doi：10.7499/j.issn.1008-8830.2505067

论著·实验研究

miR-30b/USP14 轴通过非 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬在神经元氧糖剥夺/复氧损伤中的作用研究

贝雨航　于康　王霞

（中南大学湘雅医院儿科，湖南长沙　410008）

［摘要］**目的**　探讨微小 RNA（microRNA, miR）-30b 通过调控泛素特异性肽酶 14（ubiquitin specific peptidase 14, USP14）影响非 PTEN 诱导激酶 1（PTEN-induced kinase 1, PINK1）/Parkin 通路依赖性线粒体自噬在神经元氧糖剥夺/复氧（oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R）损伤中的作用机制，为新生儿缺氧缺血性脑病的治疗提供新思路。**方法**　分离胎鼠皮层神经元并建立 OGD/R 模型。实验分为两部分：（1）将细胞随机分为对照组、OGD/R 组、OGD/R+miR 阴性对照（miR-NC）组、OGD/R+miR-30b 模拟物（mimic）组、OGD/R+miR-30b mimic+过表达阴性对照组（oe-NC）组、OGD/R+miR-30b mimic+USP14 过表达（oe-USP14）组；（2）另取细胞随机分为对照组、OGD/R 组、OGD/R+miR-NC 组、OGD/R+miR-30b mimic 组、OGD/R+miR-30b mimic+siRNA 阴性对照（si-NC）组、OGD/R+miR-30b mimic+siRNA 敲降 Parkin（si-Parkin）组、OGD/R+miR-30b mimic+siRNA 敲降动力相关蛋白 1（dynamin-related protein 1, Drp1）（si-Drp1）组。通过实时荧光定量 PCR 检测 miR-30b、USP14 mRNA 表达水平，CCK-8 检测细胞活力，碘化丙啶（propidium iodide, PI）染色检测细胞死亡情况，Western blot 法检测 USP14、微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3）Ⅱ/LC3 Ⅰ、线粒体外膜转位酶 20（translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20）、PINK1、Parkin、Drp1 蛋白表达水平，MitoTracker Green 染色检测线粒体形态变化，MitoSOX Red 荧光探针检测线粒体活性氧（reactive oxygen species, ROS）水平，AGO_2-RNA 免疫共沉淀实验和双萤光素酶报告基因实验验证 miR-30b 与 USP14 的靶向结合关系。**结果**　与 OGD/R 组相比，OGD/R 组+miR-30b mimic 组细胞活力、miR-30b 表达、LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例、Drp1 蛋白表达升高（$P<0.05$），PI 阳性率、线粒体 ROS 水平、USP14 mRNA 和蛋白表达、TOMM20 蛋白表达、线粒体碎片化指数、线粒体体积降低（$P<0.05$）；两组 PINK1、Parkin 蛋白表达水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。与 OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组相比，OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 组细胞活力、miR-30b 表达、LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例降低（$P<0.05$），PI 阳性率、线粒体 ROS 水平、USP14 mRNA 和蛋白表达、TOMM20 蛋白表达、线粒体碎片化指数、线粒体体积升高（$P<0.05$）。miR-30b 可靶向调节 USP14 的表达。与 OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 与 OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin 组 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例、碎片化指数、线粒体平均体积比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；与 OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组比较，OGD/R+ miR-30b mimic+si-Drp1 组 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例降低，碎片化指数、线粒体平均体积升高（$P<0.05$）。**结论**　miR-30b 通过靶向抑制 USP14，独立于 PINK1/Parkin 通路调控线粒体自噬，对氧糖剥夺/复氧神经元损伤发挥保护作用。［中国当代儿科杂志，2025，27（12）：1526-1534］

［关键词］缺氧缺血性脑病；线粒体自噬；PINK1/Parkin 通路；微小 RNA-30b；泛素特异性肽酶 14；神经元

The miR-30b/USP14 axis regulates mitophagy via a non-PINK1/Parkin pathway in neuronal oxygen-glucose deprivation/reoxygenation injury

BEI Yu-Hang, YU Kang, WANG Xia. Department of Pediatrics, Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China (Wang X, Email: wangxiachen@163.com)

［收稿日期］2025-05-15；［接受日期］2025-11-06
［基金项目］湖南省自然科学基金（2022JJ30967）。
［作者简介］贝雨航，男，硕士研究生。
［通信作者］王霞，女，教授。Email：wangxiachen@163.com。

