

基于网络药理学、分子对接及体外实验探讨青娥丸治疗阿尔茨海默病的作用机制

张笑丰¹, 宋琳^{2*}, 王艳杰³, 梅本圆¹

1. 黑龙江中医药大学 基础学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 惠州学院 生命科学院, 广东 惠州 516007

3. 贺州学院 食品与生物工程学院 广西康养食品科学与技术重点实验室, 广西 贺州 542899

摘要:目的 整合网络药理学、分子对接技术和实验验证, 系统探讨青娥丸治疗阿尔茨海默病(AD)的潜在活性成分及其作用机制。方法 经过 ETCM 数据库、TCMSP 数据库及文献搜索通过 SWISS ADME 平台和 Swiss Target Prediction 数据库筛选出青娥丸主要活性成分及靶点, 通过 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库获取 AD 靶点; 取交集靶点后用 STRING 数据库构建青娥丸治疗 AD 潜在靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)。运用 Cytoscape 3.9.1 软件筛选核心靶点; 采用 DAVID 数据库对交集靶点进行基因本体(GO)功能富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。使用 PyMol 软件和 AutoDock1.5.7 软件进行分子对接验证。建立 HT22 细胞模型, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 通过 Western blotting 检测磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路和细胞凋亡的关键作用靶点蛋白表达水平。结果 共得到青娥丸活性成分 119 个, 靶点 900 个; 疾病靶点 1409 个。PPI 网络获得核心靶点 Akt1、非受体酪氨酸激酶(SRC)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)、肿瘤坏死因子(TNF)和表皮生长因子受体(EGFR)等。GO 和 KEGG 富集分析获得 1532 个 GO 功能注释, 192 条信号通路, 主要涉及 PI3K/Akt 通路、细胞凋亡等。分子对接结果显示, 青娥丸中的主要活性成分与关键靶点均有强的结合能力, 对接结合能均低于-6.0 kcal/mol。细胞实验表明, 与对照组比较, 青娥丸可以改善 A β 25-35 诱导的 HT22 细胞活力($P<0.01$), 提高 A β 25-35 诱导的 HT22 细胞中 p-Akt、p-PI3K 和 Bcl-2 蛋白的表达, 抑制 Bax 蛋白的表达($P<0.05$)。结论 青娥丸可能通过调节 PI3K/Akt 信号通路和细胞凋亡保护神经元, 延缓病理进程治疗 AD, 为青娥丸的临床应用和 AD 治疗的研究提供依据。

关键词: 青娥丸; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 分子对接; 木犀草素; 黄芩苷; 柚皮素

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)06-1371-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.06.004

Mechanism of Qing'e Pills in treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology, molecular docking and *in vitro* experiments

ZHANG Xiaofeng¹, SONG Lin², WANG Yanjie³, MEI Benyuan¹

1. School of Basic Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. School of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou 516007, China

3. Guangxi Key Laboratory of Health Care Food Science and Technology, School of Food and Biological Engineering, Hezhou University, Hezhou 542899, China

Abstract: Objective Integrate network pharmacology, molecular docking technology and experimental verification to systematically explore the potential active ingredients and mechanisms of Qing'e Pills in treating Alzheimer's disease (AD). **Methods** The main active components and targets of Qing'e Pills were screened using the ETCM database, TCMSP database, and literature search via the SWISS ADME platform and Swiss Target Prediction database. AD-related targets were obtained from the Gene Cards database and OMIM database. Intersection targets were identified, and the STRING database was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network of potential targets for Qing'e Pills in treating AD. Core targets were screened using Cytoscape 3.9.1 software. Gene

收稿日期: 2025-02-27

基金项目: 中国博士后(54批)科学基金项目(2013M541427)

作者简介: 张笑丰, 女, 硕士研究生, 研究方向为中医药防治痴呆机制研究。E-mail: zyxzf20200830@163.com

*通信作者: 宋琳, 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治痴呆机制研究。E-mail: drsonglin@163.com

Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the intersection targets were performed using the DAVID database. Molecular docking validation was conducted using PyMol software and Auto Dock 1.5.7 software. An HT22 cell model was established, and cell viability was assessed using the CCK8 assay. Western blotting was used to detect the expression levels of key target proteins in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway and apoptosis. **Results** A total of 119 active components and 900 targets of Qing'e Pills were identified, along with 1 409 disease-related targets. The PPI network revealed core targets such as Akt1, non-receptor tyrosine kinase (SRC), heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1), tumor necrosis factor (TNF), and epidermal growth factor receptor (EGFR). GO and KEGG enrichment analysis yielded 1 532 GO functional annotations and 192 signaling pathways, primarily involving the PI3K/Akt pathway and apoptosis. Molecular docking results demonstrated that the main active components of Qing'e Pills exhibited strong binding affinities to the key targets, with docking binding energies all below -6.0 kcal/mol. Cell experiments showed that, compared to the control group, Qing'e Pills significantly improved A β 25-35-induced HT22 cell viability ($P < 0.01$), increased the expression of p-Akt, p-PI3K, and Bcl2 proteins in A β 25-35-induced HT22 cells, and inhibited the expression of Bax protein ($P < 0.05$). **Conclusion** Qing'e Pills may protect neurons and delay the pathological process of AD by regulating the PI3K/Akt signaling pathway and apoptosis, which provides a basis for the clinical application of Qing'e Pills and the research of AD treatment.

Key words: Qing'e Pills; Alzheimer's disease; network pharmacology; molecular docking; luteolin; baicalein; naringenin

阿尔茨海默病是一种病因尚未明确的中枢神经系统退行性疾病,其主要特征为记忆力衰退和认知功能受损,且病情呈渐进性恶化^[1]。我国阿尔茨海默病患者在全球中占 25%^[2]。阿尔茨海默病作为老年期最普遍的痴呆类型,已成为 65 岁以上老年人致残的主要因素之一^[3]。其确切病因和发病机制仍不明确,且尚无能够根治的药物。西医在治疗阿尔茨海默病时,药物常伴随明显的不良反应,如恶心、呕吐、腹痛等消化道不适,严重时甚至可能诱发癫痫,加剧病情^[4]。因此探索多靶点、低毒性的新型治疗策略具有重要临床意义。

中医治疗阿尔茨海默病注重整体调节、协同作用,具有多靶点、个体化、不良反应少等优势,在改善生活质量和延缓病情方面效果显著。阿尔茨海默病症状属中医“呆病”“痴呆”的范畴,痴呆以虚为本,以实为标。阿尔茨海默病常见记忆力减退、言语不利、腰膝酸软等,其病机与肾气亏虚、肾精不固、肾阳不足有关。中国传统方青娥丸源自宋代《太平和剂局方》,其组方以杜仲为君药,补肝肾、强腰膝、壮筋骨;补骨脂为臣药,补肾助阳;核桃仁补肾固精,大蒜宣通祛寒,二者共为佐使药,诸药合用,具有补肾温阳、固精强腰的作用,对阿尔茨海默病的治疗具有潜在的临床应用价值。然而,青娥丸治疗阿尔茨海默病的分子机制尚未系统阐明,其多成分、多靶点的作用机制与关键信号通路仍需深入探索。

本研究整合网络药理学、分子对接技术及体外实验验证,首次系统解析青娥丸治疗阿尔茨海默病

的活性成分群及其协同调控机制。通过构建“药物-成分-靶点-通路”网络模型,结合细胞水平功能验证,多角度揭示青娥丸干预阿尔茨海默病的潜在作用机制,为青娥丸的临床转化提供理论支撑,也为基于中药多靶点特性的阿尔茨海默病创新药物研发开辟新路径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠海马神经细胞 HT22 购于上海璞贝生(货号 iCell-m020)。

