

本文引用: 陈桑妮, 吴梅, 何薇, 孟盼, 李丹丹. 百合知母汤通过改善线粒体功能与自噬保护秀丽隐杆线虫多巴胺能神经元的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(12): 2271-2279.

百合知母汤通过改善线粒体功能与自噬保护秀丽隐杆线虫多巴胺能神经元的机制研究

陈桑妮, 吴梅, 何薇, 孟盼*, 李丹丹*

湖南中医药大学, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨百合知母汤对秀丽隐杆线虫(线虫)多巴胺能神经元(DN)的保护作用。**方法** 将同步化线虫随机分为空白组、模型组[400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鱼藤酮(ROT)], 百合知母汤组(6.7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 百合知母汤溶液+400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ROT)和氟西汀组(100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟西汀药物溶液+400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ROT)。根据线虫 DN 的绿色荧光蛋白(GFP)荧光强度和 DN 畸变程度筛选 ROT 最佳浓度;通过线虫头部摆动频率筛选百合知母汤的最佳药物浓度。利用 DN 荧光标记线虫(BZ555), 检测其神经损伤情况;采用线粒体电子传递链(ETC)复合物荧光标记线虫(CB7272), 检测其 ETC 复合物损伤恢复情况;采用荧光探针技术检测线粒体膜电位;采用胡桃醌诱导氧化应激线虫模型, 通过生存分析评估其生存率;利用 DCFH-DA 探针检测线虫体内活性氧(ROS)水平, 评价百合知母汤抗氧化效果。通过免疫荧光检测线粒体自噬相关基因标记线虫(RB2547), 检测 pink-1 的表达情况。**结果** ROT 最佳造模剂量为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;百合知母汤最佳给药剂量为 6.7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。与空白组相比, 模型组 DN GFP 荧光信号降低($P<0.01$), 畸变程度升高($P<0.01$), ETC 复合物 GFP 强度下降($P<0.01$), ATP 水平下降($P<0.01$), 线粒体膜电位水平下降($P<0.01$), 线虫存活率下降($P<0.01$), ROS 水平升高($P<0.01$), pink-1 荧光信号下降($P<0.05$)。与模型组相比, 百合知母汤组 DN GFP 荧光信号升高($P<0.05$);百合知母汤组和氟西汀组畸变程度降低($P<0.01$), ETC 复合物 GFP 强度升高($P<0.01$), ATP 水平升高($P<0.01$), 线粒体膜电位水平升高($P<0.01$), 线虫存活率提高($P<0.01$), ROS 水平降低($P<0.01$), pink-1 荧光信号增加($P<0.01$)。**结论** 百合知母汤可能通过改善秀丽隐杆线虫线粒体功能障碍, 增强抗氧化能力, 降低 ROS 水平, 上调 pink-1 表达, 最终保护 DN。

[关键词] 百合知母汤;秀丽隐杆线虫;氧化应激;线粒体功能;多巴胺能神经元

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.12.005

Mechanism of Baihe Zhimu Decoction in protecting dopaminergic neurons in *Caenorhabditis elegans* via enhancement of mitochondrial function and autophagy

CHEN Sangni, WU Mei, HE Wei, MENG Pan*, LI Dandan*

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of Baihe Zhimu Decoction (BHZMD) on dopaminergic neurons

[收稿日期] 2025-08-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82474468);湖湘青年英才项目(2024RC3200);湖南省卫生健康委员会高层次人才项目(青年骨干)(20240304118);长沙市杰出创新青年培养计划(kq2406017)。

[通信作者] *李丹丹, 女, 硕士, 副教授, E-mail: 48797696@qq.com;孟盼, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 403642392@qq.com。

(DNs) in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). **Methods** Synchronized *C. elegans* worms were randomly divided into blank control group, model group [exposed to $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ rotenone (ROT)], BHZMD group (treated with $6.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BHZMD solution+ $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ROT), and fluoxetine group (treated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoxetine solution+ $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ROT). The optimal concentration of ROT was determined based on the fluorescence intensity of green fluorescent protein (GFP) and the degree of DN deformity of the worms. The optimal concentration of BHZMD was selected by assessing worm head thrash frequency. Dopaminergic neuronal damage was evaluated in the worms with GFP-labeled DN (BZ555). Mitochondrial function was analyzed using worms expressing fluorescent markers for electron transport chain (ETC) complexes (CB7272) to monitor ETC recovery. Mitochondrial membrane potential was measured using a fluorescence probe. Survival analysis was performed in a juglone-induced oxidative stress model. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured using the DCFH-DA probe. The expression of pink-1 was examined in autophagy-related gene-labeled worms (RB2547) via immunofluorescence. **Results** The optimal modeling concentrations of ROT and BHZMD were determined to be $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $6.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectively. Compared with the blank control group, the model group exhibited significantly decreased GFP fluorescence signals of DN ($P<0.01$) and significantly increased degree of DN deformity ($P<0.01$). Furthermore, the GFP intensity of the mitochondrial ETC complexes was significantly reduced ($P<0.01$), along with decreased ATP levels ($P<0.01$), declined mitochondrial membrane potential ($P<0.01$), lower worm survival rate ($P<0.01$), elevated ROS levels ($P<0.01$), and weakened pink-1 fluorescence signals ($P<0.05$). Compared with the model group, the BHZMD group exhibited higher DN GFP fluorescence signals ($P<0.05$); both the BHZMD and fluoxetine groups demonstrated reduced degree of DN deformity ($P<0.01$), enhanced ETC complex GFP intensity ($P<0.01$), elevated ATP levels ($P<0.01$), improved mitochondrial membrane potential ($P<0.01$), higher survival rates ($P<0.01$), decreased ROS levels ($P<0.01$), and intensified pink-1 fluorescence signals ($P<0.01$). **Conclusion** BHZMD may protect DN in *C. elegans* by ameliorating mitochondrial dysfunction, enhancing antioxidant capacity, reducing ROS levels, and upregulating pink-1 expression.

