鬼针草总黄酮对阿尔茨海默病的改善作用及机制Δ

庞晓军[1,2*]，唐丰曼[3]，李倩倩[1]（1.钦州市第二人民医院药学部，广西 钦州 535099；2.广西医科大学药学院，南宁 530021；3.钦州市妇幼保健院药剂科，广西 钦州 535099）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2025）24-3066-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.24.09

摘 要 目的 探讨鬼针草总黄酮（TFB）对阿尔茨海默病（AD）的改善作用及潜在机制。**方法** 采用网络药理学方法，挖掘TFB用于AD的活性成分及核心靶点，进行基因本体（GO）、京都基因和基因组数据库（KEGG）富集分析。基于网络药理学结果，以雄性BALB/c小鼠为对象，以D-半乳糖皮下注射+氯化铝灌胃构建AD模型，考察TFB对AD小鼠行为学指标（逃避潜伏期、穿越平台次数、原平台象限停留时间占比）、乙酰胆碱酯酶（AChE）、乙酰胆碱（ACh）、胆碱乙酰转移酶（ChAT）、β淀粉样蛋白（Aβ）、磷酸化Tau蛋白（p-Tau）及炎症因子[白细胞介素1β（IL-1β）、IL-6、肿瘤坏死因子α（TNF-α）]、海马区神经元病理学变化、相关蛋白及mRNA表达的影响。**结果** 共筛选得TFB活性成分6种（木犀草素、槲皮素、山柰酚等），TFB与AD的共同靶点165个，核心靶点29个（*Akt1*、*TP53*等）；共同靶点主要富集于基因表达的正调控、细胞凋亡过程的负调控等生物过程，酶结合、相同蛋白结合等分子功能，细胞外间隙、质膜、受体复合物等细胞组分，以及癌症通路、磷脂酰肌醇3激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路等。动物实验结果显示，与模型组比较，各药物组小鼠海马CA3区神经元排列紊乱、变性坏死等病理改变均有所缓解，其逃避潜伏期（TFB低剂量组除外），脑组织中AChE（TFB低剂量组除外）、Aβ40、Aβ42（TFB低剂量组除外）、p-Tau（TFB低、中剂量组除外）、IL-1β、IL-6（TFB低剂量组除外）、TNF-α含量，以及Bax、caspase-3 mRNA的表达均显著缩短/降低/下调，穿越平台次数，原平台象限停留时间占比，ChAT和ACh含量，PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA（TFB低、中剂量组PI3K、Akt mRNA，TFB低剂量组Bcl-2 mRNA除外）的表达均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论** TFB可通过多成分、多靶点、多通路发挥抗AD作用，其机制可能与激活PI3K/Akt信号通路、改善胆碱能系统、减少Aβ沉积和Tau蛋白过度磷酸化、抑制神经炎症反应和神经元细胞凋亡有关。

关键词 鬼针草总黄酮；阿尔茨海默病；PI3K/Akt信号通路；网络药理学

Improvement effects and mechanism of total flavonoids from *Bidens pilosa* on Alzheimer's disease

PANG Xiaojun[1,2], TANG Fengman[3], LI Qianqian[1] (1. Dept. of Pharmacy, Qinzhou Second People's Hospital, Guangxi Qinzhou 535099, China; 2. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China; 3. Dept. of Pharmacy, Qinzhou Maternal and Child Health Hospital, Guangxi Qinzhou 535099, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the improvement effects of total flavonoids from *Bidens pilosa* (TFB) against Alzheimer's disease (AD) and elucidate its potential mechanism. **METHODS** The network pharmacology was adopted to explore active constituents and core targets of TFB for AD, followed by gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. Based on the results of network pharmacology, an AD model was induced in male BALB/c mice by D-galactose subcutaneous injection and aluminum chloride gavage. The effects of TFB on behavioral indicators (including escape latency, the number of platform crossings, and the proportion of dwell time spent in the original platform quadrant), as well as on acetylcholinesterase (AChE), acetylcholine (ACh), choline acetyltransferase (ChAT), amyloid β-protein (Aβ), phosphorylated Tau protein (p-Tau), and inflammatory factors [interleukin-1β (IL-1β), IL-6, and tumor necrosis factor-α (TNF-α)] were investigated. Additionally, its effects on the pathological changes in hippocampal neurons, as well as the expressions of related proteins and mRNAs were evaluated. **RESULTS** Network pharmacology revealed 6 active components in TFB (e.g. luteolin, quercetin, kaempferol) and 165 overlapping targets with AD, including 29 core targets (*Akt1*, *TP53*, etc.). The common targets were primarily enriched in biological processes such as positive regulation of gene expression and negative regulation of apoptotic processes, molecular functions including enzyme binding and identical protein binding, cellular components like extracellular space, plasma membrane and receptor complex, as well as signaling pathways such as cancer pathways and phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. The results of animal experiments showed that, compared with model group, the pathological changes such as disordered arrangement, degeneration, and necrosis of neurons in the hippocampal CA3 region of mice in administration groups were alleviated. The escape latency (except for the low-dose TFB group), the contents of AChE (except for the low-dose TFB group), Aβ40, Aβ42 (except for the low-dose TFB

