

基于PINK1/Parkin通路研究槲皮素减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤的作用机制

唐森¹, 方建², 高立功¹, 黄一苇¹

1. 驻马店市中心医院 神经内科, 河南 驻马店 463400

2. 河南大学第一附属医院 神经内科, 河南 开封 475001

摘要:目的 基于PTEN诱导激酶1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森蛋白 (Parkin) 通路研究槲皮素减轻血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 大鼠海马神经元损伤的作用机制。方法 通过双侧颈总动脉永久性结扎法建立VD大鼠模型, 分为模型组及槲皮素低、中、高 (25、50、100 mg/kg) 组和欧来宁 (14.8 g/kg) 组, 另取12只大鼠作为假手术组, 给予药物干预21 d后, 采用穿梭箱实验评价大鼠学习记忆能力, 比较各组大鼠步入潜伏期 (step-through latency, STL) 及在暗室中花费的总时间 (total time spent in the dark chamber, TDC); 采用Nissl染色检测大鼠海马组织神经元损伤情况; 采用透射电镜观察大鼠海马区神经元超微结构; 采用ELISA法检测大鼠脑组织中乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 水平和血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、IL-17、IL-1 β 水平; 采用Western blotting检测大鼠脑组织中自噬相关蛋白与PINK1/Parkin信号通路相关蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠海马组织神经元损伤及超微结构受损严重, 神经元内出现少量自噬体; STL显著降低 ($P < 0.05$), TDC显著升高 ($P < 0.05$); 脑组织中Ach和5-HT水平显著降低 ($P < 0.05$), 血清中IL-6、IL-17和IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.05$); 脑组织中微管相关蛋白1轻链3 II (microtubule-associated protein 1 light 3 II, LC3II)/LC3I、Beclin1、PINK1和Parkin蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 槲皮素组大鼠海马组织神经元损伤及超微结构受损减轻, 且神经元自噬现象增强; STL显著升高 ($P < 0.05$), TDC显著降低 ($P < 0.05$); 脑组织中Ach及5-HT水平显著升高 ($P < 0.05$), 血清中IL-6、IL-17和IL-1 β 水平均显著降低 ($P < 0.05$); 脑组织中LC3II/LC3I、Beclin1、PINK1和Parkin蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)。结论 槲皮素可激活PINK1/Parkin信号通路, 降低VD大鼠炎症细胞因子水平, 减轻海马神经元炎症损伤, 提高大鼠学习记忆能力, 改善其痴呆症状。

关键词: 槲皮素; 血管性痴呆; 海马神经元损伤; 自噬; PTEN诱导激酶1/帕金森蛋白信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)20-6529-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.20.025

Mechanism of quercetin on alleviating hippocampal neuron injury in vascular dementia rats based on PINK1/Parkin pathway

TANG Sen¹, FANG Jian², GAO Li-gong¹, HUANG Yi-wei¹

1. Department of Neurology, Zhumadian Central Hospital, Zhumadian 463400, China

2. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng 475001, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of quercetin on alleviating hippocampal neuron damage in vascular dementia (VD) rats based on PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin signaling pathway. **Methods** VD rat model was established by permanent ligation of bilateral common carotid arteries, and were divided into model group, quercetin low-, medium- and high-dose (25, 50, 100 mg/kg) groups, and oxiracetam (14.8 g/kg) groups, and another 12 rats were selected as sham-operated group. After 21 d of drug intervention, shuttle box experiment was used to evaluate the learning and memory ability of rats, step-through latency (STL) and total time spent in the dark chamber (TDC) of rats in each group were compared; Nissl staining was used to detect neuronal damage in hippocampus of rats; Transmission electron microscope was used to detect the ultrastructural observation of neurons in rat

收稿日期: 2022-06-06

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目 (LHGJ20210555)

