

基于 *miR-223-3p* 研究淫羊藿苷治疗大鼠颅脑外伤后神经损伤的作用机制

房正华¹, 马宝林¹, 宋湖平¹, 代景伟², 孙晓欧^{3*}

1. 厦门大学附属第一医院 神经外科, 福建 厦门 361022

2. 厦门大学附属第一医院 麻醉科, 福建 厦门 361022

3. 苏州大学附属第一医院 神经外科, 江苏 苏州 215000

摘要: 目的 基于 *miR-223-3p* 探讨淫羊藿苷治疗大鼠颅脑外伤神经损伤的作用机制。方法 随机选取 70 只大鼠, 建立局部脑挫裂伤模型, 将建模成功的 60 只大鼠随机分为模型组、淫羊藿苷 (30 mg/kg) 组、淫羊藿苷 (30 mg/kg) + 阴性对照组和淫羊藿苷 (30 mg/kg) + *miR-223-3p* antagomir 组, 每组 15 只, 另取 15 只大鼠作为对照组。给予相应药物进行干预, 末次干预 2 h 后, 对各组大鼠进行改良神经功能缺损评分 (modified neurological severity scores, mNSS); 测定各组大鼠脑组织含水量; 采用 ELISA 法检测各组大鼠脑组织白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) 和 IL-1 β 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠脑组织病理变化; 采用 TUNEL 染色法观察各组大鼠脑组织神经元凋亡情况; 采用 qRT-PCR 法检测各组大鼠脑组织 *miR-223-3p* 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, *NLRP3*) mRNA 表达情况; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠脑组织 *NLRP3*、半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达情况; 采用双荧光素酶报告基因系统检测 *miR-223-3p* 对 *NLRP3* 的靶向性。结果 与模型组比较, 淫羊藿苷组大鼠 mNSS 显著降低 ($P < 0.05$), 脑组织含水量显著降低 ($P < 0.05$), 脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$); 脑组织损伤面积和红细胞数减少; 神经元细胞凋亡指数显著降低 ($P < 0.05$); 脑组织 *miR-223-3p* mRNA 表达水平升高, *NLRP3* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 脑组织 *NLRP3*、Caspase-1 和 Bax 蛋白表达水平降低, Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。与淫羊藿苷组比较, 淫羊藿苷 + *miR-223-3p* antagomir 可显著逆转上述指标 ($P < 0.05$)。双荧光素酶报告结果显示, *miR-223-3p* 可靶向调控 *NLRP3*。结论 淫羊藿苷对大鼠颅脑外伤神经损伤具有改善作用, 其作用机制可能与调控 *miR-223-3p* 从而靶向抑制 *NLRP3* 表达、抑制炎症反应、减少神经元细胞凋亡有关。

关键词: 淫羊藿苷; 颅脑外伤; 神经损伤; *miR-223-3p*; *NLRP3*; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)19-5948-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.19.018

Mechanism of icariin on nerve injury in rats with craniocerebral trauma based on *miR-223-3p*

FANG Zheng-hua¹, MA Bao-lin¹, SONG Hu-ping¹, DAI Jing-wei², SUN Xiao-ou³

1. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361022, China

2. Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361022, China

3. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of icariin on nerve injury in rats with craniocerebral trauma based on *miR-223-3p*.

Methods Seventy rats were randomly selected to establish a local brain contusion model. Sixty rats were successfully modeled and randomly divided into model group, icariin (30 mg/kg) group, icariin (30 mg/kg) + NC group and icariin (30 mg/kg) + *miR-223-3p* antagomir group, with fifteen rats in each group, and 15 rats were selected as control group. The corresponding drugs were given for intervention. 2 h after last intervention, rats in each group were subjected to record modified neurological severity scores (mNSS); Water content of brain tissue of rats in each group was measured; ELISA was used to detect interleukin-18 (IL-18) and IL-1 β levels

收稿日期: 2021-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81971171)

作者简介: 房正华 (1974—), 男, 汉族, 硕士, 副主任医师, 研究方向为颅脑损伤的临床与实验研究。E-mail: tixin_7418@163.com

*通信作者: 孙晓欧 (1976—), 博士, 主任医师。E-mail: dianjin155@163.com

in brain tissue of rats in each group; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of brain tissue of rats in each group; TUNEL staining method was used to observe neuron apoptosis in brain tissue of rats in each group; qRT-PCR was used to detect *miR-223-3p* and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (*NLRP3*) mRNA expressions in brain tissue of rats in each group; Western blotting was used to detect *NLRP3*, Caspase-1, B-cell lymphoma 2 (*Bcl-2*) and *Bcl-2* associated X protein (*Bax*) protein expressions in brain tissue of rats in each group; Dual luciferase reporter gene system was used to detect the targeting of *miR-223-3p* to *NLRP3*. **Results** Compared with model group, mNSS of rats in icariin group was significantly reduced ($P < 0.05$), brain tissue water content was reduced ($P < 0.05$), IL-18 and IL-1 β levels in brain tissue were reduced ($P < 0.05$); Brain tissue damage area and red blood cell count were decreased; Neuronal cell apoptosis index was decreased ($P < 0.05$); *miR-223-3p* mRNA expression in brain tissue was increased, and *NLRP3* mRNA expression was decreased ($P < 0.05$); *NLRP3*, Caspase-1 and *Bax* protein expressions in brain tissue were reduced, and *Bcl-2* protein expression were increased ($P < 0.05$). Compared with icariin group, icariin + *miR-223-3p* antagomir group significantly reversed the above indicators ($P < 0.05$). The result of dual luciferase report showed that *miR-223-3p* could target *NLRP3*. **Conclusion** Icariin can improve nerve injury in rats with craniocerebral trauma, its mechanism may be related to the inhibition of *NLRP3* expression by regulating *miR-223-3p*, inhibition of inflammatory response and reduction of neuronal cell apoptosis.

