

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

王 艳¹, 郭家欣¹, 张倩霞¹, 梁淳杰^{1,2}, 赵一颖¹, 杨颖博¹, 吴 伟¹, 王团结¹, 肖保国^{3*}, 王振中^{1*}

1. 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室 (江苏康缘药业股份有限公司/南京中医药大学), 江苏 南京 211112
2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 200120
3. 复旦大学神经病学研究所, 上海 200040

摘要: **目的** 探讨银杏二萜内酯 (ginkgo diterpene lactone, GDL) 对 *D*-半乳糖诱导的衰老小鼠的保护作用及潜在作用机制。**方法** 将小鼠随机分为对照组、模型组及 GDL 低、高剂量 (5、10 mg/kg) 组和二甲双胍 (200 mg/kg) 组, 每组 6 只。小鼠连续 8 周颈部 *sc D*-半乳糖 (500 mg/kg), 从第 3 周开始, 给予相应药物干预。通过水迷宫实验评价小鼠的记忆和认知功能; β -半乳糖苷酶染色评价小鼠海马神经元的衰老情况; Western blotting 检测海马组织细胞周期相关蛋白的表达。利用网络药理学和分子对接探索 GDL 抗衰老的机制, 并采用 Western blotting 和免疫荧光法对分子对接结果进行验证。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠在目标象限停留时间减少 ($P<0.05$), 海马神经元 β -半乳糖苷酶活性显著升高 ($P<0.001$), 海马组织衰老标志蛋白 p53、p21、p16 的表达明显升高 ($P<0.001$)。与模型组比较, GDL 组小鼠在目标象限停留时间增加 ($P<0.05$), β -半乳糖苷酶活性降低 ($P<0.001$), p53、p21 和 p16 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。网络药理学和分子对接结果提示 GDL 预防衰老可能与磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路和细胞凋亡有关。动物实验验证表明 GDL 能够上调 PI3K/Akt 信号通路蛋白的表达 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 并抑制其下游凋亡蛋白剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (B-cell lymphoma-2 associated X protein, Bax) 的表达 ($P<0.01$ 、0.001)。**结论** GDL 可改善 *D*-半乳糖诱导的衰老小鼠的认知功能, 抑制衰老诱导的细胞凋亡, 其机制可能与调控 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 银杏二萜内酯; *D*-半乳糖; 衰老; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)11-3935-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.11.014

Mechanism of ginkgo diterpene lactone in alleviating neuronal aging based on PI3K/Akt signaling pathway

WANG Yan¹, GUO Jiaxin¹, ZHANG Qianxia¹, LIANG Chunjie^{1,2}, ZHAO Yiyi¹, YANG Yingbo¹, WU Wei¹, WANG Tuanjie¹, XIAO Baoguo³, WANG Zhenzhong¹

1. State Key Laboratory on Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent Manufacture (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., & Nanjing University of Chinese Medicine), Nanjing 211112, China
2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200120, China
3. Institute of Neurology, Fudan University, Shanghai 200040, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and potential mechanisms of ginkgo diterpene lactone (GDL) on *D*-galactose-induced aging in mice. **Methods** Mice were randomly divided into control group, model group, GDL low-, high-dose (5, 10 mg/kg) groups and metformin (200 mg/kg) group, with six mice in each group. Mice were given *D*-galactose (500 mg/kg) in the neck for eight consecutive weeks, and corresponding drug intervention was administered starting from the third week. The memory

收稿日期: 2025-01-07

基金项目: 江苏省基础研究计划自然科学基金——前沿引领技术基础研究专项 (BK20232014); 连云港市“521”人才工程支持项目 (LYG06521202221)

作者简介: 王 艳 (2000—), 硕士研究生, 研究方向为神经药理学。E-mail: wangywywy@163.com

*通信作者: 王振中, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药新药研发及应用。E-mail: kyzywzz@163.com

肖保国, 教授, 研究方向为神经保护和髓鞘再生。E-mail: bgxiao@shmu.edu.cn

and cognitive functions of mice were evaluated through water maze experiments; Aging status of hippocampal neurons was evaluated by β -galactosidase staining; Western blotting was used to detect the expressions of cell cycle related proteins in hippocampal tissue. The anti-aging mechanism of GDL was explored using network pharmacology and molecular docking, and molecular docking results was validated by Western blotting and immunofluorescence. **Results** Compared with control group, the time spent in the target quadrant of mice in model group was reduced ($P < 0.05$), β -galactosidase activity in hippocampal neurons was significantly increased ($P < 0.001$), the expressions of aging marker proteins p53, p21 and p16 in hippocampal tissue were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with model group, the time spent in the target quadrant of mice in GDL group was increased ($P < 0.05$), β -galactosidase activity in hippocampal neurons was significantly decreased ($P < 0.001$), the expressions of p53, p21 and p16 proteins in hippocampal tissue were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The results of network pharmacology and molecular docking suggested that the prevention of aging by GDL may be related to phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway and cell apoptosis. Animal experiments showed that GDL could up-regulate the expressions of PI3K/Akt signaling pathway proteins ($P < 0.05, 0.01, 0.001$) and inhibit the expressions of downstream apoptotic proteins such as cleaved cysteine aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) and B-cell lymphoma associated X protein (Bax) ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** GDL could improve the cognitive function of *D*-galactose-induced aging mice, inhibit aging induced cell apoptosis, and its mechanism may be related to the regulation of PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: ginkgo diterpene lactone; *D*-galactose; aging; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt pathway

全球人口正在迅速老龄化, 据世界卫生组织估计, 2030 年 60 岁及以上人群的数量将超过 14 亿^[1]。细胞衰老在多种与年龄相关的疾病的发生和发展中起着核心作用, 尤其是阿尔茨海默病等神经退行性疾病^[2-3]。在大脑中, 细胞衰老会破坏正常的细胞功能, 海马体尤其脆弱, 极易受到损伤, 导致突触丢失、认知能力下降, 并最终引发神经退行性疾病^[4-5]。因此, 迫切需要研发针对细胞衰老的靶向治疗策略, 以减缓衰老和神经退行性疾病的进展。近期的研究针对不同机制发现了几种具有前景的抗衰老药物, 包括二甲双胍、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺) 前体、胰高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 受体激动剂、抗炎药物等^[6]。然而, 目前的治疗方法存在局限性, 包括不良反应多、对潜在机制了解不足以及缺乏强有力的临床证据等。

中医药历史悠久, 中药在抗衰老方面也有大量的研究^[7-8]。银杏作为最古老的植物之一, 其叶子和果实具有重要的药用价值, 包括通畅血管、改善大脑功能、延缓大脑衰老、治疗冠心病等。银杏二萜内酯 (ginkgo diterpene lactone, GDL) 从银杏叶 *Ginkgo Folium* 提取, 主要包括银杏内酯 A (ginkgolide A, GA)、银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 和银杏内酯 K (ginkgolide K, GK) 3 种活性成分, 以其制成的中药注射液——银杏二萜内酯葡胺注射液对脑卒中具有良好的治疗作用^[9]。研究表明, GDL 具有抗血小板聚集、抗炎、抗氧化应激、抗凋亡、减轻脑屏障损伤、促进神经元等药理作

