

引用本文:任娟,覃宏伟,周冬亮,等.原花青素通过抑制Toll样受体4/核因子- $\kappa$ B信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J].安徽医药,2021,25(3):431-435.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.002.



◇ 药学研究 ◇

## 原花青素通过抑制Toll样受体4/核因子- $\kappa$ B信号通路对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用

任娟,覃宏伟,周冬亮,张敏杰,徐瑛

作者单位:上海市宝山区仁和医院神经内科,上海200431

通信作者:徐瑛,女,副主任医师,研究方向为脑血管病,Email:xuying2112@163.com

基金项目:上海市宝山区仁和医院重点学科建设计划(YXK-2018-01A)

**摘要:** **目的** 探究原花青素通过抑制Toll样受体4(TLR4)/核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路对大鼠脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤的保护作用。**方法** 选取60只雄性SD大鼠,采用随机数字表法分为对照组、模型组、原花青素低剂量组(80 mg/kg)和原花青素高剂量组(160 mg/kg),每组15只;除对照组外,其他各组大鼠使用改良线栓法制成I/R模型,原花青素低剂量组和原花青素高剂量组分别使用80 mg/kg和160 mg/kg的原花青素灌胃处理,连续处理1周。比较各组大鼠脑含水量;采用神经行为学评估比较各组大鼠神经功能缺损评分;使用试剂盒检测各组大鼠超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)水平;采用蛋白质印迹法检测TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路和凋亡蛋白B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)表达水平;采用苏木素染色观察神经细胞凋亡率。**结果** 与对照组比较,模型组大鼠神经功能缺损评分、脑含水量、活性氧含量水平、TLR4蛋白、NF- $\kappa$ B蛋白、Bax蛋白和Caspase-3蛋白表达、神经细胞凋亡率升高,SOD含量水平、GPX含量水平、Bcl-2蛋白降低( $P < 0.05$ ),其中TLR4蛋白和NF- $\kappa$ B蛋白分别为(1.80±0.20)和(1.85±0.21),显著低于对照组的(0.45±0.04)和(0.51±0.04);相比模型组,使用原花青素处理各组大鼠神经功能评分、脑含水量、活性氧含量水平、TLR4蛋白、NF- $\kappa$ B蛋白、Bax蛋白和Caspase-3蛋白表达、神经细胞凋亡率降低,且原花青素高剂量组低于原花青素低剂量组( $P < 0.05$ ),其中原花青素高剂量组TLR4蛋白和NF- $\kappa$ B蛋白分别为(0.59±0.06)和(0.64±0.06),显著低于原花青素低剂量组的(1.00±0.10)和(0.98±0.09);与模型组比较,使用原花青素处理各组大鼠SOD含量水平、GPX含量水平、Bcl-2蛋白升高,且原花青素高剂量组高于原花青素低剂量组( $P < 0.05$ )。**结论** 原花青素通过抑制TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路调控下游凋亡蛋白的表达抑制I/R后大鼠脑细胞的凋亡,缓解脑组织损伤。

**关键词:** 再灌注损伤; 原花青素类; Toll样受体4; 核因子- $\kappa$ B; 信号通路; 细胞凋亡; 大鼠, Sprague-Dawley

### Protective effect of procyanidins on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway

REN Juan, QING Hongwei, ZHOU Dongliang, ZHANG Minjie, XU Ying

Author Affiliation: Department of Neurology, Renhe Hospital of Baoshan District Shanghai, Shanghai 200431, China

