

# microRNAs 在脑出血后病理生理机制中的作用

王承 综述 万曙 周永庆 审校

浙江大学医学院附属第一医院王忠诚神经外科中心, 浙江 杭州 310003

**摘要:**脑出血是一种高发病率和死亡率的疾病,出血后的一系列继发性反应可以造成的严重的神经功能损伤。近年来,研究发现多个 microRNA 在脑出血后异常表达,参与了出血后的氧化损伤、炎症、水肿以及神经细胞凋亡等多个病理生理过程,从而加重了脑出血后继发性脑损伤。本文综述了目前 microRNAs 在脑出血后病理生理机制中作用的相关研究。

**关键词:**脑出血;microRNA;细胞凋亡;水肿;炎症

脑出血 (Intracerebral hemorrhage, ICH) 是一种常见脑血管疾病,约占全部脑卒中患者总数的 10%~15%,致残率及病死率较高。其常见病因有高血压、脑血管淀粉样变性、出血倾向、血管畸形等。ICH 引起的脑损伤主要表现为血肿的占位效应和对周围脑组织的直接破坏造成的原发性损伤以及出血后引起的一系列继发性反应造成的损伤。ICH 后血肿周围脑组织随着时间推移会出现炎症、水肿、细胞凋亡及坏死。越来越多的研究表明 microRNAs (micro-ribonucleic acid) 参与了脑出血后脑损伤的多个环节,其机制十分复杂。现综述如下:

## 1 microRNAs

microRNAs (miRNA) 是指长度约 21~25 个核苷酸的小型非编码 RNA 家族。microRNA 基因通过 RNA 聚合酶 II 转录合成原始 microRNA (pri-microRNA), 然后经 Drosha 酶切产生大小约为 70 个核苷酸并形成茎环结构的 microRNA (pre-microRNA); pre-microRNA 通过 Ran-GTP 依赖性核浆转运子 Exportin5 从核内转移至细胞质中。在细胞质中, Dicer 酶将 pre-microRNA 剪切形成一个不完全配对的双链的 RNA 片段即 microRNA 和 microRNA 双体。这种双链很快被引导进入 RNA 诱导复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 中。RISC 根据 microRNA 的序列的互补性, 识别 mRNA (messenger RNA) 3' UTR, 而在转录后水平上对基因的表达行负调控功能。当 microRNA 与靶 mRNA 完全或几乎完全配对时, 则导致 mRNA 的降解。这种转录后沉默的过

程称为 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi)。microRNAs 已被证实可以作为有效的生物标志应用于多种疾病的诊疗中。

## 2 microRNAs 与神经细胞死亡

ICH 后, 由于血肿周围脑组织的水肿造成神经细胞的坏死和凋亡, 并引起一系列临床症状。细胞凋亡是内部或外部信号诱导的程序性细胞死亡。DNA 的损伤、缺氧及葡萄糖的缺乏可以作为内部信号, 介导内源途径, 引起线粒体功能障碍, 导致多种促凋亡蛋白的释放。如细胞色素 C、内切酶 G、凋亡诱导因子 (AIF) 等, 从而启动细胞凋亡程序。同时, 配体-受体结合的方式可以作为外部信号激活外源途径导致细胞凋亡。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和 FASL (Fas ligand) 可以分别与其受体相结合而形成死亡诱导信号复合物 (the death inducing signaling complex, DISC), DISC 切割 procaspase-3 从而形成 caspase-3。Caspase-3 作为细胞凋亡的关键因子, 裂解细胞功能相关的重要蛋白并导致细胞凋亡。

多个 microRNA 已经被证明对凋亡调控基因有靶向作用。miR-125b 作为一种脑组织中富含的 microRNA, 已被证实能调控 p53 基因<sup>[1]</sup>。当 miR-125b 表达下调时, P53 表达增加, 从而启动 Bak1 (Bcl-2 antagonist killer-1)、Bad (Bcl-2 antagonist of cell death) 及 Bax (Bcl-2-associated X protein) 等促凋亡基因的转录, 进而通过内源途径引起细胞凋亡。同时, miR-15, miR-16 和 miR-34a 也被证明对抗调

**基金项目:**浙江省钱江人才计划项目 (2010R10069); 浙江省中医药科学研究基金 (2010ZA066); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2010KYA125)

