

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.07.003

❖ 基础研究 ❖

# 脑特异性 miRNA-9 介导 IGF-1R 信号对脑缺血再灌注神经损伤大鼠的保护及作用机制

邓娅<sup>1</sup>, 王顺先<sup>2</sup>

(1. 达州中医药职业学院基础医学部, 四川 达州 635000; 2. 川北医学院附属医院神经内科, 四川 南充 637000)

**【摘要】目的:** 探究脑特异性 miRNA-9 介导 IGF-1R 信号对脑缺血再灌注神经损伤 (CI/RI) 大鼠的保护及作用机制。**方法:** 将 40 只大鼠随机分为对照组 (sham 组)、CI/RI 组、miR-NC 组和 miR-9 inhibitor 组, 每组各 10 只。通过神经行为学评分检测神经功能, TTC 染色检测脑梗死面积, HE 染色检测脑组织病理学变化, TUNEL 检测神经元凋亡, 蛋白质印迹法检测脑组织中 miR-9、IGF-1R 和 IGF-1 表达。比较不同组别的神经行为学评分、脑梗死面积、脑组织病理学变化、神经元凋亡情况、脑组织中 miR-9、IGF-1R 和 IGF-1 的表达水平。**结果:** 和 sham 组相比, CI/RI 组神经功能评分、海马组织中 miR-9 相对表达量、脑梗死面积、神经元凋亡数量均升高 ( $P < 0.05$ ); 和 CI/RI 组相比, miR-9 inhibitor 组神经功能评分、海马组织中 miR-9 相对表达量、脑梗死面积、神经元凋亡数量均降低 ( $P < 0.05$ )。miR-NC 组和 CI/RI 组神经功能评分、海马组织中 miR-9 相对表达量、脑梗死面积、神经元凋亡数量比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。和 sham 组相比, CI/RI 组、miR-NC 组和 miR-9 inhibitor 组大鼠脑组织中 IGF-1、IFG-1R 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ); miR-9 inhibitor 组大鼠脑组织中 IGF-1、IFG-1R 蛋白表达高于 CI/RI 组 ( $P < 0.05$ ); 和 miR-NC 组相比, miR-9 组染野生型荧光素酶活性增加 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 抑制 miR-9 可对 CI/RI 大鼠脑组织产生保护作用, 其作用机制与促进 IGF-1R 信号通路相关。

**【关键词】** 脑缺血再灌注神经损伤; 脑特异性 miR-9; IGF-1R 信号; 神经元凋亡; 脑梗死面积

**【中图分类号】** R246.6; R743.31 **【文献标志码】** A

## Protection and mechanism of brain-specific miRNA-9 regulating IGF-1R signaling on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

DENG Ya<sup>1</sup>, WANG Shun-xian<sup>2</sup>

(1. Department of Basic Medical Science, Dazhou Vocational College of Chinese Medicine, Dazhou 635000; 2. Department of Neurology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the the protective effect and mechanism of brain-specific miRNA-9 regulating IGF-1R signaling on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods:** 40 rats were divided into sham group, CI/RI group, miR-NC group and miR-9 inhibitor group, with 10 rats in each group. Neurobehavioral score was used to detect neurological function, cerebral infarction area was detected by TTC staining, the pathological changes of brain tissue was detected by HE staining, neuronal apoptosis were detected by TUNEL, the expression of miR-9, IGF-1R and IGF-1 in brain tissue were detected by Western blotting. The neurobehavioral score, cerebral infarction area, pathological changes of brain tissue, neuronal apoptosis and the expression levels of miR-9, IGF-1R and IGF-1 in brain tissue were compared among different groups. **Results:** Compared with the sham group, the neurological function scores, relative expression of miR-9 in the hippocampus, cerebral infarction area, and the number of neurons apoptotic were significantly increased in the CI/RI group ( $P < 0.05$ ), compared with the CI/RI group, the neurological function score, the relative expression of miR-9 in the hippocampus, area of cerebral infarction, and the number of neurons apoptotic were significantly decreased in the miR-9 inhibitor group ( $P < 0.05$ ). There were no significant differences in neurological function score, relative expression of miR-9 in hippocampus, cerebral infarction area, and the number of neuronal apoptosis between the miR-NC group and the CI/RI group ( $P < 0.05$ ). Compared with the sham group, the protein expressions of IGF-1 and IFG-1R in the brain tissue of the CI/RI group, miR-NC group and miR-9 inhibitor group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The protein expressions of IGF-1 and IFG-1R in mouse brain tissue in miR-9 inhibitor group were significantly higher than those in CI/RI group ( $P < 0.05$ ). Compared with the miR-NC group, the wild-type luciferase activity in the miR-9 group was significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Inhibition of miR-9 can protect the brain tissue of rats with

