

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.24.005
文章编号: 1005-8982 (2022) 24-0026-08

实验研究·论著

基于microRNA-92a-3p靶向SIRT1调控氧糖剥夺再灌注诱导脑微血管内皮细胞炎症反应的作用机制研究*

林丽斌¹, 魏伟², 陆璐³, 李永旭³, 李惠红³, 丁琳琳³, 周阳杰¹, 卢陶陶³, 薛偕华³
(1. 福建中医药大学 康复医学院, 福建 福州 350122; 2. 福建省认知功能康复重点实验室, 福建 福州 350003; 3. 福建中医药大学附属康复医院 脑病康复一科, 福建 福州 350003)

摘要: 目的 探讨基于microRNA-92a-3p(miR-92a-3p)靶向调控SIRT1氧糖剥夺再灌注(OGD/R)诱导小鼠脑微血管内皮细胞(bEnd.3)炎症反应的作用机制。**方法** 实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)测定miR-92a-3p、SIRT1、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)mRNA的表达; Western blotting明确SIRT1、核转录因子- κ B(NF- κ B)p65、磷酸化NF- κ B(p-NF- κ B)p65、TNF- α 和IL-1 β 蛋白的表达; 双荧光素酶报告基因验证miR-92a-3p与SIRT1靶向关系; 划痕实验检测bEnd.3细胞的迁移能力。**结果** OGD/R组miR-92a-3p相对表达量较对照组升高($P < 0.05$)。M_SIRT1 WT+mimics+TK组荧光素酶活性较M_SIRT1 WT+mimics NC+TK组低($P < 0.05$)。OGD/R组SIRT1蛋白和mRNA相对表达量较对照组降低($P < 0.05$)。OGD+92a抑制剂组较OGD+92a抑制剂内参组升高($P < 0.05$)。miR-92a-3p模拟物组NF- κ Bp65/p-NF- κ Bp65蛋白较模拟物内参组高, SIRT1蛋白和mRNA表达较模拟物内参组低($P < 0.05$)。miR-92a-3p模拟物组IL-1 β 、TNF- α 蛋白和mRNA相对表达量较模拟物内参组高($P < 0.05$)。miR-92a-3p模拟物组伤口愈合率较模拟物内参组低($P < 0.05$)。**结论** miR-92a-3p通过靶向抑制SIRT1表达, 促进OGD/R诱导的脑微血管内皮细胞炎症反应。

关键词: MicroRNA-92a-3p; 脑微血管内皮细胞; 氧糖剥夺/再灌注; SIRT1; 炎症反应; 小鼠
中图分类号: R743.31 **文献标识码:** A

MicroRNA-92a-3p regulates OGD/R-induced inflammatory response via targeting SIRT1 in cerebral microvascular endothelial cells*

Li-bin Lin¹, Wei Wei², Lu Lu³, Yong-xu Li³, Hui-hong Li³, Lin-Lin Ding³,
Yang-jie Zhou¹, Tao-tao Lu³, Xie-hua Xue³

(1. College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China; 2. Fujian Provincial Key Laboratory of Cognitive Function Rehabilitation, Fuzhou, Fujian 350003, China; 3. Department of Encephalopathy Rehabilitation, Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of microRNA-92a-3p (miR-92a-3p) on regulating oxygen-

收稿日期: 2021-12-07

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 82004436); 福建省自然科学基金(No: 2021J01957, No: 2020J01761, No: 2021J01962); 福建中医药大学校管课题(No: X2020004)

[通信作者] 薛偕华, E-mail: 465356738@qq.com; Tel: 13067351145

glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced inflammatory response via targeting silent information regulator 1 (SIRT1) in cerebral microvascular endothelial cells. **Methods** Real-time fluorescent quantitative-based PCR was applied to detect the expressions of miR-92a-3p and SIRT1, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA. Western blotting was employed to determine the protein expressions of SIRT1, nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65, p-NF- κ B p65, TNF- α and IL-1 β . The targeting relationship between miR-92a-3p and SIRT1 was confirmed via dual-luciferase reporter assays. The migratory ability of bEnd.3 cells was determined via scratch assays. **Results** The relative expression of miR-92a-3p was increased in the OGD/R group compared with the control group ($P < 0.05$). The luciferase activity of the M_Sirt1 WT + mimics + TK group was lower than that of the M_Sirt1 WT + mimics NC+TK group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of SIRT1 in the OGD/R group were lower than those in the control group ($P < 0.05$), and they were higher in the OGD + 92a inhibitor group than those in the OGD + 92a control group ($P < 0.05$). Compared with the miR-92a-3p control group, the protein expressions of NF- κ Bp65/p-NF- κ Bp65 as well as the mRNA and protein expressions of IL-1 β and TNF- α were higher, and the mRNA and protein expressions of SIRT1 were lower in the miR-92a-3p mimics group ($P < 0.05$). The wound healing rate in the miR-92a-3p mimics group was higher than that in the miR-92a-3p control group ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-92a-3p promotes OGD/R-induced inflammatory response in cerebral microvascular endothelial cells via targeting and inhibiting the expression of SIRT1.

