

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2026.01.008
文章编号: 1005-8982 (2026) 01-0048-08

实验研究·论著

MicroRNA-98对糖氧剥夺诱导的SH-SY5Y 细胞损伤的影响*

钱旭东¹, 李国芸², 卜一¹, 张硕¹, 王红梅¹, 窦志杰¹

(承德医学院附属医院 1. 神经内科, 2. 呼吸内科, 河北 承德 067000)

摘要: **目的** 探讨microRNA-98(miR-98)在人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y中的表达及与缺血性脑卒中细胞凋亡和炎症损伤的关系。**方法** 采用氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)诱导SH-SY5Y细胞构建体外缺血性脑卒中细胞模型。细胞分为对照组(未经任何处理)和OGD/R组,采用MTT法检测细胞活力,采用实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测miR-98、Rho相关卷曲螺旋激酶2(ROCK2)表达;通过生物信息学的方法,寻找与ROCK2结合特异性好、稳定性强的miRNAs,采用双荧光素酶报告基因检测荧光素酶活性。Western blotting检测ROCK2蛋白相对表达量。将miR-98模拟物、miR-98抑制剂、pcDNA3.1-ROCK2和相应的阴性对照组转染到SH-SY5Y细胞中,并进行OGD/R处理。采用流式细胞术、TUNEL法检测细胞凋亡情况;采用吸光度法检测凋亡相关蛋白胱天蛋白酶3(Caspase-3)和胱天蛋白酶9(Caspase-9)水平;qRT-PCR检测TNF- α 和IL-6表达。**结果** 与对照组相比,OGD/R组细胞活力降低,miR-98相对表达量降低($P < 0.05$),ROCK2 mRNA相对表达量升高($P < 0.05$)。联合生物信息学和双荧光素酶实验分析发现ROCK2是miR-98的靶点之一($P < 0.05$)。与对照组相比,miR-98模拟物转染组miR-98 mRNA相对表达量升高($P < 0.05$),而ROCK2蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);miR-98抑制剂转染组miR-98 mRNA相对表达量降低,而ROCK2蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。与对照组相比,OGD/R组细胞凋亡率、Caspase-3和Caspase-9水平升高($P < 0.05$);与模拟物对照组相比,miR-98模拟物组细胞凋亡率、Caspase-3和Caspase-9水平降低($P < 0.05$);与miR-98模拟物组相比,miR-98模拟物组+pcDNA3.1-ROCK2组的细胞凋亡率、Caspase-3和Caspase-9水平升高($P < 0.05$)。与对照组相比,OGD/R组TNF- α 和IL-6 mRNA相对表达量升高($P < 0.05$);与模拟物对照组相比,miR-98模拟物组TNF- α 和IL-6 mRNA相对表达量降低($P < 0.05$);与miR-98模拟物组相比,miR-98模拟物组+pcDNA3.1-ROCK2组的TNF- α 和IL-6 mRNA相对表达量升高($P < 0.05$)。**结论** miR-98通过靶向抑制ROCK2的表达,抑制神经母细胞瘤SH-SY5Y细胞的凋亡和炎症损伤,在缺血性脑卒中神经元损伤中发挥保护作用。

关键词: 缺血性脑卒中; microRNA; Rho相关卷曲螺旋激酶2; 凋亡; 炎症反应

中图分类号: R743.3

文献标识码: A

The effect of microRNA-98 on SH-SY5Y cell damage induced by oxygen-glucose deprivation*

Qian Xu-dong¹, Li Guo-yun², Bu Yi¹, Zhang Shuo¹, Wang Hong-mei¹, Dou Zhi-jie¹

(1. Department of Neurology, 2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To explore the expression of microRNA-98 (miR-98) in human neuroblastoma cell

收稿日期: 2025-02-12

* 基金项目: 河北省医学科学研究课题(No: 20220005)

