

红景天苷调控非泛素化 FUNDC1 线粒体自噬途径 抑制 HT22 细胞糖氧剥夺/复氧后铁死亡

杜秋思, 廖君*

(湖南中医药大学 医学院, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 基于线粒体自噬受体 FUN14 结构域蛋白 1 (FUNDC1) 是否是线粒体自噬与神经元铁死亡的关联靶点, 探讨红景天苷 (Sal) 是否可以通过诱导 FUNDC1 的表达, 调控线粒体自噬从而抑制氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 后神经元铁死亡, 起到神经系统保护作用。建立 HT22 细胞 OGD/R 培养制作神经元缺血再灌注损伤模型, 进行 3 部分实验: ①对照组、OGD/R 组、铁抑素 (Fer-1) 组、过表达 FUNDC1 (OV-FUNDC1) 组、OV-FUNDC1+Fer-1 组; ②对照组、OGD/R 组、自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3MA) 组、Sal 组、Sal+3MA 组; ③对照组、OGD/R 组、Sal 组、沉默 FUNDC1 (Si-FUNDC1) 组、Sal+Si-FUNDC1 组。第一部分实验, CCK-8 法检测各组细胞存活率; 蛋白免疫印迹法检测整合体 1 (p62)、微管相关蛋白轻链 3 (LC3)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白水平。结果显示, 与对照组相比, OGD/R 组 p62、GPX4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ACSL4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组相比, OV-FUNDC1 组 LC3、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), p62 和 ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。第二部分实验, Sal 干预后蛋白免疫印迹法检测 FUNDC1、p62、LC3、ACSL4、GPX4 蛋白水平, JC-1 检测线粒体膜电位变化。结果显示, 与 OGD/R 组相比, Sal 组 FUNDC1、LC3、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), p62、ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), 线粒体膜电位显著升高 ($P < 0.01$); 3MA 组线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.01$)。第三部分实验, 沉默 FUNDC1 后, 使用亚铁离子 (Fe^{2+}) 试剂盒检测细胞中 Fe^{2+} 含量; 流式细胞术检测细胞活性氧 (ROS) 水平; MitoTracker Red 检测线粒体功能; 试剂盒检测细胞三磷酸腺苷 (ATP)、谷胱甘肽 (GSH) 含量; 免疫荧光检测 ACSL4、GPX4 表达; 蛋白免疫印迹法检测 p62、LC3、ACSL4、GPX4 蛋白水平。结果显示, 与 Si-FUNDC1 组相比, Sal 组 Fe^{2+} 浓度显著降低 ($P < 0.01$); ROS 表达显著降低 ($P < 0.01$); MitoTracker Red 检测荧光强度显著升高 ($P < 0.01$); GSH 含量显著升高 ($P < 0.01$); ACSL4 荧光强度显著下降 ($P < 0.01$), GPX4 荧光强度显著上升 ($P < 0.01$); LC3、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), p62、ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$)。该研究揭示 FUNDC1 可能是缺血再灌注后神经元线粒体自噬与铁死亡的关联靶蛋白, 而 Sal 干预可通过促进非泛素化 FUNDC1 线粒体自噬途径抑制神经元缺血再灌注后铁死亡。

[关键词] 脑缺血再灌注损伤; 线粒体自噬; 铁死亡; 红景天苷

Salidroside suppresses ferroptosis in HT22 cells following oxygen-glucose deprivation/reoxygenation through regulation of non-ubiquitinated FUNDC1-dependent mitophagy pathway

DU Qiu-si, LIAO Jun*

(Medical School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] This study aims to investigate whether the mitophagy receptor FUN14 domain-containing 1 (FUNDC1) serves as a molecular link between mitophagy and neuronal ferroptosis, and to determine whether salidroside (Sal) can inhibit neuronal ferroptosis after oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) by inducing FUNDC1 expression and regulating mitophagy, thereby exerting

[收稿日期] 2025-05-19

[基金项目] 湖南省自然科学基金联合基金项目 (2025JJ90019); 国家自然科学基金项目 (81774033); 湖南中医药大学研究生创新课题 (2023CX161)

[通信作者] * 廖君 副教授, 硕士生导师, E-mail: liaojun@hnu cm.edu.cn

[作者简介] 杜秋思, E-mail: duqiushi@stu.hnu cm.edu.cn

neuroprotective effects. An *in vitro* model of neuronal ischemia-reperfusion injury was established with HT22 cells subjected to OGD/R. The experiment consisted of three parts: ① control, OGD/R, ferrostatin-1 (Fer-1), FUNDC1 overexpression (OV-FUNDC1), and OV-FUNDC1+Fer-1 groups; ② control, OGD/R, 3-methyladenine (3MA, an autophagy inhibitor), Sal, and Sal+3MA groups; ③ control, OGD/R, Sal, FUNDC1 silencing (Si-FUNDC1), and Sal+Si-FUNDC1 groups. In the first part of the experiment, the survival rate of cells in each group was detected by the CCK-8 assay, and the protein levels of p62, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3), acyl-CoA synthetase long-chain family 4 (ACSL4), and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were measured by Western blot. The results showed that compared with the control group, the OGD/R group had down-regulated protein levels of p62 and GPX4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and up-regulated protein level of ACSL4 ($P < 0.01$); compared with the OGD/R group, the OV-FUNDC1 group showed increased protein levels of LC3 and GPX4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$) and decreased protein levels of p62 and ACSL4 ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In the second part of the experiment, after Sal intervention, the protein levels of FUNDC1, p62, LC3, ACSL4, and GPX4 were determined by Western blot, and changes in mitochondrial membrane potential were measured via JC-1. The results showed that compared with the OGD/R group, the Sal group had up-regulated protein levels of FUNDC1, LC3, and GPX4 ($P < 0.01$), down-regulated protein levels of p62 and ACSL4 ($P < 0.01$), and increased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$); the 3MA group showed decreased mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$). In the third part of the experiment, after silencing of FUNDC1, the intracellular Fe^{2+} content was measured via a ferrous ion assay kit; reactive oxygen species (ROS) levels were measured by flow cytometry; the mitochondrial function was assessed via MitoTracker Red; adenosine triphosphate (ATP) and glutathione (GSH) levels were detected using assay kits; the expression of ACSL4 and GPX4 was detected by immunofluorescence; the protein levels of p62, LC3, ACSL4, and GPX4 were measured by Western blot. The results showed that compared with the Si-FUNDC1 group, the Sal group had decreased Fe^{2+} concentration ($P < 0.01$), reduced ROS level ($P < 0.01$), increased MitoTracker Red fluorescence intensity ($P < 0.01$) and GSH content ($P < 0.01$), weakened ACSL4 fluorescence intensity ($P < 0.01$), enhanced GPX4 fluorescence intensity ($P < 0.01$), up-regulated protein levels of LC3 and GPX4 ($P < 0.01$), and down-regulated protein levels of p62 and ACSL4 ($P < 0.01$). This study reveals that FUNDC1 may be a key protein linking mitochondrial autophagy and ferroptosis in neurons after ischemia-reperfusion injury, and Sal intervention can inhibit neuronal ferroptosis after ischemia-reperfusion by promoting the non-ubiquitinated FUNDC1-dependent mitophagy pathway.