Keywords: microRNA-92a-3p; cerebral microvascular endothelial cells; OGD/R; SIRT1; inflammatory response; mouse

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 表现为肢体无力、言语及吞咽等功能障碍, 因脑血流量减少或者供氧不足, 引起脑组织局部发生缺血、缺氧损伤的综合征^[1]。治疗 IS 最有效的方法是机械取栓及药物静脉溶栓, 迅速建立有效血液供应以恢复缺血区脑组织的血流灌注, 缺血脑组织再灌注时会造成微血管和脑实质器官损伤, 称为脑缺血再灌注损伤^[2]。研究表明, 脑缺血再灌注过程中伴随着大量炎症因子的释放, 诱导脑微血管内皮细胞 (brain microvascular endothelial cells, BMECs) 分泌多种黏附分子及趋化因子, 细胞屏障作用减弱, 导致血液内有害物质直接损伤脑组织^[3]。故如何有效的避免脑微血管内皮细胞在缺血再灌注过程中的炎症损伤是 IS 防治领域面临的关键问题。

MicroRNA (miRNA) 是 21 ~ 25 nt 长的非编码单链 RNA, 其与 mRNA 分子 3'-非翻译区 (untranslated region, UTR) 相结合, 对转录后基因表达进行调控^[4]。研究表明, miRNAs 参与调控大脑相关疾病的生理、病理过程, 已成为潜在的治疗靶点^[5-6]。MicroRNA-92a-3p (miR-92a-3p) 作为与血管内皮细胞功能密切相关的 miRNA, 在内皮细胞中含量丰富, 参与内皮细胞炎症、分化、增殖及迁移, 调控脑缺血再灌注过程中细胞功能^[7]。沉默信息调节因子 1 (silent information regulator 1, SIRT1) 具有抗炎、氧化应激、抗凋亡和延长寿命等作用, 是 III

类组蛋白去乙酰化酶^[8]。研究表明, SIRT1 可抑制细胞的炎症反应, 起到保护细胞功能的作用, 且在 BMECs 中高表达, 对细胞迁移和成管的功能具有促进作用^[9-10]。miR-92a-3p 是否通过 SIRT1 调节 BMECs 功能尚未见阐明。

根据生物信息学分析, miR-92a-3p 与 SIRT1 mRNA 3'-UTR 相结合, 推测 miR-92a-3p 可能靶向抑制 SIRT1 的表达, 在脑微血管内皮细胞中扮演重要角色。故笔者应用 bEnd.3 复制氧剥夺再灌注 (OGD/R) 模型, 观察 OGD/R 条件下 bEnd.3 细胞 miR-92a-3p、SIRT1、炎症因子的表达及其内在联系, 以及在细胞水平明确 miR-92a-3p 靶向 SIRT1 调控 OGD/R 诱导脑微血管内皮细胞炎症反应的作用机制, 为治疗 IS 提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

bEnd.3 细胞 (上海纪宁实业有限公司), 1% 青链霉素的 H-DMEM 细胞培养基 (美国 Sigma 公司), GP-transfect-Mate 转染试剂 (上海吉玛生物公司), RNA isolater Total Extraction Reagent 试剂 (南京诺唯赞生物公司), ChamQ SYBR qPCR Master Mix 在 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司), NP-40 裂解液、蛋白酶抑制剂 (武汉博士德生物工程有限公司), BCA 蛋白定量检测试剂盒 (北京索

莱宝科技有限公司), TNF- α 抗体(美国 Proteintech 公司), 兔抗 SIRT1、兔抗核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) p65、p-NF- κ B p65 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司), 兔抗 IL-1 β 抗体(美国 Abcam 公司), β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司), 超敏化学发光检测试剂盒(苏州宇恒生物科技有限公司)。

1.2 细胞培养

将 bEnd.3 细胞接种于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 1% 青链霉素的 H-DMEM 细胞培养基 25 cm² 的无菌培养瓶内, 在 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳细胞培养箱中孵育, 取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.3 细胞转染及分组

1.3.1 miRNA 储存液配制 miR-92a-3p mimics、mimics NC、miR-92a-3p inhibitor、inhibitor NC 均为抑制剂阴性对照。四者以冻干粉运输, 分别加入 125.0 μ L、125.0 μ L、62.5 μ L 和 125.0 μ L DEPC 水溶解, 置入-20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。

