

基于HIF-1 α /BNIP3信号通路调控线粒体自噬探讨 通脉开窍丸治疗血管性痴呆大鼠的机制

丁慧敏¹, 李彦杰^{2*}, 秦合伟², 郝晨源¹, 赵楠楠¹, 徐振华¹, 孙孟艳¹

(1. 河南中医药大学, 郑州 450008; 2. 河南省中医院, 郑州 450053)

[摘要] 目的:观察通脉开窍丸对血管性痴呆(VD)大鼠海马体缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/腺病毒E1B19kD相互作用蛋白3(BNIP3)信号通路及线粒体自噬的影响。方法:将90只雄性SD大鼠适应性喂养1周后,随机抽选10只作为假手术组,仅分离颈总动脉不结扎,剩余大鼠将采用颈总动脉分次结扎法制作VD大鼠模型。剔除死亡和造模不成功的大鼠后,将造模成功的大鼠随机分为模型组、通脉开窍丸高、中、低剂量组(27.6、13.8、6.9 g·kg⁻¹)、盐酸多奈哌齐组(0.45 mg·kg⁻¹)、联合组(通脉开窍丸高剂量27.6 g·kg⁻¹+HIF-1 α 抑制剂YC-1 2.5 mg·kg⁻¹),各组对应治疗4周后取材。尼氏染色法观察海马区神经元丢失情况;苏木素-伊红(HE)染色观察海马区病理学变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测海马组织HIF-1 α 、BNIP3、自噬效应蛋白-1(Beclin-1)、微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)蛋白表达水平;透射电镜观察海马组织线粒体超微结构及自噬小体数量;免疫荧光(IF)观察海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B的荧光强度。结果:与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P<0.01$),穿越平台次数减少($P<0.01$),海马区神经元层次减少,数量骤减,结构排列不齐,尼氏小体数量减少,丢失严重,线粒体嵴紊乱,线粒体双膜结构破坏,损伤加重,自噬小体数量增加,HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3B蛋白表达增加($P<0.05$, $P<0.01$),HIF-1 α 、BNIP3、LC3B的荧光强度增强($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,通脉开窍丸各治疗组、盐酸多奈哌齐组大鼠寻找平台时间缩短($P<0.01$),穿越平台次数增加($P<0.01$),HE染色显示,海马神经元细胞数量增多,形态正常,排列整齐,尼氏小体丰富,丢失减少,损伤减轻,自噬小体数量增多,HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3B蛋白表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),HIF-1 α 、BNIP3、LC3B的荧光强度增强($P<0.05$, $P<0.01$)。与通脉开窍丸高剂量组比较,联合组大鼠逃避潜伏期显著延长($P<0.01$),穿越平台次数显著降低($P<0.01$),海马神经元细胞数量减少,损伤加重,尼氏小体数量下降,自噬小体数量有所减少,HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3B蛋白表达显著降低($P<0.01$),HIF-1 α 、BNIP3、LC3B的荧光强度显著下降($P<0.01$)。结论:通脉开窍丸可能通过激活HIF-1 α /BNIP3信号通路,促进线粒体自噬的发生,清除功能受损的线粒体,为健康细胞提供能量,减少神经细胞死亡,促进脑功能的恢复,从而减轻大鼠海马组织的缺血性损伤,提高大鼠学习记忆能力,从而发挥对VD的治疗作用。

[关键词] 通脉开窍丸; 血管性痴呆; 线粒体自噬; 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/腺病毒E1B19kD相互作用蛋白3(BNIP3)信号通路

[中图分类号] R2-0;R33;R289;R543;R743 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)21-0052-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20240738

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20240521.1507.006>

[网络出版日期] 2024-05-22 11:43:47

Tongmai Kaiqiao Pills Treat Vascular Dementia in Rats by Regulating Mitochondrial Autophagy via HIF-1 α /BNIP3 Signaling Pathway

DING Huimin¹, LI Yanjie^{2*}, QIN Hewei², HAO Chenyuan¹, ZHAO Nannan¹,
XU Zhenhua¹, SUN Mengyan¹

(1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;

2. Henan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450053, China)

[收稿日期] 2024-02-18

[基金项目] 国家中医药管理局“张仲景传承与创新专项”课题(GZY-KJS-2022-043-3);中原英才计划中原青年拔尖人才项目(豫组通[2021]44号);河南中医药大学研究生科研创新项目(2022KYCX075,2022KYCX074)

