

·实验研究 Experimental research·

miR-29b 通过抑制 N2a 细胞 p53 凋亡通路
减轻氧糖剥夺/再灌注损伤

陈 立, 邹伟婕, 张 宇, 张 帅, 王黎洲, 周 石

【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸(miR)-29b 过表达是否抑制脑缺血损伤,进一步探讨其潜在机制。**方法** 体外培养小鼠成神经细胞瘤 N2a 细胞,构建氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)模型,模拟体外脑缺血损伤。N2a 细胞随机分为空白对照组、OGD/R 组、OGD/R+转染 miR-29b 激动剂组、OGD/R+转染 miR-29b 抑制剂组、转染 miR-29b 激动剂阴性对照组、转染 miR-29b 抑制剂阴性对照组。实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测各组 miR-29b 表达,溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)比色法、乳酸脱氢酶(LDH)法检测 miR-29b 激动剂和抑制剂对 OGD/R 诱导细胞活性和凋亡的影响,Hoechst 33258 染色法观察 N2a 细胞形态学特征及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3 活性,免疫印迹法定量分析促凋亡蛋白 Bax、Bcl-2 及 p53 表达。**结果** 经 OGD/R 处理的 N2a 细胞中 miR-29b 水平明显降低。miR-29b 激动剂显著增加细胞活力,减少 LDH 漏出率,改善细胞核在凋亡过程中形态学变化,增强 OGD/R 条件下 caspase-3 活性;miR-29b 抑制剂加剧 OGD/R 诱导的细胞毒性和细胞凋亡。miR-29b 激动剂阻断 OGD/R 诱导的 Bax 和 p53 蛋白表达增加,降低 Bcl-2 蛋白表达;miR-29b 抑制剂加剧 OGD/R 诱导的这些凋亡相关蛋白改变。p53 基因敲除的 p53 siRNA 降低细胞活力,增加 LDH 漏出率,逆转 miR-29b 激动剂对细胞损伤的改善作用。**结论** miR-29b 通过负调控 p53 依赖性凋亡途径减轻脑缺血性损伤,可能为缺血性脑卒中提供一潜在的治疗靶点。

【关键词】 miR-29b; 脑缺血; p53 基因; 细胞凋亡; 成神经细胞瘤 N2a 细胞

中图分类号:R743.3 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2018)-05-0451-07

The potential mechanism of miR-29b in reducing oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced injury through inhibiting the apoptotic pathway of N2a p53 cells CHEN Li, ZOU Weijie, ZHANG Yu, ZHANG Shuai, WANG Lizhou, ZHOU Shi. Department of Interventional Radiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: 156722229@qq.com

【Abstract】 Objective To clarify whether the over-expression of microRNA-29b (miR-29b) will inhibit cerebral ischemia injury, and to make a further discussion on its potential mechanism. **Methods** Mouse-derived neuroblastoma cells (N2a cells) were cultured in vitro, the oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) model was established to make simulation of cerebral ischemic injury in vitro. The N2a cells were randomly divided into six groups: blank control group (control), OGD/R group, OGD/R + transfected with miR-29b mimics group (OGD/R+miR-29b M), OGD/R+transfected with miR-29b inhibitor group (OGD/R+miR-29b I), transfected miR-29b mimics negative control group (miR-29b M) and transfected miR-29b inhibitor negative control group (miR-29b I). Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to test the expression of miR-29b in each group. MTT colorimetric assay and lactate dehydrogenase (LDH) method were employed to detect the effect of miR-29b mimics and inhibitors on the activity and apoptosis of OGD/R-induced cells. Hoechst 33258 staining was adopted to observe the morphological

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2018.05.013

基金项目: 国家自然科学基金(81460276)

作者单位: 550004 贵阳 贵州医科大学附属医院介入科

通信作者: 周 石 E-mail: 156722229@qq.com

characteristics of N2a cells and the activity of caspase specific protease-3 (caspase-3). The expressions of pro-apoptotic proteins, including Bax, Bcl-2 and p53, were quantitatively analyzed by immunoblotting. **Results** In OGD/R-treated N2a neuroblastoma cells, the level of miR-29b decreased obviously. The miR-29b mimics could significantly increase cell's viability and decrease LDH leakage, thereby improving the morphological changes of nuclei during apoptosis and enhancing caspase-3 activity under OGD/R conditions. The inhibitors of miR-29b could exacerbate OGD/R-induced cytotoxicity and apoptosis. The mimics of miR-29b could block OGD/R-induced increase in the expressions of Bax and p53 proteins, and could decrease the expression of Bcl-2 protein in N2a cells. The inhibitors of miR-29b could exacerbate OGD/R-induced changes in these apoptosis-associated proteins. The p53 siRNA with knockdown p53 gene could decrease the cell viability and increase LDH leakage, thus reversing the improvement effect of miR-29b mimics on cells damages. **Conclusion** The results of this study indicate that miR-29b can reduce cerebral ischemic injury by negatively regulating p53-dependent apoptosis pathway, which may provide a potential therapeutic target for the treatment of ischemic stroke. (J Intervent Radiol, 2018, 27: 451-457)

