

miR-181b-5p 在胆绿素治疗脑缺血再灌注损伤中的靶基因预测及鉴定

罗 靖, 彭丽佳, 邵建林, 熊 莉, 李俊杰
(昆明医科大学第一附属医院麻醉科, 昆明 650032)

【摘要】目的:对 Small RNA 测序中筛选出的 rno-miR-181b-5p 进行靶基因预测、生物信息学分析及鉴定, 以期为 miR-181b-5p 在胆绿素治疗大鼠脑缺血再灌注损伤中的生物学作用奠定基础。**方法:**分别用 TargetScan、miRDB、miRwalk 3 个数据库预测 rno-miR-181b-5p 的靶基因, 取 3 个数据库的交集靶基因进行基因功能富集分析 (gene ontology) 及信号通路富集分析 (KEGG pathway analysis)。采用双荧光素酶基因报告实验对靶基因进行验证, 同时通过 RT-QPCR 和 Western blot 检测大鼠血管内皮细胞中过表达 miR-181b-5p 后内皮细胞特异性分子 1 (Esm1) 的表达变化。**结果:**3 个数据库交集的靶基因共有 28 个, 这些交集靶基因主要富集于调节刺激反应 ($P=0.013$)、调节细胞增长 ($P=0.014$)、积极调控 ($P=0.048$) 等生物过程 GO 条目中; 而细胞成分层面主要富集于细胞内膜结合细胞器 ($P=0.045$)、黏附连接 ($P=0.049$) 等 GO 条目中; 分子功能层面, 靶基因主要富集于与 mRNA 5'-UTR 结合 ($P=0.017$)、受体结合 ($P=0.032$)、蛋白质结合 ($P=0.046$) 等 GO 条目中。信号通路主要富集于突触小泡循环 ($P=0.024$)、基础转录因子 ($P=0.040$)、RIG-I 样受体信号通路 ($P=0.047$) 等通路中。双荧光素酶基因报告实验结果揭示了 miR-181b-5p 可以靶向调控 Esm1 基因。另外, RT-QPCR 和 Western blot 结果显示在大鼠血管内皮细胞中过表达 miR-181b-5p 可负向调控 Esm1。**结论:**rno-miR-181b-5p 可能通过靶向调控 Esm1 基因而在胆绿素治疗大鼠脑缺血再灌注损伤中发挥生物活性作用。

【关键词】rno-miR-181b-5p; 靶基因; 生物信息学; 内皮细胞特异性分子 1

【中图分类号】R363

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-12-20

Prediction and identification for target genes of miR-181b-5p in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with biliverdin

Luo Jing, Peng Lijia, Shao Jianlin, Xiong Li, Li Junjie

(Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical University)

【Abstract】Objective: To predict the target genes of rno-miR-181b-5p selected from Small RNA sequence and to perform bioinformatics analysis and identification for laying a foundation for the biological function of miR-181b-5p in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury with biliverdin. **Methods:** The target genes of rno-miR-181b-5p were screened through TargetScan, miRDB and miRwalk databases respectively. Then, bioinformatic analysis of these intersection target genes of the three databases were performed by gene ontology analysis and KEGG pathway analysis. Subsequently, dual luciferase reporter gene assays were performed to identify the targets, and the expression changes of endothelial cell specific molecule-1 (Ems1) after overexpression of miR-181b-5p in rat vascular endothelial cells were detected by RT-QPCR and Western blot. **Results:** There were 28 target genes intersected by the three databases, which were mainly located in such GO items of biological process as regulating stimulus response ($P=0.013$), regulating cell growth ($P=0.014$) and positive regulation ($P=0.048$). The cellular component of these genes principally were involved in such GO items as intracellular membrane-bounded organelles ($P=0.045$) and adherens junction ($P=0.049$). At the molecular function level, these target genes were significantly involved in such GO items as mRNA 5'-UTR binding ($P=0.017$), receptor binding ($P=0.032$), and protein binding ($P=0.046$). The KEGG pathway analysis demonstrated that these genes were mainly enriched in synaptic vesicle circulation ($P=0.024$), basal transcription factors pathway ($P=0.040$) and RIG-I-like receptor signaling pathway ($P=0.047$), etc. The results of dual luciferase reporter gene assays suggested

作者简介: 罗 靖, Email: 2292940670@qq.com,

研究方向: 免疫炎症与脑缺血再灌注损伤。

通信作者: 邵建林, Email: cmushaojl@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81760248, 81960250); 云南省应用基础研究重点资助项目 (编号: 2018FA042); 云南省高层次人才培养资助项目 (编号: D-201632); 云南产业技术领军人才培养资助项目 (编号: YLXL20170054); 俞卫锋专家工作站资助项目 (编号: 2017IC067); 云南省应用基础研究联合资助项目 (编号: 2017FE468(-034)); 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (编号: 2019J1250); 昆明医科大学研究生创新基金资助项目 (编号: 2019S030)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200929.1729.010.html>

(2020-09-30)

mo-miR-181b-5p could target and regulate Esm1 genes. Moreover, RT-QPCR and Western blot results also showed that overexpression of miR-181b-5p can negatively regulate Esm1 in rat vascular endothelial cells. **Conclusion:** mo-miR-181b-5p may play an important biological role in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats with biliverdin by targeting regulation of Esm1 gene.

