

miR-32-3p通过靶向Smad3调节氧糖剥夺/再灌注损伤中的细胞活力

张傲琪^{1,2} 赵海乐^{2,3} 巴德仁贵^{4,5} 朱润秀^{2,3} 姚远^{1,2,3*}

¹内蒙古大学, 生命科学学院, 呼和浩特 010070; ²内蒙古大学人民医院, 神经内科, 呼和浩特 010017;

³内蒙古自治区人民医院, 神经内科, 呼和浩特 010017;

⁴包头医学院, 内蒙古自治区缺氧转化医学重点实验室, 包头 014060;

⁵包头医学院, 医学技术与麻醉学学院, 包头 014060)

摘要 该文探讨了miR-32-3p通过靶向Smad3调节氧糖剥夺/再灌注损伤中的细胞活力。通过利用SK-N-SH细胞构建了一个研究脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)的氧糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation and reperfusion, OGD/R)模型。通过生物信息学预测miR-32-3p的靶基因并进行功能注释和筛选; 通过双荧光素酶报告实验、实时定量PCR、Western blot、CCK-8和活/死细胞检测等实验检测miR-32-3p通过靶向Smad3对细胞活力的影响。结果显示, Smad3是miR-32-3p的新靶点, 并且在SK-N-SH OGD/R模型中miR-32-3p表达上调。CCK-8分析表明, 与miR-32-3p抑制剂对照组和shNC组相比, sh-Smad3和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组的细胞活力显著降低。随后, 活/死细胞活力测定进一步支持了这些结果。与抑制剂NC和shNC组相比, sh-Smad3和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组中可观察到更多以红色荧光表示的死亡细胞。与SK-N-SH细胞相比, OGD/R细胞的Lats2、Yap/Taz和Smad3水平降低。这些结果表明, 缺乏Smad3可能会抑制细胞活力。这些结果说明, Hippo信号通路中的Smad3、Lats2和Yap/Taz可能共同调节细胞活力。

关键词 氧糖剥夺/再灌注; miR-32-3p; Smad3; Hippo信号通路; 活力

miR-32-3p Regulates the Vitality in Oxygen and Glucose Deprivation/Reperfusion Injury by Targeting Smad3

ZHANG Aoqi^{1,2}, ZHAO Haile^{2,3}, BADE Rengui^{4,5}, ZHU Runxiu^{2,3}, YAO Yuan^{1,2,3*}

¹College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China; ²Department of Neurology, Inner Mongolia University People's Hospital, Hohhot 010017, China; ³Department of Neurology, Inner Mongolia People's Hospital, Hohhot 010017, China;

⁴Inner Mongolia Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine, Baotou Medical College, Baotou 014060, China;

⁵School of Medical Technology and Anesthesiology, Baotou Medical College, Baotou 014060, China)

Abstract This study aimed to investigate miR-32-3p regulates the vitality in OGD/R (oxygen-glucose deprivation and reperfusion) injury by targeting Smad3. For studying CIRI (cerebral ischemia reperfusion injury), SK-N-SH cells were used to construct an OGD/R model. The target genes of miR-32-3p were predicted and then used for function annotation through bioinformatic methods. The effect of miR-32-3p on cell viability by targeting

收稿日期: 2022-06-28

接受日期: 2022-08-09

内蒙古自然科学基金(批准号: 2021MS08033)、内蒙古缺氧转化医学重点实验室开放基金(批准号: KFKT202002)和内蒙古人民医院自然科学基金(批准号: 2019YN09)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15389816911, E-mail: yuanyao129@imu.edu.cn

Received: June 28, 2022 Accepted: August 9, 2022

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2021MS08033), the Opening Foundation of Inner Mongolia Key Laboratory of Hypoxic Translational Medicine (Grant No.KFKT202002) and the Natural Science Foundation of Inner Mongolia People's Hospital (Grant No.2019YN09)

*Corresponding author. Tel: +86-15389816911, E-mail: yuanyao129@imu.edu.cn

Smad3 was verified by dual-luciferase reporter system, real-time quantitative PCR, Western blot, CCK-8 and live/dead cell assay. The results showed that Smad3 is a novel target of miR-32-3p, and miR-32-3p is upregulated in SK-N-SH OGD/R model. CCK-8 assay demonstrated that cell viability was significantly decreased in sh-Smad3 and miR-32-3p-inhibitor+sh-Smad3 groups, compared with miR-32-3p inhibitor control and shNC groups. Subsequently, these results were further supported by the live/dead cell vitality assay. The more dead cells represented by red fluorescence were observed in sh-Smad3 and miR-32-3p-inhibitor+sh-Smad3 groups, compared with those in inhibitor NC and shNC groups. Compared with the SK-N-SH cells, the Lats2, Yap/Taz, and Smad3 levels were observed to decrease in OGD/R cells. These results indicated that lacking Smad3 might inhibit cell viability. These results suggest that Smad3, Lats2 and Yap/Taz in Hippo signaling pathway may jointly regulate cell vitality.

Keywords oxygen and glucose deprivation/reperfusion; miR-32-3p; Smad3; Hippo signaling pathway; vitality

急性缺血性脑卒中 (acute ischemic stroke, AIS) 是一种常见的脑卒中类型^[1]。在世界范围内, 脑缺血损伤造成大量患者死亡或残疾, 在脑缺血相关疾病中, 以缺血性脑卒中最为常见。在中国, 卒中患者约有1 100万, 每年增加240万, 并且每年还有约110万人死于脑卒中^[2]。有许多因素都与脑卒中的发病密切相关, 包括基础身体素质如年龄、性别、种族; 不良生活习惯如吸烟和饮酒; 基础疾病如高血压、高脂血症、糖尿病和高尿酸; 也包括外力、血管变性、血栓性或血栓栓塞性动脉闭塞^[3]。目前, AIS公认的治疗方案是尽早恢复或重建血液再灌注, 但缺血再灌注过程还是和缺血过程一样会造成组织损伤, 最终诱发神经细胞凋亡或坏死, 即脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI)。对脑组织而言, 这些病理反应产生的损伤却是永久性的。因此, 如果能及时干预, 减少脑缺血过程中的损伤, 无疑是一种良好的策略, 更有利于预后。如果我们想更有效地治疗AIS, 就必须首先阐明CIRI在脑组织细胞中的机制。CIRI的发病机制主要涉及细胞能量衰竭、谷氨酸兴奋毒性、氧化应激、细胞凋亡、钙超载、酸中毒、炎症反应、血脑屏障损伤、自由基过量产生、线粒体功能障碍、硝化应激等。近几年来, 关于miR-32-3p的研究也很多, 比如可以调控动脉粥样硬化斑块稳定性, 调控微栓塞和微血管阻塞引起的心肌损伤^[4]。在很多癌症中都有miR-32-3p的研究, miR-32-3p能够抑制多发性骨髓瘤增殖, 显示出潜在的抑癌作用^[5]; miR-32-3p在乳腺癌^[6]和前列腺癌^[7]中也有研究。本文利用氧糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation and reperfusion, OGD/R) 诱导的SK-N-SH细胞, 探讨miR-32-3p/Smad3轴调控细胞活力的缺血/再灌注损伤机制。

