

延龄草总皂苷调控线粒体自噬对血管性痴呆大鼠的神经保护作用

田朝禧^{1,2}, 高建红^{1,2}, 黄静^{1,2}, 朱红^{1,3}, 赵方毓^{2,3}, 陈显兵^{1,2,3*}

¹湖北民族大学风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室, 湖北恩施 445000; ²湖北民族大学医学部, 湖北恩施 445000; ³湖北民族大学附属民大医院病理科, 湖北恩施 445000

[中图分类号] R749.1; R285.5 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0824.2025.1114

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 田朝禧, 高建红, 黄静, 等. 延龄草总皂苷调控线粒体自噬对血管性痴呆大鼠的神经保护作用[J]. 解放军医学杂志, 2026, 51(3): 410-418.

[收稿日期] 2025-04-27 [录用日期] 2025-09-04 [上线日期] 2025-11-14

[摘要] 目的 观察延龄草总皂苷(TST)对血管性痴呆(VD)大鼠的神经保护作用, 探讨TST对线粒体自噬、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/腺病毒E1B 19kD相互作用蛋白3(BNIP3)通路的作用。方法 将60只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、TST[100 mg/(kg·d), 28 d]组和多奈哌齐[0.45 mg/(kg·d), 28 d]组, 每组15只。除假手术组外, 采用双侧颈总动脉结扎(2-VO)法构建VD大鼠模型。Morris水迷宫实验、新物体识别实验检测大鼠行为学表现; HE、Nissl染色观察脑组织病理变化; 透射电子显微镜观察脑组织线粒体超微结构变化; 免疫组化法检测脑组织HIF-1 α 、自噬效应蛋白1(Beclin1)、微管相关蛋白1轻链3B(LC3B)的表达水平; Western blotting检测海马区HIF-1 α 、BNIP3、Beclin1及LC3B蛋白表达水平。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($P<0.01$), 相对识别指数降低($P<0.01$); 脑组织神经元排列松散紊乱, 尼氏小体减少, 线粒体肿胀、嵴结构断裂明显; 脑组织HIF-1 α 、LC3B、Beclin1表达阳性的神经元减少; 海马中HIF-1 α 、BNIP3、Beclin1、LC3B蛋白表达水平均降低($P<0.05$)。与模型组比较, TST组和多奈哌齐组大鼠逃避潜伏期缩短($P<0.01$), 穿越平台次数增多($P<0.05$), 相对识别指数升高($P<0.01$); 脑组织神经元排列整齐, 尼氏小体增多, 线粒体损伤减轻; 脑组织HIF-1 α 、Beclin1、LC3B表达阳性的神经元增多; 海马HIF-1 α 、BNIP3、Beclin1、LC3B蛋白表达水平增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 TST可能通过激活HIF-1 α /BNIP3信号通路, 促进线粒体自噬和受损线粒体的清除, 减轻VD大鼠神经元病理损伤。

[关键词] 延龄草总皂苷; 血管性痴呆; 线粒体自噬; HIF-1 α /BNIP3信号通路

Neuroprotective effect of total saponins of *Trillium tschonoskii* Maxim on vascular dementia rats by modulating mitophagy

Tian Chao-Xi^{1,2}, Gao Jian-Hong^{1,2}, Huang Jing^{1,2}, Zhu Hong^{1,3}, Zhao Fang-Yu^{2,3}, Chen Xian-Bing^{1,2,3*}

¹Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei 445000, China

²Medical School, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei 445000, China

³Department of Pathology, Minda Hospital Affiliated to Hubei Minzu University, Enshi, Hubei 445000, China

*Corresponding author, E-mail: chenxianbing1998@163.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82260821), the Projects of Hubei Provincial Key Laboratory of Occurrence and Intervention of Rheumatic Diseases (OIR202409Q, PT022110), and the Graduate Innovation Projects of Hubei Minzu University (MYK2023069)

[Abstract] **Objective** To investigate the neuroprotective effects of total saponins of *Trillium tschonoskii* Maxim. (TST) on

[基金项目] 国家自然科学基金(82260821); 风湿性疾病发生与干预湖北省重点实验室项目(OIR202409Q, PT022110); 湖北民族大学研究生教育创新项目(MYK2023069)

[作者简介] 田朝禧, 硕士研究生, 主要从事传统药物治疗神经损伤方面的研究

[通信作者] 陈显兵, E-mail: chenxianbing1998@163.com

vascular dementia (VD) rats and to explore its effect on the regulation of mitophagy and the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/adenovirus E1B 19 kD-interacting protein (BNIP3) pathway. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into sham group, model group, TST group [100 mg/(kg·d), 28 d], and donepezil group [0.45 mg/(kg·d), 28 d], with 15 rats in each group. Except for sham group, the VD rat model was established by bilateral common carotid artery occlusion (2-VO). Behavior performance of rats was assessed by Morris water maze and novel object recognition tests. Pathological changes of brain tissue were observed through HE and Nissl staining. The ultrastructural changes of mitochondria in brain tissue were observed by transmission electron microscopy. The expression levels of HIF-1 α , Beclin1, and microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) in brain tissue were detected by immunohistochemistry. The protein expression levels of HIF-1 α , BNIP3, Beclin1, and LC3B in the hippocampus were detected by Western blotting. **Results** Compared with sham group, model group rats exhibited prolonged escape latency ($P<0.01$), and fewer platform crossings ($P<0.01$), and a lower discrimination index ($P<0.01$). Histopathological analysis revealed disorganized neuronal arrangement, reduced Nissl bodies, and severe neuronal damage. Mitochondria displayed swelling and cristae disruption. The number of HIF-1 α -, Beclin1-, and LC3B-positive neurons was significantly reduced in brain tissue. Hippocampal protein levels of HIF-1 α , BNIP3, Beclin1, and LC3B were also decreased ($P<0.05$). Compared with model group, rats in TST and donepezil groups showed shortened escape latency ($P<0.01$), increased platform crossings ($P<0.05$), and an increased discrimination index ($P<0.01$). Neuronal arrangement improved, Nissl bodies increased, and mitochondrial damage was alleviated. The number of HIF-1 α -, Beclin1-, and LC3B-positive neurons increased in brain tissue. The protein levels of HIF-1 α , BNIP3, Beclin1 and LC3B in hippocampus were markedly upregulated ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** TST may promote mitophagy and the clearance of damaged mitochondria, thereby alleviating neuronal pathological damage in VD rats by activating the HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway.