Abstract: Objective To investigate how miR-30b regulates mitophagy independently of the PINK1/Parkin pathway by targeting ubiquitin specific peptidase 14 (USP14) in neuronal oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury, and to provide new insights for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. **Methods** Fetal rat cortical neurons were isolated and an OGD/R model was established. Experiments were conducted in two parts. In part 1, cells were randomized into control, OGD/R, OGD/R+microRNA (miR)-negative control (NC), OGD/R+miR-30b mimic, OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC, and OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 groups. In part 2, cells were randomized into control, OGD/R, OGD/R+miR-NC, OGD/R+miR-30b mimic, OGD/R+miR-30b mimic+si-NC, OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin, and OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 (dynamin-related protein 1) groups. miR-30b and USP14 mRNA levels were measured by real-time quantitative PCR. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay and cell death by propidium iodide staining. Protein levels of USP14, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) II/LC3 I, translocase of outer mitochondrial membrane 20 (TOMM20), PINK1, Parkin, and Drp1 were determined by Western blot. MitoTracker Green staining was used to evaluate mitochondrial morphology, and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) were measured using the MitoSOX Red probe. AGO_2-RNA immunoprecipitation and dual-luciferase reporter assays were performed to validate the targeting relationship between miR-30b and USP14. **Results** Compared with the OGD/R group, the OGD/R+miR-30b mimic group showed higher cell viability, miR-30b expression, LC3 II/LC3 I ratio, and Drp1 protein expression (P<0.05), and lower PI positivity, mitochondrial ROS, USP14 mRNA and protein expression, TOMM20 protein expression, mitochondrial fragmentation index, and mitochondrial volume (P<0.05). PINK1 and Parkin protein levels did not differ significantly between these two groups (P>0.05). Compared with the OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC group, the OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 group exhibited reduced cell viability, miR-30b expression, and LC3 II/LC3 I ratio (P<0.05), and increased PI positivity, mitochondrial ROS, USP14 mRNA and protein expression, TOMM20 protein expression, mitochondrial fragmentation index, and mitochondrial volume (P<0.05). miR-30b was confirmed to target USP14. In addition, no significant differences were observed between the OGD/R+miR-30b mimic+si-NC and OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin groups in LC3 II/LC3 I ratio, fragmentation index, or average mitochondrial volume (P>0.05). Compared with the OGD/R+miR-30b mimic+si-NC group, the OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 group showed a decreased LC3 II/LC3 I ratio and increased fragmentation index and average mitochondrial volume (P<0.05). **Conclusions** miR-30b regulates mitophagy by targeting USP14 independently of the PINK1/Parkin pathway, and confers protection against neuronal OGD/R injury.

[Chinese Journal of Contemporary Pediatrics, 2025, 27(12): 1526-1534]

Key words: Hypoxic-ischemic encephalopathy; Mitophagy; PINK1/Parkin pathway; MicroRNA-30b; Ubiquitin specific peptidase 14; Neuron

新生儿缺氧缺血性脑病（hypoxic-ischemic encephalopathy, HIE）是一种由围产期脑血流和氧供不足导致的严重神经系统综合征，约50%的存活患儿会遗留永久性神经功能障碍甚至死亡[1]。虽然亚低温治疗是目前唯一被证实有效的神经保护措施，但其疗效受治疗时间窗、设备条件等因素限制，且仅能提供部分神经保护[2]。因此，探索HIE新的治疗靶点具有重要临床意义。近年研究发现，神经元能量代谢障碍是HIE的核心病理特征，其中线粒体功能障碍在疾病进展中起关键作用[3]。作为维持线粒体质量的重要机制，线粒体自噬通过选择性清除受损线粒体参与神经保护[4]，但其在HIE中的调控网络尚未完全阐明。

研究表明，HIE患儿脑组织中微小RNA（microRNA, miR）-30b表达显著下调[5-6]，而该分子已被证实可通过促进线粒体自噬改善神经功能[7]。在我们前期研究中，通过生信预测分析发现去泛素化酶泛素特异性肽酶14（ubiquitin specific peptidase 14, USP14）可能是miR-30b的下游靶点。值得注意的是，USP14抑制剂可通过不依赖经典PTEN诱导激酶1（PTEN-induced kinase 1, PINK1）/Parkin通路的方式促进线粒体自噬，改善神经退行性疾病模型中的线粒体功能障碍[8]。然而，miR-30b/USP14调控轴在HIE中的作用机制，特别是其是否通过非经典通路调控线粒体自噬尚不清楚。本研究旨在阐明miR-30b通过靶向USP14调控线粒体自噬的分子机制，验证该过程对PINK1/Parkin通路的独立性，为开发新型HIE治疗策略提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 胎鼠皮层神经元氧糖剥夺/复氧模型构建

从C57BL/6胎鼠的大脑皮层中分离出初级皮层神经元[9]。分离的神经元在无葡萄糖和无氧的Dulbecco改良Eagle培养基（Gibco，美国）中孵育，并置于37℃缺氧室（StemCell Technologies，加拿大）培养4 h（95% N_2和5% CO_2），将细胞返

回到常温条件下，在正常完全培养基中培养24 h。si-Parkin、si-动力相关蛋白1（dynamin-related protein 1, Drp1）的序列以及过表达USP14质粒（oe-USP14）、miR-30b miRNA模拟物（miR-30b mimic）购自湖南丰晖生物科技有限公司。采用Lip3000转染试剂将以上序列和质粒分别转染进皮层神经元，48 h后收样。实验分为两部分：（1）将细胞随机分为对照组、氧糖剥夺/复氧（oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R）组、OGD/R+miR阴性对照（miR-NC）组、OGD/R+miR-30b mimic组、OGD/R+miR-30b mimic+过表达阴性对照组（oe-NC）组、OGD/R+miR-30b mimic+USP14过表达（oe-USP14）组；（2）另取细胞随机分为对照组、OGD/R组、OGD/R+miR-NC组、OGD/R+miR-30b mimic组、OGD/R+miR-30b mimic+siRNA阴性对照（si-NC）组、OGD/R+miR-30b mimic+siRNA敲降Parkin（si-Parkin）组、OGD/R+miR-30b mimic+siRNA敲降动力相关蛋白1（dynamin-related protein 1, Drp1）（si-Drp1）组。

