

耳蜗毛细胞 miR-30b 对 Dynamin 基因靶向调控的研究*

李 洋, 唐小林, 余 菲, 李华君, 袁 伟[△]

第三军医大学西南医院 耳鼻喉科 (重庆 400038)

【摘要】 目的 观察正常成年小鼠耳蜗毛细胞中 miR-30b 的表达, 研究其对靶基因(Dynamin1, *DNM1*)的调控是否会影响内毛细胞中突触囊泡内吞关键蛋白 Dynamin 的表达。**方法** 取正常成年 C57 小鼠耳蜗基底膜行原位杂交, 观察耳蜗毛细胞中 miR-30b 的表达分布; 构建荧光素酶报告基因载体, 转染 293T 细胞, 通过荧光素酶活性变化明确 *DNM1* 是否为 miR-30b 的靶基因; 通过耳蜗圆窗显微注射过表达 miR-30b 的腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV), 14 d 后通过 real time-PCR 检测 miR-30b 和 *DNM1* 的 mRNA 表达, 免疫印迹实验(Western blot)检测 Dynamin 蛋白表达。**结果** miR-30b 在小鼠耳蜗内、外毛细胞胞质和胞核均有表达; miR-30b 可抑制 *DNM1* 载体的荧光表达($P < 0.05$), 而突变型 *DNM1* 载体的荧光表达无抑制作用; 转染 AAV-miR-30b 后 miR-30b 的相对表达量增高, *DNM1* 和 Dynamin 蛋白表达降低。**结论** miR-30b 在小鼠耳蜗内、外毛细胞均有表达; miR-30 可以靶向下调 *DNM1* 基因从而抑制 Dynamin 蛋白表达。

【关键词】 毛细胞 miR-30b *DNM1* Dynamin 原位杂交 双荧光素酶报告基因 腺相关病毒

Expression and Regulatory Effect of miR-30b on Dynamin in Cochlear Hair Cells LI Yang, TANG Xiao-lin, YU Fei, LI Hua-jun, YUAN Wei[△]. Department of Otolaryngology Head and Neck Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

[△] Corresponding author, E-mail: weiyuan175@sina.com

【Abstract】 **Objective** To determine the expression of miR-30b in hair cells of mice, and its regulatory effect on the target gene *DNM1* and expression of Dynamin, the key protein of synaptic endocytosis in inner hair cells. **Methods** The basilar membrane of cochlear in adult C57 mice was obtained. The expression of miR-30b in the hair cells was detected by in situ hybridization. Luciferase vector was constructed and transfected into 293T cells with miR-30b. Changes in luciferase activity were measured to verify whether *DNM1* was the target gene of miR-30b. Adeno-associated virus carrying miR-30b were micro-injected into cochlear via the round window membrane. mRNA expressions of *DNM1* and miR-30b were detected by RT-PCR 14 days later. The expression of Dynamin was detected by Western blot. **Results** miR-30b expressed in the inner and outer hair cells scattered in the region of the nucleus and cytoplasm. miR-30b reduced luciferase activity from the reporter vector containing *DNM1* ($P < 0.05$), but not in its mutants. Increased expressions of miR-30b and decreased mRNA expressions of *DNM1* and Dynamin were observed following transfection of AAV-miR-30b. **Conclusion** miR-30b expresses in inner and outer hair cells, which is consistent with the morphological orientation of dynamin. miR-30b inhibits the expression of Dynamin by targeting *DNM1* gene.

【Key words】 Hair cell miR-30b *DNM1* Dynamin *in situ* hybridization Dual luciferase reporter gene Adeno-associated virus

目前超过世界总人口 5%, 即 4 亿 6 千万人存在听力损失^[1]。感音神经性耳聋(sensorineural hearing loss, SNHL)占了其中大部分比例, 因此, 研究 SNHL 发病机制意义重大。听觉信号从外周传入听觉中枢需要耳蜗内毛细胞突触释放兴奋性递质引起突触后膜产生动作点位, 再逐级传入中枢形成

听力。内毛细胞突触间神经递质持续、有效的释放需要一个高效的囊泡回收机制。研究表明, 网格蛋白介导的内吞作用(clathrin mediated endocytosis, CME)是囊泡回收的主要途径, 发动蛋白(Dynamin)在网格蛋白介导的内吞过程中发挥“剪刀”的作用, 将网格蛋白包被小窝与质膜分离, 在此过程中发挥重要作用^[2]。

小分子 RNA(miRNA)是一类长度约为 21 nt 的非编码小 RNA, 它可以通过与靶 mRNA 的 3'非编码区(3' UTR)互补或不完全互补结合, 诱导靶

