

滋肾活血方对2-VO模型大鼠海马CA1区线粒体自噬的调节及神经元再生的影响

赵梓婷¹, 伍大华^{2*}, 张秀丽^{3*}, 谢乐², 刘桐赫¹, 曾珊珊¹, 施佳仪¹,
姚婷², 谢瑶², 李映辰²

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006;
3. 湖南中医药大学 科技创新中心, 长沙 410208)

[摘要] 目的:探讨滋肾活血方通过调节线粒体自噬促进双侧颈总动脉永久性结扎(2-VO)模型大鼠海马CA1区神经元新生的作用机制。方法:2-VO法建立血管性痴呆大鼠模型,随机将60只SD大鼠分为假手术组、2-VO模型组、盐酸多奈哌齐组、滋肾活血方低、中、高剂量组(8.9、17.8、35.6 g·kg⁻¹)。Morris水迷宫实验检测各组逃避潜伏期、跨越平台次数;透射电镜观察海马CA1区线粒体自噬情况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测海马CA1区PTEN诱导激酶1(Pink1)、帕金森蛋白(Parkin) mRNA的表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马CA1区线粒体自噬信号通路相关蛋白Parkin、抗增殖蛋白2(PHB2)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)、动力学相关蛋白1(Drp1)蛋白的表达;Brdu法检测CA1区神经元再生情况。结果:与假手术组比较,2-VO模型组大鼠学习、空间记忆能力明显下降($P<0.05$),海马CA1区见线粒体结构受损,自噬溶酶体形成, Parkin、Pink1 mRNA及 Parkin、PHB2、Drp1蛋白明显上调($P<0.05$), Mfn2蛋白表达量明显降低($P<0.05$),海马CA1区神经元新生明显减少($P<0.05$)。与模型组比较,滋肾活血方干预后可明显提高2-VO模型大鼠的学习、空间记忆能力($P<0.05$),增加海马CA1区自噬小体数量并改善线粒体结构,进一步上调海马CA1区 Parkin、Pink1 mRNA及 Parkin、PHB2、Drp1蛋白表达($P<0.05, P<0.01$),下调 Mfn2蛋白表达($P<0.05, P<0.01$),增加海马CA1区神经元新生数量($P<0.05, P<0.01$)。结论:滋肾活血方对血管性痴呆大鼠海马CA1区神经元新生的促进作用与 Pink1/Parkin信号通路介导的线粒体自噬有关。

[关键词] 血管性痴呆; CA1区; 神经元新生; 线粒体分裂蛋白; 认知障碍; 滋肾活血方

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)20-0045-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221504

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220719.1738.007.html>

[网络出版日期] 2022-07-20 15:21

Effect of Zishen Huoxue Prescription on Regulation of Mitophagy and Neurogenesis in Hippocampal CA1 Region of Vascular Dementia Rats

ZHAO Ziting¹, WU Dahua^{2*}, ZHANG Xiuli^{3*}, XIE Le², LIU Tonghe¹, ZENG Shanshan¹, SHI Jiayi¹,
YAO Ting², XIE Yao², LI Yinchen²

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006, China; 3. Science and Technology Innovation Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Zishen Huoxue prescription on promoting neurogenesis in hippocampal CA1 region of vascular dementia (VD) rats by regulating mitophagy. **Method:**

[收稿日期] 2022-04-21

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81874462);湖南省重点研发计划项目(2020SK2123);湖南省教育厅优秀青年基金项目(19B426)

[第一作者] 赵梓婷,在读硕士,从事中医药防治脑病研究, E-mail:1447671882@qq.com

[通信作者] * 伍大华,主任医师,博士生导师,从事中医药防治脑病研究, E-mail:893049352@qq.com;

