

. 实验研究 .

下调lncRNA-MALAT1表达对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用

樊帅帅 宋磊军 蔺 聪 刘 扬

【摘要】目的 探讨小鼠lncRNA-MALAT1表达对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的影响。**方法** 取SPF级7 d龄SD大鼠40只,随机分为假手术组、模型组、lncRNA对照组、silncMALAT1组,每组10只。Rice-Vannucci法建立新生大鼠HIBD模型,造模后2 h,侧脑室分别注射生理盐水、生理盐水、空载体重组腺病毒液、silncMALAT1各5 μl。造模后7 d,Morris水迷宫试验评估空间学习和记忆能力,TUNEL染色检测海马组织神经元凋亡,PCR和免疫印迹法检测海马组织BDNF/TrkB信号通路mRNA和蛋白表达变化。**结果** 模型组造模失败2只,lncRNA组失败2只,silncMALAT1组失败1只,造模成功率为83.33%。下调lncRNA-MALAT1表达,明显增加新生大鼠学习和记忆能力($P<0.05$),明显减少海马组织神经元凋亡率($P<0.05$),明显下调BDNF/TrkB mRNA和蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论** 下调lncRNA-MALAT1表达可减轻新生大鼠HIBD,其机制可能与抑制BDNF/TrkB信号通路、减轻海马组织神经元凋亡有关。

【关键词】 缺氧缺血性脑损伤;新生大鼠;神经元凋亡;长链非编码RNA;lncRNA-MALAT1

【文章编号】 1009-153X(2022)05-0376-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 743

Protective effect of down-regulation of lncRNA-MALAT1 on hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats

FAN Shuai-shuai¹, SONG Lei-jun¹, LIN Cong¹, LIU Yang² 1. Department of Anesthesiology, Zhengzhou Seventh People's Hospital, Zhengzhou 450000, China; 2. Department of Anesthesiology, The 988 Hospital of The Joint Logistics Support Force, PLA, Zhengzhou 450000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of down-regulation of lncRNA-MALAT1 on the hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal rats. **Methods** Forty 7-day-old SPF SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, lncRNA control group, and silncMALAT1 group, with 10 rats in each group. The HIBD model of neonatal rats was established by the Rice-Vannucci method. Two hours after operation, 5 μl of normal saline, normal saline, empty vector recombinant adenovirus solution, and silncMALAT1 were injected into the lateral ventricle of the rats in the four groups, respectively. Seven days after operation, spatial learning and memory abilities were evaluated by Morris water maze test, neuronal apoptosis in hippocampal tissues was detected by TUNEL staining, and changes in mRNA and protein expressions of BDNF/TrkB signaling pathway in hippocampal tissues were detected by PCR and Western blotting, respectively. **Results** There were 2 failures in the model group, 2 failures in the lncRNA group, and 1 failure in the silncMALAT1 group, with a success rate of model establishment of 83.33%. Down-regulation of lncRNA-MALAT1 significantly increased the learning and memory abilities of neonatal rats ($P<0.05$), significantly decreased the apoptosis rate of neurons in the hippocampal tissues ($P<0.05$), and significantly down-regulated the mRNA and protein expression levels of BDNF/TrkB ($P<0.05$). **Conclusions** Down-regulation of lncRNA-MALAT1 can alleviate HIBD in neonatal rats, and the mechanism may be related to inhibiting BDNF/TrkB signaling pathway and reducing neuronal apoptosis in hippocampal tissues.

【Key words】 Hypoxic-ischemic brain damage; Neonatal rat; Neuron apoptosis; Long non-coding RNA; lncRNA LAMAT1

新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischaemic brain damage, HIBD)是临床常见病,预后较差。研究发现,lncRNA肺腺癌转移相关转录子1

(metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1,lncRNA-MALAT1)下调明显促进小鼠缺血性脑卒中后血管新生^[1]。脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)及其受体原肌球蛋白相关激酶B(tropomyosin-related kinase B, TrkB)信号通路与神经细胞生长、凋亡密切相关,且该通路已被证实参与HIBD的调控^[2]。本研究抑制lncRNA-MALAT1表达新生大鼠HIBD模型的影响及其作用机制。

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2022.05.013
基金项目:河南省科技攻关计划项目(LHGJ20190883)
作者单位:450000,郑州市第七人民医院麻醉科(樊帅帅、宋磊军、蔺 聪);450000 郑州,中国人民解放军联勤保障部队第988医院麻醉科(刘 扬)

