Open Access
DOI:10.3724/zdxbyxb-2025-0419

阿尔茨海默病

·专题报道·

补肾益精方可减轻秀丽隐杆线虫β淀粉样蛋白沉积及氧化损伤

陆韵薇*，李德雨，胡颖超，鲁　磊，于顾然

南京中医药大学附属医院神经内科，江苏 南京 210029

［摘　要］ **目的**：探讨补肾益精方对秀丽隐杆线虫β淀粉样蛋白（Aβ）沉积及氧化损伤的改善作用。**方法**：采用秀丽隐杆线虫模型（N2野生型、CL4176、TJ356和LG333转基因线虫）。将方药饮片经水提、冷冻干燥制成冻干粉，以不同浓度加入培养基干预线虫，并以百草枯诱导建立N2线虫氧化应激模型。观察N2线虫寿命、CL4176线虫瘫痪时间及其咽部Aβ沉积量；试剂盒检测N2线虫总抗氧化能力、超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽、丙二醛和活性氧水平；吖啶橙染色评估N2线虫体内细胞凋亡；荧光显微镜观察TJ356线虫体内DAF-16::GFP和LG333线虫SKN-1::GFP核转位；并通过分子对接及分子动力学模拟分析有效成分梓醇、四氢鸭脚木碱（THA）与核心靶点FOXO、Nrf2的结合稳定性。**结果**：与正常对照组比较，补肾益精方组可显著延长氧化应激及正常状态下N2线虫寿命（均$P<0.01$）。与模型对照组比较，补肾益精方组可延缓CL4176线虫瘫痪时间并减少其咽部Aβ沉积（均$P<0.01$）。与百草枯诱导的N2线虫氧化损伤对照组比较，补肾益精方组N2线虫总抗氧化能力、SOD、CAT和谷胱甘肽水平均升高（均$P<0.01$），丙二醛和活性氧水平均降低（均$P<0.05$），细胞凋亡亦减少。该方还可促进TJ356线虫体内DAF-16核转位及LG333线虫体内SKN-1核转位（均$P<0.01$）。梓醇、THA与核心靶点FOXO、Nrf2的结合自由能均低于−7.00 kcal/mol，分子动力学模拟证实FOXO-梓醇、Nrf2-梓醇和Nrf2-THA复合物稳定性和亲和力高。**结论**：补肾益精方可能通过稳定结合并调控FOXO/Nrf2信号通路减轻线虫Aβ沉积及其神经毒性，增强抗氧化活性，减轻氧化应激损伤。

［关键词］ 阿尔茨海默病；补肾益精方；β淀粉样蛋白；氧化应激；秀丽隐杆线虫
［中图分类号］ R285　［文献标志码］ A

收稿日期（Received）：2025-06-17　修改返回日期（Revised）：2026-04-07　接受日期（Accepted）：2026-05-20
基金项目（Funding）：国家重点研发计划（2022YFC3501403）；国家自然科学基金（82405265）；江苏省院士工作站（BM2024101）

第一作者（First author）：陆韵薇，主治医师，硕士生导师，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：417213243@qq.com；ORCID：0000-0002-6835-2788. 李德雨，博士研究生，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：525956500@qq.com；ORCID：0009-0005-6626-6244
通信作者（Corresponding author）：于顾然，主任中医师，教授，博士生导师，主要从事神经系统疾病中医药研究；E-mail：dr.ygrdf@163.com；ORCID：0000-0002-9356-8695
*现在广州中医药大学第四临床医学院、深圳市中医院脑病与心理病科工作

Bushen Yijing Formula attenuates amyloid β-protein deposition and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans*

LU Yunwei*, LI Deyu, HU Yingchao, LU Lei, YU Guran (*Department of Neurology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*)
**Now works in the Department of Neurology and Psychology, the Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital.*
LU Yunwei and LI Deyu contributed equally to this work.
Corresponding author: YU Guran, E-mail: dr.ygrdf@163.com, ORCID: 0000-0002-9356-8695

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the protective effects of Chinese medicine Bushen Yijing Formula against amyloid β-protein (Aβ) deposition and oxidative damage using models of *Caenorhabditis elegans*. **Methods**: The *C. elegans* models, including wide-type strains N2, transgenic strains CL4176, TJ356, and LG333, were employed. The herbal components of the formula were water-extracted, freeze-dried into lyophilized powder, and added to the culture medium at different concentrations. Oxidative stress was induced by paraquat exposure. Evaluated parameters included lifespan; time to paralysis and pharyngeal Aβ deposition in CL4176; levels of total antioxidant capacity, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and reactive oxygen species (ROS) measured by commercial kits; apoptosis detected by acridine orange staining; nuclear translocation of DAF-16::GFP in TJ356 nematodes and SKN-1::GFP in LG333 nematodes observed under fluorescence microscopy. Molecular docking and dynamics simulations were further performed to assess the binding stability of the active components catalpol and tetrahydroalstonine (THA) with the core targets FOXO and Nrf2. **Results**: Compared with the normal control group, Bushen Yijing Formula significantly extended the lifespan of N2 nematodes under both oxidative stress and normal conditions (all $P<0.01$). Compared with the control group of the AD model, Bushen Yijing Formula prolonged the time to paralysis and reduced pharyngeal Aβ deposition in CL4176 (all $P<0.01$). Compared with the control group in the paraquat-induced oxidative stress model in N2, Bushen Yijing Formula elevated total antioxidant capacity, SOD, CAT, and GSH levels (all $P<0.01$), decreased MDA and ROS levels (all $P<0.05$), and attenuated apoptosis. Moreover, the formula promoted nuclear translocation of DAF-16 and SKN-1 (all $P<0.01$). Molecular docking revealed that binding energies of catalpol and THA with FOXO and Nrf2 were all below −7.00 kcal/mol, and dynamics simulations confirmed high stability and favorable affinity for the FOXO-catalpol, Nrf2-catalpol, and Nrf2-THA complexes. **Conclusion**: Bushen Yijing Formula alleviates Aβ deposition and its neurotoxicity, enhances antioxidant capacity, and attenuates oxidative stress injury in model nematodes, likely through stable binding and regulation of the FOXO/Nrf2 signaling pathway.

[**Key words**] Alzheimer's disease; Bushen Yijing Formula; Amyloid β-protein; Oxidative stress; *Caenorhabditis elegans*

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(5): 425-436.]

