

山柰酚对脑缺血/再灌注损伤的体内外保护作用机制研究[△]

徐芳琴*,郭超,王婧雯*(空军军医大学第一附属医院药剂科,西安 710032)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)17-2065-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.17.04



摘要 目的 探讨山柰酚(KAE)对脑缺血/再灌注(CI/R)损伤的体内外保护作用机制。方法 首先利用网络药理学方法初步筛选KAE治疗CI/R损伤的潜在作用靶点。然后采用AutoDock Vina软件将KAE分别与排名前10位的核心靶点进行分子对接,以结合亲和力和作为评价标准,进一步明确KAE治疗CI/R损伤的可能作用机制。最后通过体内外实验验证以上结果,即构建氧糖剥夺/再灌注(OGD/R)HT22细胞损伤模型和大脑中动脉阻塞(MCAO)大鼠模型,采用CCK-8法检测细胞活性,分别对大鼠及其脑组织进行神经功能评分和TTC染色,采用Western blot法检测HT22细胞和大鼠脑组织中蛋白激酶B(Akt)、Src蛋白的磷酸化水平。结果 网络药理学筛选结果显示,KAE治疗CI/R损伤与前列腺素内过氧化物合成酶2、基质金属蛋白酶9、JUN、Akt1、肿瘤坏死因子、胱天蛋白酶3、丝裂原激活蛋白激酶8、细胞间黏附分子1、血管细胞黏附分子1、Src蛋白10个核心靶点密切相关。分子对接结果显示,KAE与Akt1、Src蛋白结合稳定。体内外实验结果表明,KAE可显著提高OGD/R损伤HT22的细胞存活率($P<0.05$),显著降低MCAO模型大鼠的神经功能评分($P<0.05$),显著减小大鼠脑梗死体积($P<0.05$),显著升高HT22细胞和大鼠脑组织中Akt、Src蛋白的磷酸化水平($P<0.05$),且呈剂量依赖趋势。结论 KAE可能通过调控Akt、Src蛋白的磷酸化水平来发挥脑保护作用,从而治疗CI/R损伤。

关键词 山柰酚;脑缺血/再灌注损伤;网络药理学;分子对接;保护作用;HT22细胞;大鼠

Study on protective mechanism of kaempferol against cerebral ischemia/reperfusion injury *in vitro* and *in vivo*

XU Fangqin, GUO Chao, WANG Jingwen (Dept. of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the protective mechanism of kaempferol (KAE) on cerebral ischemia/reperfusion (CI/R) injury *in vitro* and *in vivo*. **METHODS** Firstly, the potential targets of KAE in the treatment of CI/R injury were preliminarily screened by network pharmacology. AutoDock Vina software was used to conduct molecular docking between KAE and the top 10 core targets, and the binding affinity was used as the evaluation standard to further clarify the possible mechanism of KAE in treating CI/R injury. Finally, the above results were verified by *in vivo* and *in vitro* experiments. The oxygen glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) HT22 cell injury model and the middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat model were constructed. The cell activity was detected by CCK-8 method. The neural function score and TTC staining were performed on the rats and their brain tissues. The phosphorylation levels of protein kinase B (Akt) and Src in HT22 cells and brain tissue of rats were detected by Western blot. **RESULTS** The results of network pharmacology screening showed that KAE in the treatment of CI/R injury was closely related to 10 core targets including prostaglandin-endoperoxide synthase 2, matrix metalloproteinase 9, JUN, Akt1, tumor necrosis factor, caspase-3, mitogen activated protein kinase 8, intercellular cell adhesion molecule 1, vascular cell adhesion molecule 1 and Src. The results of molecular docking showed that KAE was stably bound with Akt1 and Src. The results of *in vitro* and *in vivo* experiments showed that KAE could significantly improve the survival rate of OGD/R-injured HT22 cells ($P<0.05$), significantly reduced the neurological function score of MCAO model rats ($P<0.05$), significantly reduces the volume of cerebral infarction in rats ($P<0.05$), and significantly increased the phosphorylation levels of Akt and Src in HT22 cells and brain tissue of rats ($P<0.05$), which showed a dose dependent trend. **CONCLUSIONS** KAE may play a neuroprotective role by regulating the phosphorylation expression of Akt and Src, thus treating CI/R injury.

[△] 基金项目 国家自然科学基金资助项目(No.81774190)
* 第一作者 主管药师。研究方向:中药药效物质和作用机制。电话:029-84771625。E-mail:xfq750274@sina.com

通信作者 副主任药师,博士。研究方向:中药药效物质和作用机制。电话:029-84775471。E-mail:wangjingwen8021@163.com

KEYWORDS kaempferol; cerebral ischemia/reperfusion injury; network pharmacology; molecular docking; protective effect; HT22 cells; rats

