

何首乌苷对大鼠中动脉栓塞再灌注模型大鼠皮层线粒体自噬的调控作用及神经保护机制

向韵^{1,2}, 黄丹^{1,2}, 雷昌^{1,2}, 周梓洋^{1,2}, 邱峰^{1,2}, 刘桐赫^{1,2}, 施佳仪^{1,2}, 谭开媚^{1,2}, 曾红雨^{1,2}, 易韬^{1,2}, 伍大华³, 张秀丽^{1,2*}

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

摘要: 目的 研究何首乌苷 (2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-glucoside, THSG) 在脑缺血再灌注 (cerebral ischemia/reperfusion, CI/R) 中对大鼠皮层神经元的保护作用。方法 采用线栓法建立大鼠短暂性大脑中动脉栓塞再灌注 (transient middle cerebral artery occlusion/reperfusion, tMCAO/R) 模型。雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和 THSG 低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg) 组, 每组 10 只。采用 Longa 5 分法评估神经功能缺损情况; TTC 染色检测大鼠脑梗死体积百分比; 苏木素-伊红 (HE) 染色检测神经元结构; Nissl 染色检测 Nissl 小体数量; Western blotting 检测半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、PTEN 诱导的激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1)、Parkin、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)、p62 的蛋白表达; 透射电镜观察皮层神经元线粒体自噬情况; 免疫荧光检测神经元 Parkin、LC3 的表达。结果 THSG 显著降低了 MCAO/R 大鼠脑梗死体积百分比和神经功能缺损评分 ($P < 0.05$ 、 0.001), 降低了 MCAO/R 大鼠皮层神经元结构损伤和 Nissl 小体丢失的现象, 下调了皮层区 cleaved Caspase-3、Bax、p62 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 上调了皮层区 Bcl-2、LC3-II/LC3-I 蛋白表达 ($P < 0.01$), 促进皮层神经元中自噬体的数量增加以及 PINK1、Parkin 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.001)。结论 THSG 能显著改善 MCAO/R 大鼠皮层神经元损伤, 其神经保护机制与促进 PINK1/Parkin 依赖性线粒体自噬途径有关。

关键词: 何首乌苷; 脑缺血再灌注; 皮层; 线粒体自噬; PINK1/Parkin 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4771-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.014

Regulation and neuroprotective mechanism of 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-glucoside on mitochondrial autophagy in cortex of rats with middle cerebral artery occlusion/reperfusion model

XIANG Yun^{1,2}, HUANG Dan^{1,2}, LEI Chang^{1,2}, ZHOU Ziyang^{1,2}, QIU Feng^{1,2}, LIU Tonghe^{1,2}, SHI Jiayi^{1,2}, TAN Kaimei^{1,2}, ZENG Hongyu^{1,2}, YI Tao^{1,2}, WU Dahua³, ZHANG Xiuli^{1,2}

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

Abstract: Objective To investigate the protective effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-O-glucoside (THSG) on cortical neurons in rats during cerebral ischemia/reperfusion (CI/R). **Methods** The rat transient middle cerebral artery occlusion/reperfusion (tMCAO/R) model was established by the wire bolt method. Male SD rats were randomly divided into sham

收稿日期: 2024-04-04

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82374441); 湖南省自然科学基金资助项目 (2023JJ30465, 2023JJ40483); 长沙市自然科学基金资助项目 (kq2208186); 湖南省教育厅青年项目 (22B0351); 湖南中医药大学校级科研项目 (2022XJZKC013, 2021XJJ026); 湖南中医药大学中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地开放基金资助项目 (21PTKF1013, 21PTKF1022, 2022FTKFJ08)

作者简介: 向韵, 女, 实验师, 从事脑病发病机制及中医药防治研究。E-mail: xiangyun003997@hnuocm.edu.cn

***通信作者:** 张秀丽, 女, 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: shxxzhzhxl.9803@163.com

group, model group and THSG low-, medium-, high-dose (10, 20, 40 mg/kg) groups, with 10 rats in each group. Longa quintile was used to assess neurological deficits; TTC staining was used to detect the volume percentage of cerebral infarction in rats. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect neuronal structure. Nissl staining was used to detect the number of Nissl bodies; Western blotting was used to detect the protein expressions of cystein-aspartate protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), PTEN induced putative kinase 1 (PINK1), Parkin, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) and p62; Mitochondrial autophagy of cortical neurons was observed by transmission electron microscopy; Immunofluorescence assay was used to detect the expressions of Parkin and LC3 in neurons. **Results** THSG significantly reduced the percentage of cerebral infarction volume and neurological deficit score in MCAO/R rats ($P < 0.05, 0.001$), reduced the structural damage and Nissl body loss of cortical neurons in MCAO/R rats, down-regulated the expressions of cleaved Caspase-3, Bax, and p62 proteins in cortical area ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), up-regulated the expressions of Bcl-2, LC3-II/LC3-I proteins in cortical area ($P < 0.01$), promoted the increase of autophagosomes in cortical neuron and expressions of PINK1 and Parkin proteins ($P < 0.05, 0.001$). **Conclusion** THSG can significantly improve cortical neuronal damage in MCAO/R rats, and its neuroprotective mechanism is related to promoting PINK1/Parkin dependent mitochondrial autophagy pathway.

Key words: 2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*-glucoside; cerebral ischemia/reperfusion; cortex; mitochondrial autophagy; PINK1/Parkin pathway

脑卒中是全球第2大死亡和致残的主要病因,根据世界卫生组织的数据,全球每年约1 500万人患有卒中,给家庭和社会带来了巨大的负担^[1]。脑卒中病患约87%为缺血性卒中,故及时恢复大脑的血氧供应对于维持神经元活力至关重要。脑缺血再灌注(cerebral ischemia/reperfusion, CI/R)是目前临床上缺血性卒中患者主要的治疗方案,但再灌注治疗过程中会引发新的损伤,该过程涉及线粒体功能障碍、自噬激活、活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生和凋亡因子的释放等病理机制^[2],在细胞和组织结构水平上加剧了脑损伤,导致不可逆损害增加。重组组织纤溶酶原激活剂(rt-PA)仍然是目前唯一批准治疗急性缺血性卒中的药物,研究显示rt-PA治疗在卒中发生(24 h内)越早越好,而绝大多数病患无法得到及早治疗^[3]。因此,如何在缺血性卒中后的再灌注期间提供神经保护,对于疾病管理有着重要的意义。