[第一作者] 丁慧敏,在读硕士,从事神经系统疾病损伤后功能障碍的康复治疗研究,E-mail:924121406@qq.com

[通信作者] *李彦杰,硕士,主任医师,硕士生导师,从事中西医结合治疗神经系统疾病研究,E-mail:yanjieli2008@126.com

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Tongmai Kaiqiao pills on the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3 (BNIP3) signaling pathway and mitochondrial autophagy in the hippocampus of the rat model of vascular dementia (VD). **Method:** Ninety male SD rats underwent adaptive feeding for one week before the study. Ten rats were randomly assigned to the sham group, where the common carotid artery was isolated without ligation. The remaining rats were subjected to sequential ligation of the common carotid artery for the modeling of VD. The successfully modeled rats were randomly assigned into the following groups: model, high-, medium-, and low-dose (27.6, 13.8, 6.9 g $\cdot$ kg⁻¹, respectively) Tongmai Kaiqiao pills, donepezil hydrochloride (0.45 mg $\cdot$ kg⁻¹), and combination (27.6 g $\cdot$ kg⁻¹ Tongmai Kaiqiao pills + 2.5 mg $\cdot$ kg⁻¹ HIF-1 α inhibitor YC-1) groups. After 4 weeks of treatment, samples were collected. Nissl staining and hematoxylin-eosin staining were performed to observe the loss of neurons and pathological changes, respectively, in the hippocampal region. Western blot was employed to determine the protein levels of HIF-1 α , BNIP3, Beclin-1, and microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) in the hippocampal tissue. Transmission electron microscopy was used to observe the mitochondrial ultrastructure and the number of autophagosomes in the hippocampal tissue. Immunofluorescence was employed to observe the fluorescence intensity of HIF-1 α , BNIP3, and LC3B in the hippocampal tissue. **Result:** Compared with the sham group, the model group showed prolonged escape latency ($P<0.01$), decreased number of platform crossings ($P<0.01$), reduced and disarranged neuronal layers in the hippocampal region, decreased number of Nissl bodies, disrupted mitochondrial cristae, damaged mitochondrial double-membrane structures, increased number of autophagosomes, upregulated expression of HIF-1 α , BNIP3, beclin1, and LC3B ($P<0.05$, $P<0.01$), and enhanced fluorescence intensity of HIF-1 α , BNIP3, and LC3B ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, Tongmai Kaiqiao pills and donepezil hydrochloride shortened the searching time for the platform ($P<0.01$) and increased the number of platform crossings ($P<0.01$). Moreover, the drugs increased the number of neurons with normal morphology and orderly arrangement and the number of Nissl bodies, alleviated the damage, increased the number of autophagosomes, upregulated the expression of HIF-1 α , BNIP3, Beclin1, and LC3B ($P<0.05$, $P<0.01$), and enhanced the fluorescence intensity of HIF-1 α , BNIP3, and LC3B ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with high-dose Tongmai Kaiqiao pills, the combination group prolonged the escape latency ($P<0.01$), reduced the number of crossing platforms ($P<0.01$), decreased the number of hippocampal neurons, aggravated the damage, decreased the number of Nissl bodies and autophagosomes, downregulated the expression of HIF-1 α , BNIP3, beclin1, and LC3B ($P<0.01$), and decreased the fluorescence intensity of HIF-1 α , BNIP3, and LC3B ($P<0.01$). **Conclusion:** Tongmai Kaiqiao pills may activate the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway to promote the occurrence of mitochondrial autophagy, clear damaged mitochondria, provide energy for healthy cells, reduce neuronal cell death, and restore the brain function, thereby reducing ischemic damage to the hippocampal tissue, improving learning and memory abilities, and exerting therapeutic effects on VD in rats.

[Keywords] Tongmai Kaiqiao pills; vascular dementia; mitochondrial autophagy; hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein 3 (BNIP3) signaling pathway

血管性痴呆(VD)是由于脑区长期低灌注损伤引起的一种认知障碍性疾病^[1],主要表现为学习记忆缺损、注意力执行能力减退,严重者可出现精神、人格障碍^[2]。VD是第二大痴呆类型,发病率仅次于阿尔茨海默病(AD),占有痴呆症患者的17%~20%^[3-4]。目前,该病的发病率日益上升,且发病隐匿,早期不易被发现,易漏诊误诊,临床患者多为疾

病中后期患者,随着病情加重,患者认知功能、生活质量大幅度下降,对患者及其家庭造成了沉重的负担,且加大治疗难度^[5-6]。

海马体是影响认知的重要调控中枢,脑区的慢性灌注不足,导致海马组织缺血缺氧,引起认知障碍的发生,这是VD发生的重要因素^[7]。线粒体自噬异常与VD的发生、发展和病理机制密切相关^[8-9],

线粒体自噬在消除受损或功能失调的线粒体和维持线粒体稳态方面起着重要作用,脑缺血可诱发大量线粒体损伤,受损的线粒体被清除后,可以把能量优先供给健康的线粒体,维持能量代谢,减轻脑损伤^[10]。缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是一种缺氧诱导蛋白,是缺氧反应的关键转录因子,神经元细胞受到损伤时,可通过诱导多种关键靶基因的表达从而减少神经元死亡。HIF-1 α /腺病毒E1B19kD相互作用蛋白3(BNIP3)是调控线粒体自噬的重要通路^[11],BNIP3位于线粒体外膜上可与自噬蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3)的相互作用启动线粒体自噬,HIF-1 α 通过靶向BNIP3参与线粒体自噬的调控^[12]。

通脉开窍丸是全国名老中医毛德西教授在临床治疗VD的有效经验方,是河南省中医院院内制剂,豫药制备字Z20210137000。临床上治疗神志不清、痴呆、健忘等认知障碍性疾病取得较好效果。课题组通过长期的临床观察,发现通脉开窍丸能有效改善VD患者的认知障碍和中医证候,临床疗效显著,但其发挥作用的具体机制目前还尚不明确。因此,本研究主要通过建立双侧颈总动脉结扎动物模型,使海马区长期受到慢性低灌注的状态,构建VD大鼠模型,验证通脉开窍丸对VD大鼠线粒体自噬的调控作用,深入探究通脉开窍丸治疗VD的作用机制,为中医药治疗VD的发展提供新的治疗途径和理论依据,提高认知障碍患者的生存质量,具有十分重要的社会意义。

1 材料

1.1 动物 SPF级成年SD雄性大鼠90只,体质量260~300 g,购买于北京斯贝福生物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0010。饲养于河南中医药大学动物实验中心,饲养条件为室温22~26℃、湿度50%~60%、通风环境良好。本实验方案经由河南中医药大学伦理审查委员会审查批准(批准文号IACUC-202309016)。

1.2 药物 通脉开窍丸由制远志18 g、石菖蒲18 g、丹参18 g、赤芍18 g、郁金15 g、三七12 g、茯神18 g、浙贝15 g组成,实验所用中药饮片均购自于河南省中医院中药房,经河南省中医院吴冬梅主任药师鉴定为正品。中药饮片由河南省中医院中药房采用传统水煎法浓缩、制备成生药量为2.76 g·mL⁻¹的水煎剂。盐酸多奈哌齐(植恩生物技术股份有限公司,5 mg/片,批号H20010723),正常成人口服剂量为5 mg/片,根据大鼠与人体表面积换算系数,盐酸多奈哌齐组大鼠灌胃剂量为0.45 mg·kg⁻¹,配置成