[Key words] total saponins of *Trillium tschonoskii* Maxim; vascular dementia; mitochondrial autophagy; HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是由脑血管疾病导致脑组织缺血、缺氧或出血性损伤而引发的认知功能障碍综合征,是仅次于阿尔茨海默病的第二大痴呆类型^[1-2]。VD的病因涉及多种血管因素(如动脉粥样硬化、微梗塞等),这些因素协同作用引发认知功能障碍。随着人口老龄化加剧,VD发病率增高,成为住院患者中常见的痴呆类型,严重危害中老年身心健康^[3-4]。研究显示,VD受自噬、神经炎症、凋亡等多种机制调控,其生理病理过程与线粒体自噬密切相关^[5]。VD的主要发生机制是长期低灌注导致的脑部缺血缺氧,而线粒体自噬可清除受损的线粒体,调整线粒体的生物合成和稳态^[6-7];当脑部缺血缺氧时大量线粒体损伤,自噬可将受损线粒体清除并维持能量代谢从而减轻脑损伤^[8-9]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α)/腺病毒E1B 19kD相互作用蛋白3(adenovirus E1B 19kD-interacting protein 3, BNIP3)在VD中的线粒体自噬过程中扮演着重要角色。HIF-1 α 是细胞对缺氧环境的主要调节因子,在VD中,因脑部血流量减少导致的缺氧状态会激活HIF-1 α ,进而上调下游因子BNIP3的表达,启动线粒体自噬,发挥对神经元的保护作用,减轻脑组织损伤^[10]。

延龄草(*Trillium tschonoskii* Maxim.)是湖北省恩施土家族苗族自治州的土家族药材之一,具有活血、祛风、安神等功效;本课题组前期研究显示,延龄草提取物延龄草总皂苷(total saponins of *Trillium tschonoskii* maxim., TST)可调控铁死亡和内质网应

激^[11-12]。目前尚无TST与线粒体自噬之间关系的研究。因此,本研究采用TST对双侧颈动脉结扎(2-VO)法制备的VD大鼠进行干预,探讨TST对VD大鼠神经损伤的治疗作用及对线粒体自噬的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 2月龄SPF级雄性SD大鼠60只,体重200~250 g,购自辽宁省实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001];于湖北民族大学清洁级动物房饲养。饲养条件为室温24~26℃,相对湿度50%~60%,通风环境良好。本研究获湖北民族大学医学伦理委员会审批(2023078)。

1.2 材料与试剂 BCA蛋白浓度测定试剂盒、尼氏染色液(P0009、C0117,上海碧云天生物技术有限公司);PAGE凝胶快速制备试剂盒(PG212,上海雅酶生物医药科技有限公司);免疫组化试剂盒(KIT-9710,福州迈新生物技术开发有限公司);HRP标记的山羊抗兔IgG、HRP标记的山羊抗鼠IgG(ab6721、ab6789,英国Abcam公司);抗HIF-1 α 抗体(340462,成都正能生物技术有限公司);抗BNIP3抗体(YT5154,美国ImmunoWay公司);抗微管相关蛋白1轻链3B(microtubule associated protein 1 light chain 3 beta, LC3B)抗体(2775S,美国Cell Signaling Technology公司);抗自噬效应蛋白1(Beclin1)抗体(T50092,上海艾比玛特医药科技有限公司);抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(15003,武汉塞维尔生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 TST 配制与使用剂量 延龄草采自湖北恩施,经湖北民族大学武陵山中药材检测中心鉴定为百合科延龄草属植物延龄草。延龄草根茎经恒温干燥箱烘干后,粉碎过筛,置于75%乙醇中过夜萃取,将所得提取物过滤,浓缩干燥后充分溶解于双蒸水中,使用正丁醇再次萃取,真空浓缩干燥后得到TST,检测其含量为14.72 mg/g。根据本课题组前期研究^[13-14],选择TST剂量为100 mg/kg。多奈哌齐的成人用量为5 mg/d,换算得出大鼠剂量为0.45 mg/kg。

1.3.2 大鼠分组及VD模型制备 SD大鼠适应性喂养1周后,采用随机数字表法将其分为假手术组、模型组、TST组和DON组,每组15只。除假手术组外,采用2-VO法制备VD大鼠模型;大鼠颈部常规剃毛并消毒后,正中作切口,将左、右两侧颈总动脉依次逐层钝性分离,结扎后逐层缝合。假手术组大鼠仅钝性分离颈总动脉,不进行其余操作。手术24 h后,TST组和DON组分别给予TST、DON灌胃,假手术组、模型组给予等体积双蒸水灌胃,连续28 d。手术结束3 d,采用Morris水迷宫实验对VD模型的建立进行评估,以假手术组大鼠逃避潜伏期为参考值,计算VD大鼠与参考值的差值,差值与参考值之比>20%定义为VD模型制备成功^[15]。

1.3.3 大鼠Morris水迷宫实验 药物干预结束当天开始水迷宫实验,持续7 d,具体操作与前期研究一致^[16]。28~32 d进行定位航行实验,以第一象限为起点将大鼠放入,60 s内大鼠成功找到平台的时间为逃避潜伏期;33 d休息;34 d将平台撤去后进行空间探索实验,记录大鼠60 s内穿越平台次数。