[通信作者] 窦志杰, E-mail: douzj0210@163.com

line SH-SY5Y and its relationship with cell apoptosis and inflammatory injury in ischemic stroke. **Methods** Oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) was used to induce SH-SY5Y cells to establish an in vitro cell model of ischemic stroke. The cells were divided into control group (without any treatment) and OGD/R group. Cell viability was detected by MTT assay. The expression levels of miR-98 and Rho-associated coiled-coil kinase 2 (ROCK2) were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Bioinformatics methods were used to screen miRNAs that specifically bind to ROCK2 with high stability, and dual-luciferase reporter gene assay was performed to detect luciferase activity. The relative expression level of ROCK2 protein was detected by Western blotting. miR-98 mimics, miR-98 inhibitors, pcDNA3.1-ROCK2 and their corresponding negative controls were transfected into SH-SY5Y cells, followed by OGD/R treatment. Flow cytometry and TUNEL assay were used to detect cell apoptosis. Absorptiometry was used to determine the levels of apoptotic-related proteins Caspase-3 and Caspase-9. The mRNA expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) were detected by qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, the OGD/R group showed decreased cell viability, reduced relative expression level of miR-98 ($P < 0.05$), and increased relative expression level of ROCK2 mRNA ($P < 0.05$). Combined bioinformatics analysis and dual-luciferase reporter gene assay confirmed that ROCK2 is one of the target genes of miR-98 ($P < 0.05$). Compared with the control group, the miR-98 mimics transfection group had an increased relative expression level of miR-98 mRNA ($P < 0.05$) and a decreased relative expression level of ROCK2 protein ($P < 0.05$); the miR-98 inhibitor transfection group had a decreased relative expression level of miR-98 mRNA and an increased relative expression level of ROCK2 protein ($P < 0.05$). Compared with the control group, the OGD/R group had increased cell apoptosis rate and elevated levels of Caspase-3 and Caspase-9 ($P < 0.05$); compared with the mimic control group, the miR-98 mimics group had decreased cell apoptosis rate and reduced levels of Caspase-3 and Caspase-9 ($P < 0.05$); compared with the miR-98 mimics group, the miR-98 mimics + pcDNA3.1-ROCK2 group had increased cell apoptosis rate and elevated levels of Caspase-3 and Caspase-9 ($P < 0.05$). Compared with the control group, the OGD/R group had increased mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$); compared with the mimic control group, the miR-98 mimics group had decreased mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$); compared with the miR-98 mimics group, the miR-98 mimics + pcDNA3.1-ROCK2 group had increased mRNA expression levels of TNF- α and IL-6 ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-98 inhibits apoptosis and inflammatory injury of human neuroblastoma SH-SY5Y cells by targeting and inhibiting the expression of ROCK2, thereby exerting a protective effect against neuronal injury in ischemic stroke.

Keywords: ischemic stroke; microRNA; Rho-associated coiled-coil kinase 2; apoptosis; inflammatory response

脑卒中是全球导致人类残疾和死亡的主要原因,不仅造成沉重的公共卫生负担,还伴随巨大的社会经济成本^[1]。脑卒中按病理类型可分为缺血性和出血性两大类^[2]。其中,缺血性脑卒中占80%以上,是大脑动脉阻塞导致脑血流量减少,致使大脑功能迅速丧失^[3]。近年来,临床治疗脑卒中主要通过神经保护来挽救脑缺血神经细胞免受不可逆损伤^[4]。然而,脑缺血的治疗受众多因素的影响,因此,探索缺血性脑卒中的发病机制至关重要。

近年来,有关研究强调了分子细胞间信息和信号转导在包括脑卒中在内的各种疾病组织损伤状态下的重要性。MicroRNA(miRNA)作为小单链RNA分子,通过调节靶标mRNA的表达在细胞信息传递中发挥关键作用^[5];microRNA-190通过调节Rho/Rho激酶信号传导来防止脑缺血再灌注损

伤^[6];此外,在缺血性脑卒中小鼠模型中分离的原代海马神经细胞中,microRNA-874-3p靶向并下调CXC趋化因子配体12(chemokine C-X-C motif ligand 12, CXCL12),从而降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1(Interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)和白细胞介素-8(Interleukin-8, IL-8)水平,最终抑制缺血性脑卒中的炎症反应^[7];也有报道发现microRNA-98(miR-98)在脑卒中患者血清和中动脉阻塞/再灌注小鼠脑组织中表达下调^[8],但是其在脑卒中神经细胞损伤中的调控机制尚不明确。本研究拟通过体外实验探讨miR-98在人神经母细胞瘤细胞SH-SY5Y中的表达及与缺血性脑卒中细胞凋亡和炎症损伤的关系,为缺血性脑卒中临床诊治提供新的靶点和理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y (CL-0208) 购自武汉普诺塞生命科技有限公司。细胞接种在含有 15% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 MEM/F12 基础培养基 (武汉普诺塞生命科技有限公司, CM-0208) 中, 在 37 °C, 5% CO₂ 的孵育箱中培养。为了获得细胞缺血性损伤模型, 采用氧糖剥夺/再灌注 (oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模拟体内细胞在缺血缺氧后再灌注的损伤过程。SH-SY5Y 细胞接种于 OGD 培养基中, 在 37 °C, 95% N₂ 和 5% CO₂ 条件下培养 1 h; 随后, 细胞在正常 MEM/F12 培养基和正常环境中培养 24 h。一直维持在 MEM/F12 培养基中且无缺氧的细胞为对照组。