**收稿日期:**2012-04-10; **修回日期:**2012-06-07

**作者简介:**王承 (1979-), 男, 硕士研究生, 目前在浙江中医药大学附属第二医院神经外科工作, 主要从事脑血管疾病的基础与临床研究。

**通讯作者:**万曙 (1974-), 男, 医学博士, 副主任医师, 主要从事脑血管疾病病理生理机制的研究。

亡蛋白 Bcl-2 ( B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma 2 ) 有调控作用, 这些 microRNA 的上调将诱导细胞凋亡<sup>[2]</sup>。Let-7a 被发现可以通过抑制 caspase-3 表达而减少细胞凋亡, 在损伤后 0 ~ 48 小时, 人和大鼠的 Let-7a 表达均明显减少, 而同时期细胞凋亡持续发生<sup>[3]</sup>。miR-17-92 簇、miR-181a 和 miR-25 被证实能通过调控 Bcl-2 相互作用蛋白 Bim 而减少凋亡发生。Park 等<sup>[4]</sup>研究发现, miR-29 能通过抑制 p53 $\alpha$  和 CDC42 诱导 P53 表达从而增加细胞凋亡, p53 $\alpha$  可以通过 AKT 激活 MDM2 蛋白 E3 连接酶导致 p53 的降解, CDC42 和 p53 之间的作用机制尚不清楚, 人脑卒中样本中可以发现 miR-29 表达上调。同样, miR-200c 也被证实可以通过抑制 Fas 相关蛋白酪氨酸磷酸酶 1 ( FAP-1 ) 的表达而诱导细胞凋亡<sup>[5]</sup>。miR-21 可以通过调控 Fas 配体从而起到减少细胞凋亡的作用<sup>[6]</sup>。在最近的脑缺血研究中已证实 miR-21 可以通过减少细胞凋亡而起到神经保护作用<sup>[7]</sup>。因此, 多种 miRNA 参与了脑出血后的细胞凋亡过程, 并发挥了不同的作用, 通过对其调控也许可以减轻 ICH 后的细胞凋亡。

### 3 microRNAs 与兴奋性毒性和氧化损伤

脑卒中后兴奋性毒性作用已经越来越被重视, 主要机制是兴奋性神经递质受体过度刺激导致神经元内钙离子的集聚。兴奋性氨基酸 ( excitatory amino acids, EAAs ) 是中枢神经系统的兴奋性递质, 广泛存在于哺乳动物中, 以谷氨酸 ( glutamate, Glu ) 和天门冬氨酸 ( aspartic acid, Asp ) 为主。在中枢神经系统中, 主要有三种类型的谷氨酸受体, 分别为 AMPA 受体、NMDA 受体以及 mGluR ( metabotropic glutamate receptor )。谷氨酸与 AMPA 受体或 NMDA 受体结合可以促进钙离子涌入神经元, 与 mGluR 结合可以导致细胞内存储钙的释放。这将导致细胞内钙的集聚, 从而改变细胞的渗透压, 并造成神经元的去极化以及更多的谷氨酸释放。钙离子还可以激活钙依赖性内源酶, 如蛋白酶、内切酶和脂肪酶, 从而分解神经元的一些重要的大分子如结构蛋白、膜脂和 DNA。Chiang 等<sup>[8]</sup>测定 75 例 ICH 患者脑脊液中 EAAs 含量后发现 Glu 和 Asp 均明显高于正常水平, 并且 EAAs 升高水平与患者预后情况呈正相关。

ICH 后的氧化损伤将导致神经细胞的死亡。大脑处于高氧的环境中且富含脂质和铁所以非常

容易受到氧化损伤。ICH 后的氧化损伤主要由红细胞裂解物引起, 血肿的红细胞由补体级联反应产生的膜攻击复合物 ( membrane attack complex, MAC ) 裂解。红细胞所释放的血红蛋白被血红素加氧酶 2 ( hemoxygenase 2, HO<sub>2</sub> ) 分解产生铁, 然后铁经过芬顿反应 ( Fenton reaction ) 产生活性氧 ( ROS )。同时, ICH 后血肿周围嗜中性粒细胞和巨噬细胞聚集, 也是产生活性氧的重要途径。活性氧能损害重要的生物大分子, 如核酸, 蛋白质和脂质。最有害的氧化损伤是脂质过氧化, 它可以导致脑屏障的破坏从而加重脑损伤<sup>[9]</sup>。脂质过氧化的产物 4-HNE ( 4-hydroxynonenal ) 也具有神经毒性并能造成神经细胞死亡。

在小鼠模型中, miR-125b 已被发现能调控 NMDA 受体的 NR2A 亚基, 通过对 NR2A 的负调控, 减轻了兴奋性毒性的损伤<sup>[10]</sup>。另外, miR-101 被发现能负调控 COX2 ( Cyclooxygenase 2 ), COX2 在经花生四烯酸途径生成白三烯过程中起到重要作用, 后者是强效的炎性介质并能增加活性氧的产生, 从而造成氧化损伤。在脑缺血的研究中发现, 伴随着 COX2 表达的增加, miR-101 表达明显下降, 因此, 在脑卒中后上调 miR-101 可能有助于减少由 COX2 诱导产生的活性氧从而减轻氧化损伤<sup>[11]</sup>。