1.3.2 细胞转染 当 bEnd.3 细胞密度达到 60% ~ 80% 时进行转染实验。GP-transfect-Mate 转染试剂提前复温; 以 6 孔板为例, 取 8 个 1.5 mL 无菌 Ep 管, 均添加无血清培养基 200 μ L/管。取 4 管加入 7.5 μ L GP-transfect-Mate 转染试剂, 另外 4 管分别加入 7.5 μ L miR-92a-3p mimics、mimics NC、miR-92a-3p inhibitor 和 inhibitor NC 储存液, 吹打混匀, 室温静置 5 min; 将各管 GP-transfect-Mate 培养基混合物分别滴加至储存液培养基混合物中, 配制成 miR-92a-3p mimics、mimics NC、miR-92a-3p inhibitor 和 inhibitor NC 转染混合物, 用移液器轻轻混匀, 室温静置 15 ~ 20 min 后立即转染, 尽量在 1 h 内使用。静置时可将 6 孔板中的培养基换成 1.6 mL 预热培养基; 将 400 μ L 转染混合物加入孔中, 最终为 2 mL/孔; 轻晃 6 孔板以均匀分布, 放入 37 $^{\circ}$ C、二氧化碳培养箱静置培养 6 h。

1.3.3 细胞分组 为观察 OGD/R 对 miR-92a-3p mRNA 及 SIRT1 蛋白表达量的影响, 将细胞分为对照组、OGD/R 组、OGD+92a 抑制剂组、OGD+92a 抑制剂内参组。对照组加入 7.5 μ L 转染试剂 6 h, 更换为含糖无血清 H-DMEM 培养基后于细胞培养箱培养 8 h, 再更换为完全培养基(89% H-DMEM、10% 胎牛

血清、1% 青链霉素)后于培养箱培养 16 h; OGD/R 组加入 7.5 μ L 转染试剂 6 h, 更换为无糖无血清 DMEM 培养基后于低氧培养箱(37 $^{\circ}$ C、1% 氧气、5% 二氧化碳、94% 氮气)培养 8 h, 再更换完全培养基后于细胞培养箱培养 16 h; OGD+92a 抑制剂组加入 2 mL miR-92a-3p inhibitor 转染混合物 6 h, 更换为无糖无血清 DMEM 培养基后于低氧培养箱培养 8 h, 再更换为完全培养基后于细胞培养箱培养 16 h; OGD+92a 抑制剂内参组加入 2 mL inhibitor NC 转染混合物 6 h, 更换为无糖无血清 DMEM 培养基后于低氧培养箱培养 8 h, 再更换为完全培养基后于细胞培养箱培养 16 h, 每组重复 3 次。

为确定 miR-92a-3p 通过调控 SIRT1 对 bEnd.3 细胞产生的不利影响, 将实验分为对照组、抑制剂内参组、miR-92a-3p 抑制剂组、模拟物内参组和 miR-92a-3p 模拟物组。对照组加入 7.5 μ L 转染试剂 6 h, 更换完全培养基细胞于培养箱培养 24 h; 抑制剂内参组加入 2 mL inhibitor NC 转染混合物 6 h, 更换完全培养基细胞培养箱培养 24 h; miR-92a-3p 抑制剂组加入 2 mL miR-92a-3p inhibitor 转染混合液 6 h, 更换完全培养基细胞培养箱培养 24 h; 模拟物内参组加入 2 mL mimics NC 转染混合液 6 h, 更换完全培养基细胞培养箱培养 24 h; miR-92a-3p 模拟物组加入 2 mL miR-92a-3p mimics 转染混合液 6 h, 更换完全培养基细胞培养箱培养 24 h, 每组重复 3 次。

1.4 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-92a-3p、SIRT1、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达

应用 RNA isolater Total Extraction Reagent 试剂从各组分离总 RNA, 运用 Hiscript[®] qRT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) 试剂盒进行逆转录, 最后使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix 在 7500 型荧光定量 PCR 仪上检测 miR-92a-3p 的表达和 SIRT1、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) mRNA 的表达。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环。熔解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。每个样本设 6 个复孔, 以 U6 或 GAPDH 作为内参, 用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算。见表 1。

1.5 Western blotting 检测蛋白表达

NP-40 裂解液、蛋白酶抑制剂按 100 : 1 配制,

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
miR-92a-3p	正向: 5'-CCGCGTATTGCACTTGTCCC-3'	60
	反向: 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	
U6	正向: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'	93
	反向: 5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTG-3'	
SIRT1	正向: 5'-ACCACCAAATCGTTACATATTCCA-3'	185
	反向: 5'-CCGTATCATCTTCCAAGCCATT-3'	
TNF- α	正向: 5'-GCCGATGGGTTGTACCTTGT-3'	139
	反向: 5'-TCTTGACGGCAGCGCGGAGG-3'	
IL-1 β	正向: 5'-GAAATGCCACCTTTTGACAGTG-3'	118
	反向: 5'-TGGATGCTCTCTCATCAGGACAG-3'	
GAPDH	正向: 5'-ACGGCAAGTTCAACGGCACAG-3'	149
	反向: 5'-GAAGACGCCAGTAGACTCCACGAC-3'	

