

引用:谢万科,刘彦宁,李治延.柯诺辛碱对创伤性脑损伤大鼠线粒体自噬的影响[J].中医导报,2024,30(5):7-12.

柯诺辛碱对创伤性脑损伤大鼠线粒体自噬的影响*

谢万科,刘彦宁,李治延

(西安交通大学第一附属医院,陕西 西安 710061)

[摘要] 目的:探究柯诺辛碱(Cor)对创伤性脑损伤(TBI)大鼠的治疗作用及其对线粒体自噬的影响。方法:将80只大鼠随机分为假手术组($n=10$)、造模组($n=70$)。假手术组大鼠仅切开皮肤,不进行造模;造模组大鼠建立TBI大鼠模型。将58只造模成功大鼠随机分为模型组($n=12$)、低剂量组($n=12$)、中剂量组($n=12$)、高剂量组($n=11$)、抑制剂组($n=11$)。低、中、高剂量组大鼠分别予低[5 mg/(kg·d)]、中[10 mg/(kg·d)]、高[20 mg/(kg·d)]剂量柯诺辛碱治疗,抑制剂组大鼠予柯诺辛碱[20 mg/(kg·d)]和自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)[15 mg/(kg·d)]治疗。给药14 d后,采用改良神经功能缺损评分法进行神经功能评分,采用Morris水迷宫实验评价认知功能,采用蔗糖偏好实验和旷场实验评价行为学。通过苏木素-伊红(HE)染色和TUNEL染色评价脑组织损伤和神经元凋亡。检测脑组织含水量、脑组织氧化应激指标[超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)]水平。采用Western blotting检测脑组织Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、LC3B、p62和Beclin-1蛋白表达。结果:低、中、高剂量组大鼠的神经功能评分、逃避潜伏期、脑组织含水量、TUNEL阳性率、MDA水平,以及Bax、cleaved Caspase-3、p62蛋白表达水平均低于模型组($P<0.05$);低、中、高剂量组大鼠穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数、垂直活动分数、SOD、CAT和GSH-Px水平,以及Bcl-2、LC3B-II/LC3B-I、Beclin-1蛋白表达水平均高于模型组($P<0.05$)。抑制剂组大鼠的神经功能评分、逃避潜伏期、脑组织含水量、TUNEL阳性率、MDA水平,以及Bax、cleaved Caspase-3、p62蛋白表达水平均高于高剂量组($P<0.05$);抑制剂组大鼠穿越平台次数、蔗糖偏好率、水平活动分数、垂直活动分数、SOD、CAT和GSH-Px水平,以及Bcl-2、LC3B-II/LC3B-I、Beclin-1蛋白表达水平均低于高剂量组($P<0.05$)。结论:柯诺辛碱可有效减轻TBI后的继发性损伤,抑制神经元凋亡和氧化应激,其机制可能与激活线粒体自噬有关。

[关键词] 创伤性脑损伤;柯诺辛碱;线粒体自噬;神经元凋亡;氧化应激;钩藤;大鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2024)05-0007-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2024.05.002

Effects of Corynoxine on Mitophagy in Rats with Traumatic Brain Injury

XIE Wanke, LIU Yanning, LI Zhiyan

(The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shaanxi 710061, China)

[Abstract] Objective: To reveal the therapeutic effect of Corynoxine (Cor) on traumatic brain injury (TBI) rats and its effect on mitophagy. Methods: Totally 80 rats were randomly divided into sham group ($n=10$) and modeling group ($n=70$). Rats in sham group only had skin incisions without modeling, while rats in modeling group established a TBI rat model. The 58 rats with successful modeling were randomly divided into model group ($n=12$), low dose group ($n=12$), middle dose group ($n=12$), high dose group ($n=11$) and inhibitor group ($n=11$). Rats in low, middle and high dose groups were treated with low [5 mg/(kg·d)], middle [10 mg/(kg·d)] and high [20 mg/(kg·d)] doses of corynoxine respectively. Rats in inhibitor group were treated with corynoxine [20 mg/(kg·d)] and autophagy inhibitor 3-MA [15 mg/(kg·d)]. After 14 days of administration, the improved neurological deficit scoring method was used to score the neurological function, and the Morris water maze test was used to evaluate the cognitive function. The sucrose preference test and the open field test were used to evaluate the behavior. Brain tissue injury and neuronal apoptosis were evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining

*基金项目:陕西省自然科学基金项目(2018JM7152)

