

• 实验研究 Experimental research •

COL4A1 在 miR-29b 对 N2B 细胞氧糖剥夺/再灌注损伤保护作用中的调控机制研究

袁映楠, 黄智, 张帅, 许敏, 周石

【摘要】目的 通过构建 N2B 神经细胞氧糖剥夺(OGD)/再灌注(R)模型验证 miR-29b 对神经细胞的保护作用,探讨 IV 型胶原蛋白基因 $\alpha 1$ (COL4A1)在 miR-29b 对神经细胞 OGD/R 损伤保护作用中的调控机制。**方法** 正常和缺氧条件培养 N2B 细胞,实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测 miR-29b 表达。细胞计数试剂盒(CCK)-8、克隆形成、Hoechst 实验,流式细胞术分别检测不同处理组细胞增殖、凋亡情况。免疫印迹双荧光素酶验证 miR-29b 靶基因是否为 COL4A1;N2B 细胞转染 miR-29b mimics, RT-qPCR 和免疫印迹检测 COL4A1 表达。构建 COL4A1 3'非翻译区(UTR)野生型和突变型载体、靶基因,设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养,CCK-8、克隆形成、Hoechst 实验,流式细胞术检测不同处理组细胞增殖、凋亡情况。**结果** OGD/R 细胞中 miR-29b 表达较正常细胞组降低。在相同缺氧/复氧条件下培养细胞中 miR-29 表达上调,细胞增殖能力明显增强,凋亡明显抑制。miR-29b 表达上调抑制 COL4A1 表达,但转染 COL4A1 及其对照组后,COL4A1 对照组细胞增殖明显高于过表达组,凋亡明显低于过表达组。**结论** miR-29b 对 N2B 神经细胞 OGD/R 模型具有保护作用,通过抑制 COL4A1 表达减轻缺氧对 N2B 神经细胞的损伤。miR-29b 可通过调节 COL4A1 表达减少缺血/缺氧再灌注对神经细胞的损伤。

【关键词】 微小核糖核酸-29b; 脑缺血; IV 型胶原蛋白基因 $\alpha 1$; 成神经细胞瘤 N2B 细胞

中图分类号:R743.3 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2019)-012-1156-06

Regulation and control mechanism of COL4A1 in the protective effect of mir-29b on oxygen glucose deprivation/reperfusion injury of N2B cells

YUAN Yingnan, HUANG Zhi, ZHANG Shuai, XU Ming, ZHOU Shi. School of Medical Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: 156722229@qq.com

【Abstract】Objective To validate the protective effect of microRNA-29b on neurons by constructing oxygen and glucose deprivation/reperfusion(OGD/R) model of N2B neurons, and to explore the mechanism of COL4A1 in the protective effect of microRNA-29b on OGD/R injury of neurons. **Methods** N2B cells were cultured under normal and hypoxic conditions. Real-time quantitative PCR (qPCR) was used to detect the expression of microRNA-29b. CCK-8, clone formation, Hoechst testing and flow cytometry were used to detect the proliferation and apoptosis of N2B cells. Western blot(WB) double luciferase was used to verify whether the target gene of microRNA-29b was COL4A1. The microRNA-29b mimics were transfected into cells, and the expression of COL4A1 was detected by qPCR and WB. The wild and mutant vectors and target genes of COL4A1 3'untranslated region (UTR) were constructed. COL4A1 was designed and synthesized, transfected into N2B cells, cultured under hypoxia, CCK8, clone formation, Hoechst testing and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis in different treatment groups. **Results** The expression of microRNA-29b in OGD/R cells was lower than that in normal cells. In the same hypoxia/reoxygenation conditions, the expression of microRNA-29b was up-regulated, the proliferation of cells was

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2019.012.009

基金项目: 贵州省普通高等医学院校医学影像工程研究中心建设项目(黔教合 KY 字 2016-012)、贵州医科大学医学影像工程研究中心建设项目(2016001)

作者单位: 550004 贵阳 贵州医科大学医学影像学院

通信作者: 周石 E-mail: 156722229@qq.com

significantly enhanced, and cell apoptosis was significantly inhibited. Upregulation of the expression of microRNA-29b could inhibit the expression of COL4A1, but after transfection of both COL4A1 and its control group, the proliferation of cells in COL4A1 control group increased significantly when compared with that in overexpression group, and the apoptosis of cells in COL4A1 control group decreased significantly if compared with that in overexpression group. **Conclusion** The microRNA-29b has protective effect on OGD/R model of N2B neurons, it can reduce the damage of N2B neurons by inhibiting the expression of COL4A1. The microRNA-29b can reduce the damage of neurons by regulating the expression of COL4A1. (J Intervent Radiol, 2019, 28: 1156-1161)

