

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research肉桂醛通过 *miR-27a-3p* 减轻创伤性脑损伤
大鼠神经功能障碍的研究Research of cinnamaldehyde alleviating neurological dysfunction in rats with
traumatic brain injury through *miR-27a-3p*黄燕龙^{1a}, 黄艳冰^{1b}, 许振伟^{1a},
朱景法^{1a}(1. 福建医科大学 附属泉州第一医院 a. 急诊科;
b. 重症医学科, 福建 泉州 362000)HUANG Yan-long^{1a},
HUANG Yan-bing^{1b},
XU Zhen-wei^{1a}, ZHU Jing-fa^{1a}(1. a. Department a of Emergency; b.
Department of Critical Care Medicine,
Quanzhou First Hospital Affiliated to
Fujian Medical University, Quanzhou
362000, Fujian Province, China)作者简介: 黄燕龙(1985-), 男, 副主任医师,
主要从事各种创伤在急诊的诊断和
治疗、多发伤、脓毒症、MODS 的基础
和临床方面的研究通信作者: 朱景法, 副主任医师
MP: 15280852628

E-mail: quanzhou010203@163.com

摘要:目的 探究肉桂醛减轻创伤性脑损伤(TBI)大鼠神经损伤的潜在作用机制。方法 将大鼠随机分为假手术组(仅行颅骨开窗,不建模)、模型组(仅构建TBI模型)、低剂量实验组(TBI+25 mg·kg⁻¹肉桂醛)、高剂量实验组(TBI+75 mg·kg⁻¹肉桂醛)、miR-NC组(TBI+miR-NC慢病毒+75 mg·kg⁻¹肉桂醛)、miR-27a-3p inhibitor组(TBI+miR-27a-3p inhibitor慢病毒+75 mg·kg⁻¹肉桂醛)。用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)实验法检测 *miR-27a-3p* 表达,用水迷宫实验法检测记忆功能,用免疫荧光实验法检测离子钙接头蛋白(Iba-1)表达,用蛋白质印迹法检测脑组织中相关蛋白相对表达水平,用双荧光素酶报告基因实验法检测 *miR-27a-3p* 与 BCL2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白3样蛋白(BNIP3L)结合水平。结果 假手术组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、miR-NC组和 miR-27a-3p inhibitor组的 *miR-27a-3p* 相对表达水平分别为 1.00±0.08、0.40±0.03、0.52±0.08、0.76±0.08、0.73±0.09 和 0.18±0.02;逃避潜伏期时间分别为(11.19±0.75)、(26.06±1.47)、(23.59±1.39)、(14.95±1.71)、(15.37±0.77)和(24.91±1.96)s;Iba-1 荧光强度分别为(1 189.50±113.68)、(2 958.70±279.29)、(2 287.05±271.69)、(1 916.55±205.44)、(1 935.57±164.54)和(2 564.52±333.05)a.u.;自噬相关基因5(ATG5)蛋白相对表达水平分别为 0.32±0.03、0.94±0.07、0.71±0.09、0.50±0.08、0.53±0.07 和 0.85±0.09;Beclin-1 自噬调节因子(Beclin-1)蛋白相对表达水平分别为 0.35±0.03、0.95±0.13、0.75±0.12、0.49±0.05、0.48±0.07 和 0.73±0.10;Parkin RBR 结构域 E3 泛素蛋白连接酶(Parkin)蛋白相对表达水平分别为 0.29±0.04、0.64±0.08、0.51±0.09、0.41±0.04、0.43±0.05 和 0.62±0.07,以上指标在模型组与假手术组间比较,在低剂量实验组、高剂量实验组与模型组间比较,在 miR-27a-3p inhibitor 组与 miR-NC 组间比较,在统计学上差异均具有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$)。双荧光素酶报告基因实验证实 *miR-27a-3p* 与 BNIP3L 靶向结合。结论 肉桂醛可能通过 *miR-27a-3p*/BNIP3L 轴调控自噬,改善神经功能,减轻神经炎症,对 TBI 脑损伤发挥神经保护作用。

