论著·神经科学

PARP9通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路促进脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡及炎症反应而加重认知障碍

陈 丽,张德绸,叶丽莎 西南医科大学附属中医医院神经内科,四川泸州

[摘要] **目的** 脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)是指血流恢复后加重缺血区神经元损伤的病理过程,其机制涉及氧化应激、炎症及凋亡等级联反应。聚(ADP-核糖)聚合酶9[poly(ADP-ribose)polymerase 9, PARP9]在CIR中的生物学功能尚待阐明。本研究旨在探讨PARP9对CIR大鼠神经元凋亡、神经炎症、认知能力及PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响。**方法** ①损伤效应实验:10只SD大鼠[雄性,8~10周龄,体质量250~260 g]采用随机数字表法分为CIR组和假手术组,每组5只。CIR组大鼠采用线栓法实现大脑中动脉栓塞,2 h后拔线再通,建立CIR模型;假手术组大鼠只暴露血管,不进行切口和插入石蜡线栓。术后7 d,Western blotting法检测2组大鼠脑组织中PARP9蛋白表达水平。②PARP9干预实验:60只SD大鼠[雄性,8~10周龄,体质量250~260 g]采用随机数字表法分为AAV-siScramble组、AAV-siPARP9组、AAV-Scramble组、AAV-PARP9组,每组15只。各组大鼠脑室注射相应腺病毒(2 μL),于注射相应腺病毒2周后,各组大鼠构建CIR模型。术后24 h,Zea-Longa法评估各组大鼠神经功能;Morris水迷宫评估各组大鼠认知能力。术后7 d,TTC染色检测各组大鼠脑梗死面积;Nissl染色检测各组大鼠脑皮质病理损伤情况;TUNEL染色检测各组大鼠脑组织中神经元凋亡率;免疫组织化学染色检测各组大鼠脑组织中TNF-α、IL-1β阳性表达;Western blotting法检测各组大鼠脑组织中PARP9、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达。**结果** ①损伤效应实验:CIR组大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平较假手术组显著增加($P<0.001$)。②PARP9干预实验:与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠的神经功能评分降低,逃避潜伏期缩短,原平台象限停留次数增加($P<0.001$);大鼠脑梗死面积占比明显下降($P<0.05$);脑组织缺血皮层区中PARP9表达水平、神经元凋亡率、TNF-α和IL-1β的阳性表达均下降($P<0.05$);脑组织缺血皮层区中p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达增加($P<0.05$);与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠的神经功能评分增加,逃避潜伏期增加,原平台象限停留次数减少($P<0.001$);脑梗死面积占比显著增加($P<0.05$);脑组织缺血皮层区中PARP9表达水平、神经元凋亡率、TNF-α和IL-1β的阳性表达均增加($P<0.05$);脑组织缺血皮层区中p-PI3K、p-AKT、p-mTOR蛋白表达下降($P<0.05$)。AAV-siPARP9组大鼠大脑皮质神经元排列规整,尼氏体含量丰富,胞质呈蓝色,细胞核着色均匀;AAV-PARP9组则表现为皮质神经元分布散乱,局部可见神经元数量减少,胞质蓝染程度变浅,尼氏体明显减少;而AAV-siScramble组和AAV-Scramble组神经元尼氏体溶解现象有所缓解,神经元存活数量增加。**结论** PARP9是CIR病理损伤的重要促进因子,其可能通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路介导。靶向抑制PARP9可减轻神经元凋亡和神经炎症反应,改善认知功能,提示PARP9可能为CIR干预提供新的分子靶点。

[关键词] 脑缺血再灌注;PARP9;PI3K/AKT/mTOR信号通路;神经元凋亡;神经炎症

[中图法分类号] R363.21;R338.64;R743.31 [文献标志码] A

[基金项目] 四川省自然科学基金面上项目(2024NSFSC1823);西南医科大学中西医结合特色项目(2023ZYYQ02);四川省科技计划项目(2022YFS0613)

[通信作者] 叶丽莎,E-mail:1873936902@qq.com

2097-0927/Copyright © 2026, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:陈丽,张德绸,叶丽莎. PARP9通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路促进脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡及炎症反应而加重认知障碍[J]. 陆军军医大学学报,2026,48(19):2770-2779. DOI:10.16016/j.2097-0927.202605059.

Citation: Chen L, Zhang D C, Ye L S. PARP9 promotes neuronal apoptosis and inflammatory responses through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and then aggravates cognitive impairment in rats with cerebral ischemia-reperfusion[J]. J Army Med Univ, 2026, 48(19): 2770-2779. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202605059.

PARP9 promotes neuronal apoptosis and inflammatory responses through inhibiting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and then aggravates cognitive impairment in rats with cerebral ischemia-reperfusion

Chen Li, Zhang Dechou, Ye Lisha Department of Neurology, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, China

[**Abstract**] Objective Cerebral ischemia-reperfusion (CIR) refers to a pathological process in which restoration of blood flow exacerbates neuronal injury in the ischemic area, with the underlying mechanisms involving cascade reactions such as oxidative stress, inflammation, and apoptosis. The biological function of poly(ADP-ribose) polymerase 9 (PARP9) in CIR remains unclarified. This study aims to investigate the effects of PARP9 on neuronal apoptosis, neuroinflammation, cognitive function, and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rats with CIR. Methods ① Experiments of injury effects: Ten male SD rats (8 to 10 weeks old, weighing 250 to 260 g) were randomly divided into a sham operation group and a CIR group, with 5 rats in each group. Rats in the CIR group underwent middle cerebral artery occlusion using intraluminal suture technique, followed by reperfusion 2 h later by removing the suture to establish the CIR model; rats in the sham operation group only had the blood vessels exposed without incision or insertion of a paraffin-coated suture. At 7 d after surgery, Western blotting was applied to detect the protein levels PARP9 in the brain tissues of both groups. ② PARP9 intervention experiment: 60 male SD rats (8 to 10 weeks old, weighing 250 to 260 g) were randomly divided into an AAV-siScramble group, an AAV-siPARP9 group, an AAV-Scramble group, and an AAV-PARP9 group, with 15 rats in each group. Rats in each group received an intracerebroventricular injection of the corresponding adenovirus (3 μL), and the CIR model was established 2 weeks after adenovirus injection. At 24 h postoperatively, neurological function was assessed using Zea-Longa method, and cognitive function was evaluated using Morris water maze test. At 7 d after surgery, TTC staining and Nissl staining were used to measure cerebral infarct volume and evaluate pathological damage in the cerebral cortex, respectively. TUNEL staining was used to detect the neuronal apoptosis rate; immunohistochemical staining was employed to detect the positive expression of TNF-α and IL-1β; and Western blotting was utilized to detect the protein expression of PARP9, p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in brain tissue. Results ① Experiments of injury effects: The expression level of PARP9 in the ischemic cortical area of brain tissue was significantly increased in the CIR group than the sham operation group ($P<0.001$). ② PARP9 intervention experiment: Compared with the AAV-siScramble group, the AAV-siPARP9 group exhibited decreased neurological function scores, shortened escape latency, and increased number of platform quadrant crossings ($P<0.001$). The percentage of cerebral infarct area was significantly reduced ($P<0.05$). The expression level of PARP9, neuronal apoptosis rate, and positive expression levels of TNF-α and IL-1β in the ischemic cortical area were all decreased ($P<0.05$). The protein levels of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in the ischemic cortical area were increased ($P<0.05$). Compared with the AAV-Scramble group, the AAV-PARP9 group showed increased neurological function scores, prolonged escape latency, and reduced number of platform quadrant crossings ($P<0.001$). The percentage of cerebral infarct area was significantly increased ($P<0.05$). The expression level of PARP9, neuronal apoptosis rate, and positive expression of TNF-α and IL-1β in the ischemic cortical area were all increased ($P<0.05$). The protein levels of p-PI3K, p-AKT, and p-mTOR in the ischemic cortical area were decreased ($P<0.05$). In the AAV-siPARP9 group, cortical neurons were regularly arranged, with abundant Nissl bodies, blue-stained cytoplasm, and uniformly stained nuclei. In the AAV-PARP9 group, cortical neurons were scattered with locally reduced neuronal numbers, lighter blue-stained cytoplasm, and significantly reduced Nissl bodies; while in the AAV-siScramble group and AAV-Scramble group, the dissolution of Nissl bodies was alleviated and the number of surviving neurons was increased. Conclusion PARP9 functions as a key pathogenic facilitator in CIR injury, which may be mediated through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR signaling cascade. Knockdown of PARP9 alleviates

