文章编号:1000-5404(2014)10-0979-04

论著

缺氧对PC12细胞中miR-210的表达及对细胞线粒体功能的影响

史孟婧,王 健,但国蓉,叶 枫,邹仲敏,赛 燕,赵吉清 (400038 重庆,第三军医大学军事预防医学院毒理学研究所)

[摘要] **目的** 研究缺氧环境下miR-210在PC12细胞中的表达、调控细胞应对缺氧的相关机制以及缺氧对线粒体功能的影响。**方法** PC12细胞在1% O_2、94% N_2、5% CO_2条件下进行缺氧培养,采用CCK-8检测缺氧暴露后细胞生存率的变化;用qRT-PCR方法检测PC12细胞中miR-210的表达水平;用Western blot检测线粒体相关蛋白ISCU1/2和COX10的表达情况;采用流式细胞仪测定缺氧暴露后PC12细胞线粒体膜电位的变化;利用高效液相色谱法(HPLC)测定细胞中ATP、ADP和AMP的含量。**结果** 缺氧暴露降低了PC12细胞存活率,缺氧24 h组和48 h组细胞存活率仅为(63.2±0.1)%和(48.7±0.4)%,显著低于正常对照组($P<0.05$)。利用罗丹明123和高效液相色谱法的检测结果表现出缺氧组较对照组线粒体膜电位下降,线粒体内ATP含量显著降低,而ADP、AMP含量显著升高。用qRT-PCR方法检测出在缺氧暴露后PC12细胞中miR-210的表达显著升高。Western blot结果提示ISCU1/2和COX10作为miR-210的靶基因,其表达显著降低($P<0.05$),与缺氧暴露存在着时间-效应关系。**结论** 缺氧导致PC12细胞线粒体功能障碍,缺氧诱导的miR-210高表达对其靶基因线粒体相关蛋白ISCU1/2和COX10的调控可能是重要途径之一。

[关键词] miR-210;线粒体;缺氧;PC12细胞;基因表达
[中图法分类号] R364.4;R394.3;R741.02 [文献标志码] A

Effect of hypoxia on miR-210 expression and mitochondrial function in PC12 cells

Shi Mengjing, Wang Jian, Dan Guorong, Ye Feng, Zou Zhongmin, Sai Yan, Zhao Jiqing (Institute of Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the expression of miR-210 in PC12 cells exposed to hypoxia and the regulatory mechanisms of hypoxia on mitochondria function. Methods PC12 cells were cultured in hypoxic condition (94% N_2, 5% CO_2, and 1% O_2) at 37 ℃. CCK-8 assay was carried out to analyze cell vitality. The expression of miR-210 was tested by qRT-PCR. Western blotting was used to detect the expression of mitochondrial proteins, iron-sulfur cluster assembly proteins (ISCU1/2) and cytochrome oxidase (COX10). Rhodamine 123-indicated mitochondrial membrane potential (MMP) was detected with flow cytometry. The concentrations of ATP, ADP and AMP in PC12 cells were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). Results After hypoxia exposure for 24 h and 48 h, the viability of PC12 cells was decreased to (63.2±0.1)% and (48.7±0.4)% of normally cultured cells ($P<0.05$), respectively. The expression of miR-210 was up-regulated at 12, 24 and 48 h after hypoxia exposure. A sharp and transient increase of MMP at 12 h was followed by significant attenuation at 24 and 48 h. Cellular contents of ADP and AMP were increased while ATP level was declined. Western blot results showed the expression of ISCU1/2 and COX10, target genes of miR-210, was dramatically reduced after hypoxia challenge in an obvious time-effect relationship. Conclusion Hypoxia induces mitochondrial dysfunction in PC12 cells. The impact of hypoxia-upregulated miR-210 expression on its target genes, ISCU1/2 and COX10, may be one of the possible key pathways.

