

葛根素通过 circ-TLK1/miR-367-3p/TLR4 抑制 SK-N-SH 细胞氧糖剥夺损伤

齐献忠, 邢英瀛, 张小林, 贾燕燕

南阳市中心医院 神经内科, 河南 南阳 473000

摘要:目的 探讨葛根素对缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)神经细胞损伤的保护作用及机制。方法 建立氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)诱导的人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 损伤模型,以葛根素进行干预,采用 qRT-PCR 法检测细胞 *circ-丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1* (tousled-like kinase1, *TLK1*) 和 *miR-367-3p* mRNA 表达情况;采用 MTT 法检测细胞存活率;采用流式细胞术检测细胞凋亡情况;采用 ELISA 法检测细胞上清液中白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平;采用 Western blotting 检测细胞 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 蛋白表达情况。采用生物信息学在线软件预测 *miR-367-3p* 与 *circ-TLK1*、TLR4 之间的靶向关系;采用双荧光素酶标记实验和 RNA 结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP)实验验证靶向结合关系。**结果** 与模型组比较,葛根素能够明显提高 OGD 诱导的 SK-N-SH 细胞存活率($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),显著降低细胞凋亡率($P < 0.01$ 、 0.001),显著降低 IL-6 和 TNF- α 水平($P < 0.01$ 、 0.001)。模型组 *circ-TLK1* mRNA 表达水平显著升高($P < 0.001$),葛根素抑制 *circ-TLK1* mRNA 表达水平($P < 0.001$),过表达 *circ-TLK1* 能够逆转葛根素对 OGD 诱导的 SK-N-SH 细胞损伤保护作用($P < 0.01$ 、 0.001)。*circ-TLK1* 能够靶向负调控 *miR-367-3p* 表达,模型组 *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著降低($P < 0.001$),葛根素显著上调 *miR-367-3p* mRNA 表达水平,抑制 *miR-367-3p* 能够逆转葛根素对 OGD 诱导的 SK-N-SH 细胞损伤保护作用($P < 0.05$ 、 0.001)。*miR-367-3p* 能够靶向负调控 TLR4 蛋白表达,模型组 TLR4 蛋白表达水平显著升高($P < 0.001$),葛根素显著下调 TLR4 蛋白表达水平($P < 0.001$),过表达 TLR4 能够逆转葛根素对 OGD 诱导的 SK-N-SH 细胞损伤保护作用($P < 0.05$ 、 0.001)。*circ-TLK1* 能够通过结合 *miR-367-3p* 调控 TLR4 表达。**结论** 葛根素能够通过作用于 *circ-TLK1*/ *miR-367-3p*/TLR4 对 IS 神经细胞损伤起到保护作用。

关键词: 葛根素; *circ-TLK1*; *miR-367-3p*; TLR4; 缺血性脑卒中; 氧糖剥夺

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)11-3286-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.11.016

Puerarin inhibits oxygen-glucose deprivation injury of SK-N-SH cells through circ-TLK1/miR-367-3p/TLR4

QI Xian-zhong, XING Ying-ying, ZHANG Xiao-lin, JIA Yan-yan

Internal Medicine-Neurology, Nanyang Central Hospital, Nanyang 473000, China

Abstract: Objective To explore the protective effect and mechanism of puerarin on neuronal damage in ischemic stroke (IS). **Methods** Oxygen glucose deprivation (OGD) induced SK-N-SH cells injury model was established. Puerarin was used to intervene SK-N-SH cells induced by OGD. Expression of *circ-TLK1* and *miR-367-3p* mRNA was detected by qRT-PCR. Cell viability was measured by MTT. Apoptosis was detected by flow cytometry. Levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were analyzed by ELISA. Expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) was detected by Western blotting. Bioinformatics online software was used to predict the targeting relationship between *miR-367-3p* and *circ-TLK1* or TLR4. Double luciferase labeling assay and RNA binding protein immunoprecipitation (RIP) assay were used to verify the targeted binding relationship. **Results** Compared with model group, puerarin significantly increased survival rate of SK-N-SH cells induced by OGD ($P < 0.05$, 0.01 , 0.001), reduced rate of apoptosis ($P < 0.01$, 0.001), reduced levels of IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$, 0.001). *circ-TLK1* mRNA level of SK-N-SH cells in model group was significantly increased ($P < 0.001$), puerarin inhibited *circ-TLK1* mRNA level ($P < 0.001$), overexpression of *circ-TLK1* reversed the protective effect of puerarin on SK-N-SH cells induced by OGD ($P < 0.01$, 0.001).

收稿日期: 2020-11-19

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题(2018ZY3052)

作者简介: 齐献忠(1968—),男,副主任医师,硕士,从事神经内科疾病研究。

circ-TLK1 targeted and negatively regulated *miR-367-3p* expression. *miR-367-3p* mRNA level of SK-N-SH cells in model group was significantly reduced ($P < 0.001$), puerarin significantly up-regulated *miR-367-3p* mRNA level, inhibited *miR-367-3p* reversed the protective effect of puerarin on SK-N-SH cells induced by OGD ($P < 0.05, 0.001$). *miR-367-3p* targeted and negatively regulated TLR4 expression. TLR4 protein expression of SK-N-SH cells in model group was significantly increased ($P < 0.001$), puerarin significantly down-regulated TLR4 protein expression ($P < 0.001$), overexpression of TLR4 reversed protective effect of puerarin on SK-N-SH cells induced by OGD ($P < 0.05, 0.001$). *circ-TLK1* regulated TLR4 expression by binding *miR-367-3p*. **Conclusion** Puerarin can protect IS nerve cells from damage via *circ-TLK1*/*miR-367-3p*/TLR4.

