

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.003014

miR-150 靶向调控血管内皮生长因子影响脑梗死后神经康复和血管新生

郭 丹¹, 张 娟¹, 王洪涛¹, 刘行高¹, 郭远瑾²

(1. 华中科技大学协和东西湖医院(武汉市东西湖区人民医院)康复医学科, 武汉 430040;

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院神经内科, 武汉 430022)

【摘要】目的:探讨 miR-150 对脑缺血大鼠血管结构的保护作用及促进血管生成的作用机制。**方法:**SD 大鼠被分为 4 组($n=15$):假手术(Sham)组、中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组、MCAO+miR-150 组和 MCAO+模拟物阴性对照(miR-NC)组。除 Sham 组外,其余组采用电凝法建立大鼠 MCAO 模型。MCAO+miR-NC 组和 MCAO+miR-150 组分别注射 PEG 脂质体包埋 miR-NC 或 miR-150(2.4 mg/kg, iv)。建模后第 14 天,观察 MCAO 大鼠神经功能、神经损伤和血管生成的变化。建立缺氧葡萄糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)模型,研究 miR-150 促进血管生成的作用及其可能机制。荧光素酶活性测定证实 miR-150 与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的结合位点。**结果:**体内实验结果表明, MCAO 大鼠脑梗死组织中 miR-150 较 Sham 组明显下调(1.00 ± 0.03 vs. 0.34 ± 0.04 , $P<0.05$)。miR-150 上调可降低脑缺血大鼠的神经功能缺损评分(第 7 天: 6.9 ± 1.0 vs. 5.3 ± 0.6 , 第 14 天: 6.4 ± 0.7 vs. 3.9 ± 0.5 , 均 $P<0.01$)和梗死体积[(13.8 ± 1.6)% vs. (5.1 ± 0.6)%, $P<0.001$], 促进血管生成。通过荧光素酶报告基因分析进一步证实 VEGF 基因是 miR-150 的靶基因,并且在 miR-150 处理的 MCAO 大鼠脑梗死组织中观察到 VEGF 表达上调。体外实验结果表明, miR-150 上调能增加 OGD 诱导的 BMECs 中 VEGF/VEGFR2 共表达,并促进其管形成。机制分析显示 miR-150 促进血管生成作用与激活 VEGF 通路有关, SU1498 可抑制 miR-150 的激活作用。**结论:**miR-150 通过靶向 VEGF 调节 MCAO 大鼠的神经功能缺损和血管生成。

【关键词】miR-150; 血管内皮生长因子; 脑梗死; 大鼠; 脑微血管内皮细胞**【中图分类号】**R735.3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2021-03-27

Effect of miR-150 targeting vascular endothelial growth factor on neurological rehabilitation and angiogenesis after cerebral infarction

Guo Dan¹, Zhang Juan¹, Wang Hongtao¹, Liu Xinggao¹, Guo Yuanjin²

(1. Department of Rehabilitation Medicine, Union Dongxihu Hospital of Huazhong University of Science and Technology/People's Hospital of Dongxihu District; 2. Department of Neurology, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology)

【Abstract】Objective: To investigate whether miR-150 promotes angiogenesis in cerebral ischemic rats and to identify its possible mechanisms. **Methods:** SD rats were divided into four groups ($n=15$): Sham group, MCAO (middle cerebral artery occlusion) group, MCAO+miR-150 group and MCAO+miR-NC group. Except for the Sham group, the other groups established MCAO models by electrocoagulation method. MCAO+miR-NC group and MCAO+miR-150 group were injected with PEG liposome embedded miR-NC or miR-150 (2.4 mg/kg, iv), respectively. On the 14th day after modeling, the changes of neurological function, nerve damage and angiogenesis of MCAO rats were observed. The oxygen-glucose deprivation (OGD) brain microvascular endothelial cells (BMECs) models were established to determine the roles and possible mechanisms of miR-150 in angiogenesis. The binding site between miR-150 and vascular endothelial growth factor (VEGF) was verified by luciferase activity assay. **Results:** *In vivo*, miR-150 was significantly down-regulated in MCAO rats compared with the Sham group (1.00 ± 0.03 vs. 0.34 ± 0.04 , $P<0.05$). Up-regulation of miR-150 reduced neurological deficit scores (day 7: 6.9 ± 1.0 vs. 5.3 ± 0.6 , day 14: 6.4 ± 0.7 vs. 3.9 ± 0.5 , both $P<0.01$) and infarct volume [(13.8 ± 1.6)% vs. (5.1 ± 0.6)%, $P<0.001$], and promoted angiogenesis in cerebral ischemic rats. Luciferase reporter gene analysis confirmed that VEGF gene was the target gene of miR-150, and the up-regulation of VEGF expression was observed in MCAO rats treated

作者介绍: 郭 丹, Email: dg0327guodan@163.com,

研究方向: 盆底康复、脑卒中康复。

基金项目: 湖北省卫健委课题资助项目(编号: WJ2019F157)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20220424.1551.003.html>

(2022-04-25)

with miR-150. *In vitro*, up-regulation of miR-150 increased the co-expression of VEGF/VEGFR2 in OGD induced BMECs and promoted the tube formation. Mechanism analysis showed that the effect of miR-150 on promoting angiogenesis was related to the activation of VEGF pathway, and the activating effects

of miR-150 were inhibited by SU1498. **Conclusion:** miR-150 regulates neurologic impairment and angiogenesis in MCAO rats by targeting VEGF.