[**Key words**] miR-210; mitochondria; hypoxia; PC12 cells; gene expression

Supported by the Key Project of the "Twelfth Five-year Plan" for Medical Science Research of PLA (BWS11R02). Corresponding author: Zhao Jiqing, E-mail: zhaojiqing392@sohu.com

[基金项目] 全军医学科技"十二五"计划重点项目(BWS11R02)
[通信作者] 赵吉清,E-mail:zhaojiqing392@sohu.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140124.1021.005.html(2014-1-24)

缺氧是由于缺乏充足的氧或不能充分利用氧,组织和细胞的代谢、功能以及形态结构发生异常变化的病理过程。中枢神经系统是对缺氧最为敏感的器官之一,脑部短暂的缺氧即会引起中枢神经系统功能障碍,甚至导致神经细胞的死亡。PC12细胞,一种从大鼠嗜铬细胞瘤分离的克隆细胞,其在神经生长因子的存在下培养表现出神经细胞的生物学效应,是目前广泛用来研究神经细胞功能、分化发育和死亡的一种组织细胞培养模型[1]。

MicroRNAs(miRNAs)是在真核生物中发现的一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,其大小为20~25个核苷酸。研究表明miRNA参与了包括分化发育、代谢、增殖和血管发生等在内的生命过程中的重要环节[2]。2007年,有研究发现缺氧能够影响多种miRNA表达,其中miR-210的表达变化最为显著。现有研究已经证实,miR-210的表达无种属和组织特异性,在多种细胞缺氧后均依赖HIF-1的表达而上调,是重要的缺氧诱导型miRNA分子[3]。目前关于miR-210研究主要涉及肿瘤和缺血性损伤等研究,而miR-210在单纯缺氧情况下对神经细胞的影响尚少见报道。本研究以缺氧培养的PC12细胞为模型,研究缺氧对于神经细胞miR-210的表达及其对线粒体功能的影响,进一步探讨缺氧影响神经细胞线粒体功能的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞,即PC12细胞为本室所保存;胎牛血清、RPMI1640细胞培养基、胰蛋白酶均购自Hyclone公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁公司;一步加A法microRNA反转录试剂盒购自哈尔滨海基生物科技有限公司;miR-210、U6上下游引物为自行设计,miR-210:AATCTGTGCGTGTGACAG;U6-FCGCAAGGATGACACGCAAAT;miR univer:TTACCTAGCGTATCGTTGAC,Invitrogen公司(上海英维捷基)合成,qPCR SYBR Green Mix购自TOYOBO公司;100×青-链霉素、Rhodamine 123、细胞周期与凋亡检测试剂盒、Trizol、RIPA裂解液、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、ECL发光液均购自碧云天生物技术研究所;ISCU1/2抗体购自Santa Cruz Biotechnology;COX10抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,β-actin,二抗;Thermo三气细胞培养箱;Vilber-Lourmat凝胶成像系统;Cytomics FC 500 MCL流式细胞仪;岛津LC20AT高效液相色谱仪;其他试剂均为国内分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 PC12细胞用含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素及0.1 mg/mL链霉素的RPMI1640完全培养基培养,37 ℃,5% CO_2细胞培养箱培养,每日换液,待细胞融合至90%传代。

1.2.2 CCK-8实验检测缺氧暴露后PC12细胞存活率 96孔板每孔加入100 μL约1×10^3个PC12细胞,37 ℃,5% CO_2细胞培养箱培养过夜,次日换液。依次将缺氧12、24、48 h组细胞放入缺氧培养箱(1% O_2,94% N_2,5% CO_2,37 ℃)。缺氧暴露后,实验组和对照组细胞每孔加入10 μL的CCK-8溶液,以无细胞的100 μL细胞培养液和10 μL CCK-8溶液作为空白对照。细胞培养箱内继续孵育1 h,然后用酶标仪在450 nm处测定各孔吸光度。

1.2.3 qRT-PCR方法检测PC12细胞中miR-210的表达水平 Trizol法提取PC12细胞总RNA。按照一步加A法microRNA反转录试剂盒步骤,反转录cDNA,构建qPCR反应体系,按如下程序进行扩增检测:95 ℃预变性20 s,95 ℃变性10 s;60 ℃退火20 s,70 ℃延伸10 s,40个循环周期。U6作为内参,每个样本设2个复孔。miR-210的相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算。

