

基于网络药理学和实验验证探讨知母盐制后治疗糖尿病认知障碍的增效机制

田书青^{1,2,3}, 王晓婷^{1,2,3,4}, 裴琳秀^{1,2,3}, 王雅竹^{1,2,3}, 高 慧^{1,2,3*}

1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600

2. 国家中医药管理局中药炮制技术传承基地(辽宁), 辽宁 大连 116600

3. 辽宁省中药炮制专业技术创新中心, 辽宁 大连 116600

4. 辽宁中医药大学第一临床学院, 辽宁 沈阳 110847

摘要: **目的** 基于网络药理学和实验验证探讨知母 *Anemarrhenae Rhizoma* 盐制后治疗糖尿病认知障碍 (diabetes cognitive impairment, DCI) 的增效机制, 为阐释盐知母炮制增效的科学内涵、临床合理用药提供科学依据。 **方法** 中药系统药理学数据库分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 联合课题组前期化学成分分析研究结果获得知母中主要活性成分, 采用 Swiss Target Prediction 数据库预测成分的潜在靶点, 从人类基因数据库 (Gene cards) 和在线人类孟德尔遗传数据库 (online Mendelian Inheritance in man, OMIM) 的 Genemap 获得 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 和阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 疾病的相关靶点, 利用 Venny 数据库获取成分与疾病的交集靶点, 并通过 STRING 数据库和 Cytoscape 3.8.2 软件分析并构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络。借助 Metascape 平台进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 利用 Cytoscape 3.8.2 构建“成分-靶点-通路”网络。采用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导糖尿病大鼠模型, 造模成功后, 随机选取 48 只分为模型组、生知母皂苷组 (176.4 mg/kg)、盐知母皂苷组 (176.4 mg/kg)、生知母组 (2.52 g/kg)、盐知母组 (2.52 g/kg) 和吡拉西坦 (500 mg/kg) 组, 每组 8 只, 另取 8 只生理状态大鼠作为对照组, 除对照组外, 其余各给药组每日上午 ig 三氯化铝 (aluminum chloride, AlCl₃, 500 mg/kg), 构建糖尿病认知障碍 (diabetes cognitive impairment, DCI) 模型, 各给药组每日下午 ig 给药 (10 mL/kg), 对照组、模型组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 连续 4 周。观察各组大鼠毛发的变化情况、测定大鼠体质量和血糖; 采用 Morris 水迷宫法检测大鼠的认知能力; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin eosin, HE) 染色观察脑组织海马区病理变化; 采用 ELISA 法检测大鼠脑组织中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 炎症因子的水平, 采用实时荧光定量聚合酶链式扩增反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、Western blotting 法检测大鼠脑组织中 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)、TNF- α mRNA 和蛋白的表达。 **结果** 共筛选出知母活性成分潜在作用靶点 120 个, 知母与疾病 T2DM 和 AD 三者之间的交集靶点 61 个, 初步推测知母治疗 T2DM 与 AD 的核心成分为知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII 以及山奈酚等; 核心靶点主要是 TNF、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、肿瘤抑制基因 (tumor protein P53, TP53)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 和雌激素受体 alpha 基因 (estrogen receptor alpha gene, ESR1) 等; 糖尿病年龄信号通路可能为主要的调控通路。动物实验证明, 与模型组比较, 各给药组均可改善大鼠的皮毛、体质量、血糖的变化 ($P < 0.01$), 显著缩短大鼠的逃避潜伏期 ($P < 0.01$), 减轻大鼠海马组织病变, 降低大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。生、盐知母及其总皂苷组均显著降低大鼠脑组织中 JNK、TNF- α mRNA 和蛋白的表达水平 ($P < 0.01$), 且盐知母皂苷组和盐知母组的改善效果分别优于生知母皂苷组及生知母组 ($P < 0.05$ 、 0.01)。 **结论** 生知母、盐知母均可不同程度的改善 DCI, 且盐制后作用更为显著, 其机制可能与调控 JNK/TNF- α 信号通路有关。

关键词: 知母; 炮制; 总皂苷; 糖尿病认知障碍; 网络药理学; JNK/TNF- α 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)05-1640-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.05.015

收稿日期: 2024-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102810); 国家中医药管理局特色炮制技术规律挖掘项目 (GZY-KJS-2022-049)

作者简介: 田书青, 硕士研究生, 从事中药炮制原理研究。E-mail: 2250411372@qq.com

*通信作者: 高 慧, 博士, 教授, 从事中药炮制原理研究。E-mail: gaohuitcm@163.com

Exploration on efficiency enhancing mechanism of salt-processing *Anemarrhenae Rhizoma* in treating diabetes cognitive impairment based on network pharmacology and experimental validation

TIAN Shuqing^{1, 2, 3}, WANG Xiaoting^{1, 2, 3, 4}, PEI Linxiu^{1, 2, 3}, WANG Yazhu^{1, 2, 3}, GAO Hui^{1, 2, 3}

1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

2. Traditional Chinese Medicine Processing Technology Inheritance Base (Liaoning) of the National Administration of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

