

黄芩苷通过上调 miR-190 表达缓解缺氧缺糖对神经细胞损伤的研究

吴艳荣¹, 刘光伟², 刘全忠², 朱志强¹, 王琳琳¹, 郑颖颖¹, 李 昕³

1. 郑州大学第二附属医院 针灸科, 河南 郑州 450003

2. 河南中医药大学第一附属医院 消化内科, 河南 郑州 450004

3. 郑州大学第二附属医院 神经内科, 河南 郑州 450003

摘要: 目的 探讨黄芩苷对缺氧缺糖 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 诱导的神经元细胞增殖、凋亡、炎症、氧化应激的影响及其对 miR-190 的调控作用。方法 采用 OGD 处理小鼠海马神经元 HT22 细胞建立细胞损伤模型, 使用不同剂量 (10、30 mg/L) 的黄芩苷处理 HT22 细胞, 分别将 miR-NC、miR-190 mimics 转染至 HT22 细胞后进行 OGD 处理 (OGD+miR-NC 组、OGD+miR-190 组); 分别将 anti-miR-NC、anti-miR-190 转染至 HT22 细胞后使用黄芩苷处理 24 h, 随后进行 OGD 处理 (OGD+黄芩苷+anti-miR-NC 组、OGD+黄芩苷+anti-miR-190 组); 采用 MTT 法检测细胞增殖情况; 采用流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 ELISA 法检测白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的水平; 采用 2,4-二硝基苯肼显色法检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的活性; 采用黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的含量; 采用 qRT-PCR 法检测 miR-190 的表达量; Western blotting 法检测细胞周期蛋白 1 (Cyclin D1)、未剪切的半胱天冬酶-3 (pro-cysteiny aspartate-specific protease-3, pro-Caspase-3)、p21、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved-cysteiny aspartate-specific protease-3, cleaved-Caspase-3) 蛋白表达量。结果 OGD 可明显降低 HT22 细胞活力及 CyclinD1、pro-Caspase-3 蛋白水平 ($P<0.05$), 升高细胞凋亡率及 p21、cleaved-Caspase-3 蛋白水平 ($P<0.05$), 并可提高 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性 ($P<0.05$), 降低 SOD 的含量 ($P<0.05$); 黄芩苷可明显提高 OGD 诱导的 HT22 细胞活力及 CyclinD1、pro-Caspase-3 蛋白水平 ($P<0.05$), 降低细胞凋亡率及 p21、cleaved-Caspase-3 蛋白水平 ($P<0.05$), 并可降低 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性 ($P<0.05$), 升高 SOD 的含量 ($P<0.05$); OGD 可明显降低 HT22 细胞中 miR-190 的表达水平 ($P<0.05$), 而黄芩苷可明显升高 miR-190 的表达水平 ($P<0.05$); miR-190 过表达对 OGD 诱导的 HT22 细胞增殖、凋亡、炎症及氧化应激的作用与黄芩苷的作用相似; 抑制 miR-190 表达可明显逆转黄芩苷对 OGD 诱导的 HT22 细胞增殖、凋亡、炎症及氧化应激的作用。结论 黄芩苷可通过上调 miR-190 的表达而促进细胞增殖及抑制炎症反应、氧化应激、细胞凋亡从而减轻 OGD 诱导的神经元细胞损伤。

关键词: 黄芩苷; miR-190; 缺氧缺糖; 神经元细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)10-3009-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.10.018

Baicalin alleviates damage of nerve cells caused by hypoxia and hypoglycemia by up-regulating expression of miR-190

WU Yan-rong¹, LIU Guang-wei², LIU Quan-zhong², ZHU Zhi-qiang¹, WANG Lin-lin¹, ZHENG Ying-ying¹, LI Xin³

1. Department of Acupuncture & Moxibustion, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

2. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450004, China

3. Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To explore the effects of baicalin on the proliferation, apoptosis, inflammation, and oxidative stress of neuronal cells induced by oxygen-glucose deprivation (OGD) and its regulation on miR-190. **Methods** OGD was used to treat mouse hippocampal neuronal cells HT22 to establish a cell injury model, and different doses (10, 30 mg/L) of baicalin was used to treat the cells. HT22 cells were transfected with miR-NC or miR-190 mimics and then treated with OGD (OGD + miR-NC group,

收稿日期: 2021-01-21

基金项目: 国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (ZDZX20120660); 河南省中医药科学研究专项 (2018JDZX109)

作者简介: 吴艳荣, 女, 硕士, 研究方向为针药结合治疗神经源性疾病。Tel: (0371)63974726 E-mail: iep243037@163.com

