

左归丸关键活性成分槲皮素可通过PI3K/Akt信号通路干预阿尔茨海默病模型细胞

李光亚,李沛泽,黄柳玲,朱静文,秦秀德,陆韵薇

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,广东 深圳 518000

[摘要] **目的:**探究左归丸关键活性成分槲皮素通过磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路对阿尔茨海默病(AD)的作用及机制。**方法:**首先,使用TCMSP、PubChem、SwissTargetPrediction、BATMAN-TCM数据库检索左归丸活性成分并预测其潜在作用靶点,使用Uniprot数据库规范靶点信息,结合DrugBank、GeneCards、OMIM获取的AD疾病靶点,取交集得到左归丸治疗AD的潜在靶点。基于这些靶点,采用Cytoscape 3.10.1软件与STRING数据库绘制左归丸治疗AD的蛋白质-蛋白质相互作用网络,通过计算获取左归丸治疗阿尔茨海默病的关键活性成分及核心靶点。对左归丸治疗AD的潜在靶点进行基因本体功能富集分析和京都基因和基因组数据库通路富集分析,探讨左归丸治疗AD的生物学过程及信号通路。然后,使用CB-Dock2对关键活性成分槲皮素与核心靶点Akt1进行分子对接与结合能力预测。最后,以 β 淀粉样蛋白₁₋₄₂(A β ₁₋₄₂)寡聚体诱导HT22细胞构建AD细胞模型,分为小剂量槲皮素组、中剂量槲皮素组、大剂量槲皮素组、PI3K激动剂表皮生长因子(EGF)组等进行体外实验。为验证槲皮素是否通过调控PI3K/Akt信号通路发挥抗凋亡作用,另设PI3K抑制剂(LY294002)组、PI3K抑制剂+大剂量槲皮素组、PI3K抑制剂+激动剂EGF组等进行验证。采用CCK-8检测细胞活性,JC-1、钙黄绿素AM/碘化丙啶、Hoechst方法检测细胞凋亡情况,蛋白质印迹法检测PI3K/Akt信号通路和细胞凋亡相关蛋白质表达。**结果:**左归丸关键活性成分槲皮素通过网络化靶向Akt1等核心蛋白,显著富集于PI3K/Akt信号通路。槲皮素与Akt1具有较好的结合能力(对接结合能为-6.6 kcal/mol)。在AD模型细胞及PI3K抑制剂处理后的HT22细胞中,大剂量槲皮素能明显增加细胞存活率,提高磷酸化Akt/Akt比值和B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)表达水平(均 $P<0.05$),降低活化型caspase-3/caspase-3比值及Bcl-2相关X蛋白(BAX)、细胞色素C表达水平(均 $P<0.01$),抑制细胞凋亡。**结论:**左归丸关



收稿日期(Received):2025-08-26 修改返回日期(Revised):2025-10-16 接受日期(Accepted):2025-11-10 网络预发表日期(Online):2025-12-08

基金项目(Funding):国家自然科学基金(82405265);广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515110832);深圳市科技计划(JCYJ20230807094801002);深圳市中医院“3030计划”中医临床研究项目(G3030202101)

第一作者(First author):李光亚,硕士研究生,主要从事中医药防治脑病和心理病研究;E-mail:13999704253@163.com;ORCID:0009-0009-2971-6399

通信作者(Corresponding author):秦秀德,主任医师,教授,博士生导师,主要从事中医药防治脑病和心理病研究;E-mail:qinxiude@foxmail.com;ORCID:0000-0002-4856-3748. 陆韵薇,主治医师,硕士生导师,主要从事中医药治疗神经系统疾病研究;E-mail:417213243@qq.com;ORCID:0000-0002-6835-2788

槲皮素可通过调控PI3K/Akt信号通路抑制AD模型细胞凋亡,发挥干预AD的作用。

[关键词] 阿尔茨海默病;左归丸;槲皮素;细胞凋亡;网络药理学;PI3K/Akt信号通路;体外实验;HT22细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A

Quercetin, a key bioactive component of Zuogui Pill, protects against Alzheimer's disease by regulating the PI3K/Akt signaling pathway

LI Guangya, LI Peize, HUANG Liuling, ZHU Jingwen, QIN Xiude, LU Yunwei
(Department of Neurology and Psychology, the Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong Province, China)

Corresponding authors: QIN Xiude, E-mail: qinxiude@foxmail.com, ORCID: 0000-0002-4856-3748; LU Yunwei, E-mail: 417213243@qq.com, ORCID: 0000-0002-6835-2788

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective mechanism of quercetin, a key bioactive component of Chinese medicine Zuogui Pill, against Alzheimer's disease (AD) via the PI3K/Akt signaling pathway. **Methods:** The TCMSP, PubChem, SwissTargetPrediction, and BATMAN-TCM databases were used to retrieve the active components of Zuogui Pill and predict their potential targets. Target information was standardized using the UniProt database. AD-related target genes were obtained from DrugBank, GeneCards, and OMIM, and the intersection was taken to identify the potential targets of Zuogui Pill for AD treatment. Based on these targets, a protein-protein interaction network was constructed using Cytoscape 3.10.1 and the STRING database. The key active components and core targets of Zuogui Pill for AD treatment were identified through computational analysis. Gene Ontology functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis were performed on the potential targets to explore the biological processes and signaling pathways involved. Subsequently, molecular docking and binding affinity prediction between the key active component quercetin and the core target Akt1 were performed using the online tool CB-Dock2. An AD cell model was established by treating mouse hippocampal neuron cells (HT22) with amyloid β -protein₁₋₄₂ ($A\beta_{1-42}$) oligomers. The cells were divided into low-, medium-, and high- dose quercetin groups, and a PI3K agonist (EGF) group for *in vitro* experiments. To verify whether quercetin exerts its anti-apoptotic effects by regulating the PI3K/Akt pathway, additional groups were established: PI3K inhibitor (LY294002) group, PI3K inhibitor+high-dose quercetin group, and PI3K inhibitor+EGF group. CCK-8 assay was used to detect cell viability; JC-1, Calcein-AM/PI, and Hoechst staining were used to assess apoptosis; and Western blotting was used to detect expression of PI3K/Akt signaling pathway and apoptosis related proteins. **Results:** Network pharmacology demonstrated that quercetin targets core proteins such as Akt1 in a network manner and is predominantly enriched in the PI3K/Akt signaling pathway. Molecular docking showed favorable binding affinity

between quercetin and Akt1 (binding energy: -6.6 kcal/mol). In the $A\beta_{1-42}$ oligomer-induced HT22 neuronal cell model and HT22 cells treated by PI3K inhibitor, high-dose quercetin significantly increased cell viability, elevated the p-Akt/Akt ratio and Bcl-2 expression level (all $P<0.05$), reduced the cleaved caspase-3/caspase-3 ratio as well as the expression levels of BAX and cytochrome C (all $P<0.01$), and alleviated apoptosis of HT22 cells. **Conclusion:** Quercetin, a key bioactive component of Chinese medicine Zuogui Pill, inhibits neuronal apoptosis by regulating the PI3K/Akt signaling pathway, thereby exerting a protective effect against AD.

