胞凋亡率较其他三组升高 ($P < 0.05$), NO 组与 NN 组细胞上述指标差异无统计学意义。结论 过表达 miR-9 通过促进 β -tubulin III 表达、抑制 GFAP 表达, 从而促进 NSCs 增殖。

关键词 神经干细胞; 神经退化性疾病; 胶质细胞; 分化

中图分类号 R 338

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0010-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.003

神经干细胞 (neural stem cells, NSCs) 是哺乳动物神经组织中的一种能够通过自身的分裂、更新、持续增殖以及多向分化的特性产生充足的脑组织细胞的细胞群体^[1]。该细胞的发现和分离实验的成功给帕金森病、脑卒中和多发性硬化等神经退化性疾病的治愈提供了希望^[2]。有报道^[3]显示 miR-9 的表达上调与 NSCs 向神经元分化有关。 β -微管蛋白-III (β -tubulin-III) 是细胞骨架家族神经细胞的特异性蛋白, 在现阶段的研究中被证实是神经元早期发

育的标志^[4]。胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是一种存在于星形胶质细胞内的中间丝蛋白, 其表达升高往往预示着星形胶质细胞的活化^[5]。目前关于三者在 NSCs 定向分化为神经元的过程中的相关性研究较少。该研究重点探讨 miR-9 是否通过调控 β -tubulin III、GFAP 影响 NSCs 增殖。

1 材料与方法

1.1 实验分组 32 只约 240 g 的健康 SPF 级 SD 孕鼠购自上海灵畅生物科技有限公司, 许可证号: SCXX (沪)2018-0003, 孕鼠进行 NSCs 分离, 将分离出的 NSCs 随机分为 4 组: NO 组常规培养; NN 组转染 miR-9 无意义序列; NM 组转染 miR-9 模拟物; NI 组转染 miR-9 抑制剂。

1.2 实验仪器与试剂 GFAP 抗体 (上海士峰生物科技有限公司, 货号: sc-33673); β -tubulin III 抗体 (北京百奥莱博科技有限公司, 货号: A0303); 电泳仪 (型号: EPS-300)、PCR 仪 (型号: DP1000) (上海启步生物科技有限公司); miR-9 mimics、miR-9-NC、miR-9 inhibitor (上海启因生物科技有限公司, 货号: 219600); MTT 试剂盒 (上海臻科生物公司, 货号: 4890-50-K); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 货号: Millipore IPVH 00010); 流式细胞仪 (东莞南寻进出口公司, 型号: SP6800); 恒温摇床 (河南信诺仪器设备公司, 型号: TS-100C)。

1.3 大鼠 NSCs 的分离、培养 麻醉大鼠 (2% 戊巴比妥钠), 取出胎鼠, 分离并剪碎脑室管膜、脑室下区、海马组织。加 0.25% 胰蛋白酶消化 20 min, 过滤, 用含胎牛血清的培养液终止消化, 将浓度为 5×10^8 /L 的细胞接种至 6 孔板, 进行胰蛋白酶消化, 1 600 r/min 离心 5 min, 收集、重悬并培养细胞。

1.4 细胞转染 将数量为 1×10^4 个的 NSCs 细胞株接种到 96 孔中, 15 h 后, 待细胞重复融合, 在 EP 管中加入 200 μ l 转染液体和 4 μ l 脂质体, 后加入 5 μ g 的 miR-145 mimics、miR-9 inhibitor、miR-145-NC, 充分混合后, 转染 9 h 后, 继续培养 4 h 采用 qRT-PCR 法检测是否转染成功。

2021-10-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81704148); 天津市教委科研计划项目 (自然科学) (编号: 2017KJ149)

作者单位: 天津中医药大学第一附属医院针灸科, 天津 300193

作者简介: 王煜, 女, 博士, 副主任医师, 责任作者, E-mail: cuohg3@163.com

1.5 细胞免疫荧光鉴定 细胞数量、接种、培养同 1.4 项。2 d 后使用多聚甲醛(40 g/L)固定,25 ℃ 固定 10 min,PBS 洗涤,5 min/次,共 3 次;0.5% Triton X-100 打孔 5 min,PBS 洗涤同上;1% BSA 25 ℃ 孵育 0.5 h 后,加 Anti-Nestin 抗体(1:200)4 ℃ 孵育过夜,PBS 洗涤同上;加 Anti-Rabbit 荧光二抗(1:100)25 ℃ 避光孵育 1 h,PBS 洗涤同上;DAPI 避光染色 10 min,PBS 洗涤同上,封固,荧光显微镜观察。

