基于线粒体能量代谢探讨藁本内酯减轻缺血性脑损伤的作用机制

吴　倩[1], 田丽宇[2,3], 周家宁[1], 万祉含[2], 汪　宁[2,3*]

(1. 安徽中医药大学中西医结合学院, 安徽 合肥 230012;　2. 安徽中医药大学, 中药研究与开发安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012;　3. 安徽中医药大学, 中药复方安徽省重点实验室, 安徽 合肥 230012)

摘要: 作为细胞的“动力工厂”, 线粒体是细胞能量供应和维持细胞内稳态的重要细胞器。缺血性脑卒中发生时, 糖氧剥夺使线粒体首先受到损伤, 引发能量代谢障碍、活性氧聚集, 进而加重缺血性神经损伤。因此, 本研究通过体内建立大鼠大脑中动脉阻塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 模型 [动物实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准后开展 (动物伦理学编号: AHUCM-rats-2021030)], 观察藁本内酯 (ligustilide, LIG) 能否通过恢复能量代谢减轻缺血性神经损伤及相关的作用机制。TTC 染色、神经功能评分及脑指数评估MCAO/R大鼠的神经损伤。线粒体功能相关指标活性氧、线粒体膜电位、线粒体ATP、乳酸、线粒体呼吸链酶复合物I～IV含量检测; Western blot法检测葡萄糖转运4蛋白表达; LIG与腺苷酸活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK] 进行分子对接; Western blot检测糖氧剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 损伤的HT22细胞p-AMPK、AMPK及PPARγ共激活因子-1α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α) 蛋白表达水平。结果显示, LIG给药组显著降低了MCAO/R大鼠的脑梗死体积、脑指数和神经行为学评分; 抑制活性氧聚集, 升高线粒体膜电位和ATP含量, 减少乳酸生成。分子对接结果显示, LIG与AMPK具有较好的结合能力。此外, LIG提高了OGD/R损伤HT22细胞p-AMPK、AMPK及PGC-1α蛋白表达。以上表明, LIG通过改善线粒体功能恢复能量代谢, 减轻了缺血性脑损伤, 其作用机制可能与激活AMPK/PGC-1α信号通路有关。

关键词: 缺血性脑卒中; 藁本内酯; AMPK/PGC-1α通路; 能量代谢; 线粒体功能

中图分类号: R966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0513-4870(2026)02-0476-10

Exploration of the mechanism of ligustilide in alleviating ischemic brain injury based on mitochondrial energy metabolism

WU Qian[1], TIAN Li-yu[2,3], ZHOU Jia-ning[1], WAN Zhi-han[2], WANG Ning[2,3*]

(*1. School of Integrated Traditional and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;　2. Anhui Province Key Laboratory of Research & Development of Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;　3. Anhui Province Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Compounds, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China*)

Abstract: As the "power factory" of cells, mitochondria are important organelles for maintaining cellular homeostasis. The depletion of glucose and oxygen causes mitochondrial damage when ischemic stroke occurs, leading to energy metabolism disorders, reactive oxygen species (ROS) aggregation, which further aggravates ischemic nerve injury. Therefore, the aim of this study is to establish a rat middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) model *in vivo* to investigate whether LIG can reduce ischemic nerve injury by restoring

收稿日期: 2025-06-27;　修回日期: 2025-09-16.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903954); 安徽省教育厅青年教师培育项目 (YQYB2023010); 安徽高校自然科学研究重点项目 (2024AH050964); “中药复方防治脑病的应用基础研究安徽省高校优秀科研创新团队” (2022AH010034).

*通讯作者 E-mail: wnsci123@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-0737

energy metabolism and the mechanism. The animal experiment protocol was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of Anhui University of Chinese Medicine before implementation (animal ethics number: AHUCM-rats-2021030). TTC staining, neurological function score and brain index were used to evaluate nerve injury in MCAO/R rats. The levels of ROS, mitochondrial membrane potential, ATP, lactic acid and mitochondrial respiratory chain enzyme complex I−IV were detected. The expression of glucose transporter 4 (GLUT 4) was detected by Western blot. Ligustilide was used for molecular docking with AMPK. Western blot was used to detect the protein expression levels of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase [AMPK], p-AMPK, and peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1α (PGC-1α) in HT22 cells damaged by oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R). The results showed that LIG treatment significantly reduced cerebral infarct volume, brain index and neurobehavioral score in MCAO/R rats. It inhibited the aggregation of ROS, increased mitochondrial membrane potential and ATP content, and reduced lactic acid production. Molecular docking showed that LIG had a good binding ability with AMPK. In addition, LIG increased the protein expression of p-AMPK, AMPK and PGC-1α in HT22 cells damaged by OGD/R. These results suggest that LIG alleviates ischemic brain injury by improving mitochondrial function and restoring energy metabolism, and the mechanism may be related to the activation of AMPK/PGC-1α signaling pathway.

Key words: ischemic stroke; ligustilide; AMPK/PGC-1α signaling pathway; energy metabolism; mitochondrial function

缺血性脑卒中又称脑梗死, 是由各种原因导致脑动脉血流中断, 局部脑组织缺氧、缺血性坏死, 从而引起神经功能缺损的脑血管疾病, 占卒中所有类型的80%左右[1]。组织纤溶酶原激活剂 (tissue plasminogen activator, tPA) 是目前临床用于缺血性脑卒中恢复血流灌注的主要手段, 但因治疗时间窗有限以及复灌造成的缺血再灌损伤而受到限制[2]。神经细胞的程序性死亡、脑组织能量代谢的障碍、血脑屏障的异常开放是缺血再灌注损伤的主要病理因素, 这些病理反应都与线粒体的结构和功能的变化有着密切关联。线粒体是细胞氧化磷酸化的细胞器, 同时也是细胞中产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的主要细胞器, 因此, 线粒体对缺氧损伤最为敏感。缺血性脑卒中发生时, 脑部局部血流中断导致能量的耗竭、自由基的产生、细胞内钙超载等, 使线粒体首先受到损伤, 进一步破坏细胞正常代谢, 加剧神经功能损伤。可见, 改善缺血性脑卒中线粒体功能以及恢复能量代谢对于减轻缺血性脑损伤具有重要的意义。

川芎是临床治疗脑卒中常见的配伍中药, 其中藁本内酯 (ligustilide, LIG) 是其发挥药效的主要活性成分, 实验研究发现, LIG可以透过血脑屏障[3], 具有较好的脑靶向性, 在治疗脑卒中等脑血管疾病具有良好的优势[4,5]。课题组前期研究已证实LIG可以改善缺血后神经元的线粒体功能[6-8], 但线粒体功能的改善能否恢复能量代谢及涉及的信号通路尚未阐明。本研究拟从能量代谢角度, 揭示LIG改善线粒体功能减轻中动脉阻塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 大鼠神经功能的作用机制, 为LIG的药物开发与临床应用提供科学依据。

