DOI:10.19893/j.cnki.ydyxb.2025-0053

·阿尔茨海默病专题·

基于网络药理学的中药复方YA3D6靶向NLRP3/NF-κB通路干预阿尔茨海默病的机制研究

马悦然[1,2,3#],梁厶爻[1,2#],陈思新[1,2],王卓灵[1,2],郑 敏[1,2],徐琦睿[1,2],尤 好[1,2],赵 艳[1,2],呼子珍[3*],吕玉红[1,2*]

(1. 延安大学延安医学院,陕西 延安 716000;2. 延安市微生物药物创新及转化重点实验室,陕西 延安 716000;3.延安市中医医院,陕西 延安 716000)

摘 要:目的 探讨中药复方YA3D6(人参、黄芪等6味中药)通过抑制NLRP3炎症小体的NF-κB通路干预阿尔茨海默病(Alzheimer′s disease, AD)的分子机制。**方法** 采用网络药理学方法筛选YA3D6活性成分及作用靶点,构建“成分-靶点-通路”网络;通过分子对接验证其活性成分与NLRP3的结合能力;实验部分优化益生菌发酵工艺,检测入血成分、抗氧化能力及对BV2细胞炎症反应的影响。**结果** 网络药理学分析显示,56个核心靶点显著富集于NLRP3/NF-κB通路,核心成分槲皮素等与NLRP3结合能均< -5 kcal/mol。发酵优化后总黄酮含量提升23%,入血成分增加8.2%。体外实验证实,YA3D6-RF抗氧化能力显著优于原型药物,可下调NLRP3表达(P<0.01),促进BV2细胞向M2型极化,改善线粒体结构。**结论** YA3D6通过“双通路抑制”(阻断NF-κB核转位与NLRP3寡聚化)干预AD神经炎症,为开发基于中药复方的AD预防药物提供理论依据。

关键词:阿尔茨海默病;网络药理学;NLRP3炎症小体;NF-κB通路;益生菌发酵;神经炎症
中图分类号:R749.16 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2639(2025)03-0001-10

A study on the mechanism of traditional Chinese medicine compound YA3D6 targeting the NLRP3/NF-κB pathway in Alzheimer´s disease based on network pharmacology

MA Yueran[1,2,3#], *LIANG Siyao*[1,2#], *CHEN Sixin*[1,2], *WANG Zhuoling*[1,2], *ZHENG Min*[1,2], *XU Qirui*[1,2], *YOU Hao*[1,2], *ZHAO Yan*[1,2], *HU Zizhen*[3*], *LYU Yuhong*[1,2*]

(1.Yan′an Medical College of Yan′an University, Yan′an 716000, China;2.Yan′an Key Laboratory of Microbial Drug Innovation and Transformation, Yan′an 716000, China;3.Yan′an Traditional Chinese Medicine Hospital, Yan′an 716000, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanism of traditional Chinese medicine (TCM) compound YA3D6 (six medicinal ingredients including ginseng and astragalus root) in intervening Alzheimer′s disease (AD) by inhibiting the NF-κB pathway of NLRP3 inflammasome via network pharmacology. **Methods** Network pharmacology

基金项目:陕西省自然科学计划(2024JC-YBMS-755);延安市科技计划(2024-SFGG-201);大学生创新创业项目(202310719044)

作者简介:马悦然(2001—),女,陕西绥德人,在读硕士研究生。研究方向:阿尔茨海默病免疫干预及机制。
梁厶爻(2003—),女,陕西渭南人,在读硕士研究生。研究方向:退行性疾病免疫干预效应及机制。
*** 通信作者:**吕玉红(1976—),女,河南洛阳人,教授,研究生导师。研究方向:慢性退行性疾病干预及机制。
E-mial:yuhonglyu@126.com
呼子珍(1983—),女,陕西延安人,副主任技师。研究方向:退行性疾病的免疫干预。
E-mial:huzizhen830908@163.com
#共同第一作者,*共同通信作者

was used to screen active components and targets of YA3D6, constructing a "component-target-pathway" network. Molecular docking validated the binding affinity between components and NLRP3. Experimental studies optimized probiotic fermentation processes, analyzed blood-active components, evaluated antioxidant capacity, and tested inflammatory responses in BV2 cell line. **Results** Network pharmacology identified 56 core targets significantly enriched in NLRP3/NF-κB pathways. Key components such as quercetin showed binding energies<-5 kcal/mol with NLRP3. Fermentation increased total flavonoids by 23% and blood-active components by 8.2%. *In vitro* experiments demonstrated that YA3D6-RF exhibited superior antioxidant activity, downregulated NLRP3 expression (P<0.01), promoted M2 polarization of BV2 cells, and improved mitochondrial structure. **Conclusion** YA3D6 intervenes in AD neuroinflammation through "dual-pathway inhibition" (blocking NF-κB nuclear translocation and NLRP3 oligomerization), providing a theoretical basis for developing TCM-based AD preventive drugs.

