

基于网络药理学及实验验证探讨毛兰素治疗阿尔茨海默病的机制研究

王维浩¹, 陈军磊¹, 朱钰颖², 郑洪博¹, 张振国¹, 李嘉怡¹, 李沂霖¹, 王婧怡¹, 李张恺¹, 付 殷^{2*}, 付 强^{2*}

1. 黑龙江中医药大学 第一临床医学院, 黑龙江 哈尔滨 150006

2. 黑龙江中医药大学 第二临床医学院, 黑龙江 哈尔滨 150006

3. 黑龙江中医药大学 基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 基于网络药理学及体外实验研究毛兰素治疗阿尔茨海默病的潜在分子作用机制。**方法** 首先通过检索 PubChem、SwissTargetPrediction、citexs 数据库, 获取毛兰素的作用靶点, 后利用 TTD、PharmGKB、GeneCards、OMIM、GEO、DisGeNET、Celt 平台检索阿尔茨海默病的相关靶点, 利用 Venny 平台、STRING 数据库、Cytoscape 软件进行拓扑分析获取毛兰素治疗阿尔茨海默病的核心靶点, 利用 R 语言对所获得的交集靶点进行基因本体 (GO) 功能和京都基因和基因百科全书 (KEGG) 信号通路富集分析, 通过 CB-dock2 网站进行分子对接, 细胞实验进行验证。**结果** 毛兰素治疗阿尔茨海默病的核心靶点为蛋白激酶 B1 (Akt1)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)。GO 富集分析显示与神经凋亡相关, KEGG 通路富集分析得到关键通路为磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路。分子对接结果显示毛兰素与 3 个核心靶点均具有较好的结合能力。细胞实验结果表明, 与模型组比较, 毛兰素组 SH-SY5Y 细胞活性显著增高, 细胞凋亡程度下降 ($P < 0.01$), 且毛兰素浓度为 50 nmol/L 时细胞活力最高; 经毛兰素干预后, SH-SY5Y 细胞 mTOR、细胞凋亡调节因子 (Bax) 蛋白表达显著降低; Bcl-2、p-Akt、Akt、PI3K 蛋白表达显著升高 ($P < 0.001$)。**结论** 毛兰素可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制细胞凋亡, 对阿尔茨海默症起到潜在治疗效果。

关键词: 毛兰素; 阿尔茨海默病; 细胞凋亡; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; 细胞凋亡调节因子; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

中图分类号: R285; R286.1

文献标志码: A

文章编号: 1674 - 5515(2025)09 - 2180 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.09.006

Mechanisms of erianin in treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology and experimental validation

WANG Weihao¹, CHEN Junlei¹, ZHU Yuying², ZHENG Hongbo¹, ZHANG Zhenguo¹, LI Jiayi¹, LI Yilin¹, WANG Jingyi¹, LI Zhangkai¹, FU Yin², FU Qiang²

1. The First Clinical Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China

2. The Second Clinical Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China

3. The Basic Medical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To explore the potential molecular mechanisms of erianin in treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods** The targets of erianin were obtained by searching databases such as PubChem, SwissTargetPrediction, and citexs. The relevant targets of Alzheimer's disease were retrieved from databases including TTD, PharmGKB, GeneCards, OMIM, GEO, DisGeNET, and Celt platform. Topological analysis was carried out using Venny platform, STRING database, and Cytoscape software to obtain the core targets of erianin in treatment of Alzheimer's disease. GO functional and KEGG pathway enrichment analyses were performed on the obtained intersection targets using R language. Molecular docking was conducted via the CB-dock2 website, and cell experiments were carried out for verification. **Results** The core targets of erianin in

收稿日期: 2025-05-29

基金项目: 大学生创新创业训练计划项目 (国家重点支持领域项目) (202310228063); 大学生创新创业训练项目 (国家级一般项目) (202410228053, 202410228015, 202410228010); 黑龙江省省属本科高校“优秀青年教师基础研究支持计划” (YQJH2024224); 黑龙江中医药大学科研基金项目 (博士创新基金) (2019BS05)

作者简介: 王维浩, 男, 研究方向为方剂配伍理论及物质基础研究。E-mail: 2713094373@qq.com

*通信作者: 付 殷, 女, 助理研究员, 博士, 研究方向为方剂配伍规律相关研究。E-mail: 261092808@qq.com

付 强, 男, 副教授, 研究方向为方剂配伍理论及物质基础研究, E-mail: fuqiang19890105@163.com

treatment of Alzheimer's disease were Akt1, Bcl-2, and mTOR. GO enrichment analysis indicated an association with neuronal apoptosis. KEGG pathway enrichment analysis identified the key pathway as the PI3K/Akt signaling pathway. Molecular docking results showed that erianin had good binding ability to the three core targets. Cell experiment results demonstrated that compared with the model group, the viability of SH-SY5Y cells in the erianin group was significantly increased, and the degree of cell apoptosis decreased ($P < 0.01$), and the cell viability was highest when the concentration of erianin was 50 nmol/L. After erianin intervention, the protein expressions of mTOR and Bax in SH-SY5Y cells were significantly decreased, while the protein expressions of Bcl-2, p-Akt, Akt, and PI3K were significantly increased ($P < 0.001$). **Conclusion** Erianin may inhibit cell apoptosis by regulating the PI3K/Akt signaling pathway, showing potential therapeutic effects on Alzheimer's disease.

