基于斑马鱼模型研究天麻提取物抗帕金森病的活性及作用机制

赵文珺[1]，史雨鑫[1]，王荣春[1]，靳　梦[1, 2*]

1. 齐鲁工业大学（山东省科学院）生物研究所，山东 济南　250103
2. 山东第一医科大学（山东省医学科学院）脑科学与类脑研究院，山东 济南　250117

摘　要：目的　探究天麻提取物抗帕金森病（Parkinson’s disease，PD）的活性及作用机制。**方法**　基于 1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）诱导的斑马鱼 PD 模型，以抗 PD 活性为筛选指标，对天麻提取物开展活性导向分离，借助网络药理学与 qRT-PCR 明确其最优活性部位及潜在机制。**结果**　天麻总水提物具有显著的抗 PD 活性，可改善 PD 样行为（P＜0.001），保护多巴胺能神经元与脑部血管（P＜0.05、0.01、0.001），并减少神经细胞凋亡（P＜0.05、0.01、0.001）。网络药理学发现其作用机制与磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路密切相关。经大孔树脂分离纯化获得天麻总水提物不同洗脱部位，结合抗 PD 活性指标筛选，确定水部位、30%乙醇部位和 95%乙醇部位为最优活性部位。超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用技术（ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry，UPLC-Q-TOF/MS）鉴定出最优活性部位中巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、天麻素、蓖麻油酸、克罗酰胺 7 种关键活性单体，结合斑马鱼行为指标分析，推断天麻素和蓖麻油酸为抗 PD 活性最佳单体。**结论**　天麻提取物通过调节自噬、氧化应激和 PD 相关基因表达来发挥抗 PD 的作用。

关键词：天麻；帕金森病；斑马鱼；神经保护；自噬；氧化应激；巴利森苷 A；巴利森苷 B；巴利森苷 C；巴利森苷 E；天麻素；蓖麻油酸；克罗酰胺

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2026)21 - 8562 - 13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.21.015

Anti-Parkinson’s disease activity and mechanism of *Gastrodia elata* extract based on zebrafish model

ZHAO Wenjun[1], SHI Yuxin[1], WANG Rongchun[1], JIN Meng[1, 2]

1. Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Biology Institute, Jinan 250103, China
2. Brain Science and Brain-like Technology Institute of Shandong First Medical University (Shandong Academy of Medical Sciences), Jinan 250117, China

Abstract: Objective　To explore the anti-Parkinson’s disease (PD) activity, optimal active parts, key components and molecular mechanism of *Gastrodia elata* extract. **Methods**　Based on the zebrafish PD model induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), an induced zebrafish PD model was used, with anti-PD activity as the screening criterion, to perform activity-guided fractionation of *G. elata* extract. Network pharmacology and qRT-PCR were employed to identify its most active fraction and elucidate the underlying mechanisms. **Results**　The total aqueous extract of *G. elata* had significant anti-PD activity, which could improve PD-like behaviors (P < 0.001), protect dopaminergic neurons and cerebral blood vessels (P < 0.05, 0.01, 0.001), and reduce neuronal apoptosis (P < 0.05, 0.01, 0.001). Network pharmacology revealed that its mechanism was closely related to the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. Different elution fractions of the total aqueous extract of *G. elata* were obtained through macroporous resin separation and purification. Based on the screening of anti-PD activity indicators, the water fraction, 30% ethanol fraction and 95% ethanol fraction were determined as the optimal active fractions. Ultra-performance

收稿日期：2026-03-22

基金项目：国家重点研发计划项目（2026YFE0201900）；国家自然基金面上基金项目（82574783）；泰山学者青年专家项目（tsqn202312233）；山东第一医科大学（山东省医学科学院）临床-基础联合创新团队项目（202404）

作者简介：赵文珺，硕士研究生，主要从事中药药效物质基础研究。E-mail: zhaowenjun0103@163.com

***通信作者：**靳　梦，教授，博士生导师，主要从事神经精神药理研究。E-mail: mjin1985@hotmail.com

liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS) identified seven key active monomers, namely parishin A, parishin B, parishin C, parishin E, gastrodin, ricinoleic acid and crocinamide, in the optimal active fractions. Combined with the analysis of zebrafish behavioral indicators, it was inferred that gastrodin and ricinoleic acid were the best single monomer for anti-PD activity. **Conclusion** *G. elata* extract exerts its anti-PD effects by modulating the expressions of autophagy, oxidative stress and PD-related genes.

Key words: *Gastrodia elata* Bl.; Parkinson's disease; zebrafish; neuroprotection; autophagy; oxidative stress; parishin A; parishin B; parishin C; parishin E; gastrodin; ricinoleic acid; croamide

帕金森病（Parkinson's disease，PD）是全球第二大神经退行性疾病，病理特征主要表现为黑质多巴胺神经元变性死亡[1-2]、路易小体大量形成[3]，临床症状包括震颤[4]、肌强直[5-7]、运动迟缓[5]等运动症状及认知障碍[4,8-10]、睡眠障碍[9]等非运动症状。随着人口老龄化加剧，我国 PD 患者数量持续增长，预计 2030 年全球半数 PD 患者将集中在中国[11]，给社会和家庭带来沉重负担。目前 PD 病因尚未完全阐明，可能与遗传、环境、氧化应激、神经炎症等多种因素相关[12-16]。临床治疗以多巴胺替代疗法、多巴胺受体激动剂等为主，但长期使用易出现开关反应、耐药性等不良反应，尚无根治手段。因此，从天然产物中筛选安全有效的抗 PD 活性成分成为研究热点。

天麻 *Gastrodiae Rhizoma* 为我国传统名贵中药，具有息风止痉、平抑肝阳、祛风通络等功效[17-18]，含有 200 余种化学成分[19-20]，展现出抗氧化、抗炎、抗凋亡及神经保护等多种活性[21]，对 PD 具有潜在防治作用[22]，但其抗 PD 的药效物质基础与分子机制尚不明确，制约了天麻的深度开发与临床转化。斑马鱼作为模式生物，具有饲养成本低、繁殖速度快、胚胎透明、与人类基因组同源性高等优势。其中枢神经系统与哺乳动物具有同源性，1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶（1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine，MPTP）诱导的斑马鱼 PD 模型可呈现多巴胺神经元损伤、脑部血管异常、运动功能障碍等与人类 PD 相似的病理特征和行为表现[23]，已被广泛应用于 PD 药物筛选和机制研究[10,24]。本研究以斑马鱼作为模型动物，结合网络药理学、超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱联用（ultra-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry，UPLC-Q-TOF/MS）、qRT-PCR 等技术，系统开展天麻抗 PD 活性研究，揭示了天麻多成分、多靶点、多通路的整体调节效应，为基于天麻开发安全高效的抗 PD 候选药物提供依据。

1 材料

1.1 动物

本研究所用斑马鱼品系有 AB 型斑马鱼、*fli1:GFP* 转基因斑马鱼、*Vmat2:GFP* 转基因斑马鱼，饲养于山东省科学院生物研究所平台斑马鱼养殖系统中，成年的雌性、雄性斑马鱼被分开培养在不同培养箱中，水温稳定在 28 ℃，每天循环光照 14 h、黑暗 10 h，定时喂养新孵化的丰年虾。收集幼鱼胚胎时，雌性与雄性以 1∶1 比例分别放在产卵缸两侧，次日 8:30 时撤去隔板，并在产卵后及时收集鱼卵。

1.2 药材

天麻（批号 20221022）购自河北大中药业有限公司，经山东省科学院生物研究所张姗姗副研究员鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl.的干燥块茎。

1.3 药品与试剂

MPTP（批号 155639）、乙腈（批号 I1133829105）、雷沙吉兰（批号 179618）、天麻素（批号 HY-N0115，质量分数为 99.94%）、巴利森苷 A（批号 HY-N2031，质量分数为 98.92%）、巴利森苷 B（批号 HY-N2124，质量分数为 99.92%）、巴利森苷 C（批号 HY-N2125，质量分数为 99.24%）、巴利森苷 E（批号 HY-N2126，质量分数为 98.9%）、蓖麻油酸（批号 HY-N6070A，质量分数为 99.93%）购自美国 MedChemExpress 公司；链霉蛋白酶 E（批号 J1609012）、柠檬酸钠抗原修复液（批号 20211223）、Triton X-100（批号 326Q022）购自北京索莱宝科技有限公司；甲醇（批号 20230308）、亚甲基蓝（批号 20110520）购自中国医药集团有限公司；麻醉（批号 MKCJ6340）、苯硫脲（批号 103-85-5）购自美国 Sigma-Aldrich 公司；甲基纤维素（批号 J1609012）、甲酸（批号 B2307725）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；PBS 漂洗缓冲液（批

