

论著·实验研究

## 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠松果体 miRNA-182 及 Clock mRNA 的表达变化

韩星 丁欣 徐利晓 刘明华 冯星

(苏州大学附属儿童医院新生儿科, 江苏 苏州 215000)

**[摘要]** **目的** 观察新生大鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)后松果体内小RNA(miRNA)的差异表达,研究其在HIBD导致的昼夜节律紊乱中的作用。**方法** 将7日龄的新生Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为HIBD模型组和假手术组,根据Rice-Vannucci法制作HIBD模型,24h后分别取两组松果体组织,通过miRNA芯片检测及实时荧光定量PCR法(RT-PCR)筛选出HIBD后高表达的miRNA,测定其在各组织(肺、肠、胃、肾、大脑皮层、松果体组织)中的表达差异。利用RT-PCR技术分别测定两组在缺氧缺血后0、24、48、72h松果体中高表达miRNA及靶基因Clock mRNA的表达变化。**结果** miRNA芯片结果结合RT-PCR技术筛选出多个和HIBD相关的miRNA,其中miRNA-182表达差异明显。miRNA-182在松果体组织中高丰度表达。HIBD后24h、48h miRNA-182的表达水平高于对应时间点的假手术组( $P<0.05$ );与对应时间点的假手术组相比,HIBD后0h Clock mRNA表达水平升高,48h时降低,72h后明显升高( $P<0.05$ )。**结论** miRNA-182可能参与了HIBD后昼夜节律紊乱的病理生理过程。 [中国当代儿科杂志, 2016, 18(3): 270-276]

**[关键词]** miRNA; miRNA-182; 缺氧缺血性脑损伤; 新生大鼠

### Expression profiles of miRNA-182 and Clock mRNA in the pineal gland of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage

HAN Xing, DING Xin, XU Li-Xiao, LIU Ming-Hua, FENG Xing. Department of Neonatology, Children's Hospital of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215000, China (Feng X, Email: xing\_feng66@hotmail.com)

**Abstract: Objective** To study the changes of miRNA expression in the pineal gland of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) and the possible roles of miRNA in the pathogenesis of circadian rhythm disturbance after HIBD. **Methods** Seven-day-old Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 2 groups: HIBD and sham-operated. HIBD was induced according to the Rice-Vannucci method. The pineal glands were obtained 24 hours after the HIBD event. The expression profiles of miRNAs were determined using GeneChip technique and quantitative real-time PCR (RT-PCR). Then the miRNA which was highly expressed was selected. The expression levels of the chosen miRNA were detected in different tissues (lungs, intestines, stomach, kidneys, cerebral cortex, pineal gland). RT-PCR analysis was performed to measure the expression profiles of the chosen miRNA and the targeted gene Clock mRNA in the pineal gland at 0, 24, 48 and 72 hours after HIBD. **Results** miRNA-182 that met the criteria was selected by GeneChip and RT-PCR. miRNA-182 was highly expressed in the pineal gland. Compared with the sham-operated group, the expression of miRNA-182 was significantly up-regulated in the pineal gland at 24 and 48 hours after HIBD ( $P<0.05$ ). Compared with the sham-operated group, Clock mRNA expression in the HIBD group increased at 0 hour after HIBD, decreased at 48 hours after HIBD and increased at 72 hours after HIBD ( $P<0.05$ ). **Conclusions** miRNA-182 may be involved in the pathogenesis of circadian rhythm disturbance after HIBD.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(3): 270-276]

**Key words:** miRNA; miRNA-182; Hypoxic-ischemic brain damage; Neonatal rats

[收稿日期] 2015-12-16; [接受日期] 2016-01-26  
[基金项目] 国家自然科学基金(81271378; 81471488)。  
[作者简介] 韩星, 女, 硕士研究生。  
[通信作者] 冯星, 男, 主任医师。

