

本文引文格式:黄建敏,陈海燕,云艳芳,等.过表达 *BIRC5* 基因对氧糖剥夺/复氧诱导的脑微血管内皮细胞活性及 VEGF 表达的影响[J].右江民族医学院学报,2024,46(1):1-6,12.

【论著与临床报道】

过表达 *BIRC5* 基因对氧糖剥夺/复氧诱导的脑微血管内皮细胞活性及 VEGF 表达的影响

黄建敏,陈海燕,云艳芳,杨桂新,蒋勇明,李晓岚,韦宝莹,周莹杰,彭立志,莫芬,李雪斌
(右江民族医学院附属医院神经内科,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨过表达 *BIRC5* 基因对氧糖剥夺/复氧(OGD/R)诱导的小鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用,并分析其可能的机制。方法 将小鼠源性脑微血管内皮细胞,根据不同干预方式分为正常对照组(细胞正常培养)、细胞损伤组(细胞正常培养 24 h,随后 OGD3h/R3h 损伤细胞)、*BIRC5* 干预组(细胞预先转染腺病毒-*BIRC5* 质粒并培养 24 h,随后 OGD3h/R3h 处理)和阴性对照组(细胞预先转染腺病毒空质粒并培养 24 h,随后 OGD3h/R3h 处理)。采用激光共聚焦显微镜观察各组细胞形态学变化;用 MTT 法和流式细胞仪分别检测各组细胞存活率和凋亡率;用 RT-PCR 和免疫印迹法分别检测各组细胞 *BIRC5* 和 VEGF mRNA 及蛋白表达。结果 正常对照组的细胞骨架微丝彼此连接,分布规则,丝网状有序排列;细胞损伤组和阴性对照组的细胞微丝断裂,收缩变短或移向周边,微丝网状排列紊乱,可见细胞外形皱缩,间隙加大,少部分微丝缺失出现空隙;*BIRC5* 干预组的细胞微丝连接,形态成长梭形,排列较规则,可见细胞间隙缩小,显示过表达 *BIRC5* 基因能够减轻损伤细胞的骨架微丝紊乱。与正常对照组相比,细胞损伤组、*BIRC5* 干预组及阴性对照组细胞存活率降低,而细胞凋亡率增高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与细胞损伤组相比,*BIRC5* 干预组的细胞存活率增高,而细胞凋亡率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常对照组相比,细胞损伤组、*BIRC5* 干预组和阴性对照组的 *BIRC5* 和 VEGF 的 mRNA 及蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与细胞损伤组相比,*BIRC5* 干预组细胞 *BIRC5* 和 VEGF 的 mRNA 及蛋白表达增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 过表达 *BIRC5* 基因对 OGD/R 诱导的脑微血管内皮细胞损伤具有保护作用,机制可能与上调 VEGF 表达有关,提示 *BIRC5* 调控 VEGF 表达促进血管新生可能是脑侧支循环建立和形成的重要机制之一。

关键词:过表达 *BIRC5* 基因;脑微血管内皮细胞;存活;凋亡;氧糖剥夺/复氧;血管内皮生长因子

中图分类号:R743 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2024)01-0001-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2024.01.001

Effect of over-expression of *BIRC5* gene on the activity and VEGF expression of cerebral microvascular endothelial cells induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation

Huang Jianmin, Chen haiyan, Yun Yanfang, Yang Guixin, Jiang Yongming,
Li Xiaolan, Wei Baoying, Zhou Yingjie, Peng Lizhi, Mo Fen, Li Xuebin

(Department of Neurology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical
University For Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of over-expression of *BIRC5* gene on microvascular endothelial cell injury induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) in mouse brain, and to analyze its possible mechanism. **Methods** According to different intervention methods, mouse brain microvascular endothelial cells were divided into normal control group (normal cell culture), cell damage group

基金项目:国家自然科学基金项目(81860226)

第一作者:黄建敏,博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:缺血性脑卒中发病机制及治疗学研究,E-mail:bshuangjianmin@126.com