OGD + miR-190 group). HT22 cells were transfected with anti-miR-NC and anti-miR-190 and treated with baicalin for 24 h, followed by OGD treatment (OGD + baicalin high-dose group + anti-miR-NC group, OGD + baicalin high-dose group + anti-miR-190 group). The MTT method and flow cytometry were used to detect cell proliferation and apoptosis rate, respectively. The levels of IL-1 β and TNF- α were detected by ELISA. The 2,4-dinitrophenylhydrazine color method was performed to assess the activity of lactate dehydrogenase (LDH). Xanthine oxidase method was used to detect the content of SOD. The expression of miR-190 was determined by qRT-PCR. And the protein expression of CyclinD1, pro-Caspase-3, p21, and cleaved-Caspase-3 was detected by Western blot. **Results** OGD significantly reduced HT22 cell viability and the protein levels of CyclinD1 and pro-Caspase-3 ($P < 0.05$), increased cell apoptosis rate and the protein levels of p21 and cleaved-Caspase-3 ($P < 0.05$), as well as increased the levels of IL-1 β , TNF- α and the activity of LDH ($P < 0.05$), reduced the content of SOD ($P < 0.05$). Baicalin could significantly increase OGD-induced HT22 cell viability and the protein levels of CyclinD1 and pro-Caspase-3 ($P < 0.05$), reduce cell apoptosis rate and the protein levels of p21 and Cleaved-caspase3 ($P < 0.05$), and reduce the levels of IL-1 β , TNF- α and the activity of LDH ($P < 0.05$), and increase the content of SOD ($P < 0.05$). OGD significantly reduced the expression level of miR-190 in HT22 cells ($P < 0.05$), while baicalin significantly increased the expression level of miR-190 ($P < 0.05$). The effects of miR-190 overexpression on the proliferation, apoptosis, inflammation and oxidative stress of HT22 cells induced by OGD were similar to those of baicalin. Inhibition of miR-190 expression reversed the effects of baicalin on the proliferation, apoptosis, inflammation and oxidative stress of OGD-induced HT22 cells. **Conclusion** Baicalin could promote cell proliferation and inhibit inflammation, oxidative stress, and apoptosis by up-regulating the expression of miR-190, thereby alleviating OGD-induced neuronal cell damage.

Key words: baicalin; miR-190; oxygen-glucose deprivation; neuronal cells; proliferation; apoptosis

缺血性脑血管疾病是威胁老年人群死亡的疾病之一, 研发缺血性脑血管疾病的治疗药物成为重点研究方向之一, 脑缺血造成脑组织损伤甚至危及生命安全, 脑组织缺氧时诱发的炎症反应、氧化应激可激活凋亡信号通路进而诱导神经元细胞凋亡, 因而如何抑制神经元细胞炎症、氧化应激成为主攻方向^[1]。近年来, 中药在脑血管疾病中的作用逐渐受到重视, 研究表明管花肉苁蓉醇提取物^[2]、白藜芦醇^[3]等中药成分在预防脑组织损伤方面发挥重要作用, 但关于其作用机制尚未阐明。

黄芩苷是黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的有效成分之一, 其可以改善帕金森病动物神经行为学症状, 还可减轻小胶质细胞损伤从而保护神经细胞^[4]。但黄芩苷对神经元细胞损伤的作用机制尚未阐明。微小 RNA (microRNA, miRNA) 在缺氧缺糖 (oxygen glucose deficiency, OGD) 诱导的神经细胞中表达异常并可调控细胞增殖及凋亡等过程^[5]。微小 RNA-190 (microRNA-190, miR-190) 在帕金森氏病小鼠模型中表达水平降低, 上调 miR-190 可减轻神经元损伤及抑制炎症反应^[6]。

但黄芩苷是否可通过调控 miR-190 的表达从而参与改善神经元细胞损伤尚未可知。因此, 本研究采用 OGD 处理小鼠海马神经元细胞建立细胞损伤模型, 探讨黄芩苷对 OGD 诱导的神经元细胞增殖、凋亡、炎症及氧化应激的影响, 探究其对 miR-190 的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂、仪器

黄芩苷, 批号 20191203, 购自成都格利普生物科技有限公司, 质量分数 95%; 小鼠海马神经元 HT22 细胞购自上海赛百慷生物技术股份有限公司; DMEM 培养液 (批号 20190306)、胎牛血清 (批号 20190203)、胰蛋白酶 (批号 20190105) 购自美国 Hyclone 公司; Lipofectamine 2000 (批号 20190402)、Trizol 试剂 (批号 20190306)、cDNA 合成试剂 (批号 20190506) 与实时荧光定量聚合酶链反应 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 试剂 (批号 20190607) 购自美国 Thermo Fisher 公司; 白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β , 批号 20190911)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α , 批号 20190616) 检测试剂盒购自上海瑞番生物科技有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH, 批号 20190618)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD, 批号 20190625) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; miR-190 寡核苷酸模拟物 (miR-190 mimics) 及阴性对照 mimic NC 序列 (miR-NC)、miR-190 特异性寡核苷酸抑制剂 (anti-miR-190) 及其阴性对照 (anti-miR-NC) 购自广州锐博生物科技有限公司; 甲基噻唑基四唑 (methylthiazolyl tetrazolium, MTT) 试剂 (批号 20190611)、凋亡检测试剂盒 (批号 20190518)、RIPA 裂解液 (批号 20190419) 购自北京索莱宝科技有限