线粒体作为细胞呼吸的中心,在CI/R损伤过程中发挥着重要作用,故与最终细胞死亡密切相关的线粒体功能障碍被认为是CI/R损伤病理生理学的基本因素^[4]。线粒体自噬在消除受损或功能失调的线粒体以及维持线粒体稳态方面发挥着重要作用,其作为一个关键的细胞内过程,可以选择性地去除受损的线粒体,以防止因积累而导致的神经元变性^[5-6]。PTEN诱导的激酶1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)/Parkin作为经典的线粒体自噬通路,在体内外实验中已被证实参与改善CI/R中海马神经元损伤^[7-8]。因此,寻找与开发合适的药物调控PINK1/Parkin依赖性线粒体自噬途径来改善CI/R

损伤,可能为缺血性脑卒中的治疗提供新的方法。

目前,西医通过干预线粒体自噬途径防治CI/R损伤多采用化学药治疗为主,虽然化学药具有起效快、作用佳的优势,但相关的治疗方案尚未达成共识,其临床用药安全性还有待阐明^[9];故将目标转向具有疗效高、成本低、安全性高等优点的中药复方及其有效成分。何首乌 *Polygoni Multiflori Radix* 作为一种天然中药,在抗衰老及众多类型的疾病中发挥了良好效用^[10-11]。何首乌苷(2,3,5,4'-tetrahydroxyl diphenylethylene-2-*O*-glucoside, THSG)作为何首乌的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化^[12-13]、抗细胞凋亡^[14]、抗脑缺血损伤^[15]作用,在神经保护方面具有很好的应用前景以及潜在药用价值,因此可列为治疗CI/R损伤的候选药物。本研究拟采用短暂性大脑中动脉栓塞/再灌注(transient middle cerebral artery occlusion/reperfusion, tMCAO/R)模型大鼠为研究对象,探讨THSG对神经元线粒体自噬的调节作用及改善CI/R损伤的潜在作用机制,为中医药治疗CI/R损伤提供新的思路。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性SD大鼠,7~9周龄,体质量220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号430727211102349131,饲养于湖南中医药大学动物实验中心,许可证号SYXK(湘)2019-0009。大鼠于SPF级饲养条件、温度(22±3)℃、相对湿度(50±5)%适应性喂养7 d后,进行后续实验。动物实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审查通过(批准号LLBH-202003270001),并遵守了有关动

物伦理使用的所有适用的机构和政府法规。

1.2 药品与试剂

THSG(批号 H08J11E115101, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司, 结构式见图 1; Parkin 抗体(批号 GR3318878-10)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) 抗体(批号 GR3338049-20)、 β -actin 抗体(批号 GR3249122-22)、Alexa Fluor 488 标记的驴抗兔二抗(批号 GR3377607-2)、Alexa Fluor 594 标记的驴抗小鼠二抗(批号 GR3235186-3) 购自英国 Abcam 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体(批号 19) 购自美国 CST 公司; PINK1 抗体(批号 00115469)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax) 抗体(批号 10005017)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体(批号 10022354)、p62 抗体(批号 13916-1-AP)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 20000575)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 20000553) 购自美国 Proteintech 公司; NSE(批号 WC3238082)、Alexa Fluor Plus 555 标记的山羊抗鸡二抗(批号 WA316332) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号 UJ9BK YBUHU) 购自 Elabscience 公司; NovoStart[®] SYBR qPCR SuperMix Plus (批号 5256502) 购自 Novoprotein 公司。

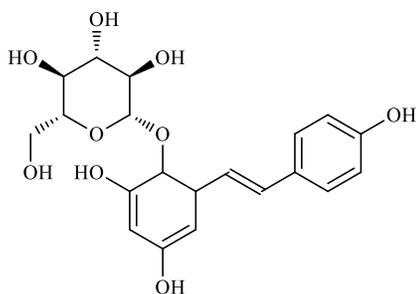


图 1 THSG 化学结构式

Fig. 1 THSG chemical structure formula

1.3 仪器

LSM800 型激光共聚焦显微镜(德国 Zeiss 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪、化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); HT7700 型透射电镜(日本 Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 tMCAO/R 模型大鼠建立^[16]

用 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠, 碘伏消毒, 颈部中

线切口后, 钝性分离皮下组织和神经。使用 MCAO 线拴插入右颈总动脉并通过颈内动脉推进以阻塞大脑中动脉的起源。90 min 后, 去除拴线以允许再灌注 24 h。假手术组除 tMCAO/R 外, 均进行了相同的操作。

2.2 分组与给药

动物随机分为假手术组、模型组和 THSG 低、中、高剂量(10、20、40 mg/kg)^[17]组, 每组 10 只。除假手术组外, 其他组大鼠均进行 tMCAO 处理, 并于再灌注开始阶段 ip THSG。再灌注 24 h 后大鼠采取安乐处死, 获取病变的大脑组织进行检测。

2.3 指标检测

2.3.1 TTC 染色检测 处死动物, 快速将大脑剥离, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下冷冻 30 min, 将冷冻完成的大脑切成 5 个 2 mm 厚的冠状切片。 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下经 2% TTC 染色 20 min, 拍照。通过 Image J 软件计算梗死区域体积百分比。

2.3.2 神经功能缺损评分 tMCAO/R 后, 采用 Longa 5 分法^[18]进行评分: 0 分, 无缺损; 1 分, 瘫痪侧前爪不能完全伸展; 2 分, 行走时向瘫痪侧转圈; 3 分, 行走时向瘫痪侧倾倒; 4 分, 无自发运动活动。

2.3.3 苏木素-伊红(HE)染色检测 动物处死后, 将大脑取出并浸泡至 4%多聚甲醛中, 随后进行石蜡包埋、切片。石蜡切片依次放入梯度浓度的二甲苯和乙醇溶液进行脱蜡处理, 水洗去残余试剂。再将切片依次进行苏木素、伊红染色操作, 最后封片。通过透射电镜进行图像的观察、采集和分析。

2.3.4 Nissl 染色检测 石蜡切片完成脱蜡操作后, 浸入甲苯胺蓝染液中 2~5 min, 经水洗、0.1%冰醋酸分化操作, 最后完成封片。通过透射电镜进行图像的观察、采集和分析。

2.3.5 Western blotting 检测相关蛋白的表达 取各组大鼠皮层组织, 匀浆后 14 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液即为蛋白样品。以每孔 20 μg 蛋白样品上样并电泳, 转膜 90 min, 封闭 2 h。分别加入 Caspase-3、Bcl-2、Bax、Parkin、PINK1、LC3、p62 一抗(1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。次日加入对应的二抗(1:5 000), 室温摇床孵育 1 h, 凝胶成像系统显影, 使用 Image J 软件计算并分析各蛋白条带灰度值。

2.3.6 透射电镜观察自噬体 收集皮层组织, 使用 2.5%戊二醛于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h, 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗, 用 1%锇酸在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 继续固定 2 h。随后样

