◇ 基础研究 ◇

http://www.cjcpt.com
2026 Oct; 31(10): 1353-1362

基于混合物设计的天麻多组分复配物优化及其改善皮质酮诱导神经细胞损伤的机制研究

王　昕[1,2,3]，裴　栋[1,2]，曾昭洋[1,3]，邸多隆[1,2]

[1]甘肃中医药大学药学院，兰州 730000，甘肃；
[2]中国科学院兰州化学物理研究所，中国科学院西北特色植物资源化学重点实验室，甘肃省天然药物重点实验室，兰州 730000，甘肃；
[3]甘肃中医药大学附属医院，兰州 730000，甘肃

摘　要　**目的**：采用皮质酮（corticosterone，CORT）诱导 PC12 和 HT22 细胞应激性损伤。应用混合物设计筛选天麻多糖（*Gastrodia elata* polysaccharide，GEP）与天麻醇提物（*Gastrodia elata* ethanolic extract，GET）的候选比例。**方法**：采用 CCK-8 法确定 CORT 建模条件及 GEP、GET 工作浓度。以细胞活力、总超氧化物歧化酶（total superoxide dismutase，T-SOD）活性和丙二醛（malondialdehyde，MDA）水平为响应，采用合意性函数进行多目标优化。随后在两种细胞中验证候选复配物，并检测活性氧（reactive oxygen species，ROS）、线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，ΔΨm）及核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）、PTEN 诱导激酶 1（PTEN-induced kinase 1，PINK1）和 Parkin 蛋白水平。**结果**：PC12 和 HT22 细胞的 CORT 浓度分别为 400 μmol/L 和 200 μmol/L。GEP 和 GET 工作液浓度分别为 200 μg/mL 和 10 μg/mL。3 个二次混合物模型的整体 *P* 值为 0.549、0.500 和 0.181，预测 R^2 均为 0。综合合意性为 0.632。由此提出 GEP 工作液:GET 工作液=71:29（*V*/*V*）的探索性候选比例。与模型组比较，候选复配物提高两种细胞的活力，降低 ROS 水平并提高 ΔΨm 水平（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。在建模阶段，MDA 下降且 T-SOD 升高。复配物干预还伴随 Nrf2、PINK1 和 Parkin 蛋白表达升高（*P*<0.05 或 *P*<0.01）。**结论**：71:29 候选复配物可缓解 CORT 诱导的体外细胞应激性损伤。现有结果支持复配优势和机制线索，但不能证明超加和作用、完整 Nrf2-PINK1/Parkin 通路或体内抗抑郁效应。

关键词　天麻多糖；天麻醇提物；混合物设计；皮质酮；细胞应激性损伤；线粒体功能；Nrf2；PINK1；Parkin

中图分类号：R285；R284
文献标志码：A
文 章 编 号：1009-2501(2026)10-1353-10
doi：10.12092/j.issn.1009-2501.2026.10.006

抑郁症具有高疾病负担[1]。慢性应激相关的氧化损伤、线粒体稳态破坏和能量代谢异常可能参与其病理过程。然而，抑郁症还涉及神经环路、下丘脑-垂体-肾上腺轴、免疫炎症和行为表型。体外细胞实验适合筛选候选干预物，但不能单独证明抗抑郁疗效。

皮质酮（corticosterone，CORT）过量暴露可诱导 PC12 和 HT22 细胞活力下降，并伴随氧化应激和线粒体损伤[2-3]。该模型只能模拟糖皮质激素相关的部分细胞事件。核因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）参与抗氧化防御。PTEN 诱导激酶 1（PTEN-induced kinase 1，PINK1）和 Parkin 参与线粒体质量控制。本研究检测三者的总蛋白表达，用于发现后续验证线索，不预设一条完整通路。

天麻为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl.的干

2026-06-22 收稿　2026-08-11 修回
国家自然科学基金（8256151098）；2025 年甘肃省高校研究生“创新之星”项目（2025CXZX-923）
王昕，女，博士研究生，研究方向：中药学。
E-mail：wxin202501@163.com
邸多隆，通信作者，男，博士，教授，研究方向：天然产物化学。
E-mail：did1@licp.cas.cn

燥块茎，具有息风止痉、平抑肝阳和祛风通络之功[4]。天麻多糖（*Gastrodia elata* polysaccharide, GEP）在 CORT 损伤、慢性应激和缺血模型中显示出神经保护潜力[5-7]。天麻乙醇提取物、天麻素和 4-羟基苄醇亦显示出抗抑郁样或神经保护作用[8-11]。上述证据来自不同工艺和模型，不能直接外推至本研究。

本研究采用扩展混合物设计评价 GEP 与天麻醇提物（*Gastrodia elata* ethanolic extract, GET）工作液的比例-效应关系[12]。研究目的有二：提出可独立验证的候选比例；比较候选复配物与单组分在两种细胞中的保护作用。机制检测定位为探索性观察。

1 材料与方法

1.1 受试药物

1.1.1 GET 制备及质量表征 天麻饮片购自甘肃陇脉药材公司。经甘肃中医药大学附属医院杨锡仓教授鉴定为兰科植物天麻 *Gastrodia elata* Bl.的干燥块茎。样品保存于甘肃中医药大学陇药研究院，批号：20250901。取饮片 100 g，以 60% 乙醇按料液比 1:10 提取 2 次。每次自沸腾后计时 1 h。合并提取液。减压回收乙醇，并于 50 ℃ 浓缩至无醇味。得 GET 14.98 g，提取得率为 14.98%。

采用超高效液相色谱-高分辨质谱（ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UPLC-HRMS）进行初步化学表征。取各待测样品等体积上清液制备池化质量控制（quality control, QC）样品。QC 重复进样 3 次，用于评价进样重复性和仪器短期稳定性[13]。色谱柱为 Kinetex C_{18}（2.1 mm×100 mm, 1.7 μm）。柱温 40 ℃，进样量 5 μL。流动相 A 为 10 mmol/L 甲酸铵水溶液，B 为乙腈。流速 0.3 mL/min。梯度为：0 ~ 1 min, B 0% ~ 20%; 1 ~ 9 min, 20% ~ 45%; 9 ~ 10 min, 45% ~ 75%; 10 ~ 17 min, 75%; 17 ~ 20 min, 75% ~ 20%。采用加热电喷雾离子化（heated electrospray ionization, HESI）技术，分别在正离子和负离子模式下采集数据。扫描范围 *m/z* 100 ~ 1 000。全扫描分辨率 70 000 FWHM。主要离子峰依据精确质量和数据库进行暂定注释，未作对照品确证或定量。