裂解液混合液 50 μ L/孔, 冰上裂解 30 min, 细胞刮刀收集细胞, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 取适量上清液进行 BCA 蛋白定量, 调整蛋白浓度至同一水平, 与适量的蛋白上样缓冲液混匀, 100 $^{\circ}$ C 加热变性 10 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 湿转法转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入 TNF- α 抗体 (1:1 000)、兔抗 SIRT1 抗体 (1:1 000)、兔抗核转录因子- κ B (nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B) p65 抗体 (1:1 000)、p-NF- κ B p65 抗体 (1:1 000)、兔抗 IL-1 β 抗体 (1:1 000) 和 β -actin 抗体 (1:8 000) 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 次日 TBST 洗涤 5 min/次, 重复 3 次, 室温孵育相对应的二抗 1 h (1:5 000), TBST 洗涤 10 min/次, 重复 3 次; 随后进行增强化学发光法显色, 运用 Image Lab 电脑软件计算条带的体积值, 分析各组蛋白表达水平。

1.6 划痕实验检测细胞迁移能力

细胞铺板 24 h 后细胞形成融合单层, 用含 0.1% 青链霉素的无血清 H-DMEM 培养基进行饥饿处理 12 h, 在 6 孔板底部中线处用 10 μ L 枪头轻轻地划 1 道竖划痕, 用 PBS 洗去漂浮的细胞, 各组加入相对应的培养基, 置于显微镜下观察, 每个 6 孔板由上至下选取 5 个视野, 使用 100 倍镜头采集图片。培养 24 h 后, 再次观察划痕融合程度, 并由上至下选取 0 h 时相同位置的 5 个视野图片。使用 Image J 软件计算划痕面积所占的百分比, 以评估

细胞迁移能力。

1.7 双荧光素酶报告实验

根据生物信息学软件 Targetscan 预测结果显示, miR-92a-3p 与 SIRT1 的 3'-UTR 存在结合位点, 将含有结合位点与突变位点的 SIRT1-3'-UTR 片段分别插入荧光素酶报告基因载体, 构建 M_SIRT1 3'-野生型 (wild type, WT) 载体与突变型 (mutation type, MT) 载体, 取生长状态良好的 HEK-293 细胞, 分别将 M_SIRT1 3'-WT 型载体和 MT 型载体与 miR-92a-3p 模拟物、模拟物内参共转染, 放入细胞培养箱内培养 48 h, 检测各组细胞荧光素酶活性。将 SIRT1 3'-UTR 对照质粒+mimics NC+TK 海肾内参作为 UTR NC+mimics NC+TK 组, SIRT1 3'-UTR 对照质粒+mmu-miR-92a-3p mimics+TK 海肾内参作为 UTR NC+mimics+TK 组, SIRT1 3'-UTR WT 质粒+mimics NC+TK 海肾内参作为 M_SIRT1 WT+mimics NC+TK 组, SIRT1 3'-UTR WT 质粒+mmu-miR-92a-3p mimics+TK 海肾内参作为 M_SIRT1 WT+mimics+TK 组, SIRT1 3'-UTR MT 质粒+mimics NC+TK 海肾内参作为 M_SIRT1 MT+mimics NC+TK 组, SIRT1 3'-UTR MT 质粒+mmu-miR-92a-3p mimics+TK 海肾内参作为 M_SIRT1 MT+mimics+TK 组。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 25.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 若方差齐, 两两比较用 LSD- t 法检验, 若方差不齐, 则用 Games Howell 法检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 miR-92a-3p 相对表达量比较

对照组、OGD/R 组、OGD+92a 抑制剂组、OGD+92a 抑制剂内参组 miR-92a-3p 相对表达量分别为 (1.00 \pm 0.02)、(5.77 \pm 0.64)、(1.67 \pm 0.08)、(5.59 \pm 0.21), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=180.373$, $P=0.000$)。进一步两两比较, OGD/R 组较对照组升高 ($P < 0.05$), OGD+92a 抑制剂内参组与 OGD/R 组 miR-92a-3p 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。说明 miR-92a-3p 抑制剂及其内参表达功能正常, 而 OGD+92a 抑制剂组 miR-92a-3p 的表达量下降。

