

基于网络药理学、分子对接及细胞实验验证探讨藏红花素改善阿尔茨海默病的作用机制

郭紫文^{1,2}, 王艳³, 陶伟伟³, 柏峰¹, 陈畅^{2*}

1. 南京中医药大学鼓楼临床医学院, 江苏 南京 210009

2. 南京中医药大学养老服务与管理学院, 江苏 南京 210023

3. 南京中医药大学中西医结合学院, 江苏 南京 210023

摘要: 目的 利用网络药理学、分子对接技术和细胞实验验证, 探讨藏红花素改善阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 的作用机制。方法 运用 Super-PRED、DisGenet、Genecards、Uniprot、STRING 数据库构建藏红花素与 AD 的相互作用网络, 导入 Cytoscape 软件根据连接程度筛选枢纽基因, 并进行基因本体 (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, 应用 Autodock vina 软件进行分子对接验证。体外采用脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导 BV2 小胶质细胞炎症模型, 给予藏红花素干预后, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, qRT-PCR 检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , *TNF- α*)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , *IL-1 β*)、*IL-6* mRNA 表达, Western blotting 检测磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) /糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 通路相关蛋白表达。结果 网络药理学结果显示, 藏红花素可能通过调控 PI3K-Akt 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路等, 作用于热休克蛋白 90AA1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1)、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit α , PIK3CA)、E1A 结合蛋白 p300 (E1A-binding protein p300, EP300) 等靶点, 发挥治疗 AD 的作用。分子对接结果显示藏红花素与 PIK3R1 靶点对接效果良好。细胞实验结果显示, 藏红花素显著抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞中炎症因子表达 ($P < 0.05$, 0.01), 促进 PI3K、Akt、GSK-3 β 的磷酸化 ($P < 0.05$)。结论 藏红花素具有改善小胶质细胞极化、抗神经炎症的作用, 其作用机制与激活 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路有关。

关键词: 藏红花素; 神经炎症; 小胶质细胞; 阿尔茨海默病; PI3K; Akt; GSK-3 β

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)13-4712-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.13.015

Mechanism of crocin in improving Alzheimer's disease based on network pharmacology, molecular docking and cellular validation

GUO Ziwen^{1,2}, WANG Yan³, TAO Weiwei³, BAI Feng¹, CHEN Chang²

1. Drum Tower Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210009, China

2. School of Elderly Care Services and Management, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

3. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of crocin in improving Alzheimer's disease (AD) by network pharmacology, molecular docking and cell experiments. **Methods** The interaction network between crocin and AD was constructed using Super PRED, DisGenet, Genecards, Uniprot and STRING databases. Hub genes were screened based on connectivity using Cytoscape software, and gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. Molecular docking validation was performed using Autodock vina software. *In vitro*, a BV2 microglial inflammation model was induced by lipopolysaccharide (LPS). After intervention with crocin, cell viability was detected by CCK-8 assay, mRNA

收稿日期: 2025-02-13

基金项目: 江苏省自然科学基金青年项目 (BK20240740); 南京中医药大学养老服务与管理学院专项研究项目 (2024YLFWYGL012)

作者简介: 郭紫文, 硕士研究生, 研究方向为临床药学。E-mail: 2824067261@qq.com

*通信作者: 陈畅, 博士, 讲师, 主治医师, 研究方向为中医药防治神经精神类疾病。E-mail: chenchang@njucm.edu.cn

expressions of tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), interleukin-1 β (*IL-1 β*) and *IL-6* was detected by qRT-PCR, Western blotting was used to detect protein expressions related to the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) pathway. **Results** The results of network pharmacology showed that crocin may act on heat shock protein 90AA1 (HSP90AA1), nuclear factor- κ B (NF- κ B), Toll-like receptor 4 (TLR4), phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1 (PIK3R1), and phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit α (PIK3CA) and E1A binding protein p300 (EP300), regulate PI3K-Akt signaling pathway, hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, thereby exert therapeutic effects on AD. The molecular docking results showed that crocin had a good docking effect with PIK3R1. The cell experiment results showed that crocin significantly inhibited the expressions of inflammatory factors in LPS-induced BV2 cells ($P < 0.05, 0.01$), and promoted the phosphorylation of PI3K, Akt and GSK-3 β ($P < 0.05$). **Conclusion** Crocin has the effects of improving microglial polarization and anti-neuroinflammation, and its mechanism is related to the activation of PI3K/Akt/GSK-3 β pathway.

Key words: crocin; neuroinflammation; microglial; Alzheimer's disease; PI3K; Akt; GSK-3 β

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases, NDs), 其主要特征为神经元变性, 表现为记忆力衰退、认知障碍^[1], 严重降低患者的生活质量。衰老、基因、环境都是导致 AD 的原因, 其中衰老是影响 AD 发病及和病情严重程度的主要因素, 病情随着患者年龄的增长而加剧。AD 的病理机制主要涉及神经元内 tau 蛋白异常磷酸化导致神经纤维原缠结, 以及细胞外 β 淀粉样蛋白 (amyloid- β , A β) 沉积。近年来, 神经炎症在 AD 的发生和进展中的关键作用逐渐被揭示。研究表明, 神经炎症不仅与 A β 沉积密切相关, 还能促进 tau 蛋白的病理性扩散, 并加剧广泛的神经元损伤及认知功能障碍。神经炎症不仅是 AD 病理进程的核心驱动因素之一, 而且作为关键的上游机制, 在 A β 聚集、tau 蛋白异常及神经退行性病变等病理过程中发挥重要调控作用^[2]。因此, 深入探讨神经炎症的机制及其在 AD 中的作用, 对于理解疾病发生发展以及探索潜在治疗策略具有重要意义。尽管已对 AD 的病理机制开展了大量研究, 但其确切发病机制尚不清楚, 目前仍缺乏有效的治疗方法^[3]。因此通过早期诊断, 从而及早干预, 以延缓疾病的进程、改善症状是控制 AD 疾病发展的重要策略。而开发新的治疗途径, 研究 AD 治疗药物的具体作用机制, 已经成为亟待解决的关键科学问题。

中医学为 AD 的研究提供了独特的理论依据, 中医认为 AD 当属疾病“痴呆”的范畴, 临床以呆傻愚笨、智力低下、善忘等为主要表现, 认为其发病机制与情绪失调、久病虚弱以及衰老导致的脑髓失养相关^[4]。其病机涉及气血不足、肾精亏虚、痰浊阻滞等^[5-6]。藏红花素又称为西红花苷、西红花素, 来源于茜草科植物大花栀子 *Gardenia jasminoides*

