

基于 PPAR γ -FUNDC1 信号轴调控线粒体自噬探讨川芎嗪改善 bEnd.3 细胞衰老的作用

陈 胜¹, 郑 洋², 张 翔¹, 杨舒添¹, 李 阳¹, 李明辰¹, 郭轩辰¹, 张博涛¹, 祁 文^{2*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000

2. 广西中医药大学 赛恩斯新医药学院, 广西 南宁 530222

摘要: **目的** 探讨川芎嗪调控线粒体自噬抑制 bEnd.3 细胞衰老的分子机制。**方法** bEnd.3 细胞随机分为对照组、模型组和川芎嗪低、中、高浓度 (25、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 除对照组外, 使用 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导 bEnd.3 细胞衰老, 通过免疫荧光双染检测 CD31/P53、CD31/P21 蛋白的表达, Transwell 实验检测细胞迁移能力, 细胞流式实验检测细胞周期, 血管形成实验检测细胞成管能力, β -半乳糖苷酶染色检测细胞衰老, Western blotting 检测 bEnd.3 细胞 P53、P21、P16、核纤层蛋白 B (Lamin B)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)、FUN14 结构域包含蛋白 1 (FUNDC1) 表达, 荧光探针检测线粒体与溶酶体共定位情况, 用 Discovery Studio 软件进行川芎嗪与 PPAR γ 的分子对接, 用 WeMol 在线平台进行分子动力学模拟。**结果** 模型组中 CD31/P53 及 CD31/P21 双阳性细胞比例较对照组显著增加 ($P<0.01$), 证明模型构建成功; 与对照组比较, 模型组细胞的迁移能力、细胞成管能力、PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达均明显减少, Lamin B 蛋白显著减少, 而 P53、P21、P16 蛋白表达显著增加, β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数量明显增加, 细胞显著阻滞在 G₀/G₁ 期, 差异均具有统计学意义 ($P<0.01$); 线粒体和溶酶体共定位明显减少。与模型组比较, 川芎嗪干预后, 细胞的迁移能力、细胞成管能力、PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达明显增加, Lamin B 蛋白表达显著增加, 而 P53、P21、P16 蛋白表达显著减少, β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数量明显减少, 显著改善细胞在 G₀/G₁ 期阻滞, 差异均具有统计学意义 ($P<0.01$), 线粒体和溶酶体共定位明显增加; 分子对接与动力学模拟表明川芎嗪与 PPAR γ 具有较好的靶向作用力。**结论** 川芎嗪通过调控 PPAR γ -FUNDC1 信号轴增强线粒体自噬, 清除受损线粒体, 从而抑制 bEnd.3 细胞衰老。

关键词: 川芎嗪; PPAR γ ; FUNDC1; 线粒体自噬; 内皮细胞; 衰老

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)12-3517-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.12.010

Effect of tetramethylpyrazine on vascular endothelial cell senescence via PPAR γ -FUNDC1 signaling axis-mediated regulation of mitophagy

CHEN Sheng¹, ZHENG Yang², ZHANG Xiang¹, YANG Shutian¹, LI Yang¹, LI Mingchen¹, GUO Xuanchen¹, ZHANG Botao¹, QI Wen²

1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

2. Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism by which tetramethylpyrazine regulates mitochondrial autophagy to inhibit senescence in bEnd.3 cells. **Methods** bEnd.3 cells were randomly divided into a control group, a model group, and tetramethylpyrazine low-, medium-, and high-concentration (25, 50, and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups. Except for the control group, bEnd.3 cells were induced to senescence with H_2O_2 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The expression of CD31/P53 and CD31/P21 proteins was detected by immunofluorescence double staining. Cell migration ability was detected by Transwell assay. Cell cycle was detected by flow cytometry. Cell tube formation ability was detected by vascular formation assay. Senescent cells were detected by β -galactosidase staining. The expression of P53, P21, P16, lamin B, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ), and FUN14 domain-containing protein 1 (FUNDC1) in bEnd.3 cells was detected by Western blotting. The co-localization of mitochondria and lysosomes

收稿日期: 2025-06-17

基金项目: 广西中医药大学赛恩斯新医药学院校级科研项目 (2024ZZA001)

作者简介: 陈 胜 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为脊柱与四肢退行性疾病的中医防治。E-mail: 1320186986@qq.com

*通信作者: 祁 文, 男, 博士, 教授、主任医师, 研究方向为关节与脊柱退行性变防治。E-mail: superkindom@foxmail.com

was detected by fluorescence probe. Molecular docking and molecular dynamics simulation were performed using Discovery Studio software and WeMol online platform, respectively. **Results** The proportion of CD31/P53 and CD31/P21 double-positive cells in the model group was significantly increased compared with the control group ($P < 0.01$), indicating successful model construction. Compared with the control group, the cell migration ability, cell tube formation ability, and the expression of PPAR γ and FUNDC1 proteins in the model group were significantly decreased, the expression of Lamin B protein was significantly decreased, while the expression of P53, P21, and P16 proteins was significantly increased, the number of β -galactosidase staining positive cells was significantly increased, and cells were significantly arrested in the G₀/G₁ phase, with statistically significant differences ($P < 0.01$). The co-localization of mitochondria and lysosomes was significantly decreased. Compared with the model group, after tetramethylpyrazine intervention, the cell migration ability, cell tube formation ability, and the expression of PPAR γ and FUNDC1 proteins were significantly increased, the expression of Lamin B protein was significantly increased, while the expression of P53, P21, and P16 proteins was significantly decreased, the number of β -galactosidase staining positive cells was significantly decreased, and the cell arrest in the G₀/G₁ phase was significantly improved, with statistically significant differences ($P < 0.01$). The co-localization of mitochondria and lysosomes was significantly increased. Molecular docking and molecular dynamics simulation indicated that tetramethylpyrazine had a good targeting force with PPAR γ . **Conclusion** Tetramethylpyrazine inhibits senescence in bEnd.3 cells by regulating the PPAR γ -FUNDC1 signaling axis to enhance mitochondrial autophagy and remove damaged mitochondria.

Key words: tetramethylpyrazine; PPAR γ ; FUNDC1; mitophagy; endothelial cell; senescence

脊髓损伤是一种严重的中枢神经系统疾病,常导致患者运动、感觉及自主神经功能不可逆性丧失^[1],并引发多系统并发症,严重影响生存质量及预后^[2]。脊髓损伤的病理生理过程包括原发性机械损伤和在其基础上产生的可逆性继发性损伤,其中后者危害最大且持续进展^[3]。脊髓损伤现主要采用手术联合大剂量激素冲击,虽短期见效快,但长期激素使用易致免疫抑制、感染及骨质疏松,而手术创伤则可能引发胃肠功能障碍、继发感染和复发风险,总体临床疗效欠佳^[4]。流行病学数据显示发展中国家脊髓损伤年发病率达每百万 55.95 个,且呈年轻化趋势,凸显其重大社会负担^[5]。血脊髓屏障(BSCB)是位于脊髓与周围血管间的屏障结构,主要由血管内皮细胞构成,它通过调控血液与脊髓实质的选择性物质交换,对维持脊髓稳态和抵御外源性损伤至关重要^[6]。脊髓损伤后,BSCB 的结构破坏会引发炎症细胞浸润与神经元死亡,从而加剧神经功能损伤。这一病理过程与血管内皮细胞衰老密切相关^[7]:脊髓损伤会加速内皮细胞衰老,而衰老的内皮细胞又会进一步削弱 BSCB 的完整性,形成一种恶性循环。在此循环中,屏障功能障碍会导致血管渗漏加剧,进而恶化神经损伤。因此,靶向调控血管内皮细胞衰老以维持 BSCB 完整性,是改善脊髓损伤预后的重要策略。线粒体自噬是一个特异性的选择过程,通过多因子协同作用实现细胞内受损线粒体的精准清除,该过程对维持细胞器稳态和保障细胞正常生理功能具有关键调控作用^[8]。靶向介导线粒体自噬可抑制细胞衰老,另有研究发现^[9],抑制血管内皮细