作者简介: 唐森, 硕士, 主治医师, 主要从事脑血管病、痴呆的诊治。Tel: 15836706647 E-mail: tangsen2244@163.com

hippocampus; ELISA was used to detect acetylcholine (ACh) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels in brain tissue, and interleukin-6 (IL-6), IL-17, and IL-1 β levels in serum; Western blotting was used to detect expressions of autophagy-related proteins and PINK1/Parkin signaling pathway related proteins in brain tissues of rats in each group. **Results** Compared with sham operation group, neurons and ultrastructure of hippocampus in model group were seriously damaged, a small number of autophagosomes appear in neurons; STL was significantly decreased ($P < 0.05$), and TDC was significantly increased ($P < 0.05$); Levels of ACh and 5-HT in brain tissue were significantly decreased ($P < 0.05$), levels of IL-6, IL-17 and IL-1 β in serum were significantly increased ($P < 0.05$); Microtubule-associated protein 1 light 3 II (LC3II)/LC3I, Beclin1, PINK1 and Parkin protein expression levels in brain tissue were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with model group, neuronal damage and ultrastructural damage in hippocampus of rats in quercetin group were alleviated, and autophagy of neurons was enhanced; STL was significantly increased ($P < 0.05$), and TDC was significantly decreased ($P < 0.05$); Levels of ACh and 5-HT in brain tissue were significantly increased ($P < 0.05$), levels of IL-6, IL-17 and IL-1 β in serum were significantly decreased ($P < 0.05$); LC3II/LC3I, Beclin1, PINK1 and Parkin protein expression levels in brain tissue were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Quercetin can activate PINK1/Parkin signaling pathway, reduce inflammatory cytokines levels in VD rats, alleviate the inflammatory damage of hippocampal neurons, improve the learning and memory ability of rats, and improve the symptoms of dementia.

Key words: quercetin; vascular dementia; hippocampal neuron injury; autophagy; PTEN-induced putative kinase 1/Parkin signaling pathway

血管性痴呆 (vascular dementia, VD) 属于脑血管损伤引起的一种痴呆亚型, 可造成记忆力减退、认知障碍、情感异常等临床症状, 是威胁中老年人健康并导致其痴呆的主要原因之一^[1-2]。脑缺血缺氧是引发 VD 的常见病因, 神经炎症、自噬和细胞凋亡在 VD 病理过程中起到关键调控作用^[3], 抑制炎症、增强自噬作用可减轻神经元损伤, 改善 VD 造成的认知障碍^[4-5]。PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1) /帕金蛋白 (Parkin) 是调节自噬的主要信号通路, 可介导受损细胞器的清除和内环境平衡的维持过程, 激活该信号可增强线粒体自噬, 有益于炎症性疾病的治疗^[6], 并可提升 β -淀粉样蛋白诱导的大鼠学习记忆能力, 改善阿尔茨海默症大鼠痴呆症状^[7]。因此 PINK1/Parkin 可作为 VD 的潜在治疗靶点。槲皮素是广泛存在于银杏、山楂和三七等众多中药中的黄酮类化合物, 具有雌激素样活性, 可保护神经系统功能, 改善阿尔茨海默症患者痴呆症状^[8-9], 并可促进 PINK1 和 Parkin 蛋白表达, 拮抗神经炎症, 激活线粒体自噬, 缓解大鼠脑缺血再灌注损伤^[10]。本研究通过建立 VD 大鼠模型, 探究槲皮素对 VD 诱导的大鼠海马神经元损伤及 PINK1/Parkin 信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~240 g, 购自康泰医学检验服务河北有限公司, 动物许可证号 SYXK (冀) 2021-006。动物于河南大学第一附属医

院屏障环境动物房中喂养, 温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~60%, 明暗 12h 交替循环。动物实验经河南大学第一附属医院伦理委员会批准 (批准号 2022079)。

