

miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经 损伤中的保护作用与机制

叶 蓓¹, 李 曼², 程 翔¹, 陈建珍¹, 贺 芳¹, 张立光¹

(1. 苏州卫生职业技术学院, 江苏 苏州 215009; 2. 山东大学齐鲁医院, 济南 250012)

【摘要】 目的 探讨 miRNA-29c 在大鼠脑缺血再灌注神经损伤中的保护作用与机制研究。**方法** 48 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, miR-29c NC 组, miR-29c inhibitor 组, 除假手术组外, 其余三组均采用栓线法建立大鼠脑中动脉局灶缺血再灌注损伤模型, 并于术后 24 h 评价大鼠神经行为变化, 检测大鼠脑梗死体积, 缺血侧脑组织细胞凋亡情况, 脑组织中 miR-29c 表达量, 超氧化物歧化酶(SOD)活性, 丙二醛(MDA)含量, 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3(Caspase 3), Caspase 8 及 Caspase 9 活性, 及 Bcl-2, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 与 cleaved caspase 9 蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组, miR-29c NC 组中 miR-29c 表达量显著提高, 大鼠神经行为评分提高, 脑梗死体积增加, 细胞凋亡率提高, SOD 活性降低, MDA 含量, Caspase 3, Caspase 8 及 Caspase 9 活性上升, Bcl-2 表达量下调, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 表达量上调, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组及 miR-29c NC 组比较, miR-29c inhibitor 组 miR-29c 表达量显著降低, 大鼠神经行为评分降低, 脑梗死体积百分比减少, 细胞凋亡率降低, SOD 活性上升, MDA 含量, Caspase 3, Caspase 8 及 Caspase 9 活性降低, Bcl-2 表达量上调, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 表达量下调, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** miR-29c 对大鼠脑缺血再灌注神经损伤具有保护作用, 与提高抗氧化能力及调控细胞凋亡相关蛋白表达有关。

【关键词】 miR-29c; 脑缺血再灌注; 细胞凋亡

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0031-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.006

The mechanism and protective effect of miR-29c on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

YE Bei¹, LI Man², CHEN Jian-zhen¹, HE Fang¹, ZHANG Liguang¹

(1. Suzhou Health College of Jiangsu, Jiangsu Soochow 215009, China;

2. Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

【Abstract】 Objective To explore protective effect of miR-29c on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats.
Methods Forty eight SD rats were randomly divided into sham group, model group, miR-29c NC group and miR-29c inhibitor group. Except the sham operation group, the other three groups were established by using ligation of middle cerebral artery. Twenty four hours after the operation, neurological behavior score, cerebral infarction volume, cell apoptosis, the activity of superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA), cysteine aspartic acid

protease 3 (caspase 3), caspase 8, caspase 9, and the expression of miR-29c, Bcl-2, Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9. **Results** Compared with sham group, neurological behavior score, cerebral infarction volume, cell apoptosis rate was increased, SOD th the expression of miR-29c, activity was decreased, the level of MDA, caspase 3, caspase 8 and caspase 9 activity was increased. The expression of Bcl-2 was down-regulated, the expression of Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9 expression was up-regulated in model group, miR-29c NC group. The differences were also statistically significant ($P < 0.01$). Compared with model group, miR-29c NC group, the expression of miR-29c, neurological behavior score, cerebral infarction volume percentage, cell apoptosis rate was decreased, SOD activity was increased, the level of MDA, caspase 3, caspase 8 and caspase 9 activity was decreased. The expression of Bcl-2 was up-regulated, the expression of Bax, Bak1, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9 expression was down-regulated in miR-29c inhibitor group. The differences were also statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusion** miR-29c had a protective effect on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, which was related to improve the antioxidant capacity and regulation of apoptosis related protein expression.

