

- 2020, 15(5):589-591.
- [18] DEVUYST O, PATTARO C. The UMOD locus: insights into the pathogenesis and prognosis of kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2018, 29(3):713-726.
- [19] 艾文婷, 符莹莹, 姜保周. 高血压早期肾损伤患者血清尿调节素变化及临床意义[J]. 临床急诊杂志, 2018, 19(9):611-614.
- [20] 赵丽娟. 尿调节素在妊娠期高血压疾病合并急性肾损伤患者外周血中的表达及临床意义[J]. 中国计划生育和妇产科, 2020, 12(11):85-88.
- [21] 卢翠莲, 窦立冬, 纪红. 血清可溶性尿激酶型纤溶酶原激活物受体对老年慢性阻塞性肺疾病急性加重期临床诊断的意义[J]. 标记免疫分析与临床, 2019, 26(8):1294-1297, 1328.
- [22] 王媛媛, 董林春, 范秋灵, 等. 不同病理类型成人肾病综合征患者血清可溶性尿激酶型纤溶酶原激活物受体水平及意义[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(8):687-691.
- [23] 张静静, 王兆君, 陶冬英, 等. 原发性肾病综合征患儿血清 sTREM-1、suPAR 的表达及临床意义[J]. 海南医学, 2019, 30(20):2640-2643.
- [24] ZHOU YJ, REN JM, LI P, et al. Expression of urokinase-type plasminogen activator receptor and its soluble form in type 2 diabetic kidney disease[J]. Arch Med Res, 2019, 50(5):249-256.
- (收稿日期:2022-05-13, 修回日期:2022-07-14)

引用本文:刘美苓,安影丹.LncRNA MIAT靶向miR-204对氧糖剥夺/复氧诱导PC12细胞损伤的保护作用[J].安徽医药, 2024, 28(1):153-158.DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2024.01.032.

◇临床医学◇



LncRNA MIAT靶向miR-204对氧糖剥夺/复氧诱导PC12细胞损伤的保护作用

刘美苓, 安影丹

作者单位:廊坊市第四人民医院神经内科, 河北 廊坊 065700

基金项目:河北省医学科研课题计划(20221592)

摘要 **目的** 探究氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株PC12细胞损伤的分子调控机制, 以期临床上靶向治疗缺血性卒中提供新的思路。**方法** 该研究于2021年6—12月进行, 购买PC12细胞后对其进行OGD/R诱导, 在诱导后的细胞中分别转染长链非编码RNA(LncRNA)心肌梗死相关转录本(MIAT)过表达载体及微RNA-204模拟物(miR-204 mimic), 以对应的载体阴性对照(pcDNA3.1-NC)或模拟物阴性对照(mimic-NC)作为阴性对照, 以未转染PC12细胞作为空白对照。使用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测LncRNA MIAT与miR-204的表达; CCK-8与流式细胞术分别检测细胞活力与凋亡; Elisa试剂盒检测炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-1 β , 抗炎性因子IL-10的表达。RNA下拉检测MIAT在miR-204上的富集; 通过starbase预测LncRNA MIAT与miR-204的结合位点, 随后采取双荧光素酶报告实验验证LncRNA MIAT与miR-204的靶向结合。**结果** 与空白对照组[1.011 $\pm$ 0.113, 1.001 $\pm$ 0.002, 1.473 $\pm$ 0.224, (8.16 $\pm$ 0.84)%, (96.75 $\pm$ 6.73)ng/L, (46.28 $\pm$ 2.84)ng/L, (39.45 $\pm$ 1.45)ng/L]相比, OGD/R组细胞中LncRNA MIAT表达显著降低(0.362 $\pm$ 0.085), miR-204表达显著升高(2.234 $\pm$ 0.306), 细胞活力显著降低0.806 $\pm$ 0.115, 凋亡率显著增加[(28.25 $\pm$ 4.13)%]; 炎症因子IL-6[(525.19 $\pm$ 15.62)ng/L]、IL-1 β [(292.54 $\pm$ 19.54)ng/L]的表达显著增加, 抗炎性因子IL-10的表达(14.33 $\pm$ 2.36)ng/L显著降低(均 P <0.01)。与阴性对照组相比[2.198 $\pm$ 0.324, 0.811 $\pm$ 0.117, (8.16 $\pm$ 0.84)%, (96.75 $\pm$ 6.73)ng/L, (46.28 $\pm$ 2.84)ng/L, (39.45 $\pm$ 1.45)ng/L], MIAT过表达后OGD/R细胞中miR-204表达显著降低1.373 $\pm$ 0.268, 细胞活力显著升高1.137 $\pm$ 0.116, 凋亡率显著降低(28.25 $\pm$ 4.13)%; 炎症因子IL-6(525.19 $\pm$ 15.62)ng/L、IL-1 β (292.54 $\pm$ 19.54)ng/L的表达显著降低, 抗炎性因子IL-10(14.33 $\pm$ 2.36)ng/L的表达显著升高(均 P <0.01)。与MIAT过表达的OGD/R细胞相比, MIAT过表达载体和miR-204模型物共转染的OGD/R细胞中miR-204表达显著升高, 细胞活力显著降低, 凋亡率显著升高; 炎症因子IL-6、IL-1 β 的表达显著升高, 抗炎性因子IL-10的表达显著降低(均 P <0.01)。**结论** 在OGD/R诱导的PC12细胞中, 低表达LncRNA MIAT促进miR-204表达上调, 最终促进细胞损伤。

