DOI:10. 15972/j. cnki. 43-1509/r. 2015. 03. 010

·临床医学·

miR-335 在急性缺血性脑卒中表达下调及对钙调蛋白的调控作用

袁 梅[1],汤永红[1],袁海军[2*],周成芳[1]

(1. 南华大学附属第二医院神经内科,湖南 衡阳 421001;2. 南华大学附属第二医院急诊科)

摘 要: **目的** 检测微小 RNA-335 在急性缺血性脑卒中(AIS)患者血清中的表达,并探讨其对钙调蛋白(CaM)调控的作用机制。 **方法** 采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)法测定 106 例 AIS 患者及 98 例健康对照组血清中 miR-335 表达情况;用生物信息学数据库查询分析 miR-335 对钙调蛋白编码基因 CALM1 的靶向结合关系;脂质体转染法将 miR-335 模拟物、抑制物以及相应阴性对照物分别转染至人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中并进行细胞培养,采用逆转录 PCR(RT-PCR)和 Western blot 分别检测干预后 HUVECs 中钙调蛋白 mRNA 和蛋白的表达水平。 **结果** 与健康对照组相比较,AIS 组患者血清 miR-335 表达明显下调($P<0.01$);生物信息学软件的查询分析显示 CALM1 存在 miR-335 潜在靶向结合位点;RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示 miR-335 模拟物组 CaM mRNA 和蛋白的表达水平较对照组显著下降($P<0.01$),而 miR-335 抑制物组 CaM mRNA 和蛋白的表达水平较对照组显著增高(均 $P<0.05$)。 **结论** 急性缺血性脑卒中患者血清 miR-335 表达明显下降,表达下调的 miR-335 可能通过上调钙调蛋白的表达从而发挥重要作用。

关键词: 微小 RNA-335; 钙调蛋白; 急性缺血性脑卒中

中图分类号:R743. 3 **文献标识码:**A

Negative Regulation of Calmodulin by miR-335 in Acute Ischemic Stroke

YUAN Mei, TANG Yonghong, YUAN Haijun, et al

(*Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan* 421001, *China*)

Abstract: **Objective** The miRNA dysfunction is suspected to be a contributing factor for many CNS pathologies including ischemic stroke. The present study investigates the expression of serum miR-335 in acute ischemic stroke (AIS), and explores the underlying mechanisms of miR-335 in acute ischemic stroke (AIS). **Methods** Blood samples were obtained from AIS patients ($n=106$) and healthy controls ($n=98$). MiR-335 was measured by using a quantitative real-time PCR. Bioinformatics database assay was used to determine whether calmodulin gene (CALM1) was the direct target of miR-335. The miR-335 mimics and inhibitors were transfected into human umbilical vein epithelial cells (HUVECs) with lipofectamine respectively. Calmodulin expression was determined by Western blot and reverse transcription-PCR (RT-PCR) in the cultured HUVECs. **Results** Compared with the healthy control group, the expression of serum miR-335 was significantly lower in patients with AIS group ($P<0.01$). In addition, bioinformatics database assay show that the CALM1 present the binding sites, which was potentially targeted by miR-335. Finally, Transfection of the miR-335 mimic inhibited the expression of CaM mRNA and protein in the HUVEC compared to the control group ($P<0.01$), while transfection of the miR-335 inhibitors increased the expression of CaM mRNA and protein ($P<0.05$). **Conclusion** MiR-335 down-regulation may increase the ischemic brain injury through up-regulating the expression of CaM.

Key words: microRNA-335; calmodulin; acute ischemic stroke

收稿日期:2014-10-20;**修回日期:**2015-03-15

基金项目: 衡阳市科技计划项目(2014KJ40).

* **通讯作者,**E-mail:yuanhaijun211@163. com.

