

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.12.007  
文章编号: 1005-8982 (2023) 12-0041-08

实验研究·论著

## lncRNA SNHG14通过miR-181c-5p/SOX6 信号轴调控缺血性脑卒中神经元细胞凋亡\*

钱旭东<sup>1</sup>, 李国芸<sup>2</sup>, 卜一<sup>1</sup>, 张硕<sup>1</sup>, 王红梅<sup>1</sup>, 窦志杰<sup>1</sup>

(承德医学院附属医院 1.神经内科, 2.呼吸内科, 河北 承德 067000)

**摘要: 目的** 通过IS体外模型探究lncRNA SNHG14在神经元细胞凋亡中的作用机制。**方法** 通过氧葡萄糖剥夺(OGD)诱导的神经元细胞损伤来模拟IS。实时荧光定量聚合酶链反应检测SNHG14、miR-181c-5p、SOX6基因表达, CCK-8法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡, Caspase-3检测试剂盒测定Caspase-3活性, RNA免疫沉淀实验和荧光素酶报告分析实验验证miR-181c-5p与SNHG14、SOX6的相互作用。**结果** sh-SNHG14组SNHG14 mRNA相对表达量低于sh-NC组( $P < 0.05$ ), OGD+ sh-SNHG14组SNHG14 mRNA相对表达量低于OGD+ sh-NC组低( $P < 0.05$ )。OGD+ sh-SNHG14组细胞活性率较OGD+ sh-NC组高( $P < 0.05$ )。OGD+ sh-SNHG14组细胞凋亡率、Caspase-3相对表达量较OGD+ sh-NC组低( $P < 0.05$ )。miR-NC组miR-181c-5p相对表达量较miR-181c-5p mimics组低( $P < 0.05$ ), inhibitor NC组较miR-181c-5p inhibitor组高( $P < 0.05$ )。SNHG14-WT+ miR-181c-5p mimics组荧光素酶相对活性较SNHG14-WT+ miR-NC组低( $P < 0.05$ ), SNHG14-WT+ miR-181c-5p inhibitor组较SNHG14-WT+ inhibitor NC组高( $P < 0.05$ )。SOX6-WT+miR-181c-5p mimics组荧光素酶相对活性较SOX6-WT+ miR-NC组低( $P < 0.05$ ), SOX6-WT+ miR-181c-5p inhibitor组较SOX6-WT+ inhibitor NC组高( $P < 0.05$ )。miR-NC组SOX6 mRNA相对表达量较miR-181c-5p mimics组高( $P < 0.05$ ), miR-181c-5p inhibitor组较inhibitor NC组高( $P < 0.05$ )。对照组细胞活性率较OGD+ sh-SNHG14组高( $P < 0.05$ ), OGD+ sh-SNHG14+ miR-181c-5p inhibitor组较OGD组高( $P < 0.05$ )。OGD+ sh-SNHG14+ miR-181c-5p inhibitor组细胞凋亡率较OGD+ sh-SNHG14组高( $P < 0.05$ )。OGD+ sh-SNHG14+ miR-181c-5p inhibitor组Caspase-3相对表达量较OGD+ sh-SNHG14组高( $P < 0.05$ )。**结论** SNHG14可调节IS模型中神经元细胞凋亡, 作用机制可能是通过靶向miR-181c-5p/SOX6信号通路实现的。

**关键词:** 缺血性脑卒中; lncRNA SNHG14; miR-181c-5p; SOX6

**中图分类号:** R743.3

**文献标识码:** A

## LncRNA SNHG14 regulates neuronal apoptosis in ischemic stroke through miR-181c-5p/SOX6 signal axis\*

Qian Xu-dong<sup>1</sup>, Li Guo-yun<sup>2</sup>, Bu Yi<sup>1</sup>, Zhang Shuo<sup>1</sup>, Wang Hong-mei<sup>1</sup>, Dou Zhi-jie<sup>1</sup>

(1. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

**Abstract: Objective** Explore the mechanism underlying the role of SNHG14 in neuronal apoptosis through an in vitro model of IS. **Methods** IS was simulated by oxygen glucose deprivation (OGD)-induced neuronal

收稿日期: 2023-01-09

\* 基金项目: 河北省医学科学研究课题(No: 20220005)

