

基于网络药理学和验证实验探讨蒲黄治疗脊髓损伤的分子机制

王国栋¹, 聂兴国², 李琦¹, 寇海龙¹

1. 新乡医学院第一附属医院 急救医学科, 河南 新乡 453000

2. 新乡医学院第一附属医院 骨外科三病区, 河南 新乡 453000

摘要: **目的** 利用网络药理学和实验验证探讨蒲黄治疗脊髓损伤的分子机制。**方法** 使用 TCMSP 数据库及文献资料筛选蒲黄的有效成分及其对应靶点, 使用 DrugBank、OMIM、TTD、GeneCard 数据库获得脊髓损伤相关靶点。Cytoscape 构建蒲黄抗脊髓损伤靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络图及“药物-化合物-靶点”网络图, 根据网络图中各靶点的拓扑学参数筛选出蒲黄抗脊髓损伤关键靶点及关键成分。使用 DAVID 数据库对蒲黄抗脊髓损伤靶点进行基因本体论 (GO) 功能和京都基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。采用 Autodock Vina 软件对关键化合物与关键靶点蛋白进行分子对接验证。动物实验观察蒲黄对脊髓损伤大鼠后肢运动神经功能的影响及对关键靶点蛋白 mRNA 表达的影响。**结果** 共筛选出花生四烯酸、异鼠李素、 β -谷甾醇、山柰酚、棕榈酸酐、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷、槲皮素、异鼠李素-3-O-新橙皮苷、香蒲新苷等活性成分。PPI 网络分析显示, 肿瘤坏死因子 (TNF)、白细胞介素 (IL)-6、蛋白激酶 B (AKT1)、IL-1B、胱天蛋白酶 3 (CASP3) 等蛋白可能在脊髓损伤的治疗中起关键作用。蒲黄抗脊髓损伤靶点的 GO 分析显示生物过程主要涉及对脂多糖的反应、对细菌源性分子的反应、细胞对化学应激的反应、活性氧代谢过程的调控过程等。KEGG 富集分析显示富集显著性较高的通路主要有 TNF 信号通路、TLR 信号通路、MAPK 信号通路等。分子对接显示关键活性成分与关键靶蛋白分子之间亲和力良好。动物实验结果表明, 与模型组相比, 蒲黄能有效促进脊髓损伤大鼠模型动物的后肢运动恢复, 降低 TNF、IL-6、IL-1B、CASP3 mRNA 表达, 升高 AKT1 mRNA 表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 蒲黄中槲皮素、山柰酚、异鼠李素、 β -谷甾醇等活性成分可能通过作用于 TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3 等靶点, 进而影响炎症及凋亡相关的通路发挥治疗脊髓损伤的作用。

关键词: 蒲黄; 脊髓损伤; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 山柰酚; 异鼠李素; β -谷甾醇

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)07-1464-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.07.006

Molecular mechanism of *Typhae Pollen* in treatment of spinal cord injury based on network pharmacology and validation experiments

WANG Guo-dong¹, NIE Xing-guo², LI Qi¹, KOU Hai-long¹

1. Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

2. Ward III of Orthopaedic Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, China

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of *Typhae Pollen* in treatment of spinal cord injury by using network pharmacology and validation experiments. **Methods** TCMSP database and literature data were used to screen the active components and corresponding targets of *Typhae Pollen*. DrugBank, OMIM, TTD, and GeneCard databases were used to obtain the targets of spinal cord injury. Cytoscape constructed PPI network diagram and drug-compound-target network diagram, and screened the key targets and components of *Typhae Pollen* against cord injury according to topological parameters of each target in the network diagram. DAVID database was used to analyze the GO function and KEGG enrichment of the anti-spinal cord injury targets of *Typhae Pollen*. Autodock Vina software was used for molecular docking verification of key compounds and key target proteins. Animal experiments were conducted to observe the effect of *Typhae Pollen* on the motor nerve function of hind limbs and the expression of key target protein mRNA in rats with spinal cord injury. **Results** A total of arachidonic acid, isorhamnetin, β sitosterol, kaempferol, testosterone palmitate, kaempferol-3-O- α -L-rhamnosyl(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucoside-qt, quercetin, isorhamnetin-3-O-neohesperidoside, ctyphloside and other active ingredients were screened. PPI network analysis showed that TNF, IL-6, AKT1, IL-1B, CASP3 and other proteins may

收稿日期: 2022-04-18

作者简介: 王国栋 (1981—), 主治医师, 硕士, 主要从事创伤急救, 创伤骨科方面的工作。E-mail: hnxx720@sina.com

play a key role in the treatment of spinal cord injury. Gene ontology (GO) analysis of the anti-spinal cord injury targets of *Typhae Pollen* showed that the biological processes mainly involve the reaction to lipopolysaccharide, the reaction to bacterial molecules, the cellular response to chemical stress, and the regulation of reactive oxygen metabolism. The enrichment analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) showed that the pathways with high enrichment significance mainly included TNF signaling pathway, TLR signaling pathway, and MAPK signaling pathway. Molecular docking showed that the affinity between key active components and key target protein molecules was good. Animal experimental results showed that compared with the model group, *Typhae Pollen* could effectively promote the recovery of hind limb movement, decrease the mRNA expression of TNF, IL-6, IL-1B and CASP3, and increase the mRNA expression of AKT1 in rats with spinal cord injury ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Quercetin, kaempferol, isorhamnetin, β -sitosterol and other active ingredients in *Typhae Pollen* may affect inflammatory and apoptosis-related pathways by acting on TNF, IL-6, AKT1, IL-1B, CASP3 and other targets.

