

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.12.003

miR-1298 表达对 PC-12 细胞糖氧剥夺 / 复氧损伤的影响及其机制研究 *

鞠加圣¹ 陈建良^{1Δ} 杨云峰¹ 彭智涛¹ 钟远强¹ 杨 淬²

(1 中山大学附属第八医院神经外科 广东 深圳 518000; 2 云南民族大学民族医药学院重点实验室 云南 昆明 650500)

摘要 目的: 通过体外细胞培养探讨 miR-1298 对缺血缺氧性神经损伤的调节作用。**方法:** 首先通过细胞活性检测和乳酸脱氢酶 (LDH) 细胞毒性法确定大鼠 PC-12 细胞糖氧剥夺 / 复氧 (OGD/R) 的造模效果, 同时采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测细胞 miR-1298 的表达差异。体外转染 miR-1298mimic、mimic NC、miR-1298 inhibitor 和 inhibitor NC 至大鼠 PC-12 细胞系, 检测 mimic、mimic NC、inhibitor、inhibitor NC 的转染效率。经过 OGD/R 处理后将细胞分为 Control 组、OGD/R 组、mimic 组、mimicNC 组、inhibitor 组和 inhibitorNC 组。流式细胞术检测各组 PC-12 细胞凋亡的情况, 免疫印迹试验 (Western blot) 检测各组 PC-12 细胞凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (BCL-2) 和 Bcl-2 相关的 x 基因 (Bax) 表达的情况。**结果:** PC12 细胞经过 OGD/R 处理后, 其细胞存活率与 Control 组比明显下降且 LDH 漏出率明显上升 (均 $P < 0.05$); 模型细胞中 miR-1298 相对表达量明显低于 Control 组 ($P < 0.05$)。转染 24 小时后 mimic 组细胞中 miR-1298 的相对表达量明显高于 mimicNC 组 ($P < 0.05$); mimic 组细胞凋亡率低于 mimicNC 组, 而 inhibitor 组细胞凋亡率高于 inhibitor NC 组 (均 $P < 0.05$); mimic 组的 BCL-2 表达量较 mimicNC 组升高, 而 BAX 表达量下降, inhibitor 组与 inhibitorNC 组相比, BCL-2 表达量下降, 而 BAX 表达量上升, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论:** miR-1298 通过抑制细胞凋亡减轻 PC-12 细胞 OGD/R 的损伤。

关键词: miR-1298; PC-12 细胞; 糖氧剥夺 / 复氧; 凋亡; BCL-2; BAX

中图分类号: R-33; R743 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)12-2212-05

Effect of miR-1298 Expression on Oxygen Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury of PC-12 Cells and its Mechanism Study*

JU Jia-sheng¹, CHEN Jian-liang^{1Δ}, YANG Yun-feng¹, PENG Zhi-tao¹, ZHONG Yuan-qiang¹, YANG Cu²

(1 Department of Neurosurgery, The Eighth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Shenzhen, Guangdong, 518000, China;

2 Key Laboratory of College of Ethnic Medicine, Yunnan University for Nationalities, Kunming, Yunnan, 650500, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the regulatory effect of miR-1298 on hypoxic-ischemic nerve injury by cell culture in vitro. **Methods:** Firstly, the modeling effect of oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) of rat PC-12 cells was determined by cell activity detection and lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity. At the same time, the expression difference of miR-1298 was detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR). The miR-1298mimic, mimic NC, miR-1298 inhibitor and inhibitor NC were transfected into rat PC-12 cell line in vitro. The transfection efficiency of miR, mimic NC, inhibitor and inhibitor NC was detected. After OGD/R treatment, the cells were divided into control group, OGD/R group, mimicgroup, mimicNC group, inhibitor group and inhibitor NC group. The apoptosis of PC-12 cells in each group was detected by flow cytometry, and the expression of PC-12 apoptosis related protein B lymphoma-2 gene (BCL-2) and Bcl-2 associated X protein (BAX) were detected by Western blot. **Results:** After OGD/R treatment, the survival rate of PC12 cells decreased significantly compared with the control group, and the leakage rate of LDH increased significantly (all $P < 0.05$). The relative expression of miR-1298 in model cells was significantly lower than that in control group ($P < 0.05$). 24 hours after transfection, the relative expression of miR-1298 in mimic group cells was significantly higher than that in mimicNC group ($P < 0.05$). The cells apoptosis rate in mimic group was lower than that in mimicNC group, while cells apoptosis rate in inhibitor group was higher than that in inhibitor NC group (all $P < 0.05$). The expression of BCL-2 in mimic group was higher than that in mimicNC group, while the expression of BAX decreased. Compared with the inhibitorNC group, the expression of BCL-2 decreased, while the expression of BAX increased, and the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion:** miR-1298 alleviates the injury of OGD/R in PC-12 cells by inhibiting apoptosis.

