

## 神经疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.02.013

## 蛛网膜下腔出血后血管平滑肌细胞凋亡的 microRNA 芯片检测及分析

李英博, 赵香琴, 姜英虹, 陈 笛, 王莎莉  
(重庆医科大学神经科学研究中心, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**采用 microRNA 芯片技术筛选蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)后血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)凋亡中起重要作用的 microRNA。**方法:**首先建立 SAH 后 VSMC 凋亡模型。然后采用 microRNA 芯片筛选差异表达 microRNA。最后采用 qRT-PCR 方法对筛选出来的 microRNA145 进行验证,并通过生物信息数据库预测其可能的靶基因。**结果:**通过 200  $\mu\text{mol/L}$  氧合血红蛋白(oxyhemoglobin, OxyHb)作用 24 h, 成功建立 SAH 后 VSMC 凋亡模型。MTT 检测显示 200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb 组作用 24 h 后吸光度(absorbance, A)值为  $0.197 \pm 0.131$ , 流式细胞仪检测凋亡率为  $30.233 \pm 7.231$ , 与其他组相比差异明显( $P < 0.05$ )。然后通过 microRNA 芯片检测, 获得差异表达 microRNA 22 个, 其中显著上调的 16 个, 显著下调的 6 个。其中 microRNA145 差异变化最大。经 qRT-PCR 验证, SAH 后 VSMC 中 microRNA145 异常高表达。预测结果显示, Bcl-2/腺病毒 E1B19000 相互作用蛋白 3(Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3, BNIP3)为其可能的靶基因。**结论:**microRNA145 可能是调控 SAH 后 VSMC 凋亡的分子靶点。microRNA145 可能通过 BNIP3 相关信号途径, 导致了 SAH 后 VSMC 凋亡, 诱发并加重了脑血管痉挛。

**【关键词】**蛛网膜下腔出血; 血管平滑肌细胞; 凋亡; microRNA 芯片

**【中图分类号】**R743.35

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2013-06-02

## MicroRNA microarray analysis for vascular smooth muscle cell apoptosis after subarachnoid hemorrhage

Li Yingbo, Zhao Xiangqin, Jiang Yinghong, Chen Di, Wang Shali  
(Institute of Neuroscience, Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To select microRNA, which plays an important role in the apoptosis of vascular smooth muscle cells(VSMC) after subarachnoid hemorrhage(SAH) by microRNA microarray. **Methods:** Firstly, the model of VSMC apoptosis after SAH was established, then, microRNA microarray was used to screen differentially expressed microRNA. Finally, the screened out microRNA145 was validated by qRT-PCR and biological information database was used to predict the possible target genes. **Results:** Model of VSMC apoptosis after SAH was established successfully. MTT assay showed that A value of 200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb group was  $0.197 \pm 0.131$  after 24 h and apoptosis rate was  $30.233 \pm 7.23$ , with significant differences compared with those of other groups( $P < 0.05$ ). There were 22 differentially expressed microRNAs, 16 microRNAs of which were up-regulated, 6 microRNAs were down-regulated obviously and microRNA145 was the greatest change one among them. MicroRNA145 expressed highly in VSMC after SAH, which was validated by qRT-PCR. It was suggested that Bcl-2/E1B 19 kDa-interacting protein 3(BNIP3) may be the target gene for it. **Conclusions:** microRNA145 may be the molecular target regulating VSMC apoptosis after SAH. MicroRNA145 causes apoptosis of VSMC after SAH, induce and increase cerebral vasospasm possibly through BNIP3 related signaling pathways.

**【Key words】**subarachnoid hemorrhage; vascular smooth muscle cells; apoptosis; microRNA microarray

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)是一个具有高发病率和死亡率,并具有灾难性后果

作者介绍: 李英博, Email: xiaosui19781127@163.com,

研究方向: 脑血管疾病。

通信作者: 王莎莉, Email: ypsali@gmail.com。

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目(编号: cstc2011jjA10031)。

的常见的脑血管病。其中, SAH 诱发的脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)是 SAH 最严重的并发症, 其发生率高达 30%~90%, 常可引起严重的脑组织缺血或迟发性缺血性脑损害, 甚至导致脑梗死, 成为 SAH 致死和致残的主要因素。因此阐明 CVS 的发病机制, 并针对性的开展预防和治疗, 是改善 SAH 预

