

基于 cAMP-Rap1-mTOR 通路探究金匱肾气丸调控 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞稳态的机制

肖圣男¹, 张佳¹, 徐磊¹, 孙芮芮¹, 杨丽霞¹, 秦劭晨², 陈茹¹, 贾璐¹, 樊慧杰¹, 柴智^{1*}

1. 山西中医药大学 帕金森病中西医结合防治重点实验室/神经生物学研究中心, 山西 晋中 030619

2. 山西省人民医院, 山西 太原 030012

摘要: **目的** 基于环磷酸腺苷-Ras 相关蛋白 1-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (cAMP-Rap1-mTOR) 信号通路探究金匱肾气丸 (JSP) 对 1-甲基-4-苯基吡啶鎓碘化物 (MPP⁺) 诱导人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 细胞稳态的调控机制。**方法** 运用网络药理学预测 JSP 治疗帕金森病 (PD) 的潜在作用靶点及通路; 采用 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞建立 PD 体外模型, 给予不同浓度 JSP 醇提物 (25、50、100、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 干预, 细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 法检测细胞活力并得到最佳给药浓度; 采用最佳给药浓度验证 JSP 的作用机制, ELISA 法检测 cAMP 含量, 流式细胞术检测细胞凋亡率, 丹酰戊二胺 (MDC) 染色观察自噬体形成, Western blotting 检测 cAMP-Rap1-mTOR 通路相关蛋白、凋亡相关蛋白及自噬相关蛋白的表达, 并加入 cAMP 通路抑制剂 ESI-09 进行验证。**结果** 网络药理学显示 cAMP-Rap1-mTOR 通路是 JSP 治疗 PD 的重要候选通路。体外实验表明, JSP 可显著提高 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞活力 ($P<0.001$), 升高 cAMP 含量 ($P<0.001$), 上调 cAMP 激活的交换蛋白 1 (Epac1)、Rap1 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.001), 下调 mTOR 蛋白表达 ($P<0.01$); 降低细胞凋亡率 ($P<0.001$), 下调 Bcl-2 相关蛋白 (Bax)、剪切型半胱天冬酶-3 (cleaved Caspase-3) 蛋白表达 ($P<0.01$), 上调 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 蛋白表达 ($P<0.01$); 增强自噬水平, 上调贝克蛋白 1 (Beclin1)、微管相关蛋白 3 $\beta/3\alpha$ (LC3B/LC3A) 蛋白表达 ($P<0.05$ 、 0.01), 下调泛素结合蛋白 (P62) 蛋白表达 ($P<0.001$)。加入 ESI-09 后可显著逆转 JSP 上述调控作用 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** JSP 可通过激活 cAMP-Rap1-mTOR 信号通路, 抑制细胞凋亡、促进细胞自噬, 恢复 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞稳态, 发挥神经保护作用。

关键词: 金匱肾气丸; 帕金森病; 环磷酸腺苷-Ras 相关蛋白 1-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (cAMP-Rap1-mTOR) 信号通路; 细胞凋亡; 细胞自噬

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)10-3591-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.10.016

Exploring mechanism of Jinkui Shenqi Pills regulating MPP⁺ induced SH-SY5Y cell homeostasis based on cAMP/Rap1/mTOR pathway

XIAO Shengnan¹, ZHANG Jia¹, XU Lei¹, SUN Ruirui¹, YANG Lixia¹, QIN Shaochen², CHEN Ru¹, JIA Lu¹, FAN Huijie¹, CHAI Zhi¹

1. Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Prevention and Treatment of Parkinson's Disease/Neurobiology Research Center, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012, China

Abstract: Objective To explore the regulatory mechanism of Jinkui Shenqi Pills (JSP) on cellular homeostasis of human neuroblastoma SH-SY5Y cells injured by 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺) via the cyclic adenosine monophosphate-Ras-related protein 1-mammalian target of rapamycin (cAMP-Rap1-mTOR) signaling pathway. **Methods** Network pharmacology was used to predict the potential therapeutic targets and pathways of JSP against Parkinson's disease (PD). An *in vitro* PD cell model was

收稿日期: 2026-06-11

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (85274609); 国家中医药管理局青年岐黄学者培养项目 (国中医药人教函〔2022〕256 号); 山西省青年拔尖人才支持计划项目 (晋组办字〔2019〕35 号文); 山西省中医药重点实验室建设专项 (zyyyjs2024022); 山西省中医药创新团队建设专项 (zyytd2024022); 山西省医学重点科研项目 (2023XM018)

作者简介: 肖圣男, 博士, 讲师, 从事中西医结合防治神经退行性疾病相关研究。E-mail: 869086406@qq.com

***通信作者:** 柴智, 博士生导师, 教授, 从事中西医结合防治神经退行性疾病相关研究。E-mail: chaizhi008@126.com

established by inducing SH-SY5Y cells with MPP⁺. The ethanol extract of JSP was prepared, and cells were intervened with JSP at different concentrations (25, 50, 100, 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was applied to detect cell viability and screen the optimal administration concentration. The optimal concentration was further adopted to verify the mechanism of JSP. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect cAMP content; flow cytometry was performed to determine cell apoptosis rate; Monodansylcadaverine (MDC) staining was used to observe autophagosome formation; Western blotting assay was adopted to detect the expression levels of proteins related to the cAMP-Rap1-mTOR pathway, apoptosis-related proteins and autophagy-related proteins. In addition, the cAMP pathway inhibitor ESI-09 was added for mechanistic verification. **Results** Network pharmacology results indicated that the cAMP-Rap1-mTOR signaling pathway was a key candidate pathway for JSP in the treatment of PD. *In vitro* assays showed that JSP significantly enhanced the viability of MPP⁺-injured SH-SY5Y cells ($P < 0.001$), increased cAMP content ($P < 0.001$), upregulated the protein expression of exchange protein directly activated by cAMP 1 (Epac1) and Rap1 ($P < 0.05$, and 0.001), and downregulated mTOR protein expression ($P < 0.01$). JSP reduced the cell apoptosis rate ($P < 0.001$), downregulated the expression of Bcl-2-associated X protein (Bax) and cleaved Caspase-3 ($P < 0.01$), and upregulated B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein expression ($P < 0.01$). Moreover, JSP elevated autophagy level, upregulated the protein expression of Beclin1 and microtubule-associated protein light chain 3B/3A (LC3B/LC3A) ($P < 0.05$ and 0.01), and downregulated sequestosome-1 (P62) protein expression ($P < 0.001$). Intervention with ESI-09 markedly reversed the above regulatory effects of JSP ($P < 0.05$, 0.01, and 0.001). **Conclusion** JSP can restore the homeostasis of MPP⁺-injured SH-SY5Y cells and exert neuroprotective effects by activating the cAMP-Rap1-mTOR signaling pathway, inhibiting cell apoptosis and promoting cell autophagy.