1.2.4 Western blot检测相关蛋白表达 收集缺氧培养后的PC12细胞,RIPA裂解液提取PC12细胞总蛋白,BCA法进行蛋白定量。按照蛋白定量结果调整浓度的蛋白样品与上样缓冲液混匀后99 ℃加热10min,12% SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭2 h,一抗4 ℃孵育过夜(稀释比例ISCU1/2为1∶100,COX10为1∶800,β-actin为1∶1 000)。TBST洗涤数次,室温孵育二抗(稀释比例1∶2 000)2 h,TBST和TBS洗涤数次。ECL化学发光并使用Vilber-Lourmat凝胶成像系统进行曝光。

1.2.5 线粒体膜电位检测 收集PC12细胞并用PBS洗涤细胞1次,加入1 mL PBS。加入200 μL Rhodamine 123染色工作液,充分混匀。细胞培养箱中37 ℃孵育20 min。用流式细胞仪检测线粒体膜电位并分析。

1.2.6 高效液相色谱法(HPLC)测定细胞中ATP、ADP和AMP的含量 收集PC12细胞并用PBS重悬。用预冷的1 000 μmol/L $HClO_4$破膜处理冰浴10 min,10 000 r/min离心10 min。取上清70 μL,以1∶9比例(V∶V)加入2.5 mol/L碳酸钾,调节其为中性pH值。12 000 r/min离心10 min。取上清20 μL上机检测。色谱条件为:shinocrom AP C18色谱柱(5 μm,250 mm×4.6 mm),柱温25 ℃。流动相为30 mmol/L的磷酸钾缓冲液(pH=6.5),流速1 mL/min,紫外检测波长254 nm,实验采用外标法定量。

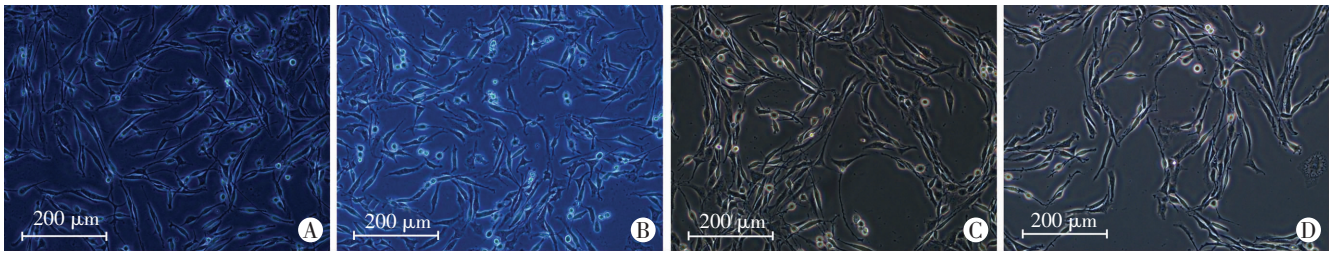
1.3 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件进行分析,组间差异用方差分析。

2 结果

2.1 PC12细胞形态的改变及缺氧暴露降低了PC12细胞的存活率

显微镜下明场可见,对照组PC12细胞呈多角形,胞体有明显突触,突触可交织成网络状。实验组细胞缺氧暴露12 h后,胞体肿胀;缺氧暴露24 h后,PC12细胞间隙增大,折光性下降,细胞突触变短和减少;缺氧暴露48 h后,死亡细胞数量增多。利用CCK-8方法检测PC12细胞活力,发现PC12细胞的存活率在12 h时,较正常细胞无显著变化($P>0.05$),而在24、48 h



