

基于 Drp1 调控线粒体质量控制探讨地黄饮子对 A β 诱导 HT22 细胞氧化损伤的干预作用

宋琳¹, 陈绒绒¹, 朴钟源^{2*}

1. 惠州学院 生命科学学院, 广东 惠州 516007

2. 惠州市第三人民医院 广州医科大学附属惠州医院 神经内科, 广东 惠州 516002

摘要: 目的 基于动力相关蛋白 1 (Drp1) 与 PTEN 诱导激酶 1 (PINK1) /E3 泛素-蛋白连接酶 (PINK1/Parkin) 协同调控线粒体质量控制 (MQC), 探讨地黄饮子 (DHYZ) 含药血清对 β -淀粉样蛋白 (A β)₂₅₋₃₅ 致 HT22 细胞氧化损伤的影响。方法 SD 大鼠 ig DHYZ (生药量 90 g·kg⁻¹), 每天 2 次, 连续 5 d, 末次给药 1 h, 腹主动脉取血制备含药血清。DHYZ (5% 含药血清) 预给药 30 min 后, 添加 A β ₂₅₋₃₅ (10 μ mol·L⁻¹) 诱导 HT22 细胞建立阿尔茨海默病 (AD) 体外模型, 继续培养 24 h, DCFH-DA 探针检测活性氧 (ROS) 含量, Calcein AM 探针检测线粒体膜通透性转换孔 (MPTP) 开放情况, ELISA 法检测细胞 A β ₁₋₄₂ 含量, 研究 DHYZ 对氧化损伤影响; 透射电镜观察自噬小体; Western blotting 检测 Drp1、线粒体融合素 1 (Mfn1)、Mfn2、视神经萎缩 1 (Opa1)、PINK1、Parkin、LC3B、苜氯素 1 (Beclin1) 的表达。预给药 Drp1 抑制剂 Mdivi-1、DHYZ (5% 含药血清)、Mdivi-1 + DHYZ 30 min, 添加 A β ₂₅₋₃₅ 诱导 HT22 细胞建立 AD 体外模型, 继续培养 24 h, Western blotting 检测总细胞、细胞质和线粒体中 Drp1 表达, 免疫荧光检测线粒体 Drp1 含量, Western blotting 检测线粒体自噬蛋白 PINK1、Parkin 表达。结果 与模型组比较, DHYZ 组 A β 含量显著降低 ($P < 0.01$), 线粒体绿色荧光信号增强 ($P < 0.05$), ROS 荧光强度降低 ($P < 0.05$); DHYZ 显著降低 Drp1 表达水平 ($P < 0.05$), 提高 Mfn1、Mfn2、Opa1 表达水平 ($P < 0.05$), DHYZ 组 PINK1、Parkin、LC3B ($P < 0.05$) 和 Beclin1 ($P < 0.01$) 表达显著下降; 电镜显示 DHYZ 组线粒体结构正常, 偶见自噬体。与模型组比较, Mdivi-1 组和 DHYZ 组细胞内 Drp1 ($P < 0.05$) 和线粒体 Drp1 ($P < 0.01$) 表达降低, 胞质 Drp1 表达升高 ($P < 0.01$), 表明给药后能阻止线粒体聚集; DHYZ 组 PINK1 ($P < 0.05$)、Parkin ($P < 0.01$) 表达下调, DHYZ + Mdivi-1 组效果最明显 ($P < 0.01$ 、0.001)。结论 DHYZ 防治 AD 可能抑制 Drp1 介导的线粒体分裂, 调节线粒体自噬 PINK1/Parkin 通路, 进而调控 MQC 链。

关键词: 地黄饮子; 阿尔茨海默病; 线粒体质量控制; 线粒体动力学; 线粒体自噬

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 6376(2026)04 - 1130 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.04.004

Exploring intervention effect of Dihuang Yinzi on A β -induced oxidative damage in HT22 cells based on Drp1 regulation of mitochondrial quality control

SONG Lin¹, CHEN Rongrong¹, PIAO Zhongyuan²

1. School of Life Science, Huizhou University, Huizhou 516007, Chin

2. Department of Neurology, Huizhou Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, The Third People's Hospital of Huizhou, Huizhou 516002, China

Abstract: Objective Based on the synergistic regulation of mitochondrial quality control (MQC) by dynamin related protein 1 (Drp1) and PTEN inducible putative kinase 1/E3 ubiquitin protein ligase (PINK1/Parkin), to explore the effect of Dihuang Yinzi (DHYZ) containing serum on the oxidative damage of HT22 cells induced by β - amyloid (A β)₂₅₋₃₅. **Methods** SD rats were ig administered

收稿日期: 2025-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81673860); 惠州学院自主创新能力提升计划“中医药认知障碍防治创新团队” (HZU202508); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (202510577030)

作者简介: 宋琳 (1975—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治认知障碍疾病防治法及作用机制。

E-mail: drsonglin@163.com

*通信作者: 朴钟源 (1974—), 男, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为认知障碍相关疾病机制及药物干预。

E-mail: piaozhongyuan@126.com

with DHYZ (90 g·kg⁻¹ crude drug) twice a day for 5 consecutive days. One hour after the last administration, blood was collected from the abdominal aorta to prepare drug-containing serum. After pre-administration of DHYZ (5% drug-containing serum) for 30 min, A β ₂₅₋₃₅ (10 μ mol·L⁻¹) was added to induce an AD *in vitro* model in HT22 cells, and the cells were further cultured for 24 h. The content of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA probe, the opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) was detected by Calcein AM probe, and the content of A β ₁₋₄₂ in cells was detected by ELISA to study the effect of DHYZ on oxidative damage. Autophagosomes were observed by transmission electron microscopy, and the expressions of Drp1, Mfn1, Mfn2, Opa1, PINK1, Parkin, LC3B, and Beclin1 were detected by Western blotting. Drp1 inhibitor Mdivi-1, DHYZ (5% drug-containing serum), and Mdivi-1 + DHYZ were pre-administered for 30 min, and A β ₂₅₋₃₅ was added to induce an AD *in vitro* model in HT22 cells. After 24 h of further culture, the expression of Drp1 in total cells, cytoplasm, and mitochondria was detected by Western blotting, the content of mitochondrial Drp1 was detected by immunofluorescence, and the expressions of mitochondrial autophagy proteins PINK1 and Parkin were detected by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the A β content in the DHYZ group was significantly decreased ($P < 0.01$), the green fluorescence signal of mitochondria was enhanced ($P < 0.05$), and the fluorescence intensity of ROS was decreased ($P < 0.05$). DHYZ significantly decreased the expression level of Drp1 ($P < 0.05$), and increased the expression levels of Mfn1, Mfn2, and Opa1 ($P < 0.05$). The expressions of PINK1, Parkin, and LC3B ($P < 0.05$) and Beclin1 ($P < 0.01$) in the DHYZ group were significantly decreased. Electron microscopy showed that the mitochondrial structure in the DHYZ group was normal, and autophagosomes were occasionally observed. Compared with the model group, the expressions of Drp1 in cells ($P < 0.05$) and mitochondria ($P < 0.01$) in the Mdivi-1 group and DHYZ group were decreased, and the expression of Drp1 in the cytoplasm was increased ($P < 0.01$), indicating that administration could prevent mitochondrial aggregation. The expressions of PINK1 ($P < 0.05$) and Parkin ($P < 0.01$) in the DHYZ group were down-regulated, and the effect was most obvious in the DHYZ + Mdivi-1 group ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** DHYZ can prevent AD by inhibiting drp1-mediated mitochondrial division, regulating mitochondrial autophagy PINK1/parkin pathway, and then regulating the mitochondrial quality control chain.