胞衰老能有效减少衰老相关分泌表型(SASP)的产生,进而减轻神经炎症并促进神经功能恢复,该策略在脊髓损伤防治中发挥重要作用。

川芎嗪是从川芎中提取的主要活性生物碱,具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、扩张冠状动脉及保护血管内皮等多重药理作用^[10]。课题组前期研究发现,川芎嗪可显著改善脊髓损伤大鼠运动功能,并抑制内皮细胞衰老标志物 P16 的表达^[11],其保护机制可能涉及调控炎症免疫反应、促进神经修复机制及激活细胞信号通路等多重途径,通过减轻氧化应激等损伤,最终减少细胞凋亡并改善神经功能损伤^[12]。此外,李姝君等^[13]研究也证实,川芎嗪能有效改善脊髓损伤小鼠的运动功能,其作用机制可能与减轻炎症反应和抑制胶质瘢痕形成有关,这些研究从不同角度共同支撑了川芎嗪的多靶点治疗潜力。然而,川芎嗪是否通过过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)-FUN14 结构域包含蛋白 1 (FUNDC1)轴调控线粒体自噬进而抑制内皮细胞衰老,目前尚未阐明。本研究聚焦 PPAR γ -FUNDC1 介导的线粒体自噬机制,旨在探讨川芎嗪对血管内皮细胞衰老的调控作用及其分子途径,为揭示中医药多靶点治疗脊髓损伤的机制提供新参考。

1 材料

1.1 主要仪器

TS-1 水平摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); CytoFLEX 流式细胞仪(美国 Beckman 公司); Mini-protein Tetra System 电泳仪和电泳槽(Bio-Rad 公司); IX51 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);

DNP-9162 恒温培养箱（上海精宏实验设备）。

1.2 细胞

小鼠脑内皮细胞系 bEnd.3 购于普诺赛生命科技有限公司（货号 CL-0598）。

1.3 主要药物与试剂

川芎嗪（北京索莱宝生物科技公司，质量分数 98%，货号 ST8120），购于中国食品药品检定研究院；Matrigel（货号 356234）、BCA 蛋白定量试剂盒（货号 PC0020）、GAPDH 抗体（货号 K200057M），北京索莱宝生物科技公司； β -半乳糖苷酶（货号 C0602），上海碧云天生物技术股份有限公司；Transwell 小室（Millipore 公司，货号 GLS3396）；MitoTracker[®] Green FM（货号 40742ES50）、LysoTracker Red DND-99（货号 40739ES50），上海翊圣生物科技有限公司；P53 抗体（博士德生物公司，货号 BM4095）；P21 抗体（批号 ab109199）、PPAR γ 抗体（批号 310323），Abcam 公司；P16 抗体（货号 28416-1-AP）、核纤层蛋白 B（Lamin B）抗体（货号 12987-1-AP），武汉三鹰生物科技公司；FUNDCl 抗体（美国 Cell Signaling Technology 公司，批号 49240S）。

2 方法

2.1 细胞分组与衰老模型的诱导

将 bEnd.3 细胞悬液按每孔 6×10^3 个的密度接种至 96 孔培养板中，待细胞增殖至 75% 融合度时，分为对照组、模型组和川芎嗪低、中、高浓度（25、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ）组^[14-15]。除对照组外，使用 Li 等^[9]的方法用 H_2O_2 诱导 bEnd.3 细胞衰老模型，吸去上清液，用磷酸盐缓冲溶液（PBS）洗去残留培养基，使用完全培养基配制 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 溶液处理 bEnd.3 细胞，置入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温培养箱中进行培养。川芎嗪各组先用 H_2O_2 诱导 bEnd.3 细胞衰老模型 4 h，再加入相应的药物干预 48 h，模型组先用 H_2O_2 诱导 bEnd.3 细胞衰老模型 4 h，再加入等量的培养液培养 48 h，对照组无需使用 H_2O_2 诱导，全程使用培养液培养。

2.2 CD31/P53、CD31/P21 免疫荧光双染^[8]

将 bEnd.3 细胞悬液按每孔 5×10^4 个的密度接种到已放置爬片的 12 孔板孔中，分为对照组和模型组，按照“2.1”项方法处理后，经 4% 多聚甲醛固定 15 min、0.3% TritonX-100 室温通透 10 min 后，以 5% 牛血清白蛋白（BSA）封闭 1 h。孵育一抗[CD31（1：200）+P53/P21（1：150）]4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜，次日加

入对应的二抗（1：150），室温孵育 1 h，DAPI 染核后封片。显微镜下随机选取 3 个视野观察并拍照，采用 Image J 分析双阳性细胞比例。

2.3 Transwell 测定细胞迁移能力^[16]

将制备好的细胞悬液以 5×10^4 个的密度接种至 Transwell 小室中，每孔接种体积为 100 μL ，每个实验样本设置 4 个复孔，按照“2.1”项方法分组及给药，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养 24 h。迁移结束后，将 Transwell 小室在 4% 多聚甲醛中室温条件下固定 20 min，固定完成后，去除固定液，用结晶紫染液室温避光下染色 15 min。染色完毕后，用 PBS 清洗晾干，在显微镜下观察迁移至小室下表面的细胞，随机选取 3 个视野进行观察并拍照记录。

2.4 细胞流式实验检测细胞周期^[16]

取对数生长期的细胞以 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 、每孔 2 mL 的密度接种于 6 孔板，按照“2.1”项方法处理后，收集细胞，经预冷 PBS 洗涤 2 次，再加入 70% 预冷乙醇，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。固定后细胞经 PBS 洗涤去除固定液，用 PI 染色液重悬细胞，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min，最后，使用流式细胞仪检测并分析各组细胞周期的分布。

2.5 血管形成实验检测细胞成管能力

按照“2.1”项方法分组及处理 bEnd.3 细胞，处理 48 h 后收集细胞，用预冷的 PBS 洗涤。在预冷的 96 孔板中，每孔均匀铺覆 50 μL Matrigel 基质胶，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中孵育 30 min，使其充分聚合形成基底膜基质。聚合完成后，将细胞悬液调整密度，每孔接种 2×10^4 个，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 6 h。每孔加入 4% 多聚甲醛固定后，用 PBS 洗涤孔板 3 次。加入结晶紫染色，室温染色 15 min 后，于显微镜下随机选取 3 个视野进行观察并拍照，用 Image J 软件分析管腔形成情况。

2.6 β -半乳糖苷酶染色检测

细胞接种及处理方法同“2.4”项，处理结束后吸除细胞培养液，用 PBS 洗涤 1 次，每孔加入 1 mL 染色固定液，室温固定 15 min；吸除细胞固定液，用 PBS 洗涤细胞 3 次，每次 3 min。吸除 PBS，每孔加入 1 mL 染色工作液，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜后即可在普通光学显微镜下观察并拍照，使用 Image pro plus 6.0 计数染色阳性细胞数。

2.7 Western blotting 检测相关蛋白表达

细胞接种及处理方法同“2.4”项，处理结束后

提取各组细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定各组细胞蛋白浓度, 然后用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分离。将蛋白质转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上, 用 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱脂奶粉在 TBST 缓冲液中封闭 1 h, 然后用相应的一抗在 4°C 过夜孵育。洗涤 3 次后用相应的 HRP 标记的二抗在室温下孵育 1 h, 然后用 ECL 发光底物进行检测。用 Image J 软件进行定量分析。

