

# 基于微小 RNA-27a-3p/ 磷酸二酯酶 3A 探讨益气活血方对缺血性脑梗死小鼠微血管保护的分子机制

欧阳方<sup>1</sup> 张小红<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 武汉市第一医院 (武汉市中西医结合医院), 湖北武汉 430022; <sup>2</sup> 武汉市第六医院, 湖北武汉 430022

通信作者: 张小红, Email: 344678104@qq.com

**【摘要】** 目的 观察益气活血方对缺血性脑梗死模型小鼠脑微血管的保护作用,并探讨其分子机制。方法 选择 50 只成年雄性 SPF C57 小鼠,按随机数字表法分为假手术组、永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)模型组和益气活血方高、中、低剂量组,每组 10 只。采用改良的线栓法复制 pMCAO 卒中模型;假手术组不进行栓线操作。术后假手术组、pMCAO 模型组均给予相同体积的生理盐水;益气活血方(组成:黄芪 40 g、人参 15 g、丹参 30 g、益母草 20 g、茯苓 25 g、葶苈子 10 g,由河北中医学院中药制剂中心制备成颗粒剂)高、中、低剂量组分别按 240、120、60 mg/kg 剂量灌胃。观察各组小鼠脑组织微血管形态、脑梗死体积的变化、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素-1(Ang-1)、内皮素-1(ET-1)含量以及微小 RNA(miRNA)-27a-3p 的 mRNA 与磷酸二酯酶 3A(PDE3A)的 mRNA 和蛋白表达水平。**结果** pMCAO 模型组脑梗死体积较假手术组明显增大[(60.25±12.05)%比(2.02±0.26)%], $P<0.01$ ];各给药组脑梗死体积均较 pMCAO 模型组明显减小,且以益气活血方高剂量组的减小程度较低剂量和中剂量组更显著[(38.98±10.26)%比(50.26±11.44)%、(45.77±8.95)%]。光镜下可见:假手术组脑血管排列规则,管腔血液充盈,血管周围红润;pMCAO 模型组梗死区血管腔内红细胞呈线性排列,管周间隙加大并有严重水肿,半暗区血管周围出现炎性细胞浸润;益气活血方各剂量组脑微血管受损程度均较 pMCAO 组明显减轻。pMCAO 模型组 VEGF、Ang-1、ET-1 含量及 PDE3A 的 mRNA 和蛋白表达水平均较假手术组明显升高[VEGF (ng/L): 6.44±1.26 比 1.44±0.59, Ang-1 (ng/L): 9.68±2.33 比 2.33±1.02, ET-1 (ng/L): 50.55±18.66 比 20.44±9.56, PDE3A mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 6.99±0.86 比 1.00±0.00, PDE3A 蛋白(PDE3A/GAPDH): 2.84±1.49 比 1.00±0.00, 均  $P<0.01$ ], miR-27a-3p mRNA 表达较假手术组明显降低( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ : 0.36±0.06 比 1.00±0.00);益气活血方高、中、低剂量组 VEGF、Ang-1、ET-1 含量及 PDE3A 的 mRNA 和蛋白表达水平均较 pMCAO 模型组降低,miR-27a-3p mRNA 表达较 pMCAO 模型组升高,并呈剂量依赖性,随药物剂量的增加上述指标的变化更显著[VEGF (ng/L): 3.12±0.69、4.55±1.56、5.06±0.64 比 6.44±1.26, Ang-1 (ng/L): 5.66±2.03、7.89±2.03、8.90±1.29 比 9.68±2.33, ET-1 (ng/L): 30.44±10.78、40.44±10.65、42.33±10.12 比 50.55±18.66, PDE3A mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 2.09±0.65、4.22±0.71、6.22±0.80 比 6.99±0.86, PDE3A 蛋白(PDE3A/GAPDH): 1.56±0.16、2.50±1.30、2.73±0.78 比 2.84±1.49, miR-27a-3p mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 0.80±0.08、0.65±0.12、0.43±0.09 比 0.36±0.06]。**结论** 益气活血方能明显改善急性脑梗死小鼠脑功能和形态,其作用与改善急性脑梗死小鼠微血管结构和调节微血管再生环境,以及调控 miRNA-27a-3p/PDE3A 的表达有关。