通讯作者:李雪斌,博士,教授,博士/硕士研究生导师,研究方向:卒中后抑郁发病机制研究,E-mail:yyfylxb@163.com

(normal cell culture for 24 hours, followed by OGD3h/R3h injury), BIRC5 intervention group (The cells were transfected with BIRC5 plasmids of adenovirus and cultured for 24 hours and then underwent OGD for 3 hours/R for 3 hours.) and negative control group (The cells were transfected with empty plasmids of adenovirus and cultured for 24 hours and then underwent OGD for 3 hours/R for 3 hours.) . Laser confocal microscope was used to observe the morphological changes of cells in each group. The cell survival rate and apoptosis rate were detected by MTT and flow cytometry, respectively. The mRNA and protein expressions of *BIRC5* and *VEGF* were detected by RT-PCR and Western blot, respectively. **Results** The cytoskeletal microfilaments of the normal control group were connected with each other and regularly distributed in an orderly network. In the injury group and negative control group, the microfilaments of the cells were broken, and the contraction of the cells became shorter or moved to the periphery; the microfilaments were arranged in a disordered network; the cell appearance was shrunk, the gap enlarged and a small number of microfilaments missing with gaps; In the BIRC5 intervention group, the microfilaments of cells were connected, spindle shaped with regular arrangement and reduced gap between cells, indicating that the overexpression of *BIRC5* gene could reduce the disorder of cytoskeletal microfilaments of damaged cells. Compared with the normal control group, the cell damage group, the BIRC5 intervention group and the negative control group had significantly reduced cell survival rates, but had significantly increased apoptosis rates, showing significant differences ($P < 0.05$). Compared with those of the cell damage group, the cell survival rate of the BIRC5 intervention group was significantly increased, while the apoptosis rate was significantly reduced, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). As compared with normal control group, *BIRC5* and *VEGF* mRNA and protein in cell damage group, BIRC5 intervention group and negative control group was significantly reduced, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the cell damage group, the BIRC5 intervention group had significantly increased mRNA and protein expressions of *BIRC5* and *VEGF*, showing significant differences ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of the *BIRC5* gene has a protective effect on microvascular endothelial cell injury induced by oxygen glucose deprivation/reoxygenation, and the mechanism may be related to its up-regulation of *VEGF* expressions, suggesting that *BIRC5*'s regulation of *VEGF* expressions to promote angiogenesis may be one of the important mechanisms for the establishment and formation of good cerebral collateral circulation.

Key words: overexpression of *BIRC5* gene; cerebral microvascular endothelial cells; survival; apoptosis; oxygen and sugar deprivation/reoxygenation; vascular endothelial growth factor

缺血性脑卒中具有高发病率、高致残率、高致死率的特点,在我国,已经成为首位致死的原因,而且发病率呈现逐年上升趋势,不仅严重威胁国民的生命健康,同时还给家庭及社会带来了沉重负担。在临床病例中发现,缺血性脑卒中患者预后好坏跟软脑膜侧支循环代偿存在密切相关^[1]。研究显示,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是迄今为止发现最强、最有特异性的促血管生成的生长因子,在生理和病理性的血管生成中均发挥着重要的作用,在缺血性血管性疾病治疗中的应用已经受到广泛关注^[2]。研究已经证实,软脑膜微血管是在遗传基因调控下,由胚胎期的中胚层细胞分化而来的血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)经过血管生成形成原始的毛细血管丛,随后在 VEGF 等环境因素影响下对该血管丛进行重塑修剪并逐步成熟,显示遗传因素对软脑膜侧支循环形成起决定性作用^[3]。杆状病毒 IAP 重复序列蛋白 5(baculoviral IAP repeat-containing protein 5, BIRC5)是近年来新发现的一种分子量

最小、作用最强的凋亡抑制蛋白,由 *BIRC5* 基因编码。研究发现,*BIRC5* 基因可以参与 VECs 增殖、迁移、侵袭以及抵抗细胞凋亡和血管新生的调控,克服 VECs 自身功能缺陷,促进新生微血管生成,提示该基因在侧支循环代偿进程中可能起重要的调控作用^[4],从而推测靶向 *BIRC5* 基因治疗缺血性脑卒中可能具有巨大的潜能,但是其疗效及具体机制尚未清楚。bEnd.3 细胞是脑微 VECs 系,来源于 BALB/c 小鼠大脑内皮细胞,细胞纯度高、性质稳定、传代快,是建立体外血管发生病理生理变化模型的理想细胞^[5]。因此,本研究以小鼠脑微 VECs bEnd.3 制作氧糖剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation /reoxygenation, OGD/R)模型模拟体外缺血/再灌注损伤模型,通过预先转染腺病毒-BIRC5 质粒诱导基因过表达,探讨其对 OGD/R 模型活性的影响及其可能机制,以为缺血性脑卒中治疗的新靶点及机制提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 DMEM 完全培养基(货号:

XB01)购自武汉普诺赛生命科技有限公司,PI 染液(货号:G1021)购自北京博沃尔斯有限公司,SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒(货号:BM0687)购自上海圻明生物科技有限公司,VEGF 抗体(货号:10542-RP01)购自北京义翘神州科技股份有限公司,GAPDH 抗体(货号:FNab03343)购自武汉菲恩有限公司,ECL 检测试剂盒(货号:CDLG-4911)购自武汉纯度生物科技有限公司,二抗购自杭州弗德生物科技有限公司,cDNA 第一链合成试剂盒(货号:XY-TE-0738)购自上海烜雅生物科技有限公司,Lipofectamine-2000(货号:11668-027)购自杭州昊鑫有限公司,MTT 试剂(货号:MBS843090-C)购自武汉艾美捷科技有限公司,二甲基亚砜(货号:D2650)购自上海联硕宝为生物科技有限公司,Annexin V-FITC 染液(货号:E-CK-A111)购自武汉伊莱瑞特有限公司。激光共聚焦显微镜(Olympus FV3000),流式细胞仪(CytoFLEX),超速离心机(WLS-450 型)。小鼠脑微 VECs bEnd. 3(货号:HTX1926),深圳市华拓细胞库提供,腺病毒-BIRC5 质粒(货号:L24705)和腺病毒空质粒(货号:FH2193),购自上海诺赛有限公司。

