



天麻素通过调控 GSK-3 β /P38 MAPK 通路对过表达 APOE4 的 SH-SY5Y 细胞的保护作用及机制

吴晓奇^{1,2}, 杨雪玢¹, 郭建军^{1,2}, 盛清¹

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018; 2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院, 浙江绍兴 312000)

摘要: 为探究天麻素(GAS)对载脂蛋白 E(APOE4)引发阿尔茨海默病(AD)的调控作用机制,进而为 AD 的干预策略提供新方案,该文采用网络药理学方法分析 GAS 在 AD 中的潜在作用靶点及相关信号通路;通过慢病毒转染技术构建稳定过表达 APOE4 基因的 SH-SY5Y 细胞模型,探究 GAS 对细胞活力和氧化应激状态的影响;利用 RT-qPCR 和 Western blotting 技术检测 Bax、Bcl-2、p-Tau(Ser396)、p-Tau(Thr181)以及糖原合成酶激酶-3 β /P38 丝裂原活化蛋白激酶(GSK-3 β , P38 MAPK)等关键蛋白的 mRNA 表达水平和蛋白表达水平变化。结果表明: GAS 可显著改善因 APOE4 过表达所导致的 SH-SY5Y 细胞活力降低和氧化应激损伤,抑制细胞凋亡;同时显著抑制 GSK-3 β 蛋白的活化,下调 p-P38 MAPK 蛋白的表达水平;并且有效缓解 p-Tau(Ser396)与 p-Tau(Thr181)的异常磷酸化及 A β 蛋白的积聚。该文研究证实, GAS 可显著减轻 APOE4 过表达引发的氧化应激反应、抑制细胞凋亡,通过调控 GSK-3 β /P38 MAPK 信号通路抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化,发挥对神经细胞的保护作用,这为 APOE4 相关的 AD 防治提供了新的干预策略。

关键词: 天麻素; 阿尔茨海默病; 载脂蛋白 E4; Tau 蛋白过度磷酸化; 糖原合成酶激酶-3 β /P38 丝裂原活化蛋白激酶; 细胞凋亡

中图分类号: R363; R742

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2026)03-0207-12

引文格式: 吴晓奇, 杨雪玢, 郭建军, 等. 天麻素通过调控 GSK-3 β /P38 MAPK 通路对过表达 APOE4 的 SH-SY5Y 细胞的保护作用及机制[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2026, 55(2): 207-218.

Reference Format: WU Xiaochi, YANG Xuebin, GUO Jianjun, et al. Protective effect and mechanism of gastrodin on SH-SY5Y cells overexpressing APOE4 by regulating GSK-3 β /P38 MAPK pathway[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(2): 207-218.

Protective effect and mechanism of gastrodin on SH-SY5Y cells overexpressing APOE4 by regulating GSK-3 β /P38 MAPK pathway

WU Xiaochi^{1,2}, YANG Xuebin¹, GUO Jianjun^{1,2}, SHENG Qing¹

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;
2. Shaoxing Academy of Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Shaoxing 312000, China)

Abstract: To investigate the regulatory mechanism underlying the effects of GAS on APOE4-induced Alzheimer's disease (AD) and to develop novel intervention strategies for AD, this study employed network pharmacology to analyze the potential targets and associated signaling pathways through which GAS may exert its effects in AD. Lentiviral transduction technology was employed to establish a stable APOE4-overexpressing SH-SY5Y cell model to investigate the effects of GAS on cell viability and oxidative stress. The mRNA expression levels and changes in protein expression levels of key proteins,

收稿日期: 2025-10-21 网络出版日期: 2025-12-10

基金项目: 浙江理工大学绍兴生物医药研究院开放基金(SXAB202007)

作者简介: 吴晓奇(1998—), 女, 广东潮州人, 硕士研究生, 主要从事生物医药方面的研究。

通信作者: 盛清, E-mail: csheng@zstu.edu.cn

including Bax, Bcl-2, p-Tau (Ser396), p-Tau (Thr181), glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), and P38 mitogen-activated protein kinase (P38 MAPK), were assessed using RT-qPCR and Western blotting. The experiment results demonstrated that GAS significantly enhanced cell viability and ameliorated oxidative stress injury in SH-SY5Y cells induced by APOE4 overexpression, while reducing cellular apoptosis. Furthermore, GAS markedly suppressed the activation of GSK-3 β and down-regulated the expression levels of p-P38 MAPK. It also effectively attenuated the abnormal phosphorylation of p-Tau (Ser396 and Thr181) and reduced the accumulation of A β protein. This study demonstrated that GAS could significantly attenuate oxidative stress and apoptosis induced by APOE4 overexpression, and inhibit Tau protein hyperphosphorylation through modulation of the GSK-3 β /P38 MAPK signaling pathway, thereby exerting neuroprotective effects and identifying a potential therapeutic target for the prevention and treatment of APOE4-associated Alzheimer's disease.

Key words: gastrodin; Alzheimer's disease; APOE4; Tau hyperphosphorylation; GSK-3 β /P38 MAPK; cell apoptosis

0 引言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的神经退行性疾病,早期主要表现为记忆力衰退、语言功能障碍;随着病情进展,患者可逐渐出现自理能力下降、记忆混乱等症状^[1]。AD的发病机制具有高度复杂性,目前尚未完全阐明^[2]。AD的主要临床病理特征包括脑内老年斑(Senile plaques, SP)的沉积以及神经纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs)的形成^[3-4]。现有研究普遍认为, β 淀粉样蛋白(Amyloid-beta protein, A β)的异常沉积及 Tau 过度磷酸化所引发的神经纤维缠结是 AD 发病的核心病理机制^[5-7]。此外,氧化应激、神经炎症等生物学过程也会导致 AD 病情加重^[8-11]。

据 2024 年统计,中国现有 AD 患者约 1700 万人;随着人口老龄化的加剧,AD 的发病率持续上升^[12]。目前可用于治疗 AD 的药物仍较为有限,主要为美金刚、多奈哌齐、加兰他敏等单靶点药物^[13]。此类药物不仅副作用较多,且难以实现疾病的预防或根治,临床需求远未得到满足。近年来仑卡奈单抗等单克隆抗体类新药的研发为轻度 AD 患者带来了新的治疗希望。但受限于高昂的治疗成本及疗效的局限性,其广泛应用仍受限制。AD 的预防与治疗仍是公共卫生领域的重大挑战^[14-15]。已有研究表明,中药在神经退行性疾病的预防和治疗中具有多靶点、多途径的干预优势。例如,灵芝中的活性化合物可减轻 AD 模型小鼠脑组织的氧化应激损伤,抑制神经细胞凋亡,减少海马神经元坏死,并改善其认知功能障碍^[16]。Bao 等^[17]在 AD 研究中,采用网络药理学方法系统分析了黄芪甲苷在 AD 相关炎症过程

中的潜在作用靶点,并验证了表皮生长因子受体(EGFR)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)为其关键调控靶点,为神经退行性疾病的临床治疗提供了潜在的分子靶标。Dartigues 等^[18]探究了银杏叶提取物的药理作用,证实其可有效降低老年人群痴呆症的发病风险及全因死亡率^[19]。

天麻(*Gastrodia elata* Bl.)是一种药食同源的传统中药,富含天麻素(Gastrodine, GAS)、天麻多糖和生物碱等植物化学成分。现代药理学研究表明,天麻富含的活性成分具有改善认知障碍与记忆功能、发挥神经保护作用以及缓解失眠、头晕等症状的功效^[20]。GAS 是天麻的主要活性成分,化学名称为 4-羟甲基苯基- β -D-吡喃葡萄糖苷,属于从天麻块茎中提取的酚苷类化合物^[21]。GAS 具有较小的相对分子量,其苷元及一元苷易于透过血脑屏障,被认为是天麻发挥中枢神经系统保护作用的关键物质基础^[22-23]。