Key words: erianin; Alzheimer's disease; apoptosis; Bcl-2; Bax; mTOR

阿尔茨海默病是由多种因素共同作用所致的神经系统退行性疾病, 临床表现为短期记忆力减退、注意力集中障碍、学习能力衰退等^[1]。阿尔茨海默病发病机制复杂, 其主要病理特征是 β -淀粉样蛋白 ($A\beta$) 聚集、神经原纤维缠结 (NFTs) 等^[2-3]。全世界约有 5 000 万以上的人患有阿尔茨海默病, 预计到 2050 年, 随着人口老龄化加剧, 这一数字将增加 2 倍以上, 给家庭和社会带来沉重的压力^[4]。目前尽管对阿尔茨海默病的研究已取得较大进展, 但现有治疗方法, 如多奈哌齐、美金刚等药物治疗, 虽然能缓解症状, 但有诸多不良反应^[5]。因此, 如何有效的延缓阿尔茨海默病的疾病进程, 并且无不良反应, 是当前亟待解决的问题。

毛兰素是一种从中药石斛中分离得到的天然双苄基化合物, 是其最重要的天然产物之一, 具有抗氧化、抑制血管生成及肿瘤生长等药理作用^[6-8]。最新研究表明, 毛兰素对神经细胞具有一定的保护作用, 如毛兰素能够通过调控细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 信号通路减轻创伤性脑损伤大鼠的氧化应激和炎症反应, 保护神经细胞免于凋亡, 促进神经细胞生成, 最终改善其认知能力和记忆功能^[9]。因此本研究基于网络药理学及生物实验, 探讨毛兰素能否治疗阿尔茨海默病及可能存在的作用机制, 为临床治疗阿尔茨海默病提供更多的参考。

1 材料

1.1 细胞及试剂

SH-SY5Y 细胞系购自中国科学院上海细胞库。基础培养基 (MEM, 批号 M7278, 美国 Sigma-Aldrich 公司); F12 培养基 (批号 11765054, 美国 Gibco 公司); 丙酮酸钠 (批号 11360070, 美国 Gibco 公司); 谷氨酰胺 (批号 35050061, 美国 Gibco 公司); 视黄酸 (批号 A9120, 北京索莱宝公司); 毛兰素 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 SE8460, 北京索莱宝公司); $A\beta_{1-42}$ (质量分数 $\geq 95\%$, 批号 A9810, 美

国 Sigma-Aldrich 公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (批号 MAO220, 大连博格林生物科技有限公司); CCK-8 试剂盒 (批号 EF016929, 武汉维克赛思科技有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 PC0020, 北京索莱宝科技有限公司); PI3K 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体 (批号 ab183957、ab8805、ab38449, 英国 Abcam 公司); mTOR、Bcl-2、Bax 抗体 (批号 ab179463、ab192623、ab181603, 英国 Abcam 公司); β -actin 抗体 (cst 公司)、二抗 (批号 BL003A, 白鲨生物公司)。

1.2 仪器

EVOS 全自动细胞成像系统 (EVOS FLoid); 3111 CO₂ 恒温培养箱 (ThermoFisher 公司); LGR20-W 低速离心机 (常杰博森仪器有限公司); iMark 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYY-6C 电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); VE-186 转膜仪 (上海天能科技有限公司); QHZ-98B 摇床 (上海智城分析仪器制造有限公司); Leica UC7 超薄切片机、Autostainer XL 染色机 (德国徕卡仪器有限公司)。

2 网络药理学及细胞实验方法

2.1 网络药理学研究方法

2.1.1 毛兰素靶点预测 通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中获取毛兰素的化学结构式, 打开相应的条目, 得到其 Canonical SMILES 编号。将获得的 Canonical SMILES 编号导入到 SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch>) 数据库, 对其进行靶点预测, 检索出符合条件 (probability > 0) 的作用靶点。同时基于赛特新思 (citexs) 数据分析平台, 对 2000-01 至 2024-10 关于毛兰素研究进行文献分析及大数据挖掘, 获取毛兰素相关靶点。最后将 2 个数据库得到的靶点合并去重复后, 得到毛兰素治疗靶点。

2.1.2 阿尔茨海默病靶点预测 以 “Alzheimer's disease” 为关键词, 在 TTD 数据库 (<https://db.idrblab>)

net/ttd/)、药物基因组学知识库 (PharmGKB) 数据库 (<https://www.pharmgkb.org/>)、GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 数据库 (<http://www.omim.org/>)、基因表达综合系统 (GEO) 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)、DisGeNET 数据库 (<http://www.disgenet.org/>) 中检索阿尔茨海默症的相关靶点。此外, 在 Celt (<https://www.celtx.com>) 平台中挖掘与阿尔茨海默病相关的文献, 并从中获得相关靶点。整合从 7 个数据库中获得的靶点, 删除重复项后获得最终阿尔茨海默病疾病靶点。利用 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 平台, 得到毛兰素与阿尔茨海默病的交集靶点并绘制韦恩图。

