

## 木犀草素改善脑缺血再灌注损伤的作用机制研究

杨军仙<sup>1</sup>, 唐中生<sup>2</sup>, 孔雨露<sup>1</sup>, 韩真<sup>1</sup>, 梁雨莎<sup>3</sup>, 朱世杰<sup>2\*</sup>, 李媛<sup>4\*</sup>

1. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州中医药大学 基础医学院, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州中医药大学 针灸推拿学院, 贵州 贵阳 550025

4. 贵州中医药大学 护理学院, 贵州 贵阳 550025

**摘要:** **目的** 通过网络药理学的预测技术和实验验证, 研究木犀草素治疗脑缺血再灌注损伤 (CIRI) 的作用机制。 **方法** 以“木犀草素”“脑缺血再灌注损伤”为关键词, 于中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 2.3 数据库、GeneCards 5.19 数据库检索靶点, 利用 Venny 2.1.0 工具得到交集靶点, 将交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 网络构建, 应用 Cytoscape3.10.1 软件对蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络给予可视化分析, 根据网络拓扑学参数挑选出关键靶点, 利用 Metascape 数据库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。利用分子对接技术, 验证木犀草素对关键靶蛋白的结合能力。 **SPF** 级雄性大鼠设置假手术组、模型组 and 木犀草素低、中、高剂量 (30、50、70 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 除假手术组外, 均制备 CIRI 模型, 造模后, 每天 18:00 时 ig 给药, 假手术和模型组 ig 同等剂量 0.9% 氯化钠溶液, 连续治疗 7 d。对大鼠进行神经功能评分, 利用苏木精-伊红 (HE) 染色观察病理改变, 采用免疫组化和 Western blotting 检测 Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子 (NF)- $\kappa$ B p65 和白细胞介素 (IL)-6 的蛋白表达。 **结果** 网络药理学分析预测木犀草素调控 IL6、NF- $\kappa$ B、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 等核心靶点, 且结合能力较好, 主要的作用途径包括 NF- $\kappa$ B、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 等。在体实验的结果表明, 模型组神经功能评分明显高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 与模型组相比, 木犀草素中、高剂量组的神经功能评分显著下降 ( $P < 0.05$ ); 与假手术组相比, 模型组大鼠海马区神经细胞离散、肿胀及细胞核固缩, 给予木犀草素中、高剂量治疗后海马区的神经细胞排列相对紧密、细胞形态相对完整; 与假手术组相比, 模型组大鼠脑组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 和 IL-6 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 木犀草素中、高剂量组与模型组比较, 能明显降低脑组织中 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 水平 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 木犀草素可改善 CIRI 引起的神经损伤, 降低神经功能评分, 其作用机制可能与抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B/IL6 通路相关。

**关键词:** 脑缺血再灌注损伤; 木犀草素; 炎症反应; 网络药理学; Toll 样受体 4; 核因子- $\kappa$ B p65; 白细胞介素-6

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)03-0752-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.002

## Role and mechanism of luteolin in cerebral ischemia-reperfusion injury

YANG Junxian<sup>1</sup>, TANG Zhongsheng<sup>2</sup>, KONG Yulu<sup>1</sup>, HAN Zhen<sup>1</sup>, LIANG Yusha<sup>3</sup>, ZHU Shijie<sup>2</sup>, LI Yuan<sup>4</sup>

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

3. School of Acupuncture-Moxibustion and Tuina, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

4. School of Nursing, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

**Abstract: Objective** The mechanism of luteolin in treating cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) was investigated through network pharmacology prediction techniques and experimental verification. **Methods** The keywords “luteolin” and “cerebral ischemia-reperfusion injury” were used to search for targets in the TCMSP 2.3 and GeneCards 5.19 databases. The intersection targets were obtained using the Venny 2.1.0 tool and imported into the STRING database for PPI network construction. The PPI network was

**收稿日期:** 2025-11-19

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (82360873); 贵州中医药大学大学生创新创业项目 (S2024106621492); 贵州中医药大学研究生教育创新计划项目 (YCXKYB2023017); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK [2022] 一般 471)

**作者简介:** 杨军仙, 女, 本科生, 研究方向为中药药理机制。E-mail: 3035009790@qq.com

**\*通信作者:** 朱世杰, 男, 讲师, 研究方向为中医药对脑血管疾病作用效果及机制。E-mail: 434574127@qq.com

李媛, 女, 副教授, 研究方向为脑血管疾病的治疗及护理。E-mail: 21298993@qq.com

visualized and analyzed using Cytoscape 3.10.1 software, and key targets were selected based on network topology parameters. The Metascape database was used to perform gene ontology (GO) biological function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on the intersection targets. Molecular docking technology was used to verify the binding ability of luteolin to key target proteins. SPF-grade male rats were divided into sham operation group, model group, and low-, medium-, and high-dose luteolin groups (30, 50, and 70 mg·kg<sup>-1</sup>). Except for the sham operation group, CIRI models were prepared in the other groups. After modeling, the rats were ig administered at 18:00 every day. The sham operation and model groups were ig administered the same dose of 0.9% sodium chloride solution for seven consecutive days. The neurological function scores of the rats were evaluated, and pathological changes were observed by HE staining. The protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), nuclear factor (NF)-κB p65, and interleukin (IL)-6 were detected by immunohistochemistry and Western blotting. **Results** Network pharmacology analysis predicted that luteolin regulated core targets such as IL6, NF-κB, and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and had good binding ability. The main action pathways included NF-κB, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (AKT), etc. The results of *in vivo* experiments showed that the neurological function score of the model group was significantly higher than that of the sham operation group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the neurological function scores of the medium- and high-dose luteolin groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the sham operation group, the neurons in the hippocampus of the model group rats were dispersed, swollen, and the nuclei were condensed. After treatment with medium- and high-dose luteolin, the neurons in the hippocampus were relatively closely arranged and the cell morphology was relatively intact. Compared with the sham operation group, the levels of TLR4, NF-κB p65, and IL-6 in the brain tissue of the model group rats were significantly increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the levels of TLR4, NF-κB p65, and IL-6 in the brain tissue of the medium- and high-dose luteolin groups were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Luteolin can improve the neurological damage caused by CIRI and reduce the neurological function score. Its mechanism of action may be related to the inhibition of the TLR4/NF-κB/IL6 pathway.