近年来的研究表明,GAS 在生物学效应方面最具特征性的功能是神经保护作用,在脑缺血再灌注损伤、癫痫综合征、阿尔茨海默病及神经病理性疼痛等多种神经系统疾病的治疗中展现出潜在的应用价值。临床上,GAS 常用于缓解头痛、失眠等症状,具有抗衰老、改善记忆、调节血压及镇静等多重药理功效^[24-25]。其作用机制涉及 Nrf2、NF- κ B 和 AMPK 等多种信号通路的调控^[26]。Liu 等^[27]研究发现,GAS 可通过调节 Wnt/Nrf2 通路,在铅诱导的神经损伤小鼠模型中发挥神经保护效应。GAS 还可通过激活 Nrf2 信号通路抑制细胞凋亡,在神经退行性疾病的治疗中发挥积极作用^[28]。Zhang 等^[29]的研究表明 GAS 通过抑制蛋白激酶/真核起始因子-2 α (PKR/eIF2 α)信号通路抑制海马 BACE1

表达来改善 AD。Jiao 等^[30]发现, GAS 可以抑制 TCDD 诱导的 NF- κ B 信号激活, 抑制 PC12 神经元凋亡和星形胶质细胞活化。

GAS 可通过靶向特定基因和信号通路对 AD 的病理变化发挥调控作用, 可通过调节 SIRT2 和 CDKN2A 的表达或活性, 干预细胞衰老进程并缓解氧化应激反应, 进而延缓 AD 的病理进程^[31]。Zhu 等^[32]研究表明, GAS 可通过抑制 P-糖蛋白的泛素化降解, 增强其将脑内 A β 转运至外周血液的能力, 减少 AD 模型小鼠脑内的 A β 斑块的沉积。Lei 等^[33]进一步发现, GAS 通过激活 β -catenin/c-Myc/MCT2 信号通路, 改善 AD 相关的脑能量代谢障碍。上述研究不仅为天麻素的传统药理功效提供了现代科学依据, 也为未来其在抗 AD 药物研发中的应用提供了潜在的新的干预策略。

载脂蛋白 E(Apolipoprotein E, APOE)是一种具有多态性的蛋白质, 在血液和中枢神经系统的脂质转运中发挥关键作用, 与心血管疾病、阿尔茨海默病等多种疾病密切相关。深入研究 APOE4 的功能及其在疾病发生发展中的分子机制, 对于开发有效的疾病诊断方法、治疗策略以及预防措施具有重要意义。APOE 基因存在 3 种主要等位基因型: APOE2、APOE3、APOE4, 其中 APOE4 是 AD 的重要遗传风险因子。全球约 40% 的 AD 患者携带至少一个 APOE4 等位基因^[34]。APOE4 可通过促进 A β 寡聚体的异常聚集、加剧 A β 沉积, 诱导微管相关蛋白 Tau 异常磷酸化并形成神经纤维缠结, 损害线粒体功能, 引发氧化应激损伤, 最终导致神经元变性与死亡, 促进 AD 的发病进程^[35]。研究表明, 在 N2a 细胞中, APOE4 的 N 端片段可与线粒体相互作用, 进而影响线粒体功能、降低细胞存活率, 并参与调控与 AD 相关的多种病理过程, 包括 A β 聚集、Tau 蛋白过度磷酸化以及线粒体膜电位下降等^[36-39]。

本文旨在探讨 GAS 对过表达 APOE4 的人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 稳定转染细胞的影响及其作用机制。通过网络药理学方法分析 GAS 在 AD 中的潜在作用靶点及相关信号通路; 构建稳定过表达 APOE4 基因的 SH-SY5Y 细胞模型, 通过细胞实验分析 GAS 对过表达 APOE4 的稳转细胞中氧化应激指标 SOD、MDA、T-AOC 水平、细胞凋亡情况以及凋亡相关蛋白检查表述及标点相关靶点 Tau、p-Tau (Ser396、Thr181) 和 GSK-3 β /P38 MAPK 信号通路的调控作用, 以揭示 GAS 在对抗由高风险遗传因子 APOE4 介导的 AD 病理进程中的潜

在机制。本文初步阐明 GAS 干预 APOE4 相关 AD 病理变化的关键分子机制, 为 GAS 在 AD 预防与早期治疗中的应用提供了重要的理论支持与科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞

人神经母细胞瘤细胞 (SH-SY5Y) 购自美国菌种保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC)。人胚胎肾细胞 (293T) 保存于本实验室。

1.1.2 主要试剂

GAS (纯度 $\geq 98\%$, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 反转录试剂盒 (艾科瑞生物工程有限公司); Hieff[®] qPCR SYBR green master mix (No rox) 试剂盒 (翌圣生物科技有限公司); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); CCK-8 (思科捷生物技术有限公司); 超氧化物歧化酶试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); 丙二醛试剂盒、总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒 (索莱宝科技有限公司); p-Tau (Ser396) 抗体 (Abcam 公司); α -tubulin 抗体 (HPR 标记)、Tau 抗体、p-Tau (Thr181) 抗体、GSK-3 β 抗体和 P38 MAPK 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 网络药理学分析

通过 Pubmed 和 Swiss target prediction 数据库, 对 GAS 可能作用的靶标蛋白进行预测, 获得 GAS 的作用靶点, 并通过在线数据库 Genecard、Omim 数据库查询 AD 的相关靶点; 通过 Venny2.1 在线平台将不同数据库预测得到的 GAS 和 AD 相关靶点进行汇总, 重叠取交集, 以获得 GAS 可能作用于 AD 的潜在靶点; 将筛选得到的 GAS 作用于 AD 的潜在靶点上传至 String 数据库, 构建 PPI 网络并筛选关键靶标蛋白, 利用 Metascape 数据库及软件进行 GO 和 KEGG 分析。

1.3 过表达 APOE4 稳转细胞的构建

通过无缝克隆方式构建 APOE4 质粒, 以慢病毒转染形式构建稳定表达 APOE4 的 SH-SY5Y 细胞。取 4×10^6 个 SH-SY5Y 细胞于 6 孔板中, 24 h 后细胞密度约为 50%; 按照 50 μ L/孔加入浓缩病毒液, 继续培养 96 h 后观察荧光; 有荧光后对转染细胞进行选择培养。加入含 3 μ g/mL 质量浓度嘌呤霉素的培养基继续培养 5~7 d, 每两天换液一次以杀死未感染成功细胞。未整合慢病毒载体的细胞因缺失嘌呤霉素抗性标记基因, 在含药培养基中丧

失增殖能力并被清除。整合慢病毒载体的细胞为过表达 APOE4 稳转细胞。

1.4 细胞活力的检测

采用 CCK-8 法检测细胞活力,将细胞接种于 96 孔板中进行培养,在避光条件下加入含有体积分数为 10% 的 CCK-8 溶液 DMEM 培养基,37 °C 孵育 1~4 h,采用 A450 酶标仪 (FLUOstar Omega, BGM Labtech GmbH) 测定吸光度值。

1.5 细胞氧化应激指标的检测

将细胞接种于 6 孔板。细胞经诱导处理后,弃去 6 孔板中的培养基旧液,用预冷的 PBS 在 4 °C 条件下洗涤细胞 3 次。加入细胞裂解液,按照试剂盒说明书,用超声破碎法在冰上裂解细胞。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测样品中的蛋白含量。根据试剂盒说明书测定丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、总抗氧化能力 (T-AOC)。

1.6 细胞凋亡检测

收集 $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 细胞,用 500 μL 的 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞。在细胞悬液中加入 5 μL Propidium Iodide 和 5 μL Annexin V-FITC,混合均匀,室温避光孵育 10~20 min。随后,将样品放在冰上。使用流式细胞仪 (NovoCyte Advanteon, 安捷伦) 分析细胞,Flowjo 软件处理数据。