**Abstract:** **Objective** To explore protective effect of procyanidins (PRO) on cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats by inhibiting Toll-like receptor 4(TLR4)/NF- $\kappa$ B signaling pathway. **Methods** Sixty male SD rats were divided into control group (Control), model group (Model), low-dose PRO group (80 mg/kg) and high-dose PRO group (160 mg/kg) by random number table method, 15 cases in each group. Except control group, modified suture method was applied in the other groups to prepare I/R models. The low-dose and high-dose PRO group were intragastrically administrated with 80 mg/kg and 160 mg/kg PRO, respectively, while control group and model group were intragastrically administered with the same amount of normal saline, once/day for 1 week. The brain water content was compared among all groups. The nerve function deficits of each group were compared by neurobehavioral evaluation. Kit was applied to detect contents of superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS) and glutathione peroxidase (GPX) in each group. The expression levels of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway related proteins and apoptosis proteins such as Bcl-2, Bax and Caspase-3 proteins in each group were detected by Western blotting. Hematoxylin staining was applied to observe apoptosis of nerve cells. **Results** Compared with control group, score of nerve function, water content in brain and ROS, expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, Bax and Caspase-3 proteins, and apoptosis rate of nerve cells were increased in model group, levels of SOD and GPX, and Bcl-2 protein were decreased ( $P < 0.05$ ), among them, TLR4 protein and NF- $\kappa$ B protein were (1.80±0.20) and (1.85±0.21), respectively, which were significantly lower than those of the control group (0.45±0.04) and (0.51±0.04). Compared with model group, score of nerve function, water content in brain and ROS, expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, Bax and Caspase-3 proteins, and apoptosis rate of nerve cells were decreased in all groups treated with PRO, and the above indexes in high-dose PRO group were lower than those in low-dose PRO group ( $P < 0.05$ ), among them, the

TLR4 protein and NF- $\kappa$ B protein of the high-dose procyanidin group were (0.59±0.06) and (0.64±0.06), respectively, which were significantly lower than those of the low-dose procyanidin group (1.00±0.10) and (0.98±0.09). Compared with model group, levels of SOD and GPX, and Bcl-2 protein were increased in all groups treated with PRO, and the above indexes in high-dose PRO group were higher than those in low-dose PRO group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Proanthocyanidins over-inhibit TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway to regulate the expression of downstream apoptotic proteins, inhibit the apoptosis of brain cells in I/R rats, and relieve cerebral tissue injury.

**Key words:** Reperfusion injury; Proanthocyanidins; Toll-Like Receptor 4; NF- $\kappa$ B; Signaling pathway; Apoptosis; Rats, Sprague-Dawley

脑缺血再灌注(I/R)损伤是指脑缺血一段时间再灌注后,缺血组织损伤和功能障碍不仅没有恢复,反而出现加重的现象,主要表现为血流动力学改变、脑组织梗死面积扩大、神经细胞自噬和凋亡异常等现象<sup>[1-3]</sup>。目前,临床尚缺乏治疗脑组织I/R损伤的特效药物,防止I/R后大脑神经细胞的凋亡和氧化应激是保护I/R损伤的重要方法之一<sup>[4-6]</sup>。原花青素是一种广泛存在于多种植物中的天然化合物,具有较强的清除自由基的能力和抑制凋亡的效果<sup>[7]</sup>。但目前关于原花青素对脑I/R损伤的保护机制尚不完全统一。本研究于2018年6月至2019年5月旨在研究原花青素通过抑制Toll样受体4(TLR4)/核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)信号通路对大鼠脑I/R损伤的保护作用,以期了解原花青素对大鼠I/R损伤的保护作用机理。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** SPF级3周龄SD雄性大鼠60只,体重(68.74±5.39)g,购自广东医学院实验动物中心,粤监证字2004A029号,饲养温度20~25℃,相对湿度50%~65%,本研究符合一般动物实验伦理学原则。

**1.2 药物与试剂** 丙二醛、超氧化物歧化酶(superoxidedismutase, SOD)、乳酸脱氢酶(Lactic dehydrogenase, LDH)检测试剂盒均购自上海恒远生物科技有限公司;B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、TLR4、NF- $\kappa$ B p65及NF- $\kappa$ B p65一抗购自Santa Cruz公司;辣根过氧化物酶(HRP)羊抗兔IgG、HRP羊抗鼠IgG等二抗购自美国Thermo公司。

**1.3 仪器** 电子天平(BS-124s型),由北京赛多斯仪器系统有限公司提供;低温离心机(3-5w型),由湖南恒诺离心机有限公司提供;正置型金相显微镜(SG-51型),由上海光学仪器厂提供;蛋白电泳及转膜仪由美国Bio-Rad公司提供;MF-ChemiBIS凝胶成像系统由以色列DNR公司提供。

