

【实验研究】

基于网络药理学、分子对接及实验验证探究黑果腺肋花楸抗脑缺血损伤的作用机制

刘雨佳¹, 付 荣², 杨 宇², 周明生², 刘月阳^{2, 3*}, 贾 辉^{2*}

1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110085

2. 沈阳医学院, 辽宁 沈阳 110034

3. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016

摘要: **目的** 探索黑果腺肋花楸抗脑缺血的主要活性成分及其作用机制。**方法** 使用 SwissTargetPrediction 和 GeneCards 等数据库筛选黑果腺肋花楸入血成分关联靶点与脑缺血相关靶点。使用 Metascape 对交集靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 通过 STRING 数据库与 Cytoscape 软件构建并分析蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络。基于分子对接对重要成分和靶点间相互作用进行验证。进一步通过大鼠永久性中动脉阻塞 (pMCAO) 的在体模型和氧糖剥夺 (OGD) 处理的体外培养的小胶质细胞模型验证黑果腺肋花楸活性成分花青素的抗脑缺血作用。**结果** 网络药理学分析结果表明花青素可能是黑果腺肋花楸发挥抗脑缺血作用的主要活性成分; GO 及 KEGG 富集分析显示, 肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路可能为黑果腺肋花楸抗脑缺血作用的主要机制; 分子对接结果显示, 基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 与花青素的结合活性较高。整体实验结果表明, 连续 7 d 给予花青素 (100、200 mg·kg⁻¹) 能够显著缓解 pMCAO 模型大鼠缺血 24 h 后的血脑屏障损伤, 并显著降低 MMP-2 表达、显著增加 VE-cadherin 和 occludin 的表达, 显著降低炎症因子白细胞介素-1 β (IL-1 β)、TNF- α 、IL-6 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达。体外实验结果表明, 花青素 (20、60 μ g·mL⁻¹) 能够显著降低 OGD 后 BV2 小胶质细胞的亚硝酸盐含量及炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 iNOS 的表达。**结论** 花青素可能是黑果腺肋花楸提取物抗脑缺血的主要活性成分。花青素能够显著缓解大鼠永久性脑缺血后的血脑屏障损伤并抑制炎症因子的释放。

关键词: 黑果腺肋花楸; 花青素; 脑缺血; 血脑屏障; 网络药理学

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 12-2713-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.12.003

Mechanisms of *Aronia melanocarpa* on cerebral ischemic injury based on network pharmacology and molecular dockingLIU Yujia¹, FU Rong², YANG Yu², ZHOU Mingsheng², LIU Yueyang^{2, 3}, JIA Hui²

1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110085, China

2. Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China

3. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: **Objective** To explore the specific components involved and underlying mechanisms of *Aronia melanocarpa* against cerebral ischemia. **Methods** SwissTargetPrediction and GeneCards databases was used to screen the blood-entry components and brain ischemia-related targets of *A. melanocarpa*. Gene ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed on the intersection targets using Metascape. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed and analyzed using the STRING database and Cytoscape software. The interaction between the

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (82204685); 辽宁省自然科学基金面上项目 (2022-MS-246); 辽宁中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (202310162004x)

第一作者: 刘雨佳 (2001—), 女, 学士。E-mail: lyj15509829340@163.com

*共同通信作者: 贾 辉 (1982—), 女, 博士, 副教授, 从事肿瘤化疗耐药机制及靶向药物研究工作。E-mail: smockingandy@163.com

刘月阳 (1989—), 女, 博士, 副教授, 从事缺血性脑卒中的发病机制及药物防治工作。E-mail: yueyangliu1989@163.com

important components and targets were determined using molecular docking. Finally, the anti-cerebral ischemia effects of *A. melanocarpa* active component anthocyanin were evaluated using an *in vivo* model of rat permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO) and an *in vitro* model of cultured microglia subjected to oxygen-glucose deprivation (OGD). **Results** The network pharmacological analysis demonstrated that anthocyanin may serve as an effective component of *A. melanocarpa* in the treatment of cerebral ischemia. GO and KEGG enrichment analysis revealed that the TNF signaling pathway might be the main mechanism underlying the anti-cerebral ischemic effect of *A. melanocarpa*. Molecular docking results indicated a strong binding activity between anthocyanin and matrix metalloproteinases 2 (MMP-2). The *in vivo* studies demonstrated that oral administration of anthocyanin (100, 200 mg·kg⁻¹) for seven consecutive days significantly ameliorated blood-brain barrier damage, downregulated the expression of MMP-2 and upregulated the levels of VE-cadherin and occluding as well as downregulated the expression of inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and inducible nitric oxide synthase (iNOS) at 24 h after cerebral ischemia in pMCAO-operated rats. *In vitro* experiments revealed that anthocyanins (20, 60 μ g mL⁻¹) effectively reduced the nitrite content and attenuated the expression of inflammatory factors TNF- α , IL-1 β , IL-6, and iNOS in OGD-treated BV2 microglia. **Conclusion** The extract of *A. melanocarpa* may contain anthocyanin as the active component against cerebral ischemia. Anthocyanin exhibits significant potential in mitigating blood-brain barrier damage and suppressing the release of inflammatory factors following permanent cerebral ischemia in rats. The present study provides an experimental foundation for further elucidating the active components, targets, and associated mechanisms underlying the anti-cerebral ischemic effects of *A. melanocarpa* and anthocyanin.

Key words: *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott; anthocyanin; cerebral ischemia; blood-brain barrier; network pharmacology

缺血性脑卒中(IS),又称脑缺血,已成为我国第一大致死性疾病,也是成年人永久性致残的主要原因^[1]。目前临床上针对IS主要以溶栓治疗为主。目前,重组型组织纤溶酶原激活剂阿替普酶(rtPA)仍然是美国食品药品监督管理局(FDA)唯一批准的溶栓药物。但溶栓治疗因其存在出血转化风险且治疗时间窗窄(4.5 h),因而临床应用较为局限^[2]。因此需要进一步开发新型的IS治疗药物。IS发病机制复杂,涉及到血脑屏障(BBB)损伤、炎症反应、钙超载、氧化应激、凋亡、自噬等机制^[3],因此,单一靶点的IS治疗药物对于IS的治疗效果不佳。近年来中药以其多成分、多靶点的特点显示出良好的IS治疗效果。

黑果腺肋花楸 *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliott, 俗称不老莓,是蔷薇科腺肋花楸属落叶、阔叶灌木,别名黑涩石楠。研究发现黑果腺肋花楸含有多酚、黄酮、维生素等成分,具有抗炎、抗氧化、抗癌、抗衰老、抗疲劳等功效^[4]。黑果腺肋花楸中富含丰富的多酚类化合物,包括单体多酚和聚合多酚^[5]。单体多酚主要包括3-*O*-半乳糖苷花青素;聚合多酚主要是以多聚体形式存在的原花青素。黄酮类化合物主要包括花色苷、槲皮素及其衍生物^[6]。在黑果腺肋花楸种子、幼苗和果实中均发现了多种有机酸,包括绿原酸、新绿原酸、龙胆酸、莽草酸、奎宁酸、咖啡酸、香草酸等^[7]。研究发现,黑果腺肋花楸因其富含黄酮、多酚类化合物,因此具有较强的抗氧化能力^[8-9]。此外,研究证实黑果腺肋花楸能够显

著抑制单核巨噬细胞释放炎症因子,例如白细胞介素6(IL-6)、IL-8和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等,提示其具有抗炎活性^[10]。Parzonko等^[11]研究发现,黑果腺肋花楸果实提取物能够通过维持血管张力,降低血压,起到预防动脉粥样硬化的作用。鉴于黑果腺肋花楸提取物的抗炎、抗氧化功效,而炎症和氧化应激又是IS的重要病理生理学机制,推测黑果腺肋花楸可能对于IS有较好的治疗作用。但是黑果腺肋花楸提取物抗IS的活性成分、药理机制、治疗靶点尚不明确,有待进一步阐明。