3. Technology Innovation Center for Traditional Chinese Medicine Processing of Liaoning Province, Dalian 116600, China

4. The First Clinical College, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

Abstract: Objective To explore the efficiency enhancing mechanism of salt-processing *Anemarrhenae Rhizoma* in the treatment of diabetes cognitive impairment (DCI) based on network pharmacology and experimental validation, providing a scientific basis for elucidating the scientific connotation of the synergy of salt-processing *Anemarrhenae Rhizoma* and the rational clinical use of drugs. **Methods** The main active components of *Anemarrhenae Rhizoma* were obtained by the preliminary chemical composition analysis research results of our research group combined with the traditional Chinese medicine systematic pharmacology database platform (TCMSP), and the potential targets of components were predicted by the Swiss Target Prediction database. The related targets of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and Alzheimer's diseases (AD) were obtained from Ggenemap of the human gene database (Gene cards) and the online Mendelian inheritance in man database (OMIM), and the intersection targets of components and diseases were obtained by Venny database. The protein-protein interaction (PPI) network was analyzed and constructed through the STRNG database and Cytoscape 3.8.2 software. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed by Metascape platform. Cytoscape 3.8.2 was used to construct an "ingredients-targets-pathway" network. In this study, a diabetic rat model was established through a high-fat, high-sugar diet combined with streptozotocin (STZ) induction. After successful modeling, a total of 48 diabetic rats were randomly assigned to the following groups: model group, timosaponins of *Anemarrhenae Rhizoma* group (176.4 mg/kg), timosaponins of salt-processed *Anemarrhenae rhizoma* group (176.4 mg/kg), *Anemarrhenae Rhizoma* group (2.52 g/kg), salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* group (2.52 g/kg) and piracetam (500 mg/kg) group, with eight rats in each group. Another eight normal rats were taken as the control group. Except for the control group, all treatment groups received 500 mg/kg of AlCl₃ via intragastric administered every morning to establish DCI model, all treatment groups were given intragastric (10 mL/kg) daily afternoon, the control group and the model group were given same volume of distilled water intragastric once a day for a duration of four weeks. Changes in fur condition, body weight, and blood glucose levels of the rats were observed and measured. Morris water maze experiment was used to test the cognitive ability of the rats. Hematoxylin eosin (HE) staining was employed to observe pathological changes in the hippocampal region of brain tissue. Additionally, the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and IL-1 β were detected by ELISA. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting were employed to detect the expression of c-Jun N-terminal kinase (JNK), TNF- α mRNA and protein in rat brain tissue. **Results** A total of 120 potential targets of active ingredients of *Anemarrhenae Rhizoma* were screened, and 61 common intersection targets between *Anemarrhenae Rhizoma* and T2DM and AD were identified. Preliminary evidence suggests that the core components of *Anemarrhenae Rhizoma* for treating T2DM and AD are *Anemarrhenae Rhizoma* timosaponin BII, *Anemarrhenae Rhizoma* timosaponin AIII and kaempferol. Core targets include TNF, protein kinase B (Akt), tumor protein P53 (TP53), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) and estrogen receptor alpha gene (ESR1), etc. Diabetic age signaling pathway may be the main regulatory pathway. In animal experiments, compared to the model group, each drug treatment group could improve the changes in the fur, body weight, and blood glucose of rats ($P < 0.01$), significantly shorten the escape latency of rats ($P < 0.01$), alleviate hippocampal tissue lesions, and reduce the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in rat brain tissue ($P < 0.05$, 0.01). *Anemarrhenae Rhizoma*, salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* and their total timosaponins groups significantly reduced the JNK and TNF- α mRNA and protein expression levels in the brain tissue ($P < 0.01$), with the salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* group and the timosaponins of salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* group showing better improvement compared to the *Anemarrhenae Rhizoma* group and the timosaponins of *Anemarrhenae Rhizoma* group ($P < 0.05$, 0.01). **Conclusion** Both *Anemarrhenae Rhizoma* and salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* can improve DCI, and salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* shows more significant effects. Its mechanism may be related to the regulation of JNK/TNF- α signaling pathway.

Key words: *Anemarrhenae Rhizoma*; processing; total timosaponins; diabetic cognitive impairment; network pharmacology; JNK/TNF- α pathway

知母为百合科植物知母 *Anemarrhena asphodeloides* Bge. 的干燥根茎, 苦、甘、寒, 归肺、胃、肾经; 具有清热泻火、滋阴润燥之功效, 用于高热烦渴、外感风寒、肺热燥咳、骨蒸潮热、内热消渴、肠燥便秘^[1]。知母作为我国应用历史悠久的传统中药, 最早见于《神农本草经》: 有“主消渴热中……”的记载^[2]。课题组前期研究并发现知母盐制后降血糖作用显著增强^[3-5], 并开展了深入系统地研究^[6-7]。

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是一种因代谢功能障碍引起的疾病, 持续的高血糖会引起心脏病、肾病以及脑病等一系列并发症, 中医称其为“消渴症”, 其主要病机是阴津亏损、燥热偏盛^[8-9], 与知母盐制后能够增强其滋阴降火作用^[10]的传统记载相符。阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD) 是一种高发于老年人的神经退行性疾病, 其病症表现以学习、记忆障碍为主, 中医又称“痴证”“呆证”。二者发病初期均与肾经衰竭、滋养不足有关, 同时也有研究证明, 2 型糖尿病使得 AD 发生的概率增加了 1.5~2.5 倍, 后期并发认知功能障碍的概率较非糖尿病患者更高^[11], 更有学者将 AD 称为“III 型糖尿病”。DM 与 AD 之间有着密不可分的关系, 研究表明, 糖尿病及其并发症的发病过程中, 均可引起短暂性或永久性的认知异常, 认知功能障碍越来越被认为是糖尿病的一种重要的共病和并发症^[12-13]。糖尿病认知障碍 (diabetes cognitive impairment, DCI) 主要临床表现除高血糖外, 还有学习记忆能力减退、语言表达、理解能力下降, 可伴有神情淡漠、行动迟缓等^[14]。目前已有研究表明知母在治疗 DCI 方面展现出较为显著的疗效^[15], 但关于盐知母对 DCI 治疗作用的研究较少。

基于前期盐知母降糖作用显著增强的系统研究及 T2DM 和 AD 的密切联系, 本研究进一步对知母盐制后对糖尿病认知障碍的治疗作用开展研究, 采用网络药理学研究思路和方法^[16], 结合体内药效评价, 探讨知母抗 DCI 的主要活性成分及作用靶点, 证明知母盐制后治疗 DCI 的增效作用并揭示其增效机制, 对阐释盐知母炮制增效的科学内涵、临床合理用药具有重要意义。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 56 只, 体质量 180~220 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司, 许可证号 SCXK (辽) 2020-0001。大鼠饲养于辽宁中医药大学 SPF 级动物实验中心, 在环境温度 22~25 ℃、相对湿度 40%~50% 的适宜条件下适应性喂养 7 d。所有相关操作均经辽宁中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 2023-011)。

1.2 药品与试剂

知母饮片购自于河北安国市聚药堂药业有限公司 (批号 2306001), 经辽宁中医药大学尹海波教授鉴定为百合科植物知母 *A. asphodeloides* Bge. 的干燥根茎。

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, 批号 18883-66-4, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自北京博爱港生物技术有限公司; 吡拉西坦片 (批号 H21021775, 国药准字 H21021775) 购自东北制药集团沈阳第一制药有限公司; 无水氯化铝 (批号 C16266566) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (批号 23090735N)、大鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 试剂盒 (批号 23090737N)、大鼠 IL-1 β 试剂盒 (批号 23090739N) 均购自上海科兴生物技术有限公司; 5 $\times$ loading buffer 上样缓冲液 (批号 2308001)、10 $\times$ 电泳缓冲液 (批号 MA0012-OCT-111)、10 $\times$ 电转缓冲液 (批号 MA0093-Aug-111)、TBST 缓冲液 (批号 MA0091-1-Jul0-51)、ECL 发光液 (批号 MA0816-Jun-131) 均购自大连美仑生物科技有限公司; 脱脂奶粉 (批号 5221031002) 购自北京索莱宝科技有限公司; 预染彩虹蛋白 Marker (批号 MA0342-Oct-12) 购自艾科瑞生物科技有限公司; PVDF 膜 (0.45 μm , 批号 0000266369) 购自德国 Merck Millipore 公司。重组 Anti-c-Jun 氨基末端激酶 1 (c-Jun N-terminal kinase, JNK1) + JNK2 + JNK3 抗体 (批号 ab179461) 购自美国 Abcam 公司; TNF- α (D2D4) XP[®] Rabbit mAb (批号 #11948)、 β -肌动蛋白 (β -Actin) Rabbit mAb (批号 4970)、HRP 标记的抗兔二抗 (批号 9074P2) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 全蛋白提取试剂盒 (批

