

DOI:10.12113/202110016

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/23.1513.Q.20220607.1343.002.html>

基于疾病与活性化合物靶点网络构建的异鼠李素抗缺血性神经损伤作用评价与验证研究

张雯, 张森, 刘珊, 宋俊科, 杜冠华*

(中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 药物靶点研究与新药筛选北京市重点实验室, 北京 100050)

摘要: 基于网络药理学与分子对接探讨异鼠李素对缺血性神经损伤的治疗作用。采用 ChEMBL、SwissTargetPrediction、DrugBank、STITCH 及 BindingDB 数据库检索异鼠李素药理学靶点, 应用 DisGeNET、GenCLIP 及 CTD 数据库检索缺血性神经损伤的疾病靶点, 取交集作为异鼠李素对缺血性神经损伤的治疗靶点, 并进行表型分析。将交集靶点导入 STRING 构建蛋白互作网络, 使用 Network analyser 进行拓扑分析, 同时应用 MODE 构建功能模块, 并基于 ClueGo 对功能模块进行分析。之后应用 DAVID 数据库对治疗靶点进行 GO 及 KEGG 富集分析。利用 Discovery Studio 评价异鼠李素与核心靶点的结合活性, 最后建立 OGD/R 损伤 PC12 细胞模型, 采用 MTT 和 LDH 法检测细胞活力, Western blot 法对 AKT1、IL6 和 MMP2 的表达进行检测。异鼠李素通过 50 个缺血性神经损伤相关靶点, 调控细胞凋亡、转录、蛋白质磷酸化、炎症反应等生物学过程, 干预 PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、FoxO 信号通路等多条途径发挥抗缺血性神经损伤的作用。初步阐释异鼠李素治疗缺血性神经损伤的作用, 涉及多靶点、多通路, 为进一步探究其药理学活性奠定理论基础。

关键词: 缺血性神经损伤; 异鼠李素; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R96 文献标志码: A 文章编号: 1672-5565(2023)01-020-09

Evaluation and verification of effect of isorhamnetin against ischemic nerve injury based on network of disease and active compound targets

ZHANG Wen, ZHANG Sen, LIU Shan, SONG Junke, DU Guanhua*

(Beijing Key Laboratory of Drug Target Identification and Drug Screening, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: On the basis of network pharmacology and molecular docking, the therapeutic effect of isorhamnetin on ischemic nerve injury was explored. ChEMBL, SwissTargetPrediction, DrugBank, STITCH, and BindingDB databases were used to search for isorhamnetin pharmacological targets, and DisGeNET, GenCLIP, and CTD databases were used to search for disease targets of ischemic nerve injury. The intersection of these targets was taken to obtain the treatment targets of isorhamnetin against ischemic nerve injury, and phenotype analysis was conducted. The intersection target was introduced into STRING to construct a protein interaction network. Network analyser was used for topological analysis. MODE was used to construct functional modules, and the functional modules were analyzed based on ClueGo. Then, the DAVID database was used for GO and KEGG enrichment analyses. Discovery Studio was used to evaluate the binding activity of isorhamnetin to the core target, and finally the OGD/R damaged PC12 cell model was established. The cell viability was detected by MTT and LDH methods, and the expression of AKT1, IL6, and MMP2 was detected by Western blot. Results show that isorhamnetin regulated cell apoptosis, transcription, protein phosphorylation, inflammation, and other biological processes through 50 ischemic nerve injury-related targets, and interfered with PI3K-AKT signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, estrogen signaling pathway, tumor necrosis factor signaling pathway, FoxO signaling pathway, and other pathways, which played a role in resisting ischemic nerve injury. Preliminary explanation of the effect of isorhamnetin in the treatment of ischemic nerve injury involves multiple targets and multiple pathways, laying a theoretical foundation for further exploration of its pharmacological activity.

Keywords: Ischemic nerve injury; Isorhamnetin; Network pharmacology; Molecular docking

收稿日期: 2021-10-28; 修回日期: 2022-02-22; 网络首发日期: 2022-06-07.

基金项目: 国家重点研发计划项目 (No.2020YFC2008302); 国家自然科学基金项目 (No.82004071).

作者简介: 张雯, 女, 博士, 研究方向: 药理学. E-mail: zhangwen9010@imm.ac.cn.

* 通信作者: 杜冠华, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药理学. E-mail: dugh@imm.ac.cn.

缺血性神经损伤 (Ischemic Nerve Injury, INI), 指脑部动脉血管管壁发生病理改变, 血管管腔狭窄、闭塞、血流停滞, 进而引起脑组织缺血坏死, 出现神经功能障碍^[1-2]。研究神经损伤发病机制, 开发新型治疗药物, 对于减少神经损伤的发病率、改善患者预后有重要意义。

异鼠李素 (Isorhamnetin, Iso) 广泛存在于多种植物的花、果实和叶中。研究表明, 异鼠李素能够通过 NF- κ B 信号通路抑制炎症反应、保护内皮细胞^[3], 还能够清除自由基、抑制线粒体脂质过氧化、减轻氧化应激造成的心肌损伤^[4]。此外, 异鼠李素能够提高 MPP⁺ 损伤后 SH-SY5Y 细胞存活率, 抑制 MPP⁺ 引起的细胞活性氧和线粒体超氧化物增加, 减缓线粒体膜电位下降^[5]。并且, 异鼠李素通过激活 PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB 信号通路减轻鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤^[6]。目前尚缺乏异鼠李素治疗缺血性神经损伤的报道, 本研究采用网络药理学和分子对接技术, 结合细胞生物学和分子生物学验证, 系统阐述异鼠李素治疗缺血性神经损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 数据库