【Key words】 microRNA-29b; cerebral ischemia; p53 gene; apoptosis; N2a neuroblastoma cell

缺血性脑卒中约占所有脑卒中患者 87%^[1-2],现阶段虽进行大量临床试验研究,但除了早期静脉注射重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)和介入治疗外,再无其它更有效的临床治疗手段^[3-4]。脑卒中触发一系列复杂细胞分子间反应,最终导致神经细胞在脑缺血中发生坏死、凋亡、氧化应激和炎症反应等^[5-7],但脑卒中诱导的细胞死亡和神经功能障碍确切机制目前仍不清楚。既往研究表明肿瘤抑制蛋白 p53 是一种能介导大量细胞内外反应,并在细胞周期阻滞和凋亡中起关键作用的转录因子^[8]。葡萄糖剥夺(glucose deprivation, GD)结合氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)是脑缺血常见体外模型^[9-11]。阐明 OGD/再灌注(reperfusion, R)所诱导神经元死亡的潜在细胞和分子机制,无疑有助于脑缺血神经保护药物开发。微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)是由 19~22 个核苷酸(NT)组成的非编码 RNA,作为转录后重要调节因子,常与多靶点信使 RNA (mRNA)协同调控靶基因^[12]。越来越多研究发现 miR 在各种生物学过程,如心血管相关疾病中细胞增殖、分化、凋亡和信号转导中具有重要作用^[13-15]。有研究证实 miR 在脑缺血反应中起重要作用^[16],在前脑缺血^[17]、局灶性脑缺血^[18]及缺血性脑卒中患者中与缺血性脑损伤密切相关^[19],并进一步证实 miR-29 家族在缺血性脑损伤中发挥重要作用。目前关于 miR-29 功能的争议在于其到底是抵抗还是促进神经细胞凋亡^[20]。许多研究显示 miR-29 在不同细胞或不同病理/生理条件下与不同靶点结合,抗凋亡和促凋亡作用均会产生^[21-23]。一项研究表明脑梗死部位 miR-29b 缺失是脑卒中关键因素之一,miR-29b 类似物治疗降低脑卒中引起的神经细胞死亡和脑

梗死面积^[24]。本研究旨在通过神经细胞损伤和卒中结局背景下细胞生物学和体外实验,探讨 miR-29b 在脑缺血进展中经 p53 介导凋亡通路对脑缺血性损伤是否有治疗作用及其潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验药品及试剂

miR-29b 激动剂和抑制剂序列(上海吉玛制药技术公司)、p53 小干扰 RNA(siRNA)序列和阴性对照 siRNA(美国 Thermo Fisher 科技公司)、溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法检测试剂盒和 Hoechst 33258 染色液(美国 Sigma-Aldrich 公司)、乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3 活性检测试剂盒(上海碧云天生物技术公司)、兔抗-Bax 抗体、兔抗 Bcl-2 多克隆抗体及山羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)共轭二次抗体(美国 CST 公司)。本实验所有试剂均为分析纯级。

1.2 N2a 细胞培养

取小鼠成神经细胞瘤 N2a 细胞(美国菌种保藏中心, ATCC),置于加入 10%胎牛血清(FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 Dulbecco 改良伊格尔培养基(DMEM), 37℃、5%CO₂、95%O₂ 环境下培养。培养介质 1~2 d 更换 1 次。

1.3 OGD/R 模型建立及 miR-29b 激动剂等转染

对 N2a 细胞作 OGD 处理,置于脱氧葡萄糖 DMEM,在 5%CO₂、1%O₂、94% N₂ 缺氧环境下培养 4 h,然后置于含葡萄糖 DMEM,正常培养条件(5% CO₂、95%O₂)下于 0、3、6、12、24 h 作 R 处理,体外脑缺血状态模型建立。采用实验浓度 Lipofectamine 3000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司)对 miR-29b 激动剂、

