

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.21.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 21-0021-07

MicroRNA-181b 及 Toll 样受体 4 在新生大鼠 神经元缺氧缺血损伤中的作用机制研究

阎雯¹, 齐薛浩²

(陕西省西安市儿童医院 1. 新生儿一科, 2. NICU 科, 陕西 西安 710003)

摘要: **目的** 观察 MicroRNA-181b (miRNA-181b) 及 Toll 样受体 4 (TLR4) 对新生大鼠缺氧缺血脑损伤 (HIBD) 的影响并探讨其潜在机制。 **方法** 选取 3 只 1~2 日龄新生大鼠脑皮质神经元细胞原代培养 7 d, 分为对照组和 HIBD 组。CKK-8 法测定原代培养的脑皮质神经元细胞活性, 流式细胞术检测细胞凋亡情况, 瞬时转染调节细胞内 miRNA-181b 及 TLR4 表达。双荧光素酶实验检测 miRNA-181b 对 TLR4 基因的靶向调控, SYBR Green 实时荧光定量 PCR 观察 miRNA-181b 及 TLR4 mRNA 表达变化。Western blot 观察 TLR4 蛋白在不同组别神经元细胞中的表达。 **结果** 与对照组比较, miRNA-181b 在新生大鼠缺氧缺血损伤神经元细胞中表达降低 ($P < 0.05$), miRNA-181b mimic 转染后过表达 miRNA-181b 能抑制缺血缺氧对新生大鼠神经元细胞的损伤 ($P < 0.05$)。双荧光素酶实验证实 miRNA-181b 可与 TLR4 mRNA 3'-UTR 直接结合, 发挥对 TLR4 转录后翻译的抑制作用。进一步机制研究发现, si-TLR4 转染后抑制 TLR4 表达能增加细胞活性, 而 miRNA-181b 抑制剂 anti-miRNA-181b 转染后降低细胞活性, anti-miRNA-181b 与 si-TLR4 共转染能部分逆转神经元细胞缺血缺氧下的损伤 ($P < 0.05$)。 **结论** 新生大鼠 HIBD 神经元细胞中 miRNA-181b 能够负性调控 TLR4 表达发挥一定的神经保护作用。

关键词: 新生儿缺血缺氧性脑病; MicroRNA-181b; Toll 样受体 4

中图分类号: R722.1

文献标识码: A

MicroRNA-181b regulates hypoxic-ischemic brain damage through TLR4 signaling pathway

Wen Yan¹, Xue-hao Qi²

(1. Department of neonatology, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shanxi 710003, China; 2. Department of NICU, Xi'an Children's Hospital, Xi'an, Shanxi 710003, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of MicroRNA-181b (miR-181b) and toll like receptor 4 (TLR4) in the progress of Neonatal hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) and the underlying mechanism. **Methods** Brain tissues of 1 or 2 days old SD newborn rats were isolated and cultured as primary neurons. Hypoxia ischemia cell model was established with standardized procedure. Cellular proliferation and cell apoptosis rate of primary cultured cortical neurons were determined by CKK-8 assay and flow cytometry assay, respectively. Expression of miR-181b and TLR4 was modulated by transient transfection, and the activity of TLR4 regulated by miR-181b was evaluated by a dual luciferase reporter assay. Levels of MiR-181b and TLR4 were determined by Real-time quantitative PCR and Western blot. **Results** Expression of miR-181b was significantly increased in hypoxic-ischemic damaged rat cortical neurons when compared with control group ($P < 0.05$), while overexpression of miR-181b apparently reversed hypoxia-induced cell damage ($P < 0.05$). Dual luciferase reporter assay demonstrated that miR-181b directly targeted

收稿日期: 2017-12-23

[通信作者] 齐薛浩, E-mail: qixuhao@163.com; Tel: 18991236874

the 3'-UTR of the TLR4, resulting in inhibition of the post-transcriptional translation of TLR4. Further mechanism researches revealed that knockdown of TLR4 expression by si-TLR4 transfection significantly upregulated cell viability in rat cortical neurons subjected to hypoxic-ischemic damage, which was abolished by anti-miR-181b transfection treatment. Co-transfection of anti-miR-181b and si-TLR4 in rat cortical neurons were partially attenuated hypoxia induced damage ($P < 0.05$). **Conclusions** MiR-181b protects rat cortical neurons under hypoxic-ischemic condition through regulating of TLR4.

