

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.32.004

## miR-21 对缺血 / 再灌注后血脑屏障保护作用 \*

李 利<sup>1</sup> 郭振丰<sup>2</sup> 乔万臣<sup>1</sup> 赵佳鑫<sup>1</sup> 董白晶<sup>1Δ</sup>

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院脑外科 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 内蒙古民族大学第二临床医学院 内蒙古 牙克石 022150)

**摘要 目的:** 研究 miR-21 在脑缺血 / 再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, I/R)损伤过程中对血脑屏障(Blood Brain Barrier)的保护作用。**方法:** 采用线栓法构建 SD 大鼠脑缺血 / 再灌注模型。实验随机分为空白质粒组, miR-21-mimic 组和 miR-21 inhibitor 组。利用 Western Blot 检测大鼠大脑皮层组织中 Bax 蛋白的表达变化, 透射电镜观察大鼠大脑皮层组织中细胞形态和血脑屏障的完整性, 免疫荧光检测大鼠皮层组织中自噬相关蛋白 LC-3 的分布情况。**结果:** Western Blot 实验结果显示: 与空白质粒相比, 给予 miR-21-mimic 的大鼠脑组织中 Bax 蛋白的表达显著降低, 而给予 miR-21 inhibitor 的大鼠脑组织中 Bax 蛋白的表达升高; 透射电镜结果显示: 与空白质粒组相比较, miR-21-mimic 组中内皮细胞周围星形胶质细胞的板层突基本完整, 而 miR-21 inhibitor 组中明显可见自噬小体、溶酶体, 并有吞噬物存在; 免疫荧光结果显示: 与空白质粒组比较, miR-21-mimic 组中自噬相关蛋白 LC-3 表达降低, 而 miR-21 inhibitor 组中 LC3 蛋白的分布增加。**结论:** miR-21 可能通过下调 Bax 蛋白的表达抑制凋亡或通过抑制自噬保护血脑屏障。

**关键词:** miR-21; 脑缺血 / 再灌注; 凋亡; 自噬**中图分类号:** R-33; R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)32-6224-04

## Protective Effect of miR-21 on the Blood Brain Barrier after Cerebral Ischemia and Reperfusion\*

LI Li<sup>1</sup>, GUO Zhen-feng<sup>2</sup>, QIAO Wan-chen<sup>1</sup>, ZHAO Jia-xin<sup>1</sup>, DONG Bai-jing<sup>1Δ</sup>

(1 Neurosurgery The fourth affiliated hospital of Harbin medical university, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Department Inner Mongolia university for nationalities second clinical medical college of Inner Mongolia forestry hospital, Inner Mongolia, Yakeshi, 022150, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the protective effect of miR-21 on the blood brain barrier after cerebral ischemia/reperfusion(I/R) injury. **Methods:** A rat model of cerebral I/R was established by suture method. The rats were randomly divided into the blank plasmid group, miR-21-mimic group and inhibitor miR-21 group. The expression of Bax protein in the cerebral cortex was detected by Western Blot, the integrity of cell morphology and blood brain barrier was detected by transmission electron microscope, the distribution of autophagy protein LC-3 in the cerebral cortex tissue was detected by immunofluorescence. **Results:** Western Blot showed that compared with the blank plasmid, the expression of Bax protein in brain tissue of rats in miR-21-mimic were significantly decreased, but increased expression of Bax protein in the brain tissue s was found in miR-21 in inhibitor-treated rats; electron microscopy results showed that compared with the blank plasmid group, Transmission electron microscopy showed that compared with the blank plasmid groups, miR-21-mimic groups in the surrounding astrocytes of lamina of endothelial cells process almost complete, Immunofluorescence showed that compared with the blank plasmid group, autophagy related protein LC-3 expression in the miR-21-mimic group was was decreased. **Conclusions:** MiR-21 could protect the blood brain barrier after cerebral I/R via down-regulating the expression of Bax protein, inhibiting apoptosis and autophagy.

