

固有免疫信号分子hsa-miR-146b调控脑卒中关联信号分子的生物信息学分析与实验研究

吕燕妮¹ 钱贻崧² 付龙生¹ 温金华¹ 陈璿瑛¹ 蔡 军¹ 张 洁^{1*}

(¹南昌大学第一附属医院药学部, 南昌 330046; ²南昌大学转化医学研究院心血管疾病研究中心, 南昌 330001)

摘要 该研究旨在运用生物信息学方法预测固有免疫信号分子hsa-miR-146b与脑卒中关联的分子调控网络。实验运用UCSC基因组浏览器、人类miRNA疾病数据库、TF-miRNA调控数据库、miRNA靶基因预测验证数据库和Genecards数据库研究hsa-miR-146b的上游转录因子、下游靶基因及信号通路的多个调控途径, 绘制hsa-miR-146b的核心调控网络图。采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激慢病毒感染的小胶质细胞BV2细胞, 采用实时定量PCR检测早期生长反应基因1(early growth response 1, EGR1)、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)、miR-146b、脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF)和基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)的mRNA水平变化, 对hsa-miR-146b调控网络进行验证。UCSC数据库中显示, hsa-miR-146b在多个物种中具有高度保守性。生物信息学分析显示, hsa-miR-146b受转录因子EGR1调控的同时, 又调控下游TLR4、BDNF和MMP9等39个靶基因。所有基因构成一个以hsa-miR-146b为核心的调控网络, 在脑卒中的发生与发展中起着重要作用。在LPS刺激的BV2细胞中, EGR1、TLR4、miR-146b、BDNF和MMP9 mRNA水平升高, 而RNA慢病毒技术干扰小胶质细胞中的EGR1的表达后, TLR4、miR-146b和MMP9 mRNA水平降低, BDNF升高, 表明EGR1是调节miR-146b表达和下游信号分子TLR4、BDNF和MMP9的关键信号分子。综上所述, 生物信息学方法预测并初步验证了hsa-miR-146b分子在脑卒中疾病中的调控网络, 为深入阐明hsa-miR-146b在脑卒中疾病中的机制奠定了实验基础。

关键词 生物信息学; 固有免疫; hsa-miR-146b; 脑卒中; 调控网络; 小胶质细胞

Bioinformatics Analysis and Laboratory Study on Innate Immune Signaling Molecule hsa-miR-146b Regulating Stroke-related Signaling Molecules

Lü Yanni¹, Qian Yisong², Fu Longsheng¹, Wen Jinhua¹, Chen Xuanying¹, Cai Jun¹, Zhang Jie^{1*}

(¹The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330046, China;

²Institute of Translational Medicine of Nanchang University, Nanchang 330001, China)

Abstract The aim of this study is to predict the stroke-related signaling molecules regulated by innate immunity signaling molecule hsa-miR-146b by the methods of bioinformatics. The UCSC gene browser, TransmiR, miRwalk and Genecards were employed in the present study to figure out the stroke-related signaling molecules regulated by hsa-miR-146b. To verify the miR-146b regulating downstream signaling molecules, use the lenti-viral transfection BV2 cells in response to lipopolysaccharide (LPS) and Real-time quantitative PCR to detect of mRNA levels of EGR1, TLR4, miR-146b, BDNF and MMP9. The UCSC gene browser showed that hsa-miR-

收稿日期: 2015-10-17 接受日期: 2015-12-23

*通讯作者。Tel: 0791-88694216, E-mail: 305260242@qq.com

Received: October 17, 2015 Accepted: December 23, 2015

*Corresponding author. Tel: +86-791-88694216, E-mail: 305260242@qq.com

网络出版时间: 2016-02-22 16:54:23

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160222.1654.004.html>

146b demonstrated high conservatism in several species. Taken all the results together, it was postulated that hsa-miR-146b was regulated by the transcription factors EGR1, and at the same time it could regulate the 39 target genes including TLR4, BDNF and MMP9. All the relative genes consisted of a regulatory network in the process of stroke. In LPS stimulated BV2 cells, the mRNA levels of EGR1, TLR4, miR-146b, BDNF and MMP9 were upregulated, while the levels of EGR1, TLR4, miR-146b and MMP9 were decreased in the lentiviral infected BV2 cells, BDNF was increased, indicating that EGR1 was the key signaling molecule regulating miR-146b and downstream signaling molecules as TLR4, BDNF and MMP9. Taken together, the bioinformatics analysis and preliminary experimental verification demonstrated that hsa-miR-146b regulating stroke-related signaling molecules provided prediction for elucidating its role in stroke and valuable guidelines for the further investigation.