网络药理学强调药物在体内作用的“多组分、多靶点、多途径”的复杂过程。通过“中药-成分-靶点”这一桥梁,系统地反映中药治疗疾病的活性成分和其作用机制,进而阐明其“多成分”作用于“多靶点”发挥协同作用的机制,为开发潜在的中药活性成分提供依据^[12-13]。网络药理学已广泛应用于中药抗IS的研究,如脑栓通胶囊、补阳还五汤等,为阐明这些药物的药理机制提供了依据^[14-15]。然而,网络药理学更多的是预测,需要更多的实验方法来验证,如分子对接方法等。分子对接已被用作评估受体与药物结合亲和力的一种计算方法。此外,仍需整体及体外实验对网络药理学分析得到的主要成分及其靶点进行实验验证。

本研究首先通过网络药理学结合分子对接技术分析明确黑果腺肋花楸发挥抗IS作用的主要成分、主要通路及靶点。随后通过大鼠永久性中动脉阻塞(pMCAO)模型及小胶质细胞的氧糖剥

夺(OGD)模型探究其主要成分花青素的抗IS作用机制。为将黑果腺肋花楸开发成为抗IS的新药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,体质量260~280 g,购自辽宁长生生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。动物饲养于沈阳药科大学实验动物中心,明暗交替环境12 h,温度(24±2)℃,自由摄食饮水。本实验经沈阳药科大学实验动物伦理委员会批准,伦理审查编号:SYPU-SQ-001。

1.2 试剂

花青素(批号:HY-126413,质量分数≥98.5%,MCE公司);BCA蛋白定量试剂盒(批号:P0012,Beyotime Biotechnology公司);PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser、TB Green® Premix Ex Taq™ II(批号:RR047A、RR820A,Takara公司);伊文思蓝(EB,批号:E2129,Sigma-Aldrich公司);基质金属蛋白酶2(MMP-2)、Occludin、VE-cadherin抗体(批号:10373-2-AP、27260-1-AP、83766-5-RR,Proteintech公司)。

1.3 仪器

Matrix VMR小动物麻醉机(MIDMARK公司);CFX connect多功能酶标仪(Bio-Red公司);Synergy HT*实时荧光定量PCR仪(Bio-tek公司);C300全自动数码凝胶成像系统(Azure公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 活性成分的筛选及治疗靶点的预测 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)检索黑果腺肋花楸活性成分^[16]。同时在中国学术期刊全文数据库(<http://www.cnki.net>)及Pubmed中检索相关文献,进一步收集黑果腺肋花楸成分,并使用Swiss ADME按照Lipinski类药性五原则,及生物利用度打分>0.1为标准,筛选黑果腺肋花楸活性成分^[17]。随后,将活性成分依次输入PubChem,查找对应的Canonical SMILES号,将SMILES号输入SwissTargetPrediction,筛选Probability>0的靶点,删除重复值,预测各成分的作用靶点。在Cytoscape软件中导入活性成分及靶点信息进行网络拓扑分析,并按照度值对黑果腺肋花楸活性成分进行排序。

2.1.2 黑果腺肋花楸抗IS疾病靶点的筛选

以“Cerebral ischemia”“Ischemic stroke”在GeneCards数据库中搜索IS相关靶点,筛选条件为Score值>5。同时,在OMIM数据库中搜索IS的相关靶点,将2个数据库的靶点整合去重,得到IS相关疾病靶点。黑果腺肋花楸有效成分靶点与IS相关疾病靶点取交集得到黑果腺肋花楸抗IS靶点。为了进一步筛选黑果腺肋花楸抗IS核心靶点,将黑果腺肋花楸抗IS靶点导入STRING数据库,选择交互作用阈值>0.4,构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图,并使用Cytoscape进行可视化及网络拓扑分析,根据度值筛选排名前20的为黑果腺肋花楸抗IS的核心靶点。

2.1.3 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将黑果腺肋花楸抗IS靶点导入MetaScape数据库,分别进行GO与KEGG通路富集分析,根据P值排序,选取GO分析排名前10和KEGG分析排名前20的富集结果进行可视化分析。

2.1.4 分子对接 采用花青素与度值排名前10的蛋白质对接,在PDB数据库搜索蛋白质晶体结构,下载PDB格式文件导入Pymol,去掉水和溶剂分子,再将其导入Autodock,加全氢,设置为受体,导出为pdbqt格式文件。在PubChem数据库中下载花青素3D结构文件,导入Autodock,加全氢,设置为配体,导出为pdb.qt格式文件。设置对接盒子及运行参数后,分别运行Autogrid4以及Autodock4,查看结合能,并进行可视化分析。

2.2 动物实验

2.2.1 实验动物及分组 SD大鼠共40只,随机分为假手术组,模型组,花青素低、高剂量(100、200 mg·kg⁻¹)组,每组10只。花青素溶解于蒸馏水,于造模前7 d通过ig给予,每天1次,连续给药7 d,于末次给药后即刻进行手术造模。

2.2.2 pMCAO模型制备 通过线栓法制备pMCAO模型。手术前动物禁食不禁水,采用异氟烷吸入麻醉(4%诱导,2%维持)后,仰卧固定于手术台上,剥离右侧颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉;结扎颈外动脉和颈总动脉的近心端,暂时夹闭颈内动脉;于颈总动脉距离分叉3~5 mm处用显微剪剪一小口,将硅胶包被的线栓(直径0.26 mm)沿着颈总动脉的切口插入至颈内动脉,线栓进入18 mm左右时,结扎线栓及颈总动脉。术毕,缝合皮肤并用碘伏消毒。假手术组除颈内动脉不插入线栓外,其余操作过程均同模型组一致。术后使用取暖装置维

持动物体温。

2.2.3 EB染色考察BBB通透性 采用EB渗漏法评估BBB通透性。各组大鼠随机取3只在术后22 h以4 mL·kg⁻¹经尾静脉iv 2% EB,注射后大鼠巩膜及皮肤迅速变成蓝色,2 h后使用2.5%三溴乙醇溶液麻醉大鼠,实验肝素0.9%氯化钠溶液行心脏灌流。脑组织缺血侧称质量后切成小块,浸入*N,N*-二甲基甲酰胺溶液(0.01 mL·mg⁻¹)中,50 °C水浴反应72 h后,离心(350×*g*,15 min),取上清液200 μL置于96孔板中,使用酶标仪于620 nm处测定吸光度(*A*)值,根据EB绘制的标准曲线计算EB含量,结果以脑组织中EB含量表示。

2.2.4 免疫印迹法检测BBB相关蛋白表达 于pMCAO造模后24 h,每组随机取3只大鼠,对大鼠进行断头处死。迅速取出大脑皮层半暗带处脑组织,并用0.9%氯化钠溶液洗去血液;用含有1%蛋白酶抑制剂以及磷酸酶抑制剂的RIPA裂解液对脑组织进行超声破碎;样本经12 000×*g*于4 °C离心15 min,取上清;使用BCA试剂盒测定上清液的蛋白浓度,并用5×上样缓冲液稀释;上述样品在金属

