

本文引用: 李晓凤, 田梦芝, 陈笑一, 彭南波, 陈思远, 杜可. 姜黄素通过 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  通路调控氧糖剥夺 PC12 细胞自噬的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(5): 836-844.

## 姜黄素通过 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$ 通路调控氧糖剥夺 PC12 细胞自噬的机制研究

李晓凤<sup>1,2</sup>, 田梦芝<sup>1</sup>, 陈笑一<sup>1</sup>, 彭南波<sup>1</sup>, 陈思远<sup>1</sup>, 杜可<sup>1\*</sup>

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 长沙市中心医院, 湖南长沙 410004

**[摘要]** **目的** 探讨姜黄素对氧糖剥夺(OGD)诱导的 PC12 细胞自噬损伤的保护作用及其机制。**方法** 通过体外建立 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤模型, 将 PC12 细胞分为 CON 组、OGD 组、右美托咪啶(DEX)组和姜黄素低、中、高剂量组。除 CON 组外, 其余各组均换 DMEM 无糖培养基, 并且在 94%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub> 条件下培养 6 h 进行 OGD 处理。姜黄素低、中、高剂量组和 DEX 组分别加入 1.25、5、20  $\mu$ mol/L 浓度的姜黄素以及 0.5  $\mu$ mol/L 的 DEX 干预 12 h。采用 MTT 法检测 PC12 细胞存活率; 透射电子显微镜观察姜黄素处理后的自噬小体及自噬溶酶体; MDC 荧光染色法观察自噬小体的荧光强度; Western blot 检测微管相关蛋白轻链 3(LC3)-II/LC3-I、苊氯素 1(Beclin-1)、整合体 1(p62)、磷酸化蛋白激酶 B/蛋白激酶 B(p-Akt/Akt)、磷酸化雷帕霉素/雷帕霉素(p-mTOR/mTOR)、缺氧诱导因子 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )等自噬相关蛋白表达情况。**结果** 与 CON 组相比, OGD 组细胞存活率显著降低( $P<0.01$ ), PC12 细胞自噬小体荧光强度显著增强( $P<0.01$ ); LC3-II/LC3-I、Beclin-1、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达显著升高( $P<0.01$ ), p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达显著降低( $P<0.01$ )。与 OGD 组相比, 姜黄素低、中、高剂量组及 DEX 组细胞存活率均升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); PC12 细胞自噬小体荧光强度减弱( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。与 OGD 组相比, 姜黄素低、中剂量组及 DEX 组 LC3-II/LC3-I、Beclin-1、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ), p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达显著升高( $P<0.01$ )。**结论** 姜黄素的低、中剂量组可通过激活 Akt/mTOR 通路, 继而影响 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达, 抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤, 从而发挥抗神经元自噬损伤的保护作用。

**[关键词]** 姜黄素; 氧糖剥夺; 细胞自噬; 右美托咪啶; Akt/mTOR/HIF- $\alpha$  通路; 自噬损伤

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.05.008

## Mechanism of curcumin in regulating autophagy in oxygen-glucose deprived PC12 cells through the Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$ pathway

LI Xiaofeng<sup>1,2</sup>, TIAN Mengzhi<sup>1</sup>, CHEN Xiaoyi<sup>1</sup>, PENG Nanbo<sup>1</sup>, CHEN Siyuan<sup>1</sup>, DU Ke<sup>1\*</sup>

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Changsha Central Hospital, Changsha, Hunan 410004, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effects of curcumin on oxygen-glucose deprivation (OGD)-induced autophagic injury in PC12 cells and its mechanism. **Methods** An in vitro OGD-induced autophagic injury model was established in PC12 cells, and the PC12 cells were divided into CON group, OGD group, dexmedetomidine (DEX) group, and low-, medium-, and high-dose curcumin groups. Except for the CON group, cells in all other groups were switched to glucose-free DMEM medium and subsequently subjected to OGD treatment by incubating them for six hours under conditions of 94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, and 1% O<sub>2</sub>. The low-, medium-, and high-dose curcumin groups, along with the DEX group, were respectively intervened with curcumin at concentrations of 1.25, 5, and 20  $\mu$ mol/L, as well as 0.5  $\mu$ mol/L DEX for 12 hours. The viability of PC12 cells was measured using the MTT assay. Transmission electron microscope was used to observe autophagosomes and autolysosomes following curcumin

**[收稿日期]** 2025-03-04

**[基金项目]** 湖南省自然科学基金项目(2025JJ80168); 湖南省普通高等学校教学改革研究项目(HNJC-2022-0134); 湖南中医药大学学科建设“揭榜挂帅”项目(22JBZ020)。

**[通信作者]** \* 杜可, 女, 博士, 副教授, E-mail: DKKTZTG@163.com。

treatment, and the MDC staining method was employed to observe the fluorescence intensity of autophagosomes. Western blot was conducted to determine the relative expression levels of autophagy-related proteins, including microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II/LC3-I, Beclin-1, sequestosome 1 (p62), phosphorylated protein kinase B/protein kinase B (p-Akt/Akt), phosphorylated mammalian target of rapamycin/mammalian target of rapamycin (p-mTOR/mTOR), and hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). **Results** Compared with the CON group, the OGD group exhibited a significantly reduced cell viability ( $P<0.01$ ) and a markedly enhanced fluorescent intensity of autophagosomes in PC12 cells ( $P<0.01$ ). The protein expression levels of LC3-II/LC3-I, Beclin-1, and HIF-1 $\alpha$  were significantly upregulated ( $P<0.01$ ), while those of p62, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR were significantly downregulated ( $P<0.01$ ). Compared with the OGD group, the low-, medium-, and high-dose curcumin groups and the DEX group exhibited increased cell viability ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and reduced autophagic fluorescence intensity in PC12 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the OGD group, the low- and medium-dose curcumin groups and the DEX group demonstrated significantly decreased protein expressions of LC3-II/LC3-I, Beclin-1, and HIF-1 $\alpha$  ( $P<0.01$ ), along with significantly elevated protein expressions of p62, p-Akt/Akt, and p-mTOR/mTOR ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The low- and medium-dose curcumin groups can exert protective effects against neuronal autophagic injury by activating the Akt/mTOR pathway, subsequently modulating HIF-1 $\alpha$  protein expression and inhibiting OGD-induced autophagic injury in PC12 cells.

