miR-129-5p靶向SOX6对氧糖剥夺/复氧诱导的 神经细胞凋亡及氧化应激的影响

霍江涛 蔡津津 梁惠 郭功兵 张小乔* (湖北省十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院),老年医学科,十堰442000)

该研究旨在探究微小RNA-129-5p(miR-129-5p)靶向SRY-box转录因子6(SOX6)对氧糖 摘要 剥夺/复氧(OGD/R)诱导的神经细胞凋亡及氧化应激的影响。将人神经元细胞(SH-SY5Y细胞)分 为Control组、OGD/R组、miR-NC组、miR-129-5p mimics组、miR-129-5p mimics+pcDNA-NC组 和miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组,除Control组外,其余组细胞均进行OGD/R诱导。采用RTqPCR检测细胞中miR-129-5p和SOX6 mRNA表达量; CCK-8试剂盒检测细胞增殖率; 流式细胞术 检测细胞凋亡情况; ELISA试剂盒检测细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘 肽过氧化物酶(GPx)含量; H2DCFDA荧光探针检测细胞活性氧(ROS)水平; Western blot检测细胞中 SOX6、Caspase-3和NF-кB蛋白表达情况。研究结果得出,与Control组比较,OGD/R组细胞中miR-129-5p表达水平、细胞活性、SOD、CAT和GPx活性下降(P<0.05), SOX6mRNA表达水平、细胞凋 亡率、ROS水平、SOX6、Caspase-3和p-NF-кB/NF-кB蛋白表达水平上升(P<0.05);与OGD/R组比较, miR-129-5p mimics组细胞miR-129-5p表达水平、细胞活性、SOD、CAT和GPx活性升高(P<0.05), SOX6 mRNA表达水平、细胞凋亡率、ROS水平、SOX6、Caspase-3和p-NF-кB/NF-кB蛋白表达水 平降低(P<0.05); 与miR-129-5p mimics组比较, miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组细胞miR-129-5p表达水平、细胞活性、SOD、CAT和GPx活性下降(P<0.05), SOX6 mRNA表达水平、细胞凋亡 率、ROS水平、SOX6和p-NF-кB/NF-кB蛋白表达水平上升(P<0.05)。双荧光素酶报告基因实验证 实SOX6是miR-129-5p的靶基因。因此,过表达miR-129-5p可下调SOX6,从而减轻OGD/R诱导的神 经细胞凋亡及氧化应激。

关键词 微小RNA-129-5p; SRY-box转录因子6; 氧糖剥夺/复氧诱导; 神经细胞凋亡; 氧化应激

Effect of miR-129-5p on Neuronal Apoptosis and Oxidative Stress Induced by Oxygen Glucose Deprivation/Reoxygenation by Targeting SOX6

HUO Jiangtao, CAI Jinjin, LIANG Hui, GUO Gongbing, ZHANG Xiaoqiao*

(Department of Geriatrics, Taihe Hospital, Shiyan City, Hubei Province (Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine), Shiyan 442000, China)