Key words: *Typhae Pollen*; spinal cord injury; network pharmacology; molecular docking; quercetin; kaempferol; isorhamnetin; β -sitosterol

脊髓损伤是一种创伤性事件,在交通、劳动和运动事故中很常见,是一种严重的中枢神经系统致残损伤,其特点是在损伤后立即严重丧失感觉、运动或自主神经功能^[1]。脊髓损伤的影响不仅会影响个人的健康,还会给家庭和社会带来巨大的经济负担^[2-3]。据报道,脊髓损伤的发病率在世界范围内不断上升,尤其是在亚洲^[4]。在我国,由车祸、建筑和采矿事故引起的脊髓损伤数量在过去 10 年中增加了 10 倍。

目前脊髓损伤的治疗方法是神经营养素,但神经营养素的相对分子质量相对较大,难以跨越血脑屏障。另外,由于酶的降解,治疗效果会严重降低。此外,神经营养素的价格非常昂贵,剂量和频率相对较高。除了上述缺点外,还存在显著的不良反应。因此,需要探索新的治疗策略来治疗脊髓损伤。近年来中药治疗脊髓损伤的研究显著增加。蒲黄是一种传统的中草药,具有较低的毒性和不良反应^[5-6]。蒲黄具有止血祛瘀功效,在临床上广泛用于治疗出血性疾病。近年来,研究发现,蒲黄能够改善脊髓损伤大鼠肢体功能后肢运动功能,促进急性脊髓损伤大鼠模型的康复^[7-8]。另外,蒲黄可使脊髓损伤模型大鼠脱髓鞘的面积明显的减少,前角运动神经元显著增多,对脊髓损伤大鼠具有神经保护作用^[9-10]。但其作用机制尚不明确。

网络药理学以系统生物学和药理学为基础,提供了一种新的“多目标、多渠道、多链接”网络模型。它为中医从经验医学向循证医学的转变提供了一种新的研究范式。网络药理学已经成为探索中医药潜在机制不可或缺的方法^[11-12]。本研究通过寻找蒲黄中有效成分和靶蛋白,构建靶点网络,确定网络中的核心靶点,并进行生物功能和途径富集分

析。通过分子对接技术验证蒲黄有效成分与核心靶点之间的结合作用,从分子水平探讨蒲黄治疗脊髓损伤的可能药理机制。

1 资料与方法

1.1 蒲黄活性成分的筛选

在 TCMSP 数据库 (<https://tcmsp-e.com/>)^[13] 中搜索蒲黄中所含化学成分及其药动学数据。活性成分筛选标准为口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 , 符合此条件的化合物被视为候选活性成分。同时查阅相关文献,建立蒲黄活性化合物成分数据库。

1.2 蒲黄抗脊髓损伤作用靶点的获得

在 TCMSP 数据库中查询活性化合物相应作用靶点,合并,即为蒲黄活性成分作用靶点。使用 Drug Bank (<https://www.drugbank.com/>), OMIM (<https://omim.org/>), TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>), Gene Card (<https://www.genecards.org/>) 数据库查询脊髓损伤相关靶点,剔除非人源基因,合并。二者使用韦恩 (Venn) 图 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 取交集,交集靶点即为蒲黄抗脊髓损伤作用靶点。

1.3 蒲黄抗脊髓损伤靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络图及关键靶点蛋白的筛选

将蒲黄抗脊髓损伤作用靶点输入 String 数据库 11.0 版 (<https://string-db.org/>), 获得 PPI 的数据文件。随后将此文件导入 Cytoscape (v3.6.1), 获得蒲黄抗脊髓损伤靶点蛋白 PPI 网络图。根据 PPI 网络图中各靶点的点度中心性 (degree)、中介中心性、接近中心性等拓扑学参数筛选出关键靶点。这些参数值越大说明此节点在网络中越重要^[14]。选取数据排名前 10 位的蛋白为核心靶点蛋白。

1.4 蒲黄治疗脊髓损伤的“药物-化合物-交集靶点”网络图及关键化合物的获得

将蒲黄活性成分及其对应靶点导入 Cytoscape 软件 (v3.6.1), 构建“药物-化合物-靶点”网络图。在网络图中, 节点表示中药、活性成分或作用靶点作用通路, 边用来关联相互作用的不同节点。根据活性成分节点的度值筛选蒲黄抗脊髓损伤的关键成分。

1.5 蒲黄抗脊髓损伤靶点的基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 分析

使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对蒲黄抗脊髓损伤靶点进行功能的富集分析, 包括 GO 和 KEGG 分析。GO 分析包括生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 的富集分析。

1.6 分子对接

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载关键靶点蛋白的 PDB 文件, 并对蛋白进行加氢、去水等处理。采用 Autodock Vina 软件对关键化合物与关键靶点蛋白进行分子对接验证, 统计其结合能。Pymol 软件对对接结果进行可视化。一般认为, 结合能 < -5.0 kJ/mol, 表明活性成分与核心靶点基因结合性较好^[15]。

1.7 动物实验

1.7.1 实验动物及药品、仪器 36 只成年雄性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 9~11 周龄, 购自河南省实验动物中心, 许可证号为 SCXK (豫) 2017-0001。本实验经新乡医学院第一附属医院动物伦理委员会批准 (2021048)。大鼠在 (24 ± 3) °C 和 12 h 光/暗循环的合适环境中饲养, 可自由饮食和饮水。适应性喂养 1 周时间。