1.2 细胞培养 将 bEnd. 3 细胞复苏后,使用含有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基在 37 °C 含 5% CO₂ 的恒温培养箱内进行培养,细胞生长贴壁达到 80%时进行传代培养,培养 2~3 代后,收集最佳状态细胞进行后续实验。

1.3 OGR/R 细胞模型的建立 取对数生长期的 bEnd. 3 细胞以 3×10^5 个/毫升接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后,用 PBS 冲洗 2 次,换成含有 10%胎牛血清的 DMEM 完全培养基,在三气培养箱中(37 °C, 5% CO₂, 1% O₂, 94% N₂)进行 OGD/R 培养。最佳时间点为 OGR3h/R3h。正常对照组在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养相同的时间。

1.4 实验分组 正常对照组:bEnd. 3 细胞在细胞培养基中正常培养;细胞损伤模型组:bEnd. 3 细胞在细胞培养基中正常培养,随后进行 OGR3h/R3h;BIRC5 干预组:预先采用 Lipofectamine-2000 转染试剂将腺病毒-BIRC5 质粒转染至 bEnd. 3 细胞,在细胞培养基中正常培养,随后进行 OGR3h/R3h;阴性对照组,预先使用 Lipofectamine-2000 转染试剂将腺病毒空质粒转染至 bEnd. 3 细胞,在细胞培养基中正常培养,随后进行 OGR3h/R3h。每组设 5 个平行孔。

1.5 激光共聚焦显微镜观察细胞形态 将各组细胞制备成细胞悬液,同时把密度调整为 1×10^6 个/升,随后其接种于激光共聚焦培养皿中,PBS 洗涤 3 次,用 4%多聚甲醛固定 10 min,0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,加入微丝绿色荧光探针,温室避光静置 40

min,0.1% Triton X-100 的 PBS 洗涤 3 次,激光共聚焦显微镜下观察细胞形态学变化。

1.6 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞存活率 各组细胞离心后弃掉上清液,将重悬细胞接种于 96 孔板中并调整到密度为 1×10^4 个/毫升,在 37 °C 下,应用 5% CO₂ 培养箱进行培养,待细胞贴壁后,每孔加入浓度为 5 g/L 的 MTT 液 20 μ L,在 37 °C 下继续孵育 4 h,弃掉上清液,加入 100 μ L 二甲基亚砜以终止反应,在摇床上振荡 10 min 后,用酶标仪在 570 nm 波长处检测吸光度(OD),重复 3 次。计算:细胞存活率(%) = 实验组(OD)/对照组(OD) \times 100%。

1.7 流式细胞仪检测细胞凋亡 各组细胞离心后弃掉上清液,制成细胞悬液并接种于 96 孔板中,在 37 °C 下,应用 5% CO₂ 培养箱进行培养 24 h,待细胞充分贴壁后,使用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒和流式细胞仪进行细胞凋亡测定,具体操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.8 RT-PCR 法检测 BIRC5 及 VEGF mRNA 相对表达 使用 trizol 试剂盒提取各组细胞总 RNA,具体操作步骤按照说明书进行,用微量分光光度仪检测 RNA 纯度和浓度,要求 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间。使用 cDNA 第一链合成试剂盒逆转录合成 cDNA,利用荧光实时定量 PCR 仪进行扩增,用 PCR 试剂盒检测 BIRC5 及 VEGF mRNA 的表达水平。PCR 反应条件:93 °C 预变性 10 min,90 °C 变性 10 s,57 °C 退火 20 s,65 °C 延伸 30 s,36 个循环。以 GAPDH 作为内参照,引物序列:GAPDH 上游引物 5'-TG-CACCACCAACTGCTTAGC-3', GAPDH 下游引物 5'-GGCATGGACTGTGGTTCATGAG-3';BIRC5 上游引物:5'-TAAGCCACTTGTCCAGCTT-3', BIRC5 下游引物:5'-CTCATCCACTCCCTTCCTCA-3';VEGF 上游引物:5'-TGCCCCTAATGCGGTGT-3', 下游引物:5'-TGCTGGCTTTGGTGAGGTT-3';采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 BIRC5 及 VEGF 的相对表达量。

