doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.12.008

# miR-124 与 MAPK/ERK 通路对调节脑梗死大鼠神经细胞凋亡的影响\*

职 瑾 段 斌 2 王 静 1 王 清 1 王虎清 3

(1 西安市第一医院 西北大学附属第一医院 神经内科 陕西 西安 710002;2 陕西省人民医院肾病血透中心 陕西 西安 710068; 3 西安交通大学第二附属医院神经内科 陕西 西安 710004)

摘要目的:研究 miR-124 和 MAPK/ERK 途径对脑梗死大鼠神经细胞凋亡的影响及其可能的机制。方法:本研究将 SD 大鼠随机 分为假手术组(Sham 组)、模型组(CI 组)、miR-124 组(miR 组)、脑梗死 +miR-124 组(CI+miR 组)和脑梗死 +MEK/ERK 阻滞剂组 (CI+U0126 组),采用 mNSS 评分法评估大鼠神经功能损伤程度,采用 TTC 染色检测脑梗死体积,采用尼式染色检查脑组织的病 理情况,采用 TUNEL 染色法检测大鼠脑神经细胞凋亡,TRIzol 法提取总 RNA,RT-PCR 检测 miR-124、ERK1 和 ERK2 基因表达, 蛋白质免疫印迹法检测 Caspase-3、Bax、Bcl-2、MEK2 和 ERK1 蛋白表达水平。结果:与 Sham 组和 miR 组相比,CI 组、CI+miR 组 和 CI+U0126 组大鼠的脑梗死体积、mNSS 评分和脑含水量均显著增加(P<0.01)。Sham 组、miR 组、CI+miR 组和 CI+U0126 组大 鼠的脑组织中尼式体的数量显著高于 CI 组,模型组大鼠的脑神经元结构被破坏且出现核移位和细胞坏死等病理变化;与 Sham 组和 miR 组相比,CI 组大鼠中 miR-124 的表达水平显著降低(P<0.01),CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠中 miR-124 的表达水平显 著上调(P<0.01)。TUNEL 染色结果显示,与模型组相比,CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠 中调产124 的表达水平显 着上调(P<0.01)。TUNEL 染色结果显示,与模型组相比,CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠脑组织中 Caspase-3 和 Bax 蛋 白表达水平显著下调,Bcl-2 蛋白的表达水平显著上调(P<0.01)。与模型组相比,CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠脑组织中Caspase-3 和 Bax 蛋

关键词:miR-124;MAPK/ERK 信号通路;脑梗死;神经细胞凋亡 中图分类号:R-33;R743.3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2021)12-2235-06

## Effects of miR-124 and MAPK/ERK Pathway on Neuronal Apoptosis in Rats with Cerebral Infarction\*

ZHI Jin', DUAN Bin<sup>2</sup>, WANG Jing', WANG Qing', WANG Hu-qing<sup>3</sup>

(1 Department of Neurology, Xi'an No.1 Hospital, The First Affiliated Hospital of Northwest University, Xi'an, Shaanxi, 710002, China; 2 Nephrotic Hemodialysis Center, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China;

3 Department of Neurology, The second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of miR-124 and MAPK/ERK pathways on neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction and the possible underlying mechanisms. **Methods:** In this experiment, SD rats were randomly divided into a sham operation group (sham group), a cerebral infarction group (CI group), miR-124 group (miR group), a CI+miR-124 group (CI+miR group) and cerebral infarction+MEK/ERK blocker group (CI+U0126 group). The mNSS scoring method was used to evaluate the degree of neurological damage in rats. The cerebral infarction volume and pathological conditions of rat brain tissue were detected by TTC staining and Nissl staining, respectively. TUNEL staining was used to detect rat brain neuronal apoptosis, TRIzol method was used to extract total RNA, RT-PCR was used to detect miR-124, ERK1 and ERK2 gene expression, and Western blot was used to detect Caspase-3, Bax, Bcl-2, MEK2 and ERK1 protein expression. **Results:** Compared with the sham group and miR group, the cerebral infarct volume, mNSS score and brain water content of the CI group, CI+miR group and CI+U0126 group was destroyed and showed nuclear shift and cell pathological changes such as necrosis. Compared with Sham group and miR group, was destroyed and showed nuclear shift and cell pathological changes such as necrosis. Compared with Sham group and miR group, the expression level of miR-124 in CI group rats was significantly reduced, while the miR-124 expression level in rats of the CI group, the CI group were significantly up-regulated (*P*<0.01). The results of TUNEL staining showed that compared with the CI group the number of apoptosis in rats in the CI+miR group and CI+U0126 group were significantly up-regulated (*P*<0.01). The results of TUNEL staining showed that compared with the CI group, the number of apoptosis in rats in the CI+miR group and CI+U0126 group was significantly up-regulated (*P*<0.01).

