

过表达 Nurr1 人羊膜间充质干细胞对帕金森病大鼠黑质纹状体的保护作用研究

陈琳, 甘露, 周红艳, 梁江红

摘要 目的 探讨过表达核相关受体因子 1 (Nurr1) 人羊膜间充质干细胞 (hAD-MSCs) 对帕金森病 (PD) 大鼠黑质纹状体的保护作用。方法 构建 Nurr1 真核过表达载体, 选取 20 只 PD 大鼠并分为 Nurr1 组 (转染过表达 Nurr1 的 hAD-MSCs) 和阴性对照组 (转染含阴性对照质粒的 hAD-MSCs), 每组各 10 只。另外选取 10 只正常大鼠作为生理盐水组。观察各组大鼠行为学变化; qRT-PCR 和 Western blot 检测黑质纹状体 Nurr1、多巴胺转运体 (DAT)、 α -突触核蛋白 (α -syn) 表达; 免疫组化检测黑质纹状体酪氨酸羟化酶 (TH) 表达; HE 染色观察黑质纹状体病理形态; Tunel 染色检测黑质纹状体细胞凋亡。结果 与生理盐水组相比, Nurr1 组与阴性对照组各时间段旋转次数及持续时间增加, 黑质纹状体 Nurr1、DAT mRNA 及蛋白表达均降低, TH 蛋白表达降低但 α -syn 表达上调, 病理特征明显且细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$)。与阴性对照组比较, Nurr1 组大鼠各时间段旋转次数及持续时间显著减少, 黑质纹状体 Nurr1、DAT mRNA 及蛋白表达均上调, TH 蛋白表达上调但 α -syn 表达降低, 病理状况改善且细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。结论 过表达 Nurr1 人羊膜间充质干细胞治疗 PD 大鼠, 能够改善其病理症状, 同时提高黑质纹状体 DAT 及 TH 含量, 减少细胞凋亡。

关键词 帕金森; 黑质纹状体; 核相关受体因子 1; 人羊膜间充质干细胞

中图分类号 R 741

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)03-0423-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.017

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是当前临床常见的中枢神经系统疾病, 目前临床上针对该病主要的治疗方法包括手术、药物以及基因治疗等^[1]。随着干细胞技术的成熟和发展, 干细胞移植治疗有望成为 PD 治疗的重要手段^[2]。人羊膜间充质干细胞 (human amnion-derived mesenchymal stem cells, hAD-MSCs) 具有多向分化潜能, 体外扩增能力强, 移植后细胞能存活, 可分化为神经元样细胞^[3]。核

相关受体因子 1 (nuclear receptor related factor 1, Nurr1) 基因是属于核受体超家族的转录因子, 主要表达于中枢神经系统, 在中脑黑质海马、小脑、下丘脑后部等均呈现高表达^[4]。该研究将 hAD-MSCs 移植和 Nurr1 基因结合起来进行研究, 探讨过表达 Nurr1 人羊膜间充质干细胞对 PD 大鼠黑质纹状体的保护作用。

1 材料与方法

1.1 细胞鉴定 人羊膜间充质干细胞 hAD-MSCs 购自北京裕恒丰科技有限公司, 将 hAD-MSCs 经 0.05% 胰蛋白酶消化后, 使用 1% BSA 调整细胞浓度在 1×10^6 /ml 加入荧光标记抗体 (CD29-PE、CD44-PE、CD34-PE) 于 150 μ l 细胞悬液避光孵育 0.5 h, 随后加入 2 ml 含 1 g/L 叠氮化钠 (NaN₃) 的 PBS 振荡混匀后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清并加入 10 g/L 多聚甲醛 200 μ l 混匀 5 min 内流式细胞仪上机检测, 使用 Cell Quest 软件分析。