1.3.4 大鼠新物体识别实验 包括适应阶段、训练阶段和测试阶段,灌胃25 d开始。适应阶段(25 d):将大鼠放入无物体的亚克力箱内自由探索5 min,适应环境。训练阶段(26 d):在亚克力箱内放置完全相同的A1和A2物体,将大鼠背朝物体等距放入箱中探索5 min,记录轨迹、时间。测试阶段(27 d):将训练阶段的A2物体替换为物体B,其余操作与训练阶段相同。使用相对识别指数(discrimination index, DI)评价各组大鼠的学习、记忆能力,公式为:DI=探索新物体时间(物体B时间)/探索总时间(物体A1时间+物体B时间)。

1.3.5 HE、Nissl染色观察大鼠脑组织病理变化 每组随机选取大鼠5只,麻醉,由左心室插管,先以生理盐水灌注,然后4%多聚甲醛灌注固定至四肢僵直,随后取脑;将全脑置于多聚甲醛固定,常规脱水后石蜡包埋,行4 μm切片,进行HE染色、Nissl染色。

1.3.6 透射电镜观察大鼠脑组织线粒体超微结构

每组随机选取5只大鼠,取材后将其皮质组织切为1 mm³大小的样本,置于4%戊二醛固定液中保存。PBS漂洗后锇酸固定,经羟丙酮脱水后包埋、聚合,超薄切片。依次置于饱和醋酸双氧铀与柠檬酸铅溶液中双重染色,冲洗,烘干,透射电镜观察拍照。

1.3.7 免疫组化染色检测大鼠脑组织HIF-1α、Beclin1、LC3B蛋白表达水平 取脑组织切片(3 μm),常规烤片脱蜡至水。置于柠檬酸钠抗原修复液中20 min,自然冷却至室温,PBS清洗3次,每次3 min。依次滴加试剂1(内源性过氧化物酶阻断剂)10 min;试剂2(非特异染色阻断剂)10 min;然后滴加一抗HIF-1α(比例1:200)、Beclin1(比例1:200)、LC3B抗体(比例1:300)静置1.5 h;随后依次滴加试剂3(生物素标记的羊抗兔IgG聚合物)、试剂4(辣根过氧化物酶)及DAB显色液。最后经苏木精复染,盐酸乙醇分化,返蓝,常规脱水、透明,中性树胶封片,拍照。

1.3.8 Western blotting 检测大鼠海马组织HIF-1α、BNIP3、LC3B、Beclin1蛋白表达水平 各组剩余5只大鼠麻醉,于冰上迅速取出脑组织并分离海马,放入-80℃冰箱备用。称取适量海马组织置于裂解液中,匀浆并超声,充分裂解,低温离心后取上清液,BCA定量,100℃水浴10 min变性。制备凝胶,电泳、转至PVDF膜、封闭,加入一抗HIF-1α(1:1000)、BNIP3(1:2000)、LC3B(1:1000)、Beclin1(1:1500);β-actin(1:5000),4℃过夜,TBST洗膜10 min×3次,室温孵育二抗1 h,洗膜,加入ECL发光液显色成像。

1.4 统计学处理 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,GraphPad Prism 9.0软件绘图。均为计量数据,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TST对VD大鼠行为学的影响 Morris水迷宫实验结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠游泳轨迹混乱、无明确目标,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,TST组和DON组大鼠游泳轨迹清晰、目标较为明确,逃避潜伏期缩短($P < 0.01$),穿越平台次数增多($P < 0.05$,图1A-C)。

新物体识别实验结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠相对识别指数降低($P < 0.01$);与模型组比较,TST组及DON组大鼠相对识别指数升高($P < 0.01$,图1D)。

2.2 TST对VD大鼠脑组织病理学形态的影响 HE

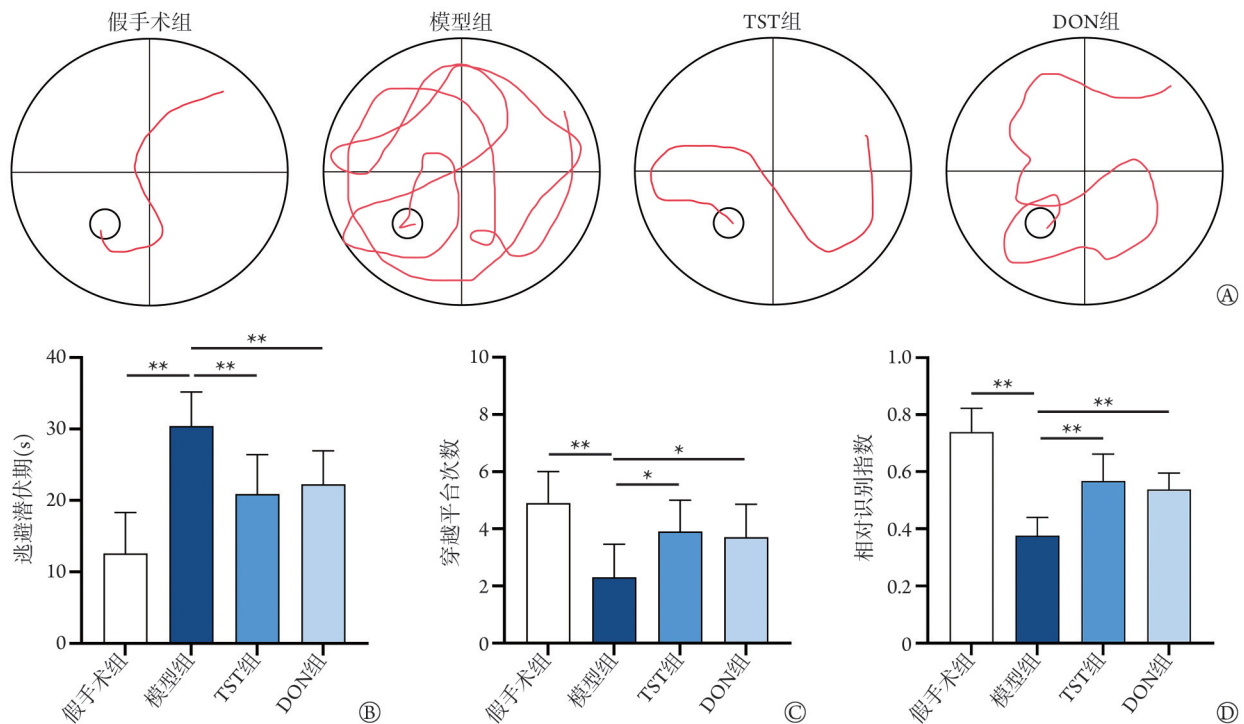


图1 TST对血管性痴呆(VD)大鼠行为学的影响($n=10$)

