

·基础研究·

电针激活大脑中动脉闭塞大鼠 miRNA 调控 NF- κ B 信号通路的机制研究

姚建宁¹ 王 鲜¹ 柳维林¹ 上官豪¹ 郑 慧¹ 黄 佳¹ 陶 静¹ 陈立典^{1,2}

摘要

目的:探讨电针通过NF- κ B信号通路治疗局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠所产生的抗炎作用的miRNA调控机制。

方法:将54只SD大鼠随机分为假手术组、模型组及电针组,以大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注模型。利用TargetScan预测miR-9a的靶基因,并用双荧光素酶报告载体验证。运用HE染色及TTC染色观察脑缺血后大鼠皮质炎症反应及梗死面积;应用蛋白免疫印迹法和实时PCR检测缺血侧皮质组织中NF- κ B, TNF- α 及miR-9a的表达情况。

结果:电针曲池、足三里穴可明显改善MCAO大鼠的神经功能缺损症状,降低脑梗死范围,炎症反应明显缓解。可以提高缺血侧皮质miR-9a的表达($P < 0.05$),降低炎症因子NF- κ B, TNF- α 的表达($P < 0.05$)。

结论:电针调控NF- κ B信号通路,抑制炎症因子分泌,来实现对脑缺血的治疗作用的机制可能与促进miR-9a的表达上调相关。

关键词 电针;脑缺血;微小RNA-9a;NF- κ B信号通路

中图分类号:R743.3, R245 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-04-0388-06

The anti-inflammatory function of miRNA regulation of NF- κ B signaling pathway by Electroacupuncture on Middle cerebral artery occlusion rats/YAO Jianning, WANG Xian, LIU Weilin, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31(4): 388—393

Abstract

Objective: To investigate the possible anti-inflammatory mechanism of electroacupuncture (EA) via regulating NF- κ B pathway in rats with focal cerebral ischemia-reperfusion (I/R).

Method: Fifty-four male adult SD rats were randomly divided into the sham operation control group (SC group), the ischemia model group (IC group) and the electroacupuncture group (EA group). Middle cerebral artery occlusion (MCAO) was performed to establish the focal cerebral ischemia-reperfusion injury model. The potential target genes of miR-9a was predicted and identified by dual-luciferase reporter assay. TTC stain was used to examine the volume of infarction, HE staining was observed inflammatory responses. Western blot analysis was employed to determine the expression of NF- κ B, TNF- α in ischemic regions. Quantitative RT-PCR was used to detect miR-9a.

Result: Electroacupuncture at Quchi (LI11) and Zusanli (ST36) acupoints significantly improved the ischemia-associated scores of neurological deficits, reduced cerebral infarction and improved inflammatory responses. The expression of miR-9a significantly increased and NF- κ B, TNF- α decreased in the EA group compared with those of IC group ($P < 0.05$).

Conclusion: Electroacupuncture exerts a neuroprotective function in cerebral ischemia through inhibition of NF- κ B-mediated inflammation, and the mechanism may be associated with the upregulation of miR-9a.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.04.003

1 福建中医药大学康复医学院,福州,350122; 2 通讯作者

作者简介:姚建宁,男,博士研究生; 收稿日期:2014-08-25

Author's address College of Rehabilitation Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, 350122

Key word electroacupuncture; cerebral ischemia; miR-9a; NF- κ B

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类序列长度约为22个核苷酸的非编码小RNA分子,以碱基互补配对原则识别靶向基因,通过转录后翻译抑制作用参与细胞增殖、分化以及凋亡等过程,与人类疾病的发生与发展密切相关^[1-3]。miRNA参与中枢神经损伤多种生理病理过程,尤其在炎症与免疫反应中发挥重要作用。其中miR-9是与神经发生密切相关的在大脑中特异性表达的miRNA,miR-9基因家族包括miR-9a,miR-9b,miR-9c和miR-9-1至miR-9-7^[4]。有研究表明,miR-9在神经组织炎症损伤中发挥重要功能,miR-9通过调控MCPIP1表达参与NF- κ B信号通路激活小胶质细胞,促进相关炎症因子IL-1 β ,TNF- α ,IL-6,MCP-1的表达^[5]。此外,有研究表明miR-9可以直接作用于炎症相关因子NF- κ B1的3'-UTR区,参与肿瘤细胞的炎症反应^[6]。但miR-9是否参与脑缺血后的炎症反应尚未见报道。

