

# LINC01116 靶向 miR-203 加剧氧糖剥夺/复氧诱导下人海马星形胶质细胞损伤

黄正义<sup>1</sup>, 赵增霞<sup>2</sup>, 符秋红<sup>3</sup>, 刘淑云<sup>2</sup>, 陈协辉<sup>1</sup>

**摘要:** 目的 明确长基因间非编码 RNA 1116(LINC01116)在急性缺血性脑卒中(AIS)海马星形胶质细胞中的作用及分子机制。方法 利用实时荧光定量 PCR 检测 131 例 AIS 患者溶栓前后血清中 LINC01116 与 miR-203 表达。采用双荧光素酶报告基因与 RNA 结合蛋白免疫沉淀试验检测 LINC01116 对 miR-203 的调控作用。以人海马星形胶质细胞(hHA)建立氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型并给予 LINC01116 干扰与 LINC01116 联合 miR-203 干扰处理,采用 CCK-8、TUNEL 与蛋白质印迹、活性氧(ROS)试验、乳酸脱氢酶(LDH)试验及酶联免疫吸附试验分别检测细胞增殖、细胞凋亡、ROS 生成、LDH 活性及炎症因子的变化。结果 溶栓后血清中 LINC01116 与 miR-203 的表达分别高于与低于溶栓前,且 LINC01116 与 miR-203 表达呈负相关( $P < 0.05$ )。LINC01116 海绵吸附 miR-203 并抑制其表达( $P < 0.05$ )。LINC01116 干扰减轻 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤,表现为细胞增殖能力提高,细胞凋亡率下降,激活型 caspase-3 与 Bax 蛋白表达降低而 Bcl-2 蛋白表达升高,ROS 生成减少,LDH 活性下降,TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 浓度下调而 IL-4、IL-10 及 IL-13 浓度上调( $P < 0.05$ )。miR-203 干扰逆转 LINC01116 干扰对 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤的保护作用( $P < 0.05$ )。结论 LINC01116 靶向 miR-203 促进 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤,表明 LINC01116/miR-203 通路可能是 AIS 的潜在治疗靶点。

**关键词:** 长基因间非编码 RNA 1116; 急性缺血性脑卒中; 人海马星形胶质细胞; 氧糖剥夺/复氧; 治疗靶点  
中图分类号:R743.3 文献标识码:A

**LINC01116 aggravates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury in human hippocampal astrocytes by targeting miR-203** HUANG Zhengyi, ZHAO Zengxia, FU QiuHong, et al. (Department of Geriatrics, Shenzhen Longhua District Central Hospital, Shenzhen 518110, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role and molecular mechanism of long intergenic non-coding RNA 1116 (LINC01116) in hippocampal astrocytes of acute ischemic stroke (AIS). **Methods** The expressions of LINC01116 and miR-203 in serum of 131 AIS patients before and after thrombolysis were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The regulatory effect of LINC01116 on miR-203 was detected by dual-luciferase reporter gene and RNA-binding protein immunoprecipitation assay. Human hippocampal astrocytes (hHA) were applied to establish an oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) model and were treated with LINC01116 interference and LINC01116 combined with miR-203 interference. The changes of cell proliferation, cell apoptosis, production of reactive oxygen species (ROS), activity of lactate dehydrogenase (LDH), and inflammatory factors were detected by CCK-8, TUNEL and Western blotting, ROS assay, LDH assay, and enzyme-linked immunosorbent assay, respectively. **Results** The expressions of LINC01116 and miR-203 in serum after thrombolysis were higher and lower than those before thrombolysis, respectively, and the expressions of LINC01116 and miR-203 were negatively correlated ( $P < 0.05$ ). LINC01116 inhibited miR-203 expression by sponge of miR-203 ( $P < 0.05$ ). LINC01116 interference alleviated the OGD/R-induced injury of hHA cells, which manifested as elevated cell proliferation ability, decreased cell apoptosis rate, decreased protein expressions of cleaved caspase-3 and Bax but raised protein expression of Bcl-2, reduced ROS production, decreased LDH activity, and downregulated TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 concentrations but upregulated IL-4, IL-10 and IL-13 concentrations ( $P < 0.05$ ). miR-203 interference reversed the protective effect of LINC01116 interference on the OGD/R-induced injury of hHA cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** LINC01116 promotes the OGD/R-induced injury of hHA cells by targeting miR-203, suggesting that the LINC01116/miR-203 pathway might be a potential therapeutic target for AIS.