浴中100 °C热变性10 min得到总蛋白;通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对总蛋白进行分离,并将蛋白转印至活化的PVDF膜中;转印后,用5%脱脂牛奶封闭PVDF膜1 h,随后孵育对应的一抗[(anti-MMP-2抗体(Proteintech, 66366-1-Ig)、anti-VE cadherin抗体(abcam, ab33168)、anti-occludin抗体(abcam, ab216327)、anti-β-actin(ACTB)抗体(Santa Cruz, sc-47778)],于4 °C孵育过夜;次日使用TBST溶液漂洗3次,每次5 min;加入二抗稀释液配制的相应种属的二抗,在垂直摇床上室温封闭1 h;使用TBST溶液漂洗3次,每次5 min;配制ECL发光液,置于凝胶成像系统中进行显色曝光。上述抗体的稀释比例均为1:500。

2.2.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测大鼠缺血半暗带脑组织炎症因子mRNA表达 使用TRIzol试剂提取各组大鼠(每组4只)皮层脑组织中的总RNA。RNA纯度经Nanodrop测定后,加入gDNA Eraser Buffer以去除基因组DNA并进行逆转录实验。逆转录完成后以无菌水将DNA模板稀释至100 ng·μL⁻¹后,进行qRT-PCR实验。引物信息见表1。

表1 大鼠引物序列

Table 1 Primer sequences of rats

引物	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
<i>IL-6</i>	GCCCACCAGGAACGAAAGTC	ACTGGCTGGAAGTCTCTTGCG
<i>IL-1β</i>	TGGCAACTGTCCCTGAAGTC	AAGGGCTTGGAAGCAATCCTTA
<i>TNF-α</i>	GATCGGTCCCAACAAGGAGG	CTTGGTGGTTTGCTACGACG
<i>iNOS</i>	GGTGAGGGGACTGGACTTTT	TTCTCCGTGGGGCTTGTAAGT
<i>β-actin</i>	ACACCCGCCACCAGTTCG	CCCACGATGGAGGGGAAGAC

2.3 细胞实验

2.3.1 正常BV2细胞分组及加药处理 BV2小鼠小胶质细胞系购于美国菌种保藏中心(ATCC)。细胞培养于含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素-链霉素双抗的DMEM培养基,培养箱环境条件设置为37 °C和5% CO₂。对照组细胞为正常培养条件,不进行任何处理。溶剂对照组细胞孵育含0.1%DMSO的细胞培养液12 h。花青素(30.60 μg·mL⁻¹)溶解于含0.1%DMSO的细胞培养液中,作用12 h。按“2.3.3”项方法测定花青素处理正常BV2细胞12 h后的亚硝酸盐(NO₂⁻)含量。

2.3.2 OGD模型制备、分组及给药 待BV2细胞生长到适宜密度时,将其培养液更换为含1%双抗的DMEM无糖培养液;将培养板放入缺氧小室中,以20 L·min⁻¹的体积流量充入5% CO₂和95% N₂的混

合气体,持续5 min后迅速密闭缺氧小室,然后将其置于37 °C的烘箱中,OGD处理并计时,于OGD后12 h取出细胞进行后续实验。对照组为正常培养,模型组造模后加0.1%DMSO处理,花青素(30、60 μg·mL⁻¹)造模后立即给予,作用12 h。

2.3.3 NO₂⁻含量的测定 NO₂⁻是一氧化氮(NO)的氧化产物,可运用Griess比色法来检测培养液中NO₂⁻的含量。取生长状态良好的BV2细胞,胰酶消化细胞后用完全培养液制备成密度为1×10⁵个·mL⁻¹的单细胞悬液,接种至96孔板中(每孔1×10⁴个)。取“2.3.2”项各组的细胞上清液50 μL加入96孔板中,然后再加入50 μL Griess试剂,于室温下反应10 min,待反应结束后于酶标仪测定吸光度(*A*)值。

$$\text{NO}_2^- \text{浓度} = A/0.0099$$

2.3.4 qRT-PCR 检测炎症因子 mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂提取 BV2 小胶质细胞中的总 RNA。RNA 纯度经 Nanodrop 测定后,加入 gDNA Eraser Buffer 以去除基因组 DNA 并进行逆转录实验。逆转录完成后以无菌水将 DNA 模板稀释至 100 ng·μL⁻¹后,进行 qRT-PCR 实验。引物的信息见表 2。

2.4 统计学分析

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。采用 GraphPad 9.0 统计软件进行检验分析,并作图。免疫印迹条带均采用 Image J 软件进行灰度值分析。实验结果采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并结合 Tukey 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 结果

3.1 黑果腺肋花楸的主要活性成分及潜在作用靶点

TCMSP 数据库中未检索到黑果腺肋花楸有效成分,因此黑果腺肋花楸有效成分主要在文献中收

集查找,经系统检索并按照 Lipinski 类药性五原则,及生物利用度打分 > 0.1 为标准筛选后共得到黑果腺肋花楸 23 个活性成分,包括多糖、多酚类化合物、有机酸、维生素等。通过 SwissTargetPrediction 预测药物靶点,共得到 158 个活性成分靶点(图 1)。将活性成分-靶点进行 PPI 网络构建并进行拓扑分析,依据度值对活性成分进行排名(表 3),可知花青素、新绿原酸、绿原酸为关键活性成分(度值为 38)。

3.2 黑果腺肋花楸抗 IS 疾病靶点的筛选

从 GeneCards、OMIM 数据库中共获得 967 个 IS 疾病靶点。黑果腺肋花楸成分靶点与 IS 疾病靶点取交集,共得到交集靶点 49 个(图 2-A),即为黑果腺肋花楸抗 IS 的潜在靶点。将交集靶点导入 STRING 数据库,进行 PPI 网络分析(图 2-B),根据度值排序,选取排名前 10 的靶点为黑果腺肋花楸抗 IS 核心靶点,主要包括 TNF、半胱天冬酶(CASP3)、表皮生长

表 2 小鼠引物序列
Table 2 Primer sequences of mice

引物	上游序列(5'→3')	下游序列(5'→3')
<i>IL-6</i>	GCCTTCTTGGGACTGATGCT	TGGAAATTGGGGTAGGAAGGAC
<i>IL-1β</i>	TAGGACGGACCCCAAAAGATGA	TCTCCACAGCCACCATAGGT
<i>TNF-α</i>	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>iNOS</i>	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTG
<i>β-actin</i>	CCTCTATGCCAACACAGTGC	GTACTCCTGCTTGCTGATCC

