

miR-34c 在大鼠局灶性脑缺血模型中的表达*

张淑艺^{1▲} 秦红亚^{1▲} 商溪溪^{1▲} 王晓莹^{1▲} 张 虎^{1▲} 王春梅^{2△}

(¹ 济宁医学院; ² 济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

摘要 目的 通过检测 miR-34c 及其靶基因在大鼠局灶性脑缺血模型中的表达变化,初步探讨 miR-34c 及其靶基因在大鼠局灶性脑缺血中的作用。**方法** 首先利用线栓法制备大鼠局灶性脑缺血模型;然后利用 qRT-PCR 检测 miR-34c 在大鼠脑缺血不同时间点的表达变化;利用生物信息学方法预测 miR-34c 的可能靶基因;再利用 RT-PCR 和 qRT-PCR 方法检测靶基因在大鼠脑缺血不同时间点的表达变化。**结果** 成功制备大鼠局灶性脑缺血模型;miR-34c 在大鼠脑缺血模型中随着缺血时间的延长其表达呈下降趋势;靶基因 Hspa1b、Cacna2d1、Sperping1、Cntn2 在大鼠脑缺血模型中随着缺血时间的延长其表达呈明显上升趋势。**结论** miR-34c 通过靶基因在大鼠局灶性脑缺血损伤过程中起到重要的保护作用。

关键词 miR-34c;大鼠局灶性脑缺血;靶基因

中图分类号:R37 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2017)02-072-05

The expression of miR-34c in rat model of focal cerebral ischemia

ZHANG Shuyi¹, QIN Hongya¹, SHANG Xixi¹, WANG Xiaoying¹, ZHANG Hu¹, WANG Chunmei²

(¹ Jining Medical University; ² School of Basic Medicine Sciences, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To detect the expression of miR-34c in middle cerebral artery occlusion (MCAO) model of rats and to preliminarily explore the function of miR-34c and its target genes in MCAO. **Methods** MCAO model of rats were prepared using thread embolism method. The expression of miR-34c was detected in model of MCAO at different times using qRT-PCR. The targets of miR-34c were predicted using bioinformatics methods. RT-PCR and qRT-PCR were further used to evaluated the expression of targets in model of MCAO at different times. **Results** MCAO model of rat was successfully prepared. The expression of miR-34c was gradually decreased in model of MCAO at different times. However, predicated targets were obviously up-regulated in model of MCAO at different times. **Conclusion** miR-34c and its targets are involved in the process of MCAO which play an important protective role.

Keywords: miR-34c; Middle cerebral artery occlusion; Target genes

miRNAs 是真核生物中普遍存在的非编码 RNA 分子,主要通过与其靶基因 mRNA 的 3'-UTR 不完全配对,抑制靶基因 mRNA 的翻译,从而参与生物的发育、增值、周期、凋亡等重要过程^[1-3]。研究证实 miR-34c 在疾病的发生发展过程中发挥重要作用。Yang 等^[4]研究发现 miR-34c 在乳腺肿瘤细胞和组织中的表达下调,过表达 miR-34c 能明显抑制乳腺癌细胞的转移与入侵。Li 等^[5]研究发现

miR-34c 在鼻咽癌细胞及临床标本中的表达降低,进一步体外实验发现 miR-34c 可抑制鼻咽癌细胞的生长和迁移。而关于 miR-34c 在脑缺血损伤中的研究较少。本研究中,我们制备大鼠局灶性脑缺血模型,分别在缺血 2、6、24h 后,分别检测 miR-34c 及其靶基因的表达变化,为后续深入研究 miR-34c 在缺血损伤过程中的具体作用及作用机制提供前期实验基础。

* [基金项目] 国家自然科学基金(81501018)
△ [通信作者] 王春梅, E-mail: wangchunmei410@163.com
▲ 济宁医学院 2013 级本科生

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所需大鼠为 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,购自山东鲁抗医药股份有限公司。实验动物的饲养和管理依照国家实验动物饲养管理及济宁医学院实验动物管理条例执行。实验动物饲养室的温度控制在 22 ~ 26 °C,湿度在 50% ~ 60%。实验过程除相关因素所需外,实验动物均自由摄食和饮水,在不影响实验要求和实验结果的基础上实施替代、减少、优化的“3R”原则。