1.6 RT-PCR 检测 miR-9、 β -tubulin III、GFAP 含量 把保存在 -80 ℃ 环境中的 NSCs 细胞取出进行研磨,用 TRIzol 进行总 RNA 的提取,逆转录参照说明书执行;将逆转后所得的 cDNA 进行荧光反应实验。所有反应严格按照反应条件进行扩增,内参采用 GAPDH,95 ℃ 变性 3 min,95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 1 min,共 40 个循环。取平均值计算 Ct 值,计算方法用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')
GAPDH	F:ATCCATGG CACCGTCAAGGCTGA
	R:TTCTCCATGGTGGTGAAGACGCCA
β -tubulin III	F:AGCAAGGTGCGTGAGGAGTA
	R:AAGCCGGGCATGAAGA AGT
GFAP	F:ACATCGAGATCGCCACCTAC
	R:ACATCACATCCTTGTGCTCC
miR-9	F:TGCGCTCTTTGGTTATCTAGCTG
	R:CCAGTGCAGGGTCCGAGGTATT

1.7 MTT 细胞活力检测 细胞数量、接种培养同 1.4。置于 5% CO₂、37 ℃ 培养 12 h 后,在 0、24、48、72 h 时,更换培养基,孵育 4 h,吸弃培养液,每孔加入 150 μ l DMSO,振荡孵育 10 min。酶联免疫检测

仪 492 nm 测定吸光度(optical density, OD)值,每组实验至少重复 3 次并收集数据。

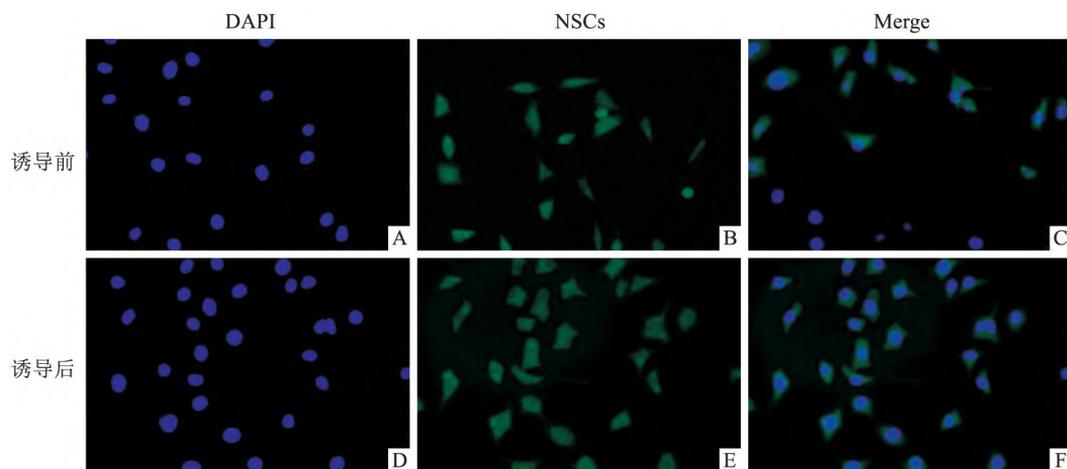
1.8 流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞数量、接种培养同 1.4。0.01 mol/L PBS 洗涤,2 500 r/min 离心 5 min,室温避光静置 15 min,收集细胞,保存,PBS 洗涤 3 次,100 μ l 接种于 5 ml 流式试管中,加入 AnnexinV-FITC 5 μ l,碘化丙啶染色液 10 μ l 充分混合,4 ℃ 避光孵育 0.5 h,流式细胞仪检测 NSCs 凋亡情况。

