

补阳还五汤对脑缺血再灌注大鼠线粒体动力学的影响及机制^Δ

张雯*, 杨畅, 金海涛[#](武汉市中医医院脑病科, 武汉 430061)

中图分类号 R965;R285

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2025)23-2946-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.23.11



摘要 **目的** 探究补阳还五汤(BYHWD)对脑缺血再灌注损伤(CIRI)大鼠线粒体动力学的影响及机制。**方法** 将CIRI大鼠随机分为CIRI组、低剂量BYHWD(L-BYHWD,灌胃3.15 mg/kg)组、高剂量BYHWD(H-BYHWD,灌胃12.60 mg/kg)组、阳性对照(腹腔注射150 mg/kg银杏叶提取物注射液)组、H-BYHWD+溶剂对照(灌胃12.60 mg/kg BYHWD+腹腔注射20 mg/kg二甲亚砜)组、H-BYHWD+Compound C(灌胃12.60 mg/kg BYHWD+腹腔注射20 mg/kg Compound C)组,每组15只;另取15只大鼠作为假手术组。各组大鼠灌胃或腹腔注射相应药液或生理盐水,每日1次,连续4周。末次给药后,检测大鼠脑梗死体积,观察缺血性半暗带(IP)区内皮细胞线粒体超微结构,评估IP区线粒体膜电位,检测IP区视神经萎缩蛋白1(OPA1)与分化簇31(CD31)荧光共定位面积比,线粒体融合蛋白2(MFN2)、OPA1、线粒体分裂蛋白1(Fis1)蛋白表达水平和AMP活化蛋白激酶(AMPK)/动力相关蛋白1(Drp1)通路相关蛋白表达水平。**结果** 与假手术组比较,CIRI组大鼠脑组织IP区内皮细胞线粒体肿胀且多呈球状,嵴发生断裂且空泡现象严重;脑梗死体积百分比、Fis1蛋白表达水平及Drp1磷酸化水平均显著升高($P<0.05$),IP区线粒体膜电位、OPA1与CD31荧光共定位面积比和MFN2、OPA1蛋白表达水平及AMPK磷酸化水平均显著降低($P<0.05$);与CIRI组比较,L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠上述指标均显著改善($P<0.05$);与H-BYHWD组、H-BYHWD+溶剂对照组比较,H-BYHWD+Compound C组大鼠上述指标均显著逆转($P<0.05$);H-BYHWD+溶剂对照组与H-BYHWD组大鼠上述指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** BYHWD可通过激活AMPK/Drp1通路,改善线粒体动力学紊乱,从而改善CIRI。

关键词 补阳还五汤;脑缺血再灌注损伤;AMPK/Drp1通路;线粒体动力学

Effect and mechanism of Buyang huanwu decoction on mitochondrial dynamics in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury

ZHANG Wen, YANG Chang, JIN Haitao (Dept. of Encephalopathy, Wuhan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the effect and mechanism of Buyang huanwu decoction (BYHWD) on mitochondrial dynamics in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI). **METHODS** CIRI rats were randomly divided into CIRI group, low-dose BYHWD (L-BYHWD, intragastric administration of 3.15 mg/kg BYHWD) group, high-dose BYHWD (H-BYHWD, intragastric administration of 12.60 mg/kg BYHWD) group, positive control (intraperitoneal administration of 150 mg/kg Extract of *Ginkgo biloba* leaves injection) group, H-BYHWD+solvent control (intragastric administration of 12.60 mg/kg BYHWD+intraperitoneal injection of 20 mg/kg DMSO) group and H-BYHWD+Compound C (intragastric administration of 12.60 mg/kg BYHWD+intraperitoneal injection of 20 mg/kg Compound C) group, with 15 rats in each group. Additionally, 15 rats were assigned to the sham operation group. All rats received the corresponding medications or saline solution via intragastric administration or intraperitoneal injection once daily for 4 consecutive weeks. After the last administration, the cerebral infarct volume of rats was measured; the ultrastructure of mitochondria in endothelial cells in the ischemic penumbra (IP) region was observed; the mitochondrial membrane potential was evaluated; the fluorescence colocalization area ratio of optic atrophy 1 (OPA1) to cluster of differentiation 31 (CD31) in the IP region was detected; the expressions of mitofusin 2 (MFN2), OPA1, mitochondrial fission 1 protein (Fis1), and proteins related to the AMP-activated protein kinase (AMPK)/dynamins-related protein 1 (Drp1) pathway in the IP region were determined. **RESULTS** Compared with the sham operation group, mitochondria in endothelial cells of the IP region in brain tissue of rats in the CIRI group were swollen, mostly spherical, with fractured cristae and severe vacuolation; the percentage of cerebral infarct volume, Fis1 expression level and phosphorylation level of Drp1 were increased significantly ($P<0.05$), while mitochondrial membrane potential in the IP region, fluorescence colocalization area ratio of OPA1 to CD31, the expressions levels of MFN2 and OPA1, and phosphorylation level of AMPK were significantly decreased ($P<0.05$). These indicators were improved in the L-BYHWD group, H-BYHWD group, and positive control group, compared with the CIRI group ($P<0.05$). Compared with the H-BYHWD group and H-BYHWD+solvent control group, the above indicators of rats in the H-BYHWD+Compound C group showed significant reversal ($P<0.05$). There was no

