

活血荣络方调控生物钟蛋白 Bmal1 改善 bEnd.3 细胞糖氧剥夺/复氧损伤后血管新生的机制研究

张宇星¹, 张 瑛¹, 曾富康¹, 郭 纯², 高晓峰², 李 中², 陈 瑶², 周德生^{2*}, 刘利娟^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410000

2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410000

摘要:目的 基于阴阳理论及活血荣络方(Huoxue Rongluo Recipe, HXRL)对脑梗死后血管新生的影响,探讨 HXRL 调控生物钟蛋白脑和肌肉芳烃受体核转位蛋白 1(brain and muscle Arnt-like 1, Bmal1)促内皮细胞血管新生的作用机制。方法 采用 Western blotting 检测小鼠脑微血管内皮细胞株(bEnd.3)受到糖氧剥夺/复氧(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)损伤后各时间点生物钟蛋白 Bmal1 和 Clock 的表达;利用染色质免疫共沉淀-测序分析(chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq)明确 Bmal1 在全基因组中发挥的作用,以及对 bEnd.3 细胞生物进程、细胞组成及分子功能的影响。采用 CCK-8 法检测 HXRL 含药血清最佳干预浓度,敲降 bEnd.3 细胞 Bmal1 基因,设置对照组、模型组、HXRL 含药血清组、si-Bmal1 组和 si-Bmal1+HXRL 含药血清组,通过划痕、迁移、成管等实验检测细胞迁移及血管形成能力;采用免疫荧光检测各组血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和神经源性基因 Notch 同源蛋白 1(neurogenic locus notch homolog protein 1, Notch1)表达;采用 Western blotting 检测 VEGF、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinases 2, MMP2)、Notch1 蛋白胞内结构域(notch1 intracellular domain, NICD)和 δ 样蛋白 4(delta-like protein 4, DLL4)蛋白表达。结果 bEnd.3 细胞受到 OGD/R 损伤后, Bmal1 及 Clock 蛋白表达逐渐升高,造模 8、12、16、20 h 后具有显著差异($P<0.05$ 、 0.001)。ChIP-seq 提示 Bmal1 在内皮细胞中参与细胞发育、分化、增殖等进程,靶向调节 VEGF、Notch1 启动子区域。CCK-8 实验结果显示, bEnd.3 细胞受到 OGD/R 损伤后, 10% 的 HXRL 含药血清可有效改善细胞活力($P<0.001$)。划痕、迁移及成管实验证实 HXRL 含药血清可有效改善 bEnd.3 细胞 OGD/R 损伤后的迁移能力及血管生成能力($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),但在 Bmal1 敲降株中,该促进作用被抑制($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。免疫荧光及 Western blotting 结果显示, HXRL 含药血清可进一步升高 OGD/R 损伤的 bEnd.3 细胞中 VEGF、MMP2、NICD、DLL4、Bmal1 及 Clock 蛋白表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),在 Bmal1 敲降株中, HXRL 含药血清对 VEGF、MMP2、NICD 及 DLL4 的促表达作用被抑制($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 HXRL 可有效促进内皮细胞经 OGD/R 损伤后的血管生成能力,其作用机制与调控生物钟 Bmal1 蛋白密切相关。

关键词:活血荣络方;脑梗死;生物钟蛋白 Bmal1;氧糖剥夺;Bmal1 敲降株;血管新生

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6509-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.023

Mechanism of Huoxue Rongluo Recipe on regulating circadian clock protein Bmal1 to improve angiogenesis in bEnd.3 cells after oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury

ZHANG Yu-xing¹, ZHANG Ying¹, ZENG Fu-kang¹, GUO Chun², GAO Xiao-feng², LI Zhong², CHEN Yao², ZHOU De-sheng², LIU Li-juan²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China

2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410000, China

收稿日期: 2022-06-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(82104766);湖南省自然科学基金资助项目(2021JJ30521, 2021JJ40424);湖南省卫健委科研项目(202103071190);湖南省中医药管理局资助项目(2021218);湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金资助项目(2020ZXYJH38, 2020ZXYJH39);湖南中医药大学校级科研基金与联合基金项目(2021XJJ039, 2021XJJ052)

作者简介:张宇星,男,博士,从事中医药对脑血管病及其并发症的防治研究。Tel: 15616213284 E-mail: yuxing-zhang@foxmail.com

***通信作者:**周德生,男,博士,主任医师,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: 2478020529@qq.com

刘利娟,女,博士,副主任医师,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

Abstract: Objective To explore the mechanism of Huoxue Rongluo Recipe (活血荣络方, HXRL) on promoting endothelial cells angiogenesis via regulating circadian protein brain and muscle arnt-like 1 (*Bmal1*) based on the theory of yin-yang and the effect of HXRL on angiogenesis after cerebral infarction. **Methods** Western blotting was used to detect the expressions of circadian proteins *Bmal1* and *Clock* at each time point after bEnd.3 cells were injured by oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R). Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) was used to determine the role of *Bmal1* in genome wide, and its effects on bEnd.3 cell biological process, cell component and molecular function. The optimal intervention concentration of HXRL containing serum was detected by CCK-8 method. *Bmal1* gene was knocked down in bEnd.3 cells and divided into control group, model group, HXRL containing serum group, si-*Bmal1* and si-*Bmal1* + HXRL containing serum group. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and neurogenic locus notch homolog protein 1 (*Notch1*) were detected by immunofluorescence. Western blotting was used to detect VEGF, matrix metalloproteinases 2 (*MMP2*), *Notch1* intracellular domain (*NICD*) and delta-like protein 4 (*DLL4*) protein expressions. **Results** After bEnd.3 cells were injured by OGD/R, the expressions of *Bmal1* and *Clock* proteins were gradually increased, and there were significant differences at 8, 12, 16 and 20 h points after modeling ($P < 0.05, 0.001$). ChIP-seq suggests that *Bmal1* was involved in cell development, differentiation, proliferation, and other processes in endothelial cells, and targeted the transcriptional start site region of VEGF and *Notch1*. The results of CCK-8 experiment showed that after bEnd.3 cells were injured by OGD/R, 10% HXRL-containing serum could effectively improve cell viability ($P < 0.001$). Scratch, migration and tube formation experiments confirmed that HXRL-containing serum could effectively improve the migration ability and angiogenesis ability of bEnd.3 cells after OGD/R injury ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), but in *Bmal1* knockdown strains, this promotion was suppressed ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The results of immunofluorescence and Western blotting showed that HXRL-containing serum could further increase the protein expressions of VEGF, *MMP2*, *NICD*, *DLL4*, *Bmal1* and *Clock* in bEnd.3 cells damaged by OGD/R ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In *Bmal1* knockdown strain, the promoting effect of HXRL-containing serum on the expressions of VEGF, *MMP2*, *NICD* and *DLL4* was inhibited ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** HXRL can effectively promote the angiogenesis of endothelial cells after OGD/R injury, and its mechanism is closely related to the regulation of circadian clock *Bmal1* protein.