通信作者:李治延,男,主治医师,研究方向为急诊医学

and TUNEL staining. The water content of brain tissue and the levels of oxidative stress indicators [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) and malondialdehyde (MDA)] in brain tissue were detected. The protein expressions of Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3, LC3B, p62 and Beclin-1 in brain tissue were detected by Western blotting. Results: The neurological function score, escape latency, brain water content, TUNEL positive rate, MDA level, Bax, cleaved Caspase-3, and p62 protein levels in low, middle and high dose groups were lower than those in model group, while the times of crossing the platform, sucrose preference, horizontal activity score, vertical activity score, SOD, CAT, GSH-Px, Bcl-2, LC3B-II/LC3B-I and Beclin-1 protein levels were higher than those in model group ($P<0.05$). The neurological function score, escape latency, brain water content, TUNEL positive rate, MDA, cleaved Caspase-3 and p62 protein levels in inhibitor group were higher than those in high dose group, while the platform crossing times, sucrose preference, horizontal activity fraction, vertical activity fraction, SOD, CAT, GSH-Px, Bcl-2, LC3B-II/LC3B-I and Beclin-1 protein levels in the inhibitor group were lower than those in high dose group ($P<0.05$). Conclusion: Corynoxine can effectively reduce the secondary injury after TBI, inhibit neuronal apoptosis and oxidative stress, and its mechanism may be related to the activation of mitophagy.

[Keywords] traumatic brain injury; corynoxine; mitophagy; neuronal apoptosis; oxidative stress; *Uncaria rhynchophylla* (Miq.) Miq. ex Havil.; rat

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)是指伴有严重并发症的机械损伤,也是最常见的脑部创伤性疾病,且致死率和致死率均较高^[1-2]。TBI涉及原发性和继发性脑损伤。虽然原发性脑损伤是主要因素,但继发性损伤的治疗才是其关键。TBI后的继发性损伤与氧化应激和线粒体功能障碍密切相关^[3],而线粒体自噬可调控氧化应激和线粒体功能障碍的发生发展^[4-5]。TBI后受损的线粒体会产生过量的活性氧(reactive oxygen species, ROS)^[6],增加膜通透性和线粒体凋亡相关蛋白的表达,从而促进神经元死亡^[7]。线粒体自噬通过降解受损的线粒体从而减少大鼠神经元凋亡,保护神经元^[8-9]。因此,增强自噬可能是TBI的有效治疗策略。如自噬激活剂雷帕霉素能显著改善小鼠TBI后的认知功能,减少病变体积,抑制神经炎症^[10]。四氢姜黄素可通过增强线粒体自噬、减轻氧化应激和细胞凋亡来改善大鼠TBI后的神经功能^[11]。目前,临床中缺少可有效减轻TBI后继发性损伤的药物,大量患者在TBI后出现多种认知功能障碍和肢体残疾^[12]。中药钩藤(*Uncaria rhynchophylla*)在治疗TBI方面疗效显著^[13-14]。柯诺辛碱是从钩藤中分离出的四环羟吡啶生物碱,也是一种天然的自噬增强剂^[15]。现有研究已经揭示了柯诺辛碱的神经保护作用,如:在帕金森病小鼠模型中,柯诺辛碱能通过诱导自噬和减少神经炎症来促进多巴胺能神经元存活^[16]。本研究考察了柯诺辛碱对TBI大鼠的治疗作用,并探讨了其对线粒体自噬的影响,旨在为TBI后继发性损伤的治疗提供候选药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 柯诺辛碱(批号:HY-N0901,纯度:99.58%)、3-甲基腺嘌呤(3-Methyladenine, 3-MA, 批号:HY-19312,纯度:99.91%)购自美国Med Chem Express公司;羧甲基纤维素钠(批号:IS9000)购自北京索莱宝科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)测试盒(批号:S0101M)、TUNEL染液(批号:C1088)、丙二醛(MDA)测试盒(批号:S0131S)、苏木素-伊红(HE)染液(批号:C0105M)均购自碧云天生物技术研究;谷

胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测试盒(批号:A005-1-2)、过氧化氢酶(CAT)测试盒(批号:A007-1-1)均购自南京建成生物工程研究所; β -actin一抗(批号:ab8227)、Bax一抗(批号:ab32503)、Bcl-2一抗(批号:ab32124)、cleaved Caspase-3一抗(批号:ab32042)、LC3B一抗(批号:ab192890)、p62一抗(批号:ab109012)、Beclin-1一抗(批号:ab207612)、IgG H&L(HRP)二抗(批号:ab205718)均购自英国Abcam公司。

1.1.2 实验仪器 CLARIOstar Plus多功能酶标仪购自德国BMG公司;TBI-0310颅脑损伤仪购自美国PSI公司;DB001 Morris水迷宫系统购自北京智鼠多宝公司;7500实时荧光定量PCR仪购自美国ABI公司。