### 4 microRNAs 与炎症

炎症是 ICH 后的常见反应, 破裂的血管引起了炎性细胞的浸润和补体系统的激活, 并且, 血液中的凝血酶也可以引起炎症。炎症涉及细胞因子、趋化因子的分泌和释放以及免疫细胞的聚集。部分病人可出现发热和脑水肿。小胶质细胞和神经胶质细胞分泌的单核细胞趋化蛋白-1 ( monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1 ) 作为一种趋化因子, 可以引起白细胞向脑实质内的浸润<sup>[12]</sup>。另外, 补体系统也在炎症反应中起到重要作用, 凝血酶可能通过溶蛋白性裂解而引发补体级联反应, 激活的补体系统通过 C3a 引起更多的炎性细胞向血肿周围脑组织浸润<sup>[13]</sup>。C3a 能活化内皮细胞, 破坏血脑屏障, 从而增加炎性细胞的外渗。

最近研究发现多个 microRNA 参与了炎症相关基因的调控, 而成为了另一种潜在的炎症介质。VCAM-1 的是一个重要的粘附分子, 其有助于炎性细胞的浸润, 已被证实受到 miR-126 的调控<sup>[14]</sup>, 在人和大鼠的卒中模型中均发现 miR-126 表达的下

调。miR-155 已被报导可以调控造血转录因子 PU.1, 从而影响单核细胞/巨噬细胞的分化<sup>[15]</sup>。也许可以利用 miR-155 降低成熟单核细胞数量从而减轻炎症反应。miR-17-92 簇已被证实通过调控 RUNX1 (Runt-related transcription factor 1) mRNA 而参与单核细胞分化<sup>[16]</sup>。miR-146 通过调控白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 受体相关激酶 1 (IRAK-1) 基因表达, 而参与 IL-1 的信号传递<sup>[17]</sup>。上调 miR-146 也许可以减弱 IL-1 的促炎症信号。同样, miR-146a/b 对促炎症细胞因子 IL-6 和 IL-8 起到调控作用<sup>[18]</sup>。miR-106a 的调控目标是抗炎症细胞因子 IL-10, 在人和大鼠的 miRNA 表达谱中均发现 miR-106a 的下调<sup>[3]</sup>。miR-21 被观察到对基质金属蛋白酶抑制剂 RECK 和 TIMP3 有调控作用<sup>[19]</sup>, 同时, miR-181b 对 TIMP3 也有调控作用<sup>[20]</sup>。最近的研究发现, 补体因子 H 作为脑组织中重要的调控分子, 可以抑制补体系统的活性, 其受到 miR-146a 的调控<sup>[21]</sup>, 下调 miR-146a 或许可以减少补体引起的红细胞裂解。因此, miRNA 参与炎症细胞分化、炎症介质的信号传递以及炎症细胞的粘附等多个环节, 但其具体机制尚不清楚, 通过对相关 miRNA 的调控可能减轻脑出血后继发性炎症反应, 从而发挥神经保护作用。

## 5 microRNAs 与脑水肿

ICH 后脑组织会出现明显的脑水肿, 水肿会增加颅内压并导致神经细胞死亡。水通道蛋白 (aquaporins AQP) 作为水转运渠道, 已被证实参与了水肿的形成, 脑组织中的 AQP 主要类型为 AQP1、AQP4 和 AQP9<sup>[22]</sup>。AQP 除了参与水肿的形成, 还参与了中枢神经系统的细胞凋亡<sup>[23]</sup>。ICH 后 AQP4 的表达明显升高<sup>[24]</sup>。ICH 后细胞外基质 (Extracellular matrix ECM) 失去其完整性也导致了脑水肿的形成。Wang 等<sup>[25]</sup>研究发现, miR-143 抑制了多功能蛋白聚糖的形成, 而后者是一种保证 ECM 完整性的一种重要蛋白。同时, miR-29c 也被证实对 ECM 中的胶原蛋白的产生有调控作用, ICH 后大鼠和人的 miR-29c 表达均降低<sup>[26]</sup>。所以, 下调 miR-29c 和 miR-143 也许可以保护 ECM 从而减轻脑水肿。最近, Sepramaniam 等<sup>[27]</sup>研究发现 miR-320a 对 AQP1 和 AQP4 的负调控作用。在大鼠脑缺血模型中, 可以观察到 miR-320a 持续降低, 直至再灌注后 18 小时, 这正是急性损伤阶段脑水肿的形成期, 上调 miR-320a 或许能减轻急性期的脑