【Key words】 miR-29c; cerebral ischemia-reperfusion; cell apoptosis

缺血性脑血管病的发病率、致残率及死亡率皆相当之高,且发病机制复杂。其可分为局灶性脑缺血及全脑缺血,前者指脑血管局部区域血流减少或被阻断,后者是指在临床上肺栓塞、休克、窒息所导致的。在缺血过程中,当血液恢复灌注后,会启动一系列内源性的损伤,加重脑缺血的损伤,而这一过程称之为脑缺血再灌注损伤^[1-2]。这一损伤过程涉及脑血管微环境及神经细胞释放大量的氧自由基等有害因子,损害细胞生物膜结构,损伤细胞线粒体功能,最终导致细胞凋亡。因此,通过清除氧自由基产物,抑制细胞凋亡对于脑缺血再灌注损伤后神经细胞的保护具有重要作用^[2-3]。

miRNAs 是一类长度约为 18 - 25 nt 高度保守的小 RNA,能结合于其靶基因 3'-UTR 区域,进而抑制靶基因的翻译,从而参与细胞生长、增值、分化与凋亡的调控。以往对于 miRNA 的研究主要集中在肿瘤的发生及免疫疾病中,近些年也陆续有研究发现 miRNA 与缺血性脑血管病关系密切。如 Jeyaseelan 等^[4]研究显示在大鼠局灶性大脑中动脉栓塞(MCAO)模型中,发现有 106 个 miRNA 异常表达。另外 Dharap 等^[5]研究也表明 MCAO 大鼠中 miRNA 在各个检测点中异常表达。上述研究报道均说明 miRNA 与脑缺血再灌注损伤密切相关,但涉及的具体调控机制尚不明确。此外 miR-29c 是一个与胚胎神经系统的发育生长密切相关的 miRNA^[6]。Huang 等^[7]研究发现降低 miR-29c 的表达,能显著的抑制 MCAO 大鼠的脑梗死体积及细胞凋亡,但是其具体作用机制未知。所以本研究将以 miR-29c 为研究对象,探讨 miR-29c 在大鼠 MCAO 中的神经保护作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 动物

48 只雄性 SD 大鼠实验动物由山东大学实验动物中心提供【SCXK(鲁)2009-0001】,清洁级, (200 ± 20)g,室内温度控制在 (23 ± 2)℃,大鼠自由饮食和饮水。实验所在实验室:山东大学齐鲁医院临床基础研究所【SYXK(鲁)2010-0038】。

1.2 主要试剂及仪器

BCA 法蛋白定量试剂盒,Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体购自碧云天生物技术有限公司;兔抗 Bcl-2, Bax, Bak1, 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9 活性检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;SOD 活力,MDA 含量试剂盒购自南京建成生物技术有限公司;miR-29c inhibitor (UAACCGATTTCAAAUGGUGCUA) 及 miR-29c NC (CAGTACUUUUGUGUAGUACAAA),购自上海吉玛生物技术有限公司。电泳仪,转印电泳仪,凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司;酶标仪购自瑞士瑞士 TECAN 集团公司;流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.3 分组及给药^[7]

将 48 只大鼠分为假手术组,模型组,miR-29c NC 组,miR-21 inhibitor 组。将 miR-29c inhibitor 及 miR-29c NC 溶解于人工脑脊液中,浓度为 20 μmol/L,进行侧脑室注射,注射速度为 1 μL/min,总共 5 μL。而假手术组及模型组用同样方式给予人工脑脊液,给药 24 h 后除假手术组外其余三组皆进行造模。

1.4 造模^[8-9]

参相关文献将制成大脑中动脉阻塞(MCAO)模

型,10%水合氯醛麻醉大鼠,使大鼠处于仰卧位,并正中切开大鼠颈部的皮肤,钝性的将两侧肌肉分离,并进一步分离出右颈总动脉(CCA),右颈内动脉(ICA)及右颈外动脉(ECA),备线并结扎ECA及CCA,并用动脉夹夹住ICA远端,同时在ECA近CCA处作一小切口,松开ICA的动脉夹,并将钝性的尼龙线缓慢插入ECA,插入深度约为18 mm,实现大脑中动脉阻塞导致脑缺血,最后消毒并缝合皮肤,另外外留尼龙线线头约1 cm。缺血2 h后,将尼龙线轻提,使线头略有阻力,血流再通,以实现再灌注22 h。假手术组仅仅分离ECA,CCA及ICA,但不结扎CCA。

1.5 神经行为学评分^[1]

于术后24 h,参考Zea Longa的5分制评分标准对各组大鼠进行神经功能评分。0分:没有出现神经损伤症状;1分:左侧前爪不能完全伸展;2分:向左侧转圈行走;3分:行走时向左侧倾倒;4分:不能够自发行走,同时意识丧失。