1.1.2 药物与试剂 杜仲、补骨脂、核桃仁、大蒜均购于北京同仁堂药店;盐酸多奈哌齐片(规格 5 mg/片,产品批号 02230230)由植恩生物技术股份有限公司生产;杜尔贝科改良 Eagle 培养基培养基(产品批号 C11330500BT)购自赛默飞世尔科技公司; β -淀粉样蛋白 25-35 (A β 25-35,产品批号 Y-0044-5mg)购自北京博奥森生物技术有限公司;细胞计数试剂盒-8 (CCK-8,产品批号 MA0218-3)购自大连美仑生物技术有限公司;二喹啉甲酸(BCA)蛋白试剂盒(产品批号 WLA004b)购自万类生物科技有限公司; β -肌动蛋白(β -actin,产品批号 AF5003)购自碧云天生物技术有限公司;蛋白激酶 B (Akt,产品批号 GB23303)、磷酸化 Akt (p-Akt,产品批号 381555)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K,产品批号 R23411)、磷酸化 PI3K (p-PI3K,产品批号 R22768)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2,产品批号 R23309)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax,产品批号 R380709)均购自成都正能生物技术有限公司。

1.1.3 设备与仪器 Heracell 240i GP CO₂ 细胞培养箱 (赛默飞世尔科技公司); Thermo Fisher 荧光倒置显微镜 (广州联波生物科技有限公司); ELX-800 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司); TDL-40B 台式低速离心机 (江苏万丰船用设备制造有限公司); H3-18KR 台式高速冷冻离心机 (湖南可成仪器设备有限公司); DYY-6C 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

1.2 网络药理学与分子对接

1.2.1 青娥丸活性成分筛选 通过 ETCM 数据库 (<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/>)、TCMSP 数据库 (<https://tcmisp-e.com/index.php>) 及文献搜索收集青娥丸成分, 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中下载活性成分结构文件并导入 SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>) 查询其体内药动学特性, 按照符合类药五原则中的 2 个及 2 个以上条件筛选。

1.2.2 青娥丸和阿尔茨海默病相关靶点及交集靶点筛选 将青娥丸活性成分导入 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库, 选取 probability>0 的潜在靶点。在 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 检索 “Alzheimer’s disease” 去重后获得阿尔茨海默病相关靶点。将阿尔茨海默病和青娥丸靶点导入 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 平台, 绘制 Venn 图, 得出两者的共同交集靶点。

1.2.3 交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建 将交集靶点上传至 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 设置置信度阈值为 0.7, 限定物种为 “Homo sapiens”, 隐藏游离节点。进行蛋白质相互作用分析, 构建 PPI 网络。将 “TSV” 格式文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件利用 CytoNCA 插件, 筛选出 degree 值大于平均数的关键靶点制作 PPI 网络图。

1.2.4 “青娥丸-活性成分-交集靶点”网络分析 准备 “青娥丸活性成分-疾病-靶点” 相关文件, 导入到 Cytoscape 3.9.1 软件, Network Analyzer 计算的靶点和化合物的拓扑参数, 绘制 “活性成分-疾病-靶点” 作用网络图。

1.2.5 交集靶点基因本体 (GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析 将 “青娥丸-疾病交集靶点” 导入 David 平台 ([https://david.](https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)

[ncifcrf.gov/summary.jsp](https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp)) 设置物种为 “Homo Sapiens”, 进行 GO 和 KEGG 功能分析, 微生信在线平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制 GO 功能柱状图和 KEGG 富集气泡图。

1.2.6 主要活性成分与关键靶点的分子对接 选取拓扑分析排名前 5 类化合物和 PPI 网络排名前 5 位关键靶点以及主要通路的关键作用靶点。利用 TCMSP 数据库下载活性成分结构式 (mol2 格式)。PDB (<https://www.rcsb.org/>) 蛋白质数据库获取关键靶点的 3D 蛋白结构 (pdb 格式), 用 Pymol 和 AutoDock Tools 软件消去其溶剂分子和配体及加氢和电子等操作。通过 AutoDock vina 对主要化合物与核心靶点做分子对接验证, 并通过 Pymol 可视化。

1.3 体外实验验证

1.3.1 青娥丸冻干粉的制备 取杜仲 32 g、补骨脂 16 g、核桃仁 10 g 和大蒜 8 g, 生药量共 66 g。药物煎煮 2 次后滤过合并药液, 将药液浓缩至约 1 g/mL。-80 °C 冰箱预冻 24 h, 待冻干机预冷至 -40 °C 后, 放入冻干机, 低温冻干 48 h, 得到青娥丸冻干粉 (含生药量 11.42 g/g)。

1.3.2 细胞培养 将收集的细胞用含 10% 胎牛血清的完全培养基重悬, 使用血细胞计数板进行细胞计数。在 96 孔细胞培养板中, 每孔接种 100 μ L 细胞悬液。接种完成后, 将培养板置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中预培养约 12 h, 使细胞充分贴壁。

1.3.3 青娥丸冻干粉对 HT22 细胞活力的影响 实验设置对照组 (10% 空白血清 + 完全培养基) 及不同浓度的实验组, 每个浓度组设置 3~6 个复孔, 向培养板各孔中加入 0.01~0.80 mg/mL 青娥丸冻干粉溶液, 放入培养箱中孵育 12、24、48 h。向每孔中加入 10% CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 酶标仪 450 nm 处测吸光度 (A) 值。筛选青娥丸冻干粉高、中、低剂量及最佳培养时间。

1.3.4 青娥丸冻干粉对 A β 25-35 诱导 HT22 细胞活力的影响 将细胞分为对照组 (10% 空白血清 + 完全培养基)、模型组 (10% 空白血清 + 完全培养基)、青娥丸高、中、低剂量 (0.20、0.10、0.05 mg/mL) 组及多奈哌齐组 (10% 空白血清 + 完全培养基 + 10 μ mol/L 盐酸多奈哌齐)。用不同浓度药物预处理细胞 0.5、1、2 h, 除对照组外其余各组均加入 A β 25-35^[5], 按照最佳给药时间孵育。向每孔中加入 10% CCK-8 溶液, 孵育 1 h, 酶标仪 450 nm 处测 A 值。选取青娥丸冻干粉最佳剂量及最佳作用时间进行后续实验。

1.3.5 实验验证主要通路的关键作用靶点 使用 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞样品,BCA 法测定蛋白质浓度,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至聚偏二氟乙烯膜;取封闭液室温封闭 2 h,随后置于一抗溶液在 4 ℃条件下于摇床上孵育过夜,用磷酸盐聚山梨酯-20 缓冲液洗涤后;置于二抗溶液中常温孵育 1 h;取出聚偏二氟乙烯膜洗涤后,滴加增强化学发光化学发光液进行曝光,利用 Image J 软件对曝光后的图像进行灰度分析。

1.3.6 统计分析 采用 SPSS 27 统计软件进行数据

处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组数据的比较采用单因素方差分析。使用 GraphPad 9.5 软件绘制图表,*P*<0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学与分子对接

2.1.1 青娥丸活性成分筛选 经 TCMS 数据库、ETCM 数据库及文献搜索^[6-9],将收集到青娥丸活性成分(*sdf)的结构导入 SWISS ADME 平台,整理去重后获得 119 个青娥丸活性成分,其中杜仲 64 个,补骨脂 46 个,核桃仁 7 个,大蒜 2 个,见表 1。