2.2 miR-92a-3p 靶基因预测及各组荧光素酶活性比较

运用 Targetscan 生物信息学软件预测 miR-92a-3p 相关的靶基因,结果提示 SIRT1 的 3'-UTR 含有 miR-92a-3p 的结合位点。为进一步验证 miR-92a-3p 是否直接靶向 SIRT1,将 HEK-293 细胞分别与含有 WT SIRT1 3'-UTR、MT SIRT1 3'-UTR、UTR NC 和 mimics NC 的 Renilla 荧光素酶报告载体共转染。UTR NC+mimics NC+TK 组、UTR NC+mimics+TK 组、M_SIRT1 WT+mimics NC+TK 组、M_SIRT1 WT+mimics+TK 组、M_SIRT1 MT+mimics NC+TK 组、M_SIRT1 MT+mimics+TK 组的荧光素酶活性分别为 (24.67 ± 0.58)、(23.67 ± 0.58)、(25.33 ± 1.53)、(15.67 ± 0.58)、(24.00 ± 1.00)、(24.33 ± 0.33),经方差分析,差异有统计学意义 ($F=50.300, P=0.000$)。进一步两两比较, M_SIRT1 WT+mimics+TK 组较 M_SIRT1 WT+mimics NC+TK 组低 ($P<0.05$),而 miR-92a-3p 对转染 SIRT1 3'-UTR 的细胞中荧光素酶活性的影响较小,说明 miR-92a-3p 可以通过与 SIRT1 3'-UTR 上的预测靶位点结合直接抑制基因的表达,而当预测的靶位点发生突变后,miR-92a-3p 对下游靶基因的抑制作用基本消除。因此 SIRT1 是 miR-92a-3p 的下游靶基因。见图 1。

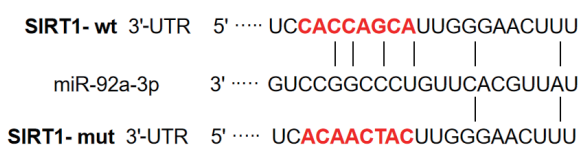


图 1 TargetScan 软件预测 miR-92a-3p 靶向 SIRT1 的 3'-UTR 区域

2.3 各组 SIRT1 蛋白、mRNA 相对表达量比较

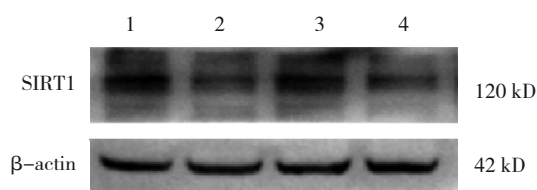
各组 SIRT1 蛋白、mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较, OGD/R 组较对照组降低 ($P<0.05$), OGD+92a 抑制剂组较 OGD+92a 抑制剂内参组升高 ($P<0.05$)。见表 2、图 2。

2.4 各组 p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白、SIRT1 蛋白和 mRNA 相对表达量比较

各组 p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白、SIRT1 蛋白和 mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。进一步两两比较, miR-92a-3p 模拟物组 NF-κB p65/p-NF-κB p65 蛋白较模

表 2 各组 SIRT1 蛋白、mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SIRT1 蛋白	SIRT1 mRNA
对照组	1.16 ± 0.14	1.41 ± 0.12
OGD/R 组	0.48 ± 0.10	0.63 ± 0.16
OGD+92a 抑制剂组	1.03 ± 0.06	1.20 ± 0.13
OGD+92a 抑制剂内参组	0.57 ± 0.10	0.68 ± 0.17
F 值	31.033	20.424
P 值	0.000	0.000



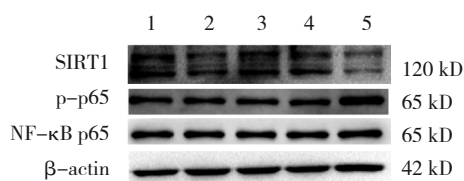
1: 对照组; 2: OGD/R 组; 3: OGD+92a 抑制剂组; 4: OGD+92a 抑制剂内参组。

图 2 各组 SIRT1 蛋白的表达

拟物内参组高, SIRT1 蛋白和 mRNA 较模拟物内参组低 ($P<0.05$)。见表 3 和图 3。

表 3 各组 p-NF-κB p65/NF-κB p65 蛋白、SIRT1 蛋白和 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-NF-κB p65/ NF-κB p65 蛋白	SIRT1 mRNA	SIRT1 蛋白
对照组	1.12 ± 0.06	1.07 ± 0.14	1.69 ± 0.10
抑制剂内参组	1.15 ± 0.12	1.06 ± 0.1	1.30 ± 0.21
miR-92a-3p 抑制剂组	1.13 ± 0.16	1.20 ± 0.14	1.57 ± 0.22
模拟物内参组	1.09 ± 0.08	1.02 ± 0.28	1.31 ± 0.13
miR-92a-3p 模拟物组	1.43 ± 0.15	0.61 ± 0.23	0.64 ± 0.07
F 值	3.897	4.671	19.935
P 值	0.037	0.022	0.000