[Key words] mo-miR-181b-5p; target genes; bioinformatics; endothelial cell specific molecule-1

脑卒中(cerebral ischemia, CI)是一种严重的心脑血管疾病,是人类生命健康的第三大杀手,也是致残率最高的疾病之一^[1]。目前,临床上对脑卒中患者治疗最常见的方法是 tPA 溶栓和栓子切除以恢复脑血流。随着血流的恢复,可造成额外的损伤和神经功能的恶化,这称为脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia reperfusion, I/R)^[2]。其原因可能是脑缺血后血管内皮损伤造成脑微血管功能紊乱,导致血脑屏障破坏。在这种不利情况下,随着血流的再灌注,大量活性氧、免疫炎症因子在缺乏制约状态下进入脆弱的大脑,进而造成持续加重的脑损伤。因此,靶向干预和治疗再灌注后长期的慢性炎症微环境可能是新的治疗靶点和方向。

针对卒中后免疫炎症微环境问题,本研究组前期进行了大鼠 MCAO 模型实验研究,发现胆绿素治疗能够降低脑缺血梗死体积并改善大鼠的神经功能预后^[3]。胆绿素可能是通过抑制炎症反应和促进微血管内皮修复而发挥治疗作用。为进一步分析和探讨胆绿素治疗脑缺血再灌注损伤的可能机制,本研究组进行了 microRNA 芯片测序,经过生物信息学筛选和 PCR 验证,结果表明 mo-miR-181b-5p 是差异表达显著的 miRNA 之一^[4]。在 I/R 损伤模型中,本研究组提出胆绿素是否能通过调控 mo-miR-181b-5p 的表达而起促进血管内皮修复和生长,从而起脑保护作用。所以,本研究组继续采用生物信息学方法预测 mo-miR-181b-5p 下游靶基因及参与的信号通路。同时,采用双荧光素酶载体报告实验验证内皮细胞特异性分子 1(endothelial cell specific molecule-1, Esm1)是 mo-miR-181b-5p 的靶基因,以此为后续机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

293T 细胞(购于上海 ATCC 细胞库);大鼠血管内皮细胞(购于北纳生物);DMEM 培养基(Hyclone, 美国);胎牛血清

(Gibco, 美国);L-谷氨酰胺(Solarbio, 北京索莱宝公司);丙酮酸钠(Solarbio, 北京索莱宝公司);10 cm 培养皿(Corning, 美国);96 孔板(Corning, 美国);胰蛋白酶(Hyclone, 美国);氨苄西林(Sigma, 德国);GP-miRGLO 质粒(上海吉玛);限制性内切酶(*Sac* I、*Xho* I)、mo-miR-27a-3p mimics/Mimics NC、感受态细胞(上海吉玛);Lipo2000 转染试剂(Invitrogen, 美国);DNA 凝胶回收试剂盒(天根生化科技有限公司);Dual-Luciferase 报告基因检测系统试剂盒(Promega, 美国);Trizol (TIANGEN);RIPA 裂解液(TIANGEN);抗-Esm1(兔源, Abcam)。

1.2 主要仪器

细胞培养箱(Thermo Electron Corporation, 美国);PCR 仪(杭州朗基科学仪器有限公司);高速冷冻离心机(Thermo Electron Corporation, 美国);电热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司);倒置荧光显微镜(OLYMPUS, 日本);Tecan M1000 多功能酶标仪(北京龙跃科技发展有限公司);化学发光成像系统(AI600, GE)。

1.3 实验方法

1.3.1 靶基因预测 基于 miRWalk (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)、miRDB (<http://www.mirdb.org/miRDB/>)、TargetScan (http://www.targetscan.org/mamm_31/) 3 个数据库,分别预测 mo-miR-181b-5p 的靶基因,采用在线维恩图工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 做预测结果韦恩图。取 3 个数据库的交集靶基因,利用 Cytoscape2.8.2 进行绘制 miRNA-靶蛋白互作图。