表 1 青娥丸有效成分
Table 1 Active ingredients of Qing'e Pills

编号	有效成分	编号	有效成分	编号	有效成分	编号	有效成分
DZ1	橄榄树脂素	DZ31	邻苯二酚	DZ61	乌药醇	BGZ27	刺桐素 A
DZ2	吐根酚碱	DZ32	表奎宁定	DZ62	乌发醇	BGZ28	染料木素
DZ3	8-羟基松脂醇	DZ33	松苷	DZ63	汉黄芩素	BGZ29	补骨脂乙素
DZ4	羟基松脂酚	DZ34	科罗索酸	DZ64	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚	BGZ30	异补骨脂二氢黄酮
DZ5	(+)-表松脂酚	DZ35	环巴胺	BGZ1	2,3-环氧补骨脂酚	BGZ31	异补骨脂色烯查耳酮
DZ6	(-)-表松脂酚	DZ36	去氢双丁香酚	BGZ2	3-羟基补骨脂酚	BGZ32	异新补骨脂异黄酮
DZ7	桉脂素	DZ37	二氢查耳酮	BGZ3	4-甲氧基黄酮	BGZ33	异补骨脂素
DZ8	皮树脂醇	DZ38	邻苯二甲酸二异丁酯	BGZ4	6-异戊二烯基柚皮素	BGZ34	异补骨脂定
DZ9	松脂酚	DZ39	刺桐灵	BGZ5	8-甲氧补骨脂素	BGZ35	3'-二甲基烯丙基染料木黄酮
DZ10	DL-丁香树脂酚	DZ40	杜仲脂素 A	BGZ6	8-异戊烯基大豆苷元	BGZ36	新补骨脂异黄酮
DZ11	1-去氧杜仲醇	DZ41	杜仲醇	BGZ7	芹菜素	BGZ37	补骨脂酚素 A
DZ12	2α,3α,24-三羟基齐墩果烷-12-烯-28-酸	DZ42	芒柄花黄素	BGZ8	紫云英苷	BGZ38	补骨脂酚素 B
DZ13	3,4-二羟基苯基丙酸	DZ43	没食子酸	BGZ9	补骨脂查尔酮	BGZ39	补骨脂酚素 C
DZ14	3-羟基-3-苯基丙酸	DZ44	京尼平龙胆双糖苷	BGZ10	补骨脂呋喃香豆精	BGZ40	补骨脂酚素 D
DZ15	异甘草素	DZ45	愈创木基甘油	BGZ11	补骨脂酚	BGZ41	补骨脂素
DZ16	4'-O-甲基光桥蛋白	DZ46	海伦那林	BGZ12	5-苄硫基四氮唑	BGZ42	补骨脂醇
DZ17	7,4'-二羟基黄酮	DZ47	山柰酚	BGZ13	补骨脂二氢黄酮甲醚	BGZ43	补骨脂定
DZ18	栲皮树脂醇	DZ48	落叶松脂醇	BGZ14	补骨脂色烯查耳酮	BGZ44	香豆素
DZ19	2'-脱氧肌苷	DZ49	黑麦草内酯	BGZ15	补骨脂香豆雌烷 A	BGZ45	槐角甲素
DZ20	无梗五加苷 B	DZ50	木犀草素	BGZ16	鹰嘴豆芽素 A	BGZ46	怀特酮
DZ21	林生续断苷 I	DZ51	白桦脂酸	BGZ17	巴西红木素	HTR1	4-氨基丁酸
DZ22	交链孢酚	DZ52	柚皮素	BGZ18	双羟异补骨脂定	HTR2	草夹竹桃苷
DZ23	维生素 C	DZ53	牡丹皮苷 E	BGZ19	补骨脂异黄酮 A	HTR3	D-苏氨酸
DZ24	黄芩素	DZ54	邻苯二甲酸二丁酯	BGZ20	补骨脂异黄酮 B	HTR4	鞣花酸
DZ25	蛇菰宁	DZ55	原儿茶酸	BGZ21	补骨脂异黄酮 C	HTR5	栗精碱
DZ26	β-胡萝卜素	DZ56	3,4-二羟基苯甲酸甲酯	BGZ22	补骨脂二氢黄酮	HTR6	栗精胺
DZ27	β-谷甾醇	DZ57	邻苯三酚	BGZ23	紫堇啡碱	HTR7	L-谷氨酸
DZ28	甲基香豆素	DZ58	槲皮素	BGZ24	补骨脂异黄酮醛	DS1	大蒜素
DZ29	咖啡酸乙酯	DZ59	木脂素	BGZ25	柑橘苷 B	DS2	蒜氨酸
DZ30	咖啡酸	DZ60	紫丁香苷	BGZ26	大豆黄素		

DZ-杜仲, BGZ-补骨脂, HTR-核桃仁, DS-大蒜。
DZ-Eucommiae Cortex, BGZ- Psoraleae Fructus, HTR-Juglandis Semen, DS-Allii Sativi Bulbus.

2.1.2 青娥丸、阿尔茨海默病相关靶点及交集靶点筛选 通过 Swiss Target Prediction 数据库整理去重得到 900 个作用靶点。将 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库中获取的靶点进行合并、去重处理后得到 1 409 个阿尔茨海默病相关靶点。将阿尔茨海默病和青娥丸相关靶点导入 Venny 2.1.0 平台,通过 Venn 图绘制功能,得出交集靶点 307 个,见图 1。

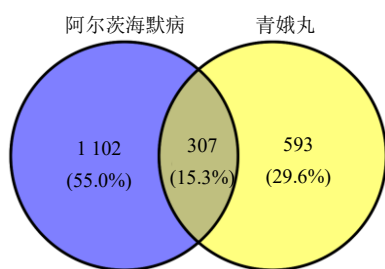


图 1 青娥丸治疗阿尔茨海默病交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of intersection targets of Qing'e Pills in treatment of Alzheimer's disease

2.1.3 交集靶点 PPI 网络构建 将青娥丸 - 阿尔茨海默病疾病交集靶点导入到 STRING 在线数据库中,进行 PPI 网络分析,获得青娥丸治疗阿尔茨海默病交集靶点 PPI 网络图(图 2),共有 303 个节点,2 155 条相互作用关系。将 PPI 网络“TSV”文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件后,利用 CytoNCA 插件得出节点平均 degree 值为 76,因此选取大于平均值的 26 个核心靶点,绘制核心靶点 PPI 网络图(图 3),圆形面积越大、颜色越趋近深色表示 degree 值越大。degree 值排名前列的靶点为热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1(HSP90AA1)、表皮生长因子受体(EGFR)、肿瘤坏死因子(TNF)、非受体酪氨酸激酶(SRC)、蛋白激酶 B1(Akt1)。

2.1.4 “青娥丸 - 活性成分 - 交集靶点”网络分析 基于 Cytoscape3.9.1 软件构建“青娥丸活性成分 - 交集 - 靶点”网络图(图 4),其中包含 430 个节点,2 391 条相互作用关系。图中 degree 值越大,节点