**基金项目:** 四川省南充市科学技术局市校科技战略合作专项 (19SXHZ0103)

**作者简介:** 邓娅 (1985 -), 女, 主治医师。E-mail: 358882117@qq.com

**通讯作者:** 王顺先。E-mail: 24198632@qq.com

cerebral ischemia-reperfusion injury, and its mechanism is related to the promotion of IGF-1R signaling pathway.

**【Key words】** Cerebral ischemia-reperfusion nerve injury; Brain-specific miR-9; IGF-1R signal; Neuronal apoptosis; Cerebral infarct size

脑血管疾病具有发病率高、死亡率高特点,其中缺血性脑疾病发病率占脑血管疾病 80% 以上<sup>[1]</sup>。脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia/reperfusion injury, CI/RI) 指突然中断脑组织供血且在恢复脑供血时错过了最佳的时间,导致脑功能不仅没得到改善,反而加重大脑功能障碍和结构损伤<sup>[2]</sup>。脑缺血可改变脑血管内皮细胞的状态,由正常时的静止到缺血时的促炎,进而加速了血脑屏障的破坏。此外,脑缺血还会诱发多种基因突变,其中微小核糖核酸 (miRNA) 可能介导 CI/RI 的发生发展<sup>[3]</sup>。miRNA 可通过调控基因的表达介导多种疾病的发生发展。miRNA-9 是一类主要在神经系统中表达的小分子 RNA,其在神经组织分化、脑成熟中发挥重要作用<sup>[4]</sup>,可介导多种生物学功能,包括影响脑发育,调节神经干细胞的增殖、分化和凋亡等<sup>[5]</sup>。但目前 miR-9 对 CI/RI 的作用机制报道极少。脑缺血性损伤后机体组织处于复杂的、多基因作用的神经保护网络中,其中胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 在该网络中起重要作用<sup>[6]</sup>,可通过维持细胞生长和抑制细胞凋亡来促进受损神经细胞的恢复<sup>[7]</sup>。本研究拟探讨 miR-9 治疗 CI/RI 模型大鼠的疗效,并观察其能否通过调控 IGF-1 对 CI/RI 大鼠进行保护。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

40 只 SD 大鼠均购自川北医学院医学院动物实验中心,许可证号:SCSK(川)2018-18。大鼠均为 6 周龄,体重 200 ~ 220 g,雌性、雄性大鼠均为 20 只。所有大鼠均饲养在统一的动物房内,室温恒定 22 ~ 24 °C,相对湿度 50 ~ 55%,光照 12 h/12 h 昼夜交替。本次动物实验符合动物伦理委员会批准 (2022-0028)。

### 1.2 试剂和仪器

miR-9 inhibitor 质粒、miR-NC 质粒 (生工生物工程技术服务有限公司); IGF-1 抗体、IGF-1R 抗体 (南京建成生物工程研究所);  $\beta$ -actin 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG (武汉三鹰生物技术有限公司); 放射免疫沉淀法裂解缓冲液 (RIPA 裂解液)、二辛可宁酸 (BCA) 蛋白试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 和化学发光试剂盒 (上海碧云天生物技术公司); L3000015 LipofectamineTM2000 转染试剂 (上

海恒斐生物科技有限公司); MA-688PCR 仪 (中国伯乐有限公司); CH-6010 型机械匀浆机 (瑞士 kinemaica 公司) 脑立体定位仪 (型号 51700, 美国 Stoelting 公司)、全自动发光仪 (型号 AC-CESS2, 美国贝克曼库尔特公司)。

### 1.3 分组和模型制备

将大鼠分为 sham 组、CI/RI 组、miR-NC 组和 miR-9 inhibitor 组,每组各 10 只。本实验根据 MCAO 法<sup>[6]</sup>制备 CI/RI 大鼠模型。麻醉各组大鼠并固定,沿大鼠颈部中线剪 2 cm 的切口,将大鼠颈部皮肤逐层分离,暴露颈总、颈外和颈内动脉并游离,暂时将颈总和颈外动脉夹闭,并于颈外动脉处用剪刀剪一个小口,去掉动脉夹,插入线栓,感觉到有稍微的阻力时停止插入。2 h 后把插入的线栓拔出形成再灌注,用丝线扎紧动脉的残端,逐层缝合颈部皮肤。Sham 组大鼠和其它各组大鼠的操作步骤相同,但不进行结扎。造模成功标准:大鼠出现神经功能缺损。本研究制备的所有 CI/RI 模型大鼠均造模成功。

