

# miR-369-3p对缺氧诱导海马神经元细胞增殖、凋亡的影响及其机制

吕喆<sup>1</sup>, 蒋晓刚<sup>2</sup>, 廉民学<sup>3</sup>

1. 西安大兴医院外科, 陕西 西安 710082;

2. 西安交通大学医学部生物化学与分子生物学系, 陕西 西安 710061;

3. 西安交通大学第一附属医院神经外科, 陕西 西安 710061

**【摘要】** 目的 探讨miR-369-3p对缺氧诱导的海马神经元细胞(Hhn)增殖、凋亡的影响及其作用机制。方法 将Hhn细胞置于持续充入95% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>的密闭培养箱中进行缺氧处理48 h(缺氧组),正常培养的细胞作为对照组。将miR-NC、miR-369-3p、anti-miR-NC、anti-miR-369-3p转染至Hhn细胞中,分别记为miR-NC组、miR-369-3p组、anti-miR-NC组、anti-miR-369-3p组;将anti-miR-NC、anti-miR-369-3p、pcDNA3.1、pcDNA3.1-NAMPT分别转染至Hhn细胞中再进行缺氧处理,分别记为缺氧+anti-miR-NC组、缺氧+anti-miR-369-3p组、缺氧+pcDNA3.1组、缺氧+pcDNA3.1-NAMPT组;将anti-miR-369-3p质粒分别与si-NC、si-NAMPT共转染至Hhn细胞中再进行缺氧处理,分别记为缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC组、缺氧+anti-miR-369-3p+si-NAMPT组;转染均采用脂质体法。实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测miR-369-3p表达水平;流式细胞术检测细胞凋亡;蛋白质印迹(Western blot)法检测细胞周期素D1(Cyclin D1)、p21、B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)和酰胺磷酸核糖转移酶(NAMPT)表达;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞增殖活性;超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒分别检测SOD活性和MDA含量;双荧光素酶报告基因检测miR-369-3p和NAMPT的靶向关系。**结果** 与对照组比较,缺氧组Hhn细胞中miR-369-3p表达水平升高,NAMPT表达水平降低,P21、Bax表达水平升高,Cyclin D1、Bcl-2表达水平降低,细胞活性降低,细胞凋亡率升高,SOD活性降低,MDA含量升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与缺氧+anti-miR-NC组比较,缺氧+anti-miR-369-3p组miR-369-3p表达水平降低,P21、Bax表达水平降低,Cyclin D1、Bcl-2表达水平升高,细胞活性升高,细胞凋亡率降低,SOD活性升高,MDA含量降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与缺氧+pcDNA3.1组比较,缺氧+pcDNA3.1-NAMPT组NAMPT表达水平升高,P21、Bax表达水平降低,Cyclin D1、Bcl-2表达水平升高,细胞活性升高,细胞凋亡率降低,SOD活性升高,MDA含量降低,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );与缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC组比较,缺氧+anti-miR-369-3p+si-NAMPT组P21、Bax表达水平升高,Cyclin D1、Bcl-2表达水平降低,细胞活性降低,细胞凋亡率升高,SOD活性降低,MDA含量升高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论** 抑制miR-369-3p表达可促进缺氧诱导的海马神经元细胞增殖,抑制细胞凋亡,减轻氧化应激反应,保护缺氧诱导的海马神经元细胞损伤,其机制可能与NAMPT相关,可为阿尔兹海默症的防治提供新思路和新靶点。

**【关键词】** Hhn细胞;miR-369-3p;酰胺磷酸核糖转移酶;缺氧诱导;海马神经元细胞;凋亡**【中图分类号】** R329.2<sup>\*1</sup> **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2020)16-2041-07

**Effect of miR-369-3p on hypoxia-induced hippocampal neuron cell proliferation and apoptosis and its mechanism.** LV Zhe<sup>1</sup>, JIANG Xiao-gang<sup>2</sup>, LIAN Min-xue<sup>3</sup>. 1. Department of Surgery, Xi'an Daxing Hospital, Xi'an 710082, Shaanxi, CHINA; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, CHINA; 3. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, Shaanxi, CHINA

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of miR-369-3p on hypoxia-induced hippocampal neuronal cell proliferation and apoptosis and its mechanism. **Methods** Hhn cells were placed in a closed incubator continuously filled with 95% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub> for hypoxia treatment for 48 h as a hypoxia group, and normal cultured cells were used as control group. miR-NC, miR-369-3p, anti-miR-NC, and anti-miR-369-3p were transfected into Hhn cells, which were recorded as miR-NC group, miR-369-3p group, and anti-miR-NC group, anti-miR-369-3p group, respectively; anti-miR-NC, anti-miR-369-3p, pcDNA3.1, pcDNA3.1-NAMPT were transfected into Hhn cells and then treated with hypoxia, recorded as hypoxia+anti-miR-NC group, hypoxia+anti-miR-369-3p group, hypoxia+pcDNA3.1 group, hypoxia+pcDNA3.1-NAMPT group, respectively; the anti-miR-369-3p was co-transfected with si-NC and si-NAMPT into Hhn cells and then treated with hypoxia, which were recorded as hypoxia+anti-miR-369-3p+si-NC group and hypoxia+anti-miR-369-3p+si-NAMPT group; transfection was performed by liposome method. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-369-3p; flow cytometry was used to detect apoptosis; Western blotting

