

陈俊,周赤忠,张玲,等. 长链非编码 RNA TUG1 调控 miR-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(2): 38-45.

Chen J, Zhou CZ, Zhang L, et al. Role of the long non-coding RNA TUG1 in the regulation of miR-137 and neural injury in rats with focal cerebral ischemia [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(2): 38-45.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 02. 006

长链非编码 RNA TUG1 调控 miR-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用机制

陈俊¹,周赤忠¹,张玲²,乔木^{1*}

(1.武汉市普仁医院,武汉 430081;2.武汉科技大学医学院,武汉 430081)

【摘要】目的 探究长链非编码 RNA(LncRNA)牛磺酸上调基因 1(TUG1)调控微小 RNA(miR)-137 参与局灶性脑缺血大鼠神经损伤的作用。**方法** 双荧光素酶鉴定 miR-137 与 TUG1 的靶向位点;Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,模型成功大鼠随机分为模型组、si-NC 组(10 μ L si-NC)、si-TUG1 组(10 μ L si-TUG1)、si-TUG1+anti-miR-NC 组(si-TUG1 和 anti-miR-NC 各 10 μ L)、si-TUG1+anti-miR-137 组(si-TUG1 和 anti-miR-137 各 10 μ L),每组 12 只。另取 12 只设为假手术组。5 d 1 次,注射 3 次,第 16 天检测。实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测海马区 TUG1、miR-137 水平情况;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测脑梗死情况;苏木精-伊红(HE)、尼氏染色观察海马神经元形态;蛋白质免疫印迹(Western blot)实验检测海马区蛋白酪氨酸激酶 1(JAK1)、信号转导子和转录激活子 1(STAT1)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(BCL2)、BCL2 相关 X 蛋白(BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase3)蛋白水平。**结果** Starbase 分析发现 miR-137 与 TUG1 存在互补的结合位点,并经双荧光素酶验证。模型组海马区神经元层次紊乱,神经元数量减少、间隙变大、部分出现神经元胞核固缩或溶解、核仁消失等现象,尼氏体数量减少;si-TUG1 组神经元数量有所增加、神经元形态有所恢复,尼氏体数量增多;si-TUG1+anti-miR-137 组相较于 si-TUG1 组神经元形态破坏严重,间隙变大、数量减少。与假手术组相比,模型组、si-NC 组海马区 TUG1 水平、JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平,脑梗死体积升高($P<0.05$),海马区 miR-137 水平、BCL2 蛋白水平降低($P<0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 TUG1 水平、JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平,脑梗死体积降低($P<0.05$),海马区 miR-137 水平、BCL2 蛋白水平升高($P<0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比,si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平、JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平,脑梗死体积升高($P<0.05$),海马区 miR-137 水平、BCL2 蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 干扰 TUG1 可上调 miR-137 实现对局灶性脑缺血大鼠神经元形态及凋亡的缓解,从而实现对神经损伤的保护。

【关键词】 长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1;微小 RNA-137;局灶性脑缺血;神经损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 02-0038-08

Role of the long non-coding RNA TUG1 in the regulation of miR-137 and neural injury in rats with focal cerebral ischemia

CHEN Jun¹, ZHOU Chizhong¹, ZHANG Ling², QIAO Mu^{1*}

(1. Wuhan Puren Hospital, Wuhan 430018, China. 2. Medical College of Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430018)