Key words: Dihuang Yinzi; Alzheimer's disease; mitochondrial quality control; mitochondrial dynamics; mitophagy

阿尔茨海默病 (AD) 属于中枢神经系统退行性疾病, 临床特征主要包括认知功能障碍和记忆损害等。AD 发病人数持续攀升, 给家庭和社会经济带来沉重负担, 研发有效防治药物迫在眉睫^[1-2]。中医认为 AD 主要是髓髓消减、神机失用所致。肾虚则肾精不足, 痰浊可蒙蔽清窍, 二者使脑窍失于充养, 发为痴呆。因此, 肾虚痰阻为 AD 的关键病机, 肾虚为本, 痰阻为标。肾虚痰阻致痴呆的观点被历代医家所认同, 且在文献中有所阐述。针对肾元虚衰、痰浊阻滞所致 AD, 应当补肾化痰, 标本兼治。地黄饮子作为补肾化痰之经典方剂, 在治疗 AD 方面能做到标本兼顾。地黄饮子 (DHYZ) 出自《宣明论方》, 主要用于治疗下元虚衰, 痰浊上泛之暗瘖症。肾主骨藏精, 肾元虚衰, 阴阳两虚, 筋骨失养则痿软无力不能行, 导致“瘖”; 虚阳上浮, 痰浊上泛则堵塞窍道, 故舌强不能语, 导致“暗”。本课题组对 DHYZ 进行系列实验研究, 研究表明 DHYZ 通过调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路调节自噬改善氧化应激损伤, 提升双转基因 AD 小鼠学习记忆能力^[3-4]; 体外实验揭示其作用机制与改善线粒体能量代谢相关^[5-6]。然而, DHYZ 能否通过调节线粒体质量控制 (MQC) 发挥神经保护作用尚未

明确。本研究聚焦 MQC 调控机制, 深入探讨 DHYZ 防治 AD 的作用靶点, 为阐释经典方剂现代药理机制及创新中药研发提供科学依据。

1 材料

1.1 动物和细胞

SD 大鼠 30 只, SPF 级, 雄性, 体质量 (280 ± 20) g, 由黑龙江大学动物安全评价中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (黑) 2018-003。动物实验已获得惠州学院实验动物福利伦理委员会批准, 批准文号 HZUDIAC2533。小鼠海马神经元细胞 (HT22), 购买自上海博蕴生物科技有限公司。

1.2 实验药物、主要试剂和仪器

DHYZ 方剂所用全部药材均购自北京同仁堂哈尔滨分店, 并经黑龙江中医药大学基础医学院桑希生教授鉴定为正品, 包括熟地 (批号 22030301)、巴戟天 (批号 22030301)、山茱萸 (批号 220801)、肉苁蓉 (批号 20220211)、麦冬 (批号 220801)、石斛 (批号 20220629)、附子 (批号 220301)、肉桂 (批号 220802)、茯苓 (批号 220802)、石菖蒲 (批号 210801)、远志 (批号 220401)、五味子 (批号 220801), 以上药材用量均为 15 g; 薄荷 (批号 20220323) 10 g; 生姜、大枣各 5 g。复方煎汤方法:

浸泡 1 h 后煎煮 2 次, 浓缩至质量浓度 $3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 封口存放至 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。参考课题组前期研究^[7]和马涛^[8]研究团队采用超高效液相色谱-高分辨质谱 (UPLC-HRMS) 对 DHYZ 的分析结果, 共鉴定出毛蕊花糖苷、 β -谷甾醇、马钱子苷、松果菊苷、五味子醇甲等 11 种成分, 其中毛蕊花糖苷质量分数为 0.10%、 β -谷甾醇质量分数为 0.08%。

β 淀粉样蛋白 ($\text{A}\beta_{25-35}$, 美国 MCE 公司, 批号 240488); 维生素 E (广州白云山星群药业, 批号 33033033); CCK8 检测试剂盒 (大连美仑生物公司, 批号 MA0218-Jun-15I); 活性氧 (ROS)、线粒体通透性转换孔 (MPTP) 检测试剂盒 (上海碧云天生物公司, 批号 060722220825、061622230327); Mouse $\text{A}\beta_{1-42}$ ELISA Kit (上海江莱生物公司, 批号 110335009113861103); 线粒体动力相关蛋白 1 (Drp1) 抗体 (英国 abcam 公司, 批号 10024491); 线粒体融合素 1 (Mfn1) 抗体 (上海碧云天生物技术有限公司); Mfn2、视神经萎缩 1 (Opa1)、PTEN 诱导激酶 1 (PINK1)、苊氯素 1 (Beclin1) 抗体 (武汉三鹰生物公司, 批号 00121537、00105949、00115469、00122143); Parkin、LC3B 抗体 (成都正能生物技术公司, 批号 M30MY12、M04MY01); 山羊抗兔 IgG、山羊抗小鼠 IgG (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 015122220809、031722220824); Mdivi-1 (美国西格玛公司, 批号 338967-87-6)。

1.3 主要仪器

Heracell 150i 型 CO_2 细胞培养箱、EVOS[®]FL Color AMF4300 型荧光倒置显微镜 (美国赛默飞世尔科技公司); DYCZ-24DN 电泳仪 (北京市六一仪器厂); Synergy H1 酶标仪 (美国 BIOTEK 公司); HITACHI HT7800 型透射电子显微镜、Hitachi TEM system 透射电子显微镜成像系统 (日本日立公司)。

2 方法

2.1 DHYZ 含药血清的制备

基于本课题前期工作^[5-6]给 30 只 SD 大鼠 ig DHYZ (生药量 $90 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、给药体积 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), 对照组 ig 等量蒸馏水, 每天 2 次, 连续 5 d。末次给药 1 h, 腹主动脉取血。

2.2 DHYZ 对 $\text{A}\beta$ 诱导 HT22 氧化应激和 MQC 的影响

2.2.1 实验分组及药物处理方案 基于本课题组前期研究^[5-6]及文献报道^[9], 实验设置对照组 (5%

空白血清)、模型组 (5%空白血清)、DHYZ (5%含药血清) 组、维生素 E (阳性药, $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)^[7]组, 预给药 30 min, 除对照组外加入 $\text{A}\beta_{25-35}$ ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)^[5] 建立 AD 体外模型。

