

急性缺血性脑卒中小鼠模型脑组织中 miR-21 表达对炎症反应和细胞凋亡的影响及相关机制研究

刘高雯, 段 颖 (咸阳市中心医院重症医学科, 陕西咸阳 712000)

摘要: 目的 研究急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 小鼠模型脑组织中 miR-21 表达对炎症反应和细胞凋亡的影响, 并探讨其相关分子机制。方法 选取 C57/BL6 小鼠 30 只随机均分为假手术组、短暂局灶性大脑中动脉闭塞 (transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO) 模型组 (利用线栓法构建短暂局灶性大脑中动脉闭塞小鼠模型) 及 miR-21 agomir 激动剂预处理组 (tMCAO 术后侧脑室注射 miR-21 agomir 激动剂)。RT-PCR 法检测小鼠脑组织中 miR-21 表达水平; 改良神经严重程度评分 (modified neurological severity score, mNSS) 评估小鼠神经功能; 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC) 染色法检测小鼠脑梗死体积; 酶联免疫吸附法检测炎症因子 (TGF- β 1, TNF- α , IL-18 和 IL-10) 水平变化; 原位末端标记 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling, TUNEL) 法观察小鼠神经细胞凋亡情况; 蛋白免疫印迹法检测 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白及凋亡蛋白 (Bcl-2/Bax) 表达情况。结果 假手术组、tMCAO 模型组和 miR-21 agomir 组小鼠脑组织中 miR-21 表达水平分别为 0.83 ± 0.17 , 0.50 ± 0.11 和 1.55 ± 0.32 , 组间差异有统计学意义 ($F=43.805$, $P<0.05$)。假手术组小鼠神经功能 mNSS 评分均为 0 分, tMCAO 组 mNSS 评分明显高于 miR-21 agomir 组 (11.30 ± 3.42 vs 5.61 ± 1.73), 差异有统计学意义 ($t=12.784$, $P<0.05$)。假手术组小鼠脑组织未出现梗死现象, tMCAO 组脑梗死体积 ($62.72\% \pm 5.30\%$) 高于 miR-21 agomir 组 ($38.22\% \pm 3.31\%$), 差异有统计学意义 ($t=31.309$, $P<0.05$)。与 tMCAO 组比较, miR-21 过表达明显降低促炎因子 TNF- α 和 IL-18 水平, 升高抗炎因子 TGF- β 1 和 IL-10 水平, 差异均有统计学意义 ($t=3.785 \sim 9.693$, 均 $P<0.05$)。假手术组脑组织皮层细胞凋亡数约为 9.40 ± 5.21 个, 明显低于 tMCAO 组的 75.52 ± 12.81 个, 差异有统计学意义 ($t=38.552$, $P<0.05$); miR-21 agomir 组细胞凋亡数约为 42.41 ± 9.62 个, 低于 tMCAO 组, 差异有统计学意义 ($t=19.174$, $P<0.05$)。与 tMCAO 组比较, miR-21 过表达组小鼠脑组织中 TLR4, NF- κ B, p-NF- κ B 和 NLRP3 蛋白表达降低, Bcl-2/Bax 表达升高, 差异均有统计学意义 ($t=2.314 \sim 3.098$, 均 $P<0.05$)。结论 miR-21 在急性缺血性脑卒中后小鼠脑组织中表达明显下降, 其过表达可以调节脑缺血后促炎因子和抗炎因子之间的平衡, 改善皮层细胞凋亡, 可能是通过调控 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路发挥脑损伤保护作用。

关键词: 微小核糖核酸 -21; 急性缺血性脑卒中; 炎症反应; 细胞凋亡

中图分类号: R743.33; R-332 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2023) 03-086-07

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2023.03.015

Effects of miR-21 Expression on Inflammatory Response and Apoptosis in Brain Tissue of Mice with Acute Ischemic Stroke and Related Mechanisms

LIU Gao-wen, DUAN Ying (Department of Critical Care Medicine, Xianyang Central Hospital, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: Objective To study the effect of miR-21 expression on inflammatory response and apoptosis in the brain tissue of acute ischemic stroke (AIS) mice, and explore its related molecular mechanism. **Methods** Thirty C57/BL6 mice were randomly divided into sham operation group, transient middle cerebral artery occlusion (tMCAO) model group (a mouse model of transient focal middle cerebral artery occlusion was established by thread embolism method) and miR-21 agonist pretreatment group (miR-21 agonist was injected into cerebral ventricle after tMCAO operation). The expression of miR-21 in mouse brain was detected by RT-PCR, modified neural severity score (mNSS) was used to evaluate the neural function of mice, 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining was used to detect the volume of cerebral infarction in mice. Detected inflammatory factors (TGF- β 1, TNF- α , IL-18 and IL-10 level change by enzyme-linked immunosorbent assay. Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) method was used to observe the neuronal apoptosis in mice, and detected TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway related protein and apoptosis protein (Bcl-2/Bax). **Results** The expression levels of miR-21 in brain tissues of sham operation group, tMCAO model group and miR-21 agomir group were 0.83 ± 0.17 , 0.50 ± 0.11 and 1.55 ± 0.32 , respectively, with significant difference between groups ($F=43.805$,

