

# miR-29 家族在深低温停循环相关性神经元损伤中的作用

李红梅 葛俊文 张儒舫 沈立

**摘要** 目的 观察 miR-29 家族在低温糖氧剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) HT22 细胞中的表达,进而探究 miR-29 家族在深低温停循环 (deep hypothermic circulatory arrest, DHCA) 相关性神经元死亡中的特异性作用及其相关机制。**方法** 将 HT22 细胞随机分为对照组、低温 OGD/R 组、类似物组 (agomir-NC 组、agomir-29a 组、agomir-29b 组和 agomir-29c 组) 和抑制剂组 (antamir-NC 组、antamir-29a 组、antamir-29b 组和 antamir-29c 组);运用一个密闭容器和一个厌氧产气袋建立 OGD/R 模型;定量 PCR 检测 HT22 细胞内 miR-29 家族的表达;CCK-8 方法检测活细胞数目;Western blot 法检测 HT22 细胞内 Bax 和 PUMA 蛋白含量;JC-1 和 H2DCFDA 法分别测定 HT22 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP)。**结果** 低温 OGD/R 模型中 miR-29 家族表达显著下降 ( $P < 0.01$ )。miR-29 家族过表达显著抑制了低温 OGD/R 诱导的 HT22 细胞死亡,以及 Bax 和 PUMA 蛋白的表达 ( $P$  均  $< 0.01$ );同时减轻了 ROS 含量和 MMP 水平 ( $P$  均  $< 0.01$ )。**结论** miR-29 家族可以通过减轻氧化应激从而对 DHCA 介导的神经元损伤产生保护作用。

**关键词** 深低温停循环 糖氧剥夺/再灌注 miR-29 氧化应激

**中图分类号** R459.4

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.05.007

**Role of miR-29 Family in the DHCA-associated Neuron Injury.** Li Hongmei, Ge Junwen, Zhang Rufang, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, Shanghai Children's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200062, China

**Abstract Objective** To investigate the expression and role of miR-29 family in HT22 cells with low temperature OGD/R, and further explore the specific role and its related mechanism of miR-29 family in DHCA-related neuron death. **Methods** The HT22 cells were randomly divided into the control group, low temperature OGD/R group, analogue group (agomir-NC group, agomir-29a group, agomir-29b group and agomir-29c group), inhibitor group (antamir-NC group, antamir-29a group, antamir-29b group and antamir-29c group). The OGD/R model was established using an airtight container and an anaeropack. The expression of miR-29 family on HT22 cell was determined by quantitative PCR. CCK-8 kit was used to detect the number of living cells. Western blot was conducted for the quantification of Bax and PUMA proteins. JC-1 and H2DCFDA were used to measure reactive oxygen species (ROS) level and mitochondrial membrane potential (MMP) of HT22 cells, respectively. **Results** The expression of miR-29 family was significantly declined in low temperature OGD/R model ( $P < 0.01$ ). Overexpression of miR-29 family significantly alleviated the HT22 cell injury induced by low temperature OGD/R, and inhibited the expression of Bax and PUMA protein ( $P < 0.05$ ). In addition, the injection of miR-29 family analogues inhibited the increase of ROS and MMP in low temperature OGD/R model ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MiR-29 family could exert its protective effect against OGD/R-mediated HT22 cell injury by reducing oxidative stress.

**Key words** Deep hypothermic circulatory arrest; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; miR-29; Oxidative stress

自 20 世纪中叶开始,深低温停循环 (DHCA) 技术已经被用于新生儿复杂心血管疾病的治疗<sup>[1-3]</sup>。但该技术为心血管外科手术带来希望的同时,也会产生严重的早期和晚期中枢神经系统并发症,严重影响