Key words: Alzheimer's disease; Network pharmacology; NLRP3 inflammasome; NF-κB pathway; Probiotic fermentation; Neuroinflammation

在全球老龄化加剧的背景下,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)发病率逐年攀升,已成为威胁老年人健康的重大公共卫生问题[1]。近年研究[2]发现,神经炎症是AD病理学进展的核心驱动因素,尤其在后COVID-19时期,持续的中枢神经系统炎症反应可进一步加速AD的进程。经典西药因“单靶点”作用模式疗效有限,而中药复方凭借“多成分-多靶点”特性展现出独特优势[3]。本研究基于中医“君臣佐使”配伍理论,从古籍中优化出YA3D6复方,其通过多通路协同作用可能在AD早期预防中发挥关键作用。

为提升中药疗效,课题组进一步采用益生菌发酵技术构建了YA3D6-RF(枯草芽孢杆菌+植物乳杆菌),利用微生物代谢重塑活性成分结构(如增加黄酮类化合物转化率),同时通过调节肠道微环境增强宿主对药物的吸收利用[4-5]。拟通过网络药理学联合实验验证YA3D6复方的作用机制,结果显示有56个靶点与AD及NLRP3炎症小体通路密切关联,提示其潜在作用机制与抑制神经炎症相关。

在AD的发生发展中,神经炎症起着关键作用,其中小胶质细胞的激活是核心环节之一。小胶质细胞在AD病理学状态下被过度激活,释放大量炎性因子如IL-1β、TNF-α等,这些炎性因子不仅直接损伤神经元,还通过级联反应放大炎症效应,进一步促进Aβ淀粉样蛋白沉积和Tau蛋白过度磷酸化,导致神经纤维缠结和神经元死亡,加剧AD的病情进展[6-7]。NLRP3炎症小体的过度激活是神经炎症的核心环节,Aβ淀粉样蛋白通过NF-κB通路预处理(上调NLRP3表达)和溶酶体损伤信号(触发炎症小体组装),形成“NF-κB→NLRP3→IL-1β”的正反馈环路,导致小胶质细胞异常活化与神经元死亡[6]。本研究拟通过网络药理学联合实验验证,揭示YA3D6复方是否通过“双通路抑制”(阻断NF-κB核转位+抑制NLRP3寡聚化)干预AD神经炎症,为开发基于中药复方的AD预防药物提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　细胞、菌株与试剂

实验所用BV2细胞系(中国典型培养物保藏中心细胞库,武汉)、中药材原料购自中国亳州仙太生物药业有限公司,生化试剂、细胞生物学试剂和分子生物学试剂均购自北京索莱宝公司,中药发酵菌株为本实验室保存。

1.2　主要网络药理学相关数据库及分析方法

网络药理学研究过程中使用了以下数据库:TCMSP(https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php)和Herb(http://herb.ac.cn)用于筛选中药活性成分;Uniprot(https://www.uniprot.org)用于标准化靶点名称;Genecard(https://www.genecards.org)、CTD(http://ctdbase.org)和STRING(https://string-db.org)分别获取疾病靶点、NLRP3相关靶点及蛋白互作数据;Venny2.1.0(https://bioinfogp.cnb.csic.es)用于靶点交集分析;Cytoscape(https://cytoscape.org)构建可视化网络;DAVID(https://david.ncifcrf.gov)进行功能富集分析;AlzData(http://www.alzdata.org)提供阿尔茨海默病相关数据支持。这些数据库共同支撑了从活性成分筛选到通路机制解析的全流程网络药理学研究。

本研究基于网络药理学方法,首先通过TCMSP、Herb等数据库筛选YA3D6复方(人参、黄芪、茯苓、

当归、肉桂、菟丝子）的活性成分（筛选条件：OB≥30%，DL≥0.18），结合Uniprot数据库标准化靶点名称，构建“成分-靶点”数据集。随后，分别从Genecards（AD靶点，得分≥10）、CTD（NLRP3相关靶点，人源+高通量数据）及STRING（NLRP3互作靶点，Combine score≥0.5，最大交互量500）获取疾病与通路靶点，通过Venny 2.1.0取三者交集，并利用Cytoscape 3.7.1构建“中药-成分-疾病-靶点”可视化网络。

蛋白质互作（protein-protein interaction，PPI）网络与核心靶点：将YA3D6与NLRP3、AD三者的交集靶点导入STRING构建蛋白互作网络，结合CytoHubba插件筛选Degree值前10的核心靶点（如RELA、NLRP3、CASP1）。分子对接：通过PubChem获取活性成分（如槲皮素）3D结构，RCSB PDB下载核心靶点蛋白结构，利用AutoDock Vina验证成分与靶点的结合活性（Pymol可视化）。富集分析：基于DAVID数据库进行GO/KEGG富集（P≤0.05），筛选前20条通路（如NF-κB、NLRP3炎症小体通路）及前15项GO功能（如炎症反应调控），并通过微生信平台绘制气泡图。

1.3 中药复方YA3D6-RF发酵

YA3D6-RF的发酵操作采用微生物转化技术优化中药复方的活性成分，具体步骤如下：首先通过单菌生长曲线确定枯草芽孢杆菌和植物乳杆菌的最佳活化条件，分别于20 h和18 h达到对数生长期。随后进行复合菌比例优化实验，发现当枯草芽孢杆菌与植物乳杆菌以2∶1比例混合，在25 ℃、180 rpm条件下培养24 h后，菌液浓度最高（OD_{600}=1.2）。在此基础上，通过响应面法对液料比（4∶1~10∶1）、发酵时间（1~9 d）和接菌量（2%~6%）进行三因素三水平优化，以总黄酮含量为响应值建立二次回归模型。

1.4 YA3D6-R和YA3D6-RF入血活性成分分析

YA3D6-R和YA3D6-RF的入血活性成分分析操作流程如下：将SD大鼠随机分为空白组、YA3D6-R组（0.925 g/kg·d）和YA3D6-RF组（0.925 g/kg·d），连续灌胃3 d后眼眶取血，分离含药血浆。采用超高效液相色谱-质谱联用（UPLC-MS/MS）技术，通过Waters ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱（1.8 μm，2.1 mm×100 μm）进行梯度洗脱（流动相A为0.1%甲酸水，B为乙腈），结合Q Exactive HF-X质谱仪在ESI+/-模式下检测。血浆样本经70%甲醇超声提取后，通过XCMS程序进行峰提取、保留时间校正和代谢物鉴定，最终从YA3D6-R和YA3D6-RF中分别鉴定出30种含量最高的入血成分。