再灌注 5 min 时,miR-NC 组大鼠经左侧脑室注射 2  $\mu$ L 浓度为 100  $\mu$ mol/L miR-NC 质粒干预,miR-9 inhibitor 组大鼠经左侧脑室注射 2  $\mu$ L 浓度为 100  $\mu$ mol/L miR-9 inhibitor 质粒干预,sham 组和 CI/RI 在大鼠注射 100  $\mu$ mol/L 生理盐水干预。24 h 后行后续实验。

### 1.4 神经行为学评分

参照既往研究<sup>[8]</sup>中方法检测神经功能,1 ~ 3 分为成功制备 CI/RI 模型。见表 1。

表 1 神经功能评分标准

评分(分)	状态
0	无神经功能缺损
1	对侧前爪不能完全伸展
2	行走时向对侧旋转
3	行走时向对侧倾倒
4	不能独立行走,意识模糊

### 1.5 检测方法

1.5.1 RT-PCR 检测各组海马组织中 miR-9 表达水平 每组取部分大鼠,颈椎脱臼处死后剪下头颅,沿枕骨大孔剪开颅骨,取出完整的脑组织,生理盐水清洗脑组织上血迹。切除小脑,分开左右脑半球,将左脑下方的脑桥剥离开,可见一月牙状结构即为海马组织,将海马组织剥离,置于冻存管中液氮冻存。各组取 50 mg 海马组织,将 1 mL 裂解液加入到海马组织中,用均浆器冰上研磨,置于 EP 管中静置,使

核酸与蛋白质完全解离。加入 200  $\mu$ L 氯仿,振荡为乳状后静置 4 min,13 000 rpm 离心 10 min,收集上层含 RNA 的无色水相层约 500  $\mu$ L,纯化并鉴定 RNA 的完整性。取纯度和完整性较好的 RNA,65  $^{\circ}$ C 热变形 5 min,去除 RNA 形成的高级结构以提高转录效率,置于冰上预冷。配置逆转录体系,振荡均匀后瞬时离心后进行逆转录反应。将获得的 cDNA 稀释 50 倍,根据逆转录试剂盒说明书配制 20  $\mu$ L 荧光定量聚合酶链式反应 (PCR) 反应体系:95  $^{\circ}$ C 下变性 30 s,循环条件为 95  $^{\circ}$ C 5 s,60  $^{\circ}$ C 10 s,72  $^{\circ}$ C 15 s,共 40 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 miR-9 的相对表达水平。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

基因	F/R	引物序列	扩增片段大小(bp)
miR-9	F	5'-ACACTCCAGCTGGGTCTTGGTTATCTAGCT-3'	72
	R	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	
U6	F	5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3'	94
	R	5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'	

1.5.2 TTC 染色检测各组脑梗死面积 取各组部分大鼠脑组织,于 -20  $^{\circ}$ C 环境冷冻 30 min。取出冷冻后的脑组织切成厚度为 2 mm 的组织切片,用 2% TTC 染色液染色脑组织切片,避光孵育组织切片 30 min,每隔 5 min 对切片进行翻动,避免染色不均。用多聚甲醛溶液固定组织切片,分析各组大鼠脑梗死面积。

1.5.3 HE 染色检测各组脑组织病理学变化 给药 24 h 后,取各组部分大鼠麻醉并处死,取出脑组织置于多聚甲醛溶液中,固定 24 h 后置于石蜡中,包埋组织后切片,厚度为 4  $\mu$ m,将苏木素染色液加入到组织切片中封片,最后用显微镜观察变化。

