

网络出版时间: 2025-03-26 11:24:07 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250325.1729.012>

基于网络药理学和动物实验探讨香青兰总黄酮 治疗血管性认知障碍的作用机制

马尚佳¹, 王璐², 李华¹, 吕佳瑜¹, 高德旺¹, 张帅强¹, 郭孖¹, 吴丽娥², 郭霞²
(¹ 包头医学院研究生院, 包头 014040; ² 包头医学院第一附属医院神经内科, 包头 014010)

摘要 目的 基于网络药理学和体内动物实验, 探讨香青兰总黄酮(TFDM)治疗血管性认知障碍(VCI)的分子机制及作用通路。方法 检索有机小分子(PubChem)、瑞士目标预测(Swiss Target Prediction)数据库及文献检索获取TFDM活性成分及靶点, 利用基因卡片(GeneCards)、在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库获取VCI的基因靶点, 应用Venny软件获取TFDM与VCI的交集靶点。利用Cytoscape软件、String数据库构建蛋白质相互作用(PPI)图。通过注释、可视化和综合发现(DAVID)数据库进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析, 探讨TFDM治疗VCI的分子机制及信号通路。将24只大鼠随机分为假手术(Sham)组、模型(Model)组、多奈哌齐(Donepezil)组、香青兰总黄酮(TFDM)组。除Sham组外, 其余各组采用双侧颈总动脉永久结扎法造模。连续灌胃21 d后, Morris水迷宫检测大鼠学习记忆功能; 苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠海马CA1区及皮质病理变化, 免疫组化检测大鼠脑组织闭锁小带蛋白1(ZO-1)阳性表达, Western blot检测大鼠脑组织核因子 κ B p65(NF- κ B p65)、肿瘤坏死因子(TNF- α)的表达水平。结果 共得到TFDM成分39种, 潜在靶点209个, VCI的基因靶点共10417个, 交集靶点有193个。GO富集分析主要有活性氧的反应及代谢过程等, KEGG富集分析主要有TNF、IL-17等信号通路。动物实验表明, TFDM显著改善VCI大鼠学习记忆功能及脑组织病理损伤, 显著上调ZO-1阳性表达, 显著下调NF- κ B p65、TNF- α 蛋白水平($P < 0.05$)。结论 TFDM从多通路、多靶点发挥药理作用治疗VCI, 其关键机制可能与抑制TNF- α /NF- κ B p65信号通路, 减轻神经炎症, 改善血脑屏障通透性有关。

关键词 香青兰总黄酮; 血管性认知障碍; 网络药理学; 神经炎症; TNF- α /NF- κ B p65信号通路

中图分类号 R 743

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)04-0675-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.013

血管性认知障碍(vascular cognitive impairment, VCI)是一种继发于各种脑血管疾病, 以认知功能障碍为主要特征的神经疾病^[1]。VCI的发病率随年龄的增长而提高, 随着病情的进行性加重将演变为血管性痴呆(vascular dementia, VaD), VaD被认为是仅次于阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的第二大痴呆类型, 约占痴呆患者的15%~20%^[2]。研究^[3]表明, 脑组织慢性低灌注不足时会引起神经炎症、氧化应激、血脑屏障破坏、单胺类神

经递质传导功能缺陷和神经营养因子分泌降低, 而进一步导致VCI的发生发展。VCI是目前唯一可防治的痴呆类型, 因此, VCI的早期诊治已成为防治痴呆的共识。

民族药香青兰总黄酮(total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L., TFDM)提取于唇形科植物香青兰中, 广泛分布于内蒙古地区。TFDM具有较强的抗炎、抗氧化作用^[4]。研究^[5]表明, TFDM可通过抑制凋亡、炎症和氧化应激, 在AD、帕金森病等神经系统病变中发挥神经保护作用。本文通过网络药理学与动物实验探讨TFDM防治VCI的作用机制, 旨在为VCI的药物研究和开发提供理论依据, 为深入开展民族药对VCI的防治研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学方法

1.1.1 TFDM活性成分及靶点获取 通过有机小分子数据库(PubChem) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)及文献挖掘的方式, 并查阅《中国药典》2020版, 获得TFDM活性成分及简化分子线性输入

2024-12-24 接收

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(编号: 2024LHMS-08004); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(编号: NJZY23019); 内蒙古医学科学院公立医院科研联合基金科技项目(编号: 2023GLLH0191、2024GLLH0565)

作者简介: 马尚佳, 女, 硕士研究生;

郭霞, 女, 医学博士, 主任医师, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: guoxia0424@163.com;

吴丽娥, 女, 教授, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: dx6917@163.com

规范 SMILES 编码,将其导入瑞士目标预测数据库 (Swiss Target Prediction) (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 预测作用靶点。

1.1.2 疾病靶点获取 使用基因卡片 (GeneCards) (<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传 (online mendelian inheritance in man, OMIM) 数据库 (<https://www.omim.org/>) 检索 “vascular cognitive impairment”, 排除重复基因, 得到 VCI 的疾病靶点。

1.1.3 药物-疾病共同靶点筛选 通过 Venny 软件 (<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 绘制 TFDM 靶点与 VCI 基因靶点的韦恩图, 标出交集靶点作为 TFDM 治疗 VCI 的潜在关键靶点。

1.1.4 构建成分-靶点-疾病的可视化网络 将 TFDM 成分和 VCI 相关靶点导入 Cytoscape 3.9.2 软件, 构建成分-靶点-疾病的可视化网络。

1.1.5 构建药物-疾病的蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 图 在 String (search tool for recurring instances of neighbouring genes) 数据库 (<http://string-db.org/>) 中输入 TFDM 用于治疗 VCI 的潜在靶点, 设定物种为人类 (homo sapiens)、设置最高置信度为 0.900, 并隐藏游离基因节点, 从而获得 PPI 图。将其导入 Cytoscape 3.9.2 中并选择网络度值 (degree) 前 10 作为核心靶点。

1.1.6 基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析与基因组百科全书 (kyoto encyclopeddia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将 TFDM 与 VCI 交集靶点导入注释、可视化和综合发现 (database for annotation, visualization and integrated discovery, DAVID) 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 获得 GO、KEGG 功能富集分析, GO 分析包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF), 并在微生物信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制条形图及气泡图。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 250~300 g, 购自北京斯贝福有限公司, 动物生产许可证 [SCXK(京) 2019-2020]。动物均饲养于包头医学院动物房, 温度 24~26 °C, 相对湿度 55%~60%, 保持 12 h 光照与 12 h 黑暗交替的环境, 自由饮水、进食。该实验经包医动伦审 [2023] 47 号批准。

