

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.003

View this article at: <https://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.003>

MiR-199a 对缺氧 / 复氧诱导的大鼠脑皮层神经元 细胞活力及凋亡的影响

巩雨, 樊嘉欣, 高震, 王虎清, 吴海琴

(西安交通大学第二附属医院神经内科, 西安 710004)

[摘要] 目的: 探讨miR-199a对缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力及凋亡的影响。方法: 在体外培养大鼠脑皮层神经元细胞, 采用缺氧/复氧的方式处理细胞建立细胞损伤模型并记作Model组; 将正常培养的细胞作为对照(Con)组。分别将空载体、miR-199a mimic转染至大鼠脑皮层神经元细胞, 建立缺氧/复氧细胞损伤模型, 分别记作Model+NC组或Model+miR-199a mimic组。将miR-199a mimic转染至大鼠脑皮层神经元细胞后加入PI3K-AKT信号通路抑制剂LY294002处理, 随后建立缺氧/复氧细胞损伤模型, 记作Model+miR-199a mimic+LY294002组。采用反转录PCR法检测miR-199a的表达量, 应用流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率, 采用MTT法检测细胞活力, 采用蛋白质印迹法检测cleaved-caspase3、pro-caspase3、p-PI3K、p-AKT蛋白表达量。结果: 与Con组比较, Model组miR-199a的表达水平、细胞活力、S期细胞比例及pro-caspase3、p-PI3K、p-AKT蛋白表达水平均显著降低, G₀~G₁期细胞比例、细胞凋亡率及cleaved-caspase3蛋白表达水平均显著提高, 差异均有统计学意义(均P<0.001)。与Model+NC组比较, Model+miR-199a mimic组细胞活力、S期细胞比例及pro-caspase3、p-PI3K、p-AKT蛋白表达水平均显著提高, G₀~G₁期细胞比例、细胞凋亡率及cleaved-caspase3蛋白表达水平均显著降低, 差异均有统计学意义(均P<0.001)。与Model+miR-199a mimic组比较, Model+miR-199a mimic+LY294002组细胞活力、S期细胞比例及pro-caspase3蛋白表达水平均显著降低, G₀~G₁期细胞比例、细胞凋亡率及cleaved-caspase3蛋白表达水平均显著提高, 差异均有统计学意义(P<0.05)。结论: MiR-199a过表达可改善缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力并抑制细胞凋亡, 从而减轻细胞损伤; 这些生物学效应可能是通过激活PI3K-AKT信号通路产生的。

[关键词] miR-199a; 缺氧/复氧; 脑皮层神经元细胞; 活力; 凋亡; AKT; 大鼠

Effects of miR-199a on the viability and apoptosis of rat cerebral cortical neurons cells induced by hypoxia/reoxygenation

GONG Yu, FAN Jiixin, GAO Zhen, WANG Huqing, WU Haiqin

(Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

Abstract **Objective:** To explore the effect of miR-199a on the viability and apoptosis of rat cerebral cortical neurons cells

收稿日期 (Date of reception): 2021-11-15

通信作者 (Corresponding author): 吴海琴, Email: whq60@163.com

基金项目 (Foundation item): 陕西省重点研发计划 (2017SF-181)。This work was supported by the Key R & D Plan of Shaanxi Province, China (2017SF-181).

induced by hypoxia/reoxygenation. **Methods:** Rat cerebral cortical neurons cells were cultured in vitro and treated with hypoxia/reoxygenation to establish the cell injury model and recorded as Model group, and normal cultured cells were used as control (Con) group. Empty vector and miR-199a mimic were respectively transfected into rat cerebral cortical neurons cells, and then hypoxia/reoxygenation cell injury models were established, which were recorded as Model + NC group or Model + miR-199a mimic group, respectively. After miR-199a mimic was transfected into rat cerebral cortical neurons cells, PI3K-AKT signaling pathway inhibitor LY294002 was added for treatment, and then hypoxia/reoxygenation cell injury model was established and recorded as Model + miR-199a mimic + LY294002 group. Then, the expression of miR-199a was detected by RT-PCR, the cell cycle and apoptosis rate were detected by flow cytometry, the cell viability was detected by MTT, and the expression of Cleaved-caspase3, pro-caspase3, p-PI3K and p-AKT proteins were detected by Western blot. **Results:** Compared with Con group, the expression level of miR-199a, cell viability, S-phase cell proportion and the expression levels of pro-caspase3, p-PI3K and p-AKT protein in Model group were significantly lower, while the cell proportion of G₀-G₁ phase, the apoptosis rate and the expression level of cleaved-caspase3 protein were significantly higher in Model group ($P<0.05$). Compared with the Model + NC group, the cell viability, the proportion of S-phase cells and the expression levels of pro-caspase3, p-PI3K and p-AKT protein in the Model + miR-199a mimic group were significantly increased, while the proportion of G₀-G₁ phase cells, the rate of apoptosis and the expression level of cleaved-caspase3 protein were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the Model + miR-199a mimic group, the cell viability, the proportion of S-phase cells and the expression level of pro-caspase3 protein in the Model + miR-199a mimic + LY294002 group were significantly decreased, and the proportion of G₀-G₁ phase cells, the apoptosis rate and the expression level of cleaved-caspase3 protein were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion:** The overexpression of miR-199a could improve the viability of rat cerebral cortical neurons cells induced by hypoxia/reoxygenation and inhibit cell apoptosis, thereby reducing cell damage. The above biological effects may be achieved by activating PI3K-Akt signaling pathway.