Key words: icariin; craniocerebral trauma; nerve injury; *miR-223-3p*; *NLRP3*; inflammatory response

颅脑外伤是指由外力造成的脑组织损伤,属于神经外科常见多发病,其发病率和致残率位居各种创伤性损伤之首,给社会和家庭造成沉重负担。颅脑外伤包括原发性脑损伤和继发性脑损伤,外力机械性冲击瞬间引起原发性脑损伤,机体启动一系列生化过程,进一步损伤脑组织,导致“损伤-炎症-损伤”的恶性循环,涉及炎症、氧化应激及细胞凋亡等多个分子机制和信号通路^[1]。因此,研究颅脑损伤发病机制及治疗方法对于改善患者预后及提高生存率具有重要意义。

淫羊藿是我国传统中药材,其主要活性成分为淫羊藿苷,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、抗抑郁、抗骨质疏松等活性^[2-4]。现代药理学研究表明,淫羊藿苷可维持神经细胞的正常形态和功能,促进神经突出生长,减轻神经元损伤,在阿尔茨海默症、抑郁症等神经系统疾病的治疗中发挥重要作用^[5-6]。微小 RNA (microRNA, miRNA) 参与细胞增殖、分化及凋亡等过程,在脑损伤炎症过程中发挥重要调节作用^[7]。淫羊藿苷可通过调节 miRNA 在软骨损伤中发挥保护作用,但其在颅脑损伤中是否可通过调节 miRNA 发挥神经保护作用值得进一步研究^[8]。*miR-223-3p* 是 miRNA 家族成员之一,与炎症反应密切相关,参与调节细胞凋亡过程^[9]。目前尚未见 *miR-223-3p* 参与颅脑损伤后引起的炎症及神经细胞凋亡过程的相关报道。本研究通过建立颅脑外伤大鼠模型,探讨淫羊藿苷是否通过 *miR-223-3p* 对颅脑外伤引起的神经损伤发挥保护作用,为临床治疗颅脑外伤提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 85 只,7 周龄,体质量 200~220 g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物许可证号 SCXK (沪) 2017-0005。动物于温度 24~26 °C、相对湿度 55%~70%、光照 12 h 明/暗交替的环境下适应性饲养 7 d,自由进食饮水。动物实验经厦门大学附属第一医院伦理委员会审核通过 (批准号 XMULL20190061)。

1.2 细胞

人皮质神经元购自美国 ATCC。

1.3 药品与试剂

淫羊藿苷 (质量分数 >98%, 批号 171123) 购自南京泽郎生物科技有限公司; *miR-223-3p* 拮抗剂 (*miR-223-3p* antagomir) 及其阴性对照 (NC) 由广州锐博生物科技有限公司合成; *miR-223-3p* 拟似物 (*miR-223-3p* mimic)、*miR-223-3p* 抑制剂 (*miR-223-3p* inhibitor) 及其 NC 由上海吉玛制药技术有限公司合成; TUNEL 试剂盒 (批号 GS008) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 大鼠白细胞介素-18 (interleukin-18, IL-18) ELISA 试剂盒 (批号 ab213909)、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 ab235646)、兔抗大鼠核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, *NLRP3*) 单抗 (批号 ab264468)、半胱氨酸蛋白酶-1 (Caspase-1) 单抗 (批号 ab238972)、B 淋巴细胞瘤 2 (B-cell lymphoma 2, *Bcl-2*) 多抗 (批号 ab194583)、*Bcl-2* 相关 X 蛋白

(Bcl-2 associated X protein, Bax) 单抗 (批号 ab182733)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 ab6721) 购自英国 Abcam 公司; 双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (批号 GM-040502A) 购自美国 Genomeditech 公司; 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 仪器

脑立体定位仪 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); InfiniteF50 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); RM2050 石蜡切片机 (德国 Leica 公司); qRT-PCR 分析系统 (美国 ABI 公司); Mini-Protean4 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 造模与分组

