基础研究 文章编号:0253-3626(2008)s1-0023-04

大鼠脑缺血急性期脑组织miRNA的表达变化

文全庆,贾延劼,王明闯,赵二义,王留东,张博爱,刘洪波

(郑州大学第一附属医院神经科,郑州 450052)

【摘 要】目的:观察脑缺血急性期大鼠脑组织小RNA(microRNA,miRNA)差异表达。方法:采用双颈总动脉结扎方法制备大鼠脑缺血模型(2VO),脑缺血后30min,将动物断头取皮层脑组织,miRNA表达谱芯片检测miRNA差异表达。结果:与正常组比较,2VO术后60min大鼠皮层脑组织中35个已知miRNA表达上调2倍以上;89个表达下调2倍以上等,其中促进凋亡和影响细胞周期的miRNA,如miR-23、-24、-26、-30、-103、-107等显著上调,与神经干或前体细胞分化有关的let-7、miR-124、-128、-9等也显著上调。结论:miRNA在脑缺血早期表达即有明显差异,可能在大鼠脑缺血早期病理生理变化中发挥作用。

【关键词】小RNA;脑缺血;大鼠;表达

【中国图书分类法分类号】R743.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Expression analysis of microRNA on acute cerebral ischemia in rats

WEN Quan-qing, et al

(*Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Zhengzhou University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the change of microRNA(miRNA) expression on acute cerebral ischemia in rats. *Methods*: We adopted the permanent occlusion of bilateral common carotid arteries in Wistar rats to produce cerebral ischemia model (2VO). Then we examined miRNA expression of cortex tissue after 60 minutes of occlusion by miRNA chip. *Results*: Compared with normal rats, 35 pieces of miRNA were up-regulated more than twice in the 2VO rats. And 89 pieces were down-regulated more than twice. *Conclusion*: The miRNA changed on acute cerebral ischemia in rats. It may play an important role in pathophysiology on acute cerebral ischemia.

【Key words】 microRNA; Cerebral ischemia; Rats; Expression

miRNA是一类长约22个(17~25个)核苷酸的非编码的单链RNA分子,广泛存在于真核生物中,在物种之间具有系统进化上的高度保守性、时序性和组织特异性。功能上,miRNA可通过引发靶mRNA的降解或/和翻译抑制来介导转录后基因沉默,调节蛋白质的表达,在神经系统分化、发育以及神经系统疾病的发生发展等过程中发挥重要作用[1-3]。本实验应用miRNA表达谱芯片技术检测大鼠脑缺血急性期miRNA差异表达。大鼠脑缺血模型采用双侧颈总动脉结扎法制备。

作者介绍:文全庆(1985-),男,硕士,
研究方向:神经病学基础与临床。
通讯作者:贾延劼,男,副教授,E-mail:jiayanjie2002@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(30770758);河南省教育厅自然科学研究计划项目(2008A320032)。

1 材料和方法

1.1 实验动物和模型制备

选择健康成年Wistar大鼠9只,SPF级,雄性,体重150~200g,随机分为正常组、假手术组、实验组,每组3只,由郑州大学动物实验中心提供。

大鼠缺血模型参考经典的双侧颈总动脉结扎模型(2VO)[4],具体如下。Wistar大鼠用10%水合氯醛0.35ml/100g腹腔内注射麻醉,仰卧位固定,去毛,消毒,颈部正中切口,分离双侧颈总动脉,并套以4号线,结扎双侧颈总动脉,假手术组除不结扎双侧颈总动脉外,其余过程与手术组相同。

1.2 组织标本制备

2VO术后60min,将各组动物断头取脑,在生理盐水冰面上分离双侧大脑皮层,每份标本取材约200mg,保存于RNAlater(Qiagen公司,德国)2ml中,-20℃保存。

