

## 2020發表文章精讀



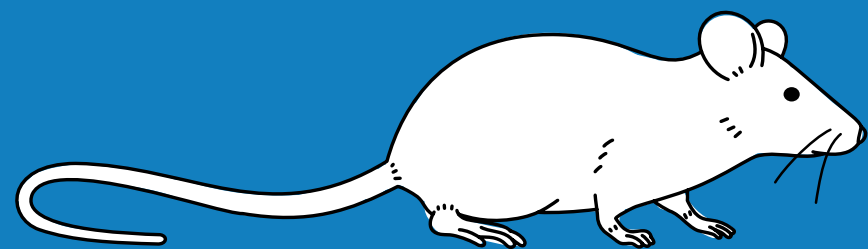
在古柯鹼上癮發生機制的研究中利用Basescope 技術定位

◆ MicroRNA134細胞類型及其調控目標 ◆





近年來，隨著對miRNA這類小型RNA的檢測技術日趨完善，使得人們能夠更加準確的定位miRNA這類小型RNA在複雜的組織細胞類型中的特異性分佈，從而為研究miRNA在神經系統內疾病調控的相關機制研究提供了可能性。在人和齧齒動物中，古柯鹼等精神興奮類藥物會提高焦慮、抑鬱行為的發生率，而焦慮行為的出現又會進一步促進毒品的重複使用率。近年來的一些研究顯示，miRNA作為一類小型RNA，在大腦中表現豐富，可以參與調節部分轉錄後的基因表現，也在神經發育的突觸可塑性中發揮功能。在2020年發表在Molecular Therapy Nucleic Acid上的一篇文章中[1]，來自南京中醫藥大學的關曉偉教授及其研究團隊發現在古柯鹼誘導的條件性偏好（CPP）的小鼠模型中，古柯鹼濫用會增加小鼠大腦海馬迴中miR134的表現，同時降低了19個與突觸可塑性相關的基因表現程度。在腹側海馬區（vHP）降低miR134則能夠逆轉其中的15個基因的變化，並挽救小鼠由於古柯鹼消失（CE）所引起的焦慮、抑鬱行為。





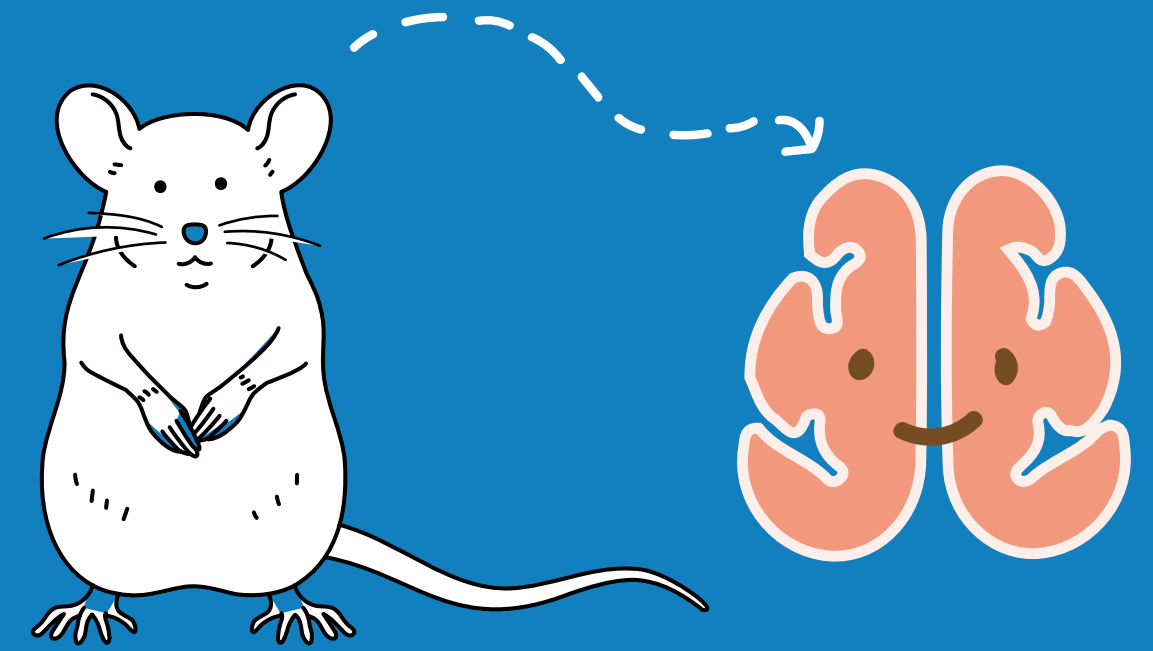
Molecular Therapy  
**Nucleic Acids**  
Original Article