Ellis var. grandiflora Nakai. 的果实、鸢尾科植物藏红花 *Crocus sativus* L. 及同属其他植物的花柱头等, 是以藏红花素 I 为主的一类水溶性天然类胡萝卜素^[7], 是由藏红花酸和龙胆二糖或葡萄糖形成的一系列酯类化合物。现代药理学研究表明, 藏红花素对中枢神经系统、心血管系统具有保护作用, 具有抗氧化、抗抑郁、抗肿瘤、保肝、抗炎和解毒等作用^[8]。近年来, 藏红花素在治疗 AD 及其他认知障碍等 NDs 方面展现出其具有神经保护作用的潜力^[9]。研究表明, 藏红花素对乙酰胆碱酯酶的活性有抑制作用^[10], 并可降低多种促炎因子和神经毒性因子的水平^[11]。临床研究发现, 相较服用安慰剂的 AD 患者, 每日服用 15 mg 藏红花胶囊 (每日 2 次, 持续 16 周) 的 AD 患者认知功能有所改善^[12]。此外, 藏红花在缓解中度至重度 AD 患者的认知能力下降方面, 与美金刚表现出相当的疗效^[13]。网络药理学作为一种整合生物信息学与中药理论的新型研究手段, 通过阐释药物与多个靶点间的相互作用, 为药物研发提供了系统性视角^[14-15]。本研究旨在整合多种数据库, 鉴定藏红花素和 AD 的作用靶点, 并通过蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络分析和通路富集分析, 预测藏红花素治疗 AD 的关键靶点和通路。之后采用分子对接技术对靶点与化合物的作用进行预测。并进一步通过脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的 BV2 小胶质细胞炎症模型, 观察藏红花素对细胞形态、炎症因子水平及预测靶点蛋白的影响, 从而验证藏红花素改善神经炎症的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

BV2 小胶质细胞购自上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

藏红花素(批号 FKX408, 质量分数为 98%) 购自上海毕得医药科技有限公司; LPS (批号 L22880) 购自美国 Sigma 公司; 0.25% 胰蛋白酶(批号 C0203)、BCA 试剂盒(批号 P0012S) 购自上海碧云天生物技术有限公司; DMEM 高糖培养基(批号 G4511)、PBS 缓冲液(批号 G4202)、HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(批号 GB23303) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 批号 FB7012) 购自美国 Gibco 公司; 青霉素-链霉素(批号 BL505A) 购自 Biosharp 公司; CCK-8 试剂(批号 ATWF06121) 购自亚科因生物技术有限公司; FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit (批号 RC101-01)、HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR (批号 R333-01)、ChamQ Universal SYBR Qpcr Master Mix (批号 Q711-02) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 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* 、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*) 引物由上海生工生物公司合成; 磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 抗体(批号 4249T)、p-PI3K 抗体(批号 13857S)、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β) 抗体(批号 9315S)、p-GSK-3 β 抗体(批号 5558T) 购自美国 CST 公司; 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体(批号 10176-2-AP)、p-Akt 抗体(批号 66444-1-Ig)、GAPDH 抗体(批号 10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 仪器

FA1204X 型电子分析天平(天津天马衡基仪器有限公司); CLM-170B-8-TC 型 CO₂ 培养箱(新加坡 ESCO 公司); M200 Pro 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); CFX96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); LWD300-38LT 型倒置生物显微镜(上海测维光电技术有限公司); SVE-4 型垂直电泳仪、SVT-4 型转印电泳仪、SPW-DM 型电泳电源、DS-2S100 型脱色摇床(武汉赛维尔生物技术有限公司); Tanon-4600 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司); FQD-16A 型 PCR 仪(杭州博日科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学研究

2.1.1 活性成分作用靶点的获取 在 PubChem

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中获取藏红花素的 Smile name, 将 Smile name 导入 SuperPRED (<https://prediction.charite.de/>) 数据库, 获得 Target Name 和 Uniprot ID, 并且筛选 probability ≥ 0 的基因, 在 Uniprot 网站 (<http://www.uniprot.org/>) 将 Uniprot ID 转换为基因名 Gene Name, 以获得藏红花素发挥作用的主要基因靶点等结果。

2.1.2 AD 疾病靶点的获取 通过 DisGenet (<https://www.disgenet.org/home>) 和 Genecards (<https://www.Genecards.org/>) 数据库, 以“Alzheimer's disease”为关键词, 背景为人类基因, 筛选 relevance score ≥ 12 的靶点基因, 合并去重后, 得到 2 个数据库中按照条件筛选后与 AD 相关的全部基因。

2.1.3 “成分-靶点-疾病”网络的构建及分析 运用 JVenn 网站 (<http://jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html>) 软件作图, 将藏红花素的靶点与 AD 的靶点取交集。以藏红花素、作用靶点、疾病为节点, 通过 Cytoscape 3.10.1 软件构建“成分-靶点-疾病”网络模型, 获得藏红花素治疗 AD 的潜在作用靶点^[16]。连线表示二者之间的关联, 以此建立网络, 并对潜在作用靶点进行分析。

2.1.4 PPI 网络构建 通过 STRING 数据库 (<https://string-db.org/STRING11.0>) 构建 PPI 网络图, 最低互作分数设置为 >0.400 , 筛选隐藏没有相互联系的蛋白网络。运用 Cytoscape 软件构建藏红花素-AD 靶点网络, 并用插件“Centiscape 2.2”功能进行筛选, 采用 MCODE 插件进行网络分析, 节点的大小和颜色深浅表示度值的大小, 以边的粗细反映介数值大小。核心蛋白根据其关联程度进行排名。

2.1.5 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 登录 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), 将藏红花素与 AD 的交集基因导入 DAVID 数据库^[17], 选择物种为人类 (homo sapiens), 进行生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 的富集, 下载相应的数据文件。在微生信平台进行 GO 功能富集分析, 进行气泡图的构建。在微生信平台选择 pathway 富集分析, 输入基因, 进行 KEGG 通路富集分析, 得到气泡图^[18-19]。

2.1.6 药物核心成分与疾病核心靶点的分子对接验证 选择度值较高的蛋白与 KEGG 富集分析中与疾病相关的通路蛋白, 从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶点的晶体结构, 从靶受体蛋白中去除未针对蛋白质配体对接进行优化的杂原子, 例如晶体结构中存在的共晶配体、ATP、金属离子和水分子。从 PubChem 数据获得藏红花素的二维结构, 并使用 Chemdraw 软件将其转换为三维结构。使用 AutoDock vina (<http://vina.scripps.edu/AutoDock>) 将目标蛋白与藏红花素对接验证, 预测关键蛋白与关键化合物小分子的相互作用, 使用 LigPlot plus 对停靠复合物中蛋白质配体的相互作用进行研究, 通过 pymol 软件实现配体-靶点结合的 3D 可视化。

2.2 细胞实验验证

2.2.1 细胞培养 BV2 细胞用含 10% FBS 和 1% 双抗的 DMEM 高糖培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

2.2.2 CCK-8 法检测细胞存活率 将对数生长期的 BV2 细胞以 6×10⁴ 个/孔接种于 96 孔板中, 培养过夜, 分别加入 0.01、0.1、1、10、20、40 μg/mL 的 LPS 或 10、20、40、80、160 μmol/L 的藏红花素, 另设置对照组 (加入不含药物的培养基)。处理 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 于 37 °C 孵育 1 h, 采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞相对活力。

$$\text{细胞相对活力} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

设置对照组、模型组和藏红花素 (10、20、40、80、160 μmol/L) 组, 除对照组外, 其余各组加入 1 μg/mL 的 LPS 诱导炎症模型, 给药组同时加入相应浓度的藏红花素, 处理 24 h。测定细胞相对活力。

2.2.3 qRT-PCR 检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 mRNA 表达 BV2 细胞以 4×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板中, 培养 24 h。设置对照组、模型组和藏红花素 (80 μmol/L) 组, 每组 3 个复孔。按“2.2.2”项下处理 24 h 后, 于倒置显微镜下观察细胞形态变化, 收集细胞。按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。以 GAPDH 为内参, 通过 2^{-ΔΔCt} 方法计算目的基因的相对 mRNA 表达水平, 引物序列见表 1。