号 SADKZ）、组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒（批号 DUKKX）购自山东思科捷生物技术有限公司；反转录试剂盒（批号 520891）、实时荧光定量 PCR 试剂盒（批号 520331）购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司；无水乙醇购自天津市富宇精细化工有限公司；去离子水购自屈臣氏有限公司；4%多聚甲醛（批号 71041800）购自北京兰杰柯科技有限公司；一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（批号 81020200930）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；克罗酰胺（批号 TN4171，质量分数为 95.00%）购自美国 TargetMol Chemicals Inc.公司；蓖麻油酸（批号 111929-202103，用于给药）购自上海诗丹德标准技术服务有限公司。

1.4 仪器

ESEN-AW-S1 型斑马鱼养殖系统（北京爱生科技发展有限公司）；AXIO-V16 型荧光显微镜（德国蔡司公司）；ZebraLab 3.3 型斑马鱼行为分析系统（法国 ViewPoint 公司）；C1000 Touch 型 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；N-1300 型旋转蒸发仪（东京理化器械株式会社）；SCIENTZ-18N 普通型冷冻干燥机（宁波新芝冻干设备股份有限公司）；Triple TOF 4600 型 UPLC-Q-TOF/MS（美国 Sciex 公司）。

2 方法

2.1 天麻提取物及活性部位制备

2.1.1 天麻总水提物（total water extraction，TWE）的制备 将干燥的天麻块茎放入液氮中速冻，砸成小块后放入粉碎机中粉碎，取粉末 200 g，加入 2 L 超纯水，回流提取 2 次，每次 2 h，合并提取液，5 000 r/min 离心 5 min，抽滤（过 0.45 μm 滤膜），浓缩后真空冷冻干燥，得到 TWE 粉末，得率为 14.96%。

2.1.2 活性部位的分离纯化 将 TWE 粉末用纯净水溶解配制成 100 mg/mL 上样液，通过预处理后的 D101 大孔树脂柱，依次用纯净水和 10%、30%、50%、70%、95%乙醇洗脱，体积流量为 0.5 mL/min，收集各洗脱液，浓缩干燥后得到水部位（water fraction，WF）、10%乙醇部位（ethanol fraction，EF）、30% EF、50% EF、70% EF、95% EF 共 6 个活性部位，得率分别为 30.83%、3.12%、2.36%、0.25%、0.03%、0.18%。

2.2 斑马鱼胚胎预处理及分组

2.2.1 斑马鱼胚胎预处理 称取 3～5 mg 链霉蛋白酶 E 溶于纯净水，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的脱膜剂，振荡混匀。挑选发育正常的受精后 1 d（1 d post fertilization，1 dpf）斑马鱼，使用脱模剂脱膜后，移入 24 孔板。每孔放置 10 条鱼，每组设置 3 个复孔，期间每天换药、剔除死卵和记录数据。采用荧光显微镜拍照前，在每毫升养鱼水中加入 30 μL 苯硫脲以抑制黑色素的形成。

2.2.2 提取物活性评价分组 设置对照组、模型组、雷沙吉兰（1 mmol/L）组和 TWE（预实验测定 TWE 对斑马鱼的半数致死浓度为 292.0 μg/mL，故剂量设定为 12.5、25.0、50.0、75.0 μg/mL）组，除对照组外，其余各组加入 50 μmol/L MPTP 处理，同时各给药组加入相应药物干预。

2.2.3 活性部位筛选分组 设置对照组、模型组、雷沙吉兰（1 mmol/L）组、WF（5 μg/mL）组、10% EF（5 μg/mL）组、30% EF（5 μg/mL）组、50% EF（5 μg/mL）组、70% EF（5 μg/mL）组和 95% EF（5 μg/mL）组，除对照组外，其余各组加入 50 μmol/L MPTP 处理，同时各给药组加入相应药物干预。

2.2.4 活性单体筛选分组 设置对照组、模型组、雷沙吉兰（1 mmol/L）组、巴利森苷 A（5 μg/mL）组、巴利森苷 B（5 μg/mL）组、巴利森苷 C（5 μg/mL）组、巴利森苷 E（5 μg/mL）组、天麻素（5 μg/mL）组、蓖麻油酸（5 μg/mL）组和克罗酰胺（5 μg/mL）组，除对照组外，其余各组加入 50 μmol/L MPTP 处理，同时各给药组加入相应药物干预。

2.3 PD 相关指标检测

2.3.1 PD 样行为检测 AB 品系斑马鱼给予药物处理至 6 dpf，将斑马鱼转移至 48 孔板，用 ZebraLab 3.3 行为分析系统记录 20 min，分析运动总距离、平均运动速度等指标。

2.3.2 多巴胺神经元检测 *Vmat2*:*GFP* 转基因斑马鱼给予药物处理至 4 dpf，使用荧光显微镜观察并采集多巴胺神经元荧光图像，用 Image J 软件定量分析多巴胺神经元长度。

2.3.3 脑部血管检测 *fli1*:*GFP* 转基因斑马鱼给予药物处理至 4 dpf，使用荧光显微镜观察并拍摄脑部血管，统计血管数量。

2.3.4 脑部细胞凋亡检测 AB 品系斑马鱼给予药物处理至 6 dpf，采用 TUNEL 染色法[25-26]，按照试剂盒说明书操作，使用荧光显微镜观察并统计脑部凋亡细胞数量。

2.4 基于网络药理学的天麻抗 PD 作用机制研究

斑马鱼作为经典脊椎动物模式生物，与人基因同源性高达 70%，其中 PD 等人类疾病关键致病基

因的同源相似度可达 84%[27-28]。采用人源靶点数据库进行靶点初筛，通过基因同源映射获得斑马鱼对应靶点[29-33]，已成为目前网络药理学结合斑马鱼动物模型，探究天然药物干预神经退行性疾病作用机制普遍采用且被广泛认可的研究策略。基于网络药理学方法，利用 SwissTargetPrediction（http://www.swisstargetprediction.ch）和 DrugBank（https://go.drugbank.com）预测天麻活性成分靶点；从 GeneCards（https://www.genecards.org）、DisGeNET（https://www.disgenet.org）、DrugBank（https://go.drugbank.com）、CTD（https://ctdbase.org）、OMIM（https://omim.org）数据库获取 PD 相关靶点；通过 Venn 分析获得二者交集基因。随后使用 STRING（https://string-db.org）构建蛋白互作网络，并在 Cytoscape 3.9.1 中进行可视化与拓扑分析；结合 Metascape 软件进行功能富集，以预测天麻的潜在抗 PD 机制。

2.5 抗 PD 活性综合评价与加权分析

为综合评价不同活性部位的抗 PD 效果，减少单一指标评价的片面性，采用加权平均值法进行指标整合分析。由于 PD 样行为学改变是反映整体运动功能的最直观表型，对模型评价具有核心意义，因此赋予其 40%权重。脑部血管完整性与多巴胺能神经元存活情况分别反映脑部血管稳态与病理损伤，二者均为 PD 病理机制的关键环节，故各赋予 30%权重。通过加权计算得到综合评分，从而客观、全面地筛选出整体改善作用最优的活性部位。

2.6 qRT-PCR 检测相关基因表达

AB 品系斑马鱼给予药物处理至 6 dpf，每组收集 30～40 尾斑马鱼，按照组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书提取斑马鱼 RNA，使用反转录试剂盒合成 cDNA，按照实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 分析，引物序列见表 1。以核糖体蛋白 L13a（ribosomal protein L13A，*rpl13a*）为内参基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 α-突触核蛋白（alpha-synuclein，*α-syn*）、酪氨酸羟化酶（tyrosine hydroxylase，*Th*）、自噬相关蛋白 5（autophagy related 5，*ATG5*）、选择性自噬接头蛋白 p62（sequestosome 1，*p62*）、微管相关蛋白 1 轻链 3β（microtubule associated protein 1 light chain 3 beta，*LC3B*）、泛素羧基末端水解酶 L1（ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1，*UCHL1*）、过氧化氢酶（catalase，*CAT*）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，*SOD*）的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	上游引物序列 (5'-3')	下游引物序列 (3'-5')
rpl13a	TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC	AGACGCACAATCTTGAGAGCAG
α-syn	ATGGATGTTTTTATGAAGGGGC	ACGCTGTCTTTGGTCTTGCT
TH	TCCACCATCTTGAAACCAGACCCA	TCAAAGAGCTGACCAGCGTGCTAA
ATG5	AGGGGATAACAGCACAAACG	CTTCTTATGCAGCGTGTCCA
LC3B	CCTCCAACTCAACTCCAACC	GCCGTCTTCGTCTCTTTCC
UCHL1	CTTCCCTTTAACGCAACAGC	CCCACAGTTCCACAGGAGTT
p62	TTTGGCTCTTGTGAAGGATGAC	GAGGGCTAAAGTGAGGTGTAGTGA
SOD	GTCGTCTGGCTTGTGGAGTG	TGTCAGCGGGCTAGTGCTT
CAT	AGGGCAACTGGGATCTTACA	GATCCTTCAGGTGAGTCTGC