TRIzol[®]试剂[赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司]; BeyoRT[™] cDNA 第一链合成试剂盒 (RNase H-) (碧云天生物技术有限公司); TB Green[®] Premix Ex Taq[™] I III [宝生物工程 (大连) 有限公司]; LightCycler[®]96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司)。生蒲黄购自北京同仁堂新乡药店, 由新乡医学院中药学教研室张来宾教授鉴定为正品。蒲黄水煎液的制备^[16-17]: 称取 100 g 生蒲黄置于 2 L 的圆底烧瓶中, 加入蒸馏水 1 200 mL, 浸泡 30 min, 加热至煮沸后回流提取 30 min, 过滤提取液, 随后滤渣中加入蒸馏水 1 000 mL, 水沸后再回流提取 20 min, 滤过, 将 2 次滤液合并, 水浴旋转蒸发仪浓缩至 100 mL, 即得 1 g/mL 蒲黄水煎液。调节 pH

值至 7.4 后冷藏备用。

1.7.2 脊髓损伤模型的建立、分组及给药 大鼠 ip 10%水合氯醛 0.4 mL/100 g 麻醉, 俯卧位固定, 无菌条件下, 沿着背部皮肤做一个约 1 cm 的中线切口, 骶棘肌沿棘突两侧切开。在用微型咬骨钳进行 T₈~T₉ 椎板切除术后, 在 T₈~T₉ 节脊柱进行脊髓损伤挫伤模型制作^[18]。为了造成严重挫伤, 将直径为 2.0 mm 的 10 g 击打棍从 50 mm 的高度跌落到暴露的脊髓上, 如损伤部位出现血肿、组织肿胀、后肢快速收缩和震颤说明模型的建立成功^[19-20]。假手术组大鼠仅接受椎板切除术, 不造成冲击伤。造模后 30 min, 造模成功大鼠分为模型组和蒲黄组, 蒲黄组大鼠 ig 10 g/kg 蒲黄水煎液, 假手术组和模型组大鼠 ig 等体积生理盐水。1 次/d, 共 6 周。

1.7.3 大鼠后肢运动神经功能的评价 脊髓损伤后 1~6 周, 第 1、7、14、21、35、42 天采用 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 评分标准^[21]对大鼠后肢的运动神经功能进行评估。BBB 评分将运动功能分为 22 个等级: 0 为完全瘫痪, 21 为正常功能。

1.7.4 苏木精-伊红 (HE) 染色组织学观察 术后第 42 天, 每组 3 只大鼠麻醉并灌流 200 mL 冷盐水, 然后灌流 300 mL 冷 4%多聚甲醛。切除 1 cm 大小的损伤处脊髓, 在 4 °C 的 4%多聚甲醛中固定 24 h。将样品包埋在石蜡中, 并切成 5 μm 厚的切片, 并对切片进行 HE 染色。

1.7.5 总 RNA 制备及实时定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 术后第 42 天, 每组 3 只进行大鼠麻醉, 切除 1 cm 大小的损伤处脊髓。使用 TRIzol[®]试剂从脊髓样本中提取总 RNA。使用 BeyoRT[™] cDNA 第一链合成试剂盒 (RNase H-) 将 RNA 反转录生成 cDNA, 严格按说明书操作。以 cDNA 为模板, 使用 TB Green[®] Premix Ex Taq[™] I II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒配制 PCR 反应液, 在 LightCycler[®]96 qTR-PCR 仪进行反应。使用两步法 PCR 扩增标准程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 共 40 个循环。本研究中使用的引物如下: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 正向 5'-TATGACAACTCCCTCA AGAT-3'、反向 5'-AGAT CCACAACGGATACATT-3'; 半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3), 正向 5'-GGAC CTGTGGACCTGAAA AA-3'、反向 5'-GCATGCCA TATCATCGTCAG-3'; 肿瘤坏死因子 (TNF), 正向 5'-TACTGAACTTCGG GGTGATTGGTCC-3'、反向 5'-CAGCCTTGTCCT

TGAAGAGAACC-3'; 白细胞介素 6 (IL-6), 正向 5'-TAGAGTCACAGAAGGA GTGG-3'、反向 5'-GC CAGTTCTTCGTAGAGAAC-3'; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (AKT1), 正向 5'-CCACAGGTCGCTACT ATGCC-3'、反向 5'-ACAG CCCGAAGTCCGTTAT C-3'; 白细胞介素 1B (IL-1B), 正向 5'-GGGCGGTT CAAGGCATAACA-3'、反向 5'-GTCGAGATGCTG CTGTGAGA-3'。以 GAPDH 为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法对数据进行相对定量分析。

2 结果

2.1 蒲黄活性成分的筛选

从蒲黄的化学成分中, 筛选出 OB/% $\geq$ 30%, DL $\geq$ 0.18 的活性化合物 7 个, 依次为花生四烯酸、异鼠李素、 β 谷甾醇、山柰酚、棕榈酸鞣酮、山柰酚-3-O- α -L-鼠李糖基 (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-葡萄糖苷、槲皮素; 同时查阅相关文献报道^[22-23], 将蒲黄中含量较高的黄酮类化合物异鼠李素-3-O-新橙皮苷和香蒲新苷加入。

2.2 蒲黄抗脊髓损伤的作用靶点

共获得蒲黄作用靶点 218 个, 脊髓损伤疾病靶点 1 027 靶点, 二者的交集靶点及蒲黄抗脊髓损伤靶点共 69 个, 见图 1。

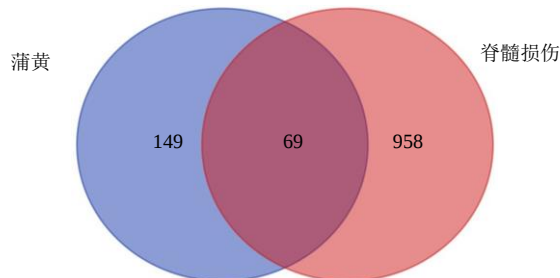


图 1 蒲黄作用靶点与脊髓损伤靶点交集的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersection of *Typhae Pollen* and spinal cord injury targets

