

清热利胆解毒方通过调控线粒体自噬改善高铜负荷大鼠的认知功能障碍

王钰岚¹, 方向^{1,2}, 陈泽铭¹, 阮炳坤¹, 韩欣礼¹, 唐雨婕¹, 朱璐瑶¹

¹安徽中医药大学第一临床医学院, 安徽 合肥 230038; ²安徽中医药大学第一附属医院脑病一科, 安徽 合肥 230031

摘要:目的 探讨清热利胆解毒方改善高铜负荷大鼠认知功能障碍的可能机制。方法 将75只SD大鼠(雄)随机分为空白组(NG)、模型组(MG)、清热利胆解毒方组(TCM)、青霉胺组(PCA)和清热利胆解毒方加青霉胺组(TCM+PCA), 15只/组。巴恩斯迷宫实验和避暗实验测试大鼠学习记忆能力, Western blotting和免疫荧光检测海马区NIX、FUNDC1、LC3的表达, 用透射电镜观察海马区线粒体形态和结构。结果 行为学测试结果显示, MG组较NG组大鼠目标洞潜伏期明显升高($P<0.05$), 进入暗室的潜伏期缩短($P<0.01$), 错误次数增加($P<0.01$); TCM+PCA组较MG组第4天、测试期目标洞潜伏期时间明显缩短($P<0.05$), 进入暗室的潜伏期延长($P<0.01$), 错误次数减少($P<0.01$), TCM+PCA组较TCM组、PCA组错误次数减少($P<0.01$)。Western blotting结果显示, NG组及治疗各组较MG组大鼠海马区NIX、FUNDC1的表达水平增高($P<0.01$), LC3I、LC3II的表达水平明显减少($P<0.05$); TCM+PCA组较TCM组、PCA组NIX、FUNDC1的表达水平明显增高($P<0.05$), LC3I的表达水平明显减少($P<0.01$)。免疫荧光检测结果显示MG组较NG组、TCM+PCA组大鼠海马区NIX、FUNDC1蛋白总荧光强度减弱($P<0.01$), LC3蛋白总荧光强度增强($P<0.01$); TCM组较PCA组各蛋白总荧光强度差异无统计学意义($P>0.05$)。透射电镜可见NG组细胞内线粒体大多形态完整, MG组线粒体结构紊乱且边缘模糊, 治疗各组线粒体形态结构均有不同程度改善。结论 清热利胆解毒方可改善高铜负荷WD模型大鼠认知功能障碍, 调控线粒体自噬可能是其作用机制之一。

关键词: 清热利胆解毒方; 肝豆状核变性; 认知障碍; NIX; FUNDC1

Qingre Lidan Jiedu Recipe improves high copper load-induced cognitive dysfunction in rats by regulating mitophagy

WANG Yulan¹, FANG Xiang^{1,2}, CHEN Zeming¹, RUAN Bingkun¹, HAN Xinli¹, TANG Yujie¹, ZHU Luyao¹

¹First Clinical Medical College of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China; ²Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China

Abstract: Objective To explore the mechanisms of Qingre Lidan Jiedu Recipe (QLJR) for improving cognitive dysfunction in rats with high copper load. **Methods** Seventy-five male SD rats were randomized into normal control group, model group, QLJR group, penicillamine (PCA) group, and QLJR+PCA group. Except for those in the control group, all the rats were fed a high-copper diet for 12 weeks. The effects of the treatments on cognitive function of the rats were assessed using the Barnes maze and passive avoidance tests. Hippocampal expressions of NIX, FUNDC1 and LC3 of the rats were detected using Western blotting and immunofluorescence staining, and changes in mitochondrial morphology were observed with transmission electron microscopy. **Results** Behavioral tests showed prolonged target hole latency, shortened latency to enter the dark chamber, and increased error counts of the rats in the model group, which were significantly improved in QLJR+PCA group; the error counts were significantly lower in QLJR+PCA group than in either QLJR or PCA group. Among all the groups, the hippocampal expressions of NIX and FUNDC1 were the lowest and LC3 I/II expression the highest in the model group; NIX and FUNDC1 expressions were significantly higher and LC3 I expression was lower in QLJR+PCA group than in QLJR group and PCA group. Immunofluorescence staining revealed weakened NIX and FUNDC1 expressions and enhanced LC3 expression in the hippocampus of the rats in the model group as compared with those in the normal control and QLJR+PCA groups, but their expressions did not differ significantly between QLJR and PCA groups. The rats in the model group showed obvious structural disarray of the mitochondria, which were improved in all the treatment groups. **Conclusion** QLJR improves cognitive dysfunction in rats with high copper load possibly by regulating mitophagy.

