

基于网络药理学、分子对接技术及实验验证探讨新橙皮苷治疗创伤性脑损伤作用机制

王伸盛, 张新中*, 张岱男, 岳双柱, 杨卫洸, 李文超

新乡医学院第一附属医院 河南省神经修复重点实验室, 河南 新乡 453100

摘要: **目的** 探讨新橙皮苷治疗对创伤性脑损伤大鼠的影响其潜在机制。**方法** 借助 TCMSP、PharmMapper、OMIM、GeneCards 等数据库并结合文献资料补充, 获取药物、疾病相关靶点, 通过 STRING 数据库构建新橙皮苷治疗与创伤性脑损伤疾病靶点蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 利用 Cytoscape 软件对 PPI 网络进行拓扑分析, 筛选得到核心靶点, 基于 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 功能与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 并通过 Autodock Vina 软件模拟新橙皮苷与关键靶点蛋白可能的对接结果。通过 Feeney's 法构建 SD 大鼠创伤性脑损伤模型, 造模后进行改良大鼠神经功能缺损严重程度评分 (mNSS); 通过尼氏染色观察神经元病理学改变, 利用 TUNEL 染色观察神经元凋亡情况, ELISA 法测定脑组织损伤灶炎症因子白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 表达水平, qRT-PCR 法检测脑组织损伤灶血管内皮生长因子 (VEGF)、酪氨酸蛋白激酶 (SRC)、蛋白激酶 B1 (Akt1) mRNA 表达水平。**结果** 共获取得到药物-疾病交集靶点 85 个, 筛选得到核心靶点 10 个, 主要包括基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、表皮生长因子受体 (EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 8、IL-6、SRC、TNF、Akt1 等。通过 KEGG 通路分析结果显示, 关键靶点可能集中在 VEGF 信号通路、TNF 通路、Rap1 信号通路等信号通路。新橙皮苷与核心靶点 MMP9、EGFR、MAPK8、IL-6、TNF、Akt1 等均有较好的亲和力。动物实验发现, 新橙皮苷治疗改善了创伤性脑损伤大鼠的神经功能, 减少神经细胞损伤, 抑制细胞凋亡 ($P < 0.05$), 新橙皮苷治疗使大鼠脑组织中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 表达水平明显下调 ($P < 0.05$), VEGF、SRC、Akt1 mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$)。**结论** 新橙皮苷可能作用于 MAPK8、IL-6、SRC、TNF、Akt1 等核心靶点, 通过 VEGF 信号通路、TNF 通路等多条信号通路发挥治疗创伤性脑损伤的作用, 具有多靶点、多通路的特点。

关键词: 新橙皮苷; 创伤性脑损伤; 网络药理学; 分子对接; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2024)04-0857-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.04.007

Mechanism of neohesperidin in treatment of traumatic brain injury based on network pharmacology, molecular docking technique and animal experiments

WANG Shensheng, ZHANG Xinzhong, ZHANG Dainan, YUE Shuangzhu, YANG Weilong, LI Wenchao

The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Henan Key Laboratory of Neural Regeneration and Repairment, Xinxiang 453100, China

Abstract: Objective To study the effect of neohesperidin on traumatic brain injury in rats and explore its potential mechanism. **Methods** To obtain relevant targets of drugs and diseases by TCMSP, PharmMapper, OMIM, GeneCards and other databases and supplemented with literature. Construct the target PPI network between neohesperidin therapy and traumatic brain injury disease through STRING database. GO function and KEGG enrichment were analyzed based on the DAVID database, and the possible docking results of neohesperidin with key target proteins were simulated by Autodock Vina software. The model of traumatic brain injury in SD rats was established by Feeney's method, and the modified neurological impairment severity score (mNSS) was performed after the model. The pathological changes of neurons were observed by Nishi staining, the apoptosis of neurons was observed by TUNEL staining, and the expression levels of inflammatory factors IL-6, IL-1 β , and TNF- α were measured by ELISA. The mRNA expression levels of VEGF, SRC, and Akt1 were detected by qRT-PCR. **Results** A total of 85 drug-disease intersection targets were obtained,

收稿日期: 2023-12-11

基金项目: 河南省医学科技攻关计划项目 (212102310708); 河南省神经修复重点实验室开放课题 (HNSJXF-2021-001)

作者简介: 王伸盛, 男, 硕士研究生, 研究方向为颅脑损伤后神经修复的应用研究。E-mail: wss20211011@163.com

*通信作者: 张新中, 男, 教授, 医学博士, 主任医师, 研究方向为颅脑损伤后神经修复的应用研究。E-mail: xinzhong1957@163.com

and 10 core targets were screened, including MMP9, EGFR, MAPK8, IL-6, SRC, TNF, Akt1, etc. KEGG pathway analysis showed that the key targets may focus on the VEGF signaling pathway, TNF signaling pathway, Rap1 signaling pathway and other signaling pathways. Neohesperidin has a good affinity with the core targets MMP9, EGFR, MAPK8, IL-6, TNF, Akt1, etc. Animal experiments showed that neohesperidin treatment improved nerve function, reduced nerve cell injury and inhibited apoptosis ($P < 0.05$), and neohesperidin treatment significantly decreased the expression levels of inflammatory factors IL-6, IL-1 β and TNF- α in rat brain tissue ($P < 0.05$). The mRNA expression levels of *VEGF*, *SRC*, and *Akt1* were significantly up-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Neohesperidin may act on MAPK8, IL-6, SRC, TNF, Akt1, and other core targets, and play a role in the treatment of traumatic brain injury through multiple signaling pathways such as VEGF signaling pathway and TNF pathway, which has the characteristics of multi-target and multi-pathway.