[Key words] cerebral ischemia-reperfusion injury; mitophagy; ferroptosis; salidroside

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20250902.401

缺血性脑卒中是由各种原因导致的脑组织血液供应障碍,并由此产生缺血缺氧性坏死,进而出现神经功能障碍的一组临床综合征^[1]。在我国,脑卒中患病率整体呈上升趋势,患病人数高居世界首位,因其病死率及复发率较高,给社会经济和患者本身带来巨大负担^[2]。脑缺血再灌注是缺血后的血流再通和复氧引发一系列脑部的“瀑布式”级联效应,自由基、钙超载、兴奋性氨基酸、炎症等进一步加重脑组织损伤^[3]。因此,亟需阐明缺血性脑卒中神经元死亡相关机制,研发有效的神经保护药物。

值得注意的是,在缺血性脑卒中神经元死亡的复杂机制中,线粒体自噬与铁死亡途径的交互作用已成为研究焦点。线粒体自噬是选择性自噬的一种形式,自噬泡识别受损线粒体并进行特异性降解,防止过量的活性氧(ROS)产生和细胞死亡,以维持细胞的代谢稳定^[4]。FUNDC1 结构域蛋白 1(FUNDC1)是一种非泛素依赖型线粒体自噬相关蛋白,能直接

与自噬体膜上的微管相关蛋白轻链 3(LC3)相互作用,从而介导线粒体自噬^[5]。在缺氧条件下 FUNDC1 的过表达在损伤早期增强神经元线粒体自噬,改善线粒体损伤,从而减少神经元凋亡^[6]。研究表明,组织型纤溶酶原激活剂(tPA)诱导的 FUNDC1 依赖的线粒体自噬可抑制脑缺血再灌注的神经元损伤^[7]。铁死亡是铁依赖的,诱导脂质过氧化物生成的程序性细胞死亡方式^[8]。研究发现,铁死亡参与了多器官缺血再灌注损伤的病理机制,而铁死亡抑制剂可靶向铁死亡调节基因,起到减轻缺血再灌注损伤的作用^[9]。研究发现,铁死亡与线粒体自噬密切相关:破坏线粒体铁硫簇合物(ISCs)后,铁调节蛋白 1(IRP1)可抑制抗凋亡蛋白 B 细胞超大大淋巴瘤(Bcl-xL)翻译,导致磷酸甘油酸变位酶 5(PGAM5)与 Bcl-xL 分离,可启动 FUNDC1 介导的线粒体自噬^[10]。短期高脂摄入会导致 FUNDC1 缺失,诱导特异性蛋白 1(SP1)-酰基辅酶 A 合成酶长

链家族成员 4 (ACLS4) 轴调控的铁死亡^[11]。

红景天作为一种传统中药用于医学治疗已有上千年历史 2020 年版《中国药典》记载红景天“益气活血,通脉平喘”,可用于治疗“气虚血瘀,胸痹心痛,中风偏瘫,倦怠气喘”^[12]。红景天苷作为红景天中主要的活性成分,多项研究证明其具有抗氧化应激、保护血脑屏障损伤、抗细胞凋亡、保护神经元的作用^[13]。研究表明,红景天苷可通过抑制氧化应激,通过线粒体保护作用逆转大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株(PC12 细胞)的缺氧损伤^[14]。红景天苷可通过抗氧化应激降低线粒体通透性和线粒体损伤,促进线粒体自噬从而清除受损的线粒体^[15]。且有研究指出红景天苷可以通过减少神经元铁死亡发挥神经保护作用^[16]。本研究聚焦于红景天苷调控线粒体自噬与铁死亡的交互作用,为缺血性脑卒中治疗提供创新性药物研发策略与理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠海马神经元细胞系 HT22 细胞系购自武汉普诺赛生命科技有限公司,批号 CL-0697。

1.2 药品与试剂 红景天苷购自上海源叶生物科技有限公司,批号 B20504-20mg; DMEM 培养基、胰酶购自武汉普诺赛生命科技有限公司,批号分别为 PM151210、PM180226; 3-甲基腺嘌呤(3MA)、铁抑制剂(Fer-1)购自美国 MedChemExpress 公司,批号分别为 HY-19312、HY-100579; 兔谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4) 抗体、兔 β -actin 抗体、兔 LC3 抗体、兔 螯合剂 1(p62) 抗体、兔 ACLS4 抗体、兔 FUNDC1 抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司,批号分别为 30388-1-AP、20536-1-AP、14600-1-AP、31403-1-AP、22401-1-AP、28519-1-AP; RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂混合物、蛋白酶抑制剂混合物购自康为世纪生物技术有限公司,批号分别为 CW2333、CW2383S、CW2200S; 超敏 ECL 化学发光底物购自上海万盛昊天生物技术有限公司,批号 EZWB01-2; 细胞亚铁比色法试剂盒、增强型细胞活力检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号分别为 E-BC-K881-M、E-CK-A362; ROS 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0033S; 三磷酸腺苷(ATP)、谷胱甘肽(GSH)含量测试盒购自南京建成生物工程研究所,批号分别为 A095-1-1、A006-2-1。

1.3 仪器 CO₂ 培养箱(型号 150i)、水套式三气培养箱(型号 Forma Steri-Cycle i160)、微量台式高速冷冻离心机(型号 Sorvall™ Legend™ Micro 21R)购自美国赛默飞世尔科技有限公司; mini PROTE-ANTetra Cell 电泳槽、mini Trans-Blot® Cell 转膜槽及电源购自美国 Bio-Rad 公司,型号 mini-sub Cell GT。

2 方法

2.1 细胞培养 HT22 细胞培养遵循标准神经元细胞体外培养方案,具体条件如下:细胞置于 37℃、5% CO₂ 的恒温恒湿培养箱中培养,定期观察细胞贴壁状态及增殖情况。采用高糖型 DMEM 培养基,补充 10% 胎牛血清(FBS)、1% 青霉素-链霉素双抗溶液(100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 μ g·mL⁻¹ 链霉素),充分混匀后经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌。

2.2 细胞转染 过表达 FUNDC1 及敲低 FUNDC1 由苏州海星生物科技有限公司构建,序列分别为 5'-TGTATTTGGCCACAGTTCGG-3'、5'-TGTGATGTGAC-CCTGATGCC-3'。取状态良好的对数生长期细胞消化离心去上清液,使用 PBS 重悬计数并取 1×10^6 个细胞至 EP 管,离心获得细胞沉淀。使用电转缓冲液重悬细胞,并加入质粒充分混匀。输入最适电转参数,对上述混合物进行电转,并在同样参数下电转增强型绿色荧光蛋白(EGFP)对照组。将电转后的各组细胞分别转移至对应的培养器皿中,放置培养箱培养 24 h 后观察细胞状态,并根据 EGFP 对照组情况判断本次电转效率。使用含药培养基,继续培养稳转细胞株进行扩大培养。使用 qPCR 验证转染效率,过表达 FUNDC1 的相对表达量是对照组的 206.33 倍;敲低 FUNDC1 的相对表达量为对照组的 0.05 倍。