**Key words:** cerebral ischemia-reperfusion injury; luteolin; inflammatory response; network pharmacology; Toll-like receptor 4; nuclear factor-κB p65; interleukin-6

脑缺血再灌注损伤 (CIRI) 是常见的脑血管疾病之一, 具有高致残率、高死亡率等特征, 对人类的生命健康构成严重威胁<sup>[1]</sup>, 但临床的治疗效果并不理想, 该病仍是国内外临床和基础的研究热点之一。该病的病机复杂, 相关研究<sup>[2]</sup>发现神经炎症、氧化应激和细胞凋亡与 CIRI 的出现存在着紧密的关联。现代研究虽然在一定程度上解释了该病发生的机制, 但仍未完全阐明, 如研究报告指出核因子 (NF)-κB 在 CIRI 病理过程中起重要作用, 是炎症调节的主要通路之一<sup>[3]</sup>, 但具体机制未被完全阐明。

当前, 临床对 CIRI 的治疗手段主要是以药物溶栓与机械取栓为主<sup>[4]</sup>。然而, 这种方法存在一些局限性, 如时间窗严格、血栓溶解不完全和费用较高等问题, 对该疾病的治疗效果不尽人意。中药拥有众多的成分、多个靶点、较轻的不良反应和较好的治疗效果等特点, 在防治 CIRI 的研究中具有较高的价值<sup>[5]</sup>。木犀草素为天然黄酮的代表, 存在于多种天然植物药中, 如可从金银花、菊花等提取获得, 具有抗炎、神经保护和抗氧化等作用<sup>[6-8]</sup>。有研究表明<sup>[9]</sup>, 木犀草素对治疗 CIRI 具有较好效果, 但其对 CIRI 作用机制还没有被完全阐明, 所以本实

验在前期研究基础上, 借助网络药理学与分子对接技术, 通过在体实验研究其治疗 CIRI 的效果及其机制。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 体质量 230~280 g, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2024-0021。制作模型前将大鼠置于实验室自然光照环境下, 适应性饲养 1 周。本研究涉及的所有动物实验操作均严格遵循贵州中医药大学实验动物伦理委员会批准的实验动物福利与伦理审查方案 (批准编号 20230235)。

### 1.2 仪器

2016 转轮式切片机 (德国徕卡公司); BMJ-A 型包埋机 (常州中威电子仪器厂); S1010E 离心机 (美国 SCLOGEX 公司); KZ-III-F 高速低温组织研磨仪、DS-H200 数显水平摇床 (武汉塞维尔科技有限公司); 5200 Multi 荧光图像分析系统 (Tanon 公司); 202-2AB 型电热恒温干燥箱 (天津市泰斯特仪器有限公司)。

### 1.3 主要试剂

木犀草素 (麦克林公司, 批号 L812409, 质量

分数 $\geq 98\%$ ); NF- $\kappa$ B p65 抗体(成都正能生物技术有限责任公司, 货号 310126); Toll 样受体 4(TLR4) 抗体(武汉贝茵莱生物科技, 货号 PAB30643); 白细胞介素(IL)-6 抗体(AFFINITY 公司, 货号 DF6087); DAB 显色液(货号 CW2069S)、蛋白酶抑制剂(批号 60345)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号 30324)、SDS-PAGE loading buffer(批号 50346)、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号 20335)、ECL 高灵敏度化学发光检测试剂盒(批号 30330)、一步法快速 WB(HRP)试剂盒(批号 20330)、一步法快速 WB(HRP)试剂盒(鼠)(批号 30324), 均购自康为世纪生物科技股份有限公司; 苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号 C0105S); 组织包埋盒(货号 31050102W, 江苏世泰实验器材有限公司); 山羊抗兔 IgG(Absam 公司, 货号 ab205718)。

## 2 方法

### 2.1 木犀草素治疗 CIRI 的靶点网络构建及通路分析

**2.1.1 木犀草素与 CIRI 靶点的获取** 以口服利用率(OB) $\geq 30\%$ 和药物相似度(DL) $\geq 0.18$ 为标准, 对木犀草素进行评价。以“luteolin”“CIRI”为关键词, 将物种设定为“Homo sapiens”, 依托中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP) 2.3 数据库(<https://tcm-sp-e.com/index.php>)、GeneCards 5.19 数据库(<https://www.genecards.org/>)进行检索, 靶点检索工作均于 2025 年 1 月 14 日完成。利用 Venny 2.1.0 工具得到交集靶点。

**2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及核心靶点筛选** 将交集靶点导入 STRING(<https://cn.string-db.org/>)数据库进行 PPI 网络构建, 创建过程中, 将物种设定为“Homo sapiens”, 相互作用置信度阈值为“0.7”。运用 Cytoscape 3.10.1 软件对构建好的 PPI 网络进行可视化。利用 CentiScaPe v2.2 插件计算各节点的度(degree)值数据, 把介数中心性(Betweenness)和接近中心性(Closeness)纳入考量, 综合 3 项拓扑指标筛选核心靶点。

**2.1.3 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析及可视化** 利用 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 背景物种统一设定为“Homo sapiens”, 富集方法采用 Metascape 默认整合算法。再凭借微生信在线分析平台对 GO 和 KEGG 分析结果进行可视化处理。

**2.1.4 分子对接** 利用分子对接技术评估木犀草素与蛋白的结合稳定性。在 PDB 数据库中取得其 3D 晶体结构, 然后在 PyMOL 软件中开展蛋白结构的去水和去配体, 利用 AutoDockTool 1.5.6 软件进行加氢以及电荷处理。同时, 从 TCMSP 数据库中获取木犀草素 3D 结构, 利用 AutoDockTool 1.5.6 软件平台开展配体预处理。采用 AutoDock 分子对接软件对木犀草素与潜在靶点蛋白进行分子对接模拟, 获取相应的结合自由能数据。借助 PyMOL 软件对对接结果进行分析。

### 2.2 木犀草素对 CIRI 大鼠的作用

**2.2.1 分组及给药方法** SPF 级雄性大鼠, 体质量 220~250 g, 设置假手术组、模型组和木犀草素低、中、高剂量(30、50、70 mg $\cdot$ kg $^{-1}$ )组, 每组 14 只。除假手术组外, 均制备 CIRI 模型, 造模后, 每天 18:00 时 ig 给药, 假手术和模型组 ig 同等剂量 0.9%氯化钠溶液, 连续治疗 7 d。

**2.2.2 CIRI 模型制备** 用 3%戊巴比妥钠(1.5 mL $\cdot$ kg $^{-1}$ ) ip 麻醉, 仰卧位固定于手术台, 颈部剪毛, 碘伏消毒, 颈部正中偏左切口, 分离左侧颈总动脉(CCA)、颈内动脉(ICA)、颈外动脉(ECA), 结扎 CCA 近心端, 在 ICA 与 ECA 分叉处结扎 ECA, 用动脉夹暂时夹闭 ICA, 在 CCA 距离分叉处 5 mm 处剪小口, 向远心端方向插入线栓并打一活结固定, 打开动脉夹, 继续插入线栓, 进入深度约 18 mm, 使其到达大脑中动脉(MCA)起始处, 阻断 MCA 血流。固定好线栓, 消毒并逐层缝合, 将留于皮肤外约 2 cm 的线栓尾端标记。假手术组不阻断 MCA 血流, 其余方法同上。阻断 2 h 后拔线栓至 ICA 颅外段, 恢复 MCA 血供, 使之再灌注。

