

反转录酶在微小 RNA 实时荧光定量聚合酶链反应中的作用

付瑶 刘海婷 施俊超 栾天 文静 张俊 张大军

作者单位: 110000 辽宁沈阳, 沈阳医学院药学院

通信作者: 张俊, Email: junjun376@163.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2023.02.020

【摘要】 目的 以微小 RNA(miRNA)作为检测样本,考察影响实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测结果的关键点,并筛选出最优的检测方法。**方法** 采用 3 种 miRNA 提取方法(分别使用 EasyPure[®] miRNA 提取试剂盒、miRNA 提取试剂盒、TransZol Up Plus RNA 提取试剂盒)和 3 种反转录方法(分别使用 TransScript[®] 第一链 cDNA 反转录试剂盒、Evo M-MLV 反转录试剂盒、miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒)处理大鼠纹状体脑区,检测 miRNA 与 cDNA 的质量和效率,并使用常规 RT-qPCR 检测 miRNA 水平,比较不同方法所得结果。**结果** 3 种 RNA 提取方法得到的 miRNA 质量和效率比较差异均有统计学意义,其中方法 2 的效果较好,但方法 1、2、3 的 RT-qPCR 结果比较差异无统计学意义(miR-132: 25.91 ± 9.79、25.26 ± 10.25、27.28 ± 7.39, miR-U6: 27.98 ± 11.25、25.98 ± 9.78、29.62 ± 9.65, 均 $P > 0.05$); 3 种反转录方法所得实验结果比较差异有统计学意义,方法 3 所得结果明显低于方法 1、方法 2(miR-132: 16.53 ± 3.17 比 35.20 ± 1.06、31.42 ± 2.95, miR-U6: 16.63 ± 1.73 比 36.06 ± 2.57、35.59 ± 1.54, 均 $P < 0.05$),主要影响 RT-qPCR 的扩增效率和扩增特异性。**结论** 使用能高效富集约 18 nt 大小 RNA 的提取方法和在 miRNA 的 3' 末端加多聚 A 尾(Poly A)的反转录酶,可以得到更可靠的 RT-qPCR 结果。

【关键词】 实时荧光定量聚合酶链反应; 微小 RNA; 提取方法; 反转录方法

基金项目: 辽宁省科技厅自然科学基金项目(2020-MS-313); 沈阳医学院大创项目(20198030)

Role of reverse transcriptase in micro RNA real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

Fu Yao, Liu Haiting, Shi Junchao, Luan Tian, Wen Jing, Zhang Jun, Zhang Dajun. School of Pharmacy, Shenyang Medical College, Shenyang 110000, Liaoning, China

Corresponding author: Zhang Jun, Email: junjun376@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the key points that affect the results of real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), and to select the optimal detection method using micro RNA (miRNA) as the detection sample. **Methods** Three miRNA extraction methods (including EasyPure[®] miRNA Kit, miRNeasy Mini Kit, TransZol Up Plus RNA Kit) were used and three reverse transcription methods (including TransScript[®] All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR, Evo M-MLV reverse transcription kit, and All-in-One miRNA First-Strand cDNA) were used to treat the brain region of rat striatum, detect the quality and efficiency of miRNA and cDNA. The content of miRNA by conventional RT-qPCR method was detected, and the results obtained by different methods were compared. **Results** There were significant differences in the quality and efficiency of miRNA obtained by three RNA extraction methods. Among them, method 2 had a better effect, but there was no significant difference in the RT-qPCR results of methods 1, 2 and 3 (miR-132: 25.91 ± 9.79, 25.26 ± 10.25, 27.28 ± 7.39, miR-U6: 27.98 ± 11.25, 25.98 ± 9.78, 29.62 ± 9.65, all $P > 0.05$). The experimental results obtained by the three reverse transcription methods showed statistically significant differences, with the results obtained by method 3 being significantly lower than those obtained by methods 1 and 2 (miR-132: 16.53 ± 3.17 vs. 35.20 ± 1.06, 31.42 ± 2.95, miR-U6: 16.63 ± 1.73 vs. 36.06 ± 2.57, 35.59 ± 1.54, all $P < 0.05$), which mainly affected the amplification efficiency and specificity of RT-qPCR. **Conclusion** Using an extraction method that could efficiently enrich approximately 18 nt sized RNA and adding poly A tail reverse transcriptase at the 3' end of miRNA could obtain more reliable RT-qPCR results.