1.3.2 GO 分析、KEGG 分析 利用 AmiGO 2 数据库 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) 和 DAVID 数据库 (<http://david.ncifcrf.gov/>),从靶基因的分子功能、细胞组成、可能参与的生物过程及信号通路等方面,对交集靶基因进行 GO 注释和 KEGG 富集分析。结果根据 Fisher Exact Test 计算 *P* 值,以 *P*<0.05 得到差异具有统计学意义的 GO 富集分析和信号通路富集分析。

1.3.3 双荧光素酶报告实验载体构建 利用 NCBI 数据库获取基因 Esm1 (Gene ID:64536)的全长序列,并结合 TargetScan 数据库预测 mo-miR-181b-5p 与 Esm1-3'UTR 是否有潜在的结合位点。用化学合成法合成 Esm1 的野生型和突变型 PCR 扩增引物序列(表 1)。引物合成时,分别在 Esm1 引物的 5'端和 3'端加上 *Sac* I、*Xho* I 酶切位点。用 PCR 退火法得到 dsDNA 模板,用于后续酶连接反应。为将目的基因片段构

建到质粒 GP-miRGLO 中,首先用 *Sac* I、*Xho* I 双酶切 GP-miRGLO 空载体,酶切产物经过琼脂糖电泳后,使用 DNA 凝胶回收试剂盒回收载体 GP-miRGLO,最后将酶切得到的 GP-miRGLO 条带和退火得到的 dsDNA 进行酶连接反应得到重组质粒。重组质粒转化感受态细胞后,将细胞置于含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林的 LB 培养基中培养,以筛选带有抗性基因的阳性克隆重组质粒。然后,用质粒小提试剂盒提取阳性克隆质粒,并送上海吉玛基因公司测序,测序比对正确后,用质粒大提试剂盒抽提阳性克隆质粒保存以用于后续实验。

1.3.4 细胞培养 人胚肾细胞(293T)使用含 10%FBS 的 DMEM(含 4.0 mol/L-Glutamine、100 U/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin)在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱中培养;大鼠血管内皮细胞接种于含有 CM1-1 培养液(90%DMEM+谷氨酰胺+丙酮酸钠+10%FBS)的培养瓶中置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 条件的细胞培养箱培养,以备后续转染使用。

1.3.5 细胞转染 人工合成 miR-181b-5p-mimics 和 mimics NC 序列(表 2)后:①293T 细胞转染:将 miR-181b-5p-mimics、mimics NC 及带有 Esm1-3'UTR 片段的质粒共转染 293T 细胞(Lipofectamine™2000 为转染试剂)。将 293T 细胞接种于 12 孔板,细胞密度 5×10^5 个/孔,待细胞达到 80%融合时进行转染。实验设立 6 组,即 pmirGLO+mimics_NC 组、pmirGLO+rno-miR-181b-5p 组、Esm1 野生型+mimics NC 组、Esm1 野生型+rno-miR-181b-5p 组、Esm1 突变型+mimics NC 组、Esm1 突变型+rno-miR-181b-5p 组,每组设置 3 个复孔。依照 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书进行共转染。转染温育 5 min 后,吸弃转染液,加入含 10% FBS 的 DMEM 培养基,继

续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱培养 24 h。②大鼠血管内皮细胞转染:将大鼠血管内皮细胞接种于 6 孔板,当细胞增殖至 80% 时进行 miR-181b-5p-mimics、mimics NC 转染。实验设立 3 组:Control 组、miR-181b-5p-mimics 组、mimics NC 组,每组设置 3 个复孔,依照 Lipofectamine™2000 试剂盒说明书进行转染。转染后,继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO₂ 培养箱培养 48 h。

1.3.6 双荧光素酶活性检测 细胞共转染 24 h 后弃培养基,加浓度为 1 倍体积的 PLB 裂解液裂解细胞,然后向细胞裂解产物中加入 30 μL LARII 试剂以检测萤火虫荧光素酶活性。检测完毕后,从酶标仪中取出测试板,再向每个检测孔加入 30 μL Stop & Glo®试剂,用酶标仪检测海肾荧光素酶活性。以海肾荧光素酶荧光值作为内参,计算和统计每个组的荧光素酶相对活性。

1.3.7 RNA 提取和实时定量 PCR 使用 Trizol 法提取样品总 RNA,然后用 RNA 样品作为模板进行逆转录以合成 cDNA。SYBR Green Real-Time PCR Master Mix(赛默飞,USA)用于制备 PCR 反应体系。设计合成引物用于 PCR 反应(表 3),Q-PCR 的实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析,以 GAPDH 为内参。

1.3.8 Western blot 6 孔板细胞弃掉培养基,PBS 润洗 2 次后,加入适量 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 PMSF,充分裂解后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000g 离心 20 min,取上清 BCA 法测定蛋白浓度。接着,蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,用含 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭液封闭 PVDF 膜 1.5 h,一抗摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗室温孵育 1.5 h 后显影。使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,数据以均数 \pm 标准