(Western Blot) was used to detect the expression of Cyclin D1, p21, B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), and nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT); tetramethylazolum salt colorimetric assay (MTT) was applied to detect cell proliferation activity; superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) kits were used to detect SOD activity and MDA content, respectively; the dual luciferase reporter gene was applied to detect the targeting relationship between miR-369-3p and NAMPT. **Results** Compared with the control group, the expression levels of miR-369-3p, P21 and Bax, cell apoptosis rate, and MDA content in the Hhn cells of the hypoxia group was increased, and the expression of NAMPT, Cyclin D1 and Bcl-2, cell activity, and SOD activity was decreased, all with statistically significant differences ( $P < 0.05$ ). Compared with the hypoxia+anti-miR-NC group, the hypoxia+anti-miR-369-3p group was significantly decreased in the expression levels of miR-369-3p, P21 and Bax, cell apoptosis rate, and MDA content, but significantly increased in Cyclin D1 and Bcl-2, cell viability, SOD activity, with statistically significant difference ( $P < 0.05$ ). Compared with the hypoxia+pcDNA3.1 group, the hypoxia+pcDNA3.1-NAMPT group had significantly increased NAMPT levels, decreased P21 and Bax levels, increased Cyclin D1 and Bcl-2 levels, increased cell activity, reduced cell apoptosis rate, increased SOD activity, and decreased MDA content ( $P < 0.05$ ). Compared with the hypoxia+anti-miR-369-3p+si-NC group, the hypoxia+anti-miR-369-3p+si-NAMPT group had significantly increased P21 and Bax levels, decreased Cyclin D1 and Bcl-2, decreased cell viability, increased cell apoptosis rate, decreased SOD activity, and increased MDA content ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Inhibition of miR-369-3p expression can promote hypoxia-induced hippocampal neuronal cell proliferation, inhibit apoptosis, reduce oxidative stress, and protect hypoxia-induced hippocampal neuronal cell damage, the mechanism of which may be related to NAMPT. It will provide new ideas and new targets for the prevention and treatment of Alzheimer's disease.

**【Key words】** Hhn cells; miR-369-3p; NAMPT; Hypoxia induction; Hippocampal neuronal cells; Apoptosis

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性中枢神经系统退行性疾病,目前尚未有完全治愈的方法,神经元细胞凋亡是其主要病理特征之一<sup>[1]</sup>。因此,寻找可抑制神经元细胞凋亡的药物及治疗方式对AD的及早预防和治疗具有重要意义。研究AD的发病机制,以相应的病理因素为靶点,开发具有新药活性的药物是目前治疗AD的研究热点<sup>[2]</sup>。MicroRNA(miRNA)是一类内源性非编码小RNA,其可通过调控靶基因的表达参与细胞的凋亡过程,且在AD的发生、发展过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。有研究发现上调miR-369可以靶向下调SOX4抑制骨肉瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡<sup>[4]</sup>。miR-369-3p通过干扰血管内皮细胞生长因子C(vascular endothelial growth factor C, VEGFC)基因的表达可抑制膀胱癌细胞的增殖,促进膀胱癌细胞的凋亡<sup>[5]</sup>。miR-369-3p在过氧化氢刺激的海马神经元细胞中显著上调表达<sup>[6]</sup>。酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, NAMPT)是一种由脂肪细胞分泌的细胞因子,一个重要的神经保护因子,可能参与脑疾病的发生<sup>[7]</sup>。NAMPT还是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)合成的限速酶,其可能通过控制细胞和机体的NAD水平,从而影响细胞中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生以及抗氧化酶的表达,进而影响衰老进程或促进AD形成<sup>[8]</sup>。然而miR-369-3p、NAMPT对缺氧诱导的海马神经元细胞凋亡的影响及其机制尚不清楚。本实验用缺氧处理海马神经元细胞建立缺氧损伤模型,研究miR-369-3p对缺氧诱导海马神经元细胞凋亡的影响及其机制是否与NAMPT