1.5.4 TUNEL 染色检测各组神经元凋亡情况 按照 1.5.3 中方法制备脑组织切片,将组织切片进行脱蜡处理,后将酒精加入到组织切片中浸泡,取出组织置于 TUNEL 染色剂中。中性树脂封片,纤维镜下观察组织切片中细胞凋亡情况。

1.5.5 蛋白印迹法检测脑组织中 IGF-1、IGF-1R 蛋白表达 给药 24 h 后,取各组部分大鼠麻醉并处死,取脑组织 50 mg,加入 300  $\mu$ L 含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液中,均浆器冰上研磨组织 10 min,于 4  $^{\circ}$ C 下 16 000 rpm 离心 10 min,收集 120  $\mu$ L 上清液于 EP 管中,加入 4  $\times$  上样缓冲液 40  $\mu$ L,沸水中煮沸 5~10 min 使蛋白质变性,冰上冷却 2 min 存于 -20  $^{\circ}$ C 冰箱保存,用于蛋白电泳上样,离心管中剩余上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。取适量蛋白质,加

入上样缓冲液,95  $^{\circ}$ C 煮沸 5 min,进行 SDS-PAGE 电泳。电泳后,将分离的蛋白条带转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。蛋白样品中分别加入 IGF-1(1:500)、IGF-1R(1:500)、 $\beta$ -actin(1:1 000)一抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。三乙醇胺缓冲盐溶液-吐温 20 (TBST)洗膜后,加入 HRP 标记的二抗 IgG(1:2 000)。37  $^{\circ}$ C 孵育 2 h。TBST 洗膜,加入增强型化学发光 (ECL) 液避光显影。Image J 图像软件分析各蛋白条带的灰度值。以  $\beta$ -actin 为内参,目标蛋白与  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达水平。

1.5.6 双荧光素酶报告靶基因荧光检测 采用 TargetScan7.1 在线靶基因预测软件验证了 IGF-1R 是 miR-9 的假定靶点。IGF-1R 的野生型 (wide type, wt) 3'-UTR 包含预测的 miR-9 结合位点和突变型 (mutant, mut) IGF-1R 3'-UTR 被上海基因有限公司化学扩增,并插入 pMIR 报告荧光素酶报告质粒生成荧光素酶质粒,分别称为 pMIR-IGF-1R-3'-UTRwt 和 pMIR-IGF-1R-3'-UTRmut。转染前 1 d 将 HEK-293T 细胞接种到 24 孔板中,使用与 pMIR-IGF-1R-3'-UTRwt、pMIR-IGF-1R-3'-UTRmut 和 miR-NC 或 miR-9 质粒共转染。转染 48 h 后检测其荧光素酶活性。见表 3。

表 3 共转染分组

组别	质粒
miR-NC	pmir GLO-wt-IGF-1R3'-UTR
miR-9	pmir GLO-wt-IGF-1R3'-UTR
miR-NC	pmir GLO-mut-IGF-1R3'-UTR
miR-9	pmir GLO-mut-IGF-1R3'-UTR

## 1.6 统计学分析

采用 Graphpadprism 8.0 软件进行统计分析。计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠神经行为学评分比较

sham 组大鼠神经功能评分为 0。CI/RI 组 ( $2.85 \pm 0.12$ ) 高于 sham 组 ( $P < 0.05$ ); miR-9 inhibitor 组 ( $1.15 \pm 0.08$ ) 低于 CI/RI 组 ( $P < 0.05$ ); CI/RI 组与 miR-NC 组 ( $2.86 \pm 0.13$ ) 比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 各组大鼠海马组织中 miR-9 表达水平比较

CI/RI 组大鼠海马组织中 miR-9 相对表达量 ( $2.13 \pm 0.14$ ) 高于 sham 组 ( $1.00 \pm 0.09$ ) ( $P < 0.05$ ); miR-9 inhibitor 组大鼠海马组织中 miR-9 相对表达量 ( $0.78 \pm 0.07$ ) 低于 CI/RI 组 ( $P < 0.05$ );

CI/RI 组大鼠海马组织中 miR-9 相对表达量和 miR-NC 组 ( $2.12 \pm 0.14$ ) 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 2。