Keywords: neonatal hypoxic ischemic encephalopathy; MicroRNA-181b (miR-181b); TLR4; mechanism research

缺血缺氧性脑病 (hypoxia-ischemic encephalopathy, HIE) 是新生儿较为常见的疾病之一, 其临床病死率高达 75%, 是目前新生儿早期死亡及小儿智力发育障碍、癫痫、小儿脑性瘫痪及其他中枢神经系统损害的主要原因, 缺血缺氧性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 后的炎症反应是新生儿 HIE 的特征性反应之一^[1]。MicroRNA (miRNA) 是真核生物中参与基因转录后调控非编码单链的小分子 RNA, miRNA 虽然仅占人类基因约 1% ~ 5%, 却能调控人类大约 60% 的 mRNA 和 30% 的蛋白编码^[2]。既往有报道指出, miRNA-181b 在中枢神经系统的急性炎症反应中通过对炎症因子肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 白介素 6 (interleukin 6, IL-6)、IL-1 β 、IL-8 及高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB-1) 表达的调控发挥重要神经保护作用^[3]。最近研究显示, miRNA-181 能够通过靶向 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 通路, 调控促炎症因子的分泌, 在烧伤、银屑病表皮细胞的过度增殖及肺脏的纤维化过程中发挥一定的保护作用^[4-6]。然而, miRNA-181b 能否在新生儿 HIE 的进展中发挥保护作用尚未见报道, 本文通过原代培养新生大鼠神经元细胞 HIBD, 体外模拟新生儿缺血缺氧的病理生理反应, 观察 miRNA-181b 在 HIE 中的作用, 并进一步探讨其可能的作用机制, 以期新的靶点的寻找提供实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

Neurobasal 培养液、B27 培养基添加剂、0.25% 胰酶及胎牛血清 (美国 Gibco 公司), CCK-8 (Cell Counting Kit-8) 细胞活性检测试剂盒 (日本同仁公司), Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒 (美国 BD 公司), 总 mRNA 提取 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒及实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) 试剂盒 (美

国 Roche 公司), 特异性引物合成 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 兔抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 及 TLR4 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司), 细胞转染试剂 Lipofectamine™ 2000 和 miRNA 第 1 链合成试剂盒 (美国 Invitrogen 公司), miRNA-181b 模拟物 (miRNA-181b mimic), miRNA-181b 无关序列 (miRNA-181b negative control, miRNA-NC) 及 miRNA-181b 抑制剂 (anti-miRNA-181b) (Ribobio 公司), si-NC (non-targeting) 及 si-TLR4 试剂盒 (美国 Ambion 公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞培养及分组 新生 1 ~ 2 日龄无特定病原体 (SPF) 斯泼累格多雷 (SD) 大鼠 3 只 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司) 常规消毒后置于超净工作台断头取脑, 在预冷的 D-Hank's 液中分离大脑皮层, 预冷的 D-Hank's 液洗净后迅速剪成 1 mm × 1 mm × 1 mm 左右的小块, 胰酶 37℃ 下消化 20 min, 每 5 分钟轻轻摇晃或吹打 1 次, 使用预冷的含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基和 Ham's F-12 营养混合物 DMEM/F12 培养液终止反应。200 目筛网过滤, 4℃, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 再用含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 新鲜培养液洗 1 次, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/L, 接种于经 0.01% 多聚赖氨酸浸泡过夜的 6 孔板中, 放入 37℃ 恒温 5% 二氧化碳 CO₂ 培养箱内培养。4 ~ 8 h 后 neurobasal+B27 营养因子培养液换全液 1 次, 接种第 4 天, 加入终浓度为 5 mol/L 的阿糖胞苷作用 24 h, 抑制胶质细胞的增殖, 以后每 4 天半量换液 1 次。取培养 7 d 的原代神经元细胞, 吸去培养液, 随机分为对照组和 HIBD 组, 其中对照组用含糖 DMEM 洗 2 次, 再加入含糖 DMEM 置于 37℃、95% 空气孵箱中继续培养 4 h。HIBD 组用无糖 DMEM 洗 2 次, 加入无糖 DMEM 培养液后, 置于 37℃、95% N₂ 的密闭缺氧室中培养 4 h。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞活性 将各组细胞以 2×10^3 个/孔密度接种于 96 孔板中, 培养箱内培养

24 h, 随后向各孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液, 轻晃混匀后置于培养箱中培养 1 h 后, 酶标仪 490 nm 波长处测光密度 (optical density, OD) 值。取 3 个复孔的 OD 值均数, 根据公式计算细胞的相对增殖率 (P%): $P\% = (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞转染 神经元细胞分别以 2×10^5 个 / 孔密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后换新鲜培养液, 按操作手册说明书以等量 DMEM 双无培养基分别稀释适量的 miRNA-181b mimic 和脂质体 Lipofectamine™ 2000, 混匀后各自室温静置 5 min, 后将两者混匀室温下共培养 20 min, 加入培养板中, 轻轻混匀, 放入培养板中继续培养, 隔 8 h 后换完全培养基继续培养, 同法转染 miRNA-181b 阴性对照 (miRNA-NC) 以及 miRNA-181b 抑制剂 (anti-miRNA-181b)。TLR4 siRNA 的转染, 当接种到 6 孔板中原代培养的神经元细胞融合达 60% 左右时, 弃完全培养基, PBS 洗 1 次, 加入 1.5 ml 无抗 DMEM 培养基。5 μ l Lipofectamine™ 2000 及 5 μ l siRNA 分别与 250 μ l 双无 DMEM 培养基混匀后, 室温培养 5 min。将上述溶液混匀后室温放置 20 min, 获得 siRNA 转染液。将 siRNA 转染液加入已换成双无 DMEM 培养基的 6 孔板中, 混匀, 继续培养 4 ~ 6 h 后, 更换为无抗 DMEM 培养基培养。24 h 后更换为含 10% 胎牛血清的完全 DMEM 培养基。

