doi:10.11659/jjssx.06E024007

·基础研究·

lncRNA KCNQ1OT1调节miR-145-5p/ROCK1轴对氧糖剥夺/复氧诱导的小胶质细胞损伤的影响

李 林,李向男,杨松涛,张云鹤,陈 通,付爱军 (华北理工大学附属医院神经外科,河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的** 探讨长链非编码RNA(lncRNA)钾电压门控通道亚家族Q成员1反向转录物1(KCNQ1OT1)调节miR-145-5p/Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(ROCK1)轴对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的小胶质细胞损伤的影响。**方法** 将小胶质细胞N9分为对照组(正常培养)、OGD/R组(OGD/R诱导损伤)、sh-NC组(OGD/R诱导损伤后转染sh-NC)、sh-KCNQ1OT1组(OGD/R诱导损伤后转染sh-KCNQ1OT1)、sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组(OGD/R诱导损伤后共转染sh-KCNQ1OT1和inhibitor NC)、sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组(OGD/R诱导损伤后共转染sh-KCNQ1OT1和miR-145-5p inhibitor)。RT-qPCR检测细胞中lncRNA KCNQ1OT1、miR-145-5p、ROCK1 mRNA的表达;Western blot分析ROCK1蛋白表达;CCK-8测定细胞增殖能力;流式细胞术分析细胞凋亡情况;ELISA检测细胞中白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-6(IL-6)水平;通过生物信息学网站预测miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1的作用位点,并使用双荧光素酶报告基因实验验证其靶向关系。**结果** 与对照组比较,OGD/R组细胞中lncRNA KCNQ1OT1表达、ROCK1 mRNA和蛋白表达、细胞凋亡率及IL-6、TNF-α、IL-1β水平均升高($P<0.05$),miR-145-5p表达、细胞存活率均降低($P<0.05$);与OGD/R组、sh-NC组比较,sh-KCNQ1OT1组细胞中lncRNA KCNQ1OT1表达、ROCK1 mRNA和蛋白表达、细胞凋亡率及IL-6、TNF-α、IL-1β水平均降低,miR-145-5p表达、细胞存活率均升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较,sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组细胞中ROCK1 mRNA和蛋白表达、细胞凋亡率及IL-6、TNF-α、IL-1β水平均增加,miR-145-5p表达、细胞存活率均降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。生物信息学网站预测显示,miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1均存在靶向作用位点;双荧光素酶报告基因实验表明miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1和ROCK1存在靶向关系($P<0.05$)。**结论** 沉默lncRNA KCNQ1OT1可通过上调miR-145-5p表达,靶向下调ROCK1表达,减轻OGD/R诱导的小胶质细胞损伤。

[关键词] 长链非编码RNA;钾电压门控通道亚家族Q成员1反向转录物1;miR-145-5p/ROCK1轴;氧糖剥夺/复氧;小胶质细胞;急性缺血性脑卒中

[中图分类号] R743.3 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-06-03

Effect of lncRNA KCNQ1OT1 on oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced microglia injury through regulating the miR-145-5p/ROCK1 axis

LI Lin, LI Xiang-nan, YANG Song-tao, ZHANG Yun-he, CHEN Tong, FU Ai-jun (Department of Neurosurgery, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of long non-coding RNA (lncRNA) potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 overlapping transcript 1 (KCNQ1OT1) on oxidative glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced microglia injury through regulating the miR-145-5p/ Rho-associated coiled-coil forming protein kinase 1 (ROCK1) axis. **Methods** Microglia N9 were divided into the control group (normal culture), the OGD/R group (OGD/R-induced injury), the sh-NC group (transfected with sh-NC after OGD/R-induced injury), the sh-KCNQ1OT1 group (transfected with sh-KCNQ1OT1 after OGD/R-induced injury), the sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC group (co-transfected with sh-KCNQ1OT1 and inhibitor NC after OGD/R-induced injury), and the sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor group (co-transfected with sh-KCNQ1OT1 and miR-145-5p inhibitor after OGD/R-induced injury). RT-qPCR was applied to detect the expression of lncRNA KCNQ1OT1, miR-145-5p, and ROCK1 mRNA in cells. The expression of ROCK1 protein was detected by Western blot. CCK-8 was applied to detect the cell proliferation. Flow cytometry was applied to detect cell apoptosis. ELISA was applied to detect the levels of interleukin-1β(IL-1β), tumor necrosis factor-α(TNF-α), and interleukin-6(IL-6) in cells. The action sites of miR-145-5p with lncRNA KCNQ1OT1 and ROCK1 were predicted by bioinformatics website, and their targeting relationships were verified by dual-luciferase reporter assay. **Results** Compared with the control group, the expression of lncRNA KCNQ1OT1, the expression of ROCK1 mRNA and protein, the apoptosis rate, and the levels of IL-6, TNF-α, and IL-1β in cells were all increased, and the level of miR-145-5p and cell survival rate were all decreased in the OGD/R group($P<0.05$). Compared with the OGD/R group and the sh-NC group, the expression of lncRNA KCNQ1OT1, the expression of ROCK1 mRNA and protein, the apoptosis rate, and the levels of IL-6, TNF-α, and IL-1β in cells