作者简介:职谨(1979-),女,硕士研究生,副主任医师,主要研究方向:脑血管病和神经系统感染,

<sup>\*</sup>基金项目:陕西省自然科学基础研究计划项目(2017JM8142);西安市科技计划项目(2019114613YX001SF039(6))

E-mail: Zhijin7911@163.com, 电话: 13669229120

<sup>(</sup>收稿日期:2020-12-09 接受日期:2021-01-05)

down-regulated (P<0.01). Compared with the CI group, the relative expression level of Caspase-3 and Bax protein in the brain tissue of the CI+miR group and CI+U0126 group was significantly down-regulated, and the relative expression level of Bcl-2 protein was significantly up-regulated (P<0.01). Compared with the CI group, the relative protein expression level of phosphorylated p-MEK-2 and p-ERK1/2 in the brain tissue of the CI+miR group and CI+U0126 group was significantly down-regulated(P<0.01). **Conclusion:** miR-124 might inhibit the activation of MAPK/ERK signaling pathway, reduce neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction, and finally play a protective role.

Key words: miR-124; MAPK/ERK signaling pathway; Cerebral infarction; Neuronal apoptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743.3 Document code: A Article ID: 1673-6273(2021)12-2235-06

## 前言

脑梗死(cerebral infarction,CI)是一种缺血性脑血管疾病, 是继缺血性心脏病之后的第二大致死疾病<sup>[1]</sup>。CI 是由于脑血供 异常引起的脑组织缺,其高发病率和高死亡率严重威胁人类健 康<sup>[2]</sup>。由脑缺血引起的脑梗塞很容易导致不可逆的神经元损害<sup>[3]</sup>; 缺血性脑梗死主要与性别、年龄、高血压、高脂血症和糖尿病史 等影响因素相关<sup>[4]</sup>。因此,CI 的早期诊断和治疗具有重要意义, 但是,目前关于脑梗死的信号通路传导机制尚不清楚。

丝裂原活化的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)在信号转导中起关键作用<sup>[5]</sup>。研究表明, MAPK/ERK 信 号途径对于调节脑梗死过程中的炎症和细胞凋亡至关重要阿。 MAPK/ERK 途径在调节神经元的增殖和分化中也起重要作 用。miRNA 在多种生理活动中发挥重要作用,如细胞增殖、分 化和调亡<sup>[7]</sup>。miR-124 在人类和哺乳动物的中枢神经系统中高 表达,miR-124 具有促进神经元发育的作用,包括促进神经突 触的延伸、诱导干细胞向神经元分化、促进神经胶质细胞的成 熟,miR-124还可参与受损神经元的修复<sup>88</sup>。研究发现,在小鼠 CI 模型中,miR-124 可激活 Wnt/β-catenin 信号通路,最终抑制 CI 大鼠的神经元凋亡<sup>19</sup>。Yu 等证实 miR-124 的保护作用可能 与其对 C/EBP-α 的靶向抑制有关<sup>[10]</sup>。然而,关于大鼠脑梗死后 MAPK/ERK 信号传导途径与神经细胞凋亡之间的关系以及 miR-124 对 CI 大鼠神经细胞凋亡的影响和对 MAPK/ERK 信 号通路的作用机制尚无研究报道。因此,在本研究中,以 SD 大 鼠为对象建立 CI 模型,研究 miR-124 通过调节 MAPK/ERK 途 径对 CI 大鼠神经细胞凋亡的影响及对脑组织的保护作用。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料