【基金项目】 湖北省卫生和计划生育委员会科研项目立项合同(WJ2017F033)。

【作者简介】 陈俊(1987—),男,硕士,研究方向:脑血管颅脑疾病。E-mail:362746557@qq.com

【通信作者】 乔木(1984—),男,硕士,研究方向:脑血管颅脑疾病。E-mail:3312801453@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the role of the long non-coding RNA (lncRNA) taurine up-regulated gene 1 (TUG1) in the regulation of microRNA (miR)-137 and nerve injury in rats with focal cerebral ischemia. **Methods** The dual luciferase assay was used to identify the target sites of miR-137 and TUG1. A rat model of focal cerebral ischemia was established using the Longa thread bolt method. Ischemic rats were randomly divided into the following groups ($n = 12$): model group, small interfering RNA (si)-negative control (NC) group (10 μ L si-NC), si-TUG1 group (10 μ L si-TUG1), si-TUG1 + anti-miR-NC group (10 μ L si-TUG1 and 10 μ L anti-miR-NC), si-TUG1 + anti-miR-137 group (10 μ L si-TUG1 and 10 μ L anti-miR-137). Another group of 12 rats were used in the sham surgery group. Once every 5 days, three injections and detection on the 16th day. The levels of TUG1 and miR-137 in the hippocampus were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). Cerebral infarction was detected by 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining. The morphology of hippocampal neurons was observed by hematoxylin-eosin and Nissl staining, and the protein levels of JAK1, STAT1, B-cell lymphoma-2 (BCL-2), BCL-2-associated X protein (BAX) and cysteinyl aspartate-specific proteinase-3 (caspase3) were detected by Western blot. **Results** Starbase analysis showed that there were complementary binding sites between miR-137 and TUG1, which were verified by the double luciferase assay. In the model group, neurons in the hippocampus were disordered, the number of neurons was decreased, neuronal gaps were larger, some neurons underwent nuclear pyknosis or dissolution, nucleoli disappeared, and the number of Nissl bodies decreased. In the si-TUG1 group, the number of neurons increased, the morphology of neurons recovered, and the number of Nissl bodies increased. Compared with that in the si-TUG1 group, damage to the neurons in the si-TUG1 + anti-miR-137 group was more serious, neuronal gaps were larger, and the number of neurons decreased. Compared with those in the sham surgery group, the cerebral infarction volume; TUG1 RNA; and JAK1, STAT1, BAX, and caspase3 protein levels in the hippocampus were higher in the model and si-NC groups ($P < 0.05$), and the levels of miR-137 and BCL-2 protein were lower ($P < 0.05$). Compared with that in the model and si-NC groups, the levels of TUG1, JAK1, STAT1, BAX, and caspase3 in the hippocampus and cerebral infarction volume in the model and si-NC groups were lower ($P < 0.05$), and the miR-137 and BCL-2 levels in the hippocampus were higher ($P < 0.05$). Compared with that in the si-TUG1 and si-TUG1 + anti-miR-NC groups, TUG1 RNA and JAK1, STAT1, BAX, and caspase3 protein in the hippocampus and cerebral infarction volume were higher in the model and si-NC groups ($P < 0.05$), and the level of miR-137 and BCL-2 protein in the hippocampus were lower ($P < 0.05$). **Conclusions** Interfering with TUG1 lncRNA upregulated miR-137 and alleviated neuronal ischemic morphology and apoptosis in rats with focal cerebral ischemia, thus protecting against nerve injury.

【Keywords】 long non-coding RNA taurine up-regulated gene 1; microRNA-137; focal cerebral ischemia; nerve injury

缺血性脑卒中发生率占脑卒中发生率的 60%~80%,脑供血不足和氧气缺乏均导致脑损伤^[1]。脑供血不足、氧缺乏等造成脑功能受到影响、神经功能缺损等,具有高致残率、致死率、复发率,已成为脑卒中死亡的主要原因之一^[2]。长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA) 参与缺血性脑卒中神经元抗凋亡、抗炎等过程,为脑卒中的靶标治疗提供依据^[3]。牛磺酸上调基因 1 (taurine up-regulated gene 1, TUG1) 是神经系统发育的重要调控因子,在氯胺酮诱导的神经元毒性中,干扰 TUG1 可降低海马神经元凋亡和活性氧水平、并增加神经元存活能力,从而降低氯胺酮的神经毒性作用^[4],但具体机制尚不清楚。微小 RNA (microRNA, miRNA) 作为重要的调节剂,miR-137 充当神经元分化 miRNA,在神经功能中发挥重要作用^[5];在缺血性脑卒中中表达降低影响神经元凋亡^[6],但与 TUG1

之间关系尚未发现研究。因此,Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,干扰 TUG1 探究其对神经元损伤的影响,初步探讨 TUG1 影响缺血性脑卒中的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

80 只健康 SD 大鼠(北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2017-0006]),SPF 级、7~9 周龄、雄性,体重(280 $\pm$ 30)g。大鼠在温度 22℃、湿度 50%左右条件下饲养。实验动物在武汉华联科生物技术有限公司[SYXK(鄂)2018-0104]单独隔离暂养 1 周进行实验。动物实验研究经武汉市普仁医院伦理委员会审批(2019L014),遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

大鼠海马神经元购自基础医学研究所基础医学细胞中心。

1.2 主要试剂与仪器

TUG1-MUT、TUG1-WT、miR-137 mimic、miR-137 NC、si-NC、si-TUG1、anti-miR-NC、anti-miR-137 均购自广州锐博生物科技有限公司;双荧光素酶报告基因检测试剂盒、蛋白酪氨酸激酶 1 (januskinase 1, JAK1)、信号转导子和转录激活子 1 (Signal transducer and activator of transcription 1, STAT1)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, BCL2)、BCL2 相关 X 蛋白 (BCL2 associated X protein, BAX)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Cystein-asparate protease 3, caspase3) 均购自英国 abcam 公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色试剂盒、苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒、尼氏染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。7500 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR) 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 双荧光素酶验证 miR-137 与 TUG1 的靶向关系

Starbase 分析发现:miR-137 与 TUG1 存在结合位点;将 miR-137 与 TUG1 结合处位点序列、结合处突变位点序列分别克隆重组至 pGL3-basic 荧光素酶报告载体上,构建 TUG1 野生型 (TUG1-WT) 及突变型 (TUG1-MUT),分别与 miR-137 mimic 或 miR-137 NC 共转染至海马神经元中,检测各组荧光素酶相对活性。

