·基础研究·

鞣花酸靶向miR-18a/TSP-1轴减轻缺血性脑损伤

刘怡珂[1,2]，李超凡[3]，宋海燕[2]，胡雨辰[1]，王如梦[1]，陈春艳[1,2*]

[1]内蒙古医科大学巴彦淖尔临床学院，内蒙古 巴彦淖尔 015000；[2]巴彦淖尔市医院神经内科，内蒙古 巴彦淖尔 015000；[3]青海大学医学院，青海 西宁 810000

［摘 要］ **目的：**探讨鞣花酸（ellagic acid，EA）是否通过调控miR-18a/血小板反应蛋白1（thrombospondin-1，TSP-1）轴对缺血性损伤脑组织发挥保护作用。**方法：**采用大鼠脑微血管内皮细胞（rat brain microvascular endothelial cells，RBMEC）氧糖剥夺（oxygen-glucose deprivation，OGD）模型和大鼠大脑中动脉闭塞（middle cerebral artery occlusion，MCAO）模型模拟缺血性脑损伤。采用TUNEL染色、流式细胞术和蛋白印迹法（Western blot，WB）检测RBMEC凋亡及凋亡相关蛋白；通过5-乙炔基-2′-脱氧尿苷（5-ethynyl-2′-deoxyuridine，EdU）、Transwell、管形成实验评估RBMEC的增殖、迁移及成管能力；利用miRNA微阵列检测EA预处理MCAO大鼠脑组织中microRNA的差异表达，并通过实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qRT-PCR）验证；生物信息学预测miR-18a的靶点，并通过WB、双荧光素酶报告基因实验及挽救实验进行验证。**结果：**与OGD组相比，EA干预组RBMEC凋亡减少，细胞增殖、迁移增多，管形成数量增多。EA预处理能显著改善MCAO大鼠Longa评分，减轻脑组织病理损伤并减少神经细胞凋亡。miRNA微阵列显示，与对照组相比，EA干预后缺血脑组织中miR-18a表达差异最大；qRT-PCR证实EA干预后RBMEC miR-18a的表达显著高于对照组；生物信息学预测TSP-1是miR-18a的直接靶点，WB证实转染miR-18a mimic后，RBMEC TSP-1的表达下调；双荧光素酶报告实验证实TSP-1是miR-18a的靶点；挽救实验表明，抑制miR-18a可抵消EA对RBMEC的保护作用。**结论：**EA通过调控miR-18a/TSP-1轴发挥抗凋亡和促血管新生作用，从而减轻缺血性脑损伤。该信号轴可能成为卒中后神经保护的潜在干预靶点。

［关键词］ 鞣花酸；缺血性脑卒中；血管新生；miR-18a；血小板反应蛋白-1

［中图分类号］ R364.1 ［文献标志码］ A ［文章编号］ 1007-4368（2026）10-1479-13

doi：10.7655/NYDXBNSN260053

Ellagic acid attenuates ischemic brain injury by targeting the miR-18a/TSP-1 axis

Liu Yike[1,2], Li Chaofan[3], Song Haiyan[2], Hu Yuchen[1], Wang Rumeng[1], Chen Chunyan[1,2*]

[1]Bayannur Clinical College of Inner Mongolia Medical University, Bayannur 015000; [2]Department of Neurology, Bayannur City Hospital, Bayannur 015000; [3]Medical College of Qinghai University, Xining 810000, China

［**Abstract**］ **Objective:** To investigate whether ellagic acid（EA）exerts a protective effect on ischaemic brain injury by regulating the miR-18a/thrombospondin-1（TSP-1）axis. **Methods:** Ischemic brain injury was simulated using rat brain microvascular endothelial cells（RBMECs）oxygen-glucose deprivation（OGD）model and rat middle cerebral artery occlusion（MCAO）model. Apoptosis and apoptosis-related proteins in RBMECs were assessed *via* TUNEL staining, flow cytometry, and Western blotting（WB）. The proliferation, migration, and tubulogenesis capabilities of RBMECs were assessed using EdU, Transwell, and tube formation assays; MicroRNA microarray analysis was employed to detect differentially expressed microRNAs in brain tissue from MCAO rats following EA intervention, with validation *via* real-time quantitative polymerase chain reaction（qRT-PCR）. Bioinformatics prediction of miR-18a's action pathways was corroborated through WB, dual luciferase reporter assays, and rescue experiments. **Results:** Compared with the OGD group, the EA intervention group showed reduced apoptosis, increased proliferation and migration, and a higher number of tube formations in RBMECs. In MCAO rats, EA pretreatment markedly improved Longa scores, alleviated brain tissue pathological damage, and reduced neuronal apoptosis. MicroRNA microarray analysis revealed that miR-18a exhibited the most significant differential expression in ischaemic brain tissue following EA intervention compared to controls. qRT-PCR results demonstrated markedly elevated

［基金项目］ 内蒙古自治区卫生健康科技计划（202201625）；内蒙古医科大学联合项目（YKD2021LH097）

*通信作者（Corresponding author），E-mail：ccy13948386077@163.com（ORCID：0009-0007-7148-7599）

miR-18a expression in RBMECs after EA treatment. Bioinformatics prediction identified TSP-1 as a direct target of miR-18a. Western blotting confirmed that transfection with miR-18a mimic significantly downregulated TSP-1 expression in RBMECs. Dual luciferase reporter assays validated TSP-1 as a direct target of miR-18a. Rescue experiments demonstrated that inhibiting miR-18a reversed EA's aforementioned protective effects on RBMECs. **Conclusion**: EA exerts anti-apoptotic and pro-angiogenic effects by modulating the miR-18a/TSP-1 signalling axis, thereby mitigating ischaemic brain injury. This axis may represent a potential therapeutic target for post-stroke neuroprotection.

[**Key words**] ellagic acid; ischemic stroke; angiogenesis; miR-18a; thrombospondin-1

[J Nanjing Med Univ, 2026, 46(10): 1479-1491]

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)是一种高病死率、高致残率且易复发的脑血管疾病,给全球医疗卫生系统带来沉重负担[1]。静脉溶栓或机械取栓为急性期的治疗策略,但由于治疗时间窗狭窄及缺血/再灌注损伤风险,临床应用受到了极大的限制[2-3]。IS的重要病理生理过程涉及神经-血管单元破坏,导致血脑屏障破坏、微循环受损和神经元死亡,其中脑微血管内皮细胞(brain microvascular endothelial cell, BMEC)功能障碍和死亡起着核心作用[4]。因此,促进缺血区域血管新生能有效恢复脑血流、促进神经修复,对改善卒中后脑功能恢复具有重要意义,被认为具有广阔的临床应用前景[5]。

微小RNA(microRNA, miRNA)是一类广泛存在于真核生物中的非编码小分子RNA,通过调节转录后基因的表达,在多种疾病的发病机制中具有重要作用[6]。其中,miR-18a已被证实广泛参与血管发育及多种血管相关病理过程[7-11]。研究表明,miR-18a的异常表达参与了脑动静脉畸形[8]、肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)[11]的发病过程。张红利等[12]发现在IS人群中miR-18a表达降低,且与不良预后相关;而在蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)模型中miR-18a过表达有利于神经功能恢复[9]。生物信息学分析及已有研究证明,血小板反应蛋白1(thrombospondin-1, TSP-1)作为一种强效的内源性血管新生抑制因子,能够抑制内皮细胞的迁移、增殖及管形成能力,其转录基因Thbs1被预测为miR-18a的关键靶基因,该通路在静脉畸形(venous malformation, VM)和糖尿病足中也得到了验证[13-14],而在IS中尚未有报道。

鞣花酸(ellagic acid, EA)是一种天然多酚,存在于多种水果和坚果中,具有抗氧化、抗炎和抗凋亡作用[15-16]。研究显示,EA可减轻大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型中的神经元凋亡和氧化应激,对脑缺血再灌注损伤具有保护潜力[17-18]。然而,EA能否直接调控BMEC的血管新生功能,参与IS后的血管修复,以及是否通过miRNA介导的信号通路发挥作用,尚未见报道。因此,本研究提出以下科学假设:EA可能通过上调miR-18a表达,靶向抑制下游靶基因Thbs1的转录翻译,解除TSP-1对血管新生的抑制作用,进而改善BMEC功能、减轻缺血性脑损伤。为验证这一假设,本研究采用氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)细胞模型和大鼠MCAO模型,系统探讨EA对缺血性脑损伤的保护作用及miR-18a/TSP-1轴的调控机制,为IS的治疗提供新的实验依据和潜在靶点。