关键词:肉桂醛;创伤性脑损伤;神经炎症;*miR-27a-3p*;自噬

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.05.009

中图分类号:R651.1 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)05-0643-07

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of cinnamaldehyde in alleviating nerve injury in rats with traumatic brain injury (TBI). **Methods** Rats were randomly divided into sham group (only craniotomy), model group (TBI model), experimental-L group (TBI+25 mg·kg⁻¹ cinnamaldehyde), experimental-H group (TBI+75 mg·kg⁻¹ cinnamaldehyde), miR-NC group (TBI+miR-NC slow virus+75 mg·kg⁻¹ cinnamaldehyde), and miR-27a-3p inhibitor group (TBI+miR-27a-3p inhibitor slow virus+75 mg·kg⁻¹ cinnamaldehyde). Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of *miR-27a-3p*. The Morris water maze test was used to detect memory function. Immunofluorescence was used to detect the expression of ion calcium junction protein (Iba-1). Western blot was used to detect the relative expression levels of related proteins in brain tissue. Dual-luciferase reporter gene experiment was used to detect the interaction between *miR-27a-3p* and BCL2/adenovirus E1B 19kDa interaction protein 3-like protein (BNIP3L). **Results** The relative expression levels of *miR-27a-3p* in the sham group, model group, low-dose experimental group, high-dose experimental group, miR-NC group, and miR-27a-3p inhibitor group were 1.00±0.08, 0.40±0.03, 0.52±0.08, 0.76±0.08, 0.73±0.09, and 0.18±0.02, respectively. The escape latency time was (11.19±0.75), (26.06±1.47), (23.59±1.39), (14.95±1.71), (15.37±0.77), and (24.91±1.96)s, respectively. Iba-1 fluorescence intensity was (1 189.50±113.68), (2 958.70±279.29), (2 287.05±271.69), (1 916.55±205.44), (1 935.57±164.54), and (2 564.52±333.05)a.u., respectively. The relative expression levels of ATG5 protein were 0.32±0.03, 0.94±0.07, 0.71±0.09, 0.50±0.08, 0.53±0.07, and 0.85±0.09, respectively. The relative expression levels of Beclin-1 protein were 0.35±0.03, 0.95±0.13, 0.75±0.12, 0.49±0.05, 0.48±0.07, and 0.73±0.10, respectively. The relative expression levels of Parkin protein were 0.29±0.04, 0.64±0.08, 0.51±0.09, 0.41±0.04, 0.43±0.05, and 0.62±0.07, respectively. The above indicators compared between the model group and the sham group, between the low-dose experimental group, high-dose experimental group and the model group, between the miR-27a-3p inhibitor group and the miR-NC group, the differences were statistically significant ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). Dual-luciferase reporter gene experiment confirmed that *miR-27a-3p* targeted BNIP3L. **Conclusion** Cinnamaldehyde may regulate autophagy through the *miR-27a-3p*/BNIP3L axis, improve nerve function, reduce nerve inflammation, and play a neuroprotective role in TBI brain injury.

75 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde), miR - NC group (TBI + miR - NC lentivirus + 75 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde) and miR - 27a - 3p inhibitor group (TBI + miR - 27a - 3p inhibitor lentivirus + 75 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde). After treatment, real - time quantitative polymerase chain reaction (RT - qPCR) was used to detect the expression of *miR - 27a - 3p*; the Morris water maze test was used to assess memory function; immunofluorescence assay was used to detect the expression of ionized calcium - binding adapter molecule 1 (Iba - 1); Western blot was used to detect the expression of related proteins in brain tissues; and the dual - luciferase reporter gene assay was used to verify the binding of *miR - 27a - 3p* to BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 - like (BNIP3L). **Results** The relative expression levels of *miR - 27a - 3p* in the sham group, model group, experimental - L group, experimental - H group, miR - NC group and miR - 27a - 3p inhibitor group were 1.00 ± 0.08, 0.40 ± 0.03, 0.52 ± 0.08, 0.76 ± 0.08, 0.73 ± 0.09 and 0.18 ± 0.02, respectively; the escape latency times were (11.19 ± 0.75), (26.06 ± 1.47), (23.59 ± 1.39), (14.95 ± 1.71), (15.37 ± 0.77) and (24.91 ± 1.96) s, respectively; the Iba - 1 fluorescence intensities were (1 189.50 ± 113.68), (2 958.70 ± 279.29), (2 287.05 ± 271.69), (1 916.55 ± 205.44), (1 935.57 ± 164.54) and (2 564.52 ± 333.05) a. u., respectively; the relative expression levels of autophagy - related gene 5 (ATG5) protein were 0.32 ± 0.03, 0.94 ± 0.07, 0.71 ± 0.09, 0.50 ± 0.08, 0.53 ± 0.07 and 0.85 ± 0.09, respectively; the relative expression levels of Beclin - 1 autophagy regulator (Beclin - 1) protein were 0.35 ± 0.03, 0.95 ± 0.13, 0.75 ± 0.12, 0.49 ± 0.05, 0.48 ± 0.07 and 0.73 ± 0.10, respectively; the relative expression levels of Parkin RBR domain E3 ubiquitin protein ligase (Parkin) protein were 0.29 ± 0.04, 0.64 ± 0.08, 0.51 ± 0.09, 0.41 ± 0.04, 0.43 ± 0.05 and 0.62 ± 0.07, respectively. For the above indicators, there were all statistically significant differences when comparing the model group with the sham group, the experimental - L and experimental - H groups with the model group, and the miR - 27a - 3p inhibitor group with the miR - NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). The dual - luciferase reporter gene assay confirmed the targeted binding of *miR - 27a - 3p* to BNIP3L. **Conclusion** Cinnamaldehyde may regulate autophagy through the *miR - 27a - 3p*/BNIP3L axis, improve neurological function, alleviate neuroinflammation and exert neuroprotective effects on TBI - induced brain injury.

