网络出版时间;2021-12-17 11;41 网络出版地址;https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1086. R. 20211216. 1031. 032. html

# microRNA-132 和 Mecp2 在甲基苯丙胺依赖中的作用

石振金<sup>1,2</sup>,张瑞林<sup>1</sup>,王一航<sup>1</sup>,吴亚梅<sup>2,3</sup>,杨根梦<sup>1</sup>,沈宝玉<sup>1</sup>,王 上<sup>1</sup>,刘鹏亮<sup>1</sup>, 朱婷娜<sup>3</sup>,赵永娜<sup>3</sup>,李利华<sup>1</sup>,张冬先<sup>1</sup>,洪仕君<sup>1</sup>

(1. 昆明医科大学法医学院,云南 昆明 650500;2. 楚雄医药高等专科学校,云南 楚雄 675005; 3. 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室,云南 昆明 650500)

doi:10.3969/j.issn.1001 - 1978.2022.01.015

文献标志码:A 文章编号:1001-1978(2022)01-0073-06 中国图书分类号:R-332;R322.81;R342.2;R394.2;R971.7; R971.93;R977.6

摘要:目的 探讨 miRNA-132 及相关蛋白 Mecp2、CREB 在 甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)神经毒性中的作用。方 法 大鼠腹腔注射 MA(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)建立 1、2、4 周 3 个不同依赖时程的 MA 依赖模型。取额叶皮质、海马, RTqPCR 检测 miRNA-132、Mecp2 mRNA, Western blot 检测 Mecp2、p-Mecp2、CREB和p-CREB。结果在额叶皮质, miRNA-132、Mecp2 mRNA 在 MA 依赖 1、2、4 周组表达均升 高(P < 0.05 和P < 0.01), Mecp2 表达明显降低(P < 0.01), Mecp2 磷酸化水平则明显升高。在海马, miRNA-132 呈降低 趋势,在2、4周组明显降低(P<0.01); Mecp2 mRNA 表达则 明显升高(P < 0.01); Mecp2 在 1 周组表达升高(P < 0.05), 之后呈降低趋势,在4周组表达明显降低(P<0.05);Mecp2 磷酸化水平在1周组降低(P<0.01),之后呈升高趋势,在2 周组明显升高(P<0.01)。结论 MA 可诱导 miRNA-132 异 常表达。在额叶皮质, miRNA-132 可能通过抑制 mRNA 的翻 译,致 Mecp2 表达降低而发挥作用;但在海马,miRNA-132 与 Mecp2 表达趋势未呈现反向对应关系, miRNA-132 调节并不 依赖于 Mecp2。

关键词:药物依赖;甲基苯丙胺;microRNA;甲基化 CpG 结合蛋白 2(Mecp2);环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB);基因表达

收稿日期:2021-08-01,修回日期:2021-09-27

基金资助:国家自然科学基金资助项目(No 81760337,81860332);云 南省科技厅 - 昆明医科大学联合专项资助(No 2017FE467-003、2018FE001-182)

作者简介:石振金(1992 - ),男,硕士,研究方向:毒品滥用毒理学机制,E-mail:903497339@qq.com;

洪仕君(1974 - ), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 毒品滥用 毒理学机制, 通信作者; E-mail; kmhongshijun@ 126. com; 张冬先(1978 - ), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 毒品滥用 毒理学机制, 通信作者, E-mail; zdx7818271@ 163. com