1.5 YA3D6-R和YA3D6-RF体外总抗氧化能力和羟自由基清除能力测定

YA3D6-R和YA3D6-RF的体外总抗氧化能力及羟自由基清除能力测定采用FRAP法和Fenton反应法，将药物倍比稀释为2~32 mg/mL浓度梯度，通过酶标仪检测593 nm和536 nm处吸光度变化。

1.6 RT-qPCR检测YA3D6-R和YA3D6-RF对BV2细胞炎症因子mRNA表达的影响

YA3D6-R和YA3D6-RF体外RT-qPCR检测炎症因子的操作流程如下：将BV2小胶质细胞接种于6孔板（3×10^5 cells/孔），分为对照组、LPS模型组（1 μg/mL）、LPS+YA3D6-R组（2 mg/mL）和LPS+YA3D6-RF组（2 mg/mL），处理24 h后收集细胞。采用Trizol法提取总RNA，经PrimeScript RT Master Mix逆转录为cDNA，使用TB Green Premix Ex Taq进行实时荧光定量PCR，检测NLRP3、INOS、CD86（促炎因子）和Arg-1、CD206（抗炎因子）的mRNA表达。相关引物序列如下：*NLRP3*正向引物5′-AGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，反向引物5′-TGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′；*INOS*正向引物5′-CGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，反向引物5′-GGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′；*CD*86正向引物5′-TGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，反向引物5′-AGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′；*Arg*-1正向引物5′-GGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，反向引物5′-CGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′；*CD*206正向引物5′-AGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′，反向引物5′-TGCTGCTGCTGCTGCTGCT-3′。反应体系含10 μL 2×SYBR Green Supermix、2 μL引物（10 μM）及100 ng cDNA，通过CFX Connect实时PCR仪进行扩增（95 ℃预变性5 min，40个循环：95 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s）。数据采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算相对表达量，组间差异通过单因素方差分析（One-way ANOVA）评估（*表示P<0.05，**表示P<0.01 *vs* LPS组）。

2 结果

2.1 中药复方YA3D6可能靶向NLRP3/NF-κB通路

基于系统生物学理论构建的多维度网络分析体系，成功揭示了YA3D6复方干预AD的潜在分子机制。通过韦恩图分析（图1），从TCMSP/Herb数据

库筛选的217个复方活性成分靶点(OB≥30%,DL≥0.18)[8]、Genecards/CTD/STRING数据库获取的AD相关靶点(得分≥10)及NLRP3通路靶点(Combine score≥0.5)中,成功筛选出56个共同靶点,这些靶点在PPI网络中呈现显著的交互关联性(图2)。通过CytoHubba插件筛选出的核心靶点包括NLRP3、IL-6、TNF、IL-1β等炎症枢纽分子,其Degree值均超过150,表明在AD病理学网络中具有关键调控作用。

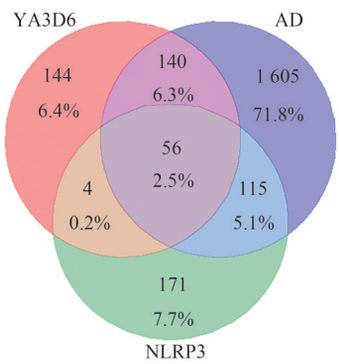


图1　YA3D6、NLRP3与AD靶点的韦恩图

进一步构建的"成分-靶点"可视化网络(图3)显示,槲皮素(MOL000098)、山奈酚(MOL000422)等4个核心黄酮类化合物与上述靶点形成高密度连接。分子对接实验证实,这些活性成分与NLRP3蛋白的结合能均低于-5 kcal/mol(结合能负值越大结合越稳定),其中槲皮素与NLRP3的LYS-23位点形成关键氢键作用(结合能-7.8 kcal/mol),提示其可能通过阻断NLRP3寡聚化发挥抑制作用。KEGG通路富集分析显示,56个靶点显著富集于NF-κB信号通路(hsa04064)、NLRP3炎症小体通路(hsa04621)等18条核心炎症相关通路(P<0.05)。其中,NF-κB通路中包含RELA、NFKB1等关键节点,NLRP3通路涉及CASP1、IL-1β等效应分子。GO功能注释揭示,这些靶点主要参与"炎症反应调控""细胞因子生成"等生物过程,以及"蛋白激酶结合""转录因子活性"等分子功能,进一步佐证了YA3D6通过多靶点协同调控神经炎症的作用模式(图4)。