后的关键。目前,关于 SAH 后 CVS 的发病机制主要集中在对血管内皮细胞的研究方面,Chen 等<sup>[1]</sup>认为,血管内皮细胞的凋亡在 CVS 的发生、发展中扮演了非常重要的角色。但是一些针对 SAH 后的血管内皮细胞的治疗措施,在临床应用中却不尽人意。因此,进一步阐明 SAH 后的细胞凋亡的病理生理过程,寻找新的分子靶点,具有特殊的重要性和紧迫性。

目前,有研究直接表明,SAH 后血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)存在凋亡现象,其凋亡受到某些凋亡相关基因的调控。因此,VSMC 的病理性改变在 SAH 后 CVS 的发生、发展中可能扮演更为重要的直接作用。但是,VSMC 凋亡对 CVS 究竟有怎样的作用,其减轻或者加重对于改善 CVS 症状有怎样的作用,目前研究不多。本课题组 Li 等<sup>[2]</sup>,Chen 等<sup>[3]</sup>在前期实验通过电镜发现,SAH 后的 VSMC 核有明显皱缩、染色质有边集现象。并且在应用抗凋亡药物后,CVS 有所改善,相应的血管通透性、脑损伤均有不同程度的改善。这从侧面反映 VSMC 的凋亡具有重要作用。抗凋亡治疗很可能成为新的治疗思路。

近年来,microRNA 的出现,为神经系统疾病的防治提供了新的思路。但是,关于 SAH 后 microRNA 对 VSMC 凋亡的调控,还未见相关报道。因此本研究首先建立 SAH 后 VSMC 凋亡细胞模型。然后采用 microRNA 芯片进行表达谱差异分析。最后利用生物信息数据库筛选出相应 microRNA 的靶基因。初步揭示 SAH 后 VSMC 凋亡的分子机制,为临床应用提供新的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 药品与试剂

氧合血红蛋白(oxyhemoglobin,OxyHb)、MTT、胰蛋白酶(美国 Sigma 公司);DMEM 培养基、胎牛血清(美国 chemicon 公司);microRNA 芯片(上海其明有限公司)。

### 1.2 VSMC 凋亡模型的建立及检测

1.2.1 细胞培养 购买 A10 大鼠胸主动脉平滑肌细胞株(重庆卓诺生物生物技术有限公司),进行常规贴壁培养(10%胎牛血清)。平均 2~3 d 采用胰酶消化法进行传代培养。

1.2.2 OxyHb 溶液的制备 无菌条件下取 OxyHb 溶于 DMEM 培养液中,离心(10 000 r/min,10 min),去渣后紫外分光光度计测定 OxyHb 浓度,-20℃储存备用。

1.2.3 MTT 法测定 OxyHb 对 VSMC 增殖的作用 选用生长较好的 3~4 代平滑肌细胞,消化收集细胞,血球计数板计数,以每孔  $10^3 \sim 10^4$  个细胞接种到 96 孔板,每孔体积 200  $\mu$ l。培养至接近汇合为单层时,分别加入不同浓度的 OxyHb 溶液,使其终浓度为 0、10、100、200  $\mu$ mol/L。分别作用 3、6、12、24 h 后每孔加 MTT 溶液(5 mg/ml 用 PBS 配制,pH=7.4)20  $\mu$ l。继续

孵育 4 h,终止培养,离心后小心吸弃孔内培养上清液。每孔加 150  $\mu$ l DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长,在酶联免疫监测仪上测定各孔吸光度(absorbance,A)值。

1.2.4 流式细胞仪(flow cytometry,FCM)检测 OxyHb 对 VSMC 凋亡的作用 将 200  $\mu$ mol/L OxyHb 溶液作用 24 h 后的 VSMC 收集到离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,除去上清,4℃预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,100  $\mu$ l PBS 缓冲液重悬细胞(细胞数量级  $\geq 1 \times 10^6$  个),转移到 1.5 ml EP 管中,加入 5  $\mu$ l AnnexinV-FITC,振荡均匀后 4℃避光孵育 15 min,然后再加入 10  $\mu$ l PI,同样孵育 5 min,孵育后立即上 FCM 分析。

