

论著·实验研究

# 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织小RNA表达的变化

彭涛 贾延劼 文全庆 关文娟 赵二义 张博爱

(郑州大学第一附属医院神经内科,河南 郑州 450052)

**[摘要]** 目的 观察新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)皮层小RNA(microRNA, miRNA)差异表达,以研究其在HIBD的病理生理中的作用。方法 建立新生大鼠HIBD模型14 d后,取皮层脑组织,miRNA表达谱芯片检测miRNA差异表达。实时定量PCR检测miR-126、-26a、-674-5p、-21、-25、-290和miR-124、-125b-5p、-9a等9个miRNA。结果 miRNA表达谱芯片结果提示,与对照组比较,HIBD大鼠皮层脑组织中27个已知miRNA表达上调2倍以上;60个表达下调2倍以上。实时定量PCR检测所选择的9个miRNA结果与miRNA芯片结果具有同样趋势。结论 HIBD模型大鼠miRNA表达有明显差异,这些改变可能在HIBD的病理生理中起着重要作用。

[中国当代儿科杂志,2010,12(5):373-376]

**[关键词]** 小RNA;缺氧缺血性脑损伤;新生大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)05-0373-04

## Expression of microRNA in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

PENG Tao, JIA Yan-Jie, WEN Quan-Qing, GUAN Wen-Juan, ZHAO Er-Yi, ZHANG Bo-Ai. Department of Neurology, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Jia Y-J, Email:jiayanjie1971@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** To study the changes of microRNA expression in cortex tissues in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage(HIBD) and the possible roles of microRNA in the pathogenesis of HIBD. **Methods** Rat HIBD model was prepared. The cortex tissues were obtained 14 days after the HIBD event. The microRNA expression profiles were measured using microRNA microarray. Expression of 9 microRNAs (miR-126, -26a, -674-5p, -21, -25, -290, miR-124, -125b-5p and microRNA-9a) was determined by quantitative real-time PCR. **Results** The results of microRNA expression profiles indicated that 27 pieces of microRNA were up-regulated more than 2 folds and 60 pieces were down-regulated more than 2 folds compared with the normal control group. The results of the 9 microRNAs detected by quantitative real-time PCR were consistent with those detected by microRNA microarray. **Conclusions** HIBD rats have significant changes in microRNA expression, suggesting that microRNA expression may play important roles in the pathogenesis of HIBD. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(5):373-376]

**Key words:** microRNA; Hypoxic-ischemic brain damage; Neonatal rats

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic brain damage, HIBD)迄今仍是新生儿脑损伤的主要原因。其病死率高,预后差,可能造成患儿在认知、语言、感觉、运动、视觉、记忆等多方面远期缺损<sup>[1]</sup>。小RNA(microRNA, 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,参与蛋白质表达的调节,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<sup>[2-3]</sup>。本研究应用miRNA表达谱芯片技术检测新生大鼠HIBD miRNA差异表达,探索miRNA在HIBD中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物和HIBD模型制作

选择健康7日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠10只,SPF级,随机分为对照组和HIBD组,每组5只,由郑州大学动物实验中心提供。

HIBD模型的制作根据Rice-Vannucci法<sup>[4]</sup>并参

[收稿日期]2009-12-10;[修回日期]2010-01-28

[作者简介]彭涛,男,硕士,主治医师。

[通信作者]贾延劼,主任医师。

照刘丽旭等<sup>[5]</sup>的方法。乙醚麻醉后,消毒,颈部正中切口,结扎离断大鼠左颈总动脉,缝合伤口后放回母鼠笼恢复2 h,而后放入8%的氮氧混合气的36℃恒温箱2 h。实验结束后将大鼠放回鼠笼由母鼠喂养,14日龄处死。对照组除不结扎颈总动脉外,其余过程与HIBD组相同。

## 1.2 主要试剂和仪器

miRCURYTM Array Power Labeling kit, miRCURYTM Array Wash buffer kit、大鼠 miRNA 表达谱芯片购自丹麦 Exiqon 公司; RNAlater、miScript PCR System, 包括 miScript Reverse Transcription Kit、miScript SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit、以及大鼠 miR-124、-126、-26a、-674-5p、-9a、-21、-25、-290 miScript Primer Assays 购自德国 Qiagen 公司; Mini-Beadbeater-16 研磨珠均质器为美国 Biospec 公司产品; 双波长激光同步扫描系统 GenePix 4000B 芯片扫描仪为美国 Axon 公司产品; 荧光定量 PCR 仪 ABI Prism 7300HT 为美国 Applied Biosystems 公司产品; 其余生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

