DOI:10. 13880/j. cnki. 65-1174/n. 2026. 22. 019　　文章编号:1007-7383(2026)05-0594-10

# NOX2 作为 miR-532-3p 的靶点介导其对脑缺血再灌注诱导 SH-SY5Y 细胞铁死亡的抑制作用

杨欣原[1],何哲[1],黄金枝[2],于柯伟[2],高蕊[1,2*]
(1 石河子大学医学院,新疆 石河子 832000;2 广东海洋大学滨海农业学院,广东 湛江 524088)

**摘要:目的** 缺血性脑卒中后,神经细胞铁死亡是导致神经功能缺损的关键病理环节。早期干预这一可逆性死亡过程,对于减轻急性期脑损伤、改善长期预后具有重要意义。微小 RNA(MicroRNA,miRNA)在脑缺血后表达谱发生显著变化,然而,miR-532-3p 在脑缺血再灌注后表达变化的生物学意义尚不明确,其能否通过靶向氧化应激关键酶 NADPH 氧化酶 2(NADPH oxidase 2, NOX2)进而影响铁死亡通路未见报道。本研究基于前期课题组测序数据,从 MCAO/R 大鼠皮层组织中筛选出变化显著的 miR-532-3p 及其潜在靶基因 NOX2,旨在阐明二者的靶向调控关系,并进一步明确 miR-532-3p-NOX2 调控轴在缺血性卒中神经细胞铁死亡中的作用。**方法** 线栓法构建大鼠中动脉闭塞再灌注模型(middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R),通过行为学评分及全脑 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色指标评定缺血再灌注模型,应用逆转录实时荧光定量聚合酶链式反应(reverse transcription quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)及蛋白质印迹(Western blot)验证 miR-532-3p 与 NOX2 的表达相关性。预测 miR-532-3p 与 NOX2 的结合位点并比对相关物种保守性,双荧光素酶报告实验验证二者结合位点特异性。构建 SH-SY5Y 细胞系的氧糖剥夺/再灌注(oxygen glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)模型并加入 miR-532-3p 模拟物(mimic)及抑制剂(inhibitor)和 NOX2 小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)验证 miR-532-3p 对 NOX2 的负向表达调控及对体外缺血再灌注模型中氧化应激水平、铁死亡标志物、线粒体状态及细胞活力的影响。**结果** 研究结果显示,在缺血脑组织中,miR-532-3p 的表达水平显著降低($P<0.05$)。该分子能够特异性识别并结合 *NOX2* mRNA 的编码序列(coding sequence, CDS)区,进而负调控 *NOX2* mRNA 翻译效率。在体外模拟缺血再灌注的 OGD/R 模型中,过表达 miR-532-3p 可有效抑制 NOX2 的表达($P<0.05$)。这一调控作用引发了一系列保护性效应:细胞的氧化还原状态得到显著改善($P<0.05$),表现为 NADPH/$NADP^+$比值($P<0.05$)与 GSH/GSSG 比值($P<0.05$)升高;同时,铁死亡进程受到抑制,具体为 GPX4 表达上调($P<0.05$),而细胞内 $Fe^{2+}$水平及脂质过氧化产物水平下降($P<0.05$)。此外,线粒体损伤得到缓解($P<0.05$),神经细胞的存活能力也显著提升($P<0.05$)。**结论** 本研究表明,miR-532-3p 可能通过直接结合并负向调控 NOX2 的表达,从而减弱 NOX2 驱动的氧化应激反应,这一过程或许进一步限制了铁死亡通路的激活。上述发现提示,该调控轴有望成为缺血性脑卒中干预研究的候选方向。

**关键词:**miR-532-3p;NOX2;MCAO/R;OGD/R;铁死亡
**中图分类号:**R743. 3　　**文献标志码:**A

# Mediation by NOX2 of the suppressive effect of miR-532-3p on ferroptosis induced by cerebral ischemia-reperfusion in SH-SY5Y cells

YANG Xinyuan[1], HE Zhe[1], HUANG Jinzhi[2], YU Kewei[2], GAO Rui[1,2*]
(1 School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China; 2 College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

**Abstract: Objective** After ischemic stroke, ferroptosis of neural cells is a key pathological process leading to neurological impairment. Early intervention in this reversible death process is of great significance for reducing acute-phose brain injury and improving long-term prognosis. The expression profile of microRNAs (miRNAs) changes significantly after cerebral ischemia, but the biological significance

**收稿日期:**2026-05-08
**基金项目:**国家自然科学基金项目(32260142);新疆生产建设兵团区域创新引导计划项目(2021BB002)
**作者简介:**杨欣原(2000—),男,硕士研究生,专业方向为生物化学与分子生物学。
*通信作者:高蕊(1980—),女,教授,从事神经系统高发性疾病发病机制的研究,e-mail:gaorui_shz@ sina. com。

of the expression changes of miR-532-3p after cerebral ischemia-reperfusion remains unclear. Whether miR-532-3p can affect the ferroptosis pathway by targeting the key enzyme of oxidative stress, NADPH oxidase 2 (NOX2), has not been reported. Based on the research groups previous sequencing data, this study identified the significantly changed miR-532-3p and its potential target gene NOX2 from the cortical tissues of MCAO/R rats, aimming to clarify the targeted regulatory relationship between them and further determine the role of the miR-532-3p-NOX2 regulatory axis in iron death of neural cells in ischemic stroke. **Methods** A rat model of middle cerebral artery occlusion and Reperfusion (MCAO/R) was established by the suture method. The ischemia-reperfusion model was evaluated by behavioral scoring and whole brain 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining indicators. The correlation between miR-532-3p and NOX2 expression was verified by Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western Blot. The binding sites of miR-532-3p and NOX2 were predicted and the conservation of related species was compared. The specificity of the binding sites was verified by dual-luciferase reporter experiments. The Oxygen Glucose Deprivation/Reperfusion (OGD/R) model of SH-SY5Y cell line was constructed and miR-532-3p mimic and inhibitor and NOX2 small interfering RNA (siRNA) were added to verify the negative expression regulation of miR-532-3p on NOX2 and its effects on oxidative stress levels, ferroptosis markers, mitochondrial status and cell viability in the in vitro ischemia-reperfusion model. **Results** The results showed that the expression level of miR-532-3p was significantly decreased in ischemic brain tissue ($P<0.05$). This molecule could specifically recognize and bind to the coding sequence (CDS) region of *NOX2* mRNA, thereby inhibiting its expression. In the OGD/R model simulating ischemia-reperfusion in vitro, overexpression of miR-532-3p effectively inhibited the expression of NOX2 ($P<0.05$). This regulatory effect triggered a series of protective effects: the redox state of cells was significantly improved ($P<0.05$), manifested as an increase in the NADPH/$NADP^+$ ratio ($P<0.05$) and the GSH/GSSG ratio ($P<0.05$); at the same time, the ferroptosis process was inhibited, specifically, the expression of GPX4 was upregulated ($P<0.05$), while the intracellular $Fe^{2+}$ level and lipid peroxidation product levels decreased ($P<0.05$). In addition, mitochondrial damage was alleviated ($P<0.05$), and the survival ability of neural cells was significantly enhanced ($P<0.05$). **Conclusion** This study indicates that miR-532-3p may directly bind to and negatively regulate the expression of NOX2, thereby weakening the oxidative stress response driven by NOX2. This process may further limit the activation of the ferroptosis pathway. These findings suggest that this regulatory axis is expected to be a candidate direction for intervention studies in ischemic stroke.