有关,以期AD的病理研究提供一定的理论依据和为AD的治疗提供靶点。

## 1 材料与方法

1.1 材料与试剂 DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶购自美国Gibco公司;神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)多克隆抗体和SP免疫组化试剂盒(即用型)购自北京中山生物技术有限公司;Trizol试剂、荧光定量试剂盒购自上海翊试生物技术有限公司;四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)试剂盒购自上海联硕生物科技有限公司;膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)和碘化丙锭(PI)试剂盒购自上海经科化学科技有限公司;二辛可宁酸(BCA)试剂盒、RIPA蛋白裂解液购自北京百奥莱博科技有限公司;Bax、Bcl-2、Cyclin D1、P21、NAMPT、GAPDH多克隆抗体和山羊抗兔IgG-辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)购自北京博奥森生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒购自上海茁彩生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自武汉纯度生物科技有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 海马神经元细胞Hhn分离培养与鉴定 参考赵秀鹤等<sup>[9]</sup>研究方法,取12~20周龄引产的胎儿,常规消毒后开颅,分离双侧海马,置于DMEM培养液中,剔除血管和脑膜组织,剪碎,加入0.125%的胰酶,消化完全,800 r/min离心5 min,去上清,加入DMEM培养液再次离心去上清,再加入DMEM培养液重悬,在37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下培养,隔天换液一次,每天在显微镜下观察神经元生长情况,培养7~14 d时海马神经元

胞体饱满,呈椭圆形或多边形,树突发达,相互交错;培养10 d后用NSE多克隆抗体进行免疫组化实验,神经元细胞会被染成棕色,此时期大部分细胞均被染色,说明多为神经元细胞,取这一时期的细胞用于实验。

**1.2.2 细胞缺氧处理与分组** 将Hhn细胞用无血清低糖的DMEM培养基培养,置于持续充入95% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>的密闭培养箱中进行缺氧处理48 h,作为缺氧组,正常培养的细胞作为对照组。取对数生长期细胞Hhn,培养24 h后更换培养基,将miR-NC、miR-369-3p、anti-miR-NC、anti-miR-369-3p分别转染至Hhn细胞中,分别记为miR-NC组、miR-369-3p组、anti-miR-NC组、anti-miR-369-3p组;将anti-miR-NC、anti-miR-369-3p、pcDNA3.1、pcDNA3.1-NAMPT分别转染至Hhn细胞中再进行缺氧处理,分别记为缺氧+anti-miR-NC组、缺氧+anti-miR-369-3p组、缺氧+pcDNA3.1组、缺氧+pcDNA3.1-NAMPT组;将anti-miR-369-3p质粒分别与si-NC、si-NAMPT共转染至Hhn细胞中再进行缺氧处理,分别记为缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC组、缺氧+anti-miR-369-3p+si-NAMPT组。转染按照Lipofectamine™ 2000试剂盒进行操作。

**1.2.3 实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)检测 miR-369-3p 表达水平** 提取细胞总RNA,反转录成cDNA,按照荧光定量试剂盒说明进行PCR扩增,miR-369-3p以U6为内参,miR-369-3p正向引物序列:5'-CTCCTGGTACCTGAAGGGAGA-3',反向引物序列:5'-CTCCAAGGTGAGATTTGATACTGA-3';U6正向引物序列:5'-CGCTTCGGCACATATAC-3',反向引物序列:5'-TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'。反应条件:95℃变性30 s,60℃退火30 s;72℃延伸30 s,共40个循环。相对表达量采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法计算。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 收集细胞,漂洗后用结合缓冲液重悬,加入Annexin V-FITC和PI,避光孵育,上流式细胞仪进行检测。实验重复3次,每次设3个复孔。

**1.2.5 蛋白质印迹(Western blot)检测 CyclinD1、P21、Bcl-2、Bax和NAMPT蛋白表达水平** 提取细胞总蛋白,BCA法进行定量,电泳、转膜至PVDF,封闭2 h,加入一抗4℃孵育过夜;加入二抗室温孵育2 h,显影,定影,Quantity One软件测各条带灰度值,以目的条带和GAPDH条带的比值作为蛋白相对表达水平。

**1.2.6 MTT检测细胞增殖活性** 取分别培养24 h、48 h、72 h的细胞,加入20 μL的MTT溶液,继续培养4 h;吸去培养液后加150 μL的DMSO,振荡10 min,检测490 nm处吸光度(OD)值。细胞增殖活性(%)=实验组OD值/空白对照组OD值×100%。实验重复3次,每次

设3个复孔。

**1.2.7 SOD和MDA试剂盒分别检测SOD活性和MDA含量** 收集细胞磷酸盐缓冲液(PBS)清洗3遍,消化,吹打,800 r/min离心10 min得细胞沉淀;PBS再洗3遍,加0.5 mL PBS吹打均匀,超声10 min使细胞裂解,40 r/min离心10 min取上清液,用于SOD活性和MDA含量检测,具体步骤分别按照SOD和MDA试剂盒进行。

**1.2.8 双荧光素酶报告** 实验检测miR-369-3p对NAMPT的靶向调控TargetScan预测显示NAMPT 3'UTR区域有miR-369-3p的结合位点。构建含miR-369-3p的结合位点的NAMPT 3'UTR野生型和突变型荧光素酶表达载体WT-NAMPT和MUT-NAMPT,将其分别与miR-NC和miR-369-3p共转染至Hhn细胞中。按照说明书操作进行,检测荧光活性,实验重复3次。