[Key words] miR-150; vascular endothelial growth factor; cerebral infarction; rat; brain microvascular endothelial cell

血管对缺血敏感,通常在缺血的超急性阶段受损^[1]。当发生脑缺血时,梗死区及其周围的血管结构受到破坏,营养供应不足,进而导致梗死扩大^[2]。因此,保护梗死区血管结构的完整性和促进血管生成对脑梗死的治疗具有重要意义。最近一些研究揭示了 microRNAs(miRNAs)在维持梗死区血管结构完整性中的作用^[3-4]。microRNA-150(miR-150)是一种在肿瘤发生和炎症中具有良好特征的 miRNA,并被证明是内皮功能的表观遗传调节因子^[5]。此外,miR-150 可能是调控血管生成的一种重要 microRNA,其与人内皮细胞系分化、鸡胚血管生成及视网膜血管生成有关^[6-7]。所有这些研究表明,miR-150 可能在不同的病理生理条件下通过不同的靶点调控新生血管的形成。尽管如此,miR-150 在脑梗死后血管生成中的作用还没有得到很好的研究。本研究探讨 miR-150 上调对脑缺血大鼠的治疗作用和血管保护作用,并通过体外氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型研究其作用机制,旨在开发一种新的、基于核酸转移治疗脑缺血的方法。

1 材料和方法

1.1 动物

20 只 10 日龄新生大鼠和 60 只 2 月龄雄性 SD 大鼠(180~220 g)购自北京斯贝福生物技术有限公司。大鼠在(22±2)℃、12 h 光/12 h 暗循环、自由获取食物和水的条件下饲养。

1.2 大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型建立

2 月龄雄性 SD 大鼠通过电凝法建立大脑 MCAO 诱导的脑缺血模型^[8]。具体操作为:SD 大鼠用 3%异氟醚麻醉并置于立体定向框架中。在颞肌与顶骨交界处作纵切口。然后用刀柄将颞肌与颞板分离,暴露颞窝,用小电钻在颞窝上钻 1 个小孔。暴露大脑中动脉后,用双极电凝钳在中动脉与下腔静脉交界处向下凝固中动脉。伤口用止血海绵填塞,术后分别缝合肌肉和皮肤。假手术大鼠大脑中动脉暴露但未凝固。大鼠缺血 24 h 后进行神经功能评分,采用改良神经严重度评分(modified neurological severity score, mNSS)筛选成功建立的 MCAO 大鼠(mNSS 为 4~12 分)。

1.3 动物分组与治疗

大鼠被分为 4 组($n=15$):假手术(Sham)组、MCAO 组、MCAO+miR-150 组和 MCAO+模拟物阴性对照(miR-NC)组。除 Sham 组外,其余组采用电凝法建立大鼠 MCAO 模型。

MCAO+miR-150 组:注射 PEG 脂质体包埋 miR-150 模拟物(2.4 mg/kg, iv); MCAO+miR-NC 组:注射 PEG 脂质体包埋 miR-150 模拟物 NC(2.4 mg/kg, iv)^[2]。MiR-150 模拟物或 NC 使用 PEG-脂质体体内转染试剂(美国 Altogen Biosystems 公司)包埋,并在 mNSS 评估成功建立 MCAO 后立即通过尾静脉给药。miR-150 模拟物或 NC 购自上海 GenePharma 公司。Sham 大鼠和 MCAO 模型大鼠作为对照。第 14 天进行 mNSS 评估并处死大鼠进行其他试验。

1.4 脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cells, BMECs)分离培养

取 10 日龄大鼠麻醉,75%乙醇消毒,快速断头,取皮层组织置于冷 D-Hanks 液中切片至 1.0 mm³ 左右。用 25%牛血清白蛋白吹入组织匀浆,600g 离心 5 min,用 0.1%胶原酶 II(美国 Sigma 公司)在 37℃酶解 5 min,加入 20%FBS(美国 GIBCO 公司)终止消化。消化后的组织溶液以 150g 离心 5 min,然后将获得的组织颗粒接种到 T25 细胞培养瓶中(1 个大脑 1 个培养瓶),加入大约 4 mL 含有 20%FBS 的 DMEM/F12 培养基(GIBCO),在 5%CO₂、37℃培养箱中培养。培养基每 2~3 d 更换 1 次。BMECs 在试验前最多传代 3 次。