### 2.3 神经功能评分

大鼠造模后, 以出现向一侧偏行、无法走直线、旋转等典型 CIRI 症状作为纳入标准, 进行神经功能评价<sup>[10]</sup>, 0 分: 无神经缺损症状; 1 分: 不能伸展对侧前爪; 2 分: 行走时向偏瘫侧转圈; 3 分: 向偏瘫侧倾倒; 4 分: 不能自发行走, 意识丧失。其中 4 分者给予剔除, 随后将造模合格的大鼠通过随机数字表法, 分为模型组及木犀草素高、中、低剂量组, 以保证各组间的基线一致性。于给药结束后再次进行神经功能评分。

### 2.4 HE 染色

采用 3%戊巴比妥钠(1.5 mL $\cdot$ kg $^{-1}$ ) ip 麻醉大鼠, 先后灌注 0.9%氯化钠溶液 2 L $\cdot$ kg $^{-1}$  和 4%多聚

甲醛  $1\text{ L}\cdot\text{kg}^{-1}$  固定, 灌注结束后置于 4% 多聚甲醛中进行后固定。每组大鼠取 5 只, 按照石蜡切片的流程进行包埋固定后, 采用冠状位进行石蜡切片, 厚  $6\ \mu\text{m}$ , 然后按照 HE 染色方法进行流程脱蜡染色, 光学显微镜下观察海马区神经元变化。

## 2.5 Western blotting 检测

各组取 3 只大鼠, 麻醉后快速取大鼠海马, 称质量后加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂 (100:1) 研磨, 离心后提取上清液。通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将蛋白样品与上样缓冲液混合并加热变性。制备 SDS-PAGE 凝胶, 电泳和转膜, 使用 5% 脱脂奶粉封闭膜, 封闭后在  $4\ ^\circ\text{C}$  下 TLR4 (1:1500)、NF- $\kappa\text{B}$  p65 (1:1000)、IL-6 (1:1000) 一抗孵育过夜。次日, 室温下二抗 (1:3000) 孵育 1 h, 显影后使用 Image J 软件分析条带灰度值, 并通过目的蛋白与内参 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值计算目的蛋白的相对表达量。

## 2.6 免疫组化检测

取石蜡切片, 按免疫组织化学试剂盒方法操作, 分别依次滴加一抗: 兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体 (1:100)、兔抗大鼠 NF- $\kappa\text{B}$  p65 多克隆抗体 (1:50)、兔抗大鼠 IL-6 多克隆抗体 (1:100),  $4\ ^\circ\text{C}$  过夜; 次日滴加二抗: 山羊抗兔 IgG (1:1500),  $37\ ^\circ\text{C}$  孵育 1 h; DAB 显色并苏木精复染, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明后中性树脂封片。

## 2.7 统计学分析

计量资料均先采用 Shapiro-Wilk 检验进行正态性检验, Levene 检验进行方差齐性检验; 符合正态分布且方差齐的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 结合 LSD- $t$  检验; 计数资料采用  $\chi^2$  检验; 采用 SPSS 26.0 软件完成数据分析。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学分析

**3.1.1 木犀草素与 CIRI 靶点的获取** 木犀草素 OB 为 36.16%, DL 为 0.25, 远超 TCMSP 药物分子筛选标准。经数据库检索, 得到与木犀草素相关的靶点 56 个, CIRI 相关靶点 1559 个。采用 Venny2.1.0 软件将二者相关靶点取交集, 鉴定出 35 个共同靶点。结果见图 1。

**3.1.2 PPI 网络构建** 将 35 个交集靶点录入 STRING 数据库中, 并利用与借助 Cytoscape 3.10.1 软件及其 CentiScaPev2.2 插件构建 PPI 网络图 (图 2), 对网络

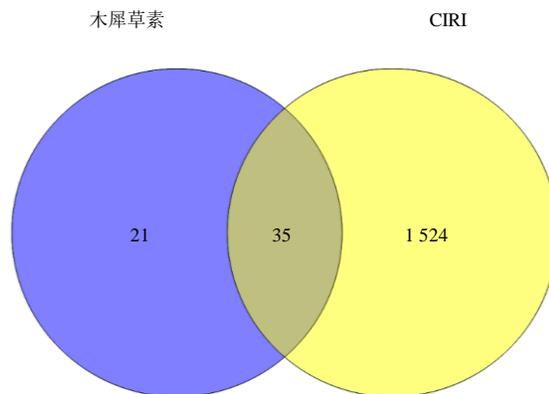


图 1 木犀草素药物靶点与 CIRI 交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersecting targets of luteolin and CIRI

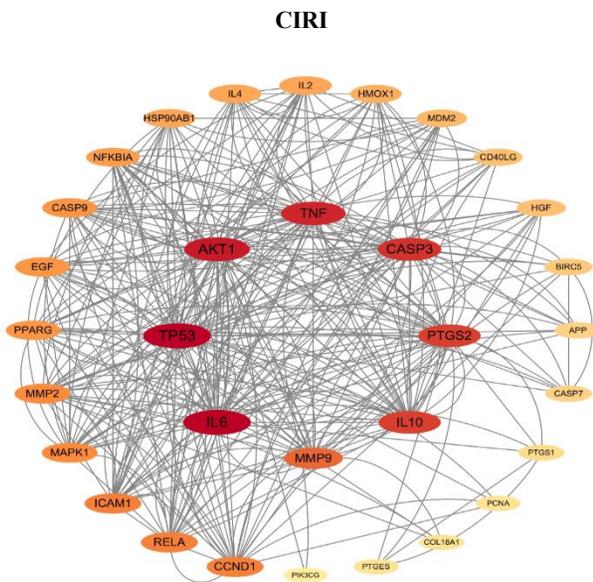


图 2 PPI 网络

Fig. 2 PPI Network

中各节点的 degree、betweenness、closeness 3 项拓扑指标进行计算 (表 1)。有 IL-6 等核心靶点, 网络

表 1 木犀草素靶点与 CIRI 核心靶点

Table 1 Core targets of luteolin and CIRI

序号	靶点名称	Degree	Betweenness	Closeness
1	IL6	46	95.4	0.8
2	TP53	46	133.7	0.8
3	AKT1	42	98.0	0.8
4	TNF	40	48.2	0.7
5	CASP3	38	66.0	0.7
6	IL10	36	30.9	0.7
7	PTGS2	36	90.7	0.7
8	MMP9	30	44.0	0.7
9	CCND1	26	31.5	0.6
10	ICAM1	26	11.5	0.6