**Key words:** LINC01116; AIS; hHA; OGD/R; Therapeutic target

急性缺血性脑卒中(AIS)是一种常见的脑血管疾病,也是全世界范围内引发60岁以上人群致残和死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。脑缺血再灌注损伤(CIRI)是指由缺血缺氧引起的脑组织损伤在重新获得血氧供应后进一步加重甚至不可逆的病理过程。研究表明,CIRI涉及一系列病理变化,包括细胞增殖

收稿日期:2022-08-05;修订日期:2022-09-30

基金项目:深圳市龙华区医疗卫生机构区级科研项目(No. 2021002)

作者单位:(1. 深圳市龙华区中心医院老年医学科,广东深圳518110;2. 深圳市龙华区中心医院神经内科,广东深圳518110;3. 深圳市龙华区中心医院急诊科,广东深圳518110)

通讯作者:陈协辉, E-mail:502887369@qq.com

受损、凋亡增加、氧化应激和炎症反应激活等,最终导致神经元损伤甚至坏死<sup>[2]</sup>。因此,进一步探究 CIRI 潜在分子机制,并寻找新的有效的治疗靶点是十分必要的。

近年来众多转录组测序与表达谱芯片证实,长链非编码 RNA (lncRNAs) 与微小 RNA (miRNAs) 在 AIS 中异常表达并与疾病进展密切相关<sup>[3]</sup>。到目前为止,研究已报道了一些 lncRNAs 在 CIRI 中的详细作用机制,如 H19 印记母体表达转录产物 (H19)、转移相关肺腺癌转录产物 1 (MALAT1)、X 染色体失活特定转录产物 (XIST) 及小核仁 RNA 宿主基因 12 (SNHG12) 等<sup>[4]</sup>。作为一个 lncRNA, LINC01116 的研究主要集中在肿瘤方面,被发现与多种肿瘤进展有关,并可作为诊断与预后的新型生物标志物<sup>[5]</sup>。我们通过分析 GEO 数据库中 GSE122709 与 GSE140275 结果,发现 LINC01116 在 AIS 患者外周血高表达,推测其可能在 CIRI 中发挥一定的作用。基于以上证据,本研究目的在于明确 LINC01116 在 AIS 海马星形胶质细胞中的作用及相关分子机制。

## 1 资料与方法

1.1 主要试剂 RNA 结合蛋白免疫沉淀 (RIP) 试剂盒来自美国 Merck Millipore 公司,人海马星形胶质细胞 (hHA) 来自上海中乔新舟公司,杜尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM)、无糖 DMEM 及胎牛血清 (FBS) 来自美国 ThermoFisher 公司,sh-Ctrl 载体、sh-LINC01116 载体、对照抑制物及 miR-203 抑制物来自上海吉玛基因公司,Advanced 高效 DNA/RNA 转染试剂盒来自美国 Zeta Life 公司,细胞增殖/毒性试剂盒-8 (CCK-8) 与末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的原位缺口末端标记法 (TUNEL) 试剂盒来自上海生工生物公司,激活型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (caspase-3)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、真核翻译起始因子 2C2 (AGO2) 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体来自美国 Abcam 公司,活性氧 (ROS) 与乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒来自苏州碧云天生物技术公司,酶联免疫吸附试验 (ELISA) 相关试剂盒来自上海科艾博生物公司。

1.2 临床标本 回顾性选择了 2018 年 1 月 - 2019 年 12 月期间在深圳市龙华区中心医院经溶栓治疗的 131 例 AIS 患者。纳入标准:按照中国 AIS 诊治指南 2018 版<sup>[6]</sup> 诊断为 AIS,且在发病 6 h 内入院治疗。排除标准:AIS 发病超过 6 h,复发性 AIS、短暂性脑缺血发作、脑出血、蛛网膜下腔出血、颅内占位性病变、意识障碍、严重肝肾功能不全、凝血功能障碍、恶性肿瘤及急慢性感染性疾病。收集所有的患者溶栓前后静脉血 5 ml,放置于抗凝管,并于 -20 °C 保存备用。本研究已获深圳市龙华区中心医

