

松树皮提取物对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究

姚期^{1,2}, 余资江^{1*}, 孙宝飞¹

(1. 贵州医科大学基础医学院 人体解剖与组织胚胎学教研室, 贵阳 550025; 2. 贵阳中医学院第二附属医院 耳鼻咽喉科, 贵阳 550003)

【摘要】 目的 探讨 IL-6/STAT3/miR-21 在松树皮提取物对脑缺血再灌注损伤小鼠的神经治疗作用和机制。**方法** 将 120 只 KM 小鼠随机分为正常对照组、假手术组、14 d 及 28 d 模型组、14 d 及 28 d 治疗组, 每组 20 只, 采取双侧颈总动脉夹闭法制作脑缺血再灌注损伤模型; 治疗组在处死前 7 d 给予松树皮提取物原花青素灌胃治疗, 对照组和假手术组采用等量生理盐水灌胃。检测各组小鼠学习、记忆能力的差异及海马组织病理学改变、白介素 6、STAT3、p-STAT3 蛋白、miR-21 的表达水平。**结果** 同时间节点治疗组小鼠比模型组小鼠学习记忆能力强; 治疗组尼氏体排列紊乱, 其中一部分细胞形态不规则, 胞质着色相对较浅, 但比模型组好; 28 d 模型组 IL-6 表达水平低于 14 d 模型组, 同时间点治疗组海马组织中的 IL-6 较模型组明显减少; 海马组织中 STAT3 总蛋白含量各组间差异无显著性 ($P > 0.05$), 同时间点治疗组 p-STAT3 含量低于模型组; 海马组织中 miR-21 在 14、28 d 治疗组的表达低于同时间点模型组, 且随时间的延长而降低。**结论** 松树皮提取物原花青素能通过有效抑制 IL-6, 显著降低 STAT3 磷酸化水平, 最终降低 miR-21 表达, 从而发挥减轻小鼠脑缺血再灌注脑损伤的作用。

【关键词】 松树皮提取物; 原花青素; 缺血再灌注损伤; 学习记忆; 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 06-0632-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.06.008

Protective effects and mechanism of pine bark extract on cerebral ischemia reperfusion injury in mice

YAO Qi^{1,2}, YU Zi-jiang^{1*}, SUN Bao-fei¹

(1. Department of Anatomy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China; 2. Department of ENT, The Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003)

【Abstract】 Objective To investigate the role of IL-6/STAT3/miR-21 in the treatment of cerebral ischemia reperfusion injury in mice by pine bark extract. **Methods** 120 KM mice were randomly divided into normal control group, sham operation group, 14 d and 28 d model groups, 14 d and 28 d treatment groups, each group with 20 mice. The model of cerebral ischemia-reperfusion injury model was made by bilateral common carotid artery occlusion. The mice in the treatment group were treated with pine bark extract procyanidins by intragastric administration for 7 days before the execution. The control group and sham operation group were treated with normal saline. The differences in learning and memory abilities and histopathological changes in the hippocampus of mice in each group were examined. The levels of interleukin 6, STAT3, p-STAT3 and miR-21 were measured. **Results** The learning and memory abilities of the mice in the treatment group were higher than that in the model group at the same time points. The treatment group had less irregularity in the arrangement of Nissl body, irregular shape of the cells, with relatively lighter cytoplasmic staining, but was better than the model group. The expression level of IL-6 in the 28 d model group was lower than that in the 14 d model group, The IL-6 in the hippocampus of the treatment group was significantly lower than that in the model group at the same time point. There

[作者简介] 姚期(1982-), 男, 本科, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉方面的研究。Email: yaoqi578@163.com

[通讯作者] 余资江(1968-), 男, 博士, 教授, 主要从事神经损伤与修复方面的研究。Email: yzj0112@126.com

were no significant differences in the contents of total STAT3 protein in the hippocampus between the groups ($P > 0.05$). The expression of p-STAT3 in the treatment group was lower than model group at the same time point. The expression of miR-21 in the hippocampus of 14 d, 28 d treatment groups was lower than that in the model group at the same time point, and decreased with time. **Conclusions** The procyanidins extracted from pine bark may effectively inhibit IL-6, then the phosphorylation level of STAT3 is significantly decreased and finally decreases the expression of miR-21, so as to alleviate the cerebral ischemia reperfusion injury in mice.

