

基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学与实验验证 探讨四君子汤治疗阿尔茨海默病的作用机制

蔡可珍¹, 郑琴^{1*}, 朱徐东², 魏韶锋¹, 吴梦琪¹, 熊慧¹, 赵海婷¹

(1. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室 创新药物与高效节能降耗制药设备国家重点实验室, 江西南昌 330004; 2. 江西省药品检验检测研究院 国家药品监督管理局中成药质量评价重点实验室 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西南昌 330029)

[摘要] 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)联用技术分析灌胃给药后四君子汤提取液在大鼠体内的入血成分,并结合网络药理学、分子对接和实验验证研究四君子汤治疗阿尔茨海默病的作用机制。根据一级质谱和二级质谱信息,结合文献和数据库数据,对四君子汤入血成分进行指认。基于这些成分结合 PharmMapper、OMIM、DisGeNET、GeneCards 和 TTD 数据库筛选四君子汤入血成分治疗阿尔茨海默病的潜在作用靶点,经网络药理学预测运用 STRING 数据库构建蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络;通过 DAVID 数据库实现京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路和基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析;Cytoscape 3.9.0 软件进行可视化分析,最后使用 AutoDock Vina 和 PyMOL 软件对相关入血成分与核心靶点进行分子对接。最后依据 KEGG 通路分析结果,选择 PI3K/Akt 信号通路进行动物实验验证。结果显示,大鼠灌胃给药后在血清样本中检测到 17 个人血成分,其中茯苓新酸 B、甘草素、白术内酯 II、白术内酯 III、人参皂苷 Rb₁、甘草酸等化合物为四君子汤发挥治疗阿尔茨海默病药效的关键成分, HSP90AA1、PPARA、SRC、AR、ESR1 等为四君子汤治疗阿尔茨海默病的主要靶点。分子对接显示核心成分与核心靶点结合性较好,推测四君子汤防治阿尔茨海默病可能涉及 PI3K/Akt 信号传导通路、癌症的途径、MAPK 信号传导通路等。动物实验验证结果表明,尼氏染色显示四君子汤治疗后明显改善阿尔茨海默病小鼠海马齿状回(dentate gyrus, DG)区神经元细胞损伤状况,明显增加神经元细胞数量,增加小鼠海马 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 的比值。综上,四君子汤显示出良好的抗阿尔茨海默病作用,其机制可能与激活 PI3K/Akt 信号通路相关,为深入阐明四君子汤作用机制及其临床应用提供了参考。

[关键词] 四君子汤; 入血成分; 网络药理学; 阿尔茨海默病; UPLC-Q-TOF-MS; PI3K/Akt 信号通路

Mechanism of Sijunzi Decoction in treatment of Alzheimer's disease based on UPLC-Q-TOF-MS, network pharmacology, and experimental verification

CAI Ke-zhen¹, ZHENG Qin^{1*}, ZHU Xu-dong², WEI Shao-feng¹, WU Meng-qi¹, XIONG Hui¹, ZHAO Hai-ting¹

(1. State Key Laboratory of Innovative Drug and Efficient Energy-Saving Pharmaceutical Equipment, Key Laboratory of Modern Preparation of Chinese Medicine under Ministry of Education, Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;
2. Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, NMPA Key Laboratory of Quality Evaluation of Traditional Chinese Patent Medicine, Jiangxi Institute for Drug Control, Nanchang 330029, China)

[Abstract] The study identified the blood-entering components of Sijunzi Decoction after gavage administration in rats by UPLC-Q-TOF-MS/MS, and investigated the mechanism of Sijunzi Decoction in treating Alzheimer's disease by virtue of network pharmacology, molecular docking, and experimental verification. The blood-entering components of Sijunzi Decoction were identified based on the

[收稿日期] 2022-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860874);江西中医药大学科技创新团队项目(CXTD22006)

[通信作者] * 郑琴, 博士生导师, 主要从事中药新制剂与新产品研究, Tel: (0791)87118658, E-mail: zhengqin912006@163.com

[作者简介] 蔡可珍, 硕士研究生, E-mail: 552357574@qq.com

mass spectra and data from literature and databases. The potential targets of the above-mentioned blood-entering components in the treatment of Alzheimer's disease were searched against PharmMapper, OMIM, DisGeNET, GeneCards, and TTD. Next, STRING was employed to establish a protein-protein interaction (PPI) network. DAVID was used to perform the Gene Ontology (GO) annotation and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment. Cytoscape 3.9.0 was used to carry out visual analysis. AutoDock Vina and PyMOL were used for molecular docking of the blood-entering components with the potential targets. Finally, the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway enriched by the KEGG analysis was selected for validation by animal experiments. The results showed that 17 blood-entering components were detected in the serum samples after administration. Among them, poricoic acid B, liquiritigenin, atractylenolide II, atractylenolide III, ginsenoside Rb₁, and glycyrrhizic acid were the key components of Sijunzi Decoction in treating Alzheimer's disease. HSP90AA1, PPARA, SRC, AR, and ESR1 were the main targets for Sijunzi Decoction to treat Alzheimer's disease. Molecular docking showed that the components bound well with the targets. Therefore, we hypothesized that the mechanism of Sijunzi Decoction in treating Alzheimer's disease may be associated with the PI3K/Akt, cancer treatment, and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. The results of animal experiments showed that Sijunzi Decoction significantly attenuated the neuronal damage in the hippocampal dentate gyrus area, increased the neurons, and raised the ratios of p-Akt/Akt and p-PI3K/PI3K in the hippocampus of mice. In conclusion, Sijunzi Decoction may treat Alzheimer's disease by activating the PI3K/Akt signaling pathway. The findings of this study provide a reference for further studies about the mechanism of action and clinical application of Sijunzi Decoction.

[Key words] Sijunzi Decoction; blood-entering components; network pharmacology; Alzheimer's disease; UPLC-Q-TOF-MS; PI3K/Akt signaling pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20221209.401

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种慢性进行性神经退行性疾病,以淀粉样蛋白 β (amyloid β , A β) 沉积形成的老年斑和过度磷酸化的 tau 蛋白形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFT) 为主要病理特征^[1]。研究表明,我国 60 岁以上的痴呆症患者有 1 507 万例,包括 983 万 AD 患者,392 万血管性痴呆患者和 132 万其他形式的痴呆症患者^[2]。我国对 AD 的诊断和治疗率仍然很低,AD 的防治变得非常迫切。AD 主要通过药物治疗,但仍缺乏有效治疗手段,且预后相对较差^[3]。目前,临床上被批准用于治疗 AD 的药物仅有几种,如 *N*-甲基-D-天门冬氨酸 (*N*-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA) 受体拮抗剂 (盐酸美金刚)、乙酰胆碱酯酶 (acetylcholinesterase, AChE) 抑制剂 (他克林、多奈哌齐、加兰他敏) 等,但上述药物效果有限,并伴随着不良反应^[4]。因此,开发新型高效低毒的抗 AD 药物具有重要的临床价值和社会意义。

AD 属于中医学“痴呆”的范畴,中医认为脾主运化,脾运化水谷精微。年老体迈者,脾胃虚弱,水谷精微不能化为精血,肾精空虚,脑髓失充则发为痴呆之证^[5]。四君子汤源自于宋代《太平惠民和剂局方》,由人参(去芦)、白术、茯苓(去皮)、甘草(炙)4 味常用中药配伍组成,具有益气补中,温养脾胃的功效,其组方中的人参、茯苓、甘草、白术是治疗 AD 的

常见中药,常常相互配伍使用^[6]。课题组前期研究发现,四君子汤能够修复 AD 细胞模型和 AD 小鼠海马神经元损伤,改善细胞存活率和动物认知功能^[7-8]。四君子汤对 AD 的治疗机制尚不明确,从分子层面深入研究四君子汤的作用机制依然存在较大困难。

