

基于生物信息分析研究黄芩素通过NOX2/STAT1/NF- κ B通路抑制LPS诱导的BV-2细胞神经炎症的作用机制

杨吾燕^{1,2,3}, 闫姣姣^{1,2,3}, 高丽^{1,2,3*}, 秦雪梅^{1,2,3*}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 山西大学化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西太原 030006; 3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西太原 030006)

摘要: 本研究旨在确定黄芩素对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的BV-2细胞神经炎症的分子机制。采用生物信息分析、分子对接方法预测黄芩素的潜在靶点和作用机制, 并使用免疫荧光染色和Western blot技术对关键靶点一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2)、信号转导子和转录激活子1/核因子 κ B (signal transducer and activator of transcription 1/nuclear factor kappa-B, STAT1/NF- κ B) 信号通路相关蛋白及其上游调控因子NADPH氧化酶2 (NADPH oxidase-2, NOX2) 进行验证, 研究黄芩素改善神经炎症的作用机制。结果表明, 生物信息分析和分子对接技术预测出iNOS和COX-2为关键靶点, NF- κ B信号通路为关键通路。实验验证表明, 在LPS诱导的BV-2细胞中, 黄芩素能显著降低iNOS和COX-2的表达水平, 有效抑制NF- κ B和STAT1的磷酸化及NOX2的生成。综上, 黄芩素可通过NOX2 (gp91^{phox}/p47^{phox})/STAT1/NF- κ B途径显著抑制LPS诱导的BV-2细胞炎症。

关键词: 黄芩素; 神经炎症; 网络药理学; 分子对接; 作用机制

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)03-0716-08

Baicalein inhibits neuroinflammation via NOX2/STAT1/NF- κ B pathway in LPS-induced BV-2 cells based on bioinformatics methods

YANG Wu-yan^{1,2,3}, YAN Jiao-jiao^{1,2,3}, GAO Li^{1,2,3*}, QIN Xue-mei^{1,2,3*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. The Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. The Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Taiyuan 030006, China)

Abstract: This study identified the exact molecular mechanisms of baicalein on neuroinflammation in lipopolysaccharide (LPS)-induced BV-2 cells. Bioinformatics methods and molecular docking were integrated for predicting the potential targets and mechanisms of baicalein. Immunofluorescence staining and Western blot were used to analyze the predicted key targets [inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)], the expression level of protein related to signal transducer and activator of transcription 1/nuclear factor kappa-B (STAT1/NF- κ B) signaling pathway and its upstream regulator NADPH oxidase-2 (NOX2), and then the mechanism of baicalein in alleviating neuroinflammation was explored. The results showed that iNOS and COX-2 were predicted as the key targets and NF- κ B signaling pathway was one of the important pathways by

收稿日期: 2021-09-13; 修回日期: 2021-10-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81603319); 山西省面上青年基金资助项目 (201801D221374).

*通讯作者 Tel: 86-351-7018379, E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn;

Tel: 86-351-7011501, E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1339

bioinformatics methods and molecular docking. Experimental verification showed that baicalein could significantly reduce the expression of iNOS and COX-2, inhibit the phosphorylation of NF- κ B and STAT1 and the production of NOX2 in LPS-induced BV-2 cells. To sum up, baicalein could effectively inhibit the inflammatory reaction in LPS-induced BV-2 cells through regulating NOX2 (gp91^{phox}/p47^{phox})/STAT1/NF- κ B pathway.

Key words: baicalein; neuroinflammation; network pharmacology; molecular docking; mechanism

脑衰老是一个高度复杂的生物过程,可导致认知功能下降和神经退行性疾病的发生。神经炎症是神经退行性疾病的主要特征,与中枢神经系统中小胶质细胞的激活和炎性因子的过度分泌有关^[1,2]。

小胶质细胞是脑内关键的免疫细胞,小胶质细胞的激活可增加促炎因子和活性氧的生成,进而引发神经元凋亡或坏死^[3,4]。因此,抑制小胶质细胞的异常激活可以延缓多种衰老相关疾病的病程。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是一种来源于革兰阴性菌的内毒素,通过诱导促炎因子的分泌,从而引发神经炎症。因此,LPS诱导的BV-2小胶质细胞和原代小胶质细胞模型常用于神经炎症的研究^[5]。

黄芩素是从黄芩根中分离得到的一种黄酮类化合物,具有抗氧化和抗炎作用^[6]。课题组前期研究发现,黄芩素不仅可减轻D-半乳糖诱导的衰老大鼠认知障碍^[7],还可改善快速老化小鼠SAMP8的学习和记忆功能^[8]。同时,课题组证明黄芩素通过抑制LPS诱导的BV-2细胞促炎因子的释放而表现出抗炎作用^[9]。但是,黄芩素改善神经炎症的具体分子机制尚不明晰。

基因差异表达是指在一定刺激下,基因的mRNA表达水平发生显著性改变的现象。大量文献报道^[10-12],LPS可诱导BV-2细胞的许多基因发生差异表达,一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)和环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)是差异表达最显著的基因之一。iNOS和COX-2是重要的炎症介质,均受信号转导子和转录激活子1/核因子 κ B(signal transducer and activator of transcription 1/nuclear factor kappa-B, STAT1/NF- κ B)信号通路的调控^[13]。NADPH氧化酶2(NADPH oxidase-2, NOX2)是一个关键的酶系统,当LPS激活小胶质细胞后会迅速导致活性氧的产生增加^[14],进一步激活STAT1/NF- κ B信号通路^[15,16]。此外,iNOS和COX-2的过度激活会使前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)和一氧化氮(nitric oxide, NO)的合成增加,这也是导致神经元损伤和神经炎症发生的主要原因^[17,18]。