**【关键词】** 缺血性脑梗死; 微血管; 益气活血方; 脑梗死

**基金项目:** 湖北省武汉市医药卫生科研项目(WX16E07)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.06.027

**Investigation on molecular mechanism of Yiqi Huoxue Recipe on microvascular protection in mice model with ischemic cerebral infarction based on micro RNA-27a-3p/phosphodiesterase 3A** Ouyang Fang<sup>1</sup>, Zhang Xiaohong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Wuhan First Hospital (Wuhan Hospital of Traditional Chinese and Western Medicine), Wuhan 430022, Hubei, China;

<sup>2</sup>the Sixth Hospital of Wuhan, Wuhan 430022, Hubei, China

Corresponding author: Zhang Xiaohong, Email: 344678104@qq.com

**【Abstract】 Objective** To observe the protective effect of Yiqi Huoxue Recipe (YHR) on cerebral micro-vessels of ischemic cerebral infarction mice model and explore its molecular mechanism. **Methods** According to random number table method, the 50 adult male SPF C57 mice were divided into sham operation group, permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) model group and high, medium and low dose YHR groups, with 10 mice in each group. The modified thread bolt method was used to replicate the pMCAO stroke model. In the sham operated group, similar operation without suture management was performed. After operation, the sham operated group and pMCAO model group were given the same volume of normal saline; in high, medium, low dose YHR groups, YHR (ingredients: Radix Astragali 40 g, Panax Salviae Miltiorrhizae 30 g, Herba Leonuri 20 g, Poria 25 g, Semen ginseng 15 g, Radix Lepidii 10 g, were mixed and prepared as granules by Traditional Chinese Medicine Preparation Center of Hebei University of Traditional Chinese Medicine) high-, mid- and low-dose groups were given with the doses of 240, 120 and 60 mg/kg by gavage administration. The morphological changes of cerebral micro-vessels, volume of cerebral infarction, contents of vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin-1 (Ang-1) and endothelin-1 (ET-1), levels of mRNA and protein expressions of miRNA-27a-3p and phosphodiesterase 3A (PDE3A) were observed. **Results** Compared with the sham operated group, the cerebral infarction volume in pMCAO model group was significantly increased [(60.25±12.05)% vs. (2.02±0.26)%],  $P<0.01$ ]; and the cerebral infarction volumes in each drug administration group were significantly lower than those in

pMCAO model group, and the degree of reduction in high dose YHR group was more significant than those in low and medium dose YHR groups [(38.98 ± 10.26)% vs. (50.26 ± 11.44)%, (45.77 ± 8.95)%]. Under the light microscope, the cerebral vessels in sham operated group were arranged regularly, the lumen of the vessels was filled with blood and vascular surroundings were ruddy; it could be seen that the red blood cells in vascular lumen in infarction area of pMCAO model group were linearly arranged, the interstitial space around blood vessels was enlarged and with serious edema, and inflammatory cells were infiltrated around the blood vessels in the semi dark area; the degrees of brain microvascular damage in YHR groups were obviously milder than those in pMCAO model group. The levels of VEGF, Ang-1, ET-1 and PDE3A mRNA and protein expressions in pMCAO model group were significantly higher than those in sham operated group [VEGF (ng/L): 6.44 ± 1.26 vs. 1.44 ± 0.59, Ang-1 (ng/L): 9.68 ± 2.33 vs. 2.33 ± 1.02, ET-1 (ng/L): 50.55 ± 18.66 vs. 20.44 ± 9.56, PDE3A mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 6.99 ± 0.86 vs. 1.00 ± 0.00, PDE3A protein (PDE3A/GAPDH): 2.84 ± 1.49 vs. 1.00 ± 0.00, all  $P < 0.01$ ], the expression of miR-27a-3p mRNA was significantly lower than that of sham operated group ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ : 0.36 ± 0.06 vs. 1.00 ± 0.00); the contents of VEGF, Ang-1, ET-1 and expression levels of PDE3A mRNA and protein in YHR high-, mid- and low dose groups were lower than those in pMCAO model group, and the expression of miR-27a-3p mRNA was higher than that in pMCAO model group, which was dose-dependent, and changes of the above indexes were more significant with increase of drug dose [VEGF (ng/L): 3.12 ± 0.69, 4.55 ± 1.56, 5.06 ± 0.64 vs. 6.44 ± 1.26, Ang-1 (ng/L): 5.66 ± 2.03, 7.89 ± 2.03, 8.90 ± 1.29 vs. 9.68 ± 2.33, ET-1 (ng/L): 30.44 ± 10.78, 40.44 ± 10.65, 42.33 ± 10.12 vs. 50.55 ± 18.66, PDE3A mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 2.09 ± 0.65, 4.22 ± 0.71, 6.22 ± 0.80 vs. 6.99 ± 0.86, PDE3A protein (PDE3A/GAPDH): 1.56 ± 0.16, 2.50 ± 1.30, 2.73 ± 0.70 vs. 2.84 ± 1.49, miR-27a-3p mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): 0.80 ± 0.08, 0.65 ± 0.12, 0.43 ± 0.09 vs. 0.36 ± 0.06]. **Conclusions** YHR can significantly improve the brain function and morphology of mice model with acute cerebral infarction. Its effect is related to the improvement of microvascular structure, regulation of environment of microvascular regeneration and regulation of the expressions of miRNA-27a-3p/PDE3A.