关键词 再灌注损伤; PC12细胞; 缺氧缺血, 脑; 细胞低氧; 卒中; 长链非编码RNA; 心肌梗死相关转录本(MIAT); 微RNA-204; 细胞凋亡

Protective effect of lncRNA MIAT-targeted miR-204 against OGD/R-induced PC12 cell injury

LIU Meiling, AN Yingdan

Author Affiliation: Department of Neurology, The Fourth People's Hospital of Langfang, Langfang, Hebei 065700, China

Abstract Objective To investigate the molecular regulatory mechanism of oxygen - glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced PC12 cell injury in a rat adrenal medullary pheochromocytoma differentiated cell line, with the aim of providing new ideas for clinically targeted therapy of ischemic stroke. **Methods** The study was conducted from June to December 2021. PC12 cells were purchased and subjected to OGD/R induction, in which the induced cells were transfected with the long noncoding RNA (lncRNA) myocardial infarction-associated transcript (MIAT) overexpression vector and microRNA-204 mimic (miR-204 mimic), respectively, and a negative control of the corresponding vector (pcDNA3.1-NC) or mimic negative control (mimic-NC) as a negative control and untransfected PC12 cells as a blank control. The expression of lncRNA MIAT and miR-204 was detected using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR); cell viability and apoptosis were detected by CCK-8 and flow cytometry, respectively; and the expression of the inflammatory factors interleukin (IL)-6 and IL-1, and the anti-inflammatory factor IL-10 was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The enrichment of the lncRNA MIAT on miR-204 was detected by RNA pull-down. The binding sites of lncRNA MIAT to miR-204 were predicted by starBase, and subsequently a dual-luciferase reporter assay was taken to verify the targeted binding of lncRNA MIAT to miR-204. **Results** Compared with the blank control group [1.011 ± 0.113 , 1.001 ± 0.002 , 1.473 ± 0.224 , $(8.16 \pm 0.84)\%$, (96.75 ± 6.73) ng/L, (46.28 ± 2.84) ng/L, and (39.45 ± 1.45) ng/L], the expression of the lncRNA MIAT was significantly decreased (0.362 ± 0.085), miR-204 expression was significantly increased (2.234 ± 0.306), cell viability was significantly decreased (0.806 ± 0.115), and the apoptosis rate was significantly increased ($28.25 \pm 4.13\%$) in OGD/R group. The expression of the inflammatory factors IL-6 (525.19 ± 15.62) ng/L and IL-1 (292.54 ± 19.54) ng/L was significantly increased, and the expression of anti-inflammatory factor IL-10 (14.33 ± 2.36) ng/L was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with the negative control group [2.198 ± 0.324 , 0.811 ± 0.117 , $(8.16 \pm 0.84)\%$, (96.75 ± 6.73) ng/L, (46.28 ± 2.84) ng/L, (39.45 ± 1.45) ng/L], the expression of miR-204 was significantly reduced in OGD/R cells after MIAT overexpression (1.373 ± 0.268), cell viability was significantly increased (1.137 ± 0.116), and the apoptosis rate was significantly decreased ($28.25 \pm 4.13\%$). The expression of the inflammatory factors IL-6 (525.19 ± 15.62) and IL-1 (292.54 ± 19.54) was significantly decreased, and the expression of the anti-inflammatory factor IL-10 (14.33 ± 2.36) expression was significantly higher ($P < 0.01$). Compared with MIAT-overexpressing OGD/R cells, miR-204 expression was significantly higher, cell viability was significantly lower, and apoptosis rate was significantly higher in OGD/R cells cotransfected with the-MIAT overexpressing vector and miR-204 model. The expression of the inflammatory factors IL-6 and IL-1 was significantly elevated, and the expression of the anti-inflammatory factor IL-10 was significantly reduced ($P < 0.01$). **Conclusion** In OGD/R-induced PC12 cells, low expression of the lncRNA MIAT promotes the upregulation of miR-204 expression and ultimately cell injury.