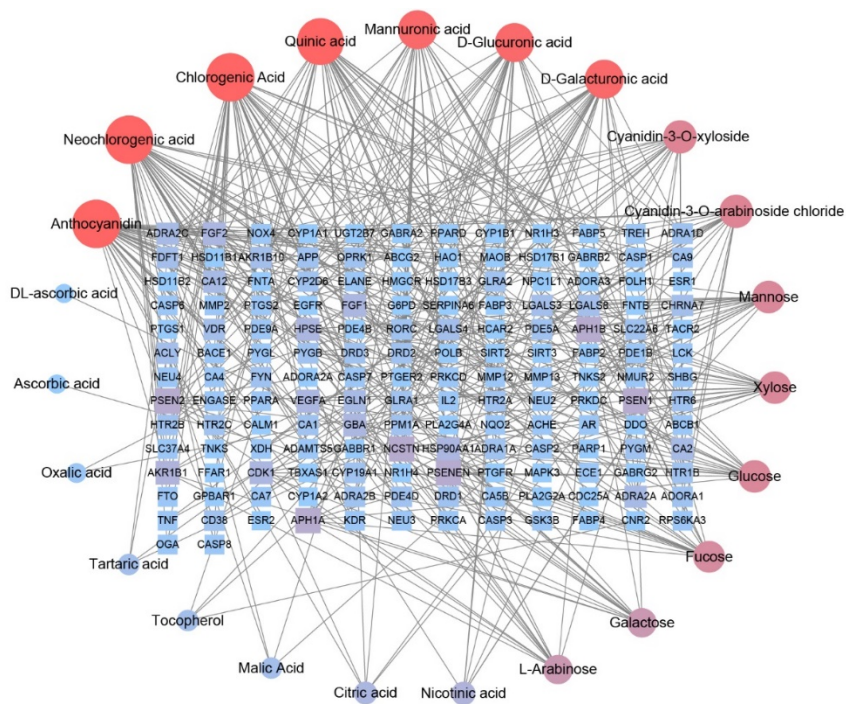


图 1 黑果腺肋花楸的活性成分-靶点网络
Fig. 1 Active ingredient-target network of *A. melanocarpa*

表3 黑果腺肋花楸的活性成分
Table 3 Active ingredients of *A. melanocarpa*

序号	成分	度值	序号	成分	度值
1	花青素(anthocyanidin)	38	13	海藻糖(fucose)	17
2	绿原酸(chlorogenic acid)	38	14	<i>L</i> -阿拉伯糖(<i>L</i> -arabinose)	14
3	新绿原酸(neochlorogenic acid)	38	15	半乳糖(galactose)	14
4	奎宁酸(quinic acid)	36	16	烟酸(nicotinic acid)	7
5	<i>D</i> -半乳糖醛酸(<i>D</i> -galacturonic acid)	26	17	柠檬酸(citric acid)	6
6	<i>D</i> -葡萄糖醛酸(<i>D</i> -glucuronic acid)	26	18	苹果酸(malic acid)	4
7	甘露醇酸(mannuronic acid)	26	19	酒石酸(tartaric acid)	4
8	矢车菊素-3- <i>O</i> -阿拉伯糖苷(cyanidin-3- <i>O</i> -arabinoside chloride)	19	20	生育酚(tocopherol)	4
9	矢车菊素-3- <i>O</i> -木糖苷(cyanidin-3- <i>O</i> -xyloside)	19	21	草酸(oxalic acid)	2
10	葡萄糖(glucose)	18	22	<i>DL</i> -抗坏血酸(<i>DL</i> -ascorbic acid)	1
11	木糖(xylose)	18	23	抗坏血酸(ascorbic acid)	1
12	甘露糖(mannose)	18			

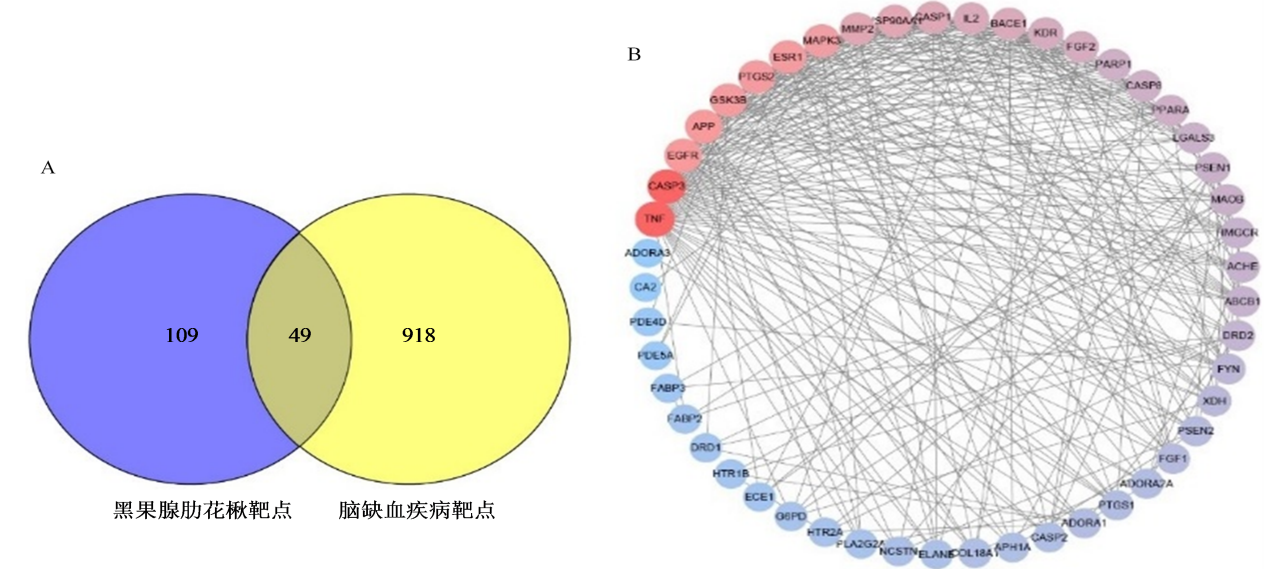


图2 黑果腺肋花楸成分靶点与IS靶点的韦恩图(A)与PPI网络图(B)
Fig. 2 Venn diagram (A) and PPI network (B) of targets of *A. melanocarpa* and IS

因子受体(EGFR)、淀粉样前体蛋白(APP)(表4)。提示,黑果腺肋花楸可能通过调节炎症、凋亡等信号通路缓解IS损伤。

3.3 GO及KEGG富集分析

使用Metascape数据库对黑果腺肋花楸抗IS靶点进行GO功能与KEGG通路富集分析以分析,黑果腺肋花楸抗IS潜在作用机制。根据*P*值选取GO分析各组分排名前10的富集结果(图3),GO分析结果显示黑果腺肋花楸抗IS相关机制参与的生物过程(BP)主要涉及化学突触传递的调节、跨突触信号转导的调控,和细胞对有机氮化合物的反应等,细胞组成(CC)主要涉及突触前膜、突触前、突触膜等,分子功能(MF)主要涉及内肽酶活性、天冬氨酸型内

表4 PPI网络的核心靶点
Table 4 Core targets of PPI network

序号	基因	度值
1	<i>TNF</i>	36
2	<i>CASP3</i>	30
3	<i>EGFR</i>	26
4	<i>APP</i>	26
5	<i>GSK3B</i>	25
6	<i>PTGS2</i>	25
7	<i>ESR1</i>	25
8	<i>MAPK3</i>	24
9	<i>MMP2</i>	20
10	<i>HSP90AA1</i>	20