1.9 Western blot 检测 β -tubulin III、GFAP 蛋白表达 将 NSCs 细胞进行裂解并提取核蛋白,并对核蛋白的浓度进行测量,分装后,-20 ℃ 保存。将提取出的蛋白溶液和缓冲溶液混匀,按照 4:1 的比例,为了让蛋白质变性需将蛋白溶液全部煮沸变性处置。将电泳后 50 μ m 的蛋白样品置于 PVDF 膜上,加脱脂奶粉加封。1 h 后加一抗 β -tubulin III(1:500)、GFAP(1:500),然后 PBS 漂洗 3 次,间隔 10 min。最后加入封闭液稀释辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:2 000),25 ℃ 封闭 1 h。取出 PVDF 膜漂洗(同上),DAB 显色后照相。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件对数据进行分析,四组 NSCs 生物活性及 β -tubulin III、GFAP 蛋白、mRNA 等比较采用单因素方差分析,组间两两比较行 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 NSCs 特征性标志蛋白 Nestin 鉴定 免疫荧光染色结果显示细胞传代后 24 h NSCs 检测指标 Nestin 在 90% 的细胞中呈现阳性,且与细胞核共定位,提示 NSCs 分离成功。见图 1。

图 1 细胞株复苏传代后 Nestin 染色 $\times 400$

A~C:诱导前细胞的荧光染色;D~F:诱导 1 d 时细胞的荧光染色;蓝色:DAPI 对照;绿色:NSCs;蓝色与绿色重叠越多表明阳性率越高

2.2 各组 miR-9、β-tubulin III、GFAP 的基因表达

NM 组 NSCs 中 miR-9 mRNA 表达量最高,与 NN 组、NO 组、NI 组相比,差异有统计学意义 ($F = 165.807, P < 0.01$),说明转染成功。四组中 NM 组 β-tubulin III mRNA 表达量最高,GFAP mRNA 表达量最低,NI 组则相反 ($F_{\beta\text{-tubulin III}} = 113.627, F_{\text{GFAP}} = 174.025, P < 0.01$);NN 组与 NO 组对比上述三个指标数据差异无统计学意义。见图 2。

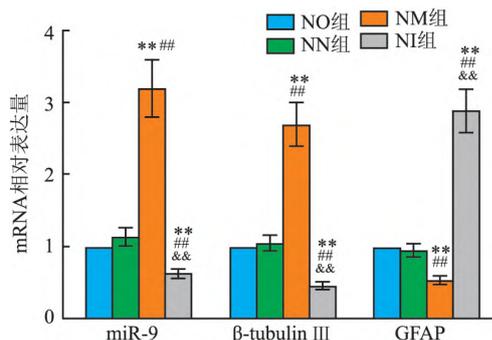


图2 4组 NSCs 细胞中 miR-9、β-tubulin III、GFAP 表达量

与 NO 组比较: ** $P < 0.01$; 与 NN 组比较: ## $P < 0.01$; 与 NM 组比较: && $P < 0.01$

2.3 各组 β-tubulin III、GFAP 蛋白含量

与 NO 组、NN 组、NI 组相比,NM 组 β-tubulin III 蛋白含量最高,GFAP 蛋白含量最低 ($F_{\beta\text{-tubulin III}} = 108.253, F_{\text{GFAP}} = 167.406, P < 0.01$)。四组中 NI 组 β-tubulin III 蛋白表达量降低,GFAP 蛋白表达升高;NO 组 β-tubulin III、GFAP 蛋白含量与 NN 组对比差异无统计学意义。见图 3。