新生儿缺氧缺血性脑损伤 (hypoxic-ischemic brain damage, HIBD) 性疾病的患儿常遗留精神运动发育障碍、睡眠觉醒周期颠倒<sup>[1]</sup>、激素内分泌节律紊乱<sup>[2]</sup>等问题,严重影响患儿生存质量。前期研究发现:HIBD后褪黑素(melatonin, MT)分泌降低,褪黑素受体<sup>[3]</sup>、糖皮质激素受体<sup>[4]</sup>、胰岛素样生长因子<sup>[5]</sup>基因表达水平下调,而皮质酮<sup>[4]</sup>、生长激素<sup>[6]</sup>等相关基因表达水平升高,表明缺氧缺血可导致多器官系统功能的节律紊乱。此外,越来越多的证据表明缺氧可影响钟基因的表达<sup>[7]</sup>,提示生物钟系统的紊乱也可能参与HIBD的发病。Clock是哺乳动物昼夜生物钟节律的一个重要正性调节因子,主要生理作用是直接影响哺乳动物节律周期性和持续性。一旦生物钟系统表达异常,常导致肿瘤、糖尿病、高血压、脂肪代谢障碍、睡眠障碍等疾病发生率的增加<sup>[8]</sup>。

松果体作为一个神经内分泌器官,既发挥中枢昼夜节律振荡器的功能,又能合成MT而发挥内分泌输出效应。有研究发现松果体中包含了以细胞微粒子形式存在的小RNA(microRNA, miRNA)<sup>[9]</sup>,miRNA普遍存在于真核细胞中,进化上高度保守,表达具有时空特异性。成熟miRNA主要通过与其靶mRNA的3'-非编码区、5'-非编码区和编码区域的碱基互补配对抑制靶mRNA翻译,在转录后水平调控靶基因表达<sup>[10]</sup>。目前miRNA的研究主要集中在肿瘤疾病的诊断,最近的研究发现miRNA还是昼夜节律的重要调节因子<sup>[11]</sup>。因此,本研究拟应用miRNA表达谱芯片、实时荧光定量PCR(RT-PCR)等相关技术来检测HIBD新生大鼠松果体miRNA差异表达,探索miRNA在HIBD节律紊乱中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物分组和HIBD模型制作

选择SPF级健康7日龄Sprague-Dawley(SD)新生大鼠,雌雄不限,均在光照-黑暗交替条件下饲养,由母鼠自由哺喂,所有实验动物均购自

上海斯莱克实验动物有限责任公司。

将新生大鼠随机分成HIBD模型组和假手术组,HIBD模型的制作根据Rice-Vannucci法<sup>[12]</sup>,新生SD大鼠乙醚吸入麻醉,仰卧位固定于手术板,颈部正中作1cm纵型切口,分离左颈总动脉并双层丝线永久性结扎,缝合切口后置于37℃暖箱中恢复2h,然后置于37℃暖箱中的密闭常压低氧舱,给予湿化的8%氮氧混合气2h,流量为1.5L/min,测氧仪监测氧浓度,模型制作完毕后送回母鼠身边饲养。假手术组仅分离出左颈总动脉,不予结扎,不予低氧处理。

### 1.2 miRNA的基因芯片筛选

分别取模型制造后24h的HIBD模型组和假手术组各6只大鼠,断头取脑后,低温快速分离出松果体组织,常规方法抽提RNA,分光光度仪测定RNA浓度和纯度,所取样本OD260/OD280比值均大于1.8。应用Exiqon公司生产的miRNA芯片miRCURY(TM)LNA Array(v.18.0)进行检测,对HIBD模型组和假手术组松果体样本进行差异表达的miRNA的筛选,操作步骤按试剂盒操作流程进行。杂交芯片图像扫描后,所得数据使用Genepix Pro V6.0软件分析,通过原始值减去背景值来修正,并用中值标准化,分别计算出两种样本中miRNA的标准值及比值。

