

咖啡酸苯乙酯治疗脊髓损伤的网络药理学研究及实验验证*

王柯文, 陈建敏, 李筱璐, 桂裕昌, 唐 云, 许建文[△]

(广西医科大学第一附属医院康复医学科, 南宁 530021)

摘要 目的: 运用网络药理学方法探究咖啡酸苯乙酯(CAPE)治疗脊髓损伤(SCI)的主要机制并行实验验证。**方法:** 通过 SwissTargetPrediction、SEA、STITCH 和 TargetNet 数据库获取 CAPE 的作用靶点, 通过 GeneCards、Malacards、DrugBank、CTD 及 TTD 数据库获取 SCI 相关基因。使用 STRING 在线数据库获取交集基因的蛋白互作(PPI)网络并通过 Cytoscape 软件筛选核心靶点, R 软件对交集基因进行 GO 分析及 KEGG 通路富集分析, 并对富集结果进行可视化, AutoDock 软件进行分子对接。将 24 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、CAPE 低剂量组、CAPE 高剂量组, 每组 6 只。采用改良 Allen 法建立 SCI 大鼠模型, Basso Beattie Bresnahan(BBB)评分检测大鼠后肢运动功能, 苏木精-伊红(HE)染色及尼氏染色观察脊髓组织结构及神经元, RT-qPCR 法验证 CAPE 干预后大鼠脊髓组织核心靶点的表达。**结果:** 共筛选出 48 个 CAPE 治疗 SCI 的预测作用靶点, *EGFR*、*JUN*、*ESR1*、*MMP9*、*PTGS2* 为核心靶点。GO 分析和 KEGG 分析显示, CAPE 治疗 SCI 可能与雌激素、HIF-1、VEGF 和 IL-17 等信号通路有关, 分子对接表明 CAPE 与 *EGFR*、*JUN*、*ESR1*、*MMP9*、*PTGS2* 蛋白均有较好的结合性。动物实验结果表明, CAPE 干预明显提高 SCI 大鼠 BBB 评分, 减轻 SCI 大鼠脊髓组织的结构破坏以及神经元损伤。与模型组相比, CAPE 低剂量组及高剂量组 *JUN*、*MMP9*、*PTGS2*、*EGFR* mRNA 表达水平降低, *ESR1* mRNA 表达水平升高(均 $P < 0.05$)。**结论:** CAPE 可能通过下调 *EGFR*、*JUN*、*MMP9* 和 *PTGS2* 基因表达及上调 *ESR1* 基因表达, 调控雌激素、HIF-1、VEGF 和 IL-17 等信号通路发挥 SCI 后的神经保护作用。

关键词 咖啡酸苯乙酯; 脊髓损伤; 网络药理学

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1005-930X(2023)05-0799-08

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.05.013

Network pharmacological study and experimental verification of caffeic acid phenethyl ester in the treatment of spinal cord injury

Wang Kewen, Chen Jianmin, Li Xiaolu, Gui Yuchang, Tang Yun, Xu Jianwen. (Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To explore the main mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in the treatment of spinal cord injury (SCI) using the method of network pharmacology and test it experimentally. **Methods:** The action targets of CAPE were obtained from SwissTargetPrediction, SEA, STITCH and TargetNet databases, and SCI related genes were obtained from GeneCards, Malacards, DrugBank, CTD and TTD databases. The protein interaction (PPI) network of overlapping genes was obtained from STRING online database and the core genes were screened by Cytoscape software. GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis of overlapping genes were carried out by R software, the enrichment results were visualized and AutoDock software was used for molecular docking. Twenty-four SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, low-dose CAPE group and high-dose CAPE group, with 6 rats in each group. The SCI rat model was established by modified Allen method. The motor function of hind limbs in rats was evaluated by Basso Beattie Bresnahan (BBB) score. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Nissl staining were used to observe the structural integrity of spinal cord tissue and neuronal survival. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to verify the expression levels of core targets in spinal cord tissue of rats after

*基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81960417); 广西自然科学基金资助项目(No. 2022GXNSFBA035545; No. 2018GXNSFAA050033); 广西科技计划项目(No. 桂科 AB20159027); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(No. 2022KY0086)
[△]通信作者, E-mail: 1049662254@qq.com
收稿日期: 2023-01-29

CAPE intervention. **Results:** A total of 48 predictive targets for CAPE treatment of SCI were screened and *EGFR*, *JUN*, *ESR1*, *MMP9* and *PTGS2* were the core targets. GO analysis and KEGG analysis showed that CAPE treatment of SCI might be related to estrogen, HIF-1, VEGF and IL-17 signaling pathways. Molecular docking showed that CAPE had good binding to EGFR, JUN, ESR1, MMP9 and PTGS2 proteins. The results of animal experiments showed that the intervention of CAPE significantly increased the BBB score of SCI rats, and reduced the structural damage of spinal cord tissue and neuronal injury in SCI rats. Compared with the model group, the expression levels of *JUN*, *MMP9*, *PTGS2* and *EGFR* mRNA in low-dose CAPE group and high-dose CAPE group decreased, while the expression level of *ESR1* mRNA increased (all $P < 0.05$). **Conclusion:** CAPE may regulate the signaling pathways of estrogen, HIF-1, VEGF and IL-17 by down-regulating the *EGFR*, *JUN*, *MMP9* and *PTGS2* gene expressions and up-regulating the *ESR1* gene expression, and then play a neuroprotective role after SCI.