1.2 实时荧光定量PCR检测miR-30b、USP14、Parkin、Drp1水平

提取样本总RNA后逆转录制备cDNA，随后在CFX Connect实时荧光定量PCR检测系统中进行检测，使用iQ SYBR Green Supermix试剂［伯乐生命医学产品（上海）有限公司］检测。以GAPDH作为内参，通过$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算目的基因相对表达量。实验独立重复3次。

1.3 Western blot检测

用RIPA裂解缓冲液裂解细胞，离心取上清，用BCA试剂盒（P0010S，上海碧云天生物技术有限公司）定量。取等量样品加入上样缓冲液后煮沸，进行电泳、转膜。用脱脂牛奶封闭PVDF膜，然后分别用抗微管相关蛋白1轻链3（microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3）Ⅰ抗体（1∶1 000；Thermo，美国）、LC3 Ⅱ抗体（1∶1 000；Thermo，美国）、抗线粒体外膜转位酶20（translocase of outer mitochondrial membrane 20, TOMM20）抗体（1∶2 000；Thermo，美国）、抗USP14抗体（1∶1 000；Thermo，美国）、抗PINK1抗体（1∶1 000；Thermo，美国）、抗Parkin抗体（1∶1 000；Thermo，美国）、抗Drp1抗体（1∶1 000；Abcam，美国）、抗GAPDH抗体（1∶1 000；Thermo，美国），4℃孵育过夜。加二抗（1∶1 000；Thermo，美国）室温孵育后洗膜，使用曝光液显影。采用Image J软件进行灰度分析，以GAPDH为内参。实验独立重复3次。

1.4 CCK-8检测细胞活力

细胞以3×10^4个细胞/mL的密度接种于96孔板，培养24 h后。每孔加入10 μL的CCK-8试剂（上海碧云天生物技术有限公司），37℃ 5% CO_2孵育2 h。用酶标仪（Synergy HTX，Agilent，美国）测定在450 nm波长处吸光度。实验独立重复3次。

1.5 碘化丙啶染色检测细胞死亡

细胞用预冷PBS洗涤后，4%多聚甲醛固定20 min，使用0.1% Triton X-100透膜处理10 min，再用1% BSA封闭内源性非特异抗原30 min，加入碘化丙啶（propidium iodide, PI）［1∶3 000，翌圣生物科技（上海）股份有限公司］染色液在黑暗中染色20 min，随后DAPI染细胞核5 min。用荧光显微镜（Nikon，日本）在每组样品中随机选取6个视场进行拍摄。实验独立重复3次。

1.6 线粒体活性氧水平检测

采用MitoSOX Red线粒体超氧化物检测试剂盒（上海碧云天生物技术股份有限公司）进行检测。消化并收集细胞，加入0.5 mL MitoSOX Red染色工作液，用PBS重悬细胞，通过流式细胞仪检测细胞线粒体活性氧（reactive oxygen species, ROS）含量。实验独立重复3次。

1.7 MitoTracker Green检测线粒体形态

离心去除细胞培养液，加入经37℃预温育的Mito-Tracker Green（Life Technologies，美国）染色工作液，于37℃避光孵育15~45 min。孵育结束后，弃去染色工作液，PBS洗涤细胞。使用激光共聚焦显微镜观察细胞线粒体形态并采集图像，利用Image J软件插件MitoLoc分析线粒体形态进，以体积/碎片指数进行量化。实验独立重复3次。

1.8 RNA免疫共沉淀检测miR-30b及USP14 mRNA与AGO_2的结合

收集细胞，使用RIPA裂解液于冰上裂解，将等量细胞裂解液分别与AGO_2抗体（Abcam，英国）或对照IgG抗体（Abcam，英国）以及protein A/G磁珠（Thermo Scientific，美国）混合，于4℃旋转孵育过夜。次日，使用酚-氯仿法从免疫沉淀复合物中提取总RNA。通过实时荧光定量PCR检测miR-30b与USP14 mRNA的富集水平。实验独立重复3次。

1.9 双萤光素酶报告基因实验验证miR-30b与USP14的靶向关系

将USP14野生型（USP14-WT）和突变型

（USP14-MUT）分别克隆至pmirGLO双萤光素酶报告基因载体（Promega，美国）。采用HEK293T细胞系，于含10%胎牛血清的DMEM培养基中，在37℃、5% CO_2条件下培养。细胞分为4组：miR-NC+USP14-WT组、miR-30b mimic+USP14-WT组、miR-NC+USP14-MUT组、miR-30b mimic+USP14-MUT组。待细胞密度达到70%~80%时，使用Lipofectamine™ 3000转染试剂（Thermo，美国）将USP14-WT或USP14-MUT与miR-30b mimic或miR-NC共转染至细胞中，培养48 h后，按照双萤光素酶试剂盒说明书检测各组细胞荧光素酶活性。实验独立重复3次。

1.10 统计学分析

采用SPSS 27.0软件对数据进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。两组间比较采用两样本t检验；多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达USP14后各组细胞活性及死亡情况比较

PI染色结果显示，OGD/R组PI阳性率较对照组升高（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic组PI阳性率较OGD/R+miR-NC组降低（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组PI阳性率较OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组升高（P<0.05）。见图1、表1。

CCK-8检测结果显示，OGD/R组细胞活力较对照组降低（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic组细胞活力较OGD/R+miR-NC组升高（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组细胞活力较OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组降低（P<0.05）。见表1。

