

基于网络药理学和实验验证探讨杜仲对阿尔茨海默病的保护作用机制

高瑞雪^{1,3}, 戴毅^{1,3}, 叶繁², 周兰庭^{2,3*}, 李珍珍^{1*}

1. 湖北文理学院附属襄阳市中心医院 医学检验部, 湖北 襄阳 441000
2. 湖北文理学院附属襄阳市中心医院 神经科学与脑科学研究所, 湖北 襄阳 441000
3. 湖北文理学院 基础医学院, 湖北 襄阳 441053

摘要: **目的** 基于网络药理学和实验动物模型探讨杜仲对阿尔茨海默病 (AD) 的作用机制。 **方法** 采用中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP), 获取杜仲的主要活性成分, 用 SwissTargetPrediction 收集杜仲活性成分全部作用靶点。从 DrugBank、PathCard、Chemogenomic Database 和 PubChem 数据库获取 AD 靶点。使用韦恩图取交集, 得到杜仲治疗 AD 的共同作用核心靶点。利用 Cytoscape 3.8.0 构建靶点的“活性成分-核心靶点”网络图。采用 Metascape 进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 筛选出杜仲主要作用信号通路。使用 CB-DOCK2 进行分子对接, 并用 Pymol 和 Discovery Studio 展示对接结果。通过 ip 东莨菪碱构建 AD 小鼠模型, 并给予杜仲颗粒 ig 处理, 采用新物体识别实验检测小鼠学习记忆能力, 通过免疫荧光检测神经核抗原抗体 (NeuN) 的表达。 **结果** 预测得到杜仲的 11 种主要活性成分, 381 个作用靶点, 674 个 AD 相关靶点, 其中杜仲治疗 AD 共同核心靶点 78 个。杜仲干预 AD 可能通过蛋白质磷酸化、细胞凋亡、化学突触传递调节、 β 淀粉样蛋白代谢过程等, 还可能涉及 AD、多巴胺能神经元、钙信号通路等。动物实验结果表明, 杜仲高剂量有助于改善 AD 小鼠认知功能障碍, 并恢复 AD 神经元标志物 NeuN 的表达。 **结论** 杜仲可能通过多成分、多靶点、多通路参与调控 AD 疾病进程, 其机制可能涉及抑制神经元凋亡等。

关键词: 杜仲; 阿尔茨海默病; 网络药理学; 分子对接; 神经元凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)03-0862-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.012

Exploring protective effects and mechanism of *Eucommia ulmoides* on Alzheimer's disease based on network pharmacology and experimental evidence

GAO Ruixue^{1,3}, DAI Yi^{1,3}, YE Fan², ZHOU Lanting^{2,3}, LI Zhenzhen¹

1. Department of Laboratory Medicine, Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441000, China
2. Institute of Neuroscience and Brain Science, Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441000, China
3. School of Basic Medicine, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Eucommia ulmoides* in Alzheimer's disease (AD) based on network pharmacology and experimental animal models. **Methods** The main active components of *E. ulmoides* were obtained from the Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database (TCMSP), and all targets were collected using SwissTargetPrediction. AD genes were obtained from the DrugBank, PathCard, Chemogenomic Database, and PubChem databases. Diagrams were used to identify the intersection, yielding core target proteins common to *E. ulmoides* treatment for AD. Cytoscape 3.8.0 was employed to construct the “active component-core target” network diagram. Metascape was utilized for GO and KEGG enrichment analysis to screen the primary signaling pathways involved in *E. ulmoides*. Molecular docking was performed using CB-DOCK2, with results

收稿日期: 2025-11-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82301374); 湖北省自然科学基金襄阳联合基金培育项目 (2025AFD068); 湖北文理学院大学生创新创业训练计划项目 (S202510519064、X202510519115); 湖北文理学院神经科学与脑科学研究所开放课题 (2023NBI07); 襄阳市中心医院科研启动经费 (2024BS03); 襄阳市中心医院人才培养经费 (2025RCQM-089)

作者简介: 高瑞雪 (2005—), 女, 本科, 研究方向为护理学。E-mail: 3449575391@qq.com

***通信作者:** 李珍珍 (1989—), 女, 硕士研究生, 中级检验技师, 研究方向为疾病分子诊断。E-mail: lzz00633@163.com

周兰庭 (1990—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为神经退行性疾病的发病机制和药物干预。E-mail: zhoulanting@hbuas.edu.cn

visualized via Pymol and Discovery Studio. An AD mouse model was established by ip injection of scopolamine, followed by *E. ulmoides* oral administration. Learning and memory abilities were assessed through the novel object recognition test, while NeuN expression was detected via immunofluorescence. **Results** Eleven major active components, 381 target proteins, and 674 AD-related targets were predicted for *E. ulmoides*, including 78 common core targets for AD treatment. Intervention of *E. ulmoides* in AD may occur through pathways including protein phosphorylation, apoptosis, chemical synapse transmission regulation, and β -amyloid metabolism, potentially involving AD, dopaminergic neurons, and calcium signaling pathways. Animal studies indicate that high-dose of *E. ulmoides* improves AD-related cognitive impairment and restores the AD neuronal reduction. **Conclusion** *E. ulmoides* may participate in regulating the AD disease process through multiple components, multiple targets, and multiple pathways. Its mechanism may involve neuronal apoptosis, providing scientific basis for systematically elucidating its action mechanism.

Key words: *Eucommia ulmoides* Oliv.; Alzheimer's disease; network pharmacology; molecular docking; neuronal apoptosis

阿尔茨海默病(AD)是老年人最常见的神经退行性疾病^[1]。AD的典型病理特征为大脑细胞外淀粉样 β 蛋白(A β)沉积与细胞内过度磷酸化Tau蛋白聚集形成的神经纤维缠结,同时伴随突触功能障碍、神经元丢失及过度活化的炎症反应^[2-3]。临床上,AD最核心的表现为认知功能进行性衰退,尤以空间学习记忆及近期记忆损害为显著特征。迄今为止,尽管大量实验证据表明A β 与磷酸化Tau在AD记忆衰退中发挥关键调控作用,但认知障碍的具体分子机制尚未完全阐明^[4]。突触功能的病理性改变是AD早期出现的核心事件,比如成熟突触丢失可引发突触传递障碍,进而损害学习记忆功能^[5]。目前,临床获批用于AD治疗的药物主要包括乙酰胆碱酯酶抑制剂与N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂,但这类药物疗效有限,仅能延缓疾病进展,无法改善患者临床症状^[6],且存在较明显的不良反应。近期,靶向A β 或者Tau的抗体治疗仍处于临床研究阶段,其治疗效果尚未明确,因此亟需进一步阐明AD的分子机制^[7-8]。