图中节点采用梯度可视化表示，节点的颜色深浅和大小与 degree 值呈正相关。明确采用 degree 值取前 10 的量化标准界定核心靶点。

**3.1.3 靶点 GO 与 KEGG 通路富集分析** 在 GO 分析中，以  $P < 0.01$  为条件进行筛选，生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 分别选取前 10

位进行双侧图显示，结果见图 3。CIRI 与木犀草素主要涉及功能如下：BP 主要涉及细胞对细胞因子刺激的反应、白细胞凋亡过程、蛋白质磷酸化的正调控等；CC 中富集基因在膜筏、内质网腔以及核膜等关键细胞结构中；MF 主要关乎细胞因子活性、蛋白酶结合和肿瘤坏死因子受体超家族等的

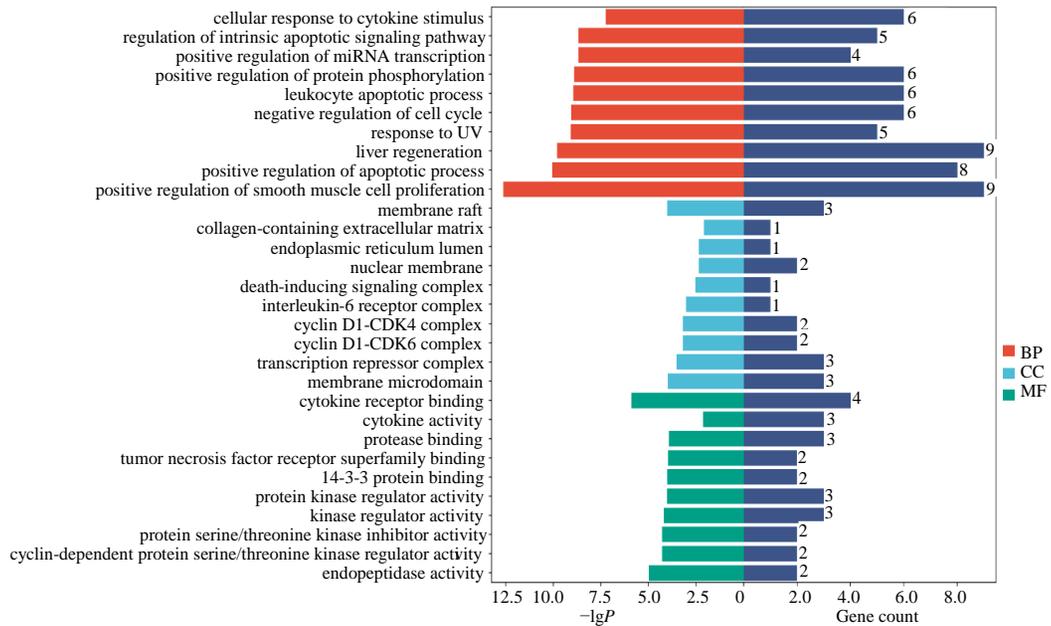


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO Enrichment analysis

调节。

KEGG 富集分析以  $P < 0.01$  为条件进行筛选，结果表明，木犀草素治疗 CIRI 的可能作用机制涉及 84 条通路，在本研究中，按照  $P$  值从小到大排序、对 CIRI 影响重要的 12 条通路绘制气泡图见图 4，主要包含 NF- $\kappa$ B、TNF 与动脉粥样硬化等信号通路。结果表明，木犀草素可通过 NF- $\kappa$ B、TNF 与动脉粥样硬化等信号通路来发挥对 CIRI 的治疗作用，有研究证实神经炎症在 CIRI 中发挥着重要作用，本研究后续着重从抑制 NF- $\kappa$ B 信号通过改善神经炎症方面验证其作用机制。

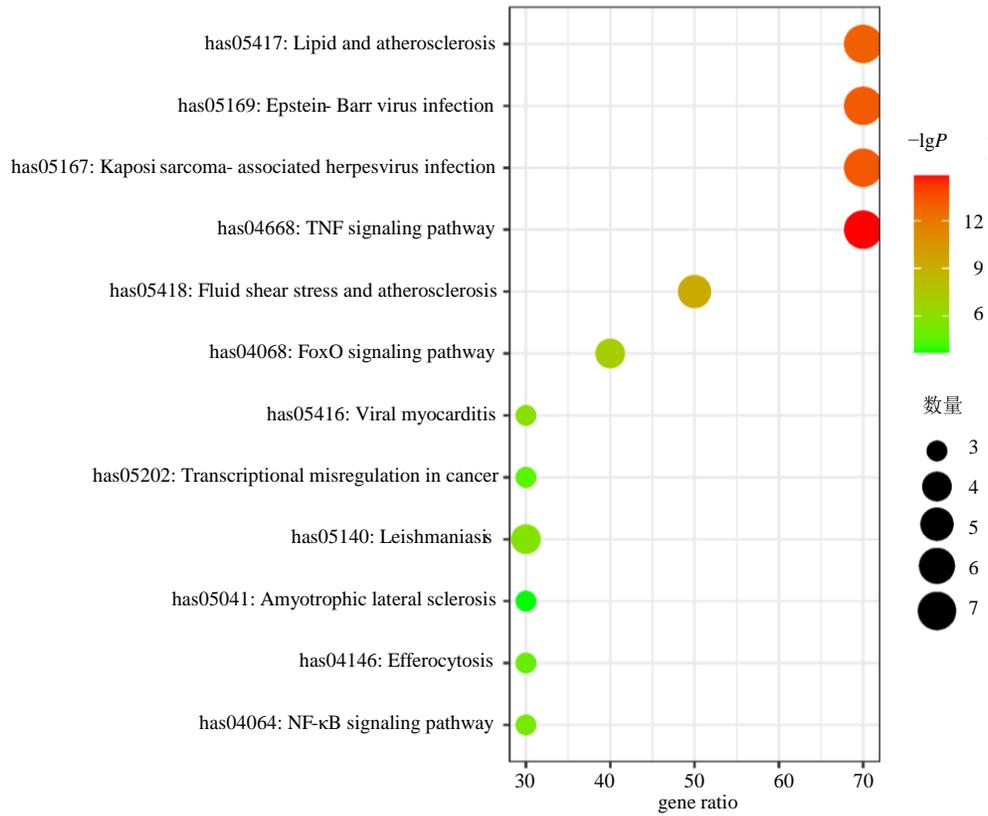
**3.1.4 分子对接结果** 参考文献报道及网络药理学分析结果，本研究选取了 TLR4、NF- $\kappa$ B、IL6、蛋白激酶 B (AKT1) 等 12 个核心靶点与木犀草素进行分子对接，结合能值越小表示活性成分与靶点活性中心结合活性越强。分子对接结果显示木犀草素与 12 个核心靶点均具有较好的结合能力 (图 5、表 2)。