脑缺血/再灌注(cerebral ischemia/reperfusion, CI/R)损伤是指大脑缺血缺氧一定时间后,恢复血液供应时造成的严重脑功能障碍^[1]。目前,CI/R损伤引起的严重脑损伤和功能障碍是临床治疗中一个具有挑战性的问题,其发病机制可能与炎症反应、氧化应激等生物过程有关,且尚未开发出可用于治疗CI/R损伤的安全可靠的靶向药物。山柰酚(kaempferol, KAE)主要来源于姜科植物山柰的根茎,属于黄酮类化合物,亦广泛存在于茶叶、蔬菜及水果中。药理研究表明,KAE具有抗炎^[2]、抗氧化^[3]、抗癌^[4-6]、改善脂质代谢^[7]、保护大脑^[8]等作用。然而,KAE治疗CI/R损伤的蛋白靶标与生物过程仍不明确。网络药理学研究和分子对接可以同时研究多种化学物质和作用靶点,从而为中药提供可能的研究途径^[9-10]。基于此,本研究首先利用网络药理学研究筛选KAE治疗CI/R损伤的作用靶点,分析其治疗CI/R损伤的可能作用机制,然后利用分子对接技术明确KAE与核心靶点的结合位点,最后利用体内外实验验证KAE发挥脑保护作用的可能机制,为KAE治疗CI/R损伤提供实验研究基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Multiskan Sky型酶标仪、371型CO₂培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司),YQX-II型厌氧培养箱(上海跃进医疗器械有限公司),CKX53型生物显微镜(日本Olympus公司),BSC-1100 II A2-X型生物安全柜(山东博科生物产业有限公司),TD4型台式离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司),BSA124S型分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司],QL-901型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),Mini-TBC型转移槽、Mini-TBC型转移芯(北京凯元信瑞仪器有限公司),Mini chemi 500型凝胶成像系统(北京赛智创业科技有限公司)等。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂包括KAE对照品(上海源叶生物科技有限公司,高效液相色谱法测得其含量≥98%),BCA蛋白定量试剂盒、RIPA裂解液(陕西中晖赫彩生物医药科技有限公司,批号分别为PQ003、BBO222),蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)、Src、磷酸化Src(p-Src)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为180947、175108、LS194236、AC2102017D、GB11002),磷酸盐缓冲液(PBS)、DMEM高糖培养基(美国Corning公司),DMEM无糖培养基(大连美仑生物技术有限公司),聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Merck Millipore公司,批号IPVH00010),HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(美国Abbkine公司),ECL化学发光超敏显色

试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司,批号32106)等。

1.3 细胞和动物

小鼠海马神经元HT22细胞系由空军军医大学西京医院新药研发中心培养和保存。实验用动物为清洁级雄性SD大鼠,共18只,体质量200~220 g,购自空军军医大学实验动物中心,动物生产许可证号为SCXK(陕)-2019-001。大鼠在动物房内适应性喂养1周后进行后续实验。

2 方法

2.1 KAE-靶点-CI/R网络构建

2.1.1 KAE靶点的预测 从TCMSP数据库(<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)获得KAE分子结构和结构式的“canonical smiles”格式信息;从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得KAE分子结构和结构式的“sdf”格式信息。选择物种为“Homo sapiens”,通过SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测靶点;利用UniProtKB数据库(<https://www.uniprot.org/>)使靶点名称标准化,并删除重复数据。

2.1.2 CI/R靶点的收集 在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)和NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)中检索,关键词为“cerebral ischemia/reperfusion”;在Drugbank数据库(<https://go.drugbank.com/>)中检索,关键词为“cerebral ischemic stroke”。收集3个数据库的CI/R靶点检索结果,删除重复数据。

2.1.3 共同靶点网络构建 将KAE、CI/R的靶点输入Venny在线绘图工具(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>),筛选KAE与CI/R的共同靶点,并利用Cytoscape 3.7.1软件(<http://www.cytoscape.org>)构建共同靶点网络。

2.2 核心靶点网络构建

2.2.1 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络可阐明预测目标与其他蛋白质之间的关系。STRING数据库(<https://string-db.org/>)可提供蛋白质间相互作用的信息,通过STRING数据库构建CI/R与KAE共同靶点的PPI网络,利用Cytoscape 3.7.1软件实现PPI网络的可视化展示。

2.2.2 核心靶点预测 对PPI网络进行拓扑学分析,利用Cytoscape 3.7.1软件中的CytoHubba插件筛选出结构亲和力排名前10位的核心靶点。节点颜色越趋近红色表示其连接的靶点越多,在CI/R损伤发生、发展中的作用越重要。

2.3 分子对接

分子对接是研究药物分子作用机制的一种方法。从RSCB PDB数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载蛋白

质结构,并使用PyMOL软件去除每个蛋白质结构的结晶水和其他小分子,然后将其保存为“PDB”格式。将结构文件导入AutoDock Vina软件中的Autodock Tool 1.5.6程序,在化合物结构上添加原子电荷及氢,保存为“pdbq”格式。将化合物KAE的“mol2”格式文件导入Autodock Tool 1.5.6程序,在化合物结构上添加原子电荷,保存为“pdbqt”格式,作为对接配体。采用AutoDock Vina软件模拟分子对接,确定核心靶点与KAE的结合亲和力。以KAE与核心靶点的对接结合能来评价结合亲和力,若分子对接的结合能 < -7 kcal/mol(1 kcal=4.186 kJ),说明具有亲和力,且结合能的数值越低,说明结合亲和力越低,结合越稳定^[11]。