［缩略语］ 阿尔茨海默病（Alzheimer's disease，AD）；β淀粉样蛋白（amyloid β-protein，Aβ）；磷脂酰肌醇3激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）；蛋白激酶B（protein kinase B，PKB，Akt）；核转录因子红系2相关因子（nuclear factor-erythroid 2-related factor，Nrf）；绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）；超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）；过氧化氢酶（catalase，CAT）；二喹啉甲酸法（bicinchoninic acid assay，BCA）；5-氟尿嘧啶（5-fluorouracil，5-FU）；含吐温-20的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered saline with Tween-20，PBST）；四氢鸭脚木碱（tetrahydroalstonine，THA）；叉头框蛋白质O（forkhead box protein O，FOXO）；淀粉样前体蛋白（amyloid precursor protein，APP）；早老蛋白1（presenilin 1，PS1）；c-Jun氨基端激酶（c-Jun N-terminal kinase，JNK）；B细胞淋巴瘤2（B cell lymphoma 2，Bcl-2）；Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，BAX）；胱天蛋白酶3（cysteine aspartic acid specific protease 3，caspase-3）

随着人口老龄化问题加重，神经退行性疾病给社会带来了极大的经济负担。AD是痴呆的主要病因，2018年全球痴呆患者约为5000万人，预计到2050年将增至1.52亿[1]。我国目前存在1000多万AD患者，给社会和家庭带来了巨大的负担[2]。尽管临床上已采用针对胆碱能或谷氨酸能神经传导的药物如多奈哌齐，以及通过调节肠道菌群代谢产物影响脑内神经炎症的药物如甘露特纳（GV-971）治疗AD，但目前这些药物的临床疗效均未得到证实[3]。药物治疗AD的瓶颈可能与临床启动治疗过晚及对AD致病机制复杂性估计不足有关。

中医药治疗具有整体观及多靶点的特点，更符合AD的演变规律和疾病特点。补肾益精方（专利号：CN202010088959.0）是江苏省中医院于顾然教授的经验方，也是江苏省中医院院内制剂补肾益精合剂（苏药制备字Z2022009000）的组方基础，具有补肾益精填髓之功效。临床观察显示其对延缓AD进展、改善临床症状疗效明显，一系列前期实验研究也证实其具有保护AD患者血脑屏障及神经功能的作用[4-6]。但是，补肾益精方在治疗AD过程中发挥作用的靶点及机制尚不明确。淀粉样斑块是AD的神经病理学标志，在AD发病机制中起关键作用，其中Aβ的产生和沉积受遗传和环境因素的共同调控[7]。前期体外研究发现补肾益精方可通过PI3K/Akt/Nrf2信号通路减轻Aβ引起的神经细胞氧化应激损伤[8]。本实验利用AD的重要模式生物秀丽隐杆线虫探讨补肾益精方减少Aβ沉积及抗氧化应激的作用，以期进一步阐明补肾益精方对AD的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器

秀丽隐杆线虫N2株系（野生型）、CL4176株系（AD模型线虫，瘫痪实验）、LG333株系（转基因线虫，表达蛋白GFP）、TJ356株系（转基因线虫，表达蛋白GFP）及其食物大肠埃希菌OP50为美国秀丽隐杆线虫遗传中心产品。

胰蛋白胨（LP0042T）、酵母提取物粉末（LP0021T）、琼脂（LP0012T）为美国Thermo Fisher Scientific公司产品；氨苄青霉素（ST007）、柠檬酸（ST1168）、β-巯基乙醇（C0342）、*N*-乙酰半胱氨酸（ST1546）、总抗氧化能力检测试剂盒（S0121）、总SOD活性检测试剂盒（S0101S）、CAT活性检测试剂盒（S0051）、活性氧检测试剂盒（S0033S）、丙二醛检测试剂盒（S0131S）、谷胱甘肽检测试剂盒（S0053）为中国上海碧云天生物技术股份有限公司产品；BCA蛋白浓度测定试剂盒（E112-01）为中国南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品；磷酸二氢钾（R018715）、磷酸氢二钾（R049462）、甲基紫精（百草枯）（R000267）、氯化钠（R019777）、氢氧化钠（R000689）、无水硫酸镁（R007583）、胆固醇溶液（R032992）、柠檬酸钾（R018583）、硫酸亚铁（R010224）、氯化锰（R000413）、硫酸锌（R018515）、多聚甲醛（R008070）中国上海易恩化学技术有限公司产品；硫黄素S（MX4465）为中国上海懋康生

物科技有限公司产品;吖啶橙(S47568)、5-羟色胺(S20086)、5-氟尿嘧啶(S17073)为中国上海源叶生物科技有限公司产品;盐酸左旋咪唑(L8230)、蛋白酶抑制剂(A8260)为中国北京索莱宝科技有限公司产品。

生物安全柜(1300A2)为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;倒置显微镜(CKX41)、双目体视显微镜(SZ2-ILST)为日本Olympus公司产品;多功能酶标仪(Synergy HT)为美国BioTek公司产品;正置荧光显微镜(DS-Qi2)为日本Nikon公司产品。

1.2 制备补肾益精方冻干粉

补肾益精方由八味中药组成:熟地黄(皖20160279)、生地黄(皖20160279)、山茱萸(黔20190013)、人参(皖20160279)、黄芪(黔20190013)、菟丝子(黔20190013)、白术(皖20160279)、海风藤(皖20160279),均购自江苏省中医院,并经江苏省中医院药学部邱召娟主任中药师鉴定符合2020版《中国药典》相关标准。所有药物用纯水浸泡30 min,文火煎煮两次,收集药液,离心及过滤后取上清液[9]。将上清液于−80 ℃预冻后,真空冷冻干燥,升华脱水,灭菌后分装至EP管置于4 ℃冰箱保存备用[10]。

1.3 制备线虫生长培养基及S培养基

线虫生长培养基:取3 g氯化钠、2.5 g蛋白胨、17 g琼脂粉,加入约975 mL蒸馏水,混匀后121 ℃高压灭菌20 min。待培养基冷却至55~60 ℃,依次加入1 mol/L磷酸钾缓冲液(pH 6.0)25 mL,以及1 mol/L硫酸镁、1 mol/L氯化钙和5 mg/mL胆固醇溶液各1 mL,每加一种后轻轻摇匀。最后将培养基倒入无菌培养皿,静置凝固后倒置,于4 ℃冰箱保存备用。

S培养基:取5.85 g氯化钠、1 g磷酸氢二钾、6 g磷酸二氢钾和1 mL胆固醇溶液(5 mg/mL,溶于乙醇),加蒸馏水定容至1 L配制成S基础液;另分别配制1 mol/L柠檬酸钾溶液(pH 6.0)、微量元素溶液(将3.06 g微量元素混合物溶于1 L蒸馏水中)、1 mol/L氯化钙溶液和1 mol/L硫酸锰溶液;在无菌条件下将1 L S基础液与10 mL柠檬酸钾溶液、10 mL微量元素溶液、3 mL氯化钙溶液、3 mL硫酸锰溶液混合,通过0.22 μm滤膜过滤除菌。

1.4 秀丽隐杆线虫培养及同期化

将线虫置于涂有大肠埃希菌OP50的线虫生长培养基中培养。其中,N2株系线虫于20 ℃培养,其他株系线虫于16 ℃培养。待线虫生长至产卵期时,使用限时产卵法或次氯酸钠裂解法同期化线虫。

1.5 行为学实验

1.5.1 百草枯氧化胁迫实验测定氧化应激状态下N2线虫寿命 裂解法同期化的N2线虫在20 ℃条件下培养至L4期,密度调整为每10 μL 20~25条,加入5-FU抑制产卵。向96孔板中加入上述线虫液,每孔10 μL,同时加入90 μL补肾益精方冻干粉溶液使其终浓度为0.1、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/mL。除正常对照组外,每孔加入终浓度为5.0 mmol/L的百草枯溶液,振荡30 s混匀,正常对照组用S培养基补齐。从加入百草枯混匀开始,每隔6 h观察线虫存活情况并计数,直至所有线虫死亡。

1.5.2 寿命实验测定正常状态下N2线虫寿命 挑取同期化至L2期的N2线虫转移至含不同浓度(5.0、10.0、20.0 mg/mL)补肾益精方的线虫生长培养基中,置于20 ℃生化培养箱中培养,每两天观察并记录线虫存活情况,直至所有线虫死亡,统计线虫存活时间。