2.1.3 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建以及核心靶点筛选 使用在线网络分析平台 STRING (<http://string-db.org/>) 分析靶点拓扑网络。将交集靶点导入 STRING 数据库, 前提选择多种蛋白, 将研究物种设定为“人”, 得到毛兰素治疗阿尔茨海默病的潜在靶点的 PPI 网络。之后导入 Cytoscape 3.9.1 的 CytoNCA 内置插件, 计算网络的度值 (DC)、中间中心度值 (BC)、紧密度值 (CC), 将大于 DC、BC、CC 的靶点定义为核心靶点。再利用 Cytoscape 3.7.0 中的“network analyzer”功能对关键靶点的 PPI 网络进行分析和可视化, 生成核心目标的 PPI 网络。

2.1.4 富集分析 将获得的交集靶点导入 R 语言, 利用“clusterProfiler”R 包富集分析基因本体 (GO)、生物过程 (BP)、细胞成分 (CC)、分子功能 (MF) 和京都基因和基因百科全书 (KEGG) 通路。将显著性阈值设置为“ $P < 0.05$ ”, 并使用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线绘图网站进行可视化分析, 绘制柱状图和桑基图。

2.1.5 分子对接 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载毛兰素的 3D 结构图。从美国全球蛋白质数据库 (PDB) 中下载核心靶点的 3D 结构图。利用 CB-DOCK 平台预测蛋白空腔, 计算空腔中心的大小, 最后进行配体与受体的分子对接。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养及分化 SHSY5Y 细胞按照中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库/干细胞库说明书[SH-SY5Y 完全培养液配方 (100 mL, 43.5 mL 的 MEM+43.5 mL 的 F12+10 mL 的 FBS+1 mL 的

Gluta-max+1 mL 的丙酮酸钠+1 mL 的 NEAA 混匀], 4 °C 保存, 配制及保存过程需避光处理。将 SHSY5Y 细胞使用配制好的完全培养液培养于 37 °C、5% CO₂、饱和相对湿度的恒温培养箱中, 每 3 天更换一次培养液。将处于对数生长期的 SH-SY5Y 细胞使用胰酶消化, 加入完全培养液终止消化, 离心、弃上清液得到细胞沉淀, 以完全培养液重悬细胞, 接种到 60 mm 培养皿中, 当细胞生长至 70% 左右时, 弃去培养液, 加入 10 μmol/L 视黄酸分化液, 放入培养箱中分化 6 d, 每 3 天换 1 次新鲜培养液。

2.2.2 分组给药处理 将毛兰素溶解于适量体积的 DMSO 中, 配成质量浓度为 50 mg/mL 的母液, 后续根据需要进行稀释处理, 得到所需的质量浓度, 取对数生长期的 SH-SY5Y 分化细胞将其稀释为细胞密度为 6×10^4 个/mL 的细胞悬液, 每孔 200 μL 接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 将细胞分为对照组、模型组、毛兰素 (25、50、100 nmol/L) 组。对照组加入等体积的完全培养液; 模型组加入终浓度为 20 μmol/L Aβ₁₋₄₂ 寡聚体的等体积完全培养液^[10]; 毛兰素组在模型组的基础上分别加入浓度为 25、50、100 nmol/L 的毛兰素等体积培养液^[11]。

2.2.3 CCK-8 检测毛兰素干预后的细胞活性 按照 2.1.4 项下的分组后, 将各组 SH-SY5Y 细胞接种到 96 孔板中, 2.5×10^3 个/孔, 处理 24 h 后按照 CCK8 试剂盒说明书指示向每个孔中加入 20 μL CCK-8 溶液, 孵育 2 h, 测量 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡 收集培养后的 SH-SY5Y 细胞置于相应离心管中, 用 PBS 溶液冲洗两次, 回收冲洗液于相应离心管当中。冲洗结束后, 离心去上清液。随后, 将细胞重悬于 $1 \times$ Binding Buffer 中, 收集到相应离心管中, 加入 Annexin V-FITC 混匀, 室温避光孵育 15 min。加入 PI 染液混匀, 室温避光孵育 5 min, 上机前 5 min 加入 $1 \times$ Binding Buffer。最后通过流式细胞仪进行检测和分析, 以评估各组细胞的凋亡状况。

2.2.5 Western blotting 检测 PI3K、p-Akt、Akt、MTOR、Bcl-2、Bax 蛋白表达情况 收集培养后的 SH-SY5Y 细胞, 用预冷的 PBS 清洗 3 次后, 加入 RIPA 裂解液, 于冰上裂解 30 min, 收集裂解液并于 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液。BCA 法蛋白定量, 制备蛋白胶。对制备好的蛋白样品采用 10%

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行蛋白电泳, 并电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入 PI3K (1:1 500)、Akt (1:1 500)、p-Akt (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Bax (1:1 000) 一抗 4 ℃ 过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 最后将洗好的膜放入 ECL 发光试剂中浸泡润湿后, 避光显影。结果用 Image J 分析蛋白条带灰度值, 用 PI3K、p-Akt、Akt、MTOR、Bcl-2、Bax 灰度比值表示, 并对各组进行归一化。