[基金项目] 2024年度河北医学科学研究计划(20240045)

were all decreased, and the level of miR-145-5p and cell survival rate were all increased in the sh-KCNQ1OT1 group, with significant differences (P<0.05). Compared with the sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC group, the expression of ROCK1 mRNA and protein, the apoptosis rate, and the levels of IL-6, TNF-α, and IL-1β in cells were all increased, and the expression of miR-145-5p and cell survival rate were all decreased in the sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor group, with significant differences (P<0.05). Bioinformatics website showed that miR-145-5p had targeted action sites with lncRNA KCNQ1OT1 and ROCK1, and dual-luciferase reporter assay confirmed that miR-145-5p had targeting relationships with lncRNA KCNQ1OT1 and ROCK1 (P<0.05). **Conclusion** Silencing lncRNA KCNQ1OT1 can alleviate OGD/R-induced microglia injury via upregulating the expression of miR-145-5p and targeting the down-regulation of ROCK1 expression.

Keywords: long non-coding RNA; potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 overlapping transcript 1; miR-145-5p/ROCK1 axis; oxygen glucose deprivation/reoxygenation; microglia; acute ischemic stroke

急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke,AIS)是脑血管疾病中最主要的类型,亦属于神经内科常见疾病,在所有脑卒中类型中占87%[1]。AIS严重威胁中老年人的生命健康,具有发病急、进展快、致死率和致残率高的特点[2]。AIS的主要治疗方法是及时恢复血流和营养供应,但缺血一段时间后进行再灌注不仅无法恢复其功能,而且会进一步加剧损伤,即脑缺血再灌注损伤。这可能使缺血后小胶质细胞被激活,导致脑组织出现炎症反应,活化的小胶质细胞分泌多种促炎细胞因子,促进神经元凋亡[3-4]。因此,抑制小胶质细胞释放促炎因子可能是缓解AIS的重要途径。随着科技的不断发展,许多长链非编码RNAs(long non-coding RNAs,lncRNAs)被发现,且在机体的生理生化过程中发挥重要作用[5]。钾电压门控通道亚家族Q成员1反向转录物1(potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 overlapping transcript 1, KCNQ1OT1)是lncRNA的一种,其在AIS患者血浆中高表达,敲低其表达能够缓解缺血再灌注后的神经功能损伤[6];且lncRNA KCNQ1OT1下调会抑制氧糖剥夺/复氧(oxygen glucose deprivation/reoxygenation,OGD/R)导致的心肌细胞凋亡[7]。但lncRNA KCNQ1OT1在OGD/R诱导的小胶质细胞损伤中的作用尚未见报道。作为真核细胞中广泛存在的非编码RNA分子,微小RNA(microRNA,miRNA)具有高度保守性,为单链小分子结构[8]。miRNA能够通过调节mRNA的转录或翻译过程,在疾病的发生发展中发挥作用[9]。据报道,miR-145-5p在神经细胞的缺血再灌注损伤及脑出血损伤过程中发挥重要作用[10-11]。Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶1(Rho-associated coiled-coil forming protein kinase 1,ROCK1)与AIS的进展相关,抑制ROCK1可减轻血脑屏障破坏和长时间缺血引起的脑损伤[12]。故本研究通过生物信息学网站预测miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1和ROCK1的潜在作用位点,探讨lncRNA KCNQ1OT1能否通过调控miR-145-5p/ROCK1轴,影响OGD/R诱导的小胶质细胞损伤,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、主要试剂和仪器

