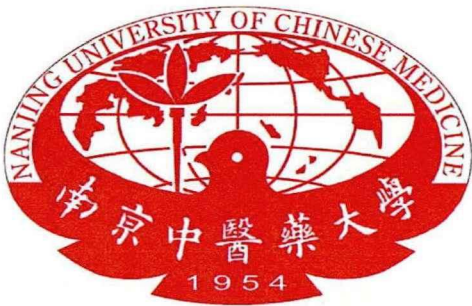


密级：公开

学号：20211788

南京中医药大学
硕士学位论文



miR-214-3p 调控 GFM1 影响线粒体功能障碍
以及多巴胺能神经元功能的研究

研 究 生	王新宇
指导教师	殷国平
学科专业	药 学
所在学院	附属南京医院
毕业时间	2024 年 6 月

**miR-214-3p regulates GFM1,affects mitochondrial
dysfunction and dopaminergic neuron function**

A Dissertation Submitted for the Master's Degree

Candidate:Wang xinyu

Adviser: Prof. YIN guoping

Nanjing University of Chinese Medicine,China

摘要

研究背景与目的

线粒体是细胞核和其他细胞组分之间发生信息交换的中心，它通过调节能量产生和代谢物供应，以满足细胞的能量供给。当线粒体无法产生 ATP 或代谢物，或合成/降解蛋白质，底物（如氧气）影响电子传递链（ETC）功能时，或发生引起线粒体蛋白受损的遗传改变时，就会出现线粒体功能障碍。线粒体功能障碍可导致多种线粒体疾病，包括多巴胺神经元损伤。尽管神经元中的线粒体密度可能低于其他细胞(如肌细胞)，但大脑消耗的氧气和葡萄糖几乎是其他组织的十倍，因此线粒体功能障碍对多巴胺能神经元的影响不容忽视。

miR-214-3p 表达的改变已经被证实与几种神经系统疾病有关，包括阿尔茨海默病（AD）、帕金森病(PD)、多发性硬化症（MS）和亨廷顿病，在课题组之前的研究中我们发现，过表达 miR-214 可能会通过影响自噬影响多巴胺神经元功能，但 miR-214-3p 能否通过其他方式影响多巴胺神经元功能还尚不清楚。因此我们构建了过表达/抑制 miR-214-3p 及对照稳转株，通过蛋白组学和转录组学联合分析发现了线粒体功能的改变可能是 miR-214-3p 影响多巴胺神经元功能的重要因素，且 GFM1 可能是其中的关键蛋白。

线粒体延伸因子 G1（EFG1）由 GFM1 核基因编码，是线粒体翻译过程中核糖体易位所需的关键成分。GFM1 蛋白表达变化可能会对线粒体翻译过程造成影响，进而引起线粒体功能障碍。

据此，本课题组将构建过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株，并检测过表达 miR-214-3p 对于线粒体功能障碍以及多巴胺神经元活力的影响以及过表达 GFM1 能否对其进行挽救，来探究减轻多巴胺神经元损伤以及线粒体功能障碍的方法。

研究方法

1. miR-214-3p 靶基因的筛选

通过慢病毒构建过表达 miR-214-3p 及对照稳转株，利用蛋白组学检测和转录组学联合分析过表达 miR-214-3p 后差异表达的蛋白和基因，并通过富集分析体现这些差异蛋白和基因的分布以及功能，通过 PPI 网络分析了解这些差异蛋白和差异基因的相互作用情况筛选出相互作用较强的关键基因，通过将蛋白组学分析和转录组学所筛选出的关

键蛋白和关键基因与 miR-214-3p 的靶基因取交集，筛选出 miR-214-3p 的靶基因，通过 WB 验证 miR-214-3p 与靶基因的靶向关系。

2. 探究 miR-214-3p 对线粒体功能障碍和神经元活力的影响

通过 ROS 检测试剂盒，细胞耗氧率检测试剂盒，ATP 检测试剂盒，ELISA 检测试剂盒检测。分别检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株中活性氧，细胞耗氧率，ATP 含量，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的变化，来探究 miR-214-3p 对线粒体功能障碍的影响。通过 CCK8 检测过表达 GFM1 且过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株中神经元活力的变化。

3. 探究 miR-214-3p 调控 GFM1 影响线粒体功能和神经元活力

使用瞬时转染方法构建过表达 GFM1 且过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞，用 WB 检测过表达效率，通过 ROS 检测试剂盒，细胞耗氧率检测试剂盒，ATP 检测试剂盒，ELISA 检测试剂盒检测。分别检测过表达 GFM1 和对照质粒的 SHSY5Y 稳转株中活性氧，细胞耗氧率，ATP 含量，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的变化，来探究过表达 GFM1 对线粒体功能障碍的影响。通过 CCK8 检测过表达 GFM1 和对照质粒的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株中神经元活力的变化。

研究结果

1. 通过蛋白组学和转录组学联合分析预测过表达 miR-214-3p 可能会影响线粒体功能，影响线粒体功能的关键基因可能是 GFM1，通过 WB 验证得出在过表达 miR-214-3p 后 GFM1 表达受到抑制。

2. 过表达 miR-214-3p 可以促进活性氧的生成，引起细胞耗氧率的降低，ATP 含量的降低，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的表达下降。抑制 miR-214-3p 则逆转此调控。

3. 过表达 GFM1 可以挽救 miR-214-3p 引起的线粒体功能障碍和神经元活力下降，减少活性氧的生成，提高细胞耗氧率，增加 ATP 含量，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的表达提高。

结论

本研究发现 miR-214-3p 上调可以引起线粒体功能障碍和神经元活力下降，且 miR-214-3p 可通过调控 GFM1 的表达影响线粒体功能和神经元活力。这为治疗多巴胺神经元相关疾病提供了新的治疗思路。

关键词：miR-214-3p；蛋白组学；转录组学；多巴胺能神经元；线粒体功能障碍

Abstract

Background and objective

Mitochondria are the centers of information exchange between the nucleus and other cellular components, and they meet the energy supply of the cell by regulating energy production and metabolite supply. Mitochondrial dysfunction occurs when mitochondria are unable to produce ATP or metabolites, or synthesize/degrade proteins, substrates (such as oxygen) affect electron chain (ETC) function, or genetic changes occur that cause damage to mitochondrial proteins. Mitochondrial dysfunction can lead to a variety of mitochondrial diseases, including dopamine neuron damage. Although mitochondrial density in neurons may be lower than in other cells (such as muscle cells), the brain consumes almost ten times more oxygen and glucose than other tissues, so the impact of mitochondrial dysfunction on dopaminergic neurons cannot be ignored.

Alterations in the expression of Mir-214-3P have been shown to be associated with several neurological diseases, including Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease, multiple sclerosis (MS) and Huntington's disease. In our previous study, we found that overexpression of miR-214 may affect the function of dopamine neurons by affecting autophagy. However, whether miR-214-3p can affect dopamine neuron function in other ways has been unclear. Therefore, we constructed overexpressing/inhibiting miR-214-3p and control stable transmutation strains, and through the combined analysis of proteomics and transcriptomics, it was found that the changes in mitochondrial function may be an important factor in the effect of miR-214-3p on the function of dopamine neurons, and GFM1 may be a key protein.

Mitochondrial extension factor G1 (EFG1) is encoded by the GFM1 nuclear gene and is a key component required for ribosome translocation during mitochondrial translation. The change of GFM1 protein expression may affect the mitochondrial translation process, and then cause mitochondrial dysfunction.

Accordingly, this research group will construct a SHSY5Y stable transmutation strain with overexpression/inhibition of miR-214-3p, and examine the effects of overexpression of miR-214-3p on mitochondrial dysfunction and the activity of dopamine neurons, as well as whether overexpression of GFM1 can save them, so as to explore ways to alleviate the damage of dopamine neurons and mitochondrial dysfunction.

Methods

1. Screening of miR-214-3p target genes

Lentivirus was used to construct overexpressing miR-214-3p and control stable transmutation strains. Proteomic detection and transcriptomics were combined to analyze the differentially expressed proteins and genes after overexpressing miR-214-3p, and the distribution and function of these differentially expressed proteins and genes were revealed through enrichment analysis. The interactions of these differential proteins and differential genes were understood through PPI network analysis and key genes with strong interactions were screened out. The target genes of MiR-214-3p were screened out by intersecting the key proteins and key genes screened by proteomic analysis and transcriptomics with the target genes of miR-214-3p. WB was used to verify the targeting relationship between miR-214-3p and target genes

2. Explore the effects of miR-214-3p on mitochondrial dysfunction and neuronal activity

Through ROS detection kit, cell oxygen consumption rate detection kit, ATP detection kit, ELISA detection kit. The changes of reactive oxygen species, cell oxygen consumption rate, ATP content, mitochondrial respiratory chain complex I and mitochondrial respiratory chain complex IV in SHSY5Y stable transfer strains that overexpressed/inhibited miR-214-3p were detected to explore the effects of miR-214-3p on mitochondrial dysfunction. The changes of neuronal activity in SHSY5Y stable transmutation strains overexpressing miR-214-3p with GFM1 were detected by CCK8.

3. To explore the effects of miR-214-3p regulation of GFM1 on mitochondrial function and neuronal activity

Transient transfection method was used to construct SHSY5Y cells that overexpressed GFM1 and overexpressed miR-214-3p. WB was used to detect the overexpression efficiency, and ROS detection kit, cell oxygen consumption rate detection kit, ATP detection kit, and ELISA detection kit were used for detection. The changes of reactive oxygen species, cell oxygen consumption rate, ATP content, mitochondrial respiratory chain complex I and mitochondrial respiratory chain complex IV in SHSY5Y stable transmutation strains overexpressing GFM1 and control plasmids were detected, respectively, to explore the effects of overexpression of GFM1 on mitochondrial dysfunction. The changes of neuron activity in SHSY5Y stable transmutation strains overexpressing GFM1 and control plasmid overexpressing miR-214-3p were detected by CCK8.

Results

1. Combined proteomic and transcriptomic analysis predicted that overexpression of

MiR-214-3p might affect mitochondrial function, and the key gene affecting mitochondrial function might be GFM1. WB verification showed that GFM1 expression was inhibited after overexpression of miR-214-3p.

2. Overexpression of miR-214-3p can promote the generation of reactive oxygen species, and lead to the decrease of cell oxygen consumption rate, ATP content, and the expression of mitochondrial respiratory chain complex I and mitochondrial respiratory chain complex IV. Inhibition of miR-214-3p reversed this regulation.

3. Overexpression of GFM1 can save mitochondrial dysfunction and neuron vitality caused by miR-214-3p, reduce the production of reactive oxygen species, and increase cell oxygen consumption rate

Conclusions

This study found that the upregulation of miR-214-3p can cause mitochondrial dysfunction and decline in neuronal activity, and miR-214-3p can affect mitochondrial function and neuronal activity by regulating the expression of GFM1

Key words: miR-214-3p; Proteomics; Transcriptomics; Dopaminergic neurons; Mitochondrial dysfunction

目 录

前言.....	1
1 miR-214-3p.....	1
2 线粒体功能障碍.....	1
3 线粒体功能障碍与多巴胺神经元	2
4 线粒体 G 伸长因子 1GFM1	3
5 microRNA	3
6 线粒体呼吸链复合物.....	3
7 miRNA 与与线粒体功能障碍	4
第一部分 利用蛋白组学以及转录组学联合分析方法预测 miR-214-3p 调控多巴胺能神经元功能的机制	6
1 材料与方法.....	6
1.1 实验材料.....	6
1.2 主要试剂配制.....	9
1.3 实验方法.....	10
1.4 统计分析.....	19
2 结果.....	19
2.1 过表达/抑制 miR-214-3p 稳转株的构建.....	19
2.2 差异蛋白识别.....	20
2.3 差异蛋白富集分析.....	21
2.4 蛋白组学 PPI 网络分析	22
2.5 差异基因识别.....	23
2.6 差异基因富集分析.....	23
2.7 转录组学 PPI 网络分析.....	24
2.8 关键基因的选取.....	25
2.9 miR-214-3p 调控 SHSY5Y 细胞 GF1 蛋白表达.....	26
3 讨论.....	27
第二部分 miR-214-3p 调控线粒体功能以及多巴胺神经元功能.....	28
1 材料与方法.....	28
1.1 实验材料.....	28
1.2 主要试剂配置.....	30
1.3 实验方法.....	31
1.4 统计分析.....	33
2 结果.....	33
2.1 miR-214-3p 调控多巴胺能神经元活力、线粒体功能障碍	33

3 讨论.....35

第三部分 miR-214-3p 通过调控 GFM1 影响线粒体功能以及多巴胺能
神经元功能37

1 材料与方法.....37

1.1 实验材料.....37

1.2 主要试剂配制.....39

1.3 实验方法.....39

1.4 统计分析.....40

2 结果.....40

2.1 过表达 GFM1 效率的检测.....40

2.2 过表达 GFM1 逆转 miR-214-3p 对神经元活力、线粒体功能障
碍的调控40

3 讨论.....43

全文结论.....45

参考文献.....46

附录 中英文缩略词表57

miR-214-3p 调控 GFM1 影响线粒体功能以及多巴胺能神经元功能的研究

前言

1 miR-214-3p

MiR-214-3p 由 Dynamin-3 对链(Dnm3os)的反义 ncRNA 编码,最初发现 miR-214-3p 可促进 HeLa 细胞凋亡¹。此后,它被认为与心血管疾病、癌症、骨骼发育和细胞分化有关²⁻⁴。在心脏中,miR-214-3p 可以防止 Ca^{2+} 离子过载和氧化损伤⁵,下调血管生成⁶,并可能促进病理性纤维化,^{7,8} miR-214-3p 表达的改变以前与几种神经系统疾病有关,包括阿尔茨海默病 (AD)、多发性硬化症 (MS) 和亨廷顿病。⁹⁻¹¹ 血清中的 miR-214-3p 在早期帕金森病(PD)中上调,在早期和前驱 PD 患者的血清中约为正常人的 2-3 倍,并随着疾病的进展进一步下调。¹²⁻¹³ 与血浆相比,miR-214-3p 在脑组织中的表达明显更高,这表明存在一系列潜在的事件,其中 miR-214-3p 表达的改变最初发生在脑组织中,随后通过外泌体介导的转运进入全身循环系统,包括血液。¹⁴ 这种错综复杂的相互作用强调了 miR-214-3p 作为神经退行性疾病动态和临床相关生物标志物的潜力。

2 线粒体功能障碍

线粒体是细胞核和其他细胞组分之间发生信息交换的中心,通过调节能量产生和代谢物供应,以满足细胞的能量供给。¹⁵ 线粒体含有自己的基因组,这在动物细胞的细胞器中是独一无二的。该基因组编码 13 种呼吸链蛋白。¹⁶ 线粒体的嵴中发现了许多特定线粒体蛋白的亚结构域,特别是 OXPHOS 蛋白。¹⁷ 这些细胞器被称为细胞的“发电站”,通过氧化磷酸化产生 ATP。¹⁸ 此外,线粒体还负责钙处理、细胞凋亡、细胞信号传导和 ROS 的产生。在某些情况下,线粒体会变得功能失调。线粒体功能障碍,定义为无法产生 ATP 或代谢物,或导入/输出蛋白质,当底物(如氧气)限制电子传递链(ETC)的功能时,或线粒体蛋白受损产生遗传改变,就会出现线粒体功能障碍。¹⁹ 虽然轻微或短暂的线粒体功能障碍会诱发适应性应激反应,但持续的线粒体功能障碍通常会导致线粒体自噬消除线粒体²⁰。细胞可以包含一组具有功能性和功能失调的线粒体。功能失调的线粒体可以发送信号来诱导应激反应,例如诱导线粒体热休克蛋白(HSP)的生成,直到线粒体自噬消除它们。线粒体自噬受损可导致功能失调的线粒体体积聚和钙稳态破坏、

ROS 过量产生以及代谢物和 ATP 生成的丧失,所有这些都会导致细胞死亡。^{21,22}

线粒体的基本功能是通过氧化磷酸化 (OxPhos) 系统产生 90% 以上的细胞能量。²³ 通过氧化磷酸化生成 ATP 是一种非常有效的有氧呼吸方法,这是动物、植物和大多数微生物生命形式能量代谢的核心。它比仅由糖酵解产生的底物水平磷酸化更有效。因此,毫无疑问,影响线粒体进行这一重要过程能力的缺陷将严重影响 ATP 的产生,并对细胞功能有害。ATP(磷酸化)的产生与穿过线粒体内膜的质子动力紧密耦合¹⁸。传统上,线粒体被认为是 ROS 的主要来源。目前已确定至少 10 种 ROS 产生的潜在来源。²⁴ 线粒体呼吸链复合物 I (NADH 脱氢酶)和 III(泛素细胞色素 c 还原酶)²⁵ 是最重要的。通过复合物 I 和 II 将电子转移到辅酶 Q 或泛醌中产生泛醇(还原泛醌, QH₂),泛醇通过半醌阴离子(•Q-)再生辅酶 Q。可以将电子转移到分子氧,导致超氧化物的形成。²⁶ 线粒体疾病是由线粒体或核基因组突变引起的线粒体呼吸链功能障碍引起的。是一种原发性疾病,是由基因组间信号传导失败导致 mtDNA 缺失积累引起的。这些 mtDNA 缺陷和呼吸链异常与许多神经退行性疾病的发病机制有关,包括帕金森病。²⁷ 线粒体疾病一直与神经功能缺陷有关,并经常致残。²⁸

3 线粒体功能障碍与多巴胺神经元

线粒体功能障碍可导致多种神经退行性疾病。神经和神经肌肉综合征是线粒体疾病最常见的临床表现。²⁹ 尽管神经元中的线粒体密度可能低于其他细胞(如肌细胞),但大脑消耗的氧气和葡萄糖几乎是其他组织的十倍。³⁰

有很多原因可以解释为什么中枢神经系统(CNS)特别容易受到线粒体功能障碍的影响。首先,大脑是高度代谢活跃的,因此容易发生生物能量衰竭。其次,与其他组织相比,大脑对 ROS 的抗氧化防御较少。³¹ 第三,大脑中的大多数神经元都是有丝分裂后不可替代的(室下区、嗅上皮和海马除外)³²。任何神经元损伤如果不以某种方式得到缓解,对细胞来说都是致命的。神经元对线粒体代谢产生的 ATP 有持续的高需求。这反映在神经元细胞体、轴突、突触前终末和树突分支的高线粒体质量上。³² 为了支持这种代谢需求,线粒体必须是高度动态的,它们需要不断地移动、融合和分裂。线粒体对于 ATP 的生成是必不可少的,ATP 在很多线粒体活动中起着至关重要的作用。³³ 在 PD 过程中,氧化应激增加导致线粒体功能障碍,从而导致线粒体 ROS 增加和线粒体 DNA 缺失。线粒体 ROS 激活 α -synuclein, 导致 α -synuclein 在细胞质中聚集。这些聚集体引起内质网功能障碍、突触功能障碍、线粒体呼吸链复合物 1 和 3 的抑制以及路易小体的形成。路易小体通过增加 $\text{tnf-}\alpha$ 、 il-1 和 il-6 引起小胶质细胞活化,从而导致细胞凋亡、神经炎症和神经元死亡。^{34,35}

