

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.21.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200629.1502.032.html\(2020-06-29\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200629.1502.032.html(2020-06-29))

短散布核元件 RNA 对衰老小鼠的抗疲劳和抗氧化作用*

吕白雪^{1,2}, 马 荣^{1,2}, 黄佳欣^{1,2}, 谢明星^{1,2,△}

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院超声影像科, 武汉 430022;

2. 分子影像湖北省重点实验室, 武汉 430022)

[摘要] **目的** 探讨基因工程小鼠短散布核元件(SINE)B1 反义 RNA(B1as RNA)对抗疲劳,抗氧化和清除衰老细胞中活性氧的作用。**方法** 将 36 只自然衰老 BALB/c 小鼠分为 A、B、C 3 组,每组 12 只,分别注射 B1as RNA, LacZ3F3R RNA 和盐水,转棒疲劳仪检测抗疲劳能力。另选 6 周龄年轻健康小鼠 12 只(D 组),不做任何处理作为对照。测定各组小鼠活性氧,超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛水平;检测 Sesn1 和 Sesn2 基因的 mRNA 的表达水平,线粒体 DNA 拷贝数(mtDNAcn)和脾脏组织细胞中 β-半乳糖苷酶(SA-β-gal)阳性率。**结果** A 组小鼠第 6~8 次在转棒疲劳仪上停留的时间明显长于 B、C 组($P<0.01$);A、B、C、D 组小鼠脾脏组织细胞中 SA-β-gal 阳性细胞比率分别为 24.63%、36.02%、37.14%、0.76%,A 组明显低于 B、C 组($P<0.05$),高于 D 组($P<0.01$)。C 组小鼠肝脏和脾脏组织中的 mtDNAcn 明显高于 D 组小鼠($P<0.01$),A 组小鼠肝脏和脾脏组织中 mtDNAcn 明显低于 C 组($P<0.05$)。C 组小鼠外周血细胞活性氧、丙二醛水平明显高于 D 组($P<0.01$);A 组小鼠的活性氧、丙二醛水平明显低于 B、C 组($P<0.05$);A 组小鼠的 SOD、GSH-Px 活性明显高于 C 组($P<0.05$);A 组小鼠肝脏、脾脏中 Sesn1、Sesn2 抗氧化防御基因的 mRNA 表达量明显高于 C 组($P<0.05$),但低于 D 组($P<0.01$)。**结论** B1as RNA 具有抗疲劳和抗氧化活性,并能清除衰老细胞中积累的活性氧。

[关键词] 基因工程小鼠 B1 反义 RNA;自然衰老小鼠;抗疲劳;抗氧化活性;线粒体 DNA 拷贝数**[中图分类号]** R945**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)21-3510-05

Anti-fatigue and antioxidant effects of short interspersed nuclear element RNA on senescent mice*

LYU Baixue^{1,2}, MA Rong^{1,2}, HUANG Jiaying^{1,2}, XIE Mingxing^{1,2,△}

(1. Department of Ultrasound Imaging, Affiliated Union Hospital, Tongji

Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China;

2. Hubei Province Key Laboratory of Molecular Imaging, Wuhan, Hubei 430022, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the anti-fatigue, antioxidant and eliminating reactive oxygen effect in senescent cells of short interspersed nuclear element (SINE) B1 antisense RNA (B1as RNA) of genetically engineered mice. **Methods** Thirty-six naturally senescent BALB/c mice were divided into 3 groups (A, B and C) with 12 cases in each group. The groups were injected by B1as RNA, LacZ3F3R RNA and normal saline respectively. The anti-fatigue ability was detected by using the rotating-bar fatigue instrument. In addition, 12 healthy young 6 weeks old mice (group D) were selected as the control without any treatment. The levels of active oxygen, ROS, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) were detected. The mRNA expression levels of Sesn1 and Sesn2 genes were detected. The mitochondrial DNA copy number (mtDNAcn) and positive rate of β-galactosidase in spleen tissue cells were detected. **Results** The time of staying on the rotating-bar fatigue instrument for mice in the group A was longer than that in the group B and C ($P<0.01$); the ratio of SA β-galactosidase (SA-β-gal) positive cells in spleen cells of the groups A, B, C and D were 24.63%, 36.02%, 37.14% and 0.76% respectively, the group A was significantly lower than the group B and C ($P<0.05$) and higher than the group D ($P<0.01$). The mtDNAcn level in liver and spleen tissues of mice in the group C was significantly higher than that in the group D ($P<0.01$),

* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(81530056);国家自然科学基金重大科研仪器研发专项(81727805)。 作者简介:吕白雪(1992-), 医师, 硕士, 主要从事超声影像学及重复序列的生物学作用。 △ 通信作者, E-mail: xmingxing2016@126.com。

the mtDNAcn level in liver and spleen tissues of mice in the group A was significantly lower than that in the group C ($P < 0.05$). The levels of reactive oxygen and MDA in peripheral blood cells of mice in the group C were significantly higher than those in the group D ($P < 0.01$); the levels of reactive oxygen and MDA in the group A were significantly lower than those in the groups B and C ($P < 0.05$); the SOD and GSH-PX activities in the group A were significantly higher than those in the group C ($P < 0.05$); the mRNA expression levels of antioxidant defense genes *Sesn1* and *Sesn2* in the liver and spleen of mice in the group A were significantly higher than those in the group C ($P < 0.05$), but lower than those in the group D ($P < 0.01$). **Conclusion** Blas RNA has the anti-fatigue and antioxidant activities and can remove the accumulated ROS in senescent cells.

[Key words] genetically engineered mice B1 antisense RNA; naturally senescent mice; anti-fatigue; antioxidant activities; mitochondrial DNA copy number

人类衰老过程中,抵抗压力和疾病的能力逐渐下降,伴随着各种年龄相关的疾病,包括糖尿病、心血管疾病、神经退行性疾病和癌症的发生^[1-3]。活性氧主要是线粒体呼吸的副产物,调节失衡可导致活性氧水平升高和氧化应激,这被认为是多种代谢和神经退行性疾病及衰老发生的主要原因。随着生活水平的提高,世界各地的人们越来越关心健康问题。防治老年病已成为许多人关注的一个重要课题^[4-5]。有研究表明,氧化应激发生在多种年龄相关疾病的发病过程中^[6-8]。通过干扰细胞内过量的活性氧,清除自由基,增强抗氧化防御能力是目前广泛采用的抗衰老策略^[1]。短散布核元件(SINE)是哺乳动物基因组中最重要的重复序列,占基因组的 10%,Alu 元件是人类基因组中主要的 SINE,B1 元件是小鼠基因组中主要的 SINE^[9-11]。SINE RNA 在基因表达调控中起重要作用。近期研究发现,重复序列涉及多种细胞过程^[12-13]。有研究报道,Alu 元件可抑制基因表达^[14-16],但也有研究报道,从 Alu 元件转录的 Alu RNA 具有激活基因表达的作用^[17]。Alu 和 B1 元件在灵长类-啮齿类动物分离后各自独立进化,但是二者在基因组中的分布有类似性^[18],均倾向于分布在基因丰富的区域和基因侧翼^[19-20]。B1 SINE 能调节基因表达,在培养细胞和活体动物中具有很强的绝缘子活性^[21]。RNA 作为调节基因表达的重要因子,越来越受到人们的重视^[11]。有研究表明,RNA 可以上调或下调基因表达^[22-23]。为了研究 SINE RNA 的作用,已有研究建立了从大肠埃希菌(*E. coli*)菌株中制备基因工程 SINE RNA 的技术方法^[24]。本文以自然衰老 BALB/c 小鼠为实验模型,研究 B1 反义 RNA(B1as RNA)是否具有抗疲劳和抗氧化活性进而清除衰老细胞中积累的活性氧。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物

SPF 级自然衰老的 BALB/c 小鼠 36 只,14 月龄以上;另选 6 周龄年轻健康小鼠 12 只,均由华中医科大学实验动物中心提供。在整个研究过程中,所有小鼠随意饮水和采食。所有动物实验经过了华中医科