## 1.3 miRNA 检测

参考我们前期研究的方法<sup>[6]</sup>, 取14日龄大鼠, 断头取脑后, 低温快速分离双侧大脑皮层取材, 每份标本约200 mg, 清洗后分别置于RNAlater 2 mL 中, -20℃备用。

**1.3.1 抽提 RNA** 冰冻粉碎标本后, Mini-Bead-Beater-16 进行匀浆; 匀浆后脑组织样品于15~30℃孵育5 min, 4℃, 12 000 g 离心15 min。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0.5 mL 异丙醇, 混匀后15-30℃孵育10 min, 4℃, 12 000 g 离心10 min。移去上清液, 加入1 mL 的75%乙醇, 清洗RNA沉淀。振荡后, 4℃, 7 500 g 离心5 min。空气中干燥RNA沉淀10 min, 保存于-70℃。采用紫外吸收测定法检测RNA溶液的OD<sub>260/280</sub>的比值, 各样本比值范围控制在1.8~2.1之间。

**1.3.2 标记 miRNA** 采用 miRCURYTM Array Power Labeling kit 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。

**1.3.3 miRNA 芯片杂交** 将12.5 μL 标记产物、90 μL 的1.5 × Hybridization buffer、77.5 μL 无RNA酶的水混合, 与miRNA表达谱芯片、95℃避光孵育2 min; 孵育后冰上放置2 min; 杂交过夜; 杂交温度为56℃, 杂交转速为2转/min。

**1.3.4 洗片** 杂交后, 将芯片用 miRCURYTM Array Wash buffer kit 洗片; 200 g 离心5 min 以甩干芯片; 芯片干燥后立即用 Genepix 4000B 635 nm 波长进行图像扫描, 所得数据进行相关软件分析, 通过原始值减去背景值来做修正, 并用中值做标准化, 分别计算出各样本中 miRNA 的标准值及比值, 每份样本重复3次。

## 1.4 实时定量聚合酶链反应(实时定量 PCR)

本研究根据 miRNA 表达谱芯片结果, 选择有代表性的 miRNA, 即 miR-124、-125b-5p、-126、-26a、-674-5p、-9a、-21、-25、-290 进行实时定量 PCR。采用 miScript PCR System 进行, 其中取1.0 μg 上述组织样本抽提的总 RNA 作为初始模板, 大鼠 miR-124、-125b-5p、-126、-26a、-674-5p、-9a、-21、-25、-290 引物均为 miScript Primer Assays。

**1.4.1 cDNA 制备** 参考 miScript Reverse Transcription Kit 操作手册进行, 总逆转录反应体系为20 μL, 包括1.0 μg 总 RNA 样本、4.0 μL 5 × miScript RT Buffer, 1.0 μL miScript Reverse Transcriptase Mix, 13.0 μL RNase-free water。冰上混匀后, 37℃避光孵育60 min; 95℃避光孵育5 min 灭活 miScript Reverse Transcriptase Mix; 冰上保存备用。

**1.4.2 实时定量 PCR** 参考 miScript SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit 操作手册, 在96孔板上进行, 每孔总反应体系为50 μL, 包括3.0 μL cDNA (1.4.1 制备), 5.0 μL 10 × miScript Primer Assay, 5.0 μL 10 × Universal Primer, 25.0 μL 2 × QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 12.0 μL RNase-free water。荧光定量 PCR 仪 (ABI 7300HT) 上进行 PCR 扩增, 设置反应条件为95℃预热15 min, 94℃ 15 s, 55℃ 30 s, 70℃ 30 s, 共40个循环。采用荧光定量 PCR 仪 SDS 软件分析, 查看每个基因的扩增情况, 记录相应的 Ct 值, 基因相对表达量采用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算, 并以此判定各样本中 miRNA 表达量的差异。