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



甲基苯丙胺(methamphetamine, MA)是一种安 非他明类中枢神经系统兴奋剂,MA 滥用者在我国 240. 4 万名在册吸毒人员中占比 56. 1%<sup>[1]</sup>,是滥用 人数最多的毒品类型。MA 具有极强的依赖性,会 引起认知障碍、焦虑、抑郁以及暴力行为等精神系统 障碍症状,甚至中毒导致因脑出血、缺血缺氧而昏迷 或死亡。迄今为止 MA 的依赖机制尚未明确。微 RNA(micro RNA, miRNA)是脑内广泛存在的基因 转录调控因子,调节神经元凋亡和突触相关基因表 达。既往研究表明, miRNA-132 在中枢神经系统中 的异常表达可能与 MA 诱发的神经毒性作用密切相 关。在 miRNA-132 基因上游调控序列中存在转录 激活因子环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB) 结合位点,而 与中枢神经发育相关的甲基化 CpG 结合蛋白 2 (methyl CpG binding protein 2, Mecp2)则为 miRNA-132 的直接作用靶点之一。但 miRNA-132、Mecp2 在 MA 所致神经毒性损害和依赖中的作用尚未见文 献报道。因此,本文试图探讨 MA 是否可通过 CREB 调控 miRNA-132 影响 miRNA-132 及 Mecp2 的表达,从而参与 MA 的依赖机制。

## 1 材料与方法

**1.1 药品、试剂和仪器** 甲基苯丙胺由云南省公安 厅公安部禁毒技术重点实验室合法提供,化学法提 纯后用生理盐水配制成 10 g·L<sup>-1</sup>的 MA 溶液(现用 现配)。Mecp2 一抗(兔抗,1:1 000, Cell Signaling 公司,D4F3,#3456),p-Mecp2 一抗(兔抗,1:1 000, Novus 公司,pSer421,#NBP2-29524),CREB 一抗(兔抗,1:1 000, Cell Signaling 公司,D76D11,#9197),p-CREB 一抗(兔抗,1:1 000, Cell Signaling 公司,Ser133,#9198),β-actin(鼠抗,1:5 000, Proteintech

公司,66375-1-Ig,#2D4H5)。HRP 标记山羊抗鼠的 二抗(1:5000, Abbkine 公司, A21010), HRP 标记 山羊抗兔的二抗(1:5000, Abbkine 公司, A21020), mRNA 逆转录试剂盒(Bestar™ qPCR RT Kit, DBI Bioscience, DBI-2220), qPCR 检测 mRNA 试 剂盒(BestarR SybrGreen qPCR Mastermix, DBI Bioscience, DBI-2043), miRNA 逆转录试剂盒(All-inone™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit, Gene-Copoeia, QP014), qPCR 检测 miRNA 试剂盒(All-inone™ miRNA qPCR Kit, Gene-Copoeia, QP011)。

主要仪器:条件性位置偏爱检测设备(上海欣软信息有限公司,型号 XR-XT401);电泳仪、膜转印装置(Bio-Rad 公司); PCR 仪(Bio-Rad 公司,型号 T100<sup>™</sup> Thermal Cycler),荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,型号 C1000 Touch<sup>™</sup> Thermal Cycler)。

- **1.2** 动物模型 雄性 SD 大鼠 60 只,5~6 周龄,体质量(180~220) g,购于昆明医科大学实验动物学部[许可证号: SCXK(滇) 2011-0004],随机分成 6 组,分别为 MA 依赖 1 周、2 周、4 周组及对照的生理盐水组。腹腔注射 MA(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)与生理盐水(10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)10 d后,用条件性位置偏爱(conditioned place preference, CPP) 及刻板行为(stereotyped behavior, SB)评分确认大鼠产生 MA 依赖,再分别给药 1、2、4 周建立不同依赖时程 MA 依赖模型,再用 CPP 实验和 SB 评分检测行为学改变。末次给药 24 h后,用 10 g·L<sup>-1</sup>水合氯醛麻醉,灌注取脑,分离额叶皮质、海马组织,置于 80 ℃超低温冰箱保存。
- 1.3 Western blot 检测蛋白质表达 脑组织解冻 后称取约 200 mg,用含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解,BCA 法检测蛋白浓度,加入上样缓冲液(5X)后混匀、变性。以50 ng 上样,SDS-PAGE 电泳分离,半干转膜仪转至 0.45 μm PVDF 膜上;膜用 5% 脱脂奶粉(或5% BSA)于摇床上室温封闭 1 h,分别加入相应 Mecp2 一抗,p-Mecp2 一抗,CREB 一抗和 p-CREB 一抗(1:1000)4 ℃孵育过夜,再加入相应种属二抗(1:5000)室温孵育 2 h;ECL 化学发光显色,Bio-Rad 凝胶成像仪显影成像。ImageJ 图像软件分析 Western blot 条带灰度值,计算目的蛋白相对于总蛋白的相对含量。