### 1.3 miRNA的RT-PCR验证

根据miRNA基因芯片结果,筛选出HIBD模型组较假手术组表达明显上调的miRNA有miRNA-200a-3p、-9a-5p、-375-3p、-141-3p、-182等;表达明显下调的miRNA有miRNA-291a-5p、-935、-125b-1-3p、-294、-204-3p等,对其中部分miRNA进行RT-PCR验证。分别取模型制造后24h的HIBD模型组和假手术组各6只大鼠,松果体组织总RNA提取方法同1.2小节。

(1)引物设计:从miRbase中调取基因芯片筛选出的HIBD松果体中差异性表达的miRNA序列,根据通用茎环引物法<sup>[13]</sup>,并利用Primer Premier 5.0引物设计软件设计PCR引物。引物序列见表1。

表 1 miRNA 引物序列

基因	引物序列 (5' → 3')
U6	Reverse: CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT R: CGCTTCACGAATTTGCGTGCAT
rno-miRNA-200a-3p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACATCGT F: GGGGTAACACTGTCTGGTAG R: TGCCTGTCCTGGAGTC
rno-miRNA-9a-5p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTCATACA F: GGGGGTCTTTGGTTATCTA R: CAGTCCGTCTCTGGA
rno-miRNA-141-3p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACCCATCT F: GGGGTAACACTGTCTGGTAA R: TGCCTGTCCTGGAGTC
rno-miRNA-9a-3p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACACTTTC F: CCGCCCAAAGGTGAAT R: TGCCTGTCCTGGAGTC
rno-miRNA-125b-1-3p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACAGCTCC F: GACGGGTTAGGCTCTTG R: CAGTCCGTCTCTGGA
rno-miRNA-204-3p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACAACGTC F: GCTGGGAAGGCAAAGG R: CAGTCCGTCTCTGGAG
rno-miRNA-291a-5p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACAGAGAGG F: GGCATCAAAGTGGAGGC R: CAGTCCGTCTCTGGA
rno-miRNA-294	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACAGATAGG F: GGCTCAAAATGGAGGC R: CAGTCCGTCTCTGGA
rno-miRNA-935	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACGCGGTAG F: CCAGTTACCGCTTCCG R: CAGTCCGTCTCTGGAG
rno-miRNA-375-3p	Reverse: GTCGTATCCAGTGCCTGTCTGGAGTCGGCAATTGCACTGGATACGACTCACGC F: GGGTTTGTTCGTTCCGGCTC R: CAGTCCGTCTCTGGAG
rno-miRNA-182	Reverse: GTCGTATCCAGTGCAGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGTGTG F: ACGGGCTTTGGCAATGCTAGAA R: CAGTGCAGGTCCGAGGTAT

(2) cDNA 制备及 RT-PCR: 取 2.0 μg 上述组织样本抽提的总 RNA 作为初始模板, 进行逆转录后, 采用 RT-PCR 技术测定松果体细胞中 miRNA 的相对表达量。PCR 反应体系内含 cDNA 2 μL, 2\*SYBR Green PCR minaster Mix 10 μL, miRNA 上下游引物各 1 μL, 用去离子水补至反应体积为 20 μL。按上述反应体系加样, 每个样品重复 3 次, 荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 设置反应条件

为: 95℃预变性 10 min; 95℃变性 15 s, 60℃退火 15 s, 72℃延伸 30 s, 72℃收集荧光, 共 45 个循环。循环结束后做相应的溶解曲线, 运用 Light Cyler 480 自带的软件进行实时数据收集和定量分析, 记录相应 Cp 值, 基因相对表达量采用公式  $2^{-\Delta Ct}$  方法计算, 以此判定各样本中 miRNA 表达量的差异。