2.7 基于 UPLC-Q-TOF/MS 的天麻成分鉴定

2.7.1 供试品溶液的制备 取 TWE、WF、30% EF、95% EF 样品，甲醇溶解后 12 000 r/min 离心 5 min，取上清作为供试品溶液。

2.7.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱（150 mm×2.1 mm，1.8 μm），流动相为乙腈（A）-0.1%甲酸水溶液（B），梯度洗脱：0～3 min，5% A；3～8 min，5%～12% A；8～20 min，12%～16% A；20～30 min，16%～42% A；30～35 min，42%～50% A；35～40 min，50%～90% A；40～43 min，90% A；43～43.1 min，90%～5% A；43.1～46 min，5% A。体积流量 0.3 mL/min；进样量 2 μL；柱温 30 ℃；检测波长 270 nm。

2.7.3 质谱条件 电喷雾离子化离子源（electrospray ionization source，ESI），正、负离子模式下检测，扫描质量范围 *m/z* 50～1 700；碰撞电压±40 eV；正离子模式下离子化电压 5 000 V，负离子模式下离子化电压−4 500 V，离子源温度 500 ℃；气帘气压力 35 psi（1 psi＝6.895 kPa），雾化气压力 50 psi，辅助加热气压力 50 psi；去簇电压 100 V，

碰撞电压±40 eV，碰撞电压摆幅 20 eV；离子释放延迟 30 ms，离子束宽度 15 ms。

2.7.4 数据处理　使用 Analyst TF 1.7.1 数据采集软件，并利用 Peakview 1.2 软件处理 UPLC-Q-TOF/MS 生成的数据。通过与 Natural Products HR-MS/MS Spectral Library 1.0 数据库比对，结合一级、二级质谱信息鉴定化学成分。

2.8　统计学分析

采用 GraphPad Prism7.0 软件进行统计分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，通过单因素方差分析（One Way ANOVA）进行各组组间显著性差异分析，组间两两比较采用 Tukey 事后多重比较检验。

3　结果

3.1　TWE 改善斑马鱼 PD 样行为

为了探究 TWE 是否对斑马鱼 PD 样行为有改善作用，选用 AB 型斑马鱼作为实验模型。如图 1 所示，与对照组比较，MPTP 处理后的斑马鱼运动轨迹和运动总距离明显减少（P＜0.01），运动平均速度变慢；经过不同质量浓度的 TWE 处理后，斑马鱼的运动能力得到恢复，运动轨迹和运动总距离明显增加（P＜0.001），运动平均速度提高，表明 TWE 能改善 MPTP 诱导的斑马鱼 PD 样行为，恢复斑马鱼的运动能力，对斑马鱼有一定的神经保护作用。结果显示，TWE 在 50～100 μg/mL 表现出良好药物活性，150 μg/mL 活性呈下降趋势。故后续机制实验选取 12.5、25.0、50.0、75.0 μg/mL 的浓度梯度，于安全有效范围内考察药物的剂量效应关系。

3.2　TWE 保护斑马鱼多巴胺神经元

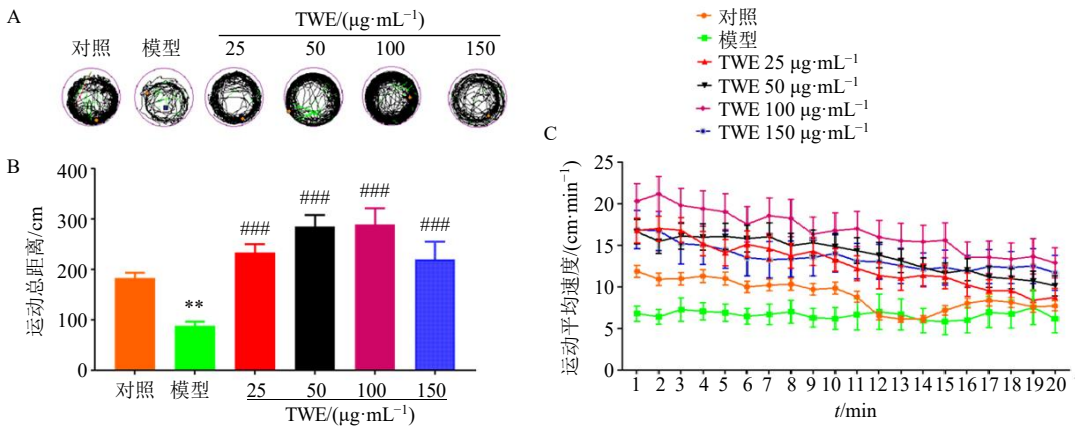
多巴胺神经元变性死亡是 PD 的主要病理特征之一，具体表现为多巴胺神经元变短，选用转基因品系 *Vmat2*:*GFP* 斑马鱼为实验模型。如图 2 所示，与对照组比较，模型组斑马鱼多巴胺神经元长度显著缩短（P＜0.001）；与模型组比较，12.5～75.0 μg/mL TWE 处理后斑马鱼多巴胺神经元长度明显变长（P＜0.05、0.01），表明 TWE 对 MPTP 处理的斑马鱼多巴胺神经元具有保护作用。

3.3　TWE 保护斑马鱼脑部血管

为了探究 TWE 是否对脑部血管系统有保护作用，选用转基因品系 *fli1*:*GFP* 作为实验模型。如图 3 所示，对照组斑马鱼的脑部血管根根分明，荧光明显；与对照组比较，模型组斑马鱼的脑部血管数目减少（P＜0.001）；与模型组比较，雷沙吉兰和 25.0～75.0 μg/mL TWE 处理后斑马鱼的脑部血管数目明显增加（P＜0.01、0.001），表明 TWE 可以改善由 MPTP 造成的损伤，对脑部血管具有保护作用。

3.4　TWE 减少斑马鱼脑部细胞凋亡

为探究 TWE 对 PD 模型中坏死性凋亡的影响，利用 TUNEL 染色来检测斑马鱼脑部细胞凋亡水平。如图 4 所示，与对照组比较，模型组斑马鱼脑部细胞凋亡显著增加（P＜0.001）；与模型组比较，雷沙吉兰和 25.0～75.0 μg/mL TWE 处理后斑马鱼脑部细胞凋亡明显减少（P＜0.01、0.001）。



A-斑马鱼行为轨迹图，红色线条代表快速运动，绿色线条代表中速运动，黑色线条代表慢速运动；B-斑马鱼 20 min 内运动总距离；C-斑马鱼在 20 min 内运动平均速度；与对照组比较：$^{*}P$＜0.05　$^{**}P$＜0.01　$^{***}P$＜0.001；与模型组比较：$^{\#}P$＜0.05　$^{\#\#}P$＜0.01　$^{\#\#\#}P$＜0.001，下图同。

A-behavior trajectory diagram of zebrafish, red lines represent rapid movement, green lines represent medium-speed movement, and black lines represent slow movement; B-total distance traveled by zebrafish within 20 min; C-average speed of zebrafish movement within 20 min; $^{*}P < 0.05$　$^{**}P < 0.01$　$^{***}P < 0.001$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$　$^{\#\#}P < 0.01$　$^{\#\#\#}P < 0.001$ *vs* model group, same as below figures.

图 1　TWE 改善斑马鱼 PD 样行为（$\bar{x} \pm s$，n = 24）

Fig. 1　TWE improved PD-like behavior of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, n = 24)

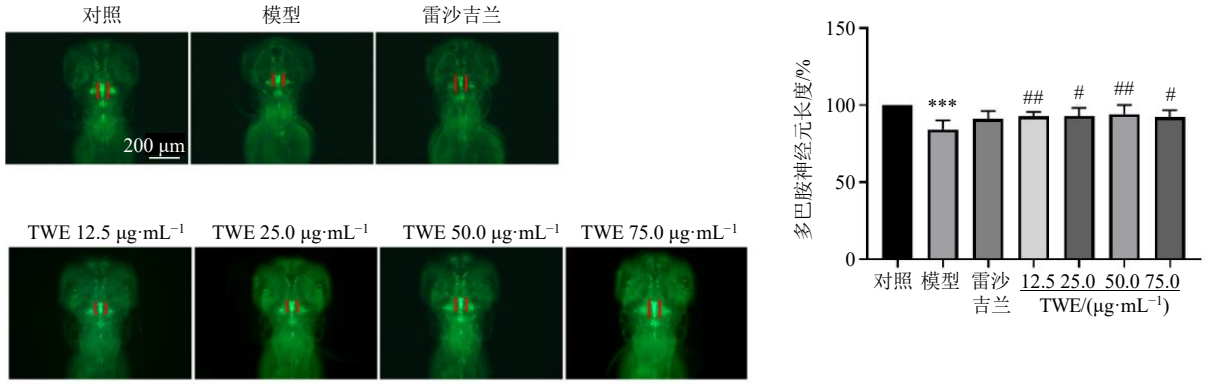
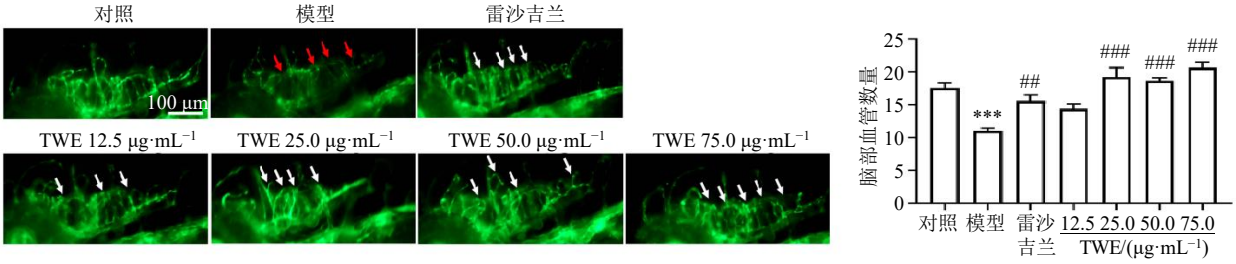


