

## • 综 述 •

## 循环 MicroRNA 在缺血性脑卒中后血管新生通路中的调控作用的研究进展

张晓晗 陈丽霞

【中图分类号】 R743.3    【文献标识码】 A    【文章编号】 1007-0478(2021)01-0107-03  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2021.01.024

缺血性脑卒中(Ischemic stroke, IS)是指由于局部脑组织血液供应障碍所产生的脑组织缺血坏死及神经功能缺损的一类疾病,是导致人类死亡和残疾的首要原因<sup>[1]</sup>。IS 的发病基础为脑组织缺血缺氧。因此,治疗 IS 的关键点是怎样使血供早期恢复。最新研究证明,特定 MicroRNA(MiRNA)在 IS 的发生发展过程中可通过调控血管新生通路来参与脑缺血后的保护和恢复机制。因此,本研究就循环 MiRNA 在 IS 后血管新生通路中的调控作用的研究进展作一阐述。

## 1 MiRNA 简述

MiRNA 是一类大小仅为 18~24 个核苷酸长度的非编码小分子 RNA,广泛存在于动物、植物、真菌、病毒及人体中。MiRNA 的存在形式多样,它最原始的形式为 pri-miRNA,进而在 RNA 聚合酶 III 核酸内切酶的裂解作用下形成 MiRNA 前体。后者在输出蛋白 5 的帮助下从原来的细胞核迁入至细胞质,并通过双链 RNA 转移性内切酶 Dicer 的加工最终变为成熟的单链 MiRNA。MiRNA 与靶基因 mRNA 上的 3'-非翻译区(3'-untranslated region, 3'-UTR)相结合,进而降解 mRNA 或者抑制翻译<sup>[2]</sup>。虽然到现在为止只发现了数千种 MiRNA,但每一种 MiRNA 可以有多个目的基因,并且 MiRNA 还可能调控着人们超过 1/2 的基因<sup>[3]</sup>,有研究证明, MiRNA 既能在组织中表达,又可以离开组织细胞进入血液,并在血液中稳定存在,成为循环 MiRNA<sup>[4]</sup>,后者在很多疾病的进展过程中都发挥着显著作用,比如癌症、心血管疾病、代谢性疾病、糖尿病和病毒感染机制等<sup>[5]</sup>。

## 2 循环 MiRNA 与 IS 后血管新生

IS 后机体可开启脑组织缺血缺氧区及周围组织的一种再生反应—血管生成。脑的血管生成分为血管发生、血管新生、动脉形成 3 个过程。以上过程既相互联系又有所区别,而其中最关键的部分则为血管新生<sup>[6]</sup>。血管新生即从先前的血管构造上生长出新的微血管的过程,它包括 3 个连续的

步骤:①血管舒张,血管壁通透性升高,基底膜降解;②内皮细胞激活、增生、迁移;③新管腔形成及重塑。内皮细胞的激活、增殖、迁移和血管管腔生成功能在 IS 的血管修复及代偿性循环中起着重要的积极作用<sup>[7]</sup>。循环 MiRNA 与 IS 关系紧密,它在 IS 的发生发展、诊断、治疗和预测方面具有至关重要的意义,并且可能作为 IS 前期诊断的标志物和初期治疗的靶标。MiRNA 在神经系统中广泛存在,大脑中独有的 MiRNA 包含 miR-9, miR-124a, miR-124b, miR-135, miR-153, miR-183 和 miR-219<sup>[8]</sup>。据科学证据表明,脑缺血后有明确的新生的微血管形成。据推断,特定 MiRNA 也能调控缺血的脑组织生成新的微血管。在所有 IS 患者(尤其是临床转归良好者)的血液中均能检测到 miR-320 表达轻度下调,特别是患有心源性脑栓塞的患者<sup>[9]</sup>。在脑缺血大鼠模型的脑细胞和血液中同样发现了类似结果<sup>[10]</sup>。调控新血管形成的特定 MiRNA 有两大类,一为促进新血管形成的 MiRNA,二为阻止新血管形成的 MiRNA。有些文献总结了与血管新生相关的 MiRNAs,其中促血管新生的有 miR-17-92, let-7, miR-27b, miR-126, miR-130a, miR-210, miR-296, miR-378, miR-21, miR-31, 抑制血管新生的有 miR-15/16, miR-424, miR-221/222, miR-92a, miR-320, miR-200b, miR-217, miR-503, miR-34, miR-214<sup>[11]</sup>。若抑制抗血管新生的 MiRNA 的表达,则可以解除对血管新生的抑制,进而促进血管生成,加速受损血管愈合。因此,进一步认识与血管新生有关的 MiRNA,在探求调节血管新生的新型治疗方式中起着积极作用。