Keywords caffeic acid phenethyl ester; spinal cord injury; network pharmacology

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)以脊髓结构和功能的异常改变为特征,通常会导致损伤节段以下肢体的感觉、运动和神经功能的损害或缺失^[1],按损伤机制可分为原发性和继发性损伤。原发性损伤指脊髓组织和血管在损伤当时立即受到挤压、牵拉、撕裂和剪切,直接导致细胞死亡,通常被认为不可逆。继发性损伤是指损伤后脊髓微环境发生改变导致的逐渐加重的神经损伤级联病理反应,是减轻SCI后神经损害的重要治疗方向^[2]。

咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)是一种天然酚类化合物,具有抗炎、抗凋亡、抗癌、抗病毒、抗氧化和促进损伤修复^[3]等作用,其具有亲脂性,在芳香族和脂肪族结构中有长的碳基团,可使腹腔给药后维持对抗疾病所需的足够血药浓度^[4]。有研究表明,CAPE可促进SCI大鼠运动功能恢复,抑制促炎细胞因子如白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧化酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)表达^[5],降低SCI后组织和血清中IL-6、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 水平,并预防SCI后水肿和微出血^[6]。但目前仍然缺乏对CAPE治疗SCI的相关信号通路以及机制的系统研究。

网络药理学是结合生物信息学和药理学,整合药物和疾病相关的基因、蛋白质进行综合分析的研究方法^[7]。SCI涉及多靶点、多因素,使用网络药理学方法可从不同角度系统综合地研究药物与疾病的关系。本研究采用网络药理学方法探讨CAPE对SCI的作用及潜在分子机制,并通过分子对接以及动物实验验证,以期为后续研究及临床应用提供一

定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 药物-疾病共同靶点获取 使用PubChem数据库(表1)以“Caffeic Acid Phenethyl Ester”为检索词获得CAPE的SMILES格式及3D格式,使用Swiss-TargetPrediction数据库、SEA数据库、TargetNet数据库、STITCH数据库作为潜在靶点分子搜索工具。在SwissTargetPrediction数据库中使用 ≥ 0.10 的集合概率,并从“选择生物体”选项中选择“智人”;在SEA数据库中设置MaxTc ≥ 0.4 ;此外,在STITCH中“最小所需交互得分”选择0.40;在TargetNet数据库中设置选中的概率 ≥ 0.10 。经Uniprot数据库对靶点名称矫正后汇总去重后获得CAPE预测作用靶点。以“Spinal Cord injury”为检索词,在GeneCards数据库、Malacards数据库、DrugBank数据库、CTD数据库、TTD数据库中检索得到的基因合并去重作为疾病相关基因数据。将上述获得的基因在Venny 2.1.0进行交集映射,交集靶点集合为CAPE治疗SCI的预测作用靶点。

1.2 蛋白互作(PPI)网络的构建及关键基因的筛选

在STRING 11.5数据库中以蛋白种属“Homo sapiens”、阈值0.4标准建立PPI关联图。用Cytoscape 3.7.2行拓扑分析,筛选Network Analyzer插件中3个重要参数:度值(degree)、介数中心性和紧密中心性均高于中位数的节点构成Hub集;收集Cyto-Hubba插件中的最大团中心性(MMC)算法得分前10的基因作为MMC集;使用聚类分析插件MCODE进一步分析网络,选取得分最高的蛋白模

块作为MCODE集,可认为是最主要的功能和关键基因。以上3种方法得到的交集基因作为核心靶点,进行进一步分子对接模拟。

表1 数据库和分析平台

名称	网址
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
SwissTargetPrediction	http://www.swisstargetprediction.ch/
SEA	https://sea.bkslab.org/
STITCH	http://stitch.embl.de/
TargetNet	http://targetnet.scbdd.com
GeneCards	https://www.genecards.org/
Malacards	https://www.malacards.org/
DrugBank	https://go.drugbank.com/
CTD	http://ctdbase.org/
TTD	https://db.idrblab.net/ttd/
Venny 2.1.0	https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html
STRING 11.5	https://cn.string-db.org/
PDB	https://www.rcsb.org/
Uniprot	https://www.uniprot.org/
R 4.2.1	https://cloud.r-project.org/
AutoDock	https://autodock.scripps.edu/

1.3 GO富集分析和KEGG通路富集分析 利用R 4.2.1对“1.1项”获得的交集靶点进行GO富集分析和KEGG通路富集分析,绘制校正后的P值最小的5个分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular components, CC)、生物过程(biological process, BP)以及20条KEGG通路的气泡图。