1　材料和方法

1.1　材料

永生化大鼠脑微血管内皮细胞系iCell-0032a购自iCell Bioscience(上海)有限公司。成年雄性Sprague-Dawley大鼠(8~10周龄,220~250 g)购自维通利华(北京)公司,许可证号SYXK(蒙)2020-0003。

EA(纯度:99.75%)购自美国MCE有限公司。一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(红色荧光)、BeyoClick™ EdU-488细胞增殖检测试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物有限公司;Lipofectamine™ 3000转染试剂购自美国赛默飞世尔科技公司;TSP-1抗体、B细胞淋巴瘤-2蛋白(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)抗体、细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)抗体、细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)抗体、β-actin抗体购自武汉三赢生物科技有限公司;HRP标记山羊抗兔/小鼠IgG二抗购自英国Abcam公司;ECL化学发光底物购自安徽白鲨生物科技有限公司;miR-18a mimic及antagomir、双荧光素酶报告系统由西安基

恩科生物合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

RBMEC采用含15%胎牛血清、1%青霉素及1%链霉素的DMEM培养基，置于37 ℃、5% CO_2、95%饱和湿度的恒温培养箱中培养。细胞传代培养至对数生长期后用于后续实验。

1.2.2 CCK-8检测RBMEC细胞活力

将RBMEC接种于96孔板，孵育24 h后更换为含不同浓度EA的完全培养液，每个浓度设5个复孔。继续培养24 h后加入CCK-8试剂避光孵育2 h，酶标仪在450 nm波长下测定各孔吸光度，计算相对于对照组的细胞活力。

1.2.3 OGD模型的建立与EA干预

将RBMEC接种于培养板，培养至细胞融合度60%~70%，更换为无糖DMEM培养基，置于三气培养箱（95% N_2、5% CO_2，37 ℃）中培养8 h以模拟OGD损伤。随后更换为正常培养基，分别给予不同浓度EA干预24 h。

1.2.4 TUNEL染色

制备细胞爬片，PBS缓冲液清洗3次后，4%多聚甲醛室温固定20 min；随后采用0.4% Triton X-100室温通透处理10 min。按照TUNEL检测试剂盒说明书配制TdT酶反应液，于37 ℃避光孵育60 min，使荧光标记dUTP掺入DNA断裂末端。PBS洗涤后，使用抗荧光淬灭封片剂封片。倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.5 流式细胞术（flow cytometry，FCM）

收集干预后的细胞，用PBS漂洗并重悬为5×10^4个/mL，随后加入Annexin V和碘化丙啶（propidium iodide，PI）染色，室温避光孵育15 min，使用流式细胞仪进行分析。

1.2.6 蛋白质印迹（Western blot，WB）

用RIPA裂解液提取细胞或脑组织总蛋白，经SDS-PAGE分离，转印至PVDF膜上，一抗4 ℃孵育过夜。HRP标记的二抗孵育后，使用ECL检测系统显影条带。

1.2.7 EdU实验

将细胞与20 μmol/L EdU工作液在37 ℃孵育2 h，移除培养基用4%多聚甲醛固定细胞，PBS洗涤后以0.5% Triton X-100通透细胞，加入Click反应混合物，避光孵育30 min，用Hoechst33342染细胞核，洗涤后在荧光显微镜下观察并计算EdU阳性细胞比例。

1.2.8 Transwell实验

收集干预后的RBMEC，用无血清培养基重悬为5×10^4个/mL密度。将200 μL细胞悬液加入上室，下室加入600 μL含10%胎牛血清的完全培养基作为趋化剂。37 ℃孵育24 h后，用4%多聚甲醛固定15 min，0.1%结晶紫染色20 min，PBS漂洗。在倒置显微镜下拍摄5个随机视野的迁移细胞并进行计数。

1.2.9 管形成实验

实验前1 d，将基质胶置于冰盒中，4 ℃过夜缓慢解冻。解冻后，用培养基按1∶1比例稀释基质胶制备工作液。将50 μL工作液加入12孔板各孔中，于37 ℃孵育促进聚合和凝固。将经过OGD并给予不同浓度EA处理的RBMEC接种于铺有基质胶的板上。培养24 h后，观察管状网络结构的形成情况。使用倒置显微镜捕获图像，并利用Image J软件量化分支节点数。

1.2.10 透射电镜观察

按标准程序制备样品用于透射电镜观察：细胞用2.5%戊二醛和1%锇酸固定，梯度乙醇脱水，环氧树脂包埋。制备超薄切片，醋酸铀和柠檬酸铅进行双重染色，在透射电镜下观察线粒体超微结构。

1.2.11 MCAO动物模型的建立

大鼠适应性饲养1周［温度（24±2）℃、湿度60%］，自由饮食饮水。1周后，将动物随机分为3组（每组6只）：①假手术组；②MCAO组；③EA+MCAO组。EA+MCAO组参考已发表的方案[19]，于MCAO术前10 d起每日予以50 mg/kg EA（溶解于0.5%羧甲基纤维素钠的生理盐水溶液中，终浓度5 mg/mL）灌胃，持续10 d；假手术组和MCAO组给予等体积羧甲基纤维素钠生理盐水混悬液。第11天参照既往研究描述的方法进行MCAO手术，采用盲法在术后第1、3、7、10天使用Longa评分法评估神经功能缺损[20]。Longa评分1~3分判定为模型建立成功，并纳入后续实验分析。于MCAO术后第10天完成神经功能评分后，对大鼠进行麻醉并处死，迅速取脑。MCAO组及EA+MCAO组分离缺血侧大脑皮质及纹状体周围的缺血半暗带组织，假手术组采集相应解剖部位的脑组织。根据后续实验用途对采集的脑组织进行分割。部分组织置于4%多聚甲醛中固定，用于后续HE染色及TUNEL染色；其余组织经液氮快速冷冻后保存于-80 ℃，分别用于总RNA和总蛋白提取及后续分子生物学检测。其中，从MCAO组和EA+MCAO组分别随机选取3只大鼠的缺血半暗带脑组织进行miRNA微阵列分析，每只大鼠作为

1个独立生物学重复，样本间不进行混合。其余相关组织样本按照相应实验要求用于WB检测。实验操作经巴彦淖尔市医院伦理委员会批准（批件号：BSYY-2021019）。

1.2.12 苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色

脑组织在4%多聚甲醛中固定24 h，经梯度乙醇脱水，石蜡包埋，切成5 μm厚切片。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后，依次进行苏木精染色、盐酸乙醇分化、流水返蓝和伊红复染，在光学显微镜下观察形态结构。

1.2.13 miRNA微阵列分析

用TRIzol提取1.2.11干预后大鼠脑组织缺血半暗带总RNA，Agilent 2100生物分析仪确认RNA完整性。按说明书完成Agilent大鼠miRNA微阵列的miRNA表达谱分析。原始数据使用GeneSpring GX软件进行标准化和分析。差异表达筛选标准为：变化倍数（fold change，FC）>2.0或FC<0.5，且$P < 0.05$。

1.2.14 生物信息学预测

利用miRWalk、TargetScan和StarBase三大在线数据库，独立预测miR-18a-5p在大鼠中的潜在靶基因。对大鼠miR-18a序列进行检索。随后，借助Metascape平台对候选基因进行基因本体论（gene ontology，GO）富集分析。

1.2.15 核酸转染

将对数生长期的RBMEC以1×10^5个/孔的密度接种于6孔板中，将细胞置于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养至融合度达到70%~80%。将5 μL Lipofectamine 3000试剂与100 pmol miR-18a antagomir或阴性对照（NC组）分别稀释于125 μL Opti-MEM™无血清培养基中，轻柔混匀。随后将两份稀释液混合（总体积250 μL），室温静置孵育15~20 min。随后，逐滴加入已更换为新鲜无血清培养基的细胞中，轻摇混匀。于37 ℃、5% CO_2培养箱中孵育6 h后，更换为完全培养基继续培养18 h，随后按1.2.3中方法进行OGD造模与EA干预实验。