1.2 细胞转染 在国家生物技术中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 Gene 库查阅大鼠 Nurr1 基因 (别名: Nr4a2, Gene ID: 54278) 并获取其编码序列。真核表达载体 (pcDNA3.1-Nurr1) 及阴性对照载体 (pcDNA3.1-Negative control) 均由美国赛默飞世尔公司完成。质粒小量制备试剂盒 (PLN350-4KT, 美国 Sigma 公司) 提取 pcDNA3.1-Nurr1 载体。使用 lipofectamine 试剂盒 (11668019, 美国 Invitrogen 公司) 将上述载体转染至传代后的 hAD-MSCs, 转染后 24 h 加入新霉素使培养基终浓度为 300 μ g/ml。

1.3 细胞移植及分组 20 只雄性 PD 模型 Sprague-Dawley 大鼠及 10 只雄性正常 Sprague-Dawley 大鼠购自北京瑞金特生物科技有限公司, 质量在 180~220 g。饲养环境: 温度 20~25 $^{\circ}$ C, 湿度 50%~60%; 光照 12 h, 黑暗 12 h。20 只 PD 大鼠随机分为阴性对照组和 Nurr1 组, 每组各 10 只。适应性喂养 1 周后, 腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉后, 用微量注射器将含有约 2×10^5 个 hAD-MSCs

2018-11-19 接收

基金项目: 2014 年度湖南省医药卫生科研计划项目 (编号: B2014-056)

作者单位: 南华大学附属第二医院神经内科, 衡阳 421000

作者简介: 陈琳, 女, 硕士, 副主任医师, 副教授, 责任作者, E-mail: chenlin6766@yeah.net

(含 pcDNA3.1-Nurr1 或 pcDNA3.1-Negative control 质粒)的 DMEM 5 μl 移植到 Nurr1 组小鼠右侧纹状体 阴性对照组转染阴性对照质粒。另选 10 只正常 Sprague-Dawley 大鼠作为生理盐水组,于相同部位注射等量的生理盐水。

1.4 旋转实验 三组大鼠分别在分组后第 4、8、12 天上午 9 点在直径为 40 cm 的不锈钢盆中观察记录大鼠的旋转次数与持续时间。

1.5 qRT-PCR 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司,大鼠黑质纹状体总 RNA 提取依照试剂盒说明书进行,以 cDNA 为模板,采用 miScript SYBR Green PCR Kit(218073,德国 QIAGEN 公司)进行实时荧光定量 PCR,PCR 反应序列见表 1。利用 2^{-ΔΔCt} 法检测大鼠黑质纹状体中各基因 mRNA 表达水平。2^{-ΔCt} 计算目的基因相对表达量,每个实验均重复 3 次,其中 ΔCt 为目的基因和内参照基因 Ct 值的差值。

表 1 qRT-PCR 引物

基因	引物序列(5'-3')
Nurr1	F: TACGCTTAGCATACAGGTTG
	R: GAGAAGGCAGAAATGTCTGA
DAT	F: GCTGCTACATCGGCATCGAG
	R: GTGCCAGCTGCAAAGTGGTC
α-syn	F: ACAGCAGTCGCTCAGAAG
	R: GCATTTTCATAAGCCTCAC
β-actin	F: GTAAAGACCTCTATGCCAACA
	R: GGACTCATCGTACTCTCTGCT

1.6 Western blot 所有抗体购自英国 Abcam 公司。提取细胞总蛋白并依据 BCA 试剂盒说明书对蛋白进行定量。取 20 μl 总蛋白并电泳、转膜并且封闭后在 37 °C 下轻摇 2 h 后分别加入一抗 Nurr1、多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)、α-突触共核蛋白(α synuclein, α-syn)进行孵育。于 4 °C 轻摇过夜后,用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,以 β-actin 作为对照。洗膜结束后加入二抗 IgG 于 37 °C 下孵育 1.5 h 后用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。ECL 显影,曝光,用 Quantity One 软件进行半定量分析,实验均重复 3 次。