院伦理委员会审批,并得到所有参与者的知情同意。

## 1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取和反转录 取 500  $\mu$ l 静脉血,加入 1.5 ml RNAiso Blood,充分混匀后,按照试剂盒提供步骤萃取总 RNA。对于 lncRNAs 反转录,取 1  $\mu$ g 总 RNA,2  $\mu$ l 5  $\times$  PrimeScript RT Master Mix 及适量去离子水至总体积为 10  $\mu$ l;之后依次 37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 30 min 合成互补脱氧核糖核酸 (cDNA)。对于 miRNAs 反转录,取 2  $\mu$ g 总 RNA,5  $\mu$ l 2  $\times$  mRQ Buffer,1.25  $\mu$ l mRQ Enzyme 及适量去离子水至总体积为 10  $\mu$ l;随后按照 37 °C 60 min,85 °C 5 min,4 °C 30 min 合成 cDNA。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 对于 LINC01116 实时荧光定量 PCR 试验,取 2  $\mu$ l cDNA,10  $\mu$ l 2  $\times$  TB Green Premix Ex Taq II,0.4  $\mu$ l 50  $\times$  ROX Reference Dye,0.8  $\mu$ l 正向引物,0.8  $\mu$ l 反向引物及 6  $\mu$ l 去离子水至总体积为 20  $\mu$ l;之后依次 95 °C 30 s,95 °C 5 s,60 °C 45 s,共 40 个循环。对于 miR-203 实时荧光定量 PCR 试验,取 2  $\mu$ l cDNA,12.5  $\mu$ l 2  $\times$  TB Green Advantage Premix,0.5  $\mu$ l 50  $\times$  ROX Dye,0.5  $\mu$ l 通用引物,0.5  $\mu$ l miR-203 引物及 9  $\mu$ l 去离子水至总体积为 25  $\mu$ l;之后依次 95 °C 15 s,95 °C 5 s,60 °C 20 s,共 40 个循环。反应结束后,分别以 GAPDH 和 U6 为内参基因采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 LINC01116 与 miR-203 表达水平。LINC01116 正向引物:5'-CACCATGCCTGGCTGATTTGTC-3',反向引物:5'-GTGTACTTCAGGGCCTTTGGGT-3'; GAPDH 正向引物:5'-CATGGGTGGAATCATATTGGAA-3',反向引物:5'-GAAGGTGAAGTCCGAGT-3'; miR-203 引物:GTGAAATGTTTAGGACCACTAG; U6 正向引物:5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',反向引物:5'-ACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.3.3 细胞培养 hHA 细胞复苏后,采用 DMEM 和 10% FBS 培养,并在培养基中添加 2 mmol/L 谷氨酰胺、100  $\mu$ g/ml 链霉素及 100 U/ml 青霉素,置于含 5% 二氧化碳的恒温 (37 °C) 加湿培养箱中培养。

1.3.4 双荧光素酶报告基因试验 LINC01116-野生型 (WT) 序列包含与 miR-203 预测结合位点被扩增并插入 pmirGLO 双荧光素酶 miRNAs 表达载体,建立报告载体 pmirGLO-LINC01116-WT。同时使用 GeneArt<sup>®</sup> 定点诱变 PLUS 系统突变 (MUT) LINC01116 序列中包含与 miR-203 预测结合位点,建立报告载体 pmirGLO-LINC01116-MUT。取对数期生长的 hHA 细胞接种至 24 孔板 (约  $5 \times 10^5$  / 孔),培养过夜。第二天采用 Advanced 高效 DNA/RNA 转染试剂将 0.5  $\mu$ g 报告载体与 30 nmol miR-203 抑制物或 30 nmol 对照抑制物共转染到细胞中并培养 48 h。根据荧光素酶报告基因试剂盒检测各

孔荧光素酶活性。

1.3.5 RIP 试验 用4℃预冷的PBS缓冲液洗涤细胞后,加入RIP裂解缓冲液冰上孵育20 min, 13,000 r/min离心30 min收集上清液。将100 μl上清液转移至含有AGO2抗体(货号:ab186733,稀释倍数:1:50)偶联磁珠的RIP免疫沉淀缓冲液中,4℃孵育过夜后,以IgG抗体(货号:ab172730,稀释倍数:1:250)作为对照。第二天将磁珠用RIP洗涤缓冲液洗涤3次,然后用蛋白酶K在55℃孵育30 min,并过柱纯化提取RNA。最后检测LINC01116与miR-203表达水平。

1.3.6 氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型建立 取对数期生长的hHA细胞接种至24孔板(约 $5 \times 10^5$ /孔),培养过夜。第二天采用无糖DMEM和10% FBS培养6 h,培养条件为37℃、0.5% O<sub>2</sub>、94.5% N<sub>2</sub>和5% CO<sub>2</sub>。之后,去除所有培养基添加DMEM和10% FBS在37℃、95%空气及5% CO<sub>2</sub>条件下继续培养24 h,即建立OGD/R。

1.3.7 实验分组及细胞转染 体外hHA细胞实验设为5个部分:分别为对照组、OGD/R组、对照干扰组、LINC01116干扰组及LINC01116联合miR-203干扰组。对照组与OGD/R组不进行细胞转染,而对照干扰组、LINC01116干扰组及LINC01116联合miR-203干扰组利用Advanced高效DNA/RNA转染试剂分别向细胞中转染0.75 μg sh-Ctrl载体,0.75 μg sh-LINC01116载体及0.5 μg sh-LINC01116载体+30 nmol miR-203抑制物。

1.3.8 CCK-8 将细胞接种至96孔培养板(约 $8 \times 10^3$ /孔),每组设计3个复孔,在培养0 h、12 h、24 h、36 h及48 h后向对应各孔加入12 μl CCK-8,继续在37℃孵育4 h。随后采用酶标仪测定各孔在450 nm波长时的吸光度值,并计算细胞增殖曲线。