表 1 Esm1 野生型、突变型引物序列

组别	引物序列
Esm1-3' UTR-WT 组	ACTTGTGGGAAGATCCTTGAATGTAAGCACAAACCGGTTGTTGGGT
Esm1-3' UTR-MUT 组	ACTTGTGGGAAGATCCTCTATGTAAGCACAAACCGGTTGTTGGGT

注:下划线为潜在的结合位点和突变位点

表 2 rno-miR-181b-5p-mimics 及 mimics NC 序列

组别	序列
rno-miR-181b-5p-mimics 组	正义链:5'-AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU-3' 反义链:5'-CCACCGACAGCAAUGAAUGUUUU-3'
mimics NC 组	正义链:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3' 反义链:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

表 3 Esm1 及 GAPDH 引物序列

组别	序列
Esm1 组	正向:5'-TGATTTCCGGTACGAGTTTGCT-3' 反向:5'-GCATACTGGAAGAAGGGGAAGT-3'
GAPDH 组	正向:5'-GACCTCTATGCCAACACACT-3' 反向:5'-AGTACTTCCGCTCAGGAGGA-3'

差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验进行 2 组间比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 靶基因预测结果

采用 miRWalk、miRDB、TargetScan 3 个数据库预测到的 miR-27a-3p 可能靶向调控的目的基因分别有 860 个、491 个、970 个。为减少预测结果的假阳性,取 3 个数据库共同的交集靶基因有 28 个(图 1),根据交集靶基因绘制 miRNA-靶蛋白互作图(图 2)。

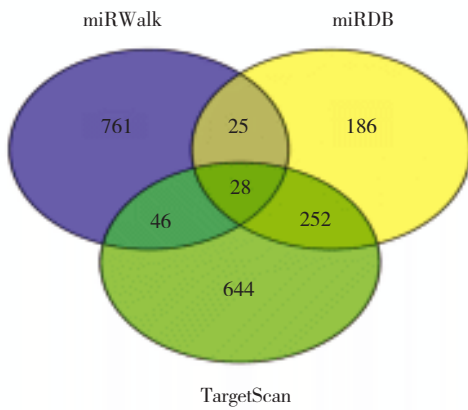
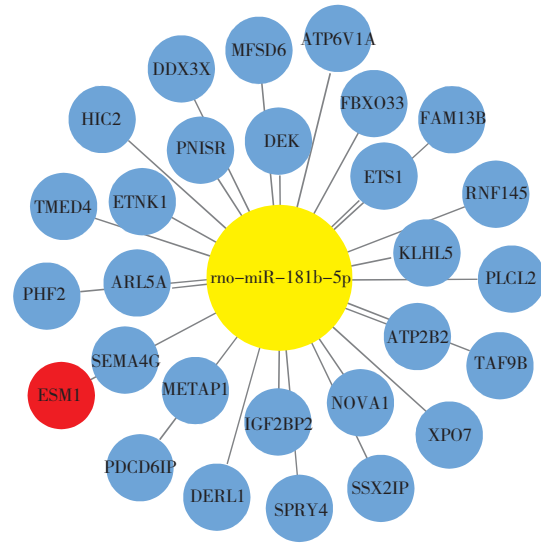


图 1 miRWalk、miRDB、TargetScan 3 个数据库预测 rno-miR-181b-5p 的靶基因结果



注:黄色, rno-miR-181b-5p; 蓝色:交集靶基因;红色: Esm1

图 2 rno-miR-181b-5p 靶基因调控网络图

2.2 预测靶基因集 GO 分析结果

在生物过程层面(biological process),靶基因主要富集于调节刺激反应($P=0.013$)、调节细胞增长($P=0.014$)、积极调控生物过程($P=0.048$)等 GO 条目中;细胞成分层面(cellular component),交集靶基因主要富集于细胞内膜结合细胞器($P=0.045$)、黏附连接($P=0.049$)等 GO 条目中;分子功能层面(molecular function),靶基因主要富集于与 mRNA 5'-UTR 结合($P=0.017$)、受体结合($P=0.032$)、蛋白质结合($P=0.046$)等 GO 条目中(图 3)。