Key words: cinnamaldehyde; traumatic brain injury; neuroinflammation; *miR - 27a - 3p*; autophagy

创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 是一种严重的脑外伤, 主要由车辆碰撞、跌倒和暴力行为等引起^[1]。脑损伤包括原发性和继发性损伤; 原发性损伤在受伤时立即发生, 不能逆转; 继发性损伤包括氧化应激、炎症反应、神经递质释放、氧自由基产生、血脑屏障破坏等一系列生理和分子生物学变化, 后者延迟发病为改善 TBI 预后提供窗口^[2-3], 然而现有干预手段多聚焦症状缓解, 难以阻断病理进程。肉桂醛具有神经保护、抗凋亡等功效, 最近已有研究表明, 肉桂醛在 TBI 后脑损伤中表现出显著的保护作用^[4], 然而其对 TBI 后神经功能的保护作用及机制仍需进一步研究。microRNA 在 TBI 病理机制中扮演关键角色, *miR - 27a - 3p* 已被证实参与神经元存活、突触重塑相关信号通路调控^[5]。基于此, 本研究旨在探索肉桂醛是否通过调控 *miR - 27a - 3p* 表达, 减轻神经功能障碍, 为 TBI 治疗提供新的天然药物靶点与分子机制参考。

材料与方法

1 材料

动物 60 只 SPF 级别雄性 SD 大鼠, 6 周龄, 体重 200 ~ 220 g, 购自厦门大学, 动物生产许可证号: SCXK (闽) 2023 - 0003, 动物使用许可证号: SYXK (闽) 2023 - 0010; 大鼠均饲养在动物房中, 自由饮水和进食, 并在适应性饲养 1 周后进行实验。本研究经福建医科大学附属泉州第一医院伦理委员会审批, 伦理批号: 泉一伦【2023】K056 号。

细胞 人肾小管上皮细胞 HK - 2, 购自深圳市豪地华拓生物科技有限公司。

药品与试剂 肉桂醛, 纯度: 98.41%, 规格: 1 g, 批号: S376301、PD98059, 纯度: 99.86%, 规格: 50 mg, 批号: S117708, 均购自美国 Selleck 公司; 苏木素 - 伊红 (hematoxyl - eosin, HE) 染色液, 购自上海麦克林有限公司; 离子钙接头蛋白 (ionized calcium binding

adaptor molecule 1, Iba-1)、自噬相关基因 5 (autophagy related gene 5, ATG5)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3) II/LC3 I、Beclin-1 自噬调节因子 (Beclin 1 autophagy regulator, Beclin-1)、隔离体 1 (sequestosome 1, p62)、Parkin RBR 结构域 E3 泛素蛋白连接酶 (Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase, Parkin)、PTEN 诱导激酶 1 (PTEN induced kinase 1, PINK1)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、Bcl-2、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Cleaved cysteine aspartate proteinase-3, Cleaved caspase-3)、 β -actin 一抗及二抗, 均购自美国 Abcam 公司; 4',6-联脒-2'-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI), 购自陕西西安齐岳生物科技有限公司; miR-NC、miR-27a-3p inhibitor 慢病毒, 购自上海吉玛基因生物公司。

仪器 RT-6100 酶标仪, 广州深圳雷杜公司产品; CX-31 显微镜, BX53 荧光显微镜, 均为日本奥林巴斯公司产品; PikoReal 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 Thermo Scientific 公司产品。

2 实验方法

2.1 TBI 大鼠模型构建^[6]

大鼠麻醉后, 剪去头顶毛发并暴露头皮, 消毒后沿头顶中线做纵向切口 (1 cm), 在前囟右后方, 用微型钻钻开骨窗, 然后, 用质量为 20 g 的砝码在垂直管道自由落体运动坠落, 并在砝码坠落后停留 1 min, 随后封闭骨窗后消毒缝合头皮, 连续 3 d 腹腔注射青霉素 ($2.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$) 预防感染。所有大鼠造模后 6 h, 均进行改良神经缺损严重程度评分, 评分超过 7 分即为造模成功, 造模成功率为 92%; 剔除死亡或不符合标准的大鼠后, 各组均补充至 10 只。

2.2 动物分组与处理方法

将大鼠随机分为假手术组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验组、miR-NC 组和 miR-27a-3p inhibitor 组, 每组 10 只, 其中假手术组大鼠仅行颅骨开窗术, 其余组大鼠均根据“2.1”中方法建模, 低、高剂量实验组大鼠成功建模后每天腹腔注射 $25/75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的肉桂醛溶液 (以少量无水乙醇助溶后, 用无菌生理盐水逐步稀释至所需浓度, 充分混匀后现配现用), 1 天 1 次, 连续 7 d; miR-NC 组大鼠成功建模后每天侧脑室注射 miR-NC 慢病毒 300 μg 并腹腔注射 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肉桂醛溶液, miR-27a-3p inhibitor 组大鼠每天侧脑室注射 miR-27a-3p inhibitor 慢病毒 300 μg 并腹腔注射 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 肉桂醛溶液, 假手术组和模型组大

鼠均注射等量的生理盐水。治疗 7 d, 后进行神经学指标检测后, 处死大鼠取脑组织备用。

2.3 Mirris 水迷宫实验法评估大鼠记忆能力^[7]

治疗 7 d 后, 将大鼠置于圆形水池 (被分为 4 个象限, 其中 1 个象限在水下 2 cm 处放 1 个平台) 中, 每天将大鼠从不同的象限放入水池, 记录 60 s 后大鼠找到平台所花的时间, 5 d 后, 记录大鼠放入水中到找平台的间隔时间, 记为逃避潜伏期, 并撤走平台, 记录大鼠 60 s 内的活动轨迹并记录大鼠在平台所在象限停留的时间和穿越平台次数, 计算目标象限的停留时间占比 (目标象限停留时间/总测试时间 $\times 100\%$)。

