

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250409006

异银杏素改善斑马鱼行为障碍和神经细胞损伤的机制研究

刘新娟¹, 俞婷², 刘妍佳³, 江美芳⁴, 王丹丹⁴, 朱国琴³, 高崎⁴, 赵妍¹, 王星禹¹, 徐颖¹

1. 上海中医药大学(上海 201203); 2. 杭州医学院(浙江 杭州 310059); 3. 上海市药材有限公司(上海 200082); 4. 上海上药杏灵科技药业股份有限公司(上海 201703)

【摘要】 目的 探究异银杏素(ISO)通过调控 APP 裂解酶与微管相关蛋白 tau(Tau)蛋白激酶对氯化铝(AlCl_3)诱导斑马鱼行为障碍及 β 淀粉样蛋白 1-42 片段($\text{A}\beta_{1-42}$)诱导 PC12 细胞损伤的影响。**方法** ①分子对接预测 ISO 与 APP 裂解酶 β -分泌酶 1(BACE1)、早老素 1(PS1)、早老素 2(PS2)和 Tau 蛋白激酶糖原合成激酶 3 β (GSK3 β)、细胞周期蛋白依赖性激酶 5(CDK5)的结合能。②以受精后 3 天(3 pdf)的斑马鱼为研究对象,分为对照(Ctrl)组、模型(AlCl_3)组、ISO 低、中、高剂量(2、8、16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)组及多奈哌齐(DPZ)组($n=30$),浸染给药 24 h,行为轨迹跟踪系统检测斑马鱼在明暗刺激下的行为反应。③应用实时逆转录 PCR(RT-qPCR)技术检测各组斑马鱼的 BACE1、PS1、PS2、CDK5 和 GSK3 β mRNA 水平。④以 PC12 细胞为研究对象,应用 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导损伤模型,2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ISO 处理 24 h,具体分组为对照(Ctrl)组、对照加药(Ctrl+ISO)组、模型($\text{A}\beta_{1-42}$)组、模型加药($\text{A}\beta_{1-42}$ +ISO)组,应用 RT-qPCR 和 Western blot 检测细胞中 BACE1、PS1、PS2、CDK5、GSK3 β mRNA 和蛋白水平,并检测丝氨酸 396 位点磷酸化 Tau 蛋白[p-Tau(396)]的表达水平。⑤以 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氯化锂(LiCl)为对照,检测 ISO 和 LiCl 单独或联合给药对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导 PC12 细胞 GSK3 β 和 p-Tau(396)蛋白表达的影响。**结果** ①ISO 与各因子均有较低的结合能。②与 AlCl_3 组相比,低、中、高剂量 ISO 与 DPZ 均能提高 AlCl_3 组斑马鱼的运动速度。③RT-qPCR 结果显示,ISO 显著抑制 BACE1、PS1、PS2、CDK5、GSK3 β mRNA 水平($P<0.05$)。④PC12 细胞实验中,与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 组相比,2.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ ISO 显著降低 BACE1、PS1、PS2、CDK5、GSK3 β 的蛋白和 mRNA 水平($P<0.05$),并降低 p-Tau(396)的水平($P<0.05$)。⑤Western blot 结果表明,与 $\text{A}\beta$ 组相比,ISO 与 LiCl 单独或者联合给药均能显著抑制 GSK3 β 和 p-Tau 的蛋白水平($P<0.05$),且各给药组间没有明显差异($P>0.05$)。**结论** ISO 通过抑制 $\text{A}\beta$ 裂解酶和 Tau 蛋白激酶水平共同发挥神经保护作用。

【关键词】 阿尔茨海默病;异银杏素;神经保护; β 淀粉样蛋白;Tau 磷酸化;作用机制;中药研究

Mechanism of isoginkgetin in improving zebrafish behavioral disorders and neuronal injury

LIU Xinjuan¹, YU Ting², LIU Yanjia³, JIANG Meifang⁴, WANG Dandan⁴, ZHU Guoqin³, GAO Qi⁴, ZHAO Yan¹, WANG Xingyu¹, XU Ying¹

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Hangzhou Medical College, Hangzhou, Zhejiang 310059, China; 3. Shanghai Traditional Chinese Medicine Co., Ltd., Shanghai 200082, China; 4. SPH XingLing Sci&Tech. Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 201703, China

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174003);上海市教委产教融合项目(2022310031002310)

[作者简介] 刘新娟,女,博士研究生,主要从事中医药对脑疾病的机制研究工作

[通信作者] 徐颖,教授,博士研究生导师;E-mail: yingxu612@shutcm.edu.cn。王星禹,实验师;E-mail: wang215103@163.com.

Abstract: Objective To investigate the effects of isoginkgetin (ISO) on AlCl_3 -induced zebrafish behavioral disorders and $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced PC12 cell injury, through the regulation of APP cleaving enzymes and microtubule-associated protein Tau kinases. **Methods** ① Molecular docking was used to predict the binding energies of ISO with APP cleaving enzymes, including β -secretase 1 (BACE1), presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), glycogen synthase

kinase 3 β (GSK3 β) and cyclin-dependent kinase 5 (CDK5). ②Zebrafish at 3 days post-fertilization (3 dpf) were used as the subjects of the study and divided into the following groups: control (Ctrl), model (AlCl₃), ISO low, medium and high doses (2, 8, 16 μ g/mL), and donepezil (DPZ) groups ($n=30$). The zebrafish were exposed to the treatment for 24 hours, and behavioral responses to light/dark stimulation were monitored using a behavioral tracking system. ③Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to measure mRNA levels of *BACE1*, *PS1*, *PS2*, *CDK5*, and *GSK3 β* in zebrafish. ④PC12 cells were treated with 10 μ mol/L A β ₁₋₄₂ to induce a injury model. Cells were treated with 2.5 μ mol/L ISO for 24 hours. The groups were: Ctrl, Ctrl+ISO, A β ₁₋₄₂, and A β ₁₋₄₂+ISO groups. RT-qPCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein levels of *BACE1*, *PS1*, *PS2*, *CDK5*, *GSK3 β* , and to assess the protein levels of p-Tau (396). ⑤The effects of ISO and LiCl, either alone or in combination, on the protein expression of GSK3 β and p-Tau (396) in A β ₁₋₄₂-induced PC12 cells were assessed, using 10 μ mol/L lithium chloride (LiCl) as a control. **Results** ①ISO had relatively low binding energies with all target factors. ②ISO (low, medium, and high doses) and DPZ significantly increased the movement speed of zebrafish in the AlCl₃ group. ③RT-qPCR results showed that ISO significantly reduced the mRNA levels of *BACE1*, *PS1*, *PS2*, *CDK5*, and *GSK3 β* ($P<0.05$). ④In PC12 cells, compared to the A β ₁₋₄₂ group, 2.5 μ mol/L ISO significantly reduced the protein and mRNA levels of *BACE1*, *PS1*, *PS2*, *CDK5*, and *GSK3 β* ($P<0.05$), and decreased the level of p-Tau (396) ($P<0.05$). ⑤Western blot results showed that ISO and LiCl, whether administered alone or in combination, significantly inhibited the protein levels of GSK3 β and p-Tau ($P<0.05$), with no significant differences observed among the treatment groups ($P>0.05$). **Conclusion** ISO exerts neuroprotective effects by inhibiting the levels of A β cleaving enzymes and Tau phosphokinases.