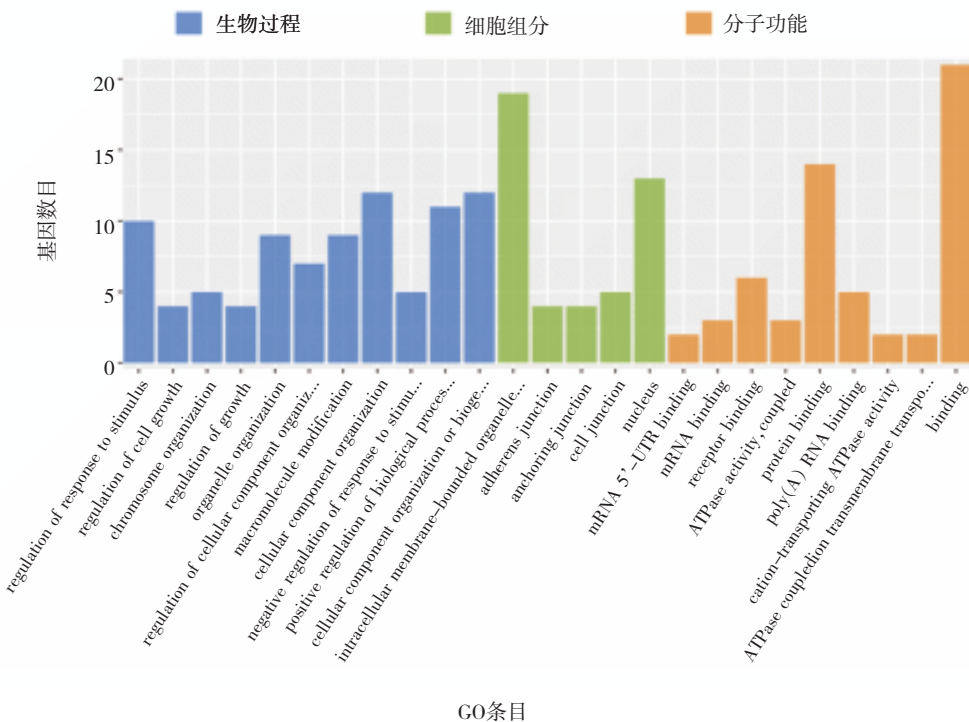


图 3 rno-miR-181b-5p 预测靶基因的 GO 分类图

2.3 预测靶基因集 KEGG 分析结果

采用 DAVID 数据库对 28 个交集的靶基因进行 KEGG 信号通路分析,根据目前数据库的数据,结果显示交集靶基因主要参与腹轴形成($P=0.024$)、基础转录因子($P=0.040$)、RIG-I 样受体信号通路($P=0.049$)3 条信号通路。其中,Esm1 参与了腹轴形成和 RIG-I 样受体信号通路中(图 4)。

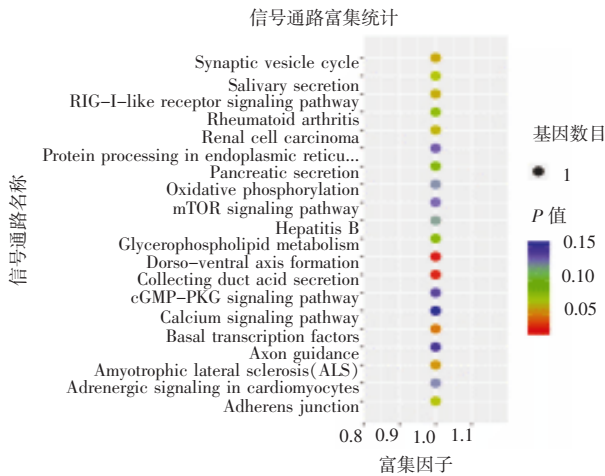


图 4 mo-miR-181b-3p 预测靶基因集 KEGG 分类图

2.4 结合位点预测

预测结果显示,mo-miR-27a-3p 与 Litaf-3'UTR 有潜在的结合位点(图 5)。

	Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom)	Site type	Context++ score	Context++ score percentile	Weighted context++ score	Conserved branch length	P_{CT}
Position 1282-1289 of Esm1 3'UTR	5' ...UUGCCAACAGAGUUGUGAAUGA... 	8mer	-0.23	95	-0.23	0.813	<0.1
mo-miR-181b-5p	3' ...UGGGUGGCUCGUCGU--ACUACAA						

