

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

杨仁义¹, 周德生², 傅馨莹¹, 颜思阳¹, 龚翠兰³, 马强¹, 刘利娟^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007;
3. 湖南中医药大学附属常德医院, 湖南常德 415000)

[摘要] 脑梗死是脑血流供应障碍引起脑组织缺血缺氧, 出现相应神经功能症状的临床疾病, 是最常见的脑血管病之一, 严重威胁到人类健康, 脑梗死的防治研究具有重要的社会意义。血管新生是脑梗死内科治疗的关键切入点, 信号传导和转录激活子(STAT)/缺氧诱导因子-1(HIF-1)/血管内皮生长因子(VEGF)通路是介导脑梗死后血管新生的重要通路。本文以血管新生为切入点, 以 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路的上游分子 STAT3, 微小 RNA(miRNA) 为主要研究对象, 综述芯片测序、实验研究、中医病机、中医治法的研究成果, 结合“转录因子(TF)—miRNA”调控模式与“微观整体”思想, 提出在中医基础理论指导下立方的中药复方和有效成分可能通过 STAT3/miRNA 反馈环路激活 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路促脑梗死后血管新生, 为中医药治疗脑梗死疾病提出了深层次的分子机制及新的方向。

[关键词] 脑梗死; 血管新生; 信号传导和转录激活子 3(STAT3); 微小 RNA(miRNA); 中医药

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0221-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201862

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200723.1017.008.html>

[网络出版日期] 2020-7-23 11:04

Regulatory Mechanism of Traditional Chinese Medicine in Promoting Angiogenesis After Cerebral Infarction Based on STAT3/miRNA Feedback Loop

YANG Ren-yi¹, ZHOU De-sheng², FU Xin-ying¹, YAN Si-yang¹, GONG Cui-lan³, MA Qiang¹,
LIU Li-juan^{2*}

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

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

3. Changde Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changde 415000, China)

[Abstract] Cerebral infarction is a clinical disease with corresponding neurological symptoms caused by cerebral ischemia and hypoxia caused by cerebral blood supply disorder. It is one of the most common cerebrovascular diseases and a serious threat to human health. The prevention and treatment of cerebral infarction has an important social significance. Angiogenesis is the key starting point for medical treatment of cerebral infarction, and signal transduction and transcriptional activators (STAT)/hypoxia inducing factor-1 (HIF-1)/vascular endothelial growth factor (VEGF) pathway are important pathways to mediate angiogenesis after cerebral infarction. This paper took the angiogenesis as the starting point and the upstream molecules of STAT/

[收稿日期] 20200209(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81874463); 湖南省科技厅科技创新平台与人才计划项目(2017SK4005); 湖南省财政中医药项目名院工程 院内优势病种项目(rsk-010-013/006-09); 湖南省中医药管理局项目(201824, 202046, 2020037); 湖南省教育厅一般项目(18C0404); 湖南中医药大学中西医结合一流学科开放基金项目(2019ZXYJH08)

[第一作者] 杨仁义, 硕士, 从事神经系统疾病的中医药防治工作, E-mail: 792799735@qq.com

[通信作者] * 刘利娟, 博士, 主治医师, 从事中医药对脑血管病及其并发症的防治工作, E-mail: 601264967@qq.com

HIF-1/VEGF signal pathway STAT3 and miRNA as the main study objects, and comprehensively discussed the results of chip sequencing, experimental research, traditional Chinese medicine (TCM) pathogenesis and TCM treatment. Based on the regulatory mode of "TF-miRNA" and the idea of "micro-whole", it is suggested that under the guidance of the basic theory of TCM, cubic compound prescriptions of TCM and its active components might activate the STAT/HIF-1/VEGF signal pathway through STAT3/miRNA feedback loop to promote angiogenesis after cerebral infarction, which puts forward a deep molecular mechanism and new direction for the treatment of cerebral infarction with TCM.

[Key words] cerebral infarction; angiogenesis; signal transduction and transcriptional activators3 (STAT3); miRNA; traditional Chinese medicine

脑梗死是脑血流供应障碍引起脑组织缺血缺氧,导致相应神经功能症状的临床疾病,是最常见的脑血管病之一。2019年《中国卫生健康统计年鉴》数据显示,脑血管病分列2018年我国农村、城市居民主要疾病死亡率的第2、3位,分别为160.19/10万,128.88/10万;其中缺血性脑卒中死亡率分别为50.42/10万,42.44/10万^[1],因此脑梗死的防治研究具有重要的社会意义。超早期溶栓^[2](重组组织型纤溶酶原激活剂(rt-PA)治疗或血管内再通是脑梗死主要且有效的治疗手段,但严格的时间窗及出血转化限制了其治疗效果,故为无溶栓适应症患者更好地建立脑侧支循环,缩小缺血面积,改善神经功能是目前亟待解决的临床问题。脑侧支循环是在动脉闭塞后动态募集的附属血管网络,分成三级循环,为一级大脑动脉环(Willis环)、二级眼动脉等较小侧支循环、三级血管新生,能为缺血脑组织提供血流灌注代偿。血管新生是在毛细血管或微静脉基础上,内皮细胞增殖、迁移、分化,以芽生或非芽生形式形成新生血管^[3],是脑梗死内科治疗的关键切入点。因此,通过对脑梗死后血管新生机制的研究,寻找关键治疗靶点及药物,制定合理有效的脑梗死治疗方案,提高患者生存率至关重要。