[**Keywords**] curcumin; oxygen-glucose deprivation; autophagy; dexmedetomidine; Akt/mTOR/HIF- $\alpha$  pathway; autophagic injury

中风是全球第二大死亡病因,也是获得性残疾的主要病因,分为缺血性和出血性两大类<sup>[1]</sup>。缺血性脑卒中(ischemia stroke, IS)是局部脑组织区域血液供应障碍,属于中医学“中风病”范畴,可导致脑组织缺血缺氧性病变坏死、神经元损伤及代谢障碍疾病<sup>[2]</sup>。IS具有高致死率、致残率的特点,且病理机制复杂。王永炎院士提出的“毒损脑络”理论,总结了缺血性中风的病因病机为瘀毒互结<sup>[3]</sup>。已有研究证实,活血化瘀类中药能有效调控自噬相关信号因子及通路<sup>[4]</sup>。氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)是常用的IS体外模型<sup>[5]</sup>。PC12细胞系可被神经生长因子诱导后分化为具有交感神经元特性的细胞,故常用于缺血缺氧损伤的研究<sup>[6-7]</sup>。因此,本实验采用OGD诱导的PC12细胞模型进行体外研究。

细胞自噬又称II型程序性细胞死亡,是真核细胞特有的、依赖于溶酶体或液泡的细胞内降解过程<sup>[8]</sup>。大量研究提示,细胞自噬与IS的发生、发展密切相关,是一把“双刃剑”<sup>[2]</sup>。适度的细胞自噬发生时,通过自噬小体——溶酶体降解过程去除长寿或受损的细胞器、蛋白质聚集物和多余的细胞成分,以此减轻细胞应激,维持细胞内稳态<sup>[5]</sup>。当自噬反应过度激活,会造成细胞中健康细胞器与其他关键蛋白降解,导致细胞的死亡及功能紊乱,还可诱发加重疾病<sup>[9]</sup>。据相关研究表明,缺糖缺氧与细胞自噬之间呈现出显著的相关性<sup>[10-11]</sup>。蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路可进行细胞自噬调控<sup>[12]</sup>。缺

氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是Akt或者mTOR下游的一个靶蛋白<sup>[13]</sup>。研究表明,HIF-1 $\alpha$ 的敲除导致细胞自噬水平显著降低,且与神经保护密切相关<sup>[14-15]</sup>。以上提示,Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$ 信号通路可能在自噬的过程中发挥关键作用。

姜黄素是从姜科植物姜黄、郁金、莪术等的根茎中提取出来的一种多酚类活性成分,具有镇痛、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等多种生物活性功效<sup>[16]</sup>,还可通过多种途径发挥抗氧化应激、抗炎、促进细胞凋亡等药理作用<sup>[17]</sup>。目前,多项研究表明姜黄素具有抗炎、抗凋亡、抗氧化损伤等神经保护作用,但有关其调控细胞自噬抗脑缺血损伤的研究尚不多<sup>[18-24]</sup>。且姜黄素具有安全无毒、人体耐受性好、易于获取且价格低廉等诸多优势,即使12 g/d连续服用3个月以上,亦不会造成肝肾实质性损伤<sup>[25]</sup>。鉴于姜黄素在脑缺血损伤中潜在的应用前景,可开展科学实验进一步探究明确其具体的作用及其机制,以期姜黄素的二次研发积累一定的实验室数据。

本研究拟构建OGD诱导的PC12细胞模型,通过体外实验MTT法测定细胞存活率,透射电镜观察自噬小体、自噬溶酶体;MDC法观测自噬小体荧光强度;Western blot检测微管相关蛋白轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)-II/LC3-I、 $\beta$ -微管素1(Beclin-1)、整合体1(sequestosome 1, p62)、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、HIF-1 $\alpha$ 自噬相关蛋白表达情况,以期明确姜黄素对OGD诱导的PC12细胞自噬损伤的影响。

## 1 材料

### 1.1 细胞

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 PC12 细胞株(商品号:TCR9),购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要药品与试剂

姜黄素、盐酸右美托咪定(dexmedetomidine, DEX)(货号:B20614、B34611,上海源叶生物科技有限公司);胎牛血清、DMEM 高糖基础培养基、DMEM 无糖基础培养基(货号:164210-50、PM150210、PM150270,武汉普诺赛生命科技有限公司);BCA 试剂盒(批号:BL521A,安徽兰杰柯科技有限公司);青链霉素混合液(100X)、细胞自噬检测试剂盒(批号:P1400、20221217,北京索莱宝有限公司);2.5%戊二醛、无蛋白快速封闭液、预染蛋白 Mark X(货号:CR2405027、G2052、MPC2408042,塞维尔生物科技有限公司);Plastic gel 预制胶 Tris-Gly 4-15%(批号:PSG2001-415F,万生昊天生物公司)。

羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(批号:D20802-25、D21207-05,北京莱阔生物科技有限公司);二甲基亚砜、MTT(噻唑蓝)(货号:D8371、M8180,北京索莱宝有限公司);mTOR、p-mTOR、LC3、Beclin-1、 $\beta$ -actin、Akt、p-Akt 一抗(货号:66888-1-Ig、67778-1-Ig、14600-1-Ig、66665-1-Ig、66009-1-Ig、60203-2-Ig-IgG1、66444-1-Ig-IgG1,武汉三鹰生物技术有限公司);HIF-1 $\alpha$  一抗(货号:ab179483,英国 Abcam 公司);蛋白酶抑制剂 PMSF(批号:21355980,安徽兰杰柯科技有限公司)。