1.7 实时荧光定量 PCR 分析

根据反转录试剂盒说明书,将提取的 RNA 反转录为 cDNA,用无菌水稀释 10 倍作为模板。RT-qPCR 反应体系按照 Hieff[®] qPCR SYBR green master mix (No rox) 试剂盒说明书进行,使用荧光定量 PCR 仪 (qTOWER³G, 耶拿分析仪器有限公司) 进行分析。将得到的 C_t 值进行处理和分析,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式法计算 mRNA 相对表达量,其中 ΔC_t 表示治疗组 C_t 值与 GAPDH 的差值, $\Delta\Delta C_t$ 表示治疗组与对照组 ΔC_t 值的差值。

1.8 细胞中蛋白质表达量的检测

将细胞裂解液与蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂按照 100:1:1 的比例均匀混合,裂解细胞,提取细胞蛋白,使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶) 电泳分离蛋白,随后将蛋白条带转至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上;5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入一抗,4 °C 孵育过夜。加入二抗,室温孵育 1 h, TBST (Tris-Buffered Saline with Tween, 三羟甲基氨基甲烷吐温洗涤缓冲液) 漂洗 4 次,每次 5 min。利用 ECL 发光试剂盒显色检测条带。

2 结果与讨论

2.1 网络药理学分析

网络药理学是一门新兴的交叉学科,通过靶标预测、网络模型构建和通路富集分析,系统阐释药物作用机制^[40-41],为新型多靶点 AD 治疗药物的研发提供重要的理论依据和候选方向。通过网络药理学方法对 GAS 治疗 AD 相关靶点进行预测,结果如图 1(a) 所示。由图 1(a) 可知: Swiss Target Prediction 数据库预测 GAS 作用靶点共 100 个, GeneCards (Relevance score > 10) 查询 AD 相关靶点共 2052 个,通过 Venny2.1 在线平台得到 GAS 对 AD 的潜在作用靶点共 51 个。

使用 Cytoscape 3.10.2 软件,以 Degree 值大于 10 为条件对 STRING 数据库得到的 PPI 信息进一步优化,构建蛋白质互作网络 (Protein-protein interaction networks, PPI)。GAS 可能作用于 AD 的关键靶点结果如图 1(b) 所示。由图 1(b) 可知,经筛选得到 15 个重要靶点。最内圈代表 Degree 值大于 20 靶点,这些靶点在整个 PPI 网络中处于极为核心的地位,其中包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase3, CASP3)、基质金属蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase 9, MMP9)。中间一圈代表 $20 > \text{Degree} > 10$ 靶点,主要包括 GSK-3 β 、热休克蛋白家族 A (Hsp70) 成员 5 (Heat shock protein family A (Hsp70) member 5, HSP5)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (Mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14, 即 P38 MAPK) 等。

针对 GAS 与 AD 的交集靶点开展 GO 和 KEGG 富集分析,结果如图 1(c)—1(d) 所示。由图 1(c) 可知,生物过程主要涵盖细胞凋亡、细胞代谢过程、氧化应激反应等;分子功能主要包含内肽酶活性、催化活性、结构分子活性、蛋白结合能力,以及参与细胞凋亡信号通路的半胱氨酸型内肽酶活性和丝氨酸型内肽酶活性。对交集靶点进行 KEGG 分析时,按照 P 值从小到大的顺序进行排序,并选取前 20 个通路。在图 1(d) 中,气泡值越大表明富集程度越高,气泡颜色越深且 P 值越小,其显著性就越高;气泡值越小则表示富集程度越低,气泡颜色越浅且 P 值越大,其显著性就越低。根据图 1(d) 的结果可知,脂质与动脉粥样硬化、细胞凋亡和 AD 存在密切关联。

