



天麻素与灵芝三萜组合物对阿尔茨海默病细胞模型 GSK-3 β 通路的作用及机制

杨雪玢^{1,2}, 吴晓奇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: 为探究药食同源活性成分天麻素(Gastrodin, GAS)与灵芝三萜(*Ganoderma lucidum* triterpenoids, GLT)的组合物在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)中的作用及机制,采用网络药理学方法分析 GAS 与 GLT 在 AD 中的潜在作用靶点及其相关信号通路,通过 CCK-8 及氧化应激实验探究 GAS 与 GLT 对细胞活力及氧化应激状态影响,并通过 Western blotting 与 RT-qPCR 技术分析糖原合成酶激酶-3 β (Glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)、p-Tau(Thr181)和 p-Tau(Ser396)的蛋白含量及 mRNA 表达水平的变化情况。结果表明:40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GAS 与 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLT 按照 1:1、1:2、2:1 体积比制备的组合物可逆转 β -淀粉样蛋白 25-35(A β_{25-35})引起的 AD 细胞模型氧化应激损伤并抑制细胞凋亡($P < 0.05$);组合物体积比为 2:1 时能够抑制 GSK-3 β 蛋白活化,缓解 p-Tau(Thr181)和 p-Tau(Ser396)的异常磷酸化($P < 0.05$);GAS 与 GLT 组合物可显著减轻 A β 引发的氧化应激反应、抑制细胞凋亡,并抑制 Tau 蛋白的过度磷酸化。该研究为利用药食同源活性成分发挥协同效开展 AD 预防与治疗提供了新思路。

关键词: 天麻素;灵芝三萜;阿尔茨海默病;糖原合成酶激酶-3 β ;Tau 蛋白过度磷酸化

中图分类号: R742

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2026)07-0524-13

引文格式: 杨雪玢, 吴晓奇, 郭建军, 等. 天麻素与灵芝三萜组合物对阿尔茨海默病细胞模型 GSK-3 β 通路的作用及机制[J]. 浙江理工大学学报(自然科学), 2026, 55(4): 524-536.

Reference Format: YANG Xuebin, WU Xiaochi, GUO Jianjun, et al. Effect and mechanism of Gastrodin and *Ganoderma lucidum* triterpenoids composition on GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease cell model[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2026, 55(4): 524-536.

Effect and mechanism of Gastrodin and *Ganoderma lucidum* triterpenoids composition on GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease cell model

YANG Xuebin^{1,2}, WU Xiaochi¹, GUO Jianjun^{1,2}, SHENG Qing¹

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Sci-Tech University Shaoxing Academy of Biomedicine, Shaoxing 312000, China)

Abstract: To explore the role and mechanism of the composition of Gastrodin (GAS) and *Ganoderma lucidum* triterpenoids (GLT), the medicine-food homologous active components, in Alzheimer's disease (AD), a network pharmacology approach was used to analyze the potential action targets and related signaling pathways of GAS and GLT in AD. Subsequently, CCK-8 assay and oxidative stress experiments were conducted to investigate the effects of GAS and GLT on cell viability and oxidative stress status. Moreover, Western blotting and RT-qPCR techniques were employed to detect the changes in protein and mRNA expression levels of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) and p-Tau (Thr181 and Ser396). The results demonstrated that the compositions prepared with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GAS and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GLT at volume ratios of 1:1, 1:2 and 2:1 could reverse the oxidative stress damage induced by β -amyloid 25-35 (A β_{25-35}) in

收稿日期: 2025-12-18 网络出版日期: 2026-03-30

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: 杨雪玢(1999—), 女, 贵阳人, 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

the AD cell model and inhibit cell apoptosis ($P < 0.05$). Meanwhile, the 2:1 volume ratio composition inhibited the activation of GSK-3 β protein and effectively alleviated the abnormal phosphorylation of p-Tau (Thr181 and Ser396) ($P < 0.05$). In conclusion, the composition of GAS and GLT could significantly alleviate A β -induced oxidative stress, inhibit cell apoptosis, and suppress the hyperphosphorylation of Tau protein via. This study provides a novel strategy for the prevention and treatment of AD by leveraging the synergistic effects of active components derived from medicine-food homology.

Key words: Gastrodin; *Ganoderma lucidum* triterpenoids; Alzheimer's disease; Glycogen synthase kinase-3 β ; Tau protein hyperphosphorylation

0 引言

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)作为一种神经退行性疾病,患病初期出现轻度认知障碍,无其他明显临床症状,发病进程可持续 15~25 年;疾病晚期,患者会出现记忆、语言、认知和解决问题能力的丧失等症状,并伴有行为改变^[1-2]。随着人类寿命的延长,老龄化社会进程加剧,阿尔茨海默病的患病率亦持续上升。截至 2020 年,全球 AD 患病人数超过 5800 万人,预计 2050 年将增至 1.52 亿人^[3]。AD 的发病机制极为复杂,目前已形成几大主流假说,包括胆碱能假说、Tau 蛋白异常磷酸化假说、淀粉样蛋白假说、谷氨酸兴奋毒性假说、线粒体级联假说等^[4-5]。AD 的主要病理特征为神经炎斑和神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs),其中神经炎斑的核心原因为 β -淀粉样蛋白(Amyloid β -protein, A β)异常沉积;神经炎斑周围常伴有营养不良的神经突起、星型胶质细胞和激活的小胶质细胞,这是 AD 最具特征性的病理性改变,也是确诊 AD 的重要依据。近年来,A β 沉积和 Tau 蛋白磷酸化相关研究已逐渐成为解析 AD 机制的重点方向。研究表明,A β 的大量沉积会干扰突触信号传导,影响认知功能^[6];Tau 的蛋白过度磷酸化导致 NFTs 增多,加重痴呆症状;A β 蛋白异常沉积与过度磷酸化的 Tau 蛋白存在相互作用,共同推动疾病的进展^[7-8]。此外,氧化应激不仅是 AD 的早期症状,也是导致 Tau 蛋白过度磷酸化的重要因素^[9-10]。

天麻(*Gastrodia elata*)为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* 的块茎,富含天麻素、天麻多糖和生物碱等多种活性成分,其中天麻素(Gastrodin, GAS)是其主要成分之一^[11-12]。现代药理学研究表明,天麻具有改善记忆、缓解认知障碍、发挥神经保护作用以及具有治疗失眠和头晕等功效^[13];此外,GAS 对 AD、帕金森病与血管性痴呆具有明显改善效果^[14-16]。近年来,越来越多的证据表明 GAS 在 AD 的防治中发挥重要作用。Zhao 等^[17]发现,在

A β_{1-42} 诱导的 AD 小鼠模型中,GAS 可通过提高 SOD 的活性增强细胞活力;Wang 等^[18]证实,GAS 能有效降低 AD 模型小鼠的神经炎症,并改善 AD 小鼠的学习和空间记忆能力。

灵芝(*Ganoderma lucidum*)通常指赤芝和紫芝的干燥子实体,具有镇静催眠、神经保护、抗氧化、抗癫痫、抗抑郁和改善记忆力等药理作用^[19-20]。灵芝的主要活性成分为三萜类化合物,并含有多糖、蛋白质、类固醇和生物碱等多种成分^[21]。灵芝提取物在 AD 防治中可抑制 Tau 蛋白过度磷酸化和 A β 形成,调节 NF- κ B/MAPK 信号通路,抑制神经细胞凋亡和乙酰胆碱酯酶活性,并影响活化的小胶质细胞,调节免疫系统^[22-24]。此外,灵芝通过下调 BCL-2 相关 X 蛋白(BCL2-associated X protein Gene, Bax)表达和抑制糖原合酶激酶-3(Glycogen synthase kinase-3, GSK-3)活性,进一步抑制细胞凋亡和 Tau 蛋白过度磷酸化^[25-26]。灵芝还具有抗氧化和抗凋亡作用,对肝脏具有保护效果^[27-28]。灵芝三萜(*Ganoderma lucidum* triterpenoids, GLT)是灵芝中的三萜类化合物,包含灵芝酸 A、C2、F 等多种成分。据报道,GLT 具有广泛的生物活性,如抗肿瘤、抗氧化与免疫调节等^[29];GLT 能够通过促进细胞增殖、抑制氧化应激损伤及 ROCK 信号通路改善小鼠认知障碍^[30]。