## 2 结果

### 2.1 miRNA 芯片检测结果

杂交后的 miRNA 芯片经扫描、分析及标准化处理后, 结果提示对照组与 HIBD 组 miRNA 表达差别很大, 14 d 龄大鼠皮层脑组织中 27 个已知 miRNA (let-7a、-7d、-7i、miR-101a、-107、-124、-125b-5p、-126、-127、-128a/128b、-132、-145、-210、-222、-23a、-23b、-26a、-27a、-27b、-30a\*、-305、-376a、-376b-3p、-378、-411、-674-5p、-9a) 表达上调2倍以上, 其中

miR-126 上调最高,达到对照组的  $6.47 \pm 0.80$  倍。同时,60 个已知 miRNA (rno-let-7e<sup>\*</sup>、rno-let-7f、rno-let-7i<sup>\*</sup>、rno-miR-1<sup>\*</sup>、rno-miR-126<sup>\*</sup>、rno-miR-129<sup>\*</sup>、rno-miR-133a、rno-miR-135a、rno-miR-135b、rno-miR-137、rno-miR-140、rno-miR-143、rno-miR-147、rno-miR-148b-5p、rno-miR-150、rno-miR-154、rno-miR-181a、rno-miR-181a<sup>\*</sup>、rno-miR-181c、rno-miR-182、rno-miR-187、rno-miR-196b、rno-miR-199a-5p、rno-miR-19a、rno-miR-204、rno-miR-205、rno-miR-21、rno-miR-211、rno-miR-218、rno-miR-219-5p、rno-miR-224、rno-miR-25、rno-miR-28、rno-miR-290、rno-miR-292-3p、rno-miR-292-5p、rno-miR-301a、rno-miR-32、rno-miR-328、rno-miR-33、rno-miR-331、rno-miR-337、rno-miR-339-5p、rno-miR-340-3p、rno-miR-363、rno-miR-363<sup>\*</sup>、rno-miR-369-3p、rno-miR-375、rno-miR-376b-5p、rno-miR-378<sup>\*</sup>、rno-miR-410、rno-miR-423、rno-miR-431、rno-miR-448、rno-miR-451、rno-miR-483、rno-miR-484、rno-miR-505、rno-miR-532-5p、rno-miR-758) 表达下调 2 倍以上,其中 miR-25 下调最低,达到  $-3.75 \pm 0.02$  倍。

## 2.2 实时定量 PCR 结果

图 1 可以看出,所选择的 9 个 miRNA 实时定量 PCR 结果与 miRNA 芯片结果是类似的,从而表明 miRNA 芯片的结果是可靠的。

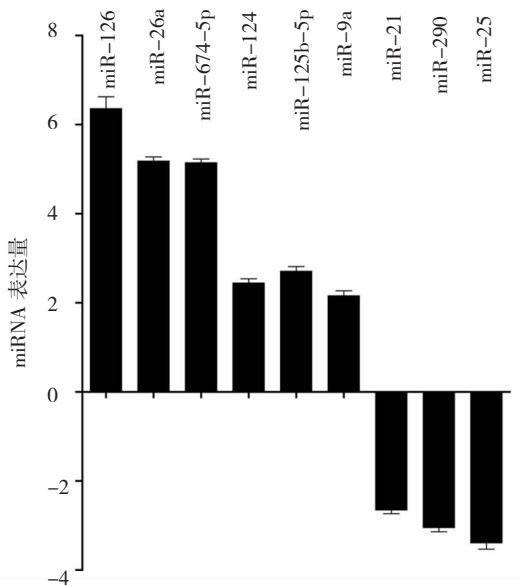


图 1 实时定量 PCR 结果 (数据采用公式  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  校正)

## 3 讨论

miRNA 归类于非编码 RNA,近年来大量研究表

明,miRNA 在生命发育进程中扮演着关键角色,至少能直接调控 30% 的人类基因表达<sup>[7]</sup>。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<sup>[8]</sup>。而且,miRNA 也参与了很多神经系统疾病的病理生理过程,如帕金森病、Alzheimer 氏病、脑肿瘤、Tourette 氏综合症、脊髓小脑共济失调、亨廷顿舞蹈病、精神分裂症、酒精引起的神经系统损伤等<sup>[7-9]</sup>。

目前,miRNA 在缺氧缺血性脑损伤的研究较少。Jeyaseelan 等<sup>[9]</sup>采用局灶性脑缺血模型(MCAO 模型)发现再灌注 24 和 48 h 后,let-7、miR-7、-27a、-29、-30c、-98、-101a、-137、-148b、-204、-218、-301、-338、-335、-369-5p、-376 和 -424 表达下调;miR-210、-215、-324-3p、-422b、-451、-497、-134 等上调。结合 DNA 基因芯片,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。Dharap 等<sup>[10]</sup>也有类似的结果。通过基因芯片分析发现,缺氧缺血条件下有变化的 miRNA 主要集中在: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 VEGF 基因。let-7b、miR-16、-20、-17-5p、-27、-106、-107、-193、-210、-320 和 -361 等<sup>[11]</sup>。