2.3 蒲黄抗脊髓损伤靶点蛋白 PPI 网络图

蒲黄抗脊髓损伤靶点蛋白 PPI 网络图见图 2。根据 PPI 网络图中关键靶点的点度中心性、中介中心性、接近中心性等拓扑学参数筛选出排名前 10 位的关键靶点 10 个, 即 TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3、PTGS2、JUN、MMP9、CCL2、CXCL8。

2.4 蒲黄治疗脊髓损伤的“药物-化合物-交集靶点”网络图及关键化合物的获得

蒲黄治疗脊髓损伤的“药物-化合物-交集靶点”网络图见图 3。蒲黄中活性化合物在药物-化

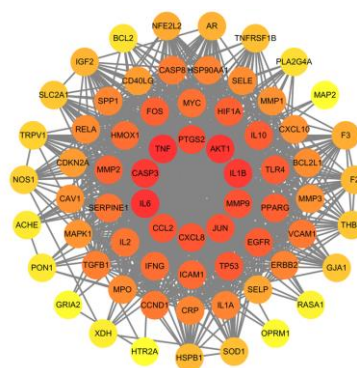


图 2 蒲黄抗脊髓损伤靶点蛋白 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network diagram of *Typhae Pollen* anti spinal cord injury target protein

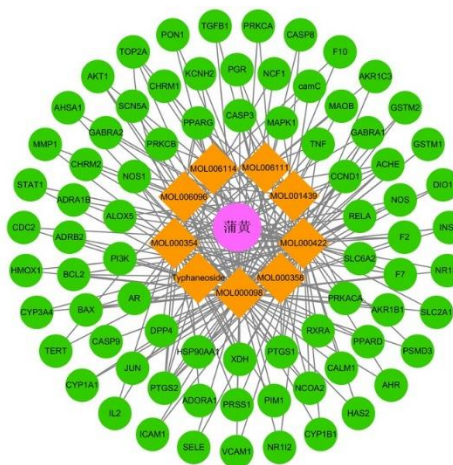


图 3 蒲黄治疗脊髓损伤的“药物-化合物-交集靶点”网络图

Fig. 3 Interaction network diagram of “drug - compound - intersection target” of *Typhae Pollen* for spinal cord injury

合物-靶点互作网络图中的度值见表 1。度值排名前 4 的化合物依次为槲皮素、山柰酚、异鼠李素、 β -谷甾醇。它们可能为蒲黄抗脊髓损伤作用中的关键化合物。

2.5 蒲黄抗脊髓损伤靶点的 GO 分析

蒲黄抗脊髓损伤靶点的 GO 分析结果见图 4。BP 主要涉及对脂多糖的反应、对细菌源性分子的反应、细胞对化学应激的反应及活性氧代谢过程的调控过程等。CC 主要集中在膜筏、膜微区、膜区等。MF 主要涉及细胞因子受体结合、细胞因子活性、受体-配体活性等。

2.6 蒲黄抗脊髓损伤靶点的 KEGG 分析

蒲黄抗脊髓损伤靶点的 KEGG 分析结果见图 5。富集显著性较高的通路主要有 TNF 信号通路、

表 1 蒲黄活性化合物在“药物-化合物-靶点”网络图中的度值

Table 1 Degree values of *Typhae Pollen* active compounds in “drug-compound-target” interaction network diagram

Mol ID	化合物名称	中文名称	度值
MOL000098	quercetin	槲皮素	67
MOL000422	kaempferol	山柰酚	56
MOL000354	isorhamnetin	异鼠李素	25
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	25
MOL001439	arachidonic acid	花生四烯酸	15
MOL006096	isorhamnetin-3-O-neo	异鼠李素-3-O-	8
	hesperidoside	新橙皮糖苷	
—	typhaneoside	香蒲新苷	6
MOL006114	kaempferol-3-O-α-L-r	山柰酚-3-O-α-L-鼠	5
	hamnosyl(1→2)-β-	李糖(1→2)-β-D-	
	D-glucoside_qt	葡萄糖苷_qt	
MOL006111	testosterone palmitate	睾酮棕榈酸酯	3

Toll 样受体 (TLR) 信号通路、MAPK 信号通路等。这表明蒲黄主要通过以上通路来干预脊髓损伤。另外前面筛选的 10 个关键基因中, TNF 信号通路包含 9 个, Toll 样受体 (TLR) 信号通路等包含 6 个, MAPK 信号通路包含 5 个。其中度值排名前 5 位关键靶蛋白分子 (TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3) 均同时存在于 3 个信号通路中。KEGG 富集信号通路与靶点基因相互关系网络图见图 6。

2.7 分子对接结果

度值排名前 4 位的槲皮素、山柰酚异鼠李素、β-谷甾醇与度值排名前 5 位关键靶蛋白分子 (TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3) 对接结合能均 < -6.0 kcal/mol (1 cal = 4.4 J)。说明互相之间亲和力良好, 尤其 AKT1、IL-1B、CASP3 等与关键成分亲和力更高, 结合能均 ≤ -6.5 kcal/mol, 见表 2。

