

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.11.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220223.0909.007.html\(2022-02-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220223.0909.007.html(2022-02-23))

丁苯酞对慢性低 O₂ 高 CO₂ 大鼠脑内线粒体凋亡和自噬的影响*

闵晶晶¹, 陈 琪², 顾 群¹, 王小同^{3△}

(1. 浙江省湖州市第一人民医院神经内科 313000; 2. 浙江省湖州市第一人民医院肾内科 313000; 3. 温州医科大学附属第二医院康复科, 浙江温州 325000)

[摘要] **目的** 观察丁苯酞胶囊对慢性低氧高二氧化碳(低 O₂ 高 CO₂)学习记忆障碍大鼠的影响和潜在机制。**方法** 将 64 只无特定病原体(SFP)级 SD 大鼠分为对照组、模型组、植物油组和丁苯酞组, 每组 16 只。除对照组外, 模型组、植物油组、丁苯酞组均置于低 O₂ 高 CO₂ 密闭舱中暴露 2 周, 每天 8 h, 2 周后采用 Morris 水迷宫、透射电镜、原位末端转移酶标记技术(TUNEL)试剂盒、Western blot 检测相关指标。**结果** 在 Morris 水迷宫实验中, 模型组、植物油组大鼠潜伏期都较对照组延长($P<0.05$), 丁苯酞组与模型组相比潜伏期缩短($P<0.05$); 各组大鼠穿越平台次数比较差异无统计学意义($P>0.05$)。电镜下, 低 O₂ 高 CO₂ 暴露导致线粒体结构破坏, 线粒体空泡化, 嵴断裂或溶解, 细胞内自噬体增加。给予丁苯酞干预后上述情况改善, 但细胞内自噬体进一步增加。TUNEL 检测法检测显示模型组、植物油组凋亡细胞较对照组增加($P<0.05$), 丁苯酞组较模型组减少($P<0.05$)。Western blot 显示, 低氧可以诱导自噬相关蛋白及凋亡相关蛋白的表达, 给予丁苯酞干预后自噬相关蛋白低氧诱导因子-1 α 亚基(HIF-1 α)、腺病毒 E1B 19-kD 相互作用蛋白 3(BNIP3)、自噬相关蛋白酵母 ATG6 同源物(Beclin-1)、自噬标记蛋白-微管相关蛋白 1 轻链 3 II(LC3 II)及抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)表达进一步增加($P<0.05$), 促凋亡的 Bcl2 关联 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)表达减少($P<0.05$)。**结论** 丁苯酞可以改善慢性低 O₂ 高 CO₂ 导致的大鼠空间学习记忆障碍, 这可能与其提高线粒体自噬同时降低凋亡有关。

[关键词] 丁苯酞; 低氧高二氧化碳氧; 凋亡; 线粒体自噬; 大鼠
[中图法分类号] R741.05 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)11-1824-06

Effects of butylphthalide on mitochondrial apoptosis and autophagy in brain on chronic low O₂ and high CO₂ rats*

MIN Jingjing¹, CHEN Qi², GU Qun¹, WANG Xiaotong^{3△}

(1. Department of Neurology, the First People's Hospital of Huzhou, Huzhou, Zhejiang 313000, China; 2. Department of Nephrology, the First People's Hospital of Huzhou, Huzhou, Zhejiang 313000, China; 3. Department of Rehabilitation, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325027, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect and potential mechanism of butylphthalide capsule on the rats with chronic low O₂ and high CO₂ learning and memory disorders. **Methods** Sixty-four SFP grade SD rats were divided into the control group, model group, vegetable oil group and butylphthalide group, 16 cases in each group. Except the control group, the model group, vegetable oil group and butylphthalide group were placed in the low O₂ and high CO₂ airtight chamber and exposed for 2 weeks, 8 h every day. After two weeks, the Morris water maze, transmission electron microscope, TUNEL kit, and Western blot were applied for detecting the related indicators. **Results** In the Morris water maze, the incubation period in the model group and vegetable oil group was prolonged compared with the control group ($P<0.05$), but which in the butylphthalide group was shortened compared with the model group ($P<0.05$). There was no statistical difference in the times of crossing platforms among the various groups ($P>0.05$). Under the electron microscopy,