小胶质细胞N9(上海富雨,批号:240609);DMEM培养基(上海晶抗,批号:241102);sh-NC(5′-CAUAGUCGAAUUUCGCUAGUGAGUU-3′)、sh-KCNQ1OT1(5′-GGUUCAGAUUCAUAAACUAGA-3′)、inhibitor NC(5′-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3′)、miR-145-5p inhibitor(5′-AGGGAUUCCUGGGAAAACUGGAC-3′)购自广州市锐博生物科技有限公司;肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)ELISA试剂盒(深圳子科,批号:240309);CCK-8试剂盒(上海白益,批号:240601);Lipofectamine 2000转染试剂(批号:240507)、TRIzol试剂(批号:241023)购自上海赛默飞;白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)ELISA试剂盒(武汉益普,批号:241130);白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)ELISA试剂盒(北京康佳宏原,批号:241125);RT-qPCR试剂盒(上海博尔森,批号:240805);ROCK1、GAPDH一抗和IgG二抗(美国MCE公司,批号:240508、240421、240516)。

细胞培养箱(美国Eppendorf,型号:CellXpert C170i);酶标仪(上海赛默飞世尔科技,型号:Multiskan™ FC);流式细胞仪(美国Cytek Biosciences,型号:NL-CLC1L-3L)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将小胶质细胞N9添加至含10%胎牛血清的DMEM培养基,在37 ℃、5%CO_2细胞培养箱内培养,用0.25%胰蛋白酶溶液进行消化处理,随后以1∶3的传代比例完成传代。

1.2.2 OGD/R损伤模型的建立 模型建立参考文献[13],将细胞培养基除去后加入D-Hanks液进行清洗,然后添加D-Hanks液,置于3气(1%O_2、94%N_2、5%CO_2)培养箱中于37 ℃缺氧培养150 min;更换为含10%胎牛血清的DMEM培养基,于37 ℃、5%CO_2中培养24 h,模拟体内缺血再灌注损伤。使用CCK-8法检测细胞增殖情况,若细胞增殖被明显抑制,说明模型

构建成功。

1.2.3 细胞转染及分组 取对数生长期的N9细胞进行分组处理，其中对照组细胞正常培养；OGD/R组细胞进行OGD/R诱导损伤；sh-NC组细胞在进行OGD/R诱导损伤的基础上转染sh-NC；sh-KCNQ1OT1组细胞在进行OGD/R诱导损伤的基础上转染sh-KCNQ1OT1；sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组细胞在进行OGD/R诱导损伤的基础上，行sh-KCNQ1OT1和inhibitor NC共转染处理；sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组细胞先经OGD/R诱导损伤，然后行sh-KCNQ1OT1和miR-145-5p inhibitor共转染。各组细胞处理48 h后，开展后续实验。

1.2.4 RT-qPCR测定lncRNA KCNQ1OT1、miR-145-5p和ROCK1 mRNA表达 收集各组培养的细胞，使用TRIzol试剂盒完成总RNA提取，随后通过逆转录将RNA合成为cDNA，以cDNA为模版开展PCR扩增。其中miR-145-5p以U6为内参，lncRNA KCNQ1OT1和ROCK1以GAPDH为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因的相对表达量。引物序列见表1。

表1 RT-qPCR引物序列

基因	正向引物	反向引物
miR-145-5p	5′-GTCCAGTTTTCCCAGGAATC-3′	5′-AGAACAGTATTTCCAGGAAT-3′
U6	5′-TAAAATCTATACACGACGGCTTCG-3′	5′-TACTGTGCGTTTAAGCACTTCGC-3′
lncRNA KCNQ1OT1	5′-CCCAGAAATCCACACCTCGG-3′	5′-TCCTCAGTGAGCAGATGGAGA-3′
ROCK1	5′-AAAGAAAGGATGGAGGATGAA-3′	5′-TGTAACAACAGCCGCTTATTT-3′
GAPDH	5′-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3′	5′-CACCATTGGCAATGAGCGGTTC-3′

1.2.5 Western blot检测ROCK1蛋白表达 各组细胞处理48 h后，移至含有蛋白酶抑制剂的RIPA缓冲液中提取总蛋白，然后在12% SDS-PAGE凝胶上分离，电泳转移至聚偏二氟乙烯膜上；将膜在含Tris缓冲盐溶液和0.1% Tween 20的5%脱脂牛奶中室温阻断2 h。膜与ROCK1和GAPDH(1∶1 000)一抗在4 ℃孵育至少12 h；随后将膜与HRP结合的二抗在室温下孵育2 h。在化学发光成像分析系统下，采用增强型化学发光检测试剂盒对免疫印迹进行可视化。使用Image J软件计算蛋白相对表达量。