* 张秀丽,副研究员,硕士生导师,从事脑病发病机制及中医药防治研究, E-mail:103022926@qq.com

The 2-VO method was used to establish the VD rat model and 60 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, donepezil hydrochloride group, and Zishen Huoxue prescription low-dose ($8.9 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium-dose ($17.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose ($35.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) groups. Morris water maze test was performed to detect the escape latency and the number of crossing platform in each group. The expression of phosphatase and tensin homology-induced kinase 1 (PINK1) and Parkinson protein (Parkin) mRNA in hippocampal CA1 region was detected by Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). Western blot was used to determine the expression of mitochondrial autophagy signaling pathway-related proteins Parkin, prohibitin 2 (PHB2), mitofusin 2 (Mfn2) and dynamin-related protein 1 (Drp1) in hippocampal CA1 region. The neurogenesis in hippocampal CA1 region was tested by Brdu method. **Result:** Compared with the conditions in the sham operation group, the learning and spatial memory abilities of the model group were decreased ($P<0.05$), with damaged mitochondrial structure and autolysosome formation in the hippocampal CA1 region. The expressions of Parkin, Pink1 mRNA and Parkin, PHB2, and Drp1 proteins were up-regulated ($P<0.05$), while the expression of Mfn2 protein and the neuronal regeneration in hippocampal CA1 region were reduced ($P<0.05$, $P<0.05$). Compared with the conditions in the model group, Zishen Huoxue prescription enhanced the learning and spatial memory abilities of VD rats ($P<0.05$), increased the number of autophagosomes in hippocampal CA1 region and improved the mitochondrial structure. The expression of Parkin, Pink1 mRNA and Parkin, PHB2, and Drp1 proteins in hippocampal CA1 region was up-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$) while the expression of Mfn2 protein was down-regulated ($P<0.05$, $P<0.01$). The number of new neurons in hippocampal CA1 region was also increased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** The promoting effect of Zishen Huoxue prescription on the neurogenesis in hippocampal CA1 region of VD rats was related to the mitophagy mediated by Pink1/Parkin signaling pathway.

[Keywords] vascular dementia; CA1 region; neurogenesis; mitochondrial fission protein; cognitive impairment; Zishen Huoxue prescription

血管性痴呆(VD)是一组临床认知障碍综合征,多因缺血性、出血性脑卒中等脑血管疾病引起的脑区灌注不足所致^[1],我国血管性痴呆的发病率为1.1%~3.0%,并且随着当前中国老龄化进程的不断发展在逐年升高。血管性痴呆的预后普遍较差,其发病5年内的死亡率高达61%,明显高于其他类型的痴呆^[2],不仅给患者自身带来了极大的负担,也对社会带来了消极的影响。因此,进一步探究VD的发病机制并开展防治具有重要的意义。

海马CA1区神经元对于学习和记忆功能有着极其重要的作用^[3],同时也对脑缺血十分敏感^[4]。而脑缺血损伤会导致海马神经元线粒体功能损伤和障碍^[5]。线粒体自噬不仅是保护海马CA1区神经元免受缺血应激损伤的关键^[6],同时可以促进神经元细胞中线粒体进行更新换代,从而确保有大量健康的线粒体为神经元新生提供能量^[7]。神经系统相关疾病与PTEN诱导激酶1(Pink1)/帕金森蛋白(Parkin)信号通路诱导的线粒体自噬关系非常密切^[8]。有研究表明,超过50%的海马CA1神经元缺失会进一步导致认知障碍,且认知障碍性疾病发生

发展过程中恢复较差也与缺乏足够的神经元有关^[9]。因此,研究海马CA1区线粒体自噬及神经元的新生对于防治VD有着重要的意义^[10]。

当前,西医治疗对VD患者认知功能的改善作用有限,而中医立足于整体调节、辨证论治,具有多成分、多环节、多靶点的系统调节优势^[11]。滋肾活血方是本课题组在国医大师刘祖贻的带领下,总结50多年临床经验后形成的治疗血管性痴呆的效验方。前期的临床研究表明滋肾活血方能明显有效改善VD患者的认知障碍,延缓病情发展,临床疗效确切^[12-14]。课题组前期实验研究也表明滋肾活血方可改善双侧颈总动脉永久性结扎(2-VO)模型大鼠的海马损伤情况,提高其学习记忆能力^[15],但其具体作用机制不明。

本文拟围绕滋肾活血方对海马CA1区线粒体自噬的干预作用和对神经再生的影响进行研究,以期对血管性痴呆的中医临床治疗提供新的实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SPF级6周龄SD大鼠,体质量

220~250 g,从湖南斯莱克景达实验动物有限公司购入。合格证编号430727211102349131,于湖南中医药大学实验动物中心进行动物饲养及实验,使用许可证号SYXK(湘)2019-0009,环境温度控制在(25±2)℃,湿度为(60±5)%,所有大鼠适应性喂养7 d后开始实验,本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审查通过,审查号为LLBH-202003270001。