Key words: puerarin; *circ-TLK1*; *miR-367-3p*; TLR4; ischemic stroke; oxygen-glucose deprivation

脑卒中是导致残疾的主要原因,也是全球第2大常见的死亡原因^[1]。约87%脑卒中病例为缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS),IS的死亡率和致残率一直处于较高水平^[2]。有效保护神经元损伤在IS防治中至关重要^[3]。葛根素是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的根中提取的异黄酮苷类物质,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[4]。葛根素被广泛用于治疗急性缺血性中风、心脏病和其他全身性疾病^[5-6]。环状RNA(*circRNA*)通过微小RNA(*miRNA*)或与RNA结合蛋白相互作用形成 *circRNA*-*miRNA*-mRNA 复合物,在转录后基因表达的调节中起关键作用^[7]。研究发现,*circRNA*可能参与了IS的发病过程,具有作为IS的新型诊断生物标志物和分子治疗靶点的潜力^[8-9]。在IS患者和动物模型中,*circ*-丝氨酸/苏氨酸蛋白扰动样激酶1(*tousled-like kinase1*, *TLK1*)表达明显上调,敲除 *circ-TLK1* 能够显著减少脑梗死体积,减少缺血性神经元损害并改善神经功能缺损^[10]。因此,本研究基于 *circ-TLK1* 探究葛根素对IS的神经细胞保护作用及机制。

1 材料

1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH 购自美国 ATCC。

1.2 药品与试剂

葛根素(质量分数 $\geq 98\%$,批号110752-201912)购自中国药品生物制品检定所;DMEM高糖培养基(批号1912)购自美国Hyclone公司;胎牛血清(批号SN201909)购自美国Gibco公司;Lipofectamine 3000转染试剂(批号L3000-015)购自美国Invitrogen公司;MTT(批号MKBP6775V)购自美国Sigma公司;*circ-TLK1*过表达载体及空载Vector、*circ-TLK1*小干扰RNA(*si-circ-TLK1*)、*siRNA*阴性对照(*si-NC*)、*miR-367-3p*模拟物(*miR-367-3p mimics*)、*miR-367-3p*抑制剂(*miR-367-3p inhibitors*)

及相应对照、Toll样受体4(Toll-like receptor 4, *TLR4*)过表达载体质粒和空载pcDNA均由上海吉玛制药技术有限公司合成;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA检测试剂盒(批号20191120)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA检测试剂盒(批号20190608)购自上海酶联生物科技有限公司;Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡试剂盒(批号MK1020)购自日本Takara公司;双荧光素酶标记试剂盒(批号E2920)、pmirGLO载体(批号E1330)购自美国Promega公司;RNA结合蛋白免疫沉淀(RNA binding protein immunoprecipitation, RIP, 批号KT102-01)购自美国Millipore公司;TLR4单抗、HRP标记的IgG二抗购自美国CST公司;RIPA裂解液(批号P0013)购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号PC0020)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器

CR21GII型低温高速离心机购自日本日立公司;T-1186-340-LA型超低温冰箱购自天地精仪科技;MAXM5型多功能酶标仪购自美谷分子仪器;YXQ-LS-75G型高压灭菌锅购自诺基仪器;流式细胞仪购自北京仪美信科技。

2 方法

2.1 细胞培养

SK-N-SH细胞用含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基,于5%CO₂、饱和湿度、37℃的培养箱中培养。

2.2 氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)对SK-N-SH细胞存活率的影响

取处于对数生长期的SK-N-SH细胞,以 2×10^4 /孔接种于6孔板中,待细胞贴壁后使用PBS洗涤3次,用不含血清、无糖的DMEM培养基,于5%CO₂、1%O₂、94%N₂、37℃的培养箱中分别培养6、12、24h;将培养基更换成DMEM高糖培养基,于5%

CO₂、饱和湿度、37 ℃的培养箱中培养 24 h, 建立 OGD 细胞模型^[11]。加入 100 μL MTT 孵育 4 h, 弃上清, 加入二甲基亚砷 (DMSO), 振荡至结晶完全溶解, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A), 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.3 细胞转染

取处于对数生长期的 SK-N-SH 细胞, 以 2×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 培养 12 h, 待细胞融合度达到 50% 时, 按照试剂盒说明书将 *circ-TLK1* 过表达载体及空载 Vector、*si-circ-TLK1* (5'-GGACATCTCAAA-AAGGCAACA-3') 及 *si-NC*、*miR-367-3p* mimics、*miR-367-3p* inhibitors 及相应对照、*TLR4* 过表达载体质粒及空载 pcDNA 转染至 SK-N-SH 细胞。

2.4 MTT 法检测细胞存活率

取处于对数生长期的 SK-N-SH 细胞, 以 2×10^4 /孔接种于 6 孔板中, 培养 12 h, 加入不同质量浓度 (20、40、80 μg/mL) 的葛根素或用质粒转染, 对照组加入不含药物的无糖 DMEM 培养基, 于 5% CO₂、1% O₂、94% N₂、37 ℃的培养箱中培养 12 h; 将培养基更换成 DMEM 高糖培养基, 于 5% CO₂、饱和湿度、37 ℃的培养箱中培养 24 h。按“2.2”项下方法检测细胞存活率。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡情况

按“2.4”项下方法处理细胞, 收集细胞, 分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液, 孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.6 ELISA 法检测上清液中 IL-6 和 TNF-α 水平

按“2.4”项下方法处理细胞, 收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6 和 TNF-α 水平。

2.7 qRT-PCR 检测 *circ-TLK1* 和 *miR-367-3p* mRNA 表达情况

按“2.4”项下方法处理细胞, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1, 将 U6 作为 *miR-367-3p* 内参, 将 *GAPDH* 作为 *circ-TLK1* 内参。

2.8 双荧光素酶标记实验检测荧光素酶活性

将包含 *miR-367-3p* 结合位点的 *circ-TLK1* 的野生型序列 (WT-*circ-TLK1*) 或不具有 *miR-367-3p* 结合位点的突变体 (MUT-*circ-TLK1*) 插入 pmirGLO 载体, 将质粒与 *miR-367-3p* mimics 或 *miR-NC* 共转染至 SK-N-SH 细胞, 采用双荧光素酶标记试剂盒考察荧光素酶活性。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

名称	序列 (5'-3')
<i>circ-TLK1</i>	F: ACAGTTTGGGAAGCTTGGGATCT R: TGCTCCCACTTGCAACTCCA
<i>miR-367-3p</i>	F: GGACTGTTGCTAATATGCAACTC R: CTCAACTGGTGTCTGGAGTCG
<i>GAPDH</i>	F: ACCATCTTCCAGGAGCGAGAT R: GGGCAGAGATGATGACCCTTT
U6	F: CGGGTTTGTCTTTCATTTCT R: AGTCCCAGCATGAACAGCTT

2.9 RIP 实验检测 *miR-367-3p* 与 *circ-TLK1* 和 *TLR4* 结合关系

以预冷的 PBS 洗涤 SK-N-SH 细胞 2 次, 加入裂解液于冰上裂解, 收集上清液, 于 -80 ℃保存。制备重悬磁珠, 加入 IgG 或 Ago2 抗体孵育, 弃上清, 以洗涤液洗涤 3 次, 加入免疫沉淀缓冲液, 离心取上清, 提取免疫沉淀的 RNA, 并通过 qRT-PCR 检测, 以确认结合靶点的富集水平。