图 5 mo-miR-181b-5p 与 Esm1-3' UTR 区域潜在结合位点

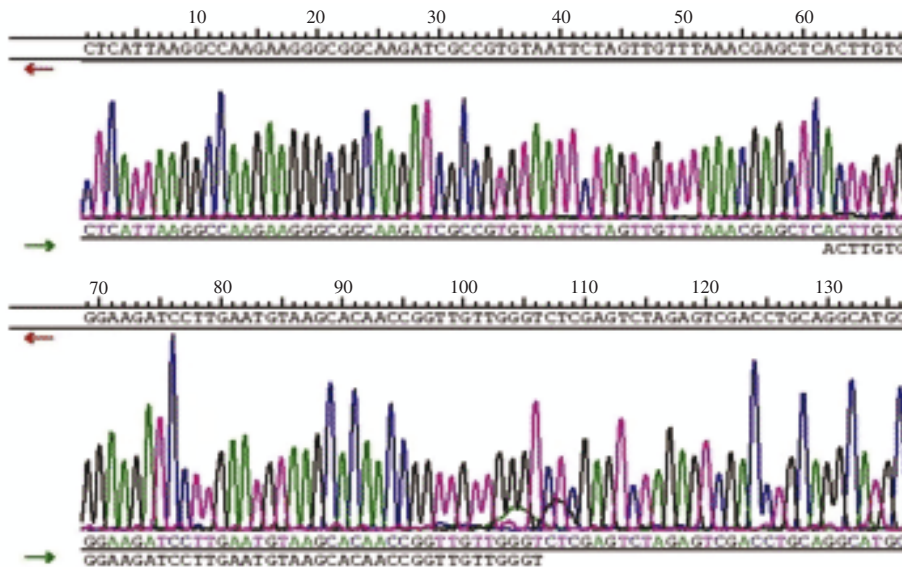


图 6 Esm1 野生型载体测序结果

2.5 重组质粒测序及序列比对分析

含有 mo-miR-181b-5p 结合位点和突变位点的野生型荧光素酶报告载体、突变型荧光素酶报告载体测序结果如图 6、图 7 所示。用构入载体中的 Esm1-3'UTR-WT、Esm1-3'UTR-MUT 序列和测序结果比对,结果表明目的序列和突变序列已经成功构建到双荧光素酶报告载体 GP-miRGLO 中,可用于后续实验。

2.6 双荧光素酶活性分析

Esm1 野生型+mo-miR-181b-5p mimics 组的酶相对活性(0.330 ± 0.018),相比较于 Esm1 野生型+mimics NC 组(1.00 ± 0.00),差异具有统计学意义($n=3, t=36.49, P<0.001$),表明 Litaf 野生型+mo-miR-27a-3p mimics 组的荧光素酶相对活性降低;Esm1 突变型+mo-miR-181b-5p mimics 组的酶相对活性(0.947 ± 0.021)与 Esm1 突变型+mimics NC 组(1.00 ± 0.00)相比,差异无统计学意义($n=3, t=2.514, P>0.05$)(图 8)。

2.7 RT-QPCR 和 Western blot 结果

在大鼠血管内皮细胞中,从 mRNA 和蛋白水平检测 miR-181b-5p 调控 Esm1 基因后 Esm1 在血管内皮细胞中的表达水平。如图 9 所示,Esm1-mRNA 的表达水平较对照组显著降低($P=0.006$);相应的,Esm1 蛋白在血管内皮细胞中表达量较对照组降低($P=0.014$)。结果显示,在大鼠血管内皮细胞中,miR-181b-5p 可负调控基因 Esm1。