* 基金项目: 浙江省医药卫生科技项目(2020RC118, 2021KY1097); 浙江省湖州市科技局项目(2019GZ40)。 作者简介: 闵晶晶(1987-), 主治医师, 硕士研究生, 主要从事脑血管病的研究。 △ 通信作者, E-mail: wangxt22@163.com。

the low O₂ and high CO₂ exposure resulted in the destruction of mitochondrial structure, mitochondrial vacuolization, cristae fracture or dissolution and intracellular autophagosomes increase. The above situation was improved after giving the butylphthalide intervention, but the intracellular autophagosomes further increased. The TUNEL assay detection showed that the apoptosis cells in the model group and vegetable oil group were increased compared with the control group ($P < 0.05$), but which in the butylphthalide group was decreased compared with the model group ($P < 0.05$). Western blot showed that hypoxia could induce the expression of autophagy-associated proteins and apoptosis-related proteins. After giving the butylphthalide intervention, the expressions of autophagy-related proteins HIF-1 α , BNIP3, Beclin-1, LC3 II and the anti-apoptosis protein Bcl-2 were further increased ($P < 0.05$). The pro-apoptotic protein Bax and caspase-3 expressions were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Butylphthalide may improve the spatial learning and memory impairment in rats caused by low O₂ and high CO₂, which may be related to increasing mitophagy, meanwhile reducing apoptosis.

[Key words] butylphthalide; low oxygen high carbon dioxide oxygen; apoptosis; mitochondrial autophagy; rats

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是呼吸系统的常见多发病, 以不完全可逆的气流受限为特征。COPD 并不单纯表现为肺部症状, 还可以继发多个脏器的损害, 特别是 COPD 患者的认知障碍问题已引起广泛关注^[1-3]。慢性低氧高二氧化碳 (低 O₂ 高 CO₂) 是 COPD 发生、发展的重要病理机制之一, 在前期的研究中也发现慢性低 O₂ 高 CO₂ 模型下大鼠存在着不同程度的学习记忆障碍^[4-5]。有研究表明, 神经元细胞的凋亡与低氧环境诱发的认知障碍密切相关^[6-7]。自噬是真核细胞溶酶体介导的细胞内成分的自我降解过程^[8-9], 近来的研究表明, 自噬的缺陷导致蛋白质突变或折叠错误, 是许多神经退行性疾病发生和发展的基础^[9-10]。丁苯酞软胶囊是我国第一个拥有自主知识产权的国家一类化学新药, 目前已被广泛应用于缺血性脑卒中的治疗, 具有重构缺血区微循环, 保护线粒体功能和抑制细胞凋亡等作用^[11-14]。本实验通过建立低 O₂ 高 CO₂ 大鼠模型, 观察大鼠学习记忆能力及线粒体凋亡、自噬的表达情况, 并通过丁苯酞软胶囊的干预来观察其是否对此模型下大鼠具有神经保护作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

低 O₂ 高 CO₂ 氧舱购自长沙华曦电子科技有限公司; Morris 水迷宫购自北京硕林苑科技有限公司; 原位末端转移酶标记技术 (TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL) 试剂盒购自罗氏公司 (Roch, 批号 11684817910); 抗 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell CLL/lymphoma 2, Bcl-2) 关联 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (cysteinyI aspartate specific proteinase 3, caspase-3)、抗自噬相关蛋白酵母 ATG6 同源物 (The mammalian ortholog of yeast autophagyrelated gene 6, Beclin-1)、抗自噬标记蛋白-微管相关蛋白 1 轻链 3 II

(microtubule-associated protein 1 light chain 3 II, LC3 II) 抗体均购自美国 Cell Signaling Technology 公司 (批号: 2722、9664、3495、2775); Bcl-2、抗腺病毒 E1B 19-kD 相互作用蛋白 3 (Bcl-2/E1B 19 kDa interacting protein 3, BNIP3)、抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 均购自英国 Abcam 公司 (批号: ab194583、ab10433、ab8345); 抗低氧诱导因子-1 α 亚基 (Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 购自美国 Novus Biologicals 公司 (批号: NB100-105); 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购自美国 Millipore (批号: IPVH 00010)。电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 发光液、辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗鼠二抗均购杭州自弗德生物科技有限公司 (批号: FD8020、FDR007、FDM007)。