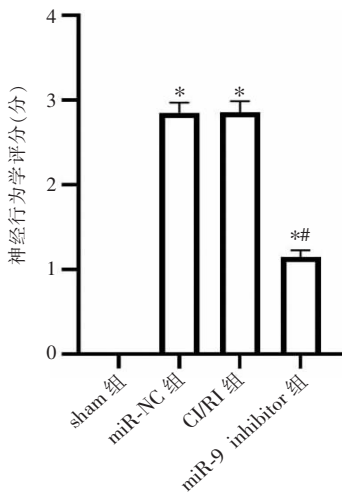


图 1 各组大鼠神经行为学评分比较

\* $P < 0.05$ , 与 sham 组比较; # $P < 0.05$ , 与 CI/RI 组比较。

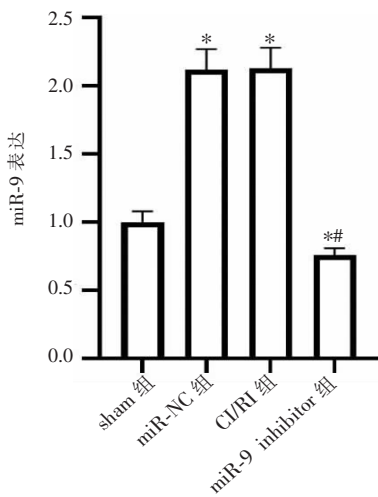


图 2 各组大鼠海马组织中 miR-9 表达比较

\* $P < 0.05$ , 与 sham 组比较; # $P < 0.05$ , 与 CI/RI 组比较。

### 2.3 各组大鼠脑梗死面积比较

CI/RI 组大鼠脑梗死面积 ( $28.13 \pm 1.26$ ) 多于 sham 组 ( $P < 0.05$ ); miR-9 inhibitor 组大鼠脑梗死面

积 ( $9.24 \pm 1.05$ ) 小于 CI/RI 组 ( $P < 0.05$ ); 且 CI/RI 组大鼠脑梗死面积与 miR-NC 组 ( $28.56 \pm 1.27$ ) 比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见图 3。

### 2.4 各组大鼠脑组织病理学变化比较

和 sham 组相比, CI/RI 组神经元大量坏死, 细胞核固缩并出现大量溶解, 神经元排列无规则且稀疏; 海马带宽度不规则, CA1 区椎体的数量也较 sham 组减少, 且排列无规律; 和模型组相比, miR-9 inhibitor 组神经元损伤得到明显改善, 细胞形态基本趋于正常, 海马带整齐排列, 且 CA1 区椎体细胞排列紧密、整齐, 细胞极性变好; miR-NC 组和 CI/RI 组大鼠脑组织病理学比较无明显差异。见图 4。

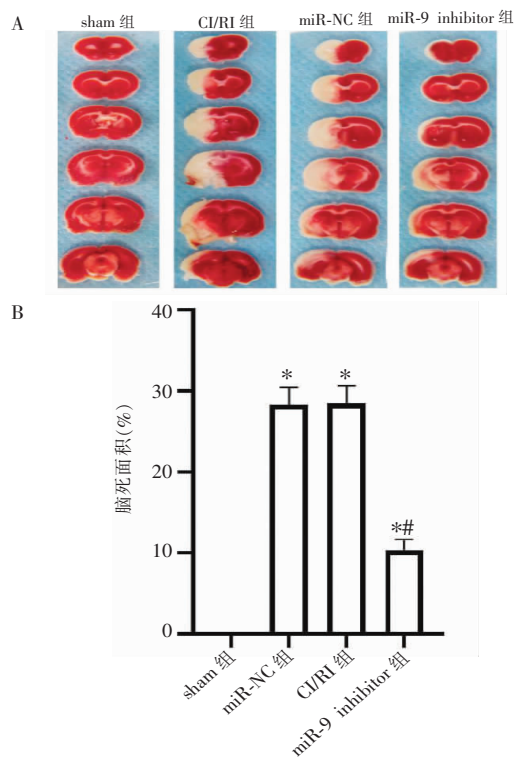


图 3 各组大鼠脑梗死面积比较

A. 各组大鼠脑组织 TCC 染色; B. 各组大鼠脑梗死面积比较。\* $P < 0.05$ , 与 sham 组比较; # $P < 0.05$ , 与 CI/RI 组比较。

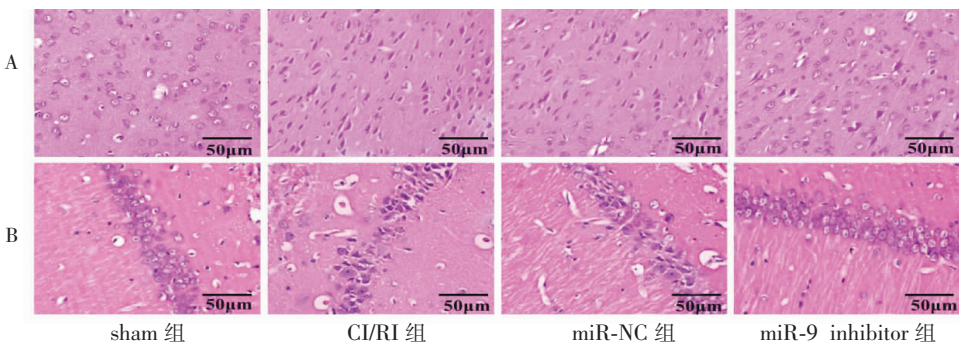


图 4 各组大鼠脑组织 HE 染色 ( $\times 200$ )