针刺作为一种有效的治疗手段在临床缺血性脑血管疾病的治疗中发挥了重要的作用。大量的基础研究表明电针可以有效改善脑缺血后的炎症损伤,如电针后可显著降低缺血侧脑组织IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA表达,下调促炎因子NF- κ B,并上调抗炎因子STAT3,可以降低血浆中IL-1 β 、IL-6和TNF- α 含量,从而对缺血再灌注脑损伤产生保护作用^[7,9]。

我们已报道电针可以抑制NF- κ B信号通路关键信号分子TLR4,NF- κ B p65等的表达及下游促炎因子的分泌,从而有效改善脑缺血后炎症反应^[10]。因此,我们假设电针对脑缺血后炎症损伤的治疗效应可能与介导miR-9调控NF- κ B信号通路有关。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

所有试验均遵照国际动物保护和和使用指南的规定实施。选取清洁级健康雄性SD大鼠54只(动物批号:2007000638342),体重(250 \pm 30)g,由上海斯莱克实验动物责任有限公司[生产许可证号码:SCXK(沪)2012-0002]提供,根据随机数字表分为:

假手术组(Sham)、模型组(MCAO)和电针组(EA),每组各18只。

1.2 模型制备

术前所有实验动物均禁食12h。在室温22 $^{\circ}$ C条件下,大鼠称重后,参考Zea-longa方法^[11],行左侧大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)手术。腹腔注射3ml/kg水合氯醛进行麻醉,仰卧位,正中切开颈部皮肤,充分暴露并钝性分离左侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈外动脉(external carotid artery, ECA)及颈内动脉(internal carotid artery, ICA)。依次结扎CCA近心端及ECA,并用微动脉夹夹闭远端ICA。在颈总动脉上近分叉处约5mm处剪一“V”型小口,将已备好的线栓经颈总动脉插入颈内动脉,直至有少许阻力感时,即阻断大脑中动脉入口处,从颈外动脉与颈内动脉分叉处起计算,约插入18—22mm,并结扎颈内动脉,伤口常规缝合。待缺血2h后缓慢退出尼龙线,使血流再灌注。试验过程和动物苏醒期间注意保温。

1.3 模型的筛选标准

采用Zea-longa评分方法,当造模大鼠清醒后,即评定动物神经功能缺损。具体评分标准为:0分:无神经功能缺损体征;1分:不能完全伸展对侧前爪;2分:向偏瘫侧转圈;3分:行走时向偏瘫侧倾倒;4分:不能自发行走,意识丧失。评分为1—3分纳入实验动物,0分、4分予以剔除。

1.4 电针干预措施

采用捆绑固定法固定大鼠(参考《医学实验动物学》^[12]),取右侧“曲池”、“足三里”穴(大鼠穴位定位参考《实验针灸学》^[13]中之定位方法),使用华佗牌30号0.5寸毫针,斜刺0.2—0.3cm,应用G6805电针仪,电压峰值为6V,以肢体轻轻抖动为度,疏密波,频率1—20Hz,每次电针30min,1次/d,共6次,手术后第2天开始治疗。假手术组及模型组以同样方法固定30min,但不进行电针刺激。

1.5 取材处理

干预结束后,采用腹腔注射10%水合氯醛深度

麻醉进行取材。每组取3只大鼠,迅速取脑放-20℃冰冻做TTC染色,每组取4只大鼠经左心室依次灌注生理盐水和4%多聚甲醛溶液,随后迅速断头取脑,经过灌流固定的脑组织浸泡于4%多聚甲醛溶液中,24h后常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,做连续冠状脑切片,切片厚5μm。余下所有大鼠不经心脏灌注直接断头取脑,分离缺血侧皮质组织,-80℃保存,以备提取蛋白和RNA。

1.6 检测方法及指标

1.6.1 TTC染色:脑组织-20℃冰冻20min,从视交叉处取冠状面均匀切成厚2mm脑片,共切5片,切好置于1% TTC磷酸缓冲液(0.2mol/L, pH7.4)中,放入37℃避光孵箱,每15min翻面一次,翻两次后取出。正常组织TTC染色为红色,梗死处TTC染色呈白色。用数码相机进行拍照,运用计算机测量梗死面积百分比。

1.6.2 HE染色法:取各组石蜡切片常规梯度脱蜡,苏木精染液染3min,流水冲洗1—2min;放入75%盐酸乙醇分化30—45s,流水冲洗10—20min至返蓝;95%乙醇1min,酸化伊红乙醇液染1min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜观察。