**Key words:** miR-21; Cerebral ischemia/reperfusion; Apoptosis; Autophagy**Chinese Library Classification(CLC):** R-33; R743 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2017)32-6224-04

## 前言

脑梗死是严重威胁人类健康的疾病之一, 30 天内的病死率高达 15%-33%。血管内溶栓会导致更严重的再灌注损伤, 如果不能在缺血后 6 h 内及时治疗, 溶栓则会因再灌注损伤导致

脑出血以及致命性的脑水肿。众所周知, 血脑屏障的破坏首先导致脑血管通透性增加, 最终导致脑水肿, 严重威胁人类生命健康。因此, 寻求保护血脑屏障再灌注损伤的方法就显现出尤为重要<sup>[1-6]</sup>。

Micro RNA 是由 RNA 聚合酶 II 合成的长度在 20-23bp 的

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81101085); 黑龙江省自然科学基金青年基金项目(QC2012C053)

作者简介: 李利(1979-), 硕士, 主治医师, 研究方向: 脑肿瘤的外科治疗, 电话: 0451-85939393, E-mail: rical2000@163.com

Δ 通讯作者: 董白晶(1976-), 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 脑肿瘤的小 RNA 干预, 电话: 0451-85939393, E-mail: jasper911@126.com

(收稿日期: 2017-03-06 接受日期: 2017-04-01)

RNA 片段。很多 micro RNA 与脑缺血的前期病变密切相关,多参与血管病变的调节,而脑血管病变之后同样可引起 micro RNA 的表达改变。在众多 micro RNA 中,miR-21 是研究热点之一,其具有明显的抑制凋亡作用<sup>[7-11]</sup>。因此,本研究主要探讨了 miR-21 对大鼠脑缺血/再灌注损伤后的血脑屏障的保护作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年 SD 大鼠,体重 220~250 g。

### 1.2 主要试剂与材料

超纯水系统(德国 Millipore 公司);低温离心机(美国 Thermal 公司);蛋白电泳仪(美国 Bio-RAD 公司);anti-Bax(Abcam 公司);LC3 抗体(Cell signaling);GAPDH 抗体(康成公司);Alexa Fluor 800 二抗(Jackson 公司)。

### 1.3 大鼠脑缺血再灌注模型的构建

采用线栓法构建大鼠脑缺血/再灌注模型。在颈总动脉远心端靠近颈内颈外分叉处穿一缝合线,不打结。用动脉夹临时阻断颈内动脉,用持针器夹一中号手术缝合用圆针在颈总动脉近心端远心端缝合线之间扎一小眼,取 MACO 专用线栓从小眼中插入到颈内颈外分叉处,稍微系紧远心端缝合线,松开小金属夹子,将线栓沿颈内动脉插入颅内,当线栓的黑色标记点到颈内颈外分叉处时停止进入,系紧远心端缝合线。并记录此时间。

### 1.4 脑内质粒注射

缺血 90 min 后拔出线栓进行再灌注,将大鼠麻醉后固定,头部备皮、用碘伏彻底消毒、利用眼科剪剪开皮肤,剥离骨膜,按照大鼠立体定向图谱在右侧大脑中线靠右 1 mm、矢状线后 0.5 mm 处,颅钻开颅,用圆头微量注射器取 5  $\mu$ L 空质粒,miR-21-mimic 和 miR-21 inhibitor,从露骨进入 4 mm,用微量注射泵设置 5 min 注射完毕,完毕后静置 5 min,拔出微量注射器,碘伏消毒,缝合皮肤。

### 1.5 蛋白质印迹检测技术

大鼠皮层组织蛋白上样质量 50  $\mu$ g, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上,用 5%脱脂牛奶(博士德)封闭处理,孵育一抗 anti-Bax 抗体(Abcam 公司),以 GAPDH 为内参。

