DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250902005
引用格式: 张毅, 岳瑞雪, 朱红, 等. 紫甘薯花青素抗氧化应激作用的网络药理学与细胞实验研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 17(2): 237–247.
ZHANG Y, YUE RX, ZHU H, *et al*. Network pharmacology and cellular evidence for purple sweet potato anthocyanins against oxidative stress [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 17(2): 237–247. (in Chinese with English abstract).

紫甘薯花青素抗氧化应激作用的网络药理学与细胞实验研究

张 毅, 岳瑞雪, 朱 红, 张文婷, 马 晨, 邓少颖, 郭 昊, 孙 健*
(江苏徐淮地区徐州农业科学研究所, 徐州 221131)

摘 要: 目的 探究紫甘薯花青素(purple sweet potato anthocyanins, PSPA)对氧化应激的抑制作用, 并阐明其分子机制。**方法** 通过公共数据库筛选 PSPA 活性成分与氧化应激相关靶点, 获取交集靶点, 并进行基因本体(gene ontology, GO)与京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析, 以初步阐明其潜在机制。采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导 BV2 小胶质细胞建立氧化应激模型, 分别给予低、高剂量 PSPA 干预, 通过酶联免疫吸附试验检测一氧化氮(nitric oxide, NO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量以及过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性; 运用 Hoechst 染色与流式细胞术检测细胞凋亡情况; 采用 Western blot 法检测相关蛋白表达。**结果** PSPA 主要活性成分为芍药素和矢车菊素, 通过网络药理学共筛选出 253 个 PSPA 作用靶点与 1178 个氧化应激相关靶点, 交集靶点 86 个。拓扑分析提示 PSPA 可能通过作用于蛋白激酶 Bα 型(protein kinase B alpha, AKT1)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1)等核心靶点抵抗氧化应激。分子对接结果显示 PSPA 与排名前 3 的核心靶点均具有良好的结合活性。GO 和 KEGG 富集分析表明, PSPA 参与调控胞质溶胶、细胞质等细胞组分; 涉及磷脂酰肌醇 3-激酶/RAC-*α* 丝氨酸/蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)信号通路激活、蛋白质磷酸化等生物过程; 并通过化学致癌-活性氧通路等多途径发挥抗氧化应激作用。细胞实验表明, PSPA 能显著降低 NO 和 MDA 水平, 提升 GSH 含量与 CAT 和 SOD 活性, 抑制细胞凋亡, 并调控 PI3K/AKT 磷酸化水平。**结论** PSPA 可有效缓解 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞氧化应激损伤, 其机制可能与激活 PI3K/AKT 信号通路有关。

关键词: 紫甘薯花青素; 网络药理学; 靶点; 氧化应激; 磷脂酰肌醇 3-激酶/RAC-*α* 丝氨酸/蛋白激酶 B 信号通路

收稿日期: 2025-09-02
基金项目: 国家甘薯产业技术体系项目(CARS-10); 农业农村部农产品加工与贮藏重点实验室开放课题项目(S2025KFKT-11); 江苏师范大学研究生科研创新计划项目(2024XKT1447)
第一作者: 张毅(1987—), 男, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为农产品产后加工。E-mail: zhangyijsnu@163.com
***通信作者:** 孙健(1979—), 男, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品加工。E-mail: sjsg9902@126.com

Network pharmacology and cellular evidence for purple sweet potato anthocyanins against oxidative stress

ZHANG Yi, YUE Rui-Xue, ZHU Hong, ZHANG Wen-Ting, MA Chen, DENG Shao-Ying, GUO Hao, SUN Jian*

(*Xuzhou Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Xuzhou District*, *Xuzhou* 221131, *China*)

ABSTRACT: Objective To investigate the inhibitory effect of purple sweet potato anthocyanins (PSPA) on oxidative stress, and elucidate its underlying molecular mechanism. **Methods** The potential targets of PSPA active components and oxidative stress were screened through public databases to obtain overlapping targets, which subsequently underwent gene ontology (GO) and kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses to preliminarily elucidate the underlying mechanisms. An oxidative stress model was established in BV2 microglial cells using lipopolysaccharide (LPS) induction. Cells were pretreated with low or high doses of PSPA. The levels of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), and the activity of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay. Apoptosis was assessed via Hoechst staining and flow cytometry, and related protein expression was analyzed by Western blot. **Results** The main active components of PSPA were identified as peonidin and cyanidin. Network pharmacology analysis identified 253 PSPA-related targets and 1178 oxidative stress-related targets, with 86 overlapping targets. Topological analysis suggested that PSPA might counteract oxidative stress by targeting key proteins such as protein kinase B alpha (AKT1), epidermal growth factor receptor (EGFR) and heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1). Molecular docking confirmed strong binding affinity between PSPA and the top 3 core targets. GO and KEGG analyses indicated that PSPA was involved in regulating cellular components such as the cytosol and cytoplasm; biological processes including activation of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signaling pathway and protein phosphorylation; and pathways related to chemical carcinogenesis–reactive oxygen species. Cellular experiments demonstrated that PSPA significantly reduced NO and MDA levels, increased GSH content and CAT and SOD activity, inhibited abnormal apoptosis, and modulated PI3K/AKT phosphorylation. **Conclusion** PSPA effectively alleviates LPS-induced oxidative stress damage in BV2 microglial cells, likely through direct activation of the PI3K/AKT signaling pathway.

KEY WORDS: purple sweet potato anthocyanins; network pharmacology; targets; oxidative stress; phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway

0 引 言

花青素(anthocyanins)作为一类重要的植物次生代谢产物, 是广泛存在于水果、蔬菜和谷物中的天然多酚化合物, 其独特的分子结构不仅赋予植物组织丰富的色彩表现, 更可作为食品工业中的高附加值功能性配料[1]。在众多花青素来源中, 紫甘薯因其高花青素含量、优异的结构稳定性[2]及广泛的生理功能[3–4]而备受关注。研究表明, 紫甘薯花青素(purple sweet potato anthocyanins, PSPA)主要包含芍药素(peonidin, Pn)、矢车菊素(cyanidin, Cy)等类黄酮苷元, 这些苷元通过槐糖或葡萄糖等糖基化, 并进一步与阿魏酸、咖啡酸及对羟基苯甲酸发生酰基化修饰, 形成结构多样的活性成分[5]。这种结构多样性赋予了 PSPA 多方面的生物活性。DAI 等[6]通过研究发现, 紫甘薯中的芍药素衍生物对肝损伤、氧化应激和纤维化具有显著的保护作用。在糖代谢调节方面, JANG 等[7]证实矢车菊素-3-咖啡酰-对羟基苯甲酰槐糖苷-5-葡萄糖苷能有效抑制人肝癌细胞(hepatocellular carcinoma cells, HepG2)的葡萄糖分泌, 表现出显著的降血糖活性。此外, CHEN 等[8]的研究结果表明, 天竺葵素-3-半乳糖苷可通过调节肠道菌群结构和抑制肠上皮细胞焦亡缓解溃疡性结肠炎。现有研究证据表明, PSPA 因其独特的结构特征而具有多方面的生理活性, 在功能食品领域具有广阔的开发前景。

氧化应激是指机体内氧化-抗氧化系统失衡, 导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)累积引发的氧化还原稳态失调, 进而诱发分子损伤与细胞功能障碍[9]。ROS 作为氧代谢衍生的高活性分子, 可通过线粒体电子传递链、还原型烟酰胺

腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶激活及外源性刺激(如紫外线、化学毒物)等途径生成。在生理浓度下, ROS 通过调控丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT)等信号通路, 参与细胞增殖、分化及免疫防御等过程, 形成“良性氧化应激”[10]。然而, 当 ROS 生成超过内源性抗氧化系统的清除能力时, 将引发脂质过氧化、蛋白质羰基化及脱氧核糖核酸氧化损伤, 最终导致衰老及相关疾病(如心血管疾病、神经退行性疾病)的发生[11]。具有邻苯二酚结构的花青素可通过供氢机制直接中和自由基, 形成稳定的半醌式中间体, 从而发挥自由基清除作用[12]。此外, 与糖链发生酰基化修饰的有机酸(如阿魏酸、咖啡酸等)同样具有抗氧化活性[13]。除直接清除 ROS 外, 花青素还可通过螯合金属离子[如 Fe(III)][14]、抑制脂质过氧化链式反应等途径缓解氧化应激损伤[15]。然而, 目前关于PSPA的分子靶点及通路调控机制尚未系统阐明[16]。