1.3.2 实验分组及处理

参考文献^[7]采用 Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型,腹腔注射 2.5%戊巴比妥钠麻醉大鼠,大鼠仰卧固定在鼠板上,消毒颈部、备皮后纵向切开皮肤,暴露出颈外动脉 (external carotid artery, ECA)、左侧颈总动脉 (common carotid artery, CCA),近心端缝合线结扎,动脉夹夹闭颈内动脉 (internal carotid artery, ICA),距 CCA 分叉部 4 mm 处剪一小口后,插一根直径为 0.24 mm 拴线,插向 ICA,拴线尾端逐层缝合,2 h 后拔出拴线。Longa 分级法对大鼠进行神经功能缺损评分,1~3 分为制备成功的模型^[8],成功 60 只,将其随机分为模型组 (model group)、si-NC 组 (si-NC group)、si-TUG1 组 (si-TUG1

group)、si-TUG1+anti-miR-NC 组 (si-TUG1+anti-miR-NC group)、si-TUG1+anti-miR-137 组 (si-TUG1+anti-miR-137 group),每组 12 只。另 12 只大鼠假手术组 (sham operation group),仅分离 CCA、ECA、ICA。

si-NC 组、si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组、si-TUG1+anti-miR-137 组各组分别在 Bregma 后 3 mm、中线旁开 2.2 mm、深度 2.5 mm 注射 10 μ L si-NC、10 μ L si-TUG1、si-TUG1 和 anti-miR-NC 各 10 μ L、si-TUG1 和 anti-miR-137 各 10 μ L,假手术组和模型组相同部位注射 10 μ L 生理盐水。5 d 1 次,第 16 天检测下列指标。

1.3.3 样本采集与处理

每组随机选 6 只大鼠取全脑,TTC 染色检测脑梗死情况;剩余 6 只取脑组织中海马区,部分 4%多聚甲醛中固定,剩余-80℃冰箱保存。

1.3.4 RT-qPCR 检测海马区 TUG1、miR-137 水平情况

-80℃冰箱组织,TRIzol 法提取总 RNA,逆转录成第一链 cDNA。设计上下游引物序列,TUG1 (F: 5'-TACGTCCCGTGCCTCCTGAT-3', R: 5'-AGGGCTGTGCTGAATCTGGG-3'), miR-137 (F: 5'-GCGCGCTTATTGCTTAAGAATAC-3', R: 5'-GTGCAGGCTCCGAGGT-3')。反应体系:2 $\times$ Mix 10 μ L, cDNA 1 μ L, F/R (均为 10 μ mol/L) 各 0.5 μ L,补 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件:94℃、60 s;95℃、30 s, (TUG1:59℃、40 s, miR-137:59℃、35 s),45 个循环。2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法计算 TUG1、miR-137 相对表达水平。

1.3.5 TTC 染色检测脑梗死情况

全脑置于-20℃冰箱冰冻 15 min 后冠状位切片,每个脑组织切片 5 片,脑片置于 2% TTC 中 37℃ 恒温水浴锅中避光孵育 30 min,弃去 TTC,置于 4%多聚甲醛中 4℃ 固定 24 h,拍照后用 Image pro 软件进行分析处理,计算脑梗死体积。脑梗死体积=全脑梗死体积/全脑体积 $\times$ 100%。

1.3.6 HE 染色观察海马神经元形态

多聚甲醛中固定的海马组织切片 (厚度:6 μ m),苏木精染色、乙醇盐酸分色、伊红复染,显微镜下观察海马区神经元形态。

1.3.7 尼氏染色观察神经元形态

1.3.6 中切片,二甲苯及梯度乙醇脱蜡、入预热 56℃的 1%甲苯胺蓝染色 60 min,经蒸馏水漂洗、95%乙醇分化、脱色数秒,显微镜下观察神经元形态。

1.3.8 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 实验检测海马区 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3 蛋白水平

-80℃取海马组织后提取总蛋白。分离蛋白、转膜后,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h;对应加入一抗 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3、GAPDH,4℃孵育过夜;加入二抗,室温孵育 2 h;凝胶成像分析系统拍照后定量分析。

1.4 统计学方法

计量数据以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 描述,统计学软件 GraphPad 8.0 对数据进行分析,多组间比较行单因素方差分析,组间两两比较行 SNK-*q* 法。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

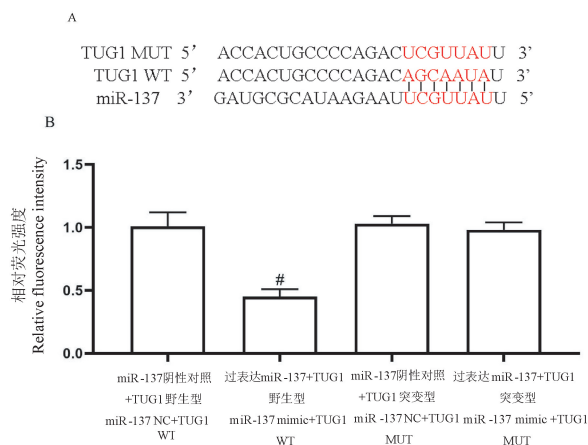
2 结果

2.1 双荧光素酶鉴定 miR-137 与 TUG1 的靶向关系

miR-137 与 TUG1 存在互补的结合位点,如图 1A。与 miR-137 NC+TUG1 WT 相比,miR-137 mimic+TUG1 WT 荧光素酶相对活性下降 ($P < 0.05$)。见图 1B。

