

• 药理与临床 •

基于 miR-34 调控 KLF4/VEGF 传导轴探讨活血荣络方促脑梗死后血管新生的机制

杨仁义¹, 颜思阳¹, 周德生², 傅馨莹¹, 马强¹, 张宇星¹, 高晓峰², 刘利娟^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

摘要:目的 基于 miR-34 家族基因与 Kruppel 样因子 4(Kruppel-like factor 4, KLF4)/血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 传导轴的相关性探讨活血荣络方促脑梗死后血管新生的机制。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、活血荣络方(11.7 g/kg)组和丁苯酞(60 mg/kg)组, 每组 10 只, 建立大鼠中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型, 连续 ig 药物 7 d。采用改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)评价大鼠神经功能缺损症状; 采用免疫荧光染色观察海马区 CD34 及皮质区 VEGF 表达; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠梗死侧脑组织中 KLF4 和 VEGF 蛋白表达情况; 采用 qRT-PCR 法检测各组大鼠脑组织中 miR-34 家族基因的表达; 采用 Pearson 相关分析探讨 miR-34 家族基因与 mNSS、KLF4、VEGF 的相关性。结果 活血荣络方能够显著改善大鼠神经功能缺损症状($P < 0.01$), 增加海马区 CD34 阳性细胞及皮质区 VEGF 表达($P < 0.01$), 增强脑组织中 KLF4 和 VEGF 蛋白表达($P < 0.01$), 抑制 miR-34 家族基因 miR-34a、miR-34b、miR-34c mRNA 表达($P < 0.01$); 且 mNSS 与 miR-34a、miR-34b、miR-34c 呈高度正相关($P < 0.05$); VEGF 与 miR-34a、miR-34b、miR-34c 呈高度负相关($P < 0.05$); KLF4 与 miR-34b 呈高度负相关($P < 0.05$), 与 miR-34c 呈高度负相关($P < 0.01$)。结论 活血荣络方能够抑制 miR-34a、miR-34b、miR-34c mRNA 表达, 激活 KLF4/VEGF 传导轴, 促进脑梗死后血管新生, 进而改善神经功能缺损症状。

关键词: 活血荣络方; 脑梗死; 血管新生; KLF4; VEGF; miR-34

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)16-4873-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.16.012

Mechanism of Huoxue Rongluo Recipe on promoting angiogenesis after cerebral infarction based on miR-34 regulating KLF4/VEGF conduction axis

YANG Ren-yi¹, YAN Si-yang¹, ZHOU De-sheng², FU xin-ying¹, MA Qiang¹, ZHANG Yu-xing¹, GAO Xiao-feng², LIU Li-juan²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Abstract: Objective Based on the correlation between miR-34 family genes and Kruppel-like factor 4 (KLF4)/vascular endothelial growth factor (VEGF) conduction axis to investigate the mechanism of Huoxue Rongluo Recipe (活血荣络方) on promoting angiogenesis after cerebral infarction. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, Huoxue Rongluo Recipe (11.7 g/kg) group and butylphthalide (60 mg/kg) group, 10 rats in each group. Middle cerebral artery occlusion/reperfusion

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81874463); 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划项目(2017SK4005); 湖南省重点研发计划项目(2020SK2092); 湖南省财政中医药项目名院工程(rsk-010-013/006-09); 湖南省教育厅一般项目(20C1405); 湖南省卫健委科研项目(202103071190); 湖南省中医药管理局资助项目(202038, 202046, 2021218); 湖南省研究生创新项目(CX20190587); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2019ZXYJH08, 2018ZXYJH10); 湖南中医药大学研究生培养质量工程专项(2020CX62)

作者简介: 杨仁义(1996—), 男, 硕士研究生, 从事神经系统疾病的中医药防治研究。Tel: 15700726938 E-mail: 792799735@qq.com

***通信作者:** 刘利娟(1985—), 女, 博士, 主治医师, 从事中医药对脑血管病及其并发症的防治研究。

Tel: (0731)85369768 E-mail: 601264967@qq.com

(MCAO/R) rats model were established, and rats were ig drugs for 7 d. Modified neurological severity score (mNSS) was used to evaluate the symptoms of neurological deficit in rats; Immunofluorescence staining was used to observe the expression of CD34 in hippocampus and VEGF in cortex; Western blotting was used to detect the expression of KLF4 and VEGF in infarcted brain tissue; qRT-PCR was used to detect the expression of miR-34 family genes in brain tissue; Pearson correlation analysis was used to observe the correlation between miR-34 family genes and mNSS, KLF4 and VEGF. **Results** Huoxue Rongluo Recipe significantly improved the symptoms of neurological deficits in rats ($P < 0.01$), increased expression of CD34 positive cells in hippocampus and expression of VEGF in cortex ($P < 0.01$), enhanced expression of KLF4 and VEGF protein in brain tissue ($P < 0.01$), inhibited mRNA expressions of *miR-34a*, *miR-34b* and *miR-34c* ($P < 0.01$); mNSS was highly positively correlated with *miR-34a*, *miR-34b* and *miR-34c* ($P < 0.05$); VEGF was highly negatively correlated with *miR-34a*, *miR-34b* and *miR-34c* ($P < 0.05$); KLF4 was highly negatively correlated with *miR-34b* ($P < 0.05$), highly negatively correlated with *miR-34c* ($P < 0.01$). **Conclusion** Huoxue Rongluo Recipe can inhibit expressions of *miR-34a*, *miR-34b* and *miR-34c*, activate KLF4/VEGF conduction axis, promote angiogenesis after cerebral infarction, and then improve the symptoms of neurological deficits.