1.2 方法

1.2.1 造模分组

64 只无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级雄性 SD 大鼠, 体重 200~230 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [编号: SCXK (沪) 2017-0005]。将 64 只大鼠分为 4 组, 每组各 16 只: 即对照组、模型组、植物油组、丁苯酞组。参照李勇等^[15]的造模方法, 将模型组、植物油组、丁苯酞组大鼠置于常压低 O₂ 高 CO₂ 舱内进行造模, 通过 N₂ 降低模型舱内 O₂ 浓度, 使舱内 O₂ 浓度维持在 9.0%~11.0%, CO₂ 浓度维持在 5.0%~6.0%, 每天造模 8 h, 共造模 2 周, 每周 6 d; 其余时间与对照组一起置于正常环境中 (室温 20~23 ℃, 相对湿度 50%~70%) 饲养, 饲养期间大鼠可自由获得食物和饮水, 丁苯酞软胶囊 80 mg/kg 或相同剂量的植物油在每天造模结束后进行灌胃, 持续 2 周, 每周 6 d。

1.2.2 Morris 水迷宫实验

连续训练 5 d, 每天接受 3 次试验, 前 2 d 如果大

鼠在 60 s 的时间内没有找到平台,将其轻轻地引导至平台并在平台上休息 30 s,第 3 天开始不再引导,未找到者记录潜伏期为 60 s。在第 6 天的空间平台搜索实验中,将平台从池中移出,并让老鼠游泳 60 s,记录穿越平台的次数。

1.2.3 TUNEL 法检测组织细胞凋亡

将石蜡切片用蒸馏水洗涤并在 37 ℃用蛋白质消化酶处理 20 min,然后根据罗氏的 TUNEL 试剂盒说明书进行原位细胞凋亡的检测,观察海马 CA1 区的凋亡细胞并计算百分比。

1.2.4 透射电镜观察自噬情况

取海马切成 1 mm³ 的小块,戊二醛磷酸缓冲液固定,常规脱水、浸透、包埋、染色,制成超薄的切片,在透射电镜下观察。

1.2.5 Western blot 检测蛋白水平

通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离等量的蛋白质并转移至 PVDF 膜,在室温下用 5% 无脂奶粉将 PVDF 膜封闭 2 h。然后将膜与各自的一抗在 4 ℃温育过夜,TBS Tween 20 Buffer(TBST 缓冲液)洗膜 5 min×6 次,加 HRP

标记的山羊抗兔或山羊抗鼠二抗(1:5 000),室温孵育 2 h,TBST 洗膜 5 min×6 次,用 ECL 发光液(试剂 A:试剂 B=1:1)覆盖膜(每张约 60 μL),曝光后进行分析计算。

1.3 统计学处理

数据采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,所有数据均进行正态性方差齐性检验,水迷宫潜伏期和游泳距离采用水迷宫重复测量数据的方差分析,其他数据两组间比较均采用单因素方差分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠定位航行实验相关指标及穿越平台次数比较

在 Morris 水迷宫训练的第 1、2 天,各组大鼠在逃避潜伏时间上比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。第 3、4、5 天,与对照组比较,模型组和植物油组的潜伏期明显延长($P < 0.05$);与模型组比较,丁苯酞组大鼠的逃避潜伏期明显缩短($P < 0.05$)。第 4、5 天的游泳距离也出现类似趋势。在最后一天的穿越平台次数试验中,各组大鼠穿越平台次数比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1~2、图 1。

表 1 各组大鼠定位航行实验逃避潜伏期时间和穿越平台次数比较($\bar{x} \pm s, n = 16$)

组别	逃避潜伏期时间(s)					穿越平台次数(次)
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	
对照组	31.86±3.65	29.53±3.41	24.76±4.16	21.79±6.23	11.38±3.81	4.00±1.07
模型组	42.34±4.70	37.11±7.82	35.46±4.67 ^a	31.17±6.38 ^a	21.33±3.31 ^a	4.13±0.83
植物油组	35.99±3.49	32.91±6.60	37.38±5.71 ^a	29.64±6.23 ^a	19.15±2.97 ^a	3.25±0.92
丁苯酞组	33.93±10.64	25.98±4.57	28.08±3.97 ^b	23.79±8.52 ^b	13.85±4.98 ^b	3.69±0.97