1.1.2 GEP 制备及质量控制 取天麻粉末 100 g，按 1:30（*W/V*）加水，于 90 ℃ 提取 120 min。离心并过滤。上清液于 50 ℃ 浓缩至 200 mL。采用 5 000 截留膜分离，再以 3 500 透析袋透析 3 d。浓缩、离心并冻干，得 GEP 6.05 g，提取得率为 6.05%。

采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮柱前衍生-高效液相色谱（1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone pre-column derivatization high performance liquid chromatography, PMP-HPLC）法分析单糖组成。GEP 经 3 mol/L 三氟乙酸于 110 ℃ 水解 8 h。衍生后使用 SinoChrom ODS-BP 色谱柱（5 μm, 4.6 mm×250 mm）检测。柱温 30 ℃。流动相为 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液（pH 6.7）-乙腈（82:18, *V/V*）。流速 1.0 mL/min，检测波长 245 nm。采用苯酚-硫酸法测定总多糖含量。葡萄糖标准曲线为 Y=0.788 5X+0.001 8，R^2=0.994。GEP 总多糖含量为 82.77%。

1.2 细胞、试剂与仪器 PC12 细胞（nobcell0313）购自浙江诺博生物制品有限公司。HT22 细胞（STCC20011）购自武汉梓杉生物技术有限公司。DMEM 高糖培养基（LOT 4511，武汉赛维尔）；胎牛血清（LOT FBS05，北京义翘神州）；CCK-8 试剂盒（LOT M4839，白鲨生物）；总超氧化物歧化酶（total superoxide dismutase, T-SOD）和丙二醛（malondialdehyde, MDA）试剂盒（A001-1-1、A003-1-1，南京建成）；氟西汀（CAS 54910-89-3，上海源叶）；CORT（LOT M5533，Abmole）；活性氧（reactive oxygen species, ROS）试剂盒（S0033L，碧云天）；JC-1 试剂盒（M86500，北京索莱宝）；GAPDH、Nrf2、PINK1 和 Parkin 一抗及相应二抗见原始试剂记录。

主要仪器包括 Spectra 酶标仪、CytoFLEX 流式细胞仪、ECLIPSE TS2-FL 倒置荧光显微镜、C300 化学发光成像系统、Agilent 1 260 高效液相色谱系统、UltiMate 3 000 高效液相色谱系统和 Q Exactive 高分辨质谱仪。

1.3 CORT 诱导细胞应激性损伤模型 PC12 和 HT22 细胞均在含 10% 胎牛血清、100 IU/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中培养。培养条件为 37 ℃、5% CO_2。PC12 细胞接种 24 h 后，分别加入 100、200、400 和 800 μmol/L CORT 处理 24 h[2]。HT22 细胞分别加入 200、400 和 600 μmol/L CORT 处理 24 h[3]。采用 CCK-8 法检测 450 nm 吸光度。细胞活力（%）=($A_{处理}$−$A_{空白}$)/($A_{对照}$−$A_{空白}$)×100%。$A_{处理}$为处理孔吸光度，$A_{空白}$为无细胞孔吸光度，$A_{对照}$为对照孔吸光度。

1.4 GEP 和 GET 工作浓度筛选 PC12 细胞先分

别接受 GEP（200、400、800、1 000 μg/mL）或 GET（5、10、20、100、200 μg/mL）预处理 24 h，再加入 400 μmol/L CORT 处理 24 h。根据细胞活力和最低有效浓度确定后续工作浓度。氟西汀 1 μmol/L 作为阳性对照。该浓度处于既往 PC12 体外研究所用的低微摩尔范围；相关研究未观察到 1 ~ 20 μmol/L 对非损伤 PC12 细胞的明显毒性，并显示 1 μmol/L 可降低损伤相关凋亡[14]。PC12 和 HT22 验证实验均使用 1 μmol/L 氟西汀。

1.5　混合物设计与多目标优化　将 GEP 工作液（200 μg/mL）和 GET 工作液（10 μg/mL）作为两个混合组分。GEP 体积分数记为 A，GET 体积分数记为 B，且 $A+B=1$。该比例为工作液体积比，不是提取物质量比。采用 Minitab 22 构建二组分扩展混合物设计。设置两个端点、中心点及 1/4 和 3/4 比例点，共 5 个设计点（COM1 ~ COM5）。CCK-8 采用 6 个重复观察，MDA 和 T-SOD 采用 3 个重复观察。模型拟合使用各设计点均值。

分别拟合 Scheffé二次混合物模型 $Y=\beta_1A+\beta_2B+\beta_{12}AB$。报告 R^2、调整 R^2、预测 R^2 和模型 P 值。采用 Minitab 多响应合意性函数同时优化。细胞活力和 T-SOD 设为最大化，MDA 设为最小化。各响应权重和重要性均为 1。最大化响应在下限 L 以下时 $d=0$，在 L 至目标 T 之间按 $d=[(y-L)/(T-L)]^s$ 计算，在 T 以上时 $d=1$。最小化响应在 T 以下时 $d=1$，在 T 至上限 U 之间按 $d=[(U-y)/(U-T)]^t$ 计算，在 U 以上时 $d=0$。综合合意性 $D=(\prod d_i^{I_i})^{1}/\Sigma^{I_i}$。式中，$y$ 为预测响应，s 和 t 为权重，I 为重要性。

1.6　候选复配物验证　在 PC12 和 HT22 模型中设置对照组、模型组、氟西汀组、GEP 组、GET 组和候选复配物组。候选复配物按 GEP 工作液∶GET 工作液=71:29（V/V）配制。混合液中 GEP 和 GET 终浓度分别为 142 μg/mL 和 2.9 μg/mL。候选复配物简称 COM。COM1 ~ COM5 仅指混合物设计阶段的 5 个设计点。

1.7　ROS、线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，ΔΨm）和蛋白表达　细胞按分组预处理 24 h，再加入相应浓度 CORT 处理 24 h。ROS 染色后在相同曝光条件下采集图像。使用 ImageJ 计算背景校正后的单位细胞 DCF 荧光，并以对照组归一化。JC-1 染色后在 30 min 内采图。分别校正红、绿通道背景。以 JC-1 聚合物/单体荧光比值表示 ΔΨm。每次独立实验的多个视野先取均值，再作为 1 个生物学重复。共完成 3 次独立实验。