1.4 化合物—核心靶点基因编码蛋白的分子对接

使用AutoDock 4.2.6将核心靶点与CAPE进行分子对接实验,验证相互作用活性。蛋白质晶体结构从PDB数据库下载:表皮生长因子受体(EGFR)(PDB:5UG9)、ESR1(PDB:5DXE)、JUN(PDB:5T01)、基质金属蛋白酶9(MMP9)(PDB:6ESM)、前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)(PDB:5F19)。利用AutoDockTools 1.5.6对蛋白质晶体和化合物结构进行处理,包括分离蛋白质结构和原始配体、去除水分子、为结构加电荷,转换成“PDBQT”格式,利用AutoDock软件完成分子对接,提取对接结果,采用PyMOL 2.5.4进行对接结果的可视化展示。

1.5 实验动物 SPF级成年雌性Sprague Dawley(SD)大鼠,体重180~220 g,购于广西医科大学实

验动物中心,动物使用许可证号:SYXK(桂)2020-0004;动物生产许可证号:SCXK(桂)2020-0003。动物饲养于室温20~25℃,相对湿度45%~50%,12 h/12 h明暗交替,自由摄食、饮水。本研究所有动物实验经过广西医科大学实验动物伦理委员会审核。

1.6 主要试剂 CAPE(纯度97%)、玉米油(试剂级)购于上海麦克林生化科技股份有限公司;实时荧光定量PCR(RT-qPCR)试剂盒购于武汉赛维尔生物科技有限公司;苏木精—伊红(HE)染色试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;尼氏染色液购于北京索莱宝科技有限公司;Nucleozol RNA提取试剂购于德国Macherey Nagel公司;逆转录试剂购于北京全式金生物技术股份有限公司。

1.7 大鼠SCI模型制备 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠俯卧位固定于手术台上,以T10棘突为中心取背部后正中纵行切口,长约3 cm,逐层进入,沿棘突剥离椎旁肌,显露T9~T11棘突及椎板,咬除T9~T11全部椎板至椎弓根部,暴露硬脊膜并保持其完整性。采用改良Allen法(10 g重物2.5 cm高度垂直打击T10节段脊髓)建立大鼠SCI模型,大鼠后肢痉挛性抽搐数次,大鼠苏醒后双后肢瘫痪即为模型建立成功。假手术组仅摘除椎板暴露脊髓,未撞击损伤。逐层缝合肌肉、筋膜、皮肤。术后3 d每天腹腔注射8万单位青霉素以预防感染,每天2次局部按摩辅助膀胱排尿直至膀胱功能恢复。

1.8 动物分组及处理 CAPE溶解于10%乙醇+90%玉米油溶液中。将24只SD大鼠随机分为4组:假手术组、模型组、CAPE低剂量组(5 mg/kg)、CAPE高剂量组(10 mg/kg)^[8],每组6只。除假手术组外,其余各组大鼠均复制SCI模型,造模成功后,假手术组和模型组以等体积的10%乙醇+90%玉米油溶液腹腔注射,CAPE低剂量及高剂量组术后立即腹腔注射CAPE溶液,共给药7 d。

1.9 后肢运动功能评估 各组大鼠于术后第1、第3、第7天,采取双盲法进行后肢运动功能评分,评分参照Basso Beattie Bresnahan(BBB)评分量表,评分范围0~21分,0分表示大鼠后肢各关节无活动,21分表示后肢运动功能完全正常。

1.10 脊髓组织病理学观察 术后第7天处死大鼠,取包含损伤节段的脊髓组织(约1 cm),使用4%多聚甲醛固定、脱水、包埋、切片,行HE染色,在病

理图像分析仪下观察并拍照。

1.11 尼氏染色 将石蜡切片脱蜡复水,浸泡于焦油紫尼氏染色液中,于56℃温箱中避光浸染1h,去离子水冲洗后浸泡于分化液中反应2min,经乙醇梯度脱水,中性树胶封固,显微镜下观察神经元形态。

1.12 RT-qPCR法检测 *JUN*、*MMP9*、*PTGS2*、*EGFR*、*ESR1* 基因表达 术后第7天,收集各组大鼠脊髓组织,分别加入500 μL Nucleozol经冷冻研磨充分裂解后提取总RNA,逆转录成cDNA后行PCR扩增。反应体系:cDNA模板2 μL,正向引物0.4 μL,反向引物0.4 μL,SYBR Green qPCR Master MIX 10 μL,无酶水7.2 μL。反应程序:95℃预变性30s;95℃变性15s,60℃退火、延伸30s,共40个循环。引物序列如下:*GAPDH*上游:5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3',下游:5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3';*JUN*上游:5'-CGTTAACAGTGGGTGCCAACTC-3',下游:5'-TCGCAACAGTCAAGTTCTCAAG-3';*MMP9*上游:5'-CCCTGGAACACACAACGTCT-3',下游:5'-TTCACCCGGTTGTGGAACTC-3';*PTGS2*上游:5'-CTTGAACACGGACTTGCTCAC-3',下游:5'-GCCTTTGCCACTGCTTGTA-3';*EGFR*上游:5'-CTATCATGTGCAAACACGGTCACTC-3',下游:5'-ACGTCAGTGGGTGGCACAG-3';*ESR1*上游:5'-CAAGTCGATTCCGCATGATGA-3',下游:5'-TC-CAGGACTCGGTGGATGTG-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达量。