Keywords bioinformatics analysis; hsa-miR-146b; innate immunity; stroke; regulating network; microglia

固有免疫通过相应的模式识别受体识别各种病原体, 其与脑卒中的密切关联已成为研究热点^[1]。脑卒中后脑内的固有免疫细胞被激活^[2], 固有免疫细胞内的微RNA(microRNA, miRNA)信号谱随之发生变化。miRNA是一类长度约为18~25个核苷酸^[3-4], 不仅参与细胞信号转导, 其自身还受到多种信号通路的调控, 广泛地参与细胞内的各种病理生理过程。已有的miR-146b功能研究多见于其对肿瘤细胞转移的调控, 如过表达miR-146b可降低NF- κ B(nuclear factor- κ B)的活性, 抑制乳腺癌细胞的转移; 其在神经胶质瘤细胞中的表达也多有研究, miR-146b/MMP16(matrix metalloproteinase 16)/MMP2通路中可抑制胶质瘤细胞的迁移和侵袭^[5]; 并且miR-146b还与动脉粥样硬化、促进血管平滑肌细胞增殖、自身免疫性疾病及脑动脉粥样硬化等疾病密切相关^[6-9]。目前有文献报道, 脑缺血再灌注后, 脑组织的miRNA水平发生变化^[10], miR-146的两个亚型即miR-146a和miR-146b表达均升高^[11-12]。在之前的预实验中也观察到类似结果, 其中miR-146b与脑卒中的关联报道较少, 其在脑卒中或卒中后再灌注中的调控机制有待进一步研究, 有关hsa-miR-146b的调控元件, 如转录因子、靶基因等并不明确。miRNA既可作为诊断脑卒中、监测脑卒中病情的标记物, 也可作为脑卒中预后判断的新型生物标志物。进一步研究hsa-miR-146b在体内的表达调控方式及下游调控途径, 将有利于阐明hsa-miR-146b作为固有免疫信号分子与脑卒中发生和发展之间的因果关系。小胶质细胞作为脑内的固有免疫细胞^[13-14], 在脑缺血早期小胶质细胞即被激活, 早于明显的神经元死亡。激活的小胶质细胞发挥双重作用, 一方面, 释放一系列免疫应答分子、细胞因子、神经毒性物质等产生

细胞毒性效应; 另一方面, 通过吞噬作用分泌神经生长因子等使得神经元再生, 发挥神经营养作用。研究小胶质细胞通过固有免疫途径改善脑缺血再灌注已成为研究热点。本研究旨在为hsa-miR-146b实验验证和功能研究提供理论依据, 也为脑卒中疾病的防治和靶向治疗提供科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生物信息学预测工具软件 UCSC基因组浏览器(<http://genome.ucsc.edu/>)为加州大学圣克鲁斯分校研制; TransmiR转录因子预测数据库(<http://www.cuilab.cn/transmir>)、TRANSFAC转录因子预测数据库(<http://www.biobase-international.com/gene-regulation>)、TF-miRNA调控数据库(<http://202.38.126.151/hmdd/mirna/tf/>)为北京大学医学部建立; miRNA靶基因预测验证数据(<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>)为德国海德堡大学建立; miRanda数据库(<http://www.microrna.org/microrna/home.do>)为纪念Sloan-Kettering癌症中心建立; PicTar数据库(<http://pictar.mdc-berlin.de/>)为柏林Max Delbrück分子医学中心建立; Genecards在线数据库(<http://www.genecards.org/index.php?path=/HTML/page/gcPeople>)为以色列魏茨曼科学研究所建立。

1.1.2 试剂及仪器 RNA干扰慢病毒试剂盒为上海吉凯基因公司定制; DMEM高糖培养基为Gibco公司产品; 小牛血清为Hyclone公司产品; LP为Sigma公司产品; 小鼠BDNF抗体为Abcam公司产品, TLR4抗体、MMP9为CST公司产品; 实时定量PCR仪为Bio-Rad公司产品; PCR序列、其余慢病毒转染试剂均来自于上海吉凯基因化学技术有限公司; 其余实验试

剂来自于江苏碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分析miR-146b在人类基因组中的位置及保守性和查询 UCSC基因组在线浏览工具包含有人类、小鼠和狗等多个物种的基因组草图,可以迅速浏览基因组任何序列,并同时可以得到与该部分有关的基因组注释信息。采用UCSC分析hsa-miR-146b在人类基因组中的位置及保守型,在搜索栏输入hsa-miR-146b得到有关基因的注释信息。