1.2 药物与试剂 滋肾活血方(制何首乌10 g、枸杞子21 g、桑葚21 g、五味子4 g、丹参21 g、粉葛21 g、益智仁7 g、石菖蒲7 g、郁金7 g、制远志7 g、全蝎2 g、山楂10 g,均为颗粒剂,购自四川新绿色药业科技发展有限公司,生产批号分别为21020068、21080009、20080008、21070116、21050010、20030112、20060161、20120087、21030024、21060005、20100102、21080088),使用时称取相应药物溶于蒸馏水配成中药混悬液,水浴加热至其完全溶解,4℃保存备用,灌胃前37℃水浴加热。盐酸多奈哌齐(浙江华海药业股份有限公司,批号1426A18002);逆转录试剂盒(美国Thermo Fisher公司,批号01125640);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(德国Qiagen公司,批号169031766);5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU,美国Sigma公司,货号B5002);BrdU、 β -肌动蛋白(β -actin)、线粒体融合蛋白2(Mfn2)、动力学相关蛋白1(Drp1)抗体、驴抗羊异硫氰酸荧光素(FITC)荧光二抗(英国Abcam公司,货号分别为ab1893、ab8226、ab260861、ab184247、ab150177);Parkin抗体(美国Santa公司,货号sc-32282);辣根过氧化物酶标记二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为SA00001-1、SA00001-2)。

1.3 仪器 SMART 3.0动物行为学视频分析系统(Panlab公司);HT7700型透射电子显微镜CC(日本Hitachi公司);CFX96型Real-time PCR仪、Mini-PROTEAN Tetra型电泳仪(美国Bio-Rad公司);LSM800型激光共聚焦显微镜(德国Zeiss公司);DYCZ-40D型转膜仪(中国北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模 通过2-VO法进行血管性痴呆大鼠模型的制备^[16],SD大鼠腹腔注射4%的戊巴比妥钠麻醉后固定,钝性分离左颈总动脉后对其进行双重结扎,结扎后缝合切口,给予青霉素肌肉注射20万U/只,预防术后感染。术后7 d后对另一侧颈总动脉进行同样的操作。假手术组仅分离左右颈

总动脉,不予结扎,其余操作均同前。造模结束后进行Morris水迷宫实验^[17],前4 d为训练,依次从4个象限将大鼠扔入,若大鼠未在60 s内站上平台,将其引导至平台上站立15 s,第5天从平台所在象限的对侧将大鼠扔入水池,各组大鼠上水中平台所需时间即为逃避潜伏期,60 s内未上则记为60 s,对每组的逃避潜伏期进行记录,以假手术组大鼠逃避潜伏期的平均值作为对照值,算出2-VO造模大鼠的平均逃避潜伏期与对照值之差占该鼠的平均逃避潜伏期的比值,若该值>20%则界定为2-VO模型造模成功^[18]。

2.2 分组给药 选取造模成功的大鼠,随机将其分为2-VO模型组、盐酸多奈哌齐组、滋肾活血方高、中、低剂量组,每组10只。滋肾活血方的灌胃剂量根据体表面积法计算相当于成人的临床常规等效剂量,将该剂量作为滋肾活血方中剂量组的灌胃剂量,即17.8 g·kg⁻¹,滋肾活血方低剂量组设为8.9 g·kg⁻¹,滋肾活血方高剂量组设为35.6 g·kg⁻¹。盐酸多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐水溶液0.000 45 g·kg⁻¹^[19],2-VO模型组和假手术组则给予等体积的生理盐水,灌胃给药时间为14 d。

2.3 指标检测

2.3.1 行为学检测 在末次灌胃后对各组大鼠再次进行定位航行实验,详细操作方法如2.1项,记录各组大鼠的逃避潜伏期。次日撤除原水下平台,对大鼠进行空间探索试验,记录60 s时间内大鼠穿越原水下平台所在位置的次数,最终以各组大鼠的逃避潜伏期和穿越原水下平台次数来对大鼠的学习能力、空间记忆能力进行测评。

2.3.2 Real-time PCR测定海马CA1区Parkin、Pink1 mRNA的表达 称取海马CA1区组织约30 mg,提取总RNA并测定浓度,按照逆转录试剂盒操作,将RNA逆转录为cDNA,Real-time PCR检测Parkin、Pink1的mRNA表达, Parkin上游5'-CCAACCTCAGACAAGGACACATCAG-3',下游5'-TGGCGGTGGTTACATTGGAAGAC-3',片段长度125 bp; Pink1上游5'-TACCGCTTCTCCGCAGT-3',下游5'-CGCCTGCTTCTCGATCA-3',片段长度150 bp; β -actin上游5'-TGTCACCAACTGGACGATA-3',下游5'-GGGGTGTGTTGAAGGTCTCAA-3',片段长度165 bp。扩增条件为95℃预变性120 s,95℃循环反应10 s,60℃退火60 s,95℃延伸15 s,进行40个循环;溶解曲线设置为60℃60 s、95℃15 s。