1.2.16 实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qRT-PCR）

用TRIzol从RBMEC中提取总RNA，按PrimeScript RT试剂盒说明反转录为cDNA，以miScript SYBR Green PCR试剂盒定量miR-18a表达，以U6作为内参。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA相对表达量。

1.2.17 双荧光素酶报告基因实验

将包含预测结合位点的大鼠Thbs1基因3′-UTR野生型（WT）或种子序列突变型（MUT）片段克隆至psiCHECK-2载体中。使用Lipofectamine 3000共转染miR-18a mimic或阴性对照，转染48 h后，按试剂盒说明依次测定萤火虫与海肾荧光素酶活性，以海肾/萤火虫荧光素酶活性比值校正转染效率，并将转染WT质粒与阴性对照组的相对荧光素酶活性归一化为1.0，计算各实验组的相对活性。

1.3 统计学方法

所有统计分析均使用GraphPad Prism8软件进行。数据以均值±标准差（$\bar{x} \pm s$）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（one-way ANOVA），事后检验采用Tukey法。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EA减轻OGD诱导的RBMEC损伤

CCK-8实验表明，在非缺氧条件下，≤50 μmol/L的EA干预24 h对RBMEC未显示出明显的细胞毒性（图1A）。25 μmol/L和50 μmol/L EA处理的细胞活力较高，因此用于后续试验。

TUNEL染色结果显示，与Control组相比，OGD组TUNEL阳性细胞显著增加（$P < 0.01$），而EA干预组TUNEL阳性细胞较OGD组显著减少，其效应呈剂量依赖性（图1B、C）。FCM同样证实，与OGD组相比，EA干预可剂量依赖性地降低细胞凋亡率（$P < 0.01$，图1D、E）；提示EA可降低OGD诱导的细胞凋亡率。WB进一步证实，EA能逆转OGD引起的凋亡相关蛋白表达失衡，上调Bcl-2并下调Bax的表达（$P < 0.05$，图1F、H）。

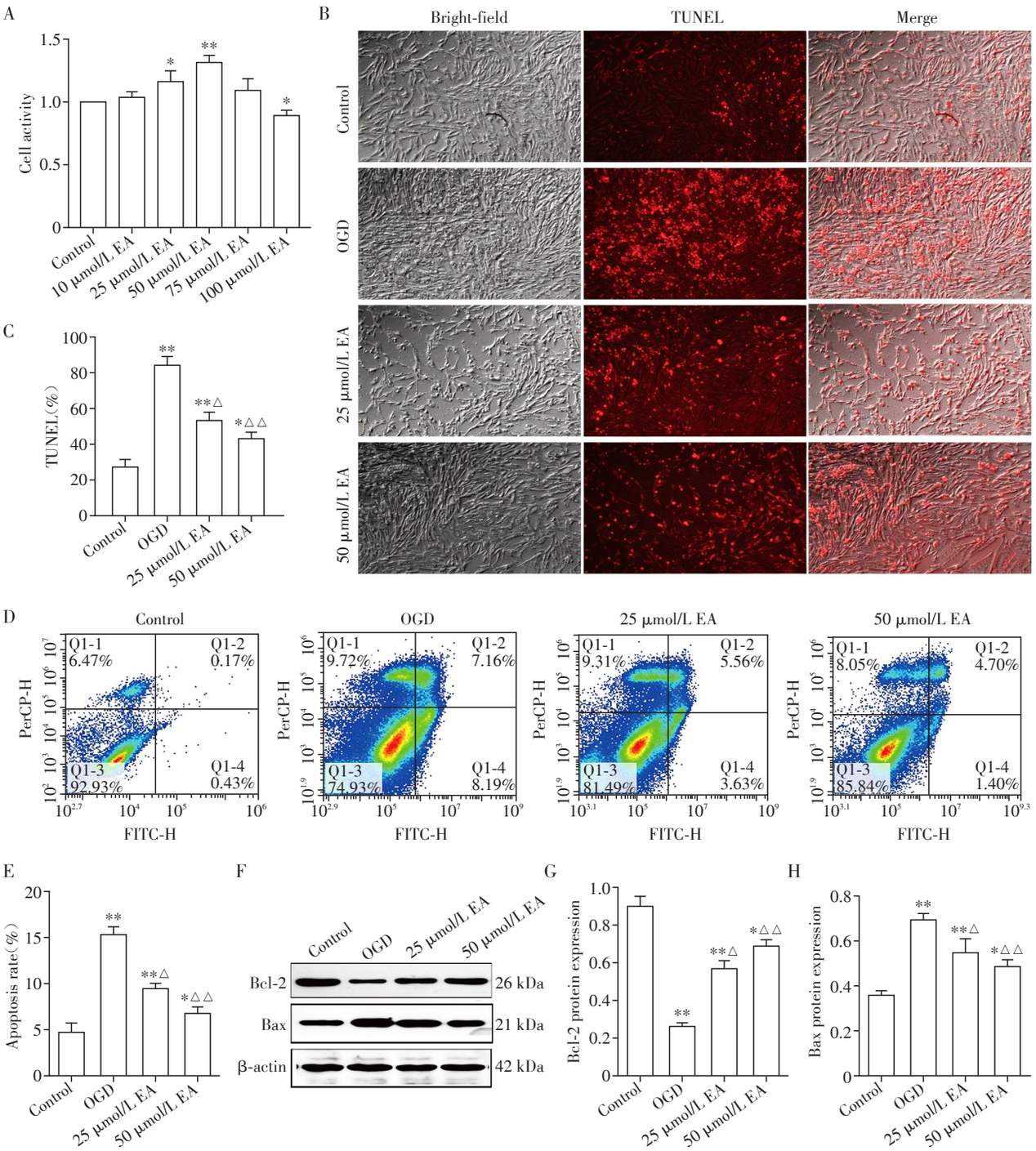
2.2 EA恢复了OGD损伤的RBMEC血管新生功能并保护线粒体超微结构

EdU实验显示，与Control组相比，OGD组EdU阳性细胞显著减少（$P < 0.01$），而EA干预后EdU阳性细胞较OGD组增多（图2A、B）。WB分析显示，与Control组相比，OGD组PCNA与Cyclin D1表达显著下调（$P < 0.01$）；而EA干预后二者表达较OGD组显著上调（图2C~E）。Transwell与管形成实验表明，与OGD组相比，EA干预组细胞迁移数量以及成管数量显著增多（$P < 0.05$），且效应呈浓度依赖性（图2F~I），提示EA能逆转OGD损伤后细胞的迁移能力并促进成管。

