

let-7a通过抑制Fas/FasL抑制缺氧缺血性新生大鼠脑组织的细胞凋亡

刘依枫 闫军* 周玲 雷蓓蓓

(重庆市九龙坡区人民医院儿科, 重庆 400050)

摘要 该文旨在探究let-7a是否通过抑制Fas/FasL减轻缺氧缺血性新生大鼠脑组织的细胞凋亡。通过结扎颈动脉建立新生大鼠缺氧缺血性模型。将60只SPF级SD新生大鼠随机分为: 假手术组(Sham组)、模型组(Model组)、let-7a激动剂(agomir)组、阴性对照(NC) agomir组、let-7a agomir+Fas激活剂组, 每组12只。造模后进行药物注射, Sham组和Model组注射等量生理盐水。给药结束后, 使用神经功能缺损程度评分法(NDS)评价各组大鼠神经功能。HE染色观察各组大鼠脑组织的病理学变化。RT-qPCR法测定各组大鼠脑组织中let-7a、Fas和FasL mRNA表达水平; Western blot检测各组大鼠脑组织中Fas/FasL信号通路及凋亡相关蛋白表达水平; TUNEL染色检测各组大鼠脑组织中细胞凋亡率; 双荧光素酶报告基因实验检测let-7a与Fas、FasL的靶向关系。与Sham组相比, Model组大鼠NSD评分, 细胞凋亡率, 脑组织中Fas、FasL mRNA表达水平, Fas、FasL、Bax和Caspase-3蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 脑组织病理损伤严重。与Model组相比, NC agomir组大鼠各项指标均无显著性差异($P>0.05$); let-7a agomir组大鼠NSD评分, 脑组织的细胞凋亡及Fas、FasL表达水平显著减少($P<0.05$), 病理损伤有所减轻。Fas激活剂减弱了过表达let-7a对缺氧缺血性新生大鼠脑组织细胞凋亡的抑制作用($P<0.05$)。let-7a与Fas、FasL均存在靶向关系。let-7a可能通过抑制Fas/FasL减轻缺氧缺血性新生大鼠脑组织的细胞凋亡。

关键词 let-7a; Fas/FasL; 缺氧缺血性脑病; 细胞凋亡

let-7a Inhibits Cell Apoptosis in Hypoxic-Ischemic Neonatal Rat Brain Tissue by Inhibiting Fas/FasL

LIU Yifeng, YAN Jun*, ZHOU Ling, LEI Beibei

(Department of Pediatrics, Chongqing Jiulongpo District People's Hospital, Chongqing 400050, China)

Abstract This study was to explore whether let-7a alleviated the cell apoptosis in hypoxic-ischemic neonatal rat brain tissue by inhibiting Fas/FasL. A hypoxic-ischemic model of neonatal rats was established by ligating the carotid artery. Sixty SPF SD neonatal rats were randomly grouped into: sham operation group (Sham group), Model group, let-7a agonist (agomir) group, negative control (NC) agomir group, and let-7a agomir+Fas activator group, 12 animals per group. After modeling, drug injection was performed, and the Sham group and the Model group were injected with the same amount of normal saline. After the administration, the neurological function of the rats in each group was evaluated by the NDS (neurological deficit scale). HE staining was used to observe the

收稿日期: 2023-08-07 接受日期: 2023-11-08

重庆市区域医学重点学科建设项目(批准号: 渝卫办科教发〔2016〕190号)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13110107131, E-mail: 1220722100@qq.com

Received: August 7, 2023 Accepted: November 8, 2023

This work was supported by the Chongqing Regional Medical Key Discipline Construction Project (Grant No. Chongqing Health Office Science and Education (2016) No. 190)

*Corresponding author. Tel: +86-13110107131, E-mail: 1220722100@qq.com

pathological changes of the brain tissue of the rats in each group. RT-qPCR method was used to determine the expression levels of let-7a, *Fas* and *FasL* mRNA in the brain tissue of rats in each group; Western blot was used to determine the expression of Fas/FasL signaling pathway and apoptosis-related proteins in the brain tissue of rats in each group; TUNEL staining was used to detect the apoptosis rate in the brain tissue of rats in each group; the targeting relationship between let-7a and *Fas* and *FasL* was detected by dual-luciferase reporter gene assay. Compared with the Sham group, the NSD score, cell apoptosis rate, the mRNA expression level of *Fas* and *FasL*, and the protein expression level of Fas, FasL, Bax and Caspase-3 in the Model group were obviously increased ($P < 0.05$); the brain tissue pathological damage was serious. Compared with the Model group, there was no obvious difference in the indicators of the rats in the NC agomir group ($P > 0.05$); the NSD score, apoptosis of brain tissue and the expression level of Fas and FasL were obviously decreased in let-7a agomir group ($P < 0.05$), and the pathological damage was alleviated to some extent. Fas activator attenuated the inhibitory effect of overexpression of let-7a on apoptosis of brain tissue in hypoxic-ischemic neonatal rats ($P < 0.05$). There was a targeting relationship between let-7a and *Fas*, *FasL*. let-7a may reduce the cell apoptosis of hypoxic-ischemic neonatal rat brain tissue by inhibiting Fas/FasL.