基于文献报道的LPS激活BV-2细胞相关的差异表达基因,本研究进行了生物信息学分析和网络分析,寻找在该过程中发挥核心作用的靶点;同时采用分子

对接方法,根据蛋白质与小分子的形状匹配和能量匹配原理,计算结合亲和力,预测小分子化合物的作用靶点^[19]。通过上述方法,预测黄芩素在LPS诱导的BV-2细胞中调节的潜在靶点和通路,进行实验验证,以阐释黄芩素抗神经炎症的分子机制。

材料与方法

药品与试剂 小鼠小胶质细胞株(BV-2细胞)、MEM培养基、特级胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(100 \times)和BCA试剂盒购自上海生工生物工程有限公司;黄芩素(批号JZ20150711,质量分数>98%)购自南京景竹生物科技有限公司;LPS购自Sigma公司;Hoechst 33342、细胞膜/细胞浆蛋白提取试剂盒购自碧云天生物技术(上海)公司;iNOS、COX-2、NF- κ B/p65、phospho-NF- κ B(p-NF- κ B)、STAT1、phospho-STAT1(p-STAT1)、gp91^{phox}抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司;p47^{phox}抗体购自上海英骏生物技术有限公司;荧光标记IgG二抗购自美国英杰生命技术有限公司。

仪器 Infinite M200 Pro多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);ECLIPSE Ti荧光显微镜(日本Nikon公司);电泳仪、光成像系统Chemi Doc TM XRS+(Bio-Rad公司);CytationTM 5细胞成像多功能检测仪(美国伯腾仪器有限公司)。

靶点收集 在PubMed^[20](<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)数据库以关键词“LPS、BV-2 cell、differentially expressed genes”收集LPS激活BV-2细胞相关差异表达基因。将所得差异基因汇总,并删除重复基因。使用SwissTargetPrediction数据库^[21](<http://www.swisstargetprediction.ch/>)和SEA数据库^[22](<http://sea.bkslab.org/>)预测黄芩素的靶点,并与LPS激活BV-2细胞的差异基因取交集,从而得到黄芩素抗神经炎症的潜在靶点。

蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络构建 使用STRING11.0数据库^[23](<https://string-db.org/>)获得靶点与靶点之间的作用关系,并用Cytoscape 3.7.2软件构建蛋白与蛋白互作网络^[24]。应用Network Analyzer^[25]插件计算网络中的拓扑参数,并使用MCODE插件获得关键子网络^[26]。

分子对接 使用 ZINC 数据库^[27] (<http://zinc.docking.org/>) 获得黄芩素的结构, RCSB PDB 数据库^[28] (<https://www.rcsb.org/>) 获得 COX-2 (PDB ID: 5KIR) 和 iNOS (PDB ID: 3E7G) 蛋白的 3D 结构。采用 AutoDock Vina (version 1.1.2) 软件^[29] 预测黄芩素与 COX-2、iNOS 的结合能值和结合模式, 并用 PyMOL (version 0.99)^[30] 可视化对接结果。

GO 富集分析 采用 DAVID 数据库^[31] (<https://david.ncifcrf.gov/>) 预测黄芩素发挥抗神经炎症作用涉及的重要生物过程。

细胞培养和药物处理 将 BV-2 细胞以每毫升 1.2×10^6 个细胞的密度接种于含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的 MEM 培养基中, 并在含 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养。根据前期研究结果^[9], 给予 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素预处理 2 h 后, 再加入 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 共孵育 24 h 进行后续实验。

Western blot 实验 收集细胞样品, 按照制造商的说明书提取细胞膜蛋白与胞浆蛋白, 具体步骤如下: 向细胞中加入 1 mL 含 1% 苯甲基磺酰氟 (phenyl methanesulfonyl fluoride, PMSF) 的裂解缓冲液 A, 反复冻融 5 次破坏细胞后, 置冰上裂解 15 min, $700 \times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 再以 $12\,000 \times g$ 离心 10 min, 收集胞浆蛋白。之后将 200 μL 裂解缓冲液 B 加入细胞膜沉淀物中, 置冰上裂解 10 min, $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 收集膜蛋白。通过 BCA 蛋白质测定法确定蛋白质浓度。

收集细胞样品, 加入 RIPA 裂解液在冰上裂解 30 min, 每 10 min 涡旋一次, 用 BCA 法测定蛋白浓度。通过 10% 或 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白 (每孔上样量为 50 μg), 并转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后, 分别加入 iNOS、COX-2、NF- κ B/p65、p-NF- κ B、STAT1、p-STAT1、p47^{phox}、gp91^{phox} 抗体, 并在 4 °C 孵育过夜。TBST 洗去一抗后, 加入二抗在 37 °C 孵育条带 1 h, 再次用 TBST 洗涤 3 次后, 在凝胶成像仪上显影成像, 并运用 Image J 对条带进行分析。