Key words: Huoxue Rongluo Recipe; cerebral infarction; angiogenesis; KLF4; VEGF; miR-34

脑梗死又称缺血性脑卒中,是由于脑循环灌注障碍,缺血、缺氧所致局限脑组织缺血性坏死,出现相应神经功能缺损症状的临床最常见脑血管病类型,约占全部急性脑血管病的70%^[1],是当前我国居民死亡的首要原因^[2]。血管新生属于三级脑侧支循环范畴,在脑动脉闭塞后,血管内皮细胞(endothelial cells, ECs)增殖、迁移、分化,在原有微动/静脉基础上以芽生式形成新的血管,能够代偿性地为脑组织提供血流灌注^[3],促进病情恢复,是脑梗死药物治疗的关键切入点^[4]。因此,积极寻求脑梗死后促血管新生的药物具有重要的意义。

脑梗死属中医“缺血性脑卒中”范畴,在脑藏象理论指导下,本课题组首次提出缺血中风之“荣气虚滞”病机理论体系^[5],认为荣气是一切精微物质的总称^[6],荣气气化的“精化气-气生变-变成形”过程与ECs增殖、迁移、分化相应,因此,在活血荣络法指导下组方的活血荣络方可能具有促脑梗死后血管新生的作用^[7]。基于荣气理论创制的活血荣络方是湖南中医药大学第一附属医院院内制剂,纳入临床路径已13年,前期临床与实验研究发现活血荣络方能够上调微囊蛋白-1(caveolin-1, CAV-1)表达,下调基质金属肽酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达,激活Janus激酶2(Janus kinase 2, JAK2)/信号传导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)通路,减轻脑梗死急性期炎症反应,增加脑缺血区微血管密度(microvessel density, MVD),促进血管新生,改善脑梗死后神经功能缺损^[8-13],但活血荣络方促脑梗死后血管新生的作用机制仍有待进一步研究。Kruppel样因子4

(Kruppel-like factor 4, KLF4)是锌指转录因子家族蛋白之一,是双向调控转录因子,能够易位过表达,正向介导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)mRNA和蛋白的表达,可以形成KLF4/VEGF传导轴促进血管新生,且TargetsCan数据库预测发现KLF4是miR-34家族基因的下游靶基因,因此本研究以miR-34家族基因与KLF4/VEGF传导轴之间的相关性为切入点,探讨活血荣络方促脑梗死后血管新生的作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠40只,10~12周龄,体重250~280g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心,昼夜交替12h,温度21~26℃,湿度40%~50%。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号20201010-8)。

1.2 药材

活血荣络方(湘药制字Z20080472)由鸡血藤30g、石楠藤30g、生地黄15g、玄参10g、黄精15g、乳香10g、没药10g、川芎10g组成,以上药材均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经湖南中医药大学第一附属医院张裕民主任药师鉴定分别为豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn的干燥藤茎、胡椒科植物石楠藤 *Piper wallichii* (Miq.) Hand. -Mazz.的干燥带叶茎枝、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch.的干燥块根、玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.的干燥根、百合科植物黄精 *Polygonatum sibiricum* Red.的

干燥根茎、橄榄科乳香树属植物乳香树 *Boswellia carterii* Birdw.树皮渗出的树脂、橄榄科植物地丁树 *Commiphora myrrha* Engl.的干燥树脂、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort.的干燥根茎,均符合《中国药典》2015年版规定。

1.3 药品与试剂

丁苯酞软胶囊(批号 H20050299, 0.1 g/粒)购自中国石药集团恩必普药业有限公司;乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液(pH 8.0, 批号 G1206)、自发荧光淬灭剂(批号 G1221-2)、488 山羊抗兔荧光抗体(批号 GB25303)、CY3 山羊抗小鼠荧光抗体(批号 GB21301)、CY3 荧光 TSA 抗体(批号 G1223)、DAPI 染液(批号 G1012)、RNA 提取试剂盒(批号 G3013)、RT First Strand cDNA Synthesis Kit(批号 G3330)、2×SYBR Green qPCR Master Mix(批号 G3322)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;VEGF 荧光抗体(批号 19003-1-ap)购自武汉三鹰生物技术有限公司;CD34 荧光抗体(批号 ab81289)、KLF4 抗体(批号 ab106629)、VEGF 抗体(批号 ab46154)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ab150120)购自英国 Abcam 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 70-PQ0012)购自杭州联科生物技术股份有限公司;SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒(批号 CW0022S)购自康为世纪生物科技有限公司;Immobilon Western HRP 底物(批号 WBKLS0100)购自美国 Millipore 公司;PageRuler™ Prestained Protein Ladder(批号 26616)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;β-actin 抗体(批号 20536-1-AP)购自美国 Proteintech 公司;HyPure™ Molecular Biology Grade Water(批号 SH30538.02)购自美国 HyClone 公司。

