

• 论 著 •

MicroRNA-9 靶向 BACE1 参与 Alzheimer 病发生发展的机制研究

严钢莉 黎逢光 李朝武 聂海岭

【摘要】 目的 探讨 microRNA-9(miR-9)靶向 BACE1 参与 Alzheimer 病(AD)发生发展的机制。**方法** 选取 2013 年 5 月 - 2015 年 5 月解放军第 161 医院收治的 AD 患者 23 例,以血管性痴呆(Vascular dementia, VD)21 例和颅内感染患者(intracranial infection, ICI)20 例为对照组,比较 3 组患者脑脊液中 miR-9、BACE1 和 APP 的表达水平;然后用荧光素酶报告系统验证 miR-9 与 BACE1 之间的靶向关系;最后将 miR-9 mimics 转染入 SH-SY5Y 细胞,qRT-PCR 和 Western Bolt 检测 BACE1 和 APP 的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** 与 VD 和 ICI 组比较,AD 患者脑脊液中 miR-9 表达水平下降,BACE1 和 APP 表达水平增高,AD 患者脑脊液中 miR-9 表达水平与 BACE1 表达水平呈负相关;BACE1 为 miR-9 的功能靶基因;miR-9 可靶向 BACE1 参与调控 SH-SY5Y 细胞 APP 表达。**结论** miR-9 可靶向 BACE1 参与 AD 的发生发展。

【关键词】 Alzheimer's 病 miR-9 BACE1

【中图分类号】 R742 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)02-0135-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.02.001

The downregulation of microRNA-9 promotes Alzheimer's disease Via targeting BACE1 Yan Gangli, Li Fengguang, Li Chaowu, et al. Department of Neurology, The Chinese PLA 161th Hospital, Wuhan 430012

【Abstract】 Objective To investigate the effects of microRNA-9(miR-9) Via targeting Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme (BACE1) on Alzheimer's disease(AD). **Methods** 23 patients with AD (AD group) and 21 patients with Vascular dementia(VD)(VD group) (the control group), 20 patients with intracranial infection(ICI)(ICI group) (the control group) were enrolled in our hospital from May 2013 to May 2015. The expression levels of miR-9, BACE1 and APP in CSF of AD, VD and ICI were detected and compared in three groups. Then wild-type and mutant luciferase reporter plasmids were constructed according to the predicted miR-9 binding site on the 3'-UTR of the BACE1 mRNA and transfected into human embryonic kidney 293 tool cells (HEK293T) to determine the targeting relationship of miR-9 and BACE1. The regulation effects of miR-9 on the BACE1 and APP expression level in human neuroblastoma SH-SY5Y cells were determined. **Results** Compared with VD group and ICI group, the expression levels of miR-9 in CSF of AD group, the expression levels of BACE1 and APP in CSF of AD group were increased, the expression level of miR-9 was negatively relation with the expression level of BACE1 in CSF of AD. And luciferase reporter assay demonstrated that miR-9 was shown to specifically bind to the 3'-UTR of BACE1. Further miR-9-mimic SH-SY5Y cells showed significantly lower BACE1 mRNA and protein expression levels and APP accumulation than those of matching negative control and non-transfected cells. **Conclusion** MiR-9 was down-regulated in an association with the up-regulation of BACE1 and APP accumulation in AD CSF, and it could reduce the BACE1 expression level, and APP accumulation in vitro by targeting BACE1. These finding suggested that miR-9 played an important role in the process of AD via targeting BACE1 and might be an new therapeutic molecular target for AD.

【Key words】 Alzheimer's disease miR-9 BACE1

基金项目:武汉中青年医学骨干人才培养工程(2018);全军医学科技青年培育计划(批准号 17QNPO50)

作者单位:430010 武汉,中部战区总医院汉口院区神经内科
[严钢莉 黎逢光(通信作者) 李朝武 聂海岭]

Alzheimer 病(Alzheimer's disease, AD)是常见的中枢神经系统退行性疾病,主要表现为进行性记忆力下降、精神行为异常、人格改变及其它认知功能损坏^[1]。AD 的发病率随着年龄的增加而增高,