图 2　TWE 保护斑马鱼多巴胺神经元（×10；$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Fig. 2　TWE protected dopaminergic neurons of zebrafish (× 10; $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

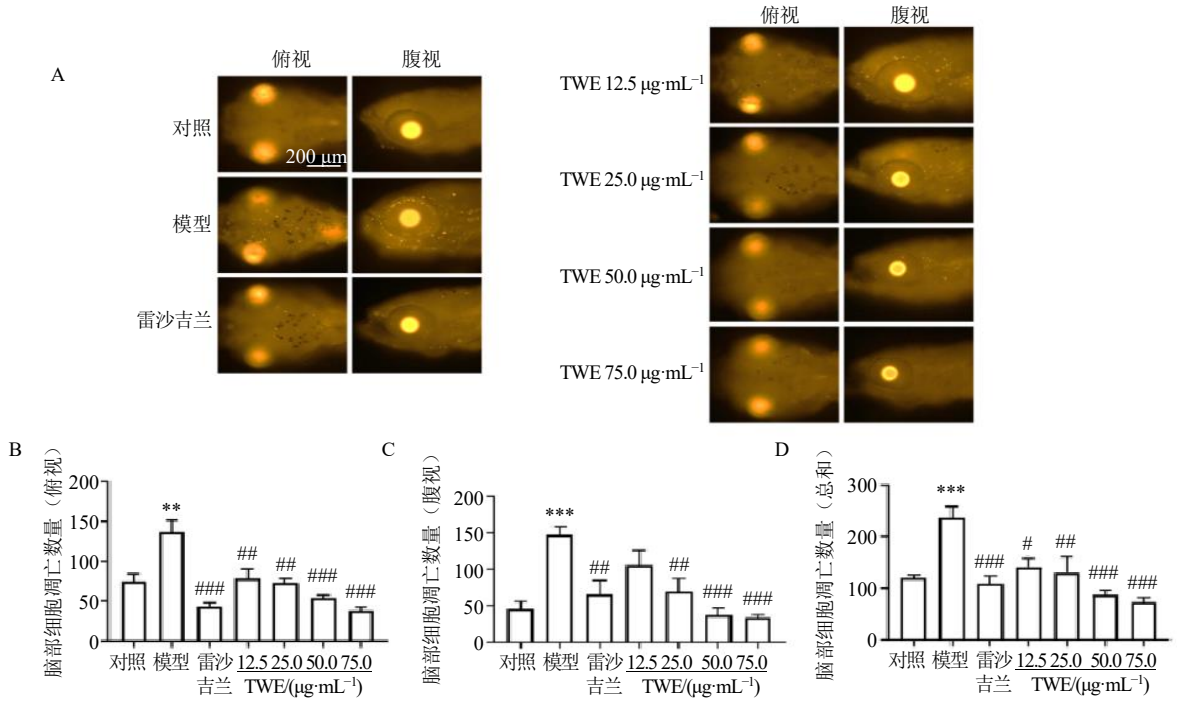


红色箭头表示脑部血管缺失，白色箭头表示脑部血管完整。

Red arrow indicates the loss of brain blood vessels, white arrow indicates that brain blood vessels are not damaged.

图 3　TWE 保护斑马鱼脑部血管（×10；$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Fig. 3　TWE protected brain blood vessels of zebrafish (× 10; $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)



A-斑马鱼幼鱼脑部俯视图和腹视图（×10）；B～D-俯视、腹视、总和斑马鱼脑部凋亡细胞数量统计。

A-lateral view and ventral view of brain of zebrafish larvae (× 10); B—D-lateral, ventral, total statistical data of apoptotic cells in zebrafish brain.

图 4　TWE 减少斑马鱼脑部细胞凋亡（$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

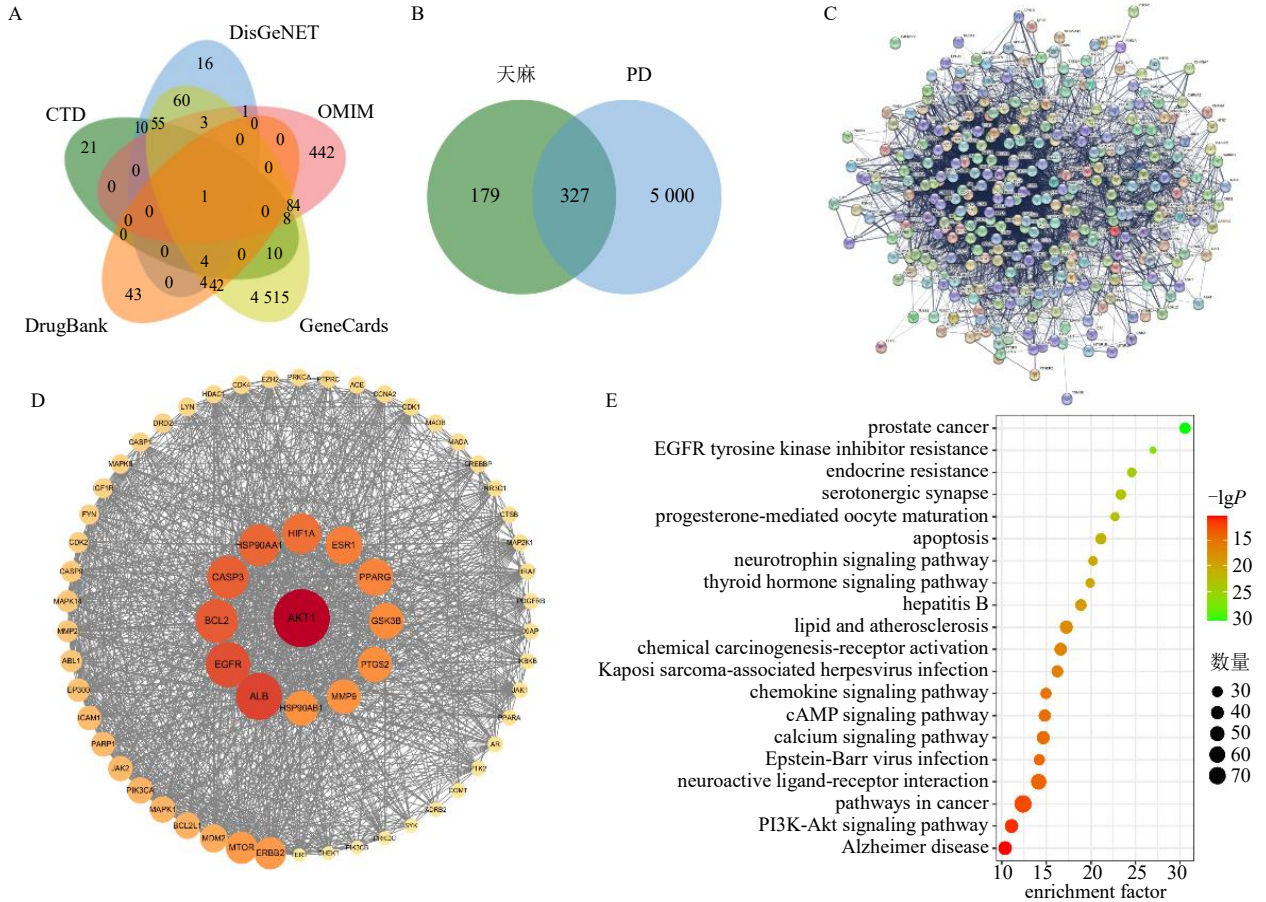
Fig. 4　TWE reduced apoptosis of zebrafish brain cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.5　天麻抗 PD 的网络药理学分析

