

基于网络药理学和细胞实验探讨和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用

范晓旭¹, 唐琴¹, 于雪², 李丽娜², 王淑艳², 畅洪昇^{1*}

¹北京中医药大学中药学院, 北京 102488; ²北京中医药大学中医学院, 北京 100029

摘要: 基于网络药理学和细胞实验探讨和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用。通过 TC MSP 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库筛选出 127 个药物靶点; 采用 DisGeNET 数据库收集到 287 个疾病靶点; 通过 String 数据库构建 PPI 网络; 采用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析得到 173 个条目。KEGG 通路筛选出前 20 条信号通路, 包括 HIF-1 通路、VEGF 通路、PI3K-Akt 通路等。分子对接结果表明和厚朴酚与 HIF-1 α 降解酶 PHDs、VHL 有较好的结合力。CCK-8 法发现和厚朴酚能有效增加 PC12 细胞的存活率。正常环境下, 和厚朴酚给药后 HIF-1 α 、VEGF、PSD 95、SYN 1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。缺氧环境下, 和厚朴酚给药后 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 PSD 95 和 SYN 1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。综上, 正常和缺氧环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路有相反的调节作用, 为和厚朴酚抗脑缺血、抗抑郁和抗肿瘤机制研究提供可靠的理论和实验支持。

关键词: 网络药理学; 和厚朴酚; HIF-1 α -VEGF 通路; 调节作用

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)5-0867-12

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.5.015

Study on regulation of honokiol on HIF-1 α -VEGF pathway in PC12 cells based on network pharmacology and experimental verification

FAN Xiao-xu¹, TANG Qin¹, YU Xue², LI Li-na², WANG Shu-yan², CHANG Hong-sheng^{1*}

¹School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;

²School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: To study the regulation of honokiol on the HIF-1 α -VEGF pathway in PC12 cells based on network pharmacology and experimental verification. To search 127 drug targets through the TC MSP database and the Swiss Target Prediction database, then using the DisGeNET database to collect 287 disease targets. Constructed PPI network map by String online database. At the same time GO and KEGG enrichment analyses were carried out by using the DAVID database. Go enrichment analysis obtained 173 entries. The KEGG pathway screened the top 20 signaling pathways, including the HIF-1 pathway, VEGF pathway, PI3K-Akt pathway, and others. The molecular docking results showed that honokiol bound well to HIF-1 α degrading enzymes PHDs, VHL. The CCK-8 method found that honokiol could effectively increase the survival rate of PC12 cells. Under normal conditions, HIF-1 α , VEGF, PSD 95, and SYN 1 protein expression were elevated after honokiol administration ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Under hypoxic conditions, HIF-1 α and VEGF protein expression were significantly lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and PSD 95 and SYN 1 protein expression were significantly higher after honokiol administration ($P < 0.01$, $P < 0.001$). In conclusion, honokiol has opposite regulatory effects on the HIF-1 α -VEGF pathway, providing reliable theoretical and experimental support for the study of the anti-ischemia, antidepressant, and antitumor mechanisms of honokiol.

Key words: network pharmacology; honokiol; HIF-1 α -VEGF pathway; regulation

厚朴作为燥湿消痰, 下气除满的理气药, 在近几年受到国内外广泛研究。厚朴的主要成分和厚朴酚是一类生物活性较强的酚类化合物, 毒性作用很小且具有抗炎^[1]、镇痛、抗肿瘤、抗病原微生物^[2]等药

收稿日期: 2022-10-13 接受日期: 2023-03-22

基金项目: 国家自然科学基金 (81373584)

* 通信作者 Tel: 86-018910848375; E-mail: chs1971@sina.com

理作用。和厚朴酚可以透过血脑屏障进入中枢神经系统,对神经组织产生直接影响,是一种很有前景的神经系统疾病药物^[3];另一方面和厚朴酚对多种癌症也有治疗作用,如胃癌、肺癌、肝癌和胰腺癌等。

激活 HIF-1 α 的表达能够发挥促血管生成、神经保护与神经修复作用,从而治疗脑缺血大鼠^[4]。此外,HIF-1 也是调控肿瘤血管形成的关键因子,和厚朴酚在大多数肿瘤和视网膜缺血性疾病中抑制 HIF 途径和缺氧介导的促血管生成基因的表达^[5]。上述研究表明,在不同状态下和厚朴酚调节 HIF-1 α 是其发挥药理作用的关键机制。本研究以“HIF-1 α ”为切入点采用网络药理学和实验验证探讨常氧和缺氧条件下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、试剂及仪器

高分化的大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞由北京中医药大学中医学院科研实验中心馈赠。

和厚朴酚 (Solarbio, 货号: SH8140, 纯度 \geq 98%); 2-甲氧基雌二醇 (2-ME, APE \times BIO, 货号: A4188, 纯度 \geq 98%); SU5416 (Abcam, 货号: ab145056, 纯度 $>$ 99%); 胎牛血清 (Gibco, 货号: 10099141); DMEM 培养基 (Gibco, 货号: 11965092); 青霉素/链霉素双抗 (Gibco, 货号: 15140163); 0.25% 胰酶 (Gibco, 货号: 25300062); DMSO (LabLead, 货号: st038); CCK-8 试剂盒 (LABLEAD, 货号: CK001); BCA 蛋白定量试剂盒 (凯基生物, 货号: KGP902); ECL 超敏化学发光盒 (新赛美, 货号: P10100); HIF-1 α 抗体 (Abcam, 货号: ab179483); VEGF 抗体 (Proteintech, 货号: 19003-1-AP); PSD 95 抗体 (Proteintech, 货号: 20665-1-AP); SYN 1 抗体 (Proteintech, 货号: 20258-1-AP); α -Tubulin 抗体 (Proteintech, 货号: 11224-1-AP); 山羊抗兔二抗 (Proteintech, 货号: SA00001-2)。

全波长酶标仪 (Bio-Rad, 美国); 化学发光成像仪 (Tanon-5200, 中国上海); HERAcell vios 160i 型 CO₂ 培养箱 (赛默飞世尔, 美国); HERAcell vios 160i 型三气培养箱 (赛默飞世尔, 美国)。

1.2 和厚朴酚靶点预测

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载 2D 结构, 文件保存为 SDF 格式, 随后分别通过 TC MSP 数据库 (<http://tcmspwp.com>) 和 Swiss Target Prediction 数据库 ([\[getprediction.ch/\]\(http://getprediction.ch/\)\) 收集和厚朴酚靶点。UniProt 平台 \(<http://www.uniprot.org/>\) 将蛋白靶点名称统一标准化处理。](http://swisstar-</p></div><div data-bbox=)

