

• 实验研究 Experimental research •

N6-甲基腺苷甲基化对小鼠脑缺血-再灌注损伤中微小核糖核酸-155 表达和脑损伤的调控作用

何欣燃, 王黎洲, 许敏, 安天志, 周石, 李兴

【摘要】目的 研究 N6-甲基腺苷(m6A)甲基化对小鼠脑缺血-再灌注损伤(CIRI)模型中微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)-155 表达和脑损伤的调控作用。**方法** 栓线法构建小鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型,实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)分析 MCAO 小鼠脑细胞中 pri-miR-155、pre-miR-155 及 miR-155 表达水平,检测建模 24 h 小鼠脑组织细胞中甲基转移酶样蛋白(METTL3)、miR-155 mRNA 表达水平及蛋白表达水平。用慢病毒转染构建 METTL3 高表达和低表达小鼠模型,再构建 MCAO 模型,检测右脑组织中 pri-miR-155、pre-miR-155 和 miR-155 表达水平。**结果** MCAO 小鼠脑组织细胞中 pri-miR-155 表达水平显著降低($P=0.009$),pre-miR-155、miR-155 表达水平显著升高($P=0.007, 0.0008$);MCAO 建模 24 h 小鼠右脑中 METTL3、miR-155 表达水平均升高($P<0.05$),METTL3 蛋白表达水平也随 miR-155 剂量增加而升高,但 METTL14、肾母细胞瘤 1 相关蛋白(WTAP) mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$);小鼠右脑组织中 METTL3 过表达显著降低 pri-miR-155 表达水平($P=0.008$),同时升高 pre-miR-155、miR-155 表达水平($P=0.04, 0.009$);METTL3 在细胞中沉默表达显著升高 pri-miR-155 表达水平($P=0.006$),同时降低 pre-miR-155、miR-155 表达水平($P=0.03, 0.009$)。**结论** CIRI 中 METTL3 异常表达可增强 m6A 修饰作用,促进 pre-miR-155 成熟,进而升高 miR-155 表达水平。这可能为未来缺血性脑卒中患者提供一新治疗策略。

【关键词】 缺血-再灌注损伤;甲基转移酶样蛋白 3;N6-甲基腺苷;脑卒中;微小核糖核酸-155

中图分类号:R743 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-10-1020-05

Regulatory effect of m6A methylation on miR-155 expression and brain injury in experimental mouse models with cerebral ischemia-reperfusion injury HE Xinran, WANG Lizhou, XU Min, AN Tianzhi, ZHOU Shi, LI Xing. School of Medical Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: LI Xing, E-mail: lixing111@sina.com

【Abstract】Objective To explore the regulatory effect of m6A methylation on miR-155 expression and brain injury in experimental mouse models with cerebral ischemia-reperfusion injury(CIRI). **Methods** The mouse model of middle cerebral artery occlusion(MCAO) was established with suture line ligation method. Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) was used to analyze the expression levels of pri-miR-155, pre-miR-155 and miR-155 in MCAO mouse brain cells. The expression levels of methyltransferase like protein(METTL3), miR-155 mRNA and protein in mouse brain tissue cells were detected 24 hours after MCAO modeling. Lentiviral transfection was used to construct high and low expression mouse models of METTL3, and then MCAO models were constructed to detect the expression levels of pri-miR-155, pre-miR-155 and miR-155 in the right brain tissue of experimental mice. **Results** The expression level of pri-miR-155 in the brain cells of MCAO mice was significantly reduced($P=0.009$), while the expression levels of pre-miR-155 and miR-155 were significantly increased($P=0.007$ and $P=0.0008$ respectively). Twenty-four hours after MCAO modeling, the expression levels of METTL3 and miR-155 in the right brain of mice increased significantly

($P<0.05$), and the protein expression level of METTL3 also showed an obvious increase with the increasing of used dose of miR-155, while the mRNA expression levels of METTL3 and Wilm tumor 1-associated protein (WTAP) showed no remarkable difference($P>0.05$). The over-expression of METTL3 in the right brain tissue of mice significantly lowered the expression level of pri-miR-155($P=0.008$), and meanwhile increased the expression level of pre-miR-155 and miR-155 ($P=0.04$ and $P=0.009$ respectively). The silent expression of METTL3 in the cells strikingly increased the expression level of pri-miR-155($P=0.006$), and meanwhile lowered the expression level of pre-miR-155 and miR-155 expression levels($P=0.03$ and 0.009 respectively).