1.6 梗死体积测定

于术后24 h,将各组大鼠麻醉,并迅速断头取脑,将脑组织周围小脑,嗅球等去除。对全脑进行切片,厚度约2 mm,立即浸入2%氯化三苯基四氮唑(TTC),置于37℃温箱中避光染色30 min,染成红色的是正常的脑组织,染成白色的梗死的脑组织。最后在10%甲醛中固定,并拍照。用Image-Pro Plus 6.0软件进行分析计算脑梗死体积,并乘以脑片厚度2 mm,累计每只大鼠所有脑切片的脑梗死容积即得全脑梗死容积,并计算脑梗死体积百分比(brain infarct volume percentage, BIVP)。

1.7 RT-PCR检测miR-29c表达

采用Trizol法抽提细胞总RNA,接着一步法RT-PCR逆转录,逆转录产物用于琼脂糖凝胶电泳。引物由上海生工生物工程有限公司合成,如下:miR-29c 5'-UAGCACCAUUUGAAAUGGUUA-3'。反转录体系为:总RNA模板2 μL(1 μg)、dNTP混合物2 μL、MgCl₂ 2 μL、加EDPC补充蒸馏水至25 μL。反应参数为:95℃预变性5 min, 95℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 循环次数为40。

1.8 SOD活性及MDA含量的检测

取缺血侧大脑组织进行匀浆,按照SOD活力,MDA含量试剂盒说明书进行检测。

1.9 流式细胞术检测缺血侧脑细胞凋亡情况

取缺血侧大脑组织进行匀浆,并用胰酶和胶原

酶进行消化,获得细胞悬液后,按照Annexin V-FITC流式细胞检测试剂盒进行检测,在1 h内进行流式细胞仪检测。

1.10 Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9活性的检测

取缺血侧大脑组织进行匀浆,按照Caspase 3, Caspase 8, Caspase 9活性试剂盒说明书进行检测。

1.11 caspase 3, cleaved caspase 8, cleaved caspase 9, Bak1, Bax及Bcl-2蛋白的检测

采用Western blot技术进行检测。取缺血侧大脑组织进行匀浆,并加入RIPA强裂解液,裂解,离心,收获蛋白。采用BCA试剂盒检测蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行十二烷基磺酸钠凝胶电泳,湿法转膜。一抗孵育,4℃过夜;二抗室温孵育1-2 h。在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件分析各抗体条带灰度值。

1.12 数据分析

所有数据均用SPSS 21.0统计分析,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间经 t 检验显著性差异,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异。

2 结果

2.1 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑组织中miR-29c表达量的影响

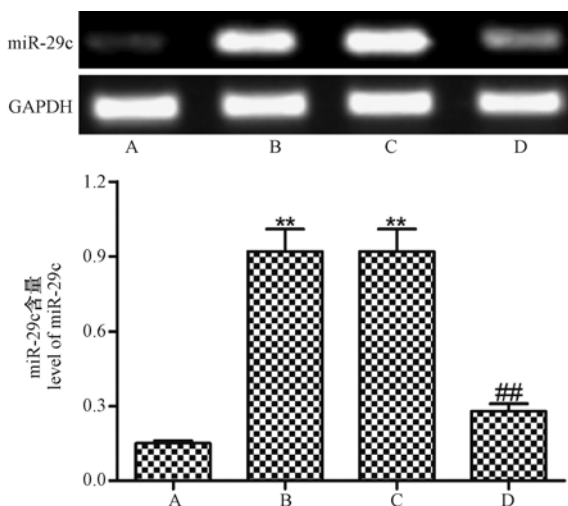
如图1所示,与假手术组比较,模型组及miR-29c NC组大鼠脑组织中miR-29c表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组大鼠脑组织中miR-29c表达量显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.2 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠神经行为评分的影响

如表1所示,与假手术组比较,模型组及miR-29c NC组大鼠神经行为评分均显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组大鼠神经行为评分显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 miR-29c inhibitor对MCAO大鼠脑梗死体积的影响

如表1所示,与假手术组比较,模型组及miR-29c NC组大鼠脑梗死体积百分比均显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及miR-29c NC组比较,miR-29c inhibitor组大鼠脑梗死体积百分比显著减少,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。