1.9 免疫印迹法检测 BIRC5 及 VEGF 蛋白表达 收集各组细胞于离心管,加入 50 μ L 裂解混合液(RIPA:PMSF = 100:1),静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min 取上清,煮沸变性,冷却后加入等体积 buffer,用 BCA 法检测蛋白含量。行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h 后加入 BIRC5 及 VEGF 一抗,4 °C 孵育过夜,羊抗兔二抗常温孵育 2 h,加入 ECL 显色液。采用增强化学发光法显色,用 Image master VDS 成像系统摄影,图像分析软件(Total lab V101)行灰度扫描分析。以目的蛋白与 GAPDH 蛋白产物条带灰度的比值表示。

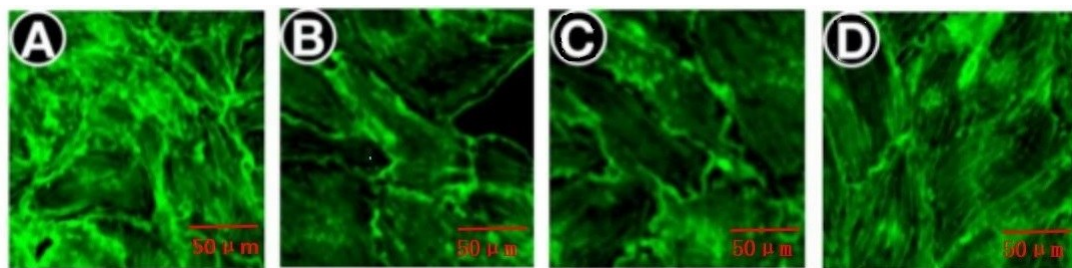
1.10 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计分

析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 经检验符合正态分布后, 多组间数据的比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 LSD- t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞的形态学 正常对照组细胞骨架微丝网状有序排列, 分布规则, 微丝之间彼此紧密连接(见

图 1A)。细胞损伤组和阴性对照组的细胞形态基本相同, 呈现细胞微丝断裂, 收缩变短或移向周边, 微丝网状排列紊乱, 可见细胞外形皱缩, 间隙加大, 少部分微丝缺失出现空隙(见图 1B、图 1C)。BIRC5 干预组细胞微丝排列较细胞损伤组和阴性对照组更有规则, 部分断裂, 部分相连, 细胞间隙有所缩小(见图 1D)。



注: A. 正常对照组; B. 细胞损伤组; C. 阴性对照组; D. BIRC5 干预组。

每 $n = 3$ (标尺 = $50 \mu\text{m}$, $\times 400$)。

图 1 4 组细胞形态学的比较

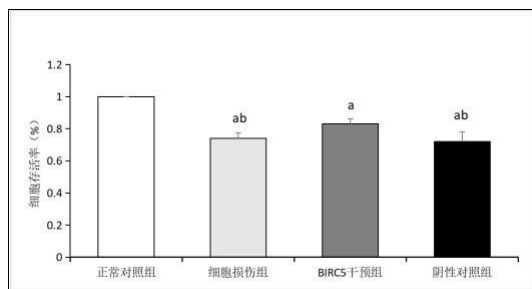
2.2 各组细胞存活率 4 组细胞存活率差异有统计学意义($F = 28.830$, $P < 0.01$), 细胞损伤组、BIRC5 干预组及阴性对照组的细胞存活率[(73.67 ± 3.51)%、(83.33 ± 4.51)%、(72.00 ± 6.00)%]均低于正常对照组[(100.00 ± 0.00)%]($P < 0.01$), BIRC5 干预组的细胞存活率[(83.33 ± 4.51)%]高于细胞损伤组和阴性对照组[(73.67 ± 3.51)%、(72.00 ± 6.00)%]($P < 0.05$), 细胞损伤组的细胞存活率[(73.67 ± 3.51)%]和阴性对照组[(72.00 ± 6.00)%]比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 2。

性对照组的细胞凋亡率[(50.33 ± 2.08)%、(40.67 ± 3.06)%、(49.00 ± 3.61)%]均高于正常对照组[(30.67 ± 2.52)%]($P < 0.01$), BIRC5 干预组的细胞凋亡率[(40.67 ± 3.06)%]低于细胞损伤组和阴性对照组[(50.33 ± 2.08)%、(49.00 ± 3.61)%]($P < 0.01$), 细胞损伤组的细胞凋亡率[(50.33 ± 2.08)%]和阴性对照组[(49.00 ± 3.61)%]比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见图 3。

2.4 各组细胞 BIRC5 及 VEGF mRNA 相对表达量

4 组细胞 BIRC5 及 VEGF mRNA 表达水平差异均有统计学意义($F = 22.200, 28.210$, $P < 0.001$)。细胞损伤组、BIRC5 干预组及阴性对照组 BIRC5 及 VEGF mRNA 表达水平均低于正常对照组(均 $P < 0.05$), BIRC5 干预组 BIRC5 及 VEGF mRNA 表达水平均高于细胞损伤组和阴性对照组($P < 0.01$), 细胞损伤组 BIRC5 及 VEGF mRNA 表达与阴性对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