Key words: Huoxue Rongluo Recipe; ischemic stroke; circadian clock protein *Bmal1*; oxygen-glucose deprivation; *Bmal1* knockdown strain; angiogenesis

缺血性脑卒中 (ischemic cerebral stroke, ICS) 是严重危害我国国民健康的重大慢性非传染性疾病, 具有高发病率、高致残率、高死亡率、高复发率、高经济负担 5 大特点^[1-2]。研究表明, 脑梗死周围区域的缺血区微血管密度 (microvessel density, MVD) 增加可提高 ICS 患者的生存时间^[3]。尽快建立三级侧支循环——新生血管可恢复局部血流供应, 挽救缺血半暗带内濒临死亡的神经细胞, 为神经-血管结构的可塑性创造良好的微环境, 恢复缺损的神经功能, 改善患者预后, 是当前治疗的有效策略之一^[4-6]。生物节律是生物体在进化过程中, 为适应光照、温度等自然节律变化而形成的以 24 h 为周期的节律活动^[7]。众多生物钟基因 [*Clock*、脑和肌肉芳烃受体核转位蛋白 1 (brain and muscle Arnt-like 1, *Bmal1*)、*Per*、*Cry*] 的转录/翻译反馈回路 (transcriptional/translational feedback loops, TTFLs) 产生细胞自主节律, 影响着机体的炎症免疫、代谢等生理病理过程^[8-9]。生物节律显著影响脑卒中的易感性、损伤、恢复和对治疗的反应机制^[10], 生物节律紊乱可加重脑梗死后神经功能缺损症状, 增加脑

梗死面积^[11]。过表达生物钟基因 *Bmal1* 可促进脑梗死后血管新生, 研究表明, 机体受到缺血缺氧损伤后, *Bmal1* 可通过上调内皮细胞 (endothelial cells, ECs) 的血管内皮生成因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素 (angiopoietin, ANG) 的表达, 促进血管新生^[12-13]。

活血荣络方是本课题组根据治疗脑梗死多年的临床经验, 在“荣气虚滞理论”的指导下, 依据阴虚血瘀病机, 制定的具有调和阴阳、养阴生津、活血养血、舒筋活络通脉功效的科室协议方, 其组成以鸡血藤、石楠藤为君, 生地黄、玄参、黄精为臣, 乳香、没药为佐、川芎为使^[14]。本课题组前期研究发现, 活血荣络方可明显增加脑梗死大鼠海马区 CD34 阳性细胞及皮质区 VEGF 表达, 增加缺血区 MVD, 促血管新生^[15]。本研究旨在探讨生物钟蛋白 *Bmal1* 对内皮细胞血管新生的影响以及活血荣络方的干预机制。

1 材料

1.1 动物与细胞株

SPF 级 SD 雄性大鼠 20 只, 12~15 周龄, 体质

量 250~280 g, 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)2016-0002, 于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心饲养, 实验许可证号 SYXK(湘)2015-0003, 依照实验动物中心管理办法, 温度 21~26 °C, 湿度 40%~50%, 通风良好, 昼夜交替, 分笼标准饲料、自由饮水, 适应性饲养 7 d 后用于实验。本研究经湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会批准(伦理批准号 ZYFY20211016)。

1.2 细胞株

小鼠脑微血管内皮细胞株(bEnd.3, 批号 CL-0598)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药材

鸡血藤、石楠藤、生地黄、玄参、黄精、乳香、没药、川芎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》2020 年版规定。

1.4 药品与试剂

嘌呤霉素(批号 P8230)购自北京索莱宝生物科技有限公司; 胎牛血清(批号 164210-50)、青霉素-链霉素混合液(批号 PB180120)、0.25%胰蛋白酶-EDTA(批号 PB180229)、DMEM 高糖培养基(批号 PM150210)、DMEM 无糖培养基(批号 PM150270)、PBS 缓冲液(批号 PB180327)、无血清非程序冻存液(批号 PB180438)均购自武汉 Procell 公司; CCK-8 试剂盒(批号 CK04)购自日本同仁公司; Matrigel 基质胶(批号 356234)购自美国 BD 公司; Transwell 24 孔板(批号 3422)购自美国 Corning 公司; β -actin 抗体(批号 20536-1-AP)、基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)抗体(批号 10373-2-AP)、神经源性基因 Notch 同源蛋白 1(neurogenic locus notch homolog protein 1, Notch1)抗体(批号 10062-2-AP)、HRP

标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 SA00001-2)购自武汉 Proteintech 公司; VEGF 抗体(批号 ab52917)、Bmal1 抗体(批号 ab3350)、驴抗兔 IgG H&L 抗体(批号 ab150075)购自英国 Abcam 公司; Clock 抗体(批号 sc-271603)购自美国 Santa 公司; δ 样蛋白 4(delta-like protein 4, DLL4)抗体(批号 A12943)购自武汉 Abclonal 公司; Dylight 549 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 A23320)购自美国 Abbkine 公司; Bmal1 siRNA 慢病毒载体由上海汉恒基因科技有限公司提供。

1.5 仪器

3427 型普通培养箱、3131 型三气培养箱、900Series 型超低温冰箱、Fresco17 型低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TD5A 型低速离心机(长沙英泰仪器有限公司); SYG-1210 型恒温水浴锅(美国 Crystal 仪器公司); Axio Vert.A1 型倒置显微镜(德国 ZEISS 公司); Cytation3 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司); SW-CJ-1F 型超净工作台(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司)。

2 方法

2.1 活血荣络方的制备

取鸡血藤 30 g、石楠藤 30 g、生地黄 15 g、玄参 10 g、黄精 15 g、乳香 10 g、没药 10 g、川芎 10 g, 加入 10 倍量水浸泡 12 h 后, 煎煮 2 h, 滤过; 加入 8 倍量水煎煮 1 h, 滤过; 加入 5 倍量水, 煎煮 1 h, 滤过, 合并 3 次提取液, 通过旋转蒸发仪将其浓缩为浸膏, 于 4 °C 保存备用。经高效液相色谱检测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 活血荣络方含药血清的制备

雄性 SD 大鼠 20 只按照随机数字表法随机分为对照组和给药组(生药 23.4 g/kg)。给药组 ig 相应药物, 对照组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 7 d。于末次给药 1 h 后, 大鼠 ip 10%水合氯醛(3 mg/kg)深度麻醉, 暴露腹主动脉, 使用负压采血管采集全血 5 mL 至无抗凝剂的普通采血管中, 静置 1 h, 3000 r/min 离心 10 min, 收集上清于离心管中, 于 56 °C 水浴灭活 30 min, 经 0.22 μ m 滤膜滤过除菌, 即为活血荣络方含药血清和对照血清, 于-80 °C 保存备用。

2.3 bEnd.3 细胞培养

bEnd.3 细胞用含 5% FBS 和 1%青霉素-链霉素

的 DMEM 高糖培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 待融合度达到 80%~90% 时进行传代。

2.4 活血荣络方含药血清对糖氧剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导 bEnd.3 细胞损伤模型细胞存活率的影响

取对数生长期的 bEnd.3 细胞, 以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 另设调零孔 (不接种细胞)。设置对照组、模型组和给药组, 对照组于正常条件下培养; 模型组将培养基更换为 DMEM 无糖培养基, 并将细胞置于 37 ℃、5% CO₂、95% N₂、1% O₂ 的三气培养箱中培养 6 h, 随后移出三气培养箱, 更换为完全培养基于普通培养箱中培养 24 h; 给药组将培养基更换为 DMEM 无糖培养基, 缺氧培养 6 h, 随后移出三气培养箱, 分别加入 5%、10%、15%、20% 的活血荣络方含药血清, 于普通培养箱中培养 24 h。更换新鲜培养基, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 2 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{调零}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.5 染色质免疫共沉淀-测序分析 (chromatin immunoprecipitation sequencing, ChIP-seq) 获取转录因子 Bmal1 的 DNA 结合片段