2.4 细胞体外实验验证

2.4.1 细胞培养 将HT22细胞接种于含10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的DMEM高糖培养基(即完全培养基)中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。每2天更换1次培养基,待细胞融合度为90%左右时,用0.25%胰酶消化并进行传代培养。本研究选用第7代细胞进行后续研究。

2.4.2 氧糖剥夺/再灌注细胞损伤模型的制备、分组与给药 实验分为对照组、氧糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)组和KAE低、中、高剂量组。对照组细胞用完全培养基常规培养24 h。OGD/R组细胞用DMEM无糖培养基在37℃恒温、厌氧培养箱(95%N₂、5%CO₂)中培养3 h,再用完全培养基代替DMEM无糖培养基常规培养24 h,构建OGD/R细胞损伤模型。KAE低、中、高剂量组细胞先参照OGD/R组厌氧培养3 h后,再分别加入含8、16、32 μmol/L KAE的DMEM无糖培养基常规培养24 h。KAE给药剂量参考文献[12]和课题组前期预实验结果设置。

2.4.3 细胞活力检测 采用CCK-8法进行检测。将HT22细胞以 5×10^4 个/孔接种于96孔板中,待细胞贴壁后,按“2.4.2”项下分组处理(每组设置3个复孔),同时设置不含细胞和药物的空白对照组。培养结束后,更换为含CCK-8的培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中孵育4 h。使用酶标仪在450 nm波长处检测各孔的光密度(OD),并计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组OD-空白对照组OD)/(对照组OD-空白对照组OD)×100%。实验重复3次。

2.4.4 HT22细胞中Akt、p-Akt、Src、p-Src蛋白表达检测 采用Western blot法检测Akt、p-Akt、Src、p-Src蛋白的表达,验证KAE对HT22细胞中上述蛋白的调控作用。将HT22细胞以 2×10^6 个/孔接种于25 cm²细胞瓶中,待细胞贴壁后,按“2.4.2”项下分组处理,用含1%蛋白酶抑制剂的4℃预冷的RIPA裂解液裂解细胞,细胞裂解液在12 000×g、4℃下离心10 min,收集上清液,保存待

用。以BCA法测定总蛋白浓度,将蛋白高温变性后,取等量蛋白质(20 μg)上样电泳,并转移至PVDF膜上。用5%脱脂牛奶于室温下封闭2 h,并在4℃下与Akt、p-Akt、Src、p-Src、GAPDH一抗(稀释度均为1:1 000)孵育过夜,再将膜与HRP标记的山羊抗兔IgG二抗(稀释度为1:5 000)在37℃下孵育2 h。用ECL化学发光超敏显色试剂盒进行显影,采用凝胶成像系统Lane 1D软件对条带进行扫描以分析条带灰度值,以Akt、p-Akt、Src、p-Src与内参蛋白(GAPDH)条带灰色值的比值表示蛋白的表达水平,以磷酸化蛋白与对应未磷酸化蛋白的灰度值比值反映该蛋白的磷酸化水平,并以对照组为参照。实验重复3次。

2.5 动物体内实验验证

2.5.1 大鼠大脑中动脉阻塞模型的制备、分组与给药 采用随机数字表法将18只大鼠随机分为假手术组(Sham组)、大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)组、KAE组(剂量20 mg/kg),每组6只。除Sham组不造模外,其余2组均造模。采用线栓法建立大鼠MCAO模型:首先大鼠腹腔注射4%戊巴比妥钠麻醉,仰卧固定,常规消毒,于颈部正中纵切口,分离出右侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉,结扎颈外动脉,动脉夹暂时夹毕颈总动脉和颈内动脉;在颈外动脉结扎处远心端剪一斜口,经此斜口插入顶端赖氨酸包被的线栓(直径0.18 mm),经颈内动脉进入大脑前动脉的起始部位,遇轻微阻力即停止;栓塞2 h后,拔出线栓,再灌注24 h,构建MCAO模型以模拟急性脑梗死^[13]。Sham组仅钝性分离大鼠颈部正中切口。于再灌注同时,Sham组及MCAO组腹腔注射生理盐水,KAE组腹腔注射20 mg/kg KAE。KAE给药剂量参考文献[14]和课题组前期预实验结果设置。

2.5.2 大鼠神经功能评价 参照改良的Longa评分法对大鼠神经功能进行评分,按照0~4分进行评价。0分:无明显神经功能缺损;1分:提尾时,对侧前肢不能前伸;2分:向缺血对侧转圈;3分:不能承受对侧自身重量;4分:意识障碍或无自主运动。评分越高,表明大鼠行为障碍越严重^[14]。