给家庭和社会带来较大的经济负担。目前 AD 缺乏根本有效的治疗方法,因此有必要对 AD 的发病机制进一步研究,为 AD 的治疗提供 1 个可能的治疗策略。

MicroRNAs (miRNAs) 是一类非编码 RNA,由 18~25 个核苷酸组成,它能与靶基因 3'-UTR 特异性结合,参与 mRNA 降解或抑制 miRNA 翻译。AD 患者体内已发现多种 miRNA 表达异常如 miR-9、miR-109、miR-29、miR-181、miR-106 表达水平降低,而 miR-34 a, miR-146 a, miR-155 表达增加^[2-5]。其中,miR-9 表达水平异常较为显著。通过生物信息学技术分析我们发现 AD 患者脑内 A β 沉积的关键基因 BACE1(β -amyloid converting enzyme 1, β 分泌酶 1)^[6-8] 可能为 miR-9 的靶基因,miR-9 可能靶向 BACE1 参与 AD 的进程。因此,本课题拟进一步研究 miR-9 靶向 BACE1 参与 AD 病程的机制,从而为 AD 的防治提供 1 个新的治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 脑脊液标本

收集 2015 年 1 月 - 2016 年收治的解放军第 161 医院的 23 例 AD,21 例 VD 和 20 例颅内感染患者(intracranial infection, ICI)脑脊液标本。AD 和 VD 诊断符合《Diagnosis and Statistical Mental Disorder, fourth edition, DSM-IV》^[9-11]。研究对象左侧曲头抱膝位抽取 CSF (4 mL)于无 RNA 酶试管。脑脊液离心(2 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 15 min)后放置在 -80 $^{\circ}$ C 内保存。

1.2 细胞培养

工具细胞 HEK 293T 细胞(ATCC, USA)和人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)由本实验室保存,使用含 10%胎牛血清(Gibco, USA)的高糖培养基 DMEM(Gibco, USA)培养,每 2~3 d 换液 1 次,待细胞密度达到 80%~85%时传代。

1.3 转染

SH-SY5Y 细胞分为 3 组:miR-9 mimics 转染

组(transfected group, TG)、对照组(the negative control group, NC)和非转染组(blank group),每组 3 个复孔,以 4×10^5 /孔的密度接种于六孔板,转染组转染 miR-9 mimics, NC 组转染 miRNA mimic NC, Blank 组为空白对照组;细胞贴壁生长 1 d 后使用 lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA)分别转染 miR-9 mimics 和 mimic NC, 转染终浓度为 50 mmol/L,转染 48 h 后收集细胞。

1.4 RNA 提取和实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

细胞 PBS 清洗后加入 1 mL Trizol, 1 min 后抽吸裂解细胞入无 RNA 酶的 EP 管;5 min 后加入 0.2 mL 氯仿,震荡后放置 2 min,离心 15 min (12 000 r/min, 5 $^{\circ}$ C);取上层水相于新的 EP 管,加入双倍体积预冷的异丙醇,10 min 后离心(12 000 r/min, 5 $^{\circ}$ C);弃去上清液,预冷的 75%酒精洗涤沉淀,干燥后用无 RNA 酶水溶解沉淀。

RNA/miRNA qRT-PCR 使用 PrimeScriptTM RT reagent kit (TaKaRa, Japan) 和 SYBR Premix Ex TaqTM II kit (TaKaRa, Japan) 试剂盒。逆转录使用步骤参照说明书 25 μ L 反应体系:模板 2 μ L + RT 引物工作液 2 μ L,再加入无 RNA 酶水至 11 μ L,接着 70 $^{\circ}$ C 放置 10 min、冰育 2 min,最后 5 \times buffer 5 μ L、Mix 1.25 μ L 和无 RNA 酶水 7.75 μ L。RT 反应条件:42 $^{\circ}$ C 60 min, 70 $^{\circ}$ C 10 min。miR-9 逆转录使用带有茎环结构的 miRNA 特异性引物(Ribo, 广州), BACE1 逆转录引物为 Random 6 mers 和 Oligo dT Primer(表 1)。PCR 反应参照说明书 20 μ L 体系:配置 PCR 反应混合液后放入 7900 HT PCR 分析仪,进行溶解曲线分析,绘制 RNA 标准曲线,测量 CT 值,计算出 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 并进行比较。

1.5 Western blot

SH-SY5Y 细胞转染 48 h 后 PBS 清洗细胞,加入 400 μ L 细胞裂解液冰上裂解 30 min,收集细胞碎片和裂解液离心 10 min (4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min);吸