## 3 循环 MiRNA 与血管新生通路

MiRNA 是绝大多数血管新生过程中的主要调节因子,它通过调控血管新生通路在 IS 发生发展、诊断及治疗过程中发挥着关键作用。

### 3.1 Notch 信号通路

血管新生是指血管新生即从先前的血管构造上生长出新的微血管的过程,涉及众多生长因子和信号通路<sup>[12]</sup>,其中包括 Notch 信号通路。1917 年 Morgan 等发现果蝇翅膀边缘有缺损是因为其体内缺乏某种基因所致,因此给该基因命名为“Notch”(缺损)<sup>[13]</sup>。Notch 信号通路主要包括受体(Notch1, Notch2, Notch3, Notch4)、配体(Delta like 1 即 DLL1, DLL3, DLL4 和 Jagged1, Jagged2), CSL—DNA 结合蛋白以及其他效应分子和调节分子<sup>[14]</sup>。有研究表明 Notch

基金项目:哈尔滨医科大学附属第二医院中青年创新科学研究基金

作者单位:150000 哈尔滨医科大学附属第二医院神经内科[张晓晗 陈丽霞(通信作者)]

受体以及其配体在哺乳动物胚胎器官的发育形成阶段都存在广泛表达<sup>[15]</sup>。众所周知,血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种高度特异性的促进血管内皮细胞生长的因子,能引起血管壁通透性升高,促进血管内皮细胞的激活、增殖、迁移和管腔生成<sup>[16]</sup>。有研究表明 Notch 信号通路的配体 DLL4 过表达可负性调节 VEGF 的表达,进而抑制血管内皮细胞的增殖及迁移<sup>[12]</sup>。Ryosuke Kikuchi 等<sup>[17]</sup>采用没有 VEGF 诱导的小鼠后肢缺血模型,发现匹伐他汀可以通过 Notch1 介导血管生成和动脉形成。Notch 信号通路可以调节血管新生的下游的 VEGF 和上游的肝配蛋白 B2(Ephrin B2),Ephrin B2 反向信号已经被证明在胚胎的血管生成中起着无法替代的作用。由此可知,Notch 信号通路在调控成人血管新生中有着举足轻重的地位。Jie 等<sup>[18]</sup>研究发现,IS 模型鼠中 miR296 通过上调 VEGF 和下调 Notch1 来促进缺血性脑卒中后的脑血管新生。Fan 等<sup>[19]</sup>研究发现在大脑中动脉闭塞小鼠模型中脑梗死面积增大和脑细胞凋亡明显增多,miR-384-5p, VEGF 的表达水平降低, DLL4 的表达增加。其研究表明 miR-384-5p 负调节 DLL4 的表达,从而进一步下调 Notch 信号通路。当 miR-384-5p 过表达或 DLL4 沉默时成血管细胞(Endothelial progenitor cells, EPC)的细胞增殖和血管新生得到促进,细胞凋亡得到抑制。Liu 等<sup>[20]</sup>研究发现,miR-137 通过激活 Notch 信号通路来靶向抑制 NR4A2,从而促进 IS 小鼠的成血管细胞增殖和血管新生。Ling 等<sup>[21]</sup>通过研究证明 miR-376b-5p 通过靶向 HIF-1 $\alpha$ (缺氧诱导因子-1 $\alpha$ )介导的 VEGF/Notch1 信号通路来阻止 HUVEC(人脐静脉内皮细胞)的新生血管形成,从而使 miRNA 成为诊治缺血性疾病的新靶标,对于 miRNA 的血管修复起到重要的启示作用。

### 3.2 PI3K/Akt 信号通路

近些年研究表明,PI3K(磷脂酰肌醇 3 激酶)-Akt(蛋白激酶 B)即 PI3K/Akt 通路,它广泛存在于细胞中,并介入各种病理生理过程的信号转导,例如细胞的生长、迁移、发育及血管新生等,是细胞内促进微血管形成的一条关键途径。PI3K 是脂质激酶家族的一员,属于细胞癌基因,是磷脂酰肌醇与肌醇的关键激酶。Akt 又称为蛋白激酶 B(Protein kinase B, PKB),属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 PI3K 重要的下游分子。在 21 年前 Kitagawa 等<sup>[22]</sup>第 1 次发现大脑血液灌注减少后可启动 PI3K/Akt 信号传导通路;苗江永等<sup>[23]</sup>研究认为当大脑血液供应不足时 PI3K/Akt 通路介入了对脑组织的保护作用。于惠贤等<sup>[24]</sup>经过探究证实 PI3K/Akt 通路的磷酸化介入了血管新生,使血流灌注不足的脑组织中毛细血管密度增加,进而促进大脑血液循环,具有保护脑组织的功能。Liang 等<sup>[25]</sup>在建立大鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)诱发永久性脑梗死的模型后通过定量聚合酶链反应(qPCR)检测到在缺血性脑卒中后大鼠脑组织和脑微血管内皮细胞(Brain microvascular endothelial cells, BMEC)中 miRNA-26a 表达水平升高,并且发现 miRNA-26a 可能通过激活 AKT 途径来上调 HIF-1 $\alpha$  的表达,从而介导 VEGF 的转录并促使 BMECs 的细胞激活、生长及生成新管腔,从而加速脑缺血大鼠模型新生血管的形成。Peng 等<sup>[26]</sup>经过研究