### 1.3 microRNA 芯片筛选差异表达 microRNA

选取 200  $\mu$ mol/L OxyHb 溶液作用 24 h 后的细胞作为 SAH 后 VSMC 凋亡模型细胞,从细胞中提取总 RNA,利用 microRNA 芯片技术对其进行分析,筛选出表达差异谱。microRNA 芯片分组:(1)对照组:VSMC 培养液作用 24 h;(2)模型组:终浓度 200  $\mu$ mol/L OxyHb 培养液作用 24 h。24 h 后提取总 RNA,质量鉴定后交由上海其明有限公司进行 Affymetrix microRNA 芯片检测(合同编号:G20130103-LYB)。使用 Affymetrix microRNA 专用软件对扫描图像所得数据进行分析,通过原始值减去背景值来做修正,并用中值做标准化,分别计算出两种样本中 microRNA 的标准值及比值。判断标准为模型组与对照组的表达量比值  $>2$  为表达上调, $<0.5$  为表达下调。

1.4 利用 qRT-PCR[实时荧光定量 PCR(real-time quantitative,PCR)]方法对 microRNA145 进一步确认

对筛选出来的差异表达 microRNA145 进行初步验证。根据 microRNA145 的序列设计引物(PCR 引物由 Invitrogen 公司设计并合成,采用的特异性引物序列为:miRNA145 正向引物 5'-GTCCAGTTTCCAGGAAT-3',反向引物 5'-TG-GTGTCTGAGTTCG-3';内参 U6 正向引物 5'-CTCGCTTC-GGCAGCACA-3',反向引物 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3')。提取细胞 RNA 在反转录酶的作用下先行反转录获取 cDNA,cDNA 在特异酶及引物作用下行 PCR,并在 PCR 反应体系中加入荧光探针,利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 过程。最后采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  法对基因表达进行相对定量。

### 1.5 microRNA145 靶基因预测

运用 miRanda([http://www.microrna.org/miranda\\_new.html](http://www.microrna.org/miranda_new.html))、MiRBase Targets(<http://microna.sanger.ac.uk/targets>)、Pictar(<http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/Pic-Tar Vertebrate.cgi>)、TargetScan(<http://targetscan.org>)和 BibiServ 等靶基因预测软件和在线数据库,检索 microRNA145 可能的靶向基因。综合分析,同时参考已发表的、高影响因子的论文,选取至少 3 种软件的共同结果,作为表达差异 microRNA 的可能靶基因。从而筛选出保守程度较高、结合自由能较低,并且与心血管系统细胞凋亡病理生理过程相关的基因作为初步候选靶基因。

### 1.6 数据统计

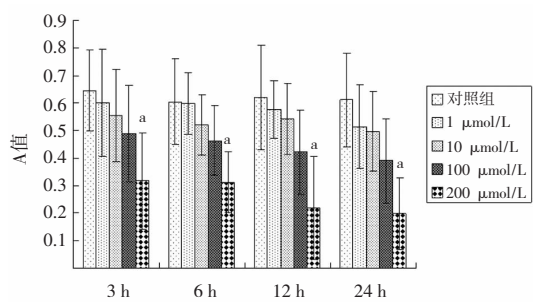
所有数据均采用 SPSS 17.0 统计软件包进行统计学分析。计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间采用单因素方差分析;组间两两比较,方差齐者用 Student-Newman-Keuls 检验。两组间比较用独立样本  $t$  检验法。检验水准  $\alpha =$

0.05。

## 2 结果

### 2.1 MTT 法测定 OxyHb 对 VSMC 增殖的作用

MTT 检测结果显示,随着 OxyHb 浓度的增高以及作用时间的延长,VSMC 的吸光度(absorbance, A)值逐渐减小(图 1)。其中,OxyHb 作用 24 h 后效果明显。对照组为  $0.611 \pm 0.171$ ,1  $\mu\text{mol/L}$  组为  $0.514 \pm 0.154$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  组为  $0.496 \pm 0.144$ ,100  $\mu\text{mol/L}$  组为  $0.389 \pm 0.152$ ,200  $\mu\text{mol/L}$  组为  $0.197 \pm 0.131$ 。因此,200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb 组作用 24 h 最为显著(与对照组、1  $\mu\text{mol/L}$  组和 10  $\mu\text{mol/L}$  组相比差异明显, $P < 0.05$ ),后续实验建模以此为依据。



a. 与对照组相比, $P < 0.05$

图 1 不同浓度 OxyHb 作用 VSMC 3、6、12、24 h 后 MTT 检测结果

Fig.1 MTT assay of VSMC treated with different concentrations of OxyHb after 3,6,12,24 h