Western blot 设置对照组、模型组和 COM 组。目标蛋白以 GAPDH 归一化。每种细胞完成 3 次独立实验。该实验未设置 GEP 和 GET 单独干预组。因此，结果仅用于判断 COM 干预是否伴随 Nrf2、PINK1 和 Parkin 表达变化，不用于比较两组分的分子贡献。

1.8　统计学处理　常规实验数据采用 SPSS 27.0 分析，以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。多组比较采用单因素方差分析，事后比较采用 Tukey 法。两组比较采用独立样本 t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。另以 5 个设计点均值进行探索性 Pearson 相关分析，用于描述细胞活力、MDA 和 T-SOD 的共同变化。该分析样本量小，仅作描述性解释。

2　结果

2.1　GEP 和 GET 质量表征　GEP 由甘露糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸、葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖组成。其摩尔比为 1.35:1.38:737.16:2.33:2.84:4.85:1.00（按 L-阿拉伯糖、D-半乳糖、D-葡萄糖、D-半乳糖醛酸、D-葡萄糖醛酸、甘露糖、鼠李糖顺序）。葡萄糖占优势（Fig.1）。GEP 总多糖含量为 82.77%。

GET 池化 QC 样品 3 次重复进样的正、负离子 TIC 整体重叠。结果支持当前分析条件下的短期仪器稳定性（Fig.2）。依据精确质量和数据库匹配，主要离子峰中暂定注释到天麻素、巴利森苷 E、原儿茶醛、阿魏酸等（Tab.1）。该结果不等同于对照品确证或含量测定。

2.2　CORT 建模结果及浓度-效应特征　PC12 细胞活力随 CORT 浓度升高而连续下降。100、200、400 和 800 μmol/L 组的细胞活力分别为 74.75%、69.04%、56.90% 和 32.81%（Fig.3A）。HT22 细胞在 200、400 和 600 μmol/L 时分别为 51.96%、74.63% 和 55.31%，呈非单调变化（Fig.3B）。经复核图表数值和组别对应后保留该结果，不作线性浓度-效应解释。综合损伤幅度和保护窗口，后续采用 400 μmol/L 处理 PC12 细胞，采用 200 μmol/L 处理 HT22 细胞。

2.3　GEP 和 GET 工作浓度筛选　与模型组比较，200 ~ 1 000 μg/mL GEP 均提高 PC12 细胞活力（$P<0.05$ 或 $P<0.01$），且组均值随浓度增加而升高。

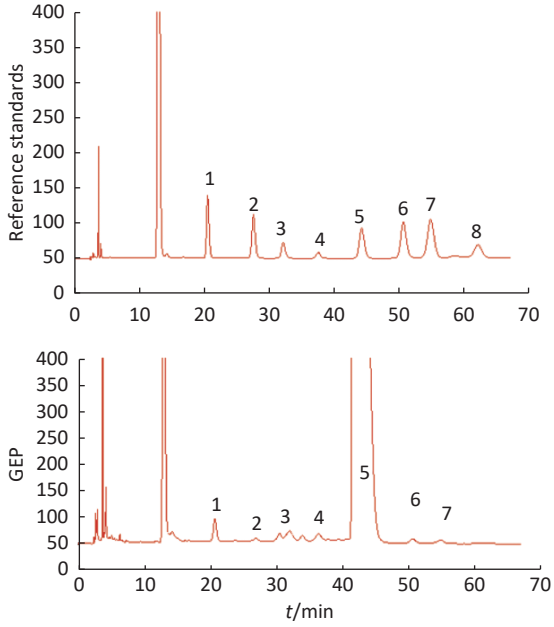


Fig.1 HPLC chromatograms of monosaccharide standards (upper panel) and GEP hydrolysate (lower panel)

The numbers in the chromatogram correspond to the following peaks: 1: mannose; 2: rhamnose; 3: glucuronic acid; 4: D-galacturonic acid; 5: D-glucose; 6: D-galactose; 7: L-arabinose; 8: fucose.

为减少后续暴露量，选用最低有效浓度 200 μg/mL（Fig.4A）。GET 呈非单调反应。仅 10 μg/mL 组提高细胞活力（P<0.05）。20 ~ 200 μg/mL 未显示保护作用（Fig.4B）。因此选用 10 μg/mL 作为 GET 工作浓度。

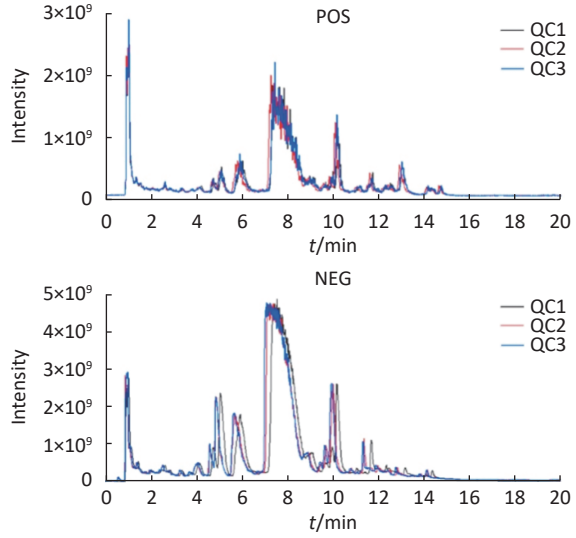


Fig.2 Overlaid total ion chromatograms of pooled GET quality-control samples in positive (POS) and negative (NEG) ion modes (three repeated injections)

2.4 混合物设计响应、相关性及模型拟合 将“2.3”节筛得的 GEP 工作液和 GET 工作液作进行组分混合，形成 5 个实验点（COM1 ~ COM5，Tab.2）。5 个设计点的细胞活力、MDA 和 T-SOD 响应随 GEP/GET 体积比例变化而波动（Fig.5）。