表 1 PCR 引物序列

基因	PCR 引物序列(5'-3')
MiR-9	Forward primer:GGGCCCGCTCTAGACTCGAGATATTTGCATGTCGCTATGTG
	Reverse primer:CGCGCCCGCCTAATGGATCCAAAAAAGGCACAGTCGAGGCTGATC
BACE1	Forward primer:ACAGCAACAGGGTGTTGGAC
	Reverse primer:TTTGAGGGTGCAGCGAACTT
APP	Forward primer:TCCGACATGACTCAGGATATG
	Reverse primer:CACCACACCATGATGAATGG

取上清液后 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白水平。配置 10% 分离胶, SDS-PAGE. 蛋白电泳 (50 μ g/孔) 分离, 转膜后脱脂牛奶封闭 1 h, 加入按 1:500 稀释的一抗: 抗兔 BACE1 抗体(ab38891)、抗兔 APP 抗体 (sigma A8717) 和抗 β -actin 抗体 (ab119716), 4 $^{\circ}$ C 过夜; 次日加入二抗 HRP, 室温 1 h 后 ABI Veriti 显影拍照。

1.6 荧光素酶报告系统

双荧光素酶报告系统验证 miR-9 与 BACE1 的靶向关系。首先根据预测的与 miR-9 相结合的 BACE1 的 3'-UTR 的结合位点(图 1)构建野生型 (wild type, WT) 片段和突变型 (mutation, mut) 片段, 插入 pMIR-EXPORT 载体构建 WT 质粒和 mut 质粒。293T 工具细胞接种于 96 孔板 (4×10^4 /孔, 细胞培养箱培养 1 d 后共转染 miR-9-mimics (50 nm)/NC (50 nm) 和 BACE1 WT/mut 质粒, 36 h 后吸去培养基, PBS 洗涤细胞后按照双荧光素酶报告系统 (Promega, USA) 操作步骤检测萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶活性。

1.7 统计学处理

计数资料用构成比 (%) 表示, 组间比较采用卡方检验; 计量资料用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 再进行组间两两比较 (LSD- t 检验); 相关性分析采用 Pearson 相关性分析; 采用 SPSS17.0 统计软件包。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑脊液中 miR-9、BACE1 和 APP 表达水平

AD 组患者 23 例、VD 组 21 例、ICI 组 20 例, 3 组的性别和年龄比较无明显差异 ($P > 0.05$) (表 2)。qRT-PCR 显示, 与 VD 和 HC 组患者比较, AD 患者脑脊液中 miR-9 表达水平显著下降, 而 BACE1 表达水平显著增高 ($P < 0.05$) (图 2)。AD 患者脑脊液中 miR-9 的表达水平与 BACE1 表达水平呈负相关 ($R^2 = 0.23, P = 0.02$) (图 2)。Western blot 显示, 与 VD 和 HC 组患者比较, AD 患者脑脊液中 BACE1 和 APP 表达水平显著增高 (图 2)。

表 2 3 组的一般情况				
指标	ICI 组	VD 组	AD 组	P
平均年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁)	52.85 \pm 8.76	50.24 \pm 7.29	51.35 \pm 5.73	0.55
性别 (男/女, 例)	8/12	11/10	14/9	0.39

2.2 miR-9 靶基因验证

通过生物信息学技术分析发现 miR-9 上有 9 个核糖核苷酸与 BACE1 3'-UTR 位点互补, 用点突变技术将该结合位点突变, 分别构建 BACE1 WT 质粒和 mut 质粒, 293T 工具细胞共转染 miR-9 mimics /NC 和 BACE1 WT/mut 质粒, 结果显示与共转染 BACE1 WT 质粒和 NC 序列的工具细胞比较, 共转染 BACE1 WT 质粒和 miR-9 mimics 的工具细胞的 Firefly luciferase/Renilla luciferase 比值显著降

