

促红细胞生成素通过 AMPK-KLF2 信号通路调节脑缺血后血管新生的分子机制 \*

刘敏, 王英, 王敬东 \*\*, 张凤香, 李红燕  
(青岛大学医学院附属第二医院 重症医学科, 山东 青岛 266042)

[摘 要] 目的: 探讨促红细胞生成素(EPO)通过 AMPK-KLF2 信号通路调大鼠脑缺血后血管新生的分子机制。方法: 雄性 SD 大鼠 92 只,16 只用于假手术组,剩余 76 只构建大脑中动脉栓塞(MCAo)模型;将造模成功的 64 只随机均分为脑缺血组、Compound C 组、EPO 组及 EPO + Compound C 组,建立大脑中动脉栓塞模型后及干预 7 d 时,镜下观察顶叶缺血周围区新生血管并计数全部新生血管数目,采用 RT-PCR 检测 Krueppel 样因子 2 (KLF2)、内皮一氧化氮合酶(eNOS)、血栓调节蛋白(TM)及血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 的转录水平,采用免疫印迹检测脑缺血区域的 AMPK 及 KLF2 蛋白表达。结果: 干预 7 d 时,EPO 组新生血管数量较脑缺血组增多,Compound C 组和 EPO + Compound C 组新生血管数目少于脑缺血组,EPO + Compound C 组新生血管数目多于 Compound C 组、少于脑缺血组( $P < 0.05$ );RT-PCR 结果显示,干预 7 d 时,EPO 组各 mRNA 的表达较脑缺血组升高,Compound C 组各 mRNA 的表达量低于脑缺血组,EPO + Compound C 组各 mRNA 的表达量高于 Compound C 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );免疫组化检测发现,干预 7 d 时,Compound C 组 AMPK、KLF2 表达量低于脑缺血组,EPO 治疗组 AMPK、KLF2 蛋白的表达量与脑缺血组相比增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: EPO 可通过上调 KLF2、eNOS、TM 及 VEGF mRNA 的转录水平进而促进 AMPK 蛋白的表达从而发挥对脑缺血后血管新生的调控作用。

[关键词] 促红细胞生成素; 脑缺血; 血管新生; AMPK- KLF2 信号通路

[中图分类号] R657.4      [文献标识码] A      [文章编号] 1000-2707(2019)07-0804-06

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.07.012

EPO Regulates the Molecular Mechanism of Angiogenesis after Cerebral Ischemia Through AMPK-KLF2 Signaling Pathway

LIU Min, WANG Ying, WANG Jingdong, ZHANG Fengxiang, LI Hongyan  
(Department of Critical Care Medicine, Second Affiliated Hospital of Medical College of Qingdao University, Qingdao 266042, Shandong, China)

[Abstract] Objective: To explore the molecular mechanism of angiogenesis after cerebral ischemia by erythropoietin (EPO) through AMPK-KLF2 signaling pathway. Methods: A total of 92 male SD rats of clean grade for 24 weeks were selected and 16 were used in the sham operation group. The remaining 76 models were constructed for middle cerebral artery embolization (MCAo). 11 models failed to be modeled, and 1 model was discarded. A total of 12 models were used for 64 follow-up experiments. The rats were randomly divided into 4 groups: The cerebral ischemia group, Compound C intervention group, EPO-treated group, the EPO + Compound C intervention group, with 16 rats in each group. Af-

\*[基金项目] 国家自然科学基金(31560270)  
\*\* 通信作者 E-mail: wjdwd@163.com  
网络出版时间:2019-07-18    网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190718.0040.012.html>

