

rhage: A Systematic Review of Published and Unpublished Studies. Stroke, 2010, 41: 1222-1228.

[15] SooYO, Yang SR, Lam WW, et al. Risk vs benefit of anti-

thrombotic therapy in ischaemic stroke patients with cerebral microbleeds. J Neurol, 2008, 255(11): 1679-1686.

微小 RNA 与缺血性脑血管病

邓锦凤, 胡中扬 综述 侯德仁 审校

中南大学湘雅三医院神经内科, 湖南省长沙市 410013

摘要:微小 RNA(miRNA)是一类小的非编码 RNA 分子,主要在转录后水平调控基因表达,miRNA 在中枢神经系统中含量丰富,参与了神经系统的生长发育和生理功能的调控,参与了脑血管病的发生发展,并可通过调节突触可塑性等方式参与缺血后的功能康复。

关键词:微小 RNA;神经系统;脑缺血;脑缺血耐受;突触可塑性

微小 RNA(microRNA, miRNA)是一类进化上高度保守的非编码单链小分子 RNA,由 19~23 个核苷酸组成,大部分是由基因的内含子部位产生,成熟 miRNA 通过与靶 mRNA 分子互补结合诱导靶其降解或/和翻译抑制,从而调控基因表达^[1]。在中枢神经系统中 miRNA 含量丰富,不仅广泛参与调节神经系统的生长发育,而且也与一些神经系统重大疾病的发生发展相关,如缺血性脑血管病、神经退行性疾病、神经系统肿瘤等。目前 miRNA 与脑血管疾病的相关性研究刚刚起步,本文就近年来 miRNA 在中枢神经系统的表达及其在缺血性脑血管病中的相关研究进展作一个详细综述。

1 miRNA 在中枢神经系统中表达的特点

目前,已在哺乳动物的脑组织中发现了大量 miRNA 的存在,据统计,大约有 20%~40% 的 miRNA 与脑组织的发育调控有关。miRNA 在中枢神经系统中的表达具有组织特异性、时相性、区域和细胞类型特异性。

miRNA 的表达具有组织特异性。研究表明组织特异性的 miRNA 有助于建立和维持不同细胞类型的蛋白表达谱。Sempere 等^[2]在人类和小鼠的正在分化的神经细胞中发现了 7 个脑组织特异性

miRNA,即 miR-9、miR-124a、miR-124b、miR-135、miR-153、miR-183 和 miR-219。在心脏中以 miR-1、let-7、miR-126、miR-133、miR-26、miR-23 和 miR-30c 为主^[3]。Mishima 等^[4]研究发现脑组织特异性的 miR-124 在小鼠的中枢神经系统中的表达水平高于其他组织 100 余倍,而肌肉特异性的 miR-1 在小鼠的中枢神经系统中的表达水平比心肌和骨骼肌低 100~1000 倍。这提示了 miRNA 在不同的组织中有着不同的表达水平。

miRNA 的表达具有时相性,Krichevsky 等^[5]在研究小鼠的皮质发育时发现,从胚胎的第 12 天至第 21 天,miR-131 的表达水平平均增加了 4 倍以上,随后表达下降,同时 miR-124a、miR-128 等也会随着皮质的发育而发生相应的变化。

此外,一些 miRNA 的表达具有区域和细胞类型特异性。例如 miR-92b、miR-146b、let-7g、miR-551b、miR-330* 和 miR-384 在大鼠海马的表达水平明显高于大脑皮质^[6]。在成年小鼠的脊髓、小脑、延髓、脑桥、下丘脑、海马、新皮质、嗅球、眼、垂体中,44 个 miRNA 的表达增加了 3 倍多^[7]。在大鼠杏仁核、小脑、海马、下丘脑及黑质的 miRNA 基因芯片分析表明 48 个 miRNA 在两个或更多的脑

基金项目:湖南省科技厅项目(2010SK3110)