公司；兔抗鼠细胞周期蛋白 1 (CyclinD1)、未剪切的半胱天冬酶-3 (pro-cysteinyl aspartate-specific protease-3, pro-Caspase-3)、p21、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved-cysteinyl aspartate-specific protease-3, cleaved-Caspase-3) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司；辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Abcam 公司。StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司；Multiskan Sky 酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司；FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司；DYY-7C 电泳仪电源、DYCZ-24DN 垂直电泳槽、DYCZ-40 电转仪购自北京六一仪器厂；HI650 离心机购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；Nano-100 微量分光光度计购自杭州奥盛仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药 OGD 诱导 HT22 细胞建立细胞损伤模型^[7]。HT22 细胞培养于不含糖的 DMEM 培养液内，置于 94% N₂、5% CO₂、1% O₂、37 °C 培养箱内培养 3 h 后更换为正常培养液，建立细胞损伤模型。HT22 细胞 (2.5×10⁴ 个/mL) 接种于 96 孔板 (100 μL/孔)，将正常培养的细胞作为对照组。OGD 处理的 HT22 细胞作为 OGD 组。HT22 细胞中分别加入含有不同质量浓度 (10、30 mg/L) 黄芩苷的培养液继续培养 24 h，进行 OGD 处理^[8]，分别记作 OGD+黄芩苷低剂量组、OGD+黄芩苷高剂量组。参照 Lipofectamine 2000 试剂说明书分别将 miR-NC、miR-190 mimics 转染至 HT22 细胞后进行 OGD 处理，分别记作 OGD+miR-NC 组、OGD+miR-190 组。分别将 anti-miR-NC、anti-miR-190 转染至 HT22 细胞后，分别加入含有质量浓度为 30 mg/L 黄芩苷的培养液继续培养 24 h，进行 OGD 处理，分别记作 OGD+黄芩苷+anti-miR-NC 组、OGD+黄芩苷+anti-miR-190 组。

1.2.2 MTT 检测细胞存活率 取对数生长期 HT22 细胞 (2.5×10⁴ 个/mL) 接种于 96 孔板 (100 μL/孔)，培养 12 h，设置对照组、黄芩苷 (10、20、30、40 mg/L) 给药组，对照组给予培养基，不同质量浓度给药组分别给予相应质量浓度黄芩苷溶液，继续培养 24 h，分别加入 MTT 溶液 (20 μL/孔) 后继续培养 4 h，弃上清后加入 DMSO (150 μL/孔)，室温孵育 5 min 后应用酶标仪检测各孔 490 nm 吸光度 (A) 值。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡率 取各组 HT22

细胞加入预冷 PBS 洗涤细胞，弃上清后加入 500 μL 结合缓冲液重悬细胞，按照凋亡试剂盒说明书分别加入 Annexin V-FITC 与 PI，室温振荡孵育 10 min 后应用 FACS Calibur 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.2.4 ELISA 法检测炎症因子 IL-1β、TNF-α 的水平 各组 HT22 细胞中加入 RIPA 裂解液后，使用离心机 (3000 r/min 离心 5 min) 离心后吸取上清，采用 ELISA 法检测炎症因子 IL-1β、TNF-α 的水平，严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.5 检测氧化应激指标 LDH、SOD 的含量 取各组细胞培养上清液，采用 2,4-二硝基苯肼显色法检测 LDH 的活性。采用反复冻融法裂解各组 HT22 细胞，采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 的含量，严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.6 qRT-PCR 检测细胞中 miR-190 的表达水平 采用 Trizol 法提取 HT22 细胞中的总 RNA，应用 Nanodrop2000c 超微量分光光度计检测 RNA 浓度后置于 -80 °C 超低温冰箱内保存。按照 cDNA 试剂盒操作得到 cDNA，以 cDNA 为模板进行 qRT-PCR 反应，反应体系：SYBR Green Master Mix 10 μL/孔，正反向引物 0.8 μL/孔，cDNA 1 μL/孔，ddH₂O 补足体系至 20 μL；反应条件：95 °C 预变性 2 min，95 °C 变性 30 s，60 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，共循环 40 次。采用 2^{-ΔΔC_t} 法计算 miR-190 (内参 U6) 相对表达量。

1.2.7 Western blotting 检测 CyclinD1、pro-caspase3、p21、cleaved-Caspase-3 蛋白表达 各组 HT22 细胞中加入 400 μL RIPA 裂解液提取细胞总蛋白，采用 BCA 法测定蛋白浓度，蛋白变性后进行 SDS-PAGE 电泳反应，转膜、封闭后分别孵育一抗稀释液 (1:1000，4 °C 孵育 24 h) 与二抗稀释液 (1:2000，室温孵育 1 h)，滴加 ECL，暗室内曝光显影后应用 Image J 软件分析各条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS21.0 统计学软件分析数据，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析，以 *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同质量浓度黄芩苷对 HT22 细胞存活率影响 与对照组比较，10、20、30 mg/L 黄芩苷组的细胞存活率无显著差异，40 mg/L 黄芩苷组的细胞

存活率显著降低 ($P < 0.05$), 经多次验证, 确定后续实验采用 10、30 mg/L 黄芩苷, 见图 1。

2.2 黄芩苷对 OGD 处理造成的 HT22 细胞增殖和凋亡的影响

与对照组比较, OGD 组 A 值降低 ($P < 0.05$), 凋亡率升高 ($P < 0.05$), CyclinD1、pro-Caspase-3 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), p21、cleaved-Caspase-3 蛋白水平升高 ($P < 0.05$); 与 OGD 组比较, OGD+黄芩苷低剂量组、OGD+黄芩苷高剂量组 A 值升高 ($P < 0.05$), 凋亡率降低 ($P < 0.05$), CyclinD1、pro-Caspase-3 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), p21、cleaved-Caspase-3 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), 见图 2~5。

