

· 论著 ·

miR-335 通过调控铁死亡对大鼠脑缺血 / 再灌注损伤的保护作用及机制研究

袁莉¹, 向军军², 李丽琴¹, 陈炜², 胡跃强², 姚春¹扫描二维码
查看更多

【摘要】 目的 探究miR-335通过调控铁死亡对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制。方法 本实验时间为2022年3—9月。将180只成年雄性Sprague Dawley大鼠随机分为假手术组、模型组、miR-335模拟物组、miR-335模拟物对照组、miR-335抑制物组、miR-335抑制物对照组, 每组30只。假手术组大鼠仅暴露右侧大脑中动脉并缝合。模型组大鼠制备大脑中动脉闭塞/再灌注(MCAO/R)损伤模型。miR-335模拟物组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335模拟物腺相关病毒2 μl , 7 d后制备MCAO/R损伤模型。miR-335模拟物对照组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335模拟物空载体, 7 d后制备MCAO/R损伤模型。miR-335抑制物组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335抑制物腺相关病毒2 μl , 7 d后制备MCAO/R损伤模型。miR-335抑制物对照组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335抑制物空载体, 7 d后制备MCAO/R损伤模型。模型制备后12、24、72 h, 分别在各组随机选取10只大鼠并将其处死, 取缺血半暗带区脑组织以进行后续实验。采用Zea Longa评分评估各组大鼠神经功能缺损程度, 采用qRT-PCR检测各组大鼠脑组织miR-335、F-box和富含亮氨酸的重复蛋白5 (FBXL5) mRNA、核受体共激活因子4 (NCOA4) mRNA相对表达量, 采用Western blot法检测各组大鼠脑组织FBXL5、NCOA4蛋白相对表达量。结果 本研究大鼠均建模成功。假手术组大鼠Zea Longa评分为0分。模型制备后12、24、72 h, miR-335模拟物组大鼠Zea Longa评分低于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠Zea Longa评分高于miR-335抑制物对照组 ($P < 0.05$)。模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织miR-335相对表达量低于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织miR-335相对表达量高于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织miR-335相对表达量低于miR-335抑制物对照组 ($P < 0.05$)。模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量低于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量高于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量低于miR-335抑制物对照组 ($P < 0.05$); 模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量高于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量低于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量高于miR-335抑制物对照组 ($P < 0.05$)。结论 上调miR-335表达可有效减轻MCAO/R损伤模型大鼠神经功能缺损程度, 其机制可能与miR-335促进FBXL5表达、抑制NCOA4表达, 调控铁自噬与铁代谢, 进而影响铁死亡有关。

【关键词】 再灌注损伤; 缺血/再灌注损伤; 大鼠; miR-335; F-box和富含亮氨酸的重复蛋白5; 核受体共激活蛋白4

【中图分类号】 R 619.9 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.097

Protective Effect and Mechanism of miR-335 on Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats by Regulating Ferroptosis

YUAN Li¹, XIANG Junjun², LI Liqin¹, CHEN Wei², HU Yueqiang², YAO Chun¹

1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530012, China

2. Encephalopathy Department, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530020, China

Corresponding author: HU Yueqiang, E-mail: 137463195@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the protective effect and mechanism of miR-335 on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by regulating ferroptosis. **Methods** The experiment was conducted from March to September 2022. One hundred and eighty adult male Sprague Dawley rats were randomly divided into sham operation group, model group, miR-335 mimic group,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973768); 广西自然科学基金重点项目 (2019GXNSFDA245006); 广西中医脑病临床研究中心项目 (桂科AD20238028); 广西研究生教育创新计划项目 (YCSZ2022015)

作者单位: 1.530012广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学 2.530020广西壮族自治区南宁市, 广西中医药大学第一附属医院脑病一区