2.4 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 实验法检测 miR-27a-3p、IL-1 β 、TNF- α 和 BNIP3L mRNA 表达^[8]

取各组大鼠脑组织, 用 TRIzol 法提取总 RNA, 并测定 RNA 浓度、纯度; 用试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 然后进行聚合酶链反应, PCR 条件: 95°C 预变性 6 min, 94°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 40 个循环, 结束后, 以 U6 或 GAPDH 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达水平。miR-27a-3p、U6 引物序列参考文献 [9]; IL-1 β 引物序列为 Forward (5'-3'): CAGCTTTCGACAGTGAG-GAGA, Reverse (5'-3'): TTGTTCGAGATGCTGCTGT-GA; TNF- α 引物序列为 Forward (5'-3'): GATCG-GTCCCAACAAGGAGG, Reverse (5'-3'): CTTGGTG-GTTTGCTACGACG; GAPDH 引物序列为 Forward (5'-3'): GCGAGATCCCGCTAACATCA, Reverse (5'-3'): ATTCGAGAGAAGGGAGGGCT; BNIP3L 引物序列为 Forward (5'-3'): TCTCACTTAGTCGAGCCGC, Reverse (5'-3'): CTCCACCCAGGAAGTGTGA。

2.5 HE 染色法检测脑组织病理学改变^[10]

收集大鼠脑组织, 用多聚甲醛固定过夜, 用不同浓度的乙醇进行脱水, 并用二甲苯浸泡 1 h 透明, 浸蜡包埋后切片; 切片经脱蜡至水后用苏木精染色 5 min, 之后用自来水冲洗去多余的染色液, 再用盐酸乙醇分化 10 s 使得细胞核更加清晰, 返蓝液处理后伊红试剂染色 3 min, 再次用不同浓度的乙醇进行脱水及透明后封片, 用显微镜观察。

2.6 免疫荧光实验法检测 Iba-1 表达^[6]

取冰冻切片, 在室温下复温 1 h, 用柠檬酸抗原修复液浸泡切片进行抗原修复, 用组织笔圈住组织, 滴加 Triton X-100 破膜液处理切片 20 min, PBS 清洗后用 BSA 封闭 1 h, 然后滴加 Iba-1 一抗在 4°C 下孵

育过夜,第2天取出湿盒清洗一抗后滴加同种属的荧光二抗室温下孵育1 h,DAPI复染10 min后封片,用荧光显微镜观察。

2.7 蛋白质印迹法检测脑组织中相关蛋白表达^[11]

收集各组大鼠脑组织,加入裂解液充分裂解、离心收集上清液,用BCA试剂盒检测蛋白浓度,取蛋白30 μg 与蛋白上样缓冲液充分混合以后变性10 min(100 $^{\circ}\text{C}$),进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,而后转至PVDF膜并在室温下封闭2 h(5%脱脂奶粉),加入ATG5、LC3 II/LC3 I、p62、Beclin-1、Parkin、PINK1、Bax、Bcl-2、Cleaved caspase-3—抗(1:1 000)在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,洗膜后与二抗试剂(1:5 000)在室温下孵育2 h,洗膜并滴加ECL显色液后曝光、成像,用Image J软件计算目的蛋白表达水平。

2.8 双荧光素酶报告基因实验^[12]

通过Targetscan在线预测网站(https://www.targetscan.org/vert_80/)预测miR-27a-3p与BCL2/腺病毒E1B 19kDa相互作用蛋白3样蛋白(BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like, BNIP3L)具有靶向结合位点,进行双荧光素酶报告基因检测:构建BNIP3L野生型(BNIP3L-WT)和突变型(BNIP3L-MUT)荧光质粒,用Lipofectamine 3000转染试剂将BNIP3L-WT、BNIP3L-MUT分别与NC mimic、miR-27a-35p mimic共转染至293T细胞中,48 h后用双荧光酶报告基因实验试剂盒检测荧光酶活性。

3 统计学处理

用SPSS 26.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用LSD-*t*检验。

结 果

1 肉桂醛对大鼠脑组织中miR-27a-3p表达的影响

假手术组、模型组、低剂量实验组、高剂量实验

组、miR-NC组和miR-27a-3p inhibitor组的miR-27a-3p相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08 、 0.40 ± 0.03 、 0.52 ± 0.08 、 0.76 ± 0.08 、 0.73 ± 0.09 和 0.18 ± 0.02 ,模型组与假手术组比较,低、高剂量实验组与模型组比较,miR-27a-3p inhibitor组与miR-NC组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$)。

2 肉桂醛通过miR-27a-3p对TBI大鼠神经功能恢复及病理学损伤的影响

假手术组脑组织无明显病理损伤,相比假手术组,模型组大鼠脑组织细胞间隙增加,部分胞核固缩,可见炎性细胞浸润,相比模型组,低、高剂量实验组及miR-NC组病理损伤均减轻,而miR-27a-3p inhibitor组病理损伤较miR-NC组加重,见图1。