2.2.2 DCFH-DA 法检测细胞内 ROS 含量 取 1 瓶生长密度约 80% 的 HT22 细胞, 消化离心后以密度 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中, 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 12 h; 按照 “2.2.1” 项方法分组加药处理, 并于培养箱继续培养 24 h; 将细胞再次消化离心重悬, 每组取部分细胞悬液接种于 12 孔板中, 使之重新贴壁。加入终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 20 min。去上清, DMEM/F-12 培养基 $500 \mu\text{L}$ 进行 3 次清洗, 利用荧光倒置显微镜观察, Image J 分析荧光强度。

2.2.3 Calcein AM 法检测 MPTP 开放情况 取一瓶生长密度为 80% 左右的 HT22 细胞, 消化离心后以密度 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板中, 于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养 12 h; 按照 “2.2.1” 项方法分组加药处理, 于培养箱继续培养 24 h; 培养结束后, 将细胞再次消化离心重悬, 按需取每组部分细胞悬液接种于 96 孔板中, 使之重新贴壁。Calcein AM 染色液加 CoCl_2 ($100\times$), 配制成荧光淬灭工作液 (终浓度为 $1\times$) $100 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱避光孵育 30 min, 吸除染料, 加入完全培养基 (预热), 孵育 (避光) 30 min; 去培养液, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 加检测缓冲液, 利用荧光倒置显微镜观察拍照, Image J 分析荧光强度。

2.2.4 ELISA 法检测 HT22 细胞 $\text{A}\beta_{1-42}$ 含量 取一瓶生长密度为 80% 左右的 HT22 细胞, 以密度 5×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中, 按照 “2.2.1” 项方法分组加药处理 24 h。收集细胞上清液于灭菌离心管中, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $1000\times g$ 离心 20 min, 取上清检测。加 $100 \mu\text{L}$ 标准品或样品, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 弃液, 加 $100 \mu\text{L}$ 生物素工作液, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; 弃液, 洗涤后, 加 $100 \mu\text{L}$ 酶结合物工作液, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 加 $90 \mu\text{L}$ TMB, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min; 加终止液, 450 nm 波长测定吸光度 (A) 值。

2.2.5 Western blotting 检测 Drp1、Mfn1、Mfn2、Opa1、PINK1、Parkin、LC3B、Beclin1、 β -actin 的表达 细胞接种、分组及给药方式同 “2.2.4” 项, 收集细胞, 提取、测定总蛋白。SDS-PAGE 分离总蛋白, 后转印至 PVDF 膜, 封闭处理。将 PVDF 膜转至孵育盒并与适量一抗 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜 (Beclin1 稀释

比例 1 : 5 000, 其他均 1 : 1 000; β -actin 来源为 Mouse, 其他均为 Rabbit), 二抗温室孵育 1 h, ECL A/B 避光混合, 添加至膜上、显影, 调节不同的曝光时间, Image J 条带图像分析。

2.2.6 透射电镜观察自噬体 设置对照组、模型组、DHYZ 组, 细胞接种、培养及给药方式同“2.2.4”项, 胰酶消化后收集细胞, 加完全培养基低速离心, 得到绿豆大小细胞沉淀。去除上清, 加 2.5%戊二醛固定液, 吹散重悬细胞团。1%锇酸固定 2 h。包埋, 后固化, 脱水, 渗透包埋, 固化, 切片, 染色, 镜下观察。

2.3 运用 Mdivi-1 观察 DHYZ 对 $A\beta$ 诱导 HT22 细胞 MQC 的影响

2.3.1 Mdivi-1 对 $A\beta$ 诱导 HT22 细胞活力的影响 HT22 细胞以 5×10^4 个 \cdot mL⁻¹ 接种于 96 孔板中, 于 37 °C 培养箱培养 12 h, 设置对照组、模型组、Mdivi-1 (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 μ mol \cdot L⁻¹) 预处理 0.5、1.0、2.0 h 组, 对照组与模型组不加药; 除对照组外, 均添加 $A\beta_{25-35}$ (10 μ mol \cdot L⁻¹), 继续培养 24 h, CCK-8 试剂盒法检测 A 值。

2.3.2 实验分组及药物处理方案 实验设置对照组 (5%空白血清)、模型组 (5%空白血清)、DHYZ 组 (5%含药血清)、Mdivi-1 (5 μ mol \cdot L⁻¹) 组、DHYZ (5%含药血清) + Mdivi-1 (5 μ mol \cdot L⁻¹) 组, Mdivi-1 和 DHYZ 预给药 30 min, 除对照组外, 加入 $A\beta_{25-35}$ (10 μ mol \cdot L⁻¹) 建立 AD 体外模型, 继续培养 24 h。

2.3.3 Western blotting 法检测细胞内、细胞质和线粒体中 Drp1 的表达 HT22 细胞以密度 5×10^4 个 \cdot mL⁻¹ 接种于 6 孔板中, 按照“2.3.2”项方法分组加药处理。细胞线粒体与胞浆分离: 收集细胞, 加线粒体分离试剂, 匀浆离心得线粒体和胞浆。线粒体加入 200 μ L 线粒体裂解液, 胞浆蛋白和线粒体添加蛋白上样缓冲液, 99 °C 煮沸 5 min, -20 °C 保存。Western blotting 法检测 Drp1 蛋白表达, 具体操作同“2.2.5”项。

2.3.4 免疫荧光检测 Drp1 线粒体募集情况 HT22 细胞悬液以 5×10^4 个 \cdot mL⁻¹ 接种于 24 孔板, 按照“2.3.2”项方法分组加药处理。加 PBS 摇床洗涤 2 次, 结束加 4%多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤, 加通透液, 摇床孵育 20 min, 再加 PBS 洗涤; 加山羊血清摇床避光孵育 1 h, PBS 洗涤; 孵育 Drp1 一抗 (1 : 200), 摇床 4 °C 过夜, PBS 洗涤 3 次; 1 : 500 二抗避光孵育 1 h, PBS 洗涤 3 次, 加 Hoechst

10 min 进行染核, PBS 洗涤 3 次, 利用荧光倒置显微镜观察, Image J 分析荧光强度。

2.3.5 Western blotting 法检测 PINK1、Parkin 的蛋白表达 细胞接种及给药方式同“2.3.3”项, 提取总蛋白, Western blotting 法检测 PINK1、Parkin 的蛋白表达, 具体操作同“2.2.5”项。

2.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 26.0 和 Graph Prism 软件进行数据处理及统计分析, 组间差异采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA)。

3 结果

3.1 DHYZ 调节 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平

与对照组比较, 模型组的 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, DHYZ 和维生素 E 组 $A\beta_{1-42}$ 水平均显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结果见表 1。