1.7 免疫组化 取 -80 °C 冰箱保存的黑质纹状体于 4% 多聚甲醛常规灌注固定,置于 20% 蔗糖溶液(4 °C)中过夜,蜡块制作切片,脱蜡。切片滴加 2 滴 3% H₂O₂ 室温孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次,每次 3 min; 随后滴加一抗酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)室温孵育 2 h, PBS 洗涤 5 次,每次 3 min; 滴加辣根过氧化物酶标 IgG 室温孵育 30 min, PBS

洗涤 5 次,每次 3 min。50 μl DAB 于 25 °C 显色 5 min 随后苏木精复染 0.1% 盐酸分化,自来水冲洗,酒精脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封固,晾干后高倍镜下观察 统计阳性染色面积率。

1.8 HE 染色 将黑质纹状体切片使用二甲苯脱腊 20 min, 梯度浓度酒精(100%、95%、80%、75%)脱水 1 min, 蒸馏水洗 2 min, 苏木精染色 10 min, 蒸馏水冲洗反蓝, 盐酸乙醇分化 30 s, 50 °C 温水浸泡 5 min, 伊红染色 30 s 后蒸馏水洗去背景红色。随后 70% 和 90% 酒精脱水各 10 min, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 高倍镜下观察组织形态。

1.9 Tunel 染色 制备好的黑质纹状体切片二甲苯浸洗 2 次,每次 5 min, 梯度酒精脱水(100%、95%、80%、75%)各 3 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min; 20 μg/ml 不含 DNase 的蛋白酶 K 工作液处理组织 15 ~ 30 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min, 烘干; 玻片滴加 50 μl Tunel 反应液于 37 °C 反应 60 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min, 50 μl DAB 于 25 °C 显色 10 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。苏木精复染,自来水冲洗 3 次,每次 5 min。梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。光学显微镜下观察,计算细胞凋亡率。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,两组间数据分析使用 T 检验,多组间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 细胞鉴定结果 流式细胞仪检测含有表面抗原 CD29、CD44 和 CD34 的 hAD-MSCs 数目: hAD-MSCs 中高表达 CD29 和 CD44 但几乎不表达 CD34。见图 1。

2.2 过表达 Nurr1 的 hAD-MSCs 移植改善 PD 大鼠旋转行为 对各组大鼠进行旋转实验:与生理盐水组各时间段相比,其余组大鼠在各时间段旋转次数及持续时间显著减少。与阴性对照组相比, Nurr1 组旋转次数和持续时间在移植后第 4 天无显著差异,但在第 8 天和第 12 天上述指标显著减少(P < 0.05)。见表 2、3。

2.3 Nurr1 过表达上调黑质纹状体 DAT 但下调 α-syn qRT-PCR 和 Western blot 检测结果:与生理盐水组相比,其余组大鼠 Nurr1、DAT mRNA 及蛋白表达均降低,但 α-syn 表达上调。与阴性对照组相比, Nurr1 组 Nurr1 和 DAT 表达上调但 α-syn 表达下调(P < 0.05)。见图 2。