号 2309001) 购自北京索莱宝科技有限公司; 无核酸酶水 (批号 00005113-130641)、SYBR[®] Green Pro Taq HS 预混型实时荧光定量聚合酶链式扩增反应 (real-time Quantitative PCR, qPCR) 试剂盒 (含 Rox, 批号 0261-130715) 均购自武汉莫纳生物科技有限公司; Trizol 试剂 (批号 140718) 购自美国 Ambion 公司; 引物由深圳华大基因股份有限公司 Olige 合成。

1.3 仪器

FA10004B 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司); Mili-Q 型超纯水机 (美国 Millipore 公司); KQ-250DB 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); Multiskan MK3 型酶标仪 (美国赛默飞世尔科技有限公司); 580 型血糖仪 (江苏鱼跃医疗设备股份有限公司); TL2010S 型高通量组织研磨仪 (北京鼎昊源科技有限公司); 04/BR186039 型电泳仪、电转槽 (美国 BIO-RAD 公司); StepOne 型实时荧光定量 PCR 仪 (赛默飞世尔科技公司); ZHJH-C1112B 型超净工作台 (上海智成科学仪器有限公司); L96G 基因扩增仪 (杭州朗基科学仪器有限公司); FMB-40 型制冰机 (上海利闻科学仪器); PHS-3GpH 计 (上海仪电科学仪器); Syngene G BOX 数码凝胶图像成像仪 (英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 知母活性成分的筛选 利用传统中药系统药理学数据库 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMS), 本研究设定口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 以及类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 作为筛选标准。在此基础上, 结合课题组前期研究成果^[7], 对知母中的活性成分进行了收集。通过整合并消除重复项的方式, 筛选出最终的活性成分。

2.1.2 活性成分和 DCI 的相关靶点收集 通过 Swiss Target Prediction 数据库筛选得到知母主要活性成分的潜在靶点, 通过 Cytoscape 3.8.2 软件构建“知母-活性成分-靶点”网络图。利用 GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库 (online mendelian inheritance in man, OMIM) 等数据库, 以“Alzheimer’s disease”、“Type 2 diabetes mellitus”为关键词, 限制条件为“Homo sapiens”, 筛选出 AD 与 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 相关疾病靶点, 采用“Venny 2.1.0”进行 Venn 图的绘

制, 得出药物知母、疾病 AD 和 T2DM 三者之间的交集靶点。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图的构建与分析 采用 STRING 数据库对得到的交集靶点进行分析, 设定物种为“Homo sapiens”, 建立 PPI 网络图。

2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 采用 Metascape 数据库收集 GO 与 KEGG 信息, 将核心靶点导入“微生信”平台进行 GO 与 KEGG 富集分析, 得到分子功能 (molecular function, MF)、生物学过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell components, CC) 和 KEGG 通路富集分析。

2.2 动物实验

2.2.1 药物的制备 盐知母的制备: 取 100 g 知母饮片, 加 30 mL (含 3 g 食盐) 盐水拌匀, 闷润至透, 150~160 °C 下炒制 8 min, 取出, 晾凉^[17]。取生、盐知母粉末过三号筛, 加入 15 倍量 75%乙醇, 回流 3 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 浓缩至无醇味, 得生、盐知母醇浸膏。用水溶解, 分别制备成含生知母、盐知母 0.252 g/mL 的药液。采用 HPLC 法对浓缩液进行定量分析, 生知母浓缩液中含知母皂苷 AIII 8.46 mg/mL, 盐知母浓缩液中含知母皂苷 AIII 9.68 mg/mL。生、盐知母总皂苷药液的制备: 取生、盐知母浸膏用去离子水复溶, 经 D101 大孔吸附树脂吸附 4 h, 用 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液和水除去杂质, 75%乙醇洗脱, 挥干, 得生、盐知母总皂苷, 用水分散, 得生知母总皂苷药液 (含生知母 17.64 mg/mL), 质量分数为 67.50%, 盐知母总皂苷药液 (含盐知母 17.64 mg/mL), 质量分数为 73.49%。

2.2.2 造模、分组与给药 通过高糖高脂饲料联合 ip STZ (40 mg/kg) 构建糖尿病模型^[18], 72 h 后测各组大鼠空腹血糖值, 当空腹血糖值 > 11.1 mmol/L 视为糖尿病模型构建成功^[17], 将造模成功的 48 只大鼠随机分为模型组、生知母皂苷 (176.4 mg/kg) 组、盐知母皂苷 (176.4 mg/kg) 组、生知母组 (2.52 g/kg)、盐知母 (2.52 g/kg) 组和吡拉西坦 (0.50 g/kg) 组, 每组 8 只, 另取 8 只生理大鼠作为对照组, 除对照组外, 其余各给药组每日上午 ig AlCl₃ (0.50 g/kg), 构建 DCI 模型^[19], 每日下午 ig 各组大鼠相应药物 (10 mL/kg), 模型组、对照组 ig 等体积蒸馏水, 1 次/d, 干预 4 周。

2.2.3 大鼠一般情况观察 实验全程观察大鼠毛发的变化情况,每周测量并记录大鼠的体质量 2 次。给药 4 周后采取尾静脉采血,测定大鼠的血糖水平。

2.2.4 行为学测试 给药结束后,所有大鼠进行 Morris 水迷宫实验,用于测定大鼠的学习和记忆能力。实验观察并记录大鼠找到平台的时间(即逃避潜伏期)和行动轨迹,90 s 内若未找到则诱导至平台站立 10 s,训练 4 d,第 5 d 进行正式测试。

2.2.5 组织病理学检查 采用 ip 20%乌拉坦(6 mL/kg)麻醉大鼠,于冰上迅速取出大鼠脑组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红染色,光镜下观察大鼠脑组织海马区病理状况。

2.2.6 大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的测定 取大鼠脑组织,按照脑组织质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入冰生理盐水,匀浆,离心并吸取上清液,采用 ELISA 法检测大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量。

2.2.7 RT-PCR 法检测大鼠脑组织中 JNK、TNF- α mRNA 表达 称取各组大鼠脑组织约 50 mg,Trizol 提取总 RNA,根据试剂盒说明书进行逆转录反应。采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法对 RT-PCR 结果进行数据分析。引物序列见表 1。