Abstract The purpose of this study was to investigate the effect of microRNA-129-5p (miR-129-5p) targeting SOX6 (SRY-box transcription factor 6) on OGD/R (oxoglucose deprivation/reoxygenation)-induced apoptosis and oxidative stress in neuronal cells. Human neuronal cells (SH-SY5Y cells) were separated into control group, OGD/R group, miR-NC group, miR-129-5p mimics group, miR-129-5p mimics+pcDNA-NC group, and miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6 group. Except for the control group, all other groups were induced with OGD/R. RT-qPCR was applied to detect the expression levels of miR-129-5p and SOX6 mRNA in cells. CCK-8 assay kit was used to detect cell proliferation rate. Flow cytometry was used to detect cell apoptosis. ELISA kit was used to detect the levels of intracellular SOD (superoxide dismutase), CAT (catalase), and GPx (glutathione peroxidase). H2DCFDA fluorescent probe was applied to detect cellular ROS (reactive oxygen species) level. Western blot was applied to detect the expression of SOX6, Caspase-3, and NF-kB proteins in cells. The results of the study are derived compared with the control group, the expression of miR-129-5p, cell activity, SOD, CAT, and GPx activities in OGD/R group decreased (P < 0.05), while the expression of SOX6 mRNA, apoptosis rate, level of ROS, the expression of SOX6, Caspase-3, and p-NF- κ B/NF- κ B proteins increased (P<0.05). Compared with the OGD/R group, the expression of miR-129-5p, cell activity, SOD, CAT, and GPx activities in miR-129-5p mimics group increased (P<0.05), while the expression of SOX6 mRNA, apoptosis rate, level of ROS, the expression of SOX6, Caspase-3, and p-NF-kB/NF-kB proteins decreased (P < 0.05). Compared with the miR-129-5p mimics group, the expression of miR-129-5p, cell activity, SOD, CAT, and GPx activities in miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6 group decreased (P<0.05), while the expression of SOX6 mRNA, apoptosis rate, level of ROS, the expression of SOX6 and p-NF-κB/NF-κB proteins increased (P<0.05). Dual luciferase reporter gene experiment confirmed that SOX6 was the target gene of miR-129-5p. Therefore, overexpression of miR-129-5p can downregulate SOX6 and alleviate OGD/R-induced neuronal apoptosis and oxidative stress.

Keywords microRNA-129-5p; SRY-box transcription factor 6; oxygen glucose deprivation/reoxygenation induction; neuronal apoptosis; oxidative stress

急性脑梗死(acute cerebral infarction, ACI),临床 上也被称为脑动脉血栓形成,主要是指血液循环中 断后缺氧缺血状态引起的局部脑组织坏死的疾病, 其是临床神经内科常见且多发疾病,具有进展快、 预后不良、残疾率高和病死率高等特点^[1]。近年来, 研究表明ACI的机制可能与神经元凋亡、氧化应 激、兴奋性氨基酸神经毒性和脑组织代谢异常等有 关^[2]。目前ACI的治疗手段有限、昂贵、副作用大, 但治疗效果尚不明朗。因此,阐明ACI的病理生理 机制并寻找新的ACI治疗策略至关重要且紧迫。微 小RNA(miRNA)是一种小的非编码RNA,在许多疾病 的生理和病理过程中起着重要作用,其以非常稳定的 形式大量存在于体液(包括血清、血浆和尿液)中,反 映机体的病理生理状态^[3]。miRNA是细胞间通讯和 组织表达变化的重要调节因子,其中miR-129-5p在肿 瘤生长、转移等过程中发挥保护作用,参与各种疾病 的进展,如消化道癌症、神经退行性疾病及抑郁症[4]。 最近的研究表明, miR-129-5p对异氟醚诱导的认知功 能障碍大鼠神经具有缓解作用;其可作为阿尔茨海默 病病理和认知能力下降的生物标志物^[5-6]。SRY-box 转录因子 6(SRY-box transcription factor 6, SOX6)是 SOXD家族的重要成员,在机体组织稳态、再生和生

理学中起着不可或缺的作用。SOX6基因的异常表 达与多种疾病(包括糖尿病、心肌病、自身免疫性 疾病和高血压)有关^[7]。在小鼠模型中发现,SOX6通 过控制肾素和肾素原表达,对肾动脉狭窄期间的高血 压和肾损伤具有保护作用^[8]。研究指出,miR-499过表 达降低了SOX6和PDCD4的表达水平并减少了脂多糖 诱导的心肌细胞凋亡;miR-19a可通过下调SOX6表达 来减轻细胞缺氧/复氧损伤^[9-10]。基于此,本研究利用 氧糖剥夺/复氧(oxoglucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)诱导神经细胞损伤模型,旨在探索miR-129-5p靶向SOX6对OGD/R诱导的神经细胞凋亡及氧化 应激的影响,为临床治疗ACI的策略制定提供支持。