## 1.4 RT-qPCR 检测 miRNA 及 mRNA

1.4.1 RT-qPCR 引物信息 经 NCBI 网站查询目的基因序列信息后,用 Primer Premier 5 软件设计引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成

(Tab 1)<sub>o</sub>

Tab 1 Primer sequences for qPCR

| Oligo name   | Sequences   | Product length | Tm   |
|--------------|---|----------------|------|
| miRNA-132-5P | 5'-AGGTAACAGTCTACAGCCATGGTCG-3'                             |                | 58 ℃ |
| miRNA-U6     | 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'                                     |                | 58 ℃ |
| Mecp2        | F ;5'-GATCAAACGCCCTGGCAGAA-3' R :5'-ACTCCCAGGCTTTCTACCCC-3' | 82 bp          | 55 ℃ |
| GAPDH        | F :5'-AGACAGCCGCATCTTGT-3' R :5'-CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT-3'    | 207 bp         | 55 ℃ |

- 1.4.2 实验步骤 脑组织解冻后称取约 100 mg, 用 TRIzol 法提取总 RNA,以 2 μg 总 RNA 进行 RT-qPCR 反应。①用 mRNA 逆转录试剂盒合成 cDNA, 再用 qPCR 试剂盒检测 Mecp2 mRNA,以 GAPDH 为内参基因。②用 miRNA 试剂盒合成第一链 cDNA, 再用 qPCR 试剂盒检测 miRNA-132,以 U6 为内参基因。2 ΔΔct 法比较各组 mRNA 和 miRNA 的表达差异。
- **1.5** 统计学分析 SPSS 21.0 进行数据分析,数据 以均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,所有数据单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较,组间两两比较用 LSD 检验。

### 2 结果

- 2.1 动物模型建立 MA 依赖 1、2、4 周组大鼠在伴药箱的停留时间明显增加,均产生明显 CPP 效应。大鼠出现明显的兴奋性及刻板行为,刻板行为评分随着依赖时间延长而减少。实验结果参见课题组前期发表的数据<sup>[2]</sup>。
- 2.2 RT-qPCR 检测 miRNA-132、Mecp2 mRNA 表达 miRNA-132 在甲基苯丙胺依赖 1、2 周组(P<0.01)和4 周组(P<0.05)额叶皮质中表达明显升高;在海马中表达呈降低趋势,其中在 MA 依赖 2、4 周组明显降低(P<0.01)(Fig 1A)。Mecp2 mRNA 在 MA 依赖 1、2、4 周组额叶皮质(P<0.05 或 P<0.01)和海马(P<0.01)中表达均升高(Fig 1B)。
- 2.3 额叶皮质中 Mecp2、p-Mecp2、CREB、p-CREB 表达 Mecp2 在 MA 依赖 1、2、4 周组 ( P < 0.01) 额叶皮质中表达明显降低 ( Fig 2A, B ),且磷酸化水平呈升高趋势,在 MA 依赖 1、2 周组 ( P < 0.01) 中磷酸化水平明显升高 ( Fig 2A, C )。 CREB 在 1、2、4 周组额叶皮质中表达无明显变化 ( Fig 2A, D ),但磷酸化水平呈降低趋势,在 1、4 周组中磷酸化水平明显降低 ( P < 0.01) ( Fig 2A, E )。

