

灯盏细辛注射液通过抑制 ROS/MPTP/VDAC1 信号轴对 OGD/R 诱导的 HT22 细胞线粒体损伤的保护作用

杨 露^{1,2}, 陈思吟³, 马理园³, 孙家宜¹, 罗开沛^{3*}, 孟宪丽^{1,2,3*}

(1. 成都中医药大学中医药创新研究院, 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学附属眉山市中医院, 四川 眉山 620032; 3. 成都中医药大学药学院/现代中药产业学院, 四川 成都 611137)

摘要: **目的** 探究灯盏细辛注射液对氧糖剥夺/复氧 (OGD/R) 损伤的 HT22 细胞线粒体的保护作用。**方法** HT22 细胞分为对照组、模型组及灯盏细辛注射液 5、10、20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组。除对照组外, 其余各组细胞均经 OGD/R 处理。CCK-8 法检测细胞活性, 倒置显微镜下观察细胞形态, 微板法检测 LDH 活性, DCFH-DA、MitoSOX 探针评价细胞及线粒体 ROS 水平, 激光共聚焦显微镜观察 Mito-Tracker Red 标记的线粒体表型, 比色法检测 ATP 水平及 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性, JC-1 染色检测 MMP 水平, 流式细胞术检测 MPTP 开放程度, TUNEL 染色检测细胞凋亡率, Western blot 法检测细胞 VDAC1、Bax、Bcl-2、Cyto C、cleaved Caspase3 蛋白表达。**结果** 灯盏细辛注射液可升高 HT22 细胞活性 ($P<0.01$), 降低 LDH 水平 ($P<0.05$), 维持细胞正常形态, 抑制细胞、线粒体 ROS 累积 ($P<0.05$), 减少线粒体碎片化表型转变, 升高 ATP 水平、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性、MMP 水平 ($P<0.05$)。此外, 它还能抑制 MPTP 异常开放 ($P<0.01$), 降低细胞凋亡率及 VDAC1、Bax、Cyto C、cleaved Caspase3 蛋白表达 ($P<0.05$), 升高 Bcl-2 蛋白表达 ($P<0.05$)。**结论** 灯盏细辛注射液可有效缓解 OGD/R 诱导的线粒体表型转换及功能障碍, 进而减少 HT22 细胞凋亡, 其作用机制与抑制 ROS/MPTP/VDAC1 信号有关。

关键词: 灯盏细辛注射液; 缺血性脑卒中; 氧糖剥夺/复氧; 神经元损伤; 线粒体功能失调; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2025)07-2416-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.07.047

缺血性脑卒中是由脑部血流供应障碍引起的脑损伤, 为全球主要致死、致残病因之一^[1-3], 线粒体功能障碍是本病复杂病理机制的关键事件^[4-7]。营养和氧气缺乏可破坏线粒体, 导致其功能失调, 为应对细胞环境变化, 受损的线粒体诱发活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 风暴, 激活细胞凋亡, 进一步诱导继发性脑损伤^[8-10]。修复损伤线粒体有益于维持神经活动, 促进脑损伤恢复^[11], 因此, 线粒体保护成为防治缺血性脑卒中的重要策略。

灯盏细辛是治疗缺血性脑卒中的常用中药^[12], 灯盏细辛注射液是其提取物制剂, 主要含有野黄芩苷、咖啡酸、二咖啡酰奎宁酸等成分^[13], 能有效降低卒中患者死亡率, 改善神经功能缺损症状^[14-16], 与抑制氧化应激反应、细胞内 Ca^{2+} 超载以及神经炎症等机制有关^[17-18]。课题组前期研究发现, 灯盏细辛注射液可促进脑缺血大鼠神经功能恢复^[19], 但其是否能缓解神经元线粒体损伤尚不清楚。本实

验以线粒体保护为切入点, 体外模拟缺血神经损伤, 开展灯盏细辛注射液抗缺血性脑卒中作用机制研究, 以期为其临床应用与二次开发提供依据。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠脑海马神经元细胞 HT22 (批号 JNO-02001) 购自广州吉妮欧生物科技有限公司。

1.2 试剂与药物 灯盏细辛注射液 (批号 20210439) 购自云南生物谷药业股份有限公司。CCK-8 试剂盒 (批号 C0038)、Mito-Tracker Red 线粒体红色荧光探针 (批号 C1049B)、线粒体通透性转换孔 (MPTP) 检测试剂盒 (批号 C2009S)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C1088) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; LDH 乳酸脱氢酶试剂盒 (批号 A020-2-2)、活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (批号 E004-1-1)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶测试盒 (批号 A016-1-1)、ATP 水平测试盒 (批

收稿日期: 2024-07-22

基金项目: 国家自然科学基金 (82304880, 82274207); 四川省自然科学基金 (2023NSFSC1782); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目 (BSH2021024)

作者简介: 杨 露 (1992—), 女, 博士, 实验师, 从事中药药理、毒理学研究。E-mail: yangluyi@cdutcm.edu.cn

* **通信作者:** 罗开沛 (1991—), 男, 博士, 副教授, 从事中药制剂、药理学研究。E-mail: luokaipai@cdutcm.edu.cn

孟宪丽 (1964—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药药理、毒理学研究。E-mail: xlm999@cdutcm.edu.cn

网络出版日期: 2024-09-24

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20240924.1456.006.html>.