**Key words**: miR-532-3p;NOX2;MCAO/R;OGD/R;ferroptosis

卒中在全球非传染性疾病中位列死因第二,并居伤残调整寿命年第三位[1]。其本质为脑血管急性闭塞或狭窄导致的脑组织低灌注,引发神经细胞缺血坏死[2]。病灶分为缺血核心与半暗带,后者因侧支循环保留部分代谢活性,是再灌注治疗的关键靶区[3]。然而,目前针对半暗带的有效干预手段仍十分有限,成为临床实践的瓶颈[4]。铁死亡作为一种铁依赖性程序性细胞死亡,在再灌注损伤中促进神经细胞死亡,抑制该过程可减轻损伤,为临床干预提供潜在方向[5-6]。

铁死亡是一种铁依赖性、脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡形式,近年来在卒中研究领域受到广泛关注。卒中发生后,血脑屏障完整性遭到破坏,导致脑毛细血管内皮细胞中蓄积的铁蛋白和游离铁与血浆中的铁蛋白共同进入缺血半暗带,形成病理性铁超载[2]。同时,缺血半暗带中的神经细胞氧化应激水平增高[7]。最终,铁蓄积及氧化-抗氧化系统失衡导致氧化还原活性铁增加,引发芬顿反应并产生大量羟基自由基,通过氧化应激和脂质过氧化作用导致细胞死亡[8]。实验证实,有效抑制铁死亡相关通路能够显著减小脑梗死体积,改善神经行为学评分并减少神经细胞死亡[9]。

MicroRNA 是一类长约 22 个核苷酸的非编码 RNA,通过影响靶基因 mRNA 的稳定性或翻译效率在转录后水平调控基因表达。在急性缺血性卒中中,多种 miRNA 已被证实参与病理过程的调节。研究表明,在大脑中动脉闭塞再灌注模型(middle cerebral artery occlusion and reperfusion, MCAO/R)模型大鼠脑内,miR-19a/b-3p 表达显著上调,通过抑制 SIRT1 基因进而影响 FoxO3/SPHK1 信号轴,促进缺血再灌注过程中的炎症反应[10]。丹参酮 IIA 可上调 miR-124-5p 表达,后者靶向负调控 FoxO1 基因,参与脑缺血再灌注损伤保护;抑制 miR-124-5p 或过表达 FoxO1 均可逆转该保护效应,表明 miR-124-5p/FoxO1 轴发挥关键作用[11]。在 MCAO/R 大鼠脑组织及 OGD 处理皮质神经元中,miR-149-5p 表达显著下调,过表达该 miRNA 通过靶向 Notch2 受体减轻 Notch 信号通路介导的炎症反应和细胞凋亡[12]。然而,目前关于 miRNA 在卒中后铁死亡这一新型细胞死亡方式中的具体调控作用,其

分子机制尚待深入探索。

在前期研究中,我们通过对大脑中动脉闭塞再灌注模型大鼠脑皮层组织进行转录组测序分析,发现与对照组相比,MCAO/R 组中 miR-532-3p 的表达水平出现显著下调[13]。然而,该 miRNA 在脑缺血病理过程中的下游作用靶点及其具体生物学功能尚未明确。基于此,本研究借助生物信息学工具对其潜在靶基因进行系统性预测,并通过分子生物学实验加以验证,最终揭示了一条新的调控通路,miR-532-3p 可通过靶向抑制 NOX2 表达,进而调节活性氧生成,参与缺血性脑卒中铁死亡过程的调控。

# 1 材料与方法

## 1.1 主要材料

本研究所用的实验动物为 8~9 周龄、体重约 250 g 的雄性斯普拉格-多雷(Sprague-Dawley, SD)大鼠,购自新疆疾病预防与控制中心实验动物中心。所有大鼠均饲养于新疆农垦科学院动物中心的 SPF 级屏障环境中,环境条件严格控制为温度 21±2 ℃、湿度 60%±10%、12 h 明暗交替光照循环,并自由获取标准饲料与饮用水。本研究的全部动物实验操作方案均已获得石河子大学医学院第一附属医院动物伦理委员会的审查与批准,批准编号为 A2022-037-01,所有程序均遵循美国国家研究委员会《实验动物护理和使用指南》进行。实验中用到的 293T 人肾上皮细胞与 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞系由石河子大学医学院生物化学教研室惠赠。MiR-532-3p 模拟物(mimic)、miR-532-3p 抑制剂(inhibitor)、NOX2 抑制剂(si-NOX2)及其阴性对照(NC)、NOX2 野生型与突变型报告基因质粒由上海吉玛基因有限公司合成提供。细胞转染实验所使用的 Lipofectamine™ 3 000 转染试剂购自 Thermo Fisher 公司。NOX2 抗体(19013-1-AP,1∶2 000)与 GPX4 抗体(67763-1-Ig,1∶2 000)采购自武汉三鹰,β-actin 抗体(TA-09,1∶2 000)、辣根酶标记山羊抗大鼠 IgG(ZB-2307,1∶5 000)与辣根酶标记山羊抗兔 IgG(ZB-2301,1∶5 000)采购自北京中杉金桥生物技术公司。依据说明书使用丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成,A003-1)、脂质过氧化检测试剂盒(索莱宝,S0043S)、CCK-8(东仁,CK04-500T)、台盼蓝试剂(索莱宝,C0040-100mL)、线粒体膜电位检测试剂盒(boxbio,AKOP013-1)、NADPH/$NADP^+$检测试剂盒(碧云天,S0179)、GSH 和 GSSG 检测试剂盒(碧云天,S0053)以及亚铁离子含量检测试剂盒(boxbio,AKIC004M)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 MCAO/R 模型构建

采用改良线栓法建立 SD 大鼠大脑 MCAO/R 模型。健康雄性 SD 大鼠(220~300 g)术前禁食 12 h,经腹腔注射丙泊酚(广东嘉博制药有限公司,中国)(10~12 $mg\cdot kg^{-1}$)麻醉后固定于 37 ℃恒温手术台。颈部术区剃毛消毒,于颈正中线左侧作 25 mm 纵向切口,钝性分离胸锁乳突肌与胸骨舌骨肌肌间隙,暴露颈动脉鞘。精细分离颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)及颈外动脉(external carotid artery, ECA)分支,结扎 ECA 远端,微动脉夹暂时阻断 CCA 近心端及 ICA。在 ECA 距 CCA 分叉 4.0 mm 处制造 30°斜切口,植入标准化硅胶涂层线栓[直径(0.26±0.02)mm,北京西浓科技有限公司,中国],沿 ICA 轻柔推进至(18.0±0.5)mm 深度,当略有阻力时停止插栓。持续闭塞 120 min 后匀速拔栓建立再灌注。假手术组除省略线栓插入步骤外,严格复制相同血管暴露与机械操作流程。术后 24 h 行 Longa 评分,Longa 评分为 1~3 分视为造模成功。

