

基于 AMPK/ULK1/Beclin1 信号通路探究蛭蛇通络胶囊干预缺血性脑卒中的作用机制

李煜, 蔡晴晴, 颜静, 张方博*, 唐仕欢*
(中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:**该文旨在研究蛭蛇通络胶囊调控单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)/UNC-51样激酶1(ULK1)/自噬关键分子酵母 Atg6同系物(Beclin1)信号通路干预缺血性脑卒中的作用机制。**方法:**雄性SD大鼠随机分为假手术组,模型组,蛭蛇通络胶囊低、中、高剂量组(0.63、1.25、2.50 g·kg⁻¹)和金纳多组(25 mg·kg⁻¹)。采用改良线栓法建立大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,并于造模后连续给药7 d。通过2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色、神经行为学评分、苏木素-伊红(HE)染色和尼氏染色评估脑损伤程度;并运用免疫组化法(IHC)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织中AMPK、ULK1、Beclin1和B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/腺病毒E1B 19 kDa相互作用蛋白3样(BNIP3L)的表达水平。此外,构建氧糖剥夺诱导的大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤细胞(PC12)损伤模型,利用Western blot检测细胞中Beclin1和BNIP3L的表达水平。**结果:**动物实验结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠神经行为学评分和脑梗死面积显著升高($P<0.01$),异常神经元数目显著增多($P<0.01$),尼氏小体数量显著减少($P<0.01$),AMPK、ULK1、Beclin1和BNIP3L表达水平明显上调($P<0.05$, $P<0.01$);蛭蛇通络胶囊治疗后,与模型组比较,蛭蛇通络胶囊高剂量组和金纳多组神经行为学评分和脑梗死面积明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),蛭蛇通络胶囊中、高剂量组和金纳多组异常神经元数量明显减少($P<0.05$, $P<0.01$),蛭蛇通络胶囊各剂量组和金纳多组尼氏小体数量明显增多($P<0.05$, $P<0.01$),AMPK、ULK1、Beclin1和BNIP3L的表达水平明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。细胞实验结果显示,与正常组比较,氧糖剥夺组PC12细胞中Beclin1和BNIP3L的表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);与氧糖剥夺组比较,蛭蛇通络胶囊肠吸收液高剂量组和依达拉奉组Beclin1和BNIP3L的表达水平明显降低($P<0.05$)。**结论:**蛭蛇通络胶囊通过调节AMPK/ULK1/Beclin1信号通路发挥神经保护作用,从而减轻脑缺血损伤。

[关键词] 缺血性脑卒中; 氧糖剥夺; 蛭蛇通络胶囊; 单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)/UNC-51样激酶1(ULK1)/自噬关键分子酵母 Atg6同系物(Beclin1)信号通路; 作用机制

[中图分类号] R277;R285;R289 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2026)15-0101-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20252342

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251204.1235.001>

[网络出版日期] 2025-12-04 13:46:06 [增强出版附件] 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Mechanism of Action of Zhishe Tongluo Capsules in Intervening Ischemic Stroke Based on AMPK/ULK1/Beclin1 Signaling Pathway

LI Yu, CAI Qingqing, YAN Jing, ZHANG Fangbo*, TANG Shihuan*

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to explore the mechanism of action of Zhishe Tongluo capsules in intervening ischemic stroke by regulating the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1)/homologue of yeast autophagy-related gene 6 (Beclin1) signaling pathway. **Methods:** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a sham group, a model group, Zhishe Tongluo capsule groups with low, medium, and high doses (0.63,

[收稿日期] 2025-08-25

[基金项目] 陕西省重点研发计划项目(2019ZDLSF04-04-01)

[第一作者] 李煜,在读博士,从事脑缺血作用特点及药物干预研究,E-mail:liyut212@163.com;

[通信作者] *张方博,博士,副研究员,从事脑缺血作用特点及药物干预研究,E-mail:fbzhang@icmm.ac.cn;

*唐仕欢,博士,研究员,从事中药新药处方筛选技术研究,E-mail:tshuan800@126.com;

1.25, 2.50 g·kg⁻¹), and the Ginaton group (25 mg·kg⁻¹). A middle cerebral artery occlusion (MCAO) rat model was established using the modified intraluminal suture occlusion method. All treatments were administered continuously for seven days after modeling. Brain injury was evaluated using 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, neurobehavioral scores, hematoxylin-eosin (HE) staining, and Nissl staining. The expression levels of AMPK, ULK1, Beclin1, and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein (BNIP3L) in brain tissue were detected by both immunohistochemistry (IHC) and Western blot. Additionally, an oxygen-glucose deprivation (OGD)-induced injury model was constructed in rats' adrenal medullary pheochromocytoma cells (PC12). The expression levels of Beclin1 and BNIP3L in the cells were detected by Western blot. **Results:** Animal experimental results show that, compared with the sham group, the model group exhibits significantly increased rats' neurobehavioral scores and cerebral infarction area ($P<0.01$), significantly increased number of abnormal neurons ($P<0.01$), significantly reduced number of Nissl bodies ($P<0.01$), and significantly upregulated expression levels of AMPK, ULK1, Beclin1, and BNIP3L ($P<0.05$, $P<0.01$). After treatment with Zhishe Tongluo capsules, compared with the model group, the Zhishe Tongluo capsule group with high dose and the Ginaton group exhibited significantly reduced neurobehavioral scores and cerebral infarction area ($P<0.05$, $P<0.01$). Zhishe Tongluo capsules groups with medium and high doses and the Ginaton group exhibited significantly decreased number of abnormal neurons ($P<0.05$, $P<0.01$). Zhishe Tongluo capsule groups with different doses and the Ginaton group exhibited significantly increased number of Nissl bodies ($P<0.05$, $P<0.01$), and the expression levels of AMPK, ULK1, Beclin1, and BNIP3L were significantly downregulated ($P<0.05$). Cellular experimental results show that, compared with the normal group, the expression levels of Beclin1 and BNIP3L in OGD-induced PC12 cells were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the OGD group, the expression levels of Beclin1 and BNIP3L were significantly decreased in the intestinal absorption liquid group of high-dose Zhishe Tongluo capsules and the edaravone group ($P<0.05$). **Conclusion:** Zhishe Tongluo capsules exert neuroprotective effects by regulating the AMPK/ULK1/Beclin1 signaling pathway, thereby alleviating cerebral ischemic injury.