1.3 miRNA检测

采用miRNA表达谱芯片检测,主要步骤分为抽提RNA,RNA

质量检测,标记miRNA,miRNA芯片杂交,洗片,数据处理等,由上海康成生物工程有限公司完成。

1.3.1 抽提RNA

首先使用Biopulverizer(Biospec公司,美国)冰冻粉碎组织后;采用Mini-Bead-Beater-16(Biospec公司,美国)进行匀浆;匀浆后脑组织样品于15~30℃孵育5min,4℃,12 000g离心15min。离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相,中间层核上层的无色的水相。将水相转移到新离心管中,加入0.5ml异丙醇,混匀后15~30℃孵育10min,4℃,12 000g离心10min。移去上清液,加入1ml的75%乙醇,清洗RNA沉淀。振荡后,4℃,7 500g离心5min。去除乙醇溶液,空气中干燥RNA沉淀5~10min。无RNA酶的水溶解RNA,保存于-70℃。

1.3.2 RNA质量检测 采用紫外吸收测定法检测RNA溶液的$OD_{260}/_{280}$的比值,范围1.8~2.1。

1.3.3 标记miRNA 采用miRCURYTM Array Power Labeling kit (Exiqon公司,丹麦)标记,按照说明书进行。终止标记反应后,轻微离心后标记产物放置于4℃以备后续杂交反应使用。

1.3.4 miRNA芯片杂交 将12.5μl标记产物、90μl的1.5×Hybridization buffer、77.5μl无RNA酶的水混合,与miRNA表达谱芯片(Exiqon公司,丹麦)、95℃避光孵育2min;孵育后冰上放置2min;使用热收缩杂交袋(Phalanx公司,中国台湾)杂交过夜;杂交温度为56℃,杂交转速为2r/min。

1.3.5 洗片 杂交后,将芯片从杂交袋中取出,用miRCURYTM Array Wash buffer kit(Exiqon公司,丹麦)洗片,按照说明书进行。洗片后,200g离心5min以甩干芯片,芯片干燥后立即扫描,所得数据进行相关软件分析。

2 结 果

2.1 RNA质量检测

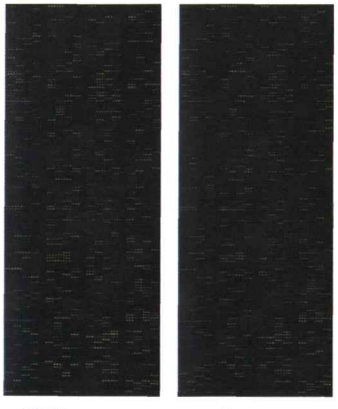
经检测,所有样本的RNA符合miRNA表达谱芯片的要求,可以进行后续实验。

表1 不同药物引起的肝功能损害比较

分组	OD_{260}	OD_{280}	$OD_{260}/_{280}$ 1.8 to 2.1	$OD_{260}/_{230}$≥2.0	ng/μl
正常组	28.787±2.314	14.99±3.27	1.92±0.04	2.14±0.08	1151.5±19.8
假手术组	38.481±4.682	20.08±2.17	1.92±0.17	2.26±0.06	1539.2±74.4
2VO 组	18.688±3.192	10.24±0.75	1.82±0.01	1.85±0.13	747.5±34.2

2.2 miRNA芯片表达结果

因为正常组与假手术组之间miRNA表达比较无明显差异,结果从略。正常组与2VO组miRNA表达变化很大,2VO术后60min大鼠皮层脑组织中35个已知miRNA表达上调2倍以上;89个已知miRNA表达下调2倍以上(图1,表2、3)。



正常组 2VO 组

图 1 miRNA 表达谱芯片结果

表2 上调2倍以上的miRNA

Name	ID	2VO/正常
miRPlus_27564	27564	2.252503172
miRPlus_28431	28431	2.374197535
miRPlus_28993	28993	3.037874161
rno-let-7a	17748	2.279119995
rno-let-7d	10914	6.549081921
rno-let-7i	19580	2.665161145
rno-miR-103	10919	2.134114073
rno-miR-107	28481	2.848563969
rno-miR-124	14328	6.439244878
rno-miR-125b-5p	30787	2.481714786
rno-miR-126	4610	5.632059377
rno-miR-127	10931	4.116374355
rno-miR-128a/128b	33902	5.077831585
rno-miR-138	13140	3.396911349
rno-miR-143	13177	7.333927032
rno-miR-184	10978	2.317918972
rno-miR-185	5560	3.712317473
rno-miR-22	11020	6.746358726
rno-miR-222	11023	4.753441118
rno-miR-23a	28399	3.89778942