收稿日期:2010-12-07;修回日期:2011-03-16

作者简介:邓锦凤(1986-),女,硕士研究生,主要研究方向为脑血管疾病和老年痴呆。

通讯作者:侯德仁(1966-),男,博士,主任医师,硕士研究生导师,从事脑血管疾病和老年痴呆的研究。E-mail:hou0718@xy3yy.com。

组织区域中表达增加了3倍多,而在小脑及前脑中则相反,这提示了miRNA在脑组织中表达具有区域特异性^[8]。另外,在脑组织中不同类型的细胞有着不同的miRNA表达谱,如miR-9在脑白质增殖活跃的成神经细胞和成胶质细胞中高表达^[9],miR-124和miR-128优先表达于神经元中,而miR-23仅仅表达于星型胶质细胞中,miR-26和miR-29在星型胶质细胞的表达比神经元中高得多^[10]。

2 miRNA在缺血性脑血管病中的发生发展

缺血性脑血管病是一种中老年多发病、常见病,也是引起残疾和死亡的常见原因之一。目前miRNA与脑血管病的关系仍在研究中,已有研究显示miRNA可能参与了脑缺血的发生发展,其机制可能涉及以下方面。

2.1 脑缺血耐受

脑缺血耐受(brain ischemic tolerance)是指脑组织一次或多次短暂性脑缺血再灌注后,大脑对以后较长时间的缺血性损伤产生显著的耐受性。预处理可调动机体内源性抗损伤能力,保护缺血缺氧的组织细胞。已知预处理诱导的耐受需要新蛋白的合成,并表现出短暂的基因表达抑制。某些研究通过检测miRNA作为调节剂在新蛋白合成中的作用,揭示了预处理可上调和下调miRNA在小鼠脑皮质中的表达,下调miRNA的一个显著的预测靶基因是全身转录调节子(MeCP2)^[11]。基因表达抑制是耐受的一个特征,MeCP2的表达在预处理大鼠脑皮质中会迅速上升,但mRNA表达却没有相关的改变,而MeCP2基因敲除大鼠表现出对缺血的易感性增高^[11],这提示了MeCP2可能是预处理诱导耐受的效应器。预处理刺激去抑制RISC-bound mRNAs,而新游离的mRNAs被翻译。这些新合成的蛋白质是转录调节子,可移位到细胞核中,并调节基因表达。MeCP2在耐受中的作用可能同时抑制非必要基因,保存了氧-糖衰竭缺血细胞的能量,并激活细胞存活所需要的必要基因。Lee等^[12]的研究发现两个miRNA家族miR-200和miR-182,他们在缺血预处理的早期上调,而miR-200家族主要是通过下调脯氨酸羟化酶2的水平发挥神经保护作用,提示这些miRNA可能在未来的研究和治疗应用中非常有用。

2.2 细胞凋亡及脑水肿形成

miRNA在缺血损伤反应中具有一定的作用。研究揭示在成年大鼠脑组织中短暂性局灶缺血可

以调节miRNA的表达,这些miRNA的预测靶蛋白与调节免疫、转录、神经保护、受体功能、离子动态平衡等脑组织蛋白相关^[13]。与miRNA生成途径有关的重要蛋白包括Drosha酶、Dicer酶、辅助因子Pasha酶和Pre-miRNA转运因子Exportin5,这些蛋白的mRNA水平在短暂性脑缺血中并不改变。然而,Dharap^[13]研究发现在缺血后的成年大鼠脑组织中,短暂性脑缺血抑制了miR-145的表达,导致它的靶基因——超氧化物歧化酶2的翻译增加。有意思的是,基因芯片研究揭示短暂性缺血诱导了8个miRNA与877个基因启动子互补,这表明了miRNA也可以调节基因表达。Yin等^[14]的研究发现在小鼠脑组织短暂性缺血和氧-葡萄糖剥夺的N2A神经母细胞瘤细胞中也可以特异诱导miR-497水平的改变。miR-497与N2A细胞中氧-葡萄糖剥夺诱导的反应相关:miR-497表达下降则抑制细胞死亡,而miR-497表达上升则使神经细胞丢失增多。由于miR-497直接与Bcl-2/w的3'UTR结合,所以小鼠大脑的miR-497被敲除后,就可以增加缺血区域Bcl-2/w蛋白的表达水平,减轻脑梗死,改善局部缺血后神经功能的结局。这些研究表明miR-497通过抑制Bcl-2和Bcl-w的表达,促进缺血性的神经元死亡,支持了缺血性脑损伤的发病机制中细胞凋亡的作用。