以“Parkinson's disease”为关键词在 GeneCards、DisGeNET、DrugBank、CTD、OMIM 数据库中进行检索，最终检索到的与 PD 相关的靶点个数分别为 4 794、162、94、128、547 个（图 5-A）。取数据库查询到的相关疾病靶点交集，去除重复后，最终获得 5 327 个靶点。通过 SwissTargetPrediction 和 DrugBank 数据库检索到天麻活性成分靶点 506 个。将天麻 506 个作用靶点和 PD 的 5 327 个作用靶点导入 Venn 在线平台，最终得到天麻与 PD 的共有靶点 327 个（图 5-B）。

将 327 个交集靶点导入 STRING 数据库中，物种设为人源，最小相互作用阈值调整为 0.4，构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络（图 5-C），其中球形代表蛋白靶点，球形与球形之间的连线代表蛋白质与蛋白质关联。该网络具有 326 个节点，存在 1 个游离的节点，4 990 条边，节点平均自由度为 30.6，平均局部聚类系数 0.47。说明有 326 个靶点之间相互关联。此外，从 STRING 数据库中导出该 PPI 网络数据为 TSV 格式，将该数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络的可视化和拓扑分析。度值表示某一节点与其他节点相互作用的个数，其数值越大，代表该节点在生物学进程的作用就越重要。度值最大为 166，最小为 1，中位数为 46，故设定度值≥二倍中位数（80）的靶点为核心靶点（图 5-D）。

京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析结果（图 5-E）显示，与 PD 相关的信号通路主要有癌症途径、细胞凋亡、神经活性配体-受体相互作用、阿尔茨海默病、神经营养因子信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路和甲状腺激素信号通路。PI3K/Akt 通路可调控多



A-各数据库 PD 靶点 Venn 图；B-天麻和 PD 靶点 Venn 图；C-交集靶点 PPI 网络；D-天麻抗 PD 的核心靶点网络；E-天麻抗 PD 的 KEGG 气泡图。

A-Venn diagram of PD targets in each database; B-Venn diagram of *G. elata* and PD targets; C-PPI network of intersection targets; D-core target network of *G. elata* against PD; E-KEGG bubble chart of *G. elata* against PD.

图 5　天麻抗 PD 作用机制的网络药理学分析

Fig. 5　Network pharmacology analysis of anti-PD mechanism of *G. elata*

巴胺能神经元功能并影响 *TH* 表达；该通路经下游信号调控自噬核心蛋白 *ATG5* 与选择性自噬接头蛋白 *p62* 的代谢。此外，PI3K/Akt 通路与 *α-syn*、氧化应激相关蛋白 *SOD*、*CAT*，以及自噬相关蛋白 *LC3B*、*UCHL1* 均存在调控关联。表明天麻可能通过作用于 PI3K/Akt 通路来发挥抗 PD 作用。

3.6 TWE 调控 PD、氧化应激和自噬相关基因的异常表达

为进一步揭示天麻对 MPTP 诱导的斑马鱼 PD 样损伤的保护机制，采用 qRT-PCR 检测了 PD、氧化应激和自噬相关基因的表达水平。如图 6 所示，与对照组比较，模型组斑马鱼 PD 相关基因（*α-syn*）及氧化应激相关基因（*SOD*、*CAT*）和自噬相关基因（*LC3B*、*UCHL1*）表达水平显著升高（$P<0.05$、0.01、0.001），PD 相关基因（*TH*）和自噬相关基因（*p62*、*ATG5*）表达水平显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001）；与模型组比较，雷沙吉兰组和 TWE（12.5、50.0、75.0 μg/mL）组 *α-syn* 基因表达水平显著降低（$P<0.05$、0.01、0.001），TWE（25.0、75.0 μg/mL）组 *TH* 基因表达水平显著升高（$P<0.01$），各给药组 *SOD* 基因表达水平显著降低（$P<0.05$），雷沙吉兰组和 TWE（25.0、50.0 μg/mL）组 *CAT* 基因表达水平显著降低（$P<0.01$、0.001），TWE（50.0、75.0 μg/mL）组 *p62* 基因表达水平显著升高（$P<0.001$），TWE（12.5、25.0、75.0 μg/mL）组 *ATG5* 基因表达水平显著升高（$P<0.05$、0.01、0.001），雷沙吉兰组和 TWE（25.0、50.0 μg/mL）组 *LC3B* 基因表达水平显著降低（$P<0.01$、0.001），TWE（12.5、25.0、50.0 μg/mL）组 *UCHL1* 基因表达水平显著降低（$P<0.05$、0.001）。表明 TWE 可通过调节 PD、氧化应激和自噬相关基因的表达，从而改善斑马鱼的 PD 样状态。

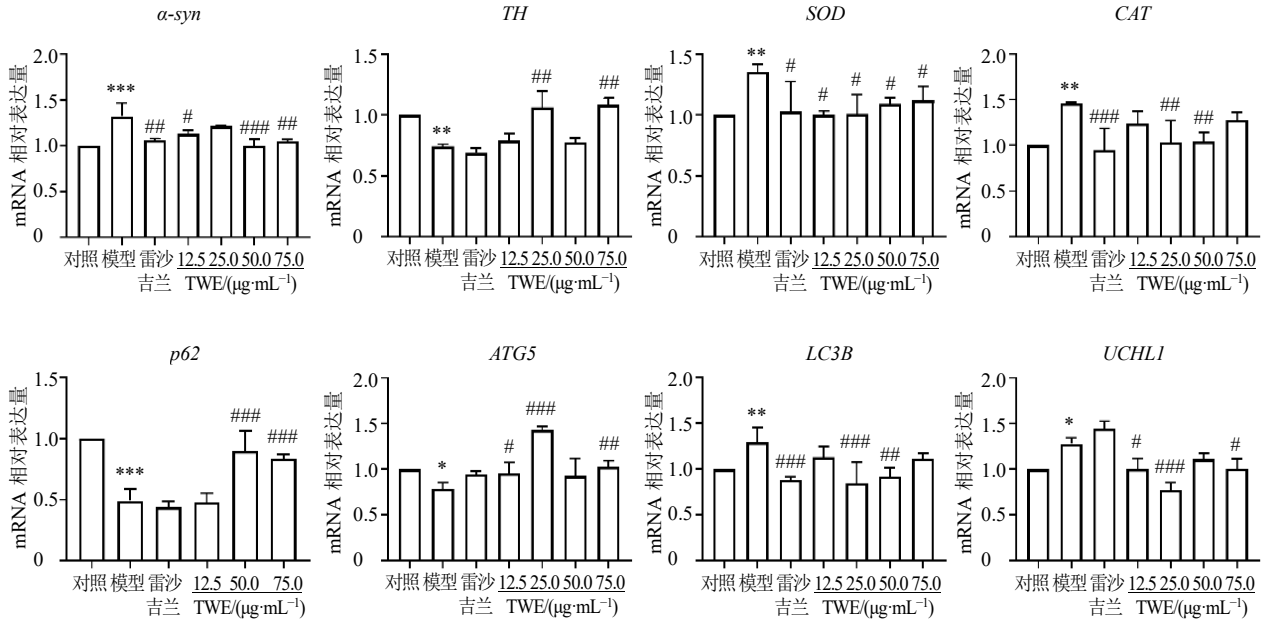


图 6 TWE 调控 PD、氧化应激和自噬相关基因的异常表达（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

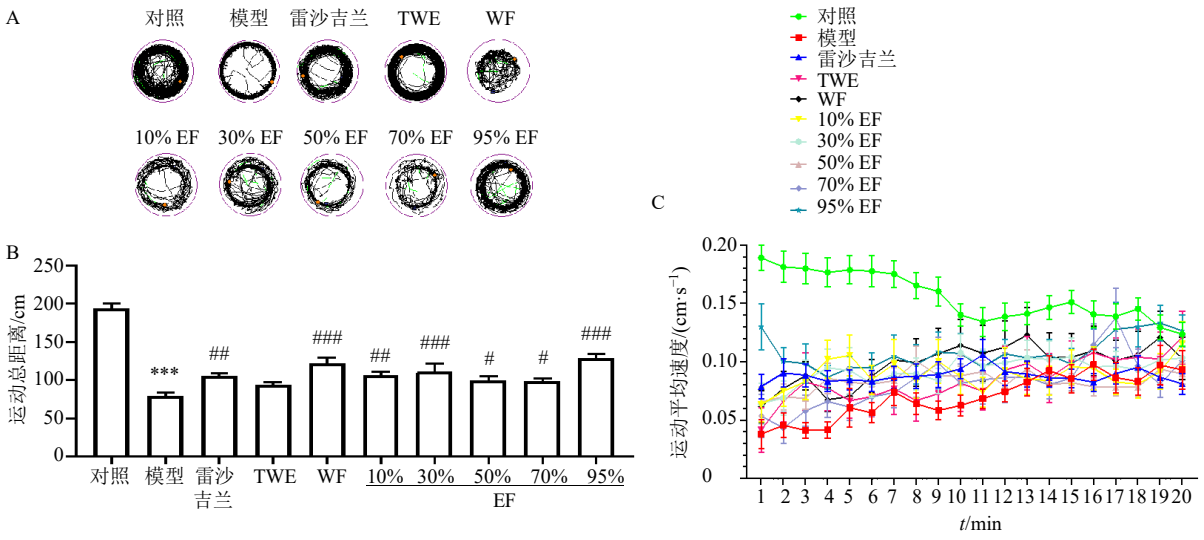
Fig. 6 TWE regulated aberrant expressions of PD, oxidative stress and autophagy-related genes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.7 天麻活性部位对斑马鱼 PD 相关指标的影响