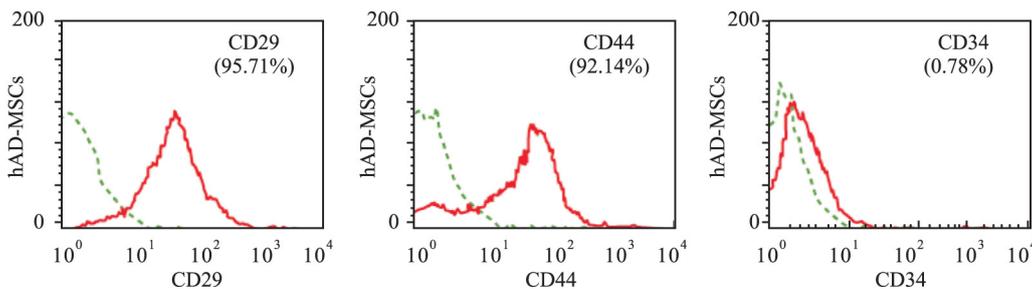


图1 CD29、CD44和CD34在hAD-MSCs中表达

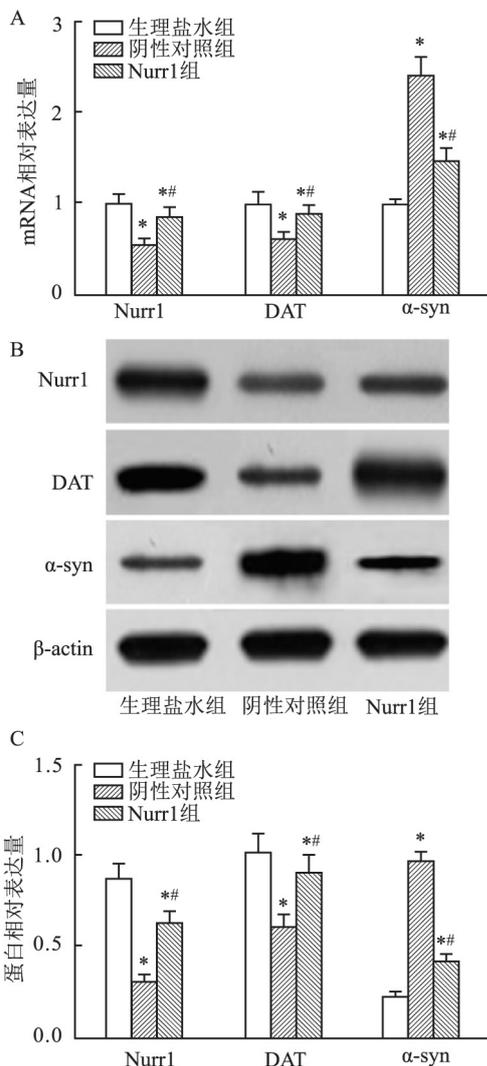


图2 大鼠黑质纹状体 Nurr1、DAT 和 α -syn 的表达

A: Nurr1、DAT 和 α -syn mRNA 相对表达量; B: Nurr1、DAT 和 α -syn 蛋白条带图; C: Nurr1、DAT 和 α -syn 蛋白相对表达量; 与生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

2.4 Nurr1 过表达上调黑质纹状体 TH 表达 免疫组化检测结果: TH 存在于黑质纹状体组织的胞质与胞核,其阳性细胞胞体较大,多神经元突起。与生理盐水组相比,其余组大鼠 TH 表达显著降低。与阴性对照组相比,过表达 Nurr1 能促进 TH 上调。见图 3。

2.5 Nurr1 过表达有助于改善黑质纹状体病理形态 HE 染色观察各组大鼠黑质纹状体病理特征:生理盐水组及神经元数目较密,排列整齐有序,间质清晰;阴性对照组神经元排列紊乱、数目减少、胞体轮廓模糊,胞质肿胀,部分空泡变性或皱缩坏死。但 Nurr1 组上述情况较为改善。见图 4。

2.6 Nurr1 过表达减少黑质纹状体细胞凋亡 TUNEL 染色检测各组大鼠黑质纹状体细胞凋亡情况:与生理盐水组相比,其余组细胞凋亡率显著升高。与阴性对照组相比,过表达 Nurr1 能减少黑质纹状体细胞凋亡。见图 5。

3 讨论

PD 作为老年中枢神经系统疾病,主要是由于中脑黑质多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性死亡进而导致黑质纹状体中 DA 含量显著减少而引起的^[5]。目前常见的手术和药物治疗仅仅能够起到缓解 PD 症状的作用,难以有效延缓病程、改善脑内 DA 含量并且保护 DA 能神经元^[6]。基因治疗以及干细胞移植方法的出现为该病的治疗提供了良好的方法。

动物实验研究^[7]证实 hAD-MSCs 能改善 PD 模型动物的症状,但因涉及复杂的重编程技术,且存在

表2 各组大鼠旋转次数($r/\min \bar{x} \pm s$)