1.4 仪器

HM325 型石蜡切片机、NanoDrop2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜、DS-U3 型显微成像系统(日本 Nikon 公司);Mini-Protean Tetra 小型垂直电泳槽、Mini Trans-Blot 型转印槽、PowerPac Basic 基础电泳仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统、qRT-PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);0.22 μm PVDF 膜(美国 Millipore 公司);D3024R 型台式高速冷冻型微量离心机(北京大龙兴创实验仪器有限公司);SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);FBZ2001-up-p 标准试剂型纯水仪(青岛富

勒姆科技有限公司);Enspire 多功能酶标仪(美国 Perkinelmer 公司)。

2 方法

2.1 活血荣络方的制备

将乳香、没药粉碎,其余药材混合,加入 10 倍量水浸泡 12 h 后煎煮 2 h;加入 8 倍量水煎煮 1 h;加入 5 倍量水煎煮 1 h;合并 3 次提取液,于旋转蒸发仪上浓缩,冷却后得到活血荣络方浸膏,于 4 °C 保存备用。采用高效液相色谱法对活血荣络方进行质量控制,其主要有效成分芒柄花素、薯蓣皂苷、正丁烯基苯酚、黄芩苷的质量分数分别为 4.298、3.568、1.779、18.634 mg/g。

2.2 大鼠脑缺血再灌注模型的制备

SD 大鼠适应性饲养 7 d,术前 12 h 禁食不禁水,ip 10% 水合氯醛(0.35 g/kg)麻醉,参考 Longa 等^[15]报道的大脑中动脉阻塞法,梗阻大鼠右侧大脑中动脉。钝性分离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,从颈外动脉和颈内动脉分叉部(4±2) mm 处剪口进拴线,插入拴线(18±2) mm,将颈内动脉挂线系牢;缺血 2 h 后,拔出拴线进行再灌注,以制备大脑中动脉闭塞/再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型。

2.3 分组与给药

采用 SPSS 23.0 软件设置随机数的方法,将 40 只 SD 大鼠随机分为对照组 10 只和造模组 30 只,造模组按“2.2”项下方法造模;对照组分离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉,不插入拴线,其余过程与模型制备方法相同。参考 Zea-Longa's 标准评分法^[15],取造模后评分为 1~3 分的大鼠 30 只,随机分为模型组、活血荣络方(11.7 g/kg)^[9-12]组和丁苯酞(60 mg/kg)^[14]组,每组 10 只。活血荣络方浸膏以蒸馏水稀释成质量浓度为 1.1 g/mL(以生药量计)的药液;丁苯酞软胶囊用麻油配制成质量浓度为 6 mg/mL 的混悬液。术后 6 h,各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),对照组和模型组 ig 等体积 0.9%氯化钠溶液,1 次/d,连续 7 d。实验过程中出现死亡、取材时发现蛛网膜下腔出血或脑出血的大鼠予以剔除。

2.4 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS)的影响

分别于给药后第 1、3、7 天,采用 mNSS^[16]评价各组大鼠神经功能缺损症状,包括运动、感觉、

平衡木、反射消失或动作异常等共 18 分,评分越高,损伤程度越严重。

2.5 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织海马区 CD34 和皮质区 VEGF 表达的影响

各组随机取 5 只大鼠,麻醉后断头取脑,依次将切片放入二甲苯 15 min,无水乙醇 5 min,85%乙醇 5 min,75%乙醇 5 min,蒸馏水洗涤。石蜡切片脱蜡至水后,以 EDTA 抗原修复缓冲液 (pH 8.0) 进行抗原修复,于 PBS 脱色,加入牛血清白蛋白孵育 30 min,分别加入 VEGF 抗体 (1:3000) 和 CD34 抗体 (1:100),4 °C 孵育过夜;PBS 洗涤后加入二抗,室温避光孵育 50 min,洗涤后加入 DAPI 染液,室温避光孵育 10 min,洗涤后用抗荧光淬灭封片剂封片,于荧光显微镜下观察并拍照,采用 Image J 1.8.0 软件,随机取海马区 5 个视野,分别对 5 个视野中 CD34 阳性细胞计数,取 5 个视野的均数,参考 Weidner 法^[17]计算 MVD 值;采用 Image J 1.8.0 软件

分析 VEGF 阳性表达的平均荧光强度。

2.6 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织 KLF4 和 VEGF 蛋白表达的影响

各组剩余的 5 只大鼠,麻醉后断头取脑,取梗死侧脑组织皮质区,加入裂解液匀浆,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,加入 5% 脱脂牛奶,室温封闭 1.5 h,分别加入 KLF4、VEGF 抗体 (1:1000),4 °C 孵育过夜;TBST 洗涤 3 次,10 min/次,加入山羊抗兔抗体 (1:10 000),室温孵育 60 min,洗涤后显色成像,采用 Image J 1.8.0 分析条带灰度值。

2.7 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c mRNA 表达的影响

按照试剂盒说明书提取各组大鼠脑组织皮质区总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1,以 U6 为内参。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	长度/bp
miR-34a	F: CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAACCG R: ACACTCCAGCTGGGTGGCAGTGTCTTAG	66
miR-34b	F: CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACAATCAG R: ACACTCCAGCTGGGAGGCAGTGTAAATTAG	66
miR-34c	F: CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGCAATCAG R: ACACTCCAGCTGGGAGGCAGTGTAGTTAG	66
U6	F: CTCGCTTCGGCAGCAC R: AACGCTTCACGAATTTGCGT	94

