

·实验研究 Experimental research·

微小核糖核酸-29b 通过靶向髓样细胞白血病-1 影响脑缺血/再灌注损伤时神经细胞凋亡

陈 浩, 黄 智, 张 帅, 王黎洲, 周 石

【摘要】 目的 确定微小核糖核酸(microRNA, miRNA, miR)在脑缺血/再灌注(I/R)损伤中对神经细胞凋亡的影响,并探讨其潜在机制。**方法** 培养小鼠成神经细胞瘤(N2a)细胞,构建氧糖剥夺(OGD)/复氧(R)模型,模拟体外脑 I/R 状态。N2a 细胞随机分为空白对照组(control)、OGD/R 组(OGD/R)、OGD/R+转染 miR-29b 模拟物组(mimics)、OGD/R+转染 miR-29b 抑制剂组(inhibitor)、OGD/R+转染 miR-29b 模拟物阴性对照组(mimics NC)、OGD/R+转染 miR-29b 抑制剂阴性对照组(inhibitor NC)。实时定量聚合酶链反应(PCR)检测各组 miR-29 表达变化。细胞计数试剂盒(CCK)-8 和流式细胞术分别检测 miR-29b 和 miR-29b 抑制剂对 N2a 细胞活力和凋亡的影响。免疫印迹法检测抗凋亡蛋白髓样细胞白血病(MCL)-1、B 淋巴细胞瘤(BCL)-2 及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3 表达。双荧光素酶分析验证 miR-29b 与 MCL-1 间相互作用。**结果** 与 control 组相比,OGD/R 组 miR-29b 表达明显升高。与 OGD/R 组相比,mimics 组 N2a 细胞凋亡增加,存活率降低,MCL-1、BCL-2 表达下调,caspase-3 表达上调,而这种效应在 inhibitor 组受到逆转。双荧光素酶分析显示 miR-29b 可通过与 MCL-1 的 3' 非翻译区(UTR)端结合下调 MCL-1 表达。**结论** miR-29b 在脑 I/R 损伤过程中通过靶向 MCL-1 促进神经细胞凋亡。这为缺血性脑卒中治疗提供了一潜在的新靶点。

【关键词】 miR-29b; 脑缺血/再灌注损伤; MCL-1; N2a 细胞; 细胞凋亡

中图分类号:R743.34 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2021)-07-0697-06

The effect of miR-29b on neurocyte apoptosis through targeting MCL-1 in cerebral ischemia/reperfusion injury CHEN Hao, HUANG Zhi, ZHANG Shuai, WANG Lizhou, ZHOU Shi. School of Medical Imaging, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou Province 550004, China

Corresponding author: ZHOU Shi, E-mail: 156722229@qq.com

【Abstract】 Objective To determine the effect of miR-29b(miRNA-29b, microRNA-29b) on neuronal apoptosis in cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury, and to discuss its potential mechanisms. **Methods** Neuroblastoma(N2a) cells were cultured and exposed to an oxygen-glucose deprivation/reoxygenation(OGD/R) environment, which was used to simulate cerebral I/R injury status in vitro. The N2a cells were randomly divided into blank control group, OGD/R group, OGD/R+miR-29b mimics transfected group(mimics group), OGD/R+miR-29b inhibitor transfected group(inhibitor group), OGD/R+miR-29b mimics negative-control transfected group(mimics NC group), and OGD/R+miR-29b inhibitors negative-control transfected group(inhibitor NC group). Real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) was used to detect the expression levels of miR-29b in each group. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and flow cytometry were separately used to test the effect of miR-29b and miR-29b inhibitor on the cell viability and apoptosis in each group. Western blotting assay was adopted to test the expressions of anti-apoptotic protein myeloid leukemia-1(MCL-1), B-lymphocytoma-2(BCL-2) and cysteine aspartate specific protease-3(caspase-3). Dual-luciferase assay was employed to validate the interaction between miR-29b and MCL-1. **Results** Compared with the control group, in OGD/R group the expression level of miR-29b was much higher. Compared with OGD/R group, in

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2021.07.012

基金项目: 国家自然科学基金(81860321)