2.2.4 Western blotting 检测 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK-3β、p-GSK-3β 蛋白表达 按“2.2.3”项下方法分组和给药, 收集细胞, 提取细胞总蛋白,

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
<i>TNF-α</i>	F: ATGTCTCAGCCTCTTCTCATTC R: GCTTGTCACCTCGAATTTTGAGA
<i>IL-1β</i>	F: CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC R: TGTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGTAC
<i>IL-6</i>	F: CTCCCAACAGACCTGTCTATAC R: CCATTGCACAACCTTTTCTCA
<i>GAPDH</i>	F: GTTCCAGTATGACTCCACTC R: CCTCACCCCATTTGATGTTA

使用 BCA 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, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 2 h; 分别加入相应抗体, 4 °C 孵育过夜; TBST 洗膜 3 次, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 加入 ECL 发光试剂显影并拍照, 采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计分析和绘图, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对两组或三组及以上进行组间方差分析。

3 结果

3.1 藏红花素靶点的筛选

藏红花素是一种水溶性类胡萝卜素二羧酸, 主要产于番红花柱头和梔子花的果实中^[20], 占干质量的 30%^[21]。此外, 藏红花素已被证明可以进入血脑屏障^[22]。本研究对藏红花素 (PubChem CID5281233, CAS No.42553-65-1) 进行网络药理学分析, 从 Super-PRED 数据库中获取藏红花素主要靶点 105 个。

3.2 疾病靶点的预测

通过 DisGenet 数据库获得 AD 靶点基因 3 397 个, 将 score 低于 0.02 的删除, 剩余 1 849 个; 通过 GeneCards 数据库获得 AD 靶点基因 14 316 个, 将 Relevance score 低于 12 的删除, 剩余 1 599 个。将 2 个数据库得到的基因去重, 得到疾病相关基因 2 716 个。

3.3 “成分-靶点-疾病”网络的构建

运用 JVenn 将疾病靶点基因 2 716 个与藏红花素的靶点 105 个取交集, 得到药物疾病交集靶点基因 63 个 (图 1-A)。“成分-靶点-疾病”网络见图 1-B。

3.4 PPI 网络的构建和拓扑分析

将藏红花素治疗 AD 的 63 个靶点导入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络 (图 2)。网络中有 63 个节

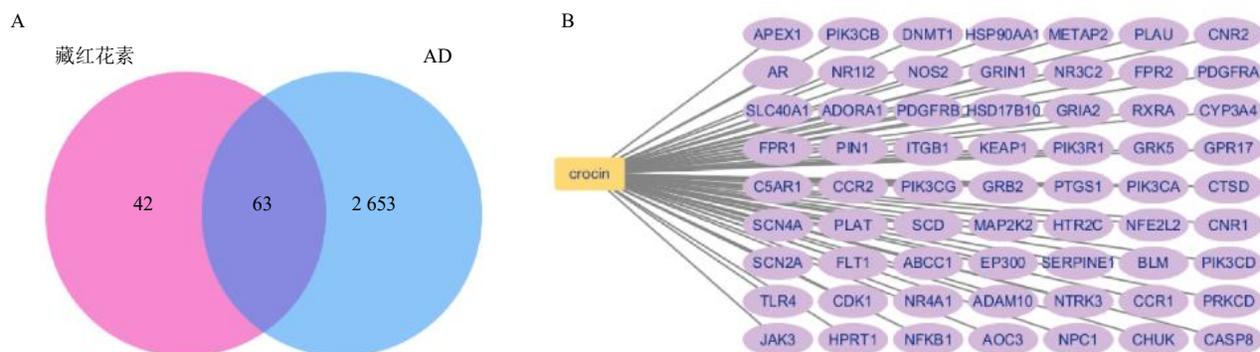
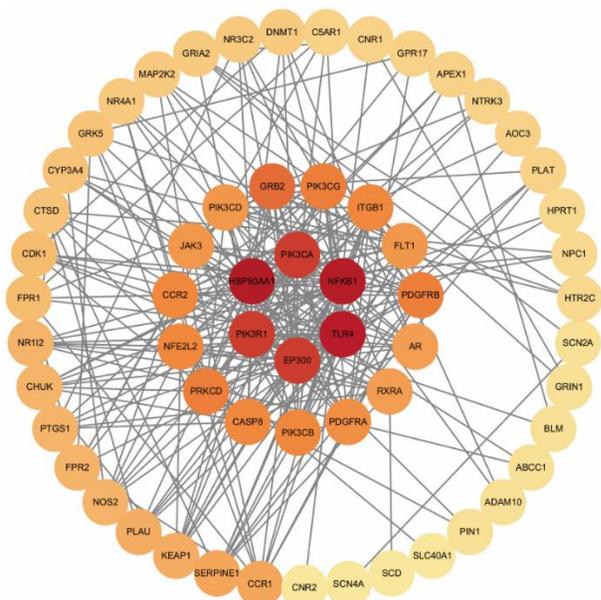


图 1 藏红花素与 AD 共有靶点的韦恩图 (A) 及“成分-靶点-疾病”网络 (B)

Fig. 1 Venn diagram of shared targets of crocin and AD (A) and “ingredient-target-disease” network (B)



节点代表蛋白，节点颜色越深则度值越大；连线代表蛋白之间的关系，连线越多表明与疾病的相关性越强。

Nodes represent proteins, and the darker the node color, the greater the degree value; The lines represent the relationships between proteins, and the more lines there are, the stronger the correlation with the disease.

图 2 PPI 网络

Fig. 2 PPI network

点，269 条边，平均节点度值为 8.54，平均局部聚类系数为 0.498。平均节点度值表示网络中每个蛋白质在指定分数阈值下的平均相互作用次数，数值越高表示蛋白质相互作用越稳定。聚类系数用来衡量网络内节点的互联性，数值越高表示结构越紧密。应用 Cytoscape 3.10.1 软件中 Centiscape 2.2 插件对核心靶点进行筛选，按照接近中心性大于 0.007 362、中介中心性大于 82.466 667、度值大于 8.966 667 为条件

筛选，得到核心靶点 11 个。其中关键蛋白热休克蛋白 90AA1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1, 度值=28)、核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB, 度值=27)、Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4, 度值=26)、磷脂酰肌醇 3-激酶调节亚基 1 (phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit 1, PIK3R1, 度值=22)、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit α, PIK3CA, 度值=22)、E1A 结合蛋白 p300 (E1A-binding protein p300, EP300, 度值=22) 是度值较高的 6 个靶点，可能是藏红花素治疗 AD 的核心靶点。

3.5 GO 功能富集分析

GO 富集分析 (图 3) 共获得 181 个 BP 条目，主要包括炎症反应、趋化作用、细胞迁移的正向调节、初级代谢过程的调节、磷酸化、信号转导、胰岛素样生长因子受体信号通路、细胞趋化作用、正向调节蛋白质入核等；41 个 CC 条目，主要包括细胞膜、细胞质、磷脂酰肌醇 3-激酶复合物 IA 类等；62 个 MF 条目，其中胰岛素受体底物结合、RNA 聚合酶 II 转录因子活性、配体激活序列特异性 DNA 结合、蛋白结合与 AD 治疗相关程度较高。