Δ **基金项目** 钦州市科学研究与技术开发计划项目（No. 202014810）

* **第一作者** 主任药师，主任技师。研究方向：中药药理、临床药学、药品临床综合评价。E-mail：pangxjun@163.com

group), p-Tau (except for the low- and medium-dose TFB groups), IL-1β, IL-6 (except for the low-dose TFB group), and TNF-α in brain tissue, as well as the expressions of Bax and caspase-3 mRNA, were all significantly shortened/reduced/down-regulated. Conversely, the number of platform crossings, the proportion of dwell time spent in the original platform quadrant, the contents of ChAT and ACh, the phosphorylation levels of PI3K and Akt, and the mRNA expressions of PI3K, Akt and Bcl-2 (except for PI3K mRNA and Akt mRNA in the low- and medium-dose TFB groups, and Bcl-2 mRNA in the low-dose TFB group) were all significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** TFB can exert anti-AD effect through multiple components, multiple targets, and multiple pathways. Its underlying mechanisms may be related to the activation of the PI3K/Akt signaling pathway, improvement of the cholinergic system, reduction of Aβ deposition and Tau protein hyperphosphorylation, as well as inhibition of neuroinflammatory responses and neuronal apoptosis.

KEYWORDS total flavonoids of *Bidens pilosa*; Alzheimer's disease; PI3K/Akt signaling pathway; network pharmacology

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种以记忆减退和认知功能下降为主要表现的慢性神经退行性疾病,好发于老年人群。随着人口老龄化加剧,全球AD患者数量持续增长,预计将从2015年的近5 000万增长至2030年的7 614万[1]。我国相关预测数据显示,截至2050年,我国60岁以上AD患者数将达2 765万,直接经济负担高达25 448亿元[2]。可见,AD已成为我国治疗负担最重的疾病之一。

AD的病理特征主要包括细胞外β淀粉样蛋白(amyloid β-protein,Aβ)斑块沉积、神经元内Tau蛋白过度磷酸化致神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles,NFT)、突触丧失和神经元死亡[3]。然而,AD的发病机制尚未完全明确,目前的研究涉及Aβ级联、Tau蛋白功能异常、胆碱能损伤、氧化应激、神经炎症等多种假说[4-5]。由于现有药物仅能缓解临床症状,无法阻断疾病进展[6],因此探索AD发病机制并开发新型药物成为医学界的研究热点之一。

鬼针草为菊科植物,具有清热解毒、活血散瘀之效。现代药理研究表明,其具有抗炎、抗肿瘤及脑保护等作用[7-9]。鬼针草总黄酮(total flavonoids of *Bidens pilosa*,TFB)是其主要活性成分,其中木犀草素、槲皮素、山柰酚等成分均被证实具有改善AD的潜力[10-12],但TFB的整体作用尚未明确。本课题组前期研究证实,TFB可通过抑制炎症因子释放,下调一氧化氮合酶、环氧合酶2、蛋白激酶C、髓样分化因子88的表达来缓解脂多糖诱导的小鼠神经炎症[13]。研究指出,在NFT和Aβ斑块周围常见大量炎症介质积累,表明神经炎症在AD的发生发展中具有关键作用[14]。基于此,本研究拟结合网络药理学与动物实验,进一步探讨TFB对AD的改善作用及潜在机制,以期为AD治疗及相关药物研发提供新思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有SMART 3.0型水迷宫系统(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司)、CKX-41型倒置显微镜(日本Olympus公司)、Synergy H1型多功能酶标仪(美国BioTek公司)、CFX Touch型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司)、Touch Imager型化学发光成像系统[易孛特生命科学(上海)有限公司]等。

1.2 主要药品和试剂

TFB原料药(批号20190604,纯度52.27%)购自钦州市医药有限责任公司;盐酸多奈哌齐片[批号2203026,规格5 mg]购自卫材(中国)药业有限公司;D-半乳糖(货号C13665375)购自上海麦克林生化科技有限公司;氯化铝(批号202107028)购自广东光华科技股份有限公司;乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase,AChE)、乙酰胆碱(acetylcholine,ACh)、胆碱乙酰转移酶(choline acetyltransferase,ChAT)、Aβ40、Aβ42、磷酸化Tau蛋白(phosphorylated Tau protein,p-Tau)、白细胞介素1β(interleukin-1β,IL-1β)、IL-6、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(货号分别为F2671-A、F3392-A、F9290-B、F2868-A、F30267-A、F2750-A、F2040-B、F2163-A、F2132-A)均购自上海凡科维生物有限公司;兔抗β-肌动蛋白(β-actin)一抗(货号GB15003)购自武汉塞维尔生物科技有限公司;兔抗磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)、蛋白激酶B(又称"Akt")一抗和辣根过氧化酶标记的羊抗兔免疫球蛋白G二抗(货号分别为ET1608-70、10176-2-AP、SA00001-2)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K,p-PI3K)一抗(货号5062)购自美国Signalway Antibody公司;兔抗磷酸化Akt(phosphorylated Akt,p-Akt)一抗(货号4060T)购自美国Cell Signaling公司;Omni-ECL™超灵敏化学发光检测试剂盒(货号SQ201)购自上海雅酶生物科技有限公司;PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成。

1.3 实验动物

11周龄SPF级健康雄性BALB/c小鼠,体重20～25 g,共60只,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,生产许可证号为SCXK(辽)2020-0001。所有动物均饲养于动物房[温度20～24 ℃,相对湿度(45±5)%,自然昼夜循环]内,自由摄食、饮水,适应性喂养1周后开始实验。本实验方案经广西医科大学实验动物伦理委员会审批(编号202209020)。