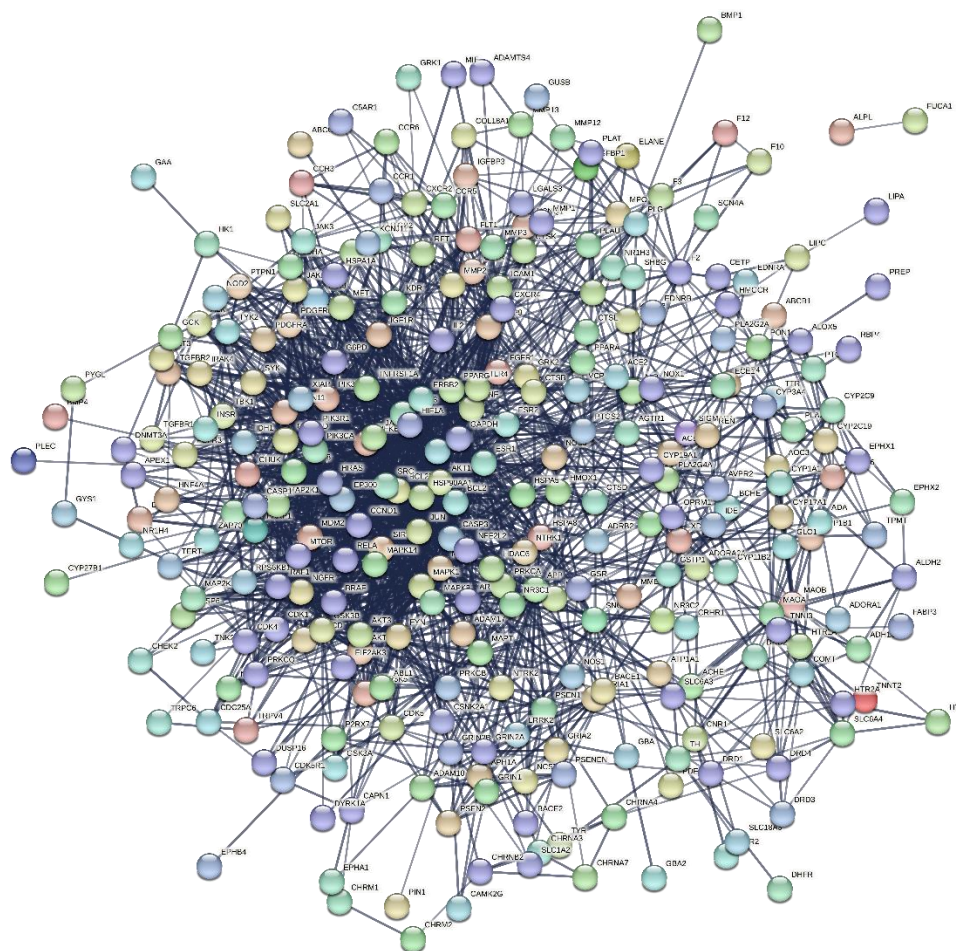


图 2 初始 PPI 网络图

Fig. 2 Initial PPI network diagram

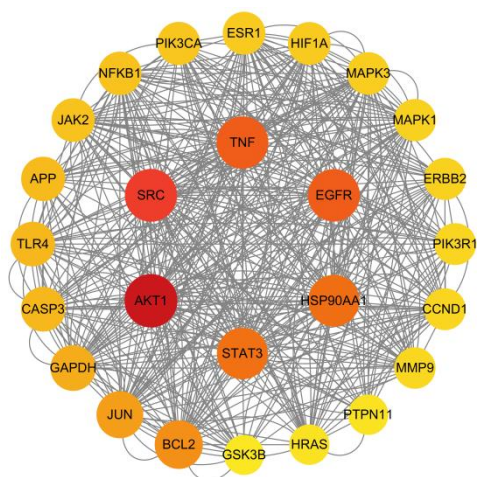


图 3 优化 PPI 网络图

Fig. 3 Optimized PPI network diagram

越大。菱形表示药物名称；六边形表示药物活性成分，以不同颜色区分；长方形表示药物-疾病的交集靶点，连线表示药物、活性成分、靶点之间的相互作用。青娥丸 degree 值排名前 5 的化合物为吡喃香豆素、木犀草素、染料木素、黄芩苷和柚皮素。

2.1.5 交集靶点的 GO 和 KEGG 富集分析 GO 分析结果显示，青娥丸干预阿尔茨海默病后可能参与了 1 126 个生物学过程 (BP)，主要涉及蛋白质磷酸化、细胞信号转导、炎症反应等关键生物过程；参与 154 个细胞组成 (CC)，包括细胞核、细胞膜、细胞质等亚细胞结构；参与 252 个分子功能 (MF) 主要包括 ATP 结合、酶结合、激酶活性等分子功能。选取 BP、CC、MF 各项 *P* 值前 10 的功能做柱状图 (图 5)。

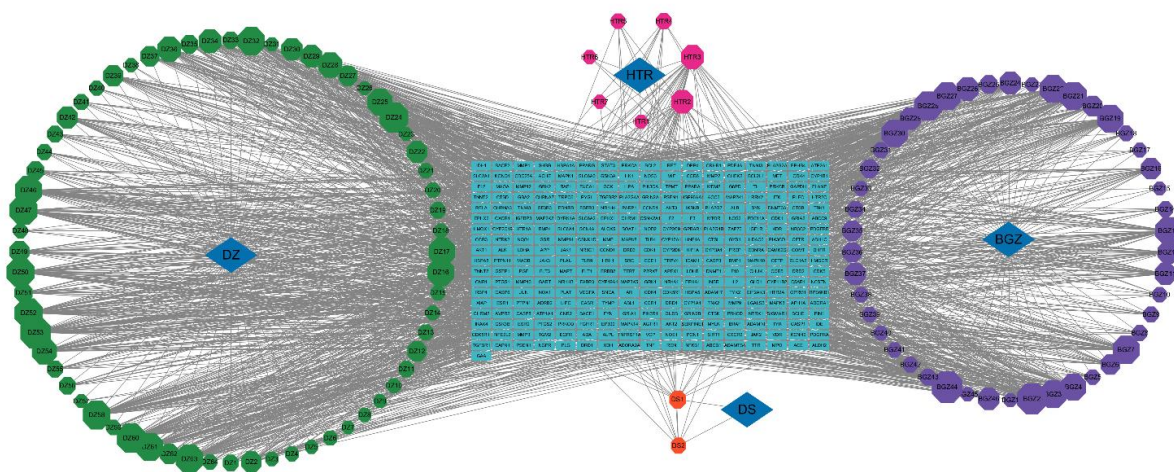


图 4 “青娥丸-活性成分-交集靶点”网络图

Fig. 4 Network diagram of “Qing’e Pills-active ingredients-intersecting targets”

KEGG 分析结果显示，青娥丸干预阿尔茨海默病参与的主要信号通路有 192 条，选取 *P* 值前 20 的通路作气泡图，并结合 PPI 核心靶点作桑基图 (图 6)。根据 *P* 值、基因比例、核心靶点数选择综合分数较高的 PI3K/Akt 信号通路与细胞凋亡通路进行体外实验验证，据通路图 (图 7) 可见其发挥作用的关键靶点为 PI3K、Akt 和 Bcl-2。

2.1.6 主要化合物与核心靶点的分子对接分析 利用分子对接技术将吡喃香豆素、木犀草素、染料木素、黄芩苷和柚皮素分别与 Akt1、PI3K、Bcl-2、SRC、EGFR、TNF、HSP90AA1 进行分子对接，对接结合能最大为 -6.0 kcal/mol (1 kcal=4.2 J)，最小为 -10.1 kcal/mol，表明活性成分与关键靶点之间均有良好的结合能力，绘制热图呈现结合能高低 (图 8)。

如图 9 所示，青娥丸活性成分进入了关键靶点的活性位点，且与活性位点处的某些氨基酸残基通过 1~6 个氢键相互作用，氢键长度均在 2~3 nm，说明氨基酸与化合物形成的氢键结合较为紧密，初步证明有效成分可自发地与多个关键靶点结合。

2.2 体外实验

2.2.1 青娥丸冻干粉对 HT22 细胞活力的影响 如图 10 所示，与对照组相比，青娥丸冻干粉在细胞培养 12、24、48 h 后均可提高细胞活力 ($P<0.05$ 、 0.01)。细胞培养 24 h 后青娥丸冻干粉 0.20、0.10、0.05 mg/mL 组对细胞活力的升高较显著 ($P<0.01$)。因此，青娥丸冻干粉对 HT22 细胞具有保护作用，选取 24 h 为最佳培养时间，青娥丸冻干粉高、中、低剂量分别为 0.20、0.10、0.05 mg/mL。