材料与方法

动物与细胞　6～8周龄SPF级雄性SD大鼠, 120只, 体重180 ± 20 g, 购自辽宁长生生物技术股份有限公司许可证 [SCXK (辽) 2020-0001]。饲养环境条件: 温度22 ± 2 ℃, 湿度55% ± 5%, 饲养期间可自由获得标准饲料和灭菌饮用水。动物实验方案经安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准后开展 (动物伦理学编号: AHUCM-rats-2021030)。HT22细胞购自于中国科学院上海生命科学研究院资源中心。

药物与试剂　LIG (成都德思特生物技术有限公司, 批号DSTDH000702, 纯度 ⩾ 98%)。LIG由二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配置为浓度为1 600 μmol·L^{-1}母液, 每EP管500 μL分装后于−20 ℃避光冷冻保存, 使用前使用生理盐水/无血清培养基稀释至所需浓度 (DMSO终浓度 < 0.3%)。丁苯酞 (石药集团恩必普药业有限公司, 批号1182104148); 胎牛血清 (武汉普诺赛生命科技有限公司, SA240910, BI公司); DMEM高糖培养基 (南京生航生物技术有限公司, BC20250624); CCK-8试剂盒 (Biosharp公司, 批号21292765); ROS检测试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 批号011520200504); 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号BB-41053)、乳酸 (LA) 检测试剂盒 (批号BB22061)、线粒体/胞浆蛋白提取试剂盒 (批号BB22061), 上海贝博生物科技有限公司; 腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine triphosphate, ATP) 含量试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号20220610); 抗体腺苷酸活化蛋白激酶 [adenosine 5'-monophosphate (AMP)-

activated protein kinase, AMPK] (Immunoway公司, 批号YT0215); Cyt-C抗体 (Abcam公司, 批号GR3429042-6); 线粒体呼吸链酶复合物I～IV抗体 (批号KK1123、KK1124、KK1125、KK0910)、抗体p-AMPK (Thr 172, 批号LL0228)、抗体PPARγ共激活因子-1α (peroxisome proliferator-activated receptorγcoactivator 1α) (批号LL0418), Zenbio公司。

仪器 超净工作台 (苏净集团安泰公司); 恒温二氧化碳培养箱 (日本Sanyo公司); D-37520低温高速离心机 (Thermo公司); ELX800uv酶标仪 (Bio-Tek公司); CK2型倒置显微镜 (日本Olympus公司)。流式细胞仪 (美国Beckman公司, 型号Cytomics FC500); 电泳仪 (美国Bio-Rad公司, 型号Mini-Protean Tetra); 超灵敏多功能成像仪 (美国General Electric公司, 型号Amersham Imager 600)。

MCAO/R大鼠模型建立及给药 大鼠大脑MCAO模型制备采用改良后的Longa线栓法[9]。将SD大鼠适应性喂养1周, 手术前一晚禁食。造模前大鼠经戊巴比妥钠 (30 mg·kg^{-1}) 麻醉, 待完全麻醉后, 颈部剃毛、碘伏消毒、颈部正中切口, 分离暴露颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉。在颈外动脉近心端结扎固定阻止血流, 动脉夹夹闭颈内动脉。用眼科剪在线栓处和动脉夹之间靠下端剪一小口, 将头部包裹石蜡的线栓向远心端插入颈内动脉, 进线深度约10～15 mm (预先用黑色记号笔做好标记长度), 造成大鼠大脑中动脉栓塞模拟局部缺血。缺血2 h后, 轻轻撤回线栓至颈外动脉, 恢复血流灌注。其中, 假手术组除线栓只插入颈内动脉外, 其他步骤与模型组一致, 术后单笼分开饲养。

实验分组 大鼠随机分为5组: 假手术 (Sham)组、模型对照 (Model) 组、LIG (10 mg·kg^{-1}·day^{-1}) 组、LIG (20 mg·kg^{-1}·day^{-1}) [10]组及阳性对照丁苯酞 (*n*-butylphthalide, NBP) 组[11]。为了加快吸收速度, 药物LIG和丁苯酞 (20 mg·kg^{-1}·day^{-1}) 在再灌注时腹腔注射, 假手术组和模型组同时注射等体积含3% Tween-80的生理盐水, 均给药7天。

神经行为学评分 参考Longa 5分制评分法对大鼠进行神经行为学评分, 在不知分组的情况下进行实验结果记录。评分标准如下: 0分: 行为无明显变化, 无明显神经功能缺损; 1分: 左前肢不能完全伸展和屈收, 轻度神经功能缺损; 2分: 行走时向瘫痪侧转圈, 有左侧追尾现象, 中度神经功能缺损; 3分: 行走困难, 向瘫痪侧倾倒, 重度神经功能缺损; 4分: 不能自发行走, 有意识障碍; 5分: 死亡。神经行为学评分为1～4分者, 视为造模成功。无蛛网膜下腔出血且评分在1～3分为入组标准。

湿重法计算MCAO/R大鼠脑指数 大鼠经造模给药后, 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 随后迅速开颅, 沿枕骨大孔处切断, 将大脑与脊髓完全分离, 以获得全部脑组织 (大脑、小脑、脑干), 用预冷的生理盐水轻轻冲洗脑组织表面杂质及血渍, 随后在滤纸上滚动以吸去脑组织表面多余水分, 精准称重。计算公式: 大鼠脑指数 (mg·g^{-1}) =脑组织湿重 (mg) / 大鼠体重 (g)。

TTC染色检测MCAO/R大鼠脑梗死体积 大鼠经造模给药后, 戊巴比妥钠麻醉, 腹主动脉取血, 随后迅速开颅剥离脑组织, 用预冷的生理盐水轻轻冲洗脑组织表面杂质及血渍, 置于−20 ℃冰箱冷冻15 min便于切片。取出预冷的脑标本沿冠状面切成1～2 mm厚的脑片, 放入2% TTC染色液中, 37 ℃避光孵育30 min, 期间轻柔震荡染色液确保脑片与TTC染色液充分接触。染色完成后, 用4%多聚甲醛中固定脑片24 h, 固定完成后拍照记录。正常脑组织呈现深红色, 缺血区呈白色。选取蓝色背景采集脑片图像, 使用ImageJ软件计算每个切片的脑梗死体积, 脑梗死体积% = 梗死体积/整体脑组织体积 × 100%。