本研究整合网络药理学分析、分子对接技术及体外细胞实验, 系统解析 PSPA 的活性成分及其与氧化应激相关靶点的相互作用, 明确调控信号通路的分子机制, 为 PSPA 的功效和相关功能食品的开发提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

紫甘薯[徐紫薯 8 号, 种植于中国农业科学院甘薯研究中心贾汪科技创新基地(117.38°E, 34.49°N)]。

Hoechst 染色试剂盒(C0003)、Griess (S0021S)、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液(上海碧云天生物技术有限公司); 甲醇、乙醇、十二烷基硫酸钠(sodium lauryl sulfate, SDS)(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 氯化钾、乙酸胺、硫酸铵、柠檬酸、AB-8 大孔树脂(上海麦克林生化科技股份有限公司); 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、噻唑蓝(thiazoyl blue, MTT)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(美国 Sigma 公司); DMEM 培养基、胎牛血清、乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)、胎牛血清(10099-141)(美国 Gibco 公司); Annexin V-FITC 双染细胞凋亡检测试剂盒(BB-4101-50T, 上海贝博生物科技有限公司); 丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(A003-4-1)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(A006-2-1)、过氧化氢酶(catalase, CAT)测定试剂盒(A007-1-1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(A001-3-2)(南京建成生物工程研究所); GAPDH(AF7021)兔源一抗(江苏 Affinity 公司); PI3K 兔源一抗(ab302958)、p-PI3K 兔源一抗(ab127617)、AKT 兔源一抗(ab8805)、p-AKT 兔源一抗(ab38449)及二抗(英国 Abcam 公司); Pierce™ BCA 蛋白检测试剂盒(A65453, 美国赛默飞世尔科技有限公司); 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(美国 Merck Millipore 公司)。

1.2　仪器与设备

24D×48 GPFD 25L ES-53°冷冻干燥机(美国 SP Scientific 公司); FST-EDI-500 纯水系统(江苏普力菲尔公司); FA1604 精密电子天平(精度 0.1 mg, 上海精密科学公司); UV2450 紫外分光光度计(日本 SHIMADZU 公司); ST16R 冷冻离心机、Multiskan FC 酶标仪、Midi 40CO_2 细胞培养箱(美国赛默飞世尔科技有限公司); BCD-648 冰箱(青岛海尔公司); ABS-MS-078 恒温混匀仪(美国 ABSON 公司); Axioskop 40 荧光生物显微镜(德国 Zeiss 公司); Beckman Cytoflex SRT 流式细胞仪(德国 Beckman 公司); Mini Protean II 垂直平板电泳槽及 Trans-Blot 转印槽(美国 Bio-Rad 公司); 5600 型化学发光成像系统(上海勤翔公司); Triple Quad 3500 液质联用仪(美国 SCIEX 公司)。

1.3　PSPA 制备、含量和组分测定

将清洗后的徐紫薯 8 号块根切成 4 mm×4 mm×4 mm 的小块, 按块根与硫酸铵、40%乙醇(含 0.5%柠檬酸)和蒸馏水的料液比 2:4:10:11 (mL/g)混合, 采用循环超声波辅助法进行提取。提取条件为超声功率 800 W、温度 60 ℃、时间 2 h。提取液于 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并经真空浓缩。浓缩液经 AB-8 大孔树脂柱吸附, 采用 70%乙醇溶液以 1 mL/min 流速洗脱目标组分。洗脱液经真空浓缩后冷冻干燥, 获得 PSPA 提取物。采用 pH 示差法[17]测定花青素含量, 采用高效液相色谱-质谱法[18]检测花青素的主要组成成分。

1.4　网络药理学分析

1.4.1　PSPA 的相关靶点预测和筛选

从 TCMSP 数据库(https://tcmspw.com/tcmsp.php)中获取 Peonidin (MOL006765) 和 Cyanidin 3-glucoside (MOL008549)的结构文件(mol2 格式), 并提取其潜在靶点基因。从 PubChem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)获取结构文件(sdf 格式), “sdf”文件提交至 SwissTargetPrediction 平台(http://www.swisstargetprediction.ch)进行靶点预测。“mol2”文件提交至 PharmMapper 服务器(http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper), 以标准化拟合分数> 0.6 为阈值筛选靶点。整合 TCMSP、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 3 个来源的预测靶点, 利用 UniProt 数据库进行基因注释, 统一转换为“Gene Symbol”命名, 去冗余后获得 PSPA 的作用靶点集。最终使用 Cytoscape 3.10.1 软件构建 PSPA 抗氧化应激的“活性成分-靶点”网络图。

1.4.2　氧化应激的相关靶点预测和筛选

使用 OMIM (https://www.omim.org)、GeneCards

(https://www.genecards.org)和 DisGeNET (https://disgenet.com)数据库, 以“oxidative stress”为关键词检索疾病相关靶点。在 GeneCards 数据库中, 以相关性评分>10 为阈值筛选靶点。整合并去冗余 3 个数据库的预测结果, 最终获得氧化应激相关疾病靶点集。

1.4.3 蛋白质互作网络构建与拓扑分析

将交集靶点输入 STRING 12.0 数据库(https://cn.string-db.org), 以置信度评分> 0.7 为阈值构建蛋白质互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)[19]。将 PPI 数据导入 Cytoscape 3.10.1 软件进行可视化及拓扑分析, 筛选 Betweenness Centrality、Closeness Centrality 和 Degree 值均高于均值的靶点为核心靶点。

1.4.4 交集靶基因的基因本体功能富集与京都基因和基因组百科全书通路富集分析

为了阐明交集靶基因在基因功能和信号通路中的作用, 将其导入 DAVID 数据库(https://david.ncifcrf.gov)开展基因本体(gene ontology, GO)功能富集与京都基因和基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析[20], 按显著性(*P*)排序后筛选前 10 位显著富集条目, 通过微生信在线分析平台(https://www.bioinformatics.com.cn), 绘制 GO 富集柱状图与 KEGG 通路气泡图。

1.4.5 分子对接验证

基于 PPI 网络拓扑分析, 选取 Degree 值排名前 3 的靶点, 在 RCSB PDB 数据库(https://www.rcsb.org)中下载高分辨率三维结构文件(pdb 格式)。通过 AutoDock Tools 1.5.6 对蛋白结构进行预处理, 包括去除水分子、加氢, 并保存为受体文件(pdbqt 格式)。小分子配体同样通过 AutoDock Tools 加氢、设定可旋转键并输出为配体文件(pdbqt 格式)。将受体与配体文件导入 AutoDock Tools, 以蛋白活性位点为中心设置 Grid Box, 生成网格参数文件(gpf 格式)。执行 AutoDock 4 分子对接并提取结合自由能(Δ*G*), 最终采用 PyMOL 2.5.0 进行可视化[21]。

1.5 细胞实验

1.5.1 细胞培养、细胞活力和一氧化氮释放量检测

BV2 小胶质细胞接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 采用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 完全培养基, 在 37 ℃、5% CO_2、90%相对湿度的培养箱中常规培养, 每 2 d 更换一次培养液。待细胞生长至 80%浓度时, 按传代比 1:2(瓶:瓶)进行传代。取 10 代以内且生长状态良好的细胞用于构建 LPS 诱导的氧化应激损伤模型[22]。采用 MTT 法[23]检测细胞活力。细胞以 3×10^4 个/cm^2 的密度接种于 96 孔板, 加入质量浓度 1 μg/mL 的 LPS 以及分别与质量浓度 10~200 μg/mL 的 PSPA 共处理细胞 24 h。孵育结束后, 每孔加入 20 μL 的 5.0 mg/mL 的 MTT 试剂, 继续在 37 °C 下孵育 4 h。将 MTT 甲臜结晶溶解于 150 μL 的 DMSO 中, 使用酶标仪在 490 nm 波长处测量吸光度。各组细胞处理结束后, 于 1000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀细胞, 经研磨破碎后, 使用 Griess 试剂法[23]测定一氧化氮(NO)浓度。