1 材料与方法

1.1 材料

人神经元细胞(SH-SY5Y细胞)购于武汉尚恩 生物技术有限公司;1%双抗(青/链霉素混合液)购于 北京索莱宝科技有限公司;10%胎牛血清购于浙江 天杭生物科技股份有限公司;DMEM培养基购于 美国ThermoFisher Scientific公司;RT-qPCR试剂 盒购于北京百迈客生物科技有限公司;CCK-8试剂 盒和Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购于上 海碧云天生物技术有限公司; ELISA试剂盒购于上 海威奥生物科技有限公司; ROS活性氧检测试剂 盒购于安徽白鲨生物科技有限公司; SOX6、Caspase-3、p-NF-κB、NF-κB和GAPDH一抗抗体购于 百奇生物科技(苏州)有限公司; 二抗购于上海优宁 维生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及模型构建 SH-SY5Y细胞用 DMEM培养基(含有1%双抗和10%胎牛血清)培养, 培养箱条件是:5% CO2、饱和湿度和温度37 °C。根 据细胞生长状态传代,以1:3的比例传代。取对数生 长期的细胞分组培养: Control组(正常培养不进行 任何处理)、OGD/R组(未转染质粒)、miR-NC组(转 染miR-NC质粒)、miR-129-5p mimics组(转染miR-129-5p mimics质粒过表达miR-129-5p)、miR-129-5p mimics+pcDNA-NC组(同时转染miR-129-5p mimics 和 pcDNA-NC质粒)和 miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组(同时转染miR-129-5p mimics质粒和过表 达SOX6的pcDNA-SOX6质粒)。除Control组外,其 余组在转染质粒48 h后构建OGD/R模型:将SH-SY5Y细胞置于无葡萄糖的DMEM培养基中,并在 37 °C下用94% N2、5% CO2和1% O2混合气体培养4 h, 随后换成正常DMEM培养基37 °C培养24 h, 再进行 后续实验。

1.2.2 实时荧光定量PCR检测 使用Trizol试剂盒 提取细胞中的总RNA,使用实时荧光定量PCR(RT-q PCR)试剂盒配制反应体系,并进行RT-qPCR扩增。 扩增程序:95°C预变性30s;95°C变性5s,60°C退 火30s,72°C延伸30s,40个循环。GADPH和U6作为 内源对照,使用2^{-ΔΔCt}方法计算相对表达水平。引物 序列见表1。 1.2.3 CCK-8试剂盒检测 各组细胞以密度5×10³个/孔 接种到96孔板中,于培养箱37 °C过夜培养,每孔加入
 10 μL CCK-8试剂溶液,培养箱37 °C孵育2 h,使用酶 标仪检测450 nm处吸光度(D)值,计算细胞活性。

1.2.4 流式细胞术检测 0.25%胰酶在 37 °C消化 各组细胞 5 min并获得细胞裂解物,使用 Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒,并根据制造商的说明书 将细胞与5 μL Annexin V-FITC和10 μL碘化丙啶染色 液在200 μL结合缓冲液中于室温下避光孵育15 min。 随后,通过流式细胞仪测定凋亡细胞率。

1.2.5 ELISA试剂盒检测 各组细胞800 r/min室温 离心5 min后收集,裂解后取上清液。按照ELISA试 剂盒说明书方法步骤检测氧化应激相关酶[超氧化 物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)]的活性。

1.2.6 荧光染色法检测细胞活性氧 各组细胞接种在12孔板(1×10⁵个/孔)中,37 °C过夜培养后,换成 含有50 μg/mL H₂DCFDA荧光探针的无血清培养基, 37 °C避光孵育40 min。用无血清培养基洗涤细胞3 次充分去除未进入细胞内的H₂DCFDA。通过荧光 显微镜观察绿色荧光强度,比较细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。

1.2.7 Western blot检测 提取各组细胞蛋白并定 量,等量的蛋白样品(30 μg)用10% SDS-PAGE凝胶分 离,然后转移到PVDF膜上。用含有0.1% TBST的5% 脱脂牛奶室温封闭2 h,之后膜与SOX6(1:1 500)、Caspase-3(1:1 500)、p-NF-κB(1:1 000)、NF-κB(1:1 500)和 GAPDH(1:2 000)一抗一起于4°C孵育过夜。随后, 将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:3 000)一起在 室温下孵育2 h,然后使用ECL检测试剂进行可视化