$P<0.05$). The mNSS score of neural function in sham operation group was 0, the mNSS score in the tMCAO group was significantly higher than that in the miR-21 agomir group (11.30 ± 3.42 vs 5.61 ± 1.73), with a statistically significant difference ($t=12.784$, $P<0.05$). There was no cerebral infarction in sham operation group, the infarct volume in tMCAO group was about $62.72\% \pm 5.30\%$, and that in miR-21 agomir group was about $38.22\% \pm 3.31\%$, and the difference was statistically significant ($t=31.309$, $P<0.05$). Compared with tMCAO group, overexpression of miR-21 significantly reduced proinflammatory factor TNF- α and IL-18 levels, increasing the anti-inflammatory factor TGF- β 1 and IL-10 levels, and the differences were statistically significant ($t=3.785 \sim 9.693$, all $P<0.05$). The number of apoptotic cortical cells in sham operation group was about 9.40 ± 5.21 , which was significantly lower than that in tMCAO group 75.52 ± 12.81 , the difference was statistically significant ($t=38.552$, $P<0.05$). The number of apoptosis in miR-21 agomir group was about 42.41 ± 9.62 , which was lower than that in tMCAO group, the difference was statistically significant ($t=19.174$, $P<0.05$). Compared with tMCAO group, TLR4, NF- κ B, p-NF- κ B and NLRP3 decreased in brain tissue of miR-21 overexpression group, the expression of Bcl-2/Bax increased, and the differences were statistically significant ($t=2.314 \sim 3.098$, all $P<0.05$). **Conclusion** The expression of miR-21 in the brain tissue of mice after acute ischemic stroke decreased significantly. Its overexpression can regulate the balance between proinflammatory factors and anti-inflammatory factors after cerebral ischemia, and improve the apoptosis of cortical cells, possibly by regulating TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway plays a protective role in brain injury.

Keywords: miR-21; acute ischemic stroke; inflammatory reaction; cell apoptosis

脑卒中是一种急性脑血管病,分为缺血性和出血性两种,不仅发病率、致残率高,复发率和死亡率也较高,其中缺血性脑卒中约占全部脑卒中的80%以上,严重影响人类生命健康^[1]。目前,急性缺血性脑卒中(acute ischemic stroke, AIS)的治疗包括降颅压治疗、溶栓治疗、抗凝治疗及支架植入等,但临床治疗效果均不尽人意,有学者指出可能是缺乏对急性脑卒中损伤后脑内细胞分子机制的深入探讨,未能做到针对性治疗^[2-3]。近年随着分子生物学的快速发展,缺血性脑卒中后内环境变化及病理机制的研究已成为科研工作者研究的热点。有研究报道,脑卒中后诱导的炎症反应使得大量吞噬细胞在缺血区域不断浸润,加剧了神经细胞凋亡,造成了脑组织的二次损伤^[4]。因此,寻找具有调节脑缺血后促炎因子和抗炎因子表达平衡的特异性分子,可为治疗急性缺血性脑卒中提供新的方法。miR-21作为具有调控作用的非编码微小RNA,已被证实心脑血管疾病中可以靶向调节炎症反应,发挥神经保护作用^[5]。研究发现,Toll样受体4(toll-like receptor-4, TLR4)/核因子- κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号通路的激活会活化下游NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎性小体,诱导机体产生免疫应答,从而建立脑内炎性环境,造成神经损伤^[6]。基于上述研究,猜测miR-21可能通过调控TLR4/NF- κ B/NLRP3通路改善急性缺血性脑卒中后炎症反应,但需研究证实。本研究拟通过建立短暂局灶性大脑中动脉闭塞(transient middle cerebral artery occlusion, tMCAO)小鼠模型,探讨了miR-21过表达对小鼠炎症反应及细胞凋亡的影响及可能作用机制,期望为急性缺血性脑卒中的治疗提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 30只雄性C57/BL6小鼠,SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证SCXK(京)2020-0014],体质量 20 ± 5 g,饲养温度 22 ± 3 ℃,湿度 $55\% \pm 5\%$,12h昼夜周期,标准喂养条件下适应性饲养一周,每笼2只,自由饮水和摄食。将30只小鼠随机分为假手术组、tMCAO模型组和miR-21 agomir激动剂预处理组,每组10只。本研究符合实验动物使用及保护条例,并经本院伦理委员会审核批准(批号20210342)。