2.10 Western blotting 法检测 TLR4 蛋白表达情况

按“2.4”项下方法处理细胞, 收集细胞, 加入 RIPA 裂解液, 提取蛋白, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 TLR4 抗体 (1:1000), 4 ℃孵育过夜; 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记的 IgG 二抗, 孵育 2 h, 使用 ECL 试剂盒显色, 采用 Image J 软件分析。

2.11 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。

3 结果

3.1 葛根素抑制 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤

如图 1-A 所示, 随着 OGD 作用时间的延长, SK-N-SH 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 后续选择 12 h 作为 OGD 的处理时间。如图 1-B~D 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低 ($P < 0.001$), 凋亡率显著升高 ($P < 0.001$), IL-6 和 TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 葛根素组细胞存活率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), IL-6 和 TNF-α 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), 表明葛根素对 OGD 致细胞损伤具有保护作用, 选择 40 μg/mL 葛根素进行后续研究。

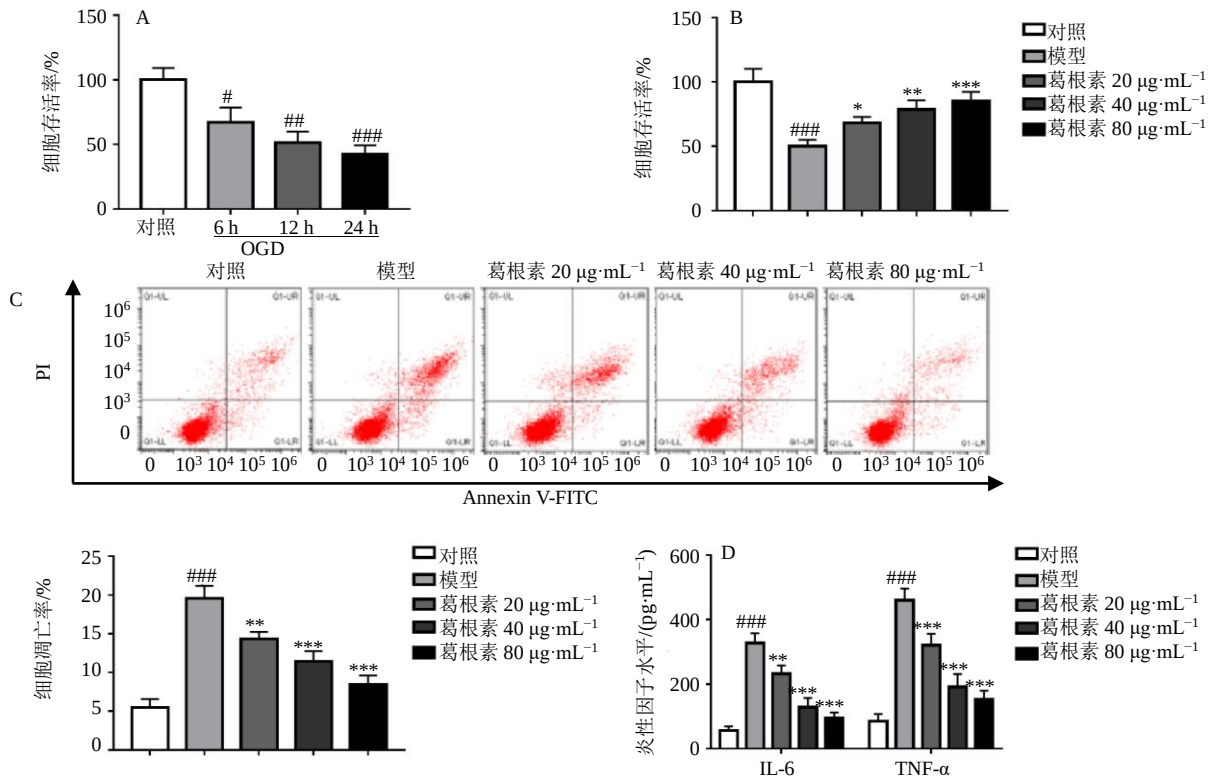


图 1 葛根素抑制 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤
 Fig. 1 Puerarin inhibited SK-N-SH cells damage induced by OGD
 A-OGD 对细胞存活率的影响 B-葛根素对 OGD 诱导的细胞存活率的影响 C-葛根素对 OGD 诱导的细胞凋亡率的影响 D-葛根素对细胞上清液中 IL-6 和 TNF-α 水平的影响 与对照组比较: [#]*P* < 0.05 ^{##}*P* < 0.01 ^{###}*P* < 0.001; 与模型组比较: ^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001
 A-effect of OGD on survival rate B-effect of puerarin on survival rate of cells induced by OGD C-effect of puerarin on apoptosis rate of cells induced by OGD D-effect of puerarin on levels of IL-6 and TNF-α in cell supernatant induced by OGD [#]*P* < 0.05 ^{##}*P* < 0.01 ^{###}*P* < 0.001 vs control group;
^{*}*P* < 0.05 ^{**}*P* < 0.01 ^{***}*P* < 0.001 vs model group

图 1 葛根素抑制 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤

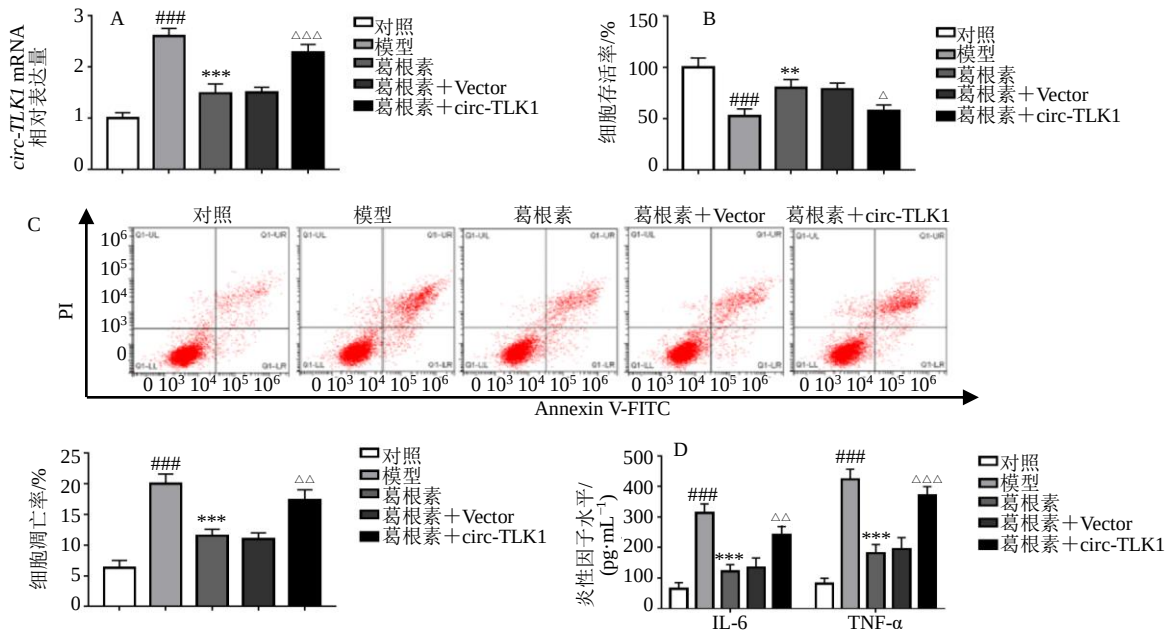
Fig. 1 Puerarin inhibited SK-N-SH cells damage induced by OGD