### 1.2.2 神经行为学评分

在撤除线栓并进行 24 h 血液再灌注后,对 MCAO/R 模型大鼠进行评分。采用 Longa 评分来评估模型的有效性。为了避免主观偏差,所有评分工作交给由对实验细节不知情的研究人员独立完成。Longa 评分标准:0 分:大鼠未出现神经功能缺损;1 分:大鼠缺血表现对侧前肢无法完全伸展;2 分:大鼠在行走时倾向于朝瘫痪侧打转;3 分:大鼠行走时向瘫痪侧倾倒;4 分:大鼠无法自发行走、且伴随意识丧失甚至死亡。

### 1.2.3 细胞培养及转染

细胞培养及转染,序列详见表 1。

表 1 siRNA

Table 1 siRNA

| 名称 | 序列(5′-3′) |
|---|---|
| inhibitor | UGCAAGCCUUGGGUGUGGGAGG |
| mimic | CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA |
| NC | UUCUCCGAACGUGUCACGUTT |
| si-NOX2 | AUUAUAUUUAGGCUCAUCGTT |

细胞均在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 ℃、5% $CO_2$ 条件下进行常规培养。为调控 miR-532-3p 表达,将处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞以 $2\times10^6$/孔的密度接种于 6 孔板,培养至 70%~

80%融合度后,利用 Lipofectamine 3000 将化学合成的 miR-532-3p mimic/inhibitor 或其阴性对照,序列详见表 1,转染入细胞,转染后通过 qRT-PCR 验证其表达变化。

### 1.2.4　RT-qPCR

使用 Trizol 法提取总 RNA,使用 NanoDrop 微量分光光度计(赛默飞,美国)RNA 纯度与完整性。总 RNA 用于高通量全转录组测序、逆转录以及 RNA 酶消化实验。采用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)试剂盒(Takara, RR047A)进行逆转录。实时荧光定量 PCR (qPCR)采用 TB Green® Premix Ex Taq™ II 试剂盒(Takara, RR820A)进行。按照说明书的说明进行反应体系的配置。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算其相对表达水平。引物(吉玛基因,中国)详见表 2。

表 2　引物序列

Table 2　Primer sequences

| 名称 | 序列(5′-3′) | 产物长度/nt |
|---|---|---|
| miR-532-3p | F:GCCTCCCACACCCAAGG<br>R:AGTGCAGGGTCCGAGGTATT | 50 |
| miR-532-3p-RT | GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAG-GTATTCGCACTGGATACGACTGCAAG | 50 |
| *NOX2* mRNA | F:GAAACCCTCCTATGACTTGG<br>R:CATCTTGGAACTCCTGCTT | 146 |
| β-actin | F:CACCCGCGAGTACAACCTTC<br>R:CCCATACCCACCATCACACC | 209 |
| U6 | F:GCCCTGTGCAAGGATGACA<br>R:GAACGCATCAGGAATCTG | 68 |

### 1.2.5　2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC)染色

牺牲大鼠后,迅速于冰上解剖并摘取全脑组织,将其置于无菌培养皿中移入 -20 ℃ 环境冷冻处理 25 min 以固形。随后在冷冻台表面,沿大脑冠状面连续切割制备 2 mm 厚度组织切片。将切片完全浸没于 37 ℃ 预温的 2% TTC 染液(索莱宝,298-96-4)中避光孵育 20 min,其间适时翻面确保双面均匀着色。染色结束后,立即将脑片移入 4% 多聚甲醛固定液(索莱宝,P1117)中,于 4 ℃条件下固定 24 h。待固定完成,对脑片进行拍摄。最终应用 Image J 软件对获取图像进行灰度值扫描,精确定量脑梗死区域体积并计算其相对全脑体积百分比。

### 1.2.6　双荧光素酶报告基因实验

委托吉玛基因将 *NOX2* mRNA CDS 区序列中含有预测 miR-532-3p 结合位点的野生型片段 (WT)或对该结合位点进行了关键碱基突变的片段(MUT),分别克隆入 GP-miRGLO 载体骨架,分别命名为 NOX2-WT 载体和 NOX2-MUT 载体。随后,在 293T 细胞中,将 miR-532-3p 模拟物或阴性对照 miRNA 模拟物 (miR-NC) 分别与前述构建好的报告载体进行配对共转染。完成转染操作 48 h 后,收集细胞样本,遵照 Promega(中国)公司提供的荧光素酶报告基因检测试剂盒说明书操作流程,使用多功能酶标仪(Thermo Fisher Scientific,美国)对细胞裂解液的萤光素酶活性进行定量测定。

### 1.2.7　Western blot

组织或细胞样本采用含苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)的 RIPA 裂解液(索莱宝,R0010)进行充分裂解,4 ℃、12 000 $r\cdot min^{-1}$ 离心 10 min 后收集上清。不含不包括线粒体的胞浆胞浆蛋白的提取采用细胞线粒体分离试剂盒(碧云天,C3606)提取。使用 BCA 蛋白定量试剂盒(索莱宝,PC0040)测定总蛋白浓度,统一调整至等浓度体系。取 30 μg 蛋白样本与 5×上样缓冲液混匀,100 ℃ 沸水浴变性处理 10 min。采用 12% SDS-PAGE 凝胶(赛维尔,G2186-50T)进行垂直电泳(赛维尔,G2081-1L),按照说明书进行电泳设置。经 400 mA 恒流转膜 30 min(赛维尔,G2028-1L),将蛋白转移至 0.45 μm PVDF 膜(索莱宝,IPVH00010)上。转印完成后,PVDF 膜在含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液(20 $mmol\cdot L^{-1}$ Tris-HCl, 150 $mmol\cdot L^{-1}$ NaCl, 0.1% Tween-20, pH 7.5)中室温封闭 2 h。封闭后的膜依次进行:a)4 ℃条件下与特异性一抗(NOX2 多克隆抗体(1∶2 000,19013-1-AP;Proteintech),GPX4 多克隆抗体(1∶2 000,30388-1-AP;Proteintech), β-actin 大鼠单克隆抗体(1∶2 000,TA-09;中杉金桥))孵育过夜(12~16 h);b)TBST 洗膜 3 次(每次 10 min);c)室温孵育 HRP 标记二抗(辣根酶标记山羊抗大鼠 IgG (1∶5 000,ZB-2307;中杉金桥)或辣根酶标记山羊抗兔 IgG(1∶5 000,ZB-2301;中杉金桥))(1∶5 000~1∶2 000)2 h。二抗孵育后经 TBST 彻底清洗,使用 Immobilon Western 化学发光底物(雅酶,SQ201)进行显影反应。显影结果通过化学发光成像仪(Bio-rad 公司,美国)采集,采用 ImageJ 软件定量分析目的条带灰度值,实验数据均以大鼠抗 β-actin 抗体作为内参进行标准化校正。每组实验均设置 3 次独立生物学重复。