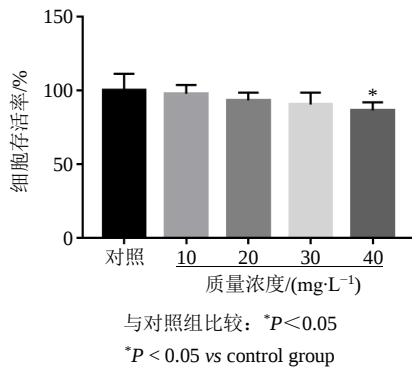
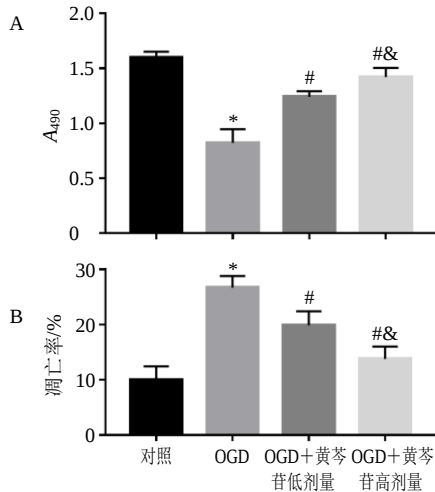


图 1 不同质量浓度黄芩苷对 HT22 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 1 Effects of different concentrations of baicalin on survival rate of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 OGD 组比较: # $P < 0.05$; 与 OGD+黄芩苷低剂量组比较: & $P < 0.05$, 图 3、6~8 同
* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs OGD group; & $P < 0.05$ vs OGD + baicalin low dose group, same as Fig. 3, 6~8

图 2 黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞增殖 (A) 和凋亡 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 2 Effects of baicalin on cell proliferation (A) and apoptosis (B) induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

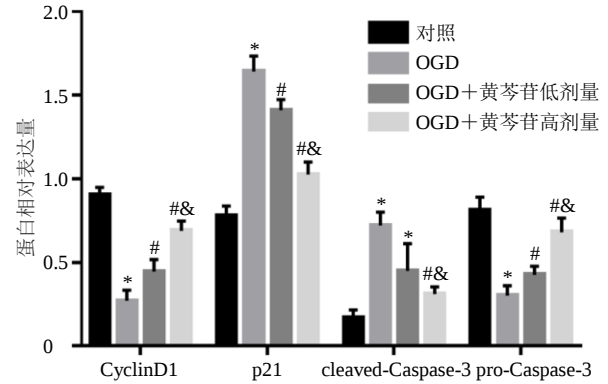


图 3 黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞增殖和凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 3 Effects of baicalin on cell proliferation and apoptosis-related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

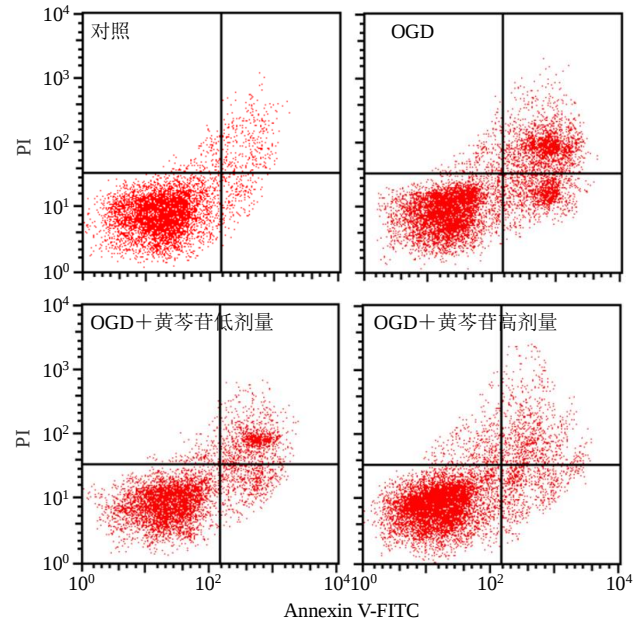


图 4 黄芩苷对 OGD 诱导细胞凋亡流式图

Fig. 4 Flow cytometric diagram of baicalin on OGD-induced cell apoptosis

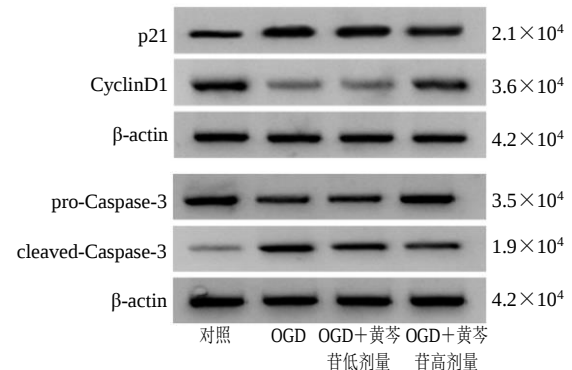


图 5 黄芩苷对 OGD 处理细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 5 Effects of baicalin on proliferation and apoptosis-related proteins expression of OGD-treated cells

2.3 黄芩苷对 OGD 处理造成的 HT22 细胞炎症因子和氧化应激的影响

与对照组比较, OGD 组 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性升高 ($P<0.05$), SOD 的含量降低 ($P<0.05$); 与 OGD 组比较, OGD+黄芩苷低剂量组、OGD+黄芩苷高剂量组 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性降低 ($P<0.05$), SOD 的含量升高 ($P<0.05$), 见图 6、7。

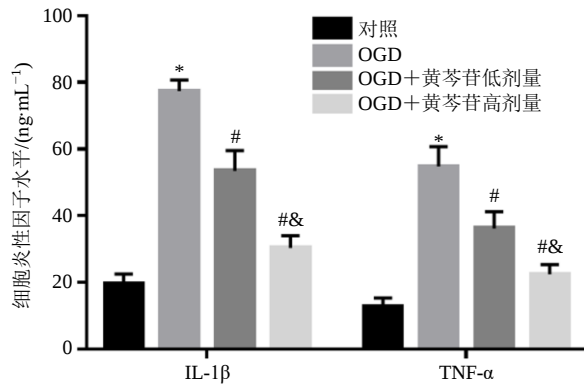


图 6 黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 6 Effects of baicalin on cell inflammatory factors induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