5 个设计点的响应未同步变化。以设计点均值进行探索性 Pearson 分析时，MDA 与 T-SOD 的

Tab.1 Major ion features tentatively annotated in GET by UPLC-HRMS

Tentative annotation	Formula	Mass error/ppm	Calculated MW	*m/z*	RT/min	Peak area
4,4′-Diapophytofluene	$C_{30}H_{46}$	−1.30	406.359 4	407.366 7	15.483	1.22×10^{9}
Gastrodin	$C_{13}H_{18}O_7$	−1.95	285.096 9	285.098 1	1.820	1.17×10^{9}
Parishin E	$C_{19}H_{24}O_{13}$	−1.64	459.113 3	459.114 1	5.520	1.11×10^{9}
4-Hydroxy-2,5-bis(4-hydroxyphenyl) cyclopent-4-ene-1,3-dione	$C_{17}H_{12}O_5$	−1.35	296.068 1	297.075 4	11.903	1.11×10^{9}
(1E,4E)-1,5-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) penta-1,4-dien-3-one	$C_{19}H_{18}O_5$	−1.90	326.114 8	309.111 5	11.867	8.68×10^{8}
Protocatechualdehyde	$C_7H_6O_3$	−1.55	138.031 5	139.038 8	6.542	1.48×10^{8}
Phytosphingosine	$C_{18}H_{39}NO_3$	−1.08	317.292 7	318.299 9	12.291	1.62×10^{8}
Betulin	$C_{30}H_{50}O_2$	−1.33	442.380 5	443.387 8	15.717	1.30×10^{8}
Protocatechualdehyde (feature 2)	$C_7H_6O_3$	−1.66	138.031 5	139.038 7	2.124	1.76×10^{8}
Ferulic acid	$C_{10}H_{10}O_4$	−1.14	194.057 7	177.054 4	2.758	1.72×10^{8}

Annotations are tentative and based on accurate mass and database matching. They were not confirmed with authentic standards and should not be interpreted as quantitative contents.

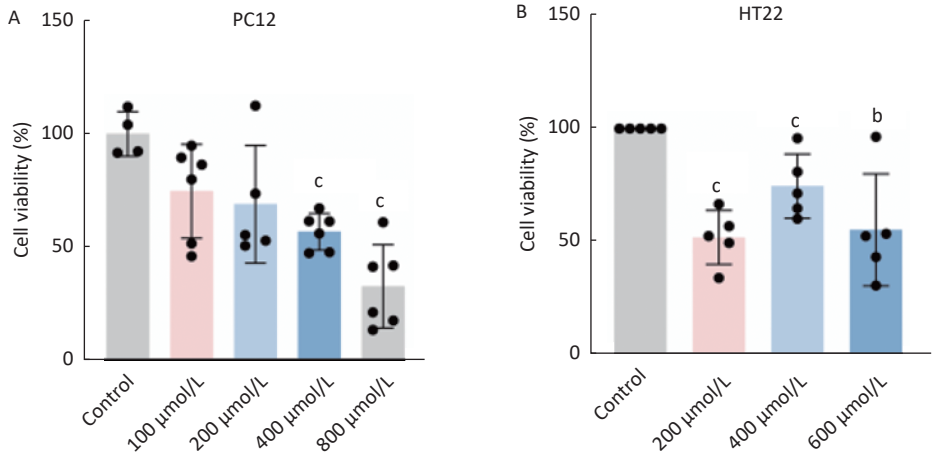


Fig.3　Effects of CORT concentration on PC12 (A) and HT22 (B) cell viability ($\bar{x}\pm s$, n=6 replicate observations)

[b]P<0.05, [c]P<0.01, compared with control group.

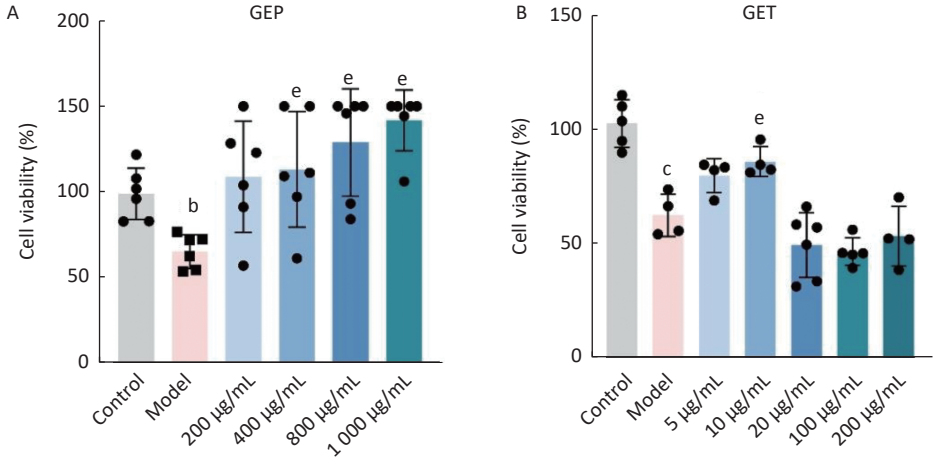


Fig.4　Effects of GEP (A) and GET (B) concentration on CORT-injured PC12 cell viability ($\bar{x}\pm s$, n=6 replicate observations)

[b]P<0.05, [c]P<0.01, compared with control group; [e]P<0.05, compared with model group.

Tab.2　Proportions of the five mixture-design points

Design point	GEP working-solution fraction, A (200 μg/mL)	GET working-solution fraction, B (10 μg/mL)
COM1	0.75	0.25
COM2	1.00	0
COM3	0.25	0.75
COM4	0.50	0.50
COM5	0	1.00

相关性较弱(r=−0.123, P=0.844)。细胞活力与MDA亦无明显相关性(r=−0.080, P=0.899)。细胞活力与T-SOD呈正相关(r=0.906, P=0.034)。由于仅有5个均值点，该结果不用于因果推断。MDA和T-SOD极值未出现在同一配比，提示单一氧化应激指标不足以代表综合效应(Tab.3)。

3个模型整体均未达到统计学显著，预测R^2均为0(Tab.4)。因此，模型仅用于描述比例-效应趋势和提出候选点，不用于宣称已证实最优配比。

多响应优化得到A=0.710 123, B=0.289 877。取整后为GEP工作液:GET工作液=71:29(V/V)。综合合意性D=0.631 710。该比例被定义为探索性候选点。

2.5　候选复配物与单组分的细胞保护作用

PC12和HT22模型组细胞活力分别为59.61%和69.94%(均P<0.01)(Fig.6)。COM干预后分别恢复至87.45%和116.51%(均P<0.01)。在PC12细胞中，预测值为90.87%，实测值为87.45%，绝对差为−3.42个百分点，相对偏差为−3.76%。HT22用于跨细胞系验证，不与PC12模型预测值比较。COM在部分成对比较中优于GEP或GET(P<0.05或P<0.01)。该结果支持复配优势，但不等同于超加和协同。