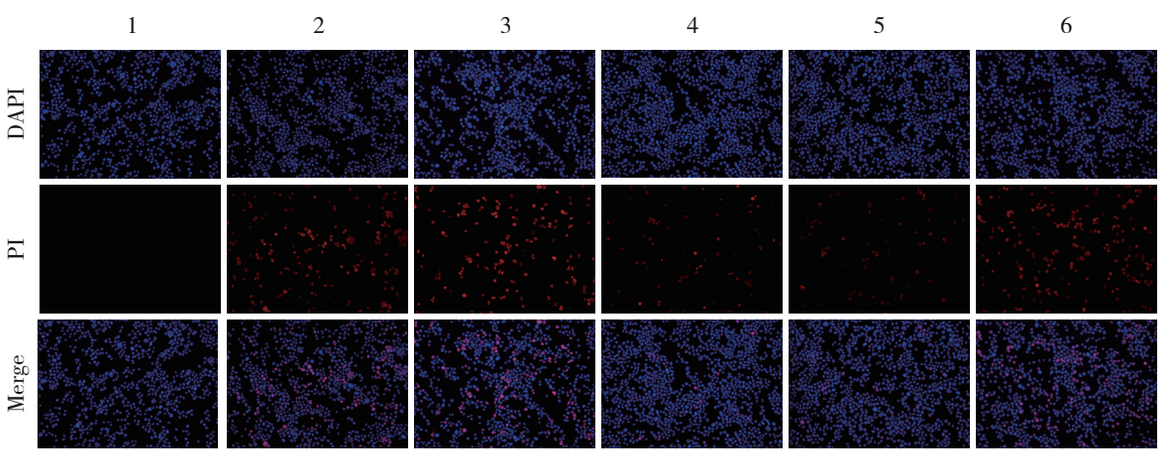


图1 各组细胞PI染色结果比较 1：对照组；2：OGD/R组；3：OGD/R+miR-NC组；4：OGD/R+miR-30b mimic组；5：OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组；6：OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组。蓝色荧光为细胞核，红色荧光为死细胞。OGD/R+miR-30b mimic组红色荧光较OGD/R+miR-NC组降低，OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组红色荧光较OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组升高。

2.2 过表达USP14后各组细胞miR-30b及USP14 mRNA表达水平比较

实时荧光定量PCR检测结果显示，与对照组相比，OGD/R组miR-30b表达水平降低，USP14 mRNA表达水平升高（P<0.05）；与OGD/R+miR-NC组相比，OGD/R+miR-30b mimic组miR-30b表达水平升高，USP14 mRNA表达水平降低（P<0.05）；与OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组相比，OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组miR-30b表达水平降低，USP14 mRNA表达水平升高（P<0.05）。见表1。

2.3 过表达USP14后各组细胞LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ、USP14、TOMM20蛋白表达水平比较

Western blot检测结果显示，与对照组相比，OGD/R组USP14蛋白表达、LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例升高，TOMM20蛋白表达降低（P<0.05）；与OGD/R+miR-NC组相比，OGD/R+miR-30b mimic组LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例升高，USP14、TOMM20蛋白表达降低（P<0.05）；与OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组相比，OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例降低，USP14、TOMM20蛋白表达升高（P<0.05）。见表1、图2。

表 1　过表达 USP14 后各组细胞中细胞活力、PI 阳性率、LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ、TOMM20 蛋白表达水平的比较　（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	细胞活力 (%)	PI 阳性率 (%)	miR-30b	USP14 mRNA	LC3 Ⅱ/ LC3 Ⅰ蛋白	TOMM20 蛋白	USP14 蛋白
对照组	100 ± 9	4.6 ± 1.8	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.07	0.83 ± 0.09	0.98 ± 0.06	0.32 ± 0.03
OGD/R 组	71 ± 6[a]	29.5 ± 2.0[a]	0.50 ± 0.07[a]	2.47 ± 0.09[a]	1.32 ± 0.10[a]	0.74 ± 0.04[a]	0.74 ± 0.10[a]
OGD/R+miR-NC 组	70 ± 4	32.1 ± 3.0	0.44 ± 0.03	2.45 ± 0.15	1.23 ± 0.17	0.75 ± 0.06	0.75 ± 0.05
OGD/R+miR-30b mimic 组	89 ± 4[b]	13.2 ± 1.8[b]	1.29 ± 0.09[b]	1.19 ± 0.13[b]	2.07 ± 0.19[b]	0.36 ± 0.05[b]	0.41 ± 0.09[b]
OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组	90 ± 5	13.7 ± 3.4	1.33 ± 0.08	1.27 ± 0.14	2.00 ± 0.28	0.36 ± 0.06	0.40 ± 0.09
OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 组	74 ± 5[c]	34.2 ± 2.0[c]	1.31 ± 0.22[c]	3.05 ± 0.06[c]	1.40 ± 0.09[c]	0.67 ± 0.09[c]	0.66 ± 0.06[c]
F 值	14.20	76.44	39.68	161.0	22.95	40.10	17.99
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较，P<0.05；b 示与 OGD/R+miR-NC 组比较，P<0.05；c 示与 OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组比较，P<0.05。［PI］碘化丙啶；［miR-30b］微小 RNA-30b；［USP14］泛素特异性肽酶 14；［LC3］微管相关蛋白 1 轻链 3；［TOMM20］线粒体外膜转位酶 20。