A:对照组;B:缺氧 12 h 组;C:缺氧 24 h 组;D:缺氧 48 h 组

图 1　光镜下观察缺氧暴露后 PC12 细胞形态变化

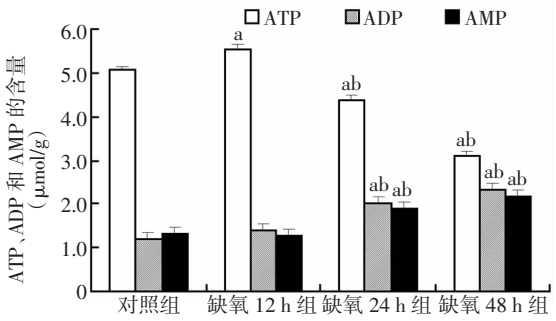
分别下降到正常水平的(63.2 ± 0.1)% 和(48.7 ± 0.4)%(P < 0.05)。缺氧 24 h、48 h 较缺氧 12 h 细胞存活率也显著降低,(P < 0.05)。见图 1。

2.2　缺氧暴露影响 PC12 细胞的线粒体功能

线粒体是对缺氧敏感的细胞器,线粒体膜电位的水平可以反映线粒体的功能状态。经 Rhodamine 123 检测结果显示出平均荧光强度为:对照组(106.3 ± 0.6)、缺氧 12 h 组(131.8 ± 3.5)、缺氧 24 h 组(101.9 ± 27.2)、缺氧 48 h 组(79.7 ± 14.2),可见缺氧 12 h 组线粒体膜电位较对照组增强,随后缺氧 24、48 h 组较对照组线粒体膜电位显著降低(P < 0.05)。缺氧 24、48 h 组较缺氧 12 h 组的线粒体膜电位也显著降低(P < 0.05)。

2.3　缺氧引起细胞内线粒体功能障碍

高效液相色谱法(HPLC)测定结果显示,缺氧 12 h 组 ATP 含量较对照组显著升高(P < 0.05),但在缺氧 24 h 组、48 h 组较对照组均显著下降(P < 0.05)。在缺氧 12 h 组 ADP 和 AMP 含量未见变化,缺氧 24 h 组和 48 h 组较对照组 ADP 和 AMP 含量均显著升高(P < 0.05)。缺氧 24 h 组、48 h 组较缺氧 12 h 组 ATP 含量显著降低,而 ADP 和 AMP 含量则显著升高(P < 0.05)。见图 2。



a:P < 0.05,与对照组比较;b:P < 0.05,与缺氧 12 h 组比较

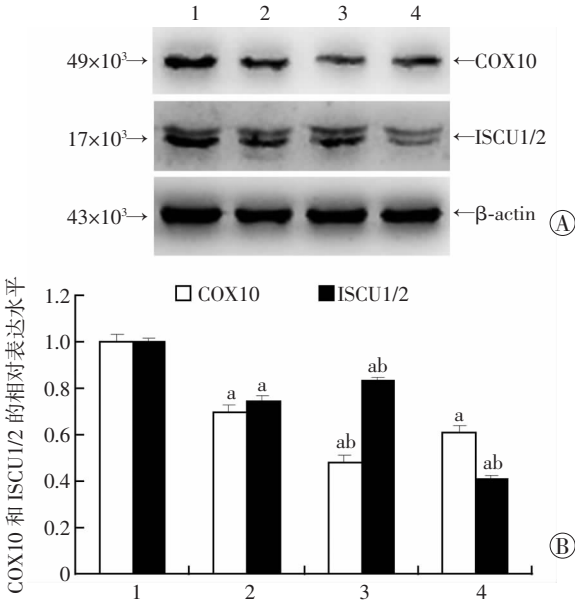
图 2　缺氧后 PC12 细胞 ADP、AMP 及 ATP 含量变化　(n = 3, $\bar{x} \pm s$)

2.4　miR-210 在缺氧暴露的 PC12 细胞中表达升高

利用实时荧光定量 PCR 检测 miR-210 表达水平发现,缺氧暴露的各实验组 miR-210 均表达上调。缺氧 12 h 组、24 h 组、48 h 组的 miR-210 表达水平较对照组均显著升高,缺氧 24 h 组较 12 h 组的 miR-210 表达水平未见显著差异,但缺氧 48 h 组较 12 h 组 miR-210 表达水平为显著升高,miR-210 的相对表达水平为缺氧 12 h 组(5.95 ± 0.96),缺氧 24 h 组(9.21 ± 1.58),缺氧 48 h 组(21.62 ± 7.08,P < 0.05)。