### 1.2.8　统计学方法

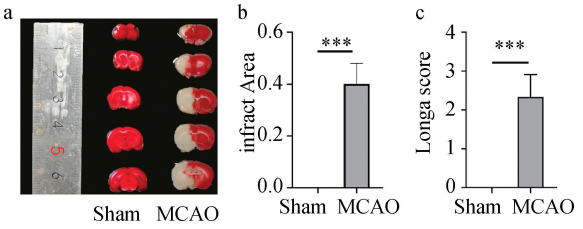
使用 SPSS 23.0 软件对实验数据进行统计学分析后用 GraPhpad Prism 9.0 绘图,数据分析连续性

计量资料以均数±标准差(mean±*SD*)表示,3 组及以上非配对组间比较,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。两组间样本间比较采用 *t* 检验。非连续计数资料的组间比较采取非参数 Mann-Whitney *U* 方法检验。所有统计学分析结果以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 大鼠 MCAO/R 2 h/R 24 h 模型的成功构建

我们成功建立了 MCAO/R 大鼠模型以模拟急性脑缺血。形态学上,TTC 染色显示模型组大鼠患侧脑组织存在大片梗死(图 1a),梗死体积定量达全脑的 40%($P<0.001$)(图 1b)。功能上,模型组大鼠表现出显著的神经功能缺损,其 Longa 评分较假手术组显著增高($P<0.001$)(图 1c)。该模型为后续机制研究提供了可靠基础。



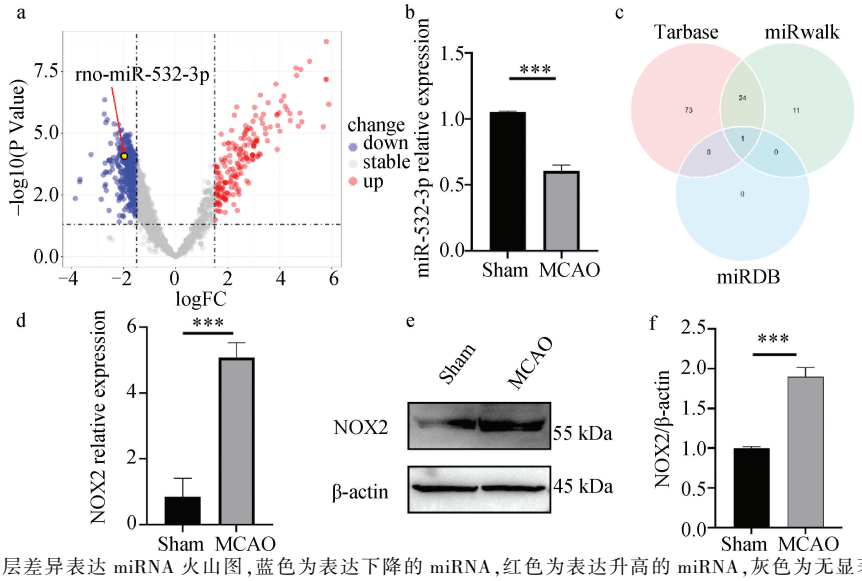

a:MCAO/R 2 h/R 24 h 大鼠脑切片 TTC 染色图;b:MCAO/R 2 h/R 24 h 大鼠脑切片 TTC 染色梗死区域灰度值量化;c:MCAO 2 h/R 24 h 大鼠 Longa 评分。所有数据均为 $\bar{x}\pm SD$($n=3$),*U* 检验,*** 表示 $P<0.001$。

图 1 大鼠 MCAO/R 2 h/R 24 h 模型评估

Figure 1 Evaluation of the rat MCAO/R 2 h/R 24 h model

### 2.2 miR-532-3p 及其下游 NOX2 在 MCAO/R 大鼠脑皮层中表达趋势的验证

基于前期全转录组测序数据[13],本研究筛选出表达显著下调的关键分子 miR-532-3p(图 2a)。qRT-PCR 结果证实,与假手术组相比,MCAO/R 模型组大鼠脑皮层中 miR-532-3p 的表达水平明显降低($P<0.001$),与测序数据趋势一致(图 2b)。




a:MCAO/R 大鼠脑皮层差异表达 miRNA 火山图,蓝色为表达下降的 miRNA,红色为表达升高的 miRNA,灰色为无显著差异表达的 miRNA;b:MCAO/R 大鼠脑皮层 miR-532-3p 表达趋势;c:3 款软件预测 miR-532-3p 下游靶基因;d:MCAO/R 大鼠脑皮层 *NOX2* mRNA 表达趋势;e:MCAO/R 大鼠脑皮层 NOX2 蛋白表达趋势;f:图 e 灰度值扫描量化分析。所有数据均为 $\bar{x}\pm SD$($n=3$),独立样本 *t* 检验,*** 表示 $P<0.001$。

图 2 MCAO/R 大鼠脑皮层 miR-532-3p 表达及其下游预测

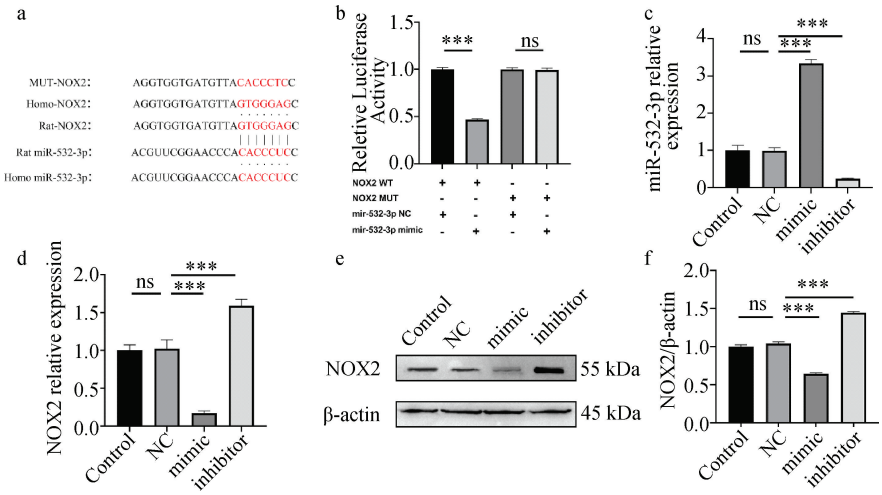
Figure 2 Expression of miR-532-3p in the cerebral cortex of MCAO/R rats and its downstream prediction

