

MicroRNA-18a 靶向性干预对减轻永久性大脑中动脉闭塞所致小鼠脑梗死的实验研究

柯伟 邓小容 李文澜 张兆辉

【摘要】 目的 探讨 RNA-18a 在脑梗死中的作用。**方法** 在糖氧剥夺后通过 qRT-PCR 方法分析 miR-18a 的表达水平,通过 Western blot 和 qRT-PCR 方法检测 ATXN1 表达水平。MiR-18a mimics 转移到 PC12 内上调 miR-18a 的表达;miR-18a 的目标是预测生物学信息并用萤光素酶报告基因分析证实;大脑中动脉闭塞 1 h 后把 Agomir-18a 注射入脑室内;大脑中动脉闭塞 24 h 后评估脑梗死体积、神经功能缺损评分和 LDH 水平。**结果** 与常氧组比较,缺氧组 PC12 细胞内 miR-18a 的表达水平明显下调,ATXN1 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高。萤光素酶报告基因分析提示 miR-18a 直接作用 ATXN1,而且当 PC12 转染 miR-18a mimics 时 ATXN1 表达水平明显增高。此外,注入 miR-18a 激动剂 24 h 后脑梗死体积显著减小,同样的改变表现在神经功能缺损评分和 LDH 水平。**结论** miR-18a 可以缓解大脑中动脉永久性闭塞和 ATXN1 所致的脑损伤,miR-18a 激动剂或许可以作为一种有效的治疗脑梗死的方法。

【关键词】 大脑中动脉闭塞 miR-18a 失调蛋白 1(ATXN1) 糖氧剥夺 PC12 细胞

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)05-0518-05

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.05.003

Experimental study of MicroRNA-18a targeted intervention in reducing the injury of permanent middle cerebral artery occlusion in mice Ke Wei*, Deng Xiaorong, Li Wenlan, et al. * Department of Neurology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060

【Abstract】 Objective To investigate the role of miR-18a in cerebral infarction. **Methods** qRT-PCR was used to analyze the expression level of miR-18a after oxygen-glucose deprivation in PC12. ATXN1 expression level was detected by Western blot and qRT-PCR. MiR-18a mimics was transferred into PC12 cells for up-regulated miR-18a expression level. The target of miR-18a was predicted by bioinformatic analysis and confirmed by luciferase reporter assay. Agomir-18a was injected into intracerebroventricular of mice after 1 h of middle cerebral artery occlusion (MCAO). Brain infarct volume, neurological deficit score and the LDH level in ischemia brain was assessed in mice subjected to 24 h of MCAO. **Results** The expression level of miR-18a in PC12 was remarkably down-regulated after subjected to hypoxia, while ATXN1 mRNA and protein expression level under hypoxic conditions were significant higher compared with normoxia. Luciferase reporter analysis indicated that ATXN1 was a direct target of miR-18a. Furthermore, the protein and mRNA levels of ATXN1 was dramatically increased when PC12 was transfected with miR-18a mimics. Moreover, post-injected with miR-18a agomir, the brain infarct volume was greatly decreased after 24 h of MCAO, the same change were found in neurological deficit score and the LDH level in brain ischemic mice. **Conclusion** miR-18a alleviated the injury induced by permanent MCAO in mice by targeting ATXN1. Post-treatment with miR-18a agomir might be an effective new approach for stroke therapy.

【Key words】 Middle cerebral artery occlusion miR-18a ATXN1 Oxygen-glucose deprivation PC12 cells

脑低灌注导致的脑损伤的特点是氧化应激、低氧、炎症和谷氨酸兴奋性毒性,最终导致西巴普凋

亡^[1]。虽然有一些随机对照研究支持治疗和保护急性脑卒中的机会,但是缺血性脑卒中仍然导致较高致残率和病死率。因此,研究分析缺血性脑卒中的发病机制和探索治疗急性缺血性脑卒中的治疗方法就显得很有必要了。

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科(柯伟 张兆辉),麻醉科[李文澜(通信作者)];湖北省第三人民医院神经内科(邓小容)