我们前期研究发现, 与健康对照组相比, AIS患者血清中的miR-32-3p水平升高了约3.28倍。miR-32-3p可能参与脑缺血损伤、再灌注损伤和脑缺血后细胞凋亡^[8], 并且也有研究表明miR-32-3p在缺血性脑卒中患者的全血组织中呈高表达^[9]。我们还根据生物信息学的提示发现, miR-32-3p可能靶向作用于Smad3蛋白。既往研究发现, RGMa在脑缺血/再灌注损伤大鼠模型中促进反应性星形胶质细胞增殖和胶质瘢痕形成, 这依赖于TGFβ1/Smad2/3信号通路^[10]。另一项研究证实, TGFβ1/Smad3信号通路可抑制CIRI大鼠模型脑细胞凋亡^[11]。2020年, 在探索动脉粥样硬化与Smads信号通路之间关系的过程中, 我国研究人员发现Smads信号通路的激活程度与脑损伤程度呈正相关, 敲低miR-17-5p可增强Act A/Smads信号环在缺血性损伤后的神经保护作用^[12]。因此, 我们有理由讨论Smad3与CIRI之间的关系。此外, 对于Smad3蛋白的激活是否能促进或抑制CIRI的发病机制, 目前存在不同的观点。在本研究中, 我们希望以SK-N-SH神经母细胞瘤细胞及其OGD/R细胞模型为研究对象来阐明上述问题。本研究以miR-32-3p为线索, 研究miR-32-3p/Smad3调控轴对细胞迁移、增殖和活性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人神经母细胞瘤细胞系SK-N-SH, 来自武汉普罗赛尔生物技术有限公司(保存机构: ATCC、HTB-11 ECACC、86012802)。

1.1.2 主要试剂 无血清和无葡萄糖培养基、DMEM(dulbecco's modified eagle medium)培养基、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)

购自Gibco公司; Opti-mem、Trizol、TransStart Tip Green qPCR SuperMix试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司; Mir XTM miRNA第一链合成试剂盒、Mir XTM miRNA qRT PCR SYBR[®]试剂盒购自美国Clontech公司; cDNA合成试剂盒(+gDNA-wiper)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 模拟物和抑制剂由上海吉玛制药技术有限公司合成; 双荧光素酶报告系统检测试剂盒、RIPA裂解液、Western blot及蛋白提取相关试剂、二抗辣根过氧化物酶标记IgG(H+L)山羊抗兔(货号: A0208)购自上海碧云天生物技术有限公司; 一抗Smad3(1:1 000, 小鼠抗人, 目录号66516-1-Ig)、Yap1(1:1 000, 兔抗人, 目录号13584-1-AP)、Taz(1:1 000, 小鼠抗人, 目录号66500-1-Ig)、Lats2(兔抗人, 1:1 000, PTG, 目录号20276-1-AP)、BCA蛋白质分析试剂盒购自Protein-tech公司; GAPDH(1:1 000, 兔抗人, 目录号AP0063)购自Bioworld公司; HRP Substrate kit购自美国GE公司; PBS缓冲液、Live-Dead Cell Staining Kit购自中国BioSharp公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染 对培养的SK-N-SH细胞进行氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)^[13]。使用无血清和无葡萄糖培养基, 在37 °C的缺氧培养箱(1% O₂、94% N₂、5% CO₂)中培养。葡萄糖和氧气剥夺3 h后, 使用含有10% FBS的DMEM培养基, 并在含有5% CO₂-95%的空气中复氧24 h。将适量的SK-N-SH细胞接种于6孔板中。当聚合度达到50%时, 转染Smad3 shRNA质粒和miR-32-3p模拟物。转染前2 h改变Opti-mem, 使细胞适应转染环境, 消除青霉素和胎牛血清的干扰。2 h后, 将转染系统添加到培养皿/平板中。6 h后, 更换培养基, 继续培养48 h, 进行后续实验。shRNA表达载体为pGPH1/GFP/Neo。具体如下, shNC: pGPH1/GFP/Neo-shGAPDH-Homo, 靶序列: 5'-GTA TGA CAA CAG CCT CAA G-3'; sh-Smad3: pGPH1/GFP /Neo-Smad3-Homo, 靶序列: 5'-GCA ACC TGA AGA TCT TCA ACA-3'。

1.2.2 miRNAs和总RNA的提取和反转录 TriRzol用于从细胞中提取总RNA, 然后通过Mir XTM Mir-XTM miRNA第一链合成试剂盒反转录成cDNA。miRNA反转录采用加尾法, 引物为5'-GCC GCG CAA TTT AGT GTG TGT GAT AT-3'。HiScript II第一链cDNA合成试剂盒(+gDNA-wiper)用于反转录总

RNA。

1.2.3 miRNA和mRNA实时定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 按照miR XTM miRNA qRT PCR SYBR[®]试剂盒或TransStart Tip Green qPCR SuperMix试剂盒的步骤, 使用qRT-PCR检测miR-32-3p或Smad3 mRNA的表达。用于扩增miR-32-3p的引物为F': 5'-CGC GCA ATT TAG TGT GTG TG-3'和R': 5'-AGT GCA GGG GTC CGA TT-3'。用于扩增Smad3的引物为F': 5'-TGC GGC TCT ACT ACA TCG C-3'和R': 5'-TGG TAC ATT CGC GGC T-3'。用于扩增Lats2的引物为F': 5'-TCC TTG TGC CTT GCT AAT G-3'和R': 5'-CAT CCT GCG TTC AGC AGT TCC-3'。qRT-PCR实验中包含目的基因miR-32-3p和Smad3两种, 其中miR-32-3p基因的内参基因为U6, Smad3基因的内参基因为 β -actin。human β -actin F': 5'-TTA GTT GCG TTA CAC CCT TTC-3'和R': 5'-ACC TTC ACC GTT CCA GTT T-3'; human U6 F': -3'5'-TCG CTT CGG CAG CAC ATA TAC-3'和R': 5'-GCG TGT CAT CCT TGC GCA G-3'。通过2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法计算相对水平, 每个样品独立重复3次。

1.2.4 生物信息学分析 蛋白质的基因本体(GO)分析注释可分为三类: 生物过程、细胞组成和分子功能。Fisher精确检验用于检测差异表达蛋白。在已鉴定蛋白质的背景下, GO富集试验的P值小于0.05被认为是显著的。路径富集分析: 使用京都基因和基因组百科全书(KEGG)数据库进行路径富集分析。Fisher精确检验用于检测差异表达蛋白。在已鉴定蛋白质的情况下, 路径富集试验中小于0.05的P值被认为是显著的。最后, 根据KEGG网站频道级别分类方法, 对这些频道进行分类。KEGG气泡图由在线软件(<https://www.omicshare.com/tools/Home/Soft/seniorbubble>)制作。