1.2.4 双荧光素酶报告检测 PCR 扩增 TLR4 mRNA 3'-UTR 并克隆至 pMD18-T 载体, 构建野生型 TLR4 基因载体 (TLR4-WT), 利用点突变方法构建 TLR4 3'-UTR 突变载体 (TLR4-Mut)。将构建的 TLR4-WT、TLR4-Mut 基因载体进行 *Xho*I 和 *Not*I 双酶切, 将野生型及含有突变位点的 TLR4-3'-UTR 克隆置于 psiCHECKTM-2 载体的海肾荧光素酶开放读码框架的下游, 构建含该野生及突变载体的双荧光素酶报告载体。将所构建的荧光素酶报告载体与 miRNA-181b mimic 表达载体或者阴性对照 miRNA-NC 载体共转染至 HEK-293 细胞, 转染后 24 h 收集细胞进行双荧光素酶报告基因测定。计算公式: 相对荧光值 = 萤火虫荧光素酶荧光值 / 海肾荧光素酶荧光值。

1.2.5 Western blot 检测 TLR4 蛋白表达 将各组原代培养的神经元细胞用 0.05% 胰蛋白酶消化后 PBS 洗涤 3 次, 加入 450 μ l 蛋白裂解液裂解细胞, BCA 法测定蛋白浓度, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 封闭后兔抗小

鼠一抗 GAPDH (1 : 2 000) 及兔抗鼠 TLR4 (1 : 500) 4 $^{\circ}$ C 过夜, HRP 标记山羊抗兔二抗 (1 : 2 000), 常温下作用 1 h, Western blot 检测 TLR4 蛋白表达, Fluor Chem Q 凝胶成像系统 (美国 Alpha Innotech 公司) 显影, Scion Image 图像分析系统对条带进行分析, 目的蛋白的相对含量以目的蛋白与 GAPDH 条带光密度的比值表示。

1.2.6 SYBR Green qRT-PCR 检测 miRNA-181b 和 TLR4 mRNA 表达 Trizol 抽提法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计测吸光度值确定 RNA 的浓度和纯度。Quantscript RT kit 逆转录合成 cDNA, PCR 扩增引物采用 Oligo 6.0 设计, 引物及其序列分别为 (5'-3'): miRNA-181b, 正向 AACATTCATTGCTGTCGGT, 反向 CCGCCTAACGTACCGCGAATTT; U6, 正向 GCTTCGG CAGCACATATACTAA, 反向 AACGCTTCACGAATTTG CGT; TLR4, 正向 GGCATCATCTTCATTGTCCCTG, 反向 AGCATTGTCTCCCACTCG; GAPDH, 正向 GGAG CGAGATCCCTCCAAAAT, 反向 GGCTGTTGTCATACTT CTCATGG。采用 SYBR Green I (美国 Roche 公司) 荧光染料嵌合法 20 μ l 反应体系, 即 10 μ l SYBR Green real-time PCR Master Mix, 1 μ l 0.2 μ mol/L 引物, 2 μ l cDNA 及 7 μ l 无菌双蒸水。避光置于 qRT-PCR 仪 (ABI 7500 Fast PCR) 采集荧光信号检测 miRNA-181b 及 TLR4 mRNA 表达, U6 及 GAPDH 分别作为 miRNA-181b 及 TLR4 mRNA 内参, ABI7500 配套软件采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 处理数据。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