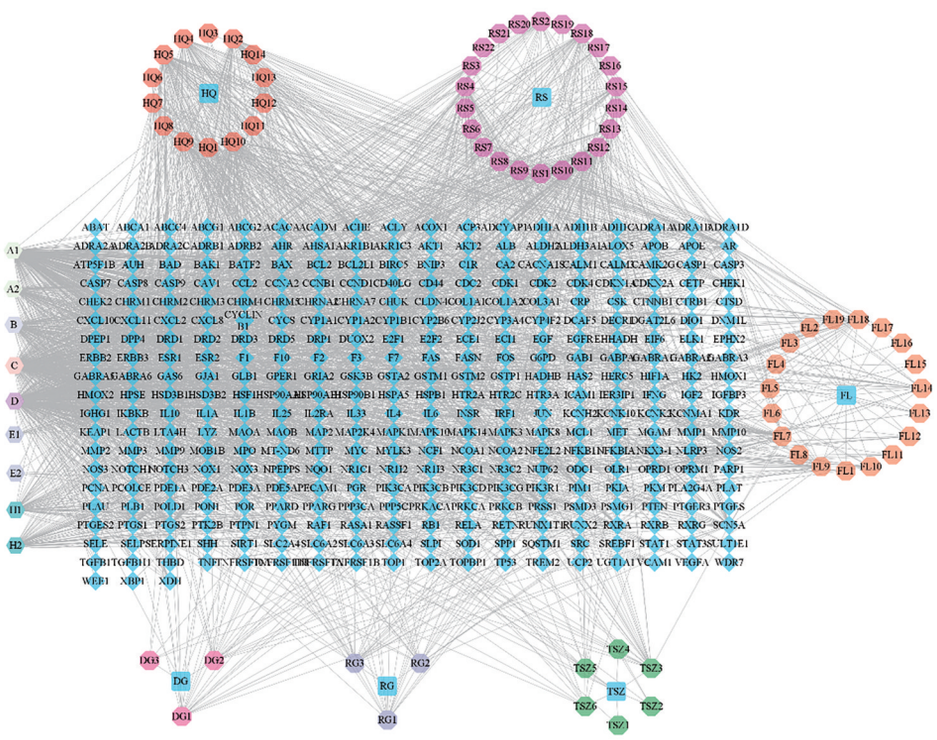


图2　YA3D6"活性成分-作用靶点"网络图

2.2　YA3D6-RF发酵工艺优化

针对中药复方活性成分生物利用度低的技术瓶颈,本研究采用益生菌发酵技术构建新型制剂YA3D6-RF。首先通过单菌生长动力学分析确定最佳活化条件:枯草芽孢杆菌在20 h进入稳定期(图5A),植物乳杆菌在18 h达到对数生长期峰值(图5B)。复合菌比例优化实验显示,当两菌以2∶1比例混合培养24 h后,菌液浓度达到最大值(OD600=1.2±0.05),较单一菌培养提高37%,表明两菌具有协同生长效应。

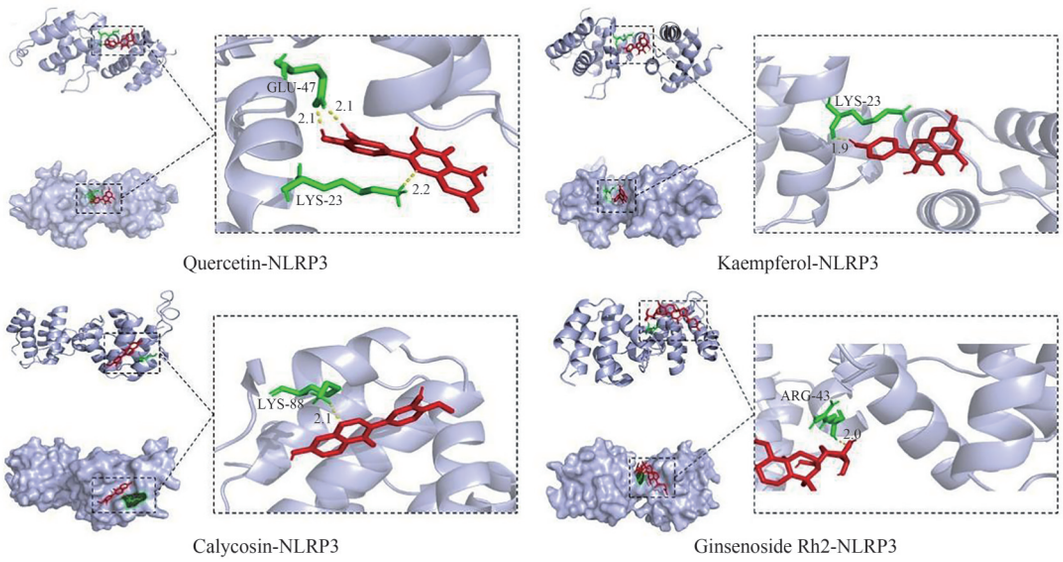
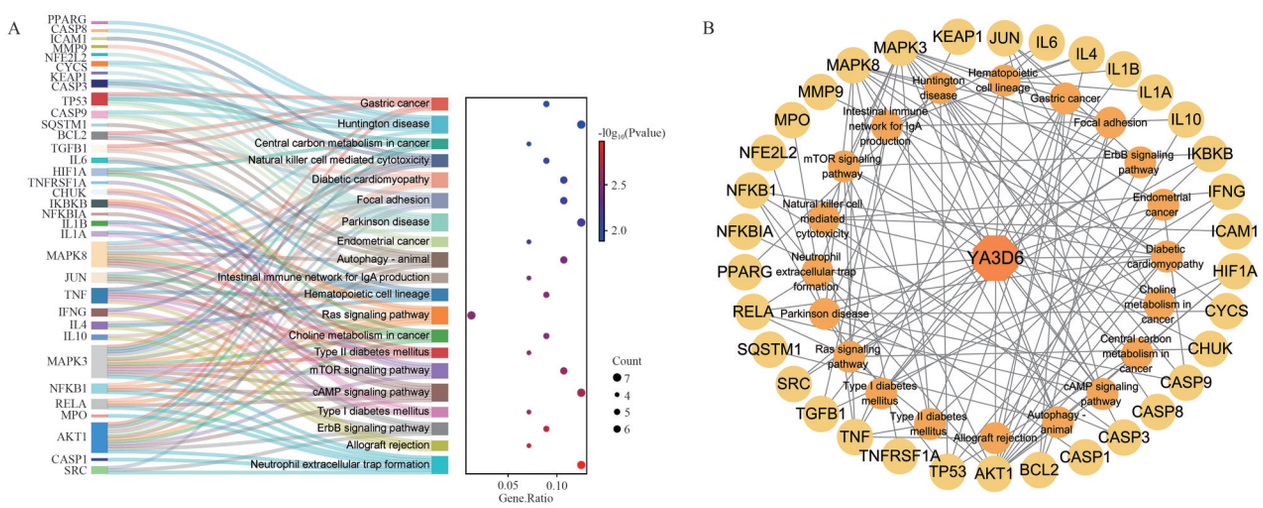
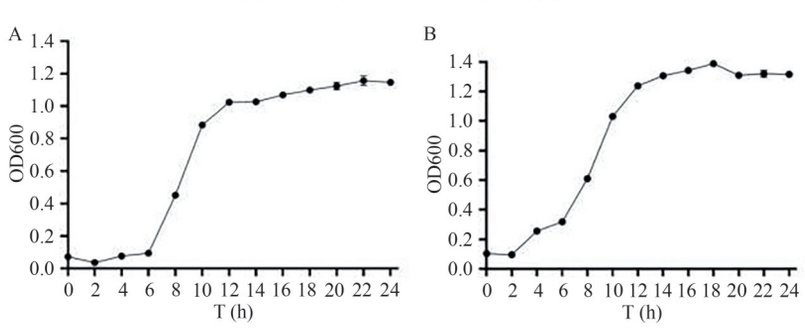