Keywords let-7a; Fas/FasL; hypoxic-ischemic encephalopathy; apoptosis

缺氧缺血性脑病(hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE)是新生儿中常见的疾病之一,是由脑组织缺氧缺血诱发的脑病^[1]。据报道,全世界HIE平均发生率为0.15%^[2]。全世界的HIE致死病例每年约为100万,占全球新生儿死亡人数的20%^[3-4]。微小RNA(miRNA, miRNA)是一种长度小于200个核苷酸的非编码RNA,参与体内多种生理、病理过程,其异常表达往往与疾病密切相关。let-7a是一种miRNA,其在细胞凋亡和细胞免疫中发挥了重要的作用,是一个抗凋亡因子。研究发现let-7a在神经干细胞的分化过程中高表达^[5]。YANG等^[6]研究发现let-7a能减轻蛛网膜下腔出血后出现的早期脑损伤。但let-7a在HIE中是否能影响脑组织的细胞凋亡,目前的研究较少。Fas是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)/神经生长因子(nerve growth factor, NGF)受体家族中的重要成员^[7]。FasL作为Fas的天然配体,属于TNF家族,能与Fas特异性结合。Fas/FasL参与了人体自身耐受、机体的细胞凋亡和免疫应答过程^[8]。Fas/FasL在HIE病理过程中对脑组织细胞凋亡的影响目前还尚不清楚。本研究建立新生大鼠HIE模型,旨在探讨let-7a在HIE新生大鼠中对Fas/FasL的调节作用,及其对脑组织细胞凋亡的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与细胞

60只SPF级SD大鼠幼崽,雄性,10日龄,体质量16~22 g,与其母鼠均购自斯贝福(北京)生物技术有

限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。所有动物饲养于采光良好、通风的实验室,保持12 h的光照/黑暗循环。幼鼠可自由获取母乳、食物和水。适应性饲养1周后用于实验。本实验已经过重庆市九龙坡区人民医院动物伦理委员会的审核和批准,批准文号为20220426。

HEK293T细胞购自中国医学科学院基础医学研究所细胞库。

1.2 主要试剂

let-7a激动剂(agomir)、NC agomir、let-7a mimic和NC mimic购自百奥迈科生物技术有限公司;HE染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;miRNA荧光定量PCR试剂盒购自上海康朗生物科技有限公司;Fas(ab82419)、FasL(ab186671)、GAPDH(ab8245)抗体及其二抗(ab6721)购自英国Abcam公司;异氟醚、Fas激动剂购自美国Sigma公司;BCA试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 大鼠HIE模型的建立、分组与给药

参考既往发表文献^[9-10]的方法,构建大鼠HIE模型。使用3%异氟醚诱导(2.5%维持)大鼠幼崽麻醉。诱导后用酒精对颈部进行消毒,在中线右侧穿过矢状面的位置做一个3~5 mm的横切口,将右侧颈总动脉分离出来。手术线双结扎右颈动脉,并切断结扎线。之后常规止血,缝合。所有手术均在5~9 min内完成。手术后,让大鼠在温控加热毯上从麻醉中恢复1 h。然后将幼鼠置于500 mL密闭罐中,置于37 °C水浴中,暴露于8%氧气和92%氮气的混合气体中2.5 h,并将

混合气体通过入口和出口输送到罐中。Sham组幼鼠麻醉后,暴露右颈总动脉,但不结扎,消毒后缝合,不进行其他操作。造模后将幼鼠送回母鼠身边,术前术后对幼鼠进行保温。

本实验共造模成功48只大鼠,将其随机分为模型组(Model组)、let-7a激动剂(agomir)组、NC agomir组、let-7a agomir+Fas激活剂组,每组12只,另取12只作为Sham组。在每只大鼠的侧脑室钻一个1 mm的毛刺孔(位于颅骨后0.8 mm,中线右侧1.5 mm,4.5 mm深度),将10 μ mol/L的let-7a agomir、NC agomir以0.5 μ L/min的速度各注射5 μ L。let-7a agomir+Fas激活剂组除脑室注射5 μ L的let-7a agomir外,还需尾静脉注射5 μ g/mL的Fas激活剂(以能穿过血脑屏障的AVV为载体)0.2 mL^[11]。Sham组注射同等体积的生理盐水。

1.4 细胞培养与转染

HEK293T培养于RPMI-1640培养基(含10%胎牛血清)中,于37 $^{\circ}$ C、含体积分数5%的CO₂的细胞培养箱中进行培养,每2~3天更换1次培养基。将HEK293T细胞以 5×10^5 个/孔的密度接种在无菌6孔板中,培养过夜。分别将let-7a mimic、NC mimic转染到HEK293T细胞中,培养24 h用于后续实验。