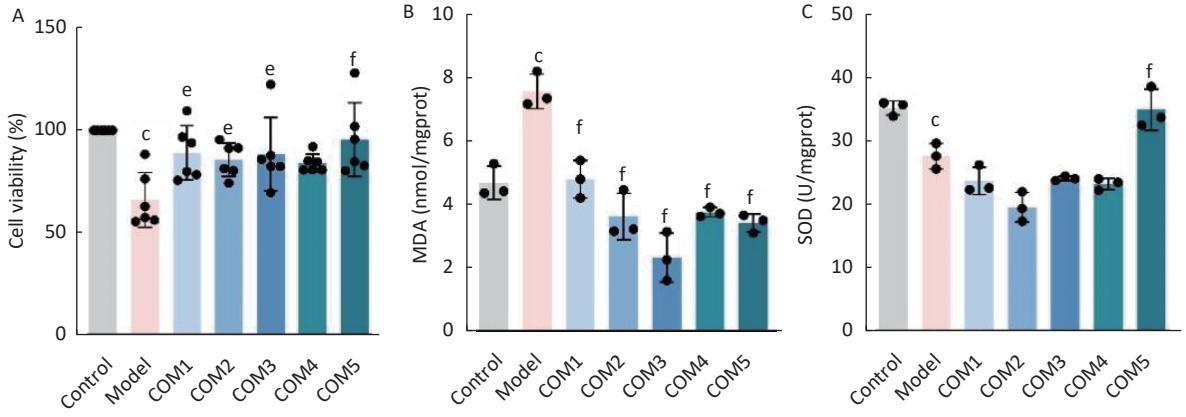


Fig.5 Responses at the five GEP/GET mixture-design points

A: cell viability (n=6 replicate observations); B: MDA and (C) T-SOD (n=3 replicate observations). Data are $\bar{x}\pm s$. ^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model group.

Tab.3 Statistical summary of the Scheffé quadratic mixture models

Response	Model	R^2 (%)	Adjusted R^2 (%)	Predicted R^2 (%)	Model P value
Cell viability	Y=90.63A+83.81B+10.8AB	45.10	0	0	0.549
T-SOD	Y=26.74A+18.43B+20.9AB	49.98	0	0	0.500
MDA	Y=2.340A+3.495B+5.58AB	81.87	63.75	0	0.181

Tab.4 Settings and predicted responses of the multi-response desirability optimization

Response	Goal	Lower	Target	Upper	Predicted	Individual desirability
Cell viability (%)	Maximize	50	120	120	90.868 9	0.583 841
T-SOD (U/mg protein)	Maximize	20	40	40	28.635 5	0.431 776
MDA (nmol/mg protein)	Minimize	4	4	8	3.822 3	1.000 000

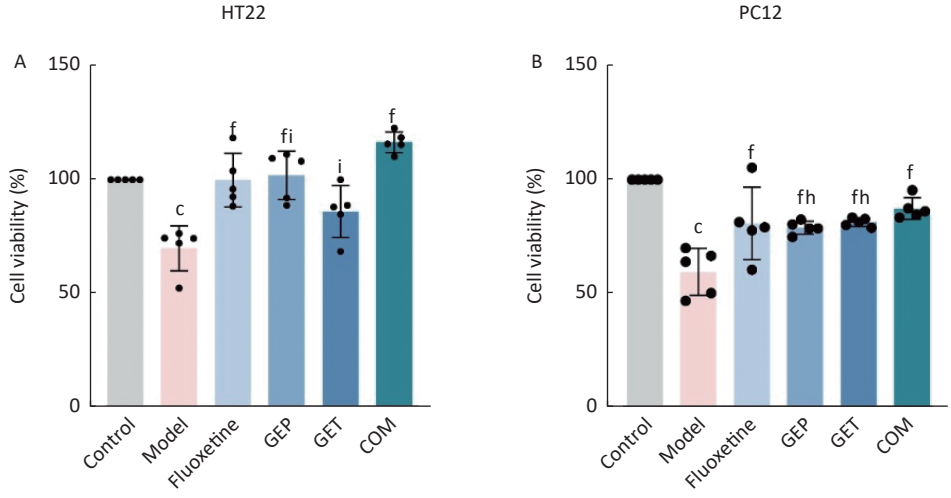


Fig.6 Cell-protective effects of the candidate combination, GEP, and GET in HT22 (A) and PC12 (B) cells ($\bar{x}\pm s$, n=6 replicate observations)

^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group; ^{h}P<0.05, ^{i}P<0.01, compared with COM group.

2.6 ROS、ΔΨm 及相关蛋白表达 CORT 处理后，两种细胞 ROS 荧光升高（P<0.01）。GEP、GET 和 COM 均降低 ROS（P<0.01）。COM 组总体下降幅度较大（Fig.7 和 Fig.8）。

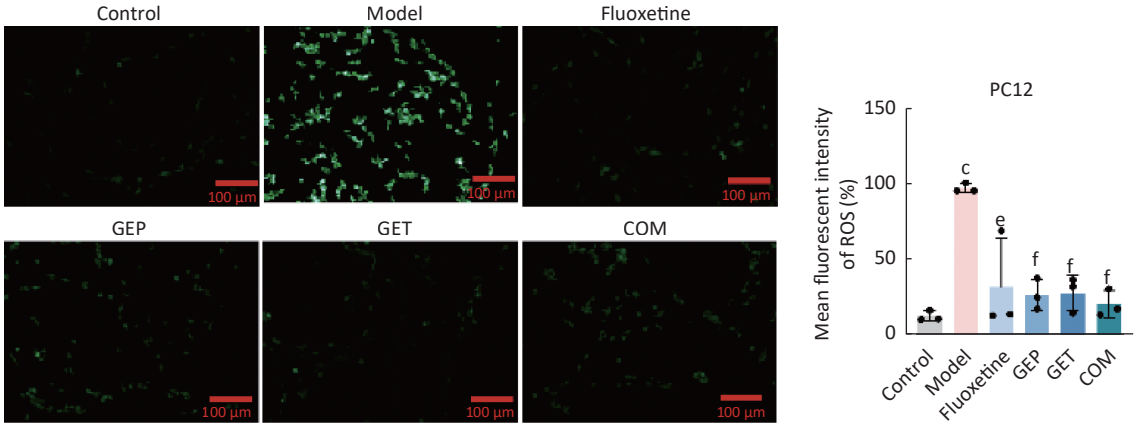


Fig.7　Effects of the candidate combination, GEP, and GET on ROS in PC12 cells ($\bar{x}\pm s$, n=3 independent experiments)

^{c}P<0.01, compared with control group; ^{e}P<0.05, ^{f}P<0.01, compared with model group. Red Scale bars=100 μm.