免疫荧光染色 将 BV-2 细胞以每毫升 1.2×10^6 个细胞的密度接种于 96 孔板中, $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素预处理 2 h 后用 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 刺激 24 h。弃去上清液后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min, 并用 PBS 洗涤。使用 0.1% TritonX-100 透化细胞, 并封闭 1 h, 加入一抗 p47^{phox} 在 4 °C 孵育过夜。清洗掉一抗后, 加入荧光二抗置于摇床上在 37 °C 孵育 2 h。最后加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33342 与细胞共孵育 15 min。使用 Cytation™ 5 细胞成像多功能检测仪检测荧光强度和拍摄荧光图像。

统计学方法 实验结果采用 $\bar{x} \pm \text{SEM}$ 表示, 使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析和 Tukey's 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 表明有统计学意义。

结果

1 黄芩素抗神经炎症靶点 PPI 网络构建

从 PubMed 数据库共收集到 2 463 个差异表达基因, 利用 SwissTargetPrediction 和 SEA 数据库预测得到黄芩素的作用靶点 139 个。通过取交集, 得到 38 个共同靶点, 见表 1^[10-12] 所示。基于 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作网络, 删除网络中未连接的节点, 得到黄芩素抗神经炎症的靶点网络 (图 1A)。网络聚类分析显示, 核心子网络 [top 1, molecular complex detection (MCODE) 得分 = 6.75] 由 9 个节点组成 (图 1B), 其中 COX-2 和 iNOS 在核心子网络中具有较高的度值 (degree), 且已报道这两个基因在 LPS 诱导的 BV-2 细胞中发生明显的差异表达。

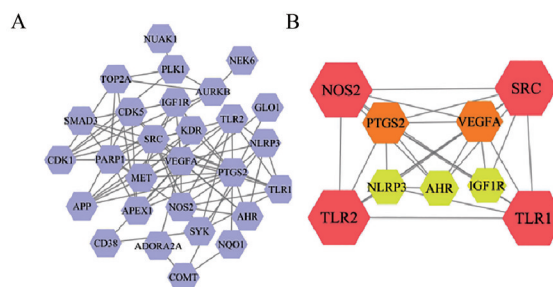


Figure 1 Protein-protein interaction network constructed by Cytoscape software. A: Graphical illustration of 38 targets; B: A core sub-network visualization of 9 targets. The higher the MCODE node score (the larger distribution a node has), the bigger the node size and the darker the node color are in the network

2 分子对接结果

为了进一步探索黄芩素与 COX-2 (PDB ID: 5KIR)、iNOS (PDB ID: 3E7G) 的结合模式, 采用 AutoDock Vina 对结合能进行预测, 并与相应的阳性小分子 (罗非昔布和 AR-C102222) 进行比较。所有对接结果的均方根偏差 (RMSD) 均小于 2, 表明对接结果是可靠的^[32]。Morris 等^[33] 研究发现, 当结合能小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时, 代表对接良好。结果显示, 黄芩素和阳性小分子罗非昔布与 COX-2 的结合能分别为 -9.9 和 $-8.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 黄芩素和阳性小分子 AR-C102222 与 iNOS 的结合能分别为 -7.2 和 $-7.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明黄芩素与 COX-2 和 iNOS 对接良好。黄芩素与 iNOS、COX-2 的最佳结合模式如图 2 所示。

Table 1 The fold changes of the 38 differentially expressed genes in lipopolysaccharide (LPS) -stimulated BV-2 cells