### 2.2 FCM 检测 OxyHb 对 VSMC 凋亡的作用

采用 FCM 对不同浓度 OxyHb 作用 24 h 后各组细胞的凋亡率进行了检测,发现 0  $\mu\text{mol/L}$  组为  $5.365 \pm 2.310$ ,10  $\mu\text{mol/L}$  组为  $9.323 \pm 4.324$ ,100  $\mu\text{mol/L}$  组为  $12.36 \pm 4.745$ ,200  $\mu\text{mol/L}$  组为  $30.233 \pm 7.231$ ,其中以 200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb 作用 24 h 后细胞凋亡率的上升最为显著(与对照组相比差异明显, $F = 19.546$ , $P = 0.000$ ,并且与 10、100  $\mu\text{mol/L}$  组相比仍然有统计学差异, $P < 0.05$ ),建模效果较好(图 2、3)。

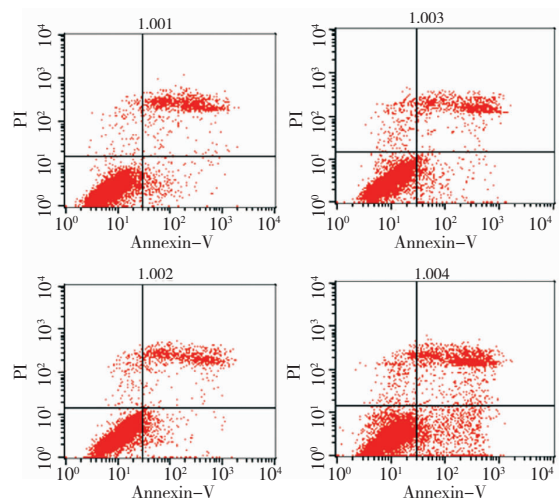
### 2.3 microRNA 芯片筛选差异表达 microRNA

选取 200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb 溶液作用 24 h 后的细胞作为 SAH 后 VSMC 凋亡模型细胞,从细胞中提取总 RNA,并进行质量鉴定。从各组细胞中提取的总 RNA,经紫外分光光度计测定  $A_{260\text{ nm}}$ 、 $A_{280\text{ nm}}$ ,其  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  值均大于 1.9,表明纯度高。用 1.0% 的甲醛变性凝胶电泳,可见清楚的 28S,18S,条带,表明 RNA 完整性好,无降解现象,符合总 RNA 要求(图 4)。然后进行了 microRNA 芯片检测。检测发现,SAH 后 VSMC 共有 22 个 microRNA 表达发生显著差异改变(16 个上调,6 个下调),其中 microRNA145 差异变化最大,上调达 7.354 倍(表 1)。初步确定了研究目标为在 SAH 后 VSMC 凋亡中起重要作用的 microRNA145。

### 2.4 qRT-PCR 对 microRNA145 差异表达的验证

对照组和 200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb 溶液作用 24 h 组 microR-

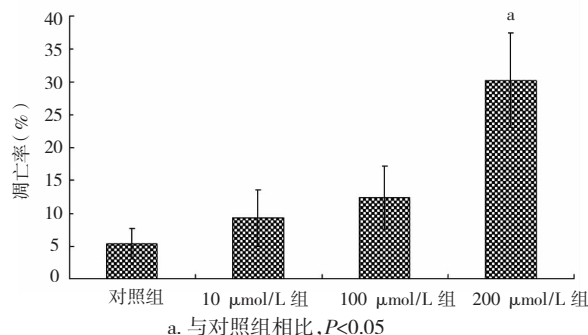
NA145 的相对表达量分别是  $0.2347 \pm 0.0541$  和  $1.6778 \pm 0.1239$ ,经独立样本  $t$  检验证实它们的差别有统计学意义( $t = -18.484$ , $P = 0.000$ )。结果显示,模型组 VSMC 与对照组相比,microRNA145 呈现高表达,与芯片结果一致。



1.001~1.004 分别为对照组、10  $\mu\text{mol/L}$  组、100  $\mu\text{mol/L}$  组、200  $\mu\text{mol/L}$  组

