

• 研究论文 •

基于 PINK1 RNAi 果蝇模型探讨黄芩素对遗传性帕金森病的作用机制

郝生慧¹, 贾若凡¹, 王娇蕊¹, 高丽¹, 秦雪梅¹, 杜冠华^{1,2*}, 张建琴^{1*}

(1. 山西大学中医药现代研究中心, 山西太原 030006; 2. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 本研究旨在探讨黄芩素对基因突变导致的遗传性帕金森果蝇模型的作用, 初步阐释黄芩素延缓遗传性帕金森病的作用机制。采用磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)-RNAi 帕金森果蝇为模型组, 野生型果蝇 w^{1118} 为对照组, 给予模型组不同剂量的黄芩素与阳性药美多芭, 观察其对 PINK1-RNAi 帕金森果蝇寿命、运动能力、异翅率、多巴胺含量及多巴胺能神经元的影响, 并观察其对腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP)、线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量等线粒体功能障碍的影响。结果表明, 黄芩素的有效给药剂量为低浓度 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、中浓度 $1.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、高浓度 $3.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阳性药美多芭最佳给药剂量为 $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。黄芩素和美多芭均能够显著提高 PINK1-RNAi 雄果蝇的寿命、运动能力和降低翅膀异常率 ($P < 0.05$), 且低剂量黄芩素效果最佳; 黄芩素可改善多巴胺能神经元的丢失, 且低、高剂量效果最佳, 但美多芭无显著影响; 黄芩素和美多芭均对多巴胺含量无显著影响 ($P > 0.05$)。黄芩素和美多芭均能够提高 PINK1-RNAi 雄果蝇的 ATP 含量 ($P < 0.05$), 且低剂量黄芩素效果最佳; 中剂量黄芩素能够显著提高 PINK1-RNAi 雄果蝇的 mtDNA 含量 ($P < 0.05$), 但美多芭无显著影响; 黄芩素和美多芭均对 ROS 含量无显著影响 ($P > 0.05$)。

关键词: 黄芩素; 遗传性帕金森病; 果蝇; 磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1; 线粒体功能障碍

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)03-0672-07

Exploring the mechanism of anti-hereditary Parkinson's disease of baicalein based on PINK1 RNAi *Drosophila* model

HAO Sheng-hui¹, JIA Ruo-fan¹, WANG Jiao-rui¹, GAO Li¹, QIN Xue-mei¹,
DU Guan-hua^{1,2*}, ZHANG Jian-qin^{1*}

(1. Modern Research Center of Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: The aim of this study was to investigate the effect of baicalein on a *Drosophila* model of hereditary Parkinson's disease caused by gene mutations and to preliminarily elucidate the mechanism of baicalein in delaying hereditary Parkinson's disease. In this paper, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)-RNAi Parkinson's *Drosophila* were used as the model group and wild-type *Drosophila w¹¹¹⁸* were used as the control group. Different doses of baicalein and Madopa were administered to the model group to observe their effects on the life span, motor ability, the abnormal rate of wings, dopamine content and dopaminergic neurons of PINK1-RNAi

收稿日期: 2022-08-02; 修回日期: 2022-10-05.

基金项目: 2021 年省筹资金资助回国留学人员项目 (2021-019); 山西省面上青年基金项目 (201801D221374).

*通讯作者 Tel: 13073591179, E-mail: jiangqinzh3@sxu.edu.cn;

Tel: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0949

Parkinson's *Drosophila* and their effects on mitochondrial dysfunction including adenosine triphosphate (ATP), mitochondrial DNA (mtDNA) and reactive oxygen species (ROS) content. The results showed that the effective administration doses of baicalein were $0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for low concentration, $1.6 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for medium concentration and $3.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ for high concentration, and the optimal administration dose of the positive drug Madopa was $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Baicalein and Madopa could significantly improve the life span, exercise ability and reduce the abnormal rate of wings of PINK1-RNAi male *Drosophila* ($P < 0.05$), and low dose baicalein showed the best effect; baicalein could improve the loss of dopaminergic neurons, and the effects of low dose and high dose were the best, but Madopa showed no significant effect; baicalein and Madopa had no significant effect on dopamine content ($P > 0.05$). Baicalein and Madopa could increase the ATP content of PINK1-RNAi male *Drosophila* ($P < 0.05$), and low dose baicalein showed the best effect; middle dose baicalein could significantly increase the mtDNA content of PINK1-RNAi male *Drosophila* ($P < 0.05$), but Madopa had no significant effect; baicalein and Madopa had no significant effect on ROS content ($P > 0.05$).