时间点	生理盐水组 (n=10)	阴性对照组 (n=10)	Nurr1 组 (n=10)	F 值	P ₁ 值	T 值	P ₂ 值
第4天	5.13 ± 0.59	8.20 ± 0.88*	8.16 ± 0.89* #	48.6	<0.001	0.101	0.920
第8天	5.51 ± 0.49	9.00 ± 0.97*	7.64 ± 0.76* #	52.8	<0.001	3.490	0.003
第12天	5.44 ± 0.37	8.64 ± 0.94*	6.64 ± 0.64* #	54.8	<0.001	5.562	<0.001

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

表3 各组大鼠旋转持续时间($\bar{x} \pm s$)

时间点	生理盐水组($n = 10$)	阴性对照组($n = 10$)	Nurr1 组($n = 10$)	F 值	P_1 值	T 值	P_2 值
第4天	58.45 ± 5.83	126.48 ± 10.54*	120.46 ± 12.12* #	146.1	<0.001	1.185	0.251
第8天	54.64 ± 5.16	121.64 ± 11.36*	97.14 ± 8.74* #	146.4	<0.001	5.352	<0.001
第12天	55.92 ± 5.42	120.11 ± 10.64*	77.64 ± 8.84* #	149.7	<0.001	9.890	<0.001

与生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

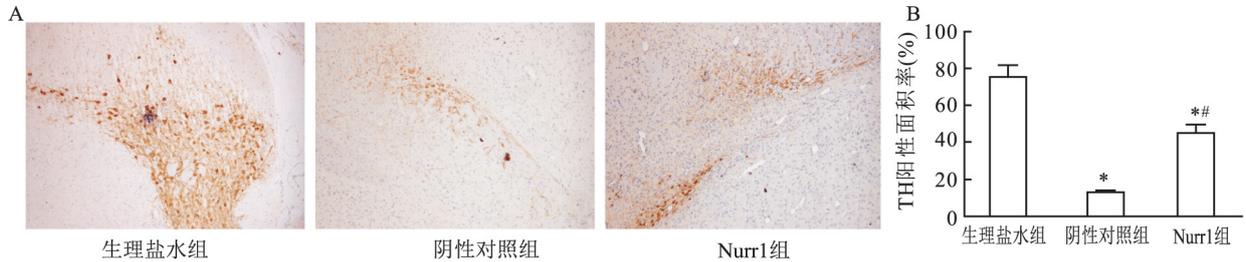


图3 免疫组化检测大鼠黑质纹状体 TH 表达 × 400

A: TH 免疫组化染色图; B: TH 阳性面积率; 与生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