### 1.3 主要仪器

超净工作台(型号:SJ-CJ-2FD,苏州苏洁净化设备有限公司);倒置显微镜(型号:AE2000,麦克奥迪实业集团有限公司);CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(型号:NU-5810E,苏州纽艾设备有限公司);三气培养箱(型号:150i,美国 Thermo Fisher 公司);酶标仪、多功能微孔板检测系统(型号:ELX800、Cytation™ 5,美国 Bio-Tek 公司);红外荧光扫描成像系统(型号:Odyssey CLX,美国 LI-COR 公司);电泳仪、转膜仪(型号:JY-600HE 型、JY-ZY5 型,北京君意东方电泳设备有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

PC12 细胞置于 37 °C 水浴箱中迅速复苏,将其接种于含有 10% 的胎牛血清、1% 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中,置于 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 及湿度饱和的培养箱中常规培养,适时换液,经 1~2 次传代后,收集对数期细胞备用。

### 2.2 OGD 诱导 PC12 细胞自噬损伤模型的制备

从培养箱中取出 PC12 细胞,弃去高糖培养液,用 PBS 清洗 2 遍,加入适量的 DMEM 无糖基础培养基(缺糖),放置于 94%N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub> 条件下缺氧处理 6 h<sup>[26-27]</sup>。

### 2.3 MTT 法检测细胞的存活率

分组及给药处理:收集对数增长期细胞,以 5×10<sup>3</sup> 个/孔接种于 96 孔板。设置 CON 组、OGD 组、DEX 组和姜黄素低、中、高剂量组,共计 6 组,每组 5 个复孔,每孔接种 100  $\mu$ L 细胞。37 °C、5%CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱下继续培养 24 h。根据预实验结果,姜黄素组低、中、高剂量组分别加入 1.25、5、20  $\mu$ mol/L 浓度的姜黄素进行干预,DEX 组加入 0.5  $\mu$ mol/L 的 DEX,加药干预 12 h。加药干预 12 h 后,除 CON 组外,其余各组均换为 DMEM 无糖培养基,并且于 94% N<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、1%O<sub>2</sub> 条件下培养 6 h 进行 OGD 处理。

采用 MTT 法检测细胞存活率:每孔加入 0.5 mg/mL MTT 100  $\mu$ L。37 °C 孵育 4 h,吸弃培养基,每孔再加入 100  $\mu$ L 二甲基亚砜,酶标仪振荡 10 min,于 490 nm 波长处测定各组吸光度(A)值,计算各组细胞存活率(R)<sup>[26-27]</sup>。R=[(A<sub>实验</sub>-A<sub>空白</sub>)/(A<sub>正常对照</sub>-A<sub>空白</sub>)]×100%。

### 2.4 透射电镜观察 PC12 细胞自噬小体和自噬溶酶体

细胞以 1.5×10<sup>6</sup> 个/mL 的密度接种于 6 cm 的培养皿中,按“2.3”中的分组方法进行培养,弃除旧培养基,用含 EDTA 的胰酶消化细胞,收集至 1.5 mL 棕色离心管,4 °C、1 000 r/min 离心 10 min。离心后弃上清液,细胞团用 2.5%戊二醛固定液进行重悬,置于 4 °C 冰箱中保存过夜。

### 2.5 MDC 荧光法观察 PC12 细胞自噬小体

细胞以 1×10<sup>6</sup> 个/mL 的密度接种于 6 孔板,按

“2.3”中的分组方法进行培养,各组处理后,弃旧培养基,PBS清洗2次,加入100  $\mu\text{L}$  MDC 荧光染色液,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育15 min;吸弃染色液,PBS清洗3次,细胞成像多功能检测仪 CFP 20倍镜下观察各组自噬小体的荧光斑点,拍照记录,用 ImageJ 软件分析并计算荧光强度。

## 2.6 Western blot 检测 LC3-II/LC3-I、p62、Beclin-1、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR、HIF-1 $\alpha$ 蛋白的表达情况

收集对数增长期细胞,以  $2.5 \times 10^6$  个/mL 密度接种于 10 cm 培养皿中。按“2.3”中的分组方法进行培养处理后,弃除旧培养基,预冷 PBS 清洗2次,在含有 1% PMSF 的 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液(即为细胞总蛋白)。BCA 法定量、SDS-PAGE 电泳后蛋白转至 PVDF 膜,快速封闭液封闭 5 min, TBST 洗膜,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育一抗(稀释比 1:1 000)过夜。次日 TBST 洗膜,室温避光孵育二抗(稀释比 1:10 000)1.5 h。Odyssey CLX 双色红外荧光扫描成像系统分析 Beclin-1、LC3-II/LC3-I、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达情况, $\beta$ -actin 为内参。计算相对灰度值及 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 的比值。

## 2.7 统计学分析

采用 Graphpad prism 9.5 和 SPSS 26.0 软件进行统计学数据处理及分析,两组间比较采用  $t$  检验,结果均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组细胞存活率比较

与 CON 组相比,OGD 组细胞存活率显著降低( $P < 0.01$ );与 OGD 组相比,姜黄素低、中、高剂量组及 DEX 组细胞存活率均升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。与 DEX 组比较,姜黄素低、高剂量组细胞存活率降低( $P < 0.05$ )。详见图 1。

### 3.2 各组细胞自噬小体及自噬溶酶体情况

CON 组细胞形态正常,细胞内基质均匀,细胞膜结构清晰,膜上可见密集的微绒毛,有极少量的自噬空泡及自噬小体。与 CON 组相比,OGD 组细胞自噬损伤程度明显,细胞形态不规则,有大量的自噬溶