GSK-3 是一种生物体内普遍表达的丝氨酸-苏氨酸激酶,参与调控多种细胞关键通路。其中,GSK-3 β 是中枢神经系统中的主要亚型,与 AD 密切相关。GSK-3 β 的表达异常会加剧 A β 和 Tau 的神经毒性,并影响突触可塑性和神经炎症^[31]。A β 由 APP 经 BACE-1 和 γ -分泌酶切割产生,其中 APP 与 PS1(γ -分泌酶的催化亚基之一)均为 GSK-3 β 的底物。GSK-3 β 活性升高会促进 APP 异常裂解,增加 A β 生成与沉积^[32];GSK-3 β 也是介导 Tau 蛋白磷酸化的重要激酶。同时,GSK-3 β 活性的降低可以减少 Tau 蛋白过度磷酸化,Jackson 等^[33]通过研究证明,GSK-3 β 的异常上调 Tau 聚集体的积累呈

正相关。GSK-3 β 与早老素-1(PS-1)结合时产生突变体 PS-1,突变体 PS-1 的表达可增加细胞中 GSK-3 β 活性和 Tau 蛋白过度磷酸化^[34]。在 AD 小鼠模型中,使用 GSK-3 β 抑制剂可减少 A β 沉积及 Tau 蛋白过度磷酸化,并改善小鼠认知功能障碍^[35-37]。

为深入探讨天麻素与灵芝三萜的组合物对以人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)构建的 AD 细胞模型的作用及机制,本文通过网络药理学分析该组合物在 AD 中的潜在靶点和相关信号通路,通过开展细胞实验,探究组合物对 AD 细胞模型中氧化应激指标丙二醛(Malonaldehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)活性、总抗氧化能力(Total Antioxidant Capacity,T-AOC)、细胞凋亡、AD 关键蛋白 GSK-3 β 、Tau 和 p-Tau(Thr181、Ser396)的影响,揭示该组合物对 AD 病理过程的作用机制,以阐明天麻素与灵芝三萜组合物在 AD 中的作用及分子机制。

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)。

1.1.2 主要试剂

β -淀粉样蛋白 25-35(A β_{25-35})(HY-P0128),购自 MCE 公司;六氟异丙醇(HFIP)(H811027),购自上海麦克林生化科技有限公司;GAS(纯度 98%),购自阿拉丁生物有限公司;灵芝三萜(含量 25.06%),购自西安世泽源生物有限公司;DMEM-F12 培养基,购自维森特生物有限公司;p-Tau(Ser396)抗体(ab32057),购自 Abcam 公司;GAPDH 抗体、Tau 抗体(66499-1-Ig)、p-Tau(Thr181)抗体(28866-1-AP)和 GSK-3 β 抗体(67329-1-Ig),均购自武汉三鹰生物技术有限公司;丙二醛(MDA)试剂盒(BC0025)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒(BC1310),均购自北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(S0101M)、DMSO(二甲亚砜,ST038-100ml)、BSA(牛血清白蛋白,ST023-200g)均购自上海碧云天生物技术有限公司;CCK-8 试剂盒(A311-01),购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(K2003),购自 APEX BIO 公司。

1.2 网络药理学分析

通过 TCMSp、TCMID 等数据库确定灵芝三萜主要成分,并利用 Pubchem 数据库获得 GAS、GLT 主要成分对应的 Canonical SMILES;通过 Swiss target prediction 数据库,分别获得 GAS 和 GLT 可能发挥作用的靶蛋白,并利用 OMIM、Genecard 数据库筛选 AD 相关的靶标基因;通过 Venny2.1 在线平台分析,获取药物与疾病的交集靶点;利用 STRING 数据库绘制 PPI 网络,使用 Cytoscape 对 PPI 网络中的关键蛋白进行筛选;结合 GO、KEGG 富集分析,预测 GAS 和 GLT 可能作用于 AD 的相关通路。

1.3 细胞活力检测

采用 CCK-8 实验检测细胞活力,将 SH-SY5Y 细胞按照 2×10^4 个/孔的数量接种于 96 孔板中,孵育 24 h;在避光条件下更换为含有体积分数为 10% CCK-8 试剂的 DMEM-F12 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1~4 h,随后使用酶标仪(FLUOstar Omega, BMG Labtech GmbH, 德国)在 450 nm 波长下测定吸光值。

1.4 AD 细胞模型构建

将 1 mg A β_{25-35} 冻干粉末用 220 μL 六氟异丙醇(HFIP)静置溶解 1 h,在超净台中蒸发去除 HFIP,使 A β_{25-35} 成为均匀肽膜附着于管壁。加入含有体积分数为 10%的 DMSO 的 PBS 溶液,冰浴超声溶解肽膜,随后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 存放 7~14 d 令其寡聚化。将 SH-SY5Y 细胞接种于孔板中,24 h 后加入 20 $\mu\text{mol/L}$ 寡聚 A β_{25-35} 溶液作用 24 h,建立 AD 细胞模型。

1.5 细胞氧化应激检测

将 SH-SY5Y 细胞按照 6×10^5 个/孔的数量接种于 6 孔板中,按照 1.4 方法构建 AD 细胞模型,随后分别加入质量浓度为 20、40 $\mu\text{g/mL}$ 和 80 $\mu\text{g/mL}$ 的 GAS 与 GLT 继续培养 24 h。弃上清,PBS 洗涤细胞 3 次,后续按照丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)活性、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒说明书进行检测。

1.6 细胞凋亡检测

收集 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ 个细胞,用 500 μL 的 $1 \times$ Binding Buffer 重悬细胞,并加入 5 μL Propidium Iodide 和 5 μL Annexin V-FITC,混合均匀,室温避光孵育 10~20 min。使用流式细胞仪(NovoCyte Advanteon,安捷伦科技有限公司,美国)分析细胞,并采用 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步骤,将 RNA 逆转录为 cDNA;按照 Hieff[®] qPCR SYBR green master mix(No Rox)试剂盒说明书进行反应体系配制,使用荧光定量 PCR 仪(qTower³G,耶拿分析仪器有限公司,德国)进行分析,所用引物序列如表 1 所示。

表 1 RT-qPCR 引物

基因	序列(5'-3')
GSK-3 β Forward	GCCCAGAACCACCTCCTTTGC
GSK-3 β Reverse	CACCTTGCTGCCGTCCTTGTC
GAPDH Forward	GTGGACCTGACCTGCCGTCTAG
GAPDH Reverse	GAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTC

1.8 蛋白表达量检测

将细胞样品使用预冷 PBS 洗涤 3 次,将细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂混合液按照体积比 100:1:1 混合进行样品裂解,提取蛋白,并使用 BCA 试剂盒检测样品蛋白浓度。采用 SDS-PAGE (十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)技术分离蛋白,再将蛋白转移至 PVDF(聚偏二氟乙烯)膜上;使用质量分数为 5% 的牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 2 h,随后加入一抗 4 °C 过夜孵育;TBST(Tris-Buffered saline with Tween-20,三羟甲基氨基甲烷缓冲液)清洗 3 次,每次 5 min;二抗于室温孵育 1 h;TBST 清洗 3 次,每次 5 min;采用 ECL 发光试剂盒显色检测条带。

1.9 统计分析

所有数据采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行单因素方差分析;实验数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,所有实验均独立重复至少 3 次,当 $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 GAS、GLT 作用于 AD 的靶点分析

