

基于 miRNA 微阵列探讨补阳还五汤对脑缺血大鼠神经血管单元的保护机制

陈博威¹, 徐雅倩², 唐荣梅¹, 易健², 刘柏炎¹ (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** 观察补阳还五汤对脑缺血大鼠微小 RNA(miRNA)表达谱的影响, 探讨其对脑缺血后神经血管单元(NVU)的保护机制。 **方法** 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、补阳还五汤组(5 g·kg⁻¹)及丁苯酞组(54 mg·kg⁻¹), 灌胃给药。除对照组外, 其余各组采用大脑中动脉栓塞法复制脑缺血模型。灌胃给药 7 d 后, 采用神经行为学评分评估神经功能损伤, HE 染色评估病理损伤, 免疫组化法检测脑组织中神经血管单元相关蛋白微管相关蛋白 2(MAP2)、神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和血管性血友病因子(VWF)的表达, miRNA 微阵列筛选差异表达的 miRNAs, 通过基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析差异 miRNAs 靶基因参与的主要生物学过程, 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法验证微阵列芯片结果。 **结果** 与对照组比较, 模型组大鼠神经行为学评分明显升高($P<0.01$); 缺血侧神经元排列不规整, 细胞间隙增宽, 细胞核固缩; 缺血侧脑组织中 MAP2 及 VWF 的表达降低($P<0.01$), GFAP 表达上升($P<0.01$); 共有 82 个差异表达的 miRNAs($FC\geq 1.5$ 且 $P<0.05$)。与模型组比较, 补阳还五汤组大鼠神经行为学评分降低($P<0.01$); 缺血侧神经元排列相对规整, 细胞间隙减小, 核仁较清晰; 缺血侧脑组织 MAP2 及 VWF 的表达上升($P<0.01$), GFAP 表达下降($P<0.01$); 并有 9 个差异表达的 miRNAs($FC\geq 1.5$ 且 $P<0.05$)。生物信息学分析显示核心 miRNAs 可能主要通过 IL-17 信号通路、趋化因子信号通路及 Hippo 信号通路等发挥治疗作用。与对照组比较, qRT-PCR 检测发现模型组中 rno-miR-532-5p、rno-miR-338-3p 及 rno-miR-412-5p 表达下调($P<0.01$, $P<0.05$), rno-miR-211-3p 及 rno-miR-494-3p 表达上调($P<0.01$, $P<0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤组 rno-miR-532-5p、rno-miR-338-3p 及 rno-miR-412-5p 表达上调($P<0.01$, $P<0.05$), rno-miR-211-3p 及 rno-miR-494-3p 表达下调($P<0.01$), 与微阵列芯片结果趋势一致。 **结论** 补阳还五汤可能通过影响脑缺血大鼠的 miRNA 表达谱, 保护神经血管单元, 发挥抗脑缺血损伤的作用。

关键词: 补阳还五汤; 脑缺血; 微小 RNA(miRNA); 微阵列; 神经血管单元(NVU); 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2022)03-0333-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2022.03.009

Exploring the Protective Mechanism of Buyang Huanwu Decoction on the Neurovascular Unit in Rats with Cerebral Ischemia Based on miRNA Microarray

CHEN Bowei¹, XU Yaqian², TANG Rongmei¹, YI Jian², LIU Baiyan¹ (1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208 Hunan, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007 Hunan, China)

Abstract: **Objective** To observe the effects of Buyang Huanwu Decoction(BHD) on miRNA expression profiles in rats with cerebral ischemia(CI) and to investigate the mechanisms underlying its protection of the neurovascular unit(NVU) after CI. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, BHD group(5 g·kg⁻¹),

收稿日期: 2021-09-20

作者简介: 陈博威, 男, 博士研究生, 研究方向: 中医药防治脑血管疾病的研究。Email: clewaychan@stu.hnucm.edu.cn。通信作者: 刘柏炎, 男, 教授, 博士研究生导师, 研究方向: 中医药防治心脑血管疾病的研究。Email: liubaiyan@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074251); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2021ZYX38); 湖南中医药大学研究生创新课题(2021CX20)。

and buphthalein group ($54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), which were treated by gavage. Each group except for the control group was modeled by using middle cerebral artery embolization method. Seven days after the intervention, neurobehavioral scores were used to assess the neurological impairment, HE staining was used to assess the pathological damage, and immunohistochemistry was performed to detect microtubule-associated protein 2 (MAP2) related to NVU proteins, glial fibrillary acidic protein (GFAP) and von Willebrand factor (VWF) in brain tissue. The differentially expressed miRNAs were screened by Agilent miRNA microarray, and the main biological processes involved in the target genes of differential miRNAs were analyzed by gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment, quantitative real-time PCR was used to verify the microarray results.

Results Compared with the control group, the neurobehavioral scores of the model rats increased significantly ($P < 0.01$), irregular arrangement, widened intercellular spaces and karyopyknosis of neurons in the ischemic side were found, and the expressions of MAP2 and VWF in the ischemic brain tissue were decreased ($P < 0.01$), the expression of GFAP was increased ($P < 0.01$), and a total of 82 differentially expressed (DE) miRNAs were observed ($FC \geq 1.5$ and $P < 0.05$). Compared with the model group, the neurobehavioral scores of rats in the BHD group were decreased ($P < 0.01$), the arrangement of neurons in the ischemic side was relatively regular, the intercellular spaces were decreased, the nucleoli were clear. The expressions of MAP2 and VWF in the ischemic side brain tissue were increased ($P < 0.01$), the expression of GFAP was decreased ($P < 0.01$), and nine DE miRNAs were identified ($FC \geq 1.5$ and $P < 0.05$). Bioinformatics analysis revealed that core miRNAs may exert therapeutic effects mainly through IL-17 signaling pathway, chemokine signaling pathway, and Hippo signaling pathway. Compared with the control group, qRT-PCR revealed that the expressions of rno-miR-532-5p, rno-miR-338-3p, and rno-miR-412-5p were downregulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while rno-miR-211-3p and rno-miR-494-3p were upregulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the expressions of rno-miR-532-5p, rno-miR-338-3p and rno-miR-412-5p were upregulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and the expressions of rno-miR-211-3p and rno-miR-494-3p were downregulated ($P < 0.01$) in the BHD group, which were consistent with the trend of the microarray results. **Conclusion** BHD may play a role against CI injury by affecting the miRNA expression profile and protecting the NVU in rats with CI.