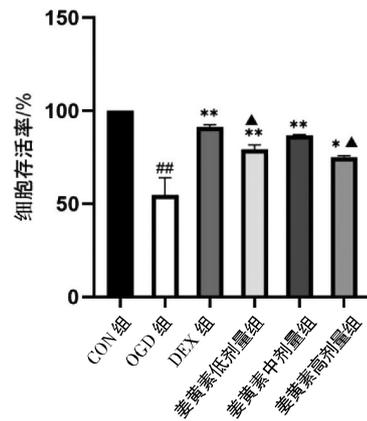


图 1 各组细胞存活率情况 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig.1 Cell viability of each group ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

注:与 CON 组比较,  $\#P < 0.01$ ;与 OGD 组比较,  $*P < 0.05, **P < 0.01$ ;与 DEX 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

酶体、自噬空泡和自噬小体存在。DEX 组和姜黄素中剂量组自噬程度较轻,细胞质轻微不均匀,未见自噬小体存在,有少量的自噬溶酶体和自噬空泡。姜黄素低、高剂量组轻度自噬,有较多的自噬溶酶体、自噬空泡和自噬小体。详见图 2。

### 3.3 各组 PC12 细胞自噬小体情况

CON 组可见少量荧光斑点,荧光强度减弱;与 CON 组相比,OGD 组荧光斑点增多,且荧光强度显著增强( $P < 0.01$ );与 OGD 组相比,姜黄素低、中、高剂量组和 DEX 组荧光斑点减少,荧光强度减弱( $P < 0.05, P < 0.01$ );与 DEX 组和姜黄素低、中剂量组相比,姜黄素高剂量组荧光强度增强( $P < 0.05$ )。详见图 3—4。

### 3.4 各组细胞自噬相关蛋白表达情况

与 CON 组相比,OGD 组细胞中 LC3-II/LC3-I、Beclin-1、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ ),p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ )。与 OGD 组相比,姜黄素低、中剂量组和 DEX 组细胞中 LC3-II/LC3-I、Beclin-1、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达显著升高( $P < 0.01$ );姜黄素高剂量组 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),p-Akt/Akt 蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。与 DEX 组和姜黄素低、中剂量组比较,姜黄素高剂量组 LC3-II/LC3-I、Beclin-1、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达升高( $P < 0.05, P < 0.01$ ),p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 蛋白表达降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。详见图 5。

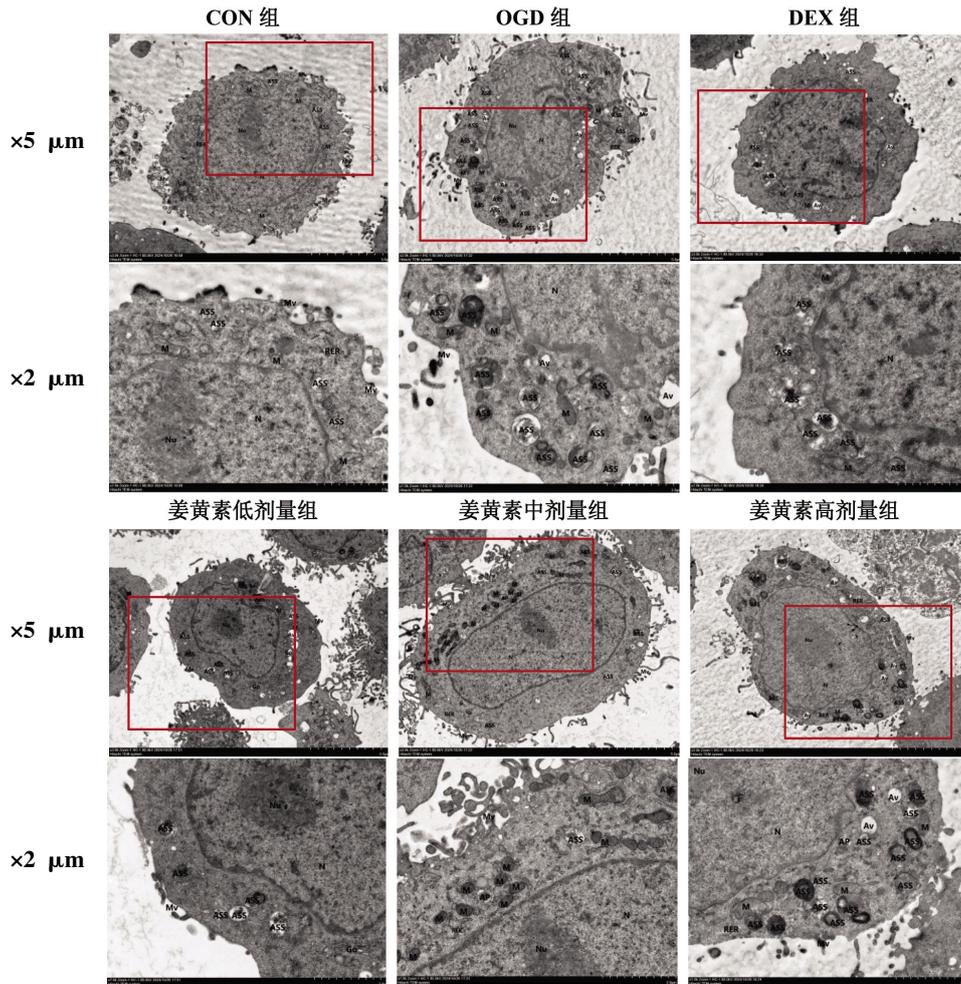


图 2 透射电镜观察各组细胞自噬小体及自噬溶酶体

Fig.2 Autophagosomes and autolysosomes of cells in each group observed by transmission electron microscopy  
注:图中红框为选定放大区域。