2　方法与结果

2.1　网络药理学研究

2.1.1　TFB成分筛选及相关靶点预测

运用中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）检索得到鬼针草的化学成分，以“口服生物利用度≥30%且类药性≥0.18”为标准[15]筛选活性成分，重点提取其黄酮类成分并结合文献进行补充。本研究共筛选出TFB活性成分6种，分别为木犀草素、奥卡宁、(2*E*)-2-(3,4-二羟基亚苄基)-6,7-二羟基苯并呋喃-3-酮、(*R*)-2-(3,4-二羟基苯基)-6,7-二羟基苯并呋喃-3(2*H*)-酮、槲皮素、山柰酚，上述成分对AD均有改善作用[7−8,10−12]。借助TCMSP和SwissTargetPrediction数据库预测TFB活性成分对应的作用靶点，利用UniProt数据库将靶蛋白信息转换为对应的基因名称，经整合、核对和去重得到TFB活性成分的预测靶点359个。

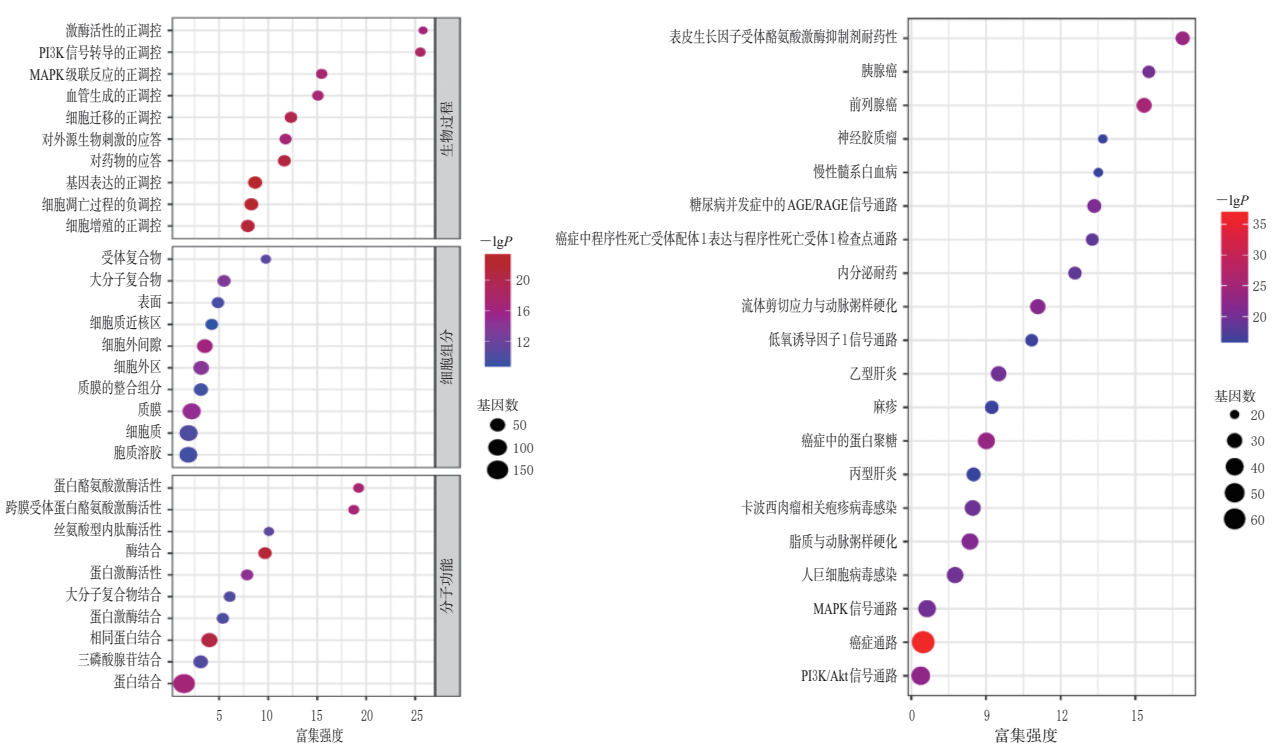
2.1.2　AD靶点及共同核心靶点获取

以“Alzheimer's disease”为关键词，在GeneCards、OMIM和TTD数据库中检索AD相关靶点并对检索结果进行整合，得到AD疾病相关靶点2 103个。进一步利用Venny 2.1.0工具进行靶点映射分析，获得TFB与AD的共同靶点，共165个。在STRING数据库中导入上述共同靶点，构建蛋白-蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络和“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络。将PPI数据导入Cytoscape 3.9.1软件，使用“CytoNCA”插件进行网络拓扑参数分析，以“节点度值（degree）大于其中位数的2倍、介数（betweenness）和中心度（closeness）大于其中位数”为标准[16]筛选TFB干预AD的核心靶点（以对应基因表示）。本研究共鉴定出29个核心靶点，包括*Akt1*、*TP53*、*SRC*、*EGFR*、*VEGFA*、*TNF*、*PIK3R1*、*EGF*、*PIK3CA*、*RELA*、*IL1β*、*PTEN*、*MYC*、*ESR1*、*CASP3*、*MMP9*、*GAPDH*、*PTPN11*、*ERBB2*、*HIF1A*、*STAT1*、*IL10*、*CAV1*、*NFKBIA*、*MDM2*、*MAPK14*、*CXCL8*、*JAK1*、*HGF*。由“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络可知，TFB的多个活性成分可通过作用于与AD密切相关的靶点，进而影响相关的信号通路及生物过程，从而发挥治疗AD的作用（限于篇幅，“药物-成分-靶点-通路-疾病”网络图可通过扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1）。