Keywords: *Buyang Huanwu* Decoction; cerebral ischemia; microRNA (miRNA); microarray; neurovascular unit (NVU); rats

缺血性脑血管病具有高发病率和高致残率的特点,造成了极大的医疗负担^[1],目前西医治疗脑缺血的临床效果仍难以让人满意。补阳还五汤是治疗缺血性中风的经典方剂,其疗效已得到循证医学的证实^[2]。本课题组前期研究发现补阳还五汤能通过诱导神经再生^[3]、促进血管新生^[4]等方式,进而发挥抗脑缺血损伤的作用。然而以往研究均是基于单一通路或单一靶点,无法系统阐明补阳还五汤治疗脑缺血的分子机制。

新近研究^[5]表明,除了神经元或血管外,其他各类脑细胞亦参与了脑组织的缺血损伤过程。因此有学者^[6]提出了以神经元、微血管和胶质细胞为主要成分的神经血管单元(neurovascular unit, NVU)的概念,强调在脑缺血的治疗中,对神经血管单元的保

护可以减少脑组织损伤。微小RNA (microRNA, miRNA)是长约22nt的非编码RNA,其在大脑内有着丰富表达^[7]。研究^[8]表明,miRNA在脑缺血后与血管新生、神经功能等生理病理反应关系密切,提示miRNA在脑缺血的发生发展中有着重要作用。

本研究拟采用大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠模型,运用miRNA微阵列芯片分析补阳还五汤对脑缺血大鼠miRNA表达谱的影响,探讨其对脑缺血后神经血管单元的保护机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级雄性SD大鼠,6~8周龄,体质量(230 ± 10)g,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实

验动物生产许可证号: SCXK(湘)2019-0004, 动物质量合格证号: 430727211100455117。喂养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 级动物房, 实验单位使用许可证号: SYXK(湘)2020-0010。室温 22~26 ℃, 湿度 45%~55%, 通风, 照明昼夜规律, 适应性饲养 1 周, 大鼠自由饮水进食。本实验已通过湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(批准号: ZYFY20201215-1)。

1.2 药液制备 补阳还五汤由黄芪(批号: CK20122902)、当归(批号: TH20122201)、赤芍(批号: NG20112502)、地龙(批号: 2020090902)、川芎(批号: 20091001120)、桃仁(批号: 2020050402)及红花(批号: 2020062001)按照 120:6:4.5:3:3:3:3 的比例混合, 中药饮片均购自湖南中医药大学第一附属医院, 经本院中心实验室中药药效物质基础平台龙红萍副研究员鉴定合格。加入 5 倍蒸馏水浸泡 1 h 后, 武火 0.5 h, 文火 1.5 h, 使用 3 层纱布滤过。继续加入 3 倍蒸馏水后采用相同方法提取滤液, 合并两次滤液后使用旋转蒸发仪将药液制备为含药量 2 g·mL⁻¹ 的浓缩液, 放至 4 ℃冰箱备用。

1.3 药品与试剂 丁苯酞软胶囊, 石家庄恩必普药业有限公司, 规格: 每粒 0.1 g, 批号: H20050299; 动脉栓线, 北京西浓科技有限公司, 货号: 2432A2; RNA wait 非冻型组织保存液, 大连美仑生物技术有限公司, 货号: MA0208; TRIzol 试剂, 美国 Life Technologies 公司, 货号: 10296010; miRNA 微阵列芯片, 美国 Agilent 公司, 货号: 086243; 微管相关蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2) 抗体、神经胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 抗体和血管性血友病因子 (von Willebrand factor, VWF) 抗体, 英国 Abcam 公司, 货号依次为: ab254264、ab7260、ab216566; 即用型 SABC 试剂盒, 武汉博士德公司, 货号: SA1020。

1.4 主要仪器 2100 型生物分析仪、G2505C 型芯片扫描仪, 美国 Agilent 公司; 9700 型 PCR 仪, 美国 ABI 公司; 5418 型离心机, 德国 Eppendorf 公司; Vectra3 智能组织切片成像系统, 美国 PerkinElmer 公司。

1.5 模型的制备与评价 采用 Longa 等^[9]报道的线栓法复制大鼠脑缺血模型。术前禁食禁水 12 h, 0.3% 戊巴比妥钠按照 10 mL·kg⁻¹ 剂量腹腔注射麻醉, 取颈正中切口, 钝性分离左侧颈总、颈内、颈外动脉; 将线栓经颈总动脉送入颈内动脉, 当线栓上黑

色标记点恰好位于颈总分叉时固定线栓, 消毒并缝合皮肤。术后 2 h 进行神经行为学评分, 1~3 分为模型复制成功^[9]。

1.6 分组与给药 本课题组前期研究^[10]表明补阳还五汤以每天 5 g·kg⁻¹ 的剂量干预疗效确切, 因此本研究采用该剂量。将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组、补阳还五汤组 (5 g·kg⁻¹) 及丁苯酞组 (54 mg·kg⁻¹, 即临床等效剂量), 每组 8 只, 其中丁苯酞用生理盐水溶解稀释至 5 mg·mL⁻¹。术后 6 h 首次灌胃, 每日灌胃 1 次, 持续 7 d, 对照组、模型组给予等体积蒸馏水灌胃。

1.7 神经行为学评估 末次给药 2 h 后, 采用改良大鼠神经功能缺损评分 (modified neurological severity score, mNSS) 法对各组所有大鼠进行神经行为学评估^[11]。