Conclusion Abnormal expression of METTL3 in CIRI can enhance the modification of m6A, promote the maturation of pre-miR-155 and increase the expression level of miR-155. It may provide a new therapeutic strategy for the treatment of ischemic stroke in future. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 1020-1024)

【Key words】 ischemia-reperfusion injury; methyltransferase like protein 3; N6 methyladenosine; stroke; miR-155

目前急性缺血性脑卒中的主要治疗方式是静脉溶栓和血管内介入治疗,如血管内机械取栓、动脉溶栓和动脉成形术^[1]。然而研究表明,血管成功再通仍可发生脑缺血-再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI),造成更为严重的脑组织结构 and 功能损害^[2]。因此,探究 CIRI 潜在分子机制,开发新的治疗靶点以减轻脑损伤,是当前缺血性脑卒中研究的主要目标。目前已报道微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)在慢性心血管或肾脏疾病过程中的作用^[3]。有研究发现信使 RNA(mRNA)和长非编码 RNA,与 DNA 和组蛋白相似,可被化学修饰,最为重要的是 mRNA 转录后调控可影响关键蛋白表达和脑功能^[4]。RNA 最丰富的内部化学修饰 N6-甲基腺苷(N6-methyladenosine, m6A)是 mRNA 稳定性、蛋白表达和其他数个细胞过程的关键调节因子^[5],m6A 上的 pri-miRNA 可扰乱 miRNA 成熟^[6]。近期研究表明 mRNA 上 m6A 修饰是可逆的,并受催化甲基转移酶如甲基转移酶样蛋白(methyltransferase like protein, METTL)3, METTL4, METTL14 等催化^[7]。本课题组前期研究结果证实 miR-155 表达与脑部神经元凋亡呈负相关^[8],但 CIRI 过程中调控 miR-155 表达的上游机制即 m6A 甲基化是如何调控 pri-miRNA,从而调控 miR-155 集中尚未阐明。本研究旨在探讨 m6A 修饰与 miR-155 表达水平在 CIRI 形成过程中的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞和动物

小鼠脑神经瘤母细胞(N2a)及 293T 细胞均购自湖南丰晖生物科技有限公司。本研究采用的实验方案已获贵州医科大学动物实验伦理委员会批准,并按照动物实验指南进行。所用动物为 8 月龄 C57BL/6

雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 20~25 g。术前小鼠在 12 h 光照和 12 h 黑暗条件、控制温度(21 ± 2)℃、控制湿度 60%~75%环境中饲养 1 周,保证充足的实验室饲料和水。

1.2 主要实验试剂

miR-155 过表达质粒(上海吉凯基因医学科技公司),TRIzol 试剂、磷酸缓冲液(PBS)(美国 Thermo Fisher 科技公司), β -肌动蛋白(actin)内参抗体、miR-155 mimics、miR-155 inhibitor(英国 Abcam 公司),DL5000 marker、DL2000 marker、限制性内切酶(日本 TaKaRa 公司),质粒小量提取试剂盒(北京索莱宝科技公司),DH5 α 感受态细胞(北京擎科生物科技有限公司)。

1.3 小鼠 CIRI 建立和实验动物分组

实验组小鼠接受颈内动脉线栓法构建大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型^[9],建模成功 24 h 后开始实验;假手术组小鼠麻醉后,不置入线栓,不阻塞大脑中动脉,其余手术步骤与实验组相同。手术过程中及结束后均使用 37℃恒温电热板维持小鼠体温,直至其完全苏醒。共分为 7 组,分别为假手术组(sham)、缺血-再灌注模型组(MCAO)、缺血-再灌注模型右侧脑室注射对照组(LV-NEG)、缺血-再灌注模型右侧脑室注入 miR-155 过表达组(LV-miR-155)、缺血-再灌注模型右侧脑室注入对照质粒组(LV-minics)、缺血-再灌注模型右侧脑室注入 METTL3 高表达质粒组(LV-METTL3)、缺血-再灌注模型右侧脑室注入 METTL3 沉默表达质粒组(LV-METTL3-inhibitor),每组各 6 只鼠。