[通信作者] 窦志杰, E-mail: douzj0210@163.com

damage. The expressions of SNHG14, miR-181c-5p and SOX6 were detected via qPCR. The CCK8 assay was performed to measure the cell viability, while the apoptosis was determined via flow cytometry. The activity of caspase-3 was determined via a kit, and RIP and luciferase assays were applied to verify the interactions between miR-181c-5p and SNHG14 or SOX6. **Results** The relative expression of SNHG14 in the sh-SNHG14 group and the OGD + sh-SNHG14 group was lower than that in the sh-NC group and the OGD + sh-NC group, respectively ( $P < 0.05$ ). The cell viability in the OGD + sh-SNHG14 group was higher than that in the OGD + sh-NC group ( $P < 0.05$ ). The cell apoptosis rate and the relative expression of caspase-3 in the OGD + sh-SNHG14 group were lower than those in the OGD + sh-NC group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of miR-181c-5p in the miR-NC group was lower than that in the miR-181c-5p mimics group ( $P < 0.05$ ), while that in the inhibitor NC group was higher than that in the miR-181c-5p inhibitor group ( $P < 0.05$ ). The relative luciferase activity in the SNHG14-WT + miR-181c-5p mimics group was lower than that in the SNHG14-WT + miR-NC group ( $P < 0.05$ ), while that in the SNHG14-WT + miR-181c-5p inhibitor group was higher than that in the SNHG14-WT + inhibitor NC group ( $P < 0.05$ ). The relative luciferase activity in the SOX6-WT + miR-181c-5p mimics group was lower than that in the SOX6-WT + miR-NC group ( $P < 0.05$ ), while that in the SOX6-WT + miR-181c-5p inhibitor group was higher than that in the SOX6-WT + inhibitor NC group ( $P < 0.05$ ). The relative expression of SOX6 mRNA in the miR-NC group was higher than that in the miR-181c-5p mimics group ( $P < 0.05$ ), and that in the miR-181c-5p inhibitor group was also higher than that in the inhibitor NC group ( $P < 0.05$ ). The cell viability in the control group was higher than that in the OGD + sh-SNHG14 group ( $P < 0.05$ ), while that in the OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor group was higher than that in the OGD group ( $P < 0.05$ ). In contrast, the cell apoptosis rate in the OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor group was higher than that in the OGD + sh-SNHG14 group ( $P < 0.05$ ). Besides, the relative expression of caspase-3 in the OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor group was higher than that in the OGD + sh-SNHG14 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** SNHG14 regulates neuronal apoptosis in IS models, at least partially through targeting the miR-181c-5p/SOX6 signaling pathway.

**Keywords:** ischemic stroke; lncRNA SNHG14; miR-181c-5p; SOX6

缺血性脑卒中 (ischemic stroke, IS) 主要是大脑供血迅速丧失引起葡萄糖和氧气缺乏所致, 约占所有脑卒中的 85%<sup>[1]</sup>。有研究表明, IS 成为全球成年人死亡和残疾的主要原因之一, 且发病率逐年递增<sup>[2]</sup>。IS 可引发一系列级联事件, 包括炎症反应、兴奋性氨基酸神经毒性和细胞凋亡等, 进而损伤脑血管和神经元<sup>[3]</sup>。其中最突出的病理改变是神经元死亡 (大部分发生凋亡), 导致不可逆的脑功能丧失<sup>[4]</sup>。由于 IS 病理、生理过程的复杂性, 目前尚无有效的治疗策略。因此, 阐明神经元细胞凋亡的潜在分子机制, 有助于探寻减轻 IS 后脑损伤新的治疗途径。

长非编码 RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs) 在细胞凋亡、侵袭、组蛋白修饰、mRNA 剪接等多种生物学过程中发挥着重要作用<sup>[5-6]</sup>。有研究证实, lncRNAs 在各种脑和神经退行性疾病中异常表达, 并调控疾病进展, lncRNA-N1LR 可能通过抑制 p53 磷酸化, 增强其在 IS 病程中的神经保护作用<sup>[7]</sup>。lncRNA NR\_120420 在氧糖剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 诱导的 SH-SY5Y 神经元细胞中高表达, 抑制其表达能够缓解细胞凋亡<sup>[8]</sup>。此

外, 有研究表明 lncRNA SNHG14 在缺血小鼠脑组织和 OGD 诱导的小鼠小胶质细胞中表达上调<sup>[9]</sup>。敲除 SNHG14 能够缓解 OGD 诱导的神经元细胞损伤<sup>[10]</sup>。然而, SNHG14 在神经元细胞凋亡中的功能与机制尚不明确。

Sry 相关高迁移率盒 (Sry-related high-mobility box, SOX) 基因家族是 1 个转录因子编码基因, 具有高度保守的 HMG-box 序列<sup>[11]</sup>。SOX 转录因子在胚胎和成人神经系统的调控中起着关键作用, 包括维持神经干/祖细胞的多向性、更新和细胞命运<sup>[12]</sup>。据报道, SOX6 基因在神经系统中可以创造神经元的多样性<sup>[13]</sup>。此外, 有证据显示 lncRNA 可通过与 microRNA (miRNA) 结合并调控 SOX6 表达, 介导 OGD 引起的神经元细胞凋亡及缺血性神经元损伤<sup>[14]</sup>。然而, lncRNA SNHG14 是否通过与 miRNA 结合调控 SOX6 表达促进 IS 神经元细胞凋亡, 还有待进一步探究。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞培养

SH-SY5Y 细胞系 (SCSP-5014) 购自中国科学院

典型培养保存委员会细胞库。细胞培养使用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)/F12 培养基 (美国 Gibco 公司), 置于 37 °C、5% 二氧化碳培养箱孵育。待细胞达到对数生长期, 用于后续实验。

## 1.2 OGD 模型复制

细胞 OGD 模型的复制参考 DONG 等<sup>[15]</sup>的研究。将细胞培养基换成不含胎牛血清、无糖的 DMEM/F12 培养基, 并将细胞置于厌氧、温度 (37.0 ± 0.5) °C 环境中, 给予 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 氮气分别处理 0、2、4、6、8 h。随后, 使用含 10% 血清的正常培养基于常氧条件下 (37 °C、5% CO<sub>2</sub>) 培养细胞。对照组细胞除暴露于 OGD 外, 其余操作相同。