Keywords miR-199a; hypoxia/reoxygenation; cerebral cortical neurons cells; viability; apoptosis; AKT; rat

脑卒中是临床常见疾病,是导致死亡加伤残的全球第三大原因,其中缺血性脑卒中占脑卒中的62.4%^[1]。缺血缺氧是造成脑组织损伤的重要原因之一,但关于其具体作用机制尚未阐明,因而探究其分子机制及治疗靶点对提高治疗效果具有重要意义^[2-3]。微小RNA(microRNA, miRNA)可能参与脑卒中等脑血管疾病发生及发展过程^[4-5]。由于微小RNA-199a(miRNA-199a, miR-199a)在窒息新生儿血清中的表达水平降低,可能在缺氧性脑损伤中发挥调控作用^[6];磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/AKT)信号通路与细胞活力及凋亡等生物学过程密切相关,其激活可抑制神经细胞凋亡从而保护脑组织^[7],但miR-199a是否可调控缺血性脑卒中的发展以及PI3K-AKT信号通路是否参与介导该过程尚未可知。因此,本研究采用缺氧/复氧建立大鼠脑皮层神经元细胞损伤模型,探讨miR-199a对缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力及凋亡的影响,并探究其对PI3K-

AKT信号通路的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠脑皮层神经元细胞购自上海名劲生物科技有限公司;PI3K-AKT信号通路抑制剂LY294002购自美国Selleck公司;DMEM培养基购自上海沪震生物科技有限公司;胎牛血清购自上海中乔新舟生物科技有限公司;LipofectamineTM2000购自上海素尔生物科技有限公司;TRIzol、反转录与real-time PCR试剂购自北京天根生化科技有限公司;MTT试剂购自上海华雅思创生物科技有限公司;凋亡检测试剂盒购自北京博迈斯科技发展有限公司;miR-199a mimic、空载体(NC)购自广州锐博生物技术有限公司;兔抗鼠cleaved-caspase3、pro-caspase3抗体购自美国Santa Cruz公司;兔抗鼠p-PI3K、p-AKT抗体购自北京普利莱基因技术有限公司;HRP标记的山羊抗兔IgG二抗购自北京中杉

金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及转染

转染前1 d收集对数生长期大鼠脑皮层神经元细胞,待细胞生长融合度达到70%时进行转染,接种于6孔板(3×10^5 个/孔)。采用不含胎牛血清的培养基(250 μ L)分别稀释NC、miR-199a mimic并室温孵育5 min,采用不含胎牛血清的培养基(250 μ L)稀释脂质体LipofectamineTM2000(10 μ L)并室温孵育5 min。将含NC或miR-199a mimic的转染物稀释液与脂质体稀释液充分混匀后室温孵育20 min,将其加入6孔板的细胞中(400 μ L/孔),转染6 h后弃培养液,更换正常培养液培养48 h后构建缺氧/复氧模型,并分别记作Model+NC组、Model+miR-199a mimic组。按上述方法转染miR-199a mimic的24 h后,加入含有浓度为0.3 mg/mL的LY294002处理24 h^[8],随后构建缺氧/复氧模型,并记作Model+miR-199a mimic+LY294002组。将同期未转染的细胞构建缺氧/复氧模型并记作Model组,正常培养的细胞作为对照(Con)组。

1.2.2 缺氧/复氧模型构建

大鼠脑皮层神经元细胞接种于96孔板(5×10^3 个/孔),待细胞生长融合度达到80%时将培养液更换为缺氧液,置于缺氧密闭容器(95% N₂、5% CO₂)内缺氧处理3 h,更换复氧培养液,置于复氧容器(95% O₂、5% CO₂)内复氧处理2 h,建立缺氧/复氧模型^[9]。造模后在37 $^{\circ}$ C、体积分数5% CO₂培养箱内培养用于后续实验。