1: 对照组; 2: 抑制剂内参组; 3: miR-92a-3p 抑制剂组; 4: 模拟物内参组; 5: miR-92a-3p 模拟物组。

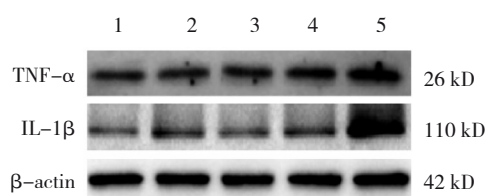
图 3 各组 p-NF-κB p65/NF-κB p65、SIRT1 蛋白的表达

2.5 各组 IL-1 β 、TNF- α 蛋白和 mRNA 相对表达量比较

各组 IL-1 β 、TNF- α 蛋白和 mRNA 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, miR-92a-3p 模拟物组较模拟物内参组高 ($P < 0.05$), 促进 bEnd.3 细胞发生炎症反应。见图 4 和表 4。

2.6 miR-92a-3p 转染对 bEnd.3 细胞迁移能力的影响

对照组、抑制剂内参组、miR-92a-3p 抑制剂组、模拟物内参组、miR-92a-3p 模拟物组划痕愈合率分别为 $(42.83 \pm 2.64)\%$ 、 $(42.41 \pm 1.34)\%$ 、 $(43.62 \pm 1.44)\%$ 、 $(41.70 \pm 2.62)\%$ 、 $(11.87 \pm 0.91)\%$, 经方差分析, 差异



1: 对照组; 2: 抑制剂内参组; 3: miR-92a-3p 抑制剂组; 4: 模拟物内参组; 5: miR-92a-3p 模拟物组。

图 4 各组 IL-1 β 、TNF- α 蛋白的表达

有统计学意义 ($F = 153.740, P = 0.000$)。进一步两两比较, miR-92a-3p 模拟物组较模拟物内参组低 ($P < 0.05$), 而 miR-92a-3p 抑制剂组与抑制剂内参组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。明确 miR-92a-3p 可以抑制 bEnd.3 细胞的迁移能力。见图 5。

表 4 各组 TNF- α 、IL-1 β 蛋白和 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α 蛋白	TNF- α mRNA	IL-1 β 蛋白	IL-1 β mRNA
对照组	1.07 \pm 0.11	1.00 \pm 0.34	1.00 \pm 0.26	1.03 \pm 0.67
抑制剂内参组	1.04 \pm 0.17	0.94 \pm 0.26	1.17 \pm 0.06	1.06 \pm 0.17
miR-92a-3p 抑制剂组	1.03 \pm 0.15	0.96 \pm 0.23	1.06 \pm 0.18	1.10 \pm 0.25
模拟物内参组	1.04 \pm 0.16	1.09 \pm 0.19	1.14 \pm 0.16	1.05 \pm 0.25
miR-92a-3p 模拟物组	1.40 \pm 0.68	1.86 \pm 0.13	2.44 \pm 0.36	1.79 \pm 0.35
F 值	4.216	7.938	29.215	5.637
P 值	0.030	0.004	0.000	0.012

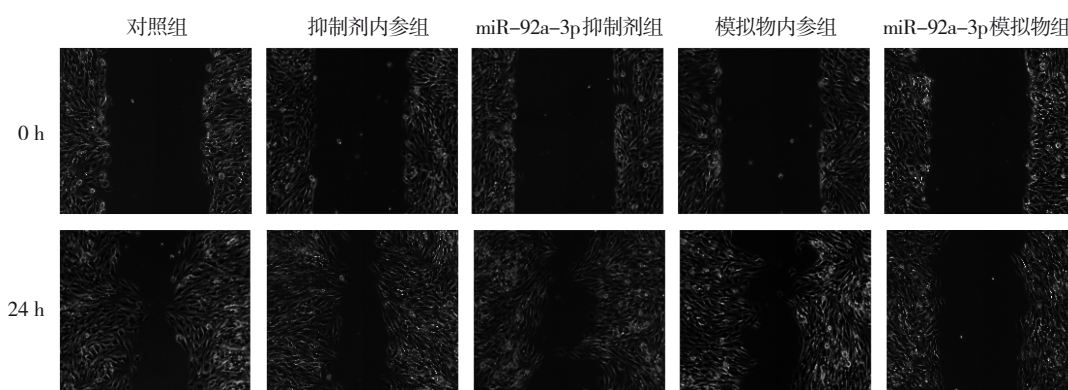


图 5 各组不同时间划痕融合程度 ($\times 100$)

3 讨论

IS 约占脑卒中的 85%^[11]。脑缺血再灌注影响 IS 的预后, 其中脑微血管内皮细胞扮演着重要的角色。脑微血管内皮细胞是一种扁平、长梭状的内皮细胞, 在脑内广泛分布, 对缺血缺氧敏感性较高。研究发现在脑缺血再灌注过程中首先累及到脑微