大学实验动物伦理与福利委员会的批准。

1.1.2 试剂及仪器

活性氧检测试剂盒购自北京碧云天生物技术公司;细胞衰老相关 β -半乳糖苷酶(SA- β -gal)染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、丙二醛测试盒及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)测试盒购自南京建成生物工程研究所;TRIzol、DNase I、RNasin、RevertAid 逆转录酶和 6nt 随机引物购自美国 Thermo Scientific 公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自北京索莱宝科技有限公司;DNeasy Blood & Tissue Kit 购自德国 Qiagen 公司;Wizard SV 96 Genomic DNA 纯化系统购自 Promega(Madison, WI, USA)公司;转棒疲劳仪(YLS-4C)购自广东东莞博之远生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因工程鼠源 B1as RNA 的制备

根据文献^[25]的报道,本研究制备了基因工程鼠源 B1as RNA。基本过程如下:B1 元件插入 pET-28 α 质粒构建表达载体,转化 BL21-DE3(DE3)大肠埃希菌,获得 pET-B1as DE3 菌。将 pET-B1as DE3 菌于 37 °C 培养至 OD600 1.0,IPTG(终浓度 0.2 mg/mL)诱导 2 h,从 pET-B1as DE3 菌中获得无内毒素污染的基因工程 B1as RNA。利用相同的技术手段,获得大肠埃希菌 LacZ 基因片段 LacZ3F3R 的基因工程 RNA(LacZ3F3R RNA)作为无关 RNA 对照。

1.2.2 动物分组及给药

衰老的 BALB/c 小鼠适应 1 周后,随机分为 A、B、C 3 组,每组 12 只。A 组小鼠,每只经尾静脉注射 20 μ g B1as RNA,每周 1 次;B 组小鼠,每只注射 20 μ g LacZ3F3R RNA,每周 1 次;C 组小鼠,每只注射等体积的生理盐水(NS)。12 只 6 周龄年轻健康小鼠(D 组),不做任何处理作为对照。

1.2.3 抗疲劳能力检测

从注射药物的第 4 周开始用转棒疲劳仪检测 B1as RNA 的抗疲劳作用,每周测量 1 次,每只小鼠测量 3 次,计算小鼠停留在转棒上时间的均值,共测量 8 周。测量时转棒的转速设置为 7 r/min,旋转周期设置为 10 min。

1.2.4 生化指标检测

使用活性氧检测试剂盒,根据厂家的说明书,检测外周血细胞活性氧水平,观察 Blas RNA 是否能清除血细胞中积累的活性氧;用 SOD,丙二醛以及 GSH-Px 试剂盒,根据说明书检测血清中抗氧化活性指标,即 SOD,GSH-Px 的活性及丙二醛水平,来观察 Blas RNA 是否具有抗氧化防御活性。使用细胞 SA-β-gal 染色试剂盒检测脾脏细胞中 SA-β-gal 的活性,该试剂盒的底物在 SA-β-gal 的催化下生成蓝色产物,在光学显微镜下观察到蓝染细胞为染色阳性细胞。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)检测线粒体 DNA 拷贝数(mtDNAcn)

使用 DNeasy Blood & Tissue Kit 或 Wizard SV 96 Genomic DNA 纯化系统,按照说明书从肝脏和脾脏组织中提取基因组 DNA(gDNA)。细胞色素 C 氧化酶 2(Cox2)是位于线粒体上的基因,qPCR 扩增量与线粒体个数成正比,36b4 是核基因组单拷贝基因,用于作为细胞数量参照。Cox2 基因上游引物:5'-ATA ACC GAG TCG TTC TGC CAA T-3',下游引物:5'-TTT CAG AGC ATT GGC CAT AGA A-3';36b4 基因的上游引物:5'-ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG-3',下游引物:5'-TCA ATG GTG CCT CTG GAG ATT-3'。qPCR 条件为 95 °C 预变性 10 min 1 个循环,95 °C 变性 15 s,60 °C 退火 10 s,72 °C 延伸 15 s,共 45 个循环。mtDNAcn 相对于参考单拷贝核基因按 $2^{-\Delta Ct}$ 方程计算^[25]: $2^{-(Ct_{tar}-Ct_{36b4})}$,其中 Ct 为阈值,Cttar 为目标基因 Cox2 的 Ct 值;Ct36b4 为单拷贝参考基因 36b4 的 Ct 值。