所用数据库及网址 (见表 1)。

表 1 数据库及网址

Table 1 Databases and websites

数据库名称	网址
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
ChEMBL Database	https://www.ebi.ac.uk/chembl
SwissTargetPrediction	http://www.swisstargetprediction.ch
DrugBank	https://go.drugbank.com
STITCH	http://stitch.embl.de
BindingDB	http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp
Uniprot	http://www.uniprot.org
DisGeNET	https://www.disgenet.org
GenCLiP	http://ci.smu.edu.cn/GenCLiP2/analysis.php
CTD	http://ctdbase.org
VarElect	https://varelect.genecards.org
STRING	https://string-db.org
DAVID	https://david.ncifcrf.gov

1.2 试剂

异鼠李素购自上海源叶生物科技有限公司。PC12 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所。Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640), 马血清, 胎牛血清, 均购自 Gibco; MTT, 多聚赖氨酸, 均购自 Sigma-Aldrich。蛋白激酶 B α (Protein Kinase

B α , AKT1)、白介素 6 (Interleukin 6, IL6)、基质金属蛋白酶 2 (Matrix Metalloproteinase2, MMP2)、 β -actin 均购自 Cell Signaling Technology。

1.3 靶点收集与网络构建

1) 靶点收集 采用 PubChem 数据库获得异鼠李素的三维结构, 应用 ChEMBL、SwissTargetPrediction、DrugBank、STITCH 及 BindingDB 数据库检索异鼠李素潜在靶点, 运用 UniProt 数据库将靶点统一转换为靶基因形式, 构建异鼠李素药理作用靶基因集合。应用 DisGeNET、GenCLiP 及 CTD 数据库检索缺血性神经损伤疾病相关靶点。将异鼠李素药理作用靶点与缺血性神经损伤疾病相关靶点取交集, 作为异鼠李素治疗缺血性神经损伤的靶点。将上述靶点导入 VarElect 数据库, 分析基因与表型之间相关性。

2) 蛋白质相互作用网络构建 将异鼠李素治疗缺血性神经损伤的靶点导入 STRING 数据库, 构建蛋白-蛋白相互作用 (Protein-protein Interaction, PPI) 网络。之后将 PPI 网络导入 Cytoscape 软件, 使 PPI 网络可视化。CytoHubba 排名前十的靶点作为异鼠李素治疗缺血性神经损伤的关键靶点。使用 Cytoscape 的 Network analyser 插件进行拓扑分析。同时应用 MODE 进行聚类构建功能模块, 并基于 ClueGo 对功能模块进行分析。

3) GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析 为了进一步探究治疗靶点参与的生物学过程及所涉及的信号通路, 将核心治疗靶蛋白上传至 DAVID 数据库进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析, 显著性阈值设为 $P < 0.05$, 筛选排名靠前的生物学过程和信号通路, 并做气泡图进行可视化。

1.4 生物活性验证

1) 分子对接 利用 PDB 数据库查询核心靶点的 PDB ID, 导入 Discovery Studio 进行分子对接, 预测和评价活性成分与靶点的结合活性。

细胞培养。PC12 细胞用 RPMI1640 培养液, 加 10% 马血清和 5% 胎牛血清, 37 °C、5% CO₂, 饱和湿度条件下培养。

2) 细胞活力检测 PC12 细胞以完全培养基 8 000 cells/well 接种于 96 孔板 24 h, 之后 PBS 洗一次, 分为正常对照组、缺糖缺氧/复糖复氧 (Oxygen Glucose Deprivation/ Reoxygenation, OGD/R) 损伤模型组和异鼠李素低中高 (1.5, 5 和 15 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 给药组。除正常对照组外, 其余各组均更换 Earle's 平衡盐溶液, 并置于低氧培养箱 (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) 37 °C 培养 2 h, 之后更换完全培养基, 重新置于常氧培养箱 37 °C 继续培养至 24 h。正常对照组始终使用完全培养基在常氧培养箱孵育 24 h。实

验终点时,取细胞上清,测定 LDH 释放;下层每孔加入 100 μL 0.5 mg/mL MTT 溶液,4 h 后加入 150 μL DMSO 振荡摇匀 5 ~ 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度。

3) Western blot 检测蛋白表达 实验终点,提取细胞蛋白,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。分别用稀释后的 AKT1、IL6、MMP2 和 β -actin 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,再置于相应种属二抗中孵育 2 h,接下来用 Tris 缓冲盐溶液洗涤后显色成像。

1.5 研究策略

运用各数据库及软件进行的网络药理学分析,通过小分子化合物筛选和疾病靶标蛋白基因筛选,分别得到化合物与疾病对应相关靶标蛋白大分子。之后将筛选得到的交集基因进行整合,在基因层面建立化合物与疾病之间的联系,并进行蛋白质相互作用及信号通路研究。最后,对网络中的关键节点和功能模块,辅以生物学验证。即以“化合物-疾病”两个分支开始,以网络构建、网络可视化、网络分析预测二者相互作用为基础,以化合物对疾病的生物学功能为终止(见图 1)。

2 结果

2.1 缺血性神经损伤靶蛋白 PPI 网络分析和靶点网络建立

通过数据库检索得到异鼠李素药理作用靶点,与缺血性神经损伤疾病相关靶点取交集,共得到 50 个共有靶点,作为异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶点。将上述靶点导入 STRING 数据库,构建 PPI 网络,结果(见图 2 和表 1),PPI 网络中的关键基因包括促分裂原活化蛋白激酶 3 (Mitogen-activated Protein Kinase 3, MAPK3)、白细胞介素家族、MMP2、AKT1、非受体酪氨酸激酶 c (SRC proto-Oncogene, non-receptor, SRC)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 8 (Recombinant caspase 8, CASP8)、基质金属蛋白酶-9 (Matrix metalloproteinase 9, MMP9) 等。