通信作者: 胡跃强, E-mail: 137463195@qq.com

miR-335 mimic control group, miR-335 inhibitor group and miR-335 inhibitor control group, with 30 rats in each group. In the sham operation group, only the right middle cerebral artery was exposed and sutured. The middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) injury model was prepared in the model group. Rats in the miR-335 mimic group were stereotaxically injected with 2 μ l of miR-335 mimic adeno-associated virus in the middle cerebral artery, and MCAO/R injury model was prepared after 7 days. Rats in the miR-335 mimic control group were stereotaxically injected with miR-335 mimic empty vector in the middle cerebral artery, and MCAO/R injury model was prepared after 7 days. Rats in the miR-335 inhibitor group were stereotaxically injected with 2 μ l of miR-335 inhibitor adeno-associated virus in the middle cerebral artery, and MCAO/R injury model was prepared after 7 days. Rats in the miR-335 inhibitor control group were stereotaxically injected with miR-335 inhibitor empty vector in the middle cerebral artery, and MCAO/R injury model was prepared after 7 days. At 12, 24 and 72 h after model preparation, 10 rats in each group were randomly selected and sacrificed, and the ischemic penumbra brain tissue was taken for subsequent experiments. Zea Longa score was used to evaluate the degree of neurological deficit in each group. The relative expression of miR-335, F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5) and nuclear receptor coactivator 4 (NCOA4) mRNA in brain tissue of each group was detected by qRT-PCR. The relative expression of FBXL5 and NCOA4 protein in brain tissue of each group was detected by Western blot. **Results** The rats in this study were successfully modeled. The Zea Longa score of the sham operation group was 0. At 12, 24 and 72 h after model preparation, the Zea Longa score of miR-335 mimic group was lower than that of miR-335 mimic control group, and the Zea Longa score of miR-335 inhibitor group was higher than that of miR-335 inhibitor control group ($P < 0.05$). At 12, 24 and 72 h after model preparation, the relative expression of miR-335 in brain tissue of model group was lower than that of sham operation group, the relative expression of miR-335 in miR-335 mimic group was higher than that in miR-335 mimic control group, and the relative expression of miR-335 in miR-335 inhibitor group was lower than that in miR-335 inhibitor control group ($P < 0.05$). At 12, 24, and 72 h after model preparation, the relative expression of FBXL5 mRNA and protein in brain tissue of model group was lower than that of sham operation group, the relative expression of FBXL5 mRNA and protein in brain tissue of miR-335 mimic group was higher than that of miR-335 mimic control group, and the relative expression of FBXL5 mRNA and protein in brain tissue of miR-335 inhibitor group was lower than that of miR-335 inhibitor control group ($P < 0.05$). At 12, 24, and 72 h after model preparation, the relative expression of NCOA4 mRNA and protein in brain tissue of model group was higher than that of sham operation group, the relative expression of NCOA4 mRNA and protein in brain tissue of miR-335 mimic group was lower than that of miR-335 mimic control group, and the relative expression of NCOA4 mRNA and protein in brain tissue of miR-335 inhibitor group was higher than that of miR-335 inhibitor control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Up-regulation of miR-335 expression can effectively reduce the degree of neurological deficit in MCAO/R injury model rats. The mechanism may be related to miR-335 promoting FBXL5 expression, inhibiting NCOA4 expression, regulating iron autophagy and iron metabolism, and then affecting ferroptosis.

【 Key words 】 Reperfusion injury; Ischemia/reperfusion injury; Cerebrum; miR-335; F-box and leucine-rich repeat protein 5; Nuclear receptor coactivator 4

缺血性卒中 (ischemic stroke, IS) 是全球范围内发病率高、死亡率高的常见疾病之一^[1], 是由血栓形成或栓塞导致血流突然中断并阻塞供应大脑特定区域血管引起的病症^[2]。目前, 溶栓治疗是IS的主要治疗方式之一, 但其治疗时间窗较窄。近年研究发现, 铁死亡可通过影响铁自噬或铁代谢而在IS的发展中发挥了重要作用^[3]。当脑缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤时, 自噬途径被激活并诱导铁蛋白过度降解, 导致神经元中的游离铁增加, 这种现象称为铁自噬, 而铁自噬过程主要受核受体共激活因子4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 的调节^[4]。F-box和富含亮氨酸的重复蛋白5 (F-box and leucine-rich repeat protein 5, FBXL5) 是SCF型泛素连接酶的底物识别亚基, 可作为哺乳动物细胞中铁代谢的主要调节剂, 其缺乏会导致铁调节蛋白1的持续积累、铁摄取调节障碍, 最终导致铁

过载和活性氧的产生^[5]。因此, FBXL5/NCOA4在大脑铁稳态中起重要作用。

miRNA作为非编码RNA, 是IS等多种神经系统疾病的重要递质^[6]。研究表明, miR-335可参与神经元的生长和发育, 成年大鼠短暂大脑中动脉闭塞后脑组织miR-335表达降低^[7]。但miR-335在大鼠脑I/R损伤中的具体调控机制尚不清楚。本研究旨在探讨miR-335通过调控铁死亡途径对大鼠脑I/R损伤的保护作用及机制, 以期为IS提供新的治疗策略, 最大限度地减轻脑I/R损伤后永久性脑损伤和残疾。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2022年3—9月。

1.2 试验动物 成年雄性Sprague Dawley大鼠180只, 体质量280~320 g, 均购自广西中医药大学实验动物中心, 生产许可证号: SCXK (湘) 2019-0014。将大

鼠饲养在受控环境中〔温度(21±2)℃,相对湿度(55±5)%,12 h光照/黑暗交替〕,实验期间,所有大鼠可自由获得食物和水,适应性饲养7 d。实验程序均按照美国国立卫生研究院实验动物护理和使用指南进行,并经广西中医药大学动物伦理委员会审核批准(批号:DW20211204-195)。