3.2 过表达 *circ-TLK1* 逆转葛根素对 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用

如图 2 所示,与对照组比较,模型组细胞 *circ-TLK1* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$);与模型组比较,葛根素组细胞 *circ-TLK1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.001$),表明葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用可能与 *circ-TLK1* 的表达有关。转染过表达 *circ-TLK1* 后,细胞 *circ-TLK1* mRNA 表达水平表达显著升高 ($P < 0.001$),细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$),细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$),IL-6 和 TNF-α 水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001),表明过表达 *circ-TLK1* 能够逆转葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用。

3.3 葛根素通过 *circ-TLK1* 靶向调控 *miR-367-3p* 对 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用

如图 3 所示,采用生物信息学在线软件预测 *circ-TLK1* 的下游靶点,发现 *miR-367-3p* 和 *circ-TLK1* 间存在特异性靶向结合位点,提示 *miR-367-3p* 可能是 *circ-TLK1* 的直接靶点。采用双荧光素酶报告基因实验和 RIP 实验验证 *miR-367-3p* 和 *circ-TLK1* 的靶向关系,结果显示,与 miR-NC 组相比,miR-367-3p 组 WT-*circ-TLK1* 荧光素酶相对活性显著降低 ($P < 0.001$),MUT-*circ-TLK1* 荧光素酶相对活性无明显改变;与 IgG 组相比,Ago2 组 *miR-367-3p* 和 *circ-TLK1* 的富集水平均显著升高 ($P < 0.001$),表明 *miR-367-3p* 可通过结合位点与 *circ-TLK1* 特异性结合。

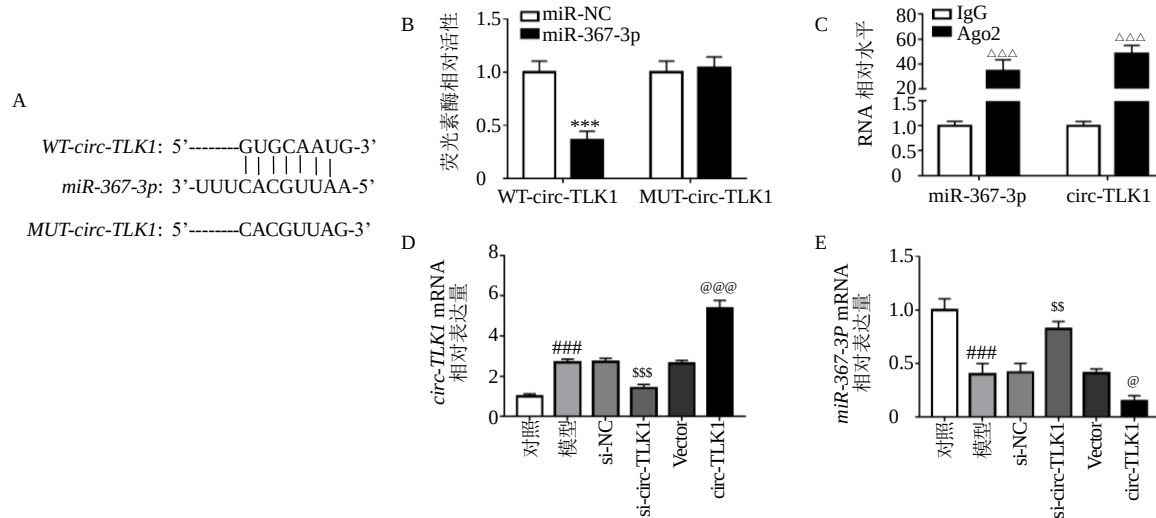


A-葛根素对细胞 *circ-TLK1* mRNA 表达水平的影响 B-过表达 *circ-TLK1* 对细胞存活率的影响 C-过表达 *circ-TLK1* 对细胞凋亡率的影响 D-过表达 *circ-TLK1* 对细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与葛根素+Vector 组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ △△△ $P < 0.001$

A-effect of puerarin on *circ-TLK1* mRNA level in cells B-effect of *circ-TLK1* overexpression on cell survival C-effect of *circ-TLK1* overexpression on cell apoptosis D-effect of *circ-TLK1* overexpression on levels of IL-6 and TNF- α in cell supernatant ### $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ △△△ $P < 0.001$ vs puerarin + Vector group

图 2 过表达 *circ-TLK1* 逆转葛根素对 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用

Fig. 2 Overexpression of *circ-TLK1* reversed protective effect of puerarin on SK-N-SH cells injury induced by OGD



A-*circ-TLK1* 和 *miR-367-3p* 的潜在结合序列 B-双荧光素酶报告基因实验验证 *circ-TLK1* 和 *miR-367-3p* 的靶向关系 C-RIP 实验验证 *circ-TLK1* 和 *miR-367-3p* 的相互作用关系 D-qRT-PCR 检测 *circ-TLK1* 的转染效率 E-过表达或抑制 *circ-TLK1* 对 *miR-367-3p* mRNA 表达水平的影响 与 miR-NC 组比较: *** $P < 0.001$; 与 IgG 组比较: △△△ $P < 0.001$; 与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与 si-NC 组比较: \$\$\$ $P < 0.001$ \$\$\$ $P < 0.001$; 与 Vector 组比较: @ $P < 0.05$ @@@ $P < 0.001$