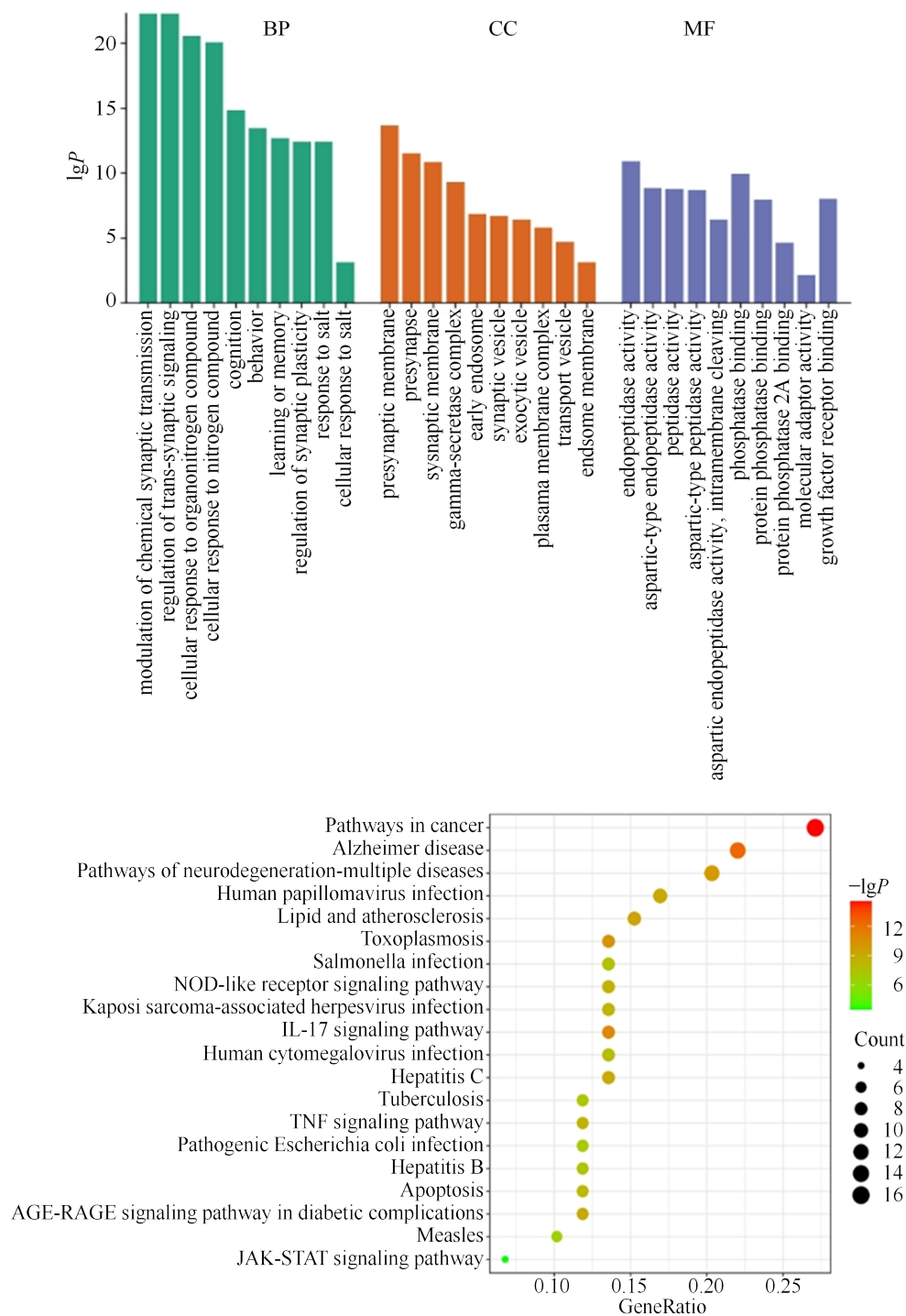


图3 GO功能与KEGG通路富集分析

Fig. 3 GO and KEGG pathway enrichment analysis

肽酶活性、肽酶活性等。KEGG 通路富集结果共 128 个,根据 P 值选取前 20 个富集结果(图 3),主要包括癌症通路、阿尔茨海默病、神经发生通路、NOD 样受体信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等。

3.4 分子对接

根据网络药理学分析可知,花青素可能为黑果腺肋花楸发挥抗 IS 作用的关键成分。选用花青素

与黑果腺肋花楸抗 IS 的 10 个核心靶点依次进行分子对接。对接评分如表 5 所示,结果显示,花青素与 MMP-2 的结合能最低($-34.86 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$),结合效果最好。通过 Pymol 对分子对接结果进行可视化(图 4)。结果显示,花青素与 MMP-2 主要以疏水相互作用,氢键以及 π -堆积的方式结合,提示花青素可能通过调节 MMP-2 从而缓解 IS 损伤。

表5 花青素与核心靶点的对接分数
Table 5 Docking score between anthocyanin and core targets

NO.	基因	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
1	<i>MMP2</i>	-34.86
2	<i>PTGS2</i>	-31.27
3	<i>MAPK3</i>	-30.51
4	<i>TNF</i>	-29.21
5	<i>HSP90AA1</i>	-27.00
6	<i>ESR1</i>	-25.67
7	<i>EGFR</i>	-25.46
8	<i>CASP3</i>	-24.12
9	<i>GSK3B</i>	-24.12
10	<i>APP</i>	-20.44

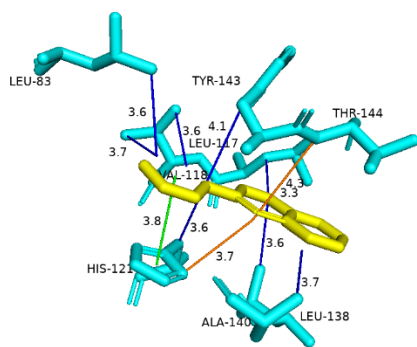


图4 花青素与MMP-2的分子对接可视化分析
Fig. 4 Visual analysis diagram of molecular docking between anthocyanin and MMP-2

3.5 花青素改善pMCAO模型大鼠的BBB损伤

网络药理学分析结果表明,花青素为黑果腺肋花楸提取物抗IS的主要成分,分子对接结果显示,花青素对MMP-2蛋白可能具有较好的结合作用。MMP-2是IS后BBB损伤的重要指标。考察花青素对pMCAO大鼠BBB渗透性及相关蛋白表达的影响。通过EB染色考察BBB通透性,实验结果如图5-A、B所示,与假手术组相比,pMCAO模型大鼠的EB染色面积显著增加,给予花青素后能够显著降低EB染色面积。通过Western blotting实验考察BBB相关蛋白的表达(图5-C),半定量结果显示,与假手术组相比,pMCAO模型大鼠的MMP-2的表达显著增加,Occludin和VE-cadherin的表达显著降低($P<0.01$ 、 0.001),而给予花青素能够显著抑制上述改变($P<0.05$ 、 0.01)。以上结果提示,花青素能够显著缓解pMCAO模型大鼠的BBB损伤。

3.6 花青素减少pMCAO模型大鼠炎症因子的释放

PPI 及 KEGG 结果均提示,黑果腺肋花楸的活

性成分能够调节多条炎症相关通路如炎症因子TNF的表达。进一步通过qRT-PCR方法,考察花青素对pMCAO大鼠缺血半暗带炎症因子释放的影响。实验结果如图6所示,对假手术组相比,模型组炎症因子IL-1 β 、TNF- α 、IL-6和iNOS表达显著增加($P<0.001$),而花青素能够显著降低上述炎症因子的表达($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。提示花青素能够显著抑制pMCAO模型大鼠炎症因子的释放。

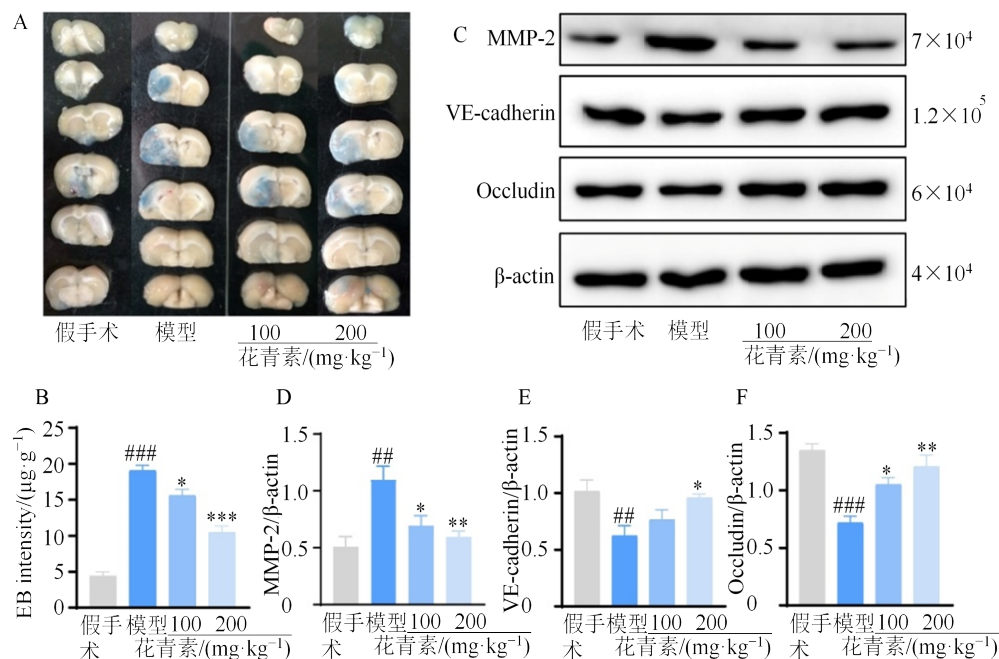
3.7 花青素减少 OGD 处理的 BV2 小胶质细胞 NO₂⁻ 含量及炎症因子的释放