流式细胞术检测ROS含量 采用流式细胞术结合DCFH-DA荧光探针检测脑组织中ROS含量。DCFH-DA荧光探针在ROS存在时被氧化, 并呈现绿色荧光, 绿色荧光强度与ROS含量呈正相关。大鼠脑组织经胶原酶消化后制备细胞悬液, 4 ℃、1 000 r·min^{-1}离心5 min, 弃上清后PBS重悬细胞, 重复2次。调整每毫升细胞数为1×10^{6}个, 加入DCFH-DA荧光探针染色液, 37 ℃避光孵育15 min, 期间轻轻震荡保证染色均匀。孵育结束后, PBS洗涤细胞2次, 去除未转移到细胞中的探针, 随后使用流式细胞仪测定, 并用FlowJo进行数据分析。

线粒体膜电位检测 JC-1检测线粒体膜电位, 一般情况下, 红色荧光代表健康线粒体 (聚合态), 绿色荧光代表受损线粒体 (单体态), 通过流式细胞仪检测荧光强度变化。新鲜大鼠脑组织用胶原蛋白酶IV消化并制备细胞悬液, 与JC-1染色液充分混匀, 37 ℃避光孵育20 min, 弃上清, 用染色缓冲液洗涤细胞2次去除未结合的JC-1, PBS混悬细胞, 分别进行荧光显微镜拍照记录及流式细胞仪检测。流式细胞仪分析红绿荧光强度比值, 比值降低提示线粒体膜电位下降。

比色法检测线粒体ATP含量 取脑组织, 迅速用预冷生理盐水冲洗, 称量, 加入9倍体积的沸腾双蒸水中, 研磨为10%匀浆液, 沸水浴中放置10 min, 搅拌并提取1 min, 将匀浆在3 500 r·min^{-1}低温下离心10 min, 收集上清并取适量加入ATP试剂盒中的反应试剂, 混合均匀后, 置于酶标仪中, 在特定波长下测定吸光度

(A) 值。ATP浓度 (μmol·g^{-1} prot) = ($A_{测定} - A_{对照}$) / ($A_{标准} - A_{空白}$) × 标准品浓度 × 样本测定前稀释倍数 ÷ 待测样本蛋白浓度。

LA含量检测　取0.1 g脑组织加入1 mL试剂盒提取液一 ($V_{提取液一}$) 进行匀浆研磨离心, 取0.8 mL上清 ($V_{上清}$) 后加0.15 mL提取液二 ($V_{提取液二}$), 离心取上清后稀释5倍, 之后按照测定步骤操作, 分别加上清液、检测工作液、标准品等, 37 ℃孵育15 min, 使用酶标仪在530 nm波长处测定A值, 测得计算$\Delta A_{测定管} = A_{测定} - A_{对照}$, 以各标准溶液浓度为$x$轴, 以其对应的吸光值 ($\Delta A$标准) 为$y$轴, 绘制标准曲线, 得到标准方程$y = kx + b$, 将$\Delta A$代入公式中得到$x$ (mol·mL^{-1})。LA含量 (μmol·g^{-1}) = $x \times (V_{上清} + V_{提取液二}) \div (W \times V_{上清} \div V_{提取液一})$ (W: 样本质量; 提取液一和提取液二为试剂盒中试剂)。

LIG与AMPK分子对接　从蛋白质数据库 (Protein Data Bank, PDB, https://www.rcsb.org) 获取AMPK蛋白 (PDB: 7MYJ) 的三维晶体结构 (去除配体、水分及杂质), 经PyMOL软件选定AMPK (PDB: 7MYJ), 通过去水、加氢和加电荷等方式优化结构。随后采用Auto dock Vina软件进行对接 (http://www.deepmice.com), 以Surflex-Dock对接进行精确打分, 选择打分最高的构象进行结合位点分析, 以结合能 (kcal·mol^{-1}) 评估亲和力。当结合能 (affinity) < −5 kcal·mol^{-1}时, 认为通过计算机模拟LIG可以与AMPK分子对接, 并分析氢键、疏水作用等关键相互作用模式。

药物亲和反应靶点稳定性实验　采用药物亲和反应靶点稳定性法 (drug affinity responsive target stability, DARTS) 验证LIG与AMPK蛋白相互作用。将HT22细胞裂解后, 12 000 ×g (4 ℃) 离心15 min, 收集上清液作为蛋白提取物。将上清液蛋白平均分到6个EP管中, 按1∶1 000、1∶800、1∶600、1∶400和1∶200的比例加入链霉蛋白酶 (1 mg·mL^{-1})。然后将蛋白混合, 离心管一起放在摇床上, 室温低速孵育30 min。最后通过蛋白质印迹分析确定最佳链霉蛋白酶浓度。重新提取总蛋白, 将蛋白分为5组, 即无链霉蛋白酶 + 二甲基亚砜组及链霉蛋白酶 + LIG (0、5、10和20 μmol·L^{-1}) 组, 混匀室温孵育1 h, 加入上样缓冲液终止反应, 并通过蛋白质印迹进行分析。

细胞热迁移实验　采用细胞热迁移实验 (cellular thermal shift assay, CETSA) 验证LIG与AMPK相互作用。HT22细胞于对数生长期置于6孔板培养, 每毫升细胞数为4×10^{5}个, 24 h后, 用PBS洗涤细胞并收获。随后将细胞沉淀在含完全蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液中裂解。将细胞裂解物在4 ℃下以12 000 r·min^{-1}离心15 min, 收集上清液。将HT22细胞与10 nmol·L^{-1} LIG或DMSO孵育1 h。将各自的裂解物分成较小的等份 (120 μL), 上清液分成11份, 通过PCR仪分别在不同温度 (50、53、56、59、62、65、68、71、74、77和80 ℃) 下加热3 min, 然后在室温下冷却3 min。在4 ℃以12 000 r·min^{-1}离心15 min后, 收集上清液, 最后通过蛋白质印迹进行评估。

Western blot法检测蛋白表达　取新鲜脑组织, 加入蛋白裂解液, 冰浴环境下匀浆30 min、12 000 r·min^{-1}离心15 min, 收集上清液, BCA定量并调整样本浓度一致。蛋白样品与5×上样缓冲液混合后煮沸10 min至变性, 待上样检测。通过SDS-PAGE凝胶电泳进行蛋白分离, 经湿转法将蛋白电转至PVDF膜。随后用5%脱脂牛奶室温封闭1.5 h, 加入稀释后的一抗 (4 ℃孵育过夜), 次日TBST洗膜后与对应二抗室温孵育1 h, 再次洗膜后采用ECL化学发光试剂显色, 利用凝胶成像系统采集图像, 并用Image J软件对条带灰度值进行定量分析。

糖氧剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 模型建立及体外实验分组　取状态良好、对数生长期的HT22细胞, 以每毫升1×10^{5}个细胞数接种于培养瓶, 24 h后, 将细胞分组并进行相应的药物干预。具体分组如下: 对照组加入新鲜培养基1 mL。模型组加入无糖的DMEM培养基, 并置于37 ℃三气培养箱 (1% O_2, 5% CO_2, 94% N_2) 中培养2 h, 再换正常新鲜培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱进行复灌, 继续培养12 h; 给药组在OGD/R造模前3 h分别加入LIG (20 μmol·L^{-1})、LIG+Cc (LIG 20 μmol·L^{-1} + compound C 10 μmol·L^{-1})。