[**Keywords**] Baihe Zhimu Decoction; *Caenorhabditis elegans*; oxidative stress; mitochondrial function; dopaminergic neuron

多巴胺能神经元(dopaminergic neuron, DN)是中枢神经系统的关键部分,其损伤与神经系统疾病的发生发展密切相关^[1]。近年研究发现,调节线粒体功能有助于维持 DN 的正常能量供应^[2]。减少氧化应激能够降低活性氧(reactive oxygen species, ROS)对 DN 造成的损伤^[3]。此外,线粒体自噬可清除受损线粒体,降低 ROS 水平,减少氧化应激,从而减轻对 DN 的损伤^[4-5]。因此,调节线粒体功能、减少氧化应激以及促进线粒体自噬,可能是保护 DN 的重要策略。

百合知母汤来源于张仲景所著的《金匱要略·百合狐惑阴阳毒病脉证治第三》,由百合和知母两味中药组成,具有补虚清热、养阴润燥的功效^[6-7]。现代药理研究表明,知母中的主要活性成分为皂苷类,如知母皂苷 B II、知母皂苷 A III 等,其在神经保护方面的作用显著^[8]。研究显示,知母皂苷能改善慢性乙醇中毒小鼠的学习记忆能力并增强突触可塑性^[9]。知

母皂苷元能通过抑制神经元凋亡与保护突触结构,显著减轻谷氨酸诱导的皮质神经元损伤^[10]。百合知母汤临床常用于治疗百合病、失眠、神经衰弱等精神类疾病,其对 DN 的保护作用及其分子机制仍有待研究^[11-12]。秀丽隐杆线虫(以下简称“线虫”),共有 302 个神经元,其中 DN 共有 4 对,分布在头部和尾部,头部包括 2 对头神经元(cephalic neurons, CEPs)和 1 对前侧尾神经元(anterior deirid neurons, ADEs),尾部则有 1 对后侧尾神经元^[7]。线虫身体透明,可结合荧光标记技术直接通过显微镜观察其特异性荧光标记的神经元状态^[13]。本研究旨在探索百合知母汤的潜在生物效应,选用线虫作为模式生物,观察其对线虫线粒体功能以及氧化应激的影响,进而深入揭示自噬相关基因在保护 DN 中的作用机制,期为中药复方在神经保护领域的应用提供新的实验依据和理论支持。

1 材料

1.1 线虫和菌株

野生型线虫 N2;线虫突变体 BZ555(dat-1::GFP)、CB7272[ccIs4251I;mIs12II;dpy-17(e164)III;frIs7IV;uIs69V]、RB2547[pink-1(ok3538)]。N2 和 RB2547 由湖南师范大学李国林教授惠赠,BZ555 和 CB7272 由同济大学王红兵教授惠赠,所用线虫均以尿嘧啶缺陷型大肠埃希菌 *Escherichia coli* OP50 作为食物。

1.2 主要药物及试剂

百合(批号:250302)、知母(批号:240701)中药饮片均购自北京同仁堂,经湖南中医药大学第一附属医院中药房张志国教授鉴定为正品。

盐酸氟西汀胶囊(礼来苏州制药有限公司,国药准字 HJ20160501,规格:20 mg×28 粒/盒,批号:23379A);鱼藤酮(rotenone, ROT)(批号:G2409122,上海阿拉丁生化科技公司);胡桃醌(批号:BD12556-1g,毕得医药);四咪唑盐酸盐(批号:A506410-0100,生工生物工程股份有限公司);腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(批号:S0026,C2006,碧云天生物技术股份有限公司);BCA 蛋白检测试剂盒(批号:E-BC-K318-M,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);DCFH-DA(批号:E004-1-1,南京建成生物工程研究所有限公司)。

1.3 主要仪器

体视显微镜(型号:T2-HD206,广东奥斯威公司);倒置荧光显微镜(型号:Axio Observer 3,德国 Carl Zeiss 公司);生物培养箱(型号:LRH-400A,广东泰宏君科学仪器股份有限公司);-80 °C超低温冰箱(型号:905GP,美国 Thermo Scientific 公司);立式自动高压蒸汽灭菌锅(型号:HRLM-60A,中国海尔集团)。

2 方法

2.1 分组

将同步化的线虫分为空白组、模型组、百合知母汤组(6.7 mg·mL⁻¹)和氟西汀组(100 μmol·L⁻¹)。除空白组外,其余各组均采用 ROT 进行造模,以 DN GFP 荧光强度下降且畸变程度升高为造模成功标准^[4]。