Keywords: Qingre Lidan Jiedu Recipe; Wilson's disease; cognitive impairment; NIX; FUNDC1

Wilson病(WD)又称肝豆状核变性(HLD),是由ATP7B基因突变导致的铜代谢障碍性疾病,因过量的铜沉积于体内而发病,可以出现以肝功能损害及神经系

统症状为主的临床表现^[1]。其中,认知障碍在WD患者神经系统损伤中较为常见^[2],严重影响到WD患者的日常生活和社交能力。铜沉积导致WD患者认知障碍的机制目前尚未明确,铜沉积导致的过度氧化应激反应所诱导的线粒体损伤被认为是WD患者认知障碍发生的一个重要原因。

既往研究表明^[3]清热利胆解毒方对WD患者的认知障碍临床疗效显著,动物实验也证明^[4]该方对高铜负荷大鼠的学习记忆功能损伤具有修复作用,可调控神经

收稿日期:2025-05-01

基金项目:安徽省自然科学基金面上项目(2208085MH271);安徽省高等学校科学研究项目重大项目(2024AH040153);安徽省中医药管理局中医药应用转化一般项目(2024cccx093)

作者简介:王钰岚,在读硕士研究生,E-mail: wangyulan0326@163.com

通信作者:方向,主任医师,博士,博士生导师,E-mail: fxdxx@ahtcm.edu.cn

元突触界面超微结构,促进突触超微结构的修复^[5],但具体治疗机制尚未进一步明确。前期研究发现^[6],WD模型铜负荷大鼠海马组织存在过度氧化应激以及线粒体损伤,清热利胆解毒方可抑制其氧化应激反应,减轻神经元线粒体损伤,维持海马线粒体稳态。基于铜导致认知障碍的生理病理机制,以及线粒体自噬在维持线粒体质量、稳态中发挥的关键作用,推测调控线粒体自噬可能是清热利胆解毒方改善WD患者认知功能障碍的重要机制之一。本研究通过巴恩斯迷宫实验和避暗实验测试、WB、免疫荧光、透射电镜等方法探讨清热利胆解毒方在改善高铜负荷大鼠认知功能的潜在机制,为WD的基础研究及认知功能障碍的治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

SPF级SD雄性大鼠75只,体质量170~230 g,许可证号为SCXK(豫)2019-2002,随机分为空白对照组(NG)、模型组(MG)、中药组(TCM)、西药组(PCA)、中药+西药组(TCM+PCA),15只/组。NG组喂食普通饲料及普通水,其余大鼠用于制备高铜负荷WD模型大鼠,实验动物均饲养于安徽中医药大学动物实验中心,全程严格遵循安徽中医药大学实验动物伦理委员会的相关规定(伦理批号:AHUCM-rats-2024032)。环境参数恒定,湿度40%~70%,温度(24±2)℃,维持12/12 h昼夜节律,自由获取饲料和水。

1.2 药物与主要试剂、仪器

清热利胆解毒方:大黄6 g、黄连6 g、姜黄6 g、金钱草15 g、三七2 g,煎煮后配制成药液含量0.7 g/mL的标准汤剂;西药:0.125 g/粒的青霉素(上海上药信谊药厂有限公司),药物均采购自安徽省中医院。电泳仪(BIO-RAD);电转仪(大连竞迈科技有限公司);酶标检测仪(BioTek);离心机(EPPENDORF);免抗NIX、FUNDC1、LC3I、LC3 II(Affinity);免抗GAPDH抗体(CST);脱水机(DIAPATH);切片机(徕卡);透射电镜(日本电子);数码相机记录图像(蒙斯特)。

1.3 方法

1.3.1 造模 实验开始起,NG组自由摄取普通标准饲料、普通水,其余各组均喂食含硫酸铜1 g/kg的高铜饲料和0.185%硫酸铜去离子水,制备铜负荷模型大鼠^[7],持续干预12周,定期观察大鼠的一般状况。

1.3.2 给药 从第7周第1天开始给药,各组均采用灌胃给药,1次/d,连续6周。TCM组:剂量据人、大鼠转化公式计算,清热利胆解毒方[3.6 g/(kg·d)];PCA组:青霉素[0.09/(kg·d)];TCM+PCA组:清热利胆解毒方+青霉素;NG组和MG组:等剂量生理盐水。

1.3.3 观察指标

1.3.3.1 一般状况 每天观察大鼠体质量、摄食量、精神状态、排泄功能、毛发等变化。

1.3.3.2 学习记忆能力测试 巴恩斯迷宫实验:在给药结束前2周,开始进行13 d的训练和测试。适应期:在训练期前1 d将大鼠置于在圆台中心区域自由探索3 min,随后在无外界刺激的情况下,引导至目标盒内适应60 s。训练期(1~4 d):将大鼠放置迷宫台面自由探索4 min后,每天训练2次,记录潜伏时间,每次间隔4 h,连续训练4 d。测试期:对大鼠进行短期记忆测试(5 d)、长期记忆测试(12 d)。每测试完1只大鼠,及时清除其留下的排泄物,并用75%乙醇消除残留气味,避免嗅觉干扰。取每只大鼠同1 d训练时间平均值进行统计学分析。避暗实验:在给药结束前2 d,开始进行训练和测试,先将大鼠放入避暗测试箱的明室中,大鼠因避暗本能通过圆洞样小门,进入暗室后,会触发电击刺激(35 mV),大鼠将逃回明室。记录达到习得标准(5 min之内未进入暗室)前大鼠错入暗室的次数;24 h后进入测试阶段,再次将大鼠放入明室,观察并记录大鼠进入暗室的时间(记忆潜伏期)。

