

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.24.006

miR-20b-5p 靶向 MAPK1 调控脑出血过程中脑微血管内皮细胞铁死亡*

蒋锋 马敏江 王乐 常莎 王晓辉[△]

(陕西省人民医院神经内一科 陕西 西安 710068)

摘要 目的: 探讨 miR-20b-5p 对氧糖剥夺 (OGD)/Hemin 处理的脑微血管内皮细胞 (BMVEC) 功能的影响及机制。**方法:** 将 BMVEC 分为 Control 组、agomir-NC 组、agomir-miR-20b-5p 组、antagomir-NC 组和 antagomir-miR-20b-5p 组。使用 Lipofectamine 2000 试剂对细胞进行相应的转染处理。BMVEC 转染后, 将 BMVEC 再分为 Control 组、OGD/Hemin 组 (O/H 组)、OGD/Hemin+agomir-NC 组 (O/H+agomir-NC 组)、OGD/Hemin+agomir-miR-20b-5p 组 (O/H+agomir-miR-20b-5p 组)、OGD/Hemin+antagomir-NC 组 (O/H+antagomir-NC 组) 和 OGD/Hemin+antagomir-miR-20b-5p 组 (O/H+antagomir-miR-20b-5p 组)。Control 组 BMVEC 正常培养, 其他组 BMVEC 进行 OGD/Hemin 处理。MTT 法检测 BMVEC 增殖, TUNEL 染色检测 BMVEC 凋亡, Transwell 检测 BMVEC 迁移。使用试剂盒检测超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和丙二醛 (MDA) 水平。使用 Iron Assay 试剂盒检测 Fe²⁺ 含量。通过 qRT-PCR 检测 miR-20b-5p 和 MAPK1 mRNA 水平。通过 Western blot 检测 MAPK1、Bax、Bcl-2、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 蛋白表达水平。通过免疫荧光染色检测 MAPK1 的荧光强度水平。**结果:** 与 Control 组和 agomir-NC 组比较, agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平升高 ($P<0.05$)。与 Control 组和 antagomir-NC 组比较, antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平降低 ($P<0.05$)。与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平降低, 细胞活力降低, TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低, 迁移数量降低, SOD 和 GSH-Px 活性降低, MDA 含量升高, Fe²⁺ 含量和 PTGS2 的蛋白表达水平升高, GPX4 的蛋白表达水平降低, MAPK1 的 mRNA 和蛋白表达水平以及相对荧光强度升高 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+agomir-NC 组比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平升高, 细胞活力升高, TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高, 迁移数量升高, SOD 和 GSH-Px 活性升高, MDA 含量降低, Fe²⁺ 含量和 PTGS2 的蛋白表达水平降低, GPX4 的蛋白表达水平升高, MAPK1 的 mRNA 和蛋白表达水平以及相对荧光强度降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平降低, 细胞活力降低, TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低, 迁移数量降低, SOD 和 GSH-Px 活性降低, MDA 含量升高, Fe²⁺ 含量和 PTGS2 的蛋白表达水平升高, GPX4 的蛋白表达水平降低, MAPK1 的 mRNA 和蛋白表达水平以及相对荧光强度升高 ($P<0.05$)。**结论:** 本研究表明上调 miR-20b-5p 通过抑制 OGD/Hemin 处理的 BMVEC 中 MAPK1 的表达从而抑制了铁死亡途径。

关键词: 脑出血; 脑微血管内皮细胞; miR-20b-5p; 丝裂原活化蛋白激酶 1; 铁死亡

中图分类号: R-33; R743.34 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)24-4633-09

miR-20b-5p Targets MAPK1 to Regulate Ferroptosis of Brain Microvascular Endothelial Cells during Intracerebral Hemorrhage*

JIANG Feng, MA Min-jiang, WANG Le, CHANG Sha, WANG Xiao-hui[△]

(Department of Neurology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi, 710068, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanism of miR-20b-5p on the function of brain microvascular endothelial cells (BMVEC) treated with oxygen glucose deprivation (OGD) /Hemin. **Methods:** BMVEC were divided into Control group, agomir-NC group, agomir-miR-20b-5p group, antagomir-NC group and antagomir-miR-20b-5p group. The cells were transfected with Lipofectamine 2000 reagent. After BMVEC transfection, BMVEC was divided into Control group, OGD/Hemin group (O/H), OGD/Hemin+agomir-NC group (O/H+agomir-NC), OGD/Hemin+agomir-miR-20b-5p group (O/H+agomir-miR-20b-5p), OGD/Hemin+antagomir-NC group (O/H+antagomir-NC) and OGD/Hemin+antagomir-miR-20b-5p group (O/H+antagomir-miR-20b-5p). BMVEC in Control group were cultured normally, and BMVEC in other groups were treated with OGD/Hemin. BMVEC proliferation was detected by MTT assay. BMVEC apoptosis was detected by TUNEL staining. BMVEC migration was detected by Transwell. The levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA) were measured using a commercial kit. Fe²⁺ content was determined using Iron Assay kit. The levels of miR-20b-5p and MAPK1 mRNA were detected by qRT-PCR. The protein expression levels of

* 基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2022JM-594)

作者简介: 蒋锋 (1981-), 男, 硕士研究生, 副主任医师, 主要研究方向: 脑血管病, E-mail: dojiangfeng@163.com

[△] 通讯作者: 王晓辉, 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要研究方向: 脑血管病, E-mail: coldfish0310@126.com

(收稿日期: 2023-05-17 接受日期: 2023-06-05)

MAPK1, Bax, Bcl-2, glutathione peroxidase 4 (GPX4) and prostaglandin peroxidase synthase 2 (PTGS2) were detected by Western blot. Fluorescence intensity of MAPK1 was detected by immunofluorescence staining. **Results:** Compared with Control group and agomir-NC group, the level of miR-20b-5p in BMVEC of agomir-miR-20b-5p group increased ($P<0.05$). Compared with Control group and antagomir-NC group, the level of miR-20b-5p in BMVEC of antagomir-miR-20b-5p group decreased ($P<0.05$). Compared with Control group, miR-20b-5p level in BMVEC of O/H group decreased, cell viability decreased, TUNEL positive rate and Bax protein expression level increased, Bcl-2 protein expression level decreased, the number of migration decreased, SOD and GSH-Px activity decreased, MDA content increased, Fe^{2+} content and PTGS2 protein expression level increased, GPX4 protein expression level decreased, the mRNA and protein expression level and the relative fluorescence intensity of MAPK1 increases ($P<0.05$). Compared with O/H group and O/H+agomir-NC group, the miR-20b-5p level in BMVEC of O/H+agomir-miR-20b-5p group increased, the cell viability increased, the positive rate of TUNEL and the expression level of Bax protein decreased, the expression level of Bcl-2 protein increased, the number of migration increased, the activity of SOD and GSH-Px increased, the content of MDA decreased, the content of Fe^{2+} and the protein expression level of PTGS2 decreased, the protein expression level of GPX4 increased, the mRNA and protein expression level and the relative fluorescence intensity of MAPK1 decreased ($P<0.05$). Compared with O/H group and O/H+antagomir-NC group, miR-20b-5p level in BMVEC of O/H+antagomir-miR-20b-5p group decreased, cell viability decreased, TUNEL positive rate and Bax protein expression level increased, Bcl-2 protein expression level decreased, the number of migration decreased, SOD and GSH-Px activity decreased, MDA content increased, Fe^{2+} content and PTGS2 protein expression level increased, GPX4 protein expression level decreased, the mRNA and protein expression level and the relative fluorescence intensity of MAPK1 increased ($P<0.05$). **Conclusions:** This study suggests that upregulation of miR-20b-5p inhibits the ferroptosis pathway by inhibiting the expression of MAPK1 in OGD/Hemin-treated BMVEC.