1.5 评价各组大鼠神经功能损伤程度

大鼠HIE术后7天分别使用神经功能缺损程度评分法(neurological deficit scale, NDS)评价神经功能的缺损程度,将大鼠行为分为7个等级,分别记为0~6分^[12]。

1.6 HE染色观察各组大鼠脑组织的病理学变化

造模7天后处死所有大鼠,各组随机取6只大鼠视交叉水平脑组织,经梯度酒精(70%、80%、90%、95%酒精和无水酒精)脱水4 h,浸入石蜡4.5 h,包埋后制成组织蜡块。切片机将组织蜡块切成5 μ m厚度的石蜡切片。对切片进行HE染色之后于光学显微镜下进行观察大鼠脑组织的病理学变化,并拍照。

1.7 RT-qPCR法检测RNA表达水平

取1.6中的脑组织进行低温研磨,之后加入Trizol液提取脑组织的总RNA。之后将其反转录为cDNA,并使用SYBR Green荧光定量PCR检测试剂盒进行cDNA扩增。PCR扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性10 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,60 $^{\circ}$ C延伸1 min,共40个循环。使用2^{- $\Delta\Delta$ CT}计算let-7a、Fas和FasL mRNA的相对表达量。let-7a上游引物为5'-AGG ATC CAA AGG TGG TGG TAA GAG GGT

GAT-3',下游引物为5'-AGT CGA CAT AAG ACA AGA AGC AAA AGG TTT-3';Fas上游引物为5'-AAC CGA CAA CAA CTG CTC AGA AGG-3',下游引物为5'-TTC GTG TGC AAG GCT CAA GGA TG-3';FasL上游引物为5'-GAC AGC AGT GCC ACT TCT CCT TG-3',下游引物为5'-CCA TTC CAA CCA GAG CCA CCA G-3'。

1.8 Western blot检测大鼠脑组织中Fas/FasL信号通路及凋亡相关蛋白表达

取1.6中所得的脑组织制备组织匀浆。使用RIPA裂解液提取大鼠脑组织总蛋白,经BCA定量后,进行电泳、转膜、封闭,将膜与一抗Fas(1:1 000)、FasL(1:1 000)、Bax(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)和GAPDH(1:1 200)于TBST中孵育过夜(4 $^{\circ}$ C)。次日于室温下与相应二抗(1:5 000)孵育1 h。加入ECL化学发光剂显影,利用凝胶成像仪成像后,检测蛋白灰度值。

1.9 TUNEL染色检测各组大鼠脑组织细胞凋亡情况

处死各组剩余大鼠后取其脑组织,制备10 μ m厚的脑组织切片,待行TUNEL染色。将脑组织切片放在染色缸中,经二甲苯、无水乙醇、95%乙醇和75%乙醇洗涤后,用PBS洗涤2次,每次5 min。之后加入20 mg/L蛋白酶K溶液,反应20 min,蒸馏水洗涤4次。在染色缸中加入含有过氧化氢(2%)的PBS溶液进行反应后用PBS洗涤。用滤纸吸去切片上多于液体后立即添加TdT酶反应液,于37 $^{\circ}$ C孵育1 h,再用PBS洗涤3次。之后加入转化剂-POD反应25 min,再用PBS洗涤4次。加入5% DBA底物进行显色,后用蒸馏水洗涤,再用苏木精复染10 min,用蒸馏水、正丁醇洗涤。最后加入二甲苯进行脱水,用中性树胶封片。在倒置显微镜下观察脑组织细胞凋亡情况。采用ImageJ软件统计细胞数量,计算细胞凋亡率。细胞凋亡率(%)=(凋亡细胞数目/细胞总数目) $\times 100\%$ 。

1.10 双荧光素酶报告基因实验检测let-7a与Fas、FasL的靶向关系

使用TargetScan软件预测let-7a与Fas、let-7a与FasL的结合位点,并进行双荧光素酶报告基因实验进行验证。构建Fas野生型质粒(Fas-WT)和突变型质粒(Fas-MUT),将Fas-WT和Fas-MUT分别与NC mimic或let-7a mimic共转染于HEK293T细胞,转染48 h后检测荧光素酶活性。

构建FasL野生型质粒(*FasL*-WT)和突变型质粒(*FasL*-MUT),将*FasL*-WT和*FasL*-MUT分别与NC mimic或let-7a mimic共转染于HEK293T细胞,转染48 h后检测荧光素酶活性。

1.11 数据统计与分析

所有实验数据采用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。采用GraphPad Prism 7.0软件进行数据分析。两组间差异分析采用LSD-*t*检验,多组间差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 被认为在统计学中具有显著性差异。

2 结果

2.1 各组大鼠行为功能评价

如图1所示与Sham组相比,Model组大鼠NDS评分显著升高($P<0.05$);与Model组相比,let-7a agomir组NDS评分显著下降($P<0.05$),NC agomir组无显著性差异($P>0.05$)。与let-7a agomir组相比,let-7a