Key words: miR-1298; PC-12 cells; Oxygen glucose deprivation/reoxygenation; Apoptosis; BCL-2; BAX

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)12-2212-05

* 基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(81760655)

作者简介: 鞠加圣(1996-), 男, 硕士, 住院医师, 从事脑血管疾病的基础与临床研究, E-mail: Jujiasheng96@163.com

Δ 通讯作者: 陈建良(1962-), 男, 博士, 主任医师, 从事头颅和脑血管性疾病基础与临床研究, E-mail: chenjl7777@163.com

(收稿日期: 2022-01-06 接受日期: 2022-01-28)

前言

卒中是一种常见的急性脑血管病,是由于脑血管破裂或者闭塞而导致局部脑组织血供不足,引起细胞能量耗竭、离子稳态破坏、谷氨酸释放、钙通道功能障碍、自由基释放、炎症反应等一系列的神经化学事件,继而导致神经元死亡或凋亡,最终使患者神经功能丧失,甚至死亡^[1,2]。卒中是世界第二大常见的死亡原因^[3],由此可见卒中严重威胁着人们的生命健康。然而现阶段用于临床治疗卒中的措施效果都不尽人意,美国食品药品监督管理局(FDA)唯一批准用于治疗卒中的药物组织纤溶酶原激活物(tPA)是目前最有效的治疗药物,该药能显著改善患者卒中后的致残率,然而并不能降低死亡率,且使用后存在再次出血的风险,同时该方法的治疗时间窗最初仅为3小时^[4,5],现在也仅扩大到4.5小时^[6],且实际上只有约5%的患者能及时接受治疗^[7]。

microRNA(miR)是一类长度约为22nt的非编码RNA,它们在沉默复合体(RISC)的帮助下与靶基因mRNA的3'-UTR区结合,沉默或降解mRNA,影响转录水平,从而调节蛋白质的表达^[8]。miR广泛存在各种生物体内调节多种生理病理过程,已有多项研究表明miR在卒中发生过程中起着重要作用^[9,10]。了解miR在卒中发病过程中的调节作用有助于为其预防、早期诊断、治疗提出新思路。Wang等^[11]人通过Illumina高通量测序技术对大鼠中动脉闭塞(MCAO)大鼠模型的脑组织进行了miR表达图谱分析,结果显示与对照组相比,模型组有多种miR表达倍数发生显著改变,其中miR-1298的表达差异在三倍以上,因此有理由推测该miR-1298在卒中发生过程中起到某种调节作用,然而并没有关于miR-1298的后续研究。糖氧剥夺/复氧(OGD/R)为研究体外细胞缺血缺氧损伤的模型,且在多项相关研究中都有应用^[12,13],因此,本研究旨在探讨miR-1298在该模型中发挥的作用,为临床缺血性脑血管病的诊断、治疗提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

大鼠PC-12细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要实验试剂

高糖DMEM培养基、无糖DMEM培养基、胎牛血清、青霉素/链霉素等购自美国Gibico公司,乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒购自中国上海碧云天公司,细胞计数试剂盒(CCK-8 Kit)购自中国上海百赛公司,Annexin V-PI凋亡检测试剂盒购自中国南京凯基公司,RNA提取分离试剂盒购自中国北京天根公司,反转录和qPCR试剂盒购自日本TaKaRa公司,RNA引物、mimic NC、inhibitor NC、mimic、inhibitor等购自中国上海生工,兔源抗 β -actin、Bcl-2相关的X基因(BAX)和辣根过氧化物酶标记的二抗购自美国CST公司,兔源抗B淋巴细胞瘤-2基因(BCL-2)购自英国Abcam公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养、OGD/R模型建立和分组 在购得高分化PC12细胞后,将细胞放入含高糖DMEM培养基(添加10%胎牛血清,1%双抗)的培养瓶中培养,并放入37℃,5%CO₂的潮