1.2.6 逆转录-定量 PCR(RT-qPCR)

RT-qPCR 的实验过程参照文献[17]进行。用 Trizol 从肝脏和脾脏组织中提取总 RNA,用 DNase I 和 RNasin 消化剩余 DNA,用 0.5% 十二烷基硫酸钠(SDS)-5% 苯酚灭活 DNase I,用乙醇沉淀。使用

RevertAid 逆转录酶和 6-nt 随机引物进行逆转录。对 2 μL 的 cDNA 进行实时 PCR。β-actin 的上游引物:5'-CTG TGC CCA TCT ACG AGG GCT AT,下游引物:5'-TTT GAT GTC ACG CAC GAT TTC C;Sesn1 基因的上游引物:5'-TCT GAA GAG CGT CGA GGA A,下游引物:5'-GAC CCA AAG CAG CAA AGG。Sesn2 基因的上游引物:5'-CTT CCG TGC CCA GGA TTA,下游引物:5'-TGG CGA TGG TGT TAT AGG TG。β-actin、Sesn1、Sesn2 基因的扩增的长度分别为 155、152、131 bp。

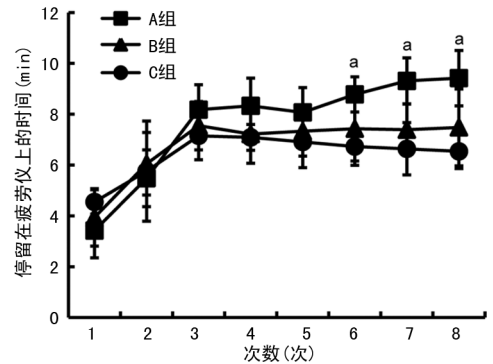
2 结果

2.1 各组小鼠转棒疲劳仪测定

抗疲劳能力检测发现,在第 6~8 次(第 9~11 周)测定时,A 组小鼠在转棒疲劳仪上停留的时间明显长于 B、C 组 ($P < 0.01$),各组小鼠抗疲劳能力比较,见图 1。

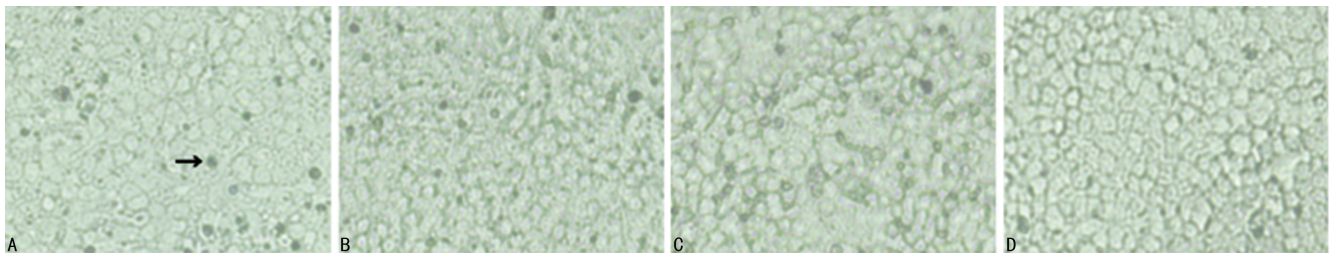
2.2 各组小鼠脾脏组织细胞中 SA-β-gal 的活性比较

A、B、C、D 组小鼠脾脏组织细胞中 SA-β-gal 阳性细胞比率为 24.63%、36.02%、37.14%、0.76%,A 组明显低于 B、C 组 ($P < 0.05$),高于 D 组 ($P < 0.01$),B、C 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组小鼠脾脏组织细胞中 SA-β-gal 阳性细胞,见图 2。



^a: $P < 0.01$,与 B、C 组比较。

图 1 各组小鼠转棒疲劳仪测定结果比较



A:A 组;B:B 组;C:C 组;D:D 组。

图 2 镜下观察各组小鼠脾脏细胞中 SA-β-gal 阳性细胞(SA-β-gal 染色,×150)