1.2 仪器与试剂 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)染色试剂盒(美国Sigma-Aldrich公司);酶联免疫试剂盒,PCR逆转录试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);PCR引物合成(上海生工生物工程公司);RIPA裂解液,BCA蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);兔抗鼠NLRP3,TLR4,NF- κ B, Bax, Bcl-2抗体及辣根标记山羊抗兔IgG抗体(北京中杉金桥有限公司);PCR仪[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];凝胶成像仪(美国BioTek公司);miR-21 agomir激动剂(广州锐博生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 模型构建及分组:所有小鼠禁食禁水12h,采用颈内动脉栓线法构建tMCAO模型。具体方法:60 mg/kg戊巴比妥腹腔注射麻醉小鼠,取俯卧位固定,颈部消毒于正中间切1.5 cm左右小口,分离皮下组织、腺体及肌肉,暴露右侧颈部总动脉及颈内动脉,顺着总动脉继续游离,暴露颈外动脉,分离动脉周围组织,结扎总动脉及颈内动脉并阻断血流,在颈外动脉两端打结,在两结之间剪一小口,插入线栓,提拉颈外动脉,使线栓缓慢进入颈内动脉约

10 mm左右遇轻微阻力即停止进入,固定线栓,逐层缝合切口,碘伏消毒防止感染,缺血90 min后拔出线栓,恢复脑血流,48 h后即可进行后续实验。假手术组与tMCAO操作相同,但线栓只进入5 mm左右,未造成小鼠大脑缺血;miR-21 agomir组小鼠行tMCAO手术后,侧脑室注射miR-21 agomir激动剂。

1.3.2 实施荧光定量PCR检测脑组织中miR-21表达:取各组小鼠脑组织,剪碎冰上研磨至匀浆后加入Trizol裂解液,提取组织总RNA,紫外分光光度仪检测其纯度;反转录合成cDNA并以此为模板,行实时定量PCR分析。反应体系:20 μ l, 95 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 循环40次。miR-21引物:上游5'-GTCGAGACTCATGTGGC-3',下游5'-GCGGTTAGCATCACGGT-3';内参U6:上游5'-CTGCCTTACGTGACATC-3',下游5'-AAGCTAAGCGGAACGGT-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量,实验重复三次取平均值。

1.3.3 mNSS评估神经功能:tMCAO手术48h后,观察各组小鼠死亡情况,根据改良神经严重程度评分(modified neurological severity score, mNSS),总分0~18,从运动、感觉、反射及平衡等方面评估各组小鼠神经功能损伤程度,分值越高代表损伤越严重。由两位人员进行评分取平均值。

1.3.4 TTC测定脑梗死体积:tMCAO手术48h后,慢慢分离颅底组织得到完整的脑组织,并将其放于模具上,切成4片冠状切片,每片厚约2 mm,将脑片浸于TTC溶液中,37 $^{\circ}$ C恒温孵育30 min,取出脑片用多聚甲醛固定24h,用扫描仪扫描成像,正常脑组织为红色区域,缺血脑组织为白色区域,脑梗死体积采用Image J软件测量。

1.3.5 酶联免疫吸附法检测炎症因子水平:取各组小鼠缺血脑组织,裂解、匀浆处理后,离心取上清,根据试剂盒说明书分别测定TNF- α , IL-10, TGF- β 1和IL-18水平。

1.3.6 Tunel染色观察神经细胞凋亡情况:取各组小鼠脑组织制备成冰冻切片,用5%(v/v) Donkey血清封闭2h, PBS洗2次,加入配制的Rabbit-anti-mouse NeuN(1:500),4 $^{\circ}$ C过夜孵育;次日取出, PBS洗三次,在孵育盒中加入配制的Donkey-anti-Rabbit cy3/594(1:1 000),室温孵育2 h, PBS洗三次,加入Tunel染液,37 $^{\circ}$ C暗盒孵育1 h,终止反应, DAPI甘油封片液封片,显微镜下观察。

1.3.7 蛋白免疫印迹实验检测炎症相关蛋白及凋亡蛋白:tMCAO术后48 h,取小鼠缺血脑组织,裂解、匀浆处理提取总蛋白,二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白浓度。取20 μ g蛋白样品进行凝胶电泳,设置80

V电压至蛋白样品跑至分离胶,调节电压为160 V,直至条带跑至分离胶底部,取出分离胶带进行聚偏氟乙烯转膜后,5%(v/v)脱脂牛奶封闭1 h,加入待测蛋白一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;次日加入二抗,室温孵育1 h,使用Image J软件分析条带灰度值。

1.4 统计学分析 采用SPSS 20.0软件分析数据,所有实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验;两组间比较采用独立样本 t 检验;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 tMCAO小鼠脑组织中miR-21表达情况 假手术组小鼠脑组织中miR-21相对表达为 0.83 ± 0.17 ,经tMCAO手术造模后,模型组脑组织中miR-21相对表达显著下降为 0.50 ± 0.11 ,两组间差异有统计学意义($t=21.370$, $P<0.05$);miR-21 agomir组小鼠侧脑室注射miR-21 agomir激动剂后,miR-21相对表达为 1.55 ± 0.32 ,三组间比较差异有统计学意义($F=43.805$, $P<0.05$),提示脑内miR-21过表达tMCAO小鼠构建成功。