0.045 g·L⁻¹的口服混悬液,4℃保存备用。

1.3 试剂 HIF-1 α 、LC3B、自噬效应蛋白-1(Beclin-1)多克隆抗体(江苏亲和生物有限公司,货号分别为AF1009、AF4650、AF5128);BNIP3多克隆抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,货号A5683);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、尼氏染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为G112、G1436);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G二抗(武汉三鹰生物科技有限公司,货号分别为10494-1-AP、SA00001-2);HRP标记山羊抗兔IgG、CY3标记山羊抗兔IgG、iF488荧光标记酪胺(iF488-Tyramide)、iF647荧光标记酪胺(iF647-Tyramide)、CY3荧光标记酪胺(CY3-Tyramide)(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为GB23303、GB21303、G1231、G1232、G1223);HIF-1 α 抑制剂YC-1(美国MCE公司,货号HY-14927)。

1.4 仪器 Olympus BX41型显微镜(日本奥林巴斯有限公司);XR-XM101型小鼠水迷宫(上海欣软信息科技有限公司);170-8265型化学发光凝胶成像仪(美国伯乐公司);MOLTSKANFC型酶标仪(美国赛默飞公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备 SD大鼠适应性喂养7 d后,采用改良颈总动脉分次结扎法(改良2-VO)制备VD大鼠模型^[13],术前大鼠禁食不禁水12 h,以2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,麻醉成功后固定在手术台上,碘伏消毒颈部皮肤,在颈部正中切开皮肤,逐层钝性分离出左侧颈总动脉(CCA),用手术线分别结扎CCA的近心和远心端,用剪刀从中间剪断后逐层缝合。1周后在同样条件下对右侧CCA实施手术。两次手术都采取颈部软组织加压的改良措施以增加模型的可靠性,术后注意大鼠的保暖。造模14 d后进行水迷宫实验,以假手术组大鼠逃避潜伏期的平均值作为参考标准值,计算造模组每只大鼠逃避潜伏期的平均值与参考标准之差占该鼠逃避潜伏期的比值,若比值>20%,则视为造模成功^[14-15]。

2.2 分组和给药 将大鼠随机分为7组:假手术组、模型组、通脉开窍丸高、中、低剂量组、盐酸多奈哌齐组、联合组。根据人与动物体表面积折算法换算出大鼠通脉开窍丸中剂量为13.8 g·kg⁻¹,低剂量为6.9 g·kg⁻¹,高剂量为27.6 g·kg⁻¹,分别配置成2.76、1.38、0.69 g·mL⁻¹工作液,4℃保存备用。通脉开窍丸高、中、低剂量组分别给予通脉开窍丸相应

剂量灌胃(27.6、13.8、6.9 g·kg⁻¹),联合组大鼠给予通脉开窍丸高剂量灌胃的同时腹腔注射 HIF-1 α 抑制剂 YC-1(27.6 g·kg⁻¹+2.5 mg·kg⁻¹),盐酸多奈哌齐组给予盐酸多奈哌齐灌胃(0.45 mg·kg⁻¹),假手术组和模型组均给予同体积蒸馏水灌胃,各组大鼠每天灌胃1次,连续给药4周。

2.3 大鼠学习记忆能力检测 采用 Morris 水迷宫实验检测大鼠的学习记忆障碍情况,水迷宫水温控制在 25℃左右,置于安静室内。将每只大鼠分别从4个象限的入水点放入水中,如果大鼠在 90 s 内爬上平台,并停留 3 s 以上,则认为大鼠找到平台,此为逃避潜伏期。如果 90 s 内大鼠未能找到平台,则拖拽其尾部,将其引导到平台,熟悉 10 s,此时潜伏期按 90 s 计算,记录大鼠的寻找逃生平台的时间及搜索平台所经过的路程。本实验在给药结束后第2天进行训练,每个象限设置大鼠的游泳时间为 90 s,每天训练1次,共训练4 d。第5天进行定位航行和空间探索实验(实验期间不给药)。

2.4 HE染色观察海马组织病理学变化情况 大鼠麻醉后,固定仰卧于鼠板上,暴露心脏,通过左心室插入升主动脉,剪开右心耳,灌注生理盐水至肝脏无血色。接着灌注4%多聚甲醛至大鼠尾部及四肢僵直,断头取脑,浸泡于4%多聚甲醛中,24 h后更换液体,1周内石蜡包埋。切片脱蜡复水,苏木素染液染 10~15 min 后自来水冲洗,伊红染液 15 s,蒸馏水清洗,梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察拍片,图像采集分析。

2.5 尼氏染色观察海马神经元尼氏小体丢失情况 石蜡切片常规脱蜡至水,用尼氏染液置于 50~60℃温箱浸染 30 min 中,蒸馏水稍洗,95%乙醇迅速分化,无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下观察拍片,图像采集分析。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠海马组织 HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3B 蛋白的表达 各组取大鼠海马组织 20 mg,加裂解液 200 mL 匀浆 5 min;冰上裂解 1 h 后 4℃、12 000 r·min⁻¹离心 5 min(离心半径 8.6 cm),提取总蛋白;BCA 定量后,100℃水浴煮 5 min 使蛋白变性。制胶、上样、电泳、转至 PVDF 膜、5%脱脂奶粉封闭 1.5 h,分别加入一抗 HIF-1 α 、Beclin-1、GAPDH(1:1 500),BNIP3、LC3B(1:1 000),4℃过夜,洗膜,室温孵育二抗(1:5 000)1 h,洗膜,显影,Image J 计算灰度值。

2.7 免疫荧光检测 HIF-1 α 、BNIP3、LC3B 表达 石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,画圈,双氧水封

闭,洗涤,BSA 室温封闭。滴加 HIF-1 α 抗体(1:1 000)4℃过夜,洗涤,滴加二抗,室温孵育后洗涤,加 488-TSA,室温孵育,洗涤,微波处理。加 BNIP3 抗体(1:3 000),4℃过夜,洗涤,加二抗,室温孵育,洗涤,加 647-TSA,室温孵育,洗涤,微波处理。加 LC3B 抗体 4℃过夜(1:200),洗涤,滴加 CY3 标记的山羊抗兔 IgG,室温孵育,洗涤,DAPI 复染细胞核,淬灭组织自发荧光。封片,采集图像。