[Keywords] ischemia stroke; oxygen-glucose deprivation; Zhishe Tongluo capsules; adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/UNC-51-like kinase 1 (ULK1)/homologue of yeast autophagy-related gene 6 (Beclin1) signaling pathway; mechanism of action

脑卒中是世界范围内致残和致死的主要原因之一,其特征常包括脑循环障碍、神经元损伤及局部脑功能丧失^[1]。随着人口老龄化加剧及脑卒中危险因素增多,其发病率持续攀升,给家庭和社会带来巨大的社会经济负担。其中,缺血性脑卒中(IS)是最常见的脑卒中类型^[2]。目前,IS的临床治疗主要依赖急性期干预手段,如静脉溶栓、抗血小板药物和机械取栓。尽管这些手段能部分恢复脑血流,但常导致患者出现多种后遗症,如认知功能障碍、肢体瘫痪、失语及长期器官功能障碍^[3]。因此,开发治疗IS的有效新策略迫在眉睫。

IS的发病机制复杂,涉及神经细胞损伤、炎症反应、氧化应激和细胞凋亡等多个病理环节。近年研究表明,单磷酸腺苷激活的蛋白激酶(AMPK)信号通路在缺血性脑损伤中扮演关键角色,其异常激活可能加剧脑缺血损伤^[4]。AMPK是细胞能量代谢的核心调节因子,在缺血条件下,因能量代谢紊乱而被激活。活化的AMPK可磷酸化UNC-51样激酶1(ULK1),促进ULK1复合体的形成^[5]。ULK1作为自噬起始阶段的关键调控蛋白,其激活后可磷酸化自噬关键分子酵母Atg6同系物(Beclin1),诱导线粒体自噬体的形成。Beclin1是自噬过程中的核心蛋白,其表达上调与自噬活性增强密切相关^[6]。然而,自噬的过度激活可能引起细胞自噬性死亡,从而加

重缺血性脑损伤。因此,抑制AMPK/ULK1/Beclin1信号通路的过度表达,可能成为IS治疗的重要策略。

蛭蛇通络胶囊由人参、黄芪、天麻、丹参、红花、葛根、川芎、石菖蒲、郁金、水蛭、冰片及乌梢蛇组成,具有息风通络、益气活血等功效^[7]。现代药理表明,蛭蛇通络胶囊可以减轻IS症状,如瘫痪、口舌歪斜等^[8]。临床观察显示,蛭蛇通络胶囊通过改善血液流变学、调节血脂水平,可减轻IS患者因高黏滞血症、高脂血症等异常状态引发的继发性病理损伤(如微循环障碍、动脉硬化进展等),并通过抑制炎症和细胞凋亡等病理过程,降低IS的复发风险,从而改善患者预后^[9]。在常规西医治疗基础上,加用蛭蛇通络胶囊可促进IS患者神经功能恢复^[10]。蛭蛇通络胶囊临床用于中风病中经络(轻中度脑梗塞)恢复期气虚血瘀证,为探索拓展其临床适应证,本研究通过构建大鼠大脑中动脉阻塞(MCAO)模型,模拟临床IS患者急性期病理状态,并于缺血24h(该时间点对应临床IS急性期)开始给予蛭蛇通络胶囊进行干预。同时,结合氧糖剥夺(OGD)诱导的PC12细胞模型,系统评价该干预方案下的药效及作用机制,以期能为蛭蛇通络胶囊用于IS急性期治疗提供实验数据和理论依据。

1 材料

1.1 动物和细胞 75只SPF级雄性SD大鼠,体重220~250 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2019-0008。实验前,所有大鼠在标准实验动物房内适应性饲养3 d,自由摄食饮水,温度20~22℃,相对湿度40%~70%,换气次数15次/h。大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤PC12细胞,购自北京协和医学院国家实验细胞资源共享平台,批号1101RAT-PUMC000024。

1.2 伦理 本实验所有动物操作程序均经中国中医科学院中药研究所动物福利伦理委员会审查批准,批准号2021B093。

1.3 试剂 蛭蛇通络胶囊(陕西健民制药有限公司,国药准字Z20090658,批号2011106,规格0.5 g/粒);金纳多(银杏叶提取物片,德国威玛舒培博士药厂,批号8530120,规格40 mg/片);依达拉奉、2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)(北京索莱宝生物科技有限公司,货号分别为IE0020、T8170);Beclin1、磷酸化(p)-AMPK、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/腺病毒E1B 19 kDa相互作用蛋白3样(BNIP3L)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司,货号分别为#3495、#2537、#12396、#5174);AMPK、p-ULK1、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗大鼠免疫球蛋白G(IgG)(H+L)、HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为66536-1-Ig、29006-1-AP、SA00001-15、SA00001-1);ULK1抗体(北京博奥森生物技术有限公司,货号bs-3602R);苏木素-伊红(HE)高清恒染试剂盒、尼氏(Nissl)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号分别为G1076、G1036)。

1.4 仪器 ALC-M型组织-器官水浴系统、ALC-CWB型数控恒温循环水槽(上海奥尔科特生物技术有限公司);5424R型低温离心机(德国Eppendorf公司);Spectra Max M5型多功能酶标仪(美国Becton-Dickinson公司);C-31型厌氧培养盒(日本三菱瓦斯化学株式会社);DYY-6D型电泳仪(北京六一生物技术有限公司);Tanon 4600型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司);SCIENTZ-48型高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 大鼠MCAO模型构建 采用改良线栓法建立大鼠MCAO模型^[11-12]。大鼠经腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉后,仰卧位固定于手术台上。颈部备皮,