1.2.2 主要试剂与仪器 TFDM 由南京普怡生物科

技有限公司提纯, 将香青兰粗碎, 经回流提取、浓缩、水冷沉、过滤、大孔树脂吸附、解吸、浓缩干燥等步骤后, 得到 TFDM 提取物, 纯度为 43.3%。多奈哌齐片购自重庆植恩生物技术股份有限公司 (批号: 02230140)。闭锁小带蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) (货号: AF5145)、核因子 κ B p65 (nuclear factor kappa-B p65, NF- κ B p65) (货号: AF5006)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (货号: AF7014) 抗体购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 通用二步法检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司 (货号: PV-9000); 超敏 ECL 发光液购自武汉亲和生命科技有限责任公司 (货号: AIWB-006)。主要仪器: Morris 水迷宫, 上海欣软信息科技有限公司; 石蜡切片机、光学显微镜, 德国 Leica 仪器有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 蛋白成像系统, 上海天能生命科学有限公司。

1.2.3 建立动物模型、分组及给药 24 只 Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为假手术 (Sham) 组、模型 (Model) 组、多奈哌齐 (Donepezil) 组、香青兰总黄酮 (TFDM) 组, 每组 6 只。通过双侧颈总动脉永久结扎法建立 VCI 模型, Sham 组仅分离颈总动脉, 不结扎。造模 1 周后通过 Morris 水迷宫验证造模成功, 标准参考既往文献^[6]。随之给予对应药物灌胃处理。Donepezil 组给予 3 mg/kg 灌胃, TFDM 组给予 50 mg/kg 灌胃, Sham 组和 Model 组给予等体积生理盐水灌胃。所有动物灌胃 21 d。

1.2.4 Morris 水迷宫 Morris 水迷宫分为 4 个象限, 将平台放置在第 4 象限, 注水至高于平台 2 cm, 保证水温适宜, 用作定位航行实验及空间探索实验。前 1~5 d, 将大鼠依次于各象限中央处放入水中自由探索, 记录 60 s 找到平台所需时间为逃避潜伏期。如大鼠未在 60 s 内找到平台则将其放于平台学习 20 s。第 6 天将平台去除, 把大鼠从第 2 象限中央处放入水中, 记录其在 120 s 穿越平台次数及目标象限 (第四象限及平台区) 百分比。

1.2.5 动物取材 所有大鼠经行为学检测后, 腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (35 mg/kg) 麻醉。腹主动脉取血, 随即心脏灌注, 各组中半数大鼠断头取脑组织, 4% 多聚甲醛固定后脱水、切片, 半数大鼠取新鲜海马置于 -20 °C 备用。

1.2.6 HE 染色 5 μ m 的脑组织切片, 依次经脱水、苏木精染色、水洗、分化等步骤进行 HE 染色, 经二甲苯透明、封片后置于光学显微镜下观察分析。

1.2.7 免疫组化检测 ZO-1 阳性表达 5 μ m 的脑组

组织切片,依次经脱蜡、过氧化氢孵育、抗原修复、封闭、一抗 4 ℃ 过夜孵育(1 :100)、二抗 37 ℃ 孵育 30 min、DAB 显色、苏木精复染、脱水透明封片后置于光学显微镜下观察分析。

1.2.8 Western blot 检测 TNF- α /NF- κ B p65 信号通路表达情况 按照蛋白提取试剂盒步骤提取海马蛋白,BCA 法检测蛋白质浓度,取 20 μ g 蛋白加入蛋白缓冲液后经 120 V 恒压电泳、300 mA 恒流转膜、5% 脱脂牛奶封闭、一抗 4 ℃ 过夜孵育(1 :1 000)、二抗室温孵育 2 h(1 :5 000)后通过成像系统分析条带。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 5 进行统计分析。计量资料采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多样本间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果

2.1.1 TFDM 活性成分及作用靶点、VCI 靶点筛选

通过 PubChem 数据库以及文献和《中国药典》2020 版补充,共获得活性成分 39 种,见表 1。通过检索 Swiss Target Prediction 数据库获得 TFDM 有效靶点 209 个。通过检索 GeneCards、OMIM 数据库得到 VCI 相关靶点,将重复基因剔除后,共得到有效靶点 10 417 个。应用 Venny 软件获取交集靶点,共 193 种,作为 TFDM 治疗 VCI 的潜在关键靶点,绘制韦恩图,见图 1。

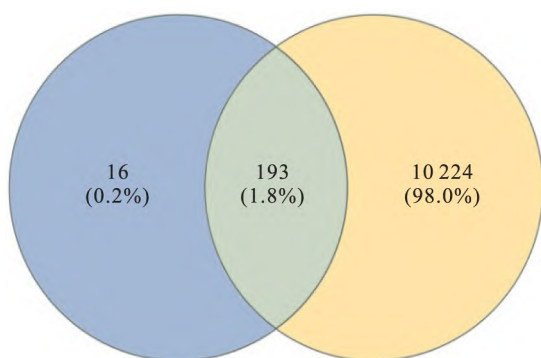


图 1 TFDM 与 VCI 靶点的韦恩图

Fig. 1 The venn diagram of intersection target gene of TFDM and VCI

2.1.2 “TFDM 成分-靶点-VCI”网络分析 利用 Cytoscape 3.9.2 软件构建“TFDM 成分-靶点-VCI”网络图,见图 2,表明 TFDM 的 39 种有效成分可能

通过 193 个靶点治疗 VCI。进行网络拓扑学分析,根据度值排名前 5 作为核心成分,即山柰酚、异鼠李素、香叶木素、芹菜素-7-O- β -D-葡萄糖吡喃糖苷和金合欢素-6 葡萄糖醛酸苷,见表 2。

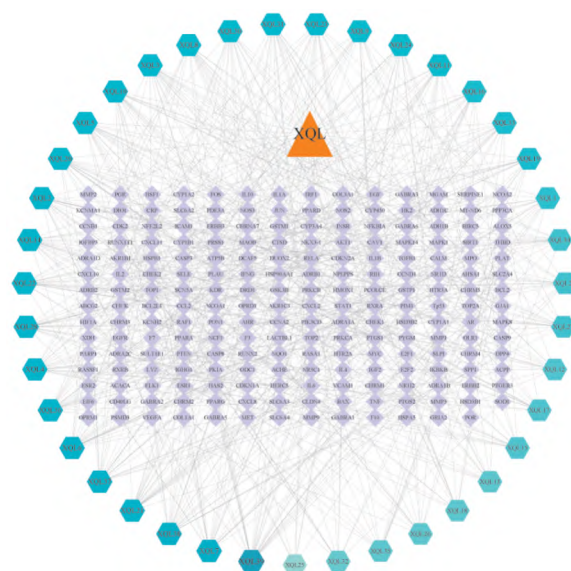


图 2 “TFDM 成分-靶点-VCI”网络图

Fig. 2 “TFDM-Targets-VCI” network

2.1.3 PPI 图结果 基于 String 数据库构建 PPI 图,见图 3。根据网络拓扑学分析筛选度值排名前 10 为核心靶点,包括: AKT1、TNF、IL-6、IL-1B、PTGS2、JUN、CASP3、ESR1、EGFR、MMP9 等,见表 3。