如图 7～9 所示，与模型组比较，天麻 WF、10% EF、30% EF、50% EF、70% EF 和 95% EF 均可显著改善斑马鱼 PD 样行为（$P<0.05$、0.01、0.001），WF、30% EF 和 95% EF 可显著增加斑马鱼多巴胺神经元长度（$P<0.05$、0.01、0.001），WF、10% EF、30% EF、50% EF、70% EF 和 95% EF 均可显著增加斑马鱼脑部血管数量（$P<0.01$、0.001）。采用加权评分法综合评价，结果见表 2，WF、30% EF、95% EF 加权平均值均高于阳性药雷沙吉兰，确定为最优活性部位。

3.8 最优活性部位改善 PD 和自噬相关基因的异常表达

如图 10 所示，与模型组比较，WF 组、30% EF 组和 95% EF 组 *α-syn*、*UCHL1* 基因表达水平显著降低（$P<0.05$、0.01），*ATG5*、*p62* 基因表达水平显著升高（$P<0.001$）；30% EF 组和 95% EF 组 *TH* 基因表达水平显著升高（$P<0.05$、0.001）。



A-斑马鱼行为轨迹图，红色线条代表快速运动，绿色线条代表中速运动，黑色线条代表慢速运动；B-斑马鱼 20 min 内运动总距离；C-斑马鱼在 20 min 内运动平均速度，图 12 同。

A-behavior trajectory diagram of zebrafish, red lines represent rapid movement, green lines represent medium-speed movement, and black lines represent slow movement; B-total distance traveled by zebrafish within 20 min; C-average speed of zebrafish movement within 20 min, same as fig. 12.

图 7　天麻活性部位改善斑马鱼 PD 样行为（$\bar{x} \pm s$，$n = 24$）

Fig. 7　Active fractions of *G. elata* improved PD-like behavior of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

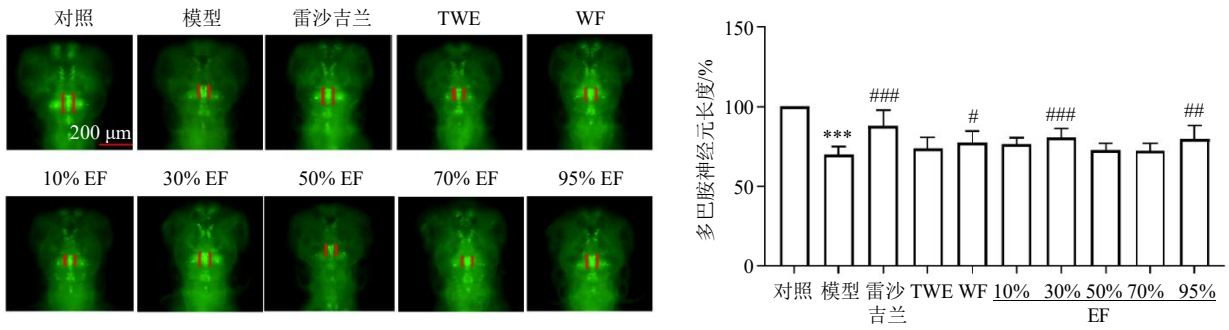
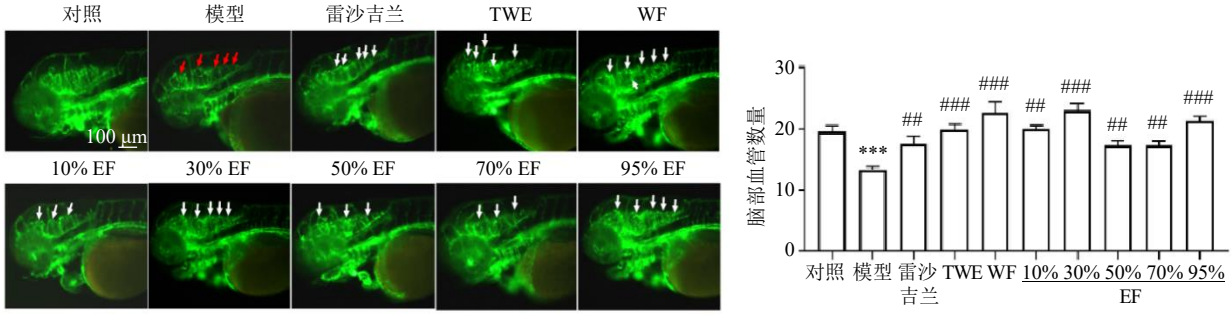


图 8　天麻活性部位保护斑马鱼多巴胺神经元（×10；$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Fig. 8　Active fractions of *G. elata* protected dopaminergic neurons of zebrafish (× 10; $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)



红色箭头表示脑部血管缺失，白色箭头表示脑部血管完整。

Red arrow indicates the loss of brain blood vessels, white arrow indicates that brain blood vessels are not damaged.

图 9　天麻活性部位保护斑马鱼脑部血管（×10；$\bar{x} \pm s$，$n = 12$）

Fig. 9　Active fractions of *G. elata* protected brain blood vessels of zebrafish (× 10; $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

表 2 天麻活性部位抗 PD 指标综合比较

Table 2 Comprehensive comparison of anti-PD indicators in active fractions of *G. elata*

组别	评分			加权平均值
	PD样行为改善作用（权重 40%）	多巴胺神经元保护作用（权重 30%）	脑部血管保护作用（权重 30%）	
雷沙吉兰	2	3	2	2.3
TWE	0	0	2	0.6
WF	3	1	3	2.4
10% EF	2	0	3	1.7
30% EF	3	3	2	2.7
50% EF	1	0	3	1.3
70% EF	1	0	2	1.0
95% EF	3	2	3	2.7

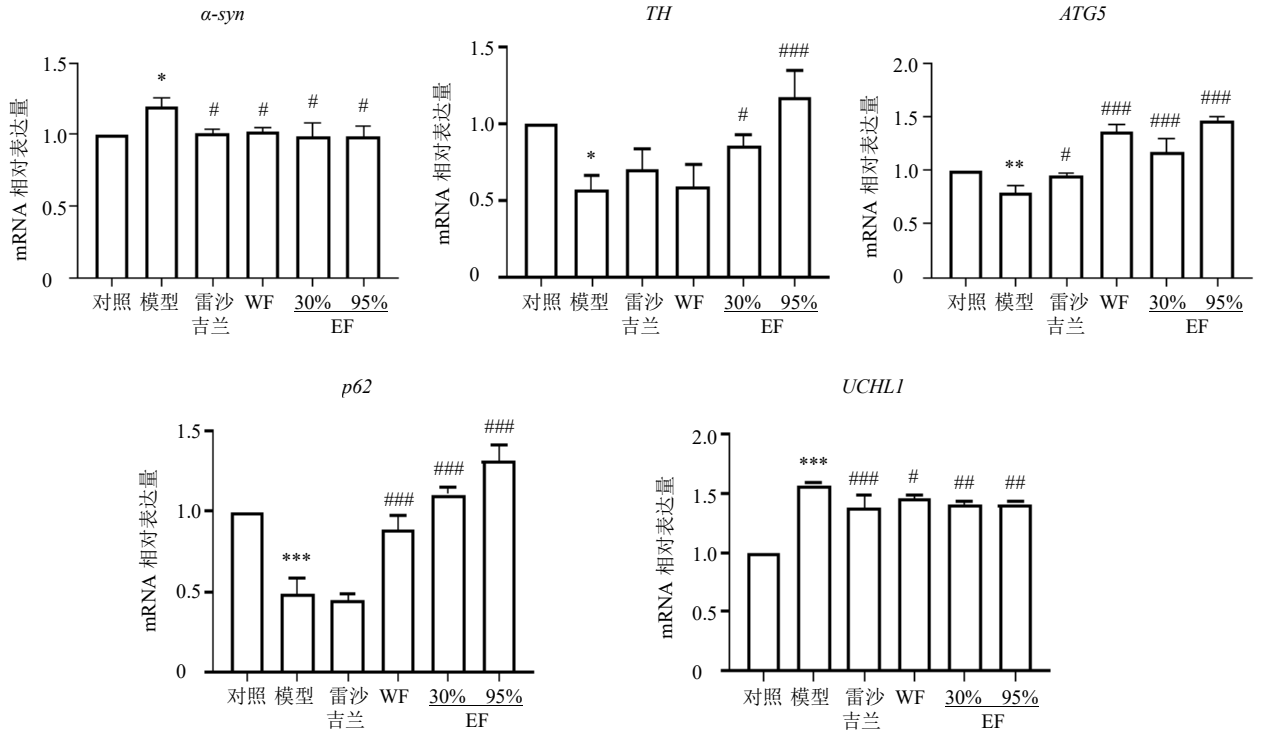


图 10 天麻最优活性部位改善 PD 和自噬相关基因的异常表达（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 10 Optimal active fraction of *G. elata* improved abnormal expressions of PD and autophagy-related genes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.9 最优活性部位的成分鉴定