1.8 缺血侧脑组织病理形态学观察 每组随机选取 5 只大鼠进行病理形态学及免疫组化检测。大鼠进行神经行为学评估后, 以 0.3% 戊巴比妥钠 10 mL·kg⁻¹ 剂量腹腔注射麻醉。打开大鼠胸腔暴露心脏, 剪开右心耳, 将注射器针头经心尖插入至主动脉端并固定好, 依次使用预冷的 100 mL 生理盐水及 250 mL 4% 多聚甲醛通过注射器进行灌注, 待心脏无血污流出及前爪、肺部颜色变成白色后断头取脑。以 4% 多聚甲醛固定脑组织后, 常规脱水、透明、包埋及切片, 以苏木素-伊红 (HE) 染色。

1.9 免疫组化法检测缺血侧脑组织 MAP2、GFAP 及 VWF 的表达 采用免疫组化法检测 MAP2、GFAP 及 VWF 的阳性细胞数量。检测步骤: 切片依次脱蜡、抗原修复及封闭。滴加一抗, 4 ℃ 孵育过夜后加入二抗, 室温孵育 1 h。常规 DAB 染色后用苏木素复染并封片。使用智能组织切片成像系统进行全片扫描, 并从脑组织缺血侧采集图像。运用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算单位面积阳性细胞数。

1.10 miRNA 微阵列芯片检测 每组随机选取 3 只大鼠进行 miRNA 微阵列芯片分析。大鼠进行神经行为学评估后, 以 0.3% 戊巴比妥钠 10 mL·kg⁻¹ 腹腔注射麻醉后直接断头取脑, 冰上操作迅速分离缺血侧脑组织, 放入预先盛满 RNA wait 液的冻存管中, 严格按照操作流程保存, 送至上海欧易生物进行芯片检测。采用 TRIzol 法提取总 RNA, RNA 浓度及质量经检测合格后, 进行 miRNA 芯片杂交及后续的数据分析。

1.11 基因本体(gene ontology, GO)分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析 首先使用 miRDB 和 miRWalk 数据库预测差异表达的 miRNAs 的靶基因, 随后运用欧易生物信平台(<https://cloud.oebiotech.cn>)的富集分析模块, 将靶基因进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析。

1.12 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)验证 将 miRNA 芯片检测后的剩余样本进行 qRT-PCR 验证。选取了 5 个差异表达的 miRNAs 进行验证。实验过程严格参照试剂盒步骤, 内参基因选用 U6, 引物由上海欧易生物设计, 并由北京擎科新业生物合成。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因的相对表达量, 各引物序列详见表 1(引物序列下游由委托公司试剂盒自带, 不提供引物下游具体序列及引物长度)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名	引物序列上游(5'→3')
U6	CAAGGATGACACGCAAAATTCG
rno-miR-211-3p	GCAAGGACAGCAAAGGGGG
rno-miR-412-5p	TGCTCGACCAGCTGAAAGT
rno-miR-494-3p	ACGCGCTTGAAACATACACG
rno-miR-338-3p	TCCACATCAGTGATTTTTG
rno-miR-532-5p	CTCCATGCCTTGAGGTA

1.13 统计学处理方法 采用差异倍数(fold change, FC) ≥ 1.5 及 $P < 0.05$ 筛选差异基因^[12]。计量资料均以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计, 多组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐时采用 LSD 法进行两两比较, 若方差不齐时则采用 Tamhane's T2 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。运用 Graphpad Prism 8 软件进行统计学分析并绘图。

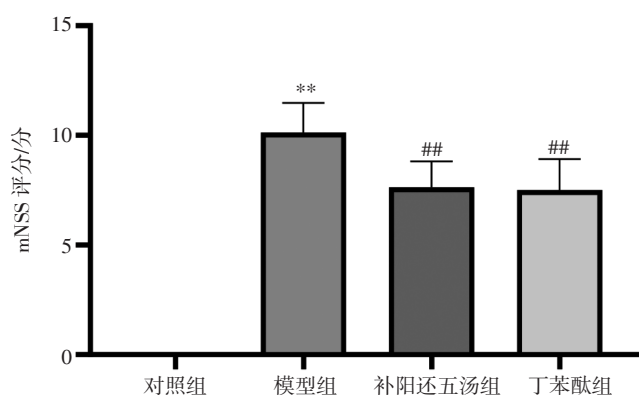
2 结果

2.1 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经行为学的影响 如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠神经行为学评分明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组比较, 补阳还五汤组与丁苯酞组大鼠神经行为学评分明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 补阳还五汤组与丁苯酞组的组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示补阳还五汤能改善脑缺血大鼠神经行为学评分。

2.2 补阳还五汤对缺血侧脑组织病理形态的影响 如

图 2 所示, HE 染色显示与对照组比较, 模型组大鼠缺血侧脑组织神经元排列不规整, 细胞间隙增宽, 细胞核固缩。与模型组比较, 补阳还五汤组与丁苯酞组大鼠脑组织神经元排列相对规整, 细胞间隙减小, 核仁较清晰。

2.3 补阳还五汤对脑缺血大鼠 NVU 的影响 如图 3 所示, 脑缺血大鼠缺血侧脑组织中 MAP2 和 VWF 的阳性细胞数明显低于对照组大鼠, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 补阳还五汤或丁苯酞治疗后, MAP2 和 VWF 的阳性细胞数明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。此外与对照组比较, 缺血侧脑组织中 GFAP 阳性细胞数亦增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 补阳还五汤组和丁苯酞组 GFAP 阳性细胞数



注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

图 1 补阳还五汤对脑缺血大鼠神经行为学的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Figure 1 Effects of Buyang Huanwu decoction on neurobehavior of middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