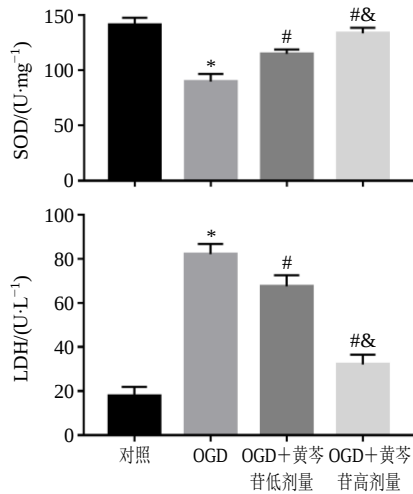


图 7 黄芩苷对 OGD 处理造成的氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 7 Effects of baicalin on oxidative stress induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

2.4 黄芩苷对 OGD 处理造成的 HT22 细胞中 miR-190 表达的影响

与对照组比较, OGD 组 miR-190 的表达水平降低 ($P<0.05$); 与 OGD 组比较, OGD+黄芩苷低剂量组、OGD+黄芩苷高剂量组 miR-190 的表达水平升高 ($P<0.05$), 见图 8。

2.5 过表达 miR-190 对 OGD 处理造成的 HT22 细胞增殖和凋亡的影响

与 OGD+miR-NC 组比较, OGD+miR-190 组 A 值升高 ($P<0.05$), 凋亡率降低 ($P<0.05$), CyclinD1、pro-Caspase-3 蛋白水平升高 ($P<0.05$), p21、cleaved-Caspase-3 蛋白水平降低 ($P<0.05$), 见图 9~12。

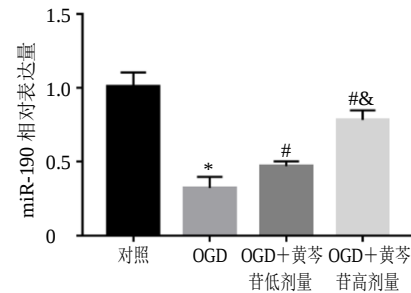
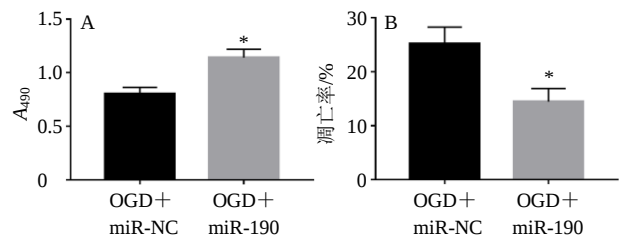


图 8 黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞中 miR-190 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 8 Effects of baicalin on miR-190 expression in OGD-treated cells ($\bar{x} \pm s, n = 9$)



与 OGD+miR-NC 组比较: * $P<0.05$, 图 10、13、14 同

* $P<0.05$ vs OGD + miR-NC group, same as Fig. 10, 13, 14

图 9 过表达 miR-190 对 OGD 处理造成的细胞增殖 (A) 和凋亡 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 9 Effects of overexpression of miR-190 on cell proliferation (A) and apoptosis (B) induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

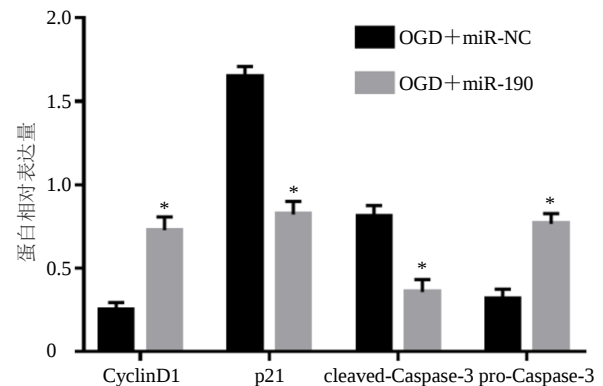


图 10 过表达 miR-190 对 OGD 处理造成的细胞增殖和凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 10 Effects of overexpression of miR-190 on cell proliferation and apoptosis-related proteins induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

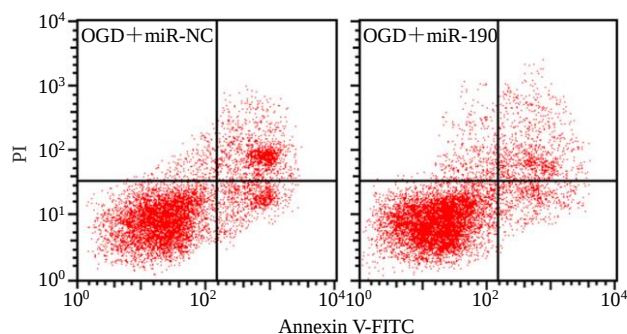


图 11 过表达 miR-190 对 OGD 诱导细胞凋亡流式图
Fig. 11 Flow cytometric diagram of overexpression of miR-190 on OGD-induced cell apoptosis