1.2.5 双荧光素酶报告实验 利用TargetScan软件预测miR-32-3p下游靶基因, 筛选miR-32-3p与Smad3的结合位点。构建了含有Smad3 3'-非翻译区(untranslated region, UTR)潜在结合位点的荧光素酶报告基因载体, 包括野生型Smad3 3'-UTR和突变型Smad3 3'-UTR。将Smad3-WT和Smad3-MUT分别与miR-32-3p模拟物、miR-32-3p抑制剂及其阴性对照物共转染SK-N-SH细胞。模拟物和抑制剂由上海吉玛制药技术有限公司合成。转染48 h后, 丢弃培养基, 用PBS洗涤细胞3次。按照双荧光素酶报告系统检

测试试剂盒的指示收集细胞,并检测细胞内荧光素酶活性。

1.2.6 蛋白质印迹 用RIPA裂解液从细胞中分离总蛋白。使用BCA蛋白质分析试剂盒测定蛋白质样品的浓度。样品煮沸20 min,然后在120 V下通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳后,将蛋白在4 °C用半干转膜法转到PVDF膜上,300 mA恒流90 min。PVDF膜在室温下用封闭溶液(含5%脱脂乳的TBST溶液)密封1 h。一抗用封闭溶液稀释,然后在室温下培养2 h或4 °C过夜。用TBST清洗膜3次,每次10 min。二抗用封闭溶液稀释,并在室温下与PVDF膜孵育1 h。洗涤后,使用HRP Substrate kit显示蛋白条带,并应用Image Pro Plus 3.0软件分析相对蛋白质水平。

1.2.7 CCK-8 将SK-N-SH细胞悬浮液(1×10^3 个/200 μ L)接种到96孔板中,每个样品5个重复。当细胞聚合度达到50%时,转染shRNA质粒或miR-32-3p。然后,将培养基换回完整培养基,每两天更换1次培养基。每24 h加入20 μ L/孔CCK-8试剂,并在培养箱中培养1.5 h。在450 nm的EPOC波长下检测每个孔的吸光度(D)值。

1.2.8 活/死细胞检测 首先,将适量的SK-N-SH细胞接种于覆盖有爬板的12孔培养皿中,并在恒温细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养。当细胞聚合度达到50%时,转染shRNA质粒或miR-32-3p。转染6 h后,更换新鲜完整培养基并培养48 h。去除培养基后,用1 \times PBS缓慢冲洗细胞3次,然后用Live-Dead Cell Staining Kit染色。染色时间为30 min,然后用1 \times PBS洗涤细胞,密封,用激光共聚焦显微镜观察并拍照。

1.2.9 统计分析 本文中的所有显著性分析均采用Graphpad Prism 8.0软件进行。使用VNOVA检验和Dunnnett多重比较检验分析数据的显著性。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$ 、 $***P < 0.001$ 和 $****P < 0.0001$ 被认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 Smad3是miR-32-3p的新靶点

使用生物数据库TarBase、TargetScan和miR-Walk预测miR-32-3p的靶基因,然后将3个数据库的预测结果进行交叉(图1A)。利用David数据库对目标基因进行注释。结果表明,miR-32-3p可能通过Hippo信号通路参与脑缺血损伤、再灌注损伤和脑

缺血后的细胞凋亡(图1B和图1C)。

2.2 miR-32-3p在SK-N-SH OGD/R模型中上调

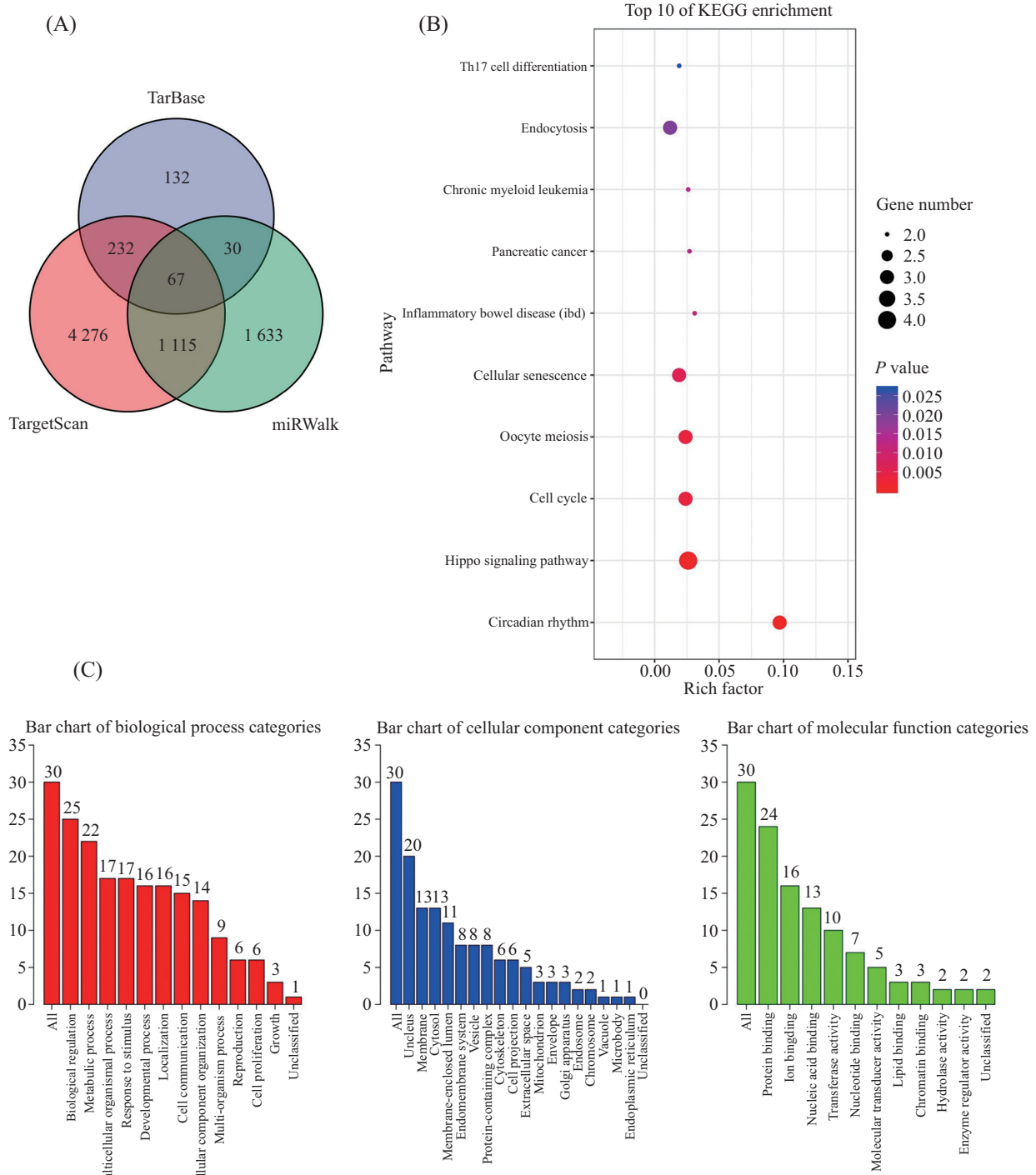
我们之前已经证明,miR-32-3p在AIS患者中高度表达^[8]。在此,我们还发现miR-32-3p可能通过Hippo途径发挥作用。因此,我们需要研究miR-32-3p的调节机制。首先,我们构建了SK-N-SH的氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)模型。在葡萄糖和氧剥夺3 h后,使用含10% FBS的DMEM培养基,在含5% CO₂-95%的空气中复氧24 h。在氧和糖剥夺后,细胞形态发生变化,细胞漂浮和坏死。OGD/R后,细胞的生长速度明显低于正常细胞,细胞的增殖能力和生存能力显著下降(图1)。然后,收集细胞进行miR-32-3p水平检测。我们发现,OGD/R-3h细胞中的miR-32-3p水平显著高于SK-N-SH细胞(图2C),这与我们之前的结果一致^[8]。然后,我们检测转染不同模拟物的OGD/R-3h细胞中miR-32-3p的水平(图2D),这符合我们的预期。然后我们利用OGD/R-3h细胞模型进行后续研究,以探讨miR-32-3p/Smad3诱导CIRI的机制。