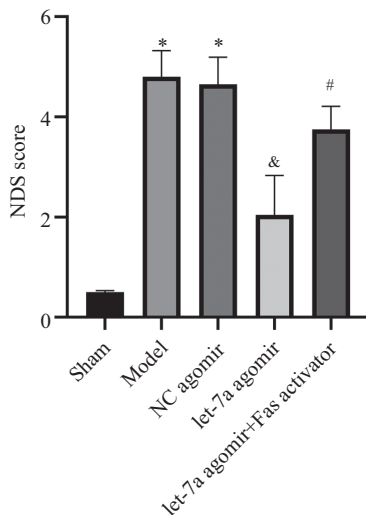
agomir+Fas激活剂组NDS评分显著上升($P<0.05$)。

2.2 HE染色观察各组大鼠脑组织的病理学变化

如图2所示,Sham组大鼠的脑组织神经细胞排列整齐紧密,结构完整;Model组和NC agomir组大鼠脑组织神经细胞出现肿胀破裂、细胞间隙增大,神经细胞出现坏死,出现多个出血灶;与Model组相比,let-7a agomir组大鼠脑组织神经细胞的病理损伤有所减轻,细胞结构较完整,细胞坏死数减少;与let-7a agomir组相比,let-7a agomir+Fas激活剂组的脑组织神经细胞病理损伤严重,细胞肿胀、坏死增多,细胞轮廓不清晰,排列较紊乱。

2.3 各组大鼠脑组织中let-7a、Fas和FasL表达水平

结果如图3所示。与Sham组相比,Model组和NC agomir组let-7a表达水平显著下降($P<0.05$),Fas和FasL mRNA表达水平显著升高($P<0.05$);与Model组相比,let-7a agomir组let-7a水平显著上升($P<0.05$),



* $P<0.05$,与Sham组相比;# $P<0.05$,与Model组相比;*& $P<0.05$,与let-7a agomir组比。 $n=12$ 。
* $P<0.05$ compared with Sham group;# $P<0.05$ compared with Model group;*& $P<0.05$ compared with let-7a agomir group. $n=12$.

图1 各组大鼠NDS评分

Fig.1 NDS scores of rats in each group

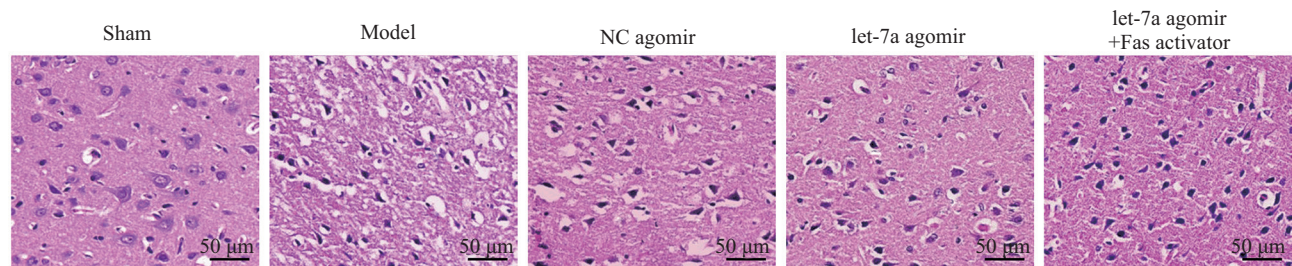


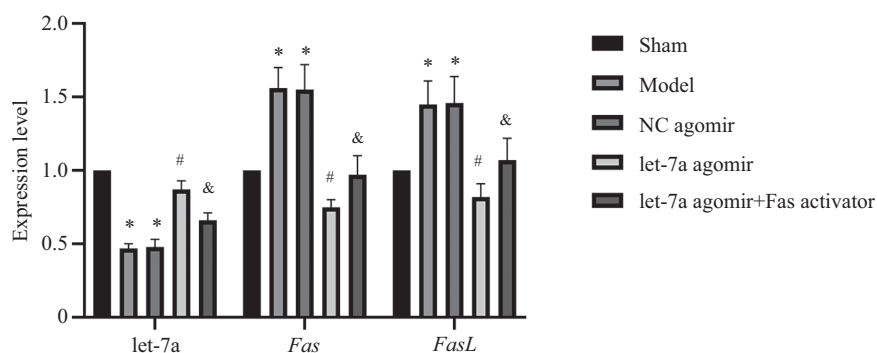
图2 各组大鼠脑组织HE染色

Fig.2 HE staining of brain tissue of rats in each group

*Fas*和*FasL* mRNA表达水平显著下降($P<0.05$); 与let-7a agomir组相比, let-7a agomir+Fas激活剂组let-7a表达水平显著下降($P<0.05$), *Fas*和*FasL* mRNA表达水平显著升高($P<0.05$)。

