

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.12.007

MiR-124 对先天性甲低新生鼠神经元凋亡的影响 *

邵庆亮¹ 姜 伟² 庄德利² 姚 笠² 张名硕¹ 许晓红^{1Δ}

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 哈尔滨医科大学附属第二医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:探讨 miR-124 在甲状腺功能低下新生大鼠海马神经元凋亡中的作用。**方法:**将 16 只孕 SD 雌鼠随机分为实验组和对照组,分别于两组仔鼠 1、5、10、15 日龄称重取血,用化学发光法测定血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、血清游离甲状腺素(FT4)及促甲状腺激素(TSH)水平。将大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,固定在脑立体定位仪,处死后收集其海马,应用荧光定量 PCR 和免疫荧光技术检测 agomir 的干预效率,确定干预有效后进行建模。观察注射后大鼠行为学改变,NeuN 染色法检测海马区脑组织神经元细胞凋亡情况。**结果:**实验组血清 TSH 水平明显高于对照组,而 FT3、FT4 水平明显低于对照组。同正常对照组相比,甲状腺功能减退组中阳性神经元数量明显减少、细胞轮廓模糊、不清晰。经 miR-124 模拟处理后,神经细胞的数量和形态明显改善。**结论:**miR-124 对先天性甲状腺功能低下新生鼠神经元凋亡起到保护作用。

关键词:先天性甲状腺功能低下;脑神经元凋亡;miR-124;海马组织;聚合酶链式反应

中图分类号:Q573;R322.51;R-33;R335.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)12-2233-04

The Effect of MIR-124 on the Neurons Apoptosis of Neurons in the Newborn Rats with Congenital Hypothyroidism*

SHAO Qing-liang¹, JIANG Wei², ZHUANG De-li², YAO Li², ZHANG Ming-shuo¹, XU Xiao-hong^{1Δ}

(1 The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of miR-124 on the neuronal apoptosis induced by congenital hypothyroidism.

Methods: 16 female SD rats were randomly divided into the experimental group and the control group, the blood samples were collected from both groups of rats at 1, 5, 10 and 15 days, respectively. The serum levels of FT3, FT4 and TSH were measured by chemiluminescence method. The rats were anesthetized with injection of 2% pentobarbital sodium, fixed in brain stereo positioning instrument, the hippocampus was collected from the mouse after being killed. The efficiency of agomir intervention was detected by fluorescence quantitative PCR and immunofluorescence technique, and the model was established after the intervention was effective. The behavioral changes of rats were observed, and apoptosis of brain tissue neurons in hippocampus was detected by NeuN staining. **Results:** The level of serum TSH in the experimental group was significantly higher than that in the control group, while the levels of FT3 and FT4 in the experimental group were significantly lower than those in the control group. Compared with the normal control group, the number of positive neurons in the hypothyroid group was significantly decreased, and the outline of the cells was obscure and unclear. After miR-124 treatment, the number and morphology of nerve cells were significantly improved. **Conclusion:** Mir-124 protects neuronal apoptosis in neonatal rats with congenital hypothyroidism.

Key words: Congenital hypothyroidism; Brain neuron apoptosis; MiR-124; Hippocampal tissue; Polymerase chain reaction

Chinese Library Classification(CLC): Q573; R322.51; R-33; R335.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)12-2233-04

前言

先天性甲状腺功能低下 (congenital hypothyroidism, CH) 是小儿常见的内分泌疾病,以出生时甲状腺激素水平下降、促甲状腺激素升高为特征,分为暂时性 CH 和永久性 CH^[1]。甲状腺激素对哺乳动物的脑发育起重要作用,其缺乏而造成的脑损伤

是不可逆的。甲状腺素调节脑发育主要有两条途径,即干扰神经细胞的增殖与凋亡^[2,3]。以往研究大多集中于细胞增殖、迁移和分化。

细胞凋亡是神经系统发育过程中的重要环节,参与神经系统的塑形和改建,维持神经结构的正常发育。近年来,随着大量小分子 RNA 的发现,人们已经认识到 miRNA 在神经系统的

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12541286)