碘伏消毒,沿颈部正中中线作垂直切口,剪开皮肤和浅筋膜,钝性分离肌肉组织,充分游离颈总动脉、颈内动脉和颈外动脉。结扎颈外动脉及颈总动脉,动脉夹临时阻断颈内动脉。在颈总动脉处用眼科剪剪一小口,将直径0.26 mm的线栓置入切口,并进入颈内动脉约18 mm,直至线栓前端遇到轻微阻力,切断血液供应。固定线栓,分层缝合肌肉及皮肤切口,大鼠置于37℃保温箱中。假手术组大鼠仅分离血管,不进行结扎及线栓插入操作。

2.2 神经行为学评分 采用Zea-Longa评分法评估大鼠神经功能^[13]。具体标准如下,四肢伸展及行走正常评为0分;对侧上肢无法完全伸展评为1分;行走时向对侧转圈评为2分;行走时向对侧倾斜评为3分;意识丧失,失去自主行走能力评为4分。1~3分视为造模成功^[14],可纳入实验组。

2.3 分组与给药 造模成功的大鼠,按神经功能缺损评分随机分为6组:假手术组,模型组,蛭蛇通络胶囊低、中、高剂量组,金纳多组,每组12只。基于体表面积等效剂量换算及课题组前期研究^[15-16],蛭蛇通络胶囊高、中、低剂量组剂量分别为2.50、1.25、0.63 g·kg⁻¹,金纳多组剂量为25 mg·kg⁻¹,每天灌胃相应剂量的药物。假手术组和模型组每天灌胃等体积纯水,连续给药7 d。

2.4 TTC染色 将脑组织置于-20℃冰冻30 min后,使用大鼠脑模具自视交叉水平向后连续冠状切取6片厚度为2 mm的脑片。将脑片置于1%TTC溶液中,37℃避光孵育30 min后,移入4%多聚甲醛中,固定24 h。使用Image J软件计算脑梗死面积,即脑梗死面积=(梗死对侧半球面积-梗死同侧非梗死面积)/梗死对侧半球面积×100%^[17]。

2.5 HE和Nissl染色 取脑组织置于4%多聚甲醛中,固定24 h,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明,石蜡包埋,切成4 μm的脑组织切片。随后,将脑组织切片脱蜡至水,分别浸入苏木素和伊红染色液中进行HE染色,Nissl染液进行Nissl染色,水洗,脱水,中性树脂封片。随机选取5个视野,定量分析缺血区存活神经元和尼氏小体的数量。

2.6 免疫组化(IHC)法检测脑组织蛋白 脑组织切片脱蜡至水,室温下,将切片置于3%H₂O₂中孵育,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,柠檬酸缓冲液进行抗原修复,5%BSA封闭1 h,滴加一抗(Beclin1和BNIP3L,1:1 000),4℃孵育过夜。次日,滴加HRP标记的相应种属二抗工作液(1:500),室温孵育1 h,PBS冲洗,二氨基联苯胺(DAB)避光显色5 min,蒸

馏水充分冲洗数次,终止显色反应。苏木素染液复染30 s,水洗,脱水,中性树胶封片。采用免疫反应评分(IRS)于5个随机视野定量分析缺血区 Beclin1与BNIP3L表达^[18]。

2.7 肠吸收液的制备 3只大鼠在实验前禁食12 h,颈部脱位,沿腹部中心线剪开皮肤及肌肉。自胃幽门下方10 cm处截取肠段,清洗干净。将肠管的一端插入硅胶管,并翻出内表面,用细线结扎,0℃台式缓冲液冲洗干净,另一端同样用细线结扎,保证无漏液。将25 mL质量浓度为170 g·L⁻¹的蛭蛇通络胶囊供试液(或添加台式缓冲液作为空白肠吸收液)加入麦氏浴管中,通入95%O₂和5%CO₂混合气体,37℃恒温水浴。将2 mL台式缓冲液注入肠管,置于麦氏浴管中2 h,收集肠管中液体,0.22 μm 无菌滤膜过滤,-20℃贮存备用^[19]。

2.8 OGD模型构建 PC12细胞采用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM高糖培养基,在37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养至对数生长期。待细胞融合度达到约80%时,经胰蛋白酶消化后接种于6孔板中,并分为以下6组:正常组、OGD组、蛭蛇通络胶囊肠吸收液低剂量组(0.5 g·L⁻¹)、蛭蛇通络胶囊肠吸收液中剂量组(1.0 g·L⁻¹)、蛭蛇通络胶囊肠吸收液高剂量组(2.0 g·L⁻¹)和依达拉奉组(50 μmol·L⁻¹)。正常组、模型组、各剂量蛭蛇通络胶囊肠吸收液组和依达拉奉组分别使用空白肠吸收液、相应剂量的蛭蛇通络胶囊肠吸收液或依达拉奉预处理24 h。除正常组外,其余各组更换为无糖无血清培养基,并立即置于95%N₂和5%CO₂的C-31厌氧培养盒中,于37℃恒温条件下进行4 h缺氧处理。实验结束后,细胞经PBS轻柔漂洗2次,加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,使用细胞刮刀收集细胞,转移至离心管中,经超声破碎处理后,于4℃、3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径6 cm),收集上清并于-20℃保存备用。