miR-21是某些生物系统中的强大抗凋亡因子。Buller等^[15]研究发现miR-21在大鼠缺血边缘区神经元的表达上调,在体外培养的皮质神经元过表达miR-21可以大大地抑制氧糖剥夺诱导的凋亡细胞死亡,而通过反义抑制衰减内源性miR-21可以加剧氧糖剥夺后的细胞死亡,这表明了miR-21过表达可以保护缺血性神经元免于死亡。进一步研究发现,miR-21的靶基因是FASLG,它是一个肿瘤坏死因子家族的成员,也是重要的细胞死亡诱导配体,miR-21可能通过下调FASLG介导了神经保护作用,以上研究暗示了miR-21可能是卒中治疗中的一个具有吸引力的治疗分子。

国内外的相关研究表明,在缺血缺氧条件下细胞内miRNA的变化主要集中在:①细胞凋亡基因,如PAR-4(miR-26、miR-30、miR-181),PCDC10(miR-103/107、miR-181),BID(miR-23),BIM(miR-24)、CASP3(miR-30),CASP7(miR-23),APAF1(miR-27),BAK1(miR-26),Bnip3L(miR-23)等。②细胞周期基因,如cdc25A(miR-21、

miR-103/107), cyclinD2 (miR-26、miR-103/107), cyclinE1 (miR-26), cyclinH (miR-23), cdk6 (miR-26、miR-103/107)。③血管内皮生长因子基因,如 let-7b、miR-16、miR-2、miR-17-5p、miR-27、miR-106、miR-107、miR-193、miR-210、miR-320 和 miR-361 等。

国外 Jeyaseelan^[16] 研究小组在大鼠局灶性脑缺血模型 (MCAO 模型) 中发现再灌注 24 h 和 48 h 后, let-7、miR-7、miR-27a、miR-29、miR-30e、miR-98、miR-101a、miR-137、miR-148b、miR-204、miR-218、miR-301、miR-338、miR-335、miR-369-5p、miR-376 和 miR-424 表达均下调, 而 miR-210、miR-215、miR-324-3p、miR-422b、miR-451、miR-497、miR-134 表达上调。国内全文庆等^[17] 采用双颈总动脉结扎方法制备大鼠缺血模型 (2VO) 研究中发现, 与正常组比较, 2VO 术后 60 min 大鼠皮质脑组织中 35 个已知 miRNA 表达上调 2 倍以上; 89 个表达下调 2 倍以上, 其中促进细胞凋亡和影响细胞周期的 miRNA, 如 miR-23、miR-24、miR-26、miR-30、miR-103、miR-107 等显著上调。彭涛等^[18] 在新生大鼠缺血缺氧性脑损伤 (HBD) 的模型中也观察到了相似的结果。以上研究选取的模型和时间点不同, 但是同样观察到了促进细胞凋亡和影响细胞周期的 miRNA 表达上调, 这提示了 miRNA 在缺血缺氧条件下, 主要启动了细胞凋亡、坏死的信号途径, 参与了脑损伤的发生发展过程。