#### 1.4 miRNA-182 在各组织中的表达差异

基因芯片鉴定同时采用 RT-PCR 方法结论

一致的 miRNA 确定为有意义的共同差异表达 miRNA, 其中 miRNA-182 是本研究鉴定得到的候选 miRNA 之一。

miRNA 的组织分布及表达量与其功能有密切关系<sup>[14]</sup>, 因此需进一步验证 miRNA-182 在不同组织的表达情况。取正常 7 日龄 SD 大鼠 3 只, 颈椎脱臼法处死后分别取肺、肠、胃、肾、大脑皮层、松果体组织, 冰冻粉碎标本后, 按常规方法抽提 RNA, 按上述方法进行 cDNA 合成并行 RT-PCR 检测, 判定各样本中 miRNA-182 的表达差异。

### 1.5 HIBD 后松果体中 miRNA-182 及钟基因 Clock mRNA 的表达情况

本研究利用 TargetScan、PicTar 和 miRanda 3 种生物信息学分析软件预测 miRNA-182 下游可能的靶基因, 取 3 者交集发现, 钟基因家族中的 Clock 可能是其潜在作用靶点, 行 RT-PCR 检测 HIBD 后松果体中 miRNA-182 与 Clock 基因有无表达变化相关性。

分别于 HIBD 后 0 h (为中午 12 时, 余推算)、24 h、48 h 和 72 h 4 个时间点(地点、光线均相同), 每组各取 6 只新生大鼠, 松果体组织总 RNA 提取方法同 1.2 小节。采用 RT-PCR 法检测松果体中 miR-182 及钟基因 Clock 的表达水平变化。引物序列如下: 钟基因 Clock: F: 5'-TGCCAGATCATGAGAAGATG-3', R: 5'-CGCTGCTCTAGCTGCTCTTT-3'。内参  $\beta$ -actin: F: 5'-CCCATCTATGAGGTTACGC-3', R: 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'。反应体系和反应条件同 1.3 小节。

### 1.6 统计学分析

运用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析, 正态分布计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 若方差齐性, 则两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析; 若方差不齐, 则采用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 差异有统计学意义时采用 Nemenyi 法行组间两两比较, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miRNA 的基因芯片筛选结果

根据 HIBD 模型组及假手术组标准化数值, 计算每个基因的差异倍数 (Fold change, FC) 来观察表达差异。FC > 2 及 < 0.5 的共有 209 个 miRNA 表达, 其中表达上调的有 92 个, 表达下调的有 117 个。与假手术组相比, 挑选出 HIBD 造模后 24 h 表达上调倍数最高的 11 个 miRNA 有 miRNA-200a-3p、-9a-5p、-375-3p、-141-3p、-9a-3p、-182、-7a-5p、-200c-3p、-106b-5p、-30c-5p、-19b-3p; 表达下调倍数最高的 10 个 miRNA 有 miRNA-291a-5p、-935、-125b-1-3p、-294、-204-3p、-21-3p、-300-5p、-207、-665、-433-5p, 见表 2。

表 2 HIBD 组与假手术组松果体中差异表达的 miRNAs

miRNA	假手术组	HIBD 组	FC 值
表达上调的 miRNA			
miRNA-200a-3p	0.219653179	7.951278928	36.19924354
miRNA-9a-5p	0.786127168	25.45676005	32.38249624
miRNA-375-3p	0.459537572	13.34226553	29.03411241
miRNA-141-3p	0.407514451	8.591961023	21.08381925
miRNA-9a-3p	1.153179191	18.07551766	15.67450905
miRNA-7a-5p	3.182080925	44.39707674	13.95221485
miRNA-200c-3p	1.112716763	6.65773447	5.983314615
miRNA-106b-5p	1.679190751	6.465286236	3.850239308
miRNA-182	7.072254335	20.07064555	2.837941709
miRNA-30c-5p	6.268786127	16.48964677	2.630436968
miRNA-19b-3p	2.312138728	5.56638246	2.407460414
表达下调的 miRNA			
miRNA-291a-5p	4.271676301	0.099878197	0.0233815
miRNA-935	1.514450867	0.051157125	0.033779323
miRNA-125b-1-3p	3.179190751	0.12180268	0.038312479
miRNA-294	8.309248555	0.545676005	0.065670921
miRNA-204-3p	5.543352601	0.621193666	0.112061005
miRNA-21-3p	6.271676301	0.716199756	0.114195906
miRNA-300-5p	6.274566474	0.862362972	0.137437857
miRNA-207	4.942196532	0.803897686	0.16266
miRNA-665	5.632947977	1.06455542	0.188987263
miRNA-433-5p	7.849710983	1.503045067	0.191477759