本研究拟采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析四君子汤血中移行成分,以血清药物化学结果为基础,采用网络药理学构建“活性成分-靶点-通路”间的多层次网络关系,分析四君子汤治疗 AD 的信号通路和关键作用靶点,同时结合 APP/PS1 双转基因模型小鼠对网络药理学筛选出的关键通路进行初步验证,为进一步的四君子汤治疗 AD 机制研究及临床应用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Waters Acquity UPLC 超高效液相色谱系统 (美国 Waters 公司); Waters Xevo G2 Q-TOF 高分辨率飞行时间质谱仪,配有电喷雾离子源 (ESI) (美国 Waters 公司); RM2016 型病理切片仪 (德国徕卡仪器有限公司); Rt-6100 型酶标仪 (美国 Rayto 公司); 164-5070 电泳仪 (美国伯乐公司)。

1.2 材料

人参 (批号 200218)、白术 (批号 200413)、茯苓

(批号 200113)、炙甘草(批号 180513)购于江西江中中药饮片有限公司,经江西中医药大学药学院刘荣华教授鉴定符合《中国药典》规定。人参皂苷 Rg₁(批号 PU0131-0025)、人参皂苷 Rb₁(批号 PU0247-0025)、甘草酸(批号 PU0054-0025)、茯苓酸(批号 PU0510-0025)、白术内酯 I(批号 PU0047-0010)、白术内酯 II(批号 PU0048-0010)、白术内酯 III(批号 PU0060-0010)对照品均购自成都普思生物科技有限公司;甘草苷(批号 111610-201908)、甘草次酸(批号 110723-201715)对照品均购自中国食品药品检定研究院,纯度≥98%;甲醇、乙腈(美国 Merck 公司,色谱纯)。BCA 蛋白定量试剂盒(批号 G2026)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)抗体、GAPDH 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 60225-1-1g、10494-1-AP;蛋白激酶 B(Akt)抗体(批号 CY5561)购自上海泊湾生物技术有限公司;磷酸化 PI3K(p-PI3K)抗体、磷酸化 Akt(p-Akt)抗体购自美国 Affinity 公司,批号分别为 AF3241、AF0016;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠二抗、HRP 标记羊抗兔二抗购自武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为 G1214、G1213。

1.3 动物

APP/PS1 双转基因雄性小鼠 50 只,相同遗传背景 C57BL/6 雄性小鼠 10 只,鼠龄为 6 月龄,体质量 25~30 g,动物生产合格证号 SCXK(苏)2020-0009,均购自南京君科生物工程有限公司。SPF 级雄性 SD 大鼠 10 只,体质量 180~220 g,动物生产合格证号 SCXK(湘)2018-0002,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。饲养条件:温度(22±2)℃,湿度 60%±10%,12 h 明暗循环,自由饮食饮水。动物适应性饲养 1 周。本实验符合动物实验伦理学要求,获江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准(批准号 JZLLSC20210021)。

1.4 分析工具

UNIFI 中药化学成分数据库(美国 Waters 公司);Masslynx V4.2 分析软件、UNIFI Portal 软件、TCM Chinese 数据库(美国 Waters 公司);PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>);PharmMapper 数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/>);UniProt 数据库([\[www.swisstargetprediction.ch/\]\(http://www.swisstargetprediction.ch/\)\); GeneCards 数据库\(<https://www.genecards.org/>\);Therapeutic Target Database 数据库\(<https://www.idrblab.net/>\);DisGeNET 数据库\(<https://www.disgenet.org/>\);OMIM 数据库\(<https://omim.org/>\);STRING 数据平台\(<https://cn.string-db.org/>\);DAVID 生物信息资源网站\(<https://David.ncicrf.gov/>\);Cytoscape 3.9.0 软件;微生信在线绘图网站\(<http://www.bioinformatics.com.cn/login/>\);PDB 数据库\(<https://www.rcsb.org/>\)。](http://www.</p>
</div>
<div data-bbox=)

2 方法

2.1 样本处理

2.1.1 对照品溶液的配制 分别取人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Rb₁、甘草酸、茯苓酸、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、甘草苷、甘草次酸对照品适量于 2 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度线,摇匀,得到质量浓度为 10 μg·mL⁻¹的混合对照品溶液。

2.1.2 四君子汤的制备 将人参去芦后,与白术、茯苓、炙甘草以 3:3:3:2 比例加至圆底烧瓶中,加 10 倍量水浸泡 30 min 后将烧瓶放至加热套上开火,回流提取 30 min,过滤并收集滤液,药渣加 8 倍量水继续回流提取 30 min,重复 2 次,将 3 次获得的药液合并,冷冻干燥。

2.1.3 动物和血清样品的处理 大鼠按体质量随机分组,每组 5 只,分别为空白组和四君子汤组,四君子汤组每天灌胃给予成人 10 倍有效剂量的四君子汤(29.7 g·kg⁻¹)^[9],空白组每天灌胃等体积的生理盐水。每天分 2 次给药,连续灌胃 7 d。在末次给药后 1.5 h,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,室温静置 2 h,3 500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清分装,-80℃保存备用。

将冻存血清室温解冻,取 1 mL 血清,加甲醇 3 mL 涡旋混匀 2 min,4℃恒温静置 3 h,4℃,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,后取上清液于 1.5 mL EP 管,37℃水浴氮气吹干。残渣加甲醇溶液 200 μL 复溶,涡旋混匀 1 min,4℃,12 000 r·min⁻¹离心 15 min,取上清液过 0.22 μm 滤膜于待测样品瓶,放置于 4℃冰箱待测。

2.2 检测条件

2.2.1 UPLC Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×100 mm,1.7 μm);柱温 40℃;流动相乙腈(A)-10 mmol·L⁻¹甲酸铵溶液(B),梯度洗脱

(0~1 min, 5% A; 1~6 min, 5%~24% A; 6~15 min, 24%~48% A; 15~30 min, 48%~78% A; 30~40 min, 78%~100% A); 流速 0.3 mL·min⁻¹; 进样量 2 μL。

2.2.2 质谱 电喷雾离子源(ESI), 正、负离子模式分别进行 MS^E 扫描; 低碰撞电压 6 V; 高碰撞电压 30~45 V; 离子源温度 100 °C (ESI⁺) 和 110 °C (ESI⁻); 锥孔电压 40 V; 锥孔气流量 50 L·h⁻¹; 电喷雾电压 2.5 kV; 雾化气体流量 800 L·h⁻¹; 脱溶剂气温度 400 °C; 扫描范围 *m/z* 102~1 200; 亮氨酸脑啡肽实时校准质量数正离子模式 *m/z* 556.277 1 [M+H]⁺, 负离子模式 *m/z* 554.261 5 [M-H]⁻。

2.3 潜在靶点的预测和筛选

将经过鉴定的入血成分使用 PubChem 数据库检索成分英文名, 获取并下载 2D 结构的 SDF 文件, 通过 PharmMapper 数据库, 利用反向药效团匹配的方法以代表性入血成分为研究对象, 预测可能匹配和对接的体内药物靶标, 设置靶点目标为“human protein target only”, 选择 norm fit>0.8 的靶点。将 SMILES 格式文件导入 SwissTargetPrediction 数据库, 限定物种为“*Homo sapiens*”, 下载成分对应靶点, 按照 probability>0 进行筛选, 剔除重复项, 即得四君子汤入血成分作用靶蛋白。运用 OMIM、DisGeNET、GeneCards、TTD 数据库, 以“Alzheimer's disease”为关键词检索并获取相关靶点, 删除重复靶点, 利用 UniProt 数据库对靶点名称进行官方校正, 获取疾病的相关靶点。利用 Venny 2.1.0 分别输入成分和疾病的作用靶点, 绘制 Venn 图, 找到其中的交集靶点作为四君子汤的潜在作用靶点, 即为四君子汤活性成分治疗 AD 的潜在作用靶点。