1.2.3 反转录PCR检测细胞中miR-199a的表达水平

采用TRIzol法提取各组大鼠脑皮层神经元细胞总RNA,将总RNA反转录合成cDNA(严格按照试剂盒说明书进行操作),以cDNA为模板进行real-time PCR反应,按照荧光定量PCR试剂盒说明书检测miR-199a相对表达量。miR-199a正向引物5'-GCGCCAGTGTTCAGA-3',反向引物5'-GTCGTATCCAGTCAG-3'; U6正向引物5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3',反向引物5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3'。每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.4 检测细胞周期

各组大鼠脑皮层神经元细胞(1×10^6 个/mL)接种于96孔板(100 μ L/孔),加入预冷PBS,以3 000 r/min离心5 min,弃上清。加入预冷PBS重悬细胞(500 μ L),加入预冷70%乙醇(3.5 mL),充分混匀,4 $^{\circ}$ C孵育24 h,3 000 r/min离心5 min,弃上清。向细胞沉淀

中加入RNaseA(50 μ L),水浴30 min(37 $^{\circ}$ C)。加入PI染色液450 μ L,4 $^{\circ}$ C孵育30 min,应用BD AccuriTM C6 Plus流式细胞仪检测各组细胞周期所占比例。每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.5 MTT检测细胞活力

取各组大鼠脑皮层神经元细胞(2.5×10^5 个/mL)接种于96孔板(100 μ L/孔),加入MTT溶液(20 μ L/孔)后继续培养4 h,弃上清。分别加入DMSO(150 μ L/孔),于室温振荡孵育5 min,应用酶标仪检测各孔光密度值(OD值)。每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率

取各组大鼠脑皮层神经元细胞加入预冷PBS洗涤,弃上清。加入500 μ L结合缓冲液重悬细胞,参照试剂盒说明书操作,应用BD FACS DIVA软件检测各组细胞凋亡率。每组3个复孔,实验重复3次。

1.2.7 蛋白质印迹法检测cleaved-caspase3、pro-caspase3、p-PI3K、p-AKT蛋白质表达

提取大鼠脑皮层神经元细胞总蛋白质,取适量蛋白样品进行SDS-PAGE反应,转移至PVDF膜,室温封闭2 h。分别孵育一抗稀释液(1:1 000)与二抗稀释液(1:2 000),于室温孵育1 h,曝光显影后应用Image J软件分析各条带灰度值。每组3个复孔,实验重复3次。

1.3 统计学处理

采用SPSS 21.0统计学软件分析数据,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,且均符合正态分布,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(两两比较采用LSD- t 检验), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MiR-199a对缺氧/复氧大鼠脑皮层神经元细胞周期及细胞活力的影响

与Con组比较,Model组、Model+NC组miR-199a的表达水平降低、G₀~G₁期细胞比例升高、S期细胞比例降低、OD值降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);但G₂~M期细胞比例比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。与Model组、Model+NC组比较,Model+miR-199a mimic组miR-199a的表达水平升高、G₀~G₁期细胞比例降低、S期细胞比例升高、OD值升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$);但G₂~M期细胞比例比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表1)。

表1 MiR-199a对缺氧/复氧模型细胞周期及细胞活力的影响

Table 1 Effects of miR-199a on cell cycle and cell viability in hypoxia/reoxygenation model

组别	miR-199a	G ₀ ~G ₁ /%	S/%	G ₂ ~M/%	OD值
Con组	1.01 ± 0.06	33.35 ± 1.18	33.45 ± 1.24	32.70 ± 1.11	1.35 ± 0.10
Model组	0.24 ± 0.02*	46.03 ± 1.30*	21.38 ± 1.00*	32.83 ± 1.42	0.58 ± 0.06*
Model+NC组	0.24 ± 0.02*	46.00 ± 1.59*	21.36 ± 0.97*	33.07 ± 1.28	0.59 ± 0.06*
Model+miR-199a mimic组	0.79 ± 0.05 ^{*#&}	37.04 ± 1.33 ^{*#&}	29.47 ± 1.08 ^{*#&}	32.89 ± 1.19	1.18 ± 0.07 ^{*#&}
F	731.371	201.737	283.917	0.133	257.537
P	<0.001	<0.001	<0.001	0.940	<0.001

与Con组相比, * $P < 0.01$; 与Model组相比, [#] $P < 0.01$; 与Model+NC组相比, [&] $P < 0.01$ 。

Compared with Con group, * $P < 0.01$; Compared with Model group, [#] $P < 0.01$; Compared with Model+NC group, [&] $P < 0.01$.