**1.3 统计学方法** 应用SPSS20.00统计软件分析实验数据,计量资料符合正态分布,以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用t检验,以P<0.05表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 miR-369-3p、NAMPT在缺氧诱导的细胞Hhn中的表达** 与对照组相比,缺氧组Hhn细胞中miR-369-3p表达水平显著升高,NAMPT表达水平明显降低,差异有统计学意义(P<0.05),见图1和表1。

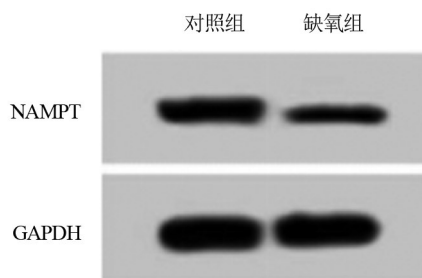


图1 NAMPT在缺氧诱导的细胞Hhn中的表达

表1 miR-369-3p、NAMPT在缺氧诱导的细胞Hhn中的表达( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	miR-369-3p	NAMPT
对照组	0.36±0.03	0.59±0.06
缺氧组	0.87±0.09	0.20±0.02
t值	16.128	18.499
P值	<0.05	<0.05

**2.2 抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn增殖、凋亡及SOD、MDA的影响** 与对照组相比,缺氧组Hhn细胞中miR-369-3p、P21、Bax表达水平明显升高,Cyclin D1、Bcl-2表达水平明显降低,细胞活性明显降低,细胞凋亡率明显升高,SOD活性明显降低,MDA含量明显升高,差异有统计学意义(P<0.05);与

缺氧+anti-miR-NC组相比,缺氧+anti-miR-369-3p组 Hhn 细胞中 miR-369-3p、P21、Bax 表达水平明显降低, Cyclin D1、Bcl-2 表达水平明显升高,细胞活性明

显升高,细胞凋亡率明显降低, SOD 活性明显升高, MDA 含量明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图2、表2和表3。

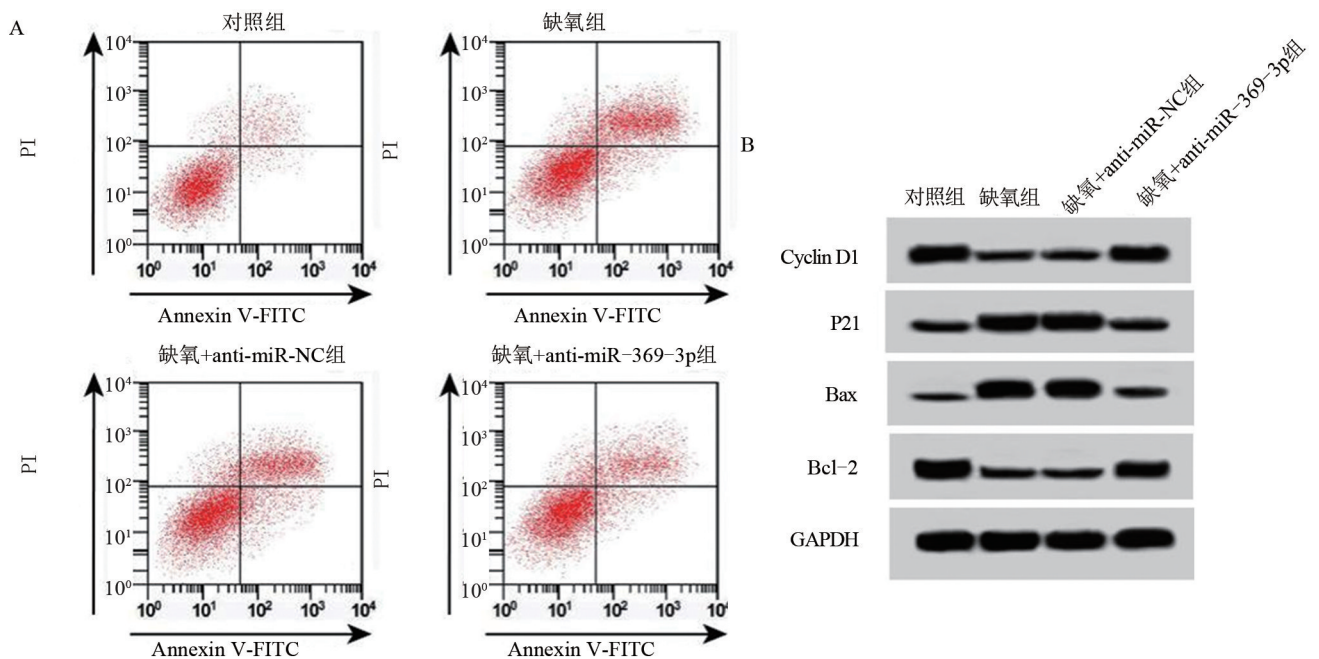


图2 抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn增殖、凋亡的影响

注:A,抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn凋亡的影响;B,抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn增殖、凋亡蛋白表达的影响。