2.5.3 大鼠脑组织病理观察 采用TTC染色法进行观察。给药后,各组大鼠腹腔注射4%戊巴比妥钠麻醉猝死后立即摘除全脑,用预冷的1×PBS洗净,滤纸吸干,分为2份。其中一份脑组织置于-20℃冰箱速冻30 min,取出后在冰上切成5片(厚度2 mm)。将切片置于2% TTC染液中,用锡箔纸盖住后,置于37℃恒温箱中放置30 min,翻动脑组织切片,使其均匀接触到染液。取出切片用PBS洗涤3~5 min,立即拍照,采用Image J 1.8.0软件计算每一片脑组织的梗死区面积,分层计算面积,每一层的梗死面积之和称为梗死体积。TTC染色为红色

表示正常组织,白色表示梗死区。

2.5.4 大鼠脑组织中 Akt、p-Akt、Src、p-Src 蛋白表达检测 采用 Western blot 法进行检测。将“2.5.3”项下另一份大鼠脑组织用预冷的 1×PBS 洗净后剪碎,称取 20 mg,用含 1% 蛋白酶抑制剂的 4℃ 预冷的 RIPA 裂解液裂解,组织裂解液在 12 000×g、4℃ 下离心 10 min,收集上清液,保存待用。其余步骤同“2.4.4”项。

2.6 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 KAE-靶点-CI/R 网络构建结果

通过 SwissTargetPrediction 数据库预测得到 KAE 靶点,并使用 UniProtKB 数据库使靶点名称标准化后,共获得 148 个 KAE 靶点。从 GeneCards、NCBI 和 Drugbank 3 个数据库中分别筛选出 1 065、73 和 78 个 CI/R 靶点,删除重复靶点,共收集到 1 124 个 CI/R 靶点。利用 Venny 在线绘图工具,将 148 个 KAE 靶点和 1 124 个 CI/R 靶点进行比对,最后得到 61 个共同靶点(图 1A)。利用 Cytoscape 3.7.1 软件获得基于 KAE-靶点-CI/R 之间相互作用的由 63 个节点和 122 条边线组成的复杂网络(图 1B)。

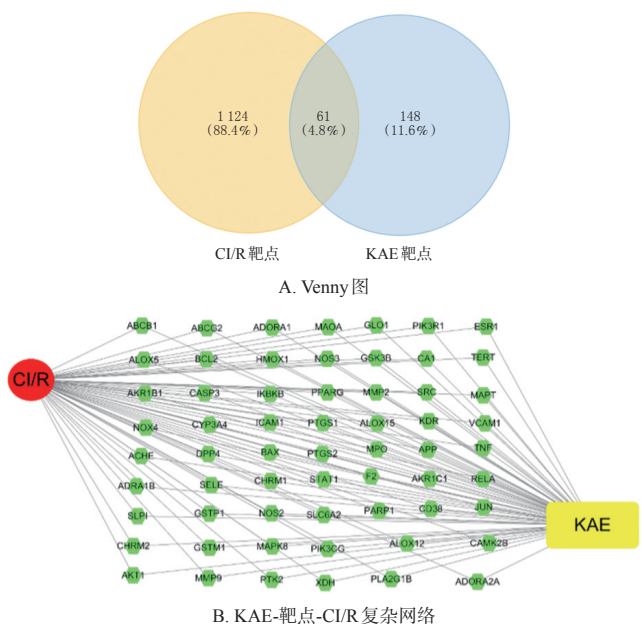


图 1 共同靶点的 Venny 图和 KAE-靶点-CI/R 复杂网络

3.2 核心靶点网络构建结果

使用 STRING 数据库构建 61 个共同靶点的 PPI 网络。以综合得分 >0.4 和“Homo sapiens”作为选择标准,获得由 141 个节点和 1 152 条边线组成的 PPI 网络(图 2A)。通过 CytoHubba 插件获得 PPI 网络中排名前 10 位的核心靶点,依次为前列腺素内过氧化物合成酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、基质金属蛋

白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP9)、JUN、Akt1、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、胱天蛋白酶 3(caspase-3, CASP3)、丝裂原激活蛋白激酶 8(mitogen-activated protein kinase 8, MAPK8)、细胞间黏附分子 1(intercellular cell adhesion molecule 1, ICAM1)、血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM1)、Src(图 2B)。