【Key words】 Real time quantitative polymerase chain reaction; Micro RNA; Extraction method; Reverse transcription method

Fund Program: Natural Science Foundation Project of Science and Technology Department of Liaoning Province (2020-MS-313); Dachuang Project of Shenyang Medical College (20198030)

实时荧光定量聚合酶链反应(real time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)作为一种高效、灵敏的基因检测技术,是检测各种类型病原微生物的常用方法,也常用于基因检测^[1-2]。目前广泛采用 RT-qPCR 作为新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)检测的首选方法^[3-4]。但是在 RT-qPCR 的应用中也存在因其敏感度高导致结果容易出现假阳性,且因检测样本极易受到污染,从而造成检测结果不准确的问题,特别是针对片段长度较短的 DNA 和 RNA 样本,容易出现假阳性或假阴性结果。

微小 RNA (micro RNA, miRNA) 作为一类内源性的、长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,可通过几个 miRNA 的组合来精细调控某个基因的表达。miRNA 有多种存在形式,能够在组织样本和无细胞生物液体(如血清或血浆)中被检测到,且已被证明会影响多种重要的生物学过程,如细胞生长、组织分化、细胞增殖、胚胎发育和细胞凋亡^[5]。本研究拟选择 miR-132 和 miR-U6 作为检测对象,分析影响 RT-qPCR 实验结果的关键点,并筛选最优检测方法,现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 3 种 miRNA 提取方法 提取方法 1: 使用 Easy Pure[®] miRNA 提取试剂盒(由北京全式金生物公司提供);提取方法 2: 使用 miRNA 提取试剂盒(由德国 QIAGEN 生物公司提供);提取方法 3: 使用 Trans Zol Up Plus RNA 提取试剂盒(由北京全式金生物公司提供)。

1.1.2 3 种反转录方法 反转录方法 1: 使用 Trans Script[®] 第一链 cDNA 反转录试剂盒(北京全式金生物公司);反转录方法 2: 使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒(湖南艾科瑞生物工程有限公司);反转录方法 3: 使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司)。

1.1.3 其他仪器与试剂 使用超微量紫外可见分光光度计[购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司]检测 miRNA 和 cDNA 浓度与纯度,使用 Light Cycler 480 实时定量 PCR 仪(购自德国罗氏公司)通过常规 RT-qPCR 检测 miRNA 含量。引物为 All-in-One TM miRNA qPCR 引物(购自美国 GeneCopoeia 公司);RT-qPCR 试剂盒为 All-in-One TM miRNA qPCR 检测试剂盒 2.0,购自美国 GeneCopoeia 公司。

1.2 研究方法

1.2.1 miRNA 提取方法 总体步骤:①取 100 mg 组织,加入 1 mL 裂解液,混匀后于室温静置 5 min;②每使用 1 mL 裂解液加入 200 μ L 氯仿剧烈振荡 30 s 后,室温孵育 3 min;③以 $\geq 10\,000\times g$ 于 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,转移上层无色水相于新的 1.5 mL 无酶 EP 管中,加入无水乙醇,颠倒混匀;④将溶液和沉淀全部转移,加入离心柱中,12 000 $\times g$ 离心 30 s,弃去收集管中的液体;⑤加入洗脱液 I,12 000 $\times g$ 离心 30 s,弃去收集管中的液体,重复此步骤 1 次;⑥加入洗脱液 II,12 000 $\times g$ 离心 30 s,弃去收集管中的液体,重复该步骤 1 次;⑦于室温下 12 000 $\times g$ 离心 2 min,彻底去除残留乙醇;⑧将离心柱放入 1.5 mL 无酶离心管中,在离心柱中央加入 30~50 μ L 双蒸水,室温静置 1 min;⑨12 000 $\times g$ 离心 1 min,洗脱 miRNA,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存;⑩测定 miRNA 的浓度及不同波长下的吸光度(A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280})值。详细方法请参照试剂盒公司官网。

