

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2019)03-0219-04

异丙酚上调 miR-21 表达改善大鼠缺血/再灌注损伤学习记忆的机制

丰亮^{1,2}, 曹苏²

(1. 南通市第二人民医院 麻醉科, 江苏 南通 226002; 2. 南通大学附属医院 麻醉手术科, 江苏 南通 226001)

【摘要】目的: 研究异丙酚对大鼠缺血/再灌注损伤后学习记忆的影响及机制。方法: 建立大鼠脑中动脉缺血(MCAO)模型, 实验分为假手术组、模型组、异丙酚处理组、miR-21 类似物组; 水迷宫检测大鼠学习记忆; 免疫印迹和免疫荧光检测损伤侧海马自噬相关蛋白表达; 聚合酶链锁反应(QRT-PCR)检测 miR-21 的表达水平。结果: 和假手术组比较, 模型组海马组织 miR-21 水平下降($P < 0.05$), 空间记忆下降, 自噬性死亡相关蛋白 Beclin1、LC3-II 蛋白表达上升($P < 0.05$)。而异丙酚处理能够逆转中动脉缺血引起的 miR-21 的下降, 改善学习记忆, 下调 Beclin1 和 LC3-II 的表达($P < 0.05$)。miR-21 类似物也能阻止 MCAO 造模引起的 miR-21 的下降, 改善学习记忆, 阻止 Beclin1 和 LC3-II 的表达($P < 0.05$)。结论: 异丙酚通过上调 miR-21 从而阻止缺血再灌注海马细胞自噬性死亡和学习记忆下降。

【关键词】异丙酚; 脑缺血再灌注; miR-21; 细胞自噬

【中图分类号】R 614; R-332; R 338.64 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2019.03.004

Propofol improves learning and memory in rats following ischemia/reperfusion injury via up-regulating miR-21 expression

FENG Liang, CAO Su

Department of Anesthesiology, Nantong Second People's Hospital, Nantong 226002, China

【Abstract】Objective: To investigate the effects of propofol on learning and memory in rats after ischemia/reperfusion injury. **Methods:** Middle cerebral artery occlusion (MCAO) model was established in rats that were divided into groups of sham operation, model, propofol treatment, miR-21 mimic intervention. Water maze test was performed to assess learning and memory. Immunoblotting and immunofluorescence as well as real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to determine the expression of related protein and expression level of miR-21 in the injured hippocampus. **Results:** miR-21 level was significantly decreased in the model group compared to the sham operation group ($P < 0.05$). Impaired spatial memory and increased expression of autophagic death-related protein Beclin1 and LC3-II levels were also noted in rats in the model group ($P < 0.05$). Both propofol and miR-21 mimic intervention indicated reversed decline of miR-21 level following MCAO, improved memory and checked increase of Beclin1 and LC3-II expression (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Propofol may prevent autophagic death and decline of learning and memory through up-regulating the miR-21 expression in rats following ischemia/reperfusion.

【Key words】propofol; cerebral ischemia reperfusion; miR-21; autophagy

异丙酚(propofol)是一种快速有效的全身麻醉剂,具有起效快、麻醉时间短、副作用小等临床特点,常被用于各科麻醉和重症病人的镇静。异丙酚对缺血再灌注损伤具有一定的保护作用,如在小肠、肝脏、肾脏、心肌等^[1-4]。异丙酚对脑组织缺血再灌注损伤也有保护作用^[5-6]。有研究报道异丙酚可能激活细胞存活信号通路磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3Ks),

阻止海马锥体细胞死亡而发挥保护脑缺血再灌注的损伤^[7]。然而异丙酚调控下游的信号通路及保护机制尚不清楚。微小 RNA-21(miR-21)是一种研究较早的 miRNA。miR-21 的研究主要集中在调控肿瘤细胞的生物活性^[8-9]。已有的报道指出大脑缺血再灌注损伤可能下调 miR-21 的水平促进神经细胞的死亡^[10]。本研究主要解答异丙酚是否通过影响

基金项目:南通市科技计划(YYZ17060)

收稿日期:2018-08-31

作者简介:丰亮(1983-),男,主治医师,(电话)13862965210,(电子信箱)9221754@qq.com;