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

表 2 各组大鼠定位航行实验游泳距离比较($\bar{x} \pm s, n = 16, m$)

组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	21.43±3.04	19.24±2.19	14.67±2.98	11.21±2.76	6.27±3.13
模型组	25.87±3.25	22.87±3.24	20.28±2.10	17.34±1.98 ^a	12.85±1.45 ^a
植物油组	23.99±5.40	24.32±3.42	21.10±4.31	15.97±3.42 ^a	13.98±1.83 ^a
丁苯酞组	22.35±1.34	20.65±2.30	13.76±1.98	12.65±3.23 ^b	9.48±2.98 ^b

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组比较。

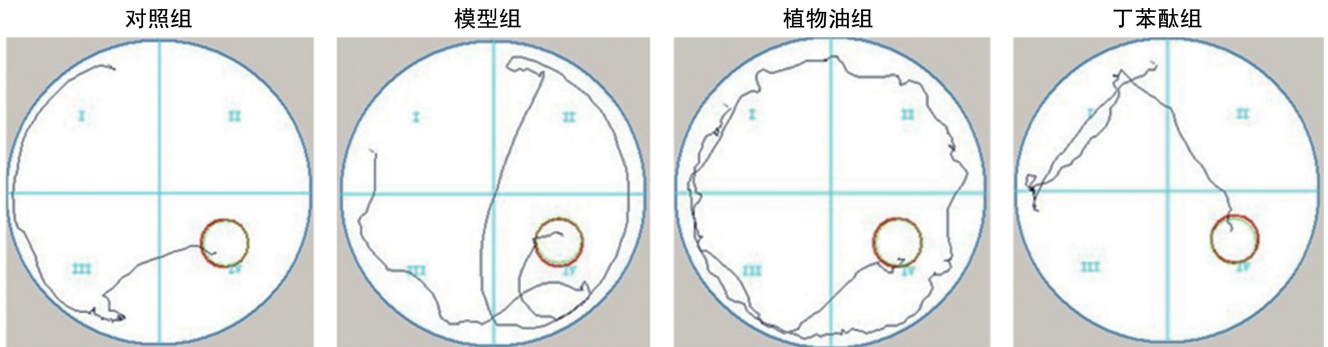


图 1 各组大鼠游泳路线图

2.2 丁苯酞软胶囊干预对于模型大鼠凋亡的影响

Western blot 检测抗凋亡因子 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax、caspase-3 水平显示,模型大鼠造模 2 周后出现了 Bcl-2、Bax 以及 caspase-3 表达的增加,丁苯酞软胶囊的干预抑制了 Bax、caspase-3 的增加,进一步促进了 Bcl-2 的表达($P<0.05$)。TUNEL 检测显示,模型组大鼠凋亡细胞增加,丁苯酞组较模型组凋亡细胞明显减少($P<0.05$)。各组大鼠凋亡相关蛋白表达水平及凋亡率比较,见表 3 和图 2、3。

表 3 各组大鼠凋亡相关蛋白相对表达水平及凋亡率比较($\bar{x}\pm s,n=16$)

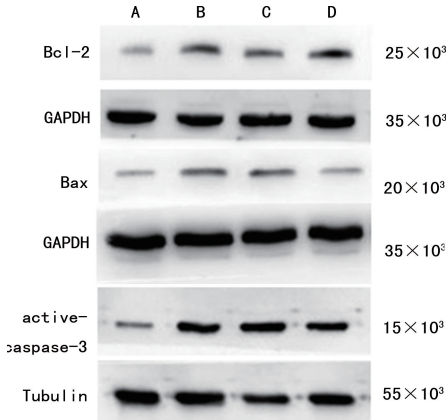
组别	Bcl-2	Bax	caspase-3	凋亡率(%)
对照组	0.13±0.05	0.29±0.05	0.15±0.03	0.60±0.59
模型组	0.30±0.03 ^a	1.25±0.19 ^a	0.69±0.07 ^a	16.53±4.28 ^a
植物油组	0.31±0.05 ^a	1.22±0.16 ^a	0.67±0.09 ^a	18.57±4.56 ^a
丁苯酞组	0.47±0.07 ^b	0.68±0.09 ^b	0.38±0.05 ^b	8.14±2.03 ^b