Keywords Reperfusion injury; PC12 cells; Hypoxia-ischemia, brain; Cell hypoxia; Stroke; Long noncoding RNA; Myocardial infarction-associated transcript (MIAT); MicroRNA-204; Apoptosis

中风是最常见的脑血管疾病类型之一,由于其高发病率、致残率和病死率^[1],已成为世界范围内的主要神经系统问题。缺血性脑卒中(IS)是脑卒中的主要亚型,被认为是全球成年人发病和死亡的主要原因^[2],仅在2016年就造成约550万人死亡^[3]。IS的主要症状包括面部麻木、记忆力减退、说话困难和部分瘫痪^[4]。在过去的几年里,IS的发病率不断上升,这可能是由多种因素造成的,例如高胆固醇血症、高血压、肥胖和糖尿病^[5]。虽然包括溶栓治疗、经皮血管内介入治疗和药物治疗在内的传统临床治疗已取得一定作用,但不理想的后续效果促使寻求新的缓解IS策略。

IS本质上是由恢复到缺血区域的血流引起的脑损伤,这会促进进一步的缺血性器官损伤。虽然脑血再灌注可以减轻葡萄糖和氧气剥夺,但再灌注过程会加剧炎症反应、氧化应激和细胞凋亡,从而进一步加剧再灌注引起的脑损伤进展^[6]。炎症和细胞凋亡是参与缺血性卒中进展的关键,据报道,抑制炎症可在一定程度上减少神经组织损伤^[7]。因此,抑制炎症和细胞凋亡可能是治疗脑缺血/再灌注

损伤的有效策略^[8]。长链非编码RNA(lncRNA)是一类长度大于200个核苷酸的非编码RNA,可以在转录前、转录中和转录后水平调节蛋白质编码基因的表达。lncRNAs是近年来的研究热点,之前的大量研究报道lncRNAs可能与心脏、大脑、肝脏、肾脏和血管内皮组织等几个重要器官的IRI的病理过程有关^[9]。lncRNA MIAT(心肌梗死相关转录本),也称为RNCR2(视网膜非编码RNA2),是一种参与多种疾病的lncRNA,如心肌梗死、糖尿病并发症、缺血性卒中和癌症^[10-11]。曾有研究报道心肌梗死相关转录本(MIAT)通过海绵化微RNA-330-5p(miR-330-5p)并激活下游肿瘤坏死因子受体相关因子6 (TRAF6)/核因子- κ B(NF- κ B)信号传导来增强脓毒症诱导的心脏损伤中的炎症和氧化应激^[12]。因此,可以推测MIAT可能是介导缺血/再灌注(I/R)损伤的关键lncRNA。

2021年6—12月进行本研究,旨在探究lncRNA MIAT在氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导PC12细胞损伤的分子调控机制,为缓解IS提供治疗策略。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与模型建立 PC12细胞购自 ATCC (USA),并在含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 氏改良 eagle 培养基 (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 中培养。为了建立缺血样条件,暴露于缺氧条件的无葡萄糖培养基中的细胞:1% 氧气,5% 二氧化碳和 94% 的氮气 4 h。然后将细胞与含有 4.5 g/L 葡萄糖的正常培养基一起孵育,并复氧 24 h。

1.2 PC12 细胞处理 LncRNA MIAT 过表达载体 (pcDNA3.1-LncRNA MIAT) 及其阴性对照 pcDNA3.1-NC、miR-204 mimic 及其阴性对照 mimic-NC 均购自上海吉玛制药技术有限公司(上海,中国),通过 Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 以 50 nmol 作为终浓度转染至 PC12 细胞中,命名为:过表达 MIAT (oe-MIAT) 和相应的阴性对照 (oe-NC),以及 miR-124 模拟物 (miR-124 mimic) 和相应的阴性对照 (mimic NC),测定转染效率,24 h 后进行后续实验。

1.3 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 利用 Bio-Rad 软件 (California, USA) 确定最佳引物对,并委托上海生工合成。用 Promega 公司 (USA) 的 RNA 提取试剂盒从各组细胞中提取总 RNA。用 PrimerScript RT Master Mix (Takara, Dalian, China) 将 1 μ g RNA 反转录为 cDNA。根据说明书用 SYBR Premix Ex Taq (Takara, Dalian, China) 在 ABI 7500 (ABI, American) 上进行 qRT-PCR,以 GAPDH 为内参,检测 MIAT 的相对表达水平,以 U6 为内参检测 miR-204 的相对表达水平。通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[13] 分别计算基因的相对表达量。PCR 引物如表 1。