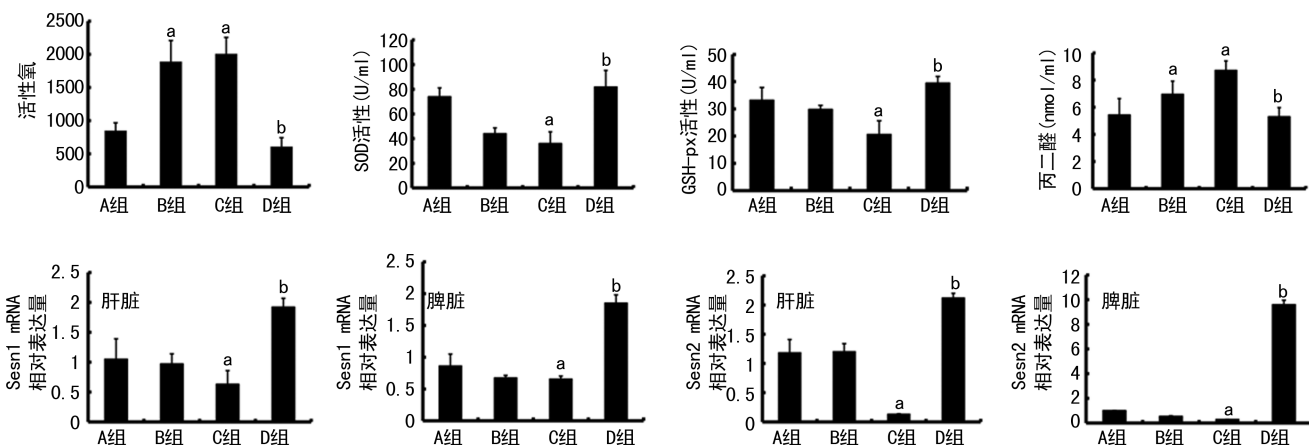
2.3 各组小鼠外周血细胞生化指标及肝脏和脾脏中 Sesn1、Sesn2 水平比较

C 组小鼠外周血细胞活性氧、丙二醛水平明显高于 D 组 ($P < 0.01$);A 小鼠的活性氧、丙二醛水平明显低于 B、C 组 ($P < 0.05$),与 D 组小鼠比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。A 组小鼠的 SOD、GSH-px 活性明显高于 C 组 ($P < 0.05$),与 D 组比较差异无统计

学意义 ($P > 0.05$)。A 组小鼠肝脏、脾脏中 Sesn1、Sesn2 抗氧化防御基因的 mRNA 表达量明显高于 C 组 ($P < 0.05$),但低于 D 组 ($P < 0.01$),与 B 组小鼠比较差异有无统计学意义 ($P > 0.05$),见图 3。

2.4 各组小鼠肝脏和脾脏组织中 mtDNAcn 水平比较

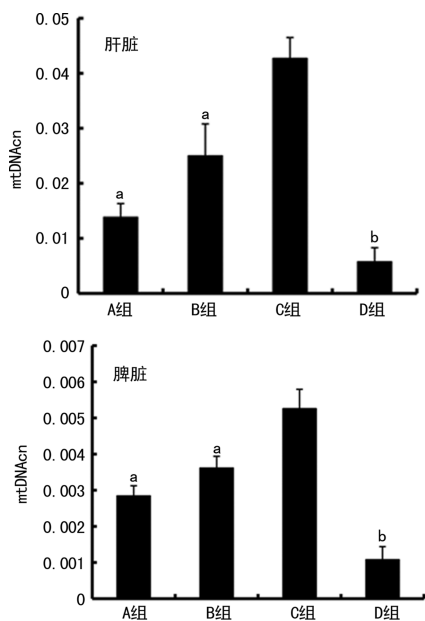
C 组小鼠肝脏和脾脏组织中的 mtDNAcn 明显高于 D 组小鼠 ($P < 0.01$);A 组小鼠肝脏和脾脏组织中



a: $P < 0.05$, 与 A 组比较; b: $P < 0.01$, 与 C 组比较。

图 4 各组小鼠外周血细胞生化指标及肝脏和脾脏中 Sesn1、Sesn2 水平比较

mtDNAcn 明显低于 C 组 ($P < 0.05$), 与 D 组小鼠 mtDNAcn 水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); B 组小鼠 mtDNAcn 明显低于 C 组 ($P < 0.05$), 但是明显高于 D 组 ($P < 0.01$), 见图 4。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与 C 组比较。