[**Key words**] Alzheimer's disease; Zuogui Pill; Quercetin; Apoptosis; Network pharmacology; PI3K/Akt signaling pathway; *In vitro* experiment; HT22 cell

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(5): 414-424.]

[**缩略语**] 阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD); 表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF); β 淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, $A\beta$); 蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, Akt); B 细胞淋巴瘤 2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2); Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, BAX); 胱天蛋白酶 (cysteine aspartic acid specific protease, caspase); 含吐温-20 的 Tris 缓冲液 (Tris buffered saline with Tween-20, TBST); 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA); 杜氏改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM); 2-吗啉乙磺酸 (2-morpholinoethanesulfonic acid, MES); 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecyl sulfate, SDS); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS); 中药系统药理学数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP); 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI); 最大团中心性 (maximal clique centrality, MCC); 最大邻域分量 (maximum neighborhood component, MNC); 基因本体 (Gene Ontology, GO); 京都基因和基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG); 二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO); 磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K); 氰化羰基-3-氯苯胺 (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazine, CCCP); 二喹啉甲酸法 (bicinchoninic acid assay, BCA); 糖原合成酶激酶 3β (glycogen synthase kinase- 3β , GSK- 3β)

AD 是一种常见的痴呆症,其主要临床症状是记忆丧失、认知功能下降、语言能力受损以及自理能力下降。目前 AD 治疗主要集中于缓解症状和延缓疾病进程,由于对其潜在发病机制的了解仍然有限,尚未发现有效的治愈方法^[1]。中医认为 AD 属于“痴呆”、“呆病”、“善忘”、“健忘”的范畴,“肾虚髓减”是 AD 的核心病机。《灵枢·本神》载:“肾藏精,精舍志。”《灵枢·海论》又云:“髓海不足,则脑转耳鸣……懈怠安卧。”后世医家据此概括为“肾精亏虚,髓海失养,则志气衰而善忘。”因此,肾精充沛,则意志坚定、记忆力强;肾精亏虚,则不能生髓充脑,髓海不足则脑转耳鸣、

目眩健忘。《景岳全书》卷五十一载,左归丸“治真阴肾水不足……凡精髓内亏、津液枯涸等证,俱速宜壮水之主,以培左肾之元阴,而精血自充矣”。该方由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、川牛膝、鹿角胶、龟甲胶、菟丝子八味药组成。徐镛《医学举要》曰:“方中熟地补肾为君;山药补脾,山茱萸补肝为臣;枸杞补精,牛膝补血,菟丝补肾中之气,鹿胶、龟胶补督任之元。虽曰左归,其实三阴并补,水火交济之方也。”此乃壮水之方,具有滋阴补肾、填精益髓之功,以其治疗 AD 符合“肾虚髓减”的核心病机。但左归丸治疗 AD 的具体作用机制尚不明确。本研究采用网络药理学结

合分子对接筛选左归丸治疗AD的关键活性成分及核心靶点,分析核心靶蛋白与关键活性成分的结合能力,进一步通过体外实验验证左归丸关键活性成分对核心靶蛋白的影响,以期AD的防治提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞、药物、试剂及仪器

HT22小鼠海马神经元细胞(SNL-202)为中国武汉尚恩生物技术有限公司产品。槲皮素(HY-18085A)、LY294002(HY-10108)和EGF(HY-P7109)为中国上海皓元生物医药科技有限公司产品。

$\text{A}\beta_{1-42}$ (04010011827)为中国上海强耀生物科技有限公司产品;磷酸化Akt1/2/3(Ser473)抗体(AF0016)为中国江苏亲科生物研究中心有限公司产品;Akt多克隆抗体(10176-2-AP)、BAX单克隆抗体(60267-1-Ig)、Bcl-2单克隆抗体(68103-1-Ig)、caspase 3/P17/P19多克隆抗体(19677-1-AP)、细胞色素C单克隆抗体(66264-1-Ig)、 β -肌动蛋白单克隆抗体(66009-1-Ig)为中国武汉三鹰生物技术有限公司产品;增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(C2003S)、Hoechst 33342染色液(C1025)、青霉素-链霉素-庆大霉素溶液(C0223)为中国上海碧云天生物技术股份有限公司产品;Calcein-AM/PI活细胞/死细胞双染试剂盒(CA1630)、10×电泳转移缓冲液(D1060)、10×TBST缓冲液(T1081)为中国北京索莱宝科技有限公司产品;0.25%胰蛋白酶-EDTA(含酚红)(25200-056)、高糖DMEM(11995065)、Restore™ PLUS Western印迹剥离缓冲液(21059)为美国Thermo Fisher Scientific公司产品;SuperKine™超敏型增强化学发光液(BMU102-CN)为中国亚科因生物技术有限公司产品;SurePAGE™, Bis-Tris, 10×8, 4%~20%, 15 wells(M00657)、MES SDS Running Buffer Powder(M00677)为中国金斯瑞生物科技股份有限公司产品;1×PBS(BL302A)为中国北京兰杰柯科技有限公司产品。

基础电泳仪电源(PowerPac Basic)、高灵敏度化学发光仪(ChemiDoc™ Imaging System)为美国Bio-Rad公司产品;多功能酶标仪(H1M)为美国BioTek公司产品;电动荧光成像显微镜(Axio Imager M2)为德国ZEISS公司产品。

