

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.22.006

文章编号: 1005-8982 (2024) 22-0032-11

实验研究·论著

MicroRNA-17-5p调控Spry1缓解 脑缺血再灌注损伤的机制研究*

任翔¹, 靖颖霞², 周芝文¹

[湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院) 1. 神经内科, 2. 急诊科,
湖南 长沙 410016]

摘要: 目的 探究miR-17-5p通过靶向Spry1调控PI3K/Akt介导氧糖剥夺/复氧(OGD/R)细胞模型氧化应激及细胞增殖凋亡的分子机制,以阐明脑缺血损伤的发病机制。**方法** 通过OGD/R处理人脑微血管内皮细胞构建细胞模型,通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-17-5p和Spry1 mRNA表达;采用CCK-8法、流式细胞术检测细胞增殖、细胞凋亡;通过生物信息学网站StarBase预测miR-17-5p和Spry1的互补结合位点,并通过双荧光素酶实验分析两者的结合关系;Western blotting检测Spry1、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt蛋白相对表达量;试剂盒检测细胞中活性氧(ROS)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平;酶联免疫吸附试验测定肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-6浓度。**结果** 与对照组相比,OGD/R处理导致miR-17-5p表达降低($P < 0.05$),Spry1水平升高($P < 0.05$),细胞活力降低($P < 0.05$),细胞凋亡率增加($P < 0.05$),ROS相对荧光强度和MDA水平升高,SOD水平降低($P < 0.05$),TNF- α 、IL-1 β 和IL-6升高($P < 0.05$),p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白水平降低($P < 0.05$);与OGD/R组相比转染miR-17-5p mimics或者Spry1敲降载体后,细胞活力升高($P < 0.05$),细胞凋亡率减少($P < 0.05$),ROS相对荧光强度和MDA水平降低,SOD水平升高($P < 0.05$),TNF- α 、IL-1 β 和IL-6降低($P < 0.05$),p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt蛋白水平升高($P < 0.05$);双荧光素酶实验证实miR-17-5p和Spry1存在互补结合;同时转染miR-17-5p mimics和Spry1过表达载体后与OGD/R组相比,各指标均差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** miR-17-5p通过靶向Spry1调控PI3K/Akt介导OGD/R细胞模型氧化应激及细胞的增殖和凋亡。

关键词: 缺血性脑卒中; miR-17-5p; Spry1; 氧化应激

中图分类号: R743.3

文献标识码: A

Mechanism by which microRNA-17-5p regulates Spry1 to alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury*

Ren Xiang¹, Jing Ying-Xia², Zhou Zhi-Wen¹

[1. Department of Neurology, 2. Department of Emergency, Hunan Provincial People's Hospital (The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha, Hunan 410016, China]

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism by which miR-17-5p targeted Spry1 to regulate the PI3K/Akt pathway, mediating oxidative stress, cell proliferation, and apoptosis in an oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) cell model, and so as to elucidate the pathogenesis of cerebral hypoxic injury. **Methods** Human brain microvascular endothelial cells were treated with OGD/R to construct a cell model. The expression levels of miR-17-5p and Spry1 mRNA were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). The CCK-8 assay and flow cytometry were used to detect the levels of cell proliferation and apoptosis. The

收稿日期: 2024-03-25

* 基金项目: 湖南省卫生健康委科研计划项目(No. 202103071026)

binding sites between miR-17-5p and Spry1 were predicted using the bioinformatics website StarBase, and the binding relationship between them was analyzed by a dual-luciferase reporter assay. The protein levels of Spry1, p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt were detected by Western blotting. The levels of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in cells were detected with respective kits. The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 beta (IL-1 β), and IL-6 were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the control group, OGD/R treatment led to decreased expression of miR-17-5p ($P < 0.05$), increased levels of Spry1 ($P < 0.05$), lower cell viability ($P < 0.05$), higher apoptosis rates ($P < 0.05$), increased levels of ROS and MDA but decreased levels of SOD ($P < 0.05$), increased levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$), and decreased p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt protein levels ($P < 0.05$). Compared with the OGD/R group, transfection with miR-17-5p mimics or Spry1 knockdown vectors enhanced the cell viability ($P < 0.05$), reduced the apoptosis rate ($P < 0.05$), lowered the levels of ROS and MDA but elevated the levels of SOD ($P < 0.05$), downregulated the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$), and upregulated the p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt protein levels ($P < 0.05$). The dual-luciferase reporter assay confirmed the binding between miR-17-5p and Spry1. After co-transfection with miR-17-5p mimics and the Spry1 overexpression vectors, there was no significant difference in any indicators compared with the OGD/R group ($P > 0.05$). **Conclusions** MiR-17-5p regulates PI3K/Akt by targeting Spry1 to mediate oxidative stress, cell proliferation and apoptosis in the OGD/R cell model.

Keywords: ischemic stroke; miR-17-5p; Spry1; oxidative stress

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)又称脑梗死,是由局部脑组织区域血液供应障碍导致的脑组织缺血缺氧性病变坏死,其发病率高,病死率高,易复发,易致残^[1]。IS是>60岁患者残疾和死亡的主要原因,约占所有卒中的87%^[2]。迄今为止,治疗急性IS最有效的方法是血管再通。然而,由于半暗带的时间窗狭窄和继发性缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤,疗效十分有限^[3]。脑I/R导致的神经元损伤是一个复杂的病理生理过程,目前对I/R脑损伤后继发引起神经细胞损伤的发病机制并无定论,还有待深入研究。最近研究表明,miRNA参与了IS的发病进程,尤其是在I/R引起的脑损伤中^[4]。有报道称,miR-17-5p在IS患者血清中存在差异表达,其水平可能与脑卒中进展相关^[5],然而目前miR-17-5p在IS发挥作用的详细分子机制仍有待探究。本研究着重探讨了miR-17-5p通过靶向调控Spry1激活PI3K/Akt缓解氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的细胞损伤,初步阐明了miR-17-5p调控IS进展的相关分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人脑微血管内皮细胞(HBMVECs)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,细胞培养基、胎牛