图 3 各组小鼠肝脏和脾脏组织中 mtDNAcn 水平比较

3 讨论

衰老是自然发生过程, 涉及多个环节^[26]。目前已提出了多种衰老相关的机制, 衰老与细胞氧化应激相关的理论得到了广泛的支持^[27-28]。

SINE 是哺乳动物基因组中最重要的重复序列。SINE RNA 在基因表达调控中起重要作用。有研究表明, RNA 可以上调或下调基因表达^[22-23]。本研究中, 从大肠埃希菌菌株中制备了基因工程小鼠 SINE B1as RNA, 然后以自然衰老 BALB/c 小鼠为实验模型, 研究 B1as RNA 在体内是否具有抗疲劳作用, 并探讨其分子机制。

衰老小鼠停留在转棒疲劳仪上的时间会缩短, 本研究表明, B1as RNA 治疗后的小鼠在转棒疲劳仪上停留的时间明显高于盐水和 LacZ3F3R RNA 对照

组, 说明 B1as RNA 可以提高老年小鼠的抗疲劳能力。mtDNAcn 被认为是衰老的标志, 并随年龄增加, 不同组织细胞中的 mtDNAcn 会增加或减少。BAEK 等^[25]检测了 C57BL/6 雄性小鼠的 12 种不同组织中 mtDNAcn, 发现随着年龄增长脾脏组织细胞中的 mtDNAcn 增加。本研究结果表明, 与年轻小鼠相比, 老龄小鼠肝脏和脾脏的 mtDNAcn 升高, 这一结果与 BAEK 等^[25]的结果一致。而 B1as RNA 治疗的老龄小鼠的 mtDNAcn 介于年轻小鼠和衰老小鼠之间, 说明 B1as RNA 具有缓解 mtDNAcn 随年龄而变化的趋势。衰老细胞通常体积变大, 并表达在 pH 6.0 时有高酶活性的 SA- β -gal。经 B1as RNA 治疗的衰老小鼠的脾脏组织细胞中 SA- β -gal 的活性下降, 说明 B1as RNA 有延缓衰老的作用。

衰老细胞积累过剩的活性氧, 活性氧攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化反应, 形成脂质过氧化物, 如醛(丙二醛)、酮基、羧基等, 引起组织和细胞的损伤。因此, 丙二醛的测定可以反映脂质过氧化程度, 间接反映细胞损伤程度。SOD 是一种广泛存在于组织和细胞中的金属酶, 用于催化超氧阴离子自由基($O_2^- \cdot$)的歧化反应, 对平衡机体的氧化和抗氧化系统, 避免活性氧损伤起着重要作用^[2], 因此, SOD 活性的高低间接反映了机体对活性氧的清除能力。本研究结果表明, B1as RNA 可以清除衰老小鼠外周血细胞积累的活性氧, 提高血清中 SOD 和 GSH-Px 的活性, 降低衰老小鼠血清中丙二醛水平, 提高肝脏和脾脏组织中抗氧化防御基因 Sesn1 和 Sesn2 mRNA 表达水平。这些结果表明, B1as RNA 可以增加老龄小鼠的抗氧化防御能力。

本研究表明, 基因工程 B1as RNA 可提高衰老小鼠的抗疲劳能力; 与年轻小鼠相比, 衰老小鼠肝脏和脾脏的 mtDNAcn 升高, 而 B1as RNA 治疗可减少衰老小鼠的 mtDNAcn; 衰老细胞中聚集过量的活性氧, B1as RNA 可以清除衰老细胞中积累的过量活性氧, 增强衰老小鼠的抗氧化防御能力。