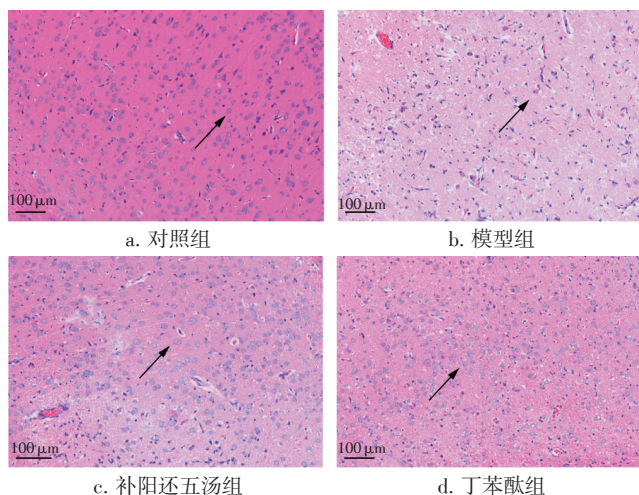
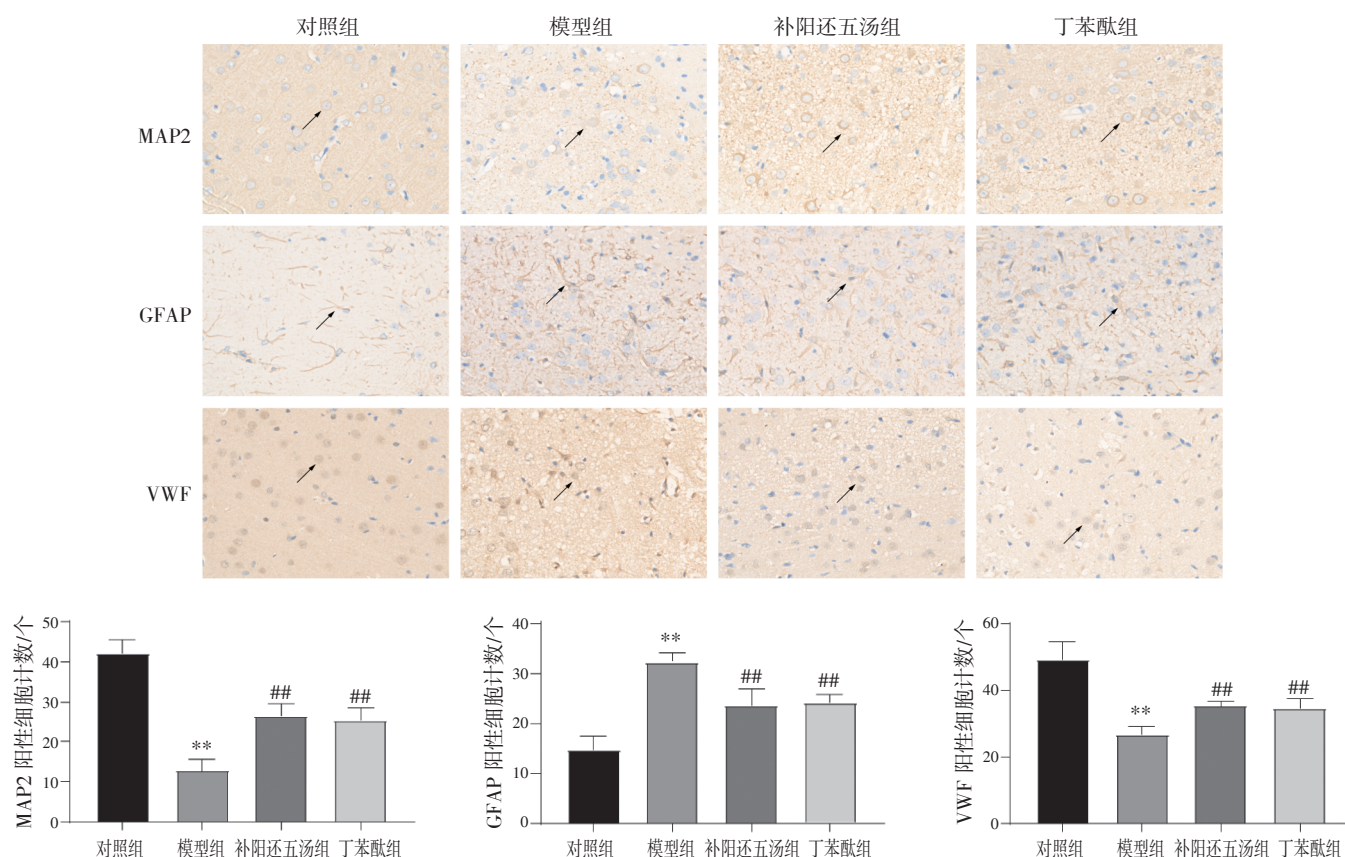


图 2 补阳还五汤对脑缺血大鼠脑组织病理形态学的影响 (HE 染色, $\times 100$)

Figure 2 Effects of Buyang Huanwu Decoction on brain pathomorphology of MCAO rats (HE staining, $\times 100$)



注：与对照组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，## $P < 0.01$

图 3 补阳还五汤对脑缺血大鼠缺血侧脑组织神经血管单元(NVU)的影响(免疫组化, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 3 Effects of Buyang Huanwu Decoction on NVU in ischemic side brain tissue of MCAO rats (immunohistochemistry, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