为进一步明确最优活性部位中的化学成分，采用 UPLC-Q-TOF/MS 对 TWE、WF、30% EF 和 95% EF 进行分析。如图 11 所示，TWE 共鉴定出 40 种化学成分，主要为巴利森苷 E、巴利森苷 B、巴利森苷 C、天麻素等；WF 含 21 种化学成分，主要成分为巴利森苷 E、天麻素、巴利森苷 G 等；30% EF 含 58 种化学成分，主要为巴利森苷 B、巴利森苷 E、巴利森苷 G 等；95% EF 含 21 种化学成分，主要为蓖麻油酸、克罗酰胺、环六亮氨酸等。与 TWE 相比，WF、30% EF、95% EF 中巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、天麻素、蓖麻油酸、克罗酰胺的相对含量显著升高，推测这些成分为天麻抗 PD 的关键活性成分。

3.10 天麻单体成分改善斑马鱼 PD 样行为

为明确天麻中抗 PD 的关键活性单体，考察巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、天麻素、蓖麻油酸及克罗酰胺对斑马鱼 PD 样行为的影响。如图 12 所示，与模型组比较巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、天麻素、蓖麻油酸及克罗酰胺均可显著改善 PD 样行为（$P<0.05$、0.01、0.001），其中蓖麻油酸和天麻素效果最佳。

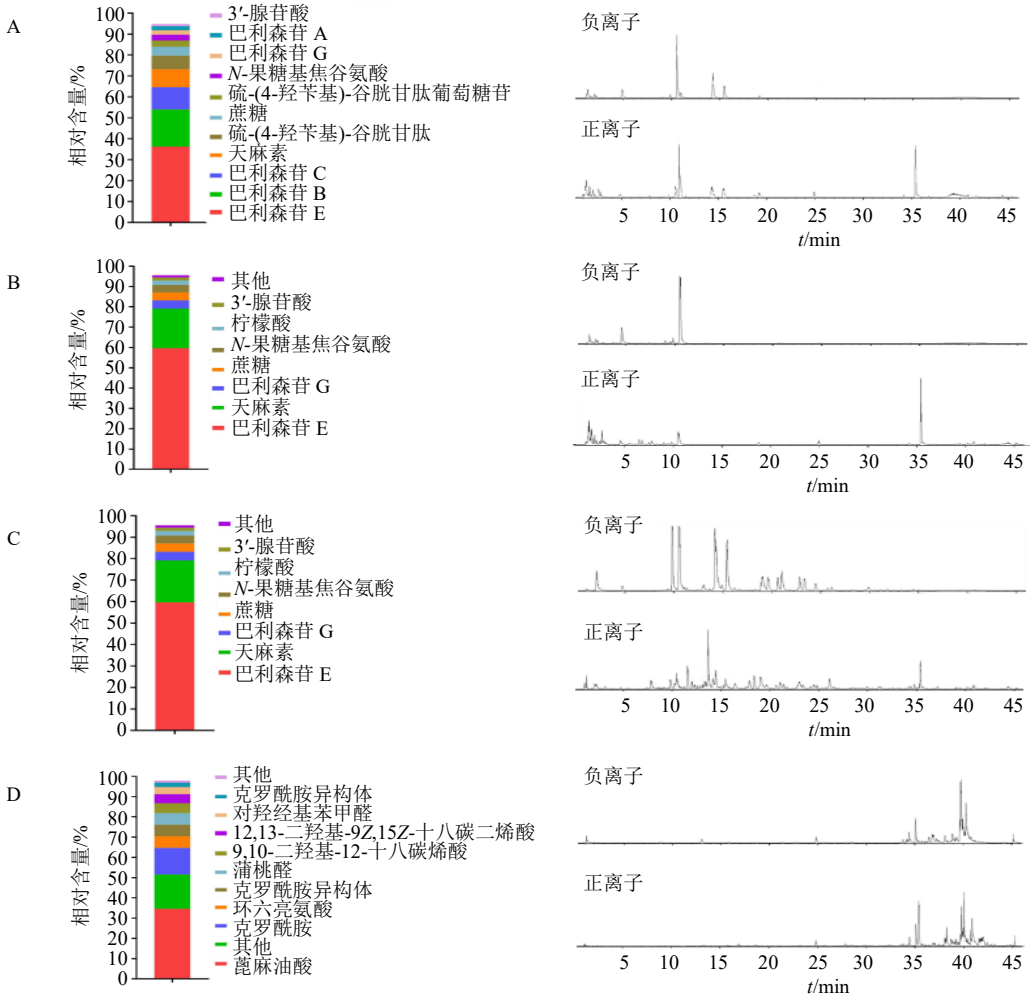


图 11　TWE (A)、WF (B)、30% EF (C) 和 95% EF (D) 的主要成分相对含量及基峰离子流图

Fig. 11　Relative contents of major components and base peak ion chromatograms and of TWE (A), WF (B), 30% EF (C), and 95% EF (D)

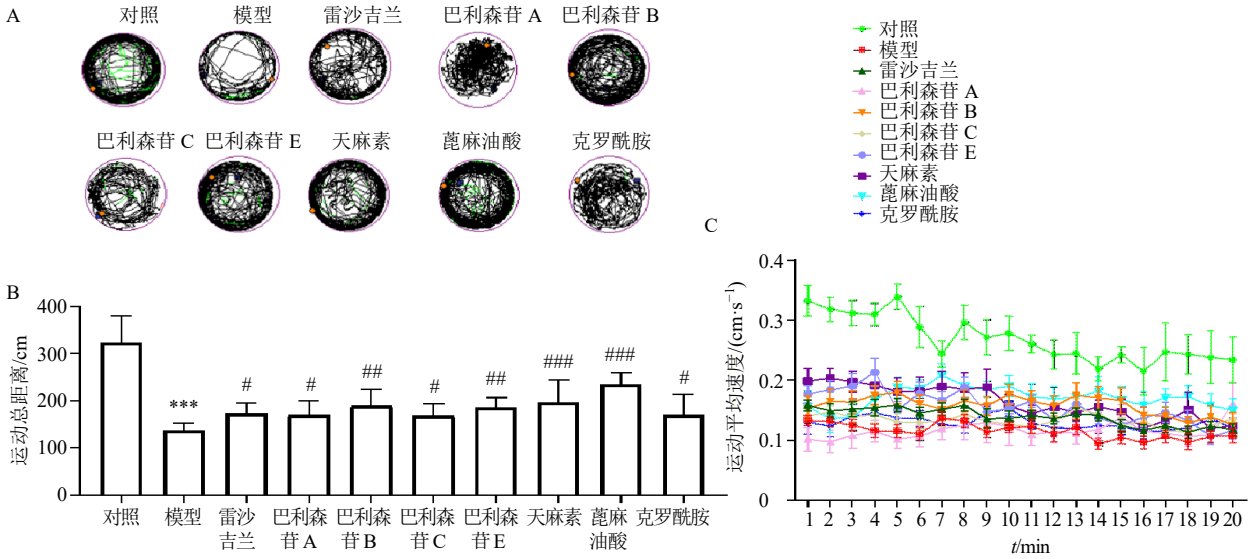


图 12　天麻活性单体成分改善斑马鱼 PD 样行为 ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

Fig. 12　Active monomers of *G. elata* improved PD-like behavior of zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