品于梯度丙酮溶液中进行脱水，再于包埋液中 37 °C 浸泡 12 h。最后 37 °C 烘箱中固化过夜，60 °C 固化 24 h。样品制成 50~100 nm 的切片，经 3% 醋酸铀、硝酸铅双染色，使用透射电镜观测。

2.3.7 免疫荧光染色检测 石蜡切片进行脱蜡、抗原修复、封闭等操作后，分别将 Parkin、LC3 的一抗按照说明书稀释成相应的比例，4 °C 孵育过夜，经 PBS 溶液漂洗 3 遍后，使用对应的荧光二抗室温避光孵育 1 h，再使用 PBS 溶液漂洗 3 遍，最后用 Hoechst 33342 标记细胞核。通过荧光显微镜进行图像的观察、采集和分析。

2.4 统计学分析

所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用独立 *t* 检验分析两组之间的差异，并使用单因素方差分析评估多组之间的比较。

3 结果

3.1 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠脑梗死体积和神经功能缺损评分的影响

如图 2 所示，与假手术组比较，模型组大鼠脑梗死体积百分比明显增加 ($P < 0.001$)，神经功能缺损评分显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，THSG (20、40 mg/kg) 组脑梗死体积百分比明显减少 ($P < 0.001$)，THSG (40 mg/kg) 组神经功能缺损评分显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠皮层神经元结构、功能的影响

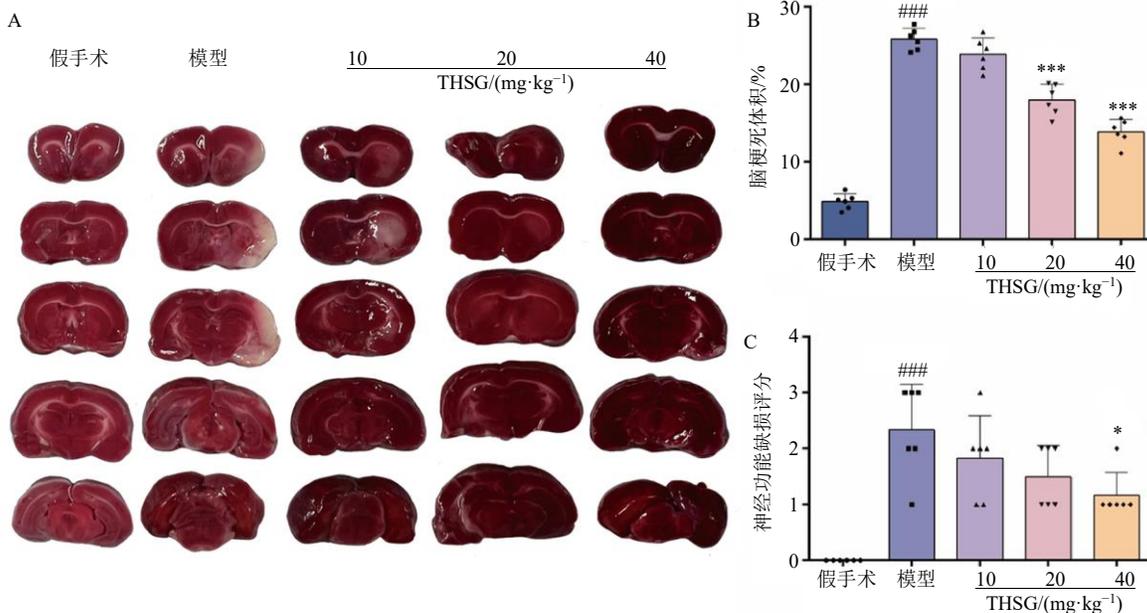
如图 3 所示，模型组大鼠皮层神经元出现细胞质水肿松动，细胞核固缩消失，轴突断裂等损伤现象，另外 Nissl 小体也呈现浅着色和数量减少等状况，但假手术组中并没有观察到上述改变。THSG 治疗后，有效地减少了神经元结构受损，并且降低了 Nissl 小体丢失的现象；且效果随着 THSG 剂量增加而增加。

3.3 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠皮层神经元凋亡相关蛋白 cleaved Caspases-3、Bax 和 Bcl-2 表达的影响

如图 4 所示，与假手术组比较，模型组大鼠皮层神经元中 cleaved Caspases-3 和 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)，Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，随着 THSG 给药剂量的增加，cleaved Caspases-3、Bax 蛋白表达水平逐步降低 ($P < 0.05、0.01$)，Bcl-2 蛋白表达水平逐步增加 ($P < 0.01$)，表明 THSG 具有良好的抗神经元凋亡效果。

3.4 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠皮层神经元中线粒体自噬发生的影响

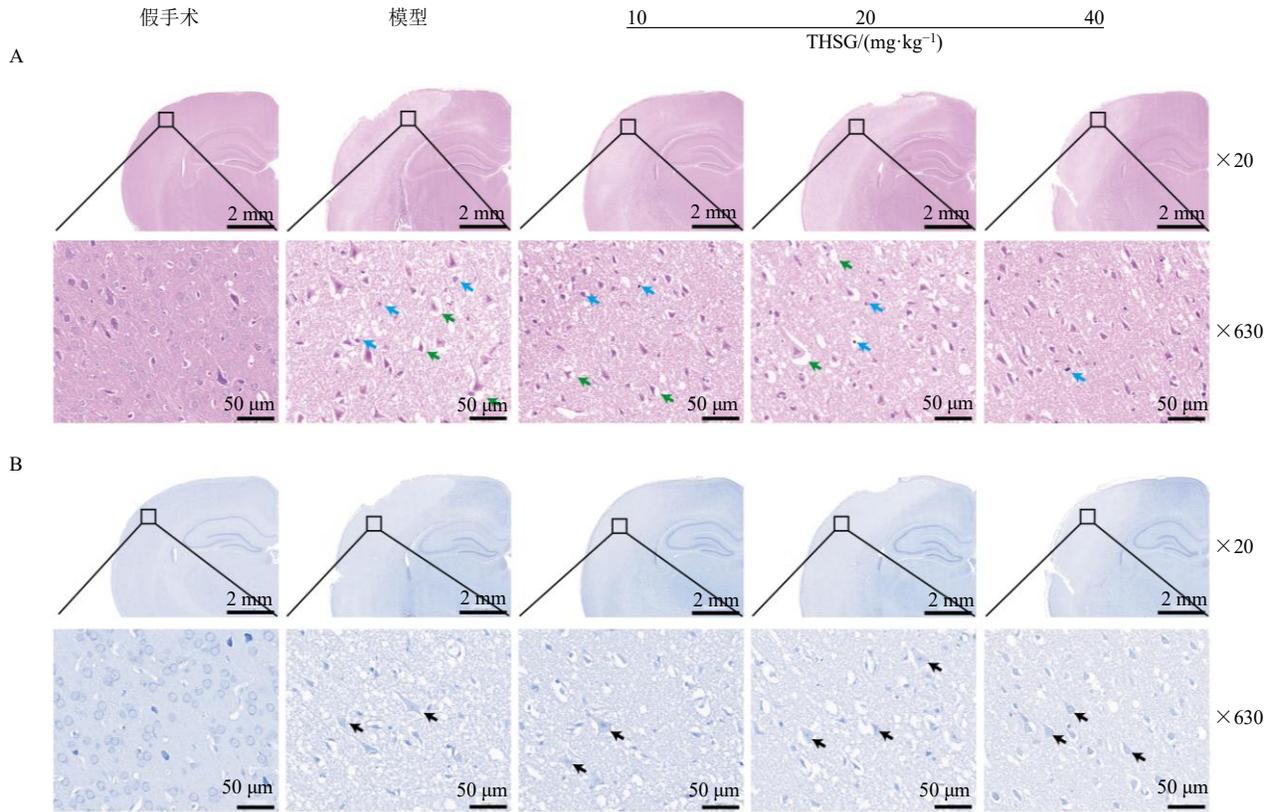
如图 5 所示，假手术组神经元的细胞核、线粒体等细胞器结构清晰完整；模型组大鼠皮层神经元