12-14 周龄体重 (270±13.1)g 的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由西安交通大学医学部医学实验动物中心(SYXK (陕)2018-001) 提供, 大鼠的周龄和体重无统计学差异(P>0. 05)。TRIzol 试剂(Invitrogen,15596026-JY),micrON<sup>™</sup> miRNA agomir (Ribobio,miR12130042),Super-Script IV 反转录(RT) 试剂盒 (GeneBetter,P414-100),RIPA 裂解缓冲液(Amresco, N653-100ML), 一抗 ERK1 和 ERK2(Bioss,bs-0022P), 一抗 caspase-3 (ThermoFisher,437800), 一抗 Bax(Sigma-Aldrich, B8429), 一抗 Bcl-2 (Bioss,bs-0032P), 一抗 p-MEK-2(OmnimAbs,OM187874), 二抗 IgG (Santa CruzBiotechnology, sc-2004),ECL 蛋白质印迹检测试剂(Solarbio,PE0010),PVDF 膜(BioRad,1620177),二辛可宁酸(BCA)(TCI,B3509)。

## 1.2 方法

1.2.1 实验分组和动物模型建立 根据改良的 Longa 方法<sup>[7]</sup>建 立脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO) 大鼠 模型。构建大鼠 CI 模型:将大鼠腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉 并固定,然后分离左颈总动脉和迷走神经;结扎左颈总动脉和 颈外动脉并在左颈总动脉远端打结,分离颈内动脉并在颈内动 脉近端切开切口,从颈内动脉切口插入缝合线向前推动约18 mm,随后结扎颈内动脉并用尼龙线缝合并消毒。将 SD 大鼠随 机分为假手术组、脑梗死模型组(CI组)、miR-124组(miR组)、 脑梗死 +miR-124 组(CI+miR 组)和脑梗死 +MEK/ERK 阻滞剂 组(CI+U0126组),各组均为5只。CI建模成功的大鼠共23 只,死亡2只(均为CI组)。CI+miR组大鼠使用脑立体定位仪 将 micrONTM miRNA-124 agomir 注入大鼠脑室,24 h 后收集 脑组织样品,并进行后续实验研究。CI+U0126 组大鼠:CI 模型 成功建立后,使用 MEK/ERK 阻滞剂 (U0126,高效的 MEK/ERK 阻滞剂)处理,将 U0126 溶解于磷酸缓冲液中并稀 释成 40 µmol/L,将总量 10 µL 溶液注入 5 只 CI 模型建成的大 鼠颈内静脉。假手术组大鼠不做结扎,其余操作同 CI 模型组操 作;miR-124 组为在假手术组大鼠基础上使用脑立体定位仪将 micrONTM miRNA-124 agomir 注入大鼠脑室。

1.2.2 大鼠 mNSS 评分和脑含水量检测 术后改良神经功能 损伤程度评分(Postoperative modified neurological severity score,mNSS)参考 Schabitz 建立的量表<sup>®</sup>,并做了部分修改。本 实验评估时将其分数表示为 0-20,其中 0 代表正常,1-5 代表轻 度损伤,6-10 代表中度损伤,11-20 代表严重损伤,20 代表最严 重的神经功能损伤。脑含水量检测:各组分别取 5 只大鼠,并完 整的取出脑组织,去除中脑、脑桥、垂体后用滤纸吸干表面水 分,然后迅速称重以得到湿重。然后放入干燥箱内烤干(85℃) 5 h 后称取干重,取均值并计算脑组织含水量。