表 1 引物序列

引物	序列
miR-204	正向 TAAAGTGCTTATAGTCAGGTAG
	反向 TGGTGTCTGAGAGTCG
U6	正向 CTCCTCGGGCAGCATATACT
	反向 ACGCTTCACATATACT
MIAT	正向 ATGAGCTTTAGGTGACTGCT
	反向 TCCATGCAAGCATCAATTTCA
GAPDH	正向 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	反向 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

注: miR-204 为微 RNA-204, MIAT 为心肌梗死相关转录本, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.4 CCK-8 将细胞接种到 96 孔板中 (每孔 3 000 个细胞) 并在 37 $^{\circ}$ C 下培养。分别培养 0、24、48 和 72 h 后,向每个孔中加入 10 μ L CCK-8 反应试剂 (上海碧云天生物技术有限公司)。37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h 后,检测 450 nm 处的吸光度 (OD₄₅₀),绘制细胞增殖曲线。

1.5 流式细胞术 使用凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 检测细胞凋亡率。简而言之,用 500 μ L 结合缓冲液 (含镁、钙、0.5% NaN₃ 和 1% FBS 的培养基) 将细胞混悬。向细胞中加入 Annexin V (5 μ L) 和 PI (10 μ L),并在室温下避光孵育 10 min。使用流式细胞仪 (Attune NxT; Thermo Fisher Scientific, Inc) 和 ModFiLT 软件 (4.1, Verity Software House) 检测并计算凋亡细胞百分比。

1.6 Elisa 检测 使用 Elisa 试剂盒 (Abcam, UK) 检测炎症相关因子 IL-6、IL-1 β 、IL-10 的含量。简而言之,使用试剂盒中裂解缓冲液重悬细胞,于 4 $^{\circ}$ C、1 500 $\times$ g 离心 15 min,取上清液,保存于 -70 $^{\circ}$ C。根据样品和标准品在 450 nm 的吸光度测定浓度。

1.7 RNA 下拉实验 生物素 (biotin) 标记的 miR-204 和阴性对照 (上海生工) 分别命名为 biotin-miR-204 和 biotin-NC,并分别与 PC12 细胞裂解物孵育。然后添加链霉亲和素涂层磁珠 (Life Technologies, Rockville, MD, USA)。使用生物素偶联 RNA 复合物 (Pierce Biotechnology, USA) 进行下拉实验,通过 qRT-PCR 检测 MIAT 的表达。

1.8 双萤光素酶报告实验 通过 Starbase 网站 (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 分析 MIAT 和 miR-204 的靶向结合位点,通过将结合序列及突变的序列分别克隆至萤光素酶载体 pGL3 (Pro-mega, Madison, WI, USA) 中来建立野生型 (MIAT-WT) 和突变型 (MIAT-MUT) 萤光素酶质粒。将 PC12 细胞接种在 6 孔板中 (2 $\times$ 10⁵ 细胞/孔)。孵育 24 h,按照说明书使用 LiPofectamine 2000 (11668-019, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 将构建好的萤光素酶载体与 mimic NC 或 miR-204 mimic (Shanghai Genechem Co., Ltd., Shanghai, China) (miRNA-mimic 30nmol) 同时转染到 PC12 细胞中。24 h 后,用 Dual-Lucy Assay Kit (Solarbio) 对萤光素酶活性进行评估。

1.9 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 21.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) 统计学软件进行处理,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。两组间数据采用独立样本 *t* 检验。多组间比较采用 one-way ANOVA 单因素方差分析,事后检验采用 Tukey's 多重比较检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MIAT 对 OGD/R 诱导的 PC12 损伤起保护作用 建立 PC12 细胞 OGD/R 模型,通过 qRT-PCR 检测 OGD/R 后 MIAT 的表达变化,观察到 OGD/R 下调了 MIAT 的表达 (*P* < 0.01)。进一步,通过 CCK-8、流式细胞术检测 OGD/R 诱导对细胞活力及凋亡的影响,观察到 OGD/R 降低了 PC12 的细胞活力,增加了细胞

的凋亡率($P<0.01$)。最后通过Elisa试剂盒检测 OGD/R 诱导上调了炎症因子白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 的含量,下调了抗炎性因子IL-10的含量(均 $P<0.01$)。在 OGD/R 诱导的 PC12 细胞中转染 pcDNA3.1-MIAT 上调其表达后($P<0.01$),上述细胞生物学改变均得到不同程度的逆转(均 $P<0.01$)。提示 MIAT 对 OGD/R 诱导的 PC12 细胞起保护作用。见表 2,3。