在 OGD 处理的 BV2 小胶质细胞中验证花青素对上述炎症因子释放及 NO_2^- 含量的影响。实验结果如图 7 所示,花青素对正常 BV2 小胶质细胞 NO_2^- 含量无显著影响。与对照组相比,OGD 处理能够显著增加 BV2 小胶质细胞中 NO_2^- 的含量及 *TNF- α* 、*IL-6*、*IL-1 β* 和 *iNOS* 的 mRNA 表达 ($P < 0.01$ 、 0.001)。而给予花青素能够显著抑制上述改变 ($P < 0.001$)。提示,花青素能够显著抑制 OGD 处理的 BV2 小胶质细胞炎症因子的释放。

4 讨论

尽管黑果腺肋花楸的主要成分及其含量已被证实,然而其抗IS的主要活性成分及作用靶点仍不十分明确。本研究首次通过网络药理学的方法分析了其活性成分及抗IS的作用靶点及相关机制。网络药理学分析可知,花青素为黑果腺肋花楸抗IS的主要活性成分,除此之外,绿原酸以及新绿原酸与花青素的度值一致,提示其可能也具有较好的抗IS活性,值得进一步研究。

近年来花青素以其较好的抗氧化活性,被用于各种疾病的研究,尤其能够降低心脑血管疾病的发病风险。虽然目前尚缺乏直接的临床证据表明花青素能够改善脑卒中患者的预后。但是已有临床研究表明,富含花青素的全果、果汁以及提取物均能够降低卒中发生的危险因素,降低血压和心血管风险^[18-19]。在1项涉及43名非吸烟成年人(平均年龄35岁)的平行随机对照试验中,研究人员发现每天给予干预组约60 mg花青素和7.5 g葡萄抗氧化膳食纤维治疗16周能够显著降低血压^[20]。两项临床研究分别指出给予黑果腺肋花楸提取物(花青素30 mg·d⁻¹)治疗12周或24周(花青素27 mg·d⁻¹)可使流体介导扩增显著增加以及肱动脉血压明显下降^[21-22]。健康老年人连续12周食用蓝莓后,发现其大脑顶叶和枕叶的脑血流量得到改善^[23],同时证明,更高的花青素摄入量能够使血压下降12%^[24]。

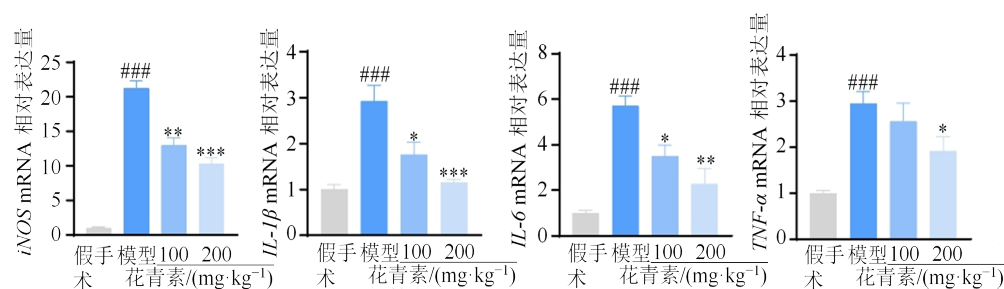


A-EB 染色展示血脑屏障的通透性;B-EB 荧光强度的半定量分析;C-通过蛋白质免疫印迹技术展示血脑屏障相关蛋白 MMP2, VE-cadherin 和 Occludin 的表达;D~F-柱形图展示了上述蛋白的半定量分析;与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$;与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

A-Representative images showing the permeability of BBB by EB staining; B-Histogram showing the semiquantitative analysis of EB intensity; C-Western blotting showing the expressions of BBB-related proteins MMP2, VE-cadherin, Occludin; D-F-Histograms showing the semiquantitative analysis of MMP2/ β -actin, VE-cadherin/ β -actin and Occludin/ β -actin; ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs sham-operated group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图5 花青素对pMCAO模型大鼠BBB损伤的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of anthocyanin on BBB damage of pMCAO-operated rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与假手术组比较: ^{###} $P < 0.001$;与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

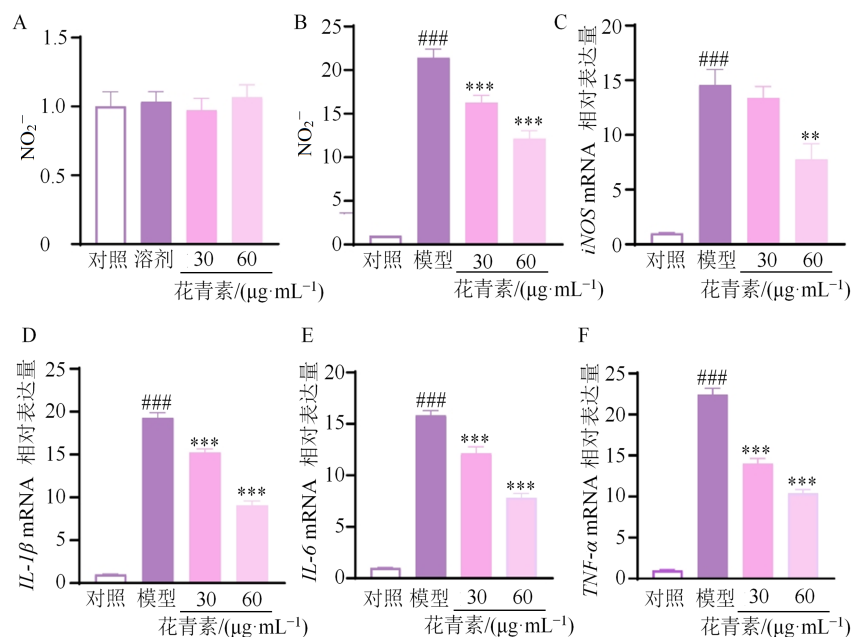
^{###} $P < 0.001$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图6 花青素对pMCAO大鼠缺血半暗带炎症因子释放的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 6 Effects of anthocyanin on release of inflammatory factor in ischemic penumbra of pMCAO-operated rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

这一发现也得到了一项纳入24名成年人(12名老年人和12名年轻人)的研究的支持^[25]。另一项研究发现,在接受含有250 mg花青素的金鸡纳霜提取物治疗4周后,高血压患者的血压也出现了显著下降^[26]。临床前研究发现,花青素具有较好的抗IS活性。从黑大豆种皮中提取的花青素已被证明可通过抑制活性氧的产生和维持线粒体膜电位来抑制OGD诱导的大鼠原代培养皮质神经元死亡^[27]。该作用也在整体实验动物中被证实。花青素还被证明可以

减少MCAO/R诱导的神经损伤、神经元凋亡和脑梗死体积增加^[28-29]。其机制与抑制c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase)的激活,上调p53的表达相关^[28],减少缺血脑组织中Toll样受体4(TLR4)、Nod样受体pyrin结构域3(NLRP3)、caspase-1和IL-8的表达,抑制经典核因子(NF- κ B)和Janus激酶2(JAK2)/信号转导和转录激活因子3(STAT3)信号^[29]。花青素的主要成分矢车菊素-3-葡萄糖苷(C3G)可以降低大鼠IS再灌注(MCAO/R)后的



A~B-正常和OGD处理的BV2小胶质细胞中的NO₂⁻含量;C~F-*iNOS*, *IL-1β*, *IL-6*和*TNF-α*的mRNA水平;与对照组比较:###*P*<0.001;与模型组比较:***P*<0.01 ****P*<0.001。

A-B-nitrite content in normal and OGD-treated BV2 cells; C-F-mRNA levels of inflammatory factors *iNOS*, *IL-1β*, *IL-6* and *TNF-α*; ###*P*<0.001 vs control group; ***P*<0.01 ****P*<0.001 vs model group.