2.2 MiR-199a对缺氧/复氧大鼠脑皮层神经元细胞凋亡的影响

与Con组比较, Model组、Model+NC组凋亡率升高、Cleaved-caspase3蛋白水平升高、pro-caspase3蛋白水平降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与Model组、Model+NC组比较, Model+miR-199a mimic组凋亡率降低、cleaved-caspase3蛋白水平降低、pro-caspase3蛋白水平升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$; 图1, 表2)。

2.3 MiR-199a对缺氧/复氧大鼠脑皮层神经元细胞中PI3K-AKT信号通路的影响

与Con组比较, Model组、Model+NC组p-PI3K、p-AKT蛋白水平显著降低, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。与Model组、Model+NC组比较, Model+miR-199a mimic组p-PI3K、p-AKT蛋白水平显著升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$; 图2, 表3)。

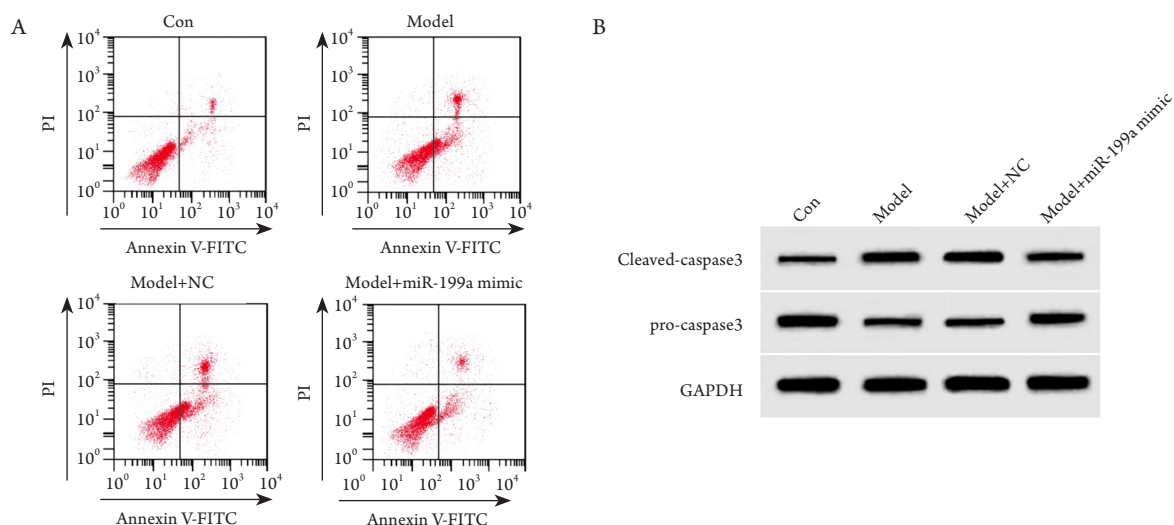


图1 MiR-199a对缺氧/复氧模型细胞凋亡及caspase3蛋白表达情况的作用

Figure 1 Effects of miR-199a on cell apoptosis and caspase3 protein expression in hypoxia/reoxygenation model

(A) 流式细胞术检测细胞凋亡; (B) 蛋白质印迹法检测蛋白质表达。

(A) Cell apoptosis detected by flow cytometry; (B) Protein expression detected by Western blotting.

表2 MiR-199a对缺氧/复氧模型细胞凋亡及caspase3蛋白表达的影响

Table 2 Effects of miR-199a on cell apoptosis and caspase3 protein expression in hypoxia/reoxygenation model

组别	凋亡率/%	Cleaved-caspase3	Pro-caspase3
Con组	7.89 ± 0.38	0.13 ± 0.01	0.78 ± 0.05
Model组	25.20 ± 1.18*	0.62 ± 0.05*	0.16 ± 0.01*
Model+NC组	25.47 ± 1.25*	0.63 ± 0.05*	0.16 ± 0.01*
Model+miR-199a mimic组	13.23 ± 0.60**&	0.26 ± 0.02**&	0.56 ± 0.04**&
F	806.311	457.449	845.566
P	<0.001	<0.001	<0.001

与Con组相比, * $P < 0.01$; 与Model组相比, * $P < 0.01$; 与Model+NC组相比, & $P < 0.01$ 。

Compared with Con group, * $P < 0.01$; Compared with Model group, * $P < 0.01$; Compared with Model+NC group, & $P < 0.01$.