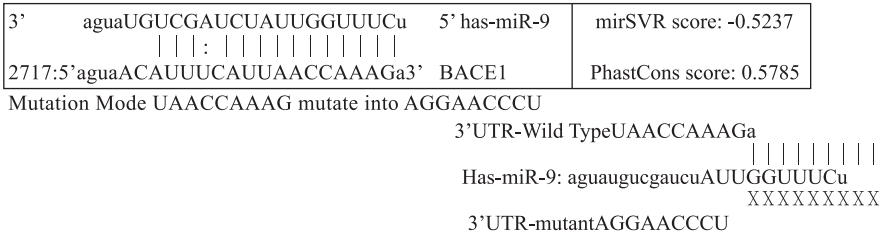


图 1 BACE1 与 miR-9 的结合片段及突变片段

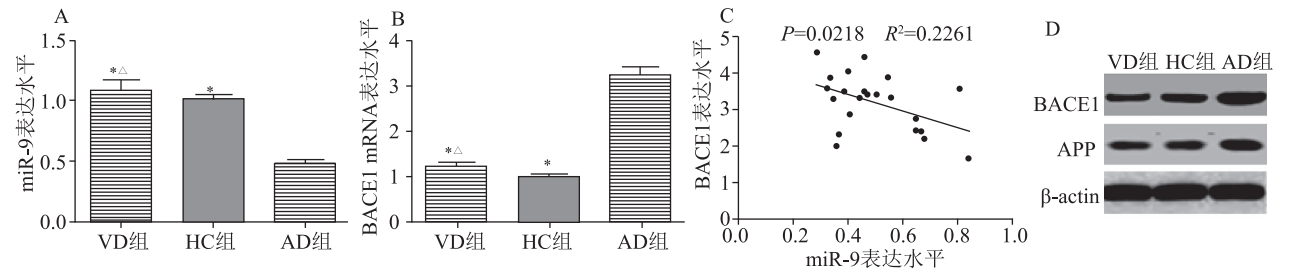


图 2 3 组中 miR-9、BACE1 和 APP 表达水平 A 为 miR-9 表达水平; B 为 BACE1 的 mRNA 表达水平; C 为 AD 患者 CSF 中 miR-9 表达水平与 BACE1 mRNA 表达水平呈负相关 ($R^2 = 0.2261, P = 0.0218$); D 为 BACE1 和 APP 的蛋白表达水平; 与 AD 组比较, $* P < 0.05$; 与 HC 组比较, $\Delta P > 0.05$

低($P<0.05$),而与共转染 BACE1 mut 质粒和 NC 序列的工具细胞比较,共转染 BACE1 mut 质粒和 miR-9 mimics 的工具细胞的 Firefly luciferase/Re-nialla luciferase 比值无统计学差异($P>0.05$)(图 3)。

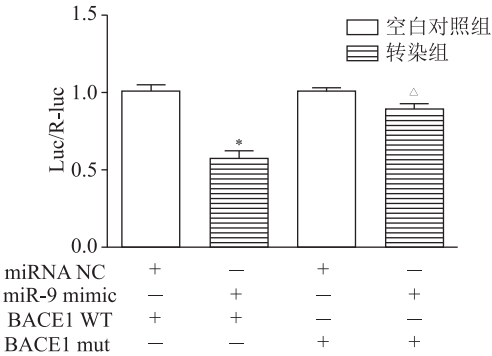


图 3 荧光素酶报告系统 与空白对照组比较, * $P<0.05$, $\Delta P>0.05$

2.3 miR-9 靶向 BACE1 参与 APP 的调控作用

SH-SY5Y 细胞转染 miR-9 mimics/NC 48 h 后收集细胞,检测 BACE1 和 APP 的表达水平。从图 4 显示,在转染组 miR-9 mimics 表达增加 15.72 倍,转染效率高。与 blank 组和 NC 组比较,BACE1 的 mRNA 表达水平明显增高($P<0.05$)(图 4);Western Blot 显示转染组 APP 和 BACE1 的蛋白表达水平明显增高(图 4)。

3 讨论

miRNA 是一类小的内源性非编码 RAN,它可作用于靶基因,调控靶基因的表达,参与细胞增殖凋亡及组织器官形成和发育等。miR-9 来源于茎环结构的 pre-miR-9,为组织特异性 miRNA,它可通过免疫与炎症反应参与肿瘤、神经系统疾病及心脏疾病发生发展^[12-13]。现有研究证实,miR-9 可通过 miR-9/TAZ 和 miR-9/PPARA-CDH1 信号通道调控细

胞增殖和迁徙而诱导肝细胞恶性肿瘤形^[12,14-15]。TAZ,IFG2BP1,TC10,MYO1D 和 ANXA2 已被证实是 miR-9 在肝癌形成过程中的靶基因^[15-18]。miR-9 在中枢系统疾病中同样有着重要的作用。它可靶向丝裂原活化蛋白激酶 3(mitogen activated protein kinase kinase 3,MAP3K3)和成纤维细胞生长因子 1(fibroblast growth factor receptor 1,FGFR1)参与调控 Zeb 2 a 和抑微管装配蛋白表达而参与神经细胞的增殖和凋亡^[13,19-24]。