2.3.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马CA1区组织 Parkin、PHB2、Drp1、Mfn2蛋白的表达情况 称取海马CA1区组织,充分裂解、匀浆,12 000 r·min⁻¹离心15 min(离心半径7 cm,下同),取上清,并测定各组蛋白浓度,每孔上样30 μg,根据蛋白相对分子质量大小及实际情况设定电泳条件,冰浴条件下进行转膜,封闭1 h,加入β-actin(1:2 000)、Parkin(1:1 000)、PHB2(1:2 000)、Mfn2(1:1 000)、Drp1(1:1 000)一抗,4℃孵育过夜,PBST洗涤后加入相对应的二抗室温摇床孵育1 h,PBST洗涤,加入显影液后于化学发光成像系统下进行显影,用Image Lab软件对目的蛋白条带灰度值进行分析处理。

2.3.4 透射电镜观察海马CA1区线粒体结构及自噬情况 取材后迅速将海马组织置于4℃预冷的固定液中,然后将海马CA1区切成1 mm³的组织块,先置于2.5%戊二醛进行前固定,后置于1%锇酸中进一步固定,梯度丙酮脱水、包埋、烘箱烘烤48 h、修块,切成厚50 μm的超薄切片,醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后置于铜载网上,透射电镜观察海马CA1区线粒体结构及自噬情况。

2.3.5 Brdu检测海马CA1区神经元新生情况 Brdu用生理盐水稀释至为10 g·L⁻¹的质量浓度,每组大鼠取材前2 h使用Brdu溶液进行腹腔注射,给药剂量为100 mg·kg⁻¹[20]。灌注、取材、包埋、切片后,石蜡切片经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、柠檬酸钠高压修复、盐酸变性、硼酸盐缓冲液中和、封闭、滴加Brdu抗体4℃孵育过夜。次日滴加荧光二抗孵育30 min后封片。采用激光共聚焦显微镜进行观察,选取海马CA1区3个视野,应用Image J软件分析计算CA1区Brdu细胞的阳性细胞数量。

2.4 统计学分析 实验数据采用SPSS 26.0统计软件处理,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),组件两两比较用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时组间比较用邓尼特T3检验法,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对2-VO模型大鼠学习与空间记忆能力的影响 与假手术组比较,2-VO模型组大鼠的平均逃避潜伏期明显延长、跨越原平台次数明显减少(P<0.05),说明2-VO模型制备成功;与模型组比较,盐酸多奈哌齐组的逃避潜伏期显著缩短(P<0.01),跨越平台次数明显增多(P<0.05),滋肾活血方低、中、高剂量组的逃避潜伏期明显缩短(P<0.05),滋肾活

血方高剂量组的跨越平台次数明显增多(P<0.05)。滋肾活血方低、中剂量组的跨越平台次数与模型组相比差异无统计学意义。见表1。

表1 滋肾活血方对VD大鼠行为学的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 1 Effect of Zishen Huoxue prescription on behavior of VD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

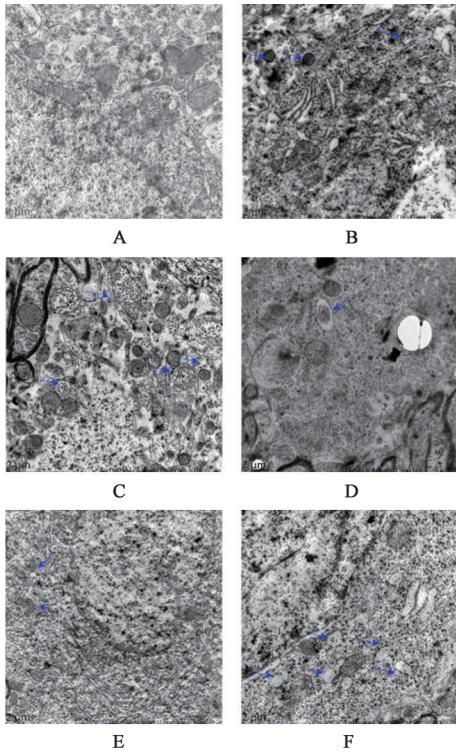
组别	剂量/g·kg ⁻¹	逃避潜伏期/s	跨越平台次数/次
假手术组		18.64±8.41	6.57±1.27
模型组		58.94±11.84 ¹⁾	1.93±0.88 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.000 45	27.60±10.40 ³⁾	4.29±1.38 ²⁾
滋肾活血方低剂量组	8.9	29.41±9.28 ²⁾	2.38±1.30
滋肾活血方中剂量组	17.8	27.64±12.15 ²⁾	3.30±1.34
滋肾活血方高剂量组	35.6	27.37±14.21 ²⁾	4.57±1.90 ²⁾