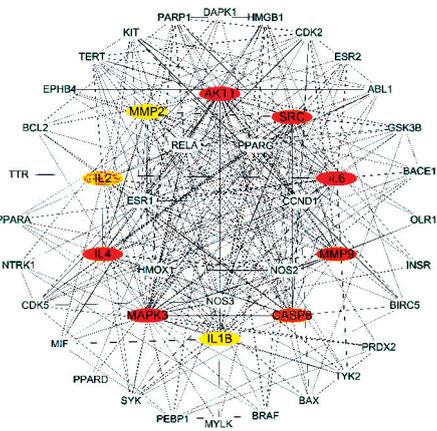


图 2 异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶点的 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of potential targets of isorhamnetin for ischemic nerve injury treatment

2.2 异鼠李素治疗缺血性神经损伤核心靶蛋白模块分析

借助 MCODE 算法对核心靶点互作网络进行模块识别,从互作网络中识别出 3 个功能模块(见图 3)。

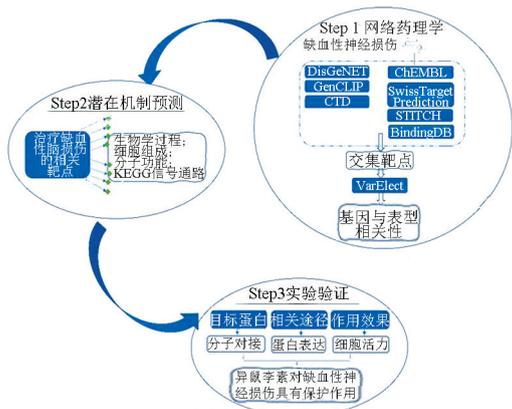


图 1 采用网络药理学方法预测化合物新适应症的流程概览

Fig. 1 Process overview of predicting new indications of compounds with a network pharmacology approach

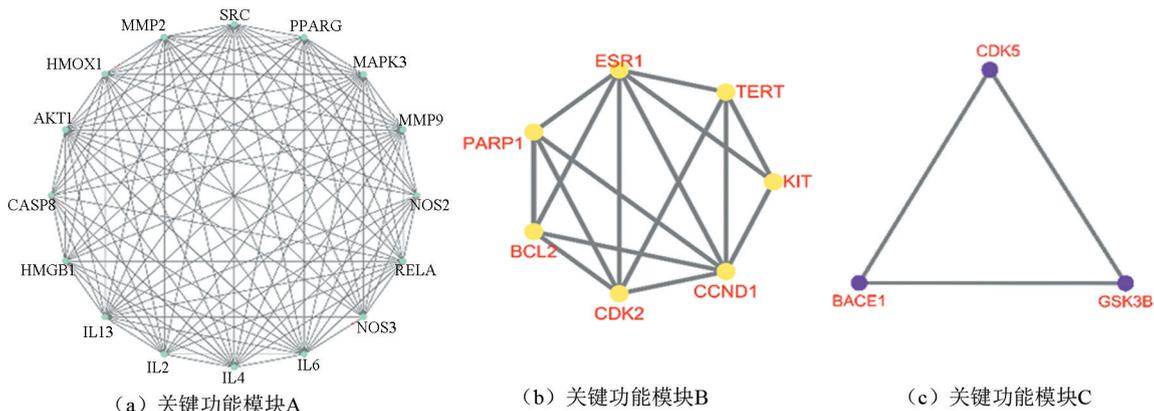


图 3 异鼠李素治疗缺血性神经损伤核心靶点的关键功能模块

Fig. 3 Key functional modules in targets of isorhamnetin against ischemic nerve injury

表 2 核心基因命名和拓扑参数

Table 2 Designations and topological parameters of hub genes

基因名称	蛋白名称	度值	紧密中心度	间距中心度
MAPK3	mitogenactivated protein kinase kinase kinase 3	35	0.830 188 70	281.708 560
<i>IL4</i>	interleukin 4	20	0.647 058 84	16.728 743
<i>IL2</i>	interleukin 2	19	0.637 681 20	15.648 768
<i>MMP2</i>	matrix metalloproteinase 2	19	0.637 681 20	26.074 991
<i>AKT1</i>	protein kinase B α	35	0.830 188 70	216.504 940
<i>SRC</i>	SRC proto-oncogene, non-receptor	30	0.758 620 70	156.625 100
<i>IL6</i>	interleukin 6	32	0.785 714 27	220.914 950
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase 9	22	0.666 666 70	42.350 204
<i>CASP8</i>	recombinant caspase 8	22	0.666 666 70	51.102 180
<i>IL1B</i>	interleukin 1 β	21	0.656 716 40	29.914 068

进一步借助 ClueGo 对识别的模块进行分析(见图 4 和表 3),MCODE A 主要功能富集在 VEGF 信号通路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路等。MCODE B 主要富集在卵泡发育、p53 信号通路。MCODE C 主要富集在淀粉样 β 蛋白反应。

2.3 异鼠李素治疗缺血性神经损伤基因-表型相关性分析

将异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶点导入 VarElect 数据库,选择表型为缺血性神经损伤,进行基因与表型相关性分析,其中 49 个潜在基因与缺血性神经损伤表型直接相关,1 个潜在基因与缺血性神经损伤表型间接相关,Average Disease Causing Likelihood 大于 65%的靶点(见表 4)。

表 3 功能模块的 GO 分析和 KEGG 富集分析

Table 3 GO and KEGG enrichment results of functional modules

子网络	条目
MCODE A	VEGF signaling pathway
	Fc epsilon RI signaling pathway
	Estrogen signaling pathway
	Prolactin signaling pathway
	Relaxin signaling pathway
	Fluid shear stress and atherosclerosis
	HIF-1 signaling pathway
	Toll-like receptor signaling pathway
	Cytosolic DNA-sensing pathway
	C-type lectin receptor signaling pathway
	IL-17 signaling pathway
	Th1 and Th2 cell differentiation
	Th17 cell differentiation
	T cell receptor signaling pathway
	TNF signaling pathway
Intestinal immune network for IgA production	
MCODE B	AGE-RAGE signaling pathway
	ovarian follicle development
MCODE C	p53 signaling pathway
	response to amyloid-beta
	cellular response to amyloid-beta