【Key words】 microRNA-29b; cerebral ischemia; COL4A1; neuroblastoma N2B cell

全世界每年有超过 1 700 万人持续处于脑卒中状态^[1]。虽然其病死率随着医疗技术进步而下降^[2],但对神经功能仍具有不可忽视的破坏性。脑卒中损伤机制在于神经细胞对缺血、缺氧状态耐受极低,普遍认为脑缺血 5 min 后会对其造成不可逆性损伤,这主要由脑细胞缺氧所致。葡萄糖剥夺(glucose deprivation, GD)和氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)是常见脑缺血体外模型^[3],阐明了 OGD/再灌注(R)诱导的神经元死亡潜在细胞和分子机制,可能有助于研究开发治疗脑缺血的神经保护药物。微小核糖核酸(miRNA, miR)是长度为 19~22 个核苷酸的非编码 RNA,作为重要的转录后调节因子与多种靶 miRNA 相互作用,调控其靶基因^[4-5]。有研究报道 miR-29 家族成员既有诱导细胞抗凋亡作用,又有促凋亡作用,这可能源于其与不同细胞中不同靶点结合或处于不同病理或生理条件^[6-7]。有研究发现动物脑缺血模型中 miR-29b 显著下调^[8],在急性缺血性卒中发生至神经细胞死亡和脑梗死过程中表达水平持续下降^[9]。研究表明,miR-29 家族在缺血性脑损伤发病过程中起重要作用^[10];miR-29b 是神经元细胞中一存活因子,梗死部位 miR-29b 丢失可能是脑卒中发展的重要因素之一^[6]。虽然大量研究证实 miR-29 家族成员对脑缺血的保护作用,但 miR-29b 在脑缺血中的作用机制仍不清楚。本研究探讨 miR-29b 在 N2B 神经细胞 OGD/R 模型中的作用以及 IV 型胶原蛋白基因 $\alpha 1$ (COL4A1)在 miR-29b 对脑缺血保护作用中的调控机制,为临床治疗缺血性脑卒中提供一种新方向。

1 材料与方法

1.1 实验器材

N2B 神经细胞系(上海北诺生物科技有限公司,液氮中冷冻保存),DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶、电转染试剂、TRIzol RNA 提取试剂盒、荧光定量聚合酶链反应(PCR)循环仪(美国

Thermo Fisher 科技公司),磷酸缓冲液(PBS,上海碧云天生物技术公司),细胞转染系统(瑞士 Lonza 公司),cDNA 合成试剂盒(北京百泰克生物技术公司),实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司),Hoechst 染色试剂盒(上海碧云天生物技术公司),双荧光素酶基因检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司),半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3、Bcl-2、Bax 凋亡相关蛋白, COL4A1 蛋白抗体(上海比昂生物医药科技公司),酶标仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司), COL4A1 3'非翻译区(UTR)野生型和突变型载体的构建(上海百力格生物技术公司)。

1.2 N2B 细胞培养、OGD/R 模型构建和转染

第 3 代 N2B 细胞按常规方法解冻,放入含 19% FBS 的 DMEM/F12 培养基中复苏 24 h,扩增培养。按照常规脂质体法将 miR-29b 及其 miRNA 对照转染入 N2B 细胞。转染前 1 d,将 N2B 细胞铺于 6 孔板,细胞密度为 80%左右,先将 1 μ L(1 μ g/ μ L)miR-29b 及其 miRNA 对照悬于脂质体 2000 中,轻轻摇动使其充分接触,室温放置 8 min。将转染混合液轻轻加入细胞中,边加边摇动,使其充分接触;转染后 24 h 更换 DMEM,37℃、5%CO₂ 培养 48 h;转染成功后向两组细胞中加入含 10%FBS 无糖培养基中,置于三气培养箱中缺氧培养 8 h,后复氧培养 2 h。分为缺氧/复氧细胞组(H/R 组)、miR-29b 阴性对照组(H/R+mimics NC 组)、miR-29b 过表达细胞组(H/R+mimics 组)。设计合成 COL4A1 基因,转染 N2B 细胞,重复上述实验。