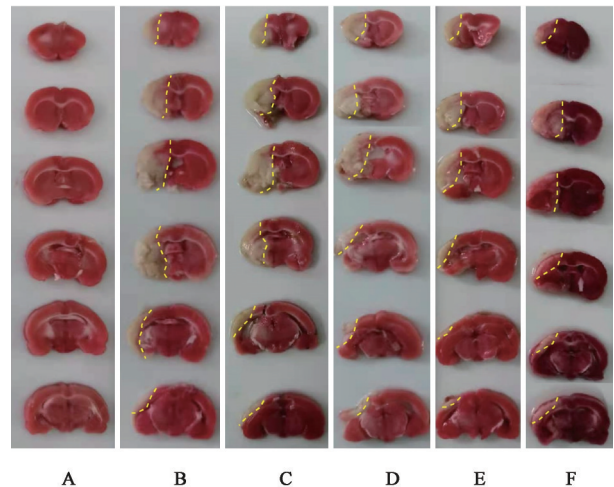
2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测脑组织和细胞蛋白 使用RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂提取脑组织或PC12细胞中的总蛋白,聚氧基丙烯酸正丁酯(BCA)测定蛋白浓度,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。随后,将样品转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,5%牛血清白蛋白(BSA)室温封闭1 h,滴加一抗(Beclin1、p-AMPK/AMPK、BNIP3L、p-ULK1/ULK1, 1:1 000),4℃孵育过夜。以GAPDH(1:1 000)作为内参。次日滴加HRP标记的相应二抗(1:5 000),室温孵育1 h,使用

增强化学发光液进行显影,Image J软件分析条带灰度值。

2.10 数据处理 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 20.0软件进行统计学处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠神经行为学评分及脑梗死面积的影响 TTC染色结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑梗死面积显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,蛭蛇通络胶囊中、高剂量组和金纳多组大鼠脑梗死面积显著降低($P < 0.01$)。神经行为学评分结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠神经行为学评分显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,蛭蛇通络胶囊高剂量组和金纳多组神经行为学评分明显降低($P < 0.05$)。见图1、表1。



注:A.假手术组;B.模型组;C.蛭蛇通络胶囊低剂量组;D.蛭蛇通络胶囊中剂量组;E.蛭蛇通络胶囊高剂量组;F.金纳多组(图2-图5同)

图1 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑梗死面积的影响(TTC)

Fig. 1 Effect of ZSTL on cerebral infarction area of MCAO rats (TTC)

3.2 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织结构的影响 HE染色结果显示,假手术组大脑皮层组织结构完整,神经元排列紧密,胞体形态正常,核仁清晰可见;与假手术组比较,模型组存活神经元数量显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,蛭蛇通络胶囊中、高剂量组和金纳多组存活神经元数量明显升高($P < 0.05, P < 0.01$)。见图2、表2。

3.3 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织尼氏小体的影响 Nissl染色结果显示,与假手术组比较,模

表1 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠神经行为学评分及脑梗死面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Zhishe Tongluo capsules (ZSTL) on neurobehavioral score and cerebral infarction area of MCAO rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	神经行为学评分/分	脑梗死面积/%
假手术组		0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		2.33±0.82 ²⁾	64.07±5.01 ²⁾
蛭蛇通络胶囊低剂量组	630	1.67±0.52	57.26±7.35
蛭蛇通络胶囊中剂量组	1 250	1.50±0.55	50.70±5.35 ⁴⁾
蛭蛇通络胶囊高剂量组	2 500	1.17±0.41 ³⁾	37.08±10.86 ⁴⁾
金纳多组	25	1.33±0.52 ³⁾	41.98±8.31 ⁴⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2-表5同)

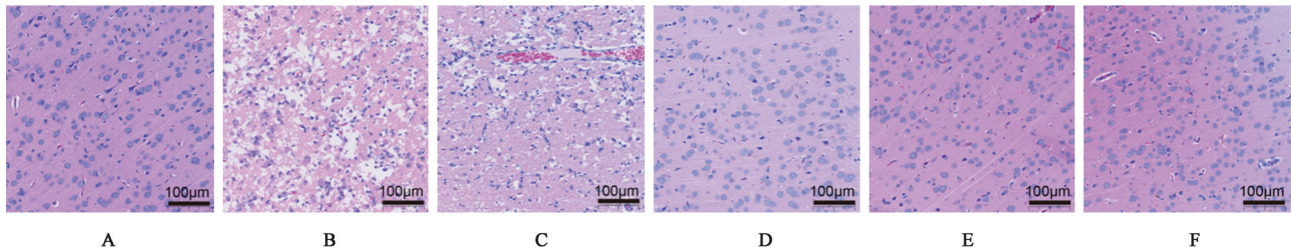


图2 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织结构的影响(HE, ×200)

Fig. 2 Effect of ZSTL on brain tissue structure of MCAO rats (HE, ×200)

表2 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织结构的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of ZSTL on brain tissue structure of MCAO rats

($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	存活神经元数量/个
假手术组		261.00±18.31
模型组		101.60±37.00 ²⁾
蛭蛇通络胶囊低剂量组	630	142.87±18.38
蛭蛇通络胶囊中剂量组	1 250	187.60±19.73 ³⁾
蛭蛇通络胶囊高剂量组	2 500	240.33±9.91 ⁴⁾
金纳多组	25	222.73±7.78 ⁴⁾

型组神经元排列紊乱,尼氏小体数量显著减少($P<0.01$);与模型组比较,蛭蛇通络胶囊各剂量组和金纳多组神经元损伤明显减轻,尼氏小体数量明显增加,差异具有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见图3、表3。

3.4 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织中AMPK/ULK1/Beclin1信号通路蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1、Beclin1和BNIP3L蛋白表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);与模型组比较,蛭蛇通络胶囊中、高剂量组和金纳多组p-AMPK/AMPK和p-ULK1/ULK1蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$),蛭蛇通络胶囊低、中和高剂量组和金纳多组Beclin1和BNIP3L蛋白表达明显降低($P<0.05$)。见图4、表4。

3.5 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织中Beclin1和BNIP3L表达的影响

IHC结果显示,假手术组大鼠脑组织中Beclin1和BNIP3L均无表达;与假手术组比较,模型组大鼠Beclin1和BNIP3L的表达显著增加($P<0.01$);与模型组比较,蛭蛇通络胶囊中、高剂量组和金纳多组Beclin1和BNIP3L的表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图5、表5。