neuronal apoptosis and neuroinflammatory responses, and improve cognitive function, suggesting that PARP9 may serve as a new molecular target for CIR intervention.

[**Key words**] cerebral ischemia-reperfusion; PARP9; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; neuronal apoptosis; neuroinflammation

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Sichuan Province (2024NSFSC1823), the Characteristic Project of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine of Southwest Medical University (2023ZYYQ02), and the Project of Science and Technology Plan of Sichuan Province (2022YFS0613). Corresponding author: Ye Lisha, E-mail: 1873936902@qq.com

脑卒中是临床上最常见的脑血管急症之一,其中缺血性卒中占据主导地位,其发病率约占全部脑卒中的80%。其发病机制主要系脑供血动脉发生狭窄或闭塞,致使脑组织灌注不足,进而诱发神经功能障碍[1]。目前,重组组织纤溶酶原激活剂静脉溶栓与机械取栓术是临床治疗缺血性脑卒中的主要血运重建手段。然而,上述疗法不仅受限于严格的时间窗口和较低的患者适用率,还可能诱发脑缺血再灌注(cerebral ischemia-reperfusion, CIR)损伤,进一步加剧神经功能损害[2]。据研究表明,CIR的核心病理机制涉及炎症反应与神经元凋亡,该过程造成的神经细胞损伤会直接损害大脑的认知能力,如学习与记忆功能[3]。聚(ADP-核糖)聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase, PARP]是一类催化ADP-核糖聚合物添加至靶蛋白的酶,在DNA修复、细胞凋亡及炎症调节中发挥关键作用[4]。研究表明,PARP的活化与糖酵解相关基因的上调表达存在正相关关系。在PARP受到抑制后,细胞的葡萄糖摄取与乳酸产量均出现下降。由于糖酵解增强与促炎性小胶质细胞的活化密切相关,提示PARP可能通过增强小胶质细胞的活化状态,进而加剧神经炎症反应[5]。聚(ADP-核糖)聚合酶9[poly(ADP-ribose)polymerase 9, PARP9],又被称为侵袭性B淋巴瘤蛋白,其在多种疾病模型中被证实参与炎症和凋亡过程[6-7]。已知PARP9参与调控免疫细胞趋化和炎症反应,而CIR后强烈的神经炎症是继发性脑损伤的核心机制。然而,PARP9是否参与CIR中的神经炎症过程,目前研究甚少。此外,PI3K/AKT/mTOR信号通路作为细胞内重要的调控网络,包括细胞存活、凋亡和炎症反应[8-9]。研究表明,该通路在缺血损伤(如脑卒中)后的激活具有显著的神经保护作用[10]。Li等[11]研究表明,五味子素通过激活PI3K/AKT/mTOR通路抑制自噬减轻CIR损伤。先前研究表明,PARP9在病毒感染和癌症疾病中下调节PI3K通路中发挥关键作用,提示PARP9与该信号轴可能存在密切关联[6,12]。然而PARP9在CIR疾病中可能的表达变化是否与PI3K/AKT/mTOR通路发生关联也仍不明确。因此,本研究旨在观测CIR大鼠中PARP9、PI3K/AKT/mTOR信号通路的表达,初步探索它们与神经元凋亡、神经炎症以及认知能力的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

70只SPF级SD大鼠[雄性,8~10周龄,体质量250~260 g],购自西南医科大学实验动物中心,动物生产许可证号[SCXK(川)2023-0017]。所有大鼠饲养于独立通风笼具系统,温度维持在22~24 ℃,湿度控制在50%~65%,压差12 Pa。12 h/12 h明暗交替。所有大鼠均可自由摄取饲料和饮水,并在此环境下适应性饲养1周。本实验方案经西南医科大学实验动物伦理委员会批准(20250331-003),动物实验严格遵照"3R"原则实施,以戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,并最大限度减少动物痛苦。预期的不良事件有:活动减少、腹泻、体质量下降、活动减少等,每日3次观察大鼠一般情况,若出现重度腹泻或呼吸困难等预期不良事件,将立即通过腹腔注射过量戊巴比妥钠(150 mg/kg)安乐死,以确保人道终点标准的执行。

1.2 主要试剂与仪器

干扰对照序列腺相关病毒(2.00×10^{11} PFU/mL,序列:CGCTGAGTACTTCGAAATGTC)、PARP9干扰序列腺相关病毒(2.00×10^{11} PFU/mL,序列:GCATTAAGACAGTAGCAATTC)、过表达对照序列腺相关病毒(2.00×10^{11} PFU/mL)、过表达PARP9腺相关病毒(2.00×10^{11} PFU/mL,基于大鼠*PARP9*基因CDS全长序列,NCBI Reference Sequence: NM_001103351)均由上海吉玛生物科技有限公司完成设计、构建及包装。TTC染色液购自武汉赛维尔生物科技有限公司。甲苯胺蓝染液、苏木素-伊红染液购自武汉百仟度生物科技有限公司,TUNEL试剂盒购自上海碧云天生物技术股份有限公司。TNF-α、IL-1β购自美国Proteintech公司。PARP9、GAPDH购自英国Abcam公司。p-PI3K、t-PI3K、p-AKT、t-AKT、p-mTOR、mTOR、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗购自美国cell signaling technology公司。正置光学显微镜购自日本尼康公司。倒置显微镜购自日本OLYMPUS公司。酶标检测仪购自美国Thermo