为了探索 COL4A1 在 miR-29b 对神经细胞 OGD/R 损伤的保护作用中的机制,将 N2B 细胞分为正常培养组(NC 组)、阴性对照组(COL4A1 NC 组)、COL4A1 过表达组(COL4A1 组)。

1.3 RT-qPCR 检测 miR-29b、COL4A1 表达水平

首先进行正常 N2B 细胞、H/R 培养 N2B 细胞中 miR-29b 提取和 PCR 扩增,即转染前分别提取

正常 N2B 细胞、H/R 培养 N2B 细胞总 RNA,按照测试试剂盒说明书分别进行 cDNA 合成;将混合物置于冰上 5~10 min,分别加入逆转录酶缓冲液 4 μ L、二硫苏糖醇 (DTT) 2 μ L 和脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 1 μ L, 42℃温育 2 min;分别加入逆转录酶缓冲液 1 μ L 于 42℃孵育 1 h,酶活性在 65℃淬灭;以 miR-29b 基因序列为模板,设计并合成引物。RT-qPCR 系统由 Master Mix 10 μ L、cDNA 2 μ L、Taq 聚合酶 0.4 μ L 和 0.08 μ M 正向/反向引物组成,加双蒸水 (ddH₂O) 直至 20 μ L,于 200 g/s 下离心。RT-qPCR 程序:94℃3 min,45 个循环 (95℃13 min,63℃40 min);每个样品设置在 3 个重复孔中以使错误最小化,构建 COL4A1 的 3'UTR 野生型和突变型载体,双荧光素酶验证靶基因;设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养,分为未转染 COL4A1 的细胞组 (NC 组)、miR-29b 阴性对照组 (miR-29b mimics NC 组)、miR-29b 过表达组 (miR-29b mimics)。重复上述实验。

1.4 CCK-8 实验和克隆形成实验检测细胞增殖

在 2 个 96 孔板中分别配置 H/R 组、H/R+mimics NC 组、H/R+mimics 组 100 μ L 细胞悬液,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱预培养 24 h 后,分别加入 10 μ L 不同浓度的待测细胞悬液;培养板置于培养箱孵育 12 h,每一加样孔中加入 10 μ L 细胞计数试剂盒 (CCK)-8 溶液,置于培养箱内孵育 1~4 h,分别于 12、24、48、72 h 用酶标仪测定细胞在 450 nm 处的吸光度 (OD)。设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养。重复上述实验检测 NC 组、COL4A1 NC 组、COL4A1 组细胞增殖。

取 H/R 组、H/R+mimics NC 组、H/R+mimics 组对数生长期细胞,分别用 0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,并把细胞悬浮在含 10%FBS 的 DMEM 培养液中备用;将细胞悬液作梯度倍数稀释,每组细胞分别以每皿 50、100、200 个细胞的梯度密度分别接种于含 10 mL 37℃预温培养液中,并轻轻转动,使细胞分散均匀;置 37℃、5%CO₂ 和饱和湿度细胞培养箱中培养 2~3 周;培养皿中出现肉眼可见克隆时,终止培养;弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次;加 4%多聚甲醛 5 mL 固定细胞 15 min;去固定液,加适量 Gimsa 应用液染色 10~30 min,流水缓慢洗去染色液,空气下干燥;平皿倒置并叠加一带网格透明胶片,肉眼直接计数克隆,或在低倍显微镜计数 >10 个细胞克隆数,计算克隆形成率。设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养。

重复上述实验检测 NC 组、COL4A1 NC 组、COL4A1 组细胞增殖。

1.5 Hoechst 实验和流式细胞术检测细胞凋亡

分别制作 H/R 组、H/R+mimics NC 组、H/R+mimics 组细胞悬液,分别用醋酸-乙醇或 Carnoy 固定液固定,0.01 mol/L PBS 漂洗 5 min;Hoechst 33 258 工作液染色,室温放置 15 min,0.01 mol/L PBS 漂洗 3 次,每次 5 min;丙三醇和 PBS 1:9 混合液或水溶性封片剂封片,置于荧光显微镜下观察 3 组细胞着色情况。设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养。重复上述实验检测 NC 组、COL4A1 NC 组、COL4A1 组细胞凋亡。