Key words: Jinkui Shenqi Pills; Parkinson's disease; cyclic adenosine monophosphate-ras-related protein 1-mammalian target of rapamycin (cAMP-Rap1-mTOR) signaling pathway; apoptosis; autophagy

《中国帕金森病报告 2025》指出, 当前我国帕金森病 (PD) 患者总人数超过 400 万, 有着数量最大的 PD 患者群体, 发病率高于全球平均水平, 加强 PD 防治工作刻不容缓^[1]. PD 的主要临床特点是静止性震颤、动作迟缓等。其发病机制复杂, 致病因素包括年龄、性别、环境以及遗传等^[2]. 传统治疗药物左旋多巴 (L-DOPA) 作为临床一线用药, 用于补充维持脑内多巴胺 (DA) 含量, 主要目的为缓解症状, 但长期用药不良反应频发, 难以从根本上解决 DA 能神经元的渐进性损失^[3]. 治疗手段的局限不断催生潜在药物和方式的尝试, 当前化学药物的开发陷入瓶颈, PD 治疗的目光逐步转向中药视角, 地黄引子、补中益气汤等经典方剂用于 PD 患者的辅助治疗, 效果良好, 这为 PD 的中医药开发提供新的方向^[4-6].

中医视角下, PD 属中医学“颤证”范畴,《素问·脉要精微论》:“骨者, 髓之府, 不能久立, 行则振掉, 骨将惫矣。”肾精不足则髓海空虚, 筋骨失养, 而成颤证, 肾精充足, 脑髓充养, 脑发育健全, 则能思维敏捷, 精力充沛^[7]. 由此, 补气补虚成为中医临床治疗 PD 的根本之法。金匱肾气丸 (JSP) 作为补肾经典名方, 首载于《金匱要略》, 该方中, 生地黄、山药、山茱萸等滋阴药补肾填精, 少佐桂枝、炮附子温肾助阳, 具有温补肾阳、助阳化气之功, 应对 PD 阳气亏虚的核心病机, 改善 PD 震颤

拘挛之症^[8].

现代医学中, PD 的病机涉及多种机制, 包括衰老、神经炎症、线粒体功能障碍等, 保护 DA 能神经元的损伤, 维持其稳态是 PD 治疗的核心目标^[9-10]. 细胞凋亡和自噬是细胞正常的生理机能, 但在 PD 病理情况下, 异常的神经元凋亡和自噬成为神经退行性疾病进展的关键因素^[11-12]. 在课题组前期研究中, JSP 通过激活溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) /谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 信号通路抑制铁死亡, 从而改善 PD 小鼠的运动障碍和 DA 能神经元损伤, 该作用在体内外模型中均得到验证。同样的, 在病证结合 PD 小鼠的治疗研究中, 得出 JSP 能有效发挥神经保护作用, 提出其在 PD 治疗中的潜在可行性^[13-14]. 然而, JSP 如何发挥 DA 能神经元保护作用, 进而缓解 PD 症状的作用机制尚未明晰。因此, 结合中医视角和现代药理学研究手段, 通过网络药理学及分子生物学的实验方法, 阐述 JSP 维持 DA 能神经元稳态的作用机制, 为其临床应用 PD 治疗提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y), 购于武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号 CL-0208。

1.2 药物与主要试剂

JSP (北京同仁堂有限责任公司, 批号

24031477); 胎牛血清 (FBS, 北京赛澳美细胞技术有限公司, 批号 SA211.03H); 胰蛋白酶、青霉素-链霉素混合液、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (大连美仑生物技术有限公司, 批号 MA0232、MA0110、MA0334); 杜氏改良老鹰培养基 (DMEM) (武汉博士德生物工程有限公司, 批号 PYG0073); 细胞裂解液、10%PAGE 彩色凝胶快速配制试剂盒、BCA 蛋白定量检测试剂盒、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 CR2305131、2601F041、2509F047、2601F046); 山羊抗兔免疫球蛋白 IgG (H+L) 辣根过氧化物 (HRP)、 β -肌动蛋白 (β -actin) (北京安诺伦生物科技有限公司, 批号 ZJ2020-R、AP0060); 环磷酸腺苷 (cAMP) 激活的交换蛋白 1 (Epac1) 重组单克隆抗体、Ras 相关蛋白 1 (Rap1) 重组单克隆抗体、泛素结合蛋白 (p62) 重组单克隆抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3 β (LC3B) (上海艾博抗贸易有限公司, 批号 Ab109415、Ab272863、Ab109012、Ab48394); 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 重组单克隆抗体、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 重组单克隆抗体、Bcl-2 相关蛋白 (Bax) 重组单克隆抗体、剪切型半胱天冬酶 3 (cleaved Caspase-3) 重组单克隆抗体 (上海赛信通生物试剂有限公司, 批号 2983、3498、14796、9444); 1-甲基-4-苯基吡啶鎓碘化物 (MPP⁺) (上海西格玛奥德里奇贸易有限公司, 批号 D048); 细胞计数试剂盒-8 (CKK-8)、细胞自噬染色检测试剂盒 (MDC 法) (上海碧云天生物科技股份有限公司, 批号 C0037、C3018S); cAMP 通路抑制剂 ESI-09 (美迪凯生物医药科技有限公司, 批号 HY-16704); 人 cAMP 酶联免疫吸附测定试剂盒 (ELISA) (上海江莱生物科技有限公司, 批号 JL13253)。