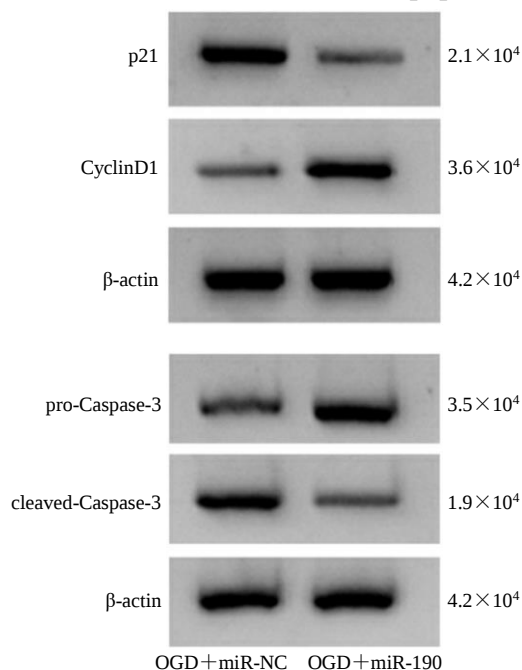


图 12 过表达 miR-190 对 OGD 诱导细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 12 Overexpression of miR-190 on expression of cell proliferation and apoptosis associated proteins induced by OGD treatment

2.6 过表达 miR-190 对 OGD 处理造成的 HT22 细胞炎症因子和氧化应激的影响

与 OGD+miR-NC 组比较, OGD+miR-190 组 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性降低($P<0.05$), SOD 的含量升高($P<0.05$), 见图 13、14。

2.7 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的 HT22 细胞增殖、凋亡、炎症因子和氧化应激的影响

与 OGD+黄芩苷+anti-miR-NC 组比较, OGD+黄芩苷+anti-miR-190 组 A 值降低($P<0.05$), 凋亡率升高($P<0.05$), CyclinD1、pro-Caspase-3 蛋

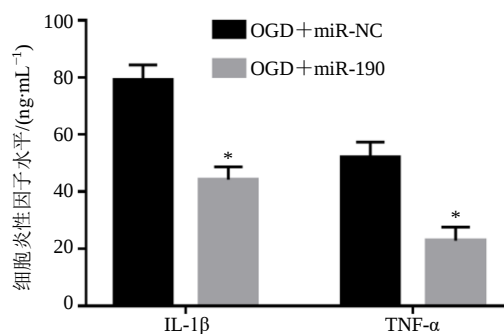


图 13 过表达 miR-190 对 OGD 处理造成的细胞炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 13 Effects of overexpression of miR-190 on cell inflammatory factors induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

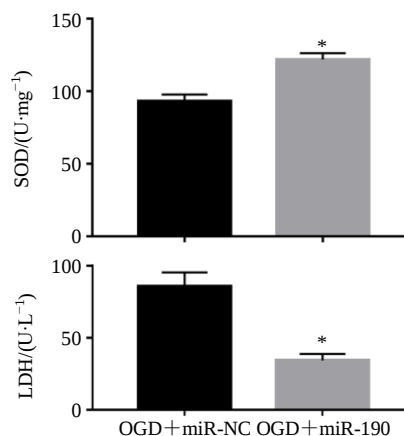


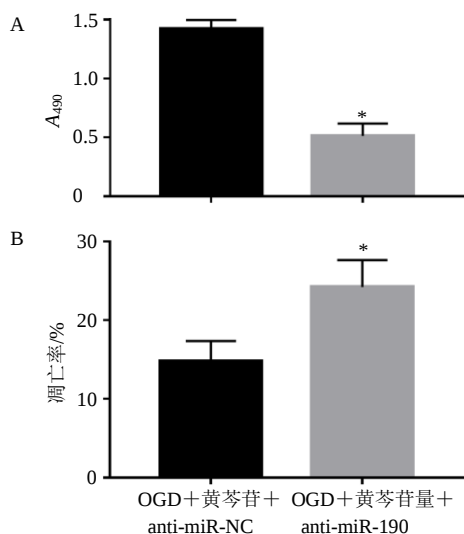
图 14 过表达 miR-190 对 OGD 处理造成的氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 14 Effects of overexpression of miR-190 on oxidative stress induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

白水平降低($P<0.05$), p21、cleaved-Caspase-3 蛋白水平升高($P<0.05$), IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性升高($P<0.05$), SOD 的含量降低($P<0.05$), 见图 15~20。

3 讨论

黄芩苷是一种异黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化等作用, 并可通过抑制 p38 MAPK 通路从而减轻人胃黏膜上皮细胞损伤^[9], 可抑制氧化应激从而减轻氯化钴诱导的神经细胞损伤^[10], 可通过抑制氧化应激从而减轻海马神经细胞损伤^[11]。本研究结果显示, OGD 诱导的神经元细胞活力降低, 凋亡率升高, 提示成功建立神经元细胞损伤模型。CyclinD1 可正向调控细胞周期, 促进细胞增殖, p21 可抑制 CyclinD1 与 CDK6 结合形成复合物从而诱导细胞周期阻滞^[12]。细胞接收凋亡信号后可激活线粒体途径从而促进 Caspase 级联反应, Caspase-3 活化后形成



与 OGD + 黄芩苷 + anti-miR-NC 组比较: * $P < 0.05$, 图 16、19、20 同

* $P < 0.05$ vs OGD + baicalin + anti-miR-NC group, same as Fig. 16, 19, 20

图 15 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞增殖 (A) 和凋亡 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 15 Inhibition of miR-190 expression reversed effects of baicalin on cell proliferation (A) and apoptosis (B) induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

