

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

张占伟¹, 廖亮英¹, 杨 惠¹, 曾劲松¹, 高 宇², 梅志刚^{2*}

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

2. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

摘要: **目的** 研究龙琥醒脑颗粒对脑缺血性再灌注损伤 (cerebral ischemia reperfusion injury, CIRI) 大鼠受损脑细胞线粒体动力学的影响及其机制。**方法** 大鼠制备 CIRI 模型, 将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组及龙琥醒脑颗粒低、中、高剂量 (75、150、300 mg/kg) 组和金纳多 (150 mg/kg) 组, 另设置假手术组 8 只, 给予相应药物干预 4 d 后, TTC 染色法检测大鼠脑组织梗死体积; 透射电镜 (TEM) 观察梗塞侧脑皮层组织超微结构的变化; Western blotting 和 qRT-PCR 法检测各组大鼠线粒体分裂蛋白 1 (mitochondrial fission protein 1, Fis1)、线粒体融合蛋白 2 (mitochondrial fusion protein 2, Mfn2)、视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy 1, Opa1)、动力相关蛋白 1 (dynamin related protein 1, Drp1)、核受体相关因子 1 (nuclear receptor-related factor 1, Nurr1)、Yes 相关蛋白 1 (Yes-associated protein 1, YAP1) 和反式形成蛋白 2 (inverted formin 2, INF2) 蛋白及 mRNA 表达情况。**结果** 与模型组相比, 各给药组大鼠神经功能评分和脑组织梗死面积均显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 大鼠大脑皮层神经元病理损伤显著减轻; 受损脑组织 *Fis1*、*INF2* 和 *Drp1* mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01$ 、 0.001), *Mfn2*、*Nurr1*、*Opa1* 和 *YAP1* mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 受损脑组织 Drp1 和 Fis1 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), Mfn2、Opa1、Nurr1 和 YAP1 蛋白表达水平平均显著上调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 龙琥醒脑颗粒可以改善 CIRI 大鼠脑梗死面积, 减轻缺血病理损伤, 延缓 CIRI 进展, 其机制可能为通过 Nurr1 调控 YAP-INF2 信号通路, 纠正线粒体动力学失衡, 从而发挥神经保护作用。

关键词: 龙琥醒脑颗粒; 线粒体动力学; 神经保护; 脑缺血再灌注损伤; 核受体相关因子 1; Yes 相关蛋白-反式形成蛋白 2 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)15-4755-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.15.019

Effect of Longhu Xingnao Granules on mitochondrial dynamics of damaged brain cells in rats with cerebral ischemia reperfusion injury

ZHANG Zhan-wei¹, LIAO Liang-ying¹, YANG Hui¹, ZENG Jin-song¹, GAO Yu², MEI Zhi-gang²

1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

2. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of Longhu Xingnao Granules (龙琥醒脑颗粒) on mitochondrial dynamics of damaged brain cells in rats with cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI). **Methods** CIRI rats model was established, and 40 successful rats were randomly divided into model group, Longhu Xingnao Granules low-, medium-and high-dose (75, 150, 300 mg/kg) groups and Ginadol (150 mg/kg) groups, and 8 rats were set as sham group. After 4 d of corresponding drug intervention, infarct volume of rats brain tissue was detected by TTC staining; Ultrastructure of infarcted cerebral cortex was observed by transmission electron microscope (TEM); Western blotting and qRT-PCR were used to detect protein and mRNA expressions of mitochondrial fission protein 1 (Fis1), mitochondrial fusion protein 2 (Mfn2), optic atrophy 1 (Opa1), dynamin related protein 1 (Drp1), nuclear receptor-related factor 1 (Nurr1), Yes-associated protein 1 (YAP1) and inverted formin 2 (INF2). **Results** Compared with model

收稿日期: 2022-04-18

基金项目: 湖南省中医药科研计划项目 (202015); 湖南省卫健委科研计划项目 (20200308); 湖南省自然科学基金面上项目 (2021JJ30529, 2021JJ30499); 湖南中医药大学中西医结合一流学科重点项目 (2021ZXYJH01)

作者简介: 张占伟, 男, 博士研究生, 研究方向为中医药防治脑血管疾病研究。E-mail: pijia1978@126.com

*通信作者: 梅志刚, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治缺血性脑病研究。E-mail: zhigangmei@139.com

group, neurological function score and brain infarction area of rats in each administration group were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01); Pathological damage of cerebral cortex neurons of rats was significantly alleviated; *Fis1*, *INF2* and *Drp1* mRNA expressions in damaged brain tissue were significantly down-regulated ($P < 0.01$, 0.001), *Mfn2*, *Nurr1*, *Opa1* and *YAP1* mRNA expressions were significantly up-regulated ($P < 0.05$, 0.01, 0.001); *Drp1* and *Fis1* protein expressions in damaged brain tissue were significantly down-regulated ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), *Mfn2*, *Opa1*, *Nurr1* and *YAP1* protein expressions were significantly up-regulated ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** Longhu Xingnao Granules can improve the cerebral infarct size in CIRC rats, reduce ischemic pathological damage, and delay the progression of CIRC. Its mechanism may be that *Nurr1* regulates YAP-INF2 signaling pathway and corrects the imbalance of mitochondrial dynamics, thereby exerting neuroprotective effects.