1.3 主要试剂 大鼠miR-335模拟物腺相关病毒及大鼠miR-335抑制物腺相关病毒(上海吉满生物科技有限公司), TRIzol™试剂(Ambion公司), mRNA反转录试剂盒、miRNA反转录试剂盒〔新贝(上海)生物科技有限公司〕,彩色预染蛋白Marker、山羊抗兔IgG HRP、ECL化学发光底物试剂盒、BCA蛋白浓度测定kit、内参抗GAPDH抗体(Biosharp公司),抗FBXL5抗体及抗NCOA4抗体(北京索莱宝科技有限公司生产)。

1.4 实验分组及干预方法 将180只大鼠随机分为假手术组、模型组、miR-335模拟物组、miR-335模拟物对照组、miR-335抑制物组、miR-335抑制物对照组,每组30只。假手术组大鼠仅暴露右侧大脑中动脉并缝合。模型组大鼠制备大脑中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)损伤模型,具体如下:在大鼠右侧大脑中动脉做一中线颈部切口,然后定位右颈外动脉,采用大鼠硅胶线栓结扎其分支,造成大脑中动脉闭塞;大脑中动脉闭塞2 h后,拔出大鼠硅胶线栓一定长度以允许血液通过右颈内动脉回流,造成大脑中动脉再灌注^[8]。本实验以模型制备后2 h Zea Longa评分1~3分为MCAO/R损伤模型制备成功标准。miR-335模拟物组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335模拟物腺相关病毒2 μl。脑立体定位注射方法如下:将大鼠麻醉后固定在StereoDrive立体定位系统框架中,取2 μl纯化后的腺相关病毒并将其固定在定位仪上,将注射器针尖移至大脑中动脉标记处并钻孔〔其中Y轴:0 mm, X轴:-2.5 mm, Z轴:-3.5 mm(相对于前凶点和硬脑膜表面)〕,进针深度达3 mm后缓慢注射腺相关病毒;7 d后制备MCAO/R损伤模型。miR-335模拟物对照组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335模拟物空载体,7 d后制备MCAO/R损伤模型。miR-335抑制物组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335抑制物腺相关病毒2 μl,7 d后制备MCAO/R损伤模型。miR-335抑制物对照组大鼠在大脑中动脉脑立体定位注射miR-335抑制物空载体,7 d后制备MCAO/R损伤模型。于模型制备后12、24、72 h,分别在各组随机选取10只大鼠并将其处死,取缺血半暗带区脑组织以进行后续实验。

1.5 Zea Longa评分 采用Zea Longa评分(5级评分法)评估各组大鼠模型制备后2、12、24、72 h神经功能缺损程度,评分越高表明大鼠神经功能缺损程度越严重^[9]。

1.6 qRT-PCR 采用qRT-PCR检测各组大鼠模型制备后12、24、72 h脑组织miR-335、FBXL5 mRNA、NCOA4 mRNA相对表达量。使用TRIzol™试剂从缺血半暗带区脑组织中提取总RNA,采用mRNA反转录试剂盒和miRNA反转录试剂盒将总RNA合成cDNA。使用扩增试剂盒进行PCR扩增,反应条件:预变性95℃ 30 s 1个循环,变性95℃ 3~10 s、退火和延伸60℃ 10~30 s,共45个循环,融解曲线时间为仪器默认,1个循环数。以U6为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算miR-335相对表达量;以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算FBXL5、NCOA4 mRNA相对表达量^[10]。引物序列见表1。

表1 引物序列及扩增长度

引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)
rno-miR-335(正向)	CGCGTCAAGAGCAATAACGAA	62
rno-miR-335(反向)	AGTGCAGGCTCCGAGCTATT	62
U6(正向)	GCTCGCTTCGGCAGCATATAC	23
U6(反向)	AGTGCAGGCTCCGAGCTATT	20
rno-miR-335-StemLoop-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACACATTT	62
U6-Stem-Loop-Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA TTCGCACTGGATACGACAAAAATATGG	54
FBXL5(正向)	AGTCTGTGGAATCAAGCTGAAGAG	111
FBXL5(反向)	AAGATGGGTTATACCTGTGGAGTG	111
NCOA4(正向)	ACAGACCTTGAGACAACAGTCAGAC	140
NCOA4(反向)	GGCTATTACATTTTGAGAACTTGG	140
GAPDH(正向)	CTCTCTGCTCCTCCCTGTTC	20
GAPDH(反向)	TCACACCGACCTTCACCATC	20