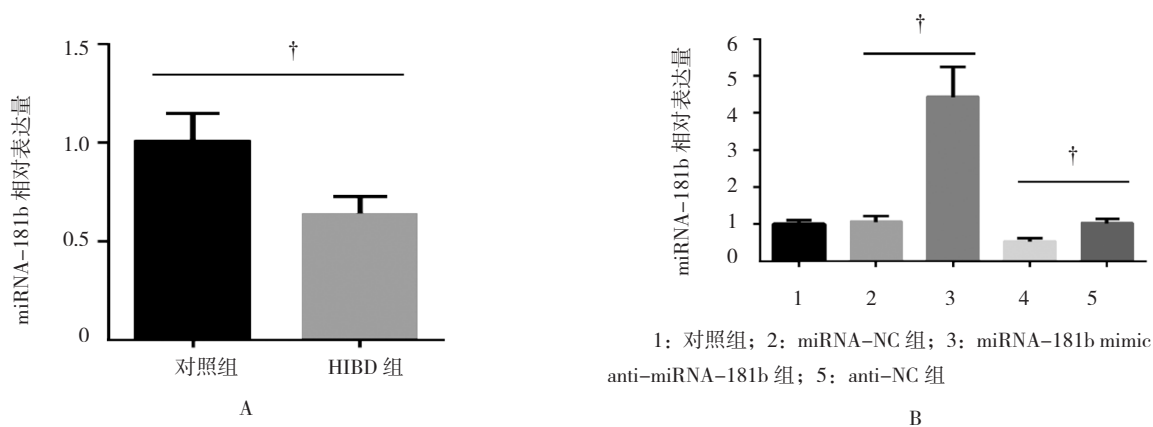
2.1 HIBD 组神经元细胞中 miRNA-181b 的表达

新生大鼠神经元细胞培养 8 d 后, HIBD 组与对照组比较, 差异有统计学意义 (0.64 ± 0.08 vs 1.01 ± 0.14 , $t = 3.974$, $P = 0.017$)。HIBD 组神经元细胞中 miRNA-181b 表达量降低。见图 1A。anti-miRNA-181b 及 miRNA-181b mimic 的转染效率, 见图 1B, 方差分析结果显示各组间 miRNA-181b 表达量有差异 ($F = 50.365$, $P = 0.000$), 其中, 与对照组比较, miRNA-NC 和 anti-NC 组神经元细胞 miRNA-181b 表达量均无明显变化, miRNA-181b mimic 组较 miRNA-NC 组

神经元细胞 miRNA-181b 表达增高 (4.42 ± 0.83 vs 1.06 ± 0.17 , $P < 0.05$), anti-miRNA-181b 组较 anti-NC 组神经元细胞 miRNA-181b 表达降低 (0.53 ± 0.09 vs 1.02 ± 0.13 , $P < 0.05$)。

