·实验研究·

生慧汤通过 Nrf2/HO－1 信号通路抗氧化应激改善阿尔茨海默病认知障碍的作用机制*

亢钰涵，刘继红，王浩然，罗日红，张紫娟，郝莉

河南中医药大学，河南 郑州 450046

摘要：目的：本研究旨在探讨生慧汤通过 Nrf2/HO－1 信号通路抗氧化应激改善阿尔茨海默病（Alzheimer′s disease，AD）认知障碍的作用机制。方法：从 45 只小鼠中随机抽取 9 只作为正常组，其余 36 只采用脑立体定位注射 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体构建 AD 模型，模型小鼠分为模型组、生慧汤低剂量组、生慧汤高剂量组和多奈哌齐组，每组 9 只。（1）通过行为学实验评估学习记忆能力，利用免疫荧光技术检测小鼠海马 β－淀粉样蛋白（amyloid β－protein，Aβ）沉积程度，并结合荧光探针法、酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA），探究生慧汤对 AD 氧化应激的影响。（2）通过网络药理学方法，筛选生慧汤的活性成分及相关靶点，并与 AD、氧化应激的疾病靶点取交集，进而构建“生慧汤有效成分－靶点－AD－氧化应激”网络和蛋白相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，筛选生慧汤关键有效成分。此外，利用 Metascape 数据库和 MCODE 算法获取目标聚类模块靶点，并借助 AutoDockTools 软件对关键有效成分和聚类模块靶点进行分子模拟对接验证。（3）蛋白质免疫印迹（Western Blot，WB）实验评估对接结合能最佳分子的蛋白表达水平。结果：行为学实验结果表明，生慧汤可改善 AD 小鼠的学习记忆能力，减少 Aβ 沉积（$P<0.05$），提升超氧化物歧化酶水平（$P<0.05$），降低活性氧和丙二醛含量（$P<0.05$）。获得“AD－生慧汤－氧化应激”有效成分 48 个和交集靶点 114 个。其中，关键有效成分为山柰酚、β－谷甾醇、豆甾醇、去甲莨菪碱和四氢鸭脚木碱。有 8 个核心靶点参与了氧化应激反应、活性氮反应及低氧反应等重要生物过程，包括胱天蛋白酶 3（Caspase－3，CASP3）、信号转导与转录激活因子 1（signal transducer and activator of transcription1，STAT1）、过氧化物酶体增生激活受体 γ（peroxisome proliferative activated receptor gamma，PPARG）、核因子红细胞系 2（nuclear factor erythroid 2，Nrf2）、细胞间黏附分子－1（intercellular cell adhesion molecule－1，ICAM－1）、血红素加氧酶 1（heme oxygenase－1，HO－1）、血管细胞黏附分子 1（vascular cell adhesion molecule 1，VCAM1）和胱天蛋白酶 1（caspase－1，CASP1）。分子对接结果显示，核心靶点 HO－1 与生慧汤关键有效成分结合效果最佳，WB 实验验证生慧汤通过调控 Nrf2 和 HO－1 的表达水平，发挥抗氧化应激作用。结论：生慧汤可改善 AD 小鼠的学习记忆能力，减少 Aβ 生成，抑制氧化应激反应，其作用机制与调控 Nrf2/HO－1 通路中相关蛋白表达水平有关。

关键词：生慧汤；Nrf2/HO－1 信号通路；阿尔茨海默病；认知障碍；氧化应激；分子对接
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.12.412
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)12－2636－14

Action Mechanism of Shenghui Decoction Alleviating Oxidative Stress via Nrf2/HO－1 Signaling Pathway and Improving Cognitive Dysfunction in Alzheimer′s Disease

KANG Yuhan，LIU Jihong，WANG Haoran，LUO Rihong，ZHANG Zijuan，HAO Li

Henan University of Chinese Medicine，Zhengzhou Henan China 450046

Abstract：Objective：This study aims to investigate the mechanism by which Shenghui Decoction alleviates cognitive dysfunction in

*基金项目：国家自然科学基金项目（U1504829）；河南省科技攻关计划项目（242102311286）；河南省高等学校重点科研项目（25A310023）

Alzheimer's disease (AD) by counteracting oxidative stress through the Nrf2/HO-1 signaling pathway. Methods: From a total of 45 mice, 9 were randomly selected as the normal control group, while the remaining 36 were injected with Aβ25-35 oligomers via stereotaxic brain injection to establish an AD model. The model mice were divided into a model group, a low-dose Shenghui Decoction group, a high-dose Shenghui Decoction group, and a donepezil group, with 9 mice in each group. (1) Behavioral experiments were conducted to assess learning and memory abilities. Immunofluorescence technology was used to detect hippocampal amyloid β-protein (Aβ) deposition in mice, and the effects of Shenghui Decoction on AD-related oxidative stress were explored in combination with fluorescent probes and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (2) Through network pharmacology methods, the active components and related targets of Shenghui Decoction were screened and intersected with disease targets for AD and oxidative stress, thereby constructing a "Shenghui Decoction active components-targets-AD-oxidative stress" network and protein-protein interaction (PPI) network. Key active components of Shenghui Decoction were identified. In addition, Metascape database and MCODE algorithm were used to obtain target cluster modules, and molecular docking of key active components with cluster module targets was validated using AutoDockTools software. (3) Western blot (WB) experiments were performed to assess the protein expression levels of molecules with the best docking binding energies. Results: Behavioral experiments indicated that Shenghui Decoction (SHD) can improve learning and memory abilities in AD mice, reduce Aβ deposition ($P<0.05$), increase superoxide dismutase levels ($P<0.05$), and decrease reactive oxygen species and malondialdehyde content ($P<0.05$). A total of 48 active components and 114 overlapping targets related to "AD-SHD-oxidative stress" were identified. The key active components include kaempferol, β-sitosterol, stigmasterol, scopolamine, and tetrahydropalmatine. Eight core targets were involved in important biological processes such as oxidative stress response, reactive nitrogen species response, and hypoxia response, including caspase-3 (CASP3), signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), nuclear factor erythroid 2 (Nrf2), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), heme oxygenase-1 (HO-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1), and caspase-1 (CASP1). Molecular docking results showed that the core target HO-1 had the best binding effect with key active components of SHD. WB experiments verified that SHD exerts antioxidant effects by regulating the expression levels of Nrf2 and HO-1. Conclusion: SHD can improve learning and memory abilities in AD mice, reduce Aβ production, and inhibit oxidative stress, with its mechanism related to the regulation of protein expression levels in the Nrf2/HO-1 pathway.

Key words: Shenghui Decoction; Nrf2/HO-1; signaling pathway; Alzheimer's Disease; cognitive dysfunction; Oxidative stress; molecular docking

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种神经退行性疾病,主要症状是认知功能障碍[1]。随着全球老龄化加剧,AD 发病率正逐年攀升。预计到 2050 年,全球 AD 患者将达到 1.52 亿。我国 AD 患者约占世界痴呆总人口 25%,且发病率逐年升高,给国家和家庭造成沉重的经济负担[2]。AD 主要病理特征是细胞外 β-淀粉样蛋白(amyloid β-protein, Aβ)沉积和细胞内 Tau 蛋白过度磷酸化。由于大脑耗氧高、抗氧化水平低,极易发生氧化应激,造成活性氧(reactive oxygen species, ROS)不断积累,并加快了 Aβ 的沉积,形成老年斑[3-4]。临床研究同样显示氧化应激损伤程度与 AD 发病进程密切相关[5]。临床前研究表明,靶向氧化应激的相关分子可改善 AD 患者学习记忆能力障碍[6]。因此,寻找安全、可靠和有效的抗氧化药物用于 AD 治疗具有较大的临床应用价值。

中药遵循中医基础理论整体观念进行辨证论治,具有多成分、多靶点、多环节和多系统的治疗优势。AD 在中医学中属于“痴呆”范畴,以“心肾不足”证型为主,主要表现为“老年健忘,近事多不记忆,虽人述其前事,犹若茫然[7]”。生慧汤始载于《辨证录》,由熟地黄、人参、山茱萸、远志、生枣仁、柏子仁(去油)、茯神、石菖蒲和白芥子组成[8]。君药为熟地黄,其滋阴补血、益肾填精,乃“精血形质中第一纯厚之药[9]”。臣药为人参和山茱萸,前者大补脾肾之气,后者补肾填精。书中亦描述此方“心肾兼补,上下互资,实治健忘之圣药[8]”。动物研究表明,熟地黄对 AD 大鼠具有神经保护作用[10-11];人参通过调节微生物-肠-脑轴缓解 AD 症状[12];山茱萸可改善 AD 大鼠的认知功能[13]。核因子红细胞系 2(nuclear factor erythroid 2, Nrf2)/血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)是重要的抗氧化通路。然而,生慧汤改善 AD 相关学习记忆障碍的抗氧化作用机制尚未阐明。

本研究运用网络药理学与分子对接技术获取生慧汤治疗 AD 的关键有效成分和核心靶点,并对该生物信息学分析结果进行动物实验验证。实验以临床上常用的 AD 治疗药物多奈哌齐为阳性对照,确

保结果的科学可靠性与临床相关性。研究旨在明确生慧汤改善 AD 学习记忆障碍的作用效果，并探讨其中可能的抗氧化作用机制，为生慧汤临床应用于改善 AD 奠定实验基础。