为探索其下游调控机制,我们联合使用 Tarbase(https://dianalab.e-ce.uth.gr/tarbasev9)、miRWalk(http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/)以及 miRDB(https://mirdb.org/)3 个生物信息学平台进行靶基因预测,预测结果表明 NOX2 基因可能为 miR-532-3p 的潜在作用靶点(图 2c)。进一步实验验证发现,MCAO/R 处理后大鼠脑皮层组织中 NOX2 的 mRNA 表达显著上调($P<0.001$)(图 2d)。Western blot 检测结果同样显示,NOX2 蛋白表达水平在模型组中明显升高($P<0.001$)(图 2e—2f)。上述结果表明,miR-532-3p 与 NOX2 在脑缺血再灌注损伤中呈现显著的负相关表达模式,结合生物信息学预测,提示 miR-532-3p 可能通过负调控 NOX2 参与缺血后神经损伤的病理进程。

### 2.3 miR-532-3p 具有物种间保守性且与 NOX2 特异性结合

为了进一步验证 miR-532-3p 与 NOX2 预测结果,我们对其结合位点进行了预测。预测结果表明,

人与大鼠的 miR-532-3p 与 NOX2 CDS 区的结合位点具有高度的物种间保守性(图 3a)。随后的双荧光素酶报告基因实验显示,野生型 NOX2 可以被 miR-532-3p 显著减弱荧光活性($P<0.001$),而突变型则保持其荧光活性不变(图 3b)。基于此,我们进一步在 SH-SY5Y 细胞系中成功构建了 miR-532-3p 敲低与过表达模型(图 3c)。在 miR-532-3p 的敲低与过表达模型中,我们发现,过表达 miR-532-3p 可以降低 *NOX2* mRNA 的表达量($P<0.001$),敲低 miR-532-3p 则可以促进 *NOX2* mRNA 表达量升高($P<0.001$)(图 3d)。同样处理下,NOX2 蛋白表达与 mRNA 表达趋势一致(图 3e—3f)。



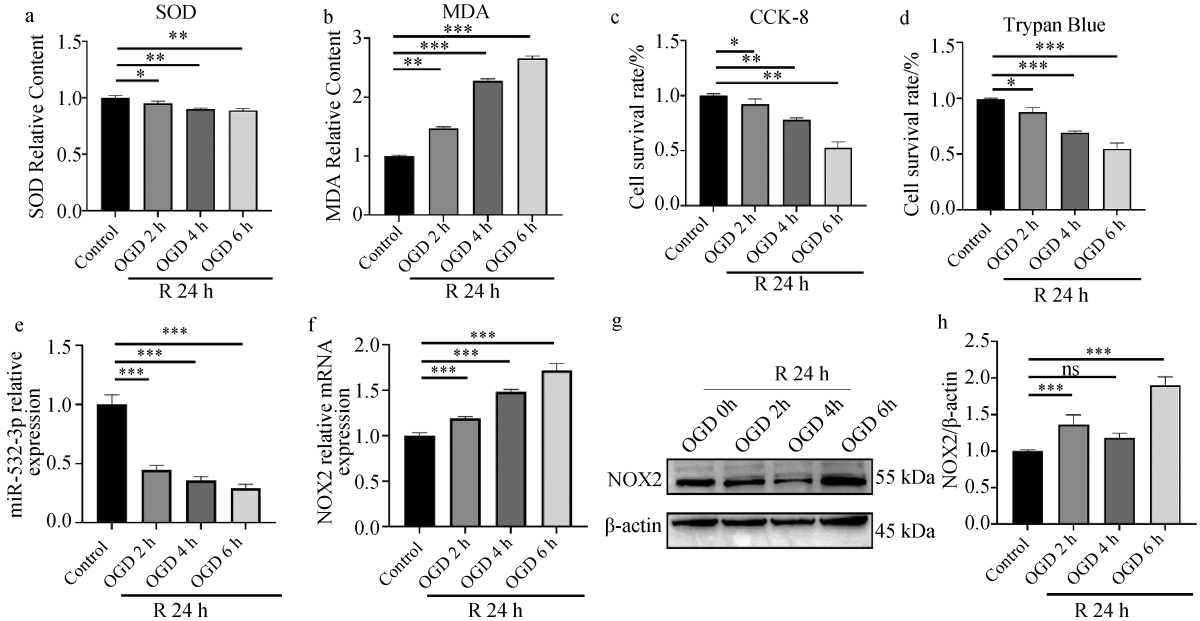

a:NOX2 与 miR-532-3p 结合位点预测及人与大鼠结合位点同源性预测,MUT 为 NOX2 结合位点突变;b:双荧光素酶报告基因实验验证 NOX2 与 miR-532-3p 特异性结合;c:验证 miR-532-3p mimic 与 inhibitor 转染效能;d. 转染 miR-532-3p mimic 与 inhibitor 细胞中 *NOX2* mRNA 表达趋势;e:转染 miR-532-3p mimic 与 inhibitor 细胞中 NOX2 蛋白表达趋势;f:图 e 量化结果。所有数据均为 $\bar{x}\pm SD$($n=3$),独立样本 $t$ 检验,方差分析,*** 表示 $P<0.001$。

**图 3　miR-532-3p 人鼠同源性及与 NOX2 靶向结合的验证**

Figure 3　Verification of the homology of miR-532-3p between humans and mice and its targeted binding to NOX2

## 2.4　SH-SY5Y OGD/R 模型构建成功

为探究 miR-532-3p 与 NOX2 在神经细胞缺血模型中的表达特征,本研究采用 OGD/R 处理 SH-SY5Y 细胞。实验结果表明,随着 OGD 时间延长,SOD 活性显著降低($P<0.01$)(图 4a),MDA 含量明显升高($P<0.001$)(图 4b),证实氧化应损伤随缺氧缺




a:超氧化物歧化酶(SOD)活性;b:丙二醛(MDA)含量;c:CCK-8 法检测细胞存活率;d:台盼蓝拒染检测细胞存活率;e:miR-532-3p 表达水平;f:*NOX2* mRNA 表达量;g:NOX2 蛋白表达水平;h:图 c 的蛋白条带灰度值定量分析。所有数据均为 $\bar{x}\pm SD$($n=3$),方差分析,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$。

**图 4　SH-SY5Y 细胞在 OGD/R 处理不同时长下的检测指标**

Figure 4　Detection indicators of SH-SY5Y cells under different durations of OGD/R treatment