4 讨论

本研究以 MPTP 诱导的斑马鱼 PD 模型为载体，证实 TWE 具有显著的抗 PD 活性，可改善 PD 样行为、保护多巴胺神经元及脑部血管，减少神经细胞凋亡，网络药理学结合 qRT-PCR 验证结果表明，天麻可靶向 AKT1 并调控 PI3K/Akt 核心信号网络；TWE 能够调控 PI3K/Akt 下游自噬、氧化应激相关基因及 PD 特征基因，进而改善斑马鱼 PD 样损伤行为。通过大孔树脂分离纯化得到 TWE 不同活性部位，结合抗 PD 相关指标分析得到最优活性部位为 WF、30% EF 及 95% EF，对改善自噬紊乱损伤作用明显，同时实现对多巴胺神经元的保护作用。结合 UPLC-Q-TOF/MS 技术进一步鉴定，明确巴利森苷 A、巴利森苷 B、巴利森苷 C、巴利森苷 E、天麻素、蓖麻油酸、克罗酰胺为其抗 PD 的关键活性单体成分。基于上述 7 种单体在斑马鱼 PD 模型中的行为学检测，发现蓖麻油酸和天麻素抗 PD 活性优于其他单体，天麻素[34]抗 PD 作用已有少量文献报道，蓖麻油酸有潜力成为抗 PD 的新成分。本研究明确了天麻抗 PD 的活性与分子机制，为其开发及 PD 创新药物研发提供实验依据。

本研究仍存在一定局限性：①仅采用斑马鱼模型评价天麻提取物的抗 PD 活性，该模型可快速直观反映多巴胺神经元损伤与行为学变化，但无法完全模拟人类 PD 复杂且长期的慢性神经退行性病程。②初步明确了 TWE 的安全作用浓度，尚未对其活性单体开展毒性评价，单一活性成分的用药安全性仍缺乏系统性验证。③初步探究了相关信号通路与关键分子的表达变化，其内在调控网络与核心作用靶点的分子机制，仍需结合细胞实验进一步探究，开展多维度、多层次的验证，从而全面揭示天麻提取物防治 PD 的作用机制与应用潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Yu D M, Wang H Y, Zhai Y W, *et al*. Effects of latroeggtoxin-VI on dopamine and α-synuclein in PC12 cells and the implications for Parkinson's disease [J]. *Biol Res*, 2024, 57(1): 9.

[2] Liu Z X, Nie J B, Li Y M, *et al*. *Bacteroides coprocola* protects dopaminergic neurons in rotenone-induced Parkinson's disease mouse model by modulating gut microbiota dysbiosis and inhibiting the NLRP3 signaling pathway [J]. *Transl Neurodegener*, 2026, 15(1): 7.

[3] Jos S, Shivanandaswamy N, Sharma A, *et al*. Parkinson's disease-specific α-Synuclein variants potentially drive Lewy body formation by engaging in promiscuous and non-functional interactions [J]. *Commun Biol*, 2026, 9: 165.

[4] Gibbs M C, D'Souza A, Sotirakis C, *et al*. Cognitive function is associated with the progression of non-tremor motor symptoms in Parkinson's disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2026, 18: 1765860.

[5] 薛慧铭, 冯真, 金畅, 等. 白芍总苷对 MPTP 致帕金森病小鼠的作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(4): 1266-1276.

[6] 符晓梅, 王嘉瑶, 陈沁园, 等. 中药协定方配合中医定向透药疗法在帕金森病肌强直患者中的应用效果 [J]. 中西医结合护理: 中英文, 2025, 11(7): 50-53.

[7] 张金茹, 蒋启明, 蒋雨, 等. 免疫相关帕金森综合征临床及影像学特征 [J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2026, 33(1): 33-38.

[8] Ren J X, Zhang W, Dahmani L, *et al*. Parkinson's disease as a somato-cognitive action network disorder [J]. *Nature*, 2026, 651(8107): 1030-1038.

[9] Solheim N, Pinho B R, Oliveira N A S, *et al*. Early motor deficits, sleep dysfunction and reduction in dopaminergic neurons in a *PARK7*$^{-/-}$ zebrafish larval model of Parkinson's disease [J]. *Sci Rep*, 2026, 16(1): 9525.

[10] Wang X Q, Mao Y, Liang T Y, *et al*. Nervonic acid suppresses MPTP-induced Parkinson's disease in an adult zebrafish model by regulating the MAPK/NF-κB signaling pathway, inflammation, apoptosis, and oxidative stress [J]. *Food Biosci*, 2024, 59: 103777.

[11] 王坚, 邬剑军, 常颖, 等. 中国帕金森疾病蓝皮书 [J]. 中国临床神经科学, 2024, 32(S1): 1-41.

[12] 郭轩彤, 陈祖昕, 曹旭, 等. 肠道功能障碍诱发帕金森病的机制 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2021, 50(4): 538-543.

[13] 洪嘉, 肖林岑, 李芯溦, 等. 氧化应激与线粒体功能障碍在帕金森病发病机制中的研究进展 [J]. 局解手术学杂志, 2026, 35(2): 180-184.

[14] 梁美霞, 魏晓玲, 黄锦, 等. 帕金森病与肠道菌群相关性及中医治疗的研究进展 [J]. 中医临床研究, 2025, 17(30): 138-142.

[15] 杨红星. 通心络干预大鼠心肌缺血再灌注损伤的自噬机制及其相关 microRNA 途径 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.

[16] Cao T Y, Zhao Q Y, Yao Y X, *et al*. *In situ* amplification of α-synuclein amyloid fibril reveals a distinct polymorph related to Parkinson's disease and dementia with Lewy body [J]. *Cell Rep*, 2025, 44(11): 116564.

[17] Zhang Z Y, Li X D, Zhang Y C, *et al*. Ecological factors impacting genetic characteristics and metabolite accumulations of *Gastrodia elata* [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(3): 562-574.

[18] 万静, 丁铃, 谌文元, 等. 天麻化学成分的提取及其在保健食品中的应用 [J]. 饮料工业, 2025, 28(1): 69-73.

[19] 刘桢桢, 严静怡, 李干鹏, 等. 天麻的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 药学前沿, 2025, 28(12): 2112-2122.

[20] 吴思颖, 吴学菊, 黄富荣, 等. 天麻主要活性成分功效及加工稳定性研究进展 [J]. 食品科学, 2025, 46(22): 363-371.

[21] 吴克红, 谢颖, 曹皇亮, 等. 天麻中巴利森类物质的化学、药理和体内外代谢研究进展 [J]. 中草药, 2025, 56(13): 4841-4851.

[22] 吴小盈, 周雪, 胡晓霞, 等. 天麻素通过调控 NF-κB/NLRP3 信号通路对 BV2 细胞炎症损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2023, 45(3): 918-923.

[23] 张鹏宇, 靳梦, 商学良, 等. 基于网络药理学和斑马鱼模型的杜仲抗帕金森病作用 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(7): 1081-1087.

[24] Ashok C, Rajasekaran N K, Jeyabalan S, *et al*. Comparative evaluation of MPTP and rotenone as inducing agents for Parkinson's disease in adult zebrafish: Behavioural and histopathological insights [J]. *Toxicol Rep*, 2025, 15: 102084.

[25] Zhang S S, Yu Z P, Xia J Y, *et al*. Anti-Parkinson's disease activity of phenolic acids from *Eucommia ulmoides* Oliver leaf extracts and their autophagy activation mechanism [J]. *Food Funct*, 2020, 11(2): 1425-1440.

[26] Zhang Y Q, Liu T H, Li X J, *et al*. Neuroprotective effects of idebenone in a zebrafish model of Parkinson's disease via regulating autophagy, mitigating apoptosis and oxidative stress [J]. *Neuroscience*, 2026, 599: 52-64.

[27] Howe K, Clark M D, Torroja C F, *et al*. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.

[28] Doyle J M, Croll R P. A critical review of zebrafish models of Parkinson's disease [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 835827.

[29] Zhao J C, Yang J, Yang F, *et al*. An integrated zebrafish model and network pharmacology to investigate the mechanism of *Chrysanthemum* for treating metabolic dysfunction-associated fatty liver disease [J]. *Food Chem*, 2025, 473: 143134.

[30] Yu T, Zhang Y X, Liu X J, *et al*. Investigation of the pharmacological effect and mechanism of mountain-cultivated ginseng and garden ginseng in cardiovascular diseases based on network pharmacology and zebrafish experiments [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 920979.

[31] Rao C, Hu R X, Hu Y X, *et al*. Theoretical exploring of potential mechanisms of antithrombotic ingredients in Danshen-Chishao herb-pair by network pharmacological study, molecular docking and zebrafish models [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 100.

[32] 蒋智锐, 李彪平, 张靖怡, 等. 基于斑马鱼模型和网络药理学研究小柴胡汤治疗非酒精性脂肪肝病的作用及潜在机制 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(23): 3285-3295.

[33] Li Y Q, Chen Y, Fang J Y, *et al*. Integrated network pharmacology and zebrafish model to investigate dual-effects components of *Cistanche tubulosa* for treating both Osteoporosis and Alzheimer's Disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112764.

[34] 徐德洲, 冯为菊, 李玉梅, 等. 天麻素对帕金森病合并轻度认知功能损害患者的认知和运动功能影响 [J]. 环球中医药, 2013, 6(S1): 63-64.

[责任编辑 李亚楠]