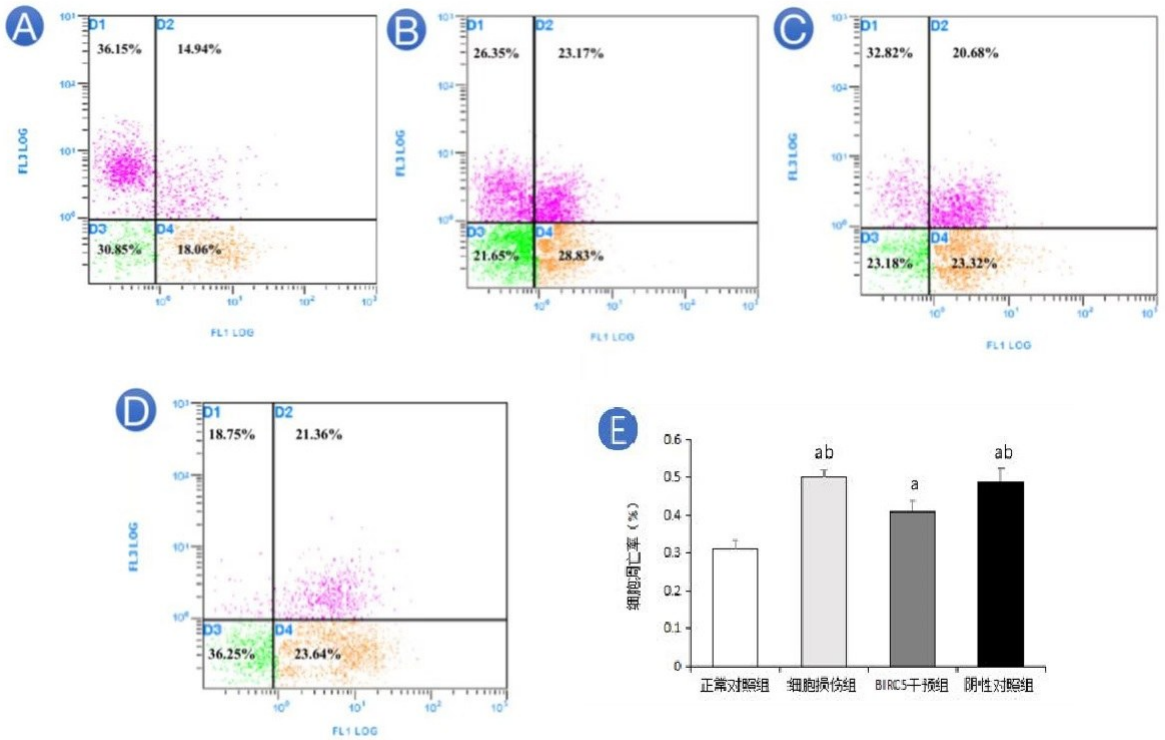
2.5 各组细胞 BIRC5 及 VEGF 蛋白相对表达量 4 组细胞 BIRC5 及 VEGF 蛋白表达水平差异均有统计学意义($F = 31.050, 14.890$, $P < 0.001$)。细胞损伤组、BIRC5 干预组及阴性对照组 BIRC5 及 VEGF 蛋白表达水平均低于正常对照组($P < 0.01$), BIRC5 干预组 BIRC5 及 VEGF 蛋白表达水平均高于细胞损伤组和阴性对照组($P < 0.01$), 细胞损伤组 BIRC5 及 VEGF 蛋白表达水平与阴性对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$), 见表 2, 图 4。



注: 与正常对照组相比, a: $P < 0.01$; 与 BIRC5 干预组相比, b: $P < 0.05$ 。每组 $n = 3$ 。

图 2 4 组细胞存活率的比较

2.3 各组细胞凋亡率 应用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率, 结果如图 3 所示: 图中 4 个象限分别为 D1: 死亡细胞; D2: 晚期凋亡细胞; D3: 活细胞; D4: 早期凋亡细胞。4 组细胞凋亡率差异有统计学意义($F = 29.960$, $P < 0.01$), 细胞损伤组、BIRC5 干预组及阴



注:A. 正常对照组;B. 细胞损伤组;C. BIRC5 干预组;D. 阴性对照组;E. 各组细胞凋亡率统计图;与正常对照组相比,a: $P < 0.01$;与 BIRC5 干预组相比,b: $P < 0.01$;每组 $n = 3$ 。