以 37% 的甲醛溶液交联固定培养瓶内 bEnd.3 细胞, 培养瓶中加入甘氨酸室温终止反应, 用细胞刮刀刮取细胞, 离心, 使用细胞裂解液和 ChIP 缓冲液混合物充分裂解细胞; 冰上超声处理 DNA 片段, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 DNA 长度 (200 bp 左右); 各取 100 μ L 超声产物置于 2 mL EP 管中并标记为 IgG 组、IP 组和 Input 组, 其余上清分装后于 -80 ℃ 保存。在各 EP 管中加入 900 μ L ChIP 缓冲液, IP 组加入 5 μ L Bmal1 抗体, IgG 组加入 5 μ L IgG 血清, 充分混匀后 4 ℃ 孵育过夜; 加入 40 μ L 经过洗涤、鱼精 DNA 封闭、TE 洗涤的 Protein G 凝胶, 于 4 ℃ 混合器中孵育 1~2 h, 3000 r/min 离心 2 min 沉淀凝胶, 取上清暂存, 留沉淀, 依次用低盐洗脱缓冲液、高盐洗脱缓冲液和 TE 缓冲液冲洗, 3000 r/min 离心 2 min 后沉淀凝胶, 吸取上清; 每管加 200 μ L ChIP 洗脱缓冲液, 温和涡旋, 65 ℃ 孵育 30 min, 间隔 5 min 拿出温和振荡; 每管加入 NaCl 解交联; DNA 产物纯化回收, 将回收的 DNA 进行高通量测序。

2.6 bEnd.3 细胞慢病毒转染及鉴定

bEnd.3 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,

置 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。根据感染复数 (MOI) = 30 计算, 使用 10 μ L Bmal1 siRNA 慢病毒载体转染 bEnd.3 细胞, 转染 24 h 后, 更换新鲜的 DMEM 培养基。72 h 后加入含 5 μ g/mL 嘌呤霉素的 DMEM 高糖培养基, 继续培养 3 d 后, 通过荧光显微镜观察细胞的转染情况达到 95% 以上, 最终得到 si-Bmal1 慢病毒转染的 bEnd.3 细胞稳定株。

2.7 分组及给药

设置对照组、模型组、活血荣络方组、si-Bmal1 组和 si-Bmal1+活血荣络方组。对照组于正常条件下培养; 模型组按“2.4”项下方法处理; 活血荣络方组将培养基更换为 DMEM 无糖培养基, 缺氧培养 6 h 后, 加入 10% 活血荣络方含药血清, 于普通培养箱中培养 24 h; si-Bmal1 组在模型组基础上进行 si-Bmal1 慢病毒转染; si-Bmal1+活血荣络方组在 si-Bmal1 组基础上加入 10% 活血荣络方含药血清干预 24 h。

2.8 划痕实验检测 bEnd.3 细胞迁移能力

用标记笔在 6 孔板背后划 5 条间距均匀的横线, 以作参考。每孔加入 2×10^5 个细胞, 细胞密度达到 85%, 用无血清培养基培养 24 h 进行周期同步化, 用移液枪头尖端划过单层细胞, 用 PBS 清洗脱落的细胞。按“2.7”项下方法进行分组及给药, 于显微镜下观察并拍照, 记录 0、24 h 划痕面积, 计算划痕愈合率。

$$\text{划痕愈合率} = (0 \text{ h 划痕面积} - 24 \text{ h 划痕面积}) / 0 \text{ h 划痕面积}$$

2.9 Transwell 小室实验检测 bEnd.3 细胞迁移能力

将 bEnd.3 细胞以 2×10^4 个/孔接种到 Transwell 上腔室, 按“2.7”项下方法进行分组及给药, 对照组、模型组和 si-Bmal1 组上、下室均添加含药血清的 DMEM 无糖培养基, 给药组添加 10% 活血荣络方含药血清的 DMEM 无糖培养基。缺氧处理 6 h 后, 将下室的培养基替换为 600 μ L 含 20% FBS 的 DMEM 高糖培养基及质量浓度为 20 μ g/L 的 VEGF, 于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中孵育 24 h 后, 去除残留在上室膜表面的细胞。下室膜表面的 bEnd.3 细胞用 4% 甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色。染色细胞拍照并在 5 个随机镜下计数, 用 Image J 软件进行定量。

2.10 Matrigel 基质胶实验检测 bEnd.3 细胞管腔形成能力

将基质胶于 4 ℃ 冰箱过夜融化, 96 孔板和 200 μ L 枪头在 4 ℃ 冰箱预冷备用。于冰上以基质胶 (50 μ L/孔) 包被 96 孔板, 置于培养箱凝固 60 min。取

处于对数生长期的 bEnd.3 细胞,用含 10%对照血清和活血荣络方含药血清的 DMEM 高糖培养基分别重悬细胞,以 2×10^4 个/孔接种至提前用基质胶包被的 96 孔板,缺氧培养 6 h,于显微镜下观察,拍照成管细胞,并随机选取 3 个视野,用 Image Pro Plus 6.0 分析系统计数每孔 4 个随机选定视野下分支点。

2.11 Western blotting 检测细胞中 Bmal1、Clock、VEGF、MMP-2、Notch-1 及 DLL4 蛋白表达

bEnd.3 细胞接种于 10 cm 培养皿中,细胞融合度达到 90%时,用无血清培养基培养 24 h,缺氧处理 6 h 后,分别于 4、8、12、16、20、24 h 收集细胞,用以检测生物钟蛋白变化。药物组则分别加入 10%对照血清和活血荣络方含药血清作用 24 h 后收集细胞,用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液裂解细胞,提取总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,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,室温摇床封闭 2 h,分别加入 Bmal1 抗体 (1:2000)、Clock 抗体 (1:400)、VEGF 抗体 (1:2000)、MMP2 抗体 (1:1000)、Notch1 抗体 (1:1500)、DLL4 抗体 (1:1500) 和 β -actin 抗体 (1:8000),4℃孵育过夜;洗膜,加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (1:8000),室温摇床孵育 2 h;洗膜后加入 ECL 超敏发光液,采用凝胶成像仪进行成像,运用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.12 免疫荧光检测细胞中 VEGF 和 Notch-1 蛋白表达

取处于对数生长期的 bEnd.3 细胞,以 5×10^3 /孔接种于预先放置好爬片的 24 孔板中,当融合度达到 20%~30%时,缺氧处理 6 h,再给予 10%活血荣络方含药血清正常处理 24 h。弃去培养液,各孔加入 500 μ L 4%多聚甲醛固定 15 min;PBS 缓冲液

润洗细胞后,加入 500 μ L 0.25% TritonX-100 破膜 3 min;PBS 缓冲液润洗后,加入 5%牛血清白蛋白,室温封闭 30 min;分别添加 100 μ L VEGF 和 Notch1 抗体 (1:100),4℃过夜;PBS 润洗后,分别滴加 100 μ L 驴抗兔 IgG H&L 抗体和 Dylight 549 标记的山羊抗兔 IgG 抗体和 (1:500),室温避光孵育 60 min;PBS 缓冲液润洗细胞,滴加 DAPI,室温避光孵育 3~5 min;PBS 缓冲液润洗后,取载玻片,滴加 10 μ L 抗荧光衰减封片剂,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.13 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 *T*3 法;不符合正态性时,采用 Kruskal-Wallis 秩和检验。

3 结果

3.1 OGD/R 增加 bEnd.3 生物钟蛋白 Bmal1 及 Clock 表达

首先对 bEnd.3 细胞进行周期同步化,糖氧剥夺 6 h 后复糖复氧,并在随后的 20 h 内,每 4 小时提取蛋白,检测生物钟蛋白 Bmal1 与 Clock 表达变化。如图 1 所示,复糖复氧 4 h,生物钟蛋白 Bmal1 与 Clock 表达无明显变化,复糖复氧 8 h 二者表达量与对照组比较均明显升高 ($P < 0.05$),复糖复氧 12~20 h, Bmal1 与 Clock 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.001$)。表明 OGD/R 损伤可使内皮细胞生物钟发生改变,且呈不断升高的趋势,根据本研究结果,将糖氧剥夺 6 h/复糖复氧 12 h 作为后续实验方案。