^a: $P<0.05$,与对照组比较,^b: $P<0.05$,与模型组比较。

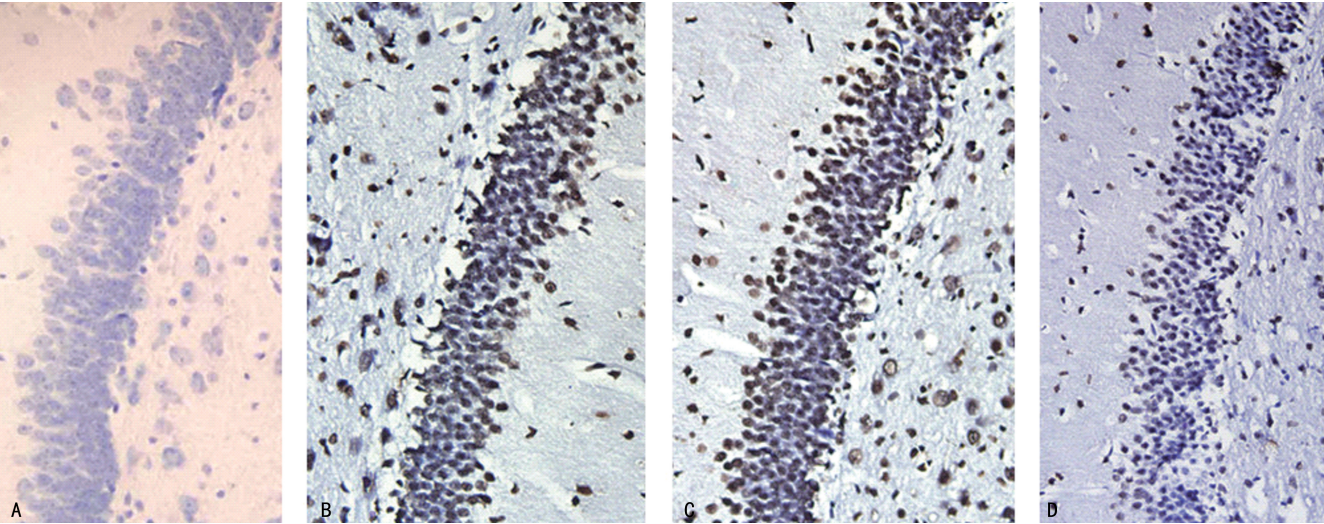
2.3 丁苯酞软胶囊干预对于模型大鼠对线粒体自噬的影响

通过透射电镜检查结果显示,慢性低 O₂ 高 CO₂

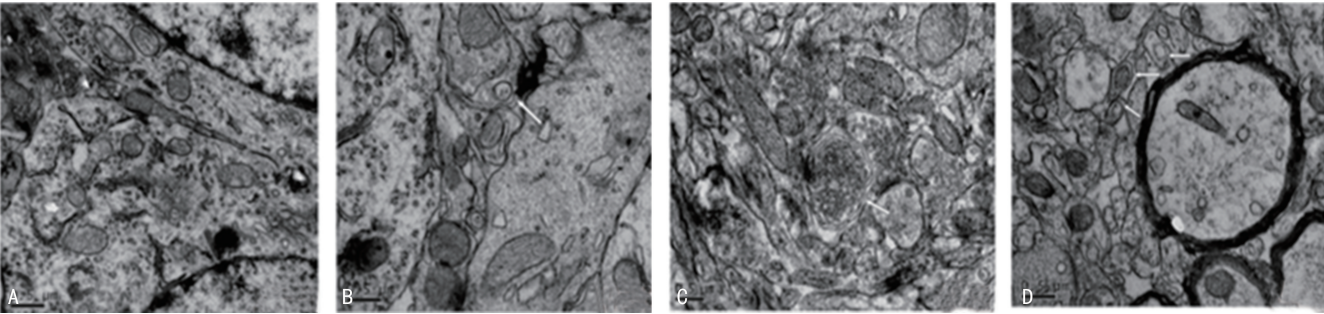
模型下存在着自噬体的表达,导致线粒体结构破坏,线粒体空泡比,嵴断裂或溶解,细胞内自噬体增加。并且在丁苯酞干预后自噬体的数量进一步增加(图 4)。Western blot 检测显示,模型下存在着 HIF-1 α 的激活,BNIP3 表达的上调及自噬标志物 Beclin-1 和 LC3 II 表达的增加,在使用丁苯酞干预后,HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3 II 蛋白的表达较模型组进一步增加($P<0.05$),见图 5、表 4。