Keywords: neohesperidin; traumatic brain injury; network pharmacology; molecular docking; IL-6; TNF- α

创伤性脑损伤是指由外部物理力量引起的大脑神经功能障碍^[1]。据统计,全世界每年有 5 000 多万人遭受颅脑损伤^[2]。颅脑损伤包括原发性和继发性,原发性损伤与大脑的原发外部影响直接相关,继发性损伤在原发性损伤后几分钟到几天内发生,通过氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等机制,进一步损害神经细胞,破坏血脑屏障,引起严重脑水肿^[3]。研究发现,继发性脑损伤在很大程度上决定了颅脑损伤患者的预后情况^[4]。

新橙皮苷是一种二氢黄酮苷类化合物,作为一种传统中药枳实的主要成分,具有抗氧化^[5]、降低炎症反应^[6]、抗凋亡^[7]等作用。研究表明,新橙皮苷可以穿透血脑屏障^[8],即使在大鼠中每天 750 mg/kg 剂量持续 91 d 未见明显毒性反应^[9]。新橙皮苷在脑缺血实验中通过抑制神经细胞的凋亡和氧化应激,减轻神经元损伤,增强大脑的抗氧化能力,从而减轻脑缺血再灌注损伤,显著改善神经功能^[10],但对大鼠创伤性脑损伤后的神经保护机制尚未见报道。

网络药理学以广泛的数据库为基础,已成为系统揭示复杂生物系统功能和行为的有力工具,可全面揭示多成分药物植物中多成分-多靶点-多通路的作用机制^[11],本研究利用通过网络药理学方法及动物实验探讨新橙皮苷治疗创伤性脑损伤的神经保护作用机制,为后续药物研发的开展提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 72 只,体质量(200 $\pm$ 20) g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,动物生产合格证号 SCXK(鲁)20220006,此实验经过新乡医学院第一附属医院伦理委员会批准,动物实验伦理批文号 EC-022-206。

1.2 主要试剂与仪器

新橙皮苷(质量分数 $\geq$ 97%,批号 N886330)

购于上海麦克林生化科技股份有限公司;ELISA 试剂盒购自武汉菲恩生物科技有限公司;TUNEL 试剂盒购自武汉赛维尔生物科技有限公司;PCR 引物购自上海生工公司;RNA 提取及逆转录试剂盒购自天根生化科技(北京)公司;倒置荧光显微镜成像系统购自德国 Carl Zeiss 公司,Quantitation DX 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

1.3 网络药理学

1.3.1 新橙皮苷靶点的预测 使用 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、PharmMapper 数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)和 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>),并查阅相关文献,对新橙皮苷的潜在靶点进行预测,在去重后,经 Uniprot 蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)将靶点信息进行规范化处理。

1.3.2 创伤性脑损伤靶点的收集 基于 OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)和 TCMIP 数据库(<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php>)^[12]、Drug Bank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)、Pharmgkb 数据库(<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>),以关键词“traumatic brain injury”进行检索,获得创伤性脑损伤的疾病靶点,合并数据去重后,利用 UniProt 数据库将靶点信息进行规范化处理。

1.3.3 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建和核心靶点筛选 使用 Venny 2.1.0 获得新橙皮苷、创伤性脑损伤的交集靶点并绘制 Venn 图,并导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)中,设置种属为“Homo sapiens”,得到 PPI 网络,利用 Cytoscape 3.8.0 的 Network Analysis 插件对得到的 PPI 网络进行拓

扑分析,应用 CytoHubba 插件基于最大团中心性(MCC)算法来确定 PPI 排名前 10 位的节点作为核心靶点。

1.3.4 靶点基因本体(GO)功能与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 利用 David 数据库(<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>),对新橙皮苷-创伤性脑损伤交集靶点进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析,设置物种为“Homo sapiens”,其中 GO 功能分析包括生物功能(BP)、细胞成分(CC)、分子功能(MF)3 部分,将结果导入微生信软件,画图并分析。

1.3.5 分子对接^[13]验证新橙皮苷与核心靶点的结合能力 在 PubChem 数据库获取新橙皮苷的结构式,将 1.3.3 项下筛选的核心靶点作为分子对接的靶点蛋白,靶点蛋白结构从 PDB 数据库获得 PDB ID,在 PDB 数据库中下载蛋白 3D 结构。用 Pymol 和 Autodock 软件对靶点蛋白进行去水、去配体、加氢、分配电荷处理,采用 AutoDockTools 1.5.7 软件完成分子对接,最后利用 PyMol 软件处理结果。

1.4 动物实验验证

1.4.1 分组、造模与给药 将大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为假手术组、模型组和新橙皮苷组,每组 24 只。模型组和新橙皮苷组采用改良 Feeney's 法造模,即沿头部中线切开皮肤,分离皮下组织暴露颅骨,定位右侧中线旁 2.5 mm,冠状缝后 1.5 mm 处,使用颅骨磨钻打开直径约 5 mm 骨窗,保持硬脑膜完整,调节自由落体打击装置,对准骨窗,于 30 cm 处使用 20 g 砝码自由落体打击骨窗,假手术组只头皮切开、游离骨膜、打开骨窗,不进行自由落体打击。脑损伤大鼠出现短暂的呼吸暂停、四肢抽搐且昏迷 2 h 以上者为造模成功^[14]。新橙皮苷组于脑损伤后 ip 生理盐水稀释的新橙皮苷 40 mg/kg,给药剂量参考文献报道^[11]设置,假手术组和模型组给予 ip 等量的生理盐水,1 次/d,共给药 7 d。

1.4.2 大鼠神经功能评估 于造模后第 1、2、3、5、7 天对各组大鼠采用神经功能缺损(mNSS)法进行评估,mNSS 评分包括运动、感觉、反射和平衡测试,评分越高表明大鼠神经功能障碍越严重。

1.4.3 大鼠脑组织病理观察 采用尼氏染色法进行观察。每组选取造模后 3 d 大鼠 5 只,ip 戊巴比妥钠麻醉,用生理盐水和 4%多聚甲醛心脏灌注后断头取脑,用 4%多聚甲醛固定液固定,石蜡包埋切片,行尼氏染色,镜下观察脑组织神经元细胞病理