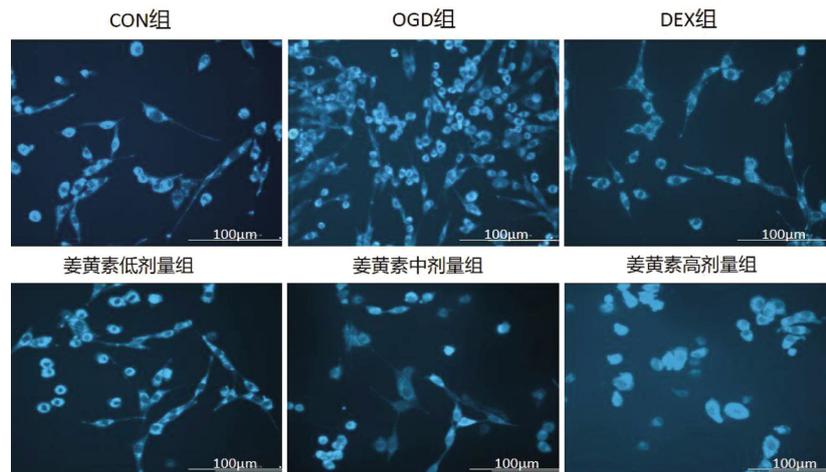


图 3 MDC 荧光染色观察各组 PC12 细胞自噬小体的情况( $\bar{x} \pm s, n=3, \times 20$ )

Fig.3 Autophagosomes of PC12 cells in each group observed by MDC fluorescence staining ( $\bar{x} \pm s, n=3, \times 20$ )

### 4 讨论

IS 因脑部血管缺血,致大脑供血及供能不足,引发神经元不可逆性损伤坏死。其具有发病率高、

死亡率高和致残率高的特点,为我国带来了沉重的经济负担<sup>[28]</sup>。OGD 是 IS 经典的体外模型<sup>[5]</sup>。细胞自噬是细胞通过溶酶体系统清除自身废物、维持细胞内环境稳态的重要机制<sup>[29]</sup>。研究表明,IS 后会诱发自

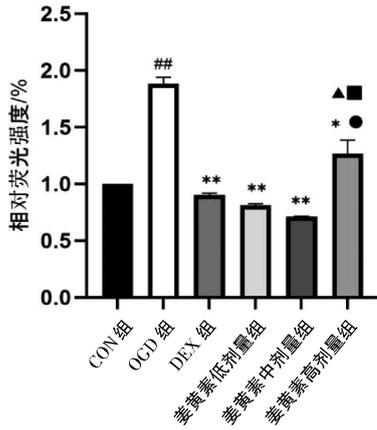


图4 各组细胞相对荧光强度( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig.4 Relative fluorescence intensity in each group of cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

注:与 CON 组比较,## $P<0.01$ ;与 OGD 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 DEX 组比较,▲ $P<0.05$ ;与姜黄素低剂量组比较,■ $P<0.05$ ;与姜黄素中剂量组比较,● $P<0.05$ 。

噬,且自噬贯穿 IS 病理过程,在其急性期、亚急性期、恢复期和后遗症期 4 个分期中发挥不同的调控作用<sup>[30]</sup>。据研究证明,适度激活海马神经元自噬,可保护神经元免受缺血损伤<sup>[31]</sup>,而过度自噬导致皮质神经元和 SH-SY5Y 细胞自噬损伤<sup>[32]</sup>。姜黄素作为传统活血化瘀类的中药单体,其具备脂溶性高、易透过血脑屏障,并具有经济成本低、效果显著等特点。多项研究表明,其能清除自由基、抑制血小板聚集、抑制炎症因子产生等原发作用继而发挥神经保护作用<sup>[16-22]</sup>。本研究旨在通过 PC12 细胞 OGD 体外模型,探讨姜黄素是否通过 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  通路调控细胞自噬抗 OGD 损伤。

Beclin-1、LC3 和 P62 蛋白水平是自噬作用的重要检测指标。Beclin-1 是一个成熟的自噬调节因子,与细胞自噬呈正相关。Beclin-1 与激酶激活蛋