近年来,中医药在治疗神经退行性疾病方面发挥了重要作用。杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliv.),是中国独有的树种,经济价值较高。杜仲为落叶乔木,适宜生长在温暖湿润和阳光充足的地方,杜仲树耐寒性强,主要分布于我国的陕西、甘肃、河南、湖北、湖南和四川等地。2023年,杜仲叶正式纳入我国药食同源目录^[9]。实验研究证明,杜仲所含化学成分多达100多种,主要包括木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、多糖类、杜仲胶、抗真菌蛋白等^[10-11]。其药理作用主要有补肾降压、增强免疫力、调血脂、降血糖、保肝利尿、神经保护等^[11]。杜仲是临床上常用的补益类中药材,具有补肝肾和强筋骨的功效^[12]。有学者^[13]基于“肾生髓通脑”理论,发现杜仲可能通过调节A β 异常沉积和氧化应激损伤,缓解AD

症状。另有学者^[14]发现,杜仲可能通过雌激素受体(ER)调控丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶(MAPK/ERK)通路发挥治疗AD的关键作用。此外,有学者^[15]发现,杜仲乙醇提取物可以增强总抗氧化能力(T-AOC)、降低乙酰胆碱酯酶(AChE)含量,改善AD模型大鼠的空间学习记忆障碍。这些研究表明,杜仲具有一定的神经保护作用,但其作用机制尚未完全阐释,因此,尚需进一步深入探究杜仲对AD的保护作用机制,为临床用药提供理论基础。

本研究基于网络药理学,筛选杜仲治疗AD的靶点,并对靶点进行信号通路富集分析,将核心成分和靶点进行分子对接。此外,在AD模型小鼠中给药处理,评价杜仲对AD的保护作用。

1 材料

1.1 动物

2月龄体质量约为20g的SPF级C57BL/6小鼠,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号SCXK(京)2021-0006。动物实验经湖北文理学院伦理委员会批准(2023-010)。

1.2 试剂

东莨菪碱(相对分子质量303.35)购自MCE公司,目录号为HY-N0296。杜仲颗粒(5g \times 10袋,国药准字Z32020036)购于南京同仁堂药业有限责任公司,批号240102。NeuN抗体购自CST公司,货号24307S。DAPI购自碧云天生物技术有限公司,货号C1002。Alexa Fluor 555标记的山羊抗兔IgG二抗购自Invitrogen公司,货号A21428。

1.3 仪器

Milli-Q台式纯水仪(德国默克公司),YM立式压力蒸汽灭菌锅(上海三申医疗器械有限公司),SK圆摇床(浙江力辰公司),YCD医用冷藏冷冻箱(青岛澳柯玛生物医疗有限公司),CM1860冷冻

切片机 (德国 Leica 公司), SP8 激光共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.4 数据库

中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); SwissTargetPrediction 数据库 (<https://swisstargetprediction.ch/>); DrugBank 数据库 (<https://www.drugbank.com/>); PathCard 数据库 (<https://pathcards.genecards.org/>); Chemogenomic Database 数据库 (<https://www.cbligand.org/CCGS/#database>); 韦恩图 (<http://www.ehbio.com/test/venn/#/>); Cytoscape 3.8.0; STRING 12.0 数据库; Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>); GraphPad prism 9; Pymol 软件; Discovery Studio 软件; CB-DOCK2 (<http://clab.labshare.cn:10380/cb-dock2/php/blinddock.php>)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 杜仲化学成分及活性成分的筛选 根据参考文献报道^[16], 采用 TCMSP 数据库收集杜仲的化学成分, 并基于相对分子质量 (MW) ≤ 500 、口服生物利用度 (OB) $\geq 10\%$ 、类药性 (DL) ≥ 0.1 、血脑屏障通过率 (BBB) ≥ -0.3 筛选杜仲的主要活性成分。

2.1.2 杜仲活性成分潜在作用靶点预测 采用 PubChem 数据库获取杜仲活性成分的 Canonical SMILES 编号, 并上传至 SwissTargetPrediction 数据库, 以 Probability > 0 为标准, 筛选主要活性成分的作用靶点, 取各成分靶点交集后, 得到杜仲的潜在作用靶点。

2.1.3 AD 潜在作用靶点筛选及杜仲-AD 核心作用靶点获取 依据参考文献报道^[16], 采用 DrugBank、PathCard、Chemogenomic Database 和 PubChem 等数据库获取 AD 相关靶点, 删掉重复靶点, 取交集得到 AD 靶点基因。取杜仲活性成分潜在靶点和 AD 靶点的交集, 得到杜仲-AD 的核心作用靶点。

2.1.4 构建杜仲治疗 AD 的“成分-共同作用靶点”网络图 运用 Cytoscape3.8.0 软件绘制并构建“活性成分-共同作用靶点”的关系网络, 将杜仲的活性成分与上述共同作用靶点进行关联, 并进行拓扑学参数分析, 根据介数中心性 (BC)、紧密中心性 (CC 以及度 (degree) 值的中位数筛选出成分-靶点网络的核心节点, 构建靶点的“成分-共同靶点”网络图。

2.1.5 构建共同靶点蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图 利用 STRING 数据库在线平台预测共同作用靶点的 PPI 关系。将杜仲与 AD 的共同作用靶点导入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络, 将网络中节点相互作用关系参数导入 Cytoscape3.8.0 软件中, 绘制 PPI 网络, 筛选出杜仲治疗 AD 的核心靶点。

2.1.6 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析 利用 Metascape 对杜仲治疗 AD 靶点进行 GO 与 KEGG 富集分析。设定 $P < 0.01$, 按照富集因子、基因数量筛选得到 GO 与 KEGG 信号通路条目。利用 GraphPad prism 9 制作 GO 和 KEGG 富集分析气泡图。

2.1.7 “活性成分-共同作用靶点-信号通路”网络构建 根据 KEGG 通路分析结果, 参考现有的研究结果以及生物学信息筛选出的其中可能与 AD 有关的信号通路, 并找出富集在这些通路上的杜仲治疗 AD 的潜在作用靶点, 与相应的活性成分相对应, 通过 Cytoscape3.8.0 软件绘制“活性成分-共同作用靶点-信号通路”网络关系图。

2.1.8 利用分子对接验证核心成分和靶点的结合 采用 CB-DOCK2 对关键成分和靶点进行分子对接。首先, 使用蛋白质数据库 PDB, 下载靶点蛋白质文件, 再用 Pymol 去配体, 在 Autodock 中读取蛋白。最后, 查看对接结果, 并用 Pymol 和 Discovery Studio 展示对接结果。

2.2 体内实验

2.2.1 AD 模型小鼠的构建、给药和行为学检测 32 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分成 4 组, 分别是对照组、模型组 (东莨菪碱 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及杜仲颗粒低、高剂量组 (10 、 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 8 只。模型组、杜仲低、高剂量组均采用 ip 东莨菪碱 ($3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 连续 15 d 的方法造模。根据参考文献报道^[17], 用无菌水将杜仲颗粒溶解成质量浓度 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 然后按照杜仲低、高剂量组 ig 给予杜仲溶液处理, 每天 1 次, 连续处理 15 d。给药结束后, 进行新物体识别实验。