### 3.2 木犀草素对 CIRI 大鼠的治疗作用

**3.2.1 神经功能评分** 模型组神经功能评分明显高于假手术组 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比，木犀草素组大鼠的神经功能评分均下降，中、高剂量组差异显著 ( $P < 0.05$ )。结果表明，木犀草素对 CIRI 具有改善神经功能的作用。见图 6。

**3.2.2 HE 染色** 如图 7 所示，假手术组大鼠海马区神经细胞排列紧密，形态饱满，呈圆形或椭圆形，核仁清晰可见，染色均匀；模型组海马区神经细胞分布散乱，核仁固缩，间隙增大，大量细胞溶解坏死；与模型组比较，给予木犀草素中、高剂量治疗后，海马区的神经细胞排列相对紧密、细胞形态相对完整，但仍能看到个别细胞存在皱缩、核仁消失。

**3.2.3 TLR4 在海马区的表达** 免疫组化及 Western blotting 结果显示，模型组大鼠脑组织中 TLR4 的含量较假手术组明显升高 ( $P < 0.05$ )；相较于模型组，木犀草素中、高剂量组脑组织中 TLR4 表达水平呈现明显下调 ( $P < 0.05$ )，中剂量组与高剂量组间差



气泡的大小与映射到该通路的靶点数量呈正相关；颜色的深浅则用于直观体现  $P$  值的大小。  
Bubble size correlates with the count of targets in the pathway; and color depth represents the  $P$  value.

图 4 KEGG 通路富集分析

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis

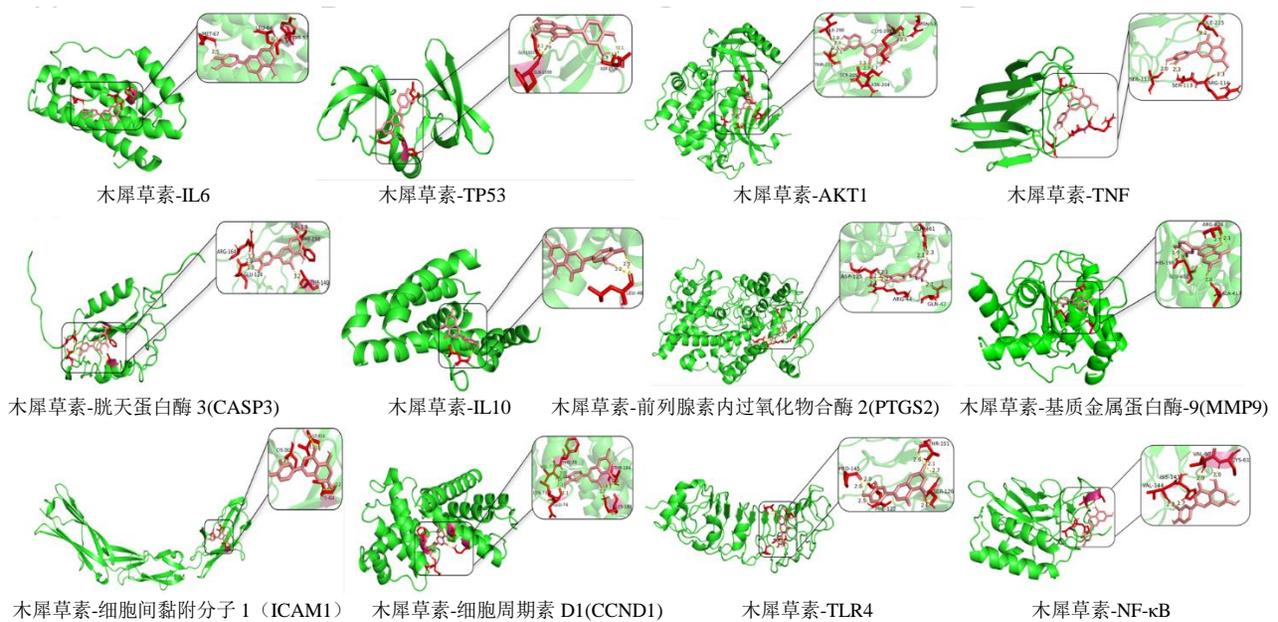


图 5 木犀草素与对接结合能小于  $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  核心靶点的分子对接

Fig. 5 Molecular docking of luteolin with core targets exhibiting binding energies  $< -20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

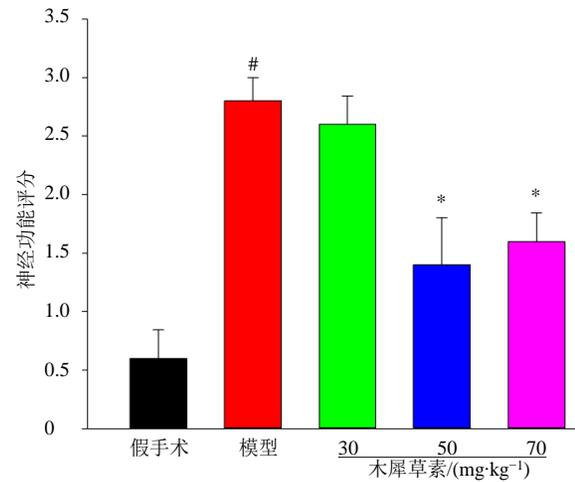
异无统计学意义。见图 8。

### 3.2.4 NF-κB p65 在海马区的表达 免疫组化及

Western blotting 结果显示,模型组大鼠脑组织中 NF-κB p65 的含量显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ); 与模

表 2 木犀草素与关键靶点的对接结合能

核心靶点	PDB ID	蛋白分辨率 ( $\times 10^{-10}$ )	结合能/ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
IL6	1ALU	1.90	-26.02
TP53	8SWJ	1.60	-31.21
AKT1	7NH5	1.90	-30.67
TNF	4NN0	1.42	-33.18
CASP3	6BFJ	1.54	-27.57
IL10	2H24	2.00	-22.76
PTGS2	5F19	2.04	-33.14
MMP9	5TH6	1.70	-39.92
ICAM1	2OZ4	2.70	-22.05
CCND1	6P8E	2.30	-29.08
TLR4	2Z62	1.70	-30.54
NF- $\kappa$ B	8TQD	2.02	-26.90



与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ 。  
# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group.