1.4 实时定量聚合酶链反应检测

采用 TRIzol 法从处死小鼠脑组织提取 RNA,以 39 μ L 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理水稀释 1 μ L RNA

(1:40 稀释), NanoDrop 仪测定样品浓度和纯度, A260/A280 比值应在 1.6 以上。总 RNA 逆转录。取聚合酶链反应(PCR)混合液 20 μ L, 转移至各孔中; 将 PCR 板装入实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)仪, 按照如下程序运行: 95 $^{\circ}$ C 2 min, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 循环次数 40 次。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 并用 Image-Pro Plus 图像分析软件计算吸光度值, 以与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)相对值记录结果。2- $\Delta\Delta$ Ct 法分析基因相对表达^[10], 计算公式: $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct(MCAO 组) - Δ Ct(对照组)。引物序列(苏州金唯智生物科技有限公司)如下: miR-155-F: 5'-GCTTCGGTTAATGCTAATCGTG-3'; miR-155-R: 5'-CAGAGCAGGGTCCGAGGTA-3'; GAPDH 上游引物 5'-GGCAAGTTCAACGGCACAG-3', 下游引物 5'-ACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'。

1.5 慢病毒转染检测

为了构建带 His 标签的慢病毒表达载体, 采用 PCDH 载体系列行目的基因 miR-155 和 METTL3 过表达, PLKO 系列行目的基因 miR-155 和 METTL3 敲除。质粒合成由外包公司合作完成。采用 293T 细胞进行慢病毒包装, 大肠杆菌 DH5 α 行扩增慢病毒包装的质粒。细胞准备好后取 5~10 μ g/mL 聚凝胺作为转染浓度, 转染后 24 h 吸取慢病毒转染液中原有培养基, 加入新鲜培养基继续培养 24 h, 加入 2 μ g/mL 嘌呤霉素行选择性培养细胞 24 h, 共计培养 3 代即可得到含有慢病毒表达质粒的细胞; 将转染慢病毒载体的细胞通过胰酶进行消化, 然后加入人工脑脊液中, 注射至小鼠右脑室; 转染后 5 d 行造模检测, RT-qPCR 检测转染结果。

1.6 蛋白质印迹分析

细胞裂解液 PBS 对小鼠右脑组织样本进行裂解, 4 $^{\circ}$ C、12 000 \times g 离心 2~3 min, 收集上清液, Bradford 法检测相关蛋白浓度; 蛋白质经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 然后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上; 按蛋白印迹位置剪开 PVDF 膜, 每张膜加入一抗稀释液 2 mL; 含一抗溶液的封闭液滴加于摇床塑料膜上, 将 Western 膜从封闭液中取出, 滤纸贴角稍吸干, 正面朝下贴在一抗上, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 一抗试剂孵育结束后, 用含 Tween $^{\circ}$ 20 磷酸盐缓冲液(PBST)对膜再次清洗, 将二抗试剂按 1:1 000 比例加入胶体溶液中, 将膜与一抗在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后与偶联的二抗在室温下孵育 2 h; PBST 对膜再次清洗; 最后置于 Super ECL Plus 超敏发光液中 2 min, 凝胶成像仪中成像。

Image Lab 软件分析蛋白条带灰度值, β -actin 作为对照, 室温下在中封闭 1 h 后, 通过增强化学发光检测试剂盒显示目标蛋白条带。

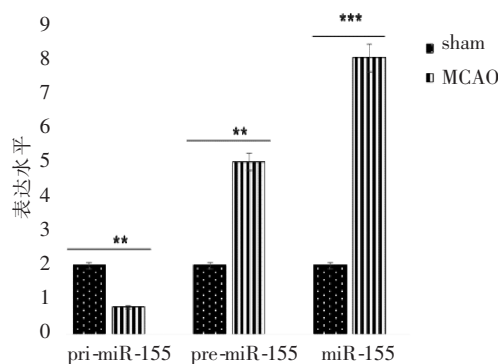
1.7 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对所有数据进行统计学分析, 所有数值均取 3 次独立实验 $\bar{x} \pm s$, 统计分析用 *t* 检验, 非正态分布数据用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MCAO 模型脑细胞中 miR-155 表达水平