新物体识别测试通过实验动物对已熟悉物体与新陌生物体的探索时间长短的行为学方法来评价动物的认知记忆能力。根据参考文献报道^[18], 准备 1 个长 \times 宽 \times 高为 $100 \text{ cm} \times 100 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$ 的不透明行为学实验箱, 实验前 1 d 将小鼠放置于行为学实验箱中 10 min, 使小鼠自由探索适应环境。在第 1 天的训练阶段, 在实验箱中放置 2 个完全一样

的训练物体 A,再把小鼠放置于实验箱中放置 10 min,记录小鼠接触物体的时间(鼻尖距离物体 ≤ 2 cm 或直接接触物体),即为物体探索时间,每次测试后用 70%乙醇擦拭场地和物体。在第 2 天的测试阶段,将实验箱中的训练物体 A 更换为形状和颜色均不一样的新物体 B,再把小鼠放置于实验箱中放置 10 min,记录小鼠接触物体的时间。小鼠对新旧物体的探索时间,即小鼠在新旧物体周围活动的时间,检测小鼠的认知情况。

认知指数 = 接触新物体的时间 / (接触新物体的时间 + 接触旧物体的时间)

2.2.2 免疫荧光 经过行为学检测后的小鼠麻醉后,取全脑置于 4%多聚甲醛中 4℃后固定 24 h,在 30%蔗糖溶液脱水至组织沉底,进行组织包埋和冷冻切片。脑片细胞膜通透处理,用 0.5% Triton X-100/PBS,室温孵育 15 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min。滴加 5% BSA/PBS 封闭液,室温孵育 30 min。按比例稀释 NeuN 一抗(1:500),滴加至脑片上,4℃湿盒内孵育过夜,进行一抗孵育。室温复温 30 min,

PBS 洗 3 次,按比例稀释 Alexa Fluor 555 标记二抗(1:2000),室温避光孵育 60 min,PBS 洗 3 次。滴加 DAPI 染液,室温避光孵育 10 min,PBS 洗 3 次。滴加 50%甘油/PBS 进行封片,在激光共聚焦显微镜观察成像,并采集图像并保存。

2.2.3 统计学方法 运用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用双因素 ANOVA 检验,单因素采用 T 检验,多组间比较采用双因素 ANOVA 检验。 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 杜仲活性成分的收集及活性成分的靶点预测 利用 TCMSP,输入“杜仲”,进入主页面,搜索查询杜仲所含有的化学成分,根据 $MW \leq 500$, $OB \geq 10\%$ 、 $DL \geq 0.1$ 、 $BBB \geq -0.3$ 的标准筛选,得到 11 种有效成分(表 1)。根据 11 种活性成分,在 PubChem 上获取 Canonical SMILES 编号,利用 SwissTargetPrediction 预测杜仲活性成分靶点,排除可能性小于 0 的靶点,得到共 381 个靶点。

表 1 杜仲中主要化学成分

Table 1 Main active components of *E. ulmoides*

MOLID	分子名字	MW	OB/%	BBB	DL
MOL002058	皮树脂醇[(+)-medioresino]	388.45	57.20	-0.29	0.61
MOL000443	刺桐灵碱(erythraline)	297.38	49.17	0.54	0.55
MOL007563	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚(yangambin)	446.54	57.52	0.00	0.80
MOL009009	皮树脂醇[(+)-medioresinol]	388.45	87.18	-0.28	0.61
MOL009015	山辣椒碱[(-)-tabernemontanine]	354.49	58.66	0.35	0.60
MOL009027	环巴胺(cyclopamine)	411.69	55.42	0.00	0.82
MOL009030	去氢双丁香酚(dehydrodieugenol)	326.42	30.10	0.62	0.23
MOL009031	表奎宁定[(9R)-6'-methoxycinchonan-9-ol]	324.46	68.21	0.17	0.40
MOL009042	心菊内酯(helenalin)	262.33	77.01	-0.22	0.19
MOL009047	桉脂素[(+)-eudesmin]	386.48	33.28	0.19	0.62
MOL009055	三甲花翠昔(hirsutin_qt)	345.35	49.81	0.02	0.37

3.1.2 AD 潜在作用靶点收集及杜仲-AD 作用核心靶点筛选 利用药物数据库 DrugBank、PathCard、Chemogenomic Database、PubChem,搜索查询 AD 的靶点,得到 674 个 AD 靶点。利用韦恩图工具,取杜仲活性成分靶点和 AD 靶点的交集,得到杜仲-AD 的共同作用核心靶点 78 个(图 1)。

3.1.3 构建杜仲-AD 的“成分-共同靶点”网络图 将杜仲的活性成分、共同靶点导入 Cytoscape3.8.0 软件,构建活性成分-共同作用靶点相互作用关系网络图。按照度(degree)值大小,分别排列主要活性成分,11 个主要活性成分和 78 个共同靶点,形成 96

个节点,228 条边(图 2)。

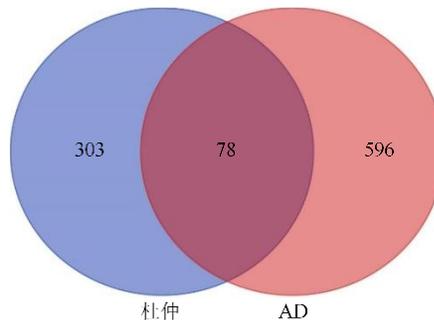


图 1 杜仲成分作用靶点与 AD 靶点的交集

Fig. 1 Intersection of target of *E. ulmoides* and AD target

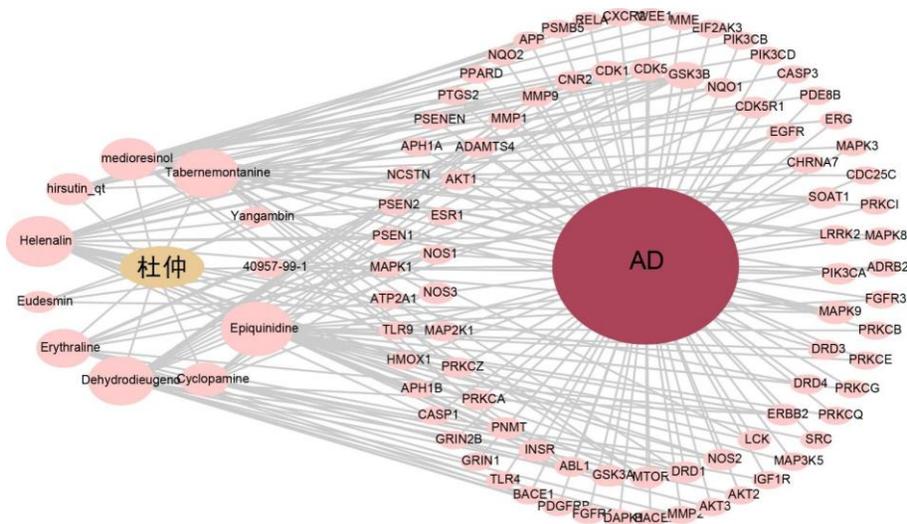


图 2 杜仲的活性成分-AD 作用靶点网络

Fig. 2 Network of active components-targets of *E. ulmoides*

3.1.4 杜仲-AD 核心靶点的 PPI 图和靶点富集分析在 STRING 12.0 数据库中导入杜仲-AD 的 78 个核心靶点, 进行 PPI 分析, 得到靶点互作 PPI 图 (图 3)。根据综合得分, 将 PPI 图中蛋白质按照 degree 值进行排序, 得到排名前 10 的蛋白质, 分别是丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT1)、半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3, CASP3)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (MTOR)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (MAPK3)、表皮生长因子受体 (EGFR)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、雌激素受体 1 (ESR1)、糖原合酶激酶 3 β (GSK3B)、前列腺素内过氧化物合酶