与假手术组比较,模型组穿越平台次数和目标象限的停留时间占比均显著降低,逃避潜伏期显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组比较,低、高剂量实验组穿越平台次数、目标象限的停留时间占比均显著升高,逃避潜伏期均显著下降($P < 0.01$, $P < 0.001$);相比miR-NC组,miR-27a-3p inhibitor组穿越平台次数、目标象限的停留时间占比均显著降低,逃避潜伏期显著升高($P < 0.05$, $P < 0.001$),见表1。

3 肉桂醛通过miR-27a-3p抑制TBI大鼠脑组织神经炎性和神经元凋亡

与假手术组比较,模型组脑组织的Iba-1荧光强度、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA及Bax/Bcl-2、Cleaved caspase-3蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组比较,低、高剂量实验组的Iba-1荧光强度、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA及Bax/Bcl-2、Cleaved caspase-3蛋白相对表达水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$);相比miR-NC组,miR-27a-3p inhibitor组的Iba-1荧光强度、IL-1 β mRNA、TNF- α mRNA及Bax/Bcl-2、Cleaved caspase-3蛋白相对表达水平均显著升高($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表2和图2。

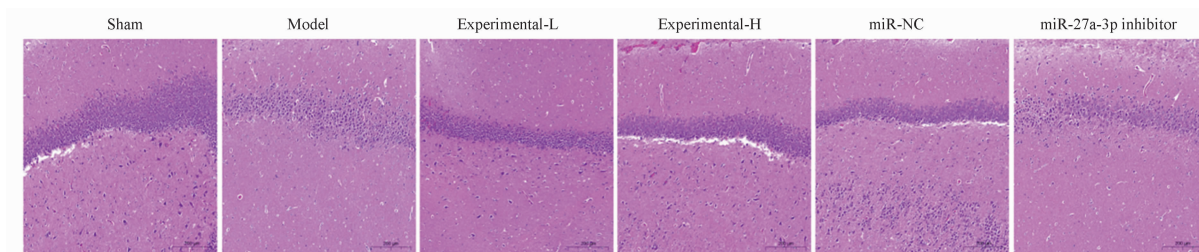


图1 苏木精-伊红(HE)染色法观察大鼠脑组织病理学改变($\times 200$)

Figure 1 The histopathological changes of rat brain tissue observed by hematoxylin-eosin(HE) staining($\times 200$)

4 肉桂醛通过 *miR-27a-3p* 抑制 TBI 大鼠脑组织自噬

与假手术组比较,模型组的 ATG5、LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$), p62 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.001$);与模型组比较,低、高剂量实验组的 ATG5、LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 蛋白相对表达水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$), p62 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.001$);相比 *miR-NC* 组, *miR-27a-3p* inhibitor 组的 ATG5、LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$), p62 蛋白相对表达水平显著降低($P < 0.001$),见图 2 和表 3。

5 肉桂醛通过 *miR-27a-3p*/BNIP3L 轴介导线粒体自噬

在线预测网站预测到 *miR-27a-3p* 与 BNIP3L 靶向结合,见图 3;与 NC 组比较, *miR-27a-3p* 联合 BNIP3L-WT 共转染组荧光素酶活性显著降低

($P < 0.001$),见表 4。模型组的 *BNIP3L* mRNA 相对表达水平及 Parkin、PINK1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与模型组比较,低、高剂量实验组的 *BNIP3L* mRNA 相对表达水平及 Parkin、PINK1 蛋白

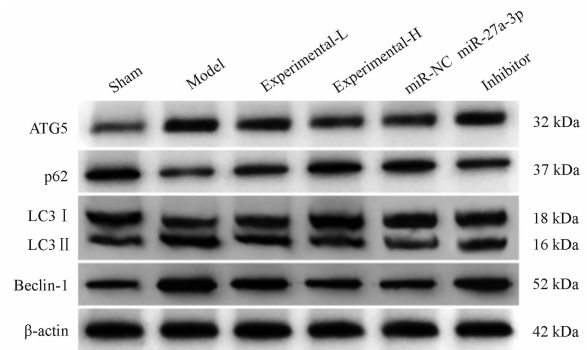


图 2 蛋白质印迹法检测自噬蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of autophagy-related proteins detected by Western blot

ATG5; Autophagy related gene 5; LC3; Microtubule associated protein 1 light chain 3; Beclin-1; Beclin 1 autophagy regulator; p62; Sequestosome 1.

表 1 各组大鼠水迷宫数据的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of water maze data of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Number of crossing platform	Escape latency (s)	Target quadrant dwell time ratio (%)
Sham	10	4.50 ± 0.50	11.19 ± 0.75	48.25 ± 5.12
Model	10	1.10 ± 0.30***	26.06 ± 1.47***	12.38 ± 3.45***
Experimental-L	10	1.70 ± 0.46##	23.59 ± 1.39##	28.64 ± 4.18##
Experimental-H	10	2.10 ± 0.30###	14.95 ± 1.71###	42.71 ± 4.93###
miR-NC	10	2.20 ± 0.40	15.37 ± 0.77	13.52 ± 3.81
miR-27a-3p inhibitor	10	1.80 ± 0.40&	24.91 ± 1.96&&&	18.96 ± 4.27&&&

Sham group: Only craniotomy was performed; Model group: TBI model was established; Experimental-L group: TBI model + 25 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde injection; Experimental-H group: TBI model + 75 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde injection; miR-NC group: TBI model + 75 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde + miR-NC lentivirus injection; miR-27a-3p inhibitor group: TBI model + 75 mg · kg⁻¹ cinnamaldehyde + miR-27a-3p inhibitor lentivirus injection; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the miR-NC group, & $P < 0.05$, &&& $P < 0.001$.

