

## ·方药研究·

本文引用:谢乐,伍大华,曹思佳,任晨斌,刘涵.滋肾活血方通过 PINK1/Parkin 信号通路增加自噬对血管性痴呆大鼠的影响[J].湖南中医药大学学报,2020,40(9):1082-1085.

# 滋肾活血方通过 PINK1/Parkin 信号通路增加自噬对血管性痴呆大鼠的影响

谢乐<sup>1</sup>,伍大华<sup>1\*</sup>,曹思佳<sup>2</sup>,任晨斌<sup>3</sup>,刘涵<sup>4</sup>

(1.湖南省中医药研究院附属医院脑病科,湖南长沙 410006;2.湖南中医药大学人文与管理学院,湖南长沙 410208;  
3.宁波市北仑区中医院内科,浙江宁波 315800;4.湖南中医药大学研究生院,湖南长沙 410208)

**[摘要]** 目的 观察滋肾活血方对血管性痴呆(vascular dementia, VD)大鼠海马组织自噬标记蛋白 LC3II、Beclin1 以及自噬调控 PINK1/Parkin 信号通路的影响。方法 改良 2-VO 法建立 VD 大鼠模型,采用滋肾活血方进行干预,免疫组化法检测 VD 大鼠海马组织 LC3II、Beclin1、PINK1 以及 Parkin 蛋白的表达。结果 滋肾活血方能显著提高 VD 大鼠海马组织自噬标记蛋白 LC3II、Beclin1 以及自噬调控 PINK1/Parkin 信号分子的表达( $P<0.01$ )。结论 滋肾活血方可能通过激活 PINK1/Parkin 信号通路,促进细胞自噬,保护 VD 大鼠海马神经元,改善其学习记忆能力。

**[关键词]** 血管性痴呆;滋肾活血方;PINK1/Parkin 信号通路;自噬

**[中图分类号]** R259;R543

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2020.09.007

## Effects of Zishen Huoxue Decoction on Vascular Dementia Rats by Increasing Autophagy Through the PINK1/Parkin Signaling Pathway

XIE Le<sup>1</sup>, WU Dahua<sup>1\*</sup>, CAO Sijia<sup>2</sup>, REN Chenbin<sup>3</sup>, LIU Han<sup>4</sup>

(1. Neurology Department, The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China;

2. School of Humanities and Management, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;

3. Internal Medicine Department, Ningbo Beilun District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Ningbo, Zhejiang 315800, China; 4. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the effects of Zishen Huoxue Decoction on the autophagy related protein LC3II and Beclin1, and autophagy regulation PINK1/Parkin signaling molecules in hippocampal of rats with vascular dementia (VD). **Methods** The modified 2-VO method was used to establish the VD rat model. The expressions of LC3II, Beclin1, PINK1 and Parkin proteins in the hippocampal of VD rats were detected by immunohistochemistry after the intervention with Zishen Huoxue Decoction. **Results** The expression of LC3II, Beclin1 and autophagy regulation PINK1/Parkin signaling molecules in the hippocampal of VD rats were significantly improved after the intervention with Zishen Huoxue Decoction ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Zishen Huoxue Decoction may improve autophagy, protect hippocampal neurons of VD rats, and improve learning and memory ability by activating PINK1/Parkin signaling pathway.

**[Keywords]** vascular dementia; Zishen Huoxue Decoction; PINK1/Parkin signaling pathway; autophagy

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指由一系列脑血管因素导致脑组织损害引起的以认知功能减退为特征的一组临床综合征,是仅次于阿尔茨海默病的第二大痴呆类型<sup>[1]</sup>。世界卫生组织统计,目前

全世界有 3 560 万 VD 患者,并以 770 万/年的速度递增<sup>[2]</sup>。我国有 540 万 VD 患者,预计到 2050 年 VD 患者人数达到现在的 3 倍,给家庭和社会带来沉重的经济负担<sup>[3]</sup>。VD 是目前唯一可防治的痴呆类型,

**[收稿日期]** 2019-03-10

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81874462);湖南省自然科学基金科卫联合项目(2018JJ6022)。