2.2 miR-21过表达对神经功能的影响 假手术组小鼠术后无死亡,进食饮水正常,呼吸平稳,可正常行走运动,mNSS评分为0分。tMCAO组小鼠术后48 h死亡率为30%,术后苏醒时间较长,精神萎靡,反应能力下降,且出现了不同程度的右侧肢体偏瘫,mNSS评分为 11.30 ± 3.42 分,显著高于假手术组,差异有统计学意义($t=17.195$, $P<0.05$);miR-21 agomir组小鼠术后48 h死亡率为20%,其饮食状况、精神状态、反应能力等均较tMCAO组有所改善,mNSS评分为 5.61 ± 1.73 分,与tMCAO组比较差异有统计学意义($t=12.784$, $P<0.05$)。说明miR-21过表达能减轻缺血性脑卒中后小鼠的神经症状,降低其神经功能评分。

2.3 miR-21过表达对脑梗死的影响 见图1。各组小鼠脑组织TTC染色。假手术组小鼠脑组织呈均匀的红色,无脑梗死;tMCAO组小鼠脑组织呈现大面积的白色区域,经计算其脑梗死体积约为 $62.72\%\pm 5.30\%$;侧脑室注射miR-21 agomir激动剂组小鼠脑组织白色区域面积较tMCAO组明显减少,其梗死体积约为 $38.22\%\pm 3.31\%$,两组间比较差异有统计学意义($t=31.309$, $P<0.05$),提示miR-21过表达能够减少缺血性脑卒中后脑梗死体积。

2.4 miR-21过表达对炎症因子水平的影响 见表1。与假手术组相比,tMCAO组小鼠脑组织中促炎因子TNF- α 和IL-18水平明显升高,差异均有统计学意义($t=9.458$, 7.777 , 均 $P<0.05$),而抗

炎因子 TGF- β 1 和 IL-10 水平稍有升高, 但差异无统计学意义 ($t=0.771, 0.739$, 均 $P > 0.05$); 与 tMCAO 组比较, 注射 miR-21 agomir 激动剂组 TNF- α 和 IL-18 明显下降, TGF- β 1 和 IL-10 明显升高, 差异有统计学意义 ($t=4.144, 4.868, 9.693, 3.785$, 均 $P < 0.05$), 提示 miR-21 过表达能够调节缺血性脑卒中后促炎因子和抗炎因子之间的平衡。

2.5 miR-21 过表达对细胞凋亡的影响 见图 2。Tunel 染色观察显示, 假手术组小鼠脑组织皮层细胞形态结构正常, 出现少量染色阳性细胞凋亡, 其凋亡数约为 9.40 ± 5.21 个, 而 tMCAO 组小鼠脑组织中细胞体积变小、细胞核固缩、细胞质浓缩, 梗死周边区皮层细胞凋亡明显, 其凋亡数约为 75.52 ± 12.81 个, 两组比较差异有统计学意义 ($t=38.552, P < 0.05$), 注射 miR-21 agomir 激动剂后, 皮层细胞凋亡情况显著改善, 其凋亡数约为

42.41 ± 9.62 个, 与 tMCAO 组比较差异有统计学意义 ($t=19.174, P < 0.05$), 提示 miR-21 过表达可明显抑制缺血性脑卒中后皮层细胞的凋亡, 具有脑损伤保护作用。

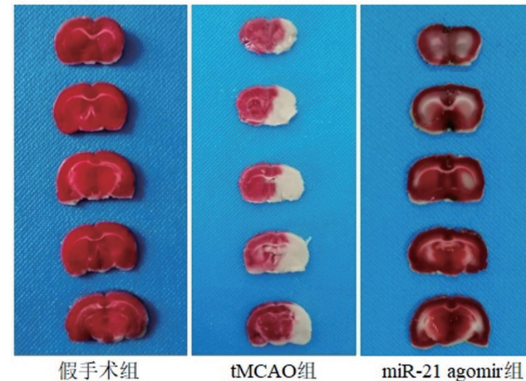


图1 各组脑组织 TTC 脑梗死面积染色

表1 miR-21 过表达对 tMCAO 小鼠脑组织中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

项目	假手术组	tMCAO 组	miR-21 agomir 组	F 值	P 值
TNF- α	230.26 \pm 27.31	369.07 \pm 33.50	305.19 \pm 29.44	45.695	< 0.001
TGF- β 1	75.38 \pm 10.42	81.16 \pm 9.72	157.45 \pm 22.50	74.988	< 0.001
IL-10	98.38 \pm 9.10	103.26 \pm 13.45	129.50 \pm 17.39	13.119	< 0.001
IL-18	46.51 \pm 6.12	90.26 \pm 15.48	61.50 \pm 12.49	30.432	< 0.001