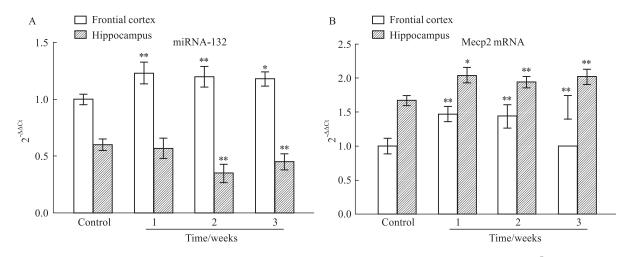


Fig 1 Expression of miRNA-132 and Mecp2 mRNA in frontal cortex and hippocampus of MA-induced rats  $(\bar{x} \pm s, n = 3)$ 

A: The levels of miRNA-132 in rats of different MA dependent groups. B: The levels of Mecp2 mRNA in rats of different MA dependent groups.  $^*P < 0.05$ ,  $^*P < 0.01$  vs Control.

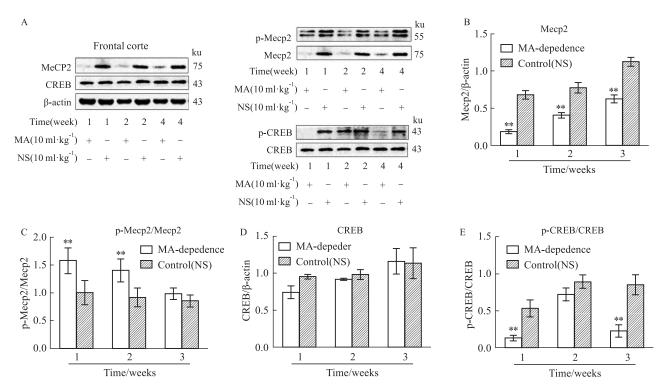


Fig 2 Expression of Mecp2, p-Mecp2/Mecp2, CREB and p-CREB/ CREB in frontal cortex of MA – induced  $rats(\bar{x} \pm s, n = 3)$ 

A: Representive bands of Western blot. B: The levels of Mecp2 in rats of different MA dependent groups. C: The levels of p-Mecp2/Mecp2 in rats of different MA dependent groups. E: The levels of p-CREB / CREB in rats of different MA dependent groups.  $^*P < 0.05$ ,  $^*P < 0.01$  vs NS.

# **2.4** 海马中 Mecp2、p-Mecp2、CREB、p-CREB 表达 Mecp2 在 MA 依赖 1 周组(*P* < 0.05)海马中表达明显升高,之后呈降低趋势,在 MA 依赖 4 周组(*P* < 0.05)中表达明显降低(Fig 3A,B)。 Mecp2 的磷酸化水平在 MA 依赖 1 周组(*P* < 0.01)表达明显降低,之后呈升高趋势,在 MA 依赖 2 周组(*P* < 0.01)中明显升高(Fig 3A,C)。 CREB 及其磷酸化

在 MA 依赖 1、2、4 周组海马中均无明显表达变化 (Fig 3 A,D-E)。

## 3 讨论

本研究以腹腔注射 MA 建立 1、2、4 周不同时程的 MA 依赖大鼠模型, MA 在各实验组均导致大鼠表现出明显的 CPP 效应。CPP 实验利用条件性刺激影响动物位置偏好,以产生药物依赖动物的行为