Fisher Scientific公司。垂直电泳仪、转印电泳仪购自美国Bio-Rad公司。化学发光仪购自中国Tanon公司。

1.3 CIR模型大鼠的构建

参照文献[13],大鼠经1.5%戊巴比妥钠(3.3 mL/kg)腹腔麻醉并仰卧位固定后,消毒颈部皮肤,沿颈正中线切开,分离出右侧的颈总动脉、颈内动脉及颈外动脉。结扎颈外动脉及颈总动脉近心端,并用动脉夹阻断颈内动脉。于颈内动脉与颈外动脉分叉处,使用血管剪作一V形斜切口。随后往颈内动脉插入石蜡线栓,并移去动脉夹,待其插至感受到轻微的阻力感时停止(总距离约2 cm)。缝合伤口,2 h后拔出线栓。24 h后进行Zea-Longa评分[14]:0分(正常,无任何神经功能缺损症状);1分(轻度,对侧前肢无法完全伸展);2分(中度,行走时出现向对侧转圈的行为);3分(重度,行走时向对侧倾倒);4分(极重度,丧失自发行走能力)。若评分为1~3分,则提示造模成功。

1.4 分组及给药

1.4.1 损伤效应实验 10只大鼠采用随机数字表法分为假手术组和CIR组,每组各5只。CIR组大鼠按1.3所述方法构建CIR模型;假手术组大鼠仅行血管分离暴露,不进行动脉切开及石蜡线栓插入操作。所有大鼠术后第7天进行取材,全部用于Western blotting检测。

1.4.2 PARP9干预实验 60只大鼠采用随机数字表法分为AAV-siScramble组、AAV-siPARP9组、AAV-Scramble组、AAV-PARP9组,每组15只。各组大鼠脑室注射腺病毒,注射位点以前囟后缘为参考:向后1.0 mm,中线左右±1.0 mm,垂直深度2.0 mm。AAV-siScramble组大鼠脑室注射2 μL干扰对照序列腺相关病毒,AAV-siPARP9组大鼠脑室注射2 μL PARP9干扰序列腺相关病毒,AAV-Scramble组大鼠脑室注射2 μL过表达对照序列腺相关病毒,AAV-PARP9组大鼠脑室注射2 μL过表达PARP9腺相关病毒。注射后,停留5 min。各组大鼠于注射相应腺病毒2周后,按1.3中的方法构建CIR模型。所有大鼠在术后24 h进行Morris水迷宫实验;术后第7天,每组15只大鼠中,5只用于TTC染色检测脑梗死面积,5只用于尼氏染色、TUNEL染色及免疫组织化学染色,5只用于Western blotting检测。

1.5 Morris水迷宫检测学习能力与记忆能力

术后24 h,将一圆形水池设置成4个象限,以某一象限作为平台象限,记录大鼠找到隐藏平台所需的时间(逃避潜伏期)变化情况,以评估其空间学习能力;连续训练5 d后撤除平台,将大鼠从对侧象限入水点放入水池,自由游泳90 s。视频追踪系统记录原平台象限停留次数及穿越原平台位置的次数,作为评估大鼠空间记忆能力的指标。

1.6 TTC检测脑组织梗死面积占比

术后7 d,每组随机取5只大鼠,经1.5%戊巴比妥钠(3.3 mL/kg)腹腔麻醉后,心脏组织快速灌注预冷的生理盐水,迅速在冰上取出脑组织于-20 ℃冰箱迅速冷冻。20 min后取出脑组织,进行冠状切片(厚度2 mm)。将切片置于2% TTC溶液中,37 ℃避光孵育30 min;随后于多聚甲醛溶液中固定。采用数码相机拍照,使用Image J软件分析大鼠相对脑梗死面积。

1.7 Nissl染色检测脑皮质病理损伤

术后7 d,每组随机取5只大鼠,经1.5%戊巴比妥钠(3.3 mL/kg)腹腔麻醉后,采用颈椎脱臼法处死大鼠,接着取出大鼠脑组织缺血皮层区,用4%多聚甲醛溶液进行固定,随后进行石蜡包埋。使用切片机进行连续切片,制成厚度为4 μm的切片,进行脱蜡、脱水和抗原修复。加入0.5%甲苯胺蓝溶液于室温下孵育40 min,流动的水冲洗2次。加入0.5%伊红溶液反应1~5 min。充分水洗,晾干,中性树胶封片。使用显微镜观察并拍照。

1.8 免疫组织化学染色检测脑组织缺血皮层区TNF-α及IL-1β的表达量

取脑组织缺血皮层区切片,进行脱蜡、脱水和抗原修复。3%H_2O_2溶液消除内源性过氧化氢酶,随后用5%BSA溶液封闭非特异性结合位点。接着将组织切片在4 ℃下与TNF-α(1∶200)或IL-1β(1∶200)单克隆抗体一起孵育过夜。第2天,用PBS溶液切片,将组织切片在室温下与生物素标记的二抗一起孵育1 h。然后用DAB试剂显色并用苏木精复染,中性树胶封片。使用显微镜观察并拍照。每张切片任取5个互不重叠的视野,采用Image J软件测定其平均光密度值。

1.9 TUNEL染色检测脑组织缺血皮层区神经元凋亡情况

取脑组织缺血皮层区切片,进行脱蜡、脱水和抗原修复。随后加入50 μL TUNEL溶液,在37 ℃恒温孵育箱中孵育1 h。之后,在避光环境下,加入DAPI溶液,在37 ℃恒温孵育箱中孵育5 min。使用荧光显微镜观察并拍照。分别计数各组切片中的细胞总数及凋亡细胞数,并计算凋亡指数。

1.10 Western blotting法检测脑组织缺血皮层区PARP9、PI3K/AKT/mTOR信号通路的蛋白表达

术后7 d,每组随机取5只大鼠,经麻醉后,采用颈椎脱臼法处死大鼠,接着取出大鼠脑组织缺血皮层区,并于-80 ℃冰箱冷冻保存。分别取每只大鼠脑组织样本100 mg,加入1 mL混合液(裂解液∶蛋白酶抑制