1　材料

1.1　动物　SPF 级 C57BL/6 小鼠，45 只，8 周龄，体质量（25 ~ 30）g，购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司（SCXK（豫）2020 - 0004）。小鼠造模前于标准笼适应性喂养，自由进食，饲养条件为温度（22 ± 2）℃，光/暗周期为 12 h/12 h，相对湿度 50% ~60%。实验过程均遵循河南中医药大学实验动物福利伦理委员会要求（DWLL201907311）进行规范化操作。

1.2　药物与试剂　生慧汤由熟地黄 30 g，山茱萸 12 g，人参 10 g，远志 6 g，生枣仁 15 g，柏子仁（去油）15 g，茯神 10 g，石菖蒲 1.5 g 和白芥子 6 g 组成。饮片购自河南中医药大学第一附属医院。$A\beta_{25-35}$（货号 118M4893），美国 Sigma - Aldrich 公司；多奈哌齐（货号 1701069），中国卫材药业有限公司。组织包埋剂（货号 MM1501），美国 Sakura 公司；驴血清封闭液（货号 SL050）、BCA 蛋白检测试剂盒（货号 SL038）、柠檬酸钠抗原修复液（货号 PC0020）、5% BSA 封闭液（货号 C1032）、高效 RIPA 裂解液（货号 SW3015），北京 Solarbio 公司；山羊抗兔 IgG HRP（1 ∶ 5 000，货号 ab0101）、山羊抗鼠 IgG HRP（1 ∶ 5 000，货号 ab0102），北京 Abways Technology 公司；驴抗兔 IgG（1 ∶ 400，货号 ab150072），$A\beta_{1-42}$（1 ∶ 1 000，货号 ab201060），英国 abcam 公司；β - actin（1 ∶ 5 000，货号 BM0627）、Keap1（1 ∶ 1 000，货号 PB0813），武汉博士德生物公司；HO - 1（1 ∶ 1 000，货号 GTX101147）、Nrf2（1 ∶ 1 000，货号 GTX101147），美国 Gene Tex 公司；MDA 试剂盒（货号 E - EL - 0060）、SOD 试剂盒（货号 E - BC - K020 - M），武汉 Elabscience 公司；ROS 荧光探针试剂盒（货号 BB470536），上海贝博生物公司。

1.3　仪器　水迷宫（深圳瑞沃德生命科技有限公司，63031 型）、Y 迷宫（深圳瑞沃德生命科技有限公司，63006 型）、旷场行为学仪器（深圳瑞沃德生命科技有限公司，63041 型）、显微镜（德国 ZEISS 公司，Axioscope5 型）、精密天平（瑞士 METTLER TOLEDO 公司，ME54 型）、石蜡切片机（德国 LECIA 公司，RM2245 型）、组织脱水机（德国 LECIA 公司，TP1020 型）、石蜡包埋机（德国 LECIA 公司，EG1150 型）、低温离心机（美国 Thermo Fisher 公司，Heraeus Fres$CO_2$1 型）、脱色摇床（海门市其林贝尔仪器公司，TS - 1000 型）、电泳转膜仪（北京六一生物公司，DYY - 6C 型）、核酸蛋白成像显影仪（美国 BIO - RAD 公司，731BR02542 型）。

2　方法

2.1　药物制备、立体定位注射及给药　熟地黄 30 g，山茱萸 12 g，人参 10 g，远志 6 g，生酸枣仁 15 g，柏子仁（去油）15 g，茯神 10 g，石菖蒲 1.5 g 和白芥子 6 g，加 8 倍量无菌蒸馏水浸泡 20 min、武火煮沸后文火慢熬 20 min，第 2 次加入 6 倍量无菌蒸馏水同法煎煮；合并 2 次煎液，浓缩制成 2.7 g · mL^{-1} 低质量浓度和 5.4 g · mL^{-1} 高质量浓度生慧汤汤剂，置于 4 ℃保存、备用。小鼠给药质量浓度选择参照张美亚等[14-15]的动物研究。$A\beta_{25-35}$ 溶于无菌蒸馏水，于 5% CO_2、37 ℃培养箱内孵育 1 周以诱导其成为 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体，后封存于 - 20 ℃保存、备用。多奈哌齐溶于生理盐水，置于 4 ℃保存、备用。

45 只小鼠进行适应性饲养，1 周后随机抽取 9 只为正常组小鼠，其余 36 只为造模小鼠。小鼠用异氟烷空气麻醉、备皮后，将其固定于脑立体定位仪上，使用微量注射器将生理盐水、$A\beta_{25-35}$ 分别注射小鼠 CA1 区域（注射严格按照小鼠脑立体定位图谱进行[16]，确定小鼠前后囟为同一水平线，以前囟为零点，前囟后、左右旁开、硬膜下分别为 2.2 mm、2.0 mm、1.7 mm），使用无菌生理盐水润洗微量注射器 3 次后，用配置好的 $A\beta_{25-35}$ 寡聚体进行注射。缓慢进针在到达目标位置后静置 5 min 后开始注射，每侧脑室均为 3 mg · kg^{-1}，结束注射后针头停滞脑内约 3 min（以上缓慢操作有助于注射液体在目标区域扩散吸收），缓慢退出针头。结束操作后使用特制明胶海绵压迫止血、消毒后使用缝合线缝合皮肤，共注射 7 d。

造模小鼠分为模型组、生慧汤低剂量组、生慧汤高剂量组和多奈哌齐组，每组 9 只。分别给予生理盐水、低剂量生慧汤（2.7 g · mL^{-1}）、高剂量生慧汤（5.4 g · mL^{-1}）和多奈哌齐（0.75 g · mL^{-1}），灌胃 60 d，每日 1 次，每次 0.1 mL。动物给药剂量严格按照动物与人体质量的等效剂量系数折算法进行[17]。第 54 天—第 60 天对小鼠进行行为学实验，实验流程见图 1。多奈哌齐是治疗 AD 的一线临床药物，具有缓解 AD 疾病进程的效果，本研究用其作为阳性对照药[18]。

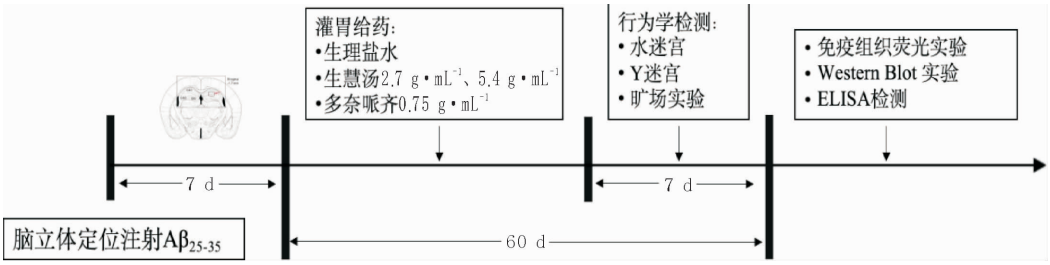


图 1　实验流程图

2.2　网络药理学研究方法

2.2.1　生慧汤有效成分及作用靶点筛选　通过中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP, https://www.tcmspw.com/tcmsp.php),以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30% 和类药性(drug likeness, DL)≥0.18 为筛选条件,检索生慧汤中熟地黄、人参、山茱萸、柏子仁、石菖蒲和酸枣仁的潜在有效成分及其作用靶点。同时,借助本草图鉴(HERB, http://herb.ac.cn)数据库补充检索远志、茯神和白芥子的潜在有效成分,并通过 PubChem(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)数据库校准这些成分的标准 SMILES 编号。随后,利用 SWISS ADME 数据库(http://www.swissadme.ch/index.php)进一步筛选出符合高消化吸收程度且满足类药五原则中任意三项"yes"的有效成分。通过 SwissTargetPrediction (https://www.swisstargetprediction.ch)数据库,获取有效成分的作用靶点。结合美国化学文摘服务社(Chemical Abstracts Service, CAS)编号,对生慧汤 9 种药物的有效成分进行确认、整合并剔除重复项,获得最终的有效成分及其对应的作用靶点。

2.2.2　筛选与 AD 和氧化应激相关的靶点　在线人类孟德尔遗传(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM, https://omim.org)数据库和基因卡(Genecards, http://genecards.com)数据库中输入关键词"Alzheimer's disease"和"Oxidative stress",获取与 AD 和氧化应激相关的靶点。以"蛋白质相关编码基因"为筛选条件对氧化应激靶点进行筛选,并保留 Score 大于中位数的靶点。使用 Venny 2.1.0 软件对生慧汤有效成分靶点、AD 相关靶点和氧化应激相关靶点取交集,并进行可视化分析,得到生慧汤经氧化应激途径抗 AD 的交集靶点。

2.2.3　构建"生慧汤有效成分－靶点－AD－氧化应激"网络图　利用 Cytoscape 3.8.2 软件对生慧汤有效成分和交集靶点可视化,构建"生慧汤有效成分－靶点－AD－氧化应激"网络图,展现其药理关系。借助 CytoNCA 插件获取网络节点的连接度(Degree)信息,并以 Degree 值排名前 5 位的有效成分作为关键有效成分。