表2 抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	miR-369-3p	Cyclin D1	P21	细胞活性(490 nm)		
				24 h	48 h	72 h
对照组	0.34±0.03	0.85±0.08	0.31±0.03	0.56±0.05	0.98±0.09	1.63±0.16
缺氧组	0.86±0.09 <sup>a</sup>	0.20±0.02 <sup>a</sup>	0.82±0.08 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>a</sup>	0.35±0.03 <sup>a</sup>	0.54±0.05 <sup>a</sup>
缺氧+anti-miR-NC组	0.83±0.08	0.22±0.02	0.84±0.08	0.22±0.02	0.34±0.03	0.55±0.05
缺氧+anti-miR-369-3p组	0.45±0.04 <sup>b</sup>	0.70±0.07 <sup>b</sup>	0.38±0.03 <sup>b</sup>	0.44±0.04 <sup>b</sup>	0.79±0.08 <sup>b</sup>	1.23±0.12 <sup>b</sup>
F值	147.529	327.942	195.514	202.959	228.000	230.207
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与缺氧+anti-miR-NC组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

表3 抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn凋亡及SOD、MDA的影响( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	SOD活性	MDA含量	Bax	Bcl-2	凋亡率(%)
对照组	101±10.27	100.21±10.34	0.14±0.01	0.94±0.09	7.11±0.75
缺氧组	38.56±3.92 <sup>a</sup>	296±22.98 <sup>a</sup>	0.85±0.08 <sup>a</sup>	0.23±0.02 <sup>a</sup>	25.61±2.63 <sup>a</sup>
缺氧+anti-miR-NC组	37.22±3.81	288±22.51	0.82±0.08	0.24±0.02	24.58±2.51
缺氧+anti-miR-369-3p组	70.29±7.36 <sup>b</sup>	165±12.37 <sup>b</sup>	0.31±0.03 <sup>b</sup>	0.76±0.07 <sup>b</sup>	12.39±1.36 <sup>b</sup>
F值	174.309	255.191	336.522	343.022	191.903
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与缺氧+anti-miR-NC组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ 。

2.3 miR-369-3p靶向、调控NAMPT的表达 TargetScan 在线软件预测显示 NAMPT 与 miR-369-3p 存在结合位点(图3A)。双荧光素酶报告实验结果(表4)显示,相较于 miR-NC 组, miR-369-3p 组转染野生型 NAMPT 载体的细胞 Hhn 荧光素酶活性明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );而转染突变型 NAMPT 载体的细胞 Hhn 荧光素酶活性差异无统计学意义( $P>0.05$ )。相较于 miR-NC 组, miR-369-3p 组 NAMPT 表达水平明显降低;相较于 anti-miR-NC 组, anti-miR-369-3p

组 NAMPT 表达水平明显升高,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见图3B和表5。

2.4 过表达 NAMPT 对缺氧诱导的细胞 Hhn 增殖、凋亡及 SOD、MDA 表达的影响 与缺氧+pcDNA3.1 组相比,缺氧+pcDNA3.1-NAMPT 组 Hhn 细胞中 P21、Bax 表达水平明显降低, NAMPT、Cyclin D1、Bcl-2 表达水平明显升高,细胞活性明显升高,细胞凋亡率明显降低, SOD 活性明显升高, MDA 含量明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图4、表6和表7。

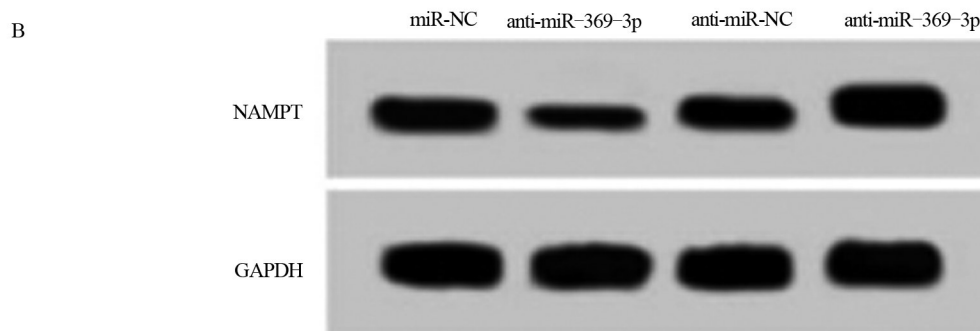
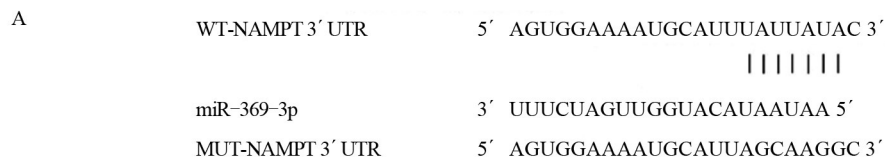