形态学,并拍照记录。

1.4.4 大鼠脑组织凋亡细胞情况 采用 TUNEL 染色法进行观察。取 1.4.3 项下脑组织石蜡切片,参照 TUNEL 试剂盒说明书步骤进行检测,依次采用 TUNEL 反应混合液、DAPI 染色,封片后使用荧光显微镜观察损伤灶及周围脑组织并拍照,每张切片中随机取 6 个视野,使用 Image J 图像分析软件计数凋亡细胞和总细胞(结果取平均值),计算凋亡率。

凋亡率=凋亡细胞数/总细胞数

1.4.5 大鼠脑组织中炎症因子含量测定 每组选取造模后 3 d 大鼠 5 只,ip 戊巴比妥钠麻醉,断头取脑,取损伤灶及边缘 2 mm 区域,按照脑湿质量与生理盐水 100 mg:0.9 mL 的比例进行组织匀浆,经研磨仪破碎处理,离心后取其上清液,采用 ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 含量,具体操作参照相应试剂盒说明书。

1.4.6 qRT-PCR 法检测大鼠脑组织血管内皮生长因子(VEGF)、酪氨酸蛋白激酶(SRC)、蛋白激酶 B1(Akt1)mRNA 表达水平 根据试剂盒说明书操作从受损脑组织中提取 RNA。经逆转录扩增后,采用荧光定量 PCR 仪(QuantStudio DX)进行常规溶解曲线分析,测定 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组目的基因的表达水平,结果以 β -actin 作为内参基因,引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence

基因名称	引物序列(5'-3')
SRC	正向: TCTCCGATGTGCTGGCTTTG
	反向: TCTCCTACGTGCTGGCTTTG
Akt1	正向: TTCTTTGCCAAGATCGTGTG
	反向: TAGGAGAAGCTTCATCAGGCG
VEGF	正向: CAATCATGAAGCCCTGGAGT
	反向: TCTCCTATGTGCTCGCTTTG
β -actin	正向: TGGCACCACAGCTTCTACAATG
	反向: TCATCTTCTCGCGCTTGGC

1.4.7 统计学方法 结果采用 SPSS 26.0 统计软件分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK- q 检验。

2 结果与分析

2.1 新橙皮苷靶点的收集

通过数据库检索并经过查阅文献报道^[15]补充相关作用靶点,比较分析去除重复值后获得 322 个作用靶点。

2.2 创伤性脑损伤靶点的获取

基于使用 OMIM、TCMIP、DrugBank、TTD、GeneCards 等数据库, 获取创伤性脑损伤的作用靶点, 合并数据库去除重复值后, 获得创伤性脑损伤疾病相关作用靶点 1 470 个。

2.3 新橙皮苷治疗创伤性脑损伤共同靶点的网络构建及分析

通过 Venny 图获得新橙皮苷治疗创伤性脑损伤的交集靶点 85 个, 见图 1。利用 Cytoscape 3.8.0 软件构建“新橙皮苷-靶点-创伤性脑损伤”关系网

络, 见图 2。



图 1 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram

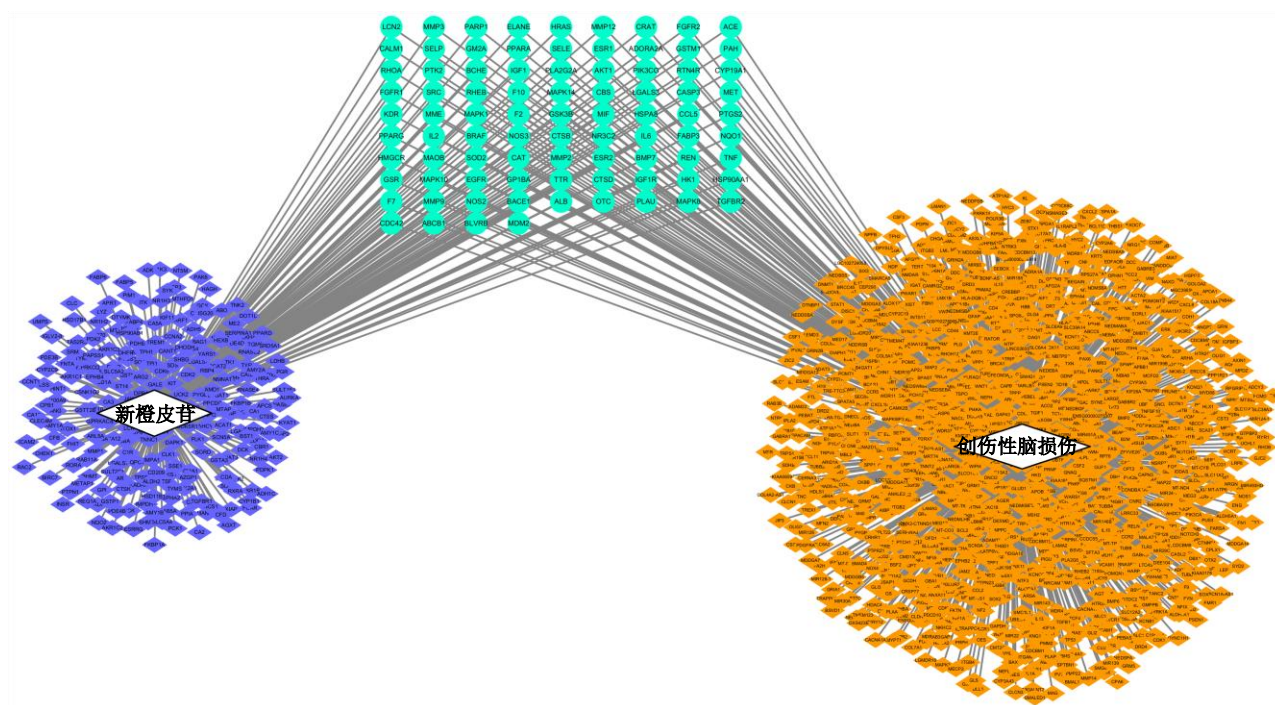


图 2 新橙皮苷-靶点-创伤性脑损伤复杂网络

Fig. 2 Neohesperidin-target- traumatic brain injury complex network

2.4 新橙皮苷和创伤性脑损伤 PPI 网络的构建和分析

将 85 个交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络见图 3, 该网络共有 85 个节点和 362 条边, 使用 Cytoscape 3.8.0 的 CytoHubba 插件基于 MCC 算法来确定 PPI 排名前 10 位的节点作为核心靶点有基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、环加氧酶 2 (PTGS2)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPARG)、表皮生长因子受体 (EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 8、IL-6、SRC、MAPK14、TNF、Akt1, 见图 4。