2.2.6 统计方法 所有结果采用 SPSS22.0 统计软件进行统计处理, 各指标采用单因素方差分析, 通过 LSD 方法进行组间多重比较。

3 结果

3.1 网络药理学及分子对接结果

3.1.1 毛兰素治疗阿尔茨海默病靶点获取 在 SwissTargetPrediction 数据库得到磷酸肌醇 3 激酶调控亚基 (PIK3R) 1、PIK3CD、PIK3CB 等毛兰素靶点。在 citexs 文献综合数据库中筛选毛兰素的药物靶点, 得到 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、细胞凋亡调节因子 (Bax)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 等靶点。将 2 个数据库获得的药物靶点进行合并与去重复之后, 共获得毛兰素的药物靶点 127 个。在 TTD、PharmGKB、GeneCards、OMIM、GEO、DisGeNET、Celt 平台中挖掘与阿尔茨海默病

相关的疾病靶点, 合并去重复之后得到阿尔茨海默病疾病靶点共 4 399 个。将筛选出的 127 个药物靶点与 4 399 个疾病靶点输入 Venny 2.1.0, 得到 97 个交集靶点, 交集靶点如图 1 所示。

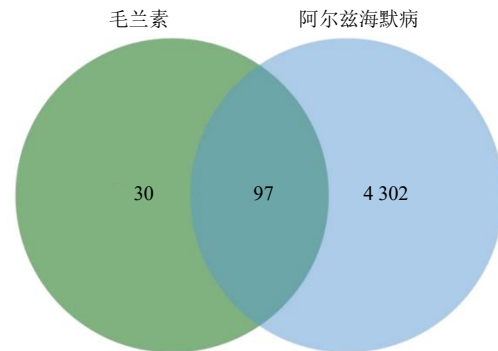


图 1 毛兰素与阿尔茨海默病交集靶点图

Fig. 1 Target map of the intersection of erianin and Alzheimer's disease

3.1.2 毛兰素治疗阿尔茨海默病靶点 PPI 网络构建 将交集靶点上传至 STRING 网站构建毛兰素治疗阿尔茨海默病的 PPI 网络, 得到 97 个潜在靶点, 1 160 条边。利用 Cytoscape 3.9.1 的 CytoNCA 进一步分析后得到 20 个关键靶点和 182 条边。利用 Cytoscape 3.7.0 中的“Network analyzer”功能对关键靶点的 PPI 网络进行分析和可视化, 节点越大、连线越多、颜色越深表明该靶点越重要。筛选相关步骤以及靶点的可视化分析如图 2 所示。

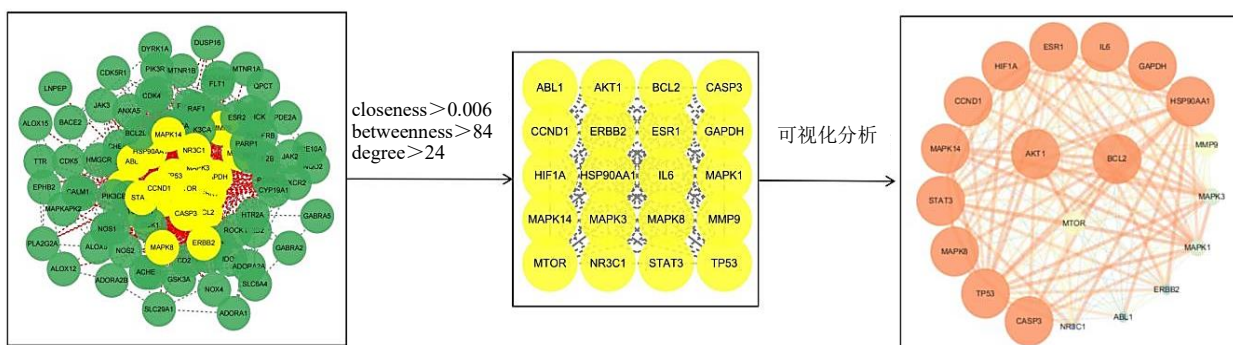


图 2 PPI 互作网络核心靶点筛选与可视化分析

Fig. 2 Screening and visualization analysis of core targets in PPI interaction networks

3.1.3 交集靶点富集分析 将 97 个交集靶点利用 R 语言得到 GO 功能与 KEGG 富集分析结果, 并借助微生信平台绘制柱状图。GO 功能分析得到显著性 $P < 0.05$ 的与共涉及 2 398 个生物条目 (图 3), 包括神经元凋亡过程、神经元凋亡过程的调控、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt1) 信号

转导等 2 165 个生物过程条目 (BP); 神经元胞体、磷酸转移酶、细胞-基质连接等 82 个细胞组成条目 (CC); 蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白质丝氨酸激酶活性、蛋白质酪氨酸激酶活性等 151 个分子功能条目 (MF)。KEGG 富集分析得到显著性 $P < 0.05$ 共有 165 条通路 (图 4), 主要涉及晚期糖