2.4 蛋白-蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建

将交集靶点导入 STRING 11.0 数据平台, 将组织 (organism) 设置为“*Homo sapiens*”, 以最高置信度 (high confidence) ≥0.7 为筛选条件, 获取 PPI 网络功能富集分析, PPI 网络以 tsv 格式下载, 保留文件中 node1、node2 和 combined score 信息, 导入 Cytoscape 3.9.0 软件, 并绘制相关靶点 PPI 网络, 利用 Network Analyzer 对作用靶点进行分析, 以拓扑参数度值 (degree)>中位数 2 倍 (即 8) 以上的靶点为核心靶点。

2.5 富集分析和通路分析

将得到的交集靶点导入 DAVID 数据库, 进行

GO 生物功能与 KEGG 信号通路富集分析, 设定标准为 *P*<0.01, 并利用微生信在线绘图网站将结果进行可视化。

2.6 “活性成分-靶点-通路”网络构建

在 Cytoscape 3.9.0 软件中分别导入核心靶点之间的相互作用关系、成分-核心靶点和成分-通路之间的对应关系, 利用 merge 功能合并成一个整体网络, 删去孤立节点, 得到四君子汤治疗 AD 的“活性成分-靶点-通路”网络。

2.7 分子对接

以 PPI 网络中排名前五的 5 个关键靶点为受体, 以“活性成分-靶点-通路”网络中与关键靶点相互作用的化学成分为配体。通过 PubChem 下载潜在活性成分的 SDF 结构文件, 通过 PDB 数据库下载核心靶点的 PDB 结构文件, 设置条件: 物种来源 (scientific name of the source organism) 为 *Homo sapiens*; 聚合物类型 (polymer entity type) 为 protein; 分辨率 (refinement resolution)<3.0。使用 PyMOL 软件对蛋白结构去除水分子及配体, 利用 AutoDockTool 1.5.6 软件对靶蛋白与化合物进行处理, 再转化为 PDBQT 格式。利用 AutoDock Vina 软件对潜在活性成分与核心靶点进行对接并分析其结果, 然后使用 PyMOL 软件进行分子可视化。

2.8 动物实验验证

2.8.1 分组与给药 将 50 只 6 月龄 APP/PS1 小鼠随机分为模型组、阳性药组和四君子汤低、中、高剂量组, 另取 10 只 C57BL/6 小鼠作为空白组。四君子汤低、中、高剂量组分别按 2.14、4.29、8.58 g·kg⁻¹ 的剂量给予四君子汤水提液, 阳性药组按照 0.65 mg·kg⁻¹ 的剂量给予盐酸多奈哌齐; 空白组和模型组给予等量生理盐水, 每天灌胃 1 次, 连续给药 30 d。

2.8.2 脑组织尼氏染色 取固定的脑组织石蜡包埋, 石蜡切片脱蜡至水, 烘干切片后置于二甲苯中脱蜡; 脱蜡 3 次后将玻片依次放入梯度乙醇中各 5 min 进行脱水处理; 切片用甲苯胺蓝染色, 然后将切片用蒸馏水清洗 5 min, 用二甲苯透明, 并用中性树胶封片。

2.8.3 Western blot 法检测 PI3K/Akt 通路相关蛋白的表达 取小鼠海马组织 40 mg, 充分研磨, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。通过电泳、湿法转至 PVDF 膜, 5% 脱

脂奶粉室温封闭 2 h, 分别加入 p-Akt、Akt、p-PI3K 和 PI3K 抗体, 4 °C 孵育过夜。TBST 洗脱后, 加入二抗孵育 1 h, 孵育后加入 ECL 发光液显影检测条带。采用 ImageJ 软件分析条带, 以 GAPDH 为内参。

2.8.4 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件和 Graph-Pad Prism 7 软件分析数据, 计量资料以均数±标准差表示, 其中多组间差异比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 四君子汤入血成分分析

比较相同色谱、质谱条件下四君子汤混合对

照品、空白血清、含药血清图谱, 根据质谱所提供的保留时间、精确相对分子质量及二级质谱裂解碎片来鉴定和推测其血中移行成分。总离子流图见图 1, 在正、负离子同时扫描的模式下从四君子汤中共鉴定出 17 种入血成分, 见表 1。白术内酯 II、白术内酯 III 来源于白术, 25-羟基-3-差向-去氢土莫酸、茯苓新酸 B、茯苓新酸 F、去氢土莫酸、土莫酸来源于茯苓, 人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rc、人参皂苷 Rd、人参皂苷 Re 来源于人参, 甘草利酮、甘草素、甘草酸、芒柄花黄素、异甘草呋喃糖苷、异甘草苷来源于甘草。

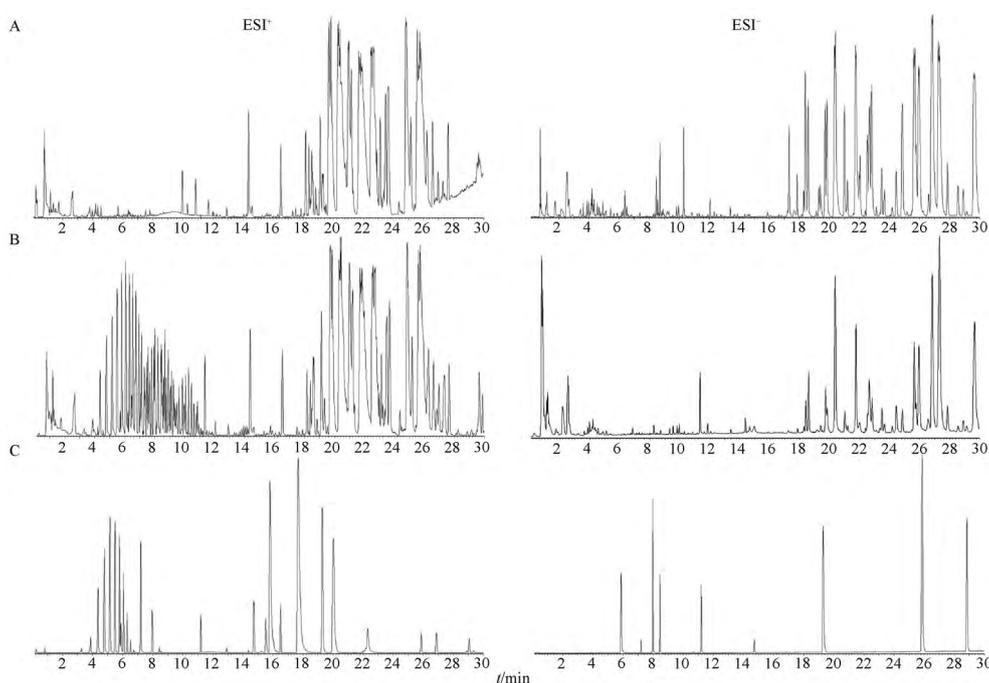


图 1 含药血清(A)、空白血清(B)及对照品(C)正、负离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of the serum containing drug (A), blank serum (B), and standards (C) in positive and negative ion modes

3.2 基于网络药理学的四君子汤治疗 AD 的作用机制

3.2.1 活性成分筛选及其靶点预测 由 3.1 项可知, 从口服四君子汤的大鼠血清中鉴定出 17 种入血成分, 通过 PubChem、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库检索成分靶点, 结合文献报道筛选出 421 个成分靶点。