2.2 MIAT 可以靶向结合 miR-204 抑制其表达通过 miRcode([http:// www. mircode.org/](http://www.mircode.org/))预测了 LncRNA MIAT 下游靶向结合 miRNA,在这之中,有研究表明 miR-204 可以促进神经细胞的损伤^[14]。首先使用生物素化的 miR-204 探针来下拉 LncRNA MIAT,与对照组(1.001 $\pm$ 0.003)相比,MIAT 特异性富集在生物素标记的 miR-204 (14.984 $\pm$ 4.762)探针上($t=5.09$, $P=0.007$)。进一步通过双萤光素酶报告实验检测 LncRNA MIAT 与 miR-204 的靶向结合,与 NC 组相比,转染 miR-204 mimic 后,MIAT-WT 组的萤光素酶活性显著降低;而 MIAT-MUT 组的萤光素酶活性没有变化(表 4)。最后 qRT-PCR 检测了前述实验各组 PC12 细胞中的 miR-204 的表达,发现 OGD/R 上调了 miR-204 的表达,但转染 pcDNA3.1-MIAT 后,miR-204 表达显著降低(表 5)。提示 LncRNA MIAT 可以靶向 miR-204 抑制其表达。

2.3 上调 miR-204 可以部分逆转高表达 MIAT 对 OGD/R 诱导的 PC12 损伤保护在转染了 pcDNA3.1-MIAT 且 OGD/R 诱导的 PC12 细胞中共转染

表 4 双萤光素酶报告实验/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	萤光素酶活性	
		mimi-NC	miR-204 mimic
MIAT-wt	3	1.001 $\pm$ 0.003	1.002 $\pm$ 0.044
MIAT-mut	3	0.488 $\pm$ 0.053	0.997 $\pm$ 0.036
t, P 值		16.74, <0.001	0.15, 0.886

注: MIAT 为心肌梗死相关转录本, MIAT-wt 为野生型 MIAT, MIAT-mut 为突变型 MIAT, mimi-NC 为模拟物阴性对照, miR-204 mimic 为 miR-204 模拟物。

表 5 各组细胞中 miR-204 表达的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-204 表达(倍数变化)
Blank	3	1.001 $\pm$ 0.002
OGD/R	3	2.234 $\pm$ 0.306
t, P 值		6.98, 0.002
OGD/R+oe-NC	3	2.198 $\pm$ 0.324
OGD/R+oe-MIAT	3	1.373 $\pm$ 0.268
t, P 值		3.40, 0.027

注: Blank 为空白对照, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, MIAT 为心肌梗死相关转录本, oe-NC 为过表达载体阴性对照, oe-MIAT 为 MIAT 过表达载体。

了 miR-204 mimic, qRT-PCR 检测了转染效率($P<0.01$)。通过 CCK-8、流式细胞术检测 miR-204 对细胞活力及凋亡的影响,观察到上调 miR-204 降低了 PC12 的细胞活力,增加了细胞的凋亡率($P<0.01$)。最后通过 Elisa 试剂盒检测观察到高表达 miR-204 上调了炎症因子 IL-6、IL-1 β 的含量,下调了抗炎性因子 IL-10 的含量(均 $P<0.01$)。提示上调 miR-204

表 2 各组 MIAT 表达和细胞活力的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	MIAT 表达(倍数变化)	OD ₄₅₀ 值				
			0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Blank	3	1.011 $\pm$ 0.113	0.487 $\pm$ 0.061	0.636 $\pm$ 0.107	0.742 $\pm$ 0.132	1.263 $\pm$ 0.286	1.473 $\pm$ 0.224
OGD/R	3	0.362 $\pm$ 0.085	0.479 $\pm$ 0.057	0.627 $\pm$ 0.112	0.654 $\pm$ 0.114	0.684 $\pm$ 0.115	0.806 $\pm$ 0.115
t, P 值		7.95, 0.001	0.17, 0.876	0.10, 0.925	0.87, 0.431	3.25, 0.031	4.59, 0.010
OGD/R+oe-NC	3	0.374 $\pm$ 0.072	0.484 $\pm$ 0.068	0.619 $\pm$ 0.098	0.648 $\pm$ 0.116	0.697 $\pm$ 0.121	0.811 $\pm$ 0.117
OGD/R+oe-MIAT	3	0.763 $\pm$ 0.116	0.476 $\pm$ 0.076	0.631 $\pm$ 0.094	0.673 $\pm$ 0.113	0.987 $\pm$ 0.113	1.137 $\pm$ 0.116
t, P 值		4.94, 0.008	0.14, 0.989	0.15, 0.886	0.27, 0.802	3.03, 0.039	3.43, 0.027