Key words: Longhu Xingnao Granules; mitochondrial dynamics; neuroprotection; cerebral ischemia reperfusion injury; *Nurr1*; YAP-INF2 signaling pathway

缺血性脑卒中指由于大脑供血动脉（颈动脉和椎动脉）狭窄或闭塞、脑供血不足导致的脑组织坏死的一类疾病，其病理核心为大脑局限性缺氧缺糖，致使神经功能受损^[1-2]。该病具有高发病率、高致残率、高死亡率和高复发率等特点，给患者及其家庭、社会带来沉重的经济和社会负担。药物溶栓、机械取栓是脑部血管栓塞急性期的主要方法，然而缺血后脑组织快速再灌注易引起脑缺血性再灌注损伤（cerebral ischemia reperfusion injury, CIRC），阻碍了患者神经功能恢复，为目前缺血性脑卒中康复的重要绊脚石^[3]。据统计，在接受再灌注治疗的缺血性脑卒中患者中，约有 25%~50%发生 CIRC，严重阻碍了缺血性脑卒中的临床获益^[4]。因此，深入了解 CIRC 的病理机制，探索有效的防治策略来减少再灌注损伤，对改善接受血运重建治疗的缺血性脑卒中患者预后至关重要。

CIRC 是一个复杂而迅速的级联反应过程，其发生机制主要与兴奋性氨基酸毒性、细胞内钙超载、自由基损伤、炎症反应、细胞凋亡和血脑屏障破坏等有关^[5]。线粒体作为缺血后神经细胞死亡的关键靶区，其动力学紊乱是 CIRC 中神经细胞损伤的关键^[6]。线粒体的动力学包括线粒体分裂与融合过程，可调控细胞信号传导、钙稳态、自噬、凋亡和坏死性凋亡等^[7]，线粒体分裂与融合失衡是线粒体动力学紊乱的病理基础^[8]。维持线粒体动力学稳态是保证神经元正常生命活动的重要基础。核受体相关因子 1（nuclear receptor-related factor 1, *Nurr1*）是在应激条件下调节线粒体稳态的重要转录因子^[9]。相关研究证实，在各种疾病模型中，*Nurr1* 是影响线粒体稳态和细胞活力的重要因子^[10]。本课题组前期研究发现，*Nurr1* 可以通过依赖于 Yes 相关蛋白 1（Yes-associated protein 1, *YAP1*）途径的方式阻止反式形成蛋白 2（inverted formin 2, *INF2*）上调来调

节线粒体分裂，维持了线粒体的稳态，减少 CIRC 大脑的梗塞面积，并减少了神经元凋亡^[11]。故从 *Nurr1* 及 YAP-INF2 信号通路调控线粒体动力学稳态，对防治 CIRC 具有重要的理论与现实价值。

CIRC 属于中医学的“中风”范畴，“气虚血瘀，经脉不通”是贯穿 CIRC 始终的核心病机，而益气养血、化瘀通络是其主要治则。龙琥醒脑颗粒由“通窍活血汤”加减而成，具有益气扶正、活血化瘀兼开窍醒神的功效，契合了 CIRC 中医病机特点。既往研究发现，龙琥醒脑颗粒对脑缺血和脑损伤具有重要的治疗作用^[12-14]，可改善脑血管意外后脑循环及脑内微环境来达到保护神经细胞、减少继发性损伤的作用^[15]，并且对 CIRC 后的神经细胞有保护作用^[16]。研究表明，活血化瘀、开窍醒神法能改善缺血脑组织供血供氧，减轻血脑屏障破坏，降低氧化应激，抑制神经细胞凋亡，改善功能损伤等^[17-18]。且该法可抑制线粒体膜电位下降，降低线粒体肿胀度，抑制线粒体异常分裂，维持线粒体功能稳定^[19-20]。

因此，本研究拟通过建立 CIRC 大鼠模型，观察脑组织病理损伤、线粒体动力学关键蛋白以及 *Nurr1* 和 YAP-INF2 通路关键因子 mRNA 及蛋白表达情况，深入探究龙琥醒脑颗粒治疗 CIRC 的具体作用机制，为临床采用中医药治疗缺血性脑卒中提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 54 只，6~8 周龄，体重 230~270 g，由湖南斯莱克景达动物实验有限公司供应，许可证号 SCXK（湘）2019-0004。动物于温度（22±2）℃、相对湿度 50%~70%的环境中，适应性饲养 1 周后开展实验。动物实验经湖南中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会审核批准（批准号 ZYFY20210812），遵循湖南中医药大学第

一附属医院有关实验动物管理和使用规定。

1.2 药品与试剂

龙琥醒脑颗粒由湖南中医药大学第一附属医院制剂中心提供,由地龙、琥珀、冰片、黄芪、当归、川芎、桃仁、赤芍、天麻、菖蒲、大黄、田七、酸枣仁等组成。参照《湖南省医疗机构制剂规范》2016 版由湖南中医药大学第一附属医院药剂科制剂室制成颗粒剂型(湘药制字 Z20070271,批号 20181206,10 g/袋),临用前以生理盐水溶解。采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)进行定量分析,其中黄芪甲苷 182.6 $\mu\text{g/g}$ 、阿魏酸 33.5 $\mu\text{g/g}$ 。