Key words: Intracerebral hemorrhage; Brain microvascular endothelial cells; miR-20b-5p; Mitogen activated protein kinase 1; Ferroptosis

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R743.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)24-4633-09

前言

脑出血 (Intra-intracerebral hemorrhage, ICH) 是指非外伤性脑实质内血管破裂引起的出血, 病死率和致残率较高^[1]。目前, 降低颅压、控制血压、手术治疗是脑出血的主要治疗手段。脑出血后的血肿占位效应对周围脑组织的破坏造成了神经细胞的丢失, 并引起了一系列的继发性损伤。目前, 脑出血发病过程中的病理机制尚不明确。多项研究表明, 微小 RNA (miRNA) 是一种小的非编码 RNA, 参与调节脑出血后的继发性损伤^[2,3]。miR-20b-5p 具有多种生物学功能, 参与调控癌症、高血压、胰腺炎、心血管疾病的发病机制^[4-7]。据报道, 脑出血大鼠脑组织中 miR-20b-5p 表达下调^[8], 然而, miR-20b-5p 在脑出血中的具体作用未知。miRNA 主要通过识别靶 mRNA 的 3'UTR 区抑制靶 mRNA 表达, 从而调控靶基因表达并影响脑出血后的继发性损伤^[9]。在 miRNA 的众多靶基因中, 丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族成员参与脑出血后的继发性损伤, MAPK 家族成员在脑出血大鼠模型中上调, 抑制 MAPK 可预防脑出血诱导的继发性损伤^[10]。MAPK1 是 MAPK 家族成员之一, 在脑出血过程中发挥重要作用^[11,12], 一些研究表明, MAPK 调控脑出血进展的机制与铁死亡 (Ferroptosis) 途径密切相关^[13,14]。本研究通过生物信息学分析预测 MAPK1 是 miR-20b-5p 的靶基因。另外, 其他文献也报道 miR-20b-5p 靶向调节 MAPK1^[8]。脑微血管内皮细胞 (Brain microvascular endothelial cells, BMVEC) 是研究脑出血病理机制的模型细胞, BMVEC 细胞膜含有丰富的微绒毛且没有孔隙, 可限制可溶性物质从血液进入大脑, 参与维持血脑屏障完整性^[15,16], 而脑出血过程中 BMVEC 的功能障碍与继发性损伤密切相关^[17]。因此,

本研究旨在探讨 miR-20b-5p 是否通过靶向 MAPK1 调控氧剥夺 (Oxygen-glucose deprivation, OGD)/Hemin 处理的 BMVEC 的增殖、凋亡、迁移和铁死亡。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 **实验细胞** 小鼠 BMVEC 细胞 (货号: PC-109m) 购自武汉赛奥斯生物科技有限公司。BMVEC 在含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养基中于 37℃、5% CO₂ 条件下培养。

1.1.2 **实验试剂** agomir-NC、agomir-miR-20b-5p、antagomir-NC 和 antagomir-miR-20b-5p、MAPK1-WT 和 MAPK1-MUT 质粒由上海吉玛基因合成。双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (货号: G06001) 购自吉玛基因。Lipofectamine 2000 (货号: 11668-019) 购自美国 Invitrogen 公司。Hemin (货号: 112016) 购自中检所。DMEM 培养基 (货号: 31600)、MTT 试剂盒 (货号: M1020) 购自北京索莱宝科技有限公司。TUNEL 试剂盒 (货号: C1088)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) (S0101M)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px) (S0057S) 和丙二醛 (Malondialdehyde, MDA) (S0131S) 购自碧云天生物技术研究所。RT reagent Kit with gDNA Eraser (货号: RR047Q) 和 TB Green Premix Ex Taq II (货号: RR820B) 购自日本 Takara 公司。Transwell (孔径 8 μm, 货号: 3422) 购自美国 Corning 公司。Iron Assay 试剂盒 (货号: ab83366) 购自 Abcam 公司。MAPK1 一抗 (货号: ab32081)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (Glutathione peroxidase 4, GPX4) 一抗 (货号: ab252833)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 一抗 (货号: ab179800)、IgG H&L (HRP) 二抗 (货号: ab6721) 购自英国

Abcam 公司。B 淋巴细胞瘤 -2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X, Bax) 一抗(货号:AF0120)、B 淋巴细胞瘤 -2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)一抗(货号:AF6139)、甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)一抗(货号:AF7021)购自美国 Affinity 公司。

1.1.3 实验仪器 IX71 荧光倒置显微镜购自日本奥林巴斯公司。ELX800 酶标仪购自美国 BIO-TEK 公司。7500 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 BMVEC 分组和转染处理 将 BMVEC 分为 Control 组、agomir-NC 组、agomir-miR-20b-5p 组、antagomir-NC 组和 antagomir-miR-20b-5p 组。将对数生长期的 BMVEC 按 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于 6 孔板,达 60%汇合后,使用 Lipofectamine 2000 试剂将 agomir-NC、agomir-miR-20b-5p、antagomir-NC 和 antagomir-miR-20b-5p 分别转染到 agomir-NC 组、agomir-miR-20b-5p 组、antagomir-NC 组和 antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中,Control 组 BMVEC 不进行转染。通过 RT-qPCR 验证转染效率。

1.2.2 BMVEC 转染后分组和 O/H 处理 BMVEC 转染后,再将 BMVEC 分为 Control 组、O/H 组(O/H)、OGD/Hemin+agomir-NC 组(O/H+agomir-NC)、OGD/Hemin+agomir-miR-20b-5p 组(O/H+agomir-miR-20b-5p)、OGD/Hemin+antagomir-NC 组(O/H+antagomir-NC)和 OGD/Hemin+antagomir-miR-20b-5p 组(O/H+antagomir-miR-20b-5p)。OGD/Hemin 处理方法参考文献^[18,19],用无糖无血清 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 和 37℃、95% O₂ 条件下分别培养 BMVEC 10 min,然后用含有 Hemin (10 μM) 的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂、94% N₂ 和 1% O₂ 低氧条件下培养细胞 2 h,然后将细胞在正常条件下培养。

1.2.3 MTT 法检测 BMVEC 增殖 OGD/Hemin 处理后,将 BMVEC(5×10^3 个细胞/孔)接种到 96 孔板中培养 48 h。然后加入 10 μL MTT 培养 4 h,酶标仪检测 490 nm 处光密度值(OD)。

1.2.4 TUNEL 染色检测 BMVEC 凋亡 OGD/Hemin 处理后,4%多聚甲醛固定 BMVEC 处理 30 min,3% H₂O₂ 孵育 10 min,0.3% Triton X-100 通透处理 5 min。然后将细胞与 50 μL 的 TUNEL 反应混合物室温避光孵育 1 h,DAPI 染核 10 min,用荧光显微镜计数 TUNEL 阳性细胞。

1.2.5 Transwell 检测 BMVEC 迁移 OGD/Hemin 处理后,将 BMVEC 用无血清培养基重悬,调整细胞密度为 1×10^5 个细胞/mL,然后取 200 μL 加入到 Transwell 上室,下室加入 800 μL 含 10%胎牛血清的 DMEM- 培养基。诱导细胞迁移 48 h 后,将迁移到小室下表面的细胞用 4%多聚甲醛固定 30 min,1%结晶紫染色 20 min。在显微镜下计数迁移细胞。

1.2.6 氧化应激指标检测 OGD/Hemin 处理后,按照试剂盒操作说明步骤,将 BMVEC 与裂解液混合,充分裂解细胞,然后 4℃、12000× g 离心 5 min,收集上清,通过 WST-8 法检测 SOD,DTNB 法检测 GSH-Px,硫代巴比妥酸法检测 MDA。

1.2.7 Fe²⁺ 含量检测 OGD/Hemin 处理后,将 BMVEC 用 PBS 清洗,然后将 1×10^5 个细胞与 100 μL 铁分析缓冲液混合,

4℃、16000× g 离心 10 min,收集上清。将 100 μL 样品和 5 μL 铁还原剂加入 96 孔板中,然后加入 5 μL 的 Fe²⁺ 测定缓冲液,再加入 5 μL 的铁还原剂,37℃孵育 30 min。加入 100 μL 铁探针试剂,37℃孵育 60 min。酶标仪检测 593 nm 的 OD 值并计算 Fe²⁺ 含量。