2.5 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

GO 富集分析结果表明, CC 主要涉及质膜、胞外区、膜筏; 生物过程主要涉及对细胞凋亡过程的

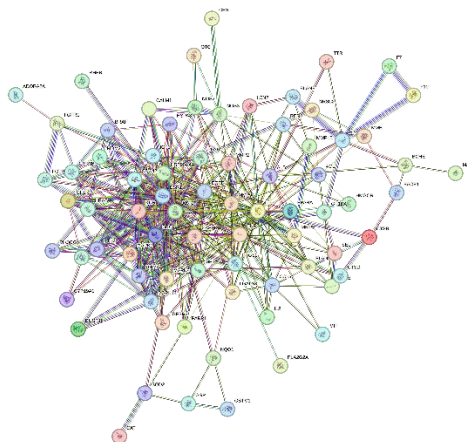


图 3 交集靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram of intersection target

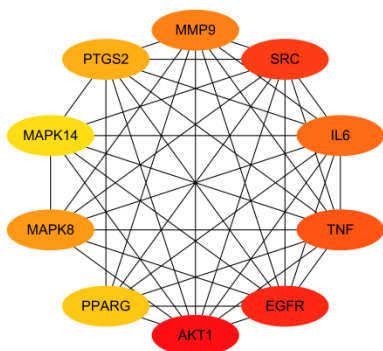


图 4 核心靶点 PPI 网络图

Fig. 4 Core target PPI network diagram

负调控、对异种刺激的反应、蛋白水解作用；MF 主要涉及相同蛋白结合、酶结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性，根据 Count 值筛选出每个模块的前 10 个项目，并将其可视化，见图 5。

KEGG 通路富集分析结果显示，新橙皮苷治疗创伤性脑损伤的关键靶点可能主要集中在内分泌抵抗、VEGF 信号通路、TNF 通路、Rap1 信号通路等，其可能主要通过抗炎、抗凋亡途径起到保护神经作用，根据 *P* 值选出前 20 项结果，并绘制气泡图，见图 6。

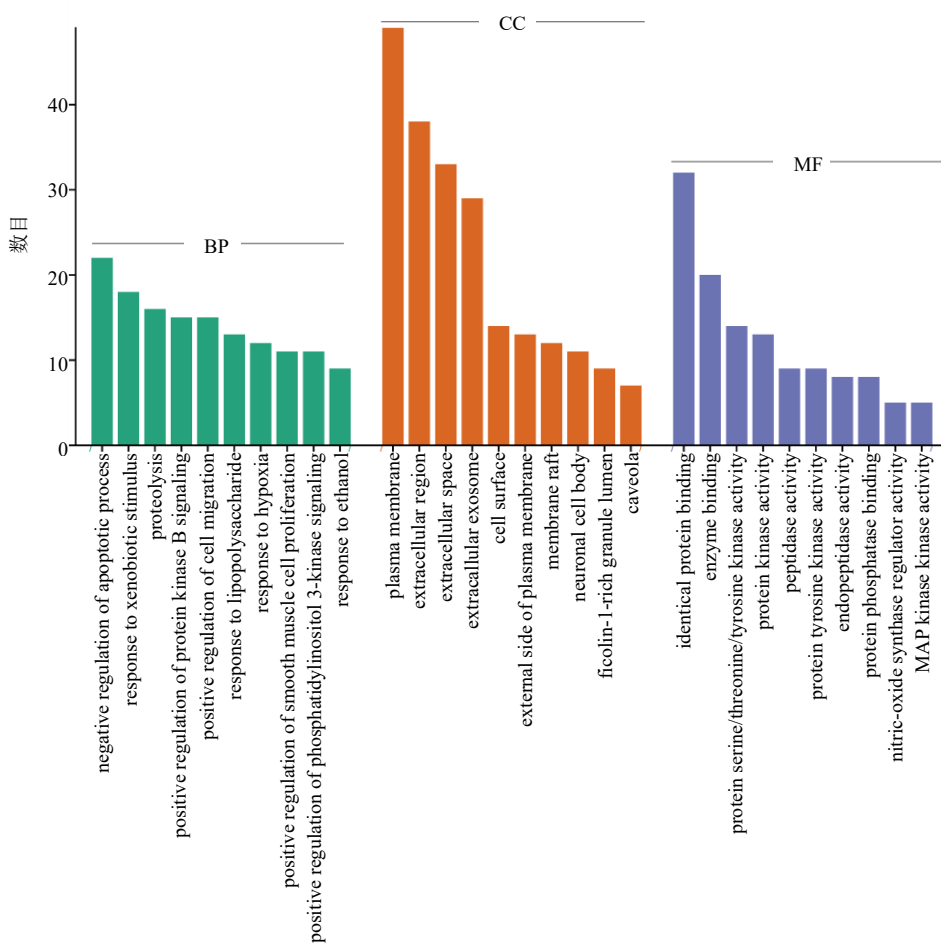


图 5 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis histogram

2.6 分子对接结果

将新橙皮苷与 10 个核心靶点分别进行分子对接。分子对接的稳定性一般通过结合能的大小来体现，结合能越小，结合两者的能量所需越少，结构越稳定。当结合能小于 -5.0 kcal/mol ($1\text{cal}=4.2\text{J}$) 表示具有较好的结合能力，结果表明，新橙皮苷与