3.6 KEGG 通路富集分析

将藏红花素作用于 AD 的 63 个基因靶点导入微生信平台，进行气泡图的构建及 KEGG 通路富集分析，得到藏红花素治疗 AD 的 KEGG 通路结果。KEGG 富集结果显示 131 条潜在通路，富集最显著的 10 条通路见图 4，涉及的人类疾病包括前列腺癌、乙型肝炎、恰加斯病、小细胞肺癌、急性髓性白血病等，涉及的环境信息过程包括 PI3K-Akt 信

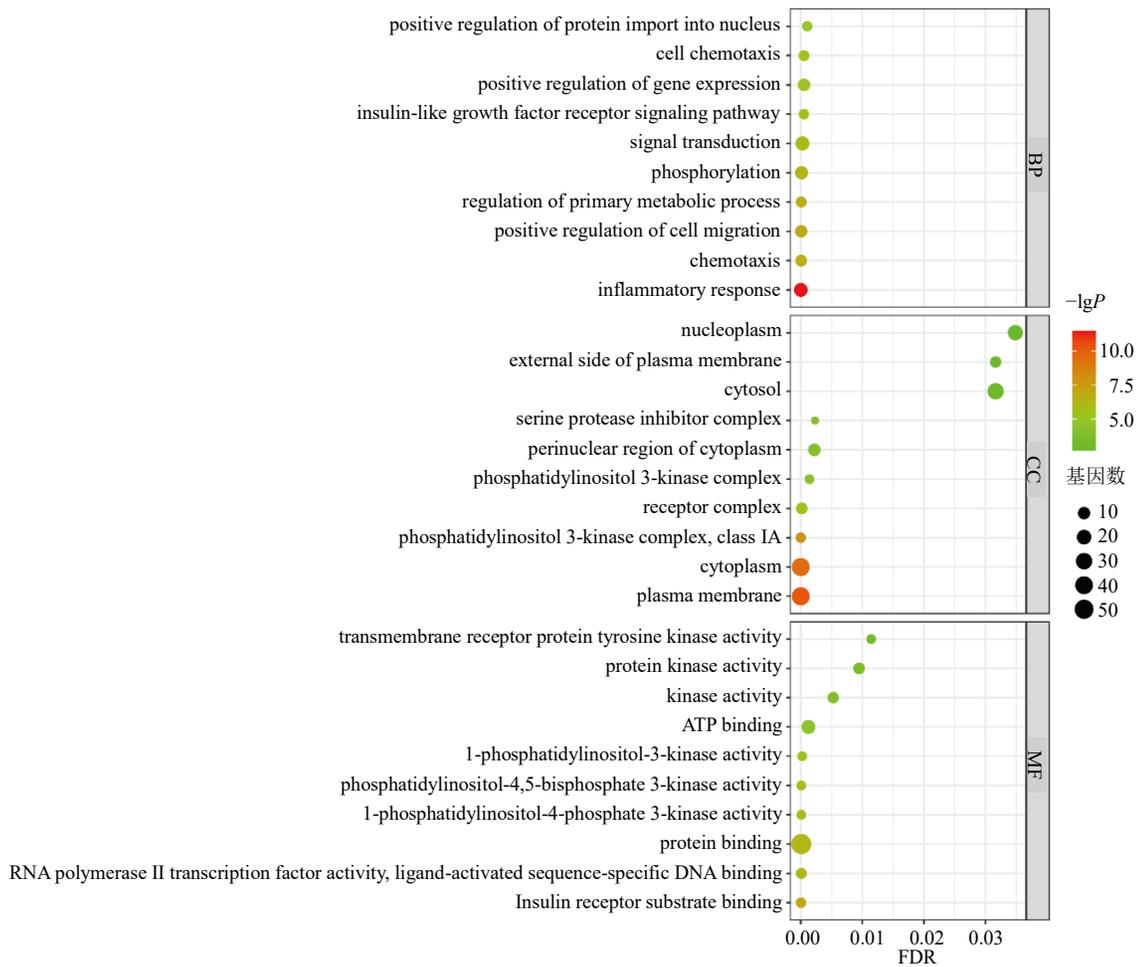


图 3 GO 功能富集分析 (前 10)

Fig. 3 GO function enrichment analysis (top 10)

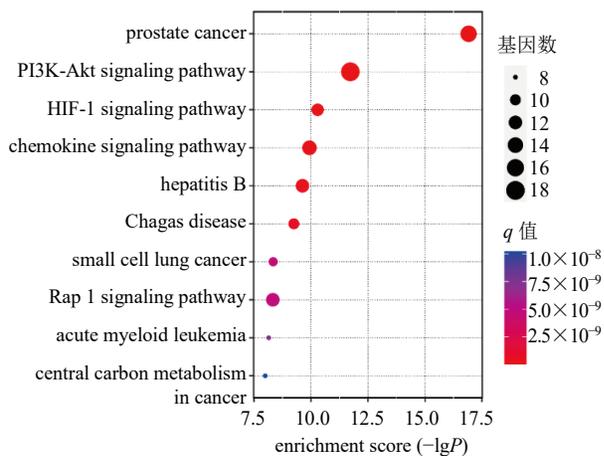


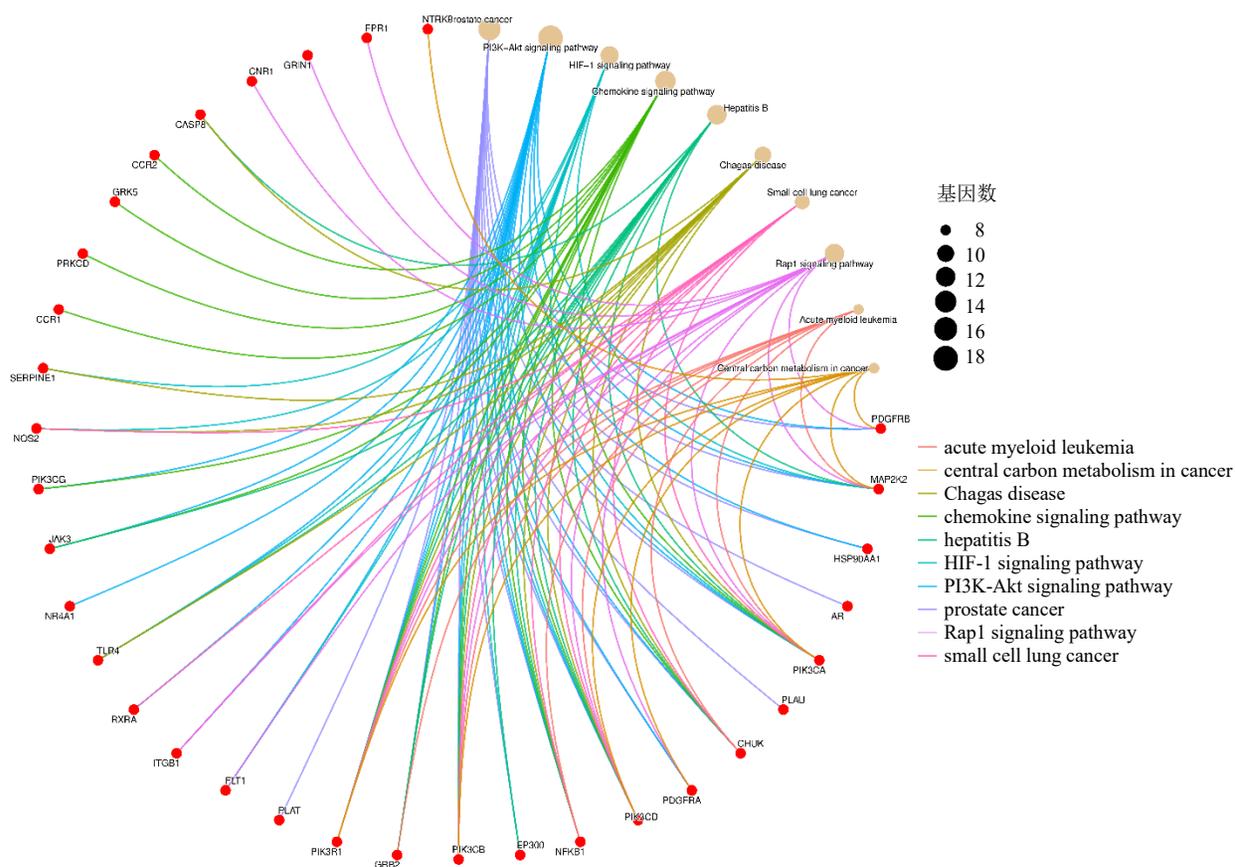
图 4 KEGG 通路富集分析 (前 10)