注:与假手术组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05,³⁾P<0.01(表2-表4同)

3.2 对2-VO模型大鼠海马CA1区线粒体结构及自噬的影响 透射电镜下可见假手术组大鼠海马CA1区线粒体数量较多,未见线粒体自噬结构。模型组海马CA1区线粒体可见结构损伤,内部嵴破坏严重甚至消失,基质颗粒减少呈现空泡状,自噬溶酶体形成。滋肾活血方高剂量组和盐酸多奈哌齐组线粒体结构较为正常,且自噬小体和自噬溶酶体等结构明显多于模型组,可见自噬泡包裹线粒体,提示线粒体自噬增多^[21]。见图1。

3.3 对2-VO模型大鼠海马CA1区 Parkin、Pink1 mRNA表达的影响 与假手术组比较,模型组Parkin mRNA、Pink1 mRNA的表达量均明显升高(P<0.05);与模型组比较,盐酸多奈哌齐组和滋肾活血方高剂量组的Parkin、Pink1 mRNA表达量显著升高(P<0.01),滋肾活血方中剂量组的Parkin mRNA显著增高(P<0.01)、Pink1 mRNA的表达量明显升高(P<0.05),滋肾活血方低剂量组差异无统计学意义。见表2。

3.4 对2-VO模型大鼠海马CA1区 Parkin、PHB2、Mfn2、Drp1蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组的Parkin、PHB2、Mfn2、Drp1蛋白表达均明显上调(P<0.05)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组的Parkin、PHB2、Drp1蛋白的表达明显上调(P<0.05),Mfn2蛋白表达量明显降低(P<0.05),滋肾活血方低、中剂量组的Parkin、PHB2、Drp1蛋白表达量差异无统计学意义,滋肾活血方中剂量组的Mfn2蛋白表达量明显降低(P<0.05),滋肾活血方高剂量组的Parkin蛋白表达量明显升高(P<0.05),滋肾活血方



注:A.假手术组;B.模型组;C.盐酸多奈哌齐组;D.滋肾活血方低剂量组;E.滋肾活血方中剂量组;F.滋肾活血方高剂量组(图2和图3同)

图1 滋肾活血方对VD大鼠CA1区线粒体结构及自噬的影响(透射电镜,×5 000)

Fig. 1 Effect of Zishen Huoxue prescription on level of mitophagy in CA1 region of VD rats (TEM, ×5 000)

高剂量组的PHB2、Drp1蛋白表达量显著升高($P < 0.01$), Mfn2蛋白表达量显著降低($P < 0.01$)。见

表3 滋肾活血方对VD大鼠海马CA1区Parkin、PHB2、Drp1、Mfn2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 3 Effect of Zishen Huoxue prescription on expression of Parkin, PHB2, Drp1, Mfn2 protein in hippocampal CA1 region of VD rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Parkin/ β -actin	PHB2/ β -actin	Drp1/ β -actin	Mfn2/ β -actin
空白组		0.58±0.02	0.61±0.11	0.69±0.13	0.91±0.03
模型组		0.99±0.44 ¹⁾	0.97±0.10 ¹⁾	0.94±0.97 ¹⁾	0.87±0.02 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.000 45	1.23±0.23 ²⁾	1.19±0.02 ²⁾	1.16±0.02 ²⁾	0.82±0.04 ²⁾
滋肾活血方低剂量组	8.9	1.01±0.23	0.88±0.11	0.92±0.15	0.86±0.06
滋肾活血方中剂量组	17.8	1.02±0.15	0.92±0.28	0.93±0.16	0.81±0.02 ²⁾
滋肾活血方高剂量组	35.6	1.21±0.24 ²⁾	1.21±0.02 ³⁾	1.25±0.10 ³⁾	0.79±0.11 ³⁾

3.5 对2-VO模型大鼠海马CA1区神经元新生的影响 与假手术组比较,模型组海马CA1新生神经细胞数目明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,盐酸多奈哌齐组CA1区新生神经细胞数目明显升高($P < 0.05$),滋肾活血方中剂量组新生神经细胞数目明显升高($P < 0.05$),高剂量组显著升高($P < 0.01$),低剂量组差异无统计学意义。见图3、表4。