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SPF级7 d龄SD大鼠40只(雌雄各半,体质量在12~16 g),购自郑州大学实验动物中心[许可证号SCXK(豫)20180001,伦理批号IA-CUC20190525001]。将大鼠随机分为假手术组、模型组、lncRNA对照组、silncMALAT1组,每组10只。

1.2 模型制作 以Rice-Vannucci法建立新生大鼠HIBD模型^[3]。吸入2%七氟醚维持麻醉,永久结扎左侧颈总动脉(假手术组仅穿线不结扎),苏醒后继续喂养2 h,置于有机玻璃缺氧箱,持续输入含8% O₂、92% N₂的混合气体,缺氧2 h,观察大鼠行为,出现夹尾、尖叫、自发左转圈,则建模成功。模型组造模失败2只,lncRNA组失败2只,silncMALAT1组失败1只,最终35只大鼠纳入研究:假手术组10只,模型组8只,lncRNA对照组8只,silncMALAT1组9只。

1.3 给药方法 建模成功后2 h,2%七氟醚麻醉,大鼠脑立体定位仪标记左侧侧脑室^[4]。lncRNA对照组、silncMALAT1组缓慢推注空载体重组腺病毒、silnc-MALAT1各5 μl(病毒滴度为2.5×10¹³ pfu/L,上海吉玛制药技术有限公司提供)。假手术组、模型组推注5 μl生理盐水。停针1 min后缓慢退针,骨腊封闭。

1.4 Morris水迷宫试验评估空间学习和记忆能力^[5] 造模后7 d进行1次适应性训练,造模后8~11 d进行定位巡航试验,记录90 s内登陆安全平台的时间即为逃避潜伏期,若90 s内未找到则引导至安全平台,停留30 s,记录为90 s。造模后12 d撤去安全平台,记录90 s内的游泳轨迹,分析目标象限停留时间及穿越目标象限内安全平台的次数。

1.5 TUNEL染色检测海马神经元凋亡情况 Morris水迷宫测试次日处死大鼠,迅速分离海马组织,4%多聚甲醛固定48 h,石蜡包埋,制作4 μm冠状位切片。按照TUNEL试剂盒(美国Roche公司)说明书操作,DAB显色,苏木精核染,封片,显微镜下观察细胞核染棕黄色或黄色颗粒则为凋亡细胞,记录每平方

毫米凋亡细胞数。见图1。

1.6 实时定量PCR法检测mRNA的表达 取海马组织70 mg,采用Trizol试剂提取组织总RNA,逆转录获得cDNA,再采用SYBR Green I实时PCR试剂盒(上海羽朵生物科技有限公司)进行实时定量PCR。以β-actin为内参,以2^{-ΔΔCT}法计算相对表达量。

1.7 免疫印迹法检测蛋白表达 取海马组织50 mg,组织裂解液冰上裂解30 min,4℃预冷,16 099.2 g离心15 min,取上清液测定总蛋白浓度。取10 μg待测蛋白和40 μg上样缓冲液混匀,置于沸水中10 min,16 099.2 g心10 min,进行SDS-PAGE电泳,经转膜、封闭、兔抗大鼠BDNF、TrkB单抗一抗(美国Abcam公司)、HRP标记的二抗孵育(美国Abcam公司),显影、曝光,分析并计算目的蛋白与内参β-actin灰度值比值。

1.8 统计学方法 采用SPSS 21.0软件分析;计量资料均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析和SNK-*q*检验;*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 lncRNA-MALAT1对HIBD大鼠学习和记忆功能的影响 Morris水迷宫试验结果显示,与假手术组相比,模型组、lncRNA对照组目标象限停留时间和穿越平台次数均明显减少(*P*<0.05),模型组和lncRNA对照组之间无统计学差异(*P*>0.05)。与lncRNA对

表1 Morris水迷宫实验分析下调lncRNA-MALAT1表达对新生大鼠HIBD后学习和记忆功能的影响

| 组别 | TSTQ(s) | 穿越平台次数(次) |
|--------------|---------------|--------------|
| 假手术组 | 45.26±4.30 | 7.25±1.04 |
| 模型组 | 21.07±3.59* | 2.10±0.52* |
| lncRNA对照组 | 20.34±3.45* | 2.05±0.51* |
| silncMALAT1组 | 37.11±3.26*## | 4.58±0.68*## |