2.8 荧光探针检测线粒体与溶酶体共定位情况^[17]

将 bEnd.3 细胞密度调整到 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 在预先放置好爬片的 12 孔板中接种 1 mL, 按照“2.1”项方法分组及给药, 在 37°C 、5% CO_2 培养箱培养过夜, 吸除培养液加入 37°C 预热的 MitoTracker[®] Green FM 和 LysoTracker Red DND-99 染色工作液 ($200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育 30 min, 置于荧光显微镜下观察拍照。

2.9 分子对接和分子动力学模拟

从 PubChem 数据库获得物质的二维结构, 并以“SDF”格式存储。从蛋白质数据库 (PDB) 中

检索关键靶标的 3D 结构, 并以“PDB”格式保存为蛋白质受体。用 Discovery Studio 软件进行分子对接操作并下载 PDB 格式导入 PyMOL 软件用于可视化对接结果, 将对接结果以 PDB 格式导入 WeMol 在线平台中进行时长 100 ns 的分子动力学模拟。

2.10 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计学分析, 计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐时多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组内比较用 LSD-*t* 检验, 方差不齐用秩和检验。

3 结果

3.1 H_2O_2 诱导 bEnd.3 细胞衰老模型的 CD31/P53、CD31/P21 双染验证

使用 bEnd.3 细胞借助 H_2O_2 诱导衰老模型, 细胞干预处理结束后使用 CD31/P53、CD31/P21 免疫双染。如图 1 所示, 对照组 CD31/P21、CD31/P53 双染的细胞显著少于模型组 ($P < 0.01$)。结果表明, 使用 H_2O_2 成功诱导衰老细胞模型。

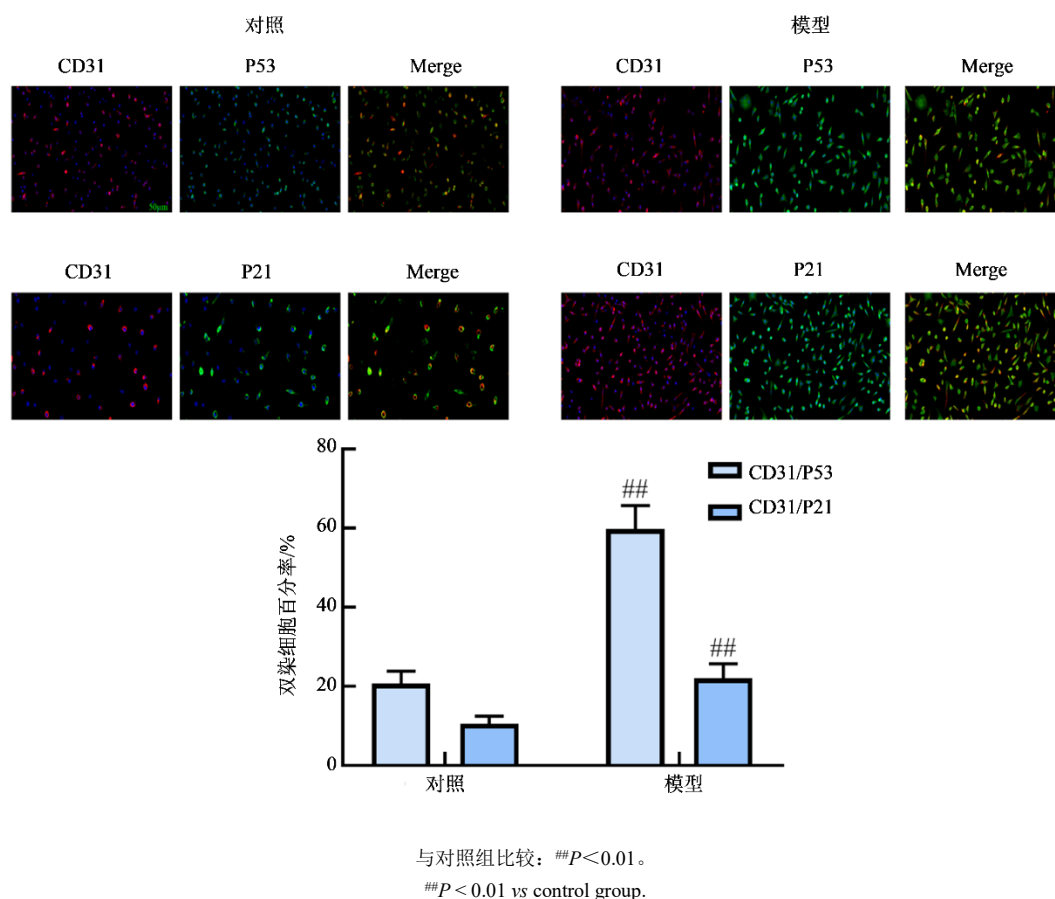


图 1 H_2O_2 诱导 bEnd.3 细胞衰老的免疫双染验证 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Immunodouble staining validation of H_2O_2 induced bEnd.3 cell senescence ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