培养 N2B 细胞,转染 miR-29b 及其 miRNA 对照组、H/R 培养,分别向 H/R 组、H/R+mimics NC 组、H/R+mimics 组 100 μ L 细胞中加入 30 μ L 反应缓冲液和 2 μ L 膜联蛋白 (annexin)-V-异硫氰酸荧光素 (FITC),充分混匀,室温下避光孵育 25 min;流式细胞仪上检测各组 N2B 细胞凋亡情况,激发光和接收光波长分别为 484 nm 和 625 nm。设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养。重复上述实验检测 NC 组、COL4A1 NC 组、COL4A1 组细胞凋亡。

1.6 免疫印迹检测凋亡相关蛋白

转染后 12、24、48 h 收集 H/R 组、H/R+mimics NC 组、H/R+mimics 组细胞蛋白质,取出预冷的 1×PBS 冲洗培养基;所有液体均移除时,将培养板放置在冰上,每孔添加 50 μ L 蛋白质裂解缓冲液,PBS 重复冲洗底部和壁;细胞转移至无酶管中,以在冰上重复混合;细胞完全裂解后将碎片于 4℃下以 12 000 g 离心 15 min;上清液收集至预冷管中,取 1 μ L 蛋白质溶液用于定量;3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照,将一抗在 4℃下以 1:200 稀释 8~10 h;Tris 缓冲 0.9%NaCl 溶液 (TBST) 漂洗,加入 500×稀释的二抗,室温孵育 2 h;漂洗 3~5 次,BioRad 全自动分析仪上加入显色底物和显色缓冲液进行检测,观察各组灰度值,计算 caspase-3、Bcl-2、Bax 凋亡相关蛋白相对表达水平。设计合成 COL4A1,转染 N2B 细胞,缺氧培养。重复上述实验检测 NC 组、COL4A1 NC 组、COL4A1 组细胞凋亡相关蛋白表达。

1.7 统计学分析

数据统计学分析和处理,均采用 SPSS 19.0 软件。数据表示为均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$)。N2B 细胞组间比较用单因素方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 则差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-29b 表达