金纳多(银杏叶提取物注射液,批号 NB169)购自悦康药业集团有限公司;大鼠血管线栓购自北京西浓科技有限公司;Trizon Reagent(批号 CW0580S)、Ultrapure RNA 超纯 RNA 提取试剂盒(批号 CW0581M)购自康为世纪有限公司; β -actin 抗体(批号 TA-09)、HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体(批号 ZB-2305)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ZB-2301)购自中山金桥生物技术有限公司;兔抗线粒体分裂蛋白 1(mitochondrial fission protein 1, Fis1,批号 DF12005)、兔抗 YAP1(批号 AF6328)购自美国 Affinity 公司;兔抗动力相关蛋白 1(dynamin related protein 1, Drp1,批号 12957-1-AP)、鼠抗视神经萎缩蛋白 1(optic atrophy 1, Opa1,批号 66583-1-Ig)购自美国 Proteintech 公司;兔抗线粒体融合蛋白 2(mitochondrial fusion protein 2, Mfn2,批号 9482)购自美国 CST 公司;兔抗 Nurr1(批号 NB110-40415ss)购自美国 Novus 公司;TTC 染色液(批号 G3005)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 仪器

WP8025 型高精度脑立体定位仪系统(美国 WPI 公司);Z32HK 型台式高速冷冻离心机(德国 Leica 公司);GS-800 型凝胶扫描成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Realplex2 型荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);JEM-1230 型透射电镜(TEM,日本 JEOL 公司)。

2 方法

2.1 动物造模

参照 Rynkowski 等^[21]方法构建大鼠右侧大脑中动脉阻断缺血(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型。大鼠适应性饲养 1 周,术前大鼠禁食 12 h,ip 1%戊巴比妥钠麻醉后,仰卧位固定于手

术板上,于颈部正中切开约 1.5 cm 开口,分离暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA),沿 CCA 寻找并小心分离颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA)。结扎 CCA 近心端和 ECA,用无菌注射用针头在距 ICA、CCA 分叉 6 mm 处扎开一小口,将尼龙线圆钝的一端沿开口小心插入 ICA,缓慢向前推进 18~20 mm,使尼龙线末端位于大脑前动脉起始段内从而阻断来自对侧的侧枝循环血流,遇阻力即停。扎紧 CCA 以避免尼龙线脱出,缝合伤口,将尼龙线残端留 1 cm 长于皮外,2 h 后,慢慢拔出尼龙线进行再灌注。假手术组大鼠除不插入尼龙线外,其余操作与模型组相同。

2.2 神经功能评分

再灌注 24 h 后,评估各组大鼠神经功能损伤,参照 Longa 等^[22]方法进行神经功能评分:神经功能无障碍为 0 分;提尾时向对侧前肢屈曲为 1 分;不能直行,大鼠向左侧旋转为 2 分;行走困难,行走时向对侧倾倒是 3 分;严重意识障碍,无自发活动或意识不清为 4 分。神经功能评分为 0~3 分的大鼠表明造模成功,纳入实验;评分为 4 分的大鼠予以剔除。

2.3 分组与给药

大鼠随机分为假手术组、模型组及龙琥醒脑颗粒低、中、高剂量(75、50、300 mg/kg)组和金纳多(150 mg/kg)组,每组 8 只,另有 6 只大鼠造模失败弃用。待术后大鼠清醒后给药,各给药组 ig 相应药物,假手术组和模型组 ig 等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠,1 次/d,连续 4 d。

2.4 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗死的影响

结束给药后,大鼠禁食 12 h,ip 2%戊巴比妥钠(300 mg/kg)麻醉致死。取全脑,清洗干净于-20 °C 冰冻 15 min;用手术刀片将脑平均切分为 5 等分,每片厚约 2 mm;用 2% TTC 染液浸没脑,用锡纸包裹于 37 °C 的烘箱中避光放置 15 min;用 4%多聚甲醛固定并拍照,脑正常区为红色,脑缺血梗死区为白色,用 Image-Pro 软件计算梗死面积。

2.5 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠梗塞侧脑皮层组织损伤的影响

大鼠麻醉处死后,于冰板上取脑,分离脑组织,于梗塞侧脑皮层组织区取体积约 1 mm³ 的脑组织块,于 2.5%戊二醛溶液中固定 24 h。PBS 溶液漂洗 3 次,于 1%锇酸固定液中 4 °C 固定 2~3 h,然后

梯度乙醇溶液脱水, 丙酮置换、浸透, 纯丙酮+包埋液包埋、烘烤后固化, 超薄切片机切片 (70 nm), 进行 3%醋酸铀-枸橼酸铅双染色, 于 TEM 下观察并拍照。

2.6 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗塞侧脑皮层组织线粒体裂解、Nurr1 和 YAP-INF2 通路相关蛋白 mRNA 表达的影响

大鼠麻醉处死后, 冰板上取脑, 分离梗塞侧大鼠皮层组织, 清洗干净后, 进行充分研磨, 用 Trizol 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 扩增, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行数据分析, 以 *GAPDH* 为内参, 相对定量法计算目的基因 mRNA 的相对表达量, 采用 Primer Premier 5.0 和 Beacon designer 7.8 软件进行定量 PCR 引物设计, 然后由通用生物系统(安徽)有限公司合成, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	序列 (5'-3')	产物长度/bp
<i>Fisl</i>	F: GTCCAAGAGCACGCAGTTTG	103
	R: TTTGGGCAACAGCTCCTCCA	
<i>Drp1</i>	F: ATGGAGTTGAAGCAGAAGAATG	163
	R: GGCGAGAAAACCTTGAGATG	
<i>Mfn2</i>	F: ATTTGAGAGGCGATTTGAGGAG	197
	R: GTCAATGAATCTCAGCCGGTC	
<i>Opal</i>	F: TGGTCCTGTTCTGGCGAATAC	277
	R: CATGAGCAGGATTTTGACACC	
<i>Nurr1</i>	F: GGTTCCTTTAAGCGCACGGT	162
	R: TAAACTGTCCGTGCGAACCA	
<i>YAP1</i>	F: AGAACAAGACCACATCCTGGC	252
	R: TGGGATTGATATTCCTGATTCCT	
<i>INF2</i>	F: ATGAGGACGAAGAGGACACG	99
	R: TGCCAGACCCTGAGGAATC	
<i>GAPDH</i>	F: GACAACTTTGGCATCGTGGA	133
	R: ATGCAGGGATGATGTTCTGG	