表 2 各组大鼠脑组织的离子钙结合适配器分子 1 (*Iba-1*)、白细胞介素-1β (*IL-1β*)、肿瘤坏死因子-α (*TNF-α*) mRNA 和凋亡相关蛋白的相对表达水平

Table 2 Comparison of the relative expression levels of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (*Iba-1*), interleukin-1β (*IL-1β*), tumor necrosis factor-α (*TNF-α*) mRNA and apoptosis-related proteins in the brain tissues of rats in each group

Group	Fluorescence	mRNA		Protein	
	<i>Iba-1</i> (a.u.)	<i>IL-1β</i>	<i>TNF-α</i>	Bax/Bcl-2	Cleaved caspase-3
Sham	1 189.50 ± 113.68	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.15	0.25 ± 0.05	0.34 ± 0.05
Model	2 958.70 ± 279.29***	2.52 ± 0.19***	2.09 ± 0.10***	2.45 ± 0.53***	1.03 ± 0.08***
Experimental-L	2 287.05 ± 271.69###	2.15 ± 0.25##	1.85 ± 0.10###	1.18 ± 0.15###	0.78 ± 0.08###
Experimental-H	1 916.55 ± 205.44###	1.56 ± 0.179###	1.48 ± 0.14###	0.54 ± 0.10###	0.60 ± 0.09###
miR-NC	1 935.57 ± 164.54	1.59 ± 0.14	1.45 ± 0.19	0.49 ± 0.07	0.57 ± 0.10
miR-27a-3p inhibitor	2 564.52 ± 333.05&&&	2.24 ± 0.26&&&	1.79 ± 0.18&&	1.75 ± 0.24&&&	0.82 ± 0.09&&&

Dose and n refer to table 1; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the miR-NC group, & $P < 0.01$, &&& $P < 0.001$.

相对表达水平均显著降低($P < 0.01$, $P < 0.001$);相比 miR - NC 组, miR - 27a - 3p inhibitor 组的 *BNIP3L* mRNA 相对表达水平及 Parkin、PINK1 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.001$),见表 5 和图 4。

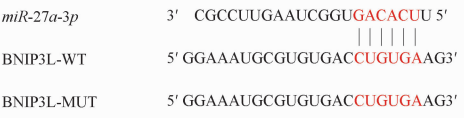


图 3 miR - 27a - 3p 与 BCL2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3 样蛋白(BNIP3L)的结合位点及突变位点

Figure 3 The binding sites and mutation sites of miR - 27a - 3p and BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3 - like (BNIP3L)

表 4 双荧光素酶报告基因实验检测 miR - 27a - 3p 与 BNIP3L 靶向结合($\bar{x} \pm s$)

Table 4 The dual - luciferase reporter gene assay was used to detect the targeted binding of miR - 27a - 3p to BNIP3L

Group	n	Luciferase activity	
		BNIP3L - WT	BNIP3L - MUT
NC	9	1.00 ± 0.14	0.98 ± 0.13
miR - 27a - 3p	9	0.20 ± 0.04 ***	0.97 ± 0.17

Compared with NC group, *** $P < 0.001$.

表 3 各组大鼠脑组织自噬相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of autophagy related protein relative expressions levels in the brain tissues of rats in each group

Group	ATG5	p62	LC3 II/LC3 I	Beclin - 1
Sham	0.32 ± 0.03	0.78 ± 0.07	0.24 ± 0.02	0.35 ± 0.03
Model	0.94 ± 0.07 ***	0.27 ± 0.02 ***	1.00 ± 0.11 ***	0.95 ± 0.13 ***
Experimental - L	0.71 ± 0.09 ###	0.46 ± 0.04 ###	0.81 ± 0.07 ###	0.75 ± 0.12 ##
Experimental - H	0.50 ± 0.08 ###	0.67 ± 0.05 ###	0.64 ± 0.06 ###	0.49 ± 0.05 ###
miR - NC	0.53 ± 0.07	0.64 ± 0.07	0.61 ± 0.06	0.48 ± 0.07
miR - 27a - 3p inhibitor	0.85 ± 0.09 &&&	0.43 ± 0.10 &&&	0.84 ± 0.11 &&&	0.73 ± 0.10 &&&

Dose and n refer to table 1; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the miR - NC group, &&& $P < 0.001$.