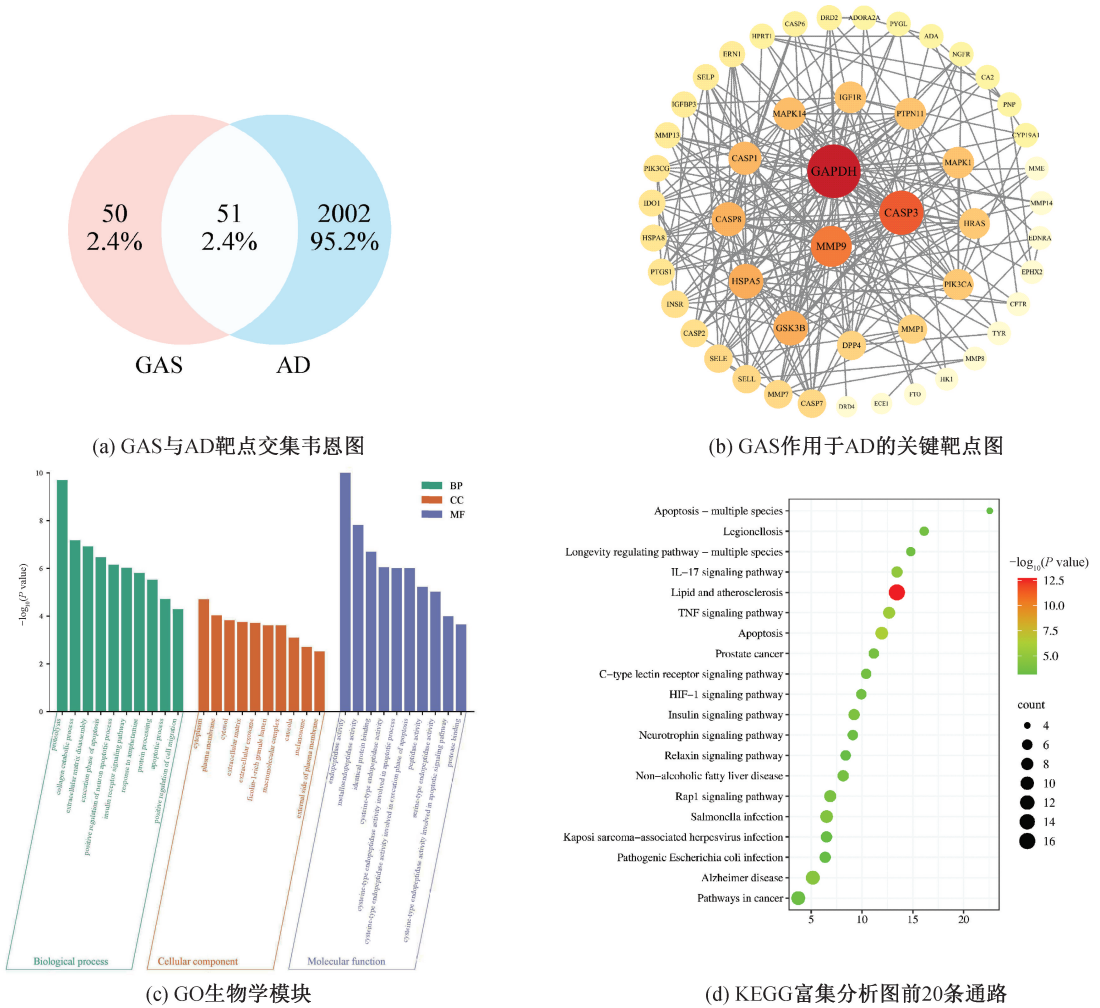


图 1 网络药理学分析图

2.2 过表达 APOE4 稳转细胞的成功构建
通过荧光显微镜观察细胞转染情况, 结果如

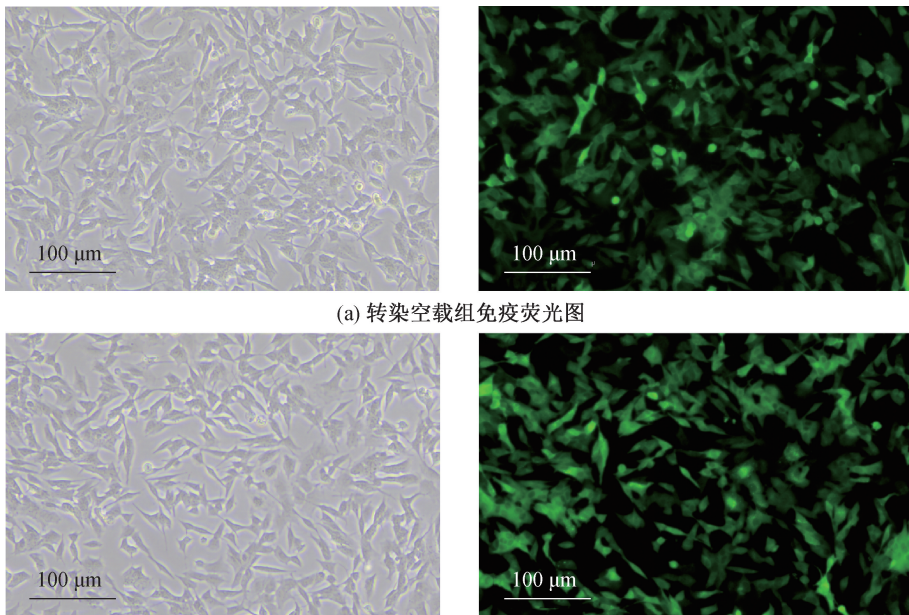


图 2 免疫荧光图

图 2 所示。由图 2 可知, 在转染空载组、APOE4 转染组的 SH-SY5Y 细胞中均有明显绿色荧光存在,

表明 APOE4 已转入细胞中。随后收集细胞蛋白, 通过 RT-qPCR 与 Western blotting 实验验证, 结果如图 3 所示。由图 3 可知, 过表达 APOE4 稳转细

胞组的 mRNA 相对于对照组显著升高 ($P < 0.001$), 蛋白水平也显著高于对照组 ($P < 0.0001$), 表明 APOE4 稳转细胞构建成功。

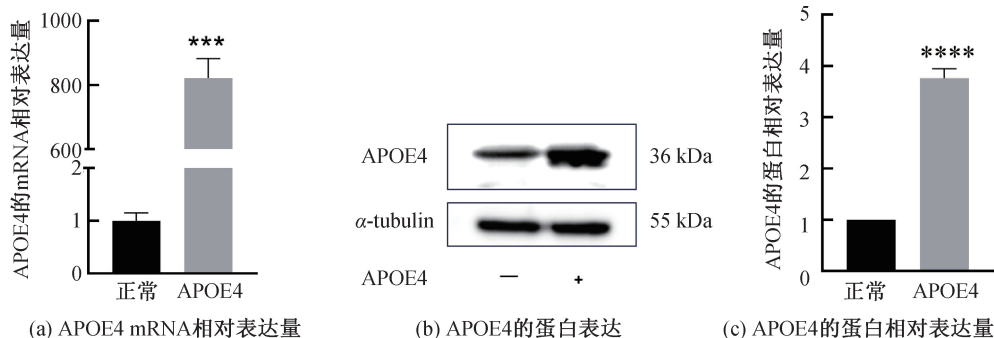
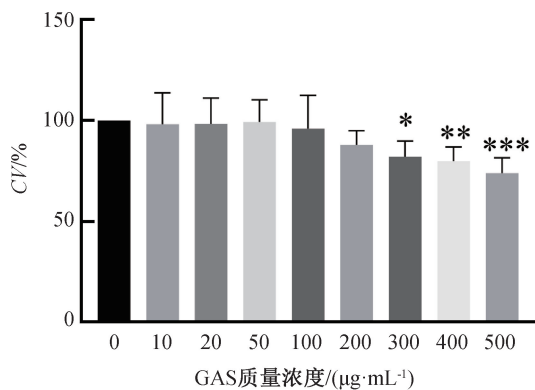


图 3 APOE4 基因过表达验证结果图

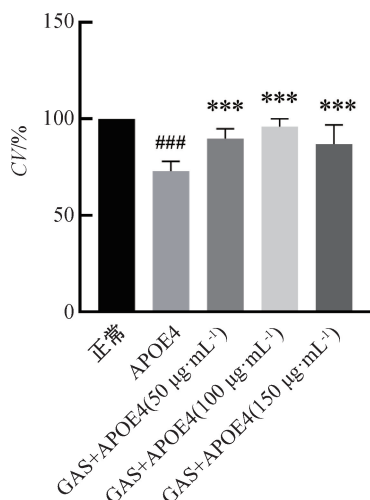
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

2.3 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞活力的影响

采用 CCK-8 法对不同质量浓度 GAS 处理后的 SH-SY5Y 细胞进行活力检测。处理 24 h 后, SH-SY5Y 细胞的活力变化如图 4(a) 所示。由图 4(a) 可



(a) SH-SY5Y 细胞活力变化直方图



(b) APOE4 过表达 SH-SY5Y 稳转细胞活力变化直方图

图 4 GAS 处理后细胞活力变化直方图

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; ### $P < 0.001$, 相较于正常组; **** $P < 0.001$, 相较于 APOE4 模型组。

知: GAS 质量浓度在 $0 \sim 200 \mu\text{g/mL}$ 范围内时, 细胞活力未受影响; 当质量浓度大于等于 $200 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞活力轻微降低。因此, 选择质量浓度为 50 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 和 $150 \mu\text{g/mL}$ 的 GAS 进行后续实验。

采用 CCK-8 法对质量浓度为 50 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 和 $150 \mu\text{g/mL}$ 的 GAS 处理后的过表达 APOE4 稳转细胞检测细胞活力, 稳转细胞活力变化如图 4(b) 所示。由图 4(b) 可以看出: 与正常组细胞相比, 过表达 APOE4 的稳转细胞存活率显著下降, 表明 APOE4 对细胞的正常生理功能造成破坏, 损害了细胞的存活能力, 这与 APOE4 在体内引发氧化应激、干扰细胞代谢等一系列病理过程密切相关^[42]。

当经不同质量浓度 GAS 处理后, 细胞存活率明显升高 ($P < 0.001$), 其中以 $100 \mu\text{g/mL}$ 效果最显著。表明 GAS 在 $50 \sim 150 \mu\text{g/mL}$ 质量浓度下可降低 APOE4 过表达对细胞活力造成的损伤。GAS 通过提高细胞抗氧化能力, 抑制细胞凋亡等方面对细胞发挥保护作用^[43-44], 在后续实验中进行探究。

2.4 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞氧化应激指标的影响

选择 GAS 质量浓度为 50 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 和 $150 \mu\text{g/mL}$, 检测过表达 APOE4 的稳转细胞经过诱导后 SOD/MDA/T-AOC 的水平变化, 结果如图 5 所示。由图 5 可知: 与正常组细胞相比, 过表达 APOE4 的稳转细胞组 MDA 水平上升 ($P < 0.01$), SOD 与 T-AOC 水平显著下降 ($P < 0.001$)。经 GAS 处理后均得到不同程度的恢复。其中, 与 APOE4 模型组对比, MDA 水平随着 GAS 质量浓度升高而下降, SOD 与 T-AOC 水平有所上升, 当 GAS 质量浓度为 $100 \mu\text{g/mL}$ 时, T-AOC 和 SOD

水平上升趋势明显($P < 0.01$)。这表明 GAS 对于 APOE4 引起的细胞损伤具有一定的修复能力。综合考量,选择质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GAS 进行后续实验。APOE4 过表达破坏了细胞的氧化还原

平衡,SOD 和 T-AOC 水平下降,MDA 水平上升。而 GAS 可通过上调抗氧化酶活性、减少脂质过氧化物产生等途径,缓解细胞氧化应激损伤^[45],发挥保护细胞的作用。