2.2.4　蛋白质相互作用(protein－protein interaction, PPI)网络构建及聚类模块分析　通过 STRING (https://string－db.org)在线数据库进行 PPI 网络分析。将交集靶点导入 STRING 数据库,限定"Homo Sapiens"物种,置信度得分高于 0.700,随后下载相关数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化分析。利用 Cytoscape 3.8.2 软件中的 CytoNCA 插件分析交集靶点的 Degree 值、介度(Betweenness)值及紧密度(Closeness)值,并以这 3 项参数均大于其中位数作为筛选条件得到核心网络及其靶点。网络中的节点颜色反映了连接度的大小。此外,通过模块功能(MCODE)插件对 PPI 网络进行聚类分析,以获取 PPI 网络中的全部聚类模块。

2.2.5　GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析及核心靶点筛选　将上述聚类模块分别输入 Metascape(http://metascape.org/gp/index.html)数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,限定"Homo sapiens"物种、筛选 $P<0.01$ 的条目,以确定与氧化应激相关的聚类模块为目标模块,并将其包含的靶点定义为核心靶点。随后,借助微生信在线平台(https://www.bioinformatics.com.cn)对目标聚类模块的数据进行可视化处理。

2.2.6　药物关键有效成分－核心靶点分子对接　将核心靶点与关键有效成分进行分子对接,以验证药物作用的可能性。在 TCMSP 和 PubChem 数据库中获取关键有效成分的二级结构,并通过 Uniprot (https://www.uniprot.org)和 RCSB(https://www.rcsb.org)数据库获取核心靶点的 3D 结构。随后,利用软件 Chem 3D 19.0 将核心靶点的二级结构转化为三级结构,并借助 PyMOLWin 2.6 软件去除关键有效成分的残基和水分子;采用 AutoDockTools 1.5.7 软件对处理后的关键有效成分和核心靶点进行对接分析,获得对接数据并评估其结合稳定性。最后,利用软件 PyMOLWin 2.6 对分子对接结果可视化。

2.3　动物实验方法

2.3.1　行为学实验　水迷宫实验：水迷宫是由直径为 1.5 m 的圆形恒温泳池和直径 3 cm 的圆形站台组成，泳池被划分为 4 个象限。前 5 d 进行定位航行实验：将小鼠背对游泳池从不同入水点放入水中（每只小鼠每天 4 次），记录其从入水到找到平台所需的时间（限时 1 min）。第 6 天进行空间探索实验：撤去平台，将小鼠背对游泳池放入水中，记录其在 1 min 内的探索行为数据。

Y 迷宫实验：Y 迷宫由 3 个夹角为 120°的长臂连接组成，调整光源确保 Y 迷宫内光照均匀一致。将小鼠置于中心区域，记录其在 5 min 内穿梭进入 3 个臂的轨迹、进入各臂的次数及准确交替次数。

旷场实验：实验箱体尺寸为长宽各 50 cm、高 40 cm，顶部开放，调整光源保证实验过程中光照一致。将小鼠放置于底板中心区域，记录其在 5 min 内运动总距离及理毛次数。

2.3.2　组织免疫荧光　每组随机取 3 只小鼠，经颈椎脱臼法处死后，暴露颅骨，剥离脑壳取出全脑，置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。固定完成后，对组织进行石蜡包埋，制备连续切片并贴附于载玻片。随后依次进行脱水、脱蜡、H_2O_2 灭活、抗原修复及血清封闭处理，孵育一抗 $A\beta_{1-42}$（1∶1 000 稀释）过夜。次日，孵育二抗（驴抗兔 IgG，1∶400 稀释），之后进行 DAPI 核染色。通过显微镜观察并采集图像，使用 ImageJ 1.8.0 软件分析图像的平均光密度。

2.3.3　活性氧（reactive oxygen species，ROS）荧光探针法　每组随机选取 3 只小鼠，取出全脑，用 4% 多聚甲醛和 20%、30% 蔗糖溶液梯度固定，冰冻切片机切片。切片转移至 24 孔板，清洗 3 次后用 DHE 活性氧荧光探针染色（37 ℃避光孵育）。染色完成后，PBS 缓冲液清洗 3 次，甘油封片。显微镜观察并采集图像，数据分析方法同 2.3.2。

2.3.4　酶联免疫吸附试验法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）　每组随机选取 3 只小鼠，取其一侧新鲜海马组织，经漂洗、匀浆和低温离心处理后收集上清液。按试剂盒说明书配置工作液，将上清液加入充分混匀，测定超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）活性和丙二醛（malondialdehyde，MDA）含量。随后在指定波长下测量吸光度，并结合标准曲线计算具体含量。

2.3.5　蛋白质免疫印迹技术（Western blot，WB）　取 2.3.4 中同一批 3 只小鼠的另一侧新鲜海马组织。将组织蛋白裂解后，在低温条件下高速离心分离，收集上清液。加入 5 × Loading Buffer 并高温变性处理。根据样品浓度计算上样量，配制 SDS - PAGE 胶并完成电泳和转膜操作。转膜后，使用封闭液封闭非特异性结合位点，依次孵育一抗（Keap1∶1∶1 000；Nrf2∶1∶1 000；HO - 1∶1∶1 000；β - actin∶1∶5 000）。次日，用相应二抗（1∶5 000）孵育，显影液浸泡后通过核酸蛋白成相显影仪成像分析。最后，使用 ImageJ 1.8.0 软件对条带灰度值进行定量分析。

2.3.6　统计学方法　数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计分析。多组样本经正态分布和方差齐性检验后，逃避潜伏期数据采用双因素方差分析（two - way ANOVA），其他数据采用单因素方差分析（one - way ANOVA）。组间两两比较采用 Tukey 法。$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学研究结果

3.1.1　生慧汤有效成分筛选及其作用靶点的获取　通过 TCMSP、HERB 数据库筛选获得符合标准的生慧汤有效成分 48 个，如表 1 所示。其中，利用 TCMSP、SwissTarget（http://www.swisstargetprediction.ch）以及 PharmMapper（http://www.lilabecust.cn/pharmmapper/）等平台系统搜集了这些有效成分的作用靶点，整合数据后剔除重复项，共获得 270 个靶点。

3.1.2　生慧汤抗 AD 有效成分的靶点筛选　通过使用 Genecards 和 OMIM 数据库，系统收集了 1 842 个 AD 相关靶点和 3 962 个氧化应激相关靶点。将这些靶点与生慧汤的 270 个有效成分靶点进行交集分析，筛选出 114 个同时与生慧汤、AD 及氧化应激相关的靶点。为直观展示结果，使用韦恩图工具（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）对数据进行了可视化处理，具体见图 2。

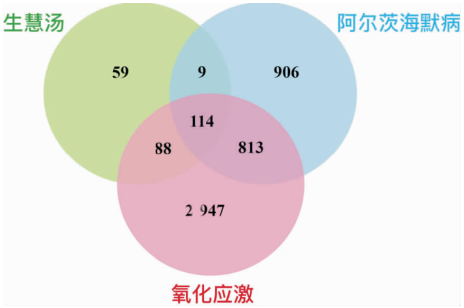
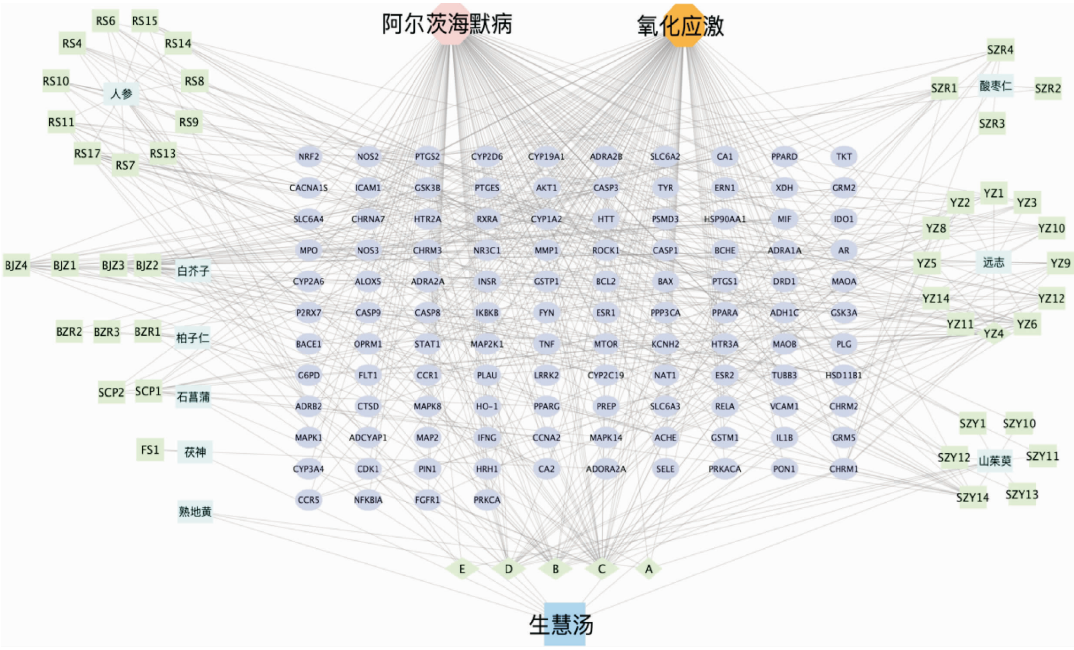