湿培养箱中孵育。根据文献^[14]建立OGD/R模型,在建立OGD/R模型前先将无糖DMEM培养基(添加10%胎牛血清,1%双抗)放入37℃,N₂/CO₂/O₂(94%/5%/1%)培养箱中预处理30分钟,随后将培养6d生长良好的PC-12细胞用PBS缓冲液洗3遍,加入预处理的无糖培养基并放入缺氧环境37℃,N₂/CO₂/O₂(94%/5%/1%)培养箱中孵育6小时,实现"糖氧剥夺",然后换正常培养基在常氧培养箱中孵育24小时,实现"复糖复氧",建立PC-12细胞OGD/R模型。根据细胞转染情况分为6组:对照组:细胞进行常规培养不做任何处理;OGD/R组:细胞经过上述方法OGD/R处理;mimic组:用miR-1298 mimic瞬时转染24h后细胞经过OGD/R处理;mimicNC组:用miR-1298 mimic NC瞬时转染24h后细胞OGD/R处理;inhibitor组:用miR-1298 inhibitor瞬时转染24h后细胞OGD/R处理;inhibitorNC组:用miR-1298 inhibitor NC瞬时转染24h后细胞OGD/R处理。

1.3.2 造模效果评估和细胞表达 miR-1298 检测 通过细胞存活率及LDH漏出率的检测结果来评估造模效果,按照试剂盒说明书使用CCK-8比色法对OGD/R组细胞存活率进行检测。将细胞铺在96孔板中进行OGD/R处理,处理完毕后在每孔中加入10 μ L CCK-8溶液,放入37℃,5%CO₂培养箱孵育2h,随后酶联免疫仪在波长450 nm处读取吸光度(OD)值,实验重复3次,结果取平均值,细胞存活率按下列公式计算:细胞存活率=OD/OD对照 $\times$ 100%,对照组的细胞存活率设定为100%。按照试剂盒说明书使用乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒测定OGD/R组细胞LDH漏出率。将细胞铺在96孔板中进行OGD/R处理,处理完毕每孔取120 μ L细胞上清液于新的96孔板中,按照说明书加入相应试剂后用酶联免疫仪在波长490 nm处读取吸光度。采用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测各组细胞miR-1298的表达。按照RNA提取分离试剂盒的说明书抽取细胞总RNA,用茎环法转录为cDNA随后用SYBR Green法进行RT-qPCR检测miR-1298相对于对照组的表达量。引物序列如下所示:miR-1298 forward: 5'-CGTTCATTCG-GCTGTCCA-3';reverse: 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'。U6 forward: 5'-CTCGCTTCGGCAGCACACA-3';reverse: 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。

1.3.3 细胞转染效率检测 转染过程按照Lipofectamine™ 3000说明书进行,在转染24小时后用RT-qPCR检测mimic组,mimicNC组,inhibitor组和inhibitorNC组PC-12细胞中miR-1298的相对表达量。

1.3.4 流式细胞术检测细胞凋亡 根据说明书用Annexin V-PI凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡率。将细胞铺在六孔板上,每组经过相应处理后收集细胞,用预冷PBS洗两遍后加入500 μ L Binding Buffer,再加入5 μ L Annexin-V溶液和5 μ L PI溶液,室温孵育20分钟,最后用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.5 免疫印迹试验(Western blot)检测 BCL-2 和 BAX 蛋白的表达 用RIPA缓冲液收集细胞提取总蛋白,用BCA法检测细胞蛋白含量,将每组蛋白稀释到相同浓度后进行SDS-PAGE凝胶电泳(上样孔每孔均加10 μ L待测蛋白),随后转膜、封闭,分别用抗 β -actin(1:1000)、抗BAX(1:1000)和抗BCL-2(1:1000)以及相应的二抗(1:3000)孵育后显影。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8 软件作图, SPSS 25.0 软件进行数据分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对于符合正态分布的两组数据间比较用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PC-12 细胞 OGD/R 模型的建立及 miR-1298 的表达水平