图 6 神经功能评分 ( $\bar{x} \pm s, n=14$ )

Fig. 6 Neurological function score ( $\bar{x} \pm s, n=14$ )

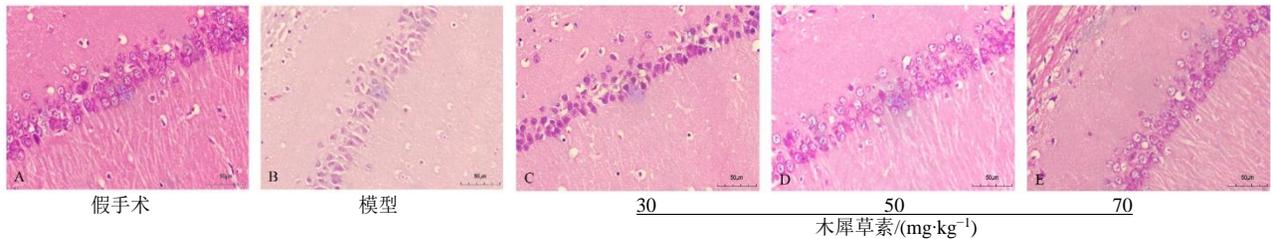


图 7 大鼠脑部海马区 HE 染色结果 ( $\times 400$ )

Fig. 7 Results of HE staining in hippocampal region of rat brain ( $\times 400$ )

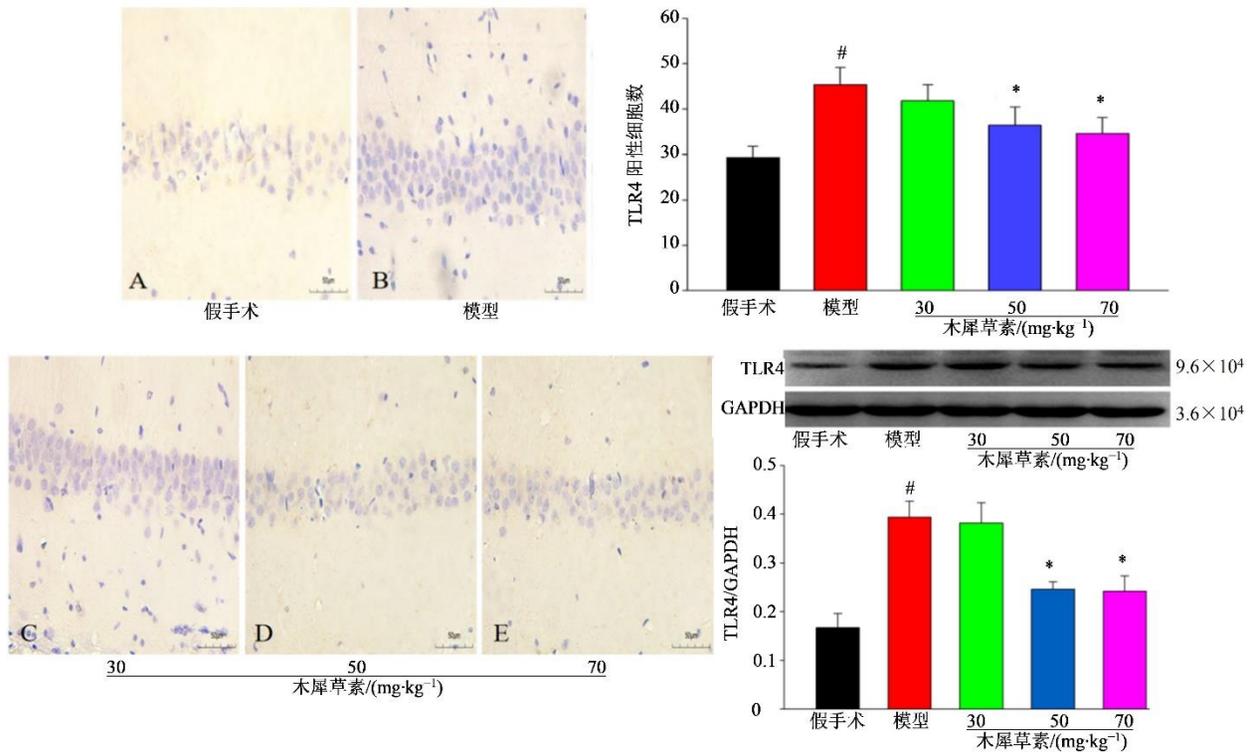
型组相比,木犀草素中、高剂量组脑组织中 NF- $\kappa$ B p65 含量均显著下降 ( $P < 0.05$ )。见图 9。

**3.2.5 IL-6 在海马区的表达** 免疫组化及 Western blotting 结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 IL-6 活性显著上升 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,木犀草素中、高剂量均可显著降低脑组织中 IL-6 活性 ( $P < 0.05$ )。结果见图 10。

#### 4 讨论

CIRI 的发病机制涉及多因素、多环节的复杂过程,主要包括神经炎症反应、氧化应激损伤和细胞凋亡等诸多关键因素。其中,炎症反应作为 CIRI 的核心发病机制之一,贯穿于 CIRI 的全过程<sup>[11-12]</sup>。有研究报道<sup>[13-14]</sup>,在 CIRI 的关键病理生理过程,TLR4 介导的炎症起着关键作用,同时, NF- $\kappa$ B 通路也在其中发挥着重要作用。本研究明确, TLR4 为网络分析中上游关键调控蛋白,虽未进入中药成分与疾病的交集靶点列表,但其作为 NF- $\kappa$ B 通路的核心启动分子,与网络分析筛选出的 IL-6、TNF 等核心靶点存在直接调控关系,是连接网络预测靶点与实验

验证轴的关键节点。对其进行分子对接发现木犀草素与 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 均具有良好的对接活性,结合能分别为  $-30.54$ 、 $-26.90 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。实验团队通过网络药理学分析得出,木犀草素发挥对 CIRI 的治疗机制中涉及细胞对细胞因子刺激的反应、内在凋亡信号的调节、微小 RNA 转录的正调控、蛋白质磷酸化的正调控等。有研究表明<sup>[15-16]</sup>,TLR4 是蛋白质受体 TLR 家族的成员,TLR4 抑制或功能缺陷已被证明可以有效减轻脑缺血引起的炎症损伤,TLR4 与内源性和外源性配体的结合可以通过影响 NF- $\kappa$ B 通路调节大鼠的炎症因子。Yang 团队<sup>[17]</sup>通过对小鼠帕金森研究发现,通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号传导介导,降低 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等促炎因子发挥治疗帕金森的作用。有文献报道<sup>[18-20]</sup>,NF- $\kappa$ B 作为转录因子在调节细胞存活和炎症级联反应中至关重要。静息状态下,核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B- $\alpha$ )与 NF- $\kappa$ B p65/p50 异二聚体结合。CIRI 发生后, I $\kappa$ B 激酶  $\beta$  (IKK- $\beta$ ) 激活后触发 I $\kappa$ B- $\alpha$  的磷酸化和降解,从而导致 NF- $\kappa$ B 二聚体的释放和 NF- $\kappa$ B 的核易位,助于增强 IL-6