血清和PBS缓冲液均购自美国Hyclone公司,胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)、青霉素-链霉素-两性霉素B混合溶液均购自北京Solarbio公司,CCK-8试剂盒购自美国Med Chem Express公司,Lipofectamine 3000购自美国Thermo Fisher Scientific公司,实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒购自上海生工生物工程股份有限公司,RNA引物由北京擎科生物科技有限公司合成,所有抗体均购自美国Abcam公司,活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(Malondialdehyde, MDA)检测试剂盒均购自美国Abcam公司,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 仪器与设备

恒温水浴锅购自上海博迅医疗生物,二氧化碳培养箱、酶标仪均购自美国Thermo Fisher Scientific公司,荧光定量PCR仪、凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司,流式细胞仪购自美国BD公司。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将HBMVECs细胞接种于含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素-两性霉素B混合溶液的培养基中,37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。构建OGD/R模型,细胞贴壁后换用无糖培养基在

37 ℃、0.5% 氧气、94.5% 氮气和 5% 二氧化碳培养箱中培养 6 h。去除无糖培养基换用正常培养基,在 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱培养 24 h。

1.3.2 细胞转染 将细胞接种于 6 孔板中培养至 60% 融合度,使用无血清培养基溶解 Lipofectamine 3000 将浓度均为 100 nmol/mL 的 mimics NC/miR-17-5p mimics 和 inhibitor NC/miR-17-5p inhibitor、siNC/si-Spry1 和 pcDNA3.1/pcDNA-Spry1 分别转染至细胞中。转染后在 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱内培养 4 h,再加入正常培养基培养 48 h 用于后续检测。

1.3.3 细胞分组 Control 组细胞不做任何处理,作为对照; mimics NC 组细胞转染 mimics NC; miR-17-5p mimics 组细胞转染 miR-17-5p mimics; inhibitor NC 组细胞转染 inhibitor NC; miR-17-5p inhibitor 组细胞转染 miR-17-5p inhibitor; OGD/R 组细胞构建 OGD/R 细胞模型; OGD/R+ miR-17-5p mimics 组细胞在 OGD/R 诱导的同时转染 miR-17-5p mimics; OGD/R+ miR-17-5p mimics+ Spry1 组细胞在 OGD/R 诱导的同时转染 miR-17-5p mimics 和 Spry1 过表达载体; OGD/R+ si-NC 组细胞在 OGD/R 诱导的同时转染 si-NC; OGD/R+ si-Spry1 组细胞在 OGD/R 诱导的同时转染 si-Spry1。

1.3.4 细胞活力检测 将细胞以 3 000 个/孔的浓度接种于 96 孔板中,每组设 5 个复孔,在 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱内培养过夜。各细胞经 OGD/R 和载体转染后 48 h,每孔加入 CCK-8 试剂 10 μL,继续培养 2 h。酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值,计算细胞存活率。

1.3.5 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 取对数期细胞通过 TRIzol(上海酶联生物科技有限公司)法抽提细胞中总 RNA,并检测 RNA 的浓度和纯度,逆转录合成 cDNA。将 cDNA 稀释 5 倍,吸取 1 μL 稀释后的 cDNA 样本,加入 1 μL 正向引物(10 mol/L),1 μL 反向引物(10 mol/L),加入 10 μL 2 × SYBR Green Mix,加水 7 μL 混匀,扩增目标片段,并检测 mRNA 表达水平。反应条件:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,59 ℃ 退火 20 s,70 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环。内参为 GAPDH 和 U6,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算相对表达量。引物序列见表 1。

1.3.6 ROS、SOD 和 MDA 水平检测 根据试剂盒说明书,配制相应浓度的各类缓冲液和工作液,处理

表 1 miR-17-5p、Spry1、GAPDH 和 U6 的引物序列表

基因	引物序列	长度/bp
miR-17-5p	正向: 5'-TGCGGCAAAGTGCTTACAGTG-3'	21
	反向: 5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'	19
Spry1	正向: 5'-ACCCTTCCTGTGTTTTTCAT-3'	19
	反向: 5'-AGTCACCTTGCTTTTCTTG-3'	19
GAPDH	正向: 5'-AAGAAGGTGGTGAAGCAGGC-3'	20
	反向: 5'-TCCACCACCCAGTTGCTGTA-3'	20
U6	正向: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAA-3'	22
	反向: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	20

细胞并收集相应样本,通过荧光显微镜观察细胞中 ROS 水平,计算相对荧光强度,测量 SOD 和 MDA 吸光度值,并根据标准曲线计算相应浓度。

1.3.7 流式细胞术检测细胞凋亡率 对照组细胞不作处理,其余各组转染相应载体 24 h 后经 OGD/R 诱导,消化洗涤并离心收集细胞;加入预冷 PBS 制成 1×10^5 个/mL 细胞密度的单细胞悬液;分别加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 PI 染色 10 min,最后每管加入 Binding Buffer 400 μL。流式细胞仪分析检测,采用 FlowJo 10 软件分析细胞凋亡率。

1.3.8 质粒载体构建与双萤光素酶报告分析 miR-17-5p 与 Spry1 的结合位点通过 starBase (<http://starbase.sysu.edu.cn/>) 预测。将含 Spry1 序列连接至双萤光素酶载体 pGL3,得到 pGL3-Spry1-WT 载体,并构建 pGL3-Spry1-MUT 的突变质粒。取对数期细胞接种于 96 孔板中,培养至细胞达到 60% 融合度,将 Spry1-WT 或 Spry1-MUT 质粒与 mimics-NC 或 miR-17-5p mimics 同时转染进细胞中,孵育 48 h 后,测定萤光素酶活力。验证 miR-17-5p 与 Spry1 的结合。

1.3.9 ELISA 法检测肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白细胞介素-1β (Interleukin-1β, IL-1β) 和 IL-6 水平 各组细胞在 6 孔板长至 80% 融合度,离心收集细胞上清液制备相应检测样品,根据试剂盒说明书,通过检测标准品浓度绘制标准曲线,并检测样品中的吸光度,根据标准曲线计算 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平。