作者简介:邵庆亮(1977-),男,博士研究生,副主任医师,主要研究方向:新生儿疾病,

E-mail: shaoqingliang@souhu.com, 电话: 0451-82576758

Δ 通讯作者:许晓红(1983-),女,硕士研究生,主治医师,主要研究方向:小儿消化系统疾病,

E-mail: suijing126@163.com, 电话: 0451-85939165

(收稿日期:2019-02-28 接受日期:2019-03-23)

发育及可塑性中发挥重要作用,并与神经系统有关疾病的发生发展关系密切^[4],miR-124 与肿瘤、神经退行性疾病等多种疾病的发生发展有关,参与了神经干细胞的自我更新、发育、增殖和分化等过程^[20-22]。尽管 microRNAs 在近几年成为研究热点,但对它在细胞凋亡中的作用仍尚不明确^[5]。

miR-124 是中枢神经系统中含量最多的一种 miRNA, miR-124 的高表达提示其在中枢神经系统中有着极其重要的作用,且血浆 miR-124 水平在不同时间点的变化尚存在争议^[24-27]。因此 miR-124 也成为分子生物学和神经生物学最受关注的 miRNA 之一^[6-8]。甲状腺激素对包括海马在内的中枢神经系统的发育有重要作用,凋亡在发育中的大脑功能活动中发挥着十分关键的作用,miR-124 的高表达提示其在中枢神经系统中有着极其重要的作用。因此,研究 miR-124 与甲状腺功能低下神经元凋亡之间的关系是揭示甲状腺激素调控脑发育机制的重要方向,可能为防治甲低性脑损害提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

16 只孕 SD 雌鼠,体重 250-270 g,称重并编号。随机取 8 只自孕 15 天起每日丙基硫氧嘧啶 50 mg(1.7% 2.9 mL)灌胃作为实验组,出生后仔鼠生长发育迟缓及血清 FT4 水平明显下降纳入研究;其余 8 只不加任何处理的孕鼠所产仔鼠作为对照组。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 获取血清 分别于仔鼠 1、5、10、15 日龄称重取血,用化学发光法测定血清 FT3、FT4 及 TSH,试剂盒的批内 CV<5%,批间 CV<10%。为获得足量的血清,1、5 日龄分别需采集 4 个仔鼠血清作为一个样本。

1.2.2 收集海马 将大鼠用 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,固定在脑立体定位仪。在囟门后 1 毫米和前囟中线 1.7 毫米附近,打开头骨。微型注射器垂直注射,速度 15 μ m/秒,总量 3.8 mm;

5 μ L 1 nmol/L miR-124 模拟溶液注入。新生鼠死亡后,取脑分离海马,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋。

1.2.3 PCR 引物设计 用于 PCR 的引物设计:miR-124 正向引物 5-GCTAAGGCACGCGGTG-3', 反向引物 5'-GT-GCAGGGTCCGAGGT-3';U6 正向引物 5'-CTCGCTTCG-GCAGCACATATACT-3', 反向引物 5'-ACGCTTCAC-GAATTTGCGTGTC-3'。

1.2.4 PCR 反应条件 PCR 反应条件为,预变性温度 95 $^{\circ}$ C、5 分钟,依次是变性温度 95 $^{\circ}$ C、30 秒;退火温度 60 $^{\circ}$ C、30 秒和延伸温度 72 $^{\circ}$ C、30 秒共 40 个这样的循环。最后延伸 72 $^{\circ}$ C、5 分钟。

1.3 统计学分析

所有数据的统计分析采用 SPSS10.0 for Windows 统计软件进行数据处理,多组间计量资料的差异进行方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组血清 TSH、FT3、FT4 水平的比较

对照组中,新生鼠体重增加、毛发发育良好。实验组中大鼠生长相对缓慢,毛稀、短尾、活动较少。促甲状腺激素(TSH)是由腺垂体分泌的、促进甲状腺的生长和机能的激素,为判定甲状腺功能的主要指标。新生鼠出生后 1 天、5 天、10 天和 15 天时,对照组血清 TSH 水平分别为 1.27 ± 0.62 、 1.36 ± 0.45 、 1.24 ± 0.82 和 1.42 ± 0.33 ;实验组血清 TSH 水平分别为 3.88 ± 0.23 、 3.25 ± 0.30 、 3.73 ± 0.71 和 3.88 ± 0.42 。实验组不同时点血清 TSH 水平均明显高于对照组($P<0.05$)。