号 A095-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所有限公司; MitoSOX Red 线粒体超氧化物红色荧光探针 (批号 40778ES50) 购自翌圣生物科技 (上海) 股份有限公司; 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1) (批号 M8650) 购自北京索莱宝科技有限公司; 全蛋白提取试剂盒 (批号 AR0102)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 AR1110)、 β -actin 抗体 (批号 AC026)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 BA0315-2) 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 电压依赖性阴离子通道 1 (voltage-dependent anion channel-1, VDAC1) 抗体 (批号 55259-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 T40056) 购自艾比玛特医药科技 (上海) 有限公司; 细胞色素 C (cytochrome C, Cyto C) 抗体 (批号 11940)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3 (cleaved-cysteinylasspartate-specific protease-3, cleaved Caspase3) 抗体 (批号 9661) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 仪器 CL-170T-8 型、CCL-170B-8 型 Esco CelCulture[®] 二氧化碳培养箱 (三气培养箱) (新加坡艺思高科技有限公司); Cellometer K2 型全自动双荧光细胞计数器 (深圳市达科为生物技术股份有限公司); DMI1 型倒置显微镜、TSC SP8 型共聚焦显微镜 (德国 Leica 公司); SpectraMax R iD5 型全波长多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); FACSCanto II 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及细胞活性检测 HT22 细胞使用含 10% 胎牛血清与 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中进行常规培养, 取对数生长期者, 以 5×10⁴/mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μL, 于恒温培养箱中培养。细胞贴壁后, 分别以 5、10、20、50、100 μL/mL 灯盏细辛注射液给药后继续培养 48 h, 采用 CCK-8 法检测细胞活性, 确定其安全浓度范围及后续剂量。为检测灯盏细辛注射液对氧糖剥夺/复氧 (oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, OGD/R) 损伤的 HT22 细胞活性的影响, 细胞培养 24 h 后分为对照组、模型组及灯盏细辛注射液 5、10、20 μL/mL 组, 细胞培养贴壁后弃去上清, 对照组加入 100 μL 新鲜培养基, 常规培养; 模型组 (即 OGD/R 处理) 加入同体积 DMEM 无糖培养基, 于三气培养箱 (1% O₂+5% CO₂+94% N₂) 中培养 4 h, 之后更换为正常培养基, 复糖复氧常规培养 24 h; 灯盏细辛注射液 5、10、20 μL/mL 组于造模前 12 h 分别加入含 5、10、20 μL/mL 灯盏细辛注射液的培养基, 后续处理同模型组。各组细胞培养结束后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 培养 1 h, 在 450 nm 波长处检测吸光度 (A), 计算细胞活性, 公式为细胞活性=[(A_{给药组}-A_{对照组})/(A_{空白组}-A_{对照组})]×100%, 其中空白组为未接种细胞、仅有 PBS 的阴性孔。

2.2 细胞形态观察 于倒置显微镜下观察各组 HT22 细胞形态, 评估灯盏细辛注射液对其生长状态的影响。

2.3 微板法检测 LDH 活性 取对数生长期 HT22 细胞, 调整密度至 1.5×10⁵/mL, 接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 收集培养上清液, 4 ℃、3 500 r/min 离心 5 min, 取上清液, 严格按照相关试剂盒说明书, 采用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处 A 值, 计算细胞中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 水平。

2.4 细胞内及线粒体 ROS 水平检测 调整 HT22 细胞密度至 0.8×10⁴/mL, 以每孔 1 mL 接种在共聚焦小皿, 按“2.1”项下方法造模及给药, 吸弃细胞培养液, 加入 1 mL 完全培养基稀释的 DCFH-DA 探针 (1:1 000), 37 ℃培养箱避光孵育 30 min, 采用荧光成像系统拍照, 检测细胞内 ROS 水平。吸弃细胞上清, 每皿加入 1 mL 稀释的 MitoSOX Red 探针 (1:1 000), 37 ℃培养箱避光孵育 15 min, 荧光镜下观测荧光信号, 采用 Image J 软件对荧光强度进行定量分析, 检测线粒体 ROS 水平。

2.5 线粒体形态检测 按“2.1”项下方法分组并处理细胞, 吸弃培养液, 加入用 1 mL 完全培养基稀释的 Mito-Tracker Red 染色液 (80 nmol/L), 37 ℃细胞培养箱中避光孵育 30 min, 采用激光共聚焦显微镜拍摄, 检测灯盏细辛注射液对细胞中线粒体形态的影响。

2.6 比色法检测 ATP 水平及 Na⁺/K⁺-ATPase 活性 按“2.1”项下方法进行接种及分组, 收集细胞, 采用超声细胞破碎仪进行处理 (功率 120 W, 超声 5 s, 间隔 10 s), 4 ℃、3 500 r/min 离心 10 min, 取上清进行 BCA 蛋白浓度检测, 严格按照相关试剂盒说明书, 检测 ATP 水平及 Na⁺/K⁺-ATPase 活性。