**[作者简介]** 谢乐,男,博士,副主任医师,研究方向:中西医脑病防治。

**[通讯作者]** \*伍大华,女,博士,主任医师,E-mail:893049352@qq.com。

并且这种防治主要针对 VD 的早期阶段<sup>[4]</sup>。研究团队前期研究发现滋肾活血方能改善 VD 患者学习记忆能力评分,如简易智力状态检查量表(MMSE)评分、日常生活能力评分(ADL)以及中医证候积分等<sup>[5]</sup>。并且发现其机制可能与上调 NR1、NR2A、NR2B,增加 CaM、CaMPK II 蛋白及 mRNA 的表达相关<sup>[6-7]</sup>。因诸多文献报道 NR 表达上调可激活细胞自噬,保护受损神经元<sup>[8-9]</sup>,故研究团队进一步研究滋肾活血方在改善 VD 大鼠学习记忆能力方面的影响,为 VD 的防治提供新的思路与方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 50 只,体质量 220~250 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,批号:SYXK(湘)2015-0008,在湖南省中医药研究院动物平台自由进食喂养,环境温度控制在(25±2)℃,湿度为(50±5)%,所有大鼠适应环境喂养 1 周后开始实验。

### 1.2 实验药品、试剂与仪器

滋肾活血方由枸杞子、制何首乌、益智仁、桑椹、丹参、葛根、石菖蒲、远志、五味子、郁金、全蝎、山楂组成,均购自湖南省中医药研究院附属医院。奥拉西坦胶囊购自石药集团欧意药业有限公司(批号:059160250),Anti-LC3II、Anti-Beclin1、Anti-PINK1、Anti-Parkin 等抗体购自英国 Abcam 公司,辣根酶标记链亲和素、Goat Anti-Rabbit IgG/HRP、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司,4%多聚甲醛购自 Biosharp 公司,柠檬酸钠购自国药集团化学试剂有限公司,切片机(Leica UC7)购自德国 Leica 公司,倒置显微镜(TH4-200 型)购自日本 Olympus 公司。

### 1.3 动物造模

采用改良 2-VO 法制作 VD 大鼠模型<sup>[10]</sup>,大鼠术前禁食禁水,10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,仰卧位固定,脱毛膏备皮,碘酊消毒,沿颈部正中中线切开皮肤,钝性分离左颈总动脉,采用 4-0 手术缝线双重结扎,缝合伤口,消毒。7 d 后采用同样方法结扎右颈总动脉,缝合伤口,消毒。假手术组予以分离颈总动脉但不结扎。

### 1.4 动物分组及给药

术后 7 d 行水迷宫测试,以正常组大鼠逃避潜

伏期(escape latency, EL)的平均值为参考值,计算每只造模大鼠逃避潜伏期与参考值之差占该鼠逃避潜伏期的比值,若该值>20%为痴呆鼠<sup>[11]</sup>。剔除大鼠游泳姿势不良以及未明显痴呆的大鼠。

### 1.5 动物分组及给药

造模成功后将大鼠随机分为假手术组、模型组、低剂量组、高剂量组、阳性组,每组 10 只。低剂量组予以相当于人常规剂量滋肾活血方[17.8 g/(kg·d)]灌胃,高剂量组予以相当于人 2 倍常规剂量滋肾活血方[35.6 g/(kg·d)]灌胃,阳性组予以相当于人常规剂量的奥拉西坦胶囊[216 mg/(kg·d)]灌胃,剂量换算参照徐叔云主编《药理实验方法学》<sup>[12]</sup>,连续灌胃 4 周。

### 1.6 免疫组化法检测 LC3II、Beclin1、PINK1 以及 Parkin 蛋白的表达

大鼠处死后取脑组织,4%多聚甲醛固定,切片,二甲苯脱蜡 3 次,乙醇洗脱,将切片置于柠檬酸钠溶液中进行抗原修复,加入过氧化酶阻断剂以阻断内源性过氧化氢酶的活性,加入 50 μL 用稀释液稀释后的一抗,室温孵育 1 h,加入 50 μL 二抗(生物素标记的羊抗鼠/兔 IgG),室温孵育 30 min,DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封片。倒置显微镜下观察,棕黄色结构为阳性表达,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件检测阳性结构的面积和强度(光密度),采用积分光密度(IOD)来表示阳性表达的水平,IOD=阳性面积×光密度<sup>[13]</sup>。

### 1.7 统计方法

采用 SPSS 20.0 进行统计分析,计量资料采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,组间比较运用 ONE-ANOVA 分析。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义, $P < 0.01$  为差异具有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织自噬标记蛋白 LC3II、Beclin1 表达的影响