1.2.8 荧光素酶报告基因检测 将 MAPK1 3'UTR 的野生型或突变型插入 psicheck2.0 荧光素酶报告载体,构建 MAPK1-WT 和 MAPK1-MUT 质粒。使用 Lipofectamine 2000 将 MAPK1-WT 和 MAPK1-MUT 与 agomir-NC 或 agomir-miR-20b-5p 一起共转染到 BMVEC 中。转染 48 h 后,使用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测量荧光素酶活性。

1.2.9 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平 TRIzol 试剂提取 BMVEC 总 RNA,使用 RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行逆转录,使用 TB Green Premix Ex Taq II 在 PCR 系统上进行扩增,扩增条件为:95℃ 5 min,95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 15 s,40 个循环。引物序列如下:miR-20b-5p (正向:5'-CAGTGCCTCAAAGTGCTCATAGT-3', 反向:5'-TATGGTTGTTACAGACTCCTTAC-3');MAPK1 (正向:5'-CCTTGACCAGCTGAATCACATC-3', 反向:5'-TCAGCGTTTGGGAACAACCT-3');U6 (正向:5'-ATTGGAACGATACAGAGAAGATT-3', 反向:5'-GGAACGCTTCACGAATTTG-3');GAPDH (正向:5'-GCCTGCTTACCACCTTCT-3', 反向:5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3')。通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因相对表达量。U6 作为 miR-20b-5p 的内参基因,GAPDH 作为 MAPK1 的内参基因。

1.2.10 Western blot 检测蛋白表达水平 RIPA 裂解液提取 BMVEC 总蛋白,BCA 法检测总蛋白浓度,总蛋白在 10%的 SDS-PAGE 上电泳并转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1 h,然后将膜与 MAPK1 (1:1000)、Bax (1:1000)、Bcl-2(1:1000)、GPX4(1:2000)、PTGS2(1:2000)和 GAPDH(1:1000)一抗 4℃孵育过夜。然后将膜与 IgG H&L(HRP)二抗(1:1000)室温孵育 2 h。ECL 显影,ImageJ 软件定量条带灰度值,GAPDH 作为内参对照。

1.2.11 免疫荧光染色 OGD/Hemin 处理后,4%多聚甲醛固定 BMVEC 处理 30 min,0.3% Triton X-100 通透处理 5 min,3%牛血清白蛋白封闭 1 h,将切片与 MAPK1 一抗(1:1000)4℃过夜孵育,然后与 IgG H&L(Alexa Fluor® 555)(1:1000)二抗室温孵育 1 h。DAPI 显色,荧光显微镜下观察图像。

1.3 统计学分析

本研究中每组设置 6 个复孔,使用 SPSS22.0 软件分析数据,所有数据均表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$),通过单因素方差分析及 LSD 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 转染效率分析

与 Control 组和 agomir-NC 组比较,agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平升高($P < 0.05$)。与 Control 组和 antagomir-NC 组比较,antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平降低($P < 0.05$)。见图 1。

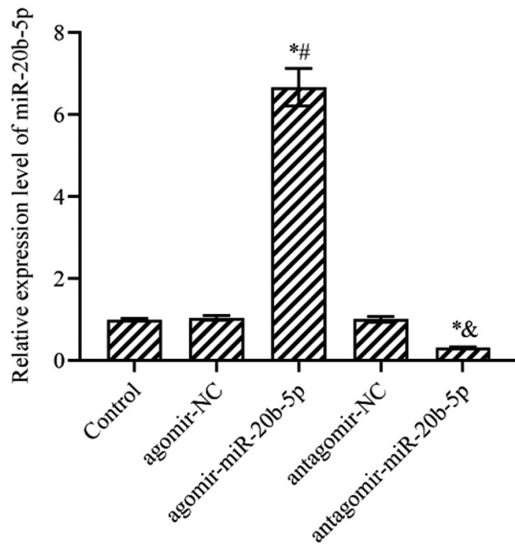


图1 各组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 相对表达量

Fig.1 Relative expression of miR-20b-5p in BMVEC of each group

Note: Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with agomir-NC group, [#] $P<0.05$; Compared with antagomir-NC group, [&] $P<0.05$.

2.2 miR-20b-5p 对 O/H 处理的 BMVEC 增殖的影响

与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平和细胞活力均降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+agomir-NC 组

比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平和细胞活力均升高 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平和细胞活力均降低 ($P<0.05$)。见图 2。

2.3 miR-20b-5p 对 O/H 处理的 BMVEC 凋亡的影响

与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 的 TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+agomir-NC 组比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 的 TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平升高 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 的 TUNEL 阳性率和 Bax 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。见图 3 和 4。

2.4 miR-20b-5p 对 O/H 处理的 BMVEC 迁移的影响

与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 的迁移数量降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+agomir-NC 组比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 的迁移数量升高 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 的迁移数量降低 ($P<0.05$)。见图 5。

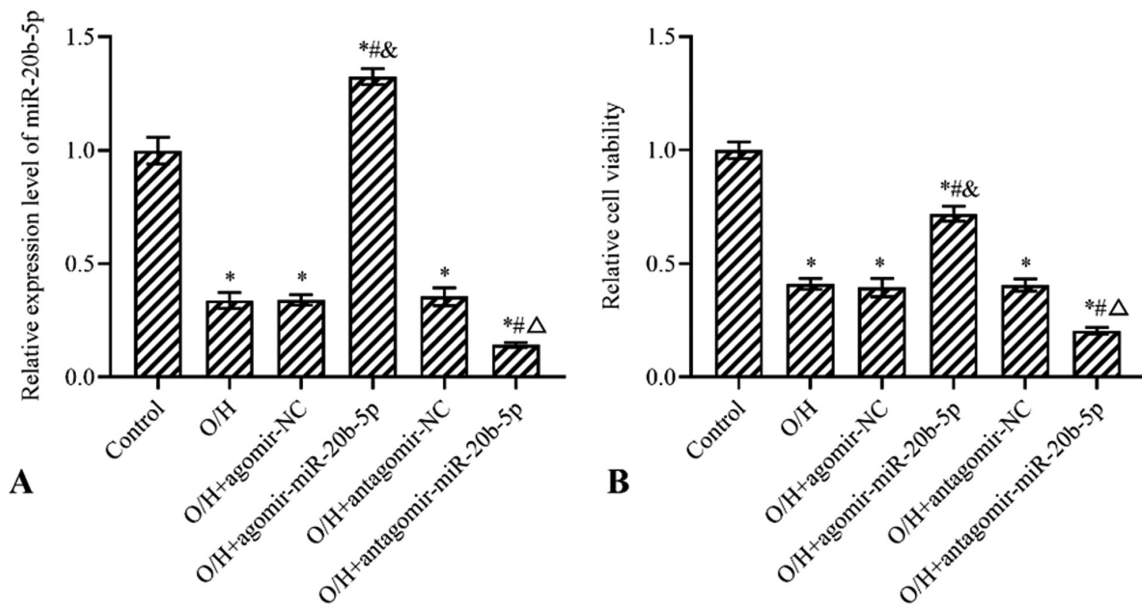


图2 各组 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平和相对细胞活力

Fig. 2 miR-20b-5p levels and relative cell activity in BMVECs in each group

Note: A: Relative expression level of miR-20b-5p; B: Relative cell viability; Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with O/H group, [#] $P<0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, [&] $P<0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, ^Δ $P<0.05$.