1.2.3 TTC 染色检测脑梗死体积和尼式染色检查脑组织的病理 情况 实验大鼠用 2%戊巴比妥钠麻醉致死后迅速断头取脑, 分离获取新鲜的大鼠脑组织放入研磨设备中,置于 -80℃冰箱 快速冷冻 30 min。取出脑组织,从额极的位置由前向后每隔 1.0 mm 冠状切取脑组织切片,每个组织的切片数不低于 6 片。 将切片置于 2%现配的 TTC 溶液中,37℃水浴避光孵育 30 min。然后使用 4%多聚甲醛固定并拍照,实验中各处理组均 重复 3 次。正常脑组织染成红色,梗死部分脑组织成白色,染色 后数码相机(尼康)拍照,用 Image J 3.0 图象分析软件处理评估 脑组织病理情况并计算脑梗死体积。取大鼠脑组织切片,进行 尼式染色(Nissl staining)。首先用甲基紫染色液涂片,染色 20 min,后用蒸馏水冲洗。Nissl Differentiation 分化 8s,后直至大部 分染色液被消除。然后依次用无水乙醇和二甲苯处理后,放置 显微镜下观察,尼式体染色为深蓝色,细胞核为淡蓝色。

1.2.4 TUNEL 染色 将大鼠脑组织切片(各组均重复 3 次)置于 60℃的烤箱中烘烤 30 min,然后用二甲苯脱蜡 (5 min× 3 次),并用 100%乙醇、95%乙醇和 70%乙醇脱水 3 次。然后将切 片与蛋白激酶 K 孵育 30 min,并用 PBS 洗涤。然后将切片与末端脱氧核苷酸转移酶和荧光素酶标记的 dUTP 在 37℃下反应 1 h。加入辣根过氧化物酶标记的特异性抗体,再在 37℃的培养箱中培养 1 h。TUNEL 染色后,对切片进行拍摄并在荧光显微镜下计数。

1.2.5 RNA 提取和 RT-PCR 检测基因表达 使用 TRIzol 试剂 并根据说明书操作,从大鼠梗死灶的脑组织中提取总 RNA,每 组至少3次重复,并用紫外分光光度计检测总 RNA 的浓度和 纯度,即用 ND-2000 核酸定量分析仪分别在 260 nm 和 280 nm 处测量 RNA 的吸光度值。根据 SuperScript IV RT 试剂盒的说 明书进行反转录操作。最后,用荧光定量 PCR 仪对反转录产物 进行 qRT-PCR 检测。RT-PCR 程序为 95℃变性 10 min,然后在 95℃进行 30 s,60℃进行 30 s 和 72℃进行 30 s,40 个循环。通 过 2<sup>-4 a CT</sup> 方法计算 mRNA 的相对表达水平<sup>[11]</sup>。本研究中使用的 引物序列如下:miR-124,F:5'-CA-GAGTCCAAAACGT-GTTCTCGCTC-3', R:5'-CTAGACAGATTACACTGTTGAAGG-A-3'; ERK1, F: 5'-GGCTCTATGGATTACCCAATC-3', R: 5'-CC-AGTGTTCGTTCCTCGGA-3';ERK2,F:5'-GCAGGACCTTTGA-AGATTTTGTGAG-3', R: 5'-GACTTTATTCTGCTGGGTGAAC-TCTCCG-3'; GAPDH, F: 5'-CGCTCTCTGCTCCTCTGTTC-3', R:5'-ATCCGTTGACTCCGACCTTCAC-3'。

1.2.6 蛋白质免疫印迹 每组大鼠的脑组织充分研磨后,加入 裂解缓冲液(RIPA)进行裂解。离心并收集上清液。使用二辛可 宁酸(BCA)法和紫外分光光度法检测提取的蛋白质的浓度。将 所有蛋白质样品定量至相同浓度,保存在 -80℃的冰箱中备用。 然后将提取的蛋白质通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电 泳(SDS-PAGE)分离,并转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将 膜与第一抗体 (Caspase-3、Bax、Bcl-2、p-MEK-2 和 p-ERK1/2) 在 4℃孵育过夜。将膜与山羊抗兔二抗(IgG)在室温黑暗中孵 育 1 h。通过 Odyssey 扫描仪扫描并定量蛋白质条带,用 Image J 软件分析灰度值。最后计算蛋白质表达水平,用 3-磷酸甘油 醛脱氢酶(GAPDH)作内参对照,每组实验均重复 3 次。