Table 1 RT-qPCR primer sequences		
基因名称	引物序列(5'→3')	
The name of the gene	Primer sequence $(5' \rightarrow 3')$	
miR-129-5p	F: GGC TTT TTG CGG TCT GG	
	R: CAG TGC GTG TCG TGG AGT	
SOX6	F: AGC TTC GGA TTG GGG AGT AT	
	R: GAG GCG ATG GTG TGG TAG TT	
<i>U6</i>	F: CTC GCT TCG GCA GCA CA	
	R:AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT	
GAPDH	F: AGG TCG GAG TCA ACG GAT TT	
	R: TGA CGG TGC CAT GGA ATT TG	

表1 RT-qPCR引物序列

蛋白质条带分析,使用 ImageJ对蛋白条带灰度值量化。

1.2.8 荧光素酶报告基因检测 TargetScan预测 miR-129-5p与 SOX6之间结合位点。然后将 SOX6野 生型 (WT)和突变型 (MUT)序列插入荧光素酶报告 载体,生成重组质粒,分别为WT SOX6或MUT SOX6。 将细胞培养在24孔板中,用Lipofectamine 2000将200 ng 荧光素酶报告质粒和 50 nmol miR-129-5p mimics或 miR-NC共转染至细胞中。

1.3 统计分析

使用SPSS 25.0软件对数据进行分析,结果表示 为平均值±标准差(x±s),采用单因素方差分析比较组 间差异。P<0.05为有统计学差异。

2 结果

2.1 SH-SY5Y细胞内miR-129-5p和SOX6 mRNA 表达水平变化

如表2所示,与Control组比较,OGD/R组miR-214-3p表达水平下降(P<0.05),SOX6 mRNA表达 水平上升(P<0.05);与OGD/R组比较,miR-129-5p mimics组miR-214-3p表达水平升高(P<0.05),SOX6 mRNA表达水平降低(P<0.05);与miR-129-5p mimics组比较,miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组 miR-214-3p表达水平下降(P<0.05),SOX6 mRNA表 达水平上升(P<0.05)。

2.2 SH-SY5Y细胞增殖率和凋亡率变化

如图1和表3所示,与Control组比较,OGD/R组 细胞活性降低(P<0.05),细胞凋亡率升高(P<0.05); 与OGD/R组比较,miR-129-5p mimics组细胞活性 上升(P<0.05),细胞凋亡率下降(P<0.05);与miR-129-5p mimics组比较,miR-129-5p mimics+pcDNA- SOX6组细胞活性降低(P<0.05),细胞凋亡率升高(P<0.05)。

2.3 SH-SY5Y细胞内SOD、CAT和GPx活性变化

如表4所示,在SH-SY5Y细胞中,与Control组比 较,OGD/R组SOD、CAT和GPx活性下降(P<0.05); 与OGD/R组比较,miR-129-5p mimics组SOD、CAT 和GPx活性上升(P<0.05);与miR-129-5p mimics组 比较,miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组SOD、 CAT和GPx活性下降(P<0.05)。

2.4 SH-SY5Y细胞内ROS水平变化

如图2和表5所示,与Control组比较,OGD/R组 细胞中荧光强度升高,ROS水平升高(P<0.05);与 OGD/R组比较,miR-129-5p mimics组细胞中荧光强 度减弱,ROS水平降低(P<0.05);与miR-129-5p mimics组比较,miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组细 胞中荧光强度升高,ROS水平升高(P<0.05)。

2.5 SH-SY5Y细胞内SOX6、Caspase-3和NF-κB 蛋白表达变化

如图3和表6所示,在SH-SY5Y细胞中,与Control组比较,OGD/R组SOX6、Caspase-3和NF-κB蛋 白表达上调(P<0.05);与OGD/R组比较,miR-129-5p mimics组SOX6、Caspase-3和NF-κB蛋白表达下调 (P<0.05);与miR-129-5p mimics组比较,miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组SOX6和NF-κB蛋白表达上 调(P<0.05)。