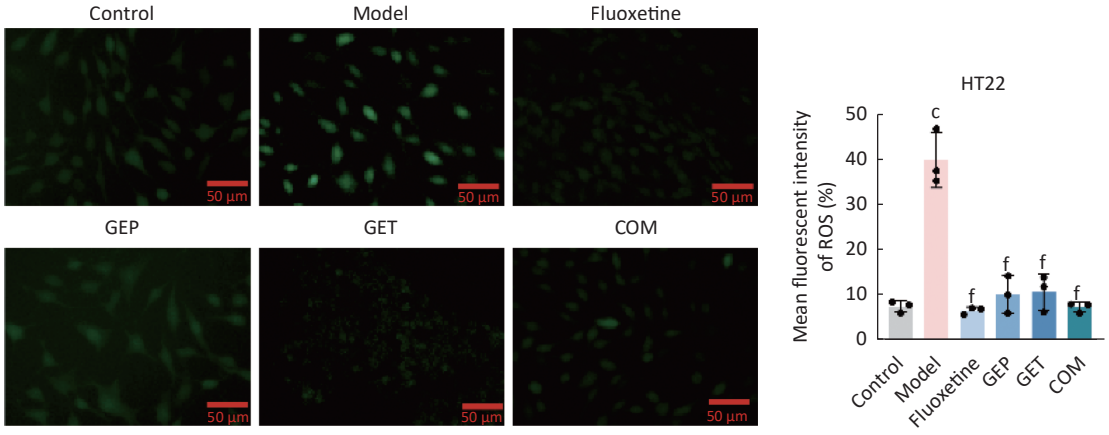


Fig.8　Effects of the candidate combination, GEP, and GET on ROS in HT22 cells ($\bar{x}\pm s$, n=3 independent experiments)

^{c}P<0.01, compared with control group; ^{f}P<0.01, compared with model group. Red Scale bars=50 μm.

CORT 处理后，两种细胞的 JC-1 聚合物/单体比值下降。COM 提高 PC12 细胞的比值（Fig.9，P<0.05），并改善 HT22 细胞的比值（Fig.10，P<0.05）。结果支持 COM 减轻线粒体去极化。

CORT 处理后，两种细胞中 Nrf2、PINK1 和 Parkin 总蛋白表达降低（P<0.05 或 P<0.01）。COM 干预后上述蛋白表达升高（Fig.11，P<0.05 或 P<0.01）。Western blot 未设置 GEP 和 GET 单独干预组，因此不能据此比较分子层面的复配优势。

3　讨论

本研究提出 GEP 工作液∶GET 工作液=71∶29（V/V）的探索性候选比例。该比例对应 GEP 142 μg/mL 和 GET 2.9 μg/mL。GEP 在筛选浓度范围内呈较稳定的保护趋势。GET 则呈窄浓度窗口。二者复配后，较低的 GET 暴露与 GEP 共同作用，可能兼顾小分子快速抗氧化效应和多糖的应激缓冲作用。该解释与细胞活力、ROS 和 ΔΨm 的共同改善一致，但仍属于机制假设。

71∶29 不能称为已证实的最优比例。3 个混合物模型均未达到统计学显著，预测 R^2 均为 0，综合合意性仅为 0.632。设计仅含 5 个比例点，残差自由度为 2。未来应增加设计点，并保留每个生物学重复用于模型拟合。还应设置独立确认批次。组分相互作用需采用 Bliss、Loewe、ZIP 或 Chou-Talalay 等方法专门评价。

MDA 和 T-SOD 在 5 个设计点中未呈稳定负相关。MDA 最低值出现在 COM3，而 T-SOD 最高值出现在 COM5。这可能与两项指标反映不同氧化应激环节有关，也可能受小样本和实验波动影响。因此，本研究采用多响应合意性函数，而不以单一指标决定比例。探索性相关分析仅支持细胞活力与 T-SOD 同步变化，不支持 MDA 与 T-SOD 之间的稳定线性关系。

机制方面，ROS 下降可能减轻脂质过氧化并间接稳定 ΔΨm。持续去极化时，PINK1 可在线粒

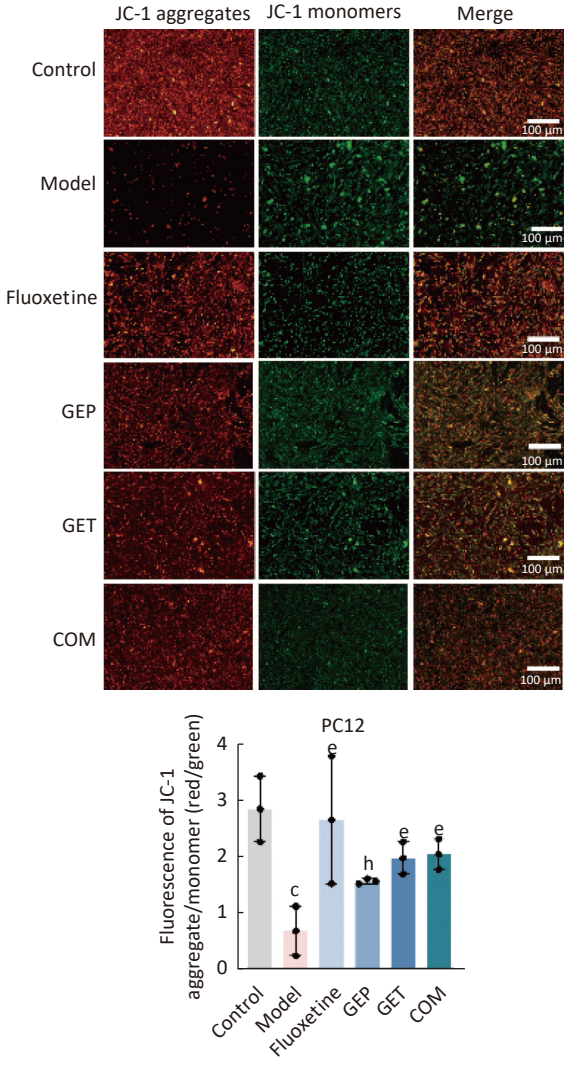


Fig.9 Effects of the candidate combination, GEP, and GET on mitochondrial membrane potential in PC12 cells ($\bar{x}$±s, n=3 independent experiments)

[c]*P*<0.01, compared with control group; [e]*P*<0.05, compared with model group; [h]*P*<0.05, compared with COM group. Scale bars=100 μm.