Jeyaseelan 等^[16] 结合 DNA 芯片分析发现, miR-124a、miR-290、miR-494 调节 VSNL1 蛋白基因的表达; miR-223、miR-290、miR-292-5p、miR-327、miR-494 调节水通道蛋白 (AQP) 1、4、5、6 和 11 基因的表达; miR-125a、miR-132、miR-290、miR-338、miR-664 调节 MMP-9 基因的表达。AQP4 在脑组织中表达最丰富, 是 miR-30a-3p、miR-99 (a 和 b)、miR-100、miR-233 和 miR-383 的靶基因, 并发现 miR-30a-3p 和 miR-383 与 AQP4 表达变化一致, 同时也发现 miR-132 和 miR-664 与 MMP9 表达变化一致, 这说明两者之间可能存在调控与被调控关系。根据已有的文献显示 AQP4 和 MMP9 与血脑屏障的破坏和血管源性脑水肿密切相关。据此推测 miRNA 可能通过调控其靶基因表达而参与脑梗死后脑水肿形成。Dharap 等^[13]、Lim 等^[19] 的研究也有类似的结果。Lim^[19] 等的研究还发现 miRNA 的变化与梗死面积的变化相关, 注射 MK801 (NM-

DA 受体拮抗剂) 后梗死面积减少, 而 miRNA 的表达模式也可以返回接近正常的水平, 大脑及血清样本中蛋白质组的数据也支持了这一发现。Sugunavathi 等^[20] 研究表明 miR-320a 前体可以作为一种抑制剂, 而反义 miR-320a 可作为 AQP1 和 AQP4 的激活剂, 其可以使脑缺血的梗死面积减少, 同时使 AQP1 和 AQP4 蛋白的表达增加。

2.3 突触可塑性

脑梗死后, 受损的神经元轴突沿一定方向重新生长并重建突触和功能联系, 产生一系列复杂的代偿过程。而突触是活动依赖性脑可塑性变化的关键结构部位, 突触可塑性变化导致的突触重建对于脑缺血后的功能康复意义重大。长时程增强 (LTP) 和长时程抑制 (LTD) 是突触可塑性的重要形式, 是学习和记忆的基础, 而脑缺血后可引起 LTP 和 LTD 的改变。研究发现, 在成熟神经元中, miRNA 是突触可塑性、突触功能及形态修饰的重要调节因子, 并且与高级认识功能如学习和记忆有关。树突处蛋白合成是突触可塑性的重要调节途径, 而与突触蛋白合成有关的基因都是 miRNA 的潜在靶基因, miRNA 可根据突触活性的改变来调控局部翻译, 从而调控突触的生长和强度^[21]。Vo^[22] 研究小组发现 miR-132 表达可以诱导皮质神经元的轴突生长, 同样, Wayman 等^[23] 发现 miR-132 可以抑制 GTP 酶激活蛋白 P250 (P250GAP) 的表达而增强海马神经元的轴突形态发生。另外, Schratz 等^[24] 研究证明了 miR-134 可以抑制 LIMK1 基因表达而调节树突棘的体积, 从而参与调节树突棘的发育、成熟和可塑性。进一步研究发现 miR-134 对 LIMK1 基因的调节具有动态可逆性。当在神经细胞中加入脑源性神经营养因子 (BDNF) 后, miR-134 对 LIMK1 mRNA 的阻遏解除, LIMK1 mRNA 可以重新开始表达, 树突棘开始生长且形态可以恢复。Siegel 等^[25] 发现位于树突中的 miR-138 也可以负性调控着树突棘的大小, 抑制 miR-138 可以增大树突棘, 进一步研究发现 miR-138 的一个靶标是酰基蛋白硫酯酶 1 (APT1), 它可以调节突触蛋白的棕榈酰化合膜定位。

3 结论与展望

miRNA 在中枢神经系统的功能研究均证实了 miRNA 在神经系统发育和功能中发挥了重要的作用。关于 miRNA 参与脑血管病调控的研究刚刚起步, 哪些 miRNA 在脑缺血中起致病的作用, 哪些起

