

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2021.02.001

❖ 基础研究 ❖

# miR-30a-5p 通过调节靶基因 ARG1 对急性缺血性脑卒中免疫应答的影响

岳岑

(厦门大学附属第一医院神经内科,福建 厦门 361000)

**【摘要】目的:**探讨 miR-30a-5p 通过调节靶基因精氨酸酶-1 (ARG1) 对急性缺血性脑卒中免疫应答的影响。**方法:**选取急性缺血性脑卒中患者 60 例为病例组,同期体检健康者 60 例作为对照组。RT-qPCR 检测外周血候选 miRNAs, miR-30a-5p 及靶基因 ARG1 表达情况;将 miR-30a-5p 模拟物、阴性对照模拟物及 mock 转染到 HL-60 或 RAW264.7 细胞中,荧光素酶报告基因分析 miR-30a-5p 与 ARG1 的作用关系;RT-qPCR 和 Western blot 检测 ARG1 mRNA 和蛋白的表达情况。**结果:** miR-30a-5p、miR-579-3p 和 Let-7e 表达水平在病例组和对照组存在统计学差异 ( $P < 0.001$ ),生物信息学预测 miR-579-3p 和 Let-7e 没有免疫调节相关的靶基因,而 ARG1 是 miR-30a-5p 潜在靶基因。荧光素酶报告基因实验证实 ARG1 是 miR-30a-5p 直接作用靶点,ARG1 mRNA 在缺血性脑卒中外周血中明显上调 ( $P < 0.05$ )。miR-30a-5p 模拟物转染 HL-60 和/或 RAW 264.7 细胞 24 h 后,ARG1 mRNA 和蛋白表达水平较 mock 和 NC 组明显降低 ( $P < 0.05$ )。miR-30a-5p 对 LPS 处理后的 RAW 264.7 细胞 48 h 后,miR-30a-5p 模拟物组 NO 水平较 mock 和 NC 组明显升高 ( $P < 0.05$ )。**结论:** miR-30a-5p 及其靶基因 ARG1 是急性缺血性脑卒中重要的分子标志物之一,miR-30a-5p 可能通过抑制靶向基因 ARG1 表达参与缺血性卒中免疫应答的病理生理过程。

**【关键词】**急性缺血性脑卒中;外周血;miRNAs;精氨酸酶-1

**【中图分类号】**R743.33 **【文献标志码】**A

## miR-30a-5p through targeted ARG1 peripheral immune response in patients with acute ischemic stroke

YUE Cen

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian, China)

**【Abstract】Objective:** To investigate the effect of miR-30a-5p on the immune response by targeting arginase-1 (ARG1). **Methods:** 60 patients with acute ischemic stroke were selected as study subjects, and 60 healthy physical examination subjects were selected as control group. Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect miRNAs and miR-30a-5p expression in peripheral blood of the two groups. miR-30a-5p mimics, negative control mimics or mocks were transfected into HL-60 or RAW264.7 cells. The expression of ARG1 mRNA and protein was detected by RT-qPCR and Western blot. The relationship between miR-30a-5p and ARG1 was analyzed by bioinformatics and luciferase reporter gene. **Results:** The expression levels of miR-579-3p, miR-579-3p and Let-7e were significantly different between the case group and the control group ( $P < 0.05$ ). Bioinformatics prediction showed that miR-579-3p and Let-7e had no immune regulation related target genes. Luciferase reporter gene assay confirmed that ARG1 was the direct target of miR-30a-5p, and ARG1 mRNA was significantly up-regulated in peripheral blood of ischemic stroke ( $P < 0.05$ ). After transfection of miR-30a-5p mimic into HL-60 and/or RAW 264.7 cells for 24 h, the expression levels of ARG1 mRNA and protein were significantly lower than those in mock and NC group ( $P < 0.05$ ). After 48 hours of treatment with miR-30a-5p on RAW 264.7 cells, no level in miR-30a-5p mimic group was significantly higher than that in mock and NC groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** miR-30a-5p and its target gene ARG1 are important molecular markers of acute ischemic stroke, miR-30a-5p may participate in the pathophysiological process of immune response in ischemic stroke by inhibiting the expression of ARG1.