2.4 Western blot检测各组大鼠脑组织中Fas、FasL、Bax和Caspase-3蛋白表达水平

如图4、图5所示, 与Sham组相比, Model组和NC agomir组大鼠脑组织中Fas、FasL、Bax和Cas-

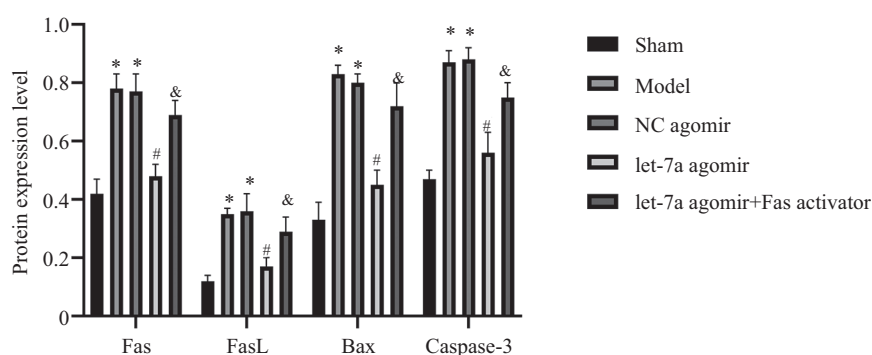


* $P<0.05$, 与Sham组相比; # $P<0.05$, 与Model组相比; & $P<0.05$, 与let-7a agomir组相比。

* $P<0.05$ compared with Sham group; # $P<0.05$ compared with Model group; & $P<0.05$ compared with let-7a agomir group.

图3 各组大鼠脑组织中let-7a、*Fas*和*FasL*表达水平比较

Fig.3 Comparison of expression levels of let-7a, *Fas* and *FasL* in brain tissues of rats in each group



* $P<0.05$, 与Sham组相比; # $P<0.05$, 与Model组相比; & $P<0.05$, 与let-7a agomir组相比。

* $P<0.05$ compared with Sham group; # $P<0.05$ compared with Model group; & $P<0.05$ compared with let-7a agomir group.

图4 各组大鼠脑组织中Fas、FasL、Bax和Caspase-3蛋白表达水平比较

Fig.4 Comparison of the expression levels of Fas, FasL, Bax and Caspase-3 in the brain tissues of rats in each group

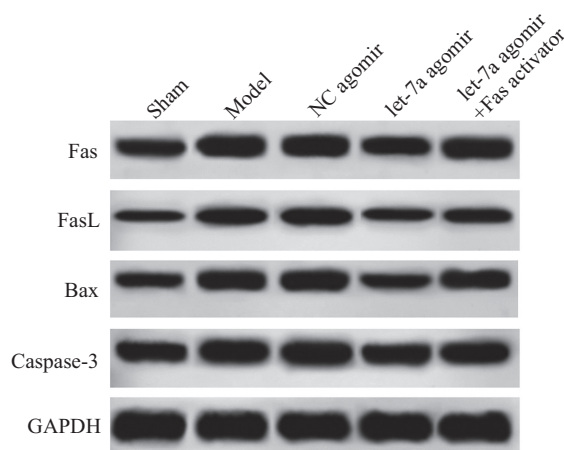


图5 各组大鼠脑组织中Fas/FasL通路及凋亡相关蛋白表达

Fig.5 Expression of Fas/FasL pathway and apoptosis-related proteins in brain tissues of rats in each group

pase-3蛋白水平显著升高 ($P<0.05$); 与 Model组相比, let-7a agomir组大鼠脑组织中Fas、FasL、Bax和Caspase-3蛋白水平显著降低 ($P<0.05$); 与 let-7a agomir组相比, let-7a agomir+Fas激活剂组大鼠脑组织中Fas、FasL、Bax和Caspase-3蛋白水平显著升高 ($P<0.05$)。

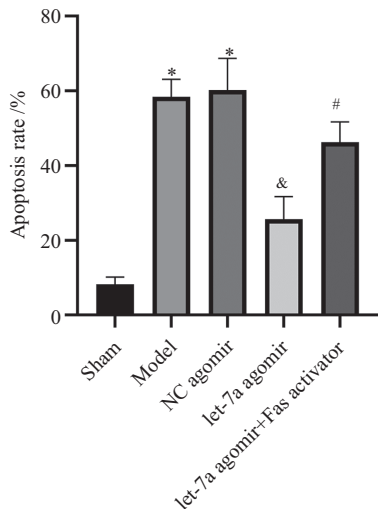
2.5 各组大鼠脑组织神经细胞凋亡情况

结果如图 6和图 7所示。Sham组大鼠神经细胞几乎不出现凋亡。与 Sham组相比, Model组和

NC agomir组大鼠脑组织神经细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。与 Model组相比, NC agomir组无显著性差异; let-7a agomir组大鼠脑组织神经细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$)。与 let-7a agomir组相比, let-7a agomir+Fas激活剂组大鼠脑组织神经细胞凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。

2.6 let-7a与Fas/FasL的靶向关系

利用 TargetScan网站分别预测 let-7a与Fas、let-7a与FasL的结合位点(图 8)。与 NC mimic组比较,



* $P<0.05$, 与Sham组相比; # $P<0.05$, 与Model组相比; & $P<0.05$, 与let-7a agomir组比。 $n=6$ 。
* $P<0.05$ compared with Sham group; # $P<0.05$ compared with Model group; & $P<0.05$ compared with let-7a agomir group. $n=6$.