在经过 OGD/R 处理后, OGD/R 组 PC12 细胞存活率 ($46.756 \pm 5.695\%$) 与 Control 组 100.000% 相比明显下降 ($t=14.230, P=0.000$)。 OGD/R 组 LDH 漏出率 ($17.486 \pm 1.503\%$) 与 Control 组 ($2.785 \pm 0.882\%$) 相比明显上升 ($t=20.670, P=0.000$), 表示体外模型建立成功。 OGD/R 组 miR-1298 相对表达量为 (0.497 ± 0.018), 明显比 Control 组的表达量 (1.000 ± 0.090) 降低, 差异有统计学意义 ($t=9.030, P=0.001$), 结果如图 1 所示。

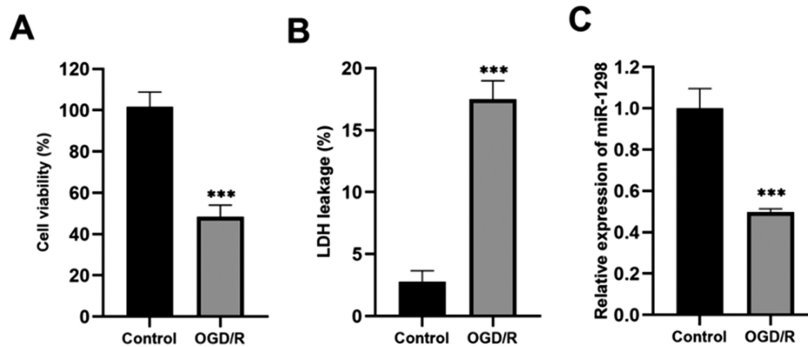


图 1 各组 PC-12 细胞存活率、LDH 漏出率以及 miR-1298 相对表达量的改变 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.1 Changes in survival rate of PC-12 cells, leakage rate of LDH and relative expression of miR-1298 in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note: A: the survival rate of PC12 cells in OGD/R group was significantly lower than that in control group.

B: The leakage rate of LDH in OGD/R group was significantly higher than that in control group.

C: The relative expression of miR-1298 in OGD/R group was significantly lower than that in control group. Compared with control group, *** $P < 0.05$.

2.2 细胞转染效率评估

在转染 24 小时后用 RT-qPCR 检测转染效率, mimic 组 miR-1298 相对表达量 (254.782 ± 9.270) 与 mimicNC 组 (1.144 ± 0.112) 比较显著上升 ($t=47.388, P=0.000$), 而 inhibitor 组的 miR-1298 相对表达量 (0.277 ± 0.008) 与 inhibitorNC 组 (1.198 ± 0.117) 相比显著下降 ($t=13.598, P=0.000$)。结果如图 2 所示。

2.3 各组 PC-12 细胞 OGD/R 损伤引起的凋亡率比较

通过流式细胞术检测发现 mimic 组细胞凋亡率 ($12.133 \pm 1.150\%$) 低于 mimicNC 组 ($20.867 \pm 0.412\%$) ($t=12.361, P=0.000$), 而 inhibitor 组细胞凋亡率 ($24.801 \pm 0.893\%$) 高于 inhibitorNC 组 ($22.067 \pm 0.901\%$) ($t=3.739, P=0.020$), 说明 miR-1298 在 OGD/R 损伤中有保护作用, 能够减少 PC-12 细胞的凋亡。如图 3 所示。

2.4 各组 PC-12 细胞 OGD/R 损伤引起凋亡蛋白表达的比较

Western blot 结果显示 mimic 组 BCL-2 相对表达量高于 mimicNC 组 [(0.651 ± 0.009) vs (0.380 ± 0.005)], BAX 表达量低于 mimicNC 组 [(0.453 ± 0.007) vs (0.694 ± 0.011)], 差异均有统计学意义 ($t=31.637, 47.642, P=0.000, 0.000$)。 inhibitor 组 BCL-2 相对表达量低于 inhibitorNC 组 [(0.359 ± 0.005) vs (0.377 ± 0.007)], BAX 表达量高于 inhibitorNC 组 [(0.838 ± 0.023) vs (0.728 ± 0.011)], 差异均有统计学意义 ($t=2.990, 7.199, P=0.040, 0.002$)。如图 4 所示。