抑制剂、阴性对照 miR、p53 siRNA 和阴性对照 siRNA 进行转染,6 h 后按指示时间用 OGD/R 处理 N2a 细胞,了解 OGD/R 模型中 N2a 细胞 miR-29b 和 p53 所起作用。将 N2a 细胞随机分为 6 组:空白对照组(C 组)、OGD/R 组、OGD/R+转染 miR-29b 激动剂组(OGD/R+miR-29b M 组)、OGD/R+转染 miR-29b 抑制剂组(OGD/R+miR-29b I 组)、转染 miR-29b 激动剂阴性对照组(miR-29b M 组)、转染 miR-29b 抑制剂阴性对照组(miR-29b I 组)。实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 N2a 细胞中 miRNA 转染效率(基于 miR-29b 水平),免疫印迹法检测 p53 siRNA 转染效率(基于 p53 水平)。hsa-miR-29b 激动剂有义链为:5'-UAGCACCAUUUGAAAUCA-GUGUU-3',反义链为:5'-AACACUGAUUUCAA-AUGGUGCUA-3';阴性对照 miRNA 有义链为:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义链为:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'。

1.4 MTT 比色法和 LDH 检测

N2a 细胞接种至 96 孔 5×10^4 细胞/mL 培养板,加入 5 mg/mL MTT 液(20 μ l/孔)并在 37℃ 下培育 3~4 h,加入 150 μ l 二甲基亚砷(DMSO)溶解深蓝色晶体;微孔板检测器(Thermo MK3 酶标仪)于 490 nm 吸光度处检测细胞存活。对照组不作任何处理,表示为 100% 细胞存活值,其余各组按此值作归一化处理。96 孔板中培养 N2a 细胞,随后同上述处理;微孔板检测器于 490 nm 吸光度(D_{490})处测定培养上清液中 LDH 水平。对照组不作任何处理,表示为 100% 值,其它组归为此值。

1.5 Hoechst 33258 染色观察 N2a 细胞凋亡形态特征

N2a 细胞接种至 24 孔培养板并进行处理,用冷磷酸缓冲液(PBS)轻轻冲洗 N2a 细胞 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min;PBS 冲洗 3 次,Hoechst 33258 染色液(5 μ g/mL)染色 10 min;PBS 洗涤 3 次,Olympus IX71 荧光显微镜(日本 Olympus 公司)下观察细胞核表现出明亮荧光,细胞呈收缩或固缩形态及典型核凝聚现象视为凋亡细胞,弥漫性荧光细胞归为存活或有活性。

1.6 caspase-3 活性检测

按上述方法处理 N2a 细胞,6 孔培养板上接种 N2a 细胞,处理后 4℃、12 000 转速离心 10 min,收集离心后蛋白提取物,生物蛋白试剂盒(美国 Bio-Rad Laboratories 公司)测定蛋白浓度;96 微孔培养板中加入 30 μ g 等量蛋白提取物,37℃ 下与 caspase-3

活性显色底物(Ac-DEVD-pNA,100 μ M)培养 4 h;微孔板检测器于 D_{405} 处检测 caspase-3 活性。采用非诱导细胞完成检测,也先用 Ac-DEVD-CHO 进行比较分析。

1.7 RNA 分离和 RT-qPCR 分析

Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取培养的 N2a 细胞总 RNA,用含 miRNA 特异性引物的 TaqMan miR 定量 PCR 试剂盒(美国 Thermo Fisher 科技公司)从 1 μ g 总 RNA 中合成第一链 cDNA;PCR 反应后,按使用说明书程序,用 ABI Prism 7900HT 型荧光 qPCR 仪(美国 ABI 公司)、All-in-One™ qPCR Mix 试剂(美国 GeneCopoeia 公司)检测 miR-29b 水平。qRT-PCR 检测过程:94℃ 变性 5 min,94℃ 解链 60 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 60 s,40 个周期 72℃ 延伸 10 min;RNU6 视作内部控制基因;miR 扩增引物:miR-29b 前引物为 5'-GGGTAGCACCATTG-AAATC-3',miR-29b 后引物为 5'-TTTGGCACT-AGCACATT-3',U6 前引物为 5'-CTCGCTTCG-GCAGCACA-3',U6 后引物为 5'-AACGCTTCACG-AATTTGCGT-3'。所有实验重复 3 次,所有样品均为正常内部控制。采用比较 CT 分析($2^{-\Delta CT}$)获得数据 lg^2 (基因芯片归一化信号)。

1.8 免疫印迹分析

低温下用放射免疫沉淀测定(RIPA)裂解缓冲液(海门生物技术公司)提取蛋白 30 min 后,用二辛可酸(BCA)试剂盒检测蛋白浓度;12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE,美国 Sigma-Aldrich 公司)法分离等量蛋白样品(30~50 μ g 蛋白/泳道)并转移至硝酸纤维素(NC)滤膜(美国 Pall Corporation 公司),室温下用 5% 脱脂奶粉阻断 2 h 后,NC 膜同主要抗体(Bax 以 1:1 000 稀释,Bcl-2 以 1:500 稀释)培育一夜;含 0.1% 吐温 Tris 缓冲 0.9% NaCl 溶液(TBST)清洗 3 次,HRP 标记的羊抗兔(3-磷酸甘油醛脱氢酶 GAPDH,1:5 000 稀释)培育 1 h;化学发光试剂(美国 Pierce 生物技术公司)检测标记的蛋白条带,用 Quantity One 灰度分析软件(美国 Bio-Rad Laboratories 公司)进行图像分析。免疫印迹分析反复进行 3 次。