A. 各组大鼠大脑皮层 HE 染色; B. 各组大鼠海马 CA1 区 HE 染色。

### 2.5 各组大鼠神经元凋亡比较

和 sham 组相比, CI/RI 组大鼠神经元凋亡数量

( $37.45 \pm 2.37\%$ ) 增加 ( $P < 0.05$ ); 和 CI/RI 组相比, miR-9 inhibitor 组大鼠神经元凋亡数量 ( $8.42 \pm$

1.17%)减少( $P < 0.05$ );且 CI/RI 组大鼠神经元数量和 miR-NC 组( $38.01 \pm 2.40\%$ )比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 5。

### 2.6 各组大鼠脑组织中 IGF-1、IFG-1R 蛋白表达水平比较

和 sham 组相比,CI/RI 组大鼠脑组织中 IGF-1、

IFG-1R 蛋白表达升高( $P < 0.05$ );miR-9 inhibitor 组大鼠脑组织中 IGF-1、IFG-1R 蛋白表达高于 CI/RI 组( $P < 0.05$ );CI/RI 组大鼠脑组织中 IGF-1、IFG-1R 蛋白表达和 miR-NC 组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 6。

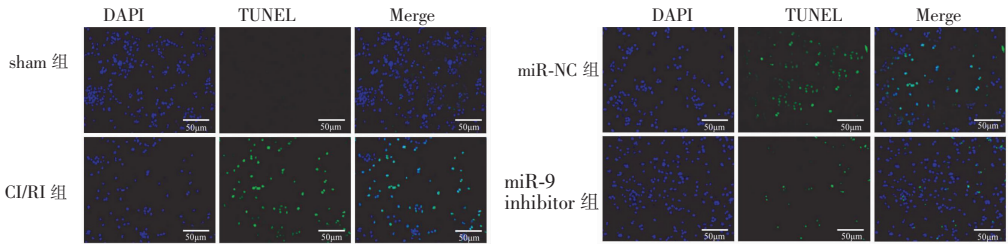


图 5 各组大鼠神经元 TUNEL 染色( $\times 200$ )

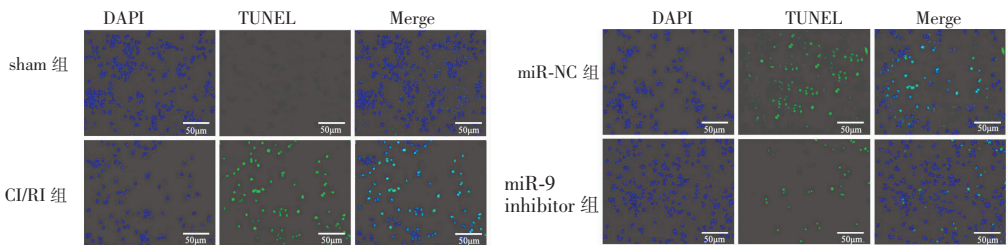


图 5 各组大鼠神经元 TUNEL 染色( $\times 200$ )

### 2.7 miR-9 靶向关系预测和鉴定

软件显示 IGF-1R 的 3'UTR 端与 miR-9 有碱基互补结合点位。在细胞中转染野生型 IGF-1R(IGF-1R-

WT)时,miR-9 组的荧光素酶活性高于 miR-NC 组( $P < 0.05$ ),但两组的突变型 IGF-1R(IGF-1R-MUT)比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 7。