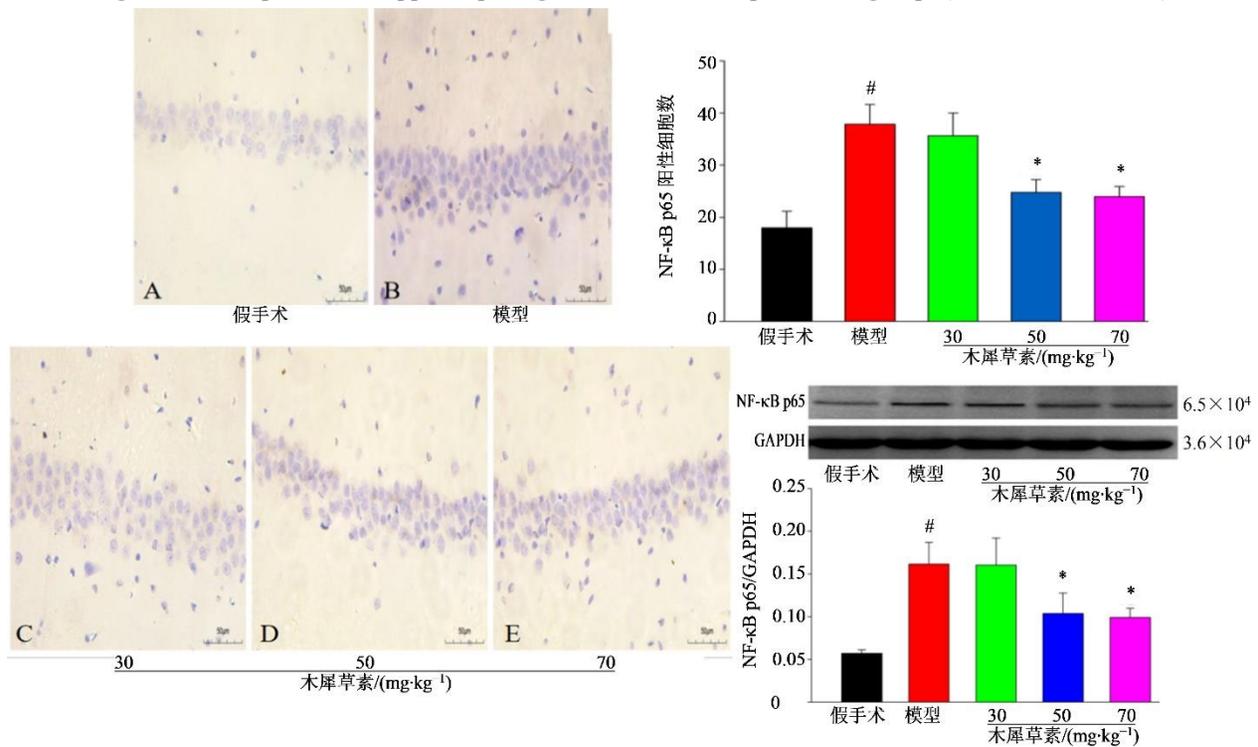


与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ 。

# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group.

图 8 各组大鼠脑部海马区 TLR4 表达 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 8 TLR4 expression in hippocampal region of rats across experimental groups ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

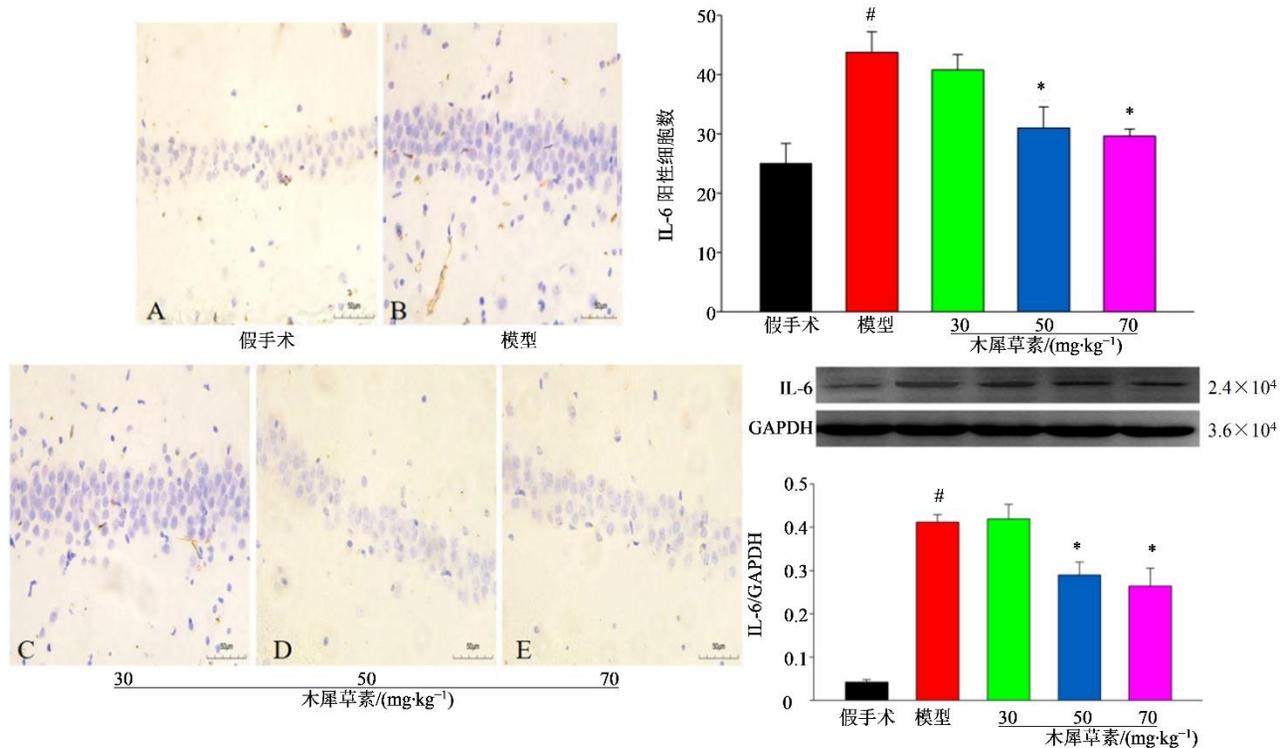


与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ 。

# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group.