Keywords: Alzheimer's disease; isoginkgetin; neuroprotection; β -amyloid protein; Tau phosphorylation; mechanism of action; Chinese materia medica research

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病周期长且难以发现和治疗,严重影响患者的生活水平。AD发病机制较为复杂,如神经炎症、胆碱能异常、突触受损、神经元受损等^[1],而 β 淀粉样蛋白(A β)沉积和微管相关蛋白 tau (Tau)蛋白磷酸化仍然是AD最主流的发病假说,因为患者脑中常会伴随有A β 沉积形成的细胞外斑块及Tau蛋白过度磷酸化形成的细胞内神经纤维缠结,临床上也会以脑脊液/血浆中A β _{42/40}和血浆苏氨酸 181 磷酸化 tau [p-Tau (181)]、血浆苏氨酸 217 磷酸化 tau [p-Tau (217)]为诊断AD的体液生物标记物^[2-4]。作为AD患者的两个最重要的病理特征,单独靶向A β 蛋白或Tau磷酸化的药物并未取得突破性进展^[5-6]。

银杏叶提取物是目前研究最广泛的中药制剂,具有抗心脑血管疾病和神经保护作用^[7]。研究^[8-9]表明银杏叶能够改善脑血流量,促进神经细胞存活,保护突触连接。异银杏素(isoginkgetin, ISO)是银杏叶中一类具有天然活性的双黄酮类成分,据报道ISO具有抗炎、抗病毒、抗癌、抗氧化等药理活性^[10-11]。此外,ISO还具有神经保护作用,经ISO处理的神经胶质细胞的培养基能够通过抑制P38蛋白激酶/核因子 κ B(p38/NF- κ B)信号通路显著减轻神经细胞的凋亡,并能恢复神经细胞活力^[12]。本研究旨在探究ISO体内外抗AD的具体机制,进一步解析其对AD特征性病理(A β 沉积、Tau蛋白磷酸化)的

作用。

斑马鱼与人类基因高达87%的同源性,多被用来作为模式动物研究神经系统相关疾病^[13-14]。氯化铝(AlCl₃)被认为是AD模型的理想诱导剂,过量摄入铝离子与A β 沉积和Tau过度磷酸化有关暴露于AlCl₃的斑马鱼表现出氧化应激和行为障碍的AD表型^[15]。此外,研究^[16]表明可以通过缺氧诱导斑马鱼内质网应激,激活 γ 分泌酶并导致认知障碍。PC12细胞是神经科学研究中广泛应用的细胞系^[17]。该细胞在神经生长因子(NGF)刺激下,能够发生形态与功能转变,分化为类似神经元的细胞类型。这种独特的分化潜能,使其能够有效模拟神经细胞损伤过程,常被用于构建神经退行性疾病研究模型。凭借对损伤刺激响应敏感、培养操作简便等优势,PC12细胞已成为探索神经保护机制及药物干预策略的重要工具^[18]。因此,本研究以斑马鱼和PC12细胞为研究对象,验证ISO是否通过抑制APP裂解酶减少A β 沉积,同时抑制蛋白激酶活性减少Tau磷酸化,发挥抗AD的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本研究使用的斑马鱼来自中国斑马鱼资源中心。斑马鱼培养在循环系统中,维持水温在(28.5 $\pm$ 1.5) $^{\circ}$ C,光照周期为14 h/10 h。经上海中医药大学药物安全评价研究中心批准(批准号:

IACUC-SR-NG2302)。

1.1.2 细胞 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12, 购自中国医学科学院细胞培养中心。

1.1.3 药物与试剂 ISO(批号:P09N8F47765), 上海源叶生物科技有限公司。 β 淀粉样蛋白 1-42 片段($A\beta_{1-42}$)(批号:04407525)、多奈哌齐(Donepezil, 批号:CCHM700646)和 cDNA 逆转录试剂盒(批号:6110A), 上海泰坦科技股份有限公司; 乙酰胆碱酯酶试剂盒(批号:A024-1-1), 南京建成生物工程研究所; TRIzol 试剂(批号:B511311)、2 $\times$ 实时定量 PCR 扩增的预混合溶液(SYBR MasterMix, 批号:B532955), 日本 Takara 公司; 六水合氯化铝($AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 批号:102301046), 南京化学试剂股份有限公司; 糖原合成激酶 3 β (GSK3 β , 货号:sc-377213)、Tau 蛋白抗体(货号:sc-32274)、p-Tau(Ser 396)抗体(货号:sc-32275)、早老素 1(PS1, 货号:sc-365495)抗体、早老素 2(PS2, sc-393758)抗体、细胞周期蛋白依赖性酶 5(CDK5, 货号:sc-6247)抗体, 美国 Santa Cruz 生物技术公司; β 分泌酶 1(BACE1, 货号:PSH05-19)抗体, 杭州华安生物技术有限公司; 胎牛血清(FBS, 批号:SV30087.02), DMEM 培养基(批号:SH30022.0 1B), 美国 HyClone 公司。

1.1.4 主要仪器 斑马鱼饲养系统(型号:ZB2550SAABSX5), 意大利 Tecniplast 公司; 斑马鱼行为轨迹跟踪系统(型号:DanoVision), 荷兰诺达思公司; 细胞培养箱(型号:BB150), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 冷冻研磨仪(型号:Scientz-48), 新芝生物科技有限公司; 多功能酶标仪(型号:Synergy2), 美国 BioTek 公司; 全自动凝胶成像仪(型号:Tanon-4200SF), 上海天能科技有限公司; 全自动荧光定量 PCR 系统(型号:05815916001L), 瑞士 Roche 公司; Western blot 电泳转膜仪(型号:PowerPacTMHC), 美国 Bio-Rad 公司。

1.2 斑马鱼实验 将受精后 3 d(3 dpf)的斑马鱼随机每组分 30 尾于 6 孔板中, 对照组含 0.1% 的二甲基亚砜(DMSO), 25 μ mol/L 的 $AlCl_3$ 为模型组, 诱导 24 h 后, 暴露于浓度依次为 2、8 和 16 μ g/mL 的 ISO 中, 继续培养 24 h, 并以 5 μ mol/L DPZ 用作阳性药对照。即实验组别依次为: 正常对照组(Ctrl)、模型组($AlCl_3$)、低、中、高剂量加药组(2、8、16 μ g/mL ISO)及 5 μ mol/L 阳性药多奈哌齐组(DPZ)。