2.8 大鼠脑组织 miR-34 家族基因与 mNSS、KLF4 和 VEGF 的相关性

根据模型组、活血荣络方组、丁苯酞组大鼠 7 d 的 mNSS、脑组织中 KLF4、VEGF 相对蛋白表达量与脑组织中 miR-34 家族基因表达量,采用 SPSS 23.0 软件进行相关性分析,并通过 R 语言 3.6.3 分别绘制 miR-34a、miR-34b、miR-34c 与 mNSS、KLF4、VEGF 之间的相关性分析图。当 $P < 0.05$ 时,则两变量存在相关性; $R > 0$ 时为正相关, $R < 0$ 为负相关; $0 \leq |R| < 0.3$ 为低度相关, $0.3 \leq |R| < 0.5$ 为中度相关, $0.5 \leq |R| < 1$ 为高度相关; $|R|$ 越大,相关关系越大。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较若符合正态性与方差齐性时,采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;方差不齐时,采用 Dunnett's T3 法;若不符合正态

性时,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。miR-34 家族基因与 mNSS、KLF4、VEGF 的相关性分析,若符合正态性,则采用 Pearson 相关分析;若不符合正态性,则采用 Spearman 相关分析。

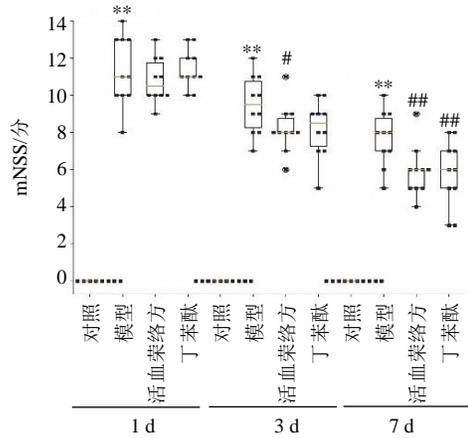
3 结果

3.1 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠 mNSS 的影响

如图 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠 mNSS 显著升高 ($P < 0.01$),神经功能缺损严重;与模型组比较,活血荣络方组 3 d mNSS 显著降低 ($P < 0.05$),各给药组 7 d mNSS 显著降低 ($P < 0.01$),神经功能明显改善。

3.2 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织海马区 CD34 和皮质区 VEGF 表达的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组大鼠海马区 MVD 数量和皮质区 VEGF 表达显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组海马区 MVD 数量和皮质区 VEGF 阳性表达均显著升高 ($P < 0.01$)。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同
** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠 mNSS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Fig. 1 Effect of Huoxue Rongluo Recipe on mNSS of MCAO/R rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

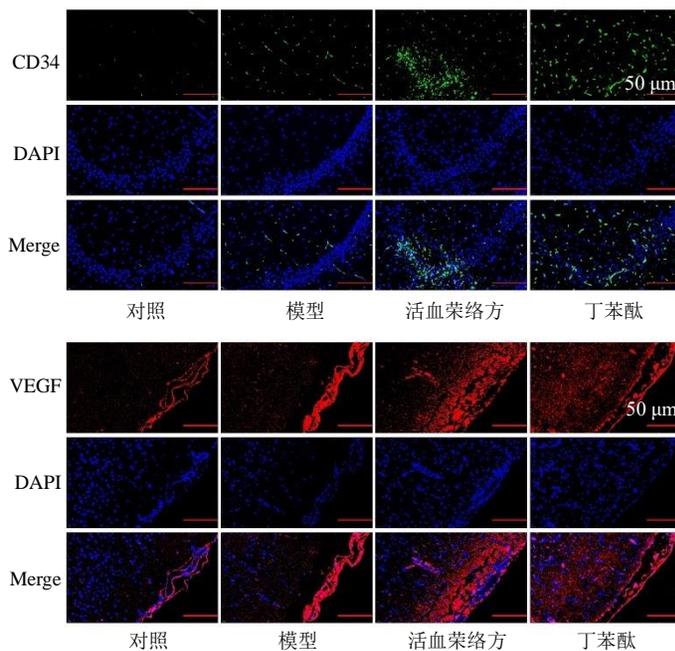


图 2 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织海马区 CD34 和皮质区 VEGF 表达的影响 ($\times 400$)

Fig. 2 Effect of Huoxue Rongluo Recipe on expressions of CD34 in hippocampus and VEGF in cortex of MCAO/R rats ($\times 400$)

miR-34c 呈高度负相关, R 分别为 -0.58 、 -0.58 、 -0.69 ($P < 0.05$); *KLF4* 与 *miR-34b* 呈高度负相关, R 为 -0.64 ($P < 0.05$), 与 *miR-34c* 呈高度负相关, R 为 -0.88 ($P < 0.01$).