1.2 药品与试剂

槲皮素 (批号 117395, 质量分数为 99%) 购自美国 Sigma 公司; 欧来宁胶囊 (批号 6916119040353, 0.4 g/粒) 购自石药集团欧意药业有限公司; 大鼠 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) ELISA 试剂盒 (批号 XY-SJH-DS1327) 购自上海烜雅生物科技有限公司; 大鼠乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh) ELISA 试剂盒 (批号 JL10299) 购自上海江莱生物科技有限公司; Nissl 染色液 (批号 C0117)、RIPA 裂解液 (批号 P0013K)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 P0011)、大鼠白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (批号 PI328)、IL-1 β ELISA 试剂盒 (批号 PI303) 均购自上海碧云天公司; IL-17 ELISA 试剂盒 (批号 SEKR-0007) 购自北京索莱宝科技有限公司; PINK1 抗体 (批号 ab23707)、Parkin 抗体 (批号 ab77924)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light 3, LC3) 抗体 (批号 ab221794)、Beclin1 抗体 (批号 ab62557)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 ab181602)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (批号 ab150077) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体 (批号 A-11029) 购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

DCS-2 型大鼠程控穿梭箱(中国医学科学院药物研究所); HT7700 型透射电镜(TEM, 日本日立公司); ASP200S 型全自动脱水机、G1150H 型加热石蜡包埋系统、DM3000 型显微镜(德国 Leica 公司); 1510 型石蜡切片机(德国 SLEE 公司); RMC POWERTOME XL 型超薄切片机(美国 RMC 公司); 1658033 型小型垂直电泳转印系统、15043 型多功能酶标仪、Chemi-Doc XRS 型化学发光成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 VD 大鼠模型的建立、分组及给药

参照文献方法^[11]制备 VD 大鼠模型, SD 大鼠禁食不禁水 12 h, ip 2.5%戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉, 仰卧固定后颈部去毛、备皮、消毒, 于正中切开, 分离肌肉, 钝性分离双侧颈总动脉后结扎, 缝合大鼠伤口即完成模型制备。1 周后通过穿梭箱实验筛选成模大鼠, 与正常大鼠相比步入潜伏期(step-through latency, STL)显著降低且暗室中花费的总时间(total time spent in the dark chamber, TDC)显著升高即为造模成功, 将其随机分为模型组、欧来宁(14.8 g/kg)^[11]组和槲皮素低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)^[12]组, 每组 12 只, 另取 12 只大鼠只分离双侧颈总动脉不对其结扎, 作为假手术组。各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg), 假手术组和模型组大鼠 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续 21 d。

2.2 穿梭箱实验检测大鼠学习记忆能力

给药结束后, 进行穿梭箱实验检测大鼠学习记忆能力^[13]。穿梭箱系统由 2 个相同的空腔组成, 1 个有灯光刺激, 处于照明状态, 1 个保持黑暗。将大鼠放入光腔室中, 并引导其自由穿梭于 2 个空腔室中 5 min, 当大鼠再次进入暗腔室中时, 以 0.5 mA 的电流给予电击刺激, 直至大鼠逃至不通电的光腔室中, 间隔 5 min 后重复同样的操作, 如此进行训练 1 d, 使大鼠在 5 min 内不进入暗腔室; 第 2 天, 将大鼠置于光腔室中, 以穿梭箱系统自带的软件记录大鼠进入暗腔室中所需的时间, 即 STL, 并记录大鼠 TDC, 采用 STL 和 TDC 作为评价大鼠学习记忆能力的指标。

2.3 ELISA 法检测大鼠脑组织 Ach、5-HT 水平和血清 IL-6、IL-17、IL-1 β 水平

穿梭箱实验结束后, 异氟醚麻醉大鼠, 采集颈动脉血 1.2 mL, 4 $^{\circ}$ C、1000 r/min 离心 15 min, 取

上清, 于-80 $^{\circ}$ C 保存备用; 然后断头处死大鼠, 解剖取出大脑, 取 0.7 g 脑组织, 加入高效 RIPA 裂解液匀浆, 4 $^{\circ}$ C、3000 r/min 离心 20 min, 取上清, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度, 于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。取脑组织蛋白样品液和血清于冰水浴中解冻, 吸取 0.2 mL 脑组织蛋白样品液和 0.3 mL 血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定脑组织 Ach、5-HT 水平和血清 IL-6、IL-17、IL-1 β 水平。