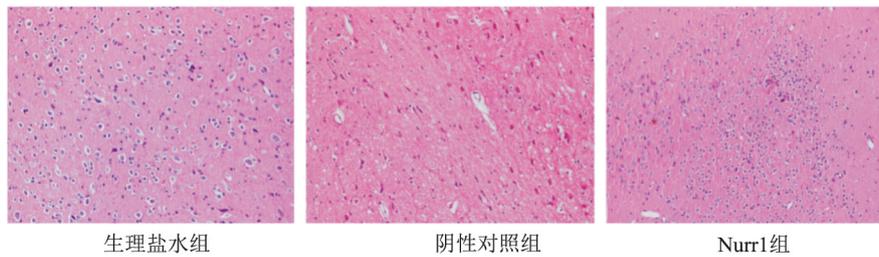


图4 HE 染色观察大鼠黑质纹状体病理情况 × 200

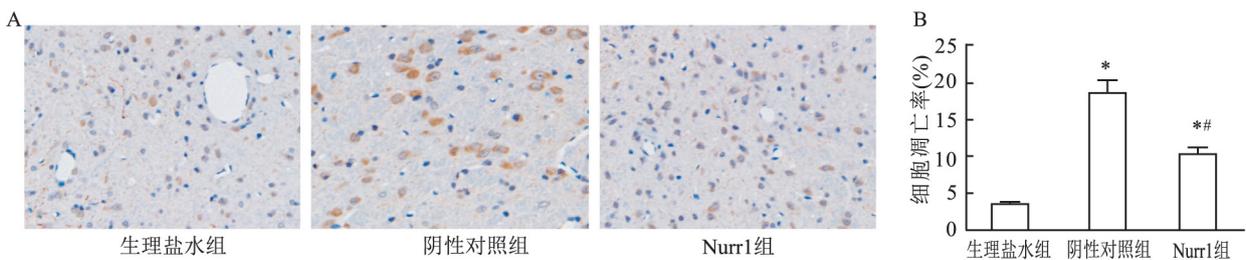


图5 TUNEL 染色检测大鼠黑质纹状体细胞凋亡 × 400

A: TUNEL 染色图; B: 细胞凋亡率; 与生理盐水组比较: * $P < 0.05$; 与阴性对照组比较: # $P < 0.05$

诱导效率低,其实际应用还有较大障碍。基因治疗主要是通过基因或病毒载体转染于病变部位进而实现治疗的目的^[8]。有研究^[9]证实将外源性的 TH 基因导入 PD 模型大鼠纹状体内可增加脑内 DA 的水平。Nurr1 基因在中脑 DA 能神经元的发育过程中具有重要意义,Nurr1 基因缺乏能够导致大鼠脑黑质 DA 能神经元显著降低^[10]。有研究^[11]将 Nurr1 基因修饰的细胞移植于 PD 大鼠脑中,发现大鼠纹状体内 DA 含量显著升高,但进一步研究却发现仅仅是 Nurr1 基因难以对大鼠 DA 水平及其症状进行长期改善。本研究将 hAD-MSCs 移植和 Nurr1 基因结

合起来进行研究,显示过表达 Nurr1 人羊膜间充质干细胞对 PD 大鼠黑质纹状体具有明显保护作用。

本实验流式细胞仪检测含有表面抗原 CD29、CD44 和 CD34 的 HAMSCs 数目显示,HAMSCs 中高表达 CD29 和 CD44 等间充质干细胞标志,但几乎不表达作为造血干细胞标志的 CD34。进一步证实了 HAMSCs 具有干细胞特性。尚玉攀等^[12]在研究中也证实了这一点。对各组大鼠进行旋转实验发现 Nurr1 组相对于阴性对照组来说,其在第 8 天和第 12 天时各时间段旋转次数及持续时间显著减少。证实过表达 Nurr1 的 HAMSCs 移植能够改善 PD 大鼠旋

转行为。中脑黑质 DA 能神经元丢失进而引起的 DAT 水平降低是导致 PD 发病的重要原因, 研究^[13]证实, PD、阿尔茨海默病以及多系统萎缩等疾病的发病与突触核蛋白表达异常存在密切关联, 也被称为突触核蛋白病。 α -syn 作为路易小体的重要组成, 其异常表达是引起以上疾病发病的重要原因^[14]。而本研究表明, Nurr1 过表达能够上调黑质纹状体 DAT, 同时促进 α -syn 水平的下调, 这也进一步证实了其在改善 PD 中的重要作用。TH 是人脑内关键 DA 递质通路, 在 DA 的合成中起着重要作用^[15]。免疫组化结果显示, 过表达 Nurr1 能够显著促进 TH 的上调, 减轻对于大鼠黑质纹状体 DA 能神经元的损伤。HE 染色和 Tunel 染色结果进一步证实, Nurr1 过表达能够显著改善大鼠黑质纹状体病理形态、减少其细胞凋亡情况。

本研究首次将 Nurr1 过表达人羊膜间充质干细胞用于 PD 大鼠的治疗, 结果显示, 该方法能够显著改善大鼠病理症状, 提高黑质纹状体 DAT 及 TH 含量, 对于 PD 的治疗提供了新的思路。今后本研究会深入关注 Nurr1 过表达人羊膜间充质干细胞对于大鼠黑质纹状体保护作用的具体机制。