用^[10]。课题组前期研究表明, GDL 能够抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 神经元衰老^[11], 但是缺乏体内的相关研究。鉴于当前针对 GDL 拮抗衰老的机制研究相对匮乏, 且已有研究充分表明缓解细胞衰老对于保护脑内神经元免受损伤具有至关重要的作用^[12], 本研究采用 *D*-半乳糖诱导小鼠衰老模型, 结合网络药理学分析与分子对接技术, 探讨 GDL 的抗衰老效果及其潜在机制, 从而为临床治疗与衰老相关疾病的干预提供新的策略。

1 材料

1.1 动物

30 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体质量 28~30 g, 6~8 周龄, 购自上海吉辉实验动物饲养有限公司, 动物生产许可号 SCXK (沪) 2022-0009, 动物合格证号 20220009020690。动物饲养于恒温 (22±2)℃、恒湿 (55±5)%、12 h 光照/黑暗循环的环境中, 自由进食饮水。动物实验经上海中医药大学伦理委员会批准 (批准号 PZSHUTCM2404050001)。

1.2 药品与试剂

GDL (质量分数为 98%, 批号 240112) 由江苏康缘药业股份有限公司中药制药过程与智能制造技术全国重点实验室制备; *D*-半乳糖 (质量分数为 99%, 批号 JF68252A)、膜蛋白、核蛋白和胞质蛋白提取试剂盒 (批号 P9163) 购自上海泰坦科技股份有限公司; 二甲双胍 (metformin, MET, 批号 A506198) 购自上海生工生物工程有限公司; 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 O1028A)、PBS (批号 MA0020) 购自大连美仑生物技术有限公司;

BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)、RIPA 裂解液(批号 P0038)、PMSF(批号 ST505)、蛋白酶抑制剂混合物(批号 P1045)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号 P0015L)、ECL 化学发光液(批号 P0018FM)、脱脂奶粉(批号 P0216)、 β -半乳糖苷酶染色试剂盒(批号 C0602)、蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt) 抗体(批号 AF1789) 购自上海碧云天生物技术公司; NC 膜(批号 57444203) 购自美国 Pall Corporation 公司; p53 抗体(批号 2524)、 β -actin 抗体(批号 3700)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved cysteine-aspartate protease-3, cleaved Caspase-3) 抗体(批号 9661)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体(批号 2118)、抗兔二抗(批号 7074)、抗小鼠二抗(批号 7076) 购自美国 CST 公司; p-Akt 抗体(批号 ab8805) 购自英国 Abcam 公司; p21 抗体(批号 10355)、Lamin B1 抗体(批号 12987) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; p16 抗体(批号 sc-1661) 购自美国 Santa Cruz 公司; B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体(批号 WL01556)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(批号 WL01637) 购自沈阳万类生物科技有限公司; 磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体(批号 61139R) 购自北京博奥森生物有限公司; p-PI3K 抗体(批号 PC6417) 购自上海 Abmart 有限公司。

1.3 仪器

JLBehv 型动物行为学影像采集系统(上海吉量生物科技有限公司); Flex Station3 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); DM6B 型荧光显微镜、CM1950 型冷冻切片机(德国 Leica 公司); PowerPac HC 蛋白印迹转印系统、Universal Hood II Chemi Doc XRS System 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); Multifuge X1R 型高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

动物适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组及 GDL 低、高剂量(5、10 mg/kg) 组和二甲双胍(200 mg/kg) 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余小鼠于颈部 sc D-半乳糖(500 mg/kg)^[13], 持续 8 周, 对照组 sc 生理盐水。从第 3 周开始, 各给药组 ip GDL^[13]或 ig 二甲双胍^[14-15], 1 次/d, 持续 6 周。

2.2 小鼠一般状态及体质量观察

在实验过程中, 每日记录各组小鼠的精神状态、毛发变化等表现, 并于每周固定时间测量并记录小鼠体质量。

2.3 水迷宫实验

在实验最后 1 周进行 Morris 水迷宫实验, 持续 5 d。前 4 d 进行定位导航训练, 第 5 天进行空间探索实验。在定位导航阶段, 每只小鼠每天接受 2 次训练。实验过程中, 将小鼠放入水中, 面朝水池壁, 记录其找到平台所需的时间; 若小鼠在 90 s 内未能找到平台, 则将其引导至平台, 并在平台上停留 10 s。在第 5 天的空间探索实验中, 首先移除平台, 并在水中加入黑色墨水以干扰小鼠的视线; 接着, 将小鼠从远离原平台象限的地方放入水中, 允许其自由探索 90 s。实验结束时, 记录小鼠的游泳轨迹、在原平台象限停留的时间占比以及穿越平台的次数。

2.4 β -半乳糖苷酶染色检测小鼠海马神经元衰老

行为学实验结束后, 对小鼠进行麻醉并进行心脏灌注以取脑。每组随机选取 3 只小鼠, 用 4%多聚甲醛进行脑内灌注固定, 之后进行 24 h 外固定处理。第 2 天使用蔗糖溶液进行梯度脱水, 脱水完成后, 将小鼠大脑进行包埋, 并使用冰冻切片机进行切片, 切片厚度为 20 μ m, 将切片置于黏附性载玻片上, 根据 β -半乳糖苷酶染色试剂盒说明书进行染色, 孵育结束后, 吸除染色液并使用 PBS 清洗脑片。利用倒置显微镜观察并收集图像, 通过 Image J 软件进行定量分析。

2.5 免疫荧光法检测海马区 cleaved Caspase-3、p-PI3K 和 p-Akt 表达

取各组小鼠脑片, 放置室温 30 min, 利用 4%多聚甲醛溶液固定 15 min, 随后使用 0.1% Triton X-100 处理 30 min 增加通透性, PBS 洗涤 3 次; 用 1%牛血清白蛋白封闭 1 h 后, 加入一抗于 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 洗涤 3 次; 室温下避光孵育二抗 2 h, PBS 洗涤 3 次; 最后, 加入 DAPI 核染色 10 min。封片后, 通过荧光显微镜观察染色结果, 并利用 Image J 软件对图像进行定量分析。

2.6 Western blotting 检测海马组织 p53、p21、p16、Lamin B1、PI3K/Akt 通路、Bax、Bcl-2 蛋白表达

取适量海马组织, 加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 提取组织总蛋白, 于冰上裂解 30 min 后, 12 000 r/min 离心 10 min; 对于核膜蛋白按照核膜蛋白提取试剂盒说明书进行提取。采用

BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白浓度。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,在 5%脱脂牛奶中封闭 2 h,加入相应一抗,4 ℃ 孵育过夜;加入二抗,室温孵育 2 h。使用 ECL 发光试剂进行显影处理,并通过化学发光成像系统可视化,利用 Image J 软件进行灰度值分析。

2.7 网络药理学分析

2.7.1 GDL 主要活性成分靶点收集 使用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 得到 GDL 活性成分 GA、GB、GK 的 SDF 格式文件,通过 Pharmmapper 数据库检索得到其作用靶点。删除重复项并结合 Uniport 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对其进行标准化处理。