1.2.2 预测hsa-miR-146b的转录因子 miRNA的转录被转录因子所调控,转录因子对miRNA的正确调控是关键性的,TransmiR数据库包含有约82个转录因子和100个miRNA,拥有转录因子和miRNA间的243个调控对。TRANSFAC主要是收集miRNA Bind Sites的数据,使用自带的Match工具,计算micorRNA的转录因子。在TransmiR和TRANSFAC数据库中搜索hsa-miR-146b的转录因子调控对。

1.2.3 查询hsa-miR-146b与脑卒中相关的靶基因 TargetScan 6.0、miWalk、miRanda、PicTar数据库均为miRNA靶基因预测的公认软件,在这些软件中分别预测hsa-miR-146b的靶基因集,并将多个靶基因集进行交集得到hsa-miR-146b的预测靶基因集。在Genecards数据库关键词搜索栏输入stroke,并结合miR-146b的相关文献^[15-17],搜集与脑卒中相关的靶基因集。将预测软件所得靶基因集与stroke关联的靶基因集两部分所得基因集进行交集,得到hsa-miR-146b与脑卒中相关的靶基因集。

1.2.4 对hsa-miR-146b靶基因集进行GO富集分析和KEGG信号通路分析 对hsa-miR-146b与脑卒中相关的靶基因集分别进行GO分析中的细胞成分、分子功能、生物学过程分析。选择统计学检验hypergeometric test,以 $P < 0.01$ 为显著性阈值,选择ontology文件为cellular component、molecular function或biological process,organism/annotation选择homo sapiens后运行BINGO。在DAVID数据库中提交hsa-miR-146b靶基因集,选择functional annotation clustering tool作为分析工作,选择KEGG信号通路分析,即可得到hsa-miR-146b靶基因信号通路富集分析结果。

1.2.5 病毒载体构建和慢病毒转染BV2细胞实验 采用从上海吉凯基因公司定制EGR1的RNA干扰慢病毒试剂盒进行实验,同时提供阴性对照慢病毒。取对数生长长期的小胶质细胞BV2细胞,以 1×10^5 /孔接

种至24孔板中,培养24 h后汇合度达到90%。转染实验前1 h弃去生长培养基,加入不含抗生素及血清的DMEM培养基;再加入终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的LPS,刺激24 h,同时设正常培养的BV2细胞组。LPS模型组:取对数生长期的BV2细胞,转染实验前1 h加入不含抗生素及血清的DMEM培养基,在细胞中加入 $90 \mu\text{L}$ 含慢病毒的Eni.S溶液 5×10^6 转导单位(transduction unit, TU)、 $10 \mu\text{L}$ 聚凝胺溶液($5 \mu\text{g/mL}$),再加入终浓度为 $1 \mu\text{g/mL}$ 的LPS,刺激24 h,并设LPS刺激阴性对照质粒转染模型组。

1.2.6 实时定量PCR检测TLR4、EGR1、miR-146b、BDNF和MMP9的mRNA水平 提取细胞总RNA,按 30°C 10 min、 50°C 30 min、 95°C 5 min、 5°C 5 min的条件进行反转录。PCR反应条件为: 94°C 2 min, 94°C 30 s, 72°C 1 min, 72°C 10 min,之后 4°C 延伸5 min, 30个循环。配制PCR反应液所需组分: ddH₂O $3.5 \mu\text{L}$ 、上游引物($2 \mu\text{mol/L}$) $2 \mu\text{L}$ 、下游引物($2 \mu\text{mol/L}$) $2 \mu\text{L}$ 、cDNA($1 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $5 \mu\text{L}$ 、ROX $12.5 \mu\text{L}$; 总体积 $25 \mu\text{L}$ 。反应条件为: 50°C 2 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s, 45个循环。

2 结果

2.1 hsa-miR-146b在人类基因组中的位置及保守性分析

用UCSC基因组在线浏览工具分析hsa-miR-146b在人类基因组中的位置(图1), hsa-miR-146b定位于人类10q24.32人染色体上104196269~104196341位置,长度共73 bp,在人、猕猴、小鼠、狗、大象五种动物中呈高度保守。