与假手术组比较：# $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ，下同。
$P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs sham group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 2 各组大鼠脑梗死体积百分比 (A、B) 和神经功能缺损评分 (C) ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Percentage of cerebral infarction volume (A, B) and neurological deficit score (C) of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-H&E 染色, 蓝色箭头表示核固缩, 绿色箭头表示神经元水肿; B-Nissl 染色, 黑色箭头表示 Nissl 小体。

A-H&E staining, blue arrows indicate nuclear pyknosis, green arrows indicate neuronal edema; B-Nissl staining, black arrows indicate Nissl bodies.

图 3 各组大鼠皮层神经元结构和功能情况

Fig. 3 Structure and function of cortical neurons in rats of each group

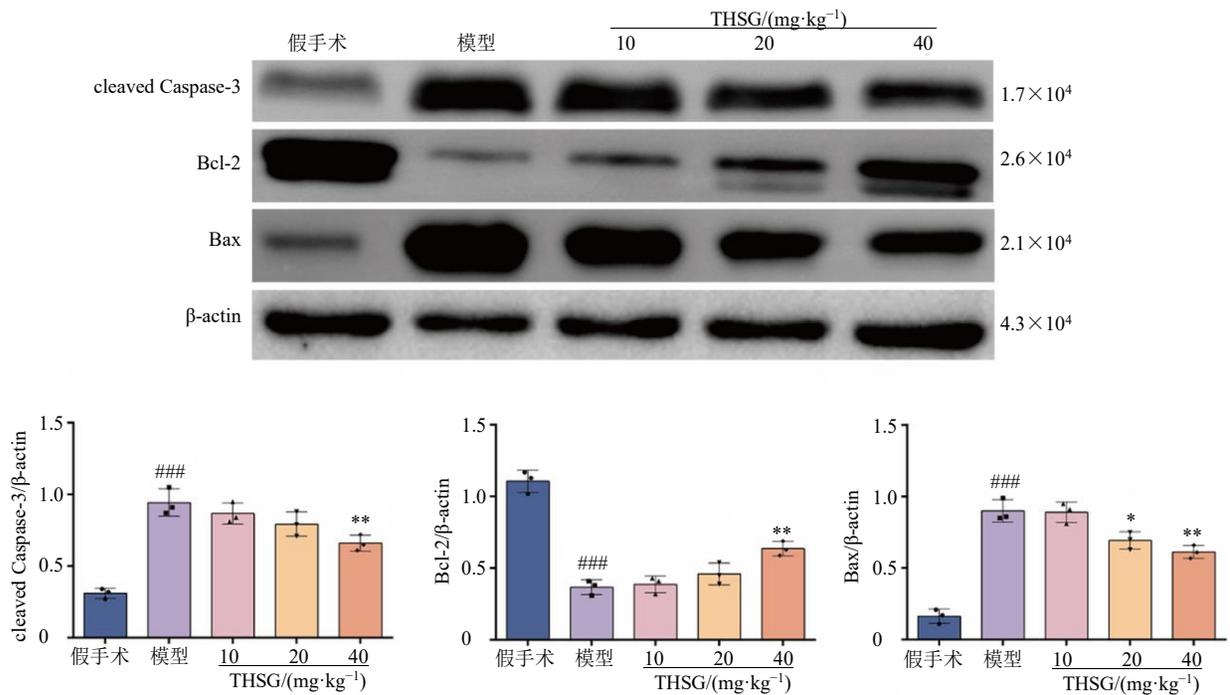
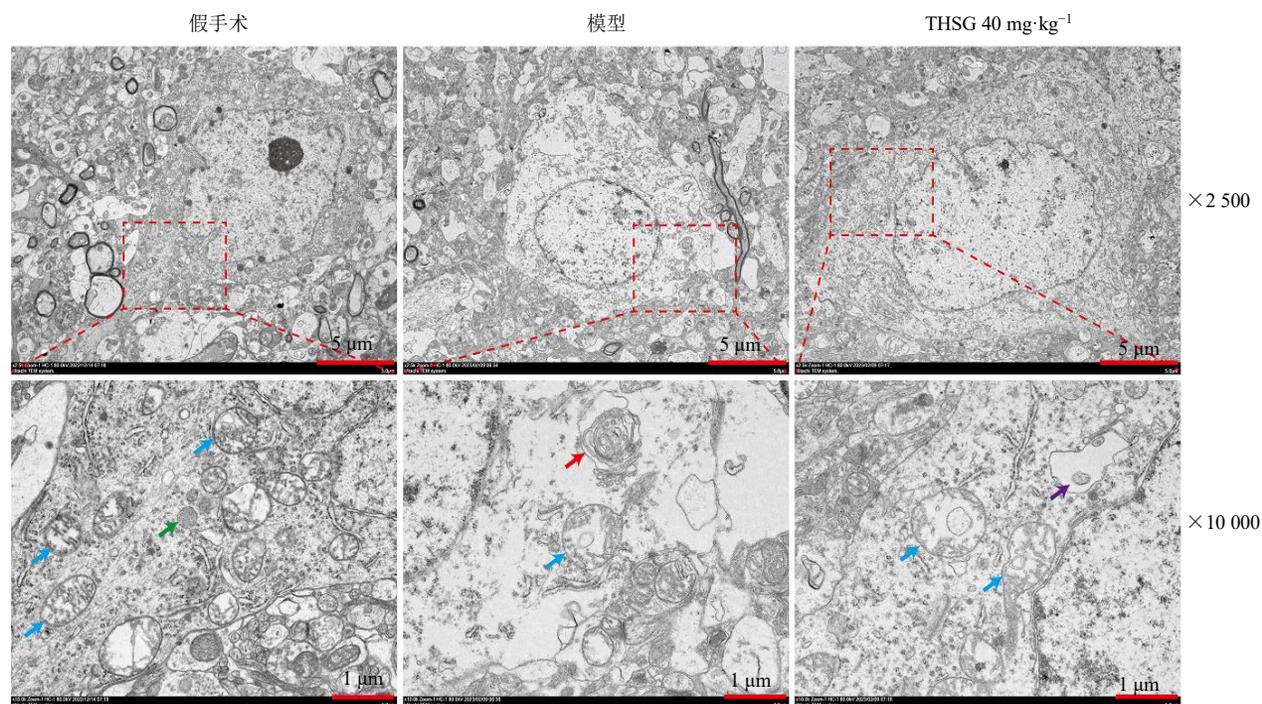