A:对照组;B:模型组;C:植物油组;D:丁苯酞组。
图 2 各组大鼠凋亡相关蛋白表达



A:对照组;B:模型组;C:植物油组;D:丁苯酞组。
图 3 TUNEL 检测各组大鼠海马区神经元凋亡情况($\times 200$)



A:对照组;B:模型组;C:植物油组;D:丁苯酞组。
图 4 电镜下自噬体的表达情况($\times 20\ 000$)

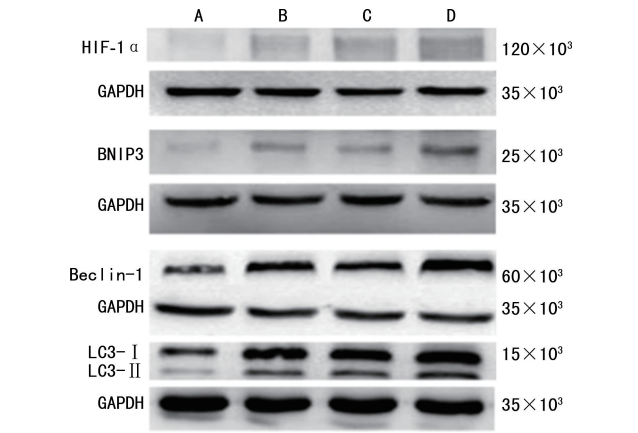


图 5 各组大鼠自噬相关蛋白表达

表 4 各组大鼠自噬相关蛋白相对表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=16$)				
组别	HIF-1 α	BNIP3	LC3 II	Beclin-1
对照组	0.65 $\pm$ 0.03	0.36 $\pm$ 0.03	0.64 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.03
模型组	1.61 $\pm$ 0.04 ^a	0.88 $\pm$ 0.02 ^a	1.22 $\pm$ 0.08 ^a	0.71 $\pm$ 0.12 ^a
植物油组	1.59 $\pm$ 0.04 ^a	0.83 $\pm$ 0.03 ^a	1.19 $\pm$ 0.08 ^a	0.68 $\pm$ 0.09 ^a
丁苯酞组	1.97 $\pm$ 0.08 ^b	1.22 $\pm$ 0.04 ^b	2.29 $\pm$ 0.21 ^b	1.50 $\pm$ 0.07 ^b

^a: $P<0.05$,与对照组比较,^b: $P<0.05$,与模型组比较。

3 讨 论

COPD 患者伴发的认知障碍给社会和家庭带来了较大的负担,慢性低 O₂ 高 CO₂ 是 COPD 发生、发展的重要病理生理机制之一。本研究中采用了慢性低 O₂ 高 CO₂ 模型来评估丁苯酞软胶囊对此模型下大鼠认知障碍的保护作用。通过 Morris 水迷宫实验发现,在慢性低 O₂ 高 CO₂ 暴露下,大鼠存在着明显的学习记忆障碍,并且伴有线粒体促凋亡蛋白、自噬表达的增加及抗凋亡蛋白表达的减少,而在使用丁苯酞软胶囊干预后大鼠逃避潜伏期和定位航行游泳距离明显缩短,学习记忆水平明显提高,同时大鼠海马 CA1 区伴有线粒体自噬水平的增加和线粒体凋亡水平的下降。但在 Morris 水迷宫中,各组大鼠穿越平台次数比较差异无统计学意义($P>0.05$),这可能与水迷宫的直径远远大于平台直径,目标平台太小有关。