按照筛选的浓度, 将细胞随机分为 4 组: 对照组(无任何处理)、LPS 组(加入 1 μg/mL LPS)、低剂量 PSPA 干预组(加入 50 μg/mL PSPA 与 1 μg/mL LPS)及高剂量 PSPA 干预组(加入 100 μg/mL PSPA 与 1 μg/mL LPS)。

1.5.2 细胞中 MDA 和 GSH 含量、CAT 和 SOD 活性检测

采用市售试剂盒分别测定各组细胞中 MDA 和 GSH 的含量以及 CAT 和 SOD 的活性, 严格按照说明书步骤进行测定。

1.5.3 细胞凋亡检测

Hoechst 染色法检测细胞凋亡。2000 r/min 离心收集细胞于 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 固定液重悬细胞, 室温固定 10 min。离心弃去固定液, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗细胞。离心后弃大部分上清, 保留 50 μL 液体将细胞沉淀轻柔重悬。取细胞悬液滴加于载玻片上, 室温稍晾干使细胞贴附。均匀滴加 0.5 mL Hoechst 33258 染色工作液, 避光条件下室温孵育 5 min。弃染色液, PBS 清洗后滴加抗荧光淬灭封片液, 并盖上盖玻片, 最后于荧光显微镜检测呈蓝色的细胞核。

采用市售细胞凋亡试剂盒检测细胞的凋亡水平, 将重悬细胞中依次加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶(propidium iodide, PI)染料各 5 μL, 室温避光孵育 15 min 后, 流式细胞仪检测。

1.5.4 蛋白表达检测

通过 Western Blot 法检测 BV2 小胶质细胞中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的表达水平。采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)按分子量大小分离后, 通过湿式转印法将蛋白转移至 PVDF 膜。随后, 使用含 5%胎牛血清的封闭液室温封闭 PVDF 膜 1 h。封闭结束后, 以含 Tween 的 Tris 缓冲盐溶液(tris-buffered saline with tween, TBST)清洗 PVDF 膜, 并置于按适当比例稀释的一抗(p-PI3K、PI3K、p-AKT 及 AKT)中, 4 ℃孵育 12 h。取出膜后, 以 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min; 随后与辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗室温避光孵育 1 h, 再次以 TBST 清洗。最后, 采用 ECL 显影液处理 PVDF 膜, 利用化学发光成像系统检测目标蛋白条带, 并通过 Image J 1.54g 对图像进行灰度分析。

1.6 数据处理

实验结果使用 DPS 9.50 进行数据处理, 数据以“平均数±标准偏差”展示。两组数据之间的比较采用 *t* 检验; 多组数据之间的比较采用单因素方差分析。每个实验至少重复 3 次。$P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著。使用 Origin 2021 软件作图。

2　结果与分析

2.1　确定与 PSPA 抗氧化应激相关的靶点

分别从 TCMSP、SwissTargetPrediction 和 PharmMapper 数据库中获得了 13、113 和 177 个 PSPA 候选靶标, 在去除重复项后, 最终获得了 253 个靶点, 其中“芍药素”和“矢车菊素”分别检索到 151 和 181 个靶点。通过检索 OMIM、GeneCards 和 DisGeNET 数据库并删除重复的靶点, 总共获得了 1178 个与氧化应激相关的靶基因(图 1A)。采用 Venny 2.1.0 (https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)在线网站绘制维恩图, 得到 PSPA 和氧化应激的 86 个交集靶点(图 1B)。PSPA“活性成分-靶点”网络图由 89 个节点和 119 条边组成(图 1C), 直观展示了 PSPA 抗氧化应激作用的潜在机制。

2.2　PPI 网络构建与拓扑分析结果

将 PSPA 的 86 个干预氧化应激靶点导入 STRING 数据库以获得 PPI 网络, 并采用 Cytoscape 软件进行数据的可视化分析(图 2)。PPI 网络包含 79 个节点和 351 条边, 圆圈代表 PSPA 干预氧化应激的靶点, 边代表靶点之间的相互作用, “Degree”值是一个重要的拓扑属性。节点越大颜色越深, 其 Degree 值越大, 生物学功能越明显[24]。共筛选出 15 个核心靶点, 包括 AKT1、EGFR、HSP90AA1、SRC、ESR1、TNF、HSP90AB1、MAPK1、APP、MAPK8、ALB、MAPT、PTGS2、SIRT1 和 PPARG。

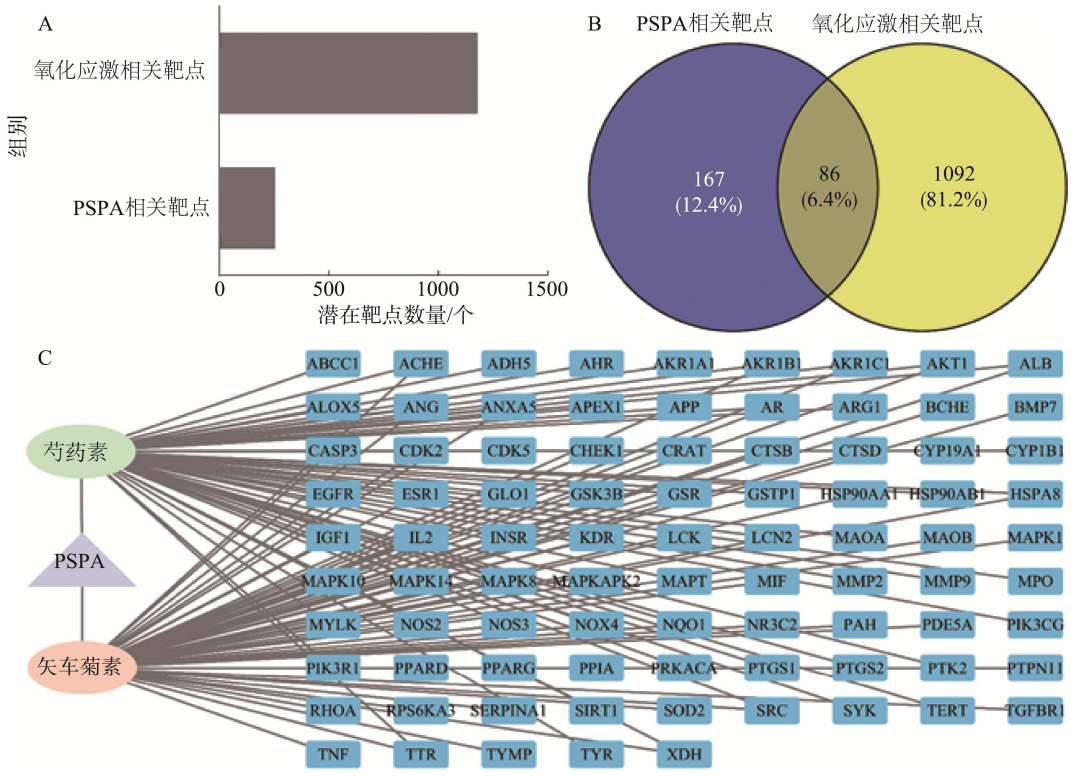
2.3　GO 富集和 KEGG 信号通路分析结果

GO 富集分析获得了 218 个生物过程(biological process, BP)、60 个细胞成分(cellular component, CC)和 112 个分子功能(molecular function, MF), 按 P 筛选出前 10 个分析结果如图 3。结果显示, 最主要的 BP 是凋亡过程负调控、基因表达负调控、PI3K/AKT 信号通路正调控和蛋白质磷酸化等; CC 结果表明, PSPA 对氧化应激的影响主要发生在胞质溶胶、细胞质、胞外外泌体和胞外区等; MF 中相同蛋白质结合、ATP 结合、蛋白激酶活性和酶结合等分子功能与 PSPA 缓解氧化应激症状有关。

