

• 论 著 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.10.002

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/50.1097.R.20230504.1654.014.html>(2023-05-05)

miR-486-5p/PINK1 通路调控线粒体自噬拮抗 SK-N-SH 细胞 氧糖剥夺/复糖复氧损伤*

蔡 利¹, 兰 蕾^{2△}, 徐胜波¹, 陈湘闻¹, 杨 鸿¹, 黄东振¹

(广西国际壮医医院:1. 颅脑外科;2 针灸科, 南宁 530001)

[摘要] **目的** 探究微 RNA-486-5p/PTEN 诱导激酶 1(miR-486-5p/PINK1)通路调控线粒体自噬对 SK-N-SH 细胞糖氧剥夺/复糖复氧(OGD/R)损伤的影响及机制。**方法** 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)检测 45 例缺血性卒中(IS)患者和 45 例健康体检者血清 miR-486-5p 表达。双荧光素酶报告基因验证 SK-N-SH 细胞中 miR-486-5p 对 PINK1 的靶向关系。取对数生长期 SK-N-SH 细胞分为:Control、OGD/R、OGD/R+miR-486-5p mimic、OGD/R+miR-NC、OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-NC、OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-PINK1 组。噻唑蓝(MTT)法检测细胞存活率,RT-qPCR 检测 miR-486-5p、PINK1、帕金森蛋白(Parkin)mRNA 表达,Western blot 检测 PINK1、Parkin、微管相关蛋白 1 轻链 3 Ⅱ(LC3-Ⅱ)、p62、Beclin1、半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3、caspase-9、细胞色素 C(CytC)蛋白表达,流式细胞术检测细胞活性氧(ROS)含量及细胞凋亡率。**结果** IS 组患者血清 miR-486-5p 表达较健康体检者明显降低($P<0.01$)。miR-486-5p 可以结合 PINK1 的 3'端非编码区($P<0.01$)。与 Control 组比较,OGD/R 组细胞 miR-486-5p、p62 的表达及细胞存活率明显降低($P<0.001$),PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ、Beclin1、ROS、caspase-3、caspase-9、CytC 的表达及细胞凋亡率明显升高($P<0.001$)。与 OGD/R 组比较,OGD/R+miR-486-5p mimic 组细胞 miR-486-5p、p62 的表达及细胞存活率明显升高($P<0.001$),PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ、Beclin1、ROS、caspase-3、caspase-9、CytC 的表达及细胞凋亡率明显降低($P<0.001$)。与 OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-NC 组比较,OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-PINK1 组细胞 miR-486-5p、p62 的表达及细胞存活率明显降低($P<0.001$),PINK1、Parkin、LC3-Ⅱ、Beclin1、ROS、caspase-3、caspase-9、CytC 的表达及细胞凋亡率明显升高($P<0.001$)。**结论** miR-486-5p 可拮抗 SK-N-SH 细胞 OGD/R 损伤,可能与抑制 PINK1/Parkin 通路进而抑制线粒体自噬有关。

[关键词] 卒中;微 RNA-486-5p;PINK1;线粒体自噬;氧糖剥夺/复糖复氧;缺血-再灌注损伤

[中图法分类号] R743.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)10-1448-06

The miR-486-5p/PINK1 pathway regulates mitochondrial autophagy that antagonizes OGD/R damage in SK-N-SH cells*

CAI Li¹, LAN Lei^{2△}, XU Shengbo¹, CHEN Xiangwen¹, YANG Hong¹, HUANG Dongzhen¹

(1. Department of Craniocerebral Surgery; 2. Department of Acupuncture and Moxibustion,
Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning, Guangxi 530001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of microRNA-486-5p/PTEN induced kinase 1 (miR-486-5p/PINK1) pathway regulating mitochondrial autophagy on glucose oxygen deprivation/re-sugar reoxygenation (OGD/R) damage in SK-N-SH cells. **Methods** Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of miR-486-5p in serum of 45 patients with ischemic stroke (IS) and 45 healthy subjects. Dual luciferase reporter gene was used to verified the targeting relationship of miR-486-5p to PINK1 in SK-N-SH cells. SK-N-SH cells at logarithmic growth stage were divided into the Control, OGD/R, OGD/R+miR-486-5p mimic, OGD/R+miR-NC, OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-NC, OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-PINK1 groups. Thiazole blue (MTT) was used to detect cell survival rate, the mRNA expressions of miR-486-5p, PINK1 and Parkin were detected by RT-qPCR. Western blot was used to detect protein expressions of PINK1, Parkin, microtubule-associated protein 1 light chain 3 Ⅱ (LC3-Ⅱ), p62, Beclin1, caspase-3, caspase-9, and cytochrome C (CytC), ROS content and apoptosis rate were determined by flow cytometry. **Results** The expression of serum miR-486-5p in patients of the IS group was significantly lower than that in