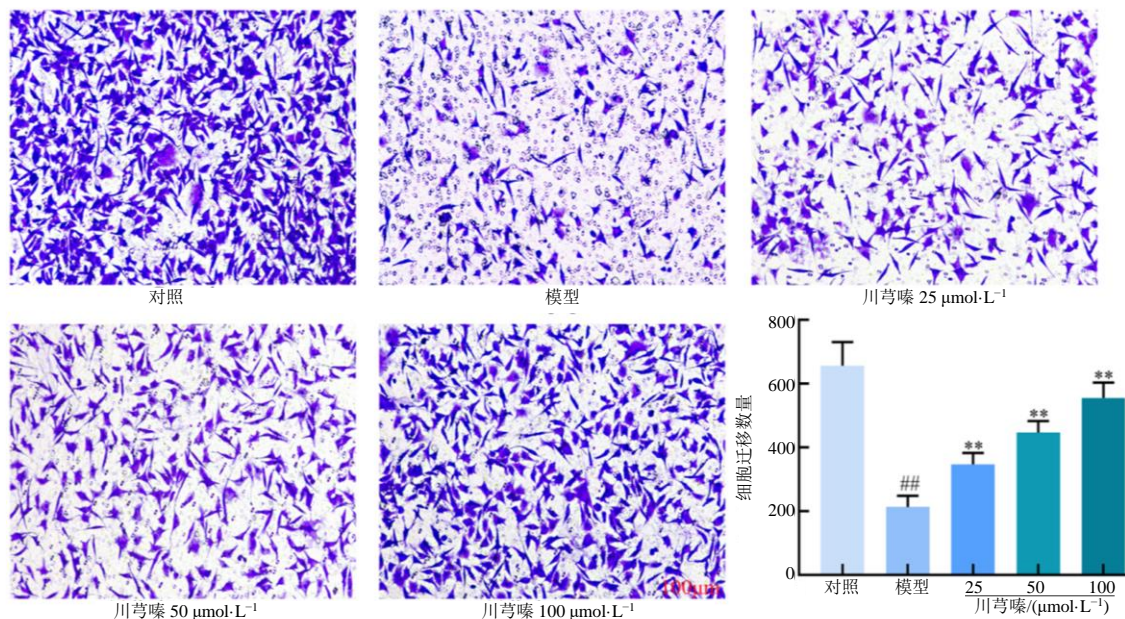
3.2 川芎嗪对 bEnd.3 细胞迁移能力的影响

Transwell 实验结果表明,与对照组比较,模型组细胞的迁移能力明显下降 ($P<0.01$);与模型组相比,川芎嗪干预后细胞的迁移能力明显增加,且

差异有统计学意义 ($P<0.01$)。结果见图 2。

3.3 川芎嗪改善 bEnd.3 细胞周期阻滞

如图 3 所示,细胞流式实验结果表明,与对照组比较,模型组细胞显著阻滞在 G_0/G_1 期 ($P<$

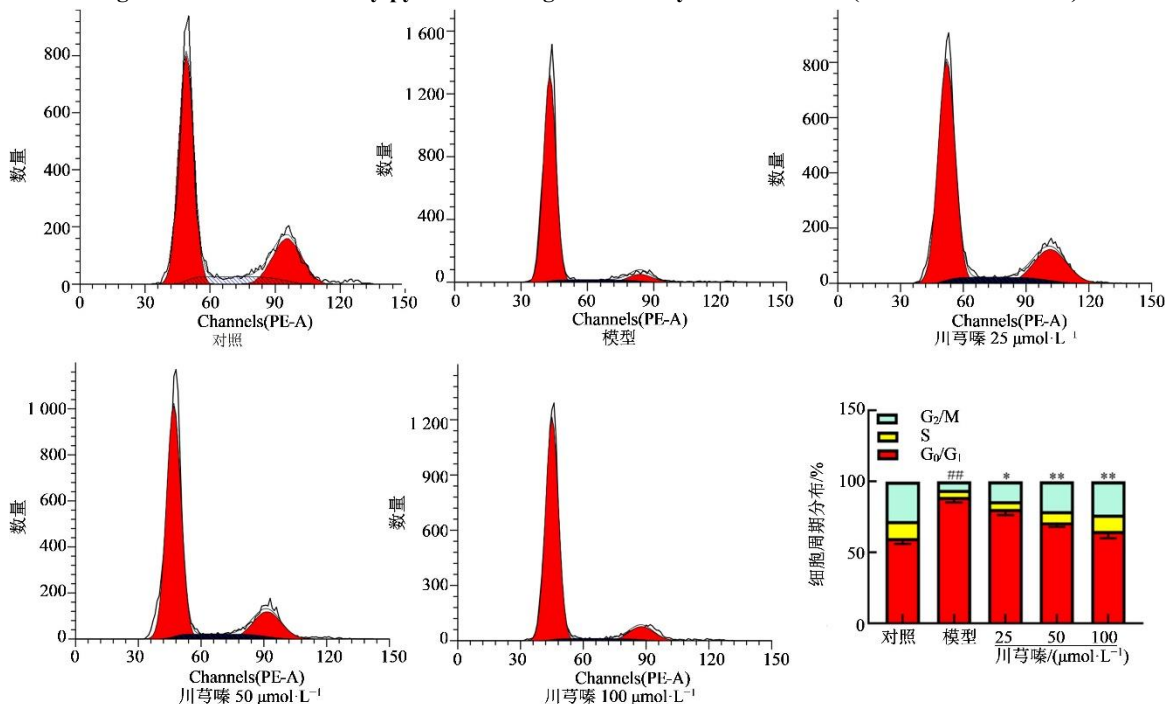


与对照组比较: ## $P<0.01$; 与模型组比较: ** $P<0.01$ 。

$P<0.01$ vs control group; ** $P<0.01$ vs model group.

图 2 川芎嗪对 bEnd.3 细胞的迁移能力的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Effect of tetramethylpyrazine on migration ability of bEnd.3 cells ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)



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

$P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group.

图 3 川芎嗪对细胞周期阻滞的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Effect of tetramethylpyrazine on cell cycle arrest ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

0.01); 与模型组比较, 川芎嗪干预后明显改善了细胞在 G₀/G₁ 期阻滞的情况 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.4 川芎嗪增加 bEnd.3 细胞成管能力

血管形成实验结果发现, 与对照组相比, 模型组细胞成管能力明显下降 ($P < 0.01$); 与模型组相

比, 川芎嗪干预后细胞成管能力明显增加 ($P < 0.01$)。结果见图 4。

3.5 川芎嗪对 bEnd.3 细胞 β -半乳糖苷酶染色的作用

如图 5 所示, β -半乳糖苷酶染色结果发现, 相比于对照组, 模型组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数

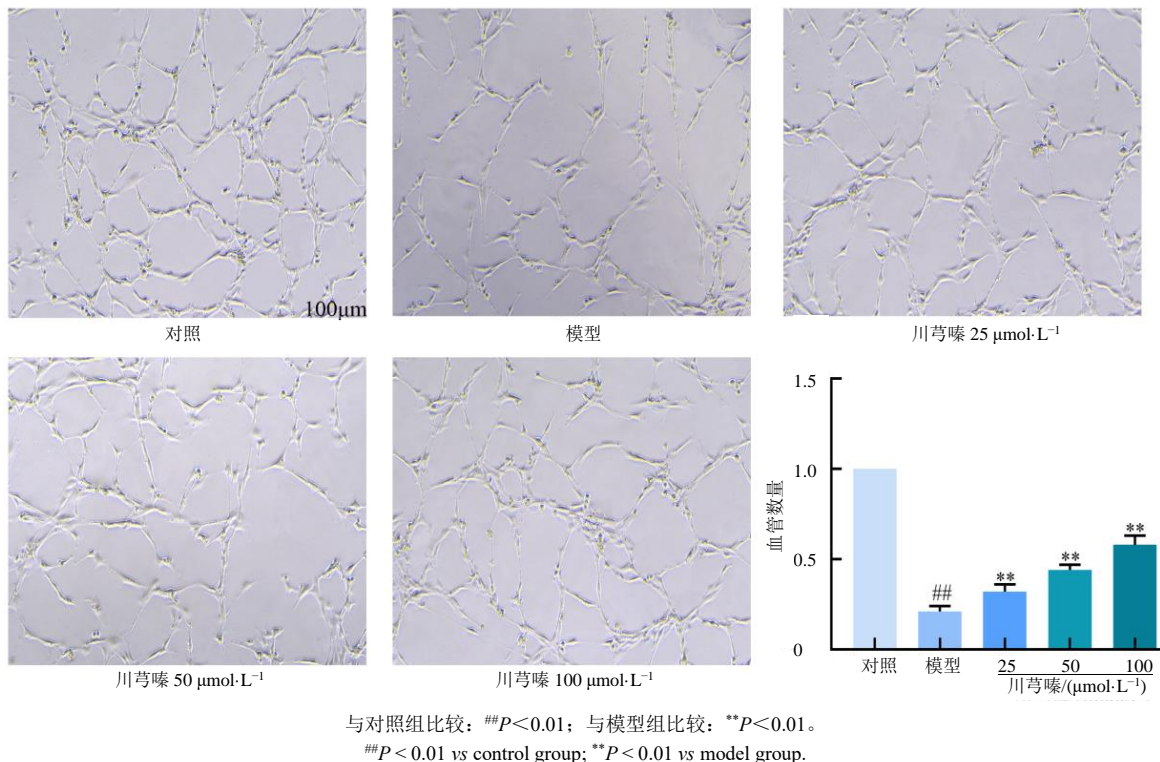


图 4 川芎嗪对 bEnd.3 细胞成管能力的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Effect of tetramethylpyrazine on tube forming ability of bEnd.3 cells ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