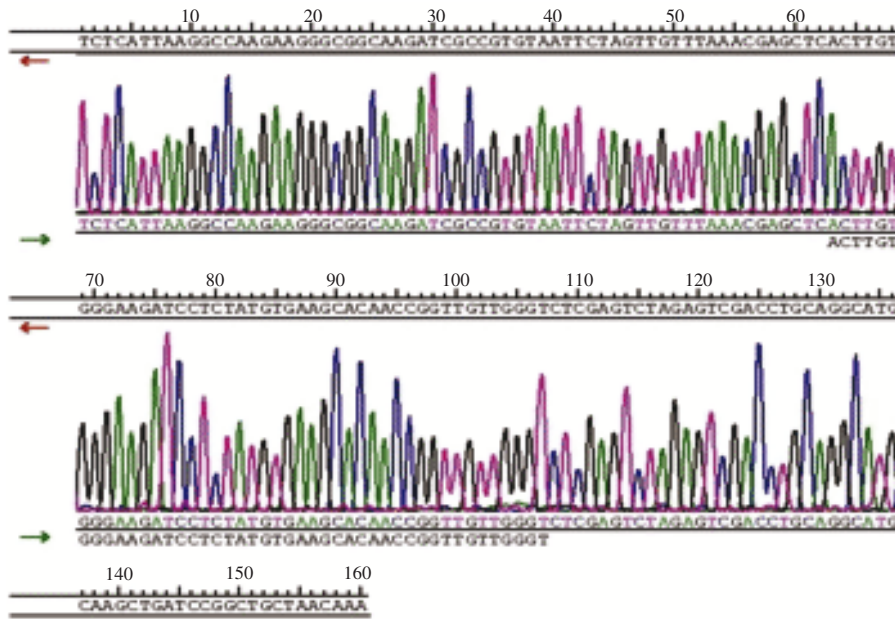


图 7 Esm1 突变型载体测序结果

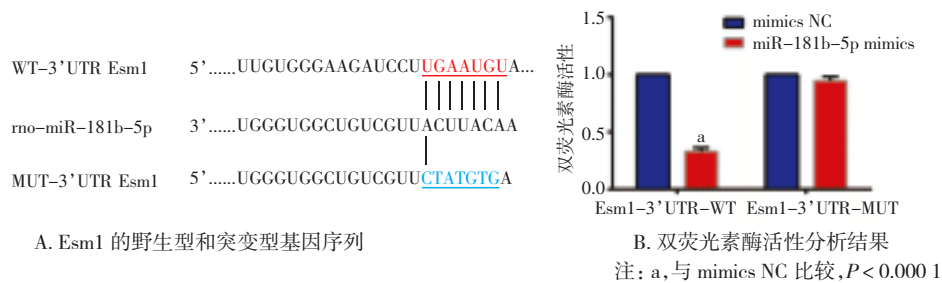


图 8 双荧光素酶报告实验结果

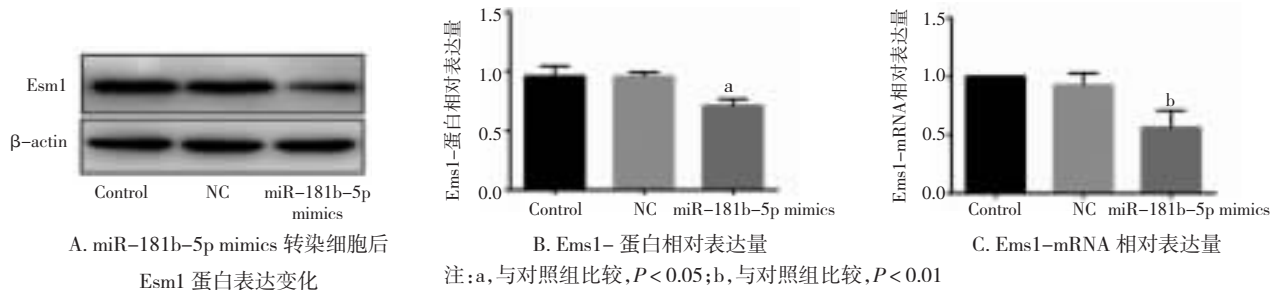


图 9 miR-181b-5p 负调控 Esm1 表达

3 讨论

脑缺血再灌注损伤的机制较复杂,主要的机制包括能量供需失衡引起的酸中毒和微血管内皮损伤后的血脑屏障破坏,最终导致内质网损伤、钙超载、细胞浸润、炎症反应和凋亡坏死^[5-6]。胆绿素是血红素氧合酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)的催化产物之一,具有抗炎^[7]、抗氧化^[8]、抗凋亡^[9]作用。近年来有研究报道称,胆绿素在许多疾病发生发展过程中通过抑制炎症反应而减慢疾病的发展或改善预

后^[10-11]。既往研究发现,胆绿素用于大鼠大脑中动脉闭塞-再灌注(middle cerebral artery occlusion-reperfusion,MCAO/R) 治疗后,MCAO/R 大鼠的神经功能损伤程度(NSS 评分)减轻染色证实脑梗死体积减小。为进一步探讨胆绿素在大鼠脑缺血再灌注损伤中的治疗作用分子机制,对在经胆绿素治疗 CIR 的大鼠脑缺血-再灌注侧的脑皮质进行了小分子 RNA (microRNAs,miRNAs)测序,筛选出差异常表达的 mi-croRNA,并结合 PCR 技术验证转录组测序结果,结果发现 miR-181b-5p 参与了疾病的发生发展^[9]。然而,miR-181b-5p 在胆绿素治疗大鼠脑缺血再灌注