MicroRNAs (miRs) 是一类小的、非编码的 RNAs, 可以调节不同的生物学进程, 包括分化、增殖、发育、迁移和凋亡^[2-4]。如今, 在缺血性脑卒中中 miRs 和它的作用引起更多的关注。如 miR-122, miR-let7e 在缺血性脑卒中的早期进展中调节细胞的生物学特性^[5-7]。所以, 鉴别 miRNAs 各自的靶目标可以提供重要的分子生物学视角和新的治疗脑血管病的方法^[8-9]。最近, 有报道通过 Kruppel-like factor 4 miR-18a 可以提高血肿瘤屏障的通透性^[10]。体外实验证实 miR-18a 能够降低慢性内皮细胞的增值^[11]。此外, 有研究证实在胃癌中缺氧条件下 miR-18a 影响细胞凋亡的速率和癌细胞侵入的能力^[12]。这些研究说明 miR-18a 在生物学进程中起着调节因子作用。然而, miR-18a 在缺血性脑血管病中的作用不得而知。本研究旨在探索 miR-18a 在大鼠大脑中动脉闭塞中的作用和提供 PC12 细胞低氧条件下 miR-18a 的重要的分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

PC12 细胞(购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞室); 高糖 DMED 培养基(Gibco, 美国); 无糖 DMED 培养基(Gibco, 美国); 苯甲基磺酰氟(PMSF)(Roche, 瑞士); 蛋白 Marker(Promega, 美国); SDS 凝胶配制试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司, 中国); BCA 蛋白定量试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 中国); PVDF 膜(Millipore, 美国); GAPDH 单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国); ATXN1 单克隆抗体(Cell Signaling Technology, 美国); 二抗(Li-Cor Bioscience, 美国); TR-Izol(Invitrogen, 美国); 逆转录试剂盒(Roche, 瑞士); SYBR Green I Master(Roche, 瑞士)。

1.2 方法

1.2.1 糖氧剥夺(OGD)模型

PC12 暴露于没有血浆和糖的加湿的含有 95% 的 N_2 和 5% 的 CO_2 环境空气的 DMEM 溶液中。含有 10% FBS 常氧细胞培养基是可控的。

1.2.2 MiR-18a 转染

活体 C57BL/6J 小鼠用 0.4% 的戊巴比妥钠(45 μ g/kg)麻醉, 通过立体定向技术将 26 号灌注导管置入左侧侧脑室(前囟点 0.58 mm, 背腹的 2.1 mm, 侧方 1.2 mm)^[13]。miR-18a 激动剂(5 nmol/kg in 1 μ L)或者对照组(RiboBio Company, Guangzhou,

China)灌注超过 5 min。体外培养 PC12 细胞, 根据操作程序将 80% 融合和转染到 50 nM miR-18a mimic 或者对照组。

1.2.3 RNA 的提取和实时 PCR 定量

总的 RNA 包括 miRNA 从试剂盒的反应物中提取(Invitrogen, NY, USA)。用逆转录工具箱将 RNA 逆转录入 cDNA(Takara, Dalian, China), 然后用 ABI 7500 快速实时 PCR 系统分析 cDNA(Applied Biosystems, Life Technologies, USA)。参照通过内部标准用比较 CT method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ U6 方法计算 miR-18a 表达水平; ATXN1 表达水平用比较 CT method $2^{-\Delta\Delta Ct}$ GAPDH 方法计算。miR-18a, U6 and ATXN1 的引物购买于 RiboBio 公司。

1.2.4 荧光素酶检测

ATXN1 野生型或者突变型端非编码区域克隆到荧光素酶基因系统(Shanghai GeneChem Co., Ltd, Shanghai, China), 通过携带有 WT 3'UTR 或 MT 3'UTR 的载体把 PC12 转染到 miR-18mimic 或者对照组; 48 h 后转染, 获取细胞, 通过双荧光素酶基因报告分析系统分析(Promega Corporation, Fitchburg, USA)。

1.2.5 蛋白质印迹法分析

根据 BCA 用 BCA 蛋白分析工具箱进行蛋白定量(Beyo time Biotechnology, Haimen, China), 将含量 30 μ g 的样品在 10% SDS-PAGE 上电泳, 然后蛋白被转移到 NC 滤过膜上。