2.2.8 Western blotting 法检测大鼠脑组织中 JNK、TNF- α 的蛋白表达 取各组大鼠脑组织约 50 mg,加入 500 μ L 裂解液 RIPA 及蛋白酶抑制剂配制的混合液,置于组织研磨机中充分匀浆,提取总蛋白。

表 2 知母活性成分
Table 2 Active ingredients of *Anemarrhenae Rhizoma*

序号	活性成分名称	分子式	Pubchem ID
1	知母皂苷 BIII	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	44575944
2	豆甾醇	C ₂₉ H ₄₈ O	5280794
3	(Z)-3-(4-羟基-3-甲氧基-苯基)-N-[2-(4-羟基苯基)乙基] 丙烯酰胺	C ₁₈ H ₁₉ NO ₄	6440659
4	薯蓣皂苷元	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	99474
5	香豆酰酞胺	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	13939145
6	金色酰胺醇酯	C ₂₇ H ₂₈ N ₂ O ₄	13855373
7	芒果醇酸	C ₂₉ H ₄₆ O ₃	16309852
8	脱氢淫羊藿苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₆	5318980
9	知母皂苷 F	C ₅₀ H ₈₂ O ₂₃	102586053
10	小星蒜碱	C ₁₇ H ₁₇ NO ₅	441594
11	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	5280863
12	淫羊藿苷 I	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₁	5745470
13	知母皂苷 C	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₈	53462233
14	知母皂苷 E	C ₄₆ H ₇₈ O ₁₉	71307556
15	知母皂苷 BII	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₉	44575945
16	知母皂苷 AIII	C ₇₈ H ₁₂₈ O ₂₆	155887663

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
JNK	F: TCCCAGCTGACTCAGAACATAACAA R: TGGACGCATCTATCACCAGCA
TNF- α	F: GGCGTGTTTCATCCGTTCTC R: CTTCAGCGTCTCGTGTGTTTCT
β -actin	F: GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA R: GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG

采用 BCA 法测蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,经封闭后,加入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加入二抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,使用 ECL 化学发光试剂盒显影,采用 Image-J 软件分析条带灰度值,以 β -actin 为内参计算蛋白相对表达量。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件对实验数据进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据采用单因素方差分析后,进行多组间方差分析。

3 结果

3.1 知母治疗 DCI 网络药理学分析

3.1.1 知母活性成分及其对应靶点 通过 TCMSP 数据库检索出知母相关活性成分共 81 个。另外,设置 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18,除去重复值和没有对应靶点的成分,共筛选出知母皂苷 BIII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BII 和山柰酚等 16 个活性成分,见表 2。

3.1.2 活性成分和 DCI 的相关靶点收集 TCMSP 与 Swiss Target Prediction 数据库中筛选得到活性成分靶点共 120 个,使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“知母-活性成分-靶点”网络图,见图 1。Gene cards 数据库检索获得 AD 相关疾病靶点 1 937 个, T2DM 相关疾病靶点 1 631 个,采用“Venny 2.1.0”进行 Venn 图的绘制,得出药物知母与疾病 AD 和 T2DM 三者之间共同的交集靶点基因 61 个,见图 2。

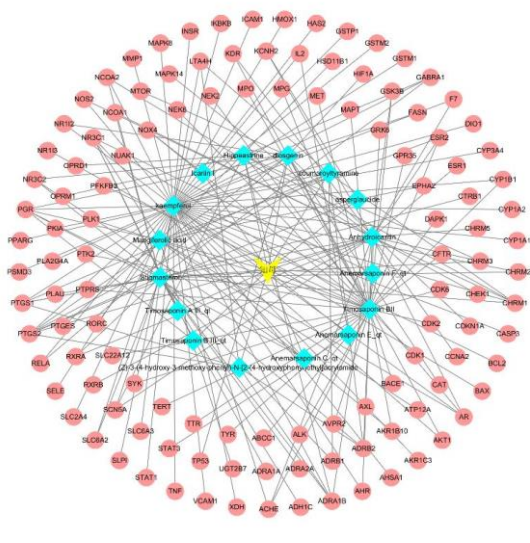


图 1 知母-活性成分-靶点

Fig. 1 *Anemarrhenae Rhizoma*-active ingredients-target diagram

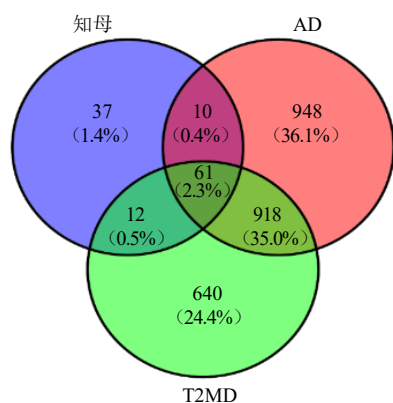


图 2 知母与 AD-T2DM 交集靶点

Fig. 2 Intersection targets of *Anemarrhenae Rhizoma* and AD-T2DM

3.1.3 PPI 网络图的构建与分析 PPI 网络有 60 个点, 667 个边, degree 值排名前 10 的靶基因分别是 TNF、AKT1、TP53、PTGS2、ESR1、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱氨酸蛋白酶-3

(Caspase-3, CASP3)、信号转导及转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、低氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1-a, HIF1A)、过氧化物酶体增生激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor gamma, PPARG), 线条越粗, 颜色越深、点越大, 表明得分越高, 重要程度越高 (图 3)。

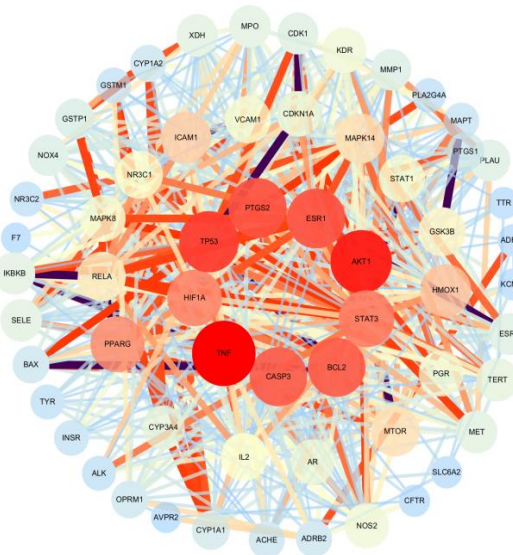


图 3 知母活性成分与 AD-T2DM 交集基因的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of active ingredients of *Anemarrhenae Rhizoma* and AD-T2DM intersection gene

3.1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 利用 Metascape 平台对 61 个潜在靶基因进行 GO 分析, 结果显示, 与生物学过程相关的通路有: 激素反应 (response to hormone)、细胞对激素刺激反应 (cellular response to hormone stimulus) 等; 与细胞组分相关的通路有: 细胞质核周区 (perinuclear region of cytoplasm)、膜微结构域 (membrane microdomain) 等; 与分子功能相关的通路主要有: 蛋白同型二聚化活性 (protein homodimerization activity)、配体激活的转录因子活性 (ligand-activated transcription factor activity) 等, 见图 4。KEGG 富集分析, 筛选条件为 $P < 0.01$, 得出 1 647 条 KEGG 富集通路, 其中 P 值排名前 20 的 KEGG 富集通路, 见图 5, 这些通路可能是知母治疗 AD 与 T2DM 的关键通路。