2.5　缺氧暴露引起线粒体相关蛋白 ISCU 和 COX10 的变化

此前研究证实,线粒体铁硫支架蛋白 ISCU1/2,以及呼吸链上细胞色素氧化酶 COX10 是 miR-210 的靶基因。Western blot 检测结果显示,ISCU1/2 和 COX10 表达量随缺氧暴露时间的延长而下降,以缺氧 24 h 组最为显著(P < 0.05,图 3)。



A:Western blot 检测缺氧 PC12 细胞中 ISCU1/2、COX10 的表达;B:蛋白印迹分析半定量分析(n = 3, $\bar{x} \pm s$)　1:对照组;2:缺氧 12 h;3:缺氧 24 h;4:缺氧 48 h;a:P < 0.05,与对照组比较;b:P < 0.05,与缺氧 12 h 组比较

图 3　缺氧对 PC12 细胞中 ISCU1/2、COX10 表达的影响

3　讨论

神经系统对缺氧及其敏感,直接影响缺氧环境下人员的作业能力。本研究以原始神经细胞系 PC12 为模型,观察缺氧对细胞存活的影响及其可能机制,发现缺氧暴露使细胞形态发生改变,细胞活性下降。线粒体内膜上分布着具有电子传递功能的蛋白质系统和使 ADP + Pi 生成 ATP 的 ATP 合酶复合体,是细胞内参与能量代谢的主要结构,也是细胞进行氧化磷酸化和合成三磷腺苷的重要场所。在缺氧环境下,细胞的线粒

体呼吸代谢途径会从氧化磷酸化转化成为糖酵解,这种转化使细胞在紧急缺氧情况下迅速适应环境。本研究发现,PC12 细胞在缺氧 12 h,细胞 ATP 含量较对照组升高,可能是由于细胞处于代偿阶段,细胞通过抑制细胞增殖等减弱了细胞代谢水平,暂时维持了细胞内稳态。但是在缺氧 24、48 h 后,线粒体的 ATP 含量显著降低,而 ADP、AMP 含量显著升高。这表明此时线粒体呼吸调节功能、氧化磷酸化偶联在缺氧作用下发生了严重障碍,线粒体内膜的 ATP 合酶复合体受到抑制,导致了 ATP 合成效率降低,进一步加剧了线粒体 ATP 含量的下降。

miR-210 是一种缺氧特异性 miRNA[4],在缺氧条件下表达上调,恢复常氧环境后其高表达仍可持续 1d 左右,这说明了 miR-210 的作用是持久的。有研究也证实缺氧血管内皮细胞中可刺激 miR-210 表达显著升高[5]。本研究表明, miR-210 在缺氧脑损伤中发挥了重要的作用。此外,miR-210 在包括心脏以及脑血管缺血性疾病中有显著的作用。有研究表明,miR-210 在心肌肥大,心力衰竭[6],脑短暂性缺血,下肢缺血以及脑缺血损伤[7]等动物模型中均表达升高。

本研究显示 miR-210 与线粒体关系密切,miR-210 可能通过靶蛋白硫酸簇组装支架蛋白(ISCU1/2)、细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase,COX)参与了对线粒体功能的调控。硫酸簇组装支架蛋白位于线粒体内膜上,可以聚集线粒体上的硫酸铁并促进电子传递,参与氧化还原反应,并与许多细胞生理功能有关,如核糖体生成、DNA 修复、亚铁离子生物合成以及铁离子代谢等[4]。细胞色素氧化酶 COX10 作为线粒体电子呼吸链终端的一个关键酶。它的损伤可直接影响线粒体功能,导致 ATP 合成减少,线粒体膜电位($\triangle\Psi$mt)丧失,并促使呼吸链产生大量活性氧(reactive oxygen species,ROS),活化凋亡信号通路,细胞出现死亡(凋亡或坏死)[8]。本研究表明线粒体铁硫支架蛋白 ISCU,以及呼吸链上细胞色素氧化酶 COX10 在缺氧 24、48 h 后表达显著降低,提示着缺氧暴露严重影响了呼吸链氧化磷酸化、电子传递等,引起线粒体功能的障碍。我们对 PC12 细胞线粒体膜电位进行检测,结果显示缺氧 24、48 h 后,线粒体膜电位显著降低,提示着缺氧暴露后,PC12 细胞呼吸链受阻产生的 ROS 导致线粒体功能受损,有可能引起了线粒体自噬。