4 线粒体 G 伸长因子 1GFM1

Hammarlund 等人在染色体 3q25 上发现并分离了线粒体 G 伸长因子的完整编码序列,并将其定位在染色体 3q25.1-q26.2 上。³⁶在哺乳动物线粒体中,线粒体 G 伸长因子有两种亚型, EFG1 和 EFG2, EFG1 催化线粒体上的 tRNA^{mt} 易位,而 EFG2 只参与线粒体的循环。³⁷人类 EFG1 的突变可导致致命的肝性脑病³⁸,这表明 EFG1 对人类线粒体蛋白的生物合成至关重要。线粒体延伸因子 G1 (EFG1) 由 GFM1 核基因编码,是线粒体翻译过程中核糖体易位所需的关键成分。GFM1 是一种 GTP 酶,可催化肽基-tRNA 从核糖体受体位点 (A 位点) 转移到肽基位点 (P 位点),使核糖体沿着 mRNA 向前移动一个密码子,从而能够通过氨酰基-tRNA 识别 A 位点中的新密码子,从而产生新的延伸周期。³⁹⁻⁴¹线粒体核糖体转运 mRNA - tRNA 模块依赖核糖体小亚基的保守运动和线粒体延伸因子 G1 的高度保守特征。GFM1 不仅控制 SSU 的构象变化以促进 tRNA 的运动,而且还导致线粒体 LSU GTPase 相关中心的大量重排。^{42,43}

5 microRNA

MicroRNA 是保守的非编码小 RNA,在基因转录中发挥重要作用。⁴⁴目前,已鉴定出 2000 多种 miRNA,并可在 <http://www.miRbase.org> 上查询。miRNA 的表达取决于细胞种类和组织的不同。miRNA 被认为影响不同的细胞活动,包括衰老、复制性衰老、细胞增殖和发育。⁴⁵成熟的 miRNA 有 18-24 个核苷酸长,是细胞内基因表达可逆调控的主要参与者。它们已在细菌、病毒、植物和动物中被探索和表征^{46,47}。miRNA 的作用模式已被充分证明;每一种都与一组特定 mRNA 的 3'UTR 区域完全或部分互补结合,导致 mRNA 转录物被翻译抑制。^{48,49}

6 线粒体呼吸链复合物

呼吸链复合物是细胞中最大的膜蛋白复合物之一。它们通过一些氧化还原辅助因子,包括黄素、铁硫簇、血红素和离子,将电子从 NADH 和琥珀酸盐转移到分子氧中。⁵⁰线粒体呼吸链复合物 I (NADH:泛醌氧化还原酶)在细胞代谢中起核心作用。它将线粒体基质中的 NADH 氧化为 NAD⁺,提供还原等量物来支持三羧酸循环(Krebs 循环)和脂肪酸的 β -复合体 I,这也是活性氧(ROS)产生的主要来源之一,它对线粒体和氧化应激有巨大的影响。线粒体呼吸链复合物 I (NADH:泛醌氧化还原酶或 NADH 脱氢酶)是 OXPHOS 的重要电子传递入口点。线粒体呼吸链复合物 I 是线粒体呼吸链的第一个酶线粒体呼吸链复合物。它通过氧化线粒体基质中三羧酸(TCA)循环、线粒体脂肪酸 β -氧化 (FAO)和氨基酸分解代谢产生的 NADH 发挥作用。⁵¹⁻⁵³线粒体呼吸链复合物 II 琥珀酸脱

氢酶，是柠檬酸循环的一部分，催化琥珀酸盐氧化为富马酸盐，并将泛醌还原为泛醇。⁵⁴ 线粒体呼吸链复合物 III，也称为细胞色素 bc₁，将电子从 QH₂ 转移到细胞色素 c 与质子在 IMM 上的易位耦合在一起。⁵⁵ 线粒体呼吸链复合物 IV 又名细胞色素 c 氧化酶，催化电子传递的最后一步，将细胞色素中的电子传递给氧气反应中心。⁵⁶ 它编码的三个亚基（MT-CO1、MT-CO2 和 MT-CO3）的 mtDNA 序列中的许多突变是 COX 缺乏症和线粒体疾病的致病原因。⁵⁷

7 miRNA 与与线粒体功能障碍

许多 miRNA 靶向与线粒体功能相关的蛋白质的 mRNA，如 LRRK2、DJ-1、PINK-1、Parkin 和电压依赖性阴离子选择性通道-1（VDAC1）。⁵⁸ miR-144-3p 是 ATP 的负调节因子，通过下调 PGC-1 α ，TFAM 来降低线粒体功能。在 MPTP 暴露的 SH-SY5Y 细胞中转染 miR-144-3p 模拟物可降低 ATP 表达，并减轻 MPTP 诱导的线粒体功能障碍。⁵⁹ miR-7 表达的增加降低了 mPTP 通道的打开，减少了线粒体的断裂/去极化，减轻了氧化应激和前凋亡蛋白的释放。此外，它还通过下调 NLRP3 炎症小体来降低促炎细胞因子的水平。⁶⁰ miR-145-3p 调节 DJ-1 蛋白的表达并维持线粒体稳态。在 PD 患者中，miR-145-3p 的过表达导致 DJ-1 减少，从而增加氧化应激。⁶¹ miR-124 在大脑中大量表达，调节 PD 中的细胞存活、自噬、线粒体功能障碍。通过这些功能，它表现出神经保护作用。⁶² miR-425 在神经保护中的作用已在 C57BL/6 小鼠 PD 模型中得到证明。它的抑制促进线粒体在细胞体内的积累，并伴随着 ROS 产生的增加。⁶³ miR-146a 通过抑制 parkin 促进线粒体碎片化。发现其水平在 PD 中升高。用抗 miR-146a 转染鱼藤酮暴露的 SH-SY5Y 细胞导致细胞免于线粒体碎裂和氧化应激。⁶⁴ miR-181a 和 miR-181b 调控参与线粒体生物发生和自噬的关键基因。这些 miRNA 负靶向 NRF1、细胞色素加氧酶 11（COX11）和辅酶 Q 结合蛋白 10B（COQ10B）。研究表明，miR-181a/b 的下调刺激了线粒体的生物进程。miR-181a/b 沉默可保护细胞在 FCCP 处理后免受线粒体损伤。

⁶⁵

基于以上研究目的我们将通过慢病毒转染方法构建过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株，在用蛋白组学和转录组学联合分析发现过表达 miR-214-3p 对 SHSY5Y 细胞线粒体产生了较大影响，并找出了过表达 miR-214-3p 影响线粒体功能障碍的关键基因。通过 WB 检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株中 GFM1 的表达，通过 ROS 试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株中的活性氧的生成，利用细胞耗氧率检测试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株中的细胞耗氧率变化。利用 ATP 检测试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-

3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株中 ATP 含量的变化。通过 ELISA 试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株中线粒体呼吸链复合物 I 和线粒体呼吸链复合物 IV 的变化。通过 CCK8 检测试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株中对神经元活力的影响。之后通过瞬时转染过表达 GFM1 挽救过表达 miR-214-3p 引起的线粒体功能障碍和神经元损伤，通过 WB 检测瞬时转染 GFM1 的效率，通过 ROS 检测试剂盒，细胞耗氧率检测试剂盒，ATP 检测试剂盒，ELISA 检测试剂盒，分别检测过表达 GFM1 且过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株中活性氧，细胞耗氧率，ATP 含量，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的变化，通过 CCK8 检测过表达 GFM1 且过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株中神经元活力的变化。揭示过表达 miR-214-3p 对于线粒体功能障碍以及神经元活力的影响以及过表达 GFM1 能否对其进行挽救。

第一部分 利用蛋白组学以及转录组学联合分析方法预测 miR-214-3p 调控多巴胺能神经元功能的机制

SH-SY5Y 细胞系是一种源自 SK-N-SH 细胞系的人类神经母细胞瘤细胞系，SK-N-SH 细胞系是从一名患有转移性神经母细胞瘤的 4 岁女性骨髓活检中培养出来的⁶⁶。SH-SY5Y 细胞已被广泛用于神经元近似和解剖神经退行性疾病和疼痛疾病的致病分子机制。⁶⁷⁻⁶⁹

蛋白质组学工具能够对组织、血浆、血清和脑脊液进行深度蛋白质分析，以发现生物标志物。⁷⁰。目前，自下而上的蛋白质组学方法是首选方法。它利用液相色谱与串联质谱（LC-MS/MS）联用来鉴定和定量来自溶解和胰蛋白酶消化蛋白的胰蛋白酶肽。^{71,72}多年来，转录组学技术提供了多种所涉及的分子途径的非常重要的信息，从而可以识别可能对诊断和预后有用的特定生物标志物。⁷³⁻⁷⁵

在课题组之前的研究中，我们发现了 miR-214-3p 在 PD 中的作用，重点关注其对自噬和多巴胺能神经元活力的影响。使用体外和体内模型，我们证明 miR-214-3p 抑制自噬并促进多巴胺能神经元凋亡。⁷⁶但引起多巴胺能神经元凋亡的途径很多，许多因素，包括氧化应激、炎症、线粒体功能障碍、细胞凋亡和自噬，^{77,78}在其中都起着重要的致病作用。

因此，我们用慢病毒转染的方式构建了过表达/抑制 miR-214-3p 的 SH-SY5Y 稳转株，对其进行了蛋白质组学和转录组学测序，通过蛋白组学和转录组学联合分析，找出过 miR-214-3p 影响多巴胺能神经元的机制，以及调控这一机制的主要基因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞

- (1) 人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y，购买于中科院上海细胞库。
- (2) 人肾上皮细胞 293T，购买于中科院上海细胞库。

1.1.2 质粒

- (1) 慢病毒包装质粒 psPAX2、pMD2.G 由南京中医药大学基础医学院教师赠予。
- (1) 慢病毒载体质粒 LV3 (H1/GFP&Puro)-shNC、LV3 (H1/GFP&Puro)-hsa-miR-214-3p inhibitor、LV3 (H1/GFP&Puro)-hsa-miR-214-3p mimics 由上海吉玛制药技术有限

公司构建。

LV3 (H1/GFP&Puro) 慢病毒载体质粒图谱及 LV3 (H1/GFP&Puro)-shNC、LV3 (H1/GFP&Puro)-hsa-miR-214-3p inhibitor、LV3 (H1/GFP&Puro)-hsa-miR-214-3p mimics 测序结果如图 1.1 所示。

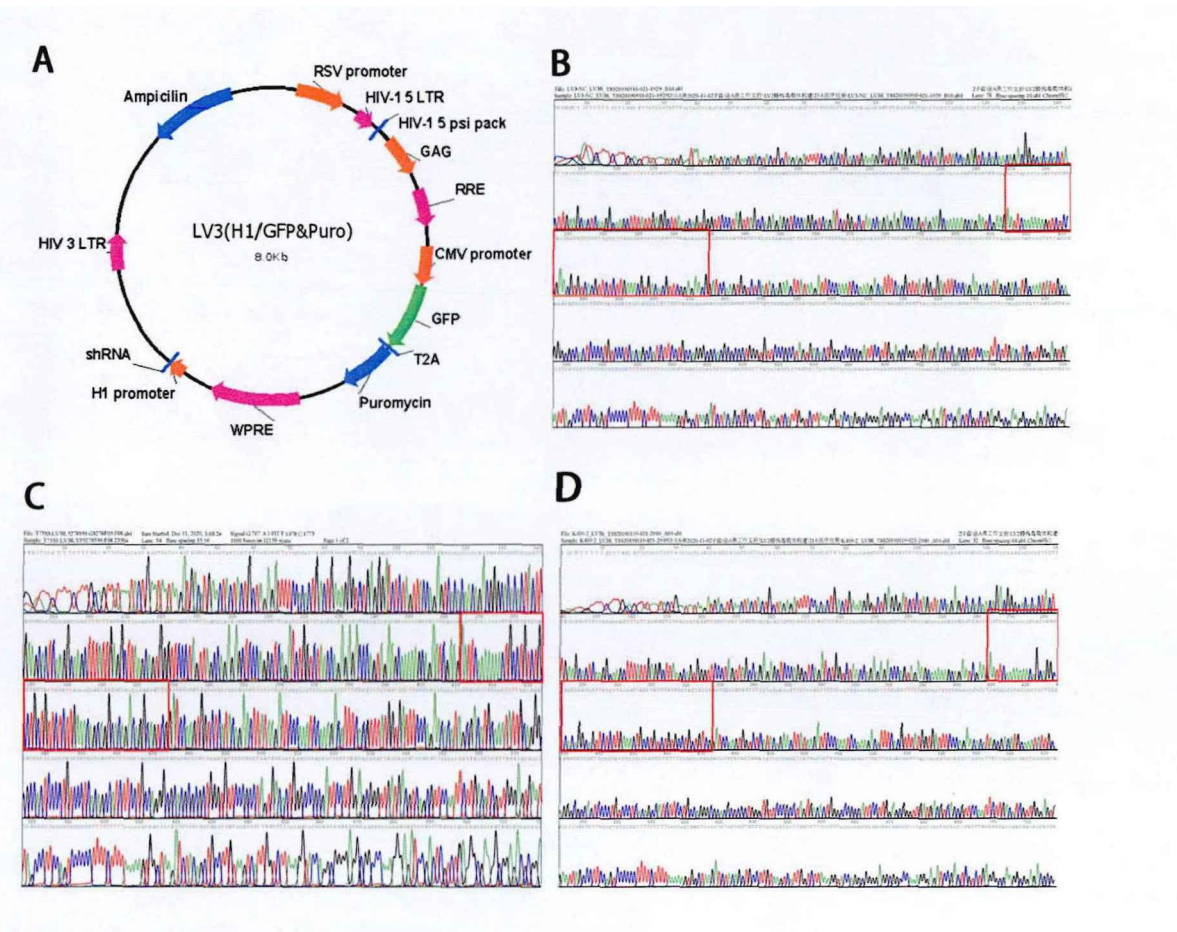


图 1.1 LV3 (H1/GFP&Puro) 慢病毒载体质粒图谱及质粒测序结果

A. LV3 (H1/GFP&Puro) 慢病毒载体质粒图谱；B. LV3 (H1/GFP&Puro)-shNC 慢病毒质粒测序结果；C. LV3 (H1/GFP&Puro)-hsa-miR-214-3p mimics 慢病毒质粒测序结果；D. LV3 (H1/GFP&Puro)-hsa-miR-214-3p inhibitor 慢病毒质粒测序结果。

1.1.3 实验仪器

仪器名称	生产厂家
酶标仪	BIO-RAD 公司（美国）
电泳仪	BIO-RAD 公司（美国）
生物安全柜	益世科生物
二氧化碳培养箱	Thermo Scientific

四度冰箱	美菱
负二十度冰箱	美菱
负八十度超低温冰箱	美菱
台式离心机	Thermo Scientific
微量离心机	Thermo Scientific
酶标仪	Thermo Scientific
紫外微量分光光度仪	Eppendorf
梯度 PCR 仪	Bio-Rad
荧光定量 PCR 仪	METTLER TOLEDO
电子天平	Bio-Rad
迷你垂直电泳槽	韦克斯
迷你转膜槽	韦克斯
化学发光成像仪	FrOteinsample
涡旋混匀仪	翌圣生物
摇床	Kylin-BellLab Instruments
恒温金属加热器	Thermo Scientific
电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
电子显微镜	Nikon
荧光显微镜	Nikon
细胞计数板	Hauserscientific
纯水仪	MERCK
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
高压灭菌锅	致微（厦门）仪器有限公司
转膜仪	BIO-RAD 公司（美国）
实时荧光定量 PCR 仪	ThermoFisher 公司（美国）
非接触式超声破碎仪器	Diagenode（比利时）
紫外微量分光光度仪	Eppendorf（中国）
超速离心机	贝克曼公司（美国）
移液器	普诺恩生物技术有限公司
抗体孵育盒	普诺恩生物技术有限公司
程序降温盒	普诺恩生物技术有限公司
细胞刮刀	普诺恩生物技术有限公司
EP 管	普诺恩生物技术有限公司

1.1.4 实验试剂

试剂名称	生产厂家
DMEM 高糖培养基	Gibco (美国)
青链霉素混合液(100×)	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
嘌呤霉素	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
胰蛋白酶-无 EDTA 消化液	Gibco (美国)
胎牛血清	Gibco 公司 (美国)
10×TBST 缓冲液	塞维尔生物科技有限公司 (中国)
BCA 蛋白定量试剂盒	雅酶生物科技有限公司 (中国)
高效 RIPA 裂解液	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
Western 一抗稀释液	碧云天生物科技有限公司 (中国)
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	雅酶生物技术有限公司 (中国)
Opti-MEM I 减血清培养基 (含 L-谷氨酰胺)	Gibco (美国)
PMSF	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
Trizol	GLPBI0 (美国)
含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
二甲基亚砜 (DMSO)	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
QuickShuttle-Enhanced(增强型转染试剂)t	苏州博奥龙免疫技术有限公司 (中国)
磷酸盐缓冲液 (PBS) 1×	普诺恩生物科技有限公司
RNA 提取试剂盒	贝贝生物科技有限公司 (中国)
Western 一抗二抗去除液(弱碱性)	碧云天生物科技有限公司 (中国)
FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit	诺唯赞公司 (中国))
无血清细胞冻存液	新赛美生物科技有限公司 (中国)
海美溴铵	福麦斯公司 (中国)
多色预染蛋白 Marker	雅酶生物科技有限公司 (中国)
脱脂奶粉	索莱宝生物科技有限公司 (中国)
5×SDS 上样缓冲液	普诺恩生物科技有限公司)
电泳液 10* (Tris/SDS/甘氨酸)	普诺恩生物科技有限公司)

1.2 主要试剂配制

1.2.1 细胞培养相关试剂的配制

细胞培养基：在生物安全柜中，向 50ml 离心管中加入 45mlDMEM 高糖培养基以

及 5ml 胎牛血清，吹打混匀，用封口膜封闭管口后转移至四度冰箱中暂存。

1.2.2 Western Blot 相关试剂的配制

(1) 向 100ml 10×电泳缓冲液中加入 900ml ddH₂O, 稀释为 1L 1×电泳液，震荡摇匀。配置完成后，记录配置时间及溶液名称，置于室温暂存。

(2) 转膜缓冲液 (1×)：量取 100ml 的 10×转膜缓冲液，用 800ml 去离子水以及 100ml 甲醇定容至 1L，振荡混匀，记录配置时间及溶液名称，置于室温暂存。

(3) TBST (1×)：量取 100ml 的 10×TBST，加入 900ml ddH₂O, 稀释为 1L 1×TBST 溶液，振荡混匀。记录配置时间及溶液名称，置于室温暂存。。

(4) 封闭液：在封闭操作前，配置 5%脱脂牛奶。用电子天平称量 0.5g 脱脂奶粉，向其中加入 1×TBST 缓冲液，定容为 10ml, 涡旋振荡使其充分混匀并放置于摇床上 100rpm/min 摇 10min。

(5) 一抗稀释液：配置 3%脱脂牛奶作为一抗稀释液（现用现配），用电子天平称量 0.3g 脱脂奶粉，向其中加入 1×TBST 缓冲液，定容为 10ml, 涡旋振荡使其充分混匀并放置于摇床上 100rpm/min 摇 10min。

1.2.3 药物的配制

MPP⁺液配制：使用 PBS 溶液溶解 MPP⁺粉末，配置成 30mM 的母液放入-80℃冰箱中暂存，使用时使用 DMEM 培养基稀释至 1.5mM 进行使用，以防止反复冻融影响药物作用效果。

1.2.4 LB 培养基及甘油菌液的配制

(1) LB 固体培养基的制备：将 10g 胰蛋白胍固体粉末、10gNaCl、5 g 酵母提取物、琼脂粉 15 g 全部加入蒸馏水中，定容至 1L，搅拌使其充分溶解，调节 PH 值到 7.2 左右，将其分装，使用透气膜对其进行封口，121℃高压灭菌 15min，灭菌后培养基冷至不烫手时再加入氨苄抗生素，摇匀倒板。倒好的含抗生素的平板 4℃保存，2 周内用完。。