2 (PTGS2)。将 78 个核心靶点导入 Metascape 进行分析, 用 GraphPad prism 9 优化为气泡图。GO 富集分析中包括含有蛋白质磷酸化 (protein phosphorylation)、细胞对氮化合物的反应 (cellular response to nitrogen compound)、细胞对化学压力的反应 (cellular response to chemical stress)、转移酶活性正向调节 (positive regulation of transferase activity)、细胞凋亡正向调节 (positive regulation of cell death) 等 (图 4)。KEGG 信号通路富集分析结果, 主要包括 AD、多巴胺能神经元 (Dopaminergic synapse)、钙信号通路 (Calcium signaling pathway) 等 (图 5)。

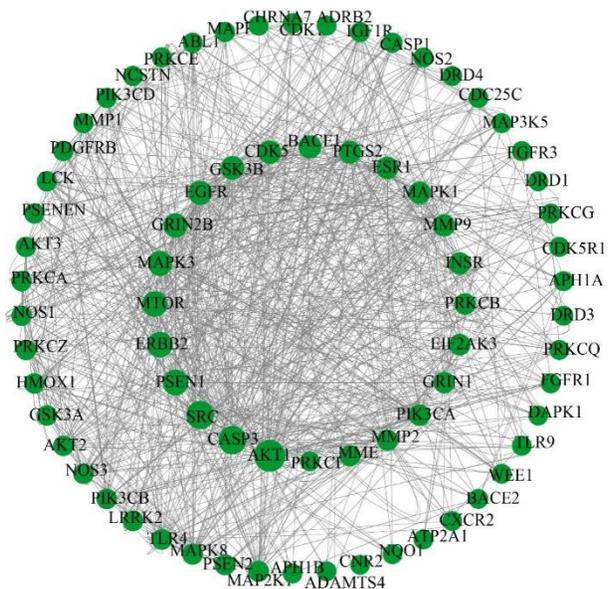


图 3 杜仲-AD 核心靶点的 PPI 图

Fig. 3 PPI interaction map of core targets between AD and *E. ulmoides*

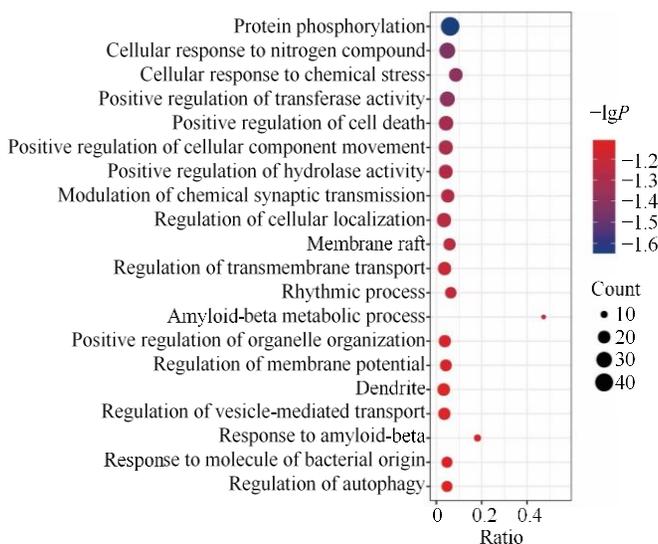


图 4 核心靶点 GO 富集分析

Fig. 4 GO analysis of core target genes

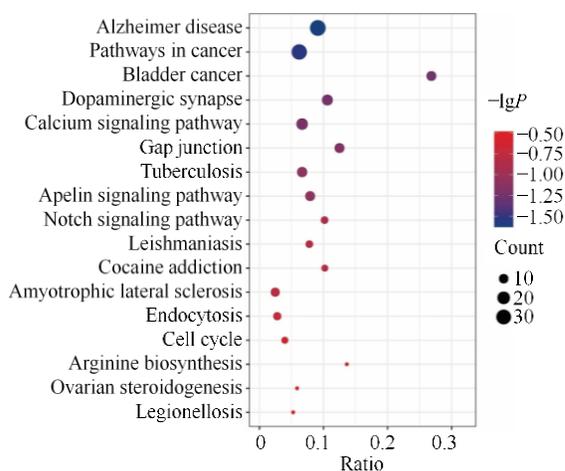


图 5 核心靶点 KEGG 富集分析

Fig. 5 KEGG analysis of core target genes

3.1.5 杜仲主要活性成分和核心靶点的分子对接
 将杜仲的 11 种活性成分，分别与排名前 10 的核心靶点进行分子对接。对接结果显示，cyclophamine 与 PTGS2、MAPK1、GSK3B、EGFR、CASP3、AKT1 的结合自由能均小于 $-29.33 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ，桉脂素与 MTOR、tabernemontanine 与 SRC、(9R)-6'-methoxycinchonan-9-ol 与 ESR1 的结合自由能也相对较低（图 6），说明它们具有比较强的结合能力。其详细的分子对接图见图 7。

3.2 体内实验

3.2.1 杜仲对 AD 模型小鼠体质量的影响
 各组小鼠体质量变化如图 8 所示，结果显示，模型组小鼠的体质量变化和对照组小鼠并无差异，与模型组相比，ig 给予杜仲后，体质量均有下降趋势。但是在

AKT1	-25.1	-29.3	-25.1	-26.0	-28.1	-27.2	-23.9	-31.4	-25.1	-25.6	-26.0
CASP3	-24.3	-27.7	-26.8	-29.3	-26.4	-26.8	-27.2	-34.8	-26.0	-27.2	-27.2
SRC	-24.3	-31.8	-38.1	-28.5	-28.1	-27.2	-26.4	-37.3	-28.5	-29.7	-30.2
MTOR	-31.8	-34.8	-38.1	-40.2	-34.8	-31.8	-31.8	-39.0	-23.9	-33.9	-33.9
MAPK3	-25.6	-30.2	-32.3	-30.6	-31.8	-26.8	-26.8	-31.8	-26.4	-28.5	-29.7
EGFR	-26.0	-31.0	-23.5	-27.7	-31.0	-28.9	-21.8	-37.3	-30.6	-29.7	-22.2
MAPK1	-28.5	-30.6	-13.0	-25.1	-13.0	-28.9	-19.7	-41.9	-5.0	-20.5	-23.9
ESR1	-33.5	-35.2	-36.5	-35.6	-38.1	-30.2	-28.9	-35.6	-32.3	-33.9	-32.3
GSK3B	-31.8	-32.3	-28.5	-10.5	-13.0	-32.3	-18.9	-40.2	-23.5	-14.7	-23.0
PTGS2	-33.9	-39.8	-37.7	-37.3	-37.3	-33.5	-37.7	-43.2	-34.4	-36.0	-36.5
结合能/($\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)	MOL009030	MOL000443	MOL009015	MOL009047	MOL009031	MOL009055	MOL007563	MOL009077	MOL009042	MOL009009	MOL002058