注:与假手术相应值比较,**P*<0.05;与模型组相应值比较,#*P*<0.05;与lncRNA对照组相应值比较,&*P*<0.05;HIBD. 缺氧缺血性脑损伤;TSTQ. 目标象限停留时间

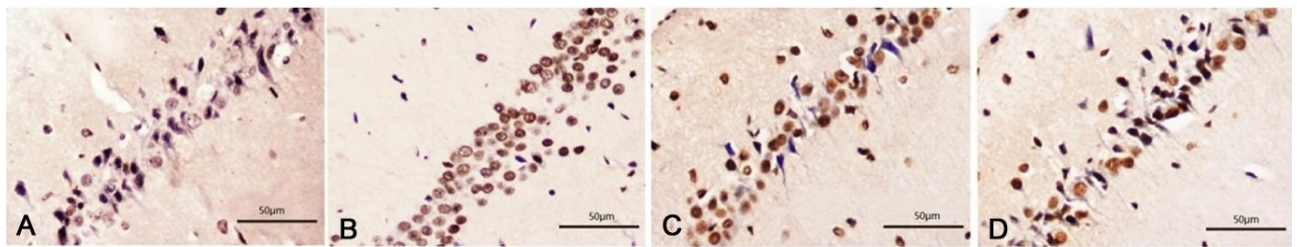


图1 TUNEL染色分析新生大鼠缺氧缺血脑损伤后海马神经元凋亡情况
凋亡神经元表现为棕黄色,核染不均匀,呈环指样或毛刷样结构;A. 假手术组;B. 模型组;C. lncRNA对照组;D. silncMALAT1组

表 2 下调 lncRNA-MALAT1 表达对新生大鼠 HIBD 后海马组织 mRNA 表达量的影响

| 组别 | lncRNA-MALAT1 | BDNF | TrkB | ERK1/2 |
|---------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| 假手术组 | 1.04±0.15 | 0.30±0.05 | 0.21±0.03 | 0.69±0.08 |
| 模型组 | 2.49±0.20 [*] | 0.95±0.12 [*] | 0.90±0.10 [*] | 0.71±0.08 |
| lncRNA 对照组 | 2.45±0.21 [*] | 0.93±0.10 [*] | 0.87±0.09 [*] | 0.70±0.10 |
| silncMALAT1 组 | 0.26±0.06 ^{*##} | 0.52±0.07 ^{*##} | 0.46±0.07 ^{*##} | 0.68±0.09 |

注:与假手术相应值比较,**P*<0.05;与模型组相应值比较,#*P*<0.05;与 lncRNA 对照组相应值比较,&*P*<0.05;HIBD. 缺氧缺血性脑损伤;BDNF. 脑原型神经营养因子;TrkB. 原肌球蛋白相关激酶 B;ERK. 细胞外调节蛋白激酶