1.2 网络药理学分析左归丸活性成分和治疗AD的核心靶点

1.2.1 左归丸活性成分筛选、靶点预测及AD相关靶点获取 使用TCMSP检索熟地黄、山药、山茱萸、枸杞子、菟丝子、川牛膝的化学成分,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 为条件筛选单味药活性成分,通过有机小分子生物活性数据库 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)进行比对确认;使用SwissTargetPrediction数据库(<https://swisstargetprediction.ch>)预测靶点,UniProt数据库(<https://www.uniprot.org>)规范靶点信息,以置信度 ≥ 0.4 为条件筛选靶点;使用BATMAN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php>)获取龟板胶、鹿角胶药物靶点。同时,在数据库OMIM(<https://www.omim.org>)、DrugBank(<https://go.drugbank.com>)、GeneCards(<https://www.genecards.org>)中以“Alzheimer's disease”为关键词进行检索,获得AD疾病靶点,并在GeneCards中设定相关性评分 ≥ 10 为筛选条件,将得到的结果合并后去重。使用Venny2.1(<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/gongju/weientu.html>)在线工具将左归丸药物作用靶点与AD疾病靶点取交集并绘制维恩图,获得左归丸治疗AD的潜在靶点。

1.2.2 左归丸关键活性成分和核心靶点筛选 将药物、活性成分和潜在靶点信息整理后导入Cytoscape 3.10.1软件构建“AD-左归丸-活性成分-靶点”网络,根据度值筛选左归丸治疗AD的关键活性成分。将左归丸治疗AD的潜在靶点输入STRING数据库(<https://cn.string-db.org>),物种选择“Homo Sapiens”,构建左归丸治疗AD的PPI网络,再利用Cytoscape 3.10.1软件进行可视化,并使用该软件内置的Cytohubba中MCC、MNC、度值三种算法筛选核心靶点并取三者交集。

1.2.3 GO及KEGG分析左归丸治疗AD的生物学过程及信号通路 将左归丸治疗AD的潜在靶点录入Metascape平台,物种选择“H.sapiens”,进行GO和KEGG分析,探讨左归丸治疗AD可能的生物学过程及信号通路。

1.3 分子对接分析左归丸关键活性成分与其治疗AD核心靶点的结合能力

通过PubChem数据库获取关键活性成分的三维结构;检索RCSB PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)获取核心靶点的蛋白质三维结构,使用

PyMOL 软件对蛋白质结构进行加氢、去水、氢键优化和能量最小化。使用在线分子对接工具 CB-Dock2 完成关键活性成分与核心靶点的分子对接,最后通过 PyMOL 和 AutoDock 软件对结果进行可视化。

1.4 AD 细胞建模及分组干预

将 1 mg $A\beta_{1-42}$ 粉末溶于 222 μL 六氟异丙醇中,置于生物安全柜中,开盖通风过夜,得到单体状 $A\beta_{1-42}$ 。加入 44 μL DMSO 吹打涡旋,同时加入 2171 μL DMEM,充分吹打涡旋后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 24 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 19 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液即得 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体溶液,存储于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。参照文献[2-3],选用终浓度为 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体溶液用于构建 AD 细胞模型。

将 HT22 细胞置于细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$,95% 空气,5% 二氧化碳)以完全培养基(含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素-庆大霉素的 DMEM 培养基)培养,2~3 d 更换一次培养液。设置槲皮素浓度梯度为 0.0、2.5、5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 $\mu\text{mol/L}$,使用 CCK-8 检测细胞存活率,筛选出对细胞活性无显著影响的浓度,以此确定槲皮素小、中、大剂量用于后续实验。加入终浓度为 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 $A\beta_{1-42}$ 寡聚体作用 24 h 构建 AD 细胞模型,设置空白对照组(正常培养 HT22 细胞)、模型对照组(AD 模型细胞)、小剂量槲皮素组(AD 模型细胞+2.5 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素)、中剂量槲皮素组(AD 模型细胞+5.0 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素)、大剂量槲皮素组(AD 模型细胞+10.0 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素)、PI3K 激动剂组(AD 模型细胞+100.0 ng/mL EGF)。为进一步验证槲皮素是否通过调控 PI3K/Akt 信号通路发挥抗凋亡作用,设置空白对照组(正常培养 HT22 细胞)、PI3K 抑制剂组(10.0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002)、PI3K 抑制剂+大剂量槲皮素组(10.0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002+10.0 $\mu\text{mol/L}$ 槲皮素)、PI3K 抑制剂+激动剂组(10.0 $\mu\text{mol/L}$ LY294002+EGF 100.0 ng/mL)。

1.5 CCK-8 检测细胞活性

取各组对数生长期的 HT22 细胞悬液,以 3×10^4 个/mL 接种于 96 孔板中,每孔加细胞悬液 100 μL 。设置药物组并分别加入含各浓度药物的培养基,同时设置不含药物仅含正常培养 HT22 细胞培养基的对照组,培养 24 h 后,每孔加 10 μL CCK-8 溶液,避光孵育 2 h,采用酶标仪在波长 450 nm 处读取吸光度值,并计算细胞存活率:细

胞存活率(%)=(经药物干预细胞吸光度值-空白孔吸光度值)/(不含药物正常培养细胞吸光度值-空白孔吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.6 JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位

将 HT22 细胞悬液以 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中,每孔加细胞悬液 1 mL,待其长至约 80%,按分组分别加入含各浓度药物的培养基,同时设置 CCCP 组作为线粒体膜电位下降的对照,培养 24 h 后用 PBS 清洗三遍。按照说明书要求将试剂盒中 10.0 mmol/L CCCP 按照 1:1000 比例加入细胞培养液中,稀释至 10.0 $\mu\text{mol/L}$,处理 20 min 后,避光环境下装载 JC-1,于细胞培养箱中孵育 20 min,吸除上清液,用 JC-1 染色缓冲液洗涤两次,加入 1 mL 细胞培养液,荧光显微镜下观察并拍摄图像,拍摄图像时扣除 CCCP 组的荧光强度。

1.7 钙黄绿素 AM/碘化丙啶双染法检测细胞活性和细胞毒性

将 HT22 细胞悬液以 1×10^5 个/mL 接种于 12 孔板中,每孔加细胞悬液 1 mL,待其长至约 80%,按分组分别加入含各浓度药物的培养基。处理完毕的细胞用 1 $\times$ Assay Buffer 浸洗两次,每次 2 min。按说明书配制钙黄绿素 AM 和碘化丙啶并加入细胞中,室温避光染色 30 min。去除上清液,加入 1 mL PBS,在荧光显微镜下观察并拍摄图像。