统计学处理　数据使用GraphPad Prism软件进行分析作图。所有数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA) 和Dunnett's检验。$P < 0.05$为具有统计学差异。

结果

1　LIG减轻MCAO/R大鼠的脑组织损伤

1.1　LIG降低MCAO/R大鼠的神经功能评分及脑指数　大鼠经MCAO/R造模后进行神经行为学评分及脑指数评价。如图1A所示, 假手术组大鼠未见明显神经行为缺损表现, 经MCAO/R造模后, 大鼠的神经行为学评分显著升高, 提示造模后出现明显的神经损伤, 表明模型制备成功。与模型组相比, LIG低、高剂量组和阳性药丁苯酞组大鼠的神经行为缺损均显著降低。同样, 与模型组比较, 经LIG及丁苯酞干预后, 大鼠脑指数显著降低 (图1B)。以上结果表明, LIG对MCAO/R大鼠具有脑保护作用。

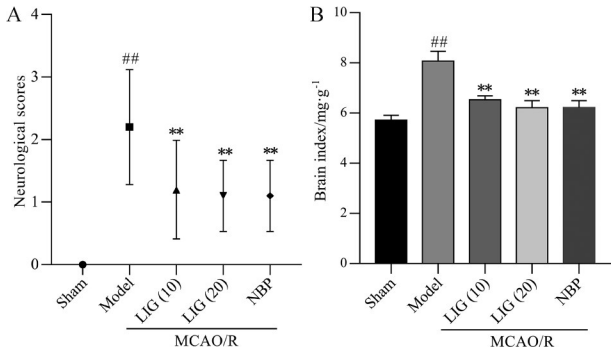


Figure 1 Effect of ligustilide (LIG) on neural injury in middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R) rats. A: Neurological scores; B: Brain index measurement. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* model group (MCAO/R). NBP: *n*-Butylphthalide

1.2 LIG减小MCAO/R大鼠脑梗死体积

TTC染色法观察脑梗死体积变化, 正常区呈深红色, 梗死区呈白色。结果可见 (图2), MCAO/R模型组大鼠白色区域显著增多, 即梗死体积明显增加; 经LIG及NBP干预后, 梗死体积出现了不同程度的减小, 且具有显著性差异。结果提示, LIG可显著减小MCAO/R大鼠脑梗死体积。

2 LIG减轻MCAO/R大鼠线粒体功能恢复能量代谢

2.1 LIG减少MCAO/R大鼠ROS过度聚集

乙酰左旋肉碱 (acetyl *L*-carnitine, ALC) 存在于线粒体中, 能够维持线粒体的能量[12], 因此本研究采用ALC作为阳性对照以考察LIG对MCAO/R大鼠线粒体功能的影响。脑缺血发生时, 能量耗竭使得线粒体氧供应不足, 呼吸链电子传递受阻, 产生大量ROS, 引起ROS的过度聚集。流式细胞术检测大鼠缺血脑组织ROS含量, 结果可见, 与假手术组相比, 模型组大鼠ROS含量显著升高; 而LIG给药后ROS含量显著降低 (图3)。结果表明, LIG可显著降低MCAO/R大鼠ROS的聚集。

2.2 LIG抑制MCAO/R大鼠线粒体膜电位下降

脑缺血使得脑缺血区ROS大量聚集, 直接损伤线粒体膜脂质和蛋白质等, 使得线粒体膜通透性增加, 膜电位急剧下降。JC-1荧光染色结果可见, 经MCAO/R造模后, 脑组织线粒体膜电位显著降低, 呈绿色荧光。与模型组相比, LIG干预后可降低绿色荧光比例 (图4A); 同样的, 流式细胞术检测线粒体膜电位 (图4B), 结果可见, 与假手术组相比, MCAO/R组线粒体膜电位显著下降; 而LIG给药后, 线粒体膜电位显著恢复。表明LIG抑制了MCAO/R大鼠线粒体膜电位的下降。

2.3 LIG抑制MCAO/R大鼠Cyt C从线粒体到胞浆的释放

缺血性脑卒中的发生使得线粒体受损, 膜电位下降通透性增加, 致使线粒体中的细胞色素C释放

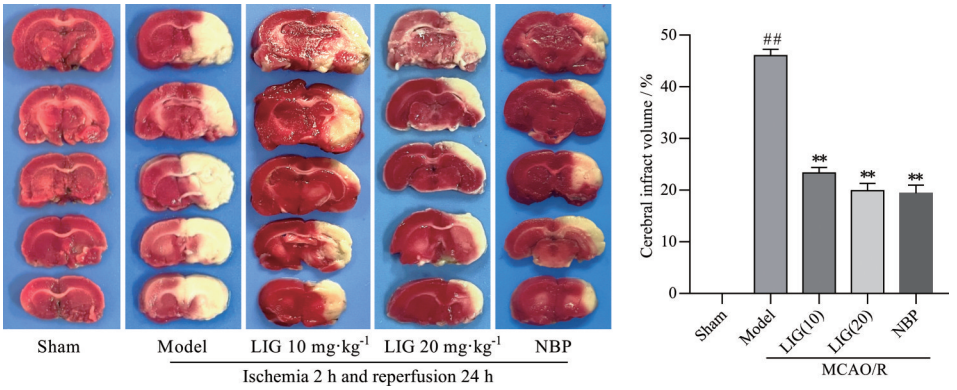


Figure 2 Effect of LIG on cerebral infarct volume in MCAO/R rats. n = 5, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* model group (MCAO/R)

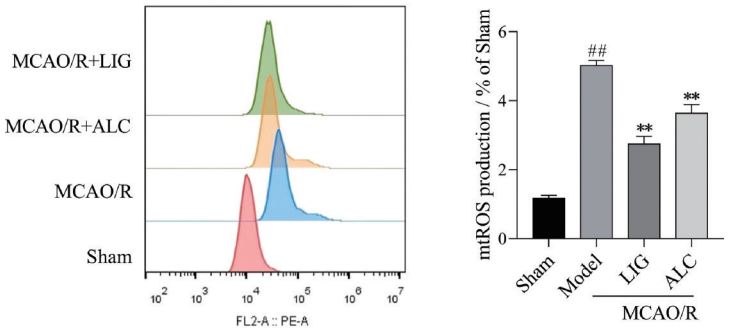


Figure 3 LIG inhibited the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in MCAO/R rats. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* model group (MCAO/R)