2.7 JC-1 法检测 HT22 细胞 MMP 变化 按“2.1”项下方法分组并处理细胞, 吸弃培养液, 加入 1 mL JC-1 工作液, 37 ℃培养箱中避光孵育 30 min, 预冷的 JC-1 缓冲液轻柔洗涤, 于荧光显微镜下观察并拍照, 采用 Image J 软件分析 JC-1 聚合态 (红色荧光) 与单体 (绿色荧光) 的比率, 评价线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 变化。当 MMP 较高时, JC-1 聚集于线粒体基质, 形成聚合物, 产生红色荧光; 当 MMP 较低时, 其在线粒体基质中聚集减少, 以单体形式存在, 呈绿色荧光。

2.8 流式细胞术检测 MPTP 开放程度 按“2.1”项下方法分组并处理细胞, 严格按照线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 检测试剂盒说明书, 加入 Calcein AM 染色溶液及抗荧光猝灭工作溶液重悬, 37 ℃培养箱中避光孵育 30 min, 缓冲液洗涤并重悬细胞, 流式细胞仪上机检测, 采用 Flow Jo 软件进行分析。绿色荧光越强, MPTP 开放程度越低; 绿色荧光越弱, MPTP 开放程度越高。

2.9 TUNEL 染色检测细胞凋亡率 按“2.1”项下方法分组并处理细胞, 移除上清液, 每孔加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 30 min, 加入 0.3% TrionX-100, 室温破膜 5 min, PBS 洗涤, 每孔加入 100 μL TUNEL 检测液, 37 ℃避光反应 60 min, DAPI 溶液染核处理 10 min, 滴加抗荧光淬灭剂, 于

荧光显微镜下观察并拍照，计数 TUNEL 阳性细胞，计算细胞凋亡率，公式为细胞凋亡率 = (TUNEL 阳性细胞数/总细胞数) × 100%。

2.10 Western blot 法检测 HT22 细胞 VDAC1、Bcl-2、Bax、Cyto C、cleaved Caspase3 蛋白表达 按“2.1”项下方法分组并处理细胞，提取后用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液进行裂解，提取蛋白，BCA 法检测浓度，取等量进行变性，加入上样缓冲液，冷冻保存。制备聚丙烯酰胺凝胶，上样，电泳，湿转法转移至 PVDF 膜，5% BSA 室温封闭 2 h，分别加入 DAC1 (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 500)、Bax (1 : 500)、Cyto C (1 : 1 000)、cleaved Caspase3 (1 : 1 000) 抗体，4 ℃ 孵育过夜，次日加入二抗 (1 : 5 000)，室温孵育 2 h，滴加化学发光液，凝胶成像仪显影并拍照。以 β -actin 为内参，通过 Image J 软件对目标条带进行分析，计算目的蛋白相对表达量。

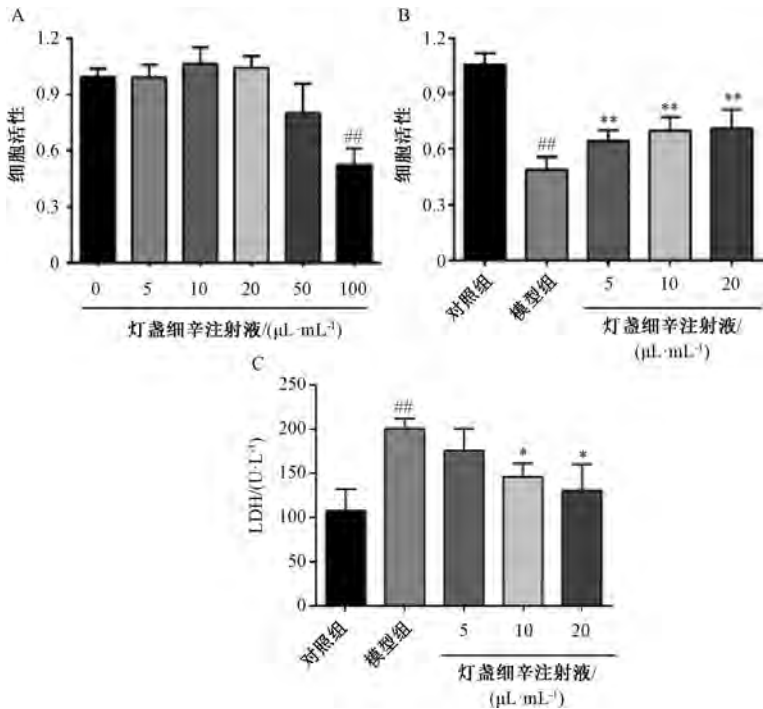
2.11 统计学分析 通过 Graphpad Prism 6.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差

分析和 Tukey 事后检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 灯盏细辛注射液安全浓度范围筛选 与对照组比较，灯盏细辛注射液浓度为 5~20 $\mu\text{L/mL}$ 时，HT22 细胞活性无明显变化 ($P > 0.05$)；随着浓度持续增加 (50~100 $\mu\text{L/mL}$)，细胞活性逐渐降低，见图 1A，提示 50 $\mu\text{L/mL}$ 以下剂量几乎无细胞毒性，较为安全。因此，本研究选择 5、10、20 $\mu\text{L/mL}$ 用于后续实验。