图 3 4 组细胞凋亡率的比较

表 1 各组细胞 BIRC5 及 VEGF mRNA 相对表达量

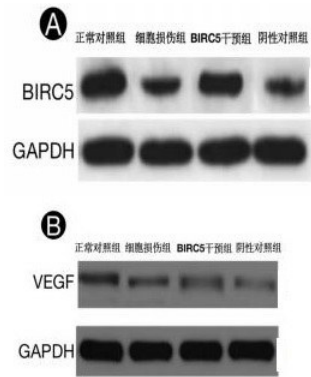
组别	BIRC5	VEGF
正常对照组	0.99 ± 0.04	0.82 ± 0.04
细胞损伤组	0.64 ± 0.08 ^{ab}	0.38 ± 0.04 ^{ab}
BIRC5 干预组	0.83 ± 0.06 ^a	0.65 ± 0.05 ^a
阴性对照组	0.63 ± 0.08 ^{ab}	0.37 ± 0.12 ^{ab}
F	22.200	28.210
P	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。②与正常对照组相比,a: $P < 0.05$;与 BIRC5 干预组相比,b: $P < 0.01$ 。

表 2 各组细胞 BIRC5 及 VEGF 蛋白相对表达量

组别	BIRC5	VEGF
正常对照组	1.85 ± 0.05	0.91 ± 0.05
细胞损伤组	1.49 ± 0.05 ^{ab}	0.60 ± 0.02 ^{ab}
BIRC5 干预组	1.67 ± 0.42 ^a	0.75 ± 0.03 ^a
阴性对照组	1.52 ± 0.06 ^{ab}	0.58 ± 0.12 ^{ab}
F	31.050	14.890
P	<0.001	<0.001

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示。②与正常对照组相比,a: $P < 0.01$;与 BIRC5 干预组,b: $P < 0.01$ 。



注:A. 各组细胞 BIRC5 蛋白表达条带图; B. 各组细胞 VEGF 蛋白表达条带图。每组 $n = 3$ 。
图 4 4 组细胞 BIRC5 及 VEGF 蛋白表达量的比较

成为体外研究缺血再灌注损伤的理想模型^[6]。研究显示,软脑膜侧支循环对于脑组织抵抗缺血缺氧、避免脑梗死具有非常重要储备能力,参与缺血性脑卒中的治疗显示巨大潜能^[7]。由此可见,深入探讨软脑膜侧支循环的发生发展对缺血性卒中患者治疗新靶点的研究将具有重大现实意义。

VECs 是在胚胎时期由中胚层细胞分化而来,随后经过血管生成形成原始的毛细血管丛,在一系列遗传因素和环境因素调控下对该血管丛进行重塑修剪逐步成熟,这一生理过程一直持续到出生后 3 周,最后形成具有各自特征的曲折度、密度和管腔直径的软脑膜

3 讨论

脑缺血再灌注损伤是缺血性脑卒中最常见病理性损伤之一,而通过氧糖剥夺/复氧损伤可以模拟缺血再灌注导致的细胞凋亡、氧化应激、炎症反应、线粒体功能障碍等多种病理损伤,因此,氧糖剥夺/复氧模型已

侧支循环^[8]。研究发现, VECs 增殖力及迁移力降低以及新生血管发生减少与脑梗塞后软脑膜侧支循环建立不良和微循环功能障碍存在密切相关, 导致脑梗塞后神经功能缺损严重、致残率和死亡率升高, 提示 VECs 在侧支循环建立及其良好状态的维持中起重要的调控作用^[9-10]。然而, 成熟 VECs 存在活性低、生长及更新速度慢、降解细胞外基质的能力弱、分裂增殖慢和细胞容易凋亡等自身缺陷, 极大程度限制其临床应用。因此, 如何赋予抗凋亡、促增殖、易迁移等克服 VECs 自身缺陷, 以促进血管新生及良好侧支循环建立和形成成为临床科技工作者急需解决的一大难题。

BIRC5 基因位于人染色体 17q25, 由 4 个外显子和 3 个内含子构成。该基因编码生存素 (survivin, SVV), 由 142 个氨基酸组成, 相对分子质量 16.5×10^3 , 是目前凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中抗凋亡作用最强、分子量最小成员。多年来研究结果已经表明, *BIRC5* 基因并非肿瘤的特异性基因, 其编码的 SVV 也并非只表达于肿瘤细胞, 多项实验已经发现并证实 SVV 在 VECs 中存在显著表达, 同时发现 *BIRC5* 基因及其表达 SVV 具有多项潜在的正性调控功能, 例如, 促进 VECs 增殖、迁移、侵袭、抵抗凋亡和微血管新生^[11]。可见, *BIRC5* 基因及其表达 SVV 可以克服 VECs 自身缺陷, 促进新生血管生成, 在脑侧支循环代偿进程中可能起重要的调控作用。*BIRC5* 基因调控 VECs 参与侧支循环形成的通路在外周动脉闭塞性疾病的血管治疗已经初步得到证实并且取得一定疗效, 但是在脑侧支循环领域的相关研究很少见国内外资料报道。