得出,IS 患者外周血中的 miR-221 表达水平明显降低,通过生物信息学和双重荧光素酶报告基因分析预测并证实了磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)是 miR-221 的直接靶标。miR-221 在 IS 患者中被下调,并经过在体外调节 PTEN/PI3K/AKT 途径来启动 HUVEC 的功能,提示其具有促进血管新生的能力。因此,miR-221 可能是 IS 治疗的一种新颖且有希望的治疗靶标。

### 3.3 MAPK/ERK 信号通路

在信号通路网络中 MAPK/ERK 信号通路是其主要途径之一,它在细胞的生长及分化、维持细胞正常的形态结构和功能、细胞衰老及癌变、炎症反应等多个生理过程中发挥着关键作用,也是把信号从细胞表面受体转移至细胞核的重要传输带。机体在构建新的血管过程中血管内皮需要 MAPK/ERK 信号通路的激活<sup>[27]</sup>。Liang 等<sup>[25]</sup>在建立 MCAO 诱发永久性脑梗死的模型后通过 qPCR 检测到在脑缺血性脑卒中后大鼠脑组织和 BMEC 中 miRNA-26a 表达水平升高,并且发现 miRNA-26a 可能通过激活 ERK1/2 途径来上调 HIF-1 $\alpha$  的表达,从而介导 VEGF 的转录并促使 BMECs 的细胞激活、生长及构建管腔,从而加速脑梗死大鼠模型新的血管生成。

### 3.4 核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路

NF- $\kappa$ B 信号传导通路在 IS 后出现的多种生理病理过程中广泛存在,在不受刺激的状态下胞浆中 NF- $\kappa$ B 与 NF- $\kappa$ B 抑制剂(I $\kappa$ B)结合变为三聚体复合物,以失活形式储存起来。在刺激条件下由于受多种因素影响,使得 I $\kappa$ B 被溶解,NF- $\kappa$ B 从胞浆中迁移至细胞核内并开启相关基因转录<sup>[28]</sup>。Che 等<sup>[29]</sup>研究表明,miR-132 可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 通路和促进 VEGF 来调节 IS 患者的血管新生。这些发现可能提供新的证据来支持将 miR-132 治疗用于 IS。

## 4 结束语

最近几年 IS 带来的损害越来越严重,目前对于发病时间<4.5 h 的患者来说,最有效的治疗方式是使用组织型纤溶酶激活剂实行静脉溶栓,不过由于溶栓时间窗较窄及出血风险高,真正受益的患者在临床上 $\leq 3\%$ ,因此需要积极寻找新的靶点使 IS 的治疗得到新的进展。近年来,一系列研究表明开通侧支循环能够使梗死体积减少并使脑梗死复发的概率降低<sup>[30-31]</sup>,同时也有研究证明良好的侧支代偿有利于改善治疗后的临床症状<sup>[32]</sup>。因此,血管新生是为大脑增加血流量的重要手段,同时也成为 IS 患者预后好转的关键。在未来治疗性血管新生可能为治疗 IS 患者的血运重建带来更多的突破和进展。然而由于 IS 的病理机制多且复杂,调节神经血管新生的 MiRNAs 及通路也很多,有些并未完全明确其调节机制,还有待未来进一步验证。

## 参 考 文 献

- [1] 王陇德,刘建民,杨弋,等.我国脑卒中防治仍面临巨大挑战—《中国脑卒中防治报告 2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(2):105-119.
- [2] Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis[J]. Nat

Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(8):509-524.