ter the establishment of middle cerebral artery embolization models, the number of neovascularization in parietal lobe was observed and counted under the microscope. Rot-pcr was used to test the mRNA transcription level of Krueppel-like factor 2 (KLF2) endothelial nitric oxide (TM) Thrombomodulin (TM) vascular endothelial growth factor (VEGF). Western blot (WB) was used to detect AMPK and KLF2 protein expression in ischemic areas. **Results:** The number of new blood vessels in the EPO-treated group increased as compared with the cerebral ischemia group ( $P < 0.05$ ). The number of new blood vessels in the Compound C intervention group and the EPO + Compound C intervention group decreased as compared with the cerebral ischemia group ( $P < 0.05$ ). The number of new blood vessels in the EPO + Compound C intervention group increased as compared with the Compound C intervention group, which was lower than that in the cerebral ischemia group, but there was no significant difference ( $P > 0.05$ ). Then the RT-PCR experiments showed that the expression of mRNA in the EPO-treated group increased more than that in the cerebral ischemia group. The expression of mRNA in the Compound C intervention group decreased compared with the cerebral ischemia group ( $P < 0.05$ ). The expression of mRNA in the EPO + Compound C intervention group was higher than that in the Compound C intervention group, and was less than that in the cerebral ischemia group. There was no significant difference in the cerebral ischemic group ( $P > 0.05$ ). After that the immunohistochemical detection revealed. the expression of AMPK, KLF2 in the Compound C intervention group was lower than that in the cerebral ischemia group ( $P < 0.05$ ). The expression of AMPK and KLF2 protein in the EPO-treated group was higher than that in the cerebral ischemia group ( $P < 0.05$ ). The expression of AMPK and KLF2 protein was higher in the EPO + Compound C group than in the Compound C group, which was lower than that in the cerebral ischemia group. **Conclusion:** EPO can upregulate the expression of *KLF2*, *eNOS*, *TM*, *VEGF* mRNA and promote the expression of AMPK protein to regulate angiogenesis after cerebral ischemia.

[**Key words**] erythropoietin; cerebral ischemia; angiogenesis; AMPK-KLF2 signaling pathway

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种糖蛋白激素,是哺乳动物调节红细胞生成必不可少的体液性生长因子<sup>[1]</sup>。在临床上,EPO多用于治疗肾功能不全合并的贫血、恶性肿瘤伴发的贫血及风湿病贫血等<sup>[2-3]</sup>。有研究表明他汀类药物能通过激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)上调转录因子 KLF2 的表达、增加 NO 的合成、并作用于血管内皮细胞,从而促进血管新生<sup>[4-7]</sup>。血管新生是影响动脉粥样硬化及多种缺氧、缺血性心血管疾病的病程发展和转归的重要因素<sup>[8]</sup>。Dorsomorphin (Compound C) 2HCl 是一种有效的、可逆的、选择性 AMPK 抑制剂。本研究旨在通过构建大脑中动脉栓塞动物模型,给予 Compound C 干预,观察动物新生血管数目及 AMPK-KLF2 信号通路 mRNA 和蛋白的表达情况,探究 EPO 通过 AMPK-KLF2 信号通路调节脑缺血后血管新生的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级 24 周雄性 SD 大鼠 92 只,体质量 250 ~ 280 g,由青岛大学医学院动物实验中心提供(合同号 2018-0216)。

### 1.2 动物分组与造模

**1.2.1 大脑中动脉栓塞(MCAo)模型的建立** 参考毕方方等<sup>[8]</sup>方法建模:取 250 ~ 280 g 大鼠 76 只,4% 水合氯醛麻醉固定,于颈正中纵切口,暴露右侧颈内动脉、颈总动脉和颈外动脉,准备两个动脉夹、一个动脉夹夹住颈总动脉的向心端,一个动脉夹夹住颈内动脉的远心端;用线结扎颈外动脉远心端,在颈外动脉的向心端的管壁上剪“V”形切口,通过自制 4-0 线栓经过切口绕过颈动脉窦向颈内动脉放置,结扎颈外动脉“V”切口下方;打开