VEGF 作为特异性最强的促血管生成因子, 其与 VECs 表面 1 型及 2 型 VEGF 受体结合后分泌胶原酶, 降解血管基底膜, 促进表皮细胞迁徙, 并激活细胞内磷脂酰肌醇信号传递通路诱导 VECs 分裂增殖及迁移、趋化, 促进新生血管生成^[12], 同时可促使 VECs 中抗凋亡相关基因 *Bcl-2* 表达上调及 *AP-1/Fas* mRNA 表达下调, 拮抗 VECs 凋亡, 维持新生血管的稳定性^[13]。研究发现, 脑梗塞后侧支循环良好患者 VEGF 的水平较侧支循环不良患者明显升高, 并且 VEGF 的水平与侧支循环的良好级别呈现显著正相关, 显示 VEGF 在脑梗塞后侧支循环建立过程中扮演着积极的作用^[14]。课题组既往研究发现, SVV 抑制剂 YM155 可以下调 SVV 和 VEGF mRNA 及其蛋白表达, 两组之间呈现正相关, 进而降低微血管密度, 提示 *BIRC5* 与 VEGF 相互作用具有高度特异性^[15]。本研究结果发现, 与正常对照组相比, 损伤组的细胞形态呈现细胞微丝断裂, 微丝网状排列紊乱, 可见细胞外形皱缩, 间隙加大, 细胞存活率显著降低, 细胞凋亡率增加; 而通

过进一步构建 *BIRC5* 过表达的 bEnd. 3 细胞, 发现细胞形态较损伤组更有规则, 断裂微丝部分相连, 间隙变小, 损伤 bEnd. 3 细胞的存活率显著增加, 凋亡率显著降低, 因此, 本实验在离体细胞内进一步证实 *BIRC5* 过表达对 bEnd. 3 细胞具有明显抗损伤的保护作用。本研究还对关键因子 *BIRC5* 及 VEGF 表达进一步研究, 结果发现损伤组 bEnd. 3 细胞中的 *BIRC5* 及 VEGF mRNA 及其蛋白的表达比对照组显著降低, 而干预组 bEnd. 3 细胞中 *BIRC5* 及 VEGF mRNA 及其蛋白的表达比损伤组显著升高, 该结果显示 *BIRC5* 可以通过调控 VEGF 表达进而增强 bEnd. 3 细胞活性和促进血管新生, 参与脑侧支循环建立和形成。

综上所述, 本实验结果表明 *BIRC5* 过表达可显著增强氧糖剥夺诱导损伤的 bEnd. 3 细胞的活性, 其机制与其上调 VEGF 表达有关, 提示 *BIRC5* 调控 VEGF 表达诱发血管新生可能是良好侧支循环形成和建立的重要机制之一。本研究存在一定的局限性, 仅仅研究正性调控机制以及某个特定时间点的变化, 对于负性调控机制和时空模式变化规律有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] WEI B Y, WANG Z Q, WU S H, et al. Improving collateral circulation: a potential adjunctive strategy to prevent or slow the progression of vascular dementia[J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2021, 17: 3061-3067.
- [2] GANTA V C, ANNEX B H. Peripheral vascular disease: preclinical models and emerging therapeutic targeting of the vascular endothelial growth factor ligand-receptor system[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2021, 25(5): 381-391.
- [3] HUANG J M, LI X B, ZHAO J J, et al. Association of *BIRC5* Gene Polymorphism with the Collateral Circulation and Severity of Large Artery Atherosclerotic Stroke [J]. *Int J Clin Pract*, 2022, 9177545. DOI: 10. 1155/2022/9177545.
- [4] MA S, WANG J, LIN J, et al. Survivin promotes rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte cell proliferation, and the expression of angiogenesis related proteins by activating the NOTCH pathway[J]. *Int J Rheum Dis*, 2021, 24(7): 922-929.
- [5] 李洁, 杨丽霞, 李佩璠, 等. N-乙酰半胱氨酸对脑微血管内皮细胞内质网应激及氧化应激的影响[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2022, 31(2): 110-115.
- [6] 杨静, 陈宇, 庞一强, 等. 低氧预适应对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的 BV2 细胞的保护作用及其对 NLRP3 表达的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2020, 42(2): 159-162.

(下转第 12 页)