注:FBXL5=F-box和富含亮氨酸的重复蛋白5, NCOA4=核受体共激活因子4

1.7 Western blot法 采用Western blot法检测各组大鼠模型制备后12、24、72 h脑组织FBXL5、NCOA4蛋白相对表达量。从缺血半暗带区脑组织匀浆中提取制备的蛋白质样品(n=6),然后通过SDS-PAGE电泳液缓冲液分离蛋白质并将其转移到硝酸纤维素膜上;加入5%脱脂奶粉于4℃封闭过夜,加入一抗(1:1 000)进行孵育;加入二抗(1:20 000)于室温下孵育60 min,采用TBST洗涤膜4次。使用Image J图像分析软件分析FBXL5、NCOA4蛋白相对表达量^[11]。

1.8 统计学方法 使用SPSS 22.0统计学软件进行数据处理。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)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-t检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Zea Longa评分 本研究大鼠均建模成功。假手术组大鼠Zea Longa评分为0分。模型制备后12、24、

72 h, 五组大鼠Zea Longa评分比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型制备后12、24、72 h, miR-335模拟物组大鼠Zea Longa评分低于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠Zea Longa评分高于miR-335抑制物对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表2。

2.2 脑组织miR-335相对表达量 模型制备后12、24、72 h, 六组大鼠脑组织miR-335相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织miR-335相对表达量低于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织miR-335 mRNA相对表达量高于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织miR-335相对表达量低于miR-335抑制物对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表3。

2.3 脑组织FBXL5、NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量 模型制备后12、24、72 h, 六组大鼠脑组织FBXL5、NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量低于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量高于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量低于miR-335抑制物对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量高于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量低于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量高于miR-335抑制物对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表4~5、图1。

3 讨论

IS具有高致残率、高死亡率等特点, 对人体健康构成严重威胁^[12-13]。miR-335已被证实是参与IS过程的重要调节剂, 其在脑I/R损伤中起着至关重要的作用^[14]。本研究结果显示, 模型制备后12、24、72 h, miR-335

表2 五组大鼠模型制备后12、24、72 h Zea Longa评分比较 ($\bar{x} \pm s$, 分, $n=10$)

Table 2 Comparison of Zea Longa scores in five groups at 12, 24 and 72 h after model preparation

组别	模型制备后12 h	模型制备后24 h	模型制备后72 h
模型组	2.70 ± 0.48	2.60 ± 0.52	2.50 ± 0.27
miR-335模拟物组	1.70 ± 0.61 ^a	1.60 ± 0.52 ^a	1.40 ± 0.12 ^a
miR-335模拟物对照组	2.50 ± 0.31	2.60 ± 0.31	2.60 ± 0.23
miR-335抑制物组	2.90 ± 0.22 ^b	2.70 ± 0.16 ^b	2.70 ± 0.21 ^b
miR-335抑制物对照组	2.70 ± 0.18	2.50 ± 0.30	2.30 ± 0.48
F值	6.067	83.34	9.695
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a表示与miR-335模拟物对照组比较, $P < 0.05$; ^b表示与miR-335抑制物对照组比较, $P < 0.05$

表3 六组大鼠模型制备后12、24、72 h脑组织miR-335相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Comparison of relative expression levels of miR-335 in brain tissue in six groups at 12, 24 and 72 h after model preparation

组别	模型制备后12 h	模型制备后24 h	模型制备后72 h
假手术组	1.02 ± 0.10	1.02 ± 0.05	1.00 ± 0.09
模型组	0.64 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.03 ^a	0.84 ± 0.21 ^a
miR-335模拟物组	2.45 ± 0.03 ^b	2.84 ± 0.10 ^b	3.21 ± 0.27 ^b
miR-335模拟物对照组	1.03 ± 0.01	1.08 ± 0.01	1.04 ± 0.03
miR-335抑制物组	0.31 ± 0.35 ^c	0.34 ± 0.04 ^c	0.45 ± 0.17 ^c
miR-335抑制物对照组	1.02 ± 0.01	1.05 ± 0.01	1.03 ± 0.02
F值	13.60	13.09	29.96
P值	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a表示与假手术组比较, $P < 0.05$; ^b表示与miR-335模拟物对照组比较, $P < 0.05$; ^c表示与miR-335抑制物对照组比较, $P < 0.05$

模拟物组大鼠Zea Longa评分低于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠Zea Longa评分高于miR-335抑制物对照组; 模型制备后12、24、72 h, 模型组大鼠脑组织miR-335相对表达量低于假手术组, miR-335模拟物组大鼠脑组织miR-335相对表达量高于miR-335模拟物对照组, miR-335抑制物组大鼠脑组织miR-335

表4 六组大鼠模型制备后12、24、72 h脑组织FBXL5、NCOA4 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Comparison of relative expression levels of FBXL5 and NCOA4 mRNA in brain tissue in six groups at 12, 24 and 72 h after model preparation