1.3 疾病靶点预测

与大脑相关的神经系统疾病 (如脑缺血、抑郁症) 以及肿瘤疾病的发病机制与 HIF-1 α 密切相关。疾病选择以“HIF-1 α ”为切入点, 它作为氧稳态的主要调节因子, 在组织缺氧时上调, 而在常氧条件下迅速降解。因此, 这类机制的疾病以“Anoxia” (缺氧症) 为关键词进行靶点预测, 通过 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/home/>) 进行检索。通过 VENNY2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 得出和厚朴酚与疾病两者的共同靶点, 即为和厚朴酚治疗与 HIF-1 α 相关疾病的潜在作用靶点。

1.4 蛋白质互作 (PPI) 网络构建

将和厚朴酚和缺氧症的交集靶点信息导入 String 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 模式选择“Multiple Proteins”选项, 物种选择为“智人”, 置信度默认为 0.4, 导出为 tsv 文件, 将此文件导入 Cytoscape3.7.1 软件绘制蛋白相互作用 (PPI) 网络图并进行拓扑学分析。

1.5 GO 富集分析及 KEGG 通路富集

将药物-疾病交集靶点信息导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>), 分别选择生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞成分 (cellular component, CC) 进行 GO 富集分析, 再选择 KEGG 进行通路分析, 保留 $P < 0.05$ 的富集条目, P 从小到大进行排序。GO 富集分析的三个方面分别取前 10 个条目绘制柱状图, 并取排名前 20 的富集通路制作 KEGG 气泡图。

1.6 分子对接验证

利用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶蛋白的 3D 晶体结构。选择物种为“智人”, 分辨率小于 3 Å, 优先选择有配体的且结合位点完好的结构, 以 PDB 格式下载。使用 PyMol2.4.1 软件去除水分子和小分子配体。采用 AutoDockTools1.5.6 软件加氢原子, 转化为 PDBQT 格式。从 PubChem 数据库中下载和厚朴酚的 2D 结构, 保存为 SDF 格式。经 AutoDockTools1.5.6 软件加全氢, 设置为配体, 自动分配电荷, 检测扭转键, 最后导出为 PDBQT 文件。设置对接 Box, 导出为 GPF 格式文件。运行 Autogrid, 设置对接参数及运算方

法,再次运行 Autogrid,最后查看结果。使用 Py-Mol2.4.1 软件进行可视化处理。

1.7 细胞培养与 OGD 模型的建立

用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素双抗的 DMEM 高糖型培养基培养 PC12 细胞,放入 37 $^{\circ}\text{C}$,含 5% CO_2 的培养箱中培养。在细胞融合度为 80% 左右的对数生长期进行传代。糖氧剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 造模时用无血清低糖型 DMEM 替代高糖型 DMEM。随后将 PC12 细胞转移到三气培养箱 (1% O_2 , 94% N_2 和 5% CO_2) 进行造模。建立 OGD 模型时,细胞活力为 60% 左右,则判定造模成功。PC12 细胞在常氧条件下培养作为对照。

1.8 细胞分组与处理

1.8.1 和厚朴酚对正常 PC12 细胞活力的影响

细胞分为对照组 (control, Con) 和和厚朴酚组 (honokiol, Hon),其中和厚朴酚组采用 2、5、8、10、16 $\mu\text{mol/L}$ 浓度分别处理正常 PC12 细胞 24 h 和 48 h。

1.8.2 和厚朴酚对 OGD 损伤的 PC12 细胞活力的影响

细胞分组为 Con、OGD 以及 2、5、8 $\mu\text{mol/L}$ 的和厚朴酚组。OGD 组于三气培养箱中造模 24 h;和厚朴酚组在造模时同时给药处理。

1.8.3 正常环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用

实验设置为 Con、Con + Hon、Con + Hon + SU (SU5416)、Con + Hon + 2-ME、Con + SU、Con + 2-ME。和厚朴酚、SU5416、2-ME 给药浓度分别为 2、4、5 $\mu\text{mol/L}$ 。Con + Hon 组细胞和厚朴酚处理 24 h 之后替换为新的 DMEM;Con + Hon + SU 组细胞 SU5416 处理 30 min 后弃去,继续和厚朴酚培养 24 h;Con + SU 组细胞 SU5416 处理 30 min 后替换为新的 DMEM;2-ME 也是处理 30 min,给药方式同 SU5416。和厚朴酚、SU5416 和 2-ME 用 DMSO 溶解后用 DMEM 培养基稀释到所需浓度并且 DMSO 终浓度不超过 0.1%。

1.8.4 缺氧环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用

SU5416 实验分组为 Con、OGD、OGD + Hon、OGD + Hon + SU、OGD + SU、Hon。2-ME 实验分组为 Con、OGD、OGD + Hon、OGD + 2-ME、OGD + Hon + 2-ME、Hon。和厚朴酚、SU5416 和 2-ME 给药浓度分别为 2、4、5 $\mu\text{mol/L}$ 。各给药组均在造模时同时

给药。SU5416 和 2-ME 处理时间为 30 min。两种阻断剂的给药时间和浓度参照相关文献设定^[6,7]。

1.9 CCK-8 法检测细胞活力

用 CCK-8 法检测 PC12 细胞的相对细胞活力。首先进行和厚朴酚的无细胞毒性浓度筛选,PC12 细胞经 0.25% 胰酶消化后计数 (1×10^5 个/mL),每孔 100 μL 细胞悬液接种在 96 孔板中, CO_2 恒温培养箱中培养 24 h。随后加入不同浓度的和厚朴酚分别处理 24 h 和 48 h,弃去培养基,每孔加 100 μL PBS 清洗 2 遍后,每孔加入 100 μL 的 CCK-8 工作液,继续孵育 1 h,用酶标仪检测 450 nm 处各孔的 OD 值。随后测定和厚朴酚对 OGD 损伤的 PC12 细胞活力的影响,将 PC12 细胞按 OGD 模型处理,在造模的同时加入不同浓度的和厚朴酚,之后测定方法同上。收集数据并按照下式计算各组细胞的相对细胞活力:

相对细胞活力 =

$$(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})$$

1.10 Western blot 检测 HIF-1 α 、VEGF、PSD 95、SYN 1 蛋白表达

PC12 细胞生长状态良好时经 0.25% 胰酶消化后计数,每孔 2 mL 细胞悬液接种在 6 孔板中 (2.5×10^5 个/mL),培养 24 h 后根据细胞分组给药。给药结束后,加入 RIPA 裂解液提取蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度,加入 5 \times loading buffer 后煮沸使蛋白变性。20 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳 (80 V,恒压 2 h),随后电转 (湿转法,300 mA 1.5 h)。5% 脱脂牛奶封闭 2 h,加入一抗孵育 (HIF-1 α 1:1 000, VEGF 1:3 000, PSD 95 1:3 000, SYN 1 1:6 000, 内参 α -Tubulin 1:5 000)。4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日 TBST 洗膜三次,每次 10 min,加入二抗 (山羊抗兔,1:5 000) 孵育 1 h, TBST 洗膜。暗室滴加 A 液和 B 液等比例混合的 ECL 发光检测工作液,使用化学发光成像仪进行显影并拍照。采用 Image J 软件分析各条带灰度值。内参为 α -Tubulin,目的蛋白相对表达水平为目的蛋白与 α -Tubulin 蛋白条带灰度值的比值。