图 2　生慧汤 - AD - 氧化应激交集靶点

3.1.3　“生慧汤有效成分－靶点－疾病－通路”网络图构建　将获得的有效成分及交集靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件，构建“生慧汤有效成分－靶点－AD－氧化应激”网络图（图 3）。其中，5 种成分为药物间的共有成分。节点之间的连线反映了“生慧汤有效成分－靶点－疾病－通路”之间的靶向关系，连线数量越多表明节点在网络中的相关性越强。通过筛选 Degree 值排名前五的药物化学成分，确定其为关键有效成分，具体信息详见表 1。



注：紫色表示生慧汤、AD 和氧化应激的共同靶点（共 114 个）；绿色表示有效成分（共 48 个）。A 代表熟地黄、山茱萸和柏子仁共有成分，熟地黄为主要来源；B 代表山茱萸和人参共有成分，山茱萸为主要来源；C 代表石菖蒲和人参共有成分，石菖蒲为主要来源；D 代表熟地黄、山茱萸和人参共有成分，熟地黄为主要来源；E 代表山茱萸和人参共有成分，山茱萸为主要来源。

图 3　“生慧汤有效成分－靶点－AD－氧化应激”网络图

表 1　生慧汤连接度前 20 位有效成分

代号	有效成分	连接度	口服利用度/%	类药性	主要来源
C	山柰酚（Kaempferol）	36	41.88	0.24	石菖蒲
B	β－谷甾醇（β－sitosterol）	22	36.91	0.75	山茱萸
D	豆甾醇（Stigmasterol）	21	43.83	0.76	熟地黄
YZ4	去甲莨菪碱（Norhyoscyamine）	16	60.34	0.17	远志
SZY14	四氢鸭脚木碱（Tetrahydroalstonine）	15	32.42	0.81	山茱萸
BJZ4	芥子醛（Sinapaldehyde）	15	63.16	0.07	白芥子
RS17	富马碱（Fumarine）	14	59.26	0.83	人参
YZ6	5,6,7－三甲氧基香豆素（5,6,7－Trimethoxycoumarin）	14	32.54	0.12	远志
SZR1	乌药碱（（S）－Coclaurine）	13	42.35	0.24	酸枣仁
BJZ2	4－羟基苯甲酰胆碱（4－hydroxybenzoylcholine）	13	2.15	0.07	白芥子
BJZ3	芥子酸胆碱（Sinapine）	13	1.21	0.18	白芥子
YZ12	哈尔满碱（Harman）	12	33.1	0.1	远志
SCP1	8－异戊二酰－山柰酚（8－Isopentenyl－Kaempferol）	11	38.04	0.39	石菖蒲
RS11	稀有人参皂苷 Rh2（Ginsenoside rh2）	10	36.32	0.56	人参
YZ9	橙花醛（Neral）	9	19.48	0.02	远志
YZ10	骆驼蓬碱（Yajeine）	9	56.8	0.13	远志
RS4	高丽槐素（Inermin）	8	65.83	0.54	人参
RS10	灌木远志酮 A（Frutinone A）	8	65.9	0.34	人参
SZR4	酸李碱（Zizyphusine）	8	41.53	0.55	酸枣仁
RS6	阿朴天仙子碱（Aposiopolamine）	7	66.65	0.22	人参

3.1.4　交集靶点的 PPI 网络构建及聚类分析　使用 STRING 数据库对交集靶点进行分析，并利用 CytoNCA 插件计算各靶点的 Degree、Betweenness 及 Closenesss 值并进行排序。其中，节点颜色深浅与

Degree、Betweenness 及 Closeness 值呈正相关。使用 MCODE 算法对包含 412 个节点的网络进行分析，获得 4 个聚类模块，具体结果见图 4。

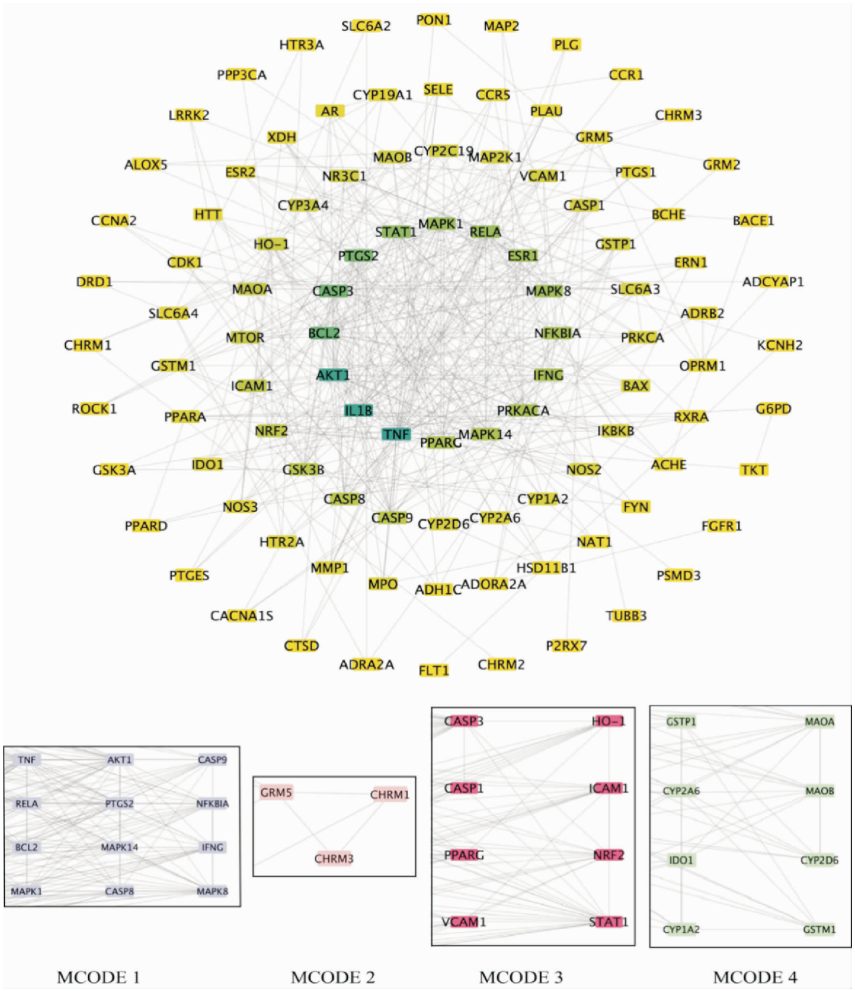


图 4　交集靶点 PPI 及 MCODE 网络图

3.1.5　核心靶点的筛选及 GO、KEGG 通路富集分析结果　利用 Metascape 数据库对 MCODE 1 至 MCODE 4 聚类模块进行了 GO 功能和 KEGG 富集分析。结果显示，MCODE 1 与细胞凋亡及激素调节通路相关；MCODE 2 与 G 蛋白偶联受体信号通路相关；MCODE 3 与氧化应激相关；MCODE 4 与细胞色素代谢相关。进一步确定 MCODE 3 中的关键靶点为核心靶点，包括胱天蛋白酶 3（Caspase－3，CASP3）、信号转导与转录激活因子 1（signal transducer and activator of transcription1，STAT1）、过氧化物酶体增生激活受体 γ（peroxisome proliferative activated receptor gamma，PPARG）、Nrf2、细胞间黏附分子－1（intercellular cell adhesion molecule－1，ICAM－1）、HO－1、血管细胞黏附分子 1（vascular cell adhesion molecule 1，VCAM1）和胱天蛋白酶 1（Caspase－1，CASP1）。随后，对 MCODE 3 的 GO 分析中 P 值排名前 20 位的生物过程（biological processes，BP）进行可视化，涵盖氧化应激反应、活性氮反应调控及低氧反应调控（图 5A）。此外，对 9 条 KEGG 信号通路进行可视化展示（图 5B），包括血脂与动脉粥样硬化[19]、AGE－RAGE 信号通路[20]、TNF 信号通路[21]及致癌相关信号通路[22]，这些通路通过影响氧化应激机制参与机体的生理病理过程。

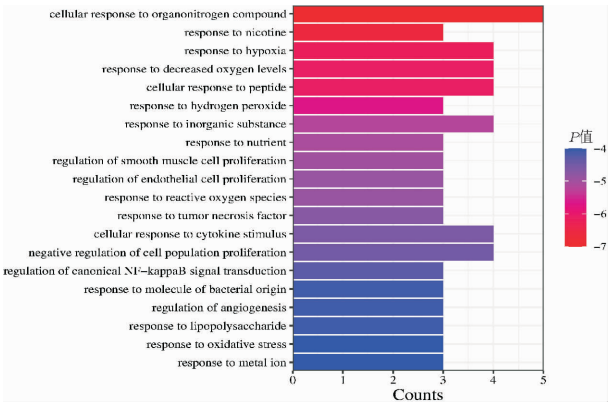
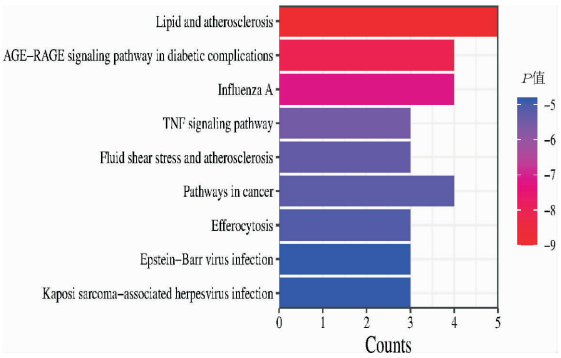