**【Key words】** Acute ischemic stroke; Peripheral blood; miRNAs; Arginase-1

急性脑缺血发生时,外周血中相关分子参与了脑卒中的病理生理过程<sup>[1]</sup>。中枢神经系统的局部

损伤会诱导血源性炎症细胞激活,产生并释放促炎因子和趋化因子。激活的白细胞浸润缺血的大脑,

加重炎症程度,最终导致神经元死亡<sup>[2-3]</sup>。但缺血性脑卒中如何改变外周血的急性免疫反应,并导致脑损伤的分子机制仍未完全了解。多项微阵列研究<sup>[4-5]</sup>发现,缺血性脑卒中外周血存在明显的基因组改变,外周血基因组分析有利于了解脑卒中病理生理过程的分子机制。MicroRNAs(miRNAs)是基因表达的主要内源性调节因子,与其靶基因的3'端非编码区结合(3'-UTR),从而抑制或激活靶基因表达<sup>[6-7]</sup>。目前,已超过2000种人类miRNAs被鉴定,约有30%的基因可能受到miRNAs的调控<sup>[8]</sup>。研究<sup>[9-10]</sup>表明,miRNAs在脑缺血事件中,特别是再灌注阶段在大脑和外周血均有明显变化,如miR-186-5p、miR-19a-3p、miR-32-5p、miR-30a-5p、miR-579-3p等在急性脑卒中中存在异常表达。本研究根据文献和相关数据库初步筛选8个候选miRNAs<sup>[9-10]</sup>,采用RT-qPCR进一步验证其在急性脑卒中患者中的表达情况及其对靶基因的调控作用,望为了解脑损伤的分子机制提供新的参考。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

本研究方案经厦门大学附属第一医院伦理委员会批准,受试者或监护人签署知情同意书。选取2017年3月至2020年3月厦门大学附属第一医院收治的急性缺血性脑卒中患者60例为病例组。其中,男性34例,女性26例;平均年龄(61.53±6.71)岁;入院时NIHSS评分中位数为2分;病因包括大动脉粥样硬化性脑卒中(LAA)、小动脉闭塞性脑梗死或腔隙性脑梗死(SAO)、心源性脑栓塞(CE)等;TOAST分型中,LAA 18例、SAO 30例、CE并SAO 12例。纳入标准:(1)符合全国脑血管病学术会议制定的急性缺血性脑卒中诊断标准<sup>[11]</sup>;(2)患者均为首次发病,并于发病24h内入院;(3)经头颅CT/MRI确诊为脑梗死。排除标准:(1)脑出血或颅内出血,短暂性脑缺血发作;(2)肿瘤患者;(3)严重肝肾功能系统疾病者;(4)合并感染、免疫类疾病者。另选取60名同期体检健康者作为对照组,其中男性31例,女性29例;平均年龄(60.56±5.87)岁;既往无神经系统疾病史、肿瘤病史、严重肝肾功能系统疾病及感染或免疫类等疾病。病例组和对照组性别、年龄、体质指数(BMI)、受教育年限、吸烟、饮酒情况等一般资料比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而高血压、高血脂和冠心病差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RT-qPCR 检测 miRNAs 的表达水平 (1)