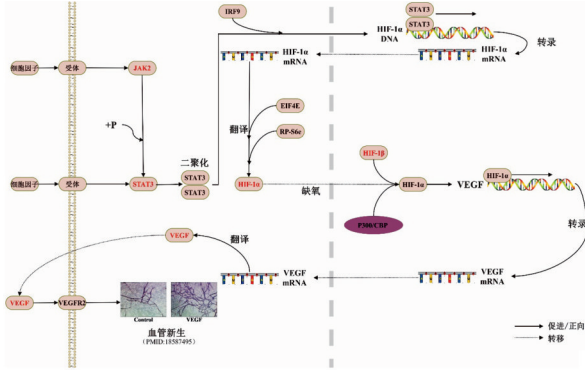
1 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路是药物治疗脑梗死后血管新生的关键机制

血管新生包括“从无到有”的血管发生(Vasculogenesis)和“从少到多”的血管形成(Angiogenesis)两个生物学过程,为机体胎盘发育、脑梗死后侧支循环建立、肿瘤生长等胚胎发育和组织再生提供营养,所以血管新生与机体生长发育、疾病发生发展密切相关。血管新生是复杂的生命过程,血管新生平衡学说指出诱导因子和抑制因子共同调控此过程,二者动态平衡具有关键作用。机体胚胎发育时,诱导因子相对高表达,平衡向促进血管新生方向发展,大量新生血管为生长发育提供

营养;成年后,正常情况下抑制因子相对高表达,平衡向抑制血管新生方面发展,血管新生减弱或停止;而创伤修复、肿瘤等环境下,局部低氧环境致诱导因子[如VEGF,碱性成纤维生长因子(bFGF)等]高表达,平衡向促进血管新生方向移动,大量新生血管形成,为创伤修复提供营养,因此在创伤修复过程中,治疗上当以促进血管新生为主,在肿瘤防治过程中,治疗上当以抑制血管新生为主。

脑梗死疾病属于机体创伤修复过程,研究发现脑梗死后血管新生诱导因子VEGF,STAT3,bFGF,酪氨酸蛋白激酶2(JAK2)等表达上调,血管新生抑制因子基质金属蛋白酶(MMPs),血管生成抑制因子(Arresten),内皮抑素(Endostatin)等表达下调,平衡向促进血管新生方向移动^[4]。诱导因子与抑制因子的表达受多条信号通路介导,JAK/STAT信号通路,HIF-1信号通路,VEGF信号通路与核转录因子- κ B(NF- κ B)/MMP信号通路的多步骤连续过程调控着血管新生的发生发展,决定了血管新生的结局。脑梗死后形成局部缺氧/低氧环境,细胞因子与膜上受体结合,通过JAK2磷酸化或直接二聚化STAT3蛋白形成二聚体,STAT3二聚体入核,激活HIF-1 α DNA转录,上调HIF-1 α 蛋白水平,进而HIF-1 α 蛋白入核激活VEGF DNA的转录,上调VEGF表达,介导内皮细胞血管新生(图1)。因此STAT/HIF-1/VEGF通路是脑梗死后血管新生的重要通路,虽然已有研究发现熟地黄有效成分梓醇能激活JAK2/STAT3信号通路刺激VEGF产生,促脑梗死后血管新生^[5];银杏内酯K能促进JAK2,STAT3蛋白磷酸化,上调HIF-1 α ,VEGF表达,激活HIF-1/VEGF信号通路,促进半暗带区血管新生,使平衡向新生血管方向移动,补充内源性血管新生的不足^[6]。但是相关研究仅涉及分子的表达水平对脑梗死后血管新生的影响,尚未涉及深层次分子直接作用机制,而直接靶向作用于STAT3的抑制剂(如Stattic,

Cucurbitacin I等)多针对肿瘤方面,故进一步明确药物通过 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路促血管新生的直接分子机制是当前亟待解决的关键问题。



+P. 磷酸化; IRF9. 干扰素调节因子9; EIF4E. 真核起始因子4E; RP-S6e. 核糖体蛋白S6; P300/CBP. 组蛋白乙酰转移酶复合物; VEGF. 血管内皮生长因子^[7]

图1 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路

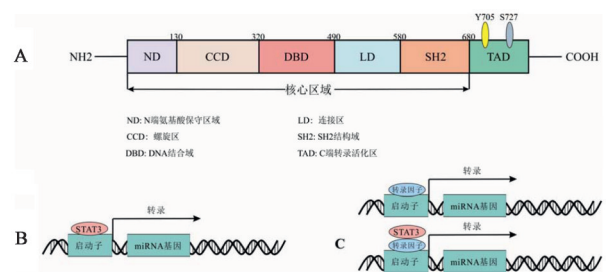
Fig. 1 Signaling pathways of STAT/HIF-1/VEGF