2.2 各组海马区 TUG1、miR-137 水平

与假手术组相比,模型组、si-NC 组、si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平升高 ($P < 0.05$),



注:A:miR-137 与 TUG1 的结合位点,红色的碱基是结合位点;
B:荧光素酶相对活性的比较。与 miR-137 NC+TUG1 WT 比较,[#] $P < 0.05$ 。

图 1 双荧光素酶鉴定 miR-137 与 TUG1 的靶向关系 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Note. A, Binding site of miR-137 with TUG1. Red base is the binding site. B, Comparison of relative luciferase activity. Compared with the miR-137 NC+TUG1 WT, [#] $P < 0.05$.

Figure 1 Dual luciferase identification of the targeting relationship between miR-137 and TUG1

miR-137 水平降低 ($P < 0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 TUG1 水平降低 ($P < 0.05$),miR-137 水平升高 ($P < 0.05$),si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平降低 ($P < 0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比,si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 TUG1 水平升高 ($P < 0.05$),miR-137 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 2A、2B。

2.3 各组脑梗死情况

与假手术组相比,模型组、si-NC 组、si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组 si-TUG1+anti-miR-137 组脑梗死体积升高 ($P < 0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组脑梗死体积下降 ($P < 0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比,si-TUG1+anti-miR-137 组脑梗死体积升高 ($P < 0.05$)。见图 3A、3B。

2.4 各组海马区神经元 HE 染色情况

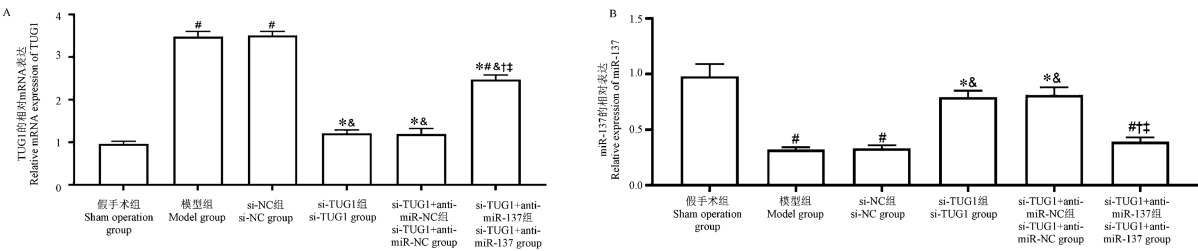
假手术组神经元未见异常,排列整齐、层次清晰,核膜、核仁清晰可见;模型组、si-NC 组层次紊乱,神经元数量减少、间隙变大、部分出现神经元胞核固缩或溶解、核仁消失等现象;si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元数量有所增加、神经元形态有所恢复;si-TUG1+anti-miR-137 组相较于 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元间隙变大、数量减少。见图 4。

2.5 各组海马区神经元尼氏染色情况

假手术组神经元排列整齐且致密、神经元内尼氏体充盈;模型组、si-NC 组神经元排列紊乱、间隙大,核膜、核仁模糊不清,尼氏体数量减少;si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元形态有所恢复,尼氏体数量增多;si-TUG1+anti-miR-137 组相较于 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组神经元形态破坏严重。见图 5。

2.6 各组海马区 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3 蛋白表达情况

与假手术组相比,模型组、si-NC 组、si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 BCL2 蛋白水平降低,JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平升高 ($P < 0.05$),si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 JAK1、STAT1、caspase3 蛋白水平升高 ($P < 0.05$);分别与模型组、si-NC 组相比,si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组海马区 BCL2 蛋白水平升高,JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平降低 ($P < 0.05$),si-TUG1+