随机选取 70 只大鼠, ip 1%戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 俯卧固定。选择颅顶外力打击位置, 对该部位备皮消毒, 沿矢状正中线无菌切开头皮, 采用改良 Feeney 方法^[10], 使用 40 g 击锤从 25 cm 高处自由落下, 撞击控制杆, 经骨窗直接打击大鼠脑部, 造成局部脑挫裂伤, 碘伏消毒, 缝合包扎伤口。撞击后大鼠出现数秒钟呼吸暂停、四肢抽搐, 且麻醉消失后未出现瘫痪, 视为造模成功。剔除撞击过程中死亡大鼠, 另取大鼠补充造模, 最终造模成功大鼠 60 只, 随机分为模型组、淫羊藿苷 (30 mg/kg) 组、淫羊藿苷 (30 mg/kg) + NC 组和淫羊藿苷 (30 mg/kg) + *miR-223-3p antagomir* 组, 每组 15 只。另取 15 只大鼠, 切开头皮, 但不撞击, 其余操作同造模大鼠, 设为对照组。

2.2 给药

2.2.1 *miR-223-3p antagomir* 及其 NC 给药方式 大鼠麻醉后, 消毒头皮, 固定于脑立体定位仪, 根据脑立体定向图谱颅脑中线纵向切口, 前凶前方约 1.0 mm、右侧约 1.5 mm 处钻孔, 深度约 2.5 mm, 使用微量注射器将 5 μ L *miR-223-3p antagomir* 或其 NC (1 nmol/L) 注入侧脑室, 5 min 内注射完毕, 留针 10 min 后拔出。骨蜡封孔, 缝合切口。

2.2.2 给药 淫羊藿苷溶于双蒸水配制成质量浓度为 1 mg/mL 的溶液。造模前 7 d 至造模后 3 d 各给药组大鼠 ig 淫羊藿苷, 对照组和模型组 ig 双蒸水, 1 次/d。淫羊藿苷组造模后 30 min 侧 icv 0.9%氯化钠溶液; 淫羊藿苷 + NC 组造模后 30 min 侧 icv *miR-223-3p antagomir* NC; 淫羊藿苷 + *miR-223-3p*

antagomir 组造模后 30 min 侧 icv *miR-223-3p antagomir*; 对照组和模型组 ig 造模后 30 min 侧 icv 0.9%氯化钠溶液。

2.3 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠改良神经功能缺损评分(modified neurological severity scores, mNSS)的影响

末次给药 2 h 后, 按照 mNSS 评分标准^[11]评价各组大鼠神经功能, 观察大鼠运动 (包括肌肉状态及异常动作)、感觉 (包括视觉、触觉、深感觉及平衡觉) 和反射状态。mNSS 评分为 0~18 分, 神经功能正常为 0 分; 分值越高, 表明神经功能损伤越严重。

2.4 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织含水量的影响

mNSS 评分结束后, 各组随机选取 5 只大鼠, 麻醉后处死, 断头取脑, 取骨窗边缘挫裂伤灶中心脑组织约 200 mg, 电子天平称定湿质量, 放入干燥箱中, 110 $^{\circ}$ C 干燥 24 h, 称定干质量, 计算脑组织含水量。

$$\text{含水量} = (\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{干质量}$$

2.5 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平的影响

取脑组织 100 mg, 按 1:10 比例加入 0.9%氯化钠溶液, 制备 10%脑组织匀浆, 10 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 按照 ELISA 试剂盒说明书检测脑组织匀浆中 IL-18 和 IL-1 β 水平。

2.6 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织病理变化的影响

各组随机选取 5 只大鼠, 麻醉大鼠, 开胸暴露心脏, 进行左心室-升主动脉灌注, 先用 0.9%氯化钠溶液进行灌注, 至右心耳流出液体变清澈时, 改用 4%多聚甲醛灌注, 大鼠表现四肢僵硬时停止灌注, 断头取脑, 以挫裂伤灶为中心, 冠状取材 (0.5 cm 厚脑组织), 于 4%多聚甲醛中固定, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 制作石蜡切片 (厚 4 μ m), 苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察大脑皮质组织病理变化。

2.7 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织神经元凋亡的影响

取脑组织切片, 常规脱蜡、水化, 双蒸水冲洗, 加入蛋白酶 K 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 以 PBS 溶液冲洗; 加入 TUNEL 反应液于 37 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 以 PBS 溶液冲洗; 加入 Counter-AP 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, 以 PBS 溶液冲洗; 加入 BCIP/NBT 于 37 $^{\circ}$ C 显色, 自来水冲洗; 加入 FastRed 于 37 $^{\circ}$ C 显色,

晾干后封片,于显微镜下取 5 个互不重叠视野,观察棕褐色 TUNEL 阳性细胞,计算凋亡率。

凋亡率 = TUNEL 阳性细胞数/总细胞数

2.8 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 *miR-223-3p* 和 *NLRP3* mRNA 表达的影响

处死各组剩余大鼠,断头取脑,取挫裂伤灶中心脑皮质 70 mg,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。将 *U6* 作为 *miR-223-3p* 内参,将 β -actin 作为 *NLRP3* 内参。引物序列: *miR-223-3p* 上游引物 5'-ACGTAGCTAGC-GCCATGGTC-3',下游引物 5'-CATCGGCTAGCG-ATGCATCG-3'; *U6* 上游引物 5'-AGGCTAGCGC-ATCGCGATGC-3',下游引物 5'-ATTAGCCCAGCT-AGCGCCGA-3'; *NLRP3* 上游引物 5'-CGATCGGA-CATCGATAGAT-3',下游引物 5'-TCGATCAGCGA-TGCACATG-3'; β -actin 上游引物 5'-ATCCGATCG-AGCAGATCACGT-3',下游引物 5'-TCAGGACTG-ACGCATGCATCG-3'。