图 4 各组大鼠皮层神经元中凋亡蛋白 cleaved Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Expressions of apoptotic proteins cleaved Caspase-3, Bcl-2 and Bax in cortical neurons of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



蓝色箭头表示线粒体；绿色箭头表示溶酶体；红色箭头表示自噬小体；紫色箭头表示线粒体自噬。

Blue arrows indicate mitochondria; Green arrows indicate lysosome; Red arrows indicate autophagosomes; Purple arrows indicate mitochondrial autophagy.

图5 各组大鼠皮层神经元中线粒体自噬发生的情况

Fig. 5 Mitochondrial autophagy in cortical neurons of rats in each group

中线粒体出现水肿、碎裂等现象，细胞质中出现大小不一的自噬泡；THSG (40 mg/kg) 给药组神经元自噬体数量进一步增加，并在其中发现由双层膜结构包被的线粒体。

3.5 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠皮层神经元中 PINK1 和 Parkin 表达的影响

使用 Parkin 和 NeuN 抗体对大鼠脑切片进行免疫共染色。如图 6 所示，模型组明显观察到皮层神经元丢失，Parkin 开始在神经元中凝聚表达，提示神经元中 Parkin 被激活；随着 THSG 给药剂量的增加，神经元中 Parkin 活化情况进一步增加。

同时采用 Western blotting 对大鼠皮层神经元中 PINK1、Parkin 蛋白表达水平进行检测，如图 7 所示，与假手术组比较，模型组 PINK1、Parkin 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，THSG 各剂量组 PINK1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.001$)，THSG 中、高剂量组 Parkin 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)，呈剂量相关性。

3.6 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠皮层神经元线粒体自噬相关蛋白 LC3 和 p62 表达的影响

使用 LC3 和神经元标志物 NeuN 的抗体，对大

鼠脑切片进行免疫共染色。如图 8 所示，模型组观察到 LC3 在皮层神经元中表达的增加；THSG 给药后促进了 LC3 在神经元中的表达，并且随 THSG 的给药剂量增加而逐步升高。

采用 Western blotting 检测并分析各组大鼠皮层区 LC3、p62 蛋白的表达，如图 9 所示，与假手术组比较，模型组皮层中 LC3-II/LC3-I 水平显著增加 ($P < 0.05$)，p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，THSG 高剂量组 LC3-II/LC3-I 水平显著增加 ($P < 0.01$)，THSG 各剂量组 p62 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)，呈剂量相关性。

4 讨论

THSG 作为从何首乌中提取的主要活性成分之一，有较好的抗 CI/R 损伤的作用^[19-20]。本研究对大鼠进行 tMCAO/R 造模以模拟临床缺血性卒中患者 CI/R 损伤的病理变化。结果显示，与假手术组比较，tMCAO/R 模型大鼠脑梗死体积和神经功能缺损增加，缺血侧皮层神经元结构功能受损增加，神经元凋亡增多，而 THSG 干预可显著降低 tMCAO/R 模型大鼠的脑损伤，且效果随着 THSG 给药剂量的增加而增加，验证了其良好的神经保护作用。