患者的生存和生活质量<sup>[4-6]</sup>。微小 RNA 是一种由 21~23 个核苷酸组成的微小非编码 RNA,可以通过对目标 mRNA 的降解或者转录抑制,在转录后水平调节基因的表达<sup>[7,8]</sup>。其中 miR-29 家族参与多个系统尤其是神经系统细胞的生长、分化、凋亡,以及免疫调控<sup>[9,10]</sup>。在本研究中,通过建立一种低温 HT22 细胞 OGD/R 模型,来模拟 DHCA 诱导的神经元细胞损伤,从而探究 miR-29 家族在 DHCA 相关性神经

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81371449)

作者单位:200062 上海交通大学附属儿童医院、上海市儿童医院心胸外科

通讯作者:沈立,电子信箱:shenlee2003@hotmail.com

元死亡上的效应和相关机制。

### 材料与方 法

1. 材料:①HT22 细胞(上海慧颖生物科技有限公司);②主要试剂与材料:胎牛血清(英国 Gibco 公司),Trizol(美国 Invitrogen 公司);抗 PUMA,抗 Bax 和抗 GADPDH 抗体(英国 Abcam 公司);CCK-8 试剂盒(东仁化学科技有限公司);H2DCFDA 和 JC-1 试剂盒(美国 Invitrogen 公司);PCR 引物、miR-29 家族类似物、抑制剂以及转染试剂,由 GenePharma 公司设计和合成。

2. 方法:(1)细胞培养和转染:将大鼠海马 HT-22 细胞培养在一个 37℃,常氧,含 5% CO<sub>2</sub> 的培养皿中,加入含 10% 胎牛血清的普通培养基,具体参考文献[11]。根据操作者手册运用脂质体 RNAiMAX 将 miR-29 家族类似物或抑制剂瞬时转染到细胞中,转染后 6h 更换新鲜培养基,继续培养 24h,对细胞继续培养或者进行低温 OGD/R 处理。(2)低温 OGD/R 模型:将 HT-22 细胞放置在一个无糖无血清培养基中,置于 2.5L 密封罐中,在密封罐的小槽内放入适量无菌水保持湿度,大槽内放入厌氧产气袋,迅速放入氧气指示剂,盖好密封盖,在 20℃ 培养箱中培养 6h。此后,将培养基更换为含糖的普通培养基,在常氧条件下继续培养 6h。对照组则将 HT-22 细胞培养在常氧条件下的普通培养基中。(3)定量 PCR:根据操作者手册,使用 Trizol 进行总 RNA 提取,然后用分光光度计定量,用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整型。使用 miRNAs 定量 RT-PCR 检测试剂盒检测 HT22 细胞中 miR-29 的表达量,以 U6 作为内参基因。上述实验均重复 3 次。数据分析采用相对定量分析法。(4)细胞活力测定:其原理是在电子偶合试剂存在的条件下,CCK-8 试剂盒中的 WST-8 可被线粒体中的脱氢酶还原为具有高度水溶性的黄色甲瓩产物,颜色深浅与活细胞的数量成正比。复糖复氧结束后,移除培养基,每孔加入 90μl 普通培养基和 10μl CCK-8 试剂,于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内温育 2h。PBS 洗涤细胞 3 次,用 Synergy H1 hybrid Reader 读板仪进行读数(450nm)以及荧光拍照。(5)细胞内活性氧(ROS)检测:其原理是不发荧光的 CM-H2DCFDA 进入细胞后能被过氧化物、氢过氧化物等氧化分解为二氯荧光黄(DCF)从而产生荧光。复糖复氧结束后,弃掉培养基,加入含有 10μmol/L CM-H2DCFDA 的培养基,每孔 100μl,于 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱内继续培养 30min。PBS 洗涤细胞 3 次,用 Synergy H1 hybrid Reader 读板仪进行读数(485nm/528nm)以及荧光拍照。(6)线粒体膜电位(MMP)检测:其原理是:正常情况下,JC-1 以聚合物的形态存在于线粒体基质中(红色荧光),MMP 下降时,JC-1 只能以单体的形式存在于胞质中(绿色荧光),因此颜色的变化能够直接反映出 MMP 的下降程度。操作步骤同 ROS 检测。(7)免疫印迹:将 HT22 细胞溶于含有蛋白酶抑制剂的冰冻 RIRA 裂解液中,PBS 冲洗。用 BCA 试剂(Pierce)进行蛋白定量。用 12% SDS-PAGE 来分离相同浓度的蛋白,再将其转到醋酸纤维薄膜上。脱脂奶粉封闭 30min。4℃ 摇晃孵 PUMA 一抗,BAX 一抗、和 GADPH 一抗过夜。采用 HRP 标记二抗(1:2000)室温孵育 2h。ECL 发光液化学发光法显色。