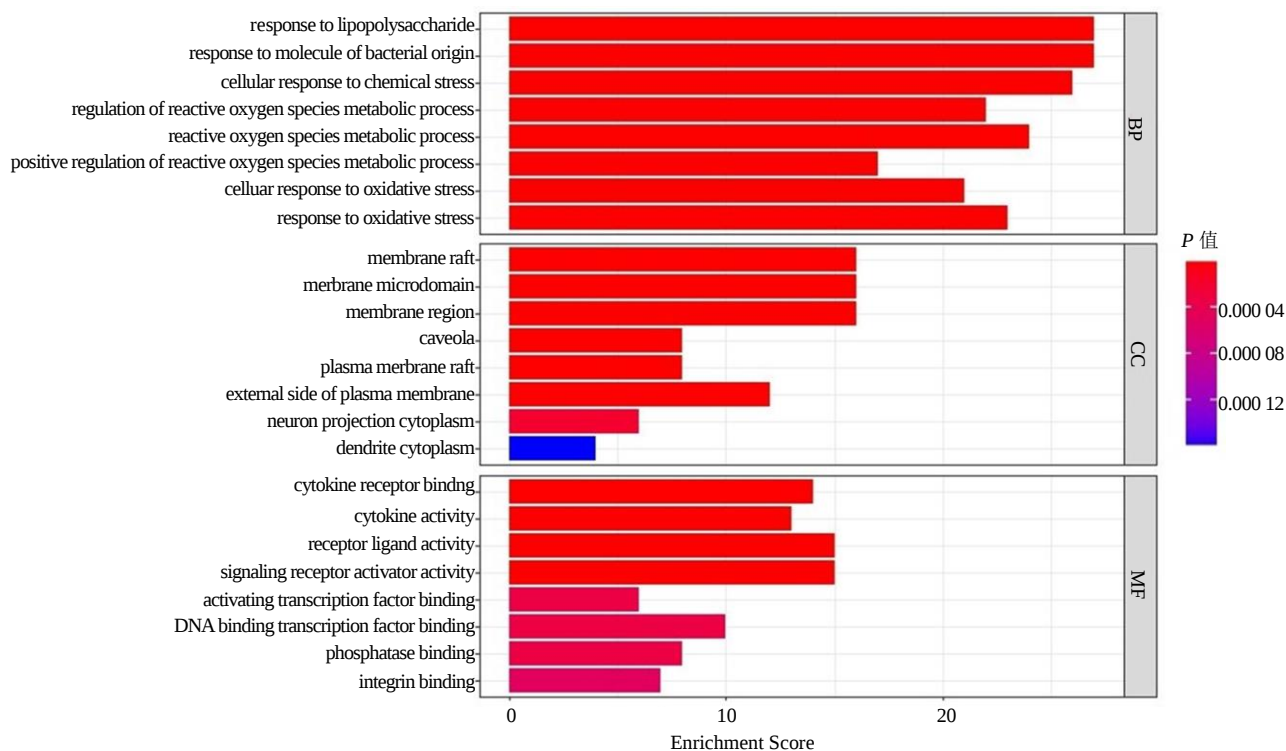


图 4 蒲黄抗脊髓损伤靶点的 GO 分析结果图

Fig. 4 GO analysis results of *Typhae Pollen* against spinal cord injury targets

2.8 动物实验结果

2.8.1 BBB 评分 假手术组在各时间点后肢运动功能的 BBB 评分均为 21 分, 给药前, 模型组和蒲黄组的 BBB 评分均 < 1, 提示造模成功。术后 3 周开始, 蒲黄组 BBB 评分开始显著高于模型组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。说明蒲黄组有助于后肢功能的恢复,

见图 7。

2.8.2 HE 染色结果 如图 8 所示, 假手术组脊髓灰质和白质的界限比较清楚, 神经元形态完整, 外周的白质结构致密。模型组可见脊髓损伤部位有广泛的出血性损伤, 脊髓结构紊乱, 灰质和白质的界限不明, 并伴有炎症细胞浸润, 白质中可见大量空