1.11 统计学分析

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,并以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。具有正态分布的数据采用单因素方差分析,随后采用 LSD 法两两比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 和厚朴酚和缺氧症靶点筛选

从 TCSP 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库获得 127 个和厚朴酚靶点,从 DisGeNET 数据库

得到疾病相关靶点 287 个。药物与疾病靶点基因取交集得到共有靶点 23 个(见表 1),绘制交集靶点基因的韦恩图(见图 1)。

表 1 和厚朴酚-缺氧症交集靶点

Table 1 The intersection targets of honokiol-anoxia

序号 No.	蛋白名称 Protein name	基因符号 Gene symbol	蛋白质 ID UniProt ID
1	钙激活钾通道亚单位 α -1 Calcium-activated potassium channel subunit alpha-1	KCNMA1	Q12791
2	G1/S-特异性周期蛋白-D1 G1/S-specific cyclin-D1	CCND1	P24385
3	分裂原活化蛋白激酶 14 Mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	Q16539
4	酪氨酸激酶受体 erbB-2 Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	ERBB2	P04626
5	一氧化氮合酶 Nitric oxide synthase	NOS1	P29475
6	钾电压门通道亚家族 A 成员 5 Potassium voltage-gated channel subfamily A member 5	KCNA5	P22460
7	多不饱和脂肪酸脂氧合酶 Polyunsaturated fatty acid lipoygenase	ALOX15	P16050
8	RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	AKT1	P31749
9	血管内皮生长因子受体 2 Vascular endothelial growth factor receptor 2	KDR	P35968
10	5-脂氧合酶激活蛋白 Arachidonate 5-lipoygenase-activating protein	ALOX5AP	P20292
11	NADPH 氧化酶 4 NADPH oxidase 4	NOX4	Q9NPH5
12	NADPH 氧化酶 1 NADPH oxidase 1	NOX1	Q9Y5S8
13	巨噬细胞迁移抑制因子 Macrophage migration inhibitory factor	MIF	P14174
14	碳酸酐酶 9 Carbonic anhydrase 9	CA9	Q16790
15	组蛋白去乙酰化酶 1 Histone deacetylase 1	HDAC1	Q13547
16	酪氨酸-蛋白激酶 Tyrosine-protein kinase	SYK	P43405
17	Egl 9 同源物 1 Egl 9 homolog 1	EGLN1	Q9GZT9
18	丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 Serine/threonine-protein kinase	SGK1	O00141
19	血管内皮生长因子受体 1 Vascular endothelial growth factor receptor 1	FLT1	P17948
20	毒蕈碱型胆碱受体 M1 Muscarinic acetylcholine receptor M1	CHRM1	P11229
21	雌激素受体 Estrogen receptor	ESR1	P03372
22	雄性激素受体 Androgen receptor	AR	P10275
23	前列腺素 G/H 合成酶 2 Prostaglandin G/H synthase 2	PTGS2	P35354

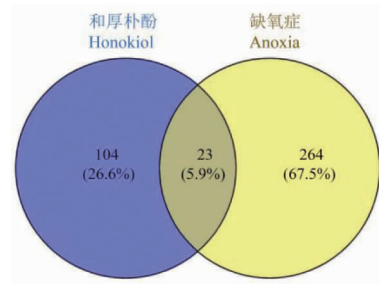


图1 和厚朴酚-缺氧症交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram for the intersection targets of honokiol-anoxia

2.2 和厚朴酚-缺氧症蛋白互作(PPI)网络分析

如图2所示,PPI网络中共有22个节点,74条边。节点表示靶点蛋白质,其大小、颜色表示作用强度(degree),颜色由黄到紫,作用强度依次增大;节点之间的连线表示靶点蛋白质之间的相互作用。共

筛选出23个交集靶点,但是有1个靶点(CHRM1)与其他靶点无相互作用,所以图中只显示了22个节点。靶蛋白拓扑学分析见表2,排名前五的靶点分别是AKT1、PTGS2、ERBB2、ESR1、KDR,预示这些靶点可能是和厚朴酚治疗缺氧症的关键靶点。

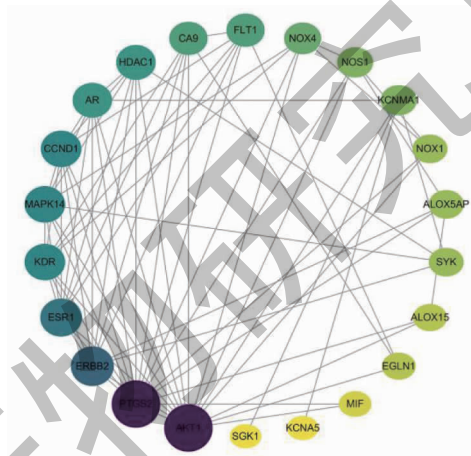


图2 和厚朴酚对缺氧症作用靶点的PPI网络图

Fig. 2 PPI network diagram of the targets of the action of honokiol on anoxia

注:网络图中节点越大、颜色越深表示度值越高。Note:In the network diagram,the larger the node and the darker the color,the higher the degree value.

表2 和厚朴酚对缺氧症作用靶点的拓扑学分析

Table 2 Topological analysis of the action targets of honokiol on anoxia

蛋白名称 Protein name	平均最短路径长度 Average shortest path length	介数中心性 Betweenness centrality	聚类系数 Clustering coefficient	度值 Degree
AKT1	1.238	0.331	0.342	16
PTGS2	1.333	0.176	0.392	16
ERBB2	1.571	0.069	0.545	11
ESR1	1.619	0.013	0.756	10
CCND1	1.667	0.009	0.806	9
MAPK14	1.667	0.028	0.639	9
KDR	1.667	0.014	0.722	9
HDAC1	1.714	0.013	0.786	8

续表 2(Continued Tab. 2)

蛋白名称 Protein name	平均最短路径长度 Average shortest path length	介数中心性 Betweenness centrality	聚类系数 Clustering coefficient	度值 Degree
AR	1.619	0.045	0.750	8
CA9	1.762	0.010	0.762	7
FLT1	1.905	0.012	0.714	7
NOX4	1.810	0.007	0.733	6
KCNMA1	1.857	0.191	0.1	5
NOS1	1.905	0.009	0.7	5
NOX1	1.952	0	1	4
ALOX5AP	2.095	0.006	0.5	4
SYK	2.048	0.018	0.333	4
EGLN1	2.048	0.002	0.667	3
ALOX15	2	0.004	0.667	3
MIF	2.048	0	1	2
KCNA5	2.810	0	0	1
SGK1	2.810	0	0	1