图3 miR-369-3p 靶向、调控 NAMPT

注:A, NAMPT的3' UTR含有miR-369-3p的互补序列;B, miR-369-3p调控NAMPT的表达。

表4 双荧光素酶报告实验( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	WT-NAMPT	MUT-NAMPT
miR-NC组	1.06±0.10	1.02±0.10
miR-369-3p组	0.41±0.04	0.98±0.10
t值	18.105	0.849
P值	<0.05	0.409

表5 miR-369-3p 调控 NAMPT 的表达( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	NAMPT
miR-NC组	0.53±0.05
miR-369-3p组	0.21±0.02 <sup>a</sup>
anti-miR-NC组	0.54±0.05
anti-miR-369-3p组	0.82±0.08 <sup>b</sup>
F值	189.661
P值	<0.05

注:与miR-NC组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与anti-miR-NC组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

2.5 抑制 NAMPT 表达能逆转抑制 miR-369-3p 对缺氧诱导的细胞 Hhn 增殖、凋亡及 SOD、MDA 表达的影响 与缺氧+anti-miR-NC 组相比,缺氧+anti-miR-369-3p 组 Hhn 细胞中 P21、Bax 表达水平明显降低, NAMPT、Cyclin D1、Bcl-2 表达水平明显升高, 细胞活性明显升高, 细胞凋亡率明显降低, SOD 活性明显升高, MDA 含量明显降低, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ); 与缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC 组相

缺氧+pcDNA3.1组 缺氧+pcDNA3.1-NAMPT组

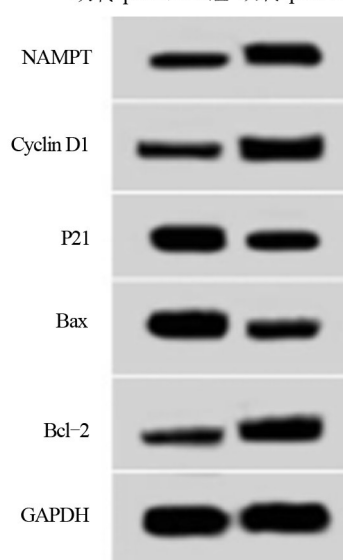


图4 过表达 NAMPT 对缺氧诱导的细胞 Hhn 增殖、凋亡蛋白表达的影响

比, 缺氧+anti-miR-369-3p+si-NAMPT 组 Hhn 细胞中 p21、Bax 表达水平明显升高, NAMPT、Cyclin D1、Bcl-2 表达水平明显降低, 细胞活性明显降低, 细胞凋亡率明显升高, SOD 活性明显降低, MDA 含量明显升高, 差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见图 5、表 8 和表 9。

表6 过表达 NAMPT 对缺氧诱导的细胞 Hhn 增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	NAMPT	Cyclin D1	P21	细胞活性(490 nm)		
				24 h	48 h	72 h
缺氧+pcDNA3.1组	0.21±0.02	0.22±0.02	0.84±0.08	0.22±0.02	0.34±0.03	0.55±0.05
缺氧+pcDNA3.1-NAMPT组	0.48±0.05	0.62±0.06	0.45±0.04	0.41±0.04	0.66±0.06	1.14±0.12
t值	15.041	18.974	13.081	12.746	14.311	13.615
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 7 过表达 NAMPT 对缺氧诱导的细胞 Hhn 凋亡及 SOD、MDA 的影响( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	SOD 活性	MDA 含量	Bax	Bcl-2	凋亡率(%)
缺氧+pcDNA3.1 组	37.22±3.81	288±22.51	0.82±0.08	0.24±0.02	24.58±2.51
缺氧+ pcDNA3.1-NAMPT 组	63.25±6.36	184±15.47	0.46±0.04	0.60±0.06	14.12±1.51
<i>t</i> 值	10.533	11.423	12.085	17.076	10.713
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

表 8 抑制 NAMPT 表达能逆转抑制 miR-369-3p 对缺氧诱导的细胞 Hhn 增殖的影响( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	NAMPT	Cyclin D1	P21	细胞活性(490 nm)		
				24 h	48 h	72 h
缺氧+anti-miR-NC 组	0.23±0.02	0.22±0.02	0.84±0.08	0.22±0.02	0.34±0.03	0.55±0.05
缺氧+anti-miR-369-3p 组	0.52±0.05 <sup>a</sup>	0.70±0.07 <sup>a</sup>	0.38±0.03 <sup>a</sup>	0.44±0.04 <sup>a</sup>	0.79±0.08 <sup>a</sup>	1.23±0.12 <sup>a</sup>
缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC 组	0.51±0.05	0.72±0.07	0.36±0.03	0.45±0.04	0.81±0.08	1.26±0.12
缺氧+anti-miR-369-3p+si-NAMPT 组	0.30±0.03 <sup>b</sup>	0.28±0.03 <sup>b</sup>	0.68±0.07 <sup>b</sup>	0.26±0.02 <sup>b</sup>	0.42±0.04 <sup>b</sup>	0.73±0.07 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值	123.810	230.919	151.237	128.625	141.020	126.854
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与缺氧+anti-miR-NC 组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05。