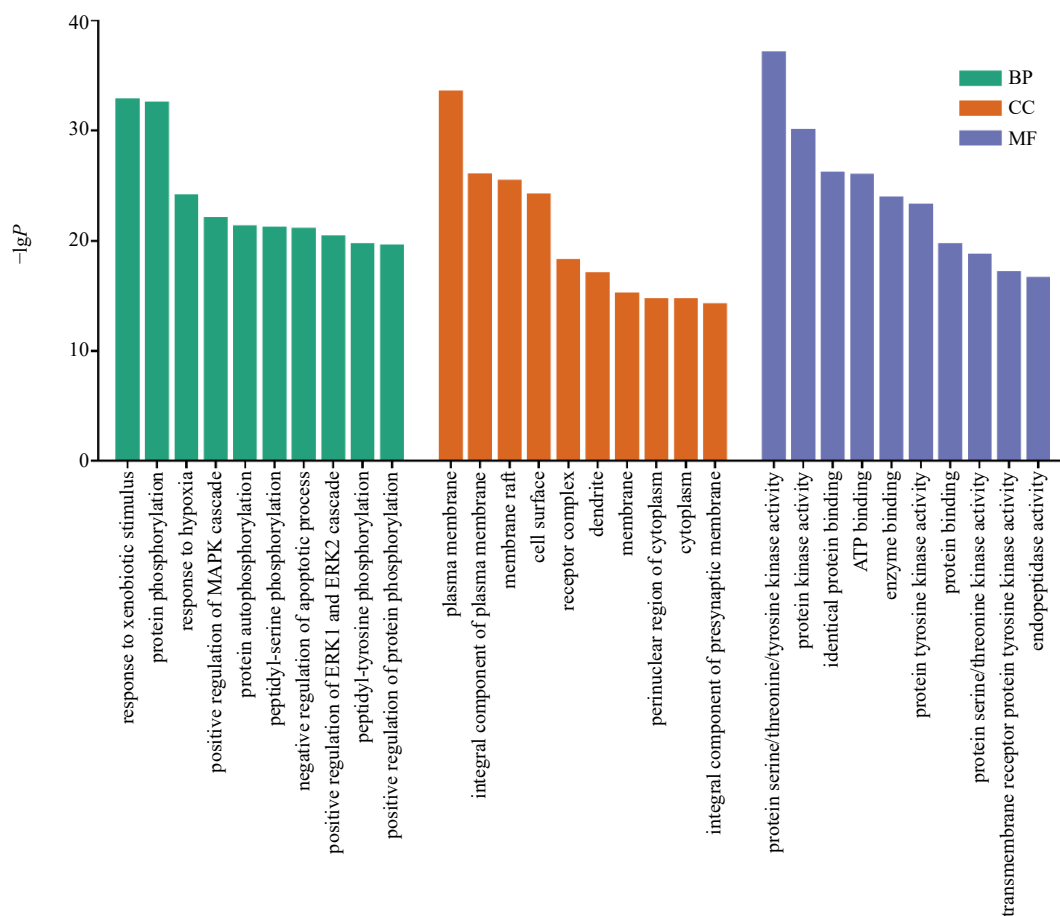


图 5 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO function enrichment analysis