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis (top 10)

号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 信号通路、趋化因子信号通路、Ras 相关

蛋白 1 信号通路等, 涉及的代谢主要是癌症的中心碳代谢等。

如图 5 所示, 藏红花素治疗 AD 的靶点主要富集在 HSP90AA1、NF-κB、TLR4、PIK3R1、PIK3CA、EP300、生长因子受体结合蛋白 2 (growth factor receptor-bound protein 2, GRB2)、蛋白激酶 Cδ (protein kinase Cδ, PRKCD)、核因子相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, NFE2L2)、C-C 基序趋化因子受体 2 (recombinant chemokine C-C-motif receptor 2, CCR2)、类视黄醇 X 受体 α (retinoid X receptor alpha, RXRA) 等多个蛋白分子上。同样, 这些靶点存在于 PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、趋化因子信号通路、Rap1 信号通路中。表明藏红花素参与体内的多个生物学过程, 藏红花素可能通过这些生物学过程发挥对 AD 的治疗作用。



红色代表靶点，黄色代表通路，其面积与富集相关程度呈正相关。

Red represents targets, yellow represents pathways, and their area is positively correlated with the degree of enrichment.

图 5 KEGG 靶点及通路富集分析

Fig. 5 KEGG target and pathway enrichment analysis

3.7 分子对接结果

为了进一步揭示藏红花素的作用机制，选取与通路相关且度值较高的蛋白，进行分子对接验证。PIK3R1 在 PI3K-Akt 通路中具有代表性，对中枢神经系统有显著影响，包括神经元的增殖、分化和死亡^[23]。TLR4 属于跨膜蛋白的 Toll 样受体家族，可识别不同的病原体相关分子模式，在先天免疫反应中发挥作用^[24]。在细胞的炎症反应、免疫应答等过程中 NF-κB 起到关键性作用。NF-κB 的错误调节会引发自身免疫病、癌症以及神经炎症^[25]等。NF-κB 是参与神经退行性变过程的途径之一，与突触的可塑性、记忆有关，多种药物均通过 TLR4/NF-κB/NLRP3 通路发挥治疗 AD 作用^[26]。因此选择这 3 个靶点蛋白分别与藏红花素进行分子对接验证。亲和力值 -4.25 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol) 表示配体与受体结合的可能性，而亲和力

值 -5.00 kcal/mol 表示具有良好的结合强度，亲和力值 -7.00 kcal/mol 表示具有较好的结合强度^[27]。藏红花素与 PIK3R1、TLR4、NF-κB 的亲和力分别为 -8.643、-5.98、-7.94 kcal/mol，运用 Pymol 软件将分子对接模拟验证结果进行可视化（图 6）。PIK3R1、TLR4、NF-κB 均可与藏红花素对接成功，其中 PIK3R1 的结合能力最强，表明 PI3K-Akt 通路在藏红花素治疗 AD 中发挥重要作用。

3.8 细胞实验结果

3.8.1 藏红花素对 LPS 诱导的 BV2 细胞活力的影响 如图 7-A 所示，给予 1、10、20、40 μg/mL 的 LPS 处理后，BV2 细胞活力明显降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，因此选择 1 μg/mL LPS 诱导 BV2 细胞炎症模型。如图 7-B 所示，20、40、80、160 μmol/L 的藏红花素显著增加 BV2 细胞活力 ($P < 0.05$ 、0.01)。如图 7-C 所示，与对照组比较，模型组细胞活力显

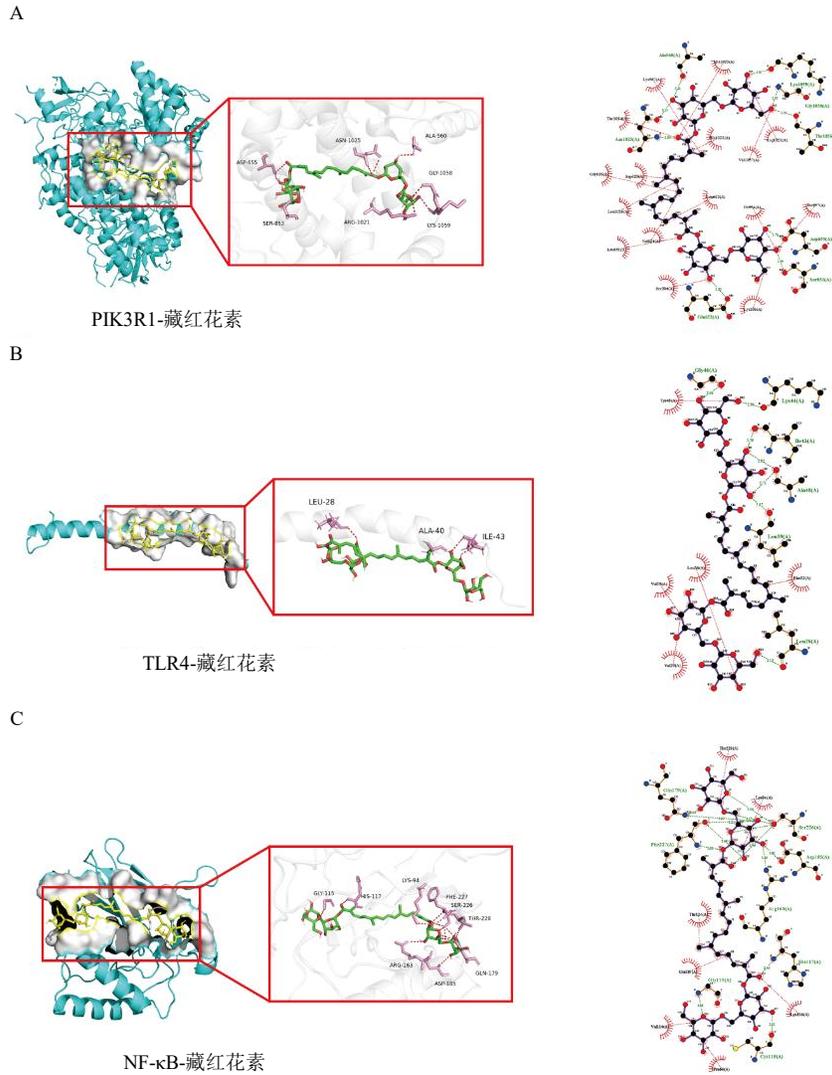
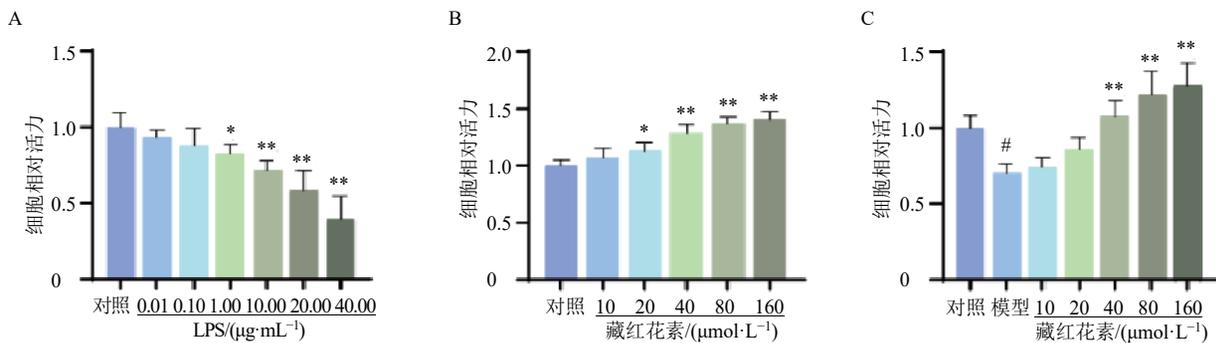