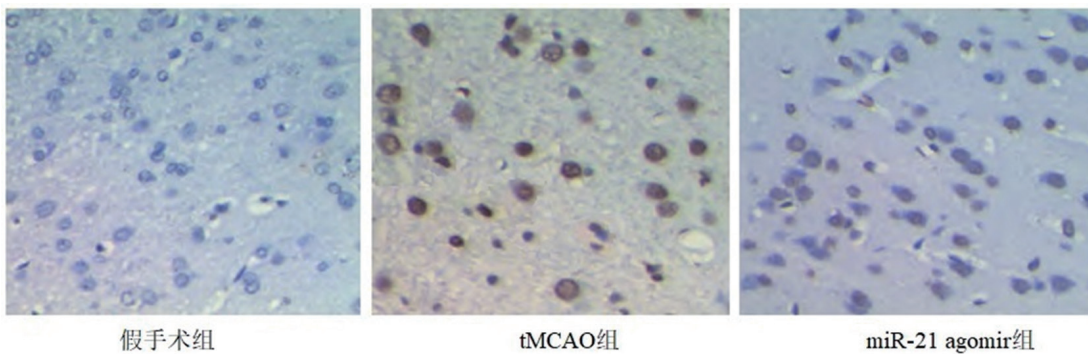


图2 Tunel 染色观察各组小鼠脑组织皮层细胞凋亡分布 ($\times 400$)

2.6 miR-21 过表达对 TLR4/ NF- κ B/NLRP3 通路相关蛋白及凋亡蛋白表达的影响 见图 3, 表 2。tMCAO 组小鼠脑组织中通路相关蛋白 TLR4, p-NF- κ B, NF- κ B 和 NLRP3 表达水平较假手术组明显上调, 凋亡蛋白 Bcl-2/Bax 比值则明显下调, 差异均有统计学意义 ($t=7.049, 4.767, 2.790, 6.453, 5.089$, 均 $P < 0.05$); 与 tMCAO 组相比, 注射 miR-21 agomir 激动剂组, 小鼠脑组织中 TLR4, p-NF- κ B, NF- κ B 和 NLRP3 表达显著下调, 而 Bcl-2/Bax 比值明显上调, 差异有统计学意义 ($t=3.098, 2.774, 2.314, 2.954, 2.217$, 均 $P < 0.05$); 提示 miR-21 过表达可能通过调控 TLR4/ NF- κ B/NLRP3 信号通路活性, 改善脑组织细胞凋亡。

3 讨论

据统计, 我国每年约有 240 万人新发脑卒中, 每年约 110 万人死于脑卒中, 其已经成为居民死亡的第一位原因, 是我国人民群众健康的第一大杀手^[7]。因此, 针对脑卒中的治疗和康复是医学界面临的难题之一。近年研究发现, miRNAs 与心脑血管病的发生有关, 冠心病、心肌病、缺血性心脏病及脑卒中等多种疾病中常伴有 miRNAs 差异表达, 提示其在脑血管疾病的发生发展中发挥重要作用^[8]。脑卒中动物实验模型研究也发现了多个 miRNA 的异常表达, 如既往文全庆等^[9]研究发现, 脑缺血大鼠模型术后 1h 皮质脑组织中有 35 个 miRNA 表达上调, 89 个表达下调。高法梁等^[10]研究表明, 大脑中动脉阻塞模型大鼠脑缺血皮质区 miR-210 表达较正常组显著上调。人脑卒中研究中发现, 多个 miRNAs

的多态性与缺血性脑卒中发病机理相关^[11]。因此,积极探究 miRNA 与脑卒中的关系,找寻新的特异性 miRNA 标志,具有重要临床意义。

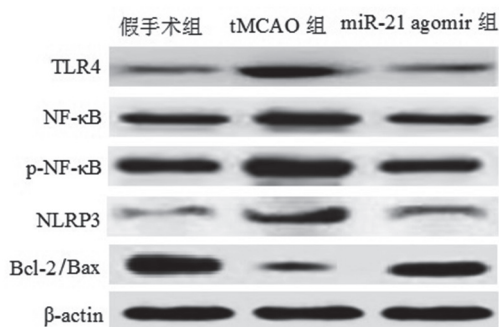


图3 Westernblot 检测 TLR4/ NF-κ B/NLRP3 通路相关蛋白及凋亡蛋白表达

表2 miR-21 过表达对 TLR4/ NF-κ B/NLRP3 通路相关蛋白及凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

类别	假手术组	tMCAO 组	miR-21 agomir 组	F 值	P 值
TLR4	0.39 ± 0.08	0.78 ± 0.15	0.60 ± 0.11	25.371	< 0.001
NF-κ B	0.54 ± 0.09	0.90 ± 0.21	0.68 ± 0.16	11.369	< 0.001
p-NF-κ B	0.67 ± 0.14	0.98 ± 0.29	0.71 ± 0.25	4.303	0.026
NLRP3	0.22 ± 0.07	0.74 ± 0.23	0.49 ± 0.18	21.136	< 0.001
Bcl-2/Bax	1.20 ± 0.28	0.61 ± 0.17	0.88 ± 0.22	13.239	< 0.001