RT-qPCR 检测显示,miR-29b 在 H/R 组培养细胞中表达较正常培养组(NC 组)降低(图 1)。

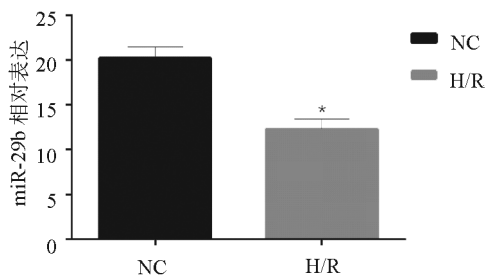


图 1 RT-qPCR 检测 miR-29b 表达

2.2 细胞增殖、凋亡

12、24、48、72 h 检测显示,H/R 组、H/R+mimics

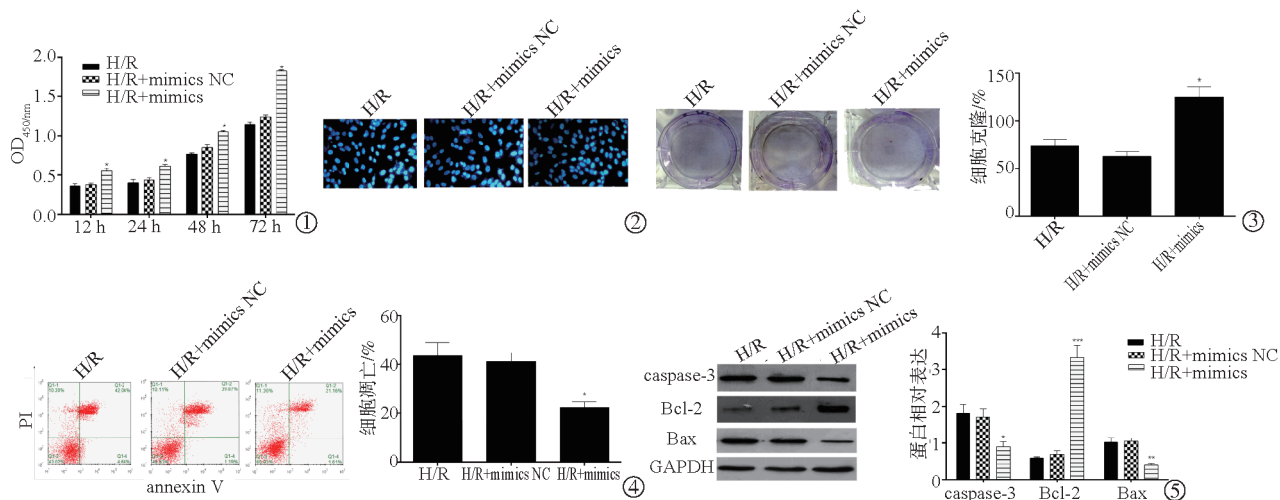


图 2 各组细胞凋亡和增殖检测结果

2.3 COL4A1 表达

RT-qPCR 检测显示,COL4A1 在 NC 组、miR-29b mimics NC 组间表达差异无统计学意义($P>0.05$),在 miR-29b mimics 组中表达明显降低($P<0.05$)(图 3)。

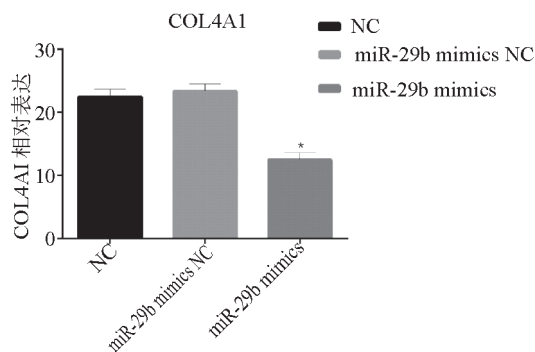


图 3 COL4A1 在 3 组细胞中表达

NC 组间细胞 OD 值差异无统计学意义($P>0.05$),H/R+mimics 组在 12、24、48 h 时较 H/R 组、H/R+mimics NC 组差异无统计学意义($P>0.05$),但在 72 h 时显著升高($P<0.05$)(图 2①);Hoechst 染色后显微镜显示 3 组染色结果无差异(图 2②),细胞克隆形成率在 H/R 组、H/R+mimics NC 组间差异无统计学意义($P>0.05$),H/R+mimics 组明显升高($P<0.05$)(图 2③);流式细胞仪测定显示,细胞凋亡在 H/R 组、H/R+mimics NC 组间差异无统计学意义($P>0.05$),H/R+mimics 组明显降低($P<0.05$)(图 2④);免疫印迹检测显示,凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2、Bax 表达在 H/R 组、H/R+mimics NC 组间差异无统计学意义($P>0.05$),H/R+mimics 组 caspase-3、Bax 表达明显降低($P<0.05$),Bcl-2 表达明显升高($P<0.05$)(图 2⑤)。

2.4 转染 COL4A1 后细胞增殖和凋亡

酶标仪检测显示,3 组细胞在 12、24、48、72 h 时 OD 值均呈不断上升趋势,但 COL4A1 组在不同时点均明显低于 NC 组、COL4A1 NC 组($P<0.05$)(图 4①);COL4A1 组细胞荧光明显强于 NC 组、COL4A1 NC 组($P<0.05$)(图 4②);NC 组、COL4A1 NC 组间细胞克隆形成率差异无统计学意义($P>0.05$),但 COL4A1 组较前两组明显降低($P<0.05$)(图 4③);流式细胞仪测定显示,NC 组、COL4A1 NC 组间 N2B 细胞凋亡差异无统计学意义($P>0.05$),COL4A1 组较前两组显著增加($P<0.05$)(图 4④);免疫印迹检测显示,NC 组、COL4A1 NC 组间细胞凋亡相关蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),COL4A1 组 caspase-3、Bax 表达较前两组明显升高($P<0.05$),Bcl-2 表达较前两组稍降低(图 4⑤)。