此外，透射电子显微镜观察发现，OGD可导致RBMEC线粒体出现明显肿胀、嵴结构模糊等超微结构损伤，而EA干预后微结构损伤明显减轻（图2J）。

2.3 EA在MCAO模型中发挥神经保护作用并改善神经功能

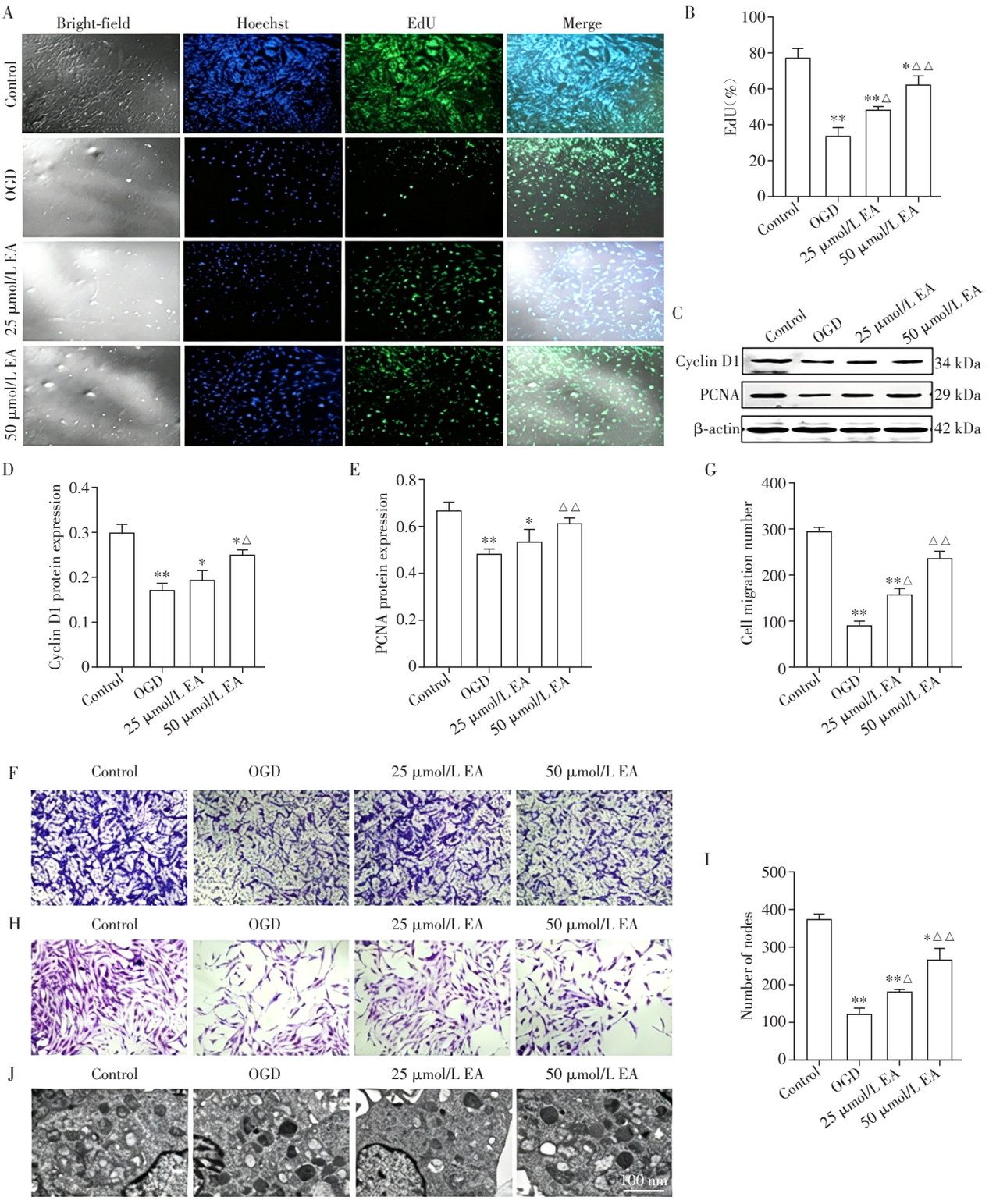
从第3天开始，EA预处理组Longa评分显著低于MCAO组（$P<0.05$），且趋势持续存在，表明EA预处理加速了缺血性脑损伤后的功能恢复（图3A）。组织病理学支持上述行为学结果，HE染色显示，MCAO组大鼠缺血半暗带脑组织出现明显的神经元排列紊乱、胞体固缩及空泡化，而EA预处理能显著



A: Cell viability was assessed using the CCK-8 assay after treating RBMEC with various concentrations of EA. B, C: Representative images (B, ×200) and quantitative analysis (C) of TUNEL staining (red). D, E: Apoptosis rates were analyzed by flow cytometry using Annexin V-FITC/PI staining. F–H: Western blot analysis of Bax and Bcl-2 protein expression. β-actin served as the loading control. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with the OGD group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$ (n=3).

图1 EA减轻OGD诱导的RBMEC凋亡

Figure 1 EA attenuates OGD-induced apoptosis in RBMEC

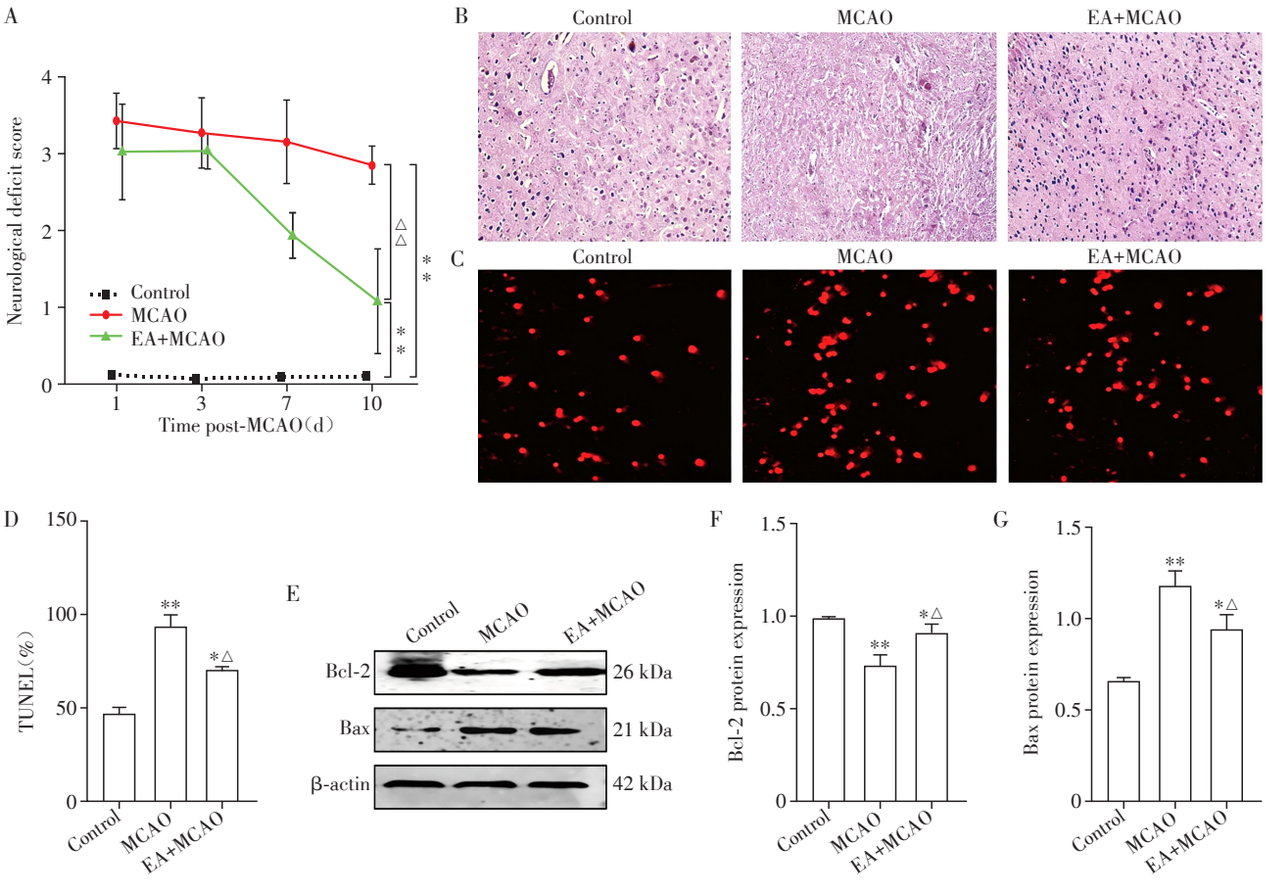


A, B: Cell proliferation was detected by EdU assay (green). Nuclei were counterstained with Hoechst (blue) (×200). C–E: Western blot analysis of PCNA and Cyclin D1 expression with β-actin as the loading control. F, G: Transwell migration assay: representative images (F, ×200) and quantification of migrated cells (G). H, I: Tube formation assay on Matrigel: representative images (H, ×100) and quantification of total junctions (I). J: Mitochondrial ultrastructure observed by transmission electron microscopy (TEM). Compared with the control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; compared with the OGD group, $^{\triangle}P < 0.05$, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$ (n=3).

