

miR-145-3p 通过调控 CaMkk β /AMPK/CREB 通路对 MPP⁺ 诱导 PD 细胞模型线粒体自噬的影响

文晓东¹, 罗宁¹, 周欣梅¹, 卢建政¹, 曾振¹, 张艺¹, 王春玲²

摘要 目的 探讨 miR-145-3p 对 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (MPP⁺) 诱导的帕金森病 (PD) 细胞模型线粒体自噬的影响及其机制。方法 将人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 分为对照组、模型组、模拟物 (mimics) 组、钙调蛋白依赖性蛋白激酶 β (CaMkk β) 抑制剂 (STO-609) 组、mimics + STO-609 组、环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (CREB) 抑制剂 (KG-501) 组、mimics + KG-501 组和 STO-609 + KG-501 组。流式细胞术检测细胞凋亡, 透射电镜观察自噬体结构, Western blot 检测凋亡、自噬和 CaMkk β /腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/CREB 通路相关蛋白的表达。结果 与对照组相比, 模型组细胞凋亡率、Bcl-2 关联 X 蛋白 (Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 和微管相关蛋白轻链 3-I (LC3-I) 蛋白表达水平均升高 ($P < 0.01$), 自噬体结构减少, B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、自噬基因 (Beclin-1)、微管相关蛋白轻链 3-II (LC3-II)、磷酸化钙调蛋白依赖性蛋白激酶 β (p-CaMkk β)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (p-AMPK)、磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (p-CREB) 蛋白水平均降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, mimics 组细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 和 LC3-I 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), 自噬体结构增多, Bcl-2、Beclin-1、LC3-II、p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), STO-609 组和 KG-501 组趋势相同均与 mimics 组相反; 与 mimics 组相比, mimics + STO-609 组和 mimics + KG-501 组细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 和 LC3-I 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), 自噬体结构减少, Bcl-2、Beclin-1、LC3-II、p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白水平降低 ($P < 0.01$); 与 STO-609 组相比, STO-609 + KG-501 组细胞凋亡率、Bax、Caspase-3 和 LC3-I 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$), 自噬体结构减少, Bcl-2、Beclin-1、LC3-II、p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白水平降低 ($P < 0.05$)。结论 miR-145-3p 能够抑制 MPP⁺ 诱导的 PD 细胞模型的凋亡, 促进线粒体自噬, 其机

制可能与促进 CaMkk β /AMPK/CREB 通路的激活有关。

关键词 miR-145-3p; CaMkk β /AMPK/CREB 通路; 帕金森病; 线粒体自噬; 细胞凋亡

中图分类号 R 749

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)11-1846-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.11.008

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是一种复杂的神经退行性疾病。研究^[1-2]表明, 线粒体功能障碍、氧化应激、自噬受损和神经炎症等均与 PD 的发生密切相关。目前, PD 的治疗主要以药物治疗为主, 但长期服用会产生不良反应, 因此, 研究 PD 的发病机制对于 PD 的治疗具有重要意义。线粒体异常被认为是包括 PD 在内的多种神经退行性疾病的一个重要靶点, 清除受损线粒体的唯一途径是线粒体自噬, 这提示刺激线粒体自噬可作为延缓 PD 患者神经退行性过程的一种有效的方法^[3]。

miR-145-3p 是一种新发现的 miRNA, 研究^[4]表明, miR-145-3p 参与包括自噬在内的多种细胞生物学过程的调控, 但关于 miR-145-3p 在 PD 中的作用还未有报道。自噬过程受到多种信号通路的调控, 其中钙调蛋白依赖性蛋白激酶 β (calmodulin-dependent protein kinase β , CaMkk β)/腺苷酸活化蛋白激酶 (adenylate activated protein kinase, AMPK) 通路与自噬密切相关, 并可激活下游环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, CREB), 参与多种神经退行性疾病^[5]。因此, 该研究通过构建 1-甲基-4-苯基吡啶离子 (1-methyl-4-phenylpyridinium ion, MPP⁺) 诱导的 PD 细胞模型, 研究 miR-145-3p 对 PD 细胞模型线粒体自噬的影响及其机制, 为深入了解 PD 的发病机制及寻找新的治疗靶点提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 购自中科院细胞库, DMEM/F12 购自美国 Hyclone 公司, CaMkk β 抑制剂 STO-609 购自美国 Selleck 公司,

2023-06-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82060888); 广西自然科学基金 (编号: 2022JJA140430); 广西壮族自治区中医药管理局课题 (编号: GZZC2020107); 广西中医药大学校级课题 (编号: 2020MS049)

作者单位: ¹ 广西中医药大学附属瑞康医院脑病一区, 南宁 530011

² 广西中医药大学药学院, 南宁 530000

作者简介: 文晓东, 男, 博士, 副主任医师;

王春玲, 女, 助理研究员, 讲师, 责任作者, E-mail: cling-wang1216@163.com

CERB 抑制剂 KG-501 购自美国 MCE 公司, CCK-8 购自北京索莱宝科技有限公司, qRT-PCR 试剂盒购自日本 TAKARA 公司, AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司, 兔抗 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Beclin-1、LC3-I、LC3-II、CaMkk β 、AMPK、CREB 和 HRP 标记的二抗均购自武汉 Bioswamp 公司, 兔抗磷酸化钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶 β (phosphorylated calmodulin-dependent protein kinase kinase β , p-CaMkk β) 购自美国 Invitrogen 公司, 兔抗磷酸化腺苷活化蛋白激酶 (phosphorylated cadenylate activated protein kinase, p-AMPK) 购自美国 Abcam 公司, 兔抗磷酸化环磷酸腺苷反应元件结合蛋白 (phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein, p-CREB) 购自美国 GeneTex 公司, 钨酸、枸橼酸铅购自北京中镜科仪技术有限公司, 醋酸铀购自西安鼎天化工有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及 MPP⁺ 诱导 PD 细胞模型的构建