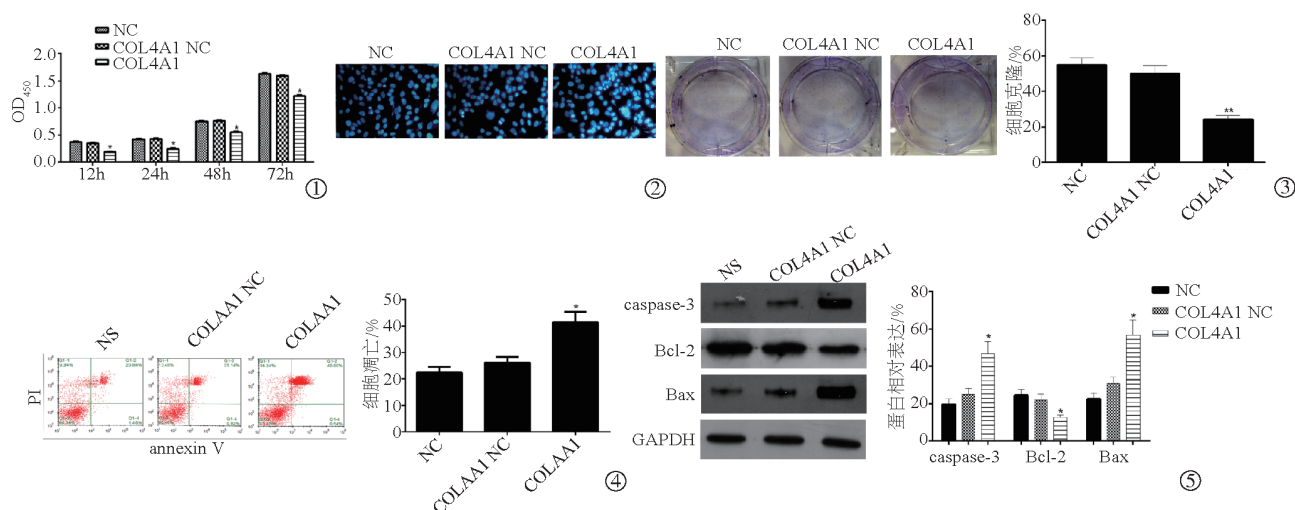


图4 转染 COL4A1 后细胞增殖和凋亡

3 讨论

脑卒中发生发展过程中有很多复杂机制,如兴奋性毒性、线粒体功能障碍、氧化应激和炎症反应等各种途径复杂相互作用,参与了脑缺血损伤分子机制^[11]。但是总的损伤机制基本一致,均为神经细胞对缺血缺氧的耐受性很低,即使是短暂的氧供缺乏,也会对神经细胞造成不可逆损伤。然而,目前获准用于脑缺血损伤的疗法中,治疗靶点和生物标志物并不理想^[11]。本研究发现再灌注后 OGD/R 处理的 N2B 细胞中 miR-29b 表达下调,而一旦上调 miR-29b 表达, COL4A1 表达相对较低;过表达的 OGD/R 处理 N2B 细胞中,细胞增殖较对照组明显受到抑制,细胞毒性作用相对增强。

过去 10 年中,许多研究证实 miRNA 在缺血性损伤的细胞反应中扮演重要角色^[12]。有研究表明, miR-29 家族是评估脑损伤和确定卒中后患者预后的重要指标^[13]。有研究报道,下调 miR-29 能通过增强 Bcl-2 表达促进局灶性缺血中神经元细胞死亡^[14]。因此,miR-29b 在脑缺血损伤中的作用明确,但其表达对脑缺血性损伤的保护机制仍未知。本研究表明 miR-29b 在 OGD/R 模型中表达降低,并通过上调 miR-29b 表达证实 miR-29b 对脑缺血损伤具有一定的保护作用。

Bcl-2 蛋白家族包括 Bcl-2 和 Bax,能通过调节线粒体膜完整性、功能和凋亡信号调节细胞凋亡^[15]。本研究中过表达的 miR-29b 细胞增殖能力较对照组明显增强,并通过抑制凋亡相关蛋白 caspase-3、Bax 表达抑制细胞凋亡,但在 miR-29b 过表达组中 Bcl-2 表达增高,这与研究预期有所出入,考虑其调

控可能存在特异性,即 Bcl 蛋白家族的蛋白存在正负两方面调控,只是触发不同调控条件不一。本研究中 OGD/R 处理显著降低 caspase-3 活性和 Bax 表达。上述结果表明 miR-29b 可通过调节 Bcl-2 家族中 Bax 蛋白表达防止脑缺血损伤^[16]。