2.2 预测hsa-miR-146b转录因子

运用TransmiR软件预测的调控hsa-miR-146b基因表达的转录因子为乳腺癌1号基因BRCA1和早期生长反应基因1(early growth response gene 1, EGR1)。BRCA1基因位于人类17号染色体q21的位置, EGR1基因位于人类5号染色体q31.1的位置。据Genecards数据库显示, BRCA1为乳腺癌的易感基因,其编码肿瘤抑制蛋白。目前证实,至少有30多种基因的转录涉及EGR1的参与, EGR1能够与靶基因结合而调控下游靶基因的转录表达^[18]。

2.3 筛选与脑卒中相关的hsa-miR-146b靶基因

得到hsa-miR-146b靶基因共171个,在Genecards数据库中查找已证实与脑卒中相关的基因共1 093

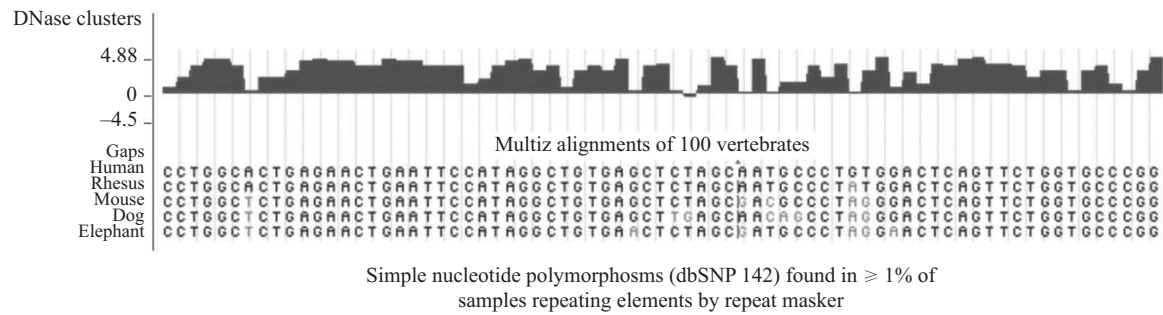


图1 应用UCSC基因组浏览工具分析hsa-miR-146b基因保守性

Fig.1 hsa-miR-146b gene conservative analysis by UCSC genome browser

表1 hsa-miR-146b靶基因集

Table 1 Target genes of hsa-miR-146b

序号 Number	基因名称 Gene name	序号 Number	基因名称 Gene name	序号 Number	基因名称 Gene name
1	ABCB1	14	CYP2C19	27	OSGIN1
2	ACE2	15	CYP2C9	28	OXA1L
3	AIFM1	16	HSP90AA1	29	PYGB
4	AKT1S1	17	HSPA1A	30	ROCK1
5	AQP4	18	HSPD1	31	SOD1
6	BAX	19	IL4	32	TBCD
7	BDNF	20	MAPK1	33	TBL3
8	CAMK2A	21	MAPK3	34	TLR2
9	CADM1	22	MMP8	35	TLR4
10	CASP3	23	MMP9	36	TNFRSF11B
11	CASP8	24	NOD1	37	TRPM7
12	CASP9	25	NOS2	38	VEGFA
13	CYP2B6	26	NOSTRIN	39	ZNF79

个。将两个数据库所得基因进行交集, 结果得出有交集的39个基因(表1), 其中包含有与细胞凋亡途径相关的促凋亡基因BAX、脑内水通道蛋白4(aquaporin 4, AQP4)、钙/钙调素依赖蛋白激酶2 α (calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain, CAMK2A)、热休克蛋白90 α (heat shock protein 90 kDa alpha A1, HSAP90AA1), 还包括与炎症相关通路有关的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、组织基质金属蛋白酶8/9(MMP8和MMP9)家族信号分子及脑源性神经营养因子BDNF基因。

2.4 hsa-miR-146b预测靶基因的GO分类富集分析结果

用BINGO对靶基因集合中39个基因的细胞组分、分子功能和生物学过程等注释信息, 进一步对GO注释信息进行富集分析。GO注释信息中分子功能项显示, hsa-miR-146b靶基因存在于细胞成分中

的细胞骨架, 细胞器和细胞核上, 分别能与ATP、腺嘌呤核苷酸等结合, 富集于细胞凋亡, 参与细胞凋亡、细胞死亡等生物学过程中(表2)。

2.5 hsa-miR-146b预测靶基因的KEGG信号通路分析

利用DAVID分析对基因集合中的39个基因进行信号通路分析。KEGG信号通路分析显示, miR-146b预测靶基因集合显著富集于神经营养因子的信号转导通路及小细胞肺癌、前列腺癌、结直肠癌、细胞凋亡、胰腺癌等相关信号通路中(表3)。