3.2.2 疾病靶点的获得 采用 OMIM、GeneCards、TTD、DisGeNET 数据库检索疾病靶点, 合并去重后, 得到 4 298 个 AD 靶点。将成分靶点与疾病靶点做

韦恩图, 获得四君子汤抗 AD 的 305 个预测作用靶标, 见图 2。

3.2.3 PPI 网络的构建 通过 STRING 数据库, 将筛选出的 305 个交集靶点, 利用 Cytoscape 3.9.0 设置节点的大小、颜色随 degree 大小变化, 构建 PPI 网络。核心靶点 PPI 网络中包含 114 个节点及 389 条边, 其中节点代表蛋白, 边代表蛋白与蛋白之间的相互作用, 节点的大小和颜色深浅代表度值的大小, 见图 3, 核心靶点网络节点见表 2。

表 1 含药血清中成分的 UPLC-Q-TOF-MS 特征信息

Table 1 Characteristics information of UPLC-Q-TOF-MS of constituents in the serum containing drug

No.	t_R /min	分子式	理论值 m/z	实际值 m/z	误差 / $\times 10^{-6}$	离子峰	MS/MS	化合物
1	12.340	$C_{31}H_{48}O_5$	500.350	500.349	-1.368	$[M-H]^-$	391.285 8	25-羟基-3-差向-去氢土莫酸
2	17.680	$C_{15}H_{20}O_2$	232.146	232.147	1.980	$[M+H]^+$	161.062 2, 159.116 3, 133.101 3, 105.068 5	白术内酯 II ¹⁾
3	14.730	$C_{15}H_{20}O_3$	248.141	248.143	5.760	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$	105.070 3	白术内酯 III ¹⁾
				248.141	-2.529	$[M-H]^-$	154.065 5	
4	15.941	$C_{30}H_{44}O_5$	484.319	484.319	-0.223	$[M-H]^-$	409.274 1, 211.149 2	茯苓新酸 B
5	17.247	$C_{31}H_{46}O_5$	498.335	498.334	-0.490	$[M-H]^-$	423.289 1, 277.217 2	茯苓新酸 F
6	16.070	$C_{22}H_{22}O_6$	382.142	382.142	-0.160	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$	283.061 5, 163.042 5	甘草利酮
				382.141	-0.456	$[M-H]^-$	366.110 9, 351.087 2, 279.030 2, 174.033 1	
7	5.870	$C_{15}H_{12}O_4$	256.074	256.076	7.770	$[M+H]^+$	137.023 6, 123.044 3, 121.065 2	甘草素
8	8.430	$C_{42}H_{62}O_{16}$	822.404	822.407	4.280	$[M+H]^+$	471.351 3, 407.335 1, 189.164 2	甘草酸 ¹⁾
				822.403	-1.317	$[M-H]^-$	645.362 1, 369.226 6, 351.055 0	
9	11.510	$C_{16}H_{12}O_4$	268.074	268.075	3.760	$[M+H]^+$, $[M+Na]^+$	161.063 2	芒柄花黄素
				268.074	-0.095	$[M-H]^-$	251.079 2, 121.029 5	
10	18.147	$C_{31}H_{48}O_4$	484.355	484.354	-2.123	$[M-H]^-$	437.340 6, 393.277 7, 311.168 3	去氢土莫酸
11	11.200	$C_{54}H_{92}O_{23}$	1 108.603	1 108.605	2.060	$[M+Na]^+$	425.383 7, 325.117 5, 163.061 6	人参皂苷 Rb ₁ ¹⁾
				1 108.601	-2.004	$[M-H]^-$	945.541 9, 783.489 7, 323.098 6	
12	11.550	$C_{53}H_{90}O_{22}$	1 078.592	1 078.594	1.150	$[M+Na]^+$	629.356 7, 504.293 8, 326.176 4, 287.153 5	人参皂苷 Rc
				1 078.590	-2.051	$[M-H]^-$	945.540 7, 783.488 8, 621.435 7	
13	12.787	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946.550	946.549	-1.012	$[M-H]^-$	783.489 9, 621.437 0, 459.383 8	人参皂苷 Rd
14	12.800	$C_{48}H_{82}O_{18}$	946.550	946.554	3.490	$[M+Na]^+$	299.139 6	人参皂苷 Re
15	18.971	$C_{31}H_{50}O_4$	486.371	486.370	-1.504	$[M-H]^-$	423.324 8, 221.189 7	土莫酸
16	5.847	$C_{26}H_{30}O_{13}$	550.169	550.168	-0.398	$[M-H]^-$	417.119 0, 255.066 8	异甘草呋喃糖苷
17	5.879	$C_{21}H_{22}O_9$	418.126	418.126	-0.220	$[M-H]^-$	255.066 8, 150.032 5, 135.008 9	异甘草苷

注: ¹⁾ 经对照品比对。

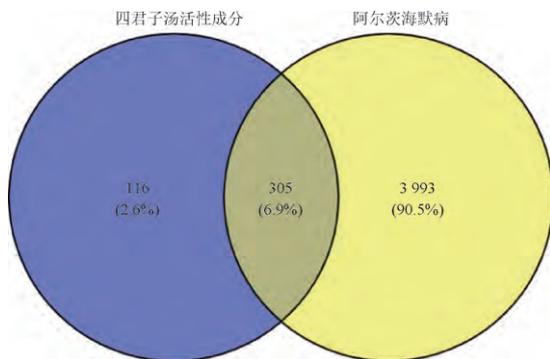


图 2 四君子汤入血成分靶点与阿尔茨海默病靶点韦恩图
Fig.2 Venn diagram of the common targets shared by the blood-entering components of Sijunzi Decoction and Alzheimer's disease

3.2.4 GO 和 KEGG 富集分析 将筛选的交集靶点在 DAVID 数据库中进行 GO 和 KEGG 富集分析。以 $P < 0.01$ 为筛选条件,共筛选到 379 个条目,其中生物过程 (biological process, BP) 条目 255 个,主要涉及对药物的反应、对 MAPK 级联的正向调节、对 MAP 激酶活性的正向调节、蛋白质的磷酸化、炎症

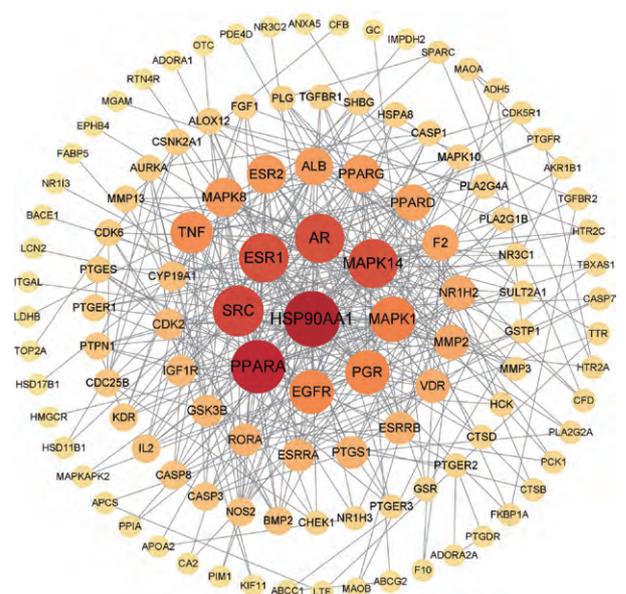


图 3 四君子汤治疗阿尔茨海默病相关靶点的 PPI 网络
Fig.3 PPI network of the relevant targets of Sijunzi Decoction in the treatment of Alzheimer's disease