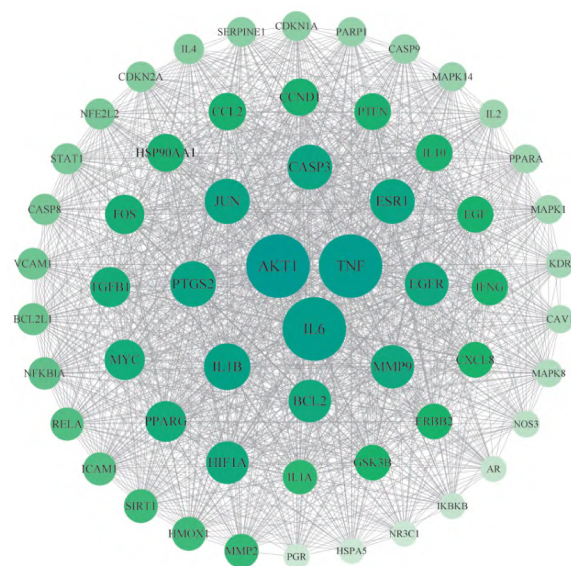


图 3 PPI 网络图

Fig. 3 The network chart of PPI

表 1 TFDM 有效成分

Tab. 1 The effective ingredient of TFDM

Number	Chinese name	English name	Molecular formula
XQL1	2,5,7,4'-四羟基黄酮	2,5,7,4'-four hydroxyl flavone	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
XQL2	5,4,7'-三羟基-3'-甲氧基黄酮	5,4,7'-trihydroxy-3'-methoxy flavone	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
XQL3	5,7,3',4',-四羟基-3-α-β-glu-rha 黄酮	5,7,3',4',-four hydroxyl-3-α-β glu-rha methoxy flavone	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
XQL4	洋芹素	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
XQL5	木犀草素	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
XQL6	山柰酚	Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
XQL7	异鼠李素	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
XQL8	田蓟苷	Tilianin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀
XQL9	藿香苷	Agastachoside	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁
XQL10	金合欢素-7-O-β-D-(6-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	Acacetin-7-O-β-D-(6-O-malonyl) glucoside	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃
XQL11	丁香脂素	Syringaresinol	C ₂₂ H ₂₆ O ₈
XQL12	丁香脂素-4-O-β-D-葡萄糖苷	Syringaresinol-4-O-β-D-monoglucoside	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₃
XQL13	丁香脂素-4,4'-O-双-β-D-葡萄糖苷	Syringaresinol-4,4'-O-bis-β-D-glucoside	C ₃₆ H ₄₆ O ₁₈
XQL14	山柰酚-3-O-β-D-(6-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖吡喃糖苷	Kaempfero-3-O-β-D-(6-O-pcoumaroyl) glucoside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
XQL15	2"-对羟基肉桂酰氧基黄芪苷	2"-p-coumarylastragaln	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
XQL16	Takakin-8-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷	Takakin-8-O-β-D-glucopyranoside	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
XQL17	玄参黄酮	Serophulein	C ₁₇ H ₁₄ O ₆
XQL18	鼠尾草素	Salvigenin	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
XQL19	8-羟基-鼠尾草素	8-hydroxy-salvigenin	C ₁₈ H ₁₆ O ₇
XQL20	金圣草素	Chrysoeriol	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
XQL21	香叶木素	Diosmetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
XQL22	梔子素乙	Gardenin B	C ₁₉ H ₁₈ O ₇
XQL23	金合欢素-7-O-β-葡萄糖醛酸苷	Acacetin-7-O-β-D-glucuronide	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁
XQL24	芹菜素-7-O-β-D-半乳糖苷	Apigenin-7-O-β-D-galactoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
XQL25	槲皮素	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
XQL26	槲皮素-3-O-[α-L-鼠李糖(1→6)]-β-D-葡萄糖苷	Quercetin-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl(1→6)]-β-D-glucopyranoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
XQL27	山柰酚-7-O-葡萄糖苷	Kaempferol-7-O-glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
XQL28	槲皮素-3-O-葡萄糖苷	Quercetin-3-O-glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
XQL29	槲皮素-3-O-半乳糖苷	Quercetin-3-O-galactopyranoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
XQL30	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	Apigenin-7-O-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
XQL31	高车前苷	Homoplantagin	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
XQL32	木犀草素-7-O-β-D-葡萄糖醛酸苷	Luteolin-7-O-β-D-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
XQL33	金合欢素-7-O-β-D-(6-O-丙二酰基)-葡萄糖苷	Acacetin-7-O-β-D-(6-O-malonyl) glucoside	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₃
XQL34	金合欢素-7-O-(3-乙酰基)-葡萄糖苷	Acacetin-7-O-(3-acetyl) glucopyranoside	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁
XQL35	金合欢素-7-O-(4-乙酰基)-葡萄糖苷	Acacetin-7-O-(4-acetyl) glucopyranoside	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁
XQL36	藿香苷	Agastachoside	C ₂₄ H ₂₄ O ₁₁
XQL37	山柰酚-3-O-β-D-(6-O-对羟基桂皮酰)-葡萄糖吡喃糖苷	Kaempfero-3-O-β-D-(6-O-pcoumaroyl) glucoside	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃
XQL38	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷	Apigenin-7-O-β-D-glucopyranoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
XQL39	金合欢素-6-葡萄糖醛酸苷	Acacetin-6-glucuronide	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁

表 2 TFDM 核心成分表

Tab. 2 The core ingredients list of TFDM

Number	Chinese Name	English Name	Degree
XQL39	金合欢素-6-葡萄糖醛酸苷	Acacetin-6-glucuronide	29
XQL7	异鼠李素	Isorhamnetin	23
XQL38	芹菜素-7-O-β-D-葡萄糖吡喃糖苷	Apigenin-7-O-β-D-glucopyrano-side	23
XQL6	山柰酚	Kaempferol	22
XQL21	香叶木素	Diosmetin	22