1.3.3.3 Western blotting法检测海马区NIX、FUNDC1、LC3I、LC3II表达的变化 行为学检测结束后随机选取各组大鼠(3只/组),麻醉后快速分离海马组织,用预冷的PBS洗涤3次,剪成小块置于匀浆管中,加入匀浆珠,加入裂解液(使用前数分钟内加入蛋白酶抑制剂),匀浆;放置于冰上裂解液(30 min),震荡(5 min/次直至组织完全裂解);12 000 r/min,4℃,离心10 min,收集上清,加入Loading Buffer,水浴加热15 min,蛋白定量后制胶、上样、电泳、转膜,置脱色摇床上,室温下封闭30 min,加入特异性NIX(1:1000)、FUNDC1(1:1000)、LC3 I(1:1000)、LC3 II(1:1000)一抗,4℃孵育摇床过夜,孵育一抗之后继续孵育二抗(1:5000),室温下孵育30 min, TBST充分清洗后,进行显影,完成后用ImageJ软件分析条带灰度值(3次独立重复),并用GAPDH校正相对表达量。

1.3.3.4 免疫荧光法检测海马区NIX、FUNDC1、LC3表达的变化 每组随机选取3只大鼠麻醉后,快速获取海马组织,进行石蜡切片处理,切片适度干燥后进行蛋白酶K(原液:PBS=1:19)修复、0.1% Triton透膜处理、BSA封闭、加一抗(湿盒4℃过夜孵育)、加二抗(PBS漂洗3次,5 min/次,滴加与一抗匹配的二抗避光室温下孵育50 min)、DAPI复染细胞核(PBS漂洗3次,5 min/次,滴加DAPI染液,避光室温下孵育10 min)、封片(PBS漂洗3次,5 min/次,抗荧光淬灭封片剂封片)、镜检拍照,拍照倍数为400倍。

1.3.3.5 透射电镜观察海马区线粒体形态和结构 每组随机选取3只大鼠麻醉后,快速分离海马组织,切取 1 mm^3 组织若干块,固定到2.5%戊二醛中(24 h)、PBS缓冲液漂洗6 h、入1%锇酸后固定(2 h)、脱水(30%乙醇10 min,50%乙醇10 min,70%乙醇醋酸铀3 h,80%乙醇10 min,95%乙醇15 min,100%乙醇两次50 min,环氧丙烷置换30 min)、浸透(环氧丙烷:环氧树脂以1:1比例渗透2 h,纯环氧树脂浸透3 h)、包埋固化(纯环氧树脂包埋,45 °C烤箱初步固化12 h,72 °C烤箱24 h)、切片、电子染色(铅染色)、拍照。

1.3.4 统计学分析 采用Graph pad Prism10.1软件进行统计分析,实验数据均以均数 \pm 标准差表示,组间比较采用 t 检验。多组比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况

NG组大鼠精神状态良好,进食、进水及活动均正常,体质量增长较快。其余各组大鼠在造模1周后出现精神萎靡,进食、进水和活动减少,部分毛发脱落。造模第2周部分大鼠开始出现消瘦,进食和活动明显减少。给药后,治疗各组大鼠精神状态较前有所好转,活动增多,进食、进水量明显增加,体质量逐渐增长。给药6周后,除MG组外的各组大鼠体质量均有不同程度增加。

2.2 学习记忆能力测试

2.2.1 巴恩斯迷宫实验 与NG组相比,MG组训练第1、2、3、4天目标洞潜伏期时间明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),治疗各组训练第3、4天目标洞潜伏期时间明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与MG组比较,TCM+PCA组第4天目标洞潜伏期时间明显降低($P<0.05$),治疗各组在训练期的平均潜伏期无明显差异($P>0.05$,表1)。与MG组比较,NG组和治疗各组测试期目标洞潜伏期时间均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),治疗各组间无明显差异($P>0.05$),TCM+PCA组较NG组无明显差异($P>0.05$,表2)。

表1 各组大鼠巴恩斯迷宫实验训练期的目标洞潜伏期时间比较

Tab.1 Comparison of the target hole latency time in the Barnes maze experiment during the training period among the groups (Mean \pm SD, n=8)

Group	1 day	2 days	3 days	4 days
NG	203.12 \pm 26.11	157.55 \pm 30.61	79.14 \pm 17.49	50.01 \pm 15.38
MG	230.58 \pm 21.85 ¹⁾	204.83 \pm 38.17 ²⁾	142.24 \pm 15.02 ²⁾	134.99 \pm 32.44 ²⁾
TCM	215.44 \pm 16.70	190.55 \pm 29.41	124.26 \pm 28.70 ²⁾	117.23 \pm 14.60 ²⁾
PCA	212.14 \pm 16.81	187.89 \pm 25.33	125.87 \pm 30.75 ²⁾	120.49 \pm 15.22 ²⁾
TCM+PCA	209.21 \pm 10.49	186.68 \pm 19.86	117.89 \pm 26.67 ¹⁾	106.59 \pm 12.45 ²⁾³⁾

NG: Normal control group; MG: Model group; TCM: *Qingre Lidan Jiedu* Recipe treatment group; PCA: Penicillamine treatment group; TCM+PCA: Combined treatment group. ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ vs NG group; ³⁾ $P<0.05$ vs MG group.

