

过表达促红细胞生成素人脐带间充质干细胞对缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

孔宁^{1,2}, 唐吉祥^{1,2}, 侯豫博^{1,2}, 孟澜^{2,3}, 孙蕾⁴, 马保东⁴, 邵一鸣⁴, 靳冉冉⁴, 岳寒⁵, 张辉²

<https://doi.org/10.12307/2025.750>

投稿日期: 2024-08-09

采用日期: 2024-09-21

修回日期: 2024-12-02

在线日期: 2024-12-17

中图分类号:

R459.9; R318; Q421

文章编号:

2095-4344(2025)36-07752-10

文献标识码: A

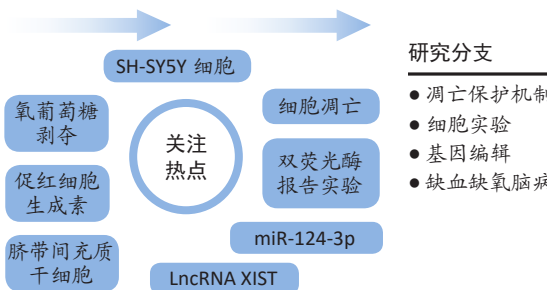
文章快速阅读: 长链非编码 RNA XIST 调控脐带间充质干细胞抑制缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞的凋亡

研究起点

- 长链非编码 RNA
- 缺血缺氧脑病
- 促红细胞生成素
- 间充质干细胞

研究来源

- LncRNA XIST
- 人神经母细胞瘤细胞
- 缺血缺氧脑病
- 过表达促红细胞生成素的脐带间充质干细胞
- miR-124-3p
- GRIN1



研究分支

- 凋亡保护机制
- 细胞实验
- 基因编辑
- 缺血缺氧脑病

文题释义:

人脐带间充质干细胞: 是一种多能性干细胞, 具备分化成多种不同细胞类型的潜力。人脐带间充质干细胞在神经系统疾病具有广泛的临床应用前景。

长链非编码RNA: 是指长度超过200个核苷酸且不具备蛋白质编码功能的RNA转录本。长链非编码RNA XIST与神经系统疾病关系密切, 近年来研究表明它可能参与调控缺血缺氧性脑病的病理生理过程, 可以作为缺血缺氧脑病的潜在诊断和治疗靶点。

摘要

背景: 长链非编码RNA(LncRNA)在神经系统发育及神经性疾病中扮演着重要角色, 课题组前期研究证明了缺血缺氧环境下过表达促红细胞生成素的人脐带间充质干细胞(EPO-MSCs)具有更好的神经保护功能, 且显著激活了LncRNA XIST的表达。研究表明XIST与缺血缺氧脑病的发病机制有关, 但其受EPO-MSCs调控进而保护缺血缺氧神经元的作用和机制尚不清楚。

目的: 探讨LncRNA XIST响应EPO-MSCs信号对缺血缺氧SH-SY5Y细胞凋亡影响的新机制。

方法: ①通过慢病毒转染构建敲低LncRNA XIST(sh-XIST)和阴性对照(NC-XIST)SH-SY5Y细胞株, 采用氧-葡萄糖剥夺诱导细胞缺氧缺血损伤, 使用Transwell小室构建EPO-MSCs和sh-XIST、NC-XIST缺血缺氧SH-SY5Y细胞非接触共培养体系, 使用CCK-8方法检测SH-SY5Y细胞的增殖能力, 使用细胞划痕实验检测SH-SY5Y细胞的迁移能力, 使用流式细胞仪检测SH-SY5Y细胞凋亡情况。②RNA-seq信生分析筛选sh-XIST与NC-XIST细胞株差异表达基因和通路, 利用双荧光素酶实验验证miR-124-3p与靶基因XIST和GRIN1之间的关系, 通过qRT-PCR验证下游miR-124-3p、GRIN1基因的表达水平。③加入miR-124-3p抑制剂和模拟物验证缺血缺氧并与EPO-MSCs共培养后SH-SY5Y的表型变化。

结果与结论: ①与NC-XIST组相比, sh-XIST组SH-SY5Y细胞缺血缺氧损伤并与EPO-MSCs共培养后的增殖和迁移能力下降, 细胞凋亡增加。②双荧光素酶实验结果显示, miR-124-3p与其靶基因XIST之间存在相互作用。在缺血缺氧条件下, 转染miR-124-3p mimics的SH-SY5Y细胞在与EPO-MSCs共培养后表现出细胞凋亡减少的情况; 相反, 当SH-SY5Y细胞转染miR-124-3p inhibitor时, 在相同的缺血缺氧条件及与EPO-MSCs共培养的情况下, 细胞凋亡则显著增加。③通过对sh-XIST进行转录组测序和生物信息学分析筛选得到显著下调的神经活性配体-受体通路及中枢神经系统发育关键受体基因GRIN1。④双荧光素酶实验结果显示, miR-124-3p与GRIN1相互作用, 与NC-XIST组相比, 缺血缺氧后sh-XIST组SH-SY5Y细胞GRIN1表达显著下调。结果表明, LncRNA XIST通过上调miR-124-3p从而促进GRIN1表达, 进而减少缺血缺氧并与EPO-MSCs共培养SH-SY5Y细胞凋亡, 增强其增殖、迁移能力; sh-XIST可以阻断这一保护功能。

关键词: 缺血缺氧脑病; 促红细胞生成素; 脐带间充质干细胞; 长链非编码RNA; 基因修饰; XIST; miR-124-3p; GRIN1; 工程化干细胞

Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing erythropoietin on apoptosis of SH-SY5Y neurons in ischemia and hypoxia

Kong Ning^{1,2}, Tang Jixiang^{1,2}, Hou Yubo^{1,2}, Meng Lan^{2,3}, Sun Lei⁴, Ma Baodong⁴, Shao Yiming⁴, Jin Ranran⁴, Yue Han⁵, Zhang Hui²

¹Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China; ²Department of Neurosurgery, ⁴Stem Cell Regenerative Medicine Translation Center, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, Henan Province, China; ³Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China; ⁵Stem Cell Regenerative Medicine Center, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450004, Henan Province, China

¹新乡医学院, 河南省新乡市 453003; 郑州大学附属郑州中心医院, ²神经外科, ⁴干细胞再生医学转化中心, 河南省郑州市 450007; ³郑州大学, 河南省郑州市 450001; ⁵河南省人民医院干细胞再生医学中心, 河南省郑州市 450004

第一作者: 孔宁, 男, 1997年生, 河南省周口市人, 汉族, 新乡医学院在读硕士, 医师, 主要从事慢性意识障碍以及干细胞相关研究。

通讯作者: 张辉, 硕士, 主任医师, 郑州大学附属郑州中心医院神经外科, 河南省郑州市 450007

共同通讯作者: 岳寒, 博士, 主任医师, 河南省人民医院干细胞再生医学中心, 河南省郑州市 463599

<https://orcid.org/0009-0001-3612-7818> (孔宁)

基金资助: 河南省医学科技攻关项目 (242102310112), 项目负责人: 邵一鸣; 河南省医学科技攻关项目 (242102310144), 项目负责人: 张辉

引用本文: 孔宁, 唐吉祥, 侯豫博, 孟澜, 孙蕾, 马保东, 邵一鸣, 靳冉冉, 岳寒, 张辉. 过表达促红细胞生成素人脐带间充质干细胞对缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(36):7752-7761.



Kong Ning, Master candidate, Physician, Xinxiang Medical College, Xinxiang 453003, Henan Province, China; Department of Neurosurgery, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, Henan Province, China

Corresponding author: Zhang Hui, MS, Chief physician, Department of Neurosurgery, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450007, Henan Province, China

Co-corresponding author: Yue Han, MD, Chief physician, Stem Cell Regenerative Medicine Center, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou 450004, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Long non-coding RNA (LncRNA) plays an important role in nervous system development and neurological diseases. Previous studies by the research team have demonstrated that human umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing erythropoietin (EPO-MSCs) under ischemic and hypoxic conditions have better neuroprotective functions and significantly activate the expression of LncRNA XIST. Research suggests that XIST is related to the pathogenesis of hypoxic-ischemic encephalopathy, but the role and mechanism of its regulation by EPO-MSCs in protecting ischemic-hypoxic neurons remain unclear.