Fig.1 Behavioral effects of TST on rats with vascular dementia (VD) ($n=10$)

A—C. Morris水迷宫实验大鼠代表性轨迹、逃避潜伏期、穿越平台次数; D. 新物体识别实验大鼠相对识别指数。* $P<0.05$; ** $P<0.01$ 。TST. 延龄草总皂苷; DON. 多奈哌齐

染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马区和皮质区的细胞膜不完整,细胞旁可见空染区,细胞形态不规则,胞核固缩,存在细胞空泡,组织受损严重;与模型组比较,TST组及DON组大鼠神经元结构完整,数量增多,排列较整齐,空泡化、核固缩现象减少,损伤程度减轻(图2A)。

Nissl染色结果显示,假手术组大鼠海马与皮质中尼氏小体与神经元数量丰富,体积较大,无明显丢失且排列整齐,核仁清晰可见;模型组大鼠海马与皮质中尼氏小体与神经元数量明显减少,丢失严重,排列紊乱;相较于模型组,TST组和DON组大鼠海马与皮质中尼氏小体丰富,神经元排列较整齐,结构紧密(图2B)。

2.3 TST对VD大鼠脑组织线粒体结构的影响 电镜观察显示,假手术组大鼠脑组织线粒体数量较多,形态正常,线粒体嵴结构完整可见;与假手术组比较,模型组大鼠线粒体数量减少,可见明显肿胀,嵴结构存在断裂、消失;相较于模型组,TST组及DON组线粒体数量较多,形态正常,线粒体嵴较清晰(图3)。

2.4 TST对VD大鼠脑组织HIF-1 α 、LC3B、Beclin1表达的影响 免疫组化染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠海马和皮质区HIF-1 α 、LC3B、Beclin1阳性表达的神经元减少且染色较浅;与模型

组比较,TST、DON组大鼠海马和皮质区HIF-1 α 、LC3B、Beclin1阳性表达的神经元增多且染色较深(图4)。

2.5 TST对VD大鼠海马组织线粒体自噬相关蛋白表达的影响 Western blotting检测结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠HIF-1 α 、BNIP3、LC3B、Beclin1蛋白表达量明显降低($P<0.05$);与模型组比较,TST组和DON组HIF-1 α 、BNIP3、LC3B与Beclin1蛋白表达量明显增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$,图5)。

3 讨论

VD是由各种脑血管疾病引起的认知功能障碍,主要与脑部血液长期低灌注有关,以淡漠、抑郁、记忆失常、行为障碍等为主要特征。同时,VD也是痴呆的常见形式之一,占有痴呆病例的20%^[17]。目前对于VD的治疗方法较为有限,多数以改善认知功能障碍为主,因此,仍需要寻找更安全、有效的治疗手段。本课题组前期研究显示,TST可通过抑制Keap-1/Nrf2/HO-1、Nrf2/SLC7A11/GPX4通路介导的铁死亡减轻脑缺血/再灌注损伤^[11],也可通过调控GRP78/IRE1 α /TRAF2/JNK通路抑制内质网应激而减轻卒中后认知障碍大鼠海马神经元损伤^[12]。有研究显示,线粒体自噬与VD的生理病理过程密切相关^[18]。故本研究以线粒体自噬为切入点,探讨TST