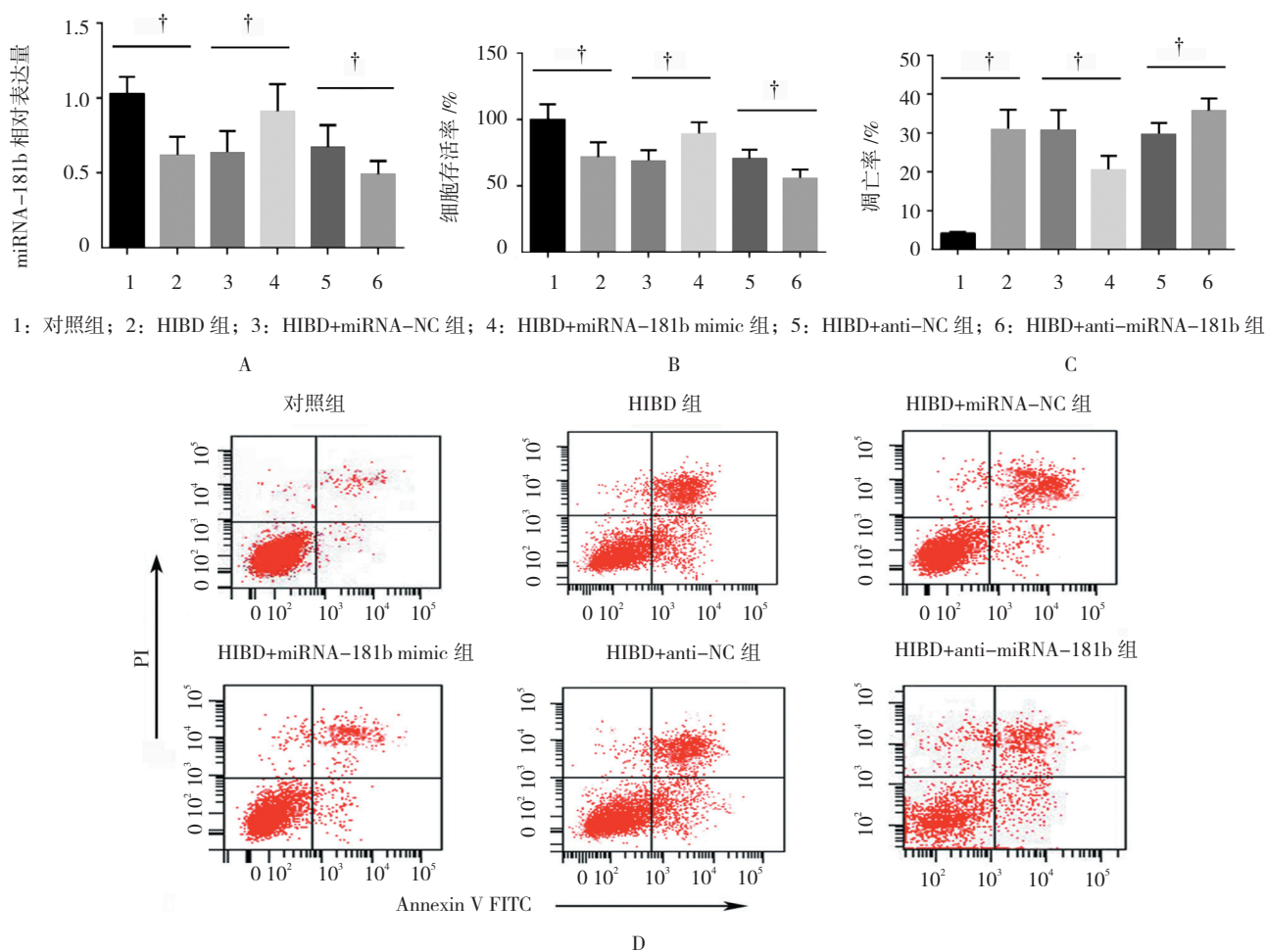
2.2 miRNA-181b 过表达对新生大鼠神经元细胞缺血缺氧损伤的影响

miRNA-181b 在各组神经元细胞中的表达水平有差异 ($F = 15.322$, $P = 0.000$) (见图 2A), 流式细胞仪及 CKK-8 检测结果 (见图 2B、2C 及 2D) 显示, 细胞存



A: 两组细胞中 miRNA-181b 表达量; B: anti-miRNA-181b 及 miRNA-181b mimic 转染效率。† 组间比较, $P < 0.05$

图 1 不同处理组神经元细胞中 miRNA-181b 表达水平比较



A: 各组细胞中 miRNA-181b 表达量; B: 各组检测细胞的存活率; C、D: 各组细胞凋亡率。† 组间比较, $P < 0.05$

图 2 miRNA-181b 过表达对新生大鼠神经元细胞缺血缺氧损伤的影响

活率及凋亡率在各组间有差异 ($F=11.496$ 和 32.312 , 均 $P=0.000$)。其中与对照组比较, 缺血缺氧能增加神经元细胞凋亡 (31.20 ± 4.90 vs 3.99 ± 0.54 , $P=0.001$), 降低细胞活性 (71.50 ± 11.20 vs 100.15 ± 11.50 , $P=0.037$)。miRNA-181b mimic 转染后, 部分逆转缺血缺氧所诱导的神经元细胞凋亡 (20.60 ± 3.50 vs 30.90 ± 5.01 , $P=0.043$), 增加细胞活性 (89.50 ± 7.20 vs 69.00 ± 6.45 , $P=0.021$)。此外, anti-miRNA-181b 转染后抑制神经元细胞中 miRNA-181b 表达会进一步加重缺血缺氧对新生大鼠神经元细胞的损伤, 增加细胞凋亡 (35.80 ± 3.00 vs 29.90 ± 2.10 , $P=0.049$), 降低细胞活性 (55.90 ± 4.72 vs 70.4 ± 4.93 , $P=0.021$)。

2.3 miRNA-181b 在新生大鼠神经元细胞中靶向调控 TLR4 表达

应用 <http://www.microrna.org> 及 <http://www.targetscan.org> 对 miRNA-181b 进行在线分析预测, 发现 miRNA-181b 与 TLR4 mRNA 的 3'-UTR 存在结合序列 (见图 3A)。双荧光素酶报告检测结果显示各组间荧光素酶活性有差异 ($F=4.810$, $P=0.034$), 其中与 miRNA-NC 组比较, miRNA-181b mimic 转染组能抑制 TLR4 mRNA 的 3'-UTR 载体的相对荧光素酶活性 (0.62 ± 0.07 vs 0.97 ± 0.19 , $P=0.040$)。而对

TLR4 mRNA 该段序列进行突变 (TLR4-Mut) 后, 该抑制作用消失 (见图 3B) (1.03 ± 0.11 vs 0.90 ± 0.17 , $P=0.329$), 本结果提示 miRNA-181b 对 TLR4 存在直接的靶向关系。此外, 在原代培养的新生大鼠神经元细胞中转染 miRNA-181b mimic 后降低 TLR4 的表达 (0.62 ± 0.09 vs 1.09 ± 0.16 , $P=0.011$), 各组间 TLR4 表达水平有差异 ($F=15.721$, $P=0.004$) (见图 3C)。

2.4 TLR4 介导缺血缺氧下的神经元损伤

Western blot 检测结果显示, 各组细胞 TLR4 表达水平有差异 ($F=11.820$, $P=0.003$), 其中 HIBD 组神经元细胞中 TLR4 表达增加 (2.26 ± 0.43 vs 1.01 ± 0.12 , $P=0.008$), si-TLR4 转染后 48 h, TLR4 表达降低 (1.48 ± 0.26 vs 2.35 ± 0.39 , $P=0.032$) (见图 4A)。CKK-8 检测结果发现不同处理组细胞存活率有差异 ($F=22.859$, $P=0.000$), TLR4 成功敲减能增加缺血缺氧下新生大鼠神经元细胞的活性 (88.5 ± 7.2 vs 65.7 ± 6.1 , $P=0.014$) (见图 4B)。