运用网络药理学分析,对 GAS、GLT 治疗 AD 的相关靶点进行预测,结果如图 1 所示。由图 1(a)–(b)可知:Swiss target prediction 数据库预测 GAS 作用靶点共 100 个,GLT 作用靶点共 227 个;通过 GeneCards(Relevance score $>$ 10)数据库查询 AD 相关靶点共 2449 个;利用 Venny2.1 在线平台得到 GAS 对 AD 的潜在作用靶点共计 54 个,GLT 对 AD 的潜在作用靶点共计 123 个。图 1(c)显示:GAS 与 GLT 共同作用于 AD 的靶点共计 27 个。

GAS 可能作用于 AD 的关键靶点结果如图 2(a)所示。由图 2(a)可知:经筛选后,GAS 可能

作用于 AD 的核心靶点共有 8 个,主要包括 GAPDH、半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase 3, CASP3)、丝裂原活化蛋白激酶 1(Mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)、GSK-3 β 等。由图 2(b)可知:经筛选后 GLT 可能作用于 AD 的核心靶点共 11 个,主要包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、CASP3、蛋白激酶 B1(Akt1)、丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)等。由图 2(c)可知:经筛选后 GAS 与 GLT 共同可能作用于 AD 的核心靶点共有 9 个,主要包括 EGFR、GSK-3 β 、CASP3 等。综合分析表明,GSK-3 β 可能是组合物作用于 AD 的核心靶点。

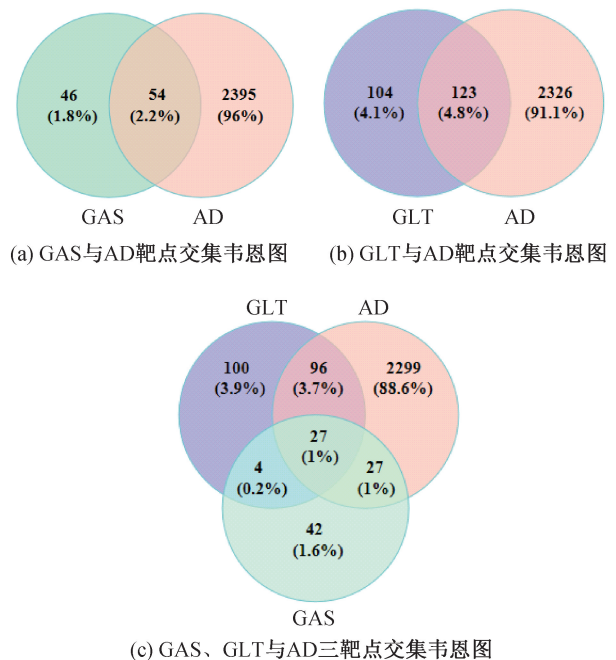


图 1 韦恩分析图

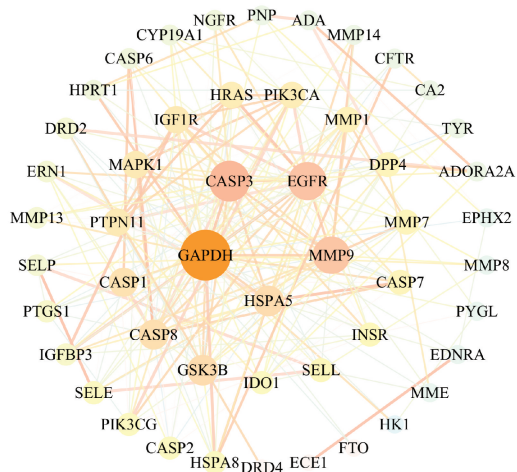
2.2 GAS、GLT 与 AD 的 KEGG、GO 富集分析

针对 GAS、GLT 与 AD 的交集靶点开展 KEGG 和 GO 富集分析,结果如图 3 所示。KEGG 分析以 P 值由小到大取排名前二十的 KEGG 通路,并以气泡图的形式进行数据可视化展示,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。

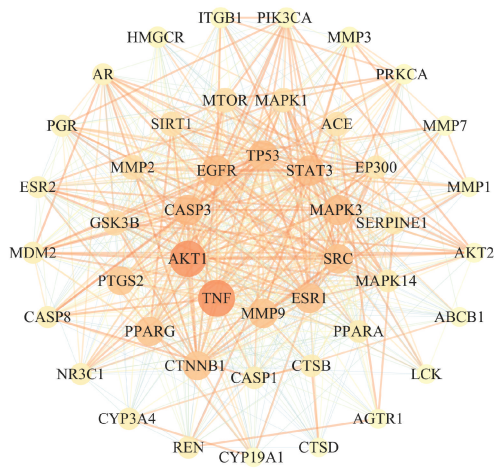
由图 3(a)可知:在 GAS 与 AD 的核心靶点富集分析结果中,生物过程(Biological process, BP)主要涉及蛋白水解、凋亡过程等;细胞成分(Cellular component, CC)主要富集了细胞外基质,细胞质膜、细胞液泡等组分;分子功能(Molecular function, MF)主要涉及参与凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性,半胱氨酸型内肽酶活性参与细胞凋亡信号通

路等。由图 3(b)可知:GAS 与 AD 交集靶点所涉及的信号通路主要包括 TNF 信号通路和细胞凋亡。从图 3(c)可知:在 GLT 与 AD 的核心靶点富集分析结果中,BP 主要涉及蛋白水解、信号转导对细胞凋亡过程的正调控与负调控、细胞凋亡过程等;CC 主要富集到细胞质、细胞核、细胞质膜等;MF 主要涉及内肽酶活性、多肽酶活性、丝氨酸型内肽酶活性等。从图 3(d)可知:GLT 与 AD 交集靶点所涉及的

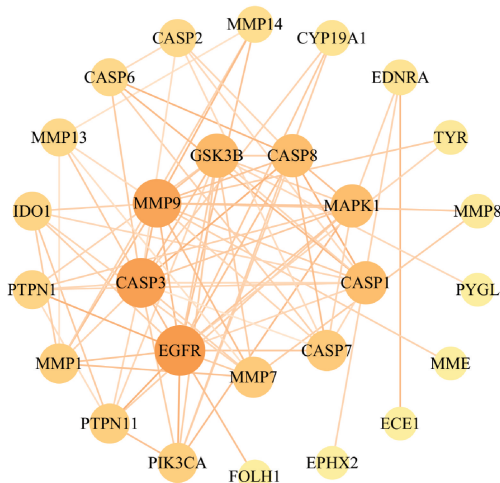
信号通路包括 TNF 信号通路、细胞凋亡、炎症。从图 3(e)可知:对 GAS、GLT 与 AD 共同作用的核心靶点进行分析,BP 主要涉及胶原蛋白分解代谢过程、细胞凋亡的执行、蛋白质加工;CC 主要富集到细胞外基质、细胞质等;MF 主要包括肽链内切酶活性、半胱氨酸型和丝氨酸型内肽酶活性等。从图 3(f)可知:三者交集靶点所涉及的信号通路包括细胞凋亡和胰岛素信号通路等。



(a) GAS与AD交集靶点的PPI网络



(b) GLT与AD交集靶点的PPI网络



(c) GAS、GLT与AD交集靶点的PPI网络

图 2 PPI 网络分析图

综上,GO 和 KEGG 富集分析结果显示,GAS 干预 AD 的潜在机制可能与蛋白激酶活性调控、细胞凋亡信号通路等密切相关;而 GLT 作用于 AD 的关键通路则主要涉及细胞凋亡信号通路、炎症反应等生物学过程。

网络药理学认为,药物可通过作用于多个靶点发挥治疗作用^[38]。使用多种药物可通过不同机制作用于同一信号通路,从而以协同的作用方式靶向该通路中的关键蛋白。本文通过利用网络药理学分