Name	ID	2VO/ 正常
rno-miR-23b	11027	3.20117472
rno-miR-24	17506	5.474212706
rno-miR-26a	11030	7.644289658
rno-miR-29a	11039	5.749829376
rno-miR-30a	11048	4.757642156
rno-miR-30e	13174	3.110927218
rno-miR-341	11229	3.905430133
rno-miR-352	11273	4.073133303
rno-miR-376a	14303	2.041300326
rno-miR-378	29204	3.2933377
rno-miR-411	17482	2.239686031
rno-miR-494	14287	7.298493954
rno-miR-674-5p	30768	3.579769665
rno-miR-9	7190	3.05079039
rno-miR-98	11182	2.261801896

表3 下调2倍以上的miRNA

Name	ID	2VO/ 正常
miRPlus_17653	17653	0.278840463
miRPlus_17811	17811	0.42804457
miRPlus_17812	17812	0.495585271
miRPlus_17821	17821	0.494126161
miRPlus_17843	17843	0.349002915
miRPlus_17858	17858	0.495787276
miRPlus_17860	17860	0.417394012
miRPlus_17868	17868	0.407440391
miRPlus_17891	17891	0.388093743
miRPlus_17912	17912	0.465485149
miRPlus_17932	17932	0.461035322
miRPlus_17937	17937	0.347039833
miRPlus_17941	17941	0.410922787
miRPlus_17957	17957	0.459676338
miRPlus_28350	28350	0.37356617
miRPlus_28534	28534	0.323814731
miRPlus_28790	28790	0.432550302
miRPlus_30271	30271	0.36257893
miRPlus_30317	30317	0.36616882
miRPlus_31515	31515	0.401021033
miRPlus_32900	32900	0.423374993
rno-let-7f	17752	0.474141678
rno-let-7i*	17913	0.436807687
rno-miR-1	14294	0.450434594
rno-miR-1*	14295	0.399097671
rno-miR-101a*	17935	0.259161531
rno-miR-126*	10930	0.494629281
rno-miR-135a	10941	0.237792882
rno-miR-137	10944	0.345587783
rno-miR-141	10946	0.401231212
rno-miR-145	10951	0.35313677
rno-miR-148b-3p	19585	0.474631746
rno-miR-150	19587	0.412503259
rno-miR-151	11260	0.428408863
rno-miR-154	10962	0.468655741
rno-miR-181a*	11013	0.382995996
rno-miR-181c	10973	0.367894223
rno-miR-182	10975	0.426371012
rno-miR-183	10977	0.362451261
rno-miR-196a	10990	0.456053035
rno-miR-196b	10991	0.290063144
rno-miR-199a-5p	29562	0.344881625
rno-miR-200b	9578	0.465546964
rno-miR-204	11005	0.428533764
rno-miR-205	11006	0.435979055
rno-miR-20a*	11261	0.485636021
rno-miR-211	19601	0.378481515
rno-miR-216a	11016	0.38977235
rno-miR-218	11018	0.442188651
rno-miR-219-5p	11019	0.318133771
rno-miR-25	11029	0.338130751
rno-miR-28	11034	0.287083043
rno-miR-290	27570	0.36257893
rno-miR-296*	19594	0.350045337
rno-miR-299	11038	0.359383319
rno-miR-29a*	17879	0.401841621
rno-miR-30a*	19595	0.357324163
rno-miR-30b-5p	17565	0.486985244
rno-miR-30d*	17853	0.485636021
rno-miR-33	11062	0.288930085
rno-miR-330	17895	0.4899464
rno-miR-337	11066	0.461913206
rno-miR-343	11267	0.352219532
rno-miR-349	11271	0.188016558
rno-miR-363	11077	0.346716102
rno-miR-369-3p	11081	0.40625321
rno-miR-375	11088	0.296287675
rno-miR-376a*	14268	0.347001465
rno-miR-376b-5p	14305	0.386750859
rno-miR-377	11091	0.324271678
rno-miR-378*	11092	0.485023618
rno-miR-380	28161	0.466957713
rno-miR-409-5p	14310	0.366094847
rno-miR-412	11103	0.306410633