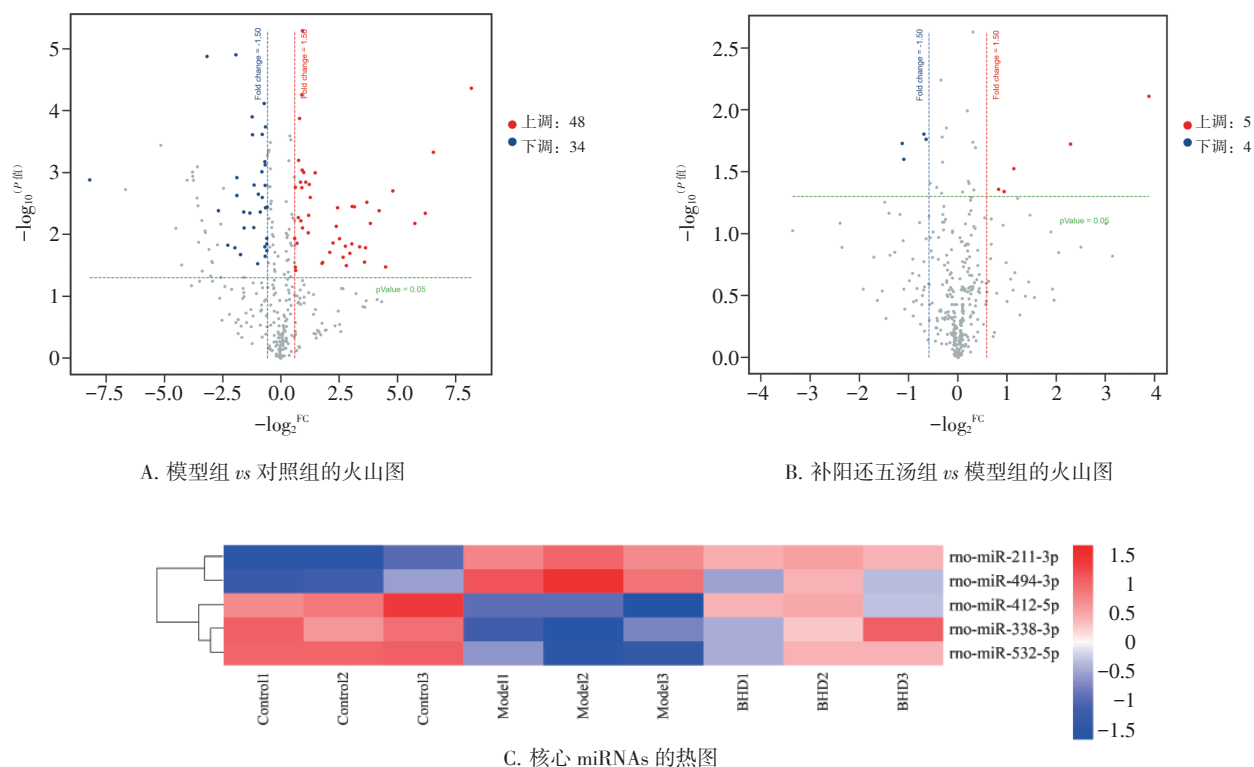
减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。提示补阳还五汤能够在脑缺血后保护神经血管单元。

2.4 差异 miRNA 的筛选 结果见图 4。基于 miRNA 微阵列芯片, 发现大鼠在脑缺血后有 82 个差异表达的 miRNAs, 其中 48 个上调, 34 个下调($FC \geq 1.5$ 且 $P < 0.05$); 另外经补阳还五汤干预后, 脑缺血大鼠组织有 9 个差异表达的 miRNAs, 其中 5 个上调, 4 个下调($FC \geq 1.5$ 且 $P < 0.05$), 详见图 4-A 及图 4-B。通过对两次比较中的差异基因进行交集分析, 发现补阳还五汤能够逆转在脑缺血后表达水平失调的 5 个 miRNAs 的表达水平, 其中 rno-miR-211-3p 及 rno-miR-494-3p 在脑缺血后表达上调, 经补阳还五汤干预后表达下降; rno-miR-412-5p、rno-miR-338-3p 及 rno-miR-532-5p 在脑缺血后表达下调, 经补阳还五汤干预后表达上升, 详见图 4-C。推测这 5 个 miRNAs 可能是补阳还五汤的核心作用靶点。

2.5 差异 miRNA 靶基因预测及其生物信息学分析 结果见图 5、图 6。使用 miRDB 和 miRWalk 在线数据库预测 5 个核心 miRNAs 的靶标 mRNAs, 最终选

择被 2 个数据库同时预测到的 31 个 mRNAs 进行下一步分析, 见图 5。发现靶标 mRNAs GO 功能的生物过程主要为调节凋亡过程及 dsRNA 转运等; 细胞组成主要为转录因子 AP-1 复合物与 THO 复合物等; 分子功能主要为转运活性与双链 RNA 结合等, 详见图 6-A。KEGG 通路富集分析结果主要为 IL-17 信号通路、趋化因子信号通路及 Hippo 信号通路等, 详见图 6-B。

2.6 差异 miRNAs 的 qRT-PCR 验证 结果见图 7。通过 qRT-PCR 验证基因芯片结果, 发现与对照组比较, rno-miR-532-5p、rno-miR-338-3p 及 rno-miR-412-5p 在模型组中表达下调, rno-miR-211-3p 及 rno-miR-494-3p 在模型组中表达上调, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$); 与模型组比较, 补阳还五汤组中 rno-miR-532-5p、rno-miR-338-3p 及 rno-miR-412-5p 表达上调, rno-miR-211-3p 及 rno-miR-494-3p 下调, 差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结果均与微阵列芯片结果趋势一致, 表明芯片结果具有一定的可靠性。



注: Control, 对照组; Model, 模型组; BHD, 补阳还五汤组

图 4 补阳还五汤对脑缺血大鼠缺血侧脑组织 miRNA 表达谱的影响

Figure 4 Effects of Buyang Huanwu Decoction on miRNA expression profiles in the ischemic brain tissue of MCAO rats

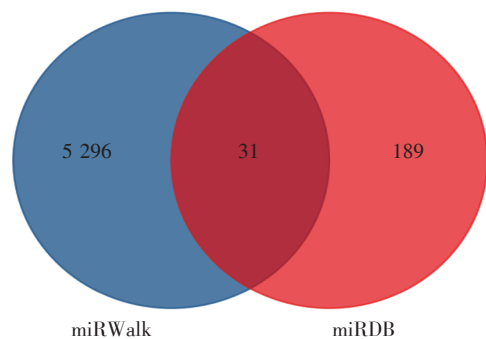


图 5 核心 miRNAs 在 miRDB 和 miRWalk 数据库同时预测到的靶标 mRNAs

Figure 5 Target mRNAs of core miRNAs in miRDB and miRWalk database

3 讨论

脑缺血的发病机制非常复杂,其神经损伤是由众多因素和机制相互作用引起的复杂病理变化。神经血管单元作为一个整体结构,在维持正常的大脑结构和功能方面发挥着重要作用。目前单一神经元保护剂对缺血性脑损伤的保护作用十分有限,因此,保护神经血管单元的多成分治疗是治疗脑缺血的重要途径^[13]。中医药具有多成分多靶点的特征,可对不同的疾病病理产生协同作用,为脑缺血的治疗提供了新