糖时间延长呈依赖性增强。

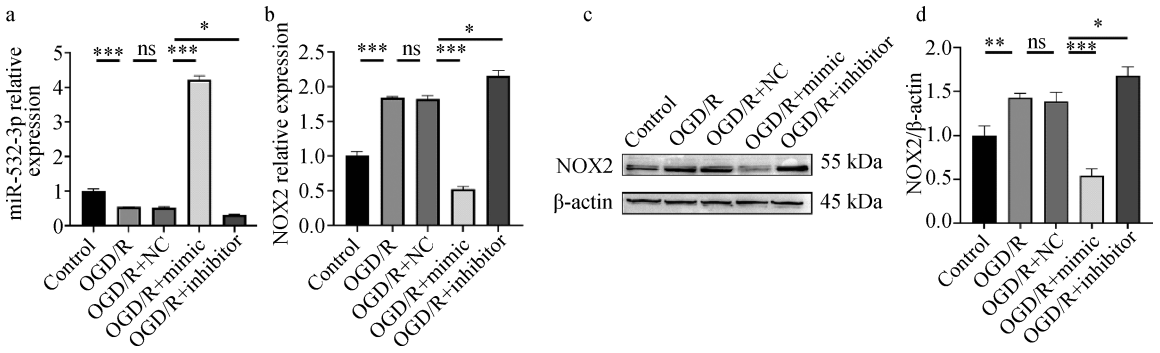
通过 CCK-8 法和台盼蓝拒染实验评估细胞存活率发现,随着处理时间的延长,细胞存活率逐渐降低($P<0.001$),在 OGD 处理 6 h 复氧 24 h 后,细胞存活率降至约 50%($P<0.001$)(图 4c、4d)。在分子表达层面,miR-532-3p 表达量随 OGD 时间延长而递减,在 OGD 6 h/R 24 h 时达到最低($P<0.001$)(图 4e);*NOX2* mRNA 和蛋白表达则呈现递增趋势,在相同时间点达到最大值($P<0.001$)(图 4f—4h),因此选择 OGD 6 h/R 24 h 作为 OGD/R 模型时间点。这些发现说明 OGD/R 模型能有效模拟缺血再灌注损伤过程,且 miR-532-3p/NOX2 的表达变化趋势与大鼠在体实验结果具有一致性。

## 2.5 在缺氧再关注损伤中 miR-532-3p 具有负向调控 NOX2 表达的功能

为明确 miR-532-3p 在缺血性卒中条件下对 NOX2 的调控作用,本研究在 OGD/R 模型基础上分别转染 miR-532-3p mimic 和 inhibitor 进行功能验证。

实验数据显示,与 Control 组相比,OGD 6 h/R 24 h 处理组中 miR-532-3p 表达显著降低($P<0.001$);OGD/R + NC 组与 OGD 6 h/R 24 h 组间无显著差异;而 mimic 组 miR-532-3p 表达较 NC 组显著上调($P<0.001$),inhibitor 组则出现显著下调($P<0.05$)(图 5a)。在 NOX2 表达层面,OGD/R 组中其 mRNA 和蛋白水平均显著升高,NC 组与 OGD/R 组无统计学差异;与 NC 组相比,mimic 组 NOX2 的转录和翻译水平均显著抑制($P<0.001$),inhibitor 组则呈现显著增强($P<0.05$)(图 5b—5d)。

这些结果证实 miR-532-3p 在 OGD/R 神经细胞模型中能够负向调控 NOX2 的表达。




a:miR-532-3p 的表达趋势验证;b:*NOX2* mRNA 的表达趋势验证;c:NOX2 蛋白的表达趋势验证;d:图 c 量化分析。所有数据均为 $\bar{x}\pm SD$($n=3$),方差分析,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$。

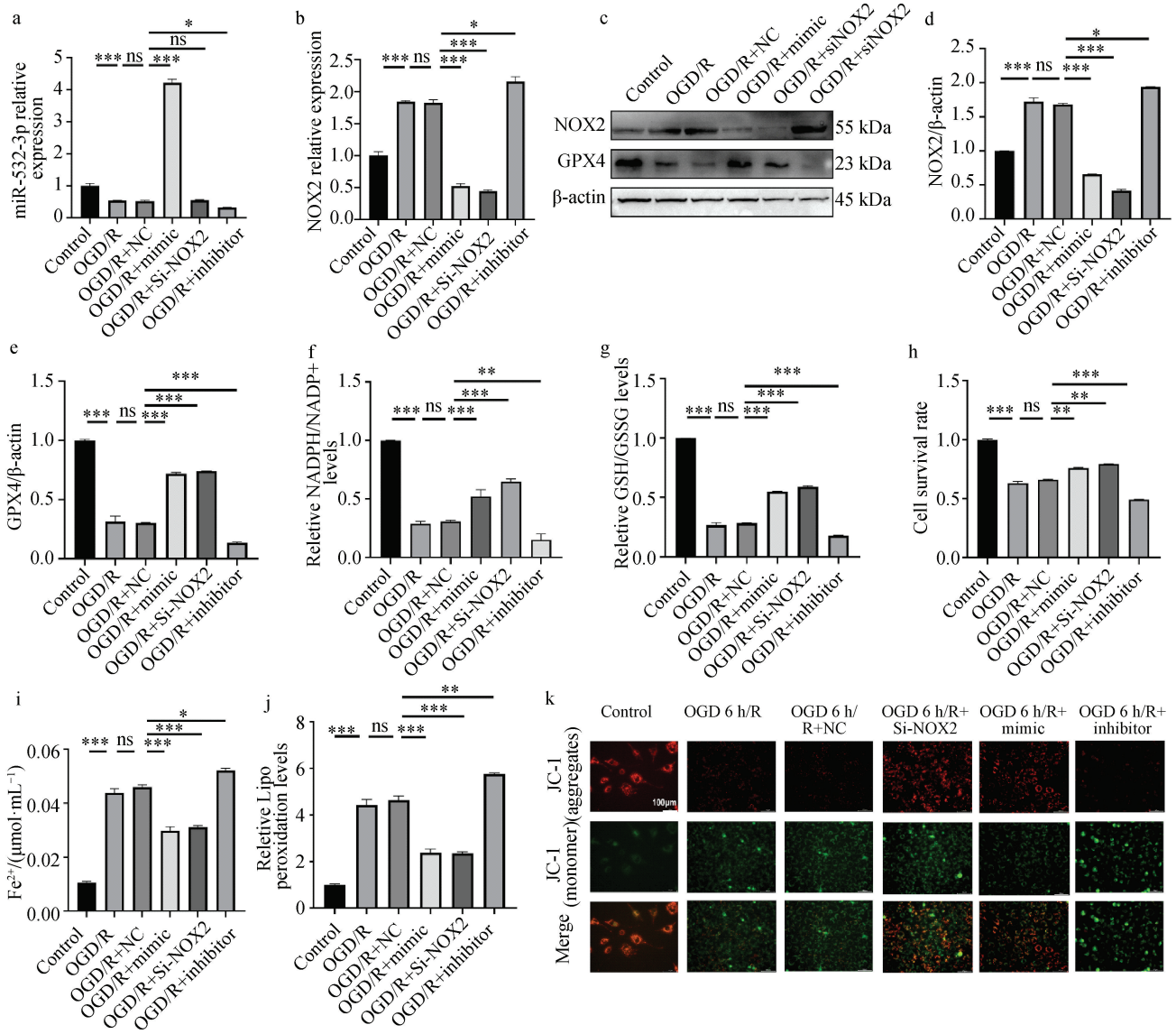
**图 5 SH-SY5Y 细胞系 OGD6 h/R 24 h 处理并敲低或过表达 miR-532-3p**