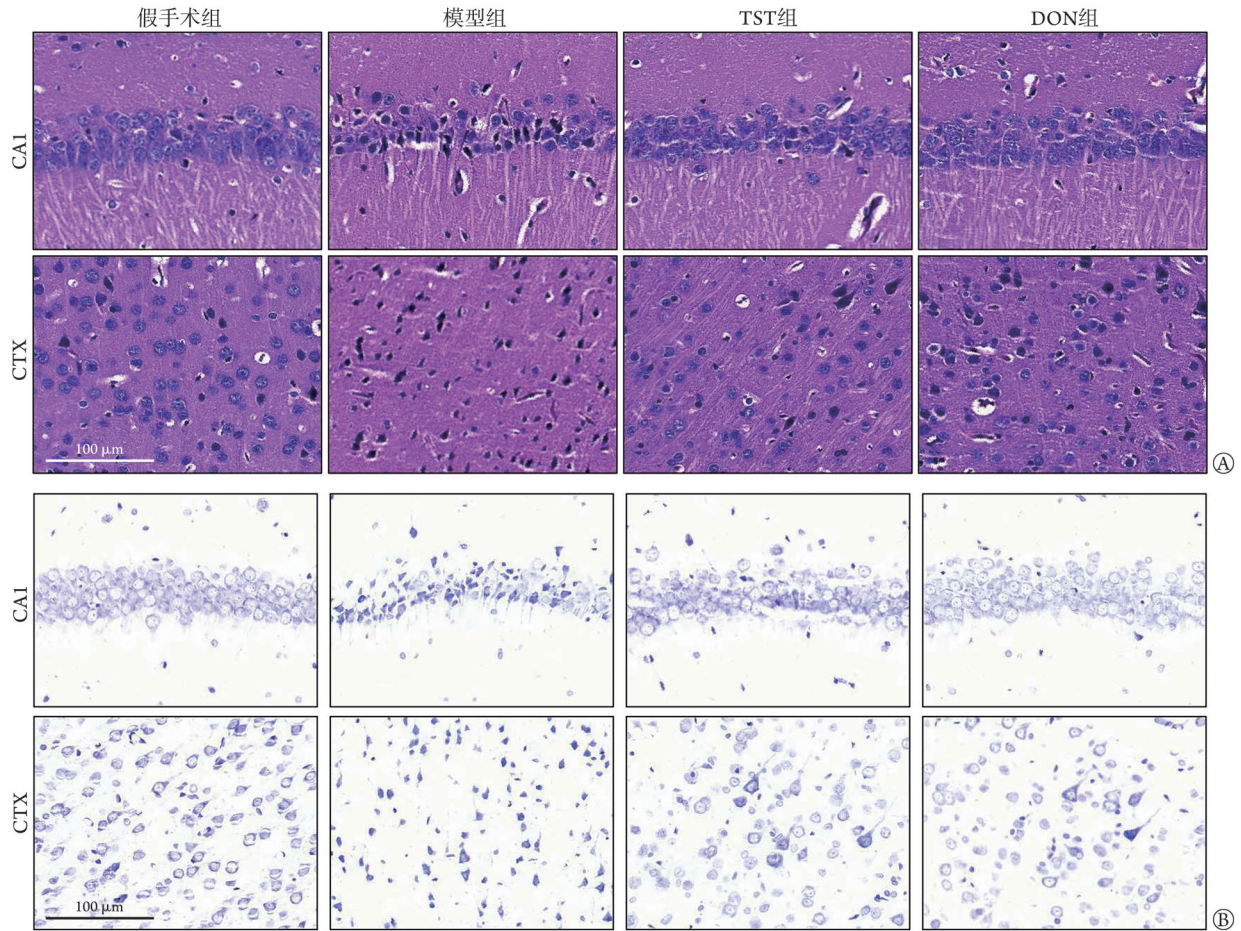


图2 TST对血管性痴呆(VD)大鼠脑组织病理学形态的影响($n=5$)

Fig.2 Effects of TST on morphological alterations in the brain tissue of rats with vascular dementia (VD) ($n=5$)
A. HE染色结果; B. Nissl染色结果; TST. 延龄草总皂苷; DON. 多奈哌齐; CA1. 海马CA1区域; CTX. 皮质区域

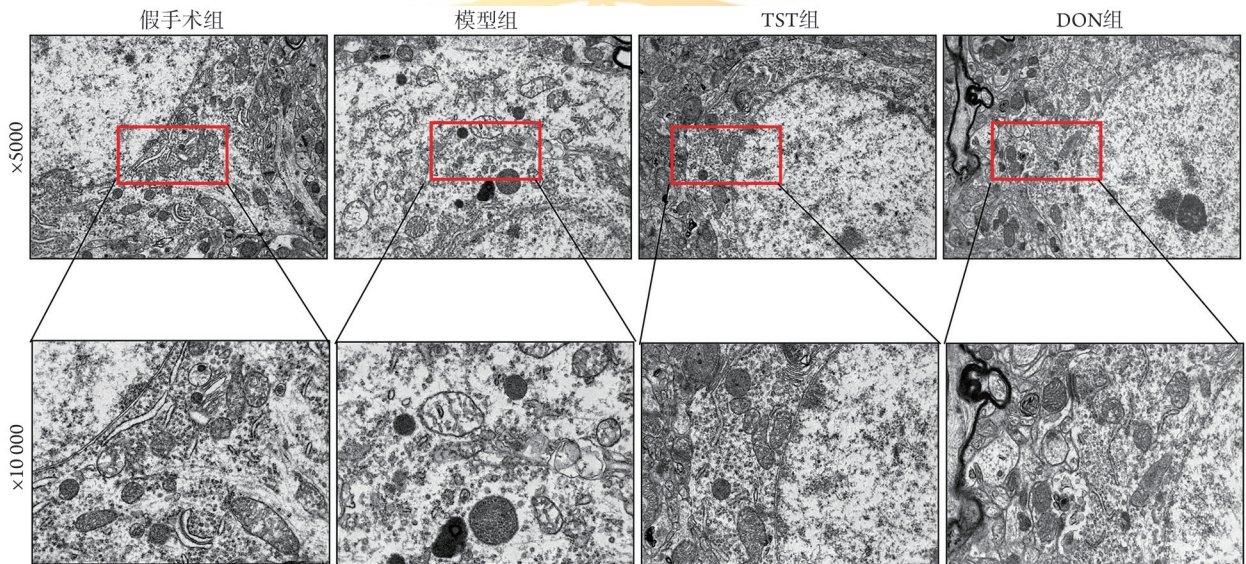


图3 TST对血管性痴呆(VD)大鼠脑皮质区线粒体结构的影响(透射电镜, $n=5$)

Fig.3 Effects of TST on the ultrastructure of mitochondria in the cortex region of rats with vascular dementia (VD) (transmission electron microscopy, $n=5$)