#### 1.3 统计学分析

用 SPSS 21.0 软件分析数据,所有数据表示为平均值的平均值±标准差。两组数据的差异比较采用 t 检验分析,多组数据差异比较使用单因素方差分析和 LSD 检验分析。P<0.05 被认为差异显著具有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 CI 大鼠脑梗死体积、mNSS 评分和脑含水量检测

大鼠脑组织 TTC 染色结果显示,与 Sham 组和 miR 组相 比,CI 组、CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠的脑梗死体积和 mNSS 评分均显著增加(P<0.01)。大鼠脑含水量检测结果显 示,CI 组大鼠显著高于 Sham 组、miR 组、CI+miR 组和 CI+U0126 组(P<0.01)。该结果说明大鼠脑梗死模型建立成功, 可用于后续实验。且由结果可见 MEK/ERK 阻滞剂 U0126 和 miR124 会减缓大鼠脑梗死造成的损伤。见图 1。





#### 2.2 miR-124 在大鼠脑组织中的表达

大鼠脑组织尼式染色结果显示,Sham 组、miR 组、CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠的脑组织中尼式体的数量显著高于 CI 组。而 CI 组大鼠的脑神经元结构被破坏且出现核移位和细胞

坏死等病理变化。大鼠脑组织中 miR-124 的 mRNA 表达量的 检测结果显示,与 Sham 组和 miR 组相比,miR-124 在 CI 组大 鼠中的表达水平显著降低 (P<0.01),而在 CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠中的表达水平显著上调(P<0.01)。见图 2。



## 2.3 CI 对大鼠脑神经细胞凋亡和 ERK1/2 基因表达的影响

TUNEL 染色结果显示,与 Sham 组和 miR 组相比,CI 组大 鼠中细胞凋亡的数目显著增加(P<0.01);与 CI 组相比,CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠中凋亡数量显著减少(P<0.01)。与 Sham 组和 miR 组相比,CI 组大鼠中 ERK1 和 ERK2 的 mRNA 相对 表达水平均显著上调(P<0.01);与 CI 组相比,CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠中 ERK1 和 ERK2 的 mRNA 相对表达水平 均显著下调(P<0.01)。该结果表明 miR-124 可能会抑制大鼠脑 神经细胞凋亡的发生,从而缓解脑梗死大鼠的脑组织损伤程 度。见图 3。



Note: A: TUNEL staining results of rat brain neuronal apoptosis; B: Positive rate of rat brain neuronal apoptosis; C: mRNA relative expression of ERK1 in rat brain tissue; D: mRNA relative expression of ERK2 in rat brain tissue; compared with sham group, \**P*<0.01; compared with miR group, \**P*<0.01; compared with CI group, \**P*<0.01.

#### 2.4 CI 对大鼠 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

与 Sham 组和 miR 组相比, CI 组大鼠脑组织中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著上调, Bcl-2 蛋白的表达水平显著下

调(P<0.01);与 CI 组相比, CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠脑组 织中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平显著下调, Bcl-2 蛋白的表 达水平显著上调(P<0.01)。见图 4。



Fig.4 Detection results of Caspase-3, Bax and Bcl-2 protein expression in rat brain tissue (n=5)

Note: Compared with sham group, \*P<0.01; compared with miR group, \*P<0.01; compared with CI group, \*P<0.01.

## 2.5 CI 对大鼠 MEK-2 和 ERK1/2 蛋白表达的影响

大鼠脑组织中磷酸化的 MEK-2 和 ERK1/2 蛋白表达水平 检测结果显示,与 Sham 组和 miR 组相比,CI 组大鼠中磷酸化 的 p-MEK-2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平均显著上调(P<0.01); 与 CI 组相比, CI+miR 组和 CI+U0126 组大鼠中磷酸化的 p-MEK-2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平均显著下调(P<0.01)。见 图 5。



图 5 大鼠脑组织中磷酸化的 p-MEK-2 和 p-ERK1/2 蛋白表达量(n=5)的检测结果 Fig.5 Detection of phosphorylated p-MEK-2 and p-ERK1/2 protein expression in rat brain tissue Note: Compared with sham group, \*P<0.01; compared with miR group, \*P<0.01; compared with CI group, \*P<0.01.