表2 滋肾活血方对VD大鼠海马CA1区Parkin、Pink1 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effect of Zishen Huoxue prescription on expression of Parkin/Pink1 mRNA in hippocampal CA1 region of VD rats ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Parkin	Pink1
假手术组		0.90±0.31	1.01±0.17
模型组		1.35±0.05 ¹⁾	1.51±0.03 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.000 45	1.76±0.35 ³⁾	1.91±0.10 ³⁾
滋肾活血方低剂量组	8.9	1.77±0.12	1.71±0.13
滋肾活血方中剂量组	17.8	1.79±0.04 ³⁾	1.79±0.21 ²⁾
滋肾活血方高剂量组	35.6	2.12±0.03 ³⁾	1.93±0.11 ³⁾

图2、表3。

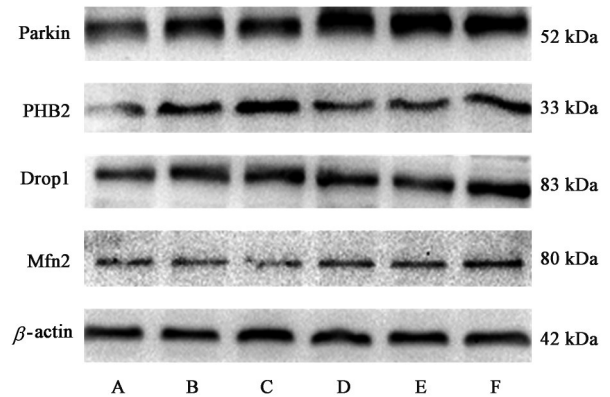


图2 大鼠海马CA1区组织Parkin、PHB2、Drp1、Mfn2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Parkin, PHB2, Drp1, Mfn2 protein expression in hippocampal CA1 region of VD rats

4 讨论

血管性痴呆在中医上属于“呆病”“健忘”等范畴^[22],其基本病机是“肾精阴虚、瘀阻脑络”,因此论治当以“滋肾填精、活血通络”为法。滋肾活血方中制首乌、枸杞子共为君药滋补肝肾;桑椹子补血养阴,益智仁滋肾助阳,两者共为臣药,可使化源得充,脑髓得到滋养。葛根升阳发表,丹参清心除烦,

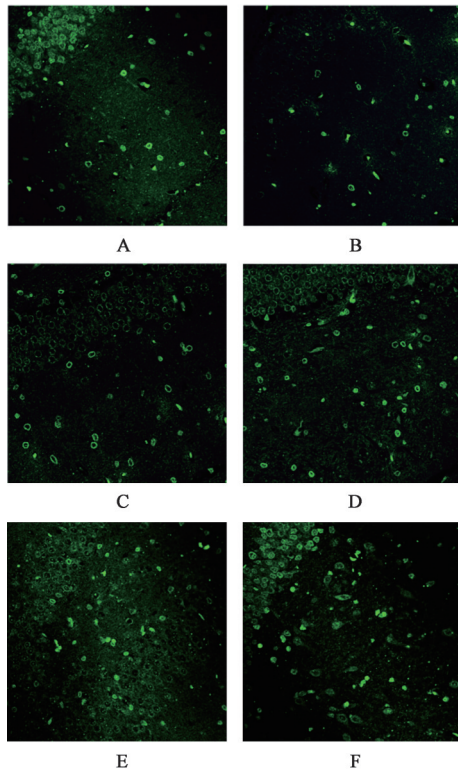


图3 滋肾活血方对VD大鼠海马CA1区神经元新生的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of Zishen Huoxue prescription on neuronal neogenesis in hippocampal CA1 region of VD rats (IF, ×200)

表4 滋肾活血方对VD大鼠海马CA1区神经元新生数目的影响(̄x±s, n=3)

Table 4 Effect of Zishen Huoxue prescription on number of neuron regeneration in hippocampal CA1 region of VD rats (̄x±s, n=3)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	新生神经元数目/个
假手术组		37.33±1.53
模型组		29.00±3.61 ¹⁾
盐酸多奈哌齐组	0.000 45	34.33±1.54 ²⁾
滋肾活血方低剂量组	8.9	30.67±4.16
滋肾活血方中剂量组	17.8	34.53±2.16 ²⁾
滋肾活血方高剂量组	35.6	36.67±1.50 ³⁾

五味子补肾宁心,远志镇惊安神,石菖蒲祛痰开窍,全蝎息风镇惊,六药均为佐。郁金祛瘀止血,山楂消食健胃,两者共为使药。全方从配伍上看具有活血通窍、滋阴补肾、益智安神的功效。

2-VO模型通过结扎双侧颈总动脉可以模拟VD患者脑内的病理生理变化和认知功能障碍^[23]。水迷宫结果显示,与假手术组比较,2-VO模型大鼠的逃避潜伏期明显延长,穿越平台次数明显减少,说明模型组大鼠学习记忆能力下降,与血管性痴呆