1.3.9 TUNEL 将0.2%聚乙二醇辛基苯基醚加入爬片孵育5 min进行透膜处理。之后,用5 μmol/L TUNEL在37℃染色15 min。将爬片放入0.3%过氧化氢中孵育10 min,并用0.5 μg/ml 4',6-二脒基-2-苯基吲哚在黑暗中37℃染色5 min。利用荧光显微镜观察细胞着色情况,并计算凋亡率(%)。

1.3.10 蛋白质印迹 提取细胞中总蛋白,取30 μg蛋白进行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。利用湿转膜法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜。将PVDF膜用5%脱脂奶粉在37℃封闭2 h,随后加入激活型caspase-3(货号:ab32042,稀释倍数:1:500)、Bax(货号:ab32503,稀释倍数:1:2500)、Bcl-2(货号:ab32124,稀释倍数:1:1000)及和GAPDH(货号:ab9485,稀释倍数:1:2500)抗体在4℃孵育过夜。第2天将PVDF膜

用含辣根过氧化物酶标记的抗兔二抗(货号:ab205718,稀释倍数:1:5000)在37℃孵育1 h。最后在避光环境中将PVDF膜用增强化学发光显色试剂处理并曝光,采用Image Pro Plus7.0软件分析灰度值并计算蛋白表达水平。

1.3.11 ROS与LDH试验 取10<sup>6</sup>个细胞重悬于10 μmol/L活性氧荧光探针(DCFH-DA)中,并在37℃孵育20 min。之后,用DMEM充分洗涤细胞去除未进入细胞内的DCFH-DA,利用荧光分光光度计测定细胞中ROS水平。向上清液中加入150 μl检测液(稀释10倍),并在37℃孵育1 h。随后400 r/min离心5 min再次收集上清液,并取120 μl上清液加入到96孔板相应孔中,采用酶标仪测定各测试孔在490 nm波长时的吸光度值,并计算LDH活性。

1.3.12 ELISA试验 将上清液和标准样品分别放入测试孔内在37℃孵育2 h,之后用缓冲液洗涤测试孔。将ELISA试剂盒自带的生物素标记抗体(TNF-α、IL-1β、IL-4、IL-6、IL-10及IL-13)放入测试孔内在37℃孵育1 h。然后将链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶放入测试孔内在37℃孵育20 min,并与四甲基联苯胺孵育20 min。通过酶标仪测定各测试孔在450 nm波长时的吸光度值,绘制标准曲线并计算炎症因子浓度。

1.4 统计学处理 采用SPSS 28.0软件包进行统计学分析。所有试验均独立重复3次,结果以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。两组数据之间的比较采用独立样本t检验,3组或3组以上数据之间的比较采用单因素方差分析,其中两两之间的比较采用Bonferroni法。 $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 AIS患者溶栓前后血清中LINC01116与miR-203的表达水平及二者的关系 本研究共收集131例AIS患者,其中女54例,男77例,年龄29~83岁( $57.41 \pm 9.26$ )岁。AIS患者溶栓后血清中LINC01116表达水平高于溶栓前,差异有显著性( $P < 0.05$ )。AIS患者溶栓后血清中miR-203表达水平低于溶栓前,差异有显著性( $P < 0.05$ )。LINC01116与miR-203表达呈负相关( $P < 0.05$ ) (见图1)。

2.2 LINC01116与miR-203的调控关系 通过生物信息学分析,预测LINC01116转录产物(NR\_040001.2)中“ATTTCA”序列可与miR-203中“TA-AAGT”序列结合,提示miR-203可能受LINC01116调控。miR-203干扰显著上调报告载体pmirGLO-LINC01116-WT荧光素酶活性( $P < 0.05$ ),而不影响报告载体pmirGLO-LINC01116-MUT荧光素酶活性。AGO2抗体显著富集LINC01116与miR-203表达( $P < 0.05$ )。二者结果表明,LINC01116通过

“ATTTC A”序列海绵吸附 miR-203(见图 2)。

2.3 LINC01116 干扰对 miR-203 表达的影响

OGD/R 组中 LINC01116 表达水平高于对照组,而 miR-203 表达水平低于对照组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。LINC01116 干扰组中 LINC01116 表达水平低于对照干扰组,而 miR-203 表达水平高于对照干扰组,差异有显著性( $P < 0.05$ )。LINC01116 联合 miR-203 干扰组中 miR-203 表达水平低于 LINC01116 干扰组,差异有显著性( $P < 0.05$ ),表明 LINC01116 抑制 miR-203 表达(见图 3)。