1.5.3 产卵实验分析N2线虫产卵数 将同期化至L2期的N2线虫卵分别置于含5.0、10.0、20.0 mg/mL补肾益精方的线虫生长培养基中,另设正常对照组,每组各6个培养皿。于各组培养皿中挑取一条L4期线虫单独培养,此时记为产卵实验第1天。每24 h将线虫转移至新的线虫生长培养基,转移后,将旧培养基继续培养36 h并记录其中由卵孵化的幼虫数。重复此过程直至第4天结束。整个实验期间在显微镜下观察并统计平均每天产出的线虫数。

1.5.4 瘫痪实验测定CL4176线虫瘫痪时间 将同期化至L2期的CL4176线虫于16 ℃培养36 h,再于25℃培养28 h后开始观察线虫瘫痪情况,此后每2 h记录一次,直至所有线虫均瘫痪。

1.6 硫磺素S染色检测CL4176线虫咽部Aβ沉积量

将CL4176线虫同期化的卵在16 ℃培养至L2期,计数后挑至新培养皿,继续培养48 h。收集线虫转至含有5.0、10.0、20.0 mg/mL补肾益精方及不加药的线虫生长培养皿中,23 ℃继续培养36 h。用4%多聚甲醛溶液在4 ℃条件下固定24 h。去

除固定液，加入通透液（5% β-巯基乙醇，1%曲拉通X-100，12 mmol/L三羟甲基氨基甲烷，pH 7.4）37 ℃孵育24 h。用PBST溶液冲洗线虫三遍，加入用50%乙醇配制的0.125%硫黄素S溶液，室温避光染色2 min。用50%乙醇脱色三次，向沉淀中加入1 mL磷酸盐缓冲液轻轻混匀，并加入左旋咪唑溶液使线虫麻痹。将线虫滴加在放置琼脂垫的载玻片上，盖上盖玻片，正置荧光显微镜拍摄图像，用ImageJ软件测量线虫咽部面积，统计线虫咽部Aβ沉积点数，并计算单位面积Aβ沉积点数。

1.7 检测N2线虫抗氧化相关指标

将同期化至L2期的N2线虫转移至24孔板，每孔约500条，设正常对照组、氧化损伤对照组、小中大剂量补肾益精方组和抗氧化剂组。各组加入S培养基、5-FU、氨苄青霉素及OP50，在此基础上，小中大剂量补肾益精方组加入不同剂量补肾益精方使其终浓度分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL，抗氧化剂组加入*N*-乙酰半胱氨酸使其终浓度为2.5 mmol/L，20 ℃摇床孵育24 h。随后，除正常对照组外，其余各组加入百草枯使其终浓度为0.2 mmol/L诱导氧化损伤，继续孵育48 h。收集线虫，加PBST及研磨珠研磨，冰上超声、离心，取上清液。按照相应试剂盒说明书中的步骤操作，分别检测N2线虫的总抗氧化能力、总SOD活性、CAT活性、活性氧水平（采用荧光酶标仪定量及荧光显微镜定性观察）、丙二醛和谷胱甘肽水平，并使用BCA试剂盒测定蛋白质浓度进行校正。

1.8 吖啶橙直接计数法观察N2线虫体内细胞凋亡

N2线虫培养、分组和氧化损伤模型构建同1.7。避光情况下向各组加入100 μL用M9缓冲液配制的25 μg/mL吖啶橙溶液孵育1 h。随后将线虫置于不含食物的线虫生长培养基中恢复2 h。冲洗线虫，加入左旋咪唑溶液使线虫麻痹。将线虫滴加在放置琼脂垫的载玻片上，盖上盖玻片，正置荧光显微镜拍摄各组线虫体内细胞凋亡情况。正常活细胞呈均匀的绿色荧光，核呈正常绿色，而凋亡细胞呈大小不一、致密浓染的黄绿色荧光。

1.9 观察TJ356线虫体内DAF-16::GFP核定位和LG333线虫SKN-1::GFP核定位

将同期化的TJ356线虫于20 ℃培养至L2期，转移至含5-FU的培养皿中培养24 h。随后将上述线虫转入含有小、中、大剂量补肾益精方的培养皿中，并设置不加药的空白对照组，继续培养48 h，每组设置三个平行对照，每板约30条线虫。培养结束后，用左旋咪唑溶液固定线虫，清洗三次。将线虫滴加在放置琼脂垫的载玻片上，盖上盖玻片，采用正置荧光显微镜观察并拍摄图像。使用ImageJ软件测量每张图像中线虫面积，统计线虫体内荧光点数，计算单位面积荧光点数以评估DAF-16::GFP入核情况。

将同期化的LG333线虫于20 ℃培养至L2期，转移至含5-FU的培养皿中培养24 h。后续处理步骤同TJ356线虫的操作方法，以评估SKN-1::GFP入核情况。

1.10 分子对接和分子动力学模拟分析补肾益精方有效成分与AD核心靶点的结合能力及稳定性

前期研究发现，梓醇和THA是补肾益精方的有效成分，具有治疗AD的活性[8, 11-13]。秀丽隐杆线虫的DAF-16是FOXO转录因子家族的直系同源物，秀丽隐杆线虫的SKN-1是哺乳动物Nrf蛋白家族的直系同源物[14]。故选择梓醇和THA针对FOXO、Nrf2进行分子对接及分子动力学模拟分析。

从美国结构生物信息学研究合作组织蛋白质结构数据库（https://www.rcsb.org）下载核心靶点的晶体结构，包括FOXO（2UZK）和Nrf2（8XGK）。使用PyMol 3.1.5.1软件对蛋白质结构进行去溶剂化和加氢预处理，利用AutoDockTools 1.5.7软件定义配体分子的可旋转键并计算其电荷分布。经上述预处理后，蛋白质与配体被转换为PDBQT格式，最终采用AutoDock Vina进行对接模拟，以评估有效成分与靶点的结合能力。

采用Gromacs 2022.3软件进行分子动力学模拟，以分析结合稳定性。小分子预处理使用AmberTools22软件添加GAFF力场，并利用Gaussian 16W软件进行加氢和RESP电势计算，所得电势数据加入体系拓扑文件。模拟在300 K恒温和1 Bar恒压下进行，力场选择Amber99SB-ILDN，溶剂采用TIP3P水分子模型，并通过添加适量钠离子中和体系电荷。模拟体系首先通过最陡下降法进行能量最小化，随后依次在等温等容系综和等温等压系综下进行平衡模拟。最终分析轨迹并绘制三维自由能景观图。

1.11 统计学方法

使用SPSS 22.0软件和GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料采

用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析,方差齐时使用Tukey检验,方差不齐时使用Dunnett's T3检验;计数资料采用例数(百分比)[n(%)]描述。使用Kaplan-Meier检验及log-rank检验进行生存分析。P<0.05为差异有统计学意义。