新生鼠出生后 1 天、5 天、10 天和 15 天时,对照组血清 FT3 水平分别为 4.12 ± 0.33 、 6.13 ± 0.45 、 7.54 ± 0.47 和 8.42 ± 0.73 ;实验组血清 FT3 水平分别为 2.11 ± 0.54 、 3.25 ± 0.47 、 4.73 ± 0.72 和 4.21 ± 0.33 。实验组不同时点血清 FT3 水平均明显低于对照组($P<0.05$)。

表 1 新生鼠不同日龄血清 TSH 水平(mU/L)

Table 1 Serum TSH level of New born rats with different days

Groups	1 st day	5 th day	10 th day	15 th day
Control group	1.27 ± 0.62	1.36 ± 0.45	1.24 ± 0.82	1.42 ± 0.33
Experimental group	$3.88 \pm 0.23^{**}$	$3.25 \pm 0.30^{**}$	$3.73 \pm 0.71^{**}$	$3.88 \pm 0.42^{**}$

表 2 新生鼠不同日龄血清 FT3 水平(mU/L)

Table 2 Serum FT3 level of New born rats with different days

Groups	1 st day	5 th day	10 th day	15 th day
Control group	4.12 ± 0.33	6.13 ± 0.45	7.54 ± 0.47	8.42 ± 0.73
Experimental group	$2.11 \pm 0.54^{**}$	$3.25 \pm 0.47^{**}$	$4.73 \pm 0.72^{**}$	$4.21 \pm 0.33^{**}$

表 3 新生鼠不同日龄血清 FT4 水平(mU/L)

Table 3 Serum FT4 level of New born rats with different days

Groups	1 st day	5 th day	10 th day	15 th day
Control group	5.12 ± 0.42	10.23 ± 0.75	17.53 ± 1.23	19.26 ± 1.34
Experimental group	$2.52 \pm 0.56^{**}$	$2.64 \pm 0.65^{**}$	$4.23 \pm 0.74^{**}$	$2.54 \pm 0.56^{**}$

血清游离甲状腺素(FT4)是甲状腺功能体外试验的灵敏指标 即使出现生理或病理情况引起血浆甲状腺结合蛋白结合力和浓度改变时 也能较准确地反映甲状腺的功能。新生鼠出生后第 1、5、10、15 天时,正常对照组血清 FT4 水平分别为 5.12 ± 0.42 、 10.23 ± 0.75 、 17.53 ± 1.23 和 19.26 ± 1.34 ;模型组血清 FT4 水平分别为 2.52 ± 0.56 、 2.64 ± 0.65 、 4.23 ± 0.74 和 2.54 ± 0.56 。实验组血清 FT4 水平均明显低于对照组($P < 0.05$)。