1.2.2 反转录方法 方法 1:使用 Trans Script[®] 第一链 cDNA 反转录试剂盒,依次加入 4 μ L 的 5 \times Trans Script[®] qPCR 第一链混合液、1 μ L 的基因 DNA (gene DNA, gDNA) 去除试剂、0.1 ng~1 μ g 的 miRNA,并加入双蒸水补足体积至 20 μ L。反转录反应条件为 42 $^{\circ}$ C 反应 15 min,85 $^{\circ}$ C 反应 5 s,于 4 $^{\circ}$ C 保存。

方法 2:使用 Evo M-MLV 反转录试剂盒,第一步依次加入 2 μ L 的 5 \times gDNA 缓冲液、1 μ L 的 gDNA 洗涤液、1 μ g 的总 RNA,并加入双蒸水补足体积至 10 μ L,42 $^{\circ}$ C 反应 2 min。第二步依次加入 10 μ L 上一步反应液、1 μ L 的 Evo-M-MLVRTase 混合酶、1 μ L 的 Oligo dT(18T) 引物(50 μ mol/L)、1 μ L 的随机 6 mers 引物(100 μ mol/L)、4 μ L 的 5 \times 反转录酶反应缓冲液混合物 I、3 μ L 双蒸水,随后 37 $^{\circ}$ C 反应 15 min,85 $^{\circ}$ C 反应 5 s,4 $^{\circ}$ C 保存。

方法 3:使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒,依次加入 0.1 ng~1 μ g 的 miRNA、1 μ L 的 2 U/ μ L 多聚 A 尾聚合酶、1 μ L 的 Sure Script TM 反转录酶混合液(20 \times)、4 μ L 的 5 \times PAP/RT 缓冲液,并加入双蒸水,补足体积至 20 μ L。反转录反应条件为 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min,85 $^{\circ}$ C 反应 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

最后,测量总 cDNA 的浓度及 A_{230} 、 A_{260} 、 A_{280} 值,分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱里。

1.2.3 RT-qPCR 方法 经反转录过程得到的 cDNA 可以直接进行 RT-qPCR 分析,本研究采用荧光实

时定量 PCR 试剂盒进行 RT-qPCR 反应,各反应体系见表 1。根据以下反应条件进行实时荧光定量 PCR,各反应条件见表 2。

表 1 RT-qPCR 反应体系

组分	体积(μL)	终浓度($\mu\text{mol/L}$)
2 \times All-in-One TM qPCR 混合物	10	1 \times
cDNA	2	
All-in-One TM miRNA qPCR 引物 (2 $\mu\text{mol/L}$)	2	0.2
通用 PCR 引物(50 $\mu\text{mol/L}$)	0.08	0.2
双蒸水	20	

注:RT-qPCR 为实时荧光定量聚合酶链反应;miRNA 为微小 RNA

表 2 RT-qPCR 扩增程序

序号	步骤	温度($^{\circ}\text{C}$)	时间	循环数
1	预变性	95	10 min	1
	变性	95	10 s	
2	退火	60	20 s	45
	延伸	72	10 s, 信号检测	
		95	60 s	
3	测定溶解曲线	40	60 s	1
		65	1 s	
		95	0.02 $^{\circ}\text{C}$, 30 s	
4	冷却	40	30 s	