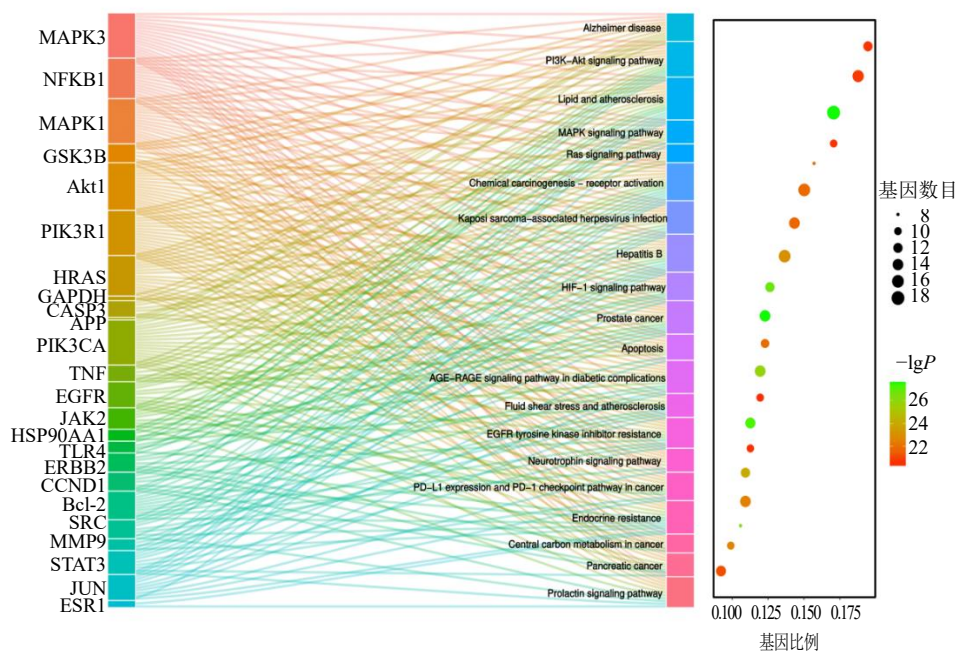


图 6 KEGG 通路富集分析

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis

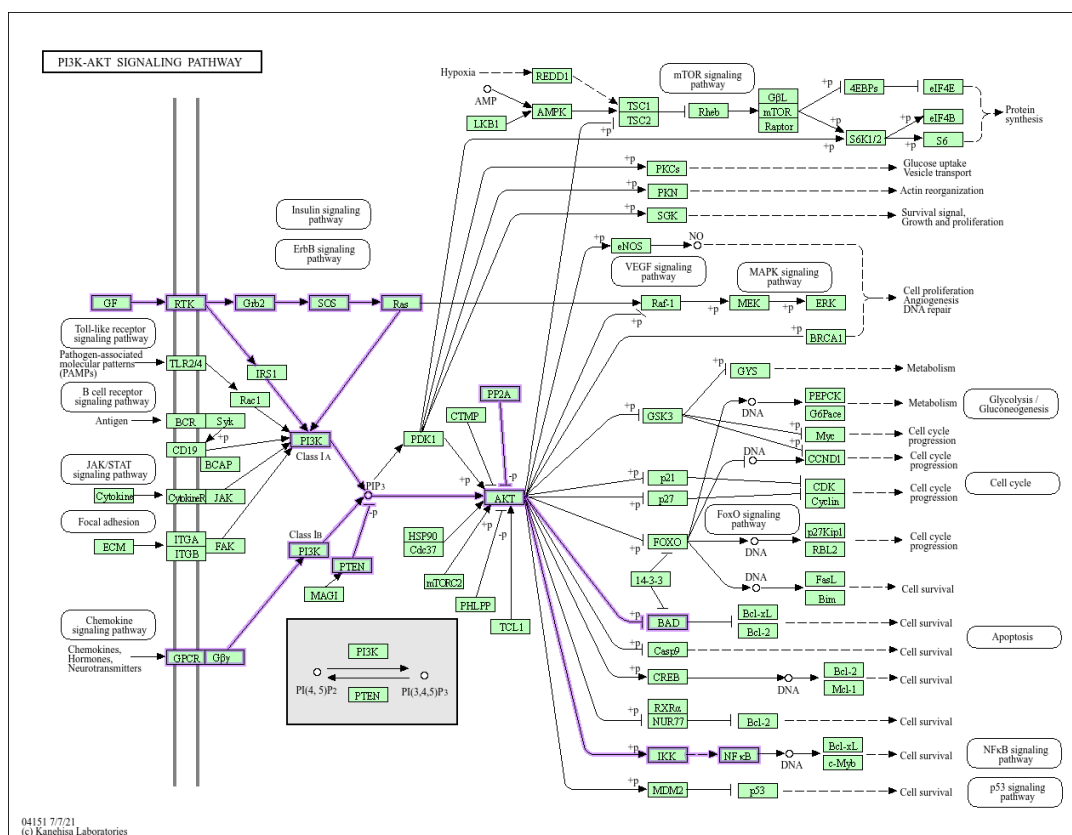


图 7 信号通路

Fig. 7 Signaling pathways

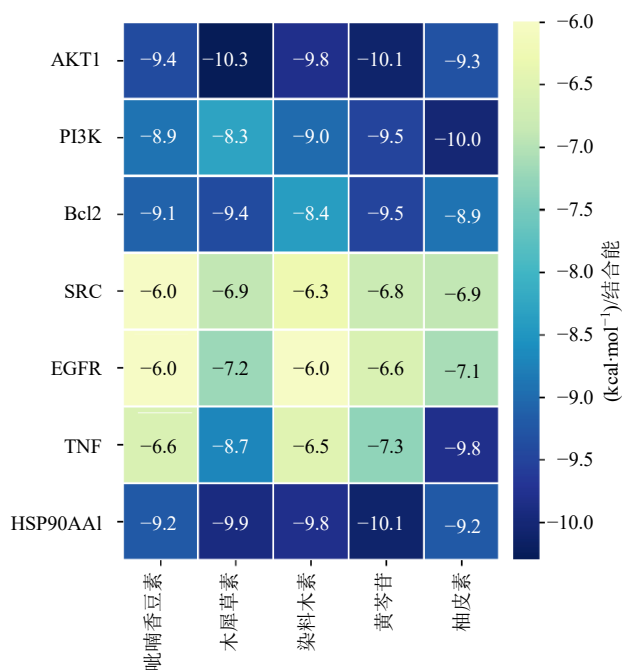


图 8 青娥丸核心成分 - 关键靶点接结合能评分热图

Fig. 8 Heat map of Qing'e Pill's core ingredient-key target bonding energy score

2.2.2 青娥丸冻干粉对 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 HT22 细胞活力的影响 如图 11 所示, 与对照组比较, 给药 0.5、1、2 h 时模型组细胞活力降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 给药 1、2 h 时, 青娥丸冻干粉 0.10、0.20 mg/mL 组均可恢复细胞活力, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 其中, 给药 1 h 时, 青娥丸冻干粉 0.10 mg/mL 组恢复细胞活力作用较显著 ($P < 0.01$)。因此, 青娥丸冻干粉可以改善 Aβ₂₅₋₃₅ 诱导的 HT22 细胞活力, 选取青娥丸冻干粉 0.10 mg/mL 组, 预处理时间 1 h, 进行后续实验。

2.2.3 Western blotting 实验验证关键靶点及通路 如图 12 所示, 与模型组比较, 青娥丸冻干粉 0.1 mg/mL 组及多奈哌齐组中神经元中标志蛋白 p-PI3K、p-Akt 表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。青娥丸冻干粉 0.1 mg/mL 组中神经元凋亡标志蛋白 Bax 表达降低, Bcl-2、Bcl-2/Bax 表达升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01)。多奈哌齐组 Bax 表达降低, Bcl-2/Bax 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

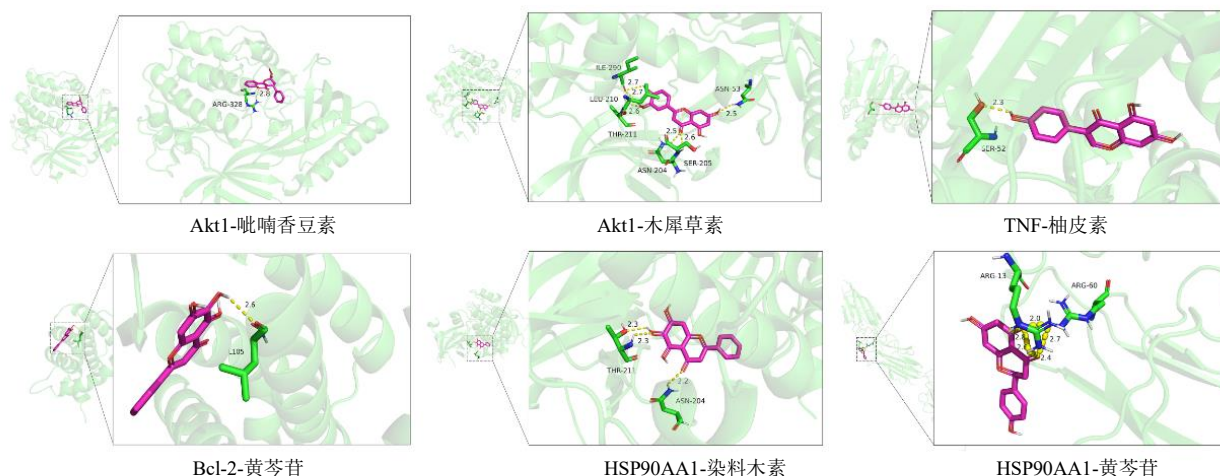
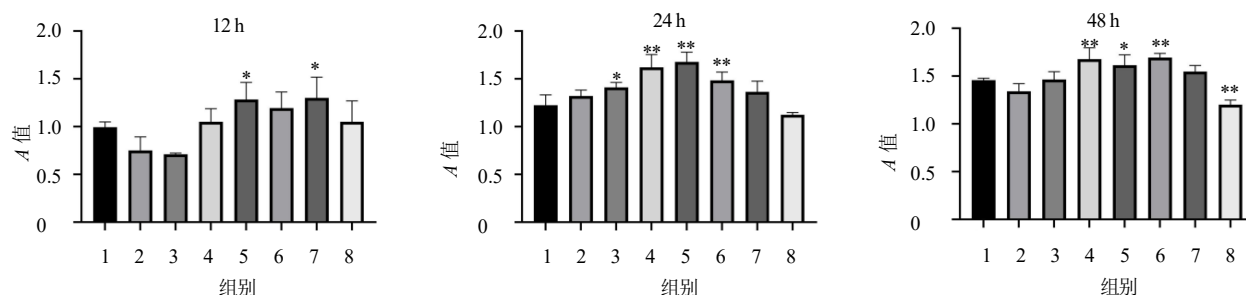
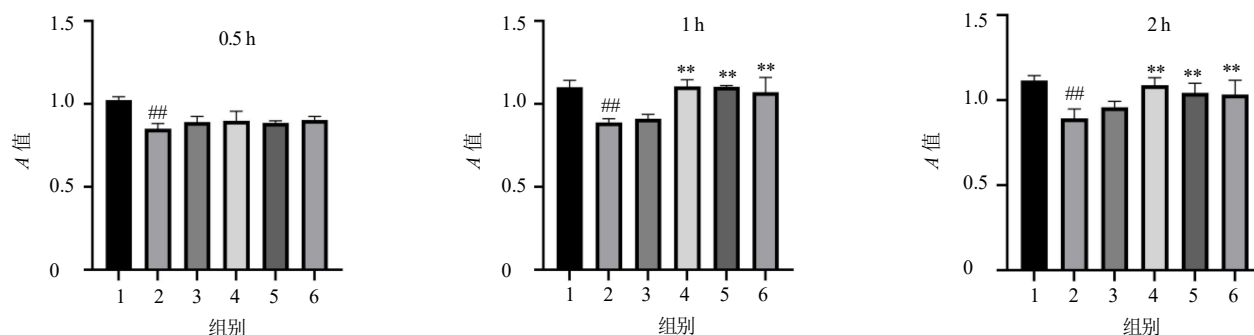