Uniprot ID	Gene symbol	Description	log ₂ (fold change)	P-value	Reference
P35354	PTGS2	Cyclooxygenase-2	6.871 714 439	2.57E-142	[10,11]
P35228	NOS2	Nitric oxide synthase 2	8.999 226 306	3.15E-119	[10,11]
P15907	ST6GAL1	ST6beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase 1	-3.561 204 319	2.61E-31	[10]
P11309	PIM1	Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	3.250 595 502	5.59E-30	[10,11]
P35968	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 2	-3.080 768 925	1.58E-25	[10]
P08581	MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	3.684 930 633	9.39E-25	[10]
O60603	TLR2	Toll-like receptor 2	2.562 772 588	1.59E-24	[10,11]
P11388	TOP2A	DNA topoisomerase II alpha	-2.990 587 245	4.52E-24	[10]
P43405	SYK	Spleen associated tyrosine kinase	2.242 920 478	4.31E-23	[10]
P21447	ABCB1A	Multidrug resistance protein 1A	3.486 623 933	1.07E-20	[10]
P06493	CDK1	Cyclin dependent kinase 1	-2.814 110 144	5.52E-20	[10]
P12931	SRC	Tyrosine-protein kinase SRC	2.994 603 505	2.27E-18	[10]
Q96P20	NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3	2.533 343 142	3.23E-17	[10,11]
P33527	ABCC1	Multidrug resistance-associated protein 1	1.955 765 744	3.77E-17	[10]
P29274	ADORA2A	Adenosine A2a receptor (by homology)	5.282 305 846	2.34E-12	[10]
P09874	PARP1	Poly [ADP-ribose] polymerase-1	-1.622 727 771	5.77E-12	[10]
P15692	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1.871 761 312	1.04E-11	[10]
Q9HC98	NEK6	Serine/threonine-protein kinase Nek6	-1.753 553 062	1.89E-11	[10]
P21964	COMT	Catechol O-methyltransferase	-1.664 059 854	2.38E-11	[10]
Q96GD4	AURKB	Serine/threonine-protein kinase Aurora-B	-3.245 112 385	2.52E-11	[10]
P53350	PLK1	Serine/threonine-protein kinase PLK1	3.727 635 228	4.87E-09	[10]
Q15399	TLR1	Toll-like receptor 1	1.749 717 415	9.78E-09	[10]
P28907	CD38	Lymphocyte differentiation antigen CD38	1.973 611 355	4.61E-08	[10]
Q04760	GLO1	Glyoxalase I	-1.835 092 126	1.00E-06	[10]
P05067	APP	Beta amyloid A4 protein	1.038 858 739	3.13E-06	[10]
P47989	XDH	Xanthine dehydrogenase/oxidase	1.084 657 012	1.79E-05	[10]
P27695	APEX1	DNA- (apurinic or apyrimidinic site) lyase	-1.336 906 145	2.94E-05	[10]
P35869	AHR	Aryl hydrocarbon receptor	2.032 453 99	5.08E-05	[10]
P08069	IGF1R	Insulin-like growth factor I receptor	-1.322 918 565	1.28E-04	[10]
P53355	DAPK1	Death-associated protein kinase 1	1.029 470 957	2.76E-04	[10-12]
P84022	SMAD3	SMAD family member 3	-2.082 222 317	8.35E-04	[10]
Q00535	CDK5	Cyclin-dependent kinase 5/CDK5 activator 1	-1.068 474 723	9.62E-04	[10]
O60285	NUAK1	NUAK family SNF1-like kinase 1	-1.721 963 927	1.52E-03	[10]
P15559	NQO1	NAD (P) H dehydrogenase [quinone] 1	1.980 887 899	1.82E-03	[10]
Q11203	ST3GAL3	CMP-N-acetylneuraminase-beta-1,4-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase	2.491 426 161	2.26E-03	[10]
P37059	HSD17B2	Hydroxysteroid 17-beta dehydrogenase 2	2.466 877 781	2.47E-03	[10]
P43250	GRK6	G protein-coupled receptor kinase 6	-1.052 302 552	3.63E-03	[10]
P63316	TNNC1	Troponin C1, slow skeletal and cardiac type	2.159 192 603	8.21E-03	[10]

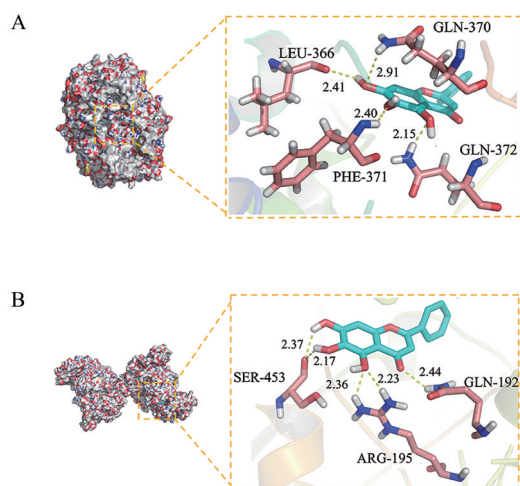


Figure 2 Molecular docking modes between baicalein and cyclooxygenase-2 (COX-2, A), baicalein and inducible nitric oxide synthase (iNOS, B)

3 GO 富集分析结果

运用 DAVID 数据库对 38 个靶点进行 GO 富集分析, 根据 $P < 0.05$, 得到 11 个显著富集的生物过程。结果显示, 黄芩素可调节氧化还原过程 (oxidation-reduction process)、炎症反应 (inflammatory response)、NF- κ B 入核的正向调节 (positive regulation of NF- κ B import into nucleus)、iNOS 生物合成过程的正向调节 (positive regulation of nitric-oxide synthase biosynthetic process), 这些生物过程与氧化应激和神经炎症的发生密切相关 (图3)。

4 黄芩素抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞 iNOS、COX-2 蛋白表达

为了验证黄芩素对炎症介质 iNOS、COX-2 的抑制作用, 采用 Western blot 技术进行检测。结果显示, $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处理细胞后, iNOS 和 COX-2 表达水平分别显著升高 132.94% 和 105.52%。然而, 用 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

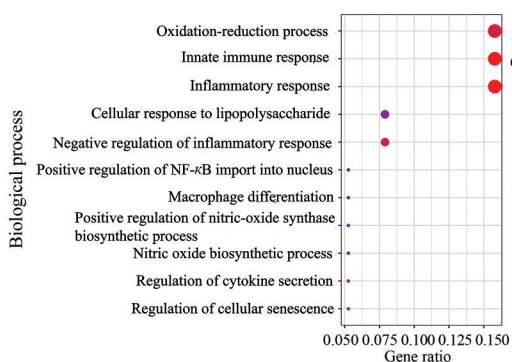


Figure 3 Eleven enriched biological processes predicted by DAVID database and visualized by RStudio. The color scales represented the different false discovery rate (FDR) and the sizes of the dots indicated the target counts of each term

黄芩素预处理后可使 iNOS 表达水平显著降低 40.09% (图 4A), COX-2 表达水平显著降低 42.80% (图 4B), 这表明黄芩素可以显著抑制 iNOS 和 COX-2 的表达。