1.1.3 实验动物 80只SPF级SD大鼠,7~8周龄,体质量250~320(285.74 $\pm$ 35.28) g,合格证号:SCXK(陕)2020-001,购于西安交通大学实验动物中心。大鼠饲养在(23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, (55 $\pm$ 5)%湿度,12 h/12 h光暗循环环境中。本研究所有实验操作遵循实验动物福利指南执行,本研究方案经过西安交通大学医学部实验动物管理委员会批准通过(XJTU1AF2020LSK-276)。

1.2 方法

1.2.1 TBI大鼠模型的制备 将80只大鼠随机分为假手术组($n=10$)、造模组($n=70$)。假手术组大鼠仅切开皮肤,不进行造模。造模组参考文献[17]建立TBI大鼠模型,异氟醚吸入麻醉大鼠,将大鼠仰卧固定于脑立体定向仪上,头部正中切开皮肤,暴露头顶骨,使用微型磨钻制作半径2 mm的骨窗,使用颅脑损伤仪打击造模,速度5 m/s,深度4.5 mm,停留时间400 ms。造模12 h后观察大鼠行为状态,剔除死亡或濒临死亡的大鼠,其余大鼠用于后续实验。本研究中,共有70只大鼠造模,58只造模成功,造模成功率为82.86%(58/70)。

1.2.2 分组及给药 将58只TBI模型大鼠随机分为模型组($n=12$)、低剂量组($n=12$)、中剂量组($n=12$)、高剂量组($n=11$)、抑制剂组($n=11$)。假手术组和模型组大鼠灌胃1 mL 0.5%羧甲基纤维素钠。低、中、高剂量组大鼠分别灌胃5、10、20 mg/(kg $\cdot$ d)的柯诺辛碱(溶于0.5%羧甲基纤维素钠,1 mL)^[16-18]。

抑制剂组大鼠灌胃0.5 mL柯诺辛碱[20 mg/(kg·d)]和0.5 mL 3-MA[自噬抑制剂,15 mg/(kg·d)]^[19]。各组大鼠均给药14 d。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 大鼠神经功能评分 采用改良神经功能缺损评分法进行神经功能评分^[20]。分数越高表示神经功能缺损程度越严重(0~18分)。

1.2.3.2 大鼠认知功能 采用Morris水迷宫实验评价认知功能^[21]。将直径150 cm、高60 cm、水深35 cm、水温30 ℃的圆形水池作为实验设备,水池被分为4个象限,第一象限中心放置直径12 cm的站台,站台距水面2 cm。通过定位航行实验记录大鼠登陆站台的时间,作为逃避潜伏期。撤去站台后,通过空间探索实验记录大鼠1 min内的穿越平台次数。

1.2.3.3 大鼠行为学评价 采用蔗糖偏好实验和旷场实验评价行为学。(1)蔗糖偏好实验方案^[22]:大鼠单笼饲养,禁水禁食12 h后,将装有200 mL自来水和200 mL 1%蔗糖溶液的2个瓶子放入笼中,6 h后互换瓶子位置。12 h后测量自来水和蔗糖溶液的消耗量,计算蔗糖偏好率。蔗糖偏好率=[蔗糖溶液消耗量/(自来水消耗量+蔗糖溶液消耗量)]×100%。(2)旷场实验方案^[23]:将大鼠置于长100 cm、宽100 cm、高40 cm的不透明盒子中,盒子底部被分成25个相等方格。记录大鼠5 min内穿越方格的次数,作为水平活动分数。记录大鼠5 min内两前肢离地次数,作为垂直活动分数。

1.2.3.4 大鼠脑组织含水量 异氟醚吸入麻醉大鼠,快速断头处死,开颅取脑,沿中线将脑组织分成两个半球,无菌分离损伤侧脑半球,去除小脑和脑干以及表面杂物,称取湿质量。95 ℃烘烤24 h后称取干质量,计算含水量。含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

1.2.3.5 大鼠脑组织损伤和细胞凋亡 常规制作5 μm厚损伤侧脑组织石蜡切片。二甲苯脱蜡,梯度酒精水化。严格按照试剂盒说明书进行HE染色和TUNEL染色。显微镜下观察大鼠脑组织损伤和细胞凋亡情况。

1.2.3.6 大鼠脑组织氧化应激指标 将大鼠脑组织剪碎,放入玻璃匀浆器中匀浆。4 ℃、12 000 g×离心5 min,取上清。WST-8法检测SOD,可见光法检测CAT,比色法检测GSH-Px,硫代巴比妥酸法检测MDA。