表 3 核心靶点表

Tab. 3 The core targets list

Number	Target	Degree
1	AKT1	131
2	TNF	124
3	IL-6	122
4	IL-1B	114
5	PTGS2	111
6	JUN	110
7	CASP3	109
8	ESR1	109
9	EGFR	106
10	MMP9	105

2.1.4 GO 及 KEGG 富集分析结果 将交集靶点导入 DAVID 数据库中,得到 GO 富集分析 BP、MF、CC 和 KEGG 通路 根据 $P < 0.01$ 分别筛选排名前 10 名 绘制条形图及气泡图。GO 分析共富集 4 677 个 BP 554 个 MF 331 个 CC 其中,主要 BP 包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)的代谢过程和对脂多糖、ROS 的反应等;主要 MF 包括 DNA-结合转录因子结合、核受体活性等;主要 CC 包括膜筏、膜区等,见图 4A。KEGG 分析共富集 259 条信号通路,主要有脂质与动脉粥样硬化、IL-17、TNF 信号通路等,见图 4B。

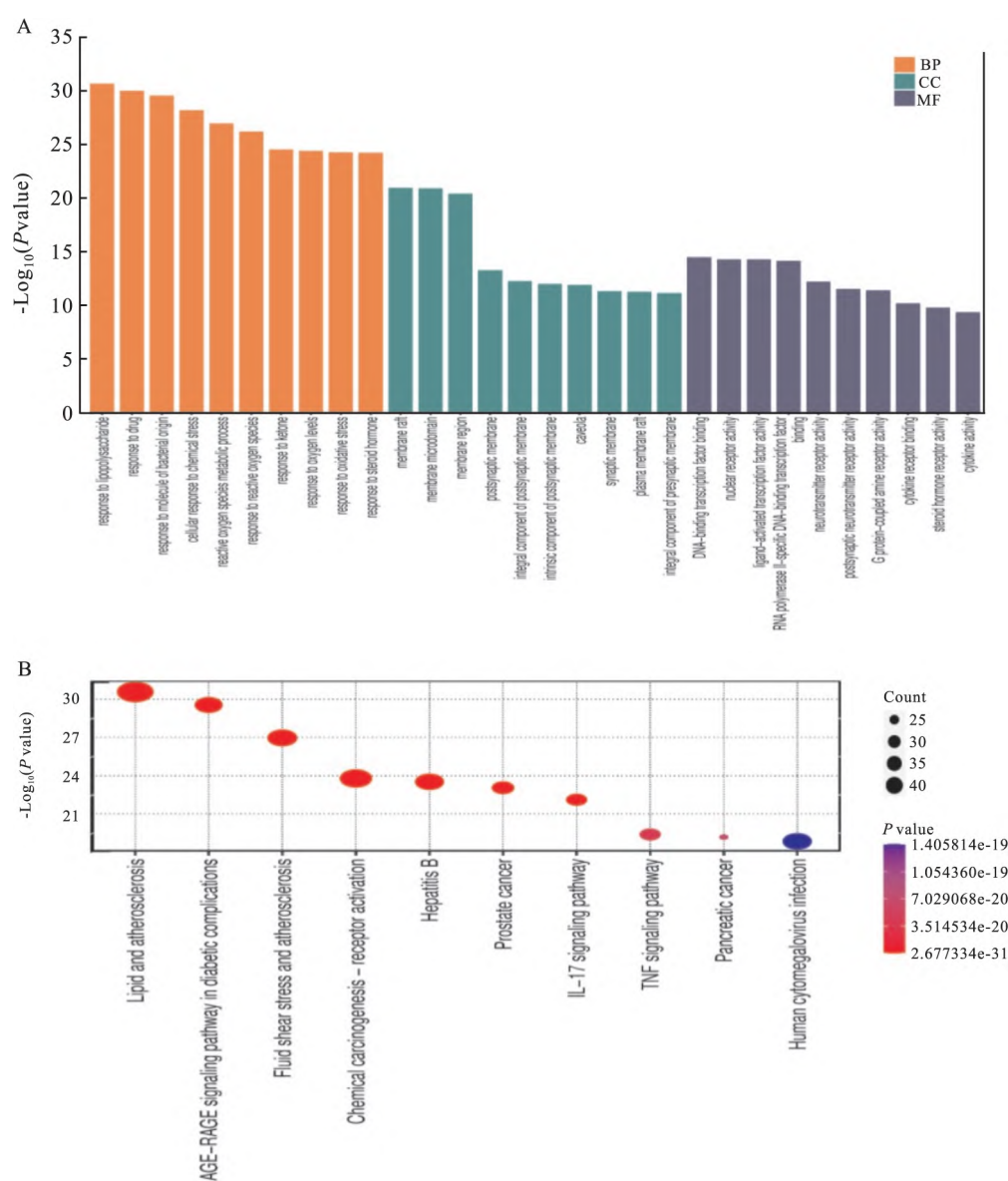


图 4 富集分析图

Fig. 4 Enrichment analysis chart

A: GO enrichment analysis histogram; BP: biological processes; CC: cell composition; GO: gene ontology; MF: molecular functions; B: Bubble diagram of KEGG enrichment analysis.

2.2 动物实验结果

2.2.1 动物行为学结果 Morris 水迷宫结果表明, 与 Sham 组相比, Model 组的逃避潜伏期明显延长 ($P<0.01$), 穿越平台次数与目标象限百分比明显减少 ($P<0.01$)。与 Model 组相比, Donepezil 组及 TFDM 组逃避潜伏期明显缩短 ($P<0.01$), 穿越平台次数与目标象限百分比明显增多 ($P<0.05$)。与 Donepezil 组相比, TFDM 组逃避潜伏期、穿越平台次数与目标象限百分比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 4。

2.2.2 海马 CA1 及皮质区 HE 染色结果 Sham 组海马 CA1 区及皮质区细胞排列整齐, 形态完整, 神经元数量多, 染色均匀; 与 Sham 组相比, Model 组海马 CA1 区及皮质区细胞结构紊乱, 坏死神经元数量较多; 与 Model 组相比, Donepezil 组及 TFDM 组海马 CA1 区及皮质区神经元损伤均有明显改善, 部分神经元排列较整齐, 坏死神经元数量较少, 见图 5。