2.3 氧糖剥夺/复氧(OGD/R)模型建立与给药 待细胞生长密度大约至 90%,除对照组外,去掉上清液,用 PBS 清洗 1 次,加入 100 μ L 无糖培养基,置于 37℃、94% N₂、1% O₂、5% CO₂ 的三气培养箱中培养 2 h 后去除上清培养基,用 PBS 洗涤 2 次,加入 100 μ L 正常完全培养基或含相应药物(1 μ mol·L⁻¹ Fer-1、5 mmol·L⁻¹ 3MA、红景天苷)的培养基,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

2.4 CCK-8 检测细胞活力 T25cm 培养瓶中细胞数达到 80% 以上时, PBS 清洗 2 次加入胰酶消化后,离心重悬,取 10 μ L 细胞悬液进行计数,将细胞稀释

为每毫升 5 000 个后以每孔 100 μL 接种至 96 孔板中,随后置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 细胞培养箱中至细胞对数生长期。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,混合均匀后,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中孵育 2 h,随后取出孔板,全程避光,使用多功能酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度(A)。细胞存活率 = $(A_{\text{样品孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

2.5 JC-1 线粒体膜电位检测 HT22 细胞培养于 10% FBS+1% 双抗的 DMEM 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。离心后,细胞悬液每 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞需 0.5 mL JC-1 染色工作液。取适量 JC-1 (200 $\times$) 按照每 50 μL JC-1 (200 $\times$) 加入 8 mL 超纯水的比例稀释 JC-1,充分溶解并混匀 JC-1,然后再加入 2 mL JC-1 染色缓冲液(5 $\times$),混匀后即成为 JC-1 染色工作液。用 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$) 洗涤 2 次,加入 1 mL JC-1 染色缓冲液(1 $\times$) 重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 600 $\times g$ 离心 5 min,沉淀细胞,弃上清液。再加入 1 mL JC-1 染色缓冲液(1 $\times$) 重悬细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 600 $\times g$ 离心 5 min,沉淀细胞,弃上清液。再用 JC-1 染色缓冲液(1 $\times$) 重悬后,用流式细胞仪分析。

2.6 亚铁离子(Fe^{2+}) 试剂盒检测 Fe^{2+} 含量 取收集好的细胞按约每 1×10^6 个加入 0.2 mL 试剂一,混匀后于冰上裂解 10 min,15 000 $\times g$ 离心 10 min,取上清液备用。标准管:取 80 μL 不同浓度标准品分别加入酶标板的相应孔中。测定管:取 80 μL 不同浓度待测样本分别加入酶标板的相应孔中。对照孔:取 80 μL 待测样本,加入酶标板相应孔中。向对照孔中加入 80 μL 试剂二,向测定孔、标准孔中加入 80 μL 试剂三。混合均匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min,在酶标仪 593 nm 处测定 A 。

2.7 流式细胞术检测细胞 ROS 水平 HT22 细胞培养于 10% FBS+1% 双抗的 DMEM 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。取对数生长期细胞消化铺板在培养皿中,待细胞贴壁后进行分组处理。按照 1 : 1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA(母液浓度 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),使终浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,以上处理的细胞离心得细胞沉淀,加入 500 μL 配制好的工作液重悬细胞,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱内孵育 30 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞,以充分去除未进入细胞内的 DCFH-DA,用 PBS 冲洗细胞 3 次,最终流式细胞仪上机检测荧光强度。

2.8 MitoTracker Red 检测线粒体功能 将细胞接

种于 6 孔板,密度为每毫升 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养至贴壁(通常为 24 h)。实验前检查细胞状态,至细胞生长密度达 60%~80%。吸除原培养基,用预热的 PBS 轻柔洗涤细胞 1 次,加入含 MitoTracker Red 工作液的新鲜培养基(体积以覆盖细胞为准,如每孔 1 mL),避光条件下,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 孵育 15~30 min。吸除染色液,用预热的 PBS 洗涤细胞 3 次,每次 5 min,去除未结合的染料,加入新鲜完全培养基,继续避光孵育 10 min 以平衡细胞状态。

吸除培养基,加入预冷的 4% 多聚甲醛,室温避光固定 15 min, PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,加入含 DAPI 的抗荧光淬灭封片剂,封片后避光保存于 4 $^{\circ}\text{C}$,于激发波长 579 nm,发射波长 599 nm 的条件下用荧光显微镜观察,使用 ImageJ 软件进行荧光强度分析。

2.9 试剂盒检测细胞 ATP、GSH 含量 使用合适的离心管收集细胞,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 1 000 $\times g$ 离心 5 min 去除上清液,用 1 $\times$ PBS 轻柔重悬细胞,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 1 000 $\times g$ 离心 5 min 去除上清液,加入一定量的冷双蒸水。然后经过超声破碎破坏细胞膜后,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 5 000 $\times g$ 离心 5 min 取上清液,上清液可立即检测;或进行分装,将标本放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,但应避免反复冻融。解冻后的样品再次离心,然后检测。随后进行 BCA 定量检测各组蛋白的浓度,以标准品的浓度为纵坐标, A 为横坐标,使用 Curve Expert 软件进行分析,并根据提示制作标准曲线,计算 ATP、GSH 浓度。

2.10 免疫荧光检测 取对数生长期 HT22 细胞,接种于预先放置好爬片的 6 孔板中,每毫升 5×10^4 个,生长密度为 30%~50% 时进行 OGD/R 及药物干预。首先将爬片用 4% 多聚甲醛固定 30 min,取出爬片后, PBS 冲洗 6 次,每次 5 min,随后用 0.3% 曲拉通 37 $^{\circ}\text{C}$ 通透 30 min; PBS 漂洗 3 次,每次 3 min; 配制 5% PBS-BSA 溶液(现配现用),滴加 PBS-BSA 溶液到细胞上,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 60 min; PBS 漂洗 3 次,每次 3 min; 滴加适当稀释的一抗,稀释比例 1 : 200,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 滴加 50~100 μL 抗兔-IgG 标记荧光抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; DAPI 工作液 37 $^{\circ}\text{C}$ 染核 10 min, PBS 漂洗 3 次,每次 5 min; 缓冲甘油封片。避光保存,或荧光显微镜下观察。使用 ImageJ 软件分析各组细胞的平均荧光强度。

2.11 蛋白免疫印迹法检测 FUNDC1、p62、LC3、ACSL4、GPX4 蛋白水平 提取细胞蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度,并将其配制成 $4 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的蛋白样品。取约 $10 \mu\text{L}$ 蛋白样品,根据蛋白相对分子质量选用 12% SDS-PAGE 胶进行电泳,分离蛋白样品。将胶上的蛋白转移到 PVDF 膜上。电转结束后,将 PVDF 膜浸泡在含 5% 脱脂奶粉的封闭液中,室温条件下孵育 2 h。使用 TBST 洗膜 5 次,每次 5 min;加入相应的一抗(GPX4, 1:1 000; p62, 1:2 000; LC3, 1:2 000; ACSL4, 1:5 000; FUNDC1, 1:5 000; β -actin, 1:5 000) 4°C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min;加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗,将 PVDF 膜与新鲜配制的 ECL 溶液反应数秒,快速于暗室中曝光显影。使用 ImageJ 软件分析条带。所有数据进行归一化处理。