Key words: baicalein; hereditary Parkinson's disease; *Drosophila melanogaster*; PTEN-induced putative kinase 1; mitochondrial dysfunction

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是人类第二大常见神经退行性疾病。临床上主要表现为震颤、步姿异常等运动障碍, 以及睡眠质量下降、嗅觉功能紊乱等非运动障碍^[1]。PD的典型病理特征是黑质致密部变性和路易体中 α -突触核蛋白(α -synuclein, α -syn)的积累^[2]。基因、环境/生活方式和人口老龄化是导致帕金森病的主要因素^[3], 但其发病机制尚不明确。已有研究发现与帕金森病相关的致病蛋白有十几种, 而应用最多、研究最广的有 α -突触核蛋白、磷酸酶及张力蛋白同源物诱导的蛋白激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)、Parkin、富亮氨酸重复激酶 2 (leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)、DJ-1 等^[4], 其中 PINK1 是 PD 的第二大诱因^[5]。PINK1 基因缺乏可导致线粒体自噬异常, 进而引起线粒体功能异常^[6]。线粒体异常是神经退行性疾病重要的病理机制, 且线粒体已被作为潜在的治疗靶点^[7]。利用这些基因构建的转基因遗传学模型为 PD 发病机制的研究提供了较为优良的模型。黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是研究神经退行性疾病分子机制的一种有价值的昆虫模型^[8]。Mhc>PINK1-RNAi (PINK1-RNAi) 转基因 PD 果蝇模型可表现出典型的 PD 特征, 包括能量消耗、选择性间接飞行肌肉异常和多巴胺能神经元变性^[9]。该遗传学模型常被用于探讨 PD 的发病机制或用于抗 PD 药物的筛选。

最初用于治疗帕金森病的药物是抗胆碱能药物, 如苯海索 (Artane, trihexy: 1949年) 和苯托品 (Cogentin: 1954年) 等, 这些药物的治疗机制尚不完全清楚。之后, 随着多巴胺 (dopamine, DA) 在 PD 疾病病理作用的深入研究, 开发出直接或间接影响多巴胺的药物, 如左旋多巴 (levodopa) 和美多芭 (Madopa)^[10]。目前市场上抗 PD 药物左旋多巴、盐酸金刚烷胺片等均可明显增

加多巴胺含量, 从而改善患者症状, 提高生活质量和生存率, 然而持续、大剂量的服用该类药物可引起许多并发症, 且疗效减退^[11]。因此, 开发新药并阐明其作用机制尤为重要。

黄芩素 (baicalein) 是唇形科 (Lamiaceae) 黄芩 (*Scutellaria baicalensis Georgi*) 的干燥根中所提取的黄酮类化合物。研究表明, 黄芩素具有一系列关键药理特性, 如抗衰老、减少氧化应激、抗炎、抑菌特性, 抑制兴奋性毒性, 抑制 α -突触核蛋白的聚集, 刺激神经发生和分化作用, 以及抗细胞凋亡作用^[12-14], 以上药理特性显示黄芩素具有治疗帕金森病的潜力。本课题组采用 6-羟基多巴胺 (6-hydroxydopamine, 6-OHDA)、鱼藤酮、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导建立 PD 模型, 发现黄芩素具有抗 PD 作用, 且黄芩素主要通过抑制氧化应激和 α -syn 形成, 维持线粒体功能, 减轻炎症反应以及调控核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 cAMP 反应元件结合蛋白/糖原合成酶激酶-3 β /过氧化物酶体增殖受体 γ 辅激活因子 α (cAMP responsive element binding protein/glycogen synthase kinase-3 β /peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator alpha, CREB/GSK-3 β /PGC-1 α) 等信号通路发挥神经保护作用。由黄芩素制成的治疗 PD 创新药百可利咀嚼片已完成 I 期临床人体耐受性及药代动力学研究。因此, 本课题组提出黄芩素可能对基因突变导致的帕金森疾病具有一定的缓解作用。为阐释上述问题, 本文以 PINK1-RNAi 遗传性 PD 果蝇为模型, 研究黄芩素对基因突变导致的遗传性帕金森病的作用, 并探讨黄芩素对 PINK1-RNAi 遗传性 PD 果蝇线粒体功能的影响。

材料与方法

实验动物 w^{1118} 黑腹果蝇 (山西大学中医药现代研究中心实验室种群), Mhc-GAL4 (BS55133) 和 UAS-PINK1/TM3 (BS31262) 均购买于 Bloomington Stock Center。