* 国家自然科学基金项目(No. 81271080、No. 81470694、No. 30973301)和重庆市科委(No. cstc2017jcyJAX0407)资助
[△] 通信作者, E-mail: weiyuan175@sina.com

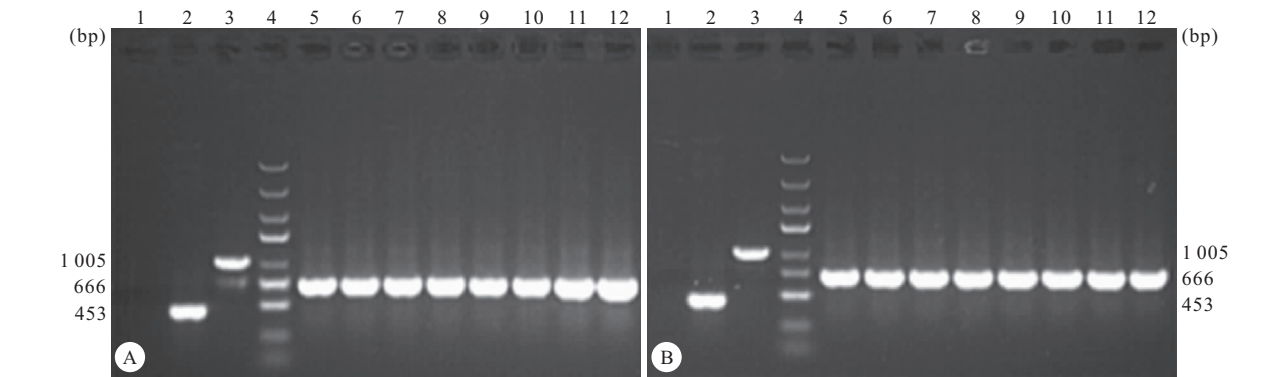


图 2 酶切电泳鉴定 DNMI 过表达质粒载体

Fig 2 Identification of the overexpressed plasmids vector of DNMI by enzyme cleaving and electrophoresis

A: DNMI wild type; B: DNMI mutant type; 1: Negative control (ddH₂O); 2: Negative control (no loaded control group); 3: Positive control (GAPDH); 4: Marker; 5-12: DNMI positive products

TRAF6 基因 3' UTR 质粒 + miR-NC; 阳性对照组: TRAF6 基因 3' UTR 质粒 + hsa-miR-146b 载体质粒。细胞转染 48 h 后进行荧光素酶活性检测。将细胞裂解后,按照双荧光素酶报告基因检测试剂盒说明操作,同一样品孔内萤火虫荧光素酶活性 (firefly luciferase) 与海肾荧光素酶活性 (renilla luciferase) 的比值表示该组荧光强度,以判断靶基因 3' UTR 空载 (实验组 1)、靶基因 3' UTR (实验组 2)、靶基因 3' UTR 突变质粒 (实验组 3) 是否与 miRNA 靶向结合 (抑制荧光强度)。

1.2.5 耳蜗圆窗显微注射和耳蜗取材 取 8 周龄 C57 小鼠 36 只,分为 3 组,每组 12 只,水合氯醛按小鼠体质量 0.1 mL/10 g 麻醉小鼠,采用耳后入路圆窗膜注射方式,将 AAV 传递到内耳中。AAV-miR-30b 组:注射 2 μ L HBAAV2/8-CMV-mmu-miR-30b-GFP 过表达 miR-30b 的 AAV;空载组:注射 2 μ L HBAAV2/8-CMV-GFP 过表达对照;正常组:未注射。在 AAV 注射 14 d 后,椎脱臼法处死小鼠,取下头部去除脑组织取出听泡,剥离听泡及其他多余组织,保留耳蜗。

1.2.6 Real-time PCR 检测转染前后 miR-30b 及 DNMI 基因的表达量 分别检测正常组、空载组、AAV-miR-30b 组耳蜗组织中 miR-30b 的相对表达量及 DNMI mRNA 的表达情况。各组分别取 8 只耳蜗,按照 Trizol 法提取各组总 RNA,测定 RNA 的浓度及纯度,逆转录试剂盒进行逆转录。逆转录引物序列如下:miR-30b 上游:5'-ACACTCCAGC TGGGCTGGGATGTGGATG-3';下游:5'-CTCAA CTGGTGTCTGCTGGAGT-3';DNMI 上游:5'-AAT