1.2 局灶性脑缺血 MCAO 模型的制备

15 只 Wistar 大鼠饲养到鼠龄 6 ~ 7 周,体重 180 ~ 200g 时,通过大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 法制备局灶性脑缺血模型,操作简述如下:大鼠经 10% 水合氯醛 (0.3ml/100g) 腹腔注射麻醉后,暴露右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎颈总动脉和颈外动脉。沿颈内动脉缓慢插入栓线,遇一定阻力停止进线,插入长度约 (18 ± 2) mm。用缝线结扎并固定渔线,缝合皮肤。分别选 5 只在大脑中动脉阻塞 2 h, 6h 及 24h 后,取相应大鼠海马脑组织进行相关实验。5 只大鼠进行假手术不插入线栓,其余步骤同上。

1.3 miR-34c 表达检测

Trizol 法提取上述海马组织的总 RNA,紫外吸收测定法和甲醛变性电泳检测总 RNA 的浓度和纯度。利用 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化科技有限公司) 将总 RNA 逆转录成 cDNA。再利用 miRNA 荧光定量试剂盒 (天根生化科技有限公司) 对 miR-34c 的表达进行检测。qRT-PCR 反应体系 (20μl): 2 × Premix 缓冲液 10μl, 10μM 特异引物 0.6μl, 10μM 通用引物 0.6μl, cDNA 2μl, dd H₂O 6.8μl。将以上反应体系加入 96 孔反应板内,同时设未加模板的阴性对照孔,反应在罗氏荧光定量 PCR 仪 (Roche 480) 进行。qRT-PCR 反应条件:95 °C 15min; 95 °C 10s, 60 °C 20s, 72 °C 30s, 40 个循环; 37 °C 保存。计算机自动分析每组 miR-34c 和内参照 U6 的 CT 值,利用公式计算 miR-34c 表达的相对水平。每个反应设 3 个复孔,结果为 3 次实验的平均值。

1.4 miR-34c-5p 靶基因的预测

利用生物网站公布的数据库 miRBase (<http://www.mirbase.org/>)、TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) 及 miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) 对 miR-34c 可能调控的靶基因进行预测。

然后利用 Venny 2.0 将 3 个数据库所检索到的靶基因进行交集 (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)。进一步通过基因功能注释 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 与文献检索,挑选 miR-34c 可能的靶基因。

1.5 RT-PCR 检测靶基因在 mRNA 水平的表达

利用 FastQuant RT kit with gDNase (天根生化科技有限公司) 将所提总 RNA 逆转录成 cDNA,首先配置去除 gDNA 体系 (10μl): 总 RNA 1μg, 5 × gDNA Buffer 2μl, dd H₂O 补足到 10μl。混匀,42 °C 孵育 3min。之后置于冰上。然后配置反转录体系 (20μl): 10 × Fast Buffer 2μl, RT Enzyme Mix 1μl, FQ-RT Primer Mix 2μl, dd H₂O 10μl, 混匀后加入去除 gDNA 体系内,42 °C 孵育 15min, 然后 95 °C 变性 3min。

将上述逆转录的 cDNA 进行 PCR 扩增,扩增体系 (20μl) 如下: 2 × PCR Mix 10μl, 10μM 上游引物 0.4μl, 10μM 下游引物 0.4μl, cDNA 模板 1μl, dd H₂O 8.2μl。扩增条件为: 94 °C 3min; 94 °C 40s, 55 °C 40s, 72 °C 50s, 30 个循环; 72 °C 10min, 最后 4 °C 保存。同时以 β-actin 为内参对照 (引物序列见表 1)。PCR 扩增后,扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳 (100V, 30min), 电泳结束后在凝胶扫描仪上记录实验结果,并利用软件对电泳条带进行分析。

