

· 论著 ·

肌萎缩侧索硬化模型鼠中 microRNA-29b 的表达

杨 毅, 蔡 宾, 樊东升[△]

(北京大学第三医院神经内科, 北京 100191)

[摘要] 目的: 探讨 microRNA-29b (miR-29b) 在肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 中的表达水平及其在该病诊断中的可能价值。方法: 留取 16 只 SOD1-G93A ALS 模型鼠和 16 只野生型鼠脑皮质、脊髓、前肢肌肉组织和血浆, 提取 microRNA, 采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 方法检测 miR-29b 的表达量, 并通过受试者工作特征曲线 (receiver operator characteristic curve, ROC) 评估 SOD1-G93A ALS 模型鼠 miR-29b 对于 ALS 的诊断价值。结果: 以 U6 snRNA 为内参, 实验组 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 相对表达量显著高于对照组水平 ($P = 0.001$)。按周龄分组, 8、12 和 16 周龄实验组 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 的相对表达量显著高于对照组水平 (3 个不同周龄的实验组 vs. 对照组显著性检验分别为 $P = 0.044$ 、 $P = 0.018$ 、 $P = 0.045$)。通过 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 的相对表达量 (以 U6 snRNA 为内参) 对 ALS 进行诊断时, ROC 曲线下面积 (area under the curve, AUC) 为 0.885, 如果以 0.185 6 为诊断临界值, 灵敏度和特异度均较高, 分别为 92.9% 和 71.4%。结论: miR-29b 可能会成为早期诊断 ALS 的检测指标。

[关键词] 微 RNA-29b; 肌萎缩侧索硬化; 早期诊断

[中图分类号] R744.8 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2015)05-0733-04

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2015.05.001

Expression of microRNA-29b in mice with amyotrophic lateral sclerosis

YANG Yi, CAI Bin, FAN Dong-sheng[△]

(Department of Neurology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate microRNA-29b (miR-29b) expression in cerebral cortex, spinal cord, fore limb muscle, and serum of SOD1-G93A amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mice, and to identify the biomarker and to assess diagnostic values for ALS. **Methods:** Cerebral cortex, spinal cord, fore limb muscle and serum from 16 SOD1-G93A ALS mice and 16 wild-type mice were taken and then microRNA extracted, detecting the expression of miR-29b by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). The diagnostic performance of miR-29b for ALS was estimated by the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results:** The results from the validation indicated that the differences in miR-29b between the cerebral cortex of SOD1-G93A ALS and the healthy control subjects were statistically significant ($P = 0.001$). Meanwhile, the expressions 8, 12, and 16 weeks later were higher than those of the controls (ALS vs. Control: 8 weeks, $P = 0.044$; 12 weeks, $P = 0.018$; 16 weeks, $P = 0.045$). When the relative expression level of miR-29b was used to diagnose ALS in SOD1-G93A ALS mice, the area under the ROC (area under the curve, AUC) was 0.885, if the diagnostic threshold was set at 0.185 6, the sensitivity and specificity were 92.9% and 71.4%. **Conclusion:** MiR-29b may act as medical monitoring indices of ALS in early time.

KEY WORDS MicroRNA-29b; Amyotrophic lateral sclerosis; Early diagnosis

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是运动神经元病 (motor neuron disease, MND) 的一种常见类型, 该病累及脊髓前角细胞、脑干运动神经核及锥体束, 是具有上、下运动神经元并存损害的慢性、进行性发展的致死性运动神经元变性病, 常见于成年起病, 临床表现为进行性加重的肌肉萎缩、无力及锥体束征, 最终导致吞咽困难和呼吸肌无力

而死亡^[1]。目前尚没有明确 ALS 病因及有效的治疗手段, 同时该病起病隐袭, 所以早期诊断对延长生命时间、提高生命质量有重要意义。

MicroRNA (miRNA) 作为一种非编码小分子 RNA, 为 ALS 的病因和发病机制的研究开辟了新的道路, 然而目前关于 ALS 的 miRNA 的研究比较有限, 本课题组在前期研究中利用 miRNA 芯片技术筛

基金项目: 国家自然科学基金(81030019)、教育部博士点基金(20100001110084)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (81030019) and the Fund for Doctoral Program of Higher Education of China(20100001110084)