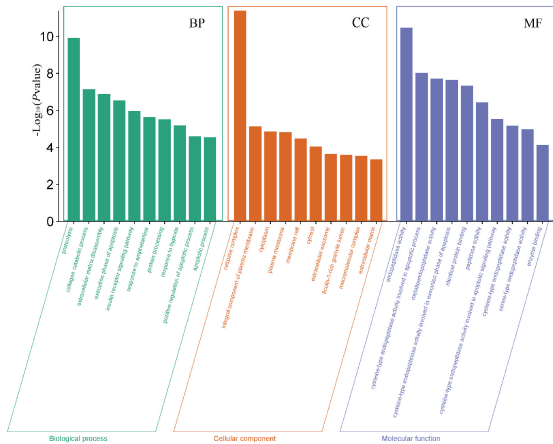
析,快速筛选组合物可能作用于 AD 的关键靶点,为后续研究奠定基础。

2.3 GAS、GLT 对细胞活力的影响

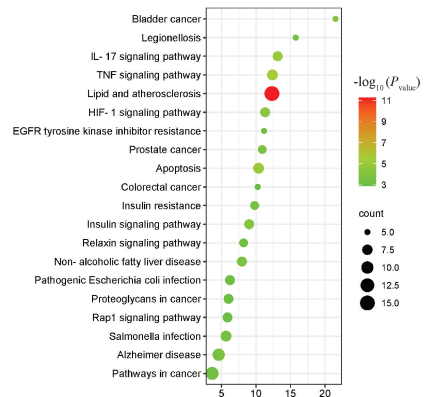
采用 CCK-8 法测定 20、40、80、160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GAS 与 GLT 对 SH-SY5Y 细胞活力影响,结果如图 4 所示。从图 4 可知:GAS 质量浓度在 20~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力未受影响;当 GAS 质量浓度达到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力略有

下降,但不具有显著性差异;当 GLT 质量浓度达到 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,细胞活力有所下降($P < 0.05$);因此

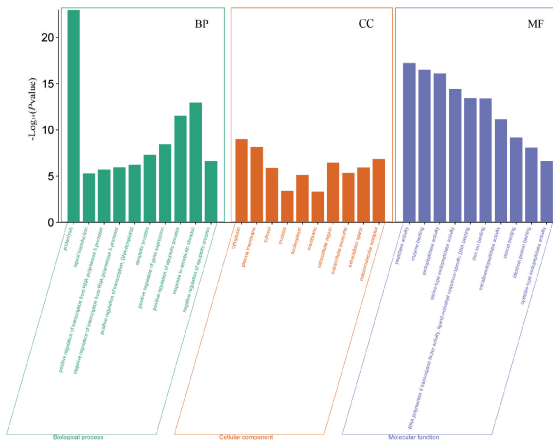
后续实验选择质量浓度为 20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GAS 和 GLT 进行研究。



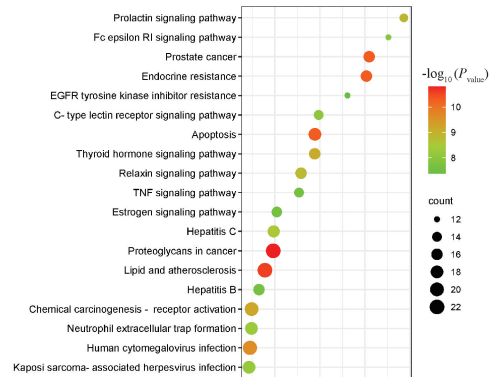
(a) GAS与AD交集靶点的GO功能分析



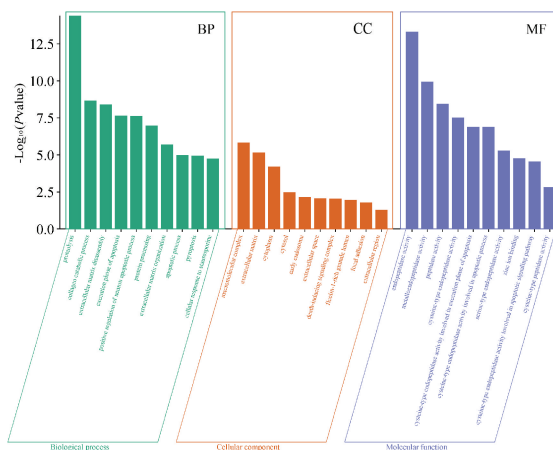
(b) GAS与AD交集靶点的KEGG功能分析



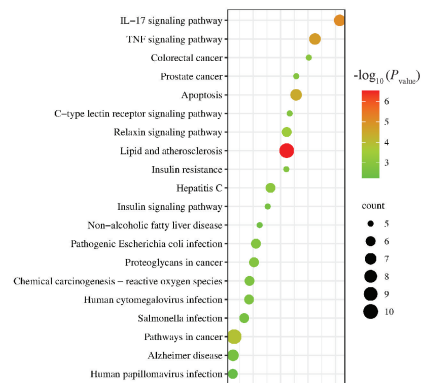
(c) GLT与AD交集靶点的GO功能分析



(d) GLT与AD交集靶点的KEGG功能分析



(e) 组合物与AD交集靶点的GO功能分析



(f) 组合物与AD交集靶点的KEGG功能分析

图 3 KEGG 与 GO 富集分析图

2.4 GAS、GLT 逆转 AD 细胞模型氧化应激损伤

选择质量浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 GAS 与 GLT, 分别作用于 AD 细胞模型, 检测 MDA、T-AOC、SOD 指标变化, 探究 GAS 与 GLT 在 AD 细胞模型中的最适作用浓度, 结果如图 5 所

示。由图 5(a) — (c) 可知: 经一定质量浓度的 GAS 处理后, MDA、T-AOC、SOD 均呈现不同程度的恢复, 其中 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GAS 可逆转由 $A\beta_{25-35}$ 诱导的 MDA 含量升高及 T-AOC 水平降低($P < 0.05$); 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ GAS 处理组细胞的 SOD 水平

均显著高于AD细胞模型组($P < 0.05$);以上结果表明,GAS在一定程度上能减轻AD细胞模型的氧化应激损伤,且 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 为最适作用质量浓度。由图5(d)~(f)可知:经一定质量浓度的GLT处理后, $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ GLT可显著抑制AD细胞模型中的MDA

产生($P < 0.05$),并显著提高T-AOC和SOD水平($P < 0.05$);当GLT质量浓度增加到 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,MDA和T-AOC水平变化无统计学差异,因此选择 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ GAS及 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ GLT进行后续GAS与GLT组合物作用机制的探究。