2.3 miR-32-3p影响Smad3的转录和表达

在Hippo信号通路中发现目标基因Smad3。使用SK-N-SH细胞,通过双荧光素酶报告基因分析分析miR-32-3p对Smad3 mRNA 3'-UTR活性的影响(图3A)。这些结果表明,与NC miRNA相比,miR-32-3p处理后,Smad3的3'-UTR荧光素酶活性降低了57.9%(图3B)。相反,Smad3的3'-UTR突变后,miR-32-3p处理并不能改变双荧光素酶活性,表明miR-32-3p可以直接结合Smad3的3'-UTR并抑制其活性。根据验证结果,miR-32-3p的直接靶点是Smad3。接下来,我们想探究miR-32-3p是否会影 响SK-N-SH细胞中Smad3的相对表达水平和蛋白水平。与阴性对照组(NC)相比,过表达miR-32-3p的细胞中Smad3 mRNA水平显著降低(图3C),蛋白质水平也降低(图3D)。与转染抑制剂NC的细胞相比,转染miR-32-3p抑制剂的细胞中Smad3的mRNA和蛋白质水平均增加。这些结果表明,miR-32-3p与Smad3的3'-UTR相互作用,影响Smad3基因的转录和表达。

2.4 miR-32-3p/Smad3轴对OGD/R细胞活性的影响

在之前的实验中,我们证实miR-32-3p可以靶向并调节Smad3的表达。因此,我们进一步探讨了miR-32-3p/Smad3调节轴在缺血再灌注损伤进展中的作用。OGD/R细胞根据转染质粒或模拟物分为五



A: Venn图显示miR-32-3p预测靶基因之间存在重叠的mRNAs。B: KEGG分析靶基因的收集。C: miR-32-3p靶基因的基因本体分析: 生物过程、细胞组成和分子功能。

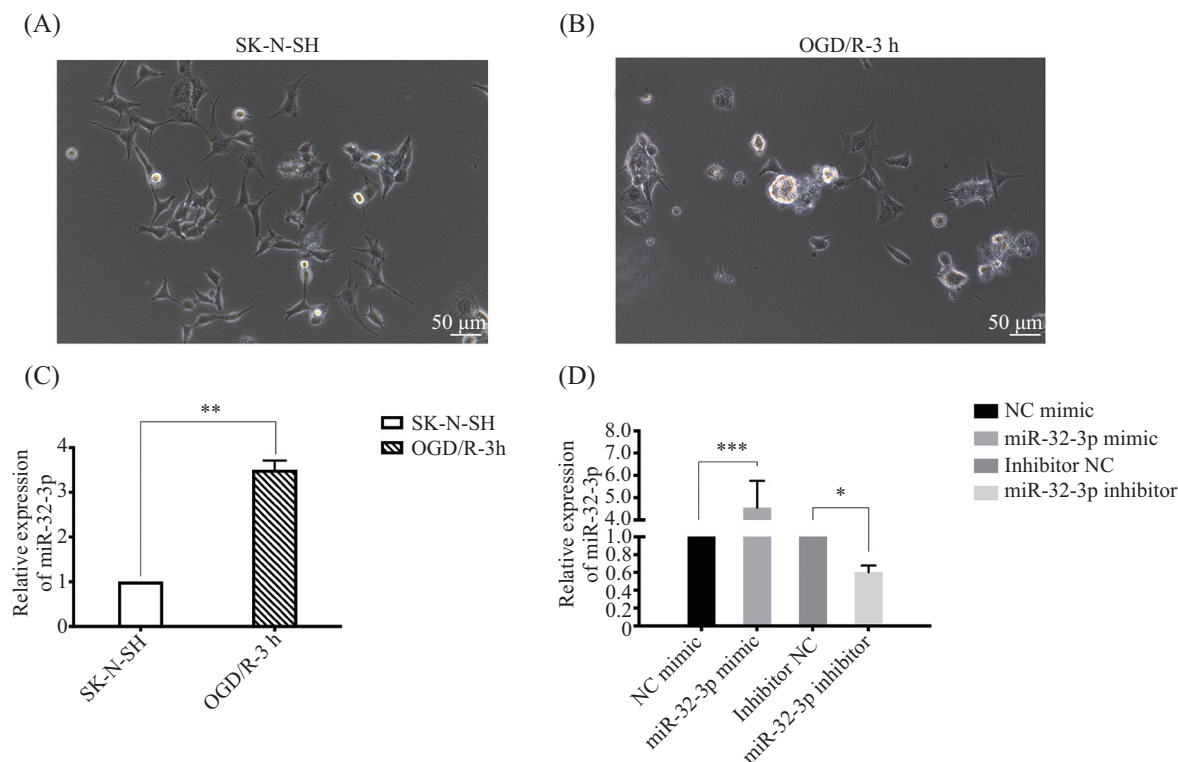
A: Venn diagram showed the overlapping mRNAs among the predictive target genes of miR-32-3p. B: collection of target genes by KEGG analysis. C: gene ontology analysis of miR-32-3p target genes: biological process, cell composition, and molecular function.