1.6.3 实时定量PCR:Trizol法提取缺血侧皮质组织的总RNA,检测RNA浓度,采用TaqMAN microRNA逆转录试剂盒(美国应用生物系统公司)将RNA逆转录为cDNA,进行实时定量PCR反应(TaqMAN Universal PCR Master Mix noAmpErase UNG,美国应用生物系统公司)。miR-9a所用引物试剂盒为rno-miR-9a-5p(miRQP0825,美国复能基因公司,广州)。反应条件:95℃ 10s,56.5℃ 20min,38个循环。miR-9a表达相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析表达差异。

1.6.4 蛋白免疫印迹法(western blot):每100mg脑组织中加入1ml的细胞裂解液和10μl PMSF储存液提取蛋白质。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,加热变性后,取50μg经12%十二烷基硫酸胺-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳,转移至PVDF膜上。5%脱脂牛奶室温封闭2h,NF-κB(1:1000)、TNF-α(1:500)和β-actin(1:1000)一抗4℃孵育过夜,洗膜后加入辣根过氧化物标记的二抗37℃振荡孵育1h。最后ECL化学发光液显色,并采用Bio-Image分析系统(Bio-

Rad, Hercules, USA)显影成像及Image-Pro Plus软件对扫描图像的目的条带进行灰度分析。

1.6.5 靶基因预测:利用生物信息学TargetsCan数据库在线预测miR-9的靶基因,并结合文献中报道的与炎症及免疫反应相关的蛋白,发现miR-9与NFκB1相互结合位点。

1.6.6 荧光素酶活性测定:将NF-κB基因的3' UTR序列及突变位点克隆到pSICHECK-2双荧光素酶报告载体中,该载体的报告荧光为hRluc,校正荧光为hluc。然后,miR-9a mimics分别与TNF-κB3'UTR质粒载体及突变载体共转染VECs细胞,通过双荧光素酶检测试剂盒(美国复能基因公司,广州)证实miR-9a对NF-κB基因3'UTR的调控作用。

1.7 统计学分析

所得数据均以均数±标准差表示,应用SPSS 20.0软件进行统计学处理,两组间则采用t检验(independent-samples-test)或Mann-Whitney U检验。

2 结果

2.1 神经功能缺损评分

模型组和电针组在脑缺血再灌注2h后(未经电针干预),两组之间评分的差异无显著性($P > 0.05$)。而在脑缺血再灌注3天后(经过电针干预),电针组的神经缺损评分与模型组相比差异有显著性意义($P < 0.05$)。由此提示电针对脑缺血大鼠的神经缺损症状有明显改善作用。见表1。

2.2 脑梗死体积

假手术组大鼠大脑未发生缺血梗死,而模型组及电针组大鼠大脑均出现梗死灶,但电针组梗死范围小于模型组(图1)。通过Motic Med 6.0系统计算脑梗死体积,电针组大鼠脑梗死体积明显小于模型组大鼠(电针组19.21%±1.82%,模型组28.16%±1.33%, $P < 0.05$)。

表1 各组神经功能评分

组别	例数	神经功能评分 ($\bar{x} \pm s$,分)		
		脑缺血再灌注 2h后	脑缺血再灌注 1天后	脑缺血再灌注 3天后
假手术组	12	0	0	0
模型组	12	1.87±0.23	2.25±0.18	2.08±0.20
电针组	12	1.83±0.24	2.17±0.28	1.08±0.23 ^①

①电针组与模型组比较 $P < 0.05$

2.3 HE染色

假手术组大鼠脑组织形态、结构正常,未见炎细胞;与之相比较,模型组大鼠脑缺血梗死区神经元及胶质细胞明显减少,残存神经元核固缩,间质高度水肿,见大量炎细胞浸润;而经过电针治疗可缓解脑组织损伤程度及炎细胞浸润数量,证明电针可能通过缓解炎症反应而改善脑组织损伤。见图2。

2.4 缺血侧脑皮质组织中miR-9a的表达水平

假手术组脑组织相对表达量为(0.67±0.51),模型组为(0.26±0.19),电针组为(0.43±0.29),模型组较假手术组miR-9a的表达水平显著下降($P < 0.05$),电针干预以后,miR-9a的表达水平较模型组升高($P < 0.05$)。