KEGG 富集了 156 条通路, 显著性较强的前 10 条通路如图 4 所示, 其中与 PSPA 干预氧化应激相关性较强的通路涉及流体剪切应力与动脉粥样硬化、癌症通路、脂质与动脉粥样硬化和化学致癌-活性氧物种等, 这些通路大多与 PIK3R1、AKT1 和 MAPK1 等靶点有关。

2.4　PSPA 与核心靶点的分子对接验证

基于上述结果, 将芍药素和矢车菊素与前 3 个核心靶点进行分子对接, 验证化合物与核心靶点之间的分子对接活性, 结果见表 1。结合活性负值越大, 结合性能越好, 当结合能<–5 kcal/mol, 受体和配体被认为具有相对良好的结合性质[25], 芍药素和矢车菊素与靶蛋白 AKT1、EGFR 和 HSP90AA1 的预估结合能均小于–5 kcal/mol, 具有较强的



注: A. PSPA 与氧化应激对应潜在靶点的数量; B. PSPA 与氧化应激之间的交集靶点; C. “活性成分-靶点”网络图。

图 1　PSPA 与氧化应激相关基因之间的交集靶点

Fig.1　Intersection targets of PSPA and oxidative stress-related genes

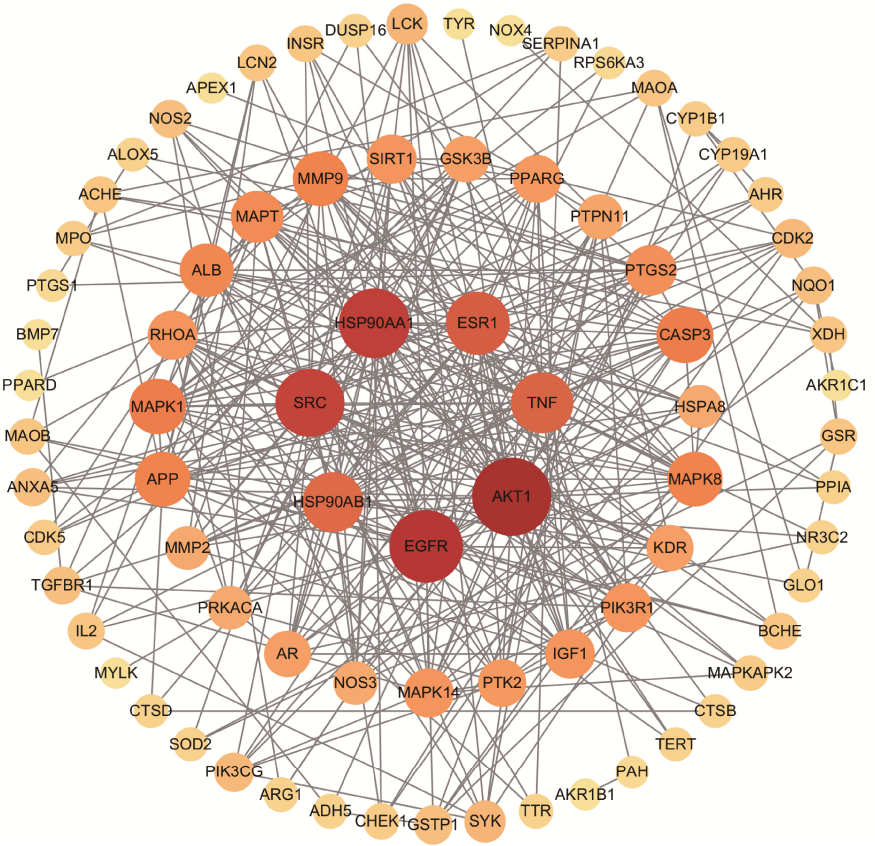
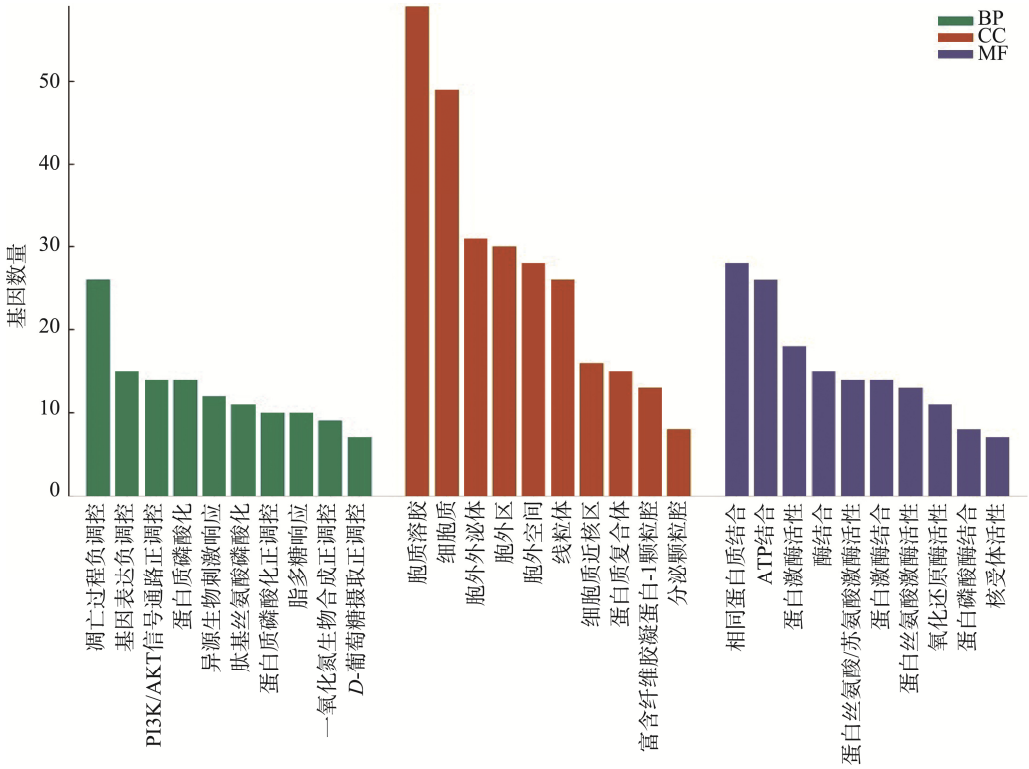


图 2 交集靶点的 PPI 网络

Fig.2 PPI network of intersection targets



注：三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)。

图 3 GO 功能富集分析柱状图

Fig.3 Bar plots of the GO function enrichment analysis

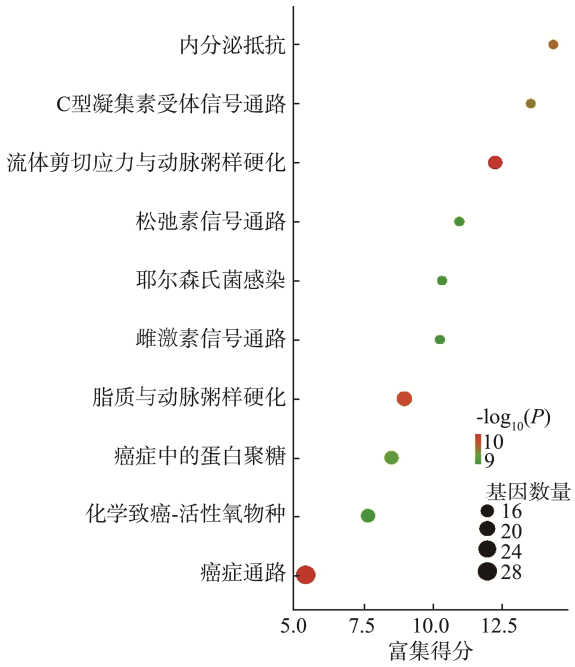


图 4　KEGG 通路富集分析气泡图

Fig.4　Enrichment bubble plots of KEGG pathways

结合亲和力。对接结果进行可视化(图 5), 结果进一步验证了网络药理学预测分析结果的可靠性。

2.5　PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活力和 NO 释放量的影响

由表 2 可知, PSPA 的主要成分为芍药素和矢车菊素, 天竺葵素含量极低。为评估 PSPA 对炎症条件下细胞活力的影响, 本研究通过 LPS 刺激 BV2 小胶质细胞建立氧化应激损伤模型, 并采用 MTT 法检测不同质量浓度 PSPA 对 LPS 诱导的细胞活性的作用。结果如图 6 所示, 当质量浓度为 10、50 和 100 μg/mL 的 PSPA 与 1 μg/mL 的 LPS 共孵育 24 h 后, 细胞存活率均保持在 90%以上, 表明在这些质量浓度下 PSPA 无明显细胞毒性; 而 200 μg/mL 的 PSPA 则使存活率降至 90%以下。因此, 后续选择 10、50 和 100 μg/mL 3 个质量浓度进行 NO 抑制实验。