图 6 杜仲主要成分-作用靶点分子对接自由能

Fig. 6 Free energy for main components-target genes of *E. ulmoides* by molecular docking

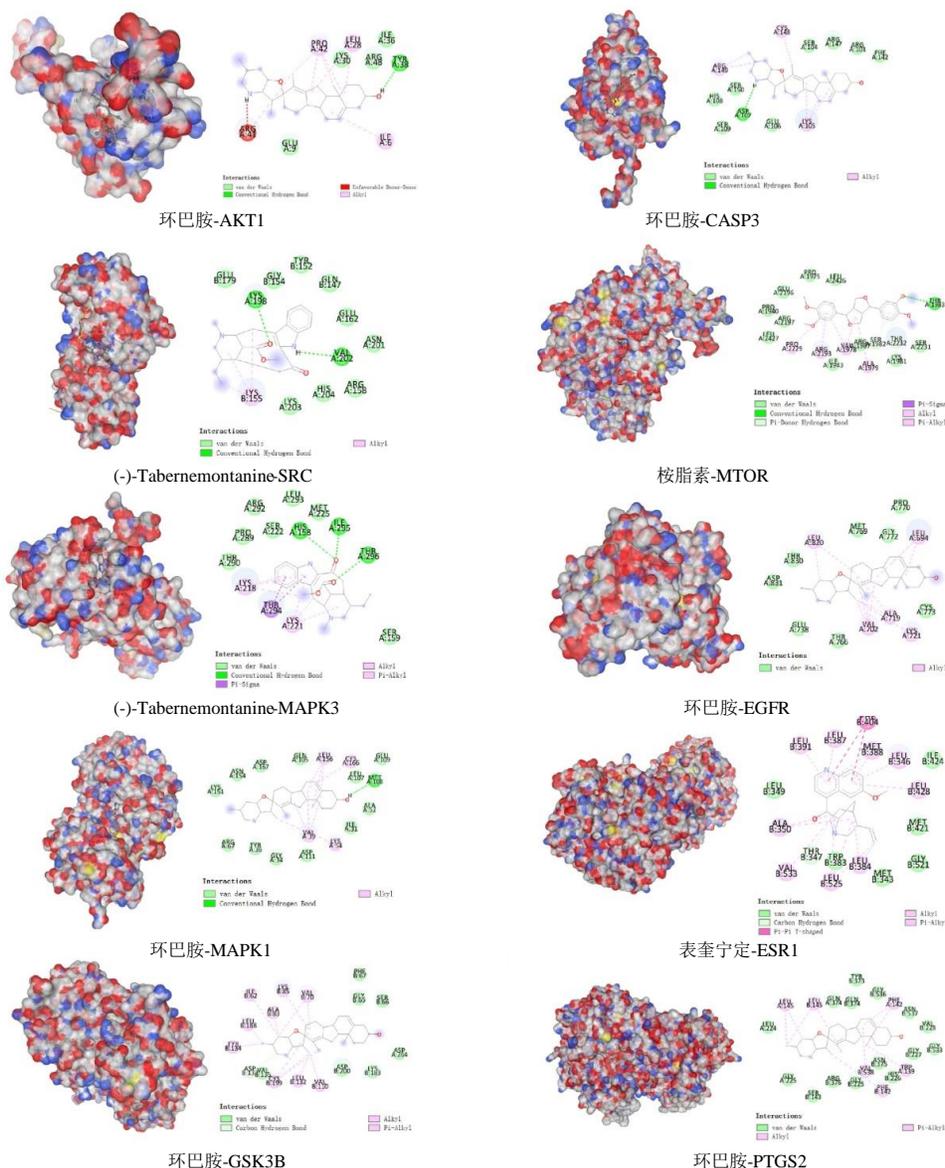
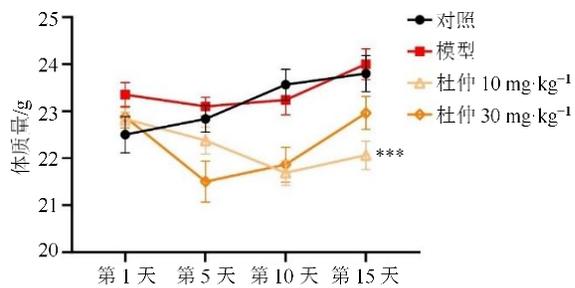


图 7 杜仲主要成分-作用靶点分子对接

Fig. 7 Molecular docking for main components-target genes of *E. ulmoides*



与模型组比较: *** $P < 0.001$.

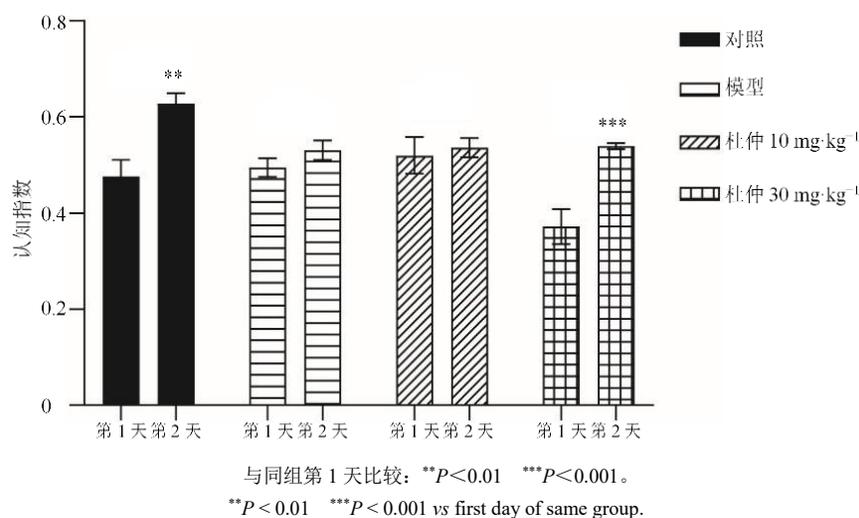
*** $P < 0.001$ vs model group.