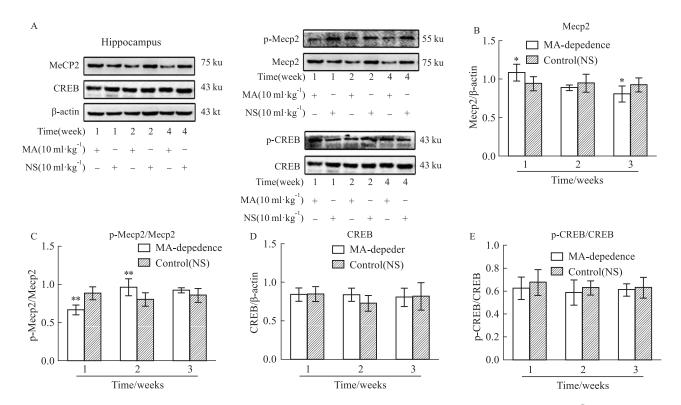


Fig 3 Expressions of Mecp2, p-Mecp2/Mecp2, CREB and p-CREB/CREB in hippocampus of MA dependent rats  $(\bar{x} \pm s, n = 3)$ 

A: Representive bands of Western blot. B: The levels of Mecp2 in rats of different MA dependent groups. C: The levels of p-Mecp2/Mecp2 in rats of different MA dependent groups. E: The levels of P-CREB/CREB in rats of different MA dependent groups.  $^*P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs NS.

学特点评价药物的依赖性,是评价动物出现药物依赖的经典动物模型。

额叶皮质、海马是调节行为活动、认知功能、学 习和记忆的重要脑区, miRNA-132 在 MA 依赖 1、2、 4周组额叶皮质中表达明显升高,在海马中则表达 降低,虽然两个脑区 miRNA -132 的表达趋势不一 致,但均存在明显的异常表达。此前,有研究在体外 培养 miRNA-212/132 敲除幼鼠皮质神经元,神经元 有出现树突短缩、分叉等改变[3], 靶向敲除 miRNA-212/132 基因会对海马中 mRNA 的转录谱产生广泛 影响,并出现空间记忆、识别记忆和认知功能障 碍[4],miRNA-132表达减少会增加神经退行性疾病 的患病率。但 Chen 等[5] 在神经干细胞转染 miR-NA-132 后,也发现 miRNA-132 通过影响细胞周期, 促进细胞凋亡来抑制神经元的分化,且促进胶质细 胞分化。维持 miRNA-132 稳定在中枢神经系统功 能调节具有重要作用, miR-132 轻度表达增加可增 强认知功能,但超生理水平的 miR-132 则会损害学 习功能<sup>[6]</sup>。上述研究结果说明 miRNA-132 参与了 调节 MA 依赖引起的神经损害作用。

miRNA 为小分子单链非编码 RNA,是基因转录

后调控因子,由 RNA 聚合酶 II 编码生成初级产物 pre-miRNA,经 Dicer 酶切后形成约 20 个核苷酸的 双链 miRNA,其中一链与靶 mRNA 的 3'非编码区互 补配对,一方面装载成 RISC 沉默复合体降解 mR-NA,另一方面与翻译起始区结合抑制 mRNA 翻 译[7]。在 MA 依赖者的血浆、外泌体以及组织中均 发现包括 miRNA-132 在内的 miRNA 的异常表达。 miRNA-132 位于人 17 号和大鼠 10 号染色体,与 miRNA-212 合称为 miRNA-212/132 家族<sup>[8]</sup>。 MA 可 增加第二信使环磷酸腺苷(cAMP)分泌,活化 CREB 后与 miRNA-212/132 基因上游 CRE 位点的结合,调 节 miRNA-212/132 的生成<sup>[9]</sup>。CREB 参与 MA 依赖 机制已有多篇文献报道, MA 通过 cAMP / PKA / CREB 通路实现 CREB 的磷酸化激活, CREB 活化后 与 c-fos、fosb、Syp、BDNF 等基因的启动子结合而发 挥作用<sup>[10]</sup>, miRNA-132 亦受 CREB 的调控。本研究 中,CREB的表达在额叶皮质无明显差异,MA在1 周和4周组中抑制了 CREB 的磷酸化,而海马中 CREB 及其磷酸化均无明显差异。有报道认为 MA 可抑制伏隔核、海马中 CREB 的磷酸化激活,但在不 同依赖时程、不同脑区组织中 CREB 蛋白的磷酸化 水平存在差异<sup>[11]</sup>, CREB 磷酸化在 MA 依赖中可能 无稳定的表达变化趋势, CREB 磷酸化水平降低也 未影响 miRNA-132 的表达。MA 可能通过其他转录 因子介导调节 miRNA-132 表达, 如已报道的 MSK1/2、ERK1/2 途径等<sup>[12]</sup>, 有待深入探索。