2.4 LINC01116 干扰与 LINC01116 联合 miR-203 干扰对 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤的影响  
OGD/R 组较对照组细胞增殖能力降低,细胞凋亡率升高,激活型 caspase-3 与 Bax 蛋白表达升高而 Bcl-

2 蛋白表达降低,ROS 生成增加,LDH 活性升高, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 浓度上调而 IL-4、IL-10 及 IL-13 浓度下调( $P < 0.05$ ),表明 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤。LINC01116 干扰组较 OGD/R 组与对照干扰组细胞增殖能力提高,细胞凋亡率下降,激活型 caspase-3 与 Bax 蛋白表达降低而 Bcl-2 蛋白表达升高,ROS 生成减少,LDH 活性下降, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 浓度下调而 IL-4、IL-10 及 IL-13 浓度上调( $P < 0.05$ ),表明 LINC01116 干扰减轻 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤。此外,miR-203 干扰逆转 LINC01116 干扰对 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤的保护作用( $P < 0.05$ ),表明 LINC01116 通过靶向 miR-203 促进 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤(见图 4)(见表 1)。

表 1 各组细胞凋亡率与 ROS 生成及 LDH 活性比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	凋亡率(%)	ROS [nmol/(min·mg)]	LDH(mU/ml)
对照组	2.10 ± 0.56	28.96 ± 4.32	48.14 ± 7.21
OGD/R 组	13.66 ± 3.79*	259.72 ± 27.52*	109.75 ± 13.86*
对照干扰组	15.79 ± 4.22*	263.54 ± 34.87*	104.25 ± 11.90*
LINC01116 干扰组	7.30 ± 1.54#	80.73 ± 6.89#	69.28 ± 9.44#
LINC01116 联合 miR-203 干扰组	10.81 ± 2.96\$	141.05 ± 20.63\$	112.73 ± 10.35\$
F	5.28	12.35	7.42
P	<0.05	<0.05	<0.05

与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组与对照干扰组比较# $P < 0.05$ ; 与 LINC01116 干扰组比较\$ $P < 0.05$

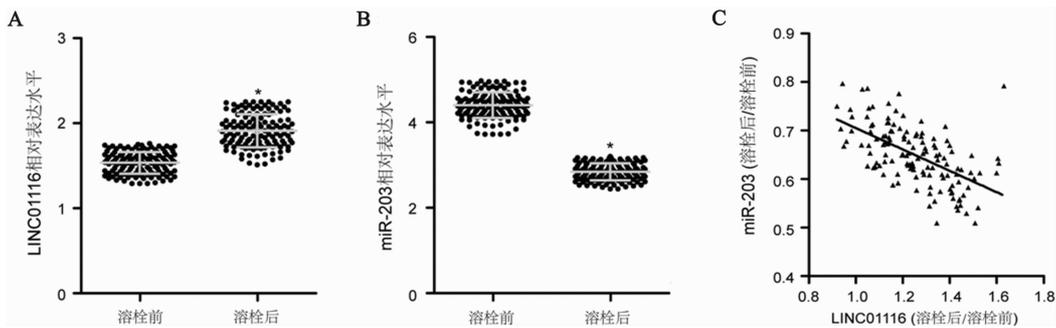
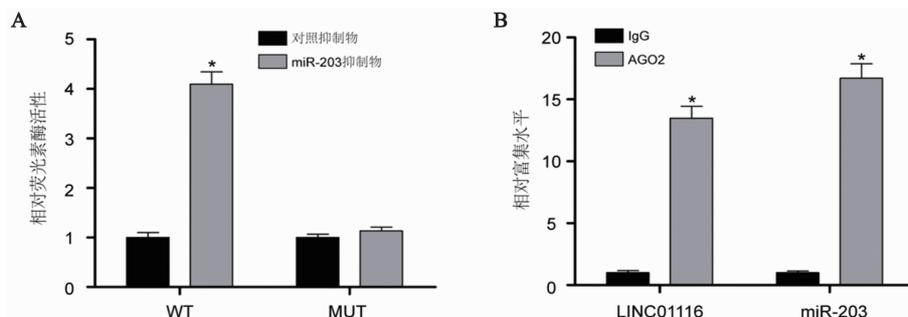