**【Key words】** Ischemic cerebral infarction; Microvessels; Yiqi Huoxue Recipe; Cerebral infarction

**Fund program:** Medical and Health Research Project in Wuhan, Hubei Province (WX16E07)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2020.06.027

统计表明,脑小血管病(CSVD)约占缺血性脑卒中患者的25%,这增加了后续中风、进行性认知下降和死亡的风险<sup>[1]</sup>。目前CSVD患者尚无特殊治疗方法。近年来有使用西洛他唑治疗CSVD的报告,然而服用西洛他唑因有头痛和心律失常等相关不良反应限制了其在临床的使用。磷酸二酯酶3(PDE3)由2个基因组成,分别位于染色体12和11位上的不同基因的产物,是调节环磷酸腺苷和环磷酸鸟苷活性的重要酶,在CSVD的发生发展中起着重要作用<sup>[2-3]</sup>。因此,需要寻找其他调节磷酸二酯酶3(PDE3)表达的方法,如使用特定的微小RNA(miRNA)。miRNA是内源性表达的18~22个核苷酸长度的非编码小RNA,它们能充当转录后基因功能和表达调节剂,并且最近被建议作为疾病诊断和分期中的潜在生物标志物<sup>[4]</sup>和治疗剂<sup>[5]</sup>。已知miRNA可调节内皮功能和相关炎症反应以及血管生成的过程<sup>[6]</sup>。脑卒中特异性miRNA在疾病风险预测和治疗药物开发领域有重要作用。

益气活血方有益气活血、通络止痛的作用,可用于治疗冠心病心绞痛中医辨证属心气虚乏、血瘀络阻证者,亦可用于气虚血瘀络阻型中风病,症见半身不遂或偏身麻木,口舌歪斜,言语不利的治疗。近年来有研究显示,益气活血方可通过改善微循环进而起到保护脑神经细胞的作用<sup>[7]</sup>。然而,益气活血方对缺血性脑损伤后脑微循环障碍的影响及其机制目前尚不清楚。本研究基于miRNA-27a-3p/PDE3A

信号轴,探讨益气活血方对缺血性脑梗死微血管保护的作用机制。

## 1 材料与方

**1.1 实验动物:**选择6~8周龄雄性SPF级C57小鼠50只,体质量20~24g,购于河北医科大学实验动物学部,动物许可证号:SCXK(冀)2016-0001。

**1.2 动物模型复制:**采用改良的线栓法复制永久性大脑中动脉闭塞(pMCAO)脑卒中模型<sup>[8]</sup>。用3.5%水合氯醛麻醉小鼠,用6-0尼龙缝线将小鼠左侧颈外动脉(ECA)和左侧颈总动脉(CCA)的近侧结扎后,从左侧CCA的远端插入6-0硅涂层单丝缝线至左侧颈内动脉(ICA),并经颈总动脉插入颈内动脉,当到达指定长度(约10mm)时结扎颈内动脉;假手术组小鼠进行同样的手术但无单丝插入。