- [3] Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing[J]. Nat Rev Genet, 2015, 16(7):421-433.
- [4] Veremeyko T, Kuznetsova IS, Dukhinova M, et al. Neuronal extracellular microRNAs miR-124 and miR-9 mediate cell-cell communication between neurons and microglia[J]. J Neurosci Res, 2019, 97(2):162-184.
- [5] Paul P, Chakraborty A, Sarkar D, et al. Interplay between miRNAs and human diseases[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(3):2007-2018.
- [6] Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis[J]. Nat Med, 2000, 6(4):389-395.
- [7] Arai K, Jin G, Navaratna D, et al. Brain angiogenesis in developmental and pathological processes: neurovascular injury and angiogenic recovery after stroke[J]. FEBS J, 2009, 276(17):4644-4652.
- [8] Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation[J]. Genome Biol, 2004, 5(3):R13.
- [9] Tan KS, Armugam A, Sepramaniam S, et al. Expression profile of MicroRNAs in young stroke patients[J]. PLoS One, 2009, 4(11):e7689.
- [10] Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A. MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion[J]. Stroke, 2008, 39(3):959-966.
- [11] Kuehbach A, Urbich C, Dimmeler S. Targeting microRNA expression to regulate angiogenesis[J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29(1):12-15.
- [12] Chappell JC, Mouillesseaux KP, Bautch VL. Flt-1 (vascular endothelial growth factor receptor-1) is essential for the vascular endothelial growth factor-Notch feedback loop during angiogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(8):1952-1959.
- [13] Lino MM, Merlo A, Boulay JL. Notch signaling in glioblastoma: a developmental drug target? [J]. BMC Med, 2010, 8:72.
- [14] Lin JT, Chen MK, Yeh KT, et al. Association of high levels of Jagged-1 and Notch-1 expression with poor prognosis in head and neck cancer [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(11):2976-2983.
- [15] Murata A, Yoshino M, Hikosaka M, et al. An evolutionary-conserved function of mammalian notch family members as cell adhesion molecules[J]. PLoS One, 2014, 9(9):e108535.
- [16] Zhou HB, Yf Y, Hu Y, et al. Suppression of vascular endothelial growth factor via siRNA interference modulates the biological behavior of human nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Jpn J Radiol, 2011, 29(9):615-622.
- [17] Kikuchi R, Takeshita K, Uchida Y, et al. Pitavastatin-induced angiogenesis and arteriogenesis is mediated by Notch1 in a murine hindlimb ischemia model without induction of VEGF[J]. Lab Invest, 2011, 91(5):691-703.
- [18] Feng J, Huang T, Huang Q, et al. Pro-angiogenic microRNA-296 upregulates vascular endothelial growth factor and down-regulates Notch1 following cerebral ischemic injury[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(6):8141-8147.
- [19] Fan J, Xu WW, Nan SJ, 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.
- [20] Liu XL, Wang G, Song W, et al. microRNA-137 promotes endothelial progenitor cell proliferation and angiogenesis in cerebral ischemic stroke mice by targeting NR4A2 through the notch pathway[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(7):5255-5266.
- [21] Li LJ, Huang Q, Zhang N, et al. miR-376b-5p regulates angiogenesis in cerebral ischemia[J]. Mol Med Rep, 2014, 10(1):527-535.
- [22] Kitagawa H, Warita H, Sasaki C, et al. Immunoreactive Akt, PI3-K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain[J]. Neurosci Lett, 1999, 274(1):45-48.
- [23] 苗江永, 祝春华, 王力娜, 等. PI3-K/Akt 通路在脑缺血治疗中的调控机制研究[J]. 脑与神经疾病杂志, 2013, 21(1):45-48.
- [24] 于惠贤, 胡永善, 贾杰, 等. 运动训练调节 Tie-2/PI3K/AKT 通路促进脑缺血大鼠缺血区血管新生[J]. 中国运动医学杂志, 2009, 28(5):518-521, 529.
- [25] Liang Z, Chi YJ, Lin GQ, 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.
- [26] Peng H, Yang H, Xiang X, et al. MicroRNA-221 participates in cerebral ischemic stroke by modulating endothelial cell function by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(1):443-450.
- [27] Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, et al. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(6):H2836-H2846.
- [28] Zhang B, Wang D, Ji TF, et al. Overexpression of lncRNA ANRIL up-regulates VEGF expression and promotes angiogenesis of diabetes mellitus combined with cerebral infarction by activating NF- $\kappa$ B signaling pathway in a rat model[J]. Oncotarget, 2017, 8(10):17347-17359.
- [29] Che F, Du HS, Zhang WD, et al. MicroRNA-132 modifies angiogenesis in patients with ischemic cerebrovascular disease by suppressing the NF- $\kappa$ B and VEGF pathway[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2):2724-2730.
- [30] Bang OY, Saver JL, Buck BH, et al. Impact of collateral flow on tissue fate in acute ischaemic stroke[J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008, 79(6):625-629.
- [31] Lyu J, Ma N, Tian C, et al. Perfusion and plaque evaluation to predict recurrent stroke in symptomatic middle cerebral artery stenosis[J]. Stroke Vasc Neurol, 2019, 4(3):129-134.
- [32] Boers AM, Jansen IG, Berkhemer OA, et al. Collateral status and tissue outcome after intra-arterial therapy for patients with acute ischemic stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, 37(11):3589-3598.

(2020-05-09 收稿)