氧化应激会引发严重组织损伤与炎症反应, 其中 NO 作为炎症进程中的关键介质, 其释放水平可反映炎症反应程度。采用 Griess 法检测 NO 的结果表明, 与 LPS 组相比, 50 μg/mL 和 100 μg/mL 的 PSPA 处理均显著抑制 NO 释放(P<0.01), 且抑制效果呈浓度依赖性; 10 μg/mL 的 PSPA 虽也可抑制 NO 生成(P<0.05), 但作用较弱。基于上述结果, 后续实验将低剂量设为 50 μg/mL, 高剂量设为 100 μg/mL。

2.6　PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞 MDA、GSH 含量和 CAT、SOD 活力的影响

MDA 是过量 ROS 攻击生物膜中多不饱和脂肪酸所产生的脂质过氧化终产物, 其含量可间接反映细胞受氧化损伤的严重程度。如图 7 与对照组相比, LPS 刺激显著提高了细胞内 MDA 水平(P<0.01); 而低剂量和高剂量的 PSPA 处理均能显著抑制 MDA 的升高(P<0.01)。GSH 作为机体内最重要的非酶性抗氧化分子, 其含量可反映整体抗氧化应激能力。低、高剂量 PSPA 处理均能显著逆转 LPS 诱导的 GSH 耗竭(P<0.01), 但两组间无统计学差异(P>0.05)。CAT 与 SOD 作为细胞内关键的抗氧化酶, 在清除 ROS 和增强抗氧化防御中起核心作用。实验结果显示, 低剂量 PSPA 处理可显著提高 CAT 和 SOD 的酶活性(P<0.05); 高剂量 PSPA 则进一步显著增强这两种酶的活性(P<0.01), 并表现出明显的浓度依赖性效应。

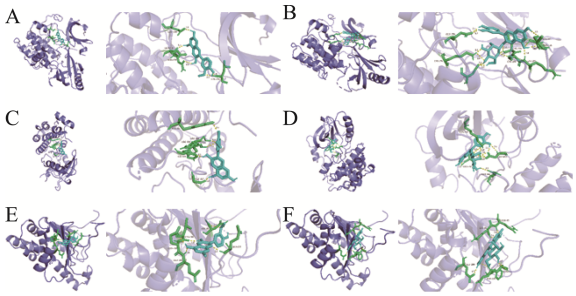
2.7　PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞凋亡的影响

氧化应激介导了线粒体依赖性凋亡通路的激活, 引发内源性氧化损伤的级联放大, 最终形成“氧化应激-细胞凋亡”循环[26]。如图 8, Hoechst 33258 染色结果显示(图 8A 和 C), 对照组正常细胞的细胞核呈正常的蓝色, 与对照组比较, LPS 组细胞核呈碎块状致密浓染, 颜色有些发白, DNA 氧化损伤逐渐增多(P<0.01)。与 LPS 组相比, 低剂量 PSPA 组细胞 DNA 氧化损伤均显著减轻(P<0.05), 而高剂量 PSPA 组抑制效果更显著(P<0.01)。使用 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒检测发现, LPS 诱导巨核细胞过度凋亡(图 8B 和 D), 低剂量和高剂量的 PSPA 处理后凋亡细胞数量明显降低(P<0.05), 表明 PSPA 具有抗氧化应激及抑制细胞凋亡的作用。

表 1　分子对接结果

Table 1　Results of molecular docking

序号	对接分子	对接靶点基因名称	UniProt ID	对接靶点蛋白质名称	ProteinData Bank ID	结合能/(kcal/mol)
1	芍药素	*AKT1*	P31749	蛋白激酶 Bα 型	4EJN	–6.98
2	矢车菊素					–6.63
3	芍药素	*EGFR*	P00533	表皮生长因子受体	3W2S	–7.26
4	矢车菊素					–7.11
5	芍药素	*HSP90AA1*	P07900	热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1	2XJX	–7.89
6	矢车菊素					–5.14



注: A: 芍药素-*AKT1*; B: 矢车菊素-*AKT1*; C: 芍药素-*EGFR*; D: 矢车菊素-*EGFR*; E: 芍药素-*HSP90AA1*; F: 矢车菊素-*HSP90AA1*。

图 5 PSPA 与排名前 3 的靶点分子对接模型

Fig.5 Molecular docking models of PSPA with the top 3 targets

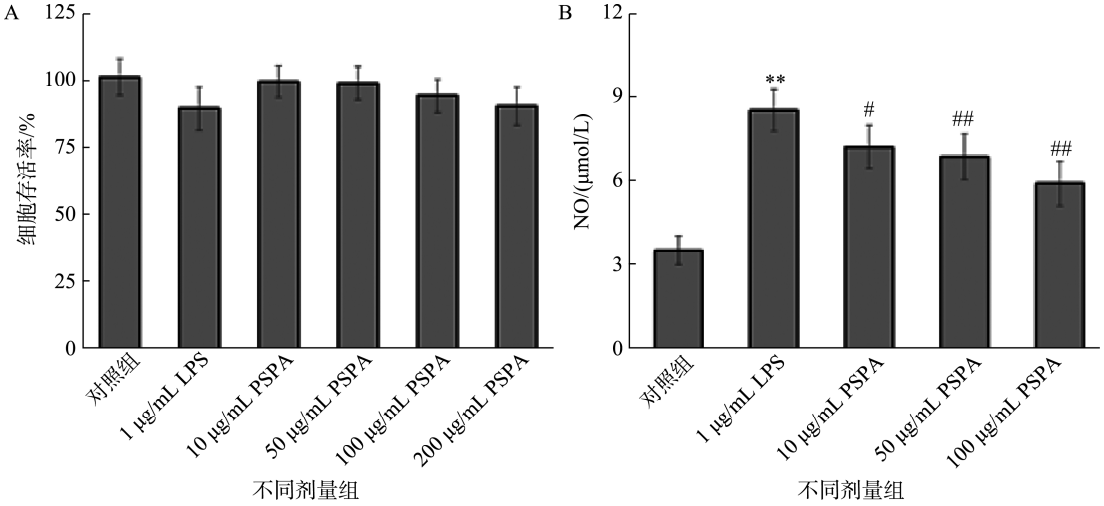
2.8 PSPA 对 PI3K/AKT 蛋白磷酸化水平的影响

通过 Western blot 法检测 PI3K 和 AKT 蛋白的磷酸化水平(图 9)。与对照组相比, LPS 刺激显著抑制了 PI3K/AKT 的活化; 与 LPS 组相比, 不同浓度 PSPA 处理均能显著逆转这一抑制效应。具体而言, 低、高剂量 PSPA 均显著上调了 BV2 小胶质细胞中 PI3K 的磷酸化水平(P<0.05); 在 AKT 方面, 低剂量 PSPA 显著升高其磷酸化水平(P<0.05), 高剂量 PSPA 的干预作用更为显著(P<0.01)。以上结果提示, PSPA 通过激活 PI3K/AKT 信号通路, 保护细胞免受氧化应激损伤。

表 2 基于 HPLC-MS/MS 的紫甘薯花青素鉴定与定量分析(n=3)

Table 2 Identification and quantification analysis of purple sweet potato anthocyanins based on HPLC-MS/MS (n=3)