RT-qPCR 检测显示, MCAO 组小鼠脑组织细胞中 pri-miR-155 表达水平与 sham 组相比显著降低($P=0.009$), 但 pre-miR-155、miR-155 表达显著升高($P=0.007$ 、 0.0008), 见图 1。



与 sham 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 1 MCAO 组和 sham 组小鼠脑组织中 miR-155 表达水平

2.2 METTL 复合物在 MACO 模型中表达水平

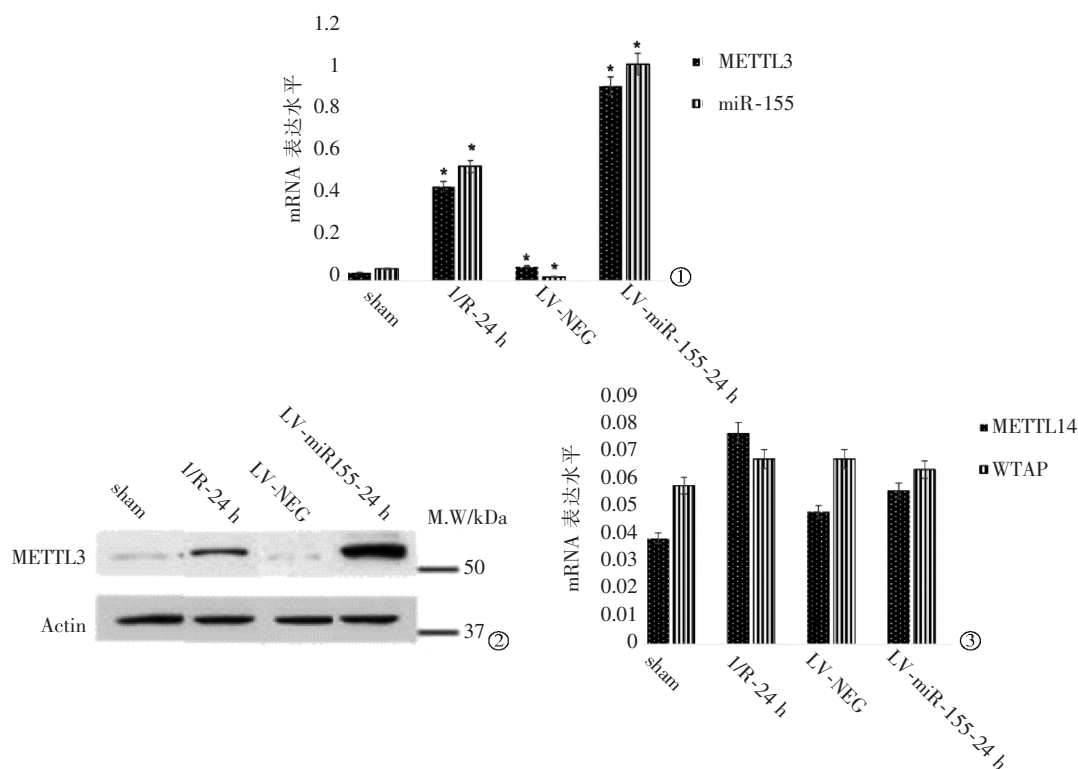
建模 24 h 检测显示, MACO 模型鼠右脑组织细胞中 METTL3、miR-155 表达水平均升高($P < 0.05$) (图 2①), METTL3 蛋白表达水平随 miR-155 剂量增加而升高(图 2②), 但 METTL14 mRNA 与肾母细胞瘤 1 相关蛋白(WTAP)mRNA 表达水平, 差异均无统计学意义($P > 0.05$) (图 2③)

2.3 METTL3 过表达对 miR-155 水平的影响

慢病毒过表达质粒 LV-METTL3 组细胞中 METTL3 过表达与对照质粒 LV-minics 组相比, 使 pri-miR-155 表达水平显著降低($P=0.008$), 同时升高 pre-miR-155 和 miR-155 表达水平($P=0.04$ 、 0.009), 差异均有统计学意义(图 3)。