2.5 miR-20b-5p 对 O/H 处理的 BMVEC 氧化应激的影响

与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 中的 SOD 和 GSH-Px 活性降低 ($P<0.05$), MDA 含量升高 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+agomir-NC 组比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 SOD 和 GSH-Px 活性升高 ($P<0.05$), MDA 含量降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 SOD 和 GSH-Px 活性降

低 ($P<0.05$), MDA 含量升高 ($P<0.05$)。见图 6。

2.6 miR-20b-5p 对 O/H 处理的 BMVEC 铁死亡的影响

与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 中的 Fe²⁺ 含量和 PTGS2 的蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), GPX4 的蛋白表达水平降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+agomir-NC 组比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 Fe²⁺ 含量和 PTGS2 的蛋白表达水平升高 ($P<0.05$), GPX4 的蛋白表达水平降低

($P < 0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 Fe^{2+} 含量和 PTGS2 的蛋

白表达水平升高 ($P < 0.05$), GPX4 的蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图 7 和图 8。

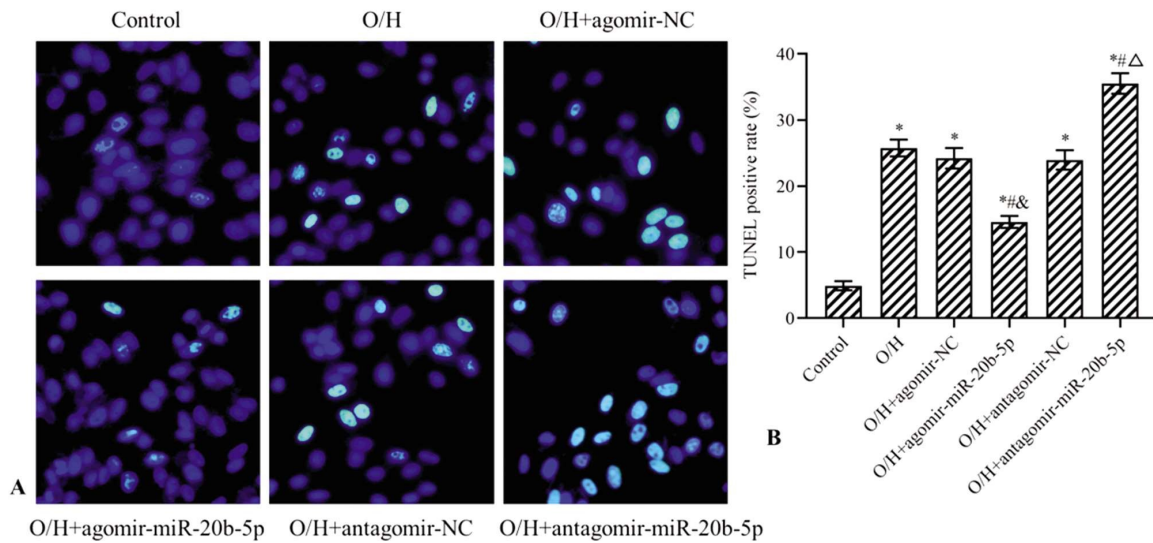


图 3 各组 BMVEC 的 TUNEL 染色结果

Fig. 3 TUNEL staining results of BMVEC in each group

Note: A: TUNEL stained image ($\times 200$), blue: DAPI, green: TUNEL; B: Positive rate of TUNEL; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with O/H group, # $P < 0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, & $P < 0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, Δ $P < 0.05$.

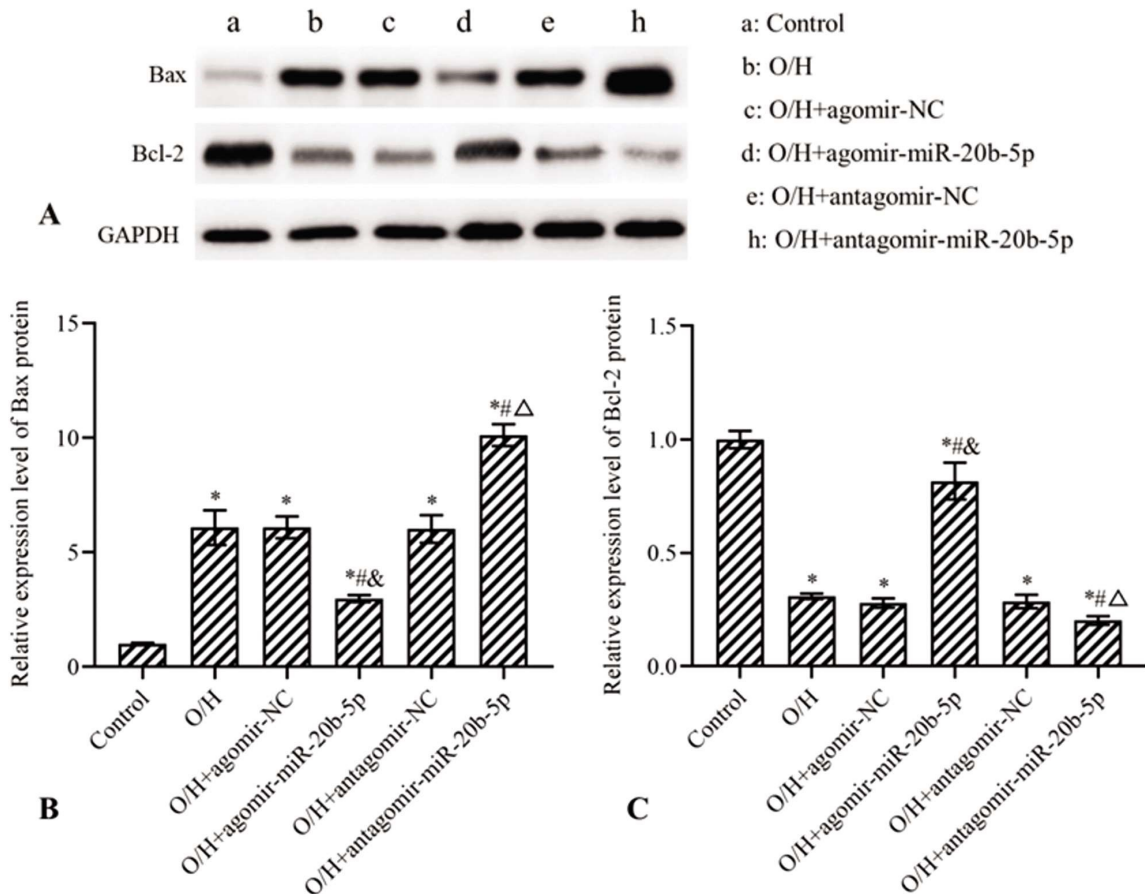


图 4 各组 BMVEC 的 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达情况

Fig. 4 Protein expression of Bax and Bcl-2 in BMVECs in each group

Note: A: Results of Western blot; B and C: Relative expression levels of Bax and Bcl-2; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with O/H group, # $P < 0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, & $P < 0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, Δ $P < 0.05$.

2.7 miR-20b-5p 靶向抑制 BMVEC 中的 MAPK1 表达

生物信息学分析结果显示, miR-20b-5p 与 MAPK1 存在潜

的结合位点。在转染了 MAPK1-WT 质粒的 BMVEC 中,与 agomir-NC 组比较, agomir-miR-20b-5p 组的相对荧光素酶活性降低 ($P<0.05$)。见图 9。

与 Control 组比较, O/H 组 BMVEC 中的 MAPK1 mRNA 和蛋白表达水平以及相对荧光强度升高 ($P<0.05$)。与 O/H 组和

O/H+agomir-NC 组比较, O/H+agomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 MAPK1 mRNA 和蛋白表达水平以及相对荧光强度降低 ($P<0.05$)。与 O/H 组和 O/H+antagomir-NC 组比较, O/H+antagomir-miR-20b-5p 组 BMVEC 中的 MAPK1 mRNA 和蛋白表达水平以及相对荧光强度升高 ($P<0.05$)。见图 10 和 11。