剂:磷酸酶抑制剂=98:1:1,体积比),使用匀浆器充分研磨。匀浆后冰上充分裂解15 min,接着置于4 ℃离心机,12 000 r/min离心15 min,取上清液。将上清液用1×蛋白上样缓冲液稀释后,沸水煮沸8 min。用10%SDS-PAGE进行电泳,每孔上样15 μL。随后,将蛋白质电转移到PVDF上。然后在室温下用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜2 h。将NC膜放入PARP9(1∶1 000)、p-PI3K(1∶1 000)、t-PI3K(1∶1 000)、p-AKT(1∶1 000)、t-AKT(1∶1 000)、p-mTOR(1∶1 000)、t-mTOR(1∶1 000)、GAPDH(1∶1 000)一抗溶液中,并在4 ℃孵育过夜。TBST洗膜,将NC膜放入HRP标记的二抗(1∶5 000)溶液中,并在室温下孵育1.5 h,TBST洗膜。往NC膜上滴加化学发光液(A液∶B液=1∶1,体积比)1 min后,经凝胶成像系统曝光,并使用Image J软件进行定量。

1.11 统计学分析

采用GraphPad Prism 9.50软件对数据进行统计分析并制图。采用Shapiro-Wilk检验评估数据正态性,采用Levene检验评估方差齐性。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,两组比较用独立样本t检验,多组比较用单因素方差分析,事后用Tukey法校正;水迷宫实验数据采用重复测量方差分析,进行Mauchly's球形检验,若不符合球形假设,则采用Greenhouse-Geisser法进行自由度校正,事后两两比较采用Bonferroni法校正。P<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PARP9在脑组织缺血皮层区中高表达

与假手术组比较,CIR组大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平显著增加(P<0.001,图1)。

2.2 AAV感染可以调控大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平

与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平下降(P<0.01);与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平增加(P<0.05,图2)。

2.3 PARP9表达变化对大鼠CIR后的神经功能与认知损伤的影响

与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠的神经功能评分降低,逃避潜伏期缩短,原平台象限停留次数增加(P<0.001);与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠的神经功能评分增加,逃避潜伏期增加,原平台象限停留次数减少(P<0.001)。见图3。

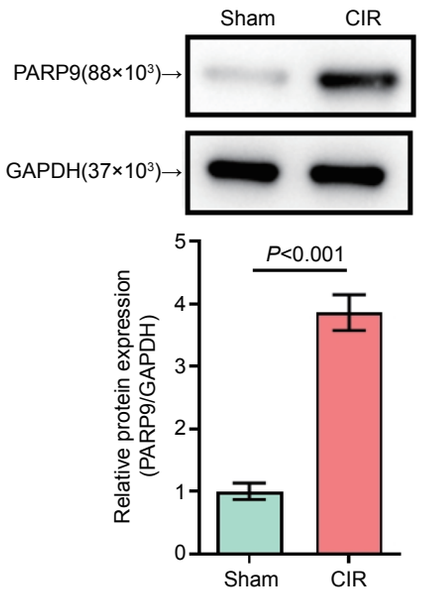


图1 Western blotting检测2组大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平

Figure 1 PARP9 expression in the cerebral ischemic cortical area in rats of cerebral ischemia-reperfusion (CIR) and sham-operation groups by Western blotting

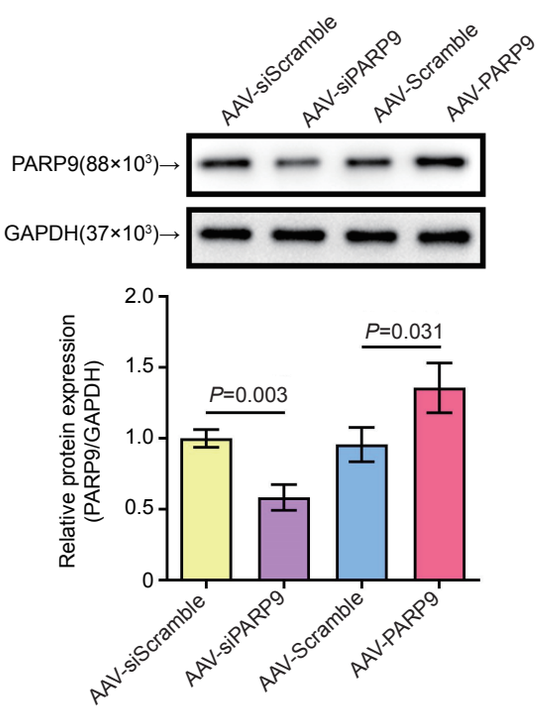


图2 Western blotting检测各组大鼠脑组织缺血皮层区中PARP9的表达水平

Figure 2 PARP9 expression in the cerebral ischemic cortical area across groups by Western blotting

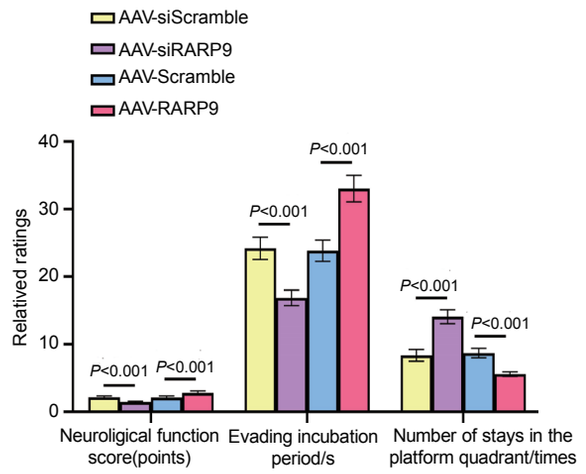


图3 Zea-Longa评分及Morris水迷宫实验检测各组大鼠神经功能评分、逃避潜伏期与原平台象限停留情况

Figure 3 Neurological function scores, escape latency, and platform quadrant crossings in each group assessed by Zea-Longa scoring and Morris water maze test

2.4 PARP9表达变化对大鼠脑梗死面积占比的影响

与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠脑梗死面积占比明显下降[(19.56±4.67)% *vs* (11.23±2.15)%,*P*<0.05];与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠脑梗死面积占比显著增加[(21.45±4.83)% *vs* (42.56±7.76)%,*P*<0.05,图4]。

2.5 PARP9表达变化对大鼠脑皮质病理损伤的影响

AAV-siPARP9组大鼠大脑皮质神经元排列规整,尼氏体含量丰富,胞质呈蓝色,细胞核着色均匀。AAV-PARP9组则表现为皮质神经元分布散乱,局部可见神经元数量减少,胞质蓝染程度变浅,尼氏体明显减少。与上述2组相比,AAV-siScramble组和AAV-Scramble组神经元尼氏体溶解现象有所缓解,神经元存活数量增加。见图5。