3. 统计学方法:使用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析。数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用学生 *t* 检验来比较两组间差异,以  $P < 0.01$  为差异有统计学意义。

### 结 果

1. 低温 OGD/R 抑制 HT22 细胞 miR-29 家族的表达:采用定量 PCR 法检测对照组和低温 OGD/R 组 HT22 细胞中 miR-29 家族表达变化。与对照组比较,低温 OGD/R 组 HT22 细胞中 miR-29a/b/c 的表达显著下降,两组比较,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 1)。

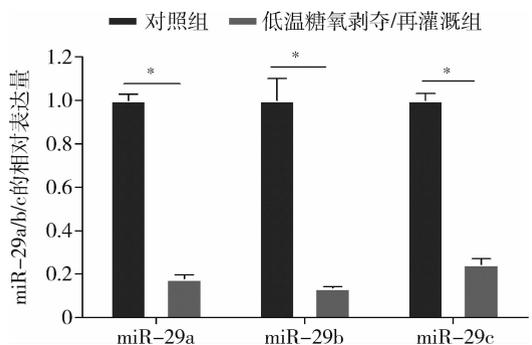


图 1 低温糖氧剥夺/再灌注对 HT22 细胞 miR-29 家族表达的影响  
\*  $P < 0.01$

2. miR-29 家族过表达抑制低温 OGD/R 诱导的 HT22 细胞损伤:将 miR-29 家族类似物和抑制剂分别转染到经低温 OGD/R 处理的 HT22 细胞中,与抑制剂比较,类似物组的活细胞数目显著增加(图 2 中 A、B);凋亡蛋白 PUMA 和 Bax 则显著减少(图 2 中 C、D),两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