miRNAs的筛选:根据文献和相关数据库初步筛选出8个候选miRNAs,分别为miR-186-5p、miR-19a-3p、miR-32-5p、miR-30a-5p、miR-579-3p、Let-7e、miR-362-3p、miR-1238-5p。(2)外周血采集和提取总RNA:抽取病例组在入院24h内静脉血5mL,取样时间为症状出现后13.5h,IQR(10~18.0h);对照组抽取体检当天静脉血5mL。样本置于EDTA抗凝管中,立于冰上30min后,吸出上清。10000g离心5min,弃沉淀。取上清保存于-80℃冰箱备用。miReute血清/血浆miRNA提取分离试剂盒(DP503,天根生化,中国)提取总RNA,操作按说明书进行。用Nanodrop光谱仪(Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA,USA)检测RNA纯度和浓度。使用逆转录系统将RNA反向转录为cDNA(Thermo Scientific,CA,USA),并保存-80℃冰箱备用。(3)RT-qPCR:采用CFX™实时系统(Bio-Rad,CA)和PCR 2x SYBR qPCR Mix试剂盒(北京中曼生物技术有限公司)检测miRNA的水平,扩增体系如下:PCR反应包含2μL cDNA、0.4μL正向引物、0.4μL反向引物、7.2μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和10μL SYBR;扩增条件为25℃,10min,48℃,30min,95℃,5min,U6作为内参基因,每个样本检测三次。采用2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析miRNA表达情况<sup>[12]</sup>,首先计算出每个样品内参基因的表达量ΔCt,再计算对照组中ΔCt的均值,用观察组每个样品的ΔCt减去对照组的ΔCt均值,得到ΔΔCt,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>公式计算出观察组的表达量。miRNAs引物及扩张片段大小如下:miR-186-5p(22bp):F:5'-CAA AGA AUU CUC CUU UUG GGC U-3',R:5'-GTG CGT GTC GTG GAG TCG-3';miR-19a-3p(23bp):F:5'-UGU GCA AAU CUA UGC AAA ACU GA-3',R:5'-GTC CGT GTC GTG GAG TCG-3';miR-32-5p(22bp):F:5'-UAU UGC ACA UUA CUA AGU UGC A-3',R:5'-GAA TAC CTC GGA CCC TGC-3';miR-30a-5p(22bp):5'-CTC AAC TGG TGT CGT GGA GT-3',R:5'-TGG TGT CGT GGA GTC G-3';miR-579-3p(23bp):F:5'-UUC AUU UGG UAU AAA CCG CGA UU-3',R:5'-GAG CAG GGT CCG AGG T-3';Let-7e(22bp):F:5'-UGA GGU AGG AGG UUG UAU AGU U-3',R:5'-AGA GCC ACA GTC CTC TTT GC-3';miR-362-3p(22bp):F:5'-AAC ACA CCU AUU CAA GGA UUC A-3',R:5'-CGG CAC TGG ATA GAG ATG CG-3';miR-1238-5p(23bp):F:5'-GUG AGU GGG AGC CCC AGU GUG UG-3',R:5'-AGG CAC GGT GTC AGC AGG C-3';U6 F:5'-CGC AAG GAT GAC ACG CAA ATT CG-3',R:5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'。

表 1 两组一般资料比较 [ $\bar{x} \pm s, n(\%)$ ]

指标	病例组 ( $n=60$ )	对照组 ( $n=60$ )	$\chi^2/t$ 值	$P$ 值
年龄(岁)	61.53 ± 6.71	60.56 ± 5.87	0.843	0.401
体质指数(kg/m <sup>2</sup> )	23.01 ± 2.44	22.54 ± 2.07	1.483	0.141
性别(男/女)	34/26	31/29	0.302	0.583
受教育年限(年)	11.33 ± 3.24	12.07 ± 3.52	1.198	0.233
吸烟	22(36.67)	24(40.00)	1.309	0.253
饮酒	27(45.00)	21(35.00)	1.250	0.264
高血压	56(93.33)	35(58.33)	18.909	0.001
高血脂	39(65.00)	27(45.00)	4.848	0.028
冠心病	24(40.00)	11(18.33)	6.817	0.009
NIHSS 评分[M(P25,P75)]	2(1,3)			
TOAST 分型				
SAO	30(60.00)			
LAA	18(30.00)			
CE	12(20.00)			

1.2.2 细胞培养与细胞转染 人急性骨髓细胞 (HL-60, 韩国细胞库, 韩国) 在 24 孔培养皿中以  $8 \times 10^5$  个细胞/mL 的密度培养。细胞均置于 DMEM 培养基中, 辅以 10% 胎牛血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA)、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素在 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱培养。以  $1 \times 10^6$  个细胞/mL 的密度在含有 500 nM 的维甲酸<sup>[13]</sup> (ATRA, Sigma, MO) 培养基中培养 5 d 以分化中性粒细胞。使用中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) 免疫细胞化学试剂盒 (Abcam, Cambridge, UK) 评估中性粒细胞分化情况。将 miR-30a-5p 模拟物处理小鼠巨噬细胞 (RAW 264.7, ATCC, VA), 并检测 ARG1 表达和一氧化氮 (NO) 含量<sup>[14]</sup>。RAW 264.7 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基 (Welgene, Daegu)、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素中培养。将密度达到  $1 \times 10^6$  cells/mL 的 RAW 264.7 细胞接种于 75-T 的培养瓶中于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的培养箱培养。miR-30a-5p 模拟物 (miR-30a-5p, 5'-UGUAAA-CAUCCUCGACUGGAAG-3') 和 miR-30a-5p 阴性对照 (NC, 5'-ACAUCUGUAAACUUGUAG-3') 购自上海基因制药有限公司, 根据使用说明, 取对数生长期的 HL-60 或 RAW264.7 细胞接种于 6 孔板中, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养细胞, 当细胞达 60% 融合时, 采用 Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 将 miR-30a-5p 模拟物、阴性对照模拟物或 mock 转染 (空白对照) 到 HL-60 或 RAW264.7 细胞中, 转染 48 h 后, 分离细胞裂解液。