2.9 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 *NLRP3*、Caspase-1、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

取挫裂伤灶中心脑皮质 70 mg,冰上研磨匀浆,加入裂解液,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,蛋白煮沸变性,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,加入含 5%脱脂奶粉的封闭液封闭 2 h;加入 *NLRP3* 抗体(1:1000)、Caspase-1 抗体(1:500)、Bcl-2 抗体(1:500)、Bax 抗体(1:800)和 β -actin 抗体(1:800),4 ℃ 孵育过夜, TBST 溶液洗涤;加入 HRP 标记的 IgG 抗体(1:2000),室温孵育 1 h, TBST 溶液洗涤,加入 ECL 发光液显色,采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.10 双荧光素酶报告基因系统检测 *miR-223-3p* 靶基因

运用 TargetScan 等软件在线预测 *miR-223-3p* 与 *NLRP3* 互补序列,将 *NLRP3* 的 3'-UTR 序列插入报告载体中,构建野生型 *NLRP3 wt* 和突变型 *NLRP3 mut*,使用 Lipofectamine™ 2000,分别将 *miR-223-3p mimic*、*miR-223-3p inhibitor* 及 NC 与 *NLRP3 wt*、*NLRP3 mut* 共转染至人皮质神经元,使用试剂盒测定荧光值。

2.11 统计学方法

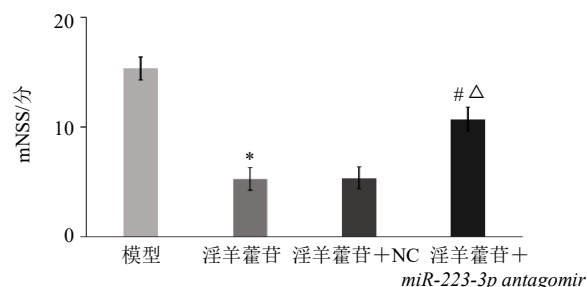
分析数据采用 SPSS 24.0 统计学软件,计量资

料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠 mNSS 的影响

如图 1 所示,与模型组比较,淫羊藿苷组大鼠 mNSS 显著降低 ($P < 0.05$);与淫羊藿苷组、淫羊藿苷 + NC 组比较,淫羊藿苷 + *miR-223-3p antagomir* 组大鼠 mNSS 显著升高 ($P < 0.05$)。



与模型组比较: * $P < 0.05$; 与淫羊藿苷组比较: # $P < 0.05$; 与淫羊藿苷 + NC 组比较: Δ $P < 0.05$

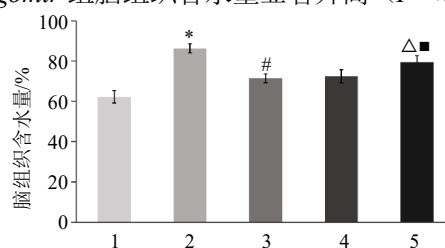
* $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs icariin group; Δ $P < 0.05$ vs icariin + NC group

图 1 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠 mNSS 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 1 Effect of icariin on mNSS of rats with craniocerebral trauma ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.2 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织含水量的影响

如图 2 所示,与对照组比较,模型组脑组织含水量显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,淫羊藿苷组脑组织含水量显著降低 ($P < 0.05$);与淫羊藿苷组、淫羊藿苷 + NC 组比较,淫羊藿苷 + *miR-223-3p antagomir* 组脑组织含水量显著升高 ($P < 0.05$)。



1-对照组 2-模型组 3-淫羊藿苷组 4-淫羊藿苷+NC 组 5-淫羊藿苷+*miR-223-3p antagomir* 组 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与淫羊藿苷组比较: Δ $P < 0.05$; 与淫羊藿苷 + NC 组比较: ■ $P < 0.05$, 图 4~6 同

1-control group 2-model group 3-icariin group 4-icariin + NC group 5-icariin + *miR-223-3p antagomir* group * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; Δ $P < 0.05$ vs icariin group; ■ $P < 0.05$ vs icariin + NC group, same as Figs. 4~6

图 2 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织含水量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of icariin on brain water content of rats with craniocerebral trauma ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

3.3 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组

比较,淫羊藿苷组脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P<0.05$);与淫羊藿苷组、淫羊藿苷+NC 组比较,淫羊藿苷+*miR-223-3p antagomir* 组脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P<0.05$)。

表 1 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Effect of icariin on IL-18 and IL-1 β levels in brain tissue of rats with craniocerebral trauma ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-18/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	65.26 $\pm$ 15.12	112.58 $\pm$ 20.15
模型	—	512.36 $\pm$ 26.36*	735.84 $\pm$ 32.56*
淫羊藿苷	30	259.47 $\pm$ 21.15 [#]	326.87 $\pm$ 26.81 [#]
淫羊藿苷+NC	30	263.48 $\pm$ 23.58	345.12 $\pm$ 23.45
淫羊藿苷+ <i>miR-223-3p antagomir</i>	30	405.91 $\pm$ 25.49 ^{Δ■}	568.48 $\pm$ 31.72 ^{Δ■}