2.12 统计学分析 数据分析和图形绘制使用 GraphPad Prism 8.0.2。对于符合正态性的数据,采用单因素方差分析进行比较,若符合方差齐性,则采用 LSD 检验;若不符合方差齐性,则采用 Games Howell 检验。对于不符合正态性的数据,采用非参数检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 过表达 FUNDC1 后对 HT22 细胞活力的影响 与对照组相比,OGD/R 组细胞存活率显著下降($P < 0.01$);与 OGD/R 组相比,Fer-1 组、过表达 FUNDC1 组、过表达 FUNDC1+Fer-1 组细胞存活率显著升高($P < 0.01$);过表达 FUNDC1 组细胞存活率较 Fer-1 组有所升高但差异无统计学意义(表 1)。

表 1 过表达 FUNDC1 后各组细胞活力($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Cell viability in each group after overexpression of FUNDC1($\bar{x} \pm s$, $n=3$) %

组别	细胞存活率
Con	100.20 $\pm$ 2.23
OGD/R	48.04 $\pm$ 1.11 ²⁾
Fer-1	69.30 $\pm$ 0.97 ⁴⁾
OV-FUNDC1	75.15 $\pm$ 0.61 ⁴⁾
OV-FUNDC1+Fer-1	79.90 $\pm$ 1.75 ⁴⁾

注:Con.对照;OGD/R.氧糖剥夺/复氧(图 1~5,表 2、4~12 同)。Fer-1.铁抑制剂;OV-FUNDC1.过表达 FUNDC1 结构域蛋白 1(图 1、表 2 同)。与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 OGD/R 组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2、4~12 同)。

3.2 过表达 FUNDC1 后细胞中 p62、LC3、GPX4 和 ACSL4 蛋白的表达 HT22 细胞经 OGD/R 处理后,与对照组相比,OGD/R 组 p62、GPX4 水平显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),ACSL4 水平显著升高($P < 0.01$)。与 OGD/R 组相比,过表达 FUNDC1 组 LC3 及 GPX4 水平显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),p62 和 ACSL4 水平显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);过表达 FUNDC1+Fer-1 组 GPX4 水平显著升高($P < 0.01$),ACSL4 水平显著降低($P < 0.01$);Fer-1 组 GPX4 表达显著升高($P < 0.01$),ACSL4 表达显著降低($P < 0.01$)。与 Fer-1 组相比,过表达 FUNDC1 组 LC3 表达显著升高($P < 0.01$)(图 1、表 2)。

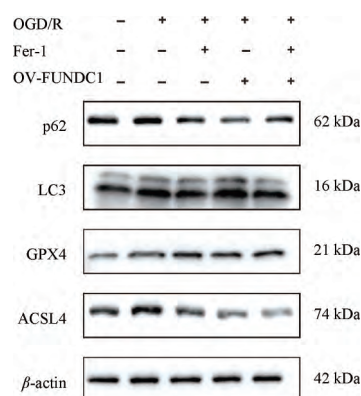


图 1 细胞中 p62、LC3、GPX4 和 ACSL4 的蛋白条带

Fig.1 Bands of p62, LC3, GPX4, and ACSL4 proteins in cells

3.3 红景天苷最佳浓度选择 与对照组相比,各浓度的红景天苷对于正常细胞的细胞存活能力并无显著影响(表 3)。与对照组相比,HT22 细胞经 OGD/R 处理后细胞存活率显著降低($P < 0.01$);红景天苷干预后能增加 OGD/R 处理后的 HT22 细胞存活率,其中以 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度增加最明显($P < 0.01$)(表 4)。因此,以该浓度的红景天苷进行后续实验。

3.4 红景天苷调节 OGD/R 后 HT22 细胞中 FUNDC1、p62、LC3、ACSL4、GPX4 的蛋白表达 与对照组相比,OGD/R 组 p62、GPX4 表达显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 OGD/R 组相比,红景天苷组 FUNDC1、LC3、GPX4 表达显著升高($P < 0.01$),p62、ACSL4 表达显著降低($P < 0.01$);与红景天苷组相比,3MA 组 FUNDC1、GPX4 表达显著下降($P < 0.01$),p62、ACSL4 表达显著升高($P < 0.01$)(图 2、表 5)。

表 2 过表达 FUNDC1 后细胞中 p62、LC3、GPX4 和 ACSL4 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 2 Proteins expression of p62 , LC3 , GPX4 , and ACSL4 in cells after overexpression of FUNDC1($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	p62/ β -actin	LC3/ β -actin	GPX4/ β -actin	ACSL4/ β -actin
Con	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.08	0.91 $\pm$ 0.05	1.00 $\pm$ 0.06
OGD/R	0.78 $\pm$ 0.10 ¹⁾	1.11 $\pm$ 0.11	0.56 $\pm$ 0.05 ²⁾	1.53 $\pm$ 0.18 ²⁾
Fer-1	0.68 $\pm$ 0.08	1.18 $\pm$ 0.03	0.99 $\pm$ 0.13 ⁴⁾	0.69 $\pm$ 0.14 ⁴⁾
OV-FUNDC1	0.51 $\pm$ 0.06 ³⁾	1.52 $\pm$ 0.03 ^{3 5)}	0.87 $\pm$ 0.09 ⁴⁾	0.68 $\pm$ 0.06 ⁴⁾
OV-FUNDC1+Fer-1	0.66 $\pm$ 0.05	1.36 $\pm$ 0.07	0.99 $\pm$ 0.11 ⁴⁾	0.58 $\pm$ 0.14 ⁴⁾

注:与 Fer-1 组相比⁵⁾ $P<0.01$ 。

表 3 不同浓度红景天苷对正常细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effects of different concentrations of salidroside on viability of normal cells($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

红景天苷/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
0	100.50 $\pm$ 6.21
25	97.48 $\pm$ 8.98
50	89.68 $\pm$ 4.92
75	87.20 $\pm$ 7.81
100	87.55 $\pm$ 5.39
200	93.64 $\pm$ 7.71

表 4 不同浓度红景天苷对 OGD/R 处理后细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 4 Effects of different concentrations of salidroside on cell viability after OGD/R treatment($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
Con	-	100.10 $\pm$ 6.18
OGD/R	-	68.64 $\pm$ 3.22 ²⁾
Sal	25	82.81 $\pm$ 3.86 ⁴⁾
	50	75.83 $\pm$ 2.88
	75	73.95 $\pm$ 3.62
	100	72.16 $\pm$ 3.19
	200	62.57 $\pm$ 10.92

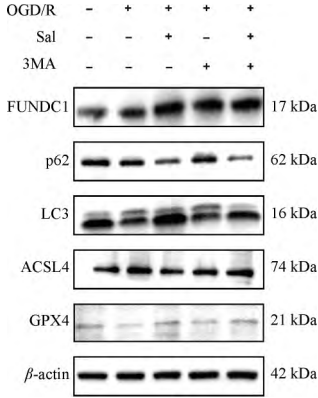
注:Sal.红景天苷(图 2~5、表 5~12 同)。

表 5 各组细胞 FUNDC1、p62、LC3、GPX4 和 ACSL4 的蛋白表达($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 5 FUNDC1 , p62 , LC3 , GPX4 , and ACSL4 proteins expression of cells in each group($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	FUNDC1/ β -actin	p62/ β -actin	LC3/ β -actin	GPX4/ β -actin	ACSL4/ β -actin
Con	0.57 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.04	0.57 $\pm$ 0.03	0.78 $\pm$ 0.04	0.95 $\pm$ 0.01
OGD/R	0.50 $\pm$ 0.06	0.96 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.50 $\pm$ 0.06	0.59 $\pm$ 0.02 ¹⁾	1.03 $\pm$ 0.06
Sal	1.03 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.60 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	1.03 $\pm$ 0.01 ⁴⁾	0.92 $\pm$ 0.09 ⁴⁾	0.70 $\pm$ 0.05 ⁴⁾
3MA	0.67 $\pm$ 0.01 ⁵⁾	0.92 $\pm$ 0.02 ⁵⁾	0.67 $\pm$ 0.01	0.40 $\pm$ 0.04 ⁵⁾	1.02 $\pm$ 0.09 ⁵⁾
Sal+3MA	0.79 $\pm$ 0.03	0.74 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.12	0.83 $\pm$ 0.01