(2) LB 液体培养基的制备：将 10g 胰蛋白胍，5g 酵母粉，10gNaCl 全部加入蒸馏水中，定容至 1L，搅拌使其充分溶解，调节 PH 值到 7.2 左右，并进行分装，使用透气膜对其进行封口，121℃高压灭菌 15min，备用

(3) 甘油菌液的制备：使用 ddH₂O 1: 1 稀释甘油，配置为 50%甘油溶液，用移液枪混匀。贴好灭菌指示带，放入高压灭菌锅中进行高压灭菌。（121℃，30min），灭菌结束后做好记录，放入 4 度冰箱中备用。

。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

(1) 细胞复苏：提前将水浴锅预热至 37℃，同时预热配置好的 DMEM 高糖培养基。从液氮罐中取出冻存的细胞，快速将其放入 37℃ 水浴锅中，以防止细胞死亡。在水浴锅中八字摇晃冻存管，使细胞分布均匀，待细胞完全溶解后将其迅速转移至 10ml 离心管内，1000 rpm 离心 5 min。在离心结束后弃去上清，用移液枪加入 1ml 预热好的 DMEM 高糖培养基，用移液枪缓慢吹打细胞混悬液，使其均匀分布。向 25 cm² 无菌培养瓶中加入 4ml DMEM 高糖培养基，再向培养瓶中加入 1ml 细胞混悬液。八字摇匀使细胞均匀分布在瓶底。放置到显微镜下观察细胞密度以及分布情况。最后将其移入到 37℃ 培养箱中培养。

(2) 细胞传代：48h 后将细胞从培养箱中取出，显微镜下观察细胞的密度以及生长状态后进行传代操作。弃去 DMEM 高糖培养基，加入 1ml PBS，洗去残留培养基。加入 1ml 胰酶，放入 37℃ 培养箱中消化 1min。加入 1 mL DMEM 高糖培养基终止消化，使用移液枪将混合液转移至离心管内，配平后放入离心机中离心（1000rpm, 5min）。弃上清并加入 1ml DMEM 高糖培养基重悬细胞。向两个 25 cm² 无菌培养瓶中分别加入 4ml DMEM 高糖培养基，再向两个培养瓶中加入 0.5ml 细胞混悬液。8 字摇匀使细胞均匀分布在瓶底。放置到显微镜下观察细胞密度以及分布情况。最后将其移入到 37℃ 培养箱中培养。

(3) 细胞冻存：将细胞从培养箱中取出，显微镜下观察细胞的密度以及生长状态后进行冻存操作。弃去 DMEM 高糖培养基，加入 1ml PBS，洗去残留培养基。加入 1ml 胰酶，放入 37℃ 培养箱中消化 1min。加入 1 mL DMEM 高糖培养基终止消化，使用移液枪将混合液转移至离心管内，配平后放入离心机中离心（1000rpm, 5min）。弃上清并加入 1ml 细胞冻存液重悬细胞。吹打混匀后将混合液转移至冻存管中，放置到 -80℃ 冰箱中暂存，如需长期保存，需在一周内将细胞从 -80℃ 冰箱转移至液氮罐中储存。

1.3.2 质粒转化、扩增及提取

(1) 质粒的转化

1) 从负八十度冰箱中取出 DH5 α 感受态细胞，立即放在冰上，静置 3-5 分钟，待细胞融化后，向其中加入待转化质粒，轻弹管壁混匀，冰上静置 30 min。

2) 提前将水浴锅加热至 42℃，将 DH5 α 感受态细胞放于水浴锅中，热激 45s，热激之后，迅速将细胞转移至冰上，静置两分钟。

3) 向 DH5 α 感受态细胞中加入 900 μ l 不含抗生素的 LB 培养基，轻轻吹打混匀，将其放入 37℃ 摇床中，200rpm 复苏 1 小时。

4) 从摇床中取出离心管，5000rpm 转速离心 3 分钟，将上清弃去，吹打混匀剩余菌液，使用接种棒将其均匀涂布在加入氨苄抗生素的 LB 固体培养基中。

5) 将涂布均匀的 LB 平板正面放置于 37℃ 培养箱中，10 分钟后观察平板吸收情况

后将平板倒置，培养 12-16 小时。

(2) 质粒的扩增

1) 向 12ml 摇菌管中加入 4ml 左右 LB 液体培养基，并加入适量的氨苄抗生素。加入要接种的菌种，放于 37℃ 摇床中，200rpm 培养 12-16 小时。

2) 将摇菌管中菌液分装至离心管中，13000rpm 离心 2 分钟。

3) 弃去离心管中的 LB 培养基，加入 250ul Buffer P1/RNase A 混合液，高速涡旋，充分混匀至混合液中没有沉淀为止。

4) 往重悬液中加入 250ul Buffer P2, 颠倒混匀，重复 8-10 次，直至混悬液变得澄清透明粘稠为止。

5) 加入 350ul Buffer P3, 立即颠倒 8~10 次让溶液彻底中和。

6) 将混悬液放入离心机中进行离心，13000rpm 转速离心一分钟。

7) 将 HiPure DNA MiniColumn IV 装在收集管中。将上清液转移到收集管中，放入离心机中进行离心，13000rpm 转速离心一分钟。

8) 弃去滤液，向柱子中加入 500ul Buffer PW1，放入离心机中进行离心，13000rpm 转速离心一分钟。

9) 弃去滤液，向柱子中加入 600ul Buffer PW2。放入离心机中进行离心，13000rpm 转速离心一分钟。

10) 弃去滤液。将柱子放入离心机中进行离心，13000rpm 转速离心三分钟。

12) 把柱子套在灭菌的 1.5ml 离心管中。加入 30-100ul Elution Bufer 至柱子的膜中央。静置 1 分钟，放入离心机中进行离心，13000rpm 转速离心一分钟。

13 使用紫外分光光度计测定质粒浓度，做好标记后放入负四十度冰箱储存。

1.3.3 慢病毒包装、过滤及浓缩

(1) 慢病毒包装

1) 铺板 HEK-293T 细胞，六孔板每孔接种 10^5 个细胞，加入 2ml 配置好的 DMEM 高糖培养基，镜下观察细胞是否均匀分布，转移至 37℃ 细胞培养箱中培养。

2) 第二天：向 200 μ L 生理盐水中加入 20 μ L 转染试剂和 8 μ L 质粒，吹打混匀。向 Opti-MEM I 减血清培养基中加入此混合液，8 字摇匀。将孔板转移至 37℃ 培养箱中培养。

3) 第三天：弃掉 Opti-MEM I 减血清培养基，换液为 DMEM 高糖培养基，转移至 37℃ 细胞培养箱中培养。

(2) 慢病毒过滤

1) 第四到六天：分别在慢病毒转染后的 24h、48h、72h 后观察各孔板中荧光密度，若荧光密度达到百分之八十以上，则收取病毒液。用 10 mL 无菌注射器吸取含有慢病

毒, 通过 $0.45\ \mu\text{m}$ 针头式过滤器过滤。将收集的病毒液分装至离心管中, 标好收集时间以及转染病毒种类。

(3) 慢病毒浓缩

1) 超高速离心管中加入收集好的慢病毒液, 两两配平, 重量差要在 50mg 以下, 液面不要过高, 需低于管口一厘米以上。

2) 超速离心机中 $4\ ^\circ\text{C}$, $40000\ \text{g}$, 离心 $2\ \text{h}$, 离心结束弃上清, 加入 $1/100$ 的 PBS 重悬沉淀, 分别放置到四度冰箱和负八十度冰箱中保存, 四度冰箱可保存一周左右, 负八十冰箱中可保存 2-3 个月。

1.3.4 病毒滴度测定

(1) 96 孔板中每孔铺板 4×10^4 个细胞并加入 $100\ \mu\text{L}$ DMEM 高糖培养基, 八字摇匀细胞, 镜下观察细胞分布, 随后将孔板转移至 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。

(2) 24h 后取 $10\ \mu\text{L}$ 病毒液, 以 $1:9$ 的比例混合病毒液和 DMEM 高糖培养基, 混匀后再取 $1/10$ 混合液重复此操作, 此过程共重复 9 次 (如图 1.2)。弃去孔板中培养基, 加入混匀的病毒液, 转移至 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24h。

(3) 弃去孔板中液体, 加入 DMEM 高糖培养基。

(4) 换液 48h 后, 根据最后一孔细胞荧光数计算病毒滴度=最后孔中的荧光细胞数/病毒原液量/ $1\text{E}-8$ (TU/ μL)。

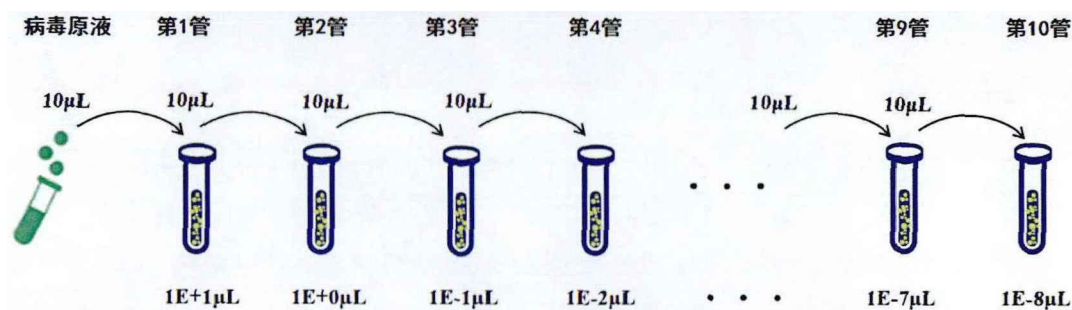


图 1.2 慢病毒原液稀释操作方法

1.3.5 稳转株的构建

(1) 六孔板每孔种 4×10^4 个 SHSY5Y 细胞并加入 2ml DMEM 高糖培养基, 八字摇匀孔板内细胞, 显微镜下观察细胞分布情况, 随后转移至 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。

(2) 第二天从培养箱中取出孔板并弃去培养基, 加入 1ml Opti-MEM I 减血清培养基 (含 0.5% polybrene), 再加入 1ml 浓缩后的病毒液 (从负八十度冰箱中取出的慢病毒只可使用一次, 反复冻融后感染效率会明显下降), 8 字摇匀并转移至 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 24h。

(3) 第三天, 弃去孔板中培养液, 加入 PBS 润洗后加入 2ml DMEM 高糖培养基转移至 $37\ ^\circ\text{C}$ 培养箱中培养。

(4) 第四天开始加入嘌呤霉素筛选稳转株，每隔一天换液一次，重复一周左右可得目的稳转株。

1.3.6 蛋白组学

用慢病毒分别构建过表达 miR-214-3p (n=3)，抑制表达 miR-214-3p (n=3) 及对照 (n=3) 的 SH-SY5Y 稳转株，送上海伟寰生物科技有限公司进行 DIA (Data independent acquisition) 蛋白组学检测。

1.3.6.1 差异蛋白识别

在获得 p 值后进行多重假设检验和校正。筛选标准为 $\log_2FC$ (折叠变化) >1 或 <-1 ，调整后的 p 值 (Q 值) <0.05 。并使用热图和火山图来可视化这些差异蛋白

1.3.6.2 差异蛋白功能富集分析

GO 功能富集分析是对基因和蛋白功能进行限定和描述，GO 功能富集分析中包括对生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组件 (CC) 的分析。KEGG 是了解基因高级功能通路和生物系统的数据库资源。将筛选的差异蛋白上传到 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)，进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析，并使用 R ggplot2 包将其可视化。采用费歇尔精确双端检验方法进行检验，P-value 值小于 0.05 为显著。

1.3.6.3 PPI 网络分析

使用检索相互作用蛋白的检索网站 David (<https://cn.string-db.org/>) 预测这些差异蛋白的 PPI 网络，并在 Cytoscape 软件 3.6.1.17 中可视化这些差异蛋白。接下来，使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件，通过边和节点的关系，筛选出其中关键的子网络和蛋白。选择标准如下：MCODE scores >5 , node score cut-off = 0.2, degree cut-off = 2, Max depth = 100, k-score = 2

1.3.7 转录组学

用慢病毒分别构建过表达 miR-214-3p (n=5)，抑制表达 miR-214-3p (n=5) 及对照 (n=5) 的 SH-SY5Y 稳转株，送到欧易有限公司进行 DIA (Data independent acquisition) 转录组学检测。

1.3.7.1 差异基因识别

选取蛋白组学中过表达组相对于对照组下降的基因进行差异基因识别，如果这些基因在转录组学测试中，p-value 值小于 0.05，这些基因将被选取为转录组学中的差异基

因

1.3.7.2 差异基因功能富集分析

GO 功能富集分析是对基因和蛋白功能进行限定和描述，GO 功能富集分析中包括对生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞组件（CC）的分析。KEGG 是了解基因高级功能通路和生物系统的数据库资源。将筛选的差异基因上传到 DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/>），进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析，并使用 R ggplot2 包将其可视化。采用费歇尔精确双端检验方法进行检验，P-value 值小于 0.05 为显著。

1.3.7.3 PPI 网络分析

使用检索相互作用基因的检索网站 David（<https://cn.string-db.org/>）预测这些差异基因的 PPI 网络，并在 Cytoscape 软件 3.6.1.17 中可视化这些差异基因。接下来，使用 Cytoscape 软件的 MCODE 插件，通过边和节点的关系，筛选出其中关键的子网络和基因。选择标准如下：MCODE scores >5, node score cut-off = 0.2, degree cut-off = 2, Max depth = 100, k-score = 2

1.3.8 关键基因的选取

在 microRNA 靶基因的预测网站 Targetscan(<https://www.targetscan.org/>) 预测 miR-214-3p 的靶基因，与蛋白组学分析中选取的关键蛋白，转录组学分析中选取的关键基因取交集，得出 miR-214-3p 调控线粒体功能障碍的关键蛋白。

1.3.9 蛋白提取及浓度检测

（1）细胞蛋白样本提取 取出细胞弃去上清 PBS 洗三遍，向六孔板中每个孔加入 100 μ L 的含有 2% PMSF，1% pi 的 RIPA 裂解液，置于冰上裂解 20 min。待其充分裂解后，用刮刀将细胞刮下，转移至 ep 管中，每隔十分钟振荡混匀一次，重复三次，4 $^{\circ}$ C，12000 r/min 离心 320min，离心结束后吸取上清至 1.5mL EP 管中，用 BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度。

（2）测定蛋白浓度 使测定蛋白浓度前，以 A 液与 B 液 50: 1 的比例配置 BCA 工作液，吹打混匀。向 96 孔板中加入不同浓度的标准品以及稀释 10 倍的待测样品。并向每个标准品孔中加入 200 μ L BCA 工作液，放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱避光孵育 30min. 酶标仪波长调为 A562，测定 2 蛋白浓度。

1.3.10 Western Blot (WB)

（1）制胶：从四度冰箱中取出 12.5% 的分离胶，根据配胶试剂盒说明（5mlA 液，

5mlB 液, 120 μ LAPS) 配好分离胶并充分混匀, 加入 4.5ml 混匀后的分离胶至制胶板中, 注意缓慢加入, 不要产生气泡, 向胶板中加满 ddH₂O。待胶凝固后, 将 ddH₂O 倒出。配置 12.5%上层浓缩胶 (1.5mlA 液, 1.5mlB 液, 20 μ LAPS), 混匀上层浓缩胶后, 取 1.5ml 加入到制胶板中, 向制胶板中迅速插入十孔梳, 插入时要小心, 避免产生气泡。。

(2) 煮蛋白: 测定出蛋白浓度后, 向蛋白溶液中加入适量的 5 $\times$ 上样缓冲液和 Ripa 裂解液, 混匀后将其放入已经预热至 100 $^{\circ}$ C 的恒温金属加热器中, 加热 25min, 转移至负八十冰箱中保存。

(3) 上样: 从冰箱中取出煮好的蛋白。在上样前使用离心机将样品摇匀, 将配制好的胶板放到电泳槽里, 向其中加满稀释好的 1 $\times$ 电泳液, 缓慢拔出梳子。将待测蛋白和 maker 分别加入对应孔道, 在外槽中加入外槽体积一半的电泳液, 盖好电泳槽盖子。

(4) 电泳: 恒压 80V 开始电泳, 20min 后, 待蛋白跑到下层胶以后, 调整电压为 120V, 时间设置为 70min。根据目的蛋白和内参蛋白的分子量确定停止电泳的时间。

(5) 转膜: 将裁剪好的 PVDF 膜放入甲醇中激活 10min, 制作转膜三明治并将其放入转膜槽, 在外槽放入冰袋并加满转膜液。盖上盖子后将其放入冰盒中, 开始转膜 (250mA, 40min)。

(6) 洗膜: 转膜结束之后从三明治中取出条带放入孵育盒中, 加入 1 $\times$ TBST 溶液, 放置于摇床上 100rpm/min 进行洗膜, 重复三次, 每次 8min。

(7) 封闭: 弃去 1 $\times$ TBST 溶液, 加入 5%脱脂牛奶, 放置于摇床上 50rpm/min 孵育 1h。

(8) 洗膜: 弃去脱脂牛奶溶液, 放置于摇床上 100rpm/min 进行洗膜, 重复三次, 每次 8min。

(9) 孵育一抗: 弃去 TBST, 加入一抗溶液, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。

(8) 复温: 回收一抗, 加入 1 $\times$ TBST 溶液, 放置于摇床上 100rpm/min 进行洗膜, 重复三次, 每次 8min。。

(8) 孵育二抗: 使用二抗稀释液稀释二抗, 放置于摇床上 50rpm/min 孵育 1h。孵育结束后回收二抗, 加入 1 $\times$ TBST 溶液, 进行洗膜, 重复三次, 每次 8min。。。

(9) 化学发光: 以 A 液和 B 液 1: 1 比例配置化学发光液, 放置于暗室避光, 将条带放入其中充分浸润后进行上机检测。

(10) 洗去一抗二抗: 上机检测后加入 ddH₂O 进行洗去一抗二抗, 放置于摇床上 100rpm/min 漂洗 5min。弃去 ddH₂O, 加入一抗二抗去除液, 放置于摇床上 100rpm/min 漂洗 10min。弃去一抗二抗去除液, 加入 1 $\times$ TBST 溶液, 放置于摇床上 100rpm/min 进行洗膜, 重复三次, 每次 5min, 结束后弃去 TBST 溶液, 加入一抗过夜孵育。

1.3.11 RNA 的提取

- (1) 六孔板每孔种 10^5 个细胞, 向每个孔板中加入 $500\ \mu\text{L}$ Buffer RL, 于摇床上震荡 15min, 收集裂解后的细胞溶液至 FastPure gDNA-Filter Columns III 中, 放入离心机中进行离心 (12000rpm , 30s), 收集滤液。
- (2) 每个收集管内加入 $250\ \mu\text{L}$ 无水乙醇, 涡旋混匀。
- (3) 向 FastPure RNA Columns III 中加入步骤二得到的混合液, 放入离心机中进行离心 (12000rpm , 30s), 倒弃滤液。
- (4) 加入 $700\ \mu\text{L}$ Buffer RW1, $12000\ \text{rpm}$, 放入离心机中进行离心 (12000rpm , 30s), 倒弃滤液。
- (5) 加入 $700\ \mu\text{L}$ Buffer RW2 (已加入无水乙醇), 放入离心机中进行离心 (12000rpm , 30s), 倒弃滤液。
- (6) 重复上一步骤。
- (7) 弃滤液, 放入离心机中进行离心 (12000rpm , 60s)。
- (8) 小心将吸附柱转移至新的离心管中, 向吸附柱中央悬空滴加 $100\ \mu\text{L}$ 的 RNase-free ddH₂O, 室温静置 1 min, 放入离心机中进行离心 (12000rpm , 60s), 即得所需的 RNA 样本。
- (9) 提取的 RNA 放于 -80 冰箱保存。