2.7 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗塞侧脑皮层组织线粒体动力学、Nurr1 和 YAP-INF2 通路相关蛋白表达的影响

取各组大鼠脑梗塞侧再灌注损伤皮层脑组织, 置于离心管中, 加入 PMSF-RIPA (1:100) 抽提试剂, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 根据 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性后上样, 经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 分别加入相应抗体, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 2 h。ECL 化学发光后通过蛋白印迹成像和定量分析系统进行扫描, 并计算各蛋白的相对光密度值。用 Image J 软件分析各条带灰度值。

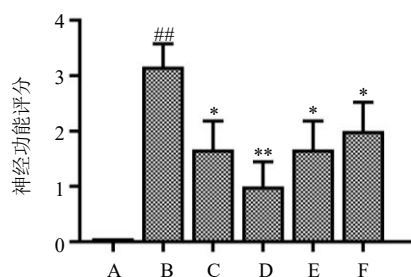
2.8 统计方法

采用 SPSS 22.0 统计软件和 GraphPad Prism 8 作图软件进行数据分析及处理, 实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用单因素 (ANOVA) 对多组样本均值间进行方差分析, 两两比较采用 LSD 检验及 Dunnett's *T3* 检验。

3 结果

3.1 造模及模型验证结果

如图 1 所示, 模型组大鼠表现出严重的神经功能损伤情况, 与假手术组相比, 其神经功能评分显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 各给药组大鼠神经功能评分均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$), 其中龙琥醒脑颗粒中剂量组作用最佳。



A-假手术组 B-模型组 C-龙琥醒脑颗粒低剂量组 D-龙琥醒脑颗粒中剂量组 E-龙琥醒脑颗粒高剂量组 F-金纳多组 与假手术组比较: $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$, 下同

A-sham group B-model group C-Longhu Xingnao Granules low-dose group D-Longhu Xingnao Granules medium-dose group E-Longhu Xingnao Granules high-dose group F-Ginnardo group $^{\#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ $^{###}P < 0.001$ vs sham group; $^*P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ $^{***}P < 0.001$ vs model group, same as below figures

图 1 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠神经功能损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of Longhu Xingnao Granules on neurological deficit of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 TTC 染色结果

图 2 中白色部分表示脑梗死区域, 红色部分表示非梗死区域。如表 2 所示, 与假手术比较, 模型组大鼠脑梗死面积显著增加 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组脑梗死面积显著减少 ($P < 0.05$), 以龙琥醒脑颗粒中剂量组梗死面积改善作用最佳。

3.3 TEM 结果

假手术组大鼠梗塞侧大脑皮层神经元细胞核大而圆, 细胞核膜完整, 核仁可见, 线粒体呈圆形或椭圆形, 内嵴清晰可见, 轴索形态规则, 髓鞘板层呈同心圆致密排列, 轴膜清晰, 紧贴内层髓鞘, 轴浆内神经微丝及微管排列紧密, 线粒体结构清晰(图

3-A1、A2、A3); 模型组神经元细胞体积缩小, 核膜皱缩, 核仁破裂分散 (图 3-B1), 线粒体内嵴结构模糊 (图 3-B2), 髓鞘板层严重分离, 局部崩解、

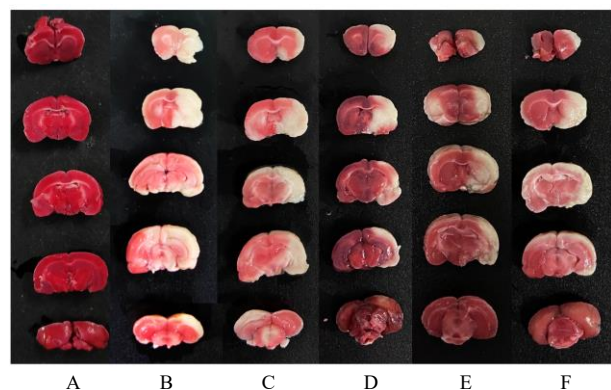


图 2 各组大鼠 TTC 染色结果

Fig. 2 TTC staining results of rats in each group

表 2 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗死的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Table 2 Effect of Longhu Xingnao Granules on cerebral infarct of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	梗死范围/%
假手术	—	0
模型	—	29.81 ± 0.67 [#]
龙琥醒脑颗粒	75	24.90 ± 0.70 [*]
	150	16.75 ± 0.80 [*]
	300	21.11 ± 0.73 [*]
金纳多	150	22.62 ± 0.77 [*]

与假手术组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.05$ vs sham group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