## 1.3 细胞转染

SNHG14 shRNA、miR-181c-5p mimics、miR-181c-5p inhibitor 及阴性对照 (sh-NC、miR-NC、inhibitor NC) 购自上海吉玛公司。根据说明书使用 Lipofectamine 2000 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 将寡核苷酸转染到神经元细胞中。转染 24 h 后对细胞进一步行体外检测。

## 1.4 分组

根据实验需要将细胞分组为对照组 (细胞正常培养)、OGD 组 (OGD 诱导 6 h)、OGD + sh-NC 组 (细胞转染 sh-SNHG14 阴性对照, 并接受 OGD 诱导 6 h)、OGD + sh-SNHG14 组 (细胞转染 sh-SNHG14, 并接受 OGD 诱导 6 h)、OGD+sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor 组 (细胞转染 sh-SNHG14 和 miR-181c-5p inhibitor, 并接受 OGD 诱导 6 h)、sh-NC 组 (细胞转染 sh-SNHG14 阴性对照)、miR-181c-5p mimics 组 (细胞转染 miR-181c-5p 模拟物)、miR-NC 组 (细胞转染模拟物阴性对照)、miR-181c-5p inhibitor 组 (细胞转染 miR-181c-5p 抑制剂)、inhibitor NC 组 (细胞转染抑制剂阴性对照)。

## 1.5 方法

**1.5.1 细胞活力检测** 将细胞以 5 000 个/孔的密度接种至 96 孔板中, 孵育过夜, 将 CCK-8 溶液 (10 μL 每孔) 与细胞混合于细胞培养箱中共同孵育 2 h, 然后将 96 孔板置于酶标仪, 在 450 nm 波长处读取各孔吸光度值, 计算细胞相对活力, 使用 CCK-8 试剂盒 (美国 Dojindo Molecular Technologies 公司) 检测。实

验重复 3 次, 每次设 4 个复孔。

**1.5.2 流式细胞术检测细胞凋亡** 细胞凋亡检测使用 Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (美国 Sigma 公司), 通过流式细胞术分析。将细胞 (1 × 10<sup>5</sup> 个/孔) 接种至 6 孔板中, PBS 冲洗 1 次, 使用试剂盒提供的结合缓冲液 (100 μL) 重新悬浮细胞, 并与 Annexin V-FITC (5 μL) 混合。再加入 5 μL PI 于黑暗中孵育 10 min。最后将结合缓冲液 (400 μL) 与溶液混合, 使用流式细胞分析仪 (美国 BD Biosciences 公司) 分析细胞凋亡率。

**1.5.3 Caspase-3 活性检测** 在 6 孔板中培养各组细胞, 并使用 Caspase-3 检测试剂盒 (美国 Abcam 公司) 检测细胞 Caspase-3 活性, 根据对照组换算相对表达量, 具体实验步骤按说明书操作。

**1.5.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测 SNHG14、miR-181C-5P mRNA** 收集细胞, 使用 TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司) 提取总 RNA, 并使用逆转录试剂盒 (日本 TaKaRa 株式会社) 将 RNA 逆转录为 cDNA。qRT-PCR 检测使用 SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒 (日本 TaKaRa 株式会社)。SNHG14 正向引物: 5'-GCCTCCTGCTTCTCATGTTG-3', 反向引物: 5'-ACCCAGGATCTTCCACTCAT-3', 长度均 20 bp; SOX6 正向引物: 5'-AGCTTCGGATTGGGGAGTAT-3', 反向引物: 5'-GAGGCGATGTTGTTAGTT-3', 长度均 20 bp; GAPDH 正向引物: 5'-AGGTCGGAGTCAACGGATTT-3', 反向引物: 5'-TGACGGTGCCATGGAATTG-3', 长度均 20 bp; miR-181c-5p 正向引物: 5'-TCGGAACATTCAACCTGTCTG-3', 反向引物: 5'-AA CAUUCAACCUGUCGGUGAGU-3', 长度分别为 20、22 bp; U6 正向引物: 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3', 反向引物: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3', 长度分别为 17、20 bp。反应条件为: 94 °C 预变性 5 s, 60 °C 变性 34 s, 72 °C 退火 30 s, 共 40 个循环。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算 RNA 的相对表达量, 以 GAPDH 和 U6 作为内参<sup>[16]</sup>。

**1.5.5 萤光素酶报告分析** 首先构建萤光素酶报告载体, 将含有预测的 miR-181c-5p 结合位点的 SNHG14 或 SOX6 片段扩增并克隆到 pGL3 萤光素酶载体 (美国 Promega 公司), 获得 SNHG14-野生型 (wild type, WT)、SNHG14-突变型 (mutation type,