注:与 Sal 组相比⁵⁾ $P<0.01$ (表 6、7、10、11 同)。



3MA、3-甲基腺嘌呤(表 5、6 同)。

图 2 细胞中 FUNDC1、p62、LC3、ACSL4 和 GPX4 的蛋白条带
Fig.2 Bands of FUNDC1 , p62 , LC3 , ACSL4 , and GPX4 proteins

3.5 红景天苷调节 OGD/R 后 HT22 细胞 JC-1 线粒体膜电位 与对照组相比 ,OGD/R 组 JC-1 绿/红荧光比值显著升高($P<0.01$) ,表明线粒体膜电位显著降低;与 OGD/R 组相比 ,红景天苷组 JC-1 绿/红荧光比值显著降低($P<0.01$) 线粒体膜电位显著升高 ,3MA 组 JC-1 绿/红荧光比值显著升高($P<0.01$) 线粒体膜电位显著降低;与红景天苷组相比 ,3MA 组 JC-1 绿/红荧光比值显著升高($P<0.01$) 线粒体膜电位显著降低(表 6)。

表 6 各组细胞绿/红荧光比值的比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 6 Comparison of green/red fluorescence ratio of cells in each group($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	JC-1 绿/红荧光比值
Con	1.12 $\pm$ 0.34
OGD/R	10.60 $\pm$ 0.30 ²⁾
Sal	6.13 $\pm$ 0.35 ⁴⁾
3MA	20.53 $\pm$ 0.74 ^{4 5)}
Sal+3MA	15.31 $\pm$ 0.53

3.6 沉默 FUNDC1 后 HT22 细胞 Fe^{2+} 浓度 与对照组比较 ,OGD/R 组 Fe^{2+} 浓度显著升高($P<0.01$) ; 与 OGD/R 组比较 ,红景天苷组和红景天苷+沉默 FUNDC1 组 Fe^{2+} 浓度显著降低($P<0.01$) ; 与红景天苷组比较 ,沉默 FUNDC1 组 Fe^{2+} 浓度显著升高($P<0.01$) (表 7) 。

表 7 各组细胞 Fe^{2+} 浓度的比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 7 Comparison of Fe^{2+} concentrations of cells in each group($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	$\text{Fe}^{2+} / \times 10^{-6}$ nmol
Con	0.17 $\pm$ 0.03
OGD/R	0.30 $\pm$ 0.03 ²⁾
Sal	0.19 $\pm$ 0.03 ⁴⁾
Si-FUNDC1	0.39 $\pm$ 0.02 ⁵⁾
Sal+Si-FUNDC1	0.26 $\pm$ 0.02 ⁴⁾

注: Si-FUNDC1、沉默 FUN14 结构域蛋白 1(表 8~12、图 3~5 同)。

3.7 沉默 FUNDC1 后 HT22 细胞 ROS 荧光强度与对照组相比 ,OGD/R 组 ROS 荧光强度显著升高

($P<0.01$) ; 与 OGD/R 组相比 ,红景天苷组 ROS 荧光强度显著降低($P<0.01$) ; 与沉默 FUNDC1 组相比 ,红景天苷组、红景天苷+沉默 FUNDC1 组 ROS 荧光强度显著降低($P<0.01$) ; 与红景天苷+沉默 FUNDC1 组比较 ,红景天苷组 ROS 荧光强度显著降低($P<0.01$) (表 8) 。

表 8 各组细胞 ROS 荧光强度的比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 8 Comparison of ROS fluorescence intensity of cells in each group($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	ROS 荧光强度
Con	1 430 $\pm$ 36
OGD/R	4 936 $\pm$ 63 ²⁾
Sal	2 394 $\pm$ 69 ^{4 5 6)}
Si-FUNDC1	6 178 $\pm$ 55
Sal+Si-FUNDC1	3 630 $\pm$ 70 ⁵⁾

注: 与 Si-FUNDC1 组相比⁵⁾ $P<0.01$ (表 9、12 同) ; 与 Sal + Si-FUNDC1 组相比⁶⁾ $P<0.01$ (表 9~12 同) 。

3.8 沉默 FUNDC1 后 HT22 细胞 MitoTracker Red 荧光强度 与对照组比较 ,OGD/R 组 MitoTracker Red 荧光强度显著降低($P<0.01$) ; 与 OGD/R 组相比 ,红景天苷组、红景天苷+沉默 FUNDC1 组 MitoTracker Red 荧光强度显著升高($P<0.01$) ,沉默 FUNDC1 组 MitoTracker Red 荧光强度显著降低($P<0.01$) ; 与红景天苷+沉默 FUNDC1 组比较 ,红景天苷组 MitoTracker Red 荧光强度显著升高($P<0.01$) (图 3、表 9) 。

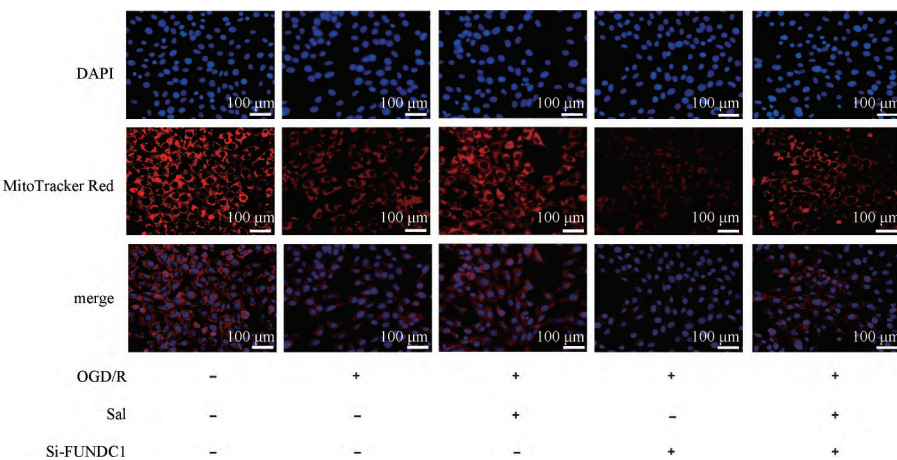


图 3 MitoTracker Red 检测线粒体($\times 200$)

Fig.3 MitoTracker Red detection for mitochondrion ($\times 200$)