4 讨论

脑梗死疾病发生后, 局部低氧致血管新生诱导

3.3 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织 KLF4 和 VEGF 蛋白表达的影响

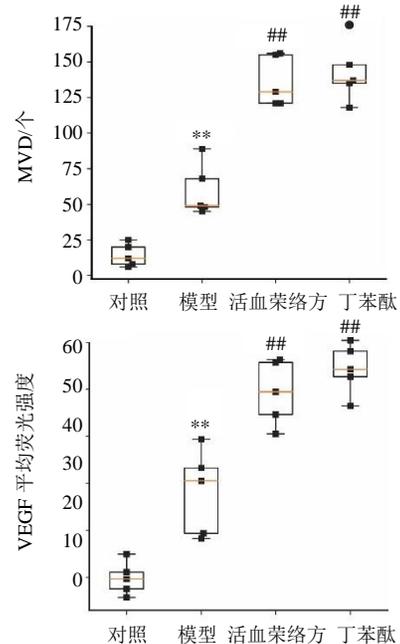
如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组脑组织中 KLF4 和 VEGF 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组 KLF4 和 VEGF 蛋白表达水平均进一步升高 ($P < 0.01$).

3.4 活血荣络方对 MCAO/R 大鼠脑组织 *miR-34a*、*miR-34b* 和 *miR-34c* mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组脑组织 *miR-34a*、*miR-34b*、*miR-34c* mRNA 表达水平均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组脑组织 *miR-34a*、*miR-34b*、*miR-34c* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.01$).

3.5 大鼠脑组织中 *miR-34* 家族基因与 mNSS、KLF4 和 VEGF 的相关性

如图 5 所示, mNSS 与 *miR-34a*、*miR-34b*、*miR-34c* 呈高度正相关, 相关系数 (R) 分别为 0.60 、 0.56 、 0.56 ($P < 0.05$); VEGF 与 *miR-34a*、*miR-34b*、



因子在脑组织中高表达, 推进由诱导因子与抑制因子组成的血管新生平衡向促进修复的方向移动, 启动内源性血管新生, 形成大量微血管, 为缺血缺氧脑组织提供灌注与营养。VEGF 作为血管新生诱导因子, 脑梗死后低氧环境能诱导其应激性表达增高, 进而促进 ECs 增殖、迁移、分化成管, 调控血管通

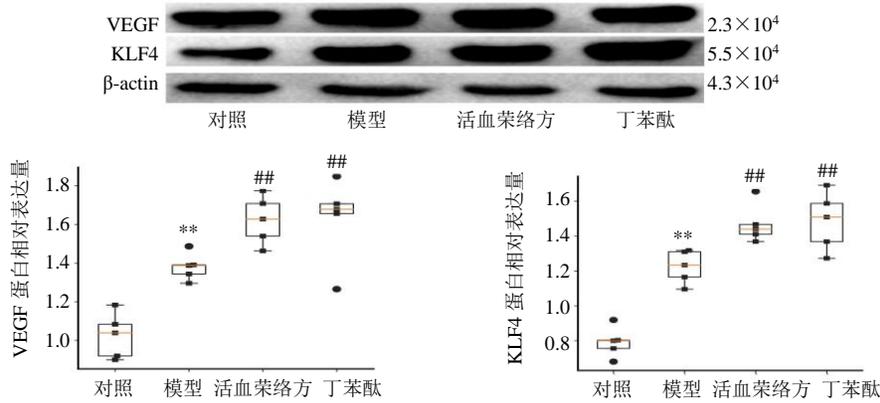


图3 活血荣络方对MCAO/R大鼠脑组织KLF4和VEGF蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Huoxue Rongluo Recipe on KLF4 and VEGF protein expression in brain tissue of MCAO/R rats

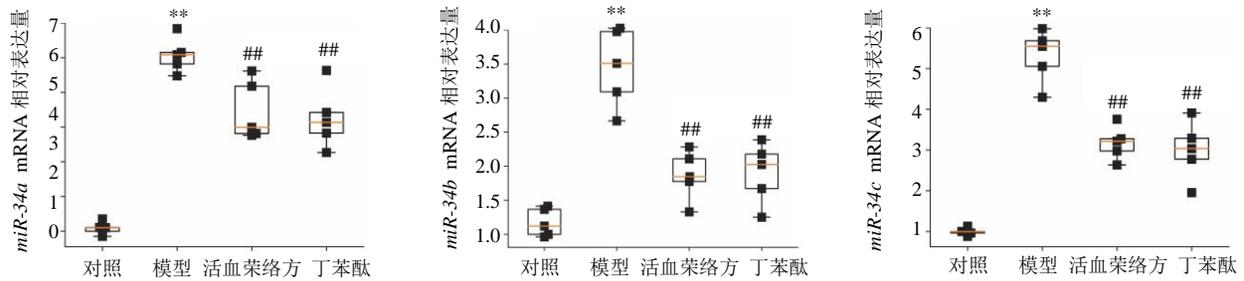


图4 活血荣络方对MCAO/R大鼠脑组织miR-34a、miR-34b和miR-34c mRNA表达的影响

Fig. 4 Effects of Huoxue Rongluo Recipe on expressions of miR-34a, miR-34b and miR-34c mRNA in brain tissue of MCAO/R rats