参考文献

- [1] Huang X, Alonso A, Guo X, et al. Statins, plasma cholesterol, and risk of Parkinson's disease: a prospective study [J]. *Mov Disord*, 2015, 30(4): 552-9.
- [2] Onishi R, Ohnishi S, Higashi R, et al. Human amnion-derived mesenchymal stem cell transplantation ameliorates dextran sulfate sodium-induced severe colitis in rats [J]. *Cell Transplant*, 2015, 24(12): 2601-14.
- [3] Wang Y, Yin Y, Jiang F, et al. Human amnion mesenchymal stem cells promote proliferation and osteogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *J Mol Histol*, 2015, 46(1): 13-20.
- [4] Wei X, Gao H, Zou J, et al. Contra-directional Coupling of Nurr1 and Nurr1 in neurodegeneration: a novel mechanism for memantine-induced anti-inflammation and anti-mitochondrial impairment [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(9): 5876-92.
- [5] Bassani T B, Gradowski R W, Zaminelli T, et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats [J]. *Brain Res*, 2014, 159(3): 95-105.
- [6] Ryu H S, Kim M S, You S, et al. Mortality of advanced Parkinson's disease patients treated with deep brain stimulation surgery [J]. *J Neurol Sci*, 2016, 369(2): 230-5.
- [7] Ahmed H, Salem A, Atta H, et al. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate Parkinson's disease in rat model? [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2014, 33(12): 1217-31.
- [8] Huang R, Ma H, Guo Y, et al. Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease [J]. *Pharm Res*, 2013, 30(10): 2549-59.
- [9] Rosenblad C, Georgievska B, Kirik D. Long-term striatal overexpression of GDNF selectively downregulates tyrosine hydroxylase in the intact nigrostriatal dopamine system [J]. *Eur J Neurosci*, 2015, 17(2): 260-70.
- [10] Levin J, Hasan A, Höglinger G U. Psychosis in Parkinson's disease: identification, prevention and treatment [J]. *J Neural Transm*, 2016, 123(1): 45-50.
- [11] Beilina A, Cookson M R. Genes associated with Parkinson's disease: regulation of autophagy and beyond [J]. *J Neurochem*, 2016, 139(S1): 91-107.
- [12] 尚玉攀, 吴昊, 曾晓丽, 等. 从脊柱内镜手术摘除组织中分离髓核间充质干细胞及其生物学特征鉴定 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(6): 1147-52.
- [13] 郭彦谷, 张晨彬, 魏新丽, 等. Wnt 信号通路调控神经干细胞向多巴胺神经元分化的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2015, 31(6): 807-10.
- [14] Allen Reish H E, Standaert D G. Role of α -synuclein in inducing innate and adaptive immunity in Parkinson disease. [J]. *J Parkinsons Dis*, 2015, 5(1): 1-19.
- [15] 孙法威, 任博, 张作风, 等. 依达拉奉可经核因子相关因子 2/抗氧化反应元件通路对帕金森病小鼠多巴胺能神经元起保护作用 [J]. *解剖学杂志*, 2014, 37(4): 487-91.

Protective effect of overexpressing Nurr1 human amniotic mesenchymal stem cells on nigrostriatal striatum in rats with Parkinson's disease

Chen Lin, Gan Lu, Zhou Hongyan, et al

(Dept of Neurology, The Second Hospital Affiliated to Nanhua University, Hengyang 421000)