1.2 细胞转染和 OGD/R 处理

miR-98 模拟物、miR-98 抑制剂和相应的阴性对照组均由南京建成生物科技有限公司合成。Rho 相关卷曲螺旋激酶 2 (ROCK2) 目的基因扩增并连接到 pcDNA3.1 (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: V79020) 载体上构建 ROCK2 的过表达载体 (pcDNA3.1-ROCK2)。SH-SY5Y 细胞培养至融合度达 90% 后, 以每孔 4×10^5 个的密度接种在 6 孔板中培养 24 h。使用 Lipofectamine 2000 (赛默飞世尔科技有限公司, 货号: 11668019) 将 miR-98 模拟物、miR-98 抑制剂、pcDNA3.1-ROCK2 和相应的阴性对照组转染到 SH-SY5Y 细胞中。随后, 转染上述质粒的 SH-SY5Y 细胞在 OGD 培养基中, 在 37 °C, 95% N₂ 和 5% CO₂ 条件下培养 1 h。然后, 细胞在正常培养基和正常环境中培养 24 h 后进行后续的实验。

1.3 MTT 法检测细胞活力

取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种至 96 孔板中培养 24 h。随后每孔中加入 20 μ L 的 MTT 溶液 (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号: 475989, 规格: 5 g/L), 于 37 °C 继续孵育 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 200 μ L 的二甲基亚砜 (DMSO) (美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号: D1435) 使结晶充分溶解, 振荡 20 min, 使用酶标仪测定 570 nm 波长处各孔的吸光度值。

1.4 双荧光素酶报告基因检测

将含有 miR-98 结合位点的 ROCK2 3'-UTR 的

野生型 (ROCK2-wt) 和 ROCK2 3'-UTR 突变型 (ROCK2-mut) 克隆到 psiCHECK2.0 载体。HEK293T 细胞以 2×10^4 密度接种在 24 孔板中, 当细胞融合度达到 70% 后, 将 ROCK2-wt 或 ROCK2-mut 与 miR-98 模拟物或模拟物对照组共同转染到 293T 细胞, 48 h 后, 根据操作说明书采集细胞并进行分析。每个实验独立重复 3 次。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率

收集瞬时转染 miR-98 抑制剂或/和 ROCK2 过表达的 OGD/R 处理的 SH-SY5Y 细胞, 转染 48 h 后, PBS 洗涤 2 次, 采用 200 μ L 的缓冲液将细胞重悬。加入 5 μ L 的 Annexin V-FITC 和 5 μ L 的 PI, 室温避光孵育 15 min, 加入 400 μ L 的缓冲液, 采用 CytoFLEX 流式细胞仪 [贝克曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司] 测定每个样本中细胞的凋亡率。每组重复 3 次。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡水平

根据试剂盒说明书采用一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: C1086) 检测细胞凋亡水平。取 miR-98 抑制剂或/和 ROCK2 过表达的 OGD/R 处理的 SH-SY5Y 细胞, PBS 洗涤细胞 1 次, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 10 min, 再次用 PBS 冲洗 1 次; 随后, 室温下使用 3% Triton X-100 渗透 5 min; 然后, PBS 洗涤 3 次, 加入 50 μ L 的 TUNEL 溶液, 室温孵育 1 h; 最后, 使用显微镜分析 TUNEL 阳性细胞。

1.7 实时荧光定量聚合酶链反应检测 miR-98、ROCK2、IL-6、TNF- α mRNA 相对表达量

TRIzol 法提取处理的各组 SH-SY5Y 细胞的总 RNA, 取 1 μ L 的 RNA 进行总 RNA 质量和浓度的检测。使用 TaKaRa 逆转录试剂盒 (大连宝生生物技术有限公司) 将 1 μ g 的 RNA 逆转录为 cDNA。实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) (Taqman real-time RT-PCR 试剂盒, 大连宝生生物技术有限公司) 检测基因的表达, 反应程序: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。以 GAPDH 和 U6 为内参。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对表达量。引物序列: miR-98, 正向: 5'-GCGGCGGTGAGGTAGTAAGTTG-3', 长度 22 bp; 反向: 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCG

AGG-3',长度20 bp。ROCK2,正向:5'-CATGGTACC CAGTGATATTGACTGCATCT-3',长度29 bp;反向:5'-CGCAAGCTTTATATGTGTGTGTGTTTATA-3',长度29 bp。IL-6,正向:5'-CAAATTCGGTACATCCTC-3',长度18 bp;反向:5'-CTGGCTTGTCTCTACTA-3',长度18 bp。TNF- α ,正向:5'-CACGCTCTTCTGCCTGCT-3',长度18 bp;反向:5'-GCTTGTCACTCGGGGTT C-3',长度18 bp。GAPDH,正向:5'-ACCACAGTCC ATGCCATCAC-3',长度20 bp;反向:5'-TCACCACCC TGTGCTGTA-3',长度19 bp。U6,正向:5'-CTCGC TTCGGCAGCACA-3',长度17 bp;反向:5'-AACGCT TCACGAATTTGCGT-3',长度20 bp。

1.8 Western blotting检测ROCK2蛋白表达

收集细胞,使用放射免疫沉淀法(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解细胞,提取总蛋白。随后,采用二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白定量试剂盒进行蛋白定量,取30 μ g的蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)凝胶电泳,随后电转至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,采用含5%脱脂奶粉、含Tween 20的Tris缓冲盐水(tris buffered saline with Tween-20, TBST)室温封闭1 h,随后使用目标蛋白选择特异性一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,随后TBST洗膜3次,5 min/次,去除未结合的一抗。随后使用与一抗对应的二抗IgG室温孵育2 h,接着TBST洗膜3次,5 min/次。采用增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(上海源叶生物科技有限公司)显色反应,采集图像,并采用Image J软件进行条带的定量分析。所用抗体:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)(1:5 000, ab8245)、ROCK2(1:10 000, ab125025)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司。每个实验组重复3次。

1.9 凋亡相关蛋白胱天蛋白酶活性的检测

采用吸光度法检测凋亡相关蛋白胱天蛋白酶3(Caspase-3)和胱天蛋白酶9(Caspase-9)水平,试剂盒购自上海佰晔生物科技公司,严格按照试剂盒说明书操作。miR-98抑制剂或/和ROCK2过表达的OGD/R处理的SH-SY5Y细胞用50 μ L的裂解液重悬,分离并进行蛋白浓度的检测。然后将

50 μ L 2 \times 反应缓冲液(含10 mmol DTT)和5 μ L 4 mmol DEVD-p-NA底物加入每个样品中。孵育2 h后,测定405 nm波长处的吸光度值,Caspase-3和Caspase-9水平以相对值表示,即实验组/对照组的比值。

1.10 统计学方法

数据分析采用SPSS 19.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用 t 检验或方差分析,两两比较用LSD- t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OGD/R处理对SH-SY5Y细胞活力的影响

对照组与OGD/R组细胞活力、miR-98相对表达量和ROCK2 mRNA相对表达量比较,经 t 检验,差异均有统计学意义($P<0.05$);与对照组相比,OGD/R组细胞活力降低,miR-98相对表达量降低($P<0.05$),ROCK2 mRNA相对表达量升高($P<0.05$)。见表1。

表1 对照组与OGD/R组细胞的细胞活力、miR-98和ROCK2 mRNA相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞活力	miR-98 mRNA	ROCK2 mRNA
对照组	98.67 \pm 2.963	1.043 \pm 0.081	0.970 \pm 0.021
OGD/R组	57.33 \pm 5.044	0.520 \pm 0.040	2.300 \pm 0.289
t 值	7.066	5.787	4.595
P 值	0.002	0.004	0.010

2.2 双荧光素酶报告基因实验分析荧光素酶的活性

TargetScan 7.2数据库信息显示miR-98与ROCK2在3'-UTR区存在结合位点(见图1)。为了验证上述结果,本研究构建了含有miR-98结合位点的ROCK2野生型载体和突变载体。结果显示,模拟物对照组与miR-98模拟物组比较,经 t 检验,ROCK2-wt荧光素酶活性的差异有统计学意义($P<0.05$);与模拟物对照组相比,ROCK2-wt与miR-98模拟物共转染组荧光素酶活性降低。而ROCK2-mut荧光素酶活性的差异无统计学意义($P>0.05$)。以上结果表明,ROCK2是miR-98的一个靶基因。见图1和表2。

2.3 miR-98模拟物和抑制剂对miR-98表达的影响

模拟物对照组与miR-98模拟物组、抑制剂对照

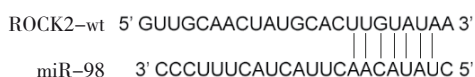


图 1 ROCK2 和 miR-98 靶向结合位点的预测

表 2 模拟物对照组与 miR-98 模拟物组细胞 ROCK2-wt、ROCK2-mut 荧光素酶活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROCK2-wt	ROCK2-mut
模拟物对照组	1.060 ± 0.070	0.980 ± 0.029
miR-98 模拟物组	0.453 ± 0.038	1.013 ± 0.024
t 值	7.616	1.579
P 值	0.002	0.190