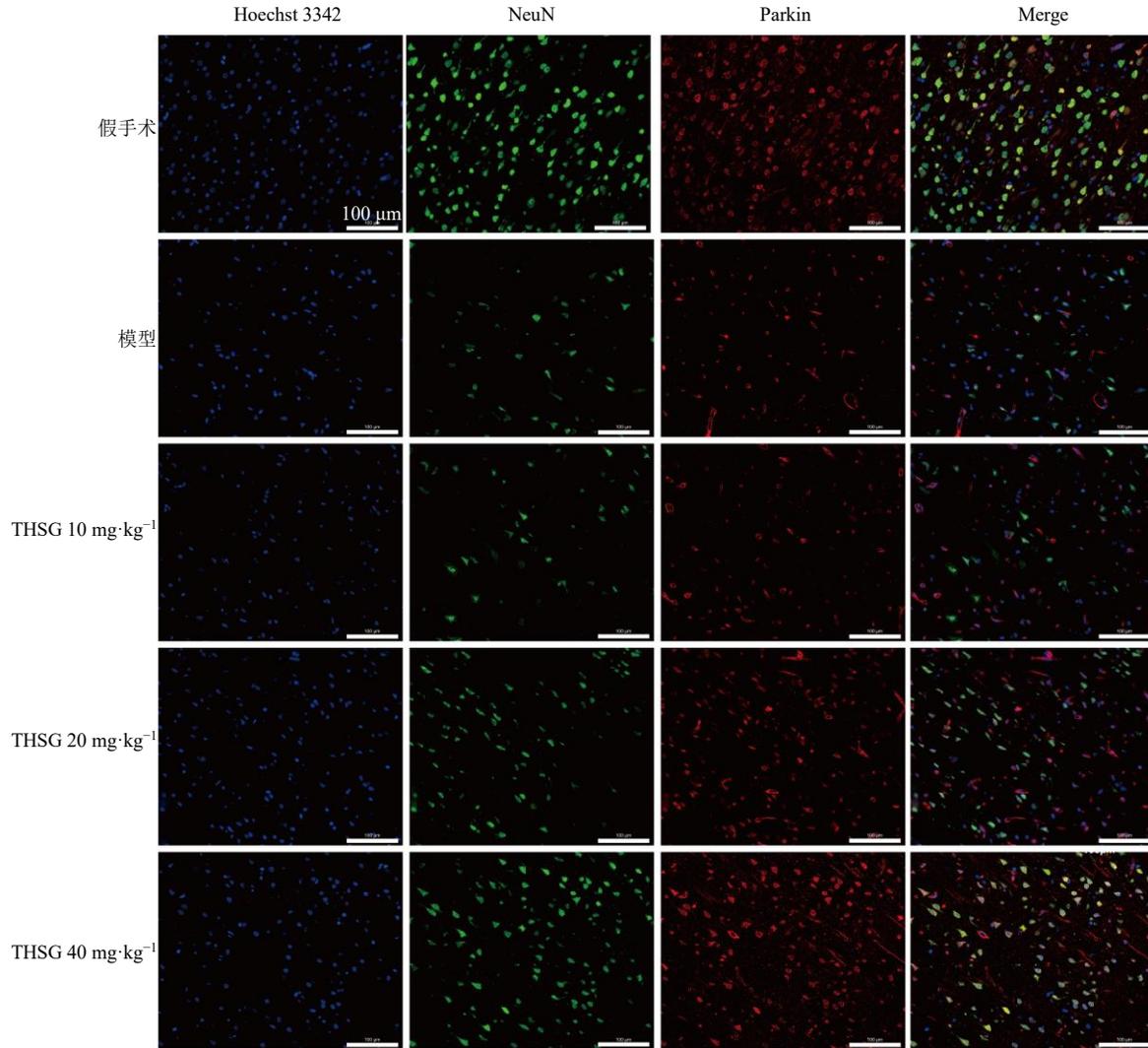


图 6 各组大鼠皮层神经元中 Parkin 的表达 (×400)

Fig. 6 Expression of Parkin in cortical neurons of rats in each group (× 400)

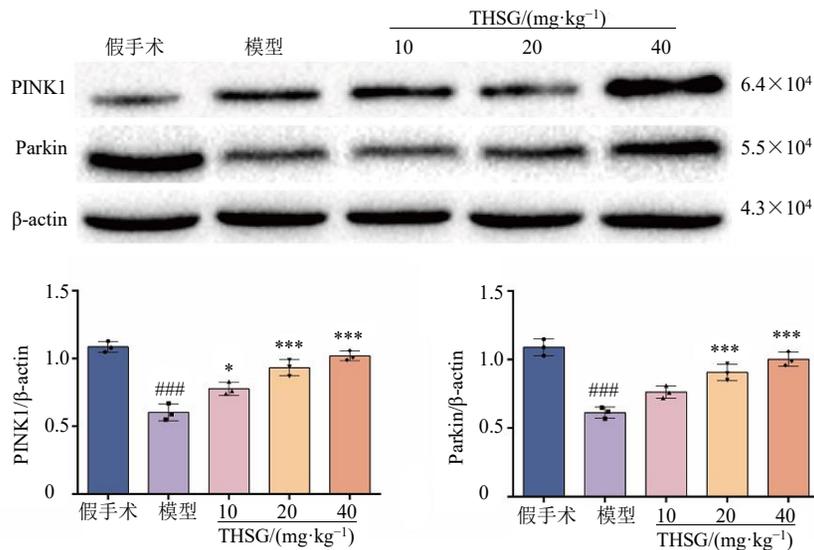


图 7 各组大鼠皮层中 PINK1、Parkin 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Expressions of PINK1 and Parkin proteins in cortical neurons of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

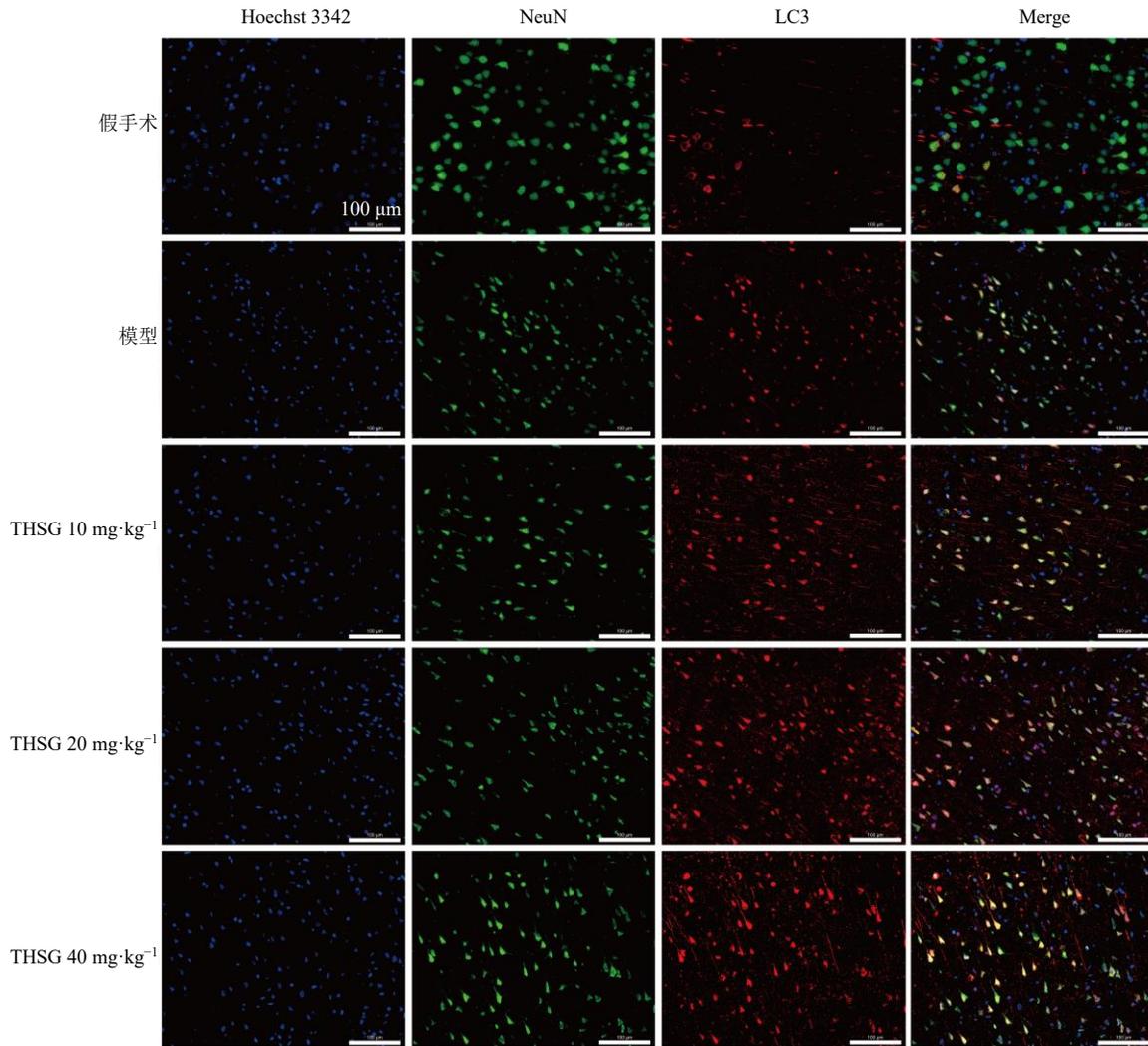


图 8 各组大鼠皮层神经元中 LC3 的表达 (×400)