图2　EA恢复OGD损伤的RBMEC的血管新生功能并保护线粒体超微结构

Figure 2　EA restores angiogenic functions and preserves mitochondrial ultrastructure in OGD-injured RBMEC

减轻这些病理改变（图3B）。TUNEL染色显示，MCAO组TUNEL阳性细胞显著多于Control组（$P<0.01$）；EA预处理可减少缺血脑组织中的凋亡细胞数量（图3C、D）。WB结果显示，与Control组相比，MCAO组缺血半球Bcl-2表达减少，而Bax的表达增多；与MCAO组相比，EA预处理显著上调了缺血半球Bcl-2的表达，同时下调了Bax的表达（P均<0.05，图3E~G）。



A: Neurological deficit scores were evaluated at 1, 3, 7, and 10 days post-MCAO using the Longa scale. B: Representative H, E staining images showing pathological changes in the ischemic penumbra (×100). C, D: TUNEL staining for the detection of apoptotic cells: representative images (C, ×200) and quantitative analysis (D). E-G: Western blot analysis of apoptosis-related proteins in brain tissue: representative images (E), and quantitative analysis of Bcl-2 (F) and Bax (G) protein expression. β-actin was used as a loading control. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; compared with the MCAO group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$ (n=6).

图3　EA预处理可改善MCAO大鼠神经功能并减轻脑缺血损伤

Figure 3　EA pretreatment ameliorates neurological function and mitigates cerebral ischemic injury in MCAO rats

2.4　EA调控缺血后miRNA表达谱及生物信息学预测

从MCAO组和EA+MCAO组分别随机选取3只造模成功的大鼠，采集缺血半暗带脑组织进行miRNA微阵列分析。每只大鼠作为1个独立生物学重复，样本间未进行混合。与MCAO组相比，EA+MCAO组缺血半暗带脑组织的miRNA表达谱发生明显改变。按照FC > 2.0或FC < 0.5，且$P<0.05$的筛选标准，共获得9个差异表达miRNA，其中miR-18a的上调幅度最为明显（图4A），提示miR-18a可能参与EA对缺血性脑损伤的保护作用。

整合miRWalk、TargetScan及StarBase这3个独立数据库的预测结果，通过交叉分析筛选出27个高置信度潜在靶基因（图4B）。通过Metascape在线数据库对潜在目标基因进行GO功能富集分析显示，这些目标基因富集于“生物过程调控”“发育过程”“细胞过程”及“免疫/节律调控”等（图4C），提示miR-18a可能通过多条通路参与内皮稳态与缺血后修复的调控。综合29次CLIP实验检测到互作分析，靶标介导的miRNA降解评分（TDMDScore）1.018，以及跨物种保守性（phyloP 4.004），3′-UTR含

有高度保守的miR-18a结合位点，且TSP-1是已知的强效内源性血管新生抑制剂。提示EA可能通过上调miR-18a，靶向抑制Thbs-1转录，解除TSP-1对血管新生的抑制作用，发挥神经保护作用。

2.5　EA通过miR-18a靶向抑制TSP-1表达的实验验证

qRT-PCR结果显示，与OGD组相比，EA干预后RBMEC miR-18a表达显著增加（$P<0.01$，图4E）；此外，WB显示，与NC组相比，转染miR-18a mimic的RBMEC TSP-1表达水平显著下调（图4F~G），初步证实二者存在明确的调控关系。

为进一步确认miR-18a是否通过直接结合Thbs1 3′-UTR发挥抑制作用，本研究构建了包含WT或MUT Thbs1 3′-UTR序列的双荧光素酶报告载体。结果显示，共转染miR-18a mimic与WT报告载体可显著降低荧光素酶活性；而当Thbs1 3′-UTR上的miR-18a结合位点发生突变后，这一抑制效应完全消失（图4H）；证实miR-18a能够靶向结合Thbs1 3′-UTR，在转录后水平特异性抑制其表达。

2.6　抑制miR-18a抵消了EA对RBMEC的保护作用

为验证miR-18a在EA保护作用中的必要性，在RBMEC接受OGD及EA处理前，预先转染miR-18a antagomir（Antagomir组）或阴性对照（NC组）；结果显示，转染miR-18a antagomir可显著阻断EA对RBMEC的抗凋亡效应；TUNEL染色及FCM结果显示，Antagomir组的凋亡细胞比例显著高于NC组（$P<0.01$，图5A~D），接近OGD组水平。WB进一步证实，与NC组相比，Antagomir组Bcl-2表达显著下调，Bax表达显著上调（P均<0.05，图5E~G）。

与之相似，抑制miR-18a后，EA对RBMEC的促增殖、迁移、成管作用亦显著减弱；EdU实验显示，Antagomir组的细胞增殖数量较NC组显著减少（$P<0.05$，图6A、B）；WB进一步验证了这一结果，细胞中PCNA与Cyclin D1的表达水平显著低于NC组（$P<0.05$，图6C~G）。功能学实验证实，EA对OGD损伤RBMEC迁移能力及管形成能力的改善作用，在miR-18a被抑制后基本消失（图6F~I）。

此外，与NC组相比，Antagomir组EA的线粒体保护效应基本消失，细胞的线粒体肿胀程度与OGD组相近（图6J）。提示EA对线粒体结构完整性的维持同样依赖于miR-18a的调控。