仪器与主要试剂 Infinite M200 Pro 多功能酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); CFX Connect Real Time PCR 仪 (Bio-Rad 公司); LSM-880 激光扫描共聚焦显微镜 (蔡司公司); 小鼠多巴胺酶联 ELISA 试剂盒 (Bioswamp 公司); 黄芩素 (南京景竹生物科技有限公司; 批号: JZ20110510; 纯度: 99.04%); 美多芭 (上海罗氏制药公司); 抗酪氨酸羟化酶 (tyrosine hydroxylase, TH) 小鼠抗体 (#22941, ImmunoStar 公司); Cy3 偶联的二抗 (#BA1031, Boster 公司); ATP 试剂盒、活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS) 含量测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 血液/细胞/组织 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司)。

果蝇的杂交 将 UAS-PINK1^{B9}RNAi 处女蝇和 MHC-GAL4/TM3 雄性果蝇杂交, 收集子一代果蝇, 即为 PINK1-RNAi PD 果蝇模型。

果蝇寿命实验 收集 3 天内羽化的 PINK1-RNAi 雄果蝇, 将收集的果蝇随机分组, 即: PINK1-RNAi 组、黄芩素给药组 (给药浓度为: 0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹) 和美多芭阳性药组 (0.05、0.1、0.25、0.5、1 μg·mL⁻¹), 连续给药, 每天记录果蝇死亡数量, 直至果蝇全部死亡, 绘制寿命曲线, 确定黄芩素和美多芭有效给药浓度。

药物治疗 根据寿命实验结果, 设置实验分组如下: 空白对照组 (w^{1118} 组)、模型组 (PINK1-RNAi 组)、黄芩素给药组 (给药浓度分别为: 低浓度 0.8 mg·mL⁻¹、中浓度 1.6 mg·mL⁻¹、高浓度 3.2 mg·mL⁻¹)、美多芭阳性药组 (给药浓度: 0.1 μg·mL⁻¹), 将 w^{1118} 雄果蝇和 PINK1-RNAi 雄果蝇培养至 45 天用于以下实验。

爬行实验 从每组中随机选择 20 只果蝇, 置于垂直的塑料柱中 20 min 以适应环境, 之后, 将果蝇移至柱底部。记录在 10 s 内可以爬升或超过 4 cm 的果蝇数量, 结果以占果蝇总数的百分比表示。上述实验独立重复 3 次, 并进行统计学分析^[15]。

表型观察 各组随机挑选 100 只果蝇, 每 10 只果蝇置于 1 个果蝇培养管。CO₂ 气体麻醉后, 在体式显微镜下观察果蝇翅膀形态, 若果蝇翅膀重叠完好则为正常形态; 若果蝇翅膀竖立则为异常形态^[16], 记录其异常翅膀果蝇数, 异翅率=异翅果蝇数/果蝇总数×100%。重复实验 5 次。

PINK1 基因表达量 各组随机挑选 10 只果蝇, 用 Trizol 试剂提取总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA,

以 RP49 为内参基因, PINK1 为目的基因, 采用 RT-qPCR 技术检测基因的 mRNA 表达水平, 各基因引物序列: RP49F: GACAGTATCTGATGCCCAACA; RP49R: CTTCTTGGAGGAGACGCCGT; PINK1F: AATCCCAACCCGTCCAAGC; PINK1R: AAACACTGCGACCCACCTCC。实验设置 3 个生物学重复。

多巴胺含量测定 各组随机挑选 20 只果蝇, 加 180 μL 生理盐水, 研磨, 按照小鼠多巴胺酶联 ELISA 试剂盒说明书开展实验, 得到多巴胺组织液, 使用多功能酶标仪进行检测, 实验重复 3 次。

多巴胺能神经元测定 将果蝇置于 4% 多聚甲醛中固定 30 min, 在 PBS 缓冲液中将雄性果蝇大脑解剖。将收集的大脑在 4% 多聚甲醛中固定 1 h, 与 PTX (含 0.3% Triton X-100 的 PBS 缓冲液) 孵育 20 min, 并在室温下用山羊血清封闭约 1 h。然后在 4 °C 下用 TH 小鼠抗体 (1:100) 对果蝇脑进行免疫染色过夜, 之后与 Cy3 偶联的二抗 (1:200) 在 4 °C 下过夜。最后用共聚焦显微镜对前脑后外侧 1 (protocerebral posterior laterall 1, PPL1) 簇中的 DA 神经元进行成像^[17]。