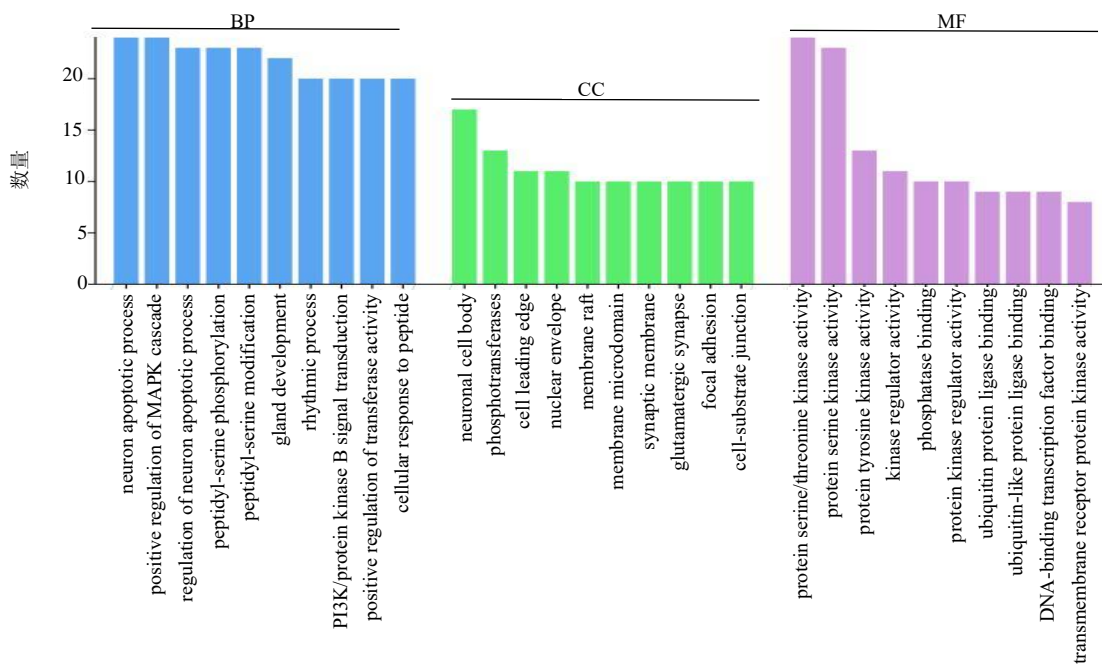


图 3 GO 富集分析结果

Fig. 3 GO enrichment analysis results

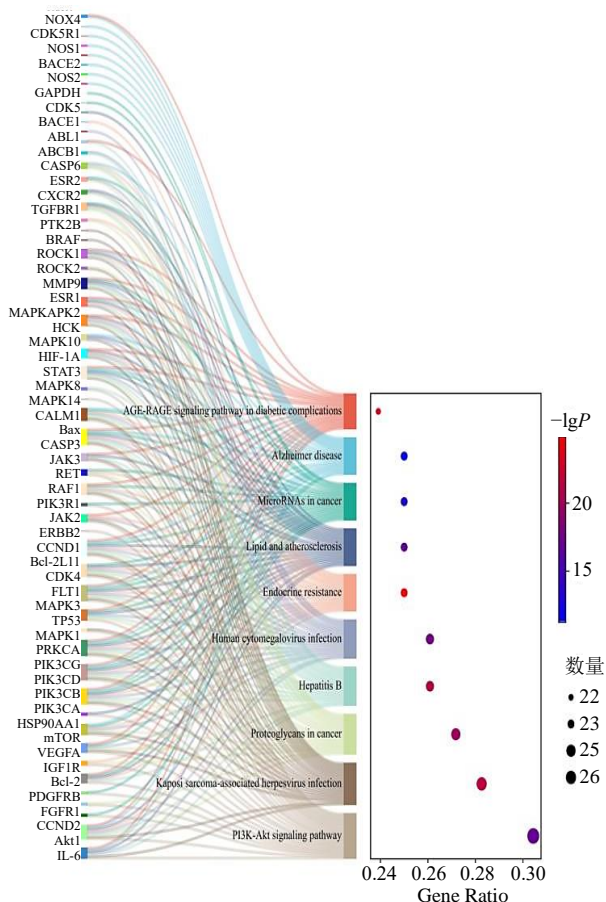


图 4 KEGG 富集分析结果

Fig. 4 KEGG enrichment analysis results

基化产物 (AGE) - 晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等, 核心靶点 Akt1、mTOR 富集在、PI3K/Akt 信号通路中, 且核心靶点 Bcl-2 与凋亡密切相关, 说明毛兰素可能通过 PI3K/Akt 通路及凋亡相关信号来发挥治疗阿尔茨海默病的作用。

3.1.4 分子对接 为进一步验证毛兰素干预阿尔茨海默病潜在靶点的可能性, 选取核心靶点与毛兰素进行分子对接, 对接结果见图 5, 以对接分数的高低作为评判化合物分子与靶蛋白之间结合能力的强弱, 结合分数越低结合能力越高, 低于 -5.0 kcal/mol (1 cal=4.2 J) 表示结合情况较好。结果显示, 毛兰素与 3 个核心靶点 Akt1、mTOR、Bcl-2 的结合能分别为 -5.5、-7.0、-7.0 kcal/mol, 结合能力较好。