1.5 OGD 模型建立与治疗分组

对于 OGD,将 BMEC 放置在含有 5%CO₂、95%N₂ 的混合气体培养箱中。用脱氧无葡萄糖 Earle's 平衡盐溶液代替正常培养基,培养物在 37℃无糖厌氧条件下孵育 4 h。对照细胞培养物置于含 25 mmol/L 葡萄糖的 Earle's 平衡盐溶液中,并在正常组织培养条件下培养相同时间。细胞分组:对照组、OGD 组(用 OGD 处理的 BMECs)、OGD+miR-150 模拟物组(在暴露于 OGD 24 h 之前用 miR-150 模拟物转染的 BMECs)、OGD+miR-NC 组(暴露于 OGD 24 h 前用模拟 NC 转染 BMECs)。此外,为了进一步确定 miR-150 是否通过扩散性 VEGF 介导血管保护作用,研究使用了 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制剂 SU1498 处理细胞。将细胞分组为:对照组、OGD 组(用 OGD 处理的 BMECs)、OGD+miR-150 组(在暴露于 OGD 24 h 之前用 miR-150 模拟物转染 BMECs)、OGD+miR-150+SU1498 组[分别在暴露于 OGD 24 h 之前用 miR-150 模拟物转染 BMECs 和在暴露于 OGD 1 h 之前用 SU1498(10 μmol/L, 美国 MedChemExpress 公司)预处理 BMECs]。

1.6 脑切片的 TTC 染色

第 14 天用戊巴比妥钠深度麻醉大鼠,处死大鼠。取下大脑,在-80℃的温度下短暂冷冻。将大脑冠状切成 5 片 2 mm 切片。切片在 37℃下用 1%TTC(美国 Sigma-Aldrich 公司)染色 30 min。最后,在 4℃下将染色切片转移到 4%多聚甲醛中固定。用 Image J 软件计算梗死面积。

1.7 免疫荧光分析

第 14 天用戊巴比妥钠深度麻醉大鼠,经心灌注肝素盐水(0.9%),取脑组织,用 4%多聚甲醛固定石蜡包埋。然后将石蜡块切割成 10 μm 切片,采用多聚赖氨酸涂层玻片进行贴

片(美国 Thermo Scientific 公司),然后在 45℃下孵育过夜。切片经 2 次二甲苯脱蜡,每次 5 min,然后依次转入 100%、90%、70%乙醇溶液中,每次 1 min。用蒸馏水冲洗切片 5 min。对于免疫荧光,通过在含有 10 mmol/L 柠檬酸(pH 6.2)、2 mmol/L EDTA 和 0.05%吐温-20 的柠檬酸-EDTA 缓冲液中加热载玻片 30 min 来回收抗原。用 1×PBS(3×10 min)清洗脑切片,并在室温下在封闭溶液(0.3%Triton X-100 在 1×PBS 中+10%血清)中封闭 1 h。然后将切片在 4℃的 CD31(1:100;美国 Santa Cruz 公司)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)(1:100;美国 Bioss 公司)和 VEGFR2(1:100;Bioss)一级抗体溶液中孵育过夜。次日,在室温下用 Alexa-Fluor488 抗山羊二级抗体或 Alexa Fluor 488、594 抗兔、鼠二级抗体(美国 Abcam 公司)孵育 1 h。最后,将切片与 DAPI 孵育 10 min 后在显微镜下观察结果。

分化条件下的 BMECs 用 PBS 洗涤 1 次,室温下用 4%多聚甲醛固定 10 min。用 PBS 洗涤 3 次后,用含 0.1%(v/v) Triton X-100 的 10%山羊血清在室温下孵育 1 h。然后将 BMECs 与一级抗体在封闭溶液中于 4℃孵育过夜。次日,用 Alexa Fluor 二级抗体在室温下轻轻摇动进一步孵育细胞 1 h。最后,将切片与 DAPI 孵育 10 min 后在显微镜下观察结果。

1.8 实时定量 PCR 分析

对于 miR-150 表达分析,使用 TaqMan MicroRNA 逆转录试剂盒(美国 ThermoFisher Scientific 公司)在 S1000™ 热循环 PCR 扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)合成 cDNA。然后通过 TaqMan(美国 Life Technologies 公司)的 miR-150 探针进行实时 PCR 以定量 miR-150 的表达。U6 作为内源性对照用于标准化。实时 PCR 由 SYBR Premix Ex Taq II(Takara)进行。GAPDH 作为内源性对照用于标准化。使用标准的 2^{-ΔΔCt}(周期阈值)方法测定 miR-193b-3p 和 mRNAs 的相对表达水平。用于实时 PCR 的引物序列如下:miR-150 正向:5'-CTT-GAAGGTAATGGAACCCGG-3',反向:5'-GTGATACCCGTG-GTAGTACCTC-3';U6 正向:5'-AGGACTATCGTCCGATC-AAC-3',反向:5'-GCCCTCACACCTGCACTGTGTC-3'。