钙超载是脑缺血/缺血再灌注损伤的重要启动因素,是导致急性缺血性脑卒中(acute ischemic

stroke,AIS)患者脑组织损害和神经功能障碍的病理生理过程,最终可导致神经元凋亡。而钙离子生理功能的发挥主要是由钙调蛋白(calmodulin,CaM)来调节。以往研究发现脑缺血/缺血再灌注后,钙调蛋白表达量明显升高[1-2]。近年来,研究表明微小 RNA(microRNA,miRNA)调控是基因在转录后表达的非常重要的调控机制,参与了细胞的增殖、分化和凋亡等生命过程的调控,并与脑卒中密切相关[3]。这提示是否存在特定的 miRNA 调控 CaM 表达参与脑卒中后的病理生理过程。研究显示 miR-335 在脑缺血再灌注动物模型脑组织中表达有下调[4]。同时通过生物信息学数据库预测发现钙调蛋白编码基因(CALM1)3′UTR 区存在 miR-335 潜在的靶向结合序列,但目前缺少文献报道。因此,本研究旨在检测 miR-335 在急性缺血性脑卒中患者血清中的表达水平并探讨 miR-335 是否靶向调控钙调蛋白的表达。

1 资料与方法

1.1 一般资料 连续收集 2013 年 6 月 ~12 月本院神经内科和急诊科就诊的发病 14 天内(≤14 天)的急性缺血性脑卒中患者共 106 例,其中男 60 例,女 46 例,年龄 67.6 ±6.2 岁;对照组来自同期本院体检中心健康普查的健康随机个体,共 98 例,男 56 例,女 42 例,年龄 65.9 ±6.8 岁,两组在性别、年龄上无统计学差异。缺血性脑卒中诊断和排除标准参考前期研究报道[3]。本研究经本院医学伦理委员会批准,所有研究对象或家属均知情同意并签署知情同意书。

1.2 材料与试剂 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)购自于中南大学湘雅医院中心试验室,Trizol RNA 抽提试剂(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒 Rever Tra Ace®(日本 TOYOBO 公司),染料法实时荧光定量试剂盒 SYBR® Premix Ex TaqTM(大连 TAKARA 公司),M-MLV 逆转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司),Lipofectamin 2000(美国 Invitrogen 公司),多克隆兔抗人钙调蛋白抗体和山羊抗兔 IgG-HRP 抗体(美国 ABclonal 公司),miR-335 模拟物、抑制物购自上海吉玛生物工程公司,逆转录颈环引物以及 PCR 扩增引物由上海生工生物有限公司合成。

1.3 实时荧光定量聚合酶链反应 所有受测者均抽取静脉血 5 mL,常温下 3 000 r/min 离心 10 min,收集上层血清 1 mL,于 -20 ℃保存备用。采用 Trizol 法提取血清中总 RNA,并用分光光度计检测所提取 RNA 的质量。采用 qRT-PCR 法检测各标本 miR-335 浓度。逆转录和 PCR 扩增均严格按照相应说明书进行操作。以 cel-miR-39 为内。miR-335 颈环引物 5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TCG CAC TGG ATA CGA CAC ATT T-3′,上游引物 5′-CTC CAG CTG TCA AGA GCA ATA AC G AA-3′,下游引物 5′- TCC AGT GCA GGG TCC GAG GT-3。cel-miR-39 颈环引物 5′-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG ACA AAG C -3′,上游引物 5′-CAC TCC GTC ACC GGG TGT AAA TC-3′,下游引物 5′- TCC AGT GCA GGG TCC GAG GT-3。PCR 反应条件:95℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 5 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 40 s,40 个循环。采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算各组 miR-335 的相对表达量。

1.4 生物学软件靶基因预测 通过 TargetScan 和 Miranda 两种生物信息学数据库查询来预测 miR-335 与钙调蛋白编码基因 CALM1 的靶向结合位点。

1.5 细胞培养与转染 HUVECs 细胞接种于 6 孔板中,加入含 10% FBS 的细胞培养液培养,在 37 ℃ 5% CO_2 细胞培养箱中培养,约 80% ~90% 融合时,采用脂质体 Lipofectamine 2000 方法瞬时转染。转染分 5 组:①模拟物干预组(miR-335-mimic 组):加入 has-miR-335 mimics;②模拟物阴性对照组(NC 组):加入阴性对照;③抑制物干预组(miR-335-inhibitor 组):加入 has-miR-335-inhibitors;④抑制物阴性对照组(NC inhibitor 组):加入 NC inhibitor;⑤ 空白对照组(blank 组):不加干预物。严格按照脂质体法进行转染,6 h 内用 OMEM 培养基进行培养,之后改用完全培养基培养 48 h 收取细胞沉淀,实验重复 3 次。