果蝇 ATP 含量分析 各组随机挑选 20 只果蝇, 置于裂解液中, 冷冻匀浆机中匀浆, 按照 ATP 试剂盒说明书方法获得组织液, 酶标仪测定化学发光值。上述实验重复 3 次, 统计学分析实验结果。

果蝇 mtDNA 含量测定 每组收集 20 只果蝇, 用基因组 DNA 提取试剂盒提取果蝇 DNA。以 act79B 为内参基因, mtDNA 为目的基因, 采用 qRT-PCR 技术检测靶基因的 mtDNA 表达水平。各基因引物序列, mtDNAF: CAACCATTCATTCCAGCCTTC; mtDNAR: AAGTCTAACCTGCCACTGAAA; Act79BF: CCGTCTACCAGTCCATCATGAA; Act79BR: CATAGTTTTGATCCCATTCCCTC; 上述实验重复 3 次。

果蝇 ROS 含量分析 将收集的果蝇置于 PBS 缓冲液中, 匀浆, 离心 (4 °C、1 000 ×g, 10 min), 用 PBS 按 1:1 000 比例稀释 DCFH-DA 探针, 孵育 30 min 使探针与样品充分接触, 离心 (4 °C 5 000 ×g, 5 min), 用 PBS 清洗 3 次除掉多余的荧光染液, 悬浮于 PBS 中, 使用酶标仪测定 488 nm 激发波长、525 nm 发射波长的荧光强弱。上述实验重复 3 次。

统计学分析 本实验数据运用 WPS、GraphPad Prism 等软件进行处理。采用 *t* 检验比较各组之间的差异, 结果用平均值 ± 标准误 ($\bar{x} \pm SEM$) 表示。

结果

1 黄芩素能够延长 PINK1-RNAi PD 果蝇的寿命

对 PINK1-RNAi 组、黄芩素给药组 (给药浓度:

0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹、美多芭阳性药组 (给药浓度: 0.05、0.1、0.25、0.5、1 μg·mL⁻¹) 的所有果蝇生存率进行统计分析, 结果显示, 与PINK1-RNAi组相比, 0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹黄芩素给药组的寿命显著提高 ($P < 0.01$), 且中剂量 1.6 mg·mL⁻¹黄芩素效果最佳 (图 1A)。因此, 将黄芩素有效给药剂量设置为低剂量 0.8 mg·mL⁻¹、中剂量 1.6 mg·mL⁻¹、高剂量 3.2 mg·mL⁻¹。

与PINK1-RNAi组相比, 1 μg·mL⁻¹美多芭处理组果蝇的生存率显著降低 ($P < 0.01$), 可能是美多芭给药剂量太高从而产生毒性。0.5 μg·mL⁻¹美多芭处理组果蝇生存率无显著性差异 ($P > 0.05$), 0.25 和 0.1 μg·mL⁻¹美多芭处理组果蝇寿命均显著提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且 0.1 μg·mL⁻¹美多芭效果最佳, 0.05 μg·mL⁻¹美多芭处理组果蝇生存率无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1B)。因此, 将美多芭最佳给药剂量设置为 0.1 μg·mL⁻¹。

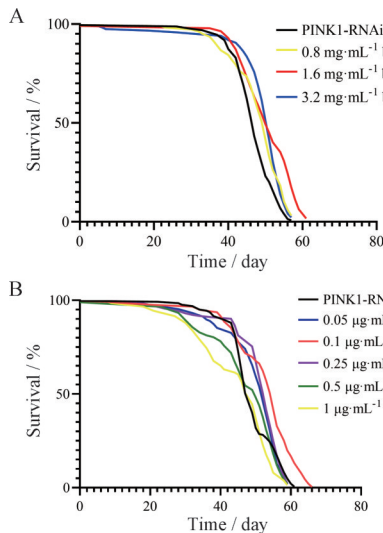


Figure 1 Effect of baicalein on the lifespan of PINK1-RNAi Parkinson's disease (PD) *Drosophila* model. A: Survival curve of PINK1-RNAi PD *Drosophila* model treated with baicalein (0.8, 1.6, 3.2 mg·mL⁻¹); B: Survival curve of PINK1-RNAi PD *Drosophila* model treated with Madopa (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 μg·mL⁻¹). $n = 5$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs PINK1-RNAi