^Δ 基金项目 湖北省中医药管理局中医药科研项目(No.ZY2025-M025)

* 第一作者 副主任医师,硕士。研究方向:中西医结合治疗神经系统疾病。E-mail:r82cmj@163.com

[#] 通信作者 副主任医师,硕士。研究方向:中西医结合治疗神经系统疾病。E-mail:562354@163.com

statistically significant difference in the above indicators between the H-BYHWD+solvent control group and the H-BYHWD group ($P>0.05$). **CONCLUSIONS** BYHWD may improve CIRI by activating the AMPK/Drp1 pathway and ameliorating mitochondrial dynamic disorders.

KEYWORDS Buyang huanwu decoction; cerebral ischemia-reperfusion injury; AMPK/Drp1 pathway; mitochondrial dynamics

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)是指组织或器官在缺血缺氧后恢复血液供应时,反而出现更严重的功能障碍或结构破坏的现象。CIRI常见于缺血性脑卒中溶栓、取栓等血流再通治疗后,发生率为25%~50%^[1],其严重程度直接影响患者的神经功能预后^[2]。近年来研究发现,线粒体动力学失衡,即线粒体分裂与融合的稳态被破坏,是CIRI的关键病理机制;动力相关蛋白1(dynamin-related protein 1, Drp1)作为调控线粒体分裂的关键蛋白,其过度活化会导致线粒体碎片化,进而引发细胞凋亡^[3]。因此,靶向抑制Drp1介导的过度线粒体分裂,已成为神经保护研究的重要策略。AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为细胞能量代谢的核心调控因子,不仅能调节能量代谢,还可直接磷酸化Drp1,抑制其向线粒体转位与活化,从而维持线粒体动力学稳定,发挥神经保护作用^[4]。这表明,AMPK/Drp1通路可能是调节线粒体动力学失衡的内在机制。

补阳还五汤(BYHWD)源自清代名医王清任的《医林改错》,是中医“益气活血”治法的经典代表方剂,全方由黄芪(君药)、当归、赤芍、桃仁、川芎、红花、地龙组成,具有益气、活血、通络的功效。基础和临床研究均证实, BYHWD对CIRI大鼠具有明确的神经保护作用^[5-6],但具体机制尚不清晰。本研究基于AMPK/Drp1通路,探究BYHWD对CIRI大鼠线粒体动力学的影响及机制,旨在为阐明该方的作用机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括JEM-1230型透射电镜(日本JEOL公司)、EM UC7型超薄切片机(德国Leica公司)、Eppendorf 5810R型高速离心机(德国Eppendorf公司)、BD FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司)、BX53型荧光倒置显微镜(日本Olympus公司)、GS-800型凝胶扫描成像系统(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药品与试剂

黄芪、当归、赤芍、桃仁、川芎、红花、地龙饮片均购自北京同仁堂药店,由武汉市中医医院综合药学部主管中药师黄慧鉴定均为真品;银杏叶提取物注射液[阳性对照,规格5 mL:17.5 mg(含银杏黄酮苷4.2 mg),货号NB169]购自悦康药业集团股份有限公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染液和柠檬酸铅染液(货号分别为T8170、L1010)均购于上海源叶生物科技有限公司;AMPK抑制剂Compound C、2.5%戊二醛固定液(货号分别为ICA13550、G1102)均购于北京索莱宝科技有限公

司;1%四氧化锇固定液(货号O8020)购于上海麦克林生化科技有限公司;醋酸铀酰染液(货号U5394)购于美国Sigma-Aldrich公司;JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(货号C2006)购于上海碧云天生物技术有限公司;兔抗线粒体融合蛋白2(mitofusin 2, MFN2)、视神经萎缩蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)、分化簇31(cluster of differentiation 31, CD31)、线粒体分裂蛋白1(mitochondrial fission 1 protein, Fis1)、磷酸化AMPK(phosphorylated AMPK, p-AMPK)、AMPK、磷酸化Drp1(phosphorylated Drp1, p-Drp1)、Drp1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体(货号分别为ab260861、ab157457、ab281583、ab158865、ab92701、ab32047、ab314755、ab156951、ab128915)及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(货号ab205719)均购于英国Abcam公司。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,7~8周龄,体重240~340 g,由武汉有度生物科技有限公司提供,生产许可证号为SCXK(鄂)2021-0025。大鼠饲养环境的温度为20~24℃,相对湿度为40%~50%,12 h明暗交替。本动物实验经武汉有度生物科技有限公司动物伦理委员会批准(批准号为202409425)。