* 基金项目:广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研课题(Z20211426)。

作者简介:蔡利(1977—),主任医师,硕士,主要从事神经外科相关疾病研究。

△ 通信作者,E-mail:lanlei88@163.com。

the healthy subjects ($P < 0.001$). The miR-486-5p could bind to the PINK1 3' UTR ($P < 0.01$). Compared with the Control group, the expressions of miR-486-5p, p62 and survival rate of the OGD/R group were significantly decreased ($P < 0.001$), while the expressions of PINK1, Parkin, LC3-II, Beclin1, ROS, caspase-3, caspase-9, CytC and apoptosis rate were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with the OGD/R group, the expressions of miR-486-5p, p62 and survival rate of the OGD/R + miR-486-5p mimic group were significantly increased ($P < 0.001$), while the expressions of PINK1, Parkin, LC3-II, Beclin1, ROS, caspase-3, caspase-9, CytC and apoptosis rate were significantly decreased ($P < 0.001$). Compared with the OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC group, the expressions of miR-486-5p, p62 and survival rate of the OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-PINK1 group were significantly decreased ($P < 0.001$), while the expressions of PINK1, Parkin, LC3-II, Beclin1, ROS, caspase-3, caspase-9, CytC and apoptosis rate were significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion** MiR-486-5p can antagonizes OGD/R damage in SK-N-SH cells, which may be mediated by inhibition of mitochondrial autophagy through PINK1/Parkin pathway.

[Key words] stroke; microRNA-486-5p; PINK1; mitophagy; oxygen glucose deprivation/reoxygenation; ischemia-reperfusion injury

卒中属急性脑血管疾病,包括缺血性卒中(ischemic stroke, IS)及出血性卒中,其中 IS 的发病率较高^[1]。目前 IS 的治疗目标是使缺血脑组织恢复血供,即再灌注,该类治疗易造成再灌注损伤,损害脑功能^[2]。线粒体自噬是细胞内清除多余或受损线粒体的过程,在 IS 再灌注损伤下,线粒体自噬明显激活,会进一步加重脑损伤。微 RNA(microRNA, miR)是真核细胞内普遍存在的长度约为 22 nt 的内源性非编码 RNA,其通过与靶标 mRNA 的 3' 端非编码区(3'-UTR)结合降解 mRNA 而调节基因表达,目前已发现多种 miR 可作为诊断 IS 的循环生物标志物,如 miR-30a^[3]、miR-126^[4]、miR-223^[5]等。miR-486-5p 是近年新发现的 miR,在多种疾病中存在异常表达,并可调控癌细胞凋亡^[6-8]。作者发现 miR-486-5p 在 IS 患者血清中低表达,利用 TargetScan 预测 miR-486-5p 可靶向 PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 基因。PINK1/Parkin 通路活化能激活线粒体自噬而介导神经元凋亡^[9]。因此,本研究拟通过探讨 miR-486-5p/PINK1 通路调控线粒体自噬对缺血-再灌注损伤神经元的保护作用及其可能的分子机制,为 IS 再灌注损伤治疗提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 一般资料

选取本院 2019 年 1 月至 2020 年 6 月收治的 IS 患者(IS 组)及同期健康体检者(Normal 组)各 45 例为研究对象。IS 患者纳入标准:(1)符合临床 IS 诊断标准^[10];(2)既往无过敏性疾病史;(3)本人或家属签署知情同意书。IS 患者排除标准:(1)合并严重高血压或脑出血者;(2)出血性脑梗死者;(3)严重意识障碍者。IS 组中男 30 例,女 15 例,平均年龄(63.40 ± 7.29)岁;Normal 组中男 29 例,女 16 例,平均年龄(62.24 ± 7.83)岁。两组性别、年龄均无明显差异($P > 0.05$)。本研究计划通过本院伦理委员会批准,所有受试者均知情同意。

1.1.2 细胞株

人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.3 主要试剂及材料

miR-486-5p mimic 及 mimic-NC 委托生工生物工程(上海)股份有限公司设计合成;结合缓冲液(Binding Buffer)购自德国 Sigma 公司;TRIzol 试剂盒、膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清、Dulbecco 磷酸盐缓冲溶液(DPBS)、DMEM 无糖培养液、DMEM 培养液、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;噻唑蓝(MTT)试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;miR 纯化试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;RT 逆转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒购自合肥白鲨生物科技有限公司;一抗 PINK1、帕金森蛋白(Parkin)、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein1 light chain 3 II, LC3-II)、p62、Beclin1、半胱氨酰天冬氨酸蛋白酶(caspase)-3、caspase-9、细胞色素 C(cytochrome C, CytC)、二抗羊抗鼠、羊抗兔抗体购自英国 Abcam 公司。

1.1.4 主要仪器

低温离心机(型号:5418R,德国 Eppendorf 公司);酶标仪(型号:FilterMax F3,美国 MD 公司);实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)分析仪(型号:AiraMx,美国 Agilent 公司);超微量核酸检测仪(型号:FC-1100,杭州遂真生物技术有限公司);凝胶图像成像系统(型号:Tanon 5200,上海天能科技有限公司);流式细胞仪(型号:BD FACSCantoTM II,美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 临床样品采集及检测