注: Blank 为空白对照, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, MIAT 为心肌梗死相关转录本, OD₄₅₀ 为 450 nm 处的吸光度, oe-NC 为过表达载体阴性对照, oe-MIAT 为 MIAT 过表达载体。

表 3 各组细胞凋亡和炎症因子水平的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	细胞凋亡率/%	IL-6/(ng/L)	IL-1 β /(ng/L)	IL-10/(ng/L)
Blank	3	8.16 $\pm$ 0.84	96.75 $\pm$ 6.73	46.28 $\pm$ 2.84	39.45 $\pm$ 1.45
OGD/R	3	28.25 $\pm$ 4.13	525.19 $\pm$ 15.62	292.54 $\pm$ 19.54	14.33 $\pm$ 2.36
t, P 值		8.26, 0.001	43.63, <0.001	21.60, <0.001	15.71, <0.001
OGD/R+oe-NC	3	27.62 $\pm$ 4.62	511.37 $\pm$ 18.75	286.84 $\pm$ 16.85	14.12 $\pm$ 2.11
OGD/R+oe-MIAT	3	18.13 $\pm$ 2.88	318.95 $\pm$ 10.34	103.58 $\pm$ 12.73	31.87 $\pm$ 4.34
t, P 值		3.02, 0.039	15.56, <0.001	15.03, <0.001	6.37, 0.003

注: Blank 为空白对照, OGD/R 为氧糖剥夺/复氧, MIAT 为心肌梗死相关转录本, oe-NC 为过表达载体阴性对照, oe-MIAT 为 MIAT 过表达载体, IL-6 为白细胞介素-6, IL-1 β 为白细胞介素-1 β , IL-10 为白细胞介素-10。

的表达可以部分逆转高表达 MIAT 对 OGD/R 诱导的 PC12 损伤保护。见表 6,7。

3 讨论

缺血性卒中是临床常见的脑血管疾病,每年约有 15 万人遭受中风伤害,并且近 500 万人死于中风伤害^[15]。在缺血条件下,大脑不能获得足够的能量供应,包括血液和氧气,用于生物合成、细胞膜结构的维持和酶的正常功能,从而导致神经损伤^[16]。迄今为止,恢复缺血脑组织的血液和氧气供应被认为是缺血性卒中临床治疗中的首要问题^[15]。然而,血液和氧气供应可能导致缺血组织的病理损伤,导致不可逆的脑缺血/再灌注损伤^[17]。因此,保护神经细胞免受 I/R 诱导的损伤可能有益于中风的治疗^[18]。脑缺血/再灌注损伤的基本机制尚未完全阐明。研究表明,再灌注后大量自由基产生和自由基清除能力下降导致的氧化应激是脑缺血再灌注损伤的关键调节因素,过度的氧化应激可导致脂质过氧化、蛋白质硝化、核酸损伤以及神经细胞膜和细胞器的严重炎症^[19]。因此,防止氧化应激和炎症反应的有效策略显示出抑制脑 I/R 损伤的有益效果。

最近,LncRNA 的作用逐渐引起人们的广泛关注^[20],本研究的主要发现是确认 LncRNA MIAT 在缺血性卒中中的重要性并阐明其潜在机制。LncRNA 广泛存在于中枢神经系统中,在脑功能和神经系统疾病中发挥着重要作用。以往的研究表明,LncRNA MIAT 在神经损伤疾病中异常表达,例如,LncRNA MIAT 通过 miRNA-379 的竞争性结合调节视神经损伤,促进神经血管重塑^[21]和调节心脏休克蛋白 5 (HSPA5)^[22]; LncRNA MIAT 的过表达通过 RAD21 激活血管内皮生长因子 A 促进急性脊髓损伤的神经损伤修复^[23],Xu 等^[24]研究也发现 MIAT 能够通过调 miR-132/SIRT1 轴来抑制 1-甲基-4-苯基吡

啶鎓(MPP⁺)诱导的氧化应激损伤。在本研究发现 MIAT 在由 OGD/R 诱导的 PC12 细胞中高表达,还发现 LncRNA MIAT 的过表达对 OGD/R 诱导的 PC12 损伤具有保护作用,而进一步的机制研究表明,PC12 细胞中 LncRNA MIAT 的过表达通过抑制 miR-204 表达,上调细胞活力及降低细胞凋亡率,还减轻了细胞的炎症,从而减轻 PC12 细胞损伤。