2.8 透射电镜观察海马结构自噬小体数量 迅速取出大鼠海马组织,切成 1 mm³ 小块,放入 4%戊二醛固定液中。磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗 4 次,进行 1%锇酸固定。脱水处理,进行包埋和聚合。制备超薄切片,捞片。用饱和醋酸双氧铀水溶液染色 20 min 后,用去离子水冲洗 10 min,烘干,再用柠檬酸铅溶液染色 5 min,离子水冲洗 10 min,烘干,电镜观察拍照。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 25.0 统计软件进行数据处理分析,符合正态性时,数据以 $\bar{x} \pm s$ 描述,方差齐时多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验;方差不齐时组间比较采用 Dunnett's T3 法,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 VD 大鼠学习记忆能力的影响 与假手术组比较,模型组大鼠逃避潜伏期延长($P < 0.01$),穿越平台次数减少($P < 0.01$);与模型组比较,通脉开窍丸各剂量组、盐酸多奈哌齐组大鼠逃避潜伏期缩短($P < 0.01$),穿越平台次数增加($P < 0.01$);与盐酸多奈哌齐组比较,通脉开窍丸高剂量组大鼠逃避潜伏期有所延长,穿越平台次数有所减少,但差异无统计学意义;与通脉开窍丸高剂量组比较,联合组大鼠逃避潜伏期显著延长($P < 0.01$),穿越平台次数显著降低($P < 0.01$)。见表1。

3.2 对 VD 大鼠海马神经元病理学形态的影响 假手术组大鼠海马区细胞形态正常,排列整齐,结构完整,形态呈圆形、椭圆形,细胞核大,饱满,核仁清晰;模型组大鼠海马区神经元细胞数量减少,形态不规则,胞质浓缩,排列分散不整齐,有细胞空泡,细胞层次减少,视野可见细胞旁有空染区,组织受损严重;通脉开窍丸高剂量组和盐酸多奈哌齐组大鼠海马区的锥体细胞数目相对较多,排列较为整齐,结构相对完整,层次较清晰,损伤程度明显减轻;通脉开窍丸中、低剂量组大鼠海马神经元细胞数量有所减少,细胞间隙增大,形态、结构排列紊

表1 通脉开窍丸对VD大鼠逃避潜伏期、穿越平台次数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

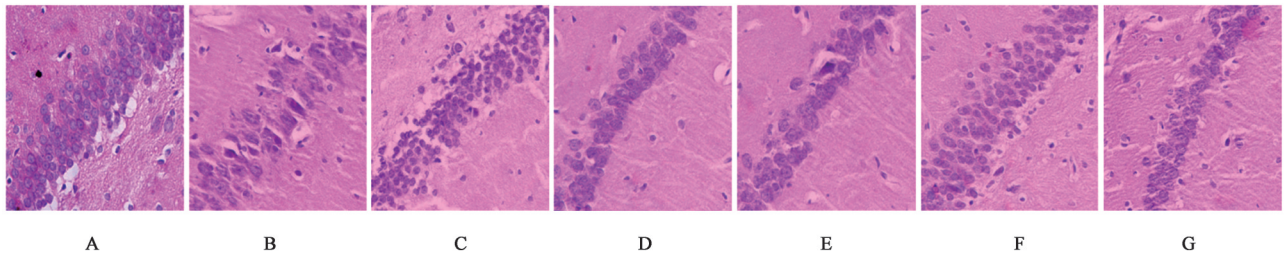
Table 1 Effect of Tongmai Kaiqiao pills on evasion latency and crossing platform times in VD rats ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	逃避潜伏期 /s	穿越平台 次数/次
假手术		14.20±2.33	6.60±1.07
模型组		40.90±2.33 ²⁾	2.20±1.14 ²⁾
通脉开窍丸高剂量组	27.6	20.47±2.71 ⁴⁾	4.50±1.08 ⁴⁾
通脉开窍丸中剂量组	13.8	25.01±4.29 ^{4,6)}	4.10±0.99 ⁴⁾
通脉开窍丸低剂量组	6.9	36.08±3.02 ^{4,6)}	3.70±1.06 ^{4,5)}
盐酸多奈哌齐组	4.5×10 ⁻⁴	19.02±1.97 ⁴⁾	4.90±1.79 ⁴⁾
联合组	27.6+2.5×10 ⁻³	38.02±1.33 ⁷⁾	2.90±1.37 ⁷⁾

注：与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$;与盐酸多奈哌齐组比较⁵⁾ $P<0.05$, ⁶⁾ $P<0.01$;与通脉开窍丸高剂量组比较⁷⁾ $P<0.01$ (表2和表3同)

乱,但与模型组比较,细胞受损程度有所减轻;与通脉开窍丸高剂量组比较,联合组大鼠海马组织神经元细胞数量减少,细胞排列分散,且出现水肿,组织受损较为严重。见图1。

3.3 对VD大鼠海马神经元尼氏小体的影响 尼氏染色可见,假手术组海马神经元形态正常、细胞排列整齐,核仁清晰,尼氏小体数量较多、体积较大,丢失情况不明显;模型组海马神经细胞损伤较为明显,细胞排列紊乱稀疏,形态不规则,核仁固缩深染,尼氏小体消失,丢失严重;通脉开窍丸高剂量组和盐酸多奈哌齐组海马神经元细胞排列结构较为整齐,尼氏小体丰富,损伤程度较轻;通脉开窍丸中、低剂量组与模型组比损伤减轻,尼氏小体数量有所增多,但增加不明显;与通脉开窍丸高剂量组比较,联合组尼氏小体减少较为明显,丢失严重,细胞形态结构异常,海马区病理损伤加重。见图2。



注:A.假手术组;B.模型组;C.通脉开窍丸高剂量组;D.通脉开窍丸中剂量组;E.通脉开窍丸低剂量组;F.盐酸多奈哌齐组;G.联合组(图2-图5同)

图1 通脉开窍丸对VD大鼠海马区病理损伤的影响(HE,×400)