[Key words] Pine bark extract; Procyanidins; Ischemia reperfusion injury; Learning and memory; Mice
Corresponding author: Yu Zi-jiang. E-mail: yzj0112@126.com

脑血管病作为导致人类死亡或生活质量下降的三大高发疾病之一,在众多的脑血管病中又以缺血性脑血管病最为常见^[1]。目前其主要治疗方案主要是争取在最短的时间内恢复缺血区的血液供应,其目的是尽可能的减轻缺血区域相应的神经细胞损伤。但在临床实践中发现,恢复缺血区域血液供应后缺血区域神经功能和结构损伤反而较缺血时严重,这一病理现象即脑缺血再灌注损伤(CIRI)。目前发现炎性细胞因子、STAT3、miR 在 CIRI 这一病理生理过程中有着重要的调控作用^[2-4]。松树皮提取物中含大量原花青素(oligomeric procyanidins, OPCs),目前研究表明原花青素对 CIRI 有治疗作用^[5],但其作用机制尚不十分明确。本研究通过观察松树皮提取物原花青素治疗 CIRI 模型小鼠,在学习记忆能力、细胞学上的差别,不同时间点检测大脑海马区组织中 miR-21、STAT3、p-STAT3、IL-6 表达的差别,探讨松树皮提取物中原花青素治疗脑缺血再灌注损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄清洁级成年 KM 小鼠 120 只,由贵州医科大学实验动物中心提供【SCXK(黔)2012-0004】,体重 20~22 g。置于室温为(20±2)℃,湿度 49%~62% 环境中饲养,并正常饮食。

1.2 分组及动物模型的制作^[6]

将 120 只小鼠按随机分组原则分为 6 组,即正常对照组、假手术组、14 d 模型组及治疗组、28 d 模型组及治疗组,每组 20 只。假手术组、14 d 模型组及治疗组、28 d 模型组及治疗组小鼠术前 12 h 予以禁食,术前 6 h 予以禁饮,以避免手术过程中误吸导致死亡影响实验结果。采用小动脉夹夹闭双颈总动脉法制作小鼠脑缺血再灌注损伤模型。当小鼠出现抽搐、呼吸深慢、心跳加速提示脑缺血再灌注损伤模型制作成功。假手术组小鼠操作同上,除外双颈总动脉夹闭过程。

1.3 Morris 水迷宫实验^[7]

本实验分为两部分,即定位航行实验和空间探索实验,测试各组小鼠的空间学习记忆能力。在整个实验过程水温恒定在 25℃ 左右。

1.4 标本的收集

小鼠腹腔注射 3.5% 水合氯醛麻醉成功后,碘伏消毒 3 次后,迅速断头并置于预先准备好的冰块上取脑,将取出的脑组织海马 CA3 区分为四部分。

1.5 HE 染色

常规脱水、浸泡、包埋,使用切片机将组织蜡块做成 6 μm 的切片,并将切片小心贴在多聚赖氨酸玻片上,HE 染色后显微镜观察并照相。

1.6 miR-21 的检测^[8]

取一部分标本,以离心柱法提取总 RNA,电泳得到 RNA 条带,电泳完成后用凝胶成像系统检测条带,逆转录过程按照 TaqMan MicroRNA Assays Reverse Transcription Primer 说明书方法进行(42℃, 60 min; 70℃, 10 min),PCR 反应条件①预变性(95℃, 30 s);②变性(95℃, 10 s);③退火(58℃, 20 s);④延伸(70℃, 1 s);第②~④步骤循环 40 次,读板。保存图像及数据。实时定量 PCR 结果由荧光定量分析仪自动采集给出目的基因和参比基因的 CT 值,基因表达量采用实验组/对照组 = $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行计算,其中 $\Delta\Delta CT = (CT_{目的} - CT_{内参})_{实验} - (CT_{目的} - CT_{内参})_{对照}$,通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算 miR-21 与内参相对表达量,实验重复多次取其平均值进行数据分析。

1.7 IL-6 的检测

ELISA 法检测 IL-6 的表达。

1.8 STAT3、p-STAT3

Western Blot 测定 STAT3、p-STAT3 蛋白的表达,β-actin 作为内参。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计分析软件进行数据处理,实验数据采用均数 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,机械痛阈、旷场实验和高架 0 迷宫实验数据采用重复测量方

差分析;其他实验数据采用独立样本 t 检验,均以 $P < 0.05$ 为差异显著的标准。采用 Pearson 法进行相关分析。

2 结果

2.1 一般行为观察

对各组小鼠观察发现:正常对照组和假手术组小鼠行为活跃、给予刺激后的反应灵敏迅速;模型组的小鼠行为活动明显减少,给予刺激后明显较正常对照组和假手术组反应迟钝,甚至无反应;给予松树皮提取物治疗后 28 d 组小鼠行为活动较正常对照组和假手术组差,但较模型组活泼,对外界刺激反应较为迅速活跃,趋近于正常水平。