**1.3 伦理学:**本研究符合动物伦理学标准,所有动物处置方法均经武汉市中西医结合医院(武汉市第一医院)动物护理与使用委员会批准(审批号:YN.No20190701-2),符合美国国家卫生研究院(NIH)指南实验动物标准。

**1.4 实验动物分组及给药:**将小鼠按随机数字表法分为假手术组、pMCAO模型组和益气活血方(组成:黄芪40g、人参15g、丹参30g、益母草20g、茯苓25g、葶苈子10g,由河北中医学院中药制剂中心制备成颗粒剂)高、中、低剂量组。益气活血方高、中、低剂量组按照240、120、60mg/kg灌胃;假手术组和pMCAO模型组在相应时间内给予等体积的溶剂。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 脑组织微血管结构的变化观察：处死小鼠后取脑组织置于 4% 多聚甲醛水溶液中固定，48 h 后用石蜡包埋，并于视交叉前缘作 5 μm 厚的冠状切片，苏木素-伊红 (HE) 染色后于光镜下观察脑组织微血管结构的变化。

1.5.2 脑梗死体积的测定：制模后 24 h 处死小鼠，取脑组织冠状切为 2 mm 切片，并在含有 2% 三苯基氯化四氮唑 (TTC) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中于 37 °C 温育 20 min，然后将切片置于 4% 多聚甲醛水溶液中固定 24 h 并拍照。每个切片的缺血区域由图像分析软件 Image J.17 分析。用公式计算梗死体积：校正的梗死体积 = [对侧半球体积 - (同侧半球体积 - 梗死体积)] / 对侧半球体积 × 100%。

1.5.3 采用反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 miRNA-27a-3p 的 mRNA 表达水平：取脑组织制备匀浆后提取总 RNA，用紫外分光光度计检测 RNA 样品浓度及 260 nm 与 280 nm 处的吸光度比值。吸光度比值 ( $A_{260}/A_{280}$ ) 介于 1.9 ~ 2.2 的 RNA 样本被认为纯度较高，可进行下一步实验；根据 RNA 样品浓度加入适量去离子水 (DEPC) 标化至 100 μg/L；按照 RNA 逆转录试剂盒说明书，配置 20 μL mRNA 逆转录混合体系 (逆转用于检测 miR121 的 RNA 时将随机引物替换为 miR-27a-3p 及 U6 的特殊逆转录引物)。实验重复 4 次，取平均值。

1.5.4 采用 RT-PCR 检测 PDE3A 的 mRNA 表达水平：使用 RNA 提取裂解液提取试剂提取大鼠脑组织总 mRNA，将得到的总 mRNA 逆转录为 cDNA，根据溶解曲线将 cDNA 稀释相应倍数，于八联管中配制混合反应体系，将 qPCR 反应参数设置为 95 °C, 30 s; 95 °C, 5 s; 60 °C, 31 s，共进行 40 个循环。采用 7300 System SDS Software 分析数据，根据  $\Delta\Delta Ct$  值相对定量样本中 PDE3A mRNA。以目的基因与内参照  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 表达量的比值作为目的基因表达量。实验重复 4 次，取平均值。

1.5.5 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组脑组织 PDE3A 的蛋白表达水平：将蛋白质样品印迹到 0.45 μm 硝酸纤维素膜上并用 5% 脱脂乳在 0.1% 含吐温的磷酸盐缓冲液 (TBS) 中封闭 1 h。加入兔抗 PDE3A (1:300) 和小鼠抗 GAPDH (1:5 000) 抗体在混合器上 4 °C 温育过夜；洗涤后，加二抗孵育 1 h，用化学发光检测试剂盒显色，以目的蛋白与内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 的比值作为 PDE3A 的蛋白表达量。使用 ImageQuant TL 软件进

行定量。

1.5.6 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测各组血管内皮生长因子 (VEGF)、血管生成素-1 (Ang-1)、内皮素-1 (ET-1) 的含量：于制模后 6、24 h 取各组小鼠眼球血，离心 10 min 后分离血清，采用 ELISA 测定血清 VEGF、Ang-1、ET-1 水平。

1.6 统计学方法：使用 SPSS 20.0 统计软件分析数据，符合正态分布的数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 益气活血方对各组小鼠脑梗死体积的影响 (表 1)：与假手术组比较，pMCAO 模型组脑梗死体积均明显增大；与 pMCAO 模型组比较，益气活血方各剂量组脑梗死体积均显著减小 (均 *P* < 0.01)，以高剂量组的作用更显著。