2.2 百合知母汤制备

称取百合 400 g、知母 200 g,饮片浸泡 0.5 h,加 10 倍量水,回流提取 2 次,每次 2 h。合并 2 次滤液,采用旋转蒸发器减压浓缩至 600 mL,得到 1 g·mL⁻¹母液。经 0.22 μm 滤膜过滤后,4 °C 保存备用。

2.3 线虫的药板处理

2.3.1 百合知母汤含药培养基配制 取百合知母汤母液(1 g·mL⁻¹),分别稀释 200、150、120、100 倍制备成百合知母汤提取物浓度为 5、6.7、8.3、10 mg·mL⁻¹的线虫生长培养基(nematode growth medium, NGM)。将百合知母汤储备液与大肠埃希菌 OP50 混合均匀后,吸取 10 μL 菌液涂布于 NGM 平板中,37 °C 恒温培养箱培养过夜后,将实验所用的同步化线虫转移至平板上进行饲喂。

2.3.2 氟西汀含药培养基配制 取一粒盐酸氟西汀胶囊(20 mg)制备成浓度为 28.9 mmol·L⁻¹的储备液。吸取 104 μL 该储备液与 NGM 混合均匀,使盐酸氟西汀终浓度为 100 μmol·L⁻¹。最后取 10 μL OP50 大肠埃希菌菌液涂布平板,37 °C 过夜培养后,将同步化线虫转入平板饲喂。

2.3.3 ROT 含药培养基配制 将经过同步化处理获得的 L1 期线虫接种于涂有 OP50 大肠埃希菌的 NGM 培养基上,并在低温培养箱中培养 1 d 后进行实验。在 ROT 诱导的线虫 DN 损伤实验中,设置 ROT 的浓度分别为 100、200、300、400、500 μmol·L⁻¹,共 5 组,次日观察 DN 荧光强度并记录 DN 畸变程度。

2.4 线虫培养及同步化

将线虫转移至涂有尿嘧啶缺陷型 OP50 大肠埃希菌的 NGM 平板中,并置于 20 °C 恒温培养箱中进行培养。将产卵期线虫用 M9 缓冲液冲洗,收集至离心管中,加入线虫裂解液,在 5 000×g 的转速下离心 3 min,去除部分上清,挑取 50 只生长良好并处于产卵期的线虫转移至新的涂有大肠埃希菌 OP50 的 NGM 中,使其产卵,2 h 后再将该皿中的 50 只线虫全部挑出。将含有虫卵的培养皿放置在 20 °C 恒温培养箱中培养,2~3 d 后即可得到处于同一生长时期的线虫。

2.5 转基因线虫的荧光测定方法

2.5.1 DN 荧光标记线虫品系 BZ555 分析神经损伤情况 在麻醉状态用倒置荧光显微镜 FITC 通道观察并拍摄线虫前部 CEPs 和 ADEs DN, 分析其畸变、丢失和恢复情况, 用 ImageJ 软件量化荧光强度。

2.5.2 线粒体电子传递链(electron transport chain, ETC)复合物荧光标记线虫品系 CB7272, 观察ETC 复合物损伤恢复情况 在转基因线虫 CB7272 中, 用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记复合物 I、II 和 III, 同时用红色荧光蛋白(red fluorescent protein, RFP)标记咽肌和表皮中的复合物 IV 和 V, 通过同时测定 CB7272 线虫中的 GFP 和 RFP 来表征线粒体呼吸链复合物 I~V 的变化。线虫麻醉后置于倒置显微镜下观察, 采用 ImageJ 进行荧光强度定量。

2.5.3 线粒体自噬相关基因标记线虫品系 RB2547, 观测 pink-1 表达情况 由于 GFP 标记的 pink-1 基因在线虫的所有细胞中表达, 使线虫身体表现出弥散状的 GFP 荧光分布形式。将倒置荧光显微镜的 FITC 通道调整至适宜放大倍数, 观察麻醉后线虫的 GFP 荧光情况并拍照, 用 ImageJ 进行荧光强度定量。

2.6 头部摆动频率测定

挑取约 30 条同步化 L4 线虫置于含不同浓度百合知母汤的培养基中, 进行药物干预后, 将线虫转移至无菌 NGM 板, 待其恢复 1 min。在倒置荧光显微镜下观察并记录 1 min 内线虫头部摆动次数, 进行 3 次平行实验, 头部从一侧摆至另一侧再返回计为一次摆动。

2.7 线粒体 ATP 含量检测

处理线虫后, 每板保持 1 000 条线虫, 用 M9 缓冲液冲洗并清洗 3 次, 加入 300 μL 裂解液, 超声破碎线虫。采用 ATP 检测试剂盒与 BCA 法分别测定上清液中的 ATP 含量与蛋白质含量。ATP 相对含量以 ATP 含量与蛋白含量的比值表示。