Mecp2 mRNA 为 miRNA-132 的作用靶点之一。 Mecp2 为甲基 CpG 结合域家族成员,可招募胞嘧啶 甲基转移酶、组蛋白去乙酰化酶和其他染色质重塑 蛋白介导基因沉默[13],而 Chahrous 等[14]检测缺失 或过表达 Mecp2 小鼠下丘脑内基因表达时,发现大 部分靶基因被 Mecp2 激活,其兼具转录激活因子和 抑制因子作用。Mecp2 基因缺陷为中枢系统发育障 碍性疾病 Ratt 综合征的主要病因,对神经元成熟、 突触形成和突触可塑性具有调节作用。在额叶皮 质, MA 依赖各组中 Mecp2 mRNA 表达均升高, 而 Mecp2 蛋白表达降低,与 miRNA-132 对 Mecp2 mR-NA的转录后调控作用的理论相吻合, miRNA-132 对 Mecp2 mRNA 有转录后抑制作用。但在海马, MA 依赖各组中 miRNA-132 表达降低, Mecp2 mRNA 表 达升高, Mecp2 蛋白在 MA 依赖 1 周组时表达增加, 此后随 MA 依赖时间的延长而降低,在 MA 依赖 4 周组中 Mecp2 的表达降低尤为明显, miRNA-132 与 Mecp2 表达趋势未呈现负对应关系。此前, Aten 等[15] 在昼夜节律研究中也发现, miRNA-132 在海马 表达变化会影响神经元形态和记忆功能,但 Mecp2 与 miRNA-132 表达趋势一致,认为在蛋白表达/调 控水平上,中枢内的动力学改变也会影响 miRNA 的 功能效果,mRNA 稳定性和翻译速率以及蛋白质的 半衰期,均影响着 miRNA 的作用效应。Morozova 等[16] 也提出 miRNA 的作用模式还取决与靶 mRNA 的自身特征,因此,存在多个靶点时,并非所有靶点 表达均受影响。Im 等[17] 则提出 miRNA-212/132 和 Mecop2 之间的作用稳态可调节可卡因的摄取,观察 到连续注射 7 d 可卡因后 Mecp2 在纹状体和海马中 高表达,在额叶皮质中则表达降低,海马中 Mecp2 的表达与本研究 MA 依赖 1 周组的结果相似。Deng 等[18]的研究也表明, Mecp2 参与慢性 MA 依赖中兴 奋性和抑制性信号传递,慢性 MA 作用会增加 Mecp2 磷酸化而调节中枢内蛋白的转录活动,与之 相似的是,本研究中 MA 依赖中 Mecp2 磷酸化水平 也有明显增加。上述结果均说明, Mecp2 在 MA 依 赖所致的毒性损害中有调节作用,但额叶皮质和海 马两个脑区中 Mecp2 的作用模式存在差异。

综上,MA 依赖可诱导额叶皮质和海马脑区中miRNA-132 的异常表达。在额叶皮质,miRNA-132

可能通过抑制 Mecp2 mRNA 的翻译,致 Mecp2 蛋白表达降低;但在海马,miRNA-132 与 Mecp2 表达趋势未呈现负对应关系。研究结果提示 miRNA-132 与 Mecp2 参与了调节 MA 诱导的神经毒性损害,miRNA-132 在额叶皮质中的作用可能是通过 Mecp2 发挥的,但在海马中并不依赖于 Mecp2 发挥其作用,Mecp2 在额叶皮质和海马中的作用模式和机制存在差异。