2.3 GO 和 KEGG 富集分析结果

GO 富集分析在生物过程、分子功能、细胞组分三个方面分别得到 121、31 和 21 个条目。每个方面取前 10 个条目做成可视化条形图(见图 3)。生物过程主要涉及对缺氧的反应,正向调控细胞增殖,细胞对血管内皮生长因子刺激的反应,血管生成,炎症反应等方面;细胞组分主要涉及到细胞膜、细胞核、核质体等位置;分子功能主要涉及到酶结合,蛋白质

结合,支架蛋白结合,生长因子结合,ATP 结合等过程。

KEGG 通路分析共得到 45 条信号通路,结果主要涉及到 HIF-1 通路、VEGF 通路、PI3K-Akt 通路等。“Rich factor”表示某一通路的靶基因数量与该通路上标注基因数量之比,其值越高,富集程度越高。取 P -value 前 20 的 KEGG 通路绘制气泡图(见图 4)。

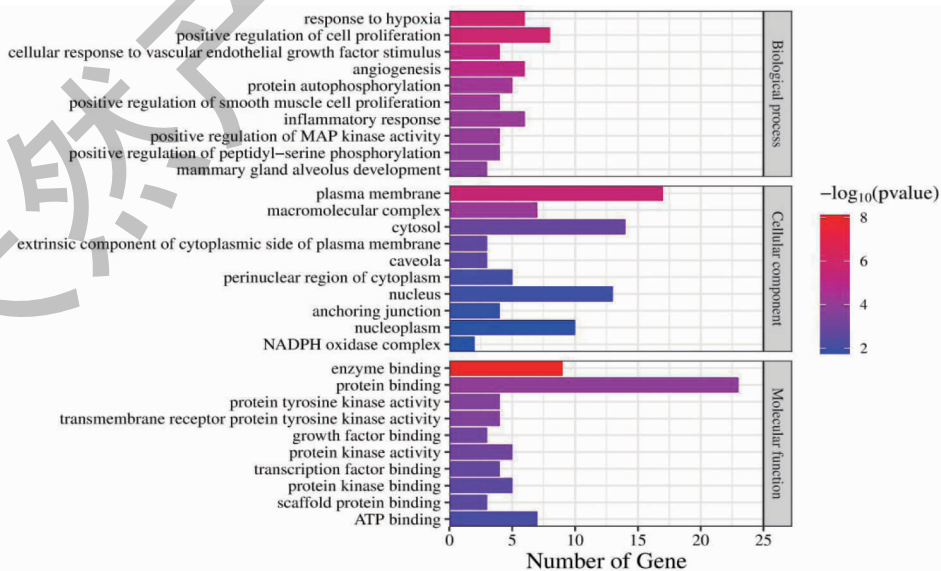


图 3 和厚朴酚-缺氧症交集靶点 GO 分析

Fig. 3 GO analysis for the intersection targets of honokiol-anoxia

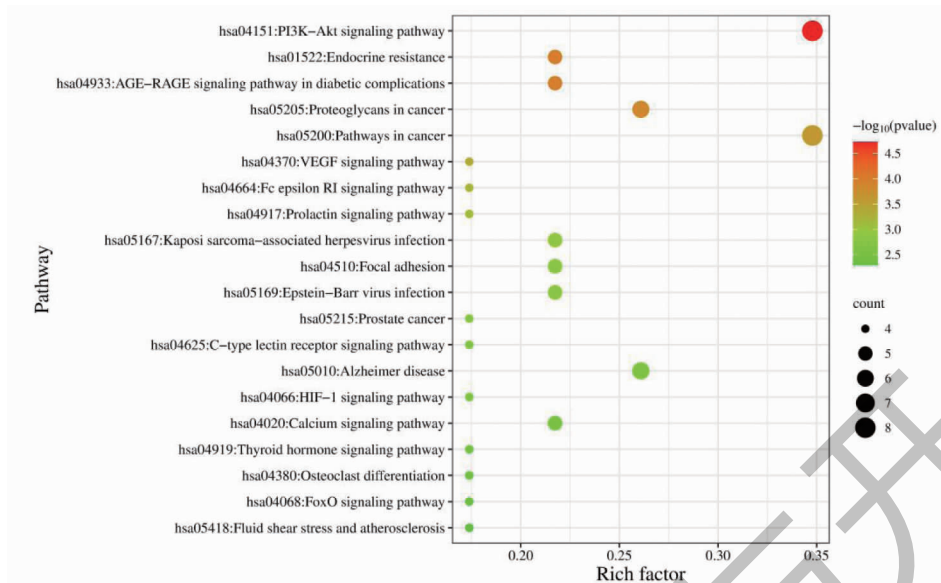


图4 前20条KEGG通路富集气泡图

Fig. 4 Top 20 pathway enrichment bubble diagram

注:气泡越大,基因个数越多;Rich factor 越大,富集程度越高。Note: The larger the bubble, the greater the number of genes; the larger the rich factor, the greater the enrichment.

2.4 分子对接结果

一般情况下配体与受体的结合能越低,亲和力越强,结合构象越稳定,发生作用的可能性越大^[8]。和厚朴酚与 HIF-1 α 降解酶脯氨酸羟化酶 (prolyl-hydroxylase, PHDs) 和希佩尔-林道基因 (von Hippel-

Lindau, VHL) 进行分子对接,对接结合能分别为-23.22 和-22.68 kJ/mol。结果表明,和厚朴酚与各蛋白均具有较高的亲和力。最后使用 PyMol2.4.1 软件对其进行可视化处理(见图5)。

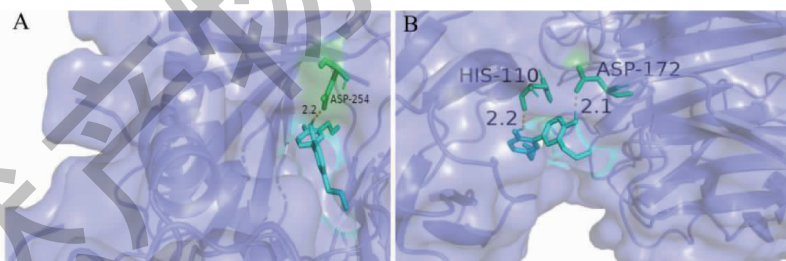


图5 分子对接模式图

Fig. 5 Molecular docking diagram

注:A. 和厚朴酚与PHDs;B. 和厚朴酚与VHL。Note: A. Honokiol and PHDs; B. Honokiol and VHL.