1.3.12 引物序列

所用引物由上海生工有限公司合成提供, 引物序列如表 1.1 所示:

表 1.1 引物序列

引物名称	引物序列 (5' -3')
miR-214-3p 茎环引物	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA
	CTGGATACGACACTGCC
miR-214-3p-F	GCACAGCAGGCACAGACA
miR-214-3p-R	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT

1.3.13 miRNA 的 qPCR

- (1) 去除 gDNA

1) 根据诺唯赞试剂盒 HiScript® III RT SuperMix for qPCR 的说明, 用 RNase-free 离心管配制如表 1.2 所示的反应体系:

表 1.2 去除 gDNA 反应体系

试剂成分	体积
RNase-free ddH ₂ O	to10 μL
5×gDNA wiper Mix	2 μL
模板 RNA	200 ng

2) 轻轻吹打混匀配好的反应体系，42 °C 放置 2 min。

(2) miRNA 逆转录合成 cDNA

1) 将上一步反应体系按照表 1.3 配置逆转录反应体系。

表 1.3 miRNA 逆转录反应体系

试剂名称	试剂用量
RNase-free ddH ₂ O	to 20 μL
上一步的混合液	10 μL
Stem-loop primer (2 μM)	1 μL
10×RT mix	2 μL
HiScript II Enzyme Mix	2 μL

2) 吹打混匀后瞬时离心，然后在 PCR 仪中按表 1.4 中的反应条件进行逆转录：

表 1.4 miRNA 逆转录反应条件

反应温度	时间
25 °C	5 min
50 °C	15 min
85 °C	5 min

(3) miRNA 的 qPCR

1) 将逆转录好的反应体系，按照试剂盒 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 说明，在 RNase-free 八连排中遵表 1.5 所示配置反应体系：

表 1.5 miRNA 的 qPCR 反应体系

试剂成分	体积
2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10 uL
Primer F (10 μM)	0.4 uL

Primer R (10 μM)	0.4 uL
cDNA	200 ng
ddH ₂ O	to 20 μL

2) 将配好的反应体系和混匀、离心，注意不要有气泡。按表 1.6 反应程序设置进行 qPCR 反应。

表 1.6 miRNA 的 qPCR 反应程序

	反应步骤	循环	温度	时间
Stage 1	预变性	Reps: 1	95 °C	30 sec
			95 °C	10 sec
Stage 2	循环反应	Reps: 40	60 °C	30 sec
			95 °C	15 sec
			60 °C	60 sec
Stage 3	溶解曲线	Reps: 1	95 °C	15 sec

1.4 统计分析

论文中所有实验均有三次以上重复结果，采用 Image J 软件对 Western Blot 结果进行统计分析，采用 GraphPad Prism 8 软件作图分析数据，实验数据以均值±标准差（Mean±S.E.M）表示。两组比较使用独立样本 t 检验，两组以上数据比较使用 Student-NewmanKeuls 检验，*P* < 0.05 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 过表达/抑制 miR-214-3p 稳转株的构建

使用三质粒系统转染 293T 细胞并在荧光显微镜下观察转染效率，如图 2.1A 所示，在转染 miR-214-3p mimics、miR-214-3p nc、miR-214-3p inhibitor 质粒的 293T 细胞中，荧光强度都达到了 90%以上，说明转染效率较高，包装慢病毒成功。

通过 qpcr 检测慢病毒构建过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株的转染效率。如图 2.1B 所示，与对照相比，miR-214-3p mimics 转染的 SH-SY5Y 细胞中 miR-214-3p 的表达量明显增加，miR-214-3p inhibitor 转染的细胞中 miR-214-3p 表达量明显降低，其结果变化均具有统计学差异，说明成功构建出过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株。

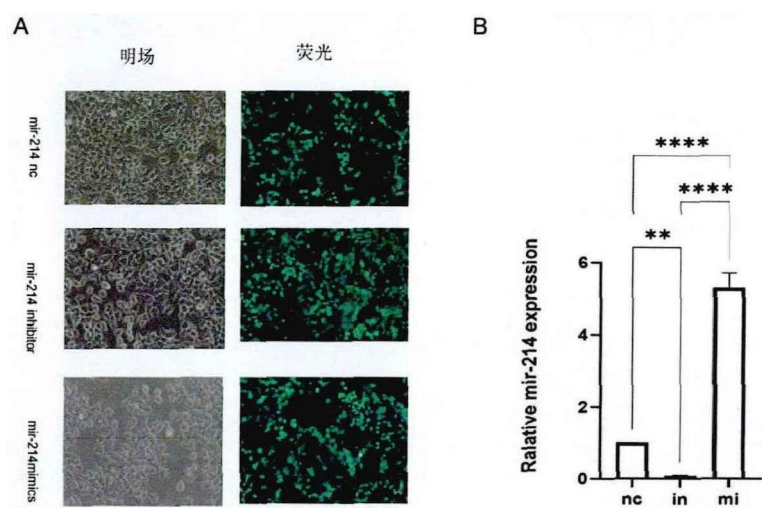


图 2.1 过表达/抑制 miR-214-3p 的 SH-SY5Y 稳转株的构建

A. 293T 慢病毒包装荧光表达； B. qPCR 检测过表达/抑制 miR-214-3p 的 SH-SY5Y 稳转株 中 miR-214-3p 表达量。 ** $p < 0.01$ **** $P < 0.0001$

2.2 差异蛋白识别

通过 DIA 检测了过表达的 miR-214-3p，抑制表达 miR-214-3p 和对照 SH-SY5Y 稳定瞬时株中的差异表达蛋白，使用热图和火山图来可视化这些差异蛋白。在过表达 miR-214-3p 组中共有 221 个蛋白被下调，72 个蛋白被上调。在抑制表达 miR-214-3p 组中共有 128 个蛋白被下调，119 个蛋白被上调。

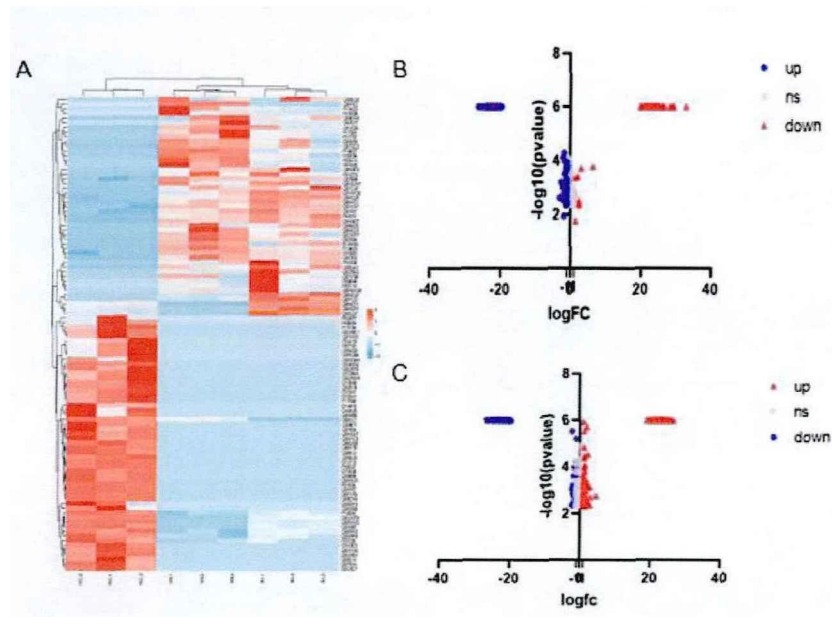


图 2.2 过表达/抑制 miR-214-3p 差异蛋白识别

A 用热图表示过表达/抑制 miR-214-3p 后差异蛋白表达的上调/下调情况，红色代表上调，蓝色代表下调

B 用火山图表示过表达 miR-214-3p 后差异蛋白的上调/下调情况，红色代表上调，蓝色代表下调， $|\log FC| > 1$, $pvalue < 0.05$

C 用火山图表示抑制表达 miR-214-3p 后差异蛋白的上调/下调情况，红色代表上调，蓝色代表下调， $|\log FC| > 1$, $pvalue < 0.05$

2.3 差异蛋白富集分析

利用 DAVID 6.8 在线工具，对差异蛋白进行了功能和通路富集分析。包括对生物过程 (BP)、分子功能 (MF)、细胞组件 (CC) 分析以及 pathway 通路分析。在过表达 miR-214-3p 组中，富集的生物过程为线粒体翻译，细胞分裂，蛋白酶体介导的泛素依赖蛋白分解代谢过程，泛素依赖蛋白分解代谢过程，凋亡过程负向调控，染色质的组织，富集的细胞组件为线粒体大核糖体亚基，线粒体，胞质，细胞质，核浆，细胞核，线粒体基质，中心体，RNA 中间体，线粒体内膜，胞内膜结合细胞器，核体，细胞质核周区，大分子复合物，胞质囊泡，细胞外泌体，细胞骨架，富集的分子功能为蛋白结合，转录抑制因子活性，ATP 结合，小 G 蛋白酶结合，微管蛋白结合，相同蛋白质结合，染色质结合，富集的途径为朊病毒疾病，帕金森病，肌萎缩侧索硬化症，阿尔茨海默病以及代谢途径。说明过表达 miR-214-3p 对线粒体组分和功能有较大影响，同时也会影响泛素蛋白，ATP 结合，染色质等。其中一些差异蛋白与神经退行性疾病如帕金森病，肌萎缩侧索硬化症，阿尔茨海默病有关，这些差异蛋白主要是线粒体核糖体亚基以及蛋白酶体亚基。

在抑制 miR-214-3p 组中，在过表达 miR-214-3p 组中，富集的生物过程为 RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调控，dna 模板化的转录正调控，富集的细胞组件为早期内吞体，细胞质，胞质。细胞外泌体，线粒体基质，线粒体，粘着斑，细胞膜，富集的分子功能为蛋白结合，金属离子结合，相同的蛋白质结合，富集的途径为嗜中性粒细胞脱颗粒，先天免疫系统。说明抑制 miR-214-3p 对线粒体组分和功能有较大影响，同时也会影响转录和翻译过程。

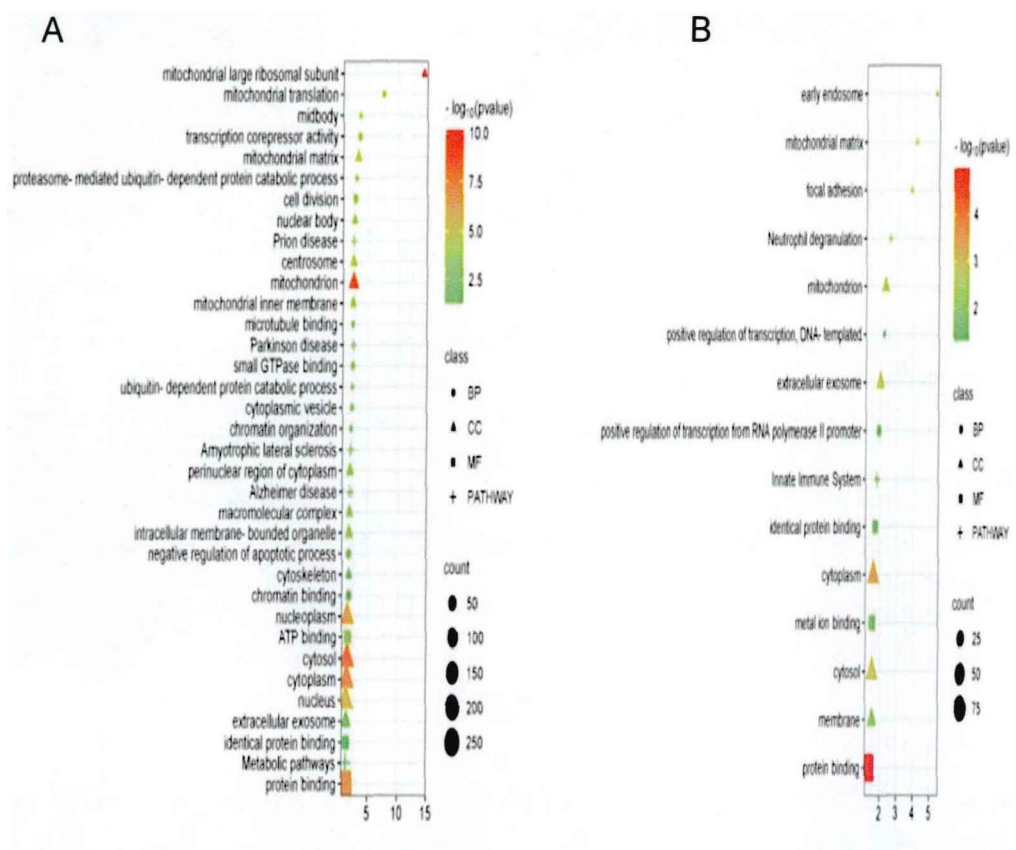


图 2.3 差异蛋白富集分析

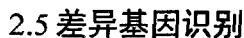
A 用气泡图表示过表达 miR-214-3p 后差异蛋白的功能和通路富集分析情况，选取蛋白数量大于 10 的功能和通路富集集合， $p\text{-value}, 0.05$ ，富集分析的类别包括生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞组件（CC）分析以及 pathway 通路分析，不同类别用不同形状表示，每个富集集合所包含蛋白的多少用点的大小表示

B 用气泡图表示抑制表达 miR-214-3p 后差异蛋白的功能和通路富集分析情况，选取蛋白数量大于 10 的功能和通路富集集合， $p\text{-value}, 0.05$ ，富集分析的类别包括生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞组件（CC）分析以及 pathway 通路分析，不同类别用不同形状表示，每个富集集合所包含蛋白的多少用点的大小表示

2.4 蛋白组学 PPI 网络分析

对过表达 miR-214-3p 组的差异蛋白使用 STRING 在线数据库获取蛋白相互作用数据，使用 Cytoscape 软件建立一个有 352 个节点和 788 条边的 PPI 网络（筛选条件为网络相互作用的得分大于 0.4）。蛋白由节点表示，而蛋白之间的连接由边表示，由蛋白节点半径大小来体现蛋白相互作用强弱。为了确定其中起到关键作用的蛋白，通过 MCODE 插件鉴定了关键蛋白，包含以下 20 个蛋白（KIF14，GFM1，MRPL40，INCENP，GTSE1，SPAG5，NUSAP1，MRPL21，ZWINT，PCLAF，MRPL38，

A 运用 string 在线数据库获取蛋白相互作用数据, 使用 Cytoscape 软件建立一个有 352 个节点和 788 条边的 PPI 网络, 筛选条件为网络相互作用得分大于 0.4, 蛋白互作网络图中各个点交互越密, 则代表这些点所代表的蛋白相互作用越强



2.6 差异基因富集分析

23

线粒体，胞质，细胞质，核浆，中心体，线粒体基质，线粒体内膜，核体，细胞核，胞内膜结合细胞器，中间体，大分子复合物，富集的分子功能为基因结合，基因 c 端结合，转录抑制因子活性，DNA 结合，富集的途径为脊髓小脑共济失调，朊病毒疾病，阿尔茨海默病。说明过表达 miR-214-3p 可能通过转录对线粒体组分和功能，基因泛素化有较大影响，同时也会影响基因结合等过程。其中一些差异基因与神经退行性疾病如脊髓小脑共济失调以及阿尔茨海默病有关，这些差异基因主要是线粒体核糖体亚基以及基因酶体亚基。

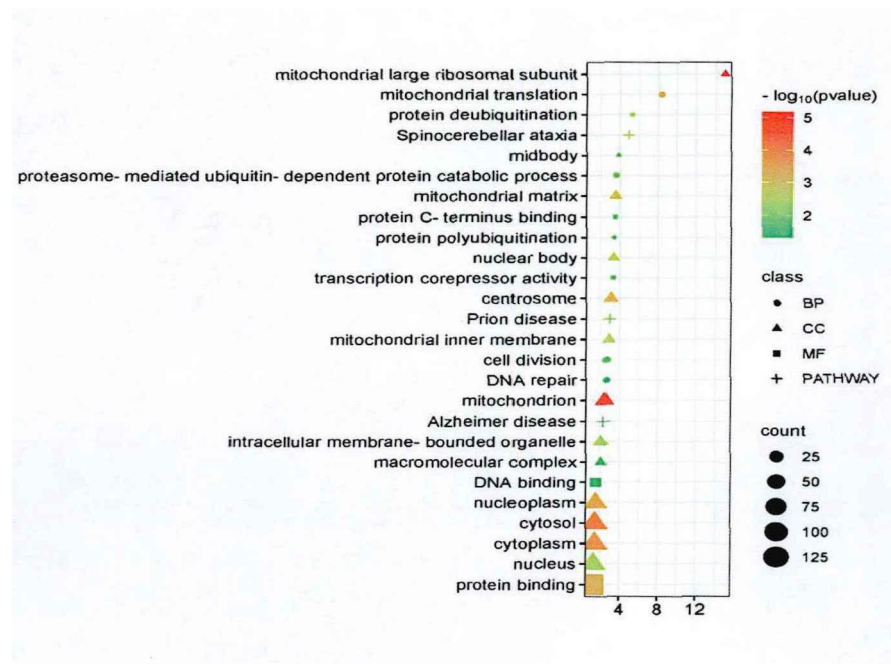


图 2.5 差异基因富集分析

用气泡图表示过表达 miR-214-3p 后差异基因的功能和通路富集分析情况，选取基因数量大于 10 的功能和通路富集集合， $pvalue < 0.05$ ，富集分析的类别包括生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞组件（CC）分析以及 pathway 通路分析，不同类别用不同形状表示，每个富集集合所包含基因数量的多少用点的大小表示

2.7 转录组学 PPI 网络分析

对转录组学分析中过表达 miR-214-3p 组下调的差异基因使用 STRING 在线数据库建立一个有 181 个节点和 214 条边的 PPI 网络（筛选条件为网络相互作用的得分大于 0.4）。基因由节点表示，而基因之间的连接由边表示，由基因节点半径大小来体现基因相互作用强弱。为了确定其中起到关键作用的基因，通过 MCODE 插件鉴定了关键基因，包含以下 9 个基因（MRPL40，MRPL33，MRPL38，MRPL21，HMGN1，MRPL13，GFM1，MRPS30，MRPL28）。这些基因与线粒体翻译有关。这些提示我们，