1.2.3.7 大鼠脑组织Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3蛋白表达 采用Western blotting检测大鼠脑组织Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3蛋白相对表达量。RIPA提取脑总蛋白,BCA法定量后,取50 μg蛋白在10% SDS-PAGE上电泳分离,并转移到PVDF膜上。5%脱脂牛奶封闭PVDF膜2 h。然后将膜与Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、cleaved Caspase-3(1:1 000)、LC3B(1:2 000)、p62(1:2 000)、Beclin-1(1:1 000)和β-actin(1:1 000)一抗4 ℃孵育过夜。然后将膜与IgG H&L(HRP)二抗(1:1 000)室温孵育1 h。ECL显影3 min。ImageJ软件分析条带灰度值,β-actin作为内参蛋白。

1.3 统计学方法 采用SPSS 26.0软件分析数据,计量资料符合正态分布且方差齐,以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。计量资料比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠神经功能和认知功能比较 模型组大鼠神经功能评分和逃避潜伏期均高于假手术组,穿越平台次数低于假手术组($P < 0.05$);低、中、高剂量组大鼠神经功能评分和逃避潜伏期均低于模型组,穿越平台次数高于模型组($P < 0.05$);抑制剂组大鼠神经功能评分和逃避潜伏期均高于高剂量组,穿越平台次数低于高剂量组($P < 0.05$)。(见表1)

表1 各组大鼠神经功能评分、逃避潜伏期和穿越平台次数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	神经功能评分/分	逃避潜伏期/s	穿越平台次数/次
假手术组	10	0.00±0.00	19.31±2.35	7.40±1.03
模型组	12	11.75±2.01 ^a	61.94±6.46 ^a	2.58±0.33 ^a
低剂量组	12	7.92±1.38 ^{ab}	48.14±3.91 ^{ab}	4.45±0.28 ^{ab}
中剂量组	12	5.67±1.44 ^{ab}	39.57±3.48 ^{ab}	5.54±0.47 ^{ab}
高剂量组	11	4.82±0.98 ^{ab}	27.66±3.25 ^{ab}	5.87±0.47 ^{ab}
抑制剂组	11	8.73±1.68 ^{abc}	50.19±2.16 ^{abc}	4.43±0.43 ^{abc}
F		85.814	173.219	101.225
P		0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与高剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠行为学比较 模型组大鼠的蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数均低于假手术组($P < 0.05$);低、中、高剂量组大鼠蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数均高于模型组($P < 0.05$);抑制剂组大鼠蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数均低于高剂量组($P < 0.05$)。(见表2)

表2 各组大鼠蔗糖偏好率、水平活动分数和垂直活动分数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	蔗糖偏好率/%	水平活动分数/次	垂直活动分数/次
假手术组	10	78.05±8.08	63.53±7.41	15.09±1.05
模型组	12	49.68±3.10 ^a	29.58±3.73 ^a	5.44±0.49 ^a
低剂量组	12	58.61±2.73 ^{ab}	37.83±3.07 ^{ab}	8.34±0.54 ^{ab}
中剂量组	12	62.45±4.24 ^{ab}	42.86±3.03 ^{ab}	9.78±1.03 ^{ab}
高剂量组	11	66.53±5.89 ^{ab}	48.99±2.93 ^{ab}	12.01±0.96 ^{ab}
抑制剂组	11	59.10±2.54 ^{abc}	39.28±3.55 ^{abc}	8.14±0.76 ^{abc}
F		43.487	84.461	179.328
P		0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$;与高剂量组比较,^c $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠脑组织损伤和细胞凋亡比较 假手术组大鼠大脑皮层无明显损伤;模型组大鼠大脑皮层病变明显,表现为神经元变形、核固缩、空泡化等;低、中、高剂量组大鼠神经元损伤程度均低于假手术组;抑制剂组大鼠神经元损伤程度高于高剂量组。(见图1)

模型组大鼠脑组织含水量高于假手术组($P < 0.05$);低、中、高剂量组大鼠脑组织含水量均低于模型组($P < 0.05$);抑制剂组大鼠脑组织含水量高于高剂量组($P < 0.05$)。(见表3)

模型组大鼠TUNEL阳性率及Bax、cleaved Caspase-3蛋白相对表达量均高于假手术组,Bcl-2蛋白相对表达量低于假手术组($P < 0.05$);低、中、高剂量组大鼠TUNEL阳性率及Bax、cleaved Caspase-3蛋白相对表达量均低于模型组,Bcl-2蛋白

相对表达量均高于模型组($P<0.05$);抑制剂组大鼠TUNEL阳性率及Bax、cleaved Caspase-3蛋白相对表达量均高于高剂量组,Bcl-2蛋白相对表达量低于高剂量组($P<0.05$)。(见图2~3、表4)