图3　核心靶点的分子对接



A为基因富集分析弦图，呈现不同通路的基因比例（Gene Ratio）与显著性[$-\log_{10}$（*P*-value）]；B为蛋白质互作网络（PPI网络），节点代表与YA3D6作用相关的潜在靶点蛋白、连线表示它们之间的相互关系。

图4　GO富集和KEGG富集分析

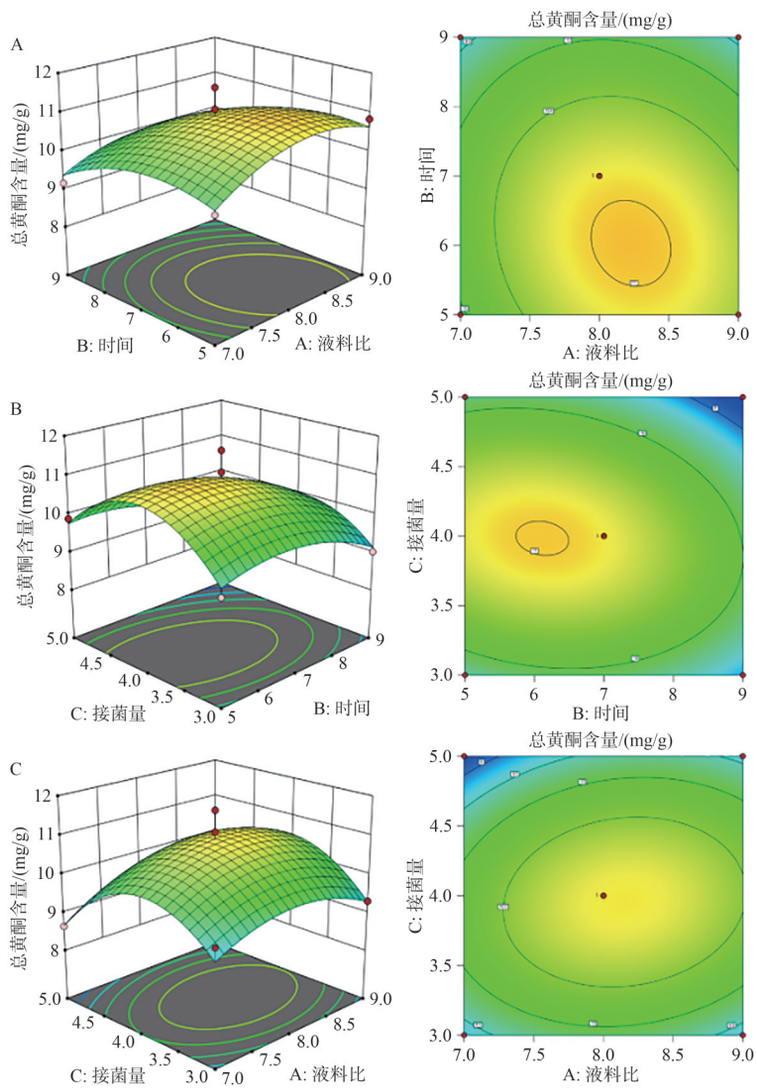


A. 枯草芽孢杆菌生长曲线；B. 植物乳杆菌生长曲线。

图5　生长曲线

在此基础上，采用Box-Behnken响应面法优化发酵工艺参数。以总黄酮含量为响应值，建立包含液料比（A）、发酵时间（B）、接菌量（C）三因素的二次回归模型（Y=10.918+0.183 75A-0.445B-0.133 75C-

0. 165AB+0. 177 5AC−0. 22BC−0. 580 25A^2−0. 497 75B^2−1. 185 25C^2)。方差分析显示模型具有显著性(F=6. 59, P<0. 05),各因素影响顺序为接菌量(C)>液料比(A)>发酵时间(B)。响应面三维曲面图(图6A−C)显示,当液料比为8. 22∶1、发酵时间6. 02 d、接菌量4. 01%时,理论最大黄酮含量为11. 05 mg/g。结合生产可行性调整为液料比8∶1、发酵6 d、接菌量4%,验证实验测得黄酮含量为10. 89±0. 32 mg/g,与预测值高度吻合。