3.2 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞活性及 LDH 活性的影响 与对照组比较，模型组 HT22 细胞活性降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，灯盏细辛注射液 5、10、20 $\mu\text{L/mL}$ 组 HT22 细胞活性升高 ($P < 0.01$)，见图 1B。与对照组比较，模型组 HT22 细胞 LDH 活性升高 ($P < 0.01$)，而灯盏细辛注射液 10、20 $\mu\text{L/mL}$ 组 HT22 细胞 LDH 活性降低 ($P < 0.05$)，并呈剂量依赖性，见图 1C。



注：与对照组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 1 灯盏细辛注射液对 HT22 细胞活性、LDH 水平及细胞形态的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

3.3 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞形态的影响 对照组细胞完整且边缘清晰，有两极或多极突起，胞体较大，相互连接成网络状；与对照组比较，模型组细胞数量减少，细胞失去突起，呈圆形亮点，出现悬浮于培养基的情况；与模型组比较，随着给药浓度升高，灯盏细辛注射液 5、10、20 $\mu\text{L/mL}$ 组细胞形态逐渐趋于正常化，见图 2。

3.4 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞内及线粒体 ROS 水平的影响 与对照组比较，模型组细胞内 DCFH-DA 探针绿色荧光信号增强，ROS 水平升高 ($P < 0.01$)，见

图 3A、3C；与模型组比较，灯盏细辛注射液 5、10、20 $\mu\text{L/mL}$ 组细胞内 ROS 水平降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较，模型组线粒体 MitoSOX Red 探针红色荧光信号增强，线粒体 ROS 水平升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，灯盏细辛注射液组 10、20 $\mu\text{L/mL}$ 组线粒体 ROS 水平降低 ($P < 0.05$)，见图 3B、3D。

3.5 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞线粒体表型转变的影响 对照组细胞线粒体表现为丝状、长管状，且相互连接，形成健康的线粒体网络；与对照组比较，模型组细胞线粒体转变为点状、颗粒状，提示线粒体碎片化

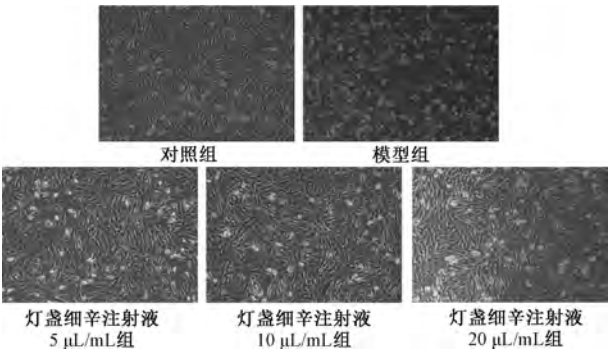
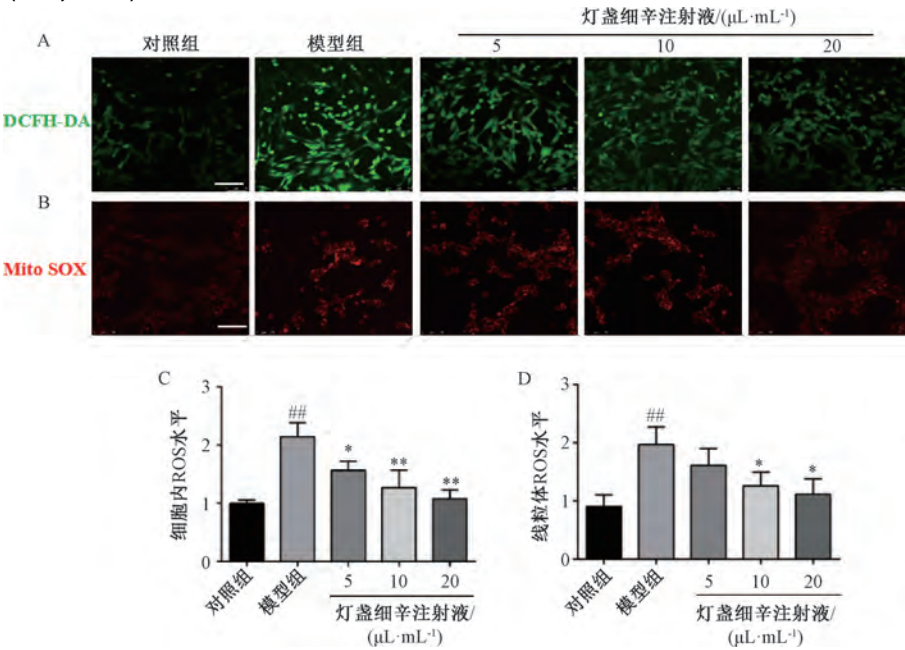


图 2 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞形态的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