1.3 PC12 细胞培养及分组 PC12 细胞以 10%FBS 和 1% 双抗的 DMEM 高葡萄糖培养基于 37 $^{\circ}$ C 和

5%CO₂培养箱中培养。①处于生长期的 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL 铺板于 6 孔板中, 用活化的 $A\beta_{1-42}$ (10 μ mol/L) 刺激 24 h, 再以 2.5 μ mol/L ISO 培养 24 h。实验组别依次为: 对照组(Ctrl)、对照加药组(Ctrl+ISO)、模型组($A\beta_{1-42}$)及模型加药组($A\beta_{1-42}$ +ISO)。②以 LiCl 为阳性药, 另设对照(Ctrl)组、对照加药(Ctrl+ISO)组、模型($A\beta_{1-42}$)组及模型加药($A\beta_{1-42}$ +ISO)组、模型加阳性药($A\beta_{1-42}$ +LiCl)组和模型加药加阳性药($A\beta_{1-42}$ +ISO+LiCl)组。

1.4 分子对接 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载 ISO 的 SDF 格式结构文件, 应用 OpenBabelGUI 3.1.1 软件转换为 MOL2 格式。从 PDB (<https://www.rcsb.org/>)数据库下载 BACE1 (PDB: 4XXS)、BACE2 (PDB: 6JSZ)、PS1 (PDB: 2KR6)、PS2 (PDB: 7Y5X)、CDK5 (PDB: 7VDP) 和 GSK3 β (PDB: 1I09) 结构, 应用 PyMOL2.6.0 软件修饰蛋白质, 包括脱水和加氢。使用 MOE2019 进行分子对接。采用 PyMOL 和 Discovery Studio 2019 软件对结果进行可视化。

1.5 斑马鱼行为学检测 实验开始前调节温控箱水温到 28.5 $^{\circ}$ C, “1.2”项下各组斑马鱼转移至 96 孔板中, 控制每孔 1 尾, 斑马鱼置于幼鱼培养箱中, 行为追踪开始前斑马鱼在观察箱开灯环境下适应 15 min, 之后以 10 min 明/10 min 暗为 1 个循环, 重复 3 个循环采集斑马鱼行为轨迹。轨迹跟踪结束后分析每组总平均速度, 导出时间-移动速度数据, 统计每尾鱼每 10 min 的平均速度代表明、暗条件下斑马鱼的平均运动速度。并收集各组实验样本, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.6 实时逆转录 PCR (RT-qPCR) 对于斑马鱼或 PC12 细胞均参照 TRIzol 试剂说明书进行实验, 即应用 TRIzol 试剂提取斑马鱼或细胞总 RNA, 按照 Takara 逆转录试剂盒操作方法: 先配制 10 μ L 含 RNA、gDNA Eraser 等的体系并经 42 $^{\circ}$ C 水浴 2 min 后冰浴 15 min 以去除基因组 DNA, 再以此反应液为基础配制 20 μ L 逆转录体系, 经 37 $^{\circ}$ C 水浴 15 min、85 $^{\circ}$ C 加热 5 s 后冰浴 15 min, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 并以 95 $^{\circ}$ C、30 s 预变性; 再以 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、30 ~ 34 s, 设置循环数为 40, 进行 PCR 反应。以 β -肌动蛋白基因(β -actin)为内参, 进行定量实时 PCR 检测, 各组均设 3 个复孔, 以 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法表示各目的基因的相对表达量。斑马鱼引物序列由生工生物工程(上海)有限公司合成, PC12 细胞引物序列由英潍捷基(上海)贸

易有限公司合成。所用引物序列见表 1、表 2。

表 1 斑马鱼引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>BACE1</i>	上游:5'-GTGCATGATGAGTTCCGCAC-3'	20
	下游:5'-CATGAAGAGCGCACAGATGC-3'	20
<i>PS1</i>	上游:5'-GGCTCATCCTCGCTGCTATT-3'	19
	下游:5'-AGCCACACCATCGTAGAGGA-3'	20
<i>PS2</i>	上游:5'-GCTCACACTCAAATACGGCG-3'	20
	下游:5'-ATGGGGTATAGATGAGCCGC-3'	20
<i>CDK5</i>	上游:5'-TCCACCGTGACCTTAAACAC-3'	21
	下游:5'-CAACGTCACACCTCAGCAG-3'	20
<i>GSK3β</i>	上游:5'-CCATCCATGGACTAAGGTGTTTCG-3'	24
	下游:5'-CCGCAGTTTCATCGAAGAAGGA-3'	21
<i>β-actin</i>	上游:5'-CTCAGGATGCGGAACTGGC-3'	20
	下游:5'-CATGGACGCCCATTTGTGAGG-3'	20

注:*BACE1*为β分泌酶1基因,*PS1*为早老素1基因,*PS2*为早老素2基因,*CDK5*为细胞周期蛋白激酶5基因,*GSK3β*为糖原合成激酶3β,*β-actin*为β-肌动蛋白基因。

表 2 PC12 细胞引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
<i>BACE1</i>	上游:5'-AAGTTTGCCATCTCACAGTCATCC-3'	24
	下游:5'-CCGTCTGAACTCATCGTGC-3'	20
<i>PS1</i>	上游:5'-ATACCTGCACCTTTGTCTACT-3'	22
	下游:5'-GCTCAGGGTTGTCAAGTCTCT-3'	21
<i>PS2</i>	上游:5'-TGCCTCATGGCCCTAGTGTTC-3'	23
	下游:5'-TGGGCTCATTTCTCTCTGGGCAGTT-3'	26
<i>CDK5</i>	上游:5'-CGCCGCGATGCAGAAATACGAGAA-3'	25
	下游:5'-TGGCCCCAAGAGGACATC-3'	20
<i>GSK3β</i>	上游:5'-CGCTCCCTGTGATTATG-3'	18
	下游:5'-TTAGTCCAAGGATGTGCC-3'	18
<i>β-actin</i>	上游:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	20
	下游:5'-TATCAGCTGTGGTGGTGAAG-3'	20

注:*BACE1*为β-分泌酶1基因,*PS1*为早老素1基因,*PS2*为早老素2基因,*CDK5*为细胞周期蛋白激酶5基因,*GSK3β*为糖原合成激酶3β,*β-actin*为β-肌动蛋白基因。

1.7 Western blot 检测 按照“1.3”项下细胞培养及分组,收集细胞并以放射免疫沉淀试验(RIPA)裂解细胞蛋白,二喹啉甲酸(BCA)定量后,以每孔上样 40 μg,10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离总蛋白,并转移至硝酸纤维素(NC)膜上,5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h。4℃摇床下以 1:1 000 比例分别孵育 GSK3β、Tau、p-Tau(Ser 396)、PS1、PS2、CDK5、BACE1 一抗过夜,第 2 天以含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)洗膜 3 次后,室温孵

育二抗(1:5 000)1 h,TBST 洗去二抗。于成像仪中成像,用 ImageJ 软件量化条带的强度,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)为内参进行分析。

1.8 统计学方法 应用 Graphpad 8.0 软件进行数据处理,数据表示为 $\bar{x} \pm s$,多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