3 讨论

miR 作为重要的非编码小 RNA, 广泛存在于多种真核生物体内, 且在多种生理病理过程中起着关键性的调控作用^[15,16]。根据研究显示人体超过三分之一的基因被 miR 所调控, 如此重要的一类调控因子在神经系统的发育以及疾病的发生发

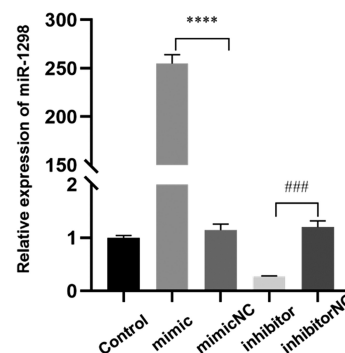


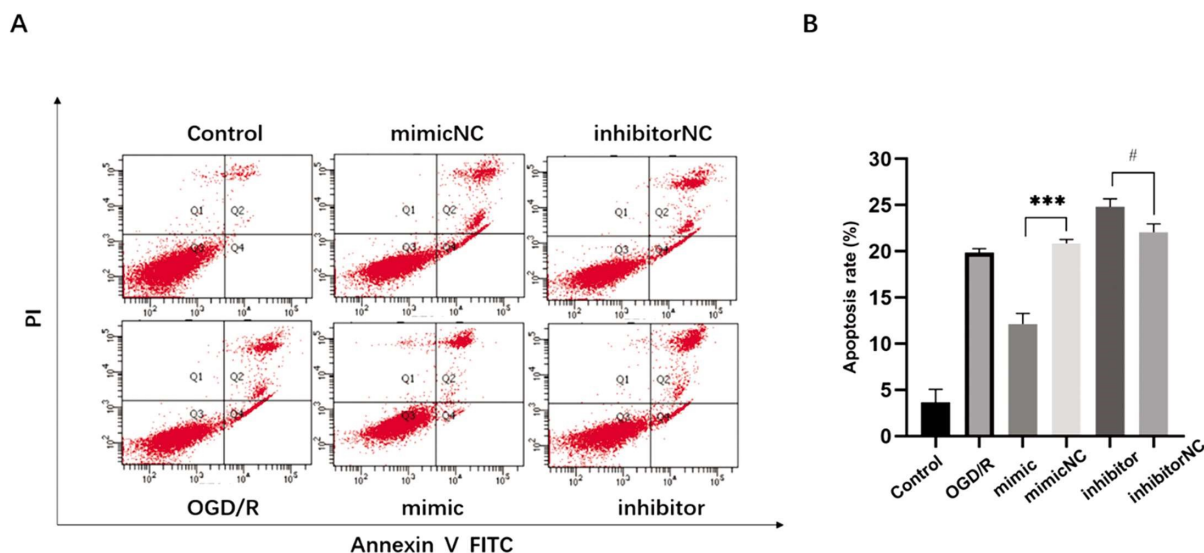
图 2 各组细胞分别转染 mimic、inhibitor、mimicNC 和 inhibitorNC 后 miR-1298 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.2 Relative expression of miR-1298 after transfection of mimic, inhibitor, mimicNC and inhibitor NC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