1.3.10 Western blotting 检测蛋白表达 将各组细胞处理 24 h 后,消化洗涤并离心收集细胞,通过 RIPA 裂解法提取细胞中的蛋白,BCA 法检测蛋白浓度。使用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转膜

后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h。加入一抗, 4 °C 过夜, 洗膜 3 次, 加入二抗, 室温反应 2 h。洗膜 30 min 后加入化学发光试剂显色。凝胶成像仪采集图像, 采用 Image J 软件定量分析灰度值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 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, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-17-5p 能够缓解 OGD/R 诱导的细胞损伤

Control 组、mimics NC 组和 miR-17-5p mimics 组 miR-17-5p mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.06)、(1.06 ± 0.08)、(2.59 ± 0.16), 经方差分析, 差异有统计学意义 (*F* = 204.410, *P* = 0.000), mimics NC 组与对照组比较, 差异无统计学意义 (*P* > 0.05); miR-17-5p

mimics 组 miR-17-5p 相对表达量较 mimics NC 组高 (*P* < 0.05)。

Control 组、OGD/R 组和 OGD/R + miR-17-5p mimics 组 miR-17-5p mRNA 相对表达量分别为 (1.00 ± 0.10)、(0.44 ± 0.11)、(0.95 ± 0.08), 经方差分析, 差异有统计学意义 (*F* = 28.050, *P* = 0.000)。OGD/R 组 miR-17-5p 相对表达量较 Control 组低 (*P* < 0.05); OGD/R + miR-17-5p mimics 组 miR-17-5p 相对表达量较 OGD/R 组高 (*P* < 0.05)。

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组细胞存活率、细胞凋亡率比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。OGD/R 组细胞存活率较对照组低 (*P* < 0.05), OGD/R + miR-17-5p mimics 组细胞存活率较 OGD/R 组高 (*P* < 0.05); OGD/R 组细胞凋亡率较对照组高 (*P* < 0.05), OGD/R + miR-17-5p mimics 组细胞存活率较 OGD/R 组低 (*P* < 0.05)。见图 1 和表 2。

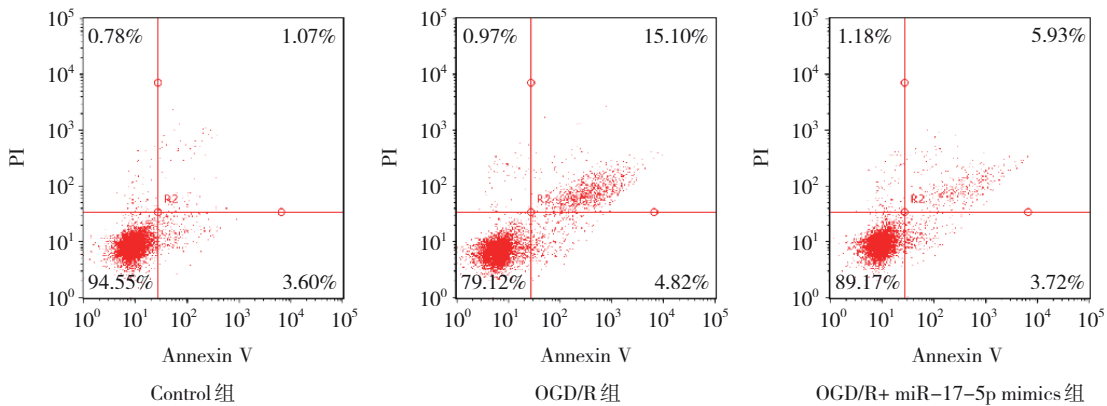


图 1 流式细胞图

表 2 Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组细胞存活率、细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
Control 组	100.00 ± 5.43	4.28 ± 1.09
OGD/R 组	71.07 ± 3.92	19.75 ± 1.43
OGD/R + miR-17-5p mimics 组	92.0 ± 3.82	10.11 ± 1.74
<i>F</i> 值	33.820	87.600
<i>P</i> 值	0.001	0.000

Control 组、OGD/R 组和 OGD/R + miR-17-5p mimics 组 ROS 相对荧光强度和 MDA、SOD 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。OGD/R 组 ROS 相对荧光强度和 MDA 水平较 Control

组高, SOD 水平较 Control 组低 (*P* < 0.05), OGD/R + miR-17-5p mimics 组 ROS 相对荧光强度和 MDA 水平较 OGD/R 组低, SOD 水平较 OGD/R 组高 (*P* < 0.05)。见表 3 和图 2。

Control 组、OGD/R 组和 OGD/R + miR-17-5p mimics 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。OGD/R 组较 Control 组高 (*P* < 0.05); OGD/R + miR-17-5p mimics 组较 OGD/R 组低 (*P* < 0.05)。见表 4。

2.2 miR-17-5p 靶向调控 Spry1 表达

starBase 网站预测 miR-17-5p 与 Spry1 结合位点, 并构建突变载体 (Spry1-MUT) (见图 3)。Spry1-WT 转染 mimics NC 组荧光素酶活力为 (1.00 ± 0.08)、

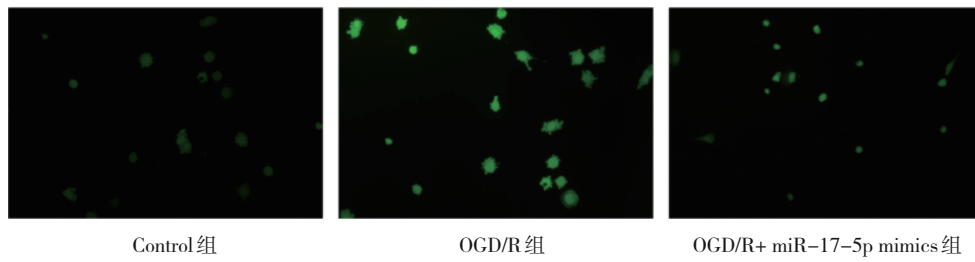


图2 各组 ROS 荧光强度 (×200)

