DOI:10.16016/j.2097-0927.202311019

氧糖剥离预处理通过保护线粒体减轻 PC12 细胞氧糖剥离/再灌注损伤

黄 丽[1,2],许 娜[2],杨朝鲜[2] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院麻醉科[1];646000 四川 泸州,西南医科大学基础医学院解剖教研室[2]

[摘要] **目的** 研究氧糖剥离预处理(oxygen-glucose deprivation preconditioning,OGDPC)对氧糖剥离/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion,OGD/R)损伤 PC12 细胞的保护作用及机制。**方法** 简单随机抽样将 PC12 细胞分为 Control、OGDPC、OGD/R 和 OGDPC+OGD/R 共 4 组。透射电镜观察线粒体的超微结构,Mito-tracker 染色观察线粒体数量,Western blot 检测 OGDH、PDHA1、COX4、HSP60 的表达,JC-1 和 ATP 试剂盒评估线粒体膜电位及 ATP 水平,TUNEL 染色观察细胞凋亡情况,并与 AIF、EndoG 的免疫荧光染色进行共定位。**结果** 与 OGD/R 组相比,OGDPC+OGD/R 组 PC12 细胞线粒体超微结构损伤较轻;OGDH、PDHA1 和 COX4 的表达增多($P<0.05$),HSP60 的表达减少($P<0.05$);线粒体膜电位及 ATP 水平提高($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$),且 AIF、EndoG 向 TUNEL 染色阳性的细胞核聚集减少($P<0.05$)。**结论** OGDPC 减轻 OGD/R 引起的 PC12 细胞损伤,其机制可能与改善线粒体结构和功能、减少线粒体途径引起的细胞凋亡有关。

[关键词] 氧糖剥离预处理;氧糖剥离/再灌注;线粒体;PC12 细胞
[中图法分类号] R329.25; R363.22; R741.02 [文献标志码] A

Oxygen-glucose deprivation preconditioning alleviates oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in PC12 cells by protecting mitochondria

HUANG Li[1,2], XU Na[2], YANG Chaoxian[2] [1]Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037; [2]Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan Province, 646000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of oxygen-glucose deprivation preconditioning (OGDPC) on PC12 cells damaged with oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) and its underlying mechanism. **Methods** PC12 cells were randomly divided into Control, OGDPC, OGD/R and OGDPC+OGD/R groups. The morphology and quantity of mitochondria were observed by transmission electron microscopy (TEM) and Mito-tracker staining. The expression of OGDH, PDHA1, COX4 and HSP60 was detected by Western blotting. Mitochondrial membrane potential and ATP production were evaluated by JC-1 and ATP assay kit. TUNEL staining was used to assess cell apoptosis, and translocation of AIF and EnodoG was observed by immunofluorescence staining and TUNEL staining. **Results** Compared with the OGD/R group, the mitochondrial ultrastructure damage were alleviated, the expression levels of OGDH, PDHA1 and COX4 were enhanced ($P<0.05$), that of HSP60 was decreased ($P<0.05$), the mitochondrial membrane potential and ATP level were increased ($P<0.05$), the cell apoptotic rate was reduced ($P<0.05$), and AIF and EndoG were less aggregated to the TUNEL-positive nucleus in OGDPC+OGD/R group ($P<0.05$). **Conclusion** OGDPC can alleviate the injury of PC12 cells caused by OGD/R, and the

[基金项目] 四川省自然科学基金(2022NSFSC0718);西南医科大学应用基础面上项目(2021ZKMS011)
[通信作者] 杨朝鲜, E-mail:lyycx@foxmail.com

2097-0927/Copyright © 2024, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

potential mechanism may be related to improving mitochondrial structure and function, and reducing cell apoptosis *via* mitochondrial pathway.