注:RT-qPCR 为实时荧光定量聚合酶链反应

1.3 统计学分析 所有数据均使用 GraphPad Prism 5.0 和 SPSS 23.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miRNA 提取 与 DNA 相比, RNA 极其容易被分解,这主要由于 RNA 自身的不稳定性以及 RNase 的存在。因此,需要检测 RNA 浓度来确定其质量是否符合要求。此外,除了 RNA 浓度, A_{260}/A_{280} 和 A_{260}/A_{230} 也可以反映 RNA 的纯度:当 A_{260}/A_{280} 处于 1.9 ~ 2.1,则表示 RNA 纯度较高; $A_{260}/A_{280} < 1.9$ 提示可能有蛋白杂质残留, $A_{260}/A_{280} > 2.1$ 则提示 RNA 可能存在降解。 A_{260}/A_{230} 在 2.0 左右表示 RNA 无污染, A_{260}/A_{230} 值越小则越可能存在盐离子残留。因此,相较于方法 1 和方法 3,方法 2 的样本 miRNA 浓度和纯度均更高。见表 3,图 1。

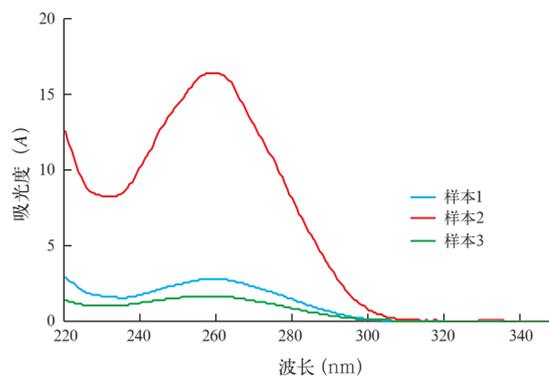
2.2 miRNA 反转录 使用 3 种方法提取 miRNA 后,将 3 个 miRNA 样本分别采用 3 种方法进行反转录,同时检测 cDNA 浓度、 A_{260} ,计算 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} 。结果显示,方法 3 的反转录效果更好。但反转录后的产物是一个混合体系,存在 cDNA、未完全反转录的 RNA、脱氧核糖核苷三磷酸(deoxy-ribonucleoside

triphosphate, dNTP)、各种蛋白和盐离子等成分,会干扰 cDNA 的吸光度。因此,要确定哪种方法效果更好,主要取决于 RT-qPCR 实验结果。见表 4,图 2。

表 3 3 种提取方法的 miRNA 浓度测定结果

样本	核酸($\mu\text{g/L}$)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	112.826	2.821	1.448	1.948	1.666
2	656.654	16.416	7.937	2.068	1.979
3	68.146	1.704	0.878	1.940	1.606