2.5 Western blot检测结果

模型建立后,大鼠缺血梗死侧的脑组织NF-κB、pNF-κB、TNF-α的表达较假手术组明显增强,而电针组较模型组蛋白表达减弱(图3)。

2.6 miR-9与NF-κB的相互作用及验证

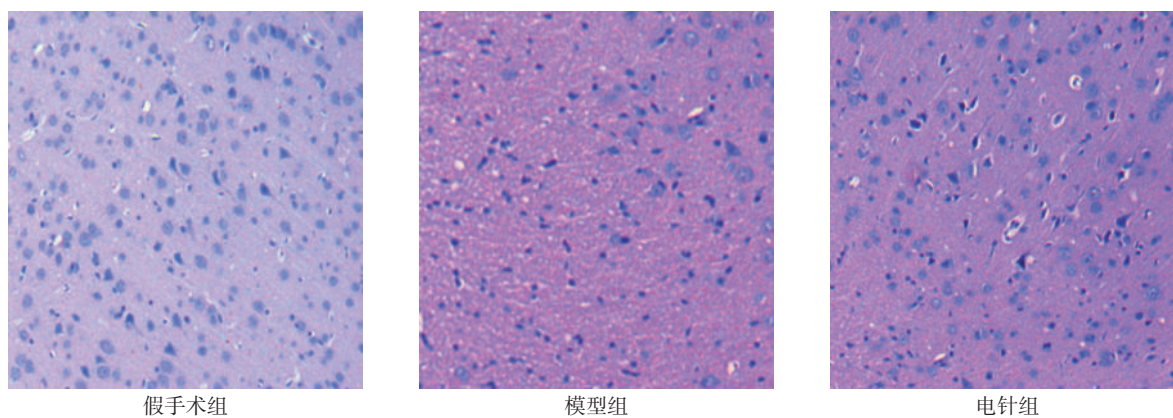
利用生物信息学Targetscan在线预测miR-9与NFκB1结合情况,结果发现存在结合位点ACCAAAG。进一步通过双荧光报告载体鉴定miR-9

与NFκB1相互作用,结果如图4,miR-9a与NF-κB 3'UTR结合($P < 0.05$),而没有与NF-κB 3'UTR突变体结合($P > 0.05$)。

图1 各组脑梗死情况 (TTC染色)



图2 脑缺血再灌注3天后各组大鼠梗死侧皮质的病理学观察 (HE, ×200)



3 讨论

临床中,电针广泛应用于治疗脑卒中损伤且疗效理想。黄剑等^[14]报道电针结合醒脑开窍法可显著改善脑卒中肢体偏瘫患者神经功能缺损评分。吴华等^[15]报道电针刺激头皮感觉区可改善运动感觉功能评分,并引起躯干感觉皮质及大脑感觉皮质区的兴

奋性改变反应。亦有大量动物实验的文献报道证实电针可明显改善大鼠神经功能缺损评分^[16-17]。

脑缺血再灌注后损伤是十分复杂的病理生理过程。国内外大量研究表明,细胞因子诱导的炎症反应是产生损伤的主要原因之一。金深辉等^[18]研究发现,电针预处理可以下调MCAO大鼠皮质、纹状体

图3 皮质组织中 TNF- α 、NF- κ B 表达情况

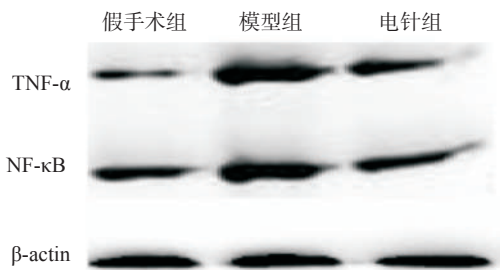
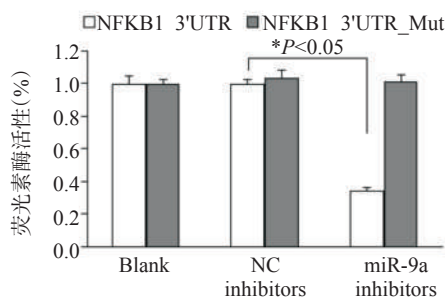