作者单位: 550004 贵阳 贵州医科大学医学影像学院

通信作者: 周 石 E-mail: 156722229@qq.com

mimics group the N2a cell apoptosis was obviously increased, the cell livability was reduced, the expressions of BCL-2 and MCL-1 were down-regulated, and the the expression of caspase-3 was up-regulated, while these effects in the inhibitor group were reversed. Dual-luciferase assay revealed that miR-29b could down-regulate the expression of MCL-1 through binding miR-29b with MCL-1 3'non-translational area(UTR) ends. **Conclusion** During cerebral I/R injury, miR-29b promotes neurocyte apoptosis through targeting MCL-1, which provides a potential new target for the treatment of ischemic stroke. (J Intervent Radiol, 2021, 30: 697-702)

【Key words】 miR-29b; cerebral ischemia/reperfusion injury; MCL-1; N2a cell; apoptosis

缺血性脑卒中是全球最严重的神经系统疾病之一,现阶段除了早期溶栓、取栓等介入治疗外,尚无其他更有效的治疗手段。然而介入治疗后血管再通的同时,可能发生脑缺血/再灌注(I/R)损伤^[1-3],是影响脑卒中预后的重要环节。因此寻找新的有效措施预防脑 I/R 损伤具有重要意义。微小核糖核酸(microRNA,miRNA,miR)是通过靶向调节信使 RNA(mRNA)稳定性和/或转化效率执行转录和转录后负调控功能的小片段(18~25 nt)单链非编码 RNA 分子^[4]。研究证实最成熟的 miRNA 通过结合 3'非编码区改变靶向 mRNA 降解或翻译^[5-6]。既往研究显示 miR-29b、miR-21、miR-200 和 miR-497 似可作为潜在治疗靶点,通过改变大脑皮层中通常高表达的关键信号元件参与脑 I/R 损伤^[7]。miR-29b 也可能负调控 B 淋巴细胞瘤(BCL)-2 家族成员,如 BCL-W(BCL-2L2)和髓样细胞白血病(MCL)-1 等促生存蛋白。这些蛋白是脑 I/R 损伤的重要调节因子,其作用机制尚不清楚^[8-10]。本研究旨在确定 miR-29b 是否对体外脑 I/R 损伤具有保护作用,并探讨其潜在作用机制,以期改善其临床疗效提供新策略。

1 材料与方法

1.1 实验细胞和主要试剂

小鼠成神经细胞瘤(N2a)细胞(中国科学院上海分院),miR-29b 模拟物、抑制剂及相应对照组序列(广州锐博生物科技公司),Lipofectamine™ 3000 试剂(美国 Invitrogen 公司),细胞计数试剂盒(CCK)-8(日本同仁化学研究所),膜联蛋白(annexin)V/碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒(杭州联科生物科技公司),TRIzol 试剂(美国 Thermo Fisher 公司),抗小鼠多克隆 MCL-1 抗体(1:2 000)(美国 Sigma 公司),抗小鼠多克隆 BCL-2 抗体(1:1 000)、抗小鼠多克隆半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)-3 抗体(1:1 000)(英国 Abcam 公司),抗小鼠多克隆 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体(1:1 000)(美国 Santa Cruz 生物技术公司),化学发光试剂(美国 Merck Millipore

公司),psiCheck™2 载体(美国 Invitrogen 公司),限制性内切酶(生工生物工程上海公司),7500 Fast 实时聚合酶链反应(PCR)系统 PCR 仪(美国 Thermo Fisher 公司),KO-PLUS 诱变试剂盒(美国 Santa Cruz 生物技术公司)。

1.2 氧糖剥夺/复氧模型建立和实验分组

37℃、5%CO₂、95%O₂湿润空气条件下,N2a 细胞置于加入 10%胎牛血清(美国 Hyclone 公司)和 1%青霉素/链霉素(美国 Mediatech 公司)的高糖 Dulbecco 改良伊格尔培养基(DMEM)(美国 HyClone 公司)中培养;N2a 细胞置于脱氧无糖 DMEM(美国 HyClone 公司)进行氧糖剥夺(OGD)处理,缺氧条件(5%CO₂、1%O₂、94%N₂)下培养 4 h;置于含葡萄糖 DMEM,正常培养条件(5%CO₂、95%O₂)下于 12 h 进行复氧(R)处理。体外 OGD/R 模型建立并分为 6 组:空白对照组(control)、OGD/R 组(OGD/R)、OGD/R+转染 miR-29b 模拟物组(mimics)、OGD/R+转染 miR-29b 抑制剂组(inhibitor)、OGD/R+转染 miR-29b 模拟物阴性对照组(mimics NC)、OGD/R+转染 miR-29b 抑制剂阴性对照组(inhibitor NC)。