Figure 5 SH-SY5Y cell line treated with OGD for 6 hours/R for 24 hours and with miR-532-3p knocked down or overexpressed

## 2.6 过表达 miR-532-3p 通过抑制 NOX2 表达缓解细胞铁死亡

为验证 miR-532-3p 是否通过调控 NOX2 表达参与铁死亡过程,本研究应用 miR-532-3p 干预进行功能验证。实验结果显示,miR-532-3p 过表达可显著提升其表达水平($P<0.001$),而抑制剂处理则显著降低其表达($P<0.05$),si-NOX2 转染未对 miR-532-3p 表达产生明显影响(图 6a)。*NOX2* mRNA 水平在 miR-532-3p 过表达组显著下降($P<0.001$),抑制剂组则显著上升($P<0.05$),si-NOX2 组也成功实现敲低效果($P<0.001$)(图 6b)。蛋白印迹分析表明 NOX2 蛋白变化趋势与 mRNA 一致($P<0.001$);铁死亡关键蛋白 GPX4 在 OGD/R 组表达显著下调($P<0.001$),而过表达 miR-532-3p 或敲低 NOX2 均可使其表达恢复,抑制 miR-532-3p 则进一步加剧其下调($P<0.001$)(图 6c—6e)。为评估 NOX2 活性,进一步检测 NADPH/$NADP^+$比值,发现 OGD/R 组与 NC 组比值均显著降低($P<0.001$),而过表达 miR-532-3p 或敲低 NOX2 可部分恢复该比值($P<0.001$),抑制剂处理则使比值进一步下降($P<0.01$),表明过表达 miR-532-3p 与敲低 NOX2 均可抑制 NOX2 的活性[14](图 6f)。GSH/GSSG 比值变化趋势与之类似($P<0.001$),表明过表达 miR-532-3p 与敲低 NOX2 均可改善缺血再灌注细胞的氧化应激水平(图 6g)。细胞存活率检测显示,过表达 miR-532-3p 或敲低 NOX2 均能显著改善细胞存活,而抑制 miR-532-3p 则加剧细胞死亡($P<0.05$)(图 6h)。亚铁离子检测表明,OGD/R 处理显著提升亚铁离子水平($P<0.05$),干预 miR-532-3p 或 NOX2 可有效逆转这一变化($P<0.05$)(图 6i)。脂

质过氧化水平在 OGD/R 组显著升高,干预 miR-532-3p 或 NOX2 可有效抑制该过程(图 6j)。JC-1 染色显示,过表达 miR-532-3p 或敲低 NOX2 能显著恢复线粒体膜电位(图 6k)。综上,过表达 miR-532-3p 通过负向调控 NOX2 表达,可有效缓解缺血性卒中诱导的铁死亡,具体表现为提高细胞存活率、抑制 NOX2 活性、改善抗氧化能力、降低亚铁离子累积、减轻脂质过氧化及稳定线粒体膜电位。




a:miR-532-3p 表达趋势;b:*NOX2* mRNA 表达;c:NOX2 和 GPX4 蛋白表达;d:NOX2 蛋白灰度定量;e:GPX4 蛋白灰度定量;f:NADPH/NADP$^+$比值检测;g:GSH/GSSG 比值检测;h:CCK-8 细胞活性;i:细胞内 $Fe^{2+}$浓度;j:脂质过氧化指标;k:JC-1 线粒体膜电位检测。所有数据均为 $\bar{x}\pm SD$($n=3$),方差分析,* 表示 $P<0.05$,** 表示 $P<0.01$,*** 表示 $P<0.001$。

**图 6　敲低/过表达 miR-532-3p 通过调控 NOX2 表达可调控铁死亡通路**

Figure 6　Knockdown/overexpression of miR-532-3p can regulate the ferroptosis pathway by modulating the expression of NOX2

## 3　讨论

近年来,虽然针对缺血性卒中的治疗策略已取得显著进步,但由于该疾病病理机制的复杂性,目前仍缺乏能够系统阐释其分子通路的完整理论体系,许多关键机制尚未明确[15]。在卒中研究领域,大鼠大脑中动脉闭塞再灌注模型被公认为理想的动物实验模型,该模型通过阻断大脑中动脉血流以模拟卒中发生,并可移除栓子实现再灌注过程[16]。此外,糖氧剥夺/复糖复氧细胞模型也被广泛采用,通过置换无糖培养基并结合缺氧环境模拟卒中急性期,再通过恢复完全培养基和正常培养条件模拟再灌注损伤[17]。本研究成功建立了 MCAO/R 动物模型和 OGD/R 细胞模型,为后续分子机制的深入验证提供

了可靠且公认的研究工具。

缺血性卒中的病理机制涉及氧化应激、炎症反应、铁死亡等多种级联事件,其中铁死亡作为一种铁依赖性的脂质过氧化驱动的新型细胞死亡方式,已成为神经保护研究的热点[6,18]。急性缺血性卒中发生后,会迅速形成因缺血导致的核心梗死区,该区域细胞已发生不可逆死亡,临床干预价值有限;而在核心区周边存在依靠侧支循环供血的缺血半暗带,该区域内细胞呈现渐进性程序性死亡特征,早期积极治疗对患者神经功能恢复至关重要[19-22]。本研究在 MCAO/R 动物模型和 OGD/R 细胞模型的基础上,首次揭示了 miR-532-3p 通过靶向 NOX2 mRNA 的 CDS 区负调控其表达,进而抑制神经细胞铁死亡的新机制。这一发现为理解卒中后铁死亡的调控网络提供了新的视角,并提示 miR-532-3p 可能成为潜在的干预靶点。

NOX2 是 NADPH 氧化酶家族在中枢神经系统中的主要亚型,其异常激活产生的超氧阴离子是细胞内 ROS 的重要来源,已被证实参与卒中后神经元损伤和铁死亡过程[23-25]。既往研究多聚焦于药物或基因沉默手段直接抑制 NOX2 活性[24],而对其上游内源性调控机制的认识相对有限。本研究证明,miR-532-3p 作为 NOX2 的内源性抑制因子,在卒中模型中表达显著下调,其缺失可能导致 NOX2 去抑制性升高,从而加剧铁死亡。这一发现不仅填补了 miRNA 调控 NOX2 参与铁死亡的知识空白,也为开发基于 miRNA 的卒中治疗策略提供了候选分子。