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: [#] $P<0.05$; 与淫羊藿苷组比较: ^Δ $P<0.05$; 与淫羊藿苷+NC 组比较: [■] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs model group; ^Δ $P<0.05$ vs icariin group; [■] $P<0.05$ vs icariin + NC group

3.4 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织病理变化的影响

如图 3 所示,对照组大鼠大脑皮质结构正常,神经元细胞形态规整,未见损伤灶;模型组可见明显损伤灶,神经元细胞发生空泡化,细胞减少,结构松散,红细胞聚集;淫羊藿苷组和淫羊藿苷+NC 组损伤面积、神经元空泡化及红细胞数较模型组均减少;淫羊藿苷+*miR-223-3p antagomir* 组损伤灶较损伤组有所减小,但效果不及淫羊藿苷组和淫羊藿

苷+NC 组,仍可见空泡化细胞,红细胞聚集。

3.5 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织神经元凋亡的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组大脑皮质神经元凋亡率显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,淫羊藿苷组大脑皮质神经元凋亡率显著降低 ($P<0.05$);与淫羊藿苷组、淫羊藿苷+NC 组比较,淫羊藿苷+*miR-223-3p antagomir* 组大脑皮质神经元凋亡率显著升高 ($P<0.05$)。

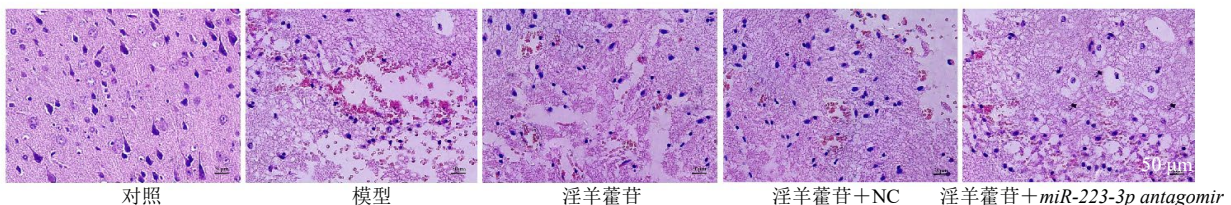


图 3 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 3 Effect of icariin on pathological changes of brain tissue of rats with craniocerebral trauma (HE, ×400)

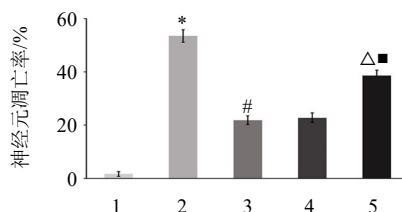
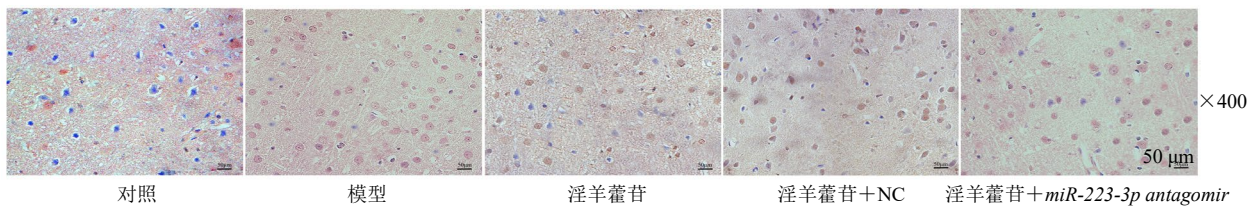


图 4 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织神经元凋亡的影响

Fig. 4 Effect of icariin on neuronal apoptosis of brain tissue of rats with craniocerebral trauma

3.6 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 *miR-233-3p* 和 *NLRP3* mRNA 表达的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组脑组织 *miR-233-3p* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$), *NLRP3* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$);与模

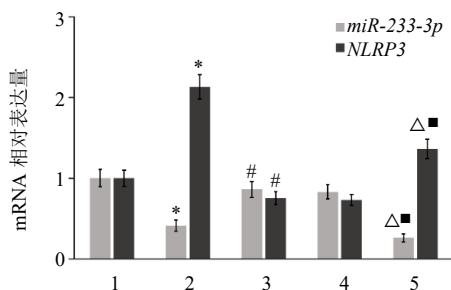


图 5 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 *miR-233-3p* 和 *NLRP3* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Effect of icariin on *miR-233-3p* and *NLRP3* mRNA expressions in brain tissue of rats with craniocerebral trauma ($\bar{x} \pm s, n=5$)