1.9 统计学分析

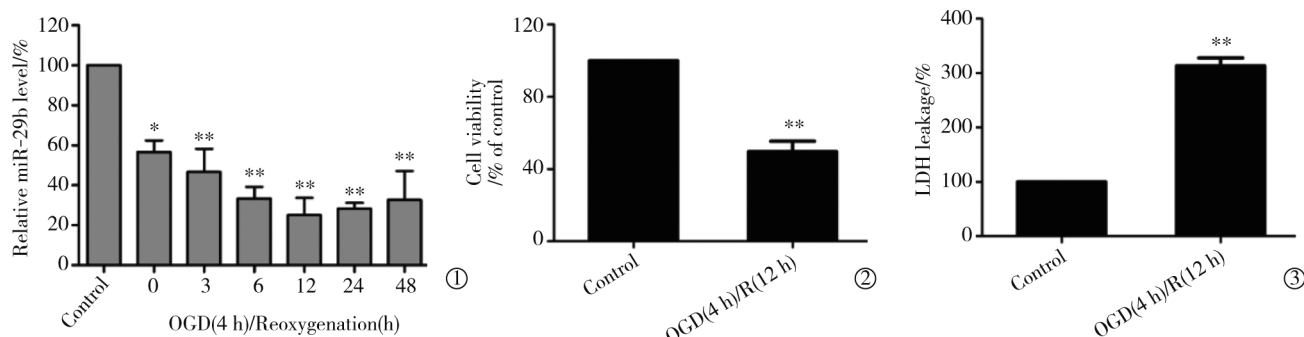
采用 SPSS 18.0 软件包对所有统计数据进行比较和分析。所有 3 个独立实验数值均表示为均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),各组间差异先用单因素方差分析检验,后用最小显著性差异检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R 处理后 miR-29b 水平变化

N2a 细胞经 OGD 4 h, RT-qPCR 检测不同 R 处理时间点 (0、3、6、12、24、48 h) N2a 细胞中 miR-29b 表达, 结果显示 miR-29b 水平与空白对照组相比明

显下调, R 处理 12 h 达平台期 (图 1①), N2a 细胞活力经 OGD (4 h) 和 R (12 h) 处理显著降低 (图 1②), LDH 释放增加 (图 1③); 表明 OGD/R 处理可诱导 N2a 细胞毒性, miR-29b 水平随之降低, 这可能与脑缺血性损伤有关。



注: 与空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 对照组无任何处理, 表示为 100% 值

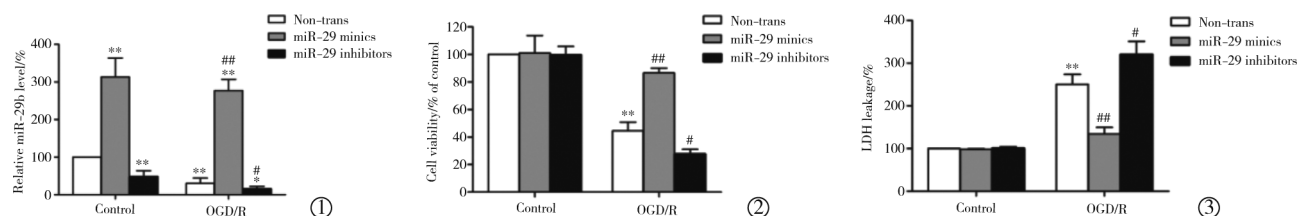
① OGD 处理 4 h 后 RT-qPCR 检测不同 R 时间点 (0、3、6、12、24、48 h) N2a 细胞中 miR-29b 表达; ② OGD (4 h)/R (12 h) 处理后 MTT 比色法检测细胞活力; ③ OGD (4 h)/R (12 h) 处理后检测 LDH 漏出率

图 1 OGD/R 处理对 N2a 细胞 miR-29b 水平的影响

2.2 miR-29b 对 OGD/R 处理 N2a 细胞的影响

经 OGD (4 h)/R (12 h) 处理, miR-29b 激动剂转染明显提高了 miR-29b 水平, miR-29b 抑制剂转染明显降低了 miR-29b 水平, 阴性对照组分别对 miR-29b 水平无影响 (图 2①); 表明 miR-29b 激动剂或抑制剂可成功地提高或降低 N2a 细胞 miR-29b 水平。MTT 法和 LDH 法分别检测 miR-29b 激动剂和抑制剂对经 OGD/R 诱导 N2a 细胞活性和凋亡的影