2.6 SH-SY5Y细胞内荧光素酶活性

如图4和表7所示,miR-129-5p和SOX6存在结合 位点。与miR-NC和WT-SOX6共转染组比较,miR-129-5p和WT-SOX6共转染组细胞中荧光素酶活性降 低(P<0.05);与miR-NC和MUT-SOX6共转染组比较, miR-129-5p和MUT-SOX6共转染组细胞中荧光素酶

	表2 miR-129-5p和SOX6 mRNA表达水平比较
Table 2	Comparison of mRNA expression levels of miR-129-5p and SOX6

组别 Group	miR-214-3p	SOX6
Control	$1.00{\pm}0.00$	$1.00{\pm}0.00$
OGD/R	0.44±0.06*	4.82±0.35*
miR-NC	$0.46{\pm}0.05*$	4.77±0.42*
miR-129-5p mimics	3.57±0.23* [#]	1.51±0.08* [#]
miR-129-5p mimics+pcDNA-NC	3.59±0.21* [#]	1.48±0.09* [#]
miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6	2.76±0.18* ^{#&}	4.06±0.33* ^{#&}

*P<0.05,与Control组比较; *P<0.05,与OGD/R组比较; *P<0.05,与miR-129-5p mimics组比较。n=6。

*P<0.05 compared with Control group; #P<0.05 compared with OGD/R group; &P<0.05 compared with miR-129-5p mimics group. n=6.



Fig.1 Flow cytometry of SH-SY5Y cells

	表3	SH-SY5Y细胞活性和凋亡率比较
Table 3	Compariso	on of activity and apoptosis rate of SH-SY5Y cells

	7 1 1		
组别	细胞活性/%	细胞凋亡率/%	
Group	Cell viability /%	Apoptotic rate /%	
Control	100.00±0.00	3.72±0.53	
OGD/R	34.11±3.89*	48.41±5.26*	
miR-NC	35.34±3.71*	45.22±5.87*	
miR-129-5p mimics	76.08±4.26* [#]	14.19±2.92* [#]	
miR-129-5p mimics+pcDNA-NC	75.30±4.05* [#]	15.94±2.88* [#]	
miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6	63.49±3.99* ^{#&}	33.01±4.14* ^{#&}	

*P<0.05,与Control组比较; *P<0.05,与OGD/R组比较; *P<0.05,与miR-129-5p mimics组比较。n=6。

*P<0.05 compared with Control group; #P<0.05 compared with OGD/R group; &P<0.05 compared with miR-129-5p mimics group. n=6.

表4 SOD、CAT和GPx活性比较			
Table 4 Comparison of SOD, CAT and GPx activities			
组别	SOD /LI·mI ⁻¹	CAT /II·mI ⁻¹	GPv /umol·L ⁻¹
Group	SOD /O IIIL	CATIONE	
Control	53.44±4.55	26.97±2.84	73.81±5.07
OGD/R	21.07±2.34*	11.47±1.50*	32.45±3.16*
miR-NC	20.41±2.22*	12.09±1.36*	34.18±3.28*
miR-129-5p mimics	42.59±3.84* [#]	21.87±2.04* [#]	59.53±4.07* [#]
miR-129-5p mimics+pcDNA-NC	43.66±3.67* [#]	21.65±2.19* [#]	60.41±4.83* [#]
miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6	33.95±3.02* ^{#&}	16.34±1.75* ^{#&}	47.44±3.66* ^{#&}

*P<0.05,与Control组比较; *P<0.05,与OGD/R组比较; *P<0.05,与miR-129-5p mimics组比较。n=6。

*P<0.05 compared with Control group; "P<0.05 compared with OGD/R group; "P<0.05 compared with miR-129-5p mimics group. n=6.



图2 SH-SY5Y细胞ROS荧光活性 Fig.2 ROS fluorescence activity of SH-SY5Y cells

	平均荧光强度		
Group	Mean fluorescence intensity		
Control	999.99±10.00		
OGD/R	2 879.26±50.41*		
miR-NC	2 764.73±53.72*		
miR-129-5p mimics	1 530.49±46.11* [#]		
miR-129-5p mimics+pcDNA-NC	1 605.80±44.73* [#]		
miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6	2 294.46±51.78* ^{#&}		

表5 ROS水平比较 Table 5 Comparison of ROS levels

*P<0.05,与Control组比较; *P<0.05,与OGD/R组比较; *P<0.05,与miR-129-5p mimics组比较。n=6。

*P<0.05 compared with Control group; #P<0.05 compared with OGD/R group; &P<0.05 compared with miR-129-5p mimics group. n=6.