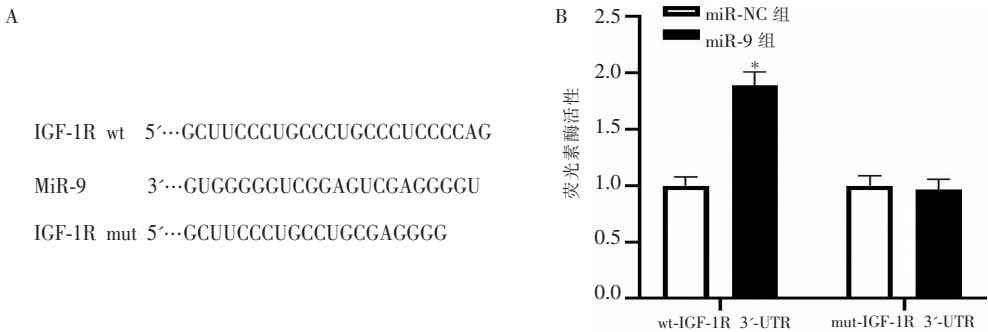


图 7 荧光素酶试验验证 miR-9 和 IGF-1R 的靶向关系

A. miR-9 在 IGF-1R 的 3'UTR 端中的野生型结合位点;B. 荧光素酶活性比较。 $*P < 0.05$ ,与 miR-NC 组比较。

## 3 讨论

脑缺血会因多种因素导致神经元损伤,其发病机制与时间、空间级联反应密切相关。脑缺血/再灌注损伤由多种病理过程所导致,例如氧化应激、细胞凋亡等多种病理生理过程,彼此间相互作用导致神经功能障碍<sup>[8-9]</sup>。大量研究<sup>[9-10]</sup>证明,miRNA 可介导脑缺血再灌注损伤的发生发展。部分研究<sup>[11]</sup>发现,miR-9 在脑内高表达,能通过促进神经干细胞的生物学活性而影响大脑和神经元。本研究结果显示,在脑缺血再灌注损伤大鼠模型中 miR-9 呈高表达,提示 miR-9 参与了大鼠 CI/RI 的过程,和既往研

究<sup>[11]</sup>结果基本一致。

脑缺血/再灌注损伤时脑损伤程度可根据神经功能评分来进行判定,当评分升高,说明脑损伤程度越重<sup>[12]</sup>。本研究中,通过对 CI/RI 大鼠侧脑室注射 miR-9 inhibitor 质粒发现,CI/RI 大鼠脑组织中 miR-9 表达显著降低,且大鼠的神经功能评分明显降低,提示 miR-9 可改善 CI/RI 大鼠神经功能损伤。本研究继续抑制 CI/RI 大鼠 miR-9 表达可减少 CI/RI 大鼠脑梗死面积,改善神经元状态,减少神经元凋亡,提示抑制脑特异性 miR-9 能通过减少大鼠脑梗死面积和神经元凋亡保护缺血再灌注大鼠脑组织,能维持神经细胞的发育和分化。Tan 等<sup>[13]</sup>研究发现,

miR-9 能对脑的发育进行有效调节。张玉敏等<sup>[14]</sup>研究证实,高表达 miR-9 可促进缺血性脑卒中患者血清中的炎症因子含量增加。

多肽生长因子 IGF-1 可对脑损伤中的神经营养产生保护作用,其可通过结合 IGF-1R 来发挥多种生物学功能,包括促进神经功能恢复、抑制神经元细胞凋亡等<sup>[15]</sup>。IGF-1 与 IGF-1R 在正常脑组织有少量表达,而脑缺血损伤发生后,脑组织中 IGF-1 与 IGF-1R 表达水平明显增加<sup>[16]</sup>。本研究显示,CI/RI 组大鼠脑组织中 IGF-1 和 IGF-1R 蛋白表达均明显增加,提示缺血再灌注损伤可促进脑组织中 IGF-1 与 IGF-1R 表达,通过 miR-9 inhibitor 干预后 CI/RI 大鼠脑组织中 IGF-1 与 IGF-1R 表达明显高于 CI/RI 模型组,提示抑制 miR-9 能进一步促进内源性 IGF-1 与 IGF-1R 的合成与表达。IGF-1 与 IGF-1R 表达上调,可调控下游信号通路,从而减轻缺血性脑损伤病情的发展,发挥神经保护作用<sup>[17]</sup>。王杰华等<sup>[18]</sup>研究证实,在脑缺血再灌注损伤中可通过促进 IGF-1 与 IGF-1R 表达改善脑损伤。为了探究 miR-9 对 CI/RI 大鼠的脑保护机制,本研究还验证了 IGF-1R 和 miR-9 的靶向关系,miR-9 可靶向抑制 IGF-1R 表达,提示抑制 miR-9 可靶向上调 IGF-1R 表达而发挥对 CI/RI 大鼠的脑保护作用。

综上所述,抑制 miR-9 可对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织产生保护作用,其作用机制与促进 IGF-1R 信号通路相关。

#### 参考文献

[1] Li L, Zhang Q, Wang Y, *et al.* Knockdown of lncRNA TUG1 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating miR-142-3p[J]. *BioFactors*, 2021, 47(5): 819 - 827.