本研究发现 AD 患者 miR-9 的表达水平显著降低,而 BACE1 表达水平明显增高,miR-9 的相对表达水平与 BACE1 的 mRNA 表达水平呈负相关。通过生物信息学分析技术发现 AD 病程中的与 A β 生成密切相关的基因 BACE1 可能为 miR-9 的功能靶基因(mirSVR score -0.5237, PhastCons score 0.5785)。本研究使用双荧光素酶报告系统进行靶基因的验证,结果显示与共转染 miRNA NC 和 BACE1 WT 比较,工具细胞共转染 miR-9 和 BACE1 WT 质粒时的荧光素酶比值较显著下降,而共转染 miR-9 和 BACE1 mut 质粒时工具细胞的荧光素酶比值较共转染 miRNA NC 和 BACE1 mut 无变化。这说明 miR-9 对 BACE1 有负向调控作用,当 miR-9 与 BACE1 的结合位点突变时 miR-9 对 BACE1 的调控作用消失,进一步证实 BACE1 为 miR-9 的功能靶基因。同时,本研究在 AD 患者的脑脊液中验证了 BACE1 的表达,结果显示与 VD 和 HC 比较,AD 患者 BACE1 表达水平显著上调,与 miR-9 表达水平呈负相关,这间接证实了 miR-9 对 BACE1 的负向调控作用,miR-9 为内源性的 BACE1 调控因子。

APP 是淀粉样前体蛋白,其蛋白代谢产物 A β 大量合成沉积是 AD 的主要病因。将 miR-9 mimics 转染入 SH-SY5Y 细胞,RT-PCR 和 Western Blot

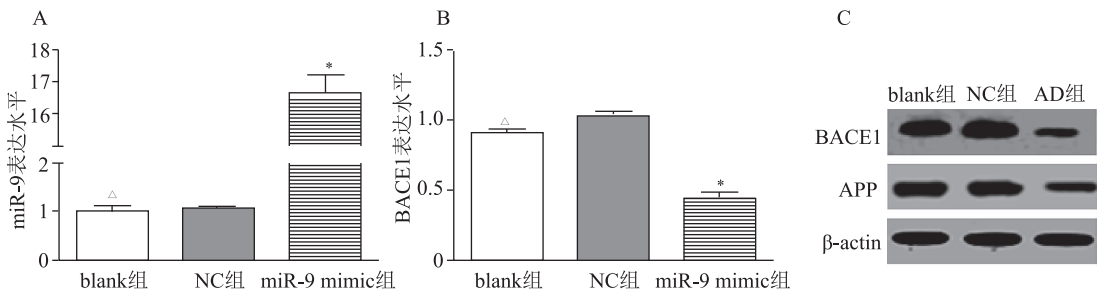


图 4 3 组细胞 miR-9、BACE1 和 APP 表达水平 A 为 miR-9 的表达水平;B 为 BACE1 的 mRNA 表达水平;C 为 BACE1 and APP 的蛋白表达水平;与 NC 组比较, * $P<0.05$, $\Delta P>0.05$

显示,与转染 miRNA NC 序列和空白对照组比较,转染组 BACE1 和 APP 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著下降。AD 患者的 miR-9 表达减少,促进了 BACE1 和 APP 的生成,导致 AD 的发生发展。当增加 miR-9 后可通过减少 BACE1 和 APP 表达,从而抑制 AD 进程。

本研究发现,AD 患者出现 miR-9 表达减少,而 BACE1 表达增加。miR-9 可与 BACE1 3'-UTR 特异性结合,负向调控 BACE1 的表达,参与 APP 的聚集,导致 A β 的沉积。因此,miR-9 可能是神经退行性疾病如 AD 的可能的治疗靶点,但需要进一步的机制研究以证实。