2.2 海马染色观察 miR-124 对神经细胞保护作用

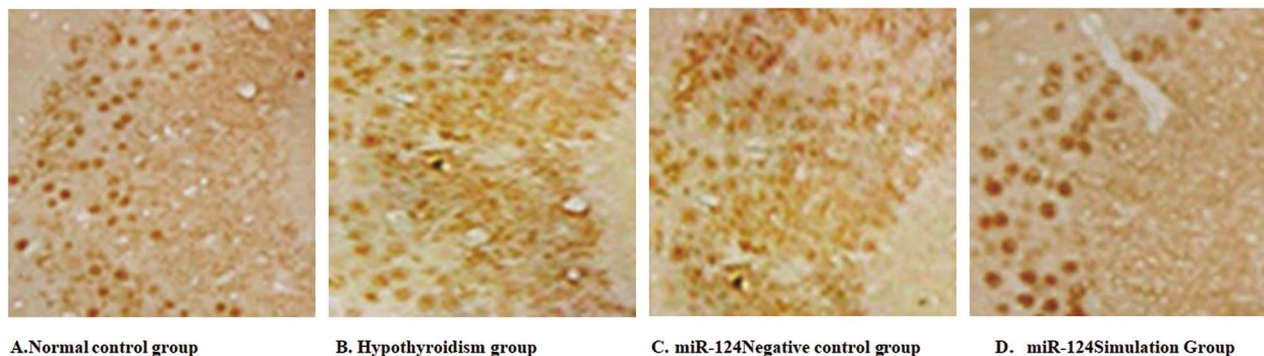


图 1 神经元细胞的数量和形态

Fig.1 Number and morphology of neurons

3 讨论

甲状腺激素可直接作用于染色体和转录水平的神经基础层,导致脑组织形态学和生化改变,脑功能损害。据国外统计显示,新生儿甲状腺功能减退症发病率为 1/2000~1/4 000,而相关研究统计显示^[19],我国甲状腺功能减退症发病率大约为 1/2 033,且存在明显的地域区别,现我国卫生部将先天性甲状腺功能减退症规定为新生儿疾病检查的项目之一,先天性甲状腺功能减退症新生儿临床筛查多采用足跟干血滴免疫分析法^[27-30],胎儿期缺碘或甲状腺功能低下是引起出生后语言、认知、行为和运动障碍的一个重要原因,症状起于新生儿期或婴儿期,分散性及地方性两类^[18],在缺碘地区发病率较高,对患儿神经系统发育可造成一定的影响^[23],临床表现为甲状腺功能异常引起的发育迟缓和神经系统缺陷的病例广泛存在^[9,10]。在神经发育的关键时刻,即使是短时间的甲状腺激素缺乏也可导致海马神经元功能损害或不可逆的损伤,这典型特点是海马神经元凋亡数升高^[11]。

多种方法可以检测到细胞凋亡,包括形态学,生物化学和流式细胞仪等。目前的主流方法是由光镜或电镜观察的 NeuN 染色^[12,13]。海马 NeuN 染色清楚地显示了神经元细胞的数量和形态。甲状腺功能减退组中阳性神经元数量明显减少、细胞轮廓模糊、不清晰。经 miR-124 模拟处理后,神经细胞的数量和形态明显改善。miR-124 是一种中枢神经系统特异性的 miRNA^[17],结合文献^[14]中各种微小 RNAs 对神经细胞凋亡的保护作用,以及 miR-124 对中风引起的神经细胞凋亡的保护作用,我们推测 miR-124 在患有甲状腺功能低下大鼠中亦起到了保护作用。

神经元 NeuN 染色结果显示甲状腺功能低下组中,神经元数量减少并且细胞轮廓发生了变化^[15]。总之,我们的研究结果表明,miR-124 能保护甲状腺功能低下引起的大鼠神经细胞凋亡。作为一种新的细胞凋亡的调节器,miR-124 可作为甲状腺

海马 NeuN 染色清楚地显示了神经元细胞的数量和形态。同正常对照组相比,甲状腺功能减退组中阳性神经元数量明显减少、细胞轮廓模糊、不清晰,且形态学观察显示,在该组神经细胞中,大量出现细胞体积缩小、细胞质浓缩、核固缩和碎裂等典型凋亡形态学改变。经 miR-124 模拟处理后,神经细胞的数量和形态明显改善,细胞凋亡数较前明显减少。同时,在加入 miR-124 模拟物处理后,miR-124 由过度表达状态逐渐趋于正常。实验结果如图 1 所示。

功能减退引起的神经损伤的神经保护材料。miRNA 对甲状腺功能低下的作用机制仍不清楚,有待于进一步的调查研究。

miR-124 是脑组织中表达最为丰富的一类 miRNA,主要在成熟的神经元中表达。若将 miR-124 感染到多种细胞中,可导致一系列非神经元转录物的表达受到抑制,将诱导这类细胞的基因组表达方式向神经方向转化,在 miR-124 的参与下,成纤维细胞将重新编程,直接诱导分化为神经细胞^[16]。实验结果表明 miR-124 对甲状腺功能减退大鼠海马神经元凋亡起到抑制作用。