1.2.6 CCK-8测定细胞增殖能力 各组细胞接种于96孔板，培养48 h后添加10 μL CCK-8试剂，于37 ℃、5%CO_2条件下继续培养2 h，酶标仪测量450 nm波长处的吸光度，计算细胞存活率。

1.2.7 流式细胞术分析细胞凋亡水平 收集各组细胞后接种于6孔板，培养24 h后经胰蛋白酶消化制成单细胞悬液，并用预冷的PBS进行清洗，离心取沉淀，加入结合缓冲液调整细胞浓度，依次添加Annexin V-FITC和PI，避光孵育10 min，流式细胞仪测量细胞凋亡率。

1.2.8 ELISA测定IL-1β、TNF-α、IL-6水平 各组细胞悬液经3 000 r/min离心10 min后取上清，于-80 ℃保存。使用ELISA试剂盒进行检测，测定吸光度后，根据标准曲线计算IL-1β、TNF-α、IL-6水平。

1.2.9 双荧光素酶报告基因实验 通过生物信息学网站预测miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1的作用位点。构建包含lncRNA KCNQ1OT1-WT/MUT、ROCK1-WT/MUT的双荧光素酶报告基因载体，与miR-NC和miR-145-5p mimic分别共转染N9细胞，48 h后测定荧光素酶活性。

1.3 统计学分析

数据采用Graphpad Prism 8.0.1软件处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，各组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用*LSD-t*检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞中lncRNA KCNQ1OT1、miR-145-5p、ROCK1 mRNA和蛋白的表达

与对照组比较，OGD/R组细胞中lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1 mRNA和蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)，miR-145-5p表达水平降低($P<0.05$)；与OGD/R组和sh-NC组比较，sh-KCNQ1OT1组细胞中lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1 mRNA和蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)，miR-145-5p表达水平显著升高($P<0.05$)；与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较，sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组细胞中ROCK1 mRNA和蛋白表达水平增加($P<0.05$)，miR-145-5p表达水平下降($P<0.05$)，见图1、表2。

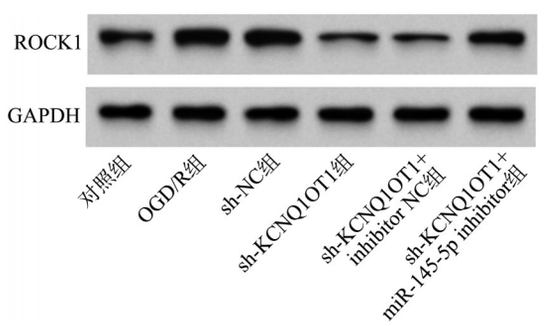


图1 各组细胞ROCK1蛋白表达

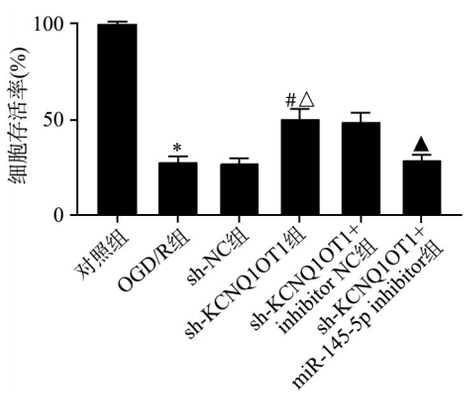
表2 各组细胞中lncRNA KCNQ1OT1、miR-145-5p、ROCK1 mRNA和蛋白表达($\bar{x}\pm s$)

组别	lncRNA KCNQ1OT1	miR-145-5p	ROCK1 mRNA	ROCK1蛋白
对照组	1.01±0.14	1.03±0.16	0.99±0.11	0.68±0.06
OGD/R组	1.65±0.19*	0.46±0.06*	1.85±0.22*	1.34±0.18*
sh-NC组	1.62±0.18	0.45±0.05	1.87±0.23	1.36±0.20
sh-KCNQ1OT1组	0.45±0.07#△	1.49±0.56#△	0.52±0.08#△	0.39±0.04#△
sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组	0.43±0.06	1.47±0.52	0.51±0.06	0.38±0.03
sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组	0.42±0.05	0.65±0.08▲	1.32±0.15▲	1.05±0.15▲