2.7.2 衰老相关靶点收集 以“aging”和“senescence”为关键词,通过 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 进行检索,获得与衰老相关的靶点。删除重复靶点并结合 Uniport 数据库,进行标准化处理。

2.7.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 利用 Venny 2.1 工具绘制韦恩图,分析 GDL 活性成分靶点与衰老靶点的交集,筛选出共同作用的靶基因。利用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络模型,将物种设置为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值设为 medium confidence (0.400),以获取蛋白质相互作用数据。使用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 网络进行可视化分析,筛选得到核心靶点。

2.7.4 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 利用 DAVID 6.8 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,使用微生信 (<http://www.bioinformatics.com.cn/login/>) 对 KEGG 富集分析结果进行可视化处理。

2.7.5 分子对接验证 选择 KEGG 分析中排名第 1 的 PI3K/Akt 核心靶点和 GDL 中活性成分靶点进行分子对接。在 PubChem 数据库中下载 GA、GB 和 GK 的 SDF 结构文件,并通过 AutoDock Tools 1.5.6 将其转换为 pdbqt 格式。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶点的 PDB 格式蛋白结构文件,使用 PyMOL 2.3.0 和 AutoDock Tools 1.5.6 对蛋白结构进行去水、加全氢处理,并将处理

后的文件保存为 pdbqt 格式。通过 AutoDock Vina 1.2.0 完成分子对接分析,并利用 PyMOL 对对接结果进行可视化展示。

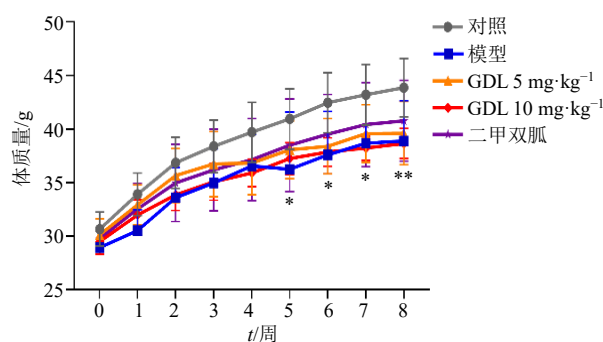
2.8 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 GraphPad 9.0 软件进行统计分析。两组间比较采用双样本独立 Students' *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 GDL 改善衰老小鼠的认知功能

模型组小鼠在 sc *D*-半乳糖 2 周后,开始出现皮肤松弛、沉闷,毛发淡黄、精神减退、食欲下降等现象;给予 GDL 和二甲双胍干预后,小鼠上述状况均有一定程度的改善。如图 1 所示,与对照组比较,第 5 周模型组小鼠体质量显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01);与模型组比较,GDL 组和二甲双胍组小鼠体质量减轻速率有所减缓。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

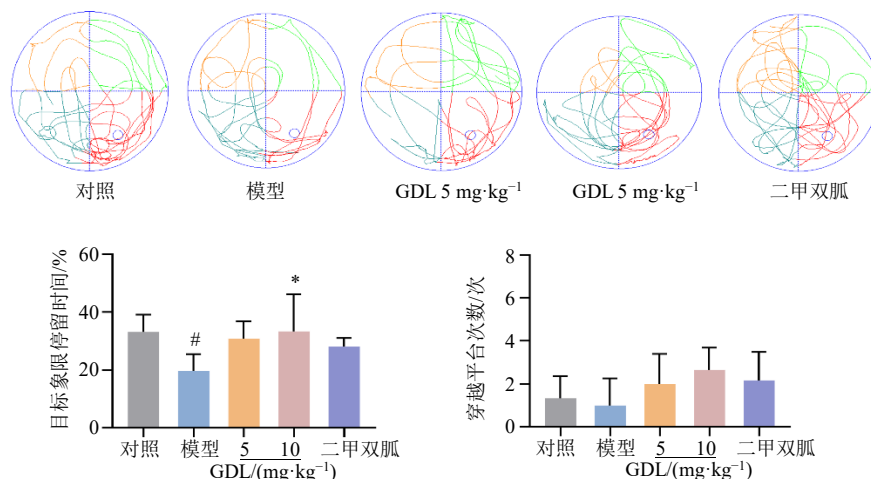
图 1 各组小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Changes in body weight of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

水迷宫实验结果如图 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠的运动轨迹较短,路径较为混乱且缺乏目的性;与模型组比较,GDL 低、高剂量组和二甲双胍组小鼠的运动轨迹有所延长,其中 GDL 高剂量组小鼠在目标象限停留的时间显著超过模型组 ($P < 0.05$)。结果表明 *D*-半乳糖可诱导小鼠脑损伤,导致小鼠认知缺陷,而高剂量 GDL 干预能够改善认知缺陷。

3.2 GDL 减轻 *D*-半乳糖诱导的小鼠海马神经元衰老

如图 3 所示,与对照组比较,模型组海马区 β -半乳糖苷酶活性显著升高 ($P < 0.001$)。如图 4 所示,*D*-半乳糖诱导海马区域细胞周期相关蛋白 p53、



与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$, 下图同。
[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 2 GDL 改善衰老小鼠的认知功能 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 GDL improves cognitive function in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

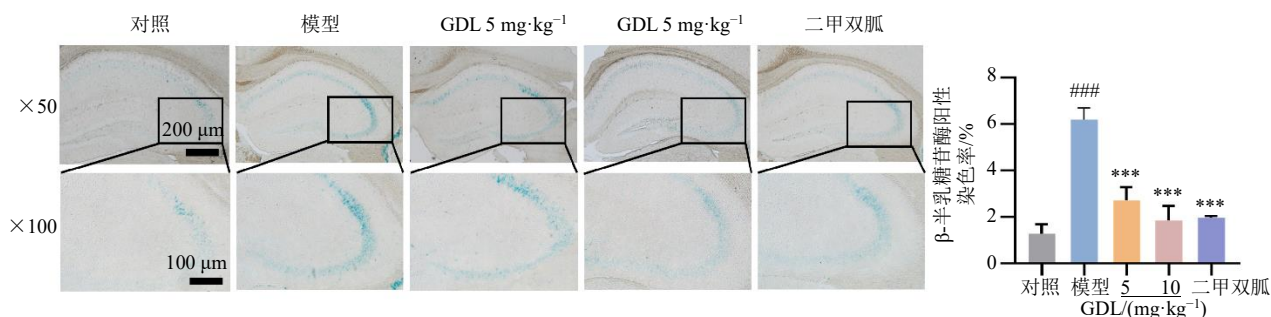


图 3 GDL 减轻 *D*-半乳糖诱导的小鼠海马区 β-半乳糖苷酶活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 GDL attenuates *D*-galactose-induced β-galactosidase activity in hippocampus of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