### 1.6 透射电镜

检测脑组织中细胞形态和血脑屏障的完整性。取材:大脑组织块大约为 1 立方毫米。固定:用浓度为 2.5%的戊二醛固定 2 h,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次/10 min,再用 1%锇酸固定 3 h,继续用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次/15 min。脱水:分别用梯度浓度的乙醇脱水,每次 15 min,用等体积 90%的乙醇与 90%的丙酮混合进行脱水,然后后 90%的丙酮脱水,最后用纯丙酮室温脱水,以上操作均在 4℃ 环境下进行。包埋:按照纯丙酮:包埋液=(2:1)配制工作液,室温 3 h,纯丙酮:包埋液=(1:2)室温过夜,纯包埋液 37℃ 包埋 2-3 h。固化:37℃ 环境下过夜,45℃ 条件下放置 12 h,60℃ 烘箱内 24 h。切片 50-60 nm,然后染色。透射电镜观察、拍片。

### 1.7 免疫荧光

免疫荧光检测大鼠皮层组织中自噬蛋白 LC-3 的分布。标本准备,大鼠经 4%多聚甲醛心脏灌注后取大脑皮层,用 4%多聚甲醛固定过夜,依次用 15%、30%蔗糖脱水 24 h。OCT 包埋后液氮冷冻 1 min 后放入 -80℃ 冰箱保存。染色步骤,冰冻切片机切片 8  $\mu$ m,室温干燥 30 min,组化笔画圈,0.01M PBS 洗涤 5 min,1X(蒸馏水稀释)碧云天抗原修复液,室温孵育 10 min,洗涤 3 次/5 min,0.1%triton X-100 室温通透 15 min,0.01 M PBS 染缸中洗涤 3 次/5 min,放入湿盒,10%山羊血清 (PBS 稀释) 37℃ 封闭 1 h,孵一抗,浓度 1:200,用 PBS 稀释,4℃ 过夜。第二天室温放置 30 min,0.01 M PBS 染缸中洗涤 3 次/10 min,孵二抗,浓度 1:200,用 PBS 稀释,室温孵育 30 min,0.01 M PBS 染缸中洗涤 3 次/10 min。(此后步骤注意避光),染核,0.1%DAPI 室温染核 1 min 后洗涤 5 次/3 min,封片,抗荧光淬灭剂封片,加盖玻片,荧光显微镜观察。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,GraphPad Prism 进行作图。计量资料均以平均数 $\pm$ 标准误(mean $\pm$  SEM)表示,应用单因素方差分析和 t-检验进行统计学分析,组内比较用 Student's t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 miR-21 对脑缺血/再灌注后大鼠大脑皮层组织中 Bax 蛋白的表达的影响

脑缺血/再灌注后,给予大鼠注射 5  $\mu$ L miR-21-mimic, Western Blot 实验结果显示:与空白质粒组比较,miR-21-mimic 组大鼠皮层组织中 Bax 蛋白表达显著下降,miR-21-inhibitor 组大鼠皮层组织中 Bax 蛋白的表达较空白质粒组显著升高(如图 1),提示 miR-21 能够抑制 Bax 的表达。

### 2.2 miR-21 对脑缺血/再灌注后大鼠大脑皮层细胞自噬的影响

电镜结果显示:空白质粒组神经元部分肿胀,核内可见固

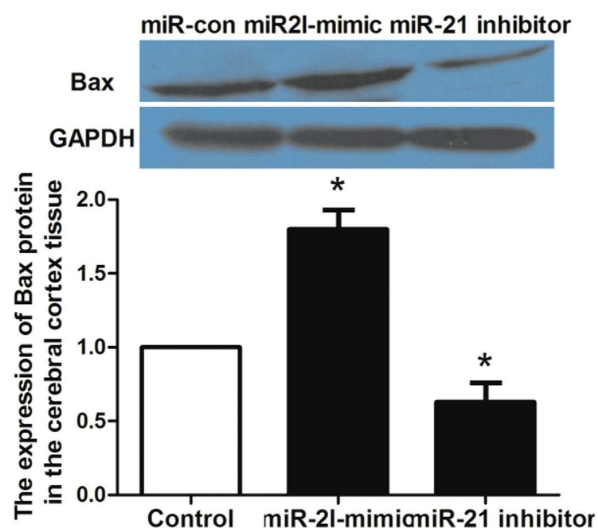


图 1 miR-21 对脑缺血/再灌注后大鼠大脑皮层组织中 Bax 蛋白的表达的影响 \*P<0.05 vs. Control, n=6。

Fig.1 The effect of miR-21 on the expression of Bax protein (upper panel) and statistical analysis (lower panel).in the cerebral cortex tissue of rat after cerebral ischemia/reperfusion. \*P<0.05 vs. Control, n=6. Western Blot analysis of  $\beta$ -MHC protein