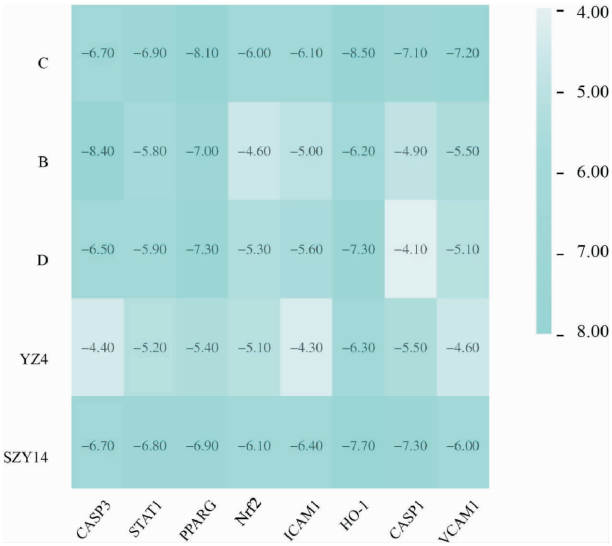
图 5A　核心靶点 GO 富集前 20 条分析结果



注：条形越长代表该信号通路富集的共同关联核心靶点就越多，颜色越接近红色代表 P 值越小。

图 5B　核心靶点 KEGG 通路富集分析结果

3.1.6　生慧汤关键有效成分和核心靶点蛋白的对接结果　将生慧汤的关键有效成分与核心靶点蛋白进行分子对接，共获得 40 组结果。结合能小于 0 kJ·mol^{-1} 的结果表明，核心靶点蛋白可自发结合关键有效成分，且结合能越低，结合活性越高，结合能力越强[23]（图 6）。进一步观察发现，HO－1 在核心靶点蛋白中表现出最高的平均结合活性。鉴于 Nrf2 和 HO－1 为经典的氧化应激相关蛋白[24－25]，利用 PyMOLWin 2.6 软件对 HO－1、Nrf2 与关键有效成分的结合结果进行了可视化处理（图 7）。

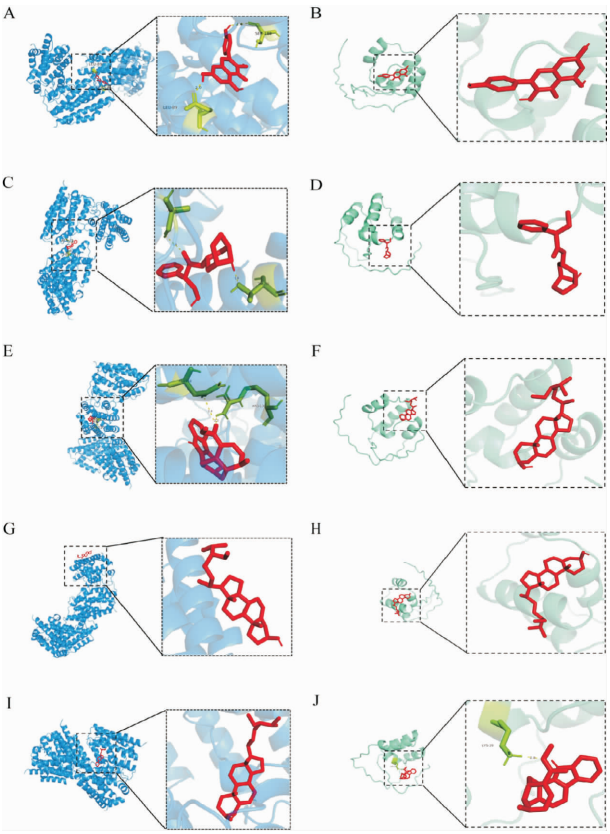


注：数值越小、颜色越深说明结合效果好。

图 6　关键有效成分与核心靶点蛋白的结合能热图

3.2　动物实验结果

3.2.1　生慧汤对 AD 小鼠空间学习记忆能力的影响　Morris 水迷宫用于评估小鼠的空间学习记忆能力。定位航行实验结果显示，第 1—4 天各组间逃避潜伏期无显著差异；第 5 天时，模型组小鼠的逃避潜伏期显著长于正常组（$P<0.05$）。与模型组相比，生慧汤低剂量组和多奈哌齐组的逃避潜伏期显著缩短（$P<0.05$），高剂量组有缩短趋势（$P>0.05$），详见表 2。空间探索实验中，模型组小鼠穿越平台次数减少且目标象限停留时间缩短（$P<0.05$）；与模型组相比，生慧汤低剂量组及多奈哌齐组的穿越平台次数和目标象限停留时间均显著增加（$P<0.05$），高剂量组的穿越平台次数显著增加（$P<0.05$），目标象限停留时间有延长趋势（$P>0.05$），详见表 3。上述结果表明，生慧汤可改善 AD 小鼠的学习记忆能力。



注：图 A、C、E、G、I 为 HO－1 分别和成分山柰酚、β－谷甾醇、豆甾醇、去甲莨菪碱和四氢鸭脚木碱的对接结果；图 B、D、F、H、J 为 Nrf2 分别和成分山柰酚、β－谷甾醇、豆甾醇、去甲莨菪碱和四氢鸭脚木碱的对接结果。其中黄色和绿色为形成的氢键及氢键连接的残基。

图 7　关键有效成分与核心靶点蛋白的分子对接模型图

3.2.2　生慧汤对 AD 小鼠空间工作记忆能力的影响　Y 迷宫实验评估小鼠空间工作记忆能力。结果显示，与正常组相比，模型组小鼠的自发交替率显著降低（$P<0.05$）。经生慧汤低剂量组、高剂量组及多奈哌齐组干预后，各组小鼠的自发交替率均显著高于模型组（$P<0.05$）。然而，各组小鼠的进臂次数无明显差异（$P>0.05$）。上述结果表明，生慧汤可改善 AD 模型小鼠的空间工作记忆能力，且不影响其运动能力（表 4）。

表 2　各组小鼠逃避潜伏期比较　（$\bar{x} \pm s$，s）

组别	n	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
正常组	9	44.73 ± 15.27	40.96 ± 19.04	39.18 ± 20.82	35.60 ± 15.08	24.80 ± 5.54
模型组	9	49.19 ± 10.81	47.43 ± 12.57	38.15 ± 21.85	38.00 ± 14.40	38.34 ± 8.99*
生慧汤低剂量组	9	45.52 ± 14.49	43.46 ± 10.65	38.03 ± 8.30	36.62 ± 13.11	24.15 ± 8.84#
生慧汤高剂量组	9	43.02 ± 12.67	42.89 ± 17.12	39.95 ± 6.72	37.82 ± 14.33	28.62 ± 10.03
多奈哌齐组	9	42.24 ± 17.76	41.36 ± 8.58	31.78 ± 5.49	27.45 ± 8.58	24.03 ± 5.76#
F 值		0.759	0.099	0.150	0.325	1.717
P 值		0.574	0.980	0.958	0.254	0.022

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$。

表 3　各组小鼠空间探索能力结果比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	穿越平台次数/次	目标象限停留时间（t/s）
正常组	9	2.29 ± 0.28	38.28 ± 2.29
模型组	9	0.57 ± 0.20*	21.48 ± 1.99*
生慧汤低剂量组	9	1.86 ± 0.34#	37.20 ± 4.73#
生慧汤高剂量组	9	1.57 ± 0.20#	27.00 ± 2.23
多奈哌齐组	9	2.00 ± 0.45#	36.49 ± 3.09#
F 值		13.760	18.080
P 值		<0.001	<0.001

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$。

表 4　各组小鼠在 Y 迷宫中的进臂次数与自发交替率　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	进臂次数/次	自发交替率/%
正常组	9	26.88 ± 6.83	36.84 ± 5.43
模型组	9	22.75 ± 4.59	16.25 ± 5.91*
生慧汤低剂量组	9	21.17 ± 4.92	23.50 ± 4.12#
生慧汤高剂量组	9	20.38 ± 3.96	22.60 ± 3.13#
多奈哌齐组	9	25.88 ± 6.47	28.50 ± 6.14#
F 值		0.822	6.854
P 值		0.539	0.006

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$。

3.2.3　生慧汤对 AD 小鼠空间探索能力的影响　旷场实验用于评估小鼠空间探索能力。结果表明，与正常组相比，模型组小鼠的理毛次数显著减少（$P<0.01$）。与模型组相比，生慧汤低剂量组和多奈哌齐组均增加小鼠的理毛次数（$P<0.05$），而高剂量组呈现增加趋势（$P>0.05$）。此外，各组间运动总距离无显著差异。上述结果提示，生慧汤可在不改变小鼠运动能力的前提下改善其空间探索能力（表 5）。