组与 miR-98 抑制剂组的 miR-98 mRNA 相对表达量比较,经 t 检验,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与模拟物对照组相比,miR-98 模拟物组细胞 miR-98 mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$);与抑制剂对照组相比,miR-98 抑制剂组细胞 miR-98 mRNA 相对表达量降低($P < 0.05$)。以上结果提示 miR-98 模拟物和抑制剂在 SH-SY5Y 细胞中转染成功。见表 3。

表 3 各组 miR-98 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	miR-98 mRNA	组别	miR-98 mRNA
模拟物对照组	1.043 ± 0.087	抑制剂对照组	0.997 ± 0.055
miR-98 模拟物组	3.233 ± 0.203	miR-98 抑制剂组	0.383 ± 0.039
t 值	9.928	t 值	9.154
P 值	0.001	P 值	0.001

2.4 miR-98 对 ROCK2 蛋白表达的影响

模拟物对照组与 miR-98 模拟物组、抑制剂对照组与 miR-98 抑制剂组的 ROCK2 蛋白相对表达量比较,经 t 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模拟物对照组相比,miR-98 模拟物组的 ROCK2 蛋白相对表达量降低($P < 0.05$);与抑制剂对照组相比,miR-98 抑制剂组 ROCK2 蛋白相对表达量升高($P < 0.05$)。以上结果表明,miR-98 抑制 ROCK2 的表达。见表 4 和图 2。

2.5 miR-98 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

各组的细胞凋亡率、Caspase-3 和 Caspase-9 水平比较,经单因素方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,OGD/R 组细胞凋亡率升高($P < 0.05$);与模拟物对照组相比,miR-98 模拟

表 4 各组 ROCK2 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ROCK2 蛋白	组别	ROCK2 蛋白
模拟物对照组	0.590 ± 0.023	抑制剂对照组	0.533 ± 0.019
miR-98 模拟物组	0.280 ± 0.023	miR-98 抑制剂组	0.773 ± 0.038
t 值	9.492	t 值	5.622
P 值	0.001	P 值	0.005

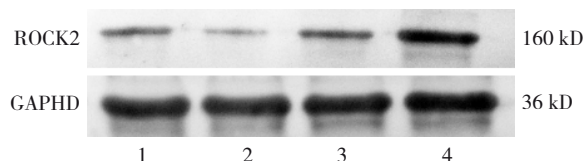


图 2 各组细胞的 ROCK2 蛋白表达

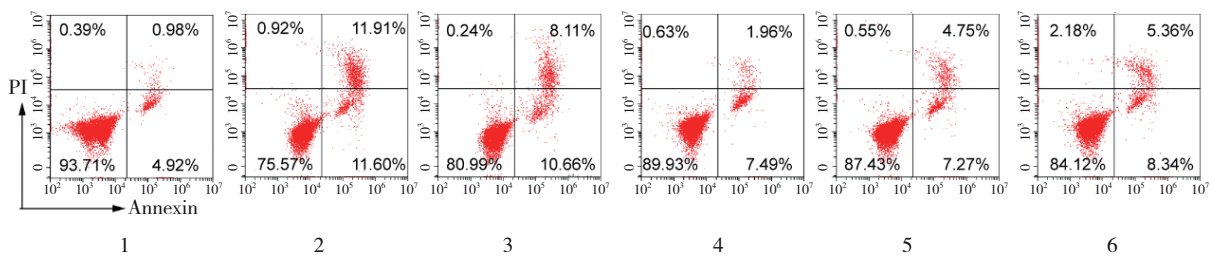
物组细胞凋亡率降低($P < 0.05$);与 miR-98 模拟物组相比,miR-98 模拟物+pcDNA3.1-ROCK2 组的细胞凋亡率升高($P < 0.05$),表明过表达 ROCK2 逆转了 miR-98 模拟物对神经细胞凋亡的抑制作用。与对照组相比,OGD/R 组 Caspase-3 和 Caspase-9 水平升高($P < 0.05$);与模拟物对照组相比,miR-98 模拟物组 Caspase-3 和 Caspase-9 水平降低($P < 0.05$);与 miR-98 模拟物组相比,miR-98 模拟物+pcDNA3.1-ROCK2 组 Caspase-3 和 Caspase-9 水平升高($P < 0.05$),表明 ROCK2 过表达逆转了 miR-98 模拟物对 Caspase-3 和 Caspase-9 水平的调控作用。TUNEL 法检测细胞凋亡结果显示,与对照组相比,OGD/R 处理导致细胞凋亡阳性细胞数增加;与模拟物对照组相比,miR-98 模拟物减少了细胞凋亡阳性数,然而过表达 ROCK2 削弱了 miR-98 模拟物对细胞凋亡的抑制作用。以上结果表明,miR-98 抑制 OGD/R 诱导的神经细胞凋亡。见表 5 和图 3、4。