表 3 Control 组、OGD/R 组和 OGD/R+ miR-17-5p mimics 组 ROS 相对荧光强度和 MDA、SOD 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS	MDA 蛋白/ (nmol/mg)	SOD 蛋白/ (u/mg)
Control 组	1.00 ± 0.11	5.22 ± 1.02	40.99 ± 1.99
OGD/R 组	8.40 ± 1.26	15.21 ± 1.27	20.05 ± 1.31
OGD/R+ miR-17-5p mimics 组	2.57 ± 0.87	10.14 ± 1.13	35.69 ± 1.59
F 值	58.120	57.370	130.001
P 值	0.000	0.000	0.000

表 4 Control 组、OGD/R 组和 OGD/R+ miR-17-5p mimics 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
Control 组	154.00 ± 13.84	112.10 ± 21.51	88.80 ± 13.71
OGD/R 组	507.70 ± 33.93	413.62 ± 23.72	369.01 ± 19.06
OGD/R+ miR-17-5p mimics 组	253.51 ± 26.07	204.50 ± 29.92	163.72 ± 18.61
F 值	148.010	111.810	211.000
P 值	0.000	0.000	0.000

miR-17-5p mimics 组为 (0.45 ± 0.08), 经 *t* 检验, 差异有统计学意义 ($t=9.596, P=0.001$)。Spry1-MUT 转染 mimics NC 组荧光素酶活力为 (1.00 ± 0.13)、miR-17-5p mimics 组为 (1.0 ± 0.12), 经 *t* 检验, 差异无统计学意义 ($t=0.496, P=0.748$)。

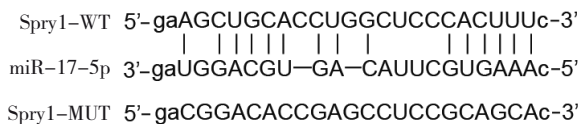


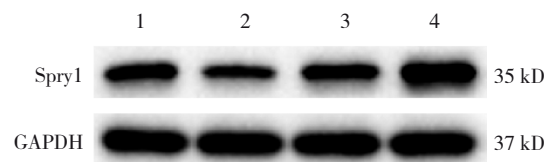
图3 starBase 预测 miR-17-5p 与 Spry1 结合位点

mimics NC 组、miR-17-5p mimics 组、inhibitor NC 组、miR-17-5p inhibitor 组 miR-17-5p、Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统

计学意义 ($P < 0.05$)。miR-17-5p mimics 组 miR-17-5p 的相对表达量较 mimics NC 组高 ($P < 0.05$), miR-17-5p inhibitor 组 miR-17-5p 的相对表达量较 inhibitor NC 组低 ($P < 0.05$), miR-17-5p mimics 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量较 mimics NC 组低 ($P < 0.05$), miR-17-5p inhibitor 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量较 inhibitor NC 组高 ($P < 0.05$)。见表 5 和图 4。

表 5 mimics NC 组、miR-17-5p mimics 组、inhibitor NC 组、miR-17-5p inhibitor 组 miR-17-5p、Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-17-5p	Spry1 mRNA	Spry1 蛋白
mimics NC 组	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	0.71 ± 0.06
miR-17-5p mimics 组	2.44 ± 0.12	0.53 ± 0.09	0.44 ± 0.07
inhibitor NC 组	1.05 ± 0.12	1.03 ± 0.11	0.67 ± 0.05
miR-17-5p inhibitor 组	0.45 ± 0.09	1.99 ± 0.15	0.91 ± 0.04
F 值	195.701	86.940	34.700
P 值	0.000	0.000	0.000



1: mimics NC 组; 2: miR-17-5p mimics 组; 3: inhibitor NC 组; 4: miR-17-5p inhibitor 组。

图4 蛋白条带图

2.3 敲降 Spry1 激活 PI3K/Akt 通路, 缓解 OGD/R 诱导的细胞损伤

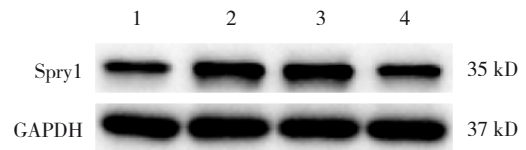
细胞经 OGD/R 处理后同时转染 Spry1 敲降载体, 各组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), OGD/R 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量较 Control 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + si-Spry1 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表

达量较 OGD/R + si-NC 组低 ($P < 0.05$)。见表 6 和图 5。

表 6 各组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Spry1 mRNA	Spry1 蛋白
Control 组	1.00 ± 0.09	0.45 ± 0.07
OGD/R 组	2.61 ± 0.19	0.72 ± 0.03
OGD/R + si-NC 组	2.72 ± 0.18	0.74 ± 0.05
OGD/R + si-Spry1 组	1.27 ± 0.10	0.4 ± 0.10
F 值	111.301	16.570
P 值	0.000	0.001

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + si-NC 组、OGD/R + si-Spry1 组细胞存活率、细胞凋亡率比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。OGD/R 组细胞存活率较 Control 组低 ($P < 0.05$), OGD/R + si-Spry1 组较 OGD/R + si-NC 组高 ($P < 0.05$); OGD/R 组细胞凋亡率较 Control 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + si-Spry1 组较



1: Control 组; 2: OGD/R 组; 3: OGD/R + si-NC 组; 4: OGD/R + si-Spry1 组。

图 5 蛋白条带图

OGD/R + si-NC 组低 ($P < 0.05$)。见表 7 和图 6。

表 7 Control 组、OGD/R 组、OGD/R + si-NC 组、OGD/R + si-Spry1 组细胞存活率、细胞凋亡率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
Control 组	100.00 ± 4.33	4.29 ± 0.91
OGD/R 组	70.73 ± 3.71	19.64 ± 1.06
OGD/R + si-NC 组	71.37 ± 5.72	19.92 ± 1.98
OGD/R + si-Spry1 组	91.30 ± 2.22	9.69 ± 1.46
F 值	36.680	74.37
P 值	0.000	0.000