表 1 不同处理方法各组小鼠脑梗死体积比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

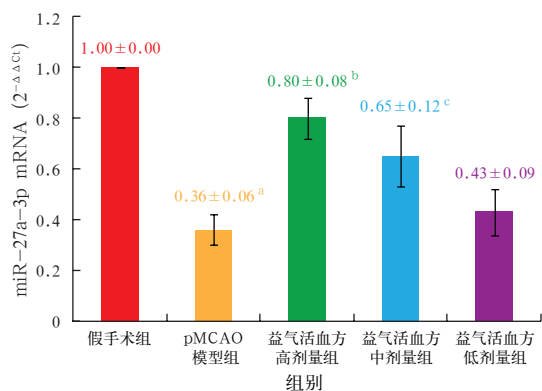
组别	动物数 (只)	脑梗死体积 (%)
假手术组	10	2.02 ± 0.26
pMCAO 模型组	10	60.25 ± 12.05 <sup>a</sup>
益气活血方高剂量组	10	38.98 ± 10.26 <sup>ab</sup>
益气活血方中剂量组	10	45.77 ± 8.95 <sup>ab</sup>
益气活血方低剂量组	10	50.26 ± 11.44 <sup>ab</sup>

注：pMCAO 为永久性大脑中动脉闭塞；与假手术组比较，<sup>a</sup>*P* < 0.01；与 pMCAO 模型组比较，<sup>b</sup>*P* < 0.01

2.2 脑组织微血管形态结构的变化：假手术组脑血管排列规则，管腔血液充盈，血管周围红润；pMCAO 模型组梗死区血管腔内红细胞呈线性排列，管腔处于闭塞状态，管周间隙加大并伴有严重水肿，半暗区血管周围出现炎症细胞浸润且少量已进入间隙，管周胶质细胞也呈水肿状态；益气活血方各剂量组脑微血管受损程度明显减轻，微血管周围也有水肿状态出现，但小鼠缺血半暗带、梗死区及海马区大部分微血管管腔均呈开放状态，脑部血液供给得以改善。

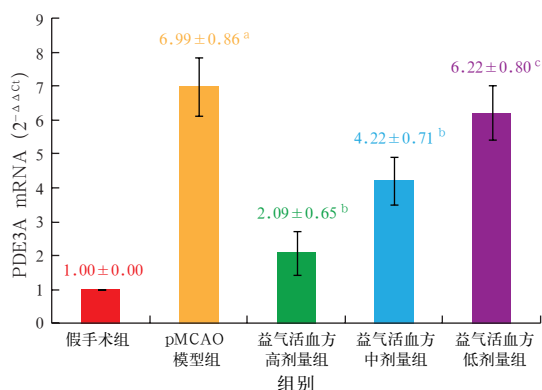
2.3 益气活血方对各组小鼠脑组织中 miR-27a-3p mRNA 表达的影响 (图 1)：pMCAO 模型组 miR-27a-3p mRNA 表达水平明显低于假手术组 (*P* < 0.01)；益气活血方各剂量组 miR-27a-3p mRNA 表达水平均高于 pMCAO 模型组，且呈剂量依赖性升高。

2.4 益气活血方对各组小鼠脑组织中 PDE3A mRNA 和蛋白表达的影响 (图 2 ~ 3)：pMCAO 模型组 PDE3A mRNA 和蛋白表达水平均明显高于假手术组 (均 *P* < 0.01)；益气活血方各剂量组 PDE3 mRNA 和蛋白表达水平均低于 pMCAO 模型组，且呈剂量依赖性降低。



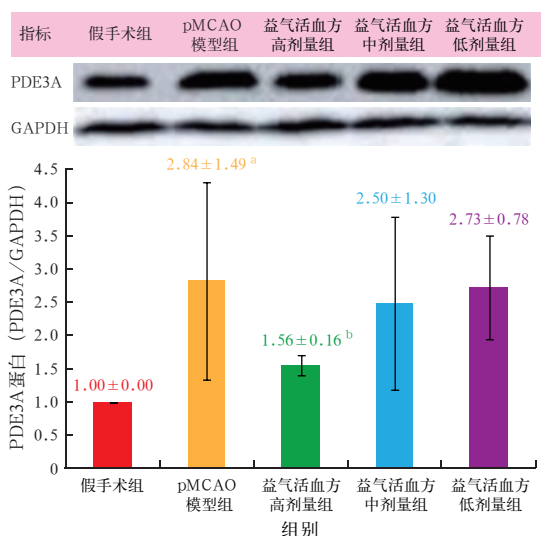
注: pMCAO 为永久性大脑中动脉闭塞; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 pMCAO 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01, <sup>c</sup>*P*<0.05