OBJECTIVE: To explore the new mechanism by which LncRNA XIST, in response to EPO-MSC signaling, affects the apoptosis of ischemic-hypoxic SH-SY5Y cells.

METHODS: (1) SH-SY5Y cell lines with knockdown of LncRNA XIST (sh-XIST) and negative control (NC-XIST) were constructed through lentiviral transfection. Oxygen-glucose deprivation was used to induce ischemic-hypoxic injury in the cells. Transwell chambers were used to create a non-contact co-culture system with EPO-MSCs, sh-XIST, and NC-XIST ischemic-hypoxic SH-SY5Y cells. Cell proliferation ability was detected using the CCK-8 assay. Cell migration ability was assessed using the scratch assay, and cell apoptosis was measured by flow cytometry. (2) RNA-seq bioinformatics analysis was performed to screen for differentially expressed genes and pathways between sh-XIST and NC-XIST cell lines. Dual-luciferase experiments were used to verify the relationship between miR-124-3p and the target genes XIST and GRIN1. qRT-PCR was conducted to validate the expression levels of downstream miR-124-3p and GRIN1 genes. (3) miR-124-3p inhibitors and mimics were added to verify phenotypic changes in SH-SY5Y cells after ischemic-hypoxic injury and co-culture with EPO-MSCs.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) Compared with the NC-XIST group, SH-SY5Y cells in the sh-XIST group showed reduced proliferation and migration abilities and increased apoptosis after ischemic-hypoxic injury and co-culture with EPO-MSCs. (2) Dual-luciferase experiments showed that miR-124-3p interacted with the target gene XIST. SH-SY5Y cells transfected with miR-124-3p mimics and co-cultured with EPO-MSCs showed decreased apoptosis after ischemic-hypoxic injury, while SH-SY5Y cells transfected with miR-124-3p inhibitors showed increased apoptosis after co-culture with EPO-MSCs. (3) Transcriptomic sequencing and bioinformatics analysis of sh-XIST revealed significant downregulation of the neuroactive ligand-receptor pathway and the key receptor gene GRIN1 for central nervous system development. (4) Dual-luciferase experiments showed that miR-124-3p interacted with GRIN1. GRIN1 expression was significantly downregulated in the sh-XIST group after ischemic-hypoxic injury compared with the NC-XIST group. These findings indicate that LncRNA XIST promotes GRIN1 expression by upregulating miR-124-3p, thereby reducing cell apoptosis after ischemic-hypoxic injury and co-culture with EPO-MSCs and enhancing proliferation and migration. sh-XIST can block this protective function.

Key words: hypoxic-ischemic encephalopathy; erythropoietin; umbilical cord mesenchymal stem cell; long non-coding RNA; gene modification; XIST; miR-124-3p; GRIN1; engineered stem cells

Funding: Henan Provincial Medical Science and Technology Research Project, No. 242102310112 (to SYM); Henan Provincial Medical Science and Technology Research Project, No. 242102310144 (to ZH)

How to cite this article: KONG N, TANG JX, HOU YB, MENG L, SUN L, MA BD, SHAO YM, JIN RR, YUE H, ZHANG H. Effects of human umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing erythropoietin on apoptosis of SH-SY5Y neurons in ischemia and hypoxia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2025;29(36):7752-7761.

0 引言 Introduction

缺血缺氧性脑病主要是由各种原因引起的神经系统缺血缺氧所致, 常见病因包括呼吸骤停、心跳骤停和休克等^[1]。研究表明, 缺血缺氧性脑病诱导的神经元死亡的主要机制是细胞凋亡^[2]。再灌注治疗虽然能够恢复血流, 但往往引发氧化应激、炎症反应等, 进一步加重脑组织的损伤^[3]。目前临床上主要采用低温治疗来缓解缺血缺氧性脑病的症状, 但疗效有限^[4]。促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 对缺血缺氧性脑病神经元凋亡有一定的改善作用^[5-6], 但由于 EPO 较难通过血脑屏障^[7], 使其治疗缺血缺氧性脑病的效果受到限制^[8]。近年来, 研究显示基因修饰的过表达 EPO 的脐带间充质干细胞 (erythropoietin-umbilical cord mesenchymal stem cells, EPO-MSCs) 在改善缺血缺氧性脑病神经元凋亡方面具有显著效果^[9-10]。

长链非编码 RNA (long non-coding RNA, LncRNA) 是一类长度超过 200 个核苷酸的非编码 RNA^[11]。LncRNA 与许多神经系统疾病密切相关^[12-13], 其中 XIST 在神经系统疾病中尤为重要, Li 等^[14]发现 XIST 可以加剧缺血缺氧再灌注后神经元损伤, 而 Wang 等^[15]发现下调 XIST 会加重缺血缺氧再灌注后脑损伤, 但是 XIST 在缺血缺氧性脑病中的作用和机制有待进一步阐明。

课题组前期利用缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞模型发现

EPO-MSCs 表现出更好的神经保护作用^[16-17]。转录组测序结果表明, LncRNA XIST 表达水平差异较显著, 基于上述测序结果, 此研究首先明确 XIST 在缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞中及其与 EPO-MSCs 共培养后的作用及机制, 然后构建敲低 XIST 的 SH-SY5Y 细胞模型, 进一步明确在缺血缺氧损伤条件下, XIST 响应 EPO-MSCs 信号在 SH-SY5Y 细胞凋亡保护中的机制, 这将为 EPO-MSCs 应用于缺血缺氧性脑病的治疗提供新的理论支持。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 细胞学体外实验。

1.2 时间及地点 实验于 2022 年 9 月至 2024 年 5 月在郑州大学附属郑州中心医院干细胞再生课题组所属分子实验室进行。

1.3 材料

1.3.1 主要试剂 DMEM 高糖培养基 (普诺赛); 胎牛血清 (普诺赛); 青霉素-链霉素溶液 (普诺赛); 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (索莱宝); D-Hank's 溶液 (索莱宝); 无程序冻存液 (普诺赛); OPTI-MEM 培养基 (赛默飞); Lipo2000 转染试剂 (赛默飞); 嘌呤霉素 (Bio-Rad); PureLink™ RNA Mini Kit (赛默飞); 反转录试剂盒/RevertAid First Strand cDNA Synthes (赛默飞); 通用型高灵敏度染

料法定量 PCR 检测试剂盒 (诺唯赞); Trizol(Invitrogen); Annexin V-APC/PI 双染色法细胞凋亡检测试剂盒 (七海生物); miR-124-3p inhibitor、miR-124-3p inhibitor NC、miR-124-3p mimic、miR-124-3p mimic NC、XIST-WT、XIST-MT、GRIN1-WT、GRIN1-MT(GenePharma, 中国上海); Dual Luciferase Reporter Gene Assay Kit(Yeasen Biotechnology); LncRNA XIST 敲低慢病毒和载体对照 (GenePharma, 中国上海)。

1.3.2 实验细胞 SH-SY5Y 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; EPO-MSCs 和 NC-MSCs 是通过慢病毒转染技术, 分别过表达 EPO 质粒和空载质粒的人脐带间充质干细胞^[16]。该研究获得了郑州大学附属郑州中心医院伦理委员会的批准, 批准文号为 202171。

1.4 实验方法

1.4.1 转录组测序并分析差异基因 将 SH-SY5Y 细胞分为正常组、缺血缺氧再灌注组、NC-MSCs 组、EPO-MSCs 组, 后 3 组 SH-SY5Y 细胞在三气培养箱中按照体积分数 94% N₂、5% CO₂、1% O₂ 和无糖无血清培养基的条件下缺血缺氧培养 24 h, 然后更换含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基, 并在每孔上方的 Tranwell 小室中加入 1×10⁵ 个 NC-MSCs 或 EPO-MSCs 共培养 48 h, 使用 Trizol 提取各组细胞总 RNA, 在干冰保存条件下送安诺基因公司进行转录组测序。最后, 使用 Deseq2 软件分析各组细胞间的差异表达基因。