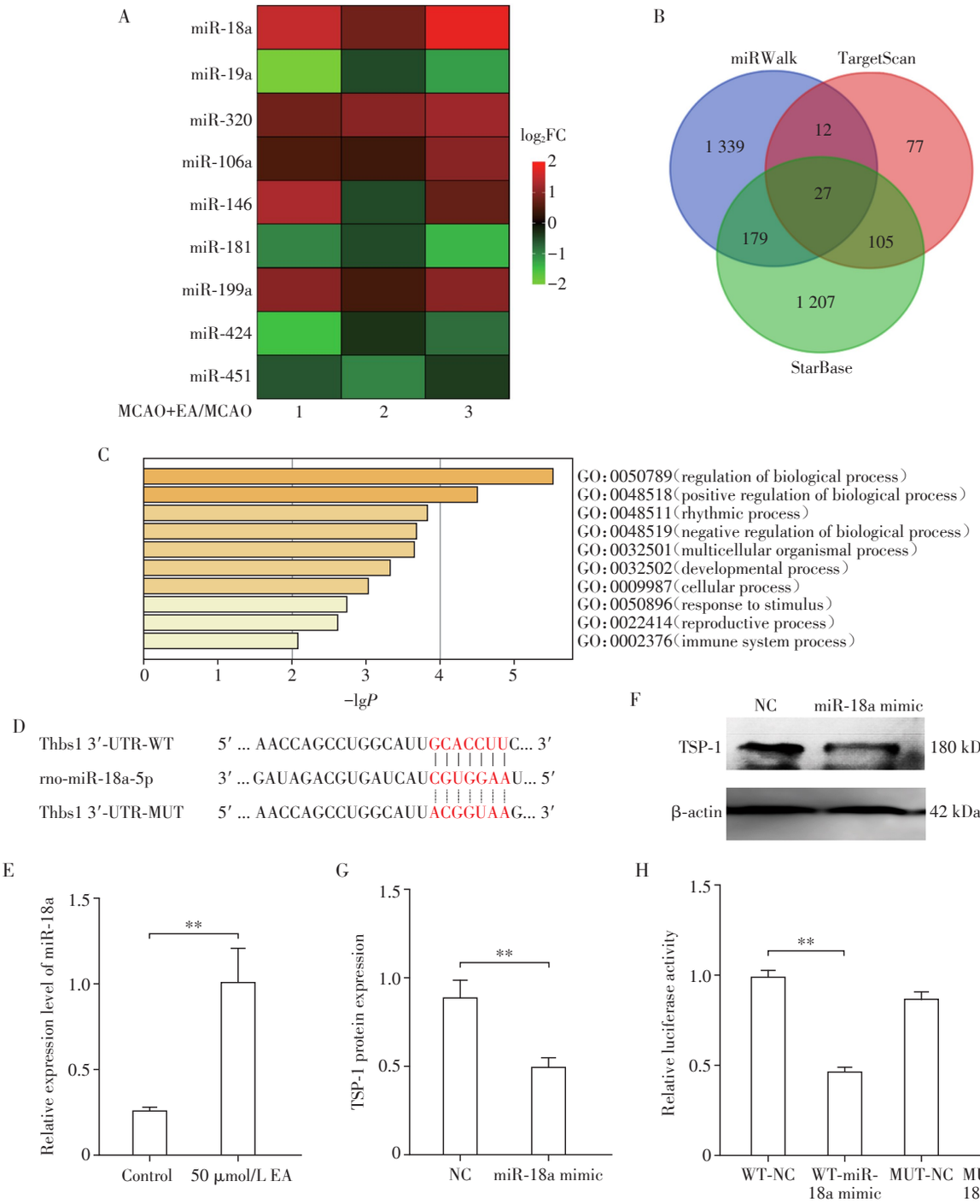
3　讨　论

本研究通过体外OGD细胞模型与大鼠MCAO模型，系统评估了EA在缺血性脑组织的保护作用。研究发现，EA通过抑制OGD诱导的RBMEC凋亡、促进血管新生相关功能（增殖、迁移及管形成），改善脑缺血性损伤；同时EA预处理可改善MCAO模型大鼠的神经功能，减轻MCAO模型脑细胞损伤以及凋亡。通过miRNA微阵列以及双荧光素酶报告基因等证明EA通过miR-18a/TSP-1轴发挥保护作用，为IS的治疗提供了新的实验依据与作用靶点。

EA是一种广泛存在于果蔬中的天然多酚，具有抗氧化、抗炎及抗凋亡等多重药理活性，并已证明在IS的相关研究中发挥脑保护作用[17-18,21]。陈敏纯等[19]通过MCAO模型证实EA通过激活PGC-1α/Nrf2通路、减轻氧化应激，从而发挥脑保护作用；Hu等[21]在缺血再灌注损伤模型中证明EA可通过抑制NLRP6炎症小体激活来缓解神经炎症，从而发挥神经保护作用。此外，研究表明EA可通过调节凋亡相关蛋白表达，减轻MCAO模型大鼠的脑组织损伤[18]。尽管本研究未进行MCAO模型中神经损伤相关标志的检测，但临床表现和病理结果与上述发现一致，EA在MCAO模型中改善神经功能、减轻病理损伤以及神经细胞凋亡；剂量依赖地减轻OGD诱导的RBMEC凋亡，调控Bcl-2/Bax蛋白平衡，恢复RBMEC的增殖、迁移及管形成能力，且对线粒体超微结构具有保护作用。EA对线粒体的保护作用已在神经退行性疾病的研究中得到证实[22]。然而，与以往研究聚焦于EA的抗氧化、抗炎、抗凋亡作用不同，本研究首次揭示EA通过调控miRNA介导的信号通路促进血管的新生，弥补了EA在IS血管修复领域研究的空白，丰富了其脑保护作用的分子机制网络。

miRNA作为基因表达的精细调控者，在卒中后的病理生理过程中扮演关键角色[6,23]。其中，miR-18a表达异常与多种血管性疾病相关[8,11,13-14]，也被证实与IS相关。张红利等[12]发现在IS中人群中miR-18a表达降低，且与不良预后相关。在SAH模型中也检测到miR-18a的低表达，而过表达miR-18a则可以阻止神经元凋亡和氧化应激，增强神经元的活性[9]。本研究发现在大鼠MCAO模型的缺血脑组织中miR-18a表达下调，而EA预处理可增加其表达；并且通过HE染色发现EA预处理可减轻缺血区域脑组织的损伤。提示miR-18a可能是EA调控缺血后修复的关键靶点。

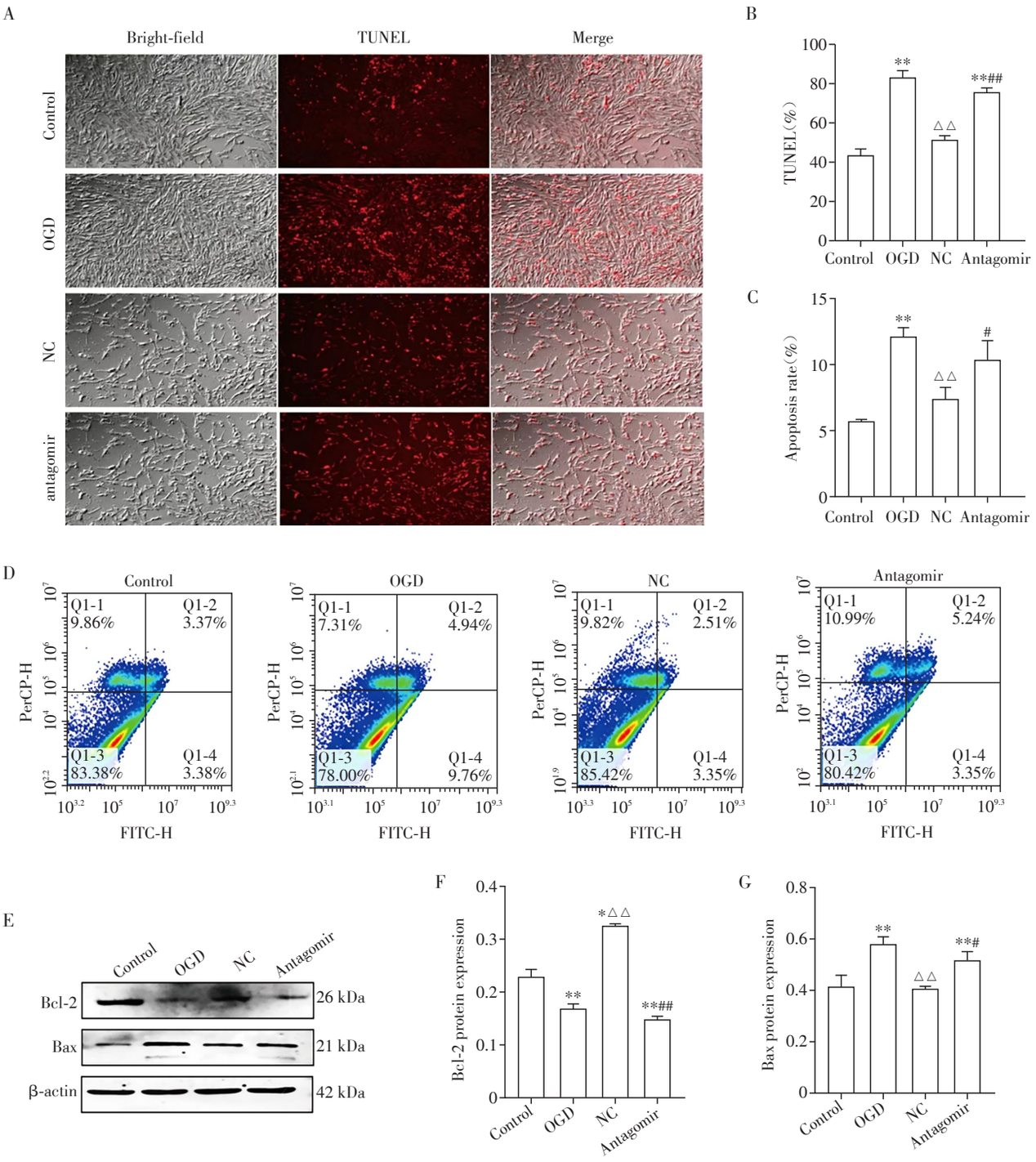
通过miRWalk、TargetScan及StarBase数据库交



A：Heatmap of differentially expressed miRNAs in the ischemic penumbra of MCAO rats following EA pretreatment. Columns 1−3 represent three independent biological replicate measurements，with expression changes presented as log_2FC between the EA+MCAO and MCAO groups. Red indicates relative upregulation and green indicates relative downregulation，with color intensity reflecting the magnitude of log_2FC. Differentially expressed miRNAs were identified using the criteria FC>2.0 or FC<0.5 and $P < 0.05$（n=3）. B：Venn diagram illustrating the intersection of predicted miR-18a target genes from miRWalk，TargetScan，and StarBase databases. C：GO enrichment analysis of the predicted target genes of miR-18a. D：The predicted binding site of miR-18a-5p within the Thbs1 3′-UTR. The solid lines indicate base pairing，and the dotted lines indicate the mutated binding site. E：Relative expression levels of miR-18a in the OGD model treated with EA，measured by qRT-PCR. F，G：Western blot analysis showing the effect of miR-18a mimic on TSP-1 protein expression in RBMEC. H：Dual-luciferase reporter assay confirming direct targeting：relative luciferase activity demonstrating that miR-18a binds to the WT but not the MUT Thbs1 3′-UTR. $^{**}P < 0.01$（n=3）.