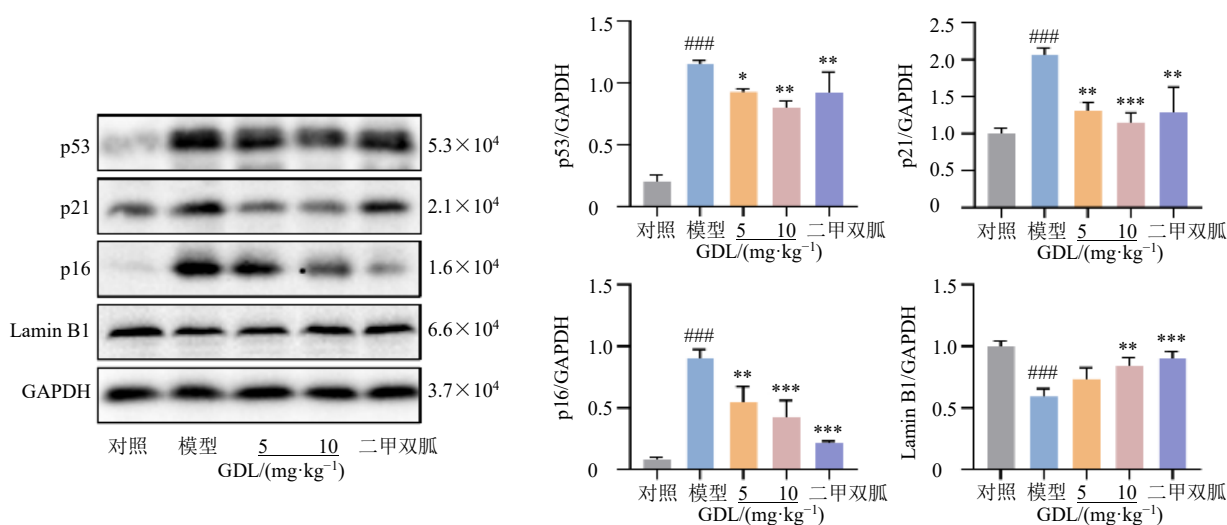


图 4 GDL 抑制 *D*-半乳糖诱导的小鼠海马 p53、p21、p16 和 Lamin B1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 GDL attenuates *D*-galactose-induced protein expressions of p53, p21, p16 and Lamin B1 in hippocampus of mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

p21、p16 表达升高 ($P < 0.001$)。核膜蛋白 Lamin B1 是构成核膜形状和完整性的关键成分^[16]。D-半乳糖诱导 Lamin B1 的表达减少 ($P < 0.001$)，提示对核膜完整性的破坏。以上结果表明 D-半乳糖可显著诱导小鼠海马神经元衰老。GDL 干预后， β -半乳糖苷酶活性显著下降 ($P < 0.001$)，并能显著降低 p53、p21、p16 的表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，同时 GDL 高剂量组能够显著促进 Lamin B1 的表达 ($P < 0.01$)。以上结果表明 GDL 可减轻 D-半乳糖诱导的小鼠海马神经元衰老。

3.3 网络药理学分析结果

3.3.1 GDL 主要活性成分靶点 通过 PubChem 数据库和 Phrammapper 数据库检索，得到 GDL 的主要活性成分 GA、GB、GK 的作用靶点。结合 Uniport 数据库对其进行标准化处理并删除重复项，最终得到 340 个作用靶点。

3.3.2 GDL 抗衰老的潜在靶点 通过 GeneCards 数据库检索得到“aging”相关靶点 25 000 个，以 Score 大于 12.7 为条件，筛选得到相关靶点 353 个，检索到“senescence”相关靶点 5 740 个，以 Score 大于 4.7 为条件，筛选得到相关靶点 111 个；通过 OMIM 数据库检索得到“aging”相关靶点 606 个，得到“senescence”相关靶点 544 个。整合 2 个数据库并去重后共得到 596 个疾病靶点。将 GDL 活性成分的 340 个靶点与衰老的 596 个相关靶点取交集，获得 58 个共同靶点（图 5）。

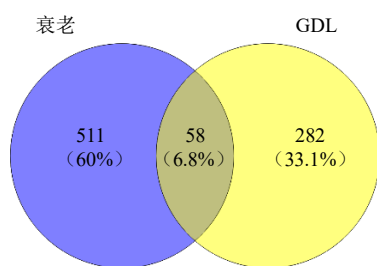


图 5 交集靶点韦恩图

Fig. 5 Venny plot of interaction targets

3.3.3 潜在靶点的 PPI 网络分析 将 58 个潜在靶点导入 STRING 数据库，构建靶蛋白互作网络图（图 6）。然后，将结果文件导入 Cytoscape 3.2.1 进行 PPI 网络分析（图 7）。该网络包含 56 个节点和 990 条边（其中 2 个靶点未与其他蛋白连接，因此未显示在 PPI 网络中）。经网络拓扑学分析，各节点的度值中位数为 30，以度值 ≥ 60 为筛选条件，得到 8 个

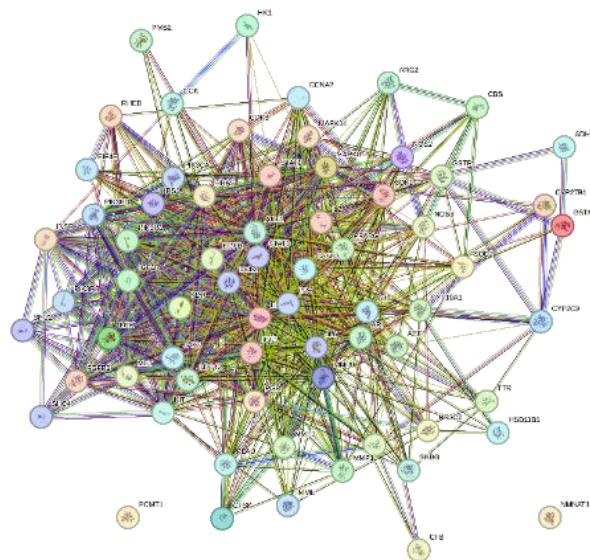


图 6 交集靶点蛋白互作网络图

Fig. 6 Network of intersection target protein interaction

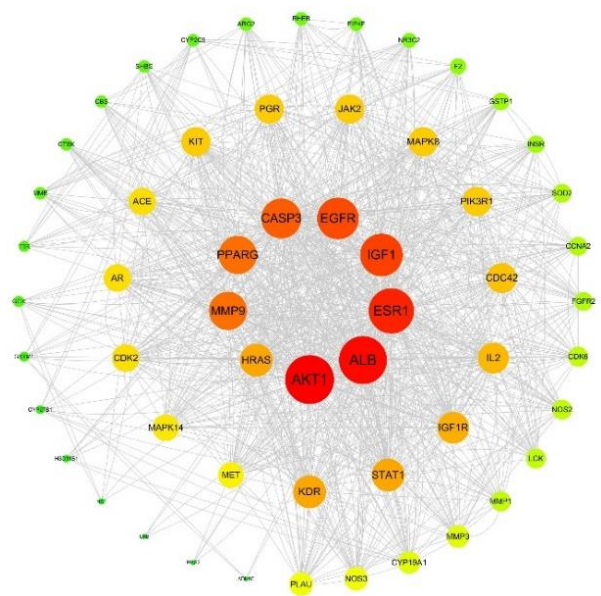


图 7 PPI 网络中的核心靶点筛选

Fig. 7 Key targets screening in PPI network

核心靶点，即 AKT1、白蛋白 (albumin, ALB)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF1)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, CASP3)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPARG)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9)。