反应、老化等;细胞组成 (cellular component, CC) 条

表2 四君子汤 27 个核心靶点的信息

Table 2 Information of the 27 core targets of Sijunzi Decoction

No.	靶点	缩写	度值	UniProt ID
1	heat shock protein 90 alpha family class A member 1	HSP90AA1	34	P53041
2	peroxisome proliferator activated receptor alpha	PPARA	32	Q07869
3	proto-oncogene tyrosine-protein kinase src	SRC	29	P12931
4	androgen receptor	AR	28	P10275
5	estrogen receptor 1	ESR1	28	P03372
6	mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	28	Q16539
7	mitogen-activated protein kinase 1	MAPK1	24	P28482
8	epidermal growth factor receptor Erbb1	EGFR	23	P00533
9	progesterone receptor	PGR	23	P06401
10	tumor necrosis factor	TNF	21	P01375
11	estrogen receptor 2	ESR2	18	Q92731
12	mitogen-activated protein kinase 8	MAPK8	18	P45983
13	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	PPARG	17	P37231
14	albumin	ALB	17	P02768
15	peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARD	16	Q03181
16	prothrombin	F2	15	P00734
17	72 kDa type IV collagenase	MMP2	14	P08253
18	oxysterols receptor LXR-beta	NR1H2	14	P55055
19	vitamin D3 receptor	VDR	13	P11473
20	steroid hormone receptor ERR1	ESRRA	12	P11474
21	prostaglandin G/H synthase 1	PTGS1	12	P23219
22	nuclear receptor ROR-alpha	RORA	12	P35398
23	steroid hormone receptor ERR2	ESRRB	12	O95718
24	glycogen synthase kinase-3 beta	GSK3B	11	P49841
25	cyclin-dependent kinase 2	CDK2	10	P24941
26	insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	10	P08069
27	aromatase	CYP19A1	9	P11511

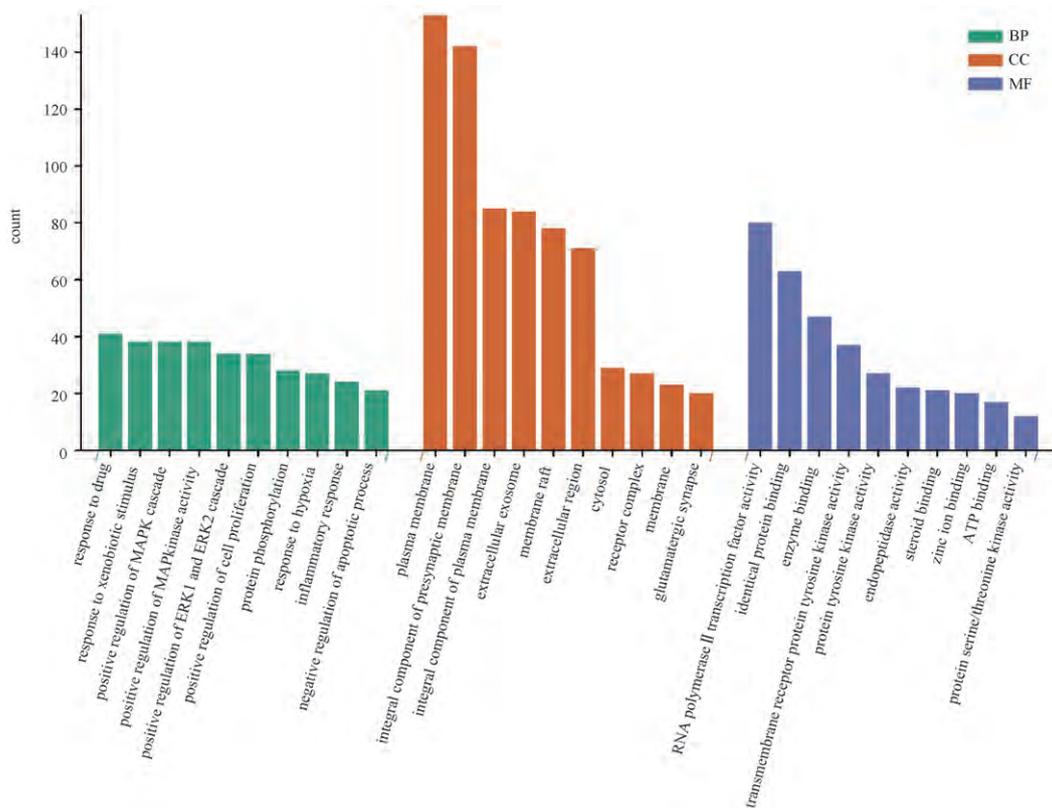
目 54 个,主要涉及浆膜、突触前膜的整体组成部分、细胞外泌体、膜筏等;分子功能(molecular function, MF)条目 70 个,主要涉及酶结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、ATP 结合等。对排名靠前的各 10 个 BP、CC、MF 条目绘制条形图,见图 4。KEGG 通路富集分析共有 133 条通路,将排名靠前的 20 条通路进行气泡图展示,见图 5。这些通路涉及癌症途径、神经活性配体-受体的相互作用、MAPK 信号传导通路、PI3K/Akt 信号传导通路、阿尔茨海默病等。其中,PI3K/Akt 信号通路在 AD 的发生发展中起重要作用,PI3K/Akt 信号通路受损会导致能量代谢障碍与线粒体功能障碍^[10]。已有文献报道发现,四君子汤可激活 PI3K/Akt 信号通路,显著改善脾气虚证大鼠学习记忆能力以及海马组织的病理形态^[11]。

3.2.5 “活性成分-靶点-通路”网络的构建 四君子汤治疗 AD“活性成分-靶点-通路”网络见图 6。使用 Network Analyzer 插件进行分析,该网络共有 64 个节点(包括 17 个成分,27 个核心靶点和 20 条

通路)和 279 条边,度值越大说明相连节点越多,在整个网络中的调控作用也就越大。度值较大的成分有茯苓新酸 B、甘草利酮、茯苓新酸 F、甘草素、去氢土莫酸、白术内酯 II、人参皂苷 Rb₁,推测为四君子汤的主要药效成分。HSP90AA1、PPARA、SRC、AR、ESR1 为四君子汤治疗 AD 的主要靶点。通路方面则集中在癌症的途径、化学致癌-受体激活信号通路、MAPK 信号传导通路、PI3K/Akt 信号传导通路等。

3.3 分子对接验证

选取 2020 年版《中国药典》中规定的指标性成分以及“活性成分-靶点-通路”网络中排名靠前的化合物作为配体,包括 25-羟基-3-差向-去氢土莫酸、茯苓新酸 B、茯苓新酸 F、甘草利酮、甘草素、白术内酯 II、白术内酯 III、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rd、甘草酸,以 HSP90AA1、PPARA、SRC、AR、ESR1 为受体进行结合能力预测,关键化合物与核心靶点分子对接结合能打分见表 3。通常结合能小于 0 说明分子之间具有结合活性,小于 -5.0 kcal·mol⁻¹说明分子



BP. 生物过程;CC. 细胞组分;MF. 分子功能。

图4 核心靶点的GO功能分析

Fig. 4 GO functional analysis of the core targets

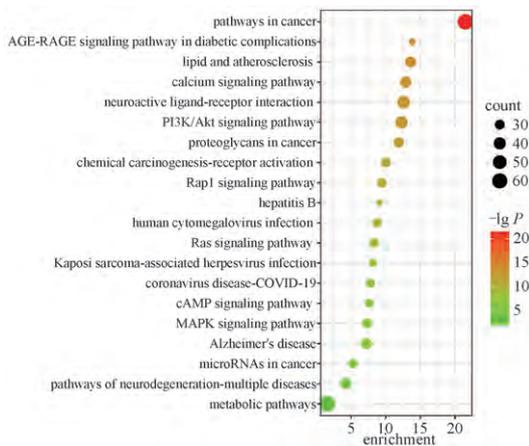


图5 核心靶点的KEGG通路富集分析

Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis of the core targets

之间具有较强的结合活性,且能量越低结合能力越强^[12-13]。四君子汤入血成分与关键靶点的结合能均 $\leq -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,可见成分与靶点蛋白有较好的结合能力,说明这10个入血成分是四君子汤治疗AD的关键药效成分。部分蛋白与成分对接的结合