1.2.3 miRNAs 靶基因的预测 采用 miRBase (<http://www.mirbase.org/>), Target Scan ([http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)) 和 MicroCosm Target (<http://www.ebi.ac.uk>) 预测 miRNAs 的靶基因。查询与急性脑卒中病理生理学相关的靶基因, 在选择 miRNAs 和靶基因后, 对其进行功能研究, 以检查所选择的 miRNAs 是否真的与预测靶点结合。

1.2.4 双荧光素酶报告分析 将对数生长期的 HL-60 细胞接种到 24 孔板中 (每孔  $1 \times 10^3$  个细胞), 待细胞达到 60% 融合时, 将 miRNA 模拟物和阴性对照分别与靶基因 3'UTR 野生型或突变型重组质粒共转染。转染 48 h 后, 使用 Renilla luciferase 报告基因 (pRL-CMV; Promega 公司, 美国威斯康星州麦迪逊市) 检测荧光素酶活性, 操作按试剂盒 (Promega 公司) 说明书进行。

1.2.5 RT-qPCR 检测外周血 ARG1 mRNA 采用 SuperScript® II First-Strand Synthesis System (Invitrogen, CA) 对样本总 RNA 进行反转录。使用 CFX™ 实时系统 (Bio-Rad, CA) 和 Quantiect® SYBR Green PCR 试剂盒 (Qiagen, CA) 定量分析 ARG1 mRNA 表达情况,  $\beta$ -actin 作为实验内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算表达水平。RT-qPCR 引物如下: ARG1 (1.4kb) F: 5'-TCT GTG GGA AAA GCA AGC GA-3', R: 5'-TTG CCA AAC TGT GGT CTC CG-3';  $\beta$ -actin: F: 5'-GAT CAT TGC TCC TCC TGA GC-3', R: 5'-ACT CCT GCT TGC TGA TCC AC-3'。

1.2.6 Western blot 采用 RIA 裂解缓冲液 (PRO-PREP™, iNtRON Biotechnology, Korea) 和蛋白酶抑制剂 (Roche, 中国) 提取转染后 HL-60 细胞系所用总蛋白。使用 BCA™ 蛋白分析试剂盒 (Pierce, 美国) 对蛋白进行定量分析。取相同量总蛋白上样, 经 10% SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上, 在 37 °C 下用 5% 脱脂乳封闭 1 h, 加入一抗 (兔抗人 ARG1 浓度 1:1 000,  $\beta$ -actin 浓度 1:1 000) 在 4 °C 下孵育过夜, 随后, 将 PVDF 膜用 TBS 洗涤 3 次, 10 min/次。加入羊抗兔二抗 (1:2 000) 室温孵育 2 h, TBS 洗涤 3 次, 10 min/次。采用 Fusion FX5 图像分析系统进行分析。

1.2.7 NO 测定 RAW264.7 细胞转染 24 h 后, 对 NO 进行测定。转染后, 用含脂多糖的新鲜培养基对细胞进行进一步处理 (LPS) 200 ng/mL, 分别孵育 0、6、24 或 48 h。在每个时间点收集 3 mL 培养基。根据制造商的说明使用 Griess 检测试剂盒 (Promega, WI) 在每个时间点测量 NO 含量。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 21.0 和 GraphPad Prism version 7.0 对数据进行分析处理。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 行  $t$  检验或秩和检验; 计数资料以 [ $n(\%)$ ] 表示, 行  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学