## MicroRNA134 of Ventral Hippocampus Is Involved in Cocaine Extinction-Induced Anxiety-like and Depression-like Behaviors in Mice

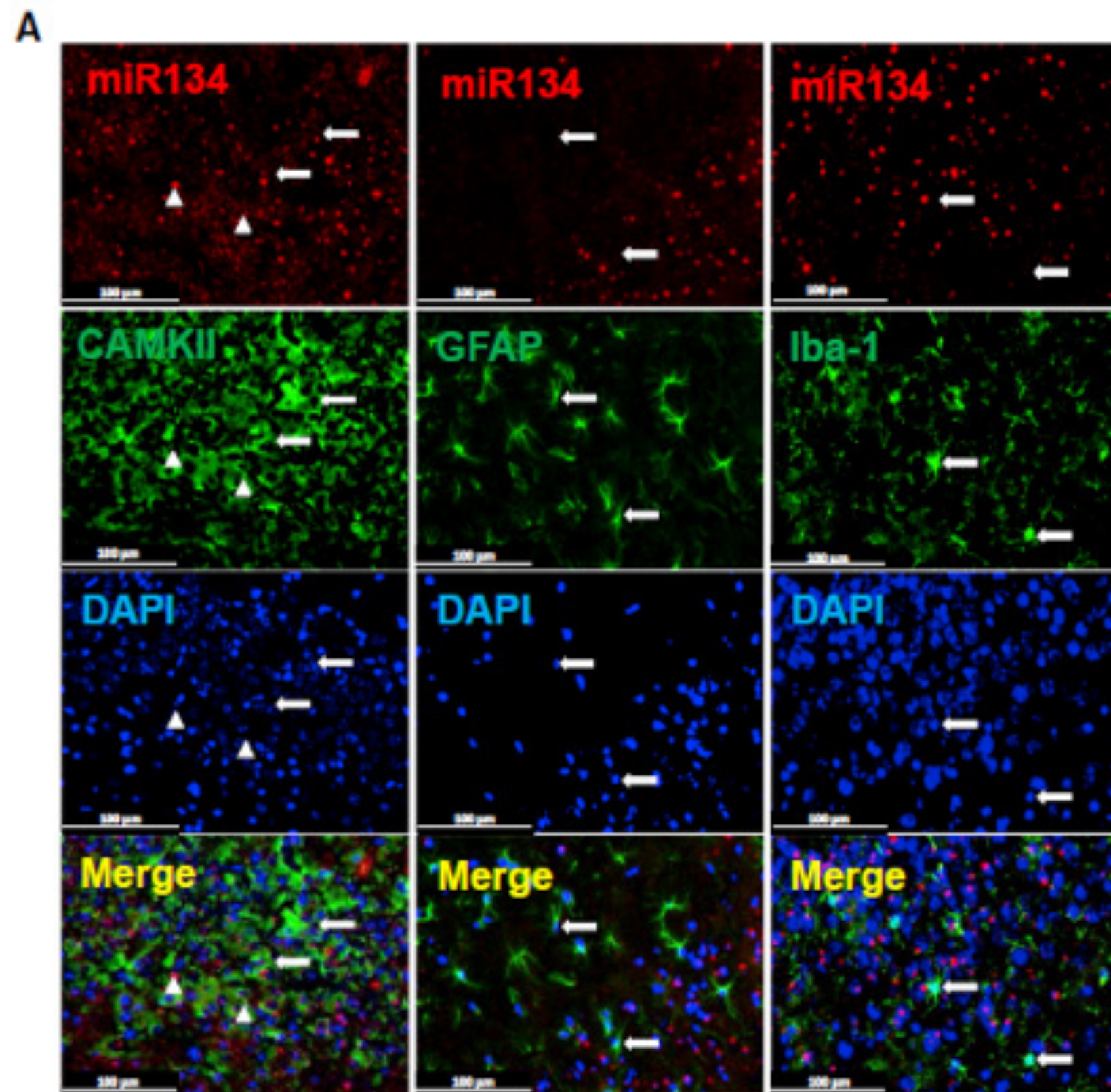
Yuehan Li,<sup>1,2,5</sup> Xue Lu,<sup>1,5</sup> Jiaxun Nie,<sup>1</sup> Panpan Hu,<sup>3</sup> Feifei Ge,<sup>1,2</sup> Ti-Fei Yuan,<sup>4</sup> and Xiaowei Guan<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Human Anatomy and Histoembryology, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, China; <sup>2</sup>Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, China; <sup>3</sup>Department of Human Anatomy, Nanjing Medical University, Nanjing, China; <sup>4</sup>Shanghai Key Laboratory of Psychotic Disorders, Shanghai Mental Health Center, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, China