2.2.3 海马 CA1 及皮质区 ZO-1 阳性表达 与 Sham 组相比, Model 组神经元细胞排列紊乱, ZO-1

表达量明显下降 ($P<0.01$); 与 Model 组相比, Donepezil 组及 TFDM 组神经元细胞排列较整齐, ZO-1 表达量明显增多 ($P<0.05$); 与 Donepezil 组相比, TFDM 组海马 CA1 区及皮质 ZO-1 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 6。

2.2.4 大鼠脑组织 TNF- α /NF- κ B p65 蛋白相对表达水平 与 Sham 组相比, Model 组大鼠脑组织 TNF- α 、NF- κ B p65 表达量明显上调 ($P<0.01$); 与 Model 组相比, Donepezil 组及 TFDM 组大鼠脑组织 TNF- α 、NF- κ B p65 表达量明显下调 ($P<0.05$); 与 Donepezil 组相比, TFDM 组大鼠脑组织 TNF- α 、NF- κ B p65 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见图 7。

3 讨论

随着人口老龄化的增长, VCI 的患病率逐年升高, 给患者、家庭及社会带来极大痛苦及负担, 因此, 亟需研发出有效的 VCI 治疗策略。该研究通过网络药理学和实验验证, 探讨 TFDM 改善 VCI 大鼠模

表 4 各组大鼠空间学习记忆能力比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Comparison of spatial learning and memory abilities of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	Escape latency (s)	Number of crossings of platforms	Percentage of the target quadrant (%)
Sham	21.26 $\pm$ 4.99	5.50 $\pm$ 1.05	47.00 $\pm$ 4.05
Model	70.13 $\pm$ 16.55**	1.50 $\pm$ 1.05**	16.24 $\pm$ 2.39**
Donepezil	40.63 $\pm$ 10.67##	4.00 $\pm$ 1.41##	32.75 $\pm$ 3.53##
TFDM	41.98 $\pm$ 13.33##	3.83 $\pm$ 0.75#	29.25 $\pm$ 5.88##

** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Model group.

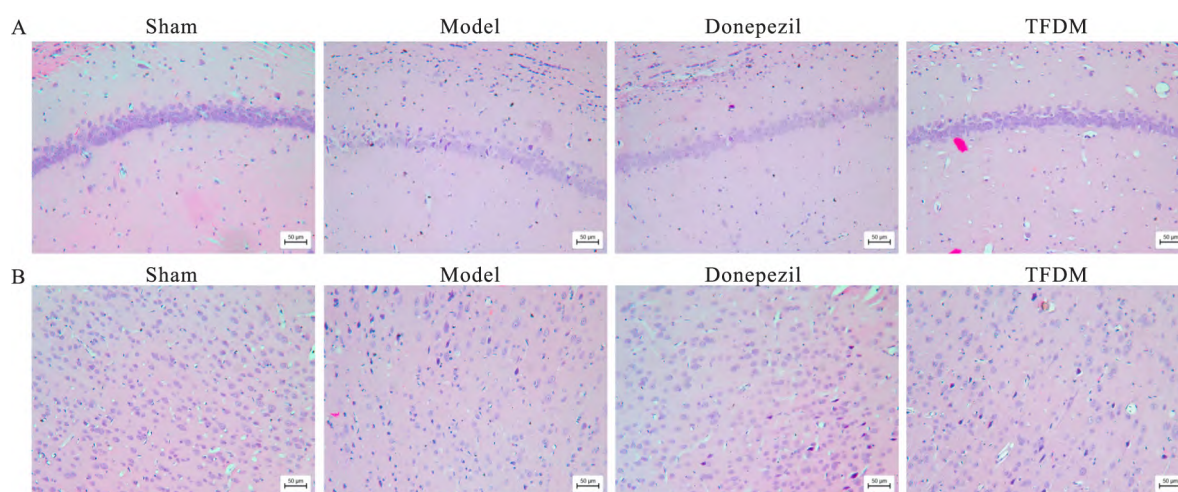
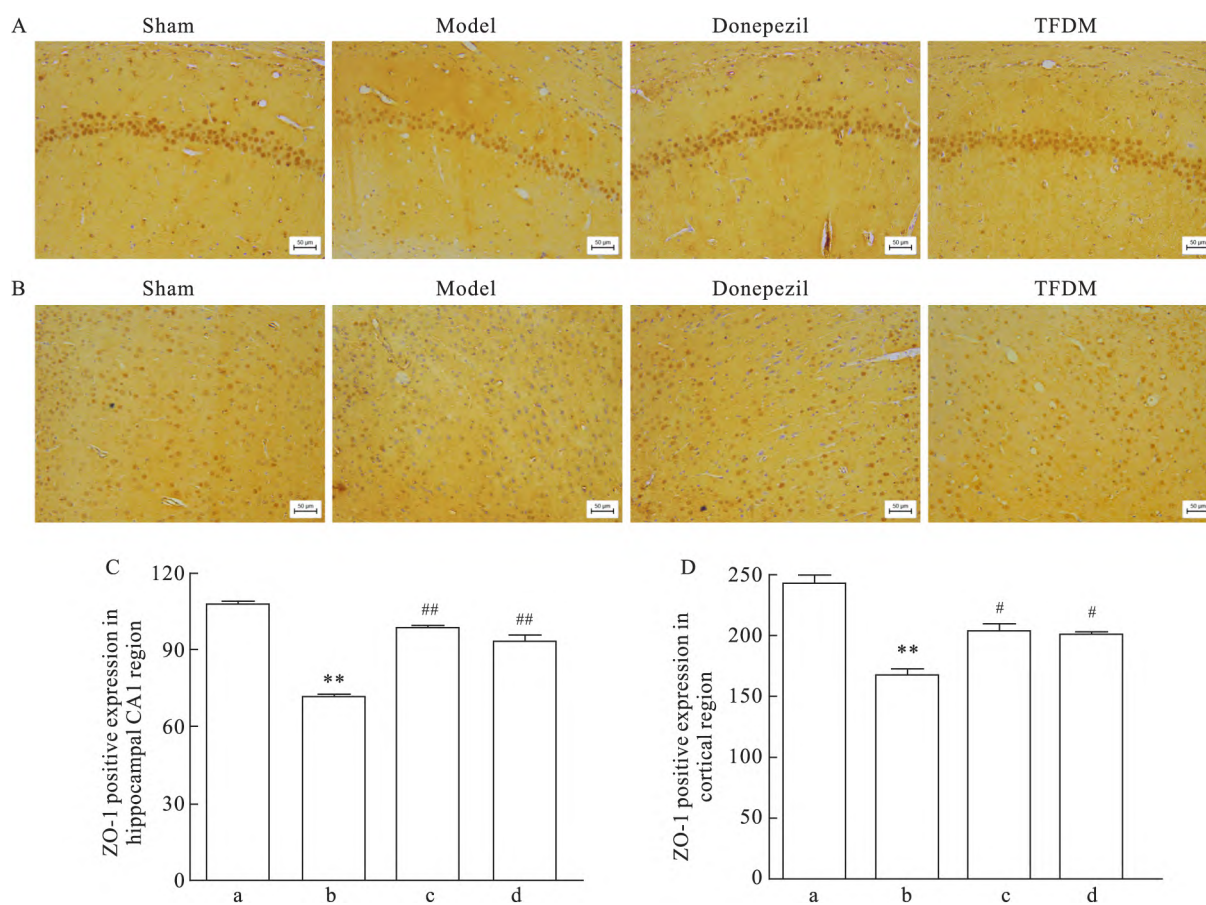