2.4 METTL3 低表达对 miR-155 水平的影响

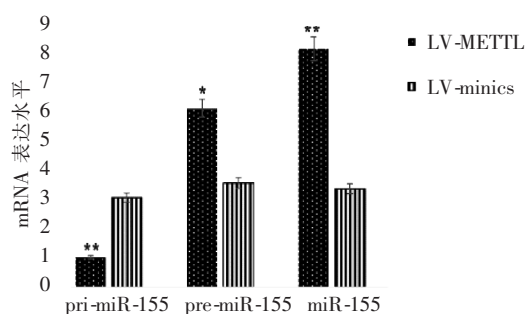
慢病毒沉默表达质粒 LV-METTL3-inhibitor 组细胞中 METTL3 沉默表达与对照质粒 LV-minics 组相比, 显著升高 pri-miR-155 表达水平($P=0.006$),



与 sham 组相比, * $P < 0.05$

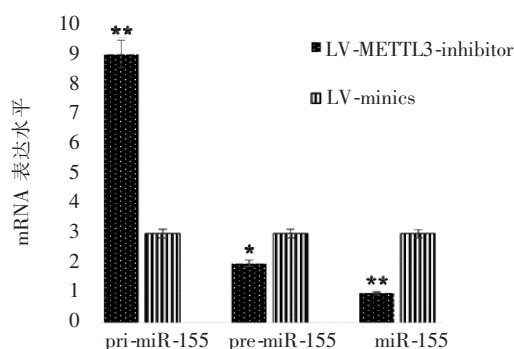
①METTL3 mRNA 表达; ②METTL3 蛋白表达; ③METTL14、WTAP mRNA 表达

图 2 METTL3、METTL14 及 WTAP 在 MACO 模型中表达水平分析



与 LV-minics 相比, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

图 3 METTL3 过表达对小鼠 CIRC 过程中 miR-155 水平的影响



与 LV-minics 相比, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

图 4 沉默表达 METTL3 对小鼠 CIRC 过程中 miR-155 水平的影响

同时降低 pre-miR-155、miR-155 表达水平($P=0.03$ 、 0.009), 差异均有统计学意义(图 4)。

3 讨论

近年来, m6A 修饰成为表观遗传研究热点。m6A 修饰参与哺乳动物许多生物学过程, 如 RNA 剪接、蛋白质翻译和干细胞更新^[11]。Li 等^[12]研究报道 m6A 上 METTL3 可通过与翻译起始密码子相互作用促进翻译, 进一步影响癌细胞生长、存活和侵袭。Visvanathan 等^[13]研究显示, METTL3 介导的 m6A 修饰在神经胶质瘤细胞维持和去分化中具有关键

作用, 揭示了 METTL3 作为胶质母细胞瘤治疗中潜在分子靶点的基本作用。上述研究虽然证实 METTL3 在肿瘤细胞中的重要调节机制, 但目前尚无针对 CIRC 过程中 M6A 修饰影响的报道, 也很少有研究关注 METTL3 在 CIRC 发生中的潜在机制^[14], 因此本研究探讨 METTL3 在 CIRC 中对 miR-155 是否存在调控作用。

有研究报道, miR-155 体内表达能显著改善脑缺血症状, 增加血管内皮通透性^[3]。有研究证实 miR-155 表达水平变化与脑损伤程度密切相关,

miR-155 表达升高与脑损伤程度加剧相关^[15]。Wang 等^[16]研究发现,抑制脑细胞中 miR-155-5p、pri-miR-155 和 pre-miR-155 表达,可改善大鼠脑缺血损伤程度,提示 miR-155 可能是一种新型脑血管病治疗剂。该结论为本研究结果提供了强有力佐证,表明 miR-155 在脑损伤中具有重要作用。本课题组先前研究发现 miR-155 在 CIRI 过程中异常表达^[8]。本研究将 pri-miR-155 中异常 m6A 修饰与 CIRI 发生和发展联系起来,结果提示 MCAO 模型小鼠脑组织细胞中 miR-155 水平可能是 pri-miR-155 加工和成熟异常造成的。