图7 花青素对OGD处理的BV2小胶质细胞NO₂⁻含量及炎症因子释放的影响($\bar{x} \pm s$, *n*=4)

Fig. 7 Effects of anthocyanin on nitrite content and release of inflammatory factor in OGD-treated BV2 microglia($\bar{x} \pm s$, *n*=4)

脂质过氧化物,增加非蛋白硫醇基、血红素氧合酶-1(HO-1)和γ-谷氨酰半胱氨酸合酶(γ-GCS)的水平^[19],从而降低梗死体积,并在小鼠pMCAO模型中抑制凋亡从而改善神经功能^[30]。基于这些发现,研究人员推测花青素在IS中的神经保护作用可能与其抑制氧化应激、抗炎、抗凋亡作用有关。本研究发现,花青素同样能够缓解pMCAO大鼠缺血半暗带中的炎症因子的释放,与文献报道一致。

IS后,BBB破坏是介导IS损伤和缺血级联反应的关键环节。BBB被破坏后,血液成分外渗进入大脑,损害正常的神经功能^[31]。同时,IS可迅速引起脑实质中的炎症反应加剧,释放包括各种促炎细胞因子、趋化因子、活性氧和活化的基质金属蛋白酶(MMPs),增加了胶质细胞的激活,从而加重了BBB的渗漏、脑水肿、神经细胞的死亡和出血转化^[32]。因此,随着对脑损伤后病理机制的研究发现,IS后BBB功能障碍在脑组织损伤中起着非常重要的作用。MMP-2和MMP-9是MMPs家族中的主要成员^[33]。在大脑中,MMPs是由神经元和胶质细胞以非活性的形式分泌的,在正常情况下,MMPs的活性非常低,在IS损伤后,MMPs的前肽去除,获得蛋白水解活性,活化的MMPs可降解胶原、弹性蛋白等基底膜和细胞外基质的成分,破坏脑血管的结

构完整性,造成BBB的通透性增加,脑组织损伤进一步加剧^[34]。同时,有研究发现,IS后激活MMP-2/9会导致Occludin和Claudin-5的表达降低^[35],MMP-2/9在IS后数小时至数天内上调,导致紧密连接(TJs)降解并破坏BBB完整性^[36],使用抑制剂阻断MMP-9能够减少TJs的降解,保持BBB完整^[37]。值得关注的是,分子对接结果显示花青素对MMP-2有较好的结合作用,而整体实验结果也表明MMP-2在pMCAO后显著增加,花青素能够显著降低pMCAO所致的BBB通透性增加,同时能够显著降低MMP-2的表达,并增加Occludin和VE-cadherin的表达。本研究首次从BBB通透性的角度证实了花青素的抗IS作用,并提示MMP-2可能为该作用的治疗靶点。

小胶质细胞是中枢神经系统的常驻免疫细胞。有研究发现,小胶质细胞活化和神经炎症与病理条件下的BBB功能障碍有关^[38]。在脂多糖(LPS)诱导的败血性脑病模型小鼠中,BBB完整性的破坏与小胶质细胞活化同时发生^[39]。在脑微血管内皮细胞(BMECs)和大鼠原代小胶质细胞的共培养模型中,LPS激活的小胶质细胞诱导了对相邻内皮细胞之间细胞旁途径的标志物荧光素钠的高通透性^[40]。活化的小胶质细胞通过细胞因子、趋化因子等促炎因子的升高直接或间接破坏BBB的完整性。此外,

已在体外证明小胶质细胞与内皮细胞共培养物的存在促进了内皮细胞的屏障特性,诱导了TJs中ZO-1和Occludin蛋白的表达^[41]。IL-1 β 被广泛认为是与中枢神经系统中BBB渗漏相关的促炎因子。IL-1 β 处理BMECs 24 h后Claudin-5和Occludin的表达降低^[42]。TNF- α 是一种众所周知的促炎细胞因子,可诱导BBB功能障碍。在体外培养的BMEC中,TNF- α 直接与TNF受体I(TNFR1)或TNF受体II(TNFR2)相互作用以增加的BBB通透性^[43],2种TNF受体协同作用,将TNF- α 转运到BBB^[44]。IL-6通过活性氧自由基(ROS)诱导BMEC通透性增加以及紧密连接蛋白Claudin-5、Occludin和ZO-1表达降低^[45]。本研究表明,花青素能够显著降低小胶质细胞中TNF α 、IL-6、IL-1 β 和iNOS的表达,提示其可能通过抑制小胶质细胞炎症因子的释放进而缓解BBB损伤。

综上所述,本研究首次通过网络药理学方法分析了黑果腺肋花楸抗IS的活性成分和相关机制。通过分子对接和整体及体外实验证实了黑果腺肋花楸主要成分花青素可能通过抑制小胶质细胞炎症因子释放进而缓解BBB损伤。为花青素治疗IS提供了新的实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhou M G, Wang H D, Zeng X Y, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [2] Wang Y L, Liao X L, Zhao X Q, et al. Using recombinant tissue plasminogen activator to treat acute ischemic stroke in China: Analysis of the results from the Chinese National Stroke Registry (CNSR) [J]. Stroke, 2011, 42(6): 1658-1664.
- [3] Qin C, Yang S, Chu Y H, et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: Molecular mechanisms and therapeutic interventions [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 215.
- [4] 王雪松,张素敏,隋韶奕,等.黑果腺肋花楸有效成分提取工艺研究[J].农业科技与装备,2020(5): 49-51.
Wang X S, Zhang S M, Sui S Y, et al. Study on extraction process of active ingredients from *Aronia melanocarpa* [J]. Agric Sci Technol Equip, 2020(5): 49-51.
- [5] 于雪,胡文忠,姜爱丽,等.黑果腺肋花楸营养物质与功效的研究进展[J].食品工业科技,2016,37(10): 396-400.
Yu X, Hu W Z, Jiang A L, et al. Research progress of nutrient elements and the efficacy of *Aronia melanocarpa* [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(10): 396-400.
- [6] 李国明,张丽萍,易平,等.黑果腺肋花楸挥发油化学成分及总黄酮含量分析研究[J].食品安全质量检测学报,2019,10(7): 1920-1926.
Li G M, Zhang L P, Yi P, et al. Analysis of chemical constituents of volatile oils and the contents of total flavonoids in *Aronia melanocarpa* Elliott [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(7): 1920-1926.
- [7] 岑晓斐,贾国晶,惠学东,等.黑果腺肋花楸的研究进展及开发前景[J].宁夏农林科技,2021,62(9): 22-29.
Cen X F, Jia G J, Hui X D, et al. Research progress and development prospect of *Aronia melanocarpa* elliot [J]. Ningxia J Agric For Sci Technol, 2021, 62(9): 22-29.
- [8] 李美兰,黄金珠,李红梅,等.黑果腺肋花楸对小鼠肝肾抗氧化性的初步研究[J].畜牧与饲料科学,2018,39(10): 1-3.
Li M L, Huang J Z, Li H M, et al. A preliminary study on effect of *Aronia melanocarpa* on antioxidant capacity of liver and kidney in mice [J]. Anim Husb Feed Sci, 2018, 39(10): 1-3.
- [9] Kulling S E, Rawel H M. Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)-A review on the characteristic components and potential health effects [J]. Planta Med, 2008, 74(13): 1625-1634.
- [10] Appel K, Meiser P, Millán E, et al. Chokeberry (*Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot) concentrate inhibits NF- κ B and synergizes with selenium to inhibit the release of pro-inflammatory mediators in macrophages [J]. Fitoterapia, 2015, 105: 73-82.
- [11] Parzonko A, Naruszewicz M. Cardioprotective effects of *Aronia melanocarpa* anthocyanins. From laboratory experiments to clinical practice [J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(2): 174-179.
- [12] Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309: 116306.
- [13] 廖韵诺,赵凯丽,郭宏伟.中药网络药理学的应用与挑战[J].中草药,2024,55(12): 4204-4213.
Liao Y N, Zhao K L, Guo H Q. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [14] Luo L K, Wu S L, Chen R Q, et al. The study of neuroprotective effects and underlying mechanism of Naoshuantong capsule on ischemia stroke mice [J]. Chin Med, 2020, 15(1): 119.