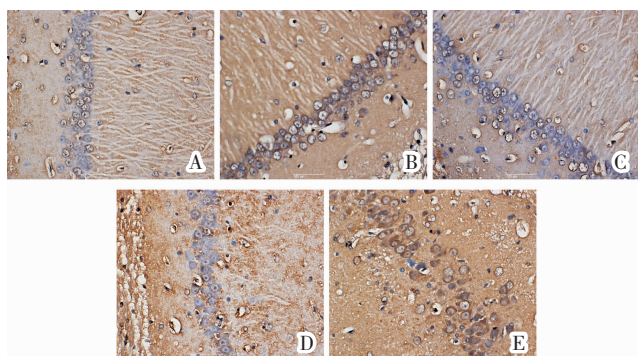
免疫组化结果显示:滋肾活血方各组干预 4 周后,VD 大鼠海马组织自噬标记蛋白 LC3II、Beclin1 表达明显增加( $P < 0.01$ )。单因素方差分析显示低剂量组与高剂量组之间结果,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而阳性组并不能增加自噬标记蛋白 LC3II、Beclin1 表达( $P > 0.05$ ),提示奥拉西坦可能不是通过影响细胞自噬改善 VD 学习记忆能力(见表 1,图 1-2)。



表 1 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织 LC3II、Beclin1、PINK1、Parkin 蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

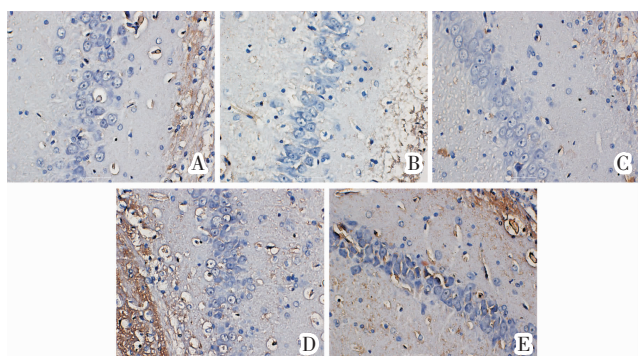
组别	LC3II( $\times 10^3$ )	Beclin1( $\times 10^3$ )	PINK1( $\times 10^3$ )	Parkin( $\times 10^3$ )
假手术组	86.42 $\pm$ 15.77	160.42 $\pm$ 30.01	106.17 $\pm$ 12.22	116.53 $\pm$ 29.76
模型组	88.21 $\pm$ 11.78	151.95 $\pm$ 33.03	114.32 $\pm$ 26.50	131.29 $\pm$ 17.45
	$P=0.83$	$P=0.66$	$P=0.22$	$P=0.51$
阳性组	81.1 $\pm$ 13.98	164.26 $\pm$ 40.24	104.48 $\pm$ 21.25	131.04 $\pm$ 21.76
	$P=0.53$	$P=0.84$	$P=0.22$	$P=0.89$
低剂量组	140.28 $\pm$ 17.18**	274.99 $\pm$ 44.22**	151.49 $\pm$ 29.42**	176.68 $\pm$ 21.83**
	$P=0.00$	$P=0.00$	$P=0.00$	$P=0.00$
高剂量组	130.54 $\pm$ 22.38**	261.25 $\pm$ 41.36**	146.93 $\pm$ 29.12**	186.22 $\pm$ 24.32**
	$P=0.00$	$P=0.00$	$P=0.00$	$P=0.00$

注:与假手术组比较,\*\* $P<0.01$



注:A.假手术组;B.模型组;C.阳性组;D.低剂量组;E.高剂量组

图 1 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织 LC3II 表达的影响( $\times 400$ )



注:A.假手术组;B.模型组;C.阳性组;D.低剂量组;E.高剂量组

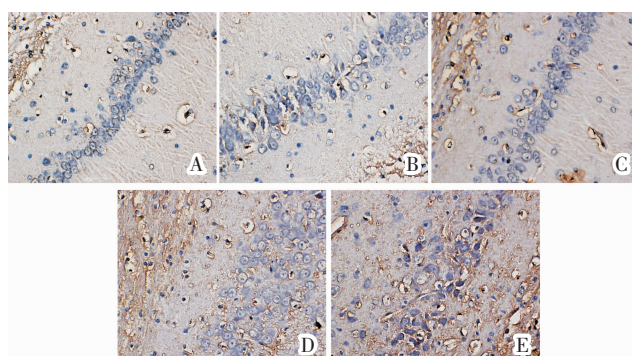
图 2 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织 Beclin1 表达的影响( $\times 400$ )

## 2.2 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织 PINK1/Parkin 表达的影响

免疫组化结果表明,干预 4 周后,滋肾活血方各组,均能显著提高 VD 大鼠海马 PINK1、Parkin 蛋白的表达水平( $P<0.01$ )。单因素方差分析结果显示低剂量组与高剂量组之间,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而阳性组 PINK1、Parkin 蛋白的表达并无明显变化(见表 1,图 3-4)。