意义。

## 2 结果

### 2.1 两组 miRNAs 表达水平比较

病例组和对照组 miR-186-5p、miR-19a-3p、miR-32-5p、miR-362-3p 和 miR-1238-5p 表达水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 miR-30a-5p、miR-579-3p 和 Let-7e 表达水平有明显差异 ( $P < 0.001$ )。见表 2。

表 2 两组 miRNAs 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

miRNA	病例组 ( $n=60$ )	对照组 ( $n=60$ )	$t$ 值	$P$ 值
miR-186-5p	1.05 ± 0.11	1.07 ± 0.13	0.910	0.365
miR-19a-3p	1.14 ± 0.14	1.11 ± 0.12	1.260	0.210
miR-32-5p	0.87 ± 0.09	0.91 ± 0.13	1.960	0.053
miR-30a-5p	0.66 ± 0.07	1.01 ± 0.11	20.793	<0.001
miR-579-3p	1.02 ± 0.15	1.25 ± 0.17	7.858	<0.001
Let-7e	1.14 ± 0.13	0.82 ± 0.12	14.010	<0.001
miR-1238-5p	0.97 ± 0.11	0.93 ± 0.12	1.903	0.059
miR-362-3p	1.01 ± 0.14	1.05 ± 0.13	1.622	0.108

### 2.2 双荧光素酶报告基因检测结果

通过取交集分析发现, miR-579-3p 和 Let-7e 没有合适的关于急性脑卒中病理生理学及免疫调节相关的靶基因, 而 miR-30a-5p 潜在靶基因是 ARG1。ARG1 由巨噬细胞产生, 在炎症反应中发挥抗炎作用, 在脑卒中诱导的外周免疫反应中发挥重要作用。生物信息学预测显示, ARG1 基因的 3' 端非编码区 (3'UTR) 包含了一个 miR-30a-5p 靶序列, 见图 1A。在 HL-60 细胞系中, 双荧光素酶报告基因检测 miR-30a-5p 组双荧光素酶相对活性明显低于 NC 组 ( $P < 0.05$ ), 证实 ARG1 是 miR-30a-5p 的直接靶点, 见图 1。

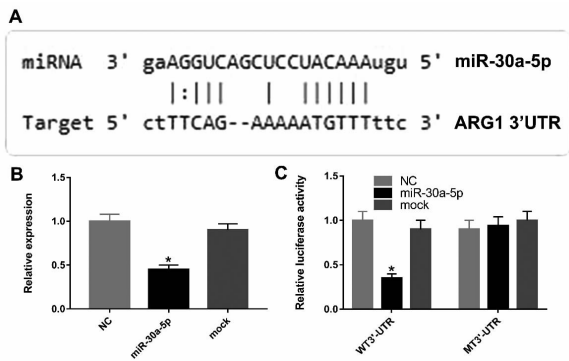


图 1 ARG1 是 miR-30a-5p 的直接作用靶点

A. 生物信息学预测 ARG1 基因 3'-UTR 包含 miR-30a-5p 靶序列; B. 双荧光素酶报告基因转染 HL-60 细胞 ARG1 mRNA 表达水平; C. 双荧光素酶报告基因检测 ARG1 是 miR-30a-5p 的直接靶点; \*  $P < 0.05$ , 与 NC 组和 mock 组相比。

### 2.3 miR-30a-5p 对 ARG1 的调节作用

RT-qPCR 检测表明, 与病例组外周血 ARG1

mRNA 表达水平比较, 对照组明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A。miR-30a-5p 模拟物转染 24 h 后, RT-qPCR 结果显示, ARG1 mRNA 表达水平较 mock 和 NC 组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2B。Western blot 结果显示, miR-30a-5p 模拟物转染 24 h 后 ARG1 蛋白表达水平较 mock 和 NC 组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2C。