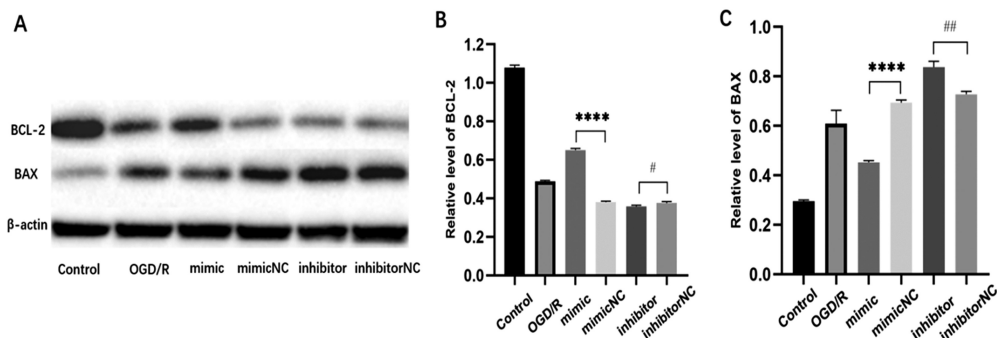
Note: compared with mimicNC group, **** $P < 0.05$. Compared with inhibitorNC group, ### $P < 0.05$.

展中同样有着关键性调控作用^[17], 因此该类非编码小 RNA 也被作为神经系统疾病中潜在的生物标记物和靶分子进行研究, 例如, 有研究者对 60 名帕金森病患者和 60 名健康对照者的血浆分析发现, 帕金森患者血浆中 miR-124 表达水平与健康对照组相比有显著差异^[18]。近年来也有研究表明卒中患者血液、脑脊液和脑组织内 microRNA 的表达谱发生显著改变, 这表明有差异表达的 microRNA 具有成为疾病早期诊断的生物标记物和决定治疗策略的重要依据, 同时可通过干预这些起着调节作用的 miR 的表达作为靶点, 为卒中的治疗提出新思路^[19,20]。

卒中的发生发展包含多个病理过程, 而其中细胞凋亡是最关键的步骤, 神经元的凋亡是导致患者功能受损的直接原因^[21], 因此如何进行有效的神经细胞保护是值得关注的问题。

图3 各组 PC-12 细胞凋亡的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Comparison of apoptosis of PC-12 cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note: A: the apoptosis of PC12 cells in each group was detected by flow cytometry after annexin V-PI staining. B: Histogram of PC12 cell apoptosis rate in each group. Compared with mimicNC group, *** $P < 0.05$. Compared with inhibitorNC group, # $P < 0.05$.

图4 各组 PC-12 细胞凋亡相关蛋白 BCL-2 和 BAX 表达的比较($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Comparison of the expression of apoptosis related proteins BCL-2 and BAX in PC-12 cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

Note: A: Electrophoresis of BCL-2 and BAX proteins in PC12 cells of each group. B: Histogram of relative expression of BCL-2 protein in PC12 cells of each group. C: Histogram of relative expression of BAX protein in PC12 cells of each group. Compared with mimicNC group, **** $P < 0.05$.

Compared with inhibitorNC group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

近年来也有研究证明了一些 miR 在神经细胞缺血缺氧性损伤中具有保护作用,Chen 等^[22]人发现 miR-193b-3p 能够通过靶向调控 5-LOX 基因,抑制细胞凋亡从而减少 MCAO 大鼠脑梗死面积。Peng 等^[23]人发现 miR-211-5p 在 MCAO 大鼠脑组织内表达下降,进一步实验证明 miR-211-5p 通过下调 COX2 基因表达,从而减轻缺血缺氧性损伤。

目前为止,大部分关于 miR-1298 的研究都集中在肿瘤方面,如 Chen 等^[24]人发现过表达 miR-1298 能够诱导乳腺癌细胞的凋亡,Zhang 等^[25]人发现低表达 miR-1298 的宫颈癌患者预后较差,抑制 miR-1298 的表达可以促进肿瘤细胞的增殖,迁移和侵袭能力。而 miR-1298 同样也被发现在 MCAO 大鼠模型脑组织中的表达量降低了三倍以上^[11],但是并没有后续研究进一步探讨 miR-1298 在缺血缺氧性损伤中是否有保护作用及其机制。

PC-12 细胞系是大鼠肾上腺嗜铬瘤细胞,具有交感神经元特性,作为神经细胞的有效体外模型广泛用于实验研究^[26]。缺血性脑卒中所引起的脑损害主要是通过脑血流闭塞后脑组织