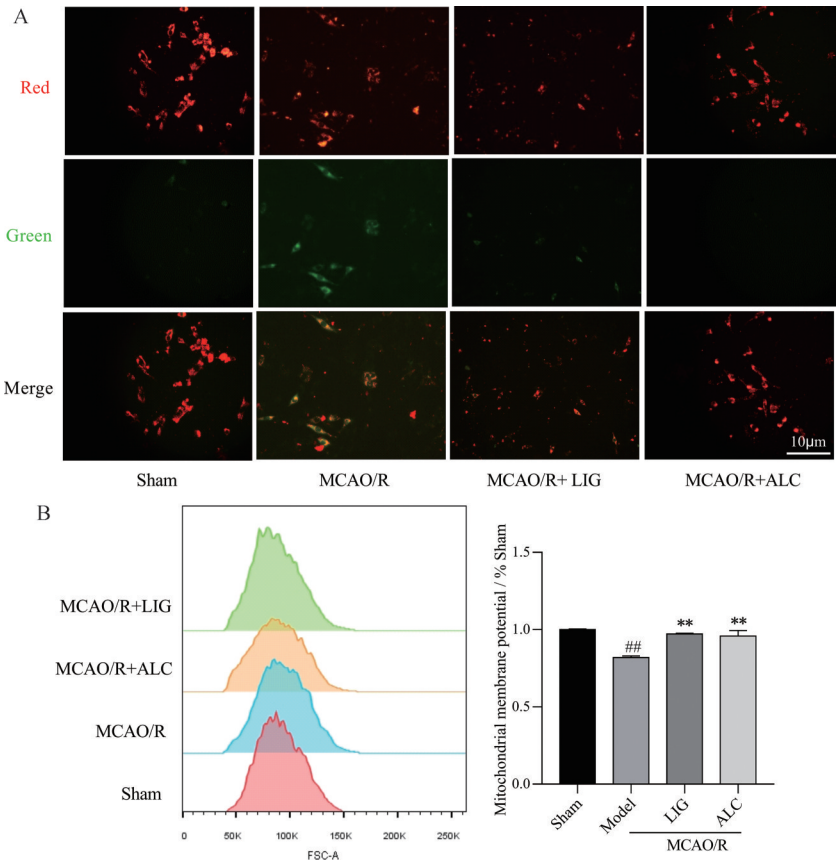


Figure 4　LIG inhibits mitochondrial membrane potential decline in MCAO/R rats. A: Immunofluorescence detection of mitochondrial membrane potential; B: Flow cytometry for detecting mitochondrial membrane potential. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* model group (MCAO/R)

到胞浆, 诱导凋亡级联反应。Western blot法检测线粒体和胞浆内Cyt C蛋白表达变化。结果可见 (图5), 与假手术组相比, MCAO/R组线粒体Cyt C表达显著下降, 而胞浆Cyt C表达上调, 提示脑缺血/再灌注模型使得线粒体中Cyt C向胞浆转移。而LIG干预后脑组织线粒体Cyt C表达明显上升, 而胞浆Cyt C与模型组相比含量明显降低。结果提示LIG干预后能显著抑制Cyt C从线粒体至胞浆的漏出, 这可能与线粒体受损线粒体膜通透性增加有关, LIG修复了这一损伤。

2.4　LIG上调MCAO/R大鼠ATP含量, 减少乳酸生成, 提高GLUT4蛋白表达水平　脑缺血的发生使得有氧呼吸中断, 致使ATP生成急剧减少, 同时丙酮酸无法进入TCA循环, 在乳酸脱氢酶的作用下被还原成乳酸, 因而造成乳酸的大量生成。如图6A所示, 与假手术组相比, 模型组线粒ATP含量明显下降, 与模型组相比, LIG干预后脑组织线粒体ATP含量明显上升。同样的, 模型组乳酸含量显著高于假手术组, LIG给药后乳酸含量显著降低, 提示LIG能够抑制糖酵解反应, 使乳酸堆积得到改善 (图6B)。GLUT4是一种转运葡萄糖的分子, 能够促进糖代谢, 提升能量生成, 其在大脑

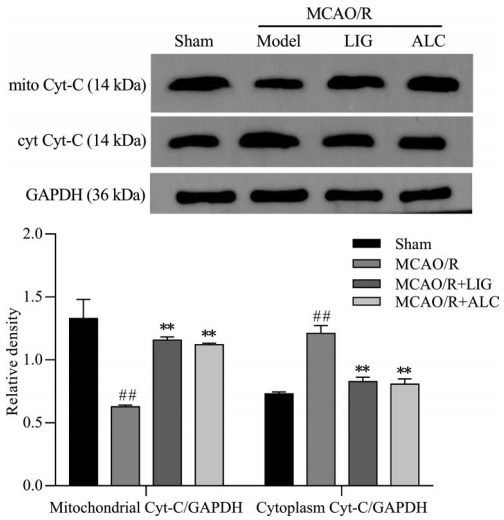


Figure 5　LIG inhibited the release of Cyt-C from mitochondria to cytosol. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* MCAO/R

中为神经元放电提供代谢能量[13]。如图6C所示, 假手术组GLUT4蛋白表达也有显著上调, 这可能是缺血早期的应激性调控, 以此缓解能量危机。LIG给药后, GLUT4蛋白表达进一步显著提高。以上结果表明,

LIG能够提高MCAO/R大鼠线粒体ATP含量, 减少乳酸堆积, 提高GLUT4蛋白表达水平。

2.5 LIG提高MCAO/R大鼠线粒体呼吸链酶复合物I～IV的表达 线粒体呼吸链酶复合物活性与能量代谢直接相关, 机体受损后, 呼吸链链酶类复合物的活性下降[14]。如图7所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠呼吸链复合物I、II、III、IV活性均降低。给予LIG及ALC后呼吸链复合物的活性明显提高。

3 LIG与AMPK分子对接及验证

3.1 LIG与AMPK分子对接 基于前面的实验结果表明, LIG可以恢复脑缺血/再灌注模型大鼠的线粒体功能、改善能量代谢, AMPK是生物能量代谢调节的关键分子, 是能量的感受器[15]。那么LIG的这一作用是否与激活AMPK有关呢? 为了进一步明确LIG与AMPK是否具有相互作用, 通过分子对接, 考察小分子药物LIG与大分子AMPK蛋白的结合情况。根据文献[16]说明, autodock vina对接打分值小于−7.0表示靶点与化合物具有强烈的结合能力; 分值小于−5.0大于−7.0表明靶点与化合物具有较好的结合能力。分子对接结果表明, LIG与AMPK的VAL-96和GLU-94具有结合能力, 结合能为6.7 kcal·mol^{-1}, 说明LIG理论上可以与AMPK进行分子对接, 具有较好的结合能力(图8)。