注:A:假手术组;B:模型组;C:miR-29c NC组;
D:miR-29c inhibitor组。与假手术组比较,

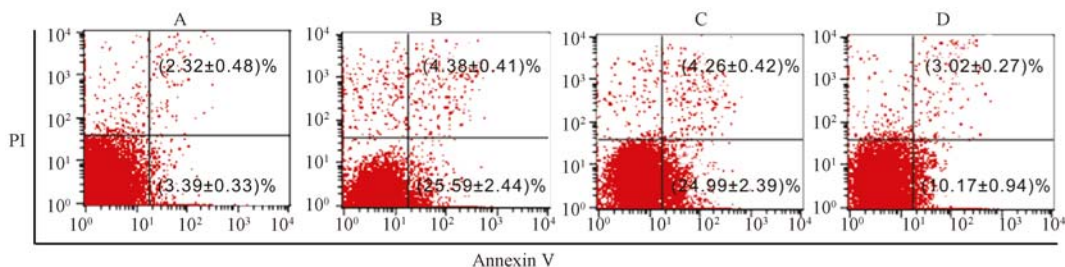
** $P < 0.01$;与模型组及 miR-29c NC 组比较,## $P < 0.01$ 。

图1 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 miR-29c 表达量的影响

Note: A: sham operation group; B: model group; C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ## $P < 0.01$.

Fig.1 Effect of miR-29c inhibitor on expression of miR-29c in MCAO rats brain tissue

2.4 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中



注:A:假手术组;B:模型组;C:miR-29c NC组;D:miR-29c inhibitor组。

图2 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑缺血侧细胞凋亡的影响

Note: A: sham operation group; B: model group; C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group.

Fig.2 Effect of miR-29c inhibitor on cerebral ischemic side cell apoptosis in MCAO rats

表1 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠神经行为评分及脑梗死体积的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Effect of miR-29c inhibitor on neurological behavior score and brain infarct volume percentage in MCAO rats

组别 Group	神经行为评分 Neurological behavior score	脑梗死体积百分比(%) Brain infarct volume percentage
假手术组 Sham operation group	—	—
模型组 Model group	$2.78 \pm 0.36^{**}$	$27.64 \pm 2.46^{**}$
miR-29c NC	$2.76 \pm 0.29^{**}$	$28.13 \pm 2.65^{**}$
miR-29c inhibitor	$1.36 \pm 0.14^{##}$	$21.88 \pm 1.92^{##}$

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组及 miR-29c 组比较,## $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ## $P < 0.01$.

SOD 活性,MDA 含量的影响

如表2所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC 组脑组织中 SOD 活力降低,MDA 含量提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC 组比较,miR-29c inhibitor 组脑组织中 SOD 活力提高,MDA 含量降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑缺血侧细胞凋亡的影响

流式细胞仪结果显示(见图2),假手术组细胞凋亡率为 1.95 ± 1.12 ,模型组及 miR-29c NC 组细胞凋亡率显著提高,分别为 9.25 ± 0.83 、 8.95 ± 0.72 ,与假手术组相比,差异具有统计学意义($P < 0.01$);miR-29c inhibitor 组细胞凋亡率为 5.42 ± 0.49 ,与模型组及 miR-29c NC 组比较,显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.6 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Caspase 3,Caspase 8 及 Caspase 9 活性的影响

如表3所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC 组脑组织中 Caspase 3,Caspase 8 及 Caspase 9 活性提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC 组比较,miR-29c inhibitor 组脑组织中 Caspase 3,Caspase 8 及 Caspase 9 活性降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 SOD 活性,MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Effect of miR-29c inhibitor on activity of SOD and level of MDA in MCAO rats

组别 Group	SOD (U/mg)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)
假手术组 Sham operation group	8.27 $\pm$ 0.82	44.68 $\pm$ 4.32
模型组 Model group	2.43 $\pm$ 0.25 **	74.23 $\pm$ 6.24 **
miR-29c NC	2.40 $\pm$ 0.24 **	80.87 $\pm$ 7.76 **
miR-29c inhibitor	7.83 $\pm$ 0.79 ^{##}	58.48 $\pm$ 6.52 ^{##}

注:与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组及 miR-29c NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ^{##} $P < 0.01$.