组别	FBXL5 mRNA			NCOA4 mRNA		
	模型制备后12 h	模型制备后24 h	模型制备后72 h	模型制备后12 h	模型制备后24 h	模型制备后72 h
假手术组	1.05 ± 0.02	1.01 ± 0.19	1.03 ± 0.09	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10
模型组	0.69 ± 0.07 ^a	0.39 ± 0.03 ^a	0.64 ± 0.02 ^a	1.57 ± 0.08 ^a	1.43 ± 0.08 ^a	1.20 ± 0.13 ^a
miR-335模拟物组	1.66 ± 0.01 ^b	1.27 ± 0.30 ^b	1.92 ± 0.01 ^b	0.42 ± 0.12 ^b	0.56 ± 0.09 ^b	0.30 ± 0.12 ^b
miR-335模拟物对照组	1.04 ± 0.00	1.03 ± 0.10	1.04 ± 0.00	1.02 ± 0.01	1.02 ± 0.01	1.03 ± 0.02
miR-335抑制物组	0.85 ± 0.14 ^c	0.36 ± 0.08 ^c	0.66 ± 0.01 ^c	1.95 ± 0.20 ^c	1.58 ± 0.21 ^c	1.43 ± 0.21 ^c
miR-335抑制物对照组	1.05 ± 0.23	1.04 ± 0.02	1.04 ± 0.02	1.04 ± 0.01	1.04 ± 0.02	1.01 ± 0.01
F值	17.10	33.10	66.09	12.89	28.8	37.29
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

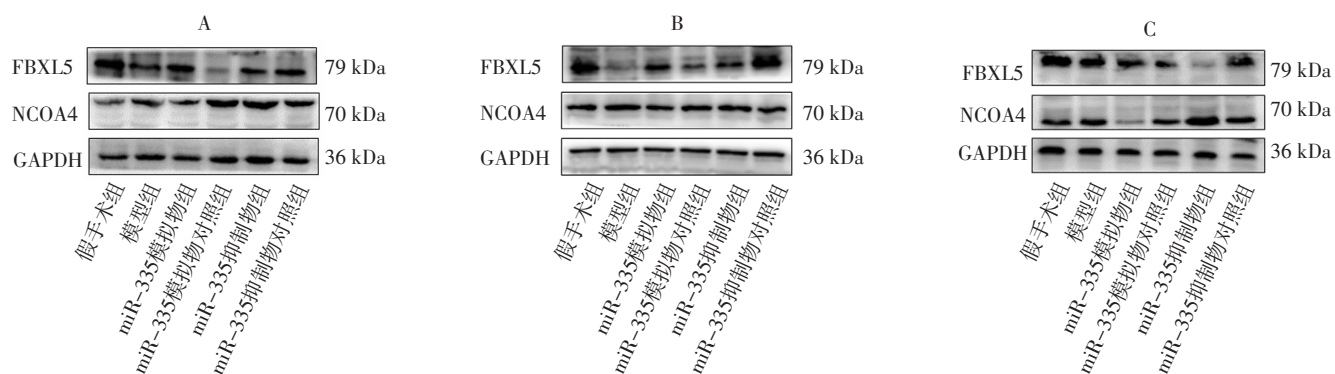
注: ^a表示与假手术组比较, $P < 0.05$; ^b表示与miR-335模拟物对照组比较, $P < 0.05$; ^c表示与miR-335抑制物对照组比较, $P < 0.05$

表5 六组大鼠模型制备后12、24、72 h脑组织FBXL5、NCOA4蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 5 Comparison of relative expression levels of FBXL5 and NCOA4 proteins in brain tissue in six groups at 12, 24 and 72 h after model preparation

组别	FBXL5蛋白			NCOA4蛋白		
	模型制备后12 h	模型制备后24 h	模型制备后72 h	模型制备后12 h	模型制备后24 h	模型制备后72 h
假手术组	1.00 ± 0.02	1.04 ± 0.04	1.02 ± 0.02	0.91 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.70 ± 0.02
模型组	0.61 ± 0.02 ^a	0.88 ± 0.02 ^a	0.90 ± 0.01 ^a	1.15 ± 0.01 ^a	0.78 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.13 ^a
miR-335模拟物组	0.73 ± 0.01 ^b	1.03 ± 0.05 ^b	1.01 ± 0.02 ^b	0.89 ± 0.02 ^b	0.65 ± 0.01 ^b	0.55 ± 0.01 ^b
miR-335模拟物对照组	0.48 ± 0.01	0.70 ± 0.01	0.62 ± 0.01	0.95 ± 0.01	1.07 ± 0.03	0.82 ± 0.01
miR-335抑制物组	0.65 ± 0.05 ^c	0.75 ± 0.08 ^c	0.43 ± 0.01 ^c	1.03 ± 0.02 ^c	1.17 ± 0.01 ^c	1.24 ± 0.02 ^c
miR-335抑制物对照组	0.99 ± 0.02	1.08 ± 0.08	0.90 ± 0.03	0.86 ± 0.02	1.03 ± 0.02	0.84 ± 0.02
F值	367.200	180.70	293.70	180.90	677.20	204.70
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a表示与假手术组相比, $P<0.05$; ^b表示与miR-335模拟物对照组比较, $P<0.05$; ^c表示与miR-335抑制物对照组比较, $P<0.05$