△ Corresponding author's e-mail, dsfan@sina.com

网络出版时间:2015-9-10 10:49:15 网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20150910.1049.024.html>

选出 ALS 患者血浆 microRNA-29b (miR-29b) 表达量与对照组存在差异,但差异没有统计学意义,经扩大样本验证后发现,ALS 患者血浆中 miR-29b 升高与 ALS 明显相关^[2-3]。为进一步明确 miR-29b 与 ALS 的相关性,本研究通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 检测 16 只 SOD1-G93A ALS 转基因模型鼠和 16 只野生型小鼠脑皮质、脊髓、前肢肌肉组织及血浆中 miR-29b 的表达水平。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

实验动物及标本:实验组为 ALS 转基因动物模型 SOD1-G93A 小鼠 16 只(来源于 Jackson Laboratory),对照组为野生型小鼠 16 只(来源于南京大学模式动物研究所),每组实验鼠 4、8、12、16 周龄各 4 只,雌、雄各半,饲养于北京大学医学部实验动物科学部清洁环境中。每只小鼠冰上留取脑皮质、脊髓、前肢肌肉组织以及血浆 4 种标本,脑皮质、脊髓和前肢肌肉组织存于液氮中,血浆存于 -80 ℃ 冰箱中。

实验试剂:miRcute miRNA 提取分离试剂盒(离心柱形)(货号 DP501)、miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(货号 KR201)、miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒(货号 FP401)、miR-29b-3p 引物(货号 CD201-0028)、U6 snRNA 引物(货号 CD201-0145)均购自 TIANGEN,氯仿、无水乙醇购自北京化工厂。

1.2 RNA 提取

将脑皮质、脊髓和前肢肌肉组织在液氮中碾碎,每 50 mg 组织加 1 mL 裂解液 MZ(Buffer MZ),用匀浆仪进行匀浆处理。每 200 μL 血浆中加入等体积裂解液 MZ,振荡器振荡混匀 30 s。将匀浆样品在室温放置 5 min,使核酸蛋白复合物完全分离,加入 200 μL 氯仿,振荡 15 s,室温放置 5 min。4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,将水相转移至新的 RNase-Free 离心管中,加入转移液体积 0.43 倍的无水乙醇混匀,一起转入吸附柱 miRspin 中,室温 12 000 r/min 离心 30 s,保留流出液。量取流出液,加入流出液体积 0.75 倍的无水乙醇混匀,一起转入吸附柱 miRelute 中,室温 12 000 r/min 离心 30 s,弃废液保留吸附柱 miRelute。向吸附柱 miRelute 中加入 500 μL 去蛋白液 MRD,室温静置 2 min,室温 12 000 r/min 离心 30 s,弃废液。向吸附柱 miRelute 加入 600 μL 漂洗液 RW,室温静置 2 min,室温 12 000 r/min

离心 30 s,弃废液,重复 2 次。将吸附柱 miRelute 转入新的 RNase-Free 离心管中,加入 RNase-Free ddH₂O 溶解 RNA,离心后即得到 RNA。采用 Nano-drop 2000 分光光度计检测所提 RNA 浓度,将光密度值 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8 ~ 2.0 的 RNA 用于检测。

1.3 cDNA 合成

按照 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 miRNA 3' 进行加 poly(A) 处理说明书,在冰上预冷 RNase-Free 反应管,加入相应试剂至总体积 20 μL, Total RNA 终浓度均调整到 1 μg。反应液配制后离心,置于 37 ℃ 反应 60 min,所得的反应液按照 miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 poly(A) 修饰的 miRNA 逆转录反应说明书进行配置,离心后置于 37 ℃ 60 min 即得 cDNA 产物。

1.4 RT-qPCR 体系及反应条件

将试剂置于冰上按 miRcute miRNA 荧光定量检测试剂盒说明书配置反应体系 50 μL,分别以 miR-29b 和 U6 snRNA(作为内参,分析 miR-29b 的表达)作为引物进行逆转录,反应程序:94 ℃ 2 min;94 ℃ 20 s, 60 ℃ 34 s, 40 个循环。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示每个 miRNA 的相对表达量, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的}} - Ct_{\text{内参}}$, 每例样本重复检测 3 次。