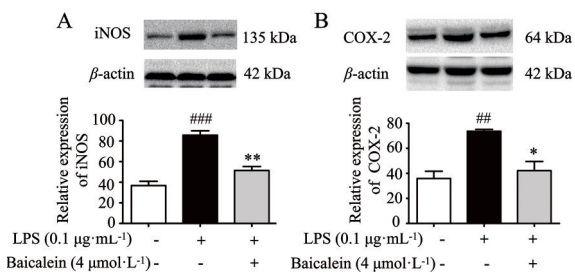


Figure 4 Effects of baicalein on protein levels of iNOS (A) and COX-2 (B) in LPS-induced BV-2 cells. $n = 3, \bar{x} \pm \text{SEM}$. $###P < 0.01, ###P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05, **P < 0.01$ vs LPS group

5 黄芩素抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞 NF-κB/p65 和 p-NF-κB 蛋白表达

iNOS 和 COX-2 是 NF-κB 信号通路中两种重要的分子, iNOS 和 COX-2 蛋白的过表达可激活 NF-κB 信号通路, 诱导神经炎症反应。本课题组前期采用免疫荧光技术发现 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素可使 LPS 诱导的 NF-κB/p65 表达显著降低且有效抑制 NF-κB/p65 的核易位^[9]。本研究采用 Western blot 对 NF-κB 信号通路的关键蛋白进行检测。结果显示, LPS 诱导 BV-2 细胞后, NF-κB/p65 和 p-NF-κB 表达水平分别上调 74.03% 和 92.63%。然而, 黄芩素给药后可使 NF-κB/p65 和 p-NF-κB 的表达水平显著下调 31.12% 和 38.22% (图 5), 这表明黄芩素能有效抑制 NF-κB/p65 的表达和 NF-κB 的磷酸化。

6 黄芩素抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞 p-STAT1 蛋白表达

LPS 可诱导 NF-κB 蛋白过表达, 并快速激活其上游

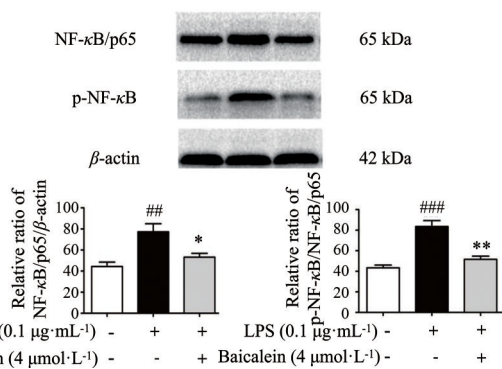


Figure 5 Effects of baicalein on protein levels of nuclear factor kappa-B (NF-κB)/p65 and p-NF-κB in LPS-induced BV-2 cells. $n = 3, \bar{x} \pm \text{SEM}$. $###P < 0.01, ###P < 0.001$ vs control group; $*P < 0.05, **P < 0.01$ vs LPS group

蛋白 STAT1 的表达, 从而加剧神经炎症。采用 Western blot 技术对 STAT1 信号通路的关键蛋白 p-STAT1 进行检测。结果显示, LPS 诱导 BV-2 细胞后能使 p-STAT1 的表达显著上调 1 222.45%。然而, 黄芩素处理后可使 p-STAT1 的表达水平显著降低 48.97% (图 6), 这表明黄芩素能明显下调 LPS 诱导的 BV-2 细胞 STAT1 蛋白的磷酸化。

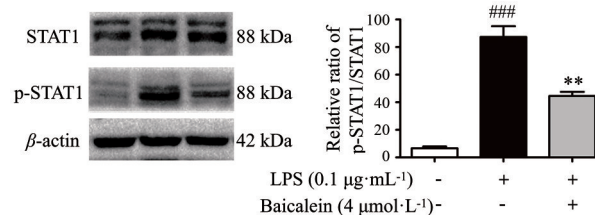


Figure 6 Effects of baicalein on the level of p-signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) protein in LPS-stimulated BV-2 cells. $n = 3, \bar{x} \pm \text{SEM}$. $###P < 0.001$ vs control group; $**P < 0.01$ vs LPS group

7 黄芩素对 LPS 诱导的 BV-2 细胞 p47^{phox}、gp91^{phox} 蛋白表达的影响

STAT1 介导的炎症反应需要 NOX2 (gp91^{phox}/p47^{phox}) 依赖性生成 ROS, 而过量的 ROS 对于激活 NF-κB 信号通路, 促进 STAT1 磷酸化和核易位至关重要。采用免疫荧光和 Western blot 技术对 p47^{phox}、gp91^{phox} 蛋白表达进行检测。免疫荧光结果表明, LPS 处理后 p47^{phox} 的表达显著增加 42.89%。然而, 黄芩素使 p47^{phox} 的表达显著降低 24.57% (图 7A)。Western blot 结果表明, LPS 刺激后使胞膜 p47^{phox} 的表达增加了 128.55%, 然而, 黄芩素处理后使胞膜 p47^{phox} 水平显著下调了 48.12% (图 7B)。此外, LPS 刺激使总蛋白水平和胞膜 gp91^{phox} 水平分别显著增加 57.80% 和 57.21%

(图 7C)。然而,黄芩素处理使 gp91^{phox} 总蛋白和膜蛋白表达显著降低了 35.76% 和 35.48%。以上结果表明, LPS 可加快 p47^{phox} 从细胞质到细胞膜的转移, 并上调膜蛋白 gp91^{phox} 的表达, 但给予黄芩素后能抑制 p47^{phox} 从胞质到胞膜的转移, 并抑制总 gp91^{phox} 蛋白和膜 gp91^{phox} 蛋白的表达。