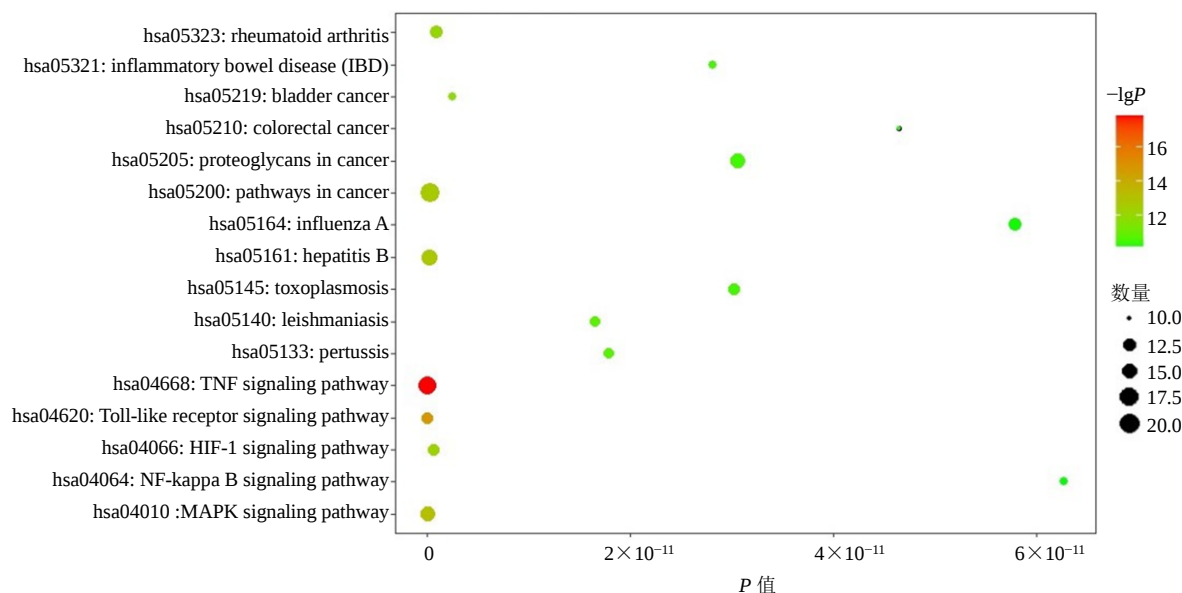


图 5 蒲黄抗脊髓损伤靶点的 KEGG 分析结果

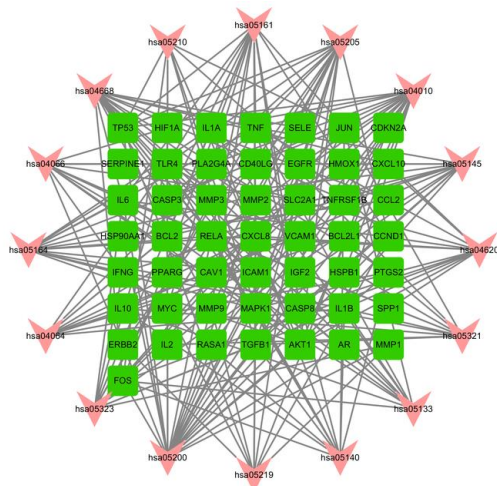
Fig. 5 KEGG analysis results of the anti-spinal cord injury target of *Typhae Pollen*

图 6 KEGG 富集信号通路与靶点基因相互关系网络图

Fig. 6 Network diagram of correlation between KEGG enrichment signaling pathway and target genes

表 2 关键靶蛋白分子对接的结合能

Table 2 Binding energy of active ingredients with key target protein molecules

活性成分	结合能/(kcal mol ⁻¹)				
	TNF	IL-6	AKT1	IL-1B	CASP3
quercetin	-6.3	-6.3	-6.6	-7.3	-6.5
kaempferol	-6.0	-6.1	-6.8	-7.2	-6.8
isorhamnetin	-6.1	-6.1	-6.8	-7.2	-6.7
beta-sitosterol	-6.6	-6.4	-6.7	-6.6	-7.0

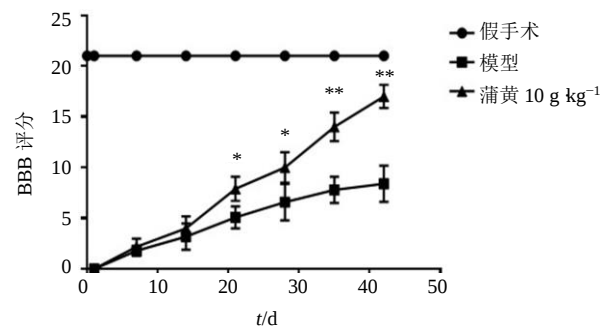
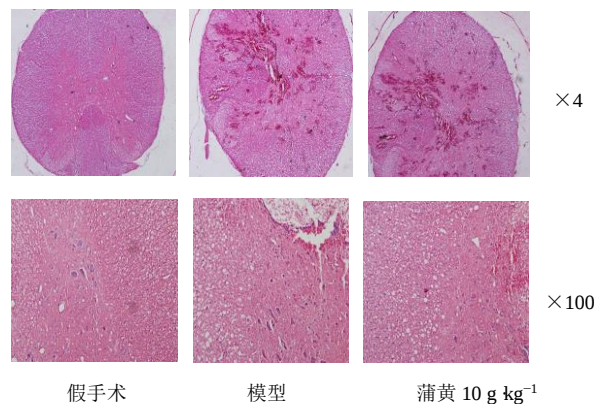
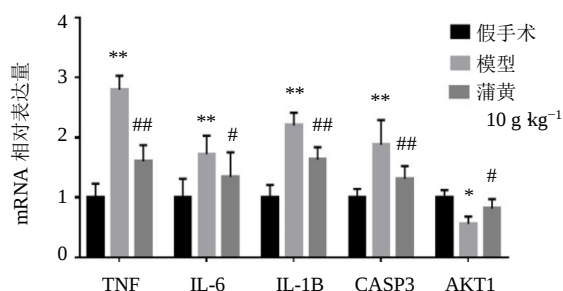
与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group图 7 各组 BBB 评分结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)Fig. 7 BBB scores in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

图 8 各组大鼠脊髓 HE 染色结果

Fig. 8 HE staining results of spinal cord of rats in each group

泡。蒲黄组镜下可见损伤区也有出血坏死,但脊髓组织的损伤程度与模型组相比稍轻,空泡区比模型组减少且变小,炎症反应程度也相应减轻。

2.8.3 蒲黄对 TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3 mRNA 表达的影响 与假手术组相比,模型组 TNF、IL-6、IL-1B、CASP3 mRNA 的表达明显升高 ($P < 0.01$), AKT1 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比,蒲黄组 TNF、IL-6、IL-1B、CASP3 mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), AKT1 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$), 见图 9。



与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

$P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs

model group

图 9 蒲黄对 TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Effects of *Typhae Pollen* on mRNA expressions of TNF, IL-6, AKT1, IL-1B and CASP3 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

本研究采用网络药理学方法和分子对接实验揭示了蒲黄的生物活性成分及其治疗脊髓损伤的分子机制。建立了蒲黄抗脊髓损伤靶点 PPI 网络,通过度值显示, TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3 等蛋白可能在脊髓损伤的治疗中起关键作用。蒲黄抗脊髓损伤靶点的 KEGG 富集分析显示富集显著性较高的通路主要有 TNF 信号通路、Toll 样受体 (TLR) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路等,表明蒲黄对主要通过以上通路来干预脊髓损伤。