3.2 细胞实验结果

3.2.1 毛兰素对 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体干预后 SH-SY5Y 细胞活力的保护作用 CCK-8 结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞活力明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 毛兰素 25、50、100 nmol/L 组的处理后, 细胞活力明显升高 ($P < 0.01$), 其中 50 nmol/L 毛兰素对细胞活力提高作用最明显。因此后续均选用浓度为 50 nmol/L 的毛兰素进行实验, 见图 6。

3.2.2 利用 AnnexinV-FITC 双染法检测毛兰素对

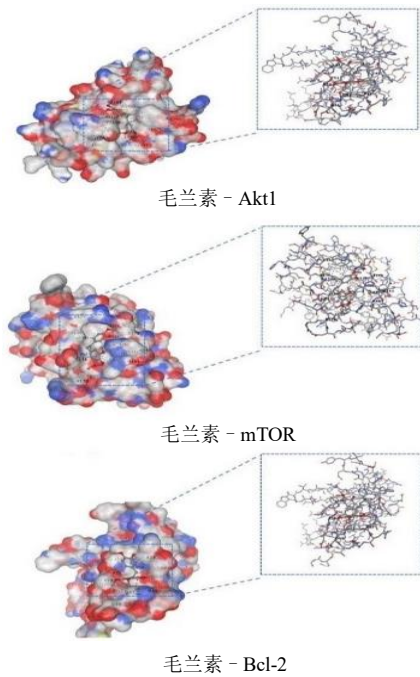
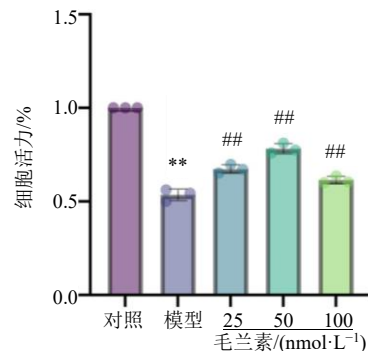


图 5 分子对接

Fig. 5 Molecular docking



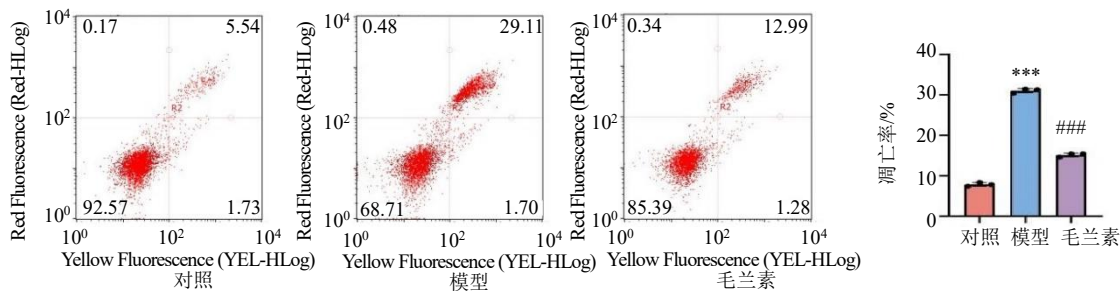
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 不同浓度毛兰素对 A β ₁₋₄₂ 干预后细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of different concentrations of erianin on cell viability after A β ₁₋₄₂ intervention ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SH-SY5Y 细胞凋亡作用的影响 流式细胞仪检测显示: 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 毛兰素组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$), 表明毛兰素可显著降低 A β ₁₋₄₂ 诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡, 见图 7。



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 7 各组 SH-SY5Y 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Comparison of apoptosis rates of SH-SY5Y cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