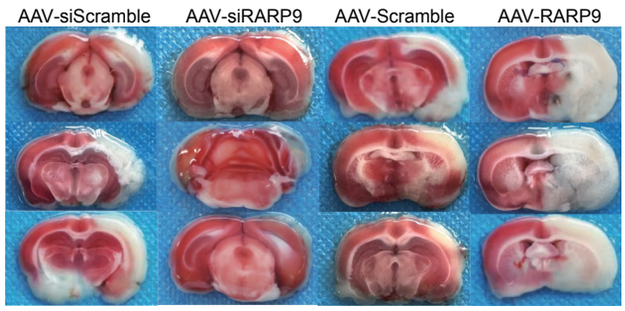


图4 TTC染色观察各组大鼠脑梗死面积占比

Figure 4 TTC staining showing percentage of cerebral infarct area in each group

2.6 PARP9表达变化对大鼠脑组织缺血皮层区中神经元凋亡率的影响

与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中神经元凋亡率显著下降[(21.59±3.47)% *vs* (8.96±1.68)%,*P*<0.001];与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中神经元凋亡率明显增加[(23.21±3.96)% *vs*(46.56±5.37)%,*P*<0.01]。见图6。

2.7 PARP9表达变化对大鼠脑组织缺血皮层区中TNF-α、IL-1β表达的影响

与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中TNF-α、IL-1β的阳性表达下降(*P*<0.05);与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中TNF-α、IL-1β的阳性表达增加(*P*<0.05)。见图7。

2.8 PARP9表达变化对大鼠脑组织缺血皮层区中PI3K/AKT/mTOR信号通路的相关蛋白表达的影响

与AAV-siScramble组比较,AAV-siPARP9组大鼠

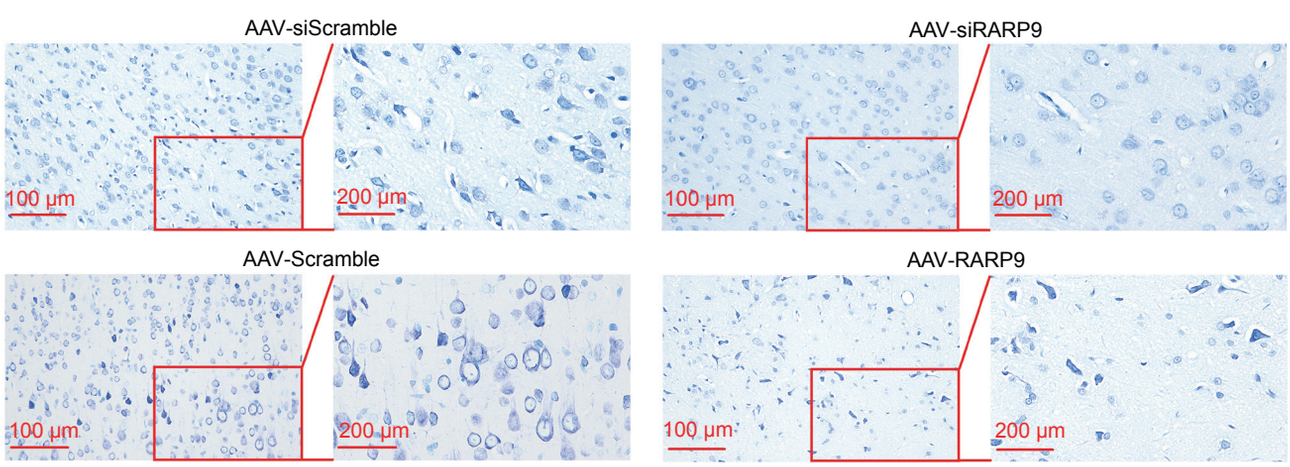


图5 Nissil染色检测各组大鼠脑皮质病理损伤情况

Figure 5 Nissl staining displaying pathological injury in the cerebral cortex of rats in each group

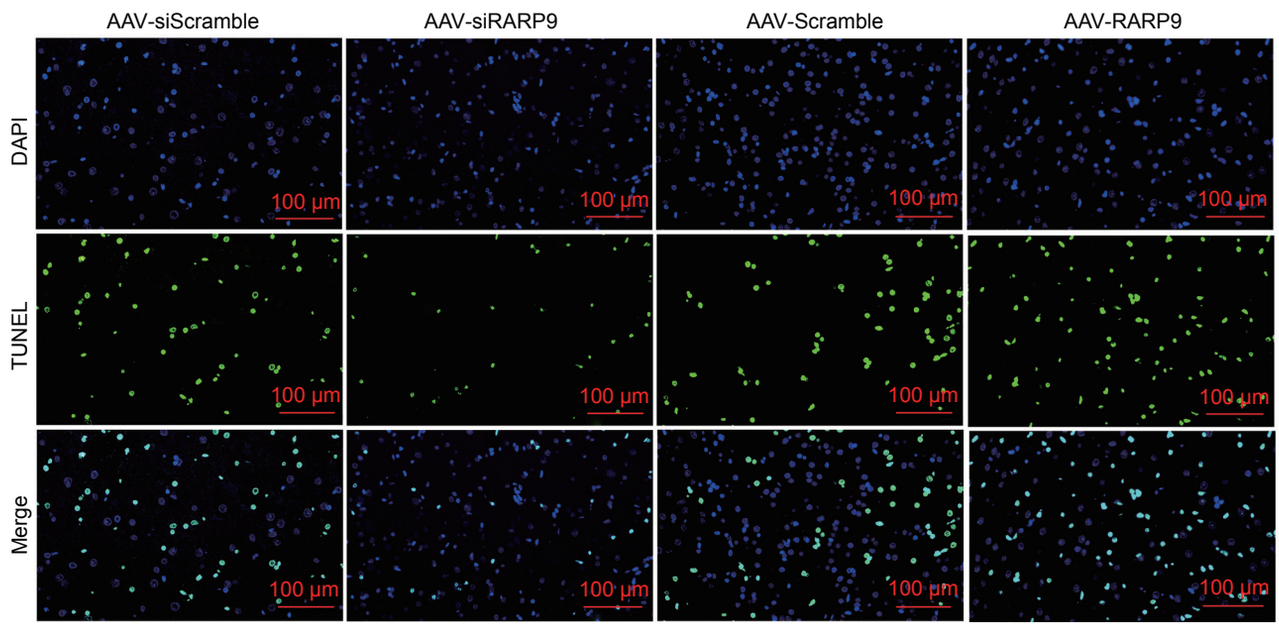


图6 TUNEL染色检测各组大鼠脑组织缺血皮层区中神经元凋亡情况

Figure 6 Neuronal apoptosis in the cerebral ischemic cortical area across groups by TUNEL staining

脑组织缺血皮层区中p-PI3K(P<0.05)、p-AKT(P<0.001)、p-mTOR(P<0.001)蛋白表达增加;与AAV-Scramble组比较,AAV-PARP9组大鼠脑组织缺血皮层区中p-PI3K(P<0.05)、p-AKT(P<0.001)、p-mTOR(P<0.05)、蛋白表达下降。见图8。