## 2.2 miRNA 的 RT-PCR 验证

RT-PCR 结果与芯片结果一致的有 miRNA-200a-3p、-375-3p、-141-3p、-182 在 HIBD 后表达明显上调, miRNA-935、-204-3p、-294 在 HIBD 后表达明显下调, 部分结果如下(表 3)。在 HIBD

组与假手术组中, miRNA-182、-375-3p、-141-3p 及 -200a-3p 的差异表达有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且本研究发现 RT-PCR 检测的几个 miRNA 中, miR-182 在 HIBD 松果体样本中稳定高表达。

表 3 假手术组和 HIBD 组新生大鼠松果体 miRNA 的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, \times 10^{-5}$ )

组别	鼠数	miRNA-182	miRNA-375-3p	miRNA-141-3p	miRNA-200a-3p	miRNA-935	miRNA-204-3p
假手术组	6	134 ± 14	8.2 ± 0.5	3.08 ± 0.26	0.045 ± 0.005	24.0 ± 3.3	11.83 ± 2.61
HIBD 组	6	565 ± 13	121.0 ± 5.0	7.05 ± 0.42	0.084 ± 0.002	5.8 ± 0.8	1.96 ± 0.05
<i>t</i> 值		31.623	31.876	11.508	10.716	-7.544	-5.341
<i>P</i> 值		0.001	0.019	0.014	0.020	0.066	0.118

## 2.3 miRNA-182 在各组织中的表达差异

miRNA-182 在正常 7 日龄新生 SD 大鼠松果体组织中呈高表达, 在肺组织中有表达, 在其他脏器如胃肠、大脑皮层、肾脏中表达微量(图 1)。miRNA-182 在各组织间的表达差异有统计学意义 ( $H = 16.392, P = 0.006$ ), 其中 miRNA-182 在大脑皮层及肾组织中的表达量较松果体组织中明显减低 ( $P < 0.05$ ), miRNA-182 在大脑皮层中的表达量较肺组织中明显减低 ( $P < 0.05$ )。

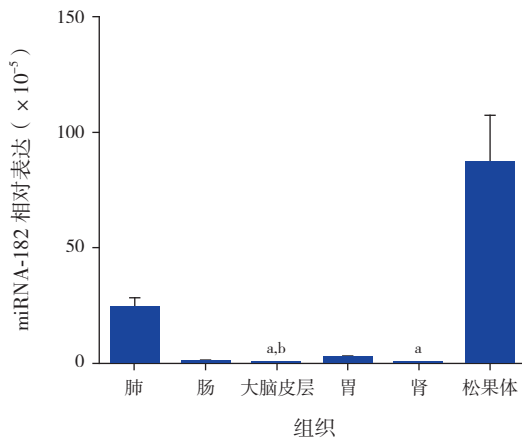


图 1 miRNA-182 在各组织中的表达差异 ( $n = 3$ )

a 示与松果体组织比较,  $P < 0.05$ ; b 示与肺组织比较,  $P < 0.05$ 。

## 2.4 HIBD 后松果体中 miRNA-182 及钟基因 Clock mRNA 的表达情况

HIBD 后 24 h、48 h miRNA-182 的表达水平高

于对应时间点的假手术组 ( $P < 0.05$ ); 而 HIBD 后 0 h、72 h miR-182 的表达水平与对应时间点假手术组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 2, 表 4)。与对应时间点假手术组相比, HIBD 后 0 h Clock mRNA 表达水平升高, 48 h 时降低, 72 h 后明显升高 ( $P < 0.05$ ); 而 24 h Clock mRNA 表达水平与对应时间点假手术组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (图 3, 表 5)。