SH-SY5Y 细胞用含 15% 胎牛血清和 1% 青-链霉素的高糖 DMEM 培养液置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 细胞融合度达到 80% 时按照 1:2 的比例进行传代, 选取对数期生长的细胞进行实验。利用 250 μ mol/L 的 MPP⁺ 干预处理 SH-SY5Y 细胞 24 h, 构建 PD 细胞模型^[6]。CCK-8 检测细胞的增殖能力, 结果显示 MPP⁺ 处理后细胞增殖能力降低, 表明 PD 细胞模型构建成功。

1.2.2 细胞转染及转染效率鉴定 合成并构建 miR-145-3p 的 mimics 及对应的 NC, 转入 MPP⁺ 诱导 PD 细胞模型中, 以未做处理的 SH-SY5Y 细胞和未转染的 MPP⁺ 诱导损伤 PD 细胞模型为对照, 分别提取各组细胞的总 RNA, qRT-PCR 法检测 miR-145-3p 的表达, 验证转染效率。结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞中 miR-145-3p 水平降低; 与模型组相比, mimics 组细胞中 miR-145-3p 水平升高, 而 mimics-NC 组细胞中 miR-145-3p 水平无明显变化, 表明转染成功。

1.2.3 细胞分组及处理 将细胞分为 8 组: 对照组、模型组、mimics 组、STO-609 组、mimics + STO-609 组、KG-501 组、mimics + KG-501 组、STO-609 + KG-501 组。对照组细胞不做处理; 其余组细胞均用 250 μ mol/L 的 MPP⁺ 诱导 24 h, mimics 组细胞转入 miR-145-3p mimics; STO-609 组加入 20 μ mol/L STO-609^[7]; mimics + STO-609 组先加入 20 μ mol/L STO-609 处理 1 h, 再转入 miR-145-3p mimics; KG-

501 组加入 5 nmol/L KG-501^[8]; mimics + KG-501 组先加入 5 nmol/L KG-501 处理 1 h, 再转入 miR-145-3p mimics; STO-609 + KG-501 组同时加入 20 μ mol/L STO-609 和 5 nmol/L KG-501。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组处理完成的细胞, 取 1×10^6 个培养基重悬的细胞, 弃上清液, 加入 1 ml 预冷的 PBS, 混匀后弃上清液, 200 μ l PBS 重悬细胞沉淀, 加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI, 混匀, 4 °C 避光孵育 30 min, 最后加入 300 μ l PBS, 随即进行流式检测。

1.2.5 透射电镜观察自噬泡和自噬体 收集各组细胞用 2.5% 戊二醛预固定 30 min 以上, 0.1 mol/L PBS 缓冲液清洗 3 次, 1% 钨酸后固定 1 h, PBS 缓冲液清洗 3 次后, 50% ~ 90% 乙醇梯度脱水, 90% 丙酮脱水, 100% 丙酮 2 次脱水, 包埋后超薄切片机切片, 厚度约为 60 nm, 醋酸铀和枸橼酸铅双染, 透射电镜观察并拍照。

1.2.6 Western blot 检测凋亡、自噬和 CaMkk β /AMPK/CREB 通路相关蛋白的表达 细胞取出后, 吸弃培养液, 预冷的 PBS 洗涤 2 次后, 加入裂解液, 充分裂解后将细胞转移至 1.5 ml EP 管中, 取上清液 BCA 法进行蛋白质定量。上样电泳, 湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 4 °C 过夜, 加入一抗稀释液室温孵育 1 h, 洗膜后加入二抗稀释液, 室温孵育 1 h, 洗膜后 ECL 显影, TANON GIS 读取条带灰度值。

1.3 统计学处理 用 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-145-3p 对 MPP⁺ 诱导 PD 模型细胞凋亡率的影响 与对照组相比, 模型组细胞凋亡率升高; 与模型组相比, mimics 组细胞凋亡率降低, KG-501 组和 STO-609 组细胞凋亡率升高; 与 mimics 组相比, mimics + STO-609 组和 mimics + KG-501 组细胞凋亡率均升高; 与 STO-609 组相比, STO-609 + KG-501 组细胞凋亡率升高 ($F = 1.085.53, P < 0.01$)。见表 1 和图 1。

2.2 miR-145-3p 调控 MPP⁺ 诱导 PD 模型细胞中凋亡相关蛋白的表达 与对照组相比, 模型组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高; 与模型组相比, mimics 组细胞中 Bcl-2