多项报道揭示 miRNA 在调节神经发育中发挥重要作用。2015 年,研究人员首次提出 miR-27a 上调可减弱缺血再灌注诱导的血-脊髓屏障炎性损伤的证据^[25]。之后,Li 等^[26]发现抑制 miR-124-3p 可减弱脊髓缺血后的神经损伤。Li 等^[27]证实了 SCII 大鼠中 4 个差异表达的 microRNA (miR-22-3p、miR-743b-3p、miR-201-5p 和 miR144-5p) 及其共同靶基因,其中 miR-22-3p 上调,miR-743b-3p、miR-201-5p 和 miR-144-5p 下调。2006 年,miR-204 首次在胰腺内分泌和腺泡肿瘤中被发现,然后,它被证明是一种广泛表达的 miRNA,在甲状腺癌等细胞中异常表达^[28]。既往报道证明缺氧刺激神经元细胞表达 miR-204^[29],而本研究也发现 miR-204 在 OGD/R 诱导后高表达,且促进了 PC12 细胞的损伤。

总而言之,本研究探究了 OGD/R 诱导的 PC12 损伤的分子调控机制,为其治疗提供了新的思路,未来也将会在动物模型中对分子机制进行进一步的验证。

参考文献

- [1] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies [J]. Exp Neurol, 2021, 335: 113518.DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113518.
- [2] RODRIGO R, FERNÁNDEZ-GAJARDO R, GUTIÉRREZ R, et al. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities [J]. CNS Neurol Disord Drug Targets,

表 6 各组 miR-204 表达和 450 nm 处的吸光度(OD₄₅₀ 值)的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	miR-204 表达	OD ₄₅₀ 值				
			0 h	12 h	24 h	48 h	72 h
OGD/R+MIAT+mimic-NC	3	1.475±0.115	0.486±0.062	0.507±0.043	0.703±0.068	0.989±0.105	1.134±0.104
OGD/R+MIAT+miR-204 mimic	3	2.087±0.121	0.488±0.058	0.508±0.057	0.692±0.074	0.735±0.110	0.879±0.096
t,P 值		6.35,0.003	0.04,0.969	0.02,0.982	0.19,0.859	2.89,0.044	3.12,0.036

注:OGD/R 为氧糖剥夺/复氧,MIAT 为心肌梗死相关转录本,mimic-NC 为模拟物阴性对照,miR-204 mimic 为 miR-204 模拟物。

表 7 各组细胞凋亡率和炎症因子水平的比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	细胞凋亡率/%	IL-6/(ng/L)	IL-1β/(ng/L)	IL-10/(ng/L)
OGD/R+MIAT+mimic-NC	3	19.956±2.62	324.871±10.36	115.765±13.750	30.854±4.669
OGD/R+MIAT+miR-204 mimic	3	28.103±3.18	459.653±11.43	223.654±18.896	18.936±3.212
t,P 值		3.42,0.027	15.13,<0.001	8.00,0.001	3.64,0.022

注:OGD/R 为氧糖剥夺/复氧,MIAT 为心肌梗死相关转录本,mimic-NC 为模拟物阴性对照,miR-204 mimic 为 miR-204 模拟物,IL-6 为白细胞介素-6,IL-1β 为白细胞介素-1β,IL-10 为白细胞介素-10。