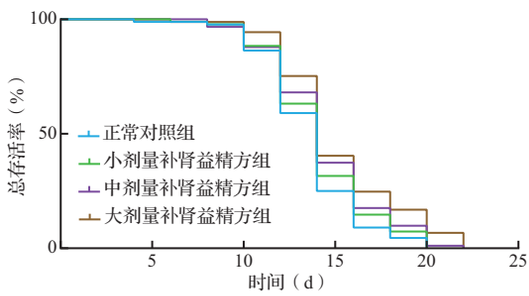
2 结 果

2.1 补肾益精方可延长百草枯氧化胁迫的N2线虫寿命

与正常对照组(46.182±3.594)h比较,0.1、2.0、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/mL补肾益精方组百草枯氧化胁迫的N2线虫平均寿命延长,分别为(47.940±3.733)、(51.720±3.766)、(59.040±4.689)、(62.580±4.844)、(68.660±5.434)、(56.820±4.194)h。其中,5.0、10.0、20.0 mg/mL补肾益精方组百草枯氧化胁迫的N2线虫平均寿命较正常对照组明显延长(均P<0.01),生存曲线明显右移;40.0 mg/mL补肾益精方组百草枯氧化胁迫的线虫平均寿命虽然也较正常对照组延长(P<0.05),但对比5.0、10.0、20.0 mg/mL补肾益精方组生存曲线左移。见图1。鉴于5.0、10.0、20.0 mg/mL补肾益精方抗氧化作用较好且呈浓度依赖性,故作为小、中、大剂量用于后续研究。

2.2 补肾益精方对N2线虫生殖能力无影响且可延长其正常状态下的寿命

针对正常N2线虫研究发现,小、中、大剂量补肾益精方组前4天产卵数均与正常对照组相近(均P>0.05),见附图1。与正常对照组(13.591±0.289)d比较,小、中、大剂量补肾益精方组平均寿命分别为(14.042±0.293)、(14.374±0.319)、(15.124±0.350)d,生存曲线均有不同程度右移,且呈浓度依赖性,其中大剂量补肾益精方组寿命较正常对照组显著延长(P<0.01),见图2。综上,补肾益精方对N2线虫的生殖能力无明显影响,且能延长其在正常状态下的寿命。



小、中、大剂量补肾益精方组的给药剂量分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL.

图2 不同剂量补肾益精方处理后N2线虫正常状态下的生存曲线

Figure 2 Survival curves of N2 nematodes under normal conditions after treatment with different doses of Bushen Yijing Formula

2.3 补肾益精方可减少AD模型线虫咽部Aβ沉积

与模型对照组(39.540±0.416)h比较,小、中、大剂量补肾益精方组非瘫痪时间延长,分别为(40.700±0.390)、(41.200±0.498)、(42.180±0.477)h,差异有统计学意义(均P<0.01),见图3。模型对照组线虫咽部可见Aβ沉积(1.000±0.000),小、中、大剂量补肾益精方组线虫咽部Aβ沉积均减少

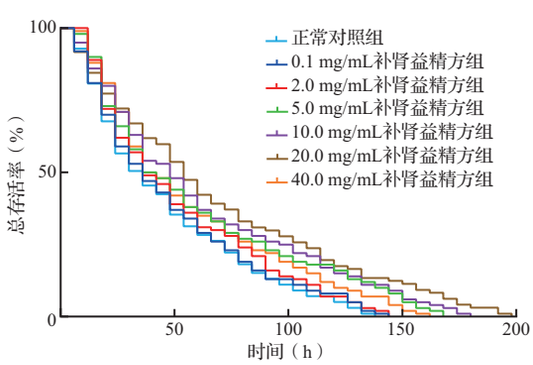
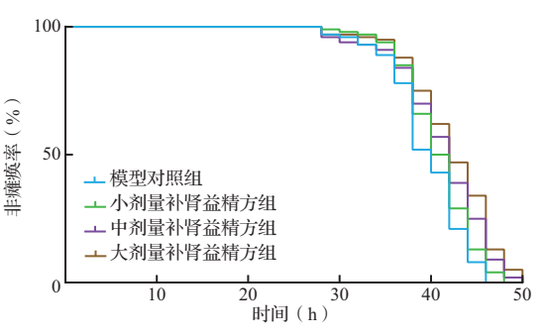


图1 不同浓度补肾益精方处理后N2线虫在百草枯氧化胁迫下的生存曲线

Figure 1 Survival curves of N2 nematodes treated with different concentrations of Bushen Yijing Formula under paraquat-induced oxidative stress



小、中、大剂量补肾益精方组的给药剂量分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL.

图3 不同剂量补肾益精方作用后阿尔茨海默病模型线虫的非瘫痪曲线

Figure 3 Non-paralysis curve of Alzheimer's disease model nematodes after treatment with different doses of Bushen Yijing Formula

（分别为0.434±0.032、0.259±0.024、0.143±0.007，均P<0.01），且呈一定浓度依赖性，见图4。结果提示，补肾益精方可减少AD模型线虫咽部Aβ沉积，缓解Aβ毒性。

2.4 补肾益精方可提高百草枯氧化胁迫的N2线虫抗氧化能力

与正常对照组比较，氧化损伤对照组线虫的总抗氧化能力和谷胱甘肽水平均降低（均P<0.01），活性氧和丙二醛水平均升高（均P<0.01），但总SOD和CAT活性均与正常对照组接近（均P>0.05）。与氧化损伤对照组比较，经补肾益精方处理后的线虫总抗氧化能力和CAT活性均显著增强（均P<0.01），总SOD活性和谷胱甘肽水平均增加且中、大剂量组差异有统计学意义（均P<0.01），活性氧和丙二醛水平均降低（均P<0.05）。见表1和附图2。此外，活性氧水平动态检测结果显示，氧化损伤对照组线虫体内活性氧水平随时间明显升高，而各剂量补肾益精方组活性氧水平的上升趋势更为平缓（附图3）。上述结果表明，补肾益精方可提高百草枯氧化胁迫的N2线虫的总抗氧化能力和抗氧化酶活性，进而减少活性氧与丙二醛的生成，增加谷胱甘肽含量，最终减轻氧化应激损伤。

2.5 补肾益精方减少百草枯氧化胁迫的N2线虫体内细胞凋亡

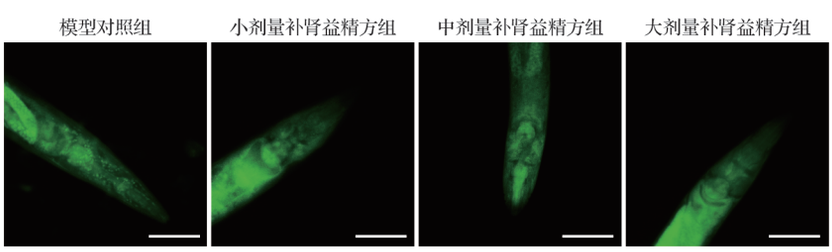
氧化损伤对照组线虫体内可见大小不一的高亮荧光斑点，而各剂量补肾益精方组及抗氧化剂组线虫荧光斑点明显减少（图5），提示补肾益精方可减轻百草枯氧化胁迫的N2线虫体内细胞凋亡。

2.6 补肾益精方促进DAF-16和SKN-1核转位

与TJ356线虫空白对照组（1.000±0.052）比较，小、中、大剂量补肾益精方组绿色荧光强度相对表达量呈浓度依赖性增加（分别为1.614±0.083、1.962±0.037和2.977±0.149，均P<0.01），见图6。与LG333线虫空白对照组（1.000±0.050）比较，小、中、大剂量补肾益精方组绿色荧光强度相对表达量呈浓度依赖性增加（分别为2.810±0.100、4.017±0.293、8.804±0.302，均P<0.01），见图6。结果表明，补肾益精方可促进TJ356线虫体内DAF-16核转位和LG333线虫体内SKN-1核转位，从而提高线虫抗氧化能力。

2.7 补肾益精方有效成分与核心靶点具有自发、稳定且高亲和力的结合能力

分子对接结果显示，



小、中、大剂量补肾益精方组的给药剂量分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL. 模型线虫（CL4176线虫）咽部沉积大量Aβ，而小、中、大剂量补肾益精方组CL4176线虫Aβ沉积均明显减少. 标尺=50 μm. Aβ：β淀粉样蛋白.