**1.4 分组及建立模型** 将60只大鼠适应性喂养1周,按随机数字表法分为对照组、模型组、原花青素低剂量组和原花青素高剂量组,各15只,并采用改良线栓法制成I/R模型,模型复制和造模成功标准均参考Wu等<sup>[8]</sup>研究。具体操作如下:麻醉大鼠并仰卧固定,分离双侧颈总动脉,使用微动脉夹夹闭10

min,松开10min,再夹闭10min复制大鼠脑组织I/R模型。

**1.5 药物干预** 原花青素低剂量组和原花青素高剂量组,分别使用原花青素灌胃处理,剂量分别为:80 mg/kg和160 mg/kg,1次/天,共处理7d。

## 1.6 检测项目

**1.6.1 大鼠神经功能缺损情况检测** 完成给药12h后,实验Longa 5分法<sup>[9]</sup>评价大鼠神经功能。

**1.6.2 大鼠脑含水量检测** 神经功能进行评分后,断脖处死大鼠,分离左右脑半球,快速称质量,计为湿质量。将大鼠左右脑半球放入恒温干燥箱干燥后称质量,计为干质量。

$$\text{脑含水量} = \frac{\text{湿质量} - \text{干质量}}{\text{湿质量}} \times 100\%$$

**1.6.3 SOD、活性氧和GPX含量检测** 断脖处死大鼠,分离腹主动脉血液,离心,按照试剂盒说明书检测丙二醛、SOD、活性氧和GPX水平。

**1.6.4 蛋白质印迹法(Western blotting)检测蛋白表达水平** 取大鼠脑组织,使用胰蛋白酶消化后,提取总蛋白,依次进行电泳、转膜、封闭,加入一抗(Bcl-2、Bax、Caspase-3、TLR4和NF- $\kappa$ B蛋白)孵育过夜,加二抗孵育2h,显色后行吸光度分析,计算各蛋白相对内参蛋白 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)的表达量。

**1.6.5 大鼠神经细胞凋亡情况检测** 大鼠脑组织切片常规脱水,严格按照DNA断裂的原位末端标记法(TUNEL法)试剂盒说明书进行操作。400倍光学显微镜下,随机选取皮质区4个不重复视野,计算凋亡细胞指数(Apoptosis cell index, ACI)=(凋亡细胞总数/细胞总数)×100%。

**1.7 统计学方法** 本研究数据分析采用软件为SPSS 22.0,采用GraphPad Prism5软件制作柱状图,组间比较采用单因素方差分析;若 $P<0.05$ 则表明数据差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠神经功能缺损情况及脑含水量检测结果** 相比对照组,模型组大鼠神经功能缺损评分及脑含水量升高( $P<0.05$ );相比模型组,原花青素低剂量组大鼠神经功能缺损评分及脑含水量降低( $P<0.05$ );相比原花青素低剂量组,原花青素高剂量组大鼠神经功能评分及脑含水量降低( $P<0.05$ ),

见表1。

表1 大鼠神经功能缺损情况及脑含水量检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	神经功能缺损评分/分	脑含水量/%
对照组	15	0.25±0.10	75.00±5.00
模型组	15	4.10±0.50 <sup>①</sup>	92.30±6.10 <sup>①</sup>
原花青素低剂量组	15	2.41±0.20 <sup>①②</sup>	85.30±5.40 <sup>①②</sup>
原花青素高剂量组	15	1.00±0.10 <sup>①②③</sup>	80.60±5.90 <sup>①②③</sup>
F值		556.529	25.548
P值		<0.001	<0.001

注:①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与原花青素低剂量组比较, $P<0.05$ 。

**2.2 大鼠氧化应激水平检测结果** 相比对照组,模型组大鼠SOD、GPX含量水平降低、活性氧含量水平升高( $P<0.05$ );相比模型组,原花青素低剂量组大鼠SOD、GPX含量水平升高、活性氧含量水平降低( $P<0.05$ );相比原花青素低剂量组,花青素高剂量组大鼠SOD、GPX含量水平升高、活性氧含量水平降低( $P<0.05$ ),见表2。