1.4.2 慢病毒转染 使用慢病毒载体在感染复数 (MOI)=20 的条件下感染 SH-SY5Y 细胞, 慢病毒表达载体由吉玛基因公司进行设计和构建, 具体信息见表 1。感染后 48 h, 将 OPTI-MEM 细胞培养基更换为 DMEM 高糖培养基, 每 20 mL 培养基加入 10 μL 质量浓度为 0.1 mg/mL 的嘌呤霉素来筛选成功转染的细胞, 最终选取 3 组不同的细胞株: 阴性对照组 (NC-XIST 组) 以及 2 种敲低 XIST 的实验组 (shXIST-sh1 组和 shXIST-sh2 组)。使用流式细胞仪和荧光显微镜进行检测, 选取其中转染效率最高且稳定敲低 XIST 的 shXIST-sh1 组为后续实验 sh-XIST 组。

表 1 | 慢病毒载体靶序列

Table 1 | Target sequences of lentiviral vectors

载体名称	靶序列
NC-XIST	5'-GTT CTC CGA ACG TGT CAC GT-3'
shXIST-sh1	5'-CTT GAC ACG TCC TCC ATA TTT-3'
shXIST-sh2	5'-GCC TCG GAT ACC TGC TTT AAT-3'

1.4.3 敲低 LncRNA XIST 的 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧再灌注并与 EPO-MSCs 共培养 将 sh-XIST 组和 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞分别以每孔 8×10⁵ 个密度接种到 6 孔板中, 放置于细胞培养箱中培养 24 h。当两组细胞融合度均达到 60% 以上时, 更换为无糖无血清的培养基, 置于三气培养箱 (体

积分数 94% N₂、5% CO₂、1% O₂) 缺血缺氧培养 24 h, 然后更换含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基, 并在每孔上方的 Tranwell 小室中加入 1×10⁵ 个 EPO-MSCs, 共培养 48 h 后收集细胞, 进行下一步实验。

1.4.4 CCK-8 检测 共培养后 sh-XIST 组和 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞消化并计数后, 以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中, 每组 5 个复孔, 在第 0, 1, 3, 5 天, 每天定时弃去旧培养基, 加入新鲜的含体积分数 10% 胎牛血清、1% 双抗的高糖 DMEM 培养基 100 μL 和 10 μL CCK-8 溶液, 置于培养箱内培养 2 h, 酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度值。

1.4.5 迁移实验 共培养后 sh-XIST 组和 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞消化并计数后, 调整细胞浓度至 6×10⁸ L⁻¹, 在 6 孔板中每孔加入 2 mL 细胞悬液, 放入细胞培养箱培养, 每组细胞设置 3 个复孔。当细胞铺满孔底后, 用无菌枪头垂直于水平标记线划痕, 用 D-Hank's 清洗 1 遍, 每孔更换为无血清培养基, 继续在培养箱中培养, 分别在 0 h 和 24 h 用显微镜拍摄 6 孔板照片, 用 Image J 软件量化划痕愈合的面积变化。

1.4.6 细胞凋亡检测 收集 5×10⁶ 个共培养后的 sh-XIST 组和 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞, 置于 1.5 mL 离心管中, 首先用 PBS 对细胞进行洗涤, 以去除细胞培养基中的残留物质。在洗涤过程结束后, 进行离心操作以去除上清液, 确保细胞的纯度。随后, 将细胞重悬于 1×Annexin V Binding Buffer 中, 为后续的染色步骤做好准备。接着, 向细胞悬液中添加 APC Annexin 和 PI 染色液, 在室温下避光孵育 15 min, 以确保染色充分且均匀。染色完成后, 加入孵育缓冲液, 调整细胞浓度至 1×10⁹ L⁻¹, 确保后续分析的准确性。最后, 通过流式细胞仪对细胞的凋亡状态进行检测和分析, 从而评估细胞的生存状况和凋亡程度。

1.4.7 双荧光素酶报告基因实验 将状态稳定的 293T 细胞以每孔 5×10⁶ 个密度接种于 24 孔板中, 当细胞生长至 60%–70% 融合时, 分别用 XIST-WT、XIST-MT、GRIN1-WT 和 GRIN1-MT 重组载体以及 NC-mimics 和 miR-124-3p-mimics 进行共转染。转染 48 h 后, 在 24 孔板中每孔中加入细胞裂解液 200 μL, 冰上孵育 5 min, 充分裂解细胞, 并使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定细胞的荧光素酶活性。

1.4.8 miR-124-3p mimics/inhibitors 转染实验 将 SH-SY5Y 细胞分为 NC-SY5Y 组、miR-124-3p mimics 组、miR-124-3p inhibitors 组, 每组 3 个复孔, 以每孔 3×10⁴ 个密度接种到 24 孔板中, 细胞培养至 60%–70% 融合度时, 更换 500 μL 无血清培养基 Opti-MEM, miR-124-3p mimics 组、miR-124-3p inhibitors 组分别加入 15 pmol miR-124-3p mimics、3 μL Lipo2000 转染试剂以及 15 pmol miR-124-3p inhibitors、3 μL Lipo2000 转染试剂。转染后继续培养细胞 48 h, 收集

细胞样本进行 qRT-PCR 检测以及缺血缺氧再灌注后细胞凋亡实验。

1.4.9 荧光定量聚合酶链反应 (quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR) 使用 Trizol 试剂提取 NC-XIST+EPO-MSCs 组、sh-XIST+EPO-MSCs 组、NC-SY5Y 组、miR-124-3p mimics+SY5Y 组、miR-124-3p inhibitor+SY5Y 组细胞总 RNA, 其中 NC-XIST+EPO-MSCs 组、sh-XIST+EPO-MSCs 组分别以 LncRNA 以及 mRNA 为模板反转录为 cDNA, NC-SY5Y 组、miR-124-3p mimics+SY5Y 组、miR-124-3p inhibitor+SY5Y 组以 miRNA 为模板加尾后反转录合成 cDNA, qRT-PCR 检测细胞内 LncRNA、mRNA 以及 miRNA 的表达水平。反应体系为: 8.2 μ L Nuclease-Free Water, 1 μ L cDNA, 0.4 μ L 上游引物, 0.4 μ L 下游引物, 10 μ L 2 \times SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ L QN ROX Reference Dye, 总反应体系为 20 μ L。引物由上海擎科公司合成, 具体引物序列见表 2。反应条件: 首先进行预变性处理, 温度设定为 95 $^{\circ}$ C, 持续时间为 30 s; 接着在 95 $^{\circ}$ C 下进行变性, 时间为 10 s, 然后进行 60 $^{\circ}$ C 的联合退火与延伸, 时间为 30 s。此过程共进行了 40 个循环。结果通过内参的表达进行标准化, 并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 LncRNA、mRNA 以及 miRNA 的相对表达量。

表 2 | qRT-PCR 的引物序列

Table 2 | Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列
XIST	Forward: 5'-AAT GGA ACG GGC TGA GTT TTA G-3' Reverse: 5'-TCA TCC CTT GCT TCA TAG-3'
β -actin	Forward: 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3' Reverse: 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'
miR-124-3p	Forward: 5'-TAA GGC ACG CGG TGA ATG C-3'
U6	Forward: 5'-CTC GCT TCG GCA GCA CA-3' Reverse: 5'-AAC GCT TCA CGA ATT TGC GT-3'
GRIN1	Forward: 5'-GGA CGA TGC TGC CAC TGT ATA C-3' Reverse: 5'-GGT CGG TGA TGT TCT CCT TCT C-3'

1.5 主要观察指标 ①在缺血缺氧再灌注处理 24 h 并与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, SH-SY5Y 细胞转录组测序筛选出差异表达的基因; ②在缺血缺氧再灌注处理 24 h 并与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, sh-XIST 组与 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞凋亡、增殖、迁移情况; ③双荧光素酶报告实验验证 LncRNA XIST、miR-124-3p、mRNA GRIN1 三者互作关系; ④ SH-SY5Y 转染 miR-124-3p-mimics、miR-124-3p inhibitors 后缺血缺氧再灌注处理 24 h 的细胞凋亡情况。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计软件, 首先对数据进行正态性检验, 对于符合正态分布的数据, 采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组数据之间的差异使用独立样本 t 检验; 多组数据之间的差异使用单因素方差分析。设定统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。文中所使用的统计学方法已获得郑州大学附属郑州中心医院生物统计学专家的审核与认可。