血管内皮细胞并释放大量炎症因子, 导致内皮细胞连接紊乱, 破坏血脑屏障的保护作用, 因而血液中的有害物质自由透过血脑屏障, 对脑组织造成损伤, 加重病情^[3]。因此, 保护脑微血管内皮细胞以及如何预防和减少脑缺血再灌注损伤已成为目前临床迫切需要解决的问题。

近来诸多研究表明,miRNAs 作为炎症信号通路的调控元件,在脑缺血再灌注中发挥重要作用,成为改善脑缺血再灌注的潜在关键的干预靶点^[12]。miR-92a-3p 是缺氧相关性 miRNA,在缺氧条件下,其表达水平相应升高,参与内皮细胞的增殖、分化和迁移的调控^[13]。HE 等^[14]研究发现脑卒中早期缺氧情况下脑内 miR-92a-3p 高表达,引起脑微血管内皮细胞炎症性损伤,血脑屏障破坏,导致脑白质损害。炎症反应是脑缺血再灌注进展的关键因素,内皮细胞产生多种黏附分子及趋化因子与炎症因子的大量释放有关,从而激活和募集炎症细胞,导致细胞通透性增加^[15]。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 参与脑缺血再灌注早期的炎症反应,炎症因子的释放引起血脑屏障通透性增强,脑微血管内皮细胞结构和功能的完整性遭到破坏,内皮细胞功能障碍,进一步损伤脑组织,说明 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 与脑缺血再灌注密切相关^[16]。FU 等^[17]研究也表明抑制 miR-92a 能够明显改善炎症反应,减少促炎细胞因子的释放。本研究发现 OGD/R 诱导脑微血管内皮细胞损伤后 miR-92a-3p 表达量增加,证实了 miR-92a-3p 在脑微血管内皮细胞中的负性调控作用。同时实验通过细胞转染 miR-92a-3p 发现,miR-92a-3p mimics 能抑制 bEnd.3 细胞的迁移及促进炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 的释放,而 miR-92a-3p inhibitor 出现相反的结果。进一步明确了 miR-92a-3p 对 bEnd.3 负性调控作用与炎症密切相关。

SIRT 是 III 类组蛋白去乙酰化酶,在哺乳动物器官中分布广泛。SIRT1 作为 Sirtuin 家族一员,依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/NADH 的信号转导,通过多种转录因子调节蛋白表达,调控各种生理功能,包括细胞炎症、细胞凋亡等^[18]。研究表明,SIRT1 表达升高可降低脓毒血症小鼠体内的炎症反应损伤^[19];小檗碱、厚朴酚和白藜芦醇等药物可促进 SIRT1 表达,抑制 NF- κ B 通路活化,减轻脑缺血再灌注过程中的炎症反应,减少细胞凋亡^[20-21]。根据生物信息学分析,推测 SIRT1 为 miR-92a-3p 下游靶基因,通过双荧光素酶实验明确了 miR-92a-3p 可以抑制 SIRT1 的表达,证实了其是 miR-92a-3p 的调控靶点。在 OGD/R 条件下 miR-92a-3p 表达水平明显升高,SIRT1 的表达量下降,结合荧光素酶的实验结果,提示 miR-92a-3p 通过负调控 SIRT1 促进 OGD/R 诱导

脑微血管内皮细胞炎症反应。

研究表明 SIRT1 可以通过 NF- κ B p65 去磷酸化,抑制 NF- κ B 信号转导,阻碍 NF- κ B 进入细胞核,无法激活 TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子发挥抗炎作用,改善脑缺血再灌注^[22]。脑缺血再灌注过程中 SIRT1 持续低表达,上调 SIRT1 能够抑制脑缺血再灌注过程中炎症反应和细胞凋亡,减轻脑缺血再灌注^[23]。本实验结果表明 miR-92a-3p 靶向抑制 SIRT1 的表达,促进 NF- κ B 信号通路激活,释放 TNF- α 、IL-1 β 炎症因子,引发炎症级联反应,在脑微血管内皮细胞 OGD/R 损伤过程中发挥重要作用,因此通过抑制 miR-92a-3p 的表达,上调 SIRT1 表达,抑制 NF- κ B 炎性通路,是改善脑缺血灌注损伤的重要途径。

综上所述,在脑微血管内皮细胞的 OGD/R 损伤过程中,miR-92a-3p 高表达靶向负调控 SIRT1 表达,激活 NF- κ B 炎症信号通路;抑制 miR-92a-3p 激活 SIRT1/NF- κ B 通路可明显减轻 OGD/R 诱导的脑微血管内皮细胞损伤,可能是临床上治疗脑缺血再灌注的潜在靶点。

参 考 文 献 :