表2 大鼠氧化应激水平检测结果/(U/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

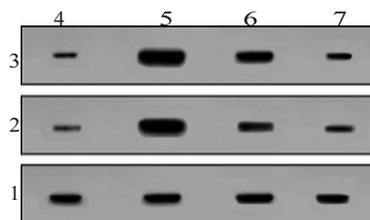
组别	鼠数	SOD	活性氧	GPX
对照组	15	2.20±0.20	2.10±0.21	158.12±12.01
模型组	15	1.01±0.11 <sup>①</sup>	6.90±0.61 <sup>①</sup>	55.32±5.01 <sup>①</sup>
原花青素低剂量组	15	1.50±0.20 <sup>①②</sup>	4.20±0.42 <sup>①②</sup>	100.25±10.24 <sup>①②</sup>
原花青素高剂量组	15	1.79±0.21 <sup>①②③</sup>	3.10±0.30 <sup>①②③</sup>	125.78±12.50 <sup>①②③</sup>
F值		110.382	367.428	262.491
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:SOD为超氧化物歧化酶,GPX为谷胱甘肽过氧化物酶。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与原花青素低剂量组比较, $P<0.05$ 。

**2.3 大鼠TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路检测结果** 由蛋白质印记实验可以看出,相比对照组,模型组大鼠脑组织中TLR4蛋白和NF- $\kappa$ B蛋白表达水平升高( $P<0.05$ );相比模型组,原花青素低剂量组大鼠脑组织中TLR4蛋白和NF- $\kappa$ B蛋白表达水平降低( $P<0.05$ );相比原花青素低剂量组,花青素高剂量组大鼠脑组织中TLR4蛋白和NF- $\kappa$ B蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ),见图1、表3。

**2.4 大鼠凋亡蛋白表达检测结果** 由蛋白质印记实验可以看出,相比对照组,模型组大鼠脑组织中Bcl-2蛋白表达降低、Bax蛋白和Caspase-3蛋白表达升高( $P<0.05$ );相比模型组,原花青素低剂量组大鼠脑组织中Bcl-2蛋白表达升高、Bax蛋白和Caspase-3蛋白表达降低( $P<0.05$ );相比原花青素低剂量组,花青素高剂量组大鼠脑组织中Bcl-2蛋白表达升高、



注:1— $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin);2—Toll样受体4(TLR4);3—核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B);4—对照组;5—模型组;6—原花青素低剂量组;7—原花青素高剂量组。

图1 大鼠TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路检测结果

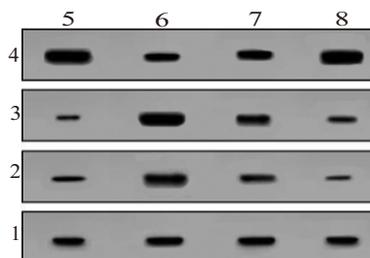
表3 大鼠TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	TLR4相对表达量	NF- $\kappa$ B相对表达量
对照组	15	0.45±0.04	0.51±0.04
模型组	15	1.80±0.20 <sup>①</sup>	1.85±0.21 <sup>①</sup>
原花青素低剂量组	15	1.00±0.10 <sup>①②</sup>	0.98±0.09 <sup>①②</sup>
原花青素高剂量组	15	0.59±0.06 <sup>①②③</sup>	0.64±0.06 <sup>①②③</sup>
F值		400.072	380.662
P值		<0.001	<0.001

注:TLR4为Toll样受体4,NF- $\kappa$ B为核因子- $\kappa$ B。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与原花青素低剂量组比较, $P<0.05$ 。

Bax蛋白和Caspase-3蛋白表达降低( $P<0.05$ ),见图2、表4。



注:1— $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin);2—胱天蛋白酶3(Caspase-3);3—Bcl-2相关X蛋白(Bax);4—B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2);5—对照组;6—模型组;7—原花青素低剂量组;8—原花青素高剂量组。

图2 大鼠凋亡蛋白表达检测结果

表4 大鼠凋亡蛋白表达检测结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	Bcl-2相对表达量	Bax相对表达量	Caspase-3相对表达量
对照组	15	1.70±0.10	0.62±0.14	1.02±0.21
模型组	15	0.90±0.10 <sup>①</sup>	1.52±0.15 <sup>①</sup>	1.62±0.14 <sup>①</sup>
原花青素低剂量组	15	1.20±0.11 <sup>①②</sup>	1.12±0.15 <sup>①②</sup>	1.03±0.11 <sup>①②</sup>
原花青素高剂量组	15	1.51±0.12 <sup>①②③</sup>	0.84±0.13 <sup>①②③</sup>	0.73±0.14 <sup>①②③</sup>
F值		159.602	110.994	87.757
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Bcl-2为B细胞淋巴瘤/白血病-2,Bax为Bcl-2相关X蛋白,Caspase-3为胱天蛋白酶3。