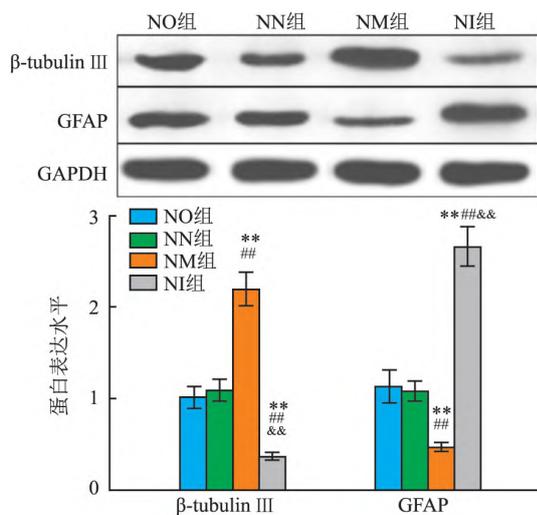


图3 各组细胞中 β-tubulin III、GFAP 的蛋白表达比较

与 NO 组比较: ** $P < 0.01$; 与 NN 组比较: ## $P < 0.01$; 与 NM 组比较: && $P < 0.01$

2.4 各组 NSCs 增殖情况 24 h 后各组细胞活性对比差距较大 ($F = 74.078, P < 0.01$)。与 NN 组、NO 组、NI 组相比,NM 组 NSCs 增殖活性最强且呈现随时间延长而逐渐增强的趋势 ($P < 0.01$),NI 的细胞活性较其他三组相比减弱,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),NO 组 NSCs 的活性略低于 NN 组,差异无统计学意义。见图 4。

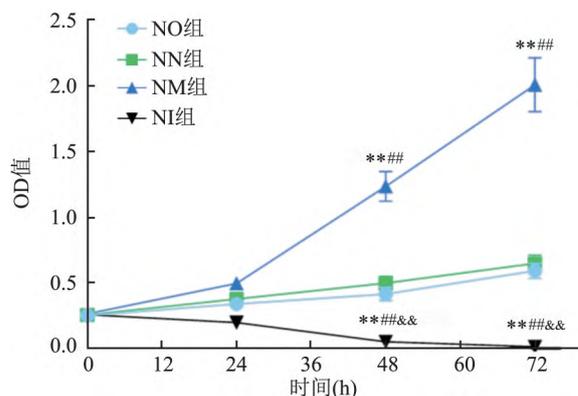


图4 各组 NSCs 细胞增殖情况

与 NO 组比较: ** $P < 0.01$; 与 NN 组比较: ## $P < 0.01$; 与 NM 组比较: && $P < 0.01$

2.5 各组 NSCs 细胞凋亡情况

NO 组、NN 组、NM 组、NI 组细胞凋亡率见图 5。其中 NM 组细胞凋亡率少于其他三组 ($P < 0.01$),NI 的细胞凋亡率较其他三组相比升高 ($P < 0.01$),NO 组与 NN 组细胞凋亡数量差异无统计学意义。

3 讨论

早期的研究中提示,正常情况下哺乳动物大脑皮质神经细胞不可再生。然而近些年的研究^[6]表明 NSCs 作为神经前体细胞不但自身具有更新能力,而且能够分化为大脑细胞。这一发现为神经退化性疾病的治疗带来了新的希望。有报道^[7]显示 NSCs 的分化机制较为复杂,受机体内某些信号调控影响,寻找干细胞增殖和分化的途径和方法成为研究的关键。

miRNAs 是一种高度保守的非编码 RNA,具有调控细胞的生物学行为的作用。有研究^[8]表明其在哺乳动物大脑中普遍存在,提示其可能在神经功能中具有重要意义。miR-9 是一种新型的保守 miRNA,在人类以及多类生物体内广泛存在。有报道^[9]显示 miR-9 在神经系统中特异性表达,发挥调节神经发育的作用。另外,miR-9 在近些年的多种肿瘤细胞的研究中呈现表达失调,提示其与癌细胞的生