图1 Hippo信号通路中的Smad3是miR-32-3p的直接靶点

Fig.1 Smad3 is a direct target of miR-32-3p in Hippo signaling pathway

组: miR-32-3p抑制剂对照组、miR-32-3p抑制剂组 (Smad3增加)、shNC组、sh-Smad3组(Smad3减少)和 miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组 (Smad3减少)。目的是模拟体外Smad3水平的升高或降低。在检测细胞

活力之前, 先进行qRT-PCR以确定转染效率。与抑制剂对照组相比, miR-32-3p抑制剂组和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组的miR-32-3p水平显著降低, 而Smad3在sh-Smad3组和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3



A: 20倍显微镜下观察正常细胞。B: OGD/R后SK-N-SH细胞的形态学变化。C: qRT-PCR检测OGD/R细胞miR-32-3p水平。D: OGD/R细胞被转染不同mimic后,采用qRT-PCR检测miR-32-3p水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: normal cells were observed under a 20 \times microscope. B: morphological changes of SK-N-SH cells after OGD/R. C: qRT-PCR was used to detect the levels of miR-32-3p in OGD/R cells. D: after OGD/R cells were transfected with different mimics, the level of miR-32-3p was detected by qRT-PCR. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图2 缺氧和葡萄糖剥夺/再灌注后正常SK-N-SH细胞的变化

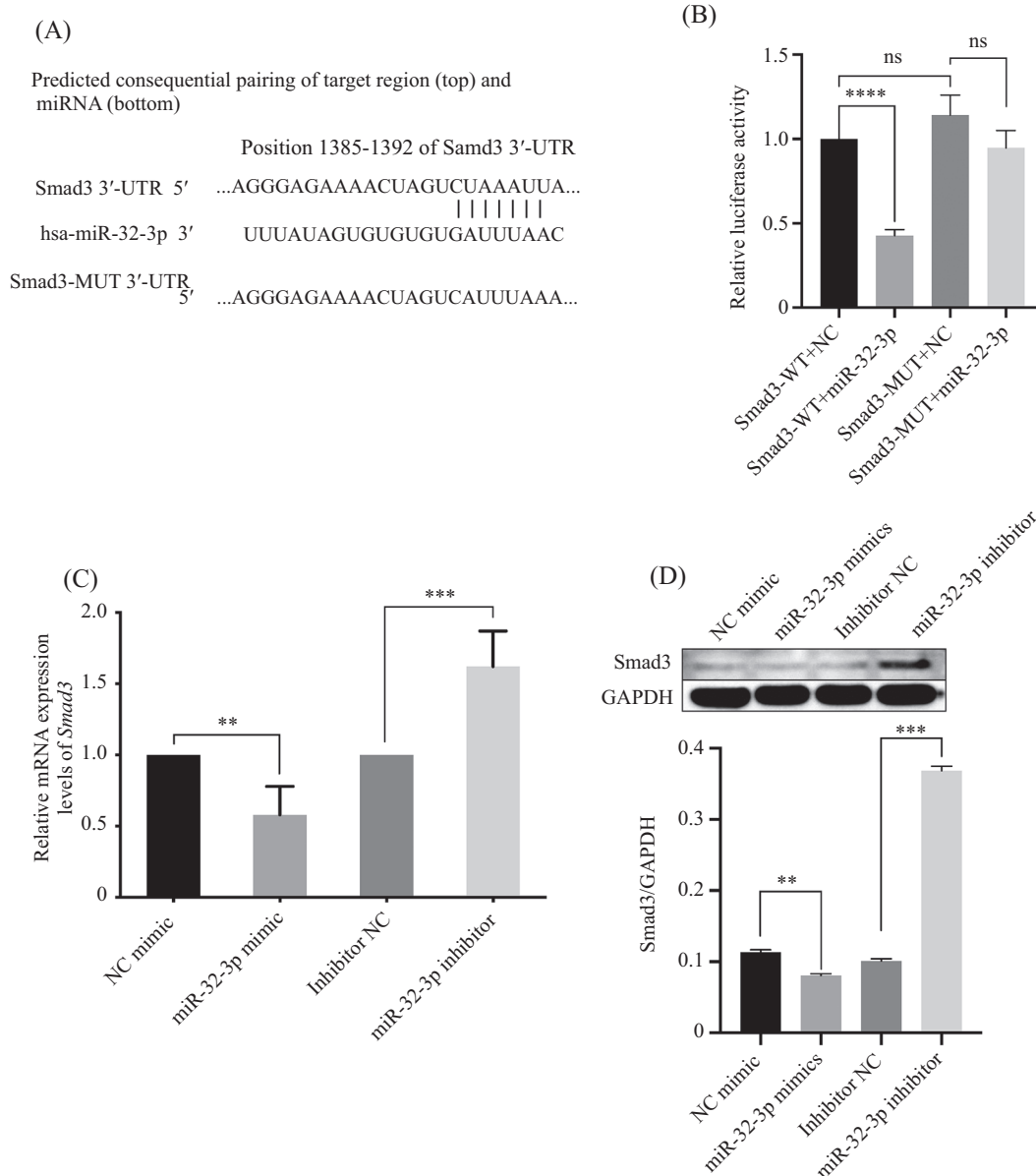
Fig.2 Changes in normal SK-N-SH cells after oxygen and glucose deprivation/reperfusion

组中也显著低于shNC组(图4A和图4B)。随后,对细胞的生物学行为进行分析。CCK-8分析表明,与miR-32-3p抑制剂对照组和shNC组相比,sh-Smad3组和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组的细胞活力显著降低(图4C)。当细胞中miR-32-3p水平受到抑制时,与sh-Smad3组和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组相比,细胞活力增强(图4C)。然而,这一增长并未达到野生型水平。这可能与Smad3的翻译水平有关。这些结果进一步得到了活/死细胞活力测定的支持。与抑制剂NC和shNC组相比,在sh-Smad3组和miR-32-3p抑制剂+sh-Smad3组中观察到更多红色荧光代表的死亡细胞(图4D)。综上所述,这些结果表明缺乏Smad3可能会抑制细胞活力。

2.5 Smad3与Hippo信号通路的Lats2和Yap/Taz共同作用影响缺血再灌注损伤

Lats2、Yap和Taz是Smad3的上游蛋白。接下来,我们想检测在OGD/R损伤过程中Lats2-Yap/Taz轴和Smad3之间的关系。在OGD/R细胞中用Western blot

检测Lats2、Yap、Taz和Smad3的表达。与SK-N-SH细胞相比,观察到OGD/R细胞中Lats2、Yap/Taz和Smad3水平降低(图5A~图5D)。我们的结果与之前的研究人员的结论一致,他们认为OGD/R激活了Hippo信号通路,相应降低了Yap和Taz蛋白的水平。与OGD/R组相比,OGD/R抑制剂组和OGD/R-miR-32-3p抑制剂组的Yap/Taz水平均未发生变化(图5C-D)。这些结果表明,Yap/Taz的表达水平不受miR-32-3p的影响,而受OGD/R刺激的影响。与OGD/R组相比,OGD/R-miR-32-3p抑制剂组的Lats2水平下降(图5B)。虽然通过生物信息学分析发现,miR-32-3p可能靶向Lats2基因(图6A),但qRT-PCR结果并不支持这种预测(图6B)。因此,这种降低可能不是由miR-32-3p调节引起的。我们还发现,与OGD/R细胞相比,SK-N-SH和OGD/R-miR-32-3p抑制剂细胞的Smad3水平升高(图5E)。这些结果表明,miR-32-3p调控的Smad3可能与Hippo信号通路中的Lats2和Yap/Taz共同参与OGD/R损伤过程。