颈内动脉动脉夹,再打开颈总动脉动脉夹。另 16 只大鼠(假手术组)只做手术、分离血管,但不夹闭或结扎任何血管、亦不放置线栓及不在外动脉上做切口。

**1.2.2 分组** 24 周清洁级雄性 SD 大鼠 92 只,16 只大鼠用于假手术组,76 只大鼠造模成功的 64 只,随机均分成脑缺血组、Compound C 组、EPO 组及 EPO + Compound C 组,每组 16 只。脑缺血组大鼠造模后每天腹腔注射生理盐水,Compound C 组在大鼠造模 24 h 后每天腹腔注射 Compound C 溶液 1 mL,EPO 组在大鼠造模 24 h 后每天注射 EPO 1 mL(4 000 UI/kg)。EPO + Compound C 组大鼠造模 24 h 后每天注射 Compound C 和 EPO 溶液各 1 mL,药物总剂量同 Compound C 组和 EPO 组,均注射 7 d;假手术组仅 4% 水合氯醛麻醉后固定,于颈正中纵切口,暴露右侧颈内动脉、颈总动脉和颈外动脉,不夹闭颈内动脉和用线结扎颈外动脉远心端及在颈外动脉的向心端的管壁上剪“V”形切口。

1.3 新生血管数目

显微镜下观察,完成造模和干预 7 d 时取大鼠大脑缺血皮质制片,镜下观察顶叶缺血周围区新生

血管并计数全部新生血管数目。

1.4 RT-PCR 检测

完成造模和药物干预 7 d 时,取 200 mg 大鼠大脑缺血皮质提取总 RNA,将组织放入 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL Trizol 剪碎组织,震荡 30 s,加 0.2 mL 氯仿,剧烈摇动 30 s,室温 3 min;12 000 r/min,4 ℃ 离心,15 min;计算浓度与纯度,-70 ℃ 保存。采用 RT-PCR 检测 Krueppel 样因子 2(krueppel-like factor 2, *KLF2*)、内皮一氧化氮合酶(*eNOS*)、血栓调节蛋白(thrombomodulin, *TM*)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, *VEGF*) mRNA 水平;PCR 反应体系为 10 × 扩增缓冲液(PCR Buffer × 10 μL)、脱氧核苷三磷酸底物(dNTPmix × 200 umol/L)、耐热 DNA 聚合酶(Taq 酶 × 2.5 μL)、寡聚核苷酸引物(Primer1 × 40 pmol, Primer2 × 40 pmol)、靶序列模板 DNA(1 μg)。反应条件为 95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 1 min(40 个循环)95 ℃ 30 s,61 ℃ 15 s。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测结果,以 β-actin 作为参照,计算 *KLF2*、*eNOS*、*TM* 及 *VEGF* mRNA 水平。

表 1 引物的核苷酸序列  
Tab.1 Sequence of the primers

基因名称	上游引物序列(5' to 3')	下游引物序列(5' to 3')	Product (bp)
KLF2	CACCAAGAGTTCGCATCTGA	CGTGTGCTTTCCGGTAGTGG	133
eNOS	ACCCTCACCGCTACAACATC	GCTCATTCTCCAGGTGCTTC	198
TM	GACCTCTGCGAGCACTTCTG	GGGCTCCAGTATGCAGTCAT	132
VEGF	CTACCTCCACCATGCCAAGT	AGCTGCGCTGATAGACATCC	104
β-actin	GACGGCCAGGTCATCACTAT	CGGATGTCAACGTCACACTT6	140

1.5 免疫印迹检测脑缺血区域的 AMPK 及 KLF2 蛋白表达

取 0.1 g 脑大鼠大脑缺血皮质,加 500 μL 蛋白裂解液,在冰浴下震荡 0.5 h,将液体移至 1.5 mL 离心管中,在 4 ℃ 冷冻离心机中 12 000 r/min 离心 20 min,取上清,利用 BCA 蛋白法对蛋白浓度进行测定。加入适量上样缓冲液,100 ℃ 水浴加热 5 min,使蛋白变性,8 000 r/min 离心 5 min 后上样。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分析,上样量为 20 ~ 40 μL/孔,转膜与杂交。

1.6 统计方法

采用 Graph Pad Prism 6.0 统计分析实验数据,计量资料采用平均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,正态分布的计量资料以百分数(%)表示,采用两独立