图 1 各组小鼠脑组织中 miR-27a-3p mRNA 表达水平比较



注: PDE3A 为磷酸二酯酶 3A, pMCAO 为永久性大脑中动脉闭塞; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 pMCAO 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01, <sup>c</sup>*P*<0.05

图 2 各组小鼠脑组织中 PDE3A mRNA 表达水平比较



注: PDE3A 为磷酸二酯酶 3A, pMCAO 为永久性大脑中动脉闭塞, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 pMCAO 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01

图 3 各组小鼠脑组织中 PDE3A 蛋白表达水平比较

2.5 益气活血方对 VEGF、ANG-1 和 ET-1 含量的影响(表 2): pMCAO 模型组 VEGF、Ang-1、ET-1 含量均较假手术组明显升高; 益气活血方各剂量组 VEGF、Ang-1、ET-1 含量均较 pMCAO 模型组明显降低(均 *P*<0.05), 以高剂量组降低最显著。

表 2 不同处理方法各组小鼠血清 VEGF、Ang-1 和 ET-1 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	VEGF (ng/L)	Ang-1 (ng/L)	ET-1 (ng/L)
假手术组	10	1.44 ± 0.59	2.33 ± 1.02	20.44 ± 9.56
pMCAO 模型组	10	6.44 ± 1.26 <sup>a</sup>	9.68 ± 2.33 <sup>a</sup>	50.55 ± 18.66 <sup>a</sup>
益气活血方高剂量组	10	3.12 ± 0.69 <sup>b</sup>	5.66 ± 2.03 <sup>b</sup>	30.44 ± 10.78 <sup>b</sup>
益气活血方中剂量组	10	4.55 ± 1.56 <sup>c</sup>	7.89 ± 2.03 <sup>b</sup>	40.44 ± 10.65 <sup>c</sup>
益气活血方低剂量组	10	5.06 ± 0.64 <sup>c</sup>	8.90 ± 1.29 <sup>b</sup>	42.33 ± 10.12 <sup>c</sup>

注: VEGF 为血管内皮生长因子, Ang-1 为血管生成素-1, ET-1 为内皮素-1, pMCAO 为永久性大脑中动脉闭塞; 与假手术组比较, <sup>a</sup>*P*<0.01; 与 pMCAO 模型组比较, <sup>b</sup>*P*<0.01, <sup>c</sup>*P*<0.05

### 3 讨论

脑血管内皮功能障碍是 CSVD 的病理生理学因素<sup>[9]</sup>, 环核苷酸在调节内皮功能和维持内皮细胞完整性中起关键作用<sup>[10]</sup>, PDE3 是脑动脉中存在的环磷酸腺苷(cAMP) 特异性酶<sup>[11]</sup>。西洛他唑是一种选择性 PDE3 抑制剂, 可调节 PDE3 的作用, 用于脑卒中和动脉外周疾病的二级预防<sup>[12]</sup>。PDE3 在改善脑血管内皮功能障碍和治疗脑卒中的作用仍有待证实, 西洛他唑可通过升高 cAMP 水平来改善脑血管内皮功能和结构的完整性<sup>[13]</sup>。最近全基因组关联研究显示, 脑卒中与 PDE3A 之间存在一定关联, 并将其指定为风险位点<sup>[14]</sup>。

目前已发现 PDE3 有两种同种型(PDE3A 和 PDE3B), 它们有不同表达模式。PDE3A 在脑、心脏、血小板、内皮细胞和血管平滑肌细胞中表达, PDE3B 在脂肪细胞、肝细胞和 β 细胞中表达。PDE3A 的突变导致酶活性增加和对高血压易感<sup>[15]</sup>。β 细胞中的 PDE3B 可调节 cAMP 介导的胰岛素信号转导<sup>[16]</sup>。由于糖尿病和高血压是 CSVD 的危险因素<sup>[17]</sup>, PDE3 同种型均可能在 CSVD 疾病中发挥作用。尽管使用西洛他唑会出现相关不良反应, 但其仍可改善内皮完整性, 抑制血管平滑肌细胞的增殖<sup>[18]</sup>, 改善脑血流<sup>[6]</sup>。目前, 西洛他唑和其他可用的 PDE3 抑制剂不区分两种同种型。因此, PDE3 同种型特异性调节剂可更好地增强脑血管内皮功能<sup>[7]</sup>。值得注意的是, miRNA 可以靶向作用于每种 PDE3 同种型的特异性 3' 非翻译区(UTR)。miRNA 的特异性及其对靶基因表达的调节代表了它们寻找治疗靶标或特定疾病生物标志物的潜在价值。然而, miRNA 的异