响, 结果显示阴性对照组 miR-29b 激动剂或抑制剂对细胞活性和 LDH 漏出率无影响; OGD (4 h)/R (12 h) 处理后 N2a 细胞活力明显减低, 这种作用在 miR-29b 激动剂作用下会逆转, 在 miR-29b 抑制剂作用下会加重 (图 2②); miR-29b 激动剂降低 LDH 漏出率, miR-29b 抑制剂增加 LDH 漏出率 (图 2③)。结果表明, OGD/R 诱导的 N2a 细胞损伤经由抑制 miR-29b 水平实现。



注: 与空白对照组相比, ** $P < 0.01$; 与 OGD/R 空白对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 对照组无任何处理, 表示为 100% 值

① RT-qPCR 检测 miR-29b 水平; ② MTT 法检测细胞活力; ③ LDH 漏出率检测

图 2 OGD/R 处理后 N2a 细胞中 miR-29b 激动剂和抑制剂对细胞存活及 LDH 漏出率的影响

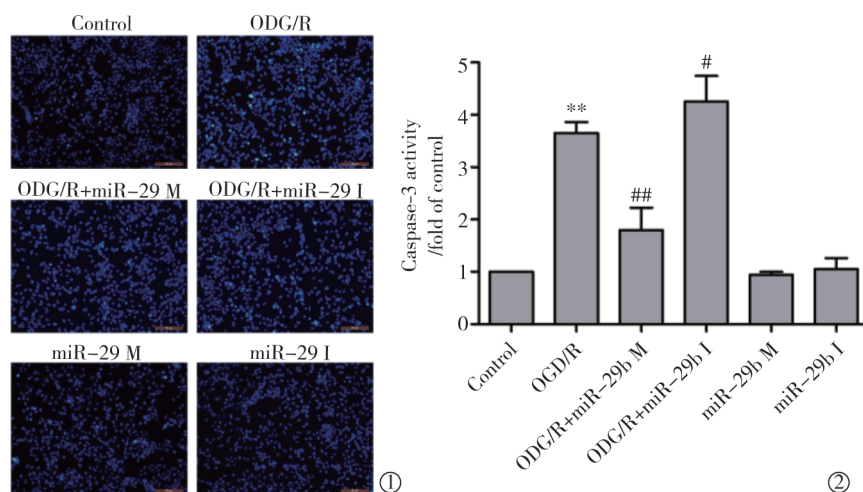
2.3 miR-29b 对 N2a 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色显示, miR-29b 激动剂或抑制剂单独应用对 N2a 细胞凋亡无影响; OGD/R 处理增加了 N2a 细胞中核碎裂现象及作为凋亡细胞代表性的亮蓝色核数量, 这些反应会被 miR-29b 激动剂消除, miR-29b 抑制剂放大 (图 3①); miR-29b 激动剂转染减弱 OGD/R 处理后细胞凋亡过程中最主要执行者 caspase-3 活性, miR-29b 抑制剂加强 OGD/R 处理后 caspase-3 活性 (图 3②); 结果表明 miR-29b 有抑制 OGD/R 诱导的 N2a 细胞凋亡的

作用。

2.4 miR-29b 对 N2a 细胞凋亡相关信号转导的影响

免疫印迹法检测 Bax 与 Bcl-2 表达见图 4①, miR-29b 激动剂和抑制剂单独转染对 N2a 细胞凋亡相关蛋白无影响, OGD/R 处理显著增加了 Bax 蛋白表达并降低 Bcl-2 蛋白表达, miR-29b 激动剂对 N2a 细胞预刺激能阻断这些反应, 也可通过 miR-29b 抑制剂对 N2a 细胞预刺激加重这些反应 (图 4②③), miR-29b 激动剂下调 p53 蛋白水平, miR-29b 抑制剂上调 p53 蛋白水平 (图 4④); 表明 miR-