图 2 不同浓度 OxyHb 作用 VSMC 24 h 后 FCM 细胞凋亡检测图

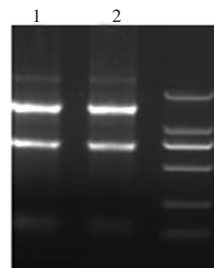
Fig.2 Apoptosis of VSMC treated with different concentrations of OxyHb after 24 h detected by flow cytometry



a. 与对照组相比, $P < 0.05$

图 3 不同浓度 OxyHb 作用 VSMC 24 h 后 FCM 细胞凋亡检测结果

Fig.3 Apoptosis of VSMC treated with different concentrations of OxyHb after 24 h detected by flow cytometry



1. 对照组;2. 200  $\mu\text{mol/L}$  OxyHb 作用 24 h 组

图 4 RNA 电泳图

Fig.4 Electrophoresis of RNA

表 1 SAH 后 VSMC 凋亡中差异表达的 microRNA ( 部分 )

Tab.1 Differentially expressed microRNA in VSMC apoptosis after SAH ( part )

| microRNA 名称    | 差异倍数      |
|----------------|-----------|
| microRNA145    | 7.353 632 |
| microRNA505    | 3.099 218 |
| microRNA218-1  | 2.941 225 |
| microRNA181b-1 | 2.565 880 |
| microRNA128-1  | 2.564 912 |
| microRNA19b-2  | 0.460 260 |
| microRNA206    | 0.379 078 |

## 2.5 microRNA145 靶基因预测

根据数据库和相关软件进行了靶基因的预测(上海其明有限公司),并进行综合评分。microRNA145 的下游靶基因较多(表 2)。BNIP3 评分最高,结合高水平文献,将其作为 microRNA145 的靶基因。

表 2 microRNA145 靶基因预测( 部分 )

Tab.2 Target genes prediction of microRNA145 ( part )

| 靶基因预测评分 | 基因名称     | 基因说明                       |
|---------|----------|----------------------------|
| 98      | BNIP3    | BCL2/腺病毒 E1B19000 相互作用蛋白 3 |
| 93      | Add3     | 内收蛋白 3                     |
| 93      | Fam108c1 | 108 序列相似家族 c1              |
| 90      | Bag4     | BCL2 关联永生基因 4              |
| 89      | Fndc3a   | 含有 3a 的纤连蛋白 III 型结构域       |
| 88      | Pappa    | 妊娠相关血浆蛋白 A                 |

## 3 讨 论

目前有直接研究表明,SAH 后 VSMC 存在凋亡现象,其凋亡受到某些凋亡相关基因的调控。其中,Ogihara 等<sup>[4]</sup>在 OxyHb 刺激离体培养的鼠动脉 VSMC 的试验中发现了凋亡特异性的多聚 ADP 核糖多聚酶的表达,并发现 OxyHb 刺激对细胞贴壁数有显著性影响,从而提出 OxyHb 刺激后 VSMC 的凋亡可能是 SAH 后 CVS 的机制之一。Zhou 等<sup>[9]</sup>报道,在 SAH 后发生迟发性 CVS 的实验性犬的脑血管内皮细胞及 VSMC 均有凋亡的发生。因此,VSMC 的病理性改变在 SAH 后 CVS 的发生、发展中可能扮演更为重要的直接作用。但是,VSMC 凋亡对 CVS 究竟有怎样的作用,其减轻或者加重对于改善 CVS 症状有怎样的作用,目前研究不多。本课题组率先展开了研究,取得了令人振奋的实验结果。在前期实验通过电镜发现,SAH 后的 VSMC 核有明显皱缩、染色质有边集现象。但是在应用抗凋亡药物人参皂苷 Rb1 后,血管痉挛有所改善,相应的血管通透性、脑

损伤具有不同程度的改善。这从侧面反映 VSMC 的凋亡具有重要作用。抗凋亡治疗很可能成为新的治疗思路。

近年来,一类新的非蛋白质编码 microRNA 的出现,为神经系统疾病的防治提供了新的思路。microRNA 是一类长度为 19~25 个核苷酸的非编码小分子 RNA。在动物体内 microRNA 主要通过靶基因 3'-UTR 区不完全配对,抑制靶基因 mRNA 翻译,参与个体发育、细胞凋亡、增殖、分化等生命活动的调控。目前已知的 microRNA 主要依赖两种序列互补原则对靶基因起负性调控作用:一种是 microRNA 与靶基因 mRNA 完全互补,引起靶基因 mRNA 的降解。另一种是 microRNA 与靶基因 mRNA 不完全互补,从而在蛋白质翻译水平上抑制靶基因 mRNA 的表达。尽管目前已经发现 1 000 多种 microRNA,调控至少 30% 以上的基因表达,形成复杂的调控网络。但是,关于 SAH 后 microRNA 对 VSMC 凋亡的调控,还未见相关报道。所以用 microRNA 来诠释 SAH 后 VSMC 凋亡的机理,有望获得一些新的思路。