1.3 主要仪器

CLM-170B-8-CN 二氧化碳培养箱 (太仓艺斯高医疗器械科技有限公司); BSC-1680A2 生物安全柜 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); CKX53 倒置显微镜 (中国奥林巴斯有限公司); EX125DZH 型电子天平 (常州奥豪斯仪器有限公司); Multiskan SkyHigh 全波长酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); MiniPROTEAN®Tetra 型电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); KDC-140HR 高速冷冻离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); TS-8 脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); Tanon-5200 Multi 型全自动化学发光图像分析系统 (上海天能科技有限公

司); CytoFLEX S 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); DM4000B 荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 药液配制

研磨 JSP 后, 过 40 目筛得药粉。取药粉 0.2 g 置于离心管中, 加入 70%乙醇 5 mL, 超声 (40 kHz, 100 W) 提取 20 min 后, 6 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 吸取上清液减压蒸发至浸膏。取浸膏加入 4 mL 培养基, 均匀溶解, 得到 50 mg·mL⁻¹ JSP 干预液, 经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过除菌, 于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 网络药理学研究

本研究基于中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.w.com/index.php>) 检索 JSP 组方药材 (生地黄、山药、山茱萸、茯苓、牡丹皮、泽泻、桂枝、附子) 的活性成分。设定口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为核心参数标准; 将得到的 JSP 生物活性成分数据, 通过 TCMSP 平台寻找其相关的潜在靶点, 利用 UniPort 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 获取各活性成分靶标蛋白对应的人类基因, 结合 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 SwissTarget Prediction 分析平台 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 加以补充; 通过 Gencards 数据库 (<http://www.genecards.org/>), 以 “Parkinson’s Disease” 为关键词检索, 收集相关疾病靶点; 将筛选得到的活性成分、疾病靶点依次导入 Cytoscape 软件 (<http://www.cytoscape.org/>), 构建 “药物-活性成分-靶点” 图; 通过在线 Venny (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 进行靶点对比, 筛选出 JSP 与 PD 的共同作用靶点。并将得到的靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org>), 进行蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 分析, 通过 Cytoscape 软件中进行可视化分析, 构建 PPI 网络, 筛选核心靶点; 运用 R 3.6.2 软件及 Bioconductor 的 org.Hs.eg.db、colorspace、stringi、DOSE、cluster Profile、pathview、ggplot2 和 limma 等程序包, 选择 “Homo sapiens” 对 JSP 防治 PD 的核心靶点进行基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。

2.3 细胞培养

SH-SY5Y 细胞株, 培养于含有 10% FBS、1% 青霉素-链霉素混合液的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱中, 传代培养至对数生长期

用于后续实验。

2.4 CCK-8 法检测不同浓度 JSP 溶液对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞活力的影响

将对数生长期 SH-SY5Y 细胞均匀接种于 96 孔板中 (每孔 1.5×10^4 个), 设置对照组、模型组、JSP 不同质量浓度 (25、50、100、200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组, 除对照组外, 各组加入 MPP⁺ ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 造模, 造模同时, JSP 不同浓度给药组共同处理细胞, 培养 24 h, 空白组不接种细胞。每个孔中加入 CCK-8 溶液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.5 ELISA 法测定 cAMP 含量

将对数生长期 SH-SY5Y 细胞均匀接种于 24 孔板中 (每孔 2.5×10^4 个), 设置对照组、模型组、JSP ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组、JSP ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) + ESI-09 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组。除对照组外, 各组加入 MPP⁺ ($3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 造模, 造模同时, 给药组共同处理细胞, 培养 24 h。收集每组细胞, 加入裂解液后离心收集细胞裂解上清液。严格按照试剂盒说明书要求完成操作, 使用酶标仪在 450 nm 处测量 A , 计算 cAMP 含量。实验重复 3 次。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

细胞接种、分组、给药方法同“2.5”项, 收集各组细胞, 缓冲液清洗 3 次, 每次 $1000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min 后除去上清液。每组细胞中分别加入 500 μL 结合缓冲液、5 μL 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素 (Annexin V-FITC)、5 μL 碘化丙啶 (PI), 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 流式细胞仪检测 Annexin V-FITC 和 PI 染色细胞比例, 计算凋亡率。其中, 第 2 象限代表晚期凋亡率, 第 4 象限代表早期凋亡率, 2 个象限之和得到该组凋亡率。实验重复 3 次。

2.7 细胞中自噬体含量检测

按照丹酰戊二胺/碘化丙啶 (MDC/PI) 检测试剂盒的说明进行操作, 制备 MDC/PI 染色溶液并按比例稀释。细胞接种、分组、给药方法同“2.5”项, 取出培养基后, 1 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 1 次, 加入 1 mL MDC/PI 染色液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下黑暗孵育 30 min 后缓冲液清洗 3 次, 加入 1 mL 缓冲液置于倒置荧光显微镜, 观察绿色和红色荧光, 拍照并分析不同组之间的差异。

2.8 Western blotting 检测细胞中相关蛋白表达水平

细胞接种、分组、给药方法同“2.5”项, 收

集各组细胞。细胞裂解液用于提取细胞总蛋白, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液, 加入蛋白酶抑制剂。蛋白定量法 (BCA) 检测各组蛋白总浓度, 计算上样体积。制备十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE), 经电泳、转膜、封闭后, 加入一抗 (1:1000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗 (1:5000) 孵育 1 h 后加入化学发光液置于全自动化学发光图像分析系统, 收集图像, 计算蛋白条带灰度值。