[**Key words**] oxygen-glucose deprivation preconditioning; oxygen-glucose deprivation/reperfusion; mitochondria; PC12 cells

Supported by the Natural Science Foundation of Sichuan Province (2022NSFSC0718) and the General Project of Applied Basic Medicine of Southwest Medical University (2021ZKMS011). Corresponding author: YANG Chaoxian, E-mail: lyycx@foxmail.com

脑缺血是当前人类疾病谱上的常见病与多发病[1]。尽早恢复脑缺血区域的血液供应,是治疗脑缺血的首要目标。然而,迅速恢复血液供应往往并不能立即改善缺血区的细胞功能,甚至可能加重该区域的细胞功能损伤,而这种二次损伤又被称为缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤[2]。目前脑 I/R 损伤被认为是一个非常复杂的病理生理过程,涉及多个病理生理机制的相互作用[3]。而外源性药物治疗的作用靶点往往比较单一,故内源性的脑保护机制也逐渐被研究者们重视起来。缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)被认为是一种潜在的有效保护策略,可通过亚致命性的缺血预处理,调动复杂的内源性保护机制,增强器官对后续致命性缺血损伤的耐受性[4-5]。尽管大量的基础和临床实验研究为 IPC 的脑保护作用提供了相应的证据,但其具体作用机制仍不十分清楚。

线粒体作为 I/R 中易受损伤的敏感细胞器,在 I/R 损伤的发生发展中扮演着重要角色[6]。脑 I/R 时会造成线粒体结构及功能失常,进一步导致其他细胞器受损,从而引起细胞凋亡或者坏死。凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)位于线粒体膜间隙,线粒体受损时 AIF 将从线粒体流出,转位至细胞核,该易位会导致细胞核固缩及大面积 DNA 断裂[7]。由于 AIF 不具有 DNA 酶活性,这表明 AIF 可能需要与其他因素一起来诱导 DNA 断裂。核酸内切酶 G(endonuclease G, EndoG)是一类核基因编码的线粒体 DNA 酶,正常情况下同样定位于线粒体膜间隙。在促凋亡因子的作用下,EndoG 可透过开放的线粒体外膜孔,与 AIF 一起易位至细胞核,进而诱导核 DNA 断裂[8]。

PC12 细胞是大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞株,具有神经细胞的一般特征,广泛用于神经科学的体外研究。本实验对 PC12 细胞进行氧糖剥离/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)以模拟体内脑 I/R,并在此之前给予短暂的氧糖剥离预处理(oxygen-glucose deprivation preconditioning, OGDPC)以模拟 IPC,研究 OGDPC 对 OGD/R 损伤 PC12 细胞的保护功能,并初步探讨其潜在的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠 PC12 细胞购自美国典型培养物保藏中心。胎牛血清购自 Serana 公司,Mito-tracker (Red)、鼠抗细胞色素 C 氧化酶亚基 4(cytochrome C oxidase subunit 4, COX4)、兔抗热休克蛋白 60(heat shock protein 60, HSP60)购自 CST 公司,鼠抗丙酮酸脱氢酶 E1 α 亚单位(pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit, PDHA1)、兔抗酮戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase, OGDH)购自 Abcam 公司,兔抗 AIF 购自 Proteintech 公司,兔抗 EndoG 购自博士德公司,羊抗兔 Alexa Fluor 488 购自 Invitrogen 公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠/兔 IgG、JC-1 试剂盒、三磷酸腺苷(ATP)试剂盒购自碧云天公司,TUNEL 试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 按照简单随机抽样将 PC12 细胞分为 4 组:Control、OGDPC、OGD/R、OGDPC+OGD/R 组,各组细胞处理如图 1 所示。Control 组:PC12 细胞采用完全培养基(90% 高糖培养基+10% 胎牛血清),在正常培养条件(温度:37 ℃,CO_2 浓度:5%)进行培养。OGDPC 组:PC12 细胞采用预先缺氧的无糖无血清培养基在缺氧条件(温度:37 ℃,O_2 浓度:2%,CO_2 浓度:5%)下培养 1 h,再用完全培养基正常条件培养。OGD/R 组:PC12 细胞在缺氧条件下用预先缺氧的无糖无血清培养基培养 4 h,再更换为完全培养基常规培养 24 h,制备 OGD/R 模型。OGDPC+OGD/R 组:先进行 OGDPC,1 h 后制备 OGD/R 模型。即先采用预先缺氧的无糖无血清培养基在缺氧条件下培养 1 h,再用完全培养基在正常条件培养 1 h,接着制备 OGD/R 模型。