1.8 Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡

将 HT22 细胞悬液以 1×10^5 个/mL 接种至预先放入细胞爬片的 12 孔板中,每孔加细胞悬液 1 mL,待其长至约 80%,按分组分别加入含各浓度药物的培养基,处理完毕的细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 清洗三遍,每孔加入 400 μL Hoechst 33342 染色液,室温避光放置 3~5 min,吸除 Hoechst 33342 染色液,用 TBST 洗涤三次,每次 5 min。将爬片用弯曲的针头扣出,盖在滴加了抗荧光淬灭液的载玻片上,指甲油封片防止水分蒸发,荧光显微镜下观察并拍摄图像。

1.9 蛋白质印迹法检测 PI3K/Akt 信号通路和细胞凋亡相关蛋白质表达

收集各组 HT22 细胞,加入裂解液,冰上裂解细胞 20 min,超声三次,每次 15 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 16 000 $\times g$ 离心 20 min,取上清液,用 BCA 试剂盒检测蛋白质浓度。加入上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 使蛋白质变性。蛋白质样品经 4%~20% SDS 聚丙烯

烯酰胺凝胶电泳,转至聚偏二氟乙烯膜,用5%脱脂牛奶室温封闭60 min,分别加入针对Akt、磷酸化Akt、BAX、Bcl-2、caspase-3、细胞色素C的特异性抗体,4℃孵育过夜;TBST洗涤三次,加入二抗室温孵育60 min;TBST再次洗涤三次,加入增强化学发光试剂显影,采用Image Lab软件分析条带灰度值。

1.10 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。所有数据先进行正态性检验和方差齐性检验:若符合正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析;若不符合正态分布或方差不齐,则采用非参数检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左归丸治疗AD的关键活性成分及核心靶点

共获得左归丸的45个活性成分及其159个靶点(表1)。在Drugbank、GeneCards、OMIM数据库中分别获得疾病靶点88、1975、545个,合并去重后共得到2455个AD相关靶点,将上述靶点与左归丸活性成分的靶点取交集获得左归丸治疗AD的80个潜在靶点。

表1 左归丸各组成药物的活性成分和靶点数

Table 1 Number of active ingredients and corresponding targets of each constituent herb in Zuogui Pill

药物名称	活性成分数	靶点数
熟地黄	2	14
山药	4	25
枸杞子	15	141
山茱萸	5	28
川牛膝	2	91
菟丝子	9	210
鹿角胶	2	37
龟板胶	6	48
合计	45	159*

*靶点数经合并、去重处理。

构建“AD-左归丸-活性成分-靶点”网络后共得到113个节点及424条关联线(附图1),度值最高的活性成分是槲皮素(度值为144,表2),提示槲皮素可能是左归丸干预AD的关键活性成分。

将左归丸治疗AD的80个潜在靶点导入STRING数据库进行PPI网络分析并使用

表2 左归丸治疗阿尔茨海默病度值排名前五位的活性成分

Table 2 Top five active ingredients in Zuogui Pill for Alzheimer's disease based on degree values

MOL ID*	活性成分	度值
MOL000098	槲皮素	144
MOL000422	山柰酚	45
MOL000449	豆甾醇	24
MOL000358	β -谷甾醇	20
MOL000953	胆固醇	15

*中药系统药理学数据库和分析平台中的成分编号。

Cytoscape 3.10.1软件可视化,隐藏游离靶点,结果见附图2,图中共有80个节点和469条边,节点平均度值为11.7,PPI的富集显著性 $P<1\times 10^{-16}$ 。使用MCC、MNC、度值对核心靶点进行筛选并取交集,最终获得左归丸治疗AD的核心靶点为Akt1、GSK-3 β 、PIK3R1、EGFR、SRC等(附图3)。

GO分析结果显示,左归丸参与的生物学过程主要包括细胞对氮化合物的反应、化学突触传递、系统过程的调节、行为过程、对A β 的反应等;涉及的细胞组分主要包括N-甲基-D-天冬氨酸选择性谷氨酸受体复合物、树突、膜筏、细胞前缘、转移含磷基团的转移酶复合物等;与AD相关靶点的分子功能主要富集于神经递质受体活性、组蛋白激酶活性、乙酰胆碱受体活性、氧化还原酶活性、激素结合等。KEGG富集分析发现,差异基因主要富集于钙信号通路、PI3K/Akt信号通路、癌症通路、胆碱能突触和内分泌耐药性等。见附图4和附图5。

综上,左归丸对AD的治疗作用可能是通过槲皮素调控核心靶点Akt1所在的信号通路实现。分子对接结果显示,槲皮素与Akt1的对接结合能为-6.6 kcal/mol,证实了两者之间具有较好的结合能力(附图6)。结合KEGG富集分析中PI3K/Akt信号通路被显著富集的结果,表明Akt1、PIK3R1以及GSK-3 β 、EGFR、SRC可能通过直接或间接调节PI3K/Akt信号通路影响神经元的生存、增殖和功能,进一步提示左归丸可能通过其关键活性成分槲皮素调控PI3K/Akt信号通路改善AD的病理过程。

2.2 槲皮素对AD细胞活性的影响

依据槲皮素对HT22细胞活性无显著影响的浓度筛选结果(附图7),设置槲皮素小、中、大剂量分别为2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 。与空白对照组

[(99.98±4.01)%]比较,模型对照组细胞存活率明显降低[(67.93±5.53)%, $P<0.01$]。与模型对照组比较,2.5、5.0、10.0 μmol/L 槲皮素和PI3K激动剂处理后细胞存活率明显增加[分别为(81.92±3.03)%、(91.27±2.52)%、(96.81±1.80)%和(142.27±6.57)%,均 $P<0.01$],且槲皮素的作用效果呈剂量依赖性增强。结果提示槲皮素和PI3K激动剂能减轻AD模型细胞损伤。