2.9 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8 软件, 使用单因素方差分析进行组间统计比较, 然后进行 Tukey 后检验。数据以独立进行的 3 次重复实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 网络药理学研究

通过 TCMSP 数据库对 JSP 及各单味药 (生地黄、山药、山茱萸、茯苓、牡丹皮、泽泻、桂枝、附子) 的主要化学成分进行筛选。最后筛选出 68 个潜在的生物活性成分, 活性成分具体分布如下: 生地黄 (2)、山药 (10)、山茱萸 (15)、茯苓 (14)、牡丹皮 (5)、泽泻 (6)、桂枝 (1)、附子 (15) (补充材料-表 S1), 上述活性成分共涉及 369 个潜在靶点 (补充材料-表 S2)。

PD 疾病靶点的搜索中, 通过对 GeneCards 和 OMIM 数据库的检索和整合, 共获得 1892 个无重复 PD 靶点。对“疾病与活性成分”二者靶点取交集, 共得 140 个 JSP 治疗 PD 的潜在作用靶点 (图 1)。

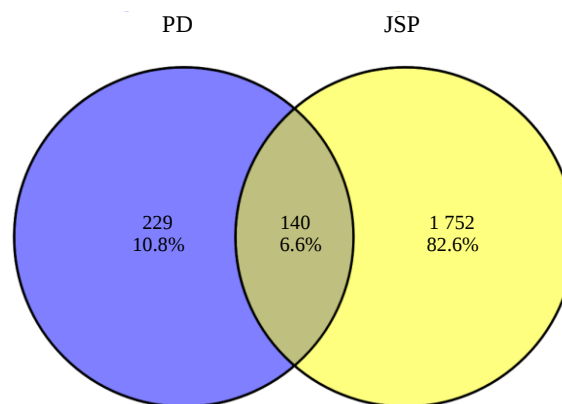


图 1 JSP 和 PD 靶点的 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of JSP and PD targets

将 140 个潜在交集靶点和 68 个活性成分删除重复数据后导入到 Cytoscape3.7.2 (<http://www.cytoscape.org/>) 构建 JSP 活性成分-潜在靶点网络, JSP 中活性成分-靶点网络图共有 140 个节点, 498

条边。继续分析并按度值由大到小排序,得到 JSP 活性成分-靶点网络图(补充材料-图 S1)。将 140 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库,并选择“人”作为物种,获得 PPI 图(补充材料-图 S2)。将生成的

互作关系整合至 Cytoscape 软件中,构建 PPI 分析网络。该网络涵盖 139 个蛋白节点及 3 108 条相互作用的边。节点大小与 degree 值呈正相关分布,并列出 degree 值排名前 20 的潜在作用靶点(表 1)。

表 1 PPI 网络图中 degree 值排名前 20 的潜在靶点

Table 1 Potential targets ranked in top 20 degree values in PPI network graph

序号	靶点	Degree	介数中心性	序号	靶点	Degree	介数中心性
1	TNF	75	0.079 099 519	11	PPARG	56	0.053 585 563
2	TP53	70	0.057 643 302	12	HIF1A	54	0.010 492 965
3	CASP3	68	0.039 480 125	13	PTGS2	52	0.015 657 654
4	VEGFA	66	0.033 430 622	14	ERBB2	51	0.013 841 912
5	EGFR	64	0.033 164 244	15	MAPK1	47	0.018 836 569
6	MAPK3	63	0.028 765 562	16	APP	45	0.027 701 585
7	SRC	62	0.031 501 482	17	SIRT1	43	0.013 644 307
8	HSP90AA1	57	0.029 841 429	18	GSK3B	40	0.009 002 223
9	MTOR	56	0.011 600 190	19	FGF2	40	0.007 580 289
10	ESR1	56	0.028 745 726	20	AR	39	0.013 994 076

GO 功能分析结果显示,分子功能(MF)分类主要包括蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、作为受体的醇基、激酶结合等;生物过程(BP)分类主要包括氮化合物的细胞反应、有机氮化合物的细胞反应、行为等;细胞组分(CC)分类主要膜筏、膜微区、树突树、树突等(补充材料-图 S3~S5)。KEGG 通路分析结果

显示, Rap1 信号通路被显著富集,且 Rap1 信号通路在 JSP 治疗 PD 过程中可能会发挥重要作用(图 2)。由 PPI 分析(表 1)可知, mTOR 与 PD 同样存在密切关系,而 cAMP-Rap1 信号通路是 mTOR 的上游调控因子^[15],因此,将 cAMP-Rap1/mTOR 通路作为后续实验的验证通路。