TST. 延龄草总皂苷; DON. 多奈哌齐

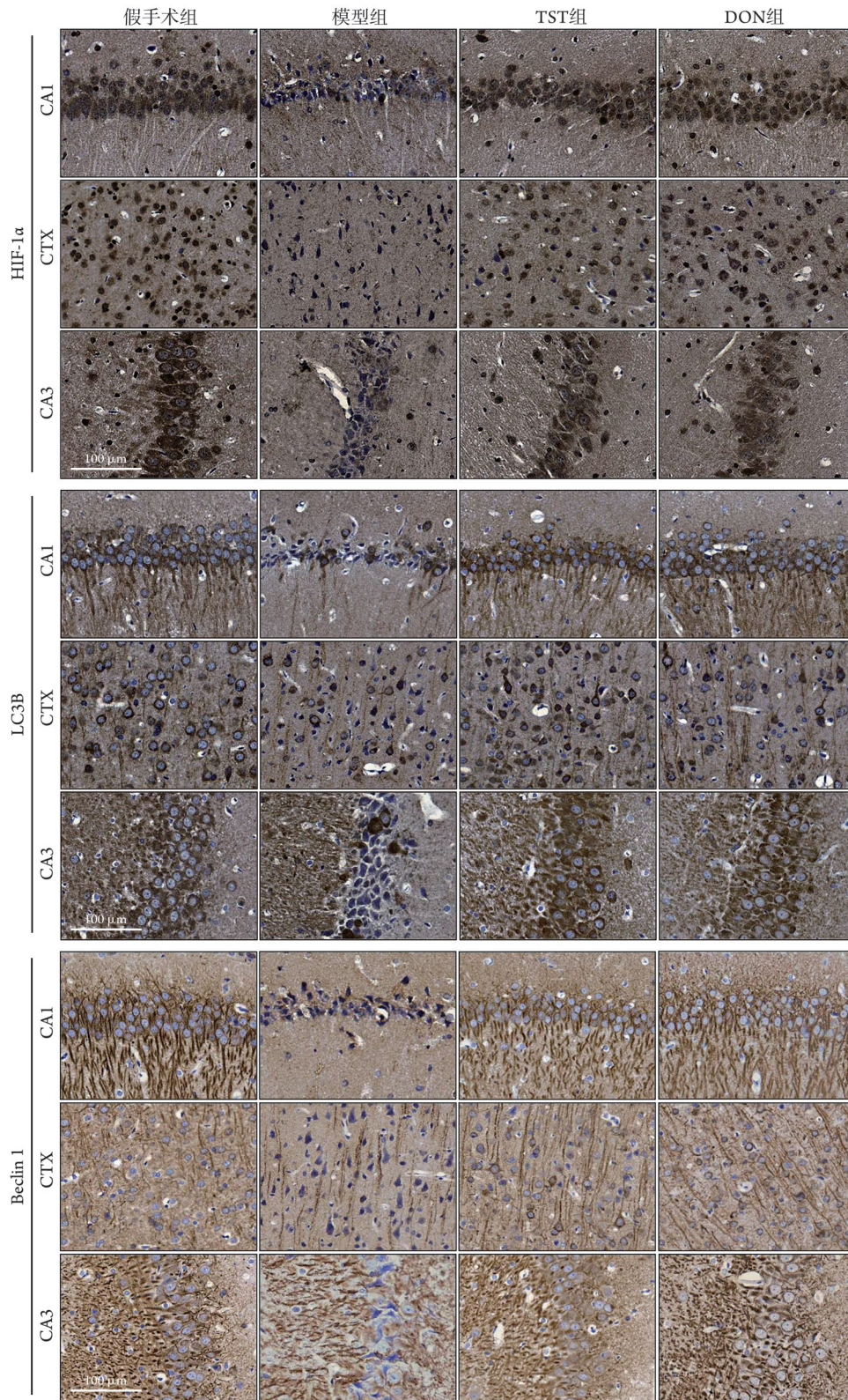


图4 TST对血管性痴呆(VD)大鼠脑组织HIF-1 α 、LC3B、Beclin1表达的影响[免疫组织化学染色(苏木精复染), $n=5$]
Fig.4 Effects of TST on expression of HIF-1 α 、Beclin1 and LC3B in the brain tissue of rats with vascular dementia (VD) [immunohistochemistry staining (hematoxylin counterstaining), $n=5$]

TST. 延龄草总皂苷; DON. 多奈哌齐片; HIF-1 α . 缺氧诱导因子-1 α ; BNIP3. 腺病毒E1B19kD相互作用蛋白3; Beclin1. 自噬效应蛋白1; LC3B. 微管相关蛋白1轻链3B; CA1. 海马CA1区域; CA3. 海马CA3区域; CTX. 皮质区域

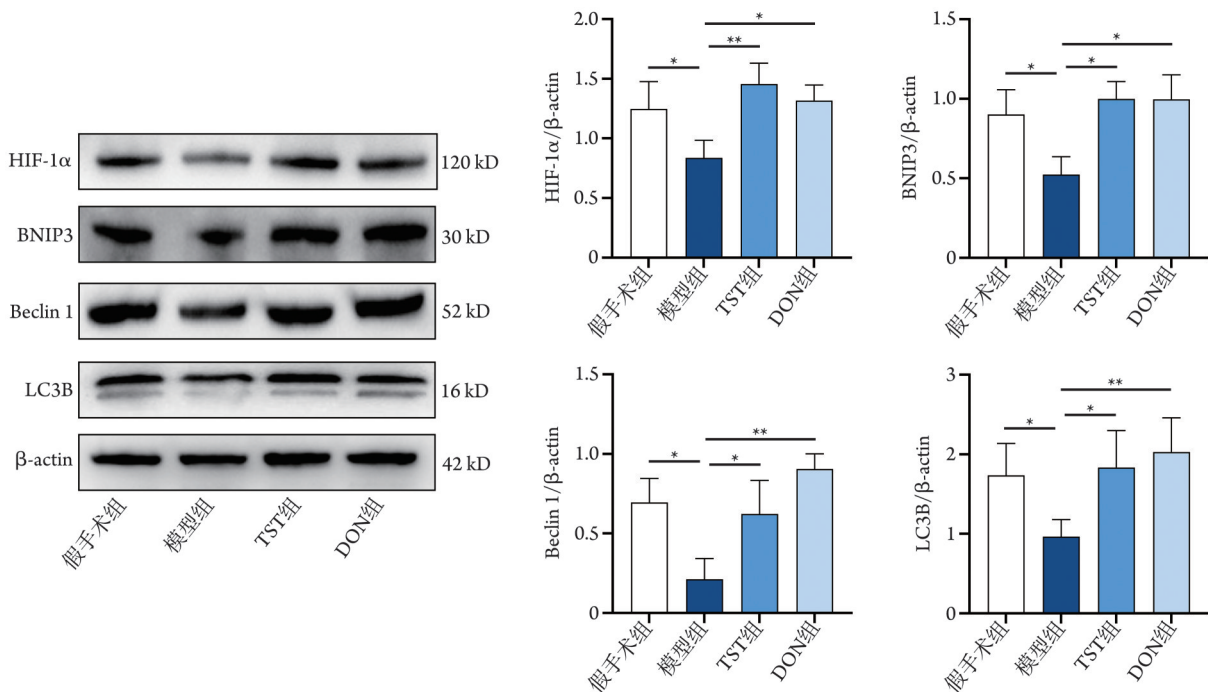


图5 TST对血管性痴呆(VD)大鼠海马组织线粒体自噬相关蛋白表达的影响(Western blotting, $n=5$)