1.9 Western blot 分析

收集梗死半球或 BMECs 中的蛋白质,并在 SDS-PAGE 凝胶上进行蛋白质印迹。为避免蛋白质降解,使用含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解缓冲液。将膜与 5%脱脂奶粉缓冲液孵育 1 h,然后与兔抗 CD31(1:500,美国 Santa Cruz 公司)、兔抗 VEGF(1:500,美国 Bioss 公司)、兔抗 VEGFR2(1:1 000,Bioss),P-VEGFR2(Tyr996)(1:1 000,Bioss),PI3K(1:1 000,美国 Proteintech 公司),Akt(1:1 000,Proteintech)和 p-Akt(Ser473)(1:1 000,Proteintech)一级抗体在 4℃孵育过夜。在室温下将膜与山羊抗兔或山羊抗鼠(1:5 000,美国 LI-COR 公司)在摇床中孵育 2 h。最后,采用 ECL 底物试剂盒(美国 Abcam 公司)检测信号,并用 Image J 软件进行定量分析。

1.10 管形成试验

将 Matrigel(美国 Corning 公司)置于冰盒中并在 4℃冰箱中融化过夜。将 10 μL Matrigel 添加到 ibidi 血管生成载玻片的每个孔中并放置在培养箱中 30 min 以凝固。用 miR-150 或 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制剂 SU1498(10 μmol/L)预处理后,细胞以 2×10⁵ 个/mL 的密度悬浮。将 50 μL 细胞悬液加

入基质凝胶表面,在 OGD 条件下培养,继续处理。8 h 后,采集图像,测量、记录并统计分析节段长度、分支长度、连接和网孔数。

1.11 数据处理

采用 SPSS 20.0 进行统计分析。实验结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)形式表达。多组间比较采用单因素方差分析,以 Turkeys 最小明显性差异作为事后检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 miR-150 在 MCAO 大鼠中的变化

在缺血 24 h 后对大鼠的神经损伤进行评分,以明确 MCAO 模型是否成功建立(图 1A)。结果发现,Sham 组大鼠无神经功能损害,评分为 0;MCAO 大鼠神经功能损害严重,评分增高,说明造模成功。RT-qPCR 分析结果(图 1B)显示,与 Sham 组相比,MCAO 大鼠 miR-150 下调(1.00 ± 0.03 vs. 0.34 ± 0.04 , $t=7.184$, $P<0.001$)。

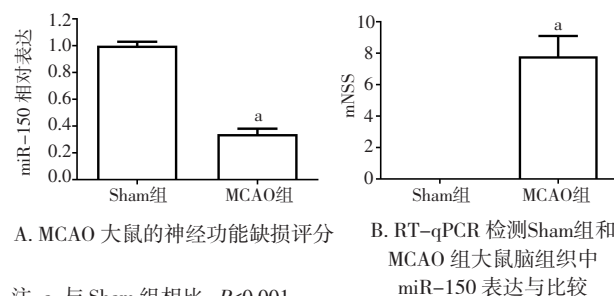


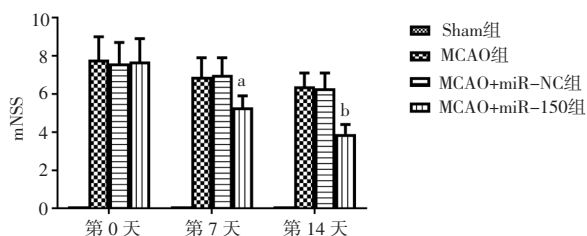
图 1 miR-150 在 MCAO 大鼠中的变化 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

2.2 miR-150 过表达对 MCAO 大鼠脑损伤的保护作用

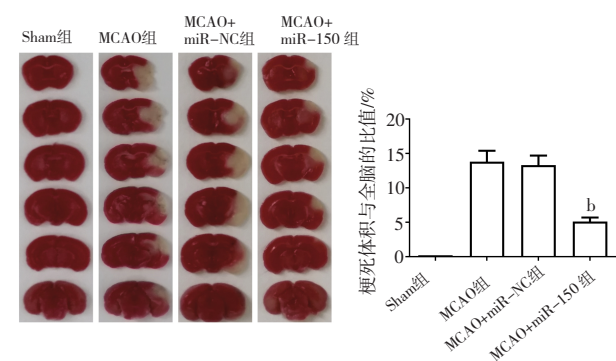
在 MCAO 后第 0、7 和 14 天评估脑缺血大鼠 mNSS。除 Sham 组外,其余各组大鼠的初始平均神经功能缺损评分均为 4~12 分,组间无统计学差异。第 7 天和第 14 天,MCAO 组大鼠的神经功能缺损评分与第 0 天 MCAO 组相比略有下降,但无统计学差异。然而,与 MCAO 组相比,miR-150 处理组的神经功能缺损评分在第 7 天(6.9 ± 1.0 vs. 5.3 ± 0.6)和第 14 天(6.4 ± 0.7 vs. 3.9 ± 0.5)明显降低($F=365.730/414.230$, 均 $P<0.001$)(图 2A)。在 MCAO 后第 14 天,Sham 大鼠脑切片 TTC 染色呈深红色,未见梗死。在 MCAO 组,梗死的大脑半球可见几乎整个右皮质、丘脑和下丘脑的苍白梗死区。与 MCAO 组大鼠相比,miR-150 处理组大鼠的梗死体积明显减少[(13.8 ± 1.6)% vs. (5.1 ± 0.6)%], $F=47.820$, $P<0.001$](图 2B)。这一结果与神经功能缺损评分的变化一致。