线粒体自噬可以作为一种防御机制能清除损伤的线粒体和过量产生的 ROS,确保细胞内线粒体功能稳定,促进应激环境中细胞的存活[9-10]。这个过程有可能是在持续的缺氧暴露后 miR-210 的升高,抑制了呼吸链重要蛋白 ISCU 的表达[11-14]。ISCU 的抑制直接减少了 ROS 的产生,从而暂时维持了细胞内稳态,起到了抑制细胞早起凋亡的作用。

综上所述,PC12 细胞在缺氧的情况下 miR-210 显著升高,调控缺氧反应相关基因的表达,引起线粒体内 ATP 含量的下降,导致其线粒体膜电位的降低,进而严重影响了线粒体的功能。这表明缺氧所致能量产生异常是细胞损伤的重要因素。

参考文献:

[1] 赵吉清, 吴强, 林海, 等. 缺氧 PC12 细胞中细胞因子和酪氨酸蛋白激酶活性的变化[J]. 重庆医学, 2009, 38(9): 1051-1052, 1055.

[2] Huang Y, Shen X J, Zou Q, *et al*. Biological functions of microRNAs: a review [J]. Bioorg Khim, 2010, 36(6): 747-752.

[3] Huang X, Ding L, Bennewith K L, *et al*. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation [J]. Mol Cell, 2009, 35(6): 856-867.

[4] Chan S Y, Zhang Y Y, Hemann C, *et al*. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2 [J]. Cell Metab, 2009, 10(4): 273-284.

[5] Fasanaro P, D´Alessandra Y, Di-Stefano V, *et al*. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3[J]. J Biol Chem, 2008, 283(23): 15878-15883.

[6] van-Rooij E, Sutherland L B, Liu N, *et al*. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(48): 18255-18260.

[7] Biswas S, Roy S, Banerjee J, *et al*. Hypoxia inducible microRNA 210 attenuates keratinocyte proliferation and impairs closure in a murine model of ischemic wounds[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(15): 6976-6981.

[8] 柏干荣, 陆松敏. 缺血缺氧与线粒体 DNA 编码细胞色素氧化酶基因损伤[J]. 创伤外科杂志,2004, 6(3): 230-232.

[9] 何云凌, 吴丽颖, 朱玲玲, 等. 线粒体自噬在低氧适应中的作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012, 39(3): 217-223.

[10] Fernandez-Silva P, Enriquez J A, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA[J]. Exp Physiol, 2003, 88(1): 41-56.

[11] 赵吉清, 吴强, 蔡颖, 等. 缺氧对 PC12 细胞 HIF-1/JAK2/NF-κB 信号级联的影响[J]. 重庆医学, 2009, 38(5): 536-538.

[12] Merlo A, de-Quiros S B, Secades P, *et al*. Identification of a signaling axis HIF-1alpha/microRNA-210/ISCU independent of SDH mutation that defines a subgroup of head and neck paragangliomas [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(11): E2194-E2200.

[13] Chan Y C, Banerjee J, Choi S Y, *et al*. miR-210: the master hypoxamir[J]. Microcirculation, 2012, 19(3): 215-223.

[14] Chen Z, Li Y, Zhang H, *et al*. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression[J]. Oncogene, 2012, 29(30): 4362-4368.

(**收稿**:2013-11-29;**修回**:2013-12-26)

(编辑 王 红)