图 8 小鼠给予东莨菪碱造模和杜仲后体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 8 Body weight of mice after scopolamine and *E. ulmoides* treatment ($\bar{x} \pm s, n=8$)

处理 15 d 后, 杜仲高剂量组小鼠的体质量和模型组无显著性差异, 与模型组相比, 杜仲低剂量组小鼠的体质量均显著性地降低 ($P < 0.001$), 结果表明, 杜仲高剂量对 AD 模型小鼠体质量无明显影响。

3.2.2 新物体识别测试 通过新物体识别实验, 对 4 组小鼠的认知能力进行检测, 结果显示野生型 C57 小鼠在第 2 天对新物体的偏好性明显高于第 1 天, 而模型组小鼠对新旧事物的偏好性没有明显差别, 表明符合 AD 认知功能障碍的特点。在给予杜仲高剂量后, 小鼠对新事物的偏好性明显高于旧事物 ($P < 0.001$), 见图 9, 说明杜仲高剂量有助于改善 AD 认知功能障碍。

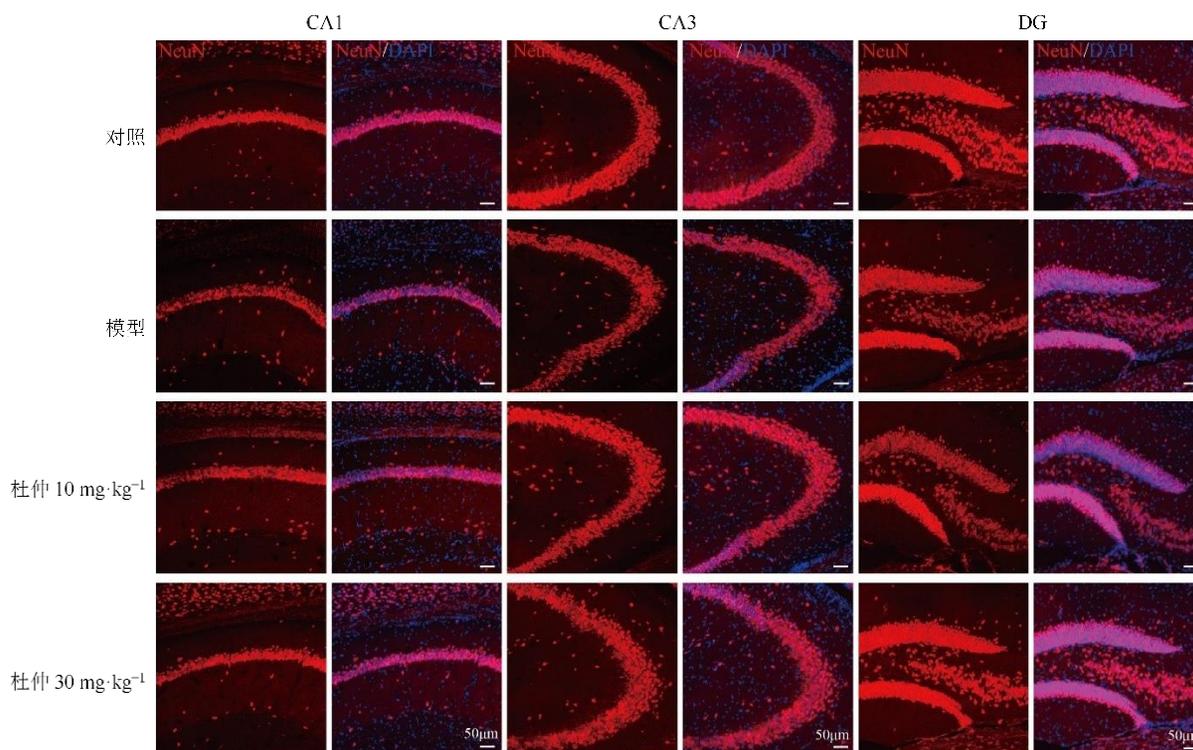
图 9 小鼠新物体识别行为学检测 ($\bar{x} \pm s, n=8$)Fig. 9 Cognitive behavior test in mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

3.2.3 免疫荧光实验 对小鼠海马神经元特异性标志物 NeuN 检测发现, 模型组中, 海马 CA1 区神经元数量降低, 表明海马 CA1、CA3 和 DG 区存在 NeuN 表达降低, 说明 AD 模型的海马存在神经元的丢失。当给予杜仲高剂量处理后, 与模型组相比, 小鼠海马中的 NeuN 荧光强度和数量有所恢复, 杜

仲低剂量处理组无明显变化(图 10), 这些结果提示, 杜仲高剂量可以改善 AD 认知功能相关脑区神经元的丢失现象。

4 讨论

AD 是最常见的神经退行性疾病, 好发人群为 60 岁以上人群。在人口老龄化趋势加剧的情况下,

图 10 小鼠海马 CA1、CA3 和 DG 区神经元特异性标志物 NeuN 染色 ($\times 200$)Fig. 10 Staining of NeuN in CA1 and CA3 regions of mouse hippocampus ($\times 200$)

预计到 2050, 全球 AD 患者将达 1 亿名。AD 是日益严重的全球性健康问题, 自 1907 年 AD 第 1 例病例报告以来, 其发病机制仍未能阐明, AD 临床治疗以缓解为主, 未有治愈方案。这使得 AD 患者家庭经济压力巨大, 同时加剧社会经济负担^[19-20]。当前获批可用于临床的药物, 主要是胆碱酯酶抑制剂和美金刚。尽管这些药物是 AD 治疗中的最佳药物治疗方案, 但是这些药物不能改变潜在神经退行性进程^[21]。据吴永继^[22]研究成果所示, 杜仲水提取物能够抗超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活力下降及丙二醛 (MDA) 的减少, 表现出一定的抗氧化性, 改善小鼠的认知功能障碍。胡凤成等^[23]研究报道从杜仲叶乙醇提取物分离提取了 13 种活性成分, 其中有 3 种可以抑制脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠 BV-2 细胞中一氧化氮 (NO) 的释放, 表现出较强的抗神经炎活性。杜仲多糖 (EPs) 是杜仲皮层中最丰富的物质之一, EPs 能以肠道微生物群依赖的方式缓解 AD 的学习和记忆障碍, 而肠道中丁酸代谢菌代谢的丁酸在调节脑谷氨酰胺代谢以改善脑微环境稳态中发挥着核心作用, 表明杜仲具有免疫调节和神经保护功能^[24]。此外, 杜仲多糖能够抑制小胶质细胞的诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达, 发挥神经保护作用^[25]。Sun 等^[26]利用 AD 的斑马鱼模型, 研究发现, 杜仲雄花提取物通过调节自噬、乙酰胆碱酯酶和多巴胺转运体改善 AD 样病理变化。这些研究表明, 杜仲对 AD 有神经保护作用, 因此, 探讨杜仲治疗 AD 的机制具有重要意义。