2.8 线粒体膜电位检测

线虫给药后, 用线粒体膜电位试剂盒对活虫进行检测。用 M9 缓冲液将每组线虫从平板上洗出, 清洗 3 次后转移至 96 孔板。按试剂盒配 JC-1 染色工

作液, 20 $^{\circ}\text{C}$ 避光 1 h。孵育后, 将线虫用 JC-1 染色缓冲液清洗 3 次, 随后麻醉线虫, 用倒置荧光显微镜拍照, ImageJ 定量。

2.9 抗氧化应激能力检测

将同步化后的野生型 L1 期线虫分别接种至药板上, 随后转移线虫至含 0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 胡桃醌的 NGM 板中, 置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养, 此时记为 0 h, 每隔 1 h 使用铂丝末端轻触线虫, 若线虫无反应则记录为死亡。观察并记录存活情况直至全部死亡。

2.10 ROS 水平检测

使用 DCFH-DA 探针检测线虫体内 ROS 水平。收集经处理的线虫, 用 M9 缓冲液清洗 3 次。彻底去除上清后, 加入 1 μL 6 mmol/L DCFH-DA 母液, 与线虫混匀, 将线虫置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 5 h, 随后加入 2 mmol/L 四咪唑盐酸盐溶液麻醉 5 min。取 8 只麻醉后的线虫整齐排列于载玻片上, 在荧光显微镜下观察并采集图像, 最终通过 ImageJ 软件对荧光强度进行定量分析。

2.11 统计学分析

数据处理使用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件完成。计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示, 统计分析根据数据特性选择方差分析或 *t* 检验, 生存分析采用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线并用对数秩检验比较差异。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 线虫造模和给药条件的筛选

3.1.1 ROT 最佳浓度 与空白组比较, 模型组(200、300、400、500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ROT)线虫 DN 的 GFP 荧光强度降低($P<0.05$, $P<0.01$), DN 畸变程度升高($P<0.01$)。其中, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 ROT 均能导致 DN GFP 荧光强度下降以及畸变程度升高, 但实验中观察到 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 ROT 导致线虫大量死亡。因此, 后续实验选择 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ROT 作为最佳造模浓度。详见表 1。

3.1.2 百合知母汤最佳浓度 与空白组比较, 百合知母汤组浓度为 5、6.7、8.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 线虫头部摆动频率升高($P<0.01$), 浓度为 6.7 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时最显

表1 ROT最佳浓度筛选($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 1 Screening of optimal concentration of ROT ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	ROT 浓度/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	DN GFP 荧光强度	DN 畸变程度/%
空白组	—	1.00±0.03	8.66±0.88
模型组	100	0.89±0.03	20.66±1.76**
	200	0.81±0.01*	29.00±2.08**
	300	0.70±0.01**	60.66±1.76**
	400	0.57±0.01**	78.00±1.52**
	500	0.51±0.01**	88.00±1.52**

注:数值以相较于空白组的倍数表示;与空白组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

著,故最终选择浓度为 $6.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的百合知母汤进行后续实验。详见表 2。

表2 百合知母汤最佳浓度筛选($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 2 Screening of optimal concentration of Baihe Zhimu Decoction ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $(\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1})$	头部摆动频率/min
空白组	—	82.73±0.92
百合知母汤组	10	83.93±0.64
	8.3	86.93±0.87**
	6.7	121.86±0.84**
	5	86.96±0.89**

注:与空白组比较,** $P<0.01$ 。

3.2 百合知母汤对线虫 DN 的保护作用

与空白组比较,模型组 DN GFP 荧光强度下降($P<0.01$),畸变程度升高($P<0.01$),达 80%。与模型组比较,百合知母汤组 DN GFP 荧光强度升高($P<0.05$),畸变程度下降($P<0.01$)。详见表 3、图 1。

3.3 百合知母汤对线虫线粒体功能的影响

3.3.1 百合知母汤对线虫线粒体 ETC 复合物的影响 与空白组比较,模型组 GFP 荧光强度下降($P<$

表3 各组线虫 DN GFP 荧光强度比较($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 3 Comparison of DN GFP fluorescence intensity among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	DN GFP 荧光强度	DN 的畸变程度/%
空白组	1.99±0.07	8.66±0.89
模型组	1.00±0.06**	80.00±2.30**
百合知母汤组	1.32±0.09 [#]	31.66±2.02 ^{##}
氟西汀组	1.23±0.01	32.66±1.73 ^{##}

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

0.01)。与模型组比较,百合知母汤组和氟西汀组 GFP 荧光强度上升($P<0.01$)。详见表 4、图 2。

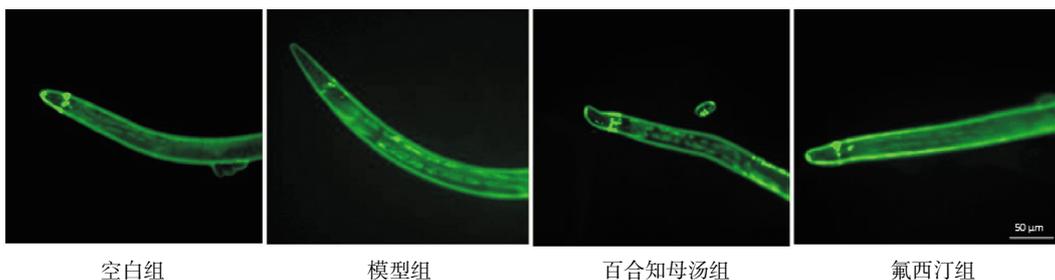
表4 各组线虫线粒体 ETC 复合物荧光强度比较($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 4 Comparison of fluorescence intensity of mitochondrial ETC complexes among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	GFP 荧光强度	RFP 荧光强度
空白组	3.16±0.02	1.00±0.04
模型组	1.00±0.04**	1.00±0.03
百合知母汤组	2.51±0.07 ^{##}	0.98±0.04
氟西汀组	2.44±0.25 ^{##}	1.05±0.04