采集 45 例 IS 患者和 45 例同期健康体检者清晨空腹状态下的外周血 5 mL, 3 000 r/min 离心 15 min,取血清,RT-qPCR 检测 miR-486-5p 表达;根据 miR 纯化试剂盒说明书从血清中提取总 miR, miR

合成试剂盒将总 RNA 逆转录合成 miR 互补 DNA (cDNA),以 SYBR green 基因 RT-qPCR 技术,定量 PCR 试剂盒检测 miR 表达。核小 RNA(snRNA)U6 为内参,PCR 反应体系:95 ℃ 30 s 变性,退火 95 ℃ 5 s、延伸 58 ℃ 30 s,35 个循环, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算,结果以目的基因与内参基因的比值表示。引物序列如下:U6 上游 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3',下游 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3';miR-486-5p 上游 5'-TCC TGT ACT GAG CTG C-3',下游 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3'。

1.2.2 SK-N-SH 细胞培养及分组

SK-N-SH 细胞复苏后,接种于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,5% CO₂,37 ℃ 培养,胰酶消化传代。取对数生长期 SK-N-SH 细胞分为 6 组:Control、糖氧剥夺/复糖复氧 (OGD/R)、OGD/R + miR-486-5p mimic、OGD/R + miR-NC、OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC、OGD/R + mimic + OE-PINK1。OGD/R + miR-486-5p mimic 和 OGD/R + miR-NC 细胞分别转染 miR-486-5p mimic 和对照序列,OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC 和 OGD/R + mimic + OE-PINK1 在上述基础上再分别转染空白质粒和 PINK1 过表达质粒,24 h 后进行建模。

1.2.3 SK-N-SH 细胞 OGD/R 损伤模型的建立

除 Control 组外,其余各组均建立 OGD/R 损伤模型^[11]:取对数生长期细胞用无糖 DMEM 培养基洗 3 次,每孔加入无糖培养基 2 mL,置于 37 ℃、5% CO₂、94% N₂、1% O₂ 培养箱中进行糖氧剥夺,6 h 后弃去无糖培养基,1×磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,加常规 DMEM 2 mL,37 ℃、5% CO₂ 常规培养。

1.2.4 双荧光素酶报告实验

分别构建野生型 PTEN 荧光素酶报告基因载体 (WT-PTEN)、突变型 PTEN 荧光素酶报告基因载体 (MUT-PTEN)及空载体 (VECTOR),并将 3 种载体分别与 miR-486-5p mimic、NC-mimic 混合后共同转染到 SK-N-SH 细胞中^[12],培养 48 h 后收集细胞,PBS 洗涤后检测细胞荧光素酶活性。

1.2.5 MTT 检测细胞存活率

将对数生长期细胞接种于 96 孔板常规培养,次日每孔加 MTT,孵育 3 h 后洗去上清液。加入 50% 二甲亚砜(DMSO)和 50% 乙醇混合液,摇床 2 h,至结晶完全溶解,测定各孔 570 nm 处吸光度(A₅₇₀)值,计算细胞存活率,细胞存活率=实验组/对照组×100%。

1.2.6 RT-qPCR

Trizol 试剂盒提取总 RNA,Prime Script 逆转录混合底物逆转录总 cDNA,使用 SYBR 预混的 Taq 酶,在 RT-qPCR 仪上检测,内参为肌动蛋白(β -Actin, ACTB),反应体系:95 ℃ 30 s 变性,退火 95 ℃ 5 s、延伸 58 ℃ 30 s,35 个循环。 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因表达,结果以目的基因与内参基因 mRNA 表达水平的比值表示。引物序列如下:ACTB 上游 5'-GTC ATT CCA

AAT ATG AGA TGC GT-3',下游 5'-GCT ATC ACC TCC CCT GTG TG-3';miR-486-5p 上游 5'-TCC TGT ACT GAG CTG C-3',下游 5'-CAG TGC GTG TCG TGG AGT-3';PINK1 上游 5'-AAC ATC ATC CGG GTT CTC CG-3',下游 5'-G GC AGC ACA TCA GGG TAG TC-3';Parkin 上游 5'-TTT CGC AGG GAA GGA GCT G-3',下游 5'-TCT CCA CGG TCT CTG CAC AA-3'。

1.2.7 Western blot

裂解细胞提取总蛋白测定蛋白水平,蛋白质样品与凝胶上样缓冲液混合,沸水变性 5 min。恒压 6%~12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE),转聚偏氟乙烯(PVDF)膜,TBST 洗涤,5% 脱脂奶粉-TBST 37 ℃ 封闭 1 h,加一抗,4 ℃ 孵育过夜。加对应辣根过氧化物酶 (HRP) 标记二抗,37 ℃ 孵育 1 h,TBST 洗涤,电化学发光 (ECL) 显影,Image J 分析条带灰度值。