图4 不同剂量补肾益精方作用后阿尔茨海默病模型线虫咽部Aβ沉积

Figure 4 Aβ deposition in Alzheimer's disease model nematodes after treatment with different doses of Bushen Yijing Formula

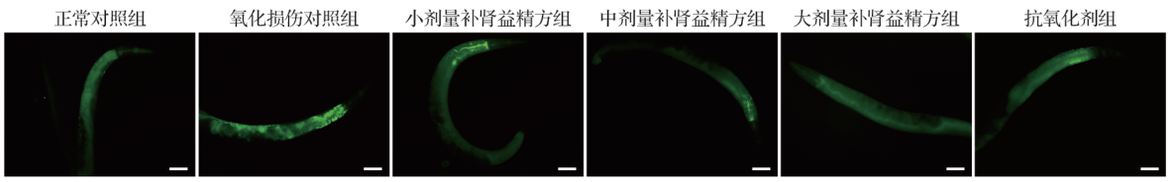
表1 不同剂量补肾益精方作用后氧化损伤模型线虫体内抗氧化相关指标比较

Table 1 Antioxidant-related indicators in oxidatively damaged model nematodes after treatment with different doses of Bushen Yijing Formula

（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组　别	总抗氧化能力（U/mL）	总SOD（U/mL）	CAT（U/mL）	活性氧	丙二醛（μmol/L）	谷胱甘肽（μmol/L）
正常对照组	2.131±0.136**	4.946±0.352	114.804±2.138	1.000±0.095**	29.635±3.665**	53.541±3.124**
氧化损伤对照组	0.987±0.047	5.378±0.160	106.282±3.799	6.732±0.075	135.269±4.588	13.297±1.969
小剂量补肾益精方组	2.208±0.082**	7.400±0.543	126.316±0.838**	4.333±0.202*	65.473±6.696**	21.902±0.662
中剂量补肾益精方组	3.503±0.082**	9.839±0.721**	131.236±0.662**	1.311±0.029**	45.470±1.649**	38.754±1.324**
大剂量补肾益精方组	4.023±0.227**	14.235±0.213**	138.192±1.199**	0.934±0.106**	30.556±2.740**	53.182±2.723**
抗氧化剂组	—	—	—	0.987±0.054**	40.185±6.313**	50.084±2.297**

—：未检测. 与氧化损伤对照组比较，*P<0.05，**P<0.01. 小、中、大剂量补肾益精方组的给药剂量分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL. SOD：超氧化物歧化酶；CAT：过氧化氢酶.



小、中、大剂量补肾益精方组的给药剂量分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL. 正常对照组呈均匀绿色荧光，氧化损伤对照组可见大量高亮绿色荧光斑点，不同剂量补肾益精方和抗氧化剂处理后线虫绿色荧光斑点较氧化损伤对照组明显减少. 标尺=50 μm.

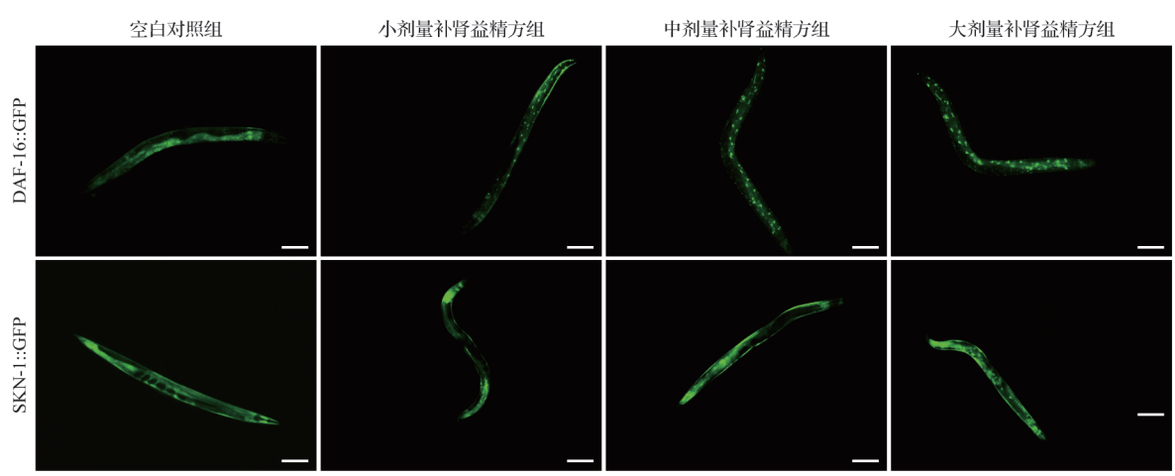
图5 不同浓度补肾益精方处理后氧化损伤模型线虫体内细胞凋亡情况

Figure 5 Apoptosis in oxidatively damaged model nematodes after treatment with different concentrations of Bushen Yijing Formula

FOXO蛋白与梓醇、THA的结合自由能分别为−8.40、−10.55 kcal/mol，Nrf2蛋白与梓醇、THA的结合自由能分别为−9.58、−10.00 kcal/mol，均优于−7.00 kcal/mol。分子动力学模拟结果显示，FOXO-梓醇、Nrf2-梓醇和Nrf2-THA均表现出优异的稳定性和高亲和力，而FOXO-THA因生物活性调节剂THA从活性中心脱离而呈现明显的不稳定性。能量分析中，吉布斯自由能剖面均呈现明显的能量极小值。见图7和附表1。综上所述，FOXO-梓醇、Nrf2-梓醇和Nrf2-THA具有良好的结构稳定性和结合亲和力。