注: A为模型制备后12 h, B为模型制备后24 h, C为模型制备后72 h; FBXL5=F-box和富含亮氨酸的重复蛋白5, NCOA4=核受体共激活因子4

图1 六组模型制备后12、24、72 h脑组织FBXL5、NCOA4蛋白SDS-PAGE图

Figure 1 SDS-PAGE of FBXL5 and NCOA4 proteins in brain tissue of six groups at 12, 24 and 72 h after model preparation

相对表达量低于miR-335抑制物对照组,与既往研究结果^[15]一致,提示上调miR-335表达可有效减轻MCAO/R损伤模型大鼠神经功能缺损程度,下调miR-335表达可加重MCAO/R损伤模型大鼠神经功能缺损程度。SAMARAWEEERA等^[16]研究证实,miR-335可通过阻断神经元分化而维持非神经元特征。此外,低水平miR-335可鉴别诊断IS患者与健康对照者,且miR-335水平降低是IS的独立危险因素^[17-18]。有动物实验表明,大脑中动脉闭塞模型大鼠缺血皮质中miR-335降低^[19]。有体外与在体实验表明,I/R与氧糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导的脑损伤24 h后miR-335下降^[20]。miR-335可通过靶向rho关联含卷曲螺旋蛋白激酶2(rho-associated coiled-coil containing protein kinase 2, ROCK2)而促进应激颗粒的形成,进而抑制细胞凋亡,减轻大脑中动脉闭塞模型大鼠脑组织缺血性损伤程度^[21]。

目前,IS患者有多种治疗方法,其中包括针对程序性细胞死亡的治疗策略。铁死亡是一种新定义的程序性细胞死亡,其特征是脂质过氧化的铁依赖性积累达到致死水平,其或可成为IS新的治疗靶点^[22]。研究表明,

I/R损伤可以通过选择性自噬途径诱导铁蛋白自噬,这是一种将载铁的铁蛋白与释放的不稳定铁一起输送到溶酶体进行降解,随后使神经元中游离铁增加的过程,该过程在全身铁稳态中具有重要作用^[23]。NCOA4为选择性自噬受体,其在介导脑组织和细胞铁蛋白自噬中具有至关重要的作用^[24]。近期,NCOA4介导的铁蛋白自噬被认为是调节铁死亡的关键机制,其过度激活会促进游离铁释放增多,而过量的游离铁又可通过芬顿反应而导致铁死亡^[4, 25]。大量研究表明,调节FBXL5对于铁稳态的维持至关重要^[26-27]。FBXL5是F-box蛋白家族成员,其特定结构域可感知铁和氧并直接结合铁,因而其可作为哺乳动物细胞铁代谢的主要调节剂^[28-30]。研究表明,FBXL5缺乏会导致铁调节蛋白的持续积累和不受调节的铁摄取,最终导致铁过载和活性氧的产生^[23]。YAMAUCHI等^[5]进行的动物实验表明,小鼠脑组织缺失FBXL5会诱导神经干祖细胞异常增殖,从而影响大脑发育,而全身缺乏FBXL5的小鼠由于铁过载和氧化应激而导致其细胞内铁水平紊乱并在子宫内死亡。为了验证miR-335是否通过调控FBXL5、NCOA4表达而减轻MCAO/R损伤模型大鼠神经功能损伤程度,本研究于大

鼠大脑中动脉脑立体定位注射miR-335模拟物/抑制物腺相关病毒,结果显示,模型制备后12、24、72 h,模型组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量低于假手术组,miR-335模拟物组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量高于miR-335模拟物对照组,miR-335抑制物组大鼠脑组织FBXL5 mRNA、蛋白相对表达量低于miR-335抑制物对照组;模型组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量高于假手术组,miR-335模拟物组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量低于miR-335模拟物对照组,miR-335抑制物组大鼠脑组织NCOA4 mRNA、蛋白相对表达量高于miR-335抑制物对照组,提示上调miR-335表达有效减轻MCAO/R损伤模型大鼠神经功能缺损程度的机制可能与其促进FBXL5表达、抑制NCOA4表达,调控铁自噬与铁代谢,进而影响铁死亡有关。