## 3 讨论

脑梗死是一种常见的脑血管疾病,由于脑供血不足,从而 引起脑组织缺血性坏死。脑梗死在中老年人中发病率高,随着 全球老龄化的加剧和生活水平的提高,脑梗死的发病率呈逐渐 上升趋势<sup>[12]</sup>。缺血性脑梗死是人类第二大致死疾病,不仅严重 危害了人类健康,还给患者及社会带来巨大的痛苦和负担<sup>[13]</sup>。 近年来,全球医学技术取得了巨大的进步,但是由脑梗死引起 的残疾和死亡率仍然很高<sup>[14]</sup>。已有证实,血管内皮细胞、自然杀 伤细胞和各种炎症性中间细胞在脑梗死的发病机制中起着至 关重要的作用<sup>[15]</sup>。然而,缺血性脑梗死的病因和发展机制仍然 是未知的。因此,研究脑梗死的发展机制,明确用于早期诊断的 生物标志物和治疗靶点尤为重要。

在过去几年中,越来越多的证据表明,非编码 RNA 在缺血 性脑梗死的发病机制中起着至关重要的作用,如 miRNA、lncR-NA 和 circRNA 等<sup>[16]</sup>。其中 miRNA 首次在秀丽隐杆线虫(C. elegans)中发现<sup>[17]</sup>,它可以在转录后水平上作为蛋白质编码基 因的关键内源性调控因子<sup>[18]</sup>,成熟的 miRNA 长度通常为 22 个 核苷酸,广泛参与动植物的代谢调节过程<sup>[19]</sup>。本研究从 miR-124 调节 MAPK/ERK 信号通路的角度分析了 miR-124 对脑梗死大 鼠 MAPK/ERK 通路和相关因子表达以及其对神经细胞凋亡的 影响。miR-124 是在人类和哺乳动物的中枢神经系统中高度表 达的 microRNA,研究发现,miR-124 可促进神经元发育和参与 修复受损神经元,包括促进神经突延伸、诱导干细胞分化为神 经元、促进神经胶质细胞的成熟等<sup>[8]</sup>。miR-124 抑制创伤性脑损 伤小鼠神经元的炎症反应,并促进其损伤神经元的神经突触生 长<sup>[20]</sup>。在脑出血的小鼠模型中,miR-124 在脑损伤区域的表达水 平显著下调,且促炎因子的表达水平也显著下调<sup>[21]</sup>。本研究的 结果表明,miR-124 可显著抑制因 CI 造成的大鼠脑组织损伤 程度,从而对脑组织起到保护作用。

先前的研究表明,急性脑梗死后 ERK 的表达与梗死体积 呈正相关<sup>[22]</sup>。本研究结果也与之相一致,大鼠脑梗死体积在 CI 组中显著增加,ERK1 和 ERK2 的 mRNA 表达水平也在脑梗死 大鼠中被显著上调,而 miR-124 可以显著的抑制大鼠脑梗死体 积的升高,可能还抑制了 ERK1 和 ERK2 表达水平的上调。另 外,我们还发现 miR-124 显著抑制了 MAPK/ERK 途径中磷酸 化的 MEK2 和 ERK1/2 蛋白表达水平。MAPK/ERK 通路是一 种保守的三级激酶模式,参与调节细胞的生长、分化、应激反 应、炎症反应等生理活动<sup>[23]</sup>,其中 ERK 可能与细胞存活有关, MAPK 活化与细胞凋亡有关。因此,我们根据结果推测, miR-124 可能会通过调节 MAPK/ERK 途径来影响大鼠脑神经 细胞的凋亡。