表 1 各组 HT22 细胞 $A\beta_{1-42}$ 分泌水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 1 $A\beta_{1-42}$ secretion levels of HT22 cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	$A\beta_{1-42}/(\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1})$
对照	—	5 589.62 \pm 675.73
模型	—	16 627.32 \pm 2 070.48 ^{###}
DHYZ	5%含药血清	10 759.92 \pm 1 797.71 ^{**}
维生素E	100 μ g \cdot mL ⁻¹	5 674.27 \pm 960.68 ^{***}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

3.2 DHYZ 调节 MPTP 开放

对照组线粒体绿色荧光信号高, 模型组显著降低 ($P < 0.05$); 相较于模型组, DHYZ 和维生素 E 组荧光信号显著增强 ($P < 0.05$), 结果提示药物均可以抑制 MPTP 开放, 结果见图 1、表 2。

3.3 DHYZ 调节 ROS 含量

对照组细胞内荧光强度较低, ROS 含量处于正常水平; 经 $A\beta$ 作用后, 细胞内荧光强度显著提高 ($P < 0.01$), 说明 $A\beta$ 导致 HT22 细胞 ROS 急剧增加。相较于模型组, DHYZ、维生素 E 组荧光强度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示 DHYZ 可以有效抑制细胞内 ROS 异常增加。结果见图 1、表 2。

3.4 DHYZ 对 $A\beta$ 诱导 HT22 细胞 MQC 的影响

3.4.1 DHYZ 对线粒体动力学相关蛋白的影响 结果如图 2、表 3 所示, 与对照组相比, 模型组线粒

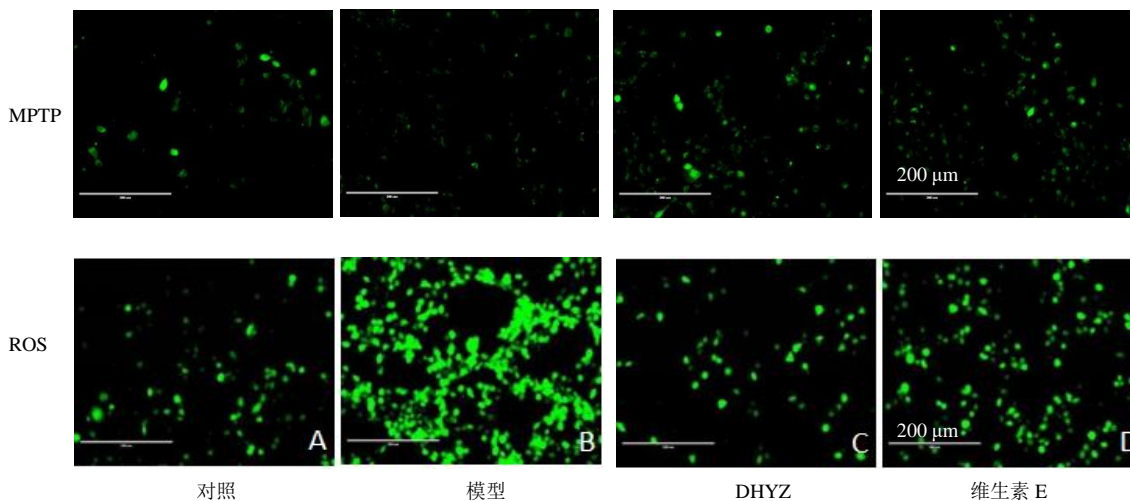


图 1 各组 HT22 细胞 MPTP 的开放情况及 ROS 水平

Fig. 1 Opening status of MPTP and level of ROS in each group of HT22 cells

表 2 各组 HT22 细胞 MPTP 的开放情况及 ROS 水平
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Opening status of MPTP and level of ROS in each group of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	MPTP 荧光值	ROS 荧光值
对照	—	17.01 ± 2.18	33.60 ± 8.67
模型	—	8.49 ± 0.25 [#]	65.94 ± 11.99 ^{##}
DHYZ	5% 含药血清	15.48 ± 0.52 [*]	45.49 ± 2.84 [*]
维生素 E	100 μg·mL ⁻¹	15.93 ± 4.78 [*]	41.65 ± 10.99 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

体分裂蛋白 Drp1 表达显著提高 ($P < 0.01$), Mfn1 ($P < 0.01$)、Mfn2 ($P < 0.01$)、Opa1 ($P < 0.05$) 3 种线粒体融合蛋白表达显著降低, 表明 Aβ 导致细胞线粒体分裂增加, 线粒体融合减少。经 DHYZ 处理后, 此现象得到逆转, 与模型组比较, DHYZ 降低了 Drp1 的表达 ($P < 0.05$), 同时提高 Mfn1、Mfn2、

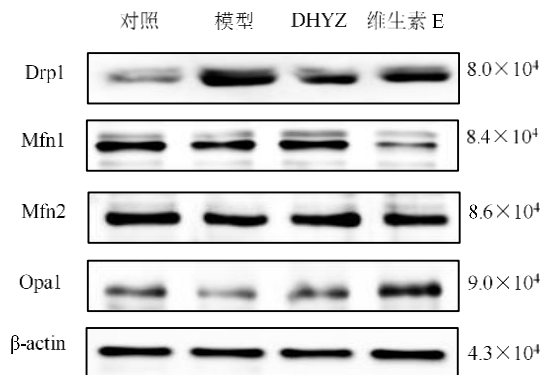


图 2 各组 HT22 细胞 Drp1、Mfn1、Mfn2、Opa1 蛋白表达
Fig. 2 Protein expression of Drp1, Mfn1, Mfn2, and Opa1 in HT22 cells of each group

Opa1 的表达水平 ($P < 0.05$), 维生素 E 显著下调 Mfn1 ($P < 0.05$)、上调 Opa1 ($P < 0.01$) 表达, 一定程度促进线粒体融合。

3.4.2 DHYZ 对自噬及线粒体自噬相关蛋白的影响结果如图 3、表 4 所示, 与对照组比较, 模型组自噬蛋白 LC3B ($P < 0.05$)、Beclin1 ($P < 0.01$), 线粒

表 3 各组 HT22 细胞 Drp1、Mfn1、Mfn2、Opa1 的表达结果比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of expression results of Drp1, Mfn1, Mfn2, and Opa1 in HT22 cells across groups ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	Drp1/β-actin	Mfn1/β-actin	Mfn2/β-actin	Opa1/β-actin
对照	—	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.22	1.00 ± 0.11
模型	—	2.58 ± 0.16 ^{##}	0.69 ± 0.14 ^{##}	0.66 ± 0.05 ^{##}	0.65 ± 0.17 [#]
DHYZ	5% 含药血清	1.64 ± 0.63 [*]	0.91 ± 0.11 [*]	0.92 ± 0.07 [*]	1.00 ± 0.14 [*]
维生素 E	100 μg·mL ⁻¹	2.47 ± 0.45	0.42 ± 0.13 [*]	0.59 ± 0.06	1.11 ± 0.09 ^{**}