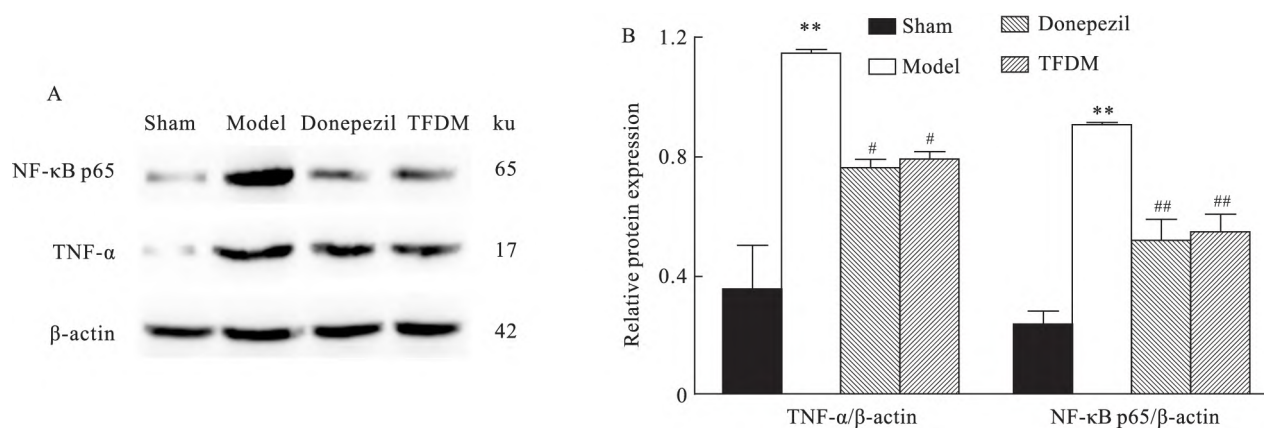
图 5 各组大鼠海马 CA1 及皮质区 HE 染色 ($\times 200$, $n=3$)

Fig. 5 HE staining of hippocampal CA1 and cortical areas in each group of rats ($\times 200$, $n=3$)

A: HE staining of hippocampal CA1 area in each group of rats; B: HE staining of cortical area in each group of rats.

图6 各组大鼠海马CA1及皮质区ZO-1表达量($n=3$)Fig. 6 ZO-1 expression in hippocampal CA1 and cortical areas of rats in each group ($n=3$)

A: Positive expression of ZO-1 in hippocampal CA1 region in each group of rats; B: Positive expression of ZO-1 in cortical region in each group of rats; C: Number of positive expression of ZO-1 in hippocampal CA1 region in each group of rats; D: Number of positive expression in cortical region in each group of rats; the brownish-yellow cells in the figure are positive expressions; a: Sham group; b: Model group; c: Donepezil group; d: TFDM group; ** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Model group.

图7 各组大鼠TNF-α/NF-κB p65蛋白相对表达量($n=3$)Fig. 7 Relative protein expression of TNF-α/NF-κB p65 in rats of each group ($n=3$)

A: Relative expression level of TNF-α/NF-κB p65 detected by Western blot; B: Relative expression of TNF-α and NF-κB p65 protein; ** $P<0.01$ vs Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Model group.

型认知能力的作用机制。

网络药理学结果表明 TFDM 活性成分有 39 种, 相关靶点 209 个, 与 VCI 交集靶点有 193 个, 核心靶点有 TNF、IL-6、IL-1B 等, 网络拓扑学表明其主要成分包括山柰酚、异鼠李素、香叶木素等。香叶木素可通过减少脑 β 淀粉样蛋白低聚物的水平, 发挥调节代谢和抑制神经炎症作用, 治疗 AD 模型小鼠的认知障碍^[7]。山柰酚、异鼠李素均具有保护心血管、抗氧化、抗肿瘤、抗炎等多重药理学作用^[8-9]。GO 富集结果显示, ROS 的代谢过程及对 ROS 的反应在 VCI 中发挥重要作用, ROS 产生过多引起氧化应激, 在活细胞内刺激脂质、蛋白质、DNA 和 RNA 的氧化损伤, 抑制细胞的正常功能, 从而诱发神经退行性疾病^[10]。KEGG 富集结果表明 TFDM 可能通过 TNF 等信号通路治疗 VCI。

TNF- α 是经典的促炎细胞因子, 脑血流灌注减少时激活炎症反应, 其大量分泌, 促使神经元和细胞损伤, 加速 VCI 的发生发展^[11]。RELA, 又称 NF- κ B p65, 是核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 中最重要的功能亚基, 通过激活炎症反应导致神经退行性疾病^[12]。当脑组织缺血缺氧时, 局部内皮细胞、神经元释放 TNF- α , 将 RELA DNA 结合因子易位到细胞核来诱导 NF- κ B 信号转导, 引起神经炎症与氧化应激, 从而进一步激活下游炎症通路, 促进炎症细胞因子的产生, 导致 VCI 认知功能障碍的发展。该研究结果表明, VCI 模型大鼠的 TNF- α 、NF- κ B p65 表达量显著上调, 与既往研究^[13]结果一致。TFDM 治疗后, TNF- α 、NF- κ B p65 表达量显著下调, 表明 TFDM 减少炎症因子的释放, 抑制神经炎症, 改善 VCI 模型大鼠的学习认知能力。

慢性低灌注时引起毛细血管内皮紧密连接缺失、周细胞丢失, 促进血脑屏障破坏, 导致学习认知能力下降。血脑屏障的完整性受到紧密连接蛋白如 ZO-1 的调控, 在创伤性脑组织损伤后 ZO-1 表达下降, 血脑屏障通透性升高^[14]。该研究结果表明, VCI 大鼠脑组织 ZO-1 表达量的显著下调, 血脑屏障通透性升高, 与之前研究^[15]结果一致。然而, TFDM 治疗可改善慢性低灌注引起的血脑屏障破坏。