进一步研究结果显示, 不同处理组 TLR4 表达水平及神经元细胞活性有差异 ($F=22.693$ 和 6.648 , 均 $P=0.015$), anti-miRNA-181b 转染后 TLR4 蛋白表达增加 (3.27 ± 0.42 vs 1.06 ± 0.09 , $P=0.001$) 并伴随细胞活性的降低 (71.5 ± 13.1 vs 100.2 ± 9.2 , $P=0.036$), anti-miRNA-181b 与 si-TLR4 共转染逆转 TLR4 表达的增加 (1.96 ± 0.33 vs 3.36 ± 0.57 , $P=0.013$), 同时部分恢复缺血缺氧下神经元细胞的活性 (94.2 ± 11.2 vs 66.1 ± 11.1 , $P=0.037$) (见图 4C、4D)。

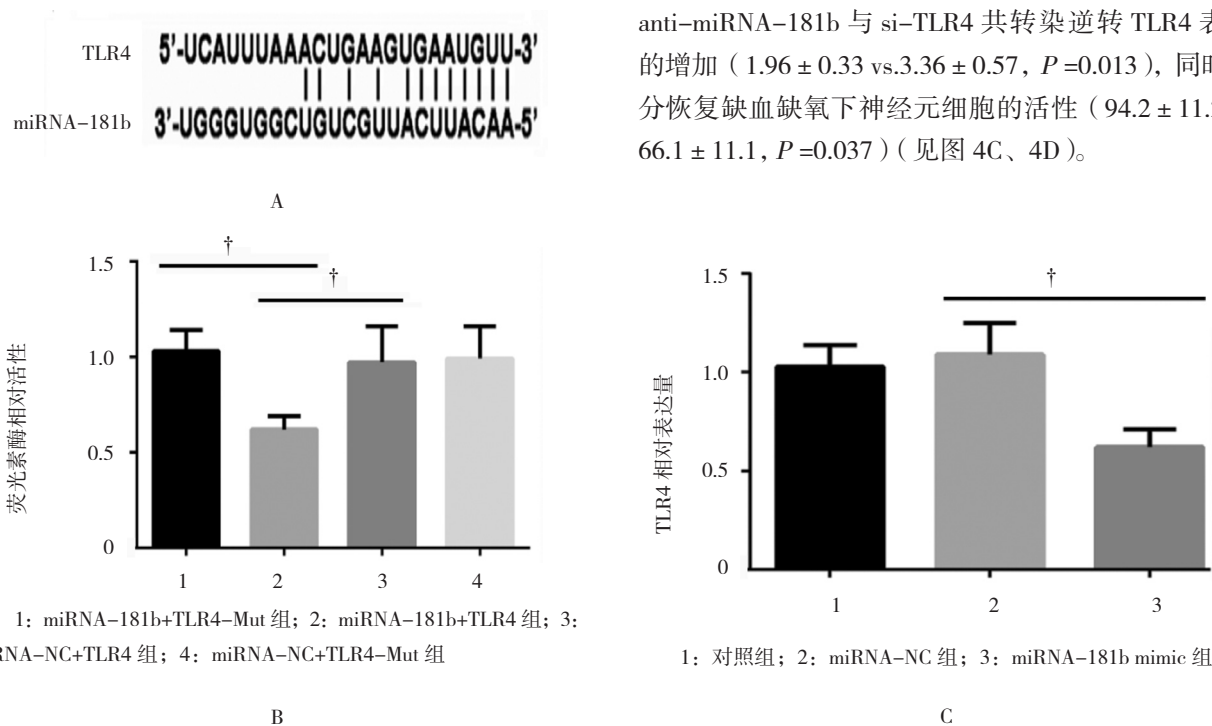
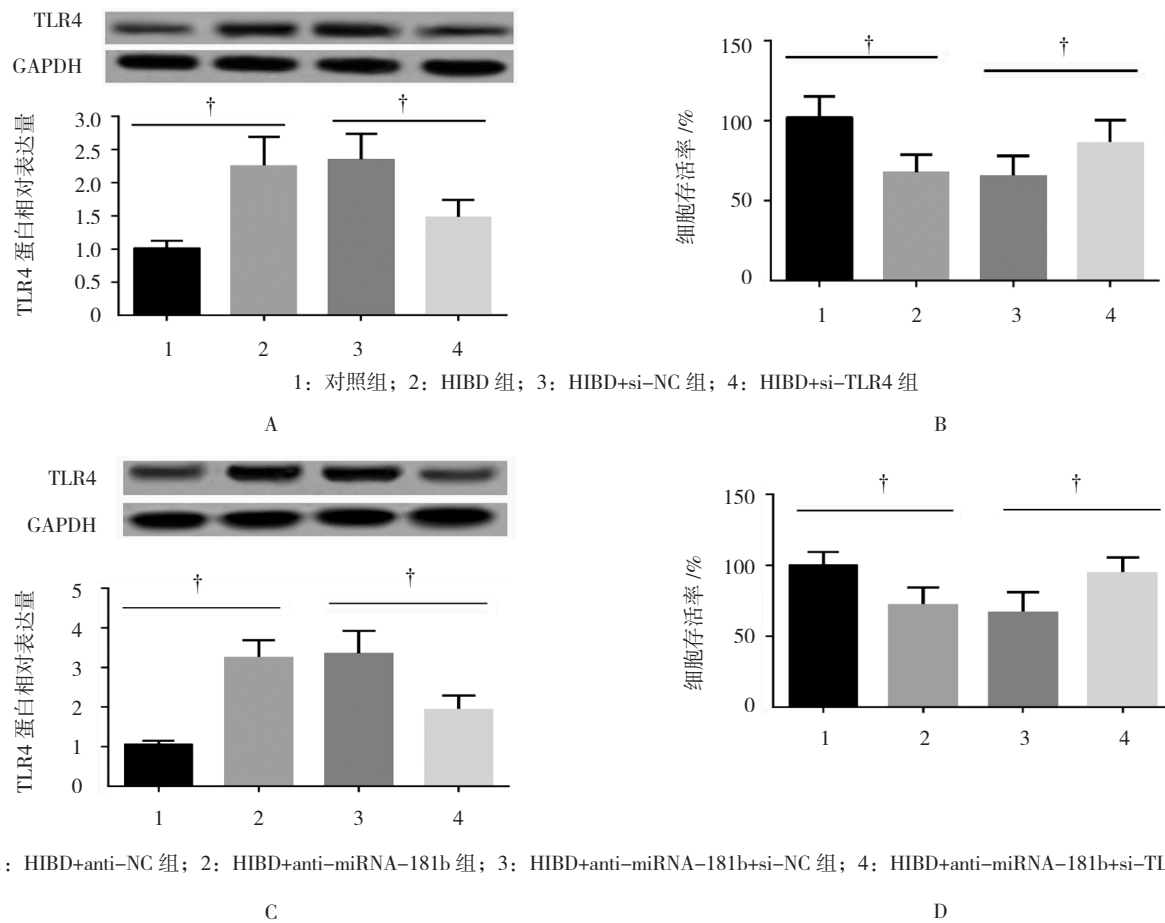