思路^[14]。补阳还五汤由清代著名医家王清任所创,专用于中风气虚血瘀证的治疗。越来越多的证据表明补阳还五汤对脑血管具有保护作用,如有研究表明补阳还五汤不仅可以在脑缺血后,上调沉默信息调节因子 1/血管内皮生长因子(sirtuin 1/vascular endothelial growth factor, SIRT1/VEGF)通路,促进血管新生^[15];而且还通过改善脑缺血大鼠的突触可塑性来促进神经功能恢复^[16]。

神经元是神经血管单元的基本单位和核心组成部分,微管相关蛋白 2(MAP2)是成熟神经元的特异性标志物,MAP2 的表达下降可以反映成熟神经元的损伤^[17]。星形胶质细胞是中枢神经系统中最丰富的神经胶质细胞。它们不仅参与神经血管单元的组成,还为神经元提供结构和营养支持^[18]。神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)是星形胶质细胞中的骨架蛋白,其表达水平可以反映星形胶质细胞的活化^[17]。血管性血友病因子(VWF)通常用于标记血管内皮细胞^[19]。因此,MAP2, GFAP 和 VWF 可以反映脑缺血后神经血管单元主要成分(神经元、星形胶质细胞和微血管)的病理损伤。本研究发现补阳还五汤改善了脑缺血大鼠神经行为学评分及缺血侧脑组织的病理形态,也发现脑缺血后 MAP2 和 VWF 阳性细胞数量减少,

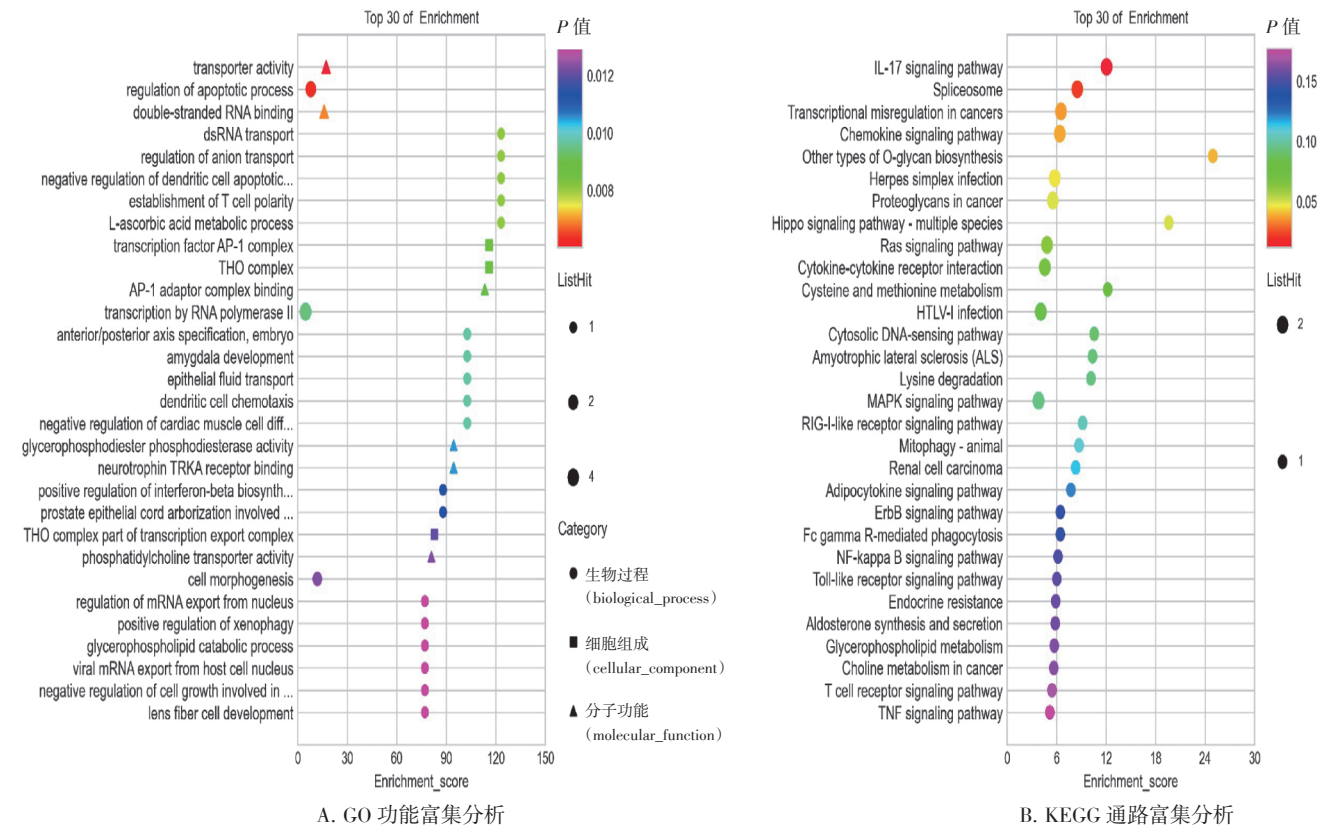
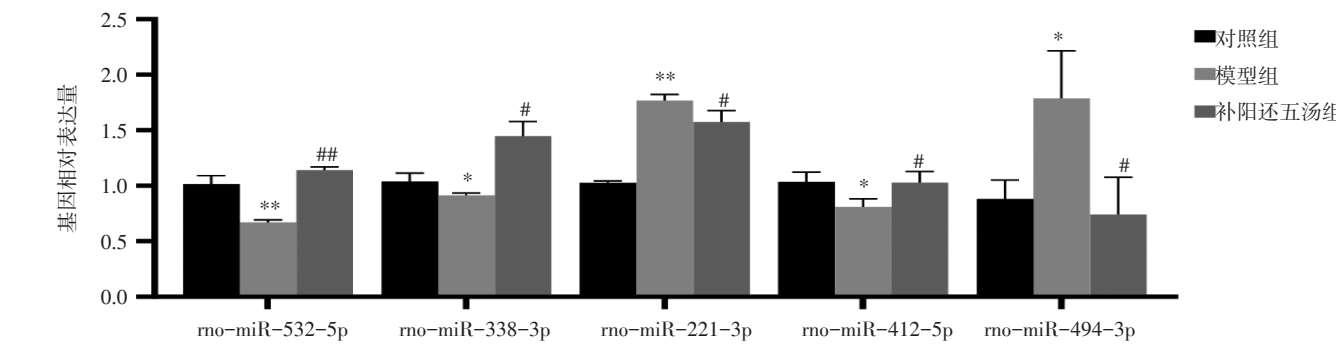