图 9 青娥丸核心成分-关键靶点的分子对接模式

Fig. 9 Molecular docking mode of the core ingredient-key target of Qing'e Pills



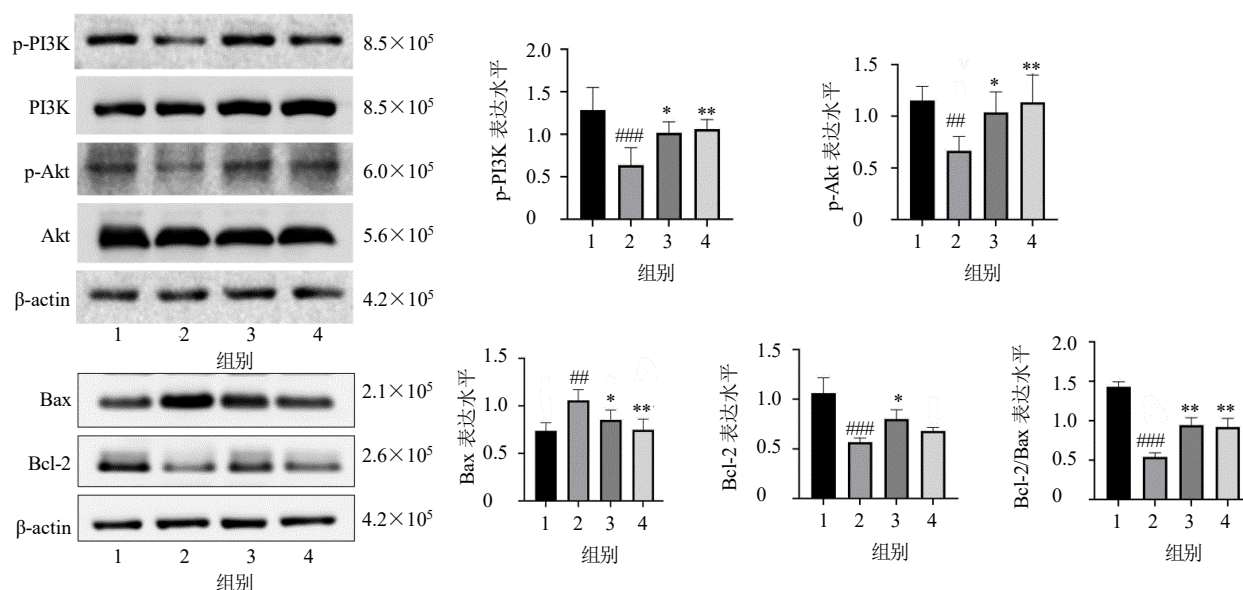
1-对照组, 2-青娥丸冻干粉 0.01 mg·mL⁻¹ 组, 3-青娥丸冻干粉 0.025 mg·mL⁻¹ 组, 4-青娥丸冻干粉 0.05 mg·mL⁻¹ 组, 5-青娥丸冻干粉 0.10 mg·mL⁻¹ 组, 6-青娥丸冻干粉 0.20 mg·mL⁻¹ 组, 7-青娥丸冻干粉 0.40 mg·mL⁻¹ 组, 8-青娥丸冻干粉 0.80 mg·mL⁻¹ 组; 与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01。
1-control group, 2—8 indicate Qing'e Pills lyophilized powder 0.01, 0.025, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80 mg·mL⁻¹ groups, respectively; Compared with control group: **P*<0.05 ***P*<0.01.

图 10 青娥丸冻干粉对 HT22 细胞保护作用 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 10 Protective effect of Qing'e Pills lyophilized powder on HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

1-对照组, 2-模型组, 3-青娥丸冻干粉 0.05 mg·mL⁻¹ 组, 4-青娥丸冻干粉 0.10 mg·mL⁻¹ 组, 5-青娥丸冻干粉 0.20 mg·mL⁻¹ 组, 6-多奈哌齐组; 与对照组比较: ##*P*<0.01; 与模型组比较: ***P*<0.01。

1-control group, 2-model group, 3—5 indicate Qing'e Pills lyophilized powder 0.05, 0.10, 0.20 mg·mL⁻¹ groups, respectively, 6-donepezil group; Compared with control group: ***P*<0.01; Compared with model group: ***P*<0.01.

图 11 青娥丸冻干粉对不同预处理时间的 Aβ25-35 诱导的 HT22 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 11 Effect of Qing'e Pills lyophilized powder on HT22 cells induced by Aβ25-35 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



1-对照组, 2-模型组, 3-青娥丸冻干粉 0.10 mg/mL 组, 4-多奈哌齐组; 与对照组比较: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。
1-control group, 2-model group, 3-Qing'e Pills lyophilized powder 0.10 mg/mL group, 4-donepezil group; Compared with control group: ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$;
Compared with model group: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

图 12 Western blotting 法检测 p-Akt、p-PI3K、Bax 和 Bcl-2 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 12 Western blotting detected expression levels of p-Akt, p-PI3K, Bax, and Bcl-2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

阿尔茨海默病病理表现为大脑皮层和海马萎缩, 伴有老年斑和神经纤维缠结的形成, 以及神经元数量显著减少^[10]。青娥丸的现代研究显示, 青娥丸对于改善 *D*-半乳糖诱导的衰老小鼠的记忆损伤具有显著效果^[11]。杜仲通过调节自噬、乙酰胆碱酯酶对模型动物的学习记忆能力产生积极影响^[12]。补骨脂可改善阿尔茨海默病小鼠的神经炎症缓解记忆能力的减退^[13]。大蒜提取物可以减少 A β 沉积, 缓解阿尔茨海默病动物模型的认知功能障碍^[14]。食用核桃仁有助于改善学习记忆能力^[6]。这表明青娥丸在治疗阿尔茨海默病方面具有潜力。

基于网络药理学、分子对接和体外实验探究青娥丸治疗阿尔茨海默病作用机制^[15], 发现青娥丸共有 119 个活性成分、307 个潜在靶点可能与治疗阿尔茨海默病相关, 其中吡喃香豆素、木犀草素、染料木素、黄芩苷和柚皮素等为青娥丸治疗阿尔茨海默病的主要活性成分。吡喃香豆素具有抗炎和降血糖作用^[16], 对小鼠海马神经元细胞系 HT22 中谷氨酸诱导的氧化应激具有保护作用^[17]。木犀草素有抗氧化和神经保护活性的作用, 可抑制脂多糖诱导的细胞增殖、炎性细胞因子的过度释放^[18]。染料木素有

抗氧化的作用^[19], 通过抑制 A β 沉积引起的神经毒性具有神经保护作用^[20]。黄芩苷有抗炎和抗凋亡作用^[21-22], 可以抑制小胶质细胞引导的神经炎症^[23]。柚皮素具有抗炎, 抗氧化和降血糖的作用^[24], 能够降低脑组织中 A β 的沉积^[25]。综上, 青娥丸的主要活性成分能够通过抑制氧化应激、炎症反应、细胞凋亡等改善阿尔茨海默病。

根据 PPI 网络结果分析, Akt1、SRC、EGFR、TNF、HSP90AA1 是青娥丸治疗阿尔茨海默病关键靶点。Akt1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞生存、增殖、分化和代谢等生理过程中起关键作用。研究表明, Akt1 参与 tau 蛋白在特定区域的磷酸化过程^[26]。SRC 是一种磷酸化酪氨酸残基的蛋白激酶, 能够减少 A β 的产生以及炎症介质的分泌^[27]。EGFR 是一种酪氨酸激酶受体, 其表达上调可能导致神经元变性和凋亡^[28]。TNF 是免疫系统的中枢调节因子, 其表达和信号转导失调可能诱发慢性炎症和组织损伤^[29]。HSP90AA1 是一种热休克蛋白, 抑制 HSP90 可以导致 tau 蛋白磷酸化减少^[30]。因此, 青娥丸可以通过调控关键靶点, 减少 A β 产生、tau 蛋白磷酸化、减轻神经炎症反应以及保护神经元, 从而改善阿尔茨海默病的病理进程。