对糖氧摄取障碍以及再通后的再灌注损伤所介导,因此,通过体外进行 OGD/R 造模可以模拟缺血/再灌注损伤^[27,28]。为了探究 miR-1298 在卒中发生发展过程中的作用,本研究选用 PC-12 细胞系来探讨 miR-1298 在体外 OGD/R 模型中的作用及机制。首先通过 CCK-8 试剂盒和 LDH 细胞毒性检测 OGD/R 处理后的 PC-12 细胞发现细胞活力下降和 LDH 漏出率上升,说明细胞受到损害,证明 OGD/R 造模成功。RT-qPCR 检测模型组细胞的 miR-1298 表达也明显上升,说明细胞转染成功。细胞凋亡是一种由基因控制的细胞自主性死亡,是神经元死亡的主要途径。BCL-2 家族是脑损伤后神经细胞凋亡调控机制中重要的蛋白,其中 BCL-2 是抗凋亡保护蛋白^[29],BAX 是凋亡促进蛋白^[30],BCL-2 家族主要作用位点在线粒体膜上,其抑制细胞凋亡的作用可能与降低氧自由基的产生和脂质过氧化物的形成,抑制钙离子跨膜流动以及离子通道蛋白之间的相互作用有关^[31]。通过流式细胞术检测发现 mimic 组的细胞凋亡率明显低于 mimicNC 组,而 inhibitor 组的细胞凋亡率明显高于 inhibitorNC 组,说明 miR-1298 能降低 PC-12 细胞的凋亡率。

随后 Western blot 的结果也显示出 mimic 组的凋亡相关蛋白 BCL-2 表达高于相应的 NC 组, BAX 表达低于相应的 NC 组, inhibitor 组的结果与之相反。说明过表达 miR-1298 能够抑制 PC-12 细胞的凋亡, 而抑制 miR-1298 表达促进了 PC-12 细胞的凋亡, miR-1298 调节 PC-12 细胞凋亡的作用是通过调节凋亡蛋白 BCL-2 和 BAX 的表达实现。