过表达 miR-214-3p 可能对线粒体功能影响较大。

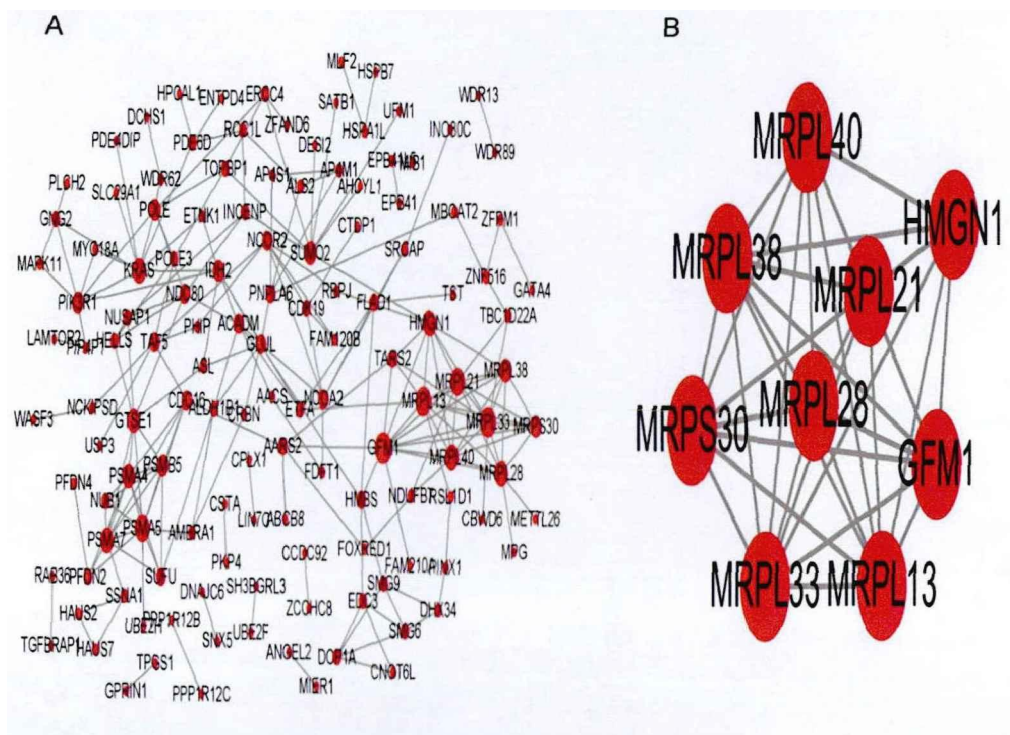


图 2.6 转录组学 PPI 网络分析

A 运用 string 在线数据库获取基因相互作用数据，使用 Cytoscape 软件建立一个有 181 个节点和 214 条边的 PPI 网络，筛选条件为网络相互作用得分大于 0.4，基因互作网络图中各个点交互越密，则代表这些点所代表的蛋白相互作用越强

B 通过 Cytoscape 软件中的 MCODE 鉴定关键蛋白，筛选标准为 MCODE scores >5, node score cut-off = 0.2, degree cut-off = 2, Max depth = 100, k-score = 2，共鉴定出 9 个关键基因

2.8 关键基因的选取

在 microRNA 靶基因的预测网站 Targetscan(<https://www.targetscan.org/>) 预测 miR-214-3p 的靶基因，与蛋白组学分析中选取的关键蛋白，转录组学分析中选取的关键基因取交集，得出 miR-214-3p 调控线粒体功能障碍的关键蛋白 GFM1。

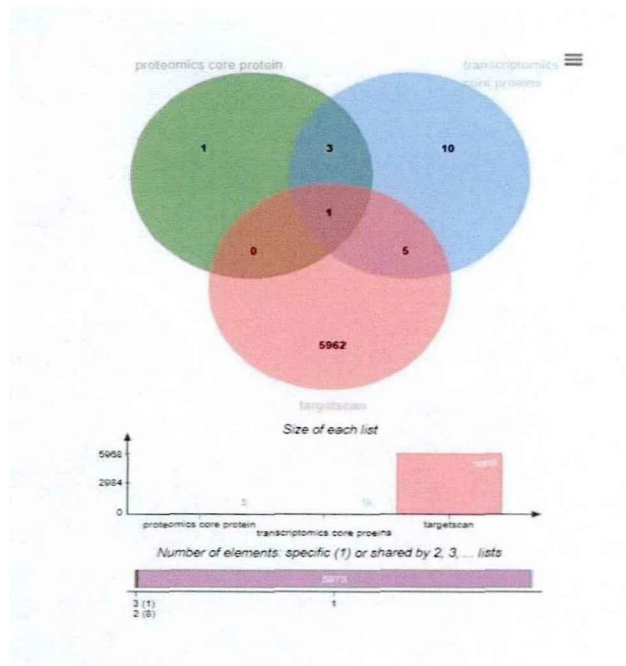


图 2.7 关键基因的选取

在 microRNA 靶基因的预测网站 Targetscan(<https://www.targetscan.org/>) 预测 miR-214-3p 的靶基因，与蛋白组学分析中选取的关键蛋白，转录组学分析中选取的关键基因取交集，得出 miR-214-3p 调控线粒体功能障碍的关键蛋白 GFM1

2.9 miR-214-3p 调控 SHSY5Y 细胞 GFM1 蛋白表达

在构建过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株后，用 WB 检测 GFM1 蛋白的表达情况，在过表达 miR-214-3p 以后，GFM1 蛋白表达下降，在抑制。表达 miR-214-3p 以后，GFM1 蛋白表达上升。

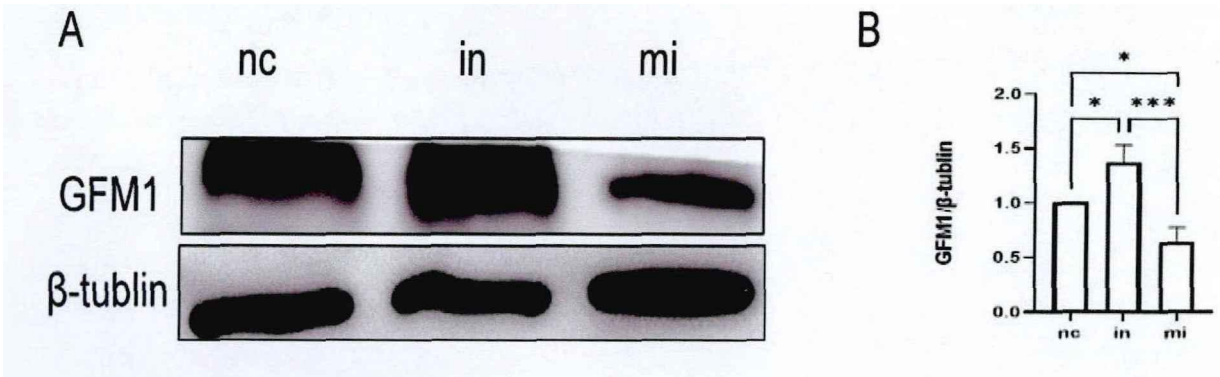


图 2.6 miR-214-3p 对 PD 细胞模型凋亡的影响

A. WB 检测过表达/抑制 miR-214-3p 稳转株中 GFM1 蛋白的表达；B. 对 GFM1 蛋白相对

表达量的统计。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$

3 讨论

此部分主要通过蛋白组学和转录组学联合分析找出了过表达 miR-214-3p 可能会影响 SHSY5Y 细胞的线粒体功能，并且影响线粒体功能的关键蛋白可能是 GFM1。

蛋白质组学作为一种强大而有效的蛋白质鉴定/定量工具，一直在帮助阐明线粒体蛋白在各种疾病中的参与。⁷⁹⁻⁸¹虽然转录组只代表了最终决定细胞形式和功能的生物学的一个层面，但其动态性质反映了环境影响的影响以及潜在的遗传和表观遗传景观。因此，转录组是一个富含信息的中间地带，可以揭示疾病生物学的重要见解。⁸²差异表达基因 (DEGs) 是发现与不同疾病 (如癌症或神经系统疾病) 相关的生物学途径的重要靶标。DEG 分析的目标是发现与未受影响的对照组相比，在疾病中可能上调或下调的基因。不同基因的过度表达或表达不足可能导致代谢、免疫和其他途径的改变，从而导致疾病。^{83,84}在生物信息学领域，已经提出了几种计算方法来解决各种问题。⁸⁵基于基因本体(GO)和 KEGG 途径，将功能基因聚类到不同的生物过程中，也有助于解决这些问题。^{86,87}PPI 网络分析提供了一个整体框架来阐明基因表达程序的拓扑结构和功能组织。值得注意的是，在平均表达水平没有变化的情况下，网络结构可能会发生变化。因此，网络分析方法可以捕获其他分析方法无法检测到的隐蔽疾病相关特征。^{88,89}

经过蛋白组学和转录组学联合分析，我们发现在 miR-214-3p 过表达后，线粒体成分和功能受到了较大影响，在蛋白组学和转录组学的富集分析中，线粒体大核糖体亚基，线粒体基质，线粒体内膜中的蛋白表达都受到抑制，线粒体翻译过程受到了较大影响。在蛋白组学和转录组学联合分析的 PPI 网络分析中，MRPL40, MRPL33, MRPL38, MRPL21, MRPL13, GFM1, MRPS30, MRPL28 被认为是相互作用较为强烈的基因，这些基因均与线粒体相关，其中 MRPL40, MRPL33, MRPL38, MRPL21, MRPL13, MRPS30, MRPL28 均是线粒体核糖体蛋白，GFM1 为线粒体 G 伸长因子 1，该基因催化线粒体上的 tRNA^{Met} 易位，是线粒体翻译当中的重要蛋白。

影响线粒体成分和功能的关键基因可能是 GFM1，并通过 WB 验证了过表达后，GFM1 蛋白表达受到抑制，线粒体蛋白由线粒体 DNA 和核 DNA 编码的蛋白质组成。编码这些蛋白质的基因组突变导致蛋白质改变和蛋白质缺乏。调节线粒体行为并与线粒体动力学、呼吸和代谢、线粒体自噬和线粒体蛋白输入途径等相关的缺陷蛋白可导致线粒体功能障碍。许多以线粒体功能障碍为特征的疾病已被描述，例如心血管疾病^{90,91}、癌症⁹²、年龄相关代谢和其他疾病⁹²⁻⁹⁴、神经系统疾病⁹⁵和胰岛素抵抗 II 型糖尿病。⁹⁶

但过表达 miR-214-3p 如何影响线粒体功能，GFM1 蛋白在其中如何发挥调控作用，还未得到验证，我们将在接下来的实验中探索这一过程。

第二部分 miR-214-3p 调控线粒体功能以及多巴胺神经元功能

线粒体通过呼吸作用和氧化磷酸化作用产生 ATP，是细胞能量的主要来源。它由复合物 I-IV 组成，在线粒体内膜上形成质子梯度。随后质子从线粒体基质向膜间空间的移动产生了电化学梯度。电梯度驱动 ADP(二磷酸腺苷)通过 ATP 合成酶(复合体 V)合成 ATP。⁹⁷ROS 产生导致的压力增加是多巴胺能神经元死亡的主要机制之一，线粒体复合物 I 被认为是 ROS 的主要来源之一。^{98,99}

第一部分的研究中，我们通过蛋白组学和转录组学联合分析发现，在 miR-214-3p 过表达之后，许多与线粒体相关的蛋白受到抑制，因此我们推测，过表达 miR-214-3p 可能会引起线粒体功能障碍。因此，我们将在第二部分的研究中测定多项线粒体相关指标，如活性氧生成，细胞耗氧率，ATP 含量，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 蛋白表达，来验证过表达 miR-214-3p 后，SHSY5Y 细胞的线粒体功能是否受到抑制，以及 miR-214-3p 过表达之后，多巴胺神经元活力是否下降。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞

实验细胞同第一部分 1.1.1

1.1.2 质粒

质粒同第一部分 1.1.2

1.1.3 实验仪器

仪器名称	生产厂家
酶标仪	BIO-RAD 公司（美国）
电泳仪	BIO-RAD 公司（美国）
生物安全柜	益世科生物
二氧化碳培养箱	Thermo Scientific
四度冰箱	美菱
负二十度冰箱	美菱

负八十度超低温冰箱	美菱
台式离心机	Thermo Scientific
微量离心机	Thermo Scientific
酶标仪	Thermo Scientific
紫外微量分光光度仪	Eppendorf
梯度 PCR 仪	Bio-Rad
荧光定量 PCR 仪	METTLER TOLEDO
电子天平	Bio-Rad
迷你垂直电泳槽	韦克斯
迷你转膜槽	韦克斯
化学发光成像仪	FrOteinsample
涡旋混匀仪	翌圣生物
摇床	Kylin-BellLab Instruments
恒温金属加热器	Thermo Scientific
电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
电子显微镜	Nikon
荧光显微镜	Nikon
细胞计数板	Hauserscientific
纯水仪	MERCK
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
高压灭菌锅	致微（厦门）仪器有限公司
转膜仪	BIO-RAD 公司（美国）
实时荧光定量 PCR 仪	ThermoFisher 公司（美国）
非接触式超声破碎仪器	Diagenode（比利时）
紫外微量分光光度仪	Eppendorf（中国）
超速离心机	贝克曼公司（美国）
移液器	普诺恩生物技术有限公司
抗体孵育盒	普诺恩生物技术有限公司
程序降温盒	普诺恩生物技术有限公司
细胞刮刀	普诺恩生物技术有限公司
EP 管	普诺恩生物技术有限公司

1.1.4 实验试剂

试剂名称	生产厂家
Oxygen Consumption Rate(OCR) Plate	
Assay Kit-细胞氧消耗量检测试剂盒	左克生物（中国）
ATP 含量检测试剂盒	索莱宝生物科技有限公司（中国）
ROS 活性氧检测试剂盒	索莱宝生物科技有限公司（中国）
CCK8 试剂盒	南京安友生物科技公司（中国）
人线粒体呼吸链复合物 I（complex I）酶	
联免疫吸附测定试剂	江莱生物（中国）
人线粒体呼吸链复合物 IV（complex I）酶	江莱生物（中国）
联免疫吸附测定试剂	
1-甲基-4-苯基吡啶离子(MPP ⁺)	MCE（美国）
DMEM 高糖培养基	Gibco（美国）
青链霉素混合液(100×)	索莱宝生物科技有限公司（中国）
嘌呤霉素	索莱宝生物科技有限公司（中国）
胰蛋白酶-无 EDTA 消化液	Gibco（美国）
胎牛血清	Gibco 公司（美国）
10×TBST 缓冲液	塞维尔生物科技有限公司（中国）
BCA 蛋白定量试剂盒	雅酶生物科技有限公司（中国）
高效 RIPA 裂解液	索莱宝生物科技有限公司（中国）
Western 一抗稀释液	碧云天生物科技有限公司（中国）
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	雅酶生物技术有限公司（中国）
Opti-MEM I 减血清培养基（含 L-谷氨酰胺）	Gibco（美国）
PMSF	索莱宝生物科技有限公司（中国）
Trizol	GLPBIO（美国）
含 DAPI 抗荧光淬灭封片剂	索莱宝生物科技有限公司（中国）
二甲基亚砜（DMSO）	索莱宝生物科技有限公司（中国）
QuickShuttle-Enhanced(增强型转染试剂)t	苏州博奥龙免疫技术有限公司（中国）
磷酸盐缓冲液 (PBS) 1×	普诺恩生物科技有限公司
RNA 提取试剂盒	贝贝生物科技有限公司（中国）

1.2 主要试剂配置

1.2.1 细胞培养相关试剂的配制

细胞培养相关试剂的配置同第一部分 1.2.1。

1.2.2 LB 培养基及甘油菌液的配制

LB 培养基及甘油菌液的配制相关试剂的配置同第一部分 1.2.2。

1.3 实验方法

1.3.1 过表达/抑制 miR-214-3p 稳转株的构建

过表达/抑制 miR-214-3p 稳转株的构建同第一部分 1.3.1-1.3.5

1.3.2 细胞活力检测

(1) 96 孔板铺板待测细胞，待测细胞分为对照组、处理组、空白组（只加培养基），每孔种 2×10^4 个细胞，镜下观察细胞分布状况，随后转移至 37°C 培养箱中培养。

(2) 24h 后，弃去原培养基，加入 $100 \mu\text{L}$ LMPP+溶液（ 1.5nm ），随后转移至 37°C 培养箱中培养。。

(3) 48h 后，弃去原培养基，使用 DMEM 高糖培养基以 1: 10 的比例稀释 CCK-8 试剂，随后转移至 37°C 培养箱中培养。

(4) 从培养箱中取出 96 孔板，注意避光，使用酶标仪检测各孔 OD 值（吸光度设定为 450nm ）。

(5) 72h 后，弃去原培养基，使用 DMEM 高糖培养基以 1: 10 的比例稀释 CCK-8 试剂，随后转移至 37°C 培养箱中培养。

(6) 从培养箱中取出 96 孔板，注意避光，使用酶标仪检测各孔 OD 值（吸光度设定为 450nm ）。

1.3.3 ROS 活性氧检测

(1) 使用前用 PBS 或者无血清培养基稀释 DHE 红色荧光母液至 $5\sim 20\mu\text{M}$

(2) 24 孔板，细胞量每孔 1×10^5 时，加入的染色量 $200\mu\text{L}$ ，工作液浓度在 $5\sim 20\mu\text{M}$ ，室温避光孵育 60min 或 37°C 孵育 30-40min。

(3) 去除染色液，用 $1 \times \text{PBS}$ 浸洗 2 次后，显微镜检测，设发射波长为 570nm 。

1.3.4 细胞耗氧率检测

(1) 将 $100 \mu\text{L}$ 含有细胞的培养基悬液($2\sim 4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$)播种至 Blank 3 孔， $100 \mu\text{L}$ 含有细胞的 Working solution 悬液($2 \sim 4 \times 10^6 \text{ cells/ml}$)播种至样品孔(黑色透明底 96 孔板)。($2 \sim 4 \times 10^5 \text{ cells/well}$)

- (2) 向 Blank 1 孔中加入 100 μ l 培养基, Blank 2 孔中加入 100 μ l Working solution。
- (3) 将孔板放入预设 在 37℃ 的荧光酶标仪, 培养 30 min。
- (4) Blank 1 孔, Blank 2 孔, Blank 3 孔中加入 10 μ l 培养基。
- (5) 立即向每孔滴入 1 滴 Mineral Oil。。
- (6) 将孔板放入预设 在 37℃ 的荧光酶标仪, 培养 5 min。
- (7) 使用酶标仪的持续读数模式, 每隔 10 min 检测一次, 持续 200 min。(Ex: 500 nm, Em: 650 nm, 底部读数模式)
- (8) 使用同仁化学研究所的自动计算表格, 输入荧光强度计算出 OCR 值。

1.3.5ATP 含量测定

- (1) 1000rpm 离心细胞 5min,弃去上清液, 以 10^4 (细胞数): 1 (提取液/ml) 的比例向细胞中加入配置好的提取液, 超声破碎细胞 1min,再次离心细胞 (10min,10000rpm, 4℃),将上清液与 500ml 氯仿混合, 涡旋混合, 再次离心 (3min,10000rpm, 4℃), 离心结束后将待测样品于冰上暂存。
- (2) 酶标仪预热 30 min 以上, 调节波长到 340nm。
- (3) 标准溶液的稀释: 用 1.5ml 的 ddH₂O 稀释 100 μ L 标准溶液 (10 μ mol/ml), 得到浓度为 0.625 μ mol/mL 的标准液, 用移液枪吹打混匀。在 96 孔 UV 板中加入:

试剂名称 (μ L)	测定管	标准管
样本	20	-
0. 625 μ mol/mL 标准液	-	20
试剂一	128	128
工作液	52	52

- (4) 加样表:
充分混合后, 立即测定 340nm 下 10s 的吸光值 A1, 将酶标仪温度调至 37℃测定其在 3min10s 时的吸光值 A2。分别计算 ΔA 测定=A2 测定-A1 测定, ΔA 标准=A2 标准-A1 标准。ATP 含量(μ mol/ 10^6 cell) = ΔA 测定/ (ΔA 标准/C 标准) $\times V$ 提取/5 =0.125 $\times \Delta A$ 测定/ ΔA 标准

1.3.6 ELISA

- (1) 贴壁细胞去除培养上清, 用预冷 PBS 轻轻清洗, 然后用胰蛋白酶消化, 1000

×g 下离心 5 分钟后收集细胞；悬浮细胞可直接离心收集。收集的细胞用预冷 PBS 清洗 3 次，每 1×10^6 个细胞中加入 150-200 μ l PBS 重悬（每 100 μ l PBS 中加入 1 μ l 蛋白酶抑制剂）并通过反复冻融（-80℃，4-8 小时/次，5 次以上）。提取液于 2-8℃，1500×g 离心 10 分钟，取上清检测。