表 4 异鼠李素治疗缺血性神经损伤基因-表型相关性分析

Table 4 Gene-phenotype correlation analysis of targets of isorhamnetin for ischemic nerve injury treatment

靶点	名称	平均致病可能性%	关联
<i>PPARD</i>	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Delta	93.27	Direct
<i>SRC</i>	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase	92.03	Direct
<i>AKT1</i>	AKT Serine/Threonine Kinase 1	90.77	Direct
<i>CCND1</i>	Cyclin D1	88.30	Direct
<i>RORA</i>	RAR Related Orphan Receptor A	86.61	Direct
<i>MAPK3</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase 3	84.66	Direct
<i>CDK5</i>	Cyclin Dependent Kinase 5	83.41	Direct
<i>GSK3B</i>	Glycogen Synthase Kinase 3 Beta	83.18	Direct
<i>BAX</i>	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator	82.96	Direct
<i>IL1B</i>	Interleukin 1 Beta	81.84	Direct
<i>RELA</i>	RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit	80.67	Direct
<i>BRAF</i>	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase	79.60	Direct
<i>SYK</i>	Spleen Associated Tyrosine Kinase	78.86	Direct
<i>BACE1</i>	Beta-Secretase 1	78.70	Direct
<i>TNKS2</i>	Tankyrase 2	78.17	Direct
<i>PNPO</i>	Amyloid Beta Precursor Protein	77.65	Indirect
<i>TERT</i>	Telomerase Reverse Transcriptase	76.64	Direct
<i>INSR</i>	Insulin Receptor	75.63	Direct
<i>IL2</i>	Interleukin 2	75.55	Direct
<i>ABL1</i>	ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase	74.05	Direct
<i>KIT</i>	KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase	72.60	Direct
<i>MMP2</i>	Matrix Metalloproteinase 2	71.78	Direct
<i>EPHB4</i>	EPH Receptor B4	69.29	Direct
<i>CDK2</i>	Cyclin Dependent Kinase 2	68.72	Direct
<i>CASP8</i>	Caspase 8	68.58	Direct

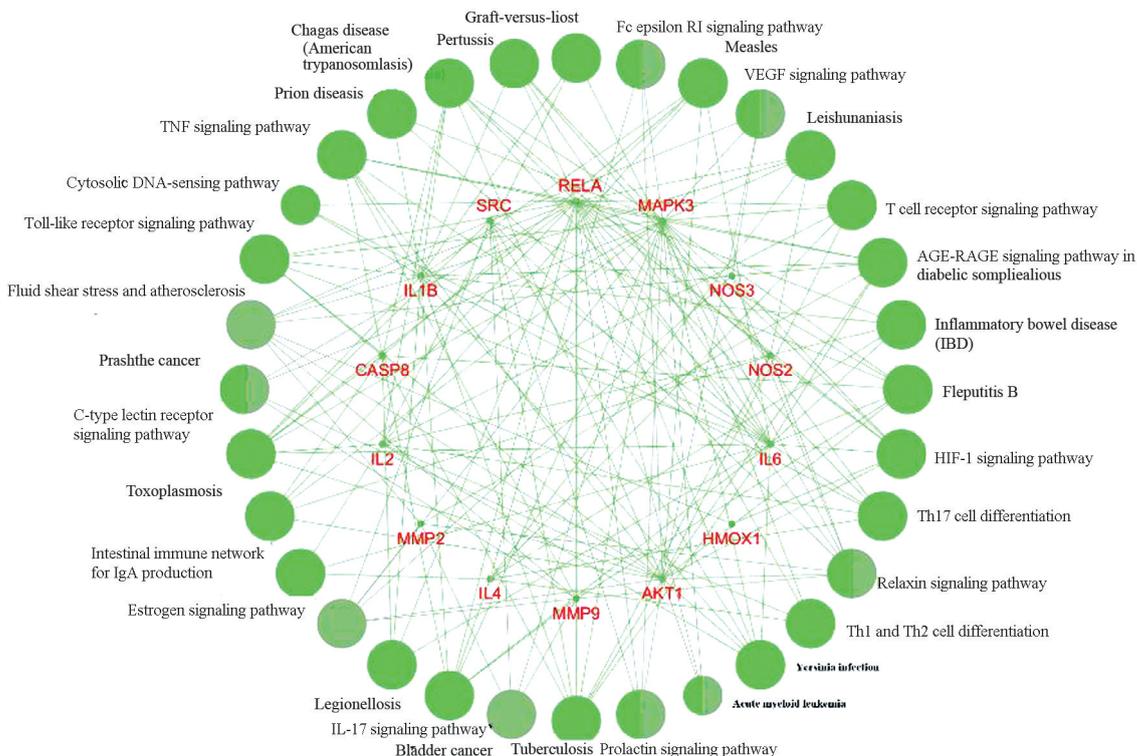


图 4 模块 A GO 分析和 KEGG 富集分析

Fig. 4 GO and KEGG enrichment results of MCODE A

2.4 异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶蛋白 GO 分析和 KEGG 富集分析

将核心治疗靶蛋白上传至 DAVID 数据库,进行 GO 分析和 KEGG 通路富集分析, $P < 0.05$ 。筛选排名靠前的生物学过程和信号通路,并做气泡图进行可视化,结果(见图 5)。富集度较高的生物学过程主要涉及调控细胞凋亡、转录、蛋白质磷酸化、炎症反应、ERK1 和 ERK2 级联反应、细胞内信号转导、细胞增殖、缺糖缺氧、血管生成、MAPK 级联反应、一氧化氮生物合成等。细胞组成主要包括细胞核、细胞质、等离子体膜、线粒体、蛋白质复合体、小窝、细胞骨架、核染色体、生长锥、周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物等。同时异鼠李素治疗缺血性神经损伤的作用与蛋白结合、ATP 结合、酶结合、类固醇激素受体活性、细胞因子活性、血红素结合、受体蛋白酪氨酸激酶活性、核心启动子序列特异性、DNA 结合性等分子功能密切相关。对异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶点涉及的 KEGG 通路进行富集分析,排名靠前的主要包括 PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路、雌激素信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、FoxO 信号通路、细胞凋亡、ErbB 信号通路、Toll 样受体信号通路、血小板激活、Jak-STAT 信号通路等。