A-potential binding sequence of *circ-TLK1* and *miR-367-3p* B-dual luciferase reporter gene experiment to verify the targeting relationship of *circ-TLK1* and *miR-367-3p* C-RIP experiment to verify *circ-TLK1* and *miR-367-3p* interaction relationship D-qRT-PCR to detect the transfection efficiency of *circ-TLK1* E-effect of overexpression or inhibition of *circ-TLK1* on *miR-367-3p* mRNA level *** $P < 0.001$ vs miR-NC group; △△△ $P < 0.001$ vs IgG group; ### $P < 0.001$ vs control group; \$\$\$ $P < 0.001$ vs si-NC group; @ $P < 0.05$ @@@ $P < 0.001$ vs Vector group

图 3 *circ-TLK1* 与 *miR-367-3p* 靶向调控作用

Fig. 3 Targeted regulation of *circ-TLK1* and *miR-367-3p*

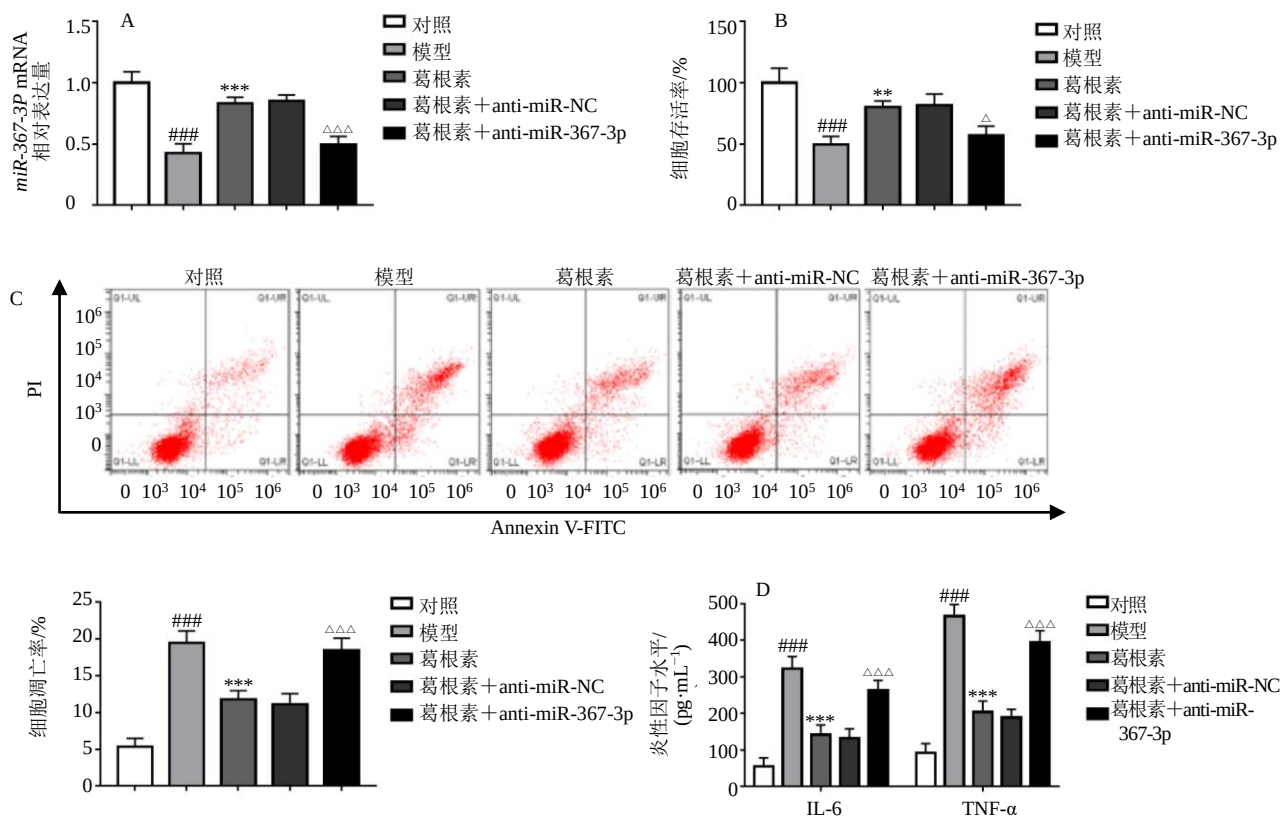
与对照组相比,模型组 *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.001$);与 si-NC 组相比, si-circ-TLK1 组 *circ-TLK1* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.001$), *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.01$);与 Vector 组相比, circ-TLK1 组 *circ-TLK1* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$), *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$), 表明 *circ-TLK1* 能够靶向负调控 *miR-367-3p* 的表达。

如图 4 所示,与对照组相比,模型组 *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.001$);与模型组相比,葛根素组 *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.001$), 表明葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用可能与 *miR-367-3p* 的表达有关。通过转染抑制 *miR-367-3p* 表达, 结果显示, 与葛根素+anti-*miR-NC* 组相比, 葛根素+anti-*miR-367-3p* 组

miR-367-3p mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.001$), 细胞存活率显著降低 ($P<0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P<0.001$), IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P<0.001$), 表明抑制 *miR-367-3p* 能够逆转葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用。

3.4 葛根素通过 *miR-367-3p* 靶向调控 TLR4 对 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用

如图 5 所示, 采用生物信息学在线软件预测 *miR-367-3p* 的下游靶基因, 发现 *miR-367-3p* 和 TLR4 间存在特异性靶向结合位点, 提示 TLR4 可能是 *miR-367-3p* 的直接靶基因。采用双荧光素酶报告基因实验和 RIP 实验验证 *miR-367-3p* 和 TLR4 的靶向关系, 结果显示, 与 *miR-NC* 组相比, *miR-367-3p* 组 WT-TLR4 荧光素酶相对活性显著降低 ($P<0.001$), MUT-TLR4 荧光素酶相对活性无明显改变;



A-葛根素对细胞 *miR-367-3p* mRNA 表达水平的影响 B-抑制 *miR-367-3p* 对细胞存活率的影响 C-抑制 *miR-367-3p* 对细胞凋亡率的影响 D-抑制 *miR-367-3p* 对细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与葛根素+anti-*miR-NC* 组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.001$

A-effect of puerarin on *miR-367-3p* mRNA level in cells B-effect of *miR-367-3p* inhibitor on cell survival C-effect of *miR-367-3p* inhibitor on cell apoptosis D-effect of *miR-367-3p* inhibitor on levels of IL-6 and TNF- α in cell supernatant ### $P<0.001$ vs control group; ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.001$ vs puerarin + anti-*miR-NC* group