模式见图7。

3.4 小鼠海马齿状回区形态

与空白组相比,模型组小鼠海马齿状回细胞严重缺失,出现细胞肿胀或皱缩,且神经元细胞结构模糊排列散乱,锥体细胞胞体内尼氏小体减少;与模型组比较,阳性药组以及四君子汤低、中、高剂量组的细胞损伤状况明显得到改善,神经元细胞数量明显增加,但与空白组比较,神经元细胞排列仍较为疏松,见图8。

3.5 Western blot 检测

根据KEGG通路结果,选择PI3K/Akt信号通路蛋白进行验证,结果见图9。与空白组相比,模型组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值显著降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,阳性药组以及四君子汤中、高剂量组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

本研究首先对给药方案进行优化,结合药物溶解性和大鼠胃容量,比较了不同给药剂量(临床等

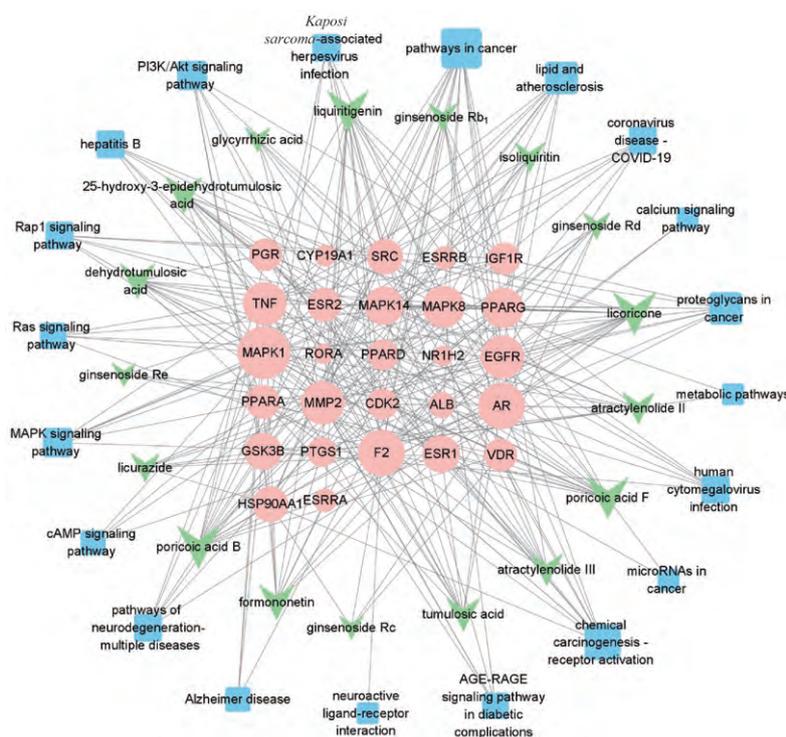
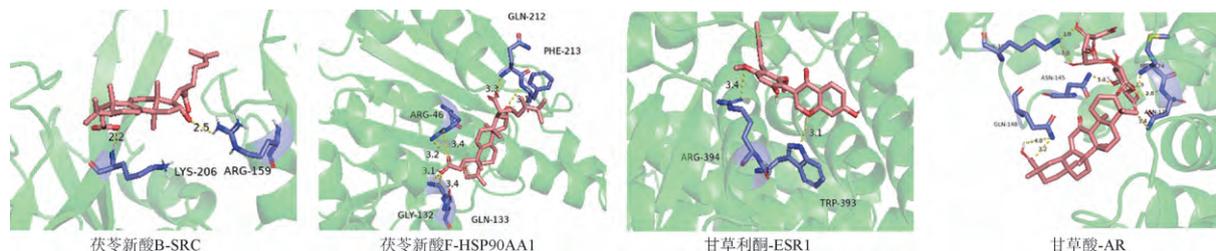


图6 “活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 6 "Active component-target-pathway" network

表3 关键化合物与核心靶点的分子对接结合能

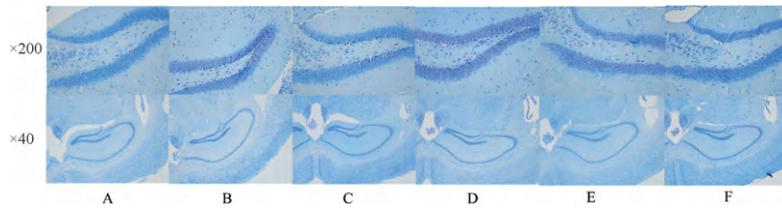
化合物	HSP90AA1	PPARA	SRC	AR	ESR1	kcal · mol ⁻¹
茯苓新酸 B	-7.0	-6.8	-6.6	-8.2	-7.3	
甘草利酮	-5.9	-6.4	-6.1	-7.5	-8.0	
茯苓新酸 F	-7.2	-5.7	-6.5	-7.4	-6.9	
甘草素	-6.5	-8.9	-7.9	-7.6	-8.3	
25-羟基-3-差向-去氢土莫酸	-7.2	-6.6	-6.4	-8.4	-7.2	
白术内酯 II	-6.3	-6.9	-6.9	-7.2	-7.4	
白术内酯 III	-6.3	-8.5	-7.3	-7.1	-7.0	
人参皂苷 Rb ₁	-7.5	-6.6	-6.7	-7.3	-7.6	
人参皂苷 Rd	-7.2	-7.2	-7.5	-8.6	-7.6	
甘草酸	-8.4	-8.3	-8.4	-9.5	-8.3	



粉色为小分子药物,紫色为结合残基,黄色为氢键。

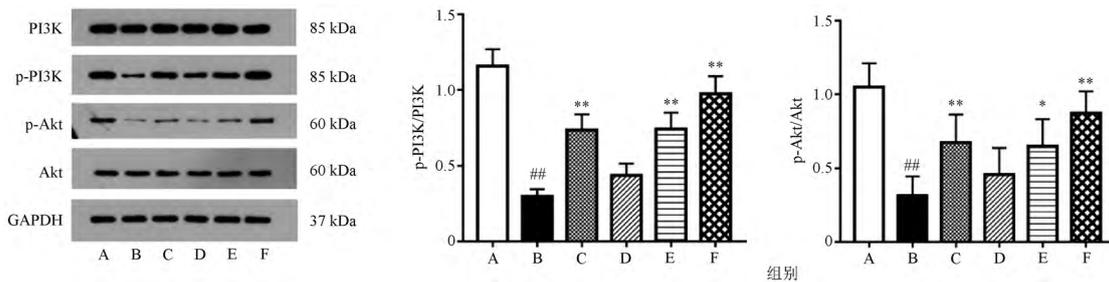
图7 活性成分与核心靶点的分子对接模式

Fig. 7 Molecular docking pattern of active components to core targets



A. 空白组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. 四君子汤低剂量组;E. 四君子汤中剂量组;F. 四君子汤高剂量组(图9同)。
图8 四君子汤对 APP/PS1 小鼠海马齿状回神经元的影响(尼氏染色)

Fig. 8 Effect of Sijunzi Decoction on the neurons in dentate gyrus of APP/PS1 mice (Nissl staining)