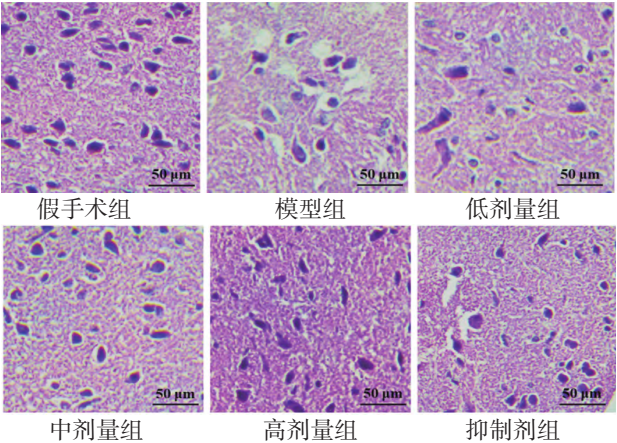


图 1 各组大鼠大脑皮层 HE 染色图 (×400)

表 3 各组大鼠脑组织含水量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	脑组织含水量/%
假手术组	10	77.33±2.33
模型组	12	86.12±3.63 ^a
低剂量组	12	83.11±3.59 ^{ab}
中剂量组	12	80.14±2.37 ^{ab}
高剂量组	11	79.11±4.14 ^a
抑制剂组	11	82.47±3.56 ^{abc}
<i>F</i>		9.920
<i>P</i>		0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

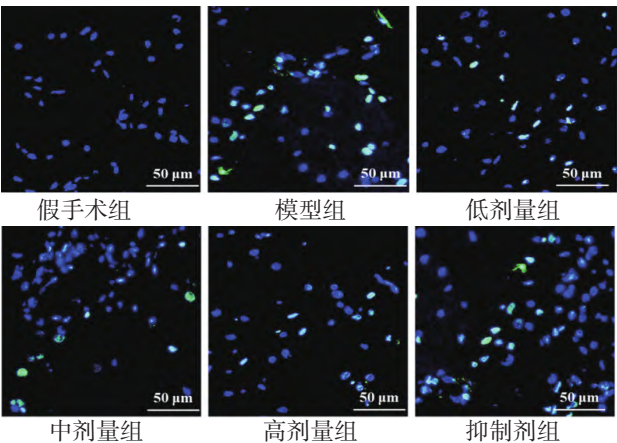


图 2 各组大鼠大脑皮层 TUNEL 染色图 (×400)

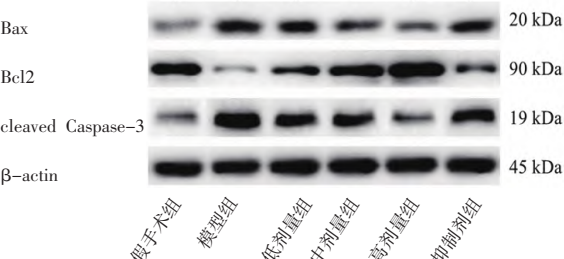


图 3 各组大鼠脑组织 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白表达 Western blotting 图

表 4 各组大鼠脑组织 TUNEL 阳性率和 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	TUNEL阳性率/%	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin
假手术组	10	3.05±0.42	0.20±0.02	1.03±0.05	0.19±0.02
模型组	12	19.77±1.97 ^a	0.83±0.04 ^a	0.10±0.01 ^a	1.20±0.05 ^a
低剂量组	12	12.15±1.52 ^{ab}	0.60±0.04 ^{ab}	0.30±0.02 ^{ab}	0.82±0.05 ^{ab}
中剂量组	12	9.94±1.16 ^{ab}	0.41±0.05 ^{ab}	0.70±0.03 ^{ab}	0.72±0.04 ^{ab}
高剂量组	11	8.02±0.94 ^{ab}	0.20±0.01 ^{ab}	1.24±0.08 ^{ab}	0.30±0.01 ^{ab}
抑制剂组	11	12.23±1.01 ^{abc}	0.61±0.03 ^{abc}	0.30±0.03 ^{abc}	0.80±0.06 ^{abc}
<i>F</i>		203.173	566.585	1 269.845	913.420
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

2.4 各组大鼠脑组织SOD、CAT、GSH-Px、MDA水平比较 模型组大鼠脑组织SOD、CAT、GSH-Px水平均低于假手术组,MDA水平高于假手术组($P<0.05$);低、中、高剂量组大鼠脑组织SOD、CAT、GSH-Px水平均高于模型组,MDA水平低于模型组($P<0.05$);抑制剂组大鼠脑组织SOD、CAT、GSH-Px水平均低于高剂量组,MDA水平高于高剂量组($P<0.05$)。(见表5)