Abstract Objective To examine the protective effect of overexpressing Nurr1 human amniotic mesenchymal stem cells on nigrostriatal striatum in rats with Parkinson's disease. **Methods** Eukaryotic overexpression vector of Nurr1 and negative control group were established and the overexpressed Nurr1 human amnion-derived mesenchymal stem cells were transplanted in nigrostriatum of rats. The behavioral changes of rats were observed. qRT-PCR and Western blot were used to examine the expression of Nurr1, DAT, α -syn in nigrostriatum. Immunohistochemical experiment was used to detect the expression of tyrosine hydroxylase (TH) in nigrostriatum. HE staining was used to ex-

amine the pathological morphologys of nigrostriatums. Tunel staining was used to detect the cell apoptosis in nigrostriatums. **Results** Compared with the saline group , the duration and times of the rotation for rats increased in Nurr1 group and negative control group; the level of Nurr1 ,DAT mRNA and protein and TH protein in nigrostriatums were decreased , while the expression of α -syn was enhanced; pathological features were obvious and the rate of apoptosis was increased(all $P < 0.05$) . Compared with the negative control group , the times and duration of rotation in Nurr1 group were decreased; the expressions of Nurr1 ,DAT mRNA and protein and TH protein in nigrostriatums were enhanced , while the levels of α -syn mRNA and protein were decreased. The pathological feature was improved and the apoptosis rate was decreased(all $P < 0.05$) . **Conclusion** Overexpression of Nurr1 human amnion-derived mesenchymalstem cells can alleviate the symptoms of Parkinson disease rats , increase the content of DAT and TH and inhibit apoptosis in nigrostriatums.

Key words Parkinson; nigrostriatum; nuclear associated receptor factor 1; human amnion-derived mesenchymal-stem cells

(上接第 422 页)

preservation[J]. *Cell Physiol Biochem* , 2018 , 48(4) : 1664 - 74.

[14] Rugarli E I , Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons [J]. *EMBO J* , 2012 , 31(6) : 1336 - 49.

[15] Anzell A R , Maizy R , Przyklenk K , et al. Mitochondrial quality control and disease: insights into ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol* , 2018 , 55(3) : 2547 - 64.

[16] Xiao Q , Yang Y , Qin Y , et al. AMP-activated protein kinase-dependent autophagy mediated the protective effect of sonic hedgehog pathway on oxygen glucose deprivation-induced injury of cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2015 , 457(3) : 419 - 25.

Schisandrin B alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via maintaining mitophagy

Lu Changqing , Jia Helei , Lei Zhen , et al

[Dept of Emergency Henan Province Hospital of TCM (The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine) , Zhengzhou 450002]

Abstract Objective To investigate the effects and mechanism of schisandrin B (Sch B) on myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury. **Methods** Mice were divided into Sham , Sham + Sch B , MI/R model and MI/R model + Sch B groups. Replication of mouse MI/R model by coronary artery ligation and mice in Sham + Sch B and MI/R model + Sch B group were treated with Sch B , and recorded the heart rate at the same time. Mice were sacrificed after administering with Sch B for 30 days. The serum lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) were detected by reagent cases , and pathologic lesions were measured by HE staining. The mRNA and protein levels of mitophagy related proteins were calculated by qRT-PCR and Western blot. Adenosine monophosphate activated protein kinase/mammalian target of rapamycin/ ULK1 (AMPK/mTOR/ULK1) pathway related proteins also were detected by Western blot. The above-mentioned tests were repeated by using AMPK- β 1 gene knockout (AMPK- β 1 - / -) mice. **Results** Sch B treatment decreased the indexes of cardiac injury (serum LDH , CK and the myocardial infarct area) , increased the heart rate and alleviated the pathological changes. Meanwhile , Sch B maintained mitophagy by up-regulating the mRNA levels of cyclooxygenase I (COX I) , COX IV and increasing protein levels of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) , Beclin 1. In addition , Sch B increased the expression of p-AMPK , p-ULK1 and decreased the expression of p-mTOR induced by MI/R injury. Furthermore , knockout AMPK- β 1 inhibited mitophagy , thus resulted in the increasing infarct area and decreasing heart rate. **Conclusion**

Sch B alleviates MI/R injury via maintaining mitophagy mediated by AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway.

Key words schisandrin B; ischemia/reperfusion injury; mitophagy