3.6 蛭蛇通络胶囊肠吸收液对OGD诱导PC12细胞损伤中Beclin1和BNIP3L蛋白表达的影响

Western blot结果显示,与正常组比较,OGD组Beclin1和

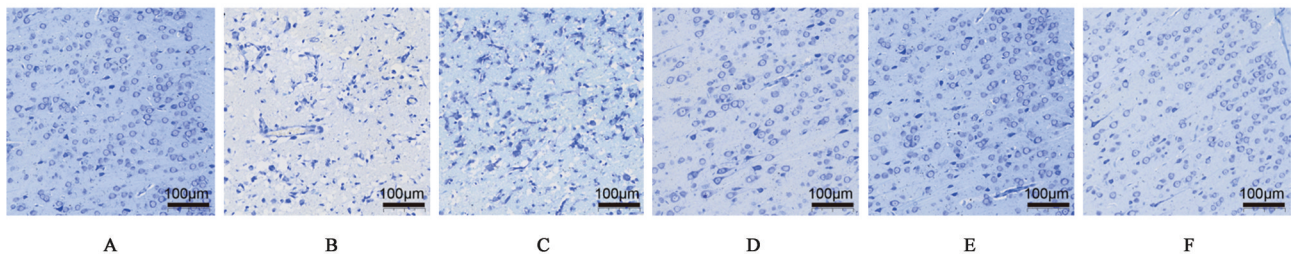


图3 蛭蛇通络胶囊对MCAO大鼠脑组织尼氏小体的影响(尼氏, ×200)

Fig. 3 Effect of ZSTL on Nissl bodies of brain tissue in MCAO rats (Nissl, ×200)

表 3 蛭蛇通络胶囊对 MCAO 大鼠脑组织尼氏小体的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of ZSTL on Nissl bodies of brain tissue in MCAO rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	尼氏小体数量/个
假手术组		249.13±17.16
模型组		122.20±18.14 ²⁾
蛭蛇通络胶囊低剂量组	630	162.40±11.00 ³⁾
蛭蛇通络胶囊中剂量组	1 250	199.07±7.41 ⁴⁾
蛭蛇通络胶囊高剂量组	2 500	220.93±16.10 ⁴⁾
金纳多组	25	236.67±4.24 ⁴⁾

BNIP3L 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$, $P<0.01$); 与 OGD 组比较, 蛭蛇通络胶囊肠吸收液中、高剂量组和依达拉奉组 BNIP3L 蛋白表达明显降低 ($P<0.05$), 蛭蛇通络胶囊肠吸收液高剂量和依达拉奉组 Beclin1 蛋白表达

表 4 蛭蛇通络胶囊对 MCAO 大鼠脑组织中 AMPK/ULK1/Beclin1 信号通路的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Effect of ZSTL on AMPK/ULK1/Beclin1 signaling pathway in brain tissue of MCAO rats ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-AMPK/AMPK	p-ULK1/ULK1	Beclin1/GAPDH	BNIP3L/GAPDH
假手术组		0.45±0.16	0.85±0.17	0.25±0.11	0.47±0.08
模型组		1.03±0.14 ²⁾	1.39±0.37 ¹⁾	0.66±0.12 ²⁾	1.03±0.16 ²⁾
蛭蛇通络胶囊低剂量组	630	0.88±0.03	1.18±0.50	0.51±0.13 ⁴⁾	0.86±0.10 ³⁾
蛭蛇通络胶囊中剂量组	1 250	0.63±0.03 ³⁾	0.98±0.38 ⁴⁾	0.37±0.08 ³⁾	0.73±0.14 ³⁾
蛭蛇通络胶囊高剂量组	2 500	0.43±0.04 ³⁾	0.76±0.20 ³⁾	0.26±0.12 ³⁾	0.42±0.09 ³⁾
金纳多组	25	0.40±0.06 ³⁾	0.77±0.20 ³⁾	0.24±0.12 ³⁾	0.37±0.09 ³⁾

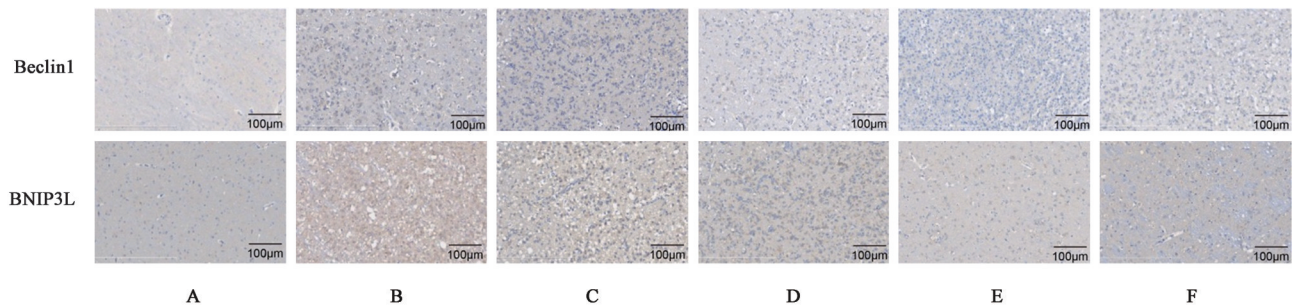


图 5 蛭蛇通络胶囊对 MCAO 大鼠脑组织中 Beclin1 和 BNIP3L 阳性表达的影响 (IHC, ×200)

Fig. 5 Effect of ZSTL on Beclin1 and BNIP3L positive expression in brain tissue of MCAO rats (IHC, ×200)

表 5 蛭蛇通络胶囊对 MCAO 大鼠脑组织中 Beclin1 和 BNIP3L 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effect of ZSTL on Beclin1 and BNIP3L expression in brain tissue of MCAO rat ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Beclin1	BNIP3L
假手术组		0.00±0.00	0.00±0.00
模型组		3.60±0.20 ²⁾	3.33±0.31 ²⁾
蛭蛇通络胶囊低剂量组	630	3.07±0.42	3.20±0.20
蛭蛇通络胶囊中剂量组	1 250	2.13±0.31 ⁴⁾	2.33±0.31 ³⁾
蛭蛇通络胶囊高剂量组	2 500	1.80±0.20 ⁴⁾	2.00±0.20 ⁴⁾
金纳多组	25	2.40±0.35 ⁴⁾	2.40±0.40 ³⁾