2.4　过表达 USP14 后各组细胞线粒体 ROS 水平及形态比较

MitoSOX Red 结果显示，OGD/R 组线粒体 ROS 水平较对照组升高（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic 组 ROS 水平较 OGD/R+miR-NC 组降低（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 组 ROS 水平较 OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组升高（P<0.05）。见表 2。

MitoTracker Green 染色结果显示，与对照组相比，OGD/R 组线粒体碎片化指数增加，线粒体体积减少（P<0.05）；OGD/R+miR-30b mimic 组线粒体碎片化指数、线粒体体积较 OGD/R+miR-NC 组减少（P<0.05）；OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 组线粒体碎片化指数、线粒体体积较 OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组增加。见表 2、图 3。

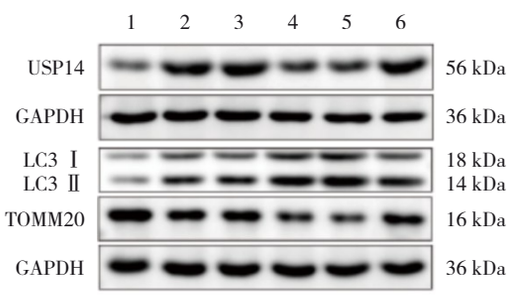


图 2　Western blot 检测各组细胞 LC3 Ⅰ/LC3 Ⅱ、TOMM20、USP14 蛋白表达条带图　1：对照组；2：OGD/R 组；3：OGD/R+miR-NC 组；4：OGD/R+miR-30b mimic 组；5：OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组；6：OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 组。［USP14］泛素特异性肽酶 14；［LC3］微管相关蛋白 1 轻链 3；［TOMM20］线粒体外膜转位酶 20。

表 2　过表达 USP14 后各组细胞线粒体 ROS 水平、碎片化指数以及线粒体平均体积的比较　（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	MitoSOX (%)	碎片化指数	线粒体平均体积/细胞 (a.u.)
对照组	6.1 ± 2.0	20.8 ± 1.8	297 292 ± 20 408
OGD/R 组	31.8 ± 3.4	31.3 ± 3.7[a]	242 695 ± 10 097[a]
OGD/R+miR-NC 组	31.4 ± 5.3	30.3 ± 2.4	239 526 ± 16 356
OGD/R+miR-30b mimic 组	17.6 ± 1.9[b]	22.5 ± 2.1[b]	192 222 ± 14 414[b]
OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组	16.6 ± 1.8	20.7 ± 2.8	203 234 ± 16 411
OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14 组	27.1 ± 4.3[c]	30.6 ± 2.6[c]	266 473 ± 17 551[c]
F 值	26.59	11.00	17.47
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较，P<0.05；b 示与 OGD/R+miR-NC 组比较，P<0.05；c 示与 OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC 组比较，P<0.05。

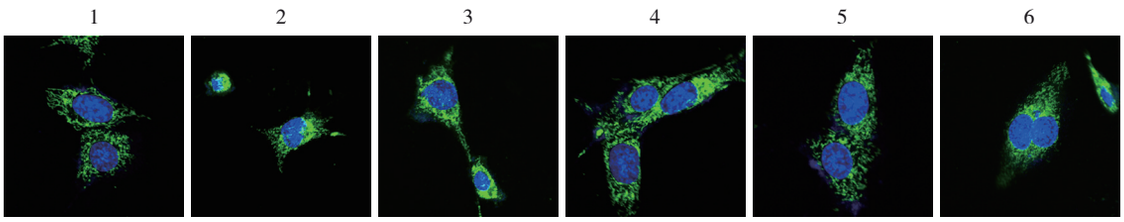


图3　MitoTracker Green染色检测各组细胞线粒体形态（激光共聚焦显微镜，×800）　1：对照组；2：OGD/R组；3：OGD/R+miR-NC组；4：OGD/R+miR-30b mimic组；5：OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组；6：OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组。蓝色为细胞核，绿色为线粒体。OGD/R+miR-30b mimic组线粒体碎片化程度、线粒体体积较OGD/R+miR-NC组减少，OGD/R+miR-30b mimic+oe-USP14组线粒体碎片化程度、线粒体体积较OGD/R+miR-30b mimic+oe-NC组增加。

2.5　miR-30b与USP14靶向关系验证

经TargetScan数据库预测发现，miR-30b与USP14之间存在结合位点（图4）。AGO_2-RIP实验结果显示，与IgG对照组（分别0.51±0.18、0.23±0.05）相比，AGO_2组miR-30b与USP14 mRNA富集水平升高（分别12.20±0.83、32.68±0.04；t=23.84、877.74，P<0.05）。双萤光素酶报告基因结果显示，与miR-NC+USP14-WT组（1.000±0.059）相比，miR-30b mimic+USP14-WT组（0.472±0.0182）荧光素酶活性降低（P<0.05）；与miR-NC+USP14-MUT（1.079±0.111）相比，mtiR-30b mimic+USP14-MUT组（1.013±0.037）荧光素酶活性无明显变化（P>0.05）。提示miR-30b与USP14存在靶向关系。

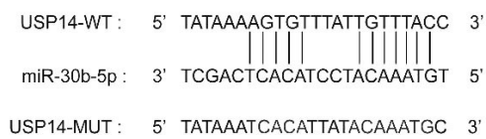


图4　Targetscan数据库预测miR-30b与USP14结合位点

2.6　敲降Parkin/Drp1后各组miR-30b、Parkin、Drp1 mRNA表达水平比较

实时荧光定量PCR检测结果显示，与OGD/R+miR-30b mimic组相比，OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin组Parkin mRNA表达水平降低（P<0.05），OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1组Drp1 mRNA表达水平降低（P<0.05），表明Parkin、Drp1敲降成功（P<0.05）。见表3。