综上所述,上调miR-335表达可有效减轻MCAO/R损伤模型大鼠神经功能缺损程度,其机制可能与miR-335促进FBXL5表达、抑制NCOA4表达,调控铁自噬与铁代谢,进而影响铁死亡有关,这为治疗IS导致的神经功能损伤提供了理论依据。

作者贡献:袁莉进行文章的构思与设计,负责撰写、修订论文;陈炜进行研究的实施与可行性分析;李丽琴进行数据收集、整理、分析;向军军进行结果分析与解释;胡跃强、姚春负责文章的质量控制及审校,对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] CHEN H S, HE Y C, CHEN S, et al. Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: applications for natural product efficacy with omics and systemic biology [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104877. DOI: 10.1016/j.phrs.2020.104877.
- [2] TAOUIK E, PROBERT L. Ischemic neuronal damage [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14 (33): 3565-3573. DOI: 10.2174/138161208786848748.
- [3] 李冰玉, 赵博, 夏中元. 铁自噬及其在缺血再灌注损伤中作用机制的研究进展 [J]. *医学综述*, 2022, 28 (7): 1260-1266. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2022.07.003.
- [4] LI C, SUN G C, CHEN B L, et al. Nuclear receptor coactivator 4-mediated ferritinophagy contributes to cerebral ischemia-induced ferroptosis in ischemic stroke [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 174: 105933. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105933.
- [5] YAMAUCHI T, NISHIYAMA M, MOROISHI T, et al. FBXL5 inactivation in mouse brain induces aberrant proliferation of neural stem progenitor cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37 (8): e00470-00416. DOI: 10.1128/MCB.00470-16.
- [6] HUANG L, MA Q Y, LI Y, et al. Inhibition of microRNA-210 suppresses pro-inflammatory response and reduces acute brain injury of ischemic stroke in mice [J]. *Exp Neurol*, 2018, 300: 41-50. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.10.024.
- [7] DHARAP A, BOWEN K, PLACE R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29 (4): 675-687. DOI: 10.1038/jcbfm.2008.157.
- [8] ZHOU Z H, XU N B, MATEI N, et al. Sodium butyrate attenuated neuronal apoptosis via GPR41/Gβγ/PI3K/Akt pathway after MCAO in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2021, 41 (2): 267-281. DOI: 10.1177/0271678X20910533.
- [9] 李广大, 李笑笑, 董健健, 等. 电针对脑缺血大鼠神经血管单元及Wnt/β-catenin信号通路的影响 [J]. *针刺研究*, 2021, 46 (2): 87-94. DOI: 10.13702/j.1000-0607.200819.
- [10] FITRIAWAN A S, KARTIKA A I, CHASANAH S N, et al. Expression of circulating microRNA-141 in epithelial ovarian cancer [J]. *Malays J Med Sci*, 2020, 27 (6): 27-38. DOI: 10.21315/mjms2020.27.6.4.
- [11] GUO P P, JIN Z, WU H S, et al. Effects of irisin on the dysfunction of blood-brain barrier in rats after focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Brain Behav*, 2019, 9 (10): e01425. DOI: 10.1002/brb3.1425.
- [12] PAUL S, CANDELARIO-JALIL E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: an overview of clinical and preclinical studies [J]. *Exp Neurol*, 2021, 335: 113518. DOI: 10.1016/j.expneurol.2020.113518.
- [13] FESKE S K. Ischemic stroke [J]. *Am J Med*, 2021, 134 (12): 1457-1464. DOI: 10.1016/j.amjmed.2021.07.027.
- [14] WENG H C, SHEN C S, HIROKAWA G, et al. Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction [J]. *Biomed Res*, 2011, 32 (2): 135-141. DOI: 10.2220/biomedres.32.135.
- [15] 王洪海, 周颖琛, 周德生, 等. 活血荣络方对大鼠脑缺血再灌注细胞凋亡的影响 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20 (11): 1981-1985. DOI: 10.12102/j.issn.1672-1349.2022.11.011.
- [16] SAMARAWEEERA L, GRANDINETTI K B, HUANG R J, et al. MicroRNAs define distinct human neuroblastoma cell phenotypes and regulate their differentiation and tumorigenicity [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 309. DOI: 10.1186/1471-2407-14-309.
- [17] 袁梅, 汤永红, 袁海军, 等. MiR-335在急性缺血性脑卒中表达下调及对钙调蛋白的调控作用 [J]. *中南医学科学杂志*, 2015, 43 (3): 276-280. DOI: 10.15972/j.cnki.43-1509/r.2015.03.010.
- [18] 袁梅, 周成芳, 汤永红, 等. 急性缺血性脑卒中患者外周血白细胞miR-335基因启动子甲基化状态及意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25 (7): 705-709.
- [19] 李晓云, 褚静, 牛建一, 等. MiR-335在局灶性脑缺血大鼠脑组织中的表达变化及作用机制研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2017, 16 (6): 570-575. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2017.06.006.
- [20] SI W W, LI Y, YE S Y, et al. Methyltransferase 3 mediated miRNA m6A methylation promotes stress granule formation in the early stage of acute ischemic stroke [J]. *Front Mol Neurosci*, 2020, 13: 103. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00103.
- [21] SI W W, YE S Y, REN Z X, et al. miR-335 promotes stress