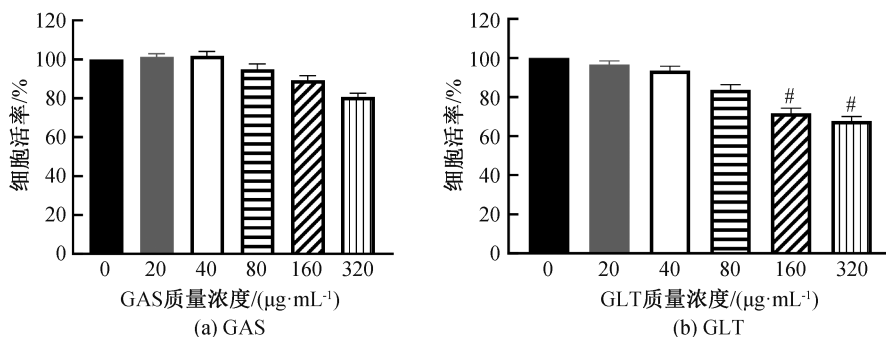


图4 GAS、GLT处理后SH-SY5Y细胞活力变化直方图

注: # $P < 0.05$, 相较于正常组。

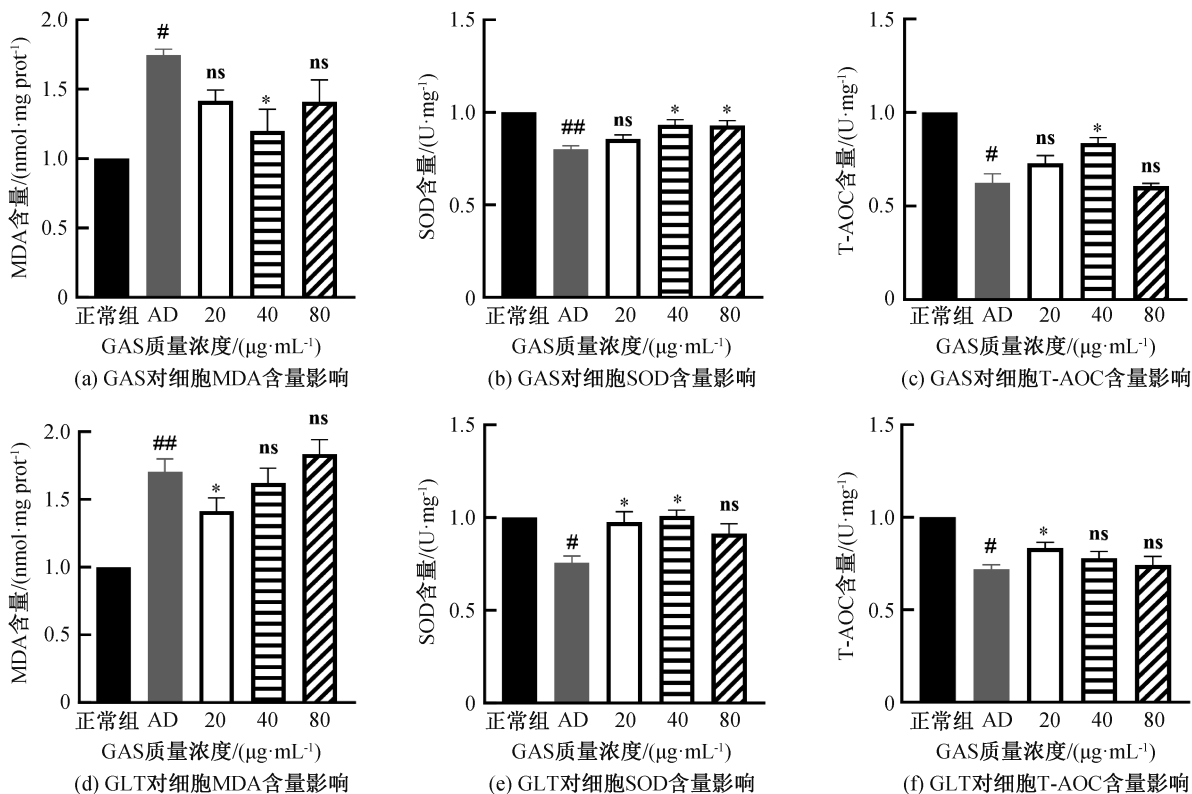


图5 GAS、GLT对AD细胞模型氧化应激指标变化直方图

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

2.5 GAS、GLT组合物对细胞活力的影响

选择 $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ GAS与 $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ GLT按体积比1:1、1:2、2:1进行组合,探究组合物对细胞活力影响。细胞经GAS与GLT组合物作用24 h后,细胞活力变化如图6所示。由图6可知:与正常组及单独使用GAS、GLT组相比,各比例组合

物处理组的细胞活力均未呈现显著差异,表明二者联用不会对细胞活力造成损害。

2.6 GAS、GLT组合物逆转AD细胞模型氧化应激损伤

检测经GAS、GLT组合物处理后的细胞中MDA、T-AOC、SOD表达水平变化,结果如图7所

示。由图 7(a)–(c)可知:与 AD 细胞模型组相比,不同体积比制备的组合物对细胞氧化应激损伤仍具有一定的保护作用,当组合物体积比为 1:2、2:1 时,MDA 水平明显降低($P < 0.05$);组合物体积比为 1:1、1:2 时可显著提高细胞 T-AOC 水平及 SOD 活性($P < 0.05$)。活性氧(ROS)过量积累会损伤细胞生物大分子,导致线粒体功能障碍和中枢神经元凋亡^[39-40]。小檗碱可抑制 AD 小鼠模型 ROS 和 MDA 过度生成,缓解氧化应激,并改善神经元损伤^[41]。本文研究证实,GAS、GLT 组合物同样通过逆转 AD 细胞模型的氧化应激损伤发挥神经保护作用。

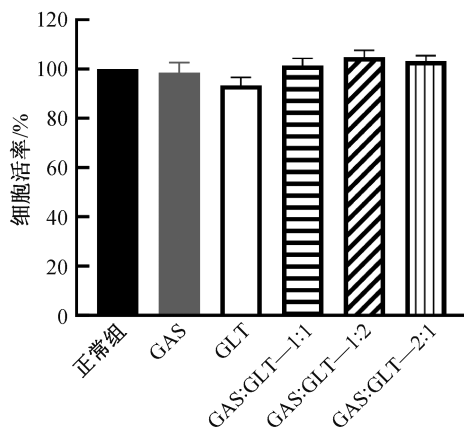


图 6 组合物对 SH-SY5Y 细胞活力影响

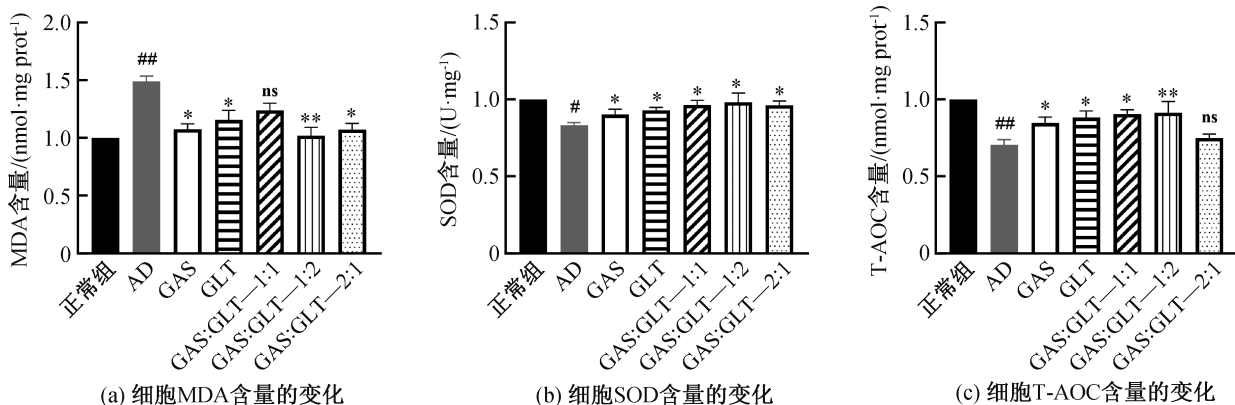


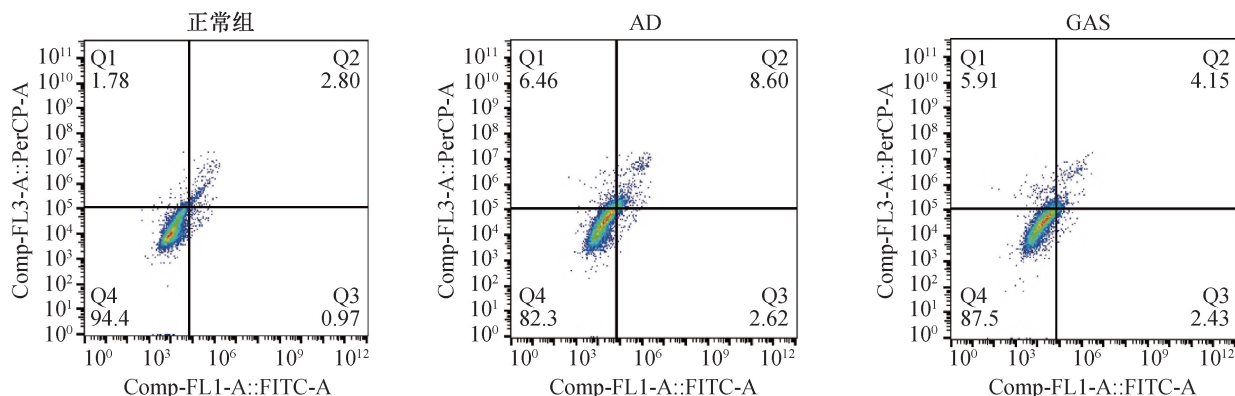
图 7 组合物对 AD 细胞模型氧化应激指标变化直方图

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

2.7 GAS、GLT 组合物抑制 AD 细胞模型凋亡

相关研究表明, $A\beta_{25-35}$ 会诱导细胞产生凋亡, 促使 AD 的发生^[42]。通过流式细胞仪检测组合物对 AD 细胞的抗凋亡影响, 结果如图 8—9 所示。由图 8 可知:与正常组相比, AD 细胞模型的凋亡率增加 7.45%; 经药物处理后, GAS、GLT 与组合物组的细胞凋亡率皆有下降, 其中组合物体积比为 2:1 时, 细胞的凋亡率降低 4.71%, 说