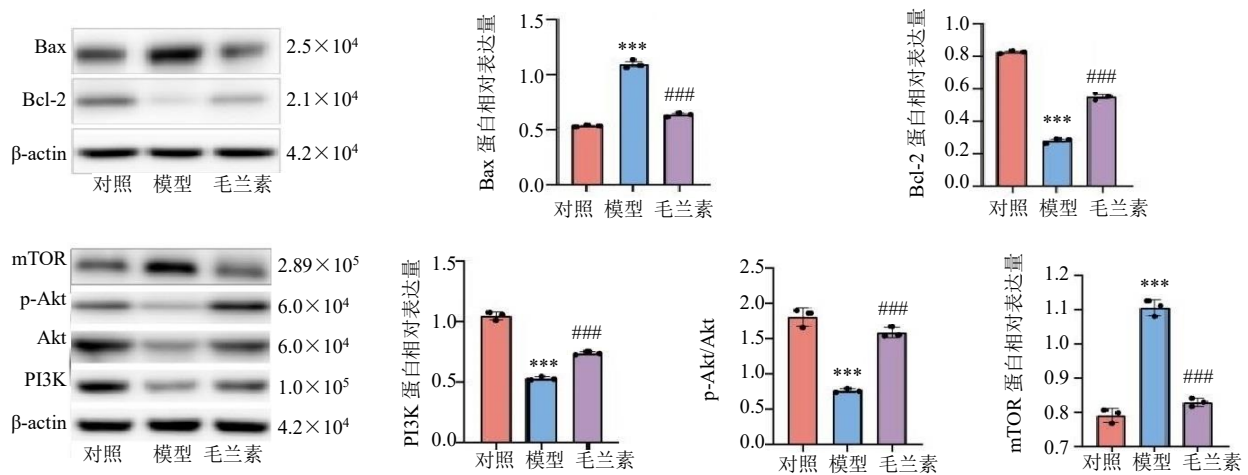
3.2.3 毛兰素对 SH-SY5Y 细胞 PI3K/Akt 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响 Western blotting 结果表明, 相比于对照组, 模型组细胞的 Bcl-2、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达水平显著下降, Bax 和 mTOR 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 毛兰素组 Bcl-2、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达水平显著增加, mTOR 和 Bax 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.001$), 见图 8。综上所述, 毛兰素在 A β ₁₋₄₂ 干预后的 SH-SY5Y 细胞保护作用, 是通过调节 PI3K/Akt 信号通路的关键蛋白 p-Akt、Akt、PI3K、mTOR 表达水平, 进而干预 Bax、Bcl-2 凋亡蛋白的

表达以减轻 SH-SY5Y 细胞凋亡而实现的。

4 讨论

阿尔茨海默病是导致痴呆的主要因素之一, 随着人口老龄化的加剧, 阿尔茨海默病的发病率不断攀升, 且其发病率随年龄增长而显著上升, 已成为严重影响家庭和社会的重大健康问题^[12-13]。既往研究报道毛兰素具有通过减轻神经炎症来保护神经的作用^[14]。本研究采用网络药理学联合体外实验验证, 探究毛兰素治疗阿尔茨海默病的作用机制。

本研究中, 采用网络药理学方法系统分析毛兰素干预阿尔茨海默病的作用机制, 对毛兰素与阿尔



与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: ### $P < 0.001$ 。
 *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs model group.

图 8 各组 SH-SY5Y 细胞中相关蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Expression of related proteins in SH-SY5Y cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

茨海默病的 97 个交集靶点进行 PPI 网络分析, 结果显示, Akt1、MORT、Bcl-2 是 3 个关键靶点基因。Akt1 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 与细胞增殖和生长有关, 研究说明 Akt1 是阿尔茨海默病的重要基因, 并表明 Akt 磷酸化的水平与阿尔茨海默病认知功能有关^[15-18]。mTOR 是 PI3K/Akt 信号通路的关键下游蛋白, mTOR 的过度表达能促进阿尔茨海默病患者脑中 Tau 蛋白磷酸化, 加剧 A β 的产生和沉积^[19]。Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白, 其能通过减少促凋亡蛋白的表达, 降低细胞的凋亡水平^[19]。为了分析毛兰素治疗阿尔茨海默病的生物学过程和潜在信号途径, 将获得的毛兰素与阿尔茨海默病的交集靶点进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析得到 2398 个条目, 其中 BP 2165 个条目, CC 82 个条目, MF 151 个条目, KEGG 通路富集得到 165 相关通路条。通路富集结果提示毛兰素治疗阿尔茨海默病的潜在信号通路主要涉及 AGE-RAGE 信号通路、PI3K/Akt 信号通路等。

细胞凋亡是一种细胞重要的死亡方式^[20]。有研究在阿尔茨海默病患者早期阶段发现了大量神经元细胞凋亡^[21-23]。PI3K 作为细胞内信号转导的关键激酶, 普遍存在于哺乳动物体内, 与其下游信号分子 Akt 构成了 PI3K/Akt 信号通路的核心^[24]。此通路在调控细胞生长、存活和凋亡过程中起核心作用, 与多种神经保护机制相关, 可以通过影响抗凋亡相关蛋白的表达起到神经保护的作用^[25-26]。Bax 与 Bcl-2 是一对与凋亡密切相关的蛋白, Bax 可以

增强线粒体的通透性, 促进细胞凋亡; Bcl-2 可以与 Bax 结合形成复合物, 降低 Bax 引起的线粒体通透性, 抑制细胞凋亡^[21, 27]。PI3K 激活后可以通过磷酸化 Akt, 调控 Bax 与 Bcl-2 的表达, 抑制神经元细胞的凋亡。mTOR 是 PI3K/Akt 信号通路下游蛋白, 阿尔茨海默病疾病进程中 mTOR 被过度激活, 增加了 A β 沉积, 而促进 PI3K/Akt 信号通路的表达, 可以抑制 mTOR 活性, 缓解阿尔茨海默病神经细胞异常, 缓解 A β 沉积, 减缓阿尔茨海默病进程^[28]。从实验结果可知, 模型组细胞经过毛兰素的干预治疗后, SH-SY5Y 细胞凋亡程度减轻, p-Akt、Akt、PI3K、Bcl-2 水平显著增加, mTOR 和 Bax 蛋白表达水平显著下降, 这说明毛兰素通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路减少神经元凋亡。

综上所述, 毛兰素通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 能够有效地减轻神经元凋亡, 进而治疗阿尔茨海默病。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] 沈阳, 陈宇, 傅洁瑜, 等. 老年痴呆症的分子机制 [J]. 生命科学, 2014, 26(6): 550-559.
 [2] Chen Y G. Research progress in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Chin Med J*, 2018, 131(13): 1618-1624.
 [3] Hardy J, Selkoe D J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: Progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.