保护的作用,具体机制是什么,目前尚不太清楚。另外,由于 miRNA 是具有细胞渗透性的小分子,体内给药具有可行性,但是,如何选择具有治疗作用的 miRNA 有待进一步研究,因为许多 miRNA 除了表达于脑组织中,也可以表达于其他组织,而且,单一 miRNA 可以调控上百个 mRNA,可能会引起所谓的“脱靶”效应,其治疗的安全性和副作用应慎重考虑。但是我们相信随着科学的进步,随着研究的深入开展,miRNA 与缺血性脑血管病的发生、发展、预后的相关性和具体机制将会逐步被阐明,miRNA 也将会成为缺血性脑血管病一个新的诊断和治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [2] Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*, 2004, 5(3): R13.
- [3] Zhang C. MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 114(12): 699-706.
- [4] Mishima T, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, et al. RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS. *Brain Res*, 2007, 1131(1): 37-43.
- [5] Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA*, 2003, 9(10): 1274-1281.
- [6] He X, Zhang Q, Liu Y, Pan X. Cloning and identification of novel microRNAs from rat hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2007, 39(9): 708-714.
- [7] Bak M, Silahatoglu A, Moller M, et al. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA*, 2008, 14(3): 432-444.
- [8] Olsen L, Klausen M, Helboe L, et al. MicroRNAs show mutually exclusive expression patterns in the brain of adult male rats. *PLoS One*, 2009, 4(10): e7225.
- [9] Nelson PT, Baldwin DA, Kloosterman WP, et al. RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *RNA*, 2006, 12(2): 187-191.
- [10] Smirnova L, Grafe A, Seiler A, et al. Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci*, 2005, 21(6): 1469-1477.
- [11] Lusardi TA, Farr CD, Faulkner CL, et al. Ischemic preconditioning regulates expression of microRNAs and a predicted target, MeCP2, in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(4): 744-756.
- [12] Lee ST, Chu K, Jung KH, et al. MicroRNAs induced during ischemic preconditioning. *Stroke*, 2010, 41(8): 1646-1651.
- [13] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral MicroRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(4): 675-687.
- [14] Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of microRNAs in young stroke patients. *PLoS One*, 2009, 4(11): e7689.
- [15] Buller B, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J*, 2010, 277(20): 4299-4307.
- [16] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 2008, 39(3): 959-966.
- [17] 文全庆,贾延劫,王明闯,等. 大鼠脑缺血急性期脑组织 miRNA 的表达变化. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(S1): 23-26.
- [18] 彭涛,贾延劫,文全庆,等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠脑组织小 RNA 表达的变化. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(5): 373-376.
- [19] Lim KY, Chua JH, Tan JR, et al. MicroRNA in Cerebral Ischemia. *Transl Stroke Res*, 2010, 1(4): 287-303.
- [20] Sugunavathi S, Arunmozhiarasi A, Kai Ying L, et al. MicroRNA 320a functions as a novel endogenous modulator of Aquaporins 1 and 4 as well as a potential therapeutic target in cerebral ischemia. *J Biol Chem*, 2010, 285(38): 29223-29230.
- [21] Klein ME, Impey S, Goodman RH. Role reversal: The regulation of neuronal gene expression by microRNAs. *Curr Opin Neurobiol*, 2005, 15(5): 507-513.
- [22] Vo N, Klein ME, Varlamova O, et al. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(45): 16426-16431.
- [23] Wayman GA, Davare M, Ando H, et al. An activity-regulated microRNA controls dendritic plasticity by downregulating p250GAP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(26): 9093-9098.
- [24] Schratz GM, Tuebing F, Nigh EA, et al. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*, 2006, 439(7074): 283-289.
- [25] Iegel G, Obernosterer G, Fiore R, et al. A functional screen implicates microRNA-138-dependent regulation of the dephosphorylation enzyme APT1 in dendritic spine morphogenesis. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(6): 705-716.