10 个核心靶点之间结合活性良好，见表 2，提示新橙皮苷可能通过作用于以上 10 个核心靶点发挥治疗创伤性脑损伤的作用，见图 7。

2.7 实验验证

2.7.1 大鼠 mNSS 评分 在第 1~7 天，相较于假手术组，模型组大鼠 mNSS 评分显著升高 ($P<$

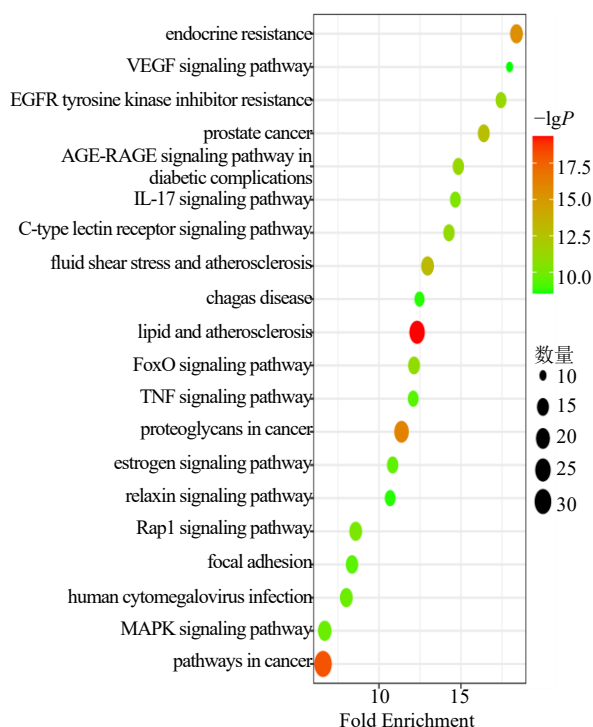


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis bubble diagram

表 2 新橙皮苷与核心靶点的结合能

Table 2 Binding energy between neohesperidin and core target

核心靶点	PDB ID	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
MMP9	4XCT	-8.7
PTGS2	3U9Q	-8.7
PPARG	5IKQ	-8.7
EGFR	8A27	-7.8
MAPK8	2XRW	-7.5
IL-6	1ALU	-7.4
SRC	1O43	-7.1
MAPK14	2FST	-6.8
TNF	2E7A	-6.6
Akt1	7MYX	-6.4

0.05), 在第 2~7 天时, 与模型组比较, 新橙皮苷组大鼠 mNSS 评分均显著降低 ($P<0.05$), 见表 3。

2.7.2 大鼠脑组织病理学变化 给药 3 d 后, 尼氏染色显示, 假手术组神经元细胞排列有序, 细胞形态规则, 染色较淡, 核仁明显; 模型组脑组织损伤灶神经元细胞排列紊乱而稀松, 细胞固缩, 神经元数量减少; 新橙皮苷组正常形态细胞较多, 排列相对规则, 固缩减轻, 神经元细胞及尼氏小体数量显著增加, 见图 8。

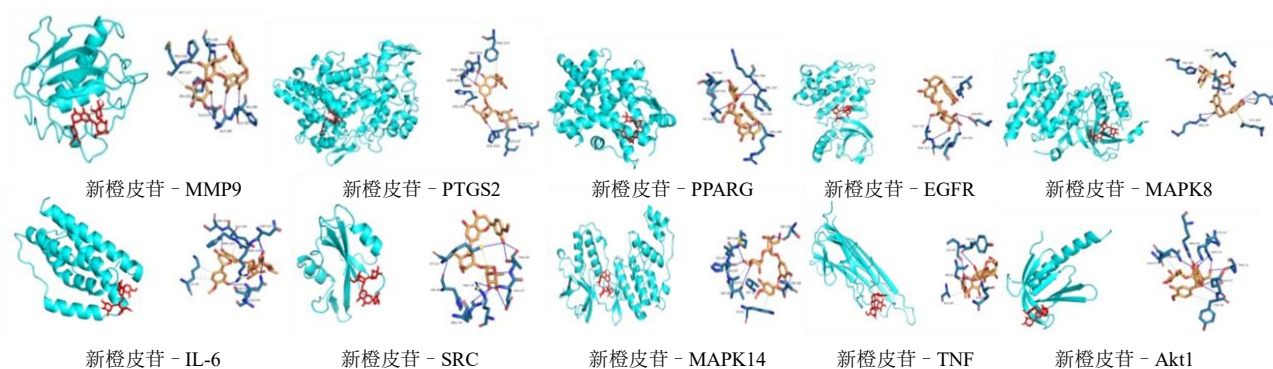


图 7 新橙皮苷与核心靶蛋白的分子对接图

Fig. 7 Molecular docking diagram of neohesperidin and core target protein

表 3 各组大鼠神经功能缺损 mNSS 评分 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 mNSS score for neurological deficits in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	mNSS 评分				
		给药后 1 d	给药后 2 d	给药后 3 d	给药后 5 d	给药后 7 d
假手术	—	1.50±0.55	1.33±0.52	1.17±0.41	0.83±0.41	0.67±0.52
模型	—	12.67±0.82*	12.17±0.41*	11.83±0.75*	11.33±0.82*	10.83±0.41*
新橙皮苷	40	12.50±0.5*	11.33±0.52*#	10.17±0.41*#	9.17±0.75*#	8.33±0.52*#

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

* $P<0.05$ vs sham-operation group; # $P<0.05$ vs model group.