明组合物处理后对细胞凋亡具有一定的保护作用。 $A\beta$ 诱导所产生的神经毒性可以引发氧化应激, 导致神经元丢失及组织损伤。氧化应激发生时, SOD 活性降低 MDA 积累, 进而促进细胞凋亡^[43-44]。中药成分可抑制细胞凋亡, 减轻神经元损伤和 AD 病理现象^[45-46]。上述结果表明, GAS 与 GLT 组合物能有效抑制 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞凋亡。



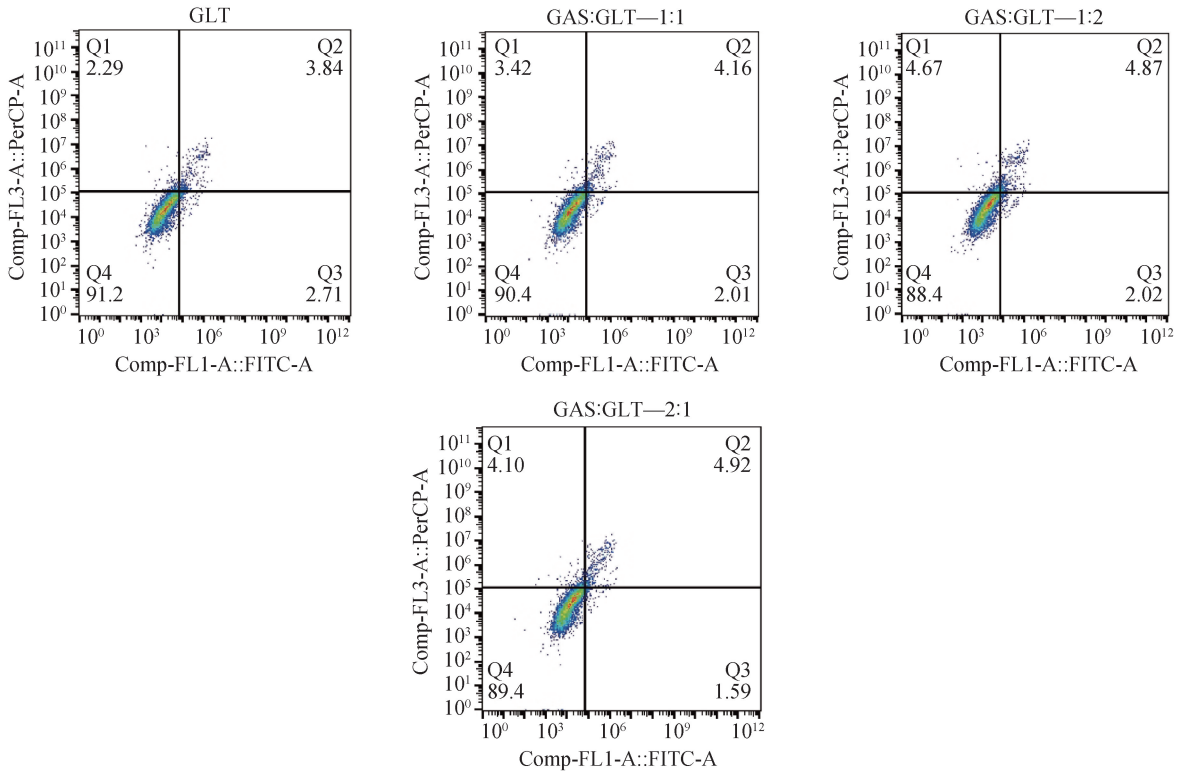


图8 GAS、GLT及其组合物对AD细胞模型凋亡流式图

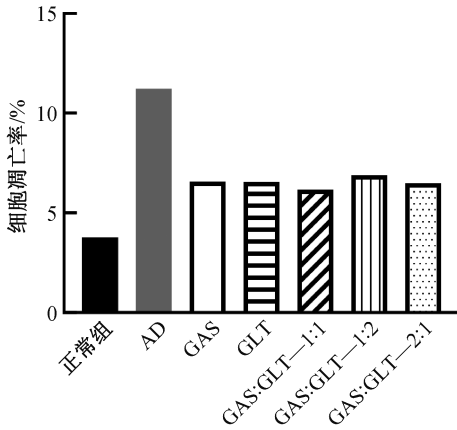


图9 GAS、GLT及其组合物对AD细胞模型凋亡直方图

2.8 GAS、GLT组合物对AD细胞模型中Tau蛋白磷酸化水平的影响

研究证实,Tau蛋白过度磷酸化与AD的发生发展密切相关。因此,本文探讨了该组合物干预对AD细胞模型中Tau蛋白(Ser396、Thr181位点)磷酸化水平的影响。结果如图10所示。从图10可知:在 $A\beta_{25-35}$ 诱导24h后,AD细胞模型中Tau蛋白Ser396和Thr181位点磷酸化水平显著升高($P < 0.05$), $40 \mu\text{g/mL}$ GAS可显著抑制该过度磷酸化($P < 0.05$),而GLT单独作用无显著作用;在GAS与GLT联用时,仅特定比例(尤其是2:1)能显著减少Ser396位点磷酸化($P < 0.05$),Thr181位点磷酸化仅在2:1比例

下呈显著下调($P < 0.05$)。结果表明,当组合物体积比为2:1时可通过抑制Tau蛋白Ser396/Thr181过度磷酸化改善AD细胞模型的病理状态。该效应可能与GSK-3 β 通路相关: $A\beta$ 通过激活GSK-3 β ,进而促进Tau蛋白磷酸化、APP异常代谢及 $A\beta$ 的生成,加剧神经元死亡^[47]。本文证明GAS与GLT组合物通过抑制GSK-3 β 活性,减轻 $A\beta$ 诱导的Tau蛋白过度磷酸化,发挥神经保护作用。

2.9 GAS、GLT组合物对AD细胞模型GSK-3 β 通路的影响

上述实验结果证明,该组合物在一定程度上能够下调AD细胞模型的氧化应激、细胞凋亡水平;并结合已确定的最适单药浓度($40 \mu\text{g/mL}$ GAS、 $20 \mu\text{g/mL}$ GLT),选取体积比为2:1的GAS、GLT组合物,探究其对AD细胞模型中GSK-3 β 的mRNA转录水平及蛋白水平调控作用,并通过WB及RT-qPCR实验对通路相关信号分子进行检测,结果如图11所示。从图11可知:在 $A\beta_{25-35}$ 作用24h后,GSK-3 β 蛋白表达水平显著上升($P < 0.05$),单独药物处理组的GSK-3 β 蛋白表达水平无显著差异,而组合物处理组的GSK-3 β 在mRNA转录水平和蛋白水平均有显著下调($P < 0.05$),这表明组合物处理对AD细胞模型中的GSK-3 β 具有下调作用,且效果明显优于单独药物组。