参 考 文 献

- [1] Bhattacharjee S, Zhao YH, Hill JM, et al. Aluminum and its potential contribution to Alzheimer's disease (AD) [J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2014, 6(4): 62.
- [2] Cheng L, Doecke JD, Sharples RA, et al. Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment [J]. *Molecular Psychiatry*, 2015, 20(10): 1188-1196.
- [3] Danborg PB, Simonsen AH, Waldemar G, et al. The potential of microRNAs as biofluid markers of neurodegenerative diseases—a systematic review [J]. *Biomarkers*, 2014, 19(4): 259-268.
- [4] Denk J, Boelmans K, Siegmund C, et al. MicroRNA profiling of CSF reveals potential biomarkers to detect alzheimer's disease [J]. *PLOS One*, 2015, 10(5): e0126423.
- [5] Serpente M, Fenoglio C, Villa C, et al. Circulating miRNAs as potential biomarkers in Alzheimer's disease [J]. *Journal of Alzheimers Disease*, 2014, 41(2): S50.
- [6] Deng Yan-yao, Din Yu, Hou D. Research status of the regulation of miRNA on BACE1 [J]. *International Journal of Neuroscience*, 2014, 124(7): 474-477.
- [7] Liu Huan, Tian Tian, Qin Shan-chun, et al. Folic acid deficiency enhances abeta accumulation in APP/PS1 mice brain and decreases amyloid-associated miRNAs expression [J]. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2015, 26(12): 1502-1508.
- [8] Yang Guo-shuai, Song Yan-min, Zhou Xiao-yan, et al. MicroRNA-29c targets beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1 and has a neuroprotective role in vitro and in vivo [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 12(2): 3081-3088.
- [9] Hill JM, Clement C, Pogue AI, et al. Pathogenic microbes, the microbiome, and Alzheimer's disease (AD) [J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2014, 6(6): 127.
- [10] Zhao Yu-hai, Pogue AI, Lukiw WJ. MicroRNA (miRNA) signaling in the human CNS in sporadic alzheimer's disease (AD)—Novel and unique pathological features [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16(12): 30105-30116.
- [11] Zhao Yan-xin, Tan Wei, Sheng Wen-hua, et al. Identification of biomarkers associated with alzheimer's disease by bioinformatics analysis [J]. *American Journal of Alzheimers Disease and Other Dementias*, 2016, 31(2): 163-168.
- [12] Chang Fei, Zhang Lin-hong, Xu Wu-ping, et al. microRNA-9 attenuates amyloid beta-induced synaptotoxicity by targeting Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2014, 9(5): 1917-1922.
- [13] Kong Y, Wu J, Yuan L. MicroRNA expression analysis of a dult-onset Drosophila Alzheimer's disease model [J]. *Current Alzheimer Research*, 2014, 11(9): 882-891.
- [14] Cai L, Cai X. Up-regulation of miR-9 expression predicate advanced clinicopathological features and poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9(12): 1000.
- [15] Higashi T, Hayashi H, Ishimoto T, et al. miR-9-3p plays a tumour-suppressor role by targeting TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma cells [J]. *British Journal of Cancer*, 2015, 113(2): 252-258.
- [16] Zhang Jiang-bo, Cheng Jin, Zeng Zhen-zhen, et al. Comprehensive profiling of novel microRNA-9 targets and a tumor suppressor role of microRNA-9 via targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 42040-42052.
- [17] Drakaki A, Hatziaepostolou M, Polyarchou C, et al. Functional microRNA high throughput screening reveals miR-9 as a central regulator of liver oncogenesis by affecting the PPARA-CDH1 pathway [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(7): 542.
- [18] Sun Zhao, Han Qin, Zhou Na, et al. MicroRNA-9 enhances migration and invasion through KLF17 in hepatocellular carcinoma [J]. *Molecular Oncology*, 2013, 7(5): 884-894.
- [19] Liu Q-y, Chang M-n, Lei J-x, et al. Identification of microRNAs involved in Alzheimer's progression using a rabbit model of the disease [J]. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2014, 3(1): 33-44.
- [20] Romano GL, Platania CB, Forte S, et al. MicroRNA target prediction in glaucoma [J]. *Prog Brain Res*, 2015, 220(6): 217-240.
- [21] Kropivsek K, Pickford J, Carter DA. Postnatal dynamics of Zeb2 expression in rat brain; analysis of novel 3' UTR sequence reveals a miR-9 interacting site [J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2014, 52(1): 138-147.
- [22] Sim SE, Lim CS, Kim JI, et al. The Brain-Enriched MicroRNA miR-9-3p regulates synaptic plasticity and memory [J]. *Journal of Neuroscience*, 2016, 36(33): 8641-8652.
- [23] Liu Zhen, Wang Cun-fu, Wang Xiao, et al. Therapeutic effects of transplantation of As-MiR-937-Expressing mesenchymal stem cells in murine model of alzheimer's disease [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 37(1): 321-330.
- [24] Jung HJ, Coffinier C, Choe Y, et al. Regulation of prelamin A but not lamin C by miR-9, a brain-specific microRNA [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7): E423-E431.

(2018-05-11 收稿)