综上所述, 该研究在网络药理学的基础上, 通过动物实验来进一步验证 TFDM 治疗 VCI 的作用机制。TFDM 可能是通过 TNF- α /NF- κ B p65 信号通路抑制神经炎症, 发挥神经保护作用治疗 VCI。该研究在一定程度上为 TFDM 治疗 VCI 提供了科学依据, 为 VCI 的机制研究及防治策略提供新思路。

参考文献

- [1] van der Flier W M, Skoog I, Schneider J A, et al. Vascular cognitive impairment [J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4: 18003. doi: 10.1038/nrdp.2018.3.
- [2] Morgan A E, Mc Auley M T. Vascular dementia: from pathobiology to emerging perspectives [J]. Ageing Res Rev, 2024, 96: 102278. doi: 10.1016/j.arr.2024.102278.
- [3] Hosoki S, Hansra G K, Jayasena T, et al. Molecular biomarkers for vascular cognitive impairment and dementia [J]. Nat Rev Neurol, 2023, 19(12): 737-53. doi: 10.1038/s41582-023-00884-1.
- [4] He C H, Lv J M, Khan G J, et al. Total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. improves pulmonary fibrosis by reducing inflammation and inhibiting the hedgehog signaling pathway [J]. Phytother Res, 2023, 37(7): 2745-58. doi: 10.1002/ptr.7771.
- [5] Ren W, Yan X S, Fan J C, et al. Effect of total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L. On neuroinflammation in Alzheimer's disease model amyloid- β (A β 1-42)-peptide-induced astrocyte activation [J]. J Toxicol Environ Health A, 2024, 87(10): 436-47. doi: 10.1080/15287394.2024.2336570.
- [6] 陈英华, 孙 玮, 王浩宇, 等. 基于蛋白质组学探讨电针治疗血管性痴呆的作用机制 [J]. 中国针灸, 2024, 44(7). doi: 10.13703/j.0255-2930.20231206-k0002.
- [6] Chen Y H, Sun W, Wang H Y, et al. Mechanism of electroacupuncture for vascular dementia based on proteomics [J]. Chin Acupunct Moxibustion, 2024, 44(7). doi: 10.13703/j.0255-2930.20231206-k0002.
- [7] Zhang Y, Luo C, Huang P, et al. Diosmetin ameliorates HFD-induced cognitive impairments via inhibiting metabolic disorders, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in male SD rats [J]. Mol Neurobiol, 2024, 61(10): 8069-85. doi: 10.1007/s12035-024-04083-x.
- [8] 朱志明, 王娟娟, 王苏美, 等. 山柰酚抗肿瘤作用的药理研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(3): 445-52. doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2024.03.018.
- [8] Zhu Z M, Wang J J, Wang S M, et al. Pharmacological research progress for anti-tumor effect of kaempferol [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(3): 445-52. doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2024.03.018.
- [9] 郑雨微, 于浪潮, 夏士杰, 等. 异鼠李素对 6-羟基多巴胺诱导的神经元细胞毒性的影响及氧化损伤的保护作用 [J]. 中国农业大学学报, 2023, 28(11): 140-50. doi: 10.11841/j.issn.1007-4333.2023.11.13.
- [9] Zheng Y W, Yu L C, Xia S J, et al. Effect of isorhamnetin on 6-hydroxydopamine-induced neuronal cytotoxicity and protection against oxidative injury [J]. J China Agric Univ, 2023, 28(11): 140-50. doi: 10.11841/j.issn.1007-4333.2023.11.13.
- [10] Bordonì L, Gabbianelli R. Mitochondrial DNA and neurodegeneration: any role for dietary antioxidants? [J]. Antioxidants (Basel), 2020, 9(8): 764. doi: 10.3390/antiox9080764.

- [11] Xie C , Tang H , Liu G , et al. Molecular mechanism of Epimedium in the treatment of vascular dementia based on network pharmacology and molecular docking[J]. Front Aging Neurosci , 2022 , 14: 940166. doi: 10.3389/fnagi.2022.940166.
- [12] Pozniak P D , White M K , Khalili K. TNF- α /NF- κ B signaling in the CNS: possible connection to EPHB2 [J]. J Neuroimmune Pharmacol , 2014 , 9(2) : 133–41. doi: 10.1007/s11481–013–9517–x.
- [13] Zhou Q , Le M , Yang Y , et al. Discovery of novel phosphodiesterase-1 inhibitors for curing vascular dementia: suppression of neuroinflammation by blocking NF- κ B transcription regulation and activating cAMP/CREB axis [J]. Acta Pharm Sin B , 2023 , 13(3) : 1180–91. doi: 10.1016/j.apsb.2022.09.023.
- [14] 李佳丽,曹 艳,凌腾晗,等. 大麻二酚对创伤性脑损伤大鼠脑皮质 Occludin、ZO-1 表达水平及血脑屏障通透性的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2024 , 59(3) : 478–83. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.03.017.
- [15] Li J L , Cao Y , Ling T H , et al. Effects of cannabidiol on the expression levels of Occludin and ZO-1 in cerebral cortex and the permeability of blood-brain barrier in rats with traumatic brain injury [J]. Acta Univ Med Anhui , 2024 , 59(3) : 478–83. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.03.017.
- [15] Thangwong P , Jearjaroen P , Tocharus C , et al. Melatonin suppresses inflammation and blood brain barrier disruption in rats with vascular dementia possibly by activating the SIRT1/PGC-1 α /PPAR γ signaling pathway [J]. Inflammopharmacology , 2023 , 31(3) : 1481–93. doi: 10.1007/s10787–023–01181–5.
- [14] 李佳丽,曹 艳,凌腾晗,等. 大麻二酚对创伤性脑损伤大鼠

Mechanism of total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L. in treatment of vascular cognitive impairment based on network pharmacology and animal experimental verification

Ma Shangjia¹, Wang Lu², Li Hua¹, Lv Jiayu¹, Gao Dewang¹, Zhang Shuaiqiang¹, Guo Zi¹, Wu Li'e², Guo Xia²

(¹Graduate School, Baotou Medical College, Baotou 014040; ²Dept of Neurology,

The First Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Baotou 014010)