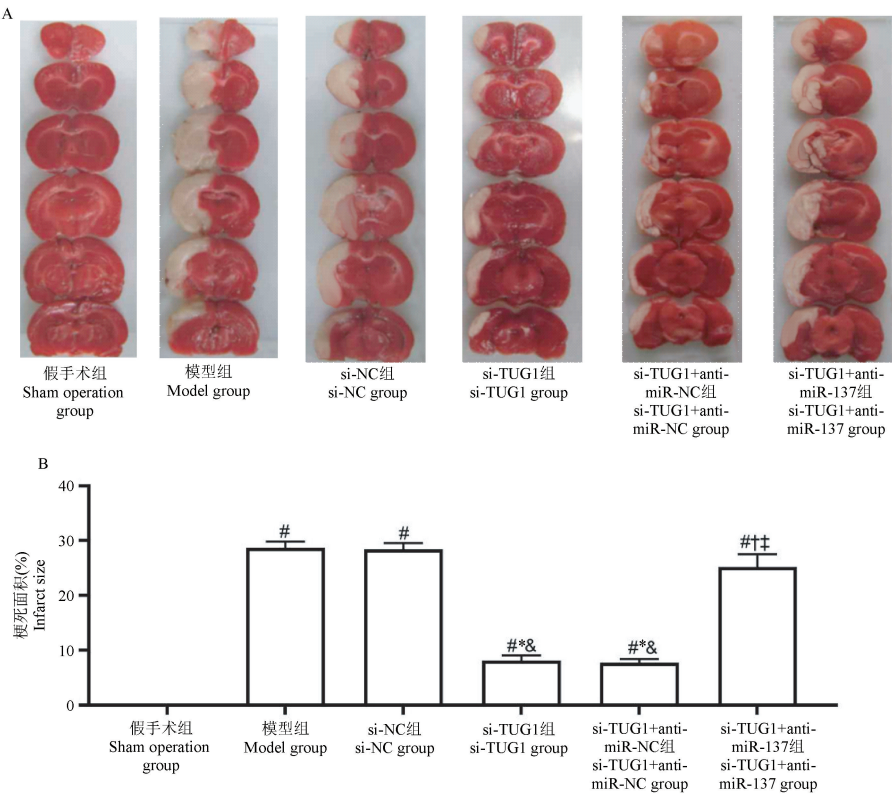


注:A:海马组织中 TUG1 水平;B:海马组织中 miR-137 的水平。与假手术组比较, # $P<0.05$;与模型组比较, * $P<0.05$;与 si-NC 组比较, & $P<0.05$;与 si-TUG1 组比较, † $P<0.05$;与 si-TUG1+anti-miR-NC 组比较, ‡ $P<0.05$ 。

图 2 海马区 TUG1、miR-137 水平 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. A, TUG1 level in the hippocampus. B, miR-137 level in the hippocampus. Compared with sham operation group, # $P<0.05$. Compared with model group, * $P<0.05$. Compared with si-NC group, & $P<0.05$. Compared with si-TUG1 group, † $P<0.05$. Compared with si-TUG1+anti-miR-NC group, ‡ $P<0.05$.

Figure 2 TUG1 and miR-137 level in the hippocampus



注:A:脑组织切片 TTC 染色图片;B:梗死体积百分比。与假手术组比较, # $P<0.05$;与模型组比较, * $P<0.05$;与 si-NC 组比较, & $P<0.05$;与 si-TUG1 组比较, † $P<0.05$;与 si-TUG1+anti-miR-NC 组比较, ‡ $P<0.05$ 。

图 3 大鼠脑梗死体积 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. A, Photographs of brain sections with TTC staining. B, Percentage of infarct volume. Compared with sham operation group, # $P<0.05$. Compared with model group, * $P<0.05$. Compared with si-NC group, & $P<0.05$. Compared with si-TUG1 group, † $P<0.05$. Compared with si-TUG1+anti-miR-NC group, ‡ $P<0.05$.

Figure 3 Volume of cerebral infarction in rats

anti-miR-137 组海马区 JAK1、STAT1、caspase3 蛋白水平降低 ($P<0.05$);分别与 si-TUG1 组、si-TUG1+anti-miR-NC 组相比, si-TUG1+anti-miR-137 组海马区 BCL2 蛋白水平降低, JAK1、STAT1、BAX、caspase3 蛋白水平升高 ($P<0.05$)。见图 6A、6B、6C、6D。

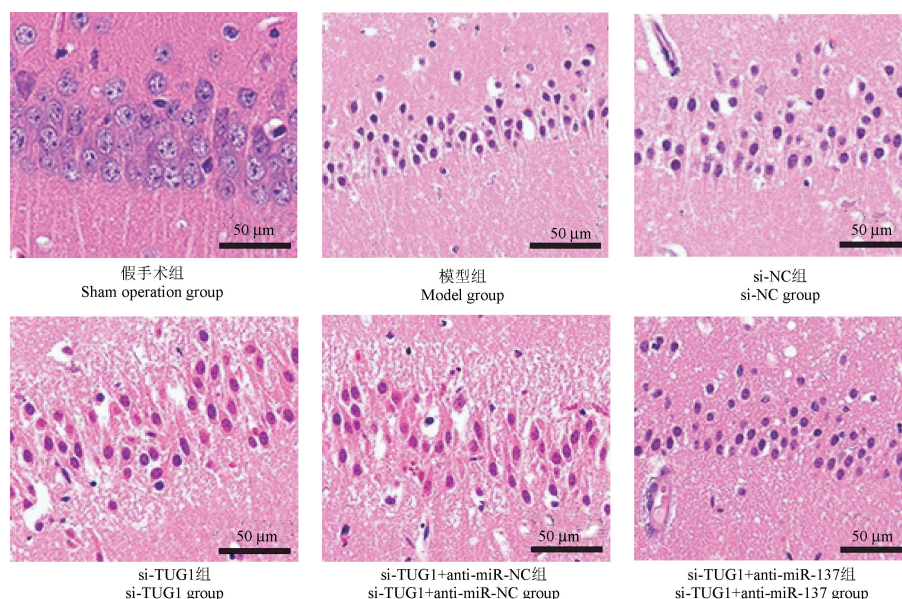


图4 大鼠海马区神经元形态(HE染色)