的临床表现相符,而滋肾活血方干预可显著提升模型组大鼠的学习记忆能力。

海马CA1区比CA3区和DG区对2-VO诱导的缺血更敏感^[24],本研究中电镜观察的结果表明,2-VO模型大鼠海马CA1区发生了明显的线粒体结构破坏,并伴随自噬小体形成。而滋肾活血方在显著提升2-VO模型大鼠的学习与记忆能力的同时进一步增加了海马CA1区自噬小体和自噬溶酶体的数量,减低了线粒体结构损伤。提示滋肾活血方对2-VO模型大鼠认知障碍的改善作用与线粒体自噬的进一步激活有关。这与魏思灿等^[25]等研究结果相一致。

Pink1/Parkin作为一条经典线粒体自噬通路^[26],在VD的发生发展中起着重要的作用。线粒体分裂是自噬发生的必要条件,线粒体分裂蛋白Drp1负责隔离受损部分线粒体^[27],而Pink1通过稳定在受损线粒体外膜上招募胞浆中的Parkin, Parkin通过一系列泛素化反应后诱发线粒体自噬^[28-29],线粒体融合蛋白Mfn2作为Parkin的底物会被蛋白酶降解从而抑制线粒体融合促进自噬^[30],PHB2作为该通路的下游蛋白,会在线粒体自噬发生时从线粒体内膜向外暴露,有助于功能障碍的线粒体被自噬小体所包裹,促进受损线粒体的清除^[31-32]。本实验结果表明滋肾活血方治疗海马CA1区组织Parkin、Pink1 mRNA及Parkin、PHB2、Drp1蛋白表达较模型组显著上升,而Mfn2蛋白的表达显著下调,提示,滋肾活血方对VD大鼠海马CA1区线粒体自噬的促进作用可能与Pink1/Parkin信号通路有关。该结果也进一步验证了滋肾活血方对线粒体自噬的激活作用。

研究表明线粒体功能障碍会导致神经元新生减少,引发一系列认知性障碍疾病^[33],而线粒体自噬可通过清除功能障碍的线粒体从而促进神经元新生^[34],新生的神经元会进一步整合至现有的神经通路中,促进神经功能的恢复^[35]。本研究结果表明滋肾活血方在增加自噬小体和自噬溶酶体数量、改善线粒体结构、上调线粒体自噬相关蛋白表达的同时促进了海马CA1区神经元新生,提示滋肾活血方可能通过上调线粒体自噬水平促进神经元再生。