①与对照组相比, $P<0.05$ 。②与模型组比较, $P<0.05$ 。③与原花青素低剂量组比较, $P<0.05$ 。

**2.5 大鼠脑神经细胞凋亡检测结果** 由染色实验观察大鼠脑神经细胞凋亡实验可以看出, 相比对照组(5.01±1.21)%, 模型组大鼠脑神经细胞凋亡数目(65.58±5.32)%显然增加( $P<0.05$ ); 相比模型组, 原花青素低剂量组大鼠脑神经细胞凋亡数目(41.32±4.80)%降低( $P<0.05$ ); 相比原花青素低剂量组, 花青素高剂量组大鼠脑神经细胞凋亡数目(22.14±4.09)%降低( $P<0.05$ ),  $F=584.172$ ,  $P<0.001$ , 见图3。

### 3 讨论

脑组织 I/R 损伤是脑动脉缺血后恢复血流灌注时, 脑组织损伤加重的现象, 与大量炎症介质释放、自由基生成、神经细胞凋亡等有关<sup>[8-10]</sup>。最为显著的表现当脑组织细胞受到损伤导致细胞破裂, 细胞内的水分溢出导致脑含水量升高, 神经功能受到影响。本研究发现, 相比模型组, 原花青素低剂量组大鼠神经功能评分及脑含水量降低。说明使用原花青素除了可以有效缓解大鼠脑 I/R 损伤, 同时相比原花青素低剂量组, 原花青素高剂量组大鼠神经功能评分及脑含水量降低, 说明在一定剂量范围内随着使用原花青素处理的增加, 其效果呈剂量依赖性。这可能是因为原花青素具有抑制炎症, 并且通过抑制氧化反应, 缓解大鼠脑损伤。有研究表明: 原花青素可以有效降低 I/R 大鼠脑含水量并改善神经功能评分<sup>[11]</sup>, 本研究得出的结论与其相一致。

SOD 是机体重要的过氧化物酶, 可以清除体内过量的活性氧, 减少脂质代谢中间产物 MAD 生成, 减轻活性氧堆积引起的氧化应激损伤<sup>[12-13]</sup>。本研究发现, 相比模型组, 使用原花青素处理的各组大鼠 SOD、GPX 含量水平升高、活性氧含量水平降低。说明原花青素可以有效抑制氧化应激反应, 同时当使用原花青素浓度升高后效果更为显著。这可能是因为原花青素中含有多酚化合物, 这些多酚化合物具有很强的抗氧化性, 有效缓解了 I/R 大鼠脑组织中的过氧化反应, 缓解了大鼠的 I/R 损伤。

NF- $\kappa$ B 广泛存在于真核细胞内, 可以调节多种免疫炎症介质释放, 改变肿瘤生长的微环境, 调节肿瘤细胞的增殖、凋亡等生物学过程<sup>[14]</sup>。等研究显示, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路激活还可以调控凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax 表达, 诱导细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。本研究发现, 相比模型组, 原花青素低剂量组大鼠脑组织中 TLR4 蛋白和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平降低且 Bcl-2 蛋白表达升高、Bax 蛋白表达也降低。说明原花青素可以抑制 TLR4 蛋白和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达, 实现抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路并影响下游凋亡相关基因的表达, 保护大鼠脑神经细胞缺血后的凋亡, 缓解了 I/R 损伤。有研究表明: 原花青素可以抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路<sup>[16]</sup>, 本研究结果与其基本一致。