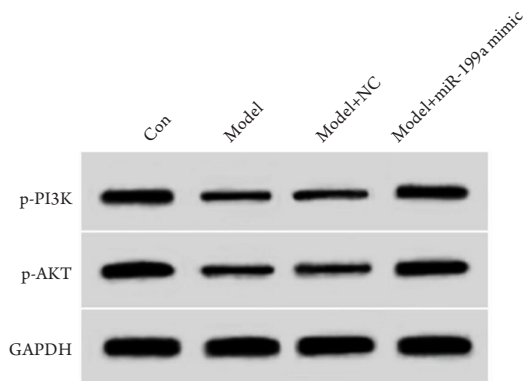


图2 PI3K-AKT信号通路蛋白表达情况检测

Figure 2 Detection of the expression of PI3K-AKT signaling pathway protein

2.4 PI3K抑制剂对miR-199a作用的缺氧/复氧大鼠脑皮层神经元细胞周期及细胞活力的影响

与Model+miR-199a mimic组比较, Model+miR-199a mimic+LY294002组 $G_0 \sim G_1$ 期细胞比例升高($P < 0.01$)、S期细胞比例降低、OD值降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 但 $G_2 \sim M$ 期细胞比例比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 表4)。

2.5 PI3K抑制剂对miR-199a作用的缺氧/复氧大鼠脑皮层神经元细胞凋亡的影响

与Model+miR-199a mimic组比较, Model+miR-199a mimic+LY294002组凋亡率升高、cleaved-caspase3蛋白水平升高、pro-caspase3蛋白水平降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, 图3, 表5)。

表3 MiR-199a对缺氧/复氧模型中PI3K-AKT信号通路蛋白质表达的影响

Table 3 Effect of miR-199a on PI3K-AKT signaling pathway protein expression in hypoxia/reoxygenation model

组别	p-PI3K	p-AKT
Con组	0.67 ± 0.06	0.77 ± 0.05
Model组	0.15 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*
Model+NC组	0.15 ± 0.01*	0.12 ± 0.01*
Model+miR-199a mimic组	0.48 ± 0.03**&	0.58 ± 0.03**&
F	546.658	1147.720
P	<0.001	<0.001

与Con组相比, * $P < 0.01$; 与Model组相比, * $P < 0.01$; 与Model+NC组相比, & $P < 0.01$ 。

Compared with Con group, * $P < 0.01$; Compared with Model group, * $P < 0.01$; Compared with Model+NC group, & $P < 0.01$.

表4 PI3K抑制剂对miR-199a作用的缺氧/复氧模型细胞周期及细胞活力的影响

Table 4 Effects of PI3K inhibitor on cell cycle and cell viability of hypoxia/reoxygenation model under the intervention of miR-199a

组别	G ₀ ~G ₁ /%	S/%	G ₂ ~M/%	OD值
Model+miR-199a mimic组	37.24 ± 1.43	29.73 ± 1.04	32.84 ± 1.10	1.17 ± 0.09
Model+miR-199a mimic+LY294002组	43.32 ± 1.71 ^{&}	23.41 ± 0.90 ^{&}	32.32 ± 0.91	0.68 ± 0.06 ^{&}
<i>t</i>	-8.191	13.778	1.089	13.765
<i>P</i>	<0.001	<0.001	0.292	<0.001

与Model+miR-199a mimic组相比, [&]*P*<0.01。

Compared with Model+miR-199a mimic group, [&]*P*<0.01.