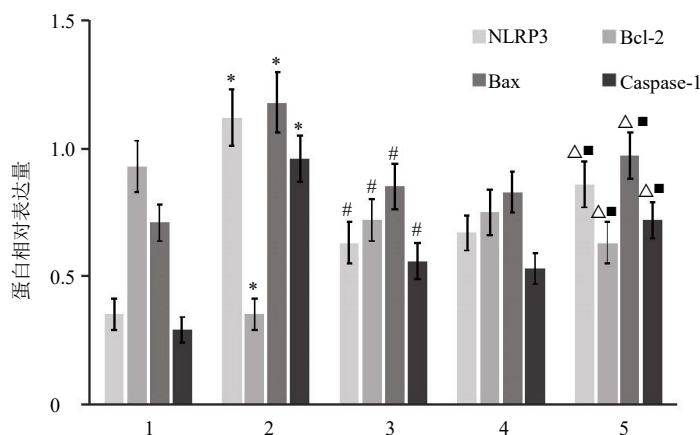
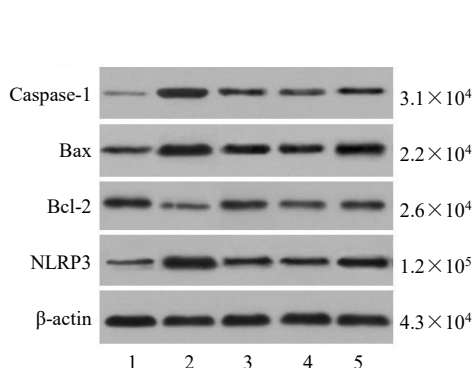


图 6 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 *NLRP3*、*Caspase-1*、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 6 Effect of icariin on *NLRP3*, *Bcl-2*, *Bax*, *Caspase-1* protein expressions in brain tissue of rats with craniocerebral trauma ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.8 双荧光素酶报告基因系统检测 *miR-233-3p* 对 *NLRP3* 的靶向性

如图 7 所示,转染 *miR-233-3p mimic* 后, *NLRP3 wt* 相对荧光素酶活性显著降低 ($P<0.05$), 转染 *miR-233-3p inhibitor* 后, *NLRP3 wt* 相对荧光素酶活性显著升高 ($P<0.05$)。

4 讨论

本研究成功建立颅脑外伤大鼠模型,损伤部位准确一致,与临床脑组织局部创伤发生机制相似,

型组比较,淫羊藿苷组脑组织 *miR-233-3p* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$), *NLRP3* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$);与淫羊藿苷组、淫羊藿苷+NC 组比较,淫羊藿苷+*miR-233-3p antagonist* 组脑组织 *miR-233-3p* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$), *NLRP3* mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.7 淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠脑组织 *NLRP3*、*Caspase-1*、*Bcl-2* 和 *Bax* 蛋白表达的影响

如图 6 所示,与对照组比较,模型组脑组织 *NLRP3*、*Bax* 和 *Caspase-1* 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), *Bcl-2* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,淫羊藿苷组脑组织 *NLRP3*、*Bax* 和 *Caspase-1* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), *Bcl-2* 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$);与淫羊藿苷组、淫羊藿苷+NC 组比较,淫羊藿苷+*miR-233-3p antagonist* 组脑组织 *NLRP3*、*Bax* 和 *Caspase-1* 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$), *Bcl-2* 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$)。

能够反映颅脑损伤相关生理病理机制。颅脑损伤包括原发性损伤和继发性损伤,氧化应激反应、炎症反应、自由基损伤以及神经毒性均在损伤过程中发挥重要作用,其中炎症反应在继发性损伤中至关重要^[12]。颅脑损伤后即引起局部炎症反应,造成局部神经组织变性坏死、血脑屏障破坏、神经毒性增加等,加重患者病情,因此抑制炎症反应引起的坏死性凋亡是治疗颅脑损伤的重要环节^[13]。