ACCAACCACGAAGACTTCATAGGC-3';下游:5'-CTTGTACCAGGACAGATTCTCAGCAG-3'; β -actin (内参) 上游:5'-GAGCACAGAGCCTC GCCTTT-3';下游:5'-AGAGGCGTACAGGGATA GCA-3'。根据罗氏 real-time PCR 试剂说明书进行操作。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,95 $^{\circ}$ C (30 s) 变性,60 $^{\circ}$ C (30 s) 退火,72 $^{\circ}$ C (30 s) 延伸,共循环 40 次,最后 95 $^{\circ}$ C (15 s) 绘制熔解曲线。每组样品重复 3 次,实验重复 3 次,最终以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值表示各组基因表达量。

1.2.7 Western blot 检测转染前后 Dynamin 蛋白表达量 分别检测正常组、空载组、AAV-miR-30b 组 Dynamin 蛋白的表达情况。各组分别取 10 只耳蜗组织加入 RIPA 蛋白裂解液,于冰下超声粉碎,4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min,离心 20 min,取上清用 BCA 法测定蛋白浓度;上样;电泳;转膜;5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗 (1:500) 4 $^{\circ}$ C 振摇过夜,PVDF 膜取出后 TBST 缓冲液冲洗,二抗 (1:5 000) 室温振摇孵育 1 h 后洗膜 3 次,膜上滴加化学发光显色液,在化学发光仪上显色,成像;用 AlPhalmager 2200 图像分析软件测定各杂交带积分光密度 (IOD) 值,以目的条带与内参 β -actin 的 IOD 值的比值表示 Dynamin 蛋白的表达水平。

1.3 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基底膜原位杂交

miR-30b 在小鼠耳蜗内、外毛细胞胞质胞核均有表达,阴性对照组未见染色(图 3)。

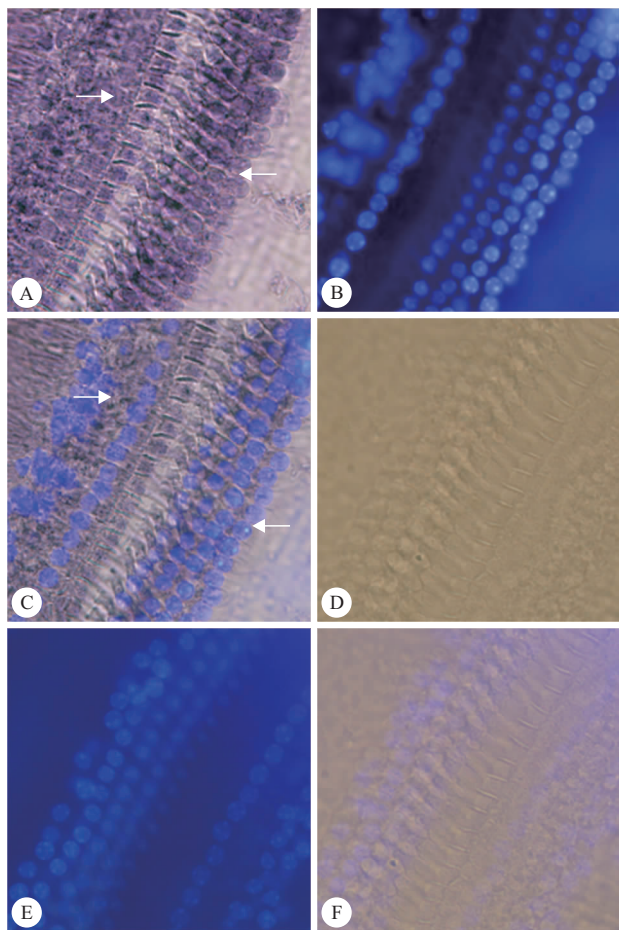


图 3 耳蜗基底膜原位杂(箭头为 miR-30b 表达强信号)。×400
Fig 3 Cochlear whole mount *in situ* hybridization (arrows show miR-30b strong signal). ×400

A, D: *In situ* hybridization; B, E: Nucleifluorescent staining; C, F: Merged; A-C: Adult C57 mice cochlear basilar membrane whole mount; D-F: Negative control

2.2 双荧光素酶实验检测 miR-30b 对 *DNM1* 的靶向抑制

实验组 2 和实验组 1 相比,荧光强度被抑制,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明 miRNA 能与靶基因 3' UTR 结合,抑制其表达。实验组 3 和实验组 2 相比,荧光强度的抑制被解除,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明在结合位点突变后,这种调控关系消失。综上,miR-30b 能与 *DNM1* 的 3' UTR 靶向结合(图 4)。