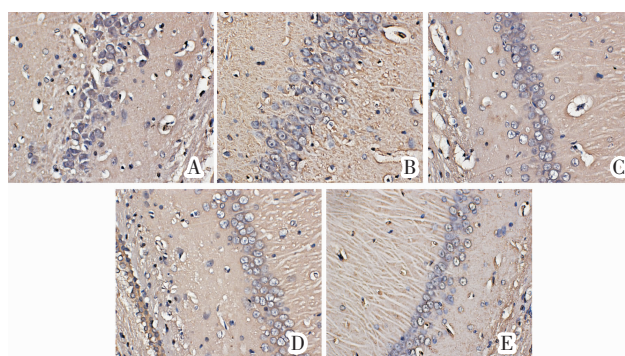
## 3 讨论

中医学并无 VD 的病名,因 VD 多见于中风之



注:A.假手术组;B.模型组;C.阳性组;D.低剂量组;E.高剂量组

图 3 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织 PINK1 表达的影响( $\times 400$ )



注:A.假手术组;B.模型组;C.阳性组;D.低剂量组;E.高剂量组

图 4 滋肾活血方对 VD 大鼠海马组织 Parkin 表达的影响( $\times 400$ )

后,故可归属于“中风痴呆”范畴。课题组对 VD 的现代文献进行了系统研究<sup>[14-15]</sup>,并对其证型进行了流行病学调查<sup>[16]</sup>,结果均证实“肾精阴虚、瘀血阻络”为 VD 的主要病机。针对该病机,课题组在国医大师刘祖贻的带领下创制了以滋肾填精、活血通络为治法的滋肾活血方,经临床研究证实其能显著改善 VD 患者学习记忆能力评分,如 MMSE 评分、ADL 评分以及中医证候积分等<sup>[5]</sup>。并且发现其机制可能与上调 NR1、NR2A、NR2B,增加 CaM、CaMPK II 蛋白及 mRNAs 的表达有关<sup>[6-7]</sup>。

因诸多文献报道 NR 激活可诱导细胞自噬,保护受损神经元。采用 NR 的配体兴奋性氨基酸 NMDA 短时间处理(3 h)可以提高大鼠小脑颗粒神经元细胞胞体及神经突的 LC3II 和 Beclin-1 水平,而当处理时间延长至 8~24 h 时则出现 MDC-、LC3-阳性的自噬小体,提示兴奋性氨基酸诱导细胞自噬<sup>[17]</sup>。Li Y 等<sup>[18]</sup>研究发现 NMDA 与突触后膜上的 NR 受体结合,激活 Fyn-NR2B-CaMKII 信号途径,增加 NR2B pY1472 位点的磷酸化,诱导神经元自噬。基于上述研究基础,故研究团队进一步探究细胞自噬在滋肾活血方改善 VD 大鼠学习记忆能力方面影响,发现滋肾活血方能显著增加自噬标记蛋白 LC3II、

Beclin1 的表达,提示滋肾活血方能增加缺血海马神经元的自噬,从而保护神经元,改善 VD 大鼠学习记忆能力。

PINK1/Parkin 通路是经典的介导细胞自噬的通路,PINK1 是一种蛋白激酶,主要在细胞质中合成,多余的 PINK1 经线粒体外两层膜进入线粒体内,被线粒体蛋白酶 MPP 和 PARL 酶剪切并运回胞浆,最终被降解而代谢。但当神经元受到缺血缺氧损伤后,早期出现线粒体膜电位下降,导致 PINK1 不能跨越线粒体外膜向线粒体内转移,不能被代谢而积累于线粒体外膜上。线粒体外膜上积聚的 PINK1 则招募并活化细胞浆中 E3 泛素化酶 Parkin, Parkin 活化后与 LC3 结合,形成自噬小体,自噬小体与溶酶体进一步结合形成自噬溶酶体,从而清除受损细胞成分,发挥保护细胞的作用<sup>[19]</sup>。目前,暂无 PINK1/Parkin 信号通路在 VD 发病机制中的研究报道,但可见在脑缺血损伤中的神经保护作用报道。Anatoly Uzdensky 等<sup>[20-21]</sup>发现采用光化学法建立大鼠脑梗死模型,4 h 后即可观察到缺血半暗带 PINK1、Parkin 蛋白表达的上调,提示 PINK1/Parkin 信号通路激活可以保护缺血损伤神经元。本研究结果显示滋肾活血方改善 VD 大鼠学习记忆能力与上调 PINK1/Parkin 信号分子相关。