2 黄芩素能够提高PINK1-RNAi PD果蝇的运动能力

果蝇的攀爬指标可以反映果蝇的运动能力。本研究分别对空白对照组 w^{1118} 、模型组PINK1-RNAi、模型给药组 (0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹黄芩素) 和阳性药组 (0.1 μg·mL⁻¹美多芭) 果蝇进行爬行指标统计学分析, 结果显示, 与对照组相比, 模型组果蝇的运动能力显著下降 19% ($P < 0.01$); 与模型组相比, 黄芩素低、中、高剂量组和阳性药组均显著提高PD果蝇的爬行指标, 分别提高了 44%、32%、22%、19% ($P < 0.01$)。低浓度 0.8 mg·mL⁻¹黄芩素效果最佳 (图 2A)。

3 黄芩素能够降低PINK1-RNAi PD果蝇的异翅率

异翅率反映果蝇运动能力的强弱。本研究分别对空白对照组 w^{1118} 、模型组PINK1-RNAi、模型给药组 (0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹黄芩素) 和阳性药组 (0.1 μg·mL⁻¹美多芭) 进行异翅率统计学分析, 结果显示, 与空白组相比, 模型组果蝇的异翅率可显著提高 73% ($P < 0.01$); 与模型组相比, 黄芩素高、中、低剂量组和阳性药美多芭组均可显著降低PD果蝇的翅膀异常情况, 分别降低了 70%、67%、66%、51% ($P < 0.01$)。低浓度 0.8 mg·mL⁻¹黄芩素效果最佳 (图 2B)。

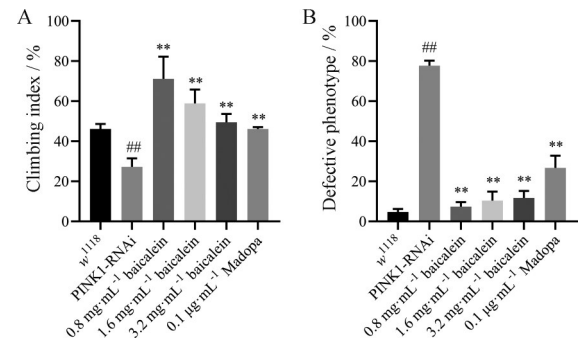


Figure 2 Effects of baicalein on motor ability (A) and the abnormal rate of wings (B) of PINK1-RNAi PD *Drosophila* model. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. ## $P < 0.01$ vs w^{1118} ; ** $P < 0.01$ vs PINK1-RNAi

4 黄芩素不能提高PINK1-RNAi PD果蝇DA含量

DA含量降低是模型组PINK1-RNAi PD果蝇的显著特征。本研究对空白对照组 w^{1118} 、模型组PINK1-RNAi、模型给药组 (0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹黄芩素)、阳性药组 (0.1 μg·mL⁻¹美多芭) 进行DA含量测定分析, 结果显示, 与空白对照组相比, 模型组果蝇DA含量显著降低 ($P < 0.01$), 表示造模成功; 与模型组相比, 黄芩素高、中、低剂量组和阳性药美多芭组果蝇DA含量均无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 3A)。

5 黄芩素能够预防PINK1-RNAi PD果蝇DA神经元的丢失

PD的主要病理特征之一是DA神经元变性。本研究对空白对照组 w^{1118} 、模型组PINK1-RNAi、模型给药组 (0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹黄芩素)、阳性药组 (0.1 μg·mL⁻¹美多芭) 果蝇的神经元进行共聚焦显微成像, 结果显示, 与模型组相比, 黄芩素高、中、低剂量组均能预防PD果蝇DA神经元的丢失, 但美多芭无影响 (图 3B)。

6 黄芩素可提高PINK1-RNAi PD果蝇ATP、mtDNA水平

ATP检测结果显示, 黄芩素 (0.8、1.6、3.2 mg·mL⁻¹) 和美多芭 (0.1 μg·mL⁻¹) 可增加ATP水平 ($P < 0.05$, 图 4A), 且低浓度 0.8 mg·mL⁻¹效果最佳, 优于阳性药美多