图 6 31 个共同靶标 mRNA 的富集分析
Figure 6 Enrichment analysis of 31 target mRNAs



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

图 7 各组差异表达 miRNAs 的验证 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Figure 7 Validation of differentially expressed miRNAs ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

GFAP 阳性细胞数量增加，补阳还五汤可以逆转上述变化。结合上述结果，本课题组推测补阳还五汤可抑制脑缺血大鼠脑组织星形胶质细胞的过度活化，减少缺血诱导的神经元和血管内皮细胞损伤，对脑缺血后神经血管单元有保护作用。但仍尚未完全系统阐明补阳还五汤治疗脑缺血的分子机制。

目前，基于微阵列芯片的高通量检测手段能够从整个转录组水平探讨药物的治疗机制，并已逐渐用于筛选中医证候特异性标志物及中药药效机制研

究^[20-21]。本研究发现脑缺血后有 84 个表达失调的 miRNAs，补阳还五汤干预后，会逆转其中 5 个差异 miRNAs 的表达水平。相关文献亦证实了相关 miRNA 的抗脑缺血损伤作用：如 miR-211 可损害轴突分化并降低神经元活力^[22]，且 miR-211 的过表达抑制神经细胞增殖并促进凋亡^[23]；PC12 细胞的缺氧复氧模型中 miR-494 表达上调，沉默 miR-494 后会抑制 PC12 细胞凋亡^[24]；脑缺血后小鼠脑组织中 miRNA-338 表达明显下降，miR-338 过表达则降低了脑缺血

小鼠的神经功能缺损和脑梗死体积^[25]；miR-532可以减少脑缺血后的梗死体积，并改善神经功能，此外miR-532亦可减轻糖氧剥夺后的N2a细胞的凋亡及细胞活力下降，具有抗脑缺血损伤的作用^[26]。同时，本研究通过qRT-PCR验证了各组大鼠上述miRNAs的表达水平，进一步印证了本研究的准确性。

KEGG通路富集分析进一步预测了差异miRNAs的潜在功能，结果发现IL-17信号通路、趋化因子信号通路及Hippo信号通路可能与补阳还五汤的抗脑缺血机制密切相关。IL-17是一个细胞因子家族，在免疫以及炎症反应中具有重要作用。研究发现在脑梗死患者的外周血及脑缺血小鼠的脑组织中，IL-17的水平均明显升高，IL-17会促进脑梗死患者的中性粒细胞浸润，损害血脑屏障，并加重神经细胞凋亡^[27]。抑制IL-17的表达后，会降低神经胶质细胞的活化水平，维持神经元-胶质细胞正常的相互作用^[28]。此外，已有报道补阳还五汤能通过下调IL-17的表达从而减少皮层神经元的凋亡^[29]。趋化因子信号通路与脑缺血后的氧化应激以及炎症反应密切相关^[30]，目前已有研究^[31-32]证实补阳还五汤能通过抑制炎症反应及降低氧化应激，保护缺血侧脑组织。Hippo通路是由一系列高度保守的激酶组成，通过调节细胞增殖与凋亡的平衡来控制器官大小和组织稳态，与细胞增殖、分化及衰老等生理过程起相互调控作用^[33]。新近研究^[34]表明，在内皮细胞中Hippo通路能够与VEGF通路形成串话，维持血管新生效应，提示Hippo通路可能是作为VEGF的效应器，参与调控血管新生的过程。上述通路与神经血管单元主要成分神经元、胶质细胞及血管内皮细胞均密切相关，本课题组推测补阳还五汤在脑缺血后可能通过上述通路，保护神经血管单元，发挥抗脑缺血损伤的作用。

综上所述，补阳还五汤能够改变脑缺血大鼠脑组织的miRNA表达谱，这些差异表达的miRNAs可能通过影响IL-17信号通路、趋化因子信号通路及Hippo等信号通路，在脑缺血后保护神经血管单元各主要成分，发挥抗脑缺血损伤的作用，但针对这些信号通路仍需进一步的验证。本研究为进一步明确补阳还五汤治疗脑梗死的分子机制提供了方向。