## 参考文献:

- [1] 马家佳, 2018 年中国毒品形势报告[N/OL]. 中国禁毒网, 2019 6 17. http://www.nncc626.com/2019 06/17/c\_1210161797.html.
- [1] Ma J J. Report on the drug situation in China in 2018 [ N/OL]. China Narcotics Network, 2019 - 6 - 17. http://www.nncc626. com/2019 - 06/17/c\_1210161797. html.
- [2] 黄兆奎,石振金,吴亚梅,等.甲基苯丙胺不同给药时程及天麻素的干预对建立大鼠条件性位置偏爱模型的影响[J].昆明医科大学学报,2019,40(3):1-5.
- [2] Huang Z K, Shi Z J, Wu Y M, et al. Establishment of the methamphetamine induced rat conditioned place preference model and the intervention effect of gastrodin [J]. J Kunming Med Univ, 2019, 40(3):1-5.
- [3] Remenyi J, Van Den Bosch M W, Palygin O, et al. MiR-132/ 212 knockout mice reveal roles for these miRNAs in regulating cortical synaptic transmission and plasticity [J]. PLoS One, 2013, 8 (4): e62509.
- [4] Hansen K F, Sakamoto K, Aten S, et al. Targeted deletion of miR-132/-212 impairs memory and alters the hippocampal transcriptome [J]. Learn Mem, 2016, 23(2): 61-71.
- [5] Chen D, Hu S, Wu Z, et al. The role of MiR-132 in regulating neural stem cell proliferation, differentiation and neuronal maturation [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(6): 2319 - 30.
- [6] Hansen K F, Karelina K, Sakamoto K, et al. miRNA-132: A dynamic regulator of cognitive capacity [J]. Brain Struct Funct, 2013, 218(3): 817-31.
- [7] Hammond S M. An overview of microRNAs [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2015, 87: 3-14.
- [8] 蒋 昕, 罗居东, 张舒羽. miR-212/132 簇生物学功能研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, **21**(11): 880-4.
- [8] Jiang X, Luo J D, Zhang S Y. Research progress in miR-212/132 cluster biological functions [J]. Chin J Cancer Prev Treat, 2014, 21(11): 880 -4.
- [9] Wang B, Chen T, Wang J, et al. Methamphetamine modulates the production of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha via the cAMP/PKA/CREB signaling pathway in lipopolysaccharideactivated microglia [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 56: 168 – 78.
- [10] 杨根梦,何翠华,洪仕君,等. NR2B/CREB 在人参皂苷 Rb1 调节甲基苯丙胺诱导大鼠条件位置偏爱中的作用[J]. 中国药理学通报,2020,36(5):604-8.

- [10] Yang G M, He C H, Hong S J, et al. Role of NR2B and CREB in ginsenoside Rb1 regulation of methamphetamine-induced conditioned place preference in rats [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(5):604-8.
- [11] 卫星辰. 甲基苯丙胺调节细胞外信号激酶(ERK)表达的研究 [D]. 昆明:昆明理工大学, 2014.
- [11] Wei X C. The study on methamphetamine regulating the expression of ERK[D]. Kunming: Kunming Univ Sci Technol, 2014.
- [12] Leo A, Giovannini G, Russo E,等. AMPA 受体及其拮抗剂在癫痫持续状态中的作用 [J]. 癫痫杂志, 2020, **6**(2): 157 65
- [12] Leo A, Giovannini G, Russo E, et al. The role of AMPA receptors and their antagonists in epileptic status epilepticus [J]. *J Epilepsy*, 2020, **6**(2): 157 65.
- [13] Rudzinskas S A, Mong J A. Methamphetamine alters DNMT and HDAC activity in the posterior dorsal medial amygdala in an ovarian steroid – dependent manner [J]. Neurosci Lett, 2018,683;125