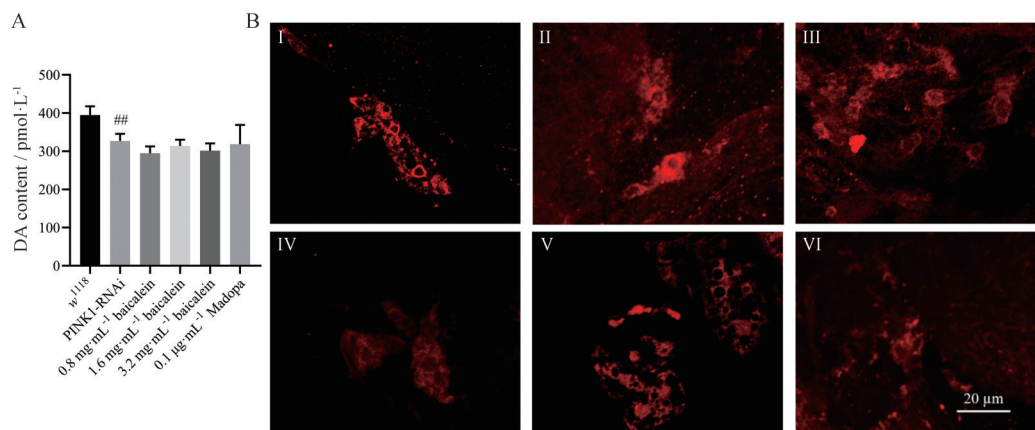


Figure 3 Effects of baicalein on dopamine (DA) content (A) and dopaminergic neurons (B) in the PINK1-RNAi PD *Drosophila* model. I: w¹¹¹⁸; II: PINK1-RNAi; III: 0.8 mg·mL⁻¹ baicalein; IV: 1.6 mg·mL⁻¹ baicalein; V: 3.2 mg·mL⁻¹ baicalein; VI: 0.1 μg·mL⁻¹ Madopa. n = 3, $\bar{x} \pm$ SEM. ^{##}P < 0.01 vs w¹¹¹⁸. Scale bar: 20 μm; magnification: 63×

芭。黄芩素可使PINK1-RNAi PD果蝇模型 mtDNA 水平升高,但美多芭无影响 (P > 0.05, 图4B)。

7 黄芩素对PINK1-RNAi PD果蝇的ROS含量无显著调节作用

线粒体功能障碍导致线粒体ROS过度产生,进而引起氧化损伤和对氧化应激的敏感性增加。本研究检测了黄芩素对PINK1-RNAi PD果蝇模型ROS的影响。结果表明,与空白对照组w¹¹¹⁸相比,模型组PINK1-RNAi ROS含量显著升高 (P < 0.05)。与模型组相比,黄芩素给药组结果显示不同浓度的黄芩素可在一定程度上减少PD果蝇体内ROS的含量,但无显著性差异 (P > 0.05, 图4C)。

讨论

本课题组前期研究表明黄芩素对PD具有一定的保护作用。然而,黄芩素对遗传性PD果蝇模型神经变性作用及其潜在机制还不明确。因此,本研究采用遗传性PD果蝇模型探讨了黄芩素的抗PD活性及其机

制。研究表明,黄芩素治疗可改善PINK1-RNAi帕金森果蝇模型的症状,包括提高攀爬能力,显著减少翅膀异常情况,且可挽救PPL1 DA能神经元的逐渐丧失,但对DA含量无影响。

黄芩素和美多芭多以口服形式服用,因此本研究将黄芩素或美多芭添加到果蝇培养基中饲喂果蝇来评价其药物的作用。本研究寿命实验结果显示,低、中、高剂量黄芩素均可显著延长PINK1-RNAi雄果蝇寿命,中剂量1.6 mg·mL⁻¹黄芩素延长寿命效果最佳(图1A)。但是,寿命这一表型受遗传、营养和环境因素等多种条件影响^[18],因此选用均能显著延长PINK1-RNAi雄果蝇寿命的低剂量0.8 mg·mL⁻¹、中剂量1.6 mg·mL⁻¹、高剂量3.2 mg·mL⁻¹的黄芩素开展后续研究。低剂量0.8 mg·mL⁻¹黄芩素对爬行指标和翅膀异常情况等行为学指标的改善作用最佳,其作用效果优于阳性药美多芭。这一研究结果与本课题组前期采用氧化震颤素致小鼠震颤模型证明黄芩素具有独特的抗震颤作用结果一致^[19];低剂量0.8 mg·mL⁻¹和高剂量