表3　各组miR-30b与Parkin、Drp1 mRNA和蛋白及LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	mRNA			蛋白		
	miR-30b	Parkin	Drp1	Parkin	Drp1	LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ
对照组	1.00±0.06	1.01±0.09	0.99±0.05	0.39±0.05	0.35±0.06	0.96±0.10
OGD/R组	0.50±0.07[a]	2.15±0.16[a]	1.53±0.03[a]	0.70±0.06[a]	0.60±0.09[a]	1.36±0.11[a]
OGD/R+miR-NC组	0.51±0.07	2.05±0.11	1.52±0.06	0.71±0.09	0.61±0.08	1.42±0.09
OGD/R+miR-30b mimic组	1.39±0.14[b]	2.08±0.16[b]	2.23±0.10[b]	0.80±0.07[b]	0.96±0.06[b]	1.98±0.15[b]
OGD/R+miR-30b mimic+si-NC组	1.32±0.09	2.20±0.20	2.28±0.10	0.79±0.08	0.94±0.07	2.00±0.17
OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin组	1.38±0.10	0.78±0.05[c]	2.23±0.06	0.49±0.09[c]	0.95±0.13	1.93±0.07
OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1组	1.32±0.12	2.23±0.11	1.10±0.10[c]	0.86±0.09	0.57±0.05[c]	1.44±0.13[c]
F值	45.85	58.04	148.13	13.65	24.28	28.77
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a示与对照组比较，P<0.05；b示与OGD/R+miR-NC组比较，P<0.05；c示与OGD/R+miR-30b mimic+si-NC组比较，P<0.05。［miR-30b］微小RNA-30b；［Drp1］动力相关蛋白1；［LC3］微管相关蛋白1轻链3。

2.7　各组LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ、PINK1、Parkin、Drp1蛋白表达水平比较

Western blot检测结果显示，与对照组相比，OGD/R组PINK1、Parkin、Drp1蛋白表达水平升高（P<0.05）；OGD/R组与OGD/R+miR-30b mimic组PINK1、Parkin蛋白表达水平比较差异无统计学意义（P>0.05）；OGD/R+miR-30b mimic组Drp1蛋白表达水平较OGD/R组升高（P<0.05）（图5A、表4）。敲降Parkin/Drp1后，OGD/R+miR-30b mimic+si-NC组与OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin组LC3

Ⅱ/LC3 Ⅰ比例比较差异无统计学意义（P>0.05），OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 组 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例较 OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组降低（P<0.05）（图 5B、表 3）。以上结果提示 Drp1 而非 Parkin 是 miR-30b 调控线粒体自噬的关键效应分子。

2.8 敲降 Parkin/Drp1 后各组细胞线粒体形态比较

MitoTracker Green 染色结果显示，OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组与 OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin 组碎片化指数、线粒体平均体积比较差异无统计学意义（P>0.05），OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 组碎片化指数、线粒体平均体积较 OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组升高（P<0.05）。见图 6、表 5。

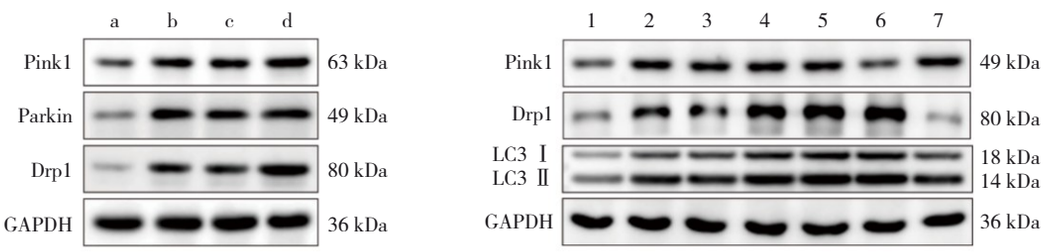


图 5　Western blot 检测各组细胞 PINK1、Parkin、Drp1 蛋白表达条带图　a：对照组；b：OGD/R 组；c：OGD/R+miR-NC 组；d：OGD/R+miR-30b mimic 组。1：对照组；2：OGD/R 组；3：OGD/R+miR-NC 组；4：OGD/R+miR-30b mimic 组；5：OGD/R+miR-30b mimic+si-NC；6：OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin 组；7：OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 组。［PINK1］PTEN 诱导激酶 1；［Drp1］动力相关蛋白 1；［LC3］微管相关蛋白 1 轻链 3。

表 4　各组 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ、PINK1、Parkin、Drp1 蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	PINK1	Parkin	Drp1
对照组	0.30 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.201 ± 0.020
OGD/R 组	0.51 ± 0.05[a]	0.50 ± 0.06[a]	0.439 ± 0.039[a]
OGD/R+miR-NC 组	0.48 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.488 ± 0.048
OGD/R+miR-30b mimic 组	0.55 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.781 ± 0.070[b]
F值	12.58	16.82	52.88
P值	0.002	<0.001	<0.001