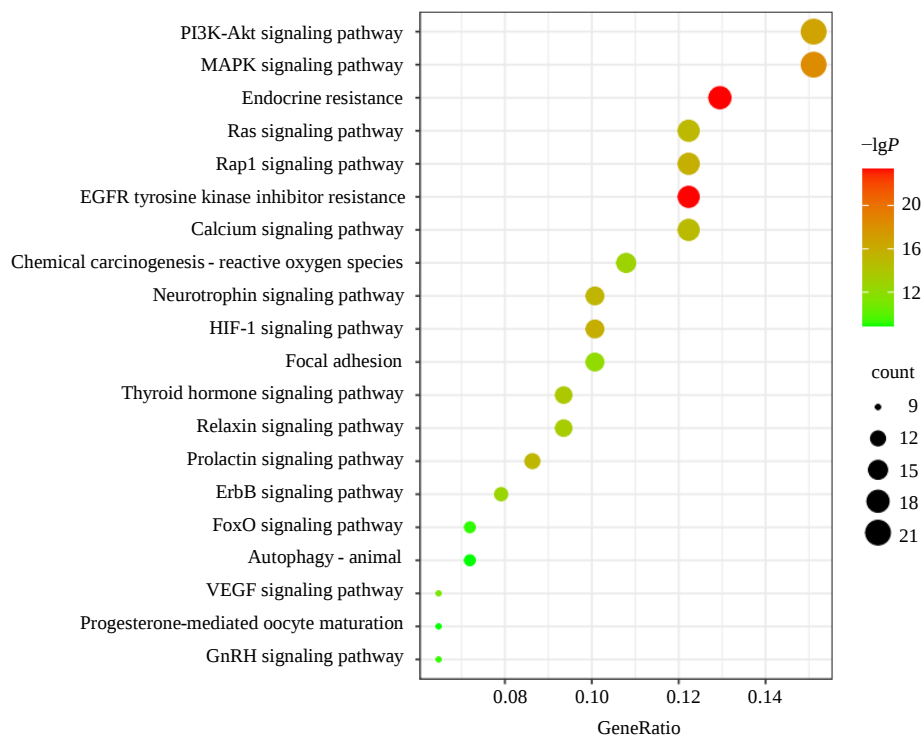


图 2 KEGG 通路富集分析

Fig. 2 KEGG pathway enrichment analysis

3.2 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞活力的影响

与对照组比较,模型组细胞活力显著下降 ($P<0.01$);与模型组比较,JSP 给药干预后,细胞活力均有不同程度提高,JSP 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组活性最高 ($P<0.001$),后续以 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为给药浓度完成机制探究。见表 2。

表 2 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of JSP on MPP ⁺ -induced SH-SY5Y cell viability ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	细胞存活率/%
对照	—	100.36 $\pm$ 0.06
模型	—	78.26 $\pm$ 0.08 ^{##}
JSP	25	82.39 $\pm$ 0.24
	50	105.33 $\pm$ 0.11 ^{***}
	100	99.74 $\pm$ 0.07 ^{**}
	200	81.48 $\pm$ 0.12

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$;与模型组比较: ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ 。
^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group.

3.3 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞中 cAMP 含量的影响

cAMP 的含量直接影响下游信号通路的调控作用。与对照组比较,模型组中 cAMP 含量显著下降 ($P<0.001$),经 JSP 给药处理后较模型组出现明显的回调 ($P<0.001$),说明 JSP 能够有效改善细胞内 cAMP 水平。见表 3。

3.4 JSP 对 Rap1/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响

Epac 作为 cAMP 的直接激活蛋白,进而激活 Rap1 蛋白。与对照组比较,模型组 Epac 和 Rap1 表

达量显著下降 ($P<0.01$),mTOR 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,JSP 给药后,Epac 和 Rap1 蛋白表达明显上调 ($P<0.05$ 、 0.001),mTOR 蛋白表达量降低 ($P<0.01$);引入 cAMP 通路抑制剂 ESI-09 后,能够有效逆转 JSP 对蛋白的调控作用,与 JSP 组比较,Epac 和 Rap1 蛋白的表达显著抑制 ($P<0.05$ 、 0.01),mTOR 蛋白表达回调 ($P<0.01$)。见图 3、表 4。

表 3 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞中 cAMP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of JSP on cAMP content in SH-SY5Y cells induced by MPP ⁺ ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	cAMP/ $(\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1})$
对照	—	82.33 $\pm$ 2.68
模型	—	40.19 $\pm$ 3.07 ^{###}
JSP	50	75.49 $\pm$ 1.56 ^{***}

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.

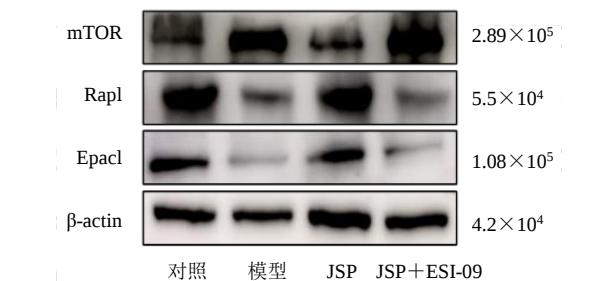


图 3 JSP 对 Rap1/mTOR 信号通路相关蛋白表达的调控作用

Fig. 3 Regulatory effect of JSP on expression of Rap1/mTOR signaling pathway related proteins

表 4 JSP 对 Rap1/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of JSP on Rap1/mTOR signaling pathway related protein expression ($\bar{x} \pm s, n=3$)					
组别	浓度	mTOR/ β -actin	Rap1/ β -actin	Epac/ β -actin	
对照	—	0.41 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.06	1.26 $\pm$ 0.14	
模型	—	0.92 $\pm$ 0.03 ^{##}	0.46 $\pm$ 0.13 ^{##}	0.41 $\pm$ 0.10 ^{##}	
JSP	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.43 $\pm$ 0.06 ^{**}	1.18 $\pm$ 0.16 ^{***}	0.97 $\pm$ 0.11 [*]	
JSP+ESI-09	50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.90 $\pm$ 0.11 ^{△△}	0.48 $\pm$ 0.12 ^{△△}	0.43 $\pm$ 0.05 [△]	

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$;与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$;与 JSP 组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ 。
^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group; [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ vs JSP group.