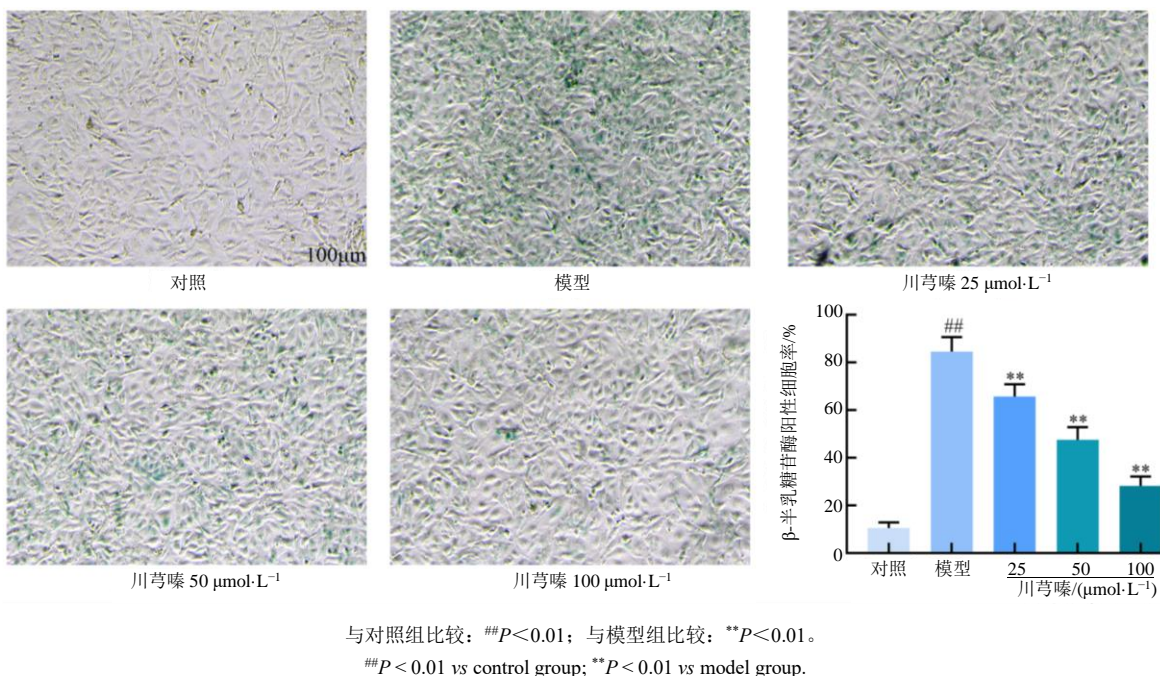


图 5 川芎嗪对 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞率的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 5 Effect of tetramethylpyrazine on positive cell rate of β -galactosidase staining ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

量明显增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 川芎嗪组 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞数量明显减少 ($P < 0.01$)。

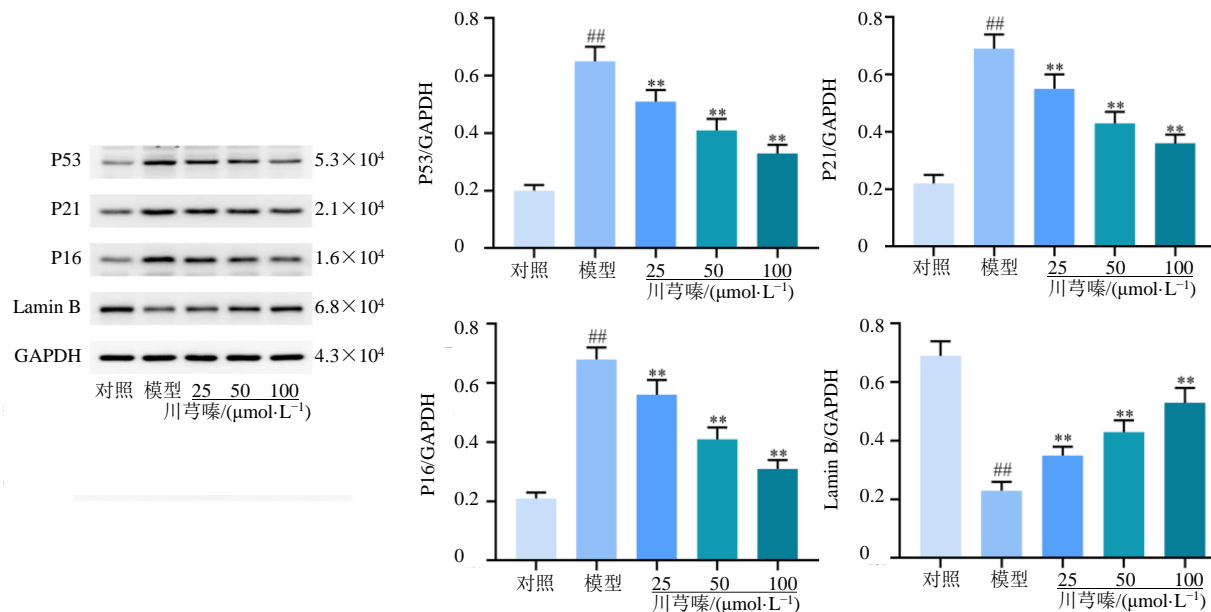
3.6 川芎嗪对 bEnd.3 细胞衰老的影响

与对照组比较, 模型组 P53、P21、P16 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), Lamin B 蛋白显著减少 ($P < 0.01$); 川芎嗪各组较模型组 P53、P21、P16 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$), Lamin B 蛋白显著增

加 ($P < 0.01$), 结果见图 6。结果表明川芎嗪具有抑制 bEnd.3 细胞衰老的作用。

3.7 川芎嗪对 PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达的影响

Western blotting 结果表明, 与对照组比较, 模型组 PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 川芎嗪干预后 PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$)。结果见图 7。

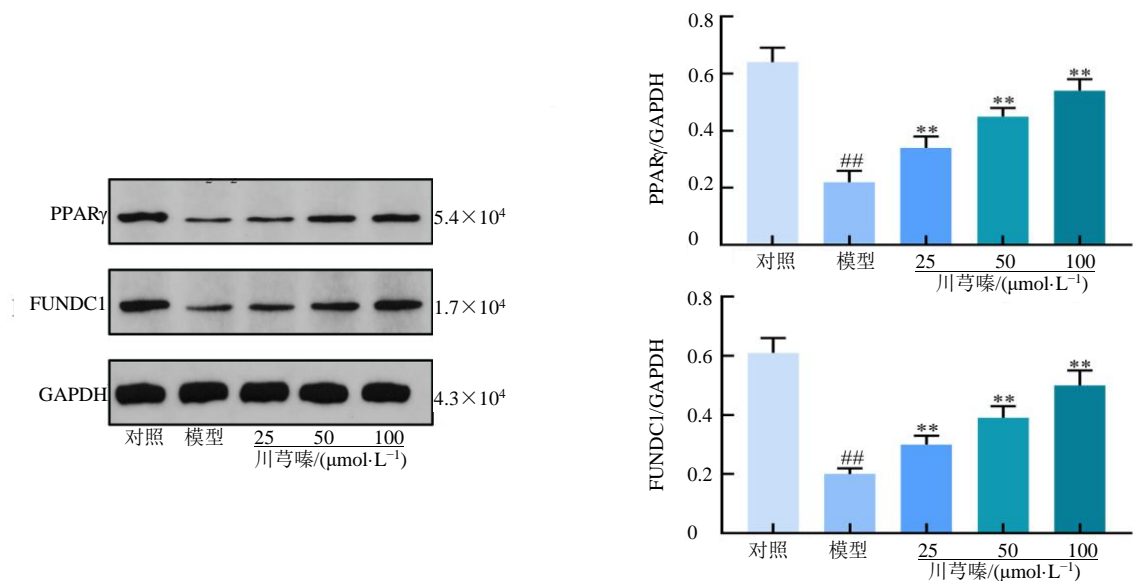


与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 6 川芎嗪对细胞衰老相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 Effect of tetramethylpyrazine on expression of aging related proteins in cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ 。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 7 川芎嗪对 PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 7 Effect of tetramethylpyrazine on PPAR γ and FUNDC1 proteins expression ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.8 川芎嗪对线粒体和溶酶体共定位的影响