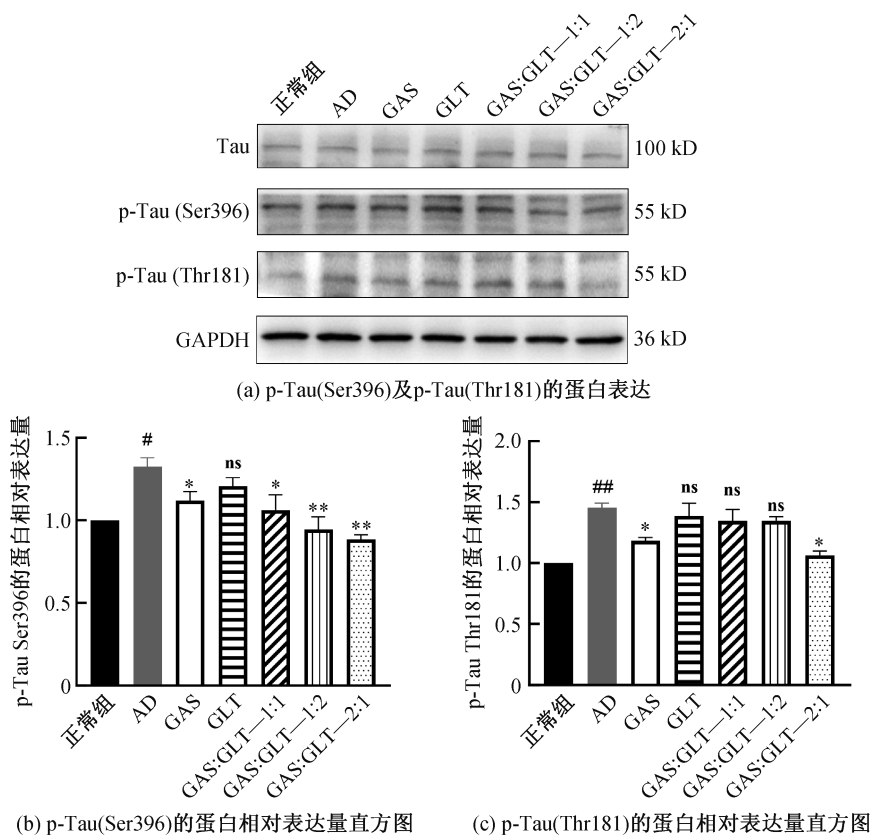


图 10 组合物对 AD 细胞模型中 p-Tau 相对蛋白表达示意图

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

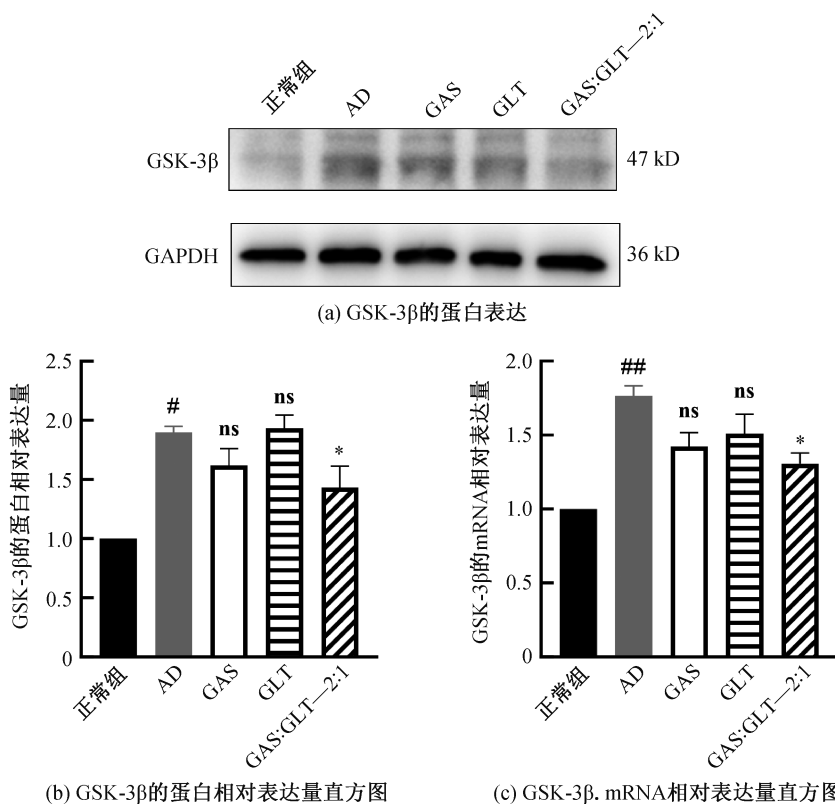


图 11 组合物对 AD 细胞模型中 GSK-3 β 蛋白及 mRNA 表达水平示意图

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

3 结 论

本文运用网络药理学分析并结合细胞实验,利用 $A\beta_{25-35}$ 诱导 SH-SY5Y 构建 AD 细胞模型,探究 GAS 与 GLT 组合物对 AD 模型细胞的神经保护作用及其通过调控 GSK-3 β 信号通路改善 AD 病理变化的分子机制,主要结论如下:

a) GSK-3 β 信号通路是天麻素与灵芝三萜组合物调控 AD 的潜在关键靶点;

b) 天麻素与灵芝三萜组合物能够有效逆转 $A\beta_{25-35}$ 诱导的细胞氧化应激损伤,抑制细胞凋亡;

c) 天麻素与灵芝三萜组合物通过调控 GSK-3 β 信号通路,抑制 Tau 蛋白过度磷酸化,从而发挥对 AD 细胞模型的保护作用。

本文初步阐明了 GAS 与 GLT 组合物在调控 AD 病理进程中 GSK-3 β 信号通路的作用机制,为其通过协同效应发挥药食同源活性以及预防和治疗 AD 提供了理论依据。

参考文献:

[1] Scheltens P, De Strooper B, Kivipelto M, et al. Alzheimer's disease[J]. *The Lancet*, 2021, 397(10284): 1577-1590.

[2] Zheng Q Y, Wang X. Alzheimer's disease: insights into pathology, molecular mechanisms, and therapy[J]. *Protein & Cell*, 2025, 16(2): 83-120.

[3] Baviskar P S, Mahajan H S. Unveiling Alzheimer's disease (1901-2025): historical insights, global burden, biological mechanisms, diagnostics, and therapeutic strategies[J]. *Ageing Research Reviews*, 2026, 114: 102990.

[4] Srivastava S, Ahmad R, Khare S K. Alzheimer's disease and its treatment by different approaches: a review [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 216: 113320.

[5] AmeliMojarad M, AmeliMojarad M. The neuroinflammatory role of microglia in Alzheimer's disease and their associated therapeutic targets [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(7): e14856.

[6] Crews L, Masliah E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. *Human Molecular Genetics*, 2010, 19(R1): R12-R20.

[7] 宋博雅. 阿尔茨海默病发病机制的研究进展[J]. *西安文理学院学报(自然科学版)*, 2020, 23(4): 77-79, 92.

[8] He Z H, Guo J L, McBride J D, et al. Amyloid- β plaques enhance Alzheimer's brain tau-seeded pathologies by facilitating neuritic plaque tau aggregation[J]. *Nature Medicine*, 2018, 24(1): 29-38.

[9] Zhao Y, Zhao B. Oxidative stress and the pathogenesis of

Alzheimer's disease [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 2013.

[10] Ionescu-Tucker A, Cotman C W. Emerging roles of oxidative stress in brain aging and Alzheimer's disease [J]. *Neurobiology of Aging*, 2021, 107: 86-95.

[11] Matias M, Silvestre S, Falcão A, et al. *Gastrodia elata* and epilepsy: rationale and therapeutic potential [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(12): 1511-1526.

[12] 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.