1.2.8 流式细胞仪检测细胞活性氧 (ROS) 表达

细胞调整浓度为 1×10^6 /mL,接种于 6 孔板,培养 24 h;加入 2',7'-二氯二氟荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA),37 ℃、5% CO₂ 培养箱静置 0.5 h,混匀,温 PBS 洗涤细胞;收获细胞,上机检测,激发光 488 nm,发射光 525 nm。

1.2.9 流式细胞仪检测细胞凋亡

细胞室温 2 000 r/min 离心 5 min,用 4 ℃ 预冷 PBS 重悬,2 000 r/min 离心,洗涤,去离子水稀释后 Binding Buffer 悬浮,Annexin V-FITC 混匀,避光,室温孵育 15 min,碘化丙啶 (PI) 标记,加已稀释的 Binding Buffer 后上机检测。

1.3 统计学处理

用 SPSS26.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 one-way ANOVA 分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,两两比较校正后检验水准 $\alpha' = 0.0083$ 。

2 结 果

2.1 血清 miR-486-5p 表达比较

与 Normal 组健康体检者比较,IS 组患者血清 miR-486-5p mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$),见图 1。

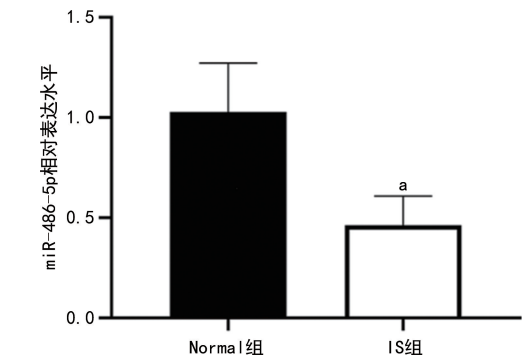
2.2 miR-486-5p 靶向 PINK1 关系验证

双荧光素酶报告基因验证结果显示,miR-486-5p 可以结合 PINK1 3'UTR ($P < 0.01$),见图 2。

2.3 各组细胞存活率比较

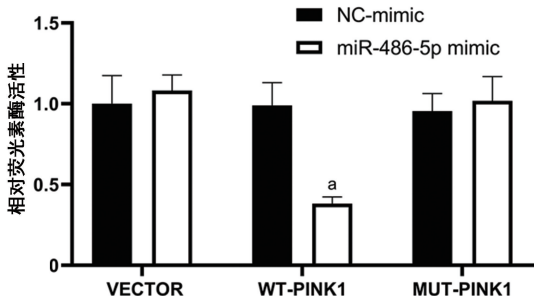
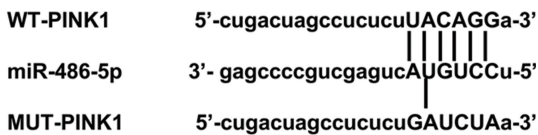
与 Control 组比较,OGD/R 组细胞存活率明显降低 ($P < 0.001$);与 OGD/R 组比较,OGD/R + miR-486-5p mimic 组细胞存活率明显升高 ($P < 0.001$),OGD/R + miR-NC 组差异无统计学意义 ($P > 0.0083$);与 OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC 组比较,OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-PINK1

组细胞存活率明显降低($P<0.001$),见图 3。



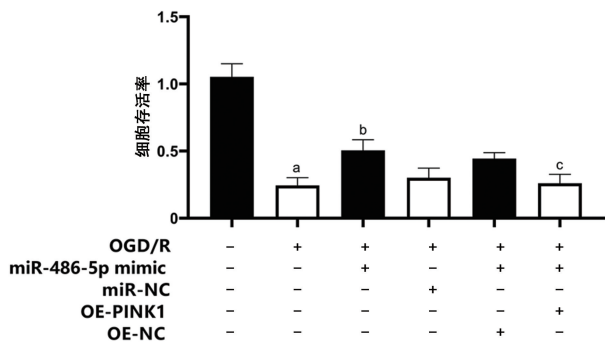
^a: $P<0.01$, 与 Normal 组比较。

图 1 RT-qPCR 检测 miR-486-5p 表达



^a: $P<0.01$, 与 NC-mimic 转染细胞比较。

图 2 双荧光素酶报告基因验证 SK-N-SH 细胞中 miR-486-5p 靶向 PINK1 的关系



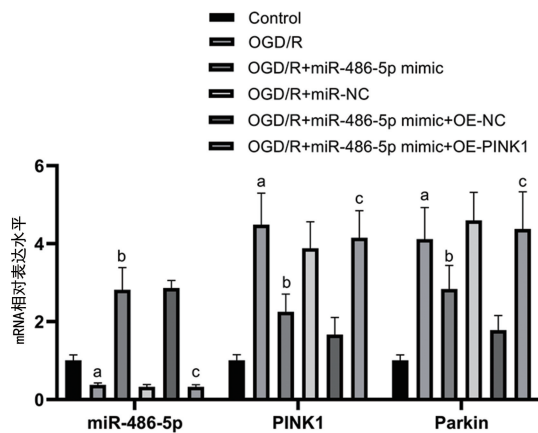
^a: $P<0.001$, 与 Control 组比较; ^b: $P<0.001$, 与 OGD/R 组比较; ^c: $P<0.001$, 与 OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC 组比较。