2.1.3　共同靶点富集分析

通过DAVID数据库对共同靶点进行基因本体（gene ontology，GO）富集分析（生物过程、细胞组成、分子功能）、京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路分析（设置物种为“Homo sapiens”，以$P<0.05$为标准），结果经微生信平台进行可视化展示。

本研究共富集到GO条目1 173个，共同靶点主要涉及基因表达的正调控、细胞凋亡过程的负调控、细胞增殖的正调控等生物过程，酶结合、相同蛋白结合、蛋白激酶活性等分子功能，以及细胞外间隙、质膜、受体复合物、大分子复合物等细胞组分。*P*值由小到大排前10位的GO富集结果见图1A。本研究共富集KEGG通路174条，共同靶点主要富集于PI3K/Akt信号通路、癌症通路、糖尿病并发症中的晚期糖基化终末产物及其受体（advanced glycation end products/receptor for advanced glycation end products，AGE/RAGE）信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）信号通路等。*P*值由小到大排前20位的富集结果见图1B。



A. GO富集　　B. KEGG富集

图1　TFB治疗AD共同靶点的GO及KEGG富集分析图

2.2 药效学研究

根据网络药理学结果，本研究基于炎症反应及PI3K/Akt信号通路进行验证。

2.2.1 动物分组、造模、给药

小鼠适应性喂养1周后，按体重随机分为空白对照组、模型组、盐酸多奈哌齐组和TFB低、中、高剂量组，每组10只。除空白对照组外，其余各组小鼠均皮下注射D-半乳糖（剂量为120 mg/kg）+灌胃氯化铝（剂量为20 mg/kg），每天1次，持续60 d以构建AD模型[17]。自实验第31天起，参照相关文献[18]和预实验结果，TFB低、中、高剂量组小鼠分别按60、120、240 mg/kg的剂量灌胃TFB药液（以生理盐水为溶剂），盐酸多奈哌齐组小鼠按1.0 mg/kg的剂量灌胃盐酸多奈哌齐药液（以生理盐水为溶剂），空白对照组和模型组小鼠灌胃等体积生理盐水，每天1次，连续30 d。

2.2.2 行为学测试

末次给药结束后2 h，采用Morris水迷宫实验进行小鼠行为学测试。随机选择1个象限作为小鼠入水点，将平台（直径10 cm）固定于另一象限并隐藏于水面下1 cm。第1至5天为定位航行实验，即每天训练小鼠4次（每个象限1次），记录其找到平台的逃避潜伏期（若小鼠在60 s内找到平台，记录实际所用时间；若未找到，则记为60 s，并将其引导至平台停留10 s）；第6天为空间探索实验，即撤除平台，将小鼠于对侧象限放入水池，记录其60 s内穿越原平台位置的次数及原平台象限停留时间占比[原平台象限停留时间占比=（原平台象限停留时间/总探索时间60 s）×100%]，以评估其空间学习记忆能力。采用SPSS 17.0、GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析与作图，实验结果以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验（方差齐时）或Dunnett's $T3$检验（方差不齐时）。检验水准$\alpha=0.05$（统计方法下同）。

结果（表1、图2）显示，与空白对照组比较，模型组小鼠找到原平台的路径明显增长，逃避潜伏期显著延长，穿越平台次数显著减少，原平台象限停留时间占比显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组小鼠找到原平台的路径均不同程度变短，逃避潜伏期（TFB低剂量组除外）显著缩短，穿越平台次数显著增加，原平台象限停留时间占比显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。

表1 各组小鼠逃避潜伏期、穿越平台次数、原平台象限停留时间占比比较（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次	原平台象限停留时间占比/%
空白对照组（$n=10$）	29.32±11.91	10.22±2.63	28.35±5.30
模型组（$n=10$）	40.88±7.44[a]	2.78±2.63[b]	9.71±7.36[b]
盐酸多奈哌齐组（$n=10$）	31.26±12.24[c]	6.44±4.22[c]	23.55±9.01[d]
TFB低剂量组（$n=9$）[e]	34.44±10.58	5.89±2.62[c]	19.83±5.85[d]
TFB中剂量组（$n=10$）	30.79±10.12[c]	6.33±3.97[c]	20.64±10.69[d]
TFB高剂量组（$n=10$）	24.55±7.31[d]	8.89±2.93[d]	26.77±7.39[d]

a：与空白对照组比较，$P<0.05$；b：与空白对照组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与模型组比较，$P<0.01$；e：剔除1个异常数值。