Figure 4 Neuron morphology in the hippocampus of rats (HE staining)

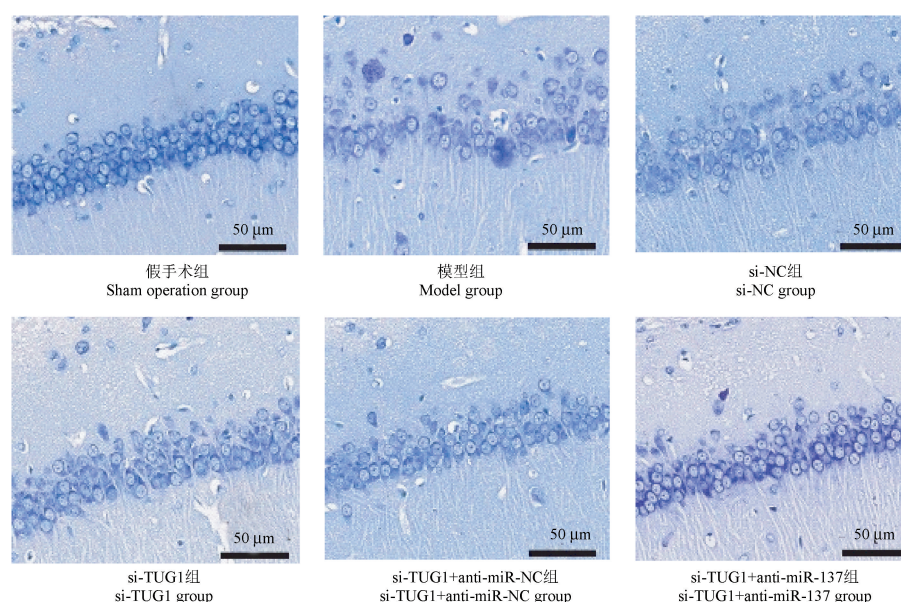


图5 大鼠海马区神经元形态(尼氏染色)

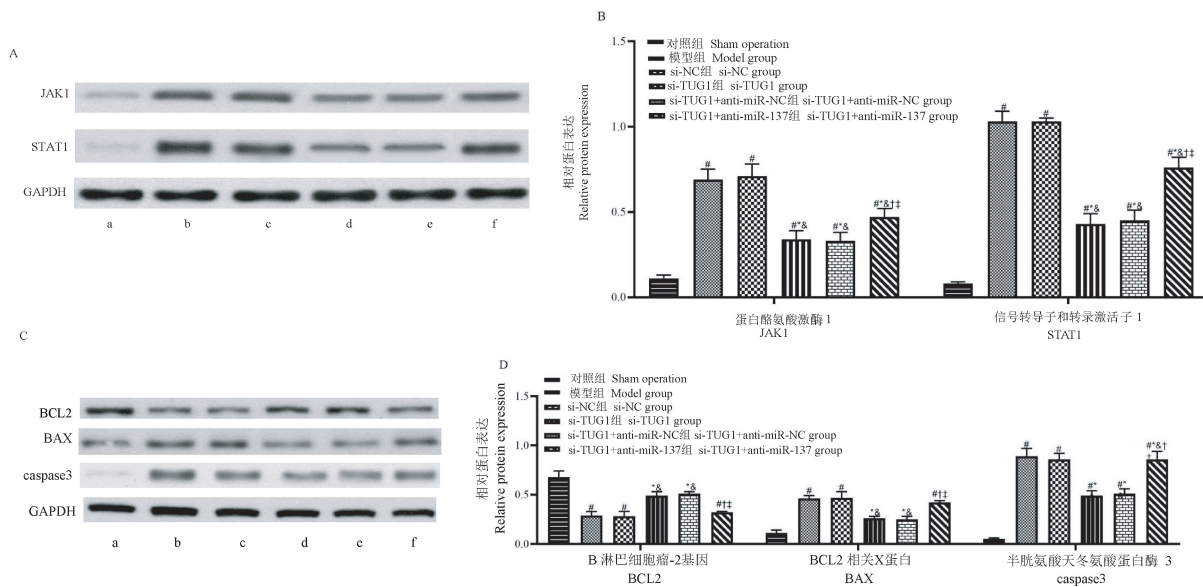
Figure 5 Neuronal morphology in the hippocampus of rats (Nissl staining)

3 讨论

缺血性脑卒中中脑组织血液动力学、能量代谢、离子均发生变化,导致细胞毒素积累,导致炎症反应、细胞凋亡等,导致多种神经功能损伤,出现后遗症包括语言障碍、肢体偏瘫、认知功能障碍等,好发于中老年人,在青年人中发病呈上升趋势^[9-10]。本研究 Longa 线栓法建立局灶性脑缺血大鼠模型, TTC 染色发现,脑组织脑梗死体积升高; HE 染色、