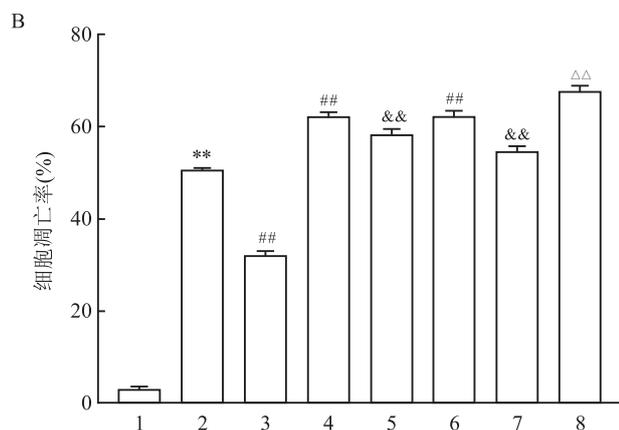
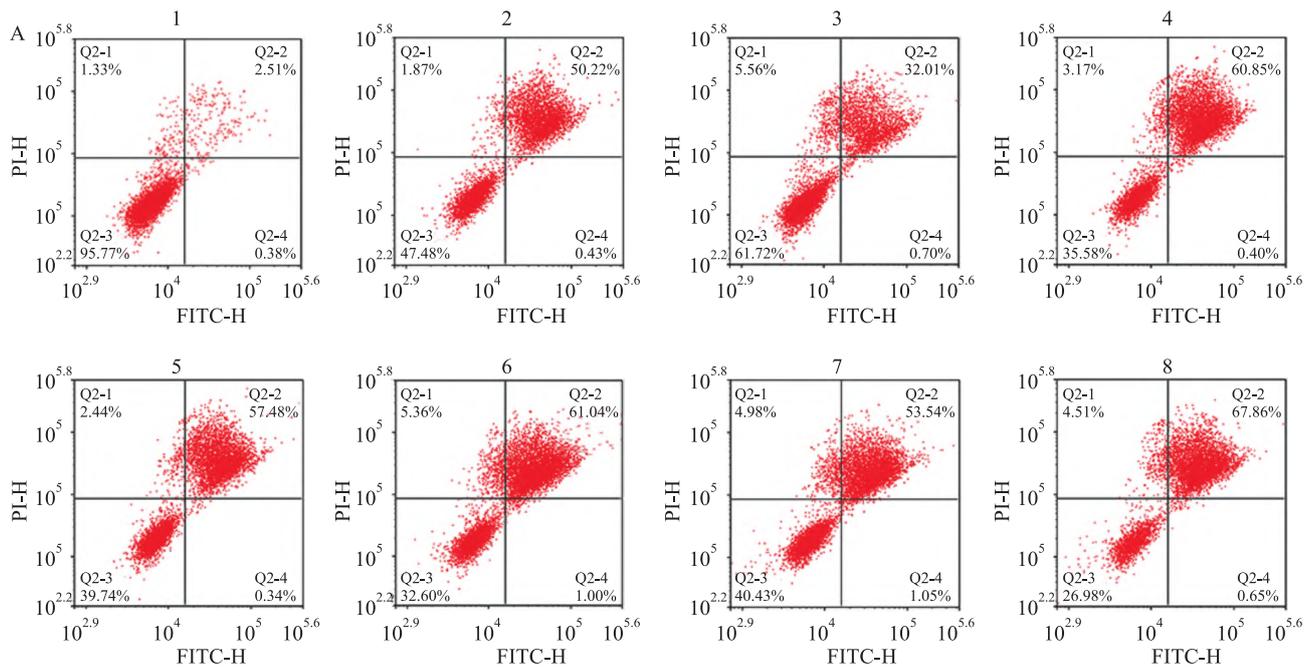


图 1 各组细胞凋亡率的比较

A: Annexin V/PI 流式细胞术结果图; B: Annexin V/PI 流式细胞术结果统计图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: mimics 组; 4: STO-609 组; 5: mimics + STO-609 组; 6: KG-501 组; 7: mimics + KG-501 组; 8: STO-609 + KG-501 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与 mimics 组比较: && $P < 0.01$; 与 STO-609 组比较: ΔΔ $P < 0.01$

表 1 各组细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	细胞凋亡率(%)
对照	2.98 ± 0.50
模型	50.63 ± 0.31
mimics	32.06 ± 0.84
STO-609	62.16 ± 1.04
mimics + STO-609	58.31 ± 0.98
KG-501	62.26 ± 1.02
mimics + KG-501	54.61 ± 1.01
STO-609 + KG-501	67.75 ± 0.99

蛋白表达水平升高, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平降低, STO-609 组和 KG-501 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高; 与 mimics 组相比, mimics + STO-609 组和 mimics + KG-501 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高; 与 STO-609 组相比,

STO-609 + KG-501 组细胞中 Bcl-2 蛋白表达水平降低, Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高。Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达差异均有统计学意义 ($F = 243.15, P < 0.01$; $F = 657.83, P < 0.01$; $F = 344.55, P < 0.01$)。见表 2 和图 2。

表 2 各组细胞内 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Bcl-2	Bax	Caspase-3
对照	0.70 ± 0.00	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.03
模型	0.54 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.27 ± 0.01
mimics	0.63 ± 0.00	0.09 ± 0.02	0.16 ± 0.01
STO-609	0.24 ± 0.03	0.55 ± 0.02	0.58 ± 0.03
mimics + STO-609	0.41 ± 0.04	0.25 ± 0.01	0.45 ± 0.01
KG-501	0.24 ± 0.02	0.57 ± 0.01	0.59 ± 0.00
mimics + KG-501	0.42 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.45 ± 0.02
STO-609 + KG-501	0.10 ± 0.02	0.65 ± 0.01	0.68 ± 0.03