曹苏(1958-),女,主任医师,教授,(电子信箱)mzkes@sina.com,通信作者。

miR-21 而发挥保护脑缺血再灌注损伤,并从细胞自噬的角度研究相关的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Morris 水迷宫(XR-XM101, 上海欣软生物),激光共聚焦显微镜(FV1000, OLYMPUS, 日本),Beclin1 抗体(CST, 美国),LC3B 抗体(CST, 美国),miR-21 类似物(上海吉玛, 中国),异丙酚(批号: 040607015, Fresenius Kabi 公司, 德国)。

1.2 大鼠大脑中动脉栓塞(MCAO)模型 清洁级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 35 只(体质量 200 ~ 250 g) 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。自然光照,动物自由进食、饮水,室温控制在(22 ± 2) °C。通过 10% 的水合氯醛(4 mL/kg) 麻醉后局部消毒备皮,沿颈部正中切口 2 ~ 2.5 cm,然后分离颈总动脉,沿左侧颈总动脉分离颈外、颈内动脉,结扎并游离颈外、颈内动脉近心端。沿切口插入直径为 0.3 mm 尼龙线,将尼龙线轻轻插入颈内动脉,120 min 后拔出。假手术组大鼠仅暴露、分离结扎血管。

1.3 实验动物及分组 实验分为 4 组($n = 8$),分别为假手术组、模型组、异丙酚处理组、miR-21 类似物组。异丙酚组为缺血后异丙酚治疗组,线栓阻断动脉血流成功后尾静脉滴注 50 mg/(kg · h) (30 min) 异丙酚;miR-21 类似物组为线栓阻断动脉血流成功后经腹腔注射 200 μL miR-21 类似物,2 h 后恢复大脑中动脉的血流。造模 7 d 后进行行为学、分子生化等实验。

1.4 Morris 水迷宫 共经历时 4 d 学习,训练开始时,将平台置于第二象限。自由录像记录系统记录大鼠找到平台的时间(escape latency) 4 次训练将大鼠分别从四个不同的起始点(不同象限)放入水中。大鼠找到平台后或 60 s 内找不到平台(潜伏期记为 60 s) 则由实验者将其拿上平台,在平台上休息 15 s,再进行下一次实验。第 5 天进行空间探索实验,撤除原平台,将大鼠任一个入水点记录大鼠 1 min 在平台所在象限停留的时间。

1.5 荧光定量 PCR 收集损伤侧海马组织,提取 RNA 后根据逆转录试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板,在荧光定量 PCR 仪上进行检测,以 U6 为内参,算出各组 miR-21 的相对表达量。引物序列如

下。miR-21: Forward 5'-TGTACCACCTTGTCCG-3', Reverse 5'-TGCTGTTGCCATGAGAT-3'; U6: Forward 5'-CGCTTCGGCAGCACATATAAC-3'; Reverse 5'-AAATA TGAACGCTTCACGA-3'。

1.6 免疫印迹 将海马组织置于 2 mL 匀浆器中,加 400 μL 单去污剂裂解液(含 PMSF)于匀浆器中匀浆,然后置于冰上,裂解海马组织。将裂解液移至 1.5 mL 离心管,然后在 4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清分装于 0.5 mL 离心管中并置于 -20 °C 保存。将样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,以 55 V 恒压电泳,使样品压缩至浓缩胶与分离胶界面,改电压为 110 V 继续电泳。在 200 mA 条件下转膜 150 min;5% 脱脂奶粉室温摇床震荡封闭 3 h;一抗(1: 1000)置于摇床 4 °C 孵育过夜;二抗(1: 5000)室温摇床震荡孵育 2 h。ECL 显色试剂显色,Fluor Chem FC3 化学发光成像系统曝光;Image J 软件分析。

1.7 免疫荧光 大鼠海马组织经 4% PFA 固定 24 h 后,再经 30% 蔗糖脱水,冰冻切片,PBS 润洗,10% 山羊血清室温封闭 1 h,加入相应浓度一抗 4 °C 孵育过夜,PBS 清洗 3 次,二抗室温避光孵育 2 h 后,加 DAPI 孵育 10 min,PBS 避光清洗 3 次,贴片,晾干加封片剂封片,激光共聚焦显微镜下摄片,计算平均荧光强度(MFI)。