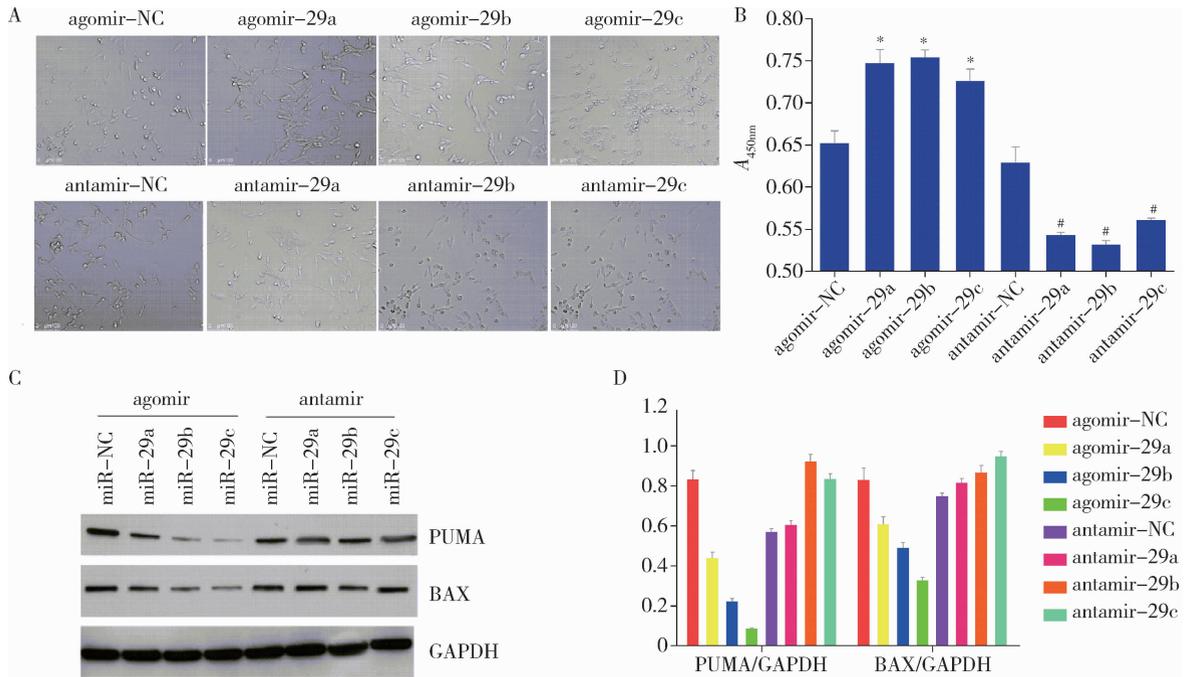


图 2 miR-29 家族类似物和抑制剂在低温糖氧剥夺/再灌注 HT22 细胞凋亡上的效应

A. 典型形态学图像 (比例尺 100μm); B. CCK-8 定量; C. 凋亡蛋白 PUMA 和 Bax 的免疫印迹分析; D. 蛋白定量; 与 agomir-NC 比较, \*P<0.01; 与 antamir-NC 比较, #P<0.01

3. miR-29 家族过表达降低低温 OGD/R 诱导的 HT22 细胞内活性氧 (ROS) 含量; 将 miR-29 家族类似物和抑制剂分别转染到经低温 OGD/R 处理的

HT22 细胞中, 检测这类微小 RNA 对 ROS 的调节效应。与抑制剂组比较, 类似物组 HT22 细胞内的 ROS 含量显著减少, 差异有统计学意义 (P<0.01, 图 3)。

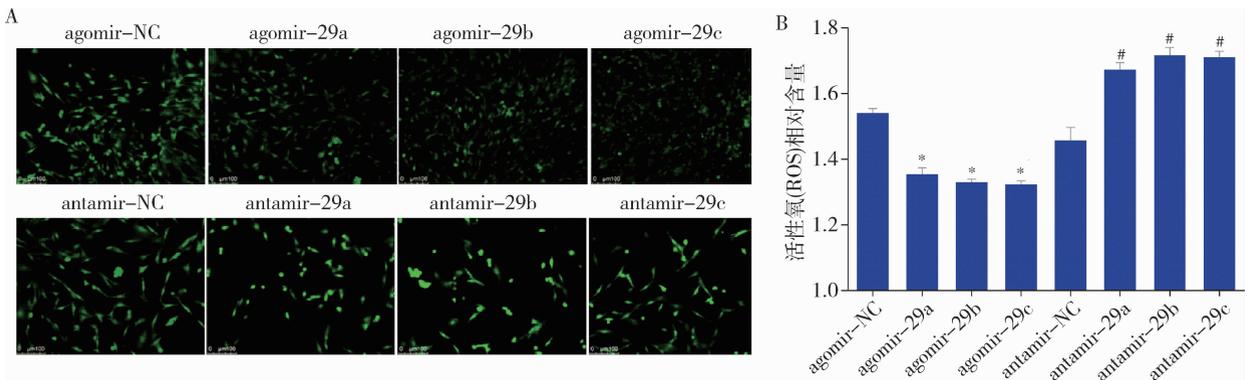


图 3 miR-29 家族类似物和抑制剂在低温糖氧剥夺/再灌注细胞活性氧 (ROS) 上的效应

A. 典型荧光图像 (比例尺 100μm); B. 荧光定量与 agomir-NC 比较, \*P<0.01; 与 antamir-NC 比较, #P<0.01

4. miR-29 家族过表达抑制了低温 OGD/R 诱导的 HT-22 细胞内线粒体膜电位 (MMP) 降低将 miR-29 家族类似物和抑制剂分别转染到经低温 OGD/R 处理的 HT22 细胞中, 检测这类微小 RNA 在调节 HT22 细胞 MMP 水平上的效应。与抑制剂组比较, 类似物组 HT22 细胞能够显著抑制低温 OGD/R 诱导的 MMP 下降, 差异有统计学意义 (P<