2 方法

2.1 BYHWD的制备

按相关文献方法^[7]制备BYHWD:称取黄芪120 g、当归6 g、赤芍4.5 g,以及桃仁、川芎、红花、地龙各3 g,加入10倍量水浸泡30 min,首次煎煮1 h后滤渣,药渣加5倍量水再煎煮1 h,合并2次煎液并浓缩至100 mL,于4℃冰箱保存备用。

2.2 造模

根据文献方法^[8]构建CIRI大鼠模型:术前93只大鼠禁食12 h,不禁水,腹腔注射(ip)1%戊巴比妥钠麻醉后以仰卧位固定,暴露颈总动脉(common carotid artery, CCA),分离颈内动脉和颈外动脉(external carotid artery, ECA),结扎ECA和CCA近心端,造成缺血状态;2 h后恢复再灌注。再灌注24 h后,根据Zea-Longa评分法^[9]评估大鼠神经功能:神经功能无异常为0分;提尾时左前肢屈曲为1分;运动方向异常为2分;明显行走障碍为3分;无法自主行走伴意识障碍为4分。评分1~3分者视为造模成功,0分者视为造模失败,4分者予以剔除。造模操作实验过程中,术后感染、意外出血等导致大鼠死亡1只,造模失败2只。另取15只大鼠作为假手术组,除不结扎外,其余按上述操作。

2.3 分组与给药

将成功造模的大鼠随机分为CIRI组、低剂量BYHWD(L-BYHWD)组、高剂量BYHWD(H-BYHWD)组、阳性对照组、H-BYHWD+溶剂对照组、H-BYHWD+Compound C组,每组15只。后5组大鼠于再灌注24 h后开始干预:L-BYHWD组、H-BYHWD组大鼠分别灌胃3.15、12.60 mg/kg(以提取物质量计)BYHWD^[7],阳性对照组大鼠灌胃ip 150 mg/kg银杏叶提取物注射液^[10],H-BYHWD+溶剂对照组大鼠灌胃12.60 mg/kg BYHWD和ip 20 mg/kg二甲基亚砜(DMSO),H-BYHWD+Compound C组大鼠灌胃12.60 mg/kg BYHWD和ip 20 mg/kg Compound C(先用DMSO溶解,临用前用生理盐水稀释至2 mg/mL)^[11]。假手术组和CIRI组大鼠灌胃和ip等量生理盐水(灌胃以H-BYHWD体积为准,ip以Compound C体积为准)。为了保证操作步骤的一致性,L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠先ip后再灌胃等量生理盐水。各组大鼠每日干预1次,连续4周。

2.4 脑梗死体积检测

末次给药后,各组随机取5只大鼠,麻醉后断头取全脑,制成2 mm冠状切片,用2%TTC染液在室温下避光染色30 min,再用4%多聚甲醛固定24 h。通过Image J软件扫描切片并计算脑梗死体积百分比。

2.5 缺血性半暗带区上皮细胞线粒体超微结构观察

各组另取5只大鼠,麻醉后快速取脑,切取缺血性半暗带(ischemic penumbra, IP)区1 mm³组织块,在2.5%戊二醛中固定24 h、1%四氧化锇中固定2 h,梯度脱水后在618环氧树脂中包埋,制成60~90 nm切片,再用醋酸铀酰在室温下染色30 min、柠檬酸铅在室温下染色15 min。使用透射电镜观察IP区内皮细胞线粒体超微结构。

2.6 IP区线粒体膜电位评估

取“2.5”项下剩余的IP区脑组织,加入预冷的磷酸盐缓冲液制成匀浆,用200目尼龙网过滤,于4℃下以3 000 r/min离心10 min,取沉淀,用JC-1工作液重悬,于37℃下避光孵育20 min后再用磷酸盐缓冲液洗涤,用流式细胞仪分析荧光信号,以绿色荧光单阳性细胞(去极化细胞)占总细胞的比例(记为H1-LR)来评估线粒体膜电位。H1-LR数值越大,表示膜电位越低。