2 结果 Results

2.1 缺血缺氧再灌注 SH-SY5Y 细胞与 EPO-MSCs 或 NC-MSCs 共培养后测序分析结果 与 NC-MSCs 组相比, EPO-MSCs 组出现了 405 个差异表达基因。其中排名在前 5 的基因中, XIST 作为唯一的 LncRNA 排在第 4 位 (SPTBN1、MED13L、ZNF618、XIST、TET3), 见图 1A。qRT-PCR 结果提示 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧再灌注并 EPO-MSCs 共培养后 LncRNA XIST 表达上调 ($P < 0.001$), 见图 1B。

2.2 各组细胞测序筛选 LncRNA XIST TPM 值以及流式细胞仪检测细胞凋亡情况 通过对正常组、缺血缺氧再灌注组、NC-MSCs 组、EPO-MSCs 组 SH-SY5Y 细胞进行转录组测序发现, 在 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧再灌注后, XIST 的 TPM 值显著上调 ($P < 0.001$), Li 等^[14] 的研究也证实这一点; 与 NC-MSCs 共培养 48 h 后, XIST 的 TPM 值明显下调 ($P < 0.001$); 而与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, XIST 的 TPM 值相比 NC-MSCs 组上调 ($P < 0.001$), 见图 2A。流式细胞仪检测结果显示, 与 NC-MSCs 组相比, EPO-MSCs 组对缺血缺氧再灌注处理的 SH-SY5Y 细胞凋亡的抑制作用更为显著, 见图 2B, C。与 Li 等^[14] 的研究一致, XIST 表达在缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞凋亡进程中起到重要的调控作用。

2.3 LncRNA XIST 通过靶向结合 miR-124-3p 响应 EPO-MSCs 从而保护缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞

2.3.1 XIST 敲低 SH-SY5Y 细胞构建及其表型验证 通过流式细胞术对转染效果进行了分析, 结果显示转染效率极高, NC-XIST 组、sh-XIST 组约 99.98% 和 99.82% 的细胞呈现绿色荧光蛋白阳性。荧光显微镜下观察显示, 转染后的细胞荧光较为明显, 见图 3A, B。转染前后的 SH-SY5Y 细胞形态未出现明显变化, 见图 3C。qRT-PCR 结果显示, NC-XIST 组中 XIST 基因的表达显著高于 shXIST-sh1 组和 shXIST-sh2 组 ($P < 0.001$), 见图 3D。选取其中转染效率最高且较稳定的 shXIST-sh1 组为 sh-XIST 组, 将 sh-XIST 组、NC-XIST 组细胞缺血缺氧 24 h 后与 EPO-MSCs 共培养 48 h。CCK-8 检测结果显示 sh-XIST 组 SH-SY5Y 细胞较 NC-XIST 组增殖减慢 ($P < 0.001$), 见图 3E; 流式细胞仪检测结果显示 sh-XIST 组较 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞凋亡增加 ($P < 0.001$), 见图 3F; 细胞迁移结果显示 sh-XIST 组 SH-SY5Y 细胞较 NC-XIST 组迁移减少 ($P < 0.005$), 见图 3G, H。

2.3.2 双荧光素酶报告实验验证 miR-124-3p 与 XIST 互作 LncRNA 通常可以吸附 miRNA, 进而影响基因的表达水平, 这种调控机制在细胞编程和重编程、肿瘤增殖、迁移和侵袭等多个生物学过程中发挥着重要作用, 因此为了探究 XIST 的调控机制, 通过 Starbase 数据库预测 miR-124-3p 与 LncRNA XIST 存在互补序列, 如图 4A。该实验成功构建了包含野生型 (WT 型) 和突变型 (MT 型) XIST 的双荧光素酶报告基因质粒, 评估 miR-124-3p 模拟物对 293T 细胞中

报告基因活性的影响。实验观察到 miR-124-3p 显著降低了 XIST-WT 组的荧光素酶活性, 这一结果表明 miR-124-3p 对 XIST 的调控可能具有高度特异性, 然而, miR-124-3p 模拟物不影响 XIST-MT 组的荧光素酶活性, 见图 4B。

2.3.3 验证 miR-124-3p 表达以及 miR-124-3p 模拟物和抑制剂转染效率和细胞凋亡情况 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧 24 h 并与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, qRT-PCR 检测显示 sh-XIST 组较 NC-XIST 组 miR-124-3p 表达下调 ($P < 0.05$), 见图 4C; miR-124-3p 模拟物和抑制剂转染 SH-SY5Y 细胞, 见图 4D,

缺血缺氧 24 h 并与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, 流式细胞仪检测显示 miR-124-3p 模拟物显著抑制细胞凋亡, 而 miR-124-3p 抑制剂则减弱了该作用 ($P < 0.001$), 见图 4E, F。

2.4 miR-124-3p 通过靶向 GRIN1 保护缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞

2.4.1 sh-XIST 组与 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧并与 EPO-MSCs 共培养处理后测序结果 将 sh-XIST 组与 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧并与 EPO-MSCs 共培养后测序, 通过 KEGG、GO 分析得到下调的神经活性配体-受体通路及中枢神经系统发育关键受体基因 GRIN1, 见图 5A-D。

2.4.2 双荧光素酶报告实验验证 miR-124-3p 与 GRIN1 互作 通过 Starbase 数据库预测, miR-124-3p 与 GRIN1 存在互补序列。该实验构建了包含野生型 (WT 型) 和突变型 (MT 型) GRIN1 的双荧光素酶报告基因质粒, 以便深入探讨 miR-124-3p 对 GRIN1 基因表达的调控作用。然后对 293T 细胞进行实验, 检测 miR-124-3p 模拟物对这两种类型报告基因活性的影响。实验结果显示, miR-124-3p 能够显著降低 GRIN1-WT 组的荧光素酶活性, 这一现象表明 miR-124-3p 与 GRIN1 的野生型存在特异性的相互作用; 而 miR-124-3p 对 GRIN1-MT 组的荧光素酶活性无显著影响, 见图 5E。

2.4.3 qRT-PCR 验证 GRIN1 表达量 将 sh-XIST 组与 NC-XIST 组 SY5Y 细胞缺血缺氧 24 h 并与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, qRT-PCR 检测其 GRIN1 表达量, sh-XIST 组 GRIN1 表达量显著低于 NC-XIST 组 ($P < 0.001$), 见图 5F。

3 讨论 Discussion

研究表明, 缺血缺氧性脑病的病理生理机制涉及氧化应激、线粒体功能障碍和细胞凋亡^[18-19]。近年来, 发现 EPO 可以用于治疗缺血缺氧性脑病^[20], 但因血脑屏障的限制, 其疗效受到影响^[21]。由于间充质干细胞可以透过血脑屏障, 因此, 课题组前期构建了过表达 EPO 的 EPO-MSCs^[16-17]。

由于 SH-SY5Y 细胞的生理功能和形态特征与神经元细胞相似^[22], 本研究采用 SH-SY5Y 细胞在缺血缺氧 24 h 后作为缺血缺氧性脑病的细胞模型^[23]。前期研究表明,

SH-SY5Y 细胞在缺血缺氧 24 h 后与 EPO-MSCs 共培养 48 h, 细胞凋亡显著减少, 但具体机制尚不清楚^[16]。

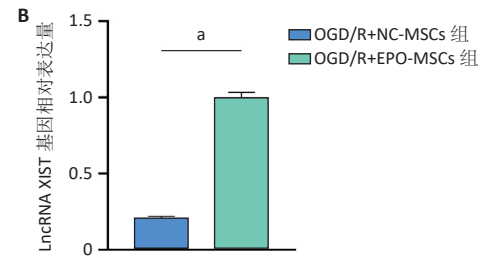
此研究对缺血缺氧 24 h 后的 SH-SY5Y 组、NC-MSCs 组和 EPO-MSCs 组进行了转录组测序分析, 发现缺血缺氧后 SH-SY5Y 细胞中 LncRNA XIST 显著上调, 凋亡增加; 缺血缺氧并与 NC-MSCs 共培养后 LncRNA XIST 显著下调, 凋亡减少; 而与 EPO-MSCs 共培养后 LncRNA XIST 相比 NC-MSCs 组上调, 凋亡进一步减少, 这提示 LncRNA XIST 可能响应 EPO-MSCs 信号并激活其抗凋亡作用。