2.6 验证miR-146b可能是TLR4、BDNF、MMP9信号途径的调控分子

在miR-146b靶基因集合中, 选取有代表性的TLR4、BDNF和MMP9进行验证。TLR4所映射的KEGG信号通路富含亮氨酸重复序列的TLR4结合物(TLR4 interactor with leucine-rich repeats), 而BDNF所代表神经营养因子信号通路中的脑源性神经营养因

表2 基因本体论分析前5位hsa-miR-146b靶基因集的细胞组分、分子功能和生物学途径

Table 2 Top 5 cellular component, molecular function and biological process of gene ontology analysis for target genes of hsa-miR-146b

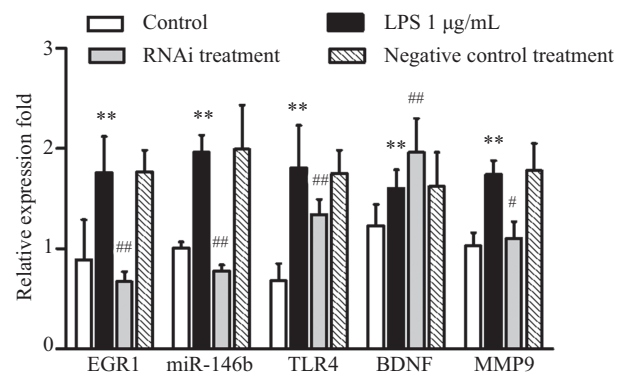
序号 Number	基因本体论序号 GO ID	描述项 Description
Biological Process		
1	GO:0006915	Apoptosis
2	GO:0012501	Programmed cell death
3	GO:0008219	Cell death
4	GO:0016265	Death
5	GO:0042981	Regulation of apoptosis
Cellular Component		
1	GO:0005856	Cytoskeleton
2	GO:0043228	Non-membrane-bounded organelle
3	GO:0043232	Intracellular non-membrane-bounded organelle
4	GO:0005730	Nucleolus
5	GO:0070013	Intracellular organelle lumen
Molecular Function		
1	GO:0005524	ATP binding
2	GO:0032559	Adenyl ribonucleotide binding
3	GO:0030554	Adenyl nucleotide binding
4	GO:0001883	Purine nucleoside binding
5	GO:0001882	Nucleoside binding

表3 hsa-miR-146b靶基因集的KEGG信号通路分析

Table 3 KEGG signaling pathway analysis for target genes of hsa-miR-146b

序号 Number	注释聚类通路序号 Annotation cluster pathway ID	通路项目 Term
1	Hsa:04722	Neurotrophin signaling pathway
2	Hsa:9865	TRIL; TLR4 interactor with leucine-rich repeats
3	Hsa:05212	Pancreatic cancer
4	Hsa:05200	Pathways in cancer
5	Hsa:497258	BDNF antisense RNA
6	Hsa:04210	Apoptosis
7	Hsa:815	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha

子, MMP9与细胞凋亡和炎症信号通路相关。这三个靶标分别代表了miR-146b可能发挥作用的三种途径, 以其为代表性靶标进行实验验证, 以初步探讨miR-146b的作用。LPS刺激的小胶质细胞中, EGR1水平升高, miR-146b的水平亦升高(图2), 且TLR4、BDNF和MMP9表达水平亦升高。而RNA慢病毒技术干扰小胶质细胞中的EGR1的表达后, 同样接受LPS刺激后, EGR1干扰的小胶质细胞中EGR1表达降低, miR-146b水平也降低, TLR4和MMP9表达被抑制, 而BDNF表达水平升高。在EGR1阴性对照中, TLR4、BDNF和MMP9的表达接近初始水平。此结果表明, EGR1是调节miR-146b表达的关键信号分子, miR-146b干扰后能调控下游信号通路TLR4、BDNF和MMP9的水平。



n=6; **P<0.01, 与对照组相比; #P<0.05, ##P<0.01, 与刺激组相比。
n=6; **P<0.01 vs control group; #P<0.05, ##P<0.01 vs model group.