表2 各组大鼠巴恩斯迷宫实验测试期的目标洞潜伏期时间比较

Tab.2 Comparison of target hole latency time during the test period of the Barnes maze experiment among the groups (Mean \pm SD, n=8)

Group	5 days (Short-term memory)	12 days (Long-term memory)
NG	16.02 \pm 5.54	17.88 \pm 10.21
MG	49.08 \pm 13.54 ²⁾	50.32 \pm 23.64 ²⁾
TCM	32.99 \pm 10.91 ¹⁾³⁾	31.26 \pm 19.93 ⁴⁾
PCA	35.51 \pm 11.99 ²⁾	33.11 \pm 20.10 ¹⁾⁴⁾
TCM+PCA	29.21 \pm 10.25 ⁴⁾	28.55 \pm 18.92 ⁴⁾

¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ vs NG group; ³⁾ $P<0.05$, ⁴⁾ $P<0.01$ vs MG group.

2.2.2 避暗实验 与MG组相比,NG组、治疗各组大鼠的进入暗室的潜伏期延长($P<0.01$),错误次数减少($P<0.01$)。治疗各组间平均潜伏期无明显差异($P>0.05$),TCM+PCA组较TCM组、PCA组平均错误次数减少($P<0.01$),平均潜伏期及错误次数较NG组无明显差异($P>0.05$,表3)。

2.3 各组大鼠海马区NIX、FUNDC1、LC3I、LC3II的western blotting检测对比

与MG组相比,NG组及治疗各组大鼠海马区NIX、FUNDC1的表达水平增高($P<0.01$),表达条带明显变宽且颜色变深,LC3 I、LC3 II的表达水平明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),表达条带明显变细且颜色变浅;TCM+

表3 各组大鼠避暗实验潜伏期及错误次数比较
Tab.3 Comparison of latency and error counts in dark avoidance test among the groups (Mean±SD, n=8)

Group	Latency (s)	Error count
NG	189.02±58.94	1.75±1.40
MG	64.07±40.38 ²⁾	7.75±1.04 ²⁾
TCM	155.22±40.82 ⁴⁾	4.75±1.28 ²⁾⁴⁾⁶⁾
PCA	152.01±48.44 ⁴⁾	5.00±1.69 ²⁾⁴⁾⁶⁾
TCM+PCA	179.73±38.11 ⁴⁾	2.13±1.96 ⁴⁾

²⁾P<0.01 vs NG group; ⁴⁾P<0.01 vs MG group; ⁶⁾P<0.01 vs TCM+PCA group.

PCA组较TCM组、PCA组NIX、FUNDCl的表达水平明显增高(P<0.05),表达条带明显变宽且颜色变深,LC3 I的表达水平明显减少(P<0.01),各治疗组间LC3 II的表达水平无明显差异(P>0.05)。TCM+PCA组与NG组,TCM组与PCA组蛋白表达水平均无明显差异(P>0.05,表4、图1)。

2.4 各组大鼠海马区NIX、FUNDCl、LC3的免疫荧光检测对比

免疫荧光染色可见,MG组较NG组大鼠海马区NIX、FUNDCl蛋白总荧光强度减弱(P<0.01),LC3

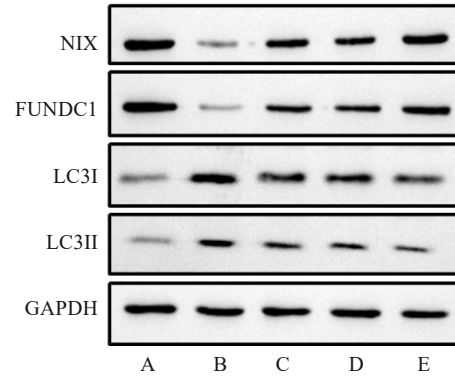


图1 清热利胆解毒方对各组大鼠海马区NIX、FUNDCl、LC3I、LC3II蛋白表达的影响

Fig.1 Effect of Qingre Lidan Jiedu Recipe on protein expression of NIX, FUNDCl, LC3I, and LC3II in the hippocampus of the rats in each group. A: NG group; B: MG group; C: TCM group; D: PCA group; E: TCM+PCA group.

蛋白总荧光强度增强(P<0.01)。TCM+PCA组较MG组大鼠海马区NIX、FUNDCl蛋白总荧光强度增强(P<0.01),LC3蛋白总荧光强度减弱(P<0.01)。TCM组较PCA组各蛋白总荧光强度无明显差异(P>0.05,图2、表5)。

表4 各组大鼠海马区NIX、FUNDCl、LC3I、LC3II蛋白的相对表达量对比

Tab.4 Comparison of relative expression levels of NIX, FUNDCl, LC3I, and LC3II proteins in the hippocampus among the groups (Mean±SD, n=3)