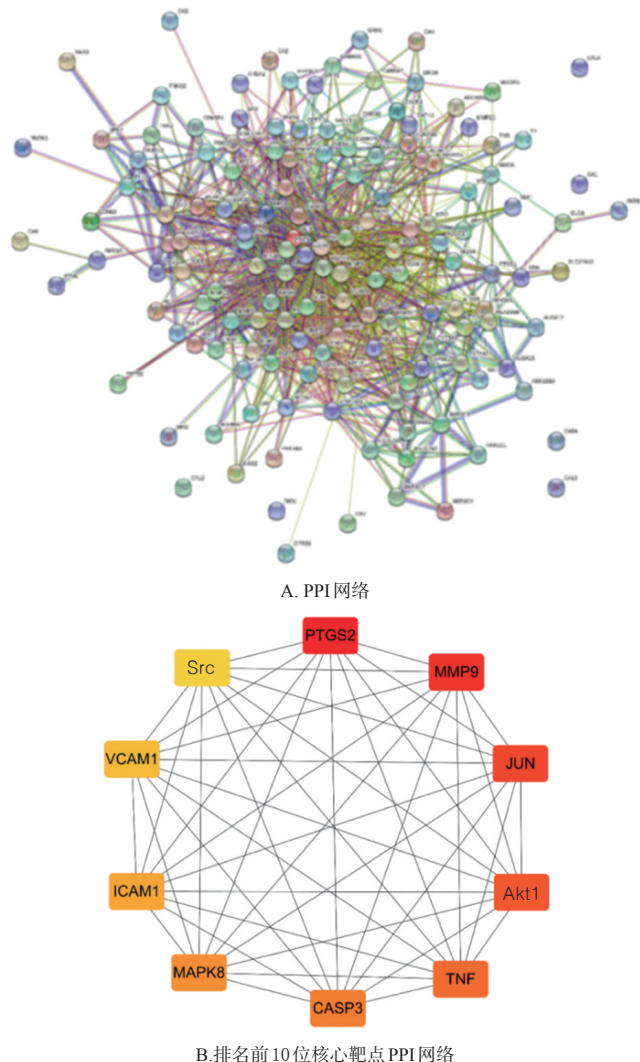


图 2 共同靶点和核心靶点的 PPI 网络

3.3 分子对接实验结果

为进一步筛选 KAE 治疗 CI/R 的关键靶点,将 KAE 分别与排名前 10 位的核心靶点——PTGS2、MMP9、JUN、Akt1、TNF、CASP3、MAPK8、ICAM1、VCAM1、Src 进行分子对接。结果表明,KAE 与上述 10 个核心靶点的结合位点依次为 5、4、4、2、3、5、4、5、5、4 个(表 1),主要包括丙氨酸(alanine, ALA)、丝氨酸(serine, SER)、酪氨酸(tyrosine, TYR)、甲硫氨酸(methionine, MET)、赖氨酸(lysine, LYS)等。分子对接后的配体-蛋白质相互作用分析结果显示,每个小分子与目标蛋白的结合主要依赖于氢键。其中,KAE 与核心靶点 Akt、Src 的结合能均不高于 -9.0 kcal/mol,说明结合较稳定,提示 KAE 可

能通过作用于 Akt、Src 发挥治疗作用。因此,本研究以 Akt、Src 为靶点进行后续实验验证。

表1 KAE 和排名前10位核心靶点的分子对接结果

靶点名称	PDB ID	结合能/(kcal/mol)	结合位点
PTGS2	5F1A	-0.5	SER-530, GLY-526, MET-522, SER-353, HIS-90
MMP9	5UE4	-8.2	ALA-191, HIS-230, GLY-233, TYR-179
JUN	4IZY	-7.4	LEU-206, MET-149, LYS-93, ILE-70
Akt1	3CQU	-9.1	ALA-230, THR-291
TNF	6OOY	-5.6	LYS-11, ALA-156, ASP-10
CASP3	2Y0B	-5.9	ASN-74, ARG-76, PHE-55, SER-63, SER-65
MAPK8	2GMX	-8.4	ALA-36, ASP-169, MET-111, LYS-55
ICAM1	3TCX	-8.0	ALA-242, SER-270, LYS-39, TYR-52, TYR-66
VCAM1	5VA0	-5.9	ARG-47, TYR-478, HIS-453, TYR-455, ALA-475
Src	2SRC	-9.0	ASP-404, LEU-273, MET-341, THR-338

3.4 体外细胞实验验证结果

3.4.1 KAE 对 OGD/R 致 HT22 细胞损伤的影响 细胞活力检测结果显示,与对照组比较,OGD/R 组细胞存活率显著降低($P<0.05$),提示 OGD/R 导致 HT22 细胞损伤;与 OGD/R 组比较,KAE 低、中、高剂量组细胞存活率均显著升高($P<0.05$),提示 KAE 可明显促进 HT22 细胞存活,并呈剂量依赖趋势。结果见图 3。

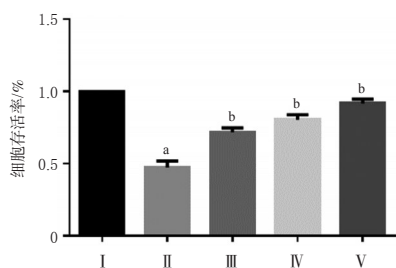


图3 KAE 对 HT22 细胞存活率的影响
I:对照组;II:OGD/R组;III:KAE低剂量组;IV:KAE中剂量组;V:KAE高剂量组;a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与 OGD/R 组比较, $P<0.05$