1.13 统计学方法 采用SPSS 27.0软件进行数据处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CAPE的潜在作用靶点预测 通过数据库筛选汇总并取交集去重得到48个基因,作为CAPE治疗SCI的预测作用靶点,见图1。

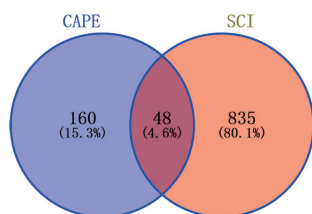


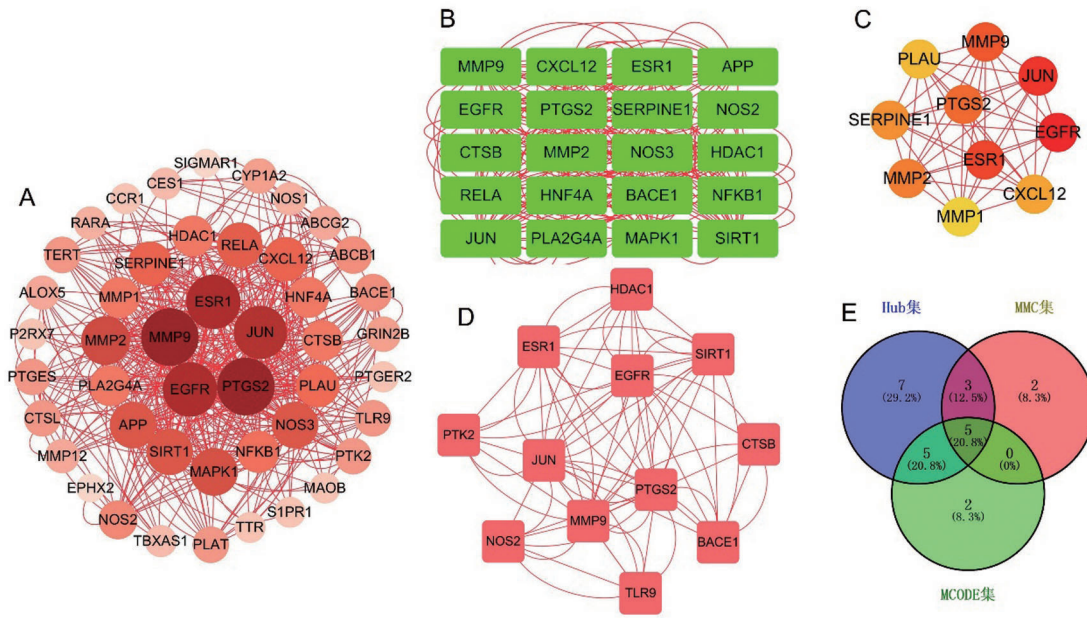
图1 CAPE作用靶点与SCI相关靶点韦恩图

2.2 交集靶点PPI网络及核心靶点 将在STRING 11.5使用中等置信度0.4的条件筛选的结果导入Cytoscape 3.7.2得到该PPI网络图,包含46个节点和492条边(其中ALPL和KIF11两个靶点因不与其他蛋白连接而被隐藏)。

应用Cytoscape软件中的Network Analyzer工具对PPI网络图中的节点进行统计,各节点根据degree排序,degree大的节点颜色深,具有更多的生物功能(图2A)^[9]。进一步使用Network Analyzer工具行拓扑分析,degree、介数中心性和紧密中心性的中位数分别为8.5、0.009 791 68、0.508 490 81,筛选出大于其中位数的Hub集(图2B)。CytoHubba插件筛选出的MMC集排名前10的基因(图2C),利用MCODE插件识别出3个蛋白质模块,相互作用更紧密且功能特征相近的靶点多聚集在同一蛋白质模块中,其中MCODE1模块得分在3个模块中最高,为6.909分,可认为关键功能靶点在此聚集(图2D)。Venny 2.1.0映射上述3种筛选方法所获得靶点,交集靶点共5个,分别为*PTGS2*、*MMP9*、*EGFR*、*ESR1*、*JUN*,为CAPE治疗SCI的核心靶点(图2E)。

2.3 GO功能富集分析及KEGG通路富集分析

48个交集靶点通过GO富集分析,删除 $P > 0.05$ 部分数据,共富集到854个条目,其中所涉及BP为769条,CC为30条,MF为55条,绘出GO富集条目排名前5位气泡图(图3)。GO富集结果显示,CAPE通过对多种生物学过程调控发挥对SCI的治疗作用,其中BP主要影响对细菌来源分子的反应、对脂多糖的反应、细胞对活性氧类的反应、细胞对化学应激的反应、对氧化应激的反应等;CC主要影响肽酶抑制剂复合物、膜筏、膜微区、囊泡腔等;MF主要影响内肽酶活性、血红素粘合剂、四吡咯结合、转录共激活因子结合等。KEGG富集通路条目排名前20位见图4,与SCI相关的信号通路主要有雌激素(Estrogen)信号通路、缺氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、IL-17信号通路。此外,5个核心靶点参与调控上述4条与SCI相关的信号通路(表2)。