图 3 MTT 检测细胞存活率

2.4 各组 miR-486-5p、PINK1、Parkin、LC3-II、p62 及 Beclin1 表达比较

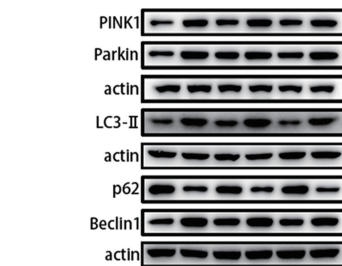
与 Control 组比较, OGD/R 组 miR-486-5p mRNA 表达降低, PINK1、Parkin mRNA 及蛋白表达升高, LC3-II、Beclin1 蛋白表达升高, p62 蛋白表达降低, 差异均有统计学意义($P<0.001$); 与 OGD/R 组比较, OGD/R + miR-486-5p mimic 组 miR-486-5p mRNA 表达升高, PINK1、Parkin mRNA 及蛋白表达降低, LC3-II、Beclin1 蛋白表达降低, p62 蛋白表达升高, 差异均有统计学意义($P<0.001$), OGD/R + miR-NC 组差异均无统计学意义($P>0.05$); 与

OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC 组比较, OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-PINK1 组 miR-486-5p mRNA 表达降低, PINK1、Parkin mRNA 及蛋白表达升高, LC3-II、Beclin1 蛋白表达升高, p62 蛋白表达降低, 差异均有统计学意义($P<0.001$), 见图 4、5。

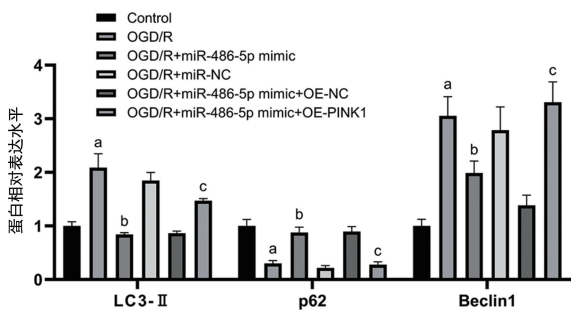
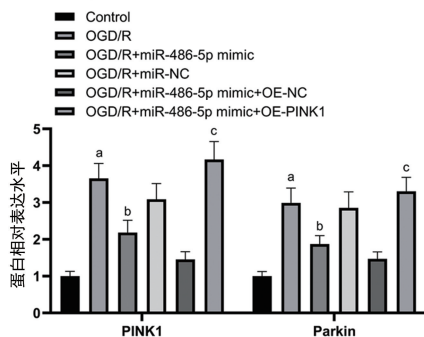


^a: $P<0.001$, 与 Control 组比较; ^b: $P<0.001$, 与 OGD/R 组比较; ^c: $P<0.001$, 与 OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC 组比较。

图 4 RT-qPCR 检测 miR-486-5p、PINK1 及 Parkin mRNA 表达



OGD/R	-	+	+	+	+	+
miR-486-5p mimic	-	-	+	-	+	+
miR-NC	-	-	-	+	-	-
OE-PINK1	-	-	-	-	-	-
OE-NC	-	-	-	-	+	-



^a: $P<0.001$, 与 Control 组比较; ^b: $P<0.001$, 与 OGD/R 组比较; ^c: $P<0.001$, 与 OGD/R + miR-486-5p mimic + OE-NC 组比较。

图 5 Western blot 检测 PINK1、Parkin、LC3-II、p62 及 Beclin1 蛋白表达

2.5 各组 ROS 表达比较

与 Control 组比较,OGD/R 组 ROS 表达明显升高($P<0.001$);与 OGD/R 组比较,OGD/R+miR-486-5p mimic 组 ROS 表达明显降低($P<0.001$),OGD/R+miR-NC 组差异无统计学意义($P>0.05$);与 OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-NC 组比较,OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-PINK1 组 ROS 表达明显升高($P<0.001$),见图 6。

2.6 各组细胞凋亡率及凋亡指标 caspase-3、caspase-9、CytC 表达比较

与 Control 组比较,OGD/R 组细胞凋亡率及 caspase-3、caspase-9、CytC 表达均明显升高($P<0.001$);与 OGD/R 组比较,OGD/R+miR-486-5p mimic 组细胞凋亡率及 caspase-3、caspase-9、CytC 表达均明显降低($P<0.001$),OGD/R+miR-NC 组差异无统计学意义($P>0.05$);与 OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-NC 组比较,OGD/R+miR-486-5p mimic+OE-PINK1 组细胞凋亡率及 caspase-3、caspase-9、CytC 表达均明显升高($P<0.001$),见图 7、8。