3.3.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 利用

DAVID 平台对 58 个潜在靶点进行 GO 功能富集分析, 其中生物过程 (biological process, BP) 分析包括 239 个条目, 涉及蛋白质磷酸化、正调控丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联、正调控细胞迁移、正调控细胞增殖; 细胞组分 (cellular component, CC) 分析包括 33 个条目, 涵盖细胞溶质、细胞外区、细胞的外泌体等; 分子功能 (molecular function, MF) 分析包括 71 个

条目, 主要涉及蛋白酪氨酸激酶活性、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、酶结合等。将排名前 10 的条目绘制 GO 富集分析图, 见图 8。KEGG 通路主要富集在 PI3K-Akt 信号通路、长寿调节途径、FoxO 信号通路、细胞凋亡等 (图 9)。以上信号通路与衰老过程中涉及的能量代谢、氧化损伤、凋亡、炎症反应等病理生理过程密切相关, 提示 GDL 可能通过以上通路调控其发挥抗衰老的作用。

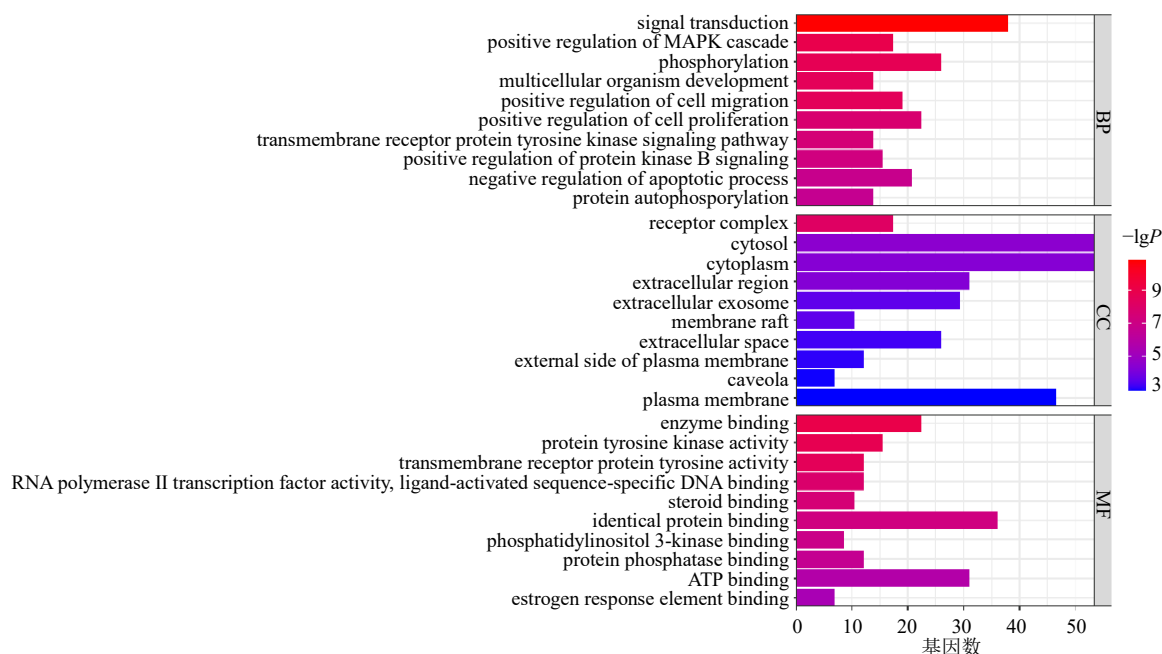


图 8 GO 功能富集分析 (前 10)

Fig. 8 GO function enrichment analysis (top 10)

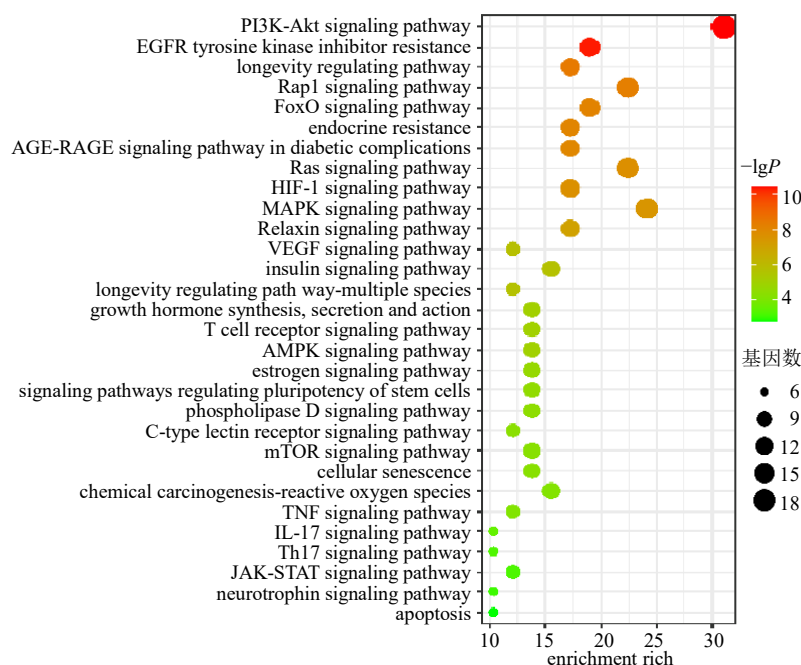


图 9 KEGG 通路富集分析

Fig. 9 KEGG pathway enrichment analysis

3.3.5 分子对接验证 将 GDL 的 3 个活性成分与 KEGG 分析富集到的 PI3K、Akt 靶点进行对接, 结果见图 10, GA、GB、GK 与 PI3K、Akt 的结合能均小于 -5 kcal/mol ($1 \text{ kcal/mol} = 4.182 \text{ kJ/mol}$), 表

明 GDL 的 3 个活性成分与 PI3K、Akt 靶点之间具有较强的结合能力, 验证了网络药理学预测的信号通路的准确性。提示 PI3K/Akt 信号通路可能是 GDL 拮抗衰老的潜在作用通路。