2.6 miR-98 对神经细胞损伤的影响

各组细胞 TNF- α 和 IL-6 mRNA 相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组相比,OGD/R 组 TNF- α 和 IL-6 mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$);与模拟物对照组相比,miR-98 模拟物组 TNF- α 和 IL-6 mRNA 相对表达量降低($P < 0.05$);与 miR-98 模拟物组相比,miR-98 模拟物+pcDNA3.1-ROCK2 组的 TNF- α 和 IL-6 mRNA 相对表达量升高($P < 0.05$)。以上结果表明 miR-98 通过靶向 ROCK2 抑制神经细胞损伤。见表 6。

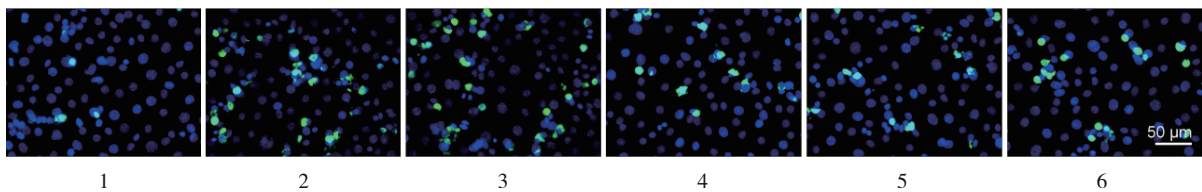
表 5 各组细胞凋亡率, Caspase-3 和 Caspase-9 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡率/%	Caspase-3	Caspase-9
对照组	5.000 ± 0.577	1.013 ± 0.067	1.080 ± 0.076
OGD/R 组	20.670 ± 1.856	3.333 ± 0.203	3.033 ± 0.157
模拟物对照组	20.000 ± 1.155	3.167 ± 0.203	3.173 ± 0.130
miR-98 模拟物组	10.670 ± 0.882	2.080 ± 0.147	1.697 ± 0.078
miR-98 模拟物+pcDNA3.1 组	10.000 ± 0.577	2.137 ± 0.092	1.933 ± 0.100
miR-98 模拟物+pcDNA3.1-ROCK2 组	15.330 ± 0.881	2.923 ± 0.118	2.467 ± 0.108
F 值	32.470	35.000	52.470
P 值	0.000	0.000	0.000



1: 对照组; 2: OGD/R 组; 3: 模拟物对照组; 4: miR-98 模拟物对照组; 5: miR-98 模拟物对照组+pcDNA3.1; 6: miR-98 模拟物对照组+pcDNA3.1-ROCK2。

图 3 各组细胞凋亡的流式细胞图



1: 对照组; 2: OGD/R 组; 3: 模拟物对照组; 4: miR-98 模拟物对照组; 5: miR-98 模拟物对照组+pcDNA3.1; 6: miR-98 模拟物对照组+pcDNA3.1-ROCK2。

图 4 各组细胞凋亡的 TUNEL 检测图

表 6 各组 TNF-α 和 IL-6 mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α mRNA	IL-6 mRNA
对照组	1.060 ± 0.070	1.020 ± 0.095
OGD/R 组	3.867 ± 0.176	3.167 ± 0.240
模拟物对照组	3.600 ± 0.231	3.267 ± 0.203
miR-98 模拟物组	1.800 ± 0.173	1.767 ± 0.145
miR-98 模拟物组+pcDNA3.1	2.000 ± 0.153	1.860 ± 0.125
miR-98 模拟物组+pcDNA3.1-ROCK2	2.933 ± 0.145	2.633 ± 0.088
F 值	44.450	30.820
P 值	0.000	0.000

3 讨论

脑卒中是当前威胁人类健康的重大疾病之一, 且脑卒中的患病率和发病率随预期寿命的增加而

升高^[9]。目前, 缺血性脑卒中的治疗受众多因素的限制, 且无有效的治疗方法来改善缺血性脑卒中后神经细胞功能损伤。近年来, 越来越多的证据表明, miRNA 在缺血性脑卒中和神经细胞损伤中具有