注:miRNA 为微小 RNA, A 为吸光度值



注:miRNA 为微小 RNA

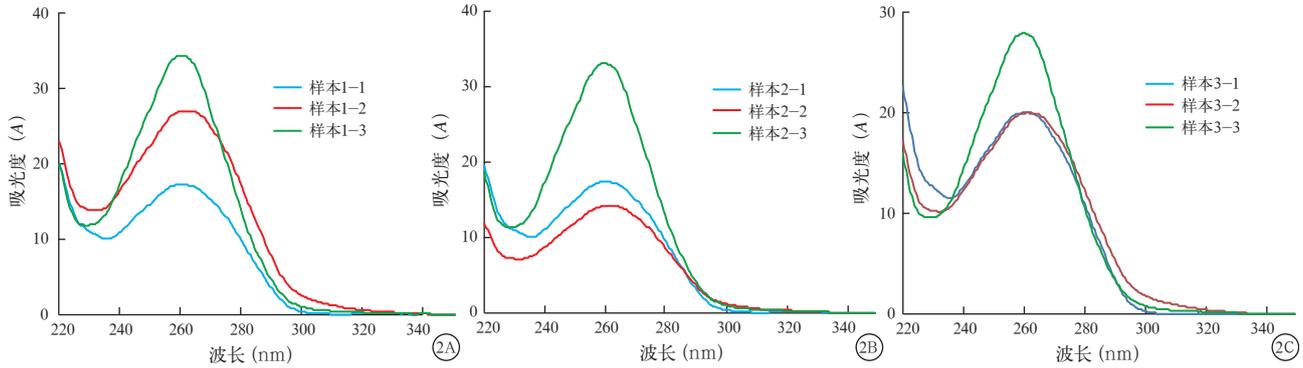
图 1 3 种 miRNA 提取方法的样本吸光度值

表 4 三种反转录方法的 cDNA 浓度测定结果

miRNA 提取方法	反转录方法	核酸($\mu\text{g/L}$)	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	1	565.977	17.151	9.491	1.807	1.570
	2	886.469	26.863	16.659	1.612	1.951
	3	1 131.335	34.283	13.147	2.608	2.906
2	1	570.417	17.285	9.596	1.801	1.587
	2	464.040	14.062	8.594	1.636	1.977
	3	1 087.027	32.940	12.956	2.543	2.901
3	1	660.237	20.007	11.062	1.809	1.589
	2	657.973	19.939	12.426	1.605	1.945
	3	920.377	27.890	10.767	2.590	2.899

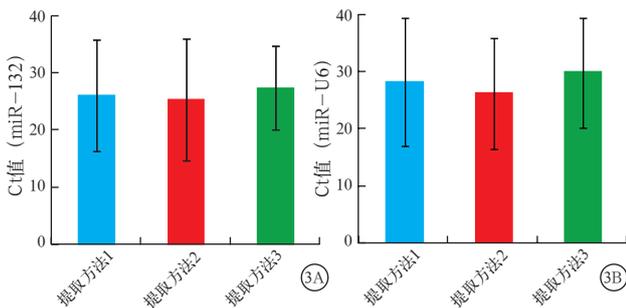
注:miRNA 为微小 RNA, A 为吸光度值

2.3 RT-qPCR 结果 在 RT-qPCR 中目的基因 RNA 可检测扩增的指标被图形化地称为定量周期,通常被定义为周期阈值(cycle threshold, Ct 值)^[3]。Ct 值过大或过小都会导致检测失败。因此,本研究通过控制变量(RNA/cDNA),以及组间两两比较对 Ct 值进行统计学分析。比较不同 RNA 提取方法所得结果可见,miR-132 与 miR-U6 在 RT-qPCR 中的 Ct 值比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3,表 5,这提示 miRNA 的提取方法对 RT-qPCR 的结果影响较小。同时,在反转录方法不同时,可以看到方法 3 与其他两组的差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 4,表 6。因此判断反转录过程对 RT-qPCR 方法检测 miRNA 含量的结果影响较大。



注：2A、2B、2C 分别为 miRNA 样本 1、2、3 通过 3 种反转录方法所得 cDNA 样本吸光度值

图 2 三种 cDNA 样本吸光度值



注：RT-qPCR 为实时荧光定量聚合酶链反应，miRNA 为微小 RNA，Ct 为周期阈值；3A 为采用不同 miRNA 提取方法以 RT-qPCR 检测同一样本的 miR-132 含量；3B 为采用不同 miRNA 提取方法以 RT-qPCR 检测同一样本的 miR-U6 含量

图 3 不同 miRNA 提取方法在 RT-qPCR 检测中的 Ct 值

表 5 不同 miRNA 提取方法在 RT-qPCR 检测中的 Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)

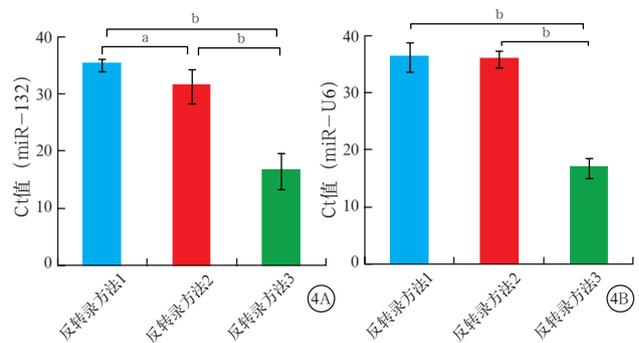
组别	样本数 (份)	Ct 值	
		miR-132	miR-U6
提取方法 1	9	25.91 ± 9.79	27.98 ± 11.25
提取方法 2	6	25.26 ± 10.25	25.98 ± 9.78
提取方法 3	6	27.28 ± 7.39	29.62 ± 9.65
t 值		0.073	0.214
P 值		0.930	0.809