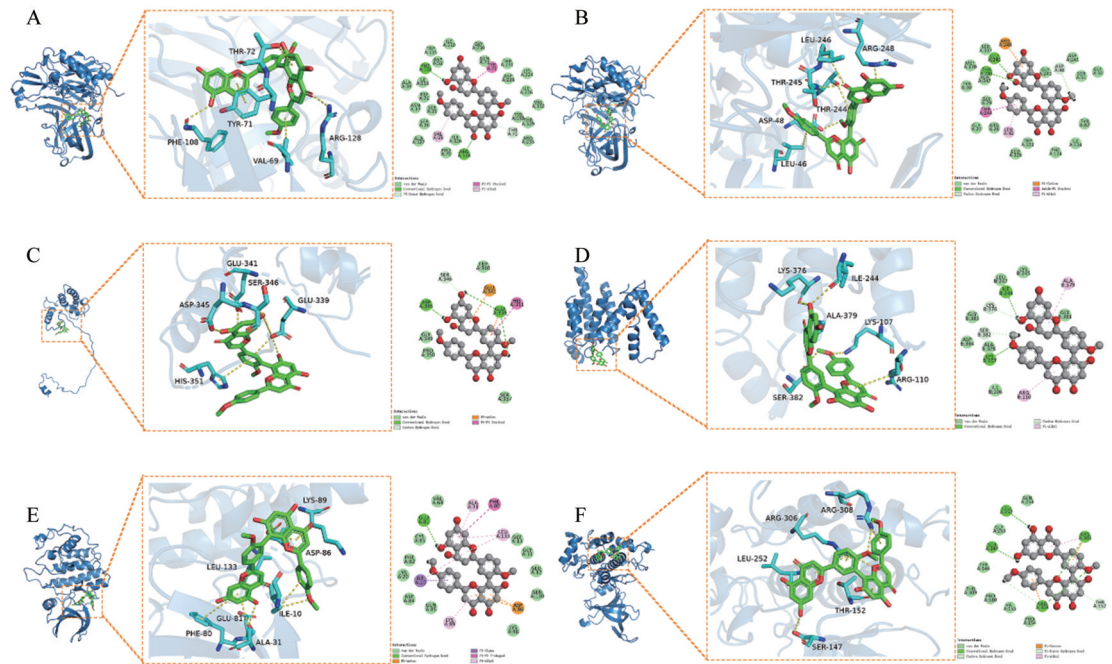
2.1 ISO 与 BACE1、BACE2、PS1、PS2、CDK5、GSK3β 蛋白分子具有良好的结合能力 为探索 ISO 与蛋白质靶点之间的相互作用,使用 MOE 2019 软件进行分子对接。通常认为结合能小于 -5.0 kcal/mol 时表明药物小分子与蛋白间有良好的结合活性,ISO 与 BACE1、BACE2、PS1、PS2、CDK5 和 GSK3β 蛋白分子对接能分别为 -8.138 6、-7.316 7、-6.576 3、-6.298 8、-6.332 4、-7.910 8 kcal/mol,表明所有预测靶点均表现出良好的结合活性。ISO 与预测靶点均表现出良好的结合活性。各蛋白与 ISO 分子直接以氢键、共价作用等多种方式结合,结果如图 1 所示。

2.2 ISO 改善 AlCl₃ 诱导的斑马鱼对明暗交替刺激的运动损伤 各组斑马鱼的平均运动速度(图 2A)及其统计图(图 2B)表明,与 Ctrl 组相比,AlCl₃ 组斑马鱼在黑暗条件下运动速度显著降低,表示为对光照刺激的反应能力下降。而 2、8、16 μg/mL ISO 及 DPZ 组斑马鱼的行为均有所改善,以高浓度 ISO 效果更为显著($P < 0.05$)。

2.3 ISO 逆转 AlCl₃ 诱导的斑马鱼中 BACE1、PS1、PS2、CDK5 和 GSK3β mRNA 水平 RT-qPCR 结果显示,模型组斑马鱼的 BACE1、PS1、PS2、CDK5 和 GSK3β mRNA 水平明显升高,在 DPZ 或 ISO 浸染治疗组 AlCl₃ 诱导的斑马鱼中上述因子的 mRNA 水平明显降低。见图 3。

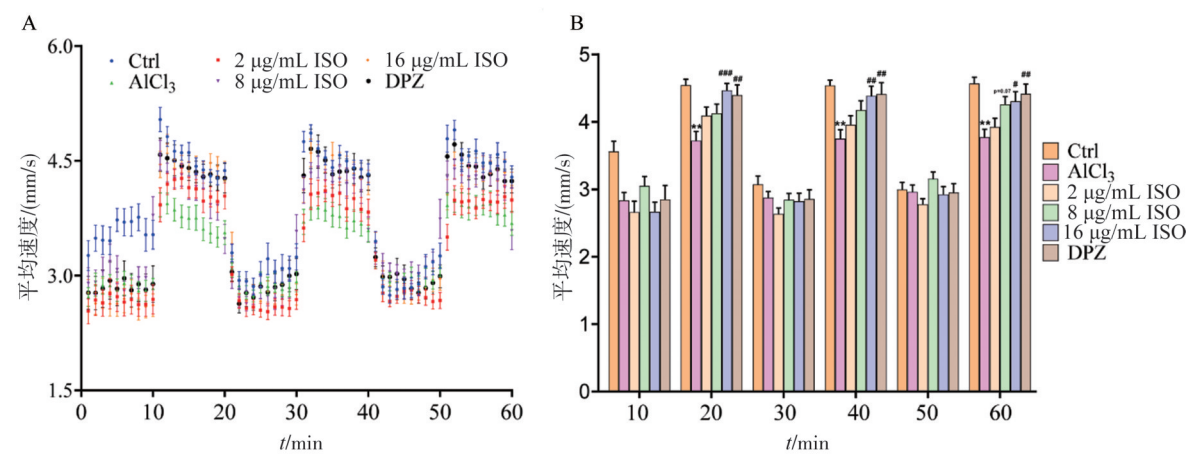
2.4 ISO 抑制 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 PC12 细胞中 BACE1、PS1 和 PS2 的蛋白和 mRNA 水平 RT-qPCR 实验检测 ISO 对 Aβ 诱导的 PC12 细胞中 APP 裂解酶的影响。Aβ 组细胞中 BACE1、PS1 和 PS2 的 mRNA 升高,而 ISO 药物组 BACE1、PS1 和 PS2 mRNA 显著下降,与斑马鱼实验结果一致。见图 4。

2.5 ISO 抑制 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 PC12 细胞中 Tau 的磷酸激酶活性及其磷酸化 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 PC12 细胞中 GSK3β 和 CDK5 的水平均有所升高,而 ISO 药物组 GSK3β 和 CDK5 的水平降低,且抑制了细胞 p-Tau(396)蛋白水平,这与斑马鱼验证结果保持一致。见图 5。



注:A为异银杏素 ISO-β 分泌蛋白 1(BACE1),B 为 ISO-β 分泌蛋白 2(BACE2),C 为 ISO-早老素 1(PS1),D 为 ISO-早老素 2(PS2),E 为 ISO-细胞周期蛋白依赖性酶 5(CDK5),F 为 ISO-糖原合成激酶 3β(GSK3β)。