2.3 过表达 miR-30b 对 *DNM1* mRNA 和 Dynamin 蛋白表达的影响

通过耳蜗圆窗显微注射将 AAV-miR-30b 转染基底膜毛细胞(图 5),出现绿色荧光,说明转染成

功。将正常组表达量设为 1.0, AAV-miR-30b 组较正常组及空载组的 miR-30b 表达升高(2.1 vs. 1.0 vs. 1.0, $P < 0.05$), *DNM1* mRNA 表达下调(0.4 vs. 1.0 vs. 1.0, $P < 0.05$), Dynamin 蛋白表达下调(0.03 vs. 1.0 vs. 1.0, $P < 0.05$)(图 6)。

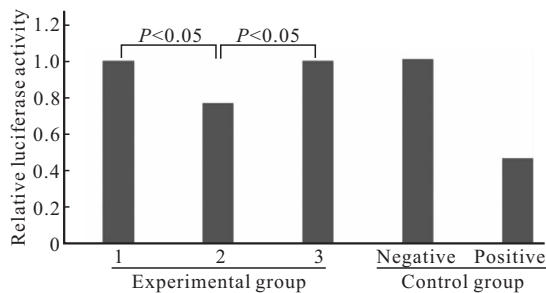


图 4 双荧光素酶报告系统检测 miR-30b 对 *DNM1* 表达的影响
Fig 4 Double luciferase reporter system was used to detect the effect of miR-30b on *DNM1*

Comparisons were based on the firefly/renilla luminescence fold after the differences were re-quantified by the same miRNA plasmid to determine the target gene 3' UTR no-load (experimental group 1), target gene 3' UTR (experimental group 2), target gene 3' UTR mutant plasmid binding to miRNA (experimental group 3)

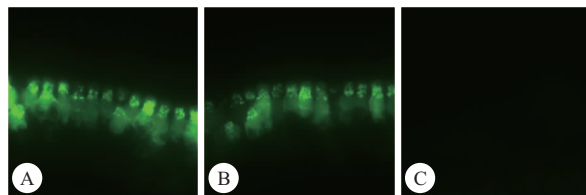


图 5 基底膜内毛细胞转染 AAV-miR-30b。×400
Fig 5 Adeno-associated virus transfected in inner hair cells of basilar membrane. ×400

Basilar membrane hair cells were successfully transfected with AAV-miR-30b (A) and AAV-GFP (B) by micro-injection through cochlear round window. C: Negative control

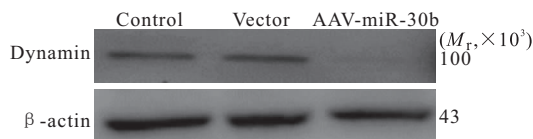


图 6 过表达 miR-30b 抑制 Dynamin 蛋白表达
Fig 6 Over-expressed miR-30b inhibits the expression of Dynamin

3 讨论

听信号传递始于神经递质从突触囊泡的释放,在此过程中,突触囊泡需要经历释放-回收的动态过程以维持突触前终末的结构和功能的完整性,囊泡回收是整个突触囊泡循环的基础。网格蛋白介导的

内吞作用(CME)是囊泡回收的主要途径,而 Dynamin 在这个过程中发挥着重要作用,它的缺失会引起 CME 功能缺失,突触囊泡数量减少,导致神经递质减少,最终影响神经信号传递^[1]。目前 Dynamin 在内耳方面的研究仅限于其在内耳有表达及其亚型定位,关于 Dynamin 自身表达调控机制的研究较少,我们希望从 microRNA 角度对 Dynamin 调控突触囊泡内吞的作用进行研究。

miR-30 家族在脊椎动物中高度保守,它由 6 个 miRNA(miR-30a,-30b,-30c-1,-30c-2,-30d 和-30e)组成。miR-30 家族在脂肪细胞分化^[4],成骨细胞^[5],控制多能性胚胎干细胞^[6]的作用已得到证实。miR-30 家族也参与控制细胞衰老^[7]和凋亡调控^[8]。从内耳 miRNA 表达研究中得知 miR-30b 在胚胎期及 P1 期的小鼠听泡发育期就开始表达,胚胎早期广泛表达于 Corti 器、螺旋神经节、前庭等,出生后开始特异性表达在毛细胞和神经元上,这表明 miR-30b 在内耳发育以及毛细胞发育和成熟过程中可能发挥着重要作用^[9]。另外一个出生前后(E16.5~P30)miRNA 表达量研究显示,P30 期时 miR-30b 的表达量相比之前出现高峰,此时内耳已经发育完全也具有功能。P30 期出现的表达高峰可能说明 miR-30b 对维持出生后毛细胞形态和功能起重要作用^[10]。因此我们对 miR-30b 产生了兴趣,检测其是否在成年鼠耳蜗毛细胞中表达,对进一步探讨 miR-30b 调控 Dynamin 影响内毛细胞突触囊泡内吞过程就显得尤为重要。本实验通过耳蜗基底膜铺片原位杂交确定 miR-30b 的表达定位并与我们前期研究的 Dynamin 在毛细胞内表达定位相符^[2],荧光素酶报告基因检测证明 miR-30b 可以靶向调控 DNM1 基因,过表达 miR-30b 后检测 DNM1 mRNA 和 Dynamin 蛋白的表达水平明确了 miR-30b 可以靶向下调 DNM1 基因从而抑制 Dynamin 蛋白表达。目前没有发现做 miR 调控 DNM1 的其他实验。