Fig. 8 Expression of LC3 in cortical neurons of rats in each group (×400)

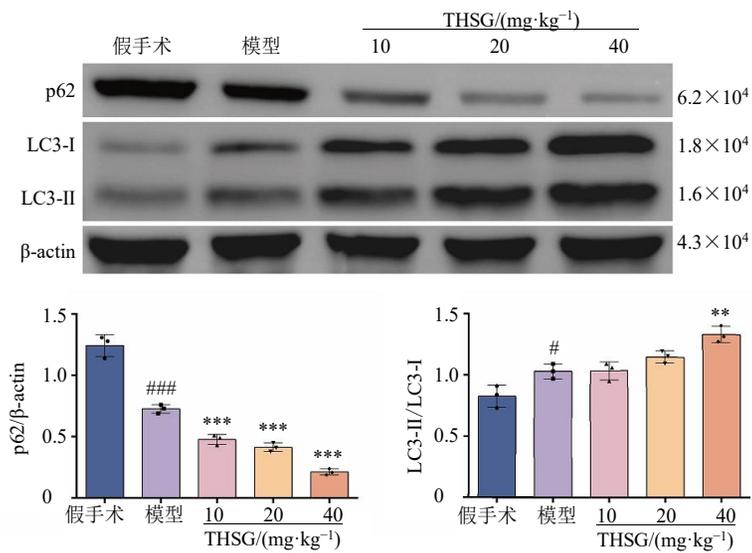


图 9 各组大鼠皮层神经元中自噬相关蛋白 LC3、p62 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Expressions of autophagy-related proteins LC3 and p62 in cortical neurons of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

线粒体作为细胞中能量产生和凋亡调控的核心,与众多神经退行性疾病和脑缺血所致病变密切相关^[21],已有的研究^[19-20]发现 THSG 能改善 CI/R 中细胞线粒体的结构损伤和功能障碍,但对于线粒体自噬的影响尚未涉及。本研究中透射电镜观察结果表明,tMCAO/R 模型大鼠皮层神经元中线粒体结构被破坏,并出现自噬小体;而 THSG 干预后不仅抑制了模型大鼠皮层神经元的凋亡,并进一步增加了神经元中线粒体自噬数量,在神经元中明显发现由双层膜结构包被的线粒体。提示 THSG 对 tMCAO/R 模型大鼠脑损伤的改善作用与促进皮层神经元线粒体自噬的发生有关,这与 Jiao 等^[22]、魏思灿等^[23]的发现一致,通过药物干预修复受损细胞形态、激活线粒体自噬来改善 CI/R 后海马神经元的损伤。

线粒体自噬是机体消除功能失调的线粒体、维持线粒体环境平衡的重要途径。其中 PINK1/Parkin 通路是目前研究最广泛的泛素依赖性线粒体自噬途径,在 CI/R 损伤的病理过程中发挥重要作用^[24-25]。线粒体蛋白 PINK1 参与线粒体形态、功能和自噬等过程,在正常线粒体中 PINK1 不断转移到线粒体内膜后被降解,故 PINK1 表达太低而无法检测到^[26]。当线粒体去极化或受损时,PINK1 进入线粒体内膜的路径被阻断,就稳定在线粒体外膜上,在那里它募集和磷酸化 Parkin 及泛素分子,导致 Parkin 的酶促激活,最终产生线粒体自噬的“吃我”信号^[27]。本研究中对 PINK1 和 Parkin 的蛋白表达水平检测结果显示,tMCAO/R 模型组大鼠皮层神经元中 PINK1 和 Parkin 水平均下调,此结果与先前报道一致^[28-29];经 THSG 干预后模型大鼠皮层神经元 PINK1 和 Parkin 水平均上调,且与 THSG 的给药剂量呈正相关,THSG 呈现促进线粒体自噬发生的作用。但在免疫荧光检测结果中,发现 tMCAO/R 模型组大鼠皮层神经元丢失, Parkin 明显被激活并聚集于受损线粒体处,且随着 THSG 给药剂量的增加,神经元中 Parkin 活化情况进一步增加。提示在大鼠 tMCAO/R 过程中线粒体自噬虽然激活,但线粒体自噬功能受损严重,进而导致神经元凋亡,而 THSG 干预能通过促进线粒体自噬发生来抵抗神经损伤。

此外,当 PINK1/Parkin 通路激活时,定位于线粒体外膜的 Parkin 还可以通过募集 LC3、p62 等共同参与泛素非依赖性线粒体自噬途径^[30-31]。位于自噬泡膜表面的 LC3 存在 2 种形式,自噬发生时由 LC3-I 转化成 LC3-II,参与自噬体膜的再生,故 LC3-

II 表达增加代表自噬率升高^[32]。p62 是一种经典的选择性自噬受体,可与自噬体上的 LC3 相互作用,从而通过选择性自噬降解蛋白质聚集体、脂滴和受损细胞器等大分子物质^[33]。自噬功能的损害会引起 p62 的大量积累,继而形成 p62 和泛素阳性的聚集体结构,促进疾病的发生发展^[34]。本研究免疫荧光和 Western blotting 检测结果显示,与模型组比较,随着给药浓度的增加,THSG 组大鼠皮层神经元中 LC3 表达、LC3-II/LC3-I 的比例增加,p62 水平降低,再次验证了 THSG 促进线粒体自噬的调节作用。同样观察到,与假手术组相比,tMCAO/R 模型组大鼠皮层神经元 LC3 的荧光表达增加,与 Parkin 的研究结果一致;但是模型组 LC3-II/LC3-I 的比例增加,p62 水平降低,与 PINK1 和 Parkin 蛋白结果相反,以上结果并不矛盾,LC3 和 p62 作为细胞自噬标志蛋白与细胞内众多的自噬途径密切相关,而 PINK1/Parkin 途径介导的线粒体自噬仅作为其中之一,二者呈现不同变化趋势更加证明在 CI/R 损伤过程中神经元自噬调控途径是复杂多样的。