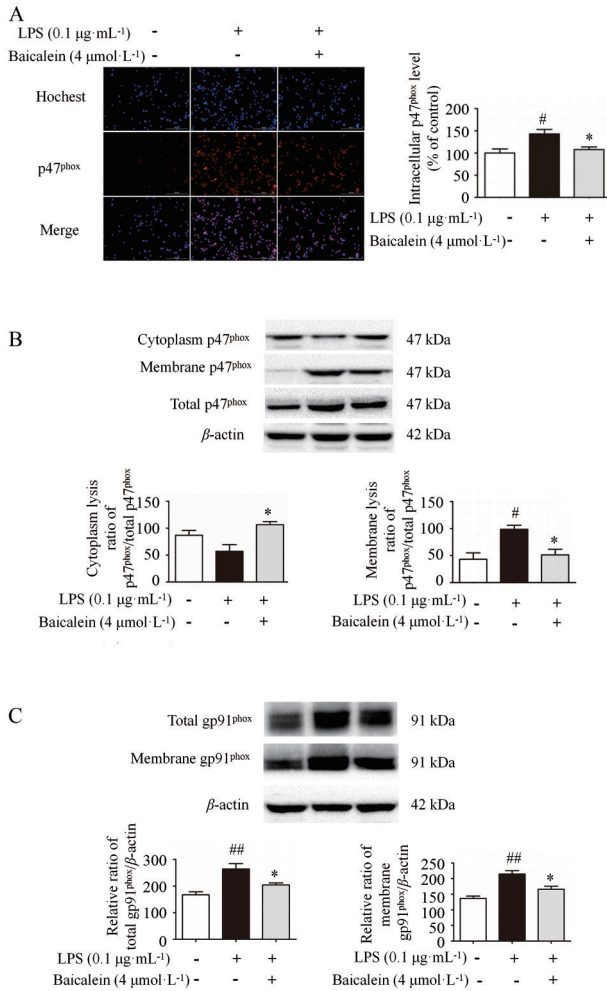


Figure 7 Effects of baicalein on the levels of p47^{phox}, gp91^{phox} in LPS-induced BV-2 cells. A: Intracellular p47^{phox} level obtained by immunofluorescence assay; B: The levels of membrane and cytosol p47^{phox}; C: The levels of total and membrane gp91^{phox}. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ vs LPS group

讨论

差异表达基因是在疾病发生发展过程中发挥重要作用的基因, 这些基因对于阐述疾病病理机制具有重要意义。大量文献报道, LPS 可诱导 BV-2 细胞内大量基因发生差异表达, 这些基因为神经炎症相关靶点的发现提供了依据。对这些基因进行生物信息挖掘, 通过网络构建和网络聚类分析寻找核心靶点, 是药物靶点发现的新途径^[34]。分子对接可用于模拟药物小分子

和受体蛋白的结合模式, 将分子对接和生物信息分析相结合, 为黄芩素抗神经炎症潜在靶点和通路的预测提供了新的思路。预测结果显示, 黄芩素可能通过与关键靶点 COX-2 和 iNOS 结合发挥抗神经炎症的作用。

LPS 可诱导小胶质细胞的过度活化, 从而引起神经变性, 导致神经元功能受损^[35]。此外, 小胶质细胞的激活将引起多种炎性介质水平的升高, 包括 COX-2 和 iNOS^[36-38]。iNOS 的过度累积加速 NO 的生成, 同时增强 COX-2 的活性, 进一步加重炎症的级联反应和神经系统的退行性病变^[39-41]。本研究发现, LPS 显著上调 iNOS 和 COX-2 的表达。然而, 给予黄芩素后可显著下调 iNOS 和 COX-2 的蛋白表达, 表明黄芩素抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症。

NF- κ B 信号通路与慢性炎症和神经退行性疾病的发展高度相关。NF- κ B 信号通路的激活可导致炎症介质 iNOS 和 COX-2 的生成增加^[42-44]。同时, NF- κ B 转录因子表达受胞质内 STAT1 的调控^[45], STAT1 可与 NF- κ B 结合并激活下游基因的表达, 最终导致神经炎症和神经退行性疾病^[46]。因此, 通过抑制 NF- κ B 信号通路来调节炎症因子的生成可减轻神经毒性和减少神经元死亡, 进而延缓衰老相关疾病的发生^[47,48]。本研究发现, LPS 显著增加 NF- κ B/p65 的表达和 NF- κ B 的磷酸化, 但给予黄芩素后显著降低 NF- κ B/p65 的表达和 NF- κ B 的磷酸化, 表明黄芩素可通过 NF- κ B 信号通路抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症。

STAT1 受 Toll 样受体刺激后迅速磷酸化, 而磷酸化的 STAT1 参与调节促炎因子的释放和介导免疫反应^[49]。通过抑制 STAT1 的磷酸化可显著减少 COX-2 和 iNOS 的生成^[50]。本研究发现, LPS 刺激后 STAT1 的磷酸化显著增加。给予黄芩素后显著抑制 STAT1 的磷酸化, 表明黄芩素可通过 STAT1 信号通路抑制 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症。本研究结果与前期发现黄芩素抑制 STAT1 信号通路减少快速老化小鼠炎症因子分泌相一致^[51]。