注：miRNA 为微小 RNA，RT-qPCR 为实时荧光定量聚合酶链反应，Ct 为周期阈值

3 讨论

RT-qPCR 可基于分子技术来检测在基因表达中目标 mRNA 的相对定量，也是检测 miRNA 的常用的方法之一。RT-qPCR 具有较高的敏感度和特异度，广泛应用于病原微生物的快速检测。这些特性使它成为在临床样本中快速检测具有大流行潜力的致命病原体（如 SARS-CoV-2）的最佳选择^[6]。但使用常规的 RT-qPCR 方法检测序列较短的目的片段是有挑战性的。

miRNA 的长度通常只有 21~23 个碱基对，对于 RT-qPCR 来说，mRNA 到 cDNA 的反转录可以



注：RT-qPCR 为实时荧光定量聚合酶链反应，miRNA 为微小 RNA，Ct 为周期阈值；4A 为采用不同反转录方法使用 RT-qPCR 检测同一样本的 miR-132 含量；4B 为采用不同反转录方法使用 RT-qPCR 检测同一样本的 miR-U6 含量；^a $P < 0.05$ ，^b $P < 0.001$

图 4 不同 miRNA 反转录方法在 RT-qPCR 检测中的 Ct 值

表 6 不同 miRNA 反转录方法在 RT-qPCR 检测中的 Ct 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (份)	Ct 值	
		miR-132	miR-U6
反转录方法 1	6	35.20 ± 1.06	36.06 ± 2.57
反转录方法 2	6	31.42 ± 2.95	35.59 ± 1.54
反转录方法 3	9	16.53 ± 3.17	16.63 ± 1.73
t 值		103.600	224.500
P 值		0.000	0.000

注：miRNA 为微小 RNA，RT-qPCR 为实时荧光定量聚合酶链反应，Ct 为周期阈值

产生显著的可变性，其中同一样本的结果可以相差 2~3 倍，这取决于 RT-qPCR 反应中使用 mRNA 的浓度和纯度^[1,7]。同样，使用普通的 mRNA 反转录方法无法得到足量 cDNA，因此 miRNA 的反转录要求将 miRNA 序列进行延长，可以使用到的延长方法包括茎环法和加尾法；且传统的 PCR 引物长度约为 20 个碱基对，因此在设计 PCR 引物的技术上具有挑战性^[8]。同时，使用特异性模板的 qPCR 通常会比单核苷酸差异的模板增加 10~100 倍的扩增信号，但使用 PCR 区分仅相差 1~2 个核苷酸的 miRNA 仍然是一个挑战^[9]。

研究表明,使用不同的 miRNA 提取方法得到的 RT-qPCR 结果比较差异无统计学意义,但可从 miRNA 的效率和质量判断出提取方法 2 效果更好;使用不同反转录方法得到的 RT-qPCR 结果比较差异有统计学意义。

与传统的基于 RT-qPCR 技术分析蛋白编码基因 mRNA 表达的方法相比,检测 miRNA 的表达水平具有特殊性和挑战性。首先,传统的 RT-qPCR 检测核苷酸序列较短的 miRNA 更加困难。其次,RT-qPCR 对于检测的表达水平差异很大(从每个细胞只有少量到 >100 000 个拷贝不等)的 miRNA 是有挑战的。最后,miRNA 不仅长度短,且序列相似,这也增加了 RT-qPCR 检测的难度。因此,许多可用的方法都利用了特殊的反转录操作步骤,以促进 PCR 扩增及其鉴定,如在反转录阶段通过茎环引物法或加尾法延长 cDNA 的长度,以满足上、下游引物、荧光探针等与 cDNA 互补结合的需求,保证后续的 RT-qPCR 过程^[10-11]。因此,针对 miRNA 或其他序列较短的 RNA,在反转录步骤中采用特殊的反转录酶是有必要的。

近年来,miRNA 也在不同领域研究中广泛得到应用,在机体的不同组织或同一组织的不同发育阶段及多种癌症组织中,miRNA 表达具有一定的差异性,如 miR-132 在神经系统疾病^[12]、精神疾病^[13]、免疫系统疾病^[14]以及癌症^[15]中都发挥着不同的调节作用。因此,后续研究可以针对不同种类样本进行分析,以便更好发现 miRNA 的表达差异情况。