*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与OGD/R组比较,$P<0.05$;△:与sh-NC组比较,$P<0.05$;▲:与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较,$P<0.05$

2.2 各组细胞增殖能力比较

OGD/R组细胞存活率低于对照组($P<0.05$);sh-KCNQ1OT1组细胞存活率高于OGD/R组、sh-NC组($P<0.05$);sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组细胞存活率低于sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组($P<0.05$),见图2。



*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与OGD/R组比较,$P<0.05$;△:与sh-NC组比较,$P<0.05$;▲:与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较,$P<0.05$

图2 各组细胞增殖能力比较

2.3 各组细胞凋亡率比较

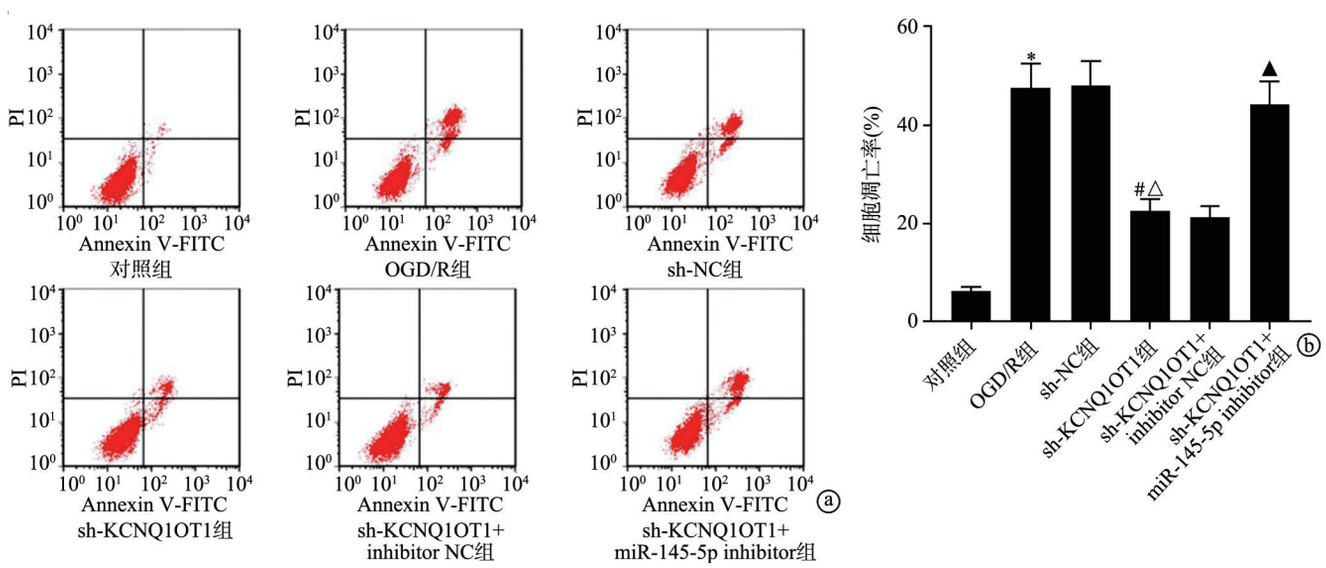
OGD/R组细胞凋亡率高于对照组($P<0.05$);sh-KCNQ1OT1组细胞凋亡率较OGD/R组、sh-NC组降低($P<0.05$);sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组细胞凋亡率较sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组升高($P<0.05$),见图3。

2.4 各组细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β水平比较

与对照组比较,OGD/R组细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β水平均升高($P<0.05$);与OGD/R组、sh-NC组比较,sh-KCNQ1OT1组细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β水平均降低($P<0.05$);与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较,sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β水平均升高($P<0.05$),见表3。

2.5 验证miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1的靶向关系

生物信息学网站预测结果显示,miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1存在靶向关系,见图4a、b。与miR-NC组比较,miR-145-5p mimic组细胞lncRNA KCNQ1OT1-WT、ROCK1-WT荧光素酶活性均下降($P<0.05$),见图4c。



a:细胞凋亡流式图;b:细胞凋亡率比较 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与OGD/R组比较,$P<0.05$;△:与sh-NC组比较,$P<0.05$;▲:与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较,$P<0.05$