2.4 Nissl 染色检测大鼠海马组织神经元损伤

取各组大鼠脑组织, 于 10%福尔马林中固定, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋后冠状切片, 取含有典型海马组织结构的切片, 经脱蜡、水化后, 浸入 Nissl 染色液中进行染色、漂洗, 以中性树胶封片, 于显微镜下观察并拍照, 神经细胞中的尼氏小体可被染为蓝紫色, 正常神经元细胞尼氏小体数量多、染色较深且均匀, 当其细胞受损时, 尼氏小体染色较浅, 数量大量减少。

2.5 TEM 观察大鼠海马区神经元超微结构

取“2.4”项下各组含有典型海马组织结构的切片, 脱蜡、水化后, 于 1%锇酸中固定, 脱水, 环氧树脂包埋, 使用超薄切片机切片(厚度 50~100 nm), 于 TEM 下观察各组神经元超微结构, 采集图像并评测自噬情况。

2.6 Western blotting 检测大鼠脑组织 PINK1/Parkin 信号通路相关蛋白表达

取“2.3”项下各组脑组织蛋白样品液, 经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5%脱脂牛奶中封闭 2 h, 分别加入 PINK1、Parkin、LC3、Beclin1 和 GAPDH 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育 13 h; TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 加入相应二抗, 37.5 $^{\circ}$ C 孵育 75 min; TBST 洗涤 3 次, 5 min/次, 通过化学发光法显影后拍照, 以 Quantity One 软件定量各条带灰度值。

2.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异比较使用 *t* 检验; 多组间差异比较进行单因素方差分析, 进一步两两比较使用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 槲皮素对 VD 大鼠学习记忆能力的影响

如表 1 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠 STL 显著降低($P < 0.05$), TDC 显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠 STL 均显著

表1 各组大鼠 STL 和 TDC ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 STL and TDC of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	STL/s	TDC/s
假手术	—	267.18±21.73	19.13±2.07
模型	—	140.32±8.25 [#]	114.64±9.21 [#]
槲皮素	25	178.95±10.84 [*]	82.56±6.35 [*]
	50	220.34±13.12 [*]	57.02±5.10 [*]
	100	260.46±15.81 [*]	23.04±4.24 [*]
欧来宁	14 800	261.95±14.09 [*]	22.38±5.02 [*]

与假手术组比较: [#]*P*<0.05; 与模型组比较: ^{*}*P*<0.05, 下表同

[#]*P*<0.05 vs sham operation group; ^{*}*P*<0.05 vs model group, same as below tables

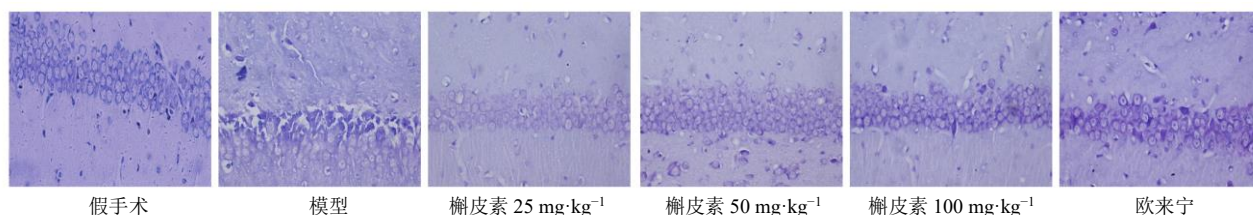


图1 Nissl 染色观察各组大鼠海马神经元损伤情况 (×400)

Fig. 1 Damage of hippocampal neurons of rats in each group observed by Nissl staining (× 400)

与假手术组大鼠海马神经元细胞状态相当。

3.3 槲皮素对 VD 大鼠海马神经元自噬的影响

如图 2 所示, 假手术组大鼠海马区神经元超微结构清晰, 完整无损, 线粒体外膜完整, 整体呈长杆状或椭圆形, 核膜完好无异常, 未见明显自噬体。模型组大鼠海马区神经元超微结构受损, 核周染色质聚集增多, 线粒体固缩且数量减少, 有少量自噬体产生, 出现自噬现象。与模型组比较, 各给药组