注：a示与对照组比较，P<0.05；b示与OGD/R+miR-NC组比较，P<0.05。［PINK1］PTEN 诱导激酶 1；［Drp1］动力相关蛋白 1。

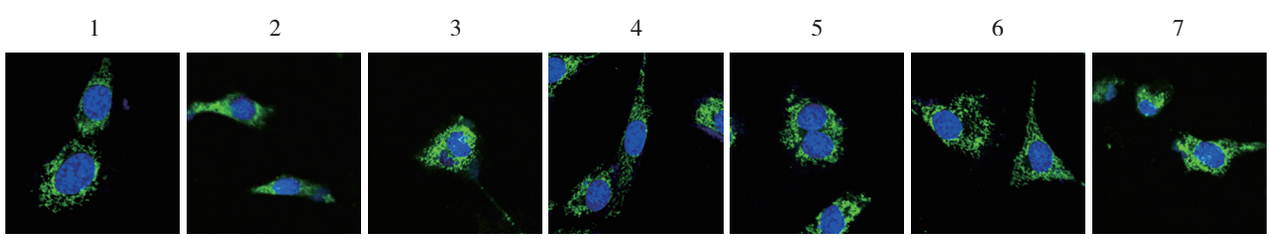


图 6　MitoTracker Green 染色检测各组细胞线粒体形态（激光共聚焦显微镜，×800）　1：对照组；2：OGD/R 组；3：OGD/R+miR-NC 组；4：OGD/R+miR-30b mimic 组；5：OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组；6：OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin 组；7：OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 组。蓝色为细胞核，绿色为线粒体。与 OGD/R+miR-30b mimic 组相比，OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin 组碎片化程度、线粒体体积无明显变化；OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 组碎片化程度、线粒体体积较 OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组升高。

表 5　各组细胞线粒体碎片化指数及线粒体平均体积比较

（$\bar{x} \pm s$，n=3）

组别	碎片化指数	线粒体平均体积/细胞 (a.u.)
对照组	20.3 ± 2.4	281 705 ± 15 808
OGD/R 组	34.9 ± 1.9[a]	241 001 ± 9 666[a]
OGD/R+miR-NC 组	35.3 ± 1.7	251 117 ± 10 712
OGD/R+miR-30b mimic 组	26.2 ± 1.9[b]	201 409 ± 12 179[b]
OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组	26.4 ± 3.0	203 653 ± 15 331
OGD/R+miR-30b mimic+si-Parkin 组	26.5 ± 1.4	212 224 ± 7 310
OGD/R+miR-30b mimic+si-Drp1 组	34.1 ± 1.7[c]	253 726 ± 13 840[c]
F 值	23.31	17.58
P 值	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较，P<0.05；b 示与 OGD/R+miR-NC 组比较，P<0.05；c 示与 OGD/R+miR-30b mimic+si-NC 组比较，P<0.05。

3　讨论

本研究探讨了 miR-30b 通过调控 USP14 促进线粒体自噬的分子机制。结果显示，在 HIE 细胞模型中，miR-30b 表达显著下调，这与此前 HIE 新生儿血液定量检测的研究结果一致[10]。线粒体自噬的标志性特征为 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例上调及 TOMM20 蛋白表达降低[11-12]，本研究发现，过表达 miR-30b 后，神经元 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例升高，TOMM20 蛋白表达降低，证实 miR-30b 过表达可有效促进线粒体自噬发生。此外，过表达 miR-30b 后神经元线粒体碎片化程度显著减轻，ROS 水平明显下降，这两项指标均被视为线粒体功能改善的标志[13]；同时细胞活力增强、细胞死亡减少。上述结果表明，在 OGD/R 诱导的 HIE 细胞模型中，过表达 miR-30b 可通过促进线粒体自噬提升细胞活性、减少细胞死亡，且该过程伴随 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例升高及 TOMM20 蛋白表达降低，证实 miR-30b 可通过调控线粒体自噬改善 HIE 病理进程。

本研究中，Targetscan 数据库预测及双萤光素酶报告基因实验验证表明，miR-30b-5p 可特异性靶向结合 USP14 的 3'非编码区（3'UTR），并下调 USP14 表达水平。进一步机制研究证实，miR-30b 通过靶向抑制 USP14 促进线粒体自噬并减少神经元损伤，而 USP14 过表达可显著削弱 miR-30b 的治疗效应。在 OGD/R 诱导的细胞模型中，USP14 过表达可逆转 miR-30b 对线粒体自噬的促进作用及对细胞存活的保护效应，提示 USP14 是介导 miR-30b 功能的关键分子。PINK1/Parkin 通路是目前公认的经典线粒体自噬通路[14-15]，本研究结果显示，敲降 Parkin 后，mmiR-30b 对 LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ比例的调控作用未受影响，这提示 miR-30b/USP14 轴对线粒体自噬的调控可能独立于 PINK1/Parkin 通路。同时，敲降 Drp1 可逆转上述调控效应。该结果表明 Drp1 可能在 miR-30b/USP14 调控线粒体自噬的过程中具有重要作用。然而，Drp1 在独立于 PINK1/Parkin 通路的线粒体自噬中发挥作用的具体机制仍需深入探索[16-17]。