图3 各组细胞凋亡情况

表3 各组细胞中IL-6、TNF-α、IL-1β水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6(ng/L)	TNF-α(ng/L)	IL-1β(pg/mL)
对照组	5.46±0.78	3.10±0.71	34.53±3.78
OGD/R组	22.83±2.55*	15.01±1.92*	127.02±13.04*
sh-NC组	21.72±2.53	14.89±1.86	126.01±12.92
sh-KCNQ1OT1组	15.28±1.61#△	9.25±1.04#△	91.32±9.51#△
sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组	15.26±1.58	9.05±1.02	90.12±9.21
sh-KCNQ1OT1+miR-145-5p inhibitor组	21.50±2.52▲	14.85±1.88▲	125.42±11.86▲

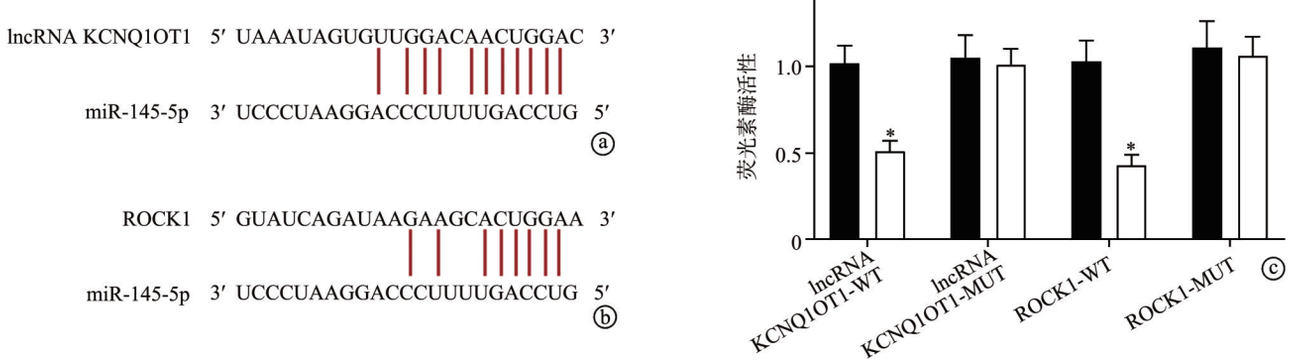
*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与OGD/R组比较,$P<0.05$;△:与sh-NC组比较,$P<0.05$;▲:与sh-KCNQ1OT1+inhibitor NC组比较,$P<0.05$

3 讨论

小胶质细胞广泛分布于中枢神经系统,占脑胶质细胞总数的20%,是中枢神经系统中的脑驻留免疫细胞[14]。在正常情况下,小胶质细胞以多种形式保持静息状态;在发生脑缺血时,细胞被大量激活,从而触发炎症反应。有研究通过对缺血性脑卒中患者脑脊液和血液中的炎症细胞因子进行多次监测发现,小胶质细胞可以在数小时内被激活并被招募到梗死病灶[14-15],而小胶质细胞凋亡可导致神经功能恶化[16-17]。这些发现为缺血/再灌注损伤中小胶质细胞的激活提供了直接证据,抑制小胶质细胞活化可能是开发抗缺血性脑卒中药物的重要靶点。故本研究采用OGD/R诱导小胶质细胞损伤,以探讨AIS的潜在治疗靶点。

lncRNA KCNQ1OT1是一种常见的lncRNA,可以参与包括细胞周期在内的多种生物学过程。已有研究发现,lncRNA KCNQ1OT1参与细胞的增殖、凋亡[18]。Zhao等[19]研究发现,lncRNA KCNQ1OT1参与糖尿病心肌细胞的凋亡过程。Liao等[20]研究发现,在急性心肌梗死患者中,lncRNA KCNQ1OT1可以减轻缺氧引起的心肌细胞凋亡。本研究结果显示,OGD/R组细胞中lncRNA KCNQ1OT1表达、细胞凋亡率及炎症因子(IL-6、TNF-α、IL-1β)水平均升高,细胞存活率降低;而沉默lncRNA KCNQ1OT1可以增强细胞活性,降低细胞凋亡率及相关炎症因子水平。这提示,沉默lncRNA KCNQ1OT1的表达可以通过抑制细胞凋亡和炎症减轻OGD/R诱导的小胶质细胞损伤。