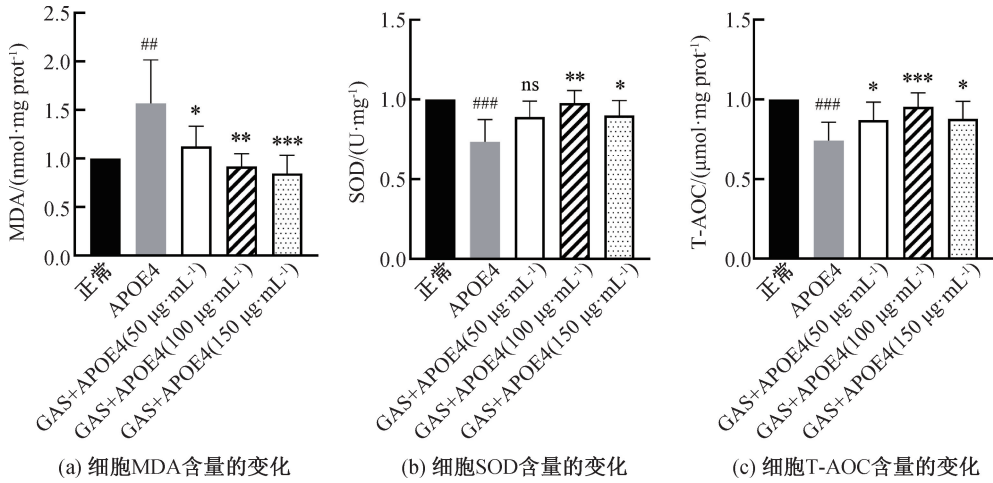


图 5 GAS 对过表达 APOE4 的稳转细胞氧化应激指标变化直方图

注: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$,相较于正常组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: no significant,相较于 APOE4 模型组。

2.5 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞中 APOE4 蛋白表达的影响

为明确质量浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GAS 对过表达 APOE4 的稳转细胞中 APOE4 蛋白水平的影响,进行了相关检测,结果如图 6 所示。由图 6 (a)—(c)可知,与正常组相比,过表达 APOE4 的稳转细胞组 APOE4 mRNA 和蛋白水平均显著上升($P < 0.001$)。经质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的

GAS 处理细胞后,与 APOE4 模型组对比,细胞 APOE4 mRNA 水平显著下降($P < 0.001$),但蛋白相对水平无显著变化。这一结果说明 GAS 对 APOE4 的蛋白表达可能存在滞后作用,推测 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞的调控可能通过对细胞内信号通路的调节、对氧化应激反应的抑制,或者对其他与 APOE4 相关的病理过程的干预等方式实现。

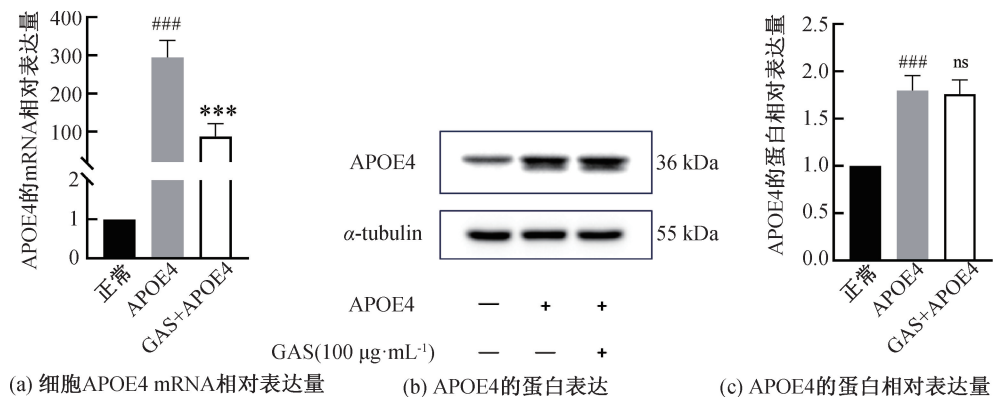


图 6 GAS 对过表达 APOE4 的稳转细胞中 APOE4 表达变化示意图

注: ### $P < 0.001$,相较于正常组; *** $P < 0.001$, ns: no significant,相较于 APOE4 模型组。

2.6 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞中细胞凋亡的影响

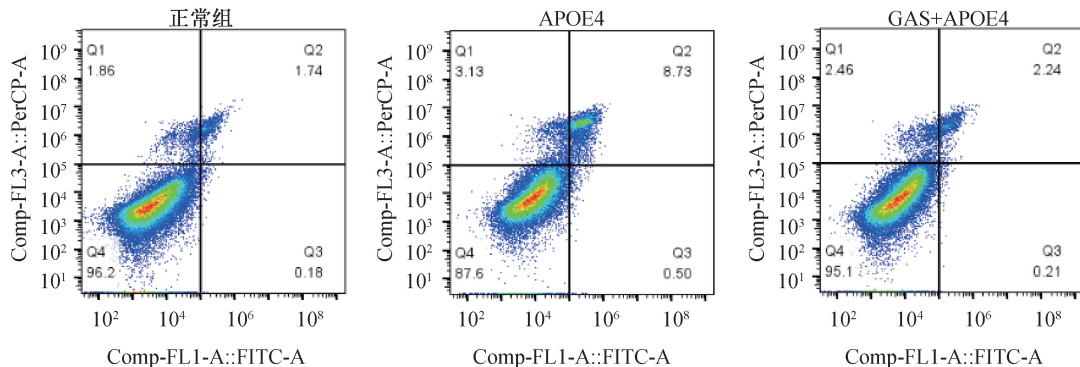
本文构建了稳定过表达 APOE4 的细胞模型,采用流式细胞术评估 GAS 对细胞凋亡的影响,检测结果如图 7(a)所示。由图 7(a)可知,与正常组相比,APOE4 模型组细胞早、晚期凋亡细胞占比增加

7.31%。与 APOE4 模型组对比,经 GAS 作用后,早、晚期凋亡细胞占比减少 6.78%。流式细胞术检测结果,GAS 对于细胞凋亡具有一定的抑制作用。

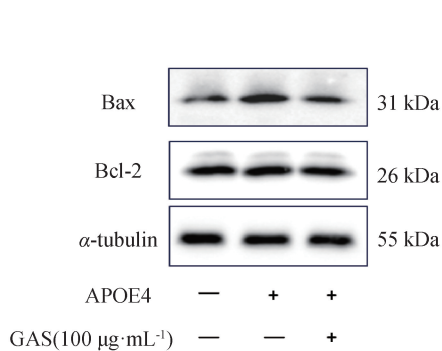
细胞凋亡结果如图 7(b)—(f)所示,与正常组相比,APOE4 模型组细胞 Bax 的 mRNA 与蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),Bcl-2 mRNA 与蛋白

水平无显著统计学差异。经过 GAS 作用 24 h 后,与 APOE4 模型组对比,GAS 处理后,Bax mRNA

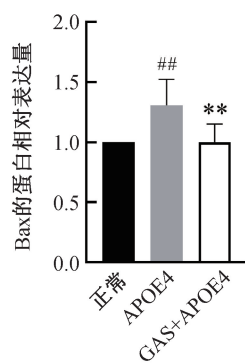
与蛋白水平降低。结果表明,GAS 能够有效逆转 APOE4 引起的 Bax 与 Bcl-2 的表达失调。