1.8 统计学分析 应用 GraphPad Prism 6.0 统计学软件进行统计分析,数据符合正态分布的应用均数 ± 标准差表示,多组间比较采用单因素方差和重复测量的方差分析,多组间两两比较采用 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异丙酚处理提高缺血/再灌注损伤模型 miR-21、Beclin 1、LC3-II/LC3-I 表达 结果显示,模型组 miR-21 的表达低于假手术组($P < 0.05$),而异丙酚组和 miR-21 类似物组 miR-21 的表达高于模型组($P < 0.05$);模型组 Beclin 1/ β -actin、LC3-II/LC3-I 和 Beclin 1 MFI 高于假手术组($P < 0.05$),而异丙酚组和 miR-21 类似物组 Beclin 1/ β -actin、LC3-II/LC3-I 和 Beclin 1 MFI 低于模型组($P < 0.05$)。见表 1,图 1、2。

表1 各组大鼠海马 miR-21、Beclin 1、LC3-II /LC3-I 的表达变化($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	miR-21	Beclin 1/ β -actin	LC3-II /LC3-I	Beclin 1 MFI
假手术组	1.00 \pm 0.04	0.29 \pm 0.10	0.22 \pm 0.08	1.00 \pm 0.00
模型组	0.45 \pm 0.13*	0.62 \pm 0.07*	0.41 \pm 0.06*	1.40 \pm 0.15*
异丙酚组	1.11 \pm 0.15#	0.29 \pm 0.09#	0.24 \pm 0.04#	1.02 \pm 0.06#
miR-21 类似物组	1.20 \pm 0.12#	0.34 \pm 0.15#	0.25 \pm 0.09#	1.01 \pm 0.10#
F	65.502	17.653	12.453	33.765
P	0.00	0.00	0.00	0.00

注:和假手术组比较,* $P < 0.05$;和模型组比较 # $P < 0.05$ 。MFI:平均荧光强度。

2.2 异丙酚处理改善缺血/再灌注模型学习记忆
结果显示,寻找平台潜伏期各组有随着时间下降的趋势($P < 0.05$)。假手术组和 miR-21 类似物组寻找平台潜伏期第 2 天、第 3 天、第 4 天较对应组前一天均下降($P < 0.05$);模型组和异丙酚组第 3 天、第 4 天较第 1 天、第 2 天下降($P < 0.05$)。训练前 3 天各组间没有差异($P > 0.05$)。训练第 4 天模型组、异

丙酚组与假手术组间有差异($P < 0.05$)。miR-21 类似物组和模型组有差异($P < 0.05$)。第 5 天的记忆测试结果显示,模型组、异丙酚组和 miR-21 类似物组停留在平台象限的时间较假手术组减少($P < 0.05$);和模型组比较,异丙酚、miR-21 类似物处理能提升平台象限停留时间($P < 0.05$)。详见表 4。

表2 各组大鼠 4 d 学习期间寻找平台潜伏期($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

组别	寻找平台潜伏期/s			
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天
假手术组	55.32 \pm 5.99	44.52 \pm 5.99 ^a	30.12 \pm 4.07 ^{ab}	16.92 \pm 4.60 ^{abc}
模型组	54.94 \pm 3.58	47.98 \pm 3.61	37.82 \pm 7.01 ^{ab}	34.72 \pm 10.46 ^{ab*}
异丙酚组	58.10 \pm 2.50	52.60 \pm 8.69	34.72 \pm 6.20 ^{ab}	29.08 \pm 11.86 ^{ab*}
miR-21 类似物组	58.40 \pm 2.63	45.42 \pm 6.29 ^a	33.28 \pm 7.07 ^{ab}	24.18 \pm 9.26 ^{abc#}

注:和假手术组比较,* $P < 0.05$;和模型组比较 # $P < 0.05$ 。和第 1 天比较,^a $P < 0.05$;和第 2 天比较,^b $P < 0.05$;和第 3 天比较,^c $P < 0.05$ 。