3.2.4　生慧汤对 AD 小鼠中 Aβ 沉积的影响　Aβ 沉积是 AD 的标志性病理特征[26]。本实验通过检测 $A\beta_{1-42}$ 斑块的沉积情况来评估 AD 小鼠的病理变化程度。组织免疫荧光染色实验结果显示：与正常组相比，模型组小鼠位于海马 CA1 区的 $A\beta_{1-42}$ 平均荧光强度增强（$P<0.01$）；与模型组相比，生慧汤低剂量组、高剂量组和多奈哌齐组的海马 CA1 区 $A\beta_{1-42}$ 平均荧光强度均有所降低（$P<0.05$），见图 8。这表明生慧汤具有减轻海马 CA1 区 Aβ 沉积的作用。

表 5　各组小鼠在旷场中的理毛次数与运动总距离　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	理毛次数/次	运动总距离（s/cm）
正常组	9	83.10 ± 5.91	1 584.23 ± 115.00
模型组	9	36.00 ± 6.04**	1 430.34 ± 148.65
生慧汤低剂量组	9	82.92 ± 3.35#	1 292.23 ± 127.74
生慧汤高剂量组	9	59.51 ± 6.74	1 363.42 ± 64.73
多奈哌齐组	9	76.51 ± 7.16#	1 480.26 ± 91.44
F 值		33.840	2.905
P 值		<0.001	0.078

注：与正常组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，# $P<0.05$。

3.2.5　生慧汤对 AD 小鼠氧化应激损伤的影响　氧化应激是神经不可逆损伤的重要因素，本研究通过检测与氧化应激相关的指标，观察了生慧汤对 AD 小鼠氧化应激损伤的影响。ROS 是氧化应激过程中的重要代谢产物[27]，结果显示：与正常组相比，模型组 ROS 水平升高（$P<0.05$）；经生慧汤、多奈哌齐干预后，生慧汤低剂量组和多奈哌齐组的 ROS 水平降低（$P<0.05$），生慧汤高剂量组有降低的趋势（$P>0.05$），见表 6、图 9。

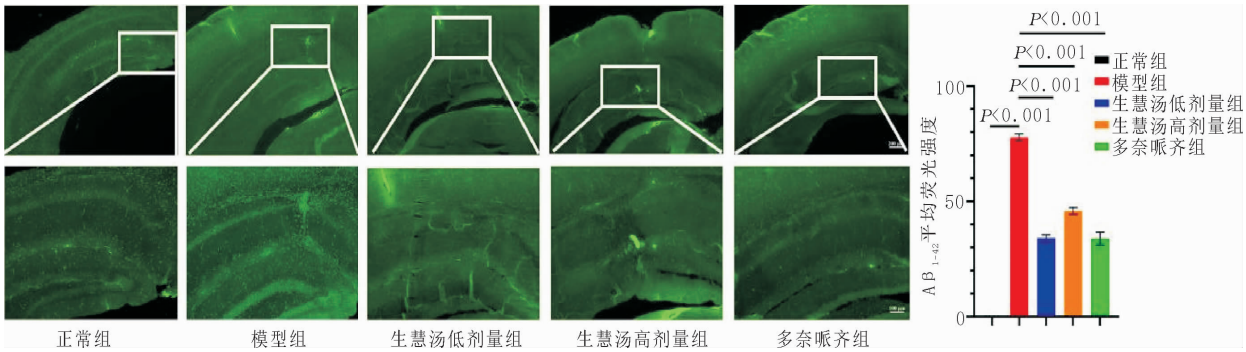
表 6　各组小鼠 ROS 荧光强度　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	ROS 荧光强度
正常组	3	8.21 ± 0.81
模型组	3	12.13 ± 0.21*
生慧汤低剂量组	3	9.64 ± 0.79#
生慧汤高剂量组	3	10.34 ± 1.36
多奈哌齐组	3	9.72 ± 0.89#
F 值		7.625
P 值		0.004

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，# $P<0.05$。

MDA 是一种脂质与氧自由基反应形成的产物，其含量可反映脂质过氧化的程度[28]。ELISA 结果表明：与正常组相比，模型组 MDA 含量增加（$P<0.05$）；经生慧汤和多奈哌齐干预后，各组 MDA 含量均低于模型组，其中生慧汤低剂量组和多奈哌齐组的 MDA 含量与模型组相比均具有统计学意义（$P<0.05$），生慧汤高剂量组有降低的趋势（$P>0.05$），见表 7。

SOD 是衡量机体抗氧化能力的重要指标[29]。ELISA 结果显示：与正常组比较，模型组 SOD 含量明显减少（$P<0.01$）；经生慧汤和多奈哌齐干预后，各组 SOD 含量均高于模型组，生慧汤低剂量组、多奈哌齐组 SOD 含量与模型组相比均具有统计学意义（$P<0.05$），生慧汤高剂量组有升高的趋势（$P>0.05$），见表 8。



注：$A\beta_{1-42}$ 单因素方差分析，$F_{(4,10)}=815.200$。

图 8　各组小鼠 $A\beta_{1-42}$ 染色结果（×100，×200）

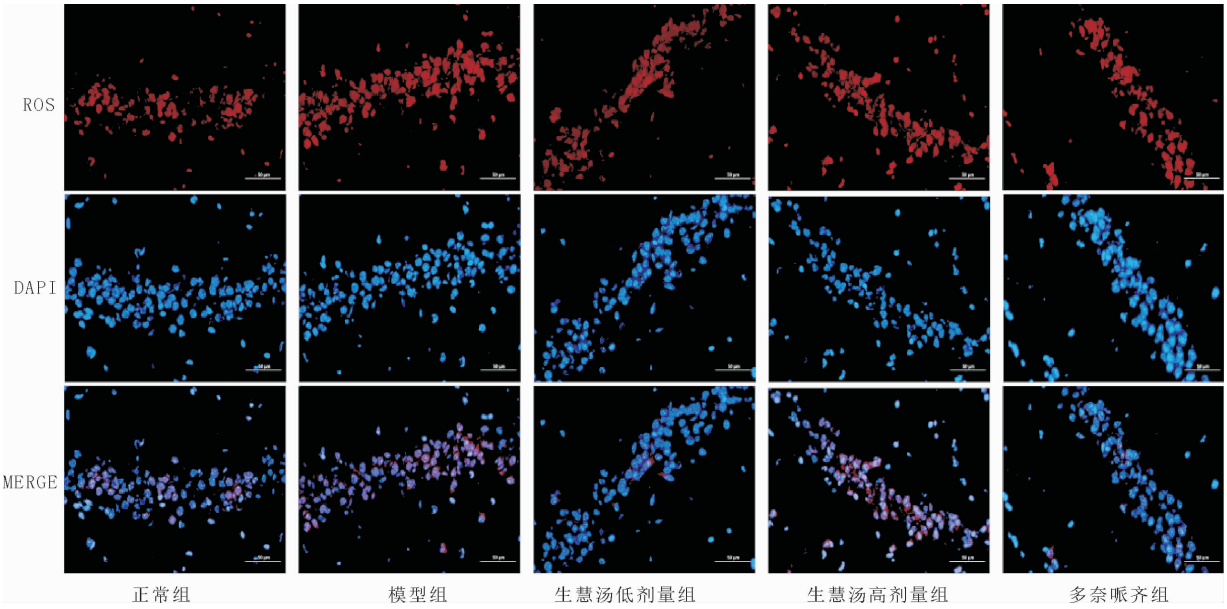


图 9　各组小鼠 ROS 荧光探针结果（×400）

表 7　各组小鼠 MDA 含量比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	MDA 含量（$U\cdot mg^{-1}$）
正常组	3	1.99 ± 0.30
模型组	3	2.78 ± 0.19 *
生慧汤低剂量组	3	1.98 ± 0.21 #
生慧汤高剂量组	3	2.16 ± 0.18
多奈哌齐组	3	1.82 ± 0.33 #
F 值		6.745
P 值		0.006

注：与正常组比较，* $P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$。

表 8　各组小鼠 SOD 含量比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	SOD 含量（$U\cdot mg^{-1}$）
正常组	3	151.92 ± 11.16
模型组	3	53.12 ± 7.34 **
生慧汤低剂量组	3	127.79 ± 11.82 #
生慧汤高剂量组	3	91.29 ± 9.58
多奈哌齐组	3	113.68 ± 11.17 #
F 值		39.580
P 值		<0.001

注：与正常组比较，** $P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$。

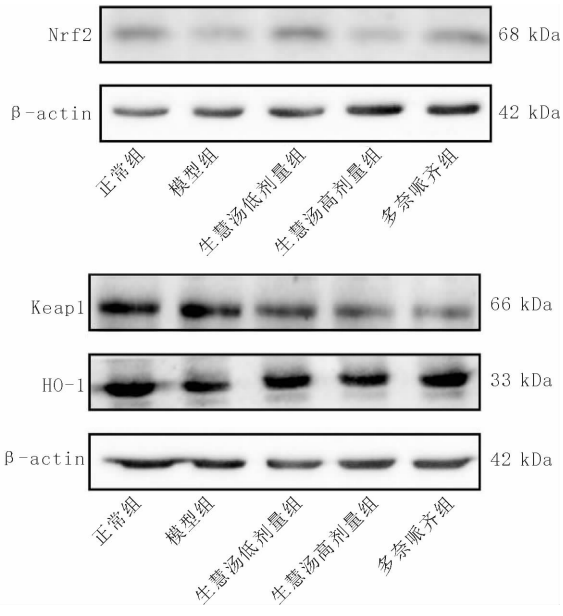
3.2.6　生慧汤对 AD 小鼠抗氧化应激蛋白的影响

Nrf2 和 HO－1 是抗氧化应激关键蛋白[24-25]，Keap1 为 Nrf2 的上游调控因子。为了验证网络药理学分析结果，本实验通过检测 Keap1、Nrf2 和 HO－1 的表达水平，探讨生慧汤对 AD 小鼠抗氧化应激通路的作用机制。WB 结果显示，与正常组相比，模型组中 Keap1 的表达升高（$P<0.05$）。经生慧汤低剂量组、高剂量组以及多奈哌齐组干预后，Keap1 的表达水平显著下降（$P<0.05$）。此外，Nrf2 和 HO－1 的表达情况显示，模型组相较于正常组表达降低（$P<0.05$）。经生慧汤及多奈哌齐干预后，低剂量组和多奈哌齐组中 Nrf2 和 HO－1 的表达显著上调（$P<0.05$），见表 9、图 10。