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.3.2 百合知母汤对线虫 ATP 的影响 与空白组比较,模型组 ATP 水平下降($P<0.01$)。与模型组比较,百合知母汤组和氟西汀组 ATP 水平升高($P<0.01$)。详见表 5。

3.3.3 百合知母汤对线虫线粒体膜电位的影响 与空白组比较,模型组线粒体膜电位水平下降($P<0.01$)。与模型组比较,百合知母汤组和氟西汀组线粒体膜电位水平升高($P<0.01$)。详见图 3、表 6。

图1 各组线虫 DN GFP 荧光图($\times 10$)Fig.1 Fluorescence images of DN GFP in each group of *C. elegans* ($\times 10$)

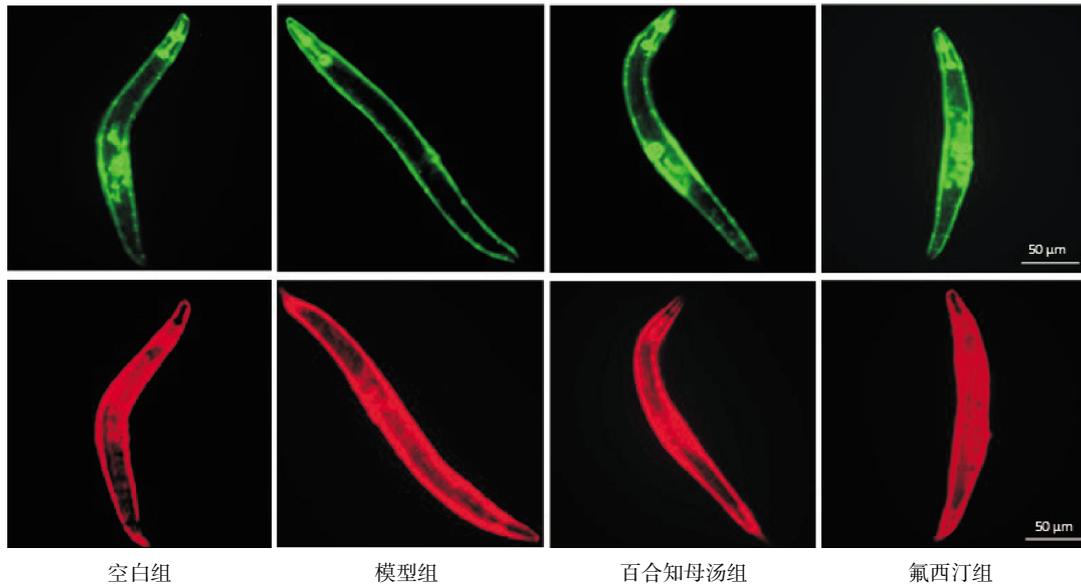


图 2 各组线虫线粒体 ETC 复合物荧光图(×10)

Fig.2 Fluorescence images of mitochondrial ETC complexes in each group of *C. elegans* (×10)

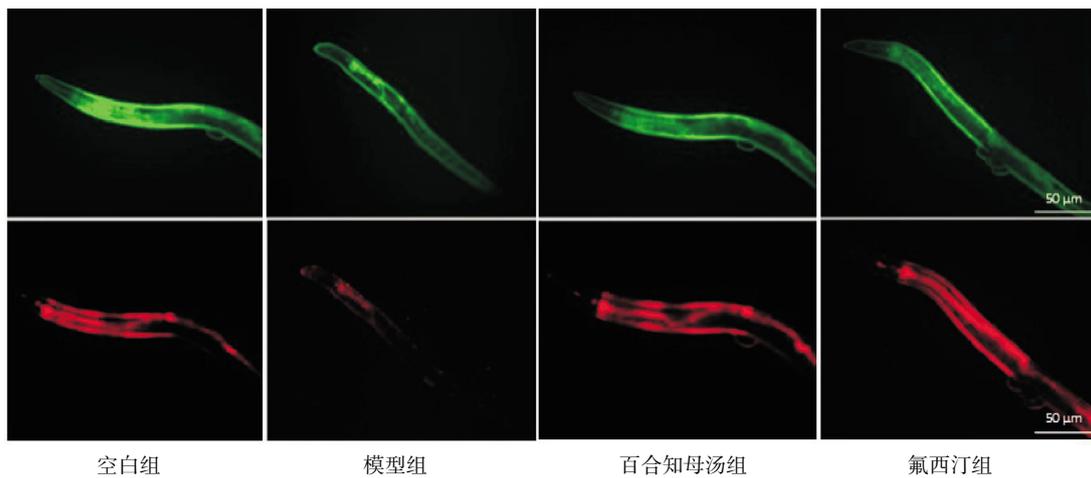


图 3 各组线虫线粒体膜电位荧光图(×10)