2.5 分子对接分析

将 CytoHubba 排名前十的核心靶点与异鼠李素进

行分子对接,异鼠李素与 AKT1、CASP8、IL6、MMP2 的结合能力均高于其内在配体,结果(见图 6)。

2.6 异鼠李素提高 OGD/R 损伤后 PC12 细胞活力

MTT 检测结果显示, $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异鼠李素作用 PC12 细胞 24 h,不影响细胞生长。缺糖缺氧 2 h,复糖复氧至 24 h 后,PC12 细胞存活率显著降低为正常对照组的 54.2%。 1.5 、 5 和 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异鼠李素能够显著降低 OGD/R 对 PC12 细胞造成的损伤,其细胞存活率分别达到 62.06%、75.59%、84.42%。LDH 检测结果显示, $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 异鼠李素作用不影响 PC12 细胞 LDH 的释放。OGD/R 损伤显著提高 LDH 释放量 ($P < 0.001$),异鼠李素 (5 和 $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 可以显著降低 OGD/R 诱导的 LDH 释放 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。

2.7 异鼠李素改善 OGD/R 损伤 PC12 细胞中 AKT1、IL6、MMP2 蛋白表达

采用 Western blot 检测异鼠李素对 SH-SY5Y 细胞中 AKT1、IL6 和 MMP2 蛋白表达的影响。与正常对照组相比,缺糖缺氧/复糖复氧 (Oxygen glucose deprivation/ reoxygenation, OGD/R) 损伤 SH-SY5Y 细胞模型组中 p-AKT1、IL6 和 MMP2 蛋白水平均显著升高。与模型组相比,异鼠李素能够显著降低 p-AKT1、IL6 和 MMP2 的活化或表达(见图 8)。

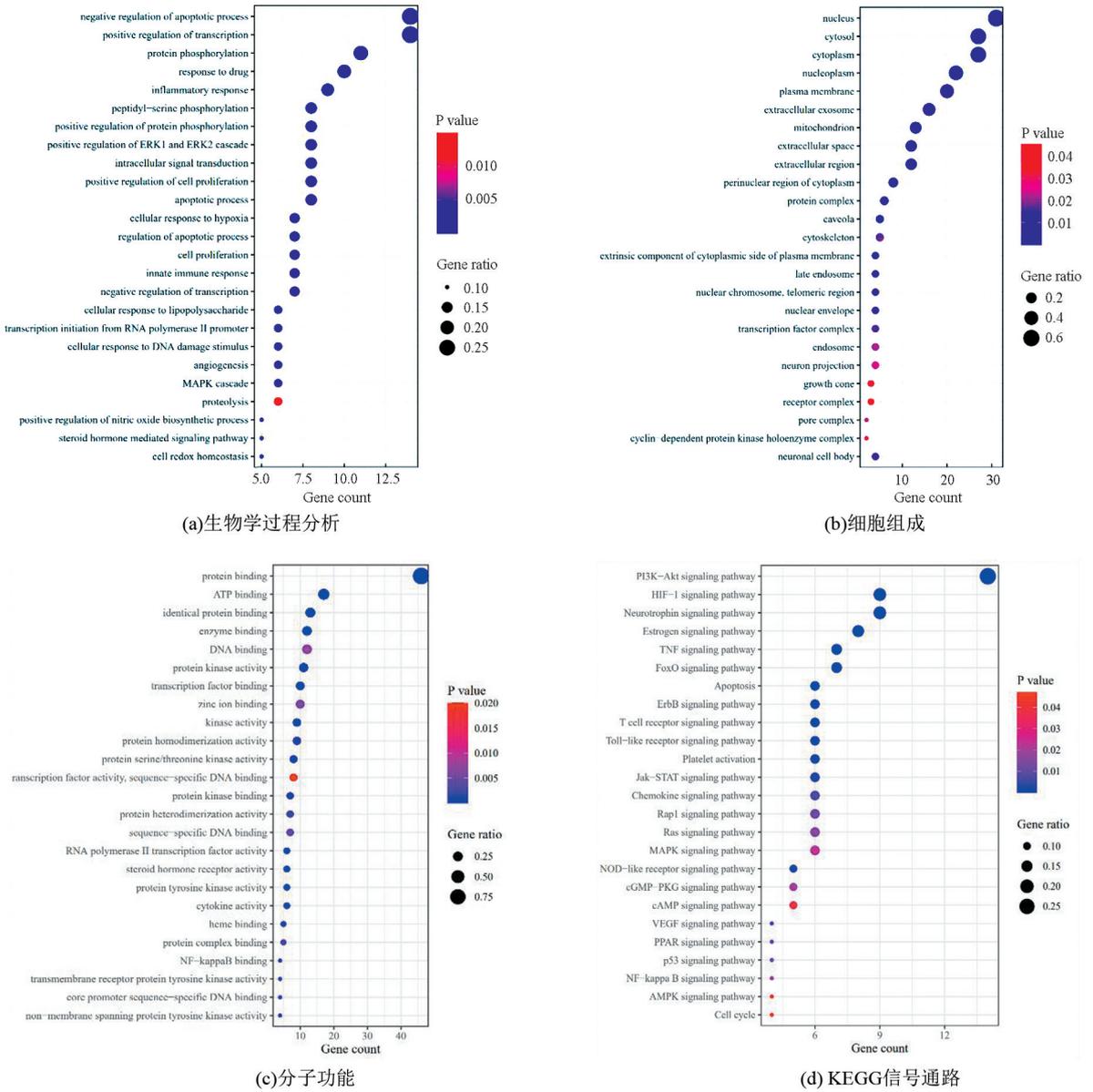


图 5 异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶基因 GO 分析和 KEGG 通路分析

Fig. 5 GO analysis and KEGG pathway analysis of isorhamnetin target for ischemic nerve injury treatment