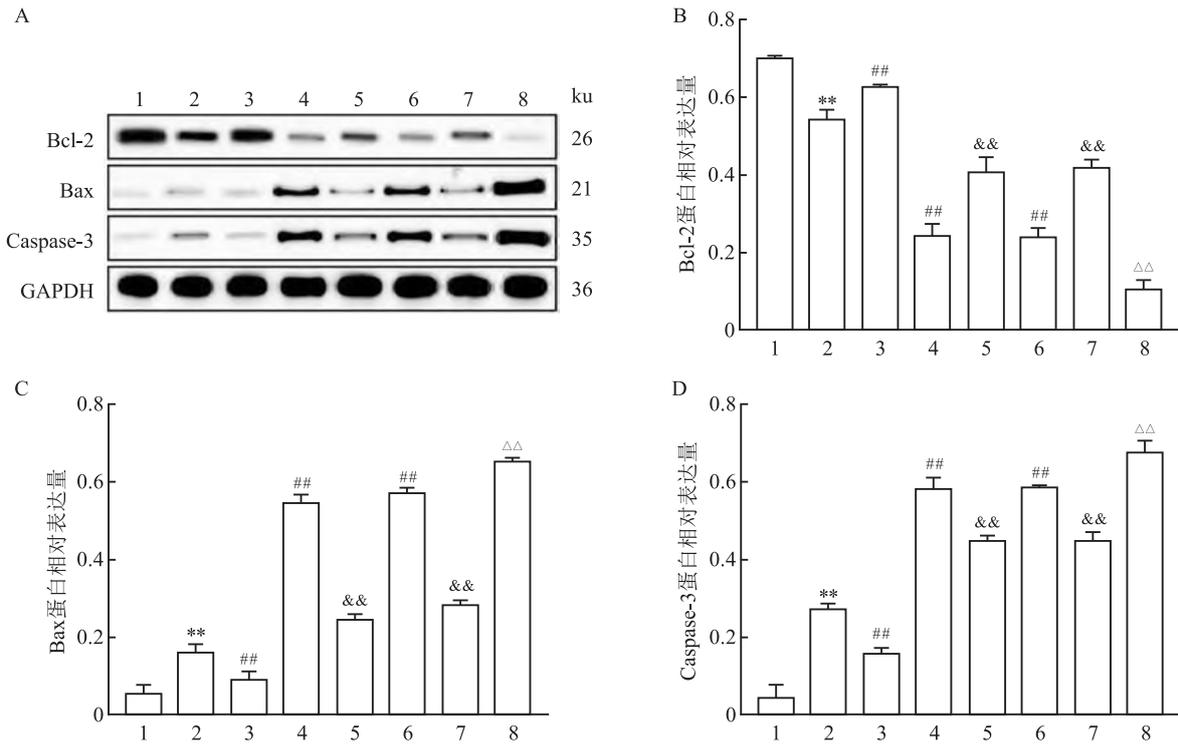


图2 各组细胞凋亡相关蛋白的表达

A: Western blot 实验结果图; B: Western blot 检测 Bcl-2 表达结果统计图; C: Western blot 检测 Bax 表达结果统计图; D: Western blot 检测 Caspase-3 表达结果统计图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: mimics 组; 4: STO-609 组; 5: mimics + STO-609 组; 6: KG-501 组; 7: mimics + KG-501 组; 8: STO-609 + KG-501 组; 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$; 与 mimics 组比较: && $P < 0.01$; 与 STO-609 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

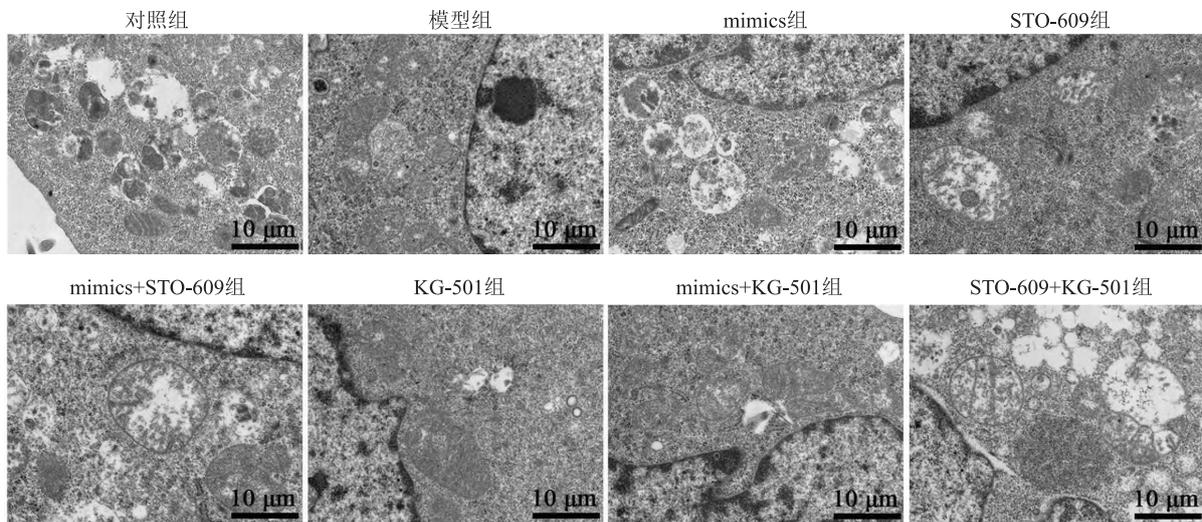


图3 各组细胞透射电镜观察结果 $\times 12\ 000$

2.3 miR-145-3p 对 MPP⁺ 诱导 PD 模型细胞中自噬的影响 对照组细胞内可见大量自噬体结构; 模型组细胞内自噬体结构较对照组明显减少; mimics 组细胞内自噬体结构较模型组增多, 而 STO-609 组和 KG-501 组细胞内自噬体结构较模型组进一步减少; 与 mimics 组相比, mimics + STO-609 组和 mimics