荧光探针检测线粒体和溶酶体共定位发现,相较于对照组,模型组线粒体和溶酶体共定位明显减少;与模型组相比,川芎嗪干预后线粒体和溶酶体共定位明显增加。结果见图 8。

3.9 川芎嗪与 PPAR γ 的分子对接与动力学模拟

使用分子对接分析川芎嗪与 PPAR γ 的靶向

关系,结果发现川芎嗪与 PPAR γ 对接活性能为 $-25.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 川芎嗪通过 SER429、LEU421、PHE432 等残基与 PPAR γ 发生相互作用,表明川芎嗪与 PPAR γ 具有较好的靶向作用力,将上述对接产物进行时长 100 ns、步长 0.002 ns 的分子动力学模拟。以 RMSD 来评价蛋白质与配体的构象稳定性;以 RMSF 分析蛋白质在特定压力和温度下的位置变

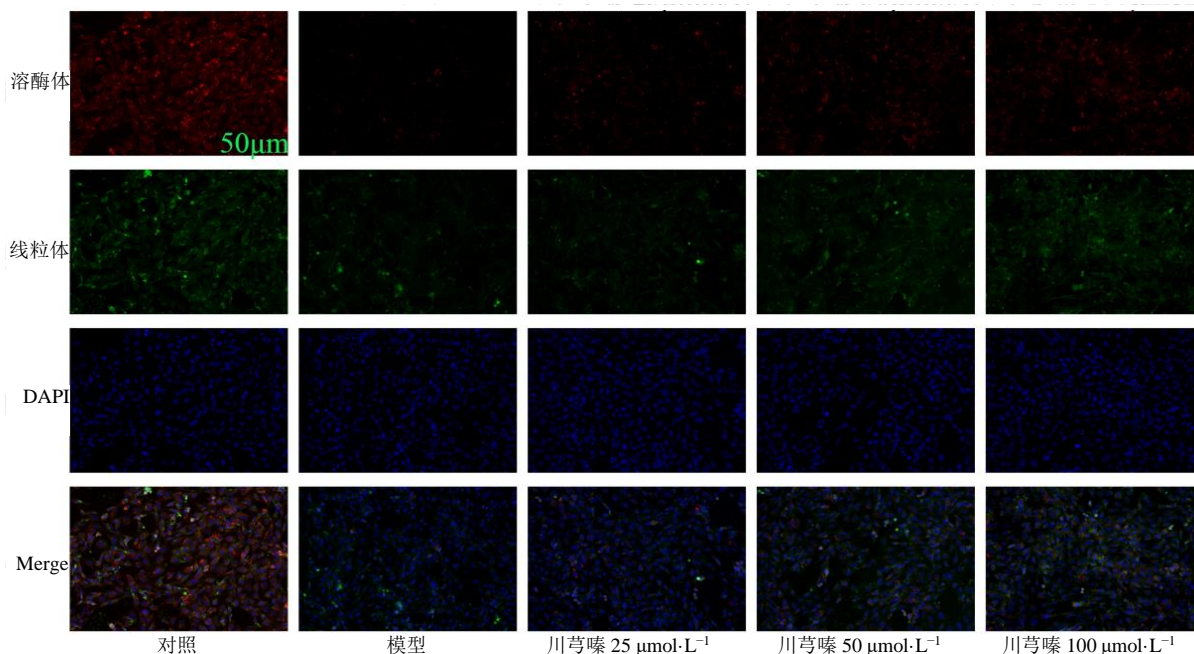


图 8 川芎嗪对线粒体和溶酶体共定位的作用 ($\times 200$)

Fig. 8 Effect of tetramethylpyrazine on mitochondrial and lysosomal co-localization ($\times 200$)

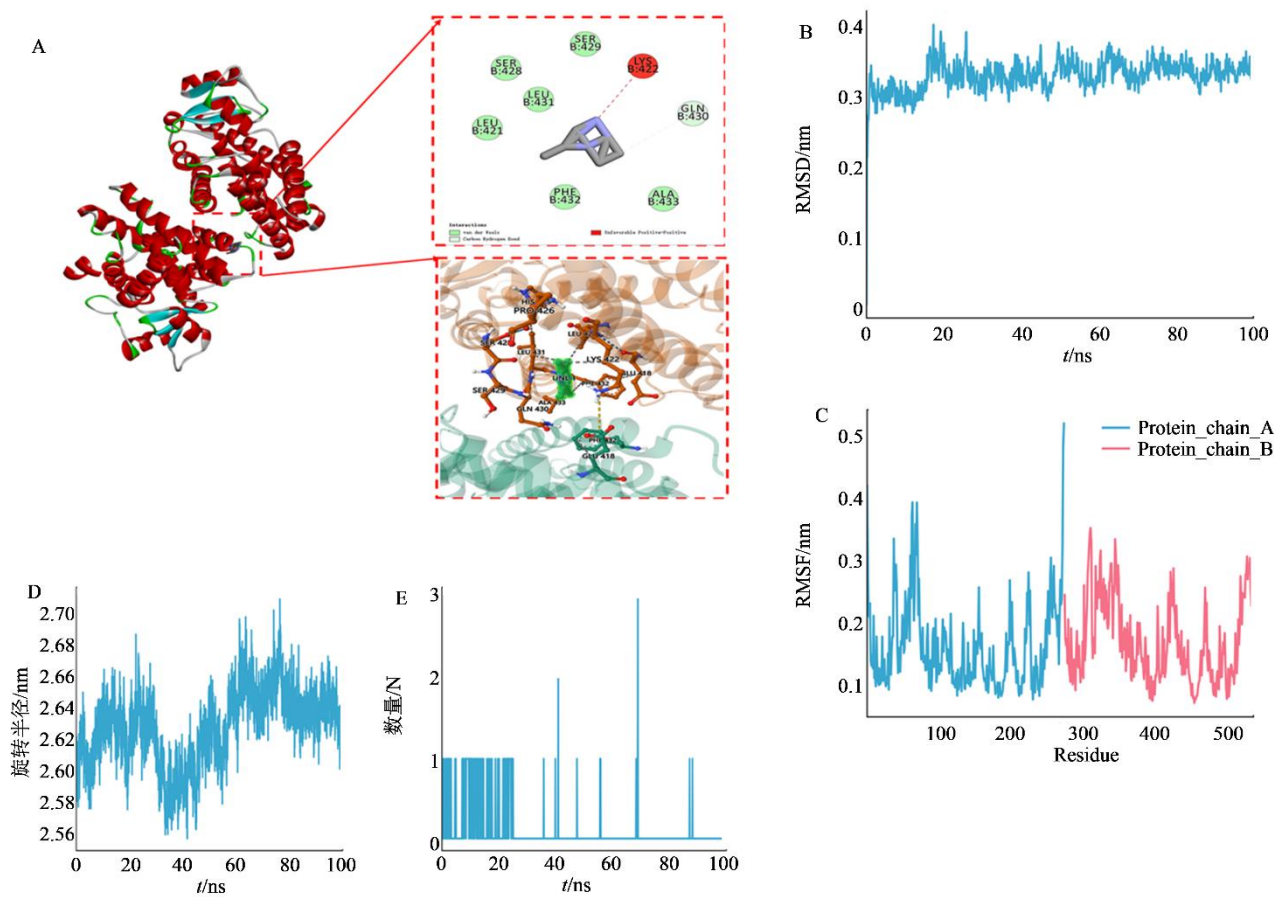
化。结果表明 RMSD 曲线在 100 ns 的运行时间表现出良好的稳定性,川芎嗪与 PPAR γ 在 20 ns 后开始趋于稳定;RMSF 中的峰值表明这些区域在整个模拟时间内波动最大,结果表明大部分残基的 RMSF 值较少,表明灵活性较低。回旋半径较小,表明体系紧凑稳定。在模拟过程中川芎嗪与 PPAR γ 至少形成了一个氢键,而在某些框架下,氢键数量增加到 3 个。分子动力学模拟有力的支持了对接结果的有效性,结果见图 9。