注:与空白非转染组相比,** $P<0.01$;与 OGD/R 非转染组相比,* $P<0.05$,## $P<0.01$

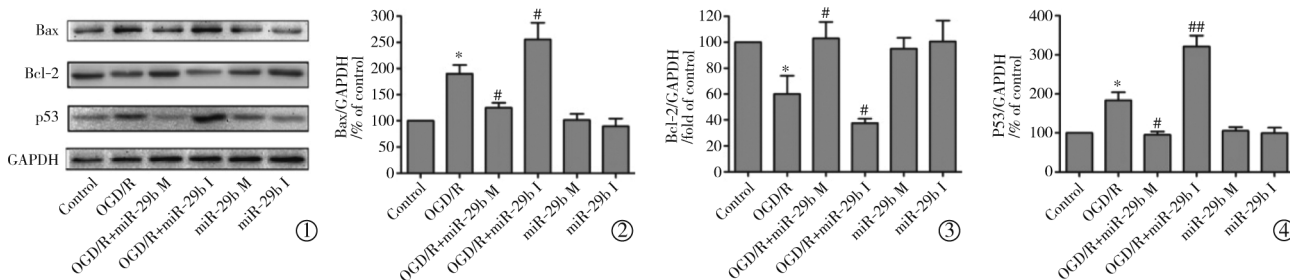
①N2a 细胞用 miR-29b 激动剂或抑制剂先预转染,后经 OGD(4 h)/R(12 h)处理,Hoechst 33258 荧光染色观察凋亡细胞形态学特征;②N2a 细胞用 miR-29b 激动剂或抑制剂先预转染,后经 OGD(4 h)/R(12 h)处理的 caspase-3 活性检测结果

图 3 miR-29b 激动剂和抑制剂对 OGD/R 诱导 N2a 细胞凋亡的影响

29b 激动剂和抑制剂会改变 p53 介导凋亡信号转导通路,miR-29b 对抗 OGD/R 诱导 N2a 细胞损伤的作用可能在于 p53 信号转导通路激活与 Bax 和 Bcl-2

蛋白表达的交替变化。

2.5 野生型 p53 特异性质粒 DNA 对 p53 过表达的影响



注:与空白非转染组相比,* $P<0.05$;与 OGD/R 非转染组相比,** $P<0.05$,## $P<0.01$

①免疫印迹检测 N2a 细胞凋亡相关蛋白表达;②miR-29b 激动剂或抑制剂预转染 N2a 细胞,ODG(4 h)/R(12 h)处理,GAPDH 作为载体对照的 Bax 蛋白定量分析;③Bcl-2 蛋白定量分析;④p53 蛋白定量分析

图 4 miR-29b 激动剂和抑制剂对 N2a 细胞凋亡相关蛋白的影响

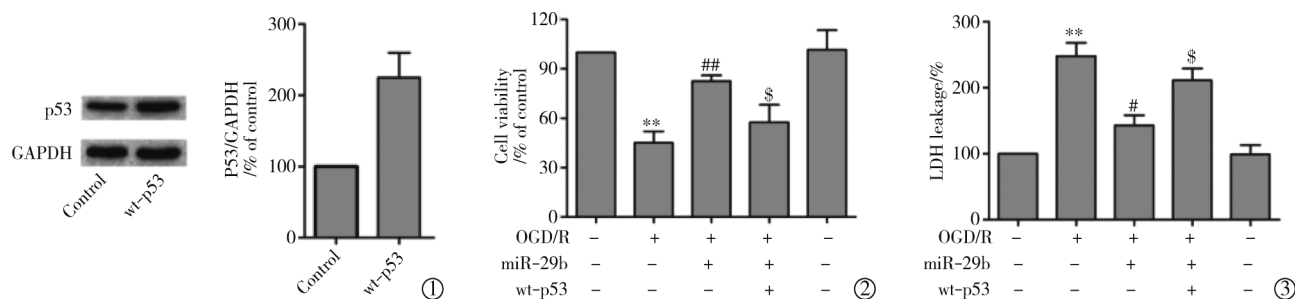
N2a 细胞经野生型 p53(wt-p53)siRNA 转染后用 miR-29b 激动剂处理和 OGD/R 处理,免疫印迹法检测显示 wt-p53 基因可明显增加 N2a 细胞 p53 蛋白水平(图 5①),MTT 法检测显示 OGD/R 处理后经 wt-p53 转染,miR-29b 激动剂诱导 N2a 细胞存活率增加明显减弱(图 5②),miR-29b 激动剂减少 LDH 漏出率也被 N2a 细胞转染的 wt-p53 基因阻断(图 5③);表明 p53 基因过度表达能逆转 miR-29b 对抗 OGD/R 诱导的 N2a 细胞损伤,p53 介导 miR-29b 调控 OGD/R 诱导的 N2a 细胞损伤。

3 讨论

脑缺血性损伤由细胞兴奋性毒性、线粒体功能

障碍、氧化应激和炎症反应等不同途径介导,具有复杂的相互作用机制,目前临床上用于脑缺血治疗的药物和治疗靶点的生物标志物均不够理想。本研究发现 OGD/R 诱导的 N2a 细胞缺血模型在 R 期间 miR-29b 水平下调,最重要的是通过负调控 p53 相关细胞凋亡,miR-29b 可诱导神经细胞保护作用,发挥抗细胞凋亡作用。