Fig. 1 Effect of Tongmai Kaiqiao pills on pathological damage in hippocampal region of VD rats (HE,×400)

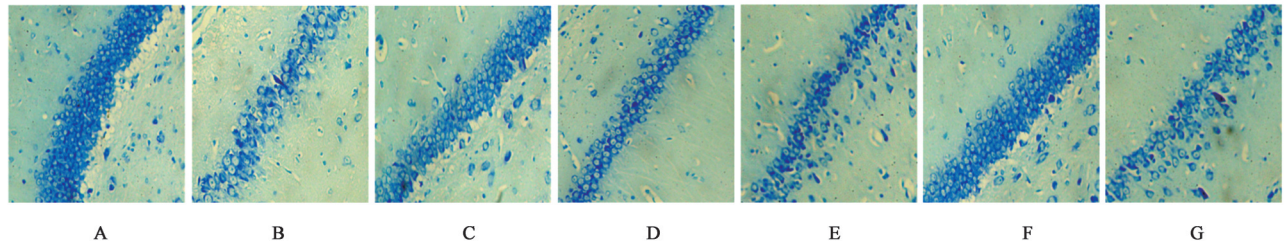


图2 通脉开窍丸对VD大鼠海马区尼氏小体的影响(尼氏染色,×200)

Fig. 2 Effect of Tongmai Kaiqiao pills on Nissl bodies in hippocampal region of VD rats (Nissl staining,×200)

3.4 对VD大鼠海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B、Beclin-1蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3B蛋白表达明显上升($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,通脉开窍丸各剂量组、盐酸多奈哌齐组HIF-1 α 、BNIP3、LC3B、Beclin-1蛋白表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$);与盐酸多奈哌齐组比较,通脉开窍丸高剂量组大鼠海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B、Beclin-1蛋白表达差异无统计学意义;与通脉开窍丸高剂量

组比较,联合组大鼠海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B、Beclin-1表达显著下降($P<0.01$)。见图3、表2。

3.5 对海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B蛋白荧光强度的影响 与假手术组比较,模型组大鼠海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B荧光强度增强($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,通脉开窍丸各剂量组大鼠海马组织HIF-1 α 、BNIP3、LC3B荧光强度明显增强,其中通脉开窍丸高剂量最为显著($P<0.01$);与盐酸

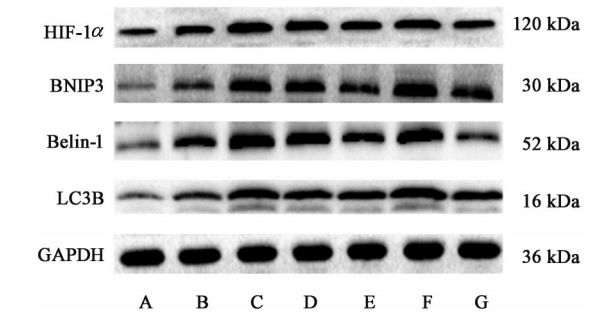


图3 各组大鼠海马 HIF-1α、BNIP3、Beclin-1、LC3B 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of protein expression of HIF-1α, BNIP3, Beclin-1, and LC3B in hippocampus of rats in each group

多奈哌齐治疗组比较,通脉开窍丸高剂量组大鼠海

马组织 HIF-1α、BNIP3、LC3B 荧光强度无显著区别,差异不具有统计学意义;与通脉开窍丸高剂量组比较,联合组大鼠海马组织 HIF-1α、BNIP3、LC3B 荧光强度显著降低($P<0.01$)。见图4、表3。

3.6 对 VD 大鼠海马神经元线粒体超微结构的影响 透射电镜可见,正常组线粒体形态正常,呈圆形或椭圆形,数量较多,线粒体嵴清晰可见,双模结构明显;模型组可见线粒体明显肿胀、外膜破裂、嵴突杂乱、断裂或消失、线粒体数量减少,线粒体损伤明显,可见少量自噬小体;通脉开窍丸高、中剂量组和盐酸多奈哌齐组线粒体形态正常,可见丰富的自

表2 通脉开窍丸对大鼠海马组织 HIF-1α、BNIP3、Beclin-1、LC3B、蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Tongmai Kaiqiao pills on expression levels of HIF-1α, BNIP3, Beclin-1, and LC3B proteins in hippocampal tissues of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HIF-1α/GAPDH	BNIP3/GAPDH	Beclin-1/GAPDH	LC3B/GAPDH
假手术组		0.30±0.19	0.30±0.12	0.42±0.05	0.29±0.04
模型组		0.61±0.18 ¹⁾	0.68±0.13 ²⁾	0.72±0.05 ²⁾	0.62±0.05 ²⁾
通脉开窍丸高剂量组	27.6	1.11±0.12 ⁴⁾	1.15±0.08 ⁴⁾	1.14±0.07 ⁴⁾	1.20±0.13 ⁴⁾
通脉开窍丸中剂量组	13.8	1.00±0.17 ⁴⁾	0.91±0.13 ³⁾	1.01±0.04 ⁴⁾	0.94±0.14 ^{4,5)}
通脉开窍丸低剂量组	6.9	0.91±0.08 ³⁾	0.73±0.07 ⁵⁾	0.86±0.05 ^{3,6)}	0.83±0.20 ^{3,6)}
盐酸多奈哌齐组	4.5×10 ⁻⁴	1.00±0.12 ⁴⁾	0.99±0.04 ⁴⁾	1.11±0.10 ⁴⁾	1.22±0.10 ⁴⁾
联合组	27.6+2.5×10 ⁻³	0.71±0.21 ⁷⁾	0.52±0.15 ⁷⁾	0.85±0.16 ⁷⁾	0.71±0.15 ⁷⁾