综上,THSG 可能通过促进 PINK1/Parkin 途径依赖的线粒体自噬发生,实现对 CI/R 损伤中神经元的保护作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Khan M M, Paez H G, Pitzer C R, *et al.* The therapeutic potential of mitochondria transplantation therapy in neurodegenerative and neurovascular disorders [J]. *Curr Neuropharmacol*, 2023, 21(5): 1100-1116.
- [2] Shen Z, Zheng Y R, Wu J Y, *et al.* PARK2-dependent mitophagy induced by acidic postconditioning protects against focal cerebral ischemia and extends the reperfusion window [J]. *Autophagy*, 2017, 13(3): 473-485.
- [3] Arkelius K, Vivien D, Orset C, *et al.* Validation of a stroke model in rat compatible with rt-PA-induced thrombolysis: New hope for successful translation to the clinic [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 12191.
- [4] Sun J, Li Y Z, Ding Y H, *et al.* Neuroprotective effects of gallic acid against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial dysfunctions *in vitro* and cerebral ischemia/reperfusion injury *in vivo* [J]. *Brain Res*, 2014, 1589: 126-139.
- [5] Li J, Wu J Y, Zhou X Y, *et al.* Targeting neuronal mitophagy in ischemic stroke: An update [J]. *Burns Trauma*, 2023, 11: tkad018.

- [6] Tang Y C, Tian H X, Yi T, *et al.* The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia [J]. *Protein Cell*, 2016, 7(10): 699-713.
- [7] Mao Z G, Tian L Y, Liu J, *et al.* Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154111.
- [8] 孙阔, 霍瑞卿, 韩宇帆, 等. 化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤大鼠线粒体自噬相关蛋白 PINK1 和 Parkin 的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2023, 38(3): 1014-1019.
- [9] 张帅迪, 李瑞青, 张建业, 等. 中西医调控线粒体自噬防治脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J/OL]. *沈阳药科大学学报*, (2024-03-29) [2024-04-04]. <https://doi.org/10.14066/j.cnki.cn21-1349/r.2023.0766.1-15>.
- [10] Rao T, Liu Y T, Zeng X C, *et al.* The hepatotoxicity of *Polygonum multiflorum*: The emerging role of the immune-mediated liver injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(1): 27-35.
- [11] 王卓, 钟凌云, 解杨, 等. 基于“生熟异用”何首乌的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. *中草药*, 2022, 53(3): 882-897.
- [12] Wang T, Gu J, Wu P F, *et al.* Protection by tetrahydroxystilbene glucoside against cerebral ischemia: Involvement of JNK, SIRT1, and NF-kappaB pathways and inhibition of intracellular ROS/RNS generation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 47(3): 229-240.
- [13] Xiang K, Liu G, Zhou Y J, *et al.* 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG) attenuates human platelet aggregation, secretion and spreading *in vitro* [J]. *Thromb Res*, 2014, 133(2): 211-217.
- [14] Tsai K Y, Wei P L, Lee C C, *et al.* 2,3,5,4'-Tetrahydroxystilbene (TG1), a novel compound derived from 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside (THSG), inhibits colorectal cancer progression by inducing ferroptosis, apoptosis, and autophagy [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(7): 1798.
- [15] 王冯瑞, 唐子龙, 王宇轩, 等. 何首乌属化学成分与药理作用研究进展 [J]. *陕西中医药大学学报*, 2024, 47(3): 136-150.
- [16] Yu J, Wang W N, Matei N, *et al.* Ezetimibe attenuates oxidative stress and neuroinflammation via the AMPK/Nrf2/TXNIP pathway after MCAO in rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4717258.
- [17] Wang C, Dai S, Gong L H, *et al.* A review of pharmacology, toxicity and pharmacokinetics of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 791214.
- [18] Liu K M, Guo L, Zhou Z J, *et al.* Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke [J]. *Microvasc Res*, 2019, 123: 74-80.
- [19] Zhang L L, Chen J Z. Biological effects of tetrahydroxystilbene glucoside: An active component of a rhizome extracted from *Polygonum multiflorum* [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3641960.
- [20] Yi C A, Wang J, Wang Y, *et al.* Neuroprotection by 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside extracts from *Polygonum multiflorum* against cerebral ischemia/reperfusion injury through the 5-hydroxytryptamine/5-hydroxytryptamine receptor pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1429-1438.
- [21] Yang J L, Mukda S, Chen S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke [J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 263-275.
- [22] Jiao K Y, Lai Z L, Cheng Q C, *et al.* Glycosides of Buyang Huanwu Decoction inhibits inflammation associated with cerebral ischemia-reperfusion via the PINK1/Parkin mitophagy pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 325: 117766.
- [23] 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.
- [24] 唐森, 方建, 高立功, 等. 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 [J]. *中草药*, 2022, 53(20): 6529-6535.
- [25] Wu M, Lu G, Lao Y Z, *et al.* Garciesculenxanthone B induces PINK1-Parkin-mediated mitophagy and prevents ischemia-reperfusion brain injury in mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(2): 199-208.
- [26] Deas E, Plun-Favreau H, Gandhi S, *et al.* PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(5): 867-879.
- [27] Li J, Yang D M, Li Z P, *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy in neurodegenerative diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2023, 84: 101817.
- [28] Cao Y L, Yang L, Cheng H. Ginkgolide B protects against ischemic stroke via targeting AMPK/PINK1 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 941094.
- [29] Wang H Y, Chen S H, Zhang Y M, *et al.* Electroacupuncture ameliorates neuronal injury by Pink1/Parkin-mediated mitophagy clearance in cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Nitric Oxide*, 2019, 91: 23-34.

- [30] Wen H X, Li L X, Zhan L X, *et al.* Hypoxic postconditioning promotes mitophagy against transient global cerebral ischemia via PINK1/Parkin-induced mitochondrial ubiquitination in adult rats [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 630.
- [31] Vargas J N S, Hamasaki M, Kawabata T, *et al.* The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(3): 167-185.
- [32] 林雪婷, 杨培培, 符维艳, 等. 基于 LC3-II 探讨电针对神经病理性疼痛大鼠自噬的影响 [J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(7): 201-205.
- [33] Alcober-Boquet L, Zang T, Pietsch L, *et al.* The PB1 and the ZZ domain of the autophagy receptor p62/SQSTM1 regulate the interaction of p62/SQSTM1 with the autophagosome protein LC3B [J]. *Protein Sci*, 2024, 33(1): e4840.
- [34] Peng H, Yang F, Hu Q, *et al.* The ubiquitin-specific protease USP8 directly deubiquitinates SQSTM1/p62 to suppress its autophagic activity [J]. *Autophagy*, 2020, 16(4): 698-708.

[责任编辑 李亚楠]