Abstract Objective To investigate the molecular mechanisms and pathways of action of total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L. (TFDM) in treating vascular cognitive impairment (VCI) based on network pharmacology and *in vivo* animal experiments. **Methods** The swiss target prediction database, literature, and PubChem were used to screen the active components and action targets of TFDM. The online mendelian inheritance in man (OMIM) and GeneCards databases were utilized to screen for possible VCI targets. Venny software was used to obtain the intersection target of TFDM and VCI. The search tool for recurring instances of neighbouring genes (String) database and Cytoscape software was used to construct the PPI network. The database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID) database was utilized to screen for the kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway and gene ontology (GO) enrichment analyses to explore the molecular mechanism and signaling pathway of TFDM for VCI. 24 rats were divided into Sham, Model, Donepezil, and TFDM groups. Except for the Sham group, the VCI model was created using modified bilateral common carotid artery ligation. After continuous gavage for 21 days, the Morris water maze test was used to evaluate the spatial learning and memory ability of rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes in the hippocampal CA1 and cortex region of the animals and immunohistochemistry detection of zonula occludens-1 (ZO-1) content in the brains of the rats. Western blot was used to detect nuclear factor kappa-B p65 (NF- κ B p65) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in rat brains. **Results** A total of 39 active ingredients of TFDM were screened, 209 corresponding targets, 10 417 gene targets of VCI, and 193 intersecting targets. According to the results of the GO enrichment of function analysis, TFDM could improve the response of reactive oxygen species and metabolic processes of reactive oxygen species, etc. KEGG pathway enrichment analysis suggested that TFDM might regulate TNF, IL-17 signaling pathway, etc. The results of animal experiments showed that TFDM improved learning and memory while reduced pathological damage in the brains of VCI rats. In addition, TFDM upregulated the positive expression of ZO-1 and downregulated the protein levels of TNF- α and NF- κ B p65 ($P < 0.05$). **Conclusion** TFDM can improve the cognitive function of VCI through multi-components and multi-targets, and its key mechanism may be

网络出版时间: 2025-03-26 11:37:25 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250325.1729.013>

转录因子 SOX4 调控 Beclin1 介导的自噬对小细胞肺癌细胞行为的影响

韩忠诚, 马丽丽, 苏莹, 柳江

(新疆维吾尔自治区人民医院肿瘤科, 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探究性别决定区 Y 框转录因子 4 (SOX4) 调控自噬对小细胞肺癌 (SCLC) 细胞的影响及机制。方法 小干扰 RNA (siRNA) 介导敲低人 SCLC 细胞系 NCI-H446 细胞中的 SOX4。RT-qPCR 和 Western blot 检测转染 siRNA 后 NCI-H446 细胞中 SOX4 的表达。细胞实验分为对照组、si-SOX4 组、si-SOX4+oe-Beclin1 组、oe-Beclin1 组。Western blot 检测各分组细胞中微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) -II/LC3-I 的表达之比、Beclin1 及 p62 的表达。荧光素酶报告基因实验和染色质免疫共沉淀 PCR (ChIP-PCR) 实验检测 SOX4 对 Beclin1 的转录调控作用。CCK-8 法检测各分组细胞增殖能力。流式细胞术检测各分组细胞凋亡率。Transwell 实验检测分组细胞迁移与侵袭能力。结果 与对照组或 si-NC 组比较, si-SOX4 组 NCI-H446 细胞中 SOX4 mRNA 和蛋白表达下调 ($P<0.05$)。LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率和 Beclin1 蛋白表达下降 ($P<0.05$)。p62 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。si-SOX4 组的 Beclin1 WT 相对荧光素酶活性低于 si-NC 组 ($P<0.05$)。Anti-SOX4 组中 Beclin1 启动子相对富集程度高于 Anti-IgG 组 ($P<0.05$)。与对照组比较, si-SOX4 组 NCI-H446 细胞增殖活性降低、细胞凋亡率增加、迁移数目和侵袭数目也减少 ($P<0.05$)。与 si-SOX4 组比较, si-SOX4+oe-Beclin1 组 NCI-H446 细胞中 LC3-II/LC3-I 蛋白表达比率和 Beclin1 蛋白表达升高、p62 蛋白表达下降。同时 NCI-H446 细胞增殖活性升高、细胞凋亡率减少、迁移数目和侵袭数目也增加 ($P<0.05$)。结论 下调 SOX4 通过抑制 Beclin1 表达来抑制自噬, 降低 NCI-H446 细胞增殖活性, 抑制细胞迁移与侵袭。

关键词 小细胞肺癌; 性别决定区 Y 框转录因子 4; 自噬; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号 R 734.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025) 04-0684-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.014

小细胞肺癌 (small cell lung cancer, SCLC) 是一种高级别神经内分泌癌, 约占所有肺癌的 15%, 其特点是生长迅速、容易转移和复发, 且放化疗后易产生耐药性^[1]。由于 SCLC 缺乏特异性症状, 大部分患者在第一次诊断时已出现远处转移, 无法进行根

治性治疗, 因此, SCLC 患者的 5 年生存率低于 5%^[2]。因此, 迫切需要了解该肿瘤的发病机制, 从而寻找诊断及治疗的有效潜在靶点。

性别决定区 Y 框转录因子 4 (sex determining region Y-box transcriptim factor 4, SOX4) 属于 SOX 家族 C 亚组的成员, 参与调节多种细胞生物学过程。SOX4 在乳腺癌、前列腺癌、肝癌、结直肠癌等多种肿瘤中过表达, 并与肿瘤进展和转移密切相关^[3]。此外, SOX4 在非小细胞肺癌患者肿瘤组织中表达升高, 下调其表达抑制非小细胞肺癌细胞迁移、侵袭等恶性肿瘤行为^[4-5]。并有研究^[6]表明, SOX4 是

2024-12-18 接收

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (编号: 2023D01C67)

作者简介: 韩忠诚, 男, 主任医师;

柳江, 男, 主任医师, 通信作者, E-mail: liujiang@cscs.org.cn

related to inhibiting TNF- α /NF- κ B p65 signaling pathway, reducing neuroinflammation, and improvement of blood-brain barrier permeability.

Key words total flavonoids of *Dracocephalum moldavica* L.; vascular cognitive impairment; network pharmacology; neuroinflammation; TNF- α /NF- κ B p65 signaling pathway

Fund programs Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (No. 2024LHMS08004); Scientific Research Project in Higher Education Institutions of Inner Mongolia Autonomous Region (No. NJZY23019); Science and Technology Program of The Joint Fund of Scientific Research for The Public Hospitals of Inner Mongolia Academy of Medical Sciences (Nos. 2023GLLH0191, 2024GLLH0565)

Corresponding authors Guo Xia, E-mail: guoxia0424@163.com; Wu Li'e, E-mail: dx6917@163.com