图6 各组大鼠脑组织神经细胞凋亡率比较

Fig.6 Comparison of neuronal cell apoptosis rate in brain tissue of rats in each group

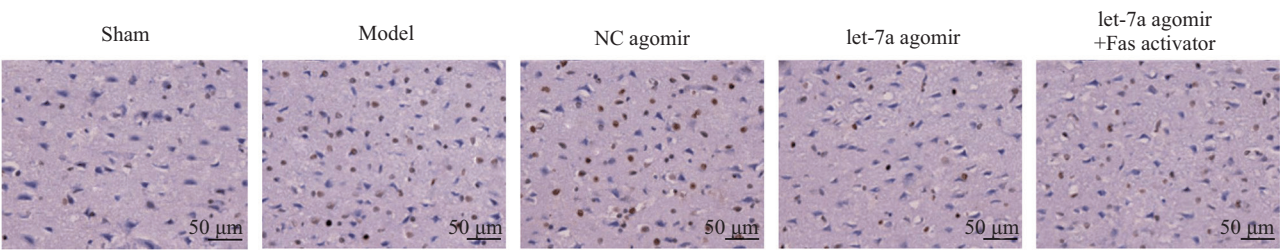


图7 各组大鼠脑组织TUNEL染色

Fig.7 TUNEL staining of brain tissue of rats in each group

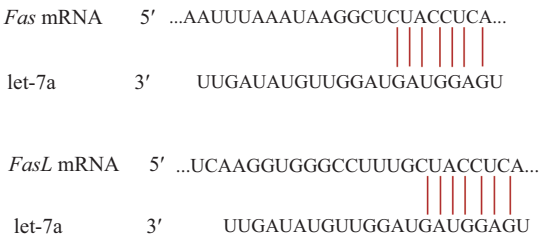
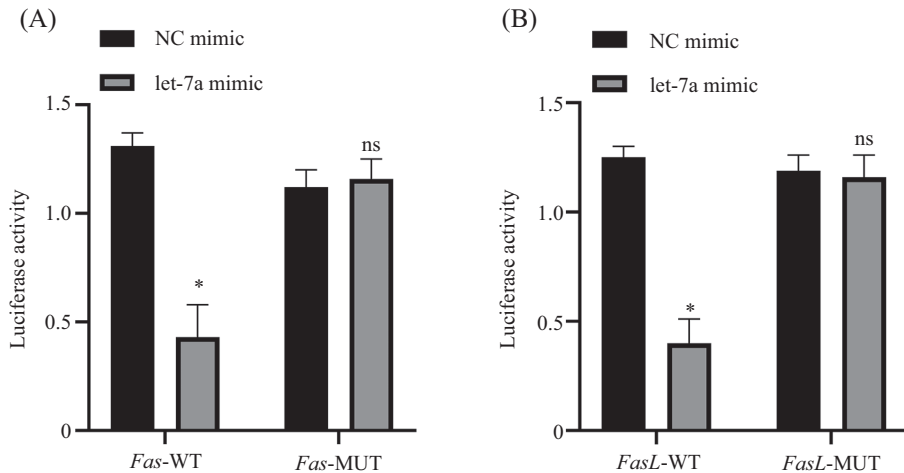


图8 let-7a与Fas、FasL的结合位点预测

Fig.8 Prediction of binding sites of let-7a with Fas and FasL



A: 含有Fas-WT/Fas-MUT的报告基因的荧光素酶活性; B: 含有FasL-WT/FasL-MUT的报告基因的荧光素酶活性。* $P < 0.05$, 与NC mimic组比较; ns: $P > 0.05$ 。

A: luciferase activity of reporter genes containing Fas-WT/Fas-MUT; B: luciferase activity of reporter genes containing FasL-WT/FasL-MUT. * $P < 0.05$ compared with NC mimic group; ns: $P > 0.05$.