与对照组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

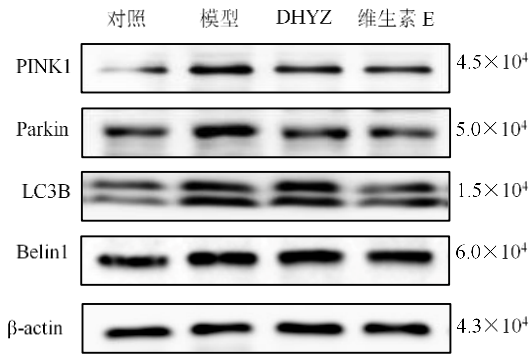


图 3 各组 HT22 细胞 PINK1、Parkin、LC3B、Beclin1 蛋白表达

Fig. 3 Protein expression of PINK1, Parkin, LC3B, and Beclin1 in HT22 cells of each group

表 4 各组 HT22 细胞 PINK1、Parkin、LC3B、Beclin1 的表达结果比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of expression results of PINK1, Parkin, LC3B and Beclin1 in each group of HT22 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	PINK1/ β -actin	Parkin/ β -actin	LC3B/ β -actin	Beclin1/ β -actin
对照	—	1.00 ± 0.35	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.24
模型	—	$1.88 \pm 0.47^{\#}$	$1.41 \pm 0.16^{\#\#}$	$1.64 \pm 0.19^{\#}$	$1.67 \pm 0.12^{\#\#}$
DHYZ	5%含药血清	$0.97 \pm 0.5^*$	$1.08 \pm 0.09^*$	$1.18 \pm 0.28^*$	$1.30 \pm 0.13^{**}$
维生素E	$100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	$0.71 \pm 0.33^{**}$	$0.89 \pm 0.06^{**}$	1.47 ± 0.21	1.53 ± 0.07

与对照组比较: $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$; 与模型组比较: $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ 。

$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

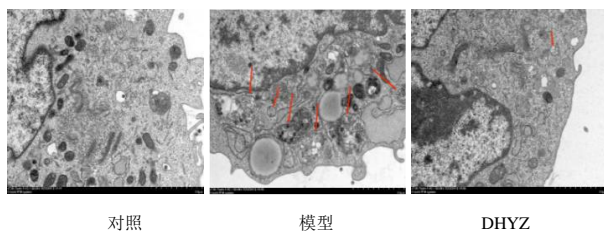


图 4 各组 HT22 细胞自噬体透射电镜结果 ($\times 7000$)

Fig. 4 Transmission electron microscopy results of autophagosomes in various groups of HT22 cells ($\times 7000$)

3.5 运用 Mdivi-1 观察 DHYZ 调节 A β 诱导 HT22 细胞 MQC

3.5.1 Mdivi-1 对 A β 诱导 HT22 细胞活力的影响 相较于对照组, 细胞经 A β 处理后, 模型组细胞活力均下降 ($P<0.05$); 与模型组比较, 在不同浓度 (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Mdivi1 预处理不同时间 (0.5、1、2 h) 后, 只有 0.5 h 组 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mdivi-1 显著提高了细胞活力 ($P<0.05$)。后续实验采用 Mdivi1 预处理 0.5 h 后加入 A β 作为对照条件。见表 5。

3.5.2 DHYZ 对细胞内、细胞质、线粒体 Drp1 蛋

白自噬相关蛋白 PINK1 ($P<0.05$)、Parkin ($P<0.01$) 含量显著增加, 说明 A β 导致自噬被过度激活。与模型组比较, DHYZ 组 PINK1、Parkin、LC3B ($P<0.05$), Beclin1 ($P<0.01$) 表达下降, 表明 DHYZ 可以降低细胞及线粒体受到的损伤, 抑制自噬过度激活。维生素 E 组 PINK1、Parkin 表达降低 ($P<0.01$), 但 LC3B、Beclin1 介导的自噬没有效果 ($P>0.05$)。

3.4.3 透射电镜观察 DHYZ 对自噬体的影响 对照组 HT22 细胞多数线粒体结构正常, 未发现典型的自噬体。模型组可见大量自噬体或自噬溶酶体, 表明 A β 导致线粒体损伤, 大量自噬体形成。DHYZ 组可见自噬小体, 但相较于模型组数量减少。见图 4。

白的影 响 与对照组比较, 经 A β 处理后, HT22 细胞内 Drp1 (总) 和线粒体 Drp1 含量升高 ($P<0.01$), 细胞质 Drp1 含量降低 ($P<0.001$), 说明 A β 导致定位在胞质 Drp1 向线粒体募集。相较于模型组, 各给药组细胞内 Drp1 和线粒体 Drp1 含量降低 ($P<0.05$ 、 0.01), 细胞质 Drp1 含量升高 ($P<0.01$), 说明 DHYZ 有效抑制了 Drp1 活性, 阻止其向线粒体方向迁移, DHYZ 与 Mdivi-1 合用时作用效果最强。见图 5、表 6。

3.5.3 DHYZ 对 Drp1 线粒体募集的影响 经 Mito-Tracker Red CMXRos 和 Drp1 共染, 与对照组相比, A β 明显诱导了 Drp1 向线粒体的募集 ($P<0.001$); 与模型组比较, Drp1 抑制剂 Mdivi-1 能够有效阻止 Drp1 向线粒体募集 ($P<0.05$), DHYZ 发挥了与 Mdivi-1 相似的效果 ($P<0.05$), DHYZ 和 Mdivi-1 合用效果最好 ($P<0.001$)。见图 6、表 7。

3.5.4 DHYZ 对 PINK1、Parkin 蛋白的影响 相较于对照组, 模型组 PINK1、Parkin 表达水平显著上调 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, DHYZ 显著下调 PINK1 ($P<0.05$)、Parkin ($P<0.01$) 的表达

表 5 不同时间及浓度 Mdivi-1 对 Aβ 诱导 HT22 细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of Mdivi-1 on Aβ-induced HT22 cells at different time points and concentrations ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	A 值		
		0.5 h	1.0 h	2.0 h
对照	—	1.27±0.05	0.99±0.08	1.59±0.10
模型	—	0.87±0.03 [#]	0.68±0.13 [#]	1.15±0.35 [#]
Mdivi-1	2.5	1.03±0.19	0.69±0.04	1.17±0.33
	5.0	1.15±0.17 [*]	0.78±0.15	1.22±0.27
	10.0	0.87±0.20	0.82±0.10	1.34±0.30
	20.0	0.85±0.03	0.83±0.02	1.32±0.20
	40.0	0.85±0.09	0.79±0.02	1.17±0.10
	60.0	0.63±0.09 [*]	0.60±0.03	0.92±0.19

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ 。
[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group.