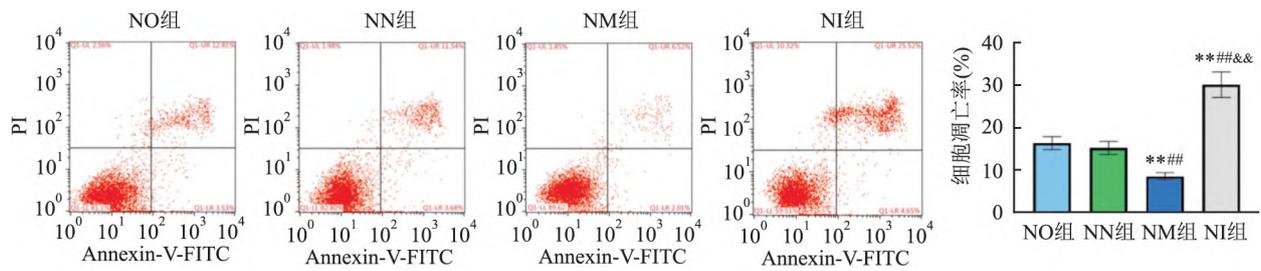


图5 4组细胞凋亡情况比较

与NO组比较: ** $P < 0.01$; 与NN组比较: ### $P < 0.01$; 与NM组比较: && $P < 0.01$

物学行为有关。同时研究^[10]表明 miR-9 在神经系统退行性病变的神经元中表达缺失。以上结果皆提示 miR-9 与神经系统发育以及疾病的发生过程相关,可能是两者的重要调控因子。本研究显示 NM 组 NSCs 活性最强且呈现随时间延长而逐渐增强的趋势。此结果提示过表达 miR-9 能够增加 NSCs 细胞活性,减少其凋亡。

李彩霞等^[11]对龟板提取物在 NSCs 向神经元细胞分化的过程中的作用进行探讨,结果表明过表达 miR-9 能够通过调节 Notch 1 的表达在间充质细胞分化为神经元的过程中发挥促进作用。何玲等^[12]研究表明脑络通通过上调 β -tubulin III、降低 GFAP 的表达促进 NSCs 增殖、分化。NSCs 向神经元分化进程中细胞的形态变化以及迁移需要细胞骨架的配合^[13]。细胞骨架最主要的组成部分为微管,微管是一种管状物,主要成分为微管蛋白,其中 β -tubulin 不仅仅是微管的组成成分之一,也是构成神经元的主要成分。其改变受 NSCs 向神经元分化影响。 β -tubulin 的所有同源体中 β -tubulin III 具备神经元特异性,作为神经元标志物之一被广泛应用于神经生物学研究^[14]。GFAP 被发现于星形胶质细胞内,属于 III 型中间丝蛋白。作为星形胶质细胞骨架的主要成分在细胞形态功能维持、神经生理功能及疾病过程中广泛参与,引起研究者的关注。免疫组化检测显示在健康的生物机体组织中 GFAP 大多呈现阴性表达,而在神经系统受损后,机体组织中的星形胶质细胞迅速增多发挥保护作用,但其增长过多时造成的胶质瘢痕在神经元的活动联结中成为了阻碍。GFAP 作为星形胶质细胞的主要成分其表达随着星形胶质细胞的激活增长。因此 GFAP 蛋白激活被当做神经系统星形胶质细胞活化的标志物,在临床可用作急性神经损伤的判断指标。本研究结果显

示,NM 组细胞中 β -tubulin III mRNA 蛋白表达量在四组中最高,而 GFAP mRNA 和蛋白表达量最低,提示 miR-9 通过调控 β -tubulin III、GFAP 的表达促进 NSCs 增殖。本研究与上述研究结果相似。

综上所述,过表达的 miR-9 通过促进 β -tubulin III 表达、抑制 GFAP 表达,从而促进 NSCs 增殖。该实验尚有一些不足,如样本量受限、未对所有类型的 NSCs 进行试验,不能排除细胞种类对实验所带来的影响,在今后的研究中应加入更多的实验方法对 NSCs 生物活性进行检测,为神经退化性疾病的治疗提供更有利的实验依据。