研究发现, miR-21 是脑血管疾病中特异性表达最为显著的 miRNA^[12-13]。TU 等^[14]通过微阵列分析检测发现,缺血性小鼠脑组织中 miR-21 表达可以改善脑组织结构,抑制神经元细胞凋亡,减少脑梗死面积。YAO 等^[15]在小鼠缺血性再灌注损伤的研究中发现, miR-21 过表达降低了血清中 IL-1β, TNF-α 和 IL-6 等炎症因子水平,减轻心肌组织病理改变,减少心肌细胞凋亡,可能为脑缺血的治疗开辟一条新的治疗途径。YAN 等^[16]研究则表明, miR-21 在体内和体外缺血模型中均表达下调,过表达可以显著抑制缺血后 p53/Bax/Bcl-2 之间的信号传导,减少神经元死亡、防止缺血性损伤,从而改善神经功能。故 miR-21 在缺血性脑卒中的研究值得注意,有望成为临床治疗的新靶点。本研究结果显示,相比假手术组, tMCAO 组小鼠脑组织中 miR-21 表达明显下降,说明 miR-21 可能在缺血脑损伤发生、发展过程中发挥重要作用。诱导 miR-21 过表达后,小鼠神经功能评分降低,脑梗死体积减少,神经细胞凋亡抑制,推断 miR-21 过表达能够改善缺血性脑卒中后的脑神经功能损伤,与上述文献报道结果相一致。

大量研究表明,缺血性脑卒中的发生与神经炎症的关系密切,认为缺血性脑卒中后脑内产生的炎症反应会加速缺血性损伤的形成,影响神经元死亡及神经组织再生^[17]。缺血性脑卒中导致脑组织缺血,会引起神经元细胞不能正常维持跨膜离子梯度及平衡,导致细胞凋亡及炎症和氧化应激的发生^[18]。此外目前主流观点认为, NLRP3 炎症小体可产生促炎因子,介导脑水肿和神经细胞功能障碍的发生,其一旦激活可诱导缺血性脑卒中的神经炎症,导致神经细胞死亡越来越多。研究表明炎症小体与缺血性脑卒中发病密切,其参与介导炎症反应的相关调节机制及其与脑卒中之间的关系,以成为当前研究的热点^[19]。本研究发现, tMCAO 组促炎因子水平明显升高,推断缺血损伤后可能诱导促炎因子释放和炎性细胞浸润,加剧了炎症反应;诱导 miR-21 过表达后促炎因子水平逆转,抗炎因子水平持续增加,这与 ZHOU 等^[20]报道的结论相一致, miR-21 为缺血性脑卒中后续研究及治疗提供了新的方向和靶点。

TLR4/NF-κ B 途径是近年来发现与抗炎免疫机制密切相关的信号通路,据报道,机体受损伤后的炎症反应会激活该信号途径,诱导 NLRP3 炎症小体表达^[21-22]。抑制 TLR4/NF-κ B/NLRP3 通路介导的抗炎途径后,小鼠缺血性损伤明显减轻^[23]。且有研究表明, HMGB1/TLR4 轴是神经炎症的重要启动子,与神经炎症及创伤性脑损伤等发生有关, TLR4 调控下游 NF-κ B 可促进炎性细胞因子产生,加速疾病发生^[24]。葛根素通过调控 TLR4/Myd88/NF-κ B 通路可抑制 NLRP3 炎症小体激活,改善大鼠心肌缺血再灌注损伤^[25]。奥美汀通过抑制 NF-κ B 表达能够减少神经元凋亡和神经炎症^[26]。红景天苷通过抑制 NLRP3 炎症小体活化可缓解局部炎症,对 MCAO 大鼠起到保护作用^[27]。上调 miR-21 表达可以抑制 TLR4/NF-κ B 通路,抑制神经元凋亡和 ROS 的产生,发挥神经损伤保护作用^[28]。本研究经探究 miR-21 对 TLR4/NF-κ B/NLRP3 信号通路相关蛋白及凋亡蛋白的影响,发现 tMCAO 组脑组织中通路相关蛋白表达明显升高,凋亡蛋白表达明显降低;注射 miR-21 激动剂后,各蛋白水平发生逆转,提示 TLR4/NF-κ B/NLRP3 信号通路可能参与了 miR-21 对缺血性脑损伤的改善作用,可作为缺血性脑卒中临床治疗的靶向途径。然而本研究未构建注射 miR-21 抑制剂敲低表达模型进一步验证 miR-21 对脑卒中后炎症反应、细胞凋亡的影响及对 TLR4/NF-κ B/NLRP3 通路的调控作用;其次研究目前仅处于基础实验探索阶段,由于脑内细胞变化的复杂性及 miRNA 调控通路的多

样性, miR-21 与 TLR4/NF- κ B/NLRP3 之间的靶向关系后期还需通过微阵列分析探讨, 并结合细胞实验进一步探讨 TLR4/NF- κ B/NLRP3 途径与小胶质细胞炎症反应的关系, 以期提供更有力的依据。

综上所述, 急性缺血性脑卒中小鼠脑组织中 miR-21 表达明显下降, 其过表达可以调节脑缺血后促炎因子和抗炎因子之间的平衡, 改善皮层细胞凋亡, 可能是通过抑制 TLR4/NF- κ B/NLRP3 通路发挥脑损伤保护作用, 为急性缺血性脑损伤的治疗提供了新方向。

参考文献:

- [1] HATHIDARA M Y, SAINI V, MALIK A M. Stroke in the young: A global update[J]. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 2019, 19(11): 91.
- [2] 申青仙, 张赛, 涂悦, 等. 急性缺血性脑卒中的临床治疗研究进展 [J]. *中国医药*, 2020, 15(4): 633-636. SHEN Qingxian, ZHANG Sai, TU Yue, et al. Research progress in clinical treatment of acute ischemic stroke[J]. *China Medicine*, 2020, 15(4): 633-636.
- [3] RABINSTEIN A A. Update on treatment of acute ischemic stroke[J]. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 2020, 26(2): 268-286.
- [4] JAYARAJ R L, AZIMULLAH S, BEIRAM R, et al. Neuroinflammation: Friend and foe for ischemic stroke[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 142.
- [5] LOPEZ M S, MORRIS-BLANCO K C, LY N, et al. MicroRNA miR-21 decreases post-stroke brain damage in rodents[J]. *Translational Stroke Research*, 2022, 13(3): 483-493.
- [6] JIN Xin, LIU Mingyan, ZHANG Dongfang, et al. Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation via suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2019, 25(5): 575-590.
- [7] 中国中西医结合学会急救医学专业委员会, 方邦江, 李志军, 等. 中国急性缺血性脑卒中中西医急诊诊治专家共识 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30(3): 193-197. Chinese Society for Integrated Chinese and Western Medicine First Aid Medicine Specialized Committee, FANG Bangjiang, LI Zhijun, et al. Expert consensus of Chinese and Western medicine emergency treatment for acute ischemic stroke in China[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2018, 30(3): 193-197.
- [8] 班俊杰, 黄丽娜. 外泌体 miRNA 在缺血性脑血管病中作用的研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2019, 33(3): 295-298. BAN Junjie, HUANG Lina. Role of exosomal microRNA in ischemic cerebrovascular disease[J]. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*, 2019, 33(3): 295-298.
- [9] 文全庆, 贾延勃, 王明闯, 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(Z1): 23-26, 40. WEN Quanying, JIA Yanjie, WANG Mingchuang, et al. Expression analysis of microRNA on acute cerebral ischemia in rats[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2008, 33(Z1): 23-26, 40.
- [10] 高法梁, 娄远蕾, 阮琼芳, 等. 缺血性脑损伤大鼠 MicroRNA 210 的动态变化 [J]. *实验与检验医学*, 2010, 28(3): 230-232. GAO Faliang, LOU Yuanlei, RUAN Qiongfang, et al. Dynamic changes of miR-210 after brain stroke in rats[J]. *Experimental and Laboratory Medicine*, 2010, 28(3): 230-232.
- [11] 郭洁, 池水侠. 急性缺血性脑卒中患者血清 miRNA-181c-5p, miRNA-340-5p 和 miRNA146a 水平表达检测的诊断价值研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021, 36(5): 43-45, 89. GUO Jie, CHI Shuixia. Diagnostic value of miRNA-181c-5p, miRNA-340-5p and miRNA146a levels in patients with acute ischemic stroke[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2021, 36(5): 43-45, 89.
- [12] KALAYINIA S, ARJMAND F, MALEKI M, et al. MicroRNAs: roles in cardiovascular development and disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2021, 50:107296.
- [13] HUANG C K, BÄR C, THUM T. MiR-21, mediator, and potential therapeutic target in the cardiorenal syndrome[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 726.
- [14] TU Qiulin, LE Dongsheng, WANG Chengyun, et al. Pterostilbene attenuates ischemic stroke by modulating miR-21-5p/PDCD4 axis in vivo and in vitro[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020, 75: 104275.
- [15] YAO Xiaofeng, WANG Yahui, ZHANG Dongya. MicroRNA-21 confers neuroprotection against cerebral Ischemia-Reperfusion injury and alleviates Blood-Brain barrier disruption in rats via the MAPK signaling pathway[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 65(1): 43-53.
- [16] YAN Honglin, HUANG Wenxian, RAO Jie, et al. MiR-21 regulates ischemic neuronal injury via the p53/Bcl-2/Bax signaling pathway[J]. *Aging*, 2021, 13(18): 22242-22255.
- [17] 杜佳琳, 龚诗立, 胡朝英, 等. 缺血性脑卒中的神经炎症反应机制及相关的抗炎药物研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(10): 2126-2132. DU Jialin, GONG Shili, HU Chaoying, et al. Progress of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs of ischemic stroke[J]. *Drug Evaluation Research*, 2022, 45(10): 2126-2132.
- [18] 孙婷婷, 张佩兰. 青年缺血性脑卒中的病因及发病机制研究进展 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2018, 21(4): 447-449. SUN Tingting, ZHANG Peilan. Research progress on etiology and pathogenesis of ischemic stroke in young People[J]. *Chinese Journal of Practical Nervous Diseases*, 2018, 21(4): 447-449.
- [19] 苏钰, 朱文浩. 炎性小体与缺血性脑卒中发病及中医相关机制的研究进展 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(19): 3582-3586. SU Yu, ZHU Wenhao. Research progress on inflammatory bodies, ischemic stroke and TCM related mechanisms[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease*, 2022, 20(19): 3582-3586. (下转第 96 页)