1.5 统计学分析

数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,结果采用均数 ± 标准误表示,两组间比较采用 t 检验,以受试者工作特征曲线(receiver operator characteristic curve, ROC) 检验诊断标准的诊断效能,计算 ROC 曲线下面积(area under the curve, AUC),通过约登指数(Youden's index)确定诊断临界值并计算相关诊断敏感度和特异度。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

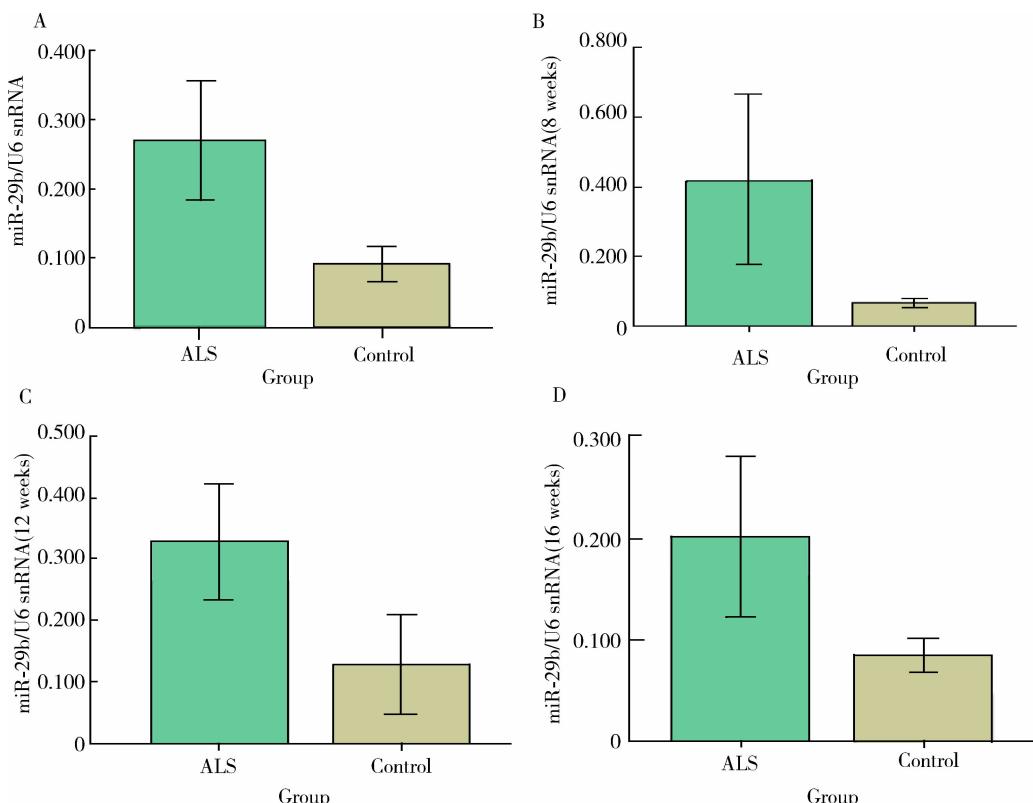
2 结果

2.1 荧光定量 PCR 结果

通过 miRNA 荧光定量 PCR 方法在实验组和对照组脑皮质、脊髓、前肢肌肉组织及血浆中进行实验研究,结果显示,以 U6 snRNA 为内参,实验组 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 的相对表达量显著高于对照组水平($P = 0.001$,图 1A)。按周龄分组分析结果显示,8、12 和 16 周龄实验组 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 的相对表达量显著高于对照组水平($P = 0.044$,图 1B; $P = 0.018$,图 1C; $P = 0.045$,图 1D)。4 周龄实验组和对照组脑皮质 miR-29b 表达量差异无统计学意义($P = 0.331$)。4、8、12、16 周龄实验组和对照组相

比,脊髓 miR-29b 表达量差异无统计学意义 ($P = 0.224, P = 0.200, P = 0.180, P = 0.282$), 前肢肌肉组织 miR-29b 表达量差异无统计学意义 ($P = 0.117$,

$P = 0.290, P = 0.197, P = 0.165$), 血浆 miR-29b 表达量差异亦无统计学意义 ($P = 0.988, P = 0.256, P = 0.113, P = 0.381$)。



A, the mean of the miR-29b expressions in two groups; B, C, D, the mean of the miR-29b expressions in two groups at 8, 12, and 16 weeks, respectively. miR, microRNA; ALS, amyotrophic lateral sclerosis.