图2 EGR1调控miR-146b的表达及下游信号分子TLR4、BDNF和MMP9的表达

Fig.2 miR-146b expression regulated by EGR1 and downstream signaling molecules TLR4, BDNF and MMP9 expression

3 讨论

hsa-miR-146b序列在人、猕猴、小鼠等多个物种间具有高度保守性, 其保守序列的突变可致严重甚至致死疾病的发生。研究具有高度保守性的miRNA序列及其上下游调控途径, 对于生物物种生存具有重要的意义。以往报道, hsa-miR-146b与颅外恶性肿瘤、乳腺癌、神经胶质瘤等疾病密切相关。我们在前期预实验中发现, 在缺血再灌注条件下, miR-146b在大脑皮质中有高表达。miR-146a属于miR-146的另一个亚型, 与脑缺血的关联密切^[11-12]; 而miR-146b报道较少, 其与脑缺血再灌注的机制关联有待明确和深入研究。本研究选取小胶质细胞作为功能细胞进行研究, 其构成脑内的固有免疫系统, 通过模式识别受体识别^[19]、结合某些病原体或病原体产物介导引起系列炎症反应, 如大量细胞因子、趋化因子、黏附分子和蛋白水解酶等被释放, 加重脑组织损伤。本研究期望在小胶质细胞上研究miR-146b的分子调控功能。

采用信息学预测方法能够快速寻找miRNA与疾病相关的分子调控网络。如苏玉亮等^[20]对基因芯片中有表达差异的miRNA, 通过miRanda、TargetScan及PicTar预测靶基因, Gene Ontology(GO)分析和KEGG信号预测与其生物学功能有关的分子生物学途径。韩泽平等^[21]运用UCSC基因组浏览器、人类miRNA疾病数据库、肝癌基因在线数据库等研究hsa-miR-122与肝癌发病机制相关的上游转录因子、下游靶基因与其相互作用的lncRNA等多个调控途径。信息学预测方法可为预测和验证miR-146b与脑卒中疾病的关联奠定信息学基础。miRNA本身既作为转录因子起调控作用, 同时也受到多个转录因子的调控, 本文首先寻找miR-146b的上游调控分子, 并对其中之一的EGR1分子进行实验验证。我们发现, 在LPS刺激的小胶质细胞模型上, 干扰EGR1后, hsa-miR-146b的上调受到了抑制, 表明EGR1可能以转录因子方式调控hsa-miR-146b的表达。

本研究发现, 与脑卒中相关的hsa-miR-146b靶基因有39个, 其中含有TLR4、BDNF和MMP9等基因。Gene Ontology通过控制注释词汇的层次结构, 使得能从不同层面查询和使用基因注释信息, 其包括生物学过程(biological process)、分子功能(molecular function)和细胞组分(cellular component)三个

方面, 了解基因与其分子功能的关系。KEGG数据库整合了基因组、化学和系统功能信息, 将基因目录与更高级别的细胞、物种和生态系统水平的系统功能关联起来, 其能够通过图形模式来分析众多的代谢途径以及各途径之间的关系, 提供基因与代谢途径的直接关联。以Gene Ontology和KEGG途径分析预测miR-146b的下游信号通路, 能够为展示miR-146b的初步的生物学途径提供有价值的信息。分析生物学途径预测中包括了细胞凋亡、细胞死亡等途径, 且KEGG信号通路分析中包括了神经营养因子的信号转导通路、TLR4信号通路、细胞凋亡途径等。靶基因TLR4与固有免疫功能相关^[22], 参与TLR4信号通路, 与下游炎症途径密切相关。有报道表明, TLR4和MMP9共同参与炎症的固有免疫途径^[23]。BDNF为脑源性神经营养因子之一, 对神经元的存活、分化、生长发育起重要作用, 与KEGG预测的神经营养因子途径密切相关^[24]。对炎症信号通路上的TLR4、BDNF和MMP9表达进行验证发现, 干扰hsa-miR-146b的表达时, TLR4和MMP9的表达也受到了抑制, 证明抑制hsa-miR-146b可抑制TLR4和MMP9固有免疫炎症途径的活性。LPS刺激小胶质细胞后, BDNF的表达升高, 这与小胶质细胞活化后释放神经营养因子发挥神经保护作用相关^[25]。而干扰hsa-miR-146b的表达后, BDNF的表达反而上升, 表明hsa-miR-146b抑制了BDNF的表达, 而干扰hsa-miR-146b后, BDNF表达升高, 神经营养作用更明显。本实验研究初步证实了hsa-miR-146b可在LPS刺激的小胶质细胞模型中具有调控作用, 而此细胞模型与脑卒中再灌注密切相关^[26-27], hsa-miR-146b与脑卒中的关联有待进一步验证。