1.3 miRNA 模拟转染和实验分组

miR-29b 模拟物、miR-29b 抑制剂、模拟物 NC、抑制剂 NC 引物序列见表 1。按 2×10⁵ 细胞将 miR-29b 模拟各组 N2a 细胞培养于 6 孔板中,分别用 Lipofectamine™ 3000 试剂转染 200 μL 成熟 miR-29b 模拟物、miR-29b 抑制剂、模拟物 NC、抑制剂 NC 24 h,并相应分为 4 组。

表 1 miRNA 引物序列

名称	序列
miR-29b 模拟物	5'-UAGCACCAUUGAAAUCAGUGUU-3'
miR-29b 抑制剂	5'-AACACUGAUUCAAUGGUGCUA-3'
miR-29b 模拟物 NC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
miR-29b 抑制剂 NC	5'-CAGUACUUUUGUGUAGUACAA-3'

1.4 细胞活力检测

上述 4 组序列转染后,在 96 孔板每孔中加入 100 μL CCK-8 溶液,培养箱中孵育 1 h;酶标仪测

量 450 nm 处吸光度。

1.5 细胞凋亡检测

采用 annexin V/PI 凋亡试剂盒定量检测凋亡细胞。收集 4 组 N2a 细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,置于含 5 μ L annexin V (10 g/mL)的 200 μ L 结合缓冲液中重新悬浮,暗室中静置 10 min;置于 10 μ L PI (20 g/mL)中孵育;流式细胞仪(美国 Beckman 公司)检测细胞凋亡,CellQuest™ 软件(美国 BD Biosciences 公司)进行数据采集和分析。

1.6 蛋白分离和免疫印迹分析

常规方法对 4 组样本 2×10^6 N2a 细胞裂解后,提取总蛋白,进行免疫印迹分析。主要抗体为抗小鼠多克隆 MCL-1 抗体(1:20 000)、BCL-2 抗体(1:1 000)、caspase-3 抗体(1:1 000)、GAPDH 抗体(1:1 000)。采用化学发光试剂和 LAS4000 发光成像分析仪(美国 GE Healthcare 公司)观察蛋白印迹。

1.7 实时定量 PCR 检测

根据 TRIzol 试剂使用说明,从细胞中提取总 RNA, NanoDrop 1000 分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司)进行 RNA 定量;根据 Bestar qPCR RT 试剂盒(德国 DBI Bioscience 公司)使用说明,对每个样本 1 μ g 总 RNA 行逆转录,96 孔板和 7500 Fast PCR 仪行实时定量 PCR 检测。每 20 μ L PCR 反应体系包括 1 μ L 逆转录产物(1:5)、0.5 μ L 有义引物、0.5 μ L 通用逆转录引物、10 μ L 混合缓冲液(Bestar Sybr-Green qPCR master mix),加双蒸水至 20 μ L。反应条件为 94 $^{\circ}$ C,反应 2 min,94 $^{\circ}$ C 和 58 $^{\circ}$ C 循环 20 s,循环 40 次,72 $^{\circ}$ C 反应 20 s,所有反应重复 3 次。引物序列见表 2。

表 2 miR-29b 引物序列

名称	序列
miR-29b 正向	5'UAGCACCAUUGAAUACAGUGUU3'
miR-29b 反向	5'CTCAACTGCTGTCGTGGA3'
U6 正向	5'CTCGCTTCGGCAGCACA3'
U6 反向	5'AACGCTTCACGAATTTGCGT3'

1.8 重组质粒结构和双荧光素酶检测

从 GenBank 数据库中检索小鼠 MCL-1 mRNA (NM_000286) 3' 非翻译区(UTR)并应用合成引物: MCL-1 正向 5'GCTAGCCGCTACTAGGCTCCCC3', 反向 5'CGGGTAGTATATACGCGTCGTTAC3' 扩增。将产物克隆至 psiCheck™2 载体,重组载体扩增至重组大肠杆菌 DH5 α ,并用无内毒素质粒纯化试剂盒纯化。每片段分别用 Takara LA Taq(日本 TaKaRa 生物公司)PCR 扩增并克隆至载体。采用 KO-PLUS