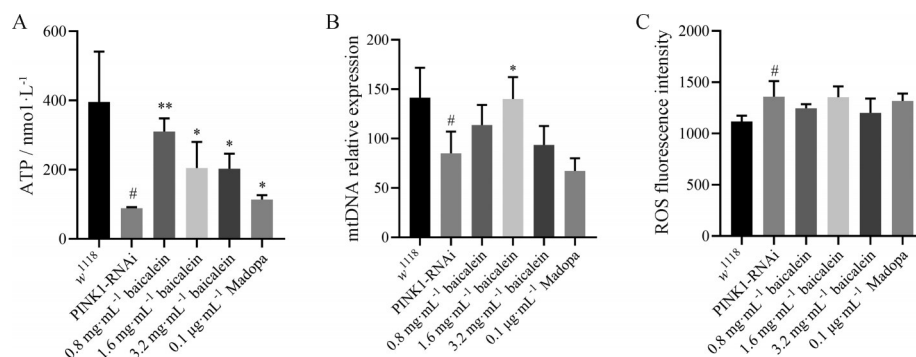


Figure 4 Effect of baicalein on adenosine triphosphate (ATP) content (A), mitochondrial DNA (mtDNA) content (B), reactive oxygen species (ROS) content (C) in the PINK1-RNAi PD *Drosophila* model. n = 3, $\bar{x} \pm$ SEM. [#]P < 0.05 vs w¹¹¹⁸; ^{*}P < 0.05, ^{**}P < 0.01 vs PINK1-RNAi

3.2 mg·mL⁻¹黄芩素对DA神经元的改善作用最佳,但阳性药美多芭无显著影响;黄芩素和美多芭均对DA含量无改善作用。在正常的生理状态下,机体内DA含量的稳态受到多个环节的影响,包括DA的合成、转化、储存、释放、转运和代谢^[20]。果蝇DA能神经元多丢失于PPL1、PPM1、PPM2区,而TH是多巴胺合成的限速酶,因此,在PPL1区进行DA神经元标志物抗酪氨酸羟化酶(TH)染色来量化DA神经元的缺失。本研究结果显示,黄芩素在一定程度上抑制了TH的丢失,因此,推测黄芩素可能在多巴胺合成过程中发挥作用。但是黄芩素对DA含量无影响,表明黄芩素无法影响DA的转运蛋白和DA代谢过程,最终导致黄芩素无法回调DA在PD果蝇体内的水平。

线粒体功能障碍在PD的发生和进程中起关键作用^[21]。mtDNA的大量缺失是PD线粒体功能障碍的表现之一。有研究表明,PD会加速mtDNA的缺失,将患者和对照人群的中枢神经单个神经元的DNA进行对比,mtDNA的缺失与PD疾病显著相关^[22]。研究表明,活性氧和氧化应激可能是导致PD的主要因素之一^[23],氧化磷酸化系统是ROS的主要来源^[24],机体抗氧化系统的缺损会产生氧化应激,其特点是活性物质(氧、羟自由基等)水平升高,导致线粒体功能障碍^[23]。本研究结果显示,黄芩素可提高ATP和mtDNA水平(图4A、B),但对ROS的水平无显著性影响(图4C)。本课题组前期使用鱼藤酮诱导PC12细胞模型发现,黄芩素可显著降低ROS的含量^[25]。PINK1缺乏会导致线粒体形态改变和线粒体自噬受损^[26],功能失调的线粒体会导致ROS的积累。ROS的积累和清除是一个动态平衡,PINK1基因突变打破这一平衡使ROS产生更多的自由基,且无法回调。因此,黄芩素和美多芭只能影响基因突变导致的ATP和mtDNA的线粒体障碍,对机体中ROS含量有一定的回调作用,但是效果不显著。

黄芩素能够显著提高PINK1-RNAi帕金森果蝇模型的寿命、运动能力,降低翅膀异常情况,减少DA能神经元的丢失,提高ATP含量,且低浓度黄芩素效果最佳。黄芩素对PD果蝇mtDNA有上调的效果,且中浓度黄芩素效果较好。综上所述,黄芩素通过提高果蝇的运动能力,减少异率率和DA能神经元的丢失以及改善线粒体功能缓解基因突变导致的遗传性帕金森病。

作者贡献: 研究概念生成由张建琴、杜冠华和秦雪梅完成;实验方法设计由张建琴、郝生慧和高丽完成;实际调查研究由郝生慧、贾若凡和王娇蕊完成;实验数据分析由郝生慧和张建琴完成;实验结果可视化和论文初稿撰写由郝生慧完