图4 miR-9a 与 NF- κ B1 的相互作用



炎症因子 IL-1 β 的表达,缓解脑缺血再灌注损伤。同时,我们课题组也有研究发现,电针“神庭”、“百会”,可以下调脑缺血海马组织 NF- κ B-p65 mRNA 并上调 I κ B mRNA 的表达。电针“曲池”、“足三里”穴,可以抑制 NF- κ B 信号通路上关键信号分子 TLR4、NF- κ B-p65、p-I κ B 表达及下游促炎细胞因子 TNF- α 、IL- β 、IL-6 分泌,而缓解脑梗死区域的炎症反应^[19,10]。在炎症反应复杂的病理机制中,转录核因子 NF- κ B 信号通路是其被激活与持续反应的中心节点和关键环节^[20-21],活化的 NF- κ B 可直接调控参与脑缺血再灌注后炎性损伤的多种介质基因的表达,因而,NF- κ B 活化被认为是介导或加剧脑缺血再灌注后炎性损伤的中心环节^[22]。本研究发现,电针“曲池”、“足三里”穴 3d,可显著降低缺血再灌注损伤大鼠脑皮质 NF- κ B、TNF- α 含量。

miRNA 是近年发现的一种小分子非编码 RNA,广泛存在于病毒、植物以及动物体内,参与生物体的生长、发育、凋亡等调控。成熟 miRNA 通过识别靶 mRNA 的 3'UTR 区,降解靶基因或抑制其翻译,从而影响蛋白质的合成,达到调控基因表达的目的^[23]。近年来研究发现,miRNA 参与了炎症发生等

多种生理病理过程,miRNA 调控的免疫反应在应对刺激因子和病原过程中存在复杂的调控网络^[24],如 miR-146a、miR-21、miR-221、miR-579、miR-125b 和 miR-155 参与了炎症反应的负向调控^[25-27]。而有关 miRNA 参与缺血性脑卒中急性或亚急性期的炎症反应较少,有报道炎症损伤后脑组织和血液中 miR-155 的表达水平显著下调^[28-29]。近年研究表明 miR-9 通过下调 MCP1,并激活 NF- κ B 在小胶质细胞的激活中发挥关键作用,而小胶质细胞的活化又与脑缺血后的炎症反应密切相关^[5]。

miR-9 是一个组织特异性的 miRNA,它主要在中后脑交界处 (midbrain hindbrain boundary, MHB) 的邻近区域表达^[30],可通过作用于成纤维生长因子 (fibroblast growth factor, FGF) 信号通路调控 MHB 的组织活性。此外 miR-9 与神经发生^[31],脑部正常发育^[32-33] 等具有密切关系。本研究发现,miR-9 参与脑缺血后炎症损伤,缺血再灌注后在皮质中的表达显著降低,而电针“曲池”、“足三里”穴位刺激后其表达上调。有关 miR-9 介导的靶点分子,研究发现,NF- κ B1 是 miR-9 在胃癌中的直接靶点^[34]。多数研究者认为,NF- κ B 活化是脑缺血后炎症反应的中心环节^[35]。局部脑缺血时 NF- κ B 活化有促进细胞死亡的作用,采用一些降低 NF- κ B 活性的措施,能缩小脑梗死体积^[36]。那么 miR-9 是否是通过 NF- κ B 参与脑缺血后的炎症反应的问题,本研究发现,miR-9 参与脑缺血后炎症损伤,并通过与 NF- κ B 3'UTR 特异性结合,降低大鼠缺血侧皮质促炎因子 TNF- α 的表达,缩小了梗死面积,改善了神经功能评分。

综上所述,miR-9 可以和 NF- κ B 特异性结合,参与脑缺血再灌注损伤的炎症反应,可能成为缺血性脑病治疗中潜在的治疗靶点。电针可在一定程度上激活 miR-9 调控 NF- κ B 信号通路,并降低信号通路相关促炎因子 TNF- α 的分泌,从而发挥拮抗脑缺血再灌注损伤作用。但是 miR-9 在脑缺血后炎症损伤中参与的信号通路可能并不是唯一,其具体途径有待进一步证明。