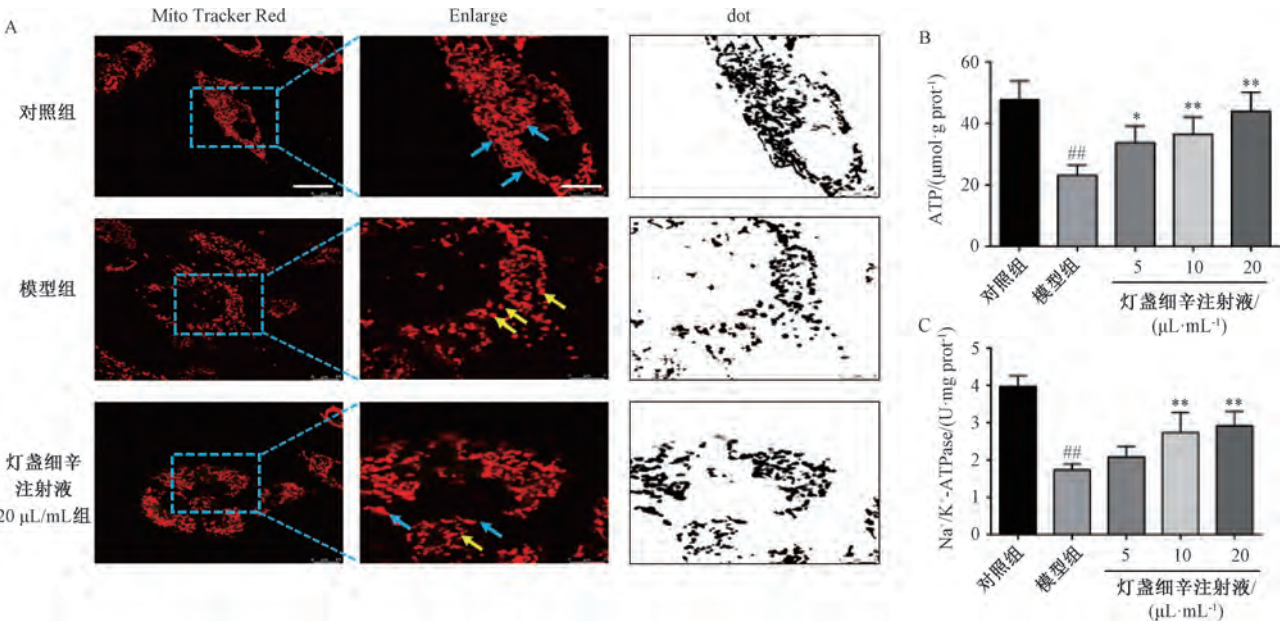
现象出现;与模型组比较,灯盏细辛注射液 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组上述现象减少,见图 4A。

3.6 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 ATP 水平、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性的影响 与对照组比较,模型组细胞 ATP 水平降低 ($P<0.01$);与模型组比较,灯盏细辛注射液 5、10、20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组 ATP 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 4B。与对照组比较,模型组细胞 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性降低 ($P<0.01$);与模型组比较,灯盏细辛注射液 10、20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组细胞 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性升高 ($P<0.01$),见图 4C。



注:与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

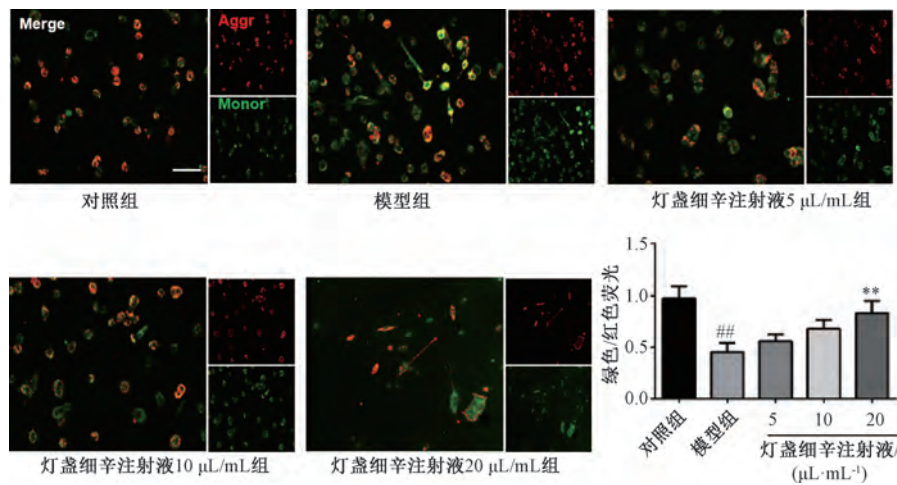
图 3 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞内及线粒体 ROS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注:蓝色箭头指示丝状或短管状线粒体,黄色箭头指示碎片化线粒体。与对照组比较,## $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