表 9　各组海马 Nrf2、Keap1 和 HO－1 蛋白印迹表达水平比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	Nrf2	HO－1	Keap1
正常组	3	1.14±0.07	1.01±0.02	1.02±0.17
模型组	3	0.67±0.87**	0.68±0.03**	1.23±0.02**
生慧汤低剂量组	3	1.05±0.13##	1.04±0.09##	1.03±0.07##
生慧汤高剂量组	3	0.81±0.34	0.75±0.09	1.05±0.01##
多奈哌齐组	3	0.97±0.24#	1.11±0.02##	1.02±0.03##
F 值		7.403	204.300	19.180
P 值		<0.05	<0.01	<0.01

注：与正常组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$。



注：Nrf2/β－actin 单因素方差分析，$F_{(4,10)}=7.403$。Keap1/β－actin 单因素方差分析，$F_{(4,10)}=19.180$。HO－1/β－actin 单因素方差分析，$F_{(4,10)}=204.300$。

图 10　各组海马 Nrf2、Keap1 和 HO－1 蛋白印迹图

4　讨论

AD 的病理机制涉及氧化应激、神经炎症和线粒体功能障碍等多种因素[4]。生慧汤作为中医古籍中治疗健忘的经典方剂，其改善 AD 相关学习记忆能力的作用机制尚不明确。本研究通过网络药理学、分子对接及体内动物实验，探讨了生慧汤改善 Aβ 诱导建立的 AD 小鼠模型认知功能障碍、减轻海马 Aβ 沉积，其作用机制可能与调节 Nrf2/HO－1 抗氧化通路相关。

$A\beta_{25-35}$是 $A\beta_{1-40}$和 $A\beta_{1-42}$的关键折叠片段，由 11 个氨基酸组成，保留了全长 Aβ 的生物学特性，因此成为构建 AD 动物模型的常用诱导剂[30-31]。本研究采用脑立体定位技术将 $A\beta_{25-35}$注射至小鼠海马 CA1 区，建立 AD 小鼠模型。行为学结果显示，Morris 水迷宫中模型组的逃避潜伏期显著延长、穿越平台次数减少以及目标象限停留时间缩短；Y 迷宫中模型组自发交替率下降，这些结果与 Hou 等[32]的 AD 转基因小鼠实验结果一致。此外，免疫荧光定量分析显示，模型组海马区存在明显的 Aβ 斑块沉积，从而验证了 AD 小鼠模型构建成功。

有临床研究表明，生慧汤可改善 AD 患者的学习记忆能力[18]。此外，相关研究发现，生慧汤对糖尿病脑病引起的认知障碍具有缓解作用[33]。本研究行为学结果显示，生慧汤可改善 AD 小鼠模型的学习记忆能力，且低剂量组的效果优于高剂量组。Aβ 沉积是 AD 的主要病理特征之一，已有实验证明生慧汤可减少秀丽隐杆线虫中的 Aβ 沉积[34]。本研究观察到生慧汤能够减轻 AD 小鼠海马区的 Aβ 沉积。此外，氧化应激作为 AD 的重要分子机制，与 Aβ 沉积密切相关。

为进一步探讨生慧汤通过抗氧化应激途径干预 AD 的作用机制，本研究采用网络药理学方法筛选了生慧汤、AD 和氧化应激之间的共同靶点。通过构建“生慧汤有效成分－AD－氧化应激”网络，筛选出 5 种关键有效成分，其中山柰酚[35]、β－谷甾醇[36]和豆甾醇[36]具有提高 ROS 清除能力、调节神经元突触可塑性、激活相关转录因子以及减轻神经元氧化应激的作用，从而有助于缓解认知障碍。为进一步验证生慧汤对 AD 小鼠海马氧化应激的影响，本研究检测了 ROS、MDA 和 SOD 的水平。结果显示，生慧汤能够降低 AD 小鼠海马中 ROS 和 MDA 的表达，同时升高 SOD 表达水平，表明生慧汤可通过改善 AD 小鼠海马的氧化损伤发挥神经保护作用。

本研究通过 PPI 网络构建及模块聚类分析，揭示了生慧汤通过氧化应激途径抗 AD 的核心靶点，包括 CASP3、STAT1、PPARG、Nrf2、ICAM－1、HO－1、VCAM1 和 CASP1。分子对接结果显示，生慧汤关键有效成分与 HO－1 及 Nrf2 的结合亲和力优于其他靶点，提示二者可能是其调控抗氧化应激的关键分子靶标。生慧汤通过调控 Nrf2/HO－1 信号通路改善 AD 的分子机制，核心在于其多组分协同激活内源性抗氧化系统。Nrf2/HO－1 作为氧化还原稳态的核心调控通路，在生理状态下通过 Keap1－Nrf2 复合物解离实现动态平衡：当 ROS 积累时，Nrf2 核转位并激活 HO－1 等抗氧化酶的表达[37]。而 AD 中，Keap1 的异常高表达抑制 Nrf2 入核，导致 HO－1 生成不足，加剧神经元氧化损伤和 Aβ 毒性[38－42]。生慧汤的关键成分山柰酚和 β－谷甾醇显示出特异性调控潜力。研究表明，山柰酚通过干扰 Keap1－Nrf2 复合物构象稳定性，促进 Nrf2 核转位[43]；β－谷甾醇则通过增强 Nrf2 转录活性上调 HO－1 表达，其作用机制在帕金森病模型中已得到验证[44]，但在 AD 中的效应仍需进一步阐明。此外，熟地黄－何首乌药对中的豆甾醇可能通过干预 Keap1 泛素化修饰调控 Nrf2 稳定性，但其直接作用靶点尚未明确[45]。本实验数据显示，生慧汤干预可降低 AD 模型小鼠海马区 Keap1 蛋白表达，同时上调 Nrf2 核蛋白及 HO－1 水平，表明其通过解除 Keap1 对 Nrf2 的抑制作用激活抗氧化防御系统。

行为学与分子生物学结果显示，生慧汤低剂量组在改善学习记忆、降低 Aβ 沉积以及调节 Nrf2/HO－1 通路方面效果优于高剂量组。高剂量组在部分行为学指标（如水迷宫实验中的逃避潜伏期和目标象限停留时间，旷场实验中的理毛次数）上与模型组无统计学差异。这提示生慧汤多组分间可能存在非线性协同效应，其具体机制可能与海马区氧化应激指标变化不显著有关，表现为 ROS 和 MDA 水平未显著下降、SOD 活性未显著提升，Nrf2 及 HO－1 表达水平无统计学差异。此外，分子对接分析进一步表明，生慧汤的活性成分对 HO－1 和 Nrf2 的结合亲和力高于其他靶点，这与网络药理学预测结果一致。

本研究存在以下局限性：（1）AD 发病率在性别上存在差异，女性高于男性[46]。未来需分别探讨生慧汤在雌性与雄性动物模型中的药效差异及其作用机制。（2）生慧汤对 Nrf2/HO－1 通路的调控作用已获验证，但受其多组分特性限制，核心药效物质基础尚未明确，后续需对关键成分开展靶向验证。（3）在 AD 小鼠症候评估中，高剂量生慧汤虽表现出改善趋势（如缩短逃避潜伏期、增加目标象限停留时间等），但差异无统计学意义。原因可能包括中医证候类型对疗效的影响（如肾虚、脾虚等）以及药物剂量增加引发的毒性或代谢改变[47]。未来研究需扩大样本量，并根据不同证候类型优化生慧汤剂量，以进一步确认其药理特性和最佳用药方案。

综上所述，本研究通过网络药理学、分子对接及体内动物实验，观察到生慧汤可改善 Aβ 诱导的 AD 小鼠模型认知功能障碍，其作用机制可能与调控 Nrf2/HO－1 抗氧化通路相关，这为生慧汤临床用于 AD 治疗奠定了理论和实验基础。

参考文献：

[1] SE THOE E, FAUZI A, TANG Y Q, et al. A review on advances of treatment modalities for Alzheimer's disease. Life Sci, 2021, 7(276): 119－129.

[2] O'NEILL D, KENNELLY S. Responding to responsive behaviour in Alzheimer's disease [J]. Lancet, 2021, 398(10303): 842.