常表达也可能导致其他中枢神经系统疾病。

益气活血方临床上主要用于治疗冠心病和缺血性脑卒中<sup>[19]</sup>。血管新生受一定的刺激因子调节,其中促血管生成因子表达上升或抑制因子表达下降均能促进血管的生成,其生成能力取决于两种刺激因子的动态平衡。VEGF 及碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)在血管新生方面起重要作用<sup>[20]</sup>。事实上,VEGF 在血管新生之前其表达已增加,给予外源性的 VEGF 能使脑血管生成明显增加;脑梗死后,缺血区周围神经元及胶质细胞 bFGF 表达增加,能促进血管新生。刘深等<sup>[19]</sup>在研究脑梗死大鼠模型时发现,通心络通过调节 Ang-1 与 ET-1 的表达亦能促进血管新生。发生脑缺血后,Ang-1 能促进缺血脑组织及其侧支的血液循环并使血管稳定,进而延缓了血管的退化,加强了内皮细胞间联系的紧密程度,并能使血脑屏障得以维持完整,改善了缺血脑组织后血流灌注能力,促进了脑缺血后的神经功能快速恢复。

在寻找 CSVD 的治疗目标时,本研究探讨 PDE3 异构体特异性 miRNA 是否与脑内皮细胞信号转导有关,这种基于 miRNA 的调节剂将是下一步研究疾病进展的潜在药物靶标。为挽救缺血性半影,并最大限度地减少 CSVD 导致的损伤,重点应放在具有神经保护和神经恢复结果的靶标上,如内皮功能障碍是 CSVD 的初步标志,改善内皮功能可有助于改善脑血液循环<sup>[21]</sup>。本研究观察益气活血方对 pMCAO 后脑微循环障碍的影响,并进一步探讨其调节缺血性脑梗死微血管保护的潜在机制,结果显示,益气活血方能通过增加毛细血管中的脑血容量来缓解脑微循环障碍,益气活血方组脑梗死体积较 pMCAO 模型组明显减小,神经元丢失减少,脑微血管处于开放状态,损伤程度显著降低;且益气活血方组 VEGF、Ang-1、ET-1 含量和 miR-27a-3p mRNA 较 pMCAO 模型组均明显升高, PDE3A 蛋白表达较 pMCAO 模型组明显降低。

综上,益气活血方能通过作用于 miRNA-27a-3p/PDE3A 信号轴调节血管活性因子 VEGF、ANG-1 和 ET-1 水平,进而改善缺血性脑梗死微血管损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

[1] Teng ZJ, Dong YH, Zhang DD, et al. Cerebral small vessel disease and post-stroke cognitive impairment [J]. *Int J Neurosci*, 2017, 127 (9): 824–830. DOI: 10.1080/00207454.2016.1261291.

[2] 维埃拉, 崔兰. 磷酸二酯酶 3 抑制剂的临床应用研究进展 [J]. *延边大学医学学报*, 2018, 41 (2): 152–155. DOI: 10.16068/j.1000-1824.2018.02.024.

Vieira, Cui L. Research progress on clinical application of phosphodiesterase 3 inhibitors [J]. *J Med Sci Yanbian Univ*, 2018,

41 (2): 152–155. DOI: 10.16068/j.1000-1824.2018.02.024.

[3] Movsesian M. Novel approaches to targeting PDE3 in cardiovascular disease [J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 163: 74–81. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.014.

[4] Wang J, Chen JY, Sen S. MicroRNA as biomarkers and diagnostics [J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231 (1): 25–30. DOI: 10.1002/jcp.25056.

[5] Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16 (3): 203–222. DOI: 10.1038/nrd.2016.246.