在局灶性脑缺血再通后,血管损伤通过破坏血脑屏障的完整性并导致微循环阻塞,在决定组织存活方面起关键作用。对于缺血性卒中,血管重塑是一种很有前途的治疗策略。本研究用 CD31 标记血管,观察梗死区血管生成情况。与 Sham 组相比,MCAO 组血管密度明显减少。然而,用 miR-150 处理组在 MCAO 后第 14 天的血管密度明显高于 MCAO 组[(120.12 ± 8.05)% vs. (161.88 ± 10.93)%]($F=33.14$, $P<0.001$, 图 2C)。此外,Western blot 分析也证实了 miR-150 处理组梗

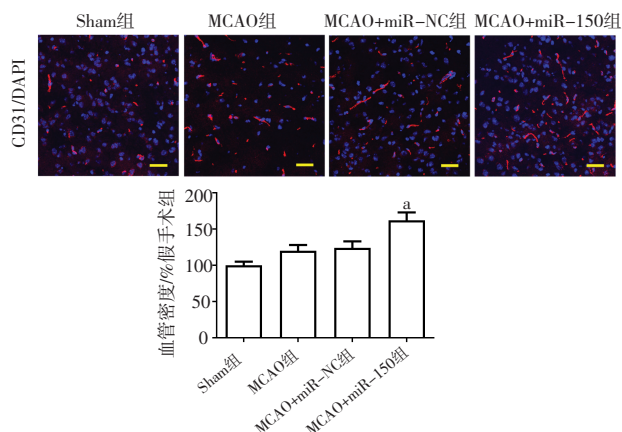
死组织中 CD31 蛋白表达高于 MCAO 组[(118.07 ± 3.94)% vs. (182.45 ± 7.04)%]($F=134.52, P<0.001$, 图 2D)。



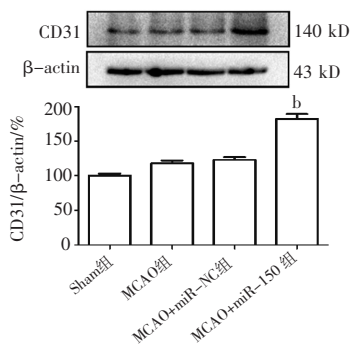
A. MCAO 后不同时间点各组大鼠 mNSS 评分



B. 各组 TTC 染色的代表性图像及脑梗死体积的定量分析 ($n=6$)



C. 免疫荧光分析 MCAO 后第 14 天各组梗死区血管数量 (CD31 阳性) 及定量分析 (比例尺=100 μ m)



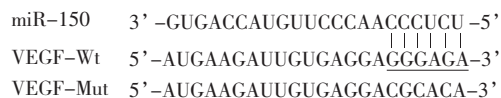
D. Western blot 分析各组大鼠脑梗死组织中 CD31 蛋白表达及定量分析

注: a, 与 MCAO 组相比, $P<0.01$; b, 与 MCAO 组相比, $P<0.001$

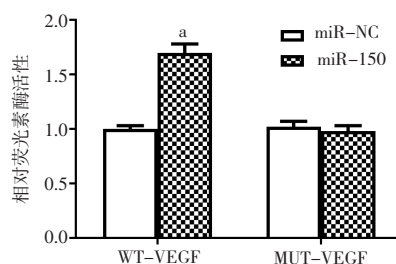
图 2 miR-150 上调对 MCAO 大鼠脑损伤的保护作用 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