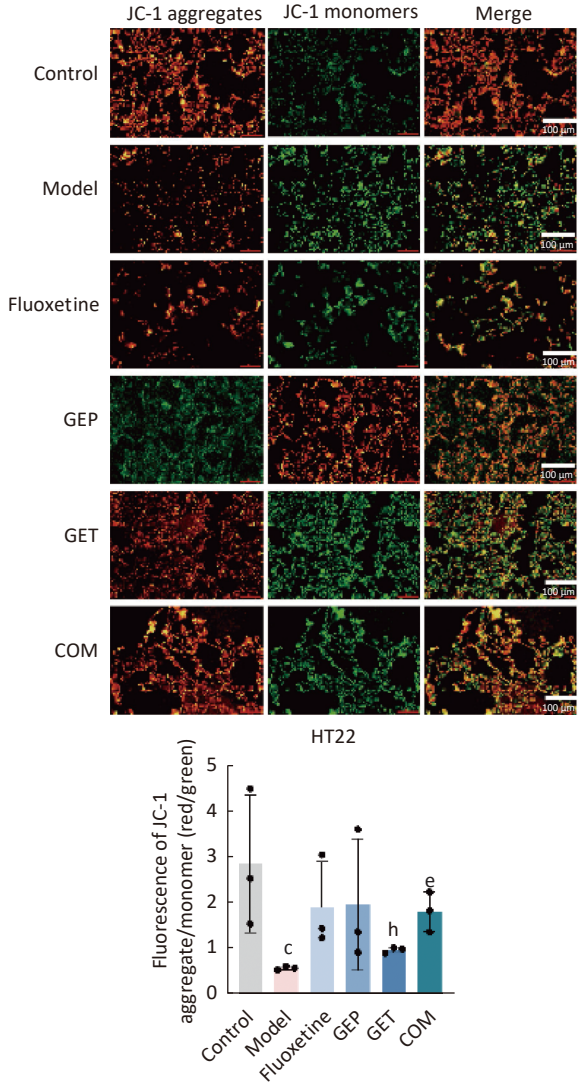


Fig.10 Effects of the candidate combination, GEP, and GET on mitochondrial membrane potential in HT22 cells ($\bar{x}$±s, n=3 independent experiments)

[c]*P*<0.01, compared with control group; [e]*P*<0.05, compared with model group; [h]*P*<0.05, compared with COM group. Scale bars=100 μm.

体外膜积累并募集 Parkin，从而参与受损线粒体标记[15]。但本研究仅检测总蛋白。未检测 Nrf2 核转位、PINK1 在线粒体外膜积累、Parkin 转位、LC3 通量或溶酶体依赖的线粒体自噬。也未采用抑制剂或基因干预。根据自噬检测规范，单一蛋白表达不能证明自噬通量增强[16]。因此，Nrf2、PINK1 和 Parkin 的变化应解释为相关线索，而不是完整通路的因果激活。

药效物质基础仍是主要限制。现有 UPLC-HRMS 数据可提供 GET 化学轮廓，并暂定注释天麻素和巴利森苷 E 等离子峰。但这些注释未经对照品确证。本文也未获得天麻素、4-羟基苄醇的定量结果，不能据此评价批间一致性。GEP 虽报告总多糖含量和单糖组成，但相对分子质量分布、糖苷键和纯度仍需补充。后续应建立指纹图谱，并对代表性质量标志物进行经验证的方法学定量。

本研究的适用范围限于体外细胞筛选。PC12 和 HT22 不能重现脑内多细胞互作、神经环路、内分泌反馈、免疫系统、药代动力学和抑郁样行为。体外名义浓度不能直接换算为动物或临床剂量。综上，71:29 候选复配物可缓解 CORT 诱导的细胞应激性损伤，并伴随氧化应激、ΔΨm 及相关蛋白改善。其复配优势、物质基础

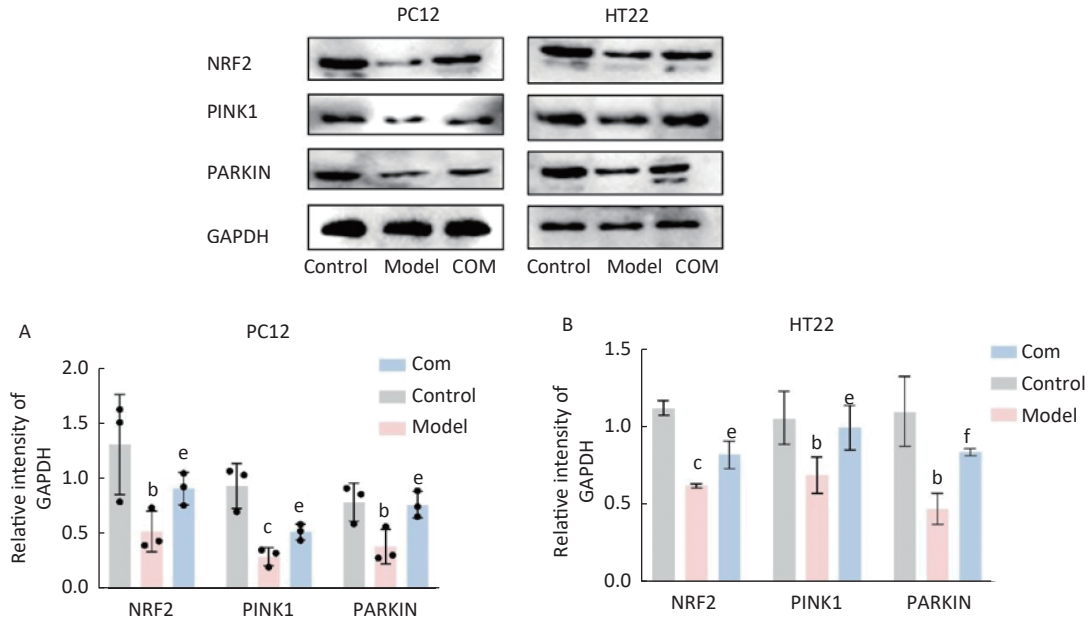


Fig.11　Effects of the candidate combination on Nrf2, PINK1, and Parkin protein expression in CORT-injured PC12 (A) and HT22 (B) cells ($\bar{x}\pm s$, n=3 independent experiments)

[b]P<0.05, [c]P<0.01, compared with control group; [e]P<0.05, [f]P<0.01, compared with model group.