讨 论

肉桂醛作为肉桂挥发油中的主要活性成分,引起学者们的广泛关注,研究已经证实,肉桂醛具有调节神经炎症、抑制氧化应激、改善突触连接、抑制细胞凋亡的神经保护作用^[13-15],这些证据提示肉桂醛对改善 TBI 后神经损伤也具有较大潜力;最近已有研究证实,肉桂醛可以通过限制中性粒细胞募集、抑制活性氧积累、减轻组织损伤和海马功能障碍显示出对 TBI 大鼠的神经保护作用^[4, 16]。本研究成功构建 TBI 大鼠

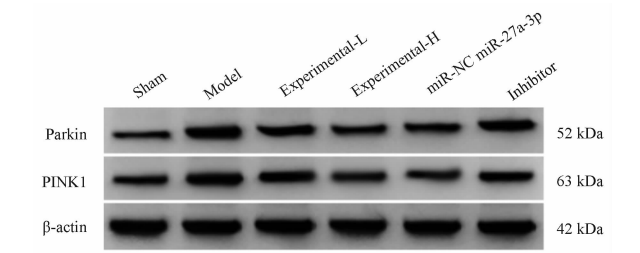


图 4 蛋白质印迹法检测脑组织 Parkin、PINK1 蛋白相对表达水平
Figure 4 The relative expression levels of Parkin and PINK1 proteins in brain tissue detected by Western blot

表 5 各组大鼠脑组织 BNIP3L mRNA 及 Parkin RBR 结构域 E3 泛素蛋白连接酶(Parkin)、PTEN 诱导激酶 1(PINK1)蛋白相对表达水平($\bar{x} \pm s$)

Table 5 The relative expression levels of BNIP3L mRNA, Parkin RBR domain E3 ubiquitin protein ligase (Parkin) and PTEN induced kinase 1 (PINK1) proteins in the brain tissues of rats in each group

Group	BNIP3L mRNA	Parkin	PINK1
Sham	1.00 ± 0.16	0.29 ± 0.04	0.32 ± 0.04
Model	3.87 ± 0.21 ***	0.64 ± 0.08 ***	0.70 ± 0.08 ***
Experimental - L	2.30 ± 0.18 ###	0.51 ± 0.09 ##	0.59 ± 0.08 ##
Experimental - H	1.37 ± 0.09 ###	0.41 ± 0.04 ###	0.46 ± 0.06 ###
miR - NC	1.33 ± 0.09	0.43 ± 0.05	0.44 ± 0.04
miR - 27a - 3p inhibitor	3.18 ± 0.32 &&&	0.62 ± 0.07 &&&	0.66 ± 0.07 &&&

Dose and n refer to table 1; Compared with the sham group, *** $P < 0.001$; Compared with the model group, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with the miR - NC group, &&& $P < 0.001$.

模型,使用肉桂醛治疗后,TBI 大鼠脑组织病理学损伤得到改善,同时水迷宫实验表明,肉桂醛可以明显改善 TBI 大鼠记忆功能,提示肉桂醛能够明显改善 TBI 大鼠神经功能缺陷,这与韩福新等^[4]研究一致。

本研究进一步探究肉桂醛改善 TBI 大鼠神经功能缺陷的相关机制,观察到 miR - 27a - 3p 在 TBI 大鼠中低表达,而肉桂醛治疗后,miR - 27a - 3p 相对表达水平明显提升,同时,肉桂醛对 TBI 大鼠的神经功能改善被低表达的 miR - 27a - 3p 削弱,提示 miR - 27a - 3p 在维持 TBI 大鼠神经功能中起关键作用,推测肉桂醛可能通过上调 miR - 27a - 3p 改善 TBI

大鼠神经功能。小胶质细胞在中枢神经系统的炎症反应中起关键作用,可以导致神经退行性疾病,此外有报道称,小胶质细胞具有降低清除作用的能力,从而导致神经细胞损伤的加重^[17]。在本研究中,TBI大鼠表现出活化的*TNF- α* 和*IL-1 β* ,且*Iba-1*相对表达水平增强,凋亡蛋白 Bax/Bcl-2、Cleaved caspase-3 水平也升高,而肉桂醛治疗减轻了这种活性,说明肉桂醛可以减轻 TBI 后神经炎性并抑制神经元凋亡。但肉桂醛对神经炎性的减轻作用被 miR-27a-3p inhibitor 逆转,这说明 miR-27a-3p 可以抑制 TBI 大鼠脑内小胶质细胞激活和促炎因子释放,肉桂醛通过上调 miR-27a-3p 发挥抗炎作用,进而减轻神经炎症对脑组织的损伤。

有研究证实,在 TBI 创伤后的继发性病理反应中,持续激活的自噬被认为是导致神经损伤恶化的不利因素^[18]。ATG5、p62、LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 是自噬相关蛋白,本研究中,肉桂醛治疗后,大鼠脑组织中 ATG5、LC3 II/LC3 I 和 Beclin-1 相对表达水平均降低,p62 升高,提示肉桂醛可以抑制 TBI 导致的自噬过度激活,而这种作用被 miR-27a-3p inhibitor 减弱,说明 miR-27a-3p 可以调节 TBI 大鼠自噬过程,肉桂醛可以通过上调 miR-27a-3p 恢复自噬平衡。进一步探究 miR-27a-3p 下游靶点,发现 miR-27a-3p 与 *BNIP3L* 靶向结合。*BNIP3L* 是线粒体自噬和细胞凋亡的关键调节因子,与神经元的线粒体健康密切相关,研究表明,在 TBI 中,*BNIP3L* 过表达会破坏线粒体膜电位,引发神经元死亡并加剧氧化应激^[19]。基于此,本研究检测了线粒体质量控制相关蛋白 Parkin、PINK1 的表达,观察到肉桂醛干预后,其相对表达水平呈剂量依赖性降低,而 miR-27a-3p inhibitor 可以减弱肉桂醛对 Parkin、PINK1 表达的调控。提示,肉桂醛可能通过 miR-27a-3p/*BNIP3L* 轴调控线粒体自噬过程,进而影响线粒体质量控制,减轻 TBI 导致的线粒体功能紊乱,不过这仍需进一步通过大量实验证实。