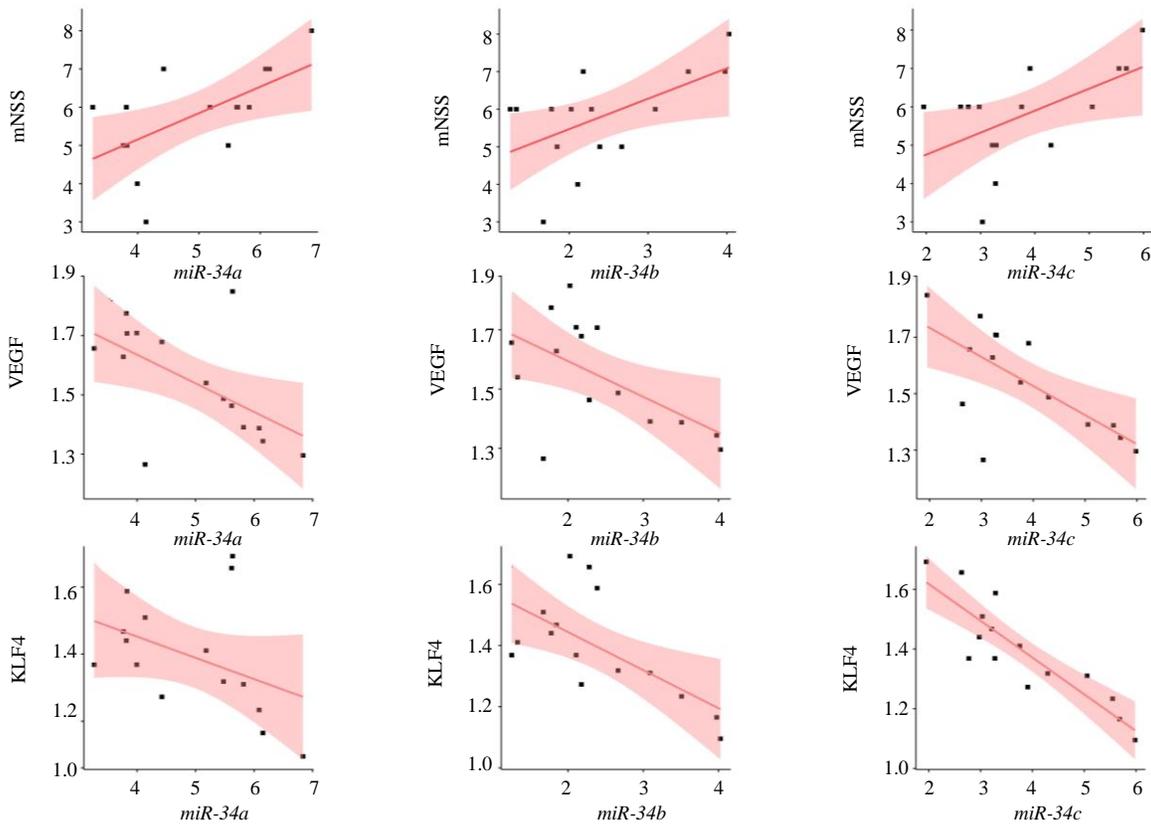


图5 大鼠脑组织中miR-34家族基因与mNSS、KLF4和VEGF的相关性

Fig. 5 Correlation of miR-34 family genes with mNSS, KLF4 and VEGF in rat brain tissue

透性,改善脑微循环,是脑梗死后血管新生的标志蛋白之一^[18]。KLF4/VEGF轴可介导下游磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)通路^[19]、磷脂酶C- γ 1(phospholipase C γ -1, PLC γ -1)-蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)通路^[20]、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路^[21],促进ECs增殖、迁移、分化成管,调控Rho家族蛋白促进血管伪足形成^[22],在多种疾病血管新生中发挥重要作用^[23]。研究发现,KLF4在脑梗死疾病中过表达^[24],能够通过转录激活肺腺癌转移相关转录物1(metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, MALAT1)抑制脑梗死后血管内皮细胞凋亡^[25],也能够通过改善血管内皮炎症反应并调节紧密蛋白表达^[26],从而减轻脑血管损伤,促进脑梗死后神经功能恢复。因此,脑梗死后血管新生的作用机制可能与低氧诱导激活KLF4/VEGF传导轴并介导下游通路、改善脑血管损伤、促进神经功能恢复有关。

miRNA是一类广泛长度约为22个碱基的非编码RNA,能够特异性识别下游目的基因mRNA 3'UTR,并形成不完全互补配对,裂解下游目的基因mRNA,进而阻断下游目的基因表达,参与调控ECs的增殖、迁移、分化成管的过程^[27]。miR-34家族基因由miR-34a、miR-34b、miR-34c组成,能够靶向负调控血管新生,为抗血管新生药物的开发提供了前景^[28]。何灏龙等^[29]通过微阵列技术发现miR-34家族基因在脑梗死大鼠模型中差异表达,归属于MAPK、JAK2/STAT3等信号通路,参与脑梗死疾病后的神经功能恢复过程。同时本课题组前期通过Targetscan数据库^[30](http://www.targetscan.org/vert_72/)发现,KLF4的转录后翻译过程主要受miR-34家族基因调控,其中miR-34a的预测分数为97分,权重分数为-0.48;miR-34b的预测分数为97分,权重分数为-0.49;miR-34c的预测分数为97分,权重分数为-0.49。基于此,可初步认为脑梗死疾病发生后,miR-34家族基因可能靶向调控KLF4/VEGF传导轴,参与脑梗死后血管新生进程。