2.7 IP区OPA1与CD31荧光共定位面积比检测

取各组剩余5只大鼠的部分IP区脑组织,用4%多聚甲醛固定24 h,经梯度脱水、包埋后冷冻,制成5 μm厚的冠状切片,经洗涤、封闭后,加入OPA1、CD31抗体,于4℃下孵育18 h;次日,加入相应二抗,于25℃下孵育2 h,洗涤、封片。使用荧光倒置显微镜进行观察,同时使用Image J软件分析OPA1与CD31荧光共定位面积比。

2.8 IP区MFN2、OPA1、Fis1蛋白及AMPK/Drp1通路相关蛋白表达检测

取“2.7”项下剩余的IP区脑组织,加入RIPA裂解液制成匀浆,提取总蛋白,测定蛋白浓度;加热变性后,上样进行电泳、转膜、封闭,加入MFN2、OPA1、Fis1、p-

AMPK、AMPK、p-Drp1、Drp1、GAPDH抗体(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:5 000),于4℃下孵育过夜;次日,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),于室温孵育2 h;以ECL显影后,用Image J软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(GAPDH)的灰度值比值评价目的蛋白的表达水平,以p-AMPK与AMPK、p-Drp1与Drp1的灰度值比值评价AMPK、Drp1的磷酸化水平。

2.9 统计学方法

数据用SPSS 25.0软件进行统计分析。计量资料均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Dunnett-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 BYHWD对脑梗死体积的影响

与假手术组(未见明显梗死,计为0)比较,CIRI组大鼠的脑梗死体积百分比[(37.59±4.12)%]显著升高($P<0.05$);与CIRI组比较,L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠的脑梗死体积百分比[分别为(25.31±2.76)%、(8.16±2.51)%、(7.73±2.47)%]均显著降低($P<0.05$);与H-BYHWD组、H-BYHWD+溶剂对照组[(8.17±2.53)%]比较,H-BYHWD+Compound C组大鼠的脑梗死体积百分比[(32.50±3.58)%]显著升高($P<0.05$);与H-BYHWD组比较,H-BYHWD+溶剂对照组大鼠脑梗死体积百分比差异无统计学意义($P>0.05$)。

3.2 BYHWD对IP区内皮细胞线粒体超微结构的影响

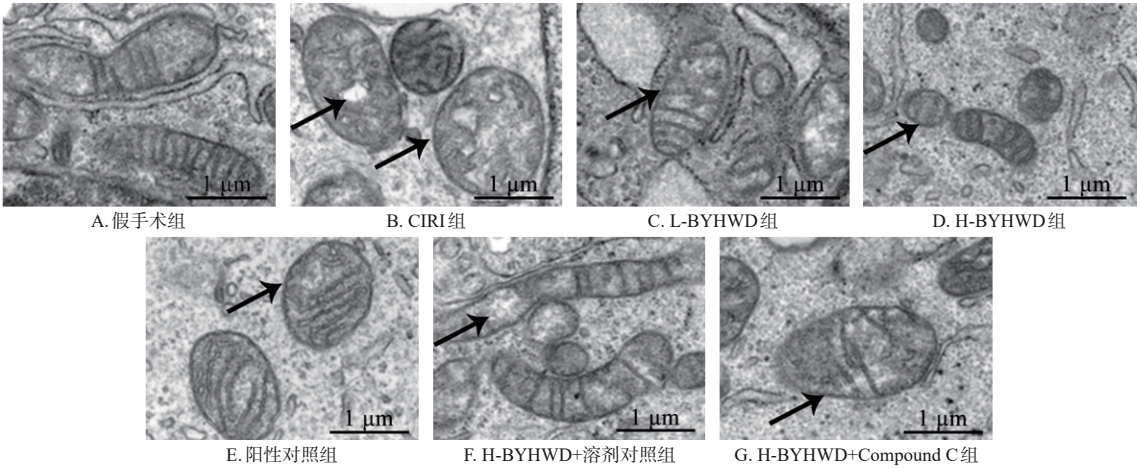
假手术组大鼠IP区内皮细胞线粒体形态正常,双层膜结构清晰且多呈杆状,嵴较多;与假手术组比较,CIRI组大鼠IP区内皮细胞线粒体出现明显病变——普遍肿胀且多呈球状,嵴发生断裂,伴空泡现象严重;与CIRI组比较,L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠IP区内皮细胞线粒体病变有不同程度改善;与H-BYHWD组、H-BYHWD+溶剂对照组比较,H-BYHWD+Compound C组大鼠IP区内皮细胞线粒体病变加重;与H-BYHWD组比较,H-BYHWD+溶剂对照组大鼠IP区内皮细胞线粒体超微结构无明显差异。结果见图1。