表 9 抑制 NAMPT 表达能逆转抑制 miR-369-3p 对缺氧诱导的细胞 Hhn 凋亡及 SOD、MDA 的影响( $\bar{x}\pm s, n=9$ )

组别	SOD 活性	MDA 含量	Bax	Bcl-2	凋亡率(%)
缺氧+anti-miR-NC 组	37.22±3.81	288±22.51	0.82±0.08	0.24±0.02	24.58±2.51
缺氧+anti-miR-369-3p 组	70.29±7.36 <sup>a</sup>	165±12.37 <sup>a</sup>	0.31±0.03 <sup>a</sup>	0.76±0.07 <sup>a</sup>	12.39±1.36 <sup>a</sup>
缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC 组	71.25±7.40	162±13.01	0.30±0.03	0.78±0.07	12.20±1.31
缺氧+anti-miR-369-3p+si-NAMPT 组	45.67±4.73 <sup>b</sup>	225±19.63 <sup>b</sup>	0.66±0.06 <sup>b</sup>	0.33±0.03 <sup>b</sup>	18.68±1.88 <sup>b</sup>
<i>F</i> 值	73.745	105.126	205.500	258.892	93.639
<i>P</i> 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与缺氧+anti-miR-NC 组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05;与缺氧+anti-miR-369-3p+si-NC 组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05。

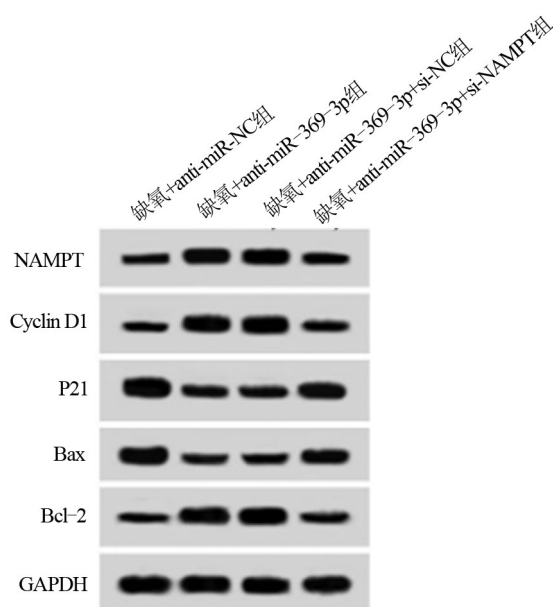


图 5 抑制 NAMPT 表达能逆转抑制 miR-369-3p 对缺氧诱导的细胞 Hhn 增殖、凋亡蛋白表达的影响

### 3 讨论

AD 发病机制复杂,氧化应激是其发生的重要因素之一<sup>[10]</sup>。有研究发现 AD 患者的海马组织中神经元凋亡率明显较高<sup>[11]</sup>;说明海马神经元细胞凋亡与 AD 的发生有关。而缺氧可诱导大鼠海马神经元凋亡<sup>[12]</sup>。

因此,本实验缺氧处理细胞 Hhn 建立 AD 细胞模型,结果显示,细胞凋亡率升高,细胞活性降低,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性降低,丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量升高;说明缺氧可诱导 Hhn 细胞凋亡和氧化应激的产生,从而导致 Hhn 细胞损伤;AD 细胞模型成功建立。

研究表明 miRNA 与 AD 的进展密切相关,药物的靶向治疗策略是 AD 的新治疗策略,miRNA 可作为 AD 新型药物研发的靶点<sup>[13]</sup>。有研究报道 AD 患者中 miR-369-3p 表达水平增加,miR-369-3p 可能与 AD 的发生发展有关<sup>[14]</sup>。研究报道抑制 miR-369-3p 表达可抑制细胞活力,促进放射诱导的细胞凋亡<sup>[15]</sup>。本实验结果显示,在缺氧处理的细胞 Hhn 中 miR-369-3p 高表达,抑制 miR-369-3p 表达可提高 CyclinD1、Bcl-2 表达水平,降低 p21、Bax 表达水平,降低细胞凋亡率,提高细胞活性,降低 SOD 活性,提高 MDA 含量。说明抑制 miR-369-3p 表达可抑制缺氧诱导的 Hhn 细胞凋亡和氧化应激反应,保护缺氧诱导的 Hhn 细胞损伤。