Group	NIX	FUNDCl	LC3I	LC3II
NG	0.99±0.12	1.07±0.15	0.32±0.05	0.36±0.08
MG	0.28±0.05 ²⁾	0.26±0.10 ²⁾	0.91±0.05 ²⁾	0.95±0.05 ²⁾
TCM	0.62±0.06 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.59±0.05 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.67±0.06 ²⁾⁴⁾⁶⁾	0.66±0.13 ²⁾⁴⁾
PCA	0.58±0.04 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.59±0.03 ²⁾⁴⁾⁵⁾	0.66±0.11 ²⁾³⁾⁶⁾	0.65±0.10 ²⁾⁴⁾
TCM+PCA	0.81±0.08 ⁴⁾	0.80±0.07 ¹⁾⁴⁾	0.44±0.04 ⁴⁾	0.47±0.05 ⁴⁾

¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01 vs NG group; ³⁾P<0.05, ⁴⁾P<0.01 vs MG group; ⁵⁾P<0.05, ⁶⁾P<0.01 vs TCM+PCA group.

2.5 各组大鼠海马区线粒体形态与结构透射电镜结果对比

通过透射电镜观察显示,NG组大鼠海马线粒体形态正常,大多数呈规则圆形、椭圆形,嵴排列整齐,形态规整,基质均匀,膜完整,边界清晰;MG组线粒体形态严重受损,普遍出现肿胀和扭曲,嵴断裂、排列紊乱或完全溶解,基质混浊不均,部分线粒体外膜破裂,边界不清晰,经过西药及中药干预后,线粒体形态及嵴、膜损伤在一定程度上得到缓解,各结构较完整,边界相对清晰,其中TCM+PCA组线粒体改善最佳,各结构清晰度高,边界相对清晰,结构接近正常(图3)。

3 讨论

线粒体是WD导致的铜过量沉积的初始靶位,产生

的过量活性氧会持续破坏细胞内氧化应激防御机制^[8],同时,铜沉积可直接引起线粒体损伤,造成其功能障碍,诱发线粒体通透性改变、线粒体动力学变化、线粒体DNA突变等,参与认知功能障碍的发生^[9]。本研究行为学结果显示MG组大鼠较NG组目标洞潜伏期时间明显升高,进入暗室的潜伏期显著缩短、错误次数显著增加,提示铜负荷可导致大鼠记忆、学习能力下降。经清热利胆解毒方干预后,TCM组大鼠认知功能得到显著改善,TCM+PCA组效果最佳。透射电镜可见,MG组大鼠海马线粒体出现严重肿胀、变形,嵴紊乱、扭曲、受损,基质混浊等病理改变。给予用药干预后,线粒体形态在不同程度上得到改善,嵴和膜损伤减轻,较MG组结构更完整、清晰,其中TCM+PCA组线粒体形态改善、结构修复最为显著,可见线粒体正常形态、功能的维持,

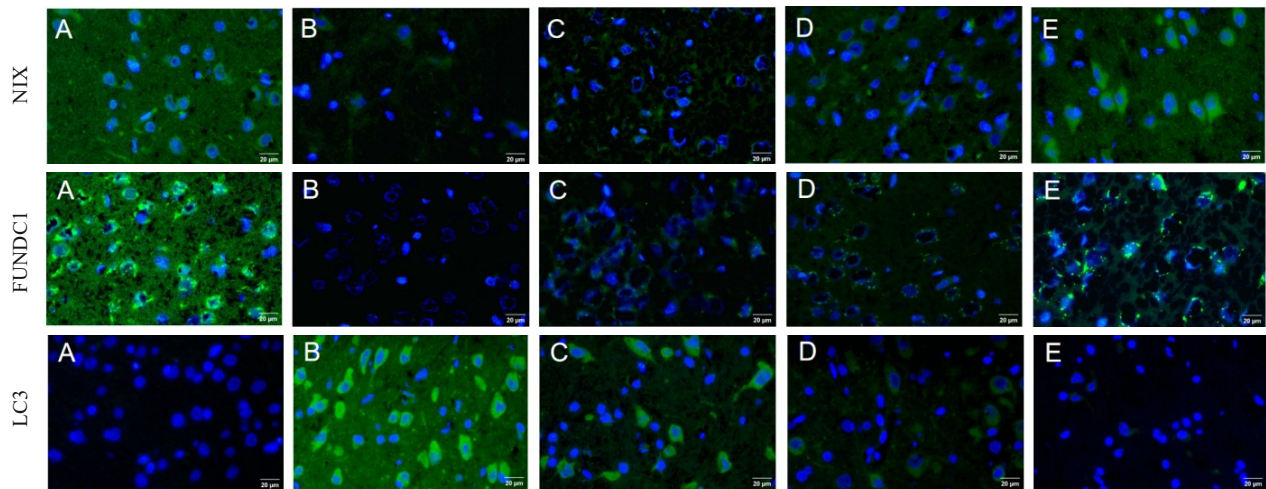


图2 清热利胆解毒方对各组大鼠海马区NIX、FUNDC1、LC3荧光强度的影响

Fig.2 Effects of *Qingre Lidan Jiedu* Recipe on the fluorescence intensities of NIX, FUNDC1 and LC3 in the hippocampus of the rats in each group (scale bar=20 μm). A: NG group; B: MG group; C: TCM group; D: PCA group; E: TCM+PCA group.