3.2 Bmal1 蛋白在内皮细胞中的生物学功能分析

生物钟蛋白可调控分子功能,参与细胞增殖、迁移、分化等生物进程。Bmal1 可促进血管新生,减轻缺氧缺氧损伤,但其在内皮细胞中的转录调控

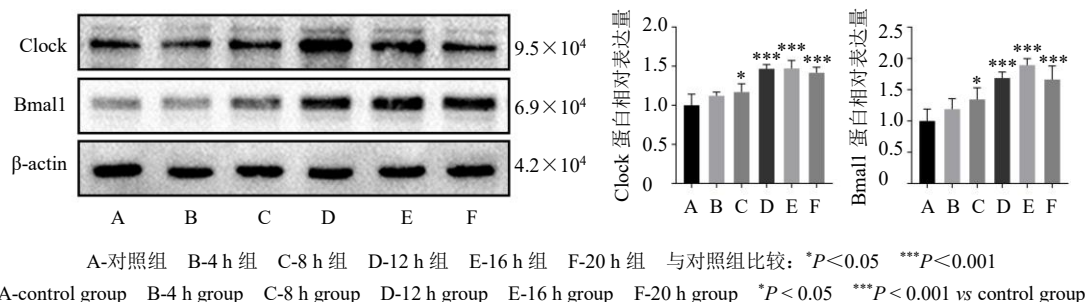


图 1 OGD/R 损伤对 bEnd.3 细胞中生物钟蛋白 Bmal1 与 Clock 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of OGD/R injury on expressions of clock proteins Bmal1 and Clock in Bend.3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

尚未报道,故借助 ChIP-seq 技术探究 Bmal1 在内皮细胞中的全基因组转录调控作用。使用特异性抗体 Bmal1 (IP 级别)与 DNA 片段进行交联形成复合物后发生免疫沉淀(图 2)。

解交联后纯化的 DNA 片段进行高通量测序,得到与蛋白质相结合的 DNA 序列信息,通过对该序列的长度和比对到该序列上的 Pair and Read 数来确定该序列对应的峰的相对丰度。图 3 显示 Peak 在基因组的不同功能区分布情况,结合启动子-转录起始区(promotor-transcriptional start site region, promotor-TSS)达 7.77%,图 4 显示在 TSS 上下游 2000 个 bp 所捕获 reads 数。基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析获得生物进程(biological process,

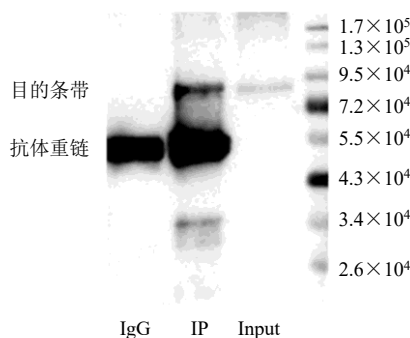


图 2 Western blotting 检测 bEnd.3 细胞免疫共沉淀

Fig. 2 bEnd.3 cells immunoprecipitation detected by Western blotting

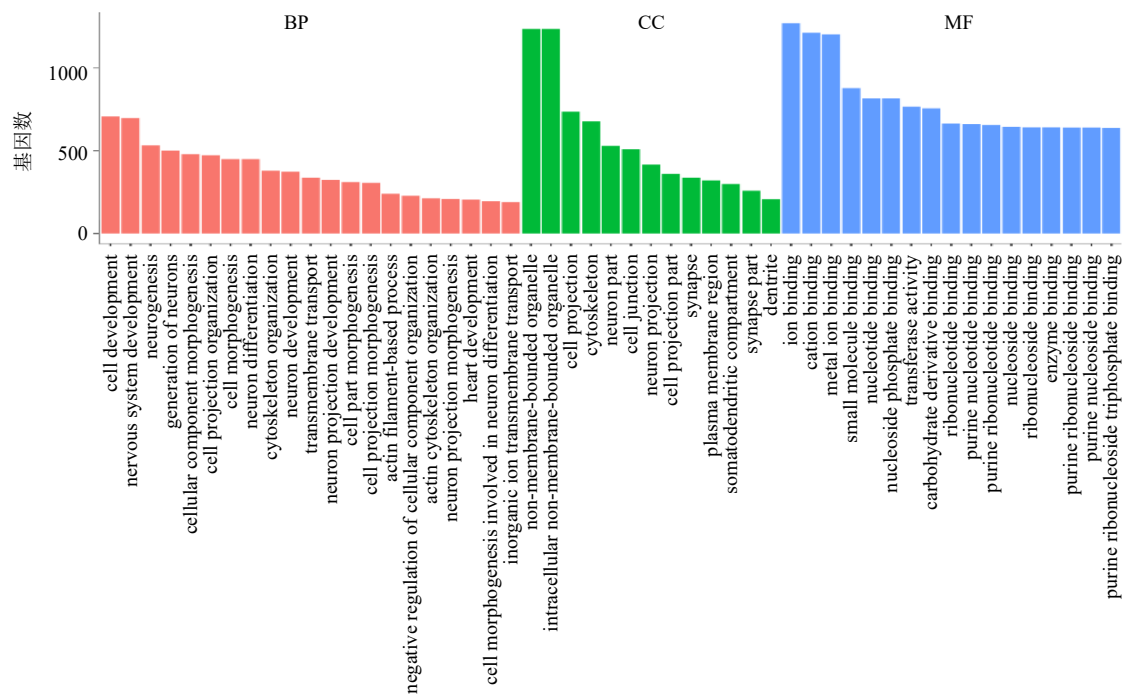


图 5 Bmal1 在内皮细胞潜在靶点 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO function enrichment analysis of potential target of Bmal1 in endothelial cells

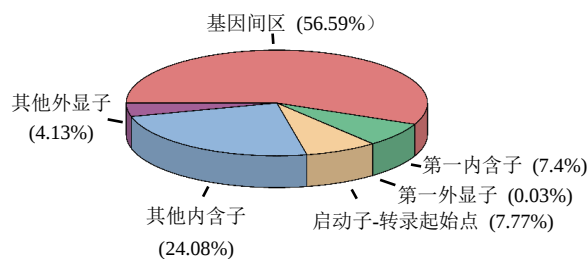


图 3 Peak 在基因组功能区的分布

Fig. 3 Distribution of Peak in functional regions of genome

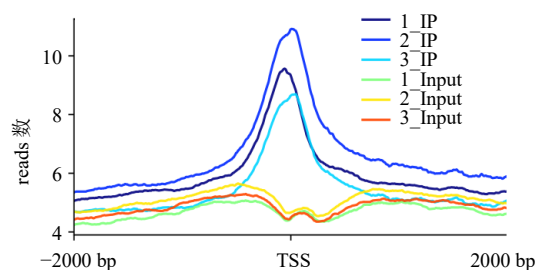


图 4 Reads 在转录起始位点 (TSS 区) 两侧的分布 (n = 3)

Fig. 4 Reads were distributed on each side of transcription start site (TSS region) (n = 3)

BP)、细胞组成 (cellular component, CC) 及分子功能 (molecular function, MF) 相关基因的分布 (图 5), 靶点涉及的 BP 条目主要富集在细胞发育、神经再生分化、细胞形态、调节细胞增殖等, 靶点涉及的 MF 相关的条目主要富集在离子结合、小分子

结合、转移酶激活等，靶点涉及 CC 相关主要富集在胞质、质膜、细胞骨架、神经元细胞等。

关联分析(图 6)发现, *Bmal1* 蛋白可以靶向结合小鼠脑微血管内皮细胞中血管新生关键基因, 如 17 号染色体上 *VEGF* 基因的启动子序列(位点 46030452~46030695), 2 号染色体上 *Notch1* 基因的增强子序列(位点 26463954~26464324), 16 号染色体上 *Hes1* 基因的启动子序列(位点 30066868~30067165、30065082~30065373、30064015~30064496)。