课题组在前期研究的基础上,采用改良 2-VO 法建立 VD 大鼠模型,结果显示滋肾活血方能显著提高自噬标记蛋白 LC3II、Beclin1 以及自噬调控 PINK1/Parkin 信号分子的表达,提示滋肾活血方可能通过激活 PINK1/Parkin 信号通路,促进细胞自噬,保护 VD 大鼠神经元,改善其学习记忆能力。

## 参考文献

- [1] O'BRIEN J T, THOMAS A. Vascular dementia[J]. *The Lancet*, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [2] SHRIVASTAVA S R, SHRIVASTAVA P S. Dementia in middle- and low-income nations: A public health priority[J]. *Journal of Research in Medical Sciences*, 2016, 21(1): 5.
- [3] MATTHEWS F E, ARTHUR A, BARNES L E, et al. A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of england: results of the cognitive function and ageing study I and II [J]. *Lancet*, 2013, 382(9902): 1405-1412.
- [4] GHORANI-AZAM A, SEPAHI S, KHODAVERDI E, et al. Herbal medicine as a promising therapeutic approach for the management of vascular dementia: A systematic literature review[J]. *Phytotherapy Research*, 2018, 32(9): 1720-1728.
- [5] 伍大华,姚 婷,蒋军林,等.滋肾活血方治疗血管性痴呆肾阴虚血瘀证的临床研究[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2015,13(12): 1372-1374.
- [6] 任晨斌,伍大华,张发友,等.滋肾活血方对血管性痴呆大鼠学习记忆能力和海马形态学的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(10):1082-1085.
- [7] 任晨斌,伍大华,郭 晨,等.滋肾活血方对血管性痴呆大鼠 NR2A 表达的影响[J].*湖南中医药大学学报*,2018,38(2):141-144.
- [8] GAO J, ZHANG X, YU M, et al. Cognitive deficits induced by multi-walled carbon nanotubes via the autophagic pathway[J]. *Toxicology*, 2015, 337(9): 21-29.
- [9] SINGH A K, KASHYAP M P, TRIPATHI V K, et al. Neuroprotection through rapamycin-induced activation of autophagy and PI3K/Akt1/mTOR/CREB signaling against amyloid- $\beta$ -induced oxidative stress, synaptic/neurotransmission dysfunction, and neurodegeneration in adult rats[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(8): 5815-5828.
- [10] MA S L, CHEN J W, CHEN C, et al. Erythropoietin rescues memory impairment in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion via the EPO-R/JAK2/STAT5/PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway[J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(4): 3290-3299.
- [11] ZHAO X L, FANG X B, LI D P. Establishing vascular dementia model in rats [J]. *Neural Regeneration Research*, 2002, 31(3): 166-167, 176.
- [12] 徐叔云.药理学实验方法学[M].北京:人民卫生出版社,2001:202-203.
- [13] 萧云备,乔正国,张晓威,等.新跨膜蛋白非转移性黑色素瘤糖蛋白 B 在前列腺癌组织中的表达及意义[J].*北京大学学报(医学版)*,2011,43(4):496-499.
- [14] 伍大华,祝 皓.血管性痴呆的辨证规律文献研究[J].*中医临床研究*,2011,3(20):109-111.
- [15] 伍大华,祝 皓.补肾活血法治疗血管性痴呆用药规律文献研究[J].*中国中医急症*,2011,20(12):1970-1971.
- [16] 姚 婷,伍大华.血管性痴呆中医证型与发病危险因素的相关性研究[J].*内蒙古中医药*,2017,36(11):4-6.
- [17] SADASIVAN S, ZHANG Z Q, LARNER S F, et al. Acute NMDA toxicity in cultured rat cerebellar granule neurons is accompanied by autophagy induction and late onset autophagic cell death phenotype[J]. *BMC Neuroscience*, 2010, 11(1): 1-11.
- [18] LI Y, SUN W, HAN S, et al. IGF-1-involved negative feedback of NR2B NMDA subunits protects cultured hippocampal neurons against NMDA-induced excitotoxicity[J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(1): 684-696.
- [19] EIYAMA A, OKAMOTO K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells[J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 33: 95-101.
- [20] UZDENSKY A, DEMYANENKO S, FEDORENKO G, et al. Protein profile and morphological alterations in penumbra after focal photothrombotic infarction in the rat cerebral cortex [J]. *Molecular Neurobiology*, 2017, 54(6): 4172-4188.
- [21] DEMYANENKO S V, PANCHENKO S N, UZDENSKY A B. Expression of neuronal and signaling proteins in penumbra around a photothrombotic infarction core in rat cerebral cortex[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, 80(6): 790-799.