图 3 miRNA-181b 在新生大鼠神经元细胞中靶向调控 TLR4 表达



1: HIBD+anti-NC 组; 2: HIBD+anti-miRNA-181b 组; 3: HIBD+anti-miRNA-181b+si-NC 组; 4: HIBD+anti-miRNA-181b+si-TLR4 组
A: si-TLR4 转染后, 各组细胞中 TLR4 蛋白表达量; B: si-TLR4 转染后, 各组细胞存活率; C: anti-miRNA-181b 与 si-TLR4 共转染后, 各组细胞中 TLR4 蛋白表达量; D: anti-miRNA-181b 与 si-TLR4 共转染后, 各组细胞存活率。† 组间比较, $P < 0.05$

图 4 TLR4 介导缺血缺氧下的神经元损伤

3 讨论

既往研究显示, 新生儿 HIBD 可引起不可逆的脑损伤, 导致一系列的神经系统后遗症, 发生过 HIBD 而存活的新生儿中约 25% 出现脑性瘫痪、癫痫及智力落后等永久性神经精神缺陷, 给社会和家庭带来沉重的经济精神负担^[7]。新生儿 HIBD 的发病机制复杂, 临床疗效差, 至今尚无统一、有效的治疗方案能防止神经系统后遗症的发生。因此, 深入研究新生儿 HIBD 分子生物学机制, 寻找新生儿 HIBD 治疗的新靶点是医学专业者亟待解决的问题。有文献报道指出 miRNA-181b 能通过调控 NF- κ B 信号通路在急性肺损伤中发挥一定的抗炎作用^[8]。与该研究类似, 本研究中发现, miRNA-181b 在新生大鼠神经元细胞 HIBD 模型中表达降低, 双荧光素酶报告结果显示 miRNA-181b 能靶向作用于 TLR4, 通过调控 TLR4 的表达, 在新生大鼠神经元细胞缺血缺氧时发挥抑制细胞凋亡,

增加细胞活性的保护性作用。

miRNAs 是一类含有约 22 个核苷酸序列组成的内源性非编码单链 RNA, 广泛参与细胞的分化、免疫、炎症及慢性疼痛等过程的调制^[9]。最近研究报道发现, 在肿瘤, 神经系统及心血管疾病领域中有多个 miRNA 与缺血缺氧密切相关, 其中 miRNA-181b 是 1 个多次出现而又倍受关注的 miRNA, 研究中发现, miRNA-181b 不仅能够通过对调节热休克蛋白 A5 以及泛素型羧基末端水解酶 L1 表达的调控在缺血缺氧性脑卒中病程进展中发挥一定的神经保护作用, 还可通过对巨噬细胞中 IL-6 的调节改变细胞对内毒素的耐受性^[10-12]。本研究中发现, miRNA-181b 转染后过表达 miRNA-181b 可减轻缺血缺氧下神经元细胞的凋亡, 增加细胞活性。因此, 可以推断缺血缺氧后神经细胞中 miRNA-181b 的表达下调可能是缺氧缺血性脑组织病理损伤的分子机制之一, miRNA-181b 表达增加可能