4 讨论

脊髓损伤在中医学中虽无直接对应病名,但根据《灵枢·寒热病》中“身有所伤,血出多,若有所堕坠,四肢懈惰不收,名曰体惰”的描述,可归属为“体惰”或“痿证”范畴。督脉损伤、肾阳不足、气滞血瘀是脊髓损伤的主要病机^[18],川芎辛散温通,善行血中滞气,破除脊髓损伤后局部瘀血,改善“不通则痛”“不荣则痛”之症;督脉为“阳脉

之海”,川芎“上行头目”之性可透达督脉,振奋阳气,推动气血濡养脊髓;肝藏血、肾藏精,川芎入肝经,疏肝气以助血行,间接补肾填精。而川芎嗪是从中药川芎中提取出来的主要有效成分,是活血行气祛瘀的一种活性生物碱。本研究发现,川芎嗪通过 PPAR γ -FUNDC1 信号轴增强线粒体自噬,不仅减少了活性氧 (ROS) 积累,还显著恢复内皮细胞迁移与成管能力,也体现了“祛瘀生新”的中医治则。

线粒体自噬是清除受损线粒体、维持细胞稳态的关键过程。本研究发现,川芎嗪显著上调 PPAR γ 和 FUNDC1 蛋白表达,同时增强线粒体与溶酶体的共定位,表明川芎嗪通过激活 PPAR γ -FUNDC1 轴促进线粒体自噬通量。FUNDC1 作为线粒体外膜受体,直接参与自噬小体对受损线粒体的识别和包裹,而 PPAR γ 可能通过转录调控增强 FUNDC1 的表达或稳定性^[19],形成正向反馈环路。分子对接结



A-川芎嗪与 PPAR γ 分子对接; B-川芎嗪与 PPAR γ 分子动力学模拟 RMSD; C-川芎嗪与 PPAR γ 分子动力学模拟 RMSF; D-川芎嗪与 PPAR γ 分子动力学模拟的旋转半径; E-川芎嗪与 PPAR γ 分子动力学模拟的氢键。

A-Docking of tetramethylpyrazine with PPAR γ molecule; B-Tetramethylpyrazine and PPAR γ molecular dynamics simulation RMSD; C-Tetramethylpyrazine and PPAR γ molecular dynamics simulation RMSF; D-Rotation radius of tetramethylpyrazine and PPAR γ molecular dynamics simulation; E-Hydrogen bonding between tetramethylpyrazine and PPAR γ molecular dynamics simulation.

图 9 川芎嗪与 PPAR γ 的分子对接与动力学模拟

Fig. 9 Molecular docking and dynamics simulation of tetramethylpyrazine and PPAR γ

果进一步表明, 川芎嗪通过关键残基 (SER429、LEU421、PHE432) 与 PPAR γ 活性位点特异性结合 (结合能 $-25.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), RMSD 在模拟 20 ns 后趋于平稳, 回旋半径变化平稳, 提示川芎嗪与 PPAR γ 的结合具有较高亲和力和构象稳定性, 揭示其可能直接靶向激活 PPAR γ 的转录活性。这一发现与王虎清等^[20]研究一致, 其发现 PPAR γ 激动剂可通过激活下游自噬相关基因改善神经元退行性变, 即 PPAR γ 的激活能够调控自噬过程。此外, 川芎嗪干预后衰老标志物 (P53、P21、P16) 的显著减少与 Lamin B 蛋白的增加, 提示线粒体自噬的激活可减轻核膜完整性破坏, 结合细胞周期分析中发现 G₀/G₁ 期阻滞缓解, 以及 β -半乳糖苷酶染色阳性细胞率的下降, 说明川芎嗪通过增强线粒体自噬清除了功能异常的线粒体, 减少 ROS 积累及 DNA 的损

伤反应, 从而逆转内皮细胞衰老表型, 最终改善内皮细胞功能。这与 Ma 等^[19]的研究一致, 其发现 PPAR γ 激动剂可增强线粒体自噬并改善内皮细胞功能。

bEnd.3 细胞衰老是 BSCB 破坏的关键因素。本研究通过 Transwell 实验、血管形成实验及 β -半乳糖苷酶染色证实, 川芎嗪显著提升内皮细胞迁移和成管能力, 并降低衰老细胞比例。推测其机制可能与线粒体自噬介导的代谢重编程有关: 通过清除受损线粒体, 恢复三磷酸腺苷 (ATP) 合成效率, 激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 和蛋白激酶 B (Akt) 等促生存信号通路, 进而促进细胞迁移和血管新生。虽然未直接检测 ATP 水平或 PI3K/Akt 通路活性, 但线粒体自噬量的提升及衰老标志物的显著抑制, 间接支持了线粒体功能恢复对细胞活力及迁移能

力的促进作用,与吴梦瑶等^[21]关于线粒体自噬调控能量代谢的结论相呼应。同时,PPAR γ 作为核受体,可能通过调控下游抗氧化基因[如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)]表达,协同增强内皮细胞的氧化应激耐受能力,从多途径拮抗衰老进程。

本研究首次揭示了川芎嗪通过激活 PPAR γ -FUNDCl 信号轴增强线粒体自噬的抗衰老机制,为中药多靶点调控衰老的分子机制研究提供了新视角。既往研究^[22]虽已证实川芎嗪具有抑制炎症因子释放和拮抗氧化损伤的作用,从而保护血管内皮功能,但其是否调控线粒体自噬尚未明确。本研究不仅从蛋白水平发现川芎嗪显著上调 PPAR γ 和 FUNDCl,增强线粒体与溶酶体共定位,促进受损线粒体的清除,还进一步在功能层面确认其对细胞衰老标志物 P16 的抑制作用,与课题组前期发现的川芎嗪下调 P16 的结果一致,本研究扩展了其作用靶点,提示川芎嗪可能通过抗炎、抗氧化与促进自噬等多通路协同发挥抗内皮衰老效应。值得注意的是, Ye 等^[23]报道低强度脉冲聚焦超声(FLIPUS)可通过 PGAM5/FUNDCl 信号轴增强软骨细胞线粒体自噬、改善骨关节炎进程,提示 FUNDCl 在不同组织类型中均可能扮演着关键自噬调控节点的角色。与 FLIPUS 依赖机械生物力学刺激激活的间接调控方式不同,川芎嗪作为小分子化合物,可通过 PPAR γ 依赖的转录调控机制直接上调 FUNDCl 表达,从而更精准地诱导线粒体自噬、清除功能障碍的线粒体、改善细胞稳态。

本研究存在一定的局限性。首先,通过线粒体与溶酶体的共定位证明了线粒体自噬的启动,但未来研究需要通过检测微管轻链 I 蛋白 3-II 型(LC3-II)的转换率及 p62 的降解动力学来进一步确认自噬流的通畅性;其次,尽管本研究观察到川芎嗪处理可浓度相关性地上调 PPAR γ 与 FUNDCl 蛋白表达,但缺乏直接结合证据证实川芎嗪与 PPAR γ 之间的直接靶向结合关系,此外,PPAR γ 是否直接转录调控 FUNDCl 表达亦需要通过染色质免疫共沉淀(ChIP)等实验进一步验证。后续研究将在动物模型层面进一步验证川芎嗪通过调控线粒体自噬延缓内皮细胞衰老的效应,并且综合利用计算生物学、蛋白互作分析及线粒体组学技术,深入阐明川芎嗪与 PPAR γ 的相互作用模式及 PPAR γ 下游调控线粒体自噬的具体分子机制。