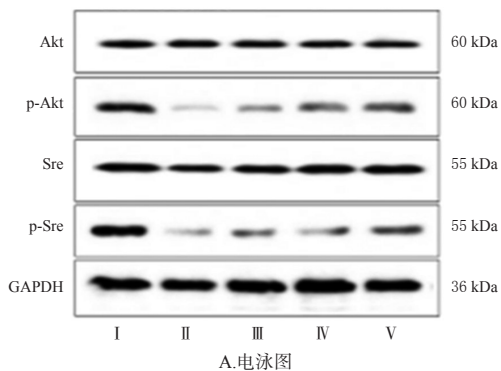
图3 KAE 对 HT22 细胞存活率的影响

3.4.2 KAE 对 OGD/R 损伤 HT22 细胞中 Akt、Src 蛋白磷酸化的影响 Western blot 法检测结果显示,与对照组比较,OGD/R 组细胞中 Akt、Src 蛋白的磷酸化水平均显著降低($P<0.05$);与 OGD/R 组比较,KAE 中、高剂量组细胞中 Akt 蛋白的磷酸化水平和 KAE 高剂量组细胞中 Src 蛋白的磷酸化水平均显著升高($P<0.05$),且呈剂量依赖趋势。结果见图 4。

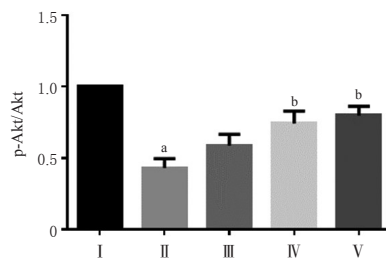
3.5 大鼠体内实验验证结果

3.5.1 KAE 对 MCAO 模型大鼠神经功能的影响 神经功能评分结果显示,与 Sham 组比较,MCAO 组大鼠神经功能评分显著升高($P<0.05$);与 MCAO 组比较,KAE 组大鼠神经功能评分显著降低($P<0.05$),提示 KAE 能够减轻 MCAO 造成的脑损伤。结果见图 5。

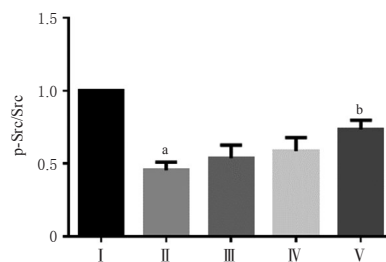
3.5.2 KAE 对 MCAO 模型大鼠脑组织病理学的影响 TTC 染色结果显示,与 Sham 组比较,MCAO 组大鼠脑梗死体积显著增加($P<0.05$);与 MCAO 组比较,



A. 电泳图



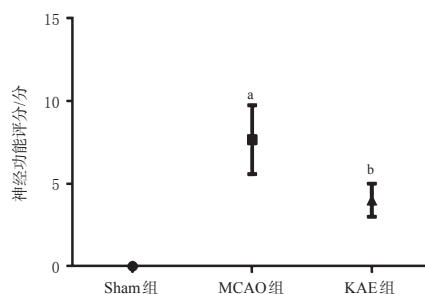
B. KAE 对 HT22 细胞中 Akt 蛋白磷酸化的影响



C. KAE 对 HT22 细胞中 Src 蛋白磷酸化的影响

I:对照组;II:OGD/R组;III:KAE低剂量组;IV:KAE中剂量组;V:KAE高剂量组;a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与 OGD/R 组比较, $P<0.05$

图4 KAE 对 HT22 细胞中 Akt、Src 蛋白磷酸化的影响



a:与 Sham 组比较, $P<0.05$;b:与 MCAO 组比较, $P<0.05$

图5 各组大鼠的神经功能评分

KAE 组大鼠脑梗死体积显著降低($P<0.05$)。结果见图 6。

3.5.3 KAE 对 MCAO 模型大鼠脑组织中 Akt、Src 蛋白磷酸化的影响 Western blot 法检测结果显示,与 Sham 组比较,MCAO 组大鼠脑组织中 Akt、Src 蛋白磷酸化水平均显著降低($P<0.05$);与 MCAO 组比较,KAE 组大鼠脑组织中 Akt、Src 蛋白磷酸化水平均显著升高($P<0.05$)。结果见图 7。

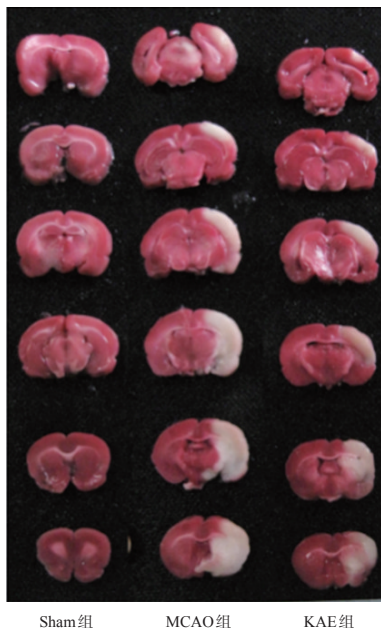
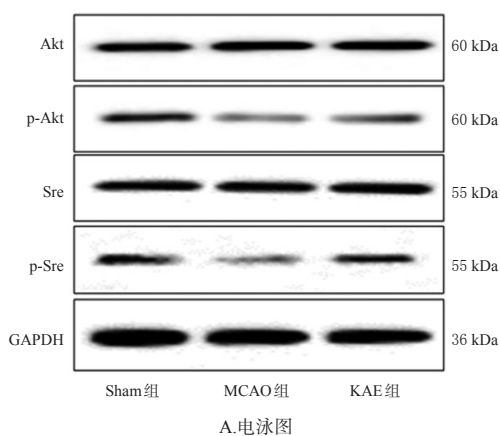
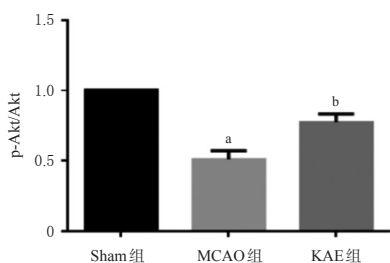