3 讨论

3.1 PARP9在CIR中的表达上调及其与神经损伤的关联

作为PARP家族的重要成员,PARP9已被证实在炎症调控及肿瘤发生发展中发挥关键作用[15-16]。在心脏疾病中,Chen等[17]发现PARP9可通过TGF-β/Smad轴影响心肌纤维化进程。然而,PARP9在CIR中的病理作用及其分子调控机制迄今尚未见报道。本研究首次发现,PARP9在CIR大鼠脑组织缺血皮层区中显著高表达,提示其可能作为损伤相关分子,参与了CIR急性期的病理进程。

为明确PARP9表达水平对CIR结局的因果影响,采用脑室注射腺病毒载体,在建模前两周完成PARP9的敲低或过表达。实验结果显示,PARP9的表达水平与神经功能缺损程度及认知功能障碍呈显著正相关:过表达PARP9加重了大鼠的神经功能评分缺陷,并延长了Morris水迷宫中的逃避潜伏期;而敲低PARP9则产生相反的保护效应。神经功能的损伤与认知障碍的加剧,其共同的病理基础在于缺血皮层区神经元的大量丧失及神经环路的破坏。进一步研究发现,PARP9过表达显著增加了缺血皮层区神经元的凋亡率,而敲低PARP9则有效抑制了神经元凋亡。CIR诱导的PARP9高表达,通过促进神经元凋亡,降低了幸存神经元的可塑性储备与突触连接的重组能力,最终表现为神经功能和认知能力的下降。该发现将PARP9从单纯的现象相关分子,定位为CIR后神经元存活与功能恢复的关键负向调控因子,为其作为治疗靶点提供了初步的病理表型基础。

3.2 PARP9正向调控CIR后的神经炎症反应

炎症反应是导致CIR后继发性脑损伤的关键病理机制。一方面,炎症可直接损伤脑组织;另一方面,受损的脑组织又会释放大量促炎因子,形成正反馈循环,级联放大炎症级联反应,最终加剧神经功能缺损[18]。而TNF-α、IL-1β作为关键促炎因子,其表达水平可反映脑内炎症微环境的激活程度[19]。本研究发现在CIR大鼠缺血皮层区,PARP9过表达显著增加TNF-α、IL-1β的阳性表达,而PARP9敲低则显著降低上述炎症因子的水平。这一结果明确表明PARP9在CIR中发挥正向调控神经炎症的作用。

这一发现与黄廉等[20]在阿尔茨海默病中的研究高度一致:后者观察到PARP9阳性小胶质细胞在Aβ斑块周围聚集,且PARP9高表达与神经炎性反应增强相关。这提示PARP9在不同中枢神经系统疾病中可能扮演着保守的促炎角色。PARP9可能通过调节小胶质细胞的极化状态(促进M1型促炎极化、抑制M2型抗炎极化)或NLRP3炎症小体的活性,来驱动促炎因子的转录与释放。释放的TNF-α和IL-1β不仅直接

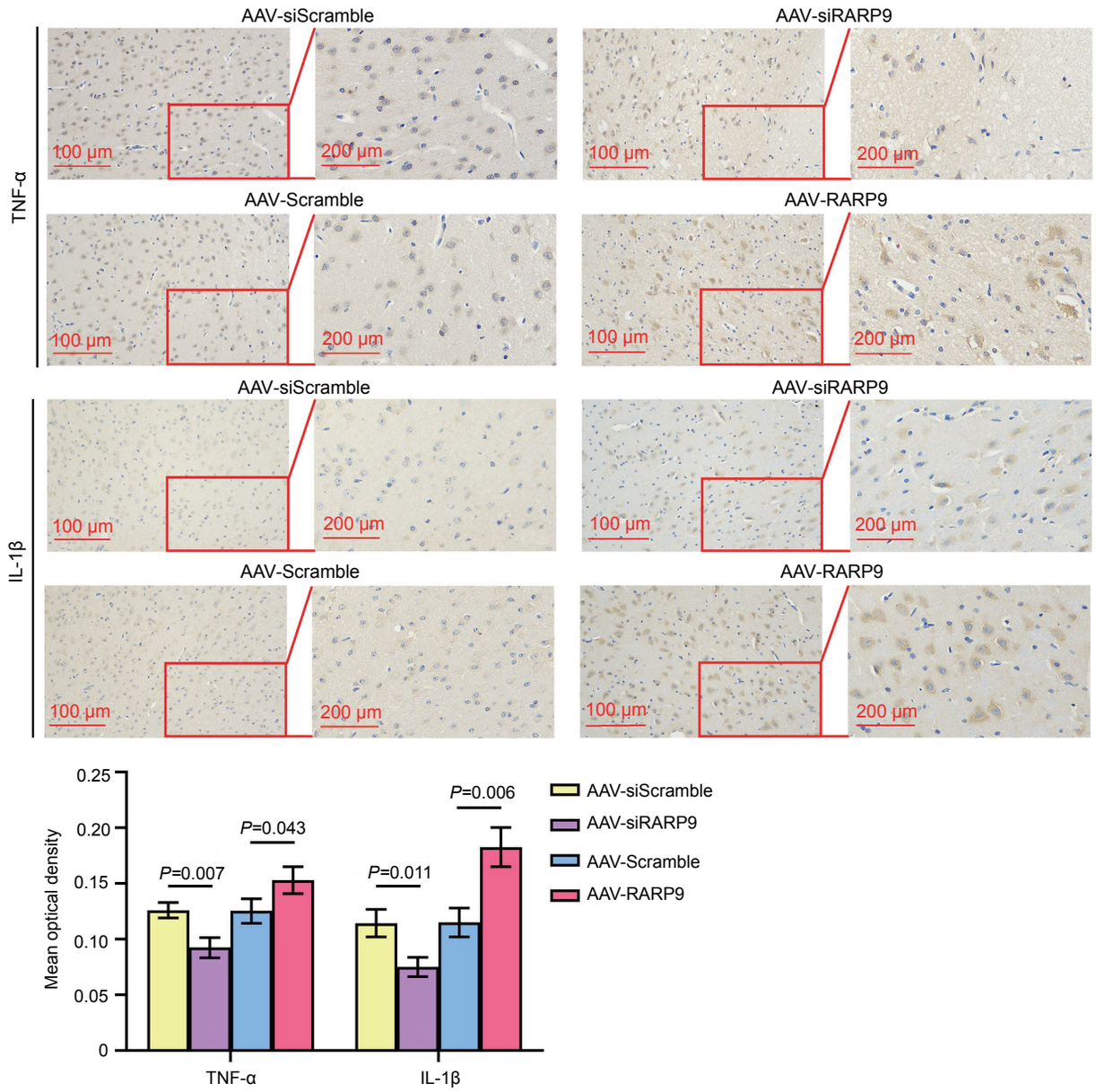


图7 免疫组织化学染色各组大鼠脑组织缺血皮层区中TNF-α、IL-1β表达情况

Figure 7 TNF-α and IL-1β expression in cerebral ischemic cortical area across groups by immunohistochemical staining