表 3 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Caspase 3, Caspase 8 及 Caspase 9 活性的影响($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Effect of miR-29c inhibitor on activity of Caspase 3, Caspase 8 and Caspase 9 in MCAO rats brain tissue

组别 Group	Caspase 3 (U/mg)	Caspase 8 (U/mg)	Caspase 9 (U/mg)
假手术组 Sham operation group	0.86 $\pm$ 0.08	1.87 $\pm$ 0.08	3.19 $\pm$ 0.32
模型组 Model group	7.54 $\pm$ 0.75 **	7.49 $\pm$ 0.73 **	11.36 $\pm$ 1.20 **
miR-29c NC	7.48 $\pm$ 0.63 ^{##}	7.46 $\pm$ 0.73 ^{##}	11.29 $\pm$ 1.28 ^{##}
miR-29c inhibitor	2.36 $\pm$ 0.37 ^{##}	2.48 $\pm$ 0.25 ^{##}	4.59 $\pm$ 0.46 ^{##}

注:与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组及 miR-29c NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

Note: Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with model group and miR-29c NC group, ^{##} $P < 0.01$.

2.7 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达的影响

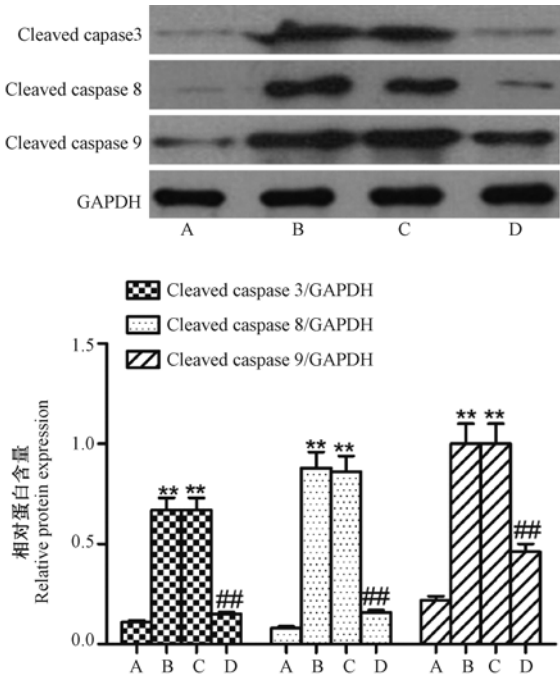
如图 3 所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC 组脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC 组比较,miR-29c inhibitor 组脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达量降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.8 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Bak1, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

如图 4 所示,与假手术组比较,模型组及 miR-29c NC 组脑组织中 Bak1, Bax 表达量显著提高, Bcl-2 表达量显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组及 miR-29c NC 组比较,miR-29c inhibitor 组脑组织中 Bak1, Bax 表达量显著降低, Bcl-2 表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

脑缺血后再恢复血供的过程中,脑血管微环境中会产生大量的损害因子,如氧自由基,这些氧自由基会损伤脑组织细胞生物膜结构,损伤线粒体 DNA,损害细胞核 DNA,使细胞内蛋白质及 DNA 大



注: A: 假手术组; B: 模型组; C: miR-29c NC 组;

D: miR-29c inhibitor 组。与假手术组比较, ** $P < 0.01$;

与模型组及 miR-29c NC 组比较, ^{##} $P < 0.01$

图 3 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白表达的影响

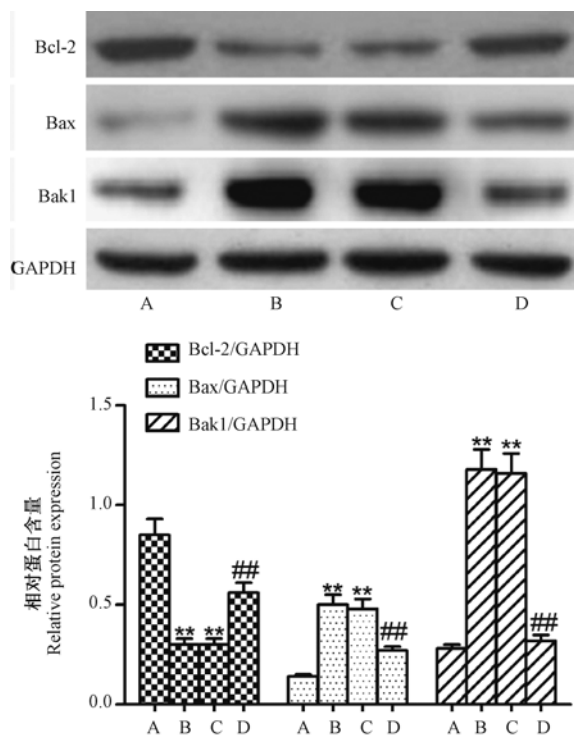
Note: A: sham operation group; B: model group;

C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group.

Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;

Compared with model group and miR-29c NC group, ^{##} $P < 0.01$

Fig.3 Effect of miR-29c inhibitor on expression of cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 and cleaved caspase 9 protein in MCAO rats brain tissue



注:A:假手术组;B:模型组;C:miR-29c NC组;

D:miR-29c inhibitor组。与假手术组比较,** $P < 0.01$;

与模型组及 miR-29c NC 组比较,## $P < 0.01$ 。

图 4 miR-29c inhibitor 对 MCAO 大鼠脑组织中 Bak1, Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

Note: A: sham operation group; B: model group;

C: miR-29c NC group; D: miR-29c inhibitor group.

Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;

Compared with model group and miR-29c NC group, ## $P < 0.01$

Fig. 4 Effect of miR-29c inhibitor on expression of Bak1, Bax and Bcl-2 protein in MCAO rats brain tissue

分子断裂,从而诱发神经细胞启动凋亡程序。所以发现一种有效的清除清除氧自由基,进而抵抗细胞损伤的物质将对脑缺血再灌注损伤后的神经保护具有重要作用^[2-3]。

miR-29c 是 miR-29 家族的一员,是 Lagos-Quintana 等在 2003 年研究神经细胞核糖核蛋白中发现的,并克隆获得的 miRNA。miR-29c 位于人类 1 号染色体,在大鼠胚胎及出生时尚未见表达,在出生 2 周后表达增高,说明该 miRNA 在神经细胞中的特异性存在与表达,并与胚胎神经的发育,生长,分化密切相关^[6]。另外 Shen 等^[10]研究显示 miR-29a, miR-29b 及 miR-29c 在缺血再灌注损伤中异常表达,表达量差异最大的 miRNA 是 miR-29c。Huang 等^[7]研究进一步表明往 MCAO 大鼠脑侧左室注射 miR-29c inhibitor 或者 miR-29c mimics,前者能够降

低脑梗死体积及细胞凋亡率,后者加重了脑缺血再灌注损伤。从而说明 miR-29c 与脑缺血再灌注损伤的关系密切。

本研究首先建立大鼠 MCAO 模型,并侧脑室注射 miR-29c inhibitor 进行干预,接着于术后 24 h 检测各组大鼠神经学行为评分,脑梗死体积及缺血侧脑组织细胞凋亡情况,结果表明 miR-29c inhibitor 能显著降低大鼠神经学行为评分,减小脑梗死体积,并抑制细胞凋亡,与 Huang 等^[7]研究结果一致。同时 MDA 是细胞膜脂质被活性氧化后的副产物,是细胞遭受氧化应激损伤的生物标志物。SOD 是细胞内主要的抗氧化酶,是清除氧自由基的主要物质,能抵抗氧自由基对细胞的损伤。所以本研究继续探讨 miR-29c 对 MCAO 大鼠脑组织中 MDA 含量及 SOD 活性的影响,结果表明 miR-29c inhibitor 能显著的提高 SOD 活性,降低 MDA 含量,从而说明 miR-29c inhibitor 能清除脑缺血再灌注损伤所产生的氧化应激产物,并提高抗氧化酶活性。