缩、凋亡、碎裂,血管内皮细胞的紧密连接大部分完整,部分断裂;miR-21-inhibitor 组神经元大多肿胀,胞浆发空,可见自噬小体、溶酶体,并可见吞噬物存在,核固缩、核碎裂多,星形胶质细胞板层突不完整甚至局部消失,血脑屏障破坏严重;miR-21-mimic 组神经元细胞接近正常,个别略显肿胀,起吞噬作用的小胶质细胞不多,胞浆丰富,线粒体、内质网等细胞器多,变性及肿胀的线粒体数量少,血管内皮细胞之间的紧密连

接基本完整,内皮细胞周围星形胶质细胞的板层突基本完整。免疫荧光检测大鼠皮层中自噬相关蛋白 LC3 的分布情况。图 3 结果显示:与空白质粒组相比较,miR-21 inhibitor 组中 LC3 的分布明显升高,而 miR-21-mimic 组中 LC3 的分布情况明显降低,提示 miR-21 能够抑制自噬蛋白 LC3 的表达,起到保护缺血/再灌注后血脑屏障的作用。这些电镜结果提示 miR-21 可能通过抑制细胞自噬来保护 I/R 后的血脑屏障。

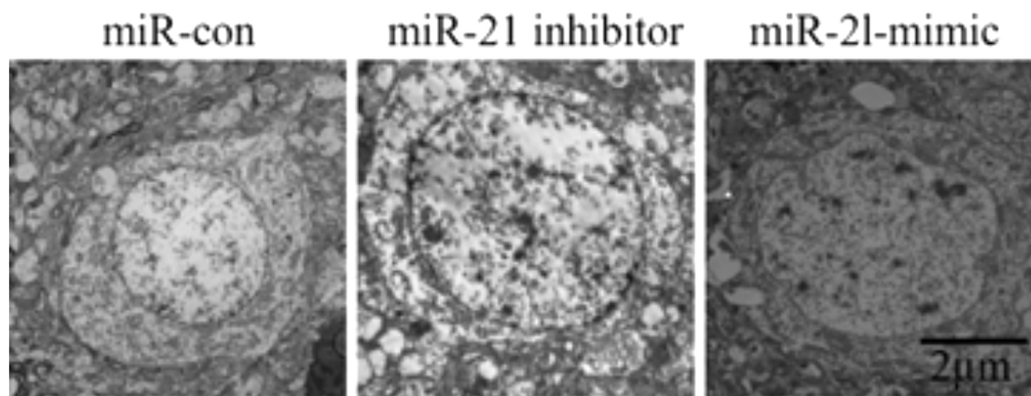


图 2 透射电镜下大鼠大脑皮层组织结构。放大倍数,× 15000 倍;电压,80 千伏;标尺,2 μm

Fig. 2 Representative electron micrographs for cerebral ischemia/reperfusion in rats