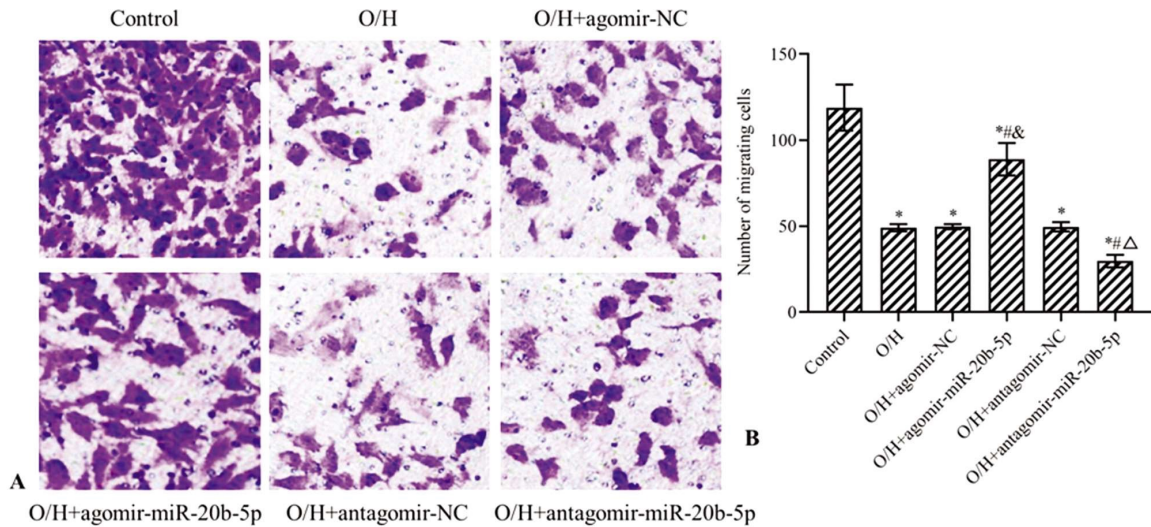


图 5 各组 BMVEC 的迁移情况

Fig. 5 BMVEC migration in each group

Note: A: BMVEC migration image in Transwell experiment ($\times 200$); B: Number of migrating cells statistics; Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with O/H group, # $P<0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, & $P<0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, Δ $P<0.05$.

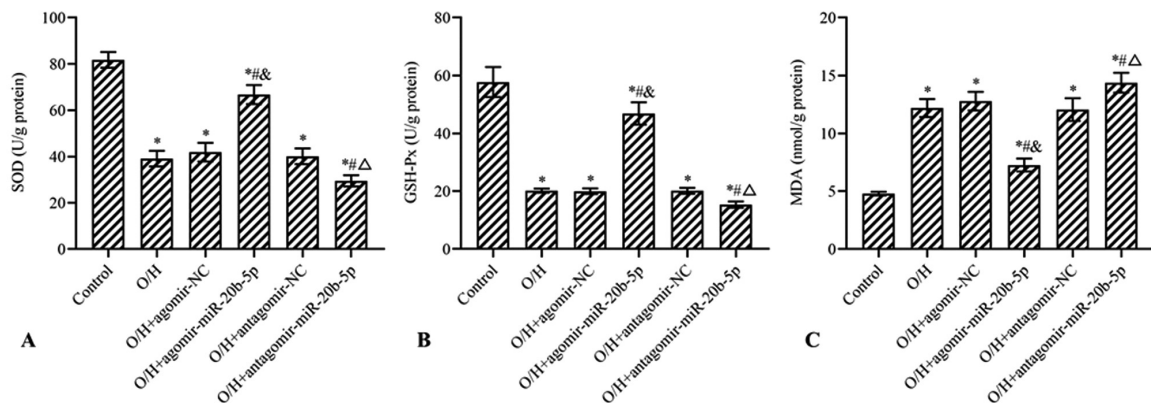


图 6 各组 BMVEC 的 SOD、GSH-Px 和 MDA 水平

Fig. 6 SOD, GSH-Px and MDA levels of BMVEC in each group

Note: A-C: SOD, GSH-Px and MDA levels, respectively; Compared with Control group, * $P<0.05$; Compared with O/H group, # $P<0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, & $P<0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, Δ $P<0.05$.

3 讨论

脑出血是致死率和致残率最高的脑血管病之一。脑出血后对脑组织的损伤主要包括两类:原发和继发性脑损伤。原发性脑损伤发生在脑出血后的几个小时内,血液渗入脑实质形成血肿,导致周围组织压迫,破坏局部脑实质^[20]。继发性脑损伤是指脑出血后的一些病理反应引起的脑组织损伤,凝血酶、补体和细胞碎片对中枢神经系统具有毒性和免疫原性,诱导氧化应激和炎症反应,最终导致各种类型的细胞死亡^[21]。继发性脑损伤是治疗脑出血的关键。

miRNA 可以调节脑出血后的炎症反应、氧化应激、血脑屏

障完整性,是减轻继发性损伤、改变大脑功能的可行分子靶点^[22-24]。前人研究表明,脑出血大鼠脑组织中 miR-20b-5p 表达下调^[9]。本研究考察了 miR-20b-5p 对脑出血体外细胞模型(即 OGD/Hemin 处理的 BMVEC)的调控作用,研究表明 OGD/Hemin 处理下调了 BMVEC 中的 miR-20b-5p 水平,并抑制了 BMVEC 的增殖和迁移,促进了凋亡。进一步研究表明,上调 miR-20b-5p 促进了 OGD/Hemin 处理的 BMVEC 的增殖和迁移,抑制了凋亡。其他文献表明,miR-20b-5p 沉默抑制了 SHR 主动脉平滑肌细胞的增殖和迁移^[5]。在低氧条件下,大鼠心肌细胞 H9c2 中 miR-20b-5p 的表达下调,miR-20b-5p 的过表达减弱了 H9c2 细胞在缺氧条件下的细胞凋亡^[7]。miR-20b-5p

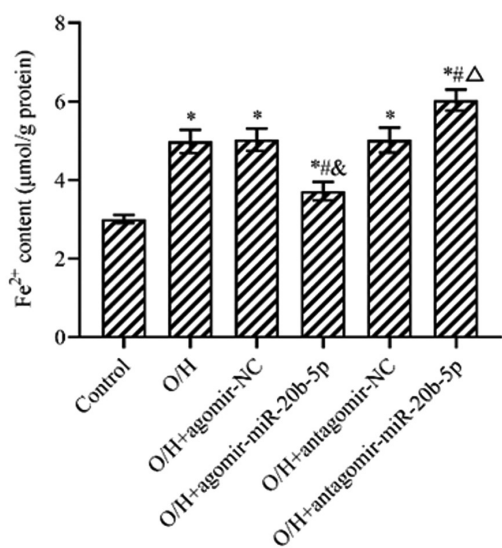


图7 各组 BMVEC 的 Fe²⁺ 含量水平

Fig. 7 Fe²⁺ content levels of BMVEC in each group

Note: Compared with Control group, *P<0.05; Compared with O/H group, #P<0.05; Compared with O/H+agomir-NC group, &P<0.05; Compared with O/H+antagomir-NC group, ΔP<0.05.

的过表达抑制了重症急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞的炎症和

凋亡,促进了血管内皮细胞的活力、迁移和管形成能力^[4]。这些结果说明,miR-20b-5p 可能参与调解多种细胞的存活和活性,上调 miR-20b-5p 可能是防止脑出血后继发性损伤的可能途径之一。

铁死亡(Ferroptosis)是一种铁依赖性的程序性细胞死亡过程,也是影响脑出血后继发性损伤进展的一种细胞死亡途径^[25]。脑出血后,过量的铁从血红蛋白中分解出来,导致铁死亡。铁死亡由活性氧过度积累引起的氧化应激和脂质过氧化作用驱动,铁死亡过程中伴随大量铁离子的累积和脂质过氧化^[26]。细胞抗氧化系统的失活是铁死亡的主要原因。其他研究证实 miRNA 参与调节脑出血后的铁死亡过程^[3,25]。本研究表明 OGD/Hemin 处理后 BMVEC 中的 SOD 和 GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,抗氧化系统失衡。此外,OGD/Hemin 处理后 BMVEC 中的 Fe²⁺ 含量和铁死亡标志物 PTGS2^[27]蛋白表达水平升高,GPX4 蛋白表达水平降低,铁死亡途径被激活。GPX4 是一种铁死亡氨基酸代谢中的调控蛋白,可清除脂质过氧化物,GPX4 的失活是铁死亡途径激活的标志^[28,29]。然而,上调 OGD/Hemin 处理的 BMVEC 中的 miR-20b-5p 有效抑制了氧化应激和铁死亡,而下调 miR-20b-5p 则进一步加剧了氧化应激和铁死亡。这些结果说明 miR-20b-5p 可能调节脑出血后的氧化应激和铁死亡。