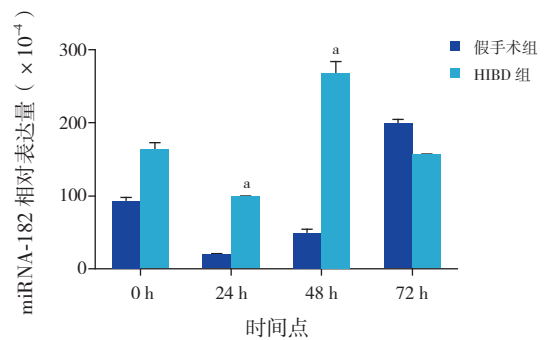


图 2 两组 HIBD 后各时间点 miRNA-182 的表达变化 ( $n = 6$ ) a 示与假手术组相比,  $P < 0.05$ 。

表 4 两组新生大鼠各时间点松果体 miRNA-182 的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s, \times 10^{-4}$ )

组别	鼠数	0 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	91.5 ± 8.5	18.9 ± 0.6	48.1 ± 8.0	198.2 ± 8.2
HIBD 组	6	161.0 ± 15.7	97.7 ± 4.0	267.0 ± 23.5	155.7 ± 0.7
<i>t</i> 值		5.508	27.639	12.462	-7.295
<i>P</i> 值		0.054	0.020	0.030	0.084

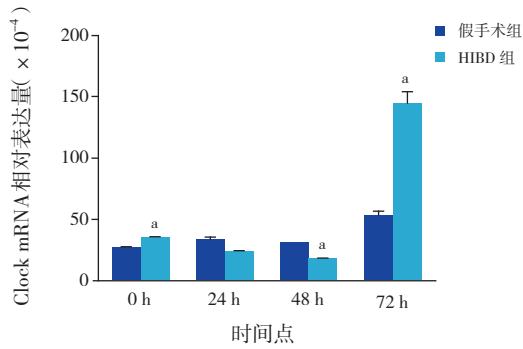


图 3 两组 HIBD 后 Clock mRNA 的表达变化 (n=6)

a 示与假手术组相比, P<0.05。

表 5 两组新生大鼠各时间点松果体 Clock mRNA 的表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\times 10^{-4}$ )

组别	n	0 h	24 h	48 h	72 h
假手术组	6	26.50 ± 0.52	33.18 ± 2.11	31.67 ± 0.01	52.88 ± 3.88
HIBD 组	6	34.73 ± 1.02	23.61 ± 0.81	17.50 ± 1.03	144.42 ± 9.20
t 值		10.158	-5.983	-19.464	12.969
P 值		0.024	0.068	0.033	0.022

### 3 讨论

miRNA 是一类高度保守的非编码小分子单链 RNA。大量研究表明 miRNA 在生命发育进程中扮演着关键角色, 至少能直接调控 30% 的人类基因表达<sup>[15]</sup>。miRNA 参与了许多疾病的生理和病理过程, 例如组织发育、组织器官形成、细胞凋亡、细胞增殖、肿瘤发生等。可见, miRNA 在机体基因表达调控中发挥着重要作用。研究发现 miRNA 是昼夜节律重要的调节因子, miRNA-122 可以通过调节 Nocturnin 基因的表达来参与肝脏昼夜节律的调节<sup>[16]</sup>, miRNA-483 通过调节靶基因芳香烷基胺-N-乙酰基转移酶来调控大鼠松果体 MT 的合成<sup>[17]</sup>。因此, 本研究拟探索 HIBD 生理及病理过程中发挥作用的 miRNA 及其作用, 为进一步明确 HIBD 中昼夜节律紊乱的内在分子机制提供理论依据。本研究中通过基因芯片技术检测出 HIBD 后表达差异倍数明显 (FC>2 及 <0.5) 的 miRNA 209 个, 我们从中挑选出差异表达最明显的 11 个 miRNA 进行 RT-PCR 验证, 两种方法结论一致的候选 miRNA 确定为有意义的共同差异表达 miRNA, 其中 miRNA-182 是本研究鉴定得到的候选 miRNA 之一。基因芯片筛选及 RT-PCR 验证中均显示 HIBD