升高 (*P*<0.05), TDC 均显著降低 (*P*<0.05), 且呈剂量相关性。

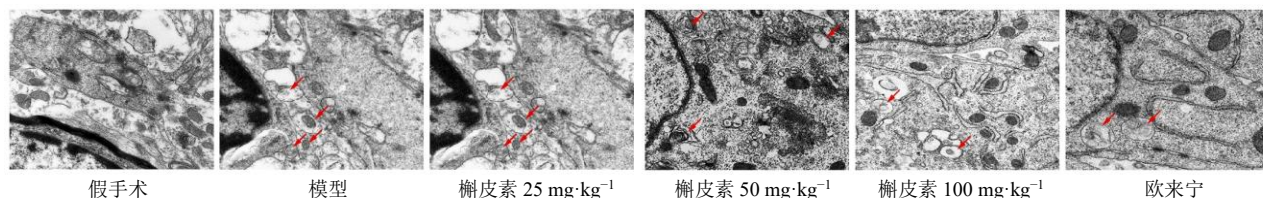
3.2 槲皮素对 VD 大鼠海马神经元损伤的影响

如图 1 所示, 假手术组大鼠海马神经元细胞尼氏小体数量众多, 排列规整, 染色深且均匀。模型组大鼠海马神经元细胞尼氏小体数量大量减少, 排列紊乱, 染色较浅, 细胞损伤严重。与模型组比较, 各给药组大鼠海马神经元细胞状态均有好转, 尼氏小体数量增加, 呈剂量相关性, 槲皮素高剂量组和欧来宁组大鼠海马神经元细胞好转、恢复程度最强,

大鼠海马区神经元超微结构受损减轻, 核周染色质聚集减少, 线粒体形态及数量有不同程度恢复, 自噬体均增多, 自噬现象增强, 且随着槲皮素剂量升高, 上述改变增强, 槲皮素高剂量组和欧来宁组大鼠海马区神经元超微结构恢复及自噬情况相当。

3.4 槲皮素对 VD 大鼠脑组织 Ach 和 5-HT 水平的影响

如表 2 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑



箭头代表自噬体

arrow indicates autophagosomes

图2 TEM 观察各组大鼠海马区神经元超微结构 (×5000)

Fig. 2 Ultrastructure of hippocampal neurons of rats in each group observed by TEM (× 5000)

表2 各组大鼠脑组织 Ach 和 5-HT 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Ach and 5-HT levels in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Ach/(pmol·L ⁻¹)	5-HT/(ng·L ⁻¹)
假手术	—	402.76±29.03	597.86±30.12
模型	—	265.64±10.59 [#]	301.72±11.38 [#]
槲皮素	25	306.47±13.91 [*]	397.43±14.06 [*]
	50	349.86±15.14 [*]	498.59±17.45 [*]
	100	493.78±24.50 [*]	590.05±20.83 [*]
欧来宁	14 800	495.85±21.62 [*]	593.17±19.39 [*]

组织中 Ach 和 5-HT 水平显著降低 (*P*<0.05); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织中 Ach 和 5-HT 水平均显著升高 (*P*<0.05), 且呈剂量相关性。

3.5 槲皮素对 VD 大鼠血清炎症因子 IL-6、IL-17 和 IL-1β 含量的影响

如表 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6、IL-17 和 IL-1β 水平均显著升高 (*P*<0.05); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 IL-6、

表 3 各组大鼠血清中 IL-6、IL-17 和 IL-1β 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 IL-6, IL-17 and IL-1β levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-17/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	21.47±3.36	47.96±5.12	212.87±40.32
模型	—	98.62±10.13 [#]	187.32±12.43 [#]	908.16±58.73 [#]
槲皮素	25	71.56±6.74 [*]	142.18±8.56 [*]	681.64±49.15 [*]
	50	52.72±5.92 [*]	98.75±6.72 [*]	458.21±37.62 [*]
	100	24.01±5.01 [*]	50.02±4.85 [*]	234.05±27.86 [*]
欧来宁	14 800	23.12±4.85 [*]	49.03±3.63 [*]	230.19±26.78 [*]