- [1] WANGQIN R Q, LASKOWITZ D T, WANG Y J, et al. International comparison of patient characteristics and quality of care for ischemic stroke: analysis of the China National Stroke Registry and the American Heart Association get with the guidelines--stroke program[J]. J Am Heart Assoc, 2018, 7(20): e010623.
- [2] FONAROW G C, SMITH E E, SAVER J L, et al. Timeliness of tissue-type plasminogen activator therapy in acute ischemic stroke: patient characteristics, hospital factors, and outcomes associated with door-to-needle times within 60 minutes[J]. Circulation, 2011, 123(7): 750-758.
- [3] ZHAO Q, YU S S, LING Y, et al. The protective effects of dexmedetomidine against hypoxia/reoxygenation-induced inflammatory injury and permeability in brain endothelial cells mediated by sigma-1 receptor[J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(11): 1940-1947.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] ALTINTAS O, OZGEN ALTINTAS M, KUMAS M, et al. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of cerebral miRNAs against transient cerebral ischemia in diabetic rats[J]. Neurol Res, 2016, 38(11): 1003-1011.
- [6] YE Y M, PEREZ-POLO J R, QIAN J Q, et al. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia-reperfusion

- injury[J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43(10): 534-542.
- [7] FANG Y, DAVIES P F. Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(4): 979-987.
- [8] SHAN P P, FAN G J, SUN L H, et al. SIRT1 functions as a negative regulator of eukaryotic Poly(A)RNA transport[J]. *Curr Biol*, 2017, 27(15): 2271-2284.e5.
- [9] POTENTE M, GHAENI L, BALDESSARI D, et al. SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(20): 2644-2658.
- [10] SUN X M, LIU B. Donepezil ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced brain microvascular endothelial cell dysfunction via the SIRT1/FOXO3a/NF- κ B pathways[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 7760-7770.
- [11] GUZIK A, BUSHNELL C. Stroke epidemiology and risk factor management[J]. *Continuum (Minneapolis, Minn)*, 2017, 23(1, Cerebrovascular Disease): 15-39.
- [12] YAN Q, SUN S Y, YUAN S, et al. Inhibition of microRNA-9-5p and microRNA-128-3p can inhibit ischemic stroke-related cell death *in vitro* and *in vivo*[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(11): 2382-2390.
- [13] LI S F, YUAN L, SU L N, et al. Decreased miR-92a-3p expression potentially mediates the pro-angiogenic effects of oxidative stress-activated endothelial cell-derived exosomes by targeting tissue factor[J]. *Int J Mol Med*, 2020, 46(5): 1886-1898.
- [14] HE J R, ZHANG Y, LU W J, et al. Age-related frontal periventricular white matter hyperintensities and miR-92a-3p are associated with early-onset post-stroke depression[J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 328.
- [15] LI T, XU T, ZHAO J, et al. Depletion of iNOS-positive inflammatory cells decelerates neuronal degeneration and alleviates cerebral ischemic damage by suppressing the inflammatory response[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 181: 209-220.
- [16] LIN Q, WANG W L, YANG L P, et al. 4-methoxybenzylalcohol protects brain microvascular endothelial cells against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury via activation of the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 252.
- [17] FU L M, ZHU P, QI S L, et al. MicroRNA-92a antagonism attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary inflammation and injury in mice through suppressing the PTEN/AKT/NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 703-711.
- [18] 万赞, 余文, 陈赟, 等. 去乙酰化酶 SIRT1 与血管内皮功能关系研究进展[J]. *中华男科学杂志*, 2012, 18(9): 831-834.
- [19] KHADER A, YANG W L, HANSEN L W, et al. SIRT1, a sirtuin 1 activator, attenuates organ injury and inflammation in sepsis[J]. *J Surg Res*, 2017, 219: 288-295.
- [20] TIAN Y L, MA J T, WANG W D, et al. Resveratrol supplement inhibited the NF- κ B inflammation pathway through activating AMPK α -SIRT1 pathway in mice with fatty liver[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 422(1-2): 75-84.
- [21] KOU D Q, JIANG Y L, QIN J H, et al. Magnolol attenuates the inflammation and apoptosis through the activation of SIRT1 in experimental stroke rats[J]. *Pharmacol Rep*, 2017, 69(4): 642-647.
- [22] HERNÁNDEZ-JIMÉNEZ M, HURTADO O, CUARTERO M I, et al. Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage[J]. *Stroke*, 2013, 44(8): 2333-2337.
- [23] 李传文, 张嵘, 侯亮, 等. SIRT1/NF- κ B 通路参与白藜芦醇改善大鼠脑缺血再灌注损伤炎症反应[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(1): 6-9.

(李科 编辑)

本文引用格式: 林丽斌, 魏伟, 陆璐, 等. 基于 microRNA-92a-3p 靶向 SIRT1 调控氧糖剥夺再灌注诱导脑微血管内皮细胞炎症反应的作用机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(24): 26-33.

Cite this article as: LIN L B, WEI W, LU L, et al. MicroRNA-92a-3p regulates OGD/R-induced inflammatory response via targeting SIRT1 in cerebral microvascularendothelial cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(24): 26-33.