此外,研究表明,细胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白 激酶(MAPK/ERK)信号通路调节神经突触的可塑性,参与多种 细胞的增殖和凋亡,影响核转录因子的释放<sup>[24]</sup>。Shah等<sup>[25]</sup>研究 表明 MAPK/ERK 信号通路参与脑缺血损伤和修复的调节。 MAPK/ERK 通路在心肌缺血再灌注细胞中也被明显激活,导 致心肌细胞的凋亡<sup>[26]</sup>,陈镇秋等<sup>[27]</sup>证实 MAPK/ERK 通路与微 血管内皮细胞的凋亡有关。Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 属于线粒体 通路蛋白,线粒体已被证实是调解多个信号通路的重要细胞 器,包括调节神经元凋亡的级联反应<sup>[28]</sup>,其中,Caspase-3 是一种 执行蛋白受到 caspase-9 的激活,从而促进程序性细胞凋亡<sup>[29]</sup>, Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的作用,而 Bax 具有促凋亡的作用<sup>[30]</sup>, Bcl-2、Caspase-9、Caspase-3 和 Bax等通过调节线粒体膜渗透 性控制细胞凋亡<sup>[31]</sup>,因此 Caspase-3 和 Bcl-2/Bax 水平可反映细 胞凋亡程度与细胞增殖和凋亡相关。本研究发现,与细胞凋亡 相关的 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达水平也在 miR-124 的影响下发生显著的变化。MAPK/ERK 途径的激活会影响这 些细胞调节因子的表达, Zhu 等<sup>[21]</sup> 发现 SB203580 对 p38 MAPK 起抑制作用,且显著上调了 Caspase 3 等调亡相关因子 的表达水平。在本研究结果中, miR-124 下调了脑梗死大鼠 MAPK/ERK 途径中关键基因和蛋白的表达,且显著下调了促 调亡因子 Caspase-3 和 Bax 蛋白的表达,上调了抗调亡因子 Bcl-2 蛋白的表达。

本研究结果表明,miR-124 可能是通过调节 MAPK/ERK 途径而引起相关因子的表达改变,从而显著抑制脑梗死大鼠神经 细胞的凋亡,并有效的保护了脑梗死对大鼠脑组织造成的损伤。

## 参考文献(References)

- 文芮,王誉霖,孟可,等. 脑梗死患者血浆致动脉硬化指数与颈动脉 粥样硬化的相关性研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2019, 36(8): 681-683
- [2] Jia L, Hao F, Wang W, et al. Circulating miR-145 is associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients[J]. Cell Biochem Funct, 2015, 33(5): 314-319
- [3] 宋佩, 鲁稳粱, 赵俊, 等. 乌司他丁对全脑缺血再灌注大鼠海马神经 元程序性坏死的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2019, 39(2): 247-250
- [4] 赖穗翩,陈钜涛,刘淑兰,等.缺血性脑卒中患者认知功能障碍发生的影响因素分析[J].卒中与神经疾病,2019,26(3):334-336
- [5] 孙大壮, 宋春青, 许勇民, 等. 丝裂原活化蛋白激酶通路在百草枯诱 导人肺 II 型上皮样细胞 A549 凋亡中的作用 [J]. 中国医科大学学 报, 2015, 48(7): 218-231
- [6] Fann DY, Lim YA, Cheng YL, et al. Evidence that NF-kappaB and MAPK signaling promotes NLRP inflammasome activation in neurons following ischemic stroke [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55 (2): 1082-1096
- [7] 王玉君, 刘颖, 林秀艳. MicroRNA-188 在胃癌中的表达及对胃癌细 胞增殖和凋亡的影响[J]. 海南医学院学报, 2019, (11): 818-825
- [8] Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, et al. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing[J]. Mol Cell, 2007, 27: 435-448
- [9] Che QQ, Huang, et al. Effect of miR-124 on neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2019, 23 (15): 6657-6664
- [10] Pan Yong, Yang, et al. MiR-124 contributes to M2 polarization of microglia and confers brain inflammatory protection via the C/EBP-alpha, pathway in intracerebral hemorrhage [J]. Immunology Letters, 2017, 182: 1-11
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 (-Delta Delta CT) method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [12] Wen H, Lv M. Correlation analysis between serum procalcitonin and infarct volume in young patients with acute cerebral infarction [J]. Neurological sciences, 2020, 27(12): 1-8
- [13] 张昕洋,陈志刚,刘雪梅.中医药干预 NLRP3 炎性小体治疗脑梗 死的研究进展[J].中华中医药杂志,2019,(6):2602-2608
- [14] 沈婷雯,陈慧铀,姜亮,等.急性缺血性脑卒中患者 DWI 表现与 TOAST 病因分型的关系[J].磁共振成像,2016,7(9):657-662
- [15] Bao Z, Zhang, Li XL, et al. MiR-5787 attenuates macrophages-mediated inflammation by targeting TLR4/NF-κB in ischemic cerebral infarction[J]. Neuromol Med, 2020, 27(9): 1-8