3.3 活血荣络方含药血清对 OGD/R 诱导 bEnd.3 细胞损伤模型细胞存活率的影响

为探索活血荣络方对内皮细胞的保护作用及与

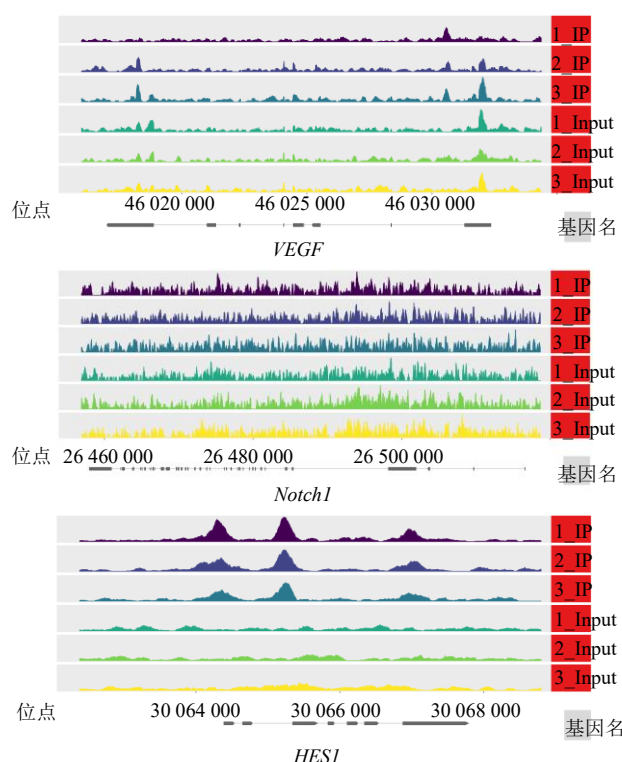
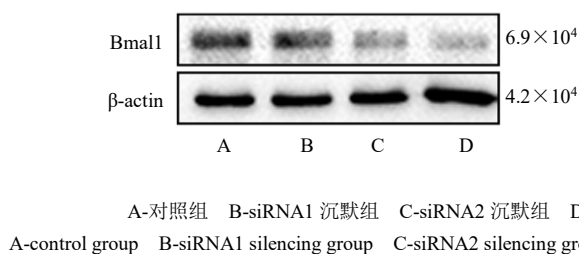


图 6 Reads 在关联基因 *VEGF*、*Notch1* 和 *HES1* 的分布情况 ($n=3$)

Fig. 6 Distribution of Reads in related genes *VEGF*, *Notch1* and *HES1* ($n=3$)



A-对照组 B-siRNA1 沉默组 C-siRNA2 沉默组 D-siRNA3 沉默组 与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$
A-control group B-siRNA1 silencing group C-siRNA2 silencing group D-siRNA3 silencing group ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

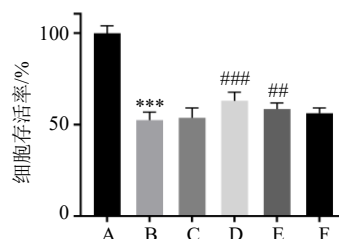
图 8 bEnd.3 细胞 *Bmal1* 基因敲降稳转株的构建 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Construction of *Bmal1* gene knockdown stable strain of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

生物节律联系的作用机制, 首先通过 CCK-8 检测活血荣络方含药血清对 OGD/R 损伤内皮细胞的保护作用。如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P<0.001$); 与模型组比较, 10%、15%活血荣络方含药血清组细胞存活率均显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001), 且 10%活血荣络方含药血清作用最佳。表明活血荣络方含药血清能减轻 OGD/R 诱导的 bEnd.3 细胞损伤, 具有内皮细胞保护作用, 故以 10%含药血清作为后续实验浓度。

3.4 活血荣络方含药血清对 OGD/R 诱导 bEnd.3 细胞损伤模型迁移能力的影响

本课题组前期实验表明, 活血荣络方可有效促进脑梗死大鼠血管新生, 为探索活血荣络方对内皮细胞的保护作用及与生物节律联系的作用机制, 利用 RNA 干扰技术, 构建生物钟基因 *Bmal1* 敲降 bEnd.3 细胞稳转株, 用于体外验证。于荧光显微镜下观察慢病毒绿色荧光蛋白表达率, 转染效率达 97%以上时, 提取 RNA 及蛋白验证 *Bmal1* 的 mRNA 与蛋白敲降效率, 如图 8 所示, 在 3 组 siRNA 中,

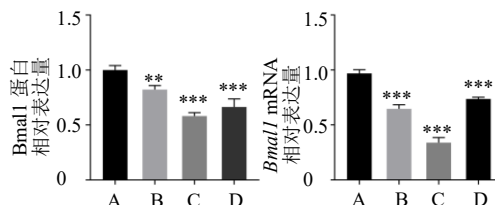


A-对照组 B-模型组 C-5% HXRL 组 D-10% HXRL 组 E-15% HXRL 组 F-20% HXRL 组 与对照组比较: *** $P<0.001$; 与模型组比较: ## $P<0.01$ ### $P<0.001$

A-control group B-model group C-5% HXRL group D-10% HXRL group E-15% HXRL group F-20% HXRL group *** $P<0.001$ vs control group; ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs model group

图 7 活血荣络方含药血清对 OGD/R 诱导的 bEnd.3 细胞损伤模型细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

Fig. 7 Effect of Huoxue Rongluo Recipe containing serum on cell survival rate in OGD/R induced bEnd.3 cells injury model ($\bar{x} \pm s, n=9$)



A-对照组 B-siRNA1 沉默组 C-siRNA2 沉默组 D-siRNA3 沉默组 与对照组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$
A-control group B-siRNA1 silencing group C-siRNA2 silencing group D-siRNA3 silencing group ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group

图 8 bEnd.3 细胞 *Bmal1* 基因敲降稳转株的构建 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Construction of *Bmal1* gene knockdown stable strain of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

siRNA2 的敲降效率最佳, *Bmal1* 的 mRNA 及蛋白表达均下降 50% 左右, 故将 siRNA2 稳转株作为后续实验细胞。

利用划痕、Transwell 研究内皮细胞血管生成表型, 如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组细胞迁移率显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 表明 OGD/R 损伤促进 bEnd.3 细胞迁移; 与模型组比较, si-Bmal1 组细胞迁移率显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示敲降 *Bmal1* 后, 细胞迁移能力受限; 活血荣络方可进一步提升 bEnd.3 细胞 OGD/R 损伤后的迁移能力 ($P < 0.01$ 、 0.001), *Bmal1* 敲降细胞株中, 活血荣络方的促迁移能力受到限制 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.5 活血荣络方含药血清对 OGD/R 诱导 bEnd.3 细胞损伤模型成管能力的影响

管腔形成是评价内皮细胞血管新生能力的另一

重要指标, 利用成管实验评价 *Bmal1* 与 HXRL 对 bEnd.3 细胞 OGD/R 损伤模型的影响。如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组血管分支总长度显著增加 ($P < 0.01$), 提示 OGD/R 损伤显著促进 bEnd.3 细胞成管能力; 与模型组比较, si-Bmal1 组血管分支总长度明显下降 ($P < 0.01$), 表明敲降 *Bmal1* 可降低 bEnd.3 细胞的管腔形成能力; 活血荣络方组血管分支总长度增加 ($P < 0.05$), 敲降 *Bmal1* 后, 血管分支总长度则明显下降 ($P < 0.05$), 表明活血荣络方具有促 bEnd.3 细胞 OGD/R 损伤后的管腔形成能力, 而在 *Bmal1* 敲降株中该促进作用被抑制。