图 1 ISO 与 BACE1、BACE2、PS1、PS2、CDK5、GSK3β 的分子对接模型图



注:A为各组斑马鱼的平均运动速度,B为A的统计图。Ctrl为空白对照,ISO为异银杏素,Aβ₁₋₄₂为氯化铝,DPZ为多奈哌齐。与Ctrl组比较,** $P<0.01$;与Aβ₁₋₄₂组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;n=30, $\bar{x}\pm s$ 。

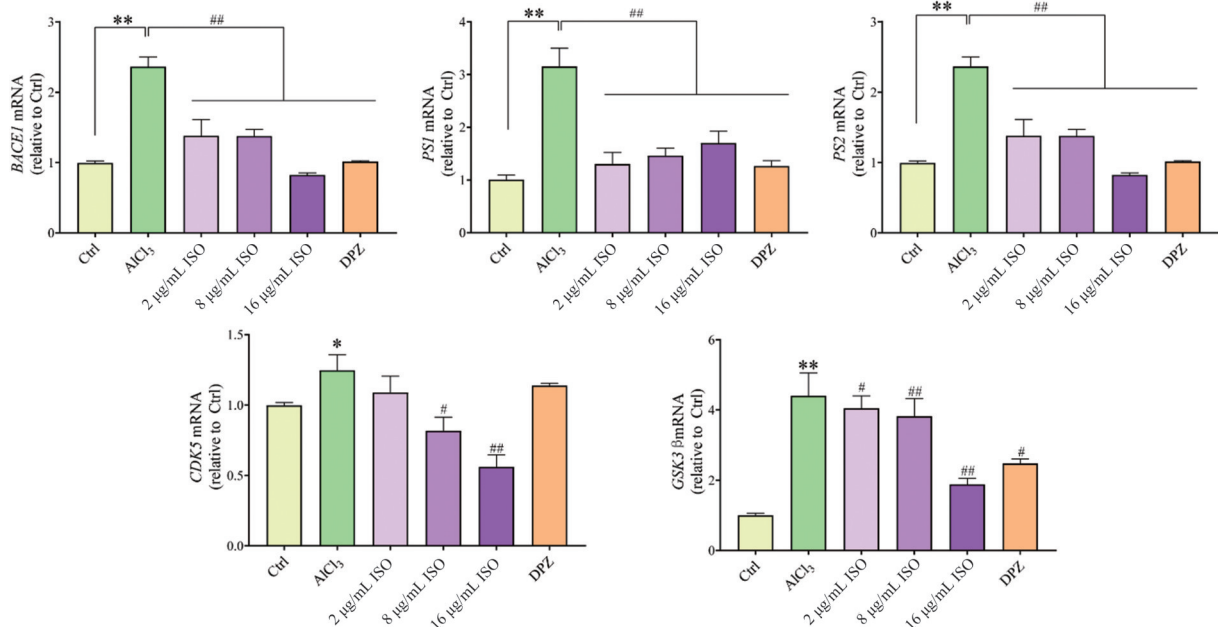
图 2 ISO 对 Aβ₁₋₄₂ 诱导的斑马鱼运动距离和运动速度的影响

2.6 ISO 通过抑制 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 PC12 细胞中 GSK3β 活性降低 Tau 的过度磷酸化 为了研究 ISO 对 GSK3β 和 Tau 的抑制作用,实验以 LiCl 为阳性对照处理 PC12 细胞。LiCl 有效抑制了 Aβ₁₋₄₂ 诱导的 GSK3β 的表达并降低磷酸化 Tau 蛋白的表达水平,而 ISO 和 LiCl 联用组与 ISO 或 LiCl 单独给药具有相似的效果,均能抑制 GSK3β 和 p-Tau 蛋白的水平,见图 6,并且两者联用并不能起到增强抑制作用,提示 ISO 与 LiCl 通过相同的机制,即通过抑制 GSK3β 降

低 p-Tau 的表达。

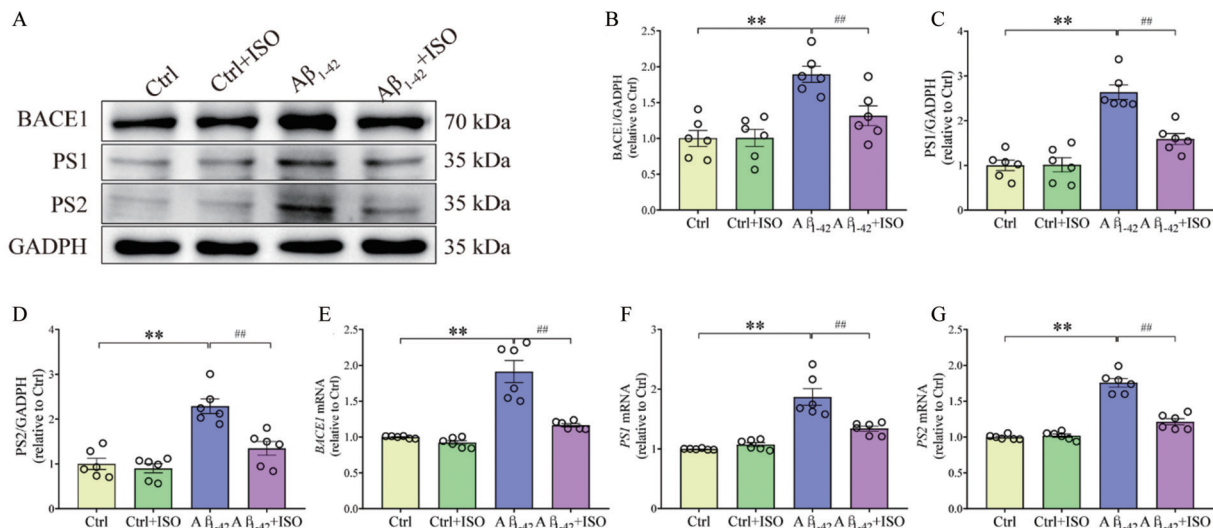
3 讨论

AD 因其机制复杂,发病率高且无有效的治疗药物而备受关注,该病以 Aβ 沉积和 Tau 蛋白磷酸化为两大关键特征,尽管以 Aβ 和 Tau 为靶点研发的抗体展现出一定抗 AD 潜力,但相关药物仍处于研究阶段^[19]。与之相比,中药凭借多靶点、多通路的独特优势,在抗 AD 药物研究领域极具前景^[20]。



注: *BACE1* 为 β -分泌酶 1 基因, *PS1* 为早老素 1 基因, *PS2* 为早老素 2 基因, *CDK5* 为细胞周期蛋白激酶 5 基因, *GSK3 β* 为糖原合成激酶 3 β 。Ctrl 为空白对照, ISO 为异银杏素, AlCl_3 为氯化铝, DPZ 为多奈哌齐。与 Ctrl 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 AlCl_3 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 3 ISO 对 AlCl_3 诱导斑马鱼 *BACE1*、*PS1*、*PS2*、*CDK5* 和 *GSK3 β* mRNA 的影响