2 STAT3/miRNA 反馈环路能调控 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路

STAT3 是 STATs 家族 (STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b 和 6) 分子之一, 含有 DNA 结合结构域 (DBD), 能结合下游靶基因 DNA 启动子区域, 形成转录起始复合物, 以 DNA 为模板指导靶基因 RNA 形成的速率和过程, 是多种细胞因子受体信号转导的基础, 参与细胞生长、增殖、凋亡、血管新生等多个生物过程^[8]。miRNA 是一类广泛存在于真核生物中的长度约为 22 个核苷酸的非编码 RNA (ncRNA), 人类 1/3 的基因转录后的蛋白翻译合成过程受 miRNA 调控。STAT3^[9], miRNA^[10] 为 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路上游分子, 一方面 STAT3 作为编码蛋白, 其转录后的蛋白翻译合成受相关分子 (如 miRNA) 的调控; 另一方面 STAT3 作为转录因子, 能促进下游基因 (如 miRNA, HIF-1 α 等) 的转录, 介导脑梗死后血管新生。因此 STAT3/miRNA 可形成反馈环, 通过 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路, 在脑梗死后血管新生中发挥作用。

2.1 STAT3-miRNA 转录调控模式 STAT3 基因位于染色体 17q21 上, 能编码分子量 69~89 kDa 的蛋白质, 该蛋白质具有 6 个结构域 (图 2A), 其中 DBD 与 Src 同源结构域 (SH2) 在转录调控中最重要的。SH2 可以与磷酸化的酪氨酸残基相互作用使 STAT3 蛋白活化; DBD 能特异性识别下游 TTCC (C/G) GGAA 序列^[11]。STAT3 能被细胞因子/生长因子诱导的 JAK/STAT 信号通路激活形成二聚体, 二聚化

的 STAT3 从细胞质易位至细胞核内, 特异性识别靶基因启动子区域, 介导下游基因的转录过程。STAT3-miRNA (如 miR-21^[12]; miR-181b^[13]; miR-384-3p^[14]; miR-92^[15] 等) 转录调控模式在多种疾病表型中被报道, 其机制主要涉及 ① STAT3 直接介导下游 miRNA 转录 (图 2B): STAT3 被活化后形成同源或异源二聚体, 易位至细胞核内与 miRNA 的 DNA 启动子区域的 TTCC (C/G) GGAA 序列特异性识别, 促进 miRNA 的转录。CHEN 等^[12] 研究证实 STAT3 能特异性结合 miR-21 基因启动子位点 (-4528~-3340), 从而上调 miR-21 表达, 靶向抑制酪氨酸磷酸酶 (PTEN) 的翻译合成, 从而促进血管紧张素 II (Ang II) 介导的血管新生。② STAT3 协同“平台效应”介导下游 miRNA 转录 (图 2C): 首先其他转录因子与 miRNA 的 DNA 特异性结合, 形成蛋白-DNA 复合物的“平台”, 磷酸化的 STAT3 与其他转录因子结合并相互作用, 协同促进或抑制 miRNA 的转录过程。研究发现, NF- κ B 能与 miR-188-3p 启动子特异性结合^[16], 形成“NF- κ B-miR-188-3p”蛋白-DNA 复合物平台, 磷酸化的 STAT3 能与 NF- κ B 相互作用调控其转录功能^[17-19], 从而抑制 miR-188-3p 的表达。磷酸化的 STAT3 也能与 C/EBP β 蛋白结合形成复合物^[13], 协同介导 miR-21 和 miR-181 的转录。所以 STAT3 既能作为转录因子直接促进下游 miRNA 的表达, 也能作为转录调控因子协同其他转录因子调控下游 miRNA 的表达。虽然 STAT3-miRNA 转录调控模式在血管新生表型研究中被报道, 但是在脑梗死后血管新生中研究尚少, 可作为后续基础研究的方向。



A. STAT3 蛋白结构; B. STAT3 直接转录 miRNA; C. STAT3 “平台效应”转录 miRNA

图2 STAT3 蛋白结构及 STAT3-miRNA 转录调控模式

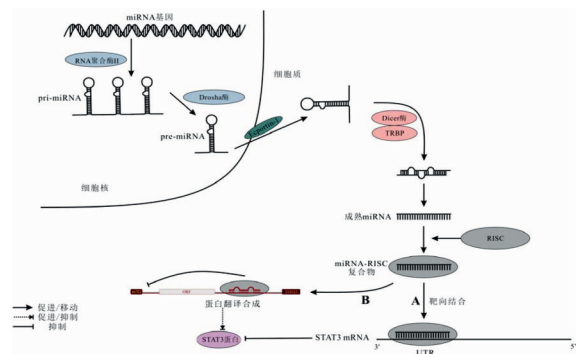
Fig. 2 STAT3 protein structure and transcriptional regulation mode of STAT3-miRNA

2.2 miRNA-STAT3 翻译调控模式 miRNA 合成后能调控基因转录后的蛋白翻译过程 (图 3), miRNA 通过 RNA 聚合酶 II 转录产生原始 miRNA