Caspase 家族基因是体内调控细胞凋亡的主要基因, 包括凋亡启动蛋白 Caspase-9、凋亡执行蛋白 Caspase-3 等<sup>[17]</sup>。已有研究显示, 一旦细胞接收到凋亡信号, Caspase-9 可以活化 Caspase-3, 进入细胞核, 降解多种重要的蛋白, 导致细胞凋亡<sup>[18]</sup>。本实验中可以看出, 相比模型组, 原花青素低剂量组大鼠脑组织中 Bcl-2 蛋白表达升高、Bax 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达降低。说明使用原花青素可以有效降低凋亡基因 Caspase 家族蛋白的表达, 这可能是因为原花青素可以抑制凋亡基因上游信号通路, 使得下游的凋亡基因表达受到抑制。李浩等<sup>[19]</sup>研究表明: 原花青素可以通过降低凋亡相关蛋白表达, 抑制脑细胞的凋亡实现保护脑 I/R 损伤, 本研究得出的结论与其相一致。

综上所述, 原花青素过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路调控下游凋亡蛋白的表达抑制 I/R 大鼠脑细胞的凋亡缓解脑 I/R 损伤。但本实验由于经费和时间限制使用的大鼠有限, 涉及到的预处理时间存在一定的限制, 在后续的实验中将进一步增加样本量, 分别在 I/R 前后不同的时间使用不同浓度的原花青素作用大鼠, 观察不同时间使用原花青素作用对大鼠 I/R 后行为学评估, 脑含水量及相关信号通路的表达的影响。

(本文图3见插图3-1)

### 参考文献

- [1] CAI F, LI CR, WU JL, et al. Theaflavin ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats through its anti-inflammatory effect and modulation of STAT-1[J]. *Mediators Inflamm*, 2006, 2006(5):30490.
- [2] 胡满燕, 吴珍妮, 龙子江, 等. 欣怡胶囊对大鼠心肌缺血再灌注损伤后炎症及氧化应激的影响[J]. *中成药*, 2016, 38(2):406-409.
- [3] CHOUCANI ET, PELL VR, JAMES AM, et al. A unifying mechanism for mitochondrial superoxide production during ischemia-reperfusion injury[J]. *Cell Metab*, 2016, 23(2):254-263.
- [4] DEBERGE M, YEAP XY, DEHN S, et al. MerTK cleavage on resident cardiac macrophages compromises repair after myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Circ Res*, 2017, 121(8):930-940.
- [5] MCTAGGART RA, OSPPEL JM, PSYCHOGIOS MN, et al. Optimization of endovascular therapy in the neuroangiography suite to achieve fast and complete (expanded treatment in cerebral ischemia 2c-3) reperfusion[J]. *Stroke*, 2020, 51(7):1961-1968.
- [6] KUMAR G, MUKHERJEE S, PALIWAL P, et al. Neuroprotective effect of chlorogenic acid in global cerebral ischemia-reperfusion rat model[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2019, 392(10):1293-1309.
- [7] 王怡悦, 何侃, 叶芊. 葡萄籽原花青素预处理对幼龄小鼠深低温缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *环球中医药*, 2017, 10(9):953-956.
- [8] WU Y, XIA ZY, MENG QT, et al. Shen-Fu injection preconditioning inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic

- rats: activation of eNOS via the PI3K/Akt pathway[J/OL]. J Biomed Biotechnol, 2011, 2011:384627. DOI: 10.1155/2011/384627.
- [9] QI ZP, XIA P, HOU TT, et al. Characteristics of mRNA dynamic expression related to spinal cord ischemia/reperfusion injury: a transcriptomics study[J]. Neural Regen Res, 2016, 11(3):480-486.
- [10] KUNECKI M, PLAZAK W, PODOLEC P, et al. Effects of endogenous cardioprotective mechanisms on ischemia-reperfusion injury[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2017, 71(2):20-31.
- [11] 陈香红, 张艳. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤代谢障碍的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2010, 13(22):15-17.
- [12] 高婷, 王子旭, 陈祝茗, 等. ROS介导的氧化应激与自噬[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45(3):656-662.
- [13] 刘莹, 卢环宇, 薛冲, 等. NRF2-SOD2途径参与高海拔暴露引起的肝脏氧化应激及炎症损伤[J]. 解放军预防医学杂志, 2017, 35(12):18-21.
- [14] 黄鑫. 核因子 $\kappa$ B1调控奶牛乳腺上皮细胞乳合成和细胞增殖的作用机理[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2017.
- [15] 范宗静, 吴旻, 唐杰, 等. 缺血再灌注损伤人心脏微血管内皮细胞凋亡基因Bel-2、Bax的表达及黄芪多糖干预研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(12):5603-5606.
- [16] 罗菲, 梅燕. 原花青素对急性痛风性关节炎大鼠TLR4/NF- $\kappa$ B信号通路的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 2(1):41-46.
- [17] 赵海, 陈明飞, 钱宁, 等. Caspase-3参与调节孕鼠中后期胎盘细胞凋亡的机制研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 9(15):234-236.
- [18] 赵英伦, 马元, 莫森, 等. 腰椎间盘突出症患者血清中Caspase-3和Caspase-9活性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(2):13-15.
- [19] 李浩, 石胜良, 吴岚, 等. 原花青素对大鼠脑缺血再灌注损伤Caspase-3和Caspase-9活性的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2):317-319.