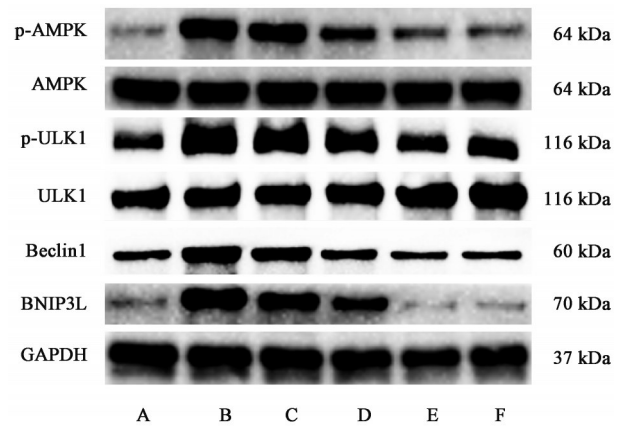


图 4 大鼠脑组织中 p-AMPK、AMPK、p-ULK1、ULK1、Beclin1 和 BNIP3L 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of p-AMPK, AMPK, p-ULK1, ULK1, Beclin1 and BNIP3L protein expressions in rat brain tissue

明显降低 ($P<0.05$)。见表 6、图 6。

4 讨论

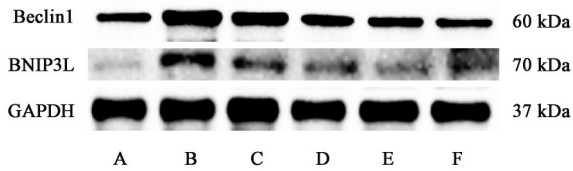
IS 是指脑血管病变导致大脑缺血、缺氧, 进而引发严重的脑组织结构性损伤和神经功能障碍^[2]。蛭蛇通络胶囊在脑血管疾病治疗中疗效确切, 并具有副作用小、价格低廉等优点。研究证实, 蛭蛇通络胶囊可显著缩小脑梗死面积, 其组方中各单味药的活性成分在神经保护及调控 AMPK 信号通路方面表现出协同作用^[20]。例如, 人参皂苷 Rg₁ 可保护神经元免受 OGD 损伤, 并通过调控 AMPK 介导的自噬通路发挥神经保护作用^[21]; 人参与石菖蒲联用

表6 蛭蛇通络胶囊肠吸收液对 OGD 诱导 PC12 细胞损伤中 Beclin1 和 BNIP3L 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ZSTL intestinal absorption liquid on Beclin1 and BNIP3L protein expression in OGD-induced PC12 cell injury ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	Beclin1/GAPDH	BNIP3L/GAPDH
假手术组		0.36±0.13	0.48±0.25
OGD 组		0.69±0.19 ¹⁾	1.20±0.25 ²⁾
蛭蛇通络胶囊肠吸收液低剂量组	0.5 g·L ⁻¹	0.67±0.20	1.08±0.22
蛭蛇通络胶囊肠吸收液中剂量组	1.0 g·L ⁻¹	0.53±0.08	0.84±0.15 ³⁾
蛭蛇通络胶囊肠吸收液高剂量组	2.0 g·L ⁻¹	0.38±0.03 ³⁾	0.68±0.08 ³⁾
依达拉奉组	50 μmol·L ⁻¹	0.41±0.10 ³⁾	0.73±0.07 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与 OGD 组比较³⁾P<0.05



注:A.正常组;B.OGD组;C-E.蛭蛇通络胶囊肠吸收液低、中、高剂量组;F.依达拉奉组

图6 PC12 细胞中 Beclin1 和 BNIP3L 蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of Beclin1 and BNIP3L protein expressions in PC12 cells

可增强神经保护作用^[22]。葛根中的葛根素通过调节 AMPK/ULK1 信号通路,抑制神经元自噬,从而减轻脑组织缺血损伤^[23];葛根与川芎联合用药可有效干预 IS 所致的大脑屏障破坏^[24]。此外,黄芪中的重要活性成分黄芪皂苷 IV 已被广泛应用于脑损伤治疗,可通过调控 AMPK 介导的小胶质细胞极化,进而改善 IS 大鼠脑组织修复^[25];与丹参中的丹参酮联用后,可抑制神经元凋亡,对 IS 大鼠发挥神经保护作用^[26]。本研究构建 MCAO 大鼠模型和 OGD 损伤 PC12 细胞模型,结果表明蛭蛇通络胶囊可以降低 MCAO 大鼠脑缺血面积和神经行为学评分,有效减轻神经元损伤,显著改善脑组织结构和增加尼氏小体数量,进而改善大鼠脑损伤。机制研究表明,蛭蛇通络胶囊通过调控 AMPK/ULK1/Beclin1 信号通路并下调 BNIP3L 的表达,有效抑制 MCAO 大鼠脑损伤和 OGD 诱导的 PC12 细胞损伤,从而发挥神经保护作用。

在 IS 后的修复过程中,神经元再生是恢复脑组织结构和功能的关键环节。IS 可导致神经元凋亡和坏死,进而破坏脑组织结构和功能^[27]。尼氏小体由游离核糖体与粗面内质网组成,是神经元内蛋白质合成的核心结构,其状态是评估神经元损伤程度和脑损伤预后能力的重要指标^[28]。研究表明,IS 后神经元内尼氏小体结构破坏且数量减少,反映神经元蛋白质合成功能降低,进而削弱神经元的自我修

复能力。改善可存活神经元内尼氏小体的结构,增加尼氏小体的数量,有助于减轻脑组织病理损伤并促进神经修复^[29]。本研究结果显示,IS 后出现大量神经元损伤,并伴随尼氏小体数量显著减少;蛭蛇通络胶囊治疗后,神经元损伤程度减轻,尼氏小体数量增加。因此,蛭蛇通络胶囊可通过减轻神经元损伤,增加尼氏小体数量,改善 IS 后脑组织结构损伤。