表 5 各组大鼠的脑组织氧化应激指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD/(U/mg)	CAT/(U/mg)	GSH-Px/(U/mg)	MDA/(nmol/mg)
假手术组	10	2.74±0.21	49.32±2.81	14.88±0.92	1.23±0.11
模型组	12	1.16±0.11 ^a	24.41±2.07 ^a	7.07±0.49 ^a	2.65±0.20 ^a
低剂量组	12	1.55±0.07 ^{ab}	29.32±1.74 ^{ab}	8.89±0.54 ^{ab}	2.09±0.09 ^{ab}
中剂量组	12	1.88±0.09 ^{ab}	35.22±2.06 ^{ab}	11.03±0.54 ^{ab}	1.79±0.12 ^{ab}
高剂量组	11	2.18±0.11 ^{ab}	40.14±2.00 ^{ab}	12.75±0.58 ^{ab}	1.48±0.12 ^{ab}
抑制剂组	11	1.59±0.09 ^{abc}	30.33±1.64 ^{abc}	9.14±0.38 ^{abc}	2.11±0.20 ^{abc}
<i>F</i>		231.583	200.685	254.349	131.121
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与高剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

2.5 各组大鼠脑组织LC3B-II/LC3B-I及Beclin-1、p62蛋白相对表达量比较 模型组大鼠脑组织LC3B-II/LC3B-I及Beclin-1蛋白相对表达量均高于假手术组,p62蛋白相对表达量低于假手术组($P<0.05$);低、中、高剂量组大鼠脑组织LC3B-II/LC3B-I及Beclin-1蛋白相对表达量均高于模型组,p62蛋白相对表达量均低于模型组($P<0.05$)。抑制剂组大鼠脑组织LC3B-II/LC3B-I及Beclin-1蛋白相对表达量均低于高剂量组,p62蛋白相对表达量高于高剂量组($P<0.05$)。(见图4、表6)

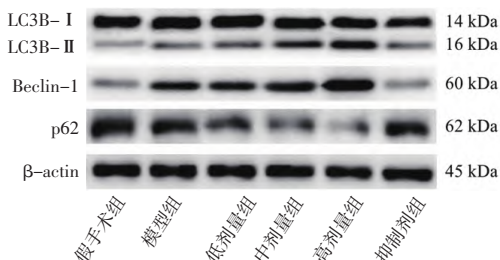


图 4 各组大鼠脑组织 LC3B-II、LC3B-I、Beclin-1、p62 蛋白表达 Western blotting图

表 6 各组大鼠脑组织 LC3B- II/LC3B- I 及 p62、Beclin-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	LC3B- II/LC3B- I	Beclin-1/ β -actin	p62/ β -actin
假手术组	10	0.09 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.01	0.78 $\pm$ 0.06
模型组	12	0.20 $\pm$ 0.02 ^a	0.31 $\pm$ 0.02 ^a	0.69 $\pm$ 0.05 ^a
低剂量组	12	0.30 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.40 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.40 $\pm$ 0.02 ^{ab}
中剂量组	12	0.41 $\pm$ 0.02 ^{ab}	0.50 $\pm$ 0.03 ^{ab}	0.21 $\pm$ 0.01 ^{ab}
高剂量组	11	0.61 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.70 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{ab}
抑制剂组	11	0.15 $\pm$ 0.01 ^{abc}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{abc}	0.71 $\pm$ 0.04 ^{abc}
F		863.221	515.172	688.762
P		0.000	0.000	0.000

注:与假手术组比较,^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05;与高剂量组比较,^cP<0.05。

3 讨 论

钩藤在治疗TBI方面疗效显著^[13-14],但钩藤中的药效成分研究相对较少。柯诺辛碱为钩藤中的四环羟吲哚生物碱,可促进神经元存活^[15-16,18],在治疗帕金森病方面具有应用潜力。本研究结果表明,柯诺辛碱能剂量依赖性地提高TBI大鼠的神经功能和认知功能,改善行为学,减轻脑组织损伤,抑制神经元凋亡。柯诺辛碱可缓解TBI后的继发性损伤,如神经功能障碍、认知功能障碍、焦虑、抑郁等。

线粒体自噬是一种选择性清除多余或受损线粒体的自噬过程,其功能是严格控制线粒体的质量和数量。线粒体自噬是一种重要的线粒体功能稳定机制,与许多生理和病理过程有关,对于维持细胞存活非常重要。其通过清除受损的细胞器从而将蛋白质毒性因子和促炎性细胞因子释放降至最低^[24-25]。本研究结果表明TBI后线粒体自噬被激活,而柯诺辛碱进一步激活了线粒体自噬过程。为了考察柯诺辛碱是否通过激活线粒体自噬减轻TBI后的继发性损伤,本研究使用自噬抑制剂3-MA阻断柯诺辛碱诱导的自噬过程。研究表明,3-MA逆转了柯诺辛碱对TBI大鼠脑损伤的治疗作用,说明柯诺辛碱对TBI大鼠的治疗作用部分依赖于其对线粒体自噬的激活。