综上所述, 本实验证明了在体外细胞模型中 miR-1298 能够减轻 PC-12 细胞 OGD/R 的损伤, 减少细胞的凋亡, 而 miR-1298 调控 BCL-2 和 BAX 表达的详细信号通道和分子机制还需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Xu M, Wu RX, Li XL, et al. Traditional medicine in China for ischemic stroke: bioactive components, pharmacology, and mechanisms[J]. *J Integr Neurosci*, 2022, 21(1): 26
- [2] Li J, Zhao T, Qiao H, et al. Research progress of natural products for the treatment of ischemic stroke[J]. *J Integr Neurosci*, 2022, 21(1): 14
- [3] Iso H. Cardiovascular disease, a major global burden: Epidemiology of stroke and ischemic heart disease in Japan [J]. *Glob Health Med*, 2021, 3(6): 358-364
- [4] Hara D, Akamatsu M, Mizukami H, et al. Opalski Syndrome Treated with Intravenous Recombinant Tissue Type Plasminogen Activator-Case Report and Review of Literature [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2020, 29(8): 104806
- [5] Turner AC, Schwamm LH, Etherton MR. Acute ischemic stroke: improving access to intravenous tissue plasminogen activator [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2020, 18(5): 277-287
- [6] Kadir RRA, Bayraktutan U. Urokinase Plasminogen Activator: A Potential Thrombolytic Agent for Ischaemic Stroke [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2020, 40(3): 347-355
- [7] Alakbarzade V, O'Kane D, Pereira AC. Hypersensitivity reactions to recombinant tissue plasminogen activator [J]. *Pract Neurol*, 2020, 20(1): 75-79
- [8] Bielska A, Skwarska A, Kretowski A, et al. The Role of Androgen Receptor and microRNA Interactions in Androgen-Dependent Diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1553
- [9] 冯芃若, 许莹, 虞文魁, 等. 急性缺血性脑卒中患者血清 miR-124、miR-134 表达与病情严重程度及炎症反应的关系研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2021, 21(9): 1751-1754
- [10] Florijn BW, Bijkerk R, Kruyt ND, et al. Sex-Specific MicroRNAs in Neurovascular Units in Ischemic Stroke [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11888
- [11] Wang C, Pan Y, Cheng B, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in cerebral ischemia-reperfusion injury of rat using deep sequencing[J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 54(4): 671-683
- [12] 石子璇, 饶维, 姬广辉, 等. Npas4 在小鼠原代神经体外氧糖剥夺/复氧损伤中的保护作用及其可能机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(8): 1409-1414
- [13] 舒见威, 黄春霞, 张丽, 等. 七氟醚后处理对氧糖剥夺/复氧复糖诱导 HT22 细胞 DNA 损伤及 SIRT1 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 261-267
- [14] Zhu H, Wang X, Chen S. Downregulation of MiR-218-5p Protects Against Oxygen-Glucose Deprivation/Reperfusion-Induced Injuries of PC12 Cells via Upregulating N-myc Downstream Regulated Gene 4 (NDRG4)[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26(2): e920101
- [15] Coradduzza D, Cruciani S, Arru C, et al. Role of miRNA-145, 148, and 185 and Stem Cells in Prostate Cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1626
- [16] Guz M, Jeleniewicz W, Cybulski M. An Insight into miR-1290: An Oncogenic miRNA with Diagnostic Potential [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1234
- [17] Sun P, Liu DZ, Jickling GC, et al. MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(7): 1125-1148
- [18] Li N, Pan X, Zhang J, et al. Plasma levels of miR-137 and miR-124 are associated with Parkinson's disease but not with Parkinson's disease with depression[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(5): 761-767
- [19] Wang Y, Li Q, Mambiya M, et al. A Meta-Analysis of the Association between MicroRNA-196A2 and Risk of Ischemic Stroke and Coronary Artery Disease in Asian Population [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(11): 3008-3019
- [20] Bejleri J, Jirstrom E, Donovan P, et al. Diagnostic and Prognostic Circulating MicroRNA in Acute Stroke: A Systematic and Bioinformatic Analysis of Current Evidence[J]. *J Stroke*, 2021, 23(2): 162-182
- [21] 赵丽静, 韩冰, 陈娜, 等. 缺血性脑卒中患者外周血 CBX7 的表达水平变化及其通过 Nrf2/HO-1 通路对神经元凋亡的影响 [J]. *卒中与神经疾病*, 2021, 28(4): 402-409
- [22] Chen Z, Yang J, Zhong J, et al. MicroRNA-193b-3p alleviates focal cerebral ischemia and reperfusion-induced injury in rats by inhibiting 5-lipoxygenase expression[J]. *Exp Neurol*, 2020, 327(5): 113223
- [23] Peng Z, Li M, Tan X, et al. miR-211-5p alleviates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by down-regulating the expression of COX2[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177(7): 113983
- [24] Chen W, Lu Q, Li S, et al. microRNA-1298 inhibits the malignant behaviors of breast cancer cells via targeting ADAM9[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(12): BSR20201215
- [25] Zhang H, Zhang R, Zhang G, et al. Clinical significance of miR-1298 in cervical cancer and its biological function in vitro [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(5): 401
- [26] Wang J, Liu G. Protective effect of microRNA 340 5p against oxygen glucose deprivation/reperfusion in PC12 cells through targeting neuronal differentiation 4[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(2): 964-974
- [27] 靳晓飞, 张昱宁, 周晓红, 等. 黄芪甲苷调控自噬减轻氧糖剥夺/复氧复糖 PC12 细胞氧化应激损伤研究 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(1): 53-58
- [28] 王赫, 陈凤收, 马虹, 等. 鞘内注射 miR-125b mimic 抑制小胶质细胞 NLRP3 炎症体激活减轻缺血再灌注损伤后的炎症反应 [J]. *中国医师杂志*, 2021, 23(4): 553-557
- [29] Kawiak A, KostECKA A. Regulation of Bcl-2 Family Proteins in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Their Implications in Endocrine Therapy[J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(2): 279
- [30] Spitz AZ, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(3): 206-220
- [31] Soond SM, Kozhevnikova MV, Savvateeva LV, et al. Intrinsically Connected: Therapeutically Targeting the Cathepsin Proteases and the Bcl-2 Family of Protein Substrates as Co-regulators of Apoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4669