为了深入探讨杜仲治疗 AD 的分子机制, 首先, 本研究利用网络药理学方法, 在 TCMS 数据库中筛选出杜仲的主要活性成分, 主要是木脂素类、环烯醚萜类、苯丙素类、黄酮类、甾类和萜类等有机化合物, 这与文章报道的相符合^[14]。据报道, 在小鼠海马原代神经元中, 桉脂素可保护突触结构免受 A β 毒性损伤, 并可以维持突触前蛋白 SV2 的稳定表达, 桉脂素还通过维持胞质 Ca²⁺ 瞬变频率, 缓解 A β 毒性导致的突触功能障碍, 桉脂素具有神经保护作用^[27]。有学者通过体外和体内模型, 发现 cyclopamine 是 γ -分泌酶的调节剂, 它可通过改变 APP 的逆向运输来减少 A β 的生成, 降低 APP-CTF 的降解率, 说明 cyclopamine 可能干预 AD 淀粉样病变过程^[28]。Kang 等^[29]发现, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 medioresinol 可以降低 A β 40 生成至 50%,

medioresinol 通过减少 β -secretase 含量发挥神经保护作用。Kim 等报道, yangambin 抑制 LPS 诱导的小鼠 BV-2 细胞中 NO 的释放, 其半数抑制浓度 (IC₅₀) 值大概为 28 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 说明 yangambin 具有一定的抗炎作用^[30]。这些研究表明, 杜仲活性成分具有 AD 保护作用。

李月等^[31]报道, 在杜仲提取物处理的 APP/PS1 中, 与模型组相比, 杜仲提取物组小鼠的认知障碍得到显著改善, 新物体识别指数显著提高。海马区出现神经元数目增多, 海马的雌激素受体 β (ER β) 表达显著升高, ER β 的表达显著升高, p-JNK/JNK 水平显著降低。这表明杜仲提取物通过调节 ER β 的表达, 激活 ER β /JNK 信号通路, 改善 APP/PS1 小鼠学习记忆能力。本研究的动物实验证实, 杜仲可以降低 AD 小鼠海马区神经元细胞凋亡, 发挥对 AD 的保护作用。通过网络药理学分析发现, 它可能通过蛋白质磷酸化、细胞凋亡、化学突触传递调节、A β 代谢过程、多巴胺能神经元、钙信号通路等信号发挥作用。核心靶点分析发现, 与 AD 疾病发生发展密切相关的靶点包括 CASP3、MTOR 和 GSK3B 等。CASP3 通过剪切方式产生病理性的 Tau 蛋白, 影响突触功能损伤和认知障碍^[32]。分子对接显示, cyclopamine、桉脂素和 CASP3 表现较低的结合自由能, 表现出较高的结合能力。Cyclopamine 与 PTGS2、MAPK1、GSK3B、EGFR、AKT1 的结合自由能均小于 -29.33 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 这些靶点在 AD 中发挥重要的调控作用^[33-35]。

综上所述, 本研究基于网络药理学和动物实验, 筛选出杜仲-AD 的核心靶点, 构建杜仲治疗 AD 的“成分-核心靶点”网络图, 并通过 GO 与 KEGG 富集分析, 明确了关键信号通路, 使用分子对接验证了杜仲主要活性成分与核心靶点的结合, 并用动物实验验证了杜仲对 AD 的保护作用机制, 本研究可为杜仲治疗 AD 的作用机制, 奠定理论基础, 提供科学依据。与此同时, 本研究具有一定的局限性。比如网络药理学缺乏进一步的实验验证, 核心靶点仅通过数据库交集分析获得, 未在细胞或动物模型中验证这些靶点的实际表达水平变化, 无法排除数据库预测带来的假阳性靶点干扰。分子对接部分仅完成结构可视化展示, 未进行杜仲药物单体成分与靶点的结合验证, 未检测活性成分与核心靶点的结合亲和力, 后续需要进一步明确杜仲关键药效成分中单体对 AD 的作用效果。在动物实验模型存在局

限性, 采用东莨菪碱诱导的急性 AD 模型, 其病理机制为胆碱能神经系统损伤, 仅模拟了 AD 的认知障碍表型, 未涵盖临床 AD 的核心病理特征(如 A β 沉积、tau 蛋白过度磷酸化、神经炎症等), 模型代表性不全面。行为学检测指标相对单一, 仅通过新物体识别实验评估学习记忆能力, 缺乏 Morris 水迷宫、Y 迷宫等经典 AD 行为学评价体系, 难以全面反映认知功能改善效果。分子层面检测指标单一, 仅检测了神经元标志物 NeuN 的表达, 后续应该验证网络药理学预测的核心通路关键蛋白, 从而建立“成分-靶点-通路-表型”的作用机制信号调控通路。此外, 后续工作还需要对杜仲药物成分入血的药动学与安全性进行研究, 以明确活性成分透过血脑屏障发挥中枢作用, 评估杜仲长期给药的安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590.
- [2] Zhang Y, Chen H Q, Li R, et al. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: Challenges, successes and future [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 248.
- [3] Ossenkoppele R, van der Kant R, Hansson O. Tau biomarkers in Alzheimer's disease: Towards implementation in clinical practice and trials [J]. *Lancet Neurol*, 2022, 21(8): 726-734.
- [4] Bateman R J, Li Y, McDade E M, et al. Safety and efficacy of long-term gantenerumab treatment in dominantly inherited Alzheimer's disease: An open-label extension of the phase 2/3 multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled platform DIAN-TU trial [J]. *Lancet Neurol*, 2025, 24(4): 316-330.
- [5] Selkoe D J. Alzheimer's disease is a synaptic failure [J]. *Science*, 2002, 298(5594): 789-791.
- [6] Jucker M, Walker L C. Alzheimer's disease: From immunotherapy to immunoprevention [J]. *Cell*, 2023, 186(20): 4260-4270.
- [7] Long J M, Holtzman D M. Alzheimer disease: An update on pathobiology and treatment strategies [J]. *Cell*, 2019, 179(2): 312-339.
- [8] Chang C W, Shao E, Mucke L. Tau: Enabler of diverse brain disorders and target of rapidly evolving therapeutic strategies [J]. *Science*, 2021, 371(6532): eabb8255.
- [9] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 关于党参等 9 种新增按照传统既是食品又是中药材的物质公告 2023 年 第 9 号 [J]. *饮料工业*, 2023, 26(6): 3-4. National Health Commission, State Administration for Market Regulation. Announcement No.9, 2023 on 9 new substances, such as *Codonopsis pilosula*, which are traditionally both food and Chinese herbal medicines [J]. *Beverage Ind*, 2023, 26(6): 3-4.
- [10] 韩锐. 杜仲叶成分及其神经保护作用机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021. Han R. Components of *Eucommia ulmoides* Oliv. leaf and their mechanisms of neuroprotective effect [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021.
- [11] 张敏, 梁凤妮, 孙延文, 等. 杜仲化学成分、药理作用和临床应用研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(14): 4740-4761. Zhang M, Liang F N, Sun Y W, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Eucommia ulmoides* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(14): 4740-4761.
- [12] 张数, 刘向哲. 杜仲防治神经退行性疾病的机制研究进展 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4268-4275. Zhang S, Liu X Z. Research progress on mechanism of *Eucommiae Cortex* in prevention and treatment of neurodegenerative diseases [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(12): 4268-4275.
- [13] 董一霏, 刘玉昂, 涂心怡, 等. 基于“肾生髓通脑”探讨补肾法对骨(骨质疏松症)-脑(阿尔茨海默病)的同治研究 [J]. *中医药信息*, 2025, 42(12): 59-66, 76. Dong Y F, Liu Y A, Tu X Y, et al. Exploring the treatment of both bone(osteoporosis) and brain (Alzheimer's disease) with kidney-tonifying method based on the theory of “the kidney produces marrow and connects with the brain” [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2025, 42(12): 59-66, 76.
- [14] 刘国良, 赵晨琼, 蔡国梁, 等. 基于网络药理学和实验验证探究杜仲“异病同治”骨质疏松症和阿尔茨海默症的作用机制 [J]. *天然产物研究与开发*, 2025, 37(6): 1149-1159. Liu G L, Zhao C Q, Cai G L, et al. Mechanism of *Eucommia ulmoides* Oliv. in the “homotherapy for heteropathy” treatment of osteoporosis and Alzheimer's disease based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2025, 37(6): 1149-1159.
- [15] 左月明, 刘电航, 张忠立. 杜仲提取物对异质性及多因性阿尔茨海默病模型大鼠空间学习记忆的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(6): 1296-1298. Zuo Y M, Liu D H, Zhang Z L. Effect of extracts from *Eucommiae Cortex* on spatial learning memory in rat model of Heterogeneity/Multi-factors' Alzheimer's disease [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2015, 26(6): 1296-1298.
- [16] 丁其莹, 刘鑫源, 覃佳运, 等. 基于药理学分析巴戟天治疗阿尔茨海默病的机制 [J]. *食品工业科技*, 2024, 45(16): 36-46. Ding Q Y, Liu X Y, Qin J Y, et al. Pharmacological analyses of the mechanisms of *Morinda officinalis* how. in the