rno-miR-421	11274	0.30659524
rno-miR-425	17608	0.449872814
rno-miR-449a	11114	0.469744396
rno-miR-489	14312	0.352219532
rno-miR-497	11129	0.489877384
rno-miR-499	14313	0.481080336
rno-miR-501	11133	0.395289855
rno-miR-505	14314	0.38840647
rno-miR-532-5p	17624	0.457026319
rno-miR-542-5p	14291	0.470746868
rno-miR-758	28759	0.481843471
rno-miR-7a*	11277	0.396246973
rno-miR-7b	4390	0.374123732
rno-miR-874	17874	0.403369059
rno-miR-9*	29852	0.399126886

3 讨 论

传统观点认为，RNA做为一种DNA和蛋白质之间的过渡性物质而存在，而RNA干扰技术的出现使该观点受到了冲击。大量证据清楚的表明，这些普遍存在的小分子保守存在于线虫、植物和脊椎动物中，在生命发育进程中扮演着关键角色，可以直接调控30%的人类基因表达[6]。因此，被*Science*杂志评为2002年世界十大科技突破的首位。在已知的miRNA中，约70%在哺乳动物大脑内有表达，其中有些是脑组织所特有的，如miR-124、miR-133b等。众多的miRNA参与了神经系统的不同生理过程、不同信号传导通路的基因表达调控，如神经系统发生和发育、神经干细胞分化、突触联系、树突棘形成、神经保护等[3]。

miRNA基因芯片的出现，使得在一张芯片上同时观察数以百计的miRNA的表达变化成为可能，也为肿瘤、内分泌、神经系统疾病的病理过程研究提供了一条新的途径。基因芯片分析发现，缺血缺氧条件下可以导致细胞内miRNA变化，主要集中在调控以下3个方面：(1)细胞凋亡基因。如：凋亡基因PAR-4(miR-26、-30、-181)，PCDC10(miR-103/107、miR-181)，BID(miR-23)，BIM(miR-24)，CASP3(miR-30)，CASP 7(miR-23)，APAF1(miR-27)，BAK1(miR-26)，Bnip3L(miR-23)等。(2)细胞周期基因。如：cdc25A(miR-21、miR-103/107)，cyclin D2(miR-26、miR-103/107)，cyclin E1(miR-26)，cyclin H(miR-23)，cdk6(miR-26、miR-103/107)。(3)血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth focfor，VEGF)基因。如：let-7b、miR-16、-20、-17-5p、-27、-106、-107、-193、-210、-320和-361等。本研究发现，脑组织缺血早期可以出现某些miRNA的上调，如miR-23、-24、-26、-30、-103、-107等，它们在促进凋亡和影响细胞周期中扮演重要角色，而促进VEGF表达的miRNA变化不明显，原因可能与缺血早期主要启动了细胞凋亡、坏死的信号途径相关。

目前，关于缺血缺氧性脑损伤后miRNA影响方面的研究才刚起步。Jeyaseelan等采用局灶性脑缺血模型(MCAO模型)，发现再灌注24h和48h后，let-7、miR-7、-27a、-29、-30c、-98、-101a、-137、-148b、-204、-218、-301、-338、-335、-369-5p、-376和-424下调；miR-210、-215、-324-3p、-422b、-451、-497、-134等上调。结合DNA基因芯片，发现这些miRNA特异性调节蛋白表达，如miR-124a、-290、-494调节VSNL1蛋白基因的表达；miR-223、-290、-292-5p、-327、-494调节水通道蛋白1、4、5、6和11基因的表达；miR-125a、-132、-290、-338、-664调节MMP-9基因的表达。而且研究发现，部分miRNA(如miR-124、-9、-let-7等)与神经干或前体细胞的分化有关，提示缺血性脑损伤后，可以通过miRNA影响神经干或前体细胞的功能[7]。虽然本研究选取的模型和时间点与Jeyaseelan的不同，但同样观察到了促进凋亡和影响细胞周期的miRNA表达上调，与神经干或前体细胞的分化有关的miRNA，如let-7、miR-124、-128、-9表达上调。