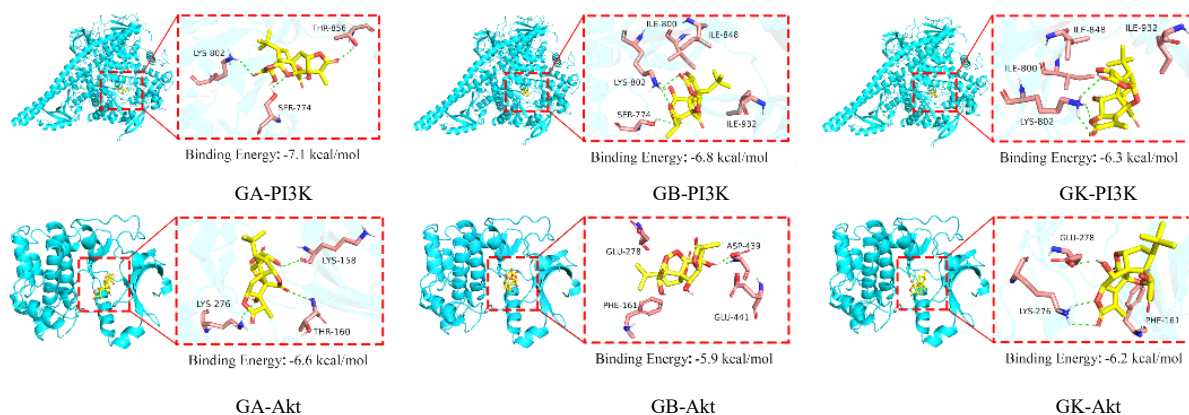


图 10 GDL 活性成分与核心靶点蛋白的分子对接图

Fig. 10 Molecular docking diagram of GDL active ingredients with core target proteins

3.4 GDL 通过调控 PI3K/Akt 信号通路减轻小鼠衰老和凋亡

网络药理学结果提示 GDL 的作用与 PI3K/Akt 信号通路和细胞凋亡间具有较强相关, 同时 PI3K/Akt 信号通路也参与细胞凋亡程序的调控。有研究报道, *D*-半乳糖诱导氧化应激, 诱导不可逆的细胞凋亡, 导致衰老和功能退化^[17]。采用 Western blotting 和免疫荧光法检测海马组织中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达情况, 如图 11、12 所示, 与对照组

比较, 模型组小鼠海马 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, GDL 高剂量组和二甲双胍组 p-PI3K/PI3K 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 各给药组 p-Akt/Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 免疫荧光结果与 Western blotting 结果一致。

如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠海马 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较,

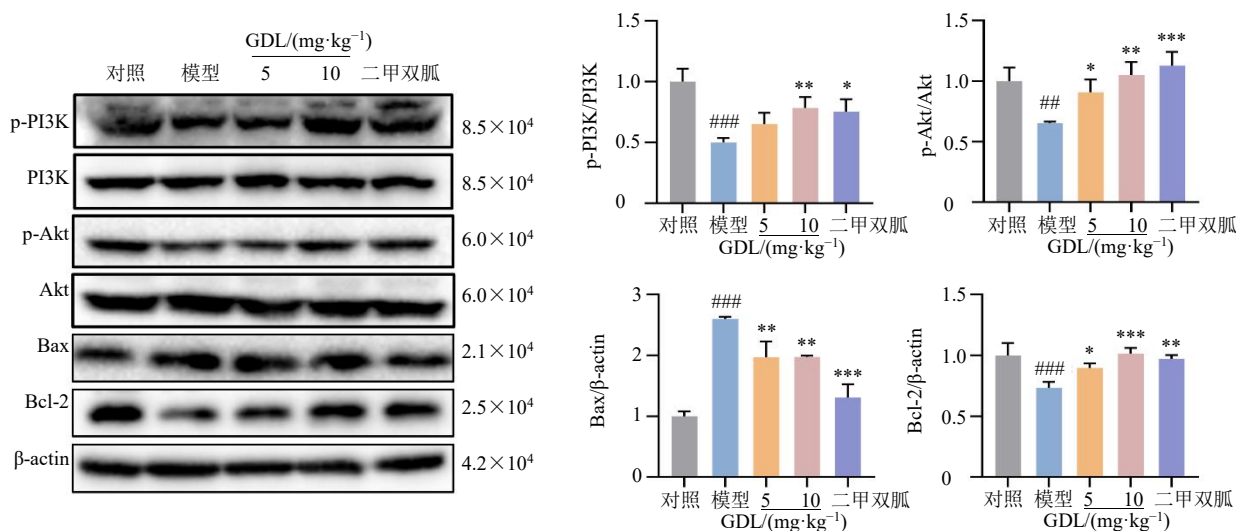


图 11 GDL 调控 PI3K/Akt 信号通路减轻小鼠衰老和凋亡 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 GDL modulates PI3K/Akt signaling pathway to attenuate aging and apoptosis in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

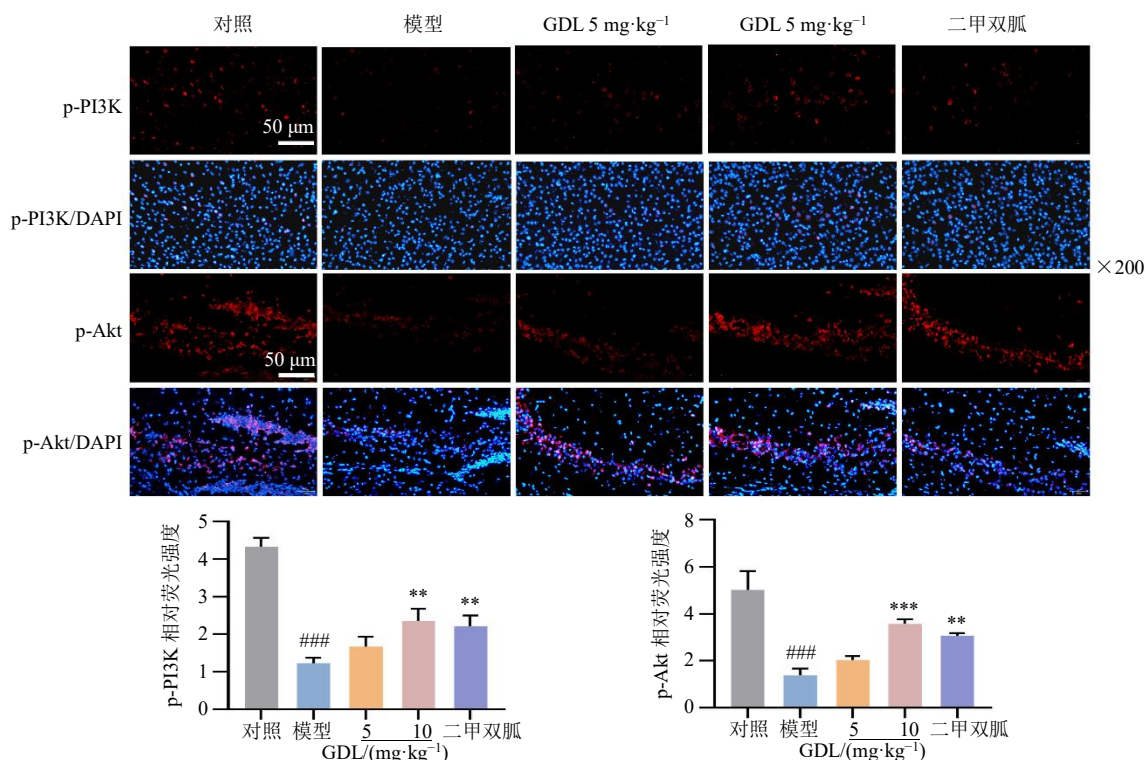


图 12 GDL 下调衰老小鼠 p-PI3K 和 p-Akt 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 GDL down-regulates expressions of p-PI3K and p-Akt in aging mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