损伤邻近神经元,还会进一步破坏血脑屏障完整性,招募外周免疫细胞浸润,形成“炎症-损伤-更多炎症”的正反馈循环[21]。

3.3 PARP9对PI3K/AKT/mTOR通路的抑制作用及其在CIR中的潜在病理意义

PI3K/AKT/mTOR是一条在细胞内至关重要的信号通路,广泛表达于各类神经细胞中,并参与调控细胞分化、增殖、代谢及程序性死亡等一系列关键生物学过程[22-23]。Cui等[24]研究发现,SRSF3在体内和体外通过PDCD4改善缺血性脑梗死,这与PI3K/AKT信号通路密切相关。Zhao等[25]研究发现,在细胞水平上,藏红花素通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路,抑制自噬并降低氧化应激,从而介导神经保护作用。大量研究表明,PI3K/AKT/mTOR通路的激活在脑缺血中具有神经保护作用。本研究结果发现,PARP9的表达与PI3K/AKT/mTOR通路活性呈现负相关:PARP9过表达抑制了缺血皮层区p-PI3K、p-AKT、p-mTOR的蛋白水平,而PARP9低表达,该通路活性显著上升。

值得注意的是,PARP9对PI3K/AKT/mTOR通路的调控在不同病理背景下呈现出明显差异。在肿瘤研究中,Hong等[12]发现PARP9敲低可阻断PI3K/AKT通路并下调PD-L1,从而抑制化疗耐药与免疫逃逸;而

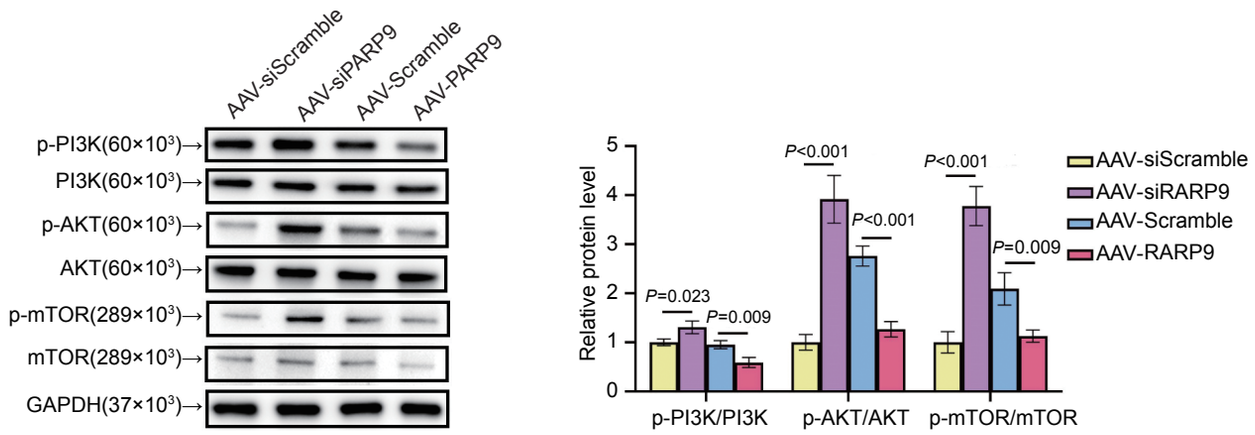


图8 Western blotting法检测各组大鼠脑组织缺血皮层区中PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白表达

Figure 8 Expression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway-related proteins in cerebral ischemic cortical area across groups by Western blotting

在免疫细胞中,PARP9过表达通过激活PI3K途径增强免疫反应,特别是在病毒攻击期间,从而促进免疫激活[26]。与之形成对比的是,本研究中PARP9过表达显著抑制了CIR大鼠缺血皮层区PI3K/AKT/mTOR通路的活性。这种方向性差异可能归因于多重因素的叠加:①细胞类型的固有差异决定了通路的基础活性水平及反馈调控环路的不同;②应激条件的特异性可影响PARP9的翻译后修饰及亚细胞分布;③PARP9在不同细胞中募集的功能伙伴存在差异,从而决定了其作为信号平台所驱动的下游转录输出不同。上述因素共同塑造了PARP9在特定病理环境中对PI3K/AKT通路截然相反的调控模式,也提示在将该分子作为治疗靶点进行跨疾病转化时,需充分考虑其细胞环境依赖性的生物学特征。

本研究首次证实,PARP9在CIR大鼠缺血皮层高表达,与神经元凋亡、神经炎症及认知损伤正相关,与PI3K/AKT/mTOR通路活性负相关,提示PARP9可能通过抑制该保护性通路加剧神经损伤。PARP9在中枢神经系统中发挥促炎作用,与阿尔茨海默病研究一致;但与癌症研究不同,其在脑缺血中过表达抑制而非激活PI3K通路,差异可能源于细胞类型及微环境特异性。然而本研究未使用PI3K特异性抑制剂LY294002,观察PARP9如何调控PI3K/AKT/mTOR信号通路,分析其神经元凋亡、神经炎症以及认知能力的作用。

综上所述,PARP9是CIR病理损伤的重要促进因子,其可能通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路介导。靶向抑制PARP9可减轻神经元凋亡和神经炎症反应,改善认知功能,提示PARP9可能为CIR干预提供新的分子靶点。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] Hilkens N A, Casolla B, Leung T W, *et al*. Stroke[J]. Lancet, 2024, 403(10446): 2820-2836. DOI: 10.1016/S0140-6736(24)00642-1.

[2] Goncalves A, Su E J, Muthusamy A, *et al*. Thrombolytic tPA-induced hemorrhagic transformation of ischemic stroke is mediated by PKCβ phosphorylation of occludin[J]. Blood, 2022, 140(4): 388-400. DOI:10.1182/blood.2021014958.

[3] Yang K L, Zeng L T, Ge A Q, *et al*. A systematic review of the research progress of non-coding RNA in neuroinflammation and immune regulation in cerebral infarction/ischemia-reperfusion injury[J]. Front Immunol, 2022, 13: 930171. DOI:10.3389/fimmu.2022.930171.

[4] Wu S F, Li X L, Gao F, *et al*. PARP-mediated PARylation of MGMT is critical to promote repair of temozolomide-induced O6-methylguanine DNA damage in glioblastoma[J]. Neuro Oncol, 2021, 23(6): 920-931. DOI: 10.1093/neuonc/noab003.

[5] Zhu H F, Zheng C F. When PARPs meet antiviral innate immunity[J]. Trends Microbiol, 2021, 29(9): 776-778. DOI:10.1016/j.tim.2021.01.002.