- puncture ameliorates beta-amyloid pathology and cognitive impairment in Alzheimer disease via a novel mechanism involving activation of TFEB (transcription factor EB)[J]. *Autophagy*, 2021, 17(11): 3833-3847.
- [3] LUO K X, WANG Y H, CHEN W S, et al. Treatment Combining Focused Ultrasound with Gastrodin Alleviates Memory Deficit and Neuropathology in an Alzheimer's Disease-Like Experimental Mouse Model [J]. *Neural Plast*, 2022, 2022: 5241449.
- [4] 王如雪, 黄锐, 赵健. 电针对 AD 模型大鼠梨状皮质 GalR2 和 AchE 表达的影响[J]. *皖南医学院学报*, 2023, 42(1): 9-13.
- [5] MAVROUDIS I A, FOTIOU D F, ADIPEPE L F, et al. Morphological changes of the human purkinje cells and deposition of neuritic plaques and neurofibrillary tangles on the cerebellar cortex of Alzheimer's disease[J]. *Am J Alzheimers Dis Other Dement*, 2010, 25(7): 585-591.
- [6] SCHMAHMANN J D. Cerebellum in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia: not a silent bystander[J]. *Brain*, 2016, 139(Pt5): 1314-1318.
- [7] KOTAJIMA-MURAKAMI H, NARUMI S, YUZAKI M, et al. Involvement of GluD2 in fear-conditioned bradycardia in mice[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166144.
- [8] 刘慧. 小脑浦肯野细胞特异性敲除线粒体解偶联蛋白 Ucp4 导致共济失调的机制研究[D]. 延安: 延安大学, 2022: 31-53.
- [9] PALMER C L, COTTON L, HENLEY J M. The molecular pharmacology and cell biology of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors [J]. *Pharmacol Rev*, 2005, 57(2): 253-277.
- [10] FRIEDMAN L K, AVALLONE J M, MAGRYS B. Maturation effects of single and multiple early-life seizures on AMPA receptors in prepubescent hippocampus[J]. *Dev Neurosci*, 2007, 29(6): 427-437.
- [11] D'AMELIO M, CAVALLUCCI V, MIDDEI S, et al. Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Nat Neurosci*, 2011, 14(1): 69-76.
- [12] 安国顺, 李淑艳, 闫琦, 等. 大鼠谷氨酸受体 2 抗体制备及其与 Caspase-3 相互作用分析[J]. *中国药物与临床*, 2008, 8(11): 876-879.
- [13] 周强, 李超. AMPA 受体亚基 GluR2 在脊髓损伤导致少突胶质前体细胞凋亡中的作用[J]. *脊柱外科杂志*, 2019, 17(1): 51-55.
- [14] 黄振, 李威, 叶佰盛, 等. 从“脑为髓海”理论探讨骨质疏松症与阿尔兹海默症的相关性[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(8): 1177-1181.
- [15] PEI H Y, SHEN H P, BI J H, et al. Gastrodin improves nerve cell injury and behaviors of depressed mice through Caspase-3-mediated apoptosis[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2023. doi: 10.1111/ens.14444.
- [16] 黄锐, 孙先钰, 周志萍, 等. 基于 AMPK/Nrf2 信号通路探讨针药联合对 AD 大鼠的治疗机制[J]. *右江民族医学院学报*, 2023, 45(3): 413-418.
- [17] 崔晶晶, 高俊虹, 王玉敏, 等. 针药结合增效机制研究的新思路探讨[J]. *针刺研究*, 2010, 35(2): 146-150.

收稿日期: 2023-10-22; 修回日期: 2023-11-18

(上接第 6 页)

- [7] 蒋超, 王月娟, 张静, 等. 急性颈内动脉系统脑梗死患者侧支循环建立情况与预后关系的研究[J]. *中华行为医学与脑科学杂志*, 2017, 26(7): 615-619.
- [8] RIZZI A, BENAGIANO V, RIBATTI D. Angiogenesis versus arteriogenesis [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2017, 58(1): 15-19.
- [9] CAO Z, GE S, XU Z, et al. β 3-Endonexin interacts with ninein in vascular endothelial cells to promote angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 566: 75-79.
- [10] CHEN K, XI M, HUANG Q H, et al. Long non-coding RNA MCM3AP antisense RNA 1 silencing upregulates microRNA-24-3p to accelerate proliferation and migration of vascular endothelial cells in myocardial infarction rats by reducing EIF4G2[J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(7): 674-684.
- [11] ZHANG H, WANG X, ZHANG C, et al. Pleiotropic effects of survivin in vascular endothelial cells[J]. *Microvasc Res*, 2016, 108: 10-16.
- [12] NITZSCHE A, PIETILA R, LOVE D T, et al. Paladin is a phosphoinositide phosphatase regulating endosomal VEGFR2 signaling and angiogenesis[J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(2): e50218.
- [13] HUANG S M, TAN Z G, CAI J, et al. Myrtenol improves brain damage and promotes angiogenesis in rats with cerebral infarction by activating the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Pharm Biol*, 2021, 59(1): 584-593.
- [14] 李易蒸, 张庆欣, 杨晓莉, 等. 急性缺血性脑卒中侧支循环与血管内皮细胞生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的相关性[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(1): 67-70.
- [15] 黄建敏, 云艳芳, 杨桂新, 等. 生存素抑制剂 YM155 对脑梗死大鼠微血管密度及血管新生相关基因表达的影响[J]. *实用医学杂志*, 2022, 38(8): 946-951.

收稿日期: 2023-10-30; 修回日期: 2023-12-19