3.2 动物实验结果

3.2.1 大鼠皮毛与体质量变化 实验期间, 对照组大鼠皮毛整体洁白、光泽无瑕; 模型组大鼠皮毛逐渐出现发黄、枯槁无泽的现象; 与模型组比较, 各

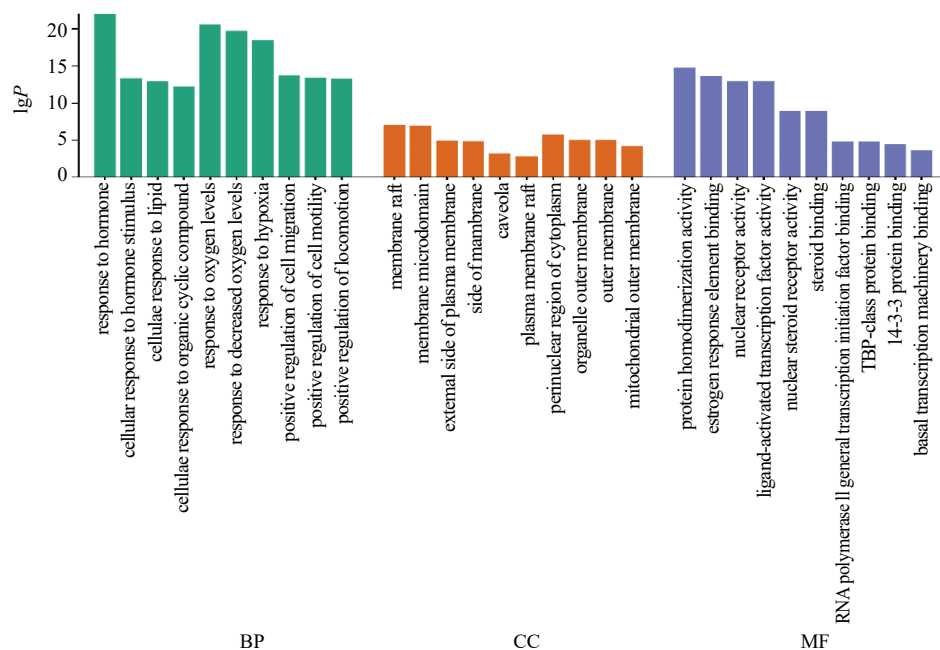


图 4 知母活性成分治疗 DCI 潜在作用靶点的 GO 富集分析

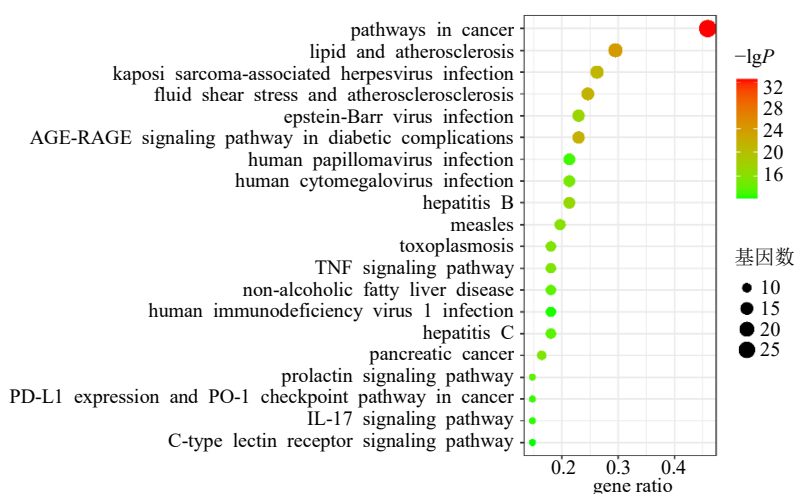
Fig. 4 GO pathway analysis of potential targets of active ingredient of *Anemarrhenae Rhizoma* in treatment of DCI

图 5 知母活性成分治疗 DCI 潜在作用靶点的 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis of potential targets of active ingredient of *Anemarrhenae Rhizoma* in treatment of DCI

给药组均能不同程度改善这一状况，尤以盐知母皂苷组和盐知母组改善效果更为明显。

在 STZ 注射前，与对照组比较，各组大鼠体质量呈显著上升趋势。在 STZ 注射后，模型组大鼠体质量开始逐渐下降，各给药组均能不同程度缓解大鼠体质量下降的情况，与生知母皂苷组和生知母组相比盐知母皂苷组和盐知母组缓解程度较为明显，见图 6。

3.2.2 大鼠血糖的变化 给药 4 周后，与对照组比

较，模型组血糖值显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组均能显著降低大鼠的血糖值 ($P < 0.01$)；与生知母皂苷组比较，盐知母皂苷组大鼠的血糖值更低 ($P < 0.05$)；与生知母组比较，盐知母组大鼠的血糖值更低 ($P < 0.01$)，见图 7。

3.2.3 大鼠行为学测试结果 与对照组比较，模型组大鼠逃避潜伏期显著增加 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组逃避潜伏期显著缩短 ($P < 0.05$ 、 0.01)；盐知母皂苷组及盐知母组分别较生知母皂

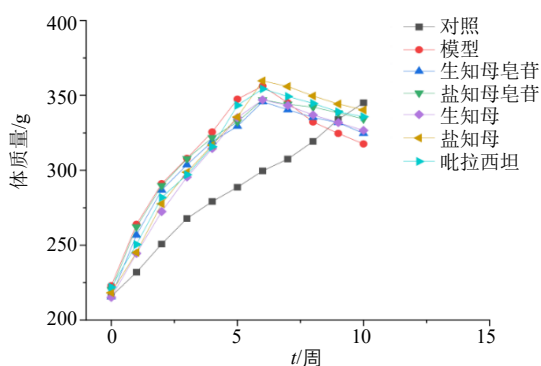
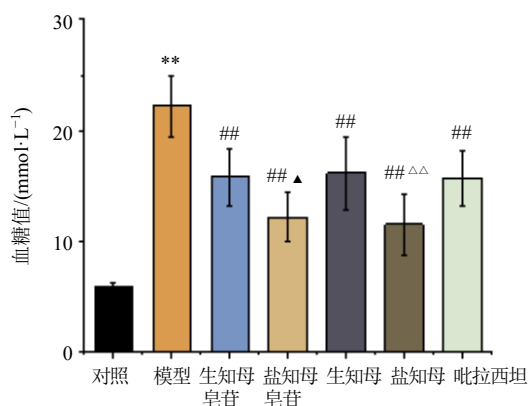


图 6 各组大鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Body weight changes of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



与对照组比较: $**P < 0.01$; 与模型组比较: $###P < 0.01$; 与生知母皂苷组比较: $\Delta P < 0.05$; 与生知母组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

$**P < 0.01$ vs control group; $###P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs timosaponins of *Anemarrhenae Rhizoma* group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs *Anemarrhenae Rhizoma* group.