参考文献(References)

- [1] Sun Y, Gui H, Li Q, et al. MicroRNA-124 protects neurons against apoptosis in cerebral ischemic stroke [J]. CNS Neurosci Ther, 2013, 19: 813-819
- [2] Mishima T, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, et al. RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS [J]. Brain Res, 2007, 1131: 37-43
- [3] 李岩松. 先天性甲状腺功能减低模型大鼠脑中 EphA5 表达及 DNA 甲基化的调控[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(49): 7976-7981
- [4] Taniguchi K, Sugito N, Kumazaki M, et al. MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTB1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer [J]. Cancer Letters, 2015, 363(1): 17-27
- [5] 李玉, 王波, 但齐琴. 胎鼠海马神经元培养及其鉴定[J]. 昆明医学院学报, 2011, 32(5): 17-19
- [6] X Li, Z Yu, Y Li, et al. The tumor suppressor miR-124 inhibits cell proliferation by targeting STAT3 and functions as a prognostic marker for postoperative NSCLC patients [J]. International Journal of Oncology, 2015, 46(2): 798-808
- [7] Qin W, Pan Y, Zheng X, et al. MicroRNA-124 regulates TGF- α -induced epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer cell [J]. Int J Oncol, 2014, 45(3): 1225-1231
- [8] 杨海河, 张玉敏, 丁辉. 先天性甲状腺功能减低症远期预后的影响

- 因素[J].中国儿童保健杂志, 2008, 16(3): 326-328
- [9] 姜雪锦, 王晓蓉, 王菁, 等. 先天性甲状腺功能低下症疗效评估及相关因素分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2013, 21(4): 342-344
- [10] 周永新, 刘俊, 李海英, 等. 缺氧缺血性脑病新生大鼠海马 EphA5 受体 mRNA 表达与神经元凋亡的关系[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2013, 11: 1521-1523
- [11] 陈倩, 王斌, 周正, 等. 先天性甲状腺功能减退症伴发育不全患儿 FOXE1 基因突变的初步研究[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(14): 2703-2706
- [12] Li X, Yi S, Deng Y. MiR-124 protects human hepatic L02 cells from H₂O₂-induced apoptosis by targeting Rab38 gene [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450: 148-153
- [13] QL Shao, W Jiang, Y Jin. MiR-124 effect in neurons apoptosis in newborn rat with thyroid hypofunction [J]. International Journal of Clinical & Experiment, 2015, 8(11): 14465
- [14] Y González-Giraldo, A Camargo, S López-León, et al. A functional SNP in MIR124-1-a brain expressed miRNA gene, is associated with aggressiveness in a Colombian sample[J]. European Psychiatry, 2015, 30(4): 499-503
- [15] Kapoor R, Fanibunda SE, Desouza LA, et al. Perspectives on thyroid hormone action in adult neurogenesis [J]. J Neurochem, 2015, 133: 599-616
- [16] X Li, Z Yu, Y Li, et al. The tumor suppressor miR-124 inhibits cell proliferation by targeting STAT3 and functions as a prognostic marker for postoperative NSCLC patients [J]. International Journal of Oncology, 2015, 46(2): 798-808
- [17] 谢尊椿, 刘彬, 周美鸿, 等. 急性缺血性脑卒中患者血浆 miR-124 表达变化及其意义[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(03): 345-345
- [18] 王琼, 黎曼依, 党峰, 博等. 新生儿先天性甲状腺功能减低症筛查中促甲状腺激素切值得探讨[J]. 中国妇幼保健, 2019, 35(03): 507-508
- [19] 常剑锋. 肇庆市新生儿先天性甲状腺功能减低症筛查中促甲状腺激素切值的建立与应用 [J]. 深圳中西医结合杂志, 2016, 26(15): 26-27
- [20] Morgado AL, Xavier JM, Dionísio PA, et al. MicroRNA-34a Modulates Neural Stem Cell Differentiation by Regulating Expression of Synaptic and Autophagic Proteins [J]. Mol Neurobiol, 2015, 51(3): 1168-1183
- [21] Gioia U, Di Carlo V, Caramanica P, et al. Mir-23a and mir-125b regulate neural stem/progenitor cell proliferation by targeting Musashi1 [J]. RNA Biol, 2014, 11(9): 1105-1112
- [22] Liu Z, Zhao R. Small regulators making big impacts: regulation of neural stem cells by small non-coding RNAs [J]. Neural Regen Res, 2017, 12(3): 397-398
- [23] 刘颖, 田永波. 黔南地区新生儿先天性甲状腺功能减退症影响因素分析[J]. 中国妇幼保健, 2017, 32(3): 509-511
- [24] Sun M, Hou X, Guang R, et al. Dynamic changes in miR-124 levels in patients with acute cerebral infarction[J]. Int J Neurosci, 2018: 1-18
- [25] Ji Q, Ji Y, Peng J, et al. Increased brain-specific miR-9 and miR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients [J]. PLoS One, 2016, 11(9): e163645
- [26] Liu Y, Zhang J, Han R, et al. Downregulation of serum brain specific microRNA is associated with inflammation and infarct volume in acute ischemic stroke[J]. J Clin Neurosci, 2015, 22(2): 291-295
- [27] 卢燕红, 林进, 张振关, 等. 妊娠期糖尿病亚临床甲状腺功能减退症筛查及管理模式探讨 [J]. 国际医药卫生导报, 2015, 21(21): 3127-3130
- [28] 林敏, 钱小泉, 郑建红, 等. 亚临床甲状腺功能减退症孕期筛查及意义[J]. 中国现代医生, 2015, 15(21): 45-47, 50
- [29] 郭琼, 赵梅. 妊娠期甲状腺疾病临床筛查指标及亚临床甲状腺功能减退症对妊娠结局的影响分析 [J]. 中国妇幼保健, 2016, 31(24): 5321-5323
- [30] 明丹, 郑荣秀. 新生儿及母亲临床特征对先天性甲状腺功能减退症筛查的影响[J]. 天津医药, 2018, 46(7): 742-746