NF- κ B 和 STAT1 信号通路的激活受 ROS 信号调控^[52]。NOX 是加快细胞中 ROS 产生的重要物质。当胞质组分 p47^{phox} 转移到细胞膜, 并在细胞膜与 gp91^{phox} 结合后, NOX 的表达会迅速增加, 进而诱导细胞内产生高水平的 ROS^[53,54]。因此, 抑制依赖于 NOX 产生 ROS 的通路可调控 NF- κ B 和 STAT1 信号通路激活介导的炎症反应。本研究结果表明, LPS 处理后胞质组分 p47^{phox} 在细胞膜上的表达显著增加, 且促使膜 gp91^{phox} 蛋白表达增加, 有利于 NOX2 的形成, 进而加速 ROS 的产生。然而, 给予黄芩素后抑制 gp91^{phox} 和 p47^{phox} 的表达, 从而减轻 LPS 诱导的 BV-2 细胞炎症反应。

综上, 通过结合生物信息分析和分子对接技术, 本研究结果揭示黄芩素可能通过抑制 NOX2 (gp91^{phox}/p47^{phox})/STAT1/NF- κ B 级联反应来改善 LPS 诱导的氧化应激和神经炎症 (图 8)。

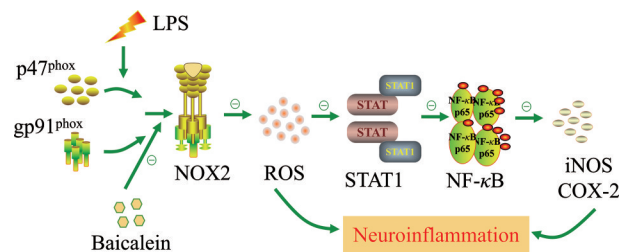


Figure 8 The signaling pathway diagram of baicalein against neuroinflammation. "⊖" represents inhibition

作者贡献: 杨吾燕和闫姣姣负责进行实验和数据分析, 完成文章撰写; 高丽和秦雪梅负责实验思路的指导; 所有作者均对本文有所贡献。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] You MM, Chen YF, Pan YM, et al. Royal Jelly attenuates LPS-induced inflammation in BV-2 microglial cells through modulating NF- κ B and p38/JNK signaling pathways [J]. *Mediators Inflamm*, 2018, 2018: 7834381.
- [2] Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration [J]. *Science*, 2016, 353: 777-783.
- [3] Chen J, Yin W, Tu Y, et al. L-F001, a novel multifunctional ROCK inhibitor, suppresses neuroinflammation *in vitro* and *in vivo*: involvement of NF- κ B inhibition and Nrf2 pathway activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 806: 1-9.
- [4] Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: the good, the bad, and the dysregulated [J]. *Exp Neurol*, 2016, 275 Pt 3: 316-327.
- [5] Yao C, Liu X, Zhou Z, et al. Melatonin attenuates expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in activated microglia induced by lipopolysaccharide (LPS) [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2019, 82: 437-446.
- [6] Dinda B, Dinda S, DasSharma S, et al. Therapeutic potentials of baicalin and its aglycone, baicalein against inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 131: 68-80.
- [7] Duan DD, Wang KX, Zhou YZ, et al. Baicalein exerts beneficial effects in *D*-galactose-induced aging rats through attenuation of inflammation and metabolic dysfunction [J]. *Rejuvenation Res*, 2017, 20: 506-516.
- [8] Gao L, Li J, Zhou Y, et al. Effects of baicalein on cortical pro-inflammatory cytokines and the intestinal microbiome in senescence accelerated mouse prone 8 [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2018, 9: 1714-1724.
- [9] Yan JJ, Gao L, Qin XM et al. Baicalein attenuates the neuroinflammation in LPS-activated BV-2 microglial cells through suppression of pro-inflammatory cytokines, COX2/NF- κ B expressions and regulation of metabolic abnormality [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 1060902.
- [10] Song H, Lu Y, Qu Z, et al. Effects of aged garlic extract and FruArg on gene expression and signaling pathways in lipopolysaccharide-activated microglial cells [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 35323.
- [11] Juknat A, Pietr M, Kozela E, et al. Microarray and pathway analysis reveal distinct mechanisms underlying cannabinoid-mediated modulation of LPS-induced activation of BV-2 microglial cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e61462.
- [12] Zhou H, Qu Z, Mossine VV, et al. Proteomic analysis of the effects of aged garlic extract and its FruArg component on lipopolysaccharide-induced neuroinflammatory response in microglial cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e113531.
- [13] Lee SB, Lee WS, Shin JS, et al. Xanthotoxin suppresses LPS-induced expression of iNOS, COX-2, TNF- α , and IL-6 *via* AP-1, NF- κ B, and JAK-STAT inactivation in RAW264.7 macrophages [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49: 21-29.
- [14] Yauger YJ, Bermudez S, Moritz KE, et al. Iron accentuated reactive oxygen species release by NADPH oxidase in activated microglia contributes to oxidative stress *in vitro* [J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16: 41.
- [15] Rendra E, Riabov V, Mossel DM, et al. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes [J]. *Immunobiology*, 2019, 224: 242-253.
- [16] Qi Z, Yin F, Lu L, et al. Baicalein reduces lipopolysaccharide-induced inflammation *via* suppressing JAK/STATs activation and ROS production [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62: 845-855.
- [17] Zheng C, Qu YX, Wang B, et al. COX-2/PGE₂ facilitates fracture healing by activating the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23: 9721-9728.
- [18] Tse JKY. Gut microbiota, nitric oxide, and microglia as prerequisites for neurodegenerative disorders [J]. *ACS Chem Neurosci*, 2017, 8: 1438-1447.
- [19] Zoete V, Schuepbach T, Bovigny C, et al. Attracting cavities for docking. Replacing the rough energy landscape of the protein by a smooth attracting landscape [J]. *J Comput Chem*, 2016, 37: 437-447.
- [20] Sayers EW, Beck J, Bolton EE, et al. Database resources of the national center for biotechnology information [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49: D10-D17.
- [21] David G, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: 32-38.
- [22] Keiser MJ, Roth BL, Armbruster BN, et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 197-206.
- [23] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D447-D452.
- [24] Lopes CT, Franz M, Kazi F, et al. Cytoscape web: an interactive web-based network browser [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 2347-