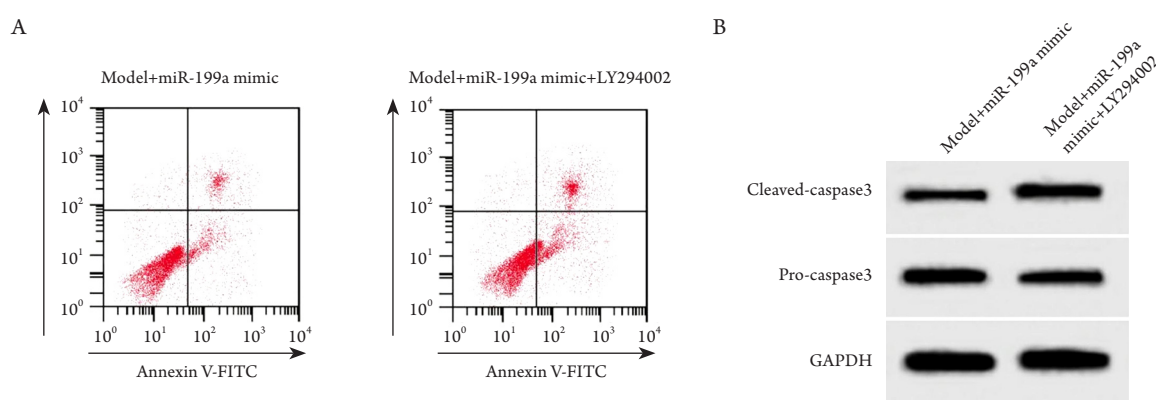


图3 PI3K抑制剂对miR-199a作用的缺氧/复氧模型凋亡及caspase3蛋白表达情况的作用

Figure 3 Effect of PI3K inhibitor on apoptosis and caspase3 protein expression in hypoxia/reoxygenation model under the intervention of miR-199a

(A) 流式细胞术检测细胞凋亡; (B) 蛋白质印迹法检测蛋白质表达。

(A) Cell apoptosis detected by flow cytometry; (B) Protein expression detected by Western blotting.

表5 PI3K抑制剂对miR-199a作用的缺氧/复氧模型细胞凋亡及caspase3蛋白表达的影响

Table 5 Effects of PI3K inhibitor on cell apoptosis and caspase3 protein expression in hypoxia/reoxygenation model under the intervention of miR-199a

组别	凋亡率/%	Cleaved-caspase3	Pro-caspase3
Model+miR-199a mimic	13.33 ± 0.70	0.26 ± 0.02	0.56 ± 0.04
Model+miR-199a mimic+LY294002	22.21 ± 1.05 ^{&}	0.55 ± 0.04 ^{&}	0.24 ± 0.01 ^{&}
<i>t</i>	-21.125	-13.324	11.525
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

与Model+miR-199a mimic组相比, [&]*P*<0.01。

Compared with Model+miR-199a mimic group, [&]*P*<0.01.

3 讨论

神经细胞炎症、氧化应激及凋亡等是缺血性脑血管疾病发生、发展过程中的重要病理机制,

虽miRNA可调控细胞活力及凋亡等生物学过程并在神经系统疾病中发挥重要的调控作用, 但其在缺血性脑血管疾病中的相关作用机制却尚未完全阐明^[10-12]。

MiR-199a可通过靶向SIRT1减轻急性肺损伤^[13], 而LncRNA SNHG12可通过激活AMPK信号通路抑制miR-199a进而上调SIRT1以减轻脑缺血/再灌注损伤^[14]。本研究结果显示: 缺氧/复氧可明显降低大鼠脑皮层神经元细胞miR-199a的表达水平, 还可降低细胞活力及S期细胞比例、提高G₀~G₁期细胞比例, 提示缺氧/复氧可能通过抑制miR-199a的表达从而抑制大鼠脑皮层神经元细胞活力并诱导细胞周期阻滞于G₀~G₁期。而过表达miR-199a可明显降低G₀~G₁期细胞比例、提高OD值及S期细胞比例, 提示miR-199a过表达可改善缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力从而对细胞发挥保护作用。进一步研究结果显示: 缺氧/复氧处理后可明显提高细胞凋亡率、促进cleaved-caspase3表达并抑制pro-caspase3表达, 而过表达miR-199a可明显降低细胞凋亡率、促进pro-caspase3表达并抑制cleaved-caspase3表达, 提示miR-199a过表达可抑制缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞凋亡从而减轻细胞损伤。另外有研究^[15]表明: 在类风湿关节炎miR-199a-3p可抑制成纤维细胞样滑膜细胞的增殖并诱导其凋亡, 与在脑皮层神经元细胞的作用相反, 其不同细胞中作用不同的原因是否为所激活的信号通路不同所致也有待研究。

PI3K-AKT信号通路是典型的抗凋亡的信号转导途径, 当PI3K激活后可促进下游基因AKT发生磷酸化, 形成p-AKT进而参与脑组织损伤过程^[16]。激活PI3K-AKT信号通路可抑制神经细胞凋亡从而保护神经细胞^[17], 而PI3K-AKT信号通路在帕金森病中可发挥重要调控作用^[18]。本研究结果显示缺氧/复氧处理后p-PI3K、p-AKT的表达水平降低, 而过表达miR-199a可促进p-PI3K、p-AKT的表达, 提示miR-199a过表达可能通过激活PI3K-AKT信号通路从而发挥作用。进一步分析发现, 使用PI3K-AKT信号通路抑制剂处理后, 细胞活力明显降低, 细胞周期被诱导阻滞于G₀~G₁期且细胞凋亡率增高。PI3K-AKT信号通路参与了小鼠脑星形胶质细胞增殖^[19], 也可改善氧糖剥夺损伤后大鼠脑皮层神经元细胞存活^[20], 提示miR-199a过表达对缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力、细胞周期及凋亡的影响可能因抑制PI3K-AKT信号通路而逆转, 进而加重细胞损伤。本研究虽使用了经典的PI3K-AKT信号通路抑制剂LY294002进行干预, 但未对PI3K及AKT的表达水平进行检测, 因此尚不足以证实LY294002在本模型中发挥了对PI3K-AKT信号通路的抑制作用。所以, 下一步在围绕miR-199a上下游信号通路的研究中, 将对使