Fig. 5 Effects of TST on expression of mitophagy-related proteins in the hippocampus of rats with vascular dementia (VD) (Western blotting, $n=5$)

* $P<0.05$; ** $P<0.01$. TST. 延龄草总皂苷; DON. 多奈哌齐; HIF-1 α . 缺氧诱导因子-1 α ; BNIP3. 腺病毒E1B19kD相互作用蛋白3; Beclin1. 自噬效应蛋白1; LC3B. 微管相关蛋白1轻链3B

对VD大鼠认知障碍的改善及神经损伤保护作用。

VD的核心发病机制和主要病理特征是慢性脑灌注不足引起的神经元损伤,当脑组织缺血缺氧时,线粒体结构与功能出现异常导致神经元损伤并加重认知障碍^[19-20]。本研究通过两种行为学测试对VD大鼠的认知功能进行评价,在Morris水迷宫实验中,TST干预可改善VD大鼠的认知障碍,具有更快、更好的学习能力。在新物体识别实验中,TST组的识别指数明显增高,提示TST可改善VD大鼠的学习记忆缺陷。HE染色和Nissl染色发现,VD大鼠经TST干预后,脑组织海马区、皮质区神经元排列紧密、整齐,尼氏小体丰富,神经损伤得到明显恢复。上述实验结果表明,TST在行为学方面对VD大鼠具有良好的改善效果,同时对其脑组织神经元病理损伤也具有积极的保护作用。

线粒体自噬是细胞通过特异性清除受损或衰老的线粒体,从而维持细胞稳态和能量代谢平衡的一种重要途径^[21]。研究显示,线粒体自噬可减轻VD等神经系统疾病中的神经元损伤^[22-23]。VD中脑组织的长期低灌注状态会导致大量线粒体受损,这时细胞启动线粒体自噬对受损线粒体进行清除以维持功能平衡。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是异源二聚体转录因子,由HIF-1 α 、HIF-2 α 及HIF-1 β /ARNT组成。其中HIF-1 α 是一种氧敏感转录因

子,可介导对缺氧的适应性代谢反应,改善线粒体功能^[24-25]。在缺氧状态下,由于泛素化过程被抑制,HIF-1 α 的氧依赖性导致其在细胞内大量聚集且状态稳定,使其具备了对线粒体自噬产生影响的条件^[24,26]。已有研究显示,HIF-1 α 通路激活而介导的线粒体自噬可缓解VD认知障碍,促进神经功能恢复^[27]。本研究中,与模型组比较,TST组神经元数量明显增多,病理损伤减轻,大鼠海马区HIF-1 α 蛋白表达水平升高,提示TST可能激活HIF-1 α 减轻脑组织损伤。

BNIP3是BCL-2和腺病毒E1B19kDa相互作用蛋白,是定位于线粒体膜上的自噬受体^[28]。在缺氧状态下,BNIP3可促进线粒体去极化,并将线粒体递送至自噬体,直接激活线粒体自噬^[29-30];同时,BNIP3也是HIF-1 α 的下游调节因子,HIF-1 α 可激活BNIP3共同参与线粒体自噬^[31]。此外,通过与BCL-2结合,BNIP3可解除BCL-2对自噬相关蛋白Beclin1的抑制,促进自噬的发生^[32]。LC3是经典的自噬过程标志物,在自噬生物发生过程中,自噬相关的4B半胱氨酸蛋白酶(ATG4B)通过切割LC3前体生成LC3I,暴露出的活性甘氨酸残基与膜上的脂质磷脂酰乙醇胺结合形成LC3II,促进自噬进程^[33]。有研究显示,BNIP3可直接与LC3相互作用促进线粒体自噬,减轻线粒体功能障碍,减少神经元凋亡^[34]。本实验中,

VD 大鼠脑组织神经损伤严重, 海马组织 BNIP3、Beclin1、LC3 蛋白表达下降, 经 TST 干预后 HIF-1 α 及其下游 BNIP3、Beclin1、LC3B 等线粒体自噬相关蛋白激活, 提高了对 VD 大鼠海马中受损线粒体的清除水平, 提示 TST 改善 VD 大鼠学习记忆障碍可能与 HIF-1 α /BNIP3 介导的线粒体自噬有关。

多奈哌齐是第二代乙酰胆碱酯酶抑制剂, 临床常用于改善 VD 患者认知功能障碍, 故本研究选用多奈哌齐作为阳性药物。研究显示, 多奈哌齐可通过抑制神经元凋亡、抑制钠通道和 N-甲基-D-天冬氨酸受体通道等减轻神经元损伤^[35-36]; 然而, 对于其治疗由 VD、脑卒中等引起的缺血性神经元损伤的具体机制尚缺乏深入研究。本研究中关于线粒体自噬的实验结果提示, 多奈哌齐对 VD 大鼠神经损伤的保护机制可能与 TST 激活线粒体自噬改善 VD 大鼠神经损伤的机制一致。

综上所述, TST 可能通过激活 HIF-1 α /BNIP3 信号通路启动线粒体自噬, 清除 VD 导致的受损线粒体, 维持能量代谢, 从而对 VD 大鼠脑组织神经损伤产生治疗效果。这些结果为临床合理用药提供了基础实验支撑。然而, 本研究仅在动物模型中验证了 TST 对线粒体自噬相关蛋白的影响, 相关的具体机制尚待进一步研究。未来需在细胞层面进一步开展相关实验, 例如通过培养原代海马神经元模拟 VD 病理微环境, 结合线粒体自噬相关基因敲除等干预手段, 深入探究具体机制。