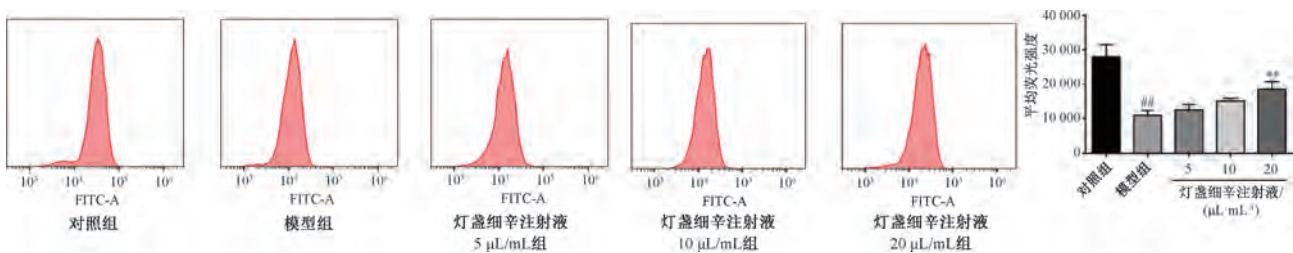
图 4 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞线粒体形态、ATP 水平、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.7 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 MMP 水平的影响 与对照组比较,模型组细胞红/绿荧光比率降低 ($P<0.01$),即 MMP 降低;与模型组比较,灯盏细辛注射液 20 $\mu\text{L/mL}$ 组细胞红/绿荧光比率升高 ($P<0.01$),即 MMP 水平升高,见图 5。



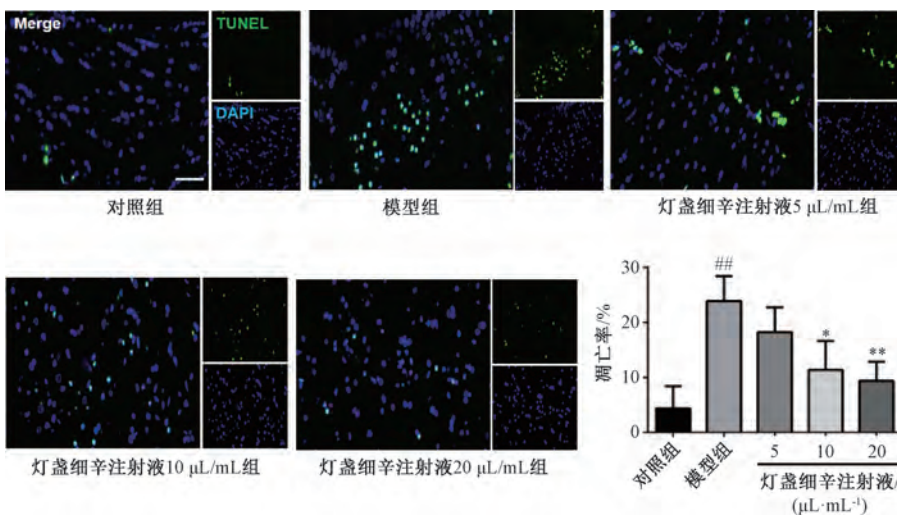
注:与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。
图 5 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 MMP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.8 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 MPTP 开放程度的影响 与对照组比较,模型组 HT22 细胞荧光信号降低 ($P<0.01$);与模型组比较,灯盏细辛注射液 20 $\mu\text{L/mL}$ 组细胞荧光信号升高 ($P<0.01$),见图 6。



注:与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。
图 6 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 MPTP 开放程度的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

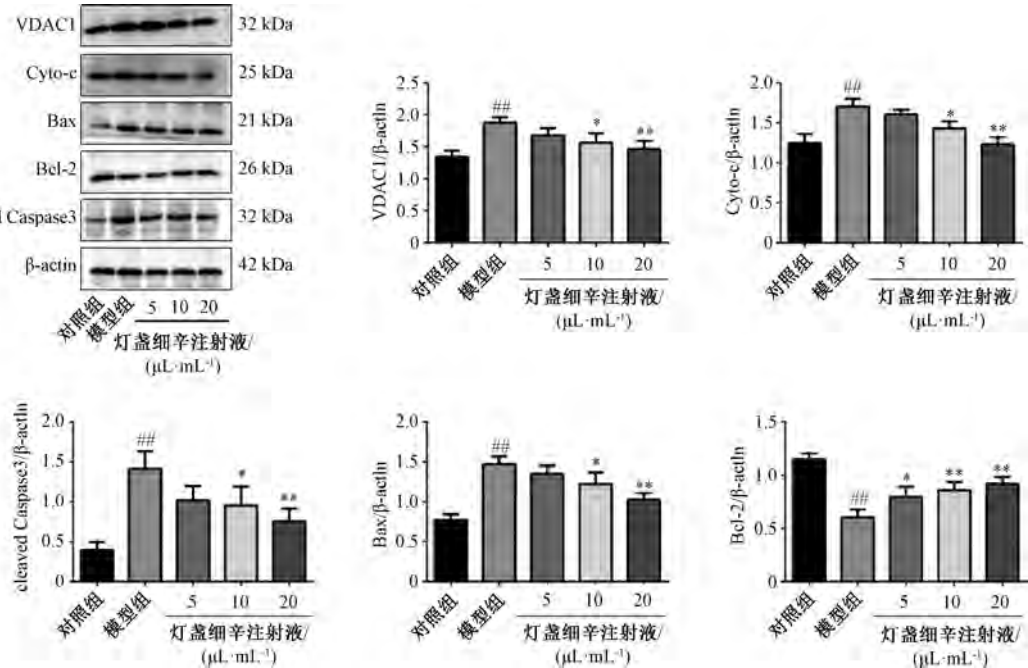
3.9 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞凋亡率的影响 与对照组比较,模型组 TUNEL 阳性信号增加,HT22 细胞凋亡率升高 ($P<0.01$);与对照组比较,灯盏细辛注射液 10、20 $\mu\text{L/mL}$ 组 HT22 细胞 TUNEL 阳性信号减弱,凋亡率降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 7。