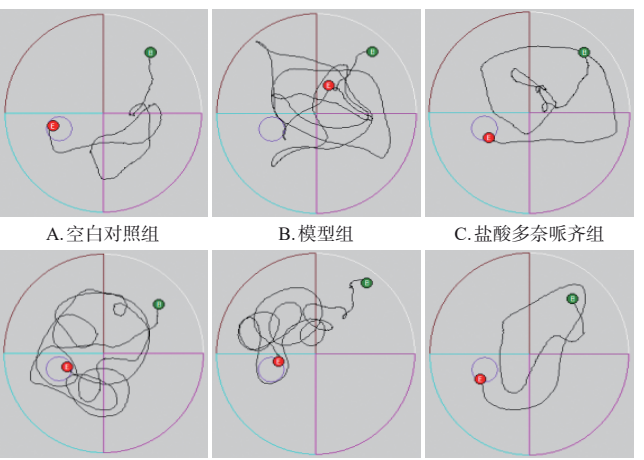


图2 各组小鼠在第5天定位航行实验中的运动轨迹图（水池直径：10 cm）

2.2.3 脑组织中AChE、ACh、ChAT、Aβ、p-Tau及炎症因子检测

采用ELISA法检测。行为学测试完成后，将所有小鼠以1%戊巴比妥钠麻醉后处死，剖取脑组织，一部分固定于4%多聚甲醛溶液中，剩余部分于−80 ℃冻存。取冻存脑组织（每组6只小鼠）适量，用预冷的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液（PBS，pH=7.4）冲洗，经滤纸吸干后称重、剪碎；将剪碎的脑组织与PBS混合（质量-体积比为1∶9），于冰浴下研磨；取匀浆液于4 ℃下以3 000 r/min离心10 min，取上清液，以酶标仪检测其AChE、ACh、ChAT、Aβ（Aβ40、Aβ42）、p-Tau及炎症因子（IL-1β、IL-6、TNF-α）含量。严格按相应试剂盒说明书方法操作。

结果（表2）显示，与空白对照组比较，模型组小鼠脑组织中AChE、Aβ40、Aβ42、p-Tau、IL-1β、IL-6、TNF-α含量均显著升高，ACh、ChAT含量均显著降低（$P<0.01$）；与模型组比较，各药物组小鼠脑组织中AChE（TFB低剂量组除外）、Aβ40、Aβ42（TFB低剂量组除外）、p-Tau（TFB低、中剂量组除外）、IL-1β、IL-6（TFB低剂量组除外）、TNF-α含量均显著降低，ACh、ChAT含量均显著升高，且TFB高剂量组Aβ42含量显著低于盐酸多奈哌齐组（$P<0.05$或$P<0.01$）。

2.2.4 海马区神经元病理学变化观察

取各组（每组4只）小鼠经4%多聚甲醛溶液固定48 h的脑组织，经常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、脱蜡后，进行苏木精-伊红（HE）染色，使用显微镜观察并记录

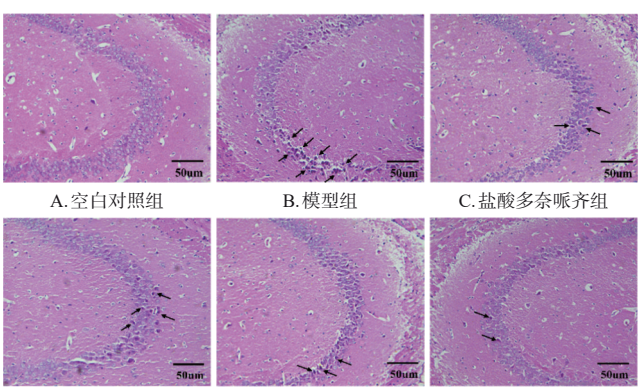
表2　各组小鼠脑组织中AChE、ACh、ChAT、Aβ、p-Tau及炎症因子含量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	AChE/(nmol/L)	ACh/(ng/mL)	ChAT/(pmol/L)	Aβ40/(pg/mL)	Aβ42/(ng/mL)	p-Tau/(pg/mL)	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
空白对照组	184.54±16.37	49.80±3.65	278.37±19.92	1 063.00±75.19	37.31±1.48	101.12±11.69	267.12±19.21	33.78±1.60	172.86±20.87
模型组	236.57±11.64[a]	28.02±2.30[a]	202.41±36.27[a]	1 422.22±60.07[a]	46.33±1.50[a]	137.04±2.90[a]	326.09±4.94[a]	44.17±0.65[a]	343.55±37.95[a]
盐酸多奈哌齐组	187.54±10.72[b]	36.63±1.27[b]	250.34±12.45[b]	1 098.11±73.11[b]	41.20±1.75[b]	112.50±16.63[b]	280.62±4.95[b]	39.98±1.89[c]	228.38±26.07[b]
TFB低剂量组	235.81±5.04	35.04±2.83[b]	230.19±6.51[c]	1 266.07±142.67[b]	44.96±0.98	136.21±5.22	309.39±7.30[c]	42.18±1.53	296.12±16.92[b]
TFB中剂量组	213.29±14.17[b]	35.97±3.45[b]	244.02±8.42[b]	1 262.33±84.64[b]	43.05±1.51[b]	127.17±6.70	298.35±6.41[b]	39.13±1.31[b]	278.59±15.34[b]
TFB高剂量组	209.28±8.05[b]	41.63±4.16[b]	259.13±11.80[b]	1 156.22±120.07[b]	39.21±1.99[bd]	120.73±5.67[b]	291.03±10.50[b]	37.34±0.84[b]	238.15±23.90[b]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.05$；d：与盐酸多奈哌齐组比较，$P<0.05$。