A: miR-32-3p在*Smad3*上的预测结合位点。B: 进行双荧光素酶报告子分析以验证miR-32-3p和*Smad3*之间的靶向关系。C: qRT-PCR检测*Smad3*的表达。D: Western blot检测NC模拟物、miR-32-3p模拟物、抑制剂NC和miR-32-3p抑制剂组中*Smad3*的相对水平。^{ns} $P>0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$, ^{****} $P<0.0001$ 。

A: the predicted binding sites of miR-32-3p on *Smad3*. B: double-luciferase reporter analysis was performed to verify the targeting relationship between miR-32-3p and *Smad3*. C: the expression of *Smad3* was detected by qRT-PCR. D: the relative levels of *Smad3* in NC mimics, miR-32-3p mimics, inhibitor NC and miR-32-3p inhibitor groups were detected by Western blot. ^{ns} $P>0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$, ^{****} $P<0.0001$.

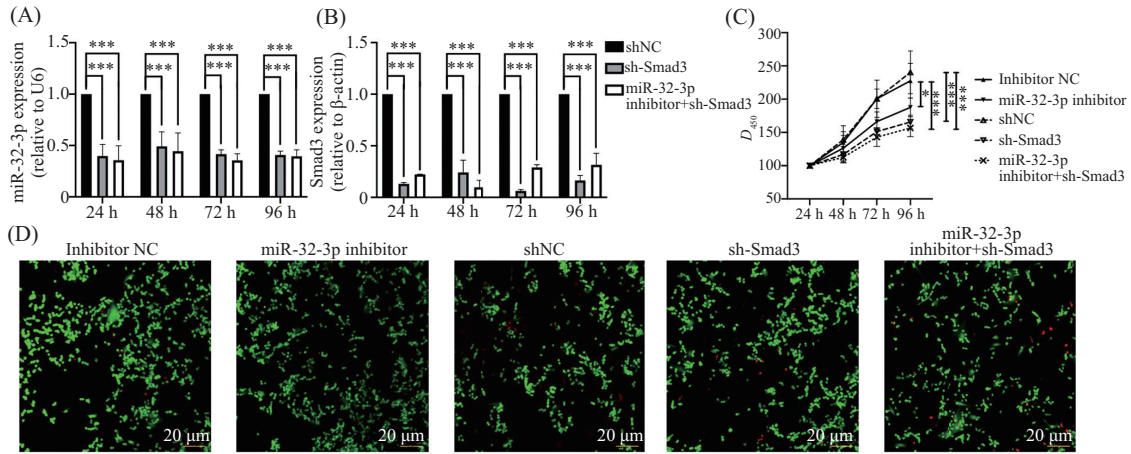
图3 miR-32-3p影响*Smad3*的转录和表达

Fig.3 miR-32-3p affects the transcription and expression of *Smad3*

3 讨论

Hippo信号通路是一种进化保守的信号级联, 调节许多生物学过程, 包括细胞生长和命运决定、器官大小控制和再生。Hippo通路在哺乳动物中的核心包括一个激酶级联MST1/2和Lats1/2, 以及下游效应子转录辅激活子Yap和Taz^[14]。Hippo信号通路与许多缺血性疾病的病理生理过程有关。它主要通

过Yap/Taz调节细胞增殖、凋亡和分化, 从而控制器官大小和组织发育动态平衡^[15]。近年来的研究发现, Hippo信号通路在神经干细胞的增殖和分化、神经前体细胞的增殖、胶质细胞的分化和激活、髓鞘的发育、神经细胞的分化以及神经系统疾病的发生和发展中起着重要作用^[16]。此外, 其他研究证实了Hippo/Yap信号通路在脑缺血/再灌注损伤中下调, 上调Hippo/Yap

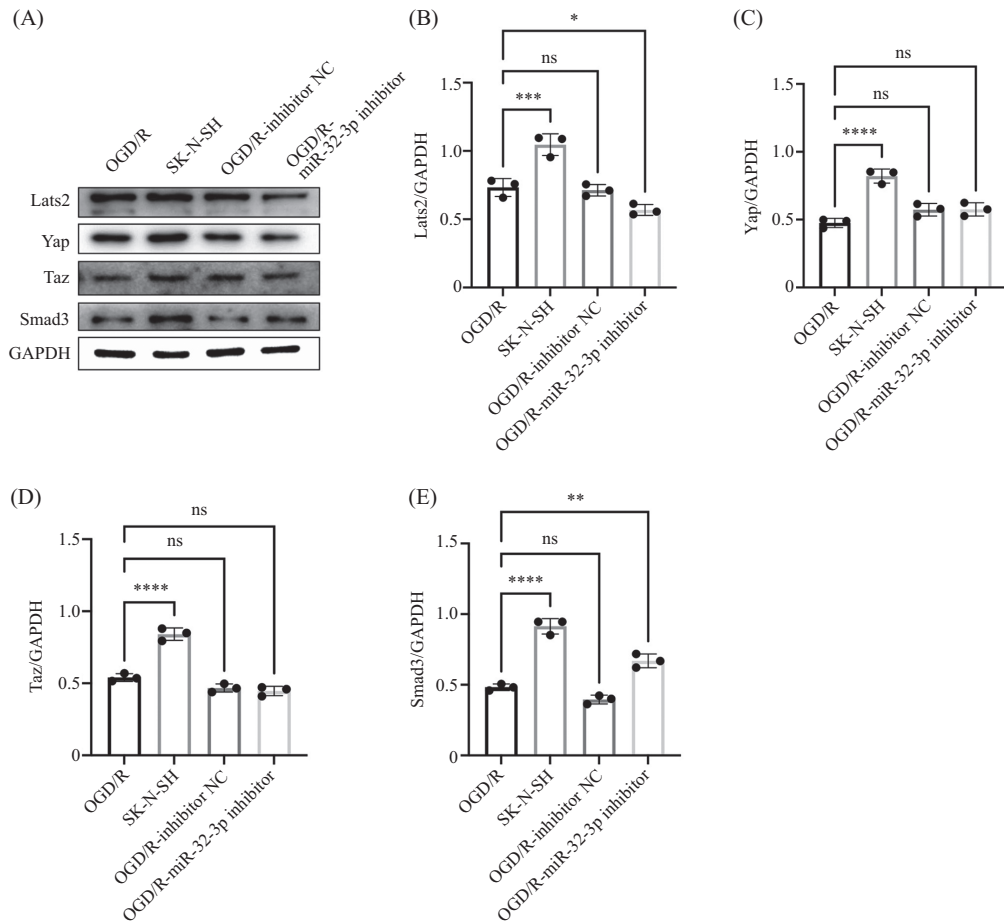


A: 转染后检测miR-32-3p水平。B: 检测转染后Smad3的表达。C: CCK-8细胞活性评估。D: 检测活死细胞。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

A: the levels of miR-32-3p were detected after transfection. B: the expression of Smad3 after transfection was detected. C: evaluation of CCK-8 cell viability. D: detection of live/dead cells. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Cells were stained with live and dead cell kits.