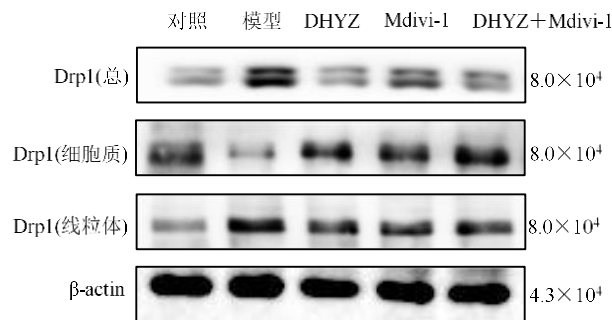


图 5 各组 HT22 细胞内、细胞质和线粒体中 Drp1 蛋白的表达

Fig. 5 Expression of Drp1 protein in the nucleus, cytoplasm, and mitochondria of HT22 cells in each group

水平, DHYZ 和 Mdivi-1 合用下调效果最好 ($P < 0.01, 0.001$)。提示 DHYZ 可能是通过抑制 Drp1 活性, 抑制线粒体分裂, 从而改善线粒体自噬。见图 7 和表 8。

4 讨论

近年来随着 AD 研究深入, 现代医者运用经方、经方加减方等, 充分发挥中医药治疗 AD 多靶点、多层次的优势。研究表明, DHYZ 通过加减配伍、联合西药等改善 AD 临床症状^[10], 基础研究揭示其可通过调节能量代谢、抑制细胞凋亡、拮抗氧化应激及调控胆碱能系统等多途径减少 Aβ 沉积^[6, 8, 10-12]。从细胞器水平上, 线粒体的质量控制通过线粒体生

表 6 各组 HT22 细胞内、细胞质和线粒体中 Drp1 表达结果的比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of Drp1 expression results in nucleus, cytoplasm, and mitochondria of HT22 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	Drp1/β-actin(总)	Drp1/β-actin(细胞质)	Drp1/β-actin(线粒体)
对照	—	1.00±0.26	1.00±0.19	1.00±0.36
模型	—	1.87±0.33 ^{###}	0.38±0.07 ^{####}	1.98±0.04 ^{##}
DHYZ	5%含药血清	1.20±0.31 ^{**}	0.91±0.12 ^{**}	1.20±0.37 ^{**}
Mdivi-1	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.30±0.12 [*]	0.90±0.16 ^{**}	1.22±0.21 ^{**}
DHYZ+Mdivi-1	5%含药血清+5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	1.00±0.09 ^{**}	0.95±0.12 ^{**}	0.97±0.27 ^{**}

与对照组比较: ^{###} $P < 0.01$ ^{####} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。
^{###} $P < 0.01$ ^{####} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

物合成、线粒体分裂和融合以及线粒体自噬消除受损的线粒体来维持。越来越多研究表明, AD 的发生与线粒体缺陷有关。线粒体分裂、融合、自噬异常使其无法维持在一个生理可控的范围内, 导致线粒体网络平衡破坏, 神经元细胞凋亡。在 AD 进展早期, 线粒体过度分裂导致线粒体断裂, 线粒体碎片

化发生^[13]。另有研究在 AD 患者死后的大脑中发现, Opa1、Mfn1 和 Mfn2 的表达水平降低, 而重组人线粒体分裂蛋白 1 (Fis1) 的表达水平显著增加^[14]。此外, 作为 AD 核心病理标志, Aβ 沉积已被证实通过线粒体损伤途径加剧神经退行性变^[15-17], 如 Aβ 与 Drp1 相互作用导致自由基产生增加^[18]。

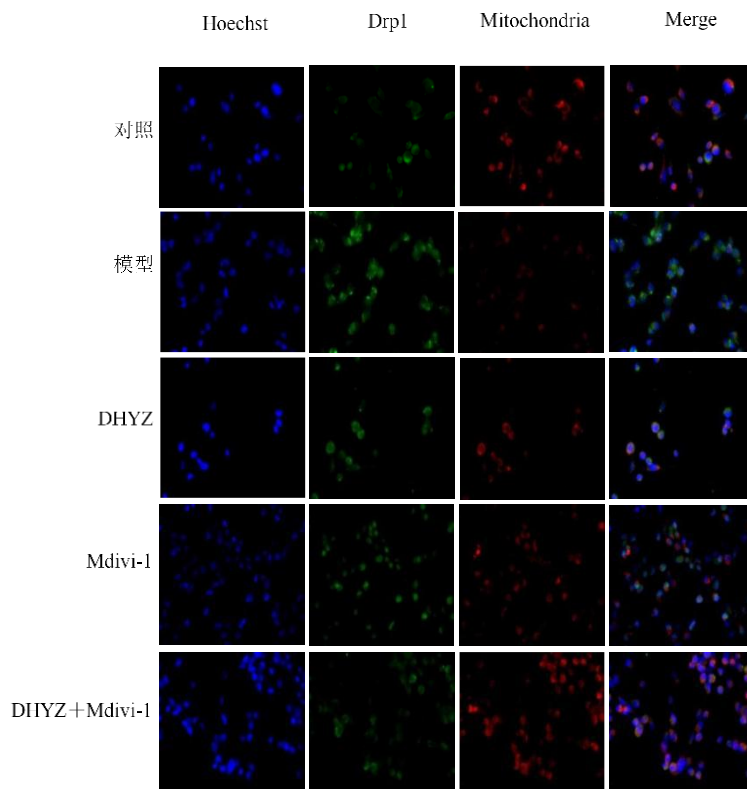


图 6 各组 HT22 细胞 Drp1 免疫荧光图 (×20)

Fig. 6 Immunofluorescence images of Drp1 in HT22 cells from each group (×20)

表 7 各组细胞 Drp1 荧光值的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 7 Comparison of Drp1 fluorescence values among different groups of cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	Drp1 荧光值
对照	—	6.88 ± 0.27
模型	—	14.28 ± 1.09 ^{###}
DHYZ	5%含药血清	10.67 ± 0.41*
Mdivi-1	5 μmol·L ⁻¹	10.69 ± 2.12*
DHYZ+	5%含药血清+	7.53 ± 1.35 ^{***}
Mdivi-1	5 μmol·L ⁻¹	

与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。
^{###} $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs model group.