表5 各组大鼠海马区NIX、FUNDC1、LC3的总荧光强度对比

Tab.5 Total fluorescence intensities of NIX, FUNDC1, and LC3 in the hippocampus of the rats in each group (Mean±SD, n=3)

Group	NIX($\times 10^7$)	FUNDC1 ($\times 10^7$)	LC3($\times 10^7$)
NG	16.35±0.24	14.44±1.79	1.80±0.42
MG	3.24±0.78 ²⁾	1.17±0.12 ²⁾	19.42±3.14 ²⁾
TCM	4.27±1.11 ²⁾⁶⁾	3.32±0.39 ²⁾⁵⁾	8.14±1.85 ²⁾⁴⁾⁶⁾
PCA	4.75±1.41 ²⁾⁶⁾	3.27±1.68 ²⁾⁵⁾	5.20±0.95 ⁴⁾
TCM+PCA	8.34±0.67 ²⁾⁴⁾	6.26±0.62 ⁴⁾	1.37±0.11 ⁴⁾

²⁾ $P < 0.01$ vs NG group; ⁴⁾ $P < 0.01$ vs MG group; ⁵⁾ $P < 0.05$; ⁶⁾ $P < 0.01$ vs TCM+PCA group.

对改善认知功能障碍有积极意义。

线粒体自噬功能的维持对于线粒体的保护意义重大^[10],对于铜诱导的神经元细胞损伤,调节线粒体自噬,维持线粒体正常功能,可能是治疗铜沉积导致的认知功能障碍的新靶点,线粒体自噬功能的维持依赖于多种线粒体自噬受体蛋白^[11],主要包括Nip3样蛋白X(NIX)和FUN14结构域蛋白1(FUNDC1)等。WB及免疫荧光结果进一步显示,清热利胆解毒方可显著增强NIX和FUNDC1表达,并降低微管相关蛋白1轻链3(LC3)水平,LC3是自噬溶酶体膜上的重要标志^[12],需结合线粒体损伤程度及线粒体自噬过程中关键蛋白的表达水平来评估线粒体自噬的程度和活性。NIX通过与LC3相互识别介导自噬体对受损线粒体的高度选择性吞噬^[13],NIX表达升高伴随着线粒体膜电位的快速下降,进而促进线粒体分裂,并通过自噬途径清除损伤线粒体^[14]。FUNDC1作为一种线粒体外膜蛋白,同样通过与LC3结合,在缺氧条件下诱导线粒体自噬^[15,16],在线粒体膜电位降低时,FUNDC1的第18位苏氨酸和第13位丝氨酸发生去磷酸化,增强与LC3的相互作用,进一步推进线粒体自噬进程,FUNDC1蛋白持续表达时可诱导开启

线粒体自噬。当自噬活动修复时,LC3被大量消耗,LC3累积降低则表现为表达减少。

研究结果表明清热利胆解毒方可以改善高铜负荷WD模型大鼠的神经行为学障碍,高铜可能通过诱导线粒体氧化应激,下调自噬相关蛋白NIX、FUNDC1的表达,导致神经细胞线粒体自噬缺陷,衰老的细胞无法清除,影响神经细胞正常功能,而清热利胆解毒方可上调线粒体自噬相关蛋白NIX、FUNDC1的表达,促进线粒体自噬的发生,消除凋亡细胞^[17,18],维持线粒体正常功能,从而阻断高铜诱导的神经元损伤,达到保护神经、改善认知功能障碍的作用。

依据不同的临床表现,WD被中医归属于“颤病”“痉病”“肝风”“痴呆”“黄疸”等范畴^[19]。中医认为先天不足,肾精亏损是该病发病基础^[20],而铜邪蓄积,聚而成毒为发病之关键。WD患者虽在极早期表现为虚象,但往往随病程进展可转变为本虚标实或虚实夹杂之象^[21],以肝胆湿热、铜毒内蕴多见。铜毒为阳邪,其性上炎,沿足厥阴肝经上至颠顶,致使“铜毒”内蕴于脑。故“铜毒内聚、肝胆湿热内蕴”为本病的主要病机^[22],宜采取清热解毒、疏肝利胆之法。依据此病机组建清热利胆解毒