表 9 各组细胞 MitoTracker Red 荧光强度的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 9 Comparison of MitoTracker Red fluorescence intensity of cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	MitoTracker Red 荧光强度
Con	712 214 $\pm$ 14 298
OGD/R	233 665 $\pm$ 10 819 ²⁾
Sal	581 723 $\pm$ 12 077 ^{4, 5 6)}
Si-FUNDC1	96 032 $\pm$ 4 377 ⁴⁾
Sal+Si-FUNDC1	399 546 $\pm$ 14 134 ⁴⁾

3.9 沉默 FUNDC1 后 HT22 细胞 ATP、GSH 的含量

与对照组相比, OGD/R 组 ATP、GSH 含量显著降低 ($P<0.01$); 与 OGD/R 组相比, 红景天苷组 ATP、GSH 含量显著升高 ($P<0.01$), 沉默 FUNDC1 组 ATP、GSH 含量显著下降 ($P<0.05$); 与红景天苷组相比, 沉默 FUNDC1 组 ATP、GSH 含量显著降低 ($P<0.01$); 与红景天苷+沉默 FUNDC1 组相比, 红景天苷组 GSH 含量显著升高 ($P<0.01$) (表 10)。

表 10 各组细胞 ATP、GSH 含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 10 Comparison of ATP and GSH content of cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	ATP	GSH
Con	142.50 $\pm$ 9.71	18.35 $\pm$ 0.96
OGD/R	57.26 $\pm$ 6.68 ²⁾	8.50 $\pm$ 0.52 ²⁾
Sal	108.60 $\pm$ 11.52 ^{4 6)}	14.13 $\pm$ 1.40 ^{4 6)}
Si-FUNDC1	34.46 $\pm$ 1.87 ^{3 5)}	5.56 $\pm$ 0.53 ^{3 5)}
Sal+Si-FUNDC1	82.61 $\pm$ 8.25	10.88 $\pm$ 0.39

3.10 沉默 FUNDC1 后 HT22 细胞 ACSL4、GPX4 荧光强度 与对照组相比, OGD/R 组 ACSL4 荧光强度显著升高 ($P<0.01$), GPX4 荧光强度显著降低 ($P<0.01$); 与 OGD/R 组相比, 红景天苷组 ACSL4 荧光强度显著降低 ($P<0.01$), GPX4 荧光强度显著升高 ($P<0.01$); 与红景天苷组比较, 沉默 FUNDC1 组 ACSL4 荧光强度显著升高 ($P<0.01$), GPX4 荧光强度显著降低 ($P<0.01$); 与红景天苷+沉默 FUNDC1 组比较, 红景天苷组 ACSL4 荧光强度显著降低 ($P<0.01$), GPX4 荧光强度显著升高 ($P<0.01$) (图 4、表 11)。

3.11 沉默 FUNDC1 后 HT22 细胞 p62、LC3、ACSL4、GPX4 蛋白表达 与对照组相比, OGD/R 组

ACSL4 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), GPX4 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 与 OGD/R 组比较, 红景天苷组 LC3、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), p62、ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$), 沉默 FUNDC1 组 p62 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), GPX4 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$); 与红景天苷+沉默 FUNDC1 组比较, 红景天苷组 LC3、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), p62、ACSL4 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$) (图 5、表 12)。

4 讨论

目前缺血性脑卒中再灌注损伤过程的发病机制涉及多种病理过程的复杂网络, 包括氧化应激、神经炎症和线粒体损伤等^[17]。其中线粒体自噬的激活有助于清除功能失调的线粒体, 缓解氧化应激, 发挥保护作用^[18]。

研究表明, 通过调控线粒体自噬相关的信号通路, 可减轻缺血性脑卒中再灌注引起的神经元细胞损伤, 从而减缓脑卒中的进展^[19]。在缺血性脑卒中病理进程中, 线粒体动力学失衡引发的 ATP 合成障碍与 ROS 暴发形成恶性循环, 可激活线粒体自噬^[20]。线粒体自噬的调控通路主要分为 2 类: ①泛素依赖型, 以 PINK1/Parkin 通路为代表, 卒中后 Parkin 表达下调导致受损线粒体清除受阻, 加剧神经元损伤^[21-22]; ②非泛素依赖型, 即受体介导型, 依赖 NIX、BNIP3、FUNDC1 等线粒体膜蛋白直接与 LC3 结合, 推进线粒体自噬的进程^[6, 23]。其中 FUNDC1 作为一种线粒体相关膜蛋白, 缺氧条件下可直接与 LC3 相互作用调节线粒体自噬^[24]。研究发现通过抑制过度激活的酪氨酸激酶 (Src) 可增加 FUNDC1 介导的神经元线粒体自噬, 起到缺血性脑卒中后神经元保护作用^[25]。

铁死亡作为一种铁依赖性程序性细胞死亡方式, 其特征在于脂质过氧化物的异常蓄积^[26]。该过程由铁代谢紊乱引发的级联反应所驱动, 过量铁离子通过 Fenton 反应催化 ROS 暴发性生成, 导致线粒体氧化磷酸化功能受损并引发神经元死亡^[27]。细胞膜上胱氨酸/谷氨酸逆转运体 (system xc-) 摄取胱氨酸合成 GSH, 进而激活 GSH-GPX4 抗氧化轴, 抑制脂质氧化酶 (LOX) 活性清除过氧化脂质, 构成铁死亡防御机制^[28]。ACSL4 通过促进多不饱和脂肪酸整合至细胞膜磷脂, 显著增强膜结构对脂质过氧化的敏感性, 这一促氧化机制与 GPX4 介导的抗氧

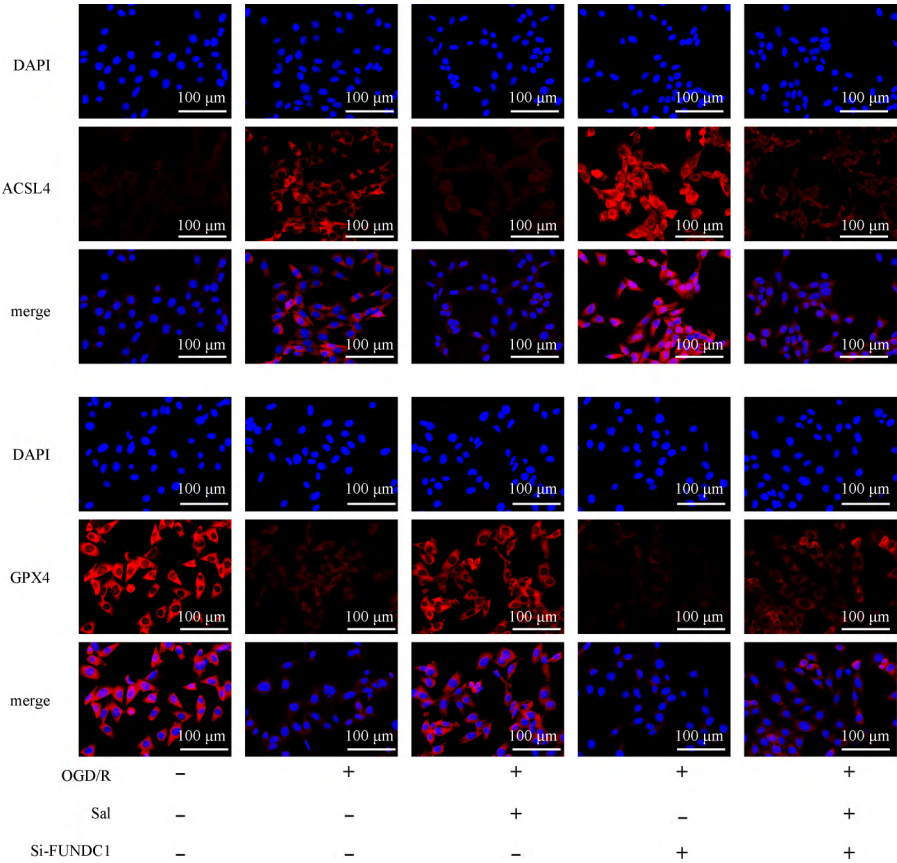


图 4 免疫荧光检测 ACSL4、GPX4 荧光强度(×400)