3.5 JSP 对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组细胞凋亡率显著上升 ($P<0.001$);经 JSP 干预给药后,与模型组相比,

细胞凋亡率明显下降 ($P<0.001$);与 JSP 组相比,ESI-09 组能够有效逆转 JSP 对细胞的保护作用 ($P<0.001$)。说明 JSP 能够通过 cAMP-Rap1/mTOR 信号通路改善细胞凋亡。见图 4、表 5。

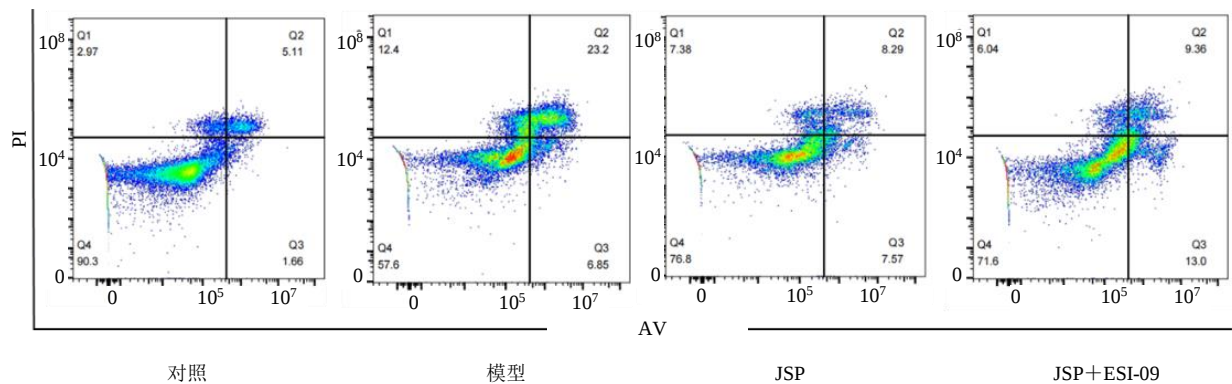


图 4 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡率流式细胞实验 (Annexin V-FITC/PI 染色)

Fig. 4 Flow cytometry experiment of apoptosis rate in SH-SY5Y cells induced by MPP⁺ (Annexin V-FITC/PI staining)

表 5 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞凋亡率的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of JSP on MPP⁺- induced apoptosis rate of SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	凋亡率/%
对照	—	6.77±1.25
模型	—	30.05±1.77 ^{###}
JSP	50 μg·mL ⁻¹	15.86±1.04 ^{***}
JSP+ESI-09	50 μg·mL ⁻¹ +20 μmol·L ⁻¹	22.36±1.38 ^{△△△}

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P<0.001$; 与 JSP 组比较: ^{△△△} $P<0.001$ 。

^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{***} $P<0.001$ vs model group; ^{△△△} $P<0.001$ vs JSP group.

3.6 JSP 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响

如图 5、表 6 所示, 与对照组比较, 模型组中 Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达量显著增加 ($P<0.05$ 、 0.01), Bcl-2 蛋白水平明显下调 ($P<0.05$);

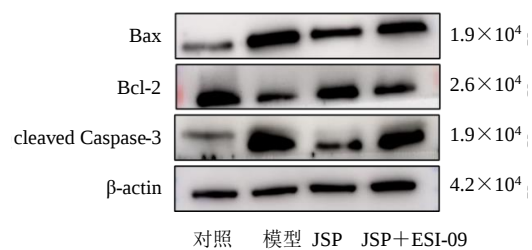


图 5 JSP 对细胞凋亡相关蛋白表达的调控作用

Fig. 5 Regulatory effect of JSP on expression of apoptosis related proteins

与模型组比较, JSP 给药干预后, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白水平显著降低 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达增加 ($P<0.01$); 与 JSP 组比较, ESI-09 干预后, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达明显增加 ($P<0.05$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白水平明显降低 ($P<0.05$)。

表 6 JSP 对细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 6 Effect of JSP on expression of apoptosis related proteins ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin	cleaved Caspase 3/β-actin
对照	—	0.59±0.07	1.20±0.15	0.48±0.14
模型	—	1.32±0.21 ^{##}	0.52±0.08 [#]	0.82±0.09 [#]
JSP	50 μg·mL ⁻¹	0.62±0.28 ^{**}	1.42±0.24 ^{**}	0.37±0.10 ^{**}
JSP+ESI-09	50 μg·mL ⁻¹ +20 μmol·L ⁻¹	1.15±0.11 [△]	0.61±0.13 [△]	1.05±0.15 ^{△△△}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$; 与 JSP 组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△△} $P<0.001$ 。

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group; [△] $P<0.05$ ^{△△△} $P<0.001$ vs JSP group.

3.7 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞自噬的影响

与对照组比较, 模型组自噬体显著减少 ($P<0.001$), 说明 MPP⁺诱导后抑制 SH-SY5Y 细胞自噬水平; 与模型组比较, JSP 干预后, 自噬体含量明显增加 ($P<0.001$); 与 JSP 比较, ESI-09 能够有效

逆转 JSP 对细胞自噬水平的调节 ($P<0.001$)。见图 6、表 7。

3.8 JSP 对细胞自噬相关蛋白表达的影响

如图 7、表 8 所示, 与对照组比较, 模型组 Beclin1、LC3B/A 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 、 0.01),

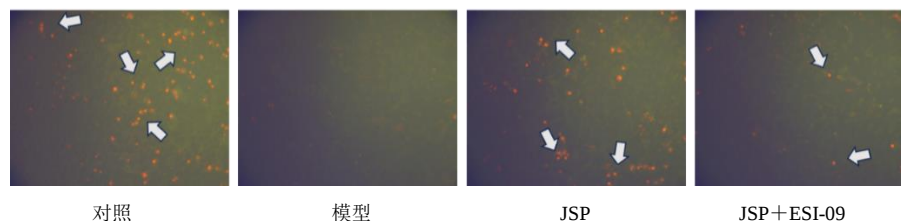


图 6 JSP 调控 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞自噬 (×100)

Fig. 6 JSP regulates MPP⁺ induced autophagy in SH-SY5Y cells (×100)

表 7 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞自噬的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Effect of JSP on MPP⁺ induced autophagy in SH-SY5Y cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	相对荧光强度/%
对照	—	1.05±0.13
模型	—	0.34±0.10 ^{###}
JSP	50 μg·mL ⁻¹	0.87±0.14 ^{***}
JSP+ESI-09	50 μg·mL ⁻¹ +20 μmol·L ⁻¹	0.46±0.11 ^{△△△}

与对照组比较: ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{***} $P<0.001$; 与 JSP 组比较: ^{△△△} $P<0.001$ 。

^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{***} $P<0.001$ vs model group; ^{△△△} $P<0.001$ vs JSP group.