miRNA在真核细胞基因表达中具有重要调控功能,其主要通过碱基互补的方式靶向结合mRNA的3′-UTR,从而发挥基因调控作用[21]。miRNA是具有多种功能的调控因子,可以参与细胞分化、增殖及凋亡等生物学过程,其异常表达在一定程度上与疾病的发生发展有关[22]。有研究发现,miR-145-5p可抑制脑梗死中小胶质细胞的激活和氧糖剥夺处理的小胶质细胞凋亡[23]。已有研究发现,miR-145-5p参与糖氧剥夺引起的星形胶质细胞炎症反应,且miR-145-5p表达增加会在一定程度上抑制炎症反应[24]。ROCK1作为Rho激酶之一,具有多种功能,其在OGD/R诱导的神经细胞损伤和缺血性脑卒中模型小鼠疾病进展过程中发挥重要作用[25-26]。本研究结果表明,与对照组比较,OGD/R组细胞中miR-145-5p表达水平降低,ROCK1表达升高,而sh-KCNQ1OT1组细胞中miR-145-5p表达较OGD/R组、sh-NC组上调,ROCK1表达下调,提示沉默lncRNA KCNQ1OT1可以促进miR-145-5p表达,抑制ROCK1表达。此外,本研究通过网站预测及双荧光素酶报告基因实验证实,miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1、ROCK1均存在一定的靶向关系;而在沉默lncRNA KCNQ1OT1的同时抑制miR-145-5p的表达发现,抑制miR-145-5p逆转了沉默lncRNA KCNQ1OT1对OGD/R诱导的小胶质细胞损伤的作用,且ROCK1 mRNA和蛋白表达升高。这提示,沉默lncRNA KCNQ1OT1可能通过调控miR-145-5p/ROCK1轴,影响



a:miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1的靶向结合位点;b:miR-145-5p与ROCK1的靶向结合位点;c:荧光素酶活性比较 *:与miR-NC组比较,$P<0.05$

图4 miR-145-5p与lncRNA KCNQ1OT1和ROCK1的靶向关系

OGD/R诱导的小胶质细胞的增殖、凋亡等生物学行为及炎症反应。

综上所述,沉默lncRNA KCNQ1OT1可能通过靶向上调miR-145-5p表达,进一步下调ROCK1,减轻OGD/R诱导的小胶质细胞损伤。但本研究仅进行了体外研究,后续还需进行体内研究验证。

[参考文献]

[1] Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, et al. Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2017, 135(10):e146-e603. doi: 10.1161/CIR.0000000000000485.

[2] Ringler J, Steck M, Shah SP, et al. Indications and evidence for dual antiplatelet therapy after acute ischemic stroke[J]. Crit Care Nurs Q, 2020, 43(2):122-137. doi: 10.1097/CNQ.0000000000000298.

[3] Li X, Yang X, Lu H, et al. Calycosin attenuates the inflammatory damage of microglia induced by oxygen and glucose deprivation through the HMGB1/TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2023, 55(9): 1415-1424. doi: 10.3724/abbs.2023125.

[4] Subedi L, Gaire BP. Phytochemicals as regulators of microglia/macrophages activation in cerebral ischemia [J]. Pharmacol Res, 2021, 165:105419. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105419.

[5] Tan YT, Lin JF, Li T, et al. LncRNA-mediated posttranslational modifications and reprogramming of energy metabolism in cancer[J]. Cancer Commun (Lond), 2021, 41(2): 109-120. doi: 10.1002/cac2.12108.

[6] Yu S, Yu M, He X, et al. KCNQ1OT1 promotes autophagy by regulating miR-200a/FOXO3/ATG7 pathway in cerebral ischemic stroke [J]. Aging Cell, 2019, 18(3):e12940. doi: 10.1111/acel.12940.

[7] 卫 训, 汪凤仪, 赵茂林, 等. lncRNA KCNQ1OT1靶向miR-760调控心肌细胞凋亡的作用机制[J]. 临床心身疾病杂志, 2021, 27(2):1-5. doi: 10.3969/j.issn.1672-187X.2021.02.001.

[8] 麦尔哈巴·阿不都热依木, 潘 燕. 非编码RNA作为ceRNA在人癌症中的功能及机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2020, 36(8):895-902. doi:10.13865/j.cnki.cjbmb.2020.06.1065.

[9] 马楚晗, 于亚男, 刘啟文, 等. miRNA对肝纤维化TGF-β/smad信号通路的影响[J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(3):369-372. doi:10.13418/j.issn.1001-165x.2021.03.024.

[10] 贾燕燕,张小林,潘 燕,等. miR-145-5p靶向FGF5对神经细胞缺血/再灌注损伤诱导的神经元细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(17): 3170-3176. doi: 10.12102/j.issn.1672-1349.2023.17.012.