- 2348.
- [25] Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SE, et al. Computing topological parameters of biological networks [J]. *Bioinformatics*, 2008, 24: 282-284.
- [26] Bader GD, Hogue CW. An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks [J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4: 2.
- [27] Sterling T, Irwin JJ. ZINC 15--ligand discovery for everyone [J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55: 2324-2337.
- [28] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28: 235-242.
- [29] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31: 455-461.
- [30] Nathan A, Nils W, Jens M. bcl:: Cluster: a method for clustering biological molecules coupled with visualization in the Pymol molecular graphics system [J]. *IEEE Int Conf Comput Adv Bio Med Sci*, 2011, 2011: 13-18.
- [31] Sherman BT, Hosack DA, Yang J, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4: P3.
- [32] Irwin JJ, Shoichet BK, Mysinger MM, et al. Automated docking screens: a feasibility study [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 5712-5720.
- [33] Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2008, Chapter 8: Unit 8.14.
- [34] Li S, Fan TP, Zhang WD, et al. Network pharmacology in traditional Chinese medicine [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014, 2014: 138460.
- [35] Farkhondeh T, Pourbagher-Shahri AM, Ashrafizadeh M, et al. Green tea catechins inhibit microglial activation which prevents the development of neurological disorders [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15: 1792-1798.
- [36] Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173: 649-665.
- [37] Zhang J, Zheng Y, Luo Y, et al. Curcumin inhibits LPS-induced neuroinflammation by promoting microglial M2 polarization via TREM2/TLR4/NF- κ B pathways in BV2 cells [J]. *Mol Immunol*, 2019, 116: 29-37.
- [38] Chhor V, Le Charpentier T, Lebon S, et al. Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia *in vitro* [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 32: 70-85.
- [39] Nogawa S, Forster C, Zhang F, et al. Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95: 10966-10971.
- [40] Brown GC, Bal-Price A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria [J]. *Mol Neurobiol*, 2003, 27: 325-355.
- [41] Kawano T, Anrather J, Zhou P, et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity [J]. *Nat Med*, 2006, 12: 225-229.
- [42] Mattson MP, Camandola S. NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders [J]. *J Clin Invest*, 2001, 107: 247-254.
- [43] Kim YJ, Hwang SY, Oh ES, et al. IL-1 β , an immediate early protein secreted by activated microglia, induces iNOS/NO in C6 astrocytoma cells through p38 MAPK and NF- κ B pathways [J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84: 1037-1046.
- [44] Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after [J]. *Cell*, 1996, 87: 13-20.
- [45] Ohmori Y, Schreiber RD, Hamilton TA. Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappa B [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 14899-14907.
- [46] Yang XJ, Seto E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention [J]. *Oncogene*, 2007, 26: 5310-5318.
- [47] Lo JY, Kamarudin MN, Hamdi OA, et al. Curcumenol isolated from *Curcuma zedoaria* suppresses Akt-mediated NF- κ B activation and p38 MAPK signaling pathway in LPS-stimulated BV-2 microglial cells [J]. *Food Funct*, 2015, 6: 3550-3559.
- [48] Zhong LM, Zong Y, Sun L, et al. Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e32195.
- [49] Luu K, Greenhill CJ, Majoros A, et al. STAT1 plays a role in TLR signal transduction and inflammatory responses [J]. *Immunol Cell Biol*, 2014, 92: 761-769.
- [50] Lee HH, Shin JS, Lee WS, et al. Biflorin, isolated from the flower buds of *Syzygium aromaticum* L., suppresses LPS-induced inflammatory mediators via STAT1 inactivation in macrophages and protects mice from endotoxin shock [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79: 711-720.
- [51] Li JQ, Zhou YZ, Gao L, et al. Integration of transcriptomics and network analysis deciphers the mechanisms of baicalein in improving learning and memory impairment in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 865: 172789.
- [52] Yang CS, Kim JJ, Lee SJ, et al. TLR3-triggered reactive oxygen species contribute to inflammatory responses by activating signal transducer and activator of transcription-1 [J]. *J Immunol*, 2013, 190: 6368-6377.
- [53] Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, et al. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 2197-2208.
- [54] El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane [J]. *Semin Immunopathol*, 2008, 30: 279-289.