0.01, 图 4)。

### 讨 论

DHCA 技术不仅可以降低组织代谢率, 保证足够的手术安全时间; 还可以为外科医生提供干净无血且清晰的手术视野, 保证复杂手术的完美完成。但是, 在客观上, DHCA 是一把双刃剑。有报道指出 15℃ 低温停循环 30min 时, 前额皮质的氧饱和度会下降到

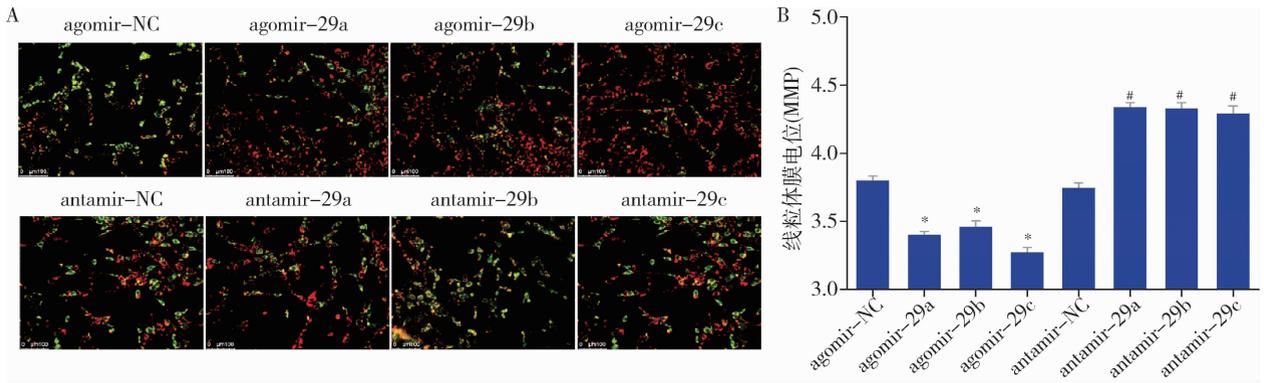


图 4 miR-29 家族类似物和抑制剂在低温糖氧剥夺/再灌注细胞线粒体膜电位 (MMP) 上的效应  
A. 典型荧光图像(比例尺 100 $\mu$ m); B. 荧光定量,与 agomir-NC 比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 antamir-NC 比较, #  $P < 0.01$

安全阈值的 60% 以下,从而产生严重的神经系统损害<sup>[12]</sup>。应用 DHCA 技术进行手术,术后脑卒中发生率和早期病死率为 4% ~ 19%。最近的研究表明这些神经学损伤似乎来自于缺血/再灌注后自由基的增加<sup>[13-15]</sup>。在正常生理情况下,恰当的自由基是维持正常生命所必需的物质,部分自由基还是细胞内重要的信号分子<sup>[16]</sup>。但是,病理状态下产生的大量自由基是生物高分子和细胞的危险杀手,这些自由基中尤其以羟自由基毒性最强,也是导致细胞氧化损伤的最主要的自由基之一,最终导致细胞的凋亡和坏死<sup>[17]</sup>。

微小 RNA 可以参与大部分基因的转录和表达调控<sup>[18,19]</sup>。之前的一项研究运用了一个中脑动脉阻塞/再灌注大鼠模型,确定了缺血脑组织中大约 100 种 miRNA。笔者最近的研究也表明,I/R 和 DHCA 损伤模型中的 miR-200a-3p、miR-200b-3p 和 miR-429 显著增加。miR-29 家族包含 3 个成员,miR-29a、miR-29b 和 miR-29c,miR-29a、miR-29b 位于人类 7 号染色体上,miR-29c 位于 1 号染色体上,miR-29 具有调节脑细胞程序性细胞死亡的作用,提示 miR-29 可能在神经退行性病变和脑卒中患者脑细胞存活方面具有一定的治疗意义。