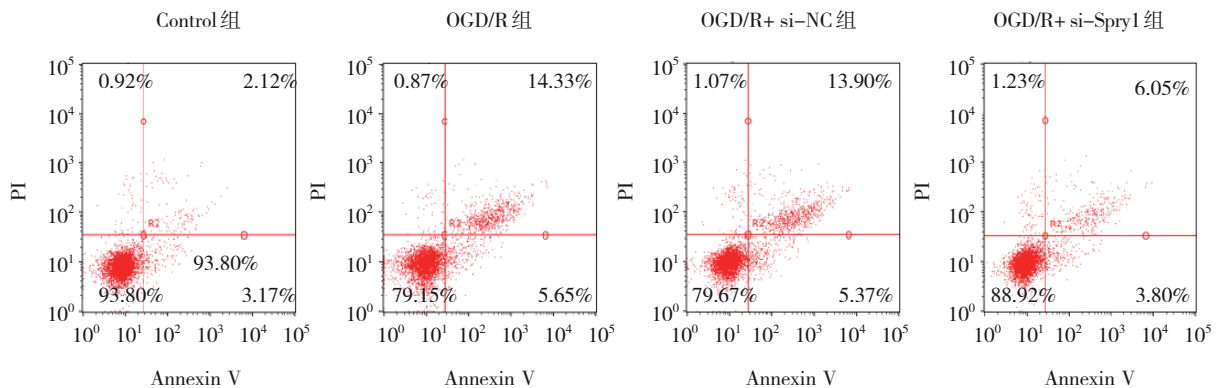


图 6 流式细胞图

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + si-NC 组和 OGD/R + si-Spry1 组 ROS 相对荧光强度和 MDA、SOD 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。OGD/R 组 ROS 相对荧光强度和 MDA 蛋白水平较 Control 组高 ($P < 0.05$), SOD 蛋白水平较 Control 组

低 ($P < 0.05$), OGD/R + si-Spry1 组 ROS 相对荧光强度和 MDA 蛋白水平较 OGD/R + si-NC 组低 ($P < 0.05$), SOD 蛋白水平较 OGD/R + si-NC 组高 ($P < 0.05$)。见图 7 和表 8。

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + si-NC 组和 OGD/R + si-Spry1 组

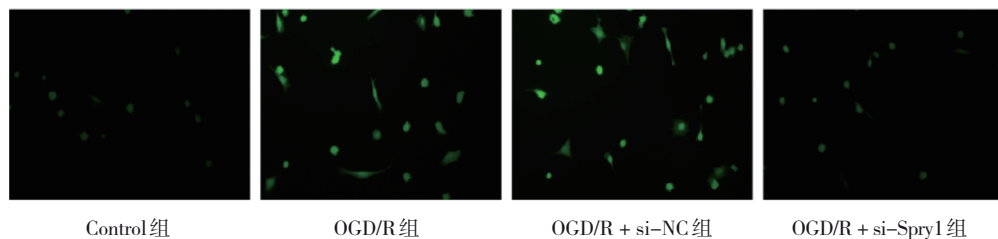


图 7 各组 ROS 荧光强度 ($\times 200$)

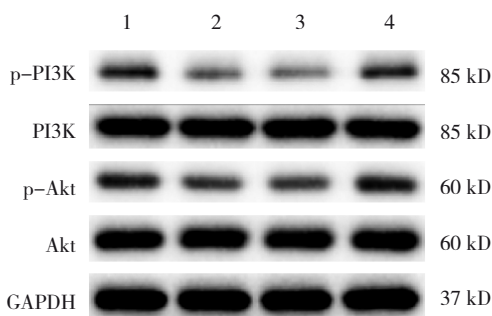
表 8 Control组、OGD/R组、OGD/R + si-NC组和 OGD/R + si-Spry1 组 ROS 相对荧光强度和 MDA、SOD 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROS	MDA 蛋白/ (nmol/mg)	SOD 蛋白/ (u/mg)
Control 组	1.00 ± 0.13	4.76 ± 1.56	40.74 ± 2.58
OGD/R 组	11.08 ± 1.26	15.54 ± 1.62	20.57 ± 1.40
OGD/R + si-NC 组	11.54 ± 1.43	16.25 ± 2.09	21.17 ± 1.90
OGD/R + si-Spry1 组	2.41 ± 0.46	9.323 ± 1.06	35.03 ± 1.88
F 值	95.850	33.860	77.750
P 值	0.000	0.000	0.000

R + si-Spry1 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。OGD/R 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平较 Control 组高($P < 0.05$), OGD/R + si-Spry1 组较 OGD/R + si-NC 组低($P < 0.05$)。见表 9 和图 8。

表 9 Control组、OGD/R组、OGD/R + si-NC组和 OGD/R + si-Spry1 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Control 组	150.90 ± 16.60	110.29 ± 19.71	85.83 ± 14.45
OGD/R 组	505.51 ± 25.75	406.52 ± 22.19	358.10 ± 28.54
OGD/R + si-NC 组	514.11 ± 31.71	408.40 ± 27.08	358.10 ± 28.54
OGD/R + si-Spry1 组	257.42 ± 29.01	200.11 ± 28.41	165.23 ± 26.62
F 值	142.410	111.796	93.621
P 值	0.000	0.000	0.000



1: Control 组; 2: OGD/R 组; 3: OGD/R + si-NC 组; 4: OGD/R + si-Spry1 组。

图 8 蛋白条带图

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + si-NC 组、OGD/R + si-Spry1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达

量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。OGD/R 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量较 Control 组低($P < 0.05$), OGD/R + si-Spry1 组较 OGD/R + si-NC 组高($P < 0.05$)。见表 10。

表 10 Control组、OGD/R组、OGD/R + si-NC组、OGD/R + si-Spry1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
Control 组	0.58 ± 0.07	0.91 ± 0.06
OGD/R 组	0.24 ± 0.07	0.31 ± 0.06
OGD/R + si-NC 组	0.24 ± 0.08	0.33 ± 0.05
OGD/R + si-Spry1 组	0.54 ± 0.08	0.58 ± 0.04
F 值	19.401	24.980
P 值	0.001	0.001