2.2 Morris 水迷宫检测

Morris 水迷宫检测数据见(表 1),结果显示:(1)从小鼠在定位航行实验中表现来看:假手术组与正常对照组相比数据差异无显著性($P > 0.05$),对照组、假手术组小鼠的逃避潜伏期耗费明显比 14、28 d 模型组少,差异有显著性($P < 0.05$)。28 d 模型组小鼠逃避潜伏期成绩少于 14 d 模型组小鼠耗时(35.54 ± 4.29 、 42.46 ± 6.21)s,差异有显著性($P < 0.05$);14、28 d 给予 OPCS 治疗后小鼠逃避潜伏期耗费时间比同期模型组明显减少,但数据显示低于同期模型组($P < 0.05$)。(2)空间探索实验统计结果显示:假手术组与正常对照组小鼠耗费时间结果差异无显著性(35.98 ± 5.11 、 37.01 ± 6.42)s ($P > 0.05$),与假手术组相比 14 d 和 28 d 缺血再灌注模型组小鼠穿越原平台所在象限时间明显降低(18.31 ± 2.91 、 26.91 ± 4.23)s,差异有显著性($P < 0.05$),说明经历脑缺血再灌注损伤后小鼠的学习记忆功能明显降低,这其中以 14 d 模型组小鼠成绩降低最为明显;实验小鼠给予松树皮提取物原花青素治疗后比同期模型组小鼠记忆能力有所好转,差异有显著性($P < 0.05$)。

2.3 HE 染色

小鼠脑缺血再灌注损伤后海马 CA3 区 HE 染色显示假手术组神经细胞排列整齐,并可见散在的、浅染的突起,表明其两组神经细胞无凋亡。而 14 d 模型组不但在数量上明显减少、排列紊乱,而且出现胞质浅着色,甚至出现胞核移位现象;14 d 治疗组镜下也可见排列紊乱、胞质浅着色及胞核移位现象,但在数量上要比 14 d 模型组少(图 1)。

2.4 小鼠海马组织中 IL-6 的测定

各组海马组织中 IL-6 结果显示如(表 2),假手术组与正常对照组检测结果差异无显著性($P > 0.05$),

模型组小鼠海马组织中 IL-6 表达同假手术组、正常对照组小鼠相比,14、28 d 模型组海马组织中 IL-6 明显升高,差异有显著性($P < 0.05$),表明缺血再灌注损伤后炎症因子表达增强,其中 14 d 模型组 IL-6 升高更为明显,结果显示模型组与假手术组比较差异有显著性($P < 0.05$);经给予 7 d 松树皮提取物原花青素治疗后发现治疗组小鼠海马组织中 IL-6 水平均低于同期模型组,差异有显著性($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠 Morris 水迷宫检测实验结果比较
($s, n = 20, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	逃避潜伏期 Escape latency	空间记忆 Spatial memory
正常对照组 Normal control group	20.46 ± 4.31	37.01 ± 6.42
假手术组 Sham group	22.31 ± 4.12	35.98 ± 5.11
14 d 模型组 14 d model group	42.46 ± 6.21 [▲]	18.31 ± 2.91 [▲]
14 d 治疗组 14 d treatment group	36.91 ± 5.21 [■]	25.52 ± 4.12 [■]
28 d 模型组 28 d model group	35.54 ± 4.29 [■]	26.91 ± 4.23 [■]
28 d 治疗组 28 d treatment group	26.21 ± 3.09 [▲] *	30.51 ± 2.12 [▲] *

注:▲ $P < 0.05$, vs 正常组;■ $P < 0.05$, vs 14 d 模型组;* $P < 0.05$, vs 28 d 模型组。

Note. ▲ $P < 0.05$, vs the normal control group; ■ $P < 0.05$, vs the 14 d model group; * $P < 0.05$, vs the 28 d model group.