图 7 知母炮制前后及其总皂苷对 DCI 大鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processing and its total saponin on blood glucose in DCI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

苷组和生知母组大鼠逃避潜伏期明显缩短 ($P < 0.05$), 见表 3 和图 8。

3.2.4 大鼠脑组织海马区病理形态的影响 对照组大鼠海马区结构完整, 神经元排列密而紧凑, 细胞核有明显的分界线, 且胞核圆润、大而清晰; 模型组大鼠海马区呈现明显损伤, 排列紊乱, 神经元细胞萎缩死亡, 细胞核数量显著减少; 与模型组比较, 各给药组海马组织病变程度均有不同程度减轻, 盐知母皂苷组与盐知母组分别较生知母皂苷组及生知母组改善效果更为明显, 见图 9。

表 3 知母炮制前后及其中总皂苷对 DCI 大鼠行为学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processing and its total saponin on behavior of DCI rats

组别	剂量	逃避潜伏期/s
对照	—	11.27 ± 5.37
模型	—	39.15 ± 6.31**
生知母皂苷	176.40 mg·g ⁻¹	23.30 ± 6.92 ^{##}
盐知母皂苷	176.40 mg·g ⁻¹	14.97 ± 5.87 ^{##▲}
生知母	2.52 g·kg ⁻¹	30.95 ± 5.98 [#]
盐知母	2.52 g·kg ⁻¹	23.97 ± 8.10 ^{##△}
吡拉西坦	0.50 g·kg ⁻¹	15.12 ± 5.78 ^{##}

与对照组比较: $**P < 0.01$; 与模型组比较: $#P < 0.05$ $###P < 0.01$;

与生知母皂苷组比较: $\Delta P < 0.05$; 与生知母组比较: $\Delta\Delta P < 0.05$ 。

$**P < 0.01$ vs control group; $#P < 0.05$ $###P < 0.01$ vs model group; $\Delta P < 0.05$ vs timosaponins of *Anemarrhenae Rhizoma* group; $\Delta\Delta P < 0.05$ vs *Anemarrhenae Rhizoma* group

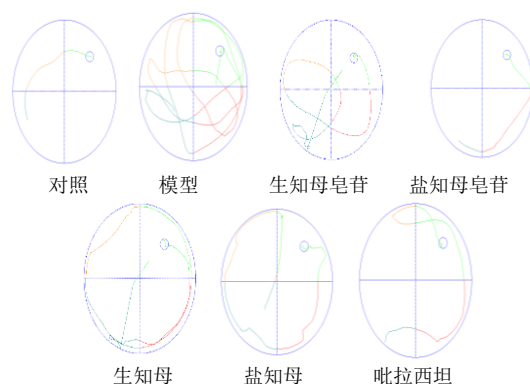


图 8 知母炮制前后及其总皂苷对 DCI 大鼠行为学的影响

Fig. 8 Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processing and its total saponins on behavior of DCI rats

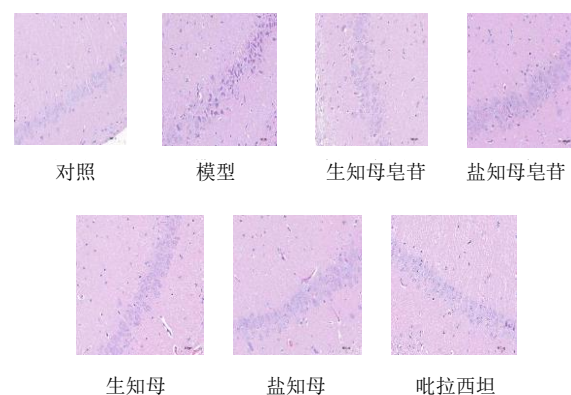
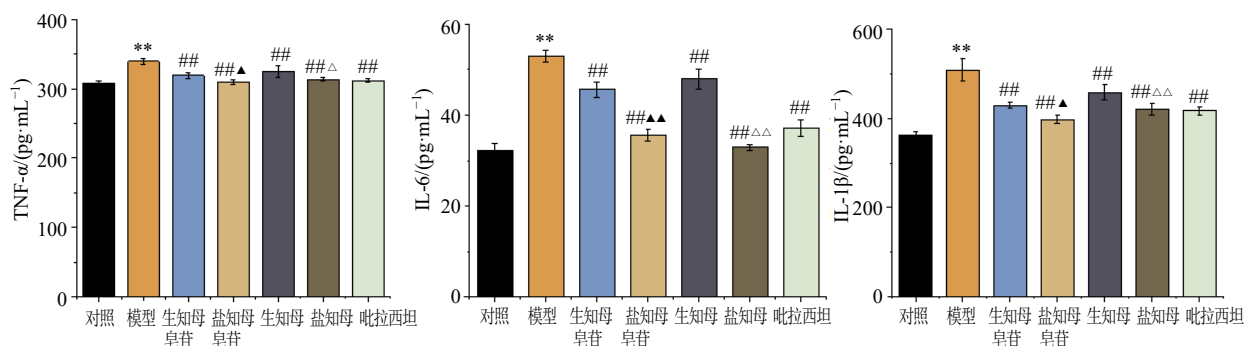


图 9 知母炮制前后及其总皂苷对 DCI 大鼠脑组织海马区病理形态的影响 (HE, ×200)

Fig. 9 Effect of *Anemarrhenae Rhizoma* before and after processing and its total saponin on pathological morphology of hippocampus in DCI rats (HE, ×200)

3.2.5 各组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量的测定 与对照组比较, 模型组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组均能降低大鼠脑组织中

TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 盐知母皂苷组和盐知母组分别较生知母皂苷组及生知母组降低效果更明显 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 10。



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与生知母皂苷组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$; 与生知母组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$, 下图同。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs timosaponins of *Anemarrhenae Rhizoma* group; △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs *Anemarrhenae Rhizoma* group, same as below figures

图 10 各组大鼠脑组织中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 10 Expression levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β in brain tissue of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.2.6 RT-PCR 法检测大鼠脑组织中 JNK、TNF- α mRNA 的表达 与对照组比较, 模型组大鼠脑组织中 JNK、TNF- α mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织中 JNK、TNF- α mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); 盐知母皂苷组及盐知母组分别较生知母皂苷组和生知母组表达降低效果更明显 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 11。

3.2.7 Western blotting 法检测大鼠脑组织中 JNK、TNF- α 的蛋白表达 与对照组比较, 模型组大鼠脑

组织中 JNK、TNF- α 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织中 JNK、TNF- α 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 盐知母皂苷组及盐知母组大鼠脑组织中 JNK 蛋白表达分别较生知母皂苷组和生知母组降低更明显 ($P < 0.05$ 、 0.01), 盐知母皂苷组及盐知母组大鼠脑组织中 TNF- α 蛋白表达分别较生知母皂苷组和生知母组有降低趋势, 见图 12。