IL-17 和 IL-1β 水平均显著降低 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

3.6 槲皮素对 VD 大鼠脑组织自噬相关蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑组织中自噬相关蛋白 Beclin1 和 LC3II/LC3I 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织中 Beclin1 和 LC3II/LC3I 表达水平进一步显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

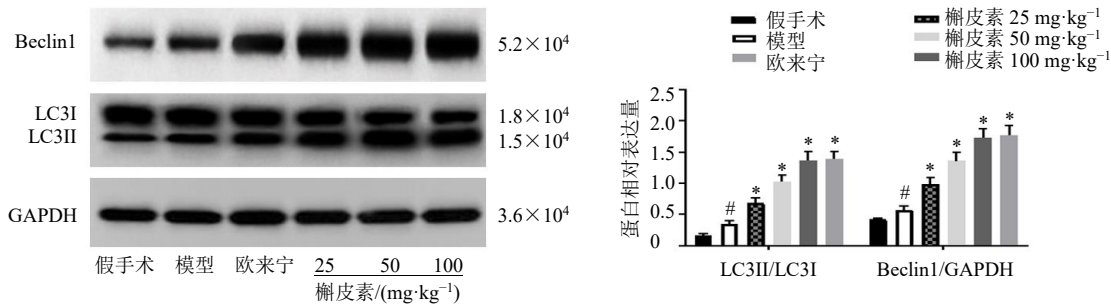
3.7 槲皮素对 VD 大鼠脑组织 PINK1/Parkin 信号通路蛋白表达的影响

如图 4 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠脑

组织中 PINK1 和 Parkin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组大鼠脑组织中 PINK1 和 Parkin 蛋白表达水平均进一步显著升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。

4 讨论

随着我国人口老龄化的加重, VD 患病率逐年升高, 极大削弱了患者的工作及自主生活能力, 因看护和治疗花费大, 给家庭造成沉重负担, 已成为亟需解决的公共医疗卫生问题^[14-15]。本研究以双侧颈总动脉永久性结扎法建立 VD 大鼠模型, 可明显升高血清中炎症因子 IL-6、IL-17 和 IL-1β 水平, 诱发并放大神经炎症, 造成大鼠海马组织神经元严重



与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, 图 4 同

[#] $P < 0.05$ vs sham operation group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group, same as Fig. 4

图 3 各组大鼠脑组织中自噬相关蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Autophagy related protein expressions in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

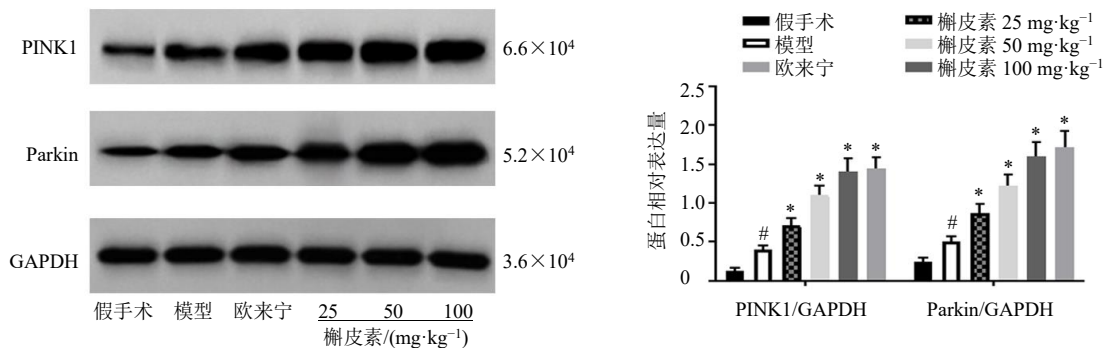


图 4 各组大鼠脑组织中 PINK1 和 Parkin 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 4 PINK1 and Parkin protein expressions in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