线粒体是细胞进行有氧呼吸的场所,它一方面通过氧化磷酸化为细胞提供能量,另一方面参与启动线粒体的凋亡途径。Bcl-2 是一种存在于线粒体外膜中的抗凋亡蛋白,通常与 Bax 形成异源二聚体来抑制细胞凋亡的激活。Bax 是一种位于细胞质中的线粒体抗凋亡蛋白,正常情况下无活性,当凋亡时被触发,Bax 与自身形成同源二聚体并从细胞质中移位线粒体外膜,启动凋亡途径。在 caspase 家族中,caspase-3 被认为是凋亡级联反应的最终执行者^[16-18]。有学者在血管性痴呆大鼠身上发现丁苯酞对血管性痴呆大鼠的记忆能力有明显改善作用,认为与其抑制

caspase-3 过度表达,抑制细胞凋亡,促进细胞存活有关^[19]。而本研究在慢性低 O₂ 高 CO₂ 模型大鼠脑内发现了 caspase-3 表达的增加同时伴随促凋亡蛋白 Bax 增加及抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加,但在使用丁苯酞干预后 Bax、caspase-3 表达明显减少,而 Bcl-2 表达进一步增加,说明丁苯酞软胶囊在此模型下可能通过调节抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白之间的平衡从而发挥一定的抗凋亡作用。

线粒体自噬是指应激条件下细胞通过自噬选择性地清除损伤或多余线粒体的过程,对维持细胞稳态具有重要作用^[19-20]。LC3 是酵母细胞基因 Atg-8 的同源体^[20],自噬泡的形成以 LC3 II 从细胞膜的外表面释放为标志,LC3 II 表达的增加通常被认为是自噬发生的金标准。Beclin-1 是启动自噬小体形成的关键蛋白,其为酵母 Atg-6 基因的同源体^[20]。当细胞处于低氧状态时,HIF-1 是低氧应激的关键调控者,HIF-1 α 是 HIF-1 的一个亚基,受氧浓度的调节^[21]。有学者发现,低氧条件下 HIF-1 α 介导了 BNIP 和 BNIP3L 表达,诱导线粒体自噬的发生从而防止细胞凋亡^[21]。BNIP3 和 BNIP3L(NIX)是同源基因,二者与 Beclin-1 具有相同的 BH3 结构域,均可竞争性地把 Beclin-1 从 Bcl-2 或 Bcl-xl 的结合复合物中游离出来,从而促进线粒体自噬的发生^[21]。有研究者在对 BNIP3 基因敲除鼠及野生大鼠的缺血缺氧动物模型研究,对基因敲除大鼠皮层神经元进行氧糖剥夺处理,发现 NIX/BNIP3L 表达上调,凋亡减弱,自噬增强,脑梗死灶体积变小^[22]。本课题组在慢性低 O₂ 高 CO₂ 模型下发现了自噬体的存在及 HIF-1 α 、BNIP3、Beclin-1、LC3 II/LC3 I 的表达,而在使用丁苯酞软胶囊干预后自噬体的数量较前增加,上述蛋白的表达较前明显提高,说明丁苯酞软胶囊可能在慢性低 O₂ 高 CO₂ 条件下通过线粒体自噬水平的进一步提高从而改善大鼠的认知障碍。

本研究表明,慢性低 O₂ 高 CO₂ 可导致大鼠空间学习记忆障碍,诱导凋亡和线粒体自噬表达,丁苯酞可能通过提高线粒体自噬水平同时降低凋亡水平来改善慢性低 O₂ 高 CO₂ 导致的大鼠空间学习记忆障碍,从而发挥神经保护作用。

参考文献

[1] PARK S K. Trajectories of change in cognitive function in people with chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Clin Nurs, 2018, 27(7/8): 1529-1542.

[2] MACDONALD M I, BARDIN P G. Contemporary Concise Review 2020: Chronic obstructive pulmonary disease[J]. Respirology, 2021, 26(5): 493-500.