序号	保留时间/min	化合物名称	标准曲线	r^2	质量浓度/(ng/mL)	含量/%
1	6.21	矢车菊素	Y=2.11×10^4X–273.14	0.998	4.91×10^{-1}±3.38×10^{-2}	41.29±1.05
2	6.76	天竺葵素	Y=3.08×10^5X–714.41	0.999	7.41×10^{-3}±4.13×10^{-4}	0.62±0.04
3	7.04	芍药素	Y=3.12×10^5X+244.23	0.992	6.90×10^{-1}±5.12×10^{-2}	58.08±1.08



注: 与对照组比较, **表示具有极显著性差异(P<0.01); 与 LPS 组比较, #表示具有显著性差异(P<0.05), ##表示具有极显著性差异(P<0.01), 图 7~9 同。

图 6 PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞活力的影响(n=6)

Fig.6 Effects of PSPA on the viability of LPS-induced BV2 microglial cells (n=6)

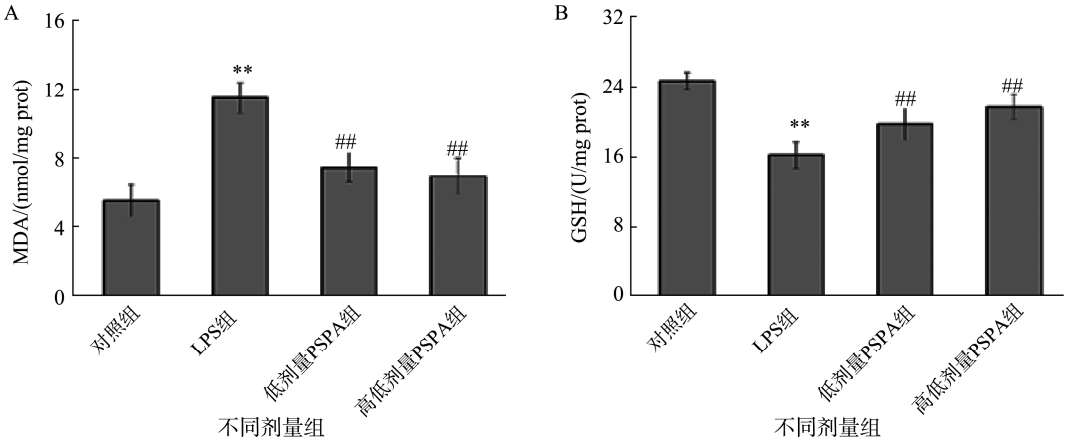


图 7 PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞 MDA、GSH 含量和 CAT、SOD 活力的影响(n=6)

Fig.7 Effects of PSPA on the content of MDA, GSH and the activity of CAT, SOD in LPS-induced BV2 microglial cells (n=6)

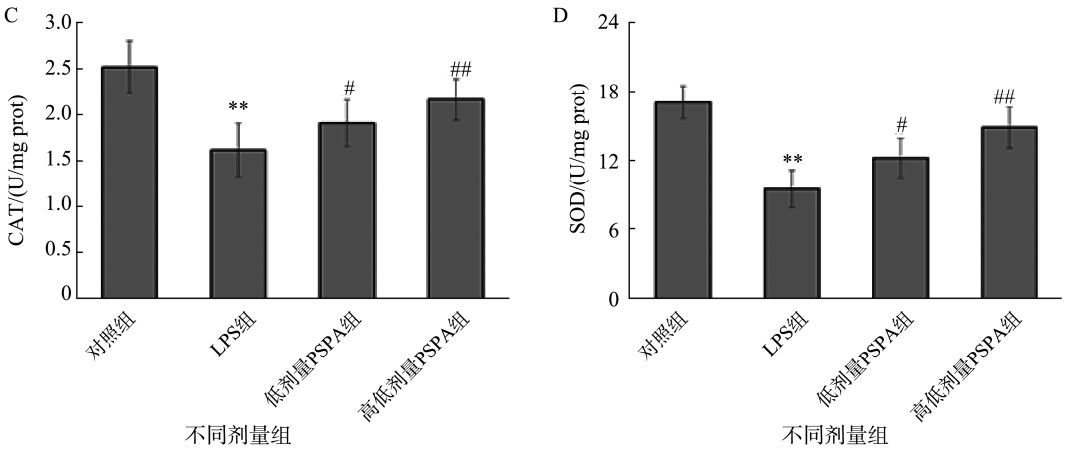


图 7(续)　PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞 MDA、GSH 含量和 CAT、SOD 活力的影响(n=6)

Fig.7　Effects of PSPA on the content of MDA, GSH and the activity of CAT, SOD in LPS-induced BV2 microglial cells (n=6)

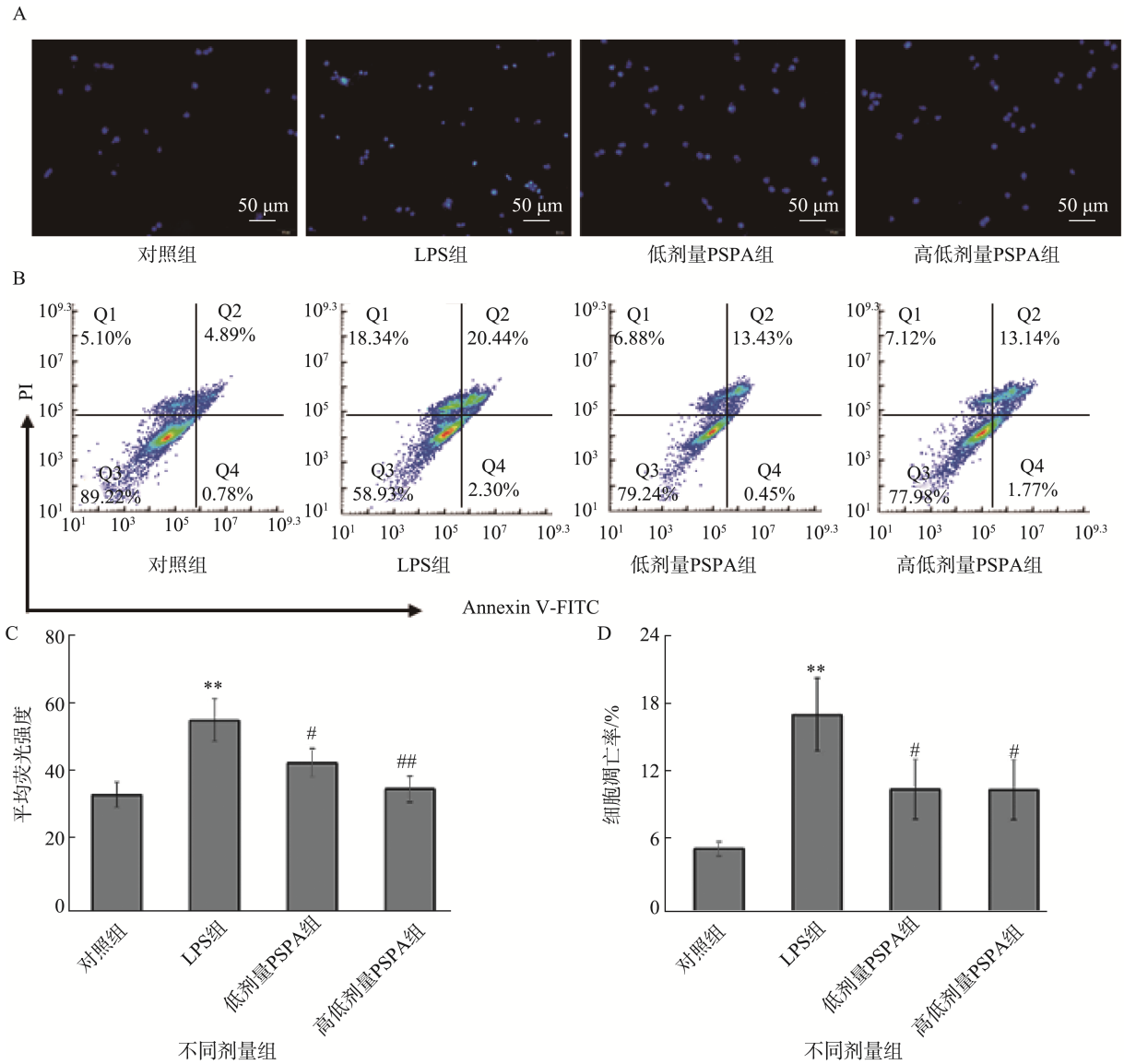


图 8　PSPA 对 LPS 诱导 BV2 小胶质细胞凋亡的影响(n=6)