AMPK 是蛋白激酶家族的丝氨酸-苏氨酸激酶,维持大脑能量代谢稳态,调节基因表达、脂质代谢和蛋白质合成等,且在神经保护过程中发挥关键作用^[30]。在氧化应激、ATP 耗尽或缺血等状态下会激活 AMPK,其激活对脑卒中是有害的,造成脑损伤加重^[4]。给予 AMPK 激活剂后,导致脑卒中后的代谢功能障碍和酸中毒,导致脑梗死面积增加^[31]。ULK1 和 Beclin1 作为 AMPK 的下游底物,参与神经元修复过程^[32]。AMPK 通过磷酸化激活 ULK1 发挥作用,ULK1 作为自噬相关蛋白 1 (Atg1) 的哺乳动物同源物,负责自噬的启动,并激活 Beclin1 的表达^[5]。Beclin1 是哺乳动物中发现的自噬相关蛋白,与仅含 B 细胞淋巴瘤-2 同源结构域 3 (BH3) 的促凋亡蛋白 BNIP3L 共同参与细胞过程^[33]。已有研究表明,大鼠脑缺血后缺血半暗带中 Beclin1 的水平升高,其可能是脑卒中后修复缺血损伤的潜在靶点^[34]。BNIP3L (NIX) 是重要的线粒体外膜受体蛋白,BNIP3L 可直接与微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) 结合以触发线粒体去极化,激活含胱天蛋白酶 (Caspase) 级联反应,导致神经元凋亡。在脑缺血过程中,抑制 BNIP3L 的表达可有效抑制脑损伤^[35]。本研究结果显示,蛭蛇通络胶囊治疗可显著抑制 MCAO 诱导的 AMPK/ULK1/Beclin1 信号通路激活,并在 MCAO 大鼠模型和 OGD 细胞模型中下调 Beclin1 与 BNIP3L 的表达。

综上所述,本研究通过构建 MCAO 大鼠模型和 OGD 损伤 PC12 细胞模型,发现蛭蛇通络胶囊通过

调节 AMPK/ULK1/Beclin1 信号通路,发挥神经保护作用,从而减轻急性 IS 所致缺血性脑损伤。目前已有大量文献表明,直接抑制 AMPK 信号通路是治疗 IS 的有效策略^[36-37]。因此,在后续的研究中,笔者将对该信号通路进行实验验证,并在此基础上,进一步辨识蛭蛇通络胶囊的有效成分,基于该信号通路深入解析其作用原理。本研究为探索拓展蛭蛇通络胶囊的临床适应症提供实验基础,也为治疗急性 IS 的新药开发及保护策略提供理论依据。蛭蛇通络胶囊通过调节 AMPK/ULK1/Beclin1 信号通路减轻 IS 的示意图增强出版附加材料。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] POTTER T B H, TANNOUS J, VAHIDY F S. A contemporary review of epidemiology, risk factors, etiology, and outcomes of premature stroke[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2022,24(12):939-948.
- [2] TU W J, WANG L D, Special Writing Group of China Stroke Surveillance Report. China stroke surveillance report 2021 [J]. *Mil Med Res*, 2023, 10(1):33.
- [3] HANKEY G J. Secondary stroke prevention [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(2):178-194.
- [4] MCCULLOUGH L D, ZENG Z, LI H, et al. Pharmacological inhibition of AMP-activated protein kinase provides neuroprotection in stroke[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(21):20493-20502.
- [5] KIM J, KUNDU M, VIOLLET B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2):132-141.
- [6] 赵泓彰,白敏,汪湛东,等. 大黄-黄连调控 AMPK/ULK1/Beclin1 通路改善 db/db 小鼠肝胰胰岛素抵抗的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(8):9-16.
- ZHAO H Z, BAI M, WANG Z D, et al. Effect and mechanism of Huazhuo Sanjie Chubi decoction on gouty bone erosion model rats based on the PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(8):9-16.
- [7] 李会梅,梁会娟,杨俊. 蛭蛇通络胶囊治疗脑梗死恢复期气虚血瘀证的临床研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22(18):3423-3426.
- LI H M, LIANG H J, YANG J, et al. Clinical research on the treatment of Qi deficiency and blood stasis syndrome during the recovery period of cerebral infarction with Zhishe Tongluo capsules [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2024, 22(18):3423-3426.
- [8] 王志恒,王晓梅,潘婕,等. 蛭蛇通络胶囊治疗中风(气虚血瘀证)的成本效用分析[J]. *中草药*, 2021, 52(15):4649-4657.
- WANG Z H, WANG X M, PAN J, et al. Cost-effectiveness analysis of Zhishe Tongluo capsule in treatment of apoplexy (qi deficiency and blood stasis syndrome) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(15):4649-4657.
- [9] 王永刚,于远望,钟伟,等. 蛭蛇通络胶囊对脑梗死恢复期患者血脂、血液流变学的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2017, 35(10):2492-2494.
- WANG Y G, YU Y W, ZHONG W, et al. Effect of Zhishe Tongluo capsule on blood lipid and blood rheology in patients with cerebral infarction recovery period [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2017, 35(10):2492-2494.
- [10] 王永刚,李彩红,于远望,等. 蛭蛇通络胶囊联合西药治疗缺血性脑卒中恢复期 78 例临床观察[J]. *中医杂志*, 2015, 56(19):1659-1662.
- WANG Y G, LI C H, YU Y W, et al. Clinical observation on Zhishe Tongluo capsule combined with west medicine treating 78 cases of ischemic stroke convalescence phase [J]. *J Tradit Chin Med*, 2015, 56(19):1659-1662.
- [11] LI Y, ZHANG J, LEI Y, et al. Multi-omics approaches reveal the therapeutic mechanism of Naoxintong capsule against ischemic stroke [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 343:119435.
- [12] SOMMER C J. Ischemic stroke: Experimental models and reality [J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(2):245-261.
- [13] 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.
- [14] LI Y, TAN L, YANG C, 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.
- [15] 秦川,谭毅. 医学实验动物学 [M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2020:189-267.
- QIN C, TAN Y. *Medical Laboratory Animal Science* [M]. 3rd ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2020:189-226.
- [16] LI Y, ZHANG J, ZHANG Y, et al. Zhishe Tongluo capsule ameliorates experimental ischemic brain injury through regulating the CALB2/Ca²⁺/PKC pathway and glycerophospholipid metabolism [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 357:120871.
- [17] WANG Y, GUAN X, GAO C L, et al. Medioresinol as a novel PGC-1 α activator prevents pyroptosis of endothelial cells in ischemic stroke through PPAR α -GOT1 axis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 169:105640.
- [18] REMMELE W, STEGNER H E. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue [J]. *Pathologie*, 1987, 8(3):138-140.
- [19] 张旻昱,龚慕辛,杨洪军. 含药肠吸收液:一种新的中药体外药理实验方法 [J]. *中草药*, 2018, 49(15):3457-3462.
- ZHANG M Y, GONG M X, YANG H J. Drug-containing intestinal absorption solution: A new *in vitro* pharmacological method of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2018, 49(15):3457-3462.