Fig.3 Fluorescence images of mitochondrial membrane potential in each group of *C. elegans* (×10)

表 5 各组线虫 ATP 水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of ATP levels among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	ATP/(nmol·mg ⁻¹)
空白组	12.45±0.67
模型组	2.91±0.32**
百合知母汤组	10.25±0.40 [#]
氟西汀组	11.19±0.41 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

表 6 各组线虫线粒体膜电位荧光比值比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of mitochondrial membrane potential fluorescence ratios among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	红/绿荧光比值
空白组	3.37±0.03
模型组	1.00±0.03**
百合知母汤组	1.48±0.05 [#]
氟西汀组	1.56±0.09 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

3.4 百合知母汤对线虫抗氧化应激能力的影响

3.4.1 百合知母汤对线虫存活率的影响 与空白组比较,模型组线虫存活率下降($P<0.01$)。与模型组比

较,百合知母汤组和氟西汀组线虫存活率升高($P<0.01$)。详见图 4。

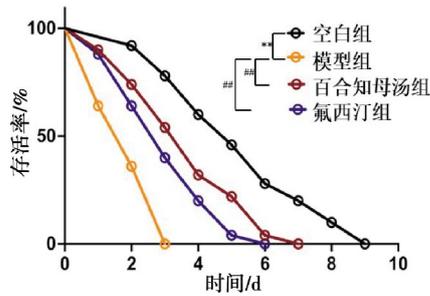


图4 各组线虫存活率比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig.4 Comparison of survival rates among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

3.4.2 百合知母汤对线虫 ROS 水平的影响 与空白组比较,模型组线虫体内 ROS 水平升高($P<0.01$)。与模型组比较,百合知母汤组和氟西汀组线虫体内 ROS 水平降低($P<0.01$)。详见表 7、图 5。

表 7 各组线虫 ROS 水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Comparison of ROS levels among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	ROS/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
空白组	0.27±0.03
模型组	1.00±0.05**
百合知母汤组	0.26±0.01##
氟西汀组	0.29±0.01##

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

3.5 百合知母汤对线虫线粒体自噬 pink-1 的影响

与空白组比较,模型组 pink-1 荧光信号下降($P<0.05$)。与模型组比较,百合知母汤组和氟西汀组 pink-1 荧光信号升高($P<0.01$)。详见表 8、图 6。

表 8 各组线虫 pink-1 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Comparison of pink-1 expression levels among different groups of *C. elegans* ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	pink-1 的 GFP 荧光信号
空白组	1.15±0.02
模型组	1.00±0.02*
百合知母汤组	1.42±0.02##
氟西汀组	1.39±0.02##

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.01$ 。

4 讨论

DN 合成神经递质多巴胺以及各种酶和蛋白质,为神经元的正常生理功能提供物质基础^[15]。当线粒体功能出现障碍时,生物能量输出不足以维持正常生理需求,造成细胞能量水平降低^[16]。在中枢神经系统疾病患者的脑内,线粒体复合物 I 受抑制,导致氧化失衡^[17-18]。氧化应激发生时,ROS 过度生成会损伤 DN 线粒体^[19]。线粒体功能障碍还会诱导线粒体自噬的发生^[20]。线粒体功能障碍和氧化应激相互促进,形成恶性循环,加剧神经元受损,最终导致神经系统疾病的发生^[21]。本研究结果表明,百合知母汤可通过逆

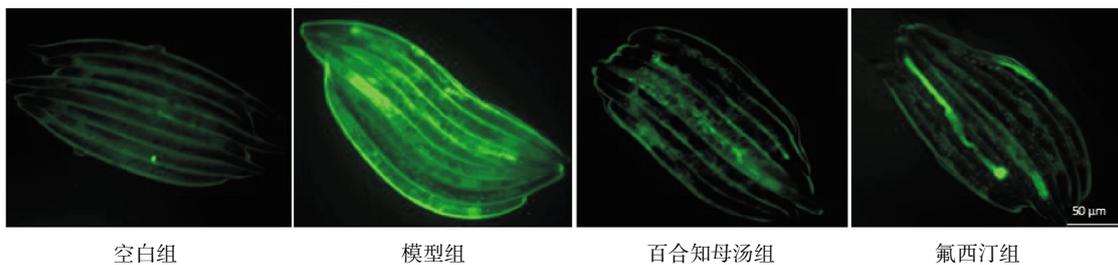


图5 各组线虫的 ROS 荧光图($\times 10$)

Fig.5 Fluorescence images of ROS in each group of *C. elegans* ($\times 10$)