Fig.8　Effects of PSPA on apoptosis in LPS-induced BV2 microglial cells (n=6)

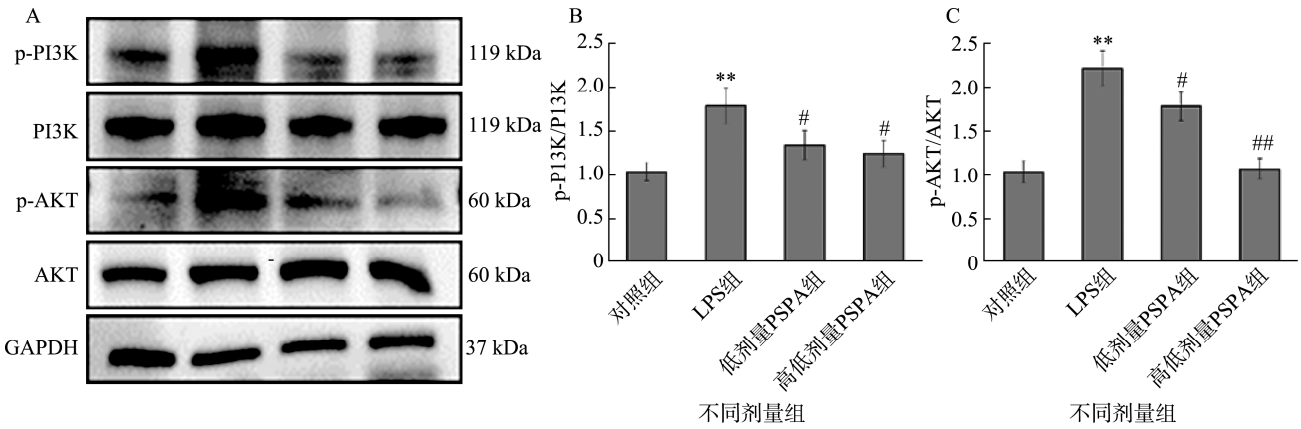


图 9 PSPA 对 PI3K/AKT 蛋白磷酸化水平的影响(n=3)

Fig.9 Effects of PSPA on the Phosphorylation Levels of PI3K/AKT proteins (n=3)

3 讨论与结论

本研究整合了网络药理学、分子对接与细胞实验, 从生物信息学预测到体外功能验证, 系统阐释了 PSPA 抗氧化应激的分子机制。在明确 PSPA 中芍药素和矢车菊素是主要组分基础上, 精准筛选出核心靶点, 通过分子对接证实了功能成分与靶点间具有强烈的结合活性, 为后续抗氧化应激作用机制的探索奠定了理论基础。

网络药理学分析揭示了 PSPA 抗氧化应激作用具有多靶点、通路的特征, 其中 *AKT1* 作为丝氨酸/苏氨酸激酶 AKT 的关键亚型, 广泛参与凋亡调控和葡萄糖代谢等生物学过程, 并通过抑制凋亡信号调节激酶的活性, 负向调控氧化应激所诱导的细胞凋亡[27]。*HSP90AA1* 作为 HSP90α 的编码基因, 是一种进化上高度保守的分子伴侣, 在 DNA 损伤修复、细胞周期进程、基因表达调控以及氧化应激相关的凋亡和自噬中发挥核心作用[28]。*EGFR* 作为一种酪氨酸激酶型跨膜受体, 可与蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)协同传递信号, 参与氧化应激与多条信号通路的调控[29]。分子对接结果进一步提示, PSPA 核心成分可能通过直接相互作用调节靶蛋白功能。GO 与 KEGG 富集分析结果表明, PSPA 的作用不仅涉及对细胞组分的调控, 更关键的是参与了包括“蛋白质磷酸化”“PI3K/AKT 信号通路正调控”在内的核心生物过程。其中, PI3K/AKT 信号通路作为调控细胞存活、增殖与代谢的关键枢纽, 其激活被广泛认为是抵抗氧化应激诱导细胞凋亡的重要机制[30]。预测结果将 PSPA 的作用机制直接指向了该经典通路, 为后续的实验验证提供了明确的方向。

花青素类成分在体内主要以葡萄糖醛酸苷形式被吸收并进入系统循环[31], 其较高的结构稳定性与生物利用度为其跨越血脑屏障和改善认知功能等提供了潜在的药理基础[32]。细胞实验结果表明, PSPA 能有效逆转 LPS 诱导的氧化损伤, 具体表现为显著降低促氧化介质 NO 和脂质过氧化终产物 MDA 的水平, 同时提升内源性抗氧化物质 GSH 的含量以及关键抗氧化酶 CAT 和 SOD 的活性。这些指标的综合改善, 证实了 PSPA 能够重塑细胞的氧化还原平衡, 从“消除过量 ROS”和“增强自身抗氧化防御”两个层面共同发挥作用。进一步地, Hoechst 染色与流式细胞术结果证实, PSPA 能有效抑制由氧化应激触发的异常细胞凋亡, 体现了其细胞保护效应。值得注意的是, PSPA 的抗氧化机制不仅限于直接清除活性氧[33], 更体现在通过多靶点、多通路介导的系统性调控作用。PI3K/AKT 通路作为细胞内重要的信号转导枢纽, 其活性受到 ROS 水平的动态调控[34], 而该通路的激活对维持细胞氧化还原稳态与抑制凋亡至关重要[35]。Western blot 验证了网络药理学的核心预测, PSPA 能够显著上调 LPS 抑制下的 p-PI3K 和 p-AKT 蛋白表达水平。这一发现从分子水平证实, PSPA 的抗氧化应激作用确实是通过激活 PI3K/AKT 信号通路来实现的。该通路的上游靶点如 EGFR 等可能被 PSPA 成分激活, 进而磷酸化并激活 PI3K, 产生的磷脂酰肌醇三磷酸[phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate, PIP3]招募并激活 AKT。活化的 AKT 可进一步促使核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2)发生核转位, 启动血红素氧合酶-1、CAT 和 SOD 等内源性抗氧化酶的表达[36], 并同时抑制 Bcl-2 相关死亡促进因子(bcl-2-associated death promoter, Bad)与胱天蛋白酶-9 (caspase-9)等凋亡相关因子的活性[37]。本研究在 PSPA 研究中将网络预测的靶点(AKT1)与功能表型(抗氧化、抗凋亡)通过 PI3K/AKT 信号通路的实验验证有机串联, 形成了“活性成分-核心靶点-关键通路-细胞功能”的完整证据链。此外, 紫甘薯花青素独特的酰化结构可能增强了其稳定性, 使其在细胞体系中能更有效地发挥作用[13]。这种结构特性与多靶点作用模式的结合, 可能是 PSPA 表现出显著抗氧化应激活性的物质基础, 后续研究可着眼于 PSPA 与细胞膜受体相互作用的起始机制, 并开展动物体内药效评价及临床前安全学研究, 以推动其应用转化。

综上所述, PSPA 的活性成分芍药素和矢车菊素可通过作用于 AKT1、EGFR、HSP90AA1 等多个核心靶点, 调控 PI3K/AKT 等信号通路来发挥抗氧化应激作用。本研究为 PSPA 作为功能性食品成分在缓解氧化应激相关疾病方面的应用提供了理论依据和实验支撑。

参考文献

[1] GAO Q, MA R, SHI L, *et al*. Anti-glycation and anti-inflammatory activities of anthocyanins from purple vegetables [J]. Food & Function, 2023, 14(4): 2034–2044.

[2] STEINGASS CB, BURKHARDT J, BÄUMER V, *et al*. Characterisation of acylated anthocyanins from red cabbage, purple sweet potato, and *Tradescantia pallida* leaves as natural food colourants by HPLC-DAD-ESI(+)-QTOF-MS/MS and ESI(+)-MSn analysis [J]. Food Chemistry, 2023, 416: 135601.