3 讨 论

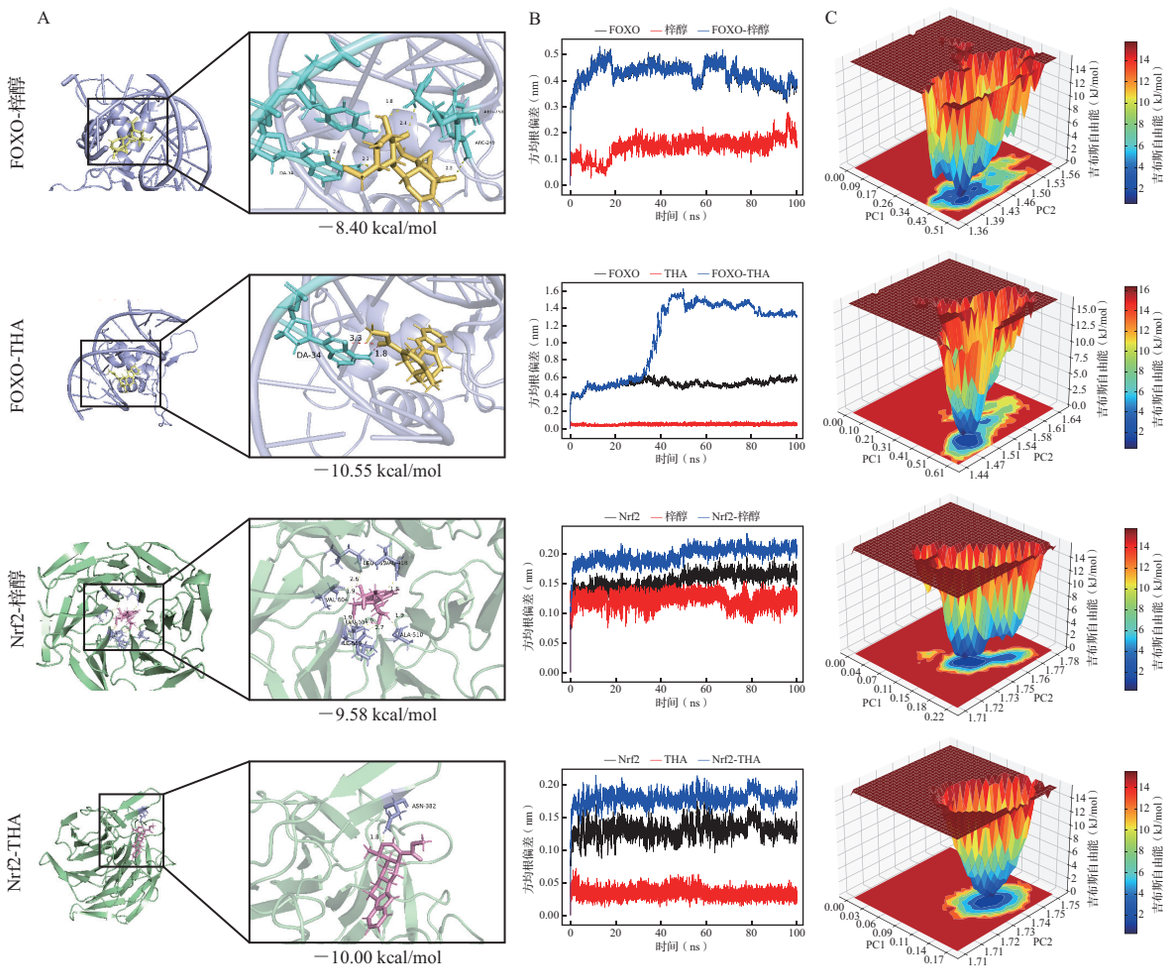
临床研究发现，补肾益精方对改善早期AD患者认知功能障碍效果明显[4-5]。前期研究发现补肾益精方可减少APP/PS1双转基因AD小鼠海马组织中Aβ沉积，具有抗氧化应激和抗细胞凋亡作用[8]。补肾益精方君药地黄可提高AD模型小鼠的日常活动能力及恐惧记忆功能，减少脑内Aβ沉积，且大剂量时效果更明显，其机制可能与降低血脑屏障通透性、保护血脑屏障完整性有关[15]；地黄的有效成分梓醇可延缓与AD淋巴母细胞样细胞系共培养的SKNMC细胞中$A\beta_{1\text{-}42}$生成和线粒体依赖性凋亡[11]。补肾益精方臣药山茱萸的有效成分THA可恢复受损的PI3K/Akt信号通路，调节胰岛素抵抗，减弱β-分泌酶1和糖原合成酶激酶3β活性，降低磷酸化JNK/JNK比值、BAX/Bcl-2比值、活化型caspase-3/caspase-3比值及细胞色素C水平，并减弱棕榈酸诱导的$A\beta_{1\text{-}42}$和τ蛋白生成[12]。因此，补肾益精方及其有效成分通过协同干预Aβ沉积、氧化应激、细胞凋亡、τ蛋白过度磷酸化及胰岛素抵抗等多重病理环节，维



小、中、大剂量补肾益精方组的给药剂量分别为5.0、10.0、20.0 mg/mL. TJ356线虫体内DAF-16::GFP呈弥散绿色荧光，核转位时聚为明亮荧光点，与空白对照组比较，小、中、大剂量补肾益精方组荧光点明显增加；LG333线虫体内SKN-1::GFP呈弥散绿色荧光，核转位时聚为明亮荧光点，与空白对照组比较，小、中、大剂量补肾益精方组荧光点明显增加. 标尺=50 μm. GFP：绿色荧光蛋白.

图6 不同浓度补肾益精方处理后线虫体内DAF-16和SKN-1核定位变化

Figure 6 Changes in DAF-16 or SKN-1 nuclear localization in nematodes after treatment with different concentrations of Bushen Yijing Formula



A：分子对接图：结合自由能最低时复合物构象；B：方均根偏差图：前20 ns内所有系统均出现初始波动，随后趋于稳定，表明各系统在所采用的分子动力学模拟条件下已达到平衡；C：吉布斯自由能景观图：蓝色和绿色区域代表低能量构象状态，对应热力学稳定构象，而红色区域代表高能量构象状态，对应热力学不稳定构象. FOXO：叉头框蛋白质O；THA：四氢鸭脚木碱；Nrf2：核转录因子红系2相关因子2；Arg：精氨酸；DA：双丙氨酸；Leu：亮氨酸；Val：缬氨酸；Ala：丙氨酸；Ile：异亮氨酸.

图7 补肾益精方有效成分与阿尔茨海默病核心靶点的分子对接和分子动力学模拟结果

Figure 7 Molecular docking and molecular dynamics simulation of active components of Bushen Yijing Formula with core targets of Alzheimer's disease

护血脑屏障完整性，具有改善AD的潜力。

秀丽隐杆线虫因其相对简单且不变的细胞谱系、刻板的神经元连接以及行为可塑性，已成为神经科学研究中常用的模式动物[16]。60%~80%的人类基因可在秀丽隐杆线虫基因组中找到直系同源物，且线虫具有高等生物衰老的特征，是目前衰老和AD干预研究中的重要模式生物[17]。

衰老是一个涉及多系统生理功能进行性衰退的复杂过程，其特征为机体对代谢、饮食和环境应激的抵御能力明显降低，进而增加年龄相关疾病的易感性[18]。年龄增长会使机体出现氧化与抗氧化系统平衡失调而产生氧化应激损伤，加速衰老进程[19]。本文资料显示补肾益精方可延长秀丽隐杆线虫在正常情况下的寿命及在氧化胁迫下的存活时间，且对线虫生殖能力无影响，证实补肾益精方在体内有抗衰老及抗氧化应激的作用。

CL4176是一种常用于AD模型构建的转基因秀丽隐杆线虫，能在肌肉组织中表达人$A\beta_{1-42}$。CL4176在16 ℃条件下呈野生型表型，而在25 ℃条件下其肌肉中表达的$A\beta_{1-42}$出现大量沉积[20-21]。本文资料显示补肾益精方明显延长了25 ℃条件下CL4176线虫未瘫痪时间并减少了其咽部Aβ沉积数，证实补肾益精方在体内可明显减少Aβ沉积，发挥抗AD作用。

氧化应激损伤是AD的核心发病机制之一，

而Aβ的神经毒性可通过诱导活性氧过量产生，进一步加重氧化应激损伤[22]。本文资料显示，补肾益精方可延长百草枯氧化胁迫的N2线虫寿命，同时提高总抗氧化能力，增强CAT和SOD的活性，降低活性氧和丙二醛水平，增加谷胱甘肽水平，并减少细胞凋亡，效果与抗氧化剂相似，证实补肾益精方在体内具有明显的抗氧化活性。