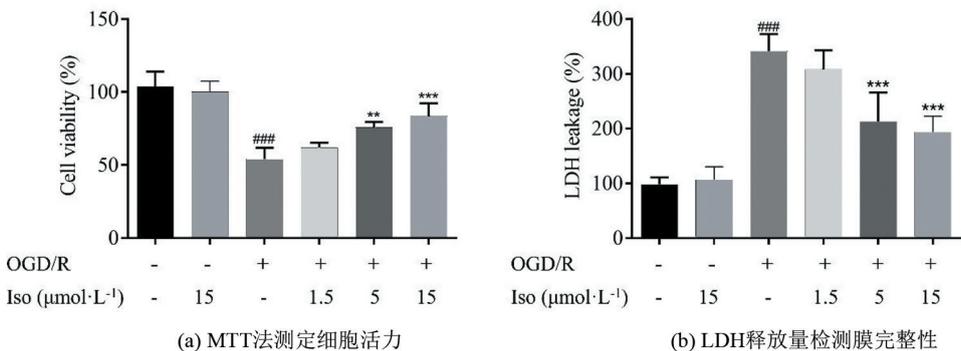


图 7 异鼠李素对 OGD/R 损伤后 PC12 细胞活力的影响

Fig. 7 Effects of isorhamnetin on cell viability of PC12 cells subjected to OGD/R

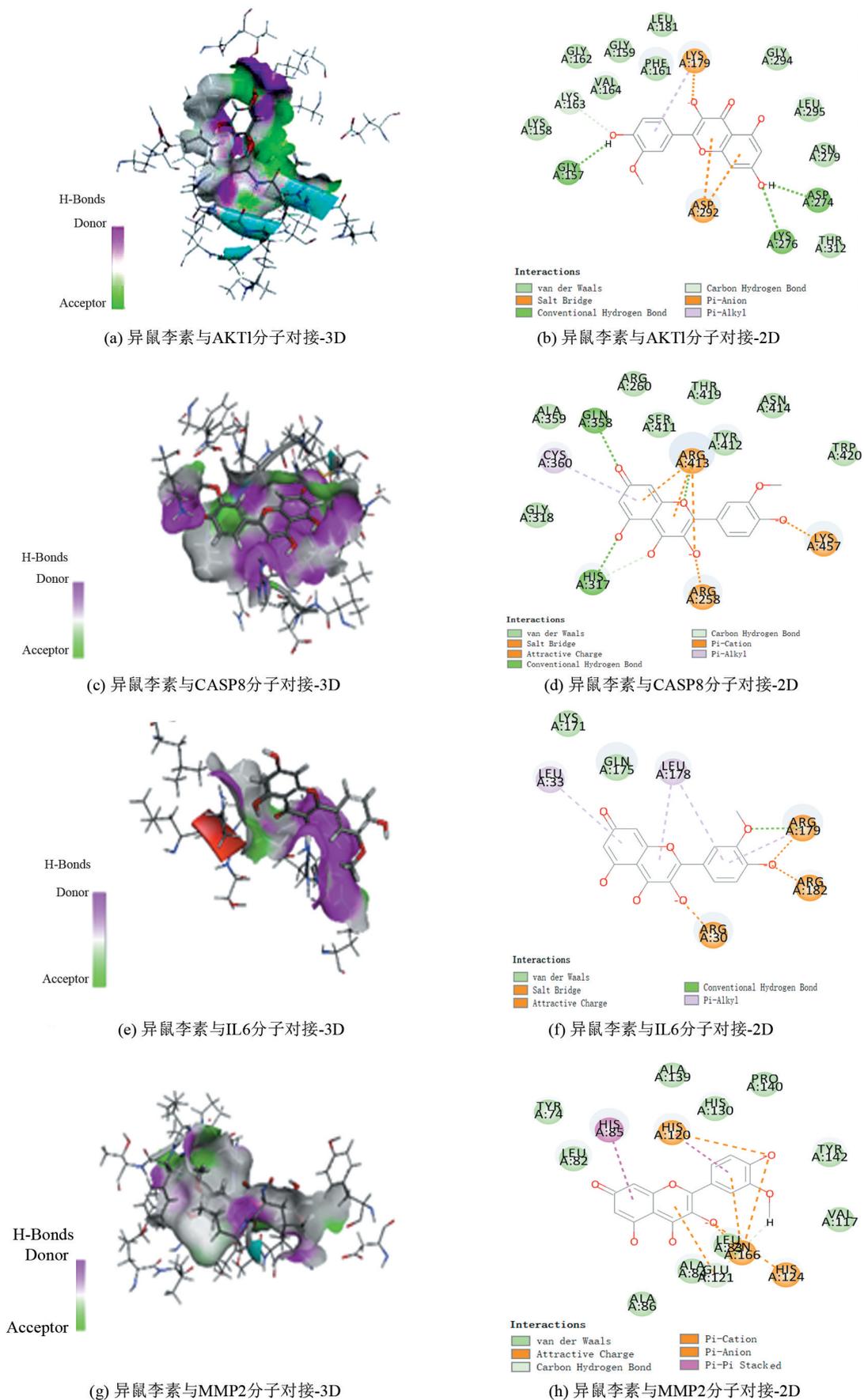


图6 异鼠李素与AKT1(a和b)、CASP8(c和d)、IL6(e和f)和MMP2(g和h)分子对接
 Fig. 6 Docking patterns of isorhamnetin interacting with AKT1(a and b), CASP8(c and d),
 IL6(e and f), and MMP2(g and h)