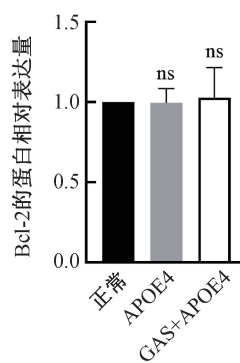
(a) GAS对过表达APOE4稳转细胞凋亡流式图



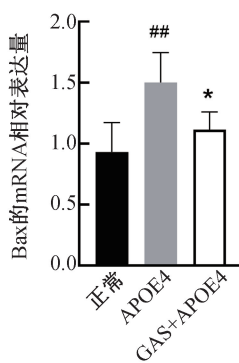
(b) Bax和Bcl-2的蛋白表达



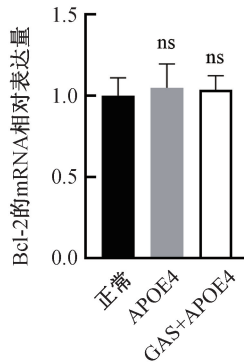
(c) Bax的蛋白相对表达量直方图



(d) Bcl-2的蛋白相对表达量直方图



(e) Bax的mRNA相对表达量



(f) Bcl-2的mRNA相对表达量

图7 GAS对过表达APOE4的稳转细胞凋亡情况示意图

注:## $P<0.01$,相较于正常组;* $P<0.05$,** $P<0.01$,ns:nosignificant,相较于APOE4模型组。

促凋亡蛋白 BAX 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 二者在细胞内维持动态平衡,共同决定细胞的存活或死亡状态。在正常生理条件下,Bax/Bcl-2 的表达比例保持相对稳定,但在外界刺激下可能发生改变。其中 Bax 表达水平升高提示细胞促凋亡能力增强;而 Bcl-2 表达上调,则反映细胞抗凋亡能力增强^[46]。在上述实验结果中,GAS 对 APOE4 过表达引起的细胞凋亡具有抑制作用,BAX/Bcl-2 比值降低,其途径可能通过特异性地下调促凋亡蛋白 BAX 来实现

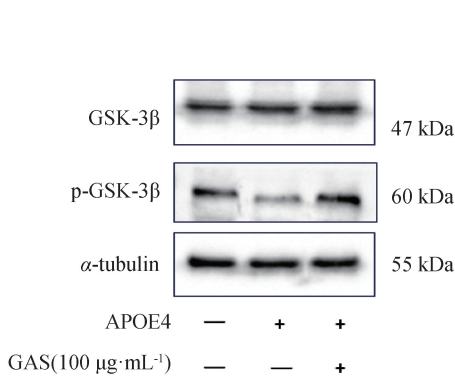
保护作用。

2.7 GAS对过表达APOE4稳转细胞GSK-3 β /P38 MAPK通路的影响

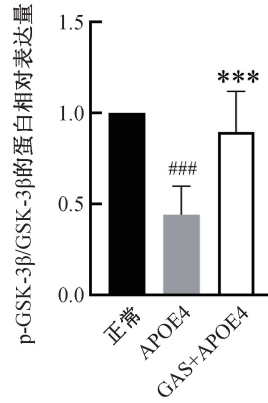
通过 WB 及 RT-qPCR 实验对通路相关信号分子进行检测,结果如图 8 所示。由图 8(a)、图 8(d) 可知,与正常组细胞相比,过表达 APOE4 的稳转细胞中 GSK-3 β 与 p-P38 MAPK 被激活,p-GSK-3 β 蛋白条带灰度减少,表达量降低,p-P38 MAPK 的蛋白条带灰度增加,表达量上升。GAS 作用于细胞 24

h 后, p-GSK-3 β 表达量上升, p-P38 MAPK 蛋白则受到抑制。p-GSK-3 β /GSK-3 β 、p-P38/P38 MAPK 的蛋白相对表达量结果如图 8(b)、图 8(e) 所示, 由图可知: 与正常组相比, APOE4 模型组 p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值显著降低 ($P < 0.001$), p-P38/P38 的比值上升; 经 GAS 处理后, 与 APOE4 模型组对比,

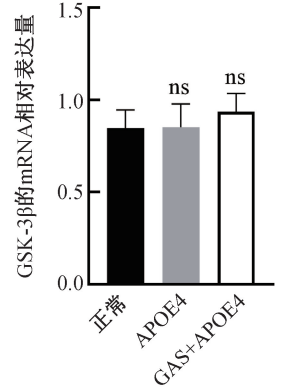
p-GSK-3 β /GSK-3 β 比值显著上升 ($P < 0.001$), p-P38/P38 MAPK 的比值显著下降 ($P < 0.01$)。这表明 GAS 能显著抑制 GSK-3 β 蛋白的活化, 下调 p-P38 MAPK 蛋白的表达。RT-qPCR 结果显示, APOE4 及 GAS 对细胞中 GSK-3 β 及 P38 MAPK 的 mRNA 水平均无明显影响。



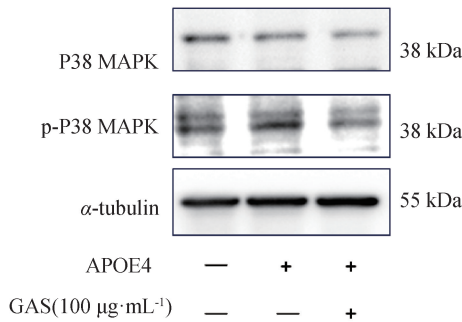
(a) GSK-3 β 和p-GSK-3 β 的蛋白表达



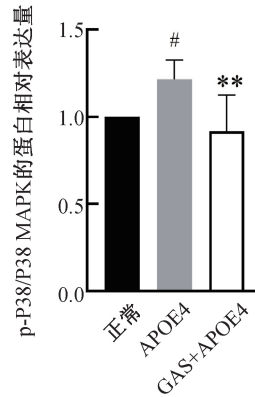
(b) p-GSK-3 β /GSK-3 β 的蛋白相对表达量比值



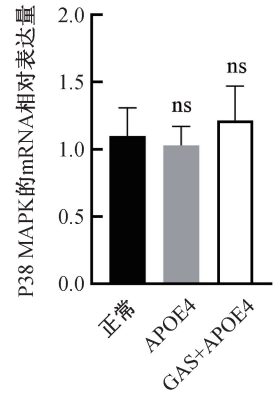
(c) GSK-3 β 的mRNA相对表达量



(d) P38和p-P38的蛋白表达



(e) p-P38/P38的蛋白相对表达量



(f) P38的mRNA相对表达量

图 8 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞中 GSK-3 β /P38 MAPK 蛋白及 mRNA 表达水平示意图

注: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$, 相较于正常组; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 相较于 APOE4 模型组; ns: no significant.

已有研究表明, 使用不同化合物抑制 GSK-3 β 活性可减少 A β 沉积和 Tau 蛋白过度磷酸化, 改善 AD 小鼠的认知功能障碍, 而 GAS 可通过抑制 P38 MAPK 信号通路发挥抗炎作用^[47-49]。本文证实, GAS 通过调控 GSK-3 β /P38 MAPK 信号通路抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化, 发挥对神经细胞的保护作用。

2.8 GAS 对过表达 APOE4 的稳转细胞 A β 、p-Tau 表达水平的影响

APOE4 容易促进 APP(淀粉样前体蛋白)切割产生 A β , 并降低 A β 的清除效率, 使 AD 患者脑中具有更多的 A β 沉积。GAS 对细胞 A β 表达水平的影响结果如图 9 所示, 与正常组相比, 过表达

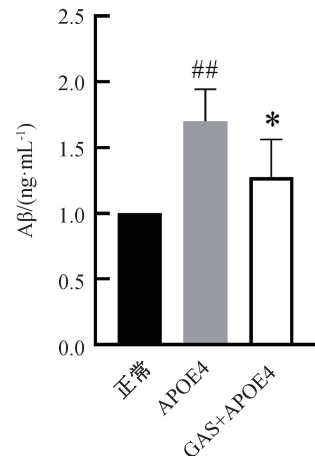


图 9 GAS 对过表达 APOE4 稳转细胞中 A β 表达量直方图

注: ## $P < 0.01$, 相较于正常组; * $P < 0.05$, 相较于 APOE4 模型组。

APOE4 稳转细胞的 A β 显著增加($P < 0.01$),当经过 GAS 作用 24 h 后,A β 的表达量下降。结果表明,GAS 对 APOE4 引起的 A β 沉积具有明显的缓解作用。