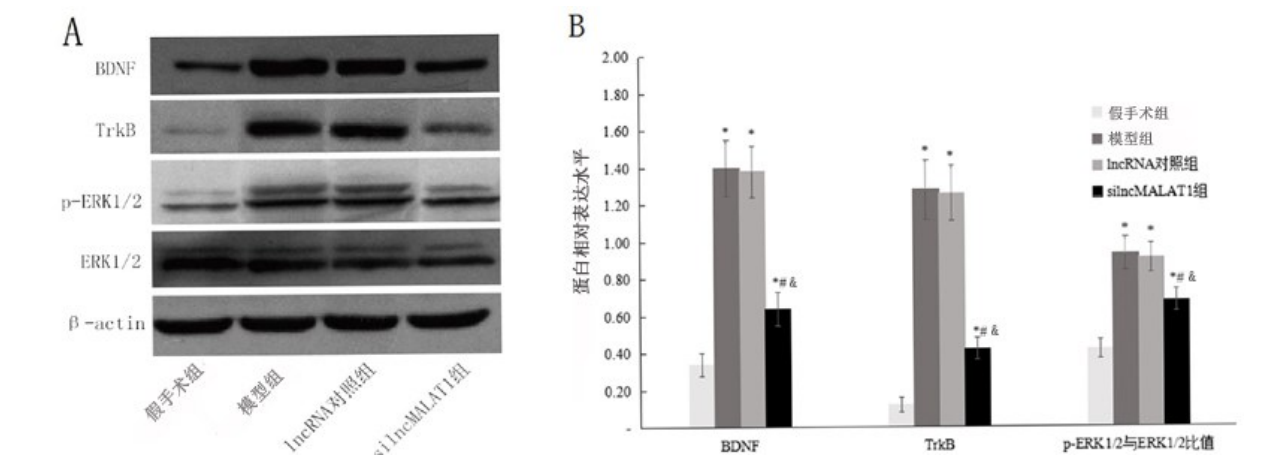


图 2 下调 lncRNA-MALAT1 表达对新生大鼠 HIBD 后海马组织蛋白表达量的影响

与假手术相应值比较,**P*<0.05;与模型组相应值比较,#*P*<0.05;与 lncRNA 对照组相应值比较,&*P*<0.05;HIBD. 缺氧缺血性脑损伤;BDNF. 脑原型神经营养因子;TrkB. 原肌球蛋白相关激酶 B;ERK. 细胞外调节蛋白激酶

照组相比,silncMALAT1 组目标象限停留时间和穿越平台次数均明显增加(*P*<0.05)。见表 1。

2.2 lncRNA-MALAT1 对 HIBD 大鼠海马神经元凋亡的影响 与假手术组[(24.20±2.31)个/mm²]相比,模型组[(146.00±12.14)个/mm²]、lncRNA 对照组[(143.60±12.54)个/mm²]海马神经元凋亡数量明显增加(*P*<0.001),模型组和 lncRNA 对照组之间无统计学差异(*P*>0.05)。与 lncRNA 对照组相比,silncMALAT1 组[(71.40±8.06)个/mm²]海马神经元凋亡数量明显减少(*P*<0.05)。

2.3 lncRNA-MALAT1 对 HIBD 大鼠海马 BDNF/TrkB 信号通路的影响 与假手术组相比,模型组、lncRNA 对照组 BDNF、TrkB、ERK1/2 mRNA 和蛋白表达水平均明显增高(*P*<0.05),模型组和 lncRNA 对照组之间无统计学差异(*P*>0.05)。与 lncRNA 对照组相比,silncMALAT1 组 BDNF、TrkB、ERK1/2 mRNA 和蛋白表达水平均明显降低(*P*<0.05)。见表 2、图 2。

3 讨论

HIBD 的发病机制复杂。研究显示,HIBD 后神经元及星形胶质细胞最先受到损害,累及神经元轴

突及微血管功能系统,进一步损害神经信号传导功能。应用最广泛的 HIBD 动物模型为 Rice-Vannucci 法制作的模型,该模型与临床 HIBD 病理基础相似,与完全缺氧法制作的模型相比,可有效降低死亡率,且成模一致性较高^[3]。本文 83.33% 的新生大鼠出现异常神经行为学表现,提示建模成功率高。

本研究发现,silncMALAT1 组大鼠海马组织 lncRNA-MALAT1 表达量降低、海马神经元凋亡数减少,目标象限停留时间延长,穿越平台次数增多,说明下调 lncRNA-MALAT1 可抑制 HIBD 新生大鼠的海马神经元凋亡,改善学习和记忆功能。小动脉侧支循环的建立对纠正 HIBD 至关重要,而多种 lncRNA 在血管新生方面发挥重要调控作用。有研究表明,缺氧可促进大鼠脑组织微血管内皮细胞 lncRNA-MALAT1 表达上调,参与调节缺氧性脑损伤,但具体调控机制不明^[6]。本研究 silncMALAT1 组海马组织 BDNF、TrkB mRNA 和蛋白表达量,以及 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值均降低,说明新生大鼠 HIBD 发病机制可能与激活 BDNF/TrkB 信号通路介导的海马神经元凋亡有关。TrkB 与 BDNF 结合后可发生二聚体化,从而磷酸化激活下游 ERK1/2 信号通路,参

与调控细胞凋亡。Atif 等^[7]研究表明, BDNF/TrkB 信号通路与小鼠 HIBD 后急性行为性癫痫和脑梗死面积减少有关。研究发现, 下调 lncRNA-MALAT1 可抑制脂多糖诱导的小胶质细胞活化, 参与调控脑内炎症反应^[8]。这说明 lncRNA-MALAT1 可能与海马区 BDNF/TrkB 信号通路存在相互作用, 抑制 lncRNA-MALAT1 表达可抑制 BDNF/TrkB 信号通路, 从而调控 HIBD 进程。

总之, 下调 lncRNA-MALAT1 表达对新生大鼠 HIBD 具有保护作用, 可能与抑制 BDNF/TrkB 信号通路有关。

【参考文献】

[1] 狄云海. lncRNA MALAT1 与 microRNA181b 调控缺血性脑卒中后血管新生的初步研究[D]. 第二军医大学, 2017.