本研究提示:肉桂醛可能通过上调 miR-27a-3p 靶向调控 *BNIP3L*,调节自噬与线粒体质量控制,抑制脑内炎症反应,最终减轻 TBI 大鼠的神经功能障碍。本研究为 TBI 的治疗提供了新的分子机制和潜在干预策略。

参考文献:

- [1] SCARBORO M, MCQUILLAN K A. Traumatic brain injury update [J]. *AACN Adv Crit Care*, 2021, 32(1): 29—50.
- [2] THAPA K, KHAN H, SINGH T G, et al. Traumatic brain injury: Mechanistic insight on pathophysiology and potential therapeutic targets[J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(9): 1725—1742.
- [3] 李张珂, 马涛, 满明昊, 等. 辛伐他汀对创伤性脑损伤小鼠继发性炎症抑制作用及机制研究[J]. *陕西医学杂志*, 2022, 51(11): 1332—1336.
- [4] 韩福新, 武伟男, 张蕊. 肉桂醛通过抑制 IRAK4/TAK1 信号通路发挥对创伤性脑损伤大鼠的神经保护作用[J]. *中医学报*, 2025, 40(6): 1311—1317.
- [5] 张海燕, 张晓娟, 张玮玮. lncRNA XIST 调节 miR-27a-3p 信号通路对创伤性脑损伤小鼠认知功能和神经炎症的影响[J]. *浙江医学*, 2025, 47(10): 1041—1047, 1116.
- [6] 马平. 9-菲酚减轻大鼠创伤性脑损伤后继发性损伤及其机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2023.
- [7] 李红枚. 依达拉奉右莰醇联合 cbMNCs 治疗减轻 MCAO 大鼠脑损伤及其机制研究[D]. 湖南 长沙: 中南大学, 2023.
- [8] 窦金金, 齐珊, 张喜武. 加减黄连温胆汤对血管性痴呆模型大鼠炎症反应的影响[J]. *世界中医药*, 2021, 16(9): 1417—1421.
- [9] LI H, LU C, YAO W, et al. Dexmedetomidine inhibits inflammatory response and autophagy through the circLrp1b/miR-27a-3p/Dram2 pathway in a rat model of traumatic brain injury[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(21): 21687—21705.
- [10] 朱世杰, 寇云芳, 吴云, 等. 天麻通过脑-肠轴对脑出血大鼠的保护机制[J]. *世界中医药*, 2022, 17(09): 1292—1296.
- [11] 向朝雪, 李福祥, 朱忠立, 等. NLRP3 炎症小体在 ICU 获得性衰弱大鼠呼吸肌和下肢肌中的表达[J]. *中华肺部疾病杂志 (电子版)*, 2020, 13(2): 198—203.
- [12] 冶俊玲, 郑小影, 郭新建, 等. lncRNA *SNHG5*/miR-26a-5p/MTDH 信号轴促进结肠癌转移的机制研究[J]. *中国癌症杂志*, 2023, 33(7): 673—685.
- [13] CHUN Y L, PARK K H, PALLAVI B, et al. Novel cinnamaldehyde derivatives inhibit peripheral nerve degeneration by targeting schwann cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(10): 1846.
- [14] 王清泉, 李亚男, 刘国飞, 等. 肉桂醛药理作用及相关作用机制研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2024, 39(12): 6646—6652.
- [15] HAJINEJAD M, GHADDARIPOURI M, DABZADEH M, et al. Natural cinnamaldehyde and its derivatives ameliorate neuroinflammatory pathways in neurodegenerative diseases[J/OL]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 1034325. 2020-11-14 [2025-12-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33274192/>.
- [16] KURU BEKTASOGLU P, KOYUNCUOGLU T, DEMIR D, et al. Neuroprotective effect of cinnamaldehyde on secondary brain injury after traumatic brain injury in a rat model [J/OL]. *World Neurosurg*, 2021, 153: e392—e402. 2021-07-02 [2025-12-11]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34224887/>.
- [17] KWON H S, KOHH S H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: The roles of microglia and astrocytes [J]. *Transl Neurodegener*, 2020, 9(1): 42.
- [18] MCDONALD B Z, TARUDJI A W, ZHANG H, et al. Traumatic brain injury heterogeneity affects cell death and autophagy[J]. *Exp Brain Res*, 2024, 242(7): 1645—1658.
- [19] BINDAL A, KARABACAK P, ASCI H, et al. Urapidil as a neuroprotective agent: Targeting hypoxia, inflammation, and oxidative stress in traumatic brain injury[J]. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 2025, 51(1): 196.