3.2 DARTS与CETSA9实验验证LIG与AMPK的结合 接下来, 进一步通过DARTS与CETSA9实验验证LIG与AMPK的相互作用。首先通过Western blot使用筛选最适链酶浓度, 在链酶作用下处理含不同浓度LIG的AMPK, 对照组加入等体积的DMSO, 随后检测AMPK的表达情况。结果可见(图9A), 随着链酶浓度的升高, AMPK表达逐渐降低, 本研究选择1∶600的链酶浓度进行后续抗链酶酶解能力实验, 结果(图9B)表明随着LIG浓度的增加, AMPK的表达也随之增加, 具有浓度依赖性, 进一步说明LIG能够增强AMPK抗链酶酶解的能力。

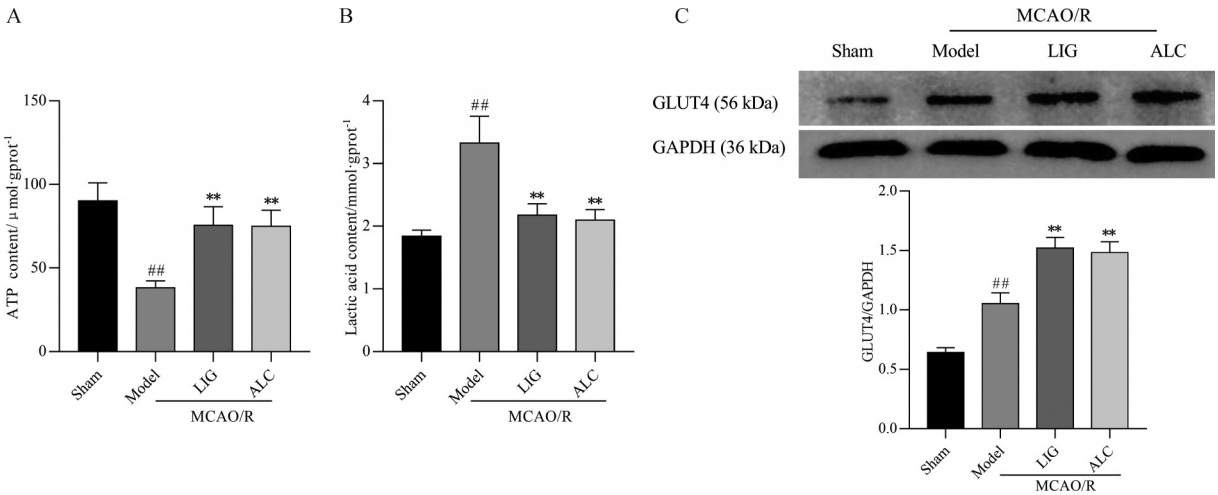


Figure 6 LIG restored ATP content, reduced lactic acid production and elevated the expression level of GLUT4 protein in MCAO/R rats. A: ATP content detection (n = 6); B: Lactic acid content test (n = 6); C: Glucose transporter 4 (GLUT4) protein expression (n = 3). $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* MCAO/R

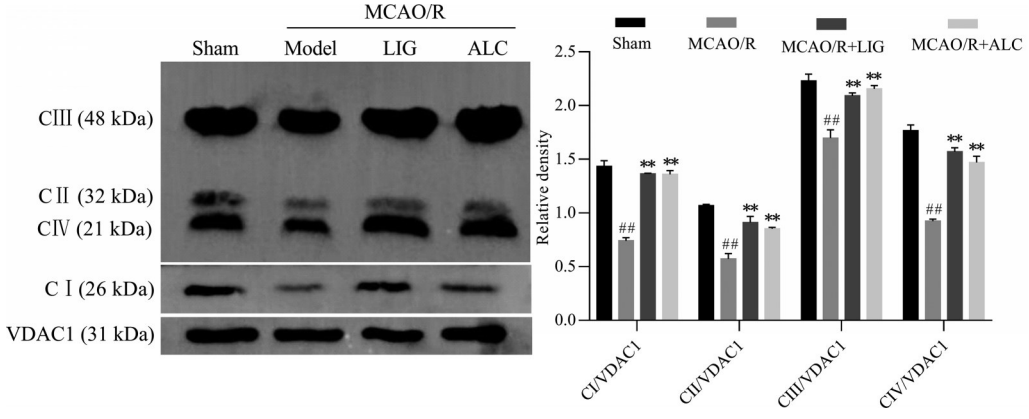


Figure 7 Effect of LIG on mitochondrial respiratory chain enzyme complexes. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* Sham group; $^{**}P < 0.01$ *vs* MCAO/R

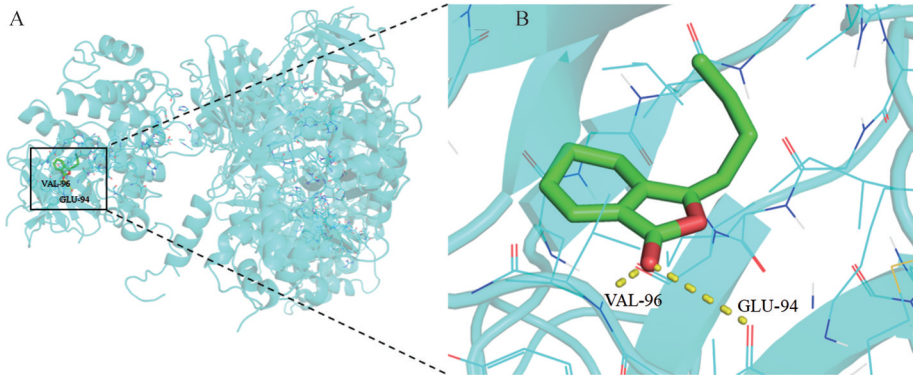


Figure 8　The molecular docking result of LIG and AMPK. A: Outcome of the advantage matching process; B: The enlarged diagram of the docking of LIG with VAL-96 and GLU-94

接下来通过热迁移实验进一步验证。用20 μmol·L^{-1} LIG与AMPK孵育1 h, 然后在温度梯度下孵育3 min, Western blot检测无糖培养基组和LIG组的p-AMPK的表达差异。如图9C所示, 随着温度的升高, p-AMPK水平逐渐降低, 且在相同温度下, LIG组p-AMPK稳定性更高, 降解程度低, 以上结果表明LIG与AMPK具有结合能力。