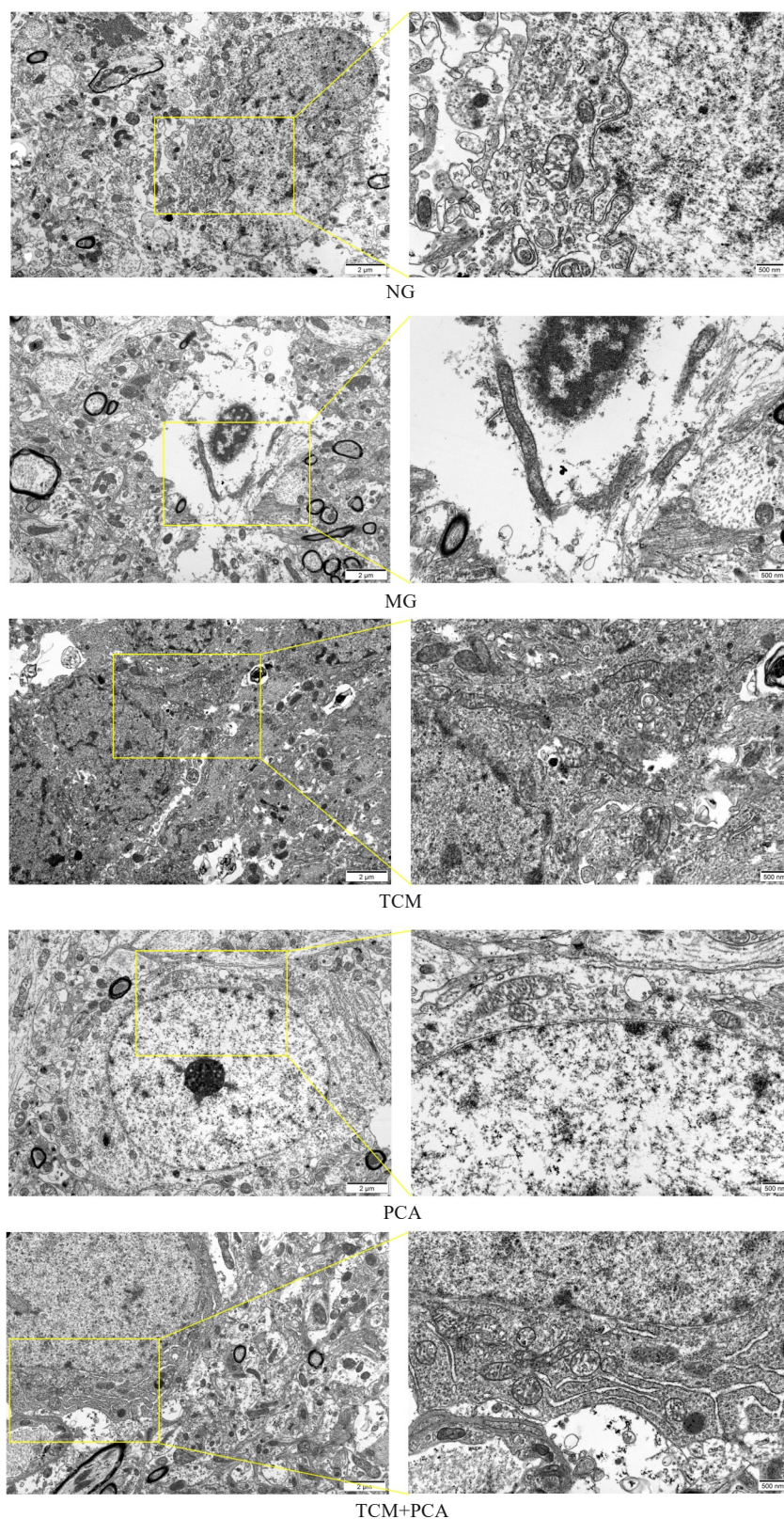


图3 清热利胆解毒方对各组大鼠海马区线粒体形态影响
 Fig.3 Effect of *Qingre Lidan Jiedu* Recipe on mitochondrial morphology in the hippocampus of the rats in each group (scale bar=2 μm/500 nm).

方,可明显改善WD患者的认知障碍^[23]。方中大黄含有大黄酚及大黄素,可缓解过度氧化应激,发挥神经保护作用^[24];黄连可增加排铜量^[25],黄连所含的小檗碱可逆转细胞凋亡,保护神经系统^[26];姜黄中的姜黄素可调节

突触可塑性,减弱神经炎症,保护神经元细胞^[27];金钱草的总黄酮提取物及多糖具有抗氧化活性和抗炎作用,并可改善胆汁代谢,促进铜经胆汁排泄^[28];三七中的三七总皂苷可增加海马神经元突触可塑性^[29]。诸药共同作