诱变试剂盒使 MCL-1 3'UTR 序列中 miR-29b 结合位点突变。所有构建物均经限制性内切酶(上海生工生物工程公司)消化测序。

N2a 细胞在 6 孔板上接种密度为 1.0×10^5 细胞/mL,次日可达到 50%覆盖。miR-29b 转染 24 h,用上述 Lipofectamine™ 3000 转染 psiCheck™2-MCL-1-3'UTR-wt/-mut 质粒(美国 Invitrogen 公司),再孵育 24 h;收集细胞,测定荧光素酶活性,通过双荧光素酶报告器(美国 Promega 公司)和微孔板阅读器(美国 Biotek 公司)标准化荧光素酶活性。处理后的细胞样本与对照细胞样本的发光率,均给予 3 个独立样本转染的均值 \pm 标准差。

1.9 数据分析

实时定量 PCR 数据分析中,以相对定量法测定目标 miRNA 表达量变化。用 U6 RNA 对表达进行标准化,并测定扩增后变化。每个样本折叠变化用 $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 表达式计算法, $\Delta\Delta Cq = (Cq \text{ 目标基因} - Cq \text{ U6})_{\text{PIH}} - (Cq \text{ 目标基因} - Cq \text{ U6})_{\text{对照}}$ 。值 $2^{-\Delta\Delta Cq} > 1.5$ 或 < 0.67 考虑 miRNA 差异表达。 t 检验评估实时定量 PCR 检测的 miRNA 表达差异。采用 SPSS 17.0 软件分析其他实验数据。各组间 miRNA log10 转换相对数量比较用单因素方差分析,其基因间差异评价用 Post-Hoc 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-29b 与 MCL-1 相互作用

双荧光素酶实验显示,与 psiCheck™2-MCL-1-3'UTR-mut 转染细胞相比,miR-29b 模拟物和 psiCheck™2-MCL-1-3'UTR-wt 处理后 N2a 细胞中荧光素酶活性降低(图 1);结果表明 miR-29b 通过与 MCL-1 的 3'UTR 端结合下调 MCL-1 表达。

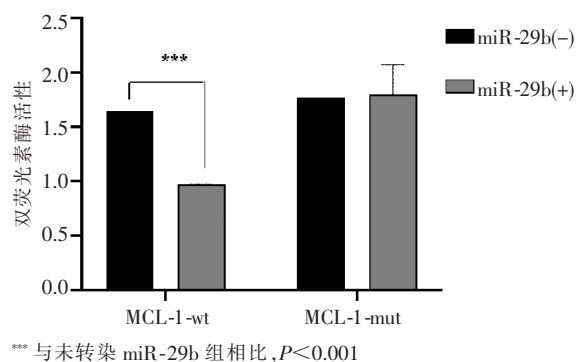


图 1 N2a 细胞中转染 miR-29b 模拟物与 MCL-1 3'UTR 端潜在 miR-29b 结合片段的相互作用

2.2 miR-29b 模拟物和抑制剂在 N2a 细胞中的作用
转染 24 h 后, OGD/R 组 miR-29b 水平与 control 组相比明显升高, mimics 组升高更明显, inhibitor 组升高不明显(图 2)。

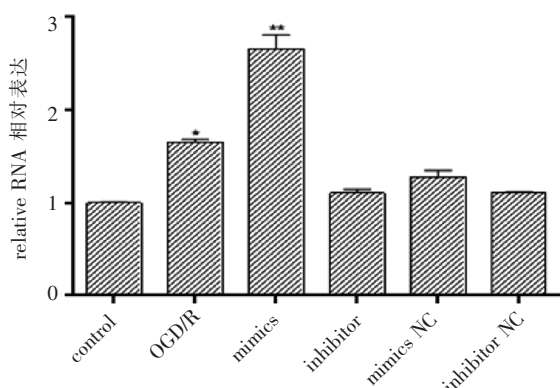
2.3 miR-29b 模拟物和抑制剂对细胞活力的影响

OGD/R 组细胞存活率与 control 组相比明显降低, mimics 组降低更加明显($P < 0.01$), inhibitor 组与 control 组无明显差别;表明 OGD/R 环境下 miR-29b