2.3 槲皮素对AD细胞凋亡及PI3K/Akt信号通路相关蛋白质表达的影响

与空白对照组比较,模型对照组细胞凋亡显著增加,而槲皮素和PI3K激动剂处理后细胞凋亡明显减少,且随着槲皮素浓度增加,其抑制细

胞凋亡的效果也逐渐增强(图1)。蛋白质印迹法检测结果显示,与空白对照组比较,模型对照组细胞中磷酸化Akt/Akt比值和Bcl-2水平均明显下降(均 $P<0.05$),活化型caspase-3/caspase-3比值及BAX、细胞色素C表达水平均明显上升(均 $P<0.05$);大剂量槲皮素和PI3K激动剂处理后Akt磷酸化水平和Bcl-2水平均明显上升(均 $P<0.01$),活化型caspase-3/caspase-3比值及BAX、细胞色素C表达水平均明显下降(均 $P<0.01$),且在槲皮素干预组中呈现剂量依赖性(附图8和表3)。结果提示,槲皮素可通过抑制细胞凋亡改善AD模型细胞损伤,其效果可能与调节PI3K/Akt信号通路有关。

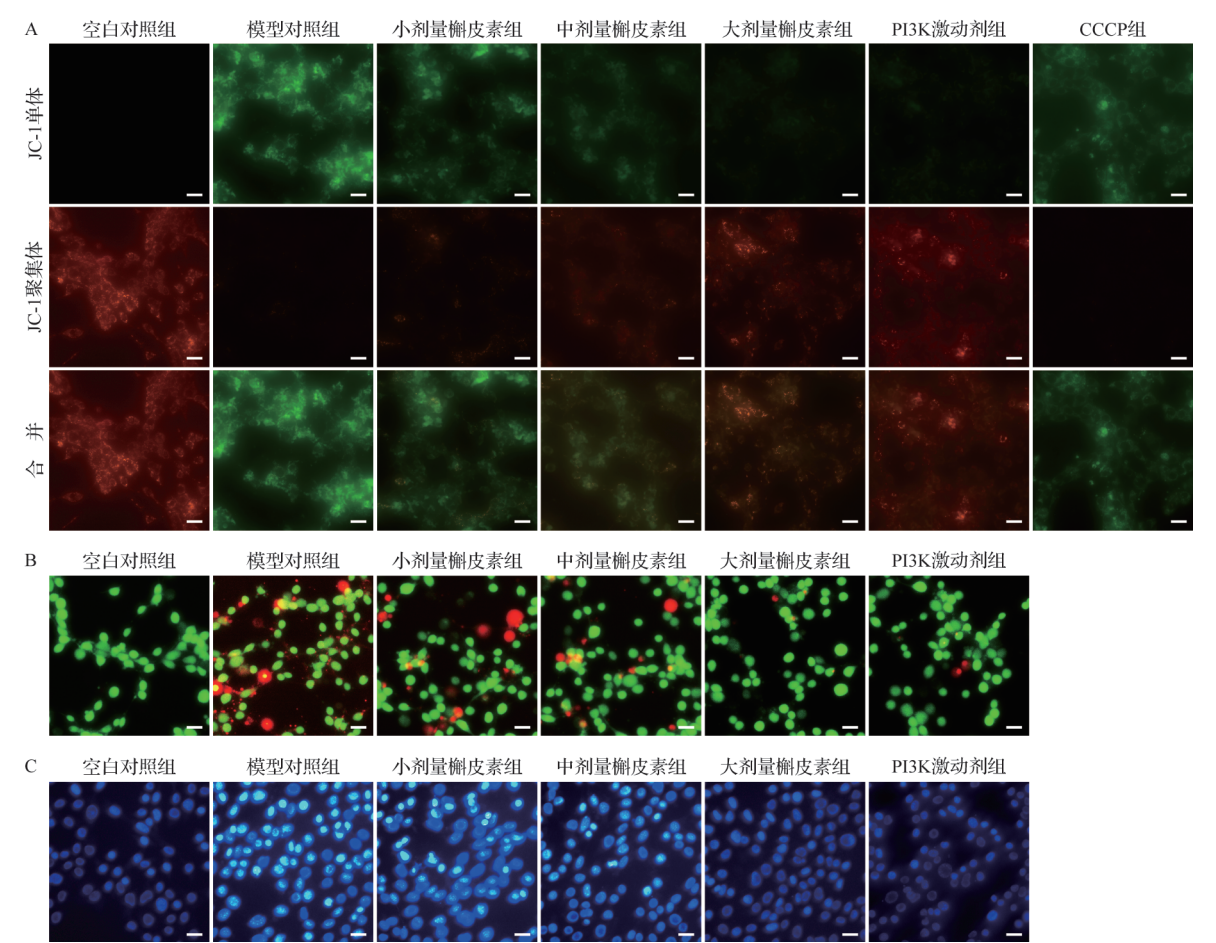


图1 不同剂量槲皮素作用后阿尔茨海默病模型细胞凋亡情况

Figure 1 Apoptosis of Alzheimer's disease model cells after treatment with different doses of quercetin

表3 不同剂量槲皮素作用后阿尔茨海默病模型细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白质表达水平比较

Table 3 Comparison of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins expression levels in Alzheimer's disease model cells after treatment with different doses of quercetin

($\bar{x}\pm s, n=3$)

组 别	磷酸化 Akt/Akt	活化型 caspase-3/ caspase-3	BAX	Bcl-2	细胞色素 C
空白对照组	1.00±0.01	1.00±0.18	1.00±0.12	1.10±0.20	1.00±0.10
模型对照组	0.77±0.05 [*]	2.38±0.20 ^{**}	1.22±0.20 [*]	0.65±0.05 [*]	1.26±0.06 ^{**}
小剂量槲皮素组	0.82±0.08	1.24±0.18 ^{##}	1.10±0.20	1.04±0.14 [#]	1.21±0.05
中剂量槲皮素组	1.00±0.09 ^{##}	0.90±0.04 ^{##}	1.01±0.06	1.18±0.26 ^{##}	1.06±0.09 ^{##}
大剂量槲皮素组	1.29±0.04 ^{##}	0.54±0.20 ^{##}	0.89±0.08 ^{##}	1.46±0.25 ^{##}	0.88±0.05 ^{##}
PI3K 激动剂组	1.24±0.06 ^{##}	0.59±0.23 ^{##}	0.85±0.08 ^{##}	1.47±0.15 ^{##}	0.89±0.06 ^{##}

与空白对照组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与模型对照组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。PI3K: 磷脂酰肌醇 3 激酶; Akt: 蛋白激酶 B; caspase-3: 胱天蛋白酶 3; Bcl-2: B 细胞淋巴瘤 2; BAX: Bcl-2 相关 X 蛋白。