MUT)、SOX6-WT、SOX6-MUT。使用 Lipofectamine 2000 试剂(美国 Invitrogen 公司)将 SNHG14-WT、SOX6-WT(或 SNHG14-MUT、SOX6-MUT)和 miR-181c-5p mimics、miR-181c-5p inhibitor(或 miR-NC、inhibitor NC)共转染。简言之,为验证 SNHG14 与 miR-181c-5p 结合,细胞分为 SNHG14-WT + miR-NC 组、SNHG14-WT + miR-181c-5p mimics 组、SNHG14-WT + inhibitor NC 组、SNHG14-WT + miR-181c-5p inhibitor 组、SNHG14-MUT + miR-NC 组、SNHG14-MUT + miR-181c-5p mimics 组、SNHG14-MUT + inhibitor NC 组、SNHG14-MUT + miR-181c-5p inhibitor 组;为验证 SOX6 与 miR-181c-5p 结合,细胞分为 SOX6-WT + miR-NC 组、SOX6-WT+miR-181c-5p mimics 组、SOX6-WT + inhibitor NC 组、SOX6-WT+ miR-181c-5p inhibitor 组、SOX6-MUT + miR-NC 组、SOX6-MUT + miR-181c-5p mimics 组、SOX6-MUT + inhibitor NC 组、SOX6-MUT+miR-181c-5p inhibitor 组。转染 48 h 后,根据试剂盒说明书操作,收集细胞,并使用双荧光素酶报告分析系统(美国 Promega 公司)分析各组荧光素酶相对活性。

**1.5.6 RNA 免疫沉淀实验** 使用 Magna RNA 免疫沉淀(RNA immunoprecipitation, RIP)<sup>™</sup> RNA 结合蛋白免疫沉淀试剂盒(美国 Millipore 公司)分析 SNHG14 与 miR-181c-5p 是否相互作用。将 miR-NC 和 miR-181c-5p mimics 转染后的细胞在 RIP 裂解缓冲液中裂解,然后根据制造商的方案,用含有磁珠[与阴性对照免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG)或 Ago2 抗体结合]的 RIP 缓冲液孵育裂解物。最后对沉淀的 RNA 进行纯化和处理,qRT-PCR 分析 SNHG14 相对表达量。

## 1.6 统计学方法

数据分析采用 GraphPad Prism 5.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,比较用 *t* 检验或单因素方差分析或随机区组设计的方差分析,两两比较用 Tukey post hoc test 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 OGD 诱导不同时间点的神经元细胞 lncRNA SNHG14 的表达

OGD 诱导 0 h 的细胞活性率为 (100.00 ±

5.57)%、2 h 为 (86.67 ± 4.73)%、4 h 为 (75.33 ± 5.51)%、6 h 为 (54.33 ± 5.03)%、8 h 为 (37.33 ± 5.51)% ,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 67.720, P = 0.000$ ),OGD 诱导 4 h、6 h、8 h 的细胞活性率较 0 h 低 ( $P < 0.05$ ),说明降低了神经元细胞的相对活力。而 OGD 诱导 2 h 与 0 h 的细胞活性率比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

OGD 诱导 0 h 的细胞凋亡率为 (3.36 ± 0.82)%、2 h 为 (6.88 ± 1.01)%、4 h 为 (9.30 ± 0.86)%、6 h 为 (15.43 ± 1.52)%、8 h 为 (21.45 ± 1.37)% ,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 113.800, P = 0.000$ ),OGD 诱导 2 h、4 h、6 h、8 h 较 0 h 高 ( $P < 0.05$ ),说明 OGD 细胞模型复制成功。

OGD 诱导 0 h 的 SNHG14 相对表达量为 (1.00 ± 0.11)、2 h 为 (1.48 ± 0.13)、4 h 为 (1.99 ± 0.23)、6 h 为 (2.68 ± 0.17)、8 h 为 (3.02 ± 0.21),经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 66.680, P = 0.000$ ),OGD 诱导 2 h、4 h、6 h、8 h 的 SNHG14 相对表达量较 0 h 高 ( $P < 0.05$ ),提示 SNHG14 可能在 IS 进程中发挥重要的调控作用。

### 2.2 lncRNA SNHG14 对 OGD 诱导的神经元细胞凋亡的影响

OGD 诱导 6 h 时敲降 SNHG14 mRNA 检测其对神经元细胞凋亡的影响。对照组 SNHG14 mRNA 相对表达量为 (1.00 ± 0.07)、sh-NC 组为 (1.00 ± 0.09)、sh-SNHG14 组为 (0.29 ± 0.07)、OGD 组为 (2.62 ± 0.14)、OGD + sh-NC 组为 (2.67 ± 0.16)、OGD + sh-SNHG14 组为 (1.38 ± 0.13),经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 209.500, P = 0.000$ ),sh-SNHG14 组低于 sh-NC 组、OGD + sh-SNHG14 组低于 OGD + sh-NC 组 ( $P < 0.05$ )。

对照组细胞活性率为 (100.00 ± 6.24)%、OGD 组为 (54.33 ± 7.64)%、OGD+sh-NC 组为 (51.67 ± 7.57)%、OGD + sh-SNHG14 组为 (80.33 ± 7.77)% ,经单因素方差分析,差异有统计学意义 ( $F = 29.360, P = 0.000$ ),OGD + sh-SNHG14 组较 OGD + sh-NC 组高 ( $P < 0.05$ )。说明抑制 SNHG14 的表达显著升高了 OGD 诱导的神经元细胞的相对活力。

对照组细胞凋亡率为 (4.31 ± 0.94)%、OGD 组为 (15.06 ± 1.53)%、OGD + sh-NC 组为 (14.79 ± 1.03)%、OGD + sh-SNHG14 组为 (8.37 ± 1.10)% ,经