水肿。

从上述研究结果可以看到, microRNA 在多个环节参与了 ICH 后的病理生理机制, 这为 microRNA 进一步应用于临床, 改善 ICH 患者预后提供了部分理论基础。但是, microRNA 数量众多, 存在多个 microRNA 调控一个基因及一个 microRNA 多种调控作用的情况, 后续仍需大量研究以明确其作用机制。miRNA 最诱人的应用价值在于其具备疾病特异性的个体化靶向治疗潜力, 这种个体化的医学模式代表着疾病治疗的未来方向。相信通过更加深入的研究, 在不久的将来, 可以发展出一种基于 microRNA 的全新治疗策略, 以减轻脑出血后继发性脑损伤, 从而改善患者预后。

## 参考文献

- [1] Le MT, Teh C, Shyh-Chang N, et al. MicroRNA-125b is a novel negative regulator of p53. *Genes Dev*, 2009, 23 (7): 862-876.
- [2] Bommer GT, Gerin I, Feng Y, et al. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol*, 2007, 17 (15): 1298-1307.
- [3] Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30 (1): 92-101.
- [4] Park SY, Lee JH, Ha M, et al. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol*, 2009, 16 (1): 23-29.
- [5] Schickel R, Park SM, Murmann AE, et al. miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol Cell*, 2010, 38 (6): 908-915.
- [6] Sayed D, He M, Hong C, et al. MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem*, 2010, 285 (26): 20281-20290.
- [7] Buller B, Liu X, Wang X, et al. MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J*, 2010, 277 (20): 4299-4307.
- [8] Chiang MF, Chiu WT, Lin FJ, et al. Multiparametric analysis of cerebral substrates and nitric oxide delivery in cerebrospinal fluid in patients with intracerebral haemorrhage: correlation with hemodynamics and outcome. *Acta Neurochir (Wien)*, 2006, 148 (6): 615-621.
- [9] Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke*, 2009, 4 (6): 461-470.
- [10] Edbauer D, Neilson JR, Foster KA, et al. Regulation of

- synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 2010, 65 (3): 373-384.
- [11] Dharap A, Bowen K, Place R, et al. Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral microRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29 (4): 675-687.
- [12] Becker KJ. Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke. *Curr Opin Neurol*, 2001, 14 (3): 349-353.
- [13] Gong Y, Xi GH, Keep RF, et al. Complement inhibition attenuates brain edema and neurological deficits induced by thrombin. *Acta Neurochir*, 2005, 95: 389-392.
- [14] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (5): 1516-1521.
- [15] Martinez-Nunez RT, Louafi F, Friedmann PS, et al. microRNA-155 modulates pathogen binding ability of dendritic cells by downregulation of DC specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DCSIGN). *J Biol Chem*, 2009, 284 (24): 16334-16342.
- [16] Fontana L, Pelosi E, Greco P, et al. microRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopoiesis through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (7): 775-787.
- [17] Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, et al. NFkappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (33): 12481-12486.
- [18] Bhaumik D, Scott GK, Schokrpur S, et al. microRNAs miR-146a/b negatively modulate the senescence-associated inflammatory mediators IL-6 and IL-8. *Aging (Albany NY)*, 2009, 1 (4): 402-411.
- [19] Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, et al. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*, 2008, 28 (17): 5369-5380.
- [20] Wang B, Hsu SH, Majumder S, et al. TGFbeta-mediated upregulation of hepatic miR-181b promotes hepatocarcinogenesis by targeting TIMP3. *Oncogene*, 2010, 29 (12): 1787-1797.
- [21] Lukiw WJ, Zhao Y, Cui JG. An NF-kappaB-sensitive microRNA-146a-mediated inflammatory circuit in Alzheimer disease and in stressed human brain cells. *J Biol Chem*, 2008, 283 (46): 31315-31322.
- [22] Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, et al. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22 (4): 367-378.
- [23] Jessica Chen M, Sepramaniam S, Armugam A, et al. Water and ion channels: crucial in the initiation and progression of apoptosis in central nervous system? *Curr Neuropharmacol*, 2008, 6 (2): 102-16.
- [24] Wu H, Zhang Z, Li Y, et al. Time course of upregulation of inflammatory mediators in the hemorrhagic brain in rats: correlation with brain edema. *Neurochem Int*, 2010, 57 (3): 248-253.
- [25] Wang X, Hu G, Zhou J. Repression of versican expression by microRNA-143. *J Biol Chem*, 2010, 285 (30): 23241-23250.
- [26] Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, up-regulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105 (15): 5874-5878.
- [27] Sepramaniam S, Armugam A, Lim KY, et al. MicroRNA 320a functions as a novel endogenous modulator of Aquaporins 1 and 4 as well as a potential therapeutic target in cerebral ischemia. *J Biol Chem*, 2010, 285 (38): 29223-29230.