为了筛选 SAH 后 VSMC 凋亡相关 microRNA,本课题组在前期应用高通量 microRNA 表达谱芯片技术,检测 SAH 条件下,VSMC 的 microRNA 表达差异,结果发现共有 22 个 microRNA 表达发生显著差异改变,其中 microRNA145 差异变化最大。qRT-PCR 实验也证明了这一点。

据 Zou 等<sup>[6]</sup>报道,microRNA145 是近年来新发现的一类具有肿瘤抑制作用的 microRNA,它的研究也尚在起步阶段。目前发现 microRNA145 主要是靶向的肿瘤相关基因:OCT4、SOX2、KLF4、c-MYC、RTKN、YES、STAT1、DFF45、JAM-A、Fascin、Mucin 1、IRS-1、FLI1、ELK-1、RREB1、TNFSF10 等,从而参与调控肿瘤生长和转移侵袭,同时在肿瘤血管生成调控中也发挥了重要作用。2009 年,美国旧金山 Gladstone 心血管疾病研究所,加州大学儿科系、生物化学与生物物理系,罗切斯特大学 Aab 心血管研究所的科学家 Cordes 等<sup>[7]</sup>在 *Nature* 上发表了关于细胞分化命运与细胞可塑性的研究进展。在该研究中,他们证实了 microRNA145 和 microRNA143 对小鼠心脏祖细胞发育成心脏 VSMC 的调控。发现 microRNA145 和 microRNA143 主要通过调控 KLF4、myocardin 和 Elk-1 的表达,进而促进 VSMC 分化,抑制增殖。总而言之,microRNA145 主要集中在抗肿瘤,它在神经系统的影响仅见一些零星报道,microRNA145 是否参与 SAH 时 VSMC 凋亡的调控,未见相关报道。结合 microRNA 芯片结果和高水平

的文献,有理由相信,microRNA145 在 SAH 后对 VSMC 凋亡的调控中起到了关键的作用。

通过计算机生物学预测软件,本课题组预测出 microRNA145 能靶向调控 BNIP3 且评分最高(靶向预测评分=98)。2010 年 Chen 等<sup>[8]</sup>在 *Cancer Research* 上发表了关于 microRNA145 靶向调控 BNIP3 的研究文章。研究发现,microRNA145-BNIP3 靶向调控作为 TP53-miR145-BNIP3-AIF 调控网络的一部分,在前列腺癌的发生、发展过程中,发挥了非常重要的作用。研究证明,在前列腺癌中 microRNA145 是低表达的,而 BNIP3 是高表达的。通过人工过表达 microRNA145 将明显下调 BNIP3,同时伴随凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 的上调,从而增加细胞的死亡。这一研究发现无疑是振奋人心的,给研究打开了新的思路。结合 microRNA145 芯片预测结果,本课题组推测,在 SAH 后 VSMC 的凋亡中,很有可能存在类似的调控机制,microRNA145 很有可能通过靶向作用 BNIP3,从而参与 SAH 后 VSMC 凋亡的调控。

Bcl-2 家族蛋白是参与调节细胞凋亡的主要家族之一,其中 BNIP3 是仅有的两个受低氧诱导因子调控的 Bcl-2 家族蛋白之一。BNIP3 作为 Bcl-2 蛋白超家族中的促凋亡成员,主要通过线粒体途径诱导细胞凋亡和自噬。BNIP3 的异常表达(上调、下调和甲基化等)与肿瘤的进展、转移和不良预后相关。Dhingra 等<sup>[9]</sup>的研究发现,BNIP3 在心血管系统细胞凋亡方面发挥了非常重要的作用。在心肌缺血早期通常无 BNIP3 的表达上调,直到出现再灌注时才有 BNIP3 的表达上调。通过敲除 BNIP3 基因来阻止缺血性心肌细胞凋亡可防止缺血性心肌梗死<sup>[9]</sup>。