Fig.4 ACSL4 and GPX4 fluorescence intensity detected by immunofluorescence(×400)

表 11 各组细胞 ACSL4、GPX4 荧光强度的比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 11 Comparison of ACSL4 and GPX4 fluorescence intensity of cells in each group($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	ACSL4 荧光强度	GPX4 荧光强度
Con	2 977±430	19 289±400
OGD/R	15 699±391 ²⁾	6 176±258 ²⁾
Sal	7 969±262 ^{4 6)}	14 884±403 ^{4 6)}
Si-FUNDC1	21 943±441 ⁵⁾	2 129±205 ⁵⁾
Sal+Si-FUNDC1	11 810±252	10 883±224

化系统形成动态平衡 ,共同调控铁死亡的进程方向^[29]。研究发现 ,OGD/R 处理 HT-22 细胞后 ,M2 型小胶质细胞来源的外泌体(M2-exos) 可被 HT-22 细胞内化 ,通过上调 FUNDC1 增强线粒体自噬 ,进而抑制铁死亡^[30]。因此 ,本研究探讨 FUNDC1 是否为神经元线粒体自噬与铁死亡关联靶蛋白。本实验构建 FUNDC1 基因过表达的 HT22 细胞 OGD/R 模型 ,Fer-1 为阳性对照 ,检测发现 FUNDC1 过表达显著增加 LC3 蛋白表达 ,促进线粒体自噬;同时 ,

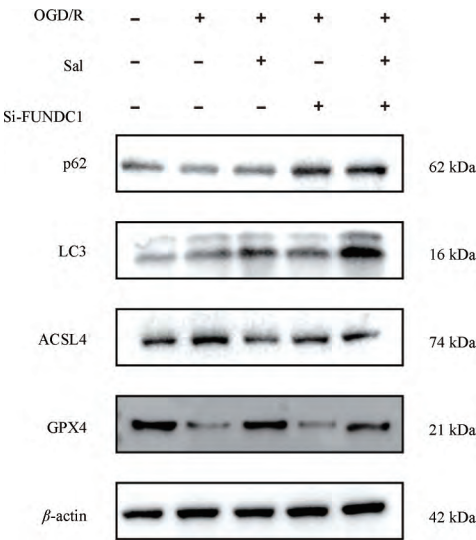


图 5 各组细胞 p62、LC3、ACSL4、GPX4 蛋白条带

Fig.5 Bands of p62 ,LC3 ,ACSL4 , and GPX4 proteins of cells in each group

FUNDC1 过表达与铁死亡抑制剂(Fer-1) 2 种不同干

表 12 各组细胞 p62、LC3、ACSL4、GPX4 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

Table 12 Comparison of p62 , LC3 , ACSL4 , and GPX4 proteins expression of cells in each group($\bar{x} \pm s$ $n=3$)

组别	p62/ β -actin	LC3/ β -actin	ACSL4/ β -actin	GPX4/ β -actin
Con	0. 67 $\pm$ 0. 04	0. 59 $\pm$ 0. 02	0. 74 $\pm$ 0. 01	1. 19 $\pm$ 0. 09
OGD/R	0. 66 $\pm$ 0. 01	0. 68 $\pm$ 0. 02 ²⁾	0. 87 $\pm$ 0. 03 ²⁾	0. 31 $\pm$ 0. 03 ²⁾
Sal	0. 50 $\pm$ 0. 03 ^{4 5 6)}	1. 11 $\pm$ 0. 08 ^{4 5 6)}	0. 67 $\pm$ 0. 02 ^{4 5 6)}	1. 02 $\pm$ 0. 03 ^{4 5 6)}
Si-FUNDC1	1. 01 $\pm$ 0. 02 ⁴⁾	0. 52 $\pm$ 0. 06 ³⁾	0. 90 $\pm$ 0. 03	0. 18 $\pm$ 0. 03 ⁴⁾
Sal+Si-FUNDC1	0. 66 $\pm$ 0. 03	0. 84 $\pm$ 0. 06	0. 80 $\pm$ 0. 03	0. 58 $\pm$ 0. 03

预 均促进 GPX4 和抑制 ACSL4 表达 ,抑制铁死亡。结果显示 ,缺血再灌注后 FUNDC1 可能通过促进神经元线粒体自噬 ,抑制铁死亡。

传统中医药在缺血性脑卒中治疗中积累了丰富的经验 ,其多组分、多靶点的作用特征可通过调控神经网络实现综合治疗效应^[31-32]。现代药理学研究揭示 ,红景天的核心活性成分红景天苷通过抑制氧化应激反应有效减轻血脑屏障损伤 ,同时可以维持线粒体膜电位稳定性、促进受损线粒体自噬清除 ,显著改善 PC12 细胞的缺氧耐受能力^[33-34]。研究发现 ,红景天苷能特异性调节铁死亡关键通路 ,通过降低 ACSL4 表达和增强 GPX4 活性双重机制 ,减少脂质过氧化物蓄积^[35]。最新卵母细胞转录组学和微量蛋白质组学分析显示 ,红景天苷通过增强高龄小鼠卵母细胞的线粒体自噬来改善卵母细胞质量^[36]。本研究通过 OGD/R 后红景天苷及自噬抑制剂 3MA 分别干预 HT22 细胞发现 ,红景天苷干预可促进 FUNDC1、LC3 蛋白表达 ,抑制 p62 蛋白表达 ,促进线粒体自噬 ,同时增加 GPX4 表达 ,减少 ACSL4 表达 ,抑制铁死亡;与 3MA 组相比 ,红景天苷干预增加 FUNDC1 蛋白表达 ,减少 p62 蛋白表达 ,可促进非泛素化 FUNDC1 的线粒体自噬 ,同时增加 GPX4 蛋白表达 ,减少 ACSL4 蛋白表达 ,抑制铁死亡。推测红景天苷干预可增加 FUNDC1 依赖的线粒体自噬并抑制铁死亡。进一步实验通过红景天苷及红景天苷+沉默 FUNDC1 分别干预后显示 ,与红景天苷+沉默 FUNDC1 组 ,红景天苷显著提高线粒体 ATP 生成 ,促进 LC3 蛋白表达 ,抑制 p62 蛋白表达 ,同时降低 Fe²⁺ 浓度、ROS 荧光强度 ,减少 ACSL4 蛋白表达 ,增加 GPX4 蛋白表达 ,具有增强线粒体自噬及抑制铁死亡的作用。由此推测 ,红景天苷可能是通过靶向 FUNDC1 ,起到促进线粒体自噬而抑制铁死亡 of 的神经元保护作用。

综上 ,本研究揭示 FUNDC1 可能是缺血再灌注后神经元线粒体自噬与铁死亡的关联靶蛋白 ,而红景天苷干预可通过促进非泛素化 FUNDC1 线粒体自噬途径抑制神经元缺血再灌注后铁死亡。

【参考文献】

[1] MENDELSON S J , PRABHAKARAN S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: a review [J]. J Am Med Assoc , 2021 , 325(11) : 1088.