2.3 miR-150 直接与 VEGF 的 UTR 结合

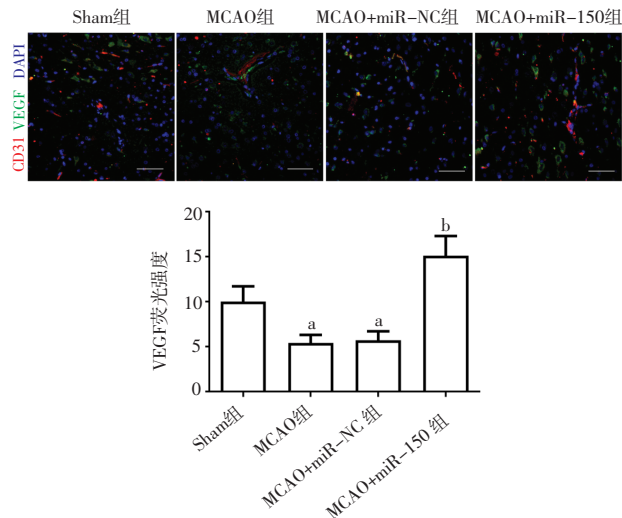
为了进一步研究 miR-150 调节 MCAO 大鼠脑损伤中的作用机制, 研究使用 TargetScan 和 miRanda 分析了 miR-150 的潜在靶点。结果显示, VEGF 基因是 miR-150 的靶基因 (图 3A), 通过荧光素酶报告基因分析进一步证实了这一点 (图 3B)。此外, 在 miR-150 处理的 MCAO 大鼠脑梗死组织中, VEGF 表达上调 (图 3C), 表明 VEGF 与 miR-150 表达正相关。



A. VEGF 3' UTR 上 miR-129b-5p 结合位点的预测及靶序列的突变



B. 将 miR-150 模拟物或 NC 模拟物与 pmir-WT-VEGF 3' UTR 或 pmir-MUT-VEGF 3' UTR 共转染 BMECs 细胞, 测定荧光素酶活性



注: a, 与 Sham 组相比, $P<0.01$; b, 与 MCAO 组相比, $P<0.001$

C. 免疫荧光法检测 MCAO 大鼠脑梗死组织中 VEGF 的表达 (比例尺=100 μ m)

图 3 miR-150 直接与 VEGF 的 UTR 结合 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

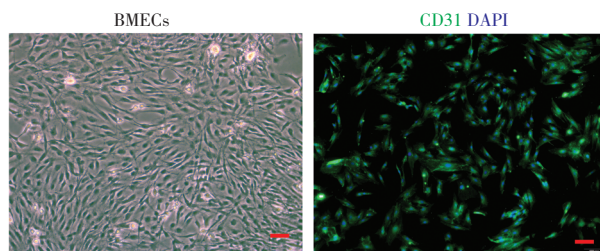
2.4 miR-150 通过靶向 VEGF 保护 BMECs 免受 OGD 损伤并促进血管生成

从 10 日龄新生大鼠获得的原代 BMECs 呈梭形或鹅卵石样外观, 并显示 CD31 阳性免疫染色 (图 4A)。免疫荧光共染色显示, 与对照组相比, OGD 组共表达 VEGF/VEGFR2 的

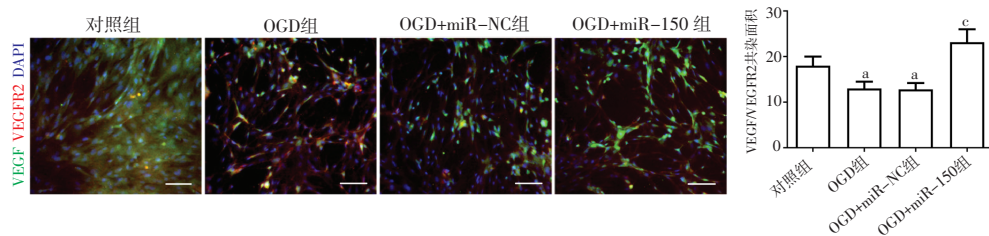
细胞面积明显减少 $[(18.02 \pm 1.98)\% \text{ vs. } (13.17 \pm 1.54)\%]$ 。此外,与 OGD 组相比,OGD+miR-150 组的 VEGF/VEGFR2 共表达区域明显增加 $[(13.17 \pm 1.54)\% \text{ vs. } (23.22 \pm 2.80)\%]$ ($F=153.42, P<0.001$,图 4B)。为了进一步确定 miR-150 是否通过扩散性 VEGF 介导血管保护作用,研究使用了 VEGFR2 酪氨酸激酶抑制剂 SU1498。SU1498 明显抑制 miR-150 体外促进的 BMECs 管形成,并明显降低管的节段长度、分支长度、连接数和网孔数($F=152.37, 204.73, 188.36, 264.29$,均 $P<0.001$,图 4C)。此外,与 OGD+miR-150 组相比,OGD+miR-150+SU1498 组 VEGF 相关通路蛋白 p-VEGFR2/VEGFR2、PI3K 和 P-Akt/Akt 的表达水平明显降低($F=88.46, 164.15, 99.54$,均 $P<0.001$,图 4D)。这些结果表明 miR-150 通过靶向 VEGF 信号通路在 BMECs 中发挥重要的保护作用并促进血管生成。