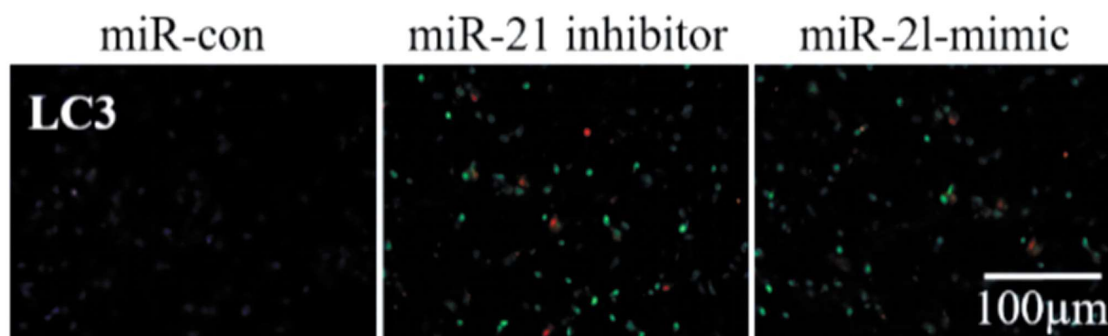


图 3 LC-3 在脑缺血 / 再灌注模型中的分布情况

Fig. 3 Distribution of LC-3 in cerebral ischemia/reperfusion model

### 3 讨论

血脑屏障的破坏首先导致脑血管通透性增加,最终导致脑水肿,严重威胁人类生命健康。血脑屏障在维持脑功能上起着重要作用,脑血流中断 1 小时后其通透性即增加,引发梗死区域的水肿,而在再灌注过程中可引起血脑屏障持续的开放,大量液体进入组织间隙,加重脑水肿。miR-21 可以调控 IL-11/STAT3 通路抗凋亡,通过下调 PTEN 等蛋白抑制凋亡<sup>[12-14]</sup>。最新研究表明 miR-21 同样在脑血管疾病中也起着重要作用。在大鼠模型中,坏死中心区域 miR-21 表达比周边明显低<sup>[9]</sup>。另有研究表明 miR-21 在体外实验中可以保护神经元免受缺血导致的损伤,miR-21 在低氧低糖的条件下低表达,给予 miR-21-inhibitor 阻断 miR-21 的作用加重这种变化,而给予 miR-21 转染则阻止凋亡,改善损伤状况。此外,miR-21 可以通过 PTEN-MMP-2 抑制基质降解和炎症反应<sup>[15-18]</sup>。本实验构建大鼠脑缺血 / 再灌注模型,实验结果显示:脑缺血 / 再灌注模型注

射 miR-21 后,Bax 蛋白较空白质粒组显著降低,表明 miR-21 可抑制细胞凋亡,从而起到保护脑缺血 / 再灌注损伤过程血脑屏障的作用。

而在缺血 / 再灌注大鼠海马神经元细胞,抑制自噬明显减轻神经元细胞死亡,具有神经保护作用。因此,抑制自噬同时也可能减轻血脑屏障的破坏,减轻脑水肿<sup>[19-24]</sup>。LC3 蛋白在自噬的调节过程中起重要作用,是调控自噬的蛋白成分之一,是细胞自噬的标志性蛋白<sup>[25-28]</sup>。研究表明:缺血再灌注后,活性氧含量上升,会引起细胞自噬的增加,从而引发一系列的病理生理改变。因此,采取手段干预血管内皮细胞和星形胶质细胞在缺血 / 再灌注后的自噬和凋亡,可能阻止血脑屏障的破坏和持续开放,防止脑水肿的进一步发展。本实验利用透射电镜检测大脑皮层组织中细胞形态和血脑屏障的完整性,实验结果显示 miR-21 能够抑制细胞自噬,保护血脑屏障。免疫荧光检测结果显示在大鼠脑缺血 / 再灌注模型中,在 miR-21 组中 LC3 蛋白的分布较空白质粒组明显减少,结果表明 miR-21 能够显著抑