(pri-miRNA), 然后 pri-miRNA 经核糖核酸酶(Drosha)裂解生成前体 miRNA(pre-miRNA), 接着 pre-miRNA 经核输出蛋白-1(Ecportin-1)转运至细胞质中, 最后 pre-miRNA 在 Dicer 酶和双链 RNA 结合蛋白(TRBP)协同作用下形成成熟 miRNA。成熟 miRNA 与 RNA 诱导的沉默复合物(miRISC)结合, 识别目的基因 mRNA 3'UTR(非翻译区)并形成不完全互补配对, 通过裂解目的基因 mRNA 导致其转录后沉默, 阻断目的基因表达, 进而参与 JAK/STAT^[20], 磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)^[21], FAN 等^[22] 诸多通路过程, 调节细胞增殖、分化、凋亡等, 在癌症、糖尿病、心血管疾病等多种疾病的早期筛查、预后标志物、药物靶点等方面发挥重要作用。

随着高通量测序技术及生物信息学的快速发展, miRNA 调控下游靶基因模式被广泛预测与证实。miRNA-STAT3 翻译调控模式是 miRNA 与 STAT3 mRNA 的 3'UTR 特异性识别并形成不完全互补配对, 导致 STAT3 mRNA 的翻译过程被抑制, 从而阻断 STAT3 表达。ZOU 等^[23] 对脑缺血大鼠模型 GEO 数据库中 miRNA^[24] (GSE97532) 与 mRNA^[24] (GSE97532) 进行分析, 其构建的内源竞争 RNA (CeRNA) 网络结果显示 miR-388-5p, miR-208a-3p, miR-24-1-5p, miR-196b-5p 上调与 STAT3 下调负相关, miR-128-2-5p 上调与 STAT3 上调正相关, 其预测结果有待荧光素酶报告基因实验验证。BAM 等^[25] 对缺血中风患者外周血单个核细胞(PBMC)进行 miRNA 谱测序预测分析, 结果显示 miR-370-3p, miR-4651, miR-1964-5p 异常高表达; miR-181a, miR-1275, miR-3064-5p, miR-762, miR-874-3p 异常低表达; 且均能靶向 STAT3 的转录后翻译过程。同时采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)对预测所得的异常表达 miRNA (miR-320a, miR-503, miR-376c 等) 及失调靶标(SMAD3, 重组人转化生长因子- β_2 (TGFB2), 白细胞介素-12(IL-12)等进行验证, 明确异常表达的 miRNA 与失调靶标具有相关性, 证实了微阵列预测结果的可靠性, 但未对异常表达 miRNA 靶向 STAT3 的预测结果进行验证分析, 为后续进一步实验验证提供了可能性。XIONG 等^[26] 在肝缺血灌注大鼠模型中证实 miR-93 能直接靶向抑制 STAT3 的转录后翻译过程。在脑缺血再灌注后血管新生的机制研究中, MENG 等^[20] 发现 miR-210 能靶向抑制细胞因子信号传导抑制分子 1(SOCS1)的翻译, 促进下游

STAT3 的表达, 激活 VEGF 信号通路介导的脑梗死后血管新生。综上, miRNA-STAT3 翻译调控模式包括 ① miRNA 靶向 STAT3 mRNA 的 3'UTR 区域, 直接抑制 STAT3 蛋白翻译合成(图 3A); ② miRNA 靶向抑制 STAT3 上游蛋白合成, 从而调控 STAT3 蛋白表达(图 3B)。在脑梗死疾病中已经存在大量高通量测序结果, 因此充分利用测序结果并进行荧光素酶报告基因实验验证 miRNA-STAT3 翻译调控模式可作为后续的研究方向。



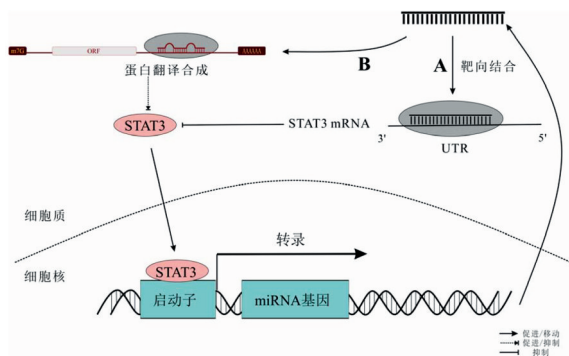
A. miRNA 直接抑制 STAT3 蛋白翻译合成; B. miRNA 靶向抑制 STAT3 上游蛋白调控 STAT3 蛋白表达。ORF. 开放阅读框; m7G. 帽子结构