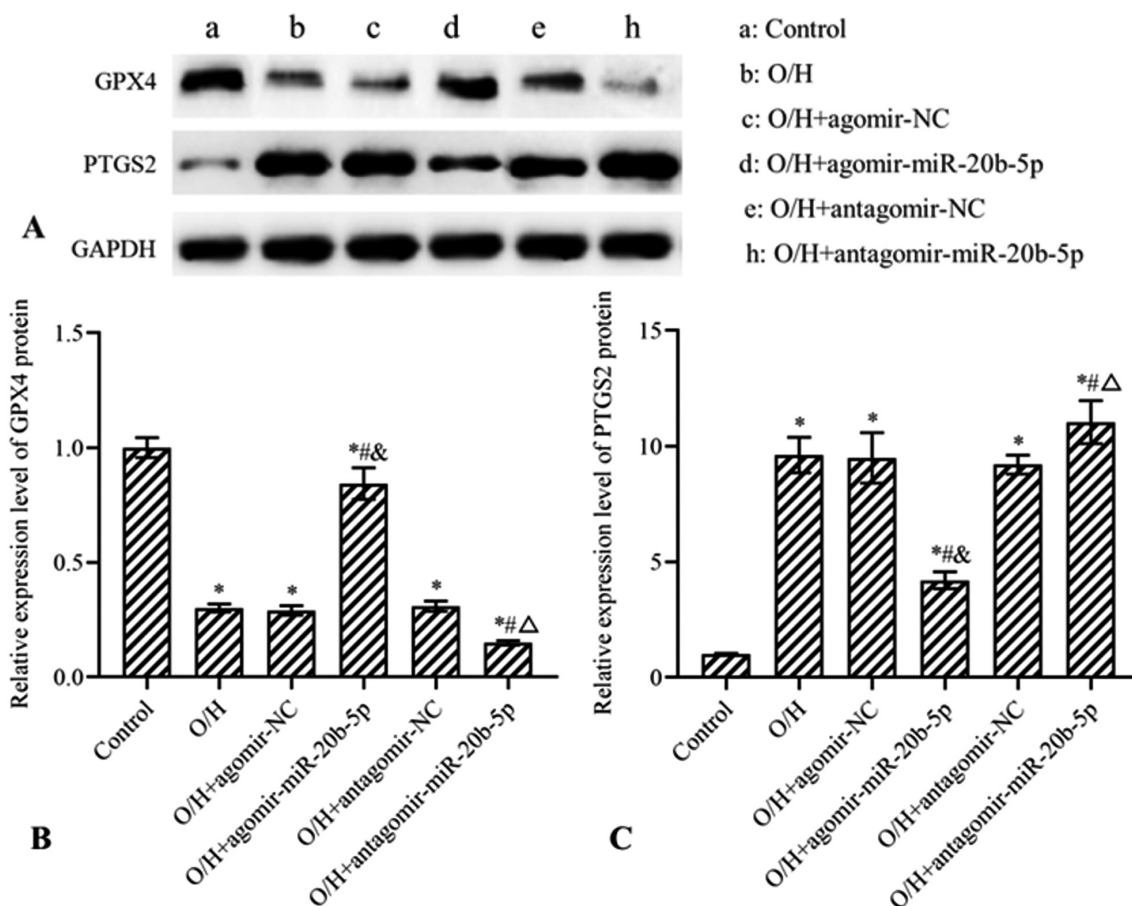


图8 各组 BMVEC 中 GPX4 和 PTGS2 的蛋白表达水平

Fig.8 Fe²⁺ content and GPX4 and PTGS2 protein expression levels of BMVEC in each group

Note: A: Results of Western blot; B and C: Relative expression levels of GPX4 and PTGS2; Compared with Control group, *P<0.05; Compared with O/H group, #P<0.05; Compared with O/H+agomir-NC group, &P<0.05; Compared with O/H+antagomir-NC group, ΔP<0.05.

Position 7597-7603 of MAPK1 3' UTR 5' ...ACACCUGUAUUGCAGCACUUUG...
 hsa-miR-20b-5p 3' GAUGGACGUGAUACUCGUGAAAC

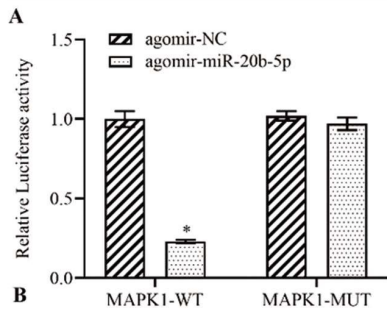


图 9 miR-20b-5p 靶向抑制 BMVEC 中的 MAPK1 表达

Fig. 9 miR-20b-5p targeted inhibition of MAPK1 expression in BMVEC
 Note: A: Potential binding sites of miR-20b-5p and MAPK1; B: Relative luciferase activity; Compared with agomir-NC group, * $P < 0.05$.

miRNA 主要通过调控靶基因表达发挥生物学功能。一些

研究表明,MAPK 家族成员参与铁死亡调节^[13,14]。MAPK1 是调控肿瘤坏死因子信号通路和氧化应激相关基因的关键分子,MAPK1 分子的调控网络可以影响脑出血后的铁死亡和氧化应激^[8]。ERK1/2 的激活在多种疾病中诱导铁死亡^[30,31]。本研究证实 MAPK1(ERK2)是 miR-20b-5p 的靶基因。OGD/Hemin 处理后 BMVEC 中的 MAPK1 表达水平升高,上调 miR-20b-5p 有效抑制了 OGD/Hemin 处理的 BMVEC 中的 MAPK1 表达,下调 miR-20b-5p 则促进了 MAPK1 表达。这些结果提示 miR-20b-5p 可能通过调控 MAPK1 表达影响铁死亡途径。MAPK1 除了参与调解脑出血后的铁死亡之外,还具有其他功能。例如,ERK1/2 介导脑出血过程中的脑血管破裂,上调 ERK1/2 可促进脑出血的发生^[32]。脑出血后脑组织中 ERK1/2 被磷酸化,引起小胶质细胞 / 巨噬细胞的激活和中性粒细胞的浸润,从而引起神经炎症^[33]。本研究推测,在脑出血后 miR-20b-5p 的下调诱导了 MAPK1 的高表达,激活的 MAPK 转移到细胞核调节靶基因表达,从而激活了铁死亡途径,促进了继发性损伤。

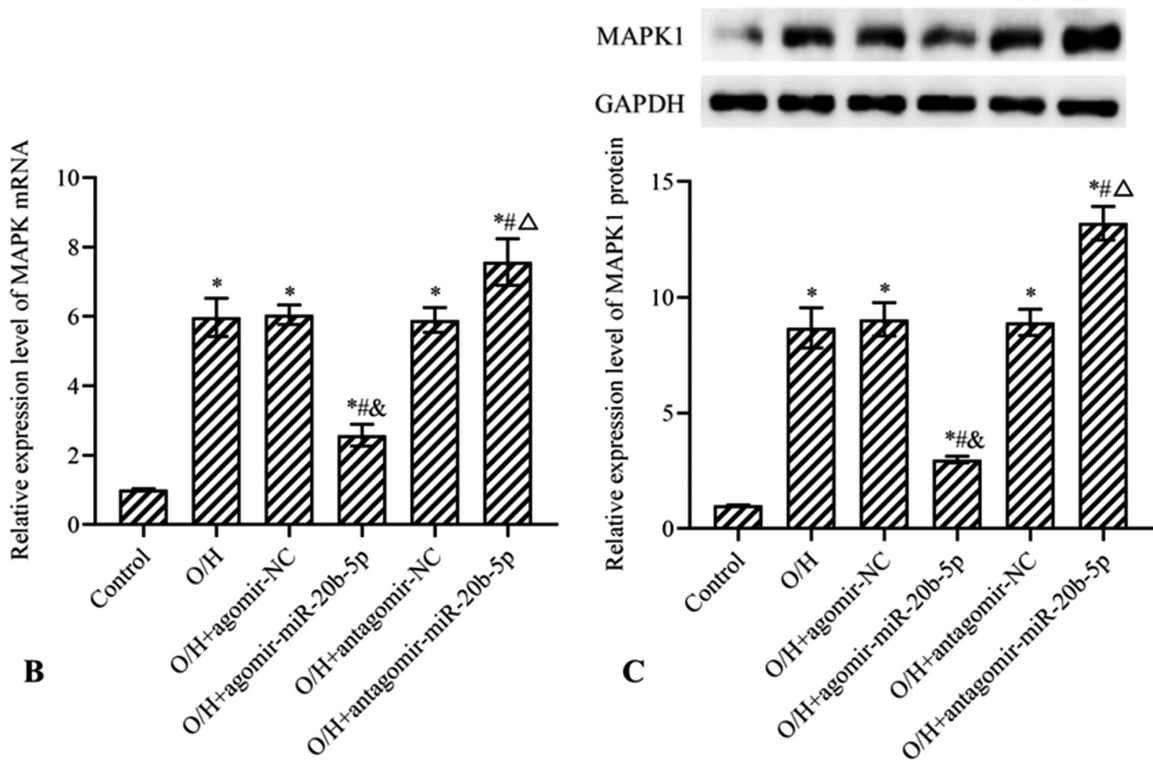


图 10 各组 BMVEC 的 MAPK1 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 10 mRNA and protein expression levels of MAPK1 in BMVECs of each group