2.5 和厚朴酚对正常 PC12 细胞活力的影响

本实验首先筛选了和厚朴酚的无细胞毒性浓度。PC12 细胞给予不同浓度的和厚朴酚(0、2、5、8、10、16 $\mu\text{mol/L}$) 分别处理 24 h 和 48 h。图 6 结果显示,和厚朴酚处理 24 小时后,与对照组相比,2、5 $\mu\text{mol/L}$ 细胞活力显著增加,并且在 16 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。处理 48 h 后,5 $\mu\text{mol/L}$ 和厚朴酚的细胞毒性不明显,但是和厚朴酚浓度大于 8 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞活力开始显著下

降($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。16 $\mu\text{mol/L}$ 和厚朴酚作用 24 h 和 48 h 时相对细胞活力分别为 0.51 ± 0.17 和 0.44 ± 0.13 ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。此外采用 Graphpad Prism 9 软件计算 IC_{50} , 24 h 时为 9.11 $\mu\text{mol/L}$, 48 h 时为 6.50 $\mu\text{mol/L}$ 。由于 2 $\mu\text{mol/L}$ 和厚朴酚给药 24 h 时相对细胞活力高达 1.35 ± 0.11 ($P < 0.05$),表现出明显的促增殖作用,且与 5 $\mu\text{mol/L}$ 时未见明显差异,因此选择 2 $\mu\text{mol/L}$ 和厚朴酚给药 24 h 用于后续探究在正常环境下和厚

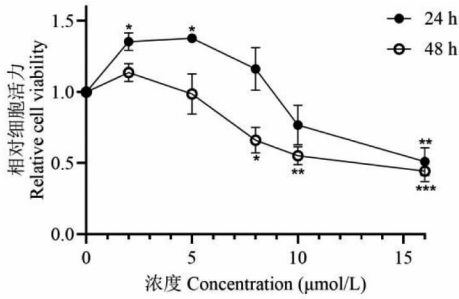


图6 和厚朴酚对正常 PC12 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of honokiol on the viability of normal PC12 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

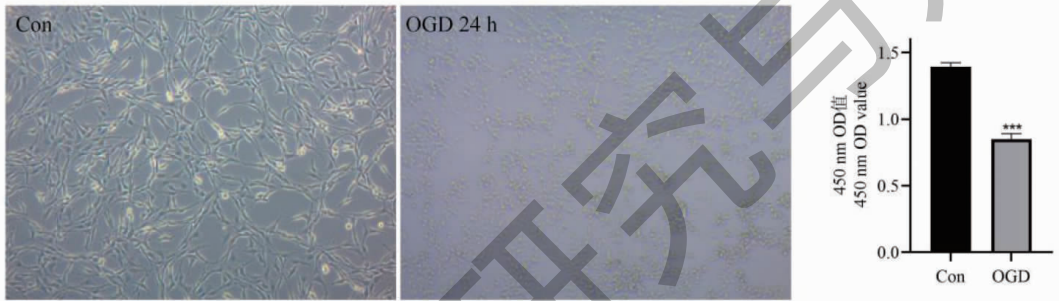


图7 正常和缺氧状态下 PC12 细胞的形态($\times 100$)以及 450 nm 处 OD 值($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 7 Morphology of PC12 cells ($\times 100$) and 450 nm OD value under normal and hypoxic conditions($\bar{x} \pm s, n=6$)

注:与对照组相比, *** $P < 0.001$ 。 Note: Compared with Con group, *** $P < 0.001$ 。

朴酚在 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 时相对细胞活力显著升高,分别为 0.74 ± 0.03 和 0.76 ± 0.05 ,对 PC12 细胞表现出显著的保护作用($P < 0.001$)。其中和厚朴酚浓度在 2 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞活力的影响与 5

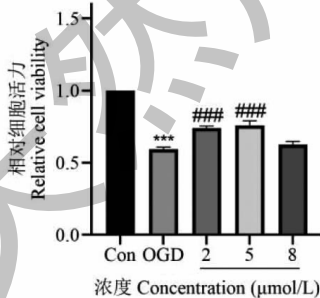


图8 24 h 下不同浓度和厚朴酚对 PC12 细胞活力的保护作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Protective effect of honokiol at different concentrations on viability of PC12 cells at 24 h($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与 Con 组相比, *** $P < 0.001$;与 OGD 组相比, ### $P < 0.001$ 。

Note: Compared with Con group, *** $P < 0.001$; Compared with OGD group, ### $P < 0.001$ 。

朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用。

2.6 PC12 细胞 OGD 模型的建立

结果表明,缺氧 24 h 时细胞存活率约为 60%,细胞存活率显著下降($P < 0.001$),判定造模成功。如图 7 所示,正常环境下的 PC12 细胞以成簇的形式贴壁生长,细胞形状为梭形,多数伸出轴突,边缘清晰可见,有较强的折光度。缺氧损伤 24 h 后,细胞形态固缩,折光度变弱,多数细胞成圆形,贴壁性较差,逐渐脱落。

2.7 和厚朴酚对 OGD 损伤的 PC12 细胞活力的影响

图 8 结果显示,与 Con 组相比,OGD 组相对细胞活力显著降低,为 0.59 ± 0.03 ($P < 0.001$)。和厚

$\mu\text{mol/L}$ 时未见明显差异,因此选择 2 $\mu\text{mol/L}$ 的和厚朴酚作为后续探究在缺氧环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用。

2.8 正常环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用

图 9 结果显示,与 Con 组相比,Con + Hon 组 HIF-1 α 、VEGF、PSD 95、SYN 1 蛋白表达显著升高($P < 0.05, P < 0.01$)。与 Con + Hon 组相比,给药 2-ME 后 HIF-1 α 、VEGF、PSD 95、SYN 1 蛋白表达显著降低($P < 0.05, P < 0.01$);给药 SU5416 后 HIF-1 α 、VEGF、SYN 1 蛋白表达显著降低($P < 0.05$),PSD 95 蛋白表达无显著差异。以上结果表明和厚朴酚在正常环境下上调 PC12 细胞 HIF-1 α 和 VEGF 的表达。此外,增强 PC12 细胞的突触可塑性相关调节因子的表达依赖于 HIF-1 α -VEGF 通路的激活。