4 讨论

知母作为一种常见的用于治疗糖尿病的传统

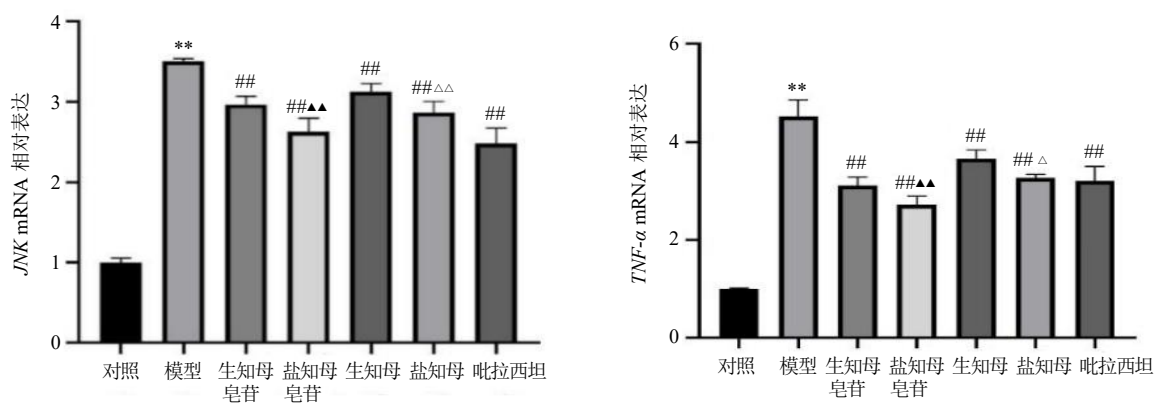
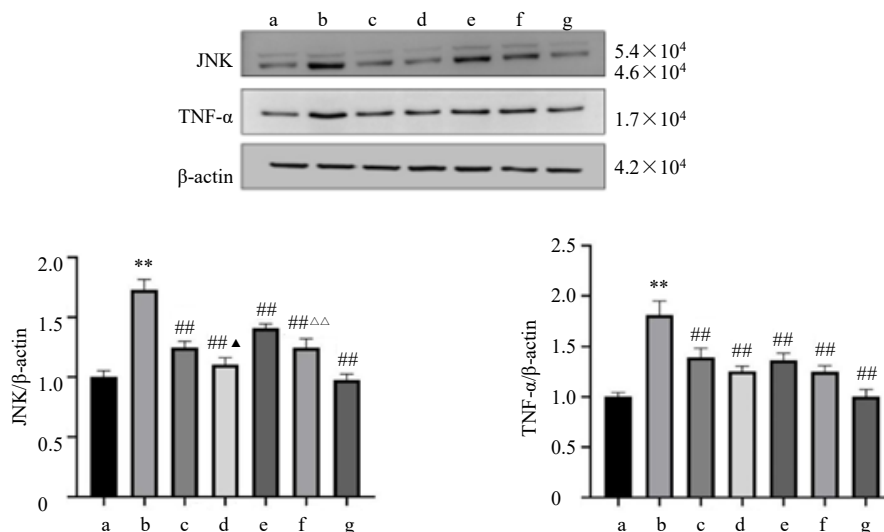


图 11 各组大鼠脑组织中 JNK、TNF- α mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Expression levels of JNK, TNF- α mRNA in brain tissues of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



a~g 分别代表对照组、模型组、生知母皂苷组、盐知母皂苷组、生知母组、盐知母组、吡拉西坦组。

A~g represent control group, model group, timosaponins of *Anemarrhenae Rhizoma* group, timosaponins of salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* group, *Anemarrhenae Rhizoma* group, salt-processed *Anemarrhenae Rhizoma* group and piracetam group, respectively.

图 12 各组大鼠脑组织中 JNK、TNF-α 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Expression levels of JNK, TNF-α protein in brain tissue of each group of rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中药, 其针对 T2DM 的治疗作用已经被众多研究所证实^[20]。也有研究表明, 知母能显著提升痴呆模型大鼠的学习与记忆功能^[21], 在治疗 DCI 方面展现出较为显著的疗效^[15]。本研究基于课题组前期对知母盐制后降糖作用显著增强这一发现, 以及 T2DM 与 AD 的密切关系, 通过网络药理学和实验验证, 进一步证明了知母盐制后能够增强对糖尿病认知障碍大鼠的治疗作用, 与预测相吻合。

中药的作用特性通常涉及多成分、多靶点及多路径的综合互动, 从多维度协同促进 DCI 的改善。网络药理学是基于系统生物学理论, 从系统水平研究药物作用机制、进行多靶点药物分子设计的新兴交叉学科, 与中医整体治疗观和辨证论治的特点相吻合, 是目前探索中药药理机制有效的方法。本研究采用网络药理学分析知母治疗 DCI 的潜在机制, 获得知母中的主要活性成分, 包括知母皂苷 BII、知母皂苷 AIII、知母皂苷 BIII 及山柰酚, 这些有效成分主要针对 TNF、AKT1、TP53、PTGS2、ESR1、BCL2、CASP3、STAT3、HIF1A、PPARG 等 10 个关键靶点发挥作用。通过 KEGG 通路富集分析发现, 知母治疗 DCI 相关的机制主要涉及神经营养因子信号通路及糖尿病相关信号通路, 该结果为知母可能通过多靶点和多途径以促进 DCI 的恢复提供了科学依据。本课题组前期研究发现知母盐制后皂苷类成分含量增加, 且知母中皂苷类成分具有抗

阿尔茨海默病、抗炎、治疗糖尿病和抗肿瘤等作用^[22], 因此我们推测盐知母治疗 DCI 的效果更强, 通过动物实验得到进一步的验证。

临床研究表明, T2DM 患者脑部的各种炎症因子和炎症标志物浓度会增加, 因炎症作为认知功能障碍和痴呆的主要原因之一, 从而导致 DCI 的发生^[23-24]。同时许多研究也表明糖尿病和 AD 的进展都会引起炎症反应并引发炎症细胞因子的高表达^[25]。本研究采用高糖高脂饲料、STZ 联合 AlCl₃ 建立 DCI 大鼠模型, 探索生、盐知母及其总皂苷对 DCI 的影响。结果表明, 与对照组比较, 模型组大鼠的学习和记忆能力下降, 血糖水平、皮毛发黄程度、TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量显著升高, HE 染色显示模型组大鼠海马中出现明显损伤, 排列紊乱, 神经元细胞萎缩死亡, 说明本研究 DCI 大鼠模型建模成功。给药后大鼠的学习和记忆能力提高, 血糖水平、皮毛发黄程度、海马区神经元细胞病变程度、TNF-α、IL-6、IL-1β 的含量显著下降, 以上结果表明各给药组均可能通过调节海马区炎症来改善 DCI, 且盐知母及其总皂苷组分别优于生知母及其总皂苷, 表明知母盐制后治疗 DCI 的作用增强。