[3] YEN CH, CHIANG MH, LEE YC, *et al*. Purple sweet potato ameliorates high-fat diet-induced visceral adiposity by attenuating inflammation and promoting adipocyte browning [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2025, 73(6): 3457–3467.

[4] KIM D, KIM Y, KIM Y. Effect of purple sweet potato using different cooking methods on cytoprotection against ethanol-induced oxidative damage through Nrf2 activation in HepG2 cells [J]. Antioxidants (Basel), 2023, 12(8): 1650.

[5] YAN H, ZHANG Y, AHMAD MQ, *et al*. Comparative analysis of anthocyanin compositions and starch physiochemical properties of purple-fleshed sweet potato “Xuzishu8” in desert regions of China [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 841969.

[6] DAI J, LI H, GOU L, *et al*. Mechanistic study of purple sweet potato anthocyanins: Multifaceted anti-fibrotic effects and targeting of PDGFRβ in liver fibrosis [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(50): 27861–27875.

[7] JANG HH, KIM HW, KIM SY, *et al*. *In vitro* and *in vivo* hypoglycemic effects of cyanidin 3-caffeoyl-p-hydroxybenzoylsophoroside-5-glucoside, an anthocyanin isolated from purple-fleshed sweet potato [J]. Food Chemistry, 2019, 272: 688–693.

[8] CHEN J, JIANG F, XU N, *et al*. Anthocyanin extracted from purple sweet potato alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice by suppressing pyroptosis and altering intestinal flora structure [J]. Journal of Medicinal Food, 2024, 27(2): 110–122.

[9] SIES H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine [J]. Redox Biology, 2015, 4: 180–183.

[10] AVERILL-BATES D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research, 2024, 1871(2): 119573.

[11] HAJAM YA, RANI R, GANIE SY, *et al*. Oxidative stress in human pathology and aging: Molecular mechanisms and perspectives [J]. Cells, 2022, 11(3): 552.

[12] 罗春丽, 王林, 李杏, 等. 紫薯花青素体外抗氧化及对 H_2O_2 诱导 HepG2 细胞氧化损伤的保护作用[J]. 食品科学, 2015, 36(17): 225–230.
LUO CL, WANG L, LI X, *et al*. Antioxidant activities and protective effect of anthocyanins from purple sweet potato on HepG2 cell injury induced by H_2O_2 [J]. Food Science, 2015, 36(17): 225–230.

[13] SHAHIDI F, CHANDRASEKARA A. Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities [J]. Phytochemistry Reviews, 2010, 9(1): 147–170.

[14] XIE J, XU Y, CHEN W. Discovery and characterization of novel anthocyanin-metal complex for blue food coloring [J]. Food Chemistry, 2025, 485: 144485.

[15] 张慢, 潘丽军, 姜绍通, 等. 紫薯花青素降血脂及抗氧化效果 [J]. 食品科学, 2014, 35(19): 246–250.
ZHANG M, PAN LJ, JIANG ST, *et al*. Hypolipidemic and antioxidant effects of anthocyanins from purple sweet potato in rats [J]. Food Science, 2014, 35(19): 246–250.

[16] CHEN Z, WANG J, LU Y, *et al*. Pre-treatment, extraction solvent, and color stability of anthocyanins from purple sweetpotato [J]. Foods, 2024, 13(6): 833.

[17] 张毅, 王洪云, 钮福祥, 等. ‘宁紫薯 1 号’花青素组分鉴定及其对大鼠高脂诱导肥胖的预防效果[J]. 中国农业科学, 2016, 49(9): 1787–1802.
ZHANG Y, WANG HY, NIU FY, *et al*. Identification of purple sweet potato color of cultivar Ningzi No.1 by HPLC-QTOF/MS and its effect on preventing obesity in high-fat-diet-treated rats [J]. Agricultural Sciences in China, 2016, 49(9): 1787–1802.

[18] CRUZ AADL, HILBERT G, RIVIÈRE C, *et al*. Anthocyanin identification and composition of wild *Vitis* spp. accessions by using LC-MS and LC-NMR [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 732: 145–152.

[19] SZKLARCZYK D, MORRIS JH, COOK H, *et al*. The STRING database in 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(D1): D368–D368

[20] HUANG DW, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. Nature Protocols, 2009, 4(1): 44–57.

[21] SEELIGER D, DE-GROOT BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina [J]. Journal of Computer-aided Molecular Design, 2010, 24(5): 417–422.

[22] 丁芷倩, 许敏, 吴华, 等. 种迷迭香化合物对脂多糖诱导的 RAW264.7 细胞氧化应激和炎症的抑制作用[J]. 食品科学, 2022, 43(23): 125–133.
DING ZQ, XU M, WU H, *et al*. Inhibitory effect of four bioactive compounds from rosemary on lipopolysaccharide (LPS)-induced oxidative stress and inflammation in RAW264.7 cells [J]. Food Science, 2022, 43(23): 125–133.

[23] ZHAO L, CHEN X, SHAO X, *et al*. Prenylated phenolic compounds from licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) and their anti-inflammatory activity against osteoarthritis [J]. Food & Function, 2022, 13(2): 795–805.

[24] HUANG M, WU Z, JIA L, *et al*. Bioinformatics and network pharmacology identify promotional effects and potential mechanisms of ethanol on esophageal squamous cell carcinoma and experimental validation [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2023, 474: 116615.

[25] XUE QQ, LIU CH, LI Y. Decoding the anti-hypertensive mechanism of α-mangostin based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation [J]. Molecular Medicine, 2024, 30(1): 234.

[26] LI X, GAO M, ZHU S, *et al*. Hengshun Aromatic vinegar ameliorates vascular endothelial injury via regulating PKCζ-mediated oxidative stress and apoptosis [J]. Frontiers in Nutrition, 2021, 8: 635232.

[27] KIM AH, KHURSIGARA G, SUN X, *et al*. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1 [J]. Molecular and Cellular Biology, 2001, 21(3): 893–901.

[28] ZUEHLKE AD, BEEBE K, NECKERS L, *et al*. Regulation and function of the human *HSP90AA1* gene [J]. Gene, 2015, 570(1): 8–16.

[29] KODIHA M, AZAD N, CHU S, *et al*. Oxidative stress and signaling through EGFR and PKA pathways converge on the nuclear transport factor RanBP1 [J]. European Journal of Cell Biology, 2024, 103(1): 151376.

[30] HERS I, VINCENT EE, TAVARÉ JM. Akt signalling in health and disease [J]. Cell Signaling, 2011, 23(10): 1515–1527.

[31] SAKAKIBARA H, OGAWA T, KOYANAGI A, *et al*. Distribution and excretion of bilberry anthocyanins in mice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(17): 7681–7686.

[32] MILBURY PE, KALT W. Xenobiotic metabolism and berry flavonoid transport across the blood-brain barrier [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(7): 3950–3956.

[33] HE Y, HU Y, JIANG X, *et al*. Cyanidin-3-O-glucoside inhibits the UVB-induced ROS/COX-2 pathway in HaCaT cells [J]. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2017, 177: 24–31.

[34] LIU S, JIA Y, MENG S, *et al*. Mechanisms of and potential medications for oxidative stress in ovarian granulosa cells: A review [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(11): 9205.

[35] Mei L, CHEN Y, CHEN P, *et al*. Fibroblast growth factor 7 alleviates myocardial infarction by improving oxidative stress via PI3Kα/AKT-mediated regulation of Nrf2 and HXK2 [J]. Redox Biology, 2022, 56: 102468.

[36] REN B, WANG M, HAO D, *et al*. *Dendrobium officinale* extract alleviates aging-induced kidney injury by inhibiting oxidative stress via the PI3K/Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2025, 352: 120156.

[37] ZHAN H, XIE D, YAN Z, *et al*. Fluid shear stress-mediated Piezo1 alleviates osteocyte apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2024, 730: 150391.

(责任编辑: 韩晓红　于梦娇)