我们在实验中观察到在急性脑缺血早期，当主要的病理变化尚未出现时，miRNA的表达已经发生了明显变化，提示在缺血性脑血管病早期，miRNA调节蛋白表达可能参与了启动缺血早期神经系统的修复过程。从转录水平调控特定的miRNA达到阻断脑缺血后续病理生理变化的目的，可能为缺血性脑损伤提供新的治疗方法。

参 考 文 献

[1] Esau CC, Monia BP. Therapeutic potential for microRNAs[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007; 59(2-3): 101-114.

[2] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight[J]? Nat Rev Genet, 2008; 9(2): 102-114.

[3] Gao FB. Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks[J]. Trends Neurosci, 2008; 31(1): 20-26.

(下转第 40 页)

forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000;20(3):715-720.

[3] 洪永敦,吴 辉,赵 萍,等.麝香保心丸对颈动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2006;9:780-782.

[4] 罗心平,李 勇,范维琥,等.麝香保心丸减少高脂血症对动脉壁损害作用的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,1998;18:486-489.

[5] Hu B,Li D, Sawamura T,et al.Oxidized LDL through LOX-1 modulates LDL-receptor expression in human coronary artery endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003;307(4):1008-1012.

[6] Chen M,Masaki T,Sawamura T.LOX-1,the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells:implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. Pharmacol Ther,2002;95(1):89-100.

[7] Ruiz-Ortega M,Ruperez M,Esteban V,et al.Molecular mechanisms of angiotensin II-induced vascular injury[J]. Curr Hypertens Rep,2003;5(1):73-79.

[8] Murase T,Kume N,Kataoka H,et al.Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2000,20(3):715-720.

[9] Chen M,Kakutani M,Naruko T.Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001;282:153-158.

[10] Li D,Saldeen T,Romeo F,et al.Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF-kappaB[J]. Circulation,2000;102(16):1970-1919.

[11] Li D,Chen H,Romeo F,et al.Statins modulate oxidized low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells:role of LOX-1[J]. J Pharmacol Exp Ther,2002;302(2):601-605.

(上接第 26 页)

[4] Lewis BP,Burge CB,Bartel DP.Conserved seed pairing,often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets[J]. Cell,2005;120(1):15-20.

[5] Kulshreshtha R,Davuluri RV,Calin GA,et al. A microRNA component of the hypoxic response[J]. Cell Death Differ,2008;15(4):667-671.

[6] Jeyaseelan K,Lim KY,Armugam A.MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke,2008;39(3):959-966.

[7] Chuang JC,Jones PA.Epigenetics and microRNAs[J].Pediatr Res,2007;61(b pt2):24R-29R.

(上接第 32 页)

参 考 文 献

[1] Adamchik Y,Frantseva MV,Weisspapir M,et al.Methods to induce primara and sec ondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures[J]. Brain Res Brain Res Protoc,2000;5(2):153-158.

[2] Laake JH,Haug FM,Wieloch T,et al.A simple in vitro model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence[J]. Brain Res Brain Res Protoc,1999;4(2):173-184.

[3] Gahwiler BH,Capogna M,Debanne D,et al.Organotypic slice cultures:a technique has come of age[J].Trends Neurosci,1997;20(10):471-477.

[4] Connelly CA,Chen LC,Colquhoum SD.Metabolic activity of cultured rat brainstem,hippocampal and spinal cord slices[J]. J Neurosci Methods,2000;99(1-2):1-7.

第九届全国神经生化会议将于
2009 年 5 月在湖南长沙举行,欢迎届时参加!