注:与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。
图 7 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.10 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 VDAC1、Bcl-2、Bax、Cyto C、cleaved Caspase3 蛋白表达的影响 与对照组比较,模型组 HT22 细胞 VDAC1、Cyto C、Bax、cleaved Caspase3 蛋白表达升高 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋

白表达降低 ($P<0.01$); 与模型组比较,灯盏细辛注射液 10、20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组 HT22 细胞 VDAC1、Cyto C、Bax、cleaved Caspase3 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达升高 ($P<0.01$), 见图 8。



注: 与对照组比较, ## $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 8 灯盏细辛注射液对 OGD/R 损伤后 HT22 细胞 VDAC1、Bcl-2、Bax、Cyto C、cleaved Caspase3 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

4 讨论

海马神经元对缺血极其敏感,是脑卒中的首要损伤靶区^[20],其受损后细胞出现膜破坏、活性降低甚至死亡等现象,这与线粒体源 ROS 诱导氧化应激损伤密切相关^[21]。灯盏注射液及其活性成分抑制脑缺血氧化应激反应在前期已被报道^[22-23],本研究以 OGD/R 处理的 HT22 细胞为海马神经元缺血损伤体外模型,验证了该制剂通过抑制 ROS 累积,提高细胞活性,减少细胞膜损伤造成的 LDH 释放,从而缓解缺血神经元损伤。此外,作为主要耗氧细胞器,线粒体在缺血条件下最先受到影响^[24-25],缺血缺氧可诱导健康线粒体由杆状、棒状或短线状连接的网络转变为碎片化、颗粒化形态,并损伤线粒体功能,甚至触发细胞死亡^[26]。本研究首次证实,灯盏细辛注射液能减少线粒体碎片化、颗粒化的表型转变,维持线粒体正常形态。同时,灯盏细辛注射液对脑缺血引起的 ATP 水平不足、能量依赖的 Na^+/K^+ -ATPase 活性降低,以及 MMP 耗散等线粒体功能失调的指征也具有改善作用^[27]。

受损线粒体是细胞凋亡刺激的直接来源,而 ROS/MPTP/VDAC1 信号轴在其中发挥重要作用^[28-29],MPTP 是线粒体跨膜非特异性孔道,在生理情况下处于关闭状态,维持线粒体结构及功能的完整性;VDAC1 是 MPTP 主要组分,影响线粒体外膜通透性,同时也关系到凋亡调节^[30]。缺血缺氧时,损伤线粒体释放大量的 ROS,刺激 MPTP 过度

开放,促使 Cyto C 释放到细胞质中;Cyto C 则形成凋亡小体,诱导 Caspase-3 的剪切与激活,触发凋亡级联^[31-32],在这一过程中 VDAC1 蛋白过表达,一方面与促凋亡蛋白 Bax 结合诱使 MPTP 开放或者扩大,另一方面诱发自身体转变成为聚合态而介导凋亡^[33]。此外, Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 形成异质二聚体,拮抗后者的抗凋亡作用^[34]。本研究发现,灯盏细辛注射液减少了细胞凋亡现象,限制了 ROS 累积及 MPTP 异常开放,降低了 VDAC1、Bax、Cyto C、cleaved Caspase3 蛋白表达,升高了 Bcl-2 蛋白表达,提示它通过调控 ROS/MPTP/VDAC1 信号轴抑制线粒体源的细胞凋亡。

综上所述,灯盏细辛注射液可通过抑制 ROS/MPTP/VDAC1 信号,减少线粒体碎片化表型转变,促进线粒体能量生产,维持线粒体 MMP,抑制线粒体损伤介导的细胞凋亡,从而发挥抗脑缺血神经保护作用。

参考文献:

[1] Tsao C W, Aday A W, Almarazooq Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2023, 147(8): e93-e621.
[2] Shi K B, Zou M, Jia D M, et al. tPA mobilizes immune cells that exacerbate hemorrhagic transformation in stroke[J]. *Circ Res*, 2021, 128(1): 62-75.

[3] Huo X C, Ma G T, Tong X, *et al.* Trial of endovascular therapy for acute ischemic stroke with large infarct[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(14): 1272-1283.

[4] Zhang Y, Zhang X T, Wei Q Q, *et al.* Activation of sigma-1 receptor enhanced pericyte survival *via* the interplay between apoptosis and autophagy: implications for blood-brain barrier integrity in stroke[J]. *Transl Stroke Res*, 2020, 11 (2): 267-287.

[5] Zhao Y F, Zhang X J, Chen X Y, *et al.* Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: from mechanisms to treatment[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(2): 15.

[6] Yang M X, He Y, Deng S X, *et al.* Mitochondrial quality control: a pathophysiological mechanism and therapeutic target for stroke[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 14: 786099.

[7] Yang J L, Mukda S, Chen S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke[J]. *Redox Biol*, 2018, 16: 263-275.