（2）从四度冰箱中取出 Elisa 试剂盒，于室温中静置 60min。

（3）设置三组样本组复孔，一个空白孔，六个标准孔，向各标准孔中分别加入 50 μ L 的浓度分别为 1.25ng/ml、2.5 ng/ml、5 ng/ml、7.5 ng/ml、10 ng/ml、20 ng/ml 的标准品溶液。

（4）样本孔中加待测样本 50 μ L；空白孔什么也不加。

（5）除空白孔外，标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体 100 μ L，加样后，使用封板膜封板，转移至 37℃培养箱中孵育 60min。

（6）使用 PBS 溶液稀释洗涤液，向各反应孔中分别加入 350 μ L 洗涤液并静置 1min，弃去液体并拍干，重复此操作五次，完成洗板。

（7）以 1：1 的比例配置 A、B 底物混合液，每个反应孔中加入 100 μ L 底物混合液，使用封板膜进行封板，转移至 37℃培养箱中反应 15min，每孔加入终止液 50 μ L，使用酶标仪测定各孔 OD 值，吸光度设置为 450nm。

1.4 统计分析

论文中所有实验均有三次以上重复结果，采用 Image J 软件对 Western Blot 结果进行统计分析，采用 GraphPad Prism 8 软件作图分析数据，实验数据以均值±标准差

（Mean±S.E.M）表示。两组比较使用独立样本 t 检验，两组以上数据比较使用 Student-NewmanKeuls 检验， $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 miR-214-3p 调控多巴胺能神经元活力、线粒体功能障碍

2.1.1 miR-214-3p 对 PD 细胞模型活力的调控

分别向过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株中加入 1.5mM 的 MPP⁺溶液。分别在 24h 和 48h 后测定细胞活力。如图 2.4.A 所示，24h 后，过表达 miR-214-3p 稳转株细胞活力明显下降，而抑制 miR-214-3p 的稳转株，细胞活力上升。如图 2.4.B 所示，随着时间的增加，过表达 miR-214-3p 稳转株细胞活力下降更加明显，而抑制 miR-214-3p 的稳转株，细胞活力继续上升。这一现象表明过表达 miR-214-3p 可能具有细胞毒性，对多巴胺神经元造成损伤。

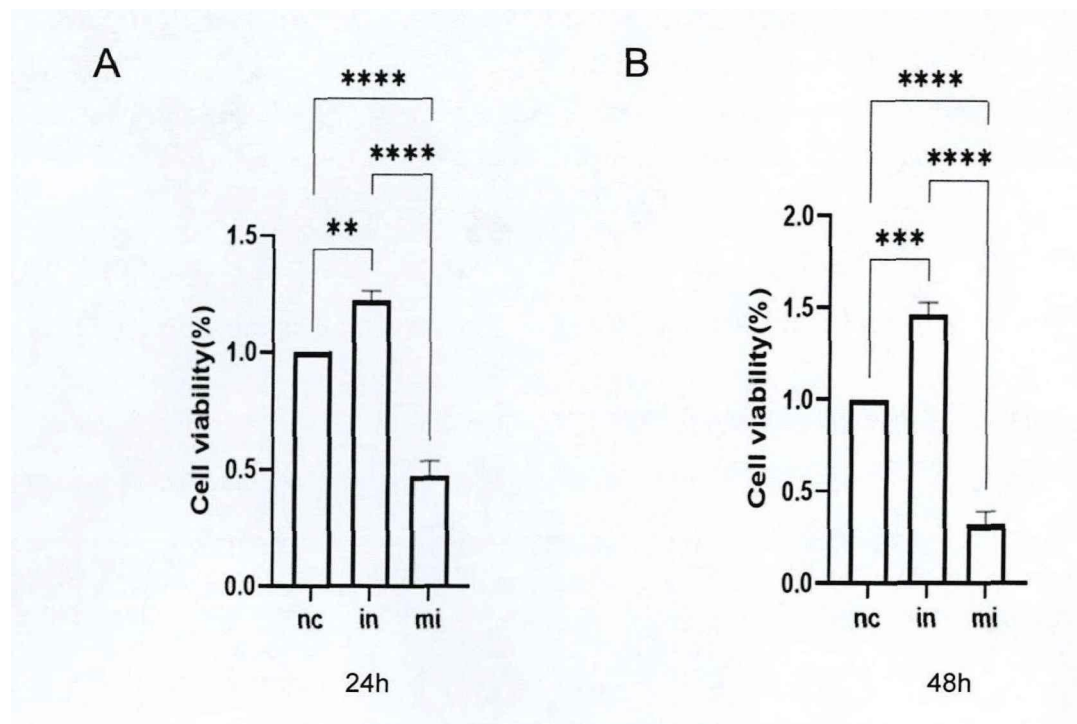


图 2.4 miR-214-3p 对多巴胺能神经元活力的调控

CCK8 检测 MPP+处理过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞稳转株的细胞活力。 ** $P < 0.01$,
*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, ,

2.1.2 miR-214-3p 对 SHSY5Y 细胞线粒体功能障碍的影响

使用活性氧检测试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株中活性氧的生成情况, 荧光越强, 则说明活性氧的产生越多, 观察荧光产生情况, 在过表达 miR-214-3p 以后, 活性氧的生成明显增加。细胞的氧气主要在线粒体氧化磷酸化过程中被消耗, 以产生三磷酸腺苷(ATP), 因此耗氧率(OCR: Oxygen Consumption Rate)是分析线粒体功能的一个指标。使用细胞耗氧量检测试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株的细胞耗氧率, 在过表达 miR-214-3p 以后, 细胞耗氧率明显降低, 而在抑制表达 miR-214-3p 以后, 细胞耗氧率略有升高。使用 ATP 检测试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株的细胞耗氧率, 在过表达 miR-214-3p 以后, 细胞 ATP 含量明显降低, 而在抑制表达 miR-214-3p 以后, 细胞 ATP 含量略有升高。使用 Elisa 试剂盒检测过表达/抑制 miR-214-3p 的稳转株中线粒体复合物 I, 线粒体复合物IV的表达情况, 在过表达 miR-214-3p 以后, 线粒体复合物 I, 线粒体复合物IV的表达明显下降, 而在抑制表达 miR-214-3p 以后, 线粒体复合物 I, 线粒体复合物IV的表达明显下降。过表达 miR-214-3p 以后, 会引起活性氧生成增加, 细胞耗氧率降低, 线粒体复合物 I, 线粒体复合物IV的表达下降, 这些结果表明, 在过表达 miR-214-3p 以后, SHSY5Y 细胞线粒体功能受到了明显影响, 引发了线粒体功能障碍。

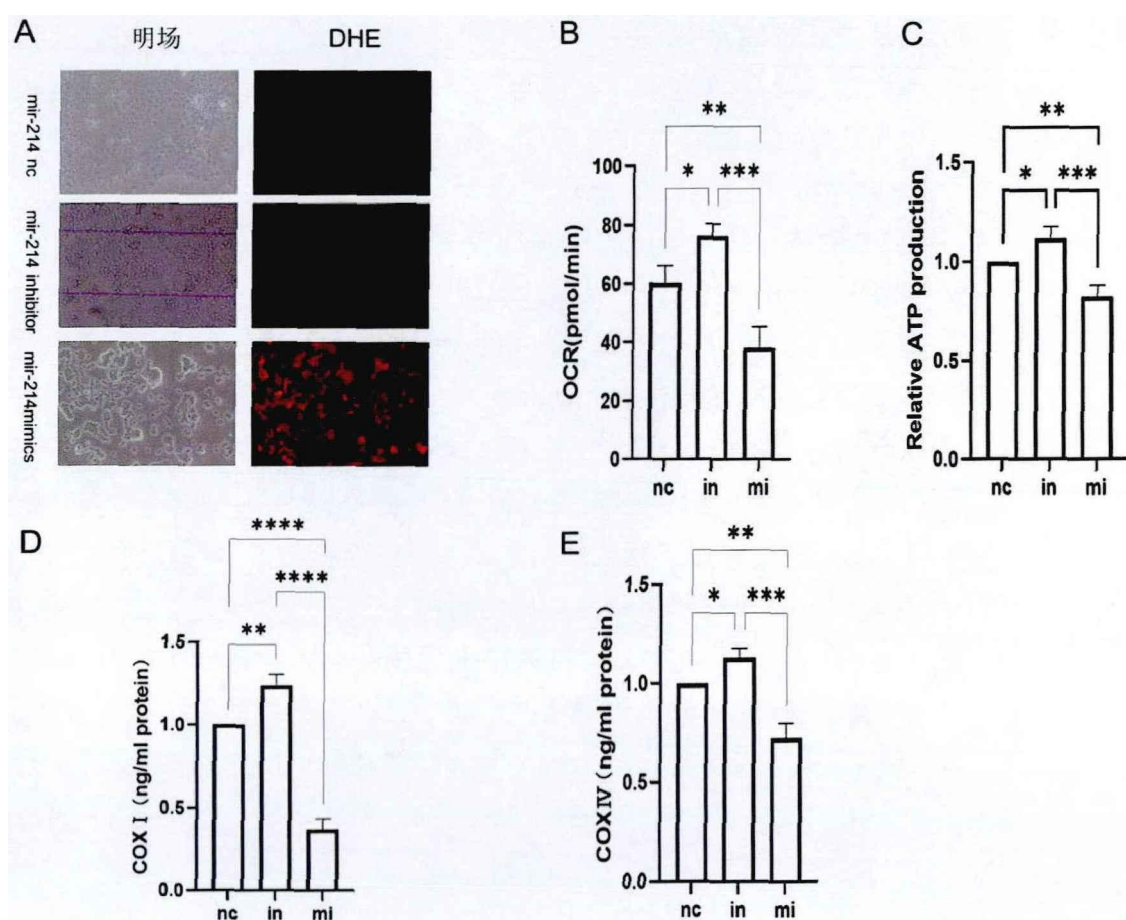


图 2.5 过表达 miR-214-3p 对线粒体功能的影响

A ROS 活性氧检测试剂盒检测转染过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的活性氧生成情况；
 B. 细胞耗氧率检测试剂盒检测转染过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的细胞耗氧率，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；C. ATP 含量检测试剂盒检测转染过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的 ATP 含量，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ；D 人线粒体呼吸链复合物 I Elisa 酶联免疫吸附测定试剂盒检测转染过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的线粒体呼吸链复合物 I 蛋白表达量，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ ，**** $P < 0.0001$ ；E 人线粒体呼吸链复合物 IV Elisa 酶联免疫吸附测定试剂盒检测转染过表达/抑制 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的线粒体呼吸链复合物 IV 蛋白表达量，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

3 讨论

MicroRNA (miRNA) 是小的、保守的非编码 RNA (平均 22 个核苷酸长)，通过与信使 RNA (mRNA) 的互补结合在转录后调节基因表达。¹⁰⁰da 已经发现了多种影响线粒体功能的 MicroRNA，miR-743a 可抑制苹果酸脱氢酶活性。¹⁰¹ 苹果酸脱氢酶参与 TCA 循环中苹果酸氧化为草酰乙酸，产生 NADH。miR-23a/b 也已知通过下调谷氨酰胺

酶来破坏 TCA 循环¹⁰²。此外，miR-210¹⁰³，miR-338¹⁰⁴ 和 miR-34a。¹⁰⁵ 抑制参与 OXPHOS 的酶的活性。神经元中产生的大部分 ATP 来自 OXPHOS，因此这一过程的抑制会阻止神经元满足其高能量需求，从而导致神经元死亡。miR-16-5p¹⁰⁶，miR-195¹⁰⁷ 和 miR-29b¹⁰⁸ 可破坏线粒体膜电位和完整性，而 miR-7 已知可稳定膜电位。¹⁰⁹ 能量产生的减少也会抑制神经元传递信号的能力。

MicroRNA 调控的线粒体功能障碍引起细胞凋亡进而引起神经元凋亡。miR-7¹⁰⁹，miR-98¹¹⁰，miR-30¹¹¹，miR-132/212¹¹² 和 miR-484¹¹³ 被发现通过影响线粒体功能抑制细胞凋亡。相反，miR-16-5p¹⁰⁶，miR-34a¹¹⁴，miR-375¹¹⁵，miR-125b¹¹⁶，miR-29a¹¹⁷，miR-29b¹¹⁸ 和 miR-140¹¹⁹ 通过影响线粒体功能诱导细胞凋亡，

在第二部分研究中，我们发现，在 miR-214-3p 过表达后，SHSY5Y 细胞内活性氧生成增加，耗氧量下降，ATP 含量下降，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 表达下降。这一系列变化引起了线粒体功能障碍，进而引起了多巴胺能神经元活力下降。但 miR-214-3p 如何调控线粒体功能，进而引起多巴胺能神经元功能下降的机制还没有研究清楚。在第一部分中，我们通过蛋白组学和转录组学联合分析发现 GFM1 可能是 miR-214-3p 调控线粒体功能的关键基因，我们将在接下来的实验中进行验证，来探究 miR-214-3p 是否能够通过调控 GFM1 影响线粒体功能进而影响多巴胺能神经元凋亡。

。

第三部分 miR-214-3p 通过调控 GFM1 影响线粒体功能以及多巴胺能神经元功能

在第二部分中，我们探究了 miR-214-3p 对于线粒体功能以及多巴胺能神经元功能的影响，我们发现在过表达 miR-214-3p 后，引起了线粒体功能障碍和多巴胺能神经元活力下降。但 miR-214-3p 调控这一生命活动的机制尚不清楚。在第一部分当中，我们发现在过表达 miR-214-3p 后，GFM1 蛋白表达下降。且我们通过蛋白组学和转录组学联合分析发现，GFM1 可能是 miR-214-3p 调控线粒体功能以及多巴胺能神经元的关键基因，在第三部分中，我们将对此机制设计实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞

1.1.2 质粒

(1) 过表达质粒 PEGFP-N1-GFM1 由擎科生物科技公司合成质粒图谱如图所示。

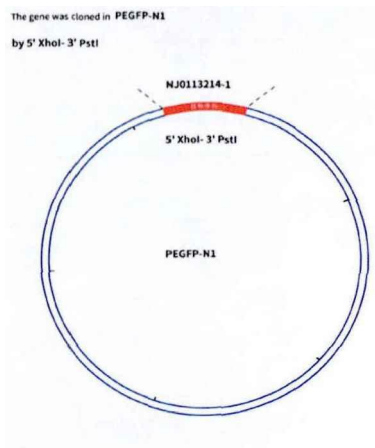


图 3.1 过表达质粒PEGFP-N1-GFM1 图谱；

1.1.3 实验仪器

仪器名称	生产厂家
酶标仪	BIO-RAD 公司（美国）
电泳仪	BIO-RAD 公司（美国）
生物安全柜	益世科生物

二氧化碳培养箱	Thermo Scientific
四度冰箱	美菱
负二十度冰箱	美菱
负八十度超低温冰箱	美菱
台式离心机	Thermo Scientific
微量离心机	Thermo Scientific
酶标仪	Thermo Scientific
紫外微量分光光度仪	Eppendorf
梯度 PCR 仪	Bio-Rad
荧光定量 PCR 仪	METTLER TOLEDO
电子天平	Bio-Rad
迷你垂直电泳槽	韦克斯.
迷你转膜槽	韦克斯
化学发光成像仪	FrOteinsample
涡旋混匀仪	翌圣生物
摇床	Kylin-BellLab Instruments
恒温金属加热器	Thermo Scientific
电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
电子显微镜	Nikon
荧光显微镜	Nikon
细胞计数板	Hausserscientific
纯水仪	MERCK
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
高压灭菌锅	致微（厦门）仪器有限公司
转膜仪	BIO-RAD 公司（美国）
实时荧光定量 PCR 仪	ThermoFisher 公司（美国）
非接触式超声破碎仪器	Diagenode（比利时）
紫外微量分光光度仪	Eppendorf（中国）
超速离心机	贝克曼公司（美国）
移液器	普诺恩生物技术有限公司
抗体孵育盒	普诺恩生物技术有限公司
程序降温盒	普诺恩生物技术有限公司
细胞刮刀	普诺恩生物技术有限公司
EP 管	普诺恩生物技术有限公司

1.1.4 实验试剂

1.2 主要试剂配制

主要试剂配制同第二部分 1.2。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养实验

细胞培养实验步骤同第一部分 1.3.1。

1.3.2 质粒转化、扩增

质粒转化及扩增实验步骤同第二部分 1.3.1。

1.3.3 过表达 GFM1 瞬转细胞的构建

1) 第一天: 铺板过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞, 六孔板每孔接种 105 个细胞, 加入 2ml 配置好的 DMEM 高糖培养基, 镜下观察细胞是否均匀分布, 转移至 37℃ 细胞培养箱中培养。

2) 第二天: 向 200 μ L 生理盐水中加入 20 μ L 转染试剂和 8 μ L GFM1 质粒, 吹打混匀。向 Opti-MEM I 减血清培养基中加入此混合液, 8 字摇匀。将孔板转移至 37℃ 培养箱中培养。

3) 第三天: 弃掉 Opti-MEM I 减血清培养基, 换液为 DMEM 高糖培养基, 转移至 37℃ 细胞培养箱中培养。

1.3.4 细胞活力检测

细胞活力检测同第二部分 1.3.2

1.3.5 ROS 活性氧检测

ROS 活性氧检测同第二部分 1.3.3

1.3.5 细胞耗氧率检测

细胞耗氧率检测同第二部分 1.3.4

1.3.6 ATP 含量测定

ATP 含量测定同第二部分 1.3.5

1.3.7 ELISA

ELISA 同第二部分 1.3.6

1.4 统计分析

论文中所有实验均有三次以上重复结果，采用 Image J 软件对 Western Blot 结果进行统计分析，采用 GraphPad Prism 8 软件作图分析数据，实验数据以均值 $\pm$ 标准差 (Mean $\pm$ S.E.M) 表示。两组比较使用独立样本 t 检验，两组以上数据比较使用 Student-NewmanKeuls 检验， $P < 0.05$ 表示具有统计学差异。

2 结果

2.1 过表达 GFM1 效率的检测

用过表达 GFM1 以及 NC 质粒分别转染 SH-SY5Y 细胞，用 GFM1 抗体通过 WB 检测 GFM1 过表达效率，结果如图 3.2 所示，与转染空质粒组相比，转染过表达 GFM1 的细胞中 GFM1 表达量明显增加，说明成功构建出过表达 GFM1 的 SHSY5Y 细胞，且转染效率较高。