- [20] 刘莹,祝琳琳,尤诗晴,等.具有防治脑缺血再灌注损伤的中药有效成分研究进展[J].药学研究,2024,43(8):785-792.
LIU Y, ZHU L L, YOU S Q, et al. Research progress in active ingredients of traditional Chinese medicine prevention and treatment of cerebral ischemia reperfusion injury[J]. J Pharm Res, 2024, 43(8):785-792.
- [21] 龙俊鹏,孙洋,刘莎莎,等.人参皂苷R_{g1}的神经保护作用研究进展[J].药学报,2023,58(1):21-26.
LONG J P, SUN Y, LIU S S, et al. Progress on the neuroprotective effects of ginsenoside R_{g1} [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(1):21-26.
- [22] 祝雨辰,邝柏宇,梁金萍,等.人参、石菖蒲及其药对防治阿尔茨海默症的药理作用研究进展[J].中国药理学通报,2024,40(5):817-822.
ZHU Y C, KUANG B Y, LIANG J P, et al. Advances in pharmacological effects of ginseng, *Acorus calamus* and its couplet medicine on Alzheimer's disease[J]. Chin Pharmacol Bull, 2024, 40(5):817-822.
- [23] 黄亚光,王金凤,杜利鹏,等.葛根素调节AMPK-mTOR信号通路抑制自噬改善大鼠脑缺血再灌注损伤研究[J].中草药,2019,50(13):3127-3133.
HUANG Y G, WANG J F, DU L P, et al. Effect of puerarin on regulation of AMPK-mTOR signaling pathway to inhibit autophagy and alleviate focal cerebral ischemia reperfusion injury[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(13):3127-3133.
- [24] CHEN R, WU P, CAI Z, et al. Puerariae Lobatae Radix with Chuanxiong rhizoma for treatment of cerebral ischemic stroke by remodeling gut microbiota to regulate the brain-gut barriers [J]. J Nutr Biochem, 2019, 65:101-114.
- [25] LI M C, JIA J T, WANG Y X, et al. Astragaloside IV promotes cerebral tissue restoration through activating AMPK-mediated microglia polarization in ischemic stroke rats[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 334:118532.
- [26] 石圆圆,傅德望.黄芪甲苷IV联合丹参酮II_A对缺血性脑卒中大鼠神经保护作用[J].锦州医科大学学报,2025,46(1):39-44.
SHI Y Y, FU D W. Neuroprotective effect and mechanism of astragaloside IV and tanshinone II_A on rats with ischemic stroke[J]. J China Med Univ, 2025, 46(1):39-44.
- [27] ZHAO Y, ZHANG X, CHEN X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review)[J]. Int J Mol Med, 2022, 49(2):15.
- [28] LUO L, LIU M, FAN Y, et al. Intermittent theta-burst stimulation improves motor function by inhibiting neuronal pyroptosis and regulating microglial polarization via TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway in cerebral ischemic mice [J]. J Neuroinflammation, 2022, 19(1):141.
- [29] XU Z, LI Y, PI P, et al. *B. glomerulata* promotes neuroprotection against ischemic stroke by inhibiting apoptosis through the activation of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Phytomedicine, 2024, 132:155817.
- [30] HANG L, THUNDYIL J, LIM K L. Mitochondrial dysfunction and Parkinson disease: A Parkin-AMPK alliance in neuroprotection[J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1350:37-47.
- [31] LI J, BENASHSKI S E, VENNA V R, et al. Effects of metformin in experimental stroke [J]. Stroke, 2010, 41(11):2645-2652.
- [32] MO Y, SUN Y Y, LIU K Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke [J]. Neural Regen Res, 2020, 15(8):1388-1396.
- [33] YAZDANKHAH M, GHOSH S, SHANG P, et al. BNIP3L-mediated mitophagy is required for mitochondrial remodeling during the differentiation of optic nerve oligodendrocytes[J]. Autophagy, 2021, 17(10):3140-3159.
- [34] RAMI A. Upregulation of Beclin1 in the ischemic penumbra [J]. Autophagy, 2008, 4(2):227-229.
- [35] LI Y, ZHENG W, LU Y, et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy: Molecular mechanisms and implications for human disease[J]. Cell Death Dis, 2021, 13(1):14.
- [36] JIANG S, LI T, JI T, et al. AMPK: Potential therapeutic target for ischemic stroke [J]. Theranostics, 2018, 8(16):4535-4551.
- [37] MA Y, BU J, DANG H, et al. Inhibition of adenosine monophosphate-activated protein kinase reduces glial cell-mediated inflammation and induces the expression of Cx43 in astroglia after cerebral ischemia [J]. Brain Res, 2015, 1605:1-11.

[责任编辑 孙丛丛]