1.6 RT-PCR 检测 用 Trlzol 法分离各组转染培养后的 HUEVC 中总 RNA,并用分光光度计检测所提取 RNA 的质量。采用 RT-PCR 法检各组干预后钙调蛋白 mRNA 的表达水平。逆转录反应及 PCR 均严格按照试剂盒说明书操作。用 β-actin 作为内参。PCR 反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环。每组样本实验重复 3 次。PCR 扩增引物见表 1。

1.7 Western blot 检测 蛋白提取和测定采用 RIPA 裂解液/BCA 蛋白定量试剂盒。

表 1 钙调蛋白基因 RT-PCR 引物

引物	序列(5′-3′)	扩增产物长度
CaLM1-F	5′-TGAAGTGGATGCTGATGGTAATGG-3′	
CaLM1-R	5′-CATAGTTGACTTGTCCGTCTCCAT-3′	257 bp
β-actin-F	5′-CACTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3′	
β-actin-R	5′-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3′	315 bp

配制 12% 分离胶、5% 浓缩胶，加入约 15 μg 蛋白样品，多余空用 2 × SDS 上样缓冲液补齐，然后进行电泳，电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳，进行转膜，冰上转膜 1.5 h，室温封闭 2 h，加入 1∶5 000 稀释的钙调蛋白抗体 4℃轻摇过夜，再加 1∶10 000 稀释的二抗室温孵育 2 h，用 PBST 将膜清洗 3 次后采用 ECL 化学发光法进行显色曝光。β-actin 作为内参。用 Amersham 图像分析系统对 Western blot 目的条带进行光密度扫描，然后用 Quantity One 软件进行灰度值分析，待测蛋白的灰度值/内参灰度值代表目的蛋白的表达量。所有实验均重复 3 次。

1.8 统计学分析 所有数据使用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计数资料比较采用 χ^2 检验，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 miR-335 表达的比较 血清 miR-335 在病例组(0.35 ± 0.26)表达明显低于对照组(1.21 ± 0.32)($P < 0.01$)。

2.2 生物学软件靶基因预测结果 通过 TargetScan 和 Miranda 生物信息学数据库查询分析发现钙调蛋白编码基因 CALM1 存在 miR-335 靶向结合位点，见图 1。

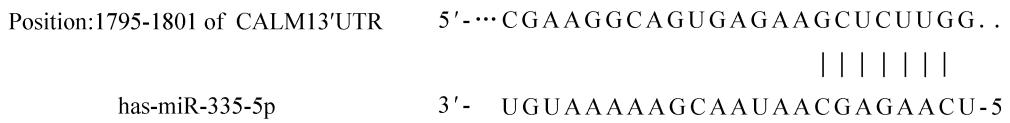

图 1 生物学软件靶基因预测结果 通过生物信息数据库查询发现 miR-335 与 CALM1 存在靶向结合位点

2.3 miR-335 对 CALM1 mRNA 表达的影响 空白对照组、模拟物阴性对照组、抑制物阴性对照组 3 组 CALM1 mRNA 表达差异无显著性（$P > 0.05$）；转染 miR-335 模拟物后，HUVECs 表达 mRNA 的量明显低于空白对照和模拟物阴性对照组（$P < 0.01$）；而转染 miR-335 抑制物后，HUVECs 表达 CALM1 mRNA 的量明显高于空白对照和抑制物阴性对照组（$P < 0.05$），见图 2。这表明 miR-335 影响 CALM1 mRNA 稳定性。

2.4 miR-335 对 CaM 蛋白表达的影响 转染 miR-335 模拟物后，HUVECs 表达 CaM 蛋白的量明显低于空白对照组和阴性对照组（$P < 0.01$）；而转染 miR-335 抑制物后，HUVECs 表达 CaM 蛋白的量明显高于空白对照组和抑制物阴性对照组（$P < 0.01$），见图 3。这表明 miR-335 能显著抑制 CALM1mRNA 翻译影响蛋白的表达水平。