损伤,且大鼠脑内与学习记忆能力密切相关的 Ach^[12]和神经递质 5-HT^[15]水平均显著降低,穿梭箱实验大鼠进入暗腔室中所需的时间显著降低,在暗室中停留更久,表明大鼠的学习记忆功能明显受损,出现认知障碍,说明 VD 大鼠模型构建成功。

研究发现,脑灌注不足引发的强烈炎症是 VD 的主要病理基础,另外自噬作用在其中也发挥着至关重要的作用^[3,16],促进自噬、减轻神经元炎症损伤是治疗 VD 的有效手段^[16-17]。槲皮素作为一种天然黄酮化合物,可降低炎症因子表达,减少神经细胞凋亡,增强自噬活性,减轻脑缺血再灌注损伤^[9,18],并可通过抑制创伤性脑损伤后神经炎症,从而发挥显著的脑保护作用^[19]。本研究结果显示,VD 模型大鼠海马神经元内出现少量自噬体,脑组织中 LC3II/LC3I 及 Beclin1 蛋白表达升高,表明 VD 模型大鼠神经元自噬代偿性增强,会对神经元起到保护作用,但神经元损伤及超微结构受损严重,揭示 VD 模型大鼠神经元的自噬代偿性增强并不足以对抗其损伤,而以不同剂量的槲皮素干预 VD 大鼠,可降低大鼠血清中炎症因子 IL-6、IL-17 和 IL-1 β 水平,抑制炎症发生,提高自噬蛋白 Beclin1 及 LC3II/LC3I 表达,减轻海马组织神经元损伤及超微结构受损情况,增加神经元自噬体数量及穿梭箱实验中大鼠进入暗腔室中所需时间,升高脑组织 Ach 及 5-HT 水平,并减少大鼠在暗室中停留时间,且呈剂量相关性,揭示槲皮素不仅可减弱神经炎症,还可增强神经元自噬,从而缓解海马神经损伤,回复大鼠的学习记忆功能,发挥神经保护作用。

研究显示,PINK1/Parkin 信号通路可通过调节线粒体自噬介导唐氏综合征、阿尔茨海默症等疾病的病理过程,上调通路蛋白 PINK1、Parkin 表达可明显增强细胞自噬活性,加快清除受损线粒体,减轻细胞氧化应激损伤^[20];过表达 PINK1 可激活自噬信号,抑制活性氧产生,改善线粒体功能障碍,缓解神经元损伤,从而改善阿尔茨海默症患者痴呆症状^[21],由此可见 PINK1/Parkin 信号可通过促进自噬减轻细胞损伤,进而推测槲皮素可能通过上调 PINK1/Parkin 信号通路而增强自噬,从而减轻血管性痴呆大鼠海马神经元损伤。本研究结果显示,VD 大鼠脑组织中 PINK1 和 Parkin 蛋白表达升高,而经槲皮素处理后,两者表达进一步升高,表明 PINK1/Parkin 信号介导 VD 的病理过程,在 VD 发病过程中,PINK1/Parkin 信号有所激活,激活自噬

作用,对永久性结扎大鼠双侧颈总动脉后所引发的脑损伤有一定抵抗作用,但功效不强,而槲皮素不仅可抑制神经炎症,还可激活 PINK1/Parkin 信号,促进自噬,进一步增强细胞自噬对脑损伤的抵抗作用,最终达到改善大鼠学习记忆功能、减轻痴呆症状的作用。