m6A 在 miRNA 成熟过程中起到关键的调控作用。m6A 甲基转移酶复合物由 METTL3、METTL14 和 WTAP 组成,其中 METTL3 过表达能增强 pri-miR 中 m6A 修饰,并加速其向 miRNA 成熟^[17]。本研究结果辅证了这一观点,证实 MCAO 建模 24 h 小鼠右脑中 METTL3 和 miR-155 表达均显著增高, METTL3 蛋白表达也随 miR-155 剂量增加而显著增加,但 METTL14 和 WTAP 并无显著差异;了解到 METTL3 和 miR-155 表达水平呈正相关后,为进一步探究 METTL3 表达对 pri-miR-155 和 pre-miR-155 表达的影响,又分别构建 METTL3 高表达和低表达小鼠模型,最终发现 METTL3 表达升高能促进 pre-miR-155 成熟,从而导致 miR-155 表达水平升高。

本研究结论认为,CIRI 过程中 METTL3 表达升高可促进 pre-miR-155 成熟,进而升高 miR-155 表达水平。这可能为未来缺血性脑卒中患者提供一新治疗策略。

[参考文献]

- [1] Powers WJ, Derdeyn CP, Biller J, et al. 2015 American Heart Association/American Stroke Association focused update of the 2013 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke regarding endovascular treatment: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2015, 46: 3020-3035.
- [2] Lesnefsky EJ, Chen Q, Tandler B, et al. Mitochondrial dysfunction and myocardial ischemia - reperfusion: implications for novel therapies[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57: 535-565.
- [3] Caballero-Garrido E, Pena-Philippides JC, Lordkipanidze T, et al. In vivo inhibition of miR-155 promotes recovery after experimental mouse stroke[J]. *J Neurosci*, 2015, 35: 12446-12464.
- [4] Tang C, Klukovich R, Peng H, et al. ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E325-E333.
- [5] Ma C, Chang M, Lü H, et al. RNA m6A methylation participates in regulation of postnatal development of the mouse cerebellum [J]. *Genome Biol*, 2018, 19: 68.
- [6] Han J, Wang JZ, Yang X, et al. METTL3 promote tumor proliferation of bladder cancer by accelerating pri-miR221/222 maturation in m6A-dependent manner[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 110.
- [7] Song H, Feng X, Zhang H, et al. METTL3 and ALKBH5 oppositely regulate m6A modification of TFEB mRNA, which dictates the fate of hypoxia/reoxygenation-treated cardiomyocytes [J]. *Autophagy*, 2019, 15: 1419-1437.
- [8] 房裕钞,王黎洲,黄学卿,等. 微小 RNA-155 通过 Notch 信号通路对脑缺血-再灌注损伤的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2019, 28:661-668.
- [9] Wang Y, Huang J, Ma Y, et al. MicroRNA-29b is a therapeutic target in cerebral ischemia associated with aquaporin 4[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35: 1977-1984.
- [10] 张言,王黎洲,杨登科,等. 高密度脂蛋白抑制 NLRP3 对大鼠脑缺血-再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *介入放射学杂志*, 2019, 28:759-764.
- [11] Patil DP, Chen CK, Pickering BF, et al. m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression[J]. *Nature*, 2016, 537: 369-373.
- [12] Li T, Hu PS, Zuo Z, et al. METTL3 facilitates tumor progression via an m6A - IGF2BP2 - dependent mechanism in colorectal carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2019, 18: 112.
- [13] Visvanathan A, Patil V, Arora A, et al. Essential role of METTL3-mediated m6A modification in glioma stem-like cells maintenance and radioresistance[J]. *Oncogene*, 2018, 37: 522-533.
- [14] 方舒东,朱也森. 脑缺血再灌注损伤的病理生理研究进展[J]. *医学综述*, 2006, 12:1114-1116.
- [15] Caballero-Garrido E, Pena-Philippides JC, Lordkipanidze T, et al. In vivo inhibition of miR-155 promotes recovery after experimental mouse stroke[J]. *J Neurosci*, 2015, 35:12446-12464.
- [16] Wang J, Li D, Hou J, et al. Protective effects of geniposide and ginsenoside Rg1 combination treatment on rats following cerebral ischemia are mediated via microglial microRNA-155-5p inhibition [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17: 3186-3193.
- [17] Huang H, Weng H, Sun W, et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 285-295.

(收稿日期:2020-12-01)

(本文编辑:秋实)