脊髓损伤是一种涉及多种病理生理变化的急性创伤性疾病。脊髓损伤诱导的继发性损伤涉及多种途径。脊髓损伤的恢复和临床结果与脊髓损伤后的炎症反应、神经元凋亡和氧化应激密切相关。因此,预防炎症和细胞凋亡有助于改善脊髓损伤的预后^[23]。在大鼠脊髓损伤模型中,细胞凋亡在损伤后 4 h 开始, 7 d 达到高峰^[24]。脊髓损伤的主要病理特

征是神经元凋亡。Caspase-3 是诱导细胞凋亡的外源性和内源性途径的交叉点^[25]。凋亡小体激活 Caspase-9 并裂解 Caspase-3, 形成活性 Caspase-3, 以促进凋亡的发生, 进而导致细胞在凋亡的最后阶段降解^[26]。

蛋白激酶 B (Akt) 在细胞存活和凋亡中起重要作用。Akt 磷酸化并使促凋亡的 Bad 蛋白失活, 减少脑缺血后的细胞凋亡^[27]。Akt 还抑制 pro-Caspase-9 和 Caspase-9 磷酸化的激活, 防止凋亡激活^[28]。据报道, MiR-212-3p 通过激活 Akt/mTOR 通路, 促进脊髓损伤模型大鼠恢复并抑制神经细胞凋亡^[29]。绞股蓝皂苷 XVII (GP 17) 在脊髓损伤中的神经保护作用与增加脊髓损伤后 Akt 的磷酸化水平有关^[30]。

另外研究发现, 脊髓损伤后促炎细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的表达水平显著升高^[31]。IL-1 β 可诱导炎症反应, 并具有损伤、感染和免疫反应的多种特征^[32]。IL-6 是炎症反应中的一种重要细胞因子, 具有促进炎症的特性^[33]。TNF- α 是一种由淋巴 T 细胞分泌的促炎症细胞因子, 在炎症和凋亡等多种过程中发挥重要作用^[34]。脊髓损伤后, TNF- α 诱导的大量脱髓鞘与损伤部位残留轴突的降解、巨噬细胞诱导的髓鞘吞噬作用的升高以及具有髓鞘再生能力的残留少突胶质细胞的死亡有关^[35]。

Toll 样受体 4 (TLR4) 是先天性免疫反应中的关键角色, 研究表明 TLR4 缺陷小鼠的炎症和损伤相关介质显著减少, TLR4 通过 PI3K/Akt 信号传导磷酸化 NF- κ B p65, 同时激活下游通路和释放炎症因子^[36], 并促进炎症反应。在脊髓损伤大鼠中, DL-3-n- 丁基苯酚可通过抑制小胶质细胞 TLR4/NF- κ B 信号减少急性胶质细胞活化^[37]。另外 MAPK 是一组在促炎细胞因子表达中起重要作用的信号分子。急性脊髓损伤后, MAPK 信号通路激活有助于小胶质细胞介导促炎因子^[38]。MAPK 家族是参与产生与炎症反应相关的细胞因子和介质的关键信号分子之一^[39]。

本研究最终筛选得到 10 个关键靶点基因, 其中中度中心性和接近中心性均比较大的前 5 位靶点基因为 TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3。在筛选的 10 个关键基因中, TNF 信号通路包含 9 个, TLR 信号通路等包含 6 个, MAPK 信号通路包含 5 个, 其中度值排名前 5 位关键靶蛋白分子均同时存在于 3 个信号通路中。将槲皮素、山柰酚、异鼠李

素、 β -谷甾醇与关键靶蛋白分子(TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3)进行分子对接,结果显示相互之间亲和力良好,分子对接的结合能均 <-6.0 kcal/mol。这表明蒲黄的药效机制有充分的物质基础,主要通过预防炎症和细胞凋亡进而改善脊髓损伤的预后。为了证实上述网络药理学分析结果,本研究还进行了脊髓损伤大鼠模型动物验证实验,结果表明,蒲黄能有效促进后肢运动恢复,明显降低TNF、IL-6、IL-1B、CASP3 mRNA 表达($P<0.05$ 、 0.01),升高 AKT1 mRNA 表达($P<0.05$),与模型组相比。这些结果表明,通过上述机制,蒲黄与抗脊髓损伤的关键靶蛋白和信号通路密切相关。