综上所述,本研究考察了不同 miRNA 提取方法和不同反转录方法对 RT-qPCR 结果的影响,筛选出最佳方法,同时对 miRNA 在临床应用研究中的检测提供了重要参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 1 TAYLOR S C, NADEAU K, ABBASI M, et al. The ultimate qPCR experiment: producing publication quality, reproducible data the first time [J]. *Trends Biotechnol*, 2019, 37 (7): 761-774. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.12.002.
- 2 王瑜.聚合酶链反应检验应用于肺结核早期诊断的准确性评价 [J]. *实用检验医师杂志*, 2022, 14 (4): 361-364. DOI: 10.3969/

- j.issn.1674-7151.2022.04.007.
- 3 SULE W F, OLUWAYELU D O. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects [J]. *Pan Afr Med J*, 2020, 35 (Suppl 2): 121. DOI: 10.11604/pamj.supp.2020.35.24258.
- 4 陶伍元,邓柳霞,李晓萍.脓毒症急性肾损伤患者血清 miR-125b-5p 的表达水平及意义 [J]. *实用检验医师杂志*, 2022, 14 (3): 299-302. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2022.03.019.
- 5 CHEN L, HEIKKINEN L, WANG C, et al. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20 (5): 1836-1852. DOI: 10.1093/bib/bby054.
- 6 WINK P L, VOLPATO F, LIMA-MORALES D, et al. RT-qPCR half-reaction optimization for the detection of SARS-CoV-2 [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2021, 54: e03192020. DOI: 10.1590/0037-8682-0319-2020.
- 7 ROCHA D, CASTRO T, AGUIAR E, et al. Gene expression analysis in bacteria by RT-qPCR [J]. *Methods Mol Biol*, 2020, 2065: 119-137. DOI: 10.1007/978-1-4939-9833-3_10.
- 8 HILL M, TRAN N. miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2021, 14 (4): DOI: 10.1242/dmm.047662.
- 9 LU T X, ROTHENBERG M E. MicroRNA [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2018, 141 (4): 1202-1207. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.034.
- 10 FORERO D A, GONZALEZ-GIRALDO Y, CASTRO-VEGA L J, et al. qPCR-based methods for expression analysis of miRNAs [J]. *Biotechniques*, 2019, 67 (4): 192-199. DOI: 10.2144/btn-2019-0065.
- 11 李炳灿,周培森,殷佳娜,等.微小 RNA-1 调节缺氧/复氧后 H9c2 心肌细胞凋亡的机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (10): 1232-1236. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210623-00940.
- 12 WALGRAVE H, BALUSU S, SNOECK S, et al. Restoring miR-132 expression rescues adult hippocampal neurogenesis and memory deficits in Alzheimer's disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2021, 28 (10): 1805-1821.e8. DOI: 10.1016/j.stem.2021.05.001.
- 13 SALAMA I I, SALAMA S I, ELMOSALAMI D M, et al. Risk factors associated with mild cognitive impairment among apparently healthy people and the role of microRNAs [J]. *Open Access Maced J Med Sci*, 2019, 7 (19): 3253-3261. DOI: 10.3889/oamjms.2019.834.
- 14 AHMED R F, SHAKER O G, ABDELGHANY H M, et al. Role of micro-RNA132 and its long non coding SOX2 in diagnosis of lupus nephritis [J]. *Lupus*, 2022, 31 (1): 89-96. DOI: 10.1177/09612033211067166.
- 15 IBRAHIM H M, ISMAIL M B, AMMAR R B, et al. Thidiazuron suppresses breast cancer *via* targeting miR-132 and dysregulation of the PI3K-Akt signaling pathway mediated by the miR-202-5p-PTEEN axis [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99 (3): 374-384. DOI: 10.1139/bcb-2020-0377.

(收稿日期: 2023-04-17)

(本文编辑: 邵文)