A: Control组; B: OGD/R; C: miR-NC组; D: miR-129-5p mimics组; E: miR-129-5p mimics+pcDNA-NC组; F: miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组。 A: the Control group; B: OGD/R; C: the miR-NC group; D: the miR-129-5p mimics group; E: miR-129-5p mimics+pcDNA-NC group; F: the miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6 group.

图3 SH-SY5Y细胞中SOX6、Caspase-3和NF-кB蛋白条带 Fig.3 Protein bands of SOX6, Caspase-3 and NF-кB in SH-SY5Y cells

活性无显著差异(P>0.05)。

3 讨论

ACI是一种严重危害人类健康的神经系统疾病,

其死亡率仅次于癌症和心肌梗死。因此,ACI已成为公共卫生面临的重大挑战之一,其治疗选择包括降低颅内压、抗凝治疗和对原发疾病的治疗。然而,随着人们生活和工作习惯的改变,ACI的病因和发病

Table 6 Comparison of protein expressions of SOX6 and Caspase-3			
组别	SOV6	Cosposo 2	n NE vD/NE vD
Group	3070	Caspase-5	p-111'-KD/111'-KD
Control	$0.40{\pm}0.04$	0.24 ± 0.04	0.27 ± 0.02
OGD/R	$0.63 \pm 0.07*$	$0.61 \pm 0.08*$	0.93±0.11*
miR-NC	$0.65 \pm 0.08*$	$0.60{\pm}0.07*$	0.94±0.12*
miR-129-5p mimics	0.30±0.03* [#]	$0.38{\pm}0.05^{*^{\#}}$	$0.47{\pm}0.05^{*^{\#}}$
miR-129-5p mimics+pcDNA-NC	0.29±0.03* [#]	$0.40{\pm}0.05^{**}$	$0.51{\pm}0.06^{*\#}$
miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6	0.52±0.06* ^{#&}	$0.49{\pm}0.06^{*^{\#}}$	$0.85{\pm}0.09^{*\&}$

表6 SOX6和Caspase-3蛋白表达量比较 Fable 6 Comparison of protein expressions of SOX6 and Caspase-3

*P<0.05, 与Control组比较; [#]P<0.05, 与OGD/R组比较; [&]P<0.05, 与miR-129-5p mimics组比较。n=6。

*P<0.05 compared with Control group; ${}^{\#}P$ <0.05 compared with OGD/R group; ${}^{\&}P$ <0.05 compared with miR-129-5p mimics group. n=6.

SOX6: 5' UGUAAAUAGUUUAUCAAAAAA 3' I : : IIIIIII miR-129-5p: 3' CGUUCGGGGUCUGGCGUUUUUC 5' 图4 miR-129-5p和SOX6结合位点 Fig.4 Binding sites of miR-129-5p and SOX6

表7 荧光素酶活性比较

Table 7	Com	parison	of luciferase	activity

组别	WT SOV	MUT SOV6
Group	W 1-30A0	MU1-50X0
miR-NC	1.06±0.12	1.04±0.12
miR-129-5p	$0.50 \pm 0.05*$	$1.05 \pm 0.11^{\text{ns}}$

*P<0.05, nsP>0.05, 与miR-NC组比较。n=6。

*P < 0.05, ^{ns}P > 0.05 compared with miR-NC group. n=6.