综上所述,槲皮素可上调 PINK1、Parkin 蛋白表达,抑制炎症细胞因子合成和释放,缓解海马神经元炎症损伤,促进自噬,改善 VD 大鼠学习记忆功能,缓解其痴呆症状,激活 PINK1/Parkin 信号可能是其发挥以上作用的机制之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Poh L, Fann D Y, Wong P, *et al.* AIM2 inflammasome mediates hallmark neuropathological alterations and cognitive impairment in a mouse model of vascular dementia [J]. *Mol Psychiatry*, 2021, 26(8): 4544-4560.
- [2] Siniscalchi A, Gray C, Malferrari G. Ultrasound diagnostic method in vascular dementia: Current concepts [J]. *Curr Med Imaging*, 2021, 17(4): 507-512.
- [3] Wang X X, Zhang B, Xia R, *et al.* Inflammation, apoptosis and autophagy as critical players in vascular dementia [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(18): 9601-9614.
- [4] Noureddine F Y, Altara R, Fan F, *et al.* Impact of the renin-angiotensin system on the endothelium in vascular dementia: Unresolved issues and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4268.
- [5] Thammisetty S S, Renaud L, Picher-Martel V, *et al.* Targeting TDP-43 pathology alleviates cognitive and motor deficits caused by chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neurotherapeutics*, 2021, 18(2): 1095-1112.
- [6] Yao R Q, Ren C, Xia Z F, *et al.* Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: A potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles [J]. *Autophagy*, 2021, 17(2): 385-401.
- [7] Han Y F, Wang N B, Kang J, *et al.* B-Asarone improves learning and memory in A β ₁₋₄₂-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy [J]. *Metab Brain Dis*, 2020, 35(7): 1109-1117.
- [8] 赵雨薇,甄艳杰,戴月英,等.槲皮素对阿尔茨海默症神经保护作用研究[J].*神经药理学报*,2020,10(5):55-64.
- [9] 王叶倩,王宇红,邹蔓姝,等.槲皮素及其糖苷衍生物抗抑郁作用及其机制的研究进展[J].*中草药*,2022,53(5):1548-1557.
- [10] 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.
- [11] 孟胜喜,陈慧泽,王兵,等.基于 PI3K/AKT 信号通路

- 及自噬探讨恒清 I 号方治疗血管性痴呆的作用机制 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(35): 3877-3881.
- [12] 陈惠芳, 莫友胜, 杨从, 等. 槲皮素对鹅膏蕈氨酸致痴呆大鼠模型海马神经元的保护作用及机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 552-556.
- [13] Kooshki R, Anaigoudari A, Abbasnejad M, *et al.* Abscisic acid interplays with PPAR γ receptors and ameliorates diabetes-induced cognitive deficits in rats [J]. *Avicenna J Phytomed*, 2021, 11(3): 247-257.
- [14] Giannouli V, Tsolaki M. Vascular dementia, depression, and financial capacity assessment [J]. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 2021, 35(1): 84-87.
- [15] Zhang L L, Fan Y Z, Kong X Y, *et al.* Neuroprotective effect of different physical exercises on cognition and behavior function by dopamine and 5-HT level in rats of vascular dementia [J]. *Behav Brain Res*, 2020, 388: 112648.
- [16] Wang L, Yang J W, Lin L T, *et al.* Acupuncture attenuates inflammation in microglia of vascular dementia rats by inhibiting miR-93-mediated TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 8253904.
- [17] Wang F, Zhang C, Hou S Y, *et al.* Synergistic effects of mesenchymal stem cell transplantation and repetitive transcranial magnetic stimulation on promoting autophagy and synaptic plasticity in vascular dementia [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2019, 74(9): 1341-1350.
- [18] 康瑜, 杨小芳. 纳米脂质体槲皮素对脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制 [J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2): 116-122.
- [19] 翟效甫, 王子钰, 于如同. 槲皮素上调 PGC-1 α 对创伤性脑损伤后炎症反应致神经细胞凋亡的影响 [J]. 临床神经外科杂志, 2020, 17(6): 689-693.
- [20] Bordi M, Darji S, Sato Y, *et al.* mTOR hyperactivation in down syndrome underlies deficits in autophagy induction, autophagosome formation, and mitophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(8): 563.
- [21] Du F, Yu Q, Yan S S. PINK1 activation attenuates impaired neuronal-like differentiation and synaptogenesis and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease trans-mitochondrial cybrid cells [J]. *J Alzheimers Dis*, 2021, 81(4): 1749-1761.

[责任编辑 李亚楠]