3.6 活血荣络方含药血清对 OGD/R 诱导 bEnd.3 细胞损伤模型中生物钟及血管新生关键蛋白表达的影响

VEGF 及 Notch1 是内皮细胞参与血管新生的

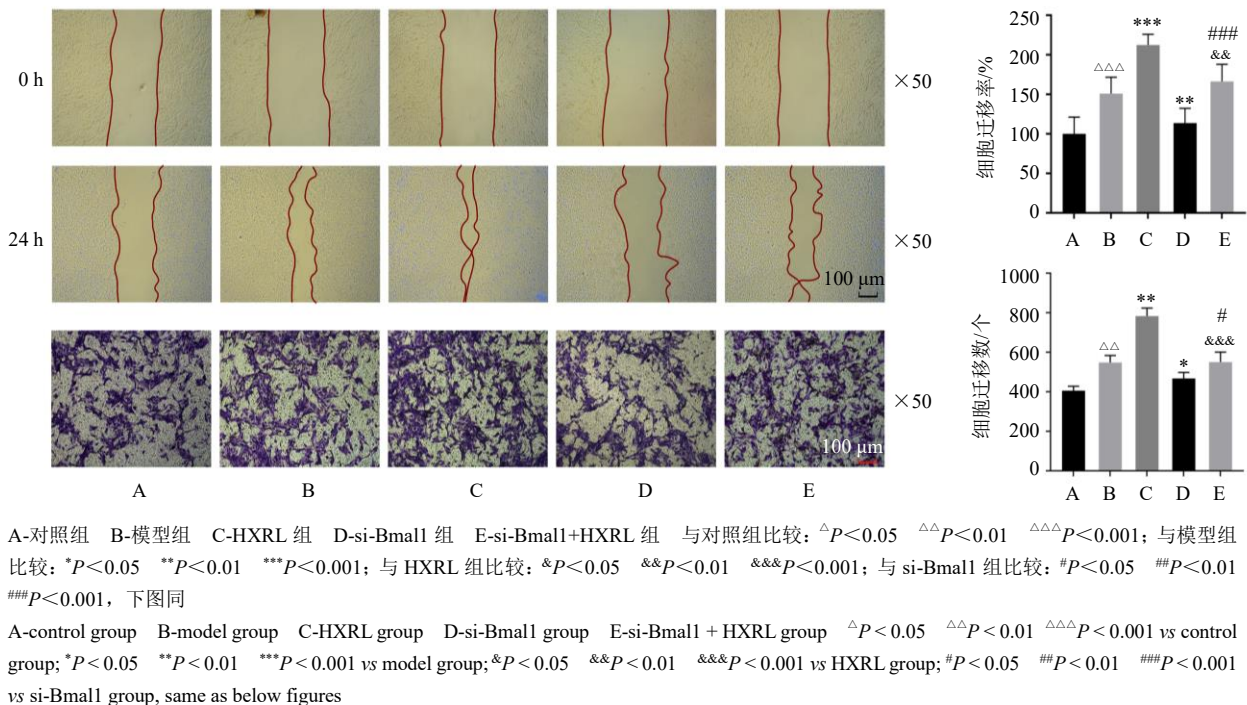


图 9 *Bmal1* 及活血荣络方对 bEnd.3 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effects of *Bmal1* and Huoxue Rongluo Recipe on migration ability of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

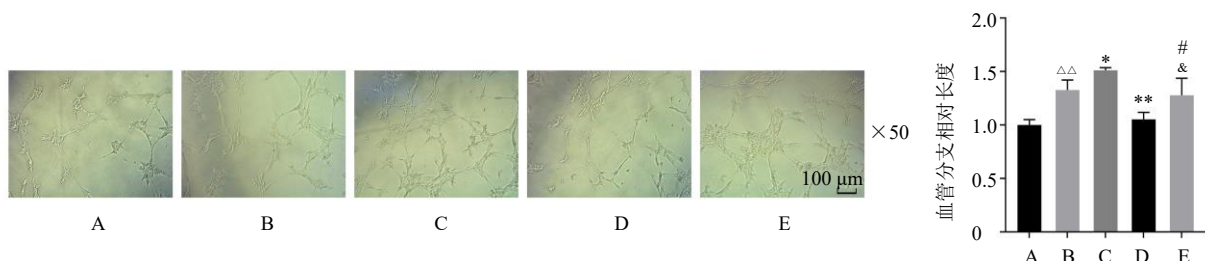


图 10 *Bmal1* 及活血荣络方对 bEnd.3 细胞成管能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 10 Effects of *Bmal1* and Huoxue Rongluo Recipe on tube formation ability of bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

重要分子, Bmal1 可调控上述关键分子的转录过程, 采取免疫荧光法检测各组细胞中 VEGF 及 Notch1 蛋白表达。如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组 VEGF 及 Notch1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, si-Bmal1 组 VEGF 及 Notch1

蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001); 活血荣络方含药血清可进一步上调 VEGF 及 Notch1 蛋白表达水平 ($P < 0.001$), 敲降 Bmal1 后, VEGF 及 Notch1 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

Western blotting 检测结果见图 12、13, 与对照

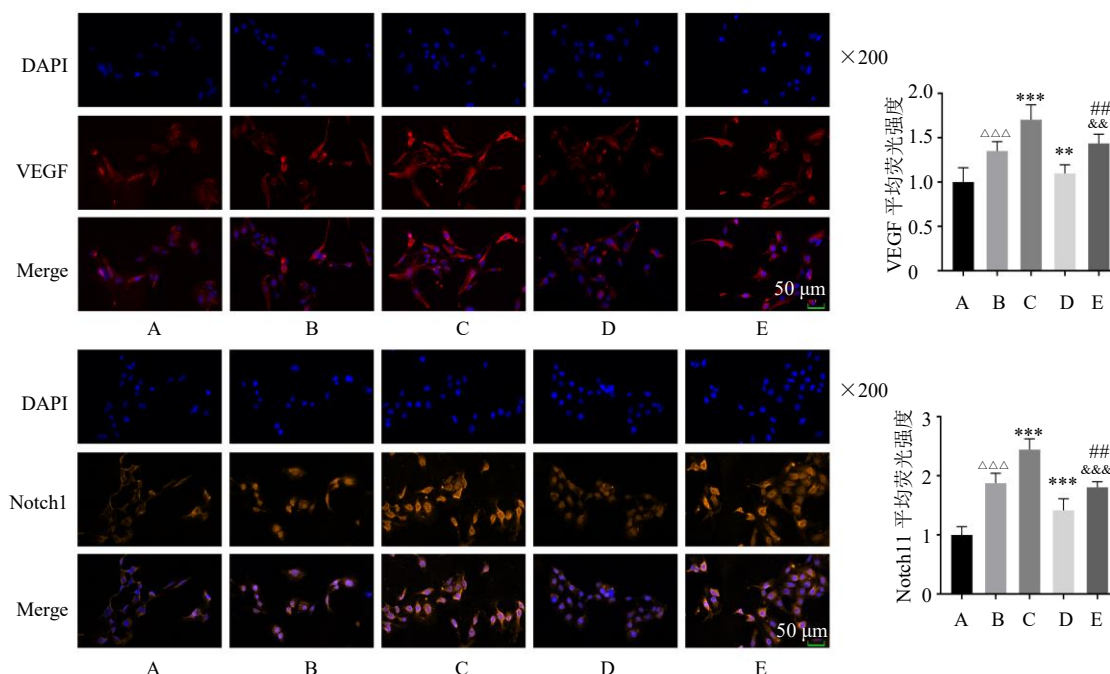


图 11 Bmal1 及活血荣络方对 bEnd.3 细胞内 VEGF 和 Notch1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effects of Bmal1 and Huoxue Rongluo Recipe on VEGF and Notch1 protein expressions in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