单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=59.470, P=0.000$ ), OGD + sh-SNHG14 组较 OGD + sh-NC 组低 ( $P<0.05$ )。

对照组 Caspase-3 相对表达量为 ( $100.00 \pm 16.70$ )、OGD 组为 ( $265.00 \pm 23.64$ )、OGD + sh-NC 组为 ( $269.33 \pm 25.54$ )、OGD + sh-SNHG14 组为 ( $146.67 \pm 20.55$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=45.560, P=0.000$ ), OGD + sh-SNHG14 组较 OGD + sh-NC 组低 ( $P<0.05$ )。说明下调 SNHG14 显著抑制了 Caspase-3 的活性。以上结果表明, 敲降 SNHG14 能够改善 OGD 诱导的神经元细胞凋亡。

### 2.3 lncRNA SNHG14 通过靶向结合 miR-181c-5p 促进 SOX6 表达

为进一步探究 lncRNA SNHG14 调控神经元细胞凋亡的分子机制, 笔者通过生物信息学分析发现, SNHG14 与 miR-181c-5p、miR-181c-5p 与 SOX6 之间存在潜在结合位点 (见图 1)。随后过表达或抑制 miR-181c-5p 以进行 RIP 和荧光素酶报告分析实验。

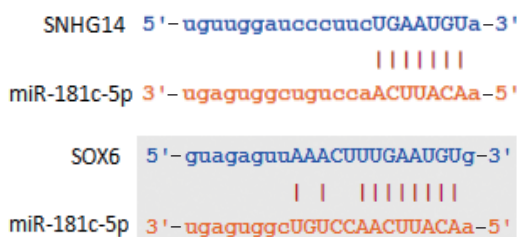


图 1 miR-181c-5p 与 SOX6、SNHG14 之间的潜在结合位点

miR-NC 组 miR-181c-5p 相对表达量为 ( $1.00 \pm 0.13$ ), miR-181c-5p mimics 组为 ( $3.12 \pm 0.28$ ), inhibitor NC 组为 ( $1.00 \pm 0.14$ ), miR-181c-5p inhibitor 组为 ( $0.34 \pm 0.12$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=134.600, P=0.000$ ), miR-NC 组较 miR-181c-5p mimics 组低 ( $P<0.05$ ), inhibitor NC 组较 miR-181c-5p inhibitor 组高 ( $P<0.05$ )。说明细胞转染 miR-181c-5p mimics 上调 miR-181c-5p 表达, 转染 miR-181c-5p inhibitor 下调 miR-181c-5p 表达。

SNHG14-WT + miR-NC 组荧光素酶相对活性为 ( $1.00 \pm 0.11$ )、SNHG14-WT + miR-181c-5p mimics 组为 ( $0.33 \pm 0.08$ )、SNHG14-WT + inhibitor NC 组为 ( $1.00 \pm 0.16$ )、SNHG14-WT + miR-181c-5p inhibitor

组为 ( $2.58 \pm 0.29$ )、SNHG14-MUT + miR-NC 组为 ( $1.00 \pm 0.14$ )、SNHG14-MUT + miR-181c-5p mimics 组为 ( $1.00 \pm 0.06$ )、SNHG14-MUT + inhibitor NC 组为 ( $1.00 \pm 0.12$ )、SNHG14-MUT + miR-181c-5p inhibitor 组为 ( $1.00 \pm 0.12$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=84.180, P=0.000$ ), SNHG14-WT + miR-181c-5p mimics 组较 SNHG14-WT + miR-NC 组低, SNHG14-WT + miR-181c-5p inhibitor 组较 SNHG14-WT + inhibitor NC 组高。说明过表达 miR-181c-5p 降低 SNHG14-WT 组细胞荧光素酶活性, 抑制 miR-181c-5p 则活性升高。

miR-NC 组与 IgG 结合 RNA 的 SNHG14 mRNA 相对表达量为 ( $1.00 \pm 0.09$ )、miR-181c-5p mimics 组为 ( $1.00 \pm 0.09$ ), 经  $t$  检验, 差异无统计学意义 ( $t=0.045, P=0.966$ ); miR-NC 组与 Ago2 结合 RNA 的 SNHG14 mRNA 相对表达量为 ( $2.62 \pm 0.66$ ), miR-181c-5p mimics 组为 ( $6.40 \pm 0.85$ ), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=6.088, P=0.004$ ), miR-181c-5p mimics 转染的细胞中内源性 SNHG14 富集, 说明 SNHG14 mRNA 与 miR-181c-5p 靶向结合。