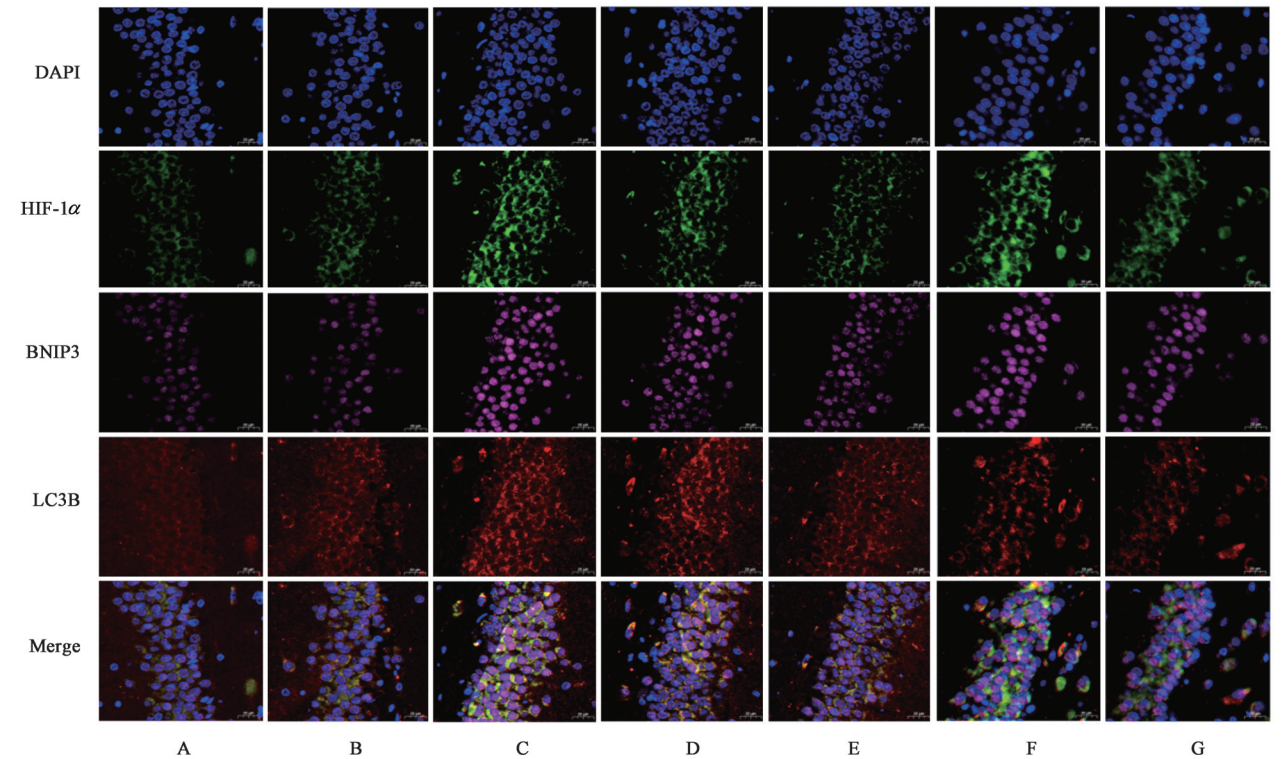


图4 通脉开窍丸对 VD 大鼠海马区 HIF-1α、BNIP3、LC3B 免疫荧光表达的影响 (免疫荧光,×400)

Fig. 4 Effect of Tongmai Kaiqiao pills on immunofluorescence expression of HIF-1α, BNIP3 and LC3B in hippocampus of VD rats (IF,×400)

表3 通脉开窍丸对VD大鼠海马区HIF-1α、BNIP3、LC3B免疫荧光表达情况 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Tongmai Kaiqiao pills on immunofluorescence expression of HIF-1α, BNIP3 and LC3B in hippocampus of VD rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HIF-1α	BNIP3	LC3B
假手术组		19.55±0.76	28.13±3.06	20.61±3.74
模型组		29.35±2.07 ²⁾	37.42±3.55 ¹⁾	38.22±2.07 ²⁾
通脉开窍丸高剂量组	27.6	49.27±4.94 ⁴⁾	64.92±4.91 ⁴⁾	58.11±1.22 ⁴⁾
通脉开窍丸中剂量组	13.8	42.30±5.02 ^{4,6)}	56.31±7.33 ⁴⁾	50.05±3.04 ^{4,5)}
通脉开窍丸低剂量组	6.9	36.64±1.75 ^{3,6)}	46.47±3.48 ^{3,6)}	45.00±2.15 ^{3,6)}
盐酸多奈哌齐组	4.5×10 ⁻⁴	50.85±4.13 ⁴⁾	62.35±3.62 ⁴⁾	58.79±3.03 ⁴⁾
联合组	27.6+2.5×10 ⁻³	38.48±2.98 ⁷⁾	45.50±5.48 ⁷⁾	46.11±7.02 ⁷⁾

噬小体,线粒体嵴较为明显,损伤程度减轻;通脉开窍丸低剂量组和联合组有少量自噬小体出现,但线粒体出现肿胀,双模结构不明显,线粒体嵴变短消失,但损伤程度仍低于模型组大鼠。见图5。

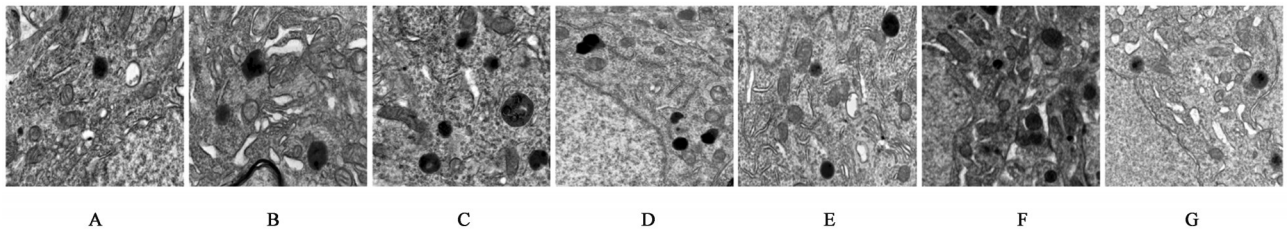


图5 通脉开窍丸对VD大鼠海马区线粒体超微结构及自噬小体的影响(透射电镜,×20 000)