- [15] Wang K, Lei L, Cao J Y, et al. Network pharmacology-based prediction of the active compounds and mechanism of Buyang Huanwu Decoction for ischemic stroke [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(4): 1050.
- [16] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [17] Martin Y C. A bioavailability score [J]. *J Med Chem*, 2005, 48(9): 3164-3170.
- [18] Laudani S, Godos J, di Domenico F M, et al. Anthocyanin effects on vascular and endothelial health: Evidence from clinical trials and role of gut microbiota metabolites [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1773.
- [19] Manolescu B N, Oprea E, Mititelu M, et al. Dietary anthocyanins and stroke: A review of pharmacokinetic and pharmacodynamic studies [J]. *Nutrients*, 2019, 11(7): 1479.
- [20] Jiménez J P, Serrano J, Tabernero M, et al. Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors [J]. *Nutrition*, 2008, 24(7/8): 646-653.
- [21] Istaş G, Wood E, Le Sayec M, et al. Effects of *Aronia* berry (poly)phenols on vascular function and gut microbiota: A double-blind randomized controlled trial in adult men [J]. *Am J Clin Nutr*, 2019, 110(2): 316-329.
- [22] Ahles S, Stevens Y R, Joris P J, et al. The effect of long-term *Aronia melanocarpa* extract supplementation on cognitive performance, mood, and vascular function: A randomized controlled trial in healthy, middle-aged individuals [J]. *Nutrients*, 2020, 12(8): 2475.
- [23] Bowtell J L, Aboo-Bakkar Z, Conway M E, et al. Enhanced task-related brain activation and resting perfusion in healthy older adults after chronic blueberry supplementation [J]. *Physiol Appl Nutr Metab*, 2017, 42(7): 773-779.
- [24] Cassidy A, O'Reilly É J, Kay C, et al. Habitual intake of flavonoid subclasses and incident hypertension in adults [J]. *Am J Clin Nutr*, 2011, 93(2): 338-347.
- [25] Igwe E O, Charlton K E, Roodenrys S, et al. Anthocyanin-rich plum juice reduces ambulatory blood pressure but not acute cognitive function in younger and older adults: A pilot crossover dose-timing study [J]. *Nutr Res*, 2017, 47: 28-43.
- [26] Herrera-Arellano A, Miranda-Sánchez J, Avila-Castro P, et al. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial [J]. *Planta Med*, 2007, 73(1): 6-12.
- [27] Bhuiyan M I, Kim J Y, Ha T J, et al. Anthocyanins extracted from black soybean seed coat protect primary cortical neurons against *in vitro* ischemia [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(7): 999-1008.
- [28] Shin W H, Park S J, Kim E J. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 79(2): 130-137. .
- [29] Cui H X, Chen J H, Li J W, et al. Protection of anthocyanin from *Myrica rubra* against cerebral ischemia-reperfusion injury via modulation of the TLR4/NF- κ B and NLRP3 pathways [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1788.
- [30] Min J Y, Yu S W, Baek S H, et al. Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 500(3): 157-161.
- [31] Jiang X Y, Andjelkovic A V, Zhu L, et al. Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke [J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163/164: 144-171.
- [32] Huang Y Y, Chen S P, Luo Y M, et al. Crosstalk between inflammation and the BBB in stroke [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2020, 18(12): 1227-1236.
- [33] Pancotto T E, Rossmeisl J H, Huckle W R, et al. Evaluation of endothelin-1 and MMPs-2, -9, -14 in cerebrospinal fluid as indirect indicators of blood-brain barrier dysfunction in chronic canine hypothyroidism [J]. *Res Vet Sci*, 2016, 105: 115-120.
- [34] Ungvari Z, Tarantini S, Kirkpatrick A C, et al. Cerebral microhemorrhages: Mechanisms, consequences, and prevention [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 312(6): H1128-H1143.
- [35] Qi Z F, Liang J, Pan R, et al. Zinc contributes to acute cerebral ischemia-induced blood-brain barrier disruption [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 95: 12-21.
- [36] Liu J, Jin X C, Liu K J, et al. Matrix metalloproteinase-2-mediated occludin degradation and caveolin-1-mediated claudin-5 redistribution contribute to blood-brain barrier damage in early ischemic stroke stage [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(9): 3044-3057.
- [37] Cui J K, Chen S Y, Zhang C Y, et al. Inhibition of MMP-9 by a selective gelatinase inhibitor protects neurovasculature from embolic focal cerebral ischemia [J]. *Mol Neurodegener*, 2012, 7: 21.
- [38] Qiu Y M, Zhang C L, Chen A Q, et al. Immune cells in the BBB disruption after acute ischemic stroke: Targets for immune therapy? [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 678744.
- [39] Nishioku T, Dohgu S, Takata F, et al. Detachment of brain pericytes from the basal *Lamina* is involved in

- disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice [J]. Cell Mol Neurobiol, 2009, 29(3): 309-316.
- [40] Matsumoto J, Dohgu S, Takata F, et al. Lipopolysaccharide-activated microglia lower P-glycoprotein function in brain microvascular endothelial cells [J]. Neurosci Lett, 2012, 524(1): 45-48.
- [41] Mehrabadi A R, Korolainen M A, Odero G, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 regulates microglia mediated decrease of endothelial tight junction integrity [J]. Neurochem Int, 2017, 108: 266-271.
- [42] Beard R S, Haines R J, Wu K Y, et al. Non-muscle Mlck is required for β -catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in IL-1 β -mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 8): 1840-1853.
- [43] Lopez-Ramirez M A, Fischer R, Torres-Badillo C C, et al. Role of caspases in cytokine-induced barrier breakdown in human brain endothelial cells [J]. J Immunol, 2012, 189(6): 3130-3139.
- [44] Pan W H, Kastin A J. TNF α transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice [J]. Exp Neurol, 2002, 174(2): 193-200.
- [45] Voirin A C, Perek N, Roche F. Inflammatory stress induced by a combination of cytokines (IL-6, IL-17, TNF- α) leads to a loss of integrity on bEnd. 3 endothelial cells *in vitro* BBB model [J]. Brain Res, 2020, 1730: 146647.

[责任编辑 齐静雯]