+ KG-501 组细胞内自噬体结构均减少; STO-609 + KG-501 组较 STO-609 组和 KG-501 组自噬体结构进一步减少。见图 3。

2.4 miR-145-3p 调控 MPP⁺ 诱导 PD 模型细胞中自噬相关蛋白的表达 与对照组相比, 模型组细胞中 Beclin-1 和 LC3-II 蛋白表达水平降低 ($P <$

0.01), LC3- I 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, mimics 组细胞中 Beclin-1 和 LC3- II 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), LC3- I 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), STO-609 组和 KG-501 组细胞中 Beclin-1 和 LC3- II 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), LC3- I 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 与 mimics 组相比, mimics + STO-609 组和 mimics + KG-501 组细胞中 Beclin-1 和 LC3- II 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), LC3- I 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 与 STO-609 组相比, STO-609 + KG-501 组细胞中 Beclin-1 和 LC3- II 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), LC3- I 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$)。Beclin-1、LC3- I 和 LC3- II 蛋白表达差异均有统计学意义 ($F = 405.45, P < 0.01; F = 177.03, P < 0.01; F = 333.62, P < 0.01$)。见表 3 和图 4。

2.5 miR-145-3p 促进 MPP⁺ 诱导 PD 细胞模型 CaMkk β /AMPK/CREB 通路的激活 与对照组相比, 模型组细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 与模型组相比, mimics 组细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白表达水

平升高 ($P < 0.01$), STO-609 组和 KG-501 组细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 与 mimics 组相比, mimics + STO-609 组和 mimics + KG-501 组细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$); 与 STO-609 组相比, STO-609 + KG-501 组细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。CaMkk β 、AMPK 和 CREB 的磷酸化差异均有统计学意义 ($F = 1498.40, P < 0.01; F = 89.77, P < 0.01; F = 329.24, P < 0.01$)。见表 4 和图 5。

表 3 各组细胞内 Beclin-1、LC3- I 和 LC3- II 蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Beclin-1	LC3- I	LC3- II
对照	0.70 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	0.57 \pm 0.01
模型	0.63 \pm 0.01	0.23 \pm 0.03	0.44 \pm 0.01
mimics	0.70 \pm 0.00	0.17 \pm 0.02	0.56 \pm 0.01
STO-609	0.32 \pm 0.02	0.43 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01
mimics + STO-609	0.44 \pm 0.01	0.30 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03
KG-501	0.36 \pm 0.01	0.44 \pm 0.03	0.20 \pm 0.01
mimics + KG-501	0.42 \pm 0.02	0.34 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02
STO-609 + KG-501	0.07 \pm 0.03	0.54 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01