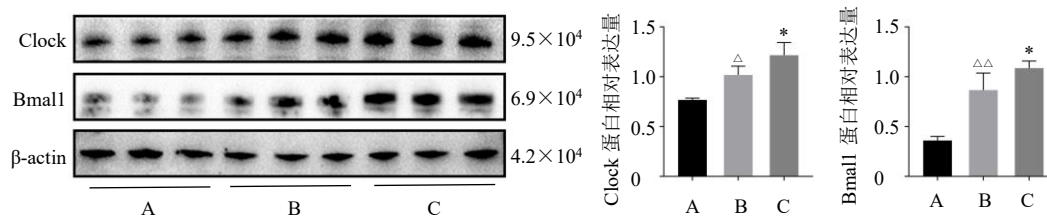


图 12 活血荣络方对 bEnd.3 细胞 Clock 和 Bmal1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of Huoxue Rongluo Recipe on Clock and Bmal1 protein expressions in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

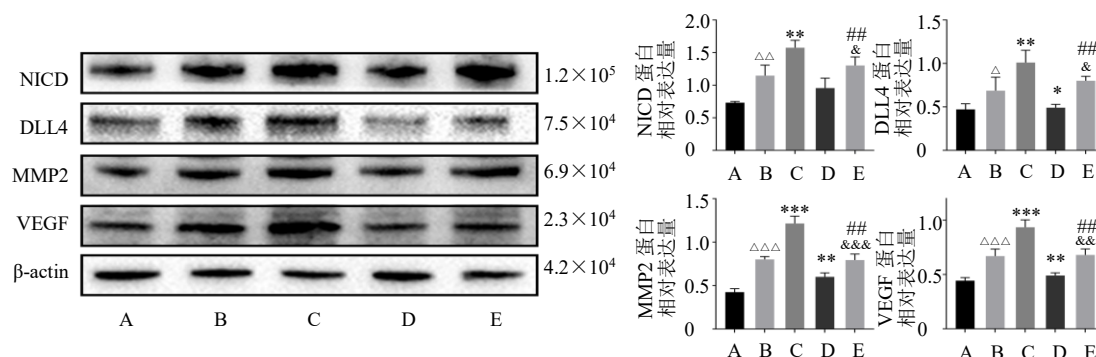


图 13 Bmal1 及活血荣络方对 bEnd.3 细胞 NICD、DLL4、MMP2 及 VEGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effects of Bmal1 and Huoxue Rongluo Recipe on NICD, DLL4, MMP2 and VEGF protein expressions in bEnd.3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组比较,模型组 Clock、Bmal1、NICD、DLL4、MMP2 和 VEGF 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001);给予活血荣络方含药血清干预后, Clock、Bmal1、NICD、DLL4、MMP2 和 VEGF 蛋白表达水平进一步升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),敲降 Bmal1 后, NICD、DLL4、MMP2 和 VEGF 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

4 讨论

脑梗死的损害主要来源于血液灌注不足引起的持续缺氧损伤,侧支循环作为重要的保护补偿机制,可通过增加血液灌注,恢复氧供,改善 ICS 的预后^[16]。血管新生属于三级侧支循环,由现有的血管中分离形式微血管网络,向发生在边界区的受影响区域提供氧气和营养物质,是应对脑梗死的关键保护机制^[17-18]。研究表明,在脑梗死患者和动物模型中,血管生成可通过促进组织修复、血管重塑、改善缺血周围组织灌注,从而促进神经功能恢复^[19-21]。因此,促进缺血后血管生成是临床治疗脑梗死的关键目标之一^[5,21-23]。

哺乳动物的昼夜节律系统由中枢下丘脑视交叉上核和外周器官(包括血管、心脏等器官)中的昼夜节律振荡器组成。这些振荡器通过多个生物钟基因(包括 Clock、Bmal1、Per、Cry 家族基因)的转录/翻译反馈回路产生细胞自主节律。这种多振荡器系统在所有生理系统(包括心血管、代谢、免疫和炎症功能)中产生内源性昼夜节律,该网络的破坏会导致内部不同步和昼夜节律紊乱,促进疾病发生发展^[24-25]。研究发现,昼夜节律紊乱可升高 ICS 发病率,与高密度脂蛋白胆固醇水平降低、三酰甘油水平升高、皮质醇节律紊乱、C 反应蛋白升高、血压升高、胰岛素敏感性降低和葡萄糖水平升高的糖尿病前期状态密切相关^[10,26-29]。此外,昼夜节律紊乱可增加 ICS 梗死面积,加重免疫炎症反应,损伤内皮功能^[11,30]。昼夜节律不仅是 ICS 的独立危险因素,在 ICS 后的血管新生进程中,同样发挥着不可替代的作用。研究表明,生物钟蛋白调控促血管生成因子的分泌、基底膜(basement membrane, BM)降解、细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑及内皮细胞增殖迁移。Bmal1^{-/-}小鼠中 MMPs 家族蛋白表达升高,进而促进 BM 降解与 ECM 重塑^[31]。过表达 Bmal1 可通过调控 VEGF 启动子活性,上调 VEGF 蛋白表达,促进缺血缺氧损伤的内皮细胞的血管生成能力,敲降 VEGF 表达可逆转

Bmal1 的促血管新生作用^[13]。综上,昼夜节律影响着脑梗死发生、发展及预后,其关键分子在脑梗死后的血管新生发挥不可替代的作用。

昼夜节律与祖国医学中的阴阳平衡理论高度契合。自然界的昼夜变化之间,阴阳在不断地进行节律性的交替转化,人体的生理活动随着昼夜变化发生相应变化,影响着人体内的阴阳平衡^[32]。《杂病广要》记载:“夫中风者,皆因阴阳不调,脏腑气偏,荣卫失度”,指出阴阳失衡是脑梗死发生的根本,恢复脏腑功能、调节荣卫之司为诊治脑卒中的关键。其中精、血、津液属阴,气属阳,“阴在内,阳之守也;阳在外,阴之使也”,即达到人体阴阳动态平衡,故阴阳平衡理论对诊治脑梗死具有较高的临床指导意义。本课题组根据多年的临床实践与理论探索,在脑藏象理论的指导下,提出荣气为精、气、血、津液等精微物质的总称,各种成分相互依存、平衡转化,是维持生命健康的重要条件^[14]。当脑梗死疾病发生后,阴阳失调,荣气虚滞,精微物质匮乏致滋养不足,荣气之荣养、化变、成形成功能障碍,新生血管受限^[33]。基于阴阳理论及荣气理论,创制具有调和阴阳、养阴生津、活血养血等功效的活血荣络方,该方为湖南中医药大学第一附属医院院内制剂,纳入临床路径达 13 年。本课题组前期研究发现,活血荣络方可上调 VEGF、Kruppel 样因子 4(kruppel-like factor 4, KLF4)、微囊蛋白-1(caveolin-1, CAV-1)表达,下调 MMP9 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 MVD,促进血管新生,改善脑梗死后神经功能缺损症状^[15]。

本研究结果表明,活血荣络方具有促进 OGD/R 损伤的 bEnd.3 细胞的血管新生能力,且该促进作用依赖于对生物钟蛋白 Bmal1 的调控。首先, bEnd.3 细胞受到 OGD/R 损伤后,生物钟蛋白 Bmal1 及 Clock 的表达随时间延长而升高,表达量于 12~20 h 显著升高,提示二者可能在 OGD/R 损伤的内皮细胞中发挥保护作用,故利用 ChIP-seq 探究 Bmal1 在内皮细胞中全基因组的调控功能,发现 Bmal1 参与细胞发育、神经再生分化、细胞形态、细胞增殖等生物进程,并与血管新生关键分子 VEGF、Notch1 等启动子区靶向结合,可作为转录激活因子,直接调节生长因子的表达,表明 Bmal1 可能在 OGD/R 损伤