2.4 槲皮素通过PI3K/Akt信号通路发挥抗细胞凋亡作用

与空白对照组比较,PI3K 抑制剂组细胞凋亡明显增多,而大剂量槲皮素和PI3K 激动剂处理后细胞凋亡均得到明显抑制(图2)。蛋白质印迹法检测结果显示,与空白对照组比较,PI3K 抑制剂组磷酸化 Akt/Akt 比值和 Bcl-2 表达水平均明显下降(均 $P<0.05$),活化型 caspase-3/caspase-3 比值及 BAX、细胞色素 C 表达水平均明显上升(均 $P<0.01$);大剂量槲皮素和PI3K 激动剂处理后 Akt 磷酸化水平、Bcl-2 表达水平均明显上升(均 $P<0.05$),活化型 caspase-3/caspase-3 比值及 BAX、细胞色素 C 表达水平均明显下降(均 $P<0.01$),见附图9和表4。结果提示,槲皮素通过调控PI3K/Akt 信号通路抑制细胞凋亡。

3 讨 论

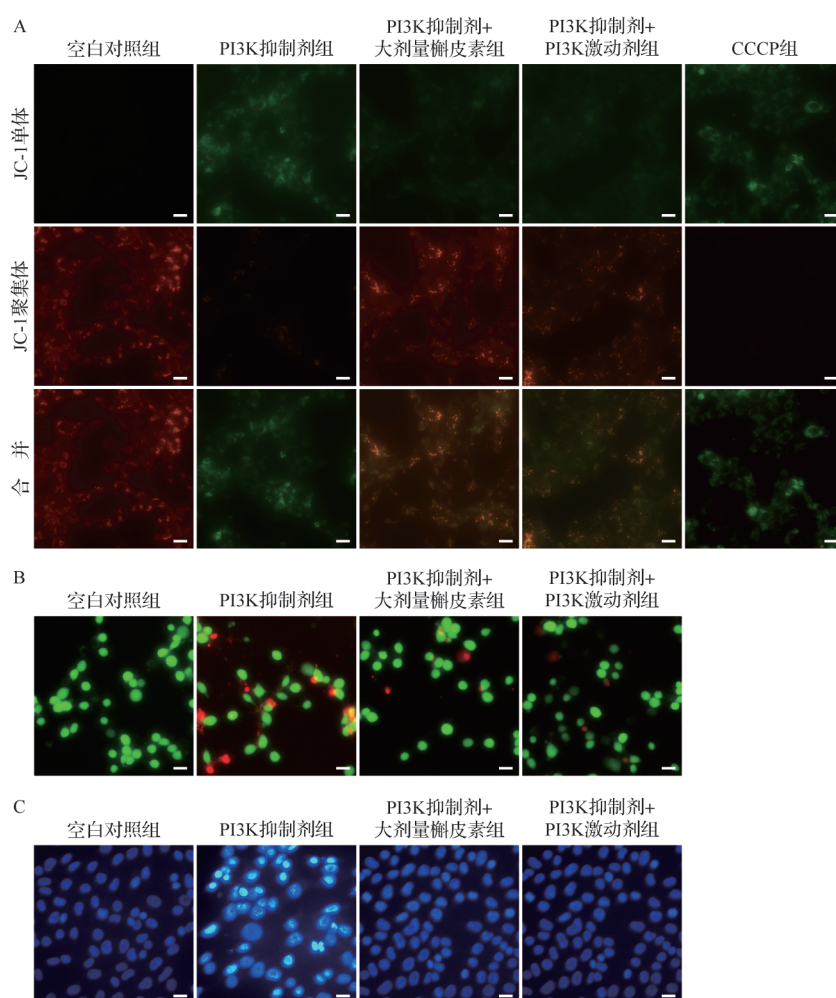
中医认为“肾虚髓减”是AD 的核心病机,左归丸出自《景岳全书》,具有滋阴补肾、填精益髓之功,以其治疗AD 符合“肾虚髓减”的核心病机。现代药理学和临床研究表明,左归丸可通过调控炎症因子平衡、增强抗氧化防御系统、抑制凋亡级联反应、改善线粒体动力学及能量代谢、上调神经营养因子表达及调节单胺类神经递质等途径,发挥神经保护、抗抑郁及整体功能调节的作用^[4]。本文资料结合网络药理学、分子对接和体外实验,探讨了左归丸及其关键活性成分治疗

AD 的潜在靶点和作用机制。

在网络药理学、分子对接研究中,首先通过TCMSP、PubChem 和 BATMAN-TCM 数据库获取左归丸的45个活性成分,并通过SwissTargetPrediction 和 BATMAN-TCM 数据库获取其潜在靶点,最终确定了159个药物靶点。结合AD 相关靶基因,最终筛选出左归丸治疗AD 的80个潜在靶点。Cytoscape 3.10.1 软件分析结果显示,槲皮素、山柰酚和豆甾醇是度值较高的化合物。构建的PPI 网络结合MCC、MNC、度值三种算法分析显示,左归丸治疗AD

的核心靶点包括Akt1、GSK-3 β 、PIK3R1、EGFR、SRC 等。GO 和KEGG 分析表明治疗AD 的潜在靶点主要富集在PI3K/Akt 等信号通路。而且,分子对接结果显示,槲皮素与核心靶点Akt1 具有较好的结合能力。综上,左归丸的关键活性成分槲皮素可能通过调控PI3K/Akt 信号通路发挥对AD 的治疗作用。

既往研究发现,槲皮素可通过提高抗氧化酶的表达,清除过量活性氧,减轻神经元的氧化损伤^[5-6];槲皮素能抑制脂质过氧化物的形成,阻断由氧化应激引发的细胞凋亡,并表现出对A β 沉积和 τ 蛋白磷酸化的抑制作用,减轻其引起的神经毒性和突触功能障碍^[7]。槲皮素还可通过调节线粒体相关凋亡通路,抑制BAX、caspase-3 活性,减少细胞色素C 释放,进而抑制细胞凋亡^[8-9]。在神经炎症方面,槲皮素通过抑制核因子 κ B 和丝裂原激活的蛋白激酶信号通路,降低促炎性细胞因子的表达,减轻中枢神经系统的炎症反应^[10]。此外,槲皮素还能通过抑制胆碱酯酶活性,增加乙酰胆碱水平,改善认知功能^[11-12]。因此,槲皮素在AD 治疗中显示出神经保护潜力。本文资料通过体外实验也证实了槲皮素能抑制神经细胞凋亡、改善AD 病理进程,且该作用可能与PI3K/Akt 信号通路相关。在A β ₁₋₄₂ 寡聚体诱导的AD 模型细胞中,槲皮素剂量依赖性地逆转了细胞损伤,激活由A β ₁₋₄₂ 寡聚体抑制的PI3K/Akt 信号通路,上调Bcl-2 的表达,并抑制活化型caspase-3/caspase-3 比值、BAX