TBI等创伤性事件会导致受损区域的神经元能量突然下降并引发急性神经元凋亡。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,凋亡细胞的细胞形态学特征包括皱缩、染色体浓缩和DNA片段化^[26]。本研究结果表明,柯诺辛碱能剂量依赖性地减轻TBI大鼠的神经元凋亡,而这种作用可被3-MA逆转。激活线粒体自噬可降低TBI诱导的细胞凋亡^[27]。TBI诱导的线粒体自噬是一种内源性神经保护过程,可限制神经元凋亡和行为缺陷^[28]。本研究推测柯诺辛碱可能通过激活线粒体自噬进而抑制神经元凋亡。

TBI后出现能源危机,无法满足机体能量需求,同时氧化磷酸化水平升高,ROS水平超过一定阈值,从而导致线粒体DNA损伤和功能障碍^[29]。TBI引起的脑灌注不足会引发缺氧,从而引起线粒体损伤并激活不同的线粒体自噬途径。ROS和缺氧等应激均可诱导线粒体自噬。线粒体自噬通路被激活后,受损线粒体被选择性清除,线粒体质量得到保证。神经元维持稳态,从而促进TBI神经功能恢复。本研究结果表明TBI后虽然线粒体自噬被激活,但脑组织氧化应激水平也明显升高。

其原因可能与线粒体自噬活性不足有关。当线粒体自噬不足时,受损的线粒体不能正常清除,ROS不断积累,导致线粒体蛋白质和DNA氧化,从而加重线粒体损伤^[30]。本研究结果表明,柯诺辛碱能剂量依赖性地减轻TBI大鼠的氧化应激。促进线粒体自噬可防止TBI大鼠脑组织中受损线粒体和ROS的积累,促进组织修复,改善神经功能^[31]。因此,本研究推测柯诺辛碱抑制氧化应激的途径也可能是通过激活线粒体自噬来实现的。

综上所述,柯诺辛碱可有效减轻TBI后的继发性损伤,抑制神经元凋亡和氧化应激,其机制可能与激活线粒体自噬有关。柯诺辛碱可能是治疗TBI后继发性损伤的潜在天然药物。

参考文献

[1] FORDINGTON S, MANFORD M. A review of seizures and epilepsy following traumatic brain injury[J]. J Neurol, 2020,267(10):3105-3111.

[2] SCARBORO M, MCQUILLAN K A. Traumatic brain injury update[J]. AACN Adv Crit Care, 2021,32(1):29-50.

[3] CAPIZZI A, WOO J, VERDUZCO -GUTIERREZ M. Traumatic brain injury[J]. Med Clin N Am, 2020,104(2): 213-238.

[4] BAECHLER B L, BLOEMBERG D, QUADRILATERO J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation[J]. Autophagy, 2019,15(9):1606-1619.

[5] BHATIA V, SHARMA S. Role of mitochondrial dysfunction, oxidative stress and autophagy in progression of Alzheimer's disease[J]. J NeurolSci, 2021,421:117253.

[6] HAGBERG H, MALLARD C, ROUSSET C I, et al. Mitochondria: Hub of injury responses in the developing brain[J]. Lancet Neurol, 2014,13(2):217-232.

[7] GALLUZZI L, BLOMGREN K, KROEMER G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury[J]. Nat Rev Neurosci, 2009,10(7):481-494.

[8] 王连辉,米国青,薛满中.基于PINK1/Parkin通路探讨小续命汤调控急性脑缺血再灌注后线粒体自噬的分子机制及神经细胞凋亡的影响[J]. 中医药导报, 2022,28(1):36-40,44.

[9] 张占伟,廖亮英,杨惠,等.龙琥醒脑颗粒介导线粒体自噬对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑神经细胞的保护作用[J]. 中医药导报, 2022,28(11):23-29.

[10] CAMPOLO M, CASILI G, LANZA M, et al. The inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in improving inflammatory response after traumatic brain injury[J]. J Cellular Molecular Medi, 2021,25(16):7855-7866.