成;研究课题监督与指导、论文审阅与修订和研究基金获取由张建琴和高丽完成。所有作者已阅读并同意该稿件的出版。

利益冲突: 作者声明没有利益冲突。

References

- [1] Przedborski S. The two-century journey of Parkinson disease research [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2017, 18: 251-259.
- [2] Tysnes O, Storstein A. Epidemiology of Parkinson's disease [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2017, 124: 901-905.
- [3] Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, et al. The emerging evidence of the Parkinson pandemic [J]. *J Parkinsons Dis*, 2018, 8: S3-S8.
- [4] Chai C, Lim KL. Genetic insights into sporadic Parkinson's disease pathogenesis [J]. *Curr Genomics*, 2013, 14: 486-501.
- [5] Ye M, Zhou D, Zhou Y, et al. Parkinson's disease-associated PINK1 G309D mutation increases abnormal phosphorylation of Tau [J]. *IUBMB Life*, 2015, 67: 286-290.
- [6] Park J, Lee SB, Lee S, et al. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin [J]. *Nature*, 2006, 441: 1157-1161.
- [7] Macdonald R, Barnes K, Hastings C, et al. Mitochondrial abnormalities in Parkinson's disease and Alzheimer's disease: can mitochondria be targeted therapeutically? [J]. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46: 891-909.
- [8] Bolus H, Crocker K, Boekhoff-Falk G, et al. Modeling neurodegenerative disorders in *Drosophila melanogaster* [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 3055.
- [9] Yang Y, Gehrke S, Imai Y, et al. Mitochondrial pathology and muscle and dopaminergic neuron degeneration caused by inactivation of *Drosophila* PINK1 is rescued by Parkin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 10793-10798.
- [10] Parkinson disease agents // LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [DB/OL]. Bethesda, MD: National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2012 [2021-10-25]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548855/>.
- [11] Du GQ, Fang BY, Liu AX, et al. Drug utilization study for rehabilitation treatment of Parkinson's disease patients [J]. *China Med (中国医药)*, 2020, 15: 5.
- [12] Duan DD, Gao L, Wang KX, et al. Mechanism of baicalein to prolong the lifespan of *Drosophila* through anti-oxidative stress [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2016, 51: 1401-1406.
- [13] Yun BY, Zhou L, Xie KP, et al. Preliminary study on the antibacterial activity and mechanism of baicalein [J]. *Acta Pharm Sin (药理学报)*, 2012, 47: 1587-1592.
- [14] Li YW, Zhao JY, Hölscher C. Therapeutic potential of baicalein in Alzheimer's disease and Parkinson's disease [J]. *CNS Drugs*, 2017, 31: 639-652.
- [15] Liu M, Yu S, Wang J, et al. Ginseng protein protects against

- mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by inducing mitochondrial unfolded protein response in *Drosophila melanogaster* PINK1 model of Parkinson's disease [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112213.
- [16] Chen ML, Hu YM, Cui Y, et al. The protective effect of Drp1 regulation on PINK1 mutant transgenic *Drosophila melanogaster* [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2016, 32: 410-417.
- [17] Xu Y, Xie M, Xue J, et al. EGCG ameliorates neuronal and behavioral defects by remodeling gut microbiota and TotM expression in *Drosophila* models of Parkinson's disease [J]. *FASEB J*, 2020, 34: 5931-5950.
- [18] Wu Z, Wu A, Dong J, et al. Grape skin extract improves muscle function and extends lifespan of a *Drosophila* model of Parkinson's disease through activation of mitophagy [J]. *Exp Gerontol*, 2018, 113: 10-17.
- [19] Mu X. Therapeutic Effects of DL0705 on Experimental Parkinsonism (化合物DL0705对帕金森氏病动物模型的治疗作用及机制研究) [D]. Beijing: Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 2009.
- [20] Singh A, Tripathi P, Yadawa AK, et al. Promising polyphenols in Parkinson's disease therapeutics [J]. *Neurochem Res*, 2020, 45: 1731-1745.
- [21] Yang Y, Lu B. Mitochondrial morphogenesis, distribution, and Parkinson disease: insights from PINK1 [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68: 953-963.
- [22] Dölle C, Flønes I, Nido GS, et al. Defective mitochondrial DNA homeostasis in the substantia nigra in Parkinson disease [J]. *Nat Commun*, 2016, 22: 13548.
- [23] Singh A, Kukreti R, Saso L, et al. Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases [J]. *Molecules*, 2019, 24: 1583.
- [24] Buneeva O, Fedchenko V, Kopylov A, et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: focus on mitochondrial DNA [J]. *Biomedicines*, 2020, 8: 591.
- [25] Li XX. Experimental Study of the Therapeutic Effect and Mechanism of Baicalein on Parkinson's Disease (百可利对实验性帕金森病的作用及机制研究) [D]. Beijing: Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, 2011.
- [26] Johnson J, Mercado-Ayon E, Mercado-Ayon Y, et al. Mitochondrial dysfunction in the development and progression of neurodegenerative diseases [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2021, 15: 108698.