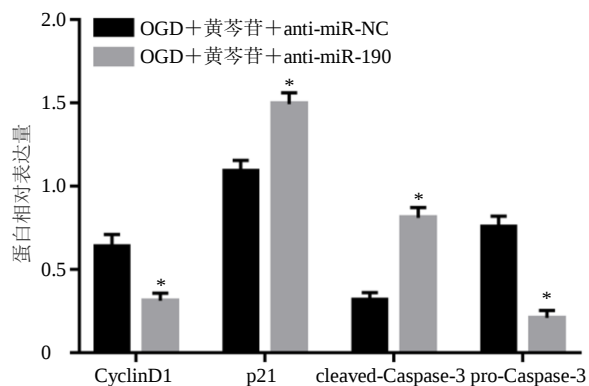


图 16 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞增殖和凋亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 16 Inhibition of miR-190 expression reversed effects of baicalin on cell proliferation and apoptosis-related proteins induced by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

cleaved-Caspase-3 从而诱导细胞凋亡^[13]。本研究结果显示, OGD 可明显降低神经元细胞中 CyclinD1、pro-Caspase-3 的表达水平及提高 p21、cleaved-Caspase-3 的表达水平, 黄芩苷处理后可明显提高 OGD 诱导的神经元细胞活力, 降低细胞凋亡率, 并可促进 CyclinD1、pro-Caspase-3 表达及抑制 p21、cleaved-Caspase-3 表达, 提示黄芩苷可促进 OGD 诱导的神经元细胞增殖及抑制细胞凋亡从而减轻细胞

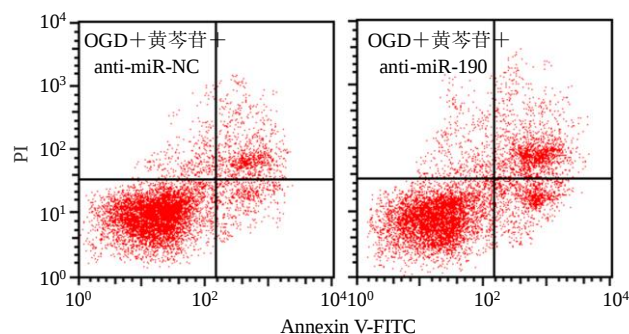


图 17 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞凋亡流式图

Fig. 17 Flow cytometric diagram of inhibition of miR-190 expression reversed effects of baicalin on apoptosis induced by OGD treatment

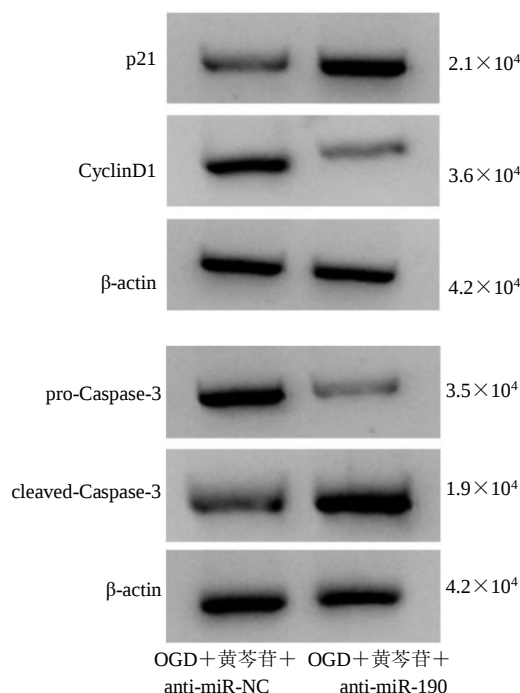


图 18 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞增殖和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 18 Inhibition of miR-190 expression reversed effects of baicalin on cell proliferation and apoptosis-related proteins expression caused by OGD treatment

损伤。炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 在脑缺血再灌注损伤中可发挥重要调控作用, 其水平升高可加重神经元细胞损伤, 而 SOD 的含量升高可通过清除氧自由基从而增强其抗氧化能力, LDH 的活性升高可促进氧化应激反应的发生而促进神经细胞凋亡从而加重神经细胞损伤^[14]。本研究结果显示, OGD 处理后神经元细胞 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性升高, 而 SOD 的含量降低, 黄芩苷处理后可明显降低 IL-1 β 、TNF- α 的水平及 LDH 的活性, 而提高

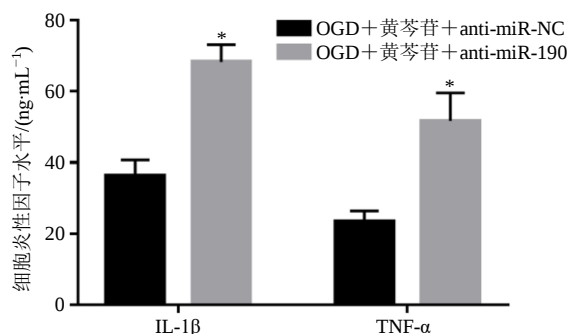


图 19 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的细胞炎症因子的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 19 Inhibition of miR-190 expression reversed effects of baicalin on cytoinflammatory factors caused by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