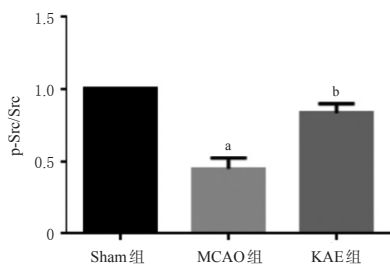
图6 各组大鼠脑组织的TTC染色图



A. 电泳图



B. KAE对MCAO模型大鼠脑组织中Akt蛋白磷酸化的影响



C. KAE对MCAO模型大鼠脑组织中Src蛋白磷酸化的影响

a: 与Sham组比较, $P < 0.05$; b: 与MCAO组比较, $P < 0.05$

图7 KAE对MCAO模型大鼠脑组织中Akt、Src蛋白磷酸化的影响

4 讨论

CI/R损伤是一种复杂的级联性病理生理过程,其发生机制尚未完全明确。CI/R引起的脑损伤涉及多种生物过程,如炎症反应、氧化应激、线粒体功能调节和血管内皮功能调节等^[15-17]。本研究为阐明KAE治疗脑卒中的作用机制,通过网络药理学研究和分子对接筛选出了KAE的主要作用靶点,随后用细胞和动物实验验证了筛选的结果。

本网络药理学研究结果显示,KAE可能作用于PTGS2、MMP9、JUN、Akt1、TNF、CASP3、MAPK8、ICAM1、VCAM1、Src 10个核心靶点,从而发挥其治疗CI/R损伤的作用。分子对接结果表明,KAE与10个核心靶点的结合亲和力均较低,提示KAE与靶点结合稳定。KAE与PTGS2、MMP9、JUN、Akt1、TNF、CASP3、MAPK8、ICAM1、VCAM1、Src 10个核心靶点的结合位点分别有5、4、4、2、3、5、4、5、5、4个,主要包括ALA、SER、TYR、MET、LYS等,提示KAE可通过与核心靶点多位点结合发挥作用,这与中医的“多靶点、多通路”治疗疾病理论相呼应。其中,KAE与核心靶点Akt、Src的结合能均不高于-9.0 kcal/mol,提示KAE可能通过作用于Akt、Src发挥治疗作用。

以往网络药理学研究结果显示,在血管内皮功能调节方面,KAE通过作用于Akt1、MMP9、Src、MAPK8等靶点,调控血管内皮生长因子、松弛素等信号通路进而调节血管内皮功能。Src是一种非受体蛋白酪氨酸激酶,在缺血脑组织中可调节细胞外信号调节激酶,继而发挥脑保护作用^[18]。在脑缺血后再灌注初期,Src可通过调节闭锁连接蛋白1和血管生成素1的表达,影响血管通透性,从而介导脑损伤^[19]。下调Src蛋白磷酸化水平,抑制Src家族激酶信号通路激活,可发挥CI/R保护作用^[20]。本研究结果表明,OGD/R损伤HT22细胞及MCAO模型大鼠脑组织中Src蛋白的磷酸化水平均显著降低,表明CI/R损伤可能导致Src失活,引发脑组织损伤;给予KAE能够显著升高OGD/R损伤HT22细胞及MCAO模型大鼠脑组织中Src蛋白的磷酸化水平,提示Src可能是发挥脑保护作用的重要靶点。

磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)-Akt是维持机体细胞正常生理活动的关键信号通路,广泛存在于脑组织中,其中Akt作为PI3K的下游蛋白,可调节细胞增殖、生长和存活^[21]。激活PI3K-Akt通路后可通过减少氧化应激、抑制炎症细胞因子表达、减少细胞凋亡,从而改善CI/R造成的脑损伤。研究表明,激活PI3K-Akt通路可抑制OGD/R诱导的HT22细胞活性氧的产生,减轻氧化应激^[22]。另外,激活PI3K-Akt-核因子E2相关因子2信号转导可减轻CI/R损伤诱导的神经炎症和氧化应激^[23]。本研究结果表明,OGD/R损伤

HT22 细胞及 MCAO 模型大鼠脑组织中 Akt 蛋白的磷酸化水平显著降低,表明 CI/R 损伤可能导致 Akt 失活,引发脑组织损伤;给予 KAE 能够显著升高 OGD/R 损伤 HT22 细胞及 MCAO 模型大鼠脑组织中 Akt 蛋白的磷酸化水平,提示 Akt 可能是 KAE 发挥脑保护作用的重要靶点。