图4　EA通过上调miR-18a并抑制TSP-1发挥神经保护作用

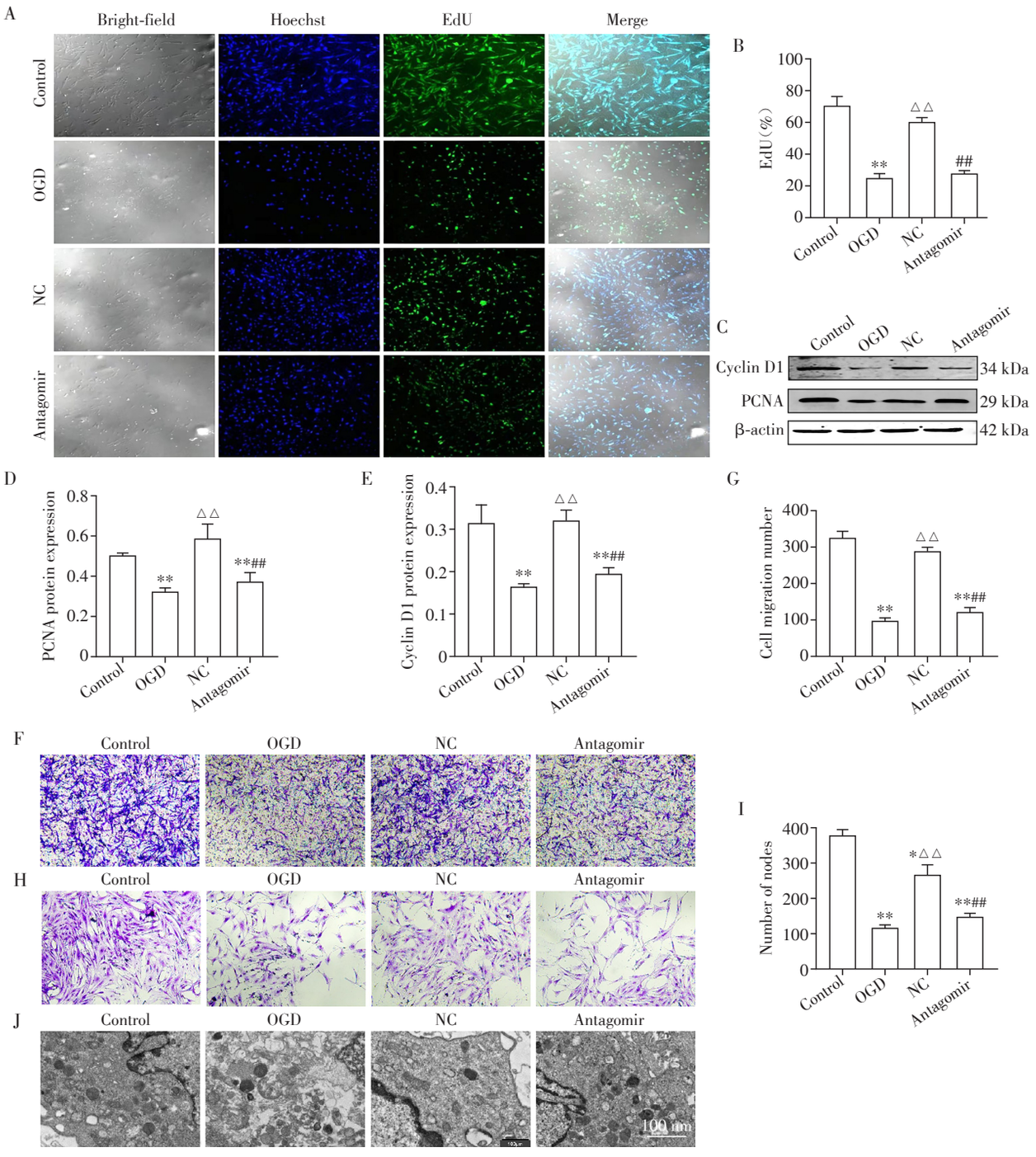
Figure 4　EA-mediated neuroprotection involves miR-18a upregulation and subsequent TSP-1 suppression



RBMEC were transfected with a miR-18a antagomir prior to OGD and EA treatment (50 μmol/L). A: Representative images of TUNEL staining (×200). B: Quantitative analysis of TUNEL-positive cells. C: Statistical summary of the total apoptotic cell percentage. D: Representative flow cytometry dot plots of Annexin V-FITC/PI staining. E: Representative Western blot images of Bcl-2 and Bax. F, G: Quantitative analysis of Bcl-2 (F) and Bax (G) protein expression levels, normalized to β-actin. Compared with the control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; compared with the OGD group, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$; compared with the NC group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ (n=3).

图5 抑制miR-18a阻断了EA对OGD损伤RBMEC的抗凋亡作用

Figure 5 Inhibition of miR-18a reverses the anti-apoptotic effects of EA in OGD-injured RBMEC



A，B：Representative fluorescence images of the EdU assay（A，×200）and quantification of EdU-positive cells（B）. C–E：Western blot analysis of PCNA and Cyclin D1 expression：representative bands（C）and quantification（D，E）. F，G：Representative images of the Transwell migration assay（F，×200）and quantification（G）. H，I：Representative images of tube formation on Matrigel（H，×100）and quantification of total tube junctions（I）. J：Representative TEM images showing mitochondrial ultrastructure. Compared with the control group，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；compared with the OGD group，$^{\triangle}P < 0.05$，$^{\triangle\triangle}P < 0.01$；compared with the NC group，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$（n=3）.

图6　抑制miR-18a阻断了EA的促血管生成作用及线粒体保护效应

Figure 6　Inhibition of miR-18a abrogates the pro-angiogenic and mitochondrial protective effects of EA

叉预测与Metascape功能富集分析发现miR-18a的潜在靶基因主要富集于“生物过程调控”“发育过程”“细胞过程”及“免疫/节律调控”等。其中，TSP-1作为强效内源性血管新生抑制因子，可通过直接抑制内皮细胞增殖、迁移及管形成能力，阻碍缺血后血管修复[24]，其编码基因Thbs1被预测为miR-18a的

高置信度靶基因。本研究通过转染miR-18a mimic证明miR-18a可抑制TSP-1表达；双荧光素酶报告基因实验进一步证实了miR-18a靶向调控Thbs1，抑制其转录后翻译，解除TSP-1的抑制，为促血管新生创造了有利的分子微环境。这一调控关系与静脉畸形[14]、糖尿病足[13]模型中的研究结论一致，提示miR-18a/TSP-1轴是调控血管新生的保守通路。本研究首次将其拓展至IS领域，为该通路的广谱调控作用提供了新的证据支持。此外，既往研究表明，TSP-1不仅是血管新生的抑制剂，还能通过CD47/CD36通路诱导内皮细胞氧化应激并促进炎症反应[25-26]。因此，本研究中EA介导的TSP-1下调，不仅直接解除了血管新生抑制，还可能在微环境层面与EA已知的激活Nrf2抗氧化通路[19]及抑制NLRP3炎症小体的作用形成协同效应[21]。即EA一方面通过Nrf2/NLRP通路直接“清扫”微环境中的毒性因素，另一方面通过miR-18a/TSP-1轴“解锁”血管修复能力，两者共同构成了“改善微环境-促进再生修复”的保护网络。

尽管本研究阐明了EA调控miR-18a/TSP-1轴促进IS的保护作用的分子机制，仍存在一些局限性。首先，虽然提供了体外血管生成的充分证据，并验证了miR-18a/TSP-1轴的调控作用，但未直接检测脑组织微血管密度。TSP-1显著下调强烈提示存在促血管微环境，但后续仍需采用特异性内皮标志物对血管新生进行定量分析。其次，EA上调miR-18a的上游机制尚不明确，仍需进一步研究。再次，本研究依赖二维细胞培养，不能模拟在体复杂微环境。最后，在临床样本中验证miR-18a/TSP-1轴的变化及其与患者预后的关联，将为该机制的临床相关性提供直接支持。

综上所述，本研究首次证实EA通过调控miR-18a/TSP-1轴，发挥抗内皮细胞凋亡和促血管生成作用，从而减轻缺血性脑损伤。这一发现不仅深化了对EA多效性神经保护机制的理解，也为IS的治疗提供了全新的分子靶点和干预思路。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

Conflict of Interests：

All authors declare no conflict of interests.