為了確認在小鼠腦的vHP中表現miR134的神經元類型，研究人員使用Bio-techne旗下ACD公司的Basescope™與免疫螢光（IF）共染的方法，使用細胞特異性標記物，證實vHP的椎體神經元表現miR134，而星形膠質細胞和小膠質細胞不表現。



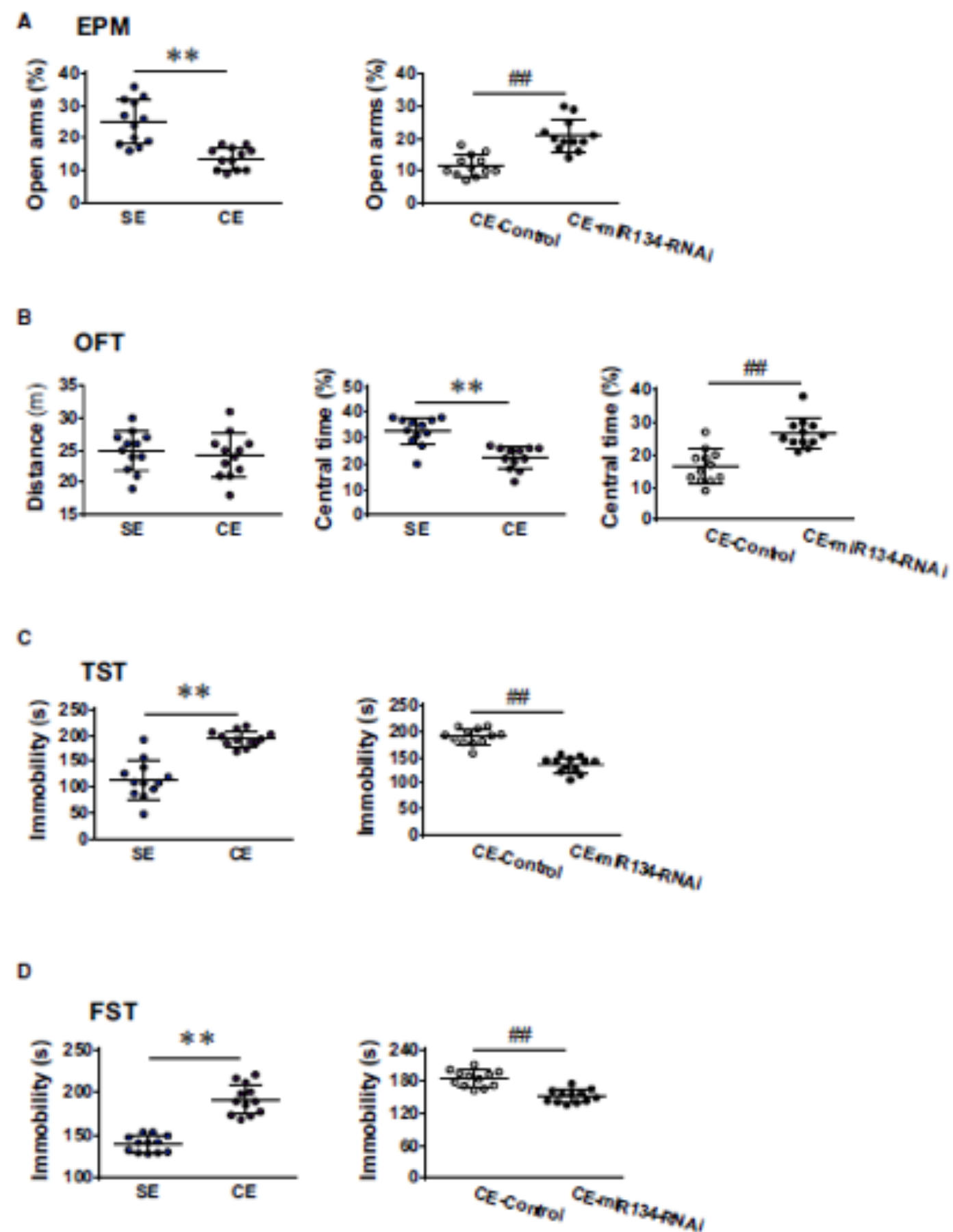


下圖中我們可以看到，紅色訊號點為使用Base-scope標記的miR134，綠色訊號點分別為標記vHP椎體神經元的CAMKII、標記星形膠質細胞的GFAP和標記小膠質細胞的Iba-1的免疫螢光訊號。我們可以看到miR134與CAMKII訊號有明顯的重疊，而與GFAP和Iba-1則沒有重疊，說明miR134主要位於vHP的神經元中。

### 圖1.

ISH-IHC共染結果。紅色：使用Basescope標記miR134。  
綠色：使用免疫螢光染色對不同神經細胞進行標記，CAMKII：海馬椎體神經元；GFAP：星形膠質細胞；Iba-1：小膠質細胞。  
DAPI：細胞核。





隨後，作者利用注射miR134-RNAi-virus的方法，對神經元進行特異性感染，從而實現對vHP內miR134進行局部性knockdown，發現knockdown後的小鼠對於古柯鹼引起的焦慮和抑鬱行為有所改善（如下圖）。同時研究者對於49個不同的與突觸可塑性相關基因進行定量檢測，發現升高的miR134會導致19個目標基因的表現量下降。而使用病毒注射對miR134進行干擾後，有15個目標基因的表現得到逆轉，暗示這15個目標基因有可能與古柯鹼消失相關的神經適應機制有關。

**圖 2.**

使用病毒注射进行miR134干擾后，在局部敲落miR134的表現，並能夠挽救小鼠抑鬱行為。EPM：高架十字迷宮；OFT：曠野試驗；TST：尾部懸吊試驗；FST：強迫游泳試驗。SE：Saline Extinction；CE：Cocaine Extinction。