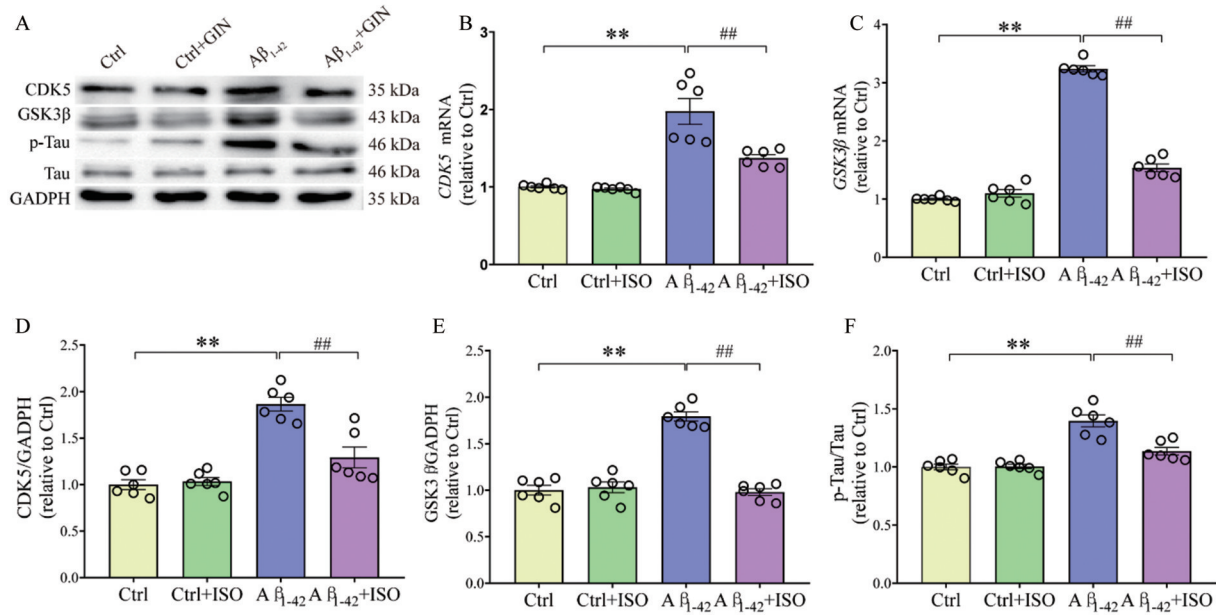


注: *BACE1* 为 β 分泌酶 1, *PS1* 为早老素 1, *PS2* 为早老素 2, GADPH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Ctrl 为空白对照, ISO 为异银杏素, $\text{A}\beta_{1-42}$ 为 β 淀粉样蛋白 1-42 片段。与 Ctrl 组比较, ** $P < 0.01$; 与 $\text{A}\beta_{1-42}$ 组比较, ## $P < 0.01$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 4 ISO 对 $\text{A}\beta_{1-42}$ 诱导的 PC12 细胞中 *BACE1*、*PS1*、*PS2* 的蛋白和 mRNA 的影响

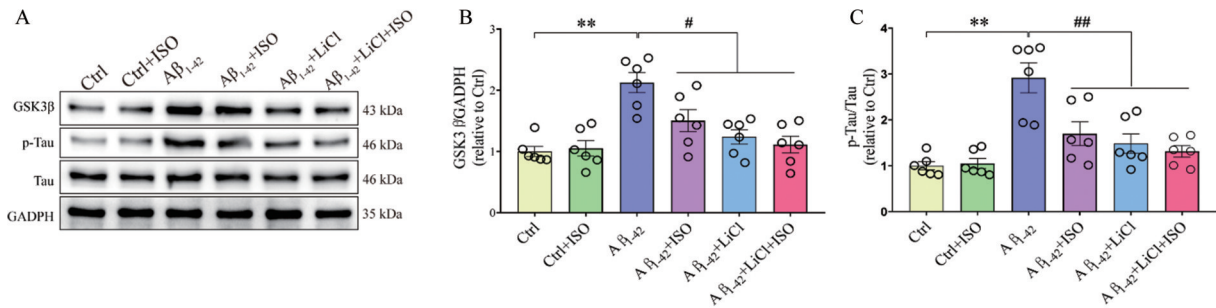
在本研究中,我们构建了 AlCl_3 诱导的斑马鱼神经损伤模型,结果显示,模型组斑马鱼对明暗刺激的运动速度显著降低,同时 *BACE1*、*PS1*、*PS2* mRNA 异常升高。 $\text{A}\beta$ 是从淀粉样前体蛋白 (APP) 上切割而来的, *BACE1* 和 γ 分泌酶的持续作用可分解 APP 产生具有神经毒性的 $\text{A}\beta_{40}$ 和 $\text{A}\beta_{42}$, 聚集并随后形成 $\text{A}\beta$ 斑块^[21]。其中 *PS1* 为 γ 分泌酶核心催化亚基, *PS1* 突变会导致 γ 分泌酶偏向切割产生更多 $\text{A}\beta_{42}$, 加

剧斑块沉积和神经元损伤,这是家族性 AD 的重要病因,作为 $\text{A}\beta$ 沉积形成的关键限速酶, *BACE1* 与 *PS1* 在 $\text{A}\beta$ 片段生成过程中协同作用。临床研究^[22-23]证实,抑制 *BACE1* 或 *PS1* 活性以降低 $\text{A}\beta$ 水平,是延缓 AD 病理进程、从源头阻断 $\text{A}\beta$ 产生的重要策略。经不同浓度 ISO 处理后,斑马鱼运动速度显著提升,且 *BACE1* 和 γ 分泌酶水平呈剂量依赖性下降,高浓度处理组效果尤为显著,这表明 ISO 不仅能改善斑



注:CDK5 为细胞周期蛋白激酶 5,GSK3 β 为糖原合成激酶 3 β ,Tau 为微管相关蛋白,p-Tau 为磷酸化 Tau,GADPH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Ctrl 为空白对照,ISO 为异银杏素,A β_{1-42} 为 β 淀粉样蛋白 1-42 片段。与 Ctrl 组比较,** $P < 0.01$;与 A β_{1-42} 组比较,## $P < 0.01$;n=6, $\bar{x} \pm s$ 。

图 5 ISO 对 A β_{1-42} 诱导的 PC12 细胞中 CDK5、GSK3 β 和 p-Tau 的影响



注:GSK3 β 为糖原合成激酶 3 β ,Tau 为微管相关蛋白,p-Tau 为磷酸化的微管相关蛋白,GADPH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Ctrl 为空白对照,ISO 为异银杏素,A β_{1-42} 为 β 淀粉样蛋白 1-42 片段,LiCl 为氯化锂。与 Ctrl 组比较,** $P < 0.01$;与 A β_{1-42} 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;n=6, $\bar{x} \pm s$ 。

图 6 ISO 和 LiCl 对 A β_{1-42} 诱导的 PC12 细胞中 GSK3 β 、p-Tau 蛋白表达的影响

马鱼行为异常,还可有效抑制 A β 沉积。此外,模型组 CDK5、GSK3 β mRNA 水平同样显著上调。作为蛋白磷酸化激酶,CDK5、GSK3 β 可在多个位点使 Tau 蛋白磷酸化,而抑制二者活性可显著降低 Tau 磷酸化水平,有效减轻神经元功能损伤。与之对应,ISO 处理组 CDK5、GSK3 β mRNA 水平显著降低。由此可见,抑制 BACE1、PS1、PS2、CDK5、GSK3 β mRNA 异常表达,可能是 ISO 发挥抗 AD 作用的潜在机制。