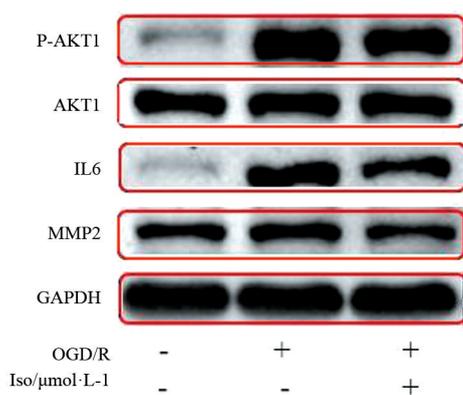


图 8 异鼠李素对 OGD/R 损伤 PC12 细胞 AKT1、IL6 和 MMP2 表达水平的影响

Fig. 8 Effects of isorhamnetin on AKT1, IL6, and MMP2 levels in OGD/R-injured PC12 cells

3 讨论

异鼠李素具有抗炎、抗氧化、抑制细胞内活性氧和线粒体超氧化物增加,减缓线粒体膜电位下降等作用,本文借助网络药理学、分子对接、分子生物学技术,分析异鼠李素治疗缺血性神经损伤的潜在作用机制。

首先通过数据库检索得到异鼠李素治疗缺血性神经损伤靶点共 50 个,主要包括炎症因子、丝裂原活化蛋白激酶家族、基质金属蛋白酶家族等。进一步借助 MCODE 对靶点互作网络进行模块识别,并采用 ClueGo 对识别的模块进行分析。

血管内皮生长因子(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)家族主要包括 VEGFA、VEGFB、VEGFC、VEGFD、VEGFE 和胎盘生长因子^[7],属于高度特异性的生长因子。VEGF 家族通过作用于内皮生长因子受体发挥作用,能够促进血管内皮细胞的增生和迁移、增加血管通透性、改变细胞外基质,在缺血性神经损伤的发生发展过程中扮演着重要的角色。其中,VEGFA 主要作用于新生血管,在促进神经元功能中具有重要作用。VEGFB 主要作用于非新生血管、病理性血管及肿瘤组织。VEGFE 主要作用于血管内皮细胞,与血管形成密切相关^[8-9]。HIF-1 为异二聚体转录因子,包括 α 和 β 两个亚型。其中, α 亚基是调控 HIF-1 氧依赖性降解的关键元件,参与调控缺氧细胞存活以及新血管形成。HIF-1 α 是缺氧激活的重要转录因子,参与调控细胞代谢、细胞凋亡、细胞自噬、新血管形成等生物学过程,一方面,HIF-1 α 通过促进糖酵解、抑制线粒体氧化磷酸化,减少细胞耗氧。此外,HIF-1 α 能够激活细胞自噬,清除受损的细胞器。另一方面,HIF-1 α 也是调控新血管形成的重要物质,参与调控众多血管新生相关蛋白,包括基质金属蛋白酶、血小板衍生生

长因子、红细胞刺激因子、表皮生长因子、转化生长因子以及细胞趋化因子等^[9-11]。Toll 样受体(Toll-like Receptors, TLRs)信号通路主要存在髓样分化因子 88(Myeloid Differentiation Factor 88, MyD88)依赖性和 MyD88 非依赖性两条途径,绝大部分 TLRs 信号转导均需依赖 MyD88 的活化,经多个信号分子激活传递,激活转录因子 NF- κ B,导致促炎性因子释放,激活天然免疫系统,形成适应性免疫炎症反应,在缺血性损伤中发挥重要作用^[12]。异鼠李素治疗缺血性神经损伤核心靶点主要集中在 VEGF 信号通路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路、T 细胞受体信号通路、肿瘤坏死因子信号通路等。由此可见,异鼠李素确实能够调节上述通路,发挥治疗缺血性神经损伤的作用。

将 CytoHubba 排名前十的核心靶点与异鼠李素进行分子对接,异鼠李素与 AKT1、CASP8、IL6、MMP2 的结合能力均高于其内在配体,最后建立 OGD/R 损伤 PC12 细胞模型,异鼠李素能够显著降低 OGD/R 对 PC12 细胞造成的损伤,提高细胞存活率降低 LDH 的释放,并且能够显著降低 OGD/R 损伤引起的 PC12 胞中 AKT1、IL6 和 MMP2 的活化或表达。

AKT 也被称为蛋白激酶 B(Protein Kinase B, PKB)主要包括 PKB α /AKT1, PKB β /AKT2 和 PKB γ ,AKT1 广泛存在于大脑中。磷脂酰肌醇-3,4,5-三磷酸盐能够诱导无活性的 AKT1 在 Ser473 和 Thr308 磷酸化生成 p-AKT,p-AKT 可以通过磷酸化多种介质促进细胞存活^[13-15]。异鼠李素能够显著抑制 OGD/R 损伤引起的 AKT1 的磷酸化。炎症因子是胶质细胞介导炎症反应的主要信使。炎症反应与众多疾病的发生发展密切相关。TNF α 、IL1 β 和 IL6 等都是重要的炎症因子,可以促进炎症反应和组织损伤,IL-6 过量释放会导致炎症反应的加重和扩大^[16-18]。OGD/R 损伤 PC12 细胞后,IL6 表达显著升高,异鼠李素能够明显抑制 IL6 的蛋白表达,从而抑制炎症反应。MMPs 属于锌依赖性酶,其主要生物学功能是降解细胞外基质。与脑缺血关系密切的主要为明胶酶 A(MMP-2)和明胶酶 B(MMP-9)。这两种 MMPs 被激活或活性上调,导致血脑屏障结构破坏,功能损伤,继而引起脑水肿和出血^[19-21]。OGD/R 损伤 PC12 细胞后,MMP2 表达活化明显升高,异鼠李素能够显著降低 MMP2 活化。