- [4] Gustavsson A, Norton N, Fast T, *et al.* Global estimates on the number of persons across the Alzheimer's disease continuum [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(2): 658-670.
- [5] No authors listed. 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2023, 19(4): 1598-1695.
- [6] 张光浓, 毕志明, 王峥涛, 等. 石斛属植物化学成分研究进展 [J]. *中草药*, 2003(6): 102-105.
- [7] Lam Y, Ng T B, Yao R M, *et al.* Evaluation of chemical constituents and important mechanism of pharmacological biology in dendrobium plants [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 841752.
- [8] 高园, 蒋松伟, 戚香, 等. 毛兰素的提取分离、化学合成和生物活性的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4362-4371.
- [9] Li Q Q, Gan X K, Zhang M, *et al.* Erianin promotes endogenous neurogenesis in traumatic brain injury rats [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 4108.
- [10] 朱仲康, 刘羽茜, 王冰, 等. 六味地黄丸含药血清对 A β 诱导 SH-SY5Y 细胞的自噬影响及机制研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2022, 24(2): 670-677.
- [11] Zhang T Y, Ouyang H, Mei X Y, *et al.* Erianin alleviates diabetic retinopathy by reducing retinal inflammation initiated by microglial cells via inhibiting hyperglycemia-mediated ERK1/2-NF- κ B signaling pathway [J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 11776.
- [12] Tiwari S, Atluri V, Kaushik A, *et al.* Alzheimer's disease: pathogenesis, diagnostics, and therapeutics [J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 5541-5554.
- [13] Twarowski B, Herbet M. Inflammatory processes in Alzheimer's disease pathomechanism, diagnosis and treatment: A review [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6518.
- [14] Yan C J, Tian Z X, Ruan W Q, *et al.* Erianin isolated from *Dendrobium huoshanense* alleviated neuroinflammation in MPTP-induced Parkinson's disease model via NF- κ B/NLRP3 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 345: 119620.
- [15] Li Z, Xiong Z Z, Manor L C, *et al.* Integrative computational evaluation of genetic markers for Alzheimer's disease [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25(5): 996-1002.
- [16] Arvanitakis Z, Wang H Y, Capuano A W, *et al.* Brain insulin signaling, Alzheimer disease pathology, and cognitive function [J]. *Ann Neurol*, 2020, 88(3): 513-525.
- [17] Ahmad F, Singh K, Das D, *et al.* Reactive oxygen species-mediated loss of synaptic Akt1 signaling leads to deficient activity-dependent protein translation early in Alzheimer's disease [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(16): 1269-1280.
- [18] 雷超芳, 陈志刚, 陈家旭, 等. 基于网络药理学探究黑逍遥散治疗阿尔茨海默病的分子作用机制 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(12): 4406-4418.
- [19] 王艳, 郭家欣, 张倩霞, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨银杏二萜内酯减轻神经元衰老的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(11): 3935-3946.
- [20] Ketelut-Carneiro N, Fitzgerald K A. Apoptosis, pyroptosis, and necroptosis—Oh my! The many ways a cell can die [J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(4): 167378.
- [21] Shao X R, Cui W T, Xie X P, *et al.* Treatment of Alzheimer's disease with framework nucleic acids [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(4): e12787.
- [22] Rather M A, Thenmozhi A J, Manivasagam T, *et al.* Asiatic acid nullified aluminium toxicity *in vitro* model of Alzheimer's disease [J]. *Front Biosci*, 2018, 10(2): 287-299.
- [23] Liu X Q, Jiang L, Li Y Y, *et al.* Wogonin protects glomerular podocytes by targeting Bcl-2-mediated autophagy and apoptosis in diabetic kidney disease [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 96-110.
- [24] Linton M R F, Moslehi J J, Babaev V R. Akt signaling in macrophage polarization, survival, and atherosclerosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11): 2703.
- [25] Zhou B C, Yang Y, Pang X M, *et al.* Quercetin inhibits DNA damage responses to induce apoptosis via SIRT5/PI3K/AKT pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115071.
- [26] Peng Y, Chi R, Liu G, *et al.* Aerobic exercise regulates apoptosis through the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway to improve cognitive impairment in Alzheimer's disease mice [J]. *Neural Plast*, 2022, 2022: 1500710.
- [27] 李莹, 王莹, 孔明望. 补肾健脾开心方对 AD 大鼠自噬及凋亡相关蛋白的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(9): 38-46.
- [28] 熊春伟, 张宪亮. 运动调控 PI3K/Akt 信号通路改善阿尔茨海默病的研究进展 [J]. *中国康复医学杂志*, 2021, 36(10): 1322-1326.