炎症反应和炎症信号通路是 T2DM 和 AD 之间的主要致病联系之一^[26]。IL-1β 的过量表达能够促进 TNF-α 等炎症因子的上调, 进而 TNF-α 与 IL-1β 共同作用显著地诱导 IL-6 的生成。IL-6 通过活

化 T 细胞与 B 细胞,进一步介导微管相关蛋白 Tau (microtubule-associated protein tau, Tau) 的过度磷酸化并导致 β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 的形成。A β 的累积触发炎症信号通路的激活,促进神经纤维缠结的形成,终发展成认知功能障碍^[27-28]。JNK/TNF- α 信号通路可能是治疗糖尿病认知障碍的重要作用通路^[29],因此,其在知母治疗 DCI 的作用中不容忽视。为探究知母盐炙后对 DCI 治疗潜在的增效机制,本研究对 JNK/TNF- α 信号通路蛋白的表达进行了研究分析。结果表明,各给药组大鼠脑组织中 JNK/TNF- α mRNA 及蛋白表达水平均显著降低,尤其是盐知母总皂苷组与盐知母组的降低效果相较于生知母总皂苷组及生知母组,表现出更为显著的下降趋势。表明知母可能通过调控 JNK/TNF- α 信号通路,实现对 DCI 的治疗作用,且盐知母的治疗效果更佳。

综上,本研究通过网络药理学和动物实验,验证了生、盐知母可能通过减少促炎症因子和调节 JNK/TNF- α 信号通路,发挥治疗 DCI 的作用,且盐制后作用增强。本研究结果为知母盐制前后治疗 DCI 提供理论支持,为进一步研究其增效机制奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 222.
- [2] 顾观光 清. 神农本草经 [M]. 北京: 学苑出版社, 2007: 155.
- [3] 高慧, 陈斌, 贾天柱. 知母盐制前后的药效学比较研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 41-42.
- [4] 王晓婷, 闫丽, 孙冬月, 等. 知母盐制后增量成分对 HepG-2 细胞葡萄糖消耗的影响 [J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(16): 1694-1696.
- [5] 吴莹, 宋泽璧, 高慧, 等. 知母盐制前后降血糖作用及其机制 [J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(23): 1977-1980.
- [6] 闫丽, 吴莹, 高慧. HPLC-CAD 法测定知母盐炙前后 4 种皂苷含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(1): 46-49.
- [7] 郑威, 闫丽, 高慧. 知母盐制前后化学成分含量及改善 2 型糖尿病小鼠胰岛素抵抗作用的差异分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 140-147.
- [8] 雷佳敏, 王晓慧, 苏征, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨黄芩治疗糖尿病的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(6): 1445-1453.
- [9] Fan X, Wang Y, Li X, *et al.* Scutellarin alleviates liver injury in type 2 diabetic mellitus by suppressing hepatocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Chin Herb Med.* 2023, 15(4): 542-548.
- [10] 钟凌云. 中药炮制学 [M]. 第 5 版. 北京: 中国中医药出版社, 2021: 224.
- [11] 于文静, 杨苗, 贺春香, 等. 阿尔茨海默病合并 2 型糖尿病大鼠模型构建及病理改变的初步评价 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(11): 1952-1961.
- [12] Biessels G J, Whitmer R A. Cognitive dysfunction in diabetes: How to implement emerging guidelines [J]. *Diabetologia*, 2020, 63(1): 3-9.
- [13] Dybjer E, Nilsson P M, Engström G, *et al.* Pre-diabetes and diabetes are independently associated with adverse cognitive test results: A cross-sectional, population-based study [J]. *BMC Endocr Disord*, 2018, 18(1): 91.
- [14] 石勇, 曹珊珊, 张瑞华, 等. 手掌参对 2 型糖尿病认知障碍的作用及机制研究 [J]. 中南药学, 2023, 21(12): 3179-3185.
- [15] 张雨涵, 袁欣, 张瑞华, 等. 人参、知母调控 NR2B-CaMKII-AMPA1 通路防治糖尿病认知功能障碍作用研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(4): 43-48.
- [16] 蔡维维, 朱雪锐, 张仕杰, 等. 网络药理学结合谱效关系及分子对接探讨五味甘露抗炎物质基础及作用机制 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(9): 1944-1959.
- [17] 王晓婷. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的知母盐制降血糖作用增效机理研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2023.
- [18] 左心真, 王蒙蒙, 董晓. 2 型糖尿病小鼠模型的建立 [J]. 青岛农业大学学报(自然科学版), 2022, 39(04): 259-264.
- [19] 张静. 知母提取物改善 3 型糖尿病作用机制初探 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [20] 吴悠, 元智玮, 刘铜华, 等. 滋肾丸及组方药物抗糖尿病研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(17): 212-220.
- [21] 詹志敏, 付万进, 胡伟. 基于网络药理学方法研究知母治疗 2 型糖尿病作用机制 [J]. 安徽医药, 2023, 27(8): 1525-1530.
- [22] 邓云, 马百平, 徐秋萍, 等. 知母有效成分对拟痴呆模型大鼠学习记忆的影响及机制 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(7): 830-833.
- [23] 张体华, 刘鑫. 知母皂苷对糖尿病肾病大鼠的肾保护作用及机制 [J]. 中国老年学杂志, 2024, 44(10): 2439-2443.
- [24] 刘艳平. 知母皂苷成分的药理活性及作用机制研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2018, 36(1): 24-29.
- [25] Du L C, Hu X T, Zhang B B, *et al.* The relationship of platelet-to-lymphocyte ratio with cognitive decline in

- T2DM [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2021, 13(1): 151.
- [26] Lontchi-Yimagou E, Sobngwi E, Matsha T E, *et al.* Diabetes mellitus and inflammation [J]. *Curr Diabetes Rep*, 2013, 13(3): 435-444.
- [27] Granic I, Dolga A M, Nijholt I M, *et al.* Inflammation and NF- κ B in Alzheimer's disease and diabetes [J]. *J Alzheimers Dis*, 16(4): 809-821.
- [28] Jin L, Li Y P, Feng Q, *et al.* Cognitive deficits and Alzheimer-like neuropathological impairments during adolescence in a rat model of type 2 diabetes mellitus [J]. *Neural Regen Res*, 2018, 13(11): 1995-2004.
- [29] 刘静, 高颖, 杨利, 等. 知母-黄芪散复方通过 TNF- α /JNK 通路改善阿尔茨海默症大鼠认知障碍的研究 [J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(3): 320-326.
- [30] Medeiros R, Figueiredo C P, Pandolfo P, *et al.* The role of TNF-alpha signaling pathway on COX-2 upregulation and cognitive decline induced by beta-amyloid peptide [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 209(1): 165-173.
- [31] Kumari S, Dhapola R, Reddy D H. Apoptosis in Alzheimer's disease: Insight into the signaling pathways and therapeutic avenues [J]. *Apoptosis*, 2023, 28(7): 943-957.

[责任编辑 罗 曦]