[8] Duan H Y, Zhang Q, Liu J, *et al.* Suppression of apoptosis in vascular endothelial cell, the promising way for natural medicines to treat atherosclerosis[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 168: 105599.

[9] Zhang Q, Li R L, Tao T, *et al.* Antiepileptic effects of cicadae periostracum on mice and its antiapoptotic effects in H₂O₂-stimulated PC12 cells *via* regulation of PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathways[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5598818.

[10] Kaur M M, Sharma D S. Mitochondrial repair as potential pharmacological target in cerebral ischemia[J]. *Mitochondrion*, 2022, 63: 23-31.

[11] Guo T, Chen M L, Liu J, *et al.* Neuropilin-1 promotes mitochondrial structural repair and functional recovery in rats with cerebral ischemia[J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1): 297.

[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 923-924.

[13] Liu G L, Tang G M, Liang W W, *et al.* PK-PD correlation of erigeron breviscapus injection in the treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury model rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2021, 71(2): 302-324.

[14] 吕 健, 谢雁鸣, 黎元元, 等. 灯盏细辛注射液治疗急性脑梗死的系统评价和 Meta 分析[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(9): 107-115.

[15] 贝 宁, 贝 箐, 王 英, 等. 灯盏细辛注射液联合黄芪注射液治疗缺血性脑卒中急性期的临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(9): 1123-1124; 1127.

[16] Li J G, Wang L Q, Yang X Y, *et al.* Chinese herbal medicine Dengzhan Xixin injection for acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *Complement Ther Med*, 2017, 34: 74-85.

[17] 刘东华, 李 扬, 常 杰. 灯盏细辛对急性期大鼠脑缺血再灌注后细胞凋亡影响作用的研究[J]. 宁夏医学杂志, 2014, 36(11): 972-975; 968.

[18] 游明瑶, 蔡胤浩, 王世君, 等. 灯盏细辛注射液对老年脑梗死患者血清 IL-6 及 TNF- α 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(17): 4762-4764.

[19] Yang L, Tao Y W, Luo L L, *et al.* Dengzhan Xixin injection derived from a traditional Chinese herb *Erigeron breviscapus* ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in rats *via* modulation of mitophagy and mitochondrial apoptosis[J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 288: 114988.

[20] Xie S S, Zhi Y, Zeng B F. Protective effects of catalpol on limb motor function and ultrastructure of hippocampal neurons in rats with cerebral ischemia[J]. *Mol Biotechnol*, 2022, 64(2): 213-219.

[21] Zhang T J, Li Z J, Qin Z, *et al.* Neuroprotection of chikusetsu saponin V on transient focal cerebral ischemia/reperfusion and the underlying mechanism[J]. *Phytomedicine*, 2021, 84: 153516.

[22] 钟兴继, 程 静. 灯盏细辛对脑梗死患者短期氧化反应、血液流变学及神经功能缺损的影响分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(2): 144-147.

[23] Xie X H, Wang F, Ge W X, *et al.* Scutellarin attenuates oxidative stress and neuroinflammation in cerebral ischemia/reperfusion injury through PI3K/Akt-mediated Nrf2 signaling pathways[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 957: 175979.

[24] Dai W, He Q Z, Zhu B Q, *et al.* Oxidative stress-mediated apoptosis is involved in bisphenol S-induced reproductive toxicity in male C57BL/6 mice[J]. *J Appl Toxicol*, 2021, 41(11): 1839-1851.

[25] Kumar R, Bukowski M J, Wider J M, *et al.* Mitochondrial dynamics following global cerebral ischemia[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2016, 76: 68-75.

[26] Zhao H, Pan W L, Chen L H, *et al.* Nur77 promotes cerebral ischemia-reperfusion injury *via* activating INF2-mediated mitochondrial fragmentation[J]. *J Mol Histol*, 2018, 49(6): 599-613.

[27] Bravo-Sagua R, Parra V, López-Crisosto C, *et al.* Calcium transport and signaling in mitochondria[J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(2): 623-634.

[28] Tuo Q Z, Zhang S T, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications[J]. *Med Res Rev*, 2022, 42(1): 259-305.

[29] Dawson T M, Dawson V L. Mitochondrial mechanisms of neuronal cell death: potential therapeutics[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2017, 57: 437-454.

[30] Li Y X, Sun J Y, Wu R X, *et al.* Mitochondrial MPTP: a novel target of ethnomedicine for stroke treatment by apoptosis inhibition[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 352.

[31] Li S, Wang T T, Zhai L, *et al.* Picoside II exerts a neuroprotective effect by inhibiting mPTP permeability and EndoG release after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 64(1): 144-155.

[32] Hou Y, Qieni X, Li N, *et al.* Longzhibu disease and its therapeutic effects by traditional Tibetan medicine: Ershi-wei Chenxiang Pills[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112426.

[33] Zhang T, Cao R J, Niu J L, *et al.* G6PD maintains the VSMC synthetic phenotype and accelerates vascular neointimal hyperplasia by inhibiting the VDAC1-Bax-mediated mitochondrial apoptosis pathway[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 47.

[34] Ladokhin A S. Regulation of apoptosis by the Bcl-2 family of proteins: field on a brink[J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2121.