Fig. 5 Effect of Tongmai Kangqiao pills on mitochondrial ultrastructure and autophagosomes in hippocampus of VD rats (TEM, ×20 000)

4 讨论

认知障碍性疾病与大脑长期血液灌注不足密切相关,常常导致神经系统功能障碍,表现为神经衰弱、失语、健忘、学习记忆困难等症状。VD是痴呆症常见类型之一,其发病机制主要与海马区长期缺血缺氧有关,海马神经元的损伤会加重认知障碍或痴呆症状^[16]。长期的低灌注状态会损害海马神经元,导致认知功能逐渐退化,影响学习和记忆能力^[17]。目前现有的治疗方法相对有限,主要针对缺血缺氧症状和改善认知功能展开治疗,因此迫切需要寻找安全、有效且经济实惠的治疗手段。

中医将VD归类为“痴呆”“愚痴”“善忘”等疾病^[18]。中医理论认为,VD的发病机制主要与痰浊和瘀血有关。痰浊会导致水液积聚,痰随气上升,蒙蔽清窍,使脑失所养,从而引发痴呆症状^[19]。古籍《血证论》中提到:“有痰沉留于心包,沃塞心窍,以致精神恍惚,凡事多不记忆者”,说明痰浊会损害认知记忆功能,治疗痴呆需先治痰。另一种病机是瘀血,《类证治裁》中指出:“若血瘀于内,而善忘如狂”,说明瘀血会导致认知功能障碍。瘀血不仅包括有形之瘀,还包括由食滞、痰浊、情志刺激等因素导致血液不畅的无形之瘀,瘀血不去,脑络难通,致

神明失用,而致痴呆发生^[20]。因此VD的主要治则是活血祛瘀,醒神开窍。通脉开窍丸由丹参、石菖蒲、赤芍、三七、制远志、郁金、茯神组成,方中以丹参、石菖蒲作为君药,可益气化痰增智,开心孔、通九窍^[21],是治疗呆病之要药;赤芍、三七作为臣药可活血化瘀止痛,扩张动脉,防止血栓聚集^[22];远志、郁金为佐药,可解郁散结、化痰开窍^[23-24];茯神为使药,可健脾宁心,补益元神^[25]。诸药合用可化痰通脉、开窍醒神、化痰增智之功效。

现代研究表明,线粒体自噬在调节神经元损伤方面发挥重要作用^[26]。线粒体自噬是线粒体质量控制的一种机制,它可以选择性地清除功能失调或多余的线粒体,调节线粒体数量,维持能量代谢,清除ROS,从而影响大脑神经元^[27]。HIF是一种由氧敏感型α亚基和构造型β亚基组成的异源二聚体转录因子,细胞氧浓度的变化会直接影响HIF-1α的表达水平和活性,HIF-1α在常氧条件下不表达,缺氧时由于泛素化过程被抑制,使其在细胞内蓄积并可影响线粒体自噬过程^[28-29]。研究表明,HIF-1α的过表达可以增加神经元的存活,促进痴呆大鼠的神经功能恢复^[30]。YANG等^[31]研究发现,在脑区低灌注期间,HIF-1α表达会持续增加,这也表明HIF-1α与痴

呆的发生密切相关。因此,HIF-1 α 在VD早期病理机制中扮演着重要角色,有必要进一步深入探究。

BNIP3是一种定位于线粒体外膜的蛋白,作为线粒体自噬受体,被认为是缺氧诱导的线粒体自噬的重要信号分子^[32]。BNIP3是HIF-1 α 的下游靶基因,可以被HIF-1 α 激活^[33-35]。HIF-1 α /BNIP3通路是调控线粒体自噬的关键机制,其中HIF-1 α 在缺氧诱导的线粒体自噬中发挥关键作用,而BNIP3在缺氧条件下作为HIF-1 α 的直接下游调节因子,促进BNIP3的表达,从而诱导线粒体自噬的发生^[36]。LC3是自噬过程的标志物,存在于溶酶体与线粒体自噬体膜上。在自噬发生时,LC3蛋白经自噬蛋白4(Atg4)剪切产生LC3 I,随后被泛素样体系加工修饰形成LC3 II,LC3 II含量与自噬程度成正比^[37]。BNIP3可以直接与LC3结合诱导自噬的发生^[38]。此外,BNIP3还能通过释放Beclin-1来促进线粒体自噬的发生,这可能与阻止B细胞淋巴瘤-2(Becl-2)与Beclin-1结合以激活线粒体自噬有关^[39]。

本实验通过建立双侧颈总动脉结扎大鼠模型,合理模拟了血管性痴呆的发病机制,探讨通脉开窍丸对VD的治疗作用及HIF-1 α /BNIP3信号通路的影响,结果显示通脉开窍丸治疗后可以明显增加海马区HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3B蛋白表达,激活HIF-1 α /BNIP3信号通路,促进线粒体自噬的发生,清除功能受损的线粒体,为线粒体新生提供能量,减轻VD大鼠的逃避潜伏期和海马神经元病理损伤,可有效改善VD大鼠的学习记忆障碍,改善认知功能,为临床合理用药提供基础实验支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] VAN DER FLIER W M, SKOOG I, SCHNEIDER J A, et al. Vascular cognitive impairment [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, doi: 10.1038/nrdp. 2018. 3.
- [2] SINHA K, SUN C, KAMARI R, et al. Current status and future prospects of pathophysiology-based neuroprotective drugs for the treatment of vascular dementia [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25 (4) : 793-799.
- [3] GIROUARD H, MUNTER L M. The many faces of vascular cognitive impairment[J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5):509-512.
- [4] LECORDIER S, MANRIQUE-CASTANO D, EL MOGHRABI Y, et al. Neurovascular alterations in vascular dementia: Emphasis on risk factors [J].

Front Aging Neurosci, 2021, doi: 10.3389/fnagi. 2021. 727590.