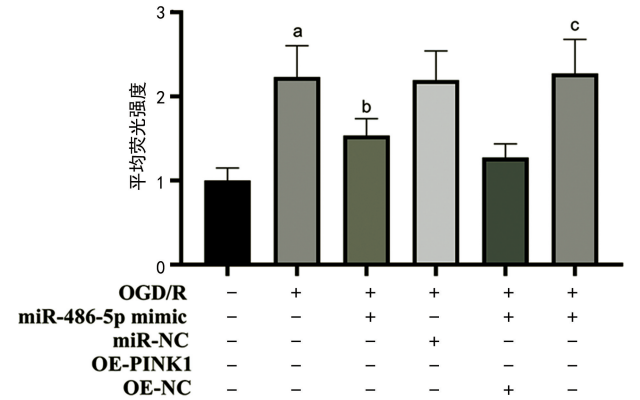


图 6 流式细胞术检测 ROS 表达

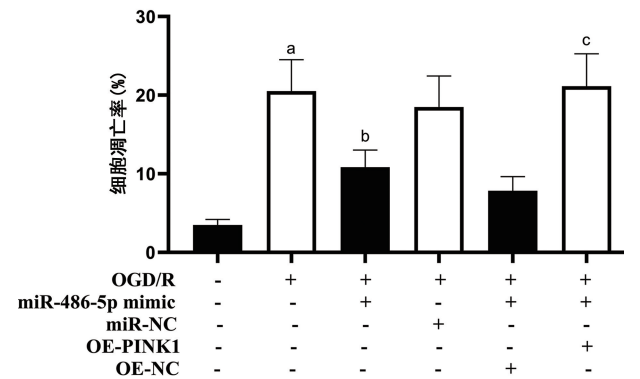


图 7 流式细胞术检测细胞凋亡率

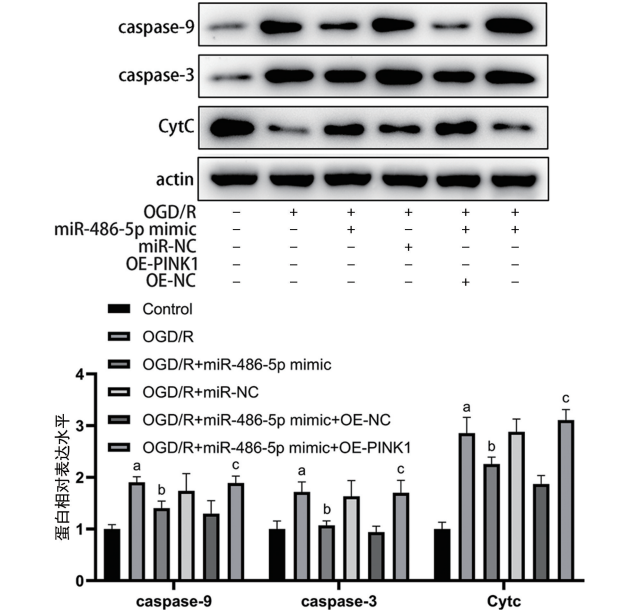


图 8 Western blot 检测 CytC、caspase-3、caspase-9 表达

3 讨论

IS 占卒中患者总数的 60%~70%,具有高致死率、高致残率的特点,目前其最有效的疗法为溶栓法,但该方法在恢复脑部血液供应的同时易造成再灌注损伤,严重影响患者预后及生存质量^[10,13]。脑缺血-再灌注损伤后,自由基大量产生、细胞内钙超载、兴奋性氨基酸损伤等会造成线粒体损伤,线粒体自噬被启动,该情况下线粒体急剧减少,三磷酸腺苷(ATP)生成减少,神经元大量凋亡^[14-15]。抑制线粒体自噬或能保护神经元,减轻 IS 缺血-再灌注损伤^[16-18]。DORI 等^[19]利用 miR 分析显示,在小鼠神经元和皮质祖细胞中 miR-486-5p 发挥着神经发生调节器的作用。本研究比较 IS 患者及健康者血清 miR-486-5p 表达水平发现,IS 患者血清 miR-486-5p 表达水平降低,同时利用双荧光素酶实验验证了 miR-486-5p 可靶向 PINK1,提示 miR-486-5 与 IS 相关,且 miR-486-5p 对 PINK1/Parkin 通路或具有调控作用。

作为缺血后神经元死亡的关键靶区,线粒体与 IS 损伤密切相关,在脑缺血-再灌注损伤下线粒体自噬会促使大量神经元凋亡,加重 IS 损伤^[20]。既往研究证实,在神经元 OGD/R 损伤模型中,PINK1/Parkin 通路及线粒体自噬被明显激活^[21]。LC3-II 是线粒体自噬标志物,可反映线粒体自噬表达情况;p62 能通过识别线粒体蛋白上的磷酸化多聚泛素链后与 LC3 结合而促进自噬体形成;Beclin1 是自噬关键调控蛋白,其表达与线粒体自噬表达呈正相关。本研究发现,过表达 miR-486-5p 能够抑制 OGD/R 导致的 SK-N-SH 细胞中 PINK1/Parkin 通路的激活,同时降低线粒体自噬,增加细胞存活率,减少 LC3-II、Beclin1 的生成,增加 p62 的表达。并且,在回复实验中,过表达 miR-486-5p 可抑制 PINK1 效应,表明过表达 miR-486-5p