模拟物抑制 N2a 细胞活力, miR-29b 抑制剂促进 N2a 细胞存活(图 3)。

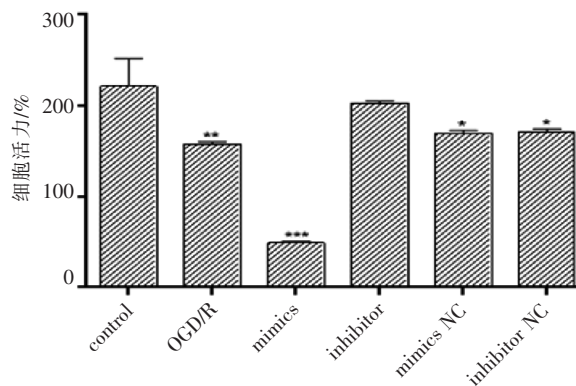
2.4 miR-29b 模拟物和抑制剂对细胞凋亡的影响

mimics 组细胞凋亡发生与 control 组相比显著升高, inhibitor 组与 mimics 组相比细胞凋亡较少(图 4);表明 OGD/R 环境下 miR-29b 模拟物促进神经细胞凋亡, miR-29b 抑制剂抑制神经细胞凋亡。



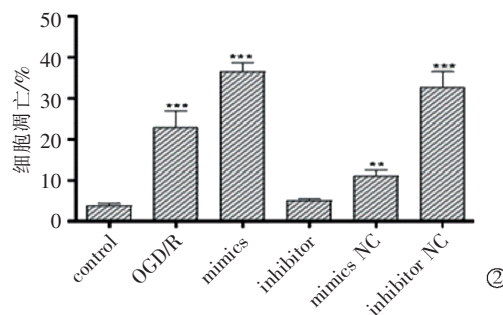
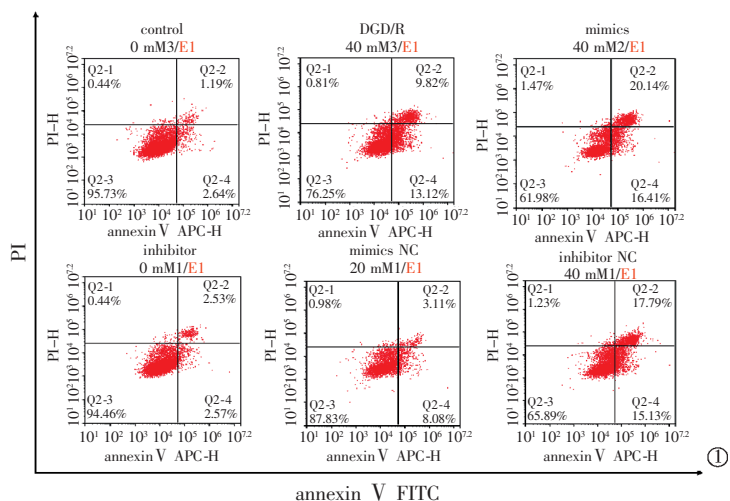
*同一时间点与 control 组相比, $P < 0.05$; **与 control 组相比, $P < 0.01$

图 2 miR-29b 模拟物和抑制剂在 N2a 细胞中的作用



*同一时间点与 control 组相比, $P < 0.05$; **与 control 组相比, $P < 0.01$; ***与 control 组相比, $P < 0.001$

图 3 miR-29b 模拟物和抑制剂对 N2a 细胞活力的影响



①脑 I/R 损伤模型中 N2a 细胞凋亡的点图; ②直方图

*同一时间点与 control 组相比, $P < 0.05$; **与 control 组相比, $P < 0.01$; ***与 control 组相比, $P < 0.001$