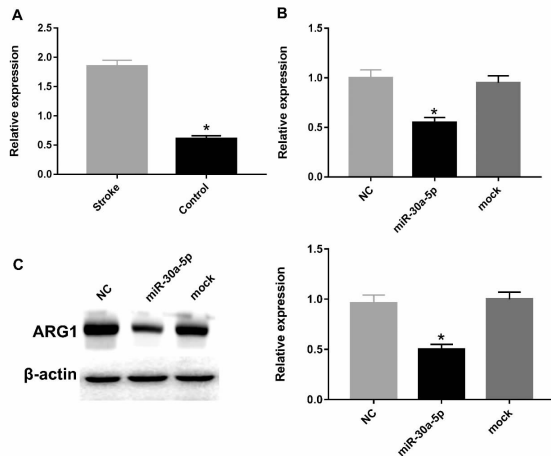


图 2 miR-30a-5p 对 ARG1 的调节作用

A. 脑卒中患者外周血 ARG1 mRNA 表达水平; B. 转染的 HL-60 细胞系中, 检测 ARG1 mRNA 表达水平; C. 转染的 HL-60 细胞系中, 检测 ARG1 蛋白表达水平。\*  $P < 0.05$ , miR-30a-5p 组与 NC 组和 mock 组相比。

### 2.4 miR-30a-5p 对 RAW 264.7 细胞系中 ARG1 蛋白的表达和 NO 的调节作用

Western blot 分析表明, miR-30a-5p 模拟物转染 RAW264.7 细胞 24 h 后, ARG1 蛋白表达水平较 mock 和 NC 组明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3A。另外, miR-30a-5p 对 LPS 处理后的 RAW 264.7 细胞 48 h 后, miR-30a-5p 模拟物组 NO 水平较 mock 和 NC 组明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B。

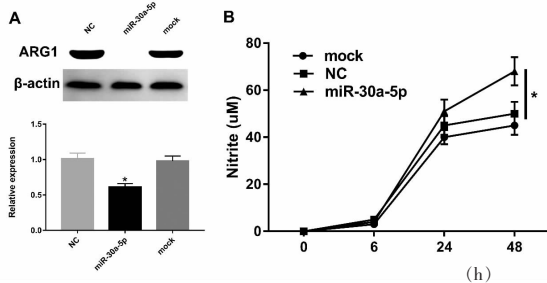


图 3 miR-30a-5p 对 RAW 264.7 细胞系中 ARG1 蛋白的表达和 NO 的调节作用

A. 转染的 RAW 264.7 细胞系中, 检测 ARG1 蛋白表达水平; B. 转染的 RAW 264.7 细胞系中, 检测 NO 代谢情况。\*  $P < 0.05$ , miR-30a-5p 组与 NC 组和 mock 组相比。

### 3 讨论

miRNAs 在急性缺血性脑卒中患者血液中比较稳定,可能作为潜在的诊断标记<sup>[15]</sup>。本研究发现 8 个候选 miRNAs 中 miR-30a-5p、miR-579-3p 和 Let-7e 表达水平在急性缺血性脑卒中外周血和较对照组存在差异( $P < 0.05$ ),表明急性缺血性脑卒中发生时外周血 miRNAs 表达则会明显改变。

荧光素酶报告基因检测发现,缺血性脑卒中患者外周血 ARG1 mRNA 表达水平相比对照组明显升高( $P < 0.05$ ),而 RT-qPCR 和 Western blot 发现,在 HL-60 或 RAW264.7 细胞中 miR-30a-5p 可以抑制 ARG1 mRNA 及其蛋白的表达,证实 ARG1 是 miR-30a-5p 直接作用靶基因。miR-30a-5p 过表达可下调中性粒细胞和小鼠巨噬细胞 ARG1 蛋白表达,表明其可能通过 ARG1 表达调节缺血性卒中患者的外周免疫应答,并参与缺血性卒中的病理生理过程。ARG1 是一种细胞质酶,主要在肝脏中表达,同时作为尿素循环的组成部分,也在外周血的免疫细胞中表达,参与机体损伤后的免疫应答<sup>[16-17]</sup>。ARG1 通过消耗 L-精氨酸来发挥抗炎作用,抑制 Th1 细胞的活力和增强 Th2 细胞增殖能力<sup>[18-19]</sup>。小鼠巨噬细胞中 ARG1 通过与 iNOS 竞争 L-精氨酸来抑制 NO 的产生<sup>[20]</sup>,进而抑制炎症反应,ARG1 抗炎作用的发现进一步支持了其在巨噬细胞中表现出高表达<sup>[21]</sup>。在炎症条件下,大量的 ARG1 从巨噬细胞、多形核中性粒细胞和骨髓来源的抑制细胞中释放到细胞外,进而抑制 T 细胞的增殖<sup>[22-23]</sup>。研究<sup>[24]</sup>表明,急性缺血性脑卒中患者的白细胞中 ARG1 mRNA 持续上调。急性缺血性脑卒中发生后,受损伤的大脑下游信号上调外周血中免疫细胞 ARG1 mRNA 水平,并下调 miR-30a-5p 的表达,而 miR-30a-5p 的下调,进一步增强了 ARG1 的表达。Fu 等<sup>[25]</sup>研究表明,miR-30-5p 水平在脊髓损伤患者明显下调,而 miR-30a-5p 过表达可改善炎症反应和氧化应激。精神类疾病患者脑组织和外周血单核细胞中,miR-30a-5p 同样明显下调,且对该类疾病的监测具有重要作用<sup>[26]</sup>。Wang 等<sup>[27]</sup>通过探讨外泌体 microRNAs 对缺血性脑卒中早期诊断的价值时指出脑卒中急性期外泌体 miR-30a-5p 表达水平降低。上述研究表明,miR-30a-5p 在脑卒中等炎症的发病过程中发挥重要作用,脑卒中发生后的分子变化可能与脑组织对局部炎症的代偿反应有关,并通过中枢神经系统,作为防御机制激活对抗促炎信号途径。此外,ARG1 增加的另一个原因可能是脑卒中后引起机体免疫抑制,患者更容易感染和预后差有关<sup>[28]</sup>。中性粒细胞