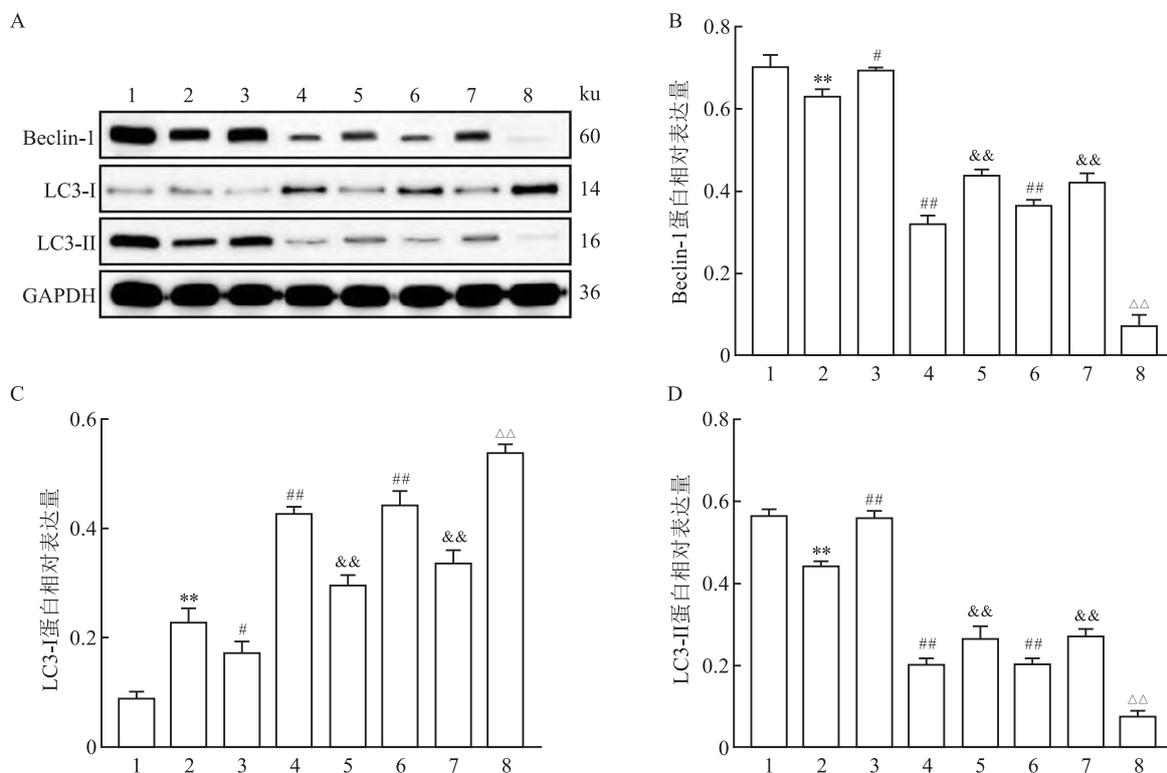


图 4 各组细胞中自噬相关蛋白表达水平的比较

A: Western blot 实验结果图; B: Western blot 检测 Beclin-1 表达结果统计图; C: Western blot 检测 LC3- I 表达结果统计图; D: Western blot 检测 LC3- II 表达结果统计图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: mimics 组; 4: STO-609 组; 5: mimics + STO-609 组; 6: KG-501 组; 7: mimics + KG-501 组; 8: STO-609 + KG-501 组; 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 mimics 组比较: && $P < 0.01$; 与 STO-609 组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

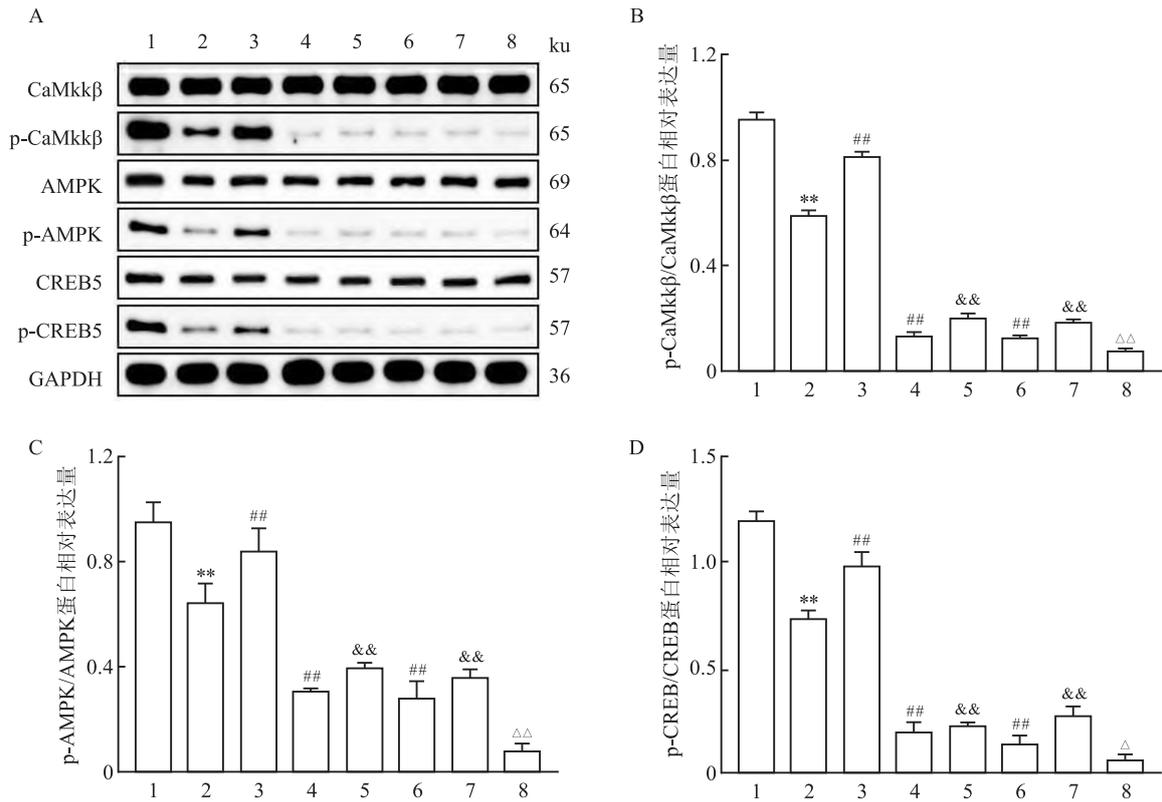


图5 各组细胞中CaMkkβ/AMPK/CREB通路相关蛋白表达水平的比较

A: Western blot 实验结果图; B: Western blot 检测 p-CaMkkβ/CaMkkβ 表达结果统计图; C: Western blot 检测 p-AMPK/AMPK 表达结果统计图; D: Western blot 检测 p-CREB/CREB 表达结果统计图; 1: 对照组; 2: 模型组; 3: mimics 组; 4: STO-609 组; 5: mimics + STO-609 组; 6: KG-501 组; 7: mimics + KG-501 组; 8: STO-609 + KG-501 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与 mimics 组比较: && $P < 0.01$; 与 STO-609 组比较: Δ $P < 0.05$, ΔΔ $P < 0.01$