[11] GAO Y Y, ZHUANG Z, GAO S T, et al. Tetrahydrocurcumin reduces oxidative stress-induced apoptosis via the mitochondrial apoptotic pathway by modulating

- autophagy in rats after traumatic brain injury[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(3):887-899.
- [12] MAS M F, MATHEWS A, GILBERT-BAFFOE E. Rehabilitation needs of the elder with traumatic brain injury[J]. *Phys Med RehabilClin N Am*, 2017, 28(4):829-842.
- [13] 张昕.天麻钩藤饮治疗轻型颅脑损伤患者的疗效研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(8):57-61.
- [14] 严瑶瑶,马瑶,周童,等.钩藤对脑损伤早期癫痫易感性的影响[J].*时珍国医国药*, 2019, 30(7):1575-1578.
- [15] CHEN L L, SONG J X, LU J H, et al. Corynoxine, a natural autophagy enhancer, promotes the clearance of alpha-synuclein via Akt/mTORpathway[J]. *J NeuroimmunePharmacol*, 2014, 9(3):380-387.
- [16] CHEN L L, HUANG Y, YU X, et al. Corynoxine protects dopaminergic neurons through inducing autophagy and diminishing neuroinflammation in rotenone-induced animal models of Parkinson's disease[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:642900.
- [17] 王瑞辉,郭新荣,吴涛,等.使用电子颅脑损伤仪器制备大鼠颅脑损伤动物模型[J].*中华实验外科杂志*, 2014, 31(3):675-676.
- [18] 黄玉菊,李冲,陈蕾蕾,等.柯诺辛对鱼藤酮所致帕金森病小鼠运动功能影响[J].*青岛大学学报(医学版)*, 2020, 56(2):153-155.
- [19] 邹树峰,姜碧霞,冯九庚,等.人参皂甙-Rb1通过促进神经元线粒体自噬治疗大鼠创伤性颅脑损伤的机制[J].*浙江中医药大学学报*, 2022, 46(10):1063-1069.
- [20] CHEN J, SANBERG P R, LI Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats [J].*Stroke*, 2001, 32(11):2682-2688.
- [21] 刘恒,孙凡,徐倩倩,等.黄芩苷对脑小血管病模型大鼠认知功能及脑内血管内皮生长因子和内皮抑素表达水平的影响[J].*吉林大学学报(医学版)*, 2019, 45(5):1080-1085, 1197.
- [22] HALES C A, STUART S A, ANDERSON M H, et al. Modelling cognitive affective biases in major depressive disorder using rodents[J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(20):4524-4538.
- [23] CERETTA L B, RÉUS G Z, STRINGARI R B, et al. Imipramine treatment reverses depressive-like behavior in alloxan-diabetic rats[J]. *Diabetes/Metabolism Res Rev*, 2012, 28(2):139-144.
- [24] SUN E Y, ZHANG J, DENG Y, et al. Docosahexaenoic acid alleviates brain damage by promoting mitophagy in mice with ischaemic stroke[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:3119649.
- [25] ZHANG L J, DAI L, LI D Y. Mitophagy in neurological disorders[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1):1-12.
- [26] CHI H, CHANG H Y, SANG T K. Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases[J]. *Int J MolSci*, 2018, 19(10):3082.
- [27] NIU F, DONG J Q, XU X J, et al. Mitochondrial division inhibitor 1 prevents early-stage induction of mitophagy and accelerated cell death in a rat model of moderate controlled cortical impact brain injury [J]. *World Neurosurg*, 2019, 122:e1090-e1101.
- [28] CHAO H L, LIN C, ZUO Q, et al. Cardiolipin-dependent mitophagy guides outcome after traumatic brain injury[J]. *J Neurosci*, 2019, 39(10):1930-1943.
- [29] WANG Y, LIU N, LU B W. Mechanisms and roles of mitophagy in neurodegenerative diseases[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2019, 25(7):859-875.
- [30] FLEURY C, MIGNOTTE B, VAYSSIÈRE J L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling[J]. *Biochimie*, 2002, 84(2-3):131-141.
- [31] ZAKARYA R, SAPKOTA A, CHAN Y L, et al. Nitroxides affect neurological deficits and lesion size induced by a rat model of traumatic brain injury [J]. *Nitric Oxide*, 2020, 97:57-65.

(收稿日期:2023-06-21 编辑:蒋凯彪)

(上接第6页)

- [46] MOLNAR V, MATIŠIĆ V, KODVANJ I, et al. Cytokines and chemokines involved in osteoarthritis pathogenesis[J]. *Int J MolSci*, 2021, 22(17):9208.
- [47] WOOD M J, MILLER R E, MALFAIT A M. The genesis of pain in osteoarthritis: Inflammation as a mediator of osteoarthritis pain[J]. *Clin Geriatr Med*, 2022, 38(2):221-238.
- [48] HOPFNER K P, HORNUNG V. Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS-STING signalling[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(9):501-521.
- [49] WANG J N, LI R R, LIN H B, et al. Accumulation of cytosolic dsDNA contributes to fibroblast-like synoviocytes-mediated rheumatoid arthritis synovial inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 76:105791.
- [50] 罗敷,杨璐,舒象忠,等.电针预处理对急性肺损伤大鼠炎症反应的影响[J].*亚太传统医药*, 2022, 18(12):41-46.

(收稿日期:2023-07-24 编辑:蒋凯彪)