2.9 缺氧环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用

结果显示,与 Con 组相比,OGD 组 SYN 1 蛋白

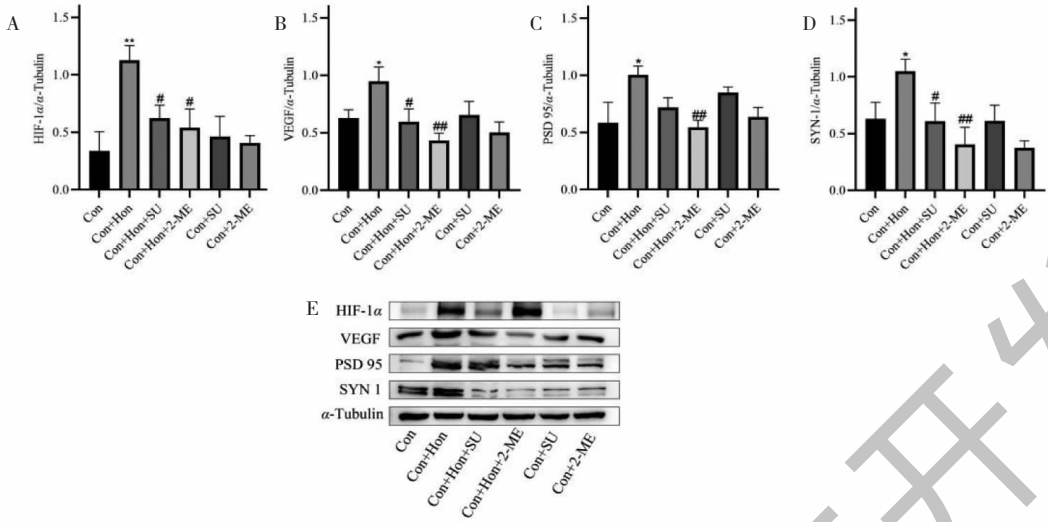


图9 正常环境下和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Regulatory effect of honokiol on HIF-1 α -VEGF pathway in PC12 cells under normal environment($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 Con + Hon 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Con + Hon group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

表达显著降低(图 10D, $P < 0.05$), PSD 95 蛋白表达也显著降低(图 11C, $P < 0.05$)。与 OGD 组相比, 给药和厚朴酚后 PSD 95 和 SYN 1 蛋白表达显著升高(图 10C, 10D, 11C, 11D, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 而给药和厚朴酚后 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达显著降低(图 10A, 10B, 11A, 11B, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。更重要的是, OGD 组给药和厚朴酚与单独给药

SU5416 都抑制 VEGF 蛋白表达(图 10B, $P < 0.05$), 还发现 OGD 给药和厚朴酚与单独给药 2-ME 都抑制 HIF-1 α 蛋白表达(图 11A, $P < 0.05$), 这说明和厚朴酚与 SU5416 和 2-ME 作用类似, 对 VEGF 和 HIF-1 α 有抑制表达作用。与 OGD + Hon 组相比, 给药 SU5416 后 PSD 95 和 SYN 1 蛋白表达显著降低(图 10C, 10D, $P < 0.05$); 给药 2-ME 后 PSD95 和

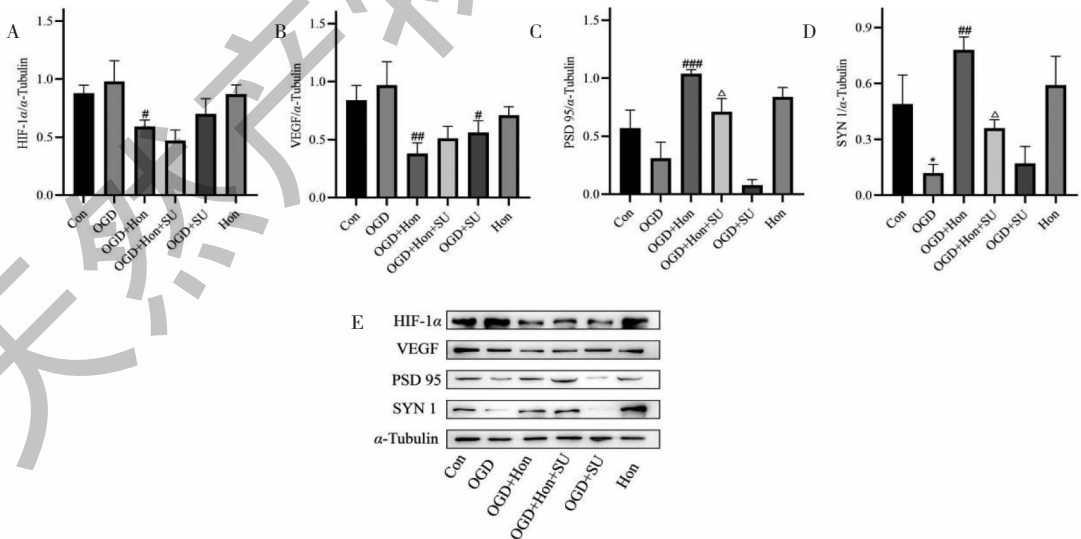


图 10 缺氧环境下采用 SU5416 探究和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 SU5416 was used to explore the regulatory effect of honokiol on HIF-1 α -VEGF pathway in PC12 cells under hypoxic environment($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$; 与 OGD 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 OGD + Hon 组相比, $\Delta P < 0.05$ 。Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$; Compared with OGD group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; Compared with OGD + Hon group, $\Delta P < 0.05$ 。