很多实验证实,miR 在脑缺血损伤反应中起着重要作用^[12,25]。近期研究也确定 miR 在脑细胞缺血损伤中的作用,miR-29 家族在评估损伤和确定脑卒中预后中扮演重要介质作用^[26]。Khanna 等^[24]研究发现 miR-29b 水平在大脑中动脉闭塞所致缺血性卒中梗死组织中明显降低。本研究数据也提示 OGD/R



注:与空白非转染组相比,** $P<0.01$;与 OGD/R 非转染组相比,* $P<0.05$,## $P<0.01$;与 miR-29b 激动剂和 OGD/R 联合处理组相比,\$ $P<0.05$

①免疫印迹分析 p53 蛋白表达,GAPDH 作为载体对照;②MTT 法检测细胞存活率;③LDH 漏出率检测

图 5 wt-p53 基因编码质粒 DNA 对细胞活性和 LDH 漏出率的影响

处理后 N2a 细胞中 miR-29b 水平显著降低。miR-29 研究目前主要集中在其对细胞凋亡信号通路的调控作用,miR-29b 是促凋亡还是抗凋亡尚存争议^[20]。脑缺血损伤中,局灶性脑缺血通过提高 Bcl2L2 (BCL-w 蛋白,一种抗凋亡的 Bcl-2 蛋白家族成员)水平^[27]造成 miR-29 水平下调,促进神经细胞凋亡;但在神经细胞成熟过程^[22]中就前脑和局灶性脑缺血^[21,24]而言,miR-29 水平上调可发挥抗凋亡作用,保护神经细胞。因此,脑缺血损伤中 miR-29b 表达及功能有待确定。本研究发现在 N2a 细胞中,通过 miR-29b 激动剂造成 miR-29b 水平有效上调,能明显增加神经细胞活力并减少 LDH 漏出率,说明 miR-29 上调可保护神经细胞,对抗 OGD/R 诱导的细胞毒性。众所周知,由 Bcl-2(抗凋亡蛋白)、Bax(促凋亡蛋白)等组成的 Bcl-2 蛋白家族是一种通过调节线粒体膜完整性、功能和凋亡信号,针对细胞凋亡的主要调节因子。有研究报道 Bcl-2 蛋白成员过度表达能对体内和体外脑缺血损伤模型产生神经保护作用^[28]。本研究还发现 OGD/R 处理后能显著降低 caspase-3 活性和 Bcl-2 表达,增加 Bax 蛋白表达,但 miR-29b 激动剂可阻断这些细胞水平调节和变化,miR-29b 抑制剂则加剧上述反应;miR-29b 可通过调节 Bcl-2 家族发挥对脑缺血损伤的保护作用。

p53 蛋白是细胞周期阻滞、细胞凋亡、DNA 修复和遗传稳定性等一系列细胞应激反应的主要协调者。一些研究表明 p53 参与了脑卒中和神经退行性疾病造成的神经元细胞死亡^[29-30]。有研究显示,从急性脑损伤如脑缺血、癫痫及慢性神经变性疾病患者提取的脑组织样本中,p53 表达显著升高。本研究显示 N2a 细胞经 OGD/R 处理后,p53 表达显著增加,与上述报道结果一致。一些研究揭示了一种由 p53 介导独立转录时促凋亡的新机制^[31],p53 通过与 Bcl-2 家族多结构域成员相互作用直接参与内源性凋亡途径,维持线粒体功能^[32]。研究表明,某些神

经元损伤可经 p53、Bax、细胞色素 c 释放,线粒体功能障碍和 caspase 激活等常见信号转导通路发生;线粒体释放促凋亡蛋白前,p53 信号转导便可引起缺血神经细胞凋亡^[33],而导致 p53 信号转导和神经元死亡的上游事件尚不清楚。本研究发现,OGD/R 条件下 p53 水平上调伴随 Bax 水平上调和 Bcl-2 水平下调,wt-p53 质粒 DNA 转染可提高 p53 水平,与 miR-29b 激动剂和 OGD/R 联合处理组相比,明显降低 N2a 细胞活力并增加 LDH 漏出率。可见,经 OGD/R 诱导的 N2a 细胞损伤中 miR-29b 对 p53 介导的细胞凋亡有保护作用。

总之,miR-29b 水平在 OGD/R 模拟的脑缺血损伤模型中下调。miR-29b 激动剂可减轻 OGD/R 诱导的细胞毒性和细胞凋亡,miR-29b 抑制剂则加重 OGD/R 诱导的细胞毒性和细胞凋亡,表明 miR-29b 在 N2a 细胞 OGD/R 损伤起保护作用。此外,经 OGD/R 处理增加 p53 蛋白表达,可阻断 miR-29b 对 OGD/R 损伤的有益作用,故 p53 在 miR-29b 抑制 OGD/R 诱导 N2a 细胞凋亡中发挥了中介介导作用。miR-29b 可调控 p53 途径介导的体外脑缺血性损伤模型神经细胞凋亡,将来可能为缺血性脑卒中提供一潜在治疗靶点。