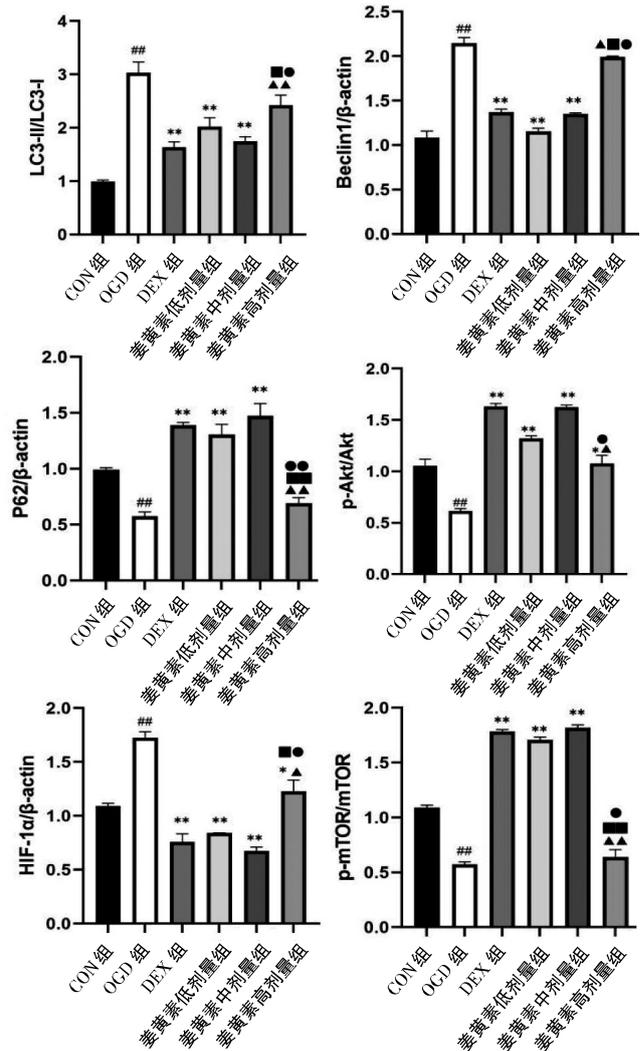
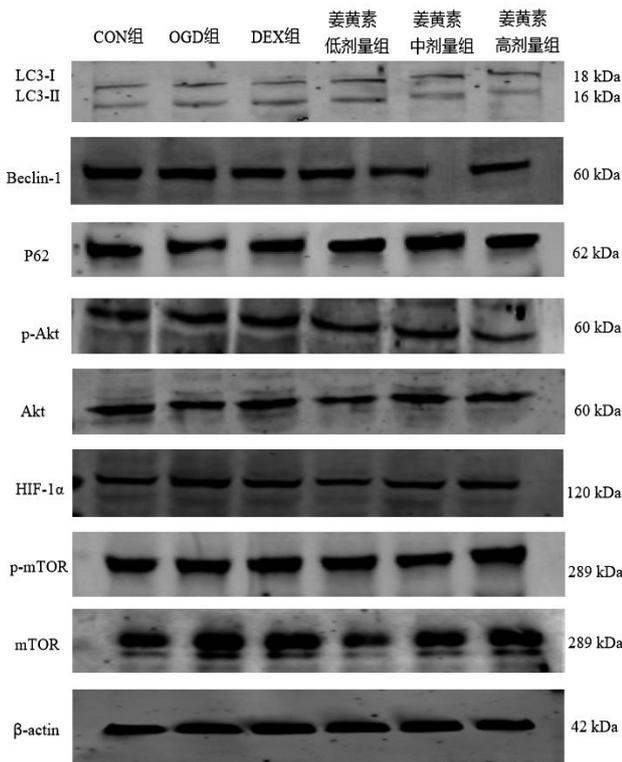


图5 各组细胞自噬相关蛋白表达情况( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig.5 Expression of autophagy-related proteins in each group ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

注:与 CON 组比较,## $P<0.01$ ;与 OGD 组比较,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ ;与 DEX 组比较,▲ $P<0.05$ ,▲▲ $P<0.01$ ;与姜黄素低剂量组比较,■ $P<0.05$ ,■■ $P<0.01$ ;与姜黄素中剂量组比较,● $P<0.05$ ,●● $P<0.01$ 。

白、磷脂酰肌醇 3-激酶、自噬相关蛋白 (autophagy-related protein, ATG)14 等蛋白发生相互作用,进而协同执行细胞自噬和膜运输的重要功能<sup>[33]</sup>。LC3 是酵母中的泛素样修饰剂 ATG8 的同源物,参与自噬。LC3 蛋白合成后被 ATG4 家族蛋白切割掉 C 端 5 肽,暴露甘氨酸残基,产生胞浆定位的 LC3-I; LC3-I 会被包括 Atg7 和 Atg3 在内的泛素样体系修饰和加工,随后与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3-II<sup>[34]</sup>。LC3-II/LC3-I 比值升高表明自噬水平升高<sup>[35]</sup>。p62 是反映自噬活性的标记蛋白,其蛋白的水平与自噬呈负相关,即出现自噬时,在细胞质中 p62 蛋白不断被降解;当自噬活性减弱、自噬功能缺陷时,p62 蛋白会在细胞质中不断累积<sup>[36]</sup>。Akt 位于一个级联信号通路的顶端<sup>[37]</sup>,通过与溶酶体蛋白 2 结合,参与抑制自噬体形成和溶酶体积累,可以直接或间接使 mTOR 磷酸化<sup>[38]</sup>。mTOR 是一种相对分子质量为 289 kDa 的非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可形成 mTORC1 和 mTORC2 两种不同复合物<sup>[39]</sup>。自噬启动因子由 Atg13、Unc-51 样激酶、抑癌基因 RB1 诱导卷曲螺旋 1 组成,mTOR 能高度磷酸化 Atg13,使 Atg13 与 Unc-51 样激酶分离,降低 Unc-51 样激酶的活性,从而抑制细胞自噬,是自噬调控的中心蛋白<sup>[40]</sup>。研究表明,p-Akt、p-mTOR 可以减轻 OGD 损伤,发挥保护细胞的作用<sup>[41]</sup>。HIF-1 $\alpha$  是在缺血缺氧的病理状态下表达的一种关键转录调节因子<sup>[42]</sup>,位于 mTOR 下游。在缺氧条件下,HIF-1 $\alpha$  在细胞内积累,并转运至细胞核中。mTOR 调控 HIF-1 $\alpha$  mRNA 的合成与蛋白的表达<sup>[43]</sup>。研究表明,抑制 HIF-1 $\alpha$  的表达或基因敲除可抑制细胞自噬,增加细胞活力<sup>[44,44]</sup>,说明 HIF-1 $\alpha$  与神经元自噬调控相关。综上,Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  可能参与了细胞自噬的调控。

DEX 是近年来应用于临床麻醉和镇静的新型、高选择性  $\alpha$ 2 肾上腺素受体激动剂<sup>[45]</sup>。研究提示,DEX 对海马和皮质缺血损伤具有保护作用<sup>[46]</sup>,且其神经保护作用与激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路和下调 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达有关<sup>[47-48]</sup>。故本研究选择 DEX 作为本研究的阳性对照药。据本研究结果显示,OGD 诱导细胞后,细胞存活率显著降低,自噬小体及自噬溶酶体显著增多,MDC 荧光斑点及强度显著增强,LC3-II/LC3-I、Beclin-1、HIF-1 $\alpha$  的表达量显著上