《中国急性缺血性脑卒中诊治指南(2018)》^[31]指出,脑梗死早期不能溶栓者,早期建议使用丁苯酞、人尿激肽原酶等药物,以改善脑循环(II级推荐,B级证据)。丁苯酞是国内开发的I类新药,能够有效改善脑梗死患者脑缺血区微循环及侧支循

环,促进脑梗死后血管新生,增加脑缺血区的脑血流灌注,改善神经功能缺损^[32]。但是临床上改善脑梗死患者侧支循环药物相对较少,临床疗效有待进一步提升,因此以脑梗死后3级侧支循环血管新生为切入点,在中医荣气气化理论指导下,研究活血荣络方促脑梗死后血管新生的分子机制,应用于临床转化,具有重要的意义。

本研究表明,活血荣络方与丁苯酞均能够改善脑梗死大鼠神经功能缺损症状,且随着给药时间延长,效果越明显。CD34、VEGF被认为是血管生成的间接标志物^[33],CD34是ECs首选标志物,是ECs损伤后修复的重要物质之一,VEGF与缺血区周围新生血管数量密切相关,血管新生发生时CD34与VEGF正相关。杨洋等^[34]采用CD34标记海马区新生血管,证实脑梗死大鼠模型中细胞外信号调节蛋白激酶1/2(extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)通路的激活能够启动内源性血管新生;Chan等^[35]采用VEGF标记皮质区新生血管,证实硫酸乙酰肝素能够促进脑梗死后血管新生,进而改善神经功能。免疫荧光结果显示,脑梗死大鼠海马区CD34阳性细胞数目与皮质区VEGF平均荧光强度较对照组明显升高,且药物干预作用下,二者表达水平进一步升高,提示脑梗死疾病发生后,机体可启动内源性血管新生,且活血荣络方与丁苯酞能够进一步促进脑梗死后血管新生。Western blotting结果显示,脑梗死大鼠脑组织中KLF4和VEGF蛋白表达较对照组升高,且药物干预作用下,二者表达水平进一步升高,提示脑梗死后血管新生的作用机制与激活KLF4/VEGF传导轴有关。qRT-PCR结果显示,脑梗死大鼠脑组织中miR-34a、miR-34b、miR-34c mRNA表达水平均显著升高,且药物能降低其表达水平,结合Pearson相关性分析结果,提示活血荣络方与丁苯酞改善脑梗死大鼠神经功能缺损症状与miR-34家族基因调控KLF4/VEGF传导轴相关。Jauhari等^[36]研究发现miR-34家族基因在分化和衰老的脑细胞中高表达;Pandey等^[37]研究发现miR-200与miR-34家族基因能够靶向KLF4,在神经元的增殖分化中发挥关键作用;Li等^[38]研究发现缺血缺氧环境下,抑制miR-7表达,能够激活KLF4/VEGF轴,促进人脐静脉内皮细胞HUVEC增殖、迁移、分化成管;Peng等^[39]研究发现异氟醚能够激活转化生长因子- β 2(transforming growth factor- β 2, TGF- β 2)/SMAD3