3.3 BYHWD对IP区线粒体膜电位的影响

与假手术组比较,CIRI组大鼠IP区线粒体膜电位显著降低($P<0.05$);与CIRI组比较,L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠IP区线粒体膜电位均显著升高($P<0.05$);与H-BYHWD组、H-BYHWD+溶剂对照组比较,H-BYHWD+Compound C组大鼠IP区线粒体膜电位显著降低($P<0.05$);与H-BYHWD组比较,H-BYHWD+溶剂对照组大鼠IP区线粒体膜电位差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图2和表1。

3.4 BYHWD对IP区OPA1与CD31荧光共定位面积比的影响

与假手术组比较,CIRI组大鼠IP区OPA1与CD31荧光共定位面积比显著降低($P<0.05$);与CIRI组比较,



箭头:受损线粒体。

图1 各组大鼠IP区内皮细胞线粒体超微结构电镜图

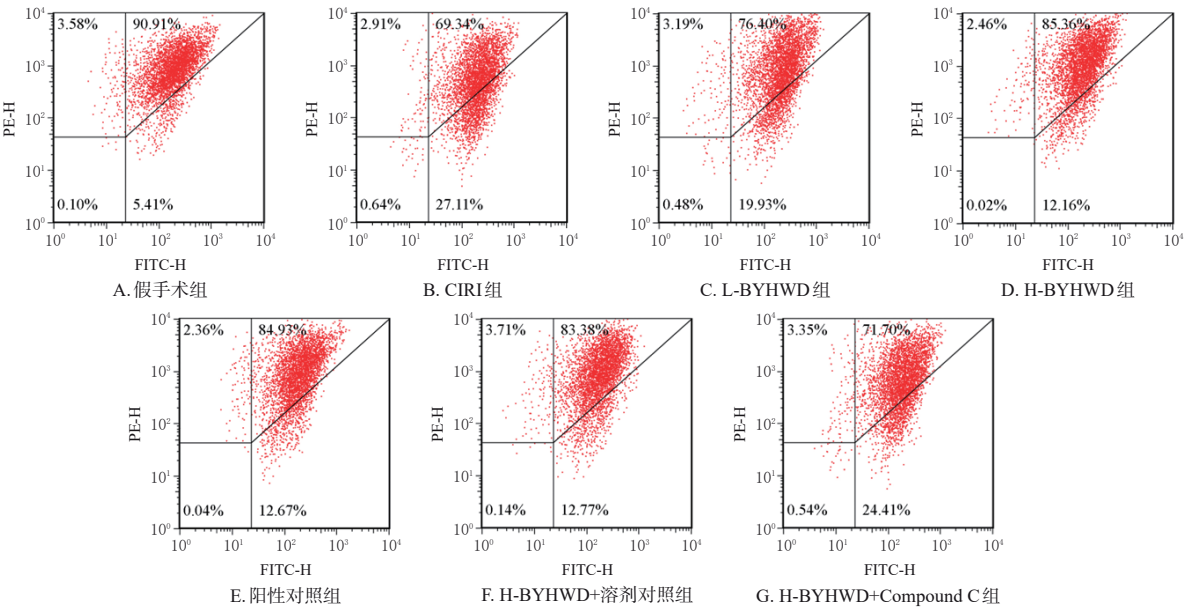


图2 各组大鼠IP区线粒体膜电位的流式散点图

表1 各组大鼠IP区线粒体膜电位、OPA1与CD31荧光共定位面积比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	H1-LR/%	OPA1与CD31荧光共定位面积比
假手术组	5.36±2.01	0.32±0.04
CIRI组	26.51±2.66 ^a	0.08±0.01 ^a
L-BYHWD组	19.37±2.37 ^b	0.17±0.02 ^b
H-BYHWD组	12.59±2.31 ^b	0.27±0.03 ^b
阳性对照组	12.34±2.25 ^b	0.25±0.03 ^b
H-BYHWD+溶剂对照组	12.61±2.29	0.26±0.03
H-BYHWD+Compound C组	23.16±2.58 ^{cd}	0.13±0.02 ^{cd}