[参考文献]

- [1] Jeon JH, Jung HW, Jang HM, et al. Canine model of ischemic stroke with permanent middle cerebral artery occlusion: clinical features, magnetic resonance imaging, histopathology, and immunohistochemistry[J]. J Vet Sci, 2015, 16: 75-85.
- [2] 徐 瑞,殷世武,王 转,等.支架取栓与动脉溶栓治疗急性缺血性脑卒中比较[J].介入放射学杂志,2016,25: 1027-1030.
- [3] Shope SR, Schiemann DA. Passive secretory immunity against Salmonella typhimurium demonstrated with foster mouse pups[J]. J Med Microbiol, 1991, 35: 53-59.

- [4] 周腾飞, 朱良付, 李天晓. 影响急性缺血性脑卒中血管内治疗预后的相关因素分析[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26: 99-104.
- [5] Anrather J, Iadecola C. Inflammation and stroke: an overview [J]. *Neurotherapeutics*, 2016, 13: 661-670.
- [6] Zhang R, Xu M, Wang Y, et al. Nrf2-a promising therapeutic target for defending against oxidative stress in stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54: 6006-6017.
- [7] Rami A, Kogel D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra; two sides of the same coin?[J]. *Autophagy*, 2008, 4: 422-426.
- [8] Vousden KH, Lane DP. P53 in health and disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8: 275-283.
- [9] Andrabi SA, Kang HC, Haince JF, et al. Iduna protects the brain from glutamate excitotoxicity and stroke by interfering with poly(ADP-ribose) polymer-induced cell death[J]. *Nat Med*, 2011, 17: 692-699.
- [10] Tu W, Xu X, Peng L, et al. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke [J]. *Cell*, 2010, 140: 222-234.
- [11] Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly (ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia[J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 10262-10272.
- [12] Ouyang YB, Stary CM, Yang GY, et al. microRNAs: innovative targets for cerebral ischemia and stroke[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14: 90-101.
- [13] Guo Y, Luo F, Liu Q, et al. Regulatory non-coding RNAs in acute myocardial infarction[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 21: 1013-1023.
- [14] Fujii S, Sugiura T, Dohi Y, et al. MicroRNA in atherothrombosis: is it useful as a disease marker?[J]. *Thromb J*, 2016, 14(Suppl 1): 21.
- [15] Zhu K, Liu D, Lai H, et al. Developing miRNA therapeutics for cardiac repair in ischemic heart disease[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8: E918-E927.
- [16] Ouyang YB, Giffard RG. MicroRNAs regulate the chaperone network in cerebral ischemia[J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4: 693-703.
- [17] Yin KJ, Deng Z, Huang H, et al. miR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 38: 17-26.
- [18] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30: 92-101.
- [19] Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of microRNAs in young stroke patients[J]. *PLoS One*, 2009, 4: e7689.
- [20] Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL?[J]. *Oncotarget*, 2010, 1: 224-227.
- [21] Ouyang YB, Xu L, Lu Y, et al. Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia[J]. *Glia*, 2013, 61: 1784-1794.
- [22] Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, et al. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3-only genes to restrict apoptosis[J]. *Genes Dev*, 2011, 25: 125-130.
- [23] Ye Y, Perez-Polo JR, Qian J, et al. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43: 534-542.
- [24] Khanna S, Rink C, Ghoorkhanian R, et al. Loss of miR-29b following acute ischemic stroke contributes to neural cell death and infarct size[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33: 1197-1206.
- [25] Li L, Stary CM. Targeting glial mitochondrial function for protection from cerebral ischemia: relevance, mechanisms, and the role of microRNAs[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 6032306.
- [26] Ouyang YB, Xu L, Yue S, et al. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 565: 53-58.
- [27] Shi G, Liu Y, Liu T, et al. Upregulated miR-29b promotes neuronal cell death by inhibiting Bcl2L2 after ischemic brain injury[J]. *Exp Brain Res*, 2012, 216: 225-230.
- [28] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity[J]. *J Neurochem*, 2003, 85: 1026-1036.
- [29] Endo H, Kamada H, Nito C, et al. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats[J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 7974-7983.
- [30] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Modulation of p53 degradation via MDM2-mediated ubiquitylation and the ubiquitin-proteasome system during reperfusion after stroke: role of oxidative stress[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 267-280.
- [31] Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1787: 414-420.
- [32] Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87: 99-163.
- [33] Chong MJ, Murray MR, Gosink EC, et al. Atm and Bax cooperate in ionizing radiation-induced apoptosis in the central nervous system[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 889-894.

(收稿日期:2017-05-22)

(本文编辑:边 皓)