图 1 实验组与对照组脑皮质 miR-29b 表达量对比

Figure 1 Comparation of the miR-29b expressions in cerebral cortex in ALS experimental group and control group

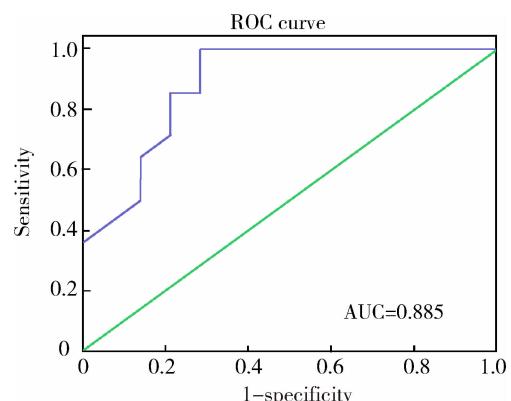
2.2 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 表达水平对 ALS 的诊断效能

ROC 曲线分析结果显示,通过 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 相对表达量(以 U6 snRNA 作为内参)对 ALS 进行诊断时(图 2),AUC 为 0.885,以 miR-29b 相对表达量为 0.185 6 作为评价临界值,即 miR-29b 相对表达量高于 0.185 6 提示诊断 ALS,此时约登指数最大,为 0.643,灵敏度和特异度均最高,分别为 92.9% 和 71.4%。

3 讨论

目前,ALS 的诊断尚无明确方法,患者早期发病往往没有典型临床症状,同时 ALS 患者的临床表现异质性较大,这也增加了 ALS 的诊断难度。2007 年新修定的 Awaji 诊断标准提出了神经电生理检查对于 ALS 诊断的重要性^[4],虽然这方面检查,尤其是胸锁乳突肌、斜方肌以及腹直肌肌电图等检查手段的发展和应用对于 ALS 早期诊断具有一定的敏感

性和特异性^[5-8],但并非是基于 ALS 的病理生理机制的特异性,且临床对于仪器及技术人员的要求较高,因此利用 miRNA 寻找早期诊断 ALS 的检测指标已成为新近研究的热点之一^[2]。



miR, microRNA; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; ROC, receiver operator characteristic curve; AUC, area under the curve.

图 2 脑皮质 miR-29b 表达对 ALS 的诊断效能

Figure 2 Diagnostic efficiency of the miR-29b expressions in cerebral cortex for ALS

成熟的 miRNA 一般有 21~24 个碱基,这些碱基与 3' 端非编码区的 mRNA(3'UTR)结合抑制转录进而影响基因的表达,并参与多种生物学信号通路的调控及多种靶基因 mRNA 的表达^[9]。哺乳类动物的脑组织中存在大量的 miRNA,这些 miRNA 与脑组织的发育、神经细胞分化及高级神经功能有关^[10~13]。miR-29b 的异常表达影响着神经变性疾病的发生和发展。Fenn 等^[14]的研究提示,高龄组鼠脑组织中小胶质细胞的重要调控元件 *IGF-I* 和 *CX3CLI* mRNA 水平降低与 miR-29b 高水平表达量相关。另有研究显示,通过对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者脑活体组织检查验证了 miR-137、miR-181c、miR-9、miR-29a、miR-29b 通过影响神经酰胺功能导致 AD 发病,同时 miR-29b 低水平表达与 AD 脑组织中 BACE1 高表达量相关^[15~16]。Shioya 等^[17]通过对 ALS 尸检额叶组织 miRNA 表达谱发现,miR-29b 的表达量升高,但病例组与对照组的 miR-29b 表达量差异无统计学意义,这一阴性结果的出现可能与该研究所用的样本量过小有关。

本研究结果表明,实验组 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 的相对表达量显著高于对照组水平。按周龄分组进行统计学分析并结合 ALS 模型鼠行为表现提示,8 周龄 SOD1-G93A ALS 模型鼠虽然没有 ALS 临床特征,但脑皮质 miR-29b 表达量已明显高于对照组,12 和 16 周龄 SOD1-G93A ALS 模型鼠均存在不同程度的 ALS 临床特征,脑皮质 miR-29b 表达量明显高于对照组。ROC 曲线分析得出 SOD1-G93A ALS 模型鼠脑皮质 miR-29b 相对表达量高于 0.185 提示诊断 ALS,灵敏度和特异度分别为 92.9% 和 71.4%。由此我们推断 miR-29b 的异常表达在 ALS 的病因、发病机制中可能起重要作用,同时 miR-29b 有可能成为 ALS 早期诊断的检测标准和治疗靶点。