表 2 各组小鼠海马组织匀浆中 IL-6 的比较
(ng/L, $n = 8, \bar{x} \pm s$)

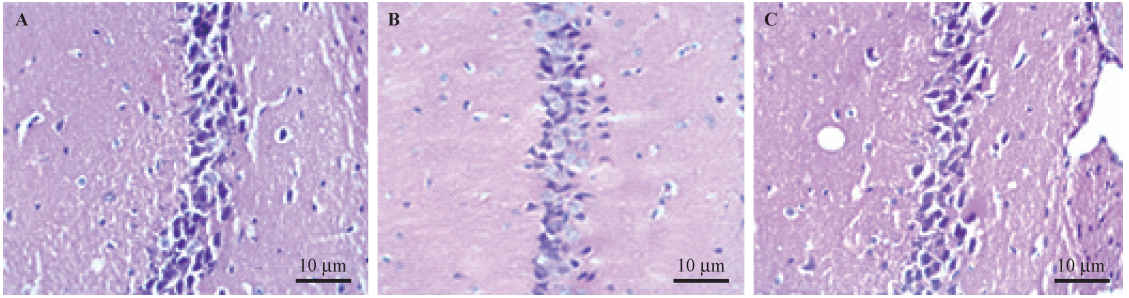
组别 Groups	IL-6
正常对照组 Normal control group	241.12 ± 18.75
假手术组 Sham group	254.72 ± 12.04
14 d 模型组 14 d model group	452.11 ± 21.63 [▲]
14 d 治疗组 14 d treatment group	351.59 ± 28.19 [■]
28 d 模型组 28 d model group	390.16 ± 20.91 [■]
28 d 治疗组 28 d treatment group	304.15 ± 17.23 [▲] *

注:▲ $P < 0.05$ vs 正常组;■ $P < 0.05$ vs 14 d 模型组;* $P < 0.05$ vs 28 d 模型组。

Note. ▲ $P < 0.05$ vs the normal control group; ■ $P < 0.05$ vs the 14 d model group; * $P < 0.05$ vs the 28 d model group.

2.5 STAT3 蛋白的表达

STAT3、p-STAT3 目的蛋白表达的灰度值与 β -actin 灰度值对比结果可见(图 2、图 3)。各组间总 STAT3 蛋白含量差异无显著性($P > 0.05$)。假手术组海马组织中的 p-STAT3 蛋白含量与正常对照组比较无显著差异($P > 0.05$);与假手术组比较,14、28 d 模型组小鼠海马组织 p-STAT3 的蛋白含量明



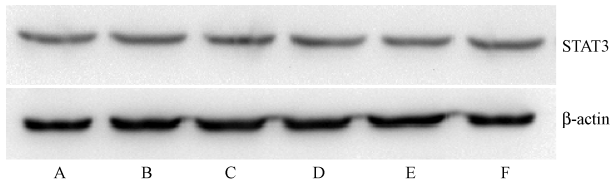
注: A. 假手术组; B. 14 d 模型组; C. 14 d 治疗组。

图 1 三组海马区 CA3 区 HE 染色结果比较(×200)

Note. A. Sham group; B. 14 d model group; C. 14 d treatment group. HE staining.

Fig. 1 Comparison of the pathological changes of CA3 region in the hippocampus of the three mouse groups

显高于假手术组, 差异具有显著性($P < 0.05$), 14 d 模型组小鼠海马组织 p-STAT3 蛋白含量高于 28 d 模型组; 14, 28 d 治疗组海马组织 p-STAT3 蛋白含量与同时期模型组比较均降低, 各实验组间差异均具有显著性($P < 0.05$)。



注: A. 正常组; B. 假手术组; C. 14 d 模型组; D. 14 d 治疗组; E. 28 d 模型组; F. 28 d 治疗组。(下图同)

图 2 各组蛋白印迹检测总 STAT3 表达比较

Note. A. Normal control group; B. Sham group; C. 14 d model group; D. 14 d treatment group; E. 28 d model group; F. 28 d treatment group. (The same in the following Figures)

Fig. 2 Comparison of total STAT3 expression determined by Western blot

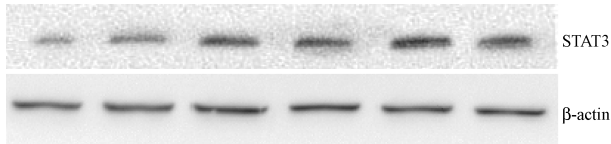


图 3 各组蛋白印迹检测 p-STAT3 表达比较

Fig. 3 Comparison of p-STAT3 expression detected by Western blot

2.6 各组小鼠海马组织中 miR-21 的相对定量表达水平

假手术组海马组织 miR-21 含量与正常对照组比较差异无显著性($P > 0.05$); 与假手术组比较, 14, 28 d 模型组小鼠海马组织 miR-21 的含量显著高于假手术组, 差异均有显著性($P < 0.05$), 14 d 模型组小鼠海马组织 miR-21 含量高于 28 d 模型组; 14, 28 d 治疗组海马组织 miR-21 含量与同时期模型组比较均降低, 各实验组间差异均具有显著性($P <$