生物信息学预测所得信息对生物学研究起到了很好的前瞻性作用, 而实验模型加以验证, 对生物学功能的继续研究起到了证实作用。本文结果提示, hsa-miR-146b可能通过多途径对脑卒中的发生机制和功能变化进行干预, 在脑卒中的发生与发展中可能扮演了重要的角色。本文已经初步对信息学所预测的信息加以证实, 然而hsa-miR-146b预测有多个靶基因, 只对其中少数进行了验证, 其余靶基因之间也有mRNA-mRNA相互调控机制, 所有的基因共同构成以hsa-miR-146b为核心的分子调控网络, hsa-miR-146b对靶基因网络的调控有待进一步探索。

参考文献 (References)

- 1 Tao X, Sun X, Yin L, Han X, Xu L, Qi Y, *et al.* Dioscin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through the downregulation of TLR4 signaling via HMGB-1 inhibition. *Free Radic Biol Med* 2015; 84: 103-15.
- 2 Yang Z, Zhong L, Zhong S, Xian R, Yuan B. miR-203 protects microglia mediated brain injury by regulating inflammatory responses via feedback to MyD88 in ischemia. *Mol Immunol* 2015; 65(2): 293-301.
- 3 朱清源, 戈宝学. MicroRNA与免疫调控. 现代免疫学(Zhu Qingyuan, Ge Baoxue. MicroRNA and immune regulation. *Curr Immunol*) 2011; 31: 89-92.
- 4 吕燕妮, 钱貽崧, 付龙生, 魏筱华. 固有免疫信号分子hsa-miR-181a调节脑中作用的生物信息学分析. 现代免疫学(Lü Yanni, Qian Yisong, Fu Longsheng, Wei Xiaohua. Bioinformatical analysis of the role of innate immune signaling molecule hsa-miR-181a in regulation of signal pathway in stroke. *Curr Immunol*) 2015; 35(3): 214-9.
- 5 李艳艳, 于士柱, 王 虔, 孙翠云, 孔妍玲, 王 影, 等. miR-146b-5p对胶质瘤TJ905细胞生长的抑制作用及其机制探讨. 中国肿瘤临床(Li Yanyan, Yu Shizhu, Wang Qian, Sun Cuiyun, Kong Yanling, Wang Ying, *et al.* Inhibitory action of miR-146b-5p on growth and mechanism of TJ905 glioma cells. *Chinese J Clin Oncol*) 2012; 39(13): 877-81.
- 6 薛云星. miRNA和主动脉夹层研究进展. 心血管病学进展(Xue Yunxing. Research progress on miRNA and aortic dissection. *Adv Cardiovasc Dis*) 2013; 34(4): 580-3.
- 7 熊 玮, 董少红, 袁建辉, 刘建军, 徐新云, 李江华. 微小RNA-146a影响血管平滑肌细胞增殖和凋亡的机制. 中国组织工程研究(Xiong Wei, Dong Shaohong, Yuan Jianhui, Liu Jianjun, Xu Xinyun, Li Jianghua. Essential role of microRNA-146a in proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Chin J Tissue Eng Res*) 2012; 16(20): 3715-9.
- 8 石 欢. miR-146a在相关自身免疫性疾病中的研究进展. 口腔颌面外科杂志(Shi Huan. Advances of miR-146a in the pathogenesis of relevant autoimmune diseases. *J Oral Maxil Surg*) 2013; 23(4): 305-8.
- 9 杨淑娜, 马爱军, 潘旭东, 仲情维, 王 兰, 张 璋, 等. 无症状性脑动脉粥样硬化与大动脉粥样硬化性卒中患者血浆微小RNA表达分析. 中国卒中杂志(Yang Shuna, Ma Aijun, Pan Xudong, Zhong Qianwei, Wang Lan, Zhang Zhang, *et al.* Analysis on the plasma miRNAs of patients with asymptomatic cerebral atherosclerotic and large artery atherosclerotic ischemic stroke. *Chin J Stroke*) 2015; 10(2): 120-7.
- 10 马丽娟, 周 健. MicroRNAs-缺血性脑卒中潜在的诊断标志物及治疗靶点. 临床检验杂志(Ma Lijuan, Zhou Jian. MicroRNAs-potential diagnostic biomarkers and therapeutic targets for ischemic stroke. *Chin J Clin Lab Med*) 2013; 611: 603-5.
- 11 Jeon YJ, Kim OJ, Kim SY, Oh SH, Oh D, Kim OJ, *et al.* Association of the miR-146a, miR-149, miR-196a2, and miR-499 polymorphisms with ischemic stroke and silent brain infarction risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33(2): 420-30.
- 12 Ouyang YB, Xu L, Yue S, Liu S, Giffard RG. Neuroprotection by astrocytes in brain ischemia: Importance of microRNAs. *Neurosci Lett* 2014; 565: 53-8.