用LY294002干预后的细胞模型中的PI3K及AKT的表达水平进行检测, 以明确PI3K-AKT信号通路在miR-199a调控缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力、细胞周期及凋亡中的作用。

综上所述, miR-199a过表达可改善缺氧/复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力并抑制细胞凋亡, 从而减轻细胞损伤, 其可能通过激活PI3K-AKT信号通路从而发挥生物学作用; miR-199a可能作为缺血性脑卒中等缺血性脑血管疾病治疗的潜在靶点。然而, 不同部位神经元的细胞特性是不同的, 所以有必要针对不同部位的神经元细胞分别展开研究; 另外, 本研究为细胞层面的研究, 所以也需进行体内动物实验进一步验证miR-199a在缺血性脑卒中等缺血性脑血管疾病中的作用机制。再者, 下一步可结合生物信息学分析、芯片或蛋白组学深入研究miR-199a参与脑血管疾病发生及发展的上下游调控机制, 如LncRNA或circRNA对miR-199a是否有调控作用也有进一步探究的价值。

参考文献

1. GBD 2019 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990—2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019[J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(10): 795-820.
2. 苏建华, 陈玉芳, 肖杭, 等. 甲钴胺对脑缺血-再灌注大鼠皮层神经细胞凋亡的预防作用[J]. *江苏医药*, 2015, 41(10): 1135-1138. SU Jianhua, CHEN Yufang, XIAO Hang, et al. Preventive effect of methycobal on apoptosis of brain tissue in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Jiangsu Medical Journal*, 2015, 41(10): 1135-1138.
3. 朱旭蓉, 燕玉娥, 狄政莉, 等. miRNA-155在大鼠脑缺血/再灌注损伤早期大脑皮层组织中的表达及其意义[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2018, 44(6): 1144-1149. ZHU Xurong, YAN Yu'e, DI Zhengli, et al. Expression of miRNA-155 in cerebral cortex tissue of rats with cerebral ischemia-reperfusion injury and its significance[J]. *Journal of Jilin University. Medicine Edition*, 2018, 44(6): 1144-1149.
4. 阎雯, 齐薛浩. 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[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(21): 21-27. YAN Wen, QI Xuehao. MicroRNA-181b regulates hypoxic-ischemic brain damage through TLR4 signaling pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2018, 28(21): 21-27.
5. Sun LQ, Guo GL, Zhang S, et al. Effects of microRNA-592-5p on hippocampal neuron injury following hypoxic-ischemic brain damage