- [3] 郑国庆,王小同,李勇.慢性阻塞性肺疾病认知功能障碍[J].中国行为医学科学,2006,15(3):284-285.
- [4] 林盈盈,陈轲扬,霍鑫龙,等.慢性低氧高二氧化碳大鼠记忆障碍与脑内胆碱能失调的关系[J].中华神经科杂志,2013,46(1):47-50.
- [5] 刘银花,杨汉文,王小同,等.硫化氢对慢性低氧高二氧化碳模型大鼠学习记忆的影响[J].中国临床神经科学,2011,19(2):141-145.
- [6] 孟晓菲,谭进,苗雨阳,等.间歇低氧诱导海马神经细胞凋亡和自噬增多[J].中华老年医学杂志,2017,36(3):311-315.
- [7] GOREN B,CAKIR A,OCALAN B,et al. Long-term cognitive effects of uridine treatment in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. Brain Res,2017,1659:81-87.
- [8] PENTIMALLI F. Autophagy in disease:hunger for translation[J]. Cell Death Dis,2019,10(3):247.
- [9] MENZIES F M,FLEMING A,CARICASOLE A A,et al. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities[J]. Neuron,2017,93(5):1015-1034.
- [10] SHEFA U,JEONG N Y,SONG I O,et al. Mitophagy links oxidative stress conditions and neurodegenerative diseases[J]. Neural Regen Res,2019,14(5):749-756.
- [11] WEI Z Z,CHEN D,LEE M,et al. DL-3-n-butylphthalide increases collaterogenesis and functional recovery after focal ischemic stroke in mice[J]. Aging Dis,2021,12(7):1835-1849.
- [12] FENG Y,GUO M,ZHAO H,et al. DL-3-n-Butylphthalide alleviates demyelination and improves cognitive function by promoting mitochondrial dynamics in white matter lesions[J]. Front Aging Neurosci,2021,13:632374.
- [13] ZQ X,ZHOU Y,SHAO B Z,et al. A systematic review of neuroprotective efficacy and safety of DL-3-N-Butylphthalide in ischemic stroke[J]. Am J Chin Med,2019,47(3):507-525.
- [14] 高立伟,张强,李萌,等.丁苯酞对血管性痴呆小鼠认知功能的影响及 Nrf2/SIRT3 信号通路的调节作用[J].中华行为医学与脑科学杂志,2020,29(3):200-201.
- [15] 李勇,柯将琼,邵胜敏,等.慢性低氧高二氧化碳对大鼠海马 NF- κ B 的影响[J].浙江实用医学,2009,14(2):100-101,177.
- [16] WANG Q,ZHANG L,YUAN X,et al. The relationship between the Bcl-2/Bax proteins and the mitochondria-mediated apoptosis pathway in the differentiation of adipose-derived stromal cells into neurons[J]. PLoS One,2016,11(10):e0163327.
- [17] SUN C,ZHANG X,YU F,et al. Atractylenolide I alleviates ischemia/reperfusion injury by preserving mitochondrial function and inhibiting caspase-3 activity[J]. J Int Med Res,2021,49(2):300060521993315.
- [18] 史婷婷,白建平,梁月琴,等.芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2, Bax,caspase-3 表达的影响[J].中国药理学通报,2011,27(5):666-671.
- [19] 毛西京,朱博驰,于挺敏,等.丁苯酞对血管性痴呆大鼠记忆能力及海马 CA1 区 caspase-3 表达的影响[J].中国医药导报,2017,14(28):9-12.
- [20] KIM D,SONG J,JIN E J. BNIP3-dependent mitophagy via PGC1 α promotes cartilage degradation[J]. Cells,2021,10(7):1839.
- [21] ZHANG Y,LIU D,HU H,et al. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Biomed Pharmacother,2019,120:109464.
- [22] SHI R Y,ZHU S H,LI V,et al. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke[J]. CNS Neurosci Ther,2014,20(12):1045-1055.

(收稿日期:2021-08-07 修回日期:2022-02-15)

(上接第 1823 页)

- [14] ZHANG Y,LU X,YANG M,et al. GAS5 knock-down suppresses inflammation and oxidative stress induced by oxidized low-density lipoprotein in macrophages by sponging miR-135a[J]. Mol Cell Biochem,2021,476(2):949-957.
- [15] LIU Q,LEI C. Neuroprotective effects of miRNA-

331-3p through improved cell viability and inflammatory marker expression: correlation of serum miRNA-331-3p levels with diagnosis and severity of Alzheimer's disease[J]. Exp Gerontol,2021,144(1):111187.

(收稿日期:2021-08-05 修回日期:2022-02-20)