图4 miR-32-3p/Smad3轴对OGD/R细胞活力的影响

Fig.4 Effects of the miR-32-3p/Smad3 axis on cell viability in OGD/R cell



A: Western blot检测Hippo信号通路中关键蛋白的水平。B: 相对于GAPDH的Lats2水平。C: 相对于GAPDH的Yap水平。D: 相对于GAPDH的Taz水平。E: 相对于GAPDH的Smad3水平。^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

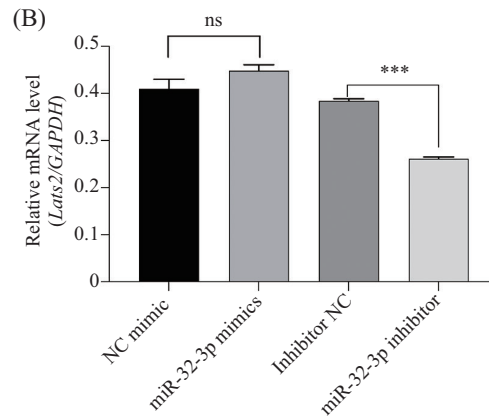
A: the levels of key proteins in the Hippo signaling pathway were detected by Western blot. B: Lats2 level relative to GAPDH. C: Yap level relative to GAPDH. D: Taz level relative to GAPDH. E: Smad3 level relative to GAPDH. ^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

图5 Smad3可能与Lats2和Hippo信号通路中的Yap/Taz共同作用于缺血再灌注损伤

Fig.5 Smad3 may function together with Lats2 and Yap/Taz of Hippo signaling pathway to affect ischemia-reperfusion injury

(A)

Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type
Position 100-106 of <i>Lats2</i> 3'-UTR hsa-miR-32-3p	5' ...AGGGCUGUUUUGUUUAAAUUAG... 3' UUUUAUAGUGUGUGAUUUUAAAC
Position 295-302 of <i>Lats2</i> 3'-UTR hsa-miR-32-3p	5' ...AUCCAUUUUUUCUUACUAAAUA... 3' UUUUAUAGUGUGUGAUUUUAAAC



A: 预测miR-32-3p在*Lats2*上的结合位点。B: 采用qRT-PCR检测NC mimic、miR-32-3p mimic、inhibitor NC和miR-32-3p inhibitor组的*Lats2*水平。^{ns} $P > 0.05$, ^{***} $P < 0.001$ 。

A: predicting the binding sites of miR-32-3p on *Lats2*. B: the levels of *Lats2* in NC mimic, miR-32-3p mimic, inhibitor NC, and miR-32-3p inhibitor groups were detected by qRT-PCR. ^{ns} $P > 0.05$, ^{***} $P < 0.001$.

图6 *Lats2*不是miR-32-3p的靶标

Fig.6 *Lats2* is not a target of miR-32-3p

信号通路对脑缺血/再灌注损伤具有神经保护作用^[17]。也有研究报道Smad3-Akt-Nrf2通路保护神经元,抑制神经炎症,从而减轻缺血性脑损伤^[18]。在我们的研究中,我们发现了miR-32-3p/Smad3轴对OGD/R细胞活力的关键作用的证据,并且OGD/R细胞中*Lats2*和Yap/Taz水平降低。基于这些结果,我们提出了miR-32-3p/Smad3在缺血再灌注损伤中的作用模型。如图7所示,当OGD/R时,Hippo信号通路处于“开启”状态。尽管*Lats2*水平降低,磷酸化的*Lats2*仍可能将磷酸基团转移到Yap/Taz。它启动磷酸化级联,导致Yap/Taz的细胞质保留。同时,由于OGD/R,miR-32-3p水平升高。miR-32-3p竞争性结合Smad3,最后,无法形成Yap/Taz-Smad3复合物。当Hippo信号通路在SK-N-SH细胞中保持“关闭”状态时,Yap/Taz仍然未磷酸化,并自由地在细胞核内定位。此时,miR-32-3p的水平非常低,Smad3的含量保持在较高水平。然后,Yap/Taz-Smad3复合体可以调控促细胞活力相关基因的表达。

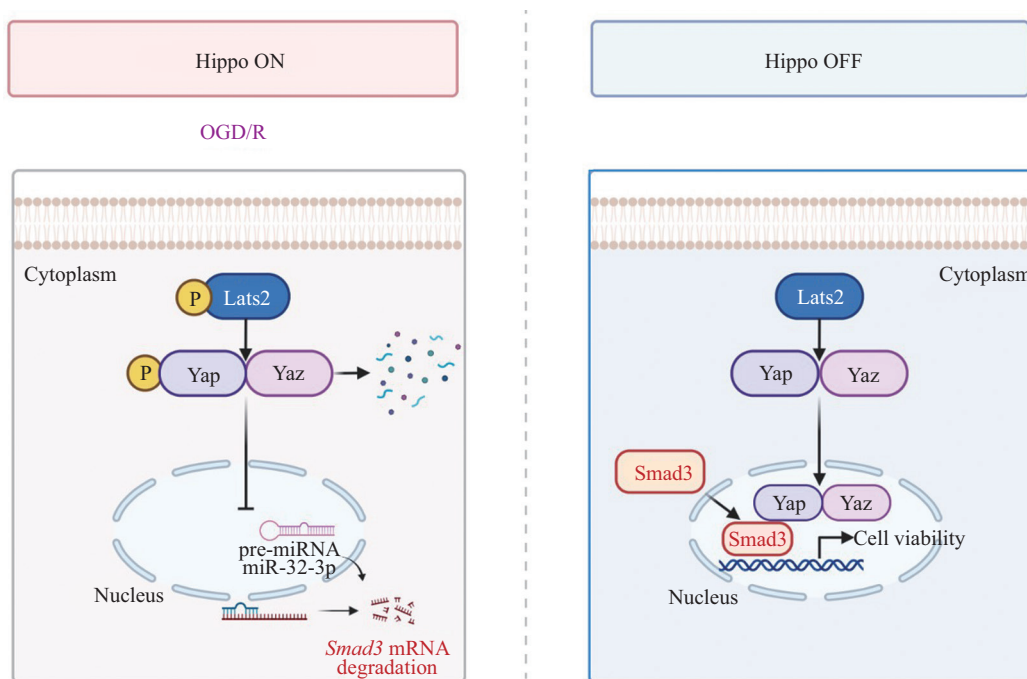
根据我们的结果,我们推测Smad3在OGD/R损

伤过程中是一种“良好”的蛋白质。但是,在与肾纤维化相关的研究中,TGF- β 1/Smad信号通路被证明可促进肾小球硬化和肾小管间质纤维化^[19]。实验运动中的Smad2和Smad3在动物模型和人肾纤维化中都被过度激活^[20]。在不同原因引起的肾纤维化模型中,敲除Smad基因可显著减轻肾纤维化的程度^[21]。在与肺纤维化相关的研究中,TGF- β /Smad3信号通路可以诱导肺纤维化^[22]。这些结果表明,Smad3具有致病性。因此,我们认为Smad3蛋白的功能取决于它所处的信号通路及与其相互作用的蛋白质。