综上所述,蒲黄中的槲皮素、山柰酚、异鼠李素、 β -谷甾醇等活性成分可能通过作用于 TNF、IL-6、AKT1、IL-1B、CASP3 等靶点,进而影响炎症及凋亡相关的通路,如 TNF 信号通路、TLR 信号通路、MAPK 信号通路等,进而发挥治疗脊髓损伤的作用。蒲黄对脊髓损伤具有潜在的多靶点、多途径的治疗作用,为其活性成分和作用机制的深入研究提供了依据和线索。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Galea M P. Spinal cord injury and physical activity: Preservation of the body [J]. *Spinal Cord*, 2012, 50(5): 344-351.
- [2] Pickelsimer E, Shiroma E J, Wilson D A. Statewide investigation of medically attended adverse health conditions of persons with spinal cord injury [J]. *J Spinal Cord Med*, 2010, 33(3): 221-231.
- [3] Furlan C, Noonan V, Singh A, et al. Assessment of impairment in patients with acute traumatic spinal cord injury: A systematic review of the literature [J]. *J Neurotrauma*, 2011, 28(8): 1445-1477.
- [4] Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, et al. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury [J]. *Clin Epidemiol*, 2014, 6: 309-331.
- [5] Ohkura N, Tamura K, Tanaka A, et al. Experimental study on the hemostatic activity of *Pollen Typhae*: A traditional folk medicine used by external and oral application [J]. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2011, 22(8): 631-636.
- [6] 陈瑾, 郝二伟, 冯旭, 等. 蒲黄化学成分、药理作用及质量标志物(Q-marker)的预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4729-4740.
- [7] 刘永辉, 赵烨, 王向阳, 等. 蒲黄对急性脊髓损伤大鼠 PARP1/MAPK 信号通路基因表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(6): 3133-3137.
- [8] 孔亮, 朱文潇, 刘蓓, 等. 中药蒲黄对急性脊髓损伤大鼠模型伤后行为能力的影响 [J]. *中国骨科临床与基础研究杂志*, 2019, 11(5): 288-292.
- [9] Wang W, Guo Z, Xu Z, et al. Effect of *Pollen Typhae* on inhibiting autophagy in spinal cord injury of rats and its mechanisms [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(3): 2375-2383.
- [10] 王卫国, 徐展望. 中药蒲黄对脊髓损伤大鼠的神经保护作用 [J]. *检验医学*, 2016, 31: 285-287.
- [11] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [12] 常裕坤, 阮一蔚, 朱亮亮, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨三七治疗腰椎间盘突出症的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2022, 37(6): 1203-1210.
- [13] Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [14] 唐标, 唐文静, 邓常清. 基于网络药理学的黄芪和三七主要有效成分配伍抗缺血性脑损伤作用机制研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2019, 26(7): 109-113.
- [15] Hsin K Y, Ghosh S, Kitano H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [16] 陈士林, 刘安, 李琦, 等. 中药饮片标准汤剂研究策略 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(8): 1367-1375.
- [17] 谢冉, 郝单丽, 易红, 等. 生蒲黄标准汤剂质量评价 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(7): 88-93.
- [18] Gruner J A. A monitored contusion model of spinal cord injury in the rat [J]. *J Neurotrauma*, 1992, 9(2): 123-126.
- [19] Meng H Y, Shao D C, Li H, et al. Resveratrol improves neurological outcome and neuroinflammation following spinal cord injury through enhancing autophagy involving the AMPK/mTOR pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(2): 2237-2244.
- [20] Engesser-Cesar C, Anderson A J, Basso D M, et al. Voluntary wheel running improves recovery from a moderate spinal cord injury [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(1): 157-171.
- [21] 陈向荣, 游思维, 金大地. BBB 评分评估脊髓损伤大鼠后肢运动功能的探讨 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2004(9): 35-37.
- [22] 陈路晓, 刘斌, 郭凤霞, 等. 蒲黄药材中香蒲新苷和异鼠李素-3-O-新橙皮苷含量测定方法优化研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2016, 39(4): 304-307.
- [23] Kim H Y, Kumar H, Jo M J, et al. Therapeutic

- efficacy-potentiated and diseased organ-targeting nanovesicles derived from mesenchymal stem cells for spinal cord injury treatment [J]. *Nano Lett*, 2018, 18(8): 4965-4975.
- [24] Alizadeh A, Dyck S M, Karimi-Abdolrezaee S. Traumatic spinal cord injury: An overview of pathophysiology, models and acute injury mechanisms [J]. *Front Neurol*, 2019, 10: 282.
- [25] Ren X D, Wan C X, Niu Y L. Overexpression of lncRNA TCTN2 protects neurons from apoptosis by enhancing cell autophagy in spinal cord injury [J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(7): 1223-1231.
- [26] Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: Master regulators of danger signalling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(12): 780-788.
- [27] Kamada H, Nito C, Endo H, *et al.* Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(3): 521-533.
- [28] Cardone M H, Roy N, Stennicke H R, *et al.* Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation [J]. *Science*, 1998, 282(5392): 1318-1321.
- [29] Guan C, Luan L, Li J, *et al.* MiR-212-3p improves rat functional recovery and inhibits neurocyte apoptosis in spinal cord injury models via PTEN downregulation-mediated activation of AKT/mTOR pathway [J]. *Brain Res*, 2021, 1768: 147576.
- [30] Sun T, Duan L, Li J, *et al.* Gypenoside XVII protects against spinal cord injury in mice by regulating the microRNA-21-mediated PTEN/AKT/mTOR pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(2): 146.
- [31] Zhou Q, Jin H, Shi N, *et al.* Inhibit inflammation and apoptosis of pyrroloquinoline on spinal cord injury in rat [J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(17): 1360.
- [32] Dinarello C A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity [J]. *Immunol Rev*, 2018, 281(1): 8-27.
- [33] Naugler W E, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(3): 109-119.
- [34] Majid D S. Tumor necrosis factor- α and kidney function: experimental findings in mice [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2011, 691: 471-480.
- [35] Chen K B, Uchida K, Nakajima H, *et al.* Tumor necrosis factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 2011, 36(17): 1350-1358.
- [36] Shao Q H, Yan W F, Zhang Z, *et al.* Nurr1: A vital participant in the TLR4-NF- κ B signal pathway stimulated by α -synuclein in BV-2 cells [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 144: 388-399.
- [37] He Z, Zhou Y, Lin L, *et al.* DL-3-n-butylphthalide attenuates acute inflammatory activation in rats with spinal cord injury by inhibiting microglial TLR4/NF- κ B signaling [J]. *J Cell Mol Med*, 2017, 21(11): 3010-3022.
- [38] Liu G, Fan G, Guo G, *et al.* FK506 attenuates the inflammation in rat spinal cord injury by inhibiting the activation of NF- κ B in microglia cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2017, 37(5): 843-855.
- [39] Liu R P, Zou M, Wang J Y, *et al.* Paroxetine ameliorates lipopolysaccharide-induced microglia activation via differential regulation of MAPK signaling [J]. *J Neuroinflammation*, 2014, 11: 47.

[责任编辑 高源]