SOX6-WT + miR-NC 组荧光素酶相对活性为 ( $1.00 \pm 0.16$ )、SOX6-WT + miR-181c-5p mimics 组为 ( $0.41 \pm 0.08$ )、SOX6-WT + inhibitor NC 组为 ( $1.00 \pm 0.15$ )、SOX6-WT + miR-181c-5p inhibitor 组为 ( $2.32 \pm 0.22$ )、SOX6-MUT + miR-NC 组为 ( $1.00 \pm 0.10$ )、SOX6-MUT + miR-181c-5p mimics 组为 ( $1.00 \pm 0.10$ )、SOX6-MUT + inhibitor NC 组为 ( $1.00 \pm 0.14$ )、SOX6-MUT + miR-181c-5p inhibitor 组为 ( $1.00 \pm 0.15$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=84.180, P=0.000$ ), SOX6-WT + miR-181c-5p mimics 组较 SOX6-WT + miR-NC 组低, SOX6-WT + miR-181c-5p inhibitor 组较 SOX6-WT + inhibitor NC 组高。说明 miR-181c-5p mimics 降低了 SOX6-WT 细胞荧光素酶活性, miR-181c-5p inhibitor 则升高了 SOX6-WT 细胞荧光素酶活性。

sh-NC 组 miR-181c-5p 相对表达量为 ( $1.00 \pm 0.18$ ), sh-SNHG14 组为 ( $2.56 \pm 0.27$ ), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=8.327, P=0.001$ ); sh-NC 组 SOX6 相对表达量为 ( $1.00 \pm 0.18$ ), sh-SNHG14 组为 ( $2.56 \pm 0.27$ ), 经  $t$  检验, 差异有统计学意义 ( $t=8.356, P=0.001$ ), 敲降 SNHG14 上调 miR-181c-5p 表达, 下调

SOX6 表达。miR-NC 组 SOX6 mRNA 相对表达量为  $(1.00 \pm 0.14)$ 、miR-181c-5p mimics 组为  $(0.40 \pm 0.07)$ 、inhibitor NC 组为  $(1.00 \pm 0.10)$ 、miR-181c-5p inhibitor 组为  $(2.31 \pm 0.27)$ ，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F=75.250, P=0.000$ )，miR-NC 组较 miR-181c-5p mimics 组高，miR-181c-5p inhibitor 组较 inhibitor NC 组高。说明 miR-181c-5p 过表达下调 SOX6 mRNA 表达，抑制 miR-181c-5p 上调 SOX6 mRNA 表达。以上实验结果表明，SNHG14 竞争结合 miR-181c-5p，从而促进 SOX6 mRNA 表达。

#### 2.4 lncRNA SNHG14 通过 miR-181c-5p/SOX6 信号轴调控神经元细胞凋亡

笔者通过挽救实验进一步验证 SNHG14 的作用机制。对照组 miR-181c-5p 相对表达量为  $(1.00 \pm 0.14)$ 、OGD 组为  $(0.43 \pm 0.09)$ ，经  $t$  检验，差异有统计学意义 ( $t=5.900, P=0.004$ )；对照组 SOX6 相对表达量为  $(1.00 \pm 0.12)$ 、OGD 组为  $(2.37 \pm 0.13)$ ，经  $t$  检验，差异有统计学意义 ( $t=13.920, P=0.000$ )，miR-181c-5p 在 OGD 诱导的神经元细胞中表达下调，而 SOX6 上调。

对照组细胞活性率为  $(100.00 \pm 8.89)\%$ 、OGD 组为  $(53.67 \pm 8.50)\%$ 、OGD + sh-SNHG14 组为  $(82.33 \pm 8.08)\%$ 、OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor 组为  $(58.33 \pm 8.02)\%$ ，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F=19.980, P=0.001$ )，对照组较 OGD + sh-SNHG14 组高，OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor 组较 OGD 组高。说明敲降 SNHG14 能提高细胞活力，而抑制 miR-181c-5p 可部分逆转 sh-SNHG14 对细胞活力的影响。

对照组细胞凋亡率为  $(3.73 \pm 1.13)\%$ 、OGD 组为  $(15.14 \pm 2.11)\%$ 、OGD + sh-SNHG14 组为  $(8.43 \pm 0.81)\%$ 、OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor 组为  $(12.69 \pm 0.81)\%$ ，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ( $F=42.900, P=0.000$ )，OGD + sh-SNHG14 + miR-181c-5p inhibitor 组较 OGD + sh-SNHG14 组高。说明抑制 miR-181c-5p 能提高 sh-SNHG14 降低的细胞凋亡率。

对照组 Caspase-3 相对表达量为  $(100.00 \pm 18.03)$ 、OGD 组为  $(263.67 \pm 26.50)$ 、OGD+sh-SNHG14 组为  $(139.33 \pm 11.59)$ 、OGD+sh-SNHG14+miR-181c-5p inhibitor 组为  $(222.67 \pm 25.54)$ ，经单因素方差分

析，差异有统计学意义 ( $F=37.190, P=0.000$ )，OGD+sh-SNHG14+miR-181c-5p inhibitor 组较 OGD+sh-SNHG14 组高。说明 miR-181c-5p inhibitor 能逆转 sh-SNHG14 对 Caspase-3 活性的抑制作用。以上结果表明，SNHG14 通过 miR-181c-5p/SOX6 信号轴调控 OGD 诱导的神经元细胞凋亡。

### 3 讨论

脑卒中是局灶性或全局性脑功能缺损迅速发作的临床综合征，近年来已成为许多国家第2大死亡原因和最重要的致残原因<sup>[17-18]</sup>。本研究通过 OGD 诱导神经元细胞建立 IS 体外模型，探究 SNHG14 的功能与潜在的分子机制。本研究结果发现 SNHG14 在 OGD 诱导的细胞模型中高表达，抑制其表达可升高细胞活力，降低细胞凋亡率和 Caspase-3 活性。此外，进一步的分子机制研究表明，SNHG14 通过调节 miR-181c-5p/SOX6 信号通路调节神经元细胞活力和凋亡。