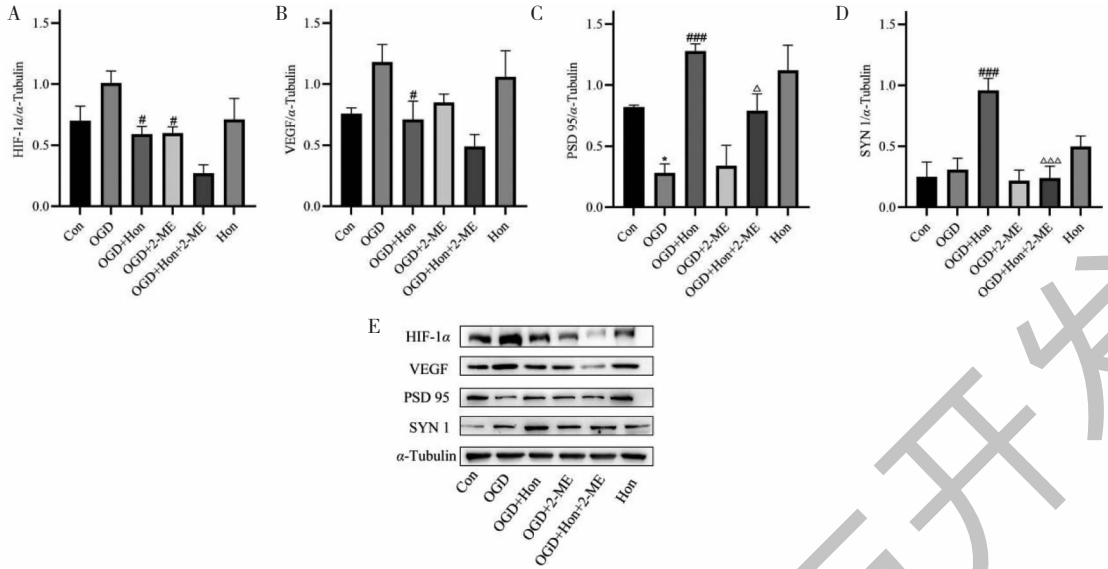


图 11 缺氧环境下采用 2-ME 探究和厚朴酚对 PC12 细胞 HIF-1 α -VEGF 通路的调节作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 2-ME was used to explore the regulatory effect of honokiol on HIF-1 α -VEGF pathway in PC12 cells under hypoxic environment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Con 组相比, * $P < 0.05$; 与 OGD 组相比, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; 与 OGD + Hon 组相比, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.001$ 。Note: Compared with Con group, * $P < 0.05$; Compared with OGD group, # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$; Compared with OGD + Hon group, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.001$ 。

SYN 1 蛋白表达也显著降低(图 11C、11D, $P < 0.05$, $P < 0.001$)。综上可知,缺氧环境下和厚朴酚下调 PC12 细胞 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,这与正常环境下和厚朴酚对 HIF-1 α 和 VEGF 的调节作用相反。此外,和厚朴酚给药后增强了 OGD 损伤的 PC12 细胞突触可塑性相关调节因子的表达。因此,我们做出假设:在缺氧环境下和厚朴酚可能没有依赖于 HIF-1 α -VEGF 通路来增强 OGD 损伤的突触可塑性调节因子的表达,其可能通过其他途径改善,如谷氨酸信号通路,在未来继续探究和厚朴酚增强突触可塑性作用机制是我们的研究方向。

3 讨论与结论

在常氧条件下 HIF-1 α 和 VEGF 低表达,给药和厚朴酚后显著促进了 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达;在缺氧条件下 HIF-1 α 和 VEGF 高表达,给予和厚朴酚后显著抑制了 HIF-1 α 和 VEGF 表达。和厚朴酚在不同状态下对 HIF-1 α 和 VEGF 表现出不同调节作用,这对研究其药理作用机制及开发利用具有重要意义。关于和厚朴酚如何影响 HIF-1 α 的形成和降解,本研究分子对接结果显示和厚朴酚与 PHDs 和 VHL 两种降解酶结合活性良好,但是具体降解酶被激活还是抑制我们仍无法阐明,这也是未来需要研究的方向。

网络药理学是通过系统生物学的方法进行研究,能够促进药物靶点的确认,已经被广泛应用于中药活性成分和作用机制的预测中。例如,有研究归纳中药抗抑郁的网络调控机制,结果显示中药通过“多靶点-多通路”、调节“神经-内分泌-免疫网络”和 PI3K-Akt 信号通路等发挥抗抑郁作用^[9]。在中药抗肿瘤的网络药理学研究中,有报道称中药通过抗炎症、抗免疫系统、抗血管生成、能量代谢等发挥抗肿瘤作用^[10]。此外,有学者研究发现中药通过调节 PI3K-Akt 通路、HIF-1 通路和 TNF 通路等促进神经细胞生长、增殖,抑制细胞凋亡,从而对缺氧起到一定调控作用^[11]。GO 富集分析结果包括对缺氧的反应,细胞对血管内皮生长因子刺激的反应,炎症反应等生物过程,这可能与缺氧症复杂的发病机制有关,说明和厚朴酚可以从多层次多途径干预疾病发生发展过程。KEGG 富集分析结果包括 HIF-1 通路、VEGF 通路、PI3K-Akt 通路等。PI3K-Akt 通路可通过磷酸化对相关蛋白进行调节,从而对细胞达到促进生长、抑制凋亡的作用^[11]。HIF-1 通路可改变基因表达来提高机体供氧能力和增加供血来适应缺血缺氧的环境。VEGF 是 HIF-1 α 下游靶基因,缺氧环境下可以刺激 HIF-1 α 的产生和稳定并启动 VEGF 的转录,致使 VEGF 表达增强。下面主要结合抑郁

症、脑缺血、肿瘤疾病重点讨论。

激活 HIF-1 α -VEGF 信号通路,在促进突触可塑性中发挥重要作用,能够有效逆转 CUMS 抑郁样行为和记忆损害^[12]。其中缺氧诱导因子-1(HIF-1)是一种低氧反应转录因子。它作为细胞氧感受器,是由不稳定 α 和 β 亚基组成的异源二聚体,在人类细胞中广泛表达。有研究表明低氧预处理(HP)能增加大鼠海马、下丘脑室旁核和新皮层的 HIF-1 α 表达^[13]。有报道也称,间歇性缺氧(IH)可以刺激海马血管生成和神经发生,并改善大脑记忆损伤^[14]。因此,HIF-1 α 信号通路是治疗抑郁症的一个很有前景的潜在靶点。血管内皮生长因子(VEGF)对血管内皮细胞有高度特异性,在中枢神经系统中具有神经营养和神经保护潜力。研究表明,VEGF 影响神经元的突触可塑性,可以促进轴突生长和神经发生^[15]。VEGFR-2(KDR)是 VEGF 的细胞表面受体,VEGF 在学习和记忆中发挥作用,具体表现为其受体 VEGFR-2 介导的长期增强、可塑性改善和认知功能改善^[16]。综上,激活 HIF-1 α -VEGF 信号通路是改善抑郁样行为的一个很有研究意义的策略。此外,在神经细胞中,PI3K-Akt 通路可以调节神经细胞的增殖和分化,还参与调节脑血流和促进神经元存活,这与抑郁症的发生和发展密切相关^[17]。抑郁症的发病机制与突触可塑性失调有关。突触可塑性改变与突触蛋白的表达密切相关。PSD 95 是突触后致密物(PSD)蛋白家族中的一种,能够调控突触传递和突触功能^[18]。SYN 1 是突触囊泡的特异性标记蛋白,可以反映突触数量、密度和分布^[19]。PSD 95 和 SYN 1 在促进信号传导和突触可塑性中有着关键作用,一些抗抑郁药物可明显增强突触可塑性。这与 2.8 和 2.9 结果一致,和厚朴酚可以提高 PSD 95 和 SYN 1 蛋白水平来增强 PC12 细胞的突触可塑性。