(上接第 2223 页)

- [19] Schneider MR, Schmidt-Ullrich R, Pans R. The hair follicle as a dynamic miniorgan[J]. Curr Biol, 2009, 19: 132-142
- [20] 宋志强, 郝飞. 毛乳头及毛囊生长调控的若干研究进展[J]. 重庆医学, 2003, 32(8): 1087-1090
- [21] W.Ouyang, S.Rutz, N.K.Crellin, et al. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease [J]. Annu.Rev. Immunol, 2011, 29: 71-109
- [22] Rojas JM, Avia M, Martin V, et al. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections[J]. J Immunol Res, 2017, 35(8): 1-14
- [23] W.K.Eddie Ip, Namiko Hoshi, Dror S. Shouval. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages[J]. Science, 2017, 356(6337): 513-519
- [24] Deng Zhi-li, Lei Xiao-hua, Zhang Xu-dong, et al. mTOR signaling promotes stem cell activation via counter-balancing BMP-mediated suppression during hair regeneration[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2015, 7(1): 62-72
- [25] 李国泉, 邓盈军, 陈利明, 等. 白芍总苷联合得宝松局部注射治疗斑秃的疗效观察及其对血清 TNF- γ 和 IL-10 的影响[J]. 中国中西医结合皮肤性病杂志, 2016, 3(15): 145-147
- [26] 周国茂, 马新华. 神应养真丹对斑秃患者血清和上清液 IL-10 水平的影响[J]. 湖北中医杂志, 2016, 38(8): 12-14
- [27] 王力, 高瑞岭, 吴海建, 等. 自拟疏肝补肾方联合窄谱中波紫外线治疗斑秃[J]. 长春中医药大学学报, 2016, 32(3): 586-588
- [28] 侯占英, 李华明. 自拟补肾养血益精汤治疗斑秃的疗效及对血管内皮细胞生长因子和毛囊中相关分子表达的影响 [J]. 中医药信息, 2018, 35(1): 66-69
- [29] 王怀良. 临床药理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2015: 6-10
- [30] 杨宝峰, 陈建国. 药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 10-12