LncRNA XIST 是由胎盘哺乳动物 X 染色体上的基因产生, 是 X 失活过程中的关键调控因子^[24]。XIST 通过调控细胞迁移、侵袭、凋亡、分化、增殖和耐药性, 与多种疾病的致病过程有关^[25]。有研究表明, XIST 在神经保护方面具有调节血管生成、减轻脑损伤以及调控细胞凋亡和自噬的作用^[14, 26]。例如, XIST 通过促进 miR-32-5p/Notch-1 轴促进血管新生, 从而在慢性压迫性脊髓损伤后促进内源性神经修复^[27]; 而 XIST 的敲除可以减轻脑缺血再灌注损伤, 减少神经元凋亡和活性氧的产生; 而 Li 等^[14]发现 XIST 可以通过 miR-25-3p/TRAF3 轴加剧脑缺血再灌注损伤。这表明 XIST 在缺血缺氧再灌注损伤中的作用可能是多因素的、时间依赖的, 或通过不同的机制进行调节的^[28]。此外, XIST 通过靶向 miR-15b-5p 调控细胞凋亡和自噬, 参与帕金森病的发病机制^[29]。课题组构建了稳定敲低 XIST 的 SH-SY5Y 细胞。将 sh-XIST 组和 NC-XIST 组细胞缺血缺氧 24 h 并 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, sh-XIST 组较 NC-XIST 组细胞凋亡增加, 增殖和迁移能力下降。

LncRNA 主要通过 microRNAs 相互作用, 从而促进或者抑制下游靶基因的表达^[30]。通过双荧光素酶实验验证了 XIST 与 miR-124-3p 的相互作用。miR-124-3p 主要在大脑中表达^[31-32], 研究发现, miR-124-3p 通过抑制 STAT3 减轻脑缺血再灌注损伤, 减少神经元凋亡和活性氧的产生^[32]。此外, miR-124-3p 还通过抑制炎症相关基因的表达, 减轻神经炎症, 从而保护神经元^[33]。在神经退行性疾病中, miR-124-3p 可能通过调节疾病相关基因的表达发挥保护作用^[34-35]。

MicroRNAs 通过结合到目标 mRNA 的 3' 非翻译区来调控基因表达, 通常导致 mRNA 的降解或翻译抑制^[36]。实验对缺血缺氧处理后 SH-SY5Y 细胞与 EPO-MSCs 共培养之后进行转录组测序以及 KEGG 富集分析后, 发现神经配体受体通路排名第一, 其中 GRIN1 基因排名靠前。双荧光素酶报告实验提示 GRIN1 与 miR-124-3p 相互作用。GRIN1 基因编码 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体的 NR1 亚单位, 是离子型谷氨酸受体的重要组成部分^[37]。NMDA 受体在中枢神经系统中负责介导兴奋性突触传递, 可以调节神经元的信号传递和突触可塑性^[38-39]。研究表

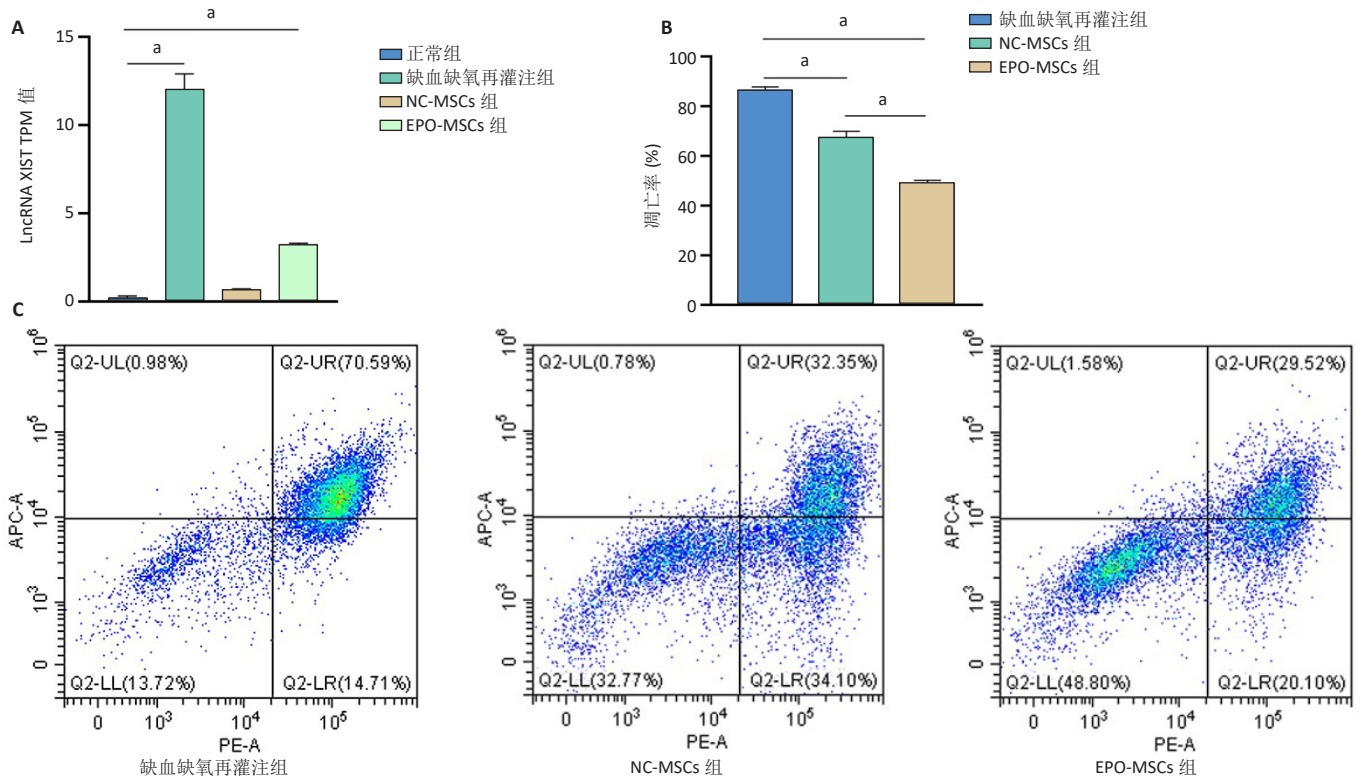
A	Gene_id	Gene_name	Expression_T	Expression_C	log2FC(T/C)	Adjusted P	Regulate
	ENSG00000115306	SPTBN1	13432.66667	6578.333333	1.035237465	0	Up
	ENSG00000123066	MED13L	6090.666667	2711	1.13992142	2.91×10^{-242}	Up
	ENSG00000157657	ZNF618	6358.333334	3097.666667	1.0225571302	3.41×10^{-221}	Up
	ENSG00000229807	XIST	1456	338.6666667	2.236741826	1.36×10^{-209}	Up
	ENSG00000187605	TET3	5261.666667	2394.333333	1.14577116	2.73×10^{-202}	Up



图注：图 A 为 RNA-seq 上调的前 5 名的基因列表；B 为两组 SH-SY5Y 细胞中的 lncRNA XIST 表达水平 ($^*P < 0.001$)。OGD/R：缺血缺氧再灌注；EPO-MSCs：过表达促红细胞生成素的脐带间充质干细胞；NC-MSCs：转染空载质粒的脐带间充质干细胞。

图 1 | 缺血缺氧再灌注 SH-SY5Y 细胞与 EPO-MSCs 共培养后 lncRNA XIST 表达上调

Figure 1 | Umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing erythropoietin (EPO-MSCs) upregulate the expression of lncRNA XIST after co-culture with oxygen-glucose deprivation/reoxygenation SH-SY5Y cells



图注：图 A 为 RNA-seq lncRNA XIST TPM 值；B, C 为凋亡流式分析。 $^*P < 0.001$ 。TPM：每百万转录本中特定基因的数量。EPO-MSCs：过表达促红细胞生成素的脐带间充质干细胞；NC-MSCs：转染空载质粒的脐带间充质干细胞。

图 2 | 各组 SH-SY5Y 细胞 RNA-seq 后 lncRNA XIST TPM 值以及细胞凋亡流式分析

Figure 2 | lncRNA XIST TPM value and apoptosis flow cytometry analysis of SH-SY5Y cells in each group after RNA-seq

明，GRIN1 在神经保护中起着关键作用，如在阿尔茨海默病中使用 NMDA 受体拮抗剂可缓解神经退行性病变^[40]，而在缺血性脑损伤中通过调节 NMDA 受体活性减少神经元凋亡^[41]。