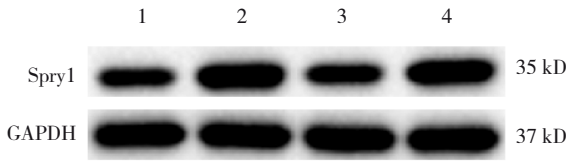
2.4 miR-17-5p 调控 Spry1, 激活 PI3K/Akt 缓解 OGD/R 诱导的细胞损伤

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。OGD/R 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量较 Control 组高($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics 组较 OGD/R 组低($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组较 OGD/R + miR-17-5p mimics 组高($P < 0.05$)。见表 11 和图 9。

表 11 Control组、OGD/R组、OGD/R + miR-17-5p mimics组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 Spry1 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Spry1 mRNA	Spry1 蛋白
Control 组	1.00 ± 0.13	0.43 ± 0.09
OGD/R 组	2.54 ± 0.21	0.81 ± 0.06
OGD/R + miR-17-5p mimics 组	1.24 ± 0.08	0.51 ± 0.06
OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组	2.10 ± 0.25	0.81 ± 0.07
F 值	47.290	24.200
P 值	0.000	0.000

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组细胞存活率、细胞凋亡率比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。OGD/R 组细胞存活率较



1: Control 组; 2: OGD/R 组; 3: OGD/R + miR-17-5p mimics 组; 4: OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组。

图 9 蛋白条带图

Control 组低 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics 组较 OGD/R 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组较 OGD/R + si-NC 组低 ($P < 0.05$); OGD/R 组细胞凋亡率较 Control 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics 组较 OGD/R 组低 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组较 OGD/R + miR-17-5p mimics 组高 ($P < 0.05$)。见表 12 和图 10。

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 ROS 相对荧光强度和 MDA、SOD 蛋白水平比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。OGD/R

表 12 Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 细胞存活率、细胞凋亡率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
Control 组	100.00 ± 4.91	4.91 ± 1.80
OGD/R 组	70.85 ± 5.90	19.51 ± 2.74
OGD/R + miR-17-5p mimics 组	89.59 ± 3.71	9.90 ± 1.63
OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组	70.75 ± 7.45	18.69 ± 1.67
F 值	19.710	37.011
P 值	0.000	0.000

组 ROS 相对荧光强度和 MDA 蛋白水平较 Control 组高 ($P < 0.05$), SOD 蛋白水平较 Control 组低 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics 组 ROS 相对荧光强度和 MDA 蛋白水平较 OGD/R 组低 ($P < 0.05$), SOD 蛋白水平较 OGD/R 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 ROS 相对荧光强度和 MDA 蛋白水平较 OGD/R + miR-17-5p mimics 组高 ($P < 0.05$), SOD 蛋白水平较 OGD/R + miR-17-5p mimics 组低 ($P < 0.05$)。见表 13 和图 11。

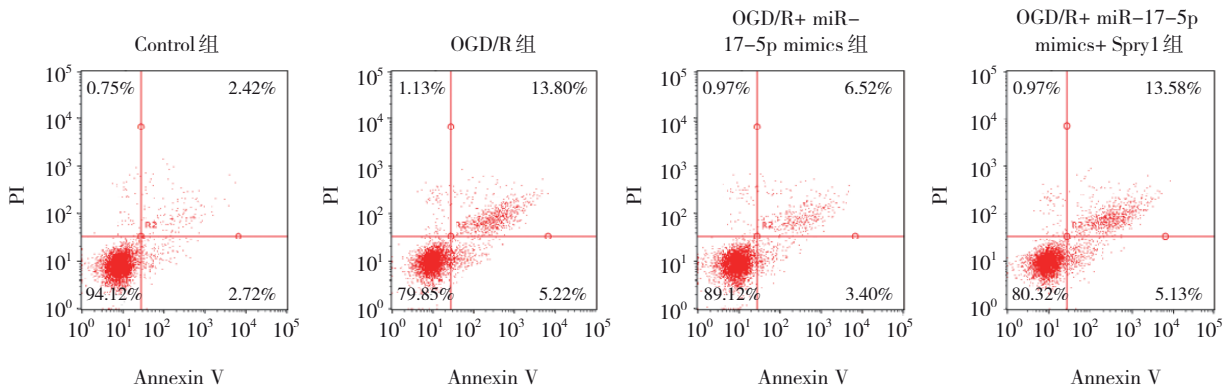


图 10 流式细胞图

表 13 Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 ROS 相对荧光强度和 MDA、SOD 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s$)

分组	ROS	MDA 蛋白/(nmol/mg)	SOD 蛋白/(u/mg)
Control 组	1.00 ± 0.15	4.99 ± 2.33	39.46 ± 2.26
OGD/R 组	9.98 ± 1.31	17.91 ± 1.42	20.46 ± 1.99
OGD/R + miR-17-5p mimics 组	2.25 ± 0.63	10.72 ± 1.44	32.21 ± 2.81
OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组	10.44 ± 1.84	16.64 ± 1.36	21.46 ± 3.76
F 值	54.070	37.450	31.851
P 值	0.000	0.000	0.000

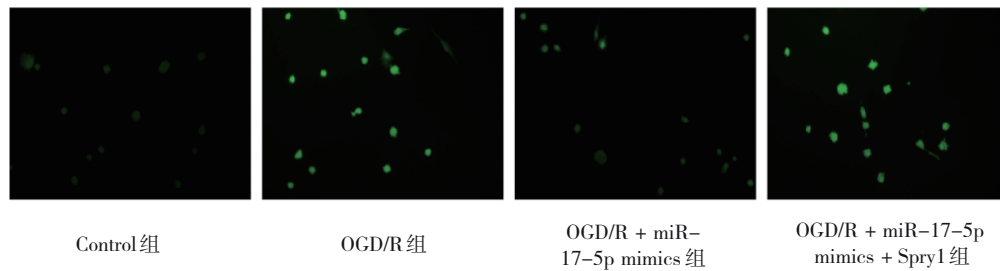


图 11 各组 ROS 相对荧光强度 (× 200)

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: OGD/R 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平均较 Control 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics 组较 OGD/R 组低 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组较 OGD/R + miR-17-5p mimics 组高 ($P < 0.05$)。见表 14。