图 3 miRNA 合成及 miRNA-STAT3 翻译调控模式

Fig. 3 miRNA synthesis and regulation model of miRNA-STAT3 translation

2.3 STAT3/miRNA 反馈环路 STAT3 与 miRNA 之间存在的反馈调控模式, 狭义上为 STAT3 与 miRNA 之间存在直接对应的靶向反馈调控关系, 即 STAT3-miRNA-STAT3 直接对应的靶向调控模式; 广义上为 STAT3 与 miRNA 在 ncRNA/其他蛋白协同作用下形成的间接对应的反馈调控关系, 即 STAT3-(蛋白/ncRNA)-miRNA-(蛋白/ncRNA)-STAT3 间接对应的调控模式。已有研究 miR-21, miR-384^[27-28], miR-7^[29-31] 能通过此反馈机制在多种疾病中发挥作用。以 miR-21 为例, STAT3-miR-21-STAT3 反馈调控模式可能是脑梗死后血管新生的作用机制, CHEN 等^[12] 在血管内皮细胞中采用染色质免疫沉淀法(ChIP)与荧光素酶报告基因实验证实, STAT3 能特异性结合 miR-21 转录起始点(TSS)上游-4528~-3340 bp 之间的启动子区域的 3 个片段, 增强 miR-21 的转录水平, 调控下游通路促进血管新生; ESCOBAR 等^[32] 发现在视网膜内皮细胞中转染 STAT3 特异性小干扰 RNA(si-RNA)后 miR-21 水平显著低于未转染组; CHEN 等^[12] 和 MCCLURE 等^[33] 也在肾脏细胞和慢性淋巴细胞性白血病中相继证实 STAT3 激活

miR-21 转录过程,同时团队利用 Jaspar 数据库^[34] 生信预测分析,STAT3-miR-21 转录调控模式结合位点信息共 33 个,包含 CHEN 等, SU 等^[33] 实验验证结合位点,其余预测结果需进一步验证。大量 miR-21-STAT3 翻译调控模式被报道, LU 等^[35] 荧光素酶报告基因实验证明 miR-21-5p 过表达靶向 STAT3 mRNA 的 3'UTR 区,从而下调 STAT3 蛋白的表达, LI 等^[36] 研究发现 miR-21-5p 能靶向抑制趋化因子 7 (CCR7),从而下调 STAT3 蛋白表达,而 REN 等^[37] 发现 miR-21-5p 能靶向抑制 PTEN 的表达,从而上调 STAT3 蛋白的表达,因此 miR-21 能直接靶向下调 STAT3,也能间接上调/下调 STAT3 蛋白表达。所以 STAT3 能直接促进 miR-21 的转录过程,上调 miR-21 的表达水平,同时 miR-21 能直接靶向 STAT3 蛋白翻译合成,下调 STAT3 蛋白的表达水平,或 miR-21 能直接靶向 STAT3 上游蛋白翻译合成,上调/下调 STAT3 蛋白的表达水平,形成正/负反馈调控模式,在脑梗死后血管新生中仍有待进一步深入研究。



A. miRNA 直接抑制 STAT3 蛋白翻译合成; B. miRNA 靶向抑制 STAT3 上游蛋白调控 STAT3 蛋白表达

图 4 STAT3/miRNA 反馈调控模式

Fig. 4 STAT3/miRNA feedback regulation pattern

STAT3 作为 STATs 家族分子之一,一方面具有 DBD 与 SH2 结构域,调控下游基因从 DNA 转录到 RNA 的过程,另一方面其自身合成受到 miRNA 等分子的调控。即 STAT3/miRNA 反馈环路能调控相关 miRNA (如 miRNA-21^[12]) 在内的下游基因的转录表达,也能反馈调控 STAT3 的翻译表达,综合影响 STAT3 在细胞质中表达水平。进一步影响其转录功能及 Y705, S727 位点磷酸化,介导下游通路 (如 HIF-1/VEGF, MAPK^[38], PI3K/Akt/mTOR^[39] 信号通路等) 调控相关分子 (如 HIF-1 α , VEGF, MMP-9 等) 表达水平。同时 STAT3 作为 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路的上游分子,能调控下游基因 HIF-1 α 转录表达,激活 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路,上调 VEGF

等血诱导因子的表达,促进平衡向新生血管新生方向移动,改善脑梗死后缺血区血流供应障碍。因此 STAT3/miRNA 反馈环路可作为直接分子调控机制,激活 STAT/HIF-1/VEGF 信号通路,从而在脑梗死后血管新生中发挥作用。

3 脑梗死后血管新生的中医理论及中医药防治研究

脑梗死属于中医“缺血中风”范畴,中医学认为缺血中风的形成不外乎风、火、痰、血、气、虚六端,病性总属本虚标实,以肝肾阴虚为本,以瘀、痰等为标,肝肾之气血津液亏虚,导致瘀血阻络,发为中风。《黄帝内经·灵枢·大惑论》^[40]云:“五脏六腑之精气……皆上属于脑。”脑为奇恒之腑,藏脑髓,传神机,为元神之府,为五脏六腑精、气、神汇聚之所。《人物志·九征》云:“凡有血气者,莫不含元一以为质,禀阴阳以立性,体五行而着形。苟有形质,犹可即而求之。”人体形质(质体),皆为血气之功也,故脑之“血络”“脉”“血脉”“筋络”“细皮”等质体(《性原广嗣·胎孕化形生禀元质次序论》^[41])皆由血气所结,气血化生而成。“物生谓之化,物极谓之变”(《素问·天元纪大论》^[40]),“万物之始皆气化”(《程氏遗书》^[42]),“阳化气,阴成形”(《黄帝内经·素问·阴阳应象大论》^[40]),气能化形,气极生变,血气相结而成“形质”“脉络”“血脉”;阴能成形,精微能化物成象。脏腑之气乃阴中之阴,属气、阴之类,能化形、生变、成象,凝聚气血精微而为血脉,故基于脏腑精气气化理论的益气活血法与滋阴活血法可致脑梗死后血管新生。