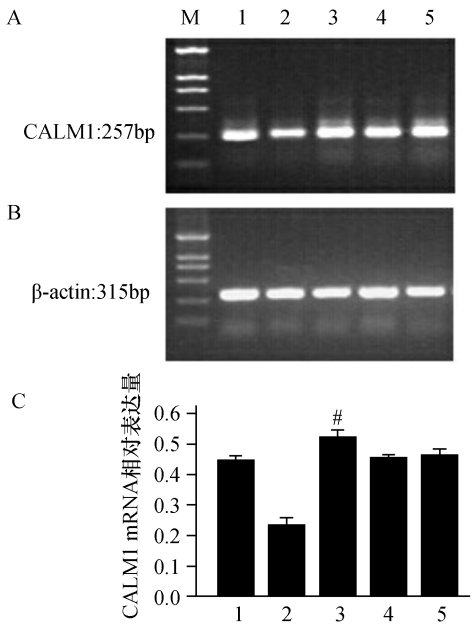

图 2 不同干预组 CALM1 mRNA 的相对表达量 A：CALM1 mRNA PCR 跑胶条带，M：Marker；1：空白对照组；2：miR-335 模拟物组；3：miR-335 抑制物组；4：模拟物阴性对照组；5：抑制物阴性对照组. B：为相应内参 β-actin PCR 跑胶条带. C：相应结果统计图. 与空白对照组和模拟物阴性对照组相比较，*：$P < 0.01$；与空白对照组和抑制物阴性对照组相比较，#：$P < 0.05$

3 讨 论

本研究通过病例-对照研究发现急性缺血性脑卒中患者血清 miR-335 表达水平明显下降，结合前

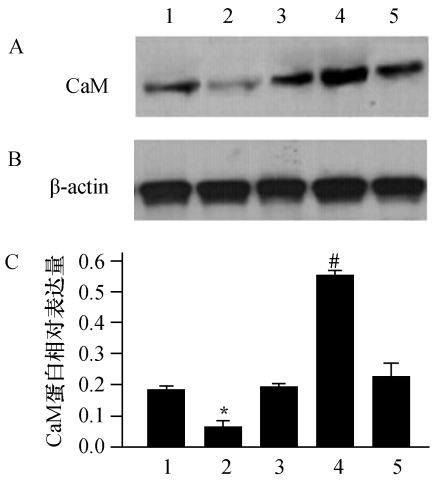

图 3 不同干预组 CaM 蛋白的相对表达量 A:CaM 蛋白条带,1:空白对照组;2:miR-335 模拟物组;3:模拟物阴性对照组;4:miR-335 抑制物组;5:抑制物阴性对照组. B:相应内参 β-actin 蛋白条带. C:相应结果统计图. 与空白组和阴性对照组相比较,*:$P<0.01$;与空白组和抑制物阴性对照组相比较,#:$P<0.01$

期研究及生物学信息软件分析,发现 miR-335 与钙调蛋白的潜在调控关系,并进一步通过体外细胞实验验证了这种调控关系。

微小 RNA(microRNA,miRNA)是一类内源性的 19~25 个核苷酸大小的非编码 RNA 分子,包含特定碱基序列,称为"种子序列",能通过碱基互补匹配原则识别结合靶基因 mRNA 的 3′UTR 特异性序列,抑制靶 mRNA 的翻译或导致其降解,在转录后水平沉默靶基因,对基因表达起着重要的调控作用。miRNA 参与了细胞的代谢、增殖、分化和凋亡及个体发育等生命过程的调控。研究发现 miRNA 参与了神经系统的生长、发育、生理功能和疾病过程,也参与了动脉斑块不稳定性、内皮功能障碍、脑水肿、炎症、细胞凋亡等脑卒中中间环节的调控,与脑卒中有密切相关性[5-7]。识别和鉴定与脑卒中相关的 miRNA,并明确其作用及调控机理,并把他们整合到基因调控网络中是当前表观遗传医学研究的热点,也是脑卒中防治的热点。脑卒中患者治疗预后不佳,是临床工作长期的难题。研究 miRNA 从 RNA 干扰这一表观遗传学角度认识脑卒中后脑损害,为寻找 AIS 患者脑保护治疗的新靶点、研发新的药物治疗有着重要的社会意义和经济价值。Samaraweera 等[8]研究发现 miR-335 能下调 HAND1 和 JAG1 的表达水平,阻断神经元的生长、分化,参与对神经元发育的调节,Tomé 等[9]研究发现过度表达的 miR-335 能够下调与细胞增殖、分化和凋亡相关的 AP-1 的表达,而 Shu 等[10]的研究发现使用 mir-335 拮抗剂(antagomir-335)后,下调 miR-335 可以使肿瘤细胞生长停滞、细胞凋亡,以往这些研究提示 miR-335 可能是神经元重要调控因子,异常表达的 miR-335 可能与神经系统疾病有密切相关性。更重要的是,最近有研究显示 miR-335 在脑缺血再灌注动物模型脑组织中表达有下调[4],本研究通过大样本的病例-对照研究,也发现急性缺血性脑卒中患者血清 miR-335 水平明显下调,与健康对照组相比较有显著性差异($P<0.01$)。miRNA 能够自由通过血脑屏障[11],可见异常表达的 miR-335 可能在急性缺血性脑卒中病理生理过程中起重要作用,在进一步研究中,我们探讨了 miR-335 影响 AIS 的可能机制。