综上所述，研究发现 lncRNA XIST 响应 EPO-MSCs 信号，通过靶向 miR-124-3p/GRIN1 轴减少缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞的凋亡并增强其迁移和增殖能力，这为治疗缺血缺氧性脑病提供了一定的理论基础。然而，此研究仍存在一些局限性，SH-SY5Y 细胞模型无法完全模拟复杂的神经元细胞微环境；对于 GRIN1 表型没进行更深一步验证。课题组计划在后续对 GRIN1 表型以及体内实验做进一步研究。

致谢：感谢郑州大学附属郑州中心医院先进医学实验室无偿提供的三气培养箱。

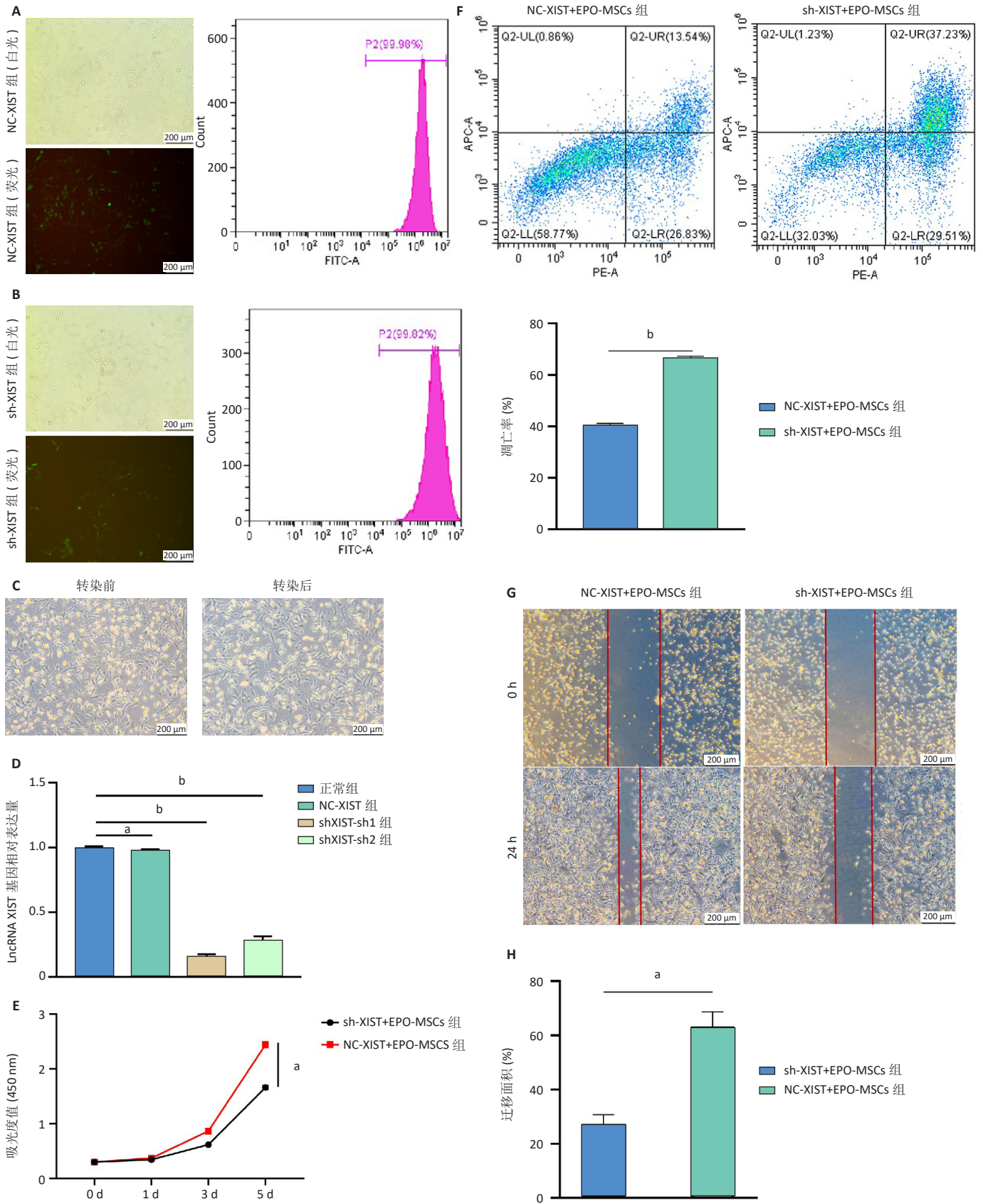
作者贡献：孔宁、唐吉祥负责实验实施、论文撰写，侯豫博、孟澜负责实验数据分析处理，马保东、靳冉冉、邵一鸣负责细胞培养、指标检测，岳寒、张辉负责数据和文章的校对，孙蕾负责实验设计。

利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

开放获取声明：这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

版权转让：文章出版前全体作者与编辑部签署了文章版权转让协议。

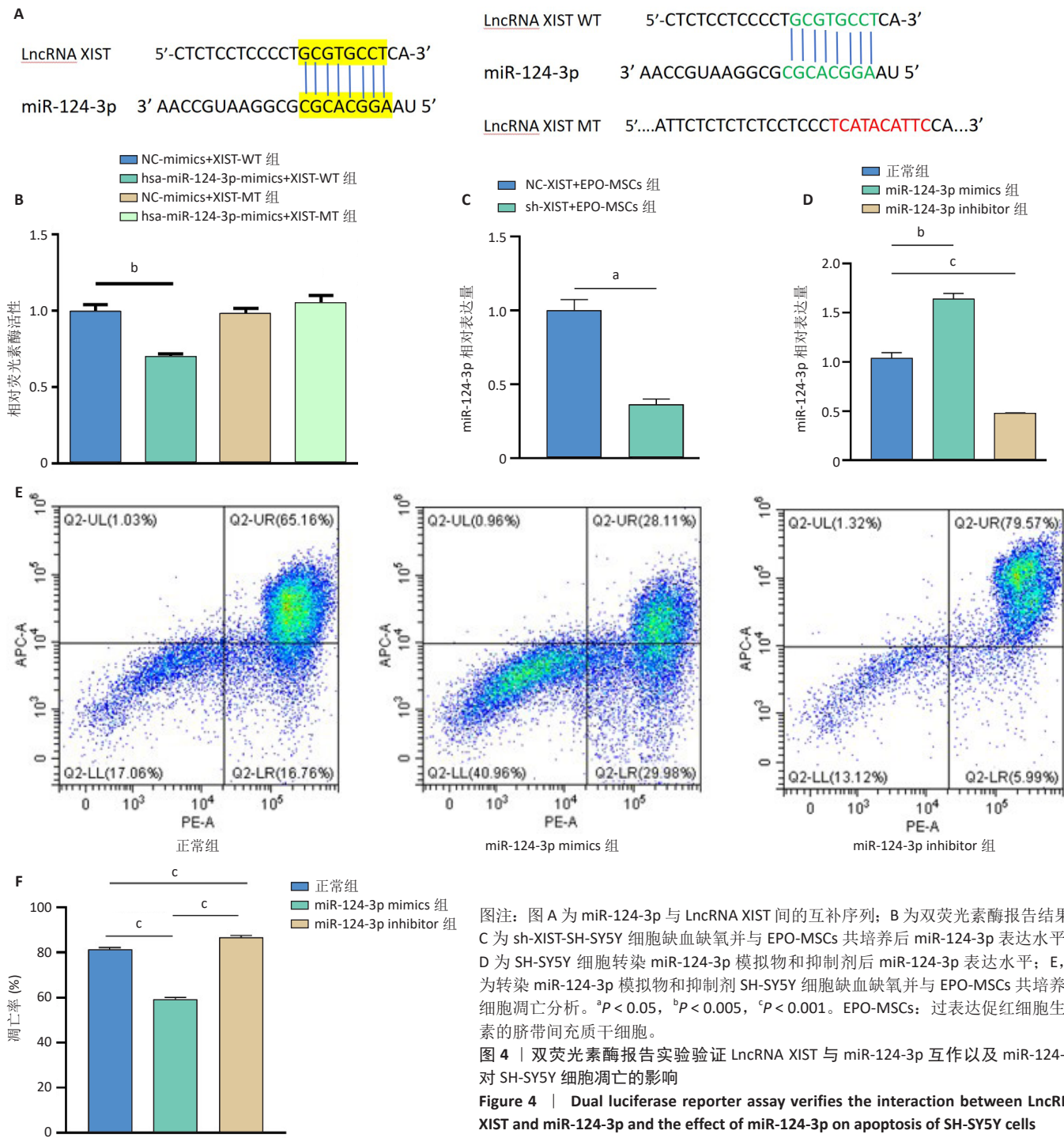
出版规范：该文章撰写遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。