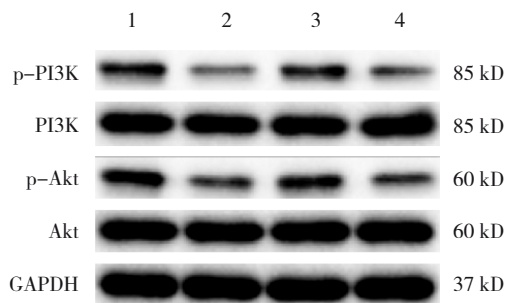
表 14 Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
Control 组	144.61 ± 19.81	105.60 ± 14.83	80.79 ± 17.59
OGD/R 组	510.52 ± 47.63	400.81 ± 31.07	333.39 ± 31.47
OGD/R + miR-17-5p mimics 组	276.91 ± 50.18	199.89 ± 27.46	157.40 ± 28.04
OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组	487.63 ± 46.16	380.21 ± 20.74	295.51 ± 10.26
F 值	50.430	100.301	75.870
P 值	0.000	0.000	0.000

Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 相对表达量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。OGD/R 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 相对表达量均较 Control 组低 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics 组较 OGD/R 组高 ($P < 0.05$), OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组较 OGD/R + miR-17-5p mimics 组低 ($P < 0.05$)。见表 15 和图 12。

表 15 Control 组、OGD/R 组、OGD/R + miR-17-5p mimics 组、OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
Control 组	0.57 ± 0.06	0.61 ± 0.06
OGD/R 组	0.21 ± 0.03	0.32 ± 0.03
OGD/R + miR-17-5p mimics 组	0.55 ± 0.04	0.57 ± 0.06
OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组	0.20 ± 0.03	0.34 ± 0.04
F 值	19.401	24.980
P 值	0.001	0.001



1: Control 组; 2: OGD/R 组; 3: OGD/R + miR-17-5p mimics 组; 4: OGD/R + miR-17-5p mimics + Spry1 组。

图 12 蛋白条带图

3 讨论

miRNA 是一类高度保守的,长度为 17 ~ 25 个核苷酸的非蛋白编码核糖核酸,在多个表观遗传水平调节基因表达,包括 mRNA 降解、mRNA 隔离、翻译抑制和转录抑制^[6]。已有文献证实 miRNAs 能够参与各种疾病的进展,包括癌症、骨关节炎、心血管疾病、阿尔兹海默症等^[7]。近年来随着科学技术的不断进步,有研究证实 miRNAs 通过调控细胞的生物学功能参与脑卒中的进展,一些分子也被建议作为脑卒中的治疗靶点^[4,8-9]。目前研究发现,多种 miRNA 在脑卒中患者的血液和脑脊液中存在差异

表达, 例如有研究显示, IS 患者血液中 miR-122、miR-148a、let-7i、miR-19a、miR-320d、miR-4429 表达水平升高, 而 miR-363、miR-487b 表达下调, 这些 miRNA 的差异表达有可能为 IS 的诊断和治疗提供研究方向^[10]。有研究报道, miR-17-5p 能够通过抑制 PTEN、BIM 通路来减轻肾脏 I/R 损伤^[11]; 同样有研究发现, 右美托咪啶通过 miR-17-5p/TLR4/NF- κ B 轴减弱氧葡萄糖剥夺/再灌注诱导的肾上腺嗜铬细胞瘤神经炎症^[12]。表明 miR-17-5p 在 I/R 损伤过程中起重要作用。最新研究也证实, miR-17-5p 通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 靶向 PTEN 抑制脑缺血/复氧损伤^[13]。本研究结果与其一致, 证实了 miR-17-5p 在脑 I/R 损伤中发挥重要作用, 能够通过抑制细胞炎症反应和氧化应激保护细胞免受损伤。并且通过生物信息学预测与实验验证发现 miR-17-5p 能够靶向结合 Spry1, 并通过调节 Spry1 表达水平调控下游 PI3K/Akt 信号通路来缓解 OGD/R 诱导的细胞损伤。本研究进一步阐明 miR-17-5p 调控 PI3K/Akt 信号通路的具体分子机制, 丰富 miR-17-5p 在 IS 的作用网络。

Spry1 蛋白是受体酪氨酸激酶信号拮抗剂蛋白 1, 其富含半胱氨酸, 具有高度保守的 N-端功能域, C-端富含半胱氨酸的功能域以及 Raf1 结合功能域。SPRY1 蛋白能够负调控多种生长因子信号的水平, 在调节皮肤表皮细胞自然衰老以及肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移及凋亡等过程中发挥重要作用^[14-16]。有研究发现, 抑制心肌细胞中 Spry1 水平对心脏 I/R 损伤具有保护作用^[17], 该研究首次报道 Spry1 在 I/R 损伤中的作用, 并且证实了在小鼠心肌梗模型中敲除 Spry1 显著减少心肌梗死面积, 保护心肌细胞线粒体膜电位的稳定。本研究则证实 Spry1 在 OGD/R 诱导的人脑微血管内皮细胞中表达显著升高, 而敲降 Spry1 后明显抑制 OGD/R 诱导的氧化应激和炎症反应, 进一步抑制 OGD/R 导致的细胞凋亡, 提高细胞存活率。并且本研究证实 Spry1 是受 miR-17-5p 调控表达, 两者表达呈负相关, 在 OGD/R 细胞模型中转染 miR-17-5p mimics 显著抑制 Spry1 的表达并缓解细胞损伤, 而同时转染 miR-17-5p mimics 和过表达 Spry1 则逆转 miR-17-5p 的作用, 无法影响 OGD/R 导致的细胞炎症反应和氧化应激。这表明 Spry1 对 IS 患者来说是一个严重的致病因