可通过抑制 PINK1/Parkin 通路抑制线粒体自噬,增加细胞存活率,减轻 SK-N-SH 细胞 OGD/R 损伤。

当脑部血供不足缺血后,线粒体中氧浓度降低,限制了 ATP 生成,而再灌注后会产生大量 ROS,易造成氧化应激,触发神经元凋亡^[22]。线粒体氧化应激受损后,由于 PINK1 的转位和降解被阻断而聚集在线粒体膜上,进而激活 Parkin,形成 PINK1/Parkin 复合体,引发线粒体外膜包裹,诱导 CytC 释放到细胞质,致细胞凋亡^[23-24]。促凋亡蛋白 CytC 通过形成凋亡复合体促使 caspase-9 和 caspase-3 先后活化,其中 caspase-9 是细胞凋亡的启动者,其通过活化凋亡效应者 caspase-3 使细胞凋亡进入不可逆阶段。本研究将过表达 miR-486-5p 的 SK-N-SH 细胞经过 OGD/R 处理后,检测了相应氧化应激及细胞凋亡指标,发现过表达 miR-486-5p 能够明显减少 ROS、caspase-3、caspase-9、CytC 表达及降低细胞凋亡率,同时降低 PINK1、Parkin 表达,表明过表达 miR-486-5p 可抑制 OGD/R 导致的 SK-N-SH 细胞氧化应激及凋亡,且可能是通过调控 PINK1/Parkin 通路实现的。此外,XIONG 等^[25]实验结果表明,过表达 miR-486-5p 可促进 OGD/R 处理的 SK-N-SH 细胞增殖并抑制凋亡,与本研究 miR-486-5p 的效应一致,进一步支持了 miR-486-5p 改善 OGD/R 损伤的观点。

综上所述,SK-N-SH 细胞的凋亡可能与缺血-再灌注损伤后线粒体氧化应激过度及线粒体自噬通路 PINK1/Parkin 过度激活有关。本研究发现 miR-486-5p 在 IS 患者血清中呈低表达,miR-486-5p 可靶向 PINK1,过表达 miR-486-5p 能够减轻 OGD/R 损伤后 SK-N-SH 线粒体自噬和细胞凋亡,其机制与抑制 PINK1/Parkin 通路激活有关,提示 miR-486-5p 可能是 IS 诊断或治疗的潜在靶标。本研究以期为阐明线粒体自噬参与 OGD/R 的机制及 miR-486-5p 改善 IS 脑缺血-再灌注损伤的机制提供一定参考。

参考文献

- [1] UCHINO H, HOUKIN K. Ischemic Stroke[M]// KURODA S. Moyamoya disease: current knowledge and future perspectives. Heidelberg: Springer, 2021.
- [2] SHAIK N F, REGAN R F, NAIK U P. Platelets as drivers of ischemia/reperfusion injury after stroke[J]. Blood Advances, 2021, 5(5): 1576-1584.
- [3] LONG G, WANG F, LI H, et al. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans[J]. BMC Neurol, 2013, 13: 178.
- [4] XIANG Y, GUO J, PENG Y F, et al. Association of miR-21, miR-126 and miR-605 gene polymorphisms with ischemic stroke risk[J]. Oncotarget, 2017, 8(56): 95755-95763.
- [5] WANG Y, ZHANG Y, HUANG J, et al. Increase of circulating miR-223 and insulin-like growth factor-1 is associated with the pathogenesis of acute ischemic stroke in patients[J]. BMC Neurol, 2014, 14: 77.
- [6] LIU Z, GU Y, CHENG X, et al. Upregulation lnc-NEAT1 contributes to colorectal cancer progression through sponging miR-486-5p and activating NR4A1/Wnt/ β -catenin pathway[J]. Cancer Biomark, 2020, 30(3): 309-319.
- [7] ABDALLAH R, ELKHOULY A, SOLIMAN R, et al. 59P Hesperitin halts metastatic breast cancer through tweaking the interplay between the tumour suppressor miR-486-5p and the oncogenic lncRNA H19 [J]. Ann Oncol, 2020, 31 (Suppl. 10): 1235.
- [8] KONG Y, LI Y, LUO Y, et al. circNFIB1 inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis via the miR-486-5p/PIK3R1/VEGF-C axis in pancreatic cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 82.
- [9] WANG H, CHEN S, ZHANG Y, et al. Electroacupuncture ameliorates neuronal injury by Pink1/Parkin-mediated mitophagy clearance in cerebral ischemia-reperfusion[J]. Nitric Oxide, 2019, 91: 23-24.
- [10] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51 (9): 666-682.
- [11] 刘雨霞, 郑菊, 张文萍, 等. 不同时间氧糖剥夺再灌注对 SH-SY5Y 细胞线粒体自噬及功能的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2019, 44 (4): 399-405.
- [12] KIM J, FIESEL F C, BELMONTE K C, et al. miR-27a and miR-27b regulate autophagic clearance of damaged mitochondria by targeting PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)[J]. Mol Neurodegener, 2016, 11(1): 55.
- [13] 刘新峰, 蒲传强. 中国急性缺血性脑卒中早期血管内介入诊疗指南[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48(5): 356-361.
- [14] SHEN L, GAN Q, YANG Y, et al. Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 687246.
- [15] WU M Y, YIANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1650-1667. (下转第 1459 页)