[6] Kuehbach A, Urbich C, Zeiher AM, et al. Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis [J]. *Circ Res*, 2007, 101 (1): 59–68. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.153916.

[7] Houslay M. Hypertension linked to PDE3A activation [J]. *Nat Genet*, 2015, 47 (6): 562–563. DOI: 10.1038/ng.3316.

[8] Nezu T, Hosomi N, Aoki S, et al. Endothelial dysfunction is associated with the severity of cerebral small vessel disease [J]. *Hypertens Res*, 2015, 38 (4): 291–297. DOI: 10.1038/hr.2015.4.

[9] Patterson CE, Lum H, Schaphorst KL, et al. Regulation of endothelial barrier function by the cAMP-dependent protein kinase [J]. *Endothelium*, 2000, 7 (4): 287–308. DOI: 10.3109/10623320009072215.

[10] Surapisitchat J, Beavo JA. Regulation of endothelial barrier function by cyclic nucleotides: the role of phosphodiesterases [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2011, (204): 193–210. DOI: 10.1007/978-3-642-17969-3\_8.

[11] Birk S, Edvinsson L, Olesen J, et al. Analysis of the effects of phosphodiesterase type 3 and 4 inhibitors in cerebral arteries [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 489 (1–2): 93–100. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.02.038.

[12] Dinicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, et al. Meta-analysis of cilostazol versus aspirin for the secondary prevention of stroke [J]. *Am J Cardiol*, 2013, 112 (8): 1230–1234. DOI: 10.1016/j.amjcard.2013.05.067.

[13] Horai S, Nakagawa S, Tanaka K, et al. Cilostazol strengthens barrier integrity in brain endothelial cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33 (2): 291–307. DOI: 10.1007/s10571-012-9896-1.

[14] Sugiura Y, Morikawa T, Takenouchi T, et al. Cilostazol strengthens the endothelial barrier of postcapillary venules from the rat mesentery in situ [J]. *Phlebology*, 2014, 29 (9): 594–599. DOI: 10.1177/0268355513497361.

[15] Malik R, Chauhan G, Traylor M, et al. Multiancestry genome-wide association study of 520,000 subjects identifies 32 loci associated with stroke and stroke subtypes [J]. *Nat Genet*, 2018, 50 (4): 524–537. DOI: 10.1038/s41588-018-0058-3.

[16] Nielsen LB, Wang C, Sorensen K, et al. Circulating levels of microRNA from children with newly diagnosed type 1 diabetes and healthy controls: evidence that miR-25 associates to residual beta-cell function and glycaemic control during disease progression [J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012: 896362. DOI: 10.1155/2012/896362.

[17] 王伟. 急性脑梗死静脉溶栓治疗后所致脑出血的研究进展 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2019, 26 (5): 638–640. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.05.033.

Wang W. Research progress of cerebral hemorrhage after intravenous thrombolytic therapy for acute cerebral infarction [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2019, 26 (5): 638–640. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2019.05.033.

[18] Topakian R, Barrick TR, Howe FA, et al. Blood-brain barrier permeability is increased in normal-appearing white matter in patients with lacunar stroke and leukoaraiosis [J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81 (2): 192–197. DOI: 10.1136/jnnp.2009.172072.

[19] 刘深, 王宏涛, 魏聪, 等. 通心络胶囊治疗缺血性脑卒中作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2017, 48 (11): 2321–2326. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.028.

Liu S, Wang HT, Wei C, et al. Advances in mechanisms of Tongxinluo Capsule in treatment of ischemic stroke [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2017, 48 (11): 2321–2326. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.11.028.

[20] 尹春丽, 王耀伍, 吕佩源. 丁苯酞联合尤瑞克林对急性脑梗死患者缺血低灌注区面积的影响及临床疗效评价 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23 (6): 565–567. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.002.

Yin CL, Wang YW, Lyu PY. Evaluation of clinical therapeutic effect of butylphthalide combined with urinary kallidinogenase for treatment of patients with acute cerebral infarction and its effect on ischemic hypoperfusion area [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2016, 23 (6): 565–567. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.002.

[21] Matsumoto M. Cilostazol in secondary prevention of stroke: impact of the Cilostazol Stroke Prevention Study [J]. *Atheroscler Suppl*, 2005, 6 (4): 33–40. DOI: 10.1016/j.atherosclerossup.2005.09.003.

(收稿日期: 2020-02-03)