3 讨论

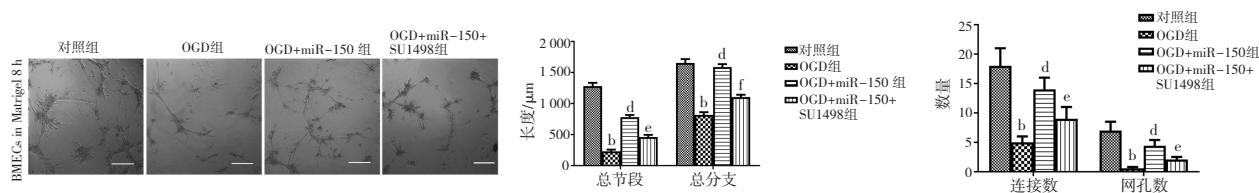
一般认为,mNSS 能从宏观上反映脑缺血大鼠病理状态的严重程度,是目前评价局灶性缺血模型构建和评价潜在治疗方案的“金标准”^[9]。本研究中,电凝诱导的脑缺血大鼠的基础神经功能缺损评分为 4~12 分,表明 MCAO 大鼠存在中度脑缺血损伤。本研究发现 miR-150 模拟物治疗第 7 天或第 14 天后,MCAO 大鼠的神经功能缺损评分降至 3~5 分,说明 miR-150 上调改善了脑缺血大鼠的神经功能。梗死体积是一个可接受的终点和衡量神经元损失的指标。相应于 mNSS 评分的降低,miR-150 处理



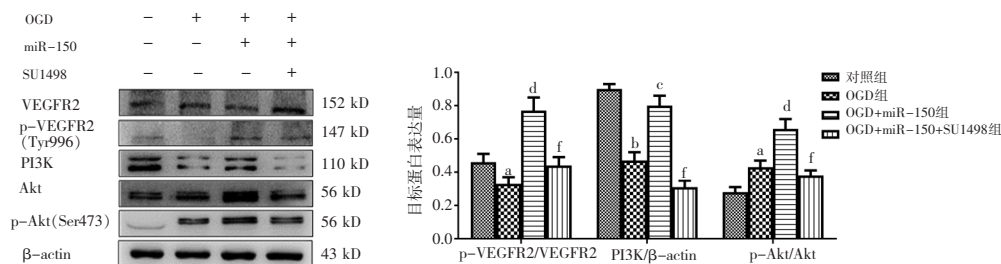
A. 10 日龄 SD 大鼠皮质原代 BMECs 代表图及免疫组化显示 CD31 阳性(比例尺=100 μm)



B. 免疫荧光共染色显示各组 BMECs 中 VEGF/VEGFR2 的荧光强度及定量分析(比例尺=100 μm)



C. SU1498 联合 miR-150 对 BMECs 成管的影响及管的总节段长度、总分支长度、连接数和网孔数的定量分析(比例尺=100 μm)



D. Western blot 分析 SU1498 联合 miR-150 对 BMECs 中 VEGF 通路相关蛋白表达的影响及定量分析与比较

注:与对照组相比,^a $P<0.05$,^b $P<0.001$;与 OGD 组相比,^c $P<0.01$,^d $P<0.001$;与 OGD+miR-150 组相比,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$

图 4 miR-150 通过靶向 VEGF 保护 BMECs 免受 OGD 损伤并促进血管生成 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组的脑梗死体积在治疗第 14 天后明显减少,表明 miR-150 阻止了脑缺血大鼠梗死面积的扩大。此外,miR-150 上调能有效改善梗死组织的坏死和空泡化,维持梗死区附近组织的完整性。结果表明,miR-150 上调对脑缺血大鼠有较好的治疗作用。

研究表明 miRNAs 可以调控血管生成^[10],如 Du K 等^[11]发现 miR-191 通过靶向 VEZF1 抑制血管生成在促进缺血性脑损伤中发挥重要作用;Li J 等^[12]发现 microRNA-381-3p 通过抑制 Cebpb 和 Map3k8,促进血管生成,抑制炎症,从而保护缺血性卒中。miR-150 是哺乳动物中进化上相对保守的 microRNA,既往研究发现其在造血和肿瘤发生中起重要作用^[5]。最近也有报道称 miR-150 可能是调控血管生成的一种重要 microRNA^[6-7]。尽管如此,尚不清楚 miR-150 促血管生成作用是否对脑梗死后血管修复产生影响。本研究发现 miR-150 在 MCAO 大鼠的大脑中表达明显降低,miR-150 上调促进了 MCAO 大鼠脑梗死区血管生成。体外研究证实 miR-150 通过靶向 VEGF 保护 BMECs 免受 OGD 损伤并促进血管生成。