样本 *t* 检验及单因素方差分析,以 *P* < 0.5 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型成功率评价

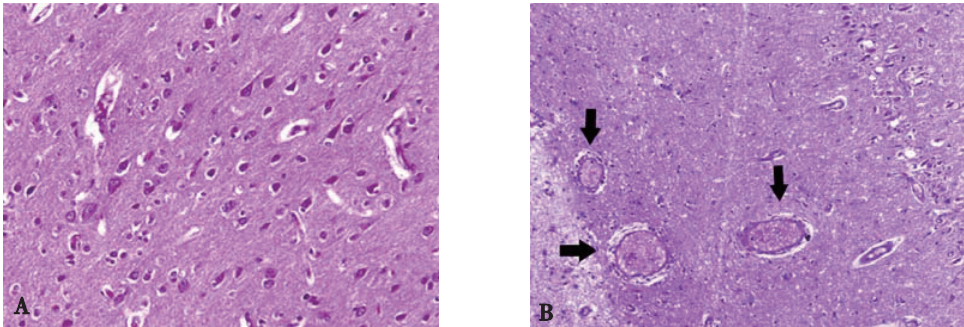
76 只建模,造模失败 12 只,1 只不明原因死亡,5 只未观察到神经功能缺损、1 只死于麻醉过量,3 只出现蛛网膜下腔出血、1 只在观察中死亡,(解剖可见左侧脑组织严重肿胀)以 Fabian 的神经功能 5 级标准评分法为标准(≥ 1 分),造模成功 64 只,模型成功率达到 85.5%。造模成功大鼠手术后 2 h 左右清醒、精神萎靡、反应迟钝、活动及进食减少甚至拒食;大鼠右前肢无力,不能抓杆且爬

杆困难;大鼠行走时,身体向右侧旋转或偏斜,身体向右侧旋转或偏斜,甚至向右侧跌倒不能行走,多数动物出现 Homers 征。65 只大鼠随机分为 4 组,弃掉 1 只。假手术组大鼠未出现明显神经功能缺损症状与体征,手术后动物进食及活动恢复较好。

2.2 显微镜下观察新生血管数目

EPO 组大鼠皮质新生血管数量较脑缺血组增

多,差异有统计学意义( $27.46 \pm 2.58$  vs  $16.21 \pm 1.22$ ,  $P < 0.05$ ), Compound C 组和 EPO + Compound C 组大鼠大脑皮质新生血管数目少于脑缺血组( $12.15 \pm 1.27$  vs  $14.32 \pm 2.11$ ,  $P < 0.05$ ), EPO + Compound C 组大鼠大脑皮质新生血管数目多于 Compound C 组,少于脑缺血组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),镜下新生血管形态见图 1。



注:A 为假手术组,示正常脑组织形态;B 为脑缺血损伤后出现新生血管,箭头所指示新生血管处

图 1 顶叶缺血周围区新生血管形态

Fig. 1 Morphology of neovascularization around parietal lobe ischemia

2.3 KLF2、eNOS、TM 及 VEGF mRNA 表达

RT-PCR 实验对各组大鼠大脑缺血皮质 KLF2、eNOS、TM 和 VEGF 的 mRNA 的表达量进行测定发现, EPO 组各 mRNA 的表达量较脑缺血组升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), Compound C

组 KLF2、eNOS、TM 和 VEGF mRNA 的表达量低于脑缺血组( $P < 0.05$ ), EPO + Compound C 组 KLF2、eNOS、TM 和 VEGF mRNA 的表达量高于 Compound C 组( $P < 0.05$ ), 低于脑缺血组,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 2。

表 2 mRNA 表达量的测定结果( $n = 16$ )  
Tab. 2 Detection results of mRNA expression levels