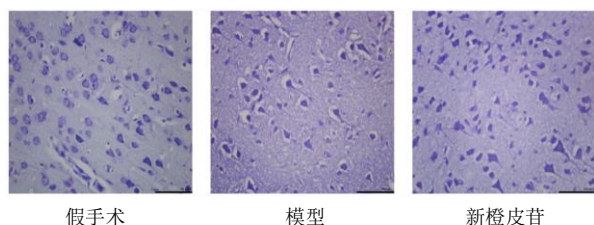


图 8 新橙皮苷对创伤性脑损伤大鼠脑组织损伤灶病理变化的影响 (尼氏染色, $\times 400$)

Fig. 8 Effect of neohesperidin on pathological changes of brain tissue injury foci in traumatic brain injury rats (Niss staining, $\times 400$)

2.7.3 大鼠脑组织神经细胞凋亡情况 给药 3 d 后, 相较于假手术组, 模型组大鼠脑组织细胞凋亡率明显上调 ($P < 0.05$), 与模型组比较, 新橙皮苷组大鼠脑组织细胞凋亡率的显著降低 ($P < 0.05$), 见图 9、10。

2.7.4 大鼠脑组织炎症因子含量比较 与假手术组相比, 模型组大鼠损伤灶中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量显著升高 ($P < 0.05$), 相较于模型组, 新橙皮苷组大鼠损伤灶中炎症因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的含量明显下降 ($P < 0.05$), 见图 11。

2.7.5 大鼠脑组织 VEGF、SRC、AKT1 mRNA 表达量的比较 给药 3 d 后, 相较于假手术组, 模型组大鼠脑组织中 SRC、Akt1 mRNA 表达水平均显著下调, 而 VEGF mRNA 表达水平明显上调 ($P < 0.05$), 与模型组相比较, 新橙皮苷组大鼠脑组织中 VEGF、SRC、AKT1 mRNA 表达水平明显上调 ($P < 0.05$), 见图 12。

3 讨论

目前, 创伤性脑损伤已成为全球第 3 大死因^[16]。全球每年有超过 5 000 万人患有不同程度的创伤性脑损伤^[17]。严重的创伤性脑损伤会导致痴呆、长期

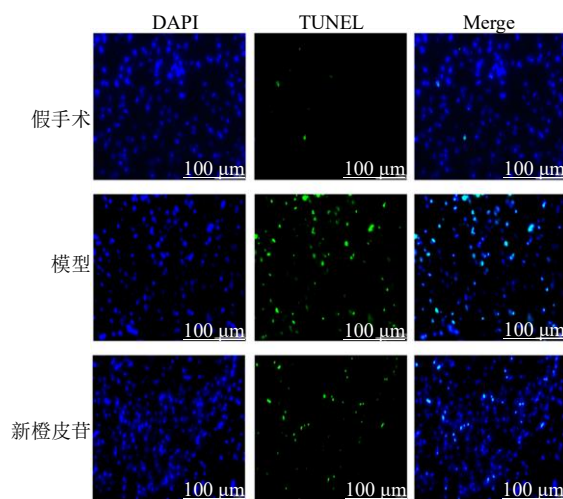
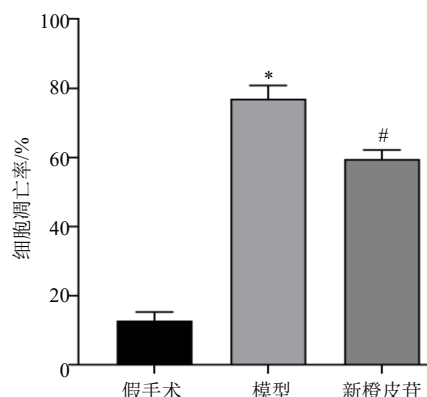


图 9 给药 3 d 后各组大鼠脑组织损伤灶神经细胞凋亡情况 (Tunel, $\times 400$)

Fig. 9 Neurocell apoptosis in the injury foci of rat brain tissue in each group after 3 d of drug administration (Tunel staining, $\times 400$)

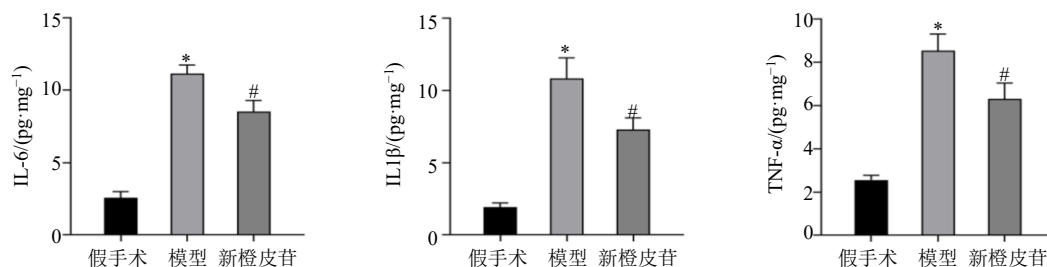


与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs sham-operation group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 10 各组大鼠脑组织损伤灶神经元凋亡率

Fig. 10 Neuronal apoptosis rate of brain tissue injury lesion



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

* $P < 0.05$ vs sham-operation group; # $P < 0.05$ vs model group.

图 11 各组大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 11 Levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

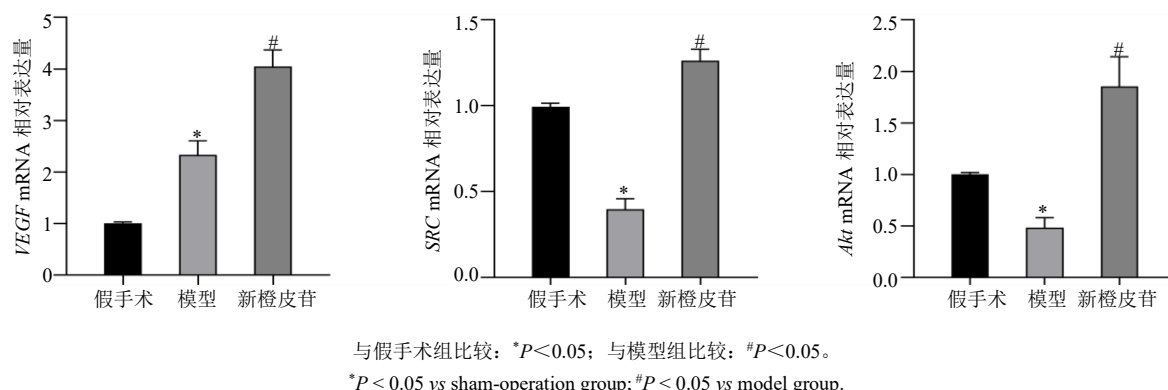


图 12 新橙皮苷治疗对大鼠脑组织 *VEGF*、*SRC*、*Akt1* mRNA 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 12 Effect of neohesperidin treatment on the expression of *VEGF*, *SRC*, and *Akt1* mRNA in rat brain tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