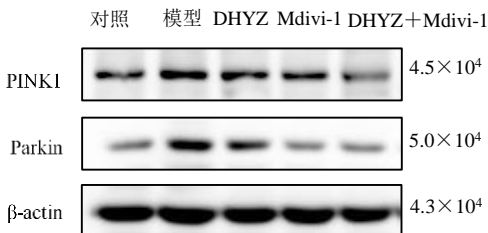


图 7 各组 HT22 细胞 PINK1、Parkin 蛋白的表达

Fig. 7 Expression of PINK1 and Parkin proteins in each group of HT22 cells

表 8 各组 HT22 细胞 PINK1、Parkin 的表达结果比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 8 Comparison of expression results of PINK1 and Parkin in HT22 cells across different groups ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	浓度	PINK1/ β-actin	Parkin/ β-actin
对照	—	1.00 ± 0.26	1.00 ± 0.5
模型	—	1.87 ± 0.33 ^{###}	3.53 ± 0.48 ^{###}
DHYZ	5%含药血清	1.20 ± 0.31 ^{**}	2.13 ± 0.52*
Mdivi-1	5 μmol·L ⁻¹	1.31 ± 0.32*	1.35 ± 0.43 ^{**}
DHYZ+	5%含药血清+	1.01 ± 0.10 ^{**}	1.28 ± 0.28 ^{***}
Mdivi-1	5 μmol·L ⁻¹		

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

线粒体分裂抑制剂 Mdivi-1 能够降低 Drp1 活性抑制线粒体分裂, 已被证明在包括 AD 在内的多种疾病中发挥有益作用。Mdivi-1 是一种细胞可渗透的喹唑啉酮, 最初由被认为是酵母和哺乳动物细胞中 Drp1 功能的抑制剂^[19]。已有研究证实 Mdivi-1 能够减少 AD 中线粒体过度断裂, 改善线粒体功

能障碍。研究发现 Mdivi-1 抑制线粒体分裂、促进融合、加强线粒体生物合成、提高细胞活力,且 Mdivi-1 预处理比后处理效果更佳^[19]。本研究首先确定 Mdivi-1 保护细胞活力的最佳浓度和时间,参照文献报道^[20-22]以及过往经验,选取了 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0、60.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 6 个浓度的 Mdivi-1 预处理 0.5、1.0、2.0 h。结果发现,3 个时间段 2.5~40.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Mdivi-1 对细胞活力整体有提高,0.5 h、2.0 h 对细胞活力提升较大,60 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 则抑制细胞活力。其中,只有 0.5 h 组 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度存在统计学意义。因此,后续实验采用 5.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 抑制剂预处理 0.5 h 再进行 A β 干预作为对照条件。

Drp1 定位于细胞质中,当线粒体分裂程序启动,Drp1 受到 Fis1、Mff 等因子的招募,从胞质迁移到线粒体,这就导致胞质中 Drp1 的含量减少,线粒体中 Drp1 含量增加。为了探究 DHYZ 与 Drp1 迁移之间的关系,本实验检测了细胞内、细胞质和线粒体中 Drp1 的含量。模型组较对照组全细胞和线粒体中 Drp1 含量升高,细胞质中 Drp1 含量降低,表明 A β 导致 Drp1 从胞质向线粒体迁移。DHYZ 处理后,细胞内和线粒体中 Drp1 含量显著降低,细胞质中 Drp1 含量显著提高,这与 Mdivi-1 效果相当。合用组则效果更佳。除此之外,实验还采用了免疫荧光技术更全面检测 DHYZ 对 A β 诱导 HT22 细胞内 Drp 迁移的影响。实验发现模型组线粒体中 Drp1 含量更高,说明 Drp1 从细胞质向线粒体聚集。DHYZ 能明显降低线粒体中 Drp1 含量,抑制其向线粒体方向的募集。本实验虽然未进一步对线粒体网络形态进行精确定量,但基于 Drp1/fusion 蛋白表达的变化及线粒体功能指标的改善,可以合理推测 DHYZ 同时改善了线粒体的过度碎片化。上述实验结果表明 DHYZ 能够以 Drp1 为靶点,抑制 Drp1 活性,阻止其向线粒体募集,从而抑制线粒体分裂。

普遍认为,线粒体分裂产生膜电位正常的线粒体继续参与分裂融合,而去极化的线粒体会被线粒体自噬标记清除。因此,可以合理地推测线粒体分裂发生在线粒体自噬之前。那么,Drp1 介导的线粒体分裂在线粒体自噬中的作用如何?越来越多结果一致表明,Drp1 在许多细胞中促进线粒体自噬^[23]。HeLa 细胞中抑制 Drp1 介导的线粒体分裂, Parkin 诱导的线粒体自噬也会受到抑制^[24]。通过中医药治疗手段的干预, PINK1、Parkin 诱导的线粒体自噬被阻止,由此神经元得以拯救^[25]。本实

验已证明 DHYZ 能够调控线粒体动力学及自噬相关因子,参与 MQC,并证实 DHYZ 能够抑制 Drp1 向线粒体的迁移,实验进一步研究了 Drp1 与 PINK1/Parkin 通路之间的关系。实验发现,模型组 PINK1、Parkin 蛋白表达水平有所提高, Mdivi-1 的干预明显降低了这二者的表达水平, DHYZ 也能够发挥相似的效果,而将 DHYZ 与抑制剂合用则效果更佳。上述结果表明, DHYZ 通过抑制 Drp1 活性进而抑制线粒体分裂,减少线粒体自噬过度激活,抵抗 A β 诱导的损伤,保护神经细胞。其机制可能是 DHYZ 通过抑制 Drp1 介导的线粒体分裂调控线粒体自噬 PINK1/Parkin 通路。

MQC 障碍是 AD 发病的重要因素和治疗靶点,但 DHYZ 对 MQC 的研究仍停留在线粒体生物合成,尚未涉及到线粒体动力学和线粒体自噬环节。前期工作表明, DHYZ 可显著提升 A β_{25-35} 诱导的 HT22 细胞线粒体膜电位^[5-6],进一步印证其改善线粒体功能、维持线粒体稳态的作用,与本研究结果一致,共同支持 DHYZ 通过调控 MQC 发挥神经保护作用的结论。因此,本研究基于 MQC,首次从其 2 大核心环节——线粒体动力学和线粒体自噬切入,通过体外实验进行初步研究发现, DHYZ 可以抑制 Drp1 介导的线粒体分裂,抑制线粒体自噬过度激活,降低 A β 诱导的损伤,保护神经细胞,发挥防治 AD 的效果。提示 DHYZ 可能是通过抑制 Drp1 介导的线粒体动力学,调节线粒体自噬 PINK1/Parkin 通路,进而调控整个 MQC 链。

本研究主要是从细胞层面探究了 DHYZ 通过 Drp1 介导的线粒体动力学调控线粒体自噬 PINK1/Parkin 通路的分子机制,缺乏相应的动物实验验证,今后可以从动物层面对此分子机制进行更加全面地探讨。线粒体分裂不仅由 Drp1 介导, Fis1、Mff、MiD49 和 MiD51 等也可参与其中, DHYZ 是否会对除 Drp1 之外的线粒体分裂因子产生影响并调控线粒体自噬,进而对整个 MQC 链产生影响,这在本研究中并未验证,今后可以从上述角度探索 DHYZ 抵抗 A β 损伤防治 AD 的分子机制。MQC 过程复杂,包括线粒体生物合成、线粒体分裂融合、线粒体运输迁移及线粒体自噬等。线粒体胞吐是线粒体运输迁移的一种方式,与氧化应激、线粒体动力学、线粒体自噬高度关联,值得深入研究。