近年来，越来越多的研究表明 lncRNAs 参与包括 IS 在内的多种神经系统疾病密切相关<sup>[19-21]</sup>。有学者发现 SNHG14 能够促进炎症反应，诱导脑缺血再灌注损伤<sup>[22]</sup>。SNHG14 在脑缺血再灌注损伤中表达升高，下调其表达可抑制小鼠海马神经元细胞损伤<sup>[23]</sup>。本研究结果显示，SNHG14 在 OGD 诱导神经元细胞中表达上调，敲降 SNHG14 能够抑制细胞凋亡。表明 SNHG14 的表达上调与 IR 引起的神经损伤有关，降低 SNHG14 水平能够缓解缺血引起的神经损伤，SNHG14 可能是治疗 IS 的潜在靶标。

竞争内源 RNA (competing endogenous RNAs, ceRNA) 被认为是 lncRNAs 的一种新的多病理、生理过程调控机制<sup>[24-25]</sup>。MicroRNAs 是一类长度约为 23 个核苷酸的非编码 RNA 小分子，通过靶向基因的 3'UTR 来调控其下游基因的表达<sup>[26-27]</sup>。有研究报道，SNHG14 可通过与 miR-98-5p<sup>[10]</sup>、miR-136-5p<sup>[22]</sup>、miR-182-5p<sup>[23]</sup> 等结合调节下游 mRNA 表达，从而参与 IS 进展。本研究结果发现，miR-181c-5p 是 SNHG14 的下游靶标并受 SNHG14 负向调控。miR-181c-5p 在进化上是保守的，在大脑中高度表达，并因其在细胞凋亡等细胞过程中的重要作用而受到关注<sup>[28-30]</sup>。有证据显示，lncRNA SNHG6 在 IS 中通过靶向 miR-181c-5p，并作为 ceRNA 调节靶基因表达

及神经元细胞凋亡<sup>[31]</sup>。本研究结果发现 miR-181c-5p 在 OGD 诱导的神经元细胞中表达下调, 抑制其表达可部分逆转 SNHG14 敲降对细胞活力、细胞凋亡和 Caspase-3 活性的影响。表明 SNHG14 可能通过 ceRNA 机制与 miR-181c-5p 相互作用调节 IS 引起的神经元凋亡。此外, 生物信息学分析显示, SOX6 是 miR-181c-5p 的下游靶基因。有研究报道, SOX6 在神经元损伤中高表达, 沉默 SOX6 可促进神经元细胞增殖, 抑制细胞凋亡和炎症反应, lncRNA 可通过与 miRNA 结合调节 SOX6 表达, 参与缺血性神经损伤体过程<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, miR-181c-5p 可负向调节 SOX6 的表达, 提示 miR-181c-5p 通过抑制 SOX6 表达发挥抗 OGD 诱导的神经元细胞凋亡的作用。

综上所述, 笔者首次阐明了 lncRNA SNHG14 通过靶向 miR-181c-5p/SOX6 信号轴调控 OGD 诱导的神经元细胞凋亡, 这一发现有助于更好地了解 SNHG14 在 IS 发病机制中的作用和潜在的调控网络。本研究结果表明, SNHG14、miR-181c-5p 或 SOX6 可能是 IS 的潜在治疗靶点。本研究尽管取得了一定的成果, 但不可避免地还存在一些不足。笔者仅进行了体外探究, 在未来的工作中还需进行体内实验验证, 并在临床方面延伸。此外, SNHG14 的其他凋亡调控途径也值得进一步挖掘, 以便全面揭示作用机制, 为 IS 治疗策略的探索提供更多的理论支持。