- 13 Chen L, Yang Y, Li CT, Zhang SR, Zheng W, Wei EQ, *et al.* CysLT2 receptor mediates lipopolysaccharide-induced microglial inflammation and consequent neurotoxicity *in vitro*. *Brain Res* 2015; 1624: 433-45.
- 14 Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: Neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2004; 4: 65-84.
- 15 Stevanato L, Sinden JD. The effects of microRNAs on human neural stem cell differentiation in two- and three-dimensional cultures. *Stem Cell Res Ther* 2014; 5(2): 49.
- 16 Bo LJ, Wei B, Li ZH, Wang ZF, Gao Z, Miao Z. Bioinformatics analysis of miRNA expression profile between primary and recurrent glioblastoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(19): 3579-86.
- 17 Ma X, Zhou J, Zhong Y, Jiang L, Mu P, Li Y, *et al.* Expression, regulation and function of microRNAs in multiple sclerosis. *Int J Med Sci* 2014; 11(8): 810-8.
- 18 Bhattacharyya S, Fang F, Tourtellotte W, Varga J. Egr-1: New conductor for the tissue repair orchestra directs harmony (regeneration) or cacophony (fibrosis). *J Pathol* 2013; 229(2): 286-97.
- 19 Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124(4): 783-801.
- 20 苏玉亮, 张 寰, 曲金力, 钱碧云. EGFR突变相关miR-335靶基因预测及其功能的生物信息学分析. 中国肿瘤临床(Su Yuliang, Zhang Huan, Qu Jinli, Qian Biyun. Bioinformatics analysis of target gene prediction and functions of miR-335 related to EGFR mutation. *Chinese J Clin Oncol*) 2013; 40(10): 560-3.
- 21 韩泽平, 何金花, 黎毓光, 戴柏莹, 吕钰冰, 朱剑霞. 基于生物信息学方法预测hsa-miR-122在肝癌中的分子调控网络. 生物医学工程与临床(Ze Ping, He Jinhua, Li Yuguang, Dai Boying, Lü Yubing, Zhu Jianxia. Prediction of hsa-miR-122 regulatory network in hepatocellular carcinoma based on bioinformatics analysis. *BME Clin Med*) 2013; 17(6): 601-5.
- 22 侯金才, 张 鹏, 刘建勋, 韩 笑, 李 丹, 王秀辉. 栀子苷对缺氧/复氧小胶质细胞TLR4通路的影响. 中国药理学通报(Hou Jincai, Zhang Peng, Liu Jianxun, Han Xiao, Li Dan, Wang Xiuhui. Geniposide on TLR4 pathway in cultured rat microglia with hypoxia/reoxygenation. *Chin Pharmacol Bull*) 2011; 6: 769-73.
- 23 Lively S, Schlichter LC. Age-related comparisons of evolution of the inflammatory response after intracerebral hemorrhage in rats. *Transl Stroke Res* 2012; 3(Suppl 1): 132-46.
- 24 杨克红, 刘 浩, 吴华璞, 祝晓光, 蒋志文. 姜黄素预处理对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用. 中国药理学通报(Yang Kehong, Liu Hao, Wu Huapu, Zhu Xiaoguang, Jiang Zhiwen. Neuroprotective effect of curcumin pretreatment on focal cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Chin Pharmacol Bull*) 2013; 10: 1432-5.
- 25 Nikodemova M, Watters JJ. Outbred ICR/CD1 mice display more severe neuroinflammation mediated by microglial TLR4/CD14 activation than inbred C57Bl/6 mice. *Neuroscience* 2011; 190: 67-74.
- 26 Gaire BP, Kwon OW, Park SH, Chun KH, Kim SY, Shin DY. Neuroprotective effect of 6-paradol in focal cerebral ischemia involves the attenuation of neuroinflammatory responses in activated microglia. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120203.
- 27 Shao J, Liu T, Xie QR, Zhang T, Yu H, Wang B, *et al.* Adjuvant attenuates lipopolysaccharide (LPS)- and ischemia-induced microglial activation. *J Neuroimmunol* 2013; 254(1/2): 83-90.