表4 各组细胞内 p-CaMkkβ/CaMkkβ、p-AMPK/AMPK 和 p-CREB/CREB 的蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	p-CaMkkβ /CaMkkβ	p-AMPK /AMPK	p-CREB /CREB
对照	0.95 ± 0.03	0.95 ± 0.07	1.20 ± 0.04
模型	0.59 ± 0.02	0.65 ± 0.07	0.73 ± 0.04
mimics	0.81 ± 0.02	0.84 ± 0.09	0.98 ± 0.06
STO-609	0.13 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.19 ± 0.04
mimics + STO-609	0.20 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.22 ± 0.02
KG-501	0.13 ± 0.01	0.28 ± 0.07	0.14 ± 0.04
mimics + KG-501	0.18 ± 0.01	0.36 ± 0.03	0.27 ± 0.04
STO-609 + KG-501	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.02

3 讨论

线粒体自噬可选择性地清除细胞内受损或多余的线粒体,以维持细胞内线粒体数量和功能的正常,线粒体自噬功能紊乱在包括 PD 在内的神经退行性疾病中发挥关键作用。当神经细胞暴露于 MPP⁺ 等神经毒素中时,会引起神经细胞的自噬和死亡的增加^[9]。该实验的结果显示,MPP⁺ 处理的 SH-SY5Y 细胞的凋亡率升高,而转染 miR-145-3p mimics 后细

胞凋亡率降低,这表明 miR-145-3p 能够抑制 PD 细胞模型的凋亡,具有保护 PD 细胞模型的作用。众所周知,细胞凋亡是一个受多基因控制的过程,Bcl-2 家族成员的抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax 共同调控细胞凋亡。当 Bax 的活性高于 Bcl-2 时,Bax 的构象发生变化并易位到线粒体膜上,促进细胞色素 C 释放到细胞质中,并促进 Caspase-3 的活化,启动线粒体途径的细胞凋亡^[10]。该实验检测了 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达,结果显示,转染 miR-145-3p mimics 后细胞中 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平较模型组降低,Bcl-2 蛋白表达水平较模型组升高,提示 miR-145-3p 可能通过抑制线粒体途径凋亡而抑制 PD 细胞模型的凋亡。

为了探讨 miR-145-3p 对 MPP⁺ 诱导的 PD 细胞模型线粒体自噬的影响,该实验利用透射电镜观察了细胞内的自噬体结构,结果显示,转染 miR-145-3p mimics 后细胞中自噬结构增多,表明 miR-145-3p 能够促进 PD 细胞模型中的线粒体自噬。Beclin-1 是一种线粒体自噬调控蛋白,可作为自噬标志物用于

自噬水平的检测^[11]。Beclin-1 上调能够增强线粒体自噬水平,从而发挥保护细胞的作用。Beclin-1 可与 LC3 结合形成复合物参与自噬体的形成,当发生自噬时,LC3- I 发生泛素化与自噬膜表面的物质结合形成 LC3- II,因此,LC3- II 可作为检测自噬活性的标志物^[12]。该结果显示,转染 miR-145-3p mimics 后 PD 细胞模型中 Beclin-1 和 LC3- II 蛋白水平升高,LC3- I 蛋白水平降低,进一步表明 miR-145-3p 能够促进 MPP⁺ 诱导的 PD 细胞模型的线粒体自噬,具有保护神经元的作用。

CaMkk β /AMPK 通路介导线粒体自噬,激活 CaMkk β /AMPK 通路可以促进细胞的自噬^[13]。有研究^[14]表明 CaMkk β /AMPK 通路与神经元中的线粒体自噬相关,CaMkk β 可激活 AMPK,AMPK 激活后可促进 TSC2 活化发生磷酸化,从而激活 CREB,CREB 是一种转录增强因子,能够促进神经元的成熟和神经递质的释放,与包括 PD 在内的多种神经退行性疾病密切相关^[15]。为了明确 miR-145-3p 调控 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞线粒体自噬发挥神经元保护的作用机制,该实验检测了 CaMkk β /AMPK/CREB 通路相关蛋白的磷酸化水平,结果显示,转染 miR-145-3p mimics 后,PD 细胞模型中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 水平升高,表明 miR-145-3p 具有调控 CaMkk β /AMPK/CREB 通路的作用。为了进一步明确其机制,该实验又利用 CaMkk β 抑制剂 STO-609 和 CREB 抑制剂 KG-501 处理细胞,结果显示,STO-609 和 KG-501 均能降低 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 的水平,且转染 miR-145-3p mimics 后细胞中 p-CaMkk β 、p-AMPK、p-CREB 的水平均升高,这表明 miR-145-3p 可通过促进 CaMkk β /AMPK/CREB 通路的激活来促进线粒体自噬,从而发挥神经元保护作用。

参考文献

[1] Raza C, Anjum R, Shakeel N U A. Parkinson's disease: mechanisms, translational models and management strategies[J]. Life Sci, 2019, 226: 77-90.

[2] Schneider R B, Iourinets J, Richard I H. Parkinson's disease psychosis: presentation, diagnosis and management[J]. Neurodegener Dis Manag, 2017, 7(6): 365-76.

[3] Malpartida A B, Williamson M, Narendra D P, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: from mechanism to therapy[J]. Trends Biochem Sci, 2021, 46(4): 329-43.

[4] 杨正祥, 谢陆莉, 邓琳, 等. miR-145-3p 靶向 HDAC4 调控人牙周膜成纤维细胞的自噬机制研究[J]. 河北医药, 2021, 43(9): 1312-5.

[5] Seo W D, Lee J H, Jia Y, et al. Saponarin activates AMPK in a calcium-dependent manner and suppresses gluconeogenesis and increases glucose uptake via phosphorylation of CRT2 and HDAC5[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2015, 25(22): 5237-42.