残疾或死亡,并且预后不良,给家庭和社会带来沉重的经济负担^[18]。创伤性脑损伤包括原发性损伤和继发性损伤。其中,由机械力造成的原发性神经损伤通常为难逆甚至不可逆。因此,如何早期减轻继发性脑损伤具有非常重要的意义^[19]。本研究为探讨新橙皮苷治疗创伤性脑损伤的作用机制,通过网络药理学方法筛选出新橙皮苷的主要作用靶点,并应用动物实验验证了筛选的预测结果。

通过网络药理学和分子对接技术筛选并验证了 10 个核心靶基因,包括 *MMP9*、*PTGS2*、*PPARG*、*EGFR*、*MAPK8*、*IL-6*、*SRC*、*MAPK14*、*TNF*、*Akt1* 等,其中 *MMP9* 与脑水肿发生密切相关,过度表达可导致血脑屏障通透性增加,加重脑水肿^[20]。*PTGS2* 可将花生四烯酸转化为生物活性前列腺素,脑损伤后急性炎症级联反应中发挥核心作用^[21]。*PPARG* 具有保护中枢神经系统的作用,表现为抑制炎症、抑制神经元凋亡、保护血脑屏障等^[22]。*EGFR* 信号通路激活,引起小胶质细胞活化,产生 *IL-6*、*IL-1 β* 和 *TNF- α* 等炎症因子,从而加速神经细胞损伤^[23]。*MAPK8* 又称为 *JNK*,属于 *MAPK* 家族,在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用^[24]。*IL-6* 在创伤性脑损伤后炎症反应、神经创伤修复等方面起着重要作用,研究表明,*IL-6* 作为变化指标能提高对创伤性脑损伤不良预后的预测特异性和敏感性^[25]。*SRC* 是一种非受体蛋白酪氨酸激酶,可调节细胞外信号调节激酶,继而发挥脑保护作用^[26]。*MAPK14* 是 *MAPKs* 超家族的一员,在颅脑创伤后病情发展的信号传递过程中发挥着重要作用^[27]。*Akt1* 可以通过抑制细胞凋亡过程参与细胞存活途径,可以阻止细胞凋亡从而促进细胞存活^[28]。*TNF* 是重要的免疫调节和炎症因子,参与创伤性脑损伤

后炎症反应等过程^[29],*TNF- α* 在脑组织中高表达具有神经毒性,可加速神经细胞的死亡^[30]。

GO 生物过程富集分析结果显示,新橙皮苷可能通过对细胞凋亡过程的负调控、磷脂酰肌醇 3-激酶 (*PI3K*) 信号的正调控过程、蛋白水解作用参与生物过程。KEGG 通路富集分析发现,新橙皮苷可能主要通过抗凋亡、抗炎等途径治疗创伤性脑损伤,保护神经功能,主要涉及 *VEGF* 信号通路、*Rap1* 信号通路、*TNF* 信号通路等。新橙皮苷与 *MMP9*、*EGFR*、*MAPK8*、*IL-6*、*TNF*、*Akt1* 等 10 个核心靶点均具有较好的结合活性及稳定性,具有良好的亲和力。上述核心靶点与 *VEGF* 信号通路明显相关,表明新橙皮苷可能通过 *VEGF* 信号通路治疗创伤性脑损伤。研究发现,*VEGF* 信号通路在血管新生、血管通透性、增强神经元细胞的再生与分化等方面发挥重要作用^[31]。据报道,发生创伤性脑损伤后,脑组织损伤区域 *VEGF* 表达上调,促进微血管发生,改善损伤大脑缺血缺氧状态,促进脑损伤神经修复。并且 *VEGF* 可以通过参与损伤血管的修复与再生,可以加快损伤区域脑组织新血管的形成及微环境的构建,从而达到修复受损神经组织的目的^[32]。*SRC* 为 *VEGF* 通路的下游基因。*SRC* 蛋白激活后会进一步促使 *PI3K/Akt* 通路激活^[33],在 *PI3K* 通路中,*PI3K* 激活后诱导 *Akt* 自身磷酸化,来调节下游底物表达,如 *Foxo*、*Caspase-9*、*mTOR* 等,通过激活数个信号转导通路发挥多重生物学效应,包括抗氧化、调节细胞周期、抗炎、抗凋亡等作用。基于网络药理学预测结果,通过体内实验表明,新橙皮苷治疗可以改善神经功能缺损,减轻神经细胞损伤,抑制细胞凋亡,并且显著抑制创伤性脑损伤大鼠脑组织中炎症因子 *IL-6*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 的表达,同时明显