1.2.6 神经功能缺损评分

每只小鼠于大脑中动脉闭塞 23 h 后进行神经功能缺损评分^[14]。采用线栓法建立大脑中动脉闭塞模型。0 分为正常的自发运动; 1 分为不能伸展对侧前肢; 2 分为盘旋至患侧; 3 分为患侧部分性瘫痪; 4 分为有自发性运动。

1.2.7 脑梗死体积测量

大脑中动脉闭塞 24 h 后取得小鼠脑组织, 冠状位每 2 mm 层厚切片, 共切 6 层, 切片于 37°条件下用 2% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)(Sangon Biotech, Shanghai, China)染色 15 min, 用推导公式计算出脑梗死体积的百分数。

1.2.8 LDH 测定

缺血的脑组织匀浆后用 12000 r/min 的转速 4 °C 离心 15 min, 获上清液用试剂盒分析缺血脑组织的 LDH 水平(Nanjing Jianchen, Nan jing, China)。

1.2.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件,所有数据用均数 ± 标准差表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 低氧下调 miR-18a 的表达,上调 ATXN1 的表达

评估低氧对神经元的影响,检测 miR-18a 在 PC12 细胞株中的表达水平。与常氧条件比较,低氧条件下在 PC12 细胞株中 miR-18a 的表达水平显著下调和 ATXN1 mRNA 表达水平显著升高(图 1)。此外,蛋白质印迹分析显示,与对照组比较,PC12 细胞株中 ATXN1 蛋白的表达水平显著增高(图 1)。

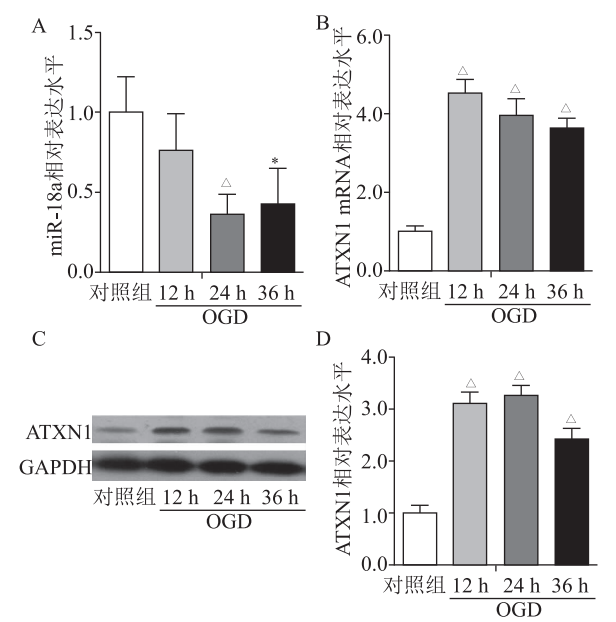


图 1 缺氧下调 miR-18a 的表达和上调 ATXN1 的表达
A 为氧糖剥夺后 PC12 细胞 miR-18a 的表达水平;B 为氧糖剥夺后 PC12 细胞 ATXN1 的表达水平;C 和 D 为氧糖剥夺后 PC12 细胞 ATXN1 蛋白的表达水平;与对照组比较,Δ $P < 0.01$, * $P < 0.05$

2.2 在 PC12 细胞株中 miR-18a 的直接靶目标 ATXN1

为了进一步探讨 miR-18a 与 ATXN1 关系,用生物学软件寻找 miR-18a 与 ATXN1 特异性结合结合位点 (<http://www.microrna.org/microrna/get>),预测 miR-18a 与 ATXN1 特异性结合结合位点(图 2)。为了验证假设,构建了含有野生型或 ATXN1 突变 3'UTR 荧光素酶报告载体(图 2),与

携带突变 ATXN1 3'UTR 载体比较,miR-18a 明显诱导携带野生型的 3'UTR ATXN1 载体的荧光素酶活性。接下来分析 miR-18a 对 ATXN1 表达水平的影响,发现 OGD 48 h 后当用 miR-18a mimics 转染了的 ATXN1 的 mRNA 和蛋白的表达水平明显升高(图 2)。