图9 荧光素酶活性比较

Fig.9 Comparison of luciferase activities

let-7a mimic组Fas-WT的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$), Fas-MUT的荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图9A)。与NC mimic组比较, let-7a mimic组FasL-WT的荧光素酶活性显著降低 ($P < 0.05$), FasL-MUT的荧光素酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图9B)。

3 讨论

HIE是新生儿常见的神经系统类疾病之一, 患者多出现神经损伤, 给其生存质量带来了干扰^[13]。HIE的临床表现多为意识状态变化、肌张力改变和惊厥等, 这些已成为判断患者发病的严重程度和后遗症的重要指标^[14]。迄今为止, 亚低温是唯一有效的治疗方法^[15]。40%~50%的HIE患儿在接受亚低温治疗后仍然死亡或出现神经系统后遗症, 这给其家庭和社会带来了沉重的负担^[15]。因此, 研究人员多年来一直试图探索HIE的发病机制, 并为新生儿HIE开发新的治疗方案。脑内miRNA与HIE的发生发展密切相关^[10,16]。let-7a作为一种癌症发展的途径已被广泛研究, 并已被证明在调节细胞生长和凋亡中发挥关键作用^[17-18]。let-7a也与组织缺氧缺血性损伤密切相关。例如, let-7a在缺氧诱导的心肌细胞损伤中的表达水平显著降低, circRNA_101237通过let-7a调节缺氧诱导的心肌细胞损伤^[19]。let-7a可抑制缺氧诱导的胶原表达并改善心房纤维化^[20]。在本研究中, let-7a

在新生儿HIE大鼠脑组织中表达下调。let-7a也在防止神经元凋亡中起关键作用^[21]。本研究发现, HIE诱导导致过度的神经元损失, 这与先前的研究结果一致^[22]。此外, let-7a过表达可抑制HIE诱导的神经元凋亡。Western blot结果显示, 过表达let-7a的神经元中脑组织中Bax和Caspase-3蛋白表达水平降低。以上研究结果说明, let-7a过表达可减轻HIE的脑组织细胞凋亡和损伤, 但其作用机制鲜有研究。

为了确定let-7a在HIE中作用的分子机制, 本研究采用TargetScan来预测let-7a的潜在靶点。我们确定了let-7a的数百个潜在靶点, 包括Fas、FasL。Fas是I型跨膜受体蛋白, 其胞内区有死亡抑制域和死亡域, 死亡域可簇集含有死亡域的Fas相关蛋白, 进而形成死亡诱导信号复合体, 该死亡域是凋亡信号转导的关键^[23]。FasL基因位于1q23, 其表达后是一种II型膜蛋白, 被称为死亡因子, 能与Fas特异性结合^[24]。研究发现, 沉默Fas基因能下调Fas、FasL蛋白表达水平, 抑制帕金森病大鼠脑纹状体多巴胺能神经元凋亡^[25]。有趣的是, Fas、FasL在HIE中的表达和作用在很大程度上仍不清楚。因此, 本研究选择Fas、FasL进行进一步研究。我们的结果证实Fas、FasL均是let-7a的靶点。在HIE大鼠中, Fas、FasL的表达上调, let-7a对其表达呈负调控。为进一步明确let-7a与Fas、FasL之间的关系, 本研究在let-7a agomir干预的基础上联合Fas激活剂处理, 结果显示, 脑组

组织的细胞凋亡和病理损伤加重, FasL表达水平升高, 提示let-7a对HIE脑组织凋亡的抑制作用是通过阻滞Fas/FasL通路实现的。

综上所述, 过表达let-7a可能通过抑制Fas/FasL信号通路减轻缺氧缺血性新生大鼠脑组织的细胞凋亡。let-7a/Fas/FasL可能成为治疗HIE的一个新靶点。然而本研究还存在不足之处, 其中的分子机制有待进一步设计实验进行研究。

参考文献 (References)