表 8 JSP 对细胞自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Effect of JSP on expression of autophagy related proteins in cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	Beclin1/β-actin	P62/β-actin	LC3B/LC3A
对照	—	1.18±0.25	0.40±0.03	1.06±0.11
模型	—	0.46±0.07 [#]	1.25±0.24 ^{###}	0.43±0.09 [#]
JSP	50 μg·mL ⁻¹	1.04±0.05 [*]	0.18±0.02 ^{***}	1.14±0.24 ^{**}
JSP+ESI-09	50 μg·mL ⁻¹ +20 μmol·L ⁻¹	0.46±0.11 [△]	0.75±0.08 ^{△△}	0.22±0.07 ^{△△△}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$ ^{####} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$; 与 JSP 组比较: [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ ^{△△△} $P<0.001$ 。

[#] $P<0.05$ ^{###} $P<0.01$ ^{####} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group; [△] $P<0.05$ ^{△△} $P<0.01$ ^{△△△} $P<0.001$ vs JSP group.

P62 蛋白表达升高 ($P<0.001$); 与模型组相比, JSP 组中 Beclin1、LC3B/LC3A 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 、0.01), P62 蛋白表达降低 ($P<0.001$); 与 JSP 组相比, JSP+ESI-09 组 Beclin1、LC3B/LC3A 蛋白表达降低 ($P<0.05$ 、0.001), P62 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。

4 讨论

中医理论将 PD 病机归于“肾虚髓亏、筋脉失养”, JSP 作为温补肾阳的经典名方, 前期研究已证实其对 PD 小鼠具有神经保护作用, 但介导该保护效应的关键分子网络尚不明确。本研究结合网络药理学与体外实验, 进一步探究其在神经保护方面的作用机制。

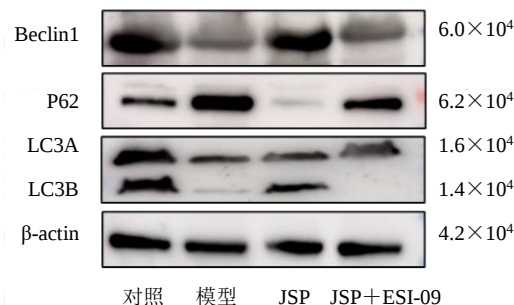


图 7 JSP 对细胞自噬相关蛋白表达的调控作用

Fig. 7 Regulatory effect of JSP on expression of autophagy related proteins in cells

从药效成分的数据挖掘出发, 基于网络药理学分析 JSP 中的药效成分, 并与 PD 的病机靶点建立互作关系, 分析潜在病理机制路径。最终, KEGG 分析显示, Rap1 信号通路被显著富集; 同样, 在靶点探索中, mTOR 作为药效与疾病中的关键靶点被筛选出来。cAMP-Rap1 信号通路是 mTOR 的上游调控因子, cAMP 作为一种信号信使, 结合下游效应子 Epac, 调节 Rap1 的激活, 影响 mTOR 的传导^[6]。这一调控机制使得 cAMP-Rap1 在细胞能量代谢、自噬等细胞活动中发挥关键作用。异常时, cAMP-Rap1-mTOR 信号网络能够调控线粒体功能障碍和异常蛋白聚集, 进而导致疾病的发生。

由此,围绕筛选得到的 cAMP-Rap1-mTOR 信号通路开展验证实验。采用 PD 体外细胞模型(MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞),发现不同浓度的 JSP 提取液能够有效改善 MPP⁺造成的细胞损伤,细胞活力显著提升。在机制层面上得出,JSP 能够有效调控 cAMP 在细胞中的含量,进而改善 Epac1、Rap1 和 mTOR 的表达。此外,本研究增加 cAMP 通路抑制剂 ESI-09,结果显示,ESI-09 能够逆转 JSP 对细胞的保护作用,更印证 JSP 通过 cAMP-Rap1-mTOR 信号通路发挥药效作用。进一步的,mTOR 可以调节细胞增殖、自噬和细胞凋亡^[17],由此,本研究围绕细胞自噬和细胞凋亡展开表型实验和相关蛋白检测。凋亡结果显示,JSP 抑制 Bax 蛋白表达,上调 Bcl-2 蛋白水平,进而改善 Caspase 级联反应,最终缓解 MPP⁺造成的凋亡水平提升,有效保护细胞的正常状态;细胞自噬结果显示,MPP⁺能够抑制细胞正常自噬水平,使难以维持自身正常活动,JSP 给药干预后,能够促进 LC3B 蛋白水平表达,增加 Beclin1 蛋白表达量,从而提升自噬小体出现,恢复正常的细胞调节自噬水平。同样的,在 ESI-09 干预下,JSP 恢复的细胞凋亡和自噬水平均出现不同程度的逆转,体现出 cAMP-Rap1-mTOR 信号通路在 JSP 药效活性中的重要作用。

本研究尚存在一定局限性。以当前的工作广度和深度,还需进一步挖掘。在本研究的网络药理学中,得出的 68 个生物活性成分,同样存在一定的误差和不确定性,神经退行性疾病最大的用药瓶颈即为血脑屏障,药物通过口服吸收,进入血液循环,最终透过血脑屏障的含量较低,在筛选得到的 68 种成分中,虽然小分子居多,但能否在大脑中检测得到,需通过体内水平进一步验证,这也是深入解析 JSP 入脑成分的必经之路。此外,JSP 作为中药复方,以 8 味药组合而成,其中药效成分网络庞大,甚至不同分子间会形成不同相态、不同结合以及不同形式等发挥药效作用,这同样是中医药多靶点的具体体现;在机制水平中,mTOR 作为细胞代谢和自噬的核心调控枢纽,其活性变化必然影响下游多种效应分子。本研究中 JSP 诱导的 mTOR 表达下调,很可能削弱 Unc-51 样自噬激活激酶 1 (ULK1) 的抑制作用,释放激酶活性,启动自噬核心复合物的组装。mTOR 下游的效应分子在调节蛋白翻译和神经元存活中同样发挥关键作用,其是否参与 JSP 介导的抗凋亡及神经保护效应,值得后续深入探