参考文献

- [1] DAVALLI P, MITIC T, CAPORALI A, et al. ROS, cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:3565127.
- [2] ZHEN Y Z, LIN Y J, LI K J, et al. Effects of rhein lysinate on D-galactose-induced aging mice[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(1):303-308.
- [3] PEIRIS H, DUBACH D, JESSUP C F, et al. RCAN1 regulates mitochondrial function and increases susceptibility to oxidative stress in mammalian cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:520316.
- [4] SCHERZ-SHOVAL R, ELAZAR Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology[J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(1):30-38.
- [5] BARNHAM K J, MASTERS C L, BUSH A I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(3):205-214.
- [6] BUTTERFIELD D A, DI DOMENICO F, BARONE E. Elevated risk of type 2 diabetes for development of Alzheimer disease: A key role for oxidative stress in brain[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842(9):1693-1706.
- [7] YU W, BONNET M, FARSO M, et al. The expression of apoptosis inducing factor (AIF) is associated with aging-related cell death in the cortex but not in the hippocampus in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease[J]. *BMC Neurosci*, 2014, 15(1):73.
- [8] JO-WATANABE A, OHSE T, NISHIMATSU H, et al. Glyoxalase I reduces glycative and oxidative stress and prevents age-related endothelial dysfunction through modulation of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation[J]. *Aging Cell*, 2014, 13(3):519-528.
- [9] GANAPATHI M, SRIVASTAVA P, DAS SUTAR S K, et al. Comparative analysis of chromatin landscape in regulatory regions of human housekeeping and tissue specific genes[J]. *BMC Bioinform*, 2005, 6:126.
- [10] HALER J, STRUB K. Alu elements as regulators of gene expression[J]. *Nucl Acids Res*, 2006, 34(19):5491-5497.
- [11] WANG X, MA Z, CHENG J, et al. A genetic program theory of aging using an RNA population model[J]. *Ageing Res Rev*, 2014, 13(1):46-54.
- [12] LEONOV G, SHAH K, YEE D, et al. Suppression of AGO2 by miR-132 as a determinant of miRNA-mediated silencing in human primary endothelial cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 69:75-84.
- [13] SONG W Q, GU W Q, QIAN Y B, et al. Identification of long non-coding RNA involved in osteogenic differentiation from mesenchymal stem cells using RNA-Seq data[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4):18268-18279.
- [14] BOLOTIN E, CHELLAPPA K, HWANG-VERSLUES W, et al. Nuclear receptor HNF4alpha binding sequences are widespread in Alu repeats[J]. *BMC Genom*, 2011, 12(1):560.
- [15] WANG X F, WANG X Y, LIU J, et al. Alu tandem sequences inhibit GFP gene expression by triggering chromatin wrapping[J]. *Genes Genom*, 2009, 31(3):209-215.
- [16] WANG H G, WANG X F, JING X Y, et al. Effect of mutations in a simian virus 40 PolyA signal enhancer on green fluorescent protein reporter gene expression[J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(3):1866-1883.
- [17] MA Z, KONG X, LIU S, et al. Combined sense-antisense Alu elements activate the EGFP reporter gene when stable transfection[J]. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292(4):833-846.
- [18] KRIEGLS J O, CHURAKOV G, JURKA J, et al. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates[J]. *Trends Genet*, 2007, 23(4):158-161.
- [19] TSIRIGOS A, RIGOUTSOS I. Alu and b1 repeats have been selectively retained in the upstream and intronic regions of genes of specific functional classes[J]. *PLoS Computat Biol*, 2009, 5(12):e1000610.
- [20] CHEN C, GENTLES A J, JURKA J, et al. Genes, pseudogenes, and Alu sequence organization across human chromosomes 21 and 22[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(5):2930-2935.
- [21] ROMÁN A C, GONZÁLEZ-RICO F J, MOLTO E. Dioxin receptor and SLUG transcription factors regulate the insulator activity of B1 SINE retrotransposons via an RNA polymerase switch[J]. *Genome Res*, 2011, 21(3):422-432.
- [22] CHEN G, GAO X, WANG J, et al. Hypoxia-induced microRNA-146a represses Bcl-2 through Traf6/IRAK1 but not Smad4 to promote chondrocyte autophagy[J]. *Biol Chem*, 2017, 398(4):499-507.