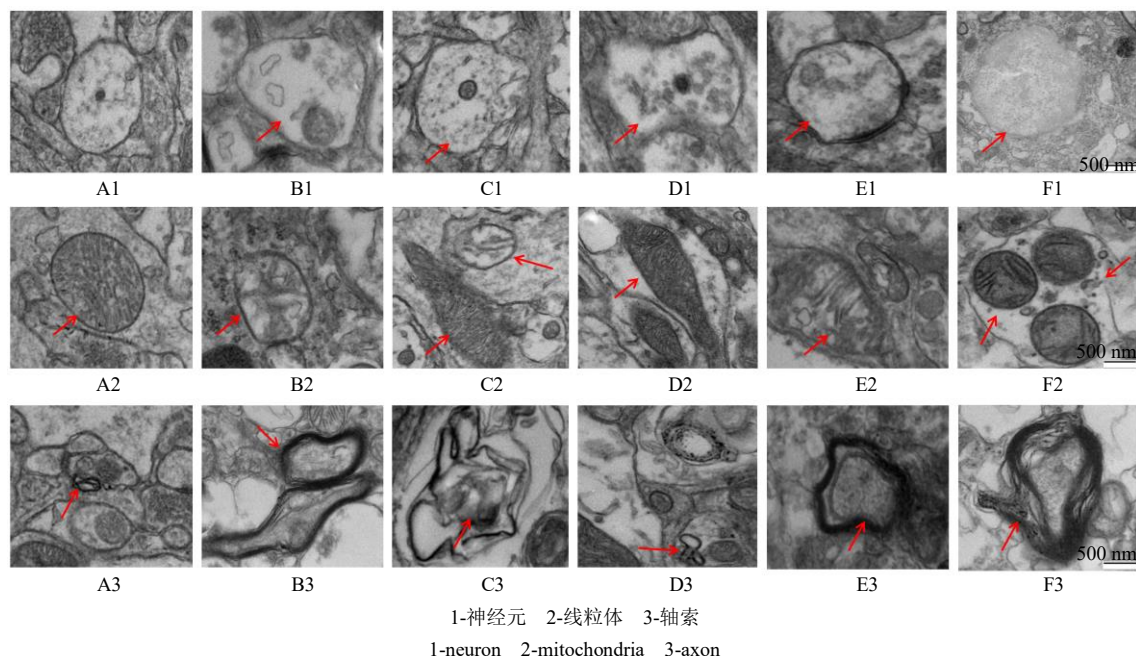


图 3 各组大鼠大脑皮层神经元细胞的超微结构

Fig. 3 Ultrastructure of cerebral cortical neurons of rats in each group

断裂, 轴浆内线粒体模糊不清 (图 3-B3); 龙琥醒脑颗粒低剂量组神经元细胞核大而偏椭圆, 核膜完整, 核仁部分分散 (图 3-C1), 部分线粒体结构模糊且空泡化 (图 3-C2), 轴索髓鞘板层排列模糊, 板层部分崩解、断裂, 轴浆内神经微丝及微管排列疏松, 轴浆内线粒体模糊不清 (图 3-C3); 龙琥醒脑颗粒中剂量组神经元体积缩小, 细胞核膜稍完整, 核仁破裂分散 (图 3-D1), 线粒体呈长条, 内嵴清晰可见 (图 3-D2), 轴索髓鞘板层模糊, 部分出现分离崩解及断裂, 轴浆内神经微丝及微管排列紧密, 线粒体结构清晰 (图 3-D3); 龙琥醒脑颗粒高剂量组细胞核大而偏椭圆, 核膜完整, 核仁部分分散 (图 3-E1), 线粒体内嵴结构模糊 (图 3-E2), 轴索髓鞘板层排列广泛分离, 大部分板层崩解、断裂明显, 轴浆内神经微丝无明显排列, 线粒体模糊结构肿胀 (图 3-E3); 金纳多组神经元细胞核大而圆, 核膜完整, 核仁破裂 (图 3-F1), 线粒体偏圆形, 内嵴结构清晰, 个别肿胀有空泡 (图 3-F2), 轴索髓鞘板层排列模糊, 板层局部崩解, 轴浆内神经微丝及微管排列疏松, 线粒体结构模糊, 部分空泡化 (图 3-F3)。

3.4 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗死侧皮层组织线粒体动力学、Nurr1 和 YAP-INT2 通路相关蛋白 mRNA 表达的影响

如图 4 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠脑梗死侧皮层组织 *Fis1*、*Drp1* 和 *INT2* mRNA 表达水