作者贡献声明：

刘怡珂负责实验设计、研究实施、数据分析和论文撰写；胡雨辰参与研究实施、数据分析；李超凡、宋海燕负责方法学、数据分析；陈春艳、王如梦提供研究思路，修改论文及提供经费支持。

Author's Contributions：

Liu Yike was responsible for experimental design, research implementation, data analysis, and manuscript writing; Hu Yuchen participated in research implementation and data analysis; Li Chaofan and Song Haiyan undertook methodology development and data analysis; Chen Chunyan and Wang Rumeng provided research ideas, revised the manuscript, and secured funding support.

[参考文献]

[1] Fan J H, Li X G, Yu X Y, et al. Global burden, risk factor analysis, and prediction study of ischemic stroke, 1990-2030[J]. Neurology, 2023, 101(2): e137-e150

[2] 中国卒中学会,《中国卒中学会急性缺血性卒中再灌注治疗指南2024》编写组. 中国卒中学会急性缺血性卒中再灌注治疗指南2024[J]. 中国卒中杂志, 2024, 19(12): 1460-1478
Chinese Stroke Association, Writing Group of Chinese Stroke Association Guidelines on Reperfusion Therapy for Acute Ischemic Stroke 2024. Chinese Stroke Association guidelines on reperfusion therapy for acute ischemic stroke 2024[J]. Chinese Journal of Stroke, 2024, 19(12): 1460-1478

[3] Nguyen T N, Abdalkader M, Fischer U, et al. Endovascular management of acute stroke[J]. Lancet, 2024, 404(10459): 1265-1278

[4] Cao M, Liu J, Ji X. Diversity of brain microvascular endothelial cell functions: physiology, ischemia/hypoxia, and underlying protection[J]. Aging Dis, 2025, doi: 10.143361/AD.2025.0664

[5] Fang J, Wang Z, Miao C Y. Angiogenesis after ischemic stroke[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(7): 1305-1321

[6] Guo S S, Wang Y M, Zhao H X, et al. Emerging frontiers in microRNA technology: innovations driving precision medicine[J]. Biomaterials, 2026, 326: 123716

[7] Van Almen G C, Verhesen W, Van Leeuwen R E W, et al. MicroRNA-18 and microRNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure[J]. Aging Cell, 2011, 10(5): 769-779

[8] Marín-Ramos N I, Thein T Z, Ghaghada K B, et al. miR-18a inhibits BMP4 and HIF-1α normalizing brain arteriovenous malformations[J]. Circ Res, 2020, 127(9): e210-e231

[9] Zhang Y M, Liu J Y, Zhou Y, et al. miR-18a-5p shuttled by mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles alleviates early brain injury following subarachnoid hemorrhage through blockade of the ENC1/p62 axis[J]. Cell Tissue Res, 2023, 392(3): 671-687

[10] Yan J Y，Gao Y，Huang J Y，et al. Loss of lncRNA UCA1 ameliorates the injury managed by cerebral ischemia-reperfusion by sponging miR-18a-5p[J]. Folia Neuropathol，2023，61（1）：77-87

[11] Miao R Y，Liu W L，Qi C R，et al. MiR-18a-5p contributes to enhanced proliferation and migration of PASMCs *via* targeting Notch2 in pulmonary arterial hypertension[J]. Life Sci，2020，257：117919

[12] 张红利，张智芳，白金娟，等. 缺血性脑卒中患者血清中miR-191、miR-18 a的表达与预后关系[J]. 中风与神经疾病杂志，2019，36（10）：877-881
Zhang H L，Zhang Z F，Bai J J，et al. Expression of miR-191 and miR-18a in serum of patients with ischemic stroke and its relationship with prognosis[J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases，2019，36（10）：877-881

[13] Wang T Y，Wang W，Li F F，et al. Maggot excretions/secretions promote diabetic wound angiogenesis *via* miR18a/19a-TSP-1 axis[J]. Diabetes Res Clin Pract，2020，165：108140

[14] Zhang L，Wang D，Wang Z，et al. MiR-18a-5p acts as a novel serum biomarker for venous malformation and promotes angiogenesis by regulating the thrombospondin-1/P53 signaling axis[J]. Am J Transl Res，2021，13（10）：11271-11286

[15] Gupta A，Singh A K，Kumar R，et al. Neuroprotective potential of ellagic acid：a critical review[J]. Adv Nutr，2021，12（4）：1211-1238

[16] Alfei S，Zuccari G. Ellagic acid：a green multi-target weapon that reduces oxidative stress and inflammation to prevent and improve the condition of Alzheimer's disease[J]. Int J Mol Sci，2025，26（2）：844

[17] Hassonizadeh Falahieh K，Sarkaki A，Edala-Tmanesh M，et al. Ellagic acid alleviates motor，cognitive and hippocampal electrical activity deficits in the male rats with 2-vessel occlusion cerebral ischemia/reperfusion[J]. Avicenna J Phytomed，2023，13（6）：651-664

[18] Liu Q S，Deng R，Li S R，et al. Ellagic acid protects against neuron damage in ischemic stroke through regulating the ratio of Bcl-2/Bax expression[J]. Appl Physiol Nutr Metab，2017，42（8）：855-860

[19] 陈敏纯，张婧一，张雨晨，等. 鞣花酸对缺血性脑卒中大鼠的保护作用[J]. 中成药，2021，43（9）：2331-2335
Chen M C，Zhang J Y，Zhang Y C，et al. Protective effect of ellagic acid on rats with ischemic stroke[J]. Chinese Traditional Patent Medicine，2021，43（9）：2331-2335

[20] Zhang Y W，Yang Q Y，Cheng H F，et al. Extracellular vesicles derived from endothelial progenitor cells modified by Houshiheisan promote angiogenesis and attenuate cerebral ischemic injury *via* miR-126/PIK3R2[J]. Sci Rep，2024，14：28166

[21] Hu L，Wei X，Shen G，et al. Ellagic acid alleviates NLRP6/caspase-1/GSDMD-mediated inflammation and pyroptosis in rats post cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Iran J Basic Med Sci，2025，28（1）：105-112

[22] Wang W Q，Guo J，Ye D Y，et al. Ellagic acid mitigates deoxyaconitine-induced neurotoxicity by improving mitochondrial function[J]. Life Sci，2025，381：124007

[23] Chang C H，Wang Y Y，Wang R Z，et al. Considering context-specific microRNAs in ischemic stroke with three "W"：where，when，and what[J]. Mol Neurobiol，2024，61（10）：7335-7353

[24] Liu B，Yang H，Song Y S，et al. Thrombospondin-1 in vascular development，vascular function，and vascular disease[J]. Semin Cell Dev Biol，2024，155：32-44

[25] Xu F F，Zheng F，Chen Y，et al. Role of thrombospondin-1 in high-salt-induced mesenteric artery endothelial impairment in rats[J]. Acta Pharmacol Sin，2024，45（3）：545-557

[26] Ramalingam P，Gutkin M C，Poulos M G，et al. Suppression of thrombospondin-1-mediated inflammaging prolongs hematopoietic health span[J]. Sci Immunol，2025，10（103）：eads1556

（收稿：2026-01-12；修回：2026-05-01；录用：2026-05-10）
（本文编辑：蒋　莉）