机制复杂多样,传统的治疗方法无效。静脉溶栓是 ACI患者的首选治疗方法,在缺血再灌注过程(灌注 氧浓度突然升高)中,会迅速产生大量氧自由基,消 耗大量抗氧化物质^[11]。氧自由基与细胞生物膜中的 不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,导致脂质过氧 化物水平升高,抗氧化自由基损伤水平降低^[12]。证 据表明炎症、细胞凋亡和氧化应激可能在ACI中起 重要作用,通过这些来减轻ACI损伤可能是一种有 效的策略^[13]。但ACI预后不良现象(肢体功能障碍等) 很可能伴随患者一生,极大程度上降低了生活质量。 本研究采用 OGD/R诱导的神经细胞模拟体内ACI, 检测神经细胞的凋亡和氧化应激水平,能够更清晰 地探究ACI损伤机制。

miRNA是参与基因表达调控的内源性小非编码RNA,作为细胞内RNA,其通过与mRNA的3'非翻译端结合,在转录后水平负向调节基因表达,并因其作为治疗靶点的潜力而成为热门话题^[14]。miRNA通

过控制炎症反应和神经损伤在神经系统疾病中起着 至关重要的作用,报道称miRNA-192-5减轻大脑中 动脉闭塞小鼠的脑损伤,抑制神经元凋亡和神经炎 症^[15]。临床数据显示, miR-129-5p在ACI患者血清中 低表达,随病情好转而升高,因此,低水平miR-129-5p 是ACI患者预后危险因素^[16]。SOX6是神经分化相关 的一种关键基因,可以调节多巴胺神经元的特异性, 控制新皮层发育过程中的神经元之间多样性[17]。研 究发现, SOX6过表达恢复了小鼠胚胎干细胞的神经 分化;在大脑动脉闭塞手术后,CHRF和SOX6与miR-126竞争结合以调节缺血性神经元死亡[18-19]。心肌缺 血时, miR-202-5p表达水平升高可能通过下调 SOX6 来抑制PI3K/AKT/FOXO3a通路的激活,从而加重心 肌缺血引起的损伤^[20]。本研究结果显示,与Control 组细胞相比,经OGD/R诱导的神经细胞miR-129-5p 表达水平下降, SOX6表达水平升高, 同时细胞活性、 氧化应激相关酶(SOD、CAT和GPx)活性降低,细胞

凋亡率和凋亡蛋白Caspase-3表达水平、ROS水平 和炎症蛋白NF-κB表达水平升高;在OGD/R诱导的 神经细胞中过表达miR-129-5p,降低了SOX6表达水 平,促进了神经细胞生长,抑制了细胞凋亡和氧化 应激。为进一步探讨miR-129-5p与SOX6的靶向关 系,同时针对过表达基因进行回补实验,发现与单 独过表达miR-129-5p的模型细胞相比,miR-129-5p mimics+pcDNA-SOX6组模型细胞增殖率、凋亡率 和氧化应激水平变化趋势均被逆转。此外,双荧光 素酶报告显示,SOX6与miR-129-5p具有靶向关系。 因此,推测miR-129-5p可能通过调控SOX6表达减轻 OGD/R诱导的神经细胞凋亡和氧化应激。

综上所述, miR-129-5p靶向 SOX6抑制 OGD/R 诱导的神经细胞凋亡及氧化应激。本研究对于 ACI 发病机制研究以及 SOX6在神经细胞中是否可以受 miRNA调节有参考意义。后续实验需要深入探究 miR-129-5p和 SOX6与信号通路(比如 PI3K/AKT)之 间的联系, 另外, miRNA治疗炎症的副作用不明确, 后续会探讨miR-129-5p毒性和不良反应。

参考文献 (References)