值得注意的是,多项研究已报道 miRNA 在卒中中的保护作用,例如 miR-27b 通过靶向 AMPK 改善神经功能[26],miR-181b 通过 PTEN/Akt 通路促进血管生成[27],miR-27a 通过抑制轴突生长抑制因子促进轴突重塑[28]。然而,这些研究大多关注 miRNA 对凋亡、自噬或血管生成的调控,鲜有涉及铁死亡。此外,已有研究表明 miRNA 也可通过结合靶基因的 CDS 区发挥调控作用[29]。这种非经典结合模式可能赋予 miR-532-3p 独特的调控特性,例如不受 3' UTR 长度或可变剪接的影响。本研究将 miRNA 调控与铁死亡联系起来,拓展了 miRNA 在卒中中的作用范畴。此外,本课题组前期发现 miR-532-3p 在其他疾病模型中亦参与氧化应激调控,本研究进一步将其功能延伸至中枢神经系统,显示了该分子的多效性潜力。

本研究为急性缺血性卒铁死亡的发生机制提供了新的理论视角。然而,研究仍存在一定局限性。尽管体外实验取得了良好结果,但尚未在动物模型层面进行验证,该 miRNA 在急性缺血性卒中患者体内是否呈现相似表达规律及功能特性仍有待探究。综上所述,本研究明确了 miR-532-3p 通过靶向调控 NOX2 表达,降低 NOX2 表达量,提高 GSH/GSSG 比值,以此减轻氧化应激水平,提高 GPX4 表达水平,减少亚铁离子丰度,降低了脂质过氧化水平,减少了线粒体损伤,有效抑制急性缺血性卒中诱导的神经细胞铁死亡进程,减少神经细胞死亡。

## 参考文献(References)


[1] Feigin V L, Brainin M, Norrving B, et al. World stroke organization: Global stroke fact sheet 2025 [J]. Int J Stroke, 2025, 20(2): 132-144.

[2] Fei Y, Leng Q. Research progress of ferroptosis in cerebral infarction [J]. Brain Behav, 2026, 16(1): e71192.

[3] Chalet L, Boutelier T, Christen T, et al. Clinical imaging of the penumbra in ischemic stroke: From the concept to the era of mechanical thrombectomy [J]. Front Cardiovasc Med, 2022(9): 861913.

[4] Wassélius J, Arnberg F, Von Euler M, et al. Endovascular thrombectomy for acute ischemic stroke [J]. J Intern Med, 2022, 291(3): 303-316.

[5] Hou L, Li X, Su C, et al. Current status and prospects of research on ischemia-reperfusion injury and ferroptosis [J]. Front Oncol, 2022(12): 920707.

[6] Hu X, Bao Y, Li M, et al. The role of ferroptosis and its mechanism in ischemic stroke [J]. Exp Neurol, 2024(372): 114630.

[7] Kamal F Z, Lefter r, Jaber H, et al. The role of potential oxidative biomarkers in the prognosis of acute ischemic stroke and the exploration of antioxidants as possible preventive and treatment options [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(7):6389.

[8] Delgado-martín S, Martínez-ruiz A. The role of ferroptosis as a regulator of oxidative stress in the pathogenesis of ischemic stroke [J]. FEBS Lett, 2024, 598(17): 2160-2173.

[9] Ye Y, Xie X, Bi Y, et al. Nrf2 alleviates acute ischemic stroke induced ferroptosis via regulating xCT/GPX4 pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2025(231): 153-162.

[10] Zhou F, Wang Y K, Zhang C G, et al. miR-19a/b-3p promotes inflammation during cerebral ischemia/reperfusion injury via SIRT1/FoxO3/SPHK1 pathway [J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 122.

[11] Su W, Lyu M, Wang D, et al. Tanshinone IIA allevi-

ates traumatic brain injury by reducing ischemia-reperfusion via the miR-124-5p/FoxO1 axis [J]. Mediators Inflamm, 2024(24): 7459054.

[12] Wang X, Xu Q, Wang S. Overexpression of miR-149-5p attenuates cerebral Ischemia/Reperfusion (I/R) injury by targeting notch2 [J]. Neuromolecular Med, 2022, 24(3): 279-289.

[13] Wang C, Yang Y, Xu M, et al. Deep sequencing of the rat MCAO cortexes reveals crucial circRNAs involved in early stroke events and their regulatory networks [J]. Neural Plast, 2021(20): 9942537.

[14] Sun Y, Wu D, Hu Q. NADP(+)/NADPH in metabolism and its relation to cardiovascular pathologies [J]. Curr Med Chem, 2025, 32(23): 4671-4687.

[15] Qin C, Yang S, Chu Y H, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 215-223.

[16] Sun Y Y, Zhu H J, Zhao R Y, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice [J]. Redox Biol, 2023(66): 102852.

[17] Ni X C, Wang H F, Cai Y Y, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits astrocyte activation and promotes transfer of astrocytic mitochondria to neurons against ischemic stroke [J]. Redox Biol, 2022(54): 102363.

[18] Guo J, Tuo Q Z, Lei P. Iron, ferroptosis, and ischemic stroke [J]. J Neurochem, 2023, 165(4): 487-520.

[19] Hilkens N A, Casolla B, Leung T W, et al. Stroke [J]. Lancet, 2024, 403(10446): 2820-2836.

[20] Yuan Y, Zhai Y, Chen J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. Biomolecules, 2021, 11(7):923.

[21] Wang Y, Liu Z, Li L, et al. Anti-ferroptosis exosomes engineered for targeting M2 microglia to improve neurological function in ischemic stroke [J]. J Nanobiotechnology, 2024, 22(1): 291-298.

[22] Wu W, Luo Z, Shen D, et al. IL-10 protects against OPC ferroptosis by regulating lipid reactive oxygen species levels post stroke [J]. Redox Biol, 2024(69): 102982.

[23] Dustin C M, Shiva S S, Vazquez A, et al. NOX2 in Alzheimer's and Parkinson's disease [J]. Redox Biol, 2024(78): 103433.

[24] Wang Q, Liu J, Zhang Y, et al. Microglial CR3 promotes neuron ferroptosis via NOX2-mediated iron deposition in rotenone-induced experimental models of Parkinson's disease [J]. Redox Biol, 2024(77): 103369.

[25] Feng Y, Wang X, Li P, et al. Exogenous hydrogen sulfide and NOX2 inhibition mitigate ferroptosis in pressure-induced retinal ganglion cell damage [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2025, 1871(3): 167705.

[26] Wang Z, Yuan Y, Zhang Z, et al. Inhibition of miRNA-27b enhances neurogenesis via AMPK activation in a mouse ischemic stroke model [J]. FEBS Open Bio, 2019, 9(5): 859-869.

[27] Xue L X, Shu L Y, Wang H M, et al. miR-181b promotes angiogenesis and neurological function recovery after ischemic stroke [J]. Neural Regen Res, 2023, 18(9): 1983-1989.

[28] Zhang Y, Liu Z, 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.

[29] Zhang K, Zhang X, Cai Z, et al. A novel class of microRNA-recognition elements that function only within open reading frames [J]. Nat Struct Mol Biol, 2018, 25(11): 1019-1027.

(责任编辑:唐慧)