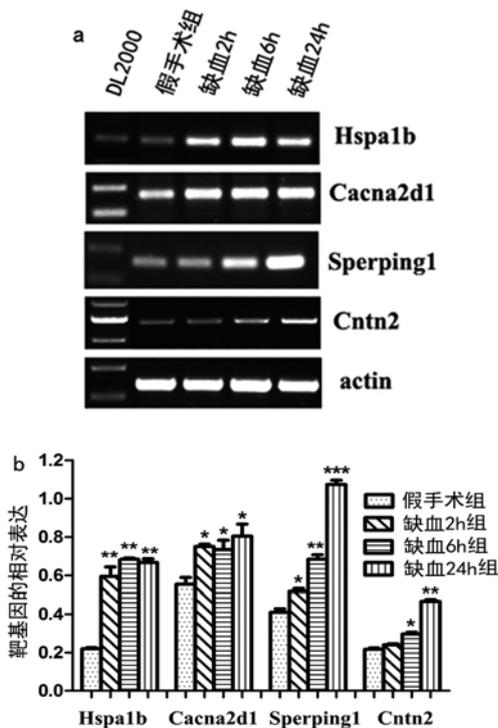
表 1 引物序列及扩增片段大小

基因名称	引物序列	片段大小
β-actin	Forward: 5' -tggaaatcctgtggcatccatgaaac-3'	249bp
	Reverse: 5' -taaacgcagctcagtaaacagctccg-3'	
Hspa1b	Forward: 5' -tctaacacgctggctgagaa-3'	233bp
	Reverse: 5' -agcagccatcaagagctgtgt-3'	
Caena2d1	Forward: 5' -aagtgacctggctgacctatg-3'	243bp
	Reverse: 5' -ttggccatcagaagaatcc-3'	
Sperping1	Forward: 5' -ccgccctccacagcctcagc-3'	186bp
	Forward: 5' -ttggtctcagccttcttctgt-3'	
Cntn2	Forward: 5' -gcagcagtgagggtattgtt-3'	728bp
	Reverse: 5' -cttcagctcccgtagctctgg-3'	

1.6 qRT-PCR 检测靶基因的表达

利用 SuperReal PreMix Plus 试剂盒 (天根生化科技有限公司) 将上述逆转录的 cDNA 进行 qRT-PCR 扩增 (20μl): 上游引物 0.6μl, 下游引物 0.6μl, 模板 2μl, dd H₂O 6.8μl, 2 × SYBR Premix Ex

鼠脑局部缺血过程中发挥重要作用,而且其作用机制不尽相同。由于在缺血过程中随着缺血时间的增加 miR-34c 的表达呈明显下降趋势,而 4 个靶基因的表达呈明显上升趋势,所以进一步判断这些基因可能是 miR-34c 的靶基因,他们可能是通过 miR-34c 的调控作用来发挥功能的。

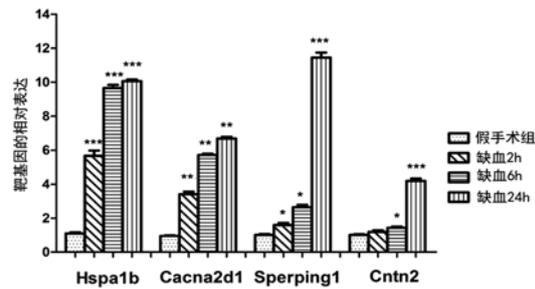


注:a 代表 RT-PCR 检测结果;b 代表凝胶条带的读数,与假手术组相比,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

图 3 RT-PCR 检测靶基因的表达变化

2.4 qRT-PCR 检测靶基因的表达情况

进一步利用 qRT-PCR 方法检测 4 个靶基因在大鼠局部脑缺血 2h, 6h 及 24h 模型中的表达变化。检测结果与 RT-PCR 方法基本一致。Hspa1b 基因的表达量在缺血 2h 时增加了 4.6 倍,缺血 6h 增加了 8.6 倍,缺血 24h 虽然升高,但与 6h 相比没有显著差异。Cacna2d1 基因的表达量在缺血 2h 上升了 2.4 倍,缺血 6h 上升了 5.71 倍,缺血 24h 上升了 6.68 倍。基因 Sperping1 的表达在缺血 2h 上升没有达到统计学意义,缺血 6h 具有统计学意义,24h 表达显著升高,是对照的 11.45 倍。基因 Cntn2 的表达趋势同样是 24h 表达显著,是对照的 4.19 倍。qRT-PCR 结果进一步表明这 4 个靶基因在大鼠局部脑缺血损伤过程中起到重要作用。见图 4。



注:与假手术组相比,* $P < 0.05$;** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

图 4 qRT-PCR 检测靶基因的表达变化

3 讨论

缺血性脑损伤为临床神经系统常见疾病,可引起缺血组织的细胞缺血,最终导致细胞坏死,造成不可逆的脑损伤。目前研究揭示可能与炎症反应、细胞凋亡、持程序性坏死等因素有关,但具体的机制还不清楚。近年来研究揭示,大脑局部缺血可引起脑组织 miRNAs 的表达谱发生显著的变化,表明 miRNAs 参与了脑缺血的损伤过程。Dharap 等^[6]研究显示,大鼠脑缺血后大脑皮层的 miRNAs 快速发生变化,缺血后 6h 至 3d,有 20 个 miRNAs 的表达发生改变,其中至少有 9 个 miRNAs 的表达差异显著。Lee 等^[7]证实大鼠脑缺血 3h 后,miR-200 家族(miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 and miR-429)和 miR-182 家族(miR-182, miR-183 and miR-96)表达上调;脑缺血 24h 后,miR-19 和 miR-681 表达上调,而 miR-468 表达下调。本研究中我们检测了 miR-34c 在大鼠局部脑缺血后 1h, 2h 及 24h 后的表达,发现随着缺血时间的增长,miR-34c 在海马组织中的表达呈明显下降趋势,表明 miR-34c 在大鼠局部缺血过程发挥重要保护作用。