调,p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 显著下调,提示 OGD 可激活 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  通路,增强细胞自噬。经过 DEX 和姜黄素低、中剂量处理后,上述指标逆转,被 OGD 诱导的 PC12 细胞存活率升高,细胞自噬小体、自噬溶酶体数量及荧光斑点、荧光强度降低,并下调 Beclin-1、LC3-II/LC3-I、HIF-1 $\alpha$  蛋白相对表达量,p62、p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 上调。这表明姜黄素可抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤,与调控 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  信号通路有关。

综上所述,姜黄素可能通过 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  通路,抑制 OGD 诱导的 PC12 细胞自噬损伤。从西医机制论述,姜黄素通过抑制细胞自噬发挥神经保护作用;从中医角度论述,姜黄素通过发挥活血化瘀、阻止瘀毒侵蚀,使脑络通、气血畅,达“驱邪扶正”之效。近年研究提示,mTOR 是缺血损伤细胞自噬调控的关键激酶<sup>[5]</sup>。经由 mTOR 调控的信号通路主要包括 3 条,其中 Akt 和丝裂原活化蛋白激酶信号转导可激活 mTOR 从而抑制细胞自噬<sup>[49]</sup>,而丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶信号转导则抑制 mTOR 促进细胞自噬等<sup>[50]</sup>。同时存在线粒体损伤时,PTEN 基因诱导激酶 1 稳定并招募 E3 连接酶帕金蛋白,启动的线粒体自噬机制<sup>[51]</sup>。另外,自噬和焦亡、铜死亡、铁死亡之间亦存在串话机制。后续可深入探究姜黄素抗细胞自噬的其他机制,明确 IS 缺血损伤的现代病理分子机制,以期为后续研究及临床治疗提供一定参考靶标和思路。

## 参考文献

- [1] CAMPBELL B C V, DE SILVA D A, MACLEOD M R, et al. Ischaemic stroke[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2019, 5: 70.
- [2] ZHAO Y F, ZHANG X J, CHEN X Y, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment(Review)[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2022, 49(2): 15.
- [3] 张锦,张允岭,郭蓉娟,等.从“毒损脑络”到“毒损络脉”的理论探讨[C]//北京中医药学会.北京中医药学会 2013 年学术年会论文汇编.北京:北京中医药学会,2013: 72-77.
- [4] WANG J H, ZOU J B, SHI Y J, et al. Traditional Chinese medicine and mitophagy: A novel approach for cardiovascular disease management[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155472.
- [5] AJOOLABADY A, WANG S Y, KROEMER G, et al. Targeting

- autophagy in ischemic stroke: From molecular mechanisms to clinical therapeutics[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 225: 107848.
- [6] WIATRAK B, KUBIS-KUBIAK A, PIWOWAR A, et al. PC12 cell line: Cell types, coating of culture vessels, differentiation and other culture conditions[J]. *Cells*, 2020, 9(4): 958.
- [7] HADIPOUR E, FEREDONI M, TAYARANI-NAJARAN Z. Betanin attenuates oxidative stress induced by 6-OHDA in PC12 cells via SAPK/JNK and PI3K pathways[J]. *Neurochemical Research*, 2020, 45(2): 395-403.
- [8] JUENEMANN K, REITS E A. Alternative macroautophagic pathways[J]. *International Journal of Cell Biology*, 2012, 2012(1): 189794.
- [9] TIAN F F, DEGUCHI K, YAMASHITA T, et al. In vivo imaging of autophagy in a mouse stroke model[J]. *Autophagy*, 2010, 6(8): 1107-1114.
- [10] ZHOU T E, LIANG L, LIANG Y R, et al. Mild hypothermia protects hippocampal neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced injury by improving lysosomal function and autophagic flux[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 358(2): 147-160.
- [11] ZHANG L, WANG Y, PAN R L, et al. Neuritin attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced neuronal injury by promoting autophagic flux[J]. *Experimental Cell Research*, 2021, 407(2): 112832.
- [12] ZHANG H C, XIE W Y, FENG Y, et al. Stromal interaction molecule 1-mediated store-operated calcium entry promotes autophagy through AKT/mammalian target of rapamycin pathway in hippocampal neurons after ischemic stroke[J]. *Neuroscience*, 2023, 514: 67-78.
- [13] ZHANG E Y, FENG X W, LIU F, et al. Roles of PI3K/Akt and c-Jun signaling pathways in human papillomavirus type 16 oncoprotein-induced HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and IL-8 expression and in vitro angiogenesis in non-small cell lung cancer cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e103440.
- [14] WEN Y D, SHENG R, ZHANG L S, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 762-769.
- [15] XIE J, ZHANG Y, LI B, et al. Inhibition of OGFOD1 by FG4592 confers neuroprotection by activating unfolded protein response and autophagy after ischemic stroke[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2024, 22(1): 248.
- [16] 张忠胜, 黄晓敏, 邓小凤. 姜黄素通过调控 NLRP3/Caspase-1 信号通路改善脑缺血大鼠神经功能障碍[J]. *中医药临床杂志*, 2023, 35(1): 104-109.
- [17] BAI X M, SONG Y B, ZHANG X Y, et al. Curcumin ameliorates ischemic stroke injury by downregulating GMFB expression: An in vitro study[J]. *Biomolecules and Biomedicine*, 2025, 25(3): 578-587.
- [18] FAN F, LEI M. Mechanisms underlying curcumin-induced neuroprotection in cerebral ischemia[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 893118.
- [19] LI Y, LI J, LI S S, et al. Curcumin attenuates glutamate neurotoxicity in the hippocampus by suppression of ER stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in a manner dependent on AMPK[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2015, 286(1): 53-63.
- [20] LIU L, ZHANG W C, WANG L, et al. Curcumin prevents cerebral ischemia reperfusion injury via increase of mitochondrial biogenesis[J]. *Neurochemical Research*, 2014, 39(7): 1322-1331.
- [21] WANG B F, CUI Z W, ZHONG Z H, et al. Curcumin attenuates brain edema in mice with intracerebral hemorrhage through inhibition of AQP4 and AQP9 expression[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, 36(8): 939-948.
- [22] 杨楚瑜, 魏建明, 曹湘玉, 等. 姜黄素对大鼠脑缺血再灌注损伤的治疗作用及其机制[J]. *山东医药*, 2023, 63(20): 16-19.
- [23] 兰晶, 潘敬芳. 姜黄素对脑缺血再灌注损伤大鼠 PI3K/AKT/mTOR 的影响[J]. *重庆医学*, 2017, 46(1): 36-39.
- [24] 陈宇虹, 汤永红. 姜黄素对脑卒中预防的表观遗传影响[J]. *中国现代医药杂志*, 2016, 18(9): 98-101.
- [25] PATEL S S, ACHARYA A, RAY R S, et al. Cellular and molecular mechanisms of curcumin in prevention and treatment of disease[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(6): 887-939.
- [26] 龙佳欣, 田梦芝, 陈笑一, 等. 黄芪甲苷介导 Akt/mTOR/HIF-1 $\alpha$  通路调控氧糖剥夺 PC12 细胞自噬的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(19): 5271-5277.
- [27] 田梦芝, 龙佳欣, 陈笑一, 等.  $\beta$ -烟酰胺单核苷酸对氧糖剥夺 PC12 细胞自噬的影响[J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(2): 260-267.
- [28] 刘一之. 缺血性脑血管疾病介入治疗[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2023: 79.
- [29] WURZER B, ZAFFAGNINI G, FRACCHIOLLA D, et al. Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy[J]. *eLife*, 2015, 4: e08941.
- [30] GINET V, SPIEHLMANN A, RUMMEL C, et al. Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death[J]. *Autophagy*, 2014, 10(5): 846-860.
- [31] YU B, RUAN M, LIANG T, et al. The synergic effect of te-