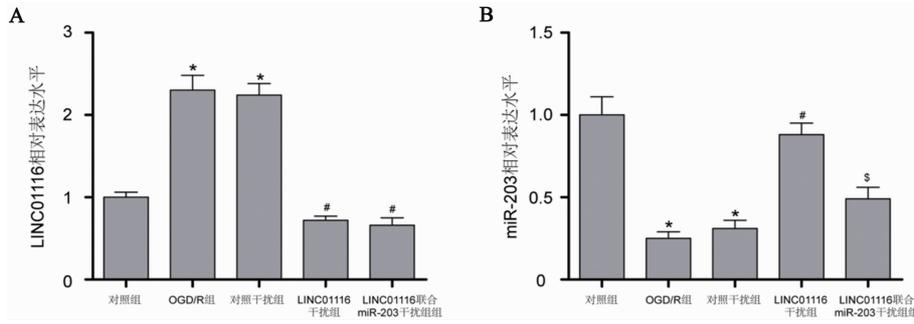
图 1 实时荧光定量 PCR 试验分析 AIS 患者溶栓前后血清中 LINC01116 与 miR-203 的表达水平  
A:溶栓后血清中 LINC01116 表达高于溶栓前;B:溶栓后血清中 miR-203 表达低于溶栓前;C:LINC01116 与 miR-203 表达呈负相关。与溶栓前比较 \*  $P < 0.05$

图 1 实时荧光定量 PCR 试验分析 AIS 患者溶栓前后血清中 LINC01116 与 miR-203 的表达水平



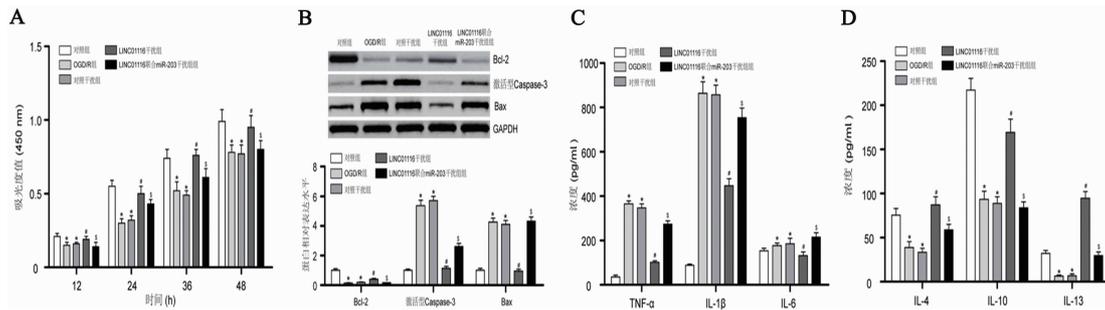
A:双荧光素酶报告基因试验,与对照抑制物比较 \*  $P < 0.05$ ;B:RIP 试验分析,与 IgG 抗体比较 \*  $P < 0.05$

图 2 LINC01116 与 miR-203 的调控关系



A:各组中 LINC01116 表达水平比较;B:各组中 miR-203 表达水平比较。与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组与对照干扰组比较#  $P < 0.05$ ; 与 LINC01116 干扰组比较 \$  $P < 0.05$

图3 实时荧光定量 PCR 试验分析 LINC01116 干扰对 miR-203 表达的影响



A:CCK-8 试验;B:蛋白质印迹试验;C:ELISA 试验检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 浓度;D:ELISA 试验检测 IL-4、IL-10 及 IL-13 浓度。与对照组比较 \*  $P < 0.05$ ; 与 OGD/R 组与对照干扰组比较#  $P < 0.05$ ; 与 LINC01116 干扰组比较 \$  $P < 0.05$

图4 LINC01116 干扰与 LINC01116 联合 miR-203 干扰对 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤的影响

### 3 讨论

最新研究发现, LINC01116 通过调节 miR-203/SMAD5 信号轴影响瘢痕疙瘩成纤维细胞的增殖、迁移和凋亡<sup>[7]</sup>。LINC01116 还可以通过海绵吸附 miR-9-5p 上调叉头框转录因子 P1 促进子宫内膜基质细胞的增殖和迁移<sup>[8]</sup>。以上证据表明, LINC01116 在各种疾病中具有广泛的生物学功能。目前如何改善 CIRI 一直是提高 AIS 治疗需面临的重要问题。前期我们在 AIS 患者外周血 lncRNAs 表达谱中发现 LINC01116 高表达<sup>[9]</sup>。此外, 多篇文献证实异常表达的 lncRNAs 在 CIRI 中发挥重要的调节作用<sup>[10]</sup>。因此, 我们推测 LINC01116 可能与 CIRI 有关。本研究通过一系列体外细胞实验及机制验证, 发现 LINC01116 靶向 miR-203 促进 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤, 将为 CIRI 防治提供新的证据与潜在靶点。

越来越多的研究显示, lncRNAs 可作为 CIRI 治疗的有希望的分子靶点。例如, Xu 等<sup>[11]</sup>报道 CAMK2D 相关转录产物 2 (C2dat2) 通过 miR-30d-5p/DDIT4/mTOR 轴促进 CIRI 中胶质细胞自噬和凋亡, 表明 C2dat2 可能是 CIRI 有前景的治疗靶点。Tu 等<sup>[12]</sup>发现 CEBPA 反义转录产物 1 通过靶向 miR-340-5p 调节 APPL1/LKB1/AMPK 通路减轻 CIRI。此外, Ni 等<sup>[13]</sup>揭示核富集转录产物 1 (NEAT1) 干扰调节小胶质细胞的活化并减少 AKT 信号和神经元