图 4 葛根素通过促进 *miR-367-3p* 表达对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤发挥保护作用

Fig. 4 Puerarin protected SK-N-SH cells from OGD induced damage by promoting *miR-367-3p* expression

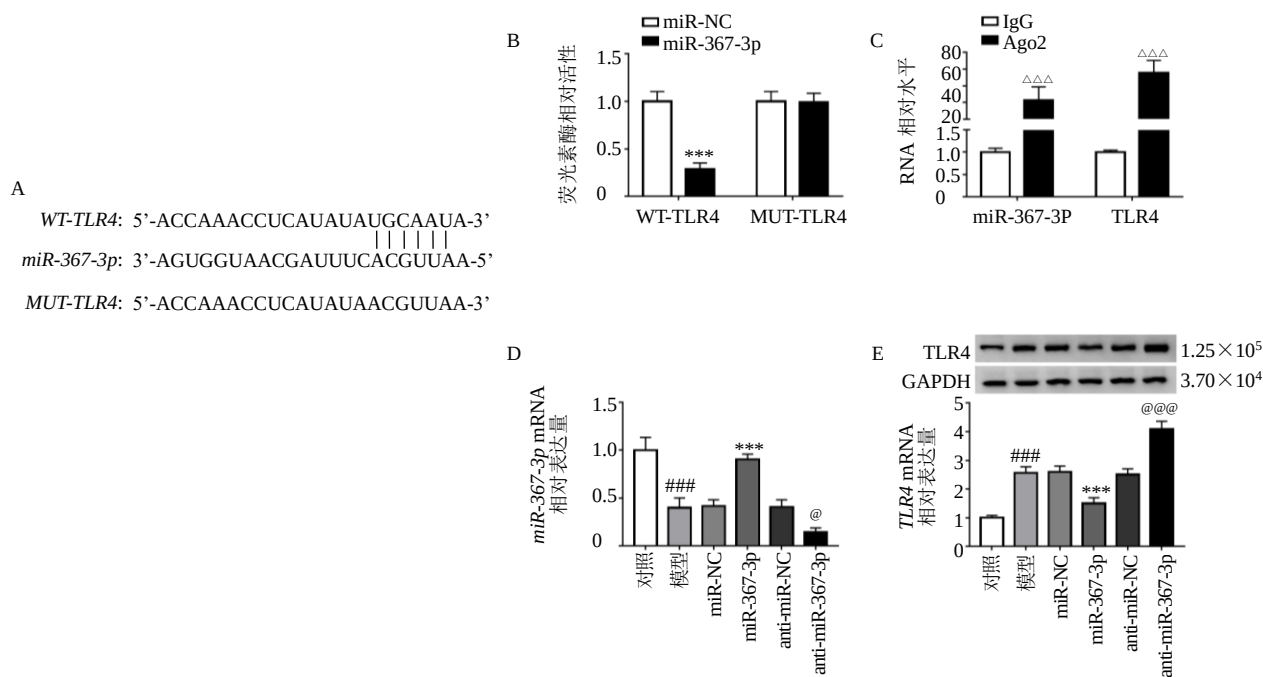


图 5 *TLR4* 和 *miR-367-3p* 靶向调控作用

Fig. 5 Targeted regulation of *TLR4* and *miR-367-3p*

与 IgG 组相比, Ago2 组 *TLR4* 和 *circ-TLK1* 的富集水平显著升高 ($P < 0.001$), 表明 *miR-367-3p* 可通过结合位点与 *TLR4* 特异性结合。

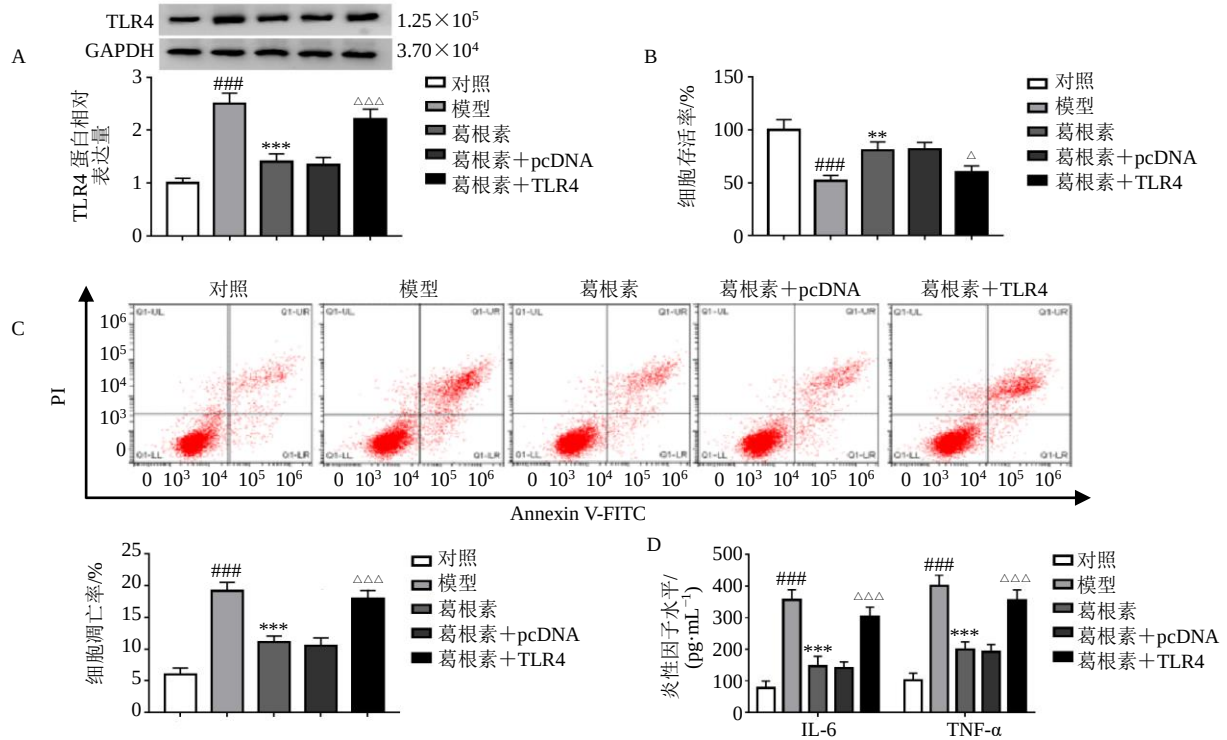
与对照组相比, 模型组 *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与 miR-NC 组相比, miR-367-3p 组 *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), *TLR4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与 anti-miR-NC 组相比, anti-miR-367-3p 组 *miR-367-3p* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 表明 *miR-367-3p* 能够靶向负调控 *TLR4* 表达。