- [16] Shekhar S, Cunningham MW, Pabbidi MR, et al. Targeting vascular inflammation in ischemic stroke: Recent developments on novel immunomodulatory approaches[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 833: 531-544
- [17] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854
- [18] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. Cell, 2009, 136(2): 215-233
- [19] Wang W, Zhong P, Yi JQ, et al. Potential role for microRNA in facilitating physiological adaptation to hypoxia in the Pacific whiteleg shrimp Litopenaeus vannamei [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2019, 84: 361-369
- [20] Huang S, Ge X, Yu J, et al. Increased miR-124-3p in microglial exosomes following traumatic brain injury inhibits neuronal inflammation and contributes to neurite outgrowth via their transfer into neurons[J]. FASEB J, 2018, 32(1): 512-528
- [21] 陈南耀,余丹.联合检测血清 miR-124 与 miR-182 的表达水平对 急性脑梗死诊断与预后评估的价值 [J].中国动脉硬化杂志,2019, 27(6): 502-506
- [22] Ou Z, Tao MX, Gao Q, et al. Up-regulation of angiotensin-converting enzyme in response to acute ischemic stroke via ERK/NF-kappaB pathway in spontaneously hypertensive rats [J]. Oncotarget, 2017, 8 (57): 97041-97051
- [23] Guo X, Jiang H, Chen J, et al. RP105 ameliorates hypoxia/reoxygenation injury in cardiac microvascular endothelial cells by suppressing TLR4/MAPKs/NF-κB signaling [J]. Int J Mol Med, 2018, 42 (1): 505-513
- [24] Xing L, Larsen RS, Bjorklund GR, et al. Layer specific and general requirements for ERK/MAPK signaling in the developing neocortex [J]. eLife, 2016, 5: e11123
- [25] Shah S, Brock EJ, Jackson RM, et al. Downregulation of Rap1Gap: a switch from DCIS to invasive breast carcinoma via ERK/MAPK activation[J]. Neoplasia, 2018, 20(9): 951-963
- [26] 张引,金世云,何淑芳,等. JNK 信号通路和 p38MAPK 信号通路 在吗啡预处理减轻心力衰竭大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(2): 219-222
- [27] 陈镇秋,洪郭驹,韩晓蕊,等. 骨科祛痰逐瘀方经 MAPK/ERK 通路 诱导血管内皮细胞迁移与血管管腔形成 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(6): 747-752
- [28] Lu F, Wang L, Chen Y, et al. In vitro cultured calculus bovis attenuates cerebral ischaemia-reperfusion injury by inhibiting neuronal apoptosis and protecting mitochondrial function in rats [J]. J Ethnopharmacol. 2020, 263: 113168
- [29] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. Science, 2004, 305(5684): 626-629
- [30] Huang WQ, Wen JL, Lin RQ, et al. Effects of mTOR/NF-κB signaling pathway and high thoracic epidural anesthesia on myocardial ischemia-reperfusion injury via autophagy in rats [J]. J Cell Physiol, 2017, 233(9): 6669-6678
- [31] Suen DF, Norris K, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis[J]. Gene Dev, 2008, 22 (12): 1577-1590
- [32] Zhu P, Zhan L, Zhu T, et al. The roles of p38 MAPK/MSK1 signaling pathway in the neuroprotection of hypoxic postconditioning against transient global cerebral ischemia in adult rats [J]. Mol Neurobiol, 2014, 49(3): 1338-1349