A: JC-1 染色: 与空白对照组比较, PI3K 抑制剂组细胞凋亡明显增加, 表现为绿色荧光(低膜电位)明显增强; 大剂量槲皮素和 PI3K 激动剂处理后红色荧光(高膜电位)明显增强, 表明槲皮素能改善 PI3K 抑制剂诱导的细胞凋亡. B: 钙黄绿素 AM/碘化丙啶染色: 绿色荧光代表活细胞, 红色荧光代表死亡细胞. 与空白对照组比较, PI3K 抑制剂组呈现更强的红色荧光; 槲皮素和 PI3K 激动剂处理后绿色荧光明显增强. C: Hoechst 33342 染色: 正常细胞的细胞核呈均匀蓝色荧光, 形态规则; 凋亡细胞的细胞核则呈亮蓝色荧光聚集块或紧缩形态. 与空白对照组比较, PI3K 抑制剂组细胞核染色质明显凝聚, 细胞凋亡明显增加, 槲皮素和 PI3K 激动剂处理后细胞核染色质凝聚明显减少, 细胞形态得以恢复. 标尺=20 μm . PI3K: 磷脂酰肌醇 3 激酶; CCCP: 羧化羰基-3-氯苯胺.

图2 槲皮素对 PI3K 抑制剂诱导的 HT22 细胞凋亡的抑制作用

Figure 2 Inhibitory effect of quercetin on PI3K inhibitor LY294002 induced apoptosis in HT22 cells

和细胞色素 C 的表达。与此同时, JC-1、Hoechst 33342 和钙黄绿素 AM/碘化丙啶染色结果也表明, 槲皮素能明显缓解 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体诱导的 AD 模型细胞凋亡。表明槲皮素可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路发挥抗凋亡作用, 从而改善 AD 病理进程。

已有研究显示, PI3K/Akt 信号通路的活性在 AD 早期即明显受到抑制, 这一变化对 $\text{A}\beta$ 代谢产生重要影响^[13]。PI3K 激活 Akt, 从而磷酸化多个

底物, 包括多个重要的凋亡调节因子^[14]。活化的 Akt 能够通过磷酸化叉头框蛋白质 O 从而下调 BAX 的转录^[15-16]; 磷酸化 BAD 以解除 BAD 对 Bcl-2 的抑制作用^[17]; 磷酸化 GSK-3 β 的 Ser9 位点抑制其激酶活性, 进而阻断 caspase-9 与 caspase-3 之间的级联反应^[18-19]; 磷酸化并抑制 GSK-3 β 活性, 进而阻断线粒体外膜通透性增加, 减少细胞色素 C 释放^[18-21], 最终抑制细胞凋亡。因此, PI3K/Akt 信号通路可能是治疗 AD 的关键通路。为进一步探讨槲皮素是否通过 PI3K 调控 Akt 而发挥对 AD 的保护作用, 本文资料显示, PI3K 抑制剂 LY294002 处理后 HT22 细胞活性及磷酸化 Akt/Akt 比值、Bcl-2 表达水平均显著下降, 而活化型 caspase-3/caspase-3 比值及 BAX、细胞色素 C 表达水平则显著上升; 同时, JC-1、Hoechst 33342 和钙黄绿素 AM/碘化丙啶染色显示细胞凋亡明显增加, 而上述变化可被槲皮素和 PI3K 激动剂 EGF 逆转。表明槲皮素对 AD

的保护作用是通过调控 PI3K/Akt 信号通路抑制神经元细胞凋亡来实现。

然而, 本文资料存在一定的局限性。如目前仅在 $\text{A}\beta_{1-42}$ 寡聚体诱导的 HT22 细胞中验证, 尚未扩展至其他 AD 细胞模型及动物模型, 不同模型对槲皮素的反应可能存在差异, 其长期疗效和安全性也有待体内外实验进一步验证。此外, 槲皮素虽然通过 PI3K/Akt 信号通路展现了明显的神经保护作用, 但该通路的具体机制仍需深入研

表4 PI3K抑制剂和槲皮素作用后HT22细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白质表达水平比较

Table 4 Comparison of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins expression levels in HT22 cells following treatment with PI3K inhibitor LY294002 and quercetin

($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	磷酸化Akt/Akt	活化型caspase-3/caspase-3	BAX	Bcl-2	细胞色素C
空白对照组	1.00±0.11	1.00±0.06	1.00±0.10	1.00±0.07	1.00±0.05
PI3K抑制剂组	0.61±0.21*	1.44±0.12**	1.37±0.06**	0.75±0.05*	1.19±0.03**
PI3K抑制剂+大剂量槲皮素组	1.07±0.27#	0.95±0.16##	0.95±0.07##	1.16±0.16##	0.87±0.04##
PI3K抑制剂+激动剂组	1.12±0.18#	0.74±0.16##	1.01±0.06##	1.18±0.17##	0.89±0.02##

与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与PI3K抑制剂组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$. PI3K: 磷脂酰肌醇3激酶; Akt: 蛋白激酶B; caspase-3: 胱天蛋白酶3; Bcl-2: B细胞淋巴瘤2; BAX: Bcl-2相关X蛋白.