后新生大鼠松果体中 miRNA-182 表达上调, 且与假手术组比较差异性表达有统计学意义; RT-PCR 发现 miRNA-182 在 HIBD 样本中稳定高表达, 且生物信息学分析结果显示 miRNA-182 在进化上高度保守, 提示其潜在功能的重要性。近期的研究发现, 重度抑郁症患者存在 miRNA-182 前体形成异常, 从而影响成熟 miRNA-182 的表达, 导致患者出现失眠等节律紊乱现象<sup>[18]</sup>。以上结果提示 miRNA-182 可能参与了 HIBD 后昼夜节律紊乱的病理生理过程。

miRNA 在组织中的表达量与其功能密切相关, 明确 miRNA 的组织表达量对于其功能研究很重要。肝脏组织特异性表达 miRNA-122<sup>[19]</sup>, 脑组织特异性表达 miRNA-9<sup>[20]</sup> 和 miRNA-124a<sup>[21]</sup>, 横纹肌组织特异性表达 miRNA-1/206 和 miRNA-133<sup>[22]</sup>, 这些 miRNA 的特异性表达与相应组织器官特殊的生理结构和功能密切相关。本研究使用 RT-PCR 的方法, 检测 miRNA-182 在主要脏器中的表达, 结果发现 miRNA-182 在正常 7 日龄新生 SD 大鼠松果体组织中呈高表达, 在肺组织中有表达, 但含量较低, 在其他脏器如胃肠、大脑皮层、肾脏中表达微量。根据表达水平和功能的相关性, 本研究推测 miRNA-182 可能参与松果体的重要病理生理过程。

认识 miRNA 的作用机制, 关键是认识 miRNA 及其靶基因的相互作用。TargetScan、PicTar 和 miRanda 是目前认为常用而准确的靶基因预测软件<sup>[23]</sup>, 本研究利用 TargetScan、PicTar 和 miRanda 三种生物信息学分析软件预测 miRNA-182 下游可能的靶基因, 取三者交集发现, 钟基因家族中的 Clock 可能是其潜在作用靶点, Clock 序列中的“UUGCCAAA”碱基序列和不同物种 miRNA-182 的保守序列“AACGGUUU”匹配。昼夜节律生物钟系统维系着机体的正常生物节律, Clock 是哺乳动物昼夜生物钟节律的一个重要正性调节因子, 因此, 本研究通过检测 HIBD 后, 不同时间点松果体中 miRNA-182 与 Clock 的表达变化来初步明确两者的相关性。本研究通过 RT-PCR 技术检测到在 HIBD 后 0、24、48 h 模型组的 miRNA-182 表达量较假手术组升高, 72 h 表达较假手术组降低, 其中 24 h 和 48 h 的差异表达有统计学意义; 钟基因 Clock mRNA 在 HIBD 后 0 h 表达水平较假手术

组升高, 24 h、48 h Clock mRNA 表达降低, 72 h 后明显升高, 其中 0 h、48 h 和 72 h 的差异表达有统计学意义。结果显示, 新生大鼠 HIBD 后松果体 miRNA-182 与 Clock mRNA 的表达有一定的相关性, 呈负向调节, 但不完全相关, 考虑因机体是一个复杂的调控系统, 存在众多的神经、内分泌等调控机制, 所以实验数据有一定的局限性, 还需体外实验等来进一步的验证。

综上所述, 在 HIBD 松果体损伤的病理生理过程中, miRNA 的表达有明显变化, 特别是 miRNA-182 可能参与 HIBD 后的昼夜节律紊乱, 本研究为 HIBD 的节律紊乱机制提供了新线索, 为 HIBD 的治疗提供了新的靶点。