图6 分子对接结果

Fig. 6 Molecular docking results



A-不同质量浓度的LPS对BV2细胞活力的影响; B-不同浓度的藏红花素对BV2细胞活力的影响; C-藏红花素对LPS诱导的BV2细胞活力的影响; 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同。

A-effect of different concentrations of LPS on viability of BV2 cells; B-effect of different concentrations of crocin on viability of BV2 cells; C-effect of crocin on viability of LPS-induced BV2 cells; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图7 CCK-8检测BV2细胞活力 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 BV2 cell viability detected by CCK-8 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

著降低 ($P < 0.05$)；与模型组比较，给予 40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的藏红花素处理后 BV2 细胞活力显著升高 ($P < 0.01$)。因此，选择 80 $\mu\text{mol/L}$ 藏红花素干预 BV2 细胞，进行后续研究。

3.8.2 藏红花素对 LPS 诱导的 BV2 细胞形态及 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达的影响 如图 8-A 所示，与对照组比较，模型组细胞数量减少，细胞体面积减小，出现伪足；与模型组比较，藏红花素

处理后细胞的数量和形态恢复，表明藏红花素能够改善 LPS 诱导的 BV2 细胞形态改变，减少细胞损伤。如图 8-B 所示，与对照组比较，模型组 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，藏红花素组 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)，表明藏红花素能够抑制 LPS 诱导的 BV2 细胞中炎症因子的释放，从而改善细胞炎症。

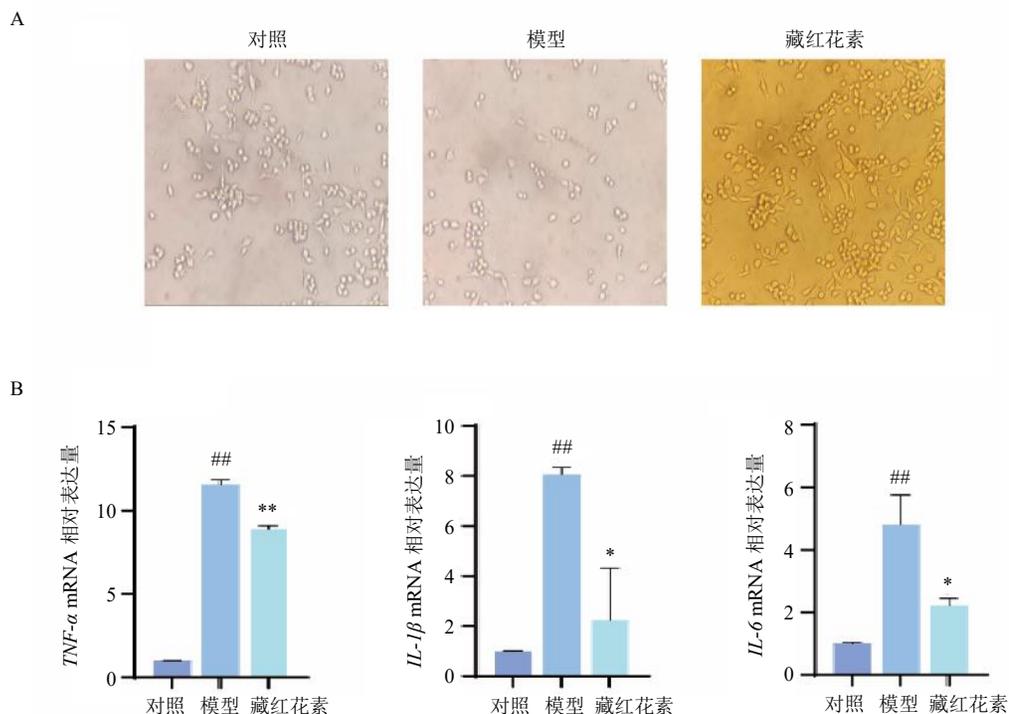


图 8 藏红花素对 LPS 诱导的 BV2 细胞形态 (A, $\times 20$) 及 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 、 $IL-6$ mRNA 表达 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 8 Effect of crocin on cell morphology (A, $\times 20$) and $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$ mRNA expressions (B) in LPS-induced BV2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.8.3 藏红花素对 LPS 诱导的 BV2 细胞中 I3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK-3 β 、p-GSK-3 β 蛋白表达的影响 如图 9 所示，与对照组比较，模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 值显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01)；与模型组比较，藏红花素组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、p-GSK-3 β /GSK-3 β 值显著升高 ($P < 0.05$)，表明藏红花素可以激活 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路。

4 讨论

AD 是最常见的痴呆类型，占痴呆病例总数的 60%~70%^[28]，并且随着年龄的增长，AD 的患病率和严重程度显著增加。AD 的发病过程隐匿，主要表现为中枢神经系统的退行性病变^[29]。目前，AD 的

早期诊断仍存在一定的挑战，大多数患者在被确诊时已进入疾病的中晚期阶段，此时患者的认知能力已显著下降，且伴有情绪不稳及推理能力丧失等症状^[30]。AD 的病理特征为异常蛋白质在大脑中积累，包括 β 淀粉样蛋白斑块和 tau 蛋白缠结，病理改变导致脑神经细胞的退化和死亡^[31]。研究表明，AD 患者的炎症标志物水平显著升高^[32]。而针对炎症的治疗能够有效延缓认知能力下降的进程^[33]。因此，进一步探索炎症相关的药物在治疗 AD 中的作用机制具有重要意义。