脑神经细胞的凋亡是细胞主动有序的自然死亡形式,其发生可能与组织中抗凋亡和促凋亡基因的表达失衡有关。其中 Bcl-2 家族是目前研究最为广泛的凋亡调控基因家族,Bcl-2 是最常见的抑制凋亡基因,能与促凋亡基因 Bax 形成异源二聚体,或者 Bax 自身能形成二聚体,从而调控细胞的凋亡。而 Bak1 也是 Bcl-2 家族促凋亡蛋白的一员,能与 Bax 形成复合物,从而维持线粒体膜的稳定性,当上游凋亡信号传递下来后,Bak1 能够介导线粒体膜孔开放,使得线粒体中的细胞色素 C 释放,并诱导 Caspase 信号级联反应,最终使得细胞凋亡。Caspase 正常情况下以无活性酶原形式存在于细胞内,激活主要通过以下 2 条信号通路^[11-13]:(1)内源性途径:细胞色素 C 从线粒体释放到胞质后与 dATP、凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)结合成复合物,激活 caspase 9,从而激活 caspase 3;(2)外源性途径:Fas 膜受体系统激活 caspase 8,从而直接激活 caspase 3,这条途径绕过了线粒体。当受到上游凋亡信号刺激时,Caspase 的起始因子 caspase 8 及 caspase 9 被其它激酶所剪切或者自身发生切割作用后被激活,从而传递凋亡级联信号,最终传递到 caspase 家族的执行因子 caspase 3,最终导致细胞凋亡^[11-13]。此外 Huang 等^[7]研究证实 Bak1 是 miR-29c 的下游靶蛋白之一。Tiao 等^[14]研究表明 miR-29c 能通过下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达,从而抑

制阻塞性黄疸导致的肝细胞凋亡。Wang 等^[15]研究表明 miR-29 inhibitor 通过抑制 Caspase 3 表达,从而减轻长时间低温循环导致的脑神经损伤。所以本研究继续探讨 miR-29c 对 MCAO 大鼠脑组织中 caspase 3, caspase 8, caspase 9 活性, cleaved caspase 3, cleaved caspase 8, cleaved caspase 9 及 Bax, Bcl-2、Bak1 蛋白的表达,结果表明 miR-29c inhibitor 能显著的上调 Bcl-2 表达,并降低 cleaved caspase 3, cleaved caspase 8 及 cleaved caspase 9 蛋白的表达,说明 miR-29c inhibitor 能通过调控细胞凋亡相关蛋白表达,同时抑制细胞内源和外源促凋亡通路共同抑制 caspase 3 的激活,从而抑制脑缺血再灌注损伤所导致的脑细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 闵昱源,冯彩华,高子军,等. 梓醇对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(20): 3805-3808.
- [2] 王富明,徐虹,孙华. 脑缺血再灌注损伤治疗的实验研究进展[J]. 医学研究杂志, 2015(02): 12-15.
- [3] 王光胜,耿德勤. 脑缺血/再灌注损伤机制研究进展[J]. 医学综述, 2011(24): 3753-3756.
- [4] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion [J]. Stroke, 2008, 39(3): 959-966.
- [5] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(4): 675-687.
- [6] 黄昌发,刘小珊. 微 RNA miR-29 与人类疾病[J]. 生命的化学, 2010, 30(2): 250-255.
- [7] Huang LG, Li JP, Pang XM, et al. MicroRNA-29c Correlates with Neuroprotection Induced by FNS by Targeting Both Birc2 and Bak1 in Rat Brain after Stroke [J]. CNS Neurosci Ther, 2015, 21(6): 496-503.
- [8] 王荣亮,赵海苹,罗玫,等. 远程缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注损伤后 MIP-1 α 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(8): 24-29.
- [9] 曾兆禄,韩继超,薛云,等. 针刺结合丹红注射液对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2): 62-66.
- [10] Shen B, Zhou S, He Y, et al. Revealing the underlying mechanism of ischemia reperfusion injury using bioinformatics approach [J]. Kidney Blood Press Res, 2013, 38(1): 99-108.
- [11] 刘晓婷,王延让,张明. 线粒体介导细胞凋亡的研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2013, 30(2): 182-185.
- [12] 王力俭,田可川,吴伟伟,等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(10): 132-135.
- [13] 梁凯,曹秉振. 线粒体调控的细胞凋亡研究进展[J]. 生物工程与临床, 2014, 18(5): 501-505.
- [14] Tiao MM, Wang FS, Huang LT, et al. MicroRNA-29a protects against acute liver injury in a mouse model of obstructive jaundice via inhibition of the extrinsic apoptosis pathway [J]. Apoptosis, 2014, 19(1): 30-41.
- [15] Wang Y, Gu T, Shi E, et al. Inhibition of microRNA-29c protects the brain in a rat model of prolonged hypothermic circulatory arrest [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2015, 150(3): 675-684.

[修回日期] 2016-07-12