- [1] CHEN L L, WANG W T, ZHANG S, et al. Cohort study on the prognosis of acute cerebral infarction in different circulatory systems at 1-year follow-up [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2021, 21(1): 521.
- [2] ZHOU H, LI S, HUANG C, et al. A Preliminary finding: N-butylphthalide plays a neuroprotective role by blocking the TLR4/HMGB1 pathway and improves mild cognitive impairment induced by acute cerebral infarction [J]. J Integr Neurosci, 2024, 23(8): 158.
- [3] REN B, LI X, ZHANG Z, et al. Exosomes: a significant medium for regulating drug resistance through cargo delivery [J]. Front Mol Biosci, 2024, 11(1): 1379822.
- [4] BOICEAN A, BIRSAN S, ICHIM C, et al. Has-miR-129-5p's involvement in different disorders, from digestive cancer to neurodegenerative diseases [J]. Biomedicines, 2023, 11(7): 2058.
- [5] WANG Y, ZHAO S, LI G, et al. Neuroprotective effect of HO-TAIR silencing on isoflurane-induced cognitive dysfunction via sponging microrna-129-5p and inhibiting neuroinflammation [J]. Neuroimmunomodulation, 2022, 29(4): 369-79.
- [6] HAN S W, PYUN J M, BICE P J, et al. miR-129-5p as a biomarker for pathology and cognitive decline in Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Res Ther, 2024, 16(1): 5.
- [7] SALEEM M, BARTUREN-LARREA P, GOMEZ J A. Emerging roles of Sox6 in the renal and cardiovascular system [J]. Physiol

Rep, 2020, 8(22): e14604.

- [8] SALEEM M, SAAVEDRA-SÁNCHEZ L, BARTUREN-LAR-REA P, et al. The transcription factor Sox6 controls renin expression during renal artery stenosis [J]. Kidney360, 2021, 2(5): 842-56.
- SHI Y, HAN Y, NIU L, et al. MiR-499 inhibited hypoxia/reoxygenation induced cardiomyocytes injury by targeting SOX6 [J]. Biotechnol Lett, 2019, 41(6/7): 837-47.
- [10] HUANG L, YANG L, DING Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells-derived exosomes transfers microRNA-19a to protect cardiomyocytes from acute myocardial infarction by targeting SOX6 [J]. Cell Cycle, 2020, 19(3): 339-53.
- [11] WO X, HAN J, WANG J, et al. Sequential butylphthalide therapy combined with dual antiplatelet therapy in the treatment of acute cerebral infarction [J]. Pak J Med Sci, 2020, 36(4): 615-20.
- [12] LIU X, MA Y, WANG Y, et al. Effects of NBP injection on the inflammatory response, oxidative stress response and vascular endothelial function in patients with ACI: a systematic review and meta-analysis [J]. Medicine, 2023, 102(10): e33226.
- [13] YANG B B, ZOU M, ZHAO L, et al. Astaxanthin attenuates acute cerebral infarction via Nrf-2/HO-1 pathway in rats [J]. Curr Res Transl Med, 2021, 69(2): 103271.
- [14] HILL M, TRAN N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. Dis Model Mech, 2021, doi: 10.1242/ dmm.047662.
- [15] HE W, MENG D L, YANG D, et al. miRNA-192-5p targets Dyrk1a to attenuate cerebral injury in MCAO mice by suppressing neuronal apoptosis and neuroinflammation [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2023, 61(4): 217-30.
- [16] 贾海莉,田齐,庞永鹏,等. 急性脑梗死患者血清NOX4、miR-129-5p表达水平与90天预后的相关性[J]. 武警后勤学院学 报(医学版)(JIA H N, TIAN Q, PANG Y P, et al. Correlation between serum NOX4 and miR-129-5p expression levels and 90day prognosis in patients with acute cerebral infarction [J].Journal of Logistics University of CAPF), 2021, 30(11): 131-3.
- [17] LI L, MEDINA-MENÉNDEZ C, GARCÍA-CORZO L, et al. SoxD genes are required for adult neural stem cell activation [J]. Cell Rep, 2022, 38(5): 110313.
- [18] ZHANG L, XUE Z, YAN J, et al. LncRNA Riken-201 and Riken-203 modulates neural development by regulating the Sox6 through sequestering miRNAs [J]. Cell Prolif, 2019, 52(3): e12573.
- [19] GAI H Y, WU C, ZHANG Y, et al. Long non-coding RNA CHRF modulates the progression of cerebral ischemia/reperfusion injury via miR-126/SOX6 signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 514(2): 550-7.
- [20] LI Y, XU H, FU X, et al. Upregulation of miR-202-5p promotes cell apoptosis and suppresses cell viability of hypoxia-induced myocardial H9c2 cells by targeting SOX6 to inhibit the activation of the PI3K/AKT/FOXO3a pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2017, 10(1): 8884-94.