小鼠海马CA3区神经元形态（如细胞核固缩情况等）和组织病理变化（如海马区神经元排列状态、神经元坏死情况等）。

结果（图3）显示，空白对照组小鼠海马CA3区神经元细胞形态饱满且规则，排列紧密，细胞质包膜分界清晰，细胞核大而圆，核仁清晰。模型组小鼠海马CA3区神经元排列紊乱，形状不规则，细胞核固缩深染，细胞间隙增大，并伴随大量神经元变性坏死。各药物组小鼠海马CA3区神经元排列较为整齐，形状较规则，仅少量神经元细胞核固缩深染。



A. 空白对照组　B. 模型组　C. 盐酸多奈哌齐组

D. TFB低剂量组　E. TFB中剂量组　F. TFB高剂量组

箭头：细胞核固缩的神经元。

图3　各组小鼠海马CA3区神经元病理学变化的显微图（HE染色，标尺：50 μm）

2.2.5　脑组织中PI3K/Akt信号通路及凋亡相关蛋白、基因表达检测

采用Western blot检测相关蛋白的表达。取各组（每组3只）小鼠冻存的脑组织适量，用RIPA裂解液（含苯甲基磺酰氟和磷酸酶抑制剂）低温裂解，离心后取上清液，以BCA法测定蛋白浓度后进行变性处理。取变性蛋白适量，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转移至聚偏二氟乙烯膜上，以5%脱脂奶粉或1%牛血清白蛋白于室温下封闭2 h；加入β-actin、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt一抗（稀释比例均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；洗膜后，加入相应二抗（稀释比例为1∶10 000），于室温下孵育16 min；洗膜后，以ECL化学发光试剂显影、成像。采用Image J软件分析各蛋白的条带灰度值，以β-actin为内参计算各蛋白的表达水平，以p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt表达水平比值表示对应蛋白的磷酸化水平。

采用实时荧光定量PCR法检测相关mRNA的表达。取各组（每组3只）小鼠冻存的脑组织适量，使用RNA提取试剂盒提取其总RNA，待测定浓度、纯度后，按逆转录试剂盒说明书操作，将RNA逆转为cDNA。以此cDNA为模板，进行PCR扩增。反应体系包括正、反向引物（具体序列及产物长度见表3）各0.5 μL，cDNA模板2.0 μL，荧光染料5.0 μL，无核酶水2.0 μL。反应条件如下：95 ℃预变性2 min；95 ℃变性2 min，60 ℃退火15 s，72 ℃延伸60 s，共循环40次。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）为内参，采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算PI3K、Akt、B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma 2，Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 related X protein，Bax）、胱天蛋白酶3（caspase-3）mRNA的相对表达量，结果以对照组为参照进行归一化处理。

表3　PCR引物序列及产物长度

基因	正向引物(5'→3')	正向引物(5'→3')	产物长度/bp
PI3K	CGAGACGGCACTTTCCTTGT	CGGTGGCAGTCTTGTTAATGAC	22
Akt	GCCGCCTGATCAAGTTCTCC	GGCTTCTGGACTCGGCAATG	20
Bcl-2	TGGTGGACAACATCGCCCTGTG	GGTCGCATGCTGGGGCCATATA	23
Bax	TGAGCGAGTGTCTCCGGCGAAT	GCACTTTAGTGCACAGGGCCTTG	23
caspase-3	TGTCATCTCGCTCTGGTACG	AAATGACCCCTTCATCACCA	20
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	23

结果（表4、图4）显示，与空白对照组比较，模型组小鼠脑组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA的表达均显著降低或下调，Bax、caspase-3 mRNA的表达均显著上调（$P<0.01$）。与模型组比较，各药物组小鼠脑组织中PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA（TFB低、中剂量组PI3K、Akt mRNA，TFB低剂量组Bcl-2 mRNA除外）的表达均显著升高或上调，Bax、caspase-3 mRNA的表达均显著下调（$P<0.05$或$P<0.01$）。

3　讨论

本研究采用网络药理学与动物实验验证相结合的方法，初步探讨了TFB防治AD的作用机制。

3.1　网络药理学分析

网络药理学分析显示，TFB主要活性成分有6种，包括木犀草素、槲皮素和山柰酚等。研究表明，木犀草素

表4　各组小鼠脑组织中PI3K/Akt信号通路和凋亡相关蛋白及mRNA表达情况比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	蛋白		mRNA				
	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	PI3K	Akt	Bcl-2	Bax	caspase-3
空白对照组	1.14±0.36	0.90±0.05	1.01±0.14	1.01±0.19	1.02±0.26	1.00±0.09	1.00±0.11
模型组	0.27±0.17[a]	0.30±0.22[a]	0.46±0.08[a]	0.46±0.19[a]	0.38±0.09[a]	1.95±0.28[a]	2.16±0.30[a]
盐酸多奈哌齐组	0.73±0.19[b]	0.81±0.12[c]	0.92±0.14[c]	0.86±0.17[b]	0.71±0.24[b]	1.16±0.22[c]	1.03±0.14[c]
TFB低剂量组	0.67±0.09[b]	0.76±0.14[c]	0.56±0.10	0.70±0.18	0.60±0.08	1.48±0.24[b]	1.36±0.27[c]
TFB中剂量组	0.75±0.13[b]	0.86±0.03[c]	0.61±0.12	0.71±0.06	0.68±0.13[b]	1.27±0.18[c]	1.24±0.19[c]
TFB高剂量组	0.94±0.10[c]	0.89±0.15[c]	0.73±0.20[b]	0.84±0.24[b]	0.69±0.11[b]	1.19±0.09[c]	0.96±0.23[c]