改善缺血缺氧下的脑损伤, 为新生儿缺氧缺血性损伤的治疗提供一个新的研究方向。

TLRs 是 I 型跨膜受体超家族, 广泛分布于中枢神经系统, 在免疫炎症反应的诱导和调节中起重要作用^[13]。既往有研究指出, 小鼠在缺失 TLR4 后炎症因子表达减少, 从而避免脑部缺血再灌注损伤, 提示 TLR4 可参与缺血再灌注损伤过程中的炎症反应。此外, 有研究证实早产儿与 TLRs 多态性存在密切关系, 且胎鼠及新生鼠中 TLR4 的过度激活与脑损伤的关系确切^[14-15]。然而, 关于 TLR4 在新生儿脑损伤中作用机制, 尤其是与 miRNAs 相互作用的研究尚未见报道, 本研究中发现缺血缺氧下 miRNA-181b 的表达下调, 负性调控 TLR4 蛋白表达增多, 促进神经元细胞死亡, TLR4 敲减后逆转缺血缺氧下神经元细胞的凋亡, 提示 TLR4 介导新生大鼠神经元细胞缺血缺氧损伤在脑损伤, 在新生儿 HIBD 过程中可能发挥神经毒性作用。

综上所述, 本研究发现在新生儿 HIBD 中 miRNA-181b 能通过负性调控 TLR4 表达缓解缺血缺氧下的脑损伤。本研究阐述 miRNA-181b 及 TLR4 在新生儿 HIBD 过程中的意义, 证实 miRNA-181b 与 TLR4 靶向关系, 补充新生儿 HIBD 过程的细胞分子生物学机制。值得注意的是新生儿 HIBD 机制复杂, 涉及多种细胞因子、炎症介质、受体以及离子通道, 且病情变化迅速, 后遗效应严重, 在以后的研究中, 希望能够进一步多角度明确参与新生儿 HIBD 的 miRNAs 及其各分子靶标, 阐明其作用机制, 为新生儿 HIBD 的治疗提供有效的药物合成新的靶点。

参 考 文 献:

- [1] ZALEWSKA T, JAWORSKA J, ZIEMKA-NALECZ M. Current and experimental pharmacological approaches in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21(11): 1433-1439.
- [2] LEE H J. Exceptional stories of microRNAs[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2013, 238(4): 339-343.
- [3] HUTCHISON E R, KAWAMOTO E M, TAUB D D, et al. Involvement of miR-181 in neuroinflammatory responses of astrocytes[J]. *Glia*, 2013, 61(7): 1018-1028.
- [4] XIAO L, LIU L, JING Y, et al. Exosome derived from human umbilical cord mesenchymal stem cell mediates miR-181c attenuating burn-induced excessive inflammation[J]. *E Bio Medicine*, 2016, 6(8): 72-82.
- [5] FENG C, BAI M, YU N Z, et al. MicroRNA-181b negatively regulates the proliferation of human epidermal keratinocytes in psoriasis through targeting TLR4[J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(2): 278-285.
- [6] TAO L, YANG J, CAO F, et al. Mogroside III, a Novel anti-fibrotic compound, reduces pulmonary fibrosis through Toll-like receptor 4 pathways[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 361(2): 268-279.
- [7] DOUGLAS-ESCOBAR M, WEISS M D. Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician[J]. *JAMA Pediatr*, 2015, 169(4): 397-403.
- [8] WANG Y, MAO G, LV Y, et al. MicroRNA-181b stimulates inflammation via the nuclear factor-kappa B signaling pathway in vitro[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(4): 1584-1590.
- [9] ZHONG X, MA X, ZHANG L, et al. MIAT promotes proliferation and hinders apoptosis by modulating miR-181b/STAT3 axis in ox-LDL-induced atherosclerosis cell models[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 9(97): 1078-1085.
- [10] PENG Z, LI J, LI Y, et al. Downregulation of miR-181b in mouse brain following ischemic stroke induces neuroprotection against ischemic injury through targeting heat shock protein A5 and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1[J]. *J Neurosci Res*, 2013, 91(10): 1349-1362.
- [11] YOO J O, KWAK S Y, AN H J, et al. miR-181b-3p promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells through Snail stabilization by directly targeting YWHAG[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(7 Pt A): 1601-1611.
- [12] ZHANG W, SHEN X, XIE L, et al. MicroRNA-181b regulates endotoxin tolerance by targeting IL-6 in macrophage RAW264.7 cells[J]. *J Inflamm (Lond)*, 2015, 2(12): 18-20.
- [13] VARTANIAN K, STENZEL-POORE M. Toll-like receptor tolerance as a mechanism for neuroprotection[J]. *Transl Stroke Res*, 2010, 1(4): 252-260.
- [14] BARBOZA R, LIMA F A, REIS A S, et al. TLR4-mediated placental pathology and pregnancy outcome in experimental malaria[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 8623-8629.
- [15] CHURCH J S, KIGERL K A, LERCH J K, et al. TLR4 deficiency impairs oligodendrocyte formation in the injured spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2016, 36(23): 6352-6364.

(王荣兵 编辑)