4　LIG对OGD/R损伤的HT22细胞p-AMPK、AMPK及PGC-1*α*蛋白表达的影响

根据分子对接结果及相关验证实验, 表明LIG与AMPK具有一定的结合能力。AMPK是调节生物能量代谢和稳态的关键分子, PGC-1*α*是AMPK的下游靶蛋白, 可被AMPK直接磷酸化, 并提升其转录活性。AMPK/PGC-1*α*信号通路协同构成细胞能量代谢的核心。因此, 接下来采用体外建立OGD/G损伤的HT22细胞模型, 通过加入AMPK抑制剂compound C, 进一步明确AMPK/PGC-1*α*信号通路在LIG对缺血性脑卒中线粒体能量代谢的影响。Western blot结果可见, HT22细胞经OGD/R造模后, p-AMPK表达量略有上调, 而给予LIG处理后HT22细胞的p-AMPK表达进一步显著增加, 且具有统计学差异, 而加入AMPK抑制剂compound C后, LIG对p-AMPK表达的上调被逆转。同时, 本研究进一步检测了LIG对p-AMPK下游蛋白PGC-1*α*蛋白表达的影响, 同样的LIG给药组PGC-1*α*蛋白表达显著上调, 而compound C逆转了LIG对PGC-1*α*蛋白表达的上调 (图10)。以上结果表明, LIG可以激活AMPK/PGC-1*α*信号通路。

讨论

缺血性脑卒中是大脑血液供应障碍, 导致脑血流量降低, 从而引起的代谢障碍和功能缺损, 具有发病率高、致残率高、死亡率高和复发率高的特点。其病理过程主要涉及能量代谢紊乱[17]、兴奋性氨基酸毒性[18]、神经炎症[19]、自噬[20]、铁死亡[21]等, 这些因素相互影响, 互为因果。因此, 深入研究缺血性脑卒中IS的病理生理机制, 寻找新策略是研究领域面临的重要问题。能量

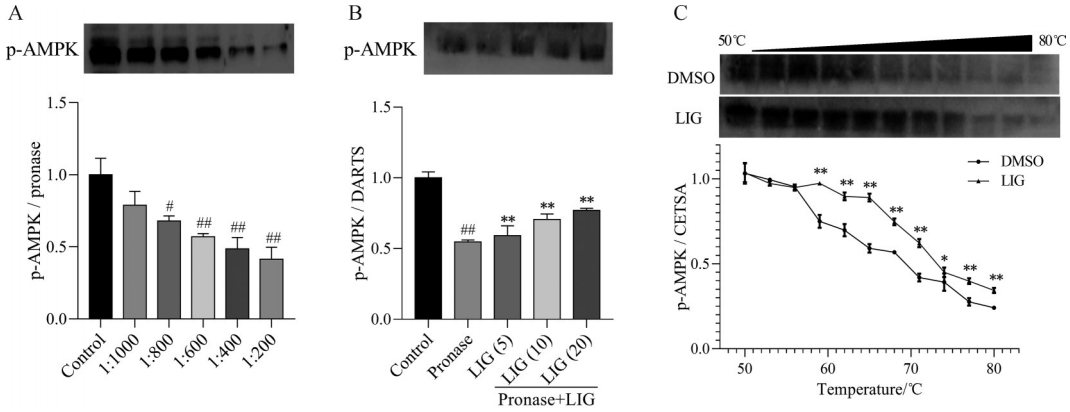


Figure 9　Drug affinity responsive target stability (DARTS) assay was used to verify the interaction between LIG and adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK). A: Chain enzyme concentration screening; B: LIG enhances the anti-lyase enzymolysis ability of AMPK; C: LIG enhances the thermal stability of AMPK. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* control group; $^{**}P < 0.01$ *vs* pronase (Fig. 9B); $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ *vs* DMSO (Fig. 9C)

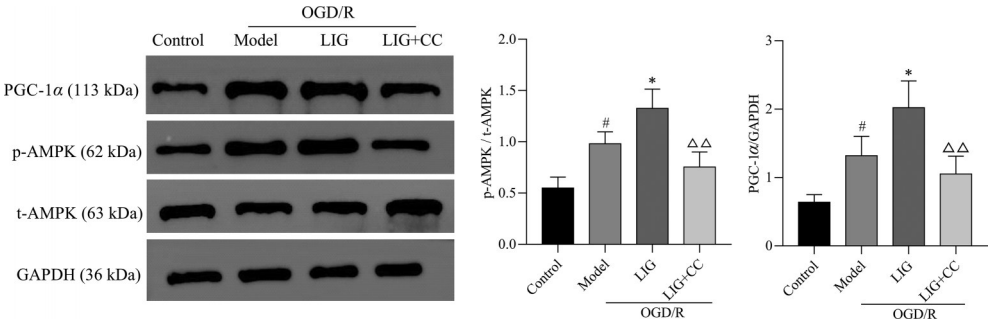


Figure 10 Effect of LIG on the protein expression of AMPK and PGC-1α in HT22 cells under OGD/R. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$ *vs* control group; $^{*}P < 0.05$ *vs* model group (OGD/R); $^{\triangle\triangle}P < 0.01$ *vs* LIG

代谢障碍贯穿缺血性脑卒中的整个过程, 是其发生、发展和加重的重要因素之一[22,23]。因此, 有效改善能量代谢是治疗缺血性脑卒中的一个重要环节。LIG为中药川芎的主要活性成分之一, 含量较高且可以透过血脑屏障, 在缺血性脑卒中的基础研究中具有很好的神经保护作用, 本实验结果表明, LIG减轻MCAO/R大鼠神经损伤的机制可能与恢复能量代谢、改善线粒体功能有关。

能量代谢障碍是缺血性脑卒中的早期病理反应。线粒体是细胞能量供应和代谢的重要细胞器, 神经细胞线粒体功能与其能量代谢密切相关, 大脑作为一个高耗能、高耗氧的器官, 高度依赖脑细胞内线粒体合成ATP。脑缺血时, 缺血缺氧导致氧化磷酸化解偶联, 线粒体合成的ATP急剧下降, 线粒体呼吸链受损[24], 复合物I～IV的活性降低, 细胞能量耗竭, 代谢紊乱, 乳酸等病理产物堆积, 从而引起线粒体通透性转换孔开放[25], 进而线粒体膜电位降低, 大量ROS从受损的线粒体漏出, 使氧化磷酸化解偶联, ATP生成减少, 最终形成恶性循环, 进一步加重神经细胞损伤。本实验结果表明, OGD/R诱导了大鼠脑组织损伤, 导致线粒体功能障碍如膜电位降低、ROS聚集及呼吸链复合物的活性降低, 而LIG干预后可以逆转这一现象, 由此表明LIG可能通过改善线粒体能量保护线粒体功能。