综上所述,通过生物信息学发现并经过实验验证Smad3是miR-32-3p的新靶点,并且可能与Hippo信号通路中的*Lats2*和Yap/Taz共同调节细胞活力。Smad3可能成为改善OGD/R损伤的新的分子靶点,这也为miR-32-3p通过Hippo信号通路相关蛋白调节OGD/R损伤中细胞的活力提供了新的证据和思路。

参考文献 (References)

- [1] ALEJANDRO A, RINABINSTIN. Update on treatment of acute



当Hippo通路处于“关闭”状态时, Yap/Taz保持未磷酸化状态, 并自由定位在细胞核内, 在那里它通过Smad3转录促进细胞活力的基因。当Hippo通路被OGD/R“开启”时, 它启动一系列磷酸化, 导致Yap/Taz在细胞质中滞留。同时, 前miRNA(miR-32)在细胞核中被加工成成熟体(miR-32-3p), 分泌到细胞质中, 并与Smad3相互作用以控制其转录。最后, 细胞存活相关基因受到限制。

When the Hippo pathway is “OFF,” Yap/Taz remains unphosphorylated and localizes freely in the nucleus, where it transcribes genes that promote cell viability via Smad3. When the Hippo pathway is “ON” by OGD/R, it initiates a series of phosphorylation that results in Yap/Taz retention in the cytoplasm. Meanwhile, pro-miRNA (miR-32) is processed into mature body (miR-32-3p) in the nucleus, secreted into the cytoplasm, and interacts with Smad3 to control its transcription. Finally, genes involved in cell survival are restricted.

图7 miR-32-3p/Smad3在缺血再灌注损伤中的作用模型

Fig.7 A model of miR-32-3p/Smad3 function on ischemia-reperfusion injury

- ischemic stroke [J]. CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology, 2020, 26(2): 268-86.
- [2] WANG W Z, JIANG B, SUN H X, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480687 adults [J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-71.
- [3] GUZIK A, BUSHNELL C. Stroke epidemiology and risk factor management [J]. *Continuum*, 2017, 23(1): 15-39.
- [4] HUANG D J, LIU Y, GAO L, et al. MiR-32-3p regulates myocardial injury induced by microembolism and microvascular obstruction by targeting RNF13 to regulate the stability of atherosclerotic plaques [J]. *Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15(1): 143-66.
- [5] 石林, 张帅帅, 任翠爱. MiR-32-3p在多发骨髓瘤中的表达及其临床意义[J]. *转化医学杂志*(SHI L, ZHANG S S, REN C A. Expression of miR-32-3p in multiple myeloma and its clinical significance [J]. *Journal of Translational Medicine*), 2022, 11(2): 65-9.
- [6] FADAKA A O, SIBUYI N R S, MADIEHE A M, et al. MicroRNA-based regulation of aurora a kinase in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2020, 11(46): 4306-24.
- [7] SCARAVILLI M, KOIVUKOSKI S, GILLEN A, et al. miR-32 promotes MYC-driven prostate cancer [J]. *Oncogenesis*, 2022, 11(1): 11.
- [8] HAN B, YAO Y, GUO X L, et al. The study of serum microRNA 32-3p as potential noninvasive biomarker in the diagnosis of acute ischemic stroke [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2017, 39(11): 1430-4.
- [9] 赵永刚, 高洋, 刘欣. 缺血性脑卒中患者血清PTX3、Cat S、IL-17A及miR-32-3p水平及其临床意义[J]. *现代生物医学进展*(ZHAO Y G, GAO Y, LIU X. Serum levels of PTX3, Cat S, IL-17A and miR-32-3p in patients with ischemic stroke and their clinical significance [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2020, 20(6): 1070-4.
- [10] ZHANG R R, WU Y P, XIE F, et al. RGMA mediates reactive astrogliosis and glial scar formation through TGFβ1/Smad2/3 signaling after stroke [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2018, 25(8): 1503-16.
- [11] ZHU H P, GUI Q F, HUI X B, et al. TGF-β1/Smad3 signaling pathway suppresses cell apoptosis in cerebral ischemic stroke rats [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 366-7.
- [12] WANG J Q, DONG Y, LI S J, et al. Knockdown of microRNA-17-5p enhances the neuroprotective effect of Act A/Smads signal loop after ischemic injury [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(8): 1807-1.
- [13] HUANG Y X, DENG L S, ZENG L, et al. Silencing of H19 alleviates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-triggered injury through the regulation of the miR-1306-5p/BCL2L13 axis [J]. *Metab Brain Dis*, 2021, 36(8): 2461-72.
- [14] MA S, MENG Z, CHEN R, et al. The hippo pathway: biology and pathophysiology [J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88: 577-604.

- [15] SAHU M R, MONDAL A C. The emerging role of Hippo signaling in neurodegeneration [J]. *Neurosci Res*, 2020, 98(5): 796-814.
- [16] GONG P, ZHANG Z, ZOU C L, et al. Hippo/YAP signaling pathway mitigates blood-brain barrier disruption after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Behav Brain Res*, 2019, 356: 8-17.
- [17] PAVLOVA N N, THOMPSON C B. The emerging hallmarks of cancer metabolism [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(1): 27-4.
- [18] DING P, CHEN W, YAN X D. BMPER alleviates ischemic brain injury by protecting neurons and inhibiting neuroinflammation via Smad3-Akt-Nrf2 pathway [J]. *Neurosci Ther*, 2022, 28(4): 593-607.
- [19] LOPEZ-HEMANDEZ F J, LOPEZ-NOVOA J M. Role of TGF- β in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 141-5.
- [20] SAMARAKOON R, HELO S, DOBBERFUHL A D, et al. Loss of tumour suppressor PTEN expression in renal injury initiates SMAD3-and p53-dependent fibrotic responses [J]. *Pathol*, 2015, 236(4): 421-3.
- [21] DING H, ZHOU Y, HUANG H H. MiR-101a ameliorates AngII-mediated hypertensive nephropathy by blockade of TGF β /Smad3 and NF- κ B signalling in a mouse model of hypertension [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2019, 46(3): 246-5.
- [22] ELKIKI S M, MANSOUR H H, ANIS L M, et al. Evaluation of aromatase inhibitor on radiation induced pulmonary fibrosis via TGF- β /Smad 3 and TGF- β /PDGF pathways in rats [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2021, 31(7): 538-4.