图注：图 A 为 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞慢病毒转染后的白光和荧光图 (标尺为 200 μm) 及转染效率分析；B 为 sh-XIST 组 SH-SY5Y 细胞慢病毒转染后的白光和荧光图 (标尺为 200 μm) 及转染效率分析；C 为 SH-SY5Y 细胞转染前后细胞形态图 (标尺为 200 μm)；D 为 qRT-PCR 验证转染后 LncRNA XIST 表达水平；E-H 为 sh-XIST 组和 NC-XIST 组 SH-SY5Y 细胞在缺血缺氧 24 h 后，与 EPO-MSCs 共培养的增殖、凋亡、迁移能力分析。^a $P < 0.005$ ，^b $P < 0.001$ 。EPO-MSCs：过表达促红细胞生成素的脐带间充质干细胞。

图 3 | LncRNA XIST 敲低 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧并与 EPO-MSCs 共培养后的凋亡、迁移、增殖能力

Figure 3 | LncRNA XIST knocked down the apoptosis, migration and proliferation ability of SH-SY5Y cells after ischemia and hypoxia and co-cultured with umbilical cord mesenchymal stem cells overexpressing erythropoietin (EPO-MSCs)



图注: 图A为 miR-124-3p 与 LncRNA XIST 间的互补序列; B 为双荧光素酶报告结果; C 为 sh-XIST-SH-SY5Y 细胞缺血缺氧并与 EPO-MSCs 共培养后 miR-124-3p 表达水平; D 为 SH-SY5Y 细胞转染 miR-124-3p 模拟物和抑制剂后 miR-124-3p 表达水平; E, F 为转染 miR-124-3p 模拟物和抑制剂 SH-SY5Y 细胞缺血缺氧并与 EPO-MSCs 共培养后细胞凋亡分析。^a*P* < 0.05, ^b*P* < 0.005, ^c*P* < 0.001。EPO-MSCs: 过表达促红细胞生成素的脐带间充质干细胞。

图 4 | 双荧光素酶报告实验验证 LncRNA XIST 与 miR-124-3p 交互以及 miR-124-3p 对 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

Figure 4 | Dual luciferase reporter assay verifies the interaction between LncRNA XIST and miR-124-3p and the effect of miR-124-3p on apoptosis of SH-SY5Y cells

4 参考文献 References

[1] DUMBUYA JS, CHEN L, WU JY, et al. The role of G-CSF neuroprotective effects in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE): current status. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):55.

[2] FINDER M, BOYLAN GB, TWOMEY D, et al. Two-Year Neurodevelopmental Outcomes After Mild Hypoxic Ischemic Encephalopathy in the Era of Therapeutic Hypothermia. *JAMA Pediatr*. 2020;174(1):48-55.

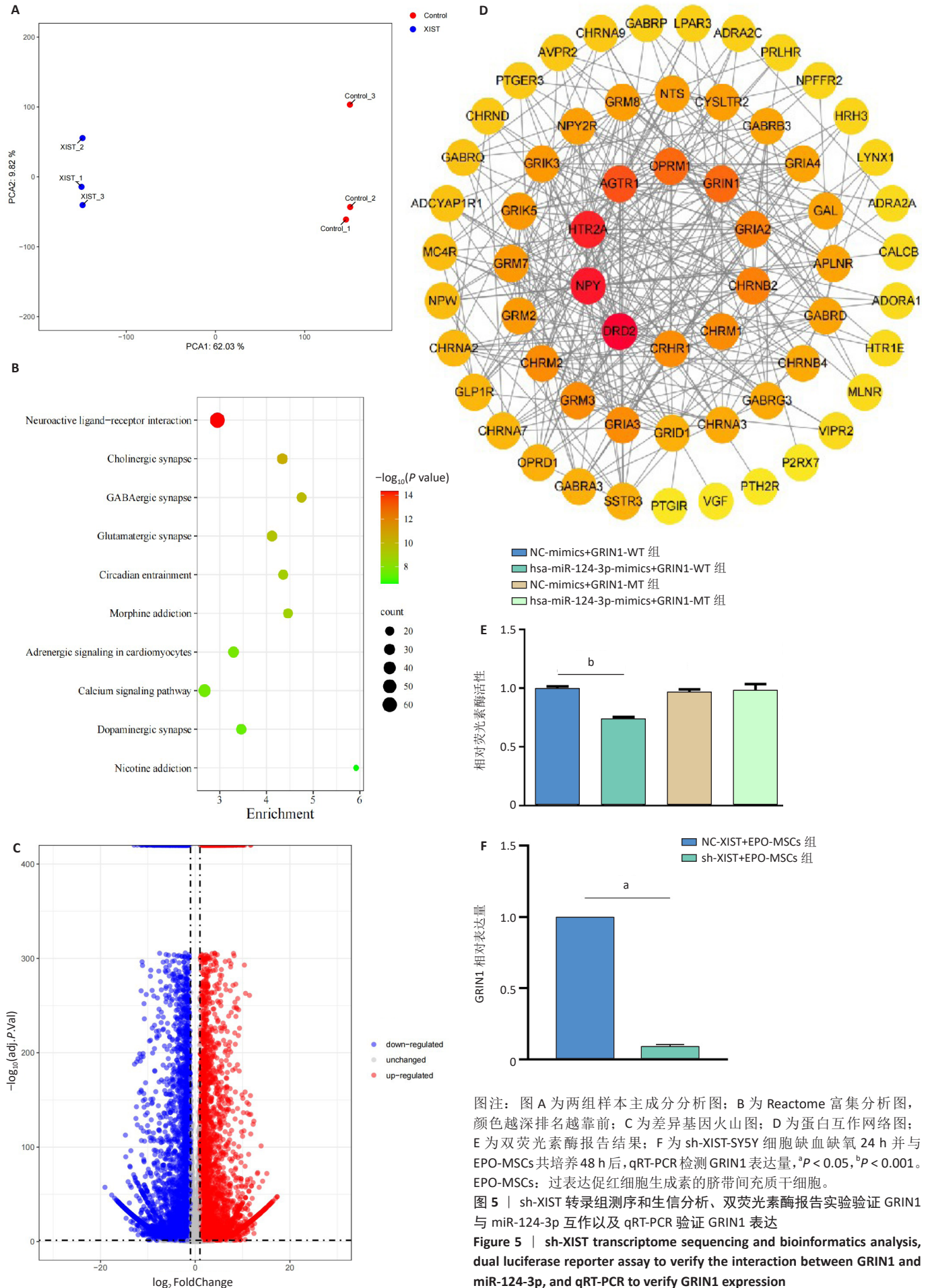
[3] DENG Z, OU H, REN F, et al. LncRNA SNHG14 promotes OGD/R-induced neuron injury by inducing excessive mitophagy via miR-182-5p/BINP3 axis in HT22 mouse hippocampal neuronal cells. *Biol Res*. 2020; 53(1):38.

[4] PARMENTIER CEJ, DE VRIES LS, GROENENDAAL F. Magnetic Resonance Imaging in (Near-)Term Infants with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *Diagnostics (Basel)*. 2022;12(3):645.

[5] RISTOVSKA S, STOMNAROSKA O, DANILOVSKI D. Hypoxic Ischemic Encephalopathy (HIE) in Term and Preterm Infants. *Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)*. 2022;43(1):77-84.

[6] RANJAN AK, GULATI A. Advances in Therapies to Treat Neonatal Hypoxic-Ischemic Encephalopathy. *J Clin Med*. 2023;12(20):6653.

[7] GLASS HC, WUSTHOFF CJ, COMSTOCK BA, et al. Risk of seizures in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy receiving hypothermia plus erythropoietin or placebo. *Pediatr Res*. 2023;94(1):252-259.