鉴于 miR-29 家族在神经细胞凋亡中的重要作用,在前期的研究基础上,笔者对 miR-29 家族在 HT22 细胞低温 OGD/R 模型中的作用进行了初步研究,结果发现 HT22 细胞中 miR-29 家族的表达显著降低,同时 miR-29 家族过表达能够增加 HT22 细胞的活细胞数目,减少促凋亡蛋白 PUMA 以及 Bax 的表达,表明 miR-29 家族可能是改善 DHCA 时脑细胞损伤的重要作用靶点。但上述研究结果只是一个初步的现象,其机制尚需深入的研究。为了确定 miR-29 家族是否参与了 DHCA 相关性氧化应激,笔

者在 HT22 细胞中过表达或者去除 miR-29a/b/c,结果发现 miR-29 家族过表达显著降低了低温 OGD/R 诱导的 ROS 含量。此外,线粒体是 ROS 产生的主要场所,又是 ROS 作用最敏感的部位,线粒体膜电位的下降是细胞氧化损伤的特征之一。所以笔者进一步研究了 miR-29 家族在 MMP 上的调节效应,发现 miR-29 家族过表达也能够显著抑制 MMP 的降低。以上研究说明,miR-29 家族之所以能够减少低温 OGD/R 诱导的神经元细胞损伤,很可能是通过减轻氧化应激实现的。

#### 参考文献

- Nolan JP, Morley PT, Vanden Hoek TL, *et al.* Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: an advisory statement by the advanced life support task force of the International Liaison Committee on Resuscitation[J]. *Circulation*, 2003, 108(1): 118-121
- Grabenwoger M, Ehrlich M, Cartes-Zumelzu F, *et al.* Surgical treatment of aortic arch aneurysms in profound hypothermia and circulatory arrest[J]. *Ann Thorac Surg*, 1997, 64(4): 1067-1071
- Brickman RD, Yates AJ, Crisler C, *et al.* Circulatory arrest during profound hypothermia. For treatment of complicated disease of major vessels[J]. *Arch Surg*, 1971, 103(2): 259-264
- Ergin MA, Uysal S, Reich DL, *et al.* Temporary neurological dysfunction after deep hypothermic circulatory arrest: a clinical marker of long-term functional deficit[J]. *Ann Thorac Surg*, 1999, 67(6): 1887-1890, discussion 1891-1884
- Bottiger BW, Schmitz B, Wiessner C, *et al.* Neuronal stress response and neuronal cell damage after cardiocirculatory arrest in rats[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(10): 1077-1087
- Kurth CD, Priestley M, Golden J, *et al.* Regional patterns of neuronal death after deep hypothermic circulatory arrest in newborn pigs[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999, 118(6): 1068-1077
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297 (下转第 35 页)