Note: A and B: Relative expression levels of MAPK1 mRNA and protein, respectively; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with O/H group, # $P < 0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, & $P < 0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, Δ $P < 0.05$.

综上所述, 本研究表明上调 miR-20b-5p 通过抑制 OGD/Hemin 处理的 BMVEC 中 MAPK1 的表达从而抑制了铁死亡途径。miR-20b-5p 和 MAPK1 可能是治疗脑出血后继发性损伤的潜在分子靶点。

参考文献(References)

[1] Puy L, Parry-Jones AR, Sandset EC, et al. Intracerebral haemorrhage [J]. Nat Rev Dis Primers, 2023, 9(1): 14
 [2] Duan S, Wang F, Cao J, et al. Exosomes derived from

microRNA-146a-5p-enriched bone marrow mesenchymal stem cells alleviate intracerebral hemorrhage by inhibiting neuronal apoptosis and microglial m1 polarization [J]. Drug Des Devel Ther, 2020, 14: 3143-3158
 [3] Zhao H, Li X, Yang L, et al. Isorhynchophylline relieves ferroptosis-induced nerve damage after intracerebral hemorrhage via miR-122-5p/TP53/SLC7A11 pathway [J]. Neurochem Res, 2021, 46(8): 1981-1994

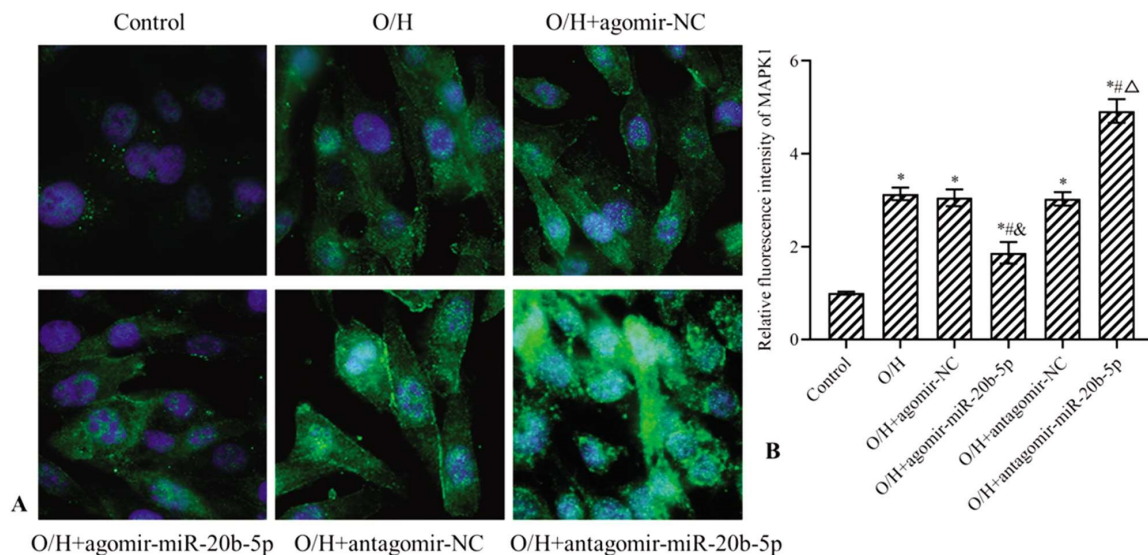


图 11 各组 BMVEC 的 MAPK1 免疫荧光染色结果

Fig. 11 Results of MAPK1 immunofluorescence staining of BMVEC in each group

Note: A: MAPK1 immunofluorescence staining images of BMVEC (× 400), blue: DAPI, green: MAPK1; B: Relative fluorescence intensity of MAPK1; Compared with Control group, * $P < 0.05$; Compared with O/H group, # $P < 0.05$; Compared with O/H+agomir-NC group, & $P < 0.05$; Compared with O/H+antagomir-NC group, Δ $P < 0.05$.

- [4] Tang GX, Yang MS, Xiang KM, et al. MiR-20b-5p modulates inflammation, apoptosis and angiogenesis in severe acute pancreatitis through autophagy by targeting AKT3 [J]. *Autoimmunity*, 2021, 54 (7): 460-470
- [5] Xu M, Yu T. MiR-20b-5p contributes to the dysfunction of vascular smooth muscle cells by targeting MAGI3 in hypertension [J]. *J Mol Histol*, 2022, 53(2): 187-197
- [6] Zhai TY, Dou M, Ma YB, et al. miR-20b-5p is a novel biomarker for detecting prostate cancer[J]. *Oncol Lett*, 2022, 24(6): 426
- [7] Zhou Z, Chen S, Tian Z, et al. miR-20b-5p attenuates hypoxia-induced apoptosis in cardiomyocytes via the HIF-1 α /NF- κ B pathway[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2020, 52(9): 927-934
- [8] Liu T, Li X, Cui Y, et al. Bioinformatics analysis identifies potential ferroptosis key genes in the pathogenesis of intracerebral hemorrhage[J]. *Front Neurosci*, 2021, 15: 661663
- [9] Fan W, Li X, Zhang D, et al. Detrimental role of miRNA-144-3p in intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury is mediated by formyl peptide receptor 2 downregulation both in vivo and in vitro[J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(6): 723-738
- [10] Wen Z, Mei B, Li H, et al. P2X7 participates in intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via MAPKs signaling pathways[J]. *Neurochem Res*, 2017, 42(8): 2372-2383
- [11] Deng S, Liu S, Jin P, et al. Albumin reduces oxidative stress and neuronal apoptosis via the ERK/Nrf2/HO-1 pathway after intracerebral hemorrhage in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 8891373
- [12] Deng S, Sherchan P, Jin P, et al. Recombinant CCL17 enhances hematoma resolution and activation of CCR4/ERK/Nrf2/CD163 signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(4): 1940-1953
- [13] Chang WT, Bow YD, Fu PJ, et al. A marine terpenoid, heteronemin, induces both the apoptosis and ferroptosis of hepatocellular carcinoma cells and involves the ROS and MAPK pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7689045
- [14] Wang X, Zhang C, Zou N, et al. Lipocalin-2 silencing suppresses inflammation and oxidative stress of acute respiratory distress syndrome by ferroptosis via inhibition of MAPK/ERK pathway in neonatal mice[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 508-520
- [15] Chen B, Wang H, Lv C, et al. Long non-coding RNA H19 protects against intracerebral hemorrhage injuries via regulating microRNA-106b-5p/acyl-CoA synthetase long chain family member 4 axis[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 4004-4015
- [16] Zhang J, Dong B, Hao J, et al. LncRNA Shng3 contributes to dysfunction of cerebral microvascular cells in intracerebral hemorrhage rats by activating the TWEAK/Fn14/STAT3 pathway[J]. *Life Sci*, 2019, 237: 116929
- [17] Zhang L, Wang X, Che W, et al. Methyltransferase-like 3 silenced inhibited the ferroptosis development via regulating the glutathione peroxidase 4 levels in the intracerebral hemorrhage progression [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(6): 14215-14226
- [18] Xie L, Wang Y, Chen Z. LncRNA Blnc1 mediates the permeability and inflammatory response of intracerebral hemorrhage by regulating the PPAR- γ /SIRT6/FoxO3 pathway[J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118942
- [19] Xie L, Wang Y, Chen Z. Early growth response protein 1 knockdown alleviates the cerebral injury in rats with intracerebral hemorrhage via STAT3/NF- κ B pathway by reducing RXR α acetylation level[J]. *Neuroscience*, 2022, 487: 120-130
- [20] Wilkinson DA, Keep RF, Hua Y, et al. Hematoma clearance as a therapeutic target in intracerebral hemorrhage: From macro to micro[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2018, 38(4): 741-745
- [21] Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282
- [22] Kashif H, Shah D, Sukumari-Ramesh S. Dysregulation of microRNA and intracerebral hemorrhage: roles in neuroinflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8115