(收稿日期:2019-11-25,修回日期:2020-01-21)

引用本文:王博,王瑞,郭丽娜,等.基于网络药理学的双黄连抗炎作用机制分析[J].安徽医药,2021,25(3):435-440.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.03.003.

◇ 药学研究 ◇



## 基于网络药理学的双黄连抗炎作用机制分析

王博,王瑞,郭丽娜,田会东,王单单,吴作敏,裴媛

作者单位:漯河市中心医院药学部,河南 漯河 462000

通信作者:王瑞,男,主任药师,硕士生导师,研究方向为临床药理学,Email:wangrui56116@163.com

基金项目:河南省中药制剂现代化技术研发与临床应用工程研究中心(豫发改高技[2019]569号)

**摘要:** **目的** 探讨双黄连抗炎的主要活性成分和药理作用机制。**方法** 通过中药系统药理学分析平台(TCMSP)检索“金银花”“黄芩”“连翘”三味药材的化学成分和作用靶点,构建化合物-靶点网络;通过比较毒物基因组学数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)检索炎症相关基因,构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络,进而在DAVID平台进行基因本体(gene ontology, GO)功能富集分析和KEGG通路富集分析,推测双黄连抗炎的作用机制。**结果** 筛选得到与炎症有关的36个化合物和53个潜在靶点,关键靶点为前列腺素G/H合成酶2(Prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、前列腺素G/H合成酶1(Prostaglandin G/H synthase 1, PTGS1)、诱导型一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, inducible, NOS2)、转录因子p65(Transcription factor p65, RELA)、外消旋- $\alpha$ 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(RAC- $\alpha$  serine/threonine-protein kinase, AKT1)。GO功能富集分析筛选得到GO条目77个,KEGG通路富集筛选得到46条信号通路。**结论** 初步预测了双黄连抗炎的药效成分和药理作用机制,为进一步深入研究其作用机制提供基础。

**关键词:** 中草药; 药理作用; 忍冬属; 黄芩; 连翘属; 炎症; 双黄连; 网络药理学

### Anti-inflammatory mechanism analysis of *Shuanghuanglian* based on network pharmacology

WANG Bo, WANG Rui, GUO Lina, TIAN Huidong, WANG Dandan, WU Zuomin, PEI Yuan

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Luohe Central Hospital, Luohe, Henan 462000, China

**Abstract:** **Objective** To study the main active components and pharmacological mechanisms of the anti-inflammatory function of *Shuanghuanglian*. **Methods** The chemical constituents and target proteins of "Lonicerae Japonicae Flos", "Scutellariae Radix" and "Forsythiae Fructus" were indexed by the traditional Chinese medicine system pharmacology platform (TCMSP) to construct the compounds-targets network. The genes related to inflammation were screened by the comparative Toxicogenomics Database (CTD) and protein and protein interaction (PPI) network was constructed. Then the Gene ontology (GO) and KEGG pathway enrichment analysis was carried out on the DAVID platform to predict the action mechanism related to anti-inflammation of *Shuanghuanglian*. **Results** 36 compounds and 53 potential targets were screened. The key targets were Prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), Prostaglandin G/H synthase 1 (PTGS1), Nitric oxide synthase, inducible (NOS2), Transcription factor p65 (RELA), RAC- $\alpha$  serine/threonine-protein kinase (AKT1). 77 GO items were obtained by GO function enrichment analysis, and 46 signaling pathways were acquired by KEGG pathway