凋亡, 提示 NEAT1 可能是 CIRI 治疗干预的潜在靶点。本研究在 AIS 患者溶栓后血清中检测到 LINC01116 表达升高, 与 Zhu 等<sup>[14]</sup>报道一致, 表明可信度高。另外, 最近 Zhang 等<sup>[15]</sup>一项研究证实 LINC01116 在急性髓性白血病患者血清中高表达。以上证据充分说明, LINC01116 是一种循环 lncRNA, 提示其可能作为 AIS 的新型分子标志物。

胶质细胞广泛参与调控炎症与免疫反应, 也对神经发生、血管生成和突触重塑至关重要<sup>[16]</sup>。本研究采用 hHA 细胞建立 OGD/R, 经 CCK-8、TUNEL 与蛋白质印迹、ROS 与 LDH 检测及 ELISA 实验发现细胞增殖能力降低, 细胞凋亡率升高, 激活型 caspase-3 与 Bax 蛋白表达升高而 Bcl-2 蛋白表达降低, ROS 生成增加, LDH 活性升高, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 IL-6 浓度上调而 IL-4、IL-10 及 IL-13 浓度下调。以上结果表明, OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤。有趣的是, 还检测到 OGD/R 中 LINC01116 表达上调, 该结果与 AIS 患者溶栓后血清 LINC01116 高表达一致, 提示 LINC01116 在 CIRI 中可能具有重要作用。

随后进一步检测 LINC01116 干扰对 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤的影响, 发现 LINC01116 干扰后细胞增殖能力提高, 细胞凋亡率下降, 激活型 caspase-3 与 Bax 蛋白表达降低而 Bcl-2 蛋白表达升高, ROS 生成减少, LDH 活性下降, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及

IL-6 浓度下调而 IL-4、IL-10 及 IL-13 浓度上调,表明 LINC01116 干扰可抵抗 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤,提示其可能是 CIRI 治疗的潜在分子靶点。本研究中 LINC01116 干扰促进细胞增殖并降低细胞凋亡,与其在胶质瘤中报道的作用相悖<sup>[17]</sup>,可能原因是由于 hHA 细胞与肿瘤细胞的异质性所致,具体原因有待进一步阐明。

越来越多的实验证实, lncRNAs 作为 ceRNA 海绵吸附 miRNAs 而发挥表观遗传调控作用<sup>[18]</sup>。目前已报道的受 LINC01116 调控的 miRNAs 包括 miR-9-5p<sup>[8]</sup>、miR-93-5p<sup>[19]</sup> 及 miR-744-5p<sup>[20]</sup> 等。miR-203 是一种高度保守的 miRNA,定位于人第 14 号染色体 q32.33 区域,与肿瘤进展、2 型糖尿病、氧化应激及炎症反应有关<sup>[21,22]</sup>。最新研究发现,miR-203 参与调节心肌缺血再灌注损伤<sup>[23]</sup>。此外,Zhong 等<sup>[24]</sup> 研究发现七氟醚治疗后通过靶向髓样分化因子 88 上调 miR-203 表达可以减轻 CIRI 诱导的神经炎症。以上证据表明,miR-203 在 CIRI 中具有保护作用。本研究发现 AIS 患者溶栓后血清与 OGD/R 中 miR-203 表达下调,且 miR-203 与 LINC01116 表达呈负相关,提示 miR-203 可能受 LINC01116 调控。进一步经双荧光素酶报告基因与 RIP 试验证实,LINC01116 通过“ATTTC A”序列海绵吸附 miR-203,表明 miR-203 是 LINC01116 的靶基因。最后通过回补实验发现 miR-203 干扰逆转 LINC01116 干扰对 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤的保护作用,该结果与 Zhong 等<sup>[24]</sup> 报道一致,充分表明 LINC01116 通过靶向 miR-203 促进 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤。

综上所述,本研究发现 LINC01116 在 AIS 患者溶栓后血清中高表达,LINC01116 靶向 miR-203 促进 OGD/R 诱导下 hHA 细胞损伤,表明 LINC01116/miR-203 通路可能是 AIS 的潜在治疗靶点。下一步将在大临床样本与动物模型中予以验证,并探讨该通路调控的下游分子。

[参考文献]

[1] Mendelson SJ, Prabhakaran S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: A review [J]. JAMA, 2021, 325(11):1088-1098.

[2] Liang W, Lin C, Yuan L, et al. Preactivation of Notch1 in remote ischemic preconditioning reduces cerebral ischemia-reperfusion injury through crosstalk with the NF-kappaB pathway[J]. J Neuroinflammation, 2019, 16(1):181.