Tau 和 A β 在调节神经回路的兴奋和抑制中起着关键作用,Tau 过度磷酸化是导致 AD 神经元异常丝状结构堆积的主要原因^[50]。对 Tau 蛋白的(Thr181、Ser396)两个磷酸化位点进行测试,结果如图 10 所示。由图 10 可知,与正常组细胞相比,过表达 APOE4 的稳转细胞中,Tau 蛋白的 Thr181、Ser396 两个位点磷酸化均有不同程度的增加,

p-Tau(Thr181、Ser396)的蛋白水平上升。在经 GAS 作用 24 h 后,Tau 蛋白磷酸化程度降低,与 APOE4 模型组对比,p-Tau(Thr181、Ser396)的蛋白水平下降,且 Thr181 位点的 p-Tau 蛋白水平下降明显($P < 0.01$)。结果表明,GAS 能够有效改善 Tau 蛋白的过度磷酸化,改善 AD 的病理现象。

研究表明,A β 、GSK-3 β 和 Tau 蛋白相互关联,GSK-3 β 失调可促进 Tau 磷酸化和 A β 生成^[51-52]。本文发现,GAS 对 APOE4 过表达所致的 A β 沉积和 Tau 过度磷酸化具有改善作用,可能与其抑制 GSK-3 β 活性有关。

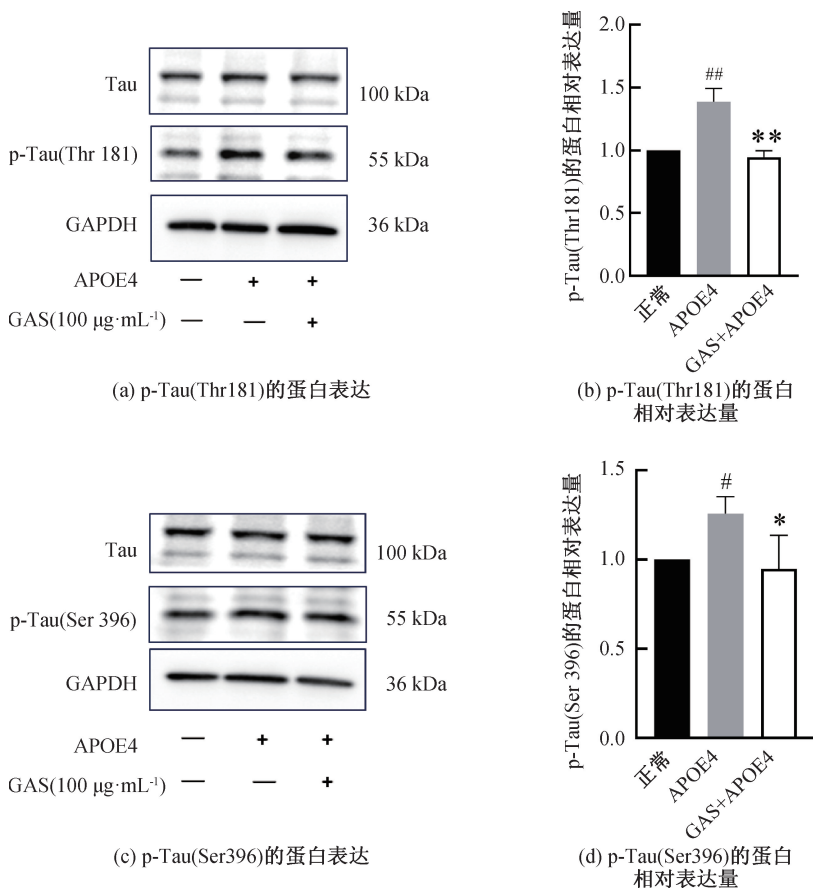


图 10 GAS 对过表达 APOE4 的稳转细胞中 p-Tau 相对蛋白表达示意图

注: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 相较于 NC 组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 相较于 APOE4 模型组。

3 结论

本文采用网络药理学方法结合细胞实验,构建了过表达 APOE4 的 SH-SY5Y 稳定转染细胞模型,探讨了 GAS 对上述细胞的神经保护作用及其通过调控 GSK-3 β /P38 MAPK 信号通路干预 AD 的分子机制,主要结论如下:

a) 网络药理学分析结果预测,GSK-3 β /P38 MAPK 信号通路为 GAS 调控 AD 的潜在作用靶点。

b) GAS 可显著缓解 APOE4 过表达所致 SH-SY5Y 稳转细胞的氧化应激损伤,并抑制细胞凋亡。

c) GAS 能够有效逆转 GSK-3 β /P38 MAPK 信号通路激活引起的 Tau 蛋白过度磷酸化,显著降低 A β 蛋白水平,发挥对过表达 APOE4 的 SH-SY5Y 稳转细胞的保护作用。

本文为深入阐明 GAS 在 APOE4 相关遗传高风险个体中对 AD 发生发展的调控机制提供了理论依据,并为 GAS 在 AD 预防与治疗中的应用提供了新的策略支持。

参考文献:

- [1] Association Z. 2024 Alzheimer's disease facts and figures[J]. *Alzheimers Dement*, 2024, 20(5): 3708-3821.
- [2] 仇成轩, 杜怡峰. 重视阿尔茨海默病和老年痴呆症的人群干预研究[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2017, 55(10): 1-6.
- [3] Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission[J]. *Lancet*, 2020, 396(10248): 413-446.
- [4] 李腾飞, 郭志全, 王晔. β -淀粉样蛋白代谢异常与阿尔茨海默病[J]. *神经疾病与精神卫生*, 2022, 22(12): 904-908.
- [5] Li S, Wei Z, Chen J, et al. Oral administration of a fusion protein between the cholera toxin B subunit and the 42-amino acid isoform of amyloid- β peptide produced in silkworm pupae protects against Alzheimer's disease in mice[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113585.
- [6] Rocchi A, Yamamoto S, Ting T, et al. A *Becn1* mutation mediates hyperactive autophagic sequestration of amyloid oligomers and improved cognition in Alzheimer's disease[J]. *PLoS Genetics*, 2017, 13(8): e1006962.
- [7] Aboelwafa H R, El-kott A F, Abd-Ella E M, et al. The possible neuroprotective effect of silymarin against aluminum chloride-prompted Alzheimer's-like disease in rats[J]. *Brain Sciences*, 2020, 10(9): 628.
- [8] Tobore T O. On the central role of mitochondria dysfunction and oxidative stress in Alzheimer's disease[J]. *Neurological Sciences*, 2019, 40(8): 1527-1540.
- [9] Kawamoto E M, Munhoz C D, Glezer I, et al. Oxidative state in platelets and erythrocytes in aging and Alzheimer's disease[J]. *Neurobiology of Aging*, 2005, 26(6): 857-864.
- [10] Stancu I C, Cremers N, Vanrusselt H, et al. Aggregated Tau activates NLRP3-ASC inflammasome exacerbating exogenously seeded and non-exogenously seeded Tau pathology in vivo[J]. *Acta Neuropathologica*, 2019, 137(4): 599-617.
- [11] Connolly K, Lehoux M, O'Rourke R, et al. Potential role of chitinase-3-like protein 1 (CHI3L1/YKL-40) in neurodegeneration and Alzheimer's disease[J]. *Alzheimer's & Dementia*, 2023, 19(1): 9-24.
- [12] 王刚, 齐金蕾, 刘馨雅, 等. 中国阿尔茨海默病报告 2024[J]. *诊断学理论与实践*, 2024, 23(3): 219-256.
- [13] Cummings J, Lee G, Mortsdorf T, et al. Alzheimer's disease drug development pipeline: 2017 [J]. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 2017, 3(3): 367-384.
- [14] Silva T, Reis J, Teixeira J, et al. Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes[J]. *Ageing Research Reviews*, 2014, 15: 116-145.
- [15] Liu X Q, Yi W J, Xi B H, et al. Identification of drug-disease associations using a random walk with restart method and supervised learning [J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 2022: 7035634.
- [16] Yu N, Huang Y, Jiang Y, et al. *Ganoderma lucidum* Triterpenoids (GLTs) Reduce Neuronal Apoptosis via Inhibition of ROCK Signal Pathway in APP/PS1 Transgenic Alzheimer's Disease Mice[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020(1): 9894037.
- [17] Bao M L, Bade R G, Liu H, et al. Astragaloside IV against Alzheimer's disease via microglia-mediated neuroinflammation using network pharmacology and experimental validation[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2023, 957: 175992.
- [18] Dartigues J F, Grasset L, Helmer C, et al. Ginkgo biloba extract consumption and long-term occurrence of death and dementia[J]. *The Journal of Prevention of Alzheimer's Disease*, 2017, 4(1): 16-20.
- [19] Savaskan E, Mueller H, Hoerr R, et al. Treatment effects of Ginkgo biloba extract EGB 761[®] on the spectrum of behavioral and psychological symptoms of dementia: Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *International Psychogeriatrics*, 2018, 30(3): 285-293.
- [20] 冯孝章, 陈玉武, 杨峻山. 天麻化学成分的研究[J]. *化学学报*, 1979, 37(3): 175-182.
- [21] Menyiy N E, Elouafy Y, Moubachir R, et al. Chemistry, biological activities, and pharmacological properties of gastrodin: Mechanism insights. [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2024, 21(6): e202400402.
- [22] Yu H, Zang J, Chen B Q, et al. Research progress on classification of chemical constituents from *Gastrodia elata* and their pharmacological effects[J]. *Chin Tradit Herbal Drugs*, 2022, 53: 5553-5562.
- [23] Tang C L, Wang L, Liu X X, et al. Comparative pharmacokinetics of gastrodin in rats after intragastric administration of free gastrodin, parishin and *Gastrodia elata* extract[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015, 176: 49-54.
- [24] Liu Y, Gao J L, Peng M, et al. A review on central nervous system effects of gastrodin[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 24.
- [25] Zhao F Y, Yin C L, Lai Y F, et al. Extraction, purification, characteristics, bioactivities, application, and toxicity of *Gastrodia R. Br.* polysaccharides: A review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2025, 301: 140084.
- [26] Wang Y L, Bai M T, Wang X, et al. Gastrodin: A comprehensive pharmacological review [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 2024, 397(6): 3781-3802.
- [27] Liu C M, Tian Z K, Zhang Y J, et al. Effects of gastrodin against lead-induced brain injury in mice associated with the Wnt/Nrf2 pathway[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1805.
- [28] de Oliveira M R, Brasil F B, Fürstenau C R. Nrf2 mediates the anti-apoptotic and anti-inflammatory effects induced by gastrodin in hydrogen peroxide-treated SH-SY5Y cells[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2019, 69(1): 115-122.
- [29] Zhang J S, Zhou S F, Wang Q, et al. Gastrodin suppresses BACE1 expression under oxidative stress condition via inhibition of the PKR/eIF2 α pathway in Alzheimer's disease

- [J]. *Neuroscience*, 2016, 325: 1-9.
- [30] Jiao M, Yin K Z, Zhang T, et al. Effect of the SSeCKS-TRAF6 interaction on gastrodin-mediated protection against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced astrocyte activation and neuronal death[J]. *Chemosphere*, 2019, 226: 678-686.
- [31] Zhou L P, Chen X Y, Liang S, et al. Exploring gastrodin against aging-related genes in Alzheimer's disease by integrated bioinformatics analysis and machine learning[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2025, 26(18): 9097.
- [32] Zhu C H, Wang S T, Ma S Y, et al. Gastrodin reduces A β brain levels in an Alzheimer's disease mouse model by inhibiting P-glycoprotein ubiquitination [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156229.
- [33] Lei H P, Yang X, Hu Y T, et al. Gastrodin alleviates mitochondrial energy metabolism dysfunction via activating β -catenin/c-Myc/MCT2 signaling in Alzheimer's disease models [J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2026, 354:120548.
- [34] Guo T, Zhang D, Zeng Y, et al. Molecular and cellular mechanisms underlying the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Molecular Neurodegeneration*, 2020, 15(1):40.
- [35] Sun Y Y, Wang Z, Huang H C. Roles of APOE4 on the pathogenesis in Alzheimer's disease and the potential therapeutic approaches [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2023, 43(7): 3115-3136.
- [36] Vecchio F L, Bisceglia P, Imbimbo B P, et al. Are apolipoprotein E fragments a promising new therapeutic target for Alzheimer's disease? [J]. *Therapeutic advances in chronic disease*, 2022, 13:20406223221081605.
- [37] Chang S J, Ma T R, Miranda R D, et al. Lipid-and receptor-binding regions of apolipoprotein E4 fragments act in concert to cause mitochondrial dysfunction and neurotoxicity [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(51): 18694-18699.
- [38] Huang Y D, Mucke L. Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies[J]. *Cell*, 2012, 148(6): 1204-1222.
- [39] Liang T, Hang W J, Chen J H, et al. ApoE4 (Δ 272-299) induces mitochondrial-associated membrane formation and mitochondrial impairment by enhancing GRP75-modulated mitochondrial calcium overload in neuron [J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 50.
- [40] Liu J, Pei T, Mu J, et al. Systems Pharmacology Uncovers the Multiple Mechanisms of Xijiao Dihuang Decoction for the Treatment of Viral Hemorrhagic Fever [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016(1): 9025036.
- [41] Ran B, Chen L, Li M J, et al. Drug-drug interactions prediction using fingerprint only [J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 2022(1): 7818480.
- [42] Pires M, Rego A C. Apoe4 and Alzheimer's Disease Pathogenesis-Mitochondrial Deregulation and Targeted Therapeutic Strategies [J]. *International journal of molecular sciences*, 2023, 24(1):778.
- [43] Zhang H, Yuan B, Huang H, et al. Gastrodin induced HO-1 and Nrf2 up-regulation to alleviate H₂O₂-induced oxidative stress in mouse liver sinusoidal endothelial cells through p38 MAPK phosphorylation [J]. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2018, 51(10): e7439.
- [44] Ton A M M, Campagnaro B P, Alves G A, et al. Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020(1): 2638703.
- [45] Li Y, Zhang E, Yang H, et al. Gastrodin Ameliorates Cognitive Dysfunction in Vascular Dementia Rats by Suppressing Ferroptosis via the Regulation of the Nrf2/Keap1-GPx4 Signaling Pathway [J]. *Molecules*, 2022, 27(19): 6311.
- [46] Czabotar P E, Lessene G, Strasser A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy [J] *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2014, 15(1): 49-63.
- [47] 柳正, 王朝晖. 蛋白质酪氨酸激酶 2 通过 PI3K/AKT/Gsk3b 信号调控 Tau 磷酸化 [J]. *标记免疫分析与临床*, 2022, 29(3): 464-470.
- [48] Yao Y Y, Li R, Guo Y J, et al. Gastrodin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response and migration via the Notch-1 signaling pathway in activated microglia [J]. *NeuroMolecular Medicine*, 2022, 24(2): 139-154.
- [49] Beurel E, Grieco S F, Jope R S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015, 148:114-131.
- [50] Lu Z, Fu J, Wu G, et al. Neuroprotection and mechanism of gas-miR36-5p from *Gastrodia elata* in an Alzheimer's disease model by regulating glycogen synthase kinase-3 β [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(24): 17295.
- [51] Hernández F, Gómez de Barreda E, Fuster-Matanzo A, et al. GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein [J]. *Experimental Neurology*, 2010, 223(2):322-325.
- [52] Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas J J, et al. Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 β overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2006, 99(6): 1445-1455.