究。由此,仍需要拓展研究范围,由点及面,不断描绘和丰富 JSP 治疗 PD 的药理学网络。

本研究证实 JSP 对 MPP⁺诱导 SH-SY5Y 细胞模型具有神经保护作用,可以调节 cAMP-Rap1-mTOR 通路促进自噬,抑制凋亡,调节自噬和凋亡的动态平衡,减少 DA 能神经元的损伤。为 JSP 应用于 PD 的中医临床治疗提供参考,进而推动 JSP 的临床应用和新适应证的开发。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王刚,徐刚,谢心怡,等.中国帕金森病报告 2025 [J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2025, 21(2): 63-98.
Wang G, Xu G, Xie X Y, et al. China Parkinson's disease report, 2025 [J]. J Neurol Neurorehabilit, 2025, 21(2): 63-98.
- [2] Morris H R, Spillantini M G, Sue C M, et al. The pathogenesis of Parkinson's disease [J]. Lancet, 2024, 403(10423): 293-304.
- [3] Jost S T, Kaldenbach M A, Antonini A, et al. Levodopa dose equivalency in Parkinson's disease: Updated systematic review and proposals [J]. Mov Disord, 2023, 38(7): 1236-1252.
- [4] Qu Q, Tong Y F, Li Y, et al. A novel network pharmacology strategy for retrieving a key functional component group and mechanisms in the di-Huang-Yin-zi treatment of Parkinson's disease [J]. Curr Neuroparmacol, 2025, 23. <https://www.eurekaselect.com/article/150898>.
- [5] 马强,杨仁义,欧阳心怡,等.补中益气汤联合多潘立酮对帕金森病胃排空延迟脾胃虚弱证患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2021, 43(10): 2685-2689.
Ma Q, Yang R Y, Ouyang X Y, et al. Clinical effects of Buzhong Yiqi Decoction combined with domperidone on patients with Parkinson's disease and delayed gastric emptying due to Spleen and Stomach Weakness [J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(10): 2685-2689.
- [6] 薛慧铭,冯真,金畅,等.白芍总苷对 MPTP 致帕金森病小鼠的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1266-1276.
Xue H M, Feng Z, Jin C, et al. Mechanism of total glucosides in *Paeoniae Radix Alba* on MPTP induced Parkinson's disease in mice [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(4): 1266-1276.
- [7] 付新钰,刘源香.中西医治疗帕金森病研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2025, 23(2): 157-159.
Fu X Y, Liu Y X. Research progress of traditional Chinese and western medicine in the treatment of Parkinson's disease [J]. Chin Med Mod Distance Educ China, 2025,

- 23(2): 157-159.
- [8] 李焕, 司亚栋, 张鼎, 等. 帕金森病平衡与步态功能障碍患者中医证候分布特征及相关性研究 [J]. 中华中医药杂志, 2025, 40(6): 3184-3188.
- Li H, Si Y D, Zhang D, et al. Study on the distribution characteristics and correlation of traditional Chinese medicine syndromes in patients with balance and gait dysfunction due to Parkinson's disease [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2025, 40(6): 3184-3188.
- [9] Wang S X, Jiang S, Wu J, et al. Trends in Parkinson's disease mortality in China from 2004 to 2021: A joinpoint analysis [J]. BMC Public Health, 2024, 24(1): 1091.
- [10] Prajwal P, Flores Sanga H S, Acharya K, et al. Parkinson's disease updates: Addressing the pathophysiology, risk factors, genetics, diagnosis, along with the medical and surgical treatment [J]. Ann Med Surg, 2023, 85(10): 4887-4902.
- [11] Lei T, Fu G S, Xue X, et al. Tianma Gouteng Decoction improve neuronal synaptic plasticity and oligodendrocyte apoptosis in Parkinson's disease mice [J]. Phytomedicine, 2025, 140: 156553.
- [12] Hussain M S, Moglad E, Afzal M, et al. Autophagy-associated non-coding RNAs: Unraveling their impact on Parkinson's disease pathogenesis [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(5): e14763.
- [13] 郇鹏飞, 何竹青, 王利, 等. 病证结合帕金森病小鼠模型的构建及中医证候属性研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2022, 36(2): 36-42.
- Huan P F, He Z Q, Wang L, et al. Establishment of combination of disease with syndrome mouse model with Parkinson's disease and study on the attributes of TCM syndrome [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2022, 36(2): 36-42.
- [14] 张佳, 牛思翔, 徐磊, 等. 基于 SLC7A11/GPX4 通路探讨金匱肾气丸对帕金森病铁死亡的影响 [J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2026, 28(2): 493-503.
- Zhang J, Niu S X, Xu L, et al. Effect of Jingui Shenqi pill on ferroptosis in Parkinson's disease based on SLC7A11/GPX4 pathway [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2026, 28(2): 493-503.
- [15] Kim Y D, Park H G, Song S, et al. Presynaptic structural and functional plasticity are coupled by convergent Rap1 signaling [J]. J Cell Biol, 2024, 223(7): e202309095.
- [16] Zhang H Y, Liu Y L, Liu J Y, et al. cAMP-PKA/EPAC signaling and cancer: The interplay in tumor microenvironment [J]. J Hematol Oncol, 2024, 17(1): 5.
- [17] Zou Z L, Tao T, Li H M, et al. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges [J]. Cell Biosci, 2020, 10: 31.

[责任编辑 兰新新]