尼氏染色检测大鼠海马区神经元发现,海马区神经元排列紊乱、神经元数量减少、间隙变大、部分出现神经元胞核固缩或溶解、核仁消失明显,提示局灶性脑缺血后大鼠海马区神经元损伤明显。

缺血性脑卒中为医学上研究热点,但目前尚无特效药物治疗^[11]。基因层面直到蛋白层面均参与缺血性脑卒中病理生理过程,且大部分基因转录为非编码蛋白 RNA,其中 LncRNA 为长度超过 200 nt 的 RNA 分子,在脑缺血后卒中发病机制、再灌注损



注:A、B: JAK1、STAT1 蛋白在海马中的表达;C、D: 海马组织中 BCL2、BAX、caspase3 蛋白表达。a: 假手术组; b: 模型组; c: si-NC 组; d: si-TUG1 组; e: si-TUG1+anti-miR-NC 组; f: si-TUG1+anti-miR-137 组。与假手术组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 si-NC 组比较, [&] $P < 0.05$; 与 si-TUG1 组比较, [†] $P < 0.05$; 与 si-TUG1+anti-miR-NC 组比较, [‡] $P < 0.05$ 。

图 6 海马区 JAK1、STAT1、BCL2、BAX、caspase3 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Note. A/B, JAK1 and STAT1 protein expression in hippocampus. C/D, Protein expression of BCL2, BAX and caspase3 in hippocampus. a, Sham operation group. b, Model group. c, si-NC group. d, si-TUG1 group. e, si-TUG1+anti-miR-NC group. f, si-TUG1+anti-miR-137 group. Compared with sham operation group, [#] $P < 0.05$. Compared with model group, ^{*} $P < 0.05$. Compared with si-NC group, [&] $P < 0.05$. Compared with si-TUG1 group, [†] $P < 0.05$. Compared with si-TUG1+anti-miR-NC group, [‡] $P < 0.05$.

Figure 6 JAK1, STAT1, BCL2, BAX and caspase3 protein expression in hippocampus

伤等都具有重要作用,有望成为治疗卒中的新靶点和思路^[12]。TUG1 作为首次在小鼠视网膜细胞中发现的 LncRNA,在缺血性脑卒中中高表达,可以损伤细胞^[13];TUG1 可通过靶向 miR-221-3p/SPRED2 轴逆转 LPS 诱导的细胞凋亡和巨噬细胞炎症,在细胞凋亡和炎症反应中发挥作用^[14];TUG1 过表达促进心肌细胞凋亡并预测心肌梗死的预后不良^[15]。本研究发现,与假手术组相比,模型组海马区 TUG1 水平升高,神经元损伤现象明显,提示 TUG1 在缺血性脑卒中中表达升高,可能促进神经元损伤从而影响疾病。且 TUG1 与 miR-137 存在靶位点,本文干扰 TUG1,在干扰 TUG1 的基础上抗 miR-137,观察抗 miR-137 对 TUG1 的影响。

miRNA 属于非编码 RNA 中小非编码 RNA,长度为 18~25 nt,广泛存在于真核生物中,通过一系列过程转化为成熟 RNA,miRNA 具有高度保守性、时序性、组织特异性,具有作为生物标记物的潜在优势^[16]。miR-137 在缺血性脑卒中表达下调,且 BCL2 等作为 miR-137 的靶基因,参与卒中后抑郁过程^[17]。BCL2、BAX、caspase3 作为影响细胞凋亡的

基因,其中 BCL2 作为抑制凋亡基因;BAX 具有促凋亡作用;caspase3 是细胞凋亡的关键执行因子,通过水解天冬氨酸残基 C 末端的肽键,激活下游 caspase 酶或分解细胞内相关底物蛋白,导致 BCL2 等抗凋亡蛋白酶解、凋亡蛋白 BAX 等细胞外基质和细胞骨架等的修复,促使细胞凋亡^[18]。本研究发现,与假手术组相比,模型组海马区 miR-137 水平降低;与模型组相比,si-TUG1 组海马区 miR-137 水平升高、脑梗死体积降低、神经元形态有所缓解,提示缺血性脑卒中干扰 TUG1 后可以升高 miR-137 的表达,缓解神经元状态,实现对疾病的保护。进一步验证 JAK1/STAT1 通路的作用发现,模型组 JAK1/STAT1 通路蛋白处于激活状态,而 miR-137 通过调节 JAK1/STAT1 信号通路减轻大鼠局灶性脑缺血损伤^[19];线粒体途径细胞凋亡受 JAK1/STAT1 信号通路的调控,活化的 STAT1 可以调节凋亡途径关键因子 BCL2、BAX 的表达^[20]。激活后的 STAT1 抑制 BCL2 的表达、促进 BAX 的表达从而促进神经元凋亡。干扰 TUG1 后 JAK1、STAT1 蛋白表达水平降低,提示干扰 TUG1 后促进 miR-137 的表达从而抑