miRNA 主要是通过调控其不同靶基因的表达来调控各种生物过程的,其中生物信息学方法是预测 miRNA 靶基因的重要方法。Zhang 等^[8]利用生物信息学软件预测 miR-34c 的靶基因,预测到 3 个基因: 锌指蛋白 148 (zfn148), Kruppel 样因子 4 (KLF4) 和血小板衍生生长因子受体 α (PDGFRA),这 3 个基因对精子发生和雄性生殖发育相关。Song 等^[9]预测蛋白激酶 C 底物 (MARCKS) miR-34c-3p 特异靶基因,miR-34c-3p 通过调控 MARCKS 基因的表达来抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。本研究中我们通过 3 个数据库、数据库交集及

靶基因的功能富集,最终筛选 4 个基因作为 miR-34c 的靶基因。并进一步通过 RT-PCR 方法检测到这几个靶基因在大鼠局部脑缺血模型中的表达均随着缺血时间的增加而成明显上升的趋势,进一步表明这 4 个基因可能是 miR-34c 的靶基因。我们将在后续的研究中验证这 4 个靶基因的功能,进一步阐述 miR-34c 的功能意义。

综上所述,本研究中我们检测到 miR-34c 在大鼠局部脑缺血不同时间点模型中的表达变化,并利用生物信息学方法预测 miR-34c 的靶基因,以及检测到靶基因在大鼠局部脑缺血不同时间点模型中的表达情况。这为后续深入研究 miR-34c 在缺血损伤中的作用机制提供重要的前期实验基础。

参考文献:

[1] Katz MG, Fargnoli AS, Kendle AP, et al. The role of microRNAs in cardiac development and regenerative capacity[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(5): H528-H541. DOI: 10. 1152/ajpheart. 00181. 2015.

[2] Lin C, Huang F, Shen G, et al. MicroRNA-101 regulates the viability and invasion of cervical cancer cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10148-10155.

[3] Iqbal N, Mei J, Liu J, et al. miR-34a is essential for p19 (Arf)-driven cell cycle arrest[J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 792-800. DOI:10. 4161/cc. 27725.

[4] Yang S, Li Y, Gao J, et al. MicroRNA-34 suppresses

breast cancer invasion and metastasis by directly targeting Fra-1 [J]. Oncogene, 2013, 32(36): 4294-4303. DOI:10. 1038/onc. 2012. 432.

[5] Li YQ, Ren XY, He QM, et al. MiR-34c suppresses tumor growth and metastasis in nasopharyngeal carcinoma by targeting MET [J]. Cell Death Dis, 2015, 6: e1618. DOI:10. 1038/cddis. 2014. 582.

[6] Dharap A, Vemuganti R. Ischemic pre-conditioning alters cerebral microRNAs that are upstream to neuroprotective signaling pathways[J]. J Neurochem, 2010, 113(6): 1685-1691. DOI: 10. 1111/j. 1471-4159. 2010. 06735. x.

[7] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning[J]. Stroke, 2010, 41(8): 1646-1651. DOI:10. 1161/STROKEAHA. 110. 579649.

[8] Zhang X, Zhao W, Li C, et al. Differential expression of miR-34c and its predicted target genes in testicular tissue at different development stages of swine [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2015, 28(11): 1532-1536. DOI:10. 5713/ajas. 15. 0047.

[9] Song J, Wang Q, Luo Y, et al. miR-34c-3p inhibits cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting MARCKS [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12728-12737. DOI: 10. 3892/ijo. 2015. 3112.

(收稿日期 2016-11-07)

(责任编辑:石俊强)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿中表、图的要求

来稿中的表、图均须置于正文中,切勿单独放于文后。每幅表、图应有言简意赅的题目。

统计表格一律采用"三线表"格式,不用纵线、斜线。要合理安排纵表的横标目,并将数据的含义表达清楚;若有合计或统计学处理行(如 F 值、P 值等),则在该行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标保留的小数位数相同。

图片应清晰,不宜过大。图的宽×高为 7cm×5cm,最大宽度半栏图不超过 7.5cm,通栏图不超过 17.0cm,高与宽的比例应掌握在 5:7 左右。

本刊编辑部