本研究仍存在局限性:(1)样本量较小,收集的数据有限;(2)所选实验组样本为 SOD1-G93A ALS 模型鼠,同时可能存在 SOD1 突变影响 miR-29b 调控机制。结合本课题组前期的研究成果及本次研究成果,我们后期将在临床工作中收集 ALS 患者的脑脊液及血浆,提取并检测循环 miR-29b 表达量,同时开展 ALS 患者尸检各组织 miRNA 分析,进一步明

确 miR-29b 作为早期诊断 ALS 的检测指标。

参考文献

- [1] Liu MS, Cui LY, Fan DS, et al. Age at onset of amyotrophic lateral sclerosis in China [J]. Acta Neurol Scand, 2014, 129 (3): 163~167.
- [2] 蔡宾, 樊东升. 肌萎缩侧索硬化患者血浆 microRNA-1285 表达的初步研究[J]. 中华神经科杂志, 2013, 46(5): 334~336.
- [3] 蔡宾. 循环 miR-1285 和 miR-29b 作为潜在生物标志物用于脊髓所侧索硬化的诊断研究[D]. 北京: 北京大学硕士研究生学位论文, 2013.
- [4] Nodera H, Lzumi Y, Kaji R. New diagnostic criteria of ALS (Awaji criteria) [J]. Brain Nerve, 2007, 59(10): 1023~1029.
- [5] Kang DX, Fan DS. The electrophysiological study of differential diagnosis between amyotrophic lateral sclerosis and cervical spondylotic myelopathy [J]. Electromyogr Clin Neurophysiol, 1995, 35(4): 231~238.
- [6] Xu YS, Zheng JY, Zhang S, et al. Upper trapezius electromyography aids in the early diagnosis of bulbar involvement in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Amyotroph Lateral Scler, 2011, 12(5): 345~348.
- [7] Xu Y, Zheng J, Zhang S, et al. Needle electromyography of the rectus abdominis in patients with amyotrophic lateral sclerosis [J]. Muscle Nerve, 2007, 35(3): 383~385.
- [8] 樊东升, 张俊, 康德瑄, 等. 肌萎缩侧索硬化/运动神经元病的基础与临床研究[J]. 北京大学学报: 医学版, 2009, 41(3): 279~281.
- [9] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281~297.
- [10] Lagos-quintans M, Rauhut R, Yalcin A, et al. Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse [J]. Curr Biol, 2002, 12(9): 735~739.
- [11] Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, et al. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs [J]. RNA, 2003, 9(2): 180~186.
- [12] Okabe M, Imai T, Kurusu M, et al. Translational repression determines a neuronal potential in Drosophila asymmetric cell division [J]. Nature, 2001, 411(6833): 94~98.
- [13] Miller S, Yasuda M, Coats JK, et al. Disruption of dendritic translation of CaMK II α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation [J]. Neuron, 2002, 36(3): 507~519.
- [14] Fenn AM, Smith KM, Lowett-Racke AE, et al. Increased microRNA 29b in the aged brain correlates with the reductions of insulin-like growth factor-1 and fractalkine ligand [J]. Neurobiology of Aging, 2013, 34(12): 2748~2758.
- [15] Cole SL, Vassar R. The basic biology of BACE1: a key therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. Curr Genomics, 2007, 8(8): 509~530.
- [16] Geekyanage H, Jicha GA, Nelson PT, et al. Blood serum miRNA: Non-invasive biomarkers for Alzheimer's disease [J]. Exp Neurol, 2012, 235(2): 491~496.
- [17] Shioya M, Obayashi S, Tabunoki H, et al. Aberrant microRNA expression in the brains of neurodegenerative diseases: miR-29a decreased in Alzheimer disease brains targets neurone navigator 3 [J]. Neuropathol Appl Neurobiol, 2010, 36(4): 320~330.

(2014-01-21 收稿)
(本文编辑:任英慧)