为进一步验证上述结论,我们构建了 A β_{1-42} 诱导的 PC12 细胞损伤模型,该实验结果与斑马鱼实验保持一致,即 A β_{1-42} 组 BACE1、PS1、PS2、CDK5 和 GSK3 β 的蛋白和 mRNA 水平均显著升高,且 p-Tau 蛋白水平也明显升高,而 ISO 处理组上述因子的蛋白和基因水平均受到抑制。在以 LiCl 为阳性对照

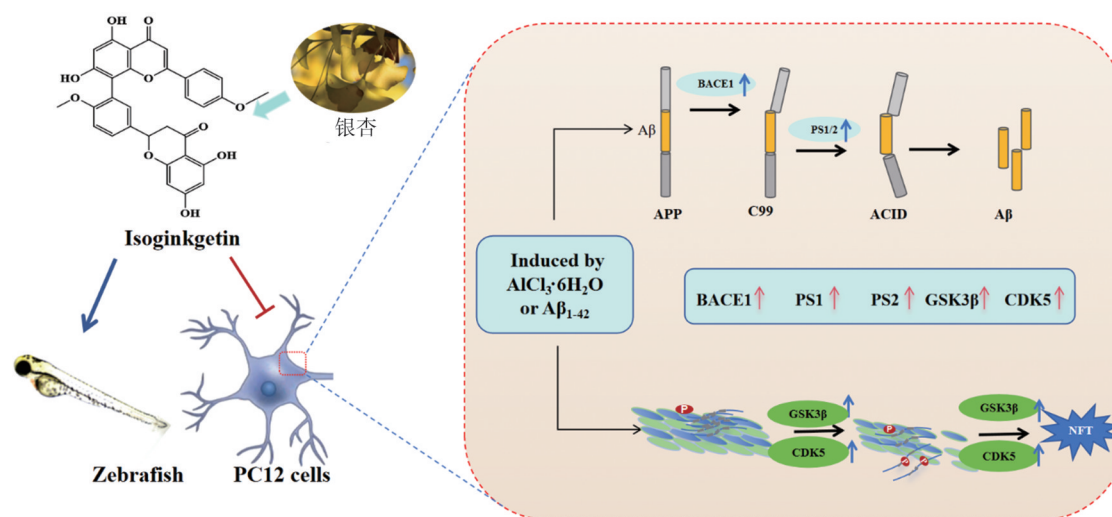
实验进一步证实 ISO 对 GSK3 β 的抑制并减弱 p-Tau (396) 表达。这充分表明,ISO 可通过双重作用机制发挥神经保护效应:一方面,抑制 BACE1、PS1、PS2 表达,减少 A β 生成;另一方面,降低 CDK5 和 GSK3 β 水平,减少 p-Tau 积累,进而改善神经细胞损伤。

A β 和 Tau 两种病理在 AD 的发病机制中起协同作用,共同推动疾病进展^[24]。Tau 蛋白主要分布于神经元轴突中,参与维持神经元细胞结构。A β 可直接或通过 A β 寡聚体与肾上腺素能受体变构位点结合诱导 GSK3 β 激活,加速 Tau 过度磷酸化^[25-26]。因此 A β 被认为能协同 Tau 诱导神经元损伤和认知缺陷,实验表明抑制 CDK5 或 GSK3 β 的活性能够显著改变 A β 诱导小鼠神经元中 p-Tau 水平^[27]。研究^[28] 表明,抑制 CDK5 或 GSK3 β 活性,可显著降低 A β 诱

导的小鼠神经元中 p-Tau 水平。此外, A β 还可通过激活 Caspase-3, 在 Asp421 位点裂解 Tau, 生成易于聚集的 N 端 Tau 产物; 同时, 激活 GSK3 β 促使过度磷酸化的 Tau 从微管脱落, 诱导 Tau 寡聚体形成, 加剧神经元损伤, 最终导致神经退行性变^[29-31]。由此可见, Tau 在介导 A β 神经毒性及认知损伤过程中发挥关键作用。

将 Tau 和 A β 等生物标志物纳入生化指标检测有利于 AD 的早期检测和预防, 而 A β 和 Tau 可与 GSK3 β 和 CDK5 中间体相互作用, 单独去除 A β 或 Tau 并不能完全终止相互作用途径继续在加速病理

进程中发挥作用。ISO 通过抑制 BACE1 和 PS1/PS2, 减少 A β 生成, 减轻 A β 寡聚体对神经元的毒性, 间接抑制 Tau 过度磷酸化。ISO 直接抑制 GSK3 β 和 CDK5 激酶活性, 减少 Tau 蛋白 Ser396 等位点磷酸化, 同时降低 A β 诱导的 GSK3 β 激活, 形成“双通路抑制”效应。抑制 A β 生成可减少其对 GSK3 β 的上游激活, 从而与直接抑制激酶形成协同, 共同阻断 Tau 病理。这些表明 ISO 具有通过同时抑制 A β 和 p-Tau 的双重机制改善或延缓 AD 的潜力, 这也为后期研究银杏叶提取物的抗 AD 作用提供研究思路和数据支撑。



注: ISO 为异银杏素, APP 为淀粉样前体蛋白, A β 为 β 淀粉样蛋白, A β_{1-42} 为 β 淀粉样蛋白 1-42 片段, ACID 为淀粉样蛋白前体蛋白 C 端片段, C99 为 99 个氨基酸的 C 末端片段, AlCl₃·6H₂O 为六水氯化铝, BACE1 为 β 分泌酶 1, PS1 为早老素 1, PS2 为早老素 2, GSK3 β 为糖原合成激酶 3 β , CDK5 为细胞周期蛋白依赖性酶 5, p-tau 为微管相关蛋白 tau 磷酸化。

图7 ISO改善斑马鱼行为障碍和神经细胞损伤机制图

值得注意的是, 在前期分子对接研究中, 我们发现 ISO 与 BACE2 也有较强的结合能力, 但 BACE2 在 AD 病理中的作用存在显著争议。部分研究表明 BACE2 可能参与 A β 代谢, 而另一些研究则认为其具有神经保护效应, 且不同物种间 BACE2 的功能表现存在差异^[32-34]。鉴于本研究聚焦于 ISO 对 A β 代谢经典通路及 Tau 蛋白磷酸化关键靶点的调控作用, 为确保研究的深度与资源利用效率, 我们暂未对 BACE2 开展进一步验证。后续研究中, 我们将持续关注 BACE2 相关研究进展, 待条件成熟时探索 ISO 对其潜在的调控机制。

参考文献:

- [1] 鲁西, 骆晓峰, 宋毓, 等. 阿尔茨海默病发病机制的研究进展[J]. 国际老年医学杂志, 2024, 45(5): 619-623.
- [2] PALMQVIST S, TIDEMAN P, CULLEN N, et al. Prediction of

future Alzheimer's disease dementia using plasma phospho-Tau combined with other accessible measures[J]. Nat Med, 2021, 27(6): 1034-1042.