重要的调控作用^[10]。MicroRNA-9 过表达通过增加细胞活力,抑制 LDH 活性和细胞凋亡,并抑制 OGD 诱导的神经细胞中内质网应激在缺血性脑卒中发挥保护作用^[11]。研究显示,miR-98-5p 对氧化应激有保护作用,且 miR-98 通过降低促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Bax 和增加抗凋亡蛋白 bcl-2 的表达抑制细胞凋亡^[8]。缺血性脑卒中导致早期局部炎症反应,包括细胞因子的分泌。报道称 microRNA-149 通过降低氧化应激,增强抗氧化活性,降低 Caspase-1 和 Caspase-3 活性,调节缺血脑区的炎症因子改善神经功能,减轻脑损伤^[12]。Caspase-3 和 Caspase-9 是细胞凋亡过程中重要的蛋白酶,研究显示神经细胞中 Caspase-3 和 Caspase-9 的过度表达与创伤性脑损伤病理生理有关^[13]。本研究结果显示,在 OGD/R 处理的 SH-SY5Y 细胞中,miR-98 表达显著下调,且 miR-98 模拟物抑制了细胞的凋亡,并降低 Caspase-3 和 Caspase-9 的活性,提示 miR-98 对脑卒中发挥保护作用。研究表明,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 分泌失调可促进神经炎症并加重神经细胞损伤^[14]。此外,另有研究显示,益气活血化浊解毒方可减少缺血性脑卒中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的水平^[15]。本研究结果表明,miR-98 模拟物抑制了 OGD/R 诱导的 TNF- α 和 IL-6 的表达。综上所述,miR-98 抑制 OGD/R 诱导的神经母细胞瘤 SH-SY5Y 的凋亡和炎症损伤,可能改善缺血性脑卒中神经细胞功能损伤。

miRNAs 的主要功能是转录后调控其靶基因(mRNAs)的表达,表明 mRNAs 表达与 miRNAs 的结合在疾病的发生、发展中发挥重要作用^[16-17]。本研究中,双萤光素酶报告基因结果阐明 ROCK2 是 miR-98 的靶基因之一,提示 miR-98 可能通过介导 ROCK2 的表达在神经元损伤中发挥重要的调控作用。ROCK2 是一种 160 kD 丝氨酸/苏氨酸激酶,参与多种细胞过程,包括血管炎症和重建、细胞黏附、细胞运动和凋亡^[18]。研究发现,ROCK2 在缺血性脑卒中患者血清中表达上调,此外,ROCK2 沉默显著抑制氧化应激的损伤及细胞凋亡和脑损伤^[19]。有研究发现,阿普斯特可通过抑制 ROCK2,减轻血脑屏障破坏与神经炎症,对缺血性卒中的预后具有显著的疗效^[20]。本研究结果显示,在 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞中,ROCK2 的表达显著上调,这与上述文

献结果一致。雷公藤甲素干预和法舒地尔干预可以改善 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤、增强细胞活性和线粒体膜电位,同时下调 ROCK2 的表达^[21]。硫化氢通过抑制 ROCK2 可以有效减轻 OGD/R 对雄性小鼠原发性血管平滑肌细胞的损伤,并改善缺血性脑卒中损伤^[22]。有研究显示, microRNA-362 通过调节下游基因 ROCK2,减轻缺血再灌注诱导的神经损伤和炎症反应^[23]。在本研究中,ROCK2 的过表达逆转了 miR-98 模拟物对 OGD/R 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡和炎症损伤,提示 miR-98 通过降低 ROCK2 表达抑制 OGD/R 诱导的细胞凋亡和脑损伤。

综上所述,在 OGD/R 诱导的缺血性脑卒中体外模型中,miR-98 表达降低,ROCK2 表达升高。ROCK2 是 miR-98 的靶点,miR-98 通过 ROCK2 在缺血性脑卒中发挥神经保护作用,表明 miR-98 可能是缺血性脑卒中的一个治疗靶点。

参 考 文 献 :