[6] 王春玲, 罗宁, 文晓东, 等. 乌梅总黄酮对 MPP⁺ 诱导 SH-SY5Y 细胞线粒体损伤的保护作用[J]. 重庆医学, 2022, 51(12): 1981-6.

[7] Li C, Zhang C, Zhou H, et al. Inhibitory effects of betulinic acid on LPS-induced neuroinflammation involve M2 microglial polarization via CaMkk β -dependent AMPK activation[J]. Front Mol Neurosci, 2018, 11: 98.

[8] Cai H Q, Zhang M J, Cheng Z J, et al. FKBP10 promotes proliferation of glioma cells via activating AKT-CREB-PCNA axis[J]. J Biomed Sci, 2021, 28(1): 13.

[9] Wang X W, Yuan L J, Yang Y, et al. IGF-1 inhibits MPTP/MPP⁺-induced autophagy on dopaminergic neurons through the IGF-1R/PI3K-Akt-mTOR pathway and GPER[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2020, 319(4): E734-43.

[10] Gao J, Tian X, Yan X, et al. Selenium exerts protective effects against fluoride-induced apoptosis and oxidative stress and altered the expression of Bcl-2/Caspase family[J]. Biol Trace Elem Res, 2021, 199(2): 682-92.

[11] 梅静, 喇宏玲, 徐桂萍. 自噬激活在抑制丙泊酚诱导的神经元凋亡中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(10): 1552-8.

[12] Ma Y, Li C, He Y, et al. Beclin-1/LC3- II dependent macroautophagy was uninfluenced in ischemia-challenged vascular endothelial cells[J]. Genes Dis, 2021, 9(2): 549-61.

[13] Sun B, Ou H, Ren F, et al. Propofol inhibited autophagy through Ca²⁺/CaMkk β /AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury[J]. Mol Med, 2018, 24(1): 58.

[14] 王春玲, 罗宁, 蒋媛静, 等. 基于 CaMkk β /AMPK 通路介导线粒体自噬探讨敛肝熄风止颤方的神经保护机制[J]. 世界中医药, 2021, 16(5): 765-8.

[15] Krasner N M, Ido Y, Ruderman N B, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e97554.

Effects of miR-145-3p on mitophagy in MPP⁺-induced PD cell model by regulating the CaMkk β /AMPK/CREB pathway

Wen Xiaodong¹, Luo Ning¹, Zhou Xinmei¹, Lu Jianzheng¹, Zeng Zhen¹, Zhang Yi¹, Wang Chunling²

(¹Brain Disease Area 1, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011; ²College of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000)

Abstract *Objective* To investigate the effect and mechanism of miR-145-3p on mitophagy in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced Parkinson's disease (PD) cell model. *Methods* Human neuroblastoma cells (SH-SY5Y) were divided into control group, model group, mimics group, calmodulin-dependent protein kinase kinase β (CaMkk β) inhibitor (STO-609) group, mimics + STO-609 group, cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (CREB) inhibitor (KG-501) group, mimics + KG-501 group and STO-609 + KG-501 group. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, autophagosome structure was observed by transmission electron microscopy, and apoptosis, autophagy and CaMkk β /adenylate activated protein kinase (AMPK)/CREB pathway related protein expression were detected by Western blot. *Results* Compared with control group, the apoptosis rate, Bcl-2-associated X protein (Bax), cysteine proteinase-3 (Caspase-3) and microtubule-associated protein light chain 3-I (LC3-I) protein expression levels in model group increased ($P < 0.01$), and the autophagosome structure decreased. The protein levels of B cell lymphoma-2 (Bcl-2), autophagy gene (Beclin-1), microtubule-associated protein light chain 3-II (LC3-II), phosphorylated calmodulin-dependent protein kinase kinase β (p-CaMkk β), phosphorylated cadenylate activated protein kinase (p-AMPK), and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein (p-CREB) decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the apoptosis rate, Bax, Caspase-3 and LC3-I protein expression levels in mimics group decreased ($P < 0.05$), and the autophagosome structure increased. The protein levels of Bcl-2, Beclin-1, LC3-II, p-CaMkk β , p-AMPK, p-CREB increased ($P < 0.05$). The trend of STO-609 group and KG-501 group was the same and opposite to mimics group. Compared with mimics group, the apoptosis rate, Bax, Caspase-3 and LC3-I protein expression levels in the mimics + STO-609 group and the mimics + KG-501 group increased ($P < 0.01$), and the autophagosome structure decreased. The protein levels of Bcl-2, Beclin-1, LC3-II, p-CaMkk β , p-AMPK, p-CREB protein levels decreased ($P < 0.01$). Compared with STO-609 group, the apoptosis rate, Bax, Caspase-3 and LC3-I protein expression levels of STO-609 + KG-501 group increased ($P < 0.01$), and the autophagosome structure decreased. The protein levels of Bcl-2, Beclin-1, LC3-II, p-CaMkk β , p-AMPK and p-CREB decreased ($P < 0.05$). *Conclusion* miR-145-3p can inhibit the apoptosis of MPP⁺-induced PD cell model and promote mitophagy, and its mechanism may be related to the activation of the CaMkk β /AMPK/CREB pathway.

Key words miR-145-3p; CaMkk β /AMPK/CREB pathway; Parkinson's disease; mitophagy; apoptosis