中医药理论研究历史悠久,但科学内涵有待深入剖析,中医的作用机制研究有待加强,高通量测序背景下分子相互作用调控模式与中医整体观念^[43]和中药多靶点治疗契合与补充^[44],一方面分子相互作用调控模式是证候变化的微观本质,具有“微观整体”特征,另一方面分子相互作用调控模式是中药多靶点、多通路的分子表达谱,为中药现代化提供依据。STAT3/miRNA 反馈调控模式与中医整体观念、辨证论治思想相契合,在中医药益气活血法与滋阴活血法指导下的复方、单药、有效成分可通过调控分子蛋白表达促脑血管新生,重建与恢复三级侧支循环,在脑梗死疾病的防治中起到重要作用。

采用 GEO 数据挖掘方法对 LIU 等^[45] 上传的气虚与阴虚血瘀型脑缺血再灌注大鼠 GEO (GSE100235) 芯片结果分析得出 STAT3 在气虚血

瘀、阴虚血瘀型脑梗死中过表达。LIU等^[46]采用高通量测序(GSE46267)与RT-PCR验证方法发现大量miRNA,如miR-21,miR-142-3p,miR-146a等在恢复期明显上调;miR-196a/b/c,miR-224,miR-324-3p等在恢复期明显下调,结合mRNA靶标分析可能与miRNA调控血管新生相关通路有关。研究发现“气虚血瘀—益气活血”理论立方的补阳还五汤上调miR-210^[47],miR-181c-3p,miR-539-5p,miR-382-5p,下调miR-33c-3p,miR-1839-5p,miR-34c的表达^[48],同时也能激活STAT3/VEGF信号通路促进脑梗死后血管新生^[49]。脑络欣通^[50]能上调miR-9a,miR-15a,下调miR-124表达恢复缺血区脑血流量,同时证实^[51]能调控JAK/STAT信号通路在脑梗死疾病中发挥作用。“阴虚血瘀—荣气虚滞”^[52]理论立方的活血荣络方在脑梗死急性期能调控STAT3蛋白的表达^[53],恢复期能促进脑梗死后血管新生^[54]。同时中药有效成分能调控STAT3与miRNA分子的表达促脑梗死后血管新生,研究发现黄芪甲苷能上调miR-210^[55],miR-21^[56],下调miR-33a^[57]等miRNA表达激活JAK2/STAT3/VEGF相关通路^[58]促脑梗死血管新生。因此在中医基础理论指导下,着眼于“微观整体”分子机制,探讨中医药在脑梗死后血管新生中的防治作用具有重要意义。

4 结论与展望

综上所述,脑梗死是临床常见病、多发病,严重威胁到人类健康,促进患者三级侧支循环血管新生是其防治研究的关键切入点。脑梗死后血管新生是机体创伤修复过程,由血管新生诱导因子和抑制因子共同调控,生理条件下,二者处于动态平衡状态;脑梗死疾病状态下,低氧/缺氧诱导STAT/HIF-1/VEGF通路激活,诱导因子(如VEGF,STAT3等)过表达,平衡向血管新生方向移动,促进脑梗死后血管新生。STAT3,miRNA既是STAT/HIF-1/VEGF通路上游分子,也可形成反馈环路共同调控下游分子表达。根据中心法则,STAT3与miRNA反馈环中存在STAT3-miRNA转录调控模式,促进miRNA的转录;也存在miRNA-STAT3翻译调控模式,抑制STAT3的翻译合成,两种模式综合影响STAT3,miRNA的表达,激活STAT/HIF-1/VEGF通路,在脑梗死后血管新生中发挥作用。

在中医基础理论指导下,着眼于中医药“微观整体”分子机制,结合“TF—miRNA”调控模式,分析芯片、测序及实验结果,认为益气活血、滋阴活血的中药复方和有效成分能通过STAT3/miRNA反馈环

路激活STAT/HIF-1/VEGF信号通路促脑梗死后血管新生,为中医药治疗脑梗死疾病提出了深层次的分子机制及新的方向。

[参考文献]