虽然 HIBD 与 MCAO 模型在病理生理机制中存在较大差异,本研究结果也提示这一点,但是,HIBD 也存在前述的促进凋亡和影响细胞周期的 miRNA 表达变化,如 miR-23、-24、-26、-30、-103、-107 等显著上调,以及与神经干或前体细胞的分化有关 let-7、miR-124、-128、-9 等。

本研究中,miR-126 表达上调最高。miR-126 主要表达在血管内皮细胞,包括毛细血管和大血管,其基本生理功能是促进血管新生<sup>[12]</sup>。而且 miR-126 的靶基因之一是 VCAM-1,抑制 miR-126 可以导致白细胞粘附于血管内皮细胞<sup>[13]</sup>。据此推测,在

HIBD 模型大鼠 miR-126 的高表达可能与新生血管的形成、抑制炎症反应有关。但是, HIBD 模型中 miR-21 的表达下调了  $3.31 \pm 0.65$  倍。miR-21 的靶基因包括 PTEN、Bcl-2, 抑制 miR-21 可以减少血管内皮细胞的增殖, 增加凋亡<sup>[13]</sup>。这些看似矛盾的结果提示了 HIBD 病理生理过程的复杂性。

而且, HIBD 模型中参与神经干细胞外遗传调控机制(epigenetic regulation)的分化调节的 miRNA 存在表达差异, 特别是 miR-124、-125b 和 9a。miR-124 主要在分化和分化后的神经细胞中表达, 可以抑制神经干细胞分化调控重要蛋白 PTBP1, 提高神经细胞特异性剪切, 促进向神经细胞分化; 同时, 可以调节成年动物室管膜下区的神经干细胞增殖、分化<sup>[14]</sup>。此外, miR-125b 和 9a 也通过多条途径促进神经干细胞向神经细胞分化<sup>[15-16]</sup>。本研究发现, HIBD 模型中 miR-124、-125b 和 9a 均有超过 2 倍的上调, 提示缺血缺氧条件下, 可能促进内源性神经干细胞的增值和分化, 参与脑损伤的修复过程。

综上所述, 在 HIBD 的病理生理过程中, miRNA 的表达有明显变化, 深入探索 miRNA 表达变化规律, 就有可能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, 为 HIBD 提供新的治疗方法。

#### [参 考 文 献]

[1] Barrett RD, Bennet L, Davidson J, Dean JM, George S, Emerald BS, et al. Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain[J]. Birth Defects Res C Embryo Today, 2007, 81(3): 163-176.

[2] Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs[J]. Pediatr Res, 2007, 61(5 Pt 2): 24R-29R.

[3] 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.

[4] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity of hypoxic-ischemic brain damage in the rat [J]. Ann Neurol, 1981, 9(2): 131-134.

[5] 刘丽旭, 杨于嘉. 高压氧治疗新生大鼠缺氧缺血性脑损伤量效及时效关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2001, 3(4): 355-358.

[6] 文全庆, 贾延劫, 王明闯, 赵二义, 王留东, 张博爱, 等. 大鼠脑缺血急性期脑组织 miRNA 的表达变化[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(S1): 23-26.

[7] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. Cell, 2007, 129(7): 1401-1414.

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

[9] Jeyaseelan K, Lim KY, Arumugam 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.

[10] Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(4): 675-687.

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

[12] van Solingen C, Seghers L, Bijkerk R, Duijs JM, Roeten MK, van Oeveren-Rietdijk AM, et al. AntagomiR-mediated silencing of endothelial cell specific microRNA-126 impairs ischemia-induced angiogenesis[J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(8A): 1577-1585.

[13] Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(4): 581-588.

[14] Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche [J]. Nat Neurosci, 2009, 12(4): 399-408.

[15] Le MT, Xie H, Zhou B, Chia PH, Rizk P, Um M, et al. MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(19): 5290-5305.

[16] Denli AM, Cao X, Gage FH. miR-9 and TLX: chasing tails in neural stem cells[J]. Nat Struct Mol Biol, 2009, 16(4): 346-347.

(本文编辑:王庆红)