各给药组 Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。如图 13 所示,与对照组比较,模型组小鼠海马组织 cleaved Caspase-3 蛋白表达显著升

高 ($P < 0.001$); 与模型组比较,各给药组 cleaved Caspase-3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.001$)。以上结果表明, GDL 通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥拮抗衰老、抑制神经元凋亡的作用。

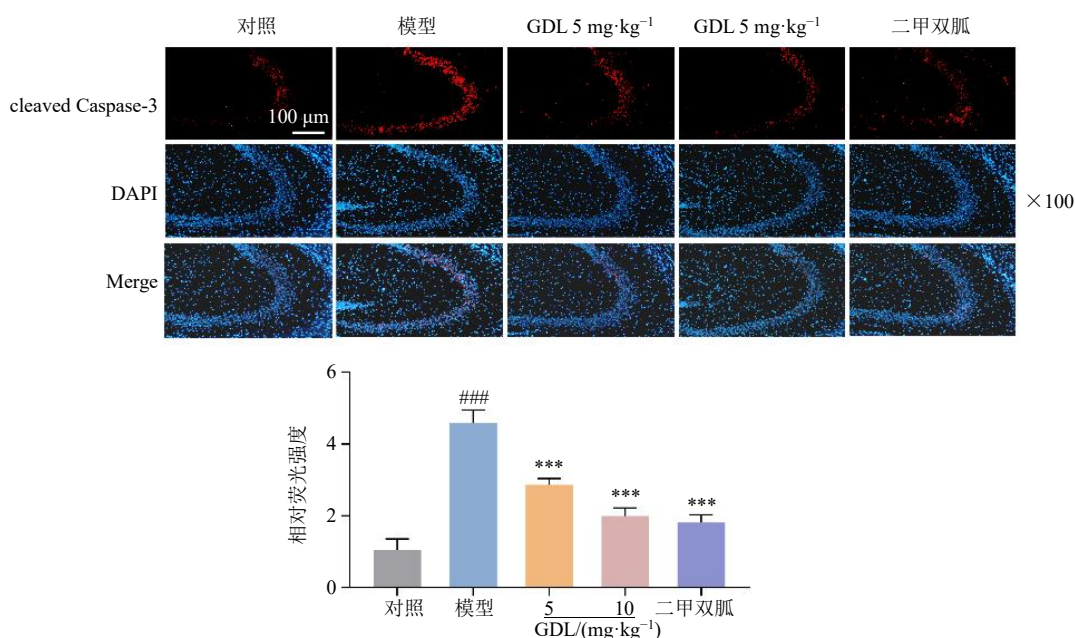


图 13 GDL 抑制 D-半乳糖诱导的小鼠海马 cleaved Caspase-3 表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 GDL inhibits cleaved Caspase-3 expression in hippocampus of D-galactose-induced mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

越来越多的研究强调,衰老是神经退行性疾病发生的关键因素,随着年龄增长,大脑经历脑萎缩、神经元突触丢失、神经化学递质降低等变化,最终走向脑衰老^[18]。GDL 是天然的中药提取物,能够穿过血脑屏障,用于治疗卒中、梗死和阿尔茨海默病等神经系统疾病,同时改善神经功能^[19]。本研究旨在探讨 GDL 减轻 *D*-半乳糖诱导小鼠脑衰老、保护神经元的潜在作用机制。

D-半乳糖作为公认的衰老诱导剂,主要通过诱导蛋白质反应形成晚期糖基化终末产物,降低抗氧化酶活性,最终导致线粒体损伤,从而模拟与自然衰老相似的生理变化^[20]。*D*-半乳糖可通过增加线粒体功能障碍、炎症、细胞凋亡,诱导大脑衰老。本研究利用 *D*-半乳糖持续干预小鼠,成功诱导小鼠出现衰老表型,包括皮肤松弛、食欲下降和行为认知障碍。给予 GDL 和二甲双胍干预 6 周后,小鼠体质量增长速率和精神状态得到有效恢复,学习能力和空间记忆能力显著改善,尤其 GDL 高剂量组效果更明显。

衰老细胞常伴随的主要特征包括细胞周期阻滞、端粒缩短、DNA 损伤、氧自由基增加、衰老相关分泌表型改变、溶酶体增大、细胞核体积增大等^[1]。p53/p21 和 p16/Rb 通路在衰老过程中起关键的细胞周期调控作用,肿瘤抑制基因 p53 的激活参与细胞凋亡、细胞周期停滞和衰老^[21]; p21 是 p53 已知的下游靶标,当受到 p53 刺激时,能够与细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 构成复合体,抑制激酶活性,并调节细胞衰老过程中的细胞周期停滞^[22]; p16INK4a 作为重要的抑癌基因,通过抑制 CDK4/6 和 D 型细胞周期蛋白的结合,阻滞 CDK4/6 对 Rb 的磷酸化,阻止细胞进入 S 期。在正常情况下, p53/p21 的表达水平较低,细胞衰老时该通路会被激活,同时 β -半乳糖苷酶活性增加,细胞核中 LMNB1 缺失^[23]。在本研究中,模型组衰老小鼠海马区 β -半乳糖苷酶阳性染色率增加,细胞停滞蛋白 p53、p21 和 p16 表达增加,而 GDL 干预有效减轻小鼠脑内细胞周期停滞的变化。此外,银杏内酯具有清除自由基、提高抵抗 DNA 损伤的能力^[24],可多靶点改善细胞衰老状态,缓解损伤。以上结果提示, GDL 能够抑制溶酶体增大、细胞周期停滞、过度氧化及 DNA 损伤等衰老特征,表明 GDL 具有减轻高糖氧化导致的细

胞衰老能力。

通过网络药理学和分子对接分析发现, GDL 的 3 个活性成分 GA、GB、GK 与 PI3K/Akt 信号通路存在较强的相关性。同样有研究表明沉默调节蛋白 1 (sirtuin 1, SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、PI3K/Akt、叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FoxO1) 可能是银杏内酯发挥抗衰作用的优先靶点^[24], Liu 等^[25]发现银杏内酯 B 能够通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡,提示 GDL 对衰老的调控可能涉及 PI3K/Akt 信号通路。在神经退行性疾病中, PI3K/Akt 信号通路的紊乱被认为是导致神经元损伤和死亡的主要机制之一,阿尔茨海默病、帕金森病患者脑中 Akt 的磷酸化水平显著下降,导致 β -淀粉样蛋白无法清除、 α -突触核蛋白异常聚集、多巴胺能神经元退化^[26-27]。PI3K/Akt 的激活可改善受损的神经血管单位,从而增强缺血性卒中大鼠的血管生成和神经发生^[28]。此外,调控 PI3K/Akt 通路可有效减缓 *D*-半乳糖诱导的小鼠肝细胞氧化应激^[29],减少心肌细胞凋亡的发生,延缓心脏衰老^[30],这与 PI3K/Akt 通路调节哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、FoxO、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 等下游信号发挥调控细胞代谢异常、减少细胞内活性氧积累、抑制自噬失调、抑制细胞周期增殖有关。PI3K/Akt 通路不仅能够通过激活 Akt 调控 Bax 和 Bcl-2 的表达水平从而控制神经元存活和凋亡^[31],还能诱导小鼠双微体同源基因 2 (mouse double minute 2 homolog, MDM2) 激活,从而抑制 p53 产生的细胞周期阻滞和凋亡。在本研究中, GDL 不仅能够减轻衰老还能有效抑制衰老引起的细胞凋亡,表现为 cleaved Caspase-3 和 Bax 表达水平下降,同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平逐渐升高。同时, GDL 干预显著上调了衰老小鼠海马 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 的蛋白表达水平。上述结果提示 GDL 可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路延缓衰老,保护组织免受损伤并延缓神经退行性疾病的进展,同时也验证了网络药理学预测和分子对接分析的可靠性。