中药因其多靶点、多系统、多途径的作用方式特点，与 AD 复杂病理机制相契合，在 AD 的治疗中具有显著优势^[34]。藏红花素是藏红花的主要活性

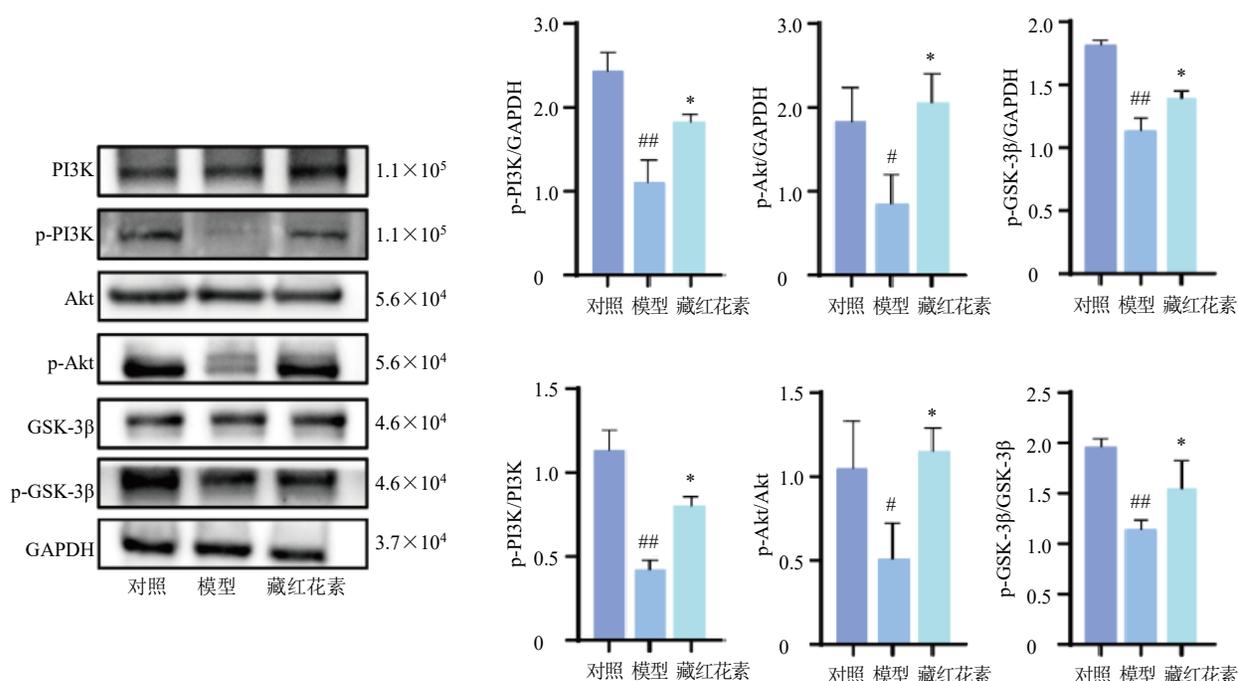


图9 藏红花素对LPS诱导的BV2细胞中PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GSK-3β和p-GSK-3β蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of crocin on PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3β and p-GSK-3β protein expressions in LPS-induced BV2 cells
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

成分，具有神经保护等多种药理作用^[35]。PI3K-Akt信号通路对中枢神经系统有重要影响，涉及神经元的增殖、分化和死亡等关键过程^[36]。此外，研究表明，Aβ聚集可以直接中断AD患者大脑中的PI3K-Akt信号传导^[37]。而藏红花素可通过调节该通路抑制神经系统疾病的进展^[38]。由此推测，藏红花素可能通过PI3K-Akt信号通路对AD发挥治疗作用。

网络药理学结合了实验、临床与计算方法，成为提高药物临床疗效的新趋势^[39]。本研究运用网络药理学和分子对接的方法，初步探索藏红花素治疗AD的潜在作用机制。网络药理学分析结果显示，藏红花素可靶向63个与AD相关的靶点，其中，HSP90AA1、NF-κB、TLR4、PIK3R1、PIK3CA、EP300为潜在关键靶点。根据拓扑参数分析，这些靶点在信号通路中起重要作用，可作为藏红花素治疗AD研究的重点。分子对接结果显示，藏红花素与PIK3R1的结合强度最高，提示该靶点在藏红花素调控PI3K-Akt信号通路中具有重要意义。研究发现，藏红花素能够减轻神经炎症，发挥神经保护作用^[40]。藏红花素通过激活PI3K-Akt通路，抑制炎症反应，有效减少海马神经元的凋亡并促进其再生，

从而改善AD模型小鼠的认知功能障碍^[41]。此外，AD的发生与炎症系统和免疫系统的过度激活密切相关，AD患者血液中炎症因子水平升高，与β淀粉样蛋白的聚集形成恶性循环。藏红花素可能通过PI3K-Akt通路缓解Aβ引发的神经炎症，保护神经元，改善认知障碍。GSK-3β作为PI3K-Akt通路的下游蛋白，是调控Tau蛋白磷酸化的重要激酶之一。本研究中分子对接结果显示藏红花素与PIK3R1靶点具有良好的结合能力。PIK3R1是PI3K复合物的调节亚基，其激活对于PI3K-Akt信号通路的启动至关重要。分子对接结果为后续细胞实验中观察到的藏红花素抗炎效应提供了分子基础。细胞实验结果显示，藏红花素能够显著抑制LPS诱导的BV2细胞中炎症因子表达，表明其具有显著的抗炎作用，同时藏红花素显著促进PI3K、Akt、GSK-3β的磷酸化水平。GSK-3β的磷酸化通常抑制其激酶活性，这种抑制作用有助于减轻神经炎症并保护神经细胞。PI3K/Akt/GSK-3β通路在细胞存活、增殖和代谢中发挥关键作用。本研究结果表明，藏红花素可能通过激活PI3K/Akt/GSK-3β通路，增强细胞的抗应激能力和存活能力。