A: CAPE—SCI 交集靶点 PPI 网络图; B: Network Analyzer 筛选出的 Hub 集; C: Cytohubba 插件 MMC 集; D: MCODE 集; E: 3 种筛选方法交集映射得到的核心靶点。

图2 交集靶点 PPI 网络及核心靶点

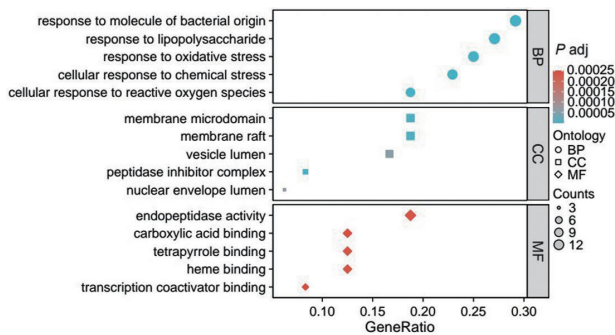


图3 GO 富集分析结果

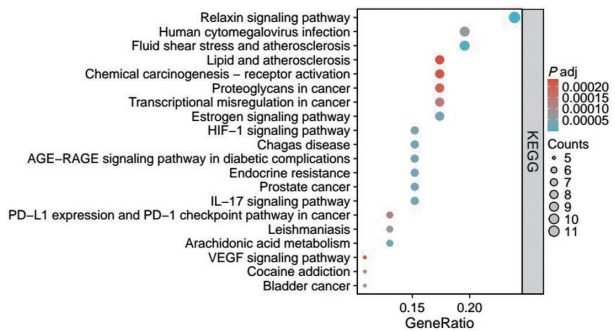


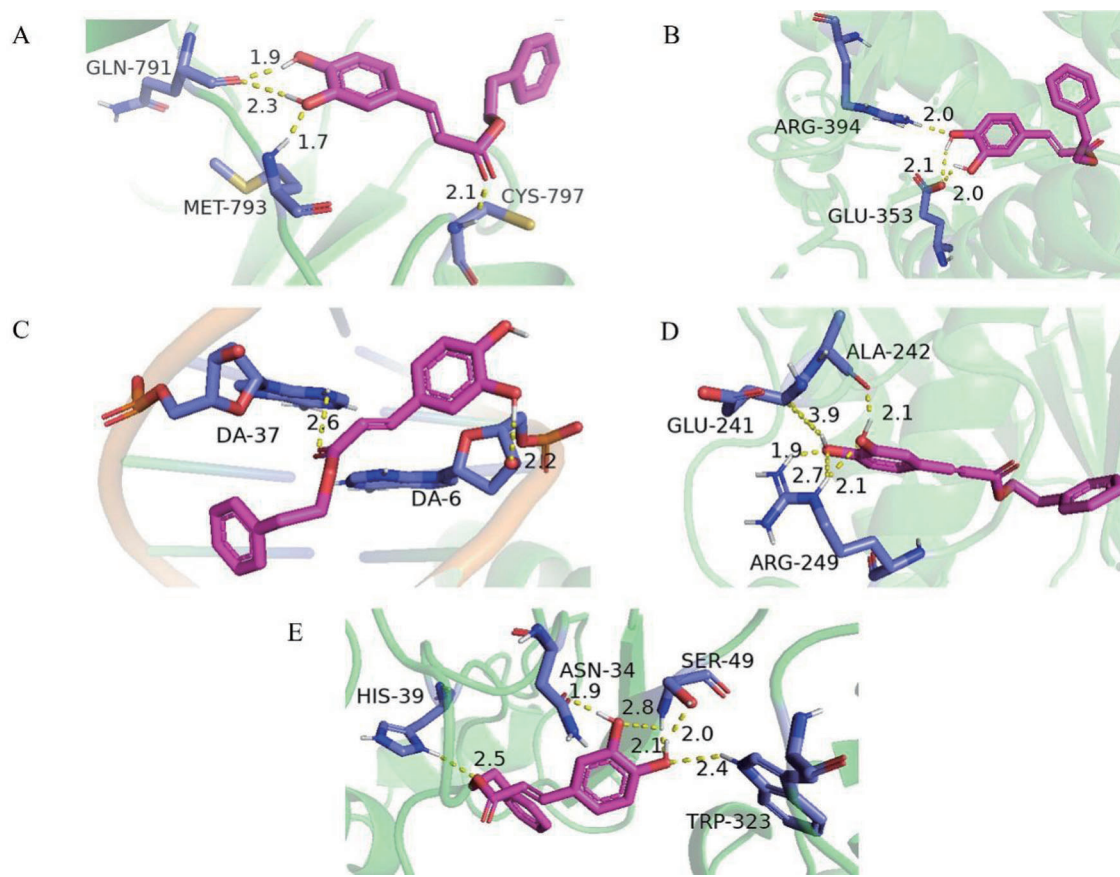
图4 KEGG 通路富集分析结果

表2 参与 CAPE 治疗 SCI 相关通路的核心靶点

通路名称	参与通路的核心靶点
Estrogen 信号通路	EGFR、ESR1、MMP9、JUN
IL-17 信号通路	MMP9、JUN、PTGS2
HIF-1 信号通路	EGFR
VEGF 信号通路	PTGS2