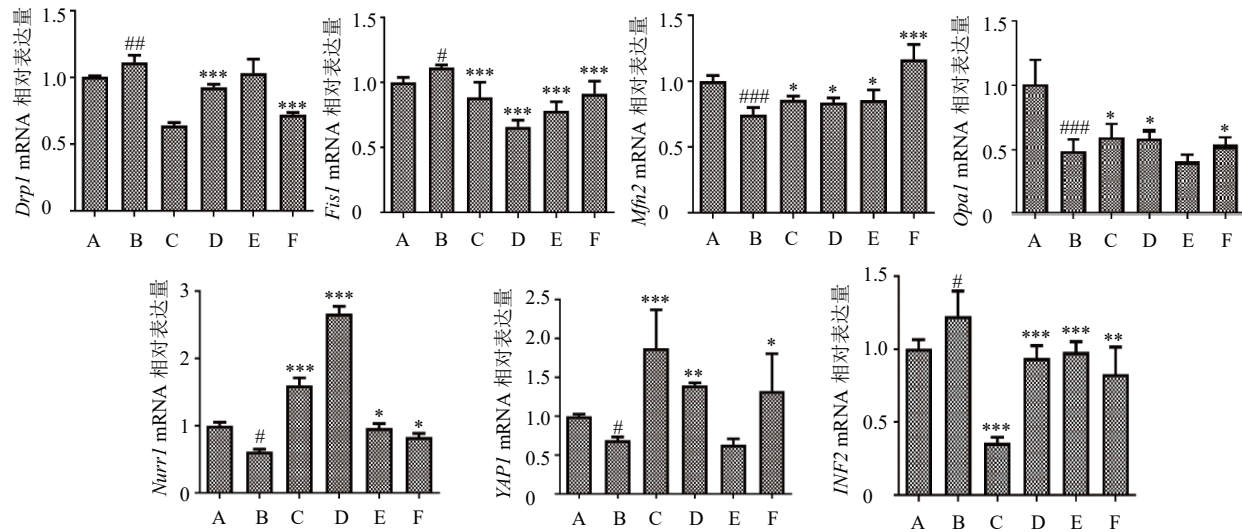


图4 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗死侧皮层组织线粒体动力学、Nurr1 和 YAP-INF2 通路相关蛋白 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 4 Effect of Longhu Xingnao Granules on mRNA expressions of mitochondrial dynamics, Nurr1 and YAP-INF2 pathway-related proteins in cerebral infarct lateral cortex of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

平均显著上调 ($P < 0.05, 0.01$), *Mfn2*、*Opa1*、*Nurr1* 和 *YAP1* mRNA 表达水平平均显著下调 ($P < 0.05, 0.001$); 与模型组比较, 各给药组 *Fis1* 和 *INF2* mRNA 表达水平显著下调 ($P < 0.01, 0.001$), *Mfn2* 和 *Nurr1* mRNA 表达水平显著上调 ($P < 0.05, 0.001$); 龙虎醒脑颗粒低、中剂量组和金纳多组 *Drp1* mRNA 表达水平平均显著下调 ($P < 0.001$), *Opa1* 和

YAP1 mRNA 表达水平平均显著上调 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

3.5 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗死侧皮层组织线粒体动力学、Nurr1 和 YAP-INF2 通路相关蛋白表达影响

如图 5 所示, 与假手术组相比, 模型组大鼠脑梗死侧皮层组织 *Fis1* 和 *Drp1* 蛋白表达水平显著上

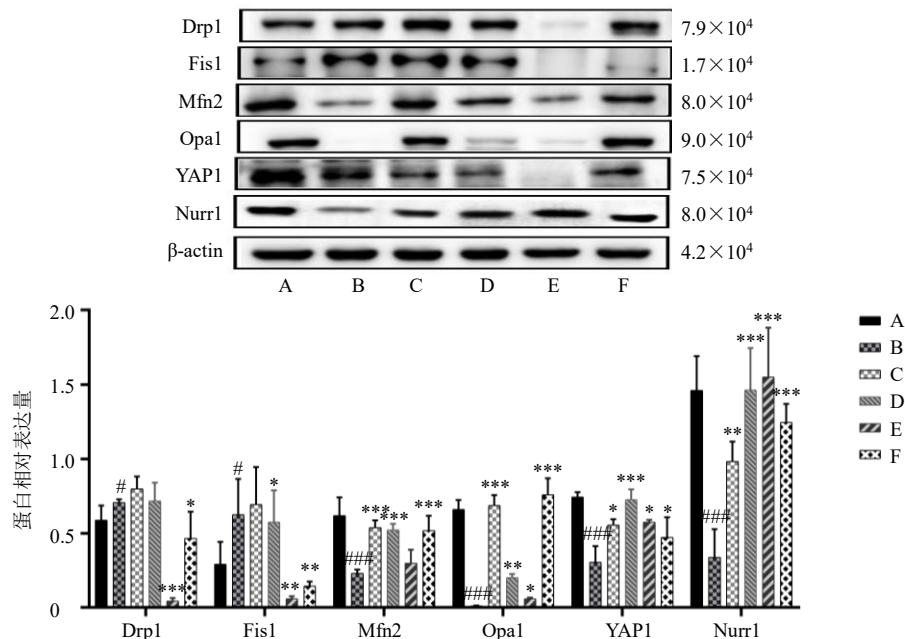


图5 龙琥醒脑颗粒对 MCAO 大鼠脑梗死侧皮层组织线粒体动力学、Nurr1 和 YAP-INF2 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Effect of Longhu Xingnao Granules on expressions of mitochondrial dynamics, Nurr1 and YAP-INF2 pathway-related proteins in cerebral infarct lateral cortex of MCAO rats ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

调 ($P<0.05$), Mfn2、Opa1、Nurr1 和 YAP1 蛋白表达水平显著下调 ($P<0.001$); 与模型组比较, 龙琥醒脑颗粒高剂量组和金纳多组 Drp1 蛋白表达水平显著下调 ($P<0.01$ 、 0.001), 龙琥醒脑颗粒中、高剂量组和金纳多组 Fis1 蛋白表达水平显著下调 ($P<0.05$ 、 0.01), 龙琥醒脑颗粒低、中剂量组和金纳多组 Mfn2 蛋白表达水平显著上调 ($P<0.001$), 各给药组 Opa1、Nurr1 和 YAP1 蛋白表达水平均显著上调 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