- [5] ANGELOPOULOS P, AGOURIDAKI H, VAIPOPOULOS H, et al. Cytokines in Alzheimer's disease and vascular dementia [J]. *Int J Neurosci*, 2008, 118(12):1659-1672.
- [6] 郭明冬,周文泉,韦云,等. 参芎补肾胶囊治疗血管性痴呆患者的疗效及其对其生活质量的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(6):593-597.
- [7] LISMAN J, BUZSÁKI G, EICHENBAUM H, et al. Viewpoints: How the hippocampus contributes to memory, navigation and cognition [J]. *Nat Neurosci*, 2017, 20(11):1434-1447.
- [8] ZHAO Z, XIE L, SHI J, et al. Neuroprotective effect of Zishen Huoxue decoction treatment on vascular dementia by activating PINK1/Parkin mediated mitophagy in the hippocampal CA1 region [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 319(Pt 1):117172.
- [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] GUAN R, ZOU W, DAI X, et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1):87.
- [11] FU Z J, WANG Z Y, XU L, et al. HIF-1 α -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Redox Biol*, 2020, doi: 10.1016/j. redox. 2020. 101671.
- [12] WEI R, SONG L, MIAO Z, et al. Hydroxysafflor yellow A exerts neuroprotective effects via HIF-1 α /BNIP3 pathway to activate neuronal autophagy after OGD/R [J]. *Cells*, 2022, 11(23):3726.
- [13] 刘煜,李鸣,吴永贵,等. 基于ERK5信号通路探讨薯蓣健脾益智合剂对血管性痴呆大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22 (1):68-74.
- [14] 王建婷,谭子虎,周剑杰,等. 基于Cx43/Glu/AMPA通路探讨加减薯蓣丸对血管性痴呆大鼠海马髓鞘损伤的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(7): 38-46.
- [15] LUO X Q, LI A, YANG X, et al. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects by modulating the M1/M2 subset polarization of microglia/macrophages in the hippocampal CA1 region of vascular dementia rats via cannabinoid receptor 2 [J]. *Chin Med*, 2018, doi: 10.1186/s13020-018-0173-1.

- [16] OGNJANOVSKI N, SCHAEFFER S, WU J, et al. Parvalbumin-expressing interneurons coordinate hippocampal network dynamics required for memory consolidation [J]. *Nat Commun*, 2017, doi: 10.1038/ncomms15039.
- [17] 曹娅军,王思诺,余燕,等. 电针“百会”“神庭”穴对血管性认知障碍大鼠海马泛素化修饰蛋白质组学的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2023, 38(8):1025-1034.
- [18] 齐大河,马桦,陈媛媛,等. 葛根素治疗血管性痴呆的作用机制研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(22):5993-6002.
- [19] 张寒玉,程红亮,胡培佳. 程红亮以“通督任、调气血、化痰瘀”法治疗血管性痴呆摘要[J]. *云南中医药大学学报*, 2023, 46(4):40-44.
- [20] 王飞雪,黄小波,裴卉,等. 血管性痴呆中医病机理论的传承和发扬[J]. *世界中医药*, 2022, 17(2):221-224, 228.
- [21] 黄薰莹,刘珍珠,王维广,等. 从《黄帝内经》脾藏意及香入脾理论探讨痴呆的中医治疗[J]. *北京中医药大学学报*, 2021, 44(12):1073-1078.
- [22] 孙大军,祁功才,吕文伟,等. 赤芍总苷对实验性血栓形成的影响及其作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(8):1080-1081.
- [23] 吴桓宇. 远志汤治疗血管性痴呆的临床观察及机制研究[D]. 南京:南京中医药大学, 2018.
- [24] 王睿弘,倪小佳,吴梁晖,等. 黄培新从风邪和痰浊论治神经内科疾病经验[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(4):738-742.
- [25] 孙羿幅,顾超,马静毅,等. 地黄益智方治疗卒中后认知障碍非痴呆肾精亏虚证的临床研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2022, 45(7):663-669.
- [26] 赵梓婷,伍大华,张秀丽,等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(20):45-52.
- [27] SHAO Z, DOU S, ZHU J, et al. The role of mitophagy in ischemic stroke [J]. *Front Neurol*, 2020, doi: 10.3389/fneur.2020.608610.
- [28] ZHENG J, CHEN P, ZHONG J, et al. HIF-1 α in myocardial ischemia-reperfusion injury (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(5):352.
- [29] ZHANG Z, YAO L, YANG J, et al. PI3K/Akt and HIF-1 signaling pathway in hypoxia-ischemia (review) [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(4):3547-3554.
- [30] 胡久略,商健,侯紫君,等. 温肾醒脑方对血管性痴呆大鼠 Ang-1 和 HIF-1 α 表达的影响[J]. *中医研究*, 2020, 33(2):62-66.
- [31] YANG Y, ZHANG J, LIU H, et al. Changes in levels of hypoxia-induced mediators in rat hippocampus during chronic cerebral hypoperfusion [J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(11):2433-2439.
- [32] WANG X, MA S, QI G. Effect of hypoxia-inducible factor 1- α on hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in primary neonatal rat cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(4):1227-1234.
- [33] YANG L, XIE P, WU J, et al. Deferoxamine treatment combined with sevoflurane postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by restoring HIF-1/BNIP3-mediated mitochondrial autophagy in GK rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:6. doi: 10.3389/fphar.2020.00006.
- [34] JIMENEZ R E, KUBLI D A, GUSTAFSSON Å B. Autophagy and mitophagy in the myocardium: Therapeutic potential and concerns [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(8):1907-1916.
- [35] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4):571-580.
- [36] MAZURE N M, POUYSSÉGUR J. Hypoxia-induced autophagy: Cell death or cell survival? [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2):177-180.
- [37] 饶江燕,李明航,刁俊玲,等. 贝沙罗汀上调线粒体自噬减轻小鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(7):940-945.
- [38] HANNA R A, QUINSAY M N, OROGO A M, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with BNIP3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(23):19094-19104.
- [39] LIN Y F, CHIU I J, CHENG F Y, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α in zinc oxide nanoparticle-induced nephrotoxicity *in vitro* and *in vivo* [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13(1):52.

[责任编辑 孙丛丛]