- treatment of Alzheimer's disease [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2024, 45(16): 36-46.
- [17] Kim M J, Kang J Y, Kim J M, et al. Effect of ethyl acetate fraction from *Eucommia ulmoides* leaves on PM2.5-induced inflammation and cognitive dysfunction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 7157444.
- [18] 高凡斯, 刘亚丹, 黄剑平, 等. 运动训练对血管性认知障碍大鼠记忆能力及海马突触可塑性的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2025, 40(5): 641-651.
- Gao F S, Liu Y D, Huang J P, et al. Effects of exercise training on memory capacity and synaptic plasticity in the hippocampus of rats with vascular cognitive impairment [J]. *Chin J Rehabil Med*, 2025, 40(5): 641-651.
- [19] 栾剑, 宋雨桐, 周婷婷, 等. 中西医药物治疗阿尔茨海默症的研究进展 [J]. *生物化工*, 2023, 9(6): 188-191.
- Luan J, Song Y T, Zhou T T, et al. Research progress of drugs and therapeutic strategies in the treatment of Alzheimer's disease in Chinese and western medicine [J]. *Biol Chem Eng*, 2023, 9(6): 188-191.
- [20] Lane C A, Hardy J, Schott J M. Alzheimer's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70.
- [21] Briggs R, Kennelly S P, O'Neill D. Drug treatments in Alzheimer's disease [J]. *Clin Med*, 2016, 16(3): 247-253.
- [22] 吴永继. 杜仲水提物对脂多糖诱导的小鼠神经炎症的保护作用及其机制研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2021.
- Wu Y J. Protective effect and mechanism of aqueous extract of *Eucommia ulmoides* Oliv. on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation in mice [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2021.
- [23] 胡凤成, 韩锐, 郭聪, 等. 杜仲叶化学成分及其神经保护活性研究 [J]. *林产化学与工业*, 2023, 43(3): 9-15.
- Hu F C, Han R, Guo C, et al. Chemical constituents of the leaves of *Eucommia ulmoides* and its neuroprotective activity [J]. *Chem Ind For Prod*, 2023, 43(3): 9-15.
- [24] Zhao Y K, Zhao W X, Chai X J, et al. Reshaping the gut microbiota: A novel opinion of *Eucommiae Cortex* polysaccharide alleviate learning and memory impairments in Alzheimer's disease [J]. *J Adv Res*, 2025: S2090-S1232(25)00269-3.
- [25] 赵永康, 赵文星, 柴学军, 等. 杜仲多糖对阿尔茨海默症小鼠脑组织神经炎症的改善作用 [J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2025, 53(7): 26-33.
- Zhao Y K, Zhao W X, Chai X J, et al. Ameliorative effect of *Eucommia Cortex* polysaccharides on neuroinflammation in the brain of Alzheimer's disease mice [J]. *J Northwest A F Univ Nat Sci Ed*, 2025, 53(7): 26-33.
- [26] 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.
- [27] Castillo C, Bravo-Arrepol G, Wendt A, et al. Neuroprotective properties of eudesmin on a cellular model of amyloid- β peptide toxicity [J]. *J Alzheimers Dis*, 2023, 94(s1): S97-S108.
- [28] Vorobyeva A G, Lee R, Miller S, et al. Cyclopamine modulates γ -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein by altering its subcellular trafficking and lysosomal degradation [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(48): 33258-33274.
- [29] Kang Y J, Seo D G, Park S Y. Phenylpropanoids from cinnamon bark reduced β -amyloid production by the inhibition of β -secretase in Chinese Hamster ovarian cells stably expressing amyloid precursor protein [J]. *Nutr Res*, 2016, 36(11): 1277-1284.
- [30] Kim J Y, Lim H J, Lee D Y, et al. *In vitro* anti-inflammatory activity of lignans isolated from *Magnolia fargesii* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19(3): 937-940.
- [31] 李月, 张莉莉, 赵灿, 等. ER β /JNK 通路介导的杜仲提取物对 APP/PS1 双转基因小鼠学习记忆能力的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(2): 285-293.
- Li Y, Zhang L L, Zhao C, et al. Effect of *Eucommiae Cortex* extract mediated by ER β /JNK pathway on learning and memory ability of APP/PS1 double-transgenic mice [J]. *China J Chin Mater Med*, 2025, 50(2): 285-293.
- [32] Olesen M A, Villavicencio-Tejo F, Johnson G V W, et al. Cyclophilin D (CypD) ablation prevents neurodegeneration and cognitive damage induced by Caspase-3 cleaved tau [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 232: 128-141.
- [33] Yang S X, Xie Z P, Pei T T, et al. Salidroside attenuates neuronal ferroptosis by activating the Nrf2/HO1 signaling pathway in A β (1-42)-induced Alzheimer's disease mice and glutamate-injured HT22 cells [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 82.
- [34] Aron L, Ngian Z K, Qiu C X, et al. Lithium deficiency and the onset of Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2025, 645(8081): 712-721.
- [35] Zhang T T, Wei W, Chang S R, et al. Integrated network pharmacology and comprehensive bioinformatics identifying the mechanisms and molecular targets of Yizhiqingxin Formula for treatment of comorbidity with Alzheimer's disease and depression [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 853375.

[责任编辑 齐静雯]