4 讨论

中医学认为, CIRI 的主要病机为瘀血阻滞, 脑络不通。瘀血等致病因素在现代医学中被认为是导致 CIRI 的重要因素, “血瘀气阻, 因瘀致虚” 导致细胞线粒体动力学及结构发生改变, 促使神经细胞出现能量代谢障碍, 影响正常细胞代谢和调节功能, 继而诱发神经元坏死、老化、凋亡。历代医家都善用活血化瘀治疗 CIRI, 龙琥醒脑颗粒是湖南中医药大学第一附属医院神经外科经验方, 由经典名方“通窍活血汤” 化裁而成, 由地龙、琥珀、桃仁、当归、川芎、黄芪、三七、赤芍和冰片等组成, 以黄芪益气扶正, 三七、赤芍、桃仁、当归、红花等养血活血、化瘀通络, 地龙祛瘀兼有利水, 琥珀活血兼镇惊安神, 冰片芳香走窜、醒脑开窍等, 全方共奏益气扶正、活血化痰兼以开窍醒神功效。然而其潜在作用机制尚不明确, 本研究从 CIRI 损伤后的线粒体动力学视角探究其作用机制, 为临床推广应用该方奠定理论基础。

CIRI 是缺血性脑卒中血流再通后发生的最常见继发性损伤, 增加了 30 d 住院死亡率^[23], 严重阻碍缺血性脑卒中患者的康复, 是临床亟待解决而又尚未解决的难题。因此, 识别 CIRI 的分子过程对早期预防具有重要意义。CIRI 是一个复杂的级联过程, 其病理环节主要包括活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 爆发、钙超载、兴奋性氨基酸的毒性、胶质细胞激活、炎症反应及白细胞黏附等, 而线粒体的动力学功能障碍被认为在介导这些病理生理过程中发挥重要作用^[24]。线粒体的动力学包括线粒体分裂与融合过程, 是维持线粒体稳态的重要内源性机制^[25]。相关研究证实, CIRI 中 ROS 的增多和钙失衡等可使线粒体分裂/融合失衡, 出现线粒体分裂增多, 融合减少, 出现线粒体断裂、碎片化增多, 引发神经元的程序性死亡^[26-27]。因此, 调节线粒体动力学的相对稳态对于 CIRI 后的恢复

至关重要。

线粒体分裂主要由 Drp1 和 Fis1 等负责调控, Drp1 可以通过 Fis1 以及其他多种衔接蛋白募集到线粒体外膜, 在线粒体周围形成环, 随后缠绕收缩使原线粒体变成 2 个单独的线粒体^[28]。线粒体融合分为线粒体外膜融合和内膜融合, 在哺乳动物中, Mfn1 和 Mfn2 通过线粒体嵴形态重塑促进线粒体外膜融合, 之后 Opa1 介导线粒体内膜融合形成网状结构以提高其能量合成的速度^[29]。相关研究证实, 在 CIRI 病理中, 线粒体分裂明显增加, 而线粒体融合现象明显减少^[30], 通过抑制线粒体分裂, 促进线粒体融合可以减缓 CIRI 的病理。Nurr1 是 Lew 教授于 1992 年首次从小鼠脑 cDNA 文库中发现的基因, 迄今为止, 还没有发现其有明确配体, 所以又属于孤儿受体超家族成员, 随着研究的深入, 其在神经退行性、肿瘤、脑血管意外等相关疾病的作用开始受到关注^[31-32], 此外, 本课题组先前的研究证实 Nurr1 可以通过一种依赖于 YAP 通路的方式阻止 INF2 的上调来抑制线粒体裂变, 维持线粒体动力学的稳态, 进而减少神经元死亡^[11]。

本研究证实, CIRI 大鼠脑梗塞侧大脑皮层中 Fis1 和 Drp1 的 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高, Mfn2、Opa1 的 mRNA 及蛋白表达水平降低, 表明 CIRI 大鼠受损皮层脑神经细胞的线粒体动力学 (分裂/融合) 出现明显的失衡状态。龙琥醒脑颗粒可以改善 CIRI 大鼠脑梗死面积, 减轻缺血后脑细胞病理损伤结构, 降低线粒体分裂蛋白 Fis1、Drp1 表达, 提高线粒体融合蛋白 Mfn2、Opa1 和 Nurr1 水平, 说明龙琥醒脑颗粒修复了线粒体动力学失衡; 且龙琥醒脑颗粒抑制线粒体分裂作用呈现剂量相关性, 高剂量的龙琥醒脑颗粒疗效最优; 而对线粒体融合的作用, 高剂量的龙琥醒脑颗粒并未观察到发挥显著的剂量相关性作用。进一步的机制探索中, 本研究发现龙琥醒脑颗粒可提高 Nurr1 的表达水平, 通过依赖于 YAP1 途径的方式阻止 INF2 上调来抑制线粒体分裂, 促进线粒体融合。龙琥醒脑颗粒上述调控作用优于或者与阳性对照药物金纳多 (银杏叶提取物) 大致相当, 可见龙琥醒脑颗粒有望成为治疗 CIRI 的潜在候选药物。