a：与空白对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$。

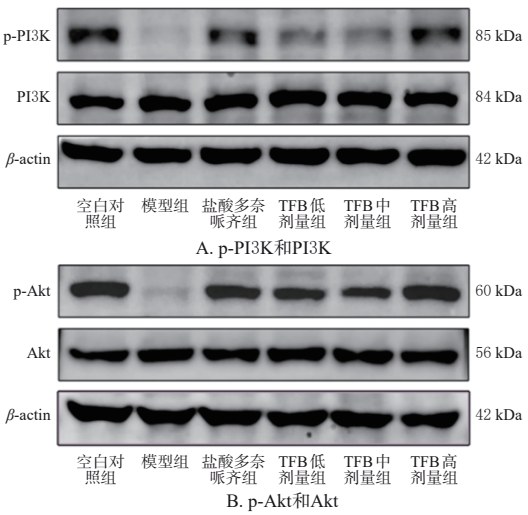


图4　各组小鼠脑组织中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的电泳图

可显著改善AD模型动物的认知功能障碍[10]；鬼针草的特征性黄酮类成分[奥卡宁、(2*E*)-2-(3,4-二羟基亚苄基)-6,7-二羟基苯并呋喃-3(2*H*)-酮]均具有抗AD活性[7−8]；槲皮素和山柰酚同样被证实可改善AD模型动物的认知功能及病理变化[11−12]。由此推测，TFB具有改善AD的潜力。

通过进一步分析，本研究获得TFB与AD的共同靶点165个；经进一步筛选后获得*Akt1*、*EGFR*、*VEGFA*、*TNF*、*PIK3R1*等29个核心靶点。GO富集分析结果显示，共同靶点通过作用于细胞外间隙等细胞组分，调节酶结合等分子功能，参与细胞增殖、凋亡等生物过程的调控；KEGG富集分析结果显示，共同靶点主要富集于PI3K/Akt、癌症、AGE/RAGE、MAPK等信号通路。其中，癌症通路富集程度最高，可能与AD和癌症均涉及PI3K/Akt、MAPK等多个关键信号通路有关[19]。研究指出，PI3K/Akt信号通路是AD病理过程中的关键调控枢纽之一，其功能异常会加剧Aβ沉积、Tau蛋白过度磷酸化、神经炎症及神经元死亡等关键病理进程[20−21]。可见，挖掘靶向调控PI3K/Akt信号通路的天然药物可为AD治疗研究提供新方向。

3.2　动物实验分析

基于网络药理学挖掘结果，本课题组推测TFB改善AD的主要作用机制可能与缓解炎症和调控PI3K/Akt信号通路有关。盐酸多奈哌齐作为一种AChE抑制剂，已被广泛应用于AD症状的改善，故本研究以其为阳性对照药，基于上述推测开展了初步的实验验证。

本研究采用D-半乳糖腹腔注射联合氯化铝灌胃的方式建立AD小鼠模型。水迷宫实验结果显示，模型组小鼠逃避潜伏期显著延长，穿越平台次数显著减少，原平台象限停留时间占比显著降低，提示其空间学习记忆能力受损。

HE染色结果显示，模型组小鼠海马CA3区神经元排列紊乱，核固缩，细胞间隙增大并伴随大量神经元坏死。ELISA检测结果显示，模型组小鼠脑组织中AChE、Aβ40、Aβ42、p-Tau含量均显著升高，而ACh、ChAT含量均显著降低，表明AD模型构建成功；而TFB干预可显著降低小鼠脑组织中AChE（TFB低剂量组除外）、Aβ40、Aβ42（TFB低剂量组除外）及p-Tau（TFB低、中剂量组除外）含量，提高ACh、ChAT含量，并改善其水迷宫行为学表现及海马神经元病理损伤，提示TFB具有保护海马神经元及改善认知功能的作用。

在神经炎症方面，小胶质细胞在AD病理状态下被Aβ激活为促炎M1表型，从而释放IL-1β、IL-6、TNF-α等炎症因子，加剧神经炎症与Aβ沉积[22]。本研究结果显示，与空白对照组比较，模型组小鼠脑组织中IL-1β、IL-6、TNF-α含量均显著升高；经TFB干预后，各剂量组小鼠脑组织中上述炎症因子（TFB低剂量组的IL-6除外）含量均显著降低，表明TFB可抑制AD相关神经炎症。此外，TFB高剂量组在减少Aβ42沉积方面的效果优于阳性对照药，显示出TFB抑制Tau蛋白磷酸化的潜力。

已有研究指出，PI3K/Akt信号通路与AD发病机制密切相关[23]。Cui等[24]报道，人参皂苷Rg_2可通过促进Akt蛋白磷酸化，上调Bcl-2表达，下调Bax、caspase-3 mRNA表达，从而改善AD大鼠的记忆能力。本研究得出类似结论，即TFB可提高PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平，上调PI3K、Akt、Bcl-2 mRNA表达，下调Bax、caspase-3 mRNA表达，提示TFB的抗AD作用可能与激活PI3K/Akt信号通路有关。

综上所述，TFB可通过多成分、多靶点、多通路发挥抗AD作用，其机制可能与激活PI3K/Akt信号通路、改善胆碱能系统、减少Aβ沉积和Tau蛋白过度磷酸化、抑制神经炎症反应和神经元细胞凋亡有关。然而，本研究仅验证了部分预测靶点及PI3K/Akt信号通路，尚未深入

探讨突触可塑性等微观机制，也未评估TFB的长期毒性及药代动力学特征。后续本课题组将通过体内外实验进一步验证AGE/RAGE等信号通路，为TFB的临床应用提供更充分的依据。

参考文献

[1] DOS SANTOS PICANCO L C，OZELA P F，DE FATIMA DE BRITO BRITO M，et al. Alzheimer's disease：a review from the pathophysiology to diagnosis，new perspectives for pharmacological treatment[J]. Curr Med Chem，2018，25(26)：3141-3159.