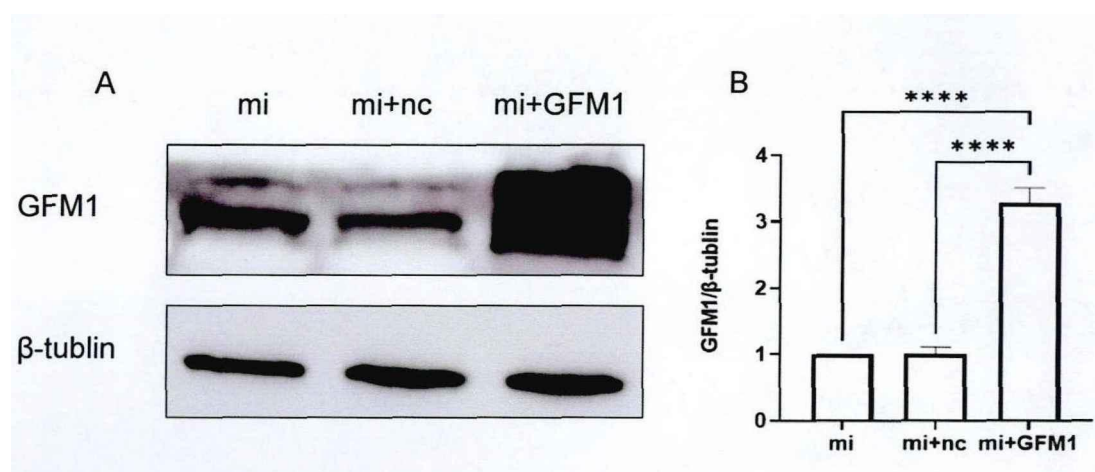


图 3.2 GFM1 过表达效率检测

A. WB 检测细胞中 GFM1 蛋白表达水平；B. 对 GFM1 蛋白相对表达量的统计。**** $p < 0.0001$

2.2 过表达 GFM1 逆转 miR-214-3p 对神经元活力、线粒体功能障碍的调控

2.2.1 过表达 GFM1 挽救 miR-214-3p 对神经元活力的抑制

分别向过表达 GFM1 及 NC 的质粒分别处理的过表达 miR-214-3p 的稳转株中加入 1.5mM 的 MPP⁺ 溶液。分别在 24h 和 48h 后测定细胞活力。如图 3.3.A 所示，24h 后，

过表达 GFM1 的过表达 miR-214-3p 稳转株细胞活力明显上升。如图 3.3.B 所示, 随着时间的增加, 过表达 GFM1 的过表达 miR-214-3p 稳转株细胞活力上升更加明显。这一现象表明过表达 GFM1 可能挽救过表达 miR-214-3p 对多巴胺神经元造成的损伤。

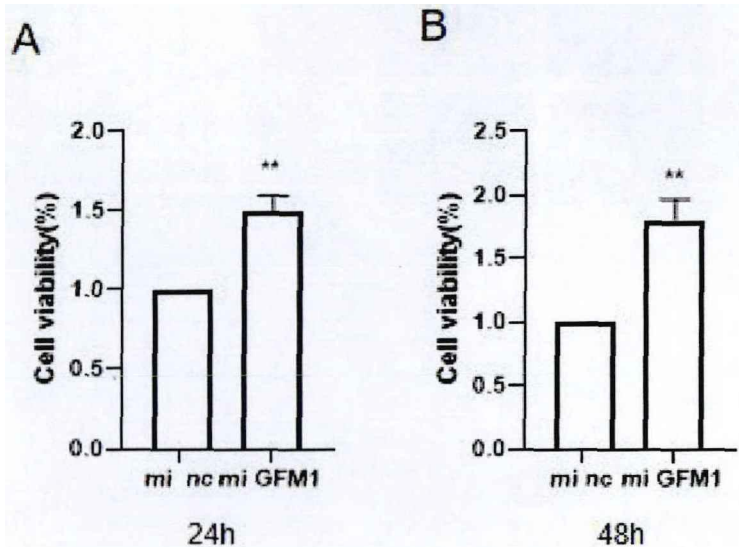


图 3.3 过表达 GFM1 后 24h, 48h 后的细胞活力检测
CCK8 检测过表达 GFM1 后细胞活力变化。**p < 0.01

2.2.2 过表达 GFM1 挽救 miR-214-3p 对线粒体功能障碍的影响

使用活性氧检测试剂盒检测过表达 GFM1 且过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞中活性氧的生成情况, 荧光越强, 则说明活性氧的产生越多, 观察荧光产生情况, 在过表达 GFM1 以后, 活性氧的生成明显减少。细胞的氧气主要在线粒体氧化磷酸化过程中被消耗, 以产生三磷酸腺苷(ATP), 因此耗氧率(OCR: Oxygen Consumption Rate)是分析线粒体功能的一个指标。使用细胞耗氧量检测试剂盒检测过表达 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞的细胞耗氧率, 在过表达 GFM1 以后, 细胞耗氧率明显上升, 使用 ATP 检测试剂盒检测过表达 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞的细胞耗氧率, 在过表达 GFM1 以后, 细胞 ATP 含量略微上升, 使用 Elisa 试剂盒检测过表达 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 细胞中线粒体复合物 I, 线粒体复合物 IV 的表达情况, 在过表达 GFM1 以后, 线粒体复合物 I, 线粒体复合物 IV 的表达明显上升。过表达 GFM1 以后, 会引起活性氧生成减少, 细胞耗氧率提高, 线粒体复合物 I, 线粒体复合物 IV 的表达升高, 这些结果表明, 过表达 GFM1 可以挽救过表达 miR-214-3p 对线粒体功能障碍的影响。

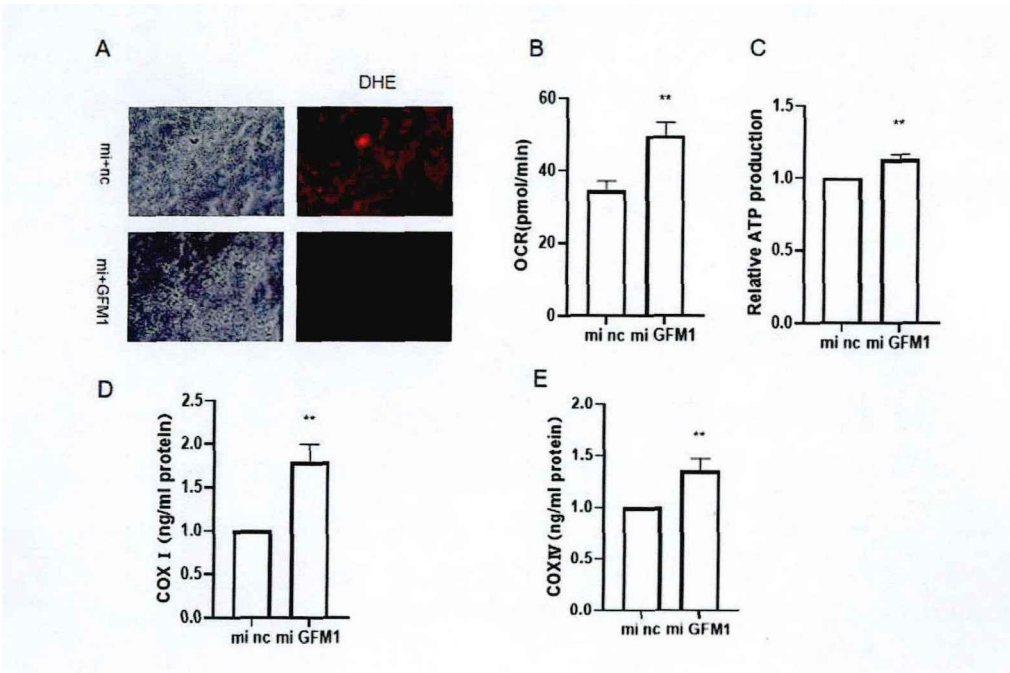


图 3.4 过表达 GFM1 对对线粒体功能的影响

A ROS 活性氧检测试剂盒检测转染过表达/对照 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的活性氧生成情况；B. 细胞耗氧率检测试剂盒检测转染过表达/对照 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的细胞耗氧率，** $p < 0.01$ ；C. ATP 含量检测试剂盒检测转染过表达/对照 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的 ATP 含量，** $p < 0.01$ ；D 人线粒体呼吸链复合物 I Elisa 酶联免疫吸附测定试剂盒检测转染过表达/对照 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的线粒体呼吸链复合物 I 蛋白表达量，** $p < 0.01$ ；*E 人线粒体呼吸链复合物 IV Elisa 酶联免疫吸附测定试剂盒检测转染过表达/对照 GFM1 的过表达 miR-214-3p 的 SHSY5Y 稳转株的线粒体呼吸链复合物 IV 蛋白表达量，** $p < 0.01$ ；

3 讨论

在前两部分研究结果的基础上,第三部分核心是探究 miR-214-3p 调控线粒体功能障碍的具体机制。在第一部分的蛋白组学和转录组学联合分析中,我们预测 GFM1 可能是影响线粒体功能的关键蛋白,并通过 WB 验证在过表达 miR-214-3p 的 SH-SY5Y 稳转株中 GFM1 蛋白表达受到抑制。我们运用过表达 GFM1 质粒和对照质粒分别瞬时转染过表达 miR-214-3p 的 SH-SY5Y 稳转株,运用 WB 检测过表达效率,确认瞬时转染成功。在 GFM1 过表达之后,由于过表达 miR-214-3p 所引起的线粒体功能障碍和多巴胺能神经元活力下降情况得到缓解。活性氧生成减少,细胞耗氧率和 ATP 含量恢复,线粒体呼吸链复合物 I 和复合物 IV 表达提高,实验结果说明 miR-214-3p 可以靶向调控 GFM1, GFM1 蛋白过表达会影响线粒体功能和多巴胺能神经元功能,据此可以认定 miR-214-3p 可能调控 GFM1 来影响线粒体功能,进而影响多巴胺能神经元功能。

线粒体拥有自己的母系遗传基因组(线粒体 DNA;mtDNA),并含有由 mtDNA 编码的线粒体蛋白。在人类中,有 13 种蛋白质由 mtDNA 编码。这些疏水蛋白是 OXPHOS 复合物的核心亚基。它们包括复合物 I 的 7 个亚基(NADH-泛醌氧化还原酶(ND1-ND6 和 ND4L)的 1-6 链和 4L 链)、复合物 III 的一个亚基(细胞色素 b)、复合物 IV 的 3 个亚基(细胞色素 c 氧化酶(COX1-COX3)的亚基 1-3)和 FoF1 ATP 合酶复合物的两个亚基(ATP 合酶亚基 a(ATP6)和 ATP 合酶蛋白 8(ATP8))。¹²⁰ 它们的翻译需要专用的蛋白质合成机制,独立于其细胞质对应物¹²¹。大约 1500 个核基因归因于线粒体生物发生和代谢¹²²,其中约 10% 被认为在线粒体翻译中发挥作用¹²³。由于线粒体保留了专门的线粒体蛋白质合成机制来合成 mtDNA 编码的蛋白质,因此线粒体延伸因子基因的突变会导致线粒体翻译缺陷。迄今为止,已经描述了三种线粒体延伸因子:EF-Tu(TUFM)、EF-Ts(TSFM)和 EF-G1(GFM1)。EF-G1(GFM1)是一种 GTP 酶,通过去除乙酰化的 tRNA 并用肽基-tRNA 代替它,强制 mtDNA 编码的 tRNA 通过线粒体核糖体的延伸依赖性运动。¹²⁴ 线粒体通过氧化磷酸化(OXPHOS)产生 ATP,这一过程取决于五种线粒体蛋白复合物(复合物 I 到 V)的协同作用。复合物 I, III, IV 和 V 都包含至少一个 mtDNA 编码的亚基,而复合物 II 完全由核 DNA 编码。¹²⁵ 因此,预计任何延伸因子的缺陷都会导致多种 OXPHOS 相关复合物的异常,这是一种线粒体功能障碍,被称为联合氧化磷酸化缺陷,所有三种线粒体延伸因子的突变都与严重的线粒体疾病表型有关。¹²⁶

在本研究中我们发现过表达 GFM1 后,线粒体复合物 I 和线粒体复合物 IV 表达得到了提高,我们推测,可能是过表达 GFM1 之后,影响了线粒体氧化磷酸化过程,导致线粒体复合物 I 和复合物 IV 的表达,由于线粒体氧化磷酸化是线粒体 ATP 的只要产生途径,因此过表达 GFM1,氧化磷酸化过程之后,会影响 ATP 的生成进而影响氧气的

消耗，致使细胞耗氧率提升，活性氧生成减少，这一系列过程引起了线粒体功能障碍，进而影响了多巴胺能神经元功能。

全文结论

我们通过蛋白组学和转录组学联合分析预测过表达 miR-214-3p 可能会影响线粒体功能，影响线粒体功能的关键基因可能是 GFM1，通过 WB 验证得出在过表达 miR-214-3p 后 GFM1 表达受到抑制。过表达 miR-214-3p 可以促进活性氧的生成，引起细胞耗氧率的降低，ATP 含量的降低，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的表达下降。这些结果说明过表达 miR-214-3p 可以引起线粒体功能障碍，CCK8 验证过表达 miR-214-3p 会引起多巴胺神经元活力下降。抑制 miR-214-3p 则逆转此调控。过表达 GFM1 可以挽救 miR-214-3p 引起的线粒体功能障碍和神经元活力下降，减少活性氧的生成，提高细胞耗氧率，增加 ATP 含量，线粒体呼吸链复合物 I，线粒体呼吸链复合物 IV 的表达提高。

综合以上结果，本研究发现 miR-214-3p 上调可以引起线粒体功能障碍和神经元活力下降，且 miR-214-3p 可通过调控 GFM1 的表达影响线粒体功能和多巴胺神经元活力，这为治疗多巴胺神经元相关疾病提供了新的治疗思路。

参考文献

- 1 Cheng, A. M., Byrom, M. W., Shelton, J. & Ford, L. P. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic acids research* 33, 1290-1297, doi:10.1093/nar/gki200 (2005).
- 2 Penna, E., Orso, F. & Taverna, D. miR-214-3p as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions. *The Journal of investigative dermatology* 135, 960-969, doi:10.1038/jid.2014.479 (2015).
- 3 Aurora, A. B. et al. MicroRNA-214 protects the mouse heart from ischemic injury by controlling Ca^{2+} overload and cell death. *The Journal of clinical investigation* 122, 1222-1232, doi:10.1172/jci59327 (2012).
- 4 Sun, Y. et al. MiR-214-3p is an important regulator of the musculoskeletal metabolism and disease. *Journal of cellular physiology* 234, 231-245, doi:10.1002/jcp.26856 (2018).
- 5 Lv, G. et al. MicroRNA-214 protects cardiac myocytes against H2O2-induced injury. *Journal of cellular biochemistry* 115, 93-101, doi:10.1002/jcb.24636 (2014).
- 6 Duan, Q. et al. MicroRNA-214 Is Upregulated in Heart Failure Patients and Suppresses XBP1-Mediated Endothelial Cells Angiogenesis. *Journal of cellular physiology* 230, 1964-1973, doi:10.1002/jcp.24942 (2015).
- 7 Sun, M., Yu, H., Zhang, Y., Li, Z. & Gao, W. MicroRNA-214 Mediates Isoproterenol-induced Proliferation and Collagen Synthesis in Cardiac Fibroblasts. *Scientific reports* 5, 18351, doi:10.1038/srep18351 (2015).
- 8 Bageghni, S. A. et al. Cardiac fibroblast-specific p38 α MAP kinase promotes cardiac hypertrophy via a putative paracrine interleukin-6 signaling mechanism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32, 4941-4954, doi:10.1096/fj.201701455RR (2018).
- 9 Junker, A. et al. MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain : a journal of neurology* 132, 3342-3352, doi:10.1093/brain/awp300 (2009).
- 10 Hoss, A. G. et al. miR-10b-5p expression in Huntington's disease brain relates to age of onset and the extent of striatal involvement. *BMC medical genomics* 8, 10, doi:10.1186/s12920-015-0083-3 (2015).
- 11 Viswambharan, V., Thanseem, I., Vasu, M. M., Poovathinal, S. A. & Anitha, A.

- miRNAs as biomarkers of neurodegenerative disorders. *Biomarkers in medicine* 11, 151-167, doi:10.2217/bmm-2016-0242 (2017).
- 12 Wang, Z. H. et al. MicroRNA-214 participates in the neuroprotective effect of Resveratrol via inhibiting α -synuclein expression in MPTP-induced Parkinson's disease mouse. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 74, 252-256, doi:10.1016/j.biopha.2015.08.025 (2015).
- 13 Li, L. et al. Serum miR-214-3p Serves as a Biomarker for Prodromal Parkinson's Disease. *Frontiers in aging neuroscience* 13, 700959, doi:10.3389/fnagi.2021.700959 (2021).
- 14 Wang, L. & Zhang, L. Circulating Exosomal miRNA as Diagnostic Biomarkers of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in molecular neuroscience* 13, 53, doi:10.3389/fnmol.2020.00053 (2020).
- 15 Chandel, N. S. Mitochondria as signaling organelles. *BMC biology* 12, 34, doi:10.1186/1741-7007-12-34 (2014).
- 16 Neupert, W. & Herrmann, J. M. Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76, 723-749, doi:10.1146/annurev.biochem.76.052705.163409 (2007).
- 17 Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. & Reichert, A. S. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *The Journal of cell biology* 175, 237-247, doi:10.1083/jcb.200605138 (2006).
- 18 van der Bliek, A. M., Sedensky, M. M. & Morgan, P. G. Cell Biology of the Mitochondrion. *Genetics* 207, 843-871, doi:10.1534/genetics.117.300262 (2017).
- 19 Martinus, R. D. et al. Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *European journal of biochemistry* 240, 98-103, doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0098h.x (1996).
- 20 Randow, F. & Youle, R. J. Self and nonself: how autophagy targets mitochondria and bacteria. *Cell host & microbe* 15, 403-411, doi:10.1016/j.chom.2014.03.012 (2014).
- 21 Breitenbach, M. et al. Mitochondria in ageing: there is metabolism beyond the ROS. *FEMS yeast research* 14, 198-212, doi:10.1111/1567-1364.12134 (2014).
- 22 Gomes, L. C. & Scorrano, L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 205-212, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.02.012 (2013).
- 23 Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148, doi:10.1038/191144a0 (1961).
- 24 Starkov, A. A. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and

- signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147, 37-52, doi:10.1196/annals.1427.015 (2008).
- 25 Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E. & Starkov, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry. Biokhimiia* 70, 200-214, doi:10.1007/s10541-005-0102-7 (2005).
- 26 Phaniendra, A., Jestadi, D. B. & Periyasamy, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB* 30, 11-26, doi:10.1007/s12291-014-0446-0 (2015).
- 27 Anderson, S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465, doi:10.1038/290457a0 (1981).
- 28 McFarland, R., Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. A neurological perspective on mitochondrial disease. *The Lancet. Neurology* 9, 829-840, doi:10.1016/s1474-4422(10)70116-2 (2010).
- 29 Di Donato, S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *Journal of inherited metabolic disease* 23, 247-263, doi:10.1023/a:1005684029429 (2000).
- 30 Klecker, T. & Westermann, B. Pathways shaping the mitochondrial inner membrane. *Open biology* 11, 210238, doi:10.1098/rsob.210238 (2021).
- 31 Gould, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nature reviews. Neuroscience* 8, 481-488, doi:10.1038/nrn2147 (2007).
- 32 Sheng, Z. H. & Cai, Q. Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nature reviews. Neuroscience* 13, 77-93, doi:10.1038/nrn3156 (2012).
- 33 Klemmensen, M. M., Borrowman, S. H., Pearce, C., Pyles, B. & Chandra, B. Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 21, e00292, doi:10.1016/j.neurot.2023.10.002 (2024).
- 34 Acin-Perez, R. & Enriquez, J. A. The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 444-450, doi:10.1016/j.bbabi.2013.12.009 (2014).
- 35 Genova, M. L. & Lenaz, G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et biophysica acta* 1837, 427-443, doi:10.1016/j.bbabi.2013.11.002 (2014).
- 36 Gao, J. et al. Cloning and characterization of human and mouse mitochondrial