研究进一步表明,BNIP3 诱导细胞死亡的特点是早期质膜通透性增加,线粒体损伤,通常不伴随 Caspase 的激活及细胞色素 C 的释放。虽然目前对 Caspase 依赖性细胞死亡通路的机理已有了比较明确的认识,然而,BNIP3 介导 Caspase 非依赖性细胞凋亡途径的下游机制尚不明确。研究表明,核酸内切酶 G (endonuclease G, Endo G) 和 AIF 作为线粒体功能障碍的下游分子,同样参与了 Caspase 非依赖性细胞死亡通路。AIF 是已知的线粒体功能障碍的下游分子之一,参与了 Caspase 非依赖性细胞死亡通路。AIF 是存在于线粒体内外膜之间的凋亡相关蛋白。当细胞受到特定的凋亡诱导信号的刺激后,线粒体膜上的线粒体通透性转换孔道打开,允许它从线粒体释放到胞浆,并转位到核内进而引起 DNA 的大片段裂解,但 AIF 本身没有核酶的特性,它的 DNA 降解作用是通过其它核酶来实现的。

Endo G 很可能是 AIF 的相互作用分子。Endo G 是一种线粒体 DNA 酶,当其从线粒体释放出来之后,可以转位到细胞核,与 AIF 结合并且以 Caspase 非依赖性方式将染色质 DNA 剪切为核小体碎片,共同促进 DNA 降解及细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。这是目前确定的唯一不依赖 Caspase 活性的 DNA 降解通路。我们推测,在 SAH 后的 VSMC 凋亡中存在 microRNA145-BNIP3-AIF/Endo G 调控通路,导致了在 SAH 时大量的 VSMC 凋亡,诱发并加重了 CVS,最终恶化了脑损伤,这将在后续实验中逐步加以证实。

## 参 考 文 献

- [1] Chen G, Zhang S, Shi J, et al. Effects of recombinant human erythropoietin (rhEPO) on JAK2/STAT3 pathway and endothelial apoptosis in the rabbit basilar artery after subarachnoid hemorrhage [J]. *Cytokine*, 2009, 45(3): 162-168.
- [2] Li Y, Tang J, Khatibi NH, et al. Ginsenoside RB1 reduces neurologic damage, is anti-apoptotic and down-regulates p53 and BAX in subarachnoid hemorrhage [J]. *Current neurovascular research*, 2010, 7(2): 85-94.
- [3] Chen D, Tang J, Khatibi NH, et al. Treatment with Z-ligustilide, a component of angelica sinensis, reduces brain injury following a subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011, 337(3): 663-672.
- [4] Ogiwara K, Aoki K, Zubkov AY, et al. Oxyhemoglobin produces apoptosis and necrosis in cultured smooth muscle cells [J]. *Brain Res*, 2001, 889(1-2): 89-97.
- [5] Zhou C, Yamaguchi M, Colohan AR, et al. Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(5): 572-582.
- [6] Zou C, Xu Q, Mao F, et al. MiR-145 inhibits tumor angiogenesis and growth by N-RAS and VEGF [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(11): 2137-2145.
- [7] Cordes KR, Sheehy NT, White MP, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity [J]. *Nature*, 2009, 460(7256): 705-710.
- [8] Chen X, Gong J, Zeng H, et al. MicroRNA145 targets BNIP3 and suppresses prostate cancer progression [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2728-2738.
- [9] Dhingra R, Gang H, Wang Y, et al. Bidirectional regulation of nuclear factor- $\kappa$ B and mammalian target of rapamycin signaling functionally links Bnip3 gene repression and cell survival of ventricular myocytes [J]. *Circ Heart Fail*, 2013, 6(2): 335-343.
- [10] Liu KC, Huang YT, Wu PP, et al. The roles of AIF and Endo G in the apoptotic effects of benzyl isothiocyanate on DU 145 human prostate cancer cells via the mitochondrial signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(3): 787-796.
- [11] Kapoor R, Rizvi F, Kakkar P. Naringenin prevents high glucose-induced mitochondria-mediated apoptosis involving AIF, Endo-G and caspases [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(1): 9-27.

(责任编辑:唐秋姗)