[2] 王 静, 郑荣秀. BDNF 修饰的骨髓间充质干细胞对缺氧缺血性脑损伤大鼠脑区 BDNF/TrkB 信号通路表达的影响与意义[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(7): 1656-1659.

[3] 莫国梁, 余加林, 李禄全, 等. 新生大鼠缺氧性脑损伤新模

型[J]. 中国当代儿科杂志, 2008, 10(5): 656-660.

[4] 王明娟, 朱青青, 潘永良, 等. 基于尼氏染色图谱的小型啮齿动物快速脑区定位方法[J]. 野生动物学报, 2020, 41(4): 919-923.

[5] Williamson LL, Bilbo SD. Neonatal infection modulates behavioral flexibility and hippocampal activation on a Morris Water Maze task [J]. *Physiol Behav*, 2014, 129(1): 152-159.

[6] Zhang X, Tang X, Liu K, *et al.* Long noncoding RNA MALAT1 regulates cerebrovascular pathologies in ischemic stroke [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(7): 1797-1806.

[7] Atif F, Yousuf S, Stein DG. Progesterone in the treatment of neonatal arterial ischemic stroke and acute seizures: role of BDNF/TrkB signaling [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 107: 317-328.

[8] 张军玲, 潘海英, 徐 敏, 等. 下调长链非编码 RNA MALAT1 表达对小胶质细胞活化的影响[J]. 中华神经医学杂志, 2018, 17(5): 445-449.

(2021-07-29 收稿, 2022-03-21 修回)

(上接第 375 页)

[4] Morita K, He S, Nowak RP, *et al.* Allosteric activators of protein phosphatase 2A display broad antitumor activity mediated by dephosphorylation of MYBL2 [J]. *Cell*, 2020, 181(3): 702-715.

[5] Carnero A. Spinophilin: a new tumor suppressor at 17q21 [J]. *Curr Mol Med*, 2012, 12(5): 528-535.

[6] Wang JL, Wang Y, Sun W, *et al.* Spinophilin modulates pain through suppressing dendritic spine morphogenesis via negative control of Rac1-ERK signaling in rat spinal dorsal horn [J]. *Neurobiol Dis*, 2021, 152: 105302.

[7] Matsuura K, Kobayashi S, Konno K, *et al.* SIPA1L1/SPAR1 interacts with the neurabin family of proteins and is involved in GPCR signaling [J]. *J Neurosci*, 2022, 4(1): 112-127.

[8] 邢靖松, 梁 东, 克甜甜, 等. 人脑胶质瘤组织中 Spinophilin 的表达及临床意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2021, 37(9): 1044-1048.

[9] Verdugo-Sivianes EM, Rojas AM, Muñoz-Galván S, *et al.* Mutation of SPINOPHILIN (PPP1R9B) found in human tumors promotes the tumorigenic and stemness properties of cells [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3452-3471.

[10] 祝启海, 夏国庆, 宋 伟. 垂体腺瘤组织 DCX 表达水平与

肿瘤侵袭性的关系[J]. 中国临床神经外科杂志, 2021, 26(8): 597-599.

[11] 刁 艺, 董 楠, 杨 阳, 等. GATA-6 和 Dickkopf-1 在垂体瘤中的表达及临床意义[J]. 河北医学, 2019, 25(3): 537-542.

[12] 王 冉, 周 琦, 杨 坤. 垂体腺瘤侵袭性相关指标的研究进展[J]. 临床神经外科杂志, 2021, 18: 226-228, 232.

[13] Brocos-Mosquera I, Nuñez Del Moral A, Morentin B, *et al.* Characterisation of spinophilin immunoreactivity in post-mortem human brain homogenates [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 81: 236-242.

[14] Verdugo-Sivianes EM, Carnero A. Role of the holoenzyme PP1-SPN in the dephosphorylation of the RB family of tumor suppressors during cell cycle [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2226.

[15] Hwang S, Lee PC, Shin DM, *et al.* Modulated start-up mode of cancer cell migration through spinophilin-tubular networks [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 652791.

[16] Cheerathodi M, Avci NG, Guerrero PA, *et al.* The cytoskeletal adapter protein spinophilin regulates invadopodia dynamics and tumor cell invasion in glioblastoma [J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(12): 1277-1287.

(2022-03-29 收稿, 2022-05-05 修回)