参考文献：

- [1] MENDELSON S, PRABHAKARAN S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: a review[J]. JAMA, 2021, 325(11): 1088-1098.
- [2] JIANG C, XU Y, ZHANG W, et al. Effects and safety of Buyang-Huanwu Decoction for the treatment of patients with acute ischemic stroke: a protocol of systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2020, 99(23): e20534.
- [3] LIU B, CAI G, YI J, et al. Buyang Huanwu Decoction regulates neural stem cell behavior in ischemic brain[J]. Neural Regen Res, 2013, 8(25): 2336-2342.
- [4] 田兆华, 刘柏炎. 补阳还五汤对局灶性脑缺血大鼠血管新生的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(3): 193-198.
- [5] XUE Q, LIU Y, QI H, et al. A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat[J]. Int J Biol Sci, 2013, 9(2): 174-189.
- [6] LO E. Degeneration and repair in central nervous system disease[J]. Nat Med, 2010, 16(11): 1205-1209.
- [7] KIM C, PAK T. miRNA degradation in the mammalian brain[J]. AM J Physiol-Cell PH, 2020, 319(4): 624-629.
- [8] STAMATOVIĆ S, PHILLIPS C, MARTINEZ-REVOLLAR G, et al. involvement of epigenetic mechanisms and non-coding RNAs in blood-brain barrier and neurovascular unit injury and recovery after stroke[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 864.
- [9] LONGA E, WEINSTEIN P, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [10] CAI G, LIU B, LIU W, et al. Buyang Huanwu Decoction can improve recovery of neurological function, reduce infarction volume, stimulate neural proliferation and modulate VEGF and Flk1 expressions in transient focal cerebral ischaemic rat brains[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 113(2): 292-299.
- [11] 周胜强, 李博, 王琦, 等. 芪仙通络方及其拆方对脑梗死大鼠神经功能及神经营养因子表达的影响[J]. 中国中医急症, 2021, 30(8): 1345-1349.
- [12] ZHANG Z, YUE L, WANG Y, et al. A circRNA-miRNA-mRNA network plays a role in the protective effect of diosgenin on alveolar bone loss in ovariectomized rats[J]. BMC Complement Med, 2020, 20(1): 220.
- [13] BANKS W, KOVAC A, MOROFUJI Y. Neurovascular unit crosstalk: pericytes and astrocytes modify cytokine secretion patterns of brain endothelial cells[J]. J Cerebr Blood F Met, 2018, 38(6): 1104-1118.
- [14] REN L, ZHENG X, LIU J, et al. Network pharmacology study of traditional Chinese medicines for stroke treatment and effective constituents screening[J]. J Ethnopharmacol, 2019, 242: 112044.
- [15] ZHENG X, SHAN C, XU Q, et al. Buyang Huanwu decoction targets SIRT1/VEGF pathway to promote angiogenesis after cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Front Neurosci, 2018, 12: 911.
- [16] PAN R, CAI J, ZHAN L, et al. Buyang Huanwu decoction facilitates neurorehabilitation through an improvement of synaptic plasticity in cerebral ischemic rats[J]. BMC Complement Altern

[1] MENDELSON S, PRABHAKARAN S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: a review[J].

- Med, 2017, 17(1): 173.
- [17] 李姣, 潘治斌, 徐仁仞. 神经前体细胞、神经元细胞、神经胶质细胞的生物标志物[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(8): 2273-2280.
- [18] KUGLER E, GREENWOOD J, MACDONALD R. The “neuro-glial-vascular” unit: the role of glia in neurovascular unit formation and dysfunction[J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 732820.
- [19] 刘抒雯, 杨丽华, 马春, 等. 中医药保护脑缺血再灌注损伤后神经血管单元的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 225-234.
- [20] 周明旺, 李盛华, 邓昶, 等. 血瘀质非创伤性股骨头坏死miRNA差异表达筛选及生物信息学分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(8): 36-40.
- [21] 林志东, 卢贺, 卢耀鸣, 等. 基于转录组测序分析鹿茸干预骨关节炎大鼠后的基因表达差异[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(7): 802-809.
- [22] FAN C, WU Q, YE X, et al. Role of miR-211 in neuronal differentiation and viability: implications to pathogenesis of Alzheimer’s disease[J]. Front Aging Neurosci, 2016, 8: 166.
- [23] LI E, ZHAO P, JIAN J, et al. LncRNA MIAT overexpression reduced neuron apoptosis in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic injury through miR-211/GDNF[J]. Cell Cycle, 2019, 18(2): 156-166.
- [24] SONG S, LIN F, ZHU P, et al. Extract of *Spatholobus suberectus* Dunn ameliorates ischemia-induced injury by targeting miR-494[J]. PloS One, 2017, 12(9): e184348.
- [25] YI X, FANG Q, LI L. MicroRNA-338-5p alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting connective tissue growth factor through the adenosine 5’-monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway[J]. Neuroreport, 2020, 31(3): 256-264.
- [26] SHI Y, YI Z, ZHAO P, et al. MicroRNA-532-5p protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by directly targeting CXCL1[J]. Aging, 2021, 13(8): 11528-11541.
- [27] ZHANG Q, LIAO Y, LIU Z, et al. Interleukin-17 and ischaemic stroke[J]. Immunology, 2021, 162(2): 179-193.
- [28] LUO H, LIU H, ZHANG W, et al. Interleukin-17 regulates neuron-glial communications, synaptic transmission, and neuropathic pain after chemotherapy[J]. Cell Rep, 2019, 29(8): 2384-2397.
- [29] 殷坚, 陈红艳, 陈安, 等. 补阳还五汤对脊髓损伤后大鼠大脑皮层运动神经元IL-17表达的影响[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(21): 4028-4031.
- [30] 周秉博, 郝胜菊, 张庆华, 等. 趋化因子基因家族在脑缺血再灌注损伤中的表达及意义[J]. 中国优生与遗传杂志, 2019, 27(12): 1409-1411.
- [31] 易健, 黄昕, 俞悦, 等. 补阳还五汤对大鼠脑缺血后白细胞介素-1 β 和肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2010, 22(10): 599-601.
- [32] 巫芳华, 刘玉莲, 高宇容, 等. 补阳还五汤通过甲酰肽受体2减轻大鼠脑缺血再灌注后氧化应激损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 9-15.
- [33] ZHANG X, ABDELRAHMAN A, VOLLMAR B, et al. The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12): 21.
- [34] WANG X, FREIRE-VALLS A, SCHERMANN G, et al. YAP/TAZ orchestrate VEGF signaling during developmental angiogenesis [J]. Dev Cell, 2017, 42(5): 462-478.

(编辑: 修春)