综上,本研究表明 GDL 通过激活 PI3K/Akt 通路,抑制神经元衰老和凋亡,展现出保护神经元的潜力。GDL 作为一种天然植物提取物,为减少神经

元衰老和治疗神经退行性疾病提供了新策略。后续本研究将在体外进行更深层次的验证,同时对网络药理学分析揭示的其他通路和靶点进行探讨,以免忽略重要靶点间的互作关系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] López-Otín C, Blasco M A, Partridge L, *et al.* Hallmarks of aging: An expanding universe [J]. *Cell*, 2023, 186(2): 243-278.
- [2] Liu R M. Aging, cellular senescence, and Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(4): 1989.
- [3] Fancy N N, Smith A M, Caramello A, *et al.* Characterisation of premature cell senescence in Alzheimer's disease using single nuclear transcriptomics [J]. *Acta Neuropathol*, 2024, 147(1): 78.
- [4] Bettio L E B, Rajendran L, Gil-Mohapel J. The effects of aging in the hippocampus and cognitive decline [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2017, 79: 66-86.
- [5] Si Z Z, Sun L L, Wang X D. Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111327.
- [6] Guarente L, Sinclair D A, Kroemer G. Human trials exploring anti-aging medicines [J]. *Cell Metab*, 2024, 36(2): 354-376.
- [7] Bjørklund G, Dadar M, Martins N, *et al.* Brief challenges on medicinal plants: An eye-opening look at ageing-related disorders [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2018, 122(6): 539-558.
- [8] Shen X Y, Dong X N, Han Y L, *et al.* Ginsenoside Rg1 ameliorates glomerular fibrosis during kidney aging by inhibiting NOX4 and NLRP3 inflammasome activation in SAMP8 mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106339.
- [9] 杜晓, 韩舟, 何斌, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液对急性缺血性脑卒中再通成功患者预后的影响 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46(3): 607-613.
- [10] 徐小波, 武子寅, 张新庄, 等. 银杏二萜内酯葡胺注射液及其银杏二萜内酯成分抗人脐静脉内皮细胞氧糖剥夺损伤的转录组学研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4233-4244.
- [11] 杜雨芯, 操娇娇, 张倩霞, 等. 银杏二萜内酯通过拮抗 PAFR 和调节 SIRT1/STAT3 抑制氧化应激诱导的 PC12 神经元衰老研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(9): 2793-2801.
- [12] Zhu X D, Chen Z Y, Shen W Y, *et al.* Inflammation, epigenetics, and metabolism converge to cell senescence and ageing: The regulation and intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 245.
- [13] Ye M J, Liu J L, Deng G H, *et al.* Protective effects of *Dendrobium huoshanense* polysaccharide on *D*-gal induced PC12 cells and aging mice, *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Food Biochem*, 2022, 46(12): e14496.
- [14] Barzilai N, Crandall J P, Kritchevsky S B, *et al.* Metformin as a tool to target aging [J]. *Cell Metab*, 2016, 23(6): 1060-1065.
- [15] Justice J N, Ferrucci L, Newman A B, *et al.* A framework for selection of blood-based biomarkers for geroscience-guided clinical trials: Report from the TAME Biomarkers Workgroup [J]. *Geroscience*, 2018, 40(5/6): 419-436.
- [16] Lyublinskaya O G, Ivanova J S, Pugovkina N A, *et al.* Redox environment in stem and differentiated cells: A quantitative approach [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 758-769.
- [17] Li C, Tan F, Yang J J, *et al.* Antioxidant effects of *Apocynum venetum* tea extracts on *D*-galactose-induced aging model in mice [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(9): 381.
- [18] Gaspar-Silva F, Trigo D, Magalhaes J. Ageing in the brain: Mechanisms and rejuvenating strategies [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(7): 190.
- [19] Zhang Q, Wang A X, Xu Q, *et al.* Efficacy and safety of ginkgo diterpene lactone meglumine in acute ischemic stroke: A randomized clinical trial [J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(8): e2328828.
- [20] Peng Z, Zhao C L, Yang Z J, *et al.* *D*-Galactose-induced mitochondrial oxidative damage and apoptosis in the cochlear stria vascularis of mice [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2023, 24(1): 27.
- [21] Chen J D. The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016, 6(3): a026104.
- [22] Han Z Y, Wang K T, Ding S L, *et al.* Cross-talk of inflammation and cellular senescence: A new insight into the occurrence and progression of osteoarthritis [J]. *Bone Res*, 2024, 12(1): 69.
- [23] Suryadevara V, Hudgins A D, Rajesh A, *et al.* SenNet recommendations for detecting senescent cells in different tissues [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(12): 1001-1023.
- [24] Phu H T, Thuan D T B, Nguyen T H D, *et al.* Herbal medicine for slowing aging and aging-associated conditions: Efficacy, mechanisms and safety [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2020, 18(4): 369-393.
- [25] Liu J, Wu P, Xu Z H, *et al.* Ginkgolide B inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis and attenuates cytotoxicity via activating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in H9c2 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(1): 310-316.
- [26] Iranpanah A, Kooshki L, Moradi S Z, *et al.* The exosome-

- mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in neurological diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 1006.
- [27] Razani E, Pourbagheri-Sigaroodi A, Safaroghli-Azar A, *et al.* The PI3K/Akt signaling axis in Alzheimer's disease: A valuable target to stimulate or suppress? [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2021, 26(6): 871-887.
- [28] Wang H J, Ran H F, Yin Y, *et al.* Catalpol improves impaired neurovascular unit in ischemic stroke rats via enhancing VEGF-PI3K/AKT and VEGF-MEK1/2/ERK1/2 signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(7): 1670-1685.
- [29] Yu F X, Zhao B, Guan K L. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer [J]. *Cell*, 2015, 163(4): 811-828.
- [30] 漆仲文, 吴丹, 赵俊男, 等. 中药治疗心血管衰老药理作用研究进展与思考 [J]. *中草药*, 2024, 55(21): 7567-7574.
- [31] Zhang W J, Wu N, Wang H, *et al.* Sulfated fuco-mannoglucuronogalactan alleviates pancreatic beta cell senescence via PI3K/AKT/FoxO1 pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 236: 123846.

[责任编辑 李亚楠]