本文资料进一步探究了补肾益精方在线虫体内发挥抗氧化作用的机制，结果显示，该方可增强TJ356线虫体内DAF-16和LG333线虫体内SKN-1核转位，并上调其表达。DAF-16或SKN-1向细胞核内转位后可激活下游相关转录因子，从而发挥对AD的保护作用[23]。秀丽隐杆线虫的DAF-16是FOXO转录因子家族的直系同源物，FOXO可调节神经元的学习记忆、再生和氧化应激抵抗，对延长寿命和治疗神经退行性疾病有重要意义[24]。FOXO的活性主要受上游胰岛素/胰岛素样生长因子信号和其他生长因子信号的负调控，生长因子信号可激活PI3K/Akt信号通路，而FOXO中存在Akt依赖的磷酸化位点，这些位点磷酸化后可将FOXO隔离在细胞质中，从而抑制其活性[25]。当细胞出现氧化还原失衡时，应激激活蛋白激酶介导的磷酸化可激活FOXO[26]，激活后的FOXO通过转录并上调*ctl-1*和*sod-2*等基因的表达，进而降低细胞内活性氧水平[27]。本文资料显示，补肾益精方可增强线虫体内CAT和总SOD的活性，这可能与增加线虫体内DAF-16入核并上调其表达有关。值得注意的是，前期研究发现补肾益精方可通过激活PI3K/Akt信号通路发挥抗氧化作用[8]，由于Akt磷酸化会抑制DAF-16活性，这与本文资料中补肾益精方增强DAF-16活性的结论看似相悖。然而，除胰岛素/胰岛素样生长因子/Akt信号通路外，FOXO还受其他多种因素和信号通路的调控[28]，因此推测补肾益精方作为一种多靶点、多成分的中药复方，可能通过其他途径增强DAF-16的表达，其具体机制仍需深入研究。此外，秀丽隐杆线虫的SKN-1是哺乳动物Nrf蛋白家族的直系同源物，是一种抗氧化应激和防御异源物质的调节蛋白质[29]。其中Nrf2是目前研究最多的Nrf家族成员，在基础条件下和应激状态下均可激活大量细胞保护基因的表达[30]。在氧化应激条件下，SKN-1从细胞质转位至细胞核，调节抗氧化反应元件，诱导多种抗氧化和解毒酶的表达。除抗氧化作用外，SKN-1还可通过调控内质网应激、缓解脂质积累、控制线粒体生物发生和线粒体吞噬等途径维持细胞稳态，SKN-1的激活在多种延长寿命的干预中发挥着重要作用，其功能已超出经典的抗氧化应激范畴[31-32]。本文资料显示，补肾益精方可明显增强线虫SKN-1入核，提示其抗氧化作用可能与SKN-1有关。结合前期研究[8]进一步证实了SKN-1/Nrf2是补肾益精方治疗AD的重要靶点之一。

分子对接和分子动力学近年来越来越得到关注[33-34]。本文资料显示，FOXO-梓醇、Nrf2-梓醇和Nrf2-THA呈现出优异的结构稳定性和高结合亲和力，生物活性调节剂梓醇和THA在靶蛋白活性中心位置固定、相互作用网络牢固，为后续的药物设计和功能验证提供了依据。FOXO-THA因小分子THA脱离活性中心导致复合物方均根偏差明显升高和氢键网络瓦解，表明该复合物在动态环境中稳定性差，不适合进一步开发。上述发现为理解梓醇和THA作为生物活性调节剂的分子机制提供了参考，也为THA在FOXO体系中的结合模式优化指明了方向。

综上所述，补肾益精方可通过减少Aβ沉积、减轻氧化应激损伤而发挥抗AD作用，FOXO和Nrf2可能是其关键作用靶点，但尚未通过*daf-16*和*skn-1*基因敲除实验验证其靶点特异性，且除梓醇和THA外是否还有其他活性成分协同参与调控FOXO/Nrf2信号通路尚不清楚。后续研究将解析补肾益精方全方化学成分，构建AD小鼠模型进一步验证其多靶点调控机制，为其临床应用提供高级别循证医学证据。

本文附加文件见电子版。

志谢 本研究得到国家重点研发计划(2022YFC3501403)、国家自然科学基金(82405265)和江苏省院士工作站(BM2024101)支持

Acknowledgements This study was supported by National Key R&D Program of China (2022YFC3501403), National Natural Science Foundation of China (82405265), and Jiangsu Provincial Academician Workstation (BM2024101)

作者贡献 陆韵薇、李德雨、胡颖超、鲁磊和于顾然参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释，起草研究

论文或修改重要智力性内容. 所有作者均已阅读并认可最终稿件，并对数据的完整性和安全性负责. 具体见电子版

Author Contributions LU Yunwei, LI Deyu, HU Yingchao, LU Lei and YU Guran participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者（E-mail：dr.ygrdf@163.com）处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at dr.ygrdf@163.com

医学伦理 本研究不涉及人体或动物实验

Ethical Approval This study does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

参考文献（References）

[1] WEIDNER W S, BARBARINO P. P4-443: the state of the art of dementia research: new frontiers[J]. **Alzheimer's & Dementia**, 2019, 15: P1473.

[2] 杨佳欣, 高　兰, 杜　婴, 等. 阿尔茨海默病中西医结合治疗进展[J]. **阿尔茨海默病及相关病杂志**, 2026, 9(2): 129-134.
YANG Jiaxin, GAO Lan, DU Ying, et al. Progress of integrated Chinese and western medicine in Alzheimer's disease[J]. **Chinese Journal of Alzheimer's Disease and Related Disorders**, 2026, 9(2): 129-134. (in Chinese)

[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): 1106-1125.

[4] 文　燕. 补肾益精方对阿尔茨海默病的临床观察及该方对*D*-半乳糖致PC12细胞MAPK路径的影响[D]. 南京: 南京中医药大学, 2016.
WEN Yan. The clinical observation of Bushenyijingfang for the treatment of Alzheimer's disease and *D*-galactase-induced apoptosis *via* MAPK signaling pathway in PC12 cells[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2016. (in Chinese)

[5] 陆韵薇. 补肾益精方对阿尔茨海默病中$A\beta_{1-42}$生成及其神经毒性的影响研究及该方临床疗效观察[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
LU Yunwei. Effect of Bu-Shen-Yi-Jing-Fang on the formation and neurotoxicity of $A\beta_{1-42}$ in Alzheimer's disease and its clinical efficacy observation[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022. (in Chinese)

[6] 郭子秋, 于顾然. 补肾益精方异病同治阿尔茨海默病和帕金森病的网络药理学作用机制[J]. **中药新药与临床药理**, 2026, 37(3): 458-467.
GUO Ziqiu, YU Guran. Exploring the network pharmacology mechanism of Bushen yijing formula in treating both Alzheimer's disease and Parkinson's disease with the same method for different diseases[J]. **Traditional Chinese Drug Research and Clinical Pharmacology**, 2026, 37(3): 458-467. (in Chinese)

[7] GOURAS G K, OLSSON T T, HANSSON O. β-amyloid peptides and amyloid plaques in Alzheimer's disease [J]. **Neurotherapeutics**, 2015, 12(1): 3-11.

[8] HU Y, HAO R, LI D, et al. Experimental verification about treatment of Bu-Shen-Yi-Jing-Fang in Alzheimer's disease by the analysis of the feasible signaling pathway of network pharmacology[J]. **BMC Complementary Med Ther**, 2024, 24(1): 222.