子, 本研究结果将为 IS 的诊断和治疗提供新的靶点。

PI3K/Akt 信号通路是细胞中一条非常重要的通路, 参与调节了细胞的各项生物学功能, 包括增殖、代谢、转录和蛋白质合成等^[18]。有研究表明, PI3K/Akt 信号通路通过抑制促凋亡信号、炎症和线粒体产生的 ROS, 发挥抗凋亡作用, 促进细胞生长和血管生成, 在心脏、肾脏和肝脏的 I/R 损伤中发挥重要作用, 被认为是 I/R 损伤的潜在治疗靶点^[19-22]。最近的研究也表明 PI3K/Akt 参与介导了大鼠脑缺血/再灌注损伤, 金银素治疗能通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路改善大鼠脑缺血/再灌注损伤。本研究同样证实了 PI3K/Akt 通路活性被 OGD/R 处理所抑制, 而 miR-17-5p mimics 或敲降 Spry1 能够激活 PI3K/Akt, 进而抑制细胞氧化应激和炎症反应。抑制 Spry1 能够激活 PI3K/Akt 信号通路的研究结果与先前在甲状腺癌研究中的结果相一致^[23]。

综上所述, 本研究阐明 miR-17-5p 通过靶向结合 Spry1, 负调节 Spry1 表达水平介导 PI3K/Akt 信号通路来缓解 OGD/R 诱导的细胞炎症反应和氧化应激, 阐明 miR-17-5p 在 IS 的作用机制。该分子机制的发现为 IS 的诊断和治疗提供了新思路。然而, 目前仅在细胞水平的研究还不能完全反映体内的作用机制, 笔者后续将会通过动物模型验证 miR-17-5p 的体内作用机制和功能。另外由于 miRNAs 具有多重靶向功能, miR-17-5p 在 IS 的其他分子机制还有待进一步深入研究, 对其在临床诊断治疗中的应用仍需要更多的研究和论证。

参 考 文 献 :

- [1] FESKE S K. Ischemic stroke[J]. *Am J Med*, 2021, 134(12): 1457-1464.
- [2] BAO M H, SZETO V, YANG B B, et al. Long non-coding RNAs in ischemic stroke[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 281.
- [3] YAPCA O E, BOREKCI B, SULEYMAN H. Ischemia-reperfusion damage[J]. *Eurasian J Med*, 2013, 45(2): 126-127.
- [4] VASUDEVA K, MUNSHI A. miRNA dysregulation in ischaemic stroke: focus on diagnosis, prognosis, therapeutic and protective biomarkers[J]. *Eur J Neurosci*, 2020, 52(6): 3610-3627.
- [5] WU J, DU K, LU X. Elevated expressions of serum miR-15a, miR-16, and miR-17-5p are associated with acute ischemic stroke[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(11): 21071-21079.
- [6] IM H I, KENNY P J. MicroRNAs in neuronal function and dysfunction[J]. *Trends Neurosci*, 2012, 35(5): 325-334.

- [7] BUSHATI N, COHEN S M. microRNA functions[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007, 23: 175-205.
- [8] MAITRIAS P, METZINGER-LE MEUTH V, NADER J, et al. The involvement of miRNA in carotid-related stroke[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(9): 1608-1617.
- [9] SOHRABJI F, SELVAMANI A. Sex differences in miRNA as therapies for ischemic stroke[J]. *Neurochem Int*, 2019, 127: 56-63.
- [10] JICKLING G C, ANDER B P, ZHAN X H, et al. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99283.
- [11] MA M, FU L, JIA Z H, et al. miR-17-5p attenuates kidney ischemia-reperfusion injury by inhibiting the PTEN and BIM pathways[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(20): 1545.
- [12] SUO L Y, WANG M Y. Dexmedetomidine attenuates oxygen-glucose deprivation/ reperfusion-induced inflammation through the miR-17-5p/ TLR4/ NF- κ B axis[J]. *BMC Anesthesiol*, 2022, 22(1): 126.
- [13] REN X, JING Y X, ZHOU Z W, et al. MiR-17-5p inhibits cerebral hypoxia/reoxygenation injury by targeting PTEN through regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Int J Neurosci*, 2022, 132(2): 192-200.
- [14] YANG E, JUAN Z, HENGSHU Z. Mechanism of SPRY1 methylation regulating natural aging of skin epidermal cells[J]. *J Cosmet Dermatol*, 2020, 19(5): 1224-1230.
- [15] LV G Y, WANG Y Y, JI C X, et al. SPRY1 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis by activating Hedgehog pathway in acute myeloid leukemia[J]. *Hematology*, 2022, 27(1): 1-10.
- [16] HE Q, JING H Y, LIAW L, et al. Suppression of spry1 inhibits triple-negative breast cancer malignancy by decreasing EGF/EGFR mediated mesenchymal phenotype[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 23216.
- [17] ALAKOSKI T, ULVILA J, YRJÖLÄ R, et al. Inhibition of cardiomyocyte Sproutyl protects from cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(2): 7.
- [18] MANNING B D, TOKER A. Akt/PKB signaling: navigating the network[J]. *Cell*, 2017, 169(3): 381-405.
- [19] ZHANG R J, ZHANG L, MANAENKO A, et al. Helium preconditioning protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(5): 1048-1055.
- [20] COVINGTON S M, BAULER L D, TOLEDO-PEREYRA L H. Akt: a therapeutic target in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *J Invest Surg*, 2017, 30(1): 47-55.
- [21] YU P, MA S C, DAI X C, et al. Elabela alleviates myocardial ischemia reperfusion-induced apoptosis, fibrosis and mitochondrial dysfunction through PI3K/Akt signaling[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(8): 4467-4477.
- [22] LIU C, CHEN K, WANG H X, et al. Gastrin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by a PI3K/Akt/bad-mediated anti-apoptosis signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 540479.
- [23] ZOU M J, BAITEI E Y, AL-RIJJAL R A, et al. KRAS(G12D)-mediated oncogenic transformation of thyroid follicular cells requires long-term TSH stimulation and is regulated by SPRY1[J]. *Lab Invest*, 2015, 95(11): 1269-1277.

(李科 编辑)

本文引用格式: 任翔, 靖颖霞, 周芝文. MicroRNA-17-5p 调控 Spry1 缓解脑缺血再灌注损伤的机制研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(22): 32-42.

Cite this article as: REN X, JING Y X, ZHOU Z W. Mechanism by which microRNA-17-5p regulates Spry1 to alleviate cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(22): 32-42.