图 9 各组大鼠脑部海马区 NF-κB p65 表达 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 9 NF-κB p65 expression in hippocampal region of rats across experimental groups ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



与对照组比较: # $P < 0.05$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$ 。

# $P < 0.05$  vs control group; \* $P < 0.05$  vs model group.

图 10 各组大鼠脑部海马区 IL-6 表达 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 10 IL-6 expression in the hippocampal region of rats across experimental groups ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

等多种炎症介质的合成。Sun 等<sup>[21]</sup>通过颈动脉闭塞 1 h 进行缺血, 然后灌注模拟 CIRI 模型, 发现大鼠脑部 IL-6 表达明显升高。上述研究虽然丰富了 CIRI 防治机制, 但 CIRI 的病理机制十分复杂, 仍需进一步深入研究。本实验团队借助网络药理学分析了木犀草素及治疗 CIRI 的靶点和发挥作用的相关信号通路。

通过分析, 实验团队共发现木犀草素药物靶点与 CIRI 交集的靶点共 35 个, 将交集靶点输入 STRING 数据库中, 结合拓扑分析, 筛选出 IL6、AKT1、TNF 等核心靶点。通过 GO 功能、KEGG 通路富集分析及分子对接得出 NF- $\kappa$ B 通路在 CIRI 防止过程中发挥重要作用, 其核心影响因子有 IL6、AKT1 等。本课题组推测木犀草素可能通过调节 TLR4 表达, 抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 阻碍其从细胞质向细胞核的转位过程, 从而减少下游 IL-6 等促炎基因的表达与释放, 以此发挥对 CIRI 的治疗作用。实验结果显示, 中、高剂量木犀草素经 ig 给药, 能下调 CIRI 大鼠神经功能损伤程度评分。通过 Western blotting 和免疫组织化学染色检测 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 在 CIRI 大鼠脑部海马的表达。与模型组相比, 给予中、高剂量木犀草素治疗, 能下

调 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、IL-6 的表达, HE 染色的结果也反映木犀草素能抑制 CIRI 引起的神经细胞的病理改变, 稳定其细胞形态。结果表明, 木犀草素可以通过降低炎症相关因子发挥治疗 CIRI 的作用。

本研究结果表明, CIRI 发生后, 脑部海马区 TLR4 会高表达, 进而激活 NF- $\kappa$ B 通路中 NF- $\kappa$ B p65、IL-6, 给予中、高剂量木犀草素 ig 治疗后, 可以降低 CIRI 大鼠神经功能损害, 其作用机制可能是通过下调 TLR4 的表达, 进而抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活, 阻碍其从细胞质向细胞核的转位过程, 从而降低下游 IL-6 等促炎基因的表达与释放。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108612.
- [2] Xu D D, Kong T T, Shao Z Q, et al. Orexin-a alleviates astrocytic apoptosis and inflammation via inhibiting OX1R-mediated NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2021, 1867(11): 166230.
- [3] Ridder D A, Schwaninger M. NF-kappaB signaling in

- cerebral ischemia [J]. *Neuroscience*, 2009, 158(3): 995-1006.
- [4] Mao Z G, Tian L Y, Liu J, et al. Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154111.
- [5] Yang Z M, Zhang Q H, Yu L H, et al. The signaling pathways and targets of traditional Chinese medicine and natural medicine in triple-negative breast cancer [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 264: 113249.
- [6] Jayawickreme D K, Ekwosi C, Anand A, et al. Luteolin for neurodegenerative diseases: A review [J]. *Pharmacol Rep*, 2024, 76(4): 644-664.
- [7] 杨萍, 刘军刚, 李学娟, 等. 木犀草素治疗炎症性疾病作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(22): 8424-8435.
- Yang P, Liu J G, Li X J, et al. Research progress on mechanism of luteolin in treatment of inflammatory diseases [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(22): 8424-8435.
- [8] 李佳敏. 木犀草素在缺血性脑卒中致血脑屏障损伤中的作用及机制研究 [D]. 咸阳: 陕西中医药大学, 2024.
- Li J M. The role and mechanism of luteolin in blood-brain barrier injury induced by ischemic stroke [D]. Xianyang: Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, 2024.
- [9] 吕明义, 邓淑玲, 郭文晏, 等. 木犀草素抑制 JAK2/STAT3 信号通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤作用的研究 [J]. *天津医药*, 2022, 50(4): 363-368.
- Lyu M Y, Deng S L, Guo W Y, et al. Effects of luteolin on alleviating cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by inhibiting the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Tianjin Med J*, 2022, 50(4): 363-368.
- [10] Bederson J B, Pitts L H, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: Evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [11] Przykaza Ł. Understanding the connection between common stroke comorbidities, their associated inflammation, and the course of the cerebral ischemia/reperfusion cascade [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 782569.
- [12] Ye Y J, Rao Z W, Xie X X, et al. Naoqing formula alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury induced inflammatory injury by regulating Csf3 mediated JAK/STAT pathway and macrophage polarization [J]. *Phytomedicine*, 2025, 140: 156626.
- [13] Wu W Z, Xu L B, Sun L, et al. Ethanol extract of *Periploca forrestii* Schltr. and chlorogenic acid alleviate ischemic stroke by inhibiting TLR4-mediated neuroinflammation [J]. *Phytomedicine*, 2025, 145: 157026.
- [14] Fan S W, Du H Y, Yao Y X, et al. Protection against stroke-induced blood-brain barrier disruption by Guanxinning injection and its active-component combination via TLR4/NF- $\kappa$ B/MMP9-mediated neuroinflammation [J]. *Phytomedicine*, 2025, 147: 157162.
- [15] Yang X, Pan Y J, Cai L, et al. Calycosin ameliorates neuroinflammation via TLR4-mediated signal following cerebral ischemia/reperfusion injury *in vivo* and *in vitro* [J]. *J Inflamm Res*, 2024, 17: 10711-10727.
- [16] Zhang M M, Guo B N, Zhang X W, et al. IFP35, a novel DAMP, aggravates neuroinflammation following acute ischemic stroke via TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 signaling [J]. *J Neuroinflammation*, 2025, 22(1): 164.
- [17] Yang L X, Huang H H, Fan Y, et al. Astragaloside IV ameliorates Parkinson's disease by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B-dependent neuroinflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 160: 114972.
- [18] Li B, Zhang B K, Li Z Y, et al. Ginkgolide C attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced inflammatory impairments by suppressing CD40/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 312: 116537.
- [19] Imakiire S, Kimuro K, Yoshida K, et al. Activated factor X inhibition ameliorates NF- $\kappa$ B-IL-6-mediated perivascular inflammation and pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2025, 329(1): L183-L196.
- [20] Jia K J, Shen R L, Li Y D, et al. LAMP3 exacerbates autophagy-mediated neuronal damage through NF- $\kappa$ B in microglia [J]. *Cell Signal*, 2025, 129: 111658.
- [21] Sun Y L, Liu D, Liu Y C, et al. VISTA alleviates microglia-mediated neuroinflammation after cerebral ischemia-reperfusion injury via regulating ACOD1/itaconic acid metabolism [J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(10): 13430-13448.