- -30.
- [14] Chahrour M, Jung S Y, Shaw C, et al. MeCP2, a key contributor to neurological fisease, activates and represses transcription [J]. Science, 2008, 320 (5880); 1224-9.
- [15] Aten S, Hansen K F, Snider K, et al. MiR-132 couples the circadian clock to daily rhythms of neuronal plasticity and cognition [J]. Learn Mem, 2018, 25(5): 214-29.
- [16] Morozova N, Zinovyev A, Nonne N, et al. Kinetic signatures of microRNA modes of action [J]. RNA, 2012, 18(9): 1635-55.
- [17] Im H I, Hollander J A, Bali P, et al. MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212 [J]. Nature Neurosci, 2010, 13(9): 1120-7.
- [18] Deng J V, Rodriguiz R M, Hutchinson A N, et al. MeCP2 in the nucleus accumbens contributes to neural and behavioral responses to psychostimulants [J]. *Nat Neurosci*, 2010, **13**(9): 1128 36.

## Role of microRNA-132 and Mecp2 in methamphetamine dependence

SHI Zhen-jin<sup>1,2</sup>, ZHANG Rui-lin<sup>1</sup>, WANG Yi-hang<sup>1</sup>, WU Ya-mei<sup>2,3</sup>, YANG Gen-meng<sup>1</sup>, SHEN Bao-yu<sup>1</sup>, WANG Shang<sup>1</sup>, LIU Peng-liang<sup>1</sup>, ZHU Ting-na<sup>3</sup>, ZHAO Yong-na<sup>3</sup>, LI Li-hua<sup>1</sup>, ZHANG Dong-xian<sup>1</sup>, HONG Shi-jun<sup>1</sup>

School of Forensic Medicine, Kunming Medical University, Kunming 650500, China;
 Chuxiong Medical College, Chuxiong Yunnan 675005, China;
 School of Pharmaceutical Science & Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural Products, Kunming Medical University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** Aim To explore the roles of miRNA-132 and its related proteins (Mecp2, CREB) in the mechanism of methamphetamine (MA)-induced neurotoxicity and dependence. Methods The rats were intraperitioneally injected (ip) with MA (10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>) to establish methamphetamine dependence model with different dependent time courses of 1 week, 2 weeks, and 4 weeks respectively. The miRNA-132 and Mecp2 mRNA were detected by RT-qPCR, and the Mecp2, p-Mecp2, CREB and p-CREB proteins were detected by Western blot in the tissues of frontal cortex and hippo-132 and Mecp2 mRNA were up-regulated in MA-dependent groups (P < 0.05 and P < 0.01), while the Mecp2 protein were down-regulated (P < 0.01). MA could promote the phosphorylation of Mecp2 protein in the frontal cortex (P < 0.01). In hippocampus, the miRNA-132 was down-regulated in the MA-dependent groups, but Mecp2 mRNA was up-regulated (P <0.05). Mecp2 protein increased in MA-dependent 1

week group (P < 0.05), and then recovered with the prolonged time of MA dependence, then decreased in MA-dependent 4 weeks groups (P < 0.05) in hippocampus. The phosphorylation level of Mecp2 was significantly decreased in the 1 week group (P < 0.01), and then increased in the 2 weeks group (P < 0.01) in hippocampus. **Conclusions** MA could induce an abnormal expression of miRNA-132 in the frontal cortex and hippocampus, and miRNA-132 might inhibit the translation of Mecp2 mRNA and induce the decrease expression of Mecp2 protein in the frontal cortex. But in hippocampus, miRNA-132 does not show the correlation with the Mecp2 expression trend of the frontal cortex. And miRNA-132 regulation does not depend on the expression of Mecp2 in hippocampus.

**Key words:** drug dependence; methamphetamine; miRNA-132; methyl CpG binding protein 2 (Mecp2); cAMP-response element binding protein(CREB); gene expression