参考文献

- [1] Boese A C, Eric Q S, Dylan P, et al. Neural stem cell therapy for subacute and chronic ischemic stroke [J]. Stem Cell Res Ther, 2018, 9(1):154.
- [2] Rockenstein E, Desplats P, Ubhi K, et al. Neuro-peptide treatment with Cerebrolysin improves the survival of neural stem cell grafts in an APP transgenic model of Alzheimer disease [J]. Stem Cell Res, 2015, 15(1):54-67.
- [3] 李慧, 李子英. miR-9 和 miR-124 促进骨髓间充质干细胞向神经细胞分化 [J]. 解剖科学进展, 2016, 22(3):292-4, 298.
- [4] 张阳. 秋水仙素对嗅感觉神经元分化过程中 β -III tubulin 的作用研究 [J]. 中国中西医结合耳鼻喉科杂志, 2012, 20(4):241-5.
- [5] 陈京, 余伟华, 李付贵. 神经干细胞神经分化示踪中 GFAP 启动子驱动荧光报告系统的价值 [J]. 中国组织工程研究, 2017, 21(21):3370-5.
- [6] Jie L, Chen D, Li S H, et al. The construction of E-cadherin lentivirus vectors and the experimental study of E-cadherin on neural stem cell biological behavior [J]. J Biomater Tissue Eng, 2016, 6(5):349-61.
- [7] 汪宏锦, 李晶晶, 柯慧, 等. 中药对神经干细胞增殖分化信号通路的综合调控作用分析 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21):4093-103.
- [8] 柳维林, 郑慧, 金婷婷, 等. 电针调控 microRNA-34a 对缺血

- 再灌注损伤大鼠内源性神经干细胞分化的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2019, 25(2):44-53.
- [9] 郭亮, 肖峻, 陶陶. miR-9-5p 对前列腺癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(7):1052-7.
- [10] 李晓琳, 胡雪玲, 孙丽华. 微小 RNA-9 在癌症及神经退行性疾病中的研究现状[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(4):315-6, 320.
- [11] 李彩霞, 周健洪, 陈东风, 等. 龟板提取物诱导 NSCs 向神经元分化过程中相关 microRNA 表达变化[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(3):481-4, 573-5.
- [12] 何玲, 石晓倩, 徐伟, 等. 脑络欣通对神经干细胞增殖分化及 β -tubulin III、GFAP 的影响[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(8):964-71.
- [13] 张先虎, 朱俊德, 龙婷婷, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路对小鼠海马神经干细胞的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(1):44-9.
- [14] 郭超, 刘润, 赵红斌, 等. Wnt/ β -catenin 信号通路介导红景天苷诱导骨髓间充质干细胞向神经细胞定向分化研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(3):349-54.

The effect of miR-9 on the proliferation of neural stem cells by regulating β -tubulin III and GFAP

Wang Yu, Zhao Lan, Kan Bohong, Shi Huiyan

(Dept of Acupuncture, The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193)

Abstract Objective To explore whether miR-9 affects the proliferation of neural stem cells (NSCs) by regulating β -tubulin III and glial fibrillary acidic protein (GFAP). **Methods** NSCs cells were isolated and cultured on the purchased healthy pregnant mice and the isolated cells were divided into NO group (non-transfected NSCs cell line), NN group (NSCs transfected with miR-9-NC), NM group (NSCs transfected) transfected with miR-9 mimics), NI group (transfected with miR-9 inhibitor). Nestin was identified by immunofluorescence, the contents of Mir-9, β -tubulin III and GFAP were measured by QRT-PCR, the proliferation of NSCs was measured by MTT method, the apoptosis of NSCs was measured by flow cytometry, and the protein expressions of Mir-9, β -tubulin III and GFAP were detected by Western blot. **Results** The detection index Nestin of NSCs for 24 h after cell passage was positive in 90% of the NSCs, and co-localized with the nucleus, indicating the successful isolation of NSCs. The expression of miR-9 mRNA in NSCs of the NM group was the highest among the four groups, indicating that the transfection was successful. Among the four groups, β -tubulin III mRNA and protein expression was the highest in the NM group, and the GFAP mRNA and protein expression was the lowest. The NI group was the opposite ($P < 0.05$). In the four groups after 24 h, the cell activity of NSCs in the NM group was the strongest and showed a trend of gradually increasing with time ($P < 0.05$). The cell activity of NI was significantly weaker than that of the other three groups ($P < 0.05$). Among the four groups, the apoptosis rate of the NM group was lower than that of the other three groups ($P < 0.05$), and the apoptosis rate of NI was higher than that of the other three groups ($P < 0.05$). The difference in the above indicators between the NO group and the NN group was smaller. **Conclusion** Overexpressed miR-9 promotes the proliferation of NSCs by promoting the expression of β -tubulin III and inhibiting the expression of GFAP.

Key words neural stem cells; neurodegenerative diseases; glial cells; differentiation