后的血管新生进程中扮演着不可或缺的角色。既往研究表明, *Bmal1*^{-/-}小鼠的后肢在缺血缺氧损伤后, 其血管生成能力显著下降, VEGF 表达降低, 过表达 *Bmal1* 则可明显促进人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 的迁移和成管能力^[13]。为此, 进一步构建 bEnd.3 细胞 *Bmal1* 敲降株, 以探究 *Bmal1* 及活血荣络方含药血清对 OGD/R 损伤的 bEnd.3 细胞血管生成能力的影响。结果显示, 敲降 *Bmal1* 的 bEnd.3 细胞在受到 OGD/R 损伤后, 迁移能力及成管能力下降。同时, 活血荣络方表现出了有效的促内皮细胞迁移及成管的能力, 但此促进作用在 *Bmal1* 敲降株中被逆转, 提示活血荣络方的促血管新生作用可能依赖于对 *Bmal1* 的调控。

Western blotting 结果显示, OGD/R 损伤可显著升高 bEnd.3 细胞中生物钟蛋白 *Bmal1* 及 *Clock* 表达, 活血荣络方进一步升高二者蛋白表达, 提示具有调和阴阳的活血荣络方在调节 OGD/R 损伤后生物节律的过程中, 发挥有效且显著的效果。免疫荧光及 Western blotting 结果表明, 活血荣络方同样可进一步升高血管新生关键分子 NICD、DLL4、MMP2 及 VEGF 的蛋白表达, 发挥促进血管新生的作用, 但该促进效果在 *Bmal1* 基因敲降的 bEnd.3 细胞株中收到抑制, 可见活血荣络方的促血管新生作用依赖于对生物节律的调控。

生物节律调节哺乳动物生理和病理的大部分过程。大量的研究表明生物节律和血管生成相互作用, 共同影响脑梗死后缺血缺氧损伤的恢复。综上, 当内皮细胞受到缺血缺氧损伤后阴阳失衡, 荣气中精微物质的消长转化受限, 而活血荣络方能够有效通过调和阴阳, 改善其生物节律, 促进内皮细胞荣气之荣养、化变、成形功能。本研究为进一步中医药防治缺血性脑卒中提供了实验基础, 丰富现代科学内涵。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王陇德, 彭斌, 张鸿祺, 等. 《中国脑卒中防治报告 2020》概要 [J]. 中国脑血管病杂志, 2022, 19(2): 136-144.
- [2] Tsao C W, Aday A W, Almarazooq Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: A report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2022, 145(8): e153-e639.
- [3] Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, et al. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke [J]. *Stroke*, 1994, 25(9): 1794-1798.
- [4] Jin Y M, Barnett A, Zhang Y F, et al. Poststroke sonic hedgehog agonist treatment improves functional recovery by enhancing neurogenesis and angiogenesis [J]. *Stroke*, 2017, 48(6): 1636-1645.
- [5] Kanazawa M, Takahashi T, Ishikawa M, et al. Angiogenesis in the ischemic core: A potential treatment target? [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2019, 39(5): 753-769.
- [6] 曹亚俊, 陈亚萍, 黄枚, 等. 枯楼桂枝汤对大鼠脑缺血/再灌注损伤后血管新生的影响 [J]. 中药药理与临床, 2022, 38(2): 2-6.
- [7] Ruan W, Yuan X Y, Eltzschig H K. Circadian rhythm as a therapeutic target [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2021, 20(4): 287-307.
- [8] Konopka R J, Benzer S. Clock mutants of *Drosophila melanogaster* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68(9): 2112-2116.
- [9] Neves A R, Albuquerque T, Quintela T, et al. Circadian rhythm and disease: Relationship, new insights, and future perspectives [J]. *J Cell Physiol*, 2022, doi: 10.1002/jcp.30815.
- [10] Lo E H, Albers G W, Dichgans M, et al. Circadian biology and stroke [J]. *Stroke*, 2021, 52(6): 2180-2190.
- [11] Ramsey A M, Stowie A, Castanon-Cervantes O, et al. Environmental circadian disruption increases stroke severity and dysregulates immune response [J]. *J Biol Rhythms*, 2020, 35(4): 368-376.
- [12] Wang F, Li C Y, Han F, et al. BMAL1 may be involved in angiogenesis and peritumoral cerebral edema of human glioma by regulating VEGF and ANG2 [J]. *Aging*, 2021, 13(22): 24675-24685.
- [13] Xu L R, Liu Y T, Cheng Q Y, et al. *Bmal1* downregulation worsens critical limb ischemia by promoting inflammation and impairing angiogenesis [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2021, 8: 712903.
- [14] 周德生, 陈湘鹏, 胡华, 等. 脑梗死荣气虚滞病机特征之探讨 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2014, 12(12): 1560-1561.
- [15] 杨仁义, 颜思阳, 周德生, 等. 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 [J]. 中草药, 2021, 52(16): 4873-4881.
- [16] Yin K J, Hamblin M, Chen Y E. Angiogenesis-regulating microRNAs and ischemic stroke [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2015, 13(3): 352-365.
- [17] Carmeliet P, Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [18] Ruan L H, Wang B, ZhuGe Q C, et al. Coupling of neurogenesis and angiogenesis after ischemic stroke [J]. *Brain Res*, 2015, 1623: 166-173.

- [19] Wang J Y, Shi Y J, Zhang L L, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids enhance cerebral angiogenesis and provide long-term protection after stroke [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 68: 91-103.
- [20] Hoffmann C J, Harms U, Rex A, *et al.* Vascular signal transducer and activator of transcription-3 promotes angiogenesis and neuroplasticity long-term after stroke [J]. *Circulation*, 2015, 131(20): 1772-1782.
- [21] Chen D D, Wei L, Liu Z R, *et al.* Pyruvate kinase M2 increases angiogenesis, neurogenesis, and functional recovery mediated by upregulation of STAT3 and focal adhesion kinase activities after ischemic stroke in adult mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2018, 15(3): 770-784.
- [22] Slevin M, Kumar P, Gaffney J, *et al.* Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential [J]. *Clin Sci*, 2006, 111(3): 171-183.
- [23] Arenillas J F, Sobrino T, Castillo J, *et al.* The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke [J]. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2007, 9(3): 205-212.
- [24] Thosar S S, Butler M P, Shea S A. Role of the circadian system in cardiovascular disease [J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(6): 2157-2167.
- [25] Foster R G. Sleep, circadian rhythms and health [J]. *Interface Focus*, 2020, 10(3): 20190098.
- [26] Morris C J, Purvis T E, Mistretta J, *et al.* Circadian misalignment increases C-reactive protein and blood pressure in chronic shift workers [J]. *J Biol Rhythms*, 2017, 32(2): 154-164.
- [27] Wong P M, Hasler B P, Kamarck T W, *et al.* Social jetlag, chronotype, and cardiometabolic risk [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(12): 4612-4620.
- [28] Morris C J, Purvis T E, Hu K, *et al.* Circadian misalignment increases cardiovascular disease risk factors in humans [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(10): E1402-E1411.
- [29] Mason I C, Qian J Y, Adler G K, *et al.* Impact of circadian disruption on glucose metabolism: Implications for type 2 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2020, 63(3): 462-472.
- [30] Hemmeryckx B, Frederix L, Lijnen H R. Deficiency of Bmal1 disrupts the diurnal rhythm of haemostasis [J]. *Exp Gerontol*, 2019, 118: 1-8.
- [31] Anea C B, Ali M I, Osmond J M, *et al.* Matrix metalloproteinase 2 and 9 dysfunction underlie vascular stiffness in circadian clock mutant mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(12): 2535-2543.
- [32] 张乃文, 李梦媛, 李小黎, 等. 基于阴阳、营卫学说探讨生物钟基因对睡眠昼夜节律的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2022, 45(4): 376-381.
- [33] 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.

[责任编辑 李亚楠]