制 JAK1/STAT1 通路蛋白活化,使 JAK1/STAT1 通路蛋白对 BCL2、BAX 的作用降低,神经元凋亡得以缓解。在 si-TUG1 的基础上抑制 miR-137 表达可逆转 si-TUG1 的效果。

综上所述,干扰 TUG1 后可上调 miR-137,从而缓解局灶性脑缺血大鼠神经元形态及凋亡,缓解神经损伤。本研究首次验证 TUG1 与 miR-137 在神经元中的关系,但 LncRNA 与 miRNA 之间关系复杂,亦可能通过别的 miRNA 发挥作用,是本研究接下来研究重点。

参考文献:

- [1] 程建华,黄一睿,肖美娟,等.急性缺血性脑卒中大鼠脑组织中 Th17/Treg 的变化[J].中国病理生理杂志,2019,35(4):758-763,768.
- [2] Fan AP, Khalil AA, Fiebach JB, et al. Elevated brain oxygen extraction fraction measured by MRI susceptibility relates to perfusion status in acute ischemic stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2020, 40(3): 539-551.
- [3] Zhang X, Zhu XL, Ji BY, et al. LncRNA-1810034E14Rik reduces microglia activation in experimental ischemic stroke[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1): 75.
- [4] Cao C, Zhang Y, Zhang Z, et al. Small interfering lncrna-tug1 (situg1) decreases ketamine-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons[J]. Int J Neurosci, 2019, 129(10): 937-944.
- [5] Velasco MX, Kosti A, Guardia GDA, et al. Antagonism between the RNA binding protein Musashi1 and miR-137 and its potential impact on neurogenesis and glioblastoma development[J]. RNA, 2019, 25(7): 768-782.
- [6] Chen F, Zhang L, Wang E, et al. LncRNA GAS5 regulates ischemic stroke as a competing endogenous RNA for miR-137 to regulate the Notch1 signaling pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 496(1): 184-190.
- [7] Duan X, Gan J, Peng DY, et al. Identification and functional analysis of microRNAs in rats following focal cerebral ischemia injury[J]. Mol Med Rep, 2019, 19(5): 4175-4184.
- [8] Hyakkoku K, Umeda N, Shimada S, et al. Post-stroke pain caused by peripheral sensory hypersensitization after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. Brain Res, 2019, 1715: 35-40.
- [9] Massard C, Soria JC, Krauss J, et al. First-in-human study to assess safety, tolerability, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of the anti-CD27L antibody-drug conjugate AMG 172 in patients with relapsed/refractory renal cell carcinoma[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2019, 83(6): 1057-1063.
- [10] Gungor L, Polat M, Ozberk MB, et al. Which ischemic stroke subtype is associated with hyperhomocysteinemia[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(7): 1921-1929.
- [11] Jiang J, Wang Y, Liu B, et al. Challenges and research progress of the use of mesenchymal stem cells in the treatment of ischemic stroke[J]. Brain Dev, 2018, 40(7): 612-626.
- [12] 李子付,洪波,刘建民.长链非编码脱氧核糖核酸在脑血管疾病中的研究进展[J].中国脑血管病杂志,2015,12(2): 105-108.
- [13] Chen S, Wang M, Yang H, et al. LncRNA TUG1 sponges microRNA-9 to promote neurons apoptosis by up-regulated Bel2l11 under ischemia[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 485(1): 167-173.
- [14] Hu L, Ye H, Liao J. LncRNA TUG1 reverses LPS-induced cell apoptosis and inflammation of macrophage via targeting MiR-221-3p/SPRED2 axis[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020, 84(12): 2458-2465.
- [15] Li B, Wu Y. LncRNA TUG1 overexpression promotes apoptosis of cardiomyocytes and predicts poor prognosis of myocardial infarction[J]. J Clin Pharm Ther, 2020, 45(6): 1452-1456.
- [16] Vychytilova-Faltejskova P, Svobodova Kovarikova A, Grolich T, et al. MicroRNA biogenesis pathway genes are deregulated in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(18): 4460-4473.
- [17] 鲁豫,田小军,史莉瑾,等. MiR-137 在缺血性卒中后抑郁患者外周血中的表达及其临床意义[J].临床神经病学杂志,2017,30(3): 217-220.
- [18] Luo Y, Fu X, Ru R, et al. CpG oligodeoxynucleotides induces apoptosis of human bladder cancer cells via Caspase-3-Bax/Bcl-2-p53 axis[J]. Arch Med Res, 2020, 51(3): 233-244.
- [19] Zhang M, Ge DJ, Su Z, et al. miR-137 alleviates focal cerebral ischemic injury in rats by regulating JAK1/STAT1 signaling pathway[J]. Hu Exp Toxicol, 2020, 39(6): 816-827.
- [20] Fan S, Sun JB, Li R, et al. Lycopene protects myocardial ischemia injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(7): 3096-3104.

[收稿日期]2020-12-17