与空白组相比^{##} $P < 0.01$;与模型组相比^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

图9 四君子汤对 APP/PS1 小鼠海马中 PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 9 Effect of Sijunzi Decoction on the expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt proteins in the hippocampus of APP/PS1 mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

效剂量的 2.5、5、10 倍给药量),发现给药剂量在低于临床给药剂量 10 倍时,入血成分个数较少,色谱峰数目更少,响应值更低。此外,本研究考察了不同采血时间对入血成分的影响,给药后 0.5、1、1.5、2、2.5 h 这 5 个时间点进行了取血时间考察,发现在给药 1.5 h 鉴定出的入血成分最多且含量较高。其次,考察了不同血样处理方法对入血成分的影响,分别比较了甲醇和乙腈沉淀法,发现甲醇沉淀处理得到的血中移行成分数目较多,内源性大分子杂质干扰较少,最终选择甲醇沉淀血清中的蛋白。

UPLC-Q-TOF-MS 具有分析速度快、特异性强、灵敏度高、准确度高、稳定性高和多指标同时分析等特点,已成为鉴定和分析中药血清药物化学的首选方法^[14-15]。通过液质联用技术对四君子汤入血成分进行全面鉴定,给药后对比分析空白血清及含药血清得到 17 个入血成分,包括 2 个内酯类、10 个三萜类、5 个黄酮类化合物。黄酮类成分在四君子汤治疗 AD 中发挥了较为重要的作用,甘草素是甘草黄酮类化合物中重要的单体活性成分,研究发现,甘草素具有提高神经突触可塑性、抗神经炎症、抑制 $A\beta$ 和老年斑生成的作用,有改善记忆缺陷的潜

力^[16-18]。三萜类中的茯苓新酸 B 入血迅速且作用时间长,从而在 AD 大鼠体内发挥作用^[19]。人参皂苷 Rb_1 可以改变淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 的淀粉样变为非淀粉样过程^[20],起到预防或者延缓 AD 动物认知障碍的作用;同时可以抑制神经元细胞凋亡^[21];激活细胞的线粒体自噬^[22],发挥其抗炎和神经保护功能^[23]。研究表明,甘草酸具有明显的抗炎、抗氧化^[24]、改善线粒体功能^[25]、神经保护^[26]等作用。此外,白术内酯 III 对谷氨酸诱导的神经元凋亡具有抑制作用^[27],能够显著改善 AD 大鼠学习和记忆障碍^[28]。人参皂苷 Rb_1 ^[29]、甘草酸^[30] 和白术内酯 III^[31] 可通过激活 PI3K/Akt 信号通路,改善甲基乙二醛 (MGO) 诱导的 SH-SY5Y 细胞和血清葡萄糖剥夺引起的 PC12 细胞氧化应激和线粒体诱导的细胞凋亡;减轻异氟醚诱导的大鼠海马神经元损伤。中药血清药物化学及分子对接结果表明,茯苓新酸 B、甘草利酮、茯苓新酸 F、甘草素、白术内酯 II、白术内酯 III、人参皂苷 Rb_1 、人参皂苷 Rd 、甘草酸可能为四君子汤抗 AD 的关键活性成分。

通过网络药理学分析得到了 27 个核心靶点,

HSP90AA1、PPARA、SRC、AR、ESR1 蛋白大多与炎症、凋亡相关,其中热休克蛋白 90(heat shock protein 90,HSP90)是细胞内一种普遍存在的、有高度活性的蛋白质,HSP90AA1 是其中负责应激诱导功能的部分。HSP90 通过抑制神经炎症性疾病中的凋亡活性,在避免蛋白质错误折叠和聚集方面具有重要作用^[32-33],在神经干细胞再激活期间于 PI3K/Akt 通路上游起作用^[34];可以增强小胶质细胞对 A β 的吞噬和降解,调节 AD 中 p-tau 的稳定性和功能^[35]。PPARA 在 AD 大脑中的表达显著降低^[36]。研究表明,PPARA 激动剂可减少海马体和皮层中的淀粉样蛋白斑块沉积,减少神经炎症,从而减少小胶质细胞和星形胶质细胞的激活^[37],增强 A β 清除率并逆转 AD 小鼠的记忆缺陷和焦虑症状^[38]。雌激素受体 1 (estrogen receptor, ESR1) 是雌二酮(E₂)的主要受体之一,具有提高健康老年妇女和 AD 患者认知功能的作用^[39]。ESR1 参与雌激素的神经保护作用,并激活 PI3K/Akt 等信号通路^[40]。其脑内作用主要有增加 CA1 区树突棘数量,调节突触可塑性,抑制 A β 诱导的神经元死亡,阻止谷氨酸兴奋性毒性损伤来保护神经^[41-43]。通过对四君子汤的入血成分进行网络药理学分析发现,KEGG 富集分析显示与 PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等密切相关。PI3K/Akt 信号通路与细胞存活、分化及凋亡等生理病理活动密切相关,在神经炎症中起着关键作用。此外,A β 寡聚体会抑制 PI3K/Akt 途径,导致神经元死亡^[44]。PI3K/Akt 信号通路调节众多下游因子如 GSK3、mTORC1 和 FOX 等,通过减轻 A β 的沉积^[45],削弱 tau 蛋白过度磷酸化并抑制 NFT 的形成^[46],调节神经元突触可塑性^[47],从而发挥神经细胞保护作用。采用 APP/PS1 双转基因小鼠为模型鼠,通过四君子汤治疗,海马组织病理损伤减轻,说明四君子汤对 AD 小鼠具有一定的治疗作用。四君子汤组小鼠脑组织中 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显升高,进一步表明四君子汤能激活 PI3K/Akt 信号通路,起到治疗 AD 的作用。

综上所述,本文基于 UPLC-Q-TOF-MS 获得的四君子汤入血成分,并通过网络药理学初步探究了四君子汤治疗 AD 可能的作用靶点及作用途径,结合动物实验验证,证明四君子汤可通过促进 PI3K/Akt 信号通路的激活,从而发挥治疗 AD 的作用,为下一步开发新药,提高疗效提供科学依据。

[参考文献]

- [1] VILLEMAGNE V L, DORÉ V, BURNHAM S C, et al. Imaging tau and amyloid- β proteinopathies in Alzheimer disease and other conditions[J]. Nat Rev Neurol, 2018, 14(4): 225.
- [2] ZHOU M, WANG H, ZENG X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990—2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2019, 394(10204): 1145.
- [3] KHAN S, BARVE K H, KUMAR M S. Recent advancements in pathogenesis, diagnostics and treatment of Alzheimer's disease[J]. Curr Neuropharmacol, 2020, 18(11): 1106.
- [4] NIKL K, CASTILLO S, HOIE E, et al. Alzheimer's disease: current treatments and potential new agents[J]. US Pharmacist, 2019, 44: 20.
- [5] 杨佳一, 赵俊, 田会玲, 等. “脾肾互赞”理论在阿尔茨海默病治疗中的应用[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2020, 22(8): 2607.
- [6] 胡盼, 韩倩, 石和元, 等. 基于中医传承计算平台探讨古代治疗阿尔茨海默症的用药规律[J]. 时珍国医国药, 2022, 33(3): 748.
- [7] 郭园园, 郑琴, 吴玲, 等. 四君子汤调控 A β 跨血脑屏障转运相关蛋白的作用研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(12): 2924.
- [8] 肖帅, 郑琴, 李文静, 等. 四君子汤对 APP/PS1 小鼠神经递质的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(19): 2655.
- [9] 尚如霞, 徐卫东, 许晓倩, 等. 四君子汤血清药效成分的 HPLC-MS 分析[J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(6): 529.
- [10] GABBOUJ S, RYHÄNEN S, MARTTINEN M, et al. Altered insulin signaling in Alzheimer's disease brain-special emphasis on PI3K-Akt pathway[J]. Front Neurosci, 2019, 13: 629.
- [11] 白敏, 段永强, 虎峻瑞, 等. 基于 BDNF/PI3K/AKT 信号通路探讨四君子汤对脾气虚证大鼠学习记忆功能的影响[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 22.
- [12] 付昌丽, 刘春花, 潘洁, 等. 基于血浆药物化学和网络药理学分析良附丸治疗胃肠道疾病的活性成分和潜在分子机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20): 5393.
- [13] 苏世杰, 陈依, 杨虹颖, 等. 基于网络药理学和实验验证远志-石菖蒲药对治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(12): 3348.
- [14] ZHOU M, HUO J, WANG C, et al. UPLC/Q-TOF MS screening and identification of antibacterial compounds in *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl leaves[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 704260.
- [15] 何天雨, 王璐, 李林, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的经典方竹茹汤化学成分鉴定及网络药理学研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19): 5235.
- [16] 季玮, 李长栋, 荔志云, 等. 异甘草素对 PC12 细胞缺氧前后 LDH 和 SOD 活性的影响[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2016, 15(2): 132.
- [17] KO Y H, KWON S H, LEE S Y, et al. Liquiritigenin ameliorates memory and cognitive impairment through cholinergic and