- 心的重度子痫前期临床特点分析[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(11): 774-781.
- [9] 金梦, 金立民, 王多友, 等. 脂肪体重指数和去脂体重指数与肥胖相关研究与进展[J]. 中国实验诊断学, 2017, 21(3): 542-545.
- [10] SILVA ROCHA A D, ROMBALDI BERNARDI J, MATOS S D, et al. Maternal adipose tissue to early preeclampsia risk detection: is the time to maternal ultrasound beyond fetal evaluation? [J]. J Obstet Gynaecol Res, 2021, 47(6): 2021-2030.
- [11] TRINDADE C R, TORLONI M R, MATTAR R, et al. Good performance of bioimpedance in early pregnancy to predict preeclampsia [J]. Pregnancy Hypertens, 2021, 26: 24-30.
- [12] VANITALLIE T B, YANG M U, HEYMSFIELD S B, et al. Height-normalized indices of the body's fat-free mass and fat mass: potentially useful indicators of nutritional status[J]. Am J Clin Nutr, 1990, 52(6): 953-959.
- [13] 马池发, 史婷婷, 袁明霞. ACE/Ang II/AT1 轴和 ACE2/Ang(1-7)/Mas 轴对脂肪组织糖脂代谢的影响[J]. 基础医学与临床, 2018, 38(5): 708-712.
- [14] 任庆文, 杨飞飞, 韩天碧, 等. 孕前体质指数和孕期增重与子痫前期及其临床亚型的关系[J]. 中华流行病学杂志, 2021, 42(11): 2037-2043.
- [15] GAGLIARDI G, TIRALONGO G M, LOPRESTI D, et al. Screening for pre-eclampsia in the first trimester: role of maternal hemodynamics and bioimpedance in non-obese patients[J]. Ultrasound Obstet Gynecol, 2017, 50(5): 584-588.
- [16] HILLESUND E R, SELAND S, BERE E, et al. Preeclampsia and gestational weight gain in the Norwegian Fit for Delivery trial[J]. BMC Res Notes, 2018, 11(1): 282.
- [17] GYSELAERS W, VONCK S, STAELENS A S, et al. Body fluid volume homeostasis is abnormal in pregnancies complicated with hypertension and/or poor fetal growth[J/OL]. PLoS One, 2018, 13(11): e206257 [2022-08/10]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206257>.
- (收稿日期: 2022-09-08 修回日期: 2023-02-10)
-
- (上接第 1453 页)
- [16] CAI Y, YANG E, YAO X, et al. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral[J]. Redox Biol, 2021, 38: 101792.
- [17] MAO Z, TIAN L, LIU J, et al. Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy[J]. Phytomedicine, 2022, 101: 154111.
- [18] ZHANG Y, HE Y, WU M, et al. Rehmapicroside ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via attenuating[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 160: 526-539.
- [19] DORI M, CAVALLI D, LESCHE M, et al. MicroRNA profiling of mouse cortical progenitors and neurons reveals miR-486-5p as a regulator of neurogenesis [J/OL]. Development, 2020, 147(9): dev190520 [2022-06-01]. <https://doi.org/10.1242/dev.190520>.
- [20] ANDRABI S S, PARVEZ S, TABASSUM X. Ischemic stroke and mitochondria: mechanisms and targets [J]. Protoplasma, 2020, 257(2): 335-343.
- [21] YE M, WU H, LI S. Resveratrol alleviates oxygen/glucose deprivation/reoxygenation induced neuronal damage through induction of mitophagy[J]. Mol Med Rep, 2020, 23(1): 73.
- [22] HE J, LIU J, HUANG Y, et al. Oxidative stress, inflammation, and autophagy: potential targets of mesenchymal stem cells-based therapies in ischemic stroke[J]. Front Neurosci, 2021, 15: 641157.
- [23] LI F, FAN X, ZHANG Y, et al. Inhibition of myosin II A-actin interaction prevents ischemia/reperfusion induced cardiomyocytes apoptosis through modulating PINK1/Parkin pathway and mitochondrial fission[J]. Int J Cardiol, 2018, 271: 211-218.
- [24] WANG R, BAO H, ZHANG S, et al. miR-186-5p promotes apoptosis by targeting IGF-1 in SH-SY5Y OGD/R model[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(13): 1791-1799.
- [25] XIONG F, WEI W P, LIU Y B, et al. Long non-coding RNA XIST enhances cerebral ischemia-reperfusion injury by regulating miR-486-5p and GAB2[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(4): 2013-2020.
- (收稿日期: 2022-08-10 修回日期: 2022-11-15)