[2] 徐勇，王军，王虹峥，等. 2023中国阿尔茨海默病数据与防控策略[J]. 阿尔茨海默病及相关病杂志，2023，6(3)：173，175-192.

[3] SCHELTENS P，DE STROOPER B，KIVIPELTO M，et al. Alzheimer's disease[J]. Lancet，2021，397(10284)：1577-1590.

[4] 潘汉博，林妙满，龚一富，等. 海洋天然产物对抗阿尔茨海默症的研究进展[J]. 中国海洋药物，2019，38(2)：73-82.

[5] 翟雅莉，王晓明. 阿尔茨海默病的发病机制研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志，2023，22(2)：139-142.

[6] MADAV Y，WAIRKAR S，PRABHAKAR B. Recent therapeutic strategies targeting beta amyloid and tauopathies in Alzheimer's disease[J]. Brain Res Bull，2019，146：171-184.

[7] 曹园，瞿慧，姚毅，等. 鬼针草化学成分研究[J]. 中草药，2013，44(24)：3435-3439.

[8] 王碧晴，赵俊男，张颖，等. 鬼针草的药理作用研究进展[J]. 中医药导报，2019，25(18)：100-103，107.

[9] 邓湘俊，潘卫松，张婷，等. 鬼针草属植物药的药理作用研究进展[J]. 中国药房，2017，28(13)：1860-1864.

[10] KOU J J，SHI J Z，HE Y Y，et al. Luteolin alleviates cognitive impairment in Alzheimer's disease mouse model via inhibiting endoplasmic reticulum stress-dependent neuroinflammation[J]. Acta Pharmacol Sin，2022，43(4)：840-849.

[11] 杨宜歆，时磊，赵杨，等. 槲皮素通过抑制氧化应激改善3×Tg-AD小鼠的认知功能障碍[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2022，24(4)：1642-1649.

[12] 刘卫红，赵伟光，韩晓正. 山柰酚对阿尔茨海默病模型大鼠的治疗作用及CREB/BDNF信号通路的影响[J]. 卒中与神经疾病，2023，30(4)：333-337，343.

[13] 唐丰曼，庞晓军，谢颜，等. 鬼针草总黄酮对脂多糖诱导小鼠神经炎症的改善作用及机制[J]. 中国药房，2023，34(14)：1719-1723.

[14] AHMAD M H，FATIMA M，MONDAL A C. Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease：rational insights for the therapeutic approaches[J]. J Clin Neurosci，2019，59：6-11.

[15] GU Y，LI Z Y，LI H，et al. Exploring the efficacious constituents and underlying mechanisms of Sini decoction for sepsis treatment through network pharmacology and multiomics[J]. Phytomedicine，2024，123：155212.

[16] 卜祥辉，安海燕，安晓娜，等. 基于网络药理学与分子对接探究鬼箭羽治疗糖尿病肾病的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报，2021，41(10)：1564-1573.

[17] 罗晓敏，张博宇，丁翼，等. 二十五味珊瑚丸调控Akt/mTOR/GSK-3β信号通路改善阿尔茨海默病小鼠的作用机制[J]. 中国中药杂志，2022，47(8)：2074-2081.

[18] 程新燕. 鬼针草总黄酮对D-GalN致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(14)：268-271.

[19] BARKER R M，CHAMBERS A，KEHOE P G，et al. Untangling the role of tau in sex hormone responsive cancers：lessons learnt from Alzheimer's disease[J]. Clin Sci(Lond)，2024，138(21)：1357-1369.

[20] KUMAR M，BANSAL N. Implications of phosphoinositide 3-kinase-Akt(PI3K-Akt)pathway in the pathogenesis of Alzheimer's disease[J]. Mol Neurobiol，2022，59(1)：354-385.

[21] 陈萱，胡静芸，陈千红，等. AD认知功能障碍的代谢紊乱机制：脑胰岛素抵抗及其介导的PI3K/Akt信号通路受损[J]. 生命的化学，2020，40(2)：269-276.

[22] CAI Z Y，HUSSAIN M D，YAN L J. Microglia，neuroinflammation，and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease[J]. Int J Neurosci，2014，124(5)：307-321.

[23] 高洋洋，赵志英. PI3K/Akt信号通路及神经损伤的研究进展[J]. 医学综述，2017，23(16)：3121-3125.

[24] CUI J，SHAN R，CAO Y Q，et al. Protective effects of ginsenoside Rg_2 against memory impairment and neuronal death induced by Aβ25-35 in rats[J]. J Ethnopharmacol，2021，266：113466.

（收稿日期：2025-07-02　修回日期：2025-11-11）

（编辑：张元媛）