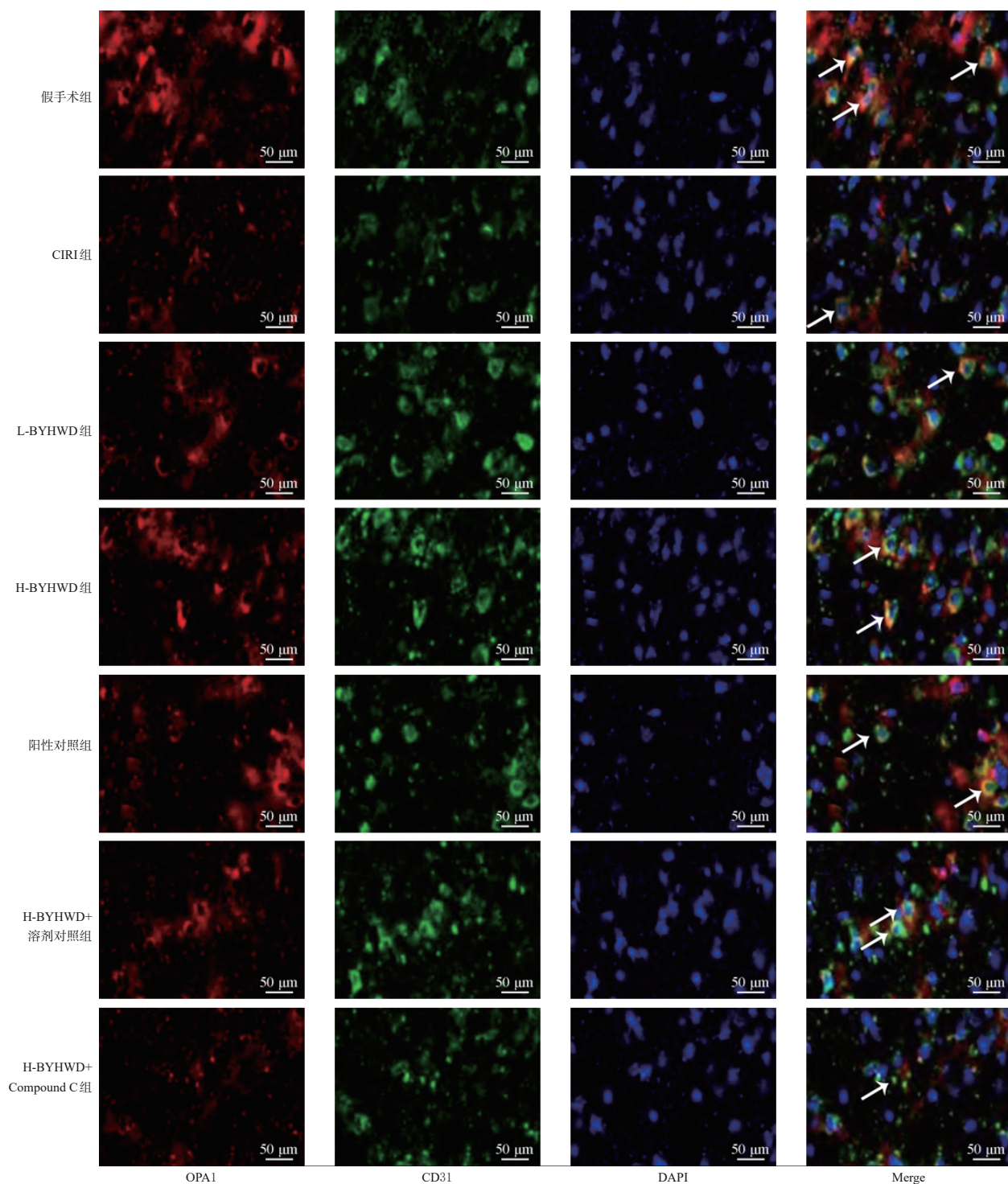
a: 与假手术组比较, $P<0.05$; b: 与CIRI组比较, $P<0.05$; c: 与H-BYHWD组比较, $P<0.05$; d: 与H-BYHWD+溶剂对照组比较, $P<0.05$ 。

L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠IP区OPA1与CD31荧光共定位面积比均显著升高($P<0.05$);与H-BYHWD组、H-BYHWD+溶剂对照组比较, H-BYHWD+Compound C组大鼠IP区OPA1与CD31荧光共定位面积比显著降低($P<0.05$);与H-BYHWD组比较, H-BYHWD+溶剂对照组大鼠IP区OPA1与CD31荧光共定位面积比差异无统计学意义($P>0.05$)。结果

见表1和图3。

3.5 BYHWD对IP区MFN2、OPA1、Fis1蛋白表达及AMPK、Drp1磷酸化的影响

与假手术组比较, CIRI组大鼠IP区MFN2、OPA1蛋白表达水平和AMPK磷酸化水平均显著降低($P<0.05$), Fis1蛋白表达水平和Drp1磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);与CIRI组比较, L-BYHWD组、H-BYHWD组、阳性对照组大鼠IP区MFN2、OPA1蛋白表达水平和AMPK磷酸化水平均显著升高($P<0.05$), Fis1蛋白表达水平和Drp1磷酸化水平均显著降低($P<0.05$);与H-BYHWD组、H-BYHWD+溶剂对照组比较, H-BYHWD+Compound C组大鼠IP区MFN2、OPA1蛋白表达水平和AMPK磷酸化水平均显著降低($P<0.05$), Fis1蛋白表达水平和Drp1磷酸化水平均显著升高($P<0.05$);与H-BYHWD组比较, H-BYHWD+溶剂对照组大鼠IP区上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图4和表2。