- in neonatal mice - involvement of PGD2/DP and PTGDR[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(2): 458-473.
6. 程佳, 沙莉, 韩树萍. 窒息新生儿血清miRNA-199a的表达变化及意义[J]. *临床医学工程*, 2013, 20(2): 159-160.
CHENG Jia, SHA Li, HAN Shuping. Expression and significance of serum miRNA-199a in newborn with asphyxia[J]. *Clinical Medical & Engineering*, 2013, 20(2): 159-160.
 7. 胡洪凭, 张洪凯, 吴滨. 丙泊酚通过PI3K/Akt/mTOR通路对脑外伤大鼠的神经保护作用[J]. *中国药师*, 2019, 22(7): 1215-1219.
HU Hongpin, ZHANG Hongkai, WU Bin. Neuroprotective effects of propofol through PI3K/Akt/mTOR pathway in rats with brain injury[J]. *China Pharmacist*, 2019, 22(7): 1215-1219.
 8. 张蓓, 王林, 柏玉兰, 等. 羧甲基化促红细胞生成素经PI3-K/Akt信号通路抗脑缺血损伤[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2017, 34(6): 488-490.
ZHANG Bei, WANG Lin, BAI Yulan, et al. Carbamylated erythropoietin via PI3-K/Akt signaling pathway reduces cerebral ischemic injury[J]. *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2017, 34(6): 488-490.
 9. 王蕊艳, 姚于飞, 刘想, 等. EGCG通过PI3-K/Akt信号通路抗神经细胞缺氧/复氧损伤[J]. *营养学报*, 2017, 39(2): 165-169.
WANG Ruiyan, YAO Yufei, LIU Xiang, et al. EGCG protects neurons against anoxia/reoxygenation injury through PI3-K/AKT pathway[J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2017, 39(2): 165-169.
 10. Wu C, Zhang X, Chen P, et al. MicroRNA-129 modulates neuronal migration by targeting Fmr1 in the developing mouse cortex[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4): 287.
 11. Liu J, An P, Xue Y, et al. Mechanism of Snhg8/miR-384/Hoxa13/FAM3A axis regulating neuronal apoptosis in ischemic mice model[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(6): 441.
 12. Guo D, Ma J, Yan L, et al. Down-regulation of LncRNA MALAT1 attenuates neuronal cell death through suppressing Beclin1-dependent autophagy by regulating miR-30a in cerebral ischemic stroke[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(1): 182-194.
 13. Liu Y, Guan H, Zhang JL, et al. Acute downregulation of miR-199a attenuates sepsis-induced acute lung injury by targeting SIRT1[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 314(4): C449-C455.
 14. Yin WL, Yin WG, Huang BS, et al. LncRNA SNHG12 inhibits miR-199a to upregulate SIRT1 to attenuate cerebral ischemia/reperfusion injury through activating AMPK signaling pathway[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 690: 188-195.
 15. Wangyang Y, Yi L, Wang T, et al. MiR-199a-3p inhibits proliferation and induces apoptosis in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via suppressing retinoblastoma 1[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(6): BSR20180982.
 16. 周一博, 苏军. 丙酮酸乙酯对缺氧缺血性脑损伤新生大鼠海马神经元凋亡及PI3-K/Akt信号通路的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(4): 519-524.
ZHOU Yibo, SU Jun. The influence of ethyl pyruvate on apoptosis and PI3-K/Akt signaling pathway in hippocampal neurons of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio/Cerebrovascular Disease*, 2019, 17(4): 519-524.
 17. 曾嘉豪, 杨承佑, 文军, 等. 芍药苷对APP/PS1小鼠的神经细胞保护作用及机制研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(6): 1049-1054.
ZENG Jiahao, YANG Chengyou, WEN Jun, et al. Protective effect of paeoniflorin on nerve cells in APP/PS1 mice and its mechanism[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2018, 34(6): 1049-1054.
 18. 邵帅, 洪乐鹏, 邓雪华, 等. 抑制PI3K/Akt信号通路对帕金森病炎症细胞模型反应的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(9): 2200-2203.
SHAO Shuai, HONG Lepeng, DENG Xuehua, et al. Effect of inhibition of PI3K/AKT signaling pathway on response in the inflammatory cell model of Parkinson's disease[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2019, 39(9): 2200-2203.
 19. 裴丹, 李洪鹏. PDGFR/PI3K/Akt信号通路在PDGF-BB促进体外小鼠脑星形胶质细胞增殖中的作用[J]. *中国医科大学学报*, 2019, 48(12): 1076-1081.
PEI Dan, LI Hongpeng. The role of the PDGFR/PI3K/Akt signaling pathway in promoting the proliferation of mouse brain astrocytes in vitro by PDGF-BB[J]. *Journal of China Medical University*, 2019, 48(12): 1076-1081.
 20. 刘勇, 杨杰, 张逸仙, 等. 骨髓间充质干细胞培养液对大鼠皮层神经元氧糖剥夺损伤的保护作用及机制[J]. *重庆医科大学学报*, 2020, 45(1): 71-75.
LIU Yong, YANG Jie, ZHANG Yixian, et al. Effect and mechanism of conditioned medium from bone marrow-derived mesenchymal stem cells on the survival of cortical neurons followed oxygen-glucose deprivation injury[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2020, 45(1): 71-75.

本文引用: 巩雨, 樊嘉欣, 高震, 王虎清, 吴海琴. MiR-199a 对缺氧 / 复氧诱导的大鼠脑皮层神经元细胞活力及凋亡的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2022, 42(5): 1028-1035. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.003

Cite this article as: GONG Yu, FAN Jiaxin, GAO Zhen, WANG Huqing, WU Haiqin. Effects of miR-199a on the viability and apoptosis of rat cerebral cortical neurons cells induced by hypoxia/reoxygenation[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2022, 42(5): 1028-1035. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2022.05.003