AMPK作为细胞能量的感受器和代谢稳态的调节器, 是缺血性脑卒中等神经系统疾病中重要的内源性防御分子[26], 具有减轻氧化应激、抑制神经炎症、抑制谷氨酸兴奋性毒性等作用。此外, AMPK也可以通过激活PGC-1α来改善线粒体能量, 从而促进线粒体修复, 增加ATP合成, 增加线粒体生物合成和氧化能力, 使能量代谢恢复平衡[27-29]。本实验结果可见, 在OGD/R损伤后, HT22细胞AMPK的磷酸化及其下游蛋白PGC-1α的表达均有所增加, 提示AMPK/PGC-1α信号通路在缺糖缺氧的情况下被激活, 这可能是细胞对抗缺血再灌注损伤的内源性保护机制[30]。LIG给药后, 该通路的表达进一步增强, 加强了对该通路的进一步激活, 表明LIG可以促进AMPK的磷酸化及PGC-1α蛋白的表达, 该信号通路可能参与了LIG对能量代谢的调控作用, 后续实验应加入AMPK抑制剂compound C, 进一步观察LIG对线粒体功能的改善是否会被抑制剂逆转, 以明确LIG对该通路的激活及扮演的积极作用。综上, LIG可能通过AMPK/PGC-1α信号通路改善OGD/R损伤的线粒体功能和能量代谢, 从而发挥神经保护作用。

作者贡献: 吴倩负责实验设计, 部分实验实施、结果分析、撰写和修改论文; 田丽宇、周家宁、万祉含负责部分实验实施、结果统计与分析; 汪宁负责实验指导, 修订论文。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] Report on Stroke Prevention and Treatment in China Writing Group. Brief report on stroke prevention and treatment in China, 2021 summary [J]. Chin J Cerebrovasc Dis (中国脑血管病杂志), 2023, 11: 783-793.

[2] Qiu L, Cai Y, Geng Y, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate tPA-induced blood-brain barrier disruption in murine ischemic stroke models [J]. Acta Biomater, 2022, 154: 424-442.

[3] Liu MY, Liu L, Feng MH, et al. Effect and mechanism of Chuanxiong Rhizoma on permeability of blood-brain barrier [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 138-147.

[4] Long Y, Zhang DK, Zheng C, et al. Theoretical tracing and research progress on Chuanxiong Rhizoma in treatment of stroke [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2024, 55: 6372-6382.

[5] Li XX, Yang P, Zhang YH, et al. Research progress on mechanisms of ligustilide in treatment of nervous system diseases [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2024, 49: 2290-2298.

[6] Wu Q, Wang N, Wang Y, et al. Protective effect of ligustilide against glutamate-induced apoptosis in PC12 cells [J]. Acta

Pharm Sin (药学学报), 2015, 50: 162-168.

[7] Wu Q, Liu J, Mao ZG, et al. Ligustilide attenuates ischemic stroke injury by promoting Drp1-mediated mitochondrial fission *via* activation of AMPK [J]. Phytomedicine, 2022, 95: 153884.

[8] Wu Q, Liu J, Tian LY, et al. Mitophagy mediated by ligustilide relieves OGD/R-induced injury in HT22 cells [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2022, 47: 1897-1903.

[9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20: 84-91.

[10] Mao ZG, Tian L, Liu J, et al. Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy [J]. Phytomedicine, 2022, 101: 154111.

[11] Ni WJ, Li WX, Wang XY, et al. Research progress on pharmacological effects and clinical combined application of 3-*n*-butylphthalide in cerebrovascular diseases [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 3047-3056.

[12] Rolim LC, da Silva EM, Flumignan RL, et al. Acetyl-*L*-carnitine for the treatment of diabetic peripheral neuropathy [J]. Cochrane Database Syst Rev, 2019, 6: CD011265.

[13] Sharma V, Singh TG, Mannan A. Therapeutic implications of glucose transporters (GLUT) in cerebral ischemia [J]. Neurochem Res, 2022, 47: 2173-2186.

[14] Schulte U, den Brave F, Haupt A, et al. Mitochondrial complexome reveals quality-control pathways of protein import [J]. Nature, 2023, 614: 153-159.

[15] Huang Y, Wu H, Hu Y, et al. Puerarin attenuates oxidative stress and ferroptosis *via* AMPK/PGC1*α*/Nrf2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. Antioxidants, 2022, 11: 1259.

[16] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, et al. AutoDock Vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and python bindings [J]. J Chem Inf Model, 2021, 61: 3891-3898.

[17] Sifat AE, Nozohouri S, Archie SR, et al. Brain energy metabolism in ischemic stroke: effects of smoking and diabetes [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 8512.

[18] Liu Y, Chu S, Hu Y, et al. Correction to: exogenous adenosine antagonizes excitatory amino acid toxicity in primary astrocytes [J]. Cell Mol Neurobiol, 2024, 44: 56.

[19] Li C, Zhao Z, Luo Y, et al. Macrophage-disguised manganese dioxide nanoparticles for neuroprotection by reducing oxidative stress and modulating inflammatory microenvironment in acute ischemic stroke [J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8: e2101526.

[20] Ajoolabady A, Wang S, Kroemer G, et al. Targeting autophagy in ischemic stroke: from molecular mechanisms to clinical therapeutics [J]. Pharmacol Ther, 2021, 225: 107848.

[21] Li C, Sun G, Chen B, et al. Nuclear receptor coactivator 4-mediated ferritinophagy contributes to cerebral ischemia-induced ferroptosis in ischemic stroke [J]. Pharmacol Res, 2021, 174: 105933.

[22] Chen YJ. Disturbed cerebral circulation and metabolism matters [J]. J Neurochem, 2022, 160: 10-12.

[23] Zeng M, Zhou H, He Y, et al. Danhong injection alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by improving intracellular energy metabolism coupling in the ischemic penumbra [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 140: 111771.

[24] He Z, Ning N, Zhou Q, et al. Mitochondria as a therapeutic target for ischemic stroke [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 146: 45-58.

[25] Guan R, Zou W, Dai X, et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke [J]. J Biomed Sci, 2018, 25: 87.

[26] Jiang S, Li T, Ji T, et al. AMPK: potential therapeutic target for ischemic stroke [J]. Theranostics, 2018, 8: 4535-4551.

[27] Gravandi MM, Fakhri S, Zarneshan SN, et al. Flavonoids modulate AMPK/PGC-1*α* and interconnected pathways toward potential neuroprotective activities [J]. Metab Brain Dis, 2021, 36: 1501-1521.

[28] Wang Y, Ruan W, Mi J, et al. Balasubramide derivative 3C modulates microglia activation *via* CaMKK*β*-dependent AMPK/PGC-1*α* pathway in neuroinflammatory conditions [J]. Brain Behav Immun, 2018, 67: 101-117.

[29] Li L, Xiao L, Hou Y, et al. Sestrin2 silencing exacerbates cerebral ischemia/reperfusion injury by decreasing mitochondrial biogenesis through the AMPK/PGC-1*α* pathway in rats [J]. Sci Rep, 2016, 6: 30272.

[30] Ramjiawan A, Bagchi RA, Blant A, et al. Roles of histone deacetylation and AMP kinase in regulation of cardiomyocyte PGC-1*α* gene expression in hypoxia [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2013, 304: C1064-C1072.