分组	mRNA 表达量			
	KLF2	eNOS	TM	VEGF
假手术组	$0.81 \pm 0.13$	$0.64 \pm 0.05$	$0.72 \pm 0.01$	$0.75 \pm 0.05$
脑缺血组	$0.42 \pm 0.11$	$0.29 \pm 0.04$	$0.33 \pm 0.03$	$0.25 \pm 0.03$
Compound C 组	$0.25 \pm 0.13^{(1)}$	$0.14 \pm 0.02^{(1)}$	$0.21 \pm 0.04^{(1)}$	$0.12 \pm 0.04^{(1)}$
EPO 组	$0.72 \pm 0.12^{(1)}$	$0.54 \pm 0.06^{(1)}$	$0.65 \pm 0.02^{(1)}$	$0.42 \pm 0.01^{(1)}$
EPO + Compound C 组	$0.37 \pm 0.07^{(2)}$	$0.21 \pm 0.05^{(2)}$	$0.28 \pm 0.01^{(2)}$	$0.19 \pm 0.02^{(2)}$
F	9.526	11.263	13.025	11.971
P	0.015	0.008	0.005	0.002

<sup>(1)</sup>与脑缺血组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 Compound C 组比较,  $P < 0.05$

2.4 AMPK 及 KLF2 蛋白表达

通过检测 KLF2 及 AMPK 蛋白表达水平发现, 正常组与假手术组大鼠有少量 AMPK 及 KLF2 蛋白表达,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。Compound C 组 AMPK 及 KLF2 蛋白表达水平低于脑缺血组,

差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), EPO 组 AMPK 蛋白的表达水平与脑缺血组比较有所增加, EPO + Compound C 组 AMPK 及 KLF2 蛋白的表达水平高于 Compound C 组, 低于脑缺血组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 3、图 2。

表 3 KLF2 及 AMPK 蛋白的表达水平( $n = 16$ )  
Tab. 3 Expression levels of KLF2 and AMPK protein

分组	KLF2	AMPK
假手术组	0.86 ± 0.03	0.641 ± 0.01
脑缺血组	0.60 ± 0.01	0.42 ± 0.03
Compound C 组	0.38 ± 0.02 <sup>(1)</sup>	0.22 ± 0.01 <sup>(1)</sup>
EPO 组	0.83 ± 0.04 <sup>(1)</sup>	0.62 ± 0.02 <sup>(1)</sup>
EPO + Compound C 组	0.43 ± 0.02 <sup>(1)(2)</sup>	0.31 ± 0.03 <sup>(1)(2)</sup>
<i>F</i>	5.487	9.127
<i>P</i>	0.003	0.006

<sup>(1)</sup> 与脑缺血组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup> 与 Compound C 组比较,  $P < 0.05$

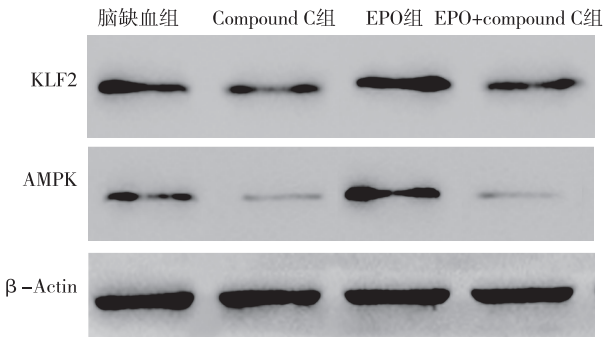


图 2 大脑皮质 AMPK 和 KLF2 蛋白  
在不同组别的表达  
Fig. 2 Expression levels of KLF2 and  
AMPK protein in different groups

3 讨论

脑缺血后,血管新生是脑微循环修复重建的重要病理过程<sup>[9]</sup>,而神经血管单元促成细胞分泌、释放促血管新生因子,例如 EPO、VEGF 等,从而促进缺血区血管生成<sup>[10]</sup>。有研究指出,EPO 的来源有血源性与脑源性两种,是一种直接促血管新生物质,可促进套式血管生长和芽生,促进 VEGF 的表达,同时促进脑血管新生和骨髓造血<sup>[11]</sup>。另 EPO 为中枢神经系统中源性的细胞因子,可通过神经元与胶质细胞的旁分泌作用,作用至神经元 EPO-R,并发挥神经保护、神经营养及调节胚胎发育的作用<sup>[12]</sup>。据报道,EPO 可引起 AMPK 和 eNOS 的磷酸化作用<sup>[13]</sup>,在此过程中,同时促进了 KLF2 蛋白质的表达水平<sup>[14]</sup>。复合物 C 或 Ad-AMPK-DN 抑制 AMPK 后限制了 KLF2 的表达上调,这是一种重组腺病毒,它编码了 AMPK 的显性负突变体<sup>[15-16]</sup>。本研究以 Compound C 为抑制剂成功建