[9] 中华中医药学会. 中药汤剂煎煮规范: T/CACM 1366—2021[S]. 北京:中华中医药学会,2021.
China Association of Chinese Medicine. Specification of traditional Chinese medicine decoction: T/CACM 1366—2021[S]. Beijing: China Association of Chinese Medicine, 2021. (in Chinese)

[10] 郝任娟. 熟地黄对AD线虫及$A\beta_{1-42}$致HT22细胞氧化应激损伤保护作用及其相关机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
HAO Renjuan. Protective effect of Rehmanniae glutinosa on oxidative stress injury of AD *C. elegans* and HT22 cells induced by $A\beta_{1-42}$ and its related mechanism[D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022. (in Chinese)

[11] XIANG C, LU Y, HAO R, et al. Catalpol alleviates amyloid- generation and neuronal oxidative stress injury *via* activating the Keap1-Nrf2/ARE signaling pathway in the immortalized lymphocytes from patients with late-onset Alzheimer's disease and SKNMC cells co-culture model[J]. **Iran J Basic Med Sci**, 2024, 27(12): 1547-1557.

[12] CHEN K, YU G. Tetrahydroalstonine possesses protective potentials on palmitic acid stimulated SK-N-MC cells by suppression of $A\beta_{1-42}$ and tau through regulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. **Eur J Pharmacol**, 2024, 962: 176251.

[13] 赵大鹏. 中药地黄对APP/PS1小鼠血脑屏障的保护性研究及以地黄为君药的中药复方治疗阿尔茨海默病的临床应用研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2022.
ZHAO Dapeng. Protective effect of Rehmannia glutinosa on the blood-brain barrier in APP/PS1 mice and clinical application of Chinese herbal compound with Rehmannia glutinosa as monarch in the treatment of Alzheimer's disease [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2022. (in Chinese)

[14] MARTÍNEZ-LÓPEZ A L, REBOREDO C, GONZÁLEZ-NAVARRO C J, et al. Zein nanoparticles extend lifespan in *C. elegans* and SAMP8 mice[J]. **Int J Pharm**, 2024, 666: 124798.

[15] 赵大鹏, 陆韵薇, 于顾然. 地黄对阿尔茨海默病小鼠行为学的影响及其对血脑屏障的保护作用[J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2021, 50(5): 553-560.
ZHAO Dapeng, LU Yunwei, YU Guran. Effects of *Radix Rehmanniae* on behavior and blood-brain barrier in Alzheimer's disease mice[J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)**, 2021, 50(5): 553-560. (in Chinese)

[16] ROUSSOS A, KITOPOULOU K, BORBOLIS F, et al. *Caenorhabditis elegans* as a model system to study human neurodegenerative disorders[J]. **Biomolecules**, 2023, 13(3): 478.

[17] WAGHMARE S G, KRISHNA M M, MACCOUX E C, et al. Functional analysis of late-onset Alzheimer's disease risk genes in *Caenorhabditis elegans* identifies regulators of neuronal aging[J/OL]. **bioRxiv**, 2026. DOI: 10.64898/2026.03.26.714531.

[18] FENG S, CHENG H, XU Z, et al. Thermal stress resistance and aging effects of *Panax notoginseng* polysaccharides on *Caenorhabditis elegans*[J]. **Int J Biol Macromol**, 2015, 81: 188-194.

[19] CABELLO-VERRUGIO C, SIMON F, TROLLET C, et al. Oxidative stress in disease and aging: mechanisms and therapies 2016[J]. **Oxid Med Cell Longev**, 2017, 2017: 4310469.

[20] MENG F, LI J, RAO Y, et al. A Chinese herbal formula, Gengnianchun, ameliorates β-amyloid peptide toxicity in a *Caenorhabditis elegans* model of Alzheimer's disease [J]. **Evid Based Complementary Altern Med**, 2017, 2017: 7480980.

[21] 李德雨, 胡颖超, 刘　欣, 等. 知母治疗阿尔茨海默病网络药理学研究及实验验证[J]. **浙江大学学报(医学版)**, 2024, 53(1): 84-97.
LI Deyu, HU Yingchao, LIU Xin, et al. Network pharmacology analysis and experimental validation of *Anemarrhenae Rhizoma* in treating Alzheimer's disease [J]. **Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)**, 2024, 53(1): 84-97. (in Chinese)

[22] 王佳伟, 魏本君. 中医药调控ROS防治阿尔茨海默病研究进展[J]. **中国实验方剂学杂志**, 2024, 30(12): 281-288.
WANG Jiawei, WEI Benjun. Prevention and treatment of Alzheimer's disease by traditional Chinese medicine *via* regulating ROS: a review[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2024, 30(12): 281-288. (in Chinese)

[23] HOU Z, AHMED A, WANG J, et al. Jujube polysaccharide promotes neuroprotection and longevity in *Caenorhabditis elegans* through oxidative stress resistance and stress-response signaling[J]. **Int J Mol Sci**, 2026, 27(11): 4727.

[24] KIM S Y, WEBB A E. Neuronal functions of FOXO/DAF-16[J]. **Nutr Healthy Aging**, 2017, 4(2): 113-126.

[25] BRUNET A, BONNI A, ZIGMOND M J, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor[J]. **Cell**, 1999, 96(6): 857-868.

[26] GUI T, BURGERING B M T. FOXOs: masters of the equilibrium[J]. **FEBS J**, 2022, 289(24): 7918-7939.

[27] KOPS G J P L, DANSEN T B, POLDERMAN P E, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress[J]. **Nature**, 2002, 419 (6904): 316-321.

[28] LIU P P, ZHANG M, WEI Z, et al. Feedback coordination of FoxO-mediated antibacterial immunity by PDGF/VEGF signaling establishes hemolymph microbiota homeostasis in shrimp[J/OL]. **PLoS Pathog**, 2026, 22 (6): e1014307.

[29] KAHN N W, REA S L, MOYLE S, et al. Proteasomal dysfunction activates the transcription factor SKN-1 and produces a selective oxidative-stress response in *Caenorhabditis elegans*[J]. **Biochem J**, 2008, 409(1): 205-213.

[30] TONELLI C, CHIO I I C, TUVESON D A. Transcriptional regulation by Nrf2[J]. **Antioxid Redox Signal**, 2018, 29(17): 1727-1745.

[31] AN J H, BLACKWELL T K. SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response[J]. **Genes Dev**, 2003, 17(15): 1882-1893.

[32] DETIENNE G, VAN DE WALLE P, DE HAES W, et al. SKN-1-independent transcriptional activation of glutathione S-transferase 4 (GST-4) by EGF signaling[J/OL]. **Worm**, 2016, 5(4): e1230585.

[33] BHOWMIK R, D'AGOSTINO I, ANGELI A, et al. Integrated in silico and *in vitro* screening approaches for the discovery of small-molecule inhibitors of β-carbonic anhydrases[J]. **Expert Opin Drug Discov**, 2026, 21 (3): 319-337.

[34] FAN C, ZHAO X, ZHANG Z, et al. Exploring the potential of calcium-chelating peptides from aquatic sources: structure-activity relationship, computational simulation, and stability mechanism analysis[J]. **Food Res Int**, 2026, 227: 118145.

[本文编辑　余　方　沈　洁]