- [3] MILÀ-ALOMÀ M, ASHTON N J, SHEKARI M, et al. Plasma p-tau231 and p-tau217 as state markers of amyloid- β pathology in preclinical Alzheimer's disease[J]. Nat Med, 2022, 28(9): 1797-1801.
- [4] TEUNISSEN C E, KOLSTER R, TRIANA-BALTER G, et al. Plasma p-tau immunoassays in clinical research for Alzheimer's disease[J]. Alzheimers Dement, 2025, 21(1): e14397.
- [5] BOXER A L, SPERLING R. Accelerating Alzheimer's therapeutic development: The past and future of clinical trials[J]. Cell, 2023, 186(22): 4757-4772.
- [6] LIU X, HAO W, QIN Y, et al. Long-term treatment with Ginkgo biloba extract EGb 761 improves symptoms and pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. Brain Behav Immun, 2015, 46: 121-131.
- [7] YU T, WEI Z, WANG J, et al. Ginkgo biloba Extract GBE50

- ameliorates cerebrovascular dysfunction and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Phytomedicine*, 2025, 141: 156646.
- [8] 冯锦辉, 毛祥正, 贺燕玲, 等. 银杏叶对心脑血管疾病药理作用的研究进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2024, 47(5): 136-140.
- [9] ŠAMEC D, KARALIJA E, DAHIJA S, et al. Biflavonoids: Important contributions to the health benefits of Ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) [J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(10): 1381.
- [10] 刘新娟, 江美芳, 俞婷, 等. 基于 LC-MS 和网络药理学探讨银杏酮酯治疗合并心血管疾病的新型冠状病毒肺炎的研究 [J]. *中成药*, 2020, 42(9): 2481-2488.
- [11] LI P, ZHANG F, LI Y, et al. Isoginkgetin treatment attenuated lipopolysaccharide-induced monoamine neurotransmitter deficiency and depression-like behaviors through downregulating p38/NF- κ B signaling pathway and suppressing microglia-induced apoptosis [J]. *J Psychopharmacol*, 2021, 35(10): 1285-1299.
- [12] WU B K, YUAN R Y, LIEN H W, et al. Multiple signaling factors and drugs alleviate neuronal death induced by expression of human and zebrafish tau proteins in vivo [J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23: 25.
- [13] SANG Z, HUANG S, TAN W, et al. Discovery of novel butyrylcholinesterase inhibitors for treating Alzheimer's disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2025, 15(4): 2134-2155.
- [14] NIE Y, YANG J, ZHOU L, et al. Marine fungal metabolite butyrolactone I prevents cognitive deficits by relieving inflammation and intestinal microbiota imbalance on aluminum trichloride-injured zebrafish [J]. *J Neuroinflammation*, 2022, 19(1): 39.
- [15] YIN X, ZHANG G, SONG G, et al. A novel near-infrared fluorescent probe for butyrylcholinesterase: Research for screening of natural anti-AD inhibitors [J]. *Anal Chim Acta*, 2024, 1331: 343348.
- [16] SALMINEN A, KAUPPINEN A, KAARNIRANTA K. Hypoxia/ischemia activate processing of Amyloid Precursor Protein: impact of vascular dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *J Neurochem*, 2017, 140(4): 536-549.
- [17] ZENG J, MO J, MUROI M, et al. A novel gastrodin derivative with neuroprotection promotes NGF-mimic activity by targeting INSR and ACTN4 to activate PI3K/Akt signaling pathway in PC12 cells [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2025, 14(3): 344.
- [18] HENEKA M T, MORGAN D, JESSEN F. Passive anti-amyloid β immunotherapy in Alzheimer's disease-opportunities and challenges [J]. *Lancet*, 2024, 404(10468): 2198-2208.
- [19] KIM B H, KIM S, NAM Y, et al. Second-generation anti-amyloid monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: current landscape and future perspectives [J]. *Transl Neurodegener*, 2025, 14(1): 6.
- [20] MILÀ-ALOMÀ M, SALVADÓ G, GISPERT J D, et al. Amyloid beta, tau, synaptic, neurodegeneration, and glial biomarkers in the preclinical stage of the Alzheimer's continuum [J]. *Alzheimers Dement*, 2020, 16(10): 1358-1371.
- [21] ZENG Z, XU J, ZHENG W. Artemisinin protects PC12 cells against β -amyloid-induced apoptosis through activation of the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 625-633.
- [22] ZHANG Y, CHEN H, LI R, et al. Amyloid β -based therapy for Alzheimer's disease: challenges, successes and future [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 248.
- [23] MOUSSA-PACHA N M, ABDIN S M, OMAR H A, et al. BACE1 inhibitors: Current status and future directions in treating Alzheimer's disease [J]. *Med Res Rev*, 2020, 40(1): 339-384.
- [24] GUO X, WANG Y, ZHOU J, et al. Molecular basis for isoform-selective inhibition of presenilin-1 by MRK-560 [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6299.
- [25] ROEMER-CASSIANO S N, WAGNER F, EVANGELISTA L, et al. Amyloid-associated hyperconnectivity drives tau spread across connected brain regions in Alzheimer's disease [J]. *Sci Transl Med*, 2025, 17(782): eadp2564.
- [26] MAITRA S, VINCENT B. Cdk5-p25 as a key element linking amyloid and tau pathologies in Alzheimer's disease: Mechanisms and possible therapeutic interventions [J]. *Life Sci*, 2022, 308: 120986.
- [27] ZHANG F, GANNON M, CHEN Y, et al. β -amyloid redirects norepinephrine signaling to activate the pathogenic GSK3 β /tau cascade [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(526): eaay6931.
- [28] SHEN L L, LI W W, XU Y L, et al. Neurotrophin receptor p75 mediates amyloid β -induced tau pathology [J]. *Neurobiol Dis*, 2019, 132: 104567.
- [29] LEE E, LEE Y, YANG S, et al. Akt-activated GSK3 β inhibitory peptide effectively blocks tau hyperphosphorylation [J]. *Arch Pharm Res*, 2024, 47(10-11): 812-828.
- [30] VAN DER KANT R, GOLDSTEIN L S B, OSSENKOPPELE R. Amyloid- β -independent regulators of tau pathology in Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(1): 21-35.
- [31] ZHANG H, WEI W, ZHAO M, et al. Interaction between A β and Tau in the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(9): 2181-2192.
- [32] YEAP Y J, KANDIAH N, NIZETIC D, et al. BACE2: A promising neuroprotective candidate for Alzheimer's Disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2023, 94(s1): S159-S171.
- [33] WANG Z, XU Q, CAI F, et al. BACE2, a conditional β -secretase, contributes to Alzheimer's disease pathogenesis [J]. *JCI Insight*, 2019, 4(1): e123431.
- [34] LUO J, ZOU H, GUO Y, et al. BACE2 variant identified from HSCR patient causes AD-like phenotypes in hPSC-derived brain organoids [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 47.

编辑:季春来

收稿日期:2025-04-09