大量研究表明钙超载在脑缺血损伤的发病机制中起着重要的作用,而钙离子生理功能的发挥主要是由钙调蛋白来介导调节。以往有动物实验研究发现脑缺血再灌注后,随着神经元细胞内的钙超载,大鼠脑组织的 CaM 活性与含量也明显升高,再灌注后其升高较脑缺血后更为显著[1],而前期研究也发现急性缺血性脑卒中患者血清钙调蛋白表达明显上调,且与神经功能缺损程度呈正相关[2]。通过生物信息学数据库查询分析发现钙调蛋白编码基因 CALM1 3′UTR 存在序列(GCUCUUG)与 miR-335 的"种子序列"碱基互补配对(见图 1),因而推测 miR-335 与钙调蛋白之间可能存在负向调控关系。本研究通过脂质体转染法将 miR-335 模拟物和抑制物转染至 HUVECs 中并进行细胞培养,采用 RT-PCR 和 Western blot 分别检测干预后 HUVECs 细胞中钙调蛋白 mRNA 和蛋白的表达水平,发现 miR-335 可在 mRNA 和蛋白水平负向调控 CaM 的表达,从而推测在急性缺血性脑卒中患者脑细胞损害和神经功能障碍机制中存在 miR-335 对钙调蛋白调节,下调的 miR-335 对钙调蛋白基因表达抑制不足,导致脑组织钙调蛋白过表达。

总之,本研究表明,在急性缺血性脑卒中下调的 miR-335 促进了钙调蛋白表达上调,参与急性缺血性脑卒中钙超载损害过程。本研究为开展针对急性缺血性脑卒中患者 miR-335 靶向治疗提供实验室依据。

参考文献:

[1] Tang LH,Xia ZY,Zhao B,et al. Phosphocreatine preconditioning attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion in-

jury of rat brain [J]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:107091.

[2] 袁梅,周成芳,夏健,等.急性缺血性脑卒中患者血清钙调蛋白水平检测及意义[J].中风与神经疾病杂志,2013,30(7):645-647.

[3] Jickling GC, Ander BP, Zhan X, et al. microRNA expression in peripheral blood cells following acute ischemic stroke and their predicted gene targets[J]. PLoS One, 2014,9(6):e99283.

[4] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2009, 29(4):675-687.

[5] Yuan M, Zhan Q, Duan X, et al. A functional polymorphism at miR-491-5p binding site in the 3′-UTR of MMP-9 gene confers increased risk for atherosclerotic cerebral infarction in a Chinese population[J]. Atherosclerosis, 2013,226(2):447-452.

[6] Zhao H, Wang J, Gao L, et al. MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation[J]. Stroke, 2013,44(6):1706-1713.

[7] Wang C, Ji B, Cheng B, et al. Neuroprotection of microRNA in neurological disorders (Review)[J]. Biomed Rep, 2014,2(5):611-619.

[8] Samaraweera L, Grandinetti KB, Huang R, et al. MicroRNAs define distinct human neuroblastoma cell phenotypes and regulate their differentiation and tumorigenicity[J]. BMC Cancer, 2014,14:309

[9] Tomé M, Sepúlveda JC, Delgado M, et al. miR-335 Correlates with senescence/aging in human mesenchymal stem cells and inhibits their therapeutic actions through inhibition of AP-1 activity[J]. Stem Cells, 2014, 32(8): 2229-2244.

[10] Shu M, Zheng X, Wu S, et al. Targeting oncogenic miR-335 inhibits growth and invasion of malignant astrocytoma cells[J]. Mol Cancer, 2011,10:59.

[11] Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients[J]. Nat Rev Cancer, 2011,11:426-437.

(此文编辑:朱雯霞)