- J Ethnopharmacol, 2017, 206(16):178-183.
- [6] XIE W, ZHOU P, SUN Y, et al. Protective effects and target network analysis of ginsenoside Rg1 in cerebral ischemia and reperfusion injury; a comprehensive overview of experimental studies[J]. Cells, 2018, 7(12):1-18.
- [7] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [8] VON KUMMER R, DZIALOWSKI I. Imaging of cerebral ischemic edema and neuronal death[J]. Neuroradiology, 2017, 59(6):545-553.
- [9] 陈杰, 周桥. 病理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2017:71-76.
- [10] VAN HERREWEGHE F, FESTJENS N, DECLERCQ W A. Tumor necrosis factor-mediated cell death; to break or to burst, that's the question[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(10):1567-1579.
- [11] LI X, HUANG L, LIU G, et al. Ginkgo diterpene lactones inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response in astrocytes via TLR4/NF- κ B pathway in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 249:112365-112420.
- [12] WU W, LIU P, LI J Y. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2012, 82(3):249-258.
- [13] YAN S, FANG C, AO L, et al. Protective effect of glycyrrhizic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting HMGB1-mediated TLR4/NF- κ B pathway[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2019, 66(6):1024-1030.
- [14] 赵杨, 孙波, 杜书章. 芦荟素抑制 p65 的磷酸化对大鼠脑缺血再灌注诱导的组织损伤和炎症的调节作用[J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(17):2084-2088, 2093.
- [15] 徐翔, 杨陈丽, 赵宝华, 等. 局部脑缺血再灌注损伤对大鼠脑组织 TLR4 和 NF- κ B 表达影响[J/OL]. 青岛大学学报(医学版), 2020, 56(2):1-5.
- [16] NIKOLETOPOULOU V, MARKAKI M, PALLIKARAS K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12):3448-3459.
- [17] 马竞, 何文龙, 高重阳, 等. 木瓜苷通过抑制 NF- κ B P65/TNF- α 通路活性减轻小鼠脑缺血再灌注诱导的组织损伤[J]. 浙江大学学报(医学版), 2019, 48(3):289-295.
- [18] 杨龙, 刘芷含, 张瑞成, 等. Necrostatin-1 对 TLR4/NF- κ B 途径的调控在大鼠脑缺血再灌注后小胶质细胞活化中的意义[J]. 中风与神经疾病杂志, 2018, 35(12):1079-1082.
- [19] 齐本权. 人参皂苷 Rg1 对致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. 南通大学学报(医学版), 2016, 36(4):260-264.
- [20] 于洋, 刘学政, 包翠芬, 等. 人参皂苷 Rg1 对局灶性脑缺血大鼠 PARP-1 和 TNFR1 表达的影响[J]. 天津医药, 2015, 43(3):245-248, 338-339.
- (收稿日期:2020-01-28 修回日期:2020-06-03)
-
- (上接第 3514 页)
- [23] ZHANG Z, RAN Y, SHAW T S, et al. MicroRNAs 10a and 10b regulate the expression of human platelet glycoprotein Iba for normal megakaryopoiesis[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11):E1873.
- [24] 尹舒贤, 赵月华, 刘超, 等. 人源 Alu RNA 工程菌的构建和表达[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(7):88-96.
- [25] BAEK J H, SON H, JEONG Y H, et al. Chronological aging standard curves of telomere length and mitochondrial DNA copy number in twelve tissues of C57BL/6 male mouse[J]. Cells, 2019, 8(3):247.
- [26] PRISILA DULCY C, SINGH H K, PREETHI J, et al. Standardized extract of Bacopa monnifera (BESEB CDRI-08) attenuates contextual associative learning deficits in the aging rat's brain induced by D-galactose[J]. J Neurosci Res, 2012, 90(10):2053-2064.
- [27] MUKHERJEE A, HALDAR C. Melatonin membrane receptor (MT1R) expression and nitro-oxidative stress in testis of golden hamster, Mesocricetus auratus; an age-dependent study[J]. Exp Gerontol, 2015, 69:211-220.
- [28] TATONE C, DI EMIDIO G, VITTI M, et al. Sirtuin functions in female fertility: Possible role in oxidative stress and aging[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015:659687.
- (收稿日期:2020-01-18 修回日期:2020-06-02)