0.05)(图 4)。

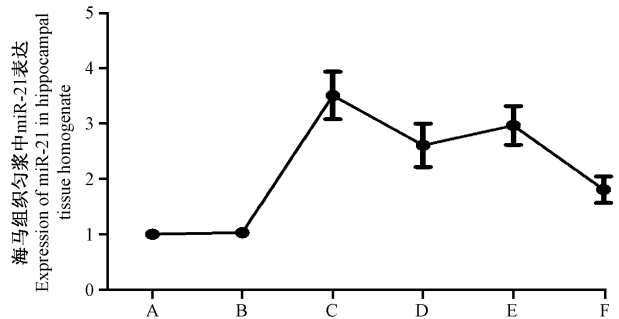


图 4 各组小鼠海马 CA3 区组织匀浆中 miR-21 的比较

Fig. 4 Comparison of the total miR-21 in the hippocampal CA3 region tissue homogenates of different mouse groups

3 讨论

脑缺血再灌注损伤是一复杂的病理生理性变化, 其涉及到的细胞因子及相互机制较为复杂, 探寻一种能有效减轻或预防脑缺血再灌注损伤的药物或方法, 是改善缺血性脑血管病患者预后的关键问题之一。

脑缺血早期 TNF- α 分泌量会在一定时间内呈上升趋势^[9], TNF- α 又能参与和诱导 IL-6 的合成。细胞中 IL-6 不但能够通过激活 STAT3 信号通路而发挥对 miRNA-21 表达的调节作用^[10], IL-6 还对神经元、内皮细胞、胶质细胞有着不可忽视的损伤^[11]。Yamashita 等^[12] 实验研究发现: 使用 IL-6 受体单克隆抗体阻断剂后发现: 小鼠大脑缺血区组织中的 p-STAT3 含量明显减少, 缺血区域神经细胞凋亡大为减少、梗塞面积明显缩小、相应区域的功能损伤明显减轻, 这说明阻断 STAT3 的活化在 CIRI 过程中可能具有神经保护作用, 考虑抑制 p-STAT3 的表达与减少神经细胞的凋亡有关。

JAK-STAT 通路是 1992 年由 Sehindl 在研究干扰素时发现, JAK-STAT 通路是由 JAKs 蛋白家族和 STATs 蛋白家族组成, 是以激活 STAT3 信号转导与转

录的细胞内信号传导通路,它参与了中枢神经系统的发育、增殖、分化等过程,并在一些疾病(如肿瘤、缺血性脑病、脑缺血再灌注损伤等)的发生、发展过程中发挥重要的调节作用。罗云波^[13]在实验中发现:脑缺血再灌注损伤后 IL-6 与 IL-6R 结合,使 JAK/STAT 信号传导通路激活,从而促使 STAT3 磷酸化,最后 p-STAT3 的表达增高。目前有研究表明 JAK/STAT 通路的激活还会使星形胶质细胞活化的,严重影响了神经功能的恢复^[14]。

MicroRNA(miRNA)是一种广泛存在于从各种生物中的、长度为 22 个核苷酸长度的、高度保守的非编码内源性小分子 RNA,其不具有开放阅读框、不编码蛋白质,但却有高度的稳定性,广泛的参与细胞的生长、凋亡等过程,具有一定的原癌基因活性,与炎症这一病理过程密切相关。一直以来 miR-21 表达增加被认为是抑制细胞凋亡和促进肿瘤的发生发展,但根据最近虞莉娜等^[15]通过检测 64 名急性脑梗死患者血清中 miR-21-5p、IL-6 发现:IL-6 与 miR-21-5p 的表达呈正比关系,miR-21-5p 的高表达组的患者人群预后远远差于低表达组,显然在缺血性脑病这一疾病中 miR-21 的抑制细胞凋亡功能并未发挥主要作用。我们通过回顾 miR-21 与一些疾病(如:炎性肠炎、系统性红斑狼疮、自身免疫性脑脊髓膜炎)的关系,我们不难发现在 miR-21 在这些疾病的病变部位和外周血中表达明显升高。其作用机制可能为:过表达的 miR-21 可以促进炎症因子(如:IL-6、TNF- α 等)的分泌,进一步加重炎症反应^[16]。