表3 重复测量的方差分析结果

ANOVA table	SS	DF	MS	F	P
时间	16 605.00	3	5535.00	2005.00	0.00
组别	526.90	3	175.60	38.40	0.00
时间 \times 组别	801.80	9	89.08	23.63	0.00

表4 各组大鼠第 5 天撤除平台后大鼠在目标象限的停留时间($\bar{x} \pm s$ $n=8$)

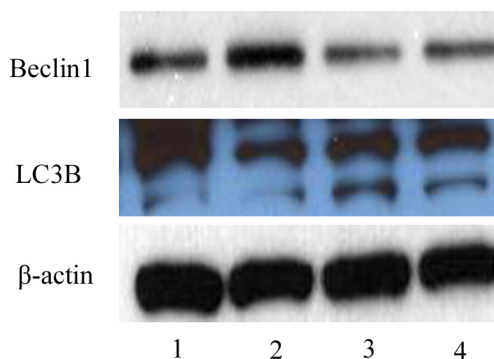
组别	目标象限停留时间/s
假手术	26.40 \pm 4.83
模型组	9.60 \pm 2.79*
异丙酚组	20.40 \pm 1.95*#
miR-21 类似物组	17.80 \pm 2.39*#
F	38.26
P	0.00

注:和假手术组比较,* $P < 0.05$;和模型组比较 # $P < 0.05$ 。

3 讨论

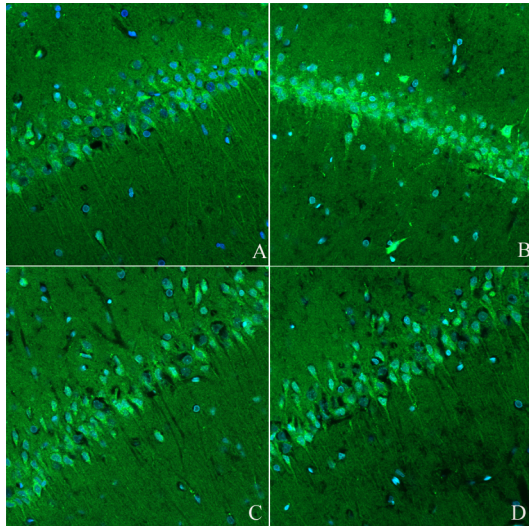
本研究结果提示在缺血后给予异丙酚能够改善再灌注引起的学习记忆下降。研究首次报道了

MCAO 模型海马组织 miR-21 的表达水平下降,而异丙酚能够逆转 miR-21 水平下降。然而,异丙酚也被报道具有一定的神经毒性,主要体现在影响神经发育^[11]或者影响神经干细胞的转化^[12]。因此,本研究认为控制异丙酚的剂量可能是一种重要的保护成年缺血再灌注损伤的策略。



1 2 3 4 分别是假手术、模型、异丙酚和 miR-21 类似物组。

图1 异丙酚处理降低中动脉缺血/再灌注引起的细胞自噬死亡相关蛋白的表达



A. 假手术组; B. 模型组; C. 异丙酚组; D. miR-21 类似物组。

图2 异丙酚处理降低中动脉缺血/再灌注引起的 Beclin1 的表达

实验中 模型组训练逃避潜伏期较假手术组没有明显的影响,而在平台停留期时间缩短 指出记忆功能的下降。本研究发现异丙酚能够降低 MCAO 引起的记忆下降。缺血再灌注的损伤主要体现在再灌注的冲击。缺血过程在整个过程可能起着一定的保护作用,但不足以逆转再灌注的损伤;而在缺血过程 给予异丙酚能够加强这种保护作用。研究发现 miR-21 在模型组表达下降,在缺血阶段使用 miR-21 类似物也能抑制再灌注造成的损伤。