NAMPT 参与 NAD 的合成,与神经退行性疾病以及心脑血管疾病密切相关<sup>[16]</sup>。有研究报道老年小鼠脑

缺血情况下NAD水平明显降低,补充NAD对脑缺血具有保护作用<sup>[17]</sup>。此外,研究报道上调NAMPT可提高SAMP8小鼠的认知功能<sup>[18]</sup>。以上研究表明NAMPT可能参与脑部疾病的进展过程,但其对缺氧处理的神经元损伤的影响还尚不清楚。本实验结果显示,在缺氧处理的细胞Hhn中NAMPT低表达,过表达NAMPT可提高CyclinD1、Bcl-2表达水平,降低p21、Bax表达水平,降低细胞凋亡率,提高细胞活性,降低SOD活性,提高MDA含量。说明过表达NAMPT可抑制细胞凋亡和氧化应激反应,保护缺氧诱导的Hhn细胞损伤。此外,本实验还发现miR-369-3p靶向调控NAMPT;而抑制NAMPT表达能逆转抑制miR-369-3p对缺氧诱导的细胞Hhn增殖促进、凋亡抑制及提高SOD活性、降低MDA含量的作用。提示,miR-369-3p可能通过调控NAMPT影响缺氧诱导的细胞Hhn损伤。

综上所述,抑制miR-369-3p表达可促进缺氧诱导的海马神经元细胞增殖,抑制细胞凋亡,减轻氧化应激反应,即可保护缺氧诱导的海马神经元细胞损伤,其机制可能与NAMPT相关,将可为阿尔兹海默症的防治提供新思路和新靶点。

#### 参考文献

- [1] 吴琪. PCSK9介导脂质对海马神经元及PC12细胞凋亡的影响及机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2014.
- [2] 王硕, 陈乃宏, 苑玉和. 阿尔兹海默症靶向治疗方案的研究进展[J]. 中国药物警戒, 2018, 15(12): 755-760.
- [3] 何祥, 王涛, 杜晓光, 等. MicroRNA在阿尔兹海默病中的作用研究[J]. 生命科学, 2015, 27(5): 569-573.
- [4] 张翼, 李甲振, 张岩, 等. miR-369靶向调节SOX4表达对骨肉瘤细胞增殖和凋亡的调控作用[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(6): 40-43.
- [5] 赵振伶, 邵焕军, 郝丽娜, 等. miR-369-3p通过调控VEGFC基因表达对膀胱癌细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国医师杂志, 2018, 20(1): 92-95, 99.
- [6] 牛静亚. 氧化应激诱导小鼠海马神经元microRNA表达谱的改变及验证[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [7] 王培. Visfatin/Nampt作为新的血管活性物质以及作为脑卒中防治新靶标的研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2009.
- [8] 童玲. NAMPT在阿尔兹海默疾病模型大鼠脑中的表达变化[D]. 芜湖: 安徽师范大学, 2013.
- [9] 赵秀鹤, 迟兆富, 尚伟, 等. 无镁诱导体外培养人胚海马神经元癫痫样放电的实验[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(5): 1031-1033.
- [10] 王莹莹, 宋修云, 王奇, 等. 天然抗氧化剂在阿尔兹海默病中的应用研究进展[J]. 神经药理学报, 2015, 5(6): 30-34.
- [11] 许浩, 胡祥友, 秦松, 等. 阿尔兹海默病海马凋亡神经元发生率增高[J]. 神经科学通报(英文版), 2002, 18(1): 462-465.
- [12] 柯荔宁, 王玮, 林凌, 等. 缺氧对大鼠海马神经元生物学功能的影响[J]. 神经解剖学杂志, 2009, 25(2): 135-140.
- [13] 孟凡琳. 阿尔兹海默症中生物活性小分子与microRNA关联网络的构建与特性分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨医科大学, 2014.
- [14] GALIMBERTI D, SERPENTE M, FENOGLIO C, et al. Role of OLR1 and its regulating hsa-miR369-3p in Alzheimer's disease: genetic and expression analysis [J]. J Alzheimers Dis, 2011, 26(4): 787-793.
- [15] ZOU Y, YAO S, CHEN X, et al. LncRNA OIP5-AS1 regulates radio-resistance by targeting DYRK1A through miR-369-3p in colorectal cancer cells [J]. Eur J Cell Biol, 2018, 97(5): 369-378.
- [16] 王峰, 张纬萍. 尼克酰胺磷酸核糖转移酶与衰老及衰老相关疾病研究进展[J]. 浙江大学学报(医学版), 2011, 40(6): 680-684.
- [17] 陆佳彤. 神经元NAD水平下降对神经元一星形胶质细胞代谢耦联的影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [18] 魏江平, 付文君, 陈欢, 等. 通络醒脑泡腾片经Nampt/SIRT1/FOXO3途径改善SAMP8小鼠的学习记忆[J]. 中成药, 2017, 39(4): 684-689.

(收稿日期: 2020-01-16)