#### 参 考 文 献 :

- [1] van der Worp H B, van Gijn J. Clinical practice. Acute ischemic stroke[J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(6): 572-579.
- [2] LIU J, CHEN Q X, JIAN Z H, et al. Daphnetin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice via inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 2816056.
- [3] LAI T W, SHYU W C, WANG Y T. Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond[J]. *Trends Mol Med*, 2011, 17(5): 266-275.
- [4] WEI N, XIAO L, XUE R, et al. MicroRNA-9 mediates the cell apoptosis by targeting Bcl2l11 in ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(10): 6809-6817.
- [5] FATICA A, BOZZONI I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development[J]. *Nat Rev Genet*, 2014, 15(1): 7-21.
- [6] GEISLER S, COLLIER J. RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts[J]. *Mol Cell Biol*, 2013, 14(11): 699-712.
- [7] WU Z M, WU P, ZUO X L, et al. LncRNA-N1LR enhances neuroprotection against ischemic stroke probably by inhibiting p53 phosphorylation[J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(10): 7670-7685.
- [8] TIAN C N, LI Z F, ZHANG L, et al. LncRNA NR\_120420 promotes SH-SY5Y cells apoptosis by regulating NF- $\kappa$ B after oxygen and glucose deprivation[J]. *Gene*, 2020, 728: 144285.
- [9] QI X, SHAO M, SUN H J, et al. Long non-coding RNA SNHG14 promotes microglia activation by regulating miR-145-5p/PLA2G4A in cerebral infarction[J]. *Neuroscience*, 2017, 348: 98-106.
- [10] ZHANG G L, GUO J H, ZENG J, et al. LncRNA SNHG14 is beneficial to oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced neuro-2a cell injury via mir-98-5p sequestration-caused BCL2L13 upregulation[J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37(6): 2005-2016.
- [11] SHI Y J, HAN Y F, NIU L L, et al. miR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6[J]. *Biotechnol Lett*, 2019, 41(6-7): 837-847.
- [12] SEVIGNY J, CHIAO P, BUSSIÈRE T, et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease[J]. *Nature*, 2016, 537(7618): 50-56.
- [13] ZALETEL I, SCHWIRTLICH M, PEROVIĆ M, et al. Early impairments of hippocampal neurogenesis in 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease are associated with altered expression of SOXB transcription factors[J]. *J Alzheimers Dis*, 2018, 65(3): 963-976.
- [14] GAI H Y, WU C, ZHANG Y, et al. Long non-coding RNA CHRF modulates the progression of cerebral ischemia/reperfusion injury via miR-126/SOX6 signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(2): 550-557.
- [15] DONG Y F, GUO R B, JI J, et al. S1PR3 is essential for phosphorylated fingolimod to protect astrocytes against oxygen-glucose deprivation-induced neuroinflammation via inhibiting TLR2/4-NF $\kappa$ B signalling[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(6): 3159-3166.
- [16] HU L X, FANG R H, GUO M. Knockdown of lncRNA SNHG1 alleviates oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced cell death by serving as a ceRNA for miR-424 in SH-SY5Y cells[J]. *Neurol Res*, 2020, 42(1): 47-54.
- [17] WARLOW C, SUDLOW C, DENNIS M, et al. Stroke[J]. *Lancet*, 2003, 362(9391): 1211-1224.
- [18] YIN K J, HAMBLIN M, CHEN Y E. Non-coding RNAs in cerebral endothelial pathophysiology: emerging roles in stroke[J]. *Neurochem Int*, 2014, 77: 9-16.
- [19] YANG J L, GU L, GUO X J, et al. LncRNA ANRIL expression and ANRIL gene polymorphisms contribute to the risk of ischemic stroke in the Chinese Han population[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, 38(6): 1253-1269.
- [20] AYANA R, SINGH S, PATI S. Decoding crucial LncRNAs implicated in neurogenesis and neurological disorders[J]. *Stem*

- Cells Dev, 2017, 26(8): 541-553.
- [21] ZHONG Y, YU C, QIN W Y. LncRNA SNHG14 promotes inflammatory response induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating miR-136-5p/ROCK1[J]. Cancer Gene Ther, 2019, 26(7): 234-247.
- [22] DENG Z X, OU H, REN F, et al. LncRNA SNHG14 promotes OGD/R-induced neuron injury by inducing excessive mitophagy via miR-182-5p/BINP3 axis in HT22 mouse hippocampal neuronal cells[J]. Biol Res, 2020, 53(1): 38.
- [23] SALMENA L, POLISENO L, TAY Y, et al. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? [J]. Cell, 2011, 146(3): 353-358.
- [24] CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA[J]. Cell, 2011, 147(2): 358-369.
- [25] DING J, LI Y Z, PANG J J, et al. Targeting ninjurin 2 by miR-764 regulates hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced neuronal cell death[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 505(4): 1180-1188.
- [26] WEI R, ZHANG R F, LI H M, et al. miR-29 targets PUMA to suppress oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced cell death in hippocampal neurons[J]. Curr Neurovasc Res, 2018, 15(1): 47-54.
- [27] MENG Q L, YE C X, LU Y Q. miR-181c regulates ischemia/reperfusion injury-induced neuronal cell death by regulating c-Fos signaling[J]. Pharmazie, 2020, 75(2): 90-93.
- [28] OLDE LOOHUIS N F M, KOLE K, GLENNON J C, et al. Elevated microRNA-181c and microRNA-30d levels in the enlarged amygdala of the valproic acid rat model of autism[J]. Neurobiol Dis, 2015, 80: 42-53.
- [29] ZHANG L, DONG L Y, LI Y J, et al. The microRNA miR-181c controls microglia-mediated neuronal apoptosis by suppressing tumor necrosis factor[J]. J Neuroinflammation, 2012, 9(1): 211.
- [30] ZHANG X A, LIU Z H, SHU Q, et al. LncRNA SNHG6 functions as a ceRNA to regulate neuronal cell apoptosis by modulating miR-181c-5p/BIM signalling in ischaemic stroke[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(9): 6120-6130.
- [31] ZENG Z L, LIU Y J, ZHENG W, et al. MicroRNA-129-5p alleviates nerve injury and inflammatory response of Alzheimer's disease via downregulating SOX6[J]. Cell Cycle, 2019, 18(22): 3095-3110.

(李科 编辑)

本文引用格式：钱旭东, 李国芸, 卜一, 等. lncRNA SNHG14 通过 miR-181c-5p/SOX6 信号轴调控缺血性脑卒中神经元细胞凋亡[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(12): 41-48.

Cite this article as: QIAN X D, LI G Y, BU Y, et al. LncRNA SNHG14 regulates neuronal apoptosis in ischemic stroke through miR-181c-5p/SOX6 signal axis[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(12): 41-48.