本研究基于 MQC,发现 DHYZ 减少 A β 诱导 HT22 细胞 A β 含量,抑制 MPTP 持续开放,减少

ROS 产生; Drp1 从细胞质向线粒体的迁移被抑制, 减少 Drp1 介导的线粒体分裂, 同时加强融合, 调节 PINK1 和 Parkin 下调线粒体自噬的过度激活, 提示 DHYZ 可能抑制 Drp1 介导的线粒体动力学调控线粒体自噬 PINK1/Parkin 通路, 调节 MQC 链。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] D'Cruz M M, Banerjee D. The person is not the disease—Revisiting Alzheimer's dementia after 120 years [J]. *J Geriatr Ment Health*, 2021, 8(2): 136-137.
- [2] Wong W. Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations [J]. *Am J Manag Care*, 2020, 26(8 Suppl): S177-S183.
- [3] 关慧波, 刘莹, 徐丽, 等. 地黄饮子对转 tau 基因果蝇 AD 模型 PI3K/AKT/dTOR 信号通路基因表达的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2014, 48(10): 85-88.
Guan H B, Liu Y, Xu L, et al. Effect of "Dihuang Decoction" on expression of tua gene of Drosophlia AD model of PI3K/AKT/dTOR signaling pathwas genes [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2014, 48(10): 85-88.
- [4] 周妍妍, 董春雪, 刘艳丽, 等. 地黄饮子对双转基因痴呆小鼠学习记忆及抗氧化能力的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2014, 48(2): 80-84.
Zhou Y Y, Dong C X, Liu Y L, et al. Effect of "Dihuang Yinzi" on memory and antioxidation of APP/PS1 double transgenic dementia mice [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2014, 48(2): 80-84.
- [5] 郑远武, 朴钟源, 宋琳, 等. 地黄饮子及其有效成分五味子醇甲对 A β 诱导 SH-SY5Y 细胞 CCK-8 的影响 [J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(8): 15-18.
Zheng Y W, Piao Z Y, Song L, et al. Effect of Dihuang Yinzi (地黄饮子) and its effective component schizandra on A β induced SH-SY5Y cells by CCK-8 [J]. *J Pract Tradit Chin Intern Med*, 2022, 36(8): 15-18.
- [6] 马洪月. 地黄饮子对 A β 诱导的 HT22 细胞线粒体功能和线粒体能量代谢的影响 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2023.
Ma H Y. The Effects of Dihuang Yinzi on Mitochondrial Function and Mitochondrial Energy Metabolism in A β -Induced HT22 Cells [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2023.
- [7] 张宁, 郭司群, 王发善, 等. 地黄饮子 UPLC-MS 指纹图谱研究 [J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2012, 14(2): 1455-1459.
Zhang N, Guo S Q, Wang F S, et al. Study on fingerprint of di-Huang-Yin-zi decoction by UPLC-MS [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol*, 2012, 14(2): 1455-1459.
- [8] Han G H, Zhen W Z, Dai Y, et al. Dihuang-yinzi alleviates cognition deficits via targeting energy-related metabolism in an Alzheimer mouse model as demonstrated by integration of metabolomics and network pharmacology [J]. *Front Aging Neurosci*, 2022, 14: 873929.
- [9] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案 [J]. *中国药理学通报*, 1999, 15(6): 569-570.
LI Y K, Wu J Y. The discussion of "ordinary method" of obtaining serum in serum pharmacology method [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 1999, 15(6): 569-570.
- [10] 窦金金, 罗泓楠, 李红颖, 等. 地黄饮子防治老年痴呆疾病研究进展 [J]. *现代中药研究与实践*, 2023, 37(1): 92-98.
Dou J J, Luo H N, Li H Y, et al. Research progress on prevention and treatment of senile dementia with Dihuang Yinzi [J]. *Res Pract Chin Med*, 2023, 37(1): 92-98.
- [11] 韩冉, 马涛, 张志辰, 等. 地黄饮子治疗阿尔茨海默病的实验研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(21): 124-130.
Han R, Ma T, Zhang Z C, et al. Experimental research progress of Dihuang Yinzi in treatment of Alzheimer's disease [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(21): 124-130.
- [12] 黄倩倩. 地黄饮子由 PERK/eIF2 α 调节能量代谢障碍 AD 小鼠内质网应激的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2019.
Huang Q Q. Study on the Mechanism of Dihuang Yinzi regulating endoplasmic reticulum stress in PERK/eIF2 α -disordered energy metabolism AD mice [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2019.
- [13] Liang J L, Wang C Y, Zhang H, et al. Exercise-induced benefits for Alzheimer's disease by stimulating mitophagy and improving mitochondrial function [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 755665.
- [14] Manczak M, Calkins M J, Reddy P H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: Implications for neuronal damage [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(13): 2495-2509.
- [15] Quintana-Cabrera R, Scorrano L. Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(6): 857-876.
- [16] de la Cueva M, Antequera D, Ordoñez-Gutierrez L, et al. Amyloid- β impairs mitochondrial dynamics and autophagy in Alzheimer's disease experimental models

- [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 10092.
- [17] Flannery P J, Trushina E. Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2019, 98: 109-120.
- [18] Morton H, Kshirsagar S, Orlov E, et al. Defective mitophagy and synaptic degeneration in Alzheimer's disease: Focus on aging, mitochondria and synapse [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 172: 652-667.
- [19] Cassidy-Stone A, Chipuk J E, Ingeman E, et al. Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(2): 193-204.
- [20] Reddy P H, Manczak M, Yin X L. Mitochondria-division inhibitor 1 protects against amyloid- β induced mitochondrial fragmentation and synaptic damage in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2017, 58(1): 147-162.
- [21] Kim D I, Lee K H, Gabr A A, et al. A β -Induced Drp1 phosphorylation through Akt activation promotes excessive mitochondrial fission leading to neuronal apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(11): 2820-2834.
- [22] Gao D C, Yang J, Wu Y T, et al. Targeting dynamin 2 as a novel pathway to inhibit cardiomyocyte apoptosis following oxidative stress [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(6): 2121-2134.
- [23] Tong M M, Zablocki D, Sadoshima J. The role of Drp1 in mitophagy and cell death in the heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 142: 138-145.
- [24] Tanaka A, Cleland M M, Xu S, et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin [J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(7): 1367-1380.
- [25] 尤付玲. 远志皂苷调节线粒体自噬在抗 A β 诱导细胞损伤中的作用及机制 [D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- You F L. The role and mechanism of polygala tenuifolia saponin in regulating mitochondrial autophagy against A β -induced cell damage [D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2017.

[责任编辑 兰新新]