[3] Wang SW, Liu Z, Shi ZS. Non-coding RNA in acute ischemic stroke: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets[J]. Cell Transplant, 2018, 27(12):1763-1777.

[4] Yu SY, Tang L, Zhou SH. Long noncoding RNAs: new players in ischaemia-reperfusion injury[J]. Heart Lung Circ, 2018, 27(3):322-332.

[5] Xing H, Sun H, Du W. LINC01116 accelerates nasopharyngeal carcinoma progression based on its enhancement on MYC transcription activity[J]. Cancer Med, 2020, 9(1):269-277.

[6] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2018[J]. 中华神经科杂志, 2018, 51(9):666-682.

[7] Yuan W, Sun H, Yu L. Long non-coding RNA LINC01116 accelerates the progression of keloid formation by regulating miR-203/SMAD5 axis[J]. Burns, 2021, 47(3):665-675.

[8] Cui L, Chen S, Wang D, et al. LINC01116 promotes proliferation and migration of endometrial stromal cells by targeting FOXPI via sponging miR-9-5p in endometriosis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(4):2000-2012.

[9] Li S, Chen L, Xu C, et al. Expression profile and bioinformatics analysis of circular RNAs in acute ischemic stroke in a South Chinese Han population[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):10138.

[10] Cai L, Zhang B. A narrative review of long noncoding RNA: insight into neural ischemia/reperfusion mediated by two pathophysiological processes of injury and repair[J]. Ann Transl Med, 2022, 10(4):235.

[11] Xu Q, Guohui M, Li D, et al. lncRNA C2dat2 facilitates autophagy and apoptosis via the miR-30d-5p/DDIT4/mTOR axis in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(8):11315-11335.

[12] Tu X, Zhang H, Chen S, et al. LncRNA CEBPA-AS1 alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by sponging miR-340-5p regulating APPL1/LKB1/AMPK pathway[J]. FASEB J, 2022, 36(1):e22075.

[13] Ni X, Su Q, Xia W, et al. Knockdown lncRNA NEAT1 regulates the activation of microglia and reduces AKT signaling and neuronal apoptosis after cerebral ischemic reperfusion[J]. Sci Rep, 2020, 10(1):19658.

[14] Zhu W, Tian L, Yue X, et al. LncRNA Expression profiling of ischemic stroke during the transition from the acute to subacute stage[J]. Front Neurol, 2019, 10(2):36.

[15] Zhang PP, Zhang F, Zhu K, et al. Matrine exerted an anti-tumor effect on acute myeloid leukemia via the lncRNA LINC01116/miR-592-mediated JAK/STAT pathway inactivation[J]. Neoplasma, 2022, 69(1):123-135.

[16] Hernandez IH, Villa-Gonzalez M, Martin G, et al. Glial cells as therapeutic approaches in brain ischemia-reperfusion injury[J]. Cells, 2021, 10(7):1639.

[17] Jiang L, Cheng C, Ji W, et al. LINC01116 promotes the proliferation and invasion of glioma by regulating the microRNA-744-5p-MDM2-p53 axis[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5):366.

[18] Zhang L, Liu B, Han J, et al. Competing endogenous RNA network analysis for screening inflammation-related long noncoding RNAs for acute ischemic stroke[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(4):3081-3094.

[19] Liu W, Liang F, Yang G, et al. LncRNA LINC01116 sponges miR-93-5p to promote cell invasion and migration in small cell lung cancer[J]. BMC Pulm Med, 2021, 21(1):50.

[20] Ren P, Chang L, Hong X, et al. Long non-coding RNA LINC01116 is activated by EGR1 and facilitates lung adenocarcinoma oncogenicity via targeting miR-744-5p/CDCA4 axis[J]. Cancer Cell Int, 2021, 21(1):292.

[21] Salem S, Mosaad R. Crosstalk between miR-203 and PKCtheta regulates breast cancer stem cell markers[J]. Ann Hum Genet, 2021, 85(3-4):105-114.

[22] Chen J, Xu Q, Zhang W, et al. MiR-203-3p inhibits the oxidative stress, inflammatory responses and apoptosis of mice podocytes induced by high glucose through regulating Sema3A expression[J]. Open Life Sci, 2020, 15(1):939-950.

[23] Tan J, Wu Z, Liu J, et al. MicroRNA-203-mediated inhibition of doublecortin underpins cardioprotection conferred by sevoflurane in rats after myocardial ischaemia-reperfusion injury[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(17):9825-9838.

[24] Zhong H, Chen H, Gu C. Sevoflurane post-treatment upregulated miR-203 expression to attenuate cerebral ischemia-reperfusion-induced neuroinflammation by targeting MyD88[J]. Inflammation, 2020, 43(2):651-663.