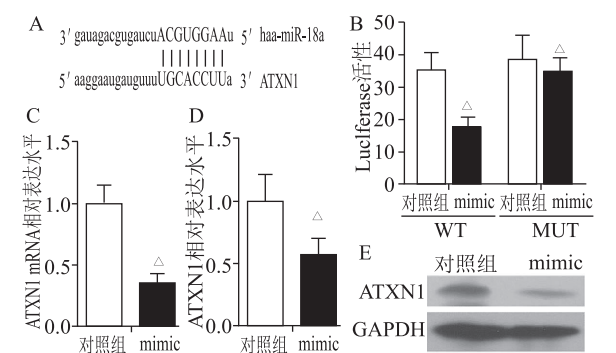


图 2 PC12 细胞株中 miR-18a 的直接靶目标 ATXN1
A 为预测 miR-18a 和 ATXN1 的结合部;B 为荧光素酶分析共转染;C 为用 miR-18a mimics 或 NC 转染的 PC12 细胞株中 ATXN1 mRNA 的表达水平;D, E 为用 miR-18a mimics 或 NC 转染的 PC12 细胞株中 ATXN1 蛋白的表达水平,与对照组比较,Δ $P < 0.01$

2.3 MiR-18a 过表达缓解大脑中动脉闭塞导致的脑梗死

为了探讨 miR-18a 在脑梗死中的作用,于大脑中动脉闭塞 1h 后通过侧脑室注入 miR-18a 激动剂上调 miR-18a 水平。miR-18a 的过表达能够缓解大脑中动脉闭塞所致的脑梗死体积(图 3);同样,神经功能缺损评分减少(图 3);缺血性脑组织 LDH 水平显著升高,注入 miR-18a 激动剂后 LDH 水平明显下降(图 3)。

3 讨论

miRNAs 是一类广泛存在于真核生物体内、内源性、非编码、单链小分子 RNA,长度为 19~25 个核苷酸,此类小分子 RNA 可以特异性地识别 mRNA,从而主要在转录后水平对其目的基因发挥负性调控作用。生物信息学分析表明,人类基因编码的 mRNA 中约有 1/3 受到 miRNA 的负性调控^[15]。miRNA 不仅与细胞的生长、分化、增殖和凋亡相关^[16],还在许多疾病的发生过程中发挥了十分重要的作用^[17]。

miRNAs 是一类复杂的基因表达调节器,通过碱基配对 3'-UTRs 短区重新认识抑制转录和/或降

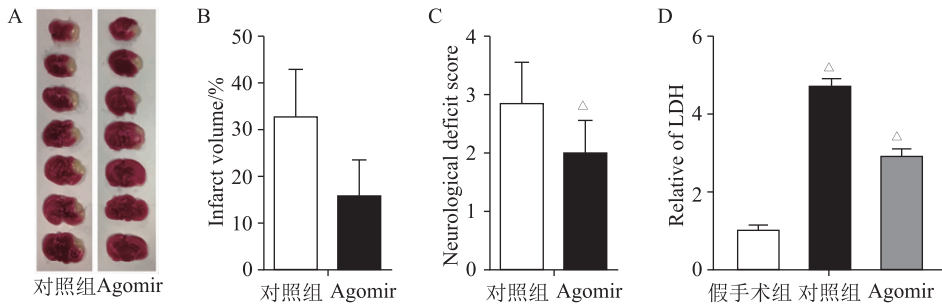


图 3 A,B 为 miR-18a 过表达后小鼠脑梗死体积的改变,与对照组比较, * $P < 0.05$; C 为 miR-18a 过表达之后小鼠神经功能缺损评分的改变,与对照组比较, * $P < 0.05$; D 为 miR-18a 过表达之后小鼠大脑局部 LDH 水平的改变,与对照组比较, $\Delta P < 0.01$, * $P < 0.05$