【参考文献】

- [1] Wolters FJ, Ikram MA. Epidemiology of vascular dementia[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39(8): 1542-1549.
- [2] 赵梦瑶, 吕佩源. 阿尔茨海默病与脑小血管病: 交织的病理与共同的征程[J]. *中国实用内科杂志*, 2025, 45(10): 838-842, 847.
- [3] Jiao C, Wei S, Liu T, *et al.* The prevalence of vascular dementia in China: a systematic review and meta-analysis from 2009-2019[J]. *Iran J Public Health*, 2021, 50(1): 11-23.
- [4] Wang Y, Li S, Zhou Q, *et al.* Vascular dementia has the highest hospitalisation rate in China: a nationwide hospital information system study[J]. *Stroke Vasc Neurol*, 2023, 8(1): 59-68.
- [5] He Y, He T, Li H, *et al.* Deciphering mitochondrial dysfunction: pathophysiological mechanisms in vascular cognitive impairment[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116428.
- [6] 马丹, 张明, 余宇璐, 等. 巨噬细胞线粒体自噬与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2025, 50(10): 1325-1331.
- [7] 张泽瑾, 李大伟, 刘力维, 等. 线粒体自噬在严重烧伤后延迟复苏小鼠心肌损伤中的作用及其机制[J]. *中华烧伤与创面修复杂志*, 2025, 41(9): 847-856.
- [8] Guan R, Zou W, Dai X, *et al.* Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 87.
- [9] O'Brien JT, Thomas A. Vascular dementia[J]. *Lancet*, 2015, 386(10004): 1698-1706.
- [10] 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.
- [11] 高建红, 宋天英, 田朝禧, 等. 延龄草总皂苷通过抑制 Keap-1/Nrf2/HO-1、Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路介导的铁死亡减轻脑缺血/再灌注损伤[J]. *中国药理学通报*, 2024(10): 1850-1857.
- [12] 王刚, 杨丽君, 杨丹, 等. 延龄草总皂苷通过调控 GRP78/IRE1 α /TRAF2/JNK 信号通路抑制内质网应激而减轻 PSCI 大鼠海马神经元损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2023, 39(2): 241-249.
- [13] 杨丹, 杨丽君, 唐鲜娥, 等. 延龄草总皂苷对 2-VO 模型大鼠认知功能及神经血管单元的作用[J]. *解放军医学杂志*, 2024, 49(3): 316-322.
- [14] 夏德尧, 张桃, 陈颖, 等. 延龄草总皂苷对 D-半乳糖诱导的 SD 大鼠心肌线粒体自噬的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(8): 582-587.
- [15] 孙晓丽, 张锴铤, 郭淑贞, 等. 龙生蛭胶囊对血管痴呆大鼠认知功能的影响及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(9): 72-79.
- [16] 王刚, 谢雅, 杨丽君, 等. 延龄草总皂苷对 D-gal 诱导的衰老大鼠认知功能及线粒体自噬的影响[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(2): 380-386.
- [17] Chang Wong E, Chang Chui H. Vascular cognitive impairment and dementia[J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2022, 28(3): 750-780.
- [18] Lyu Y, Meng Z, Hu Y, *et al.* Mechanisms of mitophagy and oxidative stress in cerebral ischemia-reperfusion, vascular dementia, and Alzheimer's disease[J]. *Front Mol Neurosci*, 2024, 17: 1394932.
- [19] 杨芮, 田雨沐, 金雨静, 等. 基于 PI3K/akt 信号通路探讨黄精健脑颗粒对血管性认知障碍大鼠学习记忆能力和脑血流量的影响及作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(22): 52-60.
- [20] Ham PB 3rd, Raju R. Mitochondrial function in hypoxic ischemic injury and influence of aging[J]. *Prog Neurobiol*, 2017, 157: 92-116.
- [21] Yao RQ, Ren C, Xia ZF, *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.
- [22] 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.
- [23] 马莉, 赵俊杰, 王鹏, 等. 黄芪甲苷通过 PINK1/parkin 通路介导的线粒体自噬途径减轻大鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2025, 41(3): 501-508.
- [24] Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 281-298.
- [25] 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.
- [26] Chun YS, Kim MS, Park JW. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 α [J]. *J Korean Med Sci*, 2002, 17(5): 581-588.
- [27] 丁慧敏, 李彦杰, 秦合伟, 等. 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[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(21): 52-60.
- [28] Boyd JM, Malstrom S, Subramanian T, *et al.* Adenovirus E1B 19kDa and Bcl-2 proteins interact with a common set of cellular proteins[J]. *Cell*, 1994, 79(2): 341-351.
- [29] O'Sullivan TE, Johnson LR, Kang HH, *et al.* BNIP3- and BNIP3L-

- mediated mitophagy promotes the generation of natural killer cell memory[J]. *Immunity*, 2015, 43(2): 331-342.
- [30] Zhang T, Xue L, Li L, *et al.* BNIP3 protein suppresses PINK1 kinase proteolytic cleavage to promote mitophagy[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(41): 21616-21629.
- [31] Fu ZJ, Wang ZY, Xu L, *et al.* HIF-1 α -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101671.
- [32] Niu C, Chen Z, Kim KT, *et al.* Metformin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment by downregulating autophagy *via* the hedgehog pathway[J]. *Autophagy*, 2019, 15(5): 843-870.
- [33] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, *et al.* LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis[J]. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1792-1802.
- [34] Yao H, Cai C, Huang W, *et al.* Enhancing mitophagy by ligustilide through BNIP3-LC3 interaction attenuates oxidative stress-induced neuronal apoptosis in spinal cord injury[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(11): 4382-4406.
- [35] 刘冬梅, 张蔓, 江晓妹, 等. 多奈哌齐和加兰他敏对氧糖剥夺/复氧导致的神经元损伤的保护作用及机制[J]. *药学报*, 2017, 52(6): 928-935.
- [36] 郭婷婷, 王伟平, 王晓良. 多奈哌齐抑制钠通道和N-甲基-D-天冬氨酸受体通道保护神经元的机制[J]. *中国药理学杂志*, 2017, 52(24): 2166-2171.

(责任编辑: 蒋铭敏)