- conventional resuscitation strategies in adult trauma patients with hemorrhagic shock: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2018, 84(5): 802-808
- [3] 张毅敏, 林益重. 限制性液体复苏策略对失血性休克患者抢救效果的影响[J]. *中外医疗*, 2022, 41(32): 106-109
- [4] 王雄明, 罗强. 限制性液体复苏救治重症胸部损伤并创伤失血性休克临床效果[J]. *临床误诊误治*, 2022, 35(08): 78-81
- [5] Pitotti C, David J. An evidence-based approach to nonoperative management of traumatic hemorrhagic shock in the emergency department[J]. *Emerg Med Pract*, 2020, 22(11): 1-24
- [6] Faria I, Thivalapill N, Makin J, et al. Bleeding, Hemorrhagic Shock, and the Global Blood Supply[J]. *Crit Care Clin*, 2022, 38(4): 775-793
- [7] 白琰. 限制性液体复苏在创伤失血性休克救治中的临床应用效果[J]. *中国实用医药*, 2021, 16(35): 82-84
- [8] 吕冰, 田利成, 何振芬. 限制性液体复苏与常规液体复苏治疗创伤性休克的疗效比较[J]. *医学信息*, 2021, 34(23): 114-116
- [9] 赵寻, 朱家旺, 张晓磊. 限制性液体复苏对创伤性休克患者炎症损伤及多系统器官功能状态的影响研究 [J]. *检验医学与临床*, 2021, 18(14): 2087-2090
- [10] Albreiki M, Voegeli D. Permissive hypotensive resuscitation in adult patients with traumatic haemorrhagic shock: a systematic review[J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2018, 44(2): 191-202
- [11] 陈俊枢. 多发性骨折合并创伤失血性休克液体复苏分析 [J]. *航空航天医学杂志*, 2014, 25(10): 1383-1384
- [12] 张伟中, 计小东, 徐浩. 多发性骨折合并创伤失血性休克液体复苏的探讨[J]. *临床和实验医学杂志*, 2006, (04): 371-372
- [13] 侯建军. 限制性液体复苏在急诊骨盆骨折伴失血性休克患者中的应用效果[J]. *中国当代医药*, 2021, 28(11): 106-108
- [14] 韦世壮, 潘云东, 李振华, 等. 限制性液体复苏对创伤失血性休克患者氧代谢、凝血功能、血清乳酸水平的影响[J]. *现代医学与健康研究电子杂志*, 2021, 5(02): 58-60
- [15] 王红银, 王海云, 徐彩云. 多处创伤性骨折合并创伤性休克患者预后影响因素分析 [J]. *中国医学前沿杂志 (电子版)*, 2020, 12(11): 72-75
- [16] 董宏伟. 限制性液体复苏方式对多发伤合并休克患者凝血功能及炎症因子水平的影响[J]. *四川生理科学杂志*, 2020, 42(03): 265-268
- [17] 孙家安, 李亚男, 王宝玉. 创伤失血性休克急救中限制性液体复苏的有效性分析[J]. *黑龙江中医药*, 2020, 49(03): 178-179
- [18] 孙瑞, 司运兴. 探究早期不同液体复苏治疗对创伤失血性休克患者血气指标和凝血功能的影响 [J]. *临床医药文献电子杂志*, 2020, 7(36): 50+65
- [19] Chang R, Holcomb JB. Optimal Fluid Therapy for Traumatic Hemorrhagic Shock[J]. *Crit Care Clin*, 2017, 33(1): 15-36
- [20] Jones AR, Miller JL, Jansen JO, et al. Whole Blood for Resuscitation of Traumatic Hemorrhagic Shock in Adults [J]. *Adv Emerg Nurs J*, 2021, 43(4): 344-354
- [21] 谢伟宏, 梁国源, 戚应静, 等. 两种液体复苏方式对失血性休克患者肾功能指标及预后的影响 [J]. *实用休克杂志 (中英文)*, 2023, 7(02): 82-85
- [22] 郝建宾, 张莹, 吴超. 限制性液体复苏对创伤性休克患者抢救成功率、凝血功能的影响[J]. *微量元素与健康研究*, 2022, 39(03): 15-16
- [23] 韩力, 赵建文, 王晓伟, 等. 限制性液体复苏对多发性骨折合并创伤失血性休克患者凝血功能、心肌损害指标及预后的影响[J]. *现代生物医学进展*, 2020, 20(11): 2068-2071
- [24] Tremoleda JL, Watts SA, Reynolds PS, et al. Modeling Acute Traumatic Hemorrhagic Shock Injury: Challenges and Guidelines for Preclinical Studies[J]. *Shock*, 2017, 48(6): 610-623
- [25] 曹文, 聂鑫, 张永和. 限制性液体复苏对多发性骨折合并创伤失血性休克患者凝血功能、心肌损害指标及预后的影响[J]. *血栓与止血学*, 2022, 28(03): 454-455+457

(上接第 4641 页)

- [23] Sultan W, Machado L, Ali MG, et al. MicroRNAs as biomarkers in spontaneous intracerebral hemorrhage: A systematic review of recent clinical evidence [J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2022, 213: 107130
- [24] Wang S, Cui Y, Xu J, et al. miR-140-5p attenuates neuroinflammation and brain injury in rats following intracerebral hemorrhage by targeting TLR4[J]. *Inflammation*, 2019, 42(5): 1869-1877
- [25] Bao WD, Zhou XT, Zhou LT, et al. Targeting miR-124/Ferroportin signaling ameliorated neuronal cell death through inhibiting apoptosis and ferroptosis in aged intracerebral hemorrhage murine model [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(11): e13235
- [26] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072
- [27] 贺莎莎, 刘进友, 李书剑, 等. 抑制铁死亡改善血管性痴呆大鼠认知功能的作用与机制研究 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2021, 24(15): 1289-1298
- [28] Liu T, Jiang L, Tavana O, et al. The Deubiquitylase OTUB1 Mediates Ferroptosis via Stabilization of SLC7A11 [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(8): 1913-1924
- [29] Ni J, Chen K, Zhang J, et al. Inhibition of GPX4 or mTOR overcomes resistance to Lapatinib via promoting ferroptosis in NSCLC cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 567: 154-160
- [30] Liu C, Tian Q, Wang J, et al. Blocking P2RX7 attenuates ferroptosis in endothelium and reduces HG-induced hemorrhagic transformation after MCAO by inhibiting ERK1/2 and P53 signaling pathways [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(2): 460-479
- [31] Savic D, Steinbichler TB, Ingruber J, et al. Erkl1/2-dependent HNSCC cell susceptibility to erastin-induced ferroptosis[J]. *Cells*, 2023, 12(2): 336
- [32] Xiao N, Liu TL, Li H, et al. Low serum uric acid levels promote hypertensive intracerebral hemorrhage by disrupting the smooth muscle cell-elastin contractile unit and upregulating the Erk1/2-MMP axis[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11(5): 1077-1094
- [33] Yan J, Zuo G, Sherchan P, et al. CCR1 activation promotes neuroinflammation through CCR1/TPR1/ERK1/2 signaling pathway after intracerebral hemorrhage in mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2020, 17(3): 1170-1183