- tramethylpyrazine phosphate and borneol for protecting against ischemia injury in cortex and hippocampus regions by modulating apoptosis and autophagy[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2017, 63(1): 70–83.
- [32] SHI R Y, WENG J Q, ZHAO L, et al. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2012, 18(3): 250–260.
- [33] TRAN S, DOUGLAS FAIRLIE W, LEE E F. BECLIN1: Protein structure, function and regulation[J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1522.
- [34] KABEYA Y, MIZUSHIMA N, UENO T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. *EMBO Journal*, 2000, 19(21): 5720–5728.
- [35] OH S H, CHOI Y B, KIM J H, et al. Quantification of autophagy flux using LC3 ELISA[J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 530: 57–67.
- [36] JEONG S J, ZHANG X Y, RODRIGUEZ-VELEZ A, et al. p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2019, 31(6): 458–471.
- [37] GÖMÖRI G, SZÁNTÓ P. Akt[J]. *World Literature Today*, 1996, 70(1): 212.
- [38] LIU Y D, WANG Z B, HAN G, et al. Hyperbaric oxygen relieves neuropathic pain through AKT/TSC2/mTOR pathway activity to induce autophagy[J]. *Journal of Pain Research*, 2019, 12: 443–451.
- [39] DELEYTO-SELDAS N, EFEYAN A. The mTOR–autophagy axis and the control of metabolism[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 655731.
- [40] SAXTON R A, SABATINI D M. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease[J]. *Cell*, 2017, 168(6): 960–976.
- [41] 仇志富, 颜 勇, 吴晓光. PI3K/Akt 信号转导通路与神经细胞凋亡研究进展[J]. *中风与神经疾病杂志*, 2015, 32(10): 952–953.
- [42] MEYERS L M, KRAWIC C, LUCZAK M W, et al. Vulnerability of HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  to damage by proteotoxic stressors[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2022, 445: 116041.
- [43] ZHANG J, HAN L, YU J, et al. miR-224 aggravates cancer-associated fibroblast-induced progression of non-small cell lung cancer by modulating a positive loop of the SIRT3/AMPK/mTOR/HIF-1 $\alpha$  axis[J]. *Aging*, 2021, 13(7): 10431–10449.
- [44] WANG X T, MA J, FU Q, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  in autophagic cell death in microglial cells induced by hypoxia[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(4): 2097–2105.
- [45] CHEN H Y, LI G H, TAN G C, et al. Dexmedetomidine enhances hypoxia-induced cancer cell progression[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019, 18(6): 4820–4828.
- [46] WANG S L, DUAN L, XIA B, et al. Dexmedetomidine preconditioning plays a neuroprotective role and suppresses TLR4/NF- $\kappa$ B pathways model of cerebral ischemia reperfusion[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 93: 1337–1342.
- [47] SHEN M, WANG S, WEN X, et al. RETRACTED: Dexmedetomidine exerts neuroprotective effect via the activation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in rats with traumatic brain injury[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 95: 885–893.
- [48] WANG Y Q, TANG Y F, YANG M K, et al. Dexmedetomidine alleviates cerebral ischemia–reperfusion injury in rats via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(5): 7834–7844.
- [49] PENG Q J, CHEN X J, LIANG X X, et al. Metformin improves polycystic ovary syndrome in mice by inhibiting ovarian ferroptosis[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1070264.
- [50] FU L, HUANG L, CAO C S, et al. Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy[J]. *Brain Research*, 2016, 1650: 103–111.
- [51] POLÁCHOVÁ E, BACH K, HEUTEN E, et al. Chemical blockade of the mitochondrial rhomboid protease PARL by novel ketoamide inhibitors reveals its role in PINK1/parkin-dependent mitophagy[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2023, 66(1): 251–265.

(本文编辑 田梦妍)