[6] Xing J J, Zhang A, Du Y, *et al*. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase 9 (PARP9) as a noncanonical sensor for RNA virus in dendritic cells[J]. Nat Commun, 2021, 12: 2681. DOI:10.1038/s41467-021-23003-4.

[7] Xu H, Chai S S, Wang Y H, *et al*. Molecular and clinical characterization of PARP9 in gliomas: a potential immunotherapeutic target[J]. CNS Neurosci Ther, 2020, 26(8): 804-814. DOI:10.1111/cns.13380.

[8] Liu Y L, Gong S T, Li K J, *et al*. Coptisine protects against hyperuricemic nephropathy through alleviating inflammation, oxidative stress and mitochondrial apoptosis *via* PI3K/Akt signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 156:

113941. DOI:10.1016/j.biopha.2022.113941.

[9] Tian Q, Guo Y J, Feng S, *et al*. Inhibition of CCR2 attenuates neuroinflammation and neuronal apoptosis after subarachnoid hemorrhage through the PI3K/Akt pathway[J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1): 312. DOI: 10.1186/s12974-022-02676-8.

[10] Ates N, Caglayan A, Balcikanli Z, *et al*. Phosphorylation of PI3K/Akt at Thr308, but not phosphorylation of MAPK kinase, mediates lithium-induced neuroprotection against cerebral ischemia in mice[J]. Exp Neurol, 2022, 351: 113996. DOI:10.1016/j.expneurol.2022.113996.

[11] Li R Q, Zheng Y Y, Zhang J X, *et al*. Gomisin N attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of autophagy by activating the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. Phytomedicine, 2023, 110: 154644. DOI: 10.1016/j.phymed.2023.154644.

[12] Hong T, Dong D X, Li J, *et al*. PARP9 knockdown confers protection against chemoresistance and immune escape of breast cancer cells by blocking the PI3K/AKT pathway[J]. Arch Med Sci, 2024, 20(4): 1228-1248. DOI: 10.5114/aoms/161444.

[13] 黄寒, 洪小婷, 常小娜, 等. 基于SIRT1/AMPK/PGC-1α信号通路探究豨莶草对脑缺血/再灌注损伤大鼠神经保护及抗氧化作用[J]. 中国药理学通报, 2026, 42(3): 527-533.
Huang H, Hong X T, Chang X N, *et al*. Investigation of neuroprotective and antioxidant effects of Siegesbeckiae Herba based on SIRT1/AMPK/PGC-1α signaling pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin Pharmacol Bull, 2026, 42(3): 527-533.

[14] 张怡, 侯仙明, 张拴成, 等. 黄芪甲苷通过调控Caspase-1介导的经典焦亡途径抑制细胞焦亡缓解脑缺血/再灌注损伤的研究[J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(2): 325-329. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2024.02.018.
Zhang Y, Hou X M, Zhang S C, *et al*. Astragaloside Ⅳ improves cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting pyroptosis *via* regulating Caspase-1-mediated classical pyroptosis pathway[J]. Chin J Immunol, 2024, 40(2): 325-329. DOI:10.3969/j.issn.1000-484X.2024.02.018.

[15] Thapa K, Khan H, Sharma U, *et al*. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 as a promising drug target for neurodegenerative diseases[J]. Life Sci, 2021, 267: 118975. DOI:10.1016/j.lfs.2020.118975.

[16] Wang S P, Huang J L, Zeng T Y, *et al*. Parps in immune response: Potential targets for cancer immunotherapy[J]. Biochem Pharmacol, 2025, 234: 116803. DOI: 10.1016/j.bcp.2025.116803.

[17] Chen N N, Zhang L Z, Zhong Z, *et al*. *PARP9* affects myocardial function through TGF-β/Smad axis and pirfenidone[J]. Biomol Biomed, 2024, 24(5): 1199-1215. DOI: 10.17305/bb.2024.10246.

[18] Mao L, Wu D H, Hu G H, *et al*. TLR4 enhances cerebral ischemia/reperfusion injury *via* regulating NLRP3 inflammasome and autophagy[J]. Mediat Inflamm, 2023, 2023: 9335166. DOI:10.1155/2023/9335166.

[19] Franke M, Bieber M, Kraft P, *et al*. The NLRP3 inflammasome drives inflammation in ischemia/reperfusion injury after transient middle cerebral artery occlusion in mice[J]. Brain Behav Immun, 2021, 92: 223-233. DOI: 10.1016/j.bbi.2020.12.009.

[20] 黄廉, 韦晖. PARP9和PARP14参与阿尔茨海默病中小胶质细胞介导的神经炎性反应[J]. 基础医学与临床, 2025, 45(5): 583-588. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2025.05.0583.
Huang L, Wei H. PARP9 and PARP14 are involved in microglia-mediated neuroinflammation in Alzheimer's disease[J]. Basic Clin Med, 2025, 45(5): 583-588. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2025.05.0583.

[21] Liao M S, Long X Y, Chen Y C, *et al*. PARP9 exacerbates apoptosis and neuroinflammation *via* the PI3K pathway in the thalamus and hippocampus and cognitive decline after cortical infarction[J]. J Neuroinflammation, 2025, 22(1): 43. DOI:10.1186/s12974-025-03374-x.

[22] Fu C, Wu Y F, Liu S J, *et al*. Rehmannioside A improves cognitive impairment and alleviates ferroptosis *via* activating PI3K/AKT/Nrf2 and SLC7A11/GPX4 signaling pathway after ischemia[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115021. DOI:10.1016/j.jep.2022.115021.

[23] 张田田, 王瑾茜, 毛果, 等. 益气活血方对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织细胞自噬及PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(11): 1993-2004. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2024.11.002.
Zhang T T, Wang J X, Mao G, *et al*. Effects of Yiqi-Huoxue formula on autophagy and PI3K/Akt/mTOR sig-naling pathway in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Pathophysiol, 2024, 40(11): 1993-2004. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2024.11.002.

[24] Cui L L, Zhao S Y, Liu H. SRSF3 alleviates ischemic cerebral infarction damage by activating the PI3K/AKT pathway[J]. Dev Neurosci, 2024, 46(5): 308-318. DOI: 10.1159/000535690.

[25] Zhao T, Lu H, Li M, *et al*. Neuroprotective mechanism of crocin *via* PI3K/Akt/mTOR signaling pathway after cerebral infarction: an *in vitro* study[J]. Am J Transl Res, 2022, 14(5): 3164-3171.

[26] Pandi K, Angabo S, Makkawi H, *et al*. *P. gingivalis*-induced TLR2 interactome analysis reveals association with PARP9[J]. J Dent Res, 2024, 103(3): 329-338. DOI: 10.1177/00220345231222181.

(**收稿**:2026-05-21;**修回**:2026-07-15)

(编辑 刘秋池)