- 2013, 12(5): 698-714.
- [3] YANG Z, WEIAN C, SUSU H, et al. Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanisms [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 771: 145-151.
- [4] RANDOLPH SA. Ischemic stroke [J]. *Workplace Health Saf*, 2016, 64(9): 444.
- [5] GRYSIEWICZ RA, THOMAS K, PANDEY DK. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors[J]. *Neurol Clin*, 2008, 26(4): 871-895.
- [6] ZHAO Y, XU J. Sanggenon C ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and oxidative stress through regulating RhoA-ROCK signaling [J]. *Inflammation*, 2020, 43(4): 1476-1487.
- [7] ZHU H, HU S, LI Y, et al. Interleukins and ischemic stroke[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 828447. DOI: 10.3389/fimmu.2022.828447.
- [8] ZHI SM, FANG GX, XIE XM, et al. Melatonin reduces OGD/R-induced neuron injury by regulating redox/inflammation/apoptosis signaling [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(3): 1524-1536.
- [9] YOON JH, ABDELMOHSEN K, GOROSPE M. Functional interactions among microRNAs and long noncoding RNAs [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 34: 9-14. DOI: 10.1016/j.semedb.2014.05.015.
- [10] FASOLO F, JIN H, WINSKI G, et al. Long Noncoding RNA MIAT controls advanced atherosclerotic lesion formation and plaque destabilization[J]. *Circulation*, 2021, 144(19): 1567-1583.
- [11] ALFAIFI M, ALI BEG MM, ALSHAHRANI MY, et al. Circulating long non-coding RNAs NKILA, NEAT1, MALAT1, and MIAT expression and their association in type 2 diabetes mellitus[J/OL]. *BMJ Open Diabetes Res Care*, 2021, 9(1): e001821. DOI: 10.1136/bmjdr-2020-001821.
- [12] XING PC, AN P, HU GY, et al. LncRNA MIAT promotes inflammation and oxidative stress in sepsis-induced cardiac injury by targeting miR-330-5p/TRAF6/NF- κ B axis [J]. *Biochem Genet*, 2020, 58(5): 783-800.
- [13] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [14] QIAO Y, PENG C, LI J, et al. Spinal cord ischemia-reperfusion causes damage of neurocyte by inhibiting RAP2C [J]. *Neurol Res*, 2017, 39(10): 877-884.
- [15] MUSUKA TD, WILTON SB, TRABOULSI M, et al. Diagnosis and management of acute ischemic stroke: speed is critical [J]. *CMAJ*, 2015, 187(12): 887-893.
- [16] 解晨, 王强, 汤旒, 等. 溴莫尼定对低氧诱导的PC12细胞神经损伤的保护作用[J]. *安徽医药*, 2022, 26(6): 1089-1093, 后插2.
- [17] ZARBOCK A, EROGLU A, ERTURK E, et al. Ischemia-reperfusion injury and anesthesia [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 980318. DOI: 10.1155/2014/980318.
- [18] QI DS, TAO JH, ZHANG LQ, et al. Neuroprotection of Cilostazol against ischemia/reperfusion-induced cognitive deficits through inhibiting JNK3/caspase-3 by enhancing Akt1 [J]. *Brain Res*, 2016, 1653: 67-74.
- [19] LIS, JIANGD, EHLERDINGEB, et al. Intrathecal administration of nanoclusters for protecting neurons against oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *ACS Nano*, 2019, 13(11): 13382-13389.
- [20] SALAH S, MATBOLI M, NASSER HE, et al. Dysregulation in the expression of (lncRNA-TSIX, TP53INP2 mRNA, miRNA-1283) in spinal cord injury [J]. *Genomics*, 2020, 112(5): 3315-3321.
- [21] JIANG Q, SHAN K, QUN-WANG X, et al. Long non-coding RNA-MIAT promotes neurovascular remodeling in the eye and brain [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 49688-49698.
- [22] XU Y, WANG X, ZHANG Y. Myocardial infarction-related transcripts (MIAT) participate in diabetic optic nerve injury by regulating heart shock protein 5 (HSPA5) via competitively binding to microRNA-379 [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2096-2103.
- [23] LI D, YANG T, SHAO C, et al. LncRNA MIAT activates vascular endothelial growth factor A through RAD21 to promote nerve injury repair in acute spinal cord injury [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 528: 111244. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111244.
- [24] XU X, ZHANG Y, KANG Y, et al. LncRNA MIAT Inhibits MPP (+)-Induced Neuronal Damage Through Regulating the miR-132/SIRT1 Axis in PC12 Cells [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(12): 3365-3374.
- [25] LI XQ, LV HW, WANG ZL, et al. MiR-27a ameliorates inflammatory damage to the blood-spinal cord barrier after spinal cord ischemia: reperfusion injury in rats by downregulating TICAM-2 of the TLR4 signaling pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12: 25.
- [26] LI R, ZHAO K, RUAN Q, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-124-3p attenuates neurological damage in spinal cord ischemia-reperfusion injury by downregulating Ern1 and promoting M2 macrophage polarization [J]. *Arthritis Res Ther*, 2020, 22(1): 75.
- [27] LI JA, ZAN CF, XIA P, et al. Key genes expressed in different stages of spinal cord ischemia/reperfusion injury [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(11): 1824-1829.
- [28] YE M, DONG S, HOU HT, et al. Oncogenic role of long noncoding RNAMALAT1 in thyroid cancer progression through regulation of the miR-204/IGF2BP2/m6A-MYC signaling [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2020, 23: 1-12.
- [29] WANG XW, LI J, WU DJ, et al. Hypoxia promotes apoptosis of neuronal cells through hypoxia-inducible factor-1 α -microRNA-204-B-cell lymphoma-2 pathway [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(2): 177-183.

(收稿日期:2022-06-20,修回日期:2022-07-25)