[3] AHMAD HAJAM Y, RANI R, GANIE S Y, et al. Oxidative stress in human pathology and aging: molecular mechanisms and perspectives [J]. Cells, 2022, 11(3): 552.

[4] BAI R R, GUO J N, YE X Y, et al. Oxidative stress: The

core pathogenesis and mechanism of Alzheimer′s disease [J]. Ageing Res Rev,2022,77:101619.

[5]BUTTERFIELD D A,SWOMLEY A M,SULTANA R. Amyloid β - peptide (1 - 42) - induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression[J]. Antioxid Redox Signal,2013,19(8):823 - 835.

[6]FRAGOULIS A,SIEGL S,FENDT M,et al. Oral administration of methysticin improves cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer′s disease[J]. Redox Biol,2017,12:843 - 853.

[7]李姝花,王岩. 试述老年痴呆的病因病机与治疗[J]. 黑龙江中医药,2007,36(1):5 - 6.

[8]彭怀仁. 中医方剂大辞典第三册[M]. 北京:人民卫生出版社,1994.

[9]刘宁宁,苏运芳,马金莲,等. 高浓度胰岛素诱导 HT22 细胞的转录组学分析及熟地黄醇提物的潜在干预机制[J]. 中国老年学杂志,2024,44(23):5758 - 5763.

[10]崔瑛,侯士良,颜正华,等. 熟地黄对毁损下丘脑弓状核大鼠学习记忆及海马 c - fos,NGF 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2003,28(4):77 - 80.

[11]许原. 基于 PI3K - AKT 信号轴探讨熟地黄 - 山茱萸配伍对 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 N2a 细胞凋亡的保护作用[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2023.

[12]王爱民. 人参 - 五味子调控微生物 - 肠 - 脑轴治疗阿尔茨海默症的作用机制研究[D]. 合肥:中国科学技术大学,2023.

[13]曹兵,曾梦楠,梁喜文,等. 基于线粒体融合分裂探究山茱萸及 Cornuofficinaliside G 对 $A\beta_{25-35}$ 诱导 AD 小鼠神经元突触损伤的影响[J]. 中华中医药杂志,2023(5):2390 - 2397.

[14]张美娅,王平,游秋云,等. 生慧汤对 APP/PS1 双转基因 AD 模型小鼠海马慢性炎症的影响[J]. 时珍国医国药,2022,33(2):339 - 342.

[15]文纯,游秋云,王平,等. 生慧汤对 APP/PS1 雄性 AD 小鼠海马内 APP 代谢产物的昼夜变化影响[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2022,24(8):3212 - 3218.

[16]帕克西诺斯 G,富兰克林 KB. 立体定位坐标中的小鼠大脑(第二版)[M]. 纽约:学术出版社,2001:112 - 128.

[17]余万桂,钱锋. 医学机能学实验指导[M]. 南京:东南大学出版社,2021.

[18]寿飞燕,吴承龙,傅丹旦,等. 生慧汤加味联合多奈哌齐治疗老年轻度认知功能障碍肾精亏虚证临床研究[J]. 新中医,2022,54(10):58 - 60.

[19]FORSTERMANN U,XIA N,LI H G. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Circ Res,2017,120(4):713 - 735.

[20]VITORAKIS N,PIPERI C. Pivotal role of AGE - RAGE axis in brain aging with current interventions[J]. Ageing Res Rev,2024,100:102429.

[21]KAJAL A,SINGH R. Coriandrum sativum improve neuronal function via inhibition of oxidative/nitrosative stress and TNF - α in diabetic neuropathic rats[J]. J Ethnopharmacol,2020,263:112959.

[22]LI D X,YU Q X,WU R C,et al. Interactions between oxidative stress and senescence in cancer: Mechanisms,therapeutic implications,and future perspectives[J]. Redox Biol,2024,73:103208.

[23]ISTYASTONO E P,RADIFAR M,YUNIARTI N,et al. PyPLIF HIPPOS: a molecular interaction fingerprinting tool for docking results of AutoDock vina and PLANTS[J]. J Chem Inf Model,2020,60(8):3697 - 3702.

[24]FAO L,MOTA S I,REGO A C. Shaping the Nrf2 - ARE - related pathways in Alzheimer′s and Parkinson′s diseases[J]. Ageing Res Rev,2019,54:100942.

[25]YAMAMOTO M,KENSLER T W,MOTOHASHI H. The KEAP1 - NRF2 system: a thiol - based sensor - effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. Physiol Rev,2018,98(3):1169 - 1203.

[26]JAGUST W. Imaging the evolution and pathophysiology of Alzheimer disease[J]. Nat Rev Neurosci,2018,19(11):687 - 700.

[27]APEL K,HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism,oxidative stress,and signal transduction[J]. Annu Rev Plant Biol,2004,55:373 - 399.

[28]CORDIANO R,DI GIOACCHINO M,MANGIFESTA R,et al. Malondialdehyde as a potential oxidative stress marker for allergy - oriented diseases: an update[J]. Molecules,2023,28(16):5979.

[29]FUKAI T,USHIO - FUKAI M. Superoxide dismutases: role in redox signaling,vascular function,and diseases[J]. Antioxid Redox Signal,2011,15(6):1583 - 1606.

[30]KANG J,LEMAIRE H G,UNTERBECK A,et al. The precursor of Alzheimer′s disease amyloid A4 protein resembles a cell - surface receptor[J]. Nature,1987,325(6106):733 - 736.

[31]HUGHES E,BURKE R M,DOIG A J. Inhibition of toxicity in the beta - amyloid peptide fragment beta - (25 - 35) using N - methylated derivatives: a general strategy to prevent amyloid formation[J]. J Biol Chem,2000,275(33):

25109 – 25115.

[32] HOU Y J, CHU X X, PARK J H, et al. Urolithin A improves Alzheimer's disease cognition and restores mitophagy and lysosomal functions[J]. Alzheimers Dement, 2024, 20(6): 4212 – 4233.

[33] 程玥, 陈淑娴, 张雪, 等. 生慧汤对糖尿病脑病模型大鼠认知障碍及神经病理改变的影响[J]. 中成药, 2015, 37(12): 2579 – 2584.

[34] 周玲, 王平, 蔡铭, 等. 补肾化痰复方对秀丽线虫神经保护的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2348 – 2351.

[35] DONG X Y, ZHOU S Y, NAO J F. Kaempferol as a therapeutic agent in Alzheimer's disease: Evidence from preclinical studies[J]. Ageing Res Rev, 2023, 87: 101910.

[36] SHARMA N, TAN M A, AN S S A. Phytosterols: potential metabolic modulators in neurodegenerative diseases[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12255.

[37] JIAO W Y, WANG Y C, KONG L H, et al. CART peptide activates the Nrf2/HO – 1 antioxidant pathway and protects hippocampal neurons in a rat model of Alzheimer's disease[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 501(4): 1016 – 1022.

[38] ROJO A I, PAJARES M, RADA P, et al. NRF2 deficiency replicates transcriptomic changes in Alzheimer's patients and worsens APP and TAU pathology[J]. Redox Biol, 2017, 13: 444 – 451.

[39] HUANG B X, HE D W, CHEN G X, et al. α – Cyperone inhibits LPS – induced inflammation in BV – 2 cells through activation of Akt/Nrf2/HO – 1 and suppression of the NF – κB pathway[J]. Food Funct, 2018, 9(5): 2735 – 2743.

[40] CHAO X J, CHEN Z W, LIU A M, et al. Effect of tacrine – 3 – caffeic acid, a novel multifunctional anti – Alzheimer's dimer, against oxidative – stress – induced cell death in HT22 hippocampal neurons: involvement of Nrf2/HO – 1 pathway[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(9): 840 – 850.

[41] QU Z, SUN J C, ZHANG W N, et al. Transcription factor NRF2 as a promising therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 159: 87 – 102.

[42] JIN S Y, XIN W, XIANG X T, et al. Inhibition of GPR17 with cangrelor improves cognitive impairment and synaptic deficits induced by Aβ(1 – 42) through Nrf2/HO – 1 and NF – κB signaling pathway in mice[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt B): 108335.

[43] YUAN Y, ZHAI Y Y, CHEN J J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen – glucose deprivation/reoxygenation – induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis[J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 923.

[44] 袁明洲, 袁欣欣, 林瑶, 等. β – 谷甾醇对帕金森病模型大鼠脑氧化应激损伤及 Nrf2/HO – 1 蛋白通路的影响[J]. 福建中医药, 2024, 55(3): 32 – 35.

[45] 杨梦琳, 周小青, 伍大华, 等. 基于网络药理学分析熟地黄 – 何首乌药对治疗阿尔茨海默病的作用机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(6): 3267 – 3272.

[46] BARTH C, CRESTOL A, DE LANGE A G, et al. Sex steroids and the female brain across the lifespan: insights into risk of depression and Alzheimer's disease[J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2023, 11(12): 926 – 941.

[47] 代成刚. 加味生慧汤治疗阿尔茨海默病的临床及机制研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2022: 38 – 44.

收稿日期: 2025 – 07 – 02

作者简介: 亢钰涵(1997 –), 女, 河南灵宝人, 硕士研究生, 主要从事中医药抗衰老研究。

通信作者: 郝莉(1971 –), 女, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 中医药抗衰老研究。E – mail: haoli66@126.com

编辑: 李潇