释放的 ARG1 蛋白抑制 T 淋巴细胞增殖,减少淋巴细胞,研究<sup>[29]</sup>表明血液中 ARG1 mRNA 的表达与中风的严重程度和不良预后以及高中性粒细胞-淋巴细胞比例密切相关,而 ARG1 是 miR-30a-5p 的靶基因,miR-30a-5p 表达的改变可能参与并作为脑卒中引起的免疫抑制的生物标志物。

综上所述,miR-30a-5p 及其靶基因 ARG1 是急性缺血性脑卒中重要的分子标志物之一,miR-30a-5p 可能通过抑制靶向基因 ARG1 表达参与缺血性卒中免疫应答病理生理过程,但具体机制尚需要进一步研究证实。

### 参考文献

- [1] Tang Y, Tong X, Li Y, *et al.* JAK2/STAT3 pathway is involved in the protective effects of epidermal growth factor receptor activation against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2018, 1(662): 219 - 226.
- [2] Zhao Y, Xue Y, Liu Z, *et al.* Role of the Janus kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway in the protective effect of remote ischemia preconditioning against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Neuroreport*, 2019, 30(9): 664 - 670.
- [3] Yin P, Wei Y, Wang X, *et al.* Roles of Specialized Pro-Resolving Lipid Mediators in Cerebral Ischemia Reperfusion Injury [J]. *Front Neurol*, 2018, 31(9): 617.
- [4] Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17(7): 796 - 808.
- [5] Asano S, Chantler PD, Barr TL. Gene expression profiling in stroke: relevance of blood-brain interaction [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2016, 9(26): 80 - 86.
- [6] Kong Y, Li S, Cheng X, *et al.* Brain Ischemia Significantly Alters microRNA Expression in Human Peripheral Blood Natural Killer Cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 14(11): 759.
- [7] Hao L, Liu MW, Gu ST, *et al.* Sedum sarmentosum Bunge extract ameliorates lipopolysaccharide- and D-galactosamine-induced acute liver injury by attenuating the hedgehog signaling pathway via regulation of miR-124 expression [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020, 20(1): 88.
- [8] McGuire A, Brown JA, Kerin MJ. Metastatic breast cancer: the potential of miRNA for diagnosis and treatment monitoring [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2015, 34(1): 145 - 155.
- [9] Tan JR, Tan KS, Koo YX, *et al.* Blood microRNAs in low or no risk ischemic stroke patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 2072 - 2084.
- [10] Tan KS, Arumugam A, Sepramaniam S, *et al.* Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients [J]. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7689.
- [11] 王薇薇, 王新德. 第六届全国脑血管病学术会议纪要 [J]. *中华神经科杂志*, 2004, 37(4): 346 - 348.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 - 408.
- [13] Munder M, Mollinedo F, Calafat J, *et al.* Arginase I is constitutively

- expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity[J]. *Blood*, 2005, 105(6): 2549 - 2556.
- [14] Yoo H, Kim J, Lee AR, *et al.* Alteration of microRNA 340-5p and Arginase-1 Expression in Peripheral Blood Cells during Acute Ischemic Stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 6(5): 3211 - 3221.
- [15] Dewdney B, Trollope A, Moxon J, *et al.* Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Acute Ischemic Stroke: A Systematic Review[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(3): 522 - 530.
- [16] You J, Chen W, Chen J, *et al.* The Oncogenic Role of ARG1 in Progression and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma[J]. *Biomed Res Int*, 2018, Doi: 10.1155/2018/2109865.
- [17] Wang XP, Chen YG, Qin WD, *et al.* Arginase I attenuates inflammatory cytokine secretion induced by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(8): 1853 - 1860.
- [18] Burrack KS, Tan JJ, McCarthy MK, *et al.* Myeloid Cell Arg1 Inhibits Control of Arthritogenic Alphavirus Infection by Suppressing Antiviral T Cells[J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11(10): e1005191.
- [19] Steggerda SM, Bennett MK, Chen J, *et al.* Inhibition of arginase by CB-1158 blocks myeloid cell-mediated immune suppression in the tumor microenvironment[J]. *J Immunother Cancer*, 2017, 5(1): 101.
- [20] Carbajosa S, Rodríguez-Angulo HO, Gea S, *et al.* L-arginine supplementation reduces mortality and improves disease outcome in mice infected with *Trypanosoma cruzi* [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(1): e0006179.
- [21] Fumagalli M, Lombardi M, Gressens P, *et al.* How to reprogram microglia toward beneficial functions[J]. *Glia*, 2018, 66(12): 2531 - 2549.
- [22] Khan S, Chan YT, Revelo XS, *et al.* The Immune Landscape of Visceral Adipose Tissue During Obesity and Aging[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 15(11): 267.
- [23] Lo CH, Lynch CC. Multifaceted Roles for Macrophages in Prostate Cancer Skeletal Metastasis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 18(9): 247.
- [24] Jickling GC, Ander BP, Shroff N, *et al.* Leukocyte response is regulated by microRNA let7i in patients with acute ischemic stroke [J]. *Neurology*, 2016, 87(21): 2198 - 2205.
- [25] Fu X, Shen Y, Wang W, *et al.* MiR-30a-5p ameliorates spinal cord injury-induced inflammatory responses and oxidative stress by targeting NeuroD 1 through MAPK/ERK signalling [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45(1): 68 - 74.
- [26] Liu S, Zhang F, Shugart YY, *et al.* The early growth response protein 1-miR-30a-5p-neurogenic differentiation factor 1 axis as a novel biomarker for schizophrenia diagnosis and treatment monitoring [J]. *Transl Psychiatry*, 2017, 7(1): e998.
- [27] Wang W, Li DB, Li RY, *et al.* Diagnosis of Hyperacute and Acute Ischaemic Stroke: The Potential Utility of Exosomal MicroRNA-21-5p and MicroRNA-30a-5p [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2018, 45(5-6): 204 - 212.
- [28] Chamorro A, Urra X, Planas AM. Infection after acute ischemic stroke: a manifestation of brain-induced immunodepression [J]. *Stroke*, 2007, 38(3): 1097 - 1103.
- [29] Petrone AB, O'Connell GC, Regier MD, *et al.* The Role of Arginase 1 in Post-Stroke Immunosuppression and Ischemic Stroke Severity [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7(2): 103 - 110.
- (收稿日期: 2020 - 08 - 10 修回日期: 2020 - 10 - 05)

## 《川北医学院学报》变更刊期启事

为进一步适应现代化期刊的发展要求,缩短出版周期,提高学术研究时效性,扩大影响范围,更好地为作者和读者服务,经主管部门同意并报四川省新闻出版局批准,本刊自 2021 年 2 月起由双月刊变更为月刊,每月 28 日出版。

敬请本刊编委、审稿专家及广大读者、作者朋友继续关注、支持本刊!热忱欢迎国内外专家、学者赐稿。投稿网址: <http://noth.cbpt.cnki.net>。

本刊编辑部