VEGF 是血管生成过程的关键调节因子,通过 VEGF/VEGFR 信号通路发挥中心调节作用^[13]。因此,促进 VEGF 表达并与相应受体结合,可以建立侧支循环,改善微循环,增强神经保护作用。大量研究表明,VEGF 结合受体 VEGFR2 在 VEGF 的作用下传递关键的血管生成信号^[14]。本研究中,VEGFR2 酪氨酸激酶抑制剂 SU1498 被用来验证 miR-150 在激活 VEGF 通路中的作用。结果表明,SU1498 可以抑制 miR-150 激活 VEGF 通路和保护血管结构的作用。缺血性卒中的血液供应障碍导致脑组织缺氧,这种缺氧环境促进了 VEGF 表达水平的增加和动态变化^[15]。一般认为,VEGF 的表达在缺血性卒中后的急性期增加,在恢复期减少^[15]。这与本研究中脑缺血第 14 天后 VEGF 表达明显降低相一致。体内外研究结果表明,miR-150 上调可促进 MCAO 大鼠梗死组织中 VEGF 的表达,从而激活 VEGF/VEGFR2 的下游信号通路,进一步促进 PI3K/Akt 产生,维持 BMECs 的活性,促进 BMECs 的血管生成。

本研究证明 miR-150 上调可改善 MCAO 大鼠的神经功能缺损和脑梗死体积,促进梗死区附近的血管生成。此外还发现 miR-150 上调对 OGD 暴露的 BMECs 有保护作用,并在体外促进 BMECs 成管。miR-150 发挥血管保护作用 and 促进血管生成的具体机制涉及 VEGF 信号通路的激活。

参 考 文 献

[1] 覃惠淘,高文,张皆德,等. 血管内取栓治疗超时间窗缺血性

卒中患者的临床疗效分析[J]. 中国脑血管病杂志,2019,16(10):533-538.

Qin HX, Gao W, Zhang JD, et al. Clinical efficacy of endovascular thrombectomy in patients with ischemic stroke beyond the time window [J]. Chin J Cerebrovasc Dis, 2019, 16(10):533-538.

[2] Deng WJ, Fan CH, Zhao YN, et al. microRNA-130a regulates neurological deficit and angiogenesis in rats with ischaemic stroke by targeting XIAP[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(18):10987-11000.

[3] Jiang YL, Liu WW, Wang Y, et al. miR-210 suppresses neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through regulating VEGF-Notch signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(1):2.

[4] Wang XD, Shi CX, Pan HX, et al. microRNA-22 exerts its neuro-protective and angiogenic functions via regulating PI3K/Akt signaling pathway in cerebral ischemia-reperfusion rats[J]. J Neural Transm (Vienna), 2020, 127(1):35-44.

[5] 郭照萌,曾宪海,刘丽芳,等. miR-150 及其靶基因 IRAK2 在变应性鼻炎小鼠模型中的表达[J]. 中华临床免疫和变态反应杂志, 2020, 14(1):11-16, F0001.

Guo ZM, Zeng XH, Liu LF, et al. Expression of miR-150 and its target gene IRAK2 in allergic rhinitis mice[J]. Chin J Allergy Clin Immunol, 2020, 14(1):11-16, F0001.

[6] Wu Z, Cheng SJ, Wang SP, et al. BMSCs-derived exosomal microRNA-150-5p attenuates myocardial infarction in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 93:107389.

[7] Liu YC, Zhao LM, Li DM, et al. Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development[J]. Protein Cell, 2013, 4(12):932-941.

[8] Su WS, Wu CH, Chen SF, et al. Low-intensity pulsed ultrasound improves behavioral and histological outcomes after experimental traumatic brain injury[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):15524.

[9] 杨镇圭,张勇,程敬亮,等. 急性大脑中动脉栓塞大鼠缺血半暗带动态演变的氧激发 MRI 研究[J]. 中华放射学杂志, 2020, 54(6):592-599.

Yang ZG, Zhang Y, Cheng JL, et al. Oxygen-challenge MR study on the dynamic evolution of ischemic penumbra in rats with middle cerebral artery occlusion[J]. Chin J Radiol, 2020, 54(6):592-599.

[10] Li GW, Morris-Blanco KC, Lopez MS, et al. Impact of microRNAs on ischemic stroke: from pre- to post-disease[J]. Prog Neurobiol, 2018, 163/164:59-78.

[11] Du K, Zhao C, Wang L, et al. miR-191 inhibit angiogenesis after acute ischemic stroke targeting VEZF1[J]. Aging, 2019, 11(9):2762-2786.

[12] Li J, Lv H, Che YQ. microRNA-381-3p confers protection against ischemic stroke through promoting angiogenesis and inhibiting inflammation by suppressing cebpb and Map3k8[J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(8):1307-1319.

[13] Yang GL, Li LY. Counterbalance: modulation of VEGF/VEGFR activities by TNFSF15[J]. Signal Transduct Target Ther, 2018, 3:21.

[14] Pianta S, Lee JY, Tuazon JP, et al. A short bout of exercise prior to stroke improves functional outcomes by enhancing angiogenesis[J]. Neuromolecular Med, 2019, 21(4):517-528.

[15] Liu Y, Ran H, Xiao YP, et al. Knockdown of HIF-1 α impairs post-ischemic vascular reconstruction in the brain via deficient homing and sprouting bmEPCs[J]. Brain Pathol, 2018, 28(6):860-874.

(责任编辑:冉明会)