用可增加细胞内锌含量,竞争性抑制铜在胃肠道的吸收、促进排铜,发挥脑保护作用。

综上所述,本研究发现高铜负荷WD模型大鼠存在认知功能障碍,而清热利胆解毒方可以上调线粒体自噬相关蛋白的表达,改善高铜负荷WD模型大鼠的认知功能障碍,提示调节线粒体自噬可能是治疗高铜负荷WD模型大鼠认知功能障碍的潜在靶点,在依据WD中医病因病机进行组方的同时,可以利用现代医学的研究成果,从线粒体保护角度选取相关药物来进行组方的合理调整,从而对WD患者的认知功能障碍发挥更好的改善作用。本研究也存在一些局限性,如清热利胆解毒方中发挥神经保护作用的主要药物及主要成分尚未明确,在今后的研究中会采取更先进的研究手段明确发挥神经保护作用的具体机制。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Lucena-Valera A, Ruz-Zafra P, Ampuero J. Wilson's disease: overview [J]. *Med Clínica Engl Ed*, 2023, 160(6): 261-7.
- [2] 裴培,张静,陈怀珍,等.肝豆状核变性新型生物标志物相对可交换铜及认知功能与中医证型的相关性研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 2024, 31(9): 1630-5.
- [3] 董婷,杨文明,张娟,等.肝豆灵对Wilson病患者前瞻性记忆功能的影响[J]. *安徽中医药大学学报*, 2018, 37(1): 13-6.
- [4] 刘康文,方向,金珊,等.清热利胆解毒方对铜负荷大鼠学习记忆功能及海马区突触相关蛋白的影响[J]. *时珍国医国药*, 2022, 33(6): 1339-41.
- [5] 方向,金珊,鲍远程,等.清热利胆解毒方对铜负荷大鼠学习记忆及海马超微结构的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(7): 2564-6.
- [6] 秦雨.基于Nrf2/Ho-1/线粒体轴的清热利胆解毒方维持海马线粒体稳态改善Wilson病认知障碍的机制研究[D]. *安徽中医药大学*, 2024.
- [7] Xu JJ, Jiang HZ, Li JQ, et al. 1H NMR-based metabolomics investigation of copper-laden rat: a model of Wilson's disease [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0119654.
- [8] 孙正哲,方向,金珊,等.基于突触相关蛋白探讨清热利胆解毒方干预高铜诱导大鼠抑郁样行为的作用机制[J]. *四川中医*, 2023, 41(8): 65-70.
- [9] 涂静怡,王世成,申长庆,等.线粒体功能障碍对认知的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(5): 1054-63.
- [10] Gao F, Yang J, Wang DD, et al. Mitophagy in Parkinson's disease: pathogenic and therapeutic implications [J]. *Front Neurol*, 2017, 8: 527.
- [11] 马穰桂,夏志,尚画雨.线粒体自噬相关受体蛋白研究进展[J]. *生理学报*, 2021, 73(6): 1025-34.
- [12] 范昕怡,魏小棋,柴王静,等.基于PINK1-Parkin通路探讨鸡鸣散改善线粒体自噬治疗心肌梗死的效应机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(12): 3346-55.
- [13] Marinković M, Šprung M, Novak I. Dimerization of mitophagy receptor BNIP3L/NIX is essential for recruitment of autophagic machinery [J]. *Autophagy*, 2021, 17(5): 1232-43.
- [14] 张泰铭. FUNDC1通过促进线粒体自噬调控缺氧状态下帕金森病的作用及机制研究[D]. *沈阳: 中国医科大学*, 2023.
- [15] 唐嘉麟,王一帆,邓晓桦,等. FUNDC1介导的线粒体自噬在肥胖性心脏病中信号通路的研究进展[J]. *中国心血管杂志*, 2024, 29(5): 475-80.
- [16] Li SQ, Zhou Y, Gu XC, et al. NLRX1/FUNDC1/NIPSNAP1-2 axis regulates mitophagy and alleviates intestinal ischaemia/reperfusion injury [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(3): e12986.
- [17] Kato M, Ospelt C, Gay RE, et al. Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(1): 40-8.
- [18] 夏冉,朱国旗,高兵,等.盐酸阿霉素通过DRP1/FUNDC1信号通路调节线粒体动力学诱导大鼠慢性心力衰竭[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(11): 1661-6.
- [19] 孙泰,陆雅春,宁芬,等.肝豆状核变性的中医证型特点及其肝肾功能、氧化应激指标的变化情况[J]. *环球中医药*, 2021, 14(9): 1701-4.
- [20] 钱南南,魏涛华,杨文明,等.中医治疗肝豆状核变性用药规律数据挖掘研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2021, 28(10): 29-36.
- [21] 饶志红,杨文明,杨玉龙,等.肝豆状核变性“肝-肾-脑”轴病机阐释及中医辨证策略[J/OL]. *北京中医药大学学报*, 2025, [Epub ahead of print]..
- [22] 方向,金珊,鲍远程,等.清热利胆解毒方中药对铜负荷大鼠学习记忆和海马区ERK表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(2): 292-4.
- [23] 傅亚瑜.基于Ghrelin相关信号通路的清热利胆解毒方对Wilson病认知障碍的干预机制研究[D]. *合肥: 安徽中医药大学*, 2021.
- [24] Semwal RB, Semwal DK, Combrinck S, et al. Emodin - A natural anthraquinone derivative with diverse pharmacological activities [J]. *Phytochemistry*, 2021, 190: 112854.
- [25] 张红博.大黄肝豆汤联合青霉胺治疗肝豆状核变性的疗效观察[J]. *国际中医中药杂志*, 2007, 29(3): 141-3.
- [26] 陈书煌,杜伟,邓静媛,等.小檗碱通过PI3K/AKT信号通路对体外膀胱癌细胞的增殖、侵袭、凋亡及细胞周期的作用机制[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(19): 4802-6.
- [27] 谭俊,张晶晶,张海峰.姜黄素调控ATP/P2X4/NLRP3/Caspase-1信号通路改善脑出血小鼠神经功能[J]. *解剖科学进展*, 2024, 30(6): 599-602.
- [28] Ryu G, Ma CJ. Neuroprotective activity of methanolic extract of *Lysimachia christinae* against glutamate toxicity in HT22 cell and its protective mechanisms [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 5352034.
- [29] 王汉隆,孙洋,刘莎莎,等.三七皂苷R1药理作用机制与神经保护作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(11): 2020-5.

(编辑: 经媛)