最後，作者總結到，miR134在古柯鹼相關成癮行為中表現量發生改變，可能通過調節與突觸可塑性和神經化學為環境相關的目標基因表達，參與到古柯鹼相關的精神問題中。



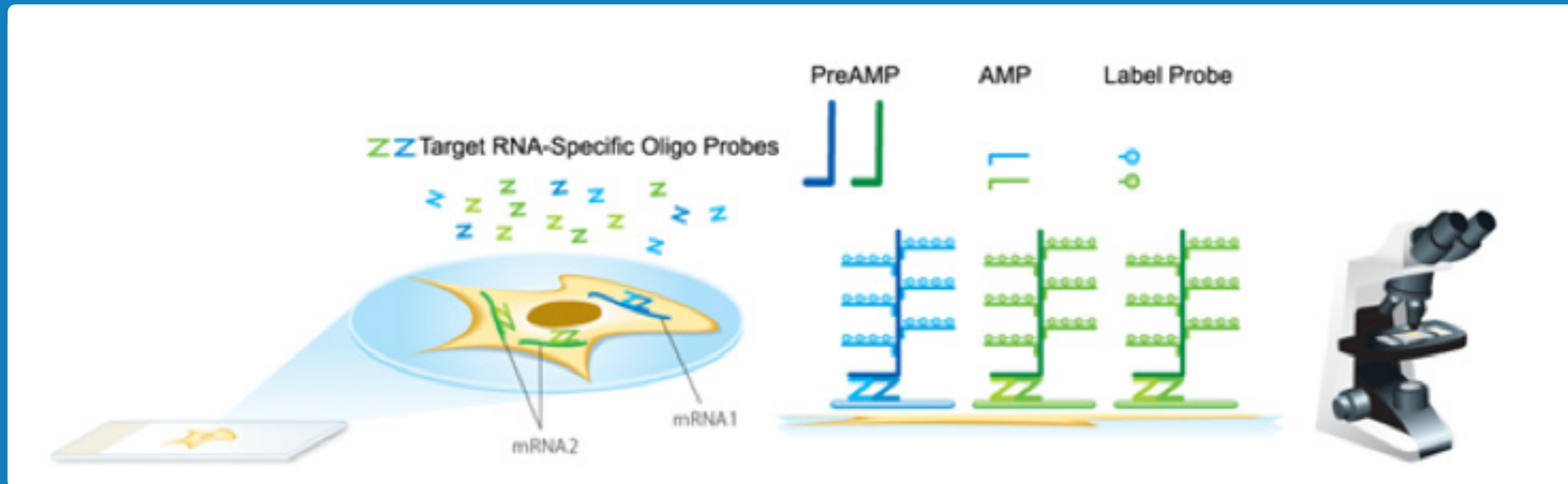
## Reference:

1. Mol Ther Nucleic Acids A. 2020 Mar 6;19:937-950.





RNAscope® 技術是由ACD公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope® 技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感靈敏地檢測到目標RNA。





## 該方法的具體優勢如下：

- 1** 可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測；
- 2** 特異性強：RNAscope®獨特的雙Z (ZZ) 探針設計可以有效結合片段化的RNA序列，從而無懼空氣中RNA酶降解導致的RNA片段化，同時雙Z探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z 探針不會產生完整的信號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫洗掉，從而防止非特異性信號的放大，使得探針的信號具有高度特異性。
- 3** 靈敏度高：RNAscope®方法檢測每個RNA 分子時，只需三對雙Z (ZZ) 探針即可完成雜交和信號的可視化。
- 4** 單分子檢測和單細胞定量：使用RNAscope®技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀信號。ACD公司建議的分析軟件更可以定量每一個單細胞內RNA 的表達量。
- 5** 檢測結果穩定一致性： RNAscope®技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程。







## 該方法的具體優勢如下：

- 6 除了可以在實驗室進行手工操作之外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平台上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。
- 7 可以實現多通道多目標同時檢測。
- 8 可以檢測所有RNA類型，除了前面提到的RNAscope®技術可以檢測300及以上長度的RNA外，ACD公司還提供BaseScope™技術以及miRNAscope技術，實現了對小片段RNA (50-300nt)、外顯子跳躍、點突變以及小RNA，包括miRNA/siRNA/ASO的原位追蹤。
- 9 探針設計合成需要4周時間即可完成。