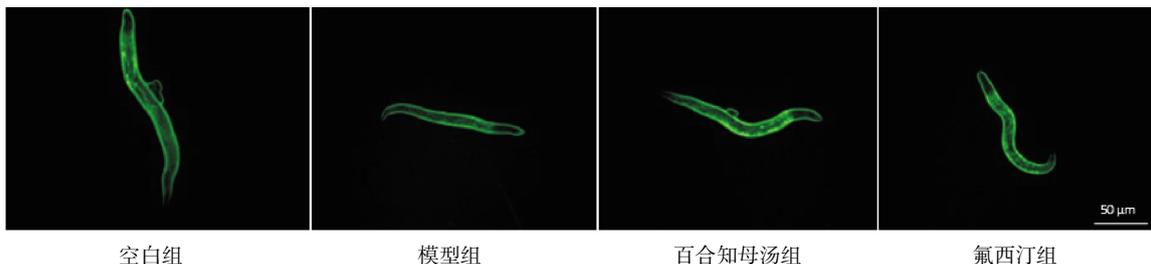


图6 各组线虫 pink-1 荧光图($\times 10$)

Fig.6 Fluorescence images of pink-1 in each group of *C. elegans* ($\times 10$)

转线粒体功能障碍、增强抗氧化应激能力以及上调线粒体自噬相关基因 pink-1 的表达,从而对 DN 产生保护作用。研究发现,氟西汀可通过改善线粒体功能增加 ATP 水平^[22],减少氧化应激,发挥保护 DN 的作用^[23],故本研究选择其作为阳性对照药物。

DN 高度依赖线粒体能量代谢^[24],而 ROT 是亲脂性的线粒体呼吸链抑制剂^[25],作为 ETC 复合物 I 抑制剂阻止 ATP 正常合成,引发线粒体功能障碍,使线粒体复合物表达下降,膜电位降低,导致 DN 死亡^[26]。氧化应激与 DN 损伤密切相关,氧化应激可促使 ROS 过度产生,ROS 的聚集会对线粒体呼吸链、膜电位进行攻击,损伤的线粒体又会加剧 ROS 的释放,进而加重氧化应激的程度^[27]。百合知母汤中的知母皂苷类成分(如知母皂苷 B-II)已被证实具有明确的线粒体保护作用,能够拮抗膜电位衰减、提升 ATP 水平并降低 ROS^[28]。本研究结果表明,百合知母汤通过增加 ATP 产量、提升线粒体膜电位及增强 ETC 复合物活性以协同改善线粒体功能,并延长氧化应激条件下的生存时间,验证了其通过调节线粒体功能与减轻氧化应激以保护 DN 的潜在机制。

线粒体自噬是维持线粒体稳态和细胞健康的关键过程,而 pink-1 在调控线粒体自噬中起核心作用^[29]。正常情况下,pink-1 经线粒体蛋白酶切割后,通过 N 端规则通路被降解,因而其蛋白水平较低^[30]。此机制可防止健康线粒体出现异常的线粒体自噬^[31]。然而,线粒体膜电位丧失或遇到错误折叠的膜蛋白将导致 pink-1 稳定在线粒体外膜上,从而触发线粒体自噬^[30]。研究表明,激活 pink-1 可通过增强线粒体自噬保护 DN^[32]。本研究发现,与模型组相比,百合知母汤和氟西汀处理后,pink-1 荧光信号显著升高。以上结果提示,百合知母汤可能通过上调 pink-1 促进线粒体自噬,进而发挥对 DN 的保护作用。然而,pink-1 的上调是否为百合知母汤发挥作用的直接原因,尚需进一步验证。后续研究可通过基因敲除或构建 pink-1 转基因动物模型进行验证,从而为阐明百合知母汤激活 pink-1 机制提供更直接的证据。

综上所述,本研究以 DN 损伤的线虫模型为研究对象,系统探讨了百合知母汤对 DN 的保护作用。研究发现,该方能改善线虫的线粒体功能障碍,同时增强其抗氧化能力,其潜在作用机制可能与激活

pink-1 有关,进而增强线粒体自噬作用,实现对 DN 的保护。

参考文献

- [1] DEMARTINI B, NISTICÒ V, BENAYOUN C, et al. Glutamatergic dysfunction, neuroplasticity, and redox status in the peripheral blood of patients with motor conversion disorders (functional movement disorders): A first step towards potential biomarkers discovery[J]. *Translational Psychiatry*, 2023, 13(1): 212.
- [2] ZHU J G, XU F X, LAI H, et al. ACO2 deficiency increases vulnerability to Parkinson's disease via dysregulating mitochondrial function and histone acetylation-mediated transcription of autophagy genes[J]. *Communications Biology*, 2023, 6(1): 1201.
- [3] 汪媛玲, 许二赫, 石莹, 等. 养帕方对亚急性 MPTP 帕金森病小鼠运动功能的干预作用及机制[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(15): 3760-3764.
- [4] WANG M M, WAN C L, HE T, et al. Sigma-1 receptor regulates mitophagy in dopaminergic neurons and contributes to dopaminergic protection[J]. *Neuropharmacology*, 2021, 196: 108360.
- [5] HU Z L, SUN T, LU M, et al. Kir6.1/K-ATP channel on astrocytes protects against dopaminergic neurodegeneration in the MPTP mouse model of Parkinson's disease via promoting mitophagy[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2019, 81: 509-522.
- [6] 余湘浩, 何华, 王晓雯. 百合地黄汤治疗失眠伴抑郁焦虑的药理机制与临床应用研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 1133-1139.
- [7] 查倩, 高向东, 陈松. VHL 抑制剂对鱼藤酮所致帕金森病秀丽隐杆线虫模型的影响[J]. *中国药科大学学报*, 2021, 52(3): 346-351.
- [8] 李陶然, 周小青, 刘宏栋, 等. 治疗阿尔茨海默病的皂苷类成分及其作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(14): 216-225.
- [9] 赵喆, 张昊婧, 隋海娟, 等. 知母皂苷对慢性乙醇中毒小鼠学习记忆能力和突触可塑性的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(14): 3084-3087.
- [10] 王琦, 隋海娟, 屈文慧, 等. 知母皂苷元对谷氨酸引起的皮层神经元损伤的保护作用研究[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(2): 281-285.
- [11] 王海兰. 百合地黄汤对抑郁模型大鼠血清 IL-4 和海马 DA 变化的影响[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2020.
- [12] 康丽杰, 杨雪静, 丁娜娜, 等. 百合知母汤的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 42(3): 132-137.
- [13] 张一平, 李璐迪, 朱安, 等. 基于秀丽线虫模型探究七叶皂苷和右美沙芬对阿尔茨海默病的保护作用[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2025, 57(4): 764-771.