综上所述, 龙琥醒脑颗粒能改善 CIRI 大鼠脑组织的病理损伤, 纠正 CIRI 后线粒体动力学失衡, 从而发挥保护神经功能, 其机制可能与调控 Nurr1、激活 YAP1-INF2 信号通路有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mendelson S J, Prabhakaran S. Diagnosis and management of transient ischemic attack and acute ischemic stroke: A review [J]. *JAMA*, 2021, 325(11): 1088-1098.
- [2] Farina M, Vieira L E, Buttari B, *et al.* The Nrf2 pathway in ischemic stroke: A review [J]. *Molecules*, 2021, 26(16): 5001.
- [3] Wu M M, Gu X P, Ma Z L. Mitochondrial quality control in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Neurobiol*, 2021, 58(10): 5253-5271.
- [4] Yao D B, Zhang S, Hu Z W, *et al.* CHIP ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by attenuating necroptosis and inflammation [J]. *Aging*, 2021, 13(23): 25564-25577.
- [5] Lim S, Kim T J, Kim Y J, *et al.* Senolytic therapy for cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11967.
- [6] Vongsfak J, Pratchayasakul W, Apaijai N, *et al.* The alterations in mitochondrial dynamics following cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(9): 1384.
- [7] Chan D C. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 235-259.
- [8] Yapa N M B, Lisnyak V, Reljic B, *et al.* Mitochondrial dynamics in health and disease [J]. *FEBS Lett*, 2021, 595(8): 1184-1204.
- [9] Kummari E, Guo-Ross S X, Partington H S, *et al.* Quantitative immunohistochemistry to measure regional expression of Nurr1 in the brain and the effect of the Nurr1 heterozygous genotype [J]. *Front Neuroanat*, 2021, 15: 563854.
- [10] Jodeiri Farshbaf M, Forouzanfar M, Ghaedi K, *et al.* Nurr1 and PPAR γ protect PC12 cells against MPP(+) toxicity: Involvement of selective genes, anti-inflammatory, ROS generation, and antimitochondrial impairment [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 420(1/2): 29-42.
- [11] Zhang Z W, Yu J B. Nurr1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury via modulating YAP-INF2-mitochondrial fission pathways [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 104: 149-160.
- [12] 喻坚柏, 周萍, 蔡蔚, 等. 微创穿刺术配合龙琥醒脑颗粒剂治疗急性外伤性颅内血肿临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(7): 403-404.
- [13] 曾劲松, 罗刚, 张占伟, 等. 龙琥醒脑颗粒治疗重型颅脑损伤的疗效及对血清 TNF- α 、IL-6 的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(2): 245-248.
- [14] 龚金兵, 王小妹, 喻坚柏, 等. 龙琥醒脑颗粒治疗急性脑梗死临床疗效及对 GFAP、UCH-L1 表达的影响 [J]. 中国中医急症, 2020, 29(11): 1930-1933.
- [15] 黄莹, 周全, 罗刚, 等. 龙琥醒脑颗粒对蛛网膜下腔出血致脑血管痉挛大鼠脑内环境的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(18): 2757-2761.
- [16] 曾劲松, 喻坚柏, 罗刚, 等. 龙琥醒脑颗粒治疗中轻型颅脑损伤后认知障碍的疗效及对血清炎症因子和 5-羟色胺的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(4): 658-661.
- [17] 兰瑞, 张勇, 马云枝, 等. 小续命汤对急性脑缺血再灌注线粒体相关蛋白 Hsp60、Mitofilin 表达的影响 [J]. 新中医, 2018, 50(10): 9-13.
- [18] 兰瑞. 小续命汤对急性脑缺血再灌注损伤的神经保护作用及机制研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2014.
- [19] 朱心红. 小续命汤对大鼠前脑缺血海马 CA1 区神经元的保护作用及机理研究 [D]. 广州: 第一军医大学, 2002.
- [20] 陈茜睿. 小续命汤有效成分组药物代谢动力学研究及蛋白质组学初探 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2017.
- [21] Rynkowski M A, Kim G H, Garrett M C, *et al.* C3a receptor antagonist attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(1): 98-107.
- [22] 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.
- [23] Lin F H, Yao X Y, Kong C, *et al.* 25-Hydroxycholesterol protecting from cerebral ischemia-reperfusion injury through the inhibition of STING activity [J]. *Aging*, 2021, 13(16): 20149-20163.
- [24] Shen L A, Gan Q Y, Yang Y C, *et al.* Mitophagy in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Aging Neurosci*, 2021, 13: 687246.
- [25] Wang S D, Fu Y Y, Han X Y, *et al.* Hyperbaric oxygen preconditioning protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrial apoptosis and energy metabolism disturbance [J]. *Neurochem Res*, 2021, 46(4): 866-877.
- [26] Hayashida K, Takegawa R, Shoaib M, *et al.* Mitochondrial transplantation therapy for ischemia reperfusion injury: A systematic review of animal and human studies [J]. *J*

- Transl Med*, 2021, 19(1): 214.
- [27] Galkin A. Brain ischemia/reperfusion injury and mitochondrial complex I damage [J]. *Biochemistry*, 2019, 84(11): 1411-1423.
- [28] 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.
- [29] Cretin E, Lopes P, Vimont E, *et al.* High-throughput screening identifies suppressors of mitochondrial fragmentation in OPA1 fibroblasts [J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(6): e13579.
- [30] Meyer J N, Leuthner T C, Luz A L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity [J]. *Toxicology*, 2017, 391: 42-53.
- [31] 段奎甲, 邓兴力, 杨智勇. Nurr1 及其在帕金森病治疗中的应用 [J]. *广东医学*, 2015, 36(20): 3237-3239.
- [32] 宋祖荣, 徐伟, 王键, 等. 补肾生髓方和益气活血方对局灶性脑缺血再灌注大鼠额顶叶皮质 Notch 信号通路 *Nurr1*、*SMO* mRNA 及其蛋白表达的影响 [J]. *安徽中医药大学学报*, 2016, 35(2): 57-60.

[责任编辑 李亚楠]