上调 *VEGF*、*SRC*、*Akt1* mRNA 表达水平, 从而发挥神经保护作用。

综上所述, 本研究采用网络药理学、分子对接及体内实验初步预测了新橙皮苷治疗创伤性脑损伤关键靶点及通路。新橙皮苷可能通过 MMP9、PTGS2、PPARG、EGFR、MAPK8、IL-6、SRC、MAPK14、TNF、Akt1 等核心靶点, 通过干预 VEGF 信号通路、TNF 通路、Rap1 信号通路等通路, 进而发挥治疗创伤性脑损伤的作用, 本研究可为新橙皮苷治疗创伤性脑损伤的进一步实验及临床研究提供参考, 但相关研究结果仍有待进一步的生物学验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Timofeev I, Santarius T, Kolia A G, *et al.* Decompressive craniectomy-operative technique and perioperative care [J]. *Adv Tech Stand neurosurg*, 2012, 38: 115-136.
- [2] Ng S Y, Lee A Y W. Traumatic brain injuries: Pathophysiology and potential therapeutic targets [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 528.
- [3] Galgano M, Toshkezi G, Qiu X C, *et al.* Traumatic brain injury: Current treatment strategies and future endeavors [J]. *Cell Transplant*, 2017, 26(7): 1118-1130.
- [4] Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, *et al.* Traumatic brain injury: Oxidative stress and neuroprotection [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(8): 836-853.
- [5] Oliveira E, Humeau C, Chebil L, *et al.* A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalysed by *Candida antarctica* lipase B [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2009, 59(1-3): 96-105.
- [6] Weiz G, Braun L, Lopez R, *et al.* Enzymatic deglycosylation of flavonoids in deep eutectic solvents-aqueous mixtures: Paving the way for sustainable flavonoid chemistry [J]. *J Mol Catal B Enzym*, 2016, 130: 70-73.
- [7] Jiang J P, Yan L, Shi Z, *et al.* Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of total flavonoids of Qu Zhi Ke (peel of *Citrus changshan-huyou*) on non-alcoholic fatty liver disease in rats via modulation of NF- κ B and MAPKs [J]. *Phytomedicine*, 2019, 64: 153082.
- [8] Fernández S P, Wasowski C, Loscalzo L M, *et al.* Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 539(3): 168-176.
- [9] Lina B A, Dreef-van der Meulen H C, Leegwater D C. Subchronic (13-week) oral toxicity of neohesperidin dihydrochalcone in rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 1990, 28(7): 507-513.
- [10] Wang J J, Cui P. Neohesperidin attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury via inhibiting the apoptotic pathway and activating the Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(9): 1023-1037.
- [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] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, *et al.* ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [13] 张雅莉, 韩建勋, 图尔荪托合提·托合提萨伊普, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 指纹图谱和分子对接技术筛选藿香正气水抗新冠病毒潜在质量标志物 [J]. *中草药*, 2022, 53(19): 6023-6034.
- [14] 王星, 余万, 黄保胜. 异甘草素通过 TLR4-TBK1-IKK ϵ 信号通路对创伤性脑损伤大鼠脑内炎症反应的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 277-282.
- [15] Wang X H, Dai C, Wang J, *et al.* Therapeutic effect of neohesperidin on TNF- α -stimulated human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(10): 741-749.
- [16] Meaney D F, Morrison B, Dale Bass C. The mechanics of traumatic brain injury: A review of what we know and what we need to know for reducing its societal burden [J]. *J Biomech Eng*, 2014, 136(2): 021008.
- [17] Ng S Y, Lee A Y W. Traumatic brain injuries: Pathophysiology and potential therapeutic targets [J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 528.
- [18] Rudolfson N, Dewan M C, Park K B, *et al.* The economic consequences of neurosurgical disease in low-and middle-income countries [J]. *J Neurosurg*, 2018, 130(4): 1149-1156.
- [19] Chakrabarti M, Das A, Samantaray S, *et al.* Molecular mechanisms of estrogen for neuroprotection in spinal cord injury and traumatic brain injury [J]. *Rev Neurosci*, 2016, 27(3): 271-281.
- [20] Wang G Y, Wang N, Liao H N. Effects of muscone on the expression of P-gp, MMP-9 on blood-brain barrier model *in vitro* [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(8): 1105-1115.
- [21] Aid S, Bosetti F. Targeting cyclooxygenases-1 and-2 in neuroinflammation: Therapeutic implications [J]. *Biochimie*, 2011, 93(1): 46-51.
- [22] Cai W, Yang T, Liu H, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): A master gatekeeper in CNS injury and repair [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163: 27-58.
- [23] Hernandez-Ontiveros D G, Tajiri N, Acosta S, *et al.* Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury [J]. *Front Neurol*, 2013, 4: 30.

- [24] 王京龙, 杨斌, 郑丹丹, 等. 基于网络药理学二黄汤治疗急性肺损伤的作用机制研究 [J]. 药学学报, 2021, 56(1): 244-256.
- [25] 汪友平, 梁子敬. 创伤性脑损伤生物学标记的临床研究进展 [J]. 国际神经病学神经外科学杂志, 2011, 38(1): 49-53.
- [26] Zhan 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.
- [27] Mori T, Wang X Y, Jung J C, *et al.* Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: *In vitro* and *in vivo* effects [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4): 444-452.
- [28] Liu M H, Li G H, Peng L J, *et al.* PI3K/Akt/FoxO3a signaling mediates cardioprotection of FGF-2 against hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 414(1-2): 57-66.
- [29] Shao X F, Yang X P, Shen J, *et al.* TNF- α -induced p53 activation induces apoptosis in neurological injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(12): 6796-6803.
- [30] Suzumura A, Ito A, Yoshikawa M, *et al.* Ibuprofen suppresses TNF α production by glial cells functioning mainly as type III phosphodiesterase inhibitor in the CNS [J]. *Brain Res*, 1999, 837(1-2): 203-212.
- [31] Okabe K, Fukada H, Tai-Nagara I, *et al.* Neuron-derived VEGF contributes to cortical and hippocampal development independently of VEGFR1/2-mediated neurotrophism [J]. *Dev Biol*, 2020, 459(2): 65-71.
- [32] Lopez-Aguilera F, Plateo-Pignatari M G, Biaggio V, *et al.* Hypoxic preconditioning induces an AT2-R/VEGFR-2 (Flk-1) interaction in the neonatal brain microvasculature for neuroprotection [J]. *Neuroscience*, 2012, 216: 1-9.
- [33] 刘萌芽, 史礼君, 李金鑫, 等. 萝卜硫素通过 Src/PI3K/Akt 通路调控人脐静脉内皮细胞 NO 的生成机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(24): 2526-2529.

[责任编辑 高源]