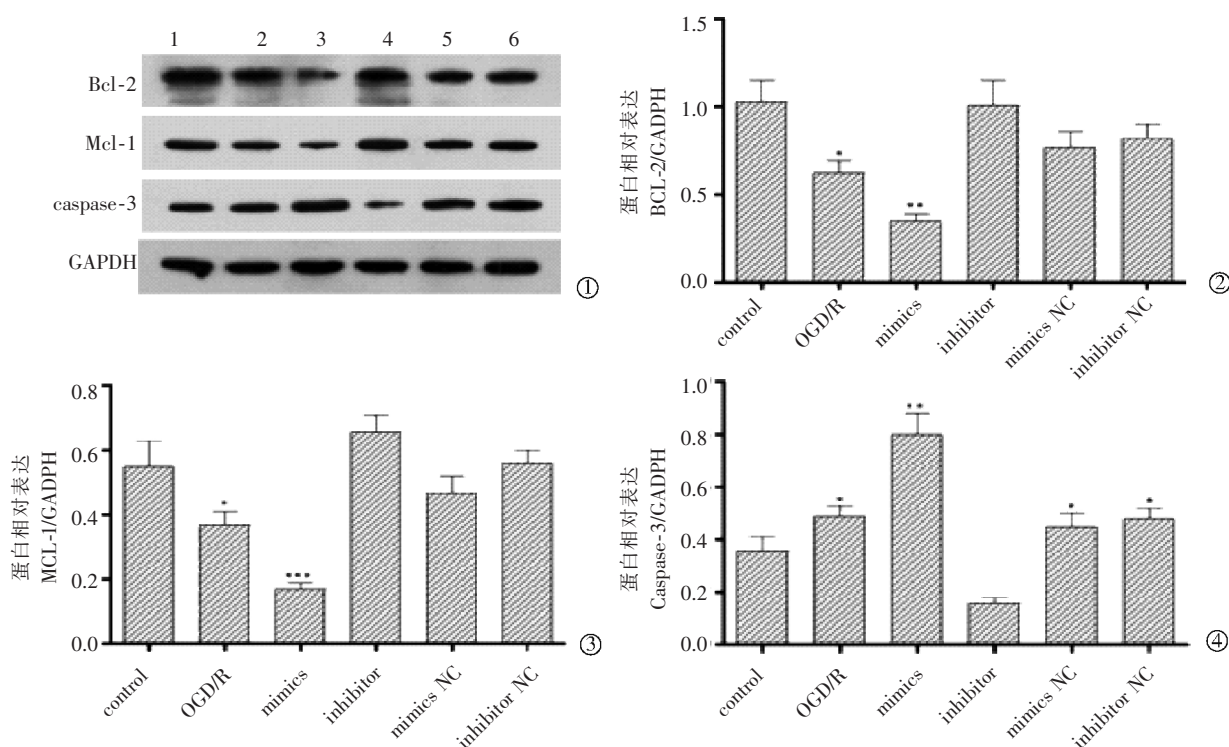
图 4 miR-29b 模拟物和抑制剂对细胞凋亡的影响

2.5 miR-29b 模拟物和抑制剂对凋亡蛋白的影响

OGD/R 组细胞中 BCL-2、MCL-1 表达水平与 control 组相比均明显下调, caspase-3 明显上调, mimics 组 BCL-2、MCL-1 表达进一步受抑, 但在 inhibitor 组明显上调, caspase-3 表达明显下调;表明 OGD/R 环境下 miR-29b 下调 MCL-1、BCL-2 表达, 同时上调 caspase-3 表达(图 5)。

3 讨论

研究表明脑 I/R 损伤是影响脑卒中预后的重要环节, OGD/R 环境下神经细胞凋亡明显增加^[11-12]。本实验研究结果与之一致。然而 OGD/R 环境下神经细胞凋亡机制不甚明确^[12]。许多研究表明, miRNA 在脑 I/R 损伤中起关键作用^[13-14]。miR-29b 是否有促进细胞凋亡的作用尚不明确^[15]。本研究结果表明,



①具代表性 BCL-2、MCL-1、caspase-3 蛋白印迹图像;②BCL-2 波段强度直方图;③MCL-1 波段强度直方图;④caspase-3 波段强度直方图

* 同一时间点与 control 组相比, $P < 0.05$; ** 与 control 组相比, $P < 0.01$; *** 与 control 组相比, $P < 0.001$

图 5 miR-29b 模拟物和抑制物对 N2a 细胞凋亡相关蛋白的影响

脑 I/R 过程中 miR-29b 表达明显升高, 且下调抗凋亡蛋白 MCL-1、BCL-2 表达, 上调凋亡蛋白 caspase-3 表达, 促进神经细胞凋亡, 但 miR-29b 促进神经细胞凋亡的具体机制仍不清楚。miR-29b 可直接与 MCL-1 3'UTR 端结合下调 MCL-1 表达, 因此推断 miR-29b 通过靶向下调 MCL-1 表达促进脑 I/R 时神经细胞凋亡。