箭头:OPA1与CD31荧光共定位处。

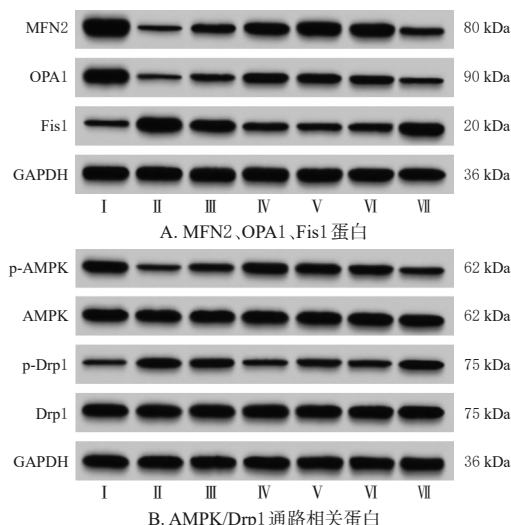
图3 各组大鼠IP区OPA1与CD31荧光共定位的荧光图

4 讨论

BYHWD作为治疗脑卒中的经典方剂,已被证实可缩小脑梗死体积,促进CIRI大鼠神经功能恢复^[5-6]。本研究结果显示,与假手术组比较,CIRI组大鼠脑梗死体积百分比显著升高,IP区内皮细胞线粒体肿胀、嵴断裂;BYHWD干预后,大鼠脑梗死体积百分比显著降低,线粒体超微结构得到修复。在功能层面,CIRI组大鼠IP区线粒体膜电位下降,提示能量代谢严重障碍;BYHWD干预后,可有效提升线粒体膜电位,表明其能改善线粒

体功能。上述结构修复与功能改善最终体现在脑梗死体积缩小上,共同证明了BYHWD对CIRI具有改善作用。

线粒体动力学可参与自噬、凋亡等多个方面的调控^[12]。OPA1与CD31荧光共定位面积比是指在单位面积的血管组织(由CD31标记)中,拥有健康、融合状态线粒体(由OPA1标记)的血管内皮细胞所占的比例。Drp1和Fis1是调控线粒体分裂的主要蛋白,MFN2和OPA1是调控线粒体融合的主要蛋白^[13]。本研究结果显示,与假手术组比较,CIRI组大鼠IP区OPA1与CD31荧光共



I :假手术组; II :CIRI组; III :L-BYHWD组; IV :H-BYHWD组; V :阳性对照组; VI :H-BYHWD+溶剂对照组; VII :H-BYHWD+Compound C组。

图4 各组大鼠IP区MFN2、OPA1、Fis1蛋白和AMPK/Drp1通路相关蛋白表达的电泳图

表2 各组大鼠IP区MFN2、OPA1、Fis1蛋白表达水平和AMPK、Drp1磷酸化水平比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	MFN2/GAPDH	OPA1/GAPDH	Fis1/GAPDH	p-AMPK/AMPK	p-Drp1/Drp1
假手术组	1.26 ± 0.14	1.05 ± 0.12	0.41 ± 0.05	0.90 ± 0.09	0.31 ± 0.04
CIRI组	0.35 ± 0.04 ^a	0.24 ± 0.03 ^a	1.01 ± 0.11 ^a	0.34 ± 0.04 ^a	0.87 ± 0.09 ^a
L-BYHWD组	0.57 ± 0.07 ^b	0.49 ± 0.06 ^b	0.83 ± 0.09 ^b	0.53 ± 0.06 ^b	0.70 ± 0.08 ^b
H-BYHWD组	0.98 ± 0.11 ^b	0.76 ± 0.09 ^b	0.56 ± 0.07 ^b	0.82 ± 0.09 ^b	0.38 ± 0.04 ^b
阳性对照组	1.03 ± 0.12 ^b	0.73 ± 0.08 ^b	0.53 ± 0.06 ^b	0.79 ± 0.08 ^b	0.42 ± 0.05 ^b
H-BYHWD+溶剂对照组	0.97 ± 0.10	0.77 ± 0.09	0.55 ± 0.06	0.81 ± 0.08	0.39 ± 0.04
H-BYHWD+Compound C组	0.46 ± 0.05 ^d	0.33 ± 0.05 ^d	0.95 ± 0.10 ^d	0.41 ± 0.05 ^d	0.76 ± 0.08 ^d

a: 与假手术组比较, $P < 0.05$; b: 与CIRI组比较, $P < 0.05$; c: 与H-BYHWD组比较, $P < 0.05$; d: 与H-BYHWD+溶剂对照组比较, $P < 0.05$ 。