[2] 《中国脑卒中防治报告 2021》编写组. 《中国脑卒中防治报告 2021》概要 [J]. 中国脑血管病杂志 , 2023 , 20(11) : 783.

[3] LI M , TANG H , LI Z , et al. Emerging treatment strategies for cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Neuroscience , 2022 , 507: 112.

[4] LOU G , PALIKARAS K , LAUTRUP S , et al. Mitophagy and neuroprotection [J]. Trends Mol Med , 2020 , 26(1) : 8.

[5] WU W , LI W , CHEN H , et al. FUNDC1 is a novel mitochondrial-associated-membrane (MAM) protein required for hypoxia-induced mitochondrial fission and mitophagy [J]. Autophagy , 2016 , 12(9) : 1675.

[6] CHEN D , ZHOU L , CHEN G , et al. FUNDC1-induced mitophagy protects spinal cord neurons against ischemic injury [J]. Cell Death Discov , 2024 , 10(1) : 4.

[7] CAI Y , YANG E , YAO X , et al. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. Redox Biol , 2021 , 38: 101792.

[8] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms , physiological functions , and therapeutic applications [J]. Cell , 2022 , 185(14) : 2401.

[9] PAN Y , WANG X , LIU X , et al. Targeting ferroptosis as a promising therapeutic strategy for ischemia-reperfusion injury [J]. Antioxidants (Basel , Switzerland) , 2022 , 11(11) : 2196.

[10] WU H , WEI H , ZHANG D , et al. Defective mitochondrial ISCs biogenesis switches on IRP1 to fine tune selective mitophagy [J]. Redox Biol , 2020 , 36: 101661.

[11] PRNG H , FU U , WANG S , et al. Ablation of FUNDC1-dependent mitophagy renders myocardium resistant to paraquat-induced ferroptosis and contractile dysfunction [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis , 2022 , 1868(9) : 166448.

[12] 王笑妍 , 李玫 , 沈志纲 , 等. 红景天苷药理作用研究进展 [J].

- 中成药, 2022, 44(12): 3932.
- [13] FAN F, YANG L, LI R, et al. Salidroside as a potential neuroprotective agent for ischemic stroke: a review of sources, pharmacokinetics, mechanism and safety [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110458.
- [14] TANG Y, HOU Y, ZENG Y, et al. Salidroside attenuates CoCl_2 -simulated hypoxia injury in PC12 cells partly by mitochondrial protection [J]. Eur J Pharmacol, 2021, 912: 174617.
- [15] GU C, LI L, HUANG Y, et al. Salidroside ameliorates mitochondria-dependent neuronal apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury partially through inhibiting oxidative stress and promoting mitophagy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3549704.
- [16] YANG S, XIE Z, PEI T, et al. Salidroside attenuates neuronal ferroptosis by activating the Nrf2/HO1 signaling pathway in $\text{A}\beta_{1-42}$ -induced Alzheimer's disease mice and glutamate-injured HT22 cells [J]. Chin Med, 2022, 17: 82.
- [17] KUMAR S S, SINGH D. Mitochondrial mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury: unravelling the intricacies [J]. Mitochondrion, 2024, 77: 101883.
- [18] ZHANG G, WANG Q, JIANG B, et al. Progress of medicinal plants and their active metabolites in ischemia-reperfusion injury of stroke: a novel therapeutic strategy based on regulation of crosstalk between mitophagy and ferroptosis [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1374445.
- [19] SHEN L, GAN Q, YANG Y, et al. Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury [J]. Front Aging Neurosci, 2021, 13: 687246.
- [20] ONISHI M, YAMANO K, SATO M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. EMBO J, 2021, 40(3): e104705.
- [21] EIYAMA A, OKAMOTO K. PINK1/Parkin-mediated mitophagy in mammalian cells [J]. Curr Opin Cell Biol, 2015, 33: 95.
- [22] WU M, LU G, LAO Y Z, et al. Garciesculenanthone B induces PINK1-Parkin-mediated mitophagy and prevents ischemia-reperfusion brain injury in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(2): 199.
- [23] CHEN J L, WANG X X, CHEN L, et al. A sphingosine kinase 2-mimicking TAT-peptide protects neurons against ischemia-reperfusion injury by activating BNIP3-mediated mitophagy [J]. Neuropharmacology, 2020, 181: 108326.
- [24] LIU H, ZANG C, YUAN F, et al. The role of FUNDC1 in mitophagy, mitochondrial dynamics and human diseases [J]. Biochem Pharmacol, 2022, 197: 114891.
- [25] TANG T, HU L, DING C, et al. Src inhibition rescues FUNDC1-mediated neuronal mitophagy in ischaemic stroke [J]. Stroke Vasc Neurol, 2024, 9(4): 367.
- [26] SHE X, LAN B, TIAN H, et al. Cross talk between ferroptosis and cerebral ischemia [J]. Front Neurosci, 2020, 14: 776.
- [27] REN J, LI C, YAN X, et al. Crosstalk between oxidative stress and ferroptosis/oxytosis in ischemic stroke: possible targets and molecular mechanisms [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6643382.
- [28] LONG H, ZHU W, WEI L, et al. Iron homeostasis imbalance and ferroptosis in brain diseases [J]. MedComm, 2023, 4(4): e298.
- [29] TUO Q, LIU Y, XIANG Z, et al. Thrombin induces ACSL4-dependent ferroptosis during cerebral ischemia/reperfusion [J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 59.
- [30] LI J, CHEN Q, GU H. M2 microglia-derived exosomes reduce neuronal ferroptosis via FUNDC1-mediated mitophagy by activating AMPK/ULK1 signaling [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 17955.
- [31] 欧昌泽, 陈彬彬, 刘新利, 等. 缺血性脑卒中中线粒体损伤的关键靶点及中医药干预机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(18): 5098.
- [32] 普元柱, 陈海丰, 王欣怡, 等. 灯盏细辛总咖啡酰奎宁酸激活 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬改善 AD 认知损伤和线粒体功能障碍 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(14): 3969.
- [33] YAO Y, REN Z, YANG R, et al. Salidroside reduces neuropathology in Alzheimer's disease models by targeting NRF2/SIRT3 pathway [J]. Cell Biosci, 2022, 12(1): 180.
- [34] LI F, MAO Q, WANG J, et al. Salidroside inhibited cerebral ischemia/reperfusion-induced oxidative stress and apoptosis via Nrf2/Trx1 signaling pathway [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(8): 2965.
- [35] YANG S, WANG L, ZENG Y, et al. Salidroside alleviates cognitive impairment by inhibiting ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 axis in SAMP8 mice [J]. Phytomedicine, 2023, 114: 154762.
- [36] GU J, HUA R, WU H. Salidroside improves oocyte competence of reproductively old mice by enhancing mitophagy [J]. Aging Cell, 2025, 24(5): e14475.

[责任编辑 马超一]