立了 AMPK 缺陷脑缺血大鼠模型。有研究表明,KLF2 的敲除降低了 eNOS 和 VEGF,并限制了红细胞生成素的迁移和内皮细胞集落形成新生血管的能力<sup>[17]</sup>。故 AMPK 通路中 KLF2 表达的上调在 EPO 诱导血管生成中起着至关重要的作用<sup>[18-19]</sup>。本研究表明,EPO 治疗 + Compound C 干预组各 mRNA 的表达量高于 Compound C 干预组,由此结果可以推测出,加入 AMPK 抑制剂后,KLF2 的表达量下降,并且 eNOS、TM、VEGF 等 mRNA 的表达量均呈现下降的趋势。据报道,EPO 可以激活 AMPK 蛋白激酶,提高 ECs 分化,最终促进血管新生。另有研究者认为,EPO 的血管生成效应是通过 VEGF/KDR 完成的<sup>[20,21]</sup>。相反,也有研究指出,由 EPO 控制的 ECFCs 的血管生成能力依赖于 AKT 而不是 VEGF<sup>[22]</sup>。但在 ECFCs 中 EPO 的血管生成效应以及相关的分子机制,特别是转录水平的机制,仍然不清楚。而本实验研究发现,EPO 治疗组新生血管数量较脑缺血组增多,EPO 治疗 + Compound C 干预组新生血管数目多于 Compound C 干预组。同时,AMPK 及 KLF2 蛋白表达量测定结果表明,EPO 治疗 + Compound C 干预组 AMPK 及 KLF2 蛋白的表达量高于 Compound C 干预组,故推测 EPO 可通过促进 AMPK 及 KLF2 蛋白的表达量,激活 AMPK,上调 KLF2 的表达,促进内皮一氧化氮合酶(eNOS)表达,进而增加 NO 产生,促使内皮克隆形成细胞向内皮细胞分化,进而提高血管新生。

综上所述,EPO 可通过上调 KLF2、eNOS、TM、VEGF mRNA 的表达量,促进 AMPK 蛋白的表达进而调节脑缺血后血管新生。

4 参考文献

[1] 杜同信,王自正,傅雷,立彦,张学忠. 促红细胞生成素、叶酸、维生素 B<sub>12</sub>(12)/铁蛋白检测在缺铁性贫血诊疗中的应用分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2008, (1):20-22.

[2] 章锁,李国玲,张明轩,赵志平,刘钟明. 慢性肾衰贫血患者尿促红细胞生成素浓度的变化及意义[J]. 河南医学研究, 1992, (2):140-143.

[3] 尹秀东. 益气补血法联合 EPO 改善恶性肿瘤相关性贫血(气血亏虚型)的疗效观察[D]. 长沙:湖南中医药大学, 2017.

[4] EIBEL B, MARKOSKI M M, RODRIGUES C G, et al. VEGF gene therapy cooperatively recruits molecules from