综上,本研究通过网络药理学和分子对接方法发现藏红花素主要通过调控 PI3K-Akt、HIF-1、趋化因子、Rap1 等信号通路,作用于 HSP90AA1、NF- κ B、TLR4、PIK3CA、PIK3R1、EP300 等靶点,从而改善 AD。进一步通过体外实验进行验证,藏红花素对 LPS 诱导的 BV2 细胞炎症反应具有显著的抑制作用,可能通过激活 PI3K/Akt/GSK-3 β 通路,抑制促炎因子的释放,从而发挥抗神经炎症作用。本研究结果为藏红花素治疗 AD 的机制研究提供了重要的理论依据,同时为 AD 药物研发提供了新的方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Saeedi M, Rashidy-Pour A. Association between chronic stress and Alzheimer's disease: Therapeutic effects of saffron [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110995.
- [2] Pascoal T A, Benedet A L, Ashton N J, et al. Microglial activation and tau propagate jointly across Braak stages [J]. *Nat Med*, 2021, 27(9): 1592-1599.
- [3] Agnello L, Ciaccio M. Neurodegenerative diseases: From molecular basis to therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 12854.
- [4] Zhu W M, Hu H Y. A survey of TCM treatment for Alzheimer's disease [J]. *J Tradit Chin Med*, 2007, 27(3): 226-232.
- [5] 苗琦, 朱仁艳, 李念念, 等. 阿尔茨海默病中医治疗进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2024, 47(1): 139-142.
- [6] 世界中医药学会联合会, 中华中医药学会. 国际中医临床实践指南阿尔茨海默病 (2019-10-11) [J]. *世界中医药*, 2021, 16(8): 1181-1187.
- [7] Yorgun M A, Rashid K, Aslanidis A, et al. Crocin, a plant-derived carotenoid, modulates microglial reactivity [J]. *Biochem Biophys Res*, 2017, 12: 245-250.
- [8] Song Y N, Wang Y, Zheng Y H, et al. Crocins: A comprehensive review of structural characteristics, pharmacokinetics and therapeutic effects [J]. *Fitoterapia*, 2021, 153: 104969.
- [9] Asadi F, Jamshidi A H, Khodagholi F, et al. Reversal effects of crocin on amyloid β -induced memory deficit: Modification of autophagy or apoptosis markers [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2015, 139(Pt A): 47-58.
- [10] Geromichalos G D, Lamari F N, Papandreou M A, et al. Saffron as a source of novel acetylcholinesterase inhibitors: Molecular docking and *in vitro* enzymatic studies [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(24): 6131-6138.
- [11] Finley J W, Gao S. A perspective on *Crocus sativus* L. (saffron) constituent crocin: A potent water-soluble antioxidant and potential therapy for Alzheimer's disease [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(5): 1005-1020.
- [12] Akhondzadeh S, Shafiee Sabet M, Harirchian M H, et al. Saffron in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: A 16-week, randomized and placebo-controlled trial [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2010, 35(5): 581-588.
- [13] Farokhnia M, Shafiee Sabet M, Iranpour N, et al. Comparing the efficacy and safety of *Crocus sativus* L. with memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease: A double-blind randomized clinical trial [J]. *Hum Psychopharmacol*, 2014, 29(4): 351-359.
- [14] Sadaqat M, Qasim M, Tahir Ul Qamar M, et al. Advanced network pharmacology study reveals multi-pathway and multi-gene regulatory molecular mechanism of *Bacopa monnieri* in liver cancer based on data mining, molecular modeling, and microarray data analysis [J]. *Comput Biol Med*, 2023, 161: 107059.
- [15] Xu L, Zhang J Q, Wang Y F, et al. Uncovering the mechanism of Ge-Gen-Qin-Lian Decoction for treating ulcerative colitis based on network pharmacology and molecular docking verification [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(2): BSR20203565.
- [16] Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. Jvenn: An interactive Venn diagram viewer [J]. *BMC Bioinformatics*, 2014, 15: 293.
- [17] Sherman B T, Hao M, Qiu J, et al. DAVID a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [18] Yu G C, Wang L G, Han Y Y, et al. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS A J Integr Biol*, 2012, 16(5): 284-287.
- [19] Luo W J, Brouwer C. Pathview: An R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(14): 1830-1831.
- [20] Liu T L, Yu S Z, Xu Z C, et al. Prospects and progress on crocin biosynthetic pathway and metabolic engineering [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2020, 18: 3278-3286.
- [21] Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses [J]. *Wien Med Wochenschr*, 2007, 157(13/14): 315-319.
- [22] Lautenschläger M, Sendker J, Hüwel S, et al. Intestinal formation of trans-crocetin from saffron extract (*Crocus sativus* L.) and *in vitro* permeation through intestinal and blood brain barrier [J]. *Phytomedicine*, 2015, 22(1): 36-44.

- [23] Long H Z, Cheng Y, Zhou Z W, *et al.* PI3K/AKT signal pathway: A target of natural products in the prevention and treatment of Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 648636.
- [24] Halajian E A, LeBlanc E V, Gee K, *et al.* Activation of TLR4 by viral glycoproteins: A double-edged sword? [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 1007081.
- [25] Thawkar B S, Kaur G. Inhibitors of NF- κ B and P2X7/NLRP3/Caspase-1 pathway in microglia: Novel therapeutic opportunities in neuroinflammation induced early-stage Alzheimer's disease [J]. *J Neuroimmunol*, 2019, 326: 62-74.
- [26] Sun E, Motolani A, Campos L, *et al.* The pivotal role of NF- κ B in the pathogenesis and therapeutics of Alzheimer's disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 8972.
- [27] Gaillard T. Evaluation of AutoDock and AutoDock vina on the CASF-2013 benchmark [J]. *J Chem Inf Model*, 2018, 58(8): 1697-1706.
- [28] Hou Y, Dan X, Babbar M, *et al.* Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2019, 15(10): 565-581.
- [29] Lane C A, Hardy J, Schott J M. Alzheimer's disease [J]. *Eur J Neurol*, 2018, 25(1): 59-70.
- [30] Robakis N K. Alzheimer's disease: New light on etiology and management [J]. *Mt Sinai J Med*, 2010, 77(1): 1-2.
- [31] Jack C R Jr, Knopman D S, Jagust W J, *et al.* Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: An updated hypothetical model of dynamic biomarkers [J]. *Lancet Neurol*, 2013, 12(2): 207-216.
- [32] Gagliardi S, Truffi M, Tinelli V, *et al.* Bisdemethoxycurcumin (BDC)-loaded H-ferritin-nanocages mediate the regulation of inflammation in Alzheimer's disease patients [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9237.
- [33] Nillert N, Boonyarat C, Welbat J U, *et al.* *Clausena Harmandiana* root extract attenuated cognitive impairments via reducing amyloid accumulation and neuroinflammation in A β ₁₋₄₂-induced rats [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2022, 22(1): 108.
- [34] Chen S Y, Gao Y, Sun J Y, *et al.* Traditional Chinese medicine: Role in reducing β -amyloid, apoptosis, autophagy, neuroinflammation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction of Alzheimer's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 497.
- [35] 杨晓佳, 吴敏, 江萌, 等. 基于 DKK3 调控探讨藏红花素对 A β ₂₅₋₃₅ 诱导神经元损伤的保护作用 [J]. *中国中医药科技*, 2024, 31(1): 27-32.
- [36] 王艳, 郭家欣, 张倩霞, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨银杏二萜内酯减轻神经衰老的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(11): 3935-3946.
- [37] Fu Z, Yang J F, Wei Y J, *et al.* Effects of piceatannol and pterostilbene against β -amyloid-induced apoptosis on the PI3K/Akt/Bad signaling pathway in PC12 cells [J]. *Food Funct*, 2016, 7(2): 1014-1023.
- [38] Zhao T, Lu H, Li M, *et al.* Neuroprotective mechanism of crocin via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway after cerebral infarction: An *in vitro* study [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(5): 3164-3171.
- [39] Yu S X, Gao W H, Zeng P H, *et al.* Exploring the effect of Gupi Xiaoji Prescription on hepatitis B virus-related liver cancer through network pharmacology and *in vitro* experiments [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111612.
- [40] Wong K H, Xie Y N, Huang X, *et al.* Delivering crocetin across the blood-brain barrier by using γ -cyclodextrin to treat Alzheimer's disease [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 3654.
- [41] Su W W, Wang Y B, Shao S, *et al.* Crocin ameliorates neuroinflammation and cognitive impairment in mice with Alzheimer's disease by activating PI3K/AKT pathway [J]. *Brain Behav*, 2024, 14(5): e3503.

[责任编辑 李亚楠]