GO 和 KEGG 富集分析结果显示,青娥丸参与蛋白质磷酸化、信号传导、炎症反应等生物学过程,通过细胞凋亡、PI3K/Akt 信号通路等信号通路治疗阿尔茨海默病。PI3K/Akt 信号通路在延缓阿尔茨海默病进展中具有重要作用。被 PI3K 激活的 Akt 通过磷酸化下游靶点,调控细胞存活、自噬、神经发生和神经元增殖与分化等中枢神经系统的生理过程^[31]。PI3K/Akt 信号通路通过调节线粒体膜通透性相关蛋白(如 Bcl-2、Bax 等)的表达影响细胞凋亡的过程,最终导致细胞解体。体外实验结果显示,青娥丸可以改善 A β 25-35 诱导的 HT22 细胞活力($P<0.01$),提高 A β 25-35 诱导的 HT22 细胞中 p-Akt、p-PI3K 和 Bcl-2 蛋白的表达,抑制 Bax 蛋白的表达($P<0.05$)。实验结果不仅验证了网络预测的可靠性,更从功能层面证实青娥丸通过激活 PI3K/Akt 通路促进神经元存活,同时调控凋亡蛋白以延缓阿尔茨海默病进展,为“补肾填精”中医理论提供了现代分子生物学依据。

综上所述,本研究阐释青娥丸治疗阿尔茨海默病的作用机制,也为开发低毒性、多靶点的阿尔茨海默病治疗方案奠定科学基础。青娥丸作为药食同源复方,其长期应用的安全性与经济性优势显著,未来有望成为阿尔茨海默病早期干预与联合治疗的重要候选策略。青娥丸中的核心活性成分可能成为阿尔茨海默病药物开发的候选分子,为其临床应用的开发提供数据与理论支持。后续可通过体内实验验证信号通路和靶点,深入研究其有效成分和作用机制,促进青娥丸在阿尔茨海默病治疗中的应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li N, Zhang L, Du W, *et al.* Prevalence of dementia-associated disability among Chinese older adults: Results from a national sample survey [J]. *Am J Geriatr Psychiatry*, 2015, 23(3): 320-325.
- [2] Dubois B, Villain N, Frisoni G B, *et al.* Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Recommendations of the international working group [J]. *Lancet Neurol*, 2021, 20(6): 484-496.
- [3] 王英全. 2020-2050 年我国阿尔茨海默患病情况预测研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [4] 高军, 纪玉英, 侯玉岭, 等. 药物治疗对阿尔茨海默病的无可奈何 [J]. 首都医药, 2013, 20(13): 13-14.
- [5] 叶佳希, 朱敏, 陶彦谷, 等. 黄芩素对 HT22 细胞痴呆模型 PI3K/Akt 信号通路的影响 [J]. 新中医, 2025, 57(1): 209-216.
- [6] Chauhan A, Chauhan V. Beneficial effects of walnuts on cognition and brain health [J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 550.
- [7] 胡杨, 李先芝, 刘洋, 等. 杜仲化学成分、药理作用及应用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2022, 18(2): 234-239.
- [8] 杨婷, 杨学军, 邓芳, 等. 补骨脂化学成分研究及其质量标志物预测分析 [J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(8): 141-149.
- [9] 张成明, 刘绍鹏, 胡润红, 等. 大蒜活性成分及药理作用研究进展 [J]. 山东化工, 2023, 52(9): 69-71.
- [10] Soria Lopez J A, González H M, Léger G C. Alzheimer's disease [J]. *Handb Clin Neurol*, 2019, 167: 231-255.
- [11] Zhong L, Huang F, Shi H L, *et al.* Qing'E formula alleviates the aging process in D-galactose-induced aging mice [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(1): 101-106.
- [12] Sun C, Zhang S S, Ba S K, *et al.* *Eucommia ulmoides* olive male flower extracts ameliorate Alzheimer's disease-like pathology in zebrafish via regulating autophagy, acetylcholinesterase, and the dopamine transporter [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 901953.
- [13] Hiramatsu G, Mizutani R, Toume K, *et al.* Preventive effects of psoraleae Semen extracts on cognitive dysfunction in Alzheimer's disease model App^{NL-P-F} mice [J]. *Biol Pharm Bull*, 2025, 48(1): 75-79.
- [14] Luo J F, Dong Y, Chen J Y, *et al.* The effect and underlying mechanisms of garlic extract against cognitive impairment and Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis of experimental animal studies [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114423.
- [15] 毛永馨, 周莉, 秦菲, 等. 基于数据挖掘、网络药理学、分子模拟和实验验证探究中药治疗糖尿病足溃疡用药规律及作用机制 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5559-5572.
- [16] Tran N K S, Trinh T A, Pyo J, *et al.* Neuroprotective potential of pyranocoumarins from *Angelica gigas* nakai on glutamate-induced hippocampal cell death [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(8): 1651.
- [17] Jayalakshmi M, Joy F, Nizam D A, *et al.* Multicomponent synthesis strategies, catalytic activities, and potential therapeutic applications of pyranocoumarins: A comprehensive review [J]. *Chem Biodiversity*, 2023, 20(10): e202300836.
- [18] Devi K P, Shanmuganathan B, Manayi A, *et al.* Molecular and therapeutic targets of genistein in Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2017, 54(9): 7028-7041.
- [19] Duan X Y, Li Y S, Xu F, *et al.* Study on the neuroprotective effects of genistein on Alzheimer's disease [J]. *Brain Behav*, 2021, 11(5): e02100.

- [20] Maeda S, Yamada J, Iinuma K M, *et al.* Chondroitin sulfate proteoglycan is a potential target of memantine to improve cognitive function *via* the promotion of adult neurogenesis [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179(20): 4857-4877.
- [21] Hossain M M, Belkadi A, Al-Haddad S, *et al.* Deltamethrin exposure inhibits adult hippocampal neurogenesis and causes deficits in learning and memory in mice [J]. *Toxicol Sci*, 2020, 178(2): 347-357.
- [22] Li X Y, Zhai Q, Gou X C, *et al.* Involvement of paired immunoglobulin-like receptor B in cognitive dysfunction through hippocampal-dependent synaptic plasticity impairments in mice subjected to chronic sleep restriction [J]. *Mol Neurobiol*, 2023, 60(3): 1132-1149.
- [23] Jin X, Liu M Y, Zhang D F, *et al.* Baicalin mitigates cognitive impairment and protects neurons from microglia-mediated neuroinflammation *via* suppressing NLRP3 inflammasomes and TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(5): 575-590.
- [24] 杨宏亮, 田珩, 李沛波, 等. 柚皮苷及柚皮素的生物活性研究 [J]. *中药材*, 2007, 30(6): 752-754.
- [25] Zhu Y L, Guo X M, Li S M, *et al.* Naringenin ameliorates amyloid- β pathology and neuroinflammation in Alzheimer's disease [J]. *Commun Biol*, 2024, 7(1): 912.
- [26] Cheng W J, Chen W M, Wang P, *et al.* Asiatic acid protects differentiated PC12 cells from A β_{25-35} -induced apoptosis and tau hyperphosphorylation *via* regulating PI3K/Akt/GSK-3 β signaling [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 96-101.
- [27] Portugal C C, Almeida T O, Socodato R, *et al.* Src family kinases (SFKs): Critical regulators of microglial homeostatic functions and neurodegeneration in Parkinson's and Alzheimer's diseases [J]. *FEBS J*, 2022, 289(24): 7760-7775.
- [28] Mansour H M, Fawzy H M, El-Khatib A S, *et al.* Potential repositioning of anti-cancer EGFR inhibitors in Alzheimer's disease: Current perspectives and challenging prospects [J]. *Neuroscience*, 2021, 469: 191-196.
- [29] Fischer R, Kontermann R E, Pfizenmaier K. Selective targeting of TNF receptors as a novel therapeutic approach [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 401.
- [30] Bohush A, Bieganski P, Filippek A. Hsp90 and its co-chaperones in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(20): 4976.
- [31] Yan L, Jin Y F, Pan J P, *et al.* 7, 8-dihydroxycoumarin alleviates synaptic loss by activated PI3K-Akt-CREB-BDNF signaling in Alzheimer's disease model mice [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(23): 7130-7138.

[责任编辑 金玉洁]