2.4 分子对接结果 CAPE 与核心靶点基因 *PTGS2*、*MMP9*、*EGFR*、*ESR1*、*JUN* 编码蛋白的结合能分别为 -7.65 kcal/mol、-9.77 kcal/mol、-6.20 kcal/mol、-7.42 kcal/mol、-5.06 kcal/mol，通常认为结合能低于 -5.00 kcal/mol 表示化合物与核心靶点的基因编码蛋白结合活性较强^[10]，CAPE 与核心靶点结合能均低于 -5.00 kcal/mol，提示结合较好(图 5)。

2.5 各组大鼠术后后肢运动功能比较 术后第 1、第 3、第 7 天，模型组 BBB 评分低于假手术组 ($P < 0.05$)；与模型组相比，CAPE 低剂量组和 CAPE 高剂量组 BBB 评分均升高(均 $P < 0.05$)，且高剂量组升高更为显著 ($P < 0.05$)，见表 3。



A:EGFR;B:ESR1;C:JUN;D:MMP9;E:PTGS2。

图5 CAPE与核心靶标的分子对接图

表3 各组大鼠术后BBB评分比较

组别	BBB评分/分		
	第1天	第3天	第7天
假手术组	20.00±0.63	20.50±0.55	20.83±0.40
模型组	0.33±0.52*	1.67±0.52*	3.17±0.75*
CAPE低剂量组	0.50±0.55	2.33±0.52 [#]	4.33±0.52 [#]
CAPE高剂量组	0.67±0.52	3.33±0.52 ^{#△}	5.67±0.52 ^{#△}
F	1 850.23	1 788.43	1 300.70
P	<0.05	<0.05	<0.05

与假手术组比较,* $P<0.05$,与模型组比较,[#] $P<0.05$,与低剂量组相比,[△] $P<0.05$ 。

2.6 各组大鼠术后第7天HE染色及尼氏染色结果

假手术组大鼠可见完整脊髓结构,细胞紧密,分布均匀,脊髓前角神经元形态正常,结构完整,虎斑状尼氏体较多且清晰;模型组脊髓组织结构严重

破坏,细胞间隙增加,空泡数量明显增多,神经元形态紊乱,结构不完整,大量神经元固缩或水肿,尼氏体数量较少,结构破裂;CAPE低剂量组及高剂量组相较于模型组损伤程度较轻,细胞间隙较小,空泡数量明显减少,神经元形态较清晰,结构较模型组完整,尼氏体形态较模型组改善,且CAPE高剂量组改善更明显,组织形态较完整,尼氏体数量稍多于低剂量组(图6)。

2.7 核心靶点mRNA表达水平

与假手术组相比,模型组 *JUN*、*MMP9*、*PTGS2*、*EGFR* mRNA 表达水平升高, *ESR1* mRNA 表达水平降低(均 $P<0.05$);与模型组相比,CAPE低剂量组及高剂量组 *JUN*、*MMP9*、*PTGS2*、*EGFR* mRNA 表达水平降低, *ESR1* mRNA 表达水平升高(均 $P<0.05$),CAPE低、高剂量组核心靶点mRNA相对表达量无明显差异($P>0.05$),见表4。

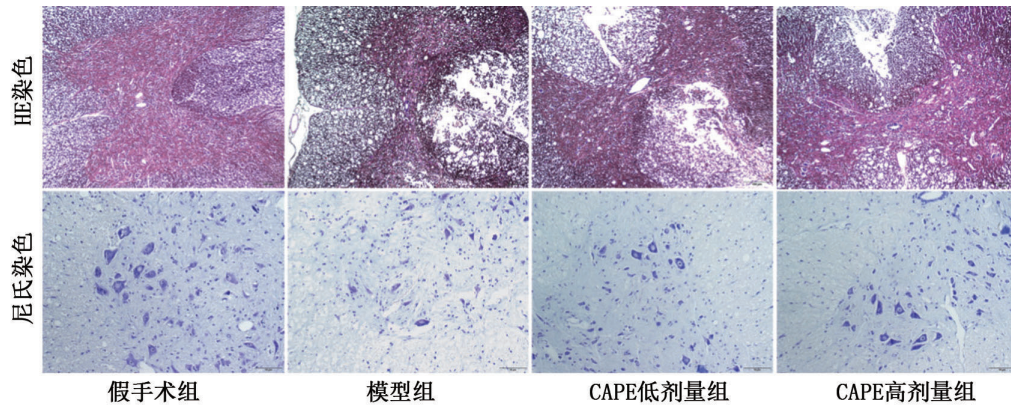


图6 脊髓组织HE染色结果(×100)及尼氏染色结果(×200)