- [1] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴[M]. 2019版:中国协和医科大学出版社,2019:284-298.
- [2] 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.
- [3] REN C, YAO Y, HAN R, et al. Cerebral ischemia induces angiogenesis in the peri-infarct regions via Notch1 signaling activation[J]. Exp Neurol, 2018, 304(6):30-40.
- [4] CHEN 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.
- [5] DONG W, XIAN Y, YUAN W, et al. Catalpol stimulates VEGF production via the JAK2/STAT3 pathway to improve angiogenesis in rats' stroke model[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 191(17):169-179.
- [6] CHEN M, ZOU W, CHEN M, et al. Ginkgolide K promotes angiogenesis in a middle cerebral artery occlusion mouse model via activating JAK2/STAT3 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 833(16):221-229.
- [7] KANE R, GODSON C, O'BRIEN C. Chordin-like 1, a bone morphogenetic protein-4 antagonist, is upregulated by hypoxia in human retinal pericytes and plays a role in regulating angiogenesis[J]. Mol Vis, 2008, 14(6):1138-1148.
- [8] PAIVA S L. Dumping STAT3 in the trash[J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(1):19.
- [9] 陈明霞,刘建勋,武曲星,等. 桂皮醛经JAK2/STAT3通路抑制VEGF诱导的内皮细胞增殖、迁移及成管[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(8):28-33.
- [10] 赵亚娜,李倩晓,施育平. miRNA与心肌细胞凋亡研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2020,29(2):179-182.
- [11] CHEN X, XU H, YUAN P, et al. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells[J]. Cell, 2008, 133(6):1106-1117.
- [12] CHEN L Y, WANG X, QU X L, et al. Activation of the STAT3/microRNA-21 pathway participates in

- angiotensin II-induced angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11):19640-19654.
- [13] MCCLURE C, MCPEAK M B, YOUSSEF D, et al. Stat3 and C/EBP β synergize to induce miR-21 and miR-181b expression during sepsis[J]. *Immunol Cell Biol*, 2017, 95(1):42-55.
- [14] DERGHAL A, ASTIER J, SICARD F, et al. Leptin modulates the expression of miRNAs-targeting POMC mRNA by the JAK2-STAT3 and PI3K-Akt pathways [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(12):2213.
- [15] CHEN M W, YANG S T, CHIEN M H, et al. The STAT3-miRNA-92-Wnt signaling pathway regulates spheroid formation and malignant progression in ovarian cancer [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(8):1955-1967.
- [16] MENG F, ZHANG S, SONG R, et al. NCAPG2 overexpression promotes hepatocellular carcinoma proliferation and metastasis through activating the STAT3 and NF- κ B/miR-188-3p pathways [J]. *EBio Medicine*, 2019, 44(5):237-249.
- [17] KUO W Y, HWU L, WU C Y, et al. STAT3/NF- κ B-regulated lentiviral TK/GCV suicide gene therapy for cisplatin-resistant triple-negative breast cancer [J]. *Theranostics*, 2017, 7(3):647-663.
- [18] MASOUMI-DEHGHANI S, BABASHAH S, SADEGHIZADEH M. microRNA-141-3p-containing small extracellular vesicles derived from epithelial ovarian cancer cells promote endothelial cell angiogenesis through activating the JAK/STAT3 and NF- κ B signaling pathways [J]. *J Cell Commun Signal*, 2020, 14(1):548-550.
- [19] SP N, KANG D Y, KIM D H, et al. Nobiletin inhibits CD36-dependent tumor angiogenesis, migration, invasion, and sphere formation through the Cd36/Stat3/Nf- κ b signaling Axis [J]. *Nutrients*, 2018, 10(6):772.
- [20] MENG Z Y, KANG H L, DUAN W, et al. MicroRNA-210 promotes accumulation of neural precursor cells around ischemic foci after cerebral ischemia by regulating the SOCS1-STAT3-VEGF-C pathway [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(5):e005052.
- [21] LIANG Z, CHI Y J, LIN G Q, et al. MiRNA-26a promotes angiogenesis in a rat model of cerebral infarction via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(11):3485-3492.
- [22] FAN J, XU W, NAN S, et al. MicroRNA-384-5p promotes endothelial progenitor cell proliferation and angiogenesis in cerebral ischemic stroke through the delta-like ligand 4-mediated notch signaling pathway [J]. *Cerebrovasc Dis*, 2020, 49(1):39-54.
- [23] ZOU J B, CHAI H B, ZHANG X F, et al. Reconstruction of the lncRNA-miRNA-mRNA network based on competitive endogenous RNA reveal functional lncRNAs in cerebral infarction [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):12176.
- [24] TAKUMA A, ABE A, SAITO Y, et al. Gene expression analysis of the effect of ischemic infarction in whole blood [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(11):2335.
- [25] BAM M, YANG X, SEN S, et al. Characterization of dysregulated miRNA in peripheral blood mononuclear cells from ischemic stroke patients [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(2):1419-1429.
- [26] XIONG L, YU K H, ZHEN S Q. MiR-93 blocks STAT3 to alleviate hepatic injury after ischemia-reperfusion [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(16):5295-5304.
- [27] ZHENG J, LIU X, WANG P, et al. CRNDE promotes malignant progression of glioma by attenuating miR-384/PIWIL4/STAT3 Axis [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(7):1199-1215.
- [28] HAN J, LIU Y, ZHEN F, et al. STAT3 regulates miR-384 transcription during Th17 polarization [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7(11):253.
- [29] LIU L, LIU FB, HUANG M, et al. Circular RNA ciRS-7 promotes the proliferation and metastasis of pancreatic cancer by regulating miR-7-mediated EGFR/STAT3 signaling pathway [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2019, 18(6):580-586.
- [30] QIU J, ZHANG J, ZHOU Y, et al. MicroRNA-7 inhibits melatonin synthesis by acting as a linking molecule between leptin and norepinephrine signaling pathways in pig pineal gland [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(3):e12552.
- [31] TANG Z, XU T, LI Y, et al. Inhibition of CRY2 by STAT3/miRNA-7-5p promotes osteoblast differentiation through upregulation of CLOCK/BMAL1/P300 expression [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 19(3):865-876.
- [32] ESCOBAR T, YU C R, MULJO S A, et al. STAT3 activates miR-155 in Th17 cells and acts in concert to promote experimental autoimmune uveitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(6):4017-4025.
- [33] SU Y, ZHAO A, CHENG G, et al. The IGF-I/JAK2-STAT3/miR-21 signaling pathway may be associated with human renal cell carcinoma cell growth [J]. *Cancer Biomark*, 2017, 19(3):289-296.