通路, 增加 VEGF 与 CD34 表达, 促进脑梗死后血管新生, 改善脑梗死大鼠神经功能缺损症状, 在一定程度上与本研究结果相互佐证。

综上所述, 活血荣络方能够促进脑梗死后血管新生, 改善神经功能缺损症状, 可能与抑制 *miR-34a*、*miR-34b*、*miR-34c* mRNA 表达, 进而激活 KLF4/VEGF 传导轴有关, 本研究为中药改善脑循环、防治脑梗死疾病提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 肖波. 神经病学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2019: 179-189.
- [2] GBD DALYs and HALE Collaborators. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 1859-1922.
- [3] 杨仁义, 周德生, 傅馨莹, 等. 基于 STAT3/miRNA 反馈环路探讨中医药促脑梗死后血管新生的调控机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20): 221-228.
- [4] 高长玉, 吴成翰, 赵建国, 等. 中国脑梗死中西医结合诊治指南(2017) [J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2): 136-144.
- [5] 周韩, 周德生, 刘利娟, 等. 缺血中风荣气虚滞病机源流 [J]. 中医学报, 2019, 34(9): 1844-1849.
- [6] 周德生, 张雪花, 谭静. 荣气虚滞论 [J]. 中医药通报, 2005, 4(2): 22-25.
- [7] 杨仁义, 周德生, 傅馨莹, 等. 基于“荣气理论-促血管新生”探讨脑梗死的防治策略 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(12): 1562-1566.
- [8] 李中, 周德生, 江元璋, 等. 活血荣络颗粒联合针刺八脉交会穴治疗脑梗死痉挛性瘫痪临床研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(5): 22-26.
- [9] Zhou D, Li M, Hu H, *et al.* Huoxue Rongluo Tablet reduces matrix metalloproteinase-9 expression in infarcted brain tissue [J]. *Neural Regen Res*, 2013, 8(34): 3216-3224.
- [10] 周颖璨, 王洪海, 周德生, 等. 活血荣络方对大鼠脑缺血再灌注损伤 JAK2、STAT3 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2111-2114.
- [11] 周德生, 刘利娟, 寇志刚, 等. 活血荣络片对大鼠中动脉缺血模型大鼠脑组织微囊蛋白-1 表达的影响 [J]. 河北中医, 2016, 38(1): 80-84.
- [12] 周德生, 刘利娟, 寇志刚, 等. 活血荣络片对大鼠 MCAO 模型脑组织 MVD 表达的影响 [J]. 河南中医, 2015, 35(5): 956-959.
- [13] 杨仁义, 刘利娟, 康蕾, 等. 基于网络药理学的活血荣络方对脑梗死血管新生作用机制研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(8): 98-105.
- [14] 康蕾. 基于 GEO 数据库筛选脑梗死大鼠血清生物标志物及活血荣络方干预作用研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [15] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [16] Hu G J, Feng Y G, Lu W P, *et al.* Effect of combined VEGF165/SDF-1 gene therapy on vascular remodeling and blood perfusion in cerebral ischemia [J]. *J Neurosurg*, 2017, 127(3): 670-678.
- [17] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1995, 36(2): 169-180.
- [18] Jiang Y L, Liu W W, Wang Y, *et al.* MiR-210 suppresses neuronal apoptosis in rats with cerebral infarction through regulating VEGF-notch signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(1): 2.
- [19] Cheng S Y, Zhang X X, Feng Q, *et al.* Astragaloside IV exerts angiogenesis and cardioprotection after myocardial infarction via regulating PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2019, 227: 82-93.
- [20] Matsushima S, Shimizu A, Kondo M, *et al.* Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 188.
- [21] Icli B, Li H, Pérez-Cremades D, *et al.* MiR-4674 regulates angiogenesis in tissue injury by targeting p38K signaling in endothelial cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2020, 318(3): C524-C535.
- [22] Hoang M V, Whelan M C, Senger D R. Rho activity critically and selectively regulates endothelial cell organization during angiogenesis [J]. *PNAS*, 2004, 101(7): 1874-1879.
- [23] Mai J, Zhong Z Y, Guo G F, *et al.* Polo-Like Kinase 1 phosphorylates and stabilizes KLF4 to promote tumorigenesis in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Theranostics*, 2019, 9(12): 3541-3554.
- [24] Sakuma R, Takahashi A, Nakano-Doi A, *et al.* Comparative characterization of ischemia-induced brain multipotent stem cells with mesenchymal stem cells: Similarities and differences [J]. *Stem Cells Dev*, 2018, 27(19): 1322-1338.

- [25] Yang H J, Xi X X, Zhao B, *et al.* KLF4 protects brain microvascular endothelial cells from ischemic stroke induced apoptosis by transcriptionally activating MALAT1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(3): 2376-2382.
- [26] Zhang X Y, Wang L, Han Z X, *et al.* KLF4 alleviates cerebral vascular injury by ameliorating vascular endothelial inflammation and regulating tight junction protein expression following ischemic stroke [J]. *J Neuroinflammation*, 2020, 17(1): 107.
- [27] Wade S M, Ohnesorge N, McLoughlin H, *et al.* Dysregulated miR-125a promotes angiogenesis through enhanced glycolysis [J]. *EBioMedicine*, 2019, 47: 402-413.
- [28] Maroof H, Salajegheh A, Smith R A, *et al.* Role of microRNA-34 family in cancer with particular reference to cancer angiogenesis [J]. *Exp Mol Pathol*, 2014, 97(2): 298-304.
- [29] 何灏龙, 郑慧娥, 高音来, 等. 针刺调控脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧海马差异 miRNA 信号归属通路及 mir-34c-3p 表达的研究 [J]. *中国康复医学杂志*, 2020, 35(11): 1290-1295.
- [30] Agarwal V, Bell G W, Nam J W, *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs [J]. *Elife*, 2015, 4: e05005.
- [31] 中华医学会神经病学分会, 中华医学会神经病学分会脑血管病学组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南(2018) [J]. *中华神经科杂志*, 2018, 51(9): 666-682.
- [32] Wei H, Zhan L P, Zhang B, *et al.* D1-3n-butylphthalide reduces oxygen-glucose deprivation-induced endothelial cell damage by increasing PGC-1 α [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(10): 4481-4490.
- [33] Carmeliet P, Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [34] 杨洋, 刘晓楠, 马超, 等. ERK1/2 信号传导通路在大鼠局灶性急性脑缺血再灌注中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(11): 987-992.
- [35] Chan S J, Esposito E, Hayakawa K, *et al.* Vascular endothelial growth factor 165-binding heparan sulfate promotes functional recovery from cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2020, 51(9): 2844-2853.
- [36] Jauhari A, Singh T, Singh P, *et al.* Regulation of miR-34 family in neuronal development [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2): 936-945.
- [37] Pandey A, Singh P, Jauhari A, *et al.* Critical role of the miR-200 family in regulating differentiation and proliferation of neurons [J]. *J Neurochem*, 2015, 133(5): 640-652.
- [38] Li Y Z, Wen L, Wei X, *et al.* Inhibition of miR-7 promotes angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells by upregulating VEGF via KLF4 [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(3): 1569-1575.
- [39] Peng L, Yin J W, Wang S, *et al.* TGF- β 2/Smad3 signaling pathway activation through enhancing VEGF and CD34 ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury after isoflurane post-conditioning in rats [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(11): 2606-2618.

[责任编辑 李亚楠]