损伤中的作用仍不明确,有待进一步研究。

MiRNAs 是一类非蛋白质编码小分子 RNA,由 18~23 个核苷酸组成^[12],可作为独立的转录物调节转录因子、诱导 mRNAs 降解、对基因表达进行转录后调节^[13];miRNAs 也可通过直接抑制或降低靶基因的翻译起到转录后调节作用。一个 microRNA 可以调控多个靶基因;同时,一个靶基因可被多个 miRNA 调控^[12]。为进一步揭示 miR-181b-5p 的生物学功能,本实验通过 TargetScan、miRDB、miRwalk 3 个数据库预测其靶基因,同时对预测到的靶基因进行 GO 和 KEGG 分析。GO 结果显示 miR-181b-5p 的靶基因主要富集于调节刺激反应、调节细胞增长、积极调控等生物过程;KEGG 结果显示 miR-181b-5p 的靶基因集通路富集于腹轴形成、RIG-I 样受体信号通路、黏附连接等信号通路。其中,Esm1 参与调节刺激反应、调节细胞增长生物学过程和腹轴形成、黏附连接等信号通路,因此可能发挥调节细胞增殖、连接等生物学作用。Esm1 主要表达于血管内皮细胞和肾上皮细胞^[15],与肿瘤细胞增殖、侵袭^[14],以及血管生成和修复有关^[15]。Rocha SF 等^[15]研究发现,在内皮细胞中,Esm1 基因通过血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路在血管再生、炎症反应和血管通透性中扮演重要角色,Burton DG 等^[16]研究发现,Esm1 参与动脉粥样硬化的发生发展,Esm1 与内皮功能紊乱、动脉粥样硬化性疾病有关。为了验证 Esm1 是否为 miR-181b-5p 的靶基因之一,本研究首先通过 TargetScan 数据库预测发现 miR-181b-5p 的种子区域与 Esm1 的 3'UTR 端有一个明显的结合位点;接着成功构建了野生型和突变型双荧光素酶报告实验载体,并检测荧光素酶活性来判断 miR-181b-5p 对 Esm1 的 3'UTR 的调控作用,结果显示 miR-181b-5p mimics 组荧光活性显著降低,表明 Esm1 是 miR-181b-5p 的靶基因。为进一步验证 miR-181b-5p 调控 Esm1 基因后,Esm1 在血管内皮细胞中的表达情况,本研究对大鼠血管内皮细胞进行过表达 miR-181b-5p 后,从 mRNA 和蛋白水平检测 Esm1 表达变化,结果显示在大鼠血管内皮细胞中 miR-181b-5p 可以负调控基因 Esm1。

综上所述,通过结合高通量测序、生物信息学方法及分子蛋白实验,结果提示 miR-181b-5p 靶向调控 Esm1 可能在血管生成、血管修复、血管性疾病中具有一定的作用,这也可能是胆绿素在大鼠脑缺血再灌注损伤中起作用的关键所在。然而,miR-181b-5p 调控 Esm1 后的生物学作用仍然需要进一

步的研究和验证。

参 考 文 献

- [1] Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, et al. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review[J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8(4): 355-369.
- [2] Janus-laszuk B, Mirowska-guzel D, Sarzynska-dlugosz I, et al. Effect of medical complications on the after-stroke rehabilitation outcome[J]. *Neurorehabilitation*, 2017, 40(2): 223-232.
- [3] Li JJ, Zou ZY, Liu J, et al. Biliverdin administration ameliorates cerebral ischemia reperfusion injury in rats and is associated with proinflammatory factor downregulation[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 671-679.
- [4] Zou ZY, Liu J, Chang C, et al. Biliverdin administration regulates the microRNA-mRNA expressional network associated with neuroprotection in cerebral ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(3): 1356-1372.
- [5] Tuma RF, Steffens S. Targeting the endocannabinoid system to limit myocardial and cerebral ischemic and reperfusion injury[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2012, 13(1): 46-58.
- [6] Sanderson TH, Reynolds CA, Kumar R, et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 9-23.
- [7] Overhaus M, Moore BA, Barbatto JE, et al. Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(4): 695-703.
- [8] Chaves HV, Do Val DR, Ribeiro KA, et al. Heme oxygenase-1/biliverdin/carbon monoxide pathway downregulates hypernociception in rats by a mechanism dependent on cGMP/ATP-sensitive K⁺ channels[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(5): 407-422.
- [9] Sun J, Zhang P, Yang X, et al. Biliverdin protects the isolated lungs from ischemia/reperfusion injury via anti-apoptosis[J]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2017, 29(1): 25-29.
- [10] Kosaka J, Morimatsu H, Takahashi T, et al. Effects of biliverdin administration on acute lung injury induced by hemorrhagic shock and resuscitation in rats[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e63606.
- [11] Ayer A, Zarjou A, Agarwal A, et al. Heme oxygenases in cardiovascular health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2016, 96(4): 1449-1508.
- [12] Lu TX, Ronthenberg ME. MicroRNA[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141(4): 1202-1207.
- [13] Lin SL, Ying SY. Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs[J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1733: 107-126.
- [14] Ma M, Zhao J, Wu Q, et al. MiRNA-545 negatively regulates the oncogenic activity of EMS1 in gastric cancer[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(6): 2452-2462.
- [15] Rocha SF, Schiller M, Jing D, et al. Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability[J]. *Circ Res*, 2014, 115(6): 581-590.
- [16] Burton DG, Giles PJ, Sheerin AN, et al. Microarray analysis of senescent vascular smooth muscle cells: a link to atherosclerosis and vascular calcification[J]. *Exp Gerontol*, 2009, 44(10): 659-665.

(责任编辑:张学颖)