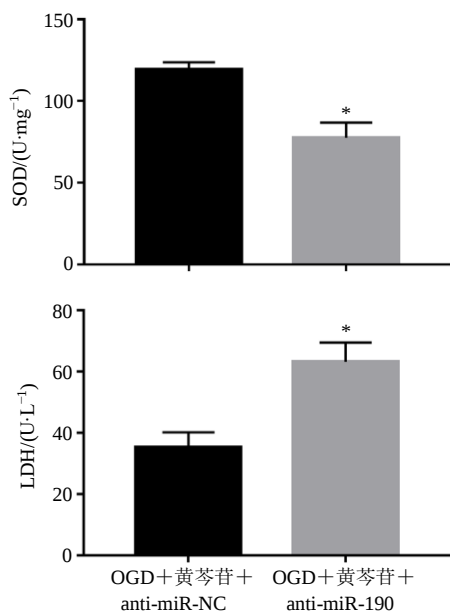


图 20 抑制 miR-190 表达逆转黄芩苷对 OGD 处理造成的氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Fig. 20 Inhibition of miR-190 expression reversed effects of baicalin on oxidative stress caused by OGD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

SOD 的含量,提示黄芩苷可通过抑制炎症反应、氧化应激而抑制神经元细胞凋亡从而减轻 OGD 诱导的神经元细胞损伤。

miR-190 通过靶向 MAPK8 和调节 MAPK8/ERK 信号通路抑制 H₂O₂ 诱导的心肌细胞凋亡从而减轻细胞损伤^[15]。本研究结果显示,OGD 可明显降低神经元细胞中 miR-190 的表达水平,而黄芩苷可明显提高 miR-190 的表达水平,提示黄芩苷可能通过上调 miR-190 的表达从而发挥作用。本研究结果显示,miR-190 过表达可明显提高 OGD 诱导的神

经元细胞活力,降低细胞凋亡率,还可降低 IL-1β、TNF-α 的水平及 LDH 的活性,提高 SOD 的含量,提示 miR-190 过表达可通过抑制炎症、氧化应激而抑制细胞凋亡从而减轻 OGD 诱导的神经元细胞损伤。同时本研究结果显示,抑制 miR-190 表达可明显逆转黄芩苷对 OGD 诱导的神经元细胞增殖、凋亡、炎症及氧化应激的作用。

综上所述,黄芩苷可通过上调 miR-190 的表达而抑制炎症反应、氧化应激进而抑制神经元细胞凋亡从而减轻 OGD 诱导的神经元细胞损伤,miR-190 可能作为黄芩苷治疗缺血性脑血管疾病的潜在靶点,但关于其具体作用机制尚未阐明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵梦迪, 杨洁红, 周惠芬, 等. 补阳还五汤类方对氧糖剥夺再复糖复氧海马神经元细胞的体外保护作用及其机制研究 [J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(9): 728-736.
- [2] 王竞康, 王丽超, 姜勇, 等. 管花肉苁蓉醇提取物对缺氧/缺糖再灌注所致神经细胞损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(13): 2686-2690.
- [3] 吴印华, 胡万保. 白藜芦醇通过激活 mTOR/自噬抑制缺氧缺糖/复氧复糖诱导的 PC12 细胞损伤及凋亡 [J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(2): 298-303.
- [4] 马宝仓, 陈忻, 张楠. 黄芩苷对鱼藤酮致 BV2 细胞激活损伤的影响 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(8): 1-5.
- [5] Wei R, Zhang R F, Li H M, et al. MiR-29 targets PUMA to suppress oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced cell death in hippocampal neurons [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2018, 15(1): 47-54.
- [6] Sun Q, Wang S L, Chen J, et al. MicroRNA-190 alleviates neuronal damage and inhibits neuroinflammation via Nlrp3 in MPTP-induced Parkinson's disease mouse model [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 23379-23387.
- [7] 黄竹燕, 潘蓓蓓, 黄春燕, 等. 黄连解毒汤抗原皮层神经元缺氧缺糖损伤的活性部位筛选 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(8): 981-987.
- [8] 邓嘉, 王导新, 梁爱玲, 等. 黄芩苷对肺泡上皮细胞 α-ENaC 亚基表达调控作用的研究 [J]. 临床医药实践, 2018, 27(1): 16-19.
- [9] 邓志燕, 万强. 黄芩苷对幽门螺杆菌诱导人胃黏膜上皮 GES-1 细胞损伤的保护作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 145-149.
- [10] 闵冬雨, 贾连群, 宋因, 等. 黄芩苷对 CoCl₂ 诱导的 SHSY-5y 细胞损伤的保护作用及其对自由基的影响

- [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(9): 2079-2081.
- [11] 崔晓燕, 张敏, 施麟. 黄芩苷对过氧化氢引起新生大鼠原代海马神经细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(22): 2081-2084.
- [12] Wani W Y, Kandimalla R J L, Sharma D R, *et al.* Cell cycle activation in p21 dependent pathway: An alternative mechanism of organophosphate induced dopaminergic neurodegeneration [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(7): 1858-1866.
- [13] Wang T, Cheng Y, Han H, *et al.* miR-194 accelerates apoptosis of A β_{1-42} -transduced hippocampal neurons by inhibiting Nrn1 and decreasing PI3K/Akt signaling pathway activity [J]. *Genes* (Basel), 2019, 10(4): 313-323.
- [14] Sun K, Fan J, Han J. Ameliorating effects of traditional Chinese medicine preparation, Chinese materia medica and active compounds on ischemia/reperfusion-induced cerebral microcirculatory disturbances and neuron damage [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(1): 8-24.
- [15] Zhai C L, Tang G M, Qian G, *et al.* miR-190 protects cardiomyocytes from apoptosis induced by H₂O₂ through targeting MAPK8 and regulating MAPK8/ERK signal pathway [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(4): 2183-2192.

[责任编辑 郑礼胜]