脑缺血再灌注损伤能引起神经细胞自噬性死亡^[13]。本研究检测细胞自噬相关的经典蛋白 Beclin1 和 LC3 的表达,通过免疫印迹和免疫荧光技术发现 MCAO 能促进细胞自噬性死亡,而异丙酚处理降低自噬性死亡相关蛋白的表达。与此同时,miR-21 类似物也能降低 MCAO 造模引起的自噬性死亡蛋白的表达。尽管预缺血能够引起细胞自噬,而且自噬在缺血再灌注损伤中扮演着保护的角色,适度和过度的自噬对于神经功能的作用是相反的。前期的研究报道了异丙酚通过抑制 PTEN 发挥保护脑缺血再灌注的损伤。而且,miR-21 可能通过调控 PTEN/AKT/mTor 通路影响细胞自噬^[14]。本研究提示该过程或信号通路在脑缺血再灌注损伤过程发挥相似的作用。异丙酚通过上调 miR-21 从而阻止缺血再灌注模型海马细胞的程序化死亡和学习记忆下降。

【参考文献】

[1] HEIBERG J ,ROYSE CF ,ROYSE AG ,et al. Propofol attenuates the myocardial protection properties of desflurane by modulating

mitochondrial permeability transition [J]. *Anesth Analg* ,2018 , 127: 387 – 397.

[2] GAN X ,XING D ,SU G ,et al. Propofol Attenuates small intestinal ischemia reperfusion injury through inhibiting nadph oxidase mediated mast cell activation [J]. *Oxid Med Cell Longev* ,2015; 2015: 167014.

[3] WEI L ,CHEN WY ,HU T ,et al. Effect and mechanism of propofol in hepatic ischemia/reperfusion injury of rat [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* ,2017 , 21: 3516 – 3522.

[4] SU M ,REN S ,ZHONG W ,et al. Impact of propofol on renal ischemia/reperfusion endoplasmic reticulum stress [J]. *Acta Cir Bras* , 2017 , 32: 533 – 539.

[5] YU W ,GAO D ,JIN W ,et al. Propofol prevents oxidative stress by decreasing the ischemic accumulation of succinate in focal cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res* ,2018 , 43: 420 – 429.

[6] ZHENG Y ,BU J ,YU L ,et al. Nobiletin improves propofol-induced neuroprotection via regulating Akt/mTOR and TLR 4/NF-kappaB signaling in ischemic brain injury in rats [J]. *Biomed Pharmacother* ,2017 , 91: 494 – 503.

[7] CHEN X ,DU YM ,XU F ,et al. Propofol prevents hippocampal neuronal loss and memory impairment in cerebral ischemia injury through promoting PTEN degradation [J]. *J Mol Neurosci* ,2016 , 60: 63 – 70.

[8] LI G ,SONG Y ,LI G ,et al. Downregulation of microRNA21 expression inhibits proliferation and induces G1 arrest and apoptosis via the PTEN/AKT pathway in SKM1 cells [J]. *Mol Med Rep* ,2018 , 18(3) : 2771 – 2779.

[9] HSIEH CH ,TAI SK ,YANG MH. Snail-overexpressing cancer cells promote m2-like polarization of tumor-associated macrophages by delivering MiR-21-abundant exosomes [J]. *Neoplasia* ,2018 , 20: 775 – 788.

[10] YAO X ,WANG Y ,ZHANG D. microRNA-21 confers neuroprotection against cerebral ischemia-reperfusion injury and alleviates blood-brain barrier disruption in rats via the mapk signaling pathway [J]. *J Mol Neurosci* ,2018 , 65: 43 – 53.

[11] LI J ,XIONG M ,ALHASHEM HM ,ZHANG Y ,et al. Effects of prenatal propofol exposure on postnatal development in rats [J]. *Neurotoxicol Teratol* ,2014 , 43: 51 – 58.

[12] LIU F ,RAINOSSEK SW ,SADOVOVA N ,et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on propofol-induced toxicity in embryonic neural stem cells [J]. *Neurotoxicology* ,2014 , 42: 49 – 57.

[13] ADHAMI F ,LIAO G ,MOROZOV YM ,et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy [J]. *Am J Pathol* ,2006 , 169: 566 – 583.

[14] WANG WJ ,YANG W ,OUYANG ZH ,et al. MiR-21 promotes ECM degradation through inhibiting autophagy via the PTEN/akt/mTOR signaling pathway in human degenerated NP cells [J]. *Biomed Pharmacother* ,2018 , 99: 725 – 734.