和因果机制仍需在标准化质量控制、扩展配比设计和体内实验中验证。

参考文献

[1] Liu Q, He H, Yang J, et al. Changes in the global burden of depression from 1990 to 2017: findings from the Global Burden of Disease study [J]. J Psychiatr Res, 2020, 126: 134-140.

[2] Ma Z, Yu Y, Gao M, et al. Protective effect of hop ethyl acetate extract on corticosterone-induced PC12 and improvement of depression-like behavior in mice [J]. ACS Chem Neurosci, 2024, 15(9): 1893-1903.

[3] He Z, Yu H, Wu H, et al. Antidepressant effects of total alkaloids of Fibraurea recisa on improving corticosterone-induced apoptosis of HT-22 cells and chronic unpredictable mild stress-induced depressive-like behaviour in mice [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 1436-1448.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2025.

[5] Zhou BH, Tan J, Zhang C, et al. Neuroprotective effect of polysaccharides from Gastrodia elata Blume against corticosterone-induced apoptosis in PC12 cells via inhibition of the endoplasmic reticulum stress-mediated pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(1): 1182-1190.

[6] Wen M, Liu M, Zhang Y, et al. Gastrodia elata polysaccharide alleviates depression via gut microbiota modulation and Keap1-Nrf2/BDNF-TrkB pathway activation [J]. Int J Biol Macromol, 2025, 317(Pt 1): 144630.

[7] Zhang Y, Ye P, Zhu H, et al. Neutral polysaccharide from Gastrodia elata alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis-mediated neuroinflammation via the NRF2/HO-1 signaling pathway [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(3): e14456.

[8] Zhou BH, Li XJ, Liu M, et al. Antidepressant-like activity of the Gastrodia elata ethanol extract in mice [J]. Fitoterapia, 2006, 77(7-8): 592-594.

[9] Chen WC, Lai YS, Lin SH, et al. Anti-depressant effects of Gastrodia elata Blume and its compounds gastrodin and 4-hydroxybenzyl alcohol, via the monoaminergic system and neuronal cytoskeletal remodeling [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 182: 190-199.

[10] Wang R, Ren Q, Gao D, et al. Ameliorative effect of Gastrodia elata Blume extracts on depression in zebrafish and cellular models through modulating reticulon 4 receptors and apoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115018.

[11] Wang Y, Liu J, Wu W, et al. Ethanol extract of Gastrodia elata Blume alleviates ischemic stroke by inhibiting oxidative stress and ferroptosis through the PI3K/AKT/Nrf2 pathway [J]. J Ethnopharmacol, 2026, 358: 120956.

[12] Li W, Liu K, Tao X, et al. Application of mixture design for optimum cardio protection efficacy of mixtures of salvianolic acid A, salvianolic acid B and danshensu from Salvia miltiorrhiza [J]. Ind Crops Prod, 2023, 192: 116095.
[13] Broadhurst D, Goodacre R, Reinke SN, et al. Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies [J]. Metabolomics, 2018, 14(6): 72.
[14] Chua PF, Lim WK. Optimisation of a PC12 cell-based in vitro stroke model for screening neuroprotective agents [J]. Sci Rep, 2021, 11(1): 8096.
[15] Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy [J]. Nature, 2015, 524(7565): 309-314.
[16] Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition) [J]. Autophagy, 2021, 17(1): 1-382.

Optimization of a *Gastrodia elata* multi-component combination based on mixture design and its protective effects against corticosterone-induced cellular stress injury

WANG Xin[1,2,3], PEI Dong[1,2], ZENG Zhaoyang[1,3], DI Duolong[1,2]

[1] School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China; [2] Key Laboratory of Chemistry of Specialty Plant Resources of Northwest China, Chinese Academy of Sciences; Key Laboratory of Natural Medicines of Gansu Province, Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, Gansu, China; [3] Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, Gansu, China

ABSTRACT **AIM**: To identify an exploratory candidate ratio of *Gastrodia elata* polysaccharide (GEP) and *Gastrodia elata* ethanolic extract (GET) in corticosterone (CORT)-induced PC12 and HT22 cellular stress models and to evaluate associated changes in oxidative stress, mitochondrial membrane potential, and related proteins. **METHODS**: CCK-8 assays were used to determine CORT conditions and the working concentrations of GEP and GET. Cell viability, total superoxide dismutase (T-SOD), and malondialdehyde (MDA) were integrated by multi-response desirability optimization. The candidate combination was validated in both cell lines. Reactive oxygen species (ROS), mitochondrial membrane potential (ΔΨm), and Nrf2, PINK1, and Parkin expression were assessed. **RESULTS**: CORT was used at 400 μmol/L in PC12 cells and 200 μmol/L in HT22 cells. GEP and GET working solutions were 200 μg/mL and 10 μg/mL, respectively. The three quadratic mixture models were not statistically significant (P=0.549, 0.500, and 0.181), and all predicted R^2 values were 0. The composite desirability was 0.632, yielding an exploratory GEP-to-GET working-solution ratio of 71:29 (V/V). The candidate combination increased cell viability and improved ROS and ΔΨm in both models (P<0.05 or P<0.01). During model development, MDA decreased and T-SOD increased. Treatment was also accompanied by higher Nrf2, PINK1, and Parkin protein expression (P<0.05 or P<0.01). **CONCLUSION**: The 71:29 candidate combination alleviated CORT-induced cellular stress injury *in vitro*. The findings support a combination advantage and mechanistic leads but do not establish supra-additive synergy, activation of a complete Nrf2-PINK1/Parkin pathway, or antidepressant efficacy *in vivo*.

KEYWORDS *Gastrodia elata* polysaccharide; *Gastrodia elata* ethanolic extract; mixture design; corticosterone; cellular stress injury; mitochondrial function; Nrf2; PINK1; Parkin