- elongation factor G, GFM and Gfm, and mapping of GFM to human chromosome 3q25.1-q26.2. *Genomics* 74, 109-114, doi:10.1006/geno.2001.6536 (2001).
- 37 Hammarsund, M. et al. Identification and characterization of two novel human mitochondrial elongation factor genes, hEFG2 and hEFG1, phylogenetically conserved through evolution. *Human genetics* 109, 542-550, doi:10.1007/s00439-001-0610-5 (2001).
- 38 Balasubramaniam, S. et al. Infantile Progressive Hepatoencephalomyopathy with Combined OXPHOS Deficiency due to Mutations in the Mitochondrial Translation Elongation Factor Gene GFM1. *JIMD reports* 5, 113-122, doi:10.1007/8904_2011_107 (2012).
- 39 Bhargava, K., Templeton, P. & Spremulli, L. L. Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G. *Protein expression and purification* 37, 368-376, doi:10.1016/j.pep.2004.06.030 (2004).
- 40 Chung, H. K. & Spremulli, L. L. Purification and characterization of elongation factor G from bovine liver mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 265, 21000-21004 (1990).
- 41 Katunin, V. I., Savelsbergh, A., Rodnina, M. V. & Wintermeyer, W. Coupling of GTP hydrolysis by elongation factor G to translocation and factor recycling on the ribosome. *Biochemistry* 41, 12806-12812, doi:10.1021/bi0264871 (2002).
- 42 Koripella, R. K. et al. Structures of the human mitochondrial ribosome bound to EF-G1 reveal distinct features of mitochondrial translation elongation. *Nature communications* 11, 3830, doi:10.1038/s41467-020-17715-2 (2020).
- 43 Kummer, E. & Ban, N. Structural insights into mammalian mitochondrial translation elongation catalyzed by mtEFG1. *The EMBO journal* 39, e104820, doi:10.15252/embj.2020104820 (2020).
- 44 Kumar, S. & Reddy, P. H. Are circulating microRNAs peripheral biomarkers for Alzheimer's disease? *Biochimica et biophysica acta* 1862, 1617-1627, doi:10.1016/j.bbadis.2016.06.001 (2016).
- 45 Jung, H. J. & Suh, Y. MicroRNA in Aging: From Discovery to Biology. *Current genomics* 13, 548-557, doi:10.2174/138920212803251436 (2012).
- 46 Hadj-Moussa, H., Hawkins, L. J. & Storey, K. B. Role of MicroRNAs in Extreme Animal Survival Strategies. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2257, 311-347, doi:10.1007/978-1-0716-1170-8_16 (2022).
- 47 Li, Z., Xu, R. & Li, N. MicroRNAs from plants to animals, do they define a new messenger for communication? *Nutrition & metabolism* 15, 68, doi:10.1186/s12986-018-0305-8 (2018).
- 48 Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116,

- 281-297, doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5 (2004).
- 49 Chan, S. P. & Slack, F. J. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA biology* 3, 97-100, doi:10.4161/rna.3.3.3499 (2006).
- 50 Sousa, J. S., D'Imprima, E. & Vonck, J. Mitochondrial Respiratory Chain Complexes. *Sub-cellular biochemistry* 87, 167-227, doi:10.1007/978-981-10-7757-9_7 (2018).
- 51 Hirst, J. Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry* 82, 551-575, doi:10.1146/annurev-biochem-070511-103700 (2013).
- 52 Laube, E., Meier-Credo, J., Langer, J. D. & Kühlbrandt, W. Conformational changes in mitochondrial complex I of the thermophilic eukaryote *Chaetomium thermophilum*. *Science advances* 8, eadc9952, doi:10.1126/sciadv.adc9952 (2022).
- 53 Vercellino, I. & Sazanov, L. A. The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nature reviews. Molecular cell biology* 23, 141-161, doi:10.1038/s41580-021-00415-0 (2022).
- 54 Hägerhäll, C. Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme. *Biochimica et biophysica acta* 1320, 107-141, doi:10.1016/s0005-2728(97)00019-4 (1997).
- 55 Trumpower, B. L. & Gennis, R. B. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annual review of biochemistry* 63, 675-716, doi:10.1146/annurev.bi.63.070194.003331 (1994).
- 56 Sharma, V., Ala-Vannessluoma, P., Vattulainen, I., Wikström, M. & Róg, T. Role of subunit III and its lipids in the molecular mechanism of cytochrome c oxidase. *Biochimica et biophysica acta* 1847, 690-697, doi:10.1016/j.bbabi.2015.04.007 (2015).
- 57 DiMauro, S., Tanji, K. & Schon, E. A. The many clinical faces of cytochrome c oxidase deficiency. *Advances in experimental medicine and biology* 748, 341-357, doi:10.1007/978-1-4614-3573-0_14 (2012).
- 58 Nies, Y. H. et al. MicroRNA Dysregulation in Parkinson's Disease: A Narrative Review. *Frontiers in neuroscience* 15, 660379, doi:10.3389/fnins.2021.660379 (2021).
- 59 Li, K., Zhang, J., Ji, C. & Wang, L. MiR-144-3p and Its Target Gene β -Amyloid Precursor Protein Regulate 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine-Induced Mitochondrial Dysfunction. *Molecules and cells* 39, 543-549, doi:10.14348/molcells.2016.0050 (2016).
- 60 Zhou, Y. et al. MicroRNA-7 targets Nod-like receptor protein 3 inflammasome to modulate neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Molecular neurodegeneration* 11, 28, doi:10.1186/s13024-016-0094-3 (2016).

- 61 Chen, Y. et al. Increased Salivary microRNAs That Regulate DJ-1 Gene Expression as Potential Markers for Parkinson's Disease. *Frontiers in aging neuroscience* 12, 210, doi:10.3389/fnagi.2020.00210 (2020).
- 62 Angelopoulou, E., Paudel, Y. N. & Piperi, C. miR-124 and Parkinson's disease: A biomarker with therapeutic potential. *Pharmacological research* 150, 104515, doi:10.1016/j.phrs.2019.104515 (2019).
- 63 Hu, Y. B. et al. miR-425 deficiency promotes necroptosis and dopaminergic neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell death & disease* 10, 589, doi:10.1038/s41419-019-1809-5 (2019).
- 64 Jauhari, A., Singh, T., Mishra, S., Shankar, J. & Yadav, S. Coordinated Action of miR-146a and Parkin Gene Regulate Rotenone-induced Neurodegeneration. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 176, 433-445, doi:10.1093/toxsci/kfaa066 (2020).
- 65 Indrieri, A. et al. miR-181a/b downregulation exerts a protective action on mitochondrial disease models. *EMBO molecular medicine* 11, doi:10.15252/emmm.201708734 (2019).
- 66 Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. & Freedman, L. S. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research* 38, 3751-3757 (1978).
- 67 Gordon, J., Amini, S. & White, M. K. General overview of neuronal cell culture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1078, 1-8, doi:10.1007/978-1-62703-640-5_1 (2013).
- 68 Slanzi, A., Iannoto, G., Rossi, B., Zenaro, E. & Constantin, G. In vitro Models of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in cell and developmental biology* 8, 328, doi:10.3389/fcell.2020.00328 (2020).
- 69 Yin, K., Baillie, G. J. & Vetter, I. Neuronal cell lines as model dorsal root ganglion neurons: A transcriptomic comparison. *Molecular pain* 12, doi:10.1177/1744806916646111 (2016).
- 70 Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D. & Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Molecular systems biology* 13, 942, doi:10.15252/msb.20156297 (2017).
- 71 Hondius, D. C. et al. Profiling the human hippocampal proteome at all pathologic stages of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* 12, 654-668, doi:10.1016/j.jalz.2015.11.002 (2016).
- 72 Hondius, D. C. et al. Proteomics analysis identifies new markers associated with

- capillary cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications* 6, 46, doi:10.1186/s40478-018-0540-2 (2018).
- 73 Recabarren-Leiva, D. & Alarcón, M. New insights into the gene expression associated to amyotrophic lateral sclerosis. *Life sciences* 193, 110-123, doi:10.1016/j.lfs.2017.12.016 (2018).
- 74 Pradat, P. F. et al. Muscle gene expression is a marker of amyotrophic lateral sclerosis severity. *Neuro-degenerative diseases* 9, 38-52, doi:10.1159/000329723 (2012).
- 75 Saris, C. G. et al. Weighted gene co-expression network analysis of the peripheral blood from Amyotrophic Lateral Sclerosis patients. *BMC genomics* 10, 405, doi:10.1186/1471-2164-10-405 (2009).
- 76 Dong, H. et al. miR-214-3p promotes the pathogenesis of Parkinson's disease by inhibiting autophagy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 171, 116123, doi:10.1016/j.biopha.2024.116123 (2024).
- 77 Hald, A. & Lotharius, J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental neurology* 193, 279-290, doi:10.1016/j.expneurol.2005.01.013 (2005).
- 78 Dias, V., Junn, E. & Mouradian, M. M. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease* 3, 461-491, doi:10.3233/jpd-130230 (2013).
- 79 Rahman, J. & Rahman, S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet (London, England)* 391, 2560-2574, doi:10.1016/s0140-6736(18)30727-x (2018).
- 80 Gregersen, N., Hansen, J. & Palmfeldt, J. Mitochondrial proteomics--a tool for the study of metabolic disorders. *Journal of inherited metabolic disease* 35, 715-726, doi:10.1007/s10545-012-9480-3 (2012).
- 81 Calvo, S. E. & Mootha, V. K. The mitochondrial proteome and human disease. *Annual review of genomics and human genetics* 11, 25-44, doi:10.1146/annurev-genom-082509-141720 (2010).
- 82 Picelli, S. Single-cell RNA-sequencing: The future of genome biology is now. *RNA biology* 14, 637-650, doi:10.1080/15476286.2016.1201618 (2017).
- 83 Jiang, H. et al. Identification of a selective and direct NLRP3 inhibitor to treat inflammatory disorders. *The Journal of experimental medicine* 214, 3219-3238, doi:10.1084/jem.20171419 (2017).
- 84 Rodriguez-Esteban, R. & Jiang, X. Differential gene expression in disease: a comparison between high-throughput studies and the literature. *BMC medical genomics* 10, 59, doi:10.1186/s12920-017-0293-y (2017).

- 85 Wei, L., Wan, S., Guo, J. & Wong, K. K. A novel hierarchical selective ensemble classifier with bioinformatics application. *Artificial intelligence in medicine* 83, 82-90, doi:10.1016/j.artmed.2017.02.005 (2017).
- 86 Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic acids research* 43, D1049-1056, doi:10.1093/nar/gku1179 (2015).
- 87 Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M. & Tanabe, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic acids research* 44, D457-462, doi:10.1093/nar/gkv1070 (2016).
- 88 Hudson, N. J., Dalrymple, B. P. & Reverter, A. Beyond differential expression: the quest for causal mutations and effector molecules. *BMC genomics* 13, 356, doi:10.1186/1471-2164-13-356 (2012).
- 89 de la Fuente, A. From 'differential expression' to 'differential networking' - identification of dysfunctional regulatory networks in diseases. *Trends in genetics : TIG* 26, 326-333, doi:10.1016/j.tig.2010.05.001 (2010).
- 90 Kumar, V. et al. Chronic Pressure Overload Results in Deficiency of Mitochondrial Membrane Transporter ABCB7 Which Contributes to Iron Overload, Mitochondrial Dysfunction, Metabolic Shift and Worsens Cardiac Function. *Scientific reports* 9, 13170, doi:10.1038/s41598-019-49666-0 (2019).
- 91 Nunes, J. P. S. et al. Co-Exposure of Cardiomyocytes to IFN- γ and TNF- α Induces Mitochondrial Dysfunction and Nitro-Oxidative Stress: Implications for the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy. *Frontiers in immunology* 12, 755862, doi:10.3389/fimmu.2021.755862 (2021).
- 92 Wang, Y., Zhang, J., Li, B. & He, Q. Y. Proteomic analysis of mitochondria: biological and clinical progresses in cancer. *Expert review of proteomics* 14, 891-903, doi:10.1080/14789450.2017.1374180 (2017).
- 93 Bornstein, R., Gonzalez, B. & Johnson, S. C. Mitochondrial pathways in human health and aging. *Mitochondrion* 54, 72-84, doi:10.1016/j.mito.2020.07.007 (2020).
- 94 Natarajan, V. et al. Mitochondrial Dysfunction in Age-Related Metabolic Disorders. *Proteomics* 20, e1800404, doi:10.1002/pmic.201800404 (2020).
- 95 Wang, L. et al. Mitochondrial protein dysfunction in pathogenesis of neurological diseases. *Frontiers in molecular neuroscience* 15, 974480, doi:10.3389/fnmol.2022.974480 (2022).
- 96 Gomes, K. P. et al. Proteomic Analysis Suggests Altered Mitochondrial Metabolic Profile Associated With Diabetic Cardiomyopathy. *Frontiers in cardiovascular medicine* 9, 791700, doi:10.3389/fcvm.2022.791700 (2022).

- 97 Subramaniam, S. R. & Chesselet, M. F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 106-107, 17-32, doi:10.1016/j.pneurobio.2013.04.004 (2013).
- 98 Schapira, A. H. et al. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 54, 823-827, doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x (1990).
- 99 Hattori, N., Tanaka, M., Ozawa, T. & Mizuno, Y. Immunohistochemical studies on complexes I, II, III, and IV of mitochondria in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 30, 563-571, doi:10.1002/ana.410300409 (1991).
- 100 O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y. & Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology* 9, 402, doi:10.3389/fendo.2018.00402 (2018).
- 101 Shi, Q. & Gibson, G. E. Up-regulation of the mitochondrial malate dehydrogenase by oxidative stress is mediated by miR-743a. *Journal of neurochemistry* 118, 440-448, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07333.x (2011).
- 102 Gao, P. et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762-765, doi:10.1038/nature07823 (2009).
- 103 Chen, Z., Li, Y., Zhang, H., Huang, P. & Luthra, R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 29, 4362-4368, doi:10.1038/onc.2010.193 (2010).
- 104 Aschrafi, A. et al. MicroRNA-338 regulates local cytochrome c oxidase IV mRNA levels and oxidative phosphorylation in the axons of sympathetic neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 12581-12590, doi:10.1523/jneurosci.3338-08.2008 (2008).
- 105 Sarkar, S. et al. Expression of microRNA-34a in Alzheimer's disease brain targets genes linked to synaptic plasticity, energy metabolism, and resting state network activity. *Brain research* 1646, 139-151, doi:10.1016/j.brainres.2016.05.026 (2016).
- 106 Kim, Y. J. et al. miR-16-5p is upregulated by amyloid β deposition in Alzheimer's disease models and induces neuronal cell apoptosis through direct targeting and suppression of BCL-2. *Experimental gerontology* 136, 110954, doi:10.1016/j.exger.2020.110954 (2020).
- 107 Zhang, R. et al. MiR-195 dependent roles of mitofusin2 in the mitochondrial dysfunction of hippocampal neurons in SAMP8 mice. *Brain research* 1652, 135-143, doi:10.1016/j.brainres.2016.09.047 (2016).

- 108 Lungu, G., Stoica, G. & Ambrus, A. MicroRNA profiling and the role of microRNA-132 in neurodegeneration using a rat model. *Neuroscience letters* 553, 153-158, doi:10.1016/j.neulet.2013.08.001 (2013).
- 109 Chaudhuri, A. D., Choi, D. C., Kabaria, S., Tran, A. & Junn, E. MicroRNA-7 Regulates the Function of Mitochondrial Permeability Transition Pore by Targeting VDAC1 Expression. *The Journal of biological chemistry* 291, 6483-6493, doi:10.1074/jbc.M115.691352 (2016).
- 110 Chen, F. Z., Zhao, Y. & Chen, H. Z. MicroRNA-98 reduces amyloid β -protein production and improves oxidative stress and mitochondrial dysfunction through the Notch signaling pathway via HEY2 in Alzheimer's disease mice. *International journal of molecular medicine* 43, 91-102, doi:10.3892/ijmm.2018.3957 (2019).
- 111 Li, J. et al. miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS genetics* 6, e1000795, doi:10.1371/journal.pgen.1000795 (2010).
- 112 Wong, H. K. et al. De-repression of FOXO3a death axis by microRNA-132 and -212 causes neuronal apoptosis in Alzheimer's disease. *Human molecular genetics* 22, 3077-3092, doi:10.1093/hmg/ddt164 (2013).
- 113 Liu, X. et al. By targeting apoptosis facilitator BCL2L13, microRNA miR-484 alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury-induced neuronal apoptosis in mice. *Bioengineered* 12, 948-959, doi:10.1080/21655979.2021.1898134 (2021).
- 114 Lin, Q., Mao, Y., Song, Y. & Huang, D. MicroRNA-34a induces apoptosis in PC12 cells by reducing B-cell lymphoma 2 and sirtuin-1 expression. *Molecular medicine reports* 12, 5709-5714, doi:10.3892/mmr.2015.4185 (2015).
- 115 Wang, Q., Ge, X., Zhang, J. & Chen, L. Effect of lncRNA WT1-AS regulating WT1 on oxidative stress injury and apoptosis of neurons in Alzheimer's disease via inhibition of the miR-375/SIX4 axis. *Aging* 12, 23974-23995, doi:10.18632/aging.104079 (2020).
- 116 Hong, H., Li, Y. & Su, B. Identification of Circulating miR-125b as a Potential Biomarker of Alzheimer's Disease in APP/PS1 Transgenic Mouse. *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 59, 1449-1458, doi:10.3233/jad-170156 (2017).
- 117 Bargaje, R. et al. Identification of novel targets for miR-29a using miRNA proteomics. *PloS one* 7, e43243, doi:10.1371/journal.pone.0043243 (2012).
- 118 Liang, C. et al. MicroRNA-140 silencing represses the incidence of Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 758, 135674, doi:10.1016/j.neulet.2021.135674 (2021).
- 119 Bai, X. Y. et al. miR-335 and miR-34a Promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. *Journal of the American Society of Nephrology :*

- JASN 22, 1252-1261, doi:10.1681/asn.2010040367 (2011).
- 120 Ott, M. & Herrmann, J. M. Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1803, 767-775, doi:10.1016/j.bbamcr.2009.11.010 (2010).
- 121 Raturi, A. & Simmen, T. Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochimica et biophysica acta* 1833, 213-224, doi:10.1016/j.bbamcr.2012.04.013 (2013).
- 122 de Brito, O. M. & Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610, doi:10.1038/nature07534 (2008).
- 123 Rötig, A. Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis. *Biochimica et biophysica acta* 1807, 1198-1205, doi:10.1016/j.bbabbio.2011.06.010 (2011).
- 124 Christian, B. E. & Spremulli, L. L. Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* 1819, 1035-1054, doi:10.1016/j.bbagrm.2011.11.009 (2012).
- 125 Wallace, D. C. A mitochondrial bioenergetic etiology of disease. *The Journal of clinical investigation* 123, 1405-1412, doi:10.1172/jci61398 (2013).
- 126 Boczonadi, V. & Horvath, R. Mitochondria: impaired mitochondrial translation in human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* 48, 77-84, doi:10.1016/j.biocel.2013.12.011 (2014).

附录

中英文缩略词表

英文缩写	英文全称	中文名称
3'-UTR	3'untranslated region	3'非翻译区
AD	Alzheimer's disease	阿尔茨海默症
PD	Parkinson's Disease	帕金森病
OxPhos	Oxidative phosphorylation	氧化磷酸化
ROS	reactive oxygen species	活性氧
ATP	ATP adenosinetriphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
ETC	Electron transport chain	电子传递链
OCR	Oxygen Consumption Rate	氧气消耗速率
HSP	heat shock protein	热休克蛋白
GTP	Guanosine triphosphate	三磷酸鸟苷
α -syn	α -synuclein	α -突触核蛋白
mtDNA	Mitochondrial DNA	线粒体 DNA
GO	Gene Ontology	基因功能国际标准分类体系
COX	Complex	复合物
BP	Biological Process	生物过程
CC	Cell Component	细胞组分
MF	Molecular Function	分子功能
tRNA	Transfer RNA	转运 RNA