解靶 mRNAs^[18]。先前的研究表明 miRNAs 调节缺血性脑损伤,可以作为缺血性脑损伤干预治疗的新方法^[19]。通过增强 beclin 1 调节自噬下调 miR-NA-30a 可以缓解脑缺血损伤^[20]。此外,在脑梗死中 miR-207/352 调节溶酶体相关的膜蛋白和酶^[21]。microRNA-18a 为脑特殊的 miRNA,在抑郁的小鼠用度洛西汀后大脑额叶和海马 microRNA-18a 表达水平显著上调^[22]。通过低氧诱导的 1 α 因子 mi-croRNA-18a 也可以调节脑肿瘤的浸润^[23],而且抑制 miR-18a 表达能促使滋养层细胞的凋亡^[24]。有证据表明 miR-18a 在癫痫中扮演着重要的角色,然而在缺血性脑损伤中 miR-18a 的鉴别和功能仍然不为所知。本研究结果表明低氧条件下 PC12 细胞 miR-18a 的表达水平可以显著下调。miR-18a 在调节细胞对低氧的反应起着重要的作用。此外,本研究结果证实 miR-18a 过表达能够降低大脑中动脉所致的脑梗死体积。同样的注入 miR-18a 激动剂后神经功能缺损显著改善。本研究首次报道 miR-18a 正调节细胞对低氧应激的反应。

ATXN1 基因的提供制造一种名为 ataxin-1 蛋白的指令,这种蛋白质被发现在整个身体。越来越多的证据表明 ATXN1 参与小脑的病理生理学^[25-26]。在扩展的多聚谷氨酰胺疾病小鼠模型沉默 ATXN1 mRNA 为有效治疗的方法^[27]。本研究通过生物软件和荧光素酶报告基因分析预测了 miR-18a 目标,并进行确认 miR-18a 的潜在目标。本研究发现,miR-18a 可以直接结合的 3'-UTR ATXN1 基因和基因表达的负调控 ATXN1。此外,在 PC12 细胞株中 ATXN1 蛋白水平也显著降低转染 miR-18a 模仿。总之,这些证据上 miR-18a 针对缺血性脑损伤的靶目标 ATXN1,miR-18a 可能成为治疗脑梗死介入治疗的贡献因素。

总之,本研究结果表明,miR-18a 缓解永久性 MCAO 和 ATXN1 所致的脑损伤,miR-18a 激动剂后处理可能是脑梗死治疗的一种有效的新方法。

参 考 文 献

- [1] Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke[J]. Nat Rev Neurosci, 2003, 4(5): 399-415.
- [2] Rottiers V, Najafi-Shoushtari SH, Kristo F, et al. MicroRNAs in metabolism and metabolic diseases[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2011, 76(7): 225-233.
- [3] Araldi E and Suarez Y. MicroRNAs as regulators of endothelial cell functions in cardiometabolic diseases[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1861(12): 2094-2103.
- [4] Schotte D, Pieters R and Den Boer ML. MicroRNAs in acute leukemia: from biological players to clinical contributors. Leukemia, 2012, 26(3): 1-12.
- [5] Liu DZ, Jickling GC, Ander BP, et al. Elevating microRNA-122 in blood improves outcomes after temporary middle cerebral artery occlusion in rats[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(3): 1374-1383.
- [6] Peng G, Yuan Y, Wu S, et al. MicroRNA let-7e is a potential circulating biomarker of acute stage ischemic stroke. Transl Stroke Res, 2015, 6(11): 437-445.
- [7] Jia L, Hao F, Wang W, et al. Circulating miR-145 is associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients[J]. Cell Biochem Funct, 2015, 33(19): 314-319.
- [8] Samanta S, Balasubramanian S, Rajasingh S, et al. MicroRNA: a new therapeutic strategy for cardiovascular diseases [J]. Trends Cardiovasc Med, 2016, 26(5): 407-419.
- [9] Volny O, Kasickova L, Coufalova D, et al. MicroRNAs in cerebrovascular disease[J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 888(9): 155-195.
- [10] Zhao YY, Zhao LN, Wang P, et al. Overexpression of miR-18a negatively regulates myocyte enhancer factor 2D to increase the permeability of the blood-tumor barrier via Kruppel-like factor 4-mediated downregulation of zonula occluden-1, claudin-5, and occludin[J]. J Neurosci Res, 2015, 93(2): 1891-1902.