- endometrial carcinoma and its regulation of PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(1): 119-124.
- [11] 朱岱阳, 杜洋, 范培芝. LncRNAs 在甲状腺癌中的研究进展 [J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(8): 1116-1120.
- ZHU Daiyang, DU Yang, FAN Peizhi. Summary of the research progress of LncRNAs in thyroid cancer[J]. *The Journal of Practical Medicine*, 2020, 36(8): 1116-1120.
- [12] 建方方, 车晓霞, 冯炜炜. 子宫内膜癌中长链非编码 RNA 表达谱的生物信息学分析 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2020, 40(6): 768-775.
- JIAN Fangfang, CHE Xiaoxia, FENG Weiwei. Bioinformatics analysis of expression profiles of long noncoding RNA in endometrial cancer[J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University Medical Science*, 2020, 40(6): 768-775.
- [13] LI Bilan, WAN Xiaoping. The role of LncRNAs in the development of endometrial carcinoma[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(3): 3424-3429.
- [14] YU Ting, JIANG Hailong, FAN Yunren, et al. The association of CDKN2BAS gene polymorphisms and intracranial aneurysm: A meta-analysis[J]. *Medicine*, 2020, 99(49): e23209.
- [15] MANGALARAPU M, VINUKONDA S, KOMARAVALLI P L, et al. Association of CDKN2BAS gene polymorphism with periodontitis and Coronary Artery Disease from South Indian population[J]. *Gene*, 2019, 710: 324-332.
- [16] TIMOFEEVA S V, SHERCHKOVA T A, SHKURAT T P. Polymorphism rs2383207 of CDKN2B-AS and susceptibility to atherosclerosis: a mini review[J]. *Non Coding RNA*, 2022, 8(6): 78.
- [17] WANG Lei, BI Rongrong, LI Lei, et al. LncRNA ANRIL aggravates the chemoresistance of pancreatic cancer cells to gemcitabine by targeting inhibition of miR-181a and targeting HMGB1-induced autophagy[J]. *Aging*, 2021, 13(15): 19272-19281.
- [18] WANG H M, SHEN S L, LI N M, et al. LncRNA CDKN2BAS aggravates the progression of ovarian cancer by positively interacting with GAS6[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(11): 5946-5952.
- [19] XIE Dalong, ZHANG Hui, SHANG Chao. Long non-coding RNA CDKN2B antisense RNA 1 gene inhibits Gemcitabine sensitivity in bladder urothelial carcinoma[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(12): 2160-2166.
- [20] HANG Chen, ZHANG Yachao, QU Yong, et al. LncRNA ANRIL represses proliferation of oral squamous cell carcinoma cells through targeting miR-99a[J]. *Minerva Medica*, 2022, 113(5): 887-889.
- [21] DENG Wei, ZHANG Yulong, CAI Jun, et al. LncRNA-ANRIL promotes gastric cancer progression by enhancing NF- κ B signaling[J]. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 2019, 244(12): 953-959.
- 收稿日期: 2023-01-05
修回日期: 2023-02-01

(上接第91页)

- [20] ZHOU Wei, SU Li, DUAN Xingyu, et al. MicroRNA-21 down-regulates inflammation and inhibits periodontitis[J]. *Molecular Immunology*, 2018, 101: 608-614.
- [21] LUO Man, YAN Dongsheng, SUN Qingsong, et al. Ginsenoside Rg1 attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2020, 121(4): 2994-3004.
- [22] LI Yuping, LIANG Wenyi, GUO Caijuan, et al. Renshen shouwu extract enhances neurogenesis and angiogenesis via inhibition of TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway following ischemic stroke in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2020, 253: 112616.
- [23] BAI Yejun, LI Zhigang, LIU Weihao, et al. Biochanin A attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2019, 34(11): e201901104.
- [24] SUN Zhezhe, NYANZU M, YANG Su, et al. VX765 attenuates pyroptosis and HMGB1/TLR4/NF- κ B pathways to improve functional outcomes in TBI mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 7879629.
- [25] 王丹妹, 燕柳艳, 孙姝婵, 等. 葛根素通过 TLR4/Myd88/NF- κ B 抑制 NLRP3 炎症小体抗大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *药理学学报*, 2021, 56(5): 1343-1351.
- WANG Danshu, YAN Liuyan, SUN Shuchan, et al. Puerarin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via TLR4/Myd88/NF- κ B pathway in rats[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2021, 56(5): 1343-1351.
- [26] ZHANG Yan, JIANG Yuliang, LU Dongjie. Diosmetin suppresses neuronal apoptosis and inflammation by modulating the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT/nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway in a rat model of pneumococcal meningitis[J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2238-2245.
- [27] LIU Jie, MA Wei, ZANG Chenghao, et al. Salidroside inhibits NLRP3 inflammasome activation and apoptosis in microglia induced by cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2021, 9(22): 1694.
- [28] ZHAN Lan, PANG Yu, JIANG Hao, et al. Butylphthalide inhibits TLR4/NF- κ B pathway by upregulation of miR-21 to have the neuroprotective effect[J]. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022, 2022: 4687349.
- 收稿日期: 2022-11-01
修回日期: 2023-02-08