综上所述，在 HIE 细胞模型中，miR-30b 可通过靶向抑制 USP14，以不依赖于 PINK1/Parkin 通路的方式调控线粒体自噬。在理论层面，不仅拓展了 miRNA 调控线粒体自噬的认知边界，揭示了一条独立于 PINK1/Parkin 通路的线粒体自噬新调控机制；在临床转化层面，基于 miR-30b 的靶向治疗策略，可能为新生儿 HIE 干预提供新方向，尤其适用于对传统治疗反应不佳的患儿群体。同时，本研究提示，miR-30b 表达水平监测有望成为评估 HIE 病情进展的潜在生物标志物。当然，将上述发现转化为临床应用仍面临诸多挑战，如 miRNA 体内递送效率优化、长期安全性评估等关键问题亟待解决。未来研究可进一步探索 USP14 下游的具体作用靶点，以及 Drp1 在该调控通路中的精确分子机制，为开发更高效、安全的 HIE 治疗手段提供坚实理论依据。

作者贡献声明：贝雨航负责实验研究的开展及论文写作；于康负责实验数据的收集、录入、统计分析及论文写作；王霞负责课题设计及论文稿件的审查和修改。

利益冲突声明：所有作者声明不存在利益冲突。

［参　考　文　献］

[1] Wu YW, Comstock BA, Gonzalez FF, et al. Trial of erythropoietin for hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns [J]. N Engl J Med, 2022, 387(2): 148-159. PMID: 35830641. PMCID: PMC10542745. DOI: 10.1056/NEJMoa2119660.

[2] Rodríguez M, Valez V, Cimarra C, et al. Hypoxic-ischemic encephalopathy and mitochondrial dysfunction: facts, unknowns, and challenges[J]. Antioxid Redox Signal, 2020, 33(4): 247-262. PMID: 32295425. DOI: 10.1089/ars.2020.8093.

[3] Greco P, Nencini G, Piva I, et al. Pathophysiology of hypoxic-

ischemic encephalopathy: a review of the past and a view on the future[J]. Acta Neurol Belg, 2020, 120(2): 277-288. PMID: 32112349. DOI: 10.1007/s13760-020-01308-3.

[4] Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(9): 1013-1022. PMID: 30154567. DOI: 10.1038/s41556-018-0176-2.

[5] Xu TH, Qiu XB, Sheng ZT, et al. Restoration of microRNA-30b expression alleviates vascular calcification through the mTOR signaling pathway and autophagy[J]. J Cell Physiol, 2019, 234 (8): 14306-14318. PMID: 30701530.DOI: 10.1002/jcp.28130.

[6] Peeples ES. MicroRNA therapeutic targets in neonatal hypoxic-ischemic brain injury: a narrative review[J]. Pediatr Res, 2023, 93(4): 780-788. PMID: 35854090. DOI: 10.1038/s41390-022-02196-4.

[7] Chen M, Peng L, Gong P, et al. Baicalein induces mitochondrial autophagy to prevent Parkinson's disease in rats via miR-30b and the SIRT1/AMPK/mTOR pathway[J]. Front Neurol, 2021, 12: 646817. PMID: 35237220. PMCID: PMC8883053. DOI: 10.3389/fneur.2021.646817.

[8] Chakraborty J, von Stockum S, Marchesan E, et al. USP14 inhibition corrects an *in vivo* model of impaired mitophagy[J]. EMBO Mol Med, 2018, 10(11): e9014. PMID: 30249595. PMCID: PMC6220287. DOI: 10.15252/emmm.201809014.

[9] Zhang H, Wang J, Huang J, et al. Inhibiting Jumoji domain containing protein 3 (JMJD3) prevent neuronal apoptosis from stroke[J]. Exp Neurol, 2018, 308: 132-142. PMID: 30028997. DOI: 10.1016/j.expneurol.2018.07.007.

[10] Wang W, Jia L. Regulatory mechanism of MicroRNA-30b on neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2021, 30(3): 105553. PMID: 33360521. DOI: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2020.105553.

[11] Li J, Chang X, Shang M, et al. Mitophagy-lysosomal pathway is involved in silver nanoparticle-induced apoptosis in A549 cells [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, 208: 111463. PMID: 33130480. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.111463.

[12] Park K, Sonn SK, Seo S, et al. Impaired TFEB activation and mitophagy as a cause of PPP3/calcineurin inhibitor-induced pancreatic β-cell dysfunction[J]. Autophagy, 2023, 19(5): 1444-1458. PMID: 36217215. PMCID: PMC10240995. DOI: 10.1080/15548627.2022.2132686.

[13] Adebayo M, Singh S, Singh AP, et al. Mitochondrial fusion and fission: the fine-tune balance for cellular homeostasis[J]. FASEB J, 2021, 35(6): e21620. PMID: 34048084. PMCID: PMC8415099. DOI: 10.1096/fj.202100067R.

[14] Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin[J]. PLoS Biol, 2010, 8(1): e1000298. PMID: 20126261. PMCID: PMC2811155. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000298.

[15] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011, 12(1): 9-14. PMID: 21179058. PMCID: PMC4780047. DOI: 10.1038/nrm3028.

[16] E Y, Lin Y, Yan G, et al. Exogenous H_2S alleviates senescence of glomerular mesangial cells through up-regulating mitophagy by activation of AMPK-ULK1-PINK1-parkin pathway in mice[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2023, 1870(8): 119568. PMID: 37597773. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2023.119568.

[17] Kawalec M, Wojtyniak P, Bielska E, et al. Mitochondrial dynamics, elimination and biogenesis during post-ischemic recovery in ischemia-resistant and ischemia-vulnerable gerbil hippocampal regions[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2023, 1869(3): 166633. PMID: 36566873. DOI: 10.1016/j.bbadis.2022.166633.

（本文编辑：杨丹）

（版权所有©2025 中国当代儿科杂志）