脑水肿和细胞凋亡是颅脑外伤主要病理表现,

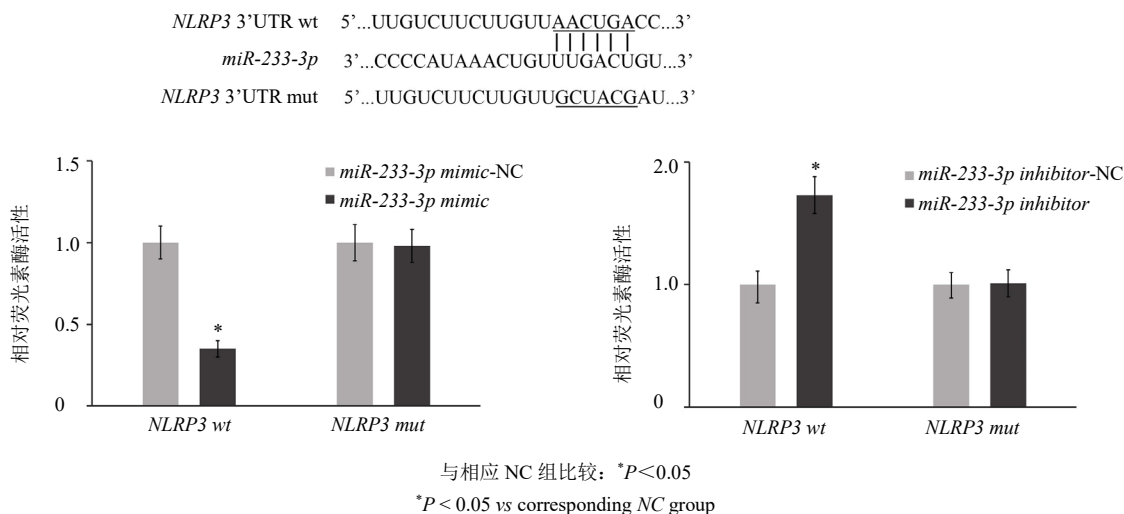


图 7 miR-233-3p 靶向调控 NLRP3

Fig. 7 miR-233-3p target and regulate NLRP3

外力损伤脑部后导致脑水肿,引起血脑屏障通透性增加,产生大量自由基,不仅加重水肿症状,产生炎症级联反应,同时还可导致神经兴奋性增加,损伤神经元细胞,进而导致细胞凋亡,引起神经缺损症状^[14]。通过药物抑制神经炎症反应、防治神经元细胞凋亡、减少继发性脑损伤,可有效改善患者预后。研究发现,淫羊藿苷具有明显的抗炎作用,注射淫羊藿苷可减轻猪牙周炎局部炎症反应,促进牙周组织再生^[15]。淫羊藿苷在皮瓣缺血再灌注损伤动物模型中也具有明显的抗炎作用,可提高皮瓣存活率,减轻皮瓣再损伤^[16]。此外,淫羊藿苷还具有明显的神经保护作用,可抑制帕金森小鼠中促炎因子产生,减轻神经毒性^[17]。IL-18、IL-1 β 在脑损伤炎症中发挥重要作用,抑制二者水平可明显减轻缺血性脑卒中炎症反应,改善神经缺陷^[18]。本研究结果显示,与模型组比较,淫羊藿苷组大鼠 mNSS 降低,脑组织含水量降低,脑组织 IL-18 和 IL-1 β 水平降低,神经元细胞凋亡率降低,脑组织病理学改善明显,提示淫羊藿苷可减轻颅脑外伤大鼠炎症反应,改善继发性脑损伤,还可抑制神经元细胞凋亡,从而发挥神经保护作用。

miRNA 是高度保守的小分子 RNA,参与调控多种基因表达,其表达水平与组织、细胞的病理生理过程有关,其异常表达反映机体病理状态,可作为疾病治疗靶点。*miR-223* 是一种重要 miRNA,可通过多种途径调节炎症反应,在肺炎、结肠炎等炎症性疾病中发挥免疫调节作用^[19-20]。*miR-223-3p* 在幽门螺旋杆菌相关性胃炎中异常表达,诱导促进胃

癌发生发展^[21]。脑损伤后, NLRP3 炎症小体激活, Caspase-1 表达增加,促使 IL-18、IL-1 β 等促炎因子成熟和分泌,诱导细胞凋亡,表现为抑凋亡基因 Bcl-2 表达降低,促凋亡基因 Bax 表达升高^[22]。*miR-223-3p* 可靶向调控 NLRP3,减轻炎症反应,减少神经元细胞损伤,从而发挥脑保护作用^[23]。淫羊藿苷可抑制 NLRP3 介导的细胞凋亡,减轻骨关节炎炎症^[24]。本研究结果显示,模型组脑组织 *miR-223-3p* mRNA 表达水平低于对照组,而淫羊藿苷组 *miR-223-3p* mRNA 表达水平升高,提示淫羊藿苷可能对 *miR-223-3p* 表达具有调节作用。为验证淫羊藿苷是否通过 *miR-223-3p* 发挥作用,大鼠 ig 淫羊藿苷同时注射 *miR-223-3p* antagomir,发现 *miR-223-3p* mRNA 表达水平低于淫羊藿苷组,表明淫羊藿苷可调节颅脑外伤大鼠脑组织 *miR-223-3p* 表达; NLRP3 mRNA 表达与 *miR-223-3p* mRNA 表达趋势相反,双荧光素酶实验结果显示, *miR-223-3p* 可直接靶向调节 NLRP3 表达;抑制 *miR-223-3p* 表达后,与淫羊藿苷组比较,淫羊藿苷 + antagomir 组脑组织 NLRP3、Bax 和 Caspase-1 蛋白表达水平升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低,提示淫羊藿苷通过上调 *miR-223-3p* 表达,靶向抑制 NLRP3 炎症小体功能,从而抑制下游 Caspase-1 蛋白表达,减少神经元细胞凋亡。