以往大量研究关注 miR-29b 对肿瘤的调控作用。然而 miR-29b 在 OGD/R 环境下和脑 I/R 损伤患者神经细胞中也显著上调^[7,16]。有研究显示, 激活的 miR-29b 在神经元成熟过程中通过靶向 BH3 蛋白表达促进神经细胞凋亡^[17]。本实验研究表明 miR-29 可与 MCL-1 蛋白 3'UTR 端结合, 这与既往研究结果一致。BCL-2 家族可分为抗凋亡因子或促凋亡因子, 它们通过改变线粒体膜完整性和功能发挥作用, 也影响凋亡信号转导通路。BCL-2 家族由 3 个亚群组成: ①促生存蛋白, 如 BCL-2、BCL-xl (BCL-2L1)、BCL-w (BCL-2L2)、MCL-1 和 A1; ②多域促凋亡蛋白, 如 BAX 和 BAK; ③BH3 域促凋亡蛋白, 如 BIM、PUMA (BBC3)、BID、BAD、BIK、BMF、HRK 和 NOXA (PMAIP1)^[18-20]。MCL-1 是 BCL-2 家族中重要的抗凋亡蛋白, 抑制 MCL-1 可通过线粒体途径促进

细胞死亡; MCL-1 还参与脑 I/R 损伤过程中神经细胞凋亡^[21]。因此, 本研究考虑 miR-29b 与 MCL-1 间相互作用, 是神经细胞凋亡过程中关键因素之一。Shi 等^[22]研究也表明, 一些 miRNA 直接针对 BCL-2 家族蛋白 3'UTR 端, 如 miR-15b 在永久性大脑中动脉闭塞 (MCAO) 后高表达, 可能直接针对 BCL-2。miR-491-5p 也被认为可结合 BCL-xl (BCL-2L1) mRNA, 这是 BCL-2 家族中抗凋亡成员之一^[23]。此外, miR-29b 上调通过抑制缺血后脑损伤 BCL-2L2 蛋白促进神经元细胞凋亡^[24]。许多化疗药物通过下调肿瘤细胞中 MCL-1 表达诱导细胞凋亡, 本中心既往研究结果表明靶向 miR-29b 也可能通过抑制 MCL-1 表达成为脑 I/R 损伤的治疗靶点^[25]。本研究再次证实该结果。

本研究在蛋白质和组织学水平证实本中心最初假设, 即 miR-29b 通过靶向 MCL-1 促进脑 I/R 损伤过程中神经细胞凋亡。然而本研究也有一定局限性, 如实验数据是在体外环境中应用 miR-29b 模拟物所获得, 可能不能准确反映体内效应。本中心计划在 MCAO 动物模型中进一步实验探索脑 I/R 损伤与 miR-29b 抑制剂或 MCL-1 过表达间的治疗关系。此外, 需要进一步实验验证 miR-29b 在脑 I/R 损

伤中靶向 MCL-1 的神经损伤和神经保护作用,探讨 miR-29b 在脑 I/R 损伤时神经元细胞中的功能和机制,以期对缺血性脑卒中患者开发出新的治疗靶点。

[参考文献]