定位面积比和MFN2、OPA1蛋白表达水平均显著降低, Fis1蛋白表达水平和Drp1磷酸化水平均显著升高,致使线粒体分裂过度、融合减少,线粒体结构遭到破坏,脑梗死体积增大;而BYHWD可逆转上述变化,表明BYHWD可通过调控内皮细胞线粒体动力学平衡,修复线粒体超微结构,减轻线粒体损伤,减少脑梗死体积,从而改善CIRI。

AMPK是细胞能量代谢的关键调节器,其介导的AMPK/Drp1通路是调控线粒体融合、分裂动态平衡的核心途径,通过该通路可减少线粒体过度裂变,改善线粒体动力学紊乱,进而改善能量代谢^[14]。本研究结果显示,与假手术组比较,CIRI组大鼠IP区AMPK磷酸化水平显著降低,Drp1磷酸化水平显著升高,而BYHWD可逆转上述变化;进一步引入AMPK抑制剂Compound C进行逆向验证后发现,联合使用Compound C后BYHWD的逆转作用被抑制。由此证明,BYHWD对CIRI大鼠线粒体损伤的改善作用可通过激活AMPK/Drp1通路实现。

综上所述,BYHWD可通过激活AMPK/Drp1通路,改善线粒体动力学紊乱,从而改善CIRI。然而,BYHWD减轻线粒体损伤的其他分子机制并不清楚,仍需进行更加深入的研究。

参考文献

- [1] YAO D B, ZHANG S, HU Z W, et al. CHIP ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating necroptosis and inflammation[J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(23):25564-25577.
- [2] RABINSTEIN A A. Update on treatment of acute ischemic stroke[J]. Continuum (Minneap Minn), 2020, 26(2):268-286.
- [3] EMAUS K J, FOGO G M, WIDER J M, et al. The role of cardiolipin in mitochondrial dynamics and quality control in neuronal ischemia/reperfusion injury[J]. Cell Death Dis, 2025, 16(1):494.
- [4] FAN H Y, DING R, LIU W C, et al. Heat shock protein 22 modulates NRF1/TFAM-dependent mitochondrial biogenesis and DRP1-sparked mitochondrial apoptosis through AMPK-PGC1 α signaling pathway to alleviate the early brain injury of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. Redox Biol, 2021, 40:101856.
- [5] 辛紫媛, 靳晓飞, 周晓红, 等. 补阳还五汤通过SIRT1/NF- κ B p65信号通路减轻大鼠脑缺血/再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(8):1454-1462.
- [6] 刘炳辉, 李鑫, 罗志红. 补阳还五汤对气虚血瘀型脑出血脑血流参数的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2024, 51(10):69-72.
- [7] 张馨蓉, 王天朗, 张家豪, 等. 基于IRE1 α /ASK1/JNK通路探讨补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠神经功能恢复作用及机制[J]. 中国中药杂志, 2025, 50(14):3857-3867.
- [8] LI Y, TAN L, YANG C X, et al. Distinctions between the Koizumi and Zea Longa methods for middle cerebral artery occlusion (MCAO) model: a systematic review and meta-analysis of rodent data[J]. Sci Rep, 2023, 13(1):10247.
- [9] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1):84-91.
- [10] 张占伟, 廖亮英, 杨惠, 等. 龙琥醒脑颗粒对脑缺血再灌注模型大鼠受损脑细胞线粒体动力学的影响[J]. 中草药, 2022, 53(15):4755-4763.
- [11] 任广伟, 耿彪, 李明伟, 等. 白花丹素调节AMPK/CREB/BDNF信号通路对癫痫大鼠神经元损伤的影响[J]. 现代免疫学, 2025, 45(2):96-103.
- [12] CHAN D C. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease[J]. Annu Rev Pathol, 2020, 15:235-259.
- [13] SCHMITT K, GRIMM A, DALLMANN R, et al. Circadian control of DRP1 activity regulates mitochondrial dynamics and bioenergetics[J]. Cell Metab, 2018, 27(3):657-666.e5.
- [14] 褚可靠. 人参皂苷Rg₃通过调控AMPK/Drp1通路抑制LPS诱导的牙周膜细胞焦亡的机制研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2023.

(收稿日期:2025-08-13 修回日期:2025-11-21)

(编辑:邹丽娟)