[2] Huang Y, Wang Y, Duan Z, *et al.* Restored microRNA-326-5p inhibits neuronal apoptosis and attenuates mitochondrial damage via suppressing STAT3 in cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Nanoscale Research Letters*, 2021, 16(1): 1 - 11.

[3] Shi Y, Yi Z, Zhao P, *et al.* MicroRNA-532-5p protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by directly targeting CXCL1[J]. *Aging*, 2021, 13(8): 11528.

[4] 兰婷. miR-9 在阿魏酸钠改善缺氧缺血性脑损伤大鼠学习记忆中的作用[J]. *神经解剖学杂志*, 2020, 36(1): 65 - 70.

[5] 刘艳玉, 蒋星军, 任彩萍. miR-9 的研究进展[J]. *生命科学研究*, 2014, 18(5): 435 - 440.

[6] Zakharova IO, Bayunova LV, Zorina II, *et al.* Insulin and brain gangliosides prevent metabolic disorders caused by activation of free radical reactions after two-vessel ischemia-reperfusion injury to the rat forebrain[J]. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 2022, 58(1): 279 - 291.

[7] Hayes CA, Valcarcel-Ares MN, Ashpole NM. Preclinical and clinical evidence of IGF-1 as a prognostic marker and acute intervention with ischemic stroke[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2021, 41(10): 2475 - 2491.

[8] Zhou F, Wang YK, Zhang CG, *et al.* miR-19a/b-3p promotes inflammation during cerebral ischemia/reperfusion injury via SIRT1/FoxO3/SPHK1 pathway[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 1 - 13.

[9] Yang B, Zang L, Cui J, *et al.* Circular RNA TTC3 regulates cerebral ischemia-reperfusion injury and neural stem cells by miR-372-3p/TLR4 axis in cerebral infarction[J]. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021, 12(1): 1 - 11.

[10] Luo L, Zang G, Liu B, *et al.* Bioengineering CXCR4-overexpressing cell membrane functionalized ROS-responsive nanotherapeutics for targeting cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Theranostics*, 2021, 11(16): 8043 - 8056.

[11] 杜鹏, 张晶晶, 徐敬轩, 等. miR-9 对人脑胶质瘤 LN229 细胞增殖的影响[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2020, 34(3): 258 - 260.

[12] Yu S, Wu K, Liang Y, *et al.* Therapeutic targets and molecular mechanism of calyosin for the treatment of cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. *Aging*, 2021, 13(12): 16804 - 16815.

[13] Tan SL, Ohtsuka T, González A, *et al.* MicroRNA9 regulates neural stem cell differentiation by controlling Hes1 expression dynamics in the developing brain[J]. *Genes to Cells Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 2012, 17(12): 952 - 961.

[14] 张玉敏, 韩素桂, 刘启为, 等. 急性缺血性脑卒中患者血清 miR-9 的表达及其与炎症的相关性[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(15): 1864 - 1867.

[15] 高微, 吴伟, 周凯丽, 等. IGF-1 对睡眠剥夺模型小鼠认知功能的影响及海马 IGF-1/PI3K/Akt 信号通路的调节作用[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2020, 29(5): 419 - 425.

[16] 程坤, 胡治平. 沙鼠前脑缺血再灌注损伤后脑组织 HSP27 和 IGF-1 的表达变化[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2013, 11(12): 1499 - 1500.

[17] 康雅琴, 朱红, 徐继宗. 异氟醚后处理对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠远期认知功能及脑组织 IGF-1, BDNF, NGF 表达水平的影响[J]. *热带医学杂志*, 2020, 20(9): 1136-1139, 1151.

[18] 王杰华, 李国前, 杨小霞, 等. 尤瑞克林对脑缺血再灌注大鼠脑组织中 IGF-1 和 IGF-1R 表达水平的影响及其机制[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2015, 41(2): 338 - 342.

(收稿日期: 2022 - 03 - 01

修回日期: 2022 - 04 - 05)