图注: 图 A 为两组样本主成分分析图; B 为 Reactome 富集分析图, 颜色越深排名越靠前; C 为差异基因火山图; D 为蛋白互作网络图; E 为双荧光素酶报告结果; F 为 sh-XIST-SY5Y 细胞缺氧缺血 24 h 并与 EPO-MSCs 共培养 48 h 后, qRT-PCR 检测 GRIN1 表达量, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.001$ 。EPO-MSCs: 过表达促红细胞生成素的脐带间充质干细胞。

图 5 | sh-XIST 转录组测序和生信分析、双荧光素酶报告实验验证 GRIN1 与 miR-124-3p 互作以及 qRT-PCR 验证 GRIN1 表达

Figure 5 | sh-XIST transcriptome sequencing and bioinformatics analysis, dual luciferase reporter assay to verify the interaction between GRIN1 and miR-124-3p, and qRT-PCR to verify GRIN1 expression

- [8] PAN JJ, WU Y, LIU Y, et al. The effect of erythropoietin on neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: An updated meta-analysis of randomized control trials. *Front Pediatr.* 2023;10:1074287.
- [9] PERRONE S, LEMBO C, GIRONI F, et al. Erythropoietin as a Neuroprotective Drug for Newborn Infants: Ten Years after the First Use. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(4):652.
- [10] XU Y, HUANG L, HAN J, et al. Effects of EPO combined with mild hypothermia on oxidative stress and neuroprotection in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2022;68(4):36-45.
- [11] BRIDGES MC, DAULAGALA AC, KOURTIDIS A. LNCcation: lncRNA localization and function. *J Cell Biol.* 2021;220(2):e202009045.
- [12] QIU X, CHEN J. LSINCT5: A Novel lncRNA in Cancers. *Curr Med Chem.* 2023;30(39):4409-4420.
- [13] YANG Z, JIANG S, SHANG J, et al. lncRNA: Shedding light on mechanisms and opportunities in fibrosis and aging. *Ageing Res Rev.* 2019;52:17-31.
- [14] LI Y, ZHANG JK, YU ZT, et al. lncRNA XIST Exacerbates Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation-Induced Cerebral Injury Through the miR-25-3p/TRAF3 Axis. *Mol Neurobiol.* 2023;60(10):6109-6120.
- [15] WANG C, DONG J, SUN J, et al. Silencing of lncRNA XIST impairs angiogenesis and exacerbates cerebral vascular injury after ischemic stroke. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021;26:148-160.
- [16] 班跃耀, 孙蕾, 马保东, 等. 促红细胞生成素基因修饰的人脐带间充质干细胞对神经元周期和凋亡的调控作用及机制 [J]. *新乡医学院学报*, 2023,40(10):909-916.
- [17] 李瑞博, 孔宁, 孙蕾, 等. 过表达促红细胞生成素脐带间充质干细胞抑制缺血缺氧 SH-SY5Y 细胞凋亡及机制 [J]. *中国组织工程研究*, 2024,28(31):4937-4944.
- [18] HU X, ZHANG H, ZHANG Q, et al. Emerging role of STING signalling in CNS injury: inflammation, autophagy, necroptosis, ferroptosis and pyroptosis. *J Neuroinflammation.* 2022;19(1):242.
- [19] XUE L, DU R, BI N, et al. Transplantation of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells for repair of neurological damage in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neural Regen Res.* 2024;19(9):2027-2035.
- [20] NABETANI M, MUKAI T, SHINTAKU H. Preventing Brain Damage from Hypoxic-Ischemic Encephalopathy in Neonates: Update on Mesenchymal Stromal Cells and Umbilical Cord Blood Cells. *Am J Perinatol.* 2022;39(16):1754-1763.
- [21] ZHAO J, LE M, LI J, et al. LINC00938 alleviates hypoxia ischemia encephalopathy induced neonatal brain injury by regulating oxidative stress and inhibiting JNK/p38 MAPK signaling pathway. *Exp Neurol.* 2023;367:114449.
- [22] FENG M, ZHU X, ZHUO C. H19/miR-130a-3p/DAPK1 axis regulates the pathophysiology of neonatal hypoxic-ischemia encephalopathy. *Neurosci Res.* 2021;163:52-62.
- [23] MENG Q, YANG P, LU Y. MicroRNA-410 serves as a candidate biomarker in hypoxic-ischemic encephalopathy newborns and provides neuroprotection in oxygen-glucose deprivation-injured PC12 and SH-SY5Y cells. *Brain Behav.* 2021;11(8):e2293.
- [24] BROCKDORFF N, BOWNESS JS, WEI G. Progress toward understanding chromosome silencing by Xist RNA. *Genes Dev.* 2020;34(11-12):733-744.
- [25] DOU DR, ZHAO Y, BELK JA, et al. Xist ribonucleoproteins promote female sex-biased autoimmunity. *Cell.* 2024;187(3):733-749.e16.
- [26] RICHART L, PICOD-CHEHOTEL ML, WASSEF M, et al. XIST loss impairs mammary stem cell differentiation and increases tumorigenicity through Mediator hyperactivation. *Cell.* 2022;185(12):2164-2183.e25.
- [27] LI J, MING Z, YANG L, et al. Long noncoding RNA XIST: Mechanisms for X chromosome inactivation, roles in sex-biased diseases, and therapeutic opportunities. *Genes Dis.* 2022;9(6):1478-1492.
- [28] ELDESOUKI S, SAMARA KA, QADRI R, et al. XIST in Brain Cancer. *Clin Chim Acta.* 2022;531:283-290.
- [29] HU C, BAI X, LIU C, et al. Long noncoding RNA XIST participates hypoxia-induced angiogenesis in human brain microvascular endothelial cells through regulating miR-485/SOX7 axis. *Am J Transl Res.* 2019;11(10):6487-6497.
- [30] XIAO M, LI J, LI W, et al. MicroRNAs activate gene transcription epigenetically as an enhancer trigger. *RNA Biol.* 2017;14(10):1326-1334.
- [31] ESTEVES M, ABREU R, FERNANDES H, et al. MicroRNA-124-3p-enriched small extracellular vesicles as a therapeutic approach for Parkinson's disease. *Mol Ther.* 2022;30(10):3176-3192.
- [32] MAVROUDIS I, BALMUS IM, CIOBICA A, et al. The Role of Microglial Exosomes and miR-124-3p in Neuroinflammation and Neuronal Repair after Traumatic Brain Injury. *Life (Basel).* 2023;13(9):1924.
- [33] LIU F, QIU F, CHEN H. miR-124-3p Ameliorates Isoflurane-Induced Learning and Memory Impairment via Targeting STAT3 and Inhibiting Neuroinflammation. *Neuroimmunomodulation.* 2021;28(4):248-254.
- [34] GE X, GUO M, HU T, et al. Increased Microglial Exosomal miR-124-3p Alleviates Neurodegeneration and Improves Cognitive Outcome after rtTBI. *Mol Ther.* 2020;28(2):503-522.
- [35] LI L, LI M. Astrocyte-derived extracellular vesicles inhibit the abnormal activation of immune function in neonatal mice with hypoxic-ischemic brain damage by carrying miR-124-3p. *Neurol Res.* 2023;45(12):1079-1090.
- [36] YAO B, ZHANG Q, YANG Z, et al. CircEZH2/miR-133b/IGF2BP2 aggravates colorectal cancer progression via enhancing the stability of m6A-modified CREB1 mRNA. *Mol Cancer.* 2022;21(1):140.
- [37] BLAKES AJM, ENGLISH J, BANKA S, et al. A homozygous GRIN1 null variant causes a more severe phenotype of early infantile epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A.* 2022;188(2):595-599.
- [38] PLATZER K, LEMKE JR. GRIN1-Related Neurodevelopmental Disorder. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Amemiya A, editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2024.
- [39] RAGNARSSON L, ZHANG Z, DAS SS, et al. GRIN1 variants associated with neurodevelopmental disorders reveal channel gating pathomechanisms. *Epilepsia.* 2023;64(12):3377-3388.
- [40] XU Y, SONG R, CHEN W, et al. Recurrent seizure-related GRIN1 variant: Molecular mechanism and targeted therapy. *Ann Clin Transl Neurol.* 2021;8(7):1480-1494.
- [41] ZHANG D, RUAN J, PENG S, et al. Synaptic-like transmission between neural axons and arteriolar smooth muscle cells drives cerebral neurovascular coupling. *Nat Neurosci.* 2024;27(2):232-248.

(责任编辑: MZH, ZN, QY, ZLJ)