参考文献

[1] Cullen BR. Transcription and processing of human microR-

- NA precursors[J]. *Mol Cell*, 2004, 16(6):861—865.
- [2] Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(5):504—511.
- [3] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease[J]. *Development*, 2005, 132(21):4653—4662.
- [4] 罗丹丹,罗玉萍,彭娟,等.miRNA-9 基因家族进化分析及其靶基因预测[J].*中国细胞生物学学报*,2011,(5):510—519.
- [5] Yao H, Ma R, Yang L, et al. MiR-9 promotes microglial activation by targeting MCP1[J]. *Nat Commun*, 2014, (5):4386.
- [6] Guo LM, Pu Y, Han Z, et al. MicroRNA-9 inhibits ovarian cancer cell growth through regulation of NF- κ B1[J]. *FEBS J*, 2009, 276(19):5537—5546.
- [7] 程玲,骆明军,明建扩,等.电针对脑缺血再灌注大鼠缺血脑区 IL-1 β 和 TNF- α mRNA 表达的调节[J].*针刺研究*,2003,(03):174—177.
- [8] 陈紫煜.电针对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤炎症反应的影响[D].中南大学,2011.
- [9] 王军,于震,贾士奇,等.电针预处理对全脑缺血再灌注大鼠炎症细胞因子的影响[J].*中国实用医药*,2008,(06):4—5.
- [10] Lan L, Tao J, Chen A, et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1):75—80.
- [11] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84—91.
- [12] 刘恩岐.医学实验动物学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2004.123.
- [13] 李忠仁.实验针灸学[M].北京:中国中医药出版社,2003.327—329.
- [14] 黄剑,彭支莲,丁盼.电针配合醒脑开窍法对脑卒中肢体偏瘫疗效的临床研究[J].*时珍国医国药*,2011,22(6):1506—1507.
- [15] 吴华,顾旭东,吴彩虹,等.电针刺刺激头皮感觉区对脑卒中患者功能恢复的临床研究[J].*中华中医药杂志*,2013,28(8):2463—2466.
- [16] 张巧梅,李立亚,高渐,等.电针对小鼠脑缺血后 Neurogenin2 表达和神经功能的影响[J].*神经解剖学杂志*,2013,29(3):321—324.
- [17] 马璟曦,罗勇.电针合谷穴对大鼠局灶性脑缺血再灌注后脑内毛细血管密度及 CD34 表达的影响[J].*中国康复理论与实践*, 2014,20(3):201—205.
- [18] 金深辉,刘俊伟,罗亮,等.电针预处理对脑缺血再灌注大鼠皮质及纹状体 IL-1 β 表达的影响[J].*浙江中医杂志*,2012,47(4):255—256.
- [19] 冯晓东,刘娇,陈立典.电针对局灶性脑缺血大鼠学习记忆能力的影响及其机制[J].*中国康复理论与实践*,2013,(03):227—230.
- [20] Harari OA, Liao JK. NF- κ B and innate immunity in ischemic stroke[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, (1207):32—40.
- [21] Ridder DA, Schwaninger M. NF- κ B signaling in cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3):995—1006.
- [22] Lentsch AB1, Ward PA. The NF κ B/I κ B system in acute inflammation[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2000,48(2):59—63.
- [23] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing[J]. *Cell*, 2003, 113(6):673—676.
- [24] O'Connell RM, Rao DS, Baltimore D. microRNA regulation of inflammatory responses[J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, (30):295—312.
- [25] Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling[J]. *Int Immunol*, 2011, 23(7):421—425.
- [26] Sheedy FJ, Palsson-McDermott E, Hennessy EJ, et al. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21 [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2):141—147.
- [27] El Gazzar M, McCall CE. MicroRNAs distinguish translational from transcriptional silencing during endotoxin tolerance[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(27):20940—20951.
- [28] Tili E, Michaille JJ, Cimino A, et al. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock[J]. *J Immunol*, 2007, 179(8):5082—5089.
- [29] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(1):92—101.
- [30] Delaloy C, Gao FB. MicroRNA-9 multitasking near organizing centers[J]. *Nat Neurosci*, 2008, 11(6):625—626.
- [31] Wang K, Long B, Zhou J, et al. miR-9 and NFATc3 regulate myocardin in cardiac hypertrophy[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16):11903—11912.
- [32] Zhang Z, Chang H, Li Y, et al. MicroRNAs: potential regulators involved in human anencephaly[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(2):367—374.
- [33] Coolen M, Bally-Cuif L. MicroRNAs in brain development and physiology[J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2009, 19(5):461—470.
- [34] Wan HY, Guo LM, Liu T, et al. Regulation of the transcription factor NF- κ B1 by microRNA-9 in human gastric adenocarcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2010, (9):16.
- [35] Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications[J]. *Neurol Res*, 2004, 26(8):884—892.
- [36] Nurmi A, Lindsberg PJ, Koistinaho M, et al. Nuclear factor- κ B contributes to infarction after permanent focal ischemia[J]. *Stroke*, 2004, 35(4):987—991.