本研究是国内首个运用基底膜行原位杂交实验定位 microRNA 表达情况的研究。以往研究 miR 在毛细胞内的表达多用基因芯片测序和耳蜗切片原位杂交的方法。基因芯片测序需要转基因小鼠,通过细胞流式分选收集细胞再利用基因芯片测序分析^[11]。该方法需要的特定转基因小鼠获得较难、成本高,流式细胞分选需要大量细胞而正常小鼠基底膜仅有几千个内毛细胞,使得细胞收集、分选变得困难,同时还会对毛细胞产生不可避免的损害。传统

的耳蜗切片原位杂交每张切片仅仅显示 3 个外毛细胞和 1 个内毛细胞,观察结果局限。而通过耳蜗基底膜铺片原位杂交确定 miR 的表达定位,不仅材料获得容易,最主要的是可以观察到基底膜上任意部位(底转、中转、顶转基底膜)内外毛细胞的表达情况且保持了细胞完整性,其实用性和可操作性较以往方法更易推广。

本研究结果表明了 miR-30b 可能对毛细胞的功能有着重要作用,后续我们将进一步验证内毛细胞突触囊泡内吞是否会受到 miR-30b 的调控及其机制,从而进一步阐释感音神经性耳聋可能的发病机制,为听功能损伤的防护提供新的研究靶点。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization survey data for March 2018. [2018-02-11]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>.
- [2] RAIMONDI A,FERGUSON SM,LOU X, *et al.* Overlapping role of dynamin isoforms in synaptic vesicle endocytosis. *Neuron*,2011,70(6):1100-1114.
- [3] 蔡 婷,袁 伟.突触内吞关键蛋白 Dynamin 在小鼠耳蜗内毛细胞中的表达研究. *中华耳科学杂志*,2014,(4):643-646.
- [4] ZARAGOSI LE,WDZIEKONSKI B,BRIGAND KL, *et al.* Small RNA sequencing reveals miR-642a-3p as a novel adipocyte-specific microRNA and miR-30 as a key regulator of human adipogenesis. *Genome Biol*,2011,12(7):R64[2018-02-11]. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-7-r64>.
- [5] WU T,ZHOU H,HONG Y, *et al.* MiR-30 family members negatively regulate osteoblast differentiation. *J Biol Chem*,2012,287(10):7503-7511.
- [6] ZHONG X,LI N,LIANG S, *et al.* Identification of microRNAs regulating reprogramming factor LIN28 in embryonic stem cells and cancer cells. *J Biol Chem*,2010,285(53):41961-41971.
- [7] MARTINEZ I,CAZALLA D,ALMSTEAD LL, *et al.* MiR-29 and miR-30 regulate B-Myb expression during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108(2):522-527.
- [8] LI J,DONATH S,LI Y, *et al.* MiR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genetics*,2010,6(1):e1000795 [2018-02-11]. <http://journals.plos.org/plosgenetics/article/10.1371/journal.pgen.1000795>. doi:10.1371/journal.pgen.1000795.
- [9] WANG XR,ZHANG XM,ZHEN J, *et al.* MicroRNA expression in the embryonic mouse inner ear. *Neuroreport*,2010,21(9):611-617.
- [10] LILACH M,FRIEDMAN LM,KAREN B. MicroRNAs and epigenetic regulation in the mammalian inner ear: implications for deafness. *Mamm Genome*,2009,20(9/10):581-603.
- [11] SCHEFFER DI,SHEN J,COREY DP, *et al.* Gene expression by mouse inner ear hair cells during development. *J Neurosci*,2015,35(16):6366-6380.

(2017-09-27 收稿,2017-12-07 修回)

编辑 吕 熙