#### 【参 考 文 献】

- [1] Takenouchi T, Rubens EO, Yap VL, et al. Delayed onset of sleep-wake cycling with favorable outcome in hypothermic-treated neonates with encephalopathy[J]. *J Pediatr*, 2011, 159(2): 232-237.
- [2] Smith AL, Alexander M, Rosenkrantz TS, et al. Sex differences in behavioral outcome following neonatal hypoxia ischemia: insights from a clinical meta-analysis and a rodent model of induced hypoxic ischemic brain injury[J]. *Exp Neurol*, 2014, 254: 54-67.
- [3] 王莹, 杨祖铭, 朱海娟, 等. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠褪黑素受体的变化[J]. *临床儿科杂志*, 2009, 27(4): 368-370, 374.
- [4] 王莹, 杨祖铭, 朱海娟, 等. 褪黑素对 HIBD 新生大鼠皮质酮及糖皮质激素受体 mRNA 的影响[J]. *临床儿科杂志*, 2010, 28(3): 278-281.
- [5] Liu W, D'Ercole JA, Ye P. Blunting type 1 insulin-like growth factor receptor expression exacerbates neuronal apoptosis following hypoxic/ischemic injury[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 64.
- [6] Alba-Betancourt C, Luna-Acosta JL, Ramirez-Martinez CE, et al. Neuro-protective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-ischemia injury in embryonic chicken cerebellum[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2013, 183: 17-31.
- [7] Lundkvist GB, Sellix MT, Nygård M, et al. Clock gene expression during chronic inflammation induced by infection with *Trypanosoma brucei brucei* in rats[J]. *J Biol Rhythms*, 2010, 25(2): 92-102.
- [8] Ishida N. Circadian clock, cancer and lipid metabolism[J]. *Neurosci Res*, 2007, 57(4): 483-490.
- [9] Clokie SJ, Lau P, Kim HH, et al. MicroRNAs in the pineal gland: miR-483 regulates melatonin synthesis by targeting arylalkylamine N-acetyltransferase[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30): 25312-25324.
- [10] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(2): 102-114.
- [11] Zhou W, Li Y, Wang X, et al. MiR-206-mediated dynamic mechanism of the mammalian circadian clock[J]. *BMC Syst Biol*, 2011, 5: 141.
- [12] Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [13] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179.
- [14] Ambros V. The functions of animal microRNAs[J]. *Nature*, 2004, 431(7006): 350-355.
- [15] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing[J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1401-1414.
- [16] Kojima S, Gatfield D, Esau CC, et al. MicroRNA-122 modulates the rhythmic expression profile of the circadian deadenylase Nocturnin in mouse liver[J]. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11264.
- [17] Clokie SJ, Lau P, Kim HH, et al. MicroRNAs in the pineal gland: miR-483 regulates melatonin synthesis by targeting arylalkylamine N-acetyltransferase[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(30): 25312-25324.
- [18] Saus E, Soria V, Escaramis G, et al. Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator, in major depression patients with late insomnia[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20): 4017-4025.
- [19] Song K, Kwon H, Han C, et al. Active glycolytic metabolism in CD133(+) hepatocellular cancer stem cells: regulation by MIR-122[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(38): 40822-40835.
- [20] Nowak JS, Choudhury NR, de Lima Alves F, et al. Lin28a regulates neuronal differentiation and controls miR-9 production[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3687.
- [21] Pierson J, Hostager B, Fan R, et al. Regulation of cyclin dependent kinase 6 by microRNA 124 in medulloblastoma[J]. *J Neurooncol*, 2008, 90(1): 1-7.
- [22] Boutz PL, Chawla G, Stoilov P, et al. MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(1): 71-84.
- [23] 茹松伟, 申卫红, 杨鹏程, 等. microRNA 靶基因预测算法研究概况及发展趋势[J]. *生命科学*, 2007, 19(5): 562-567.

( 本文编辑: 万静 )