- [J]. Chem Med Chem, 2016, 11(11): 1137 - 1144
- 6 Hennig EE, Mikula M, Rubel T, *et al.* Comparative kinome analysis to identify putative colon tumor biomarkers[J]. J Mol Med: Berl, 2012, 90(4): 447 - 456
  - 7 Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, *et al.* Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil - based adjuvant therapy in colon cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(20): 3219 - 3226
  - 8 Sinicrope FA, Shi Q. Combining molecular markers with the TNM staging system to improve prognostication in stage II and III colon cancer: are we ready yet? [J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(21): 1616 - 1618
  - 9 Hutchins G, Southward K, Handley K, *et al.* Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(10): 1261 - 1270
  - 10 Shiovitz S, Bertagnolli M M, Renfro L A, *et al.* CpG island methylator phenotype is associated with response to adjuvant irinotecan - based therapy for stage III colon cancer[J]. Gastroenterology, 2014, 147(3): 637 - 645
  - 11 Marisa L, Svrcsek M, Collura A, *et al.* The balance between cytotoxic T - cell lymphocytes and immune checkpoint expression in the prognosis of colon tumors[J]. J Natl Cancer Inst, 2018, 110(1): 32 - 39
  - 12 Li Y, Liang L, Dai W, *et al.* Prognostic impact of programmed cell death - 1 (PD - 1) and PD - ligand 1 (PD - L1) expression in cancer cells and tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 55
  - 13 Cornils H, Kohler R S, Hergovich A, *et al.* Human NDR kinases control G(1)/S cell cycle transition by directly regulating p21 stability[J]. Mol Cell Biol, 2011, 31(7): 1382 - 1395
  - 14 Cho CY, Lee KT, Chen WC, *et al.* MST3 promotes proliferation and tumorigenicity through the VAV2/Rac1 signal axis in breast cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(12): 14586 - 14604
  - 15 Le TL, Joseph SR, Yap AS, *et al.* Protein kinase C regulates endocytosis and recycling of E - cadherin[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2002, 283(2): C489 - C499
  - 16 Lin CY, Wu HY, Wang PL, *et al.* Mammalian Ste20 - like protein kinase 3 induces a caspase - independent apoptotic pathway[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(1): 98 - 105
  - 17 Mardakheh FK, Self A, Marshall CJ. RHO binding to FAM65A regulates Golgi reorientation during cell migration[J]. J Cell Sci, 2016, 129(24): 4466 - 4479
  - 18 Lu TJ, Lai WY, Huang CY, *et al.* Inhibition of cell migration by autophosphorylated mammalian sterile 20 - like kinase 3 (MST3) involves paxillin and protein - tyrosine phosphatase - PEST[J]. J Biol Chem, 2006, 281(50): 38405 - 38417
  - 19 Kanteti R, Batra SK, Lennon FE, *et al.* FAK and paxillin, two potential targets in pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(21): 31586 - 31601
  - 20 Qin J, Wang F, Jiang H, *et al.* MicroRNA - 145 suppresses cell migration and invasion by targeting paxillin in human colorectal cancer cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(2): 1328 - 1340

(收稿日期:2017 - 09 - 21)

(修回日期:2017 - 09 - 30)

(上接第 31 页)

- 9 Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, *et al.* The miR - 29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury[J]. Physiol Genomics, 2012, 44(4): 237 - 244
- 10 Tumaneng K, Schlegelmilch K, Russell RC, *et al.* YAP mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K - TOR pathways by suppressing PTEN via miR - 29[J]. Nat Cell Biol, 2012, 14(12): 1322 - 1329
- 11 Liu J, Li L, Suo WZ. HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties[J]. Life Sci, 2009, 84(9 - 10): 267 - 271
- 12 Fischer GW, Lin HM, Krol M, *et al.* Noninvasive cerebral oxygenation may predict outcome in patients undergoing aortic arch surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 141(3): 815 - 821
- 13 Kurth CD, Steven JM, Nicolson SC. Cerebral oxygenation during pediatric cardiac surgery using deep hypothermic circulatory arrest[J]. Anesthesiology, 1995, 82(1): 74 - 82
- 14 Zhang N, Komine - Kobayashi M, Tanaka R, *et al.* Edaravone reduces early accumulation of oxidative products and sequential inflammatory responses after transient focal ischemia in mice brain[J]. Stroke, 2005, 36(10): 2220 - 2225
- 15 Shen L, Wang J, Liu K, *et al.* Hydrogen - rich saline is cerebroprotective in a rat model of deep hypothermic circulatory arrest[J]. Neurochem Res, 2011, 36(8): 1501 - 1511
- 16 Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease[J]. Physiol Rev, 2007, 87(1): 315 - 424
- 17 Imlay JA. Pathways of oxidative damage[J]. Annu Rev Microbiol, 2003, 57(395 - 418)
- 18 Griffiths - Jones S, Saini HK, van Dongen S, *et al.* miRBase: tools for microRNA genomics[J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36: D154 - 158
- 19 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

(收稿日期:2017 - 09 - 04)

(修回日期:2017 - 09 - 06)