改善局灶性脑缺血大鼠的神经功能可能与促进 HIF-1 α -VEGF 信号通路的表达及脑缺血后突触可塑性形成有关^[20]。有学者发现发挥脑保护作用机制与提高 HIF-1 α 及其下游靶基因 VEGF、EPO 表达有关^[21]。对于改善高原缺氧导致脑缺血机制也与 HIF-1 α 通路的上调有关^[22]。PI3K-Akt 通路的激活也可以改善神经功能缺损对脑缺血再灌注损伤大鼠有脑保护作用。此外,HIF-1 α -VEGF 信号通路在肿瘤发生发展过程中起着重要作用,尤其是在中枢神经系统肿瘤方面。研究发现和厚朴酚通过降低

HIF-1 α 及其靶基因 VEGF 和 GLUT1 的表达来抑制神经胶质瘤细胞的增殖^[23]。在动物实验中,有学者采用裸鼠建立人结肠癌细胞实体瘤模型,和厚朴酚灌胃后显著抑制肿瘤的生长,其机制与抑制 HIF-1 α -VEGF 通路和 PI3K-AKT 通路有关^[24]。

综上,正常和缺氧环境下和厚朴酚对 HIF-1 α -VEGF 信号通路有不同的调节作用。和厚朴酚可能通过多通路、多靶点治疗抑郁症、脑缺血、肿瘤疾病,为进一步开展和厚朴酚治疗这些疾病的机制研究提供了方向。此外,分子对接角度预测和厚朴酚与 HIF-1 α 降解酶对接良好,本研究后续采用分子生物学等方法继续探讨和厚朴酚如何影响 HIF-1 α 。

致谢:感谢北京中医药大学中医学院科研实验中心对细胞实验的指导。

参考文献

- 1 Guo MX, Liao SL, Wu X, et al. Synthesis and characterization of magnolol and honokiol derivatives and evaluation of their anti-inflammatory and anti-tumor activities in vitro [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2020, 32: 749-758.
- 2 Trifan A, Bostănu AC, Luca SV, et al. Honokiol and magnolol: insights into their antidermatophytic effects [J]. Plants, 2021, 10: 2522.
- 3 Lin JW, Chen JT, Hong CY, et al. Honokiol traverses the blood-brain barrier and induces apoptosis of neuroblastoma cells via an intrinsic bax-mitochondrion-cytochrome c-caspase protease pathway [J]. Neuro-Oncology, 2012, 14: 302-314.
- 4 Cao YJ, Chen YP, Huang M, et al. Effect of Gualou Guizhi Decoction on neogenesis after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2022, 38: 2-6.
- 5 Vavilala D T, Ponnaluri VKC, Kanjilal D, et al. Evaluation of anti-hif and anti-angiogenic properties of honokiol for the treatment of ocular neovascular diseases [J]. PLoS One, 2014, 9: e113717.
- 6 Khan M, Dhammu T S, Matsuda F, et al. Promoting endothelial function by s-nitrosoglutathione through the hif-1 α /vegf pathway stimulates neurorepair and functional recovery following experimental stroke in rats [J]. Drug Des Dev Ther, 2015, 9: 2233-2247.
- 7 Fournier N M, Lee B, Banasr M, et al. Vascular endothelial growth factor regulates adult hippocampal cell proliferation through MEK/ERK- and PI3K/AKT-dependent signaling [J]. Neuropharmacology, 2012, 63: 642-652.
- 8 Hao MQ, Wang JH, Li XL, et al. Study on the mechanism of

- Astragali Radix in the treatment of ulcerative colitis based on network pharmacology and molecular docking [J]. China Pharm(中国药房), 2021 , 32 : 1215-1223.
- 9 Qin XM, Gao Y. Application of network pharmacology in research on mechanism of antidepressant effect of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2018 , 32 : 857.
- 10 Huang J, Cheung F, Tan HY, et al. Identification of the active compounds and significant pathways of yinchenhao decoction based on network pharmacology [J]. Mol Med Rep, 2017 , 16 : 4583-4592.
- 11 Xu Y. Study on the function and mechanism of antihypoxia effective parts of *Gentiana stramines* [D]. Xianyang: Tibet University for Nationalities(西藏民族大学), 2020.
- 12 Li G, Zhao M, Cheng X, et al. FG-4592 improves depressive-like behaviors through hif-1-mediated neurogenesis and synapse plasticity in rats [J]. Neurotherapeutics, 2020 , 17 : 664-675.
- 13 Baranova KA, Mironova VI, Rybnikova EA, et al. Characteristics of the transcription factor hif-1 α expression in the rat brain during the development of a depressive state and the antidepressive effects of hypoxic preconditioning [J]. Neurochem J, 2010 , 4 : 35-40.
- 14 Zhu XH, Yan HC, Zhang J, et al. Intermittent hypoxia promotes hippocampal neurogenesis and produces antidepressant-like effects in adult rats [J]. J Neurosci, 2010 , 30 : 12653-12663.
- 15 Tillo M, Ruhrberg C, Mackenzie F. Emerging roles for semaphorins and vegfs in synaptogenesis and synaptic plasticity [J]. Cell Adhes Migr, 2012 , 6 : 541-546.
- 16 Yang J, Yao Y, Chen T, et al. VEGF ameliorates cognitive impairment in *in vivo* and *in vitro* ischemia via improving neuronal viability and function [J]. NeuroMol Med, 2014 , 16 : 376-388.
- 17 Fakhri S, Iranpanah A, Gravandi MM, et al. Natural products attenuate PI3K/AKT/mTOR signaling pathway: a promising strategy in regulating neurodegeneration [J]. Phytomedicine, 2021 , 91 : 153664.
- 18 Sheng M, Hoogenraad CC. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view [J]. Annu Rev Biochem, 2007 , 76 : 823-847.
- 19 Hirokawa N, Sobue K, Kanda K, et al. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1 [J]. J Cell Biol, 1989 , 108 : 111-126.
- 20 Wang H, Song S, Zhao JC, et al. The effects of *Ginkgo biloba* diterpene lactone glumine injection on SIRT1/HIF-1 α /VEGF signaling pathway and synaptic plasticity in rats with focal cerebral ischemia [J]. Med J West China(西部医学), 2021 , 33 : 823-828.
- 21 Wang Y. A study on the mechanism of electroacupuncture combined with enriched rehabilitation training to intervene the expression of HIF-1 α and its downstream factors mediation angiogenesis in rats with focal cerebral ischemia [D]. Hefei: Anhui University of Chinese Medicine(安徽中医药大学), 2021.
- 22 Huang YQ. The protective effect of blood-letting puncture on well point by mitophagy mediated by HIF-1 α /BNIP3 pathway on acute high altitude brain injury in rats [D]. Xining: Qinghai University(青海大学), 2020.
- 23 Dong Y. The effects and mechanisms of honokiol on glioma U87 cells growth [D]. Shanghai: Fudan University(复旦大学), 2012.
- 24 Chen F. A study on the anti-tumour mechanism of the multiple pathways of honokiol [D]. Hangzhou: Zhejiang University(浙江大学), 2004.