综上所述,KAE 可能通过调控 Akt、Src 蛋白的磷酸化水平来发挥脑保护作用,从而改善 CI/R 损伤。

参考文献

- [1] LIU Y, ZHU X, TONG X, et al. Syringin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury via inhibiting neuroinflammation and TLR4 signaling[J]. *Perfusion*, 2021, 2021:2676591211007025.
- [2] 蔡美云,庄文欣,吕娥,等.山柰酚通过抑制 p38 MAPK 通路减轻 6-羟多巴胺(6-OHDA)诱导的 PC12 细胞炎症[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2020, 36(7):583-589.
- [3] SHAKYA G, MANJINI S, HODA M, et al. Hepatoprotective role of kaempferol during alcohol- and Δ PUFA-induced oxidative stress[J]. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2014, 25(1):73-79.
- [4] KUO W T, TSAI Y C, WU H C, et al. Radiosensitization of non-small cell lung cancer by kaempferol[J]. *Oncol Rep*, 2015, 34(5):2351-2356.
- [5] LEE H S, CHO H J, YU R N, et al. Mechanisms underlying apoptosis-inducing effects of kaempferol in HT-29 human colon cancer cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(2):2722-2737.
- [6] KIM S H, HWANG K A, CHOI K C. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models[J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 28(1):70-82.
- [7] 刘贵波,刘跃光,孙成,等.山柰酚对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢及胰岛素抵抗的影响[J]. *实用临床医药杂志*, 2012, 16(9):1-3.
- [8] 向丽,董志,李然然,等.山柰酚对脑缺血再灌注大鼠神经元超微结构及 TLR4/NF- κ B 的影响[J]. *中国医院药学杂志*, 2015, 35(10):869-873.
- [9] XU T F, LI S Z, SUN Y F, et al. Systematically characterize the absorbed effective substances of Wutou decoction and their metabolic pathways in rat plasma using UHPLC-Q-TOF-MS combined with a target network pharmacological analysis[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 141:95-107.
- [10] MORRIS G M, LIM-WILBY M. Molecular docking[J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 443:365-382.
- [11] UMESH H R, RAMESH K V, DEVARAJU K S. Molecular docking studies of phytochemicals against trehalose-6-phosphate phosphatases of pathogenic microbes[J]. *Beni-Suef U J Basic*, 2020, 9(3):701-703.
- [12] YANG E J, KIM G S, JUN M, et al. Kaempferol attenuates the glutamate-induced oxidative stress in mouse-derived hippocampal neuronal HT22 cells[J]. *Food Funct*, 2014, 5(7):1395-1402.
- [13] 汪宁,高军,白方会,等.基于 Akt/GSK-3 β 通路研究紫檀芪对脑缺血再灌注大鼠脑保护作用及血管内皮间质过度转化的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(8):2399-2406.
- [14] LI W H, CHENG X, YANG Y L, et al. Kaempferol attenuates neuroinflammation and blood brain barrier dysfunction to improve neurological deficits in cerebral ischemia/reperfusion rats[J]. *Brain Res*, 2019, 1722:146361.
- [15] HUANG J, UPADHYAY U M, TAMARGO R J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia[J]. *Surg Neurol*, 2006, 66(3):232-245.
- [16] LATTANZI S, NORATA D, DIVANI A A, et al. Systemic inflammatory response index and futile recanalization in patients with ischemic stroke undergoing endovascular treatment[J]. *Brain Sci*, 2021, 11(9):1164.
- [17] LI X G, CHENG S L, HU H, et al. Progranulin protects against cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury by inhibiting necroptosis and oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3):569-576.
- [18] ZAN L K, ZHANG X, XI Y F, et al. Src regulates angiogenic factors and vascular permeability after focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Neurosci*, 2014, 262:118-28.
- [19] ZAN L, ZHANG X, XI Y, et al. Src regulates angiogenic factors and vascular permeability after focal cerebral ischemia-reperfusion[J]. *Neuroscience*, 2014, 262:118-128.
- [20] 徐榆林,秦莎莎,祝赫,等.补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠血小板 Src, Akt 和 p38 MAPK 蛋白的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(5):135-140.
- [21] ZHANG H B, TU X K, CHEN Q, et al. Propofol reduces inflammatory brain injury after subarachnoid hemorrhage: involvement of PI3K/Akt pathway[J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(12):104375.
- [22] YAO L, YANG M L, ZHANG J L, et al. Tectorigenin attenuates the OGD/R-induced HT-22 cell damage through regulation of the PI3K/AKT and the PPAR γ /NF- κ B pathways[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(8):1320-1331.
- [23] WEN Z M, HOU W C, WU W, et al. 6-O-galloylpaeoniflorin attenuates cerebral ischemia reperfusion-induced neuroinflammation and oxidative stress via PI3K/Akt/Nrf2 activation[J]. *Oxidative Med Cell Longev*, 2018, 2018:8678267.

(收稿日期:2022-05-25 修回日期:2022-07-18)

(编辑:舒安琴)