- [34] STORMO G D. Modeling the specificity of protein-DNA interactions [J]. *Quant Biol*, 2013, 1 (2) : 115-130.
- [35] LU X, YU Y, TAN S. The role of the miR-21-5p-mediated inflammatory pathway in ulcerative colitis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(2):981-989.
- [36] LI G, YANG Y, XU S, et al. mir-21-5p inhibits the progression of human chondrosarcoma by regulating CCR7/STAT3/NF- κ B pathway [J]. *Connect Tissue Res*, 2019, 61(2):1-12.
- [37] REN W, HOU J, YANG C, et al. Extracellular vesicles secreted by hypoxia pre-challenged mesenchymal stem cells promote non-small cell lung cancer cell growth and mobility as well as macrophage M2 polarization via miR-21-5p delivery [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1):62.
- [38] LIANG F, REN C, WANG J, et al. The crosstalk between STAT3 and p53/RAS signaling controls cancer cell metastasis and cisplatin resistance via the Slug/MAPK/PI3K/Akt-mediated regulation of EMT and autophagy [J]. *Oncogenesis*, 2019, 8(10):59.
- [39] ZHANG Z H, LI M Y, WANG Z, et al. Convallatoxin promotes apoptosis and inhibits proliferation and angiogenesis through crosstalk between JAK2/STAT3 (T705) and mTOR/STAT3 (S727) signaling pathways in colorectal cancer [J]. *Phytomedicine*, 2020, doi: 10.1016/j.phymed.2020.153172.
- [40] 张志聪. 黄帝内经集注(上下)[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2015: 746-748.
- [41] 薛清録. 性原广嗣[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2014: 26-33.
- [42] 程颢, 程颐. 二程集-理学丛书[M]. 北京: 中华书局出版社, 2018: 45-47.
- [43] 潘祥龙, 郝二伟, 谢金玲, 等. 活血化瘀中药调节血瘀证的分子机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(24): 227-234.
- [44] 王忠, 陈寅莹, 张盈颖, 等. 多组分多靶点中药药理作用机制研究中的问题和解决策略[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(5): 1-6.
- [45] LIU T L, LIU M N, XU X L, et al. Differential gene expression profiles between two subtypes of ischemic stroke with blood stasis syndromes [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67): 111608-111622.
- [46] LIU F J, LIM K Y, KAUR P, et al. microRNAs involved in regulating spontaneous recovery in embolic stroke model [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (6) : e66393.
- [47] 胡辉, 储利胜, 孙斯琪, 等. 补阳还五汤上调 miRNA-210 表达促进人脑微血管内皮细胞血管生成[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(2): 227-231.
- [48] 费洪新, 姜波, 张英博, 等. 补阳还五汤对脑组织作用机制的研究进展[J]. *中医药信息*, 2015, 32(1) : 125-127.
- [49] YANG J, GAO F, ZHANG Y, et al. Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) enhances angiogenic effect of mesenchymal stem cell by upregulating VEGF expression after focal cerebral ischemia [J]. *J Mol Neurosci*, 2015, 56(4): 898-906.
- [50] 邓勇, 王键, 谭辉, 等. 脑络欣通对大鼠脑缺血再灌注后海马 mRNA 的特异性表达及 Wnt/ β -catenin 的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(6): 483-491.
- [51] 韩义皇, 王键. 益气活血方(脑络欣通)对 MCAO-R 大鼠 JAK-STAT 信号转导通道的影响 [J]. *中医学报*, 2017, 32(12): 2399-2403.
- [52] 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.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] 曾子修, 刘雪梅, 张允岭. 中医药对缺血性脑卒中后血管内皮生长因子及 MicroRNAs 影响的研究进展 [J]. *北京中医药*, 2016, 35(7): 641-644.
- [56] 常方圆, 冯泽瑞, 许迎春, 等. miR-21 在黄芪甲苷保护 ox-LDL 诱导的内皮细胞炎症损伤过程中的作用 [J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2019, 11(4): 276-282, 309.
- [57] 秦合伟, 李彦杰, 张志鑫, 等. 黄芪甲苷通过调控 miR-33a 及 ABCA1 信号发挥抗动脉粥样硬化作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(12): 2120-2126.
- [58] 李玉梅, 鲍慧玮, 王楚盈, 等. 黄芪甲苷与阿魏酸合用调控 JAK-STAT 通路促进血管内皮细胞增殖作用的研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(1): 1-8.

[责任编辑 周冰冰]