A. 料液比与发酵时间相互作用的响应面等高线图;B. 发酵时间与接菌量相互作用的响应面等高线图;C. 液料比与接菌量相互作用的响应面等高线图。

图6　响应面等高线图

2. 3　YA3D6−R、YA3D6−RF主要入血活性成分及其功能分析

基于UPLC−MS/MS数据,进行化学成分分析。YA3D6−R有4 864个化学成分,而发酵后的YA3D6−RF有5 224个化学成分,有显著提高。经过韦恩图分析,两者共有4 576个相同化学成分,如图7,这些物质包括黄酮类、氨基酸类、木脂素和香豆素等共21类化学成分。

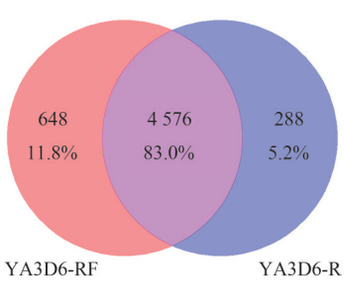


图7　YA3D6−R、YA3D6−RF的化学成分韦恩图

通过超高效液相色谱-质谱联用技术(UPLC-MS/MS)对YA3D6-R和YA3D6-RF的入血成分进行定性定量分析,结果显示发酵后成分种类显著增加:YA3D6-R检测到30种入血成分,YA3D6-RF检测到30种,其中24种为共有成分。这些成分涵盖黄酮类、有机酸、氨基酸衍生物等12大类化合物,包括槲皮素($C_{15}H_{10}O_7$)、1-脱氧野尻霉素($C_6H_{13}NO_4$)、Eplerenone($C_{24}H_{30}O_6$)等关键活性成分(表1)。

表1展示了YA3D6入血成分在各种疾病中的作用机制。Ganoderic acid A通过抑制TLR4/NLRP3信号通路的激活,减轻细胞凋亡、氧化应激和炎症反应。Glycerol在急性肾损伤中,通过NLRP3炎性小体引发炎症反应和细胞凋亡。Quercetin在神经炎症相关疾病和糖尿病视网膜病变中,通过促进线粒体自噬抑制NLRP3炎性小体的激活,并通过SIRT1调节细胞衰老过程。Eplerenone在肾系膜细胞焦亡过程中,通过MR/NLRP3通路抑制HMC焦亡。1-Deoxynojirimycin在急性肝损伤中,通过抑制ASC和Caspase-1的表达以及p38 MAPK和ERK1/2的磷酸化,发挥其保护作用。将这5个入血成分与NLRP3进行分子对接(图8),发现NLRP3与Ganoderic acid A、Glycerol、Quercetin、Eplerenone、1-Deoxynojirimycin结合,结合能分别为-6.681 kcal/mol、-3.125 kcal/mol、-7.403 kcal/mol、-6.721 kcal/mol、-4.244 kcal/mol。分析表明入血成分中的化合物均与核心靶点NLRP3能较好结合,进一步提示YA3D6通过NLRP3这一关键靶点发挥干预AD的作用。

表1　YA3D6入血成分在疾病中的作用

化合物	相关症状	作用通路	分子靶点机制	参考文献
Ganoderic acid A	细胞凋亡、氧化应激和炎症反应	TLR4/NLRP3信号轴	抑制TLR4/NLRP3信号通路的激活	[9]
Glycerol	急性肾损伤	NLRP3炎性小体	引发炎症反应和凋亡细胞死亡	[10-11]
Quercetin	神经炎症相关疾病、糖尿病视网膜病变	NLRP3炎性小体、SIRT1相关信号通路	通过促进线粒体自噬抑制mtROS介导的NLRP3炎性小体激活;*SIRT1*参与多种与衰老相关的细胞过程	[12]
Eplerenone	慢性炎症、胰岛素抵抗	NLRP3-炎症小体、ROS、ATP和Nigericin诱导的IL1B分泌	抑制NLRP3和caspase1的表达,抑制ROS的产生和IL-1β分泌,从而减轻慢性炎症	[13]
1-Deoxynojirimycin	氧化应激和炎症反应	NLRP3和MAPK信号通路	抑制ASC和Caspase-1的表达,抑制p38 MAPK和ERK1/2的磷酸化	[14]

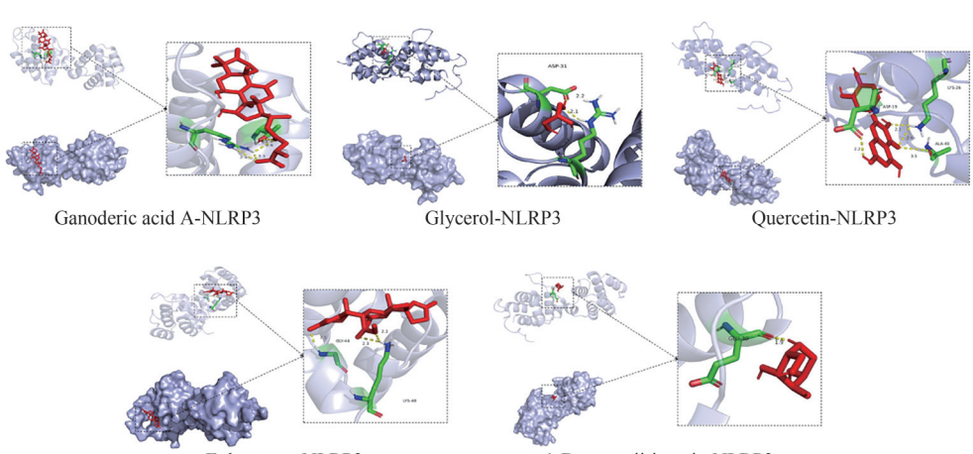


图8　关键入血成分与NLRP3的分子对接

2.4　YA3D6-R与YA3D6-RF体外抗氧化活性及细胞毒性评价

通过FRAP法和Fenton反应法检测了YA3D6-R与YA3D6-RF的抗氧化能力(图9)。实验设置2~32 mg/mL浓度梯度,结果显示两者的总抗氧化能力(T-AOC)和羟自由基清除率均呈显著浓度依赖性增强($P<0.05$)。在相同浓度下,YA3D6-RF的T-AOC值较YA3D6-R提高18%~25%,羟自由基清除