制细胞自噬,保护脑缺血/再灌注后血脑屏障。

因此,miR-21可能通过下调Bax蛋白的表达抑制凋亡或通过抑制自噬保护血脑屏障。miR-21有望作为治疗缺血造成的中枢神经系统损伤的靶点。

#### 参考文献(References)

- [1] Lamperska KM, Kozłowski P, Kolenda T, et al. Unpredictable changes of selected miRNA in expression profile of HNSCC [J]. Cancer biomarkers, 2016, 16(1): 55-64
- [2] Chen X, Sturgis EM, Wang C, et al. Significance of microRNA-related variants in susceptibility to recurrence of oropharyngeal cancer patients after definitive radiotherapy [J]. Oncotarget, 2016, 7: 35015-5025
- [3] Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, et al. Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumourigenesis mechanism[J]. Molecular cancer, 2016, 15: 28
- [4] Wong N, Khwaja SS, Baker CM, et al. Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas[J]. Cancer medicine, 2016, 86: 196-200
- [5] Li Y, Li W, Yang Y, et al. MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme[J]. Brain Res, 2009, 1286: 13-18
- [6] Yin C, Salloum FN, Kukreja RC, et al. A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70[J]. Circ Res, 2009, 104(5): 572-575
- [7] Dong S, Cheng Y, Yang J, et al. MicroRNA expression signature and the role of microRNA-21 in the early phase of acute myocardial infarction[J]. J Biol Chem, 2009, 284(43): 29514-29525
- [8] Haider KH, Idris NM, Kim HW, et al. MicroRNA-21 is a key determinant in IL-11/Stat3 anti-apoptotic signalling pathway in preconditioning of skeletal myoblasts [J]. Cardiovasc Res, 2010, 88 (1): 168-178
- [9] Cipollone F, Felicioni L, Sarzani R, et al. A unique microRNA signature associated with plaque instability in humans [J]. Stroke, 2011, 42(9): 2556-2563
- [10] Buller B, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death[J]. FEBS J, 2010, 277(20): 4299-4307
- [11] Lee JY, He Y, Sagher O, et al. Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage [J]. Brain Res, 2009, 1287: 126-135
- [12] Vandenboom II TG, Li Y, Philip PA, et al. MicroRNA and Cancer: Tiny Molecules with Major Implications[J]. Current genomics, 2008, 9: 97-109
- [13] Selcuklu SD, Donoghue MT, Spillane C, et al. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes[J]. Biochemical Society transactions, 2009, 37: 918-925
- [14] Cao P, Zhou L, Zhang J, et al. Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. Head & neck, 2013, 35: 720-728
- [15] Ren W, Qiang C, Gao L, et al. Circulating microRNA-21 (MIR-21) and phosphatase and tensin homolog (PTEN) are promising novel biomarkers for detection of oral squamous cell carcinoma [J]. Biomarkers, 2014, 19: 590-596
- [16] Wang Y, Zhu Y, Lv P, et al. The role of miR-21 in proliferation and invasion capacity of human tongue squamous cell carcinoma in vitro [J]. International journal of clinical and experimental pathology, 2015, 8: 4555-4563
- [17] Zhang X, Gee H, Rose B, et al. Regulation of the tumour suppressor PDCD4 by miR-499 and miR-21 in oropharyngeal cancers [J]. BMC cancer, 2015, 16: 86
- [18] Schiller J H. Noninvasive monitoring of tumors [J]. New England Journal of Medicine, 2008, 359(4): 418-420
- [19] Goldstraw P, et al. Non-small-cell lung cancer [J]. Lancet, 2011, 378 (9804): 1727-1740
- [20] Bachoo R M, Maher E A, Ligon K L, et al. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf[J]. Cancer Cell, 2002, 19(3): 269-277
- [21] Ntzachristos V, Weissleder R. Fluorescence-mediated molecular tomography: US, US6615063[P]. 2003
- [22] Devaraj N K, Keliher E J, Thurber G M, et al. 18F Labeled Nanoparticles for in Vivo PET-CT Imaging [J]. Bioconjugate Chemistry, 2016, 20(2): 397-401
- [23] Shi S, Chen F, Cai W, et al. Biomedical applications of functionalized hollow mesoporous silica nanoparticles: focusing on molecular imaging[J]. Nanomedicine, 2017, 8(12): 2027-2039
- [24] Cui L, Rao J. Semiconducting polymer nanoparticles as photoacoustic molecular imaging probes [J]. Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine & Nanobiotechnology, 2016, 66: 1397-1402
- [25] Li J, Huang H, Sun L, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 3998-4008
- [26] Chang YC, Jan CI, Peng CY, et al. Activation of microRNA-494-targeting Bmi1 and ADAM10 by silibinin ablates cancer stemness and predicts favourable prognostic value in head and neck squamous cell carcinomas[J]. Oncotarget, 2015, 6: 24002-24016
- [27] Romano G, Acunzo M, Garofalo M, et al. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109: 16570-16575
- [28] Shen PF, Chen XQ, Liao YC, et al. MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer[J]. The Prostate, 2014, 74: 756-767