松树皮提取物原花青素属于生物类黄酮,具有廉价、天然、易获得、无明显致癌性和副作用的特点,目前普遍认为 OPCs 具有较强的抗氧化性和清除自由基功能,对炎症因子的表达也有抑制功能。已有研究表明松树皮提取物原花青素可能通过多种途径减轻脑缺血再灌注损伤。细胞凋亡是 CIRI 的关键,通过调节内源性基因的表达来抑制细胞凋亡是改善缺血性脑血管病预后的途径之一。根据以上研究结果,我们推测松树皮提取物原花青素治疗小鼠脑缺血再灌注损伤作用机制最终与 miR-21 的表达有关,目前尚未见 OPCs 治疗脑缺血再灌注损伤中 IL-6、STAT3、miR-21 之间相互作用途径的报道,本实验发现脑缺血再灌注损伤能够引起炎症因子 IL-6 表达增高,从而刺激小鼠脑内海马结构炎症反应,且脑缺血再灌注损伤所引起的细胞炎症因子 IL-6 水平升高又可促进 STAT3 激活,进而上调 miR-21 表达水平,其可能是导致学习、记忆能力损伤的原因之一。松树皮提取物能抑制 IL-6 水平,进而抑制 STAT3 激活,致 miR-21 表达降低,减轻炎症反应及细胞凋亡。相信随着基础医

学的发展,miRNA 研究的深入,OPCs 治疗 CIRI 的作用机制将能得到更进一步的明确,这也为对脑缺血再灌注损伤的治疗提供进一步的理论依据。

参 考 文 献

- [1] 贾建平. 神经病学[M]. (第 6 版). 北京:人民卫生出版社, 2009: 171 - 175.
- [2] Ridder DA, Schwaninger M. NF- κ B signaling cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 995 - 1006.
- [3] 韦家俊, 廖小明, 王耀辉, 等. JAK2/STAT 3 信号传导通路在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *临床神经病学杂志*, 2015, 28(4): 281 - 283.
- [4] Buller B, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death [J]. *FEBS J*, 2010, 277(20): 4299 - 4307.
- [5] 李建玲, 何斌, 李琳琳. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国生化药物杂志*, 2011, 32(6): 463 - 466.
- [6] 闵思源, 刘文博, 王强, 等. 一种成年大鼠脑缺血诱发的抽搐模型 [J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2012, 11(2): 122 - 127.
- [7] 周荣易, 王娇娇, 韩新民. SHR、WKY 大鼠与 SD 大鼠注意缺陷多动障碍模型行为学特征的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(4): 380 - 385.
- [8] 薛飞, 沈照立, 沈睿, 等. 人脑胶质瘤组织中微小 RNA-21 与磷酸酶和张力蛋白同源基因的表达及其临床意义 [J]. *中国医药导报*, 2014, 11(12): 36 - 38, 41.
- [9] Clark IA, Alleva LM, Vissel B, et al. The roles of TNF in brain dysfunction and disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 128(3): 519 - 548.
- [10] Löffler D, Brocke-Heidrich K, Pfeifer G, et al. Interleukin-6-dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer [J]. *Blood*, 2007, 110(4): 1330 - 1333.
- [11] 向赞, 董大翠, 刘庆莹. 脑缺血与白细胞介素-6 的变化 [J]. *江汉大学学报*, 2005, 33(3): 83 - 87.
- [12] Yamashita T, Sawamoto K, Suzuki S, et al. Blockade of interleukin-6 signaling aggravates ischemic cerebral damage in mice: possible involvement of STAT 3 activation in the protection of neurons [J]. *J Neurochem*, 2005, 94(2): 459.
- [13] 罗云波. 肢体反复短暂缺血预处理对高脂血症大鼠局灶性脑缺血再灌注后 IL-6、JAK2、STAT3 表达的影响 [D]. 西南医科大学, 2016.
- [14] Leung YK, Pankhurst M, Dunlop SA, et al. Metallothionein induces a regenerative reactive astrocyte phenotype via JAK/STAT at RhoA signaling pathways [J]. *Exp Neurol*, 2010, 221(221): 98 - 106.
- [15] 虞莉娜, 席刚明, 刘进香, 等. 急性脑梗死患者血清中 miR-21-5p 与炎症因子的相关性分析 [J]. *河北医科大学学报*, 2016, 36(6): 632 - 635.
- [16] Murugaiyan G, da Cunha AP, Ajay AK, et al. MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *J Clin Invest* 2015, 125(3): 1069 - 1080.