- BDNF pathways in the mouse hippocampus [J]. Arch Pharm Res, 2017, 40(10):1209.
- [18] 杜焯湘. 甘草素通过抑制炎症反应对阿尔兹海默病的保护作用及其机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2019.
- [19] 冯晓晓, 王彬斌, 陈东, 等. 基于阿尔茨海默症模型大鼠的开心散药动学研究[J]. 中草药, 2022, 53(14):4388.
- [20] LIN J, GAO S, WANG T, et al. Ginsenoside Rb₁ improves learning and memory ability through its anti-inflammatory effect in Aβ₁₋₄₀ induced Alzheimer's disease of rats [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(5):2955.
- [21] WANG Y, LI Y, YANG W, et al. Ginsenoside Rb₁ inhibit apoptosis in rat model of Alzheimer's disease induced by Aβ₁₋₄₀ [J]. Am J Transl Res, 2018, 10(3):796.
- [22] 蒋怡萱, 谢晓琴, 黄盼玲, 等. 人参皂苷 Rb₁ 在 Aβ 损伤的 PC12 细胞中激活线粒体自噬的机制研究[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2021, 23(7):2319.
- [23] YANG Y, LI S, HUANG H, et al. Comparison of the protective effects of ginsenosides Rb₁ and Rg₁ on improving cognitive deficits in SAMP8 mice based on anti-neuroinflammation mechanism [J]. Front Pharmacol, 2020, 11:834.
- [24] GUO J, YANG C X, YANG J J, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates cognitive impairment in a rat model of vascular dementia associated with oxidative damage and inhibition of voltage-gated sodium channels [J]. CNS Neurol Disord-DR, 2016, 15(8):1001.
- [25] RASHEDINIA M, SABERZADEH J, KHOSRAVI B T, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates mitochondrial function and biogenesis against aluminum toxicity in PC12 cells [J]. Neurotox Res, 2019, 35(3):584.
- [26] BAN J Y, PARK H K, KIM S K. Effect of glycyrrhizic acid on scopolamine-induced cognitive impairment in mice [J]. Int Neurolog J, 2020, 24(Suppl 1):S48.
- [27] ZHAO H, JI Z H, LIU C, et al. Neuroprotection and mechanisms of atractylenolide III in preventing learning and memory impairment induced by chronic high-dose homocysteine administration in rats [J]. Neuroscience, 2015, 290:485.
- [28] 于新宇, 张媛媛, 嵇志红. 白术内酯 III 对痴呆大鼠学习记忆能力及海马 Bcl-2 表达的影响 [J]. 东北师大学报 (自然科学版), 2018, 50(3):109.
- [29] NAN F, SUN G, XIE W, et al. Ginsenoside Rb₁ mitigates oxidative stress and apoptosis induced by methylglyoxal in SH-SY5Y cells via the PI3K/Akt pathway [J]. Mol Cell Probes, 2019, 48:101469.
- [30] KAO T C, SHYU M H, YEN G C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(2):754.
- [31] ZHU S, WANG Z, YU J, et al. Atractylenolide III alleviates isoflurane-induced injury in rat hippocampal neurons by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. J Food Biochem, 2021, 45(9):e13892.
- [32] ALAM Q, ALAM M Z, SAIT K, et al. Translational shift of HSP90 as a novel therapeutic target from cancer to neurodegenerative disorders; an emerging trend in the cure of Alzheimer's and Parkinson's diseases [J]. Curr Drug Metab, 2017, 18(9):868.
- [33] LACKIE R E, MACIEJEWSKI A, OSTAPCHENKO V G, et al. The Hsp70/Hsp90 chaperone machinery in neurodegenerative diseases [J]. Front Neurosci, 2017, 11:254.
- [34] HUANG J, WANG H. Hsp83/Hsp90 physically associates with insulin receptor to promote neural stem cell reactivation [J]. Stem Cell Rep, 2018, 11(4):883.
- [35] SULISTIO Y A, HEESE K. The ubiquitin-proteasome system and molecular chaperone deregulation in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(2):905.
- [36] WÓJTOWICZ S, STROSZNAJDER A K, JEŻYNA M, et al. The novel role of PPAR alpha in the brain: promising target in therapy of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders [J]. Neurochem Res, 2020, 45(5):972.
- [37] CHANDRA S, ROY A, JANA M, et al. Cinnamic acid activates PPARα to stimulate lysosomal biogenesis and lower amyloid plaque pathology in an Alzheimer's disease mouse model [J]. Neurobiol Dis, 2019, 124:379.
- [38] LUO R, SU L Y, LI G, et al. Activation of PPARA-mediated autophagy reduces Alzheimer disease-like pathology and cognitive decline in a murine model [J]. Autophagy, 2020, 16(1):52.
- [39] RUSSELL J K, JONES C K, NEWHOUSE P A. The role of estrogen in brain and cognitive aging [J]. Neurotherapeutics, 2019, 16(3):649.
- [40] 韩帅. 利用神经细胞损伤模型研究新型雌激素受体 ER-α36 在雌激素神经保护中的作用及相关机制 [D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [41] PHAN A, SUSCHKOV S, MOLINARO L, et al. Rapid increases in immature synapses parallel estrogen-induced hippocampal learning enhancements [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(52):16018.
- [42] LAN Y L, ZHAO J, LI S. Update on the neuroprotective effect of estrogen receptor alpha against Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 43(4):1137.
- [43] 杨琳, 艾静. 脑源雌激素在阿尔兹海默病中的作用研究进展 [J]. 神经药理学报, 2019, 9(5):50.
- [44] 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.
- [45] CURTIS D, BANDYOPADHYAY S. Mini-review: role of the PI3K/Akt pathway and tyrosine phosphatases in Alzheimer's disease susceptibility [J]. Ann Hum Genet, 2021, 85(1):1.
- [46] KITAGISHI Y, NAKANISHI A, OGIURA Y, et al. Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3β pathway in Alzheimer's disease [J]. Alzheimers Res Ther, 2014, 6(3):35.
- [47] CUI W, WANG S, WANG Z, et al. Inhibition of PTEN attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis via activation of PI3K/AKT pathway in Alzheimer's disease [J]. Neurochem Res, 2017, 42(11):3052.

[责任编辑 马超一]