综上所述,滋肾活血方可能通过干预Pink1/Parkin这一经典自噬通路上调线粒体自噬水平,从而促进海马CA1区神经元再生,改善2-VO模型大鼠的学习和空间记忆能力。该实验结果对于研究VD的发生发展有着积极的作用,并为临床治疗提供了一个新的思路与靶点。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] IADECOLA C. The pathobiology of vascular dementia [J]. *Neuron*, 2013, 80(4):844-866.
- [2] WANG W, QIAO O, JI H, et al. Autophagy in vascular dementia and natural products with autophagy regulating activity [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105756.
- [3] OGNJANOVSKI N, SCHAEFFER S, WU J, et al. Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation[J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 15039.
- [4] LIANG R, PANG Z P, DENG P, et al. Transient enhancement of inhibitory synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons after cerebral ischemia[J]. *Neuroscience*, 2009, 160(2):412-418.
- [5] TANG J, HU Z, TAN J, et al. Parkin protects against oxygen-glucose deprivation/reperfusion insult by promoting Drp1 degradation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:8474303.
- [6] LI Q, ZHANG T, WANG J, et al. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 444 (2) : 182-188.
- [7] SHENG Z H. The interplay of axonal energy homeostasis and mitochondrial trafficking and anchoring[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(6):403-416.
- [8] EGAN D F, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy[J]. *Science*, 2011, 331(6016):456-461.
- [9] CASTELLAZZI M, PATERGNANI S, DONADIO M, et al. Autophagy and mitophagy biomarkers are reduced in sera of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1):20009.
- [10] OZGEN S, KRIGMAN J, ZHANG R, et al. Significance of mitochondrial activity in neurogenesis and neurodegenerative diseases[J]. *Neural Regen Res*, 2022, 17(4): 741-747.
- [11] CHANG D, LIU J, BILINSKI K, et al. Herbal medicine for the treatment of vascular dementia: An overview of scientific evidence [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016:7293626.
- [12] 杨维华,周慎,刘芳,等. 滋肾健脑法对脑萎缩肾阴虚血瘀证主症及智能状态的影响[J]. *光明中医*, 2004, 19(5):45-46.
- [13] 周慎,杨维华,李佑生,等. 益肾健脑颗粒剂对脑萎缩肾阴虚血瘀证主症及血流变的影响[J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(2):100-102.
- [14] 伍大华,姚婷,蒋军林,等. 滋肾活血法治疗血管性痴呆肾阴虚血瘀证的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2015, 13(12):1372-1374.
- [15] 任晨斌,伍大华,张发友,等. 滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马形态学的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2017, 37(10):1082-1085.
- [16] HU Z, HU K, WANG R, et al. Differentially expressed genes accompanying neurobehavioral deficits in a modified rat model of vascular dementia [J]. *Neurosci Lett*, 2021, 750:135774.
- [17] YUAN Z, ZHOU H, ZHOU N, et al. Dynamic evaluation indices in spatial learning and memory of rat vascular dementia in the morris water maze [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):7224.
- [18] 张杰,周媛,马云枝,等. 基于PI3K/Akt/mTOR通路探讨补肾通络方对血管性痴呆大鼠海马神经元突触可塑性的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27 (18):25-31.
- [19] 刘晓霞. 益髓法对实验性血管性痴呆大鼠海马区BDNF表达影响的研究[D]. 长春:长春中医药大学, 2017.
- [20] 孟盼,杨琴,杨蕙,等. 百事乐胶囊对抑郁模型大鼠海马隔颞轴神经再生的影响[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(3):169-172.
- [21] ANZELL A R, MAIZY R, PRZYKLENK K, et al. Mitochondrial quality control and disease: Insights into ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3):2547-2564.
- [22] 陈昭,吴林,蓝雪琳,等. 血管性痴呆发病机制中西医结合研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(1): 40-44.
- [23] HEGELE R A, DICHGANS M. Advances in stroke 2009: Update on the genetics of stroke and cerebrovascular disease 2009[J]. *Stroke*, 2010, 41(2): e63-e66.
- [24] LUO P, LU Y, LI C, et al. Long-lasting spatial learning and memory impairments caused by chronic cerebral hypoperfusion associate with a dynamic change of HCN1/HCN2 expression in hippocampal CA1 region [J]. *Neurobiol Learn Mem*, 2015, 123:72-83.
- [25] 魏思灿,林天来,黄玲,等. 槲皮素通过PINK1/parkin通路激活线粒体自噬减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(12):2251-2257.
- [26] 李和梅,蒋怡萱,黄盼玲,等. 人参皂苷Rg₁通过激活

- PINK1/parkin增强线粒体自噬保护A β 损伤的PC12细胞[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2):484-491.
- [27] SULKSHANE P, RAM J, THAKUR A, et al. Ubiquitination and receptor-mediated mitophagy converge to eliminate oxidation-damaged mitochondria during hypoxia[J]. Redox Biol, 2021, 45:102047.
- [28] GEISLER S, HOLMSTRÖM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(2):119-131.
- [29] PARK Y S, CHOI S E, KOH H C. PGAM5 regulates PINK1/Parkin-mediated mitophagy via DRP1 in CCCP-induced mitochondrial dysfunction[J]. Toxicol Lett, 2018, 284:120-128.
- [30] 黄健, 卢博, 邹前, 等. Mfn2调节线粒体自噬[J]. 吉林医药学院学报, 2018, 39(1):59-61.
- [31] ZHANG T, WU P, BUDBAZAR E, et al. Mitophagy reduces oxidative stress via Keap1 (Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1)/Nrf2 (nuclear factor-E₂-related factor 2)/PHB2 (prohibitin 2) pathway after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Stroke, 2019, 50(4):978-988.
- [32] DI RIENZO M, ROMAGNOLI A, CICCOSANTI F, et al. AMBRA1 regulates mitophagy by interacting with ATAD3A and promoting PINK1 stability [J]. Autophagy, 2022, 18(8):1752-1762.
- [33] KHACHO M, CLARK A, SVOBODA D S, et al. Mitochondrial dysfunction underlies cognitive defects as a result of neural stem cell depletion and impaired neurogenesis [J]. Hum Mol Genet, 2017, 26(17):3327-3341.
- [34] RUTH B. Mitochondrial metabolism-mediated regulation of adult neurogenesis[J]. Brain Plast, 2017, 3(1):73-87.
- [35] NING W J, LV R J, XU N, et al. Lycopene-loaded microemulsion regulates neurogenesis in rats with A β -induced Alzheimer's disease rats based on the Wnt/ β -catenin pathway [J]. Neural Plast, 2021, 2021:5519330.

[责任编辑 周冰冰]