本次研究证实川芎嗪可通过靶向激活 PPAR γ ,上调线粒体自噬受体 FUNDCl 的表达,进而增强线粒体自噬活性,清除功能异常的线粒体,最终延缓 bEnd.3 细胞衰老并改善其功能。该发现不仅从“祛瘀生新”角度深化了川芎嗪活血化瘀作用的现代生物学内涵,揭示了其在线粒体质量控制中的新机制,也为脊髓损伤后 BSCB 恢复提供了潜在药物靶点和治疗策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Shu H M, Zhang X, Pu Y Y, et al. Fucoidan improving spinal cord injury recovery: Modulating microenvironment and promoting remyelination [J]. CNS Neurosci Ther, 2024, 30(8): e14903.
- [2] Anjum A, Yazid M D, Fauzi Daud M, et al. Spinal cord injury: Pathophysiology, multimolecular interactions, and underlying recovery mechanisms [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7533.
- [3] Pizzolato C, Gunduz M A, Palipana D, et al. Non-invasive approaches to functional recovery after spinal cord injury: Therapeutic targets and multimodal device interventions [J]. Exp Neurol, 2021, 339: 113612.
- [4] Chio J C T, Xu K J, Popovich P, et al. Neuroimmunological therapies for treating spinal cord injury: Evidence and future perspectives [J]. Exp Neurol, 2021, 341: 113704.
- [5] Golestani A, Shobeiri P, Sadeghi-Naini M, et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in developing countries from 2009 to 2020: A systematic review and Meta-analysis [J]. Neuroepidemiology, 2022, 56(4): 219-239.
- [6] 李建花, 罗林钊, 邓强, 等. 中药治疗脊髓损伤后血-脊髓屏障功能障碍机制的研究进展 [J]. 中医研究, 2023, 36(12): 84-88.
Li J H, Luo L Z, Deng Q, et al. Research progress of traditional Chinese medicine treatment of blood spinal cord barrier dysfunction after spinal cord injury and its mechanism [J]. Tradit Chin Med Res, 2023, 36(12): 84-88.
- [7] He Y, Zou S, Wang J, et al. Curcumin-loaded milk-derived sEVs fused with platelet membrane attenuate endothelial senescence and promote spinal cord injury recovery in diabetic mice [J]. Mater Today Bio, 2025, 33: 102036.
- [8] 谢洪, 李艳君, 陈英玉. 线粒体自噬 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(12): 1081-1087.
Xie H, Li Y J, Chen Y Y. Mitochondrial autophagy [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2011, 27 (12): 1081-1087
- [9] Li C J, Qin T, Zhao J Y, et al. Kdm6a-CNN1 axis

- orchestrates epigenetic control of trauma-induced spinal cord microvascular endothelial cell senescence to balance neuroinflammation for improved neurological repair [J]. Bone Res, 2024, 12(1): 19.
- [10] 杨松柏, 尹健, 侯旭晖. 川芎嗪治疗冠心病作用及机制研究进展 [J]. 特产研究, 2024, 46(5): 165-172.
- Yang S B, Yin J, Hou X H. Research progress on the effect and mechanism of ligustrazine in treating coronary heart disease [J]. Spec Wild Econ Anim Plant Res, 2024, 46(5): 165-172.
- [11] 张毅, 祁文, 吴迪, 等. 中药川芎治疗脊髓损伤的网络药理学研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(6): 13-17, 221.
- Zhang Y, Qi W, Wu D, et al. Network pharmacology on treatment of spinal cord injury with Chuanxiong (*Ligusticum chuanxiong*) [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2020, 47(6): 13-17, 221.
- [12] 张毅, 祁文, 吴迪, 等. 基于转录组测序技术研究川芎嗪对急性脊髓损伤模型大鼠基因表达的影响 [J]. 中国药房, 2020, 31(11): 1327-1335.
- Zhang Y, Qi W, Wu D, et al. Study on the effects of ligustrazine on gene expression of acute spinal cord injury model rats based on transcriptome sequencing [J]. China Pharm, 2020, 31(11): 1327-1335.
- [13] 李姝君, 漆国栋, 漆伟, 等. 川芎嗪对脊髓损伤后小鼠神经保护作用的实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(14): 3848-3854.
- Li S J, Qi G D, Qi W, et al. Neuroprotective effect of tetramethylpyrazine on mice after spinal cord injury [J]. China J Chin Mater Med, 2023, 48(14): 3848-3854.
- [14] Ou Y, Dong X, Liu X Y, et al. Mechanism of tetramethylpyrazine analogue CXC195 inhibition of hydrogen peroxide-induced apoptosis in human endothelial cells [J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(3): 432-438.
- [15] Wu Y H, Xu Z J, Yang Y, et al. Tetramethylpyrazine (TMP) ameliorates corneal neovascularization via regulating cell infiltration into Cornea after alkali burn [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 1041-1051.
- [16] Najari Beidokhti M, Villalba N, Ma Y G, et al. Lung endothelial cell senescence impairs barrier function and promotes neutrophil adhesion and migration [J]. GeroScience, 2025, 47(3): 2655-2671.
- [17] Zhou Y, Wu R M, Wang X Q, et al. Activation of UQCRC2-dependent mitophagy by tetramethylpyrazine inhibits MLKL-mediated hepatocyte necroptosis in alcoholic liver disease [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 179: 301-316.
- [18] 张刘波, 周峻, 王佩佩, 等. 脊髓损伤中医药辨证论治研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(16): 1813-1817.
- Zhang L B, Zhou J, Wang P P, et al. Research progress on syndrome differentiation and treatment of spinal cord injury with traditional Chinese medicine [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 29(16): 1813-1817.
- [19] Ma L J, Li K F, Wei W X, et al. Exercise protects aged mice against coronary endothelial senescence via FUNDC1-dependent mitophagy [J]. Redox Biol, 2023, 62: 102693.
- [20] 王虎清, 樊嘉欣, 陈婉莹, 等. PPAR γ 通路激活可增强细胞抗氧化能力和保护长程培养原代神经细胞 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(1): 23-29.
- Wang H Q, Fan J X, Chen W Y, et al. Activation of PPAR γ pathway enhances cellular anti-oxidant capacity to protect long-term cultured primary rat neural cells from apoptosis [J]. J South Med Univ, 2019, 39(1): 23-29.
- [21] 吴梦瑶, 张卉, 王陆, 等. 线粒体自噬受体蛋白 BNIP3 的研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2023, 39(3): 534-542.
- Wu M Y, Zhang H, Wang L, et al. Advances in study of mitophagy receptor protein BNIP3 [J]. Chin J Pathophysiol, 2023, 39(3): 534-542.
- [22] 顾民华, 顾勇. 川芎嗪通过 miR-34a 对氧化型低密度脂蛋白诱导的冠状动脉内皮细胞损伤的保护作用 [J]. 陕西中医, 2023, 44(9): 1169-1172.
- Gu M H, Gu Y. Protective effect and mechanism of ligustrazine on coronary artery endothelial cell injury induced by oxidized low-density lipoprotein through miR-34a [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2023, 44(9): 1169-1172.
- [23] Ye H X, Li D Q, Wei X, et al. Focused low-intensity pulsed ultrasound alleviates osteoarthritis via restoring impaired FUNDC1-mediated mitophagy [J]. iScience, 2023, 26(10): 107772.