- the immune system and stimulates cell homing and angiogenesis in refractory angina [J]. *Cytokine*, 2017, 91(1):44–50.
- [5] 郭婷. 过表达膜联蛋白 A2 受体对新生血管形成的作用研究 [D]. 第二军医大学, 2017.
- [6] 梁有峰, 王爱玲. 促红细胞生成素与心肌缺血性疾病的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2009, 30(1):118–121.
- [7] EPO 衍生肽 HBSP 抑制大鼠心肌微血管内皮细胞缺血/再灌注损伤的作用研究 [D]. 第四军医大学, 2015.
- [8] ZHANG Q, CHEN Z W, ZHAO Y H, ET A L. Bone marrow stromal cells combined with sodium ferulate and n-butylidenephthalide promote the effect of therapeutic angiogenesis via advancing astrocyte-derived trophic factors after ischemic stroke [J]. *Cell Transplantation*, 2016, 26(2):229–242.
- [9] ZHAO G C, YUAN Y L, CHAI F R, et al. Effect of Melilotus officinalis extract on the apoptosis of brain tissues by altering cerebral thrombosis and inflammatory mediators in acute cerebral ischemia [J]. *Biomed Pharmacother*. 2017, 89:1346–1352.
- [10] HABIB P, STAMM A S, ZEYEN T, et al. EPO regulates neuroprotective Transmembrane BAX Inhibitor-1 Motif-containing (TMBIM) family members GRINA and FAIM2 after cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Neurol*, 2019, 15:112978.
- [11] YAN F, CHAO J, YAN M, et al. Erythropoietin improves hypoxic-ischemic encephalopathy in neonatal rats after short-term anoxia by enhancing angiogenesis [J]. *Brain Research*, 2016, 1651(1):104–113.
- [12] LEIGH R, CHRISTENSEN S, CAMPBELL B C V, et al. Pretreatment blood-brain barrier disruption and post-endovascular intracranial hemorrhage [J]. *Neurology*, 2016, 87(3):263.
- [13] MERNTIE M, RISSANEN R, LOTTONEN-RAIKASLEHTO L, et al. Doxycycline modulates vegf-a expression; failure of doxycycline-inducible lentivirus shRNA vector to knockdown vegf-a expression in transgenic mice [J]. *PloS One*, 2018, 13(1):e0190981.
- [14] SHI Y X, YANG R F, BO Y, et al. Recombinant human erythropoietin promotes healing of incisions and anemia in the postoperated patients with gout [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2016, 25(14):1617–1620.
- [15] YAN Z, DENG Y, JIAO F, et al. Lipopolysaccharide downregulates kruppel-like factor 2 (klf2) via inducing DNMT1-mediated hypermethylation in endothelial cells [J]. *Inflammation*, 2017, 25(1):1–10.
- [16] NA L I, JUAN-JUAN H E, WANG Q, et al. Effect and mechanism of phosphorylated ampk on hypoxia preconditioning with its special inhibitor-compound c [J]. *Journal of Sun Yat-sen University (Medical Sciences)*, 2016, 37(2):168–174.
- [17] NEMECZ M, ALEXANDRU N, TANKO G, et al. Role of microrna in endothelial dysfunction and hypertension [J]. *Current Hypertension Reports*, 2016, 18(12):87.
- [18] PURROY C, FAIRCHILD R L, TANAKA T, et al. Erythropoietin receptor-mediated molecular crosstalk promotes t cell immunoregulation and transplant survival [J]. *Journal of the American Society of Nephrology Jasn*, 2017, 28(8):2377–2392.
- [19] WANG D, SONG Y, ZHANG J, et al. AMPK-KLF2 signaling pathway mediates the proangiogenic effect of erythropoietin in endothelial colony forming cells [J]. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 2017, 313(6):674–685.
- [20] REDDY M, VASIR J K, HEGDE G V, et al. Erythropoietin induces excessive neointima formation; a study in a rat carotid artery model of vascular injury [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2007, 12(3):237–247.
- [21] WANG H. Anti-VEGF therapy in the management of retinopathy of prematurity: what we learn from representative animal models of oxygen-induced retinopathy [J]. *Eye & Brain*, 2016, 8(1):81–90.
- [22] KOLUSARI A, OKYAY A G, KOKAYA E A. The effect of erythropoietin in preventing ischemia-reperfusion injury in ovarian tissue transplantation [J]. *Reproductive Sciences*, 2017, 25(6):406–413.

(2019-03-12 收稿, 2019-06-21 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 丁廷森