- [3] KLEUSKENS D G, GONÇALVES COSTA F, ANNINK K V, et al. Pathophysiology of cerebral hyperperfusion in term neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review for future research [J]. *Front Pediatr*, 2021, 9: 631258.
- [3] GROENENDAAL F, DE VRIES L S. Fifty years of brain imaging in neonatal encephalopathy following perinatal asphyxia [J]. *Pediatr Res*, 2017, 81(1/2): 150-5.
- [3] FRAJEWICKI A, LAŠTŮVKA Z, BORBÉLYOVÁ V, et al. Perinatal hypoxic-ischemic damage: review of the current treatment possibilities [J]. *Physiol Res*, 2020, 69(Suppl 3): S379-S401.
- [4] GUNN A J, THORESEN M. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 162: 217-37.
- [5] WANG Y, HAN T, GUO R, et al. Micro-RNA let-7a-5p derived from mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles promotes the regrowth of neurons in spinal-cord-injured rats by targeting the HMGA2/SMAD2 axis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 850364.
- [6] YANG S, TANG W, HE Y, et al. Long non-coding RNA and microRNA-675/let-7a mediates the protective effect of melatonin against early brain injury after subarachnoid hemorrhage via targeting TP53 and neural growth factor [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 99.
- [7] 靳青, 张相伦, 魏晨, 等. 氧化应激通过Fas/FasL信号通路调控奶牛子宫内膜细胞凋亡[J]. *畜牧兽医学报*(JIN Q, ZHANG X L, WEI C, et al. Oxidative stress-induced apoptosis in bovine endometrial cells is mediated through Fas/FasL signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*), 2022, 53(6): 1819-28.
- [8] MAO M G, XU J, LIU R T, et al. Fas/FasL of pacific cod mediated apoptosis [J]. *Dev Comp Immunol*, 2021, 119: 104022.
- [9] HU X, LI S, DOYCHEVA D M, et al. Rh-CSF1 attenuates neuroinflammation via the CSF1R/PLCG2/PKC ϵ pathway in a rat model of neonatal HIE [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 182.
- [10] CAI Q, ZHANG X, SHEN L, et al. The protective effect of MiR-27a on the neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy by targeting FOXO1 in rats [J]. *Transl Pediatr*, 2022, 11(7): 1199-208.
- [11] 李博. Fas/FasL介导的大鼠肺纤维化动物模型及DcR3对其的影响[D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- [12] 孙永, 孙辉, 姚凯华, 等. microRNA-21-5p在缺氧缺血性新生大鼠脑组织中的表达及其生物学功能研究[J]. *中国临床药理学杂志*(SUN Y, SUN H, YAO K H, et al. Expression of microRNA-21-5p in the brain tissue of hypoxic-ischemic neonatal rats and its biological function [J]. *Chin J Clin Pharmacol*), 2020, 36(10): 1244-7.
- [13] 詹震, 林先红, 郑洪, 等. 选择性头部亚低温对缺氧缺血性脑病新生儿血清细胞焦亡相关分子的影响[J]. *蚌埠医学院学报*(ZHAN Z, LIN X H, ZHENG H, et al. Effect of selective head cooling on serum pyroptosis-related molecules in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *J Bengbu Med Coll*), 2021, 46(5): 615-8,22.
- [14] TETOROU K, SISA C, IQBAL A, et al. Current therapies for neonatal hypoxic-ischaemic and infection-sensitised hypoxic-ischaemic brain damage [J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2021, 13: 709301.
- [15] FINDER M, BOYLAN G B, TWOMEY D, et al. Two-year neurodevelopmental outcomes after mild hypoxic ischemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia [J]. *JAMA Pediatr*, 2020, 174(1): 48-55.
- [16] KE F, WANG H, GENG J, et al. MiR-155 promotes inflammation and apoptosis via targeting SIRT1 in hypoxic-ischemic brain damage [J]. *Exp Neurol*, 2023, 362: 114317.
- [17] LIANG J H, XU Q D, GU S G. LncRNA RSU1P2-microRNA let-7a-testis-expressed protein 10 axis modulates tumorigenesis and cancer stem cell-like properties in liver cancer [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 4285-300.
- [18] ZHOU T, LIN K, NIE J, et al. LncRNA SPINT1-AS1 promotes breast cancer proliferation and metastasis by sponging let-7 a/b/i-5p [J]. *Pathol Res Pract*, 2021, 217: 153268.
- [19] GAN J, YUAN J, LIU Y, et al. Circular RNA_101237 mediates anoxia/reoxygenation injury by targeting let-7a-5p/IGF2BP3 in cardiomyocytes [J]. *Int J Mol Med*, 2020, 45(2): 451-60.
- [20] LO C H, LI L C, YANG S F, et al. MicroRNA Let-7a, -7e and -133a attenuate hypoxia-induced atrial fibrosis via targeting collagen expression and the jnk pathway in HL1 cardiomyocytes [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 9636.
- [21] 杨慧, 万广, 高绚照, 等. let-7a通过抑制MAP4K3/MKK4/JNK信号通路减少脑出血大鼠神经元凋亡[J]. *中国病理生理杂志*(YANG H, WAN G, GAO X Z, et al. let-7a inhibits MAP4K3/MKK4/JNK signaling pathway to decrease neuronal apoptosis in rats with intracerebral hemorrhage [J]. *Chin J Pathophysiol*), 2020, 36(6): 1055-62.
- [22] YANG L, ZHANG L, ZHU J, et al. Abnormal expression and role of MicroRNA-214-3p/SLC8A1 in neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy [J]. *Int J Exp Pathol*, 2023, 104(4): 199-208.
- [23] YAJIMA T, HOSHINO K, MURANUSHI R, et al. Fas/FasL signaling is critical for the survival of exhausted antigen-specific CD8⁺ T cells during tumor immune response [J]. *Mol Immunol*, 2019, 107: 97-105.
- [24] LIAO L, YU Y, SHAO B, et al. Redundant let-7a suppresses the immunomodulatory properties of BMSCs by inhibiting the Fas/FasL system in osteoporosis [J]. *FASEB J*, 2018, 32(4): 1982-92.
- [25] 刘会星, 马建法, 王阳, 等. Fas基因沉默对帕金森病大鼠脑纹状体多巴胺能神经元凋亡的影响及机制研究[J]. *卒中与神经疾病*(LIU H X, MA J F, WANG Y, et al. The effects of Fas gene silencing on apoptosis of dopaminergic neurons in striatum of a Parkinson's disease rat model and its mechanism [J]. *Stroke and Nervous Diseases*), 2021, 28(3): 268-73.