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组 *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 葛根素组 *TLR4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), 表明葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用可能与 *TLR4* 表达有关。通过转染过表达 *TLR4*, 结果显示, 与葛根素 + pcDNA 组相比, 葛根素 +

TLR4 组 *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 细胞存活率显著降低 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$), IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.001$), 表明过表达 *TLR4* 能够逆转葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用。

3.5 葛根素通过调控 *circ-TLK1*/*miR-367-3p*/*TLR4* 抑制 OGD 所致的 SK-N-SH 细胞损伤

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组 *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与 si-NC 组相比, si-*circ-TLK1* 组 *TLR4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与 si-*circ-TLK1* + anti-miR-NC 组相比, si-*circ-TLK1* + anti-miR-367-3p 组 *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 葛根素组 *TLR4* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与葛根素 + Vector 组相比, 葛根素 + *circ-TLK1* 组 *TLR4* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与葛根素 + anti-miR-NC 组相比, 葛根素 + anti-miR-367-3p 组

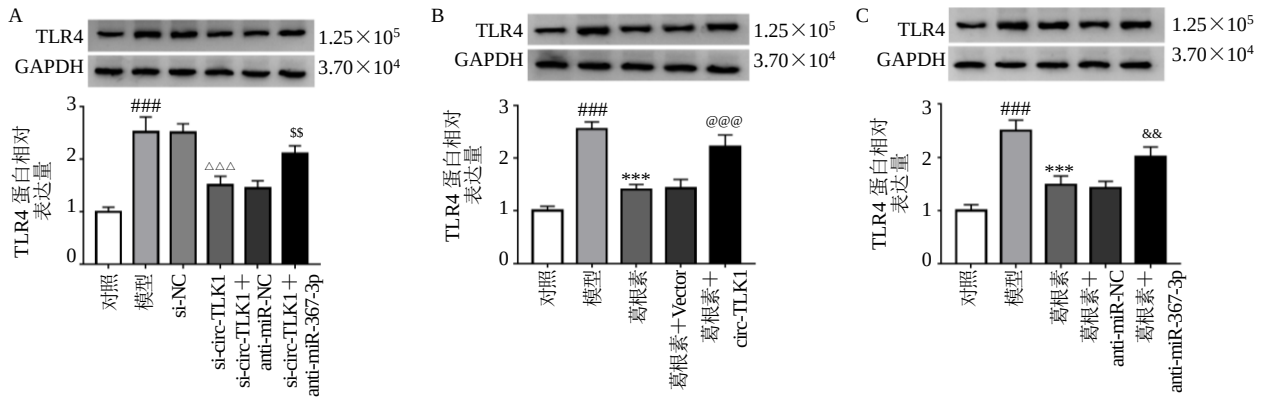


A-葛根素对细胞 TLR4 蛋白表达水平的影响 B-过表达 TLR4 对细胞存活率的影响 C-过表达 TLR4 对细胞凋亡率的影响 D-过表达 TLR4 对细胞上清液中 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 与对照组比较: ###P<0.001; 与模型组比较: **P<0.01 ***P<0.001; 与葛根素+pcDNA 组比较: Δ P<0.05 $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001

A-effect of puerarin on TLR4 expression in cells B-effect of TLR4 overexpression on cell survival C-effect of TLR4 overexpression on cell apoptosis D-effect of TLR4 overexpression on levels of IL-6 and TNF- α in cell supernatant ###P<0.001 vs control group; **P<0.01 ***P<0.001 vs model group; Δ P<0.05 $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001 vs puerarin+pcDNA group

图 6 葛根素通过抑制 TLR4 表达对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤发挥保护作用

Fig. 6 Puerarin protected SK-N-SH cells from OGD induced damage by inhibiting TLR4 expression



A-circ-TLK1 或同时抑制 circ-TLK1 和 miR-367-3p 对 TLR4 蛋白表达水平的影响 B-葛根素联合过表达 circ-TLK1 对 TLR4 蛋白表达水平的影响 C-葛根素联合抑制 miR-367-3p 对 TLR4 蛋白表达水平的影响 与对照组比较: ###P<0.001; 与模型组比较: ***P<0.001; 与 si-NC 组比较: $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001; 与 si-circ-TLK1+anti-miR-NC 组比较: $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001; 与 si-circ-TLK1+anti-miR-367-3p 组比较: $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001; 与葛根素+Vector 组比较: @@@P<0.001; 与葛根素+anti-miR-NC 组比较: &&&P<0.001

A-effect of circ-TLK1 or simultaneous inhibition of circ-TLK1 and miR-367-3p on TLR4 protein expression B-effect of puerarin combined with overexpression circ-TLK1 on TLR4 protein expression C-effect of puerarin combined miR-367-3p inhibitor on TLR4 protein expression ###P<0.001 vs control group; ***P<0.001 vs model group; $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001 vs si-NC group; $\Delta\Delta\Delta$ P<0.001 vs si-circ-TLK1+anti-miR-NC group; @@@P<0.001 vs puerarin+pcDNA group; &&&P<0.001 vs puerarin+anti-miR-NC group

图 7 葛根素对 circ-TLK1/miR-367-3p/TLR4 的调控作用

Fig. 7 Regulatory effect of puerarin on circ-TLK1/miR-367-3p/TLR4

TLR4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。

4 讨论

IS 为危害我国中老年人健康及生活质量的主要疾病, 具有高发病率、高致残率、高死亡率及高复发率等特点^[12-13]。研究发现, 葛根中的葛根素可以改善血液循环并减少心血管和脑血管疾病; 葛根素能够减少脑缺血再灌注引起的神经元损伤, 并降低脑卒中神经细胞损伤过程^[14-17]。本研究发现葛根素可以有效提高 OGD 诱导的 SK-N-SH 细胞存活率, 降低细胞凋亡率, 降低 IL-6 和 TNF- α 水平, 表明葛根素对 IS 神经细胞损伤具有保护作用。