究。未来的研究应进一步探讨槲皮素对AD相关通路的调节效应,并评估其与现有AD治疗药物的协同作用,充分挖掘槲皮素在AD治疗中的临床应用潜力。

本文附加文件见电子版。



志谢 本研究得到国家自然科学基金(82405265)、广东省基础与应用基础研究基金(2023A1515110832)、深圳市科技计划(JCYJ20230807094801002)和深圳市中医院“3030计划”中医临床研究项目(G3030202101)支持。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李珊珊硕士研究生在网络药理学分析过程中给予专业建议并指导数据分析。《浙江大学学报(医学版)》编辑部余方、沈洁等编辑对论文提出修改建议

Acknowledgements This study was supported by National Natural Science Foundation of China (82405265), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2023A1515110832), Shenzhen Science and Technology Program (JCYJ20230807094801002), and “3030 Plan” TCM Clinical Research Project of Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital (G3030202101). Master’s student LI Shanshan from the Department of Neurology and Psychology of the Fourth Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine and Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital provided professional advice and guidance on the network pharmacology and data analysis. Senior editor SHEN Min, editor YU Fang, editor SHEN Jie and other editorial staff from the Editorial Department of *Journal of Zhejiang University (Medical*

Sciences) provided valuable suggestions for the revision of this manuscript

作者贡献 李光亚、李沛泽、黄柳玲、朱静文、秦秀德和陆韵薇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 LI Guangya, LI Peize, HUANG Liuling, ZHU Jingwen, QIN Xiude and LU Yunwei 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:417213243@qq.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 E-mail: 417213243@qq.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] CAO Z, KONG F, DING J, et al. Promoting Alzheimer’s disease research and therapy with stem cell technology[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2024, 15(1): 136.
[2] YANG F, LIM G P, BEGUM A N, et al. Curcumin inhibits formation of amyloid β oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid *in vivo*[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(7): 5892-5901.

- [3] CHAN Y, CHEN W, WAN W, et al. $A\beta_{1-42}$ oligomer induces alteration of tight junction scaffold proteins via RAGE-mediated autophagy in bEnd. 3 cells[J]. **Exp Cell Res**, 2018, 369(2): 266-274.
- [4] 王 博, 谢 萍, 吕虹丽, 等. 左归丸治疗中枢神经系统疾病的临床应用及作用机制研究进展[J]. **中医药信息**, 2025, 42(8): 70-77.
WANG Bo, XIE Ping, LYU Hongli, et al. Clinical applications and mechanism research progress of Zuogui pill in treating central nervous system diseases[J]. **Information on Traditional Chinese Medicine**, 2025, 42(8): 70-77. (in Chinese)
- [5] KAUR K, KULKARNI Y A, WAIRKAR S. Exploring the potential of quercetin in Alzheimer's disease: pharmacodynamics, pharmacokinetics, and nanodelivery systems[J]. **Brain Res**, 2024, 1834: 148905.
- [6] DAJAS F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin[J]. **J Ethnopharmacol**, 2012, 143(2): 383-396.
- [7] KHAN H, ULLAH H, ASCHNER M, et al. Neuroprotective effects of quercetin in Alzheimer's disease[J]. **Biomolecules**, 2019, 10(1): 59.
- [8] 朱玲玲, 赵捷平, 窦勤玲, 等. 线粒体凋亡途径在槲皮素诱导 U937 细胞凋亡中的作用研究[J]. **中国免疫学杂志**, 2018, 34(10): 1466-1471.
ZHU Lingling, ZHAO Jieping, DOU Qinling, et al. Experimental study of mitochondrial apoptosis pathway on quercetin-induced apoptosis in U937 cells[J]. **Chinese Journal of Immunology**, 2018, 34(10): 1466-1471. (in Chinese)
- [9] 赵雨薇, 戴月英, 甄艳杰, 等. 槲皮素对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 PC12 细胞线粒体途径凋亡的雌激素样神经保护作用[J]. **中国药理学通报**, 2022, 38(7): 993-999.
ZHAO Yuwei, DAI Yueying, ZHEN Yanjie, et al. The estrogen-like protective effect of quercetin on $A\beta_{25-35}$ induced apoptosis in mitochondrial pathway of PC12 cells[J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2022, 38(7): 993-999. (in Chinese)
- [10] AHMAD ANSARI M, ABDUL H M, JOSHI G, et al. Protective effect of quercetin in primary neurons against Abeta(1-42): relevance to Alzheimer's disease[J]. **J Nutr Biochem**, 2009, 20(4): 269-275.
- [11] 刘丽莹, 孔 荐, 管清燕, 等. 槲皮素对阿尔茨海默病的作用机制研究新进展[J]. **药学研究**, 2022, 41(1): 48-52, 63.
LIU Liying, KONG Jian, GUAN Qingyan, et al. Research progress on the mechanism of quercetin on Alzheimer's disease[J]. **Journal of Pharmaceutical Research**, 2022, 41(1): 48-52, 63. (in Chinese)
- [12] WILLIAMS R J, SPENCER J P E. Flavonoids, cognition, and dementia: actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease[J]. **Free Radic Biol Med**, 2012, 52(1): 35-45.
- [13] PAN J, YAO Q, WANG Y, et al. The role of PI3K signaling pathway in Alzheimer's disease[J]. **Front Aging Neurosci**, 2024, 16: 1459025.
- [14] HE X, LI Y, DENG B, et al. The PI3K/AKT signalling pathway in inflammation, cell death and glial scar formation after traumatic spinal cord injury: mechanisms and therapeutic opportunities[J/OL]. **Cell Prolif**, 2022, 55(9): e13275.
- [15] 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.
- [16] ZHANG X, TANG N, HADDEN T J, et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2011, 1813(11): 1978-1986.
- [17] DEL PESO L, GONZÁLEZ-GARCÍA M, PAGE C, et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt[J]. **Science**, 1997, 278(5338): 687-689.
- [18] ROMORINI L, GARATE X, NEIMAN G, et al. AKT/GSK3 β signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival[J]. **Sci Rep**, 2016, 6: 35660.
- [19] PENG Y, CHI R, LIU G, et al. Aerobic exercise regulates apoptosis through the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway to improve cognitive impairment in Alzheimer's disease mice[J]. **Neural Plast**, 2022, 2022: 1500710.
- [20] OZPAK L, BAĞCA B G. Neuroprotective effects of resveratrol through modulation of PI3K/Akt/GSK-3 β pathway and metalloproteases[J]. **IUBMB Life**, 2024, 76(12): 1199-1208.
- [21] SUSHMA, SAHU M R, MURUGAN N A, et al. Amelioration of amyloid- β induced Alzheimer's disease by *Bacopa monnieri* through modulation of mitochondrial dysfunction and GSK-3 β /wnt/ β -catenin signaling[J/OL]. **Mol Nutr Food Res**, 2024, 68(13): e2300245.

[本文编辑 余 方 沈 洁]