[13] Wang D, Liu W, Lu M, et al. Neuropharmacological effects of *Gastrodia elata* Blume and its active ingredients [J]. *Frontiers in Neurology*, 2025, 16.

[14] Shi R, Zheng C B, Wang H Y, et al. *Gastrodin* alleviates vascular dementia in a 2-VO-vascular dementia rat model by altering amyloid and tau levels [J]. *Pharmacology*, 2020, 105(7/8): 386-396.

[15] He J Z, Li X, Yang S P, et al. *Gastrodin* extends the lifespan and protects against neurodegeneration in the *Drosophila* PINK1 model of Parkinson's disease [J]. *Food & Function*, 2021, 12(17): 7816-7824.

[16] Fasina O B, Wang J Y, Mo J X, et al. *Gastrodin* from *gastrodia elata* enhances cognitive function and neuroprotection of AD mice via the regulation of gut microbiota composition and inhibition of neuron inflammation [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 814271.

[17] Zhao X M, Zou Y, Xu H, et al. *Gastrodin* protect primary cultured rat hippocampal neurons against amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity via ERK1/2-Nrf2 pathway [J]. *Brain Research*, 2012, 1482: 13-21.

[18] Wang W S, Wang Y, Wang F J, et al. *Gastrodin* regulates the TLR4/TRAF6/NF- κ B pathway to reduce neuroinflammation and microglial activation in an AD model [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155518.

[19] 罗云, 陈霖, 张雪涟, 等. 灵芝三萜类成分药理活性研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(9): 1185-1188.

[20] Cör D, Knez Ž, Knez Hrnič M. Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase effect of *ganoderma lucidum* terpenoids and polysaccharides: a review [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 649.

[21] Galappaththi M C A, Patabendige N M, Premarathne B M, et al. A review of *ganoderma* triterpenoids and their bioactivities [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(1): 24.

[22] Luz D A, Pinheiro A M, Fontes-Júnior E A, et al. Neuroprotective, neurogenic, and anticholinergic evidence of *Ganoderma lucidum* cognitive effects: crucial knowledge is still lacking [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2023, 43(5): 1504-1536.

- [23] Huang C H, Liao Y T, Chen C L, et al. Protective effect of *Ganoderma lucidum*-fermented crop extracts against hydrogen peroxide- or β -amyloid-induced damage in human neuronal SH-SY5Y cells[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2024, 24(1): 148.
- [24] Chen X J, Deng Z, Zhang L L, et al. Therapeutic potential of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* against Alzheimer's disease [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024, 172: 116222.
- [25] Sen T, Saha P, Jiang T, et al. Sulfhydration of AKT triggers Tau-phosphorylation by activating glycogen synthase kinase β in Alzheimer's disease [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(8): 4418-4427.
- [26] Petit-Paitel A. GSK-3 β : a central kinase for neurodegenerative diseases? [J]. *medecine*, 2010, 26(5): 516-521.
- [27] Wu H H, Tang S S, Huang Z Q, et al. Hepatoprotective effects and mechanisms of action of triterpenoids from Lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes) on α -amanitin-induced liver injury in mice [J]. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2016, 18(9): 841-850.
- [28] Zhao C, Zhang C C, Xing Z, et al. Pharmacological effects of natural *Ganoderma* and its extracts on neurological diseases: a comprehensive review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019, 121: 1160-1178.
- [29] Liang C Y, Tian D N, Liu Y Z, et al. Review of the molecular mechanisms of *Ganoderma lucidum* triterpenoids: ganoderic acids A, C2, D, F, DM, X and Y [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 174: 130-141.
- [30] Yu N H, Huang Y P, 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: 9894037.
- [31] Zhao J, Wei M, Guo M, et al. GSK3: A potential target and pending issues for treatment of Alzheimer's disease [J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(7): e14818.
- [32] Cai Z Y, Zhao Y, Zhao B. Roles of glycogen synthase kinase 3 in Alzheimer's disease [J]. *Current Alzheimer Research*, 2012, 9(7): 864-879.
- [33] Jackson G R, Wiedau-Pazos M, Sang T K, et al. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in drosophila [J]. *Neuron*, 2002, 34(4): 509-519.
- [34] Zhang Z H, Hartmann H, Minh Do V, et al. Destabilization of β -catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis [J]. *Nature*, 1998, 395(6703): 698-702.
- [35] Fiorentini A, Rosi M C, Grossi C, et al. Lithium improves hippocampal neurogenesis, neuropathology and cognitive functions in APP mutant mice [J]. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14382.
- [36] Ly P T T, Wu Y L, Zou H Y, et al. Inhibition of GSK3 β -mediated BACE1 expression reduces Alzheimer-associated phenotypes [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(1): 224-235.
- [37] Toledo E M, Inestrosa N C. Activation of Wnt signaling by lithium and rosiglitazone reduced spatial memory impairment and neurodegeneration in brains of an APP^{swe}/PSEN1 Δ E9 mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Molecular Psychiatry*, 2010, 15(3): 272-285.
- [38] Zhao L, Zhang H, Li N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2023, 309: 116306.
- [39] Bai R R, Guo J N, Ye X Y, et al. Oxidative stress: the core pathogenesis and mechanism of Alzheimer's disease [J]. *Ageing Research Reviews*, 2022, 77: 101619.
- [40] D'Alessandro M C B, Kanaan S, Geller M, et al. Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease [J]. *Ageing Research Reviews*, 2025, 107: 102713.
- [41] Sun C B, Gao X Y, Sha S, et al. Berberine alleviates Alzheimer's disease by activating autophagy and inhibiting ferroptosis through the JNK-p38MAPK signaling pathway [J]. *International Immunopharmacology*, 2025, 155: 114550.
- [42] Zhang W D, Ding F, Rong X, et al. A β -induced excessive mitochondrial fission drives type H blood vessels injury to aggravate bone loss in APP/PS1 mice with Alzheimer's diseases [J]. *Aging Cell*, 2025, 24(2): e14374.
- [43] Özdemir A Y, Hofbauerová K, Kopecký V, et al. Different amyloid β 42 preparations induce different cell death pathways in the model of SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 2024, 29(1).
- [44] Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, et al. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease [J]. *Redox Biology*, 2018, 14: 450-464.
- [45] Pu K T, Yang S M, Sheng R L, et al. Chuanxiong-Danggui herb pair alleviated cognitive deficits of APP/PS1 mice by promoting mitophagy [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2025, 350: 119988.
- [46] Ye J X, Wu J Y, Ai L, et al. Geniposide effectively safeguards HT22 cells against A β -induced damage by activating mitophagy via the PINK1/Parkin signaling pathway [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2024, 226: 116296.
- [47] Sayas C L, Ávila J. GSK-3 and tau: a key duet in Alzheimer's disease [J]. *Cells*, 2021, 10(4): 721.

团队介绍

盛清教授学术团队专注于中药在阿尔茨海默病等的防治研究,主要研究方向包括药食同源中药活性成分分析与功能研究、健脑功能食品研发等。盛清,中国生物化学与分子生物学会理事,浙江省生物化学与分子生物学学会常务理事,浙江省营养学会副理事长;2009年12月获浙江大学生物化工博士学位,2010年4月—2012年4月完成清华大学博士后研究,加州大学旧金山分校访问学者。团队承担各类科技项目10余项,发表SCI论文50余篇,申请或授权发明专利8项。团队近年来在中药特异 miRNA 跨界调控作用机制研究领域取得突破性进展,鉴定了38个天麻特有的全新 miRNAs,发现并证实多个全新天麻特异 miRNA 在天麻中稳定且高表达,并筛选出靶向阿尔茨海默病相关信号通路的 miRNA;此外,深入开展灵芝、天麻中活性成分对衰老和神经退行性疾病的作用及机制研究,初步阐明了灵芝三萜、天麻素对阿尔茨海默病中 Tau 蛋白过度磷酸化的抑制作用及机制。

(责任编辑:张会巍)