综上所述,淫羊藿苷对颅脑外伤大鼠具有神经保护作用,可能通过调控 *miR-223-3p* 表达、抑制其靶蛋白 NLRP3 表达、减轻炎症反应、减少神经元细胞凋亡从而发挥脑保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杨扬, 程璐璐, 李力, 等. 大鼠创伤性颅脑损伤后不同时间点施加高压氧治疗的影响 [J]. 神经解剖学杂志, 2019, 35(4): 407-412.
- [2] 刘亚林, 黄冕, 冯晶, 等. 基于 Micro-CT 技术分析淫羊藿苷和朝藿定 C 对糖皮质激素性骨质疏松症小鼠骨组织微结构的影响 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(9): 1733-1739.
- [3] 刁婷婷, 田骋, 王洪亮, 等. 淫羊藿苷通过 VEGF 通路对缺氧诱导的脉络膜视网膜内皮细胞系 RF/6A 增殖、侵袭和迁移能力的调节作用 [J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(12): 1819-1823.
- [4] 尤旭, 赵海霞, 杨思琪, 等. 淫羊藿苷激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻自然衰老大鼠睾丸生殖细胞 DNA 损伤研究 [J]. 中草药, 2019, 50(12): 2915-2921.
- [5] 高洁, 蒋志滨, 李文, 等. 基于维生素 D 轴的淫羊藿苷干预阿尔兹海默病机制探讨 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(12): 2988-2989.
- [6] Cao L H, Qiao J Y, Huang H Y, *et al.* PI3K-AKT signaling activation and icariin: The potential effects on the perimenopausal depression-like rat model [J]. *Molecules*, 2019, 24(20): 3700.
- [7] Yu J, Chen J, Yang H, *et al.* Overexpression of *miR-200a-3p* promoted inflammation in sepsis-induced brain injury through ROS-induced NLRP3 [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(5): 1811-1823.
- [8] Liu N, Zhang T, Cao B R, *et al.* Icariin possesses chondroprotective efficacy in a rat model of dexamethasone-induced cartilage injury through the activation of *miR-206* targeting of cathepsin K [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 1039-1047.
- [9] Zhang L, Li H, Zang Y, *et al.* NLRP3 inflammasome inactivation driven by *miR-223-3p* reduces tumor growth and increases anticancer immunity in breast cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2180-2188.
- [10] Chen X, Pan Z, Fang Z, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acid attenuates traumatic brain injury-induced neuronal apoptosis by inducing autophagy through the upregulation of SIRT1-mediated deacetylation of Beclin-1 [J]. *J Neuroinflamm*, 2018, 15(1): 310.
- [11] Asadi Y, Gorjipour F, Behrouzifar S, *et al.* Irisin peptide protects brain against ischemic injury through reducing apoptosis and enhancing BDNF in a rodent model of stroke [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(8): 1549-1560.
- [12] Clark D P Q, Perreau V M, Shultz S R, *et al.* Inflammation in traumatic brain injury: Roles for toxic A₁ astrocytes and microglial-astrocytic crosstalk [J]. *Neurochem Res*, 2019, 44(6): 1410-1424.
- [13] Wang Z, Zhou F, Dou Y, *et al.* Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats via suppressing apoptosis, inflammation, oxidative stress, DNA damage, and mitochondria injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(1): 74-91.
- [14] Xue Z, Song Z, Wan Y, *et al.* Calcium-sensing receptor antagonist NPS2390 attenuates neuronal apoptosis through intrinsic pathway following traumatic brain injury in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(2): 589-594.
- [15] Zhang X, Han N, Li G, *et al.* Local icariin application enhanced periodontal tissue regeneration and relieved local inflammation in a minipig model of periodontitis [J]. *Int J Oral Sci*, 2018, 10(2): 19.
- [16] 刘昌雄, 黄雄杰, 肖湘君, 等. 淫羊藿苷对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤后炎症反应的抑制作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(6): 532-535.
- [17] Zhang B, Wang G, He J, *et al.* Icariin attenuates neuroinflammation and exerts dopamine neuroprotection via an Nrf2-dependent manner [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 92.
- [18] Li Q, Cao Y, Dang C, *et al.* Inhibition of double-strand DNA-sensing cGAS ameliorates brain injury after ischemic stroke [J]. *EMBO Mol Med*, 2020, 12(4): e11002.
- [19] Zhang D, Lee H, Wang X, *et al.* A potential role of microvesicle-containing *miR-223/142* in lung inflammation [J]. *Thorax*, 2019, 74(9): 865-874.
- [20] Neudecker V, Haneklaus M, Jensen O, *et al.* Myeloid-derived *miR-223* regulates intestinal inflammation via repression of the NLRP3 inflammasome [J]. *J Exp Med*, 2017, 214(6): 1737-1752.
- [21] Yang F H, Xu Y G, Liu C, *et al.* NF- κ B/*miR-223-3p*/ARID1A axis is involved in *Helicobacter pylori* CagA-induced gastric carcinogenesis and progression [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(1): 1-13.
- [22] He J N, Zhang X J. *miR-668* inhibitor attenuates mitochondrial membrane potential and protects against neuronal apoptosis in cerebral ischemic stroke [J]. *Folia Neuropathol*, 2020, 58(1): 22-29.
- [23] 高蒙, 黄娟. 白藜芦醇通过调节 *miR-223-3p*/NLRP3 通路发挥对幼年大鼠脑膜炎模型皮质神经元的保护作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1161-1169.
- [24] Zu Y, Mu Y, Li Q, *et al.* Icariin alleviates osteoarthritis by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis [J]. *J Orthop Surg Res*, 2019, 14(1): 307.

[责任编辑 李亚楠]