- [14] NAß J, ABDELFAH S, EFFERTH T. Induction of stress resistance and extension of lifespan in *Caenorhabditis elegans* serotonin-receptor knockout strains by withanolide A[J]. *Phytotherapy*, 2021, 84: 153482.
- [15] CHEN H, LI J S, HUANG Z X, et al. Dopaminergic system and neurons: Role in multiple neurological diseases [J]. *Neuropharmacology*, 2024, 260: 110133.
- [16] MANCZAK M, HEMACHANDRA REDDY P. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: Implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage [J]. *Human Molecular Genetics*, 2012, 21(11): 2538-2547.
- [17] KLEIN M O, BATTAGELLO D S, CARDOSO A R, et al. Dopamine: Functions, signaling, and association with neurological diseases[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2019, 39(1): 31-59.
- [18] CABRAL-COSTA J V, KOWALTOWSKI A J. Neurological disorders and mitochondria[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2020, 71: 100826.
- [19] RAMÍREZ-CARRETO R J, ZALDÍVAR-MACHORRO V J, PÉREZ-RAMÍREZ D J, et al. Oral administration of silybin protects against MPTP-induced neurotoxicity by reducing pro-inflammatory cytokines and preserving BDNF levels in mice[J]. *Molecular Neurobiology*, 2023, 60(12): 6774-6788.
- [20] MALPARTIDA A B, WILLIAMSON M, NARENDRA D P, et al. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's disease: From mechanism to therapy [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2021, 46(4): 329-343.
- [21] 曾艳丽, 金晨, 廖佳伟, 等. 黄酮类化合物干预神经炎症治疗神经退行性疾病的机制研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(12): 2224-2231.
- [22] LU S F, LI C Y, JIN X H, et al. Baicalin improves the energy levels in the prefrontal cortex of mice exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. *Heliyon*, 2022, 8(12): e12083.
- [23] CHUNG Y C, KIM S R, PARK J Y, et al. Fluoxetine prevents MPTP-induced loss of dopaminergic neurons by inhibiting microglial activation[J]. *Neuropharmacology*, 2011, 60(6): 963-974.
- [24] ELLIOFF K J, OSTING S M K, LENTINE A, et al. Ablation of mitochondrial RCC1-L induces nigral dopaminergic neurodegeneration and parkinsonian-like motor symptoms[J]. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2024, 29: 2023.
- [25] 赵江宇, 郭兴. 线粒体功能障碍与亨廷顿病[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2024, 45(6): 941-952.
- [26] PRASERTSUKSRI P, KRAOKAEW P, PRANWEERAPAIBOON K, et al. Neuroprotection of andrographolide against neurotoxin MPP⁺-induced apoptosis in SH-SY5Y cells via activating mitophagy, autophagy, and antioxidant activities[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(10): 8528.
- [27] 刘瑾, 周磊, 卜兰兰, 等. 秀丽隐杆线虫在中药抗衰老研究中的应用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2022, 42(9): 1586-1592.
- [28] 张锦坤, 周梦琪, 马浩洁, 等. 知母皂苷 B-II 对 MPP⁺诱导的 SH-SY5Y 细胞帕金森病模型线粒体的保护作用[J]. *北京中医药大学学报*, 2020, 43(12): 1027-1033.
- [29] KHEDR N F, SELIM H M, ABOURAYYA G A. Therapeutic potential of natural compounds in the management of chronic diseases: Targeting PINK1-Parkin pathway [J]. *Pathology-Research and Practice*, 2025, 277: 156284.
- [30] ZHANG L J, DAI L, LI D Y. Mitophagy in neurological disorders[J]. *Journal of Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 297.
- [31] YAMANO K, YOULE R J. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway[J]. *Autophagy*, 2013, 9(11): 1758-1769.
- [32] RAMIREZ-MORENO M J, DUARTE-JURADO A P, GOPAR-CUEVAS Y, et al. Autophagy stimulation decreases dopaminergic neuronal death mediated by oxidative stress[J]. *Molecular Neurobiology*, 2019, 56(12): 8136-8156.

(本文编辑 周旦)