[11] Xiao W, Jiang Z, Wan W, et al. miR-145-5p targets MMP2 to protect brain injury in hypertensive intracerebral hemorrhage via inactivation of the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(10):571. doi: 10.21037/atm-22-1897.

[12] Lin Y, Zhan Z, Hu M, et al. Inhibition of interaction between ROCK1 and Rubicon restores autophagy in endothelial cells and attenuates brain injury after prolonged ischemia[J]. J Neurochem, 2023,164(2):172-192. doi: 10.1111/jnc.15721.

[13] 唐凡人, 余萍萍, 王 莉, 等. 白藜芦醇预处理对大鼠皮质神经元氧糖剥夺/再复氧损伤后神经元突起生长的影响[J]. 解剖学报, 2017, 48(1): 1-6. doi: 10.16098/j.issn.0529-1356.2017.01.001.

[14] Tian M, Yang M, Li Z, et al. Fluoxetine suppresses inflammatory reaction in microglia under OGD/R challenge via modulation of NF-κB signaling[J]. Biosci Rep, 2019,39(4):BSR20181584. doi: 10.1042/BSR20181584.

[15] Ma Y, Wang J, Wang Y, et al. The biphasic function of microglia in ischemic stroke [J]. Prog Neurobiol, 2017, 157: 247-272. doi: 10.1016/j.pneurobio.2016.01.005.

[16] Zhou H, Yan L, Huang H, et al. Tat-NTS peptide protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via ANXA1 SUMOylation in microglia [J]. Theranostics, 2023, 13(15): 5561-5583. doi: 10.7150/thno.85390.

[17] 曹天然,刘青芳,潘美民,等. LncRNA SNHG8通过抑制miR-494-3p表达减轻脑缺血再灌注损伤[J]. 南方医科大学学报, 2023, 43(12):2015-2022. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2023.12.04.

[18] Li K, Cao H, Fan M, et al. LncRNA KCNQ1OT1 participates in Ox-LDL-induced proliferation/apoptosis imbalance in vascular smooth muscle cells by regulating the MiR-196a-5p/FOXO1 axis [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2022, 31(8): 106622. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2022.106622.

[19] Zhao SF, Ye YX, Xu JD, et al. Long non-coding RNA KCNQ1OT1 increases the expression of PDCD4 by targeting miR-181a-5p, contributing to cardiomyocyte apoptosis in diabetic cardiomyopathy [J]. Acta Diabetol, 2021, 58(9): 1251-1267. doi: 10.1007/s00592-021-01713-x.

[20] Liao B, Dong S, Xu Z, et al. LncRNA Kcnq1ot1 renders cardiomyocytes apoptosis in acute myocardial infarction model by upregulating Tead1[J]. Life Sci, 2020, 256(1):117811-117847. doi: 10.1016/j.lfs.2020.117811.

[21] You J, Qian F, Huang Y, et al. lncRNA WT1-AS attenuates hypoxia/ischemia-induced neuronal injury during cerebral ischemic stroke via miR-186-5p/XIAP axis[J]. Open Med (Wars), 2022,17(1):1338-1349. doi: 10.1515/med-2022-0528.

[22] Zhan L, Mu Z, Jiang H, et al. MiR-21-5p protects against ischemic stroke by targeting IL-6R[J]. Ann Transl Med, 2023, 11(2):101. doi: 10.21037/atm-22-6451.

[23] Qi X, Shao M, Sun H, 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. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.002.

[24] 柴春泉, 姜 逸, 梁尚华, 等. 丹参川芎嗪注射液通过miR-145-5p/PLA2G4A抑制糖氧剥夺诱导的星形胶质细胞活化和炎症反应[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(6):101-106. doi:10.13412/j.cnki.zyyl.2021.06.021.

[25] Wang S, Li N, Meng X. Silencing of the circ-Arhgap5 RNA protects neuronal PC12 cells against injury and depends on the miR-29a-3p/Rock1 axis[J]. Metab Brain Dis, 2023, 38(4): 1285-1296. doi: 10.1007/s11011-023-01178-7.

[26] He W, Cheng Y, Lai Y. CircRNA_102046 affects the occurrence and development of ischemic stroke by regulating the miR-493-5p/ROCK1 signaling[J]. Cardiovasc Toxicol, 2024, 24(3): 280-290. doi: 10.1007/s12012-024-09831-y.

(编辑:龙小芬)