既往研究已证实 miRNA 对脑缺血具保护作用^[17]。但 miRNA 靶点基因预测可能具有挑战性,因为在某些情况下,miRNA 靶点基因并非固定匹配^[18]。本实验选定 COL4A1 为 miR-29b 靶点基因,以期通过上调 miR-29b 寻求两者间存在关联,同时通过调节 COL4A1 表达测定 N2B 细胞增殖、凋亡、细胞毒性,验证 COL4A1 作为 miR-29b 及其对神经细胞缺血缺氧性损伤保护作用的一种潜在靶点,为脑卒中临床治疗探寻新的治疗方向及更多潜在的治疗机制。

本研究结论认为,miR-29b 在脑缺血细胞模型中表达下调,miR-29b 激动剂降低了 OGD/R 诱导的细胞损伤和细胞毒性,miR-29b 对 N2B 神经细胞 OGD/R 模型具有保护作用;此外 miR-29b 降低了 COL4A1 表达,且由于 COL4A1 表达降低,抑制了 OGD/R 模型诱导的 N2B 细胞损伤和细胞毒性。miR-29b 可预防 OGD/R 诱导的损伤,从而保护 N2B 细胞,其保护作用依赖于 COL4A1 介导的细胞凋亡,miR-29b 可能是将来脑卒中治疗的潜在靶点之一。

[参考文献]

- [1] Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the

- global burden of disease study 2010 [J]. *Lancet*, 2014, 383: 245-254.
- [2] Patel MD, Tilling K, Lawrence E, et al. Relationships between long-term stroke disability, handicap and health-related quality of life[J]. *Age Ageing*, 2006, 35: 273-279.
- [3] 陈立, 邹伟婕, 张宇, 等. miR-29b 通过抑制 N2a 细胞 p53 凋亡通路减轻氧糖剥夺/再灌注损伤[J]. *介入放射学杂志*, 2018, 27: 451-457.
- [4] Ouyang YB, Stary CM, Yang GY, et al. microRNAs: innovative targets for cerebral ischemia and stroke[J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14: 90-101.
- [5] 占美晓, 李勇, 胡宝山, 等. 甲胎蛋白阴性肝癌射频消融治疗前血清中转移相关 miRNA 的临床价值[J]. *介入放射学杂志*, 2014, 23: 601-605.
- [6] Kole AJ, Swahari V, Hammond SM, et al. miR-29b is activated during neuronal maturation and targets BH3 - only genes to restrict apoptosis[J]. *Genes Dev*, 2011, 25: 125-130.
- [7] Ye Y, Perez-Polo JR, Qian J, et al. The role of microRNA in modulating myocardial ischemia - reperfusion injury [J]. *Physiol Genomics*, 2011, 43: 534-542.
- [8] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29: 675-687.
- [9] Khanna S, Rink C, Ghoshkhani R, et al. Loss of miR-29b following acute ischemic stroke contributes to neural cell death and infarct size[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013, 33: 1197-1206.
- [10] Ouyang YB, Xu L, Lu Y, et al. Astrocyte-enriched miR-29a targets PUMA and reduces neuronal vulnerability to forebrain ischemia[J]. *Glia*, 2013, 61: 1784-1794.
- [11] Bano S, Chaudhary V, Garga UC. Neonatal hypoxic - ischemic encephalopathy: a radiological review [J]. *J Pediatr Neurosci*, 2017, 12: 1-6.
- [12] Li L, Stary CM. Targeting glial mitochondrial function for protection from cerebral ischemia: relevance, mechanisms, and the role of MicroRNAs[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 6032306.
- [13] Ouyang YB, Xu LJ, Yue S, et al. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: importance of microRNAs[J]. *Neurosci Lett*, 2014, 565: 53-58.
- [14] Shi G, Liu Y, Liu T, et al. Upregulated miR-29b promotes neuronal cell death by inhibiting Bcl2L2 after ischemic brain injury[J]. *Exp Brain Res*, 2012, 216: 225-230.
- [15] Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential[J]. *Curr Opin Immunol*, 2007, 19: 488-496.
- [16] Cao L, Zhang Y, Zhang S, et al. MicroRNA - 29b alleviates oxygen and glucose deprivation/reperfusion - induced injury via inhibition of the p53 - dependent apoptosis pathway in N2a neuroblastoma cells[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15: 67-74.
- [17] 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[J]. *Stroke*, 2008, 39: 959-966.
- [18] Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA - target interactions [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13: 849-851.
- (收稿日期:2019-04-30)
(本文编辑:边 佶)