4 结论

异鼠李素可能通过 AKT1、IL6、CASP8 和 MMP2 等靶点作用于 PI3K-AKT 信号通路、VEGF 信号通

路、HIF-1 信号通路、Toll 样受体信号通路等多条信号通路发挥脑保护作用,为异鼠李素的进一步研究提供理论基础。

参考文献(References)

- [1] ASAKAWA T, ZONG L, WANG L, et al. Unmet challenges for rehabilitation after stroke in China [J]. *Lancet*, 2017, 390(190):121-122. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)31584-2.
- [2] BENJAMIN E J, MUNTNER P, ALONSO A A, et al. Heart disease and stroke statistics-2019 update: A report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2019, 139(10):E56-E528. DOI: 10.1161/CIR.0000000000000659.
- [3] KIM S Y, JIN C Y, KIM C H, et al. Isorhamnetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV2 microglia by inactivating NF- κ B, blocking the TLR4 pathway and reducing ROS generation [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 43(2):682-692. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3993.
- [4] ZHAO T T, YANG T L, GONG L, et al. Isorhamnetin protects against hypoxia/reoxygenation-induced injury by attenuating apoptosis and oxidative stress in H9c2 cardiomyocytes [J]. *Gene*, 2018, 666:92-99. DOI: 10.1016/j.gene.2018.05.009.
- [5] 张雯, 宋俊科, 朱晓瑜, 等. 异鼠李素激活 Sirt1/PGC-1 α 信号通路抑制 MPP⁺ 诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤[J]. *药理学学报*, 2019, 54(11):1976-1981. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0205.
ZHANG Wen, SONG Junke, ZHU Xiaoyu, et al. Isorhamnetin activates Sirt1/PGC-1 α signaling pathway to inhibit MPP⁺-induced SH-SY5Y cell injury [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2019, 54(11):1976-1981. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0205.
- [6] 谭会洁, 宋俊科, 石峰, 等. 异鼠李素激活 PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB 信号通路减轻鱼藤酮诱导的 PC12 细胞损伤[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(2):272-276. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.02.023.
TAN Huijie, SONG Junke, SHI Feng, et al. Isorhamnetin prevents PC12 cell from rotenone-induced injury via PI3K/Akt/GSK-3 β /CREB signaling pathway [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2020, 36(2):272-276. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.02.023.
- [7] SAMUEL J G, CECILIE M. The Janus face of VEGF in stroke [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(5):1362. DOI: 10.3390/ijms19051362.
- [8] SETYOPRANOTO I, SADEWA A H, WIBOWO S, et al. Comparison of mean VEGF-A expression between acute ischemic stroke patients and non-ischemic stroke subjects[J]. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2019, 7(5):747-751. DOI: 10.3889/oamjms.2019.175.
- [9] YANG X, ZHANG Y, GENG K, et al. Sirt3 protects against ischemic stroke injury by regulating HIF-1 α /VEGF signaling and blood-brain barrier integrity[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2020, doi:10.1007. DOI:10.1007/s10571-020-00889-0.
- [10] JIANG Q, GENG X K, WARREN J, et al. Hypoxia inducible Factor-1 α (HIF-1 α) mediates NLRP3 inflammasome-dependent-pyroptotic and apoptotic cell death following ischemic stroke [J]. *Neuroscience*, 2020, 448:126-139. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2020.09.036.
- [11] PENG X, LI C, YU W, et al. Propofol attenuates hypoxia-induced inflammation in BV2 microglia by inhibiting oxidative stress and NF- κ B/Hif-1 α signaling[J]. *BioMed Research International*, 2020: 8978704. DOI: 10.1155/2020/8978704.
- [12] LI B, XIA Y, HU B. Infection and atherosclerosis: TLR-dependent pathways[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2020, 77(14):2751-2769. DOI: 10.1007/s00018-020-03453-7.
- [13] HOU Y Y, WANG K, WAN W J, et al. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats[J]. *Genes & Diseases*, 2018, 5(3):245-255. DOI: 10.1016/j.gendis.2018.06.001.
- [14] LIU Q, JIN Z Q, XU Z L, et al. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2019, 24(2):441-452. DOI: 10.1007/s12192-019-00977-1.
- [15] SAMAKOVA A, GAZOVA A, SABOVA N, et al. The PI3k/Akt pathway is associated with angiogenesis, oxidative stress and survival of mesenchymal stem cells in pathophysiologic condition in ischemia [J]. *Physiological research/Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2019, 68(S2):S131-S138. DOI: 10.33549/physiolres.934345.
- [16] LYKKE K, BENTE F, BETTINA H et al. Post-stroke inflammation-target or tool for therapy [J]. *Acta Neuropathologica*, 2019, 137(5):693-714. DOI: 10.1007/s00401-018-1930-z.
- [17] BENJAMIN, H, SARAH H, LENA U, et al. IL-6 plasma levels correlate with cerebral perfusion deficits and infarct sizes in stroke patients without associated infections [J]. *Frontiers in Neurology*, 2019, 10:3389. DOI: 10.3389/fneur.2019.00083.
- [18] YANG J X, PAN Y Y, GE J H, et al. Tanshinone IIA attenuates TNF-alpha-induced expression of VCAM-1 and ICAM-1 in endothelial progenitor cells by blocking activation of NF-kappaB [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016,40(1/2):195-206. DOI:10.1159/000452537.
- [19] SHEN Y F, GU J X, LIU Z J, et al. Inhibition of HIF-1 α reduced blood brain barrier damage by regulating MMP-2 and VEGF during acute cerebral ischemia[J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2018, 288. DOI: 10.3389/fncel.2018.00288.
- [20] CHEN L, YANG Q, DING R, et al. Carotid thickness and atherosclerotic plaque stability, serum inflammation, serum MMP-2 and MMP-9 were associated with acute cerebral infarction [J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2018, 16(6):5253-5257. DOI: 10.3892/etm.2018.6868.
- [21] YANG Y, ROSENBERG G A. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke [J]. *Brain Research*, 2015, 1623:30-38. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.04.024.