- granule formation to inhibit apoptosis by targeting ROCK2 in acute ischemic stroke [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43 (3): 1452-1466. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4073.
- [22] REN J X, LI C, YAN X L, et al. Crosstalk between oxidative stress and ferroptosis/oxytosis in ischemic stroke: possible targets and molecular mechanisms [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6643382. DOI: 10.1155/2021/6643382.
- [23] QUILES DEL REY M, MANCIAS J D. NCOA4-mediated ferritinophagy: a potential link to neurodegeneration [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 238. DOI: 10.3389/fnins.2019.00238.
- [24] RUIZ J C, BRUICK R K. F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5): sensing intracellular iron and oxygen [J]. *J Inorg Biochem*, 2014, 133: 73-77. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2014.01.015.
- [25] ZHANG Y L, KONG Y, MA Y, et al. Loss of COPZ1 induces NCOA4 mediated autophagy and ferroptosis in glioblastoma cell lines [J]. *Oncogene*, 2021, 40 (8): 1425-1439. DOI: 10.1038/s41388-020-01622-3.
- [26] MOROISHI T, NISHIYAMA M, TAKEDA Y, et al. The FBXL5-IRP2 axis is integral to control of iron metabolism in vivo [J]. *Cell Metab*, 2011, 14 (3): 339-351. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.07.011.
- [27] WANG H, SHI H, RAJAN M, et al. FBXL5 regulates IRP2 stability in iron homeostasis via an oxygen-responsive [2Fe2S] cluster [J]. *Mol Cell*, 2020, 78 (1): 31-41.e5. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.02.011.
- [28] NAKAYAMA K I, NAKAYAMA K. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6 (5): 369-381. DOI: 10.1038/nrc1881.
- [29] CHOLLANGI S, THOMPSON J W, RUIZ J C, et al. Hemerythrin-like domain within F-box and leucine-rich repeat protein 5 (FBXL5) communicates cellular iron and oxygen availability by distinct mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (28): 23710-23717. DOI: 10.1074/jbc.M112.360404.
- [30] WANG Z W, LIU P D, INUZUKA H, et al. Roles of F-box proteins in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14 (4): 233-247. DOI: 10.1038/nrc3700.
- (收稿日期: 2022-10-26; 修回日期: 2023-03-10)
(本文编辑: 谢武英)

· 作者 · 读者 · 编者 ·

《实用心脑血管病杂志》绿色通道投稿须知

为进一步满足广大医务工作者科研、工作需求,《实用心脑血管病杂志》开通了投稿绿色通道,凡符合以下条件的稿件编辑部将提供优化研究设计方案、优化统计学处理、优化参考文献等编辑深加工服务并由资深编辑负责论文的修改、润色,享受优先审稿、优先外审、优先出版等优惠政策,欢迎您积极踊跃投稿!

- (1) 最新权威指南/指南解读、述评、Meta分析/系统评价类型文章,其中确有重大指导作用者缴费后1~2个月优先出版;
- (2) 国家级及省级以上基金项目支持文章,其中确有重大影响力者缴费后1~2个月内优先出版;
- (3) 省级基金项目支持文章及前瞻性研究、大型临床随机对照试验、大样本量调查研究缴费后2~3个月内优先出版;
- (4) 系统阐释、深入研究某一种/一组疾病规律的专题研究(由4~6篇文章组成)缴费后2~3个月内优先出版;
- (5) 介绍自主研发/研制或具有专利号的医疗技术、仪器、设备等相关文章,缴费后2~3个月内优先出版;
- (6) 优秀或获奖博士生导师学位论文(须附导师推荐意见)缴费后2~3个月内优先出版。

凡符合上述条件的稿件请登录本刊官网(www.syxnf.net)“作者投稿系统”进行投稿,并在填写文题信息时标注“绿色通道”、提交基金项目证明文件、论文推荐函以备登记、审核,请务必保证所留信息正确、无误,不符合上述条件而标注“绿色通道”、相关证明材料不全、联系方式不完整或未提交论文推荐函者将直接退稿处理。

凡符合上述条件的稿件审稿时间将控制15~30 d以内,并可申请网络首发,未尽事宜详询电话:18833006545/0310-2067168,微信号: [syxnfxgbzz1993](https://www.syxnf.net), E-mail: [syxnfxgbz@chinagp.net.cn](mailto:syxnfxbz@chinagp.net.cn)。

(本刊编辑部)