表4 各组大鼠脊髓组织核心靶点mRNA相对表达

组别	$\bar{x} \pm s$				
	<i>JUN</i>	<i>MMP9</i>	<i>PTGS2</i>	<i>EGFR</i>	<i>ESR1</i>
假手术组	1.01±0.19	1.05±0.38	1.04±0.38	1.05±0.38	1.00±0.49
模型组	3.03±0.70*	3.50±0.50*	4.25±0.52*	3.50±0.50*	0.25±0.12*
CAPE低剂量组	1.77±0.52 [#]	2.22±0.49 [#]	2.91±0.95 [#]	2.22±0.49 [#]	0.48±0.11 [#]
CAPE高剂量组	1.43±0.20 [#]	1.80±0.43 [#]	1.93±0.58 [#]	1.80±0.43 [#]	0.69±0.20 [#]
<i>F</i>	10.71	15.63	13.73	15.63	17.34
<i>P</i>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

与假手术组比较, **P*<0.05; 与模型组比较, [#]*P*<0.05。

3 讨论

本研究使用网络药理学研究方法,从公共数据库对CAPE在SCI中的核心治疗靶点和潜在作用机制分析,筛选到48个潜在治疗靶点。通过PPI网络分析,得到与SCI密切相关的5个CAPE靶点作为CAPE治疗SCI的核心靶点,即*EGFR*、*JUN*、*ESR1*、*MMP9*和*PTGS2*,分子对接结果显示CAPE与核心靶点结合较好。*PTGS2*编码COX-2蛋白,COX-2在前列腺素(prostaglandin,PG)合成中发挥关键作用,发生炎症时表达上调,对炎症反应起到放大和增强的作用,抑制COX-2蛋白表达可改善SCI损伤后的功能恢复^[11];MMP9有降解细胞外基质和蛋白的作用,抑制MMP9可减轻SCI中BSCB的破坏^[12];Zhang等^[13]发现,SCI后抑制EGFR通过增加神经胶质前体细胞和少突胶质细胞的活化促进受损脊髓的髓鞘再生,*ESR1*基因编码雌激素受体α(ERα)蛋白,有研究显示,ERα可上调PI3K/AKT磷酸化水平使核内ERα磷酸化,调节其表达和活性,从而减轻SCI后细胞凋亡^[14]。AP1是一个集合术语,指由JUN、Fos或ATF亚单位组成的二聚体转录因子通过共同的DNA位点即AP1结合位点结合,SCI后NF-κB和AP1蛋白表达增加进而转位入细胞核来启动炎症因子表达,加重损伤局部的继发性损伤。

Zhang等^[15]研究发现,降低c-JUN的表达可以促进SCI小鼠前肢运动功能恢复。

在对其进行GO分析后发现,靶点主要涉及到对细菌来源分子的反应、对脂多糖的反应、细胞对活性氧类的反应等生物学过程。同时,KEGG富集分析发现,CAPE可能通过调控雌激素信号通路、IL-17信号通路、HIF-1信号通路及VEGF信号通路等发挥SCI后的神经保护作用。IL-17是主要经由Th17细胞产生的重要促炎因子,在炎症中发挥重要作用^[16],IL-17可诱导SCI后STAT3的异常激活,IL-17及其相关炎症细胞因子IL-6、IL-21、IL-23表达呈正相关关系。雌激素发挥作用主要通过与其受体(estrogen receptor, ER)结合而实现,调控ERα可减少SCI伤后病变大小、反应性胶质增生和神经胶质瘢痕形成^[17]。有研究发现,缺氧诱导因子-1(HIF-1α)介导Circ 0001723通过miR-380-3p/NLRP3在体内和体外减少SCI后炎症反应^[18],同时HIF-1信号通路与VEGF信号通路在SCI的修复中联系密切,激活HIF-1α/VEGF信号轴,促进SCI伤后的血管生成和功能恢复^[19]。

本研究动物实验表明,CAPE可促进SCI大鼠后肢运动功能恢复,脊髓组织HE染色及尼氏染色结果证明CAPE对脊髓组织和神经元具有保护作用,其中CAPE高剂量组具有更好的保护效果。进一步的核心靶点RT-qPCR实验结果表明,CAPE调

控上述4条信号通路可能与抑制 *EGFR*、*JUN*、*MMP9*和 *PTGS2*表达,促进 *ESR1*基因表达有关。

综上所述,CAPE对SCI大鼠的运动功能、脊髓组织及神经元具有保护作用,其可能通过多靶点、多通路发挥SCI后的神经保护作用。CAPE治疗SCI的具体作用机制将在今后的研究中进一步探讨。

参考文献:

- [1] LI C,WU Z R,ZHOU L Q,et al.Temporal and spatial cellular and molecular pathological alterations with single-cell resolution in the adult spinal cord after injury[J].Signal transduction and targeted therapy,2022,7(1):65.
- [2] FAN B Y,WEI Z J,YAO X,et al.Microenvironment imbalance of spinal cord injury[J]. Cell transplantation, 2018, 27(6):853-866.
- [3] OLGIERD B,KAMILA Z,ANNA B,et al.The pluripotent activities of caffeic acid phenethyl ester[J].Molecules, 2021,26(5):1335.
- [4] CELLI N,DRAGANI L K,MURZILLI S,et al.In vitro and in vivo stability of caffeic acid phenethyl ester, a bioactive compound of propolis[J]. Journal of agricultural and food chemistry,2007,55(9):3398-3407.
- [5] KASAI M,FUKUMITSU H,SOUMIYA H,et al.Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction[J]. Biomedical research (Tokyo, Japan),2011,32(1):1-7.
- [6] AKGUN B,OZTURK S,ARTAS G,et al.Effects of intrathecal caffeic acid phenethyl ester (cape) on IL-6 and TNF- α levels and local inflammatory responses in spinal cord injuries[J]. Turkish neurosurgery,2018,28(4):625-629.
- [7] LI S, ZHANG B. Traditional chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. Chinese journal of natural medicines,2013,11(2):110-120.
- [8] 薛卫星,刘卫平. 咖啡酸苯乙酯通过下调LRRK2抑制JNK信号通路减轻大鼠创伤性颅脑损伤[J]. 药物评价研究,2022,45(3):473-480.
XUE W X,LIU W P. Caffeic acid phenethyl ester reduces traumatic brain injury in rats by downregulating LRRK2 and inhibiting JNK signaling pathway[J].Drug evaluation research,2022,45(3):473-480.
- [9] 吴娜,毛祥坤,魏武,等.基于网络药理学和分子对接的理肠四方治疗溃疡性结肠炎分子机制的比较研究[J]. 中药材,2020,43(1):186-192.
WU N,MAO X K,WEI W,et al.Comparative study on the molecular mechanism of the treatment of ulcerative colitis by four prescription for recuperating intestines based on network pharmacology and molecular docking[J].Journal of Chinese medicinal materials,2020,43(1):186-192.
- [10] 张良,杨双蓉,李淑莹,等.基于网络药理学和实验验证探讨槲皮素治疗心力衰竭的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(15):156-165.
- [11] ZHANG L,YANG S R,LI S Y,et al.Study on mechanism of quercetin in heart failure based on network pharmacology and experimental validation[J].Chinese journal of experimental traditional medical formulae,2021,27(15):156-165.
- [12] AN Y,LI J N,LIU Y J,et al.Neuroprotective effect of novel celecoxib derivatives against spinal cord injury via attenuation of cox-2, oxidative stress, apoptosis and inflammation[J]. Bioorganic chemistry,2020,101:104044.
- [13] QIN W W,LI J,ZHU R J,et al.Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the notch3/nf-kappab pathway[J].Aging,2019,11(23):11391-11415.
- [14] ZHANG S,JU P J,TJANDRA E,et al.Inhibition of epidermal growth factor receptor improves myelination and attenuates tissue damage of spinal cord injury[J]. Cellular and molecular neurobiology,2016,36(7):1169-1178.
- [15] LI X M,YANG Q,LI X B,et al.Estrogen-like neuroprotection of isopsoralen against spinal cord injury through estrogen receptor eralpha[J]. Metabolic brain disease,2017, 32(1):259-265.
- [16] ZHANG T,GAO G,CHANG F.Mir-152 promotes spinal cord injury recovery via c-jun amino terminal kinase pathway[J]. European review for medical and pharmacological sciences,2019,23(1):44-51.
- [17] KORN T, BETTELLI E,OUKKA M,et al.IL-17 and TH17 cells[J]. Annual review of immunology, 2009, 27(1): 485-517.
- [18] MOSQUERA L, COLON J M, SANTIAGO J M, et al. Tamoxifen and estradiol improved locomotor function and increased spared tissue in rats after spinal cord injury: their antioxidant effect and role of estrogen receptor alpha[J].Brain research,2014,1561:11-22.
- [19] LI X G,LOU X F,XU S Z,et al.Hypoxia inducible factor-1 (hif-1 α) reduced inflammation in spinal cord injury via mir-380-3p/ nlrp3 by circ 0001723[J]. Biological research,2020,53(1):35.
- [20] HUANG J H,HE H,CHEN Y N,et al.Exosomes derived from M2 macrophages improve angiogenesis and functional recovery after spinal cord injury through hif-1 α / vegf axis[J].Brain sciences,2022,12(10):1322.

本文引用格式:

王柯文,陈建敏,李筱璐,等.咖啡酸苯乙酯治疗脊髓损伤的网络药理学研究及实验验证[J]. 广西医科大学学报, 2023,40(5):799-806.DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.05.013

WANG K W,CHEN J M,LI X L,et al. Network pharmacological study and experimental verification of caffeic acid phenethyl ester in the treatment of spinal cord injury[J]. Journal of Guangxi medical university, 2023, 40(5): 799-806. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.05.013