率提升12%~19%,表明发酵处理显著增强了抗氧化活性。进一步通过CCK-8法检测细胞毒性(图10),发现1 μg/mL LPS与2 mg/mL药物共处理24 h后,各组细胞存活率均>90%,与空白对照组无显著差异(P>0.05),证实药物在有效浓度下无细胞毒性。

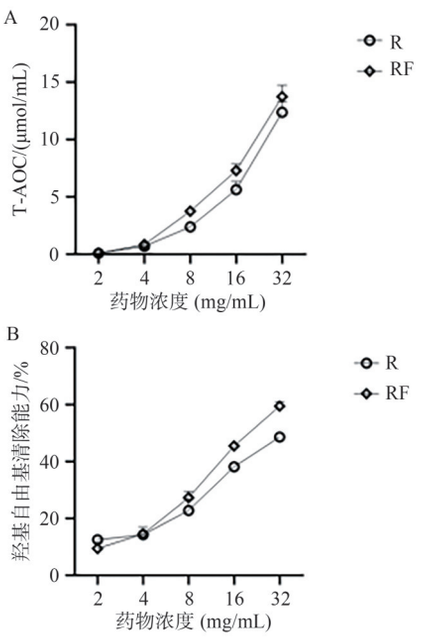


图9　YA3D6体外总抗氧化能力及羟自由基清除能力

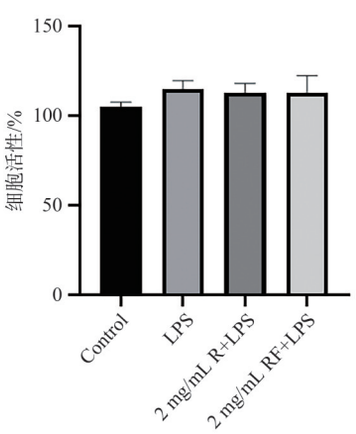


图10　YA3D6对LPS诱导的BV2的细胞活力影响

2.5　RT-qPCR验证YA3D6对BV2细胞极化及NLRP3表达的调控作用

采用RT-qPCR技术检测了YA3D6对LPS诱导的BV2小胶质细胞极化及NLRP3表达的影响(图11)。结果显示,与Control组相比,LPS组NLRP3表达量显著上调3.2倍(P<0.001),同时促炎因子iNOS和CD86分别升高2.8倍和2.5倍,抗炎因子Arg-1和CD206降低至0.4倍和0.3倍,表明模型组细胞成功极化为促炎表型。给予2 mg/mLYA3D6-R和YA3D6-RF干预后,NLRP3表达量分别下调47%和58%(P<0.01),iNOS和CD86表达量显著降低(P<0.05),而Arg-1和CD206分别回升至1.8倍和1.6倍(P<0.05)。表明YA3D6能够有效抑制LPS诱导的NLRP3炎症小体激活,促进小胶质细胞从促炎状态变为抗炎状态。其中YA3D6-RF的调控效果更显著,可能与其发酵后活性成分增加有关。该结果与网络药理学预测的NLRP3为核心靶点相一致,进一步验证了YA3D6通过抑制NLRP3通路干预神经炎症的作用机制。

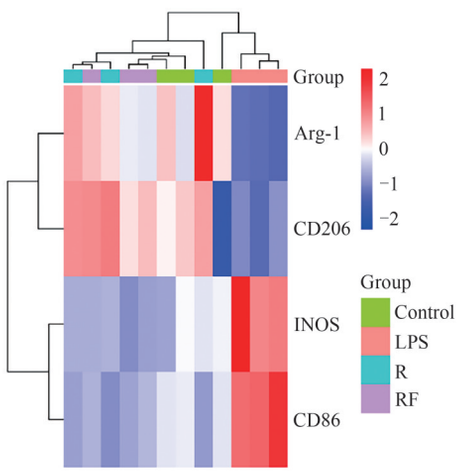
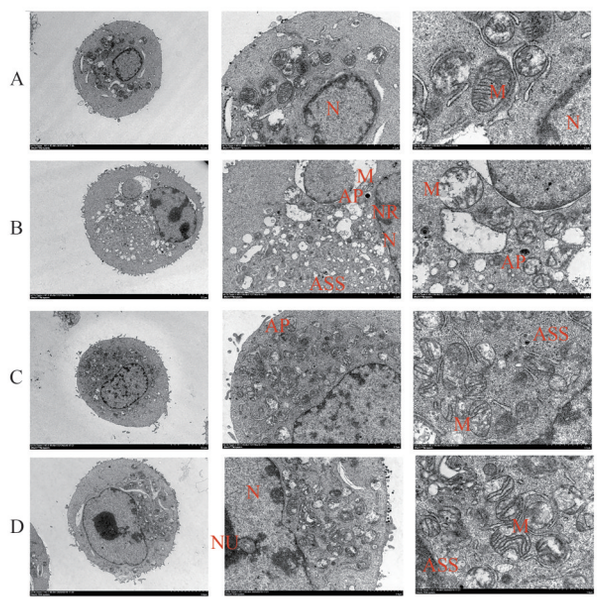