CircRNA 在组织中特异性表达, 具有高度同源性、结构稳定等特点^[18-19]。本研究结果显示, OGD 诱导的 SK-N-SH 细胞中 *circ-TLK1* mRNA 表达水平显著升高, 与文献报道一致^[10]; 葛根素显著下调 *circ-TLK1* mRNA 表达, 过表达 *circ-TLK1* 能够逆转葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用, 表明葛根素通过降低 SK-N-SH 细胞中 *circ-TLK1* 表达, 从而发挥抗脑卒中的作用。circRNA 通常被用作 miRNA 的分子海绵来调节 mRNA 表达。研究发现, *miR-367-3p* 具有明显的抗 IS 的作用^[20]。本研究结果显示, *miR-367-3p* 为 *circ-TLK1* 的靶 miRNA, *circ-TLK1* 可以负向调节 *miR-367-3p* 表达; 模型组 SK-N-SH 细胞 *miR-367-3p* mRNA 表达水平明显降低, 葛根素显著上调 *miR-367-3p* mRNA 表达, 抑制 *miR-367-3p* 能够逆转葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用, 表明葛根素可能通过下调 *circ-TLK1* 表达并上调 *miR-367-3p* 表达, 从而发挥抗脑卒中的作用。

本研究通过生物信息学软件搜索 *miR-367-3p* 的靶基因, 并将 TLR4 确认为 *miR-367-3p* 的直接靶点。*miR-497* 能够通过调节 TLR4 和环磷腺苷反应元件结合蛋白 (cAMP-responsive element-binding protein, CREB) 信号传导途径减轻患者脑梗死^[21]。*miR-182-5p* 通过调节 TLR4 介导的炎症反应, 在脑缺血再灌注损伤中发挥神经保护作用^[22]。本研究结果显示, 模型组 TLR4 蛋白表达水平显著降低, 葛根素上调 TLR4 蛋白表达, 过表达 *TLR4* 能够逆转葛根素对 OGD 致 SK-N-SH 细胞损伤的保护作用; 此外, *circ-TLK1* 能够通过结合 *miR-367-3p* 来调节 TLR4 蛋白表达。以上结果表明, 葛根素通过 *circ-TLK1*/*miR-367-3p*/TLR4 轴抑制 IS 中的神经细胞损伤。

综上, 葛根素能够有效提高 IS 体外模型中 SK-N-SH 细胞存活率, 抑制细胞凋亡, 减少炎症因子的分泌, 对神经细胞损伤具有保护作用, 其作用机制与调控 *circ-TLK1*/*miR-367-3p*/TLR4 有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Hathidara M Y, Saini V, Malik A M. Stroke in the young: A global update [J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2019, 19(11): 91.
- [2] Barthels D, Das H. Current advances in ischemic stroke research and therapies [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2020, 1866(4): 165260.
- [3] Wang Y Z, Tian D, Wei C W, et al. Propofol attenuates α -synuclein aggregation and neuronal damage in a mouse model of ischemic stroke [J]. *Neurosci Bull*, 2020, 36(3): 289-298.
- [4] Zhang L. Pharmacokinetics and drug delivery systems for puerarin, a bioactive flavone from traditional Chinese medicine [J]. *Drug Deliv*, 2019, 26(1): 860-869.
- [5] Song Q T, Zhao Y, Li Q, et al. Puerarin protects against iron overload-induced retinal injury through regulation of iron-handling proteins [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109690.
- [6] Long Y, Yang Q, Xiang Y, et al. Nose to brain drug delivery-A promising strategy for active components from herbal medicine for treating cerebral ischemia reperfusion [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104795.
- [7] Miao L, Yin R X, Zhang Q H, et al. A novel circRNA-miRNA-mRNA network identifies circ-YOD1 as a biomarker for coronary artery disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 18314.
- [8] Zuo L, Zhang L, Zu J, et al. Circulating circular RNAs as biomarkers for the diagnosis and prediction of outcomes in acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2020, 51(1): 319-323.
- [9] Wang Q W, Liu X, Zhao J J, et al. Circular RNAs: Novel diagnostic and therapeutic targets for ischemic stroke [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2020, 20(10): 1039-1049.
- [10] Wu F, Han B, Wu S, et al. Circular RNA *TLK1* aggravates neuronal injury and neurological deficits after ischemic stroke via *miR-335-3p*/TIPARP [J]. *J Neurosci*, 2019, 39(37): 7369-7393.
- [11] 吴静蕊, 王龙虎, 杨海慧, 等. mGluR4 激动剂对氧糖剥夺 SH-SY5Y 细胞损伤的保护作用研究 [J]. *神经解剖学杂志*, 2018, 34(6): 679-686.
- [12] Stinear C M, Lang C E, Zeiler S, et al. Advances and challenges in stroke rehabilitation [J]. *Lancet Neurol*, 2020, 19(4): 348-360.

- [13] Gu X, Li Y, Chen S, *et al.* Association of lipids with ischemic and hemorrhagic stroke: A prospective cohort study among 267 500 Chinese [J]. *Stroke*, 2019, 50(12): 3376-3384.
- [14] Guan L N, Li C, Zhang Y, *et al.* Puerarin ameliorates retinal ganglion cell damage induced by retinal ischemia/reperfusion through inhibiting the activation of TLR4/NLRP3 inflammasome [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117935.
- [15] Ni S Y, Zhong X L, Li Z H, *et al.* Puerarin alleviates lipopolysaccharide-induced myocardial fibrosis by inhibiting PARP-1 to prevent HMGB1-mediated TLR4-NF- κ B signaling pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2020, 20(5): 482-491.
- [16] Zhang Y, Yang X, Ge X H, *et al.* Puerarin attenuates neurological deficits via Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 and Sirt3/SOD2 apoptotic pathways in subarachnoid hemorrhage mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 726-733.
- [17] 黄亚光, 王金凤, 杜利鹏, 等. 葛根素调节 AMPK-mTOR 信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(13): 3127-3133.
- [18] Shafabakhsh R, Mirhosseini N, Chaichian S, *et al.* Could circRNA be a new biomarker for pre-eclampsia? [J]. *Mol Reprod Dev*, 2019, 86(12): 1773-1780.
- [19] Li J J, Wang W, Wang X Q, *et al.* A novel strategy of identifying circRNA biomarkers in cardiovascular disease by meta-analysis [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(12): 21601-21612.
- [20] Tabet F, Lee S, Zhu W, *et al.* microRNA-367-3p regulation of GPRC5A is suppressed in ischemic stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(6): 1300-1315.
- [21] Chen S, Yin W, Bi K, *et al.* MicroRNA-497 attenuates cerebral infarction in patients via the TLR4 and CREB signaling pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(1): 547-556.
- [22] Wang J, Xu Z, Chen X, *et al.* MicroRNA-182-5p attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by targeting Toll-like receptor 4 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(3): 677-684.

[责任编辑 李亚楠]