- [1] 中国老年医学学会急诊医学分会,中华医学会急诊医学分会卒中医学组,中国卒中学会急救医学分会. 急性缺血性脑卒中急诊急救中国专家共识 2018 版(上)[J]. 心脑血管病防治, 2019, 19:201-204.
- [2] 周腾飞,朱良付,李天晓. 影响急性缺血性脑卒中血管内治疗预后的相关因素分析[J]. 介入放射学杂志, 2017, 26:99-104.
- [3] 刘天助,韩志安,李铁林,等. 急性缺血性脑卒中机械取栓治疗进展[J]. 中华神经医学杂志, 2015, 14:1185-1188.
- [4] De Gasperi R, Graham ZA, Harlow LM, et al. The signature of microRNA dysregulation in muscle paralyzed by spinal cord injury includes downregulation of microRNAs that target myostatin signaling[J]. PLoS One, 2016, 11: e0166189.
- [5] Xia HF, Jin XH, Cao ZF, et al. MicroRNA expression and regulation in the uterus during embryo implantation in rat [J]. FEBS J, 2014, 281: 1872-1891.
- [6] Floris I, Kraft JD, Altosaar I. Roles of microRNA across prenatal and postnatal periods[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17: 1994.
- [7] Di Y, Lei Y, Yu F, et al. MicroRNAs expression and function in cerebral ischemia reperfusion injury[J]. J Mol Neurosci, 2014, 53: 242-250.
- [8] Jafarinejad - Farsangi S, Farazmand A, Mahmoudi M, et al. MicroRNA-29a induces apoptosis via increasing the Bax: Bcl-2 ratio in dermal fibroblasts of patients with systemic sclerosis[J]. Autoimmunity, 2015, 48: 369-378.
- [9] Xu L, Xu Y, Jing Z, et al. Altered expression pattern of miR-29a, miR-29b and the target genes in myeloid leukemia[J]. Exp Hematol Oncol, 2014, 3: 17.
- [10] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF, et al. Mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis[J]. Oncogene, 2007, 26: 6133-6140.
- [11] Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia[J]. J Neurosci, 2005, 25: 10262-10272.
- [12] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. Stroke, 2009, 40: E331-E339.
- [13] Ziu M, Fletcher L, Rana S, et al. Temporal differences in microRNA expression patterns in astrocytes and neurons after ischemic injury[J]. PLoS One, 2011, 6: e14724.
- [14] Uhlmann S, Mracsko E, Javidi E, et al. Genome-wide analysis of the circulating miRNome after cerebral ischemia reveals a reperfusion-induced microRNA cluster[J]. Stroke, 2017, 48: 762-769.
- [15] Pekarsky Y, Croce CM. Is miR-29 an oncogene or tumor suppressor in CLL?[J]. Oncotarget, 2010, 1: 224-227.
- [16] Altintas O, Ozgen Altintas M, Kumas M, et al. Neuroprotective effect of ischemic preconditioning via modulating the expression of cerebral miRNAs against transient cerebral ischemia in diabetic rats[J]. Neurol Res, 2016, 38: 1003-1011.
- [17] Annis RP, Swahari V, Nakamura A, et al. Mature neurons dynamically restrict apoptosis via redundant premitochondrial brakes [J]. FEBS J, 2016, 283: 4569-4582.
- [18] Delgado-Soler L, Del Mar OM, Rubio-Martinez J. Structure-based approach to the design of BakBH3 mimetic peptides with increased helical propensity[J]. J Mol Model, 2013, 19: 4305-4318.
- [19] Santiveri CM, Shorgi L, de Alba E. Nuclear magnetic resonance study of protein-protein interactions involving apoptosis regulator diva(boo) and the BH3 domain of proapoptotic Bcl-2 members [J]. J Mol Recognit, 2012, 25: 665-673.
- [20] Smits C, Czabotar PE, Hinds MG, et al. Structural plasticity underpins promiscuous binding of the prosurvival protein A1[J]. Structure, 2008, 16: 818-829.
- [21] Dewson G. Characterizing Bcl-2 family protein conformation and oligomerization using cross-linking and antibody gel-shift in conjunction with native PAGE [J]. Methods Mol Biol, 2016, 1419: 185-196.
- [22] Shi H, Sun BL, Zhang J, et al. MiR-15b suppression of Bcl-2 contributes to cerebral ischemic injury and is reversed by sevoflurane preconditioning[J]. CNS Neurol Disord Drug Targets, 2013, 12: 381-391.
- [23] Denoyelle C, Lambert B, Meryet-Figuere M, et al. MiR-491-5p-induced apoptosis in ovarian carcinoma depends on the direct inhibition of both BCL-XL and EGFR leading to BIM activation [J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1445.
- [24] Shi G, Liu Y, Liu TL, et al. Upregulated miR-29b promotes neuronal cell death by inhibiting Bcl2L2 after ischemic brain injury[J]. Exp Brain Res, 2012, 216: 225-230.
- [25] Huang Z, Lu L, Jiang T, et al. MiR-29b affects neurocyte apoptosis by targeting MCL-1 during cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Exp Ther Med, 2018, 16: 3399-3404.

(收稿日期:2020-06-18)

(本文编辑:秋 实)