- [1] LU Z Z, XIONG Y Y, FENG X Y, et al. Insulin resistance estimated by estimated glucose disposal rate predicts outcomes in acute ischemic stroke patients[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2023, 22(1): 225.
- [2] 樊文香. 缺血性脑卒中的机制研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2018, 49(6): 751-759.
- [3] WANG S W, LIU Z, SHI Z S. Non-coding RNA in acute ischemic stroke: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets[J]. *Cell Transplant*, 2018, 27(12): 1763-1777.
- [4] HAN B, ZHANG Y, ZHANG Y H, et al. Novel insight into circular RNA HECTD1 in astrocyte activation via autophagy by targeting MIR142-TIPARP: implications for cerebral ischemic stroke[J]. *Autophagy*, 2018, 14(7): 1164-1184.
- [5] MAINALI S, NEPAL G, WEBB A, et al. MicroRNA expression profile in acute ischemic stroke[J]. *Res Sq*, 2024: rs.3.rs-3754883.
- [6] JIANG C, DONG N, FENG J L, et al. MiRNA-190 exerts neuroprotective effects against ischemic stroke through rho/rho-kinase pathway[J]. *Pflugers Arch*, 2021, 473(1): 121-130.
- [7] XIE K L, CAI Y, YANG P, et al. Upregulating microRNA-874-3p inhibits CXCL12 expression to promote angiogenesis and suppress inflammatory response in ischemic stroke[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 319(3): C579-C588.
- [8] YU S, ZHAI J J, YU J, et al. miR-98-5p protects against cerebral ischemia/reperfusion injury through anti-apoptosis and anti-oxidative stress in mice[J]. *J Biochem*, 2021, 169(2): 195-206.
- [9] ZHAO H P, HAN Z P, JI X M, et al. Epigenetic regulation of oxidative stress in ischemic stroke[J]. *Aging Dis*, 2016, 7(3): 295-306.
- [10] ZHANG Y, LIU Z W, CHOPP M, et al. Small extracellular

- vesicles derived from cerebral endothelial cells with elevated microRNA 27a promote ischemic stroke recovery[J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20(1): 224-233.
- [11] CHI L M, JIAO D, NAN G X, et al. miR-9-5p attenuates ischemic stroke through targeting ERMP1-mediated endoplasmic reticulum stress[J]. *Acta Histochem*, 2019, 121(8): 151438.
- [12] VAHIDI S, BIGDELI M R, SHAHSAVARANI H, et al. Neuroprotective therapeutic potential of microRNA-149-5p against murine ischemic stroke[J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(11): 8886-8903.
- [13] UNNISA A, GREIG N H, KAMAL M A. Inhibition of caspase 3 and caspase 9 mediated apoptosis: a multimodal therapeutic target in traumatic brain injury[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(4): 1001-1012.
- [14] CHEN Z L, BALACHANDRAN Y L, CHONG W P, et al. Roles of cytokines in Alzheimer's disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(11): 5803.
- [15] 刘学飞, 武萌萌, 孙翔, 等. 益气活血化浊解毒方调控 KAT3B/STING 轴介导的小胶质细胞极化对缺血性脑卒中大鼠神经功能的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(1): 1-8.
- [16] ZHOU X L, XU X M, WANG J H, et al. Identifying miRNA/mRNA negative regulation pairs in colorectal cancer[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 12995.
- [17] 马寒玉, 赵宇浩, 张铭, 等. MicroRNA-132-3p 靶向 Nrf2 加重脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞损伤的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2025, 35(6): 24-31.
- [18] SI W W, YE S Y, REN Z X, et al. miR-335 promotes stress granule formation to inhibit apoptosis by targeting ROCK2 in acute ischemic stroke[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(3): 1452-1466.
- [19] ZENG J, ZHU L, LIU J, et al. Metformin protects against oxidative stress injury induced by ischemia/reperfusion via regulation of the lncRNA-H19/miR-148a-3p/Rock2 axis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8768327.
- [20] WANG M Y, MENG X Y, CHENG Z H. Apremilast exerts protective effects on stroke outcomes and blood-brain barrier (BBB) dysfunction through regulating rho-associated protein kinase 2 expression[J]. *Brain Behav*, 2022, 12(9): e2677.
- [21] 张慧宇, 白振军, 李亮, 等. 雷公藤甲素通过抑制 NogoA/RhoA/ROCK 信号通路减轻氧糖剥夺/复糖复氧所致的 SH-SY5Y 细胞损伤[J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(1): 9-15.
- [22] CHEN Y, XU F F, CHEN F, et al. Hydrogen sulfide-mediated inhibition of ROCK₂ exerts a vasoprotective effect on ischemic brain injury[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2025, 328(3): C986-C1000.
- [23] WANG J T, FU Z Q, WANG M H, et al. Knockdown of XIST attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury through regulation of miR-362/ROCK2 axis[J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(8): 2167-2180.

(张蕾 编辑)

本文引用格式: 钱旭东, 李国芸, 卜一, 等. MicroRNA-98对糖氧剥夺诱导的SH-SY5Y细胞损伤的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2026, 36(1): 48-55.

Cite this article as: QIAN X D, LI G Y, BU Y, et al. The effect of microRNA-98 on SH-SY5Y cell damage induced by oxygen-glucose deprivation[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2026, 36(1): 48-55.