图11　YA3D6对BV2细胞极化的影响

2.6　透射电镜观察YA3D6对BV2细胞形态及线粒体结构的保护作用

通过透射电镜观察不同处理组BV2细胞的超微结构变化(图12),结果显示对照组(A组)细胞呈典型静息态,胞体细长,突起丰富,线粒体结构完整,嵴清晰排列,粗面内质网(RER)分布均匀,自噬小体(AP)和自噬溶酶体(ASS)数量较少。LPS刺激组(B组)细胞显著活化,胞体肿胀呈阿米巴样,突起消失,线粒体明显肿胀,嵴减少甚至空泡化,自噬溶酶体数量显著增多,提示线粒体功能受损和过度自噬激活。给予YA3D6-R(C组)和YA3D6-RF(D组)干预后,细胞形态明显改善,胞体回缩,突起重新形成,接近静息态。线粒体结构显著恢复,肿胀减轻,嵴密度增加,自噬溶酶体数量减少,粗面内质网分布趋于正常。定量分析显示,LPS组线粒体肿胀率达68.7%±5.2%,而YA3D6-R和YA3D6-RF组分别降至32.4%±4.1%和25.6%±3.8%(P<0.01)。线粒体嵴密度在药物组显著高于LPS组(P<0.05),自噬溶酶体数量减少约40%。这些结构变化与RT-qPCR检测的NLRP3表达下调趋势一致,表明YA3D6通过抑制NLRP3炎症小体激活,有效地改善线粒体功能障碍,抑制过度自噬,从而减轻LPS诱导的神经

炎症损伤。透射电镜结果观察为YA3D6的神经保护机制提供了直接的超微结构证据，进一步支持通过“双通路抑制”策略干预AD的理论假设。



A：Control（without drug）；B：LPS（1 μg/L）24h；C：YA3D-6-R（2 mg/mL）+ LPS（1 μg/mL）24 h；D：YA3D-6-RF（2 mg/mL）+ LPS（1 μg/mL）24 h；M：线粒体；RER：粗面内质网；N：细胞核；NU：核仁；ASS：自噬溶酶体；AP：自噬小体。

图12　BV2细胞的电镜结果

3　讨论

本研究首次系统揭示了中药复方YA3D6通过“双通路抑制”策略干预阿尔茨海默病神经炎症的分子机制。网络药理学分析显示，YA3D6的56个核心靶点显著富集于NLRP3/NF-κB炎症通路，其中槲皮素等活性成分通过氢键与NLRP3的LYS-23位点结合（结合能-7.8 kcal/mol），阻断其寡聚化过程。实验进一步表明，益生菌发酵技术使总黄酮含量提升23%，入血成分种类增加8.2%，其中Ganoderic acid A等5种成分与NLRP3具有高亲和力，为“成分-靶点”网络提供了直接证据。

体外实验证实，YA3D6-RF抗氧化能力较原型药物提高18%~25%，通过下调NLRP3表达（$P<0.01$），促进BV2细胞向抗炎的M2型极化，抑制LPS诱导的线粒体肿胀（肿胀率从68.7%降至25.6%）和过度自噬。透射电镜观察到的线粒体结构改善与qPCR结果高度一致，表明其通过保护线粒体功能发挥神经保护作用。

本研究创新之处在于构建了“网络预测-发酵优化-成分验证-机制解析”的完整研究链条，发现发酵工艺通过糖苷键水解增强活性成分生物利用度，并阐明YA3D6通过调控NLRP3/线粒体轴抑制神经炎症的机制。研究结果为开发基于微生物转化的中药创新制剂提供了理论支撑，尤其对后疫情时代AD防治具有重要意义。

然而，本研究仍存在局限：缺乏体内实验验证，对肠道菌群-肠脑轴的调控机制尚未深入探讨，长期毒性评价不足。未来需开展APP/PS1转基因小鼠模型研究，结合代谢组学和宏基因组学技术，进一步揭示YA3D6通过“成分-菌群-代谢物”多维度干预AD的分子网络。同时，应开展临床前毒理学研究，为新药开发奠定基础。本研究为中药复方现代化研究提供了范式，其多靶点作用特点有望突破传统西药单靶点局限，为AD干预开辟新路径。

参考文献：

[1]阿尔茨海默病防治协会网. “2023年中国阿尔茨海默病：事实与数字.” http://www.caad.org.cn/art/2024/1/23/art_44_346496.html（accessed.

[2]DOUAUD G，LEE S，ALFARO-ALMAGRO F，et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank[J]. Nature，2022，604(7907)：697-707.

[3]LI L，ZHANG L，YANG C C. Multi-target strategy and experimental studies of traditional Chinese medicine for Alzheimer’s disease therapy[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry，2015，16(5)：537-548.

[4]马玉俊，李翔，李菁，等. 中药微生物发酵及其研究进展[J]. 西藏农业科技，2024，46(1)：107-112.

[5]宋沁洁，李咸慰，李国峰，等. 中药发酵研究新进展[J]. 沈阳药科大学学报，2024，41(10)：1298-1305.

[6]HENEKA M T，MCMANUS R M，LATZ E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease[J]. Nature Reviews. Neuroscience，2018，19(10)：610-621.

[7]MOONEN S，KOPER M J，VAN SCHOOR E，et al. Pyroptosis in Alzheimer’s disease：Cell type-specific activation in microglia，astrocytes and neurons[J]. Acta Neuropathologica，2023，145(2)：175-195.

[8]WEI M Q，LI H，LI Q F，et al. Based on network pharmacology to explore the molecular targets and mechanisms of Gegen Qinlian decoction for the treatment of ulcerative colitis[J]. BioMed Research International，2020，2020(1)：5217405.

[9]WANG D，CAI X H，XU F，et al. Ganoderic Acid A alleviates the degeneration of intervertebral disc *via* suppressing the activation of TLR4/NLRP3 signaling pathway[J]. Bioengineered，2022，13(5)：11684-11693.

（下转第17页）