1.2.2 Mito-tracker 标记线粒体 Mito-tracker (Red)粉剂用二甲基亚砜溶解为 1 mmol/L 的浓度,再用完全培养基将其稀释成 10 μmol/L 的浓度,并加入 PC12 细胞的培养基中达 200 nmol/L 的终浓度,37 ℃孵育 30 min,PBS 清洗。激光共聚焦显微镜照像,并利用 Image J 软件对所采集图像进行分析。

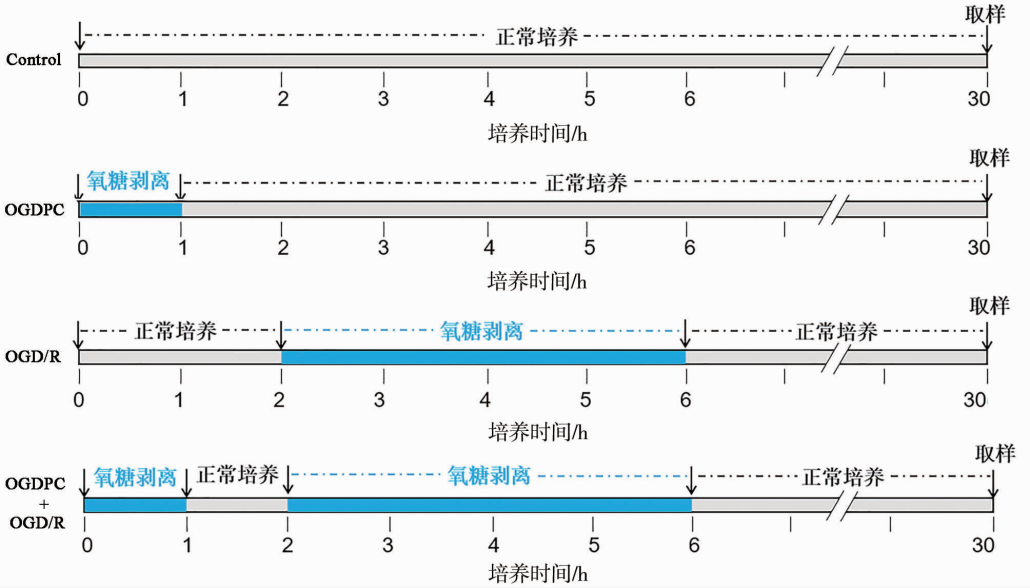


图 1 各组细胞培养实验过程

1.2.3 透射电镜检查 在图 1 所示取样时间点收集细胞,用 0.5%戊二醛重悬细胞并离心去上清。加入 3%戊二醛进行预固定,1%四氧化锇再固定。采用浓度梯度的丙酮逐级脱水,以及脱水剂和环氧树脂不同比例的混合液处理。包埋后进行超薄切片(厚度 50 nm),依次进行醋酸铀染色和枸橼酸铅染色。将样本放到透射电镜下观察并采集图像。

1.2.4 蛋白免疫印迹(Western blot) 蛋白裂解液裂解各组细胞,收集蛋白样本。采用 SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离蛋白并转移至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h,一抗(兔抗 OGDH、鼠抗 PDHA1、鼠抗 COX4、兔抗 HSP60、鼠抗 β-actin 均为 1∶1 000,鼠抗 α-tubulin 为 1∶2 000)4 ℃孵育过夜,羊抗鼠/兔二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h,加入化学发光液置于荧光化学发光分析仪曝光、显影。利用 Quantity One 软件分析图像并计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 JC-1 检测线粒体膜电位 参考试剂盒说明书操作如下:相应时间点取出细胞培养板,避光环境下加入提前配置好的 1×JC-1 工作液,37 ℃避光孵育 20 min。1×染色缓冲液充分洗涤细胞后加入适量完全培养基,通过倒置荧光显微镜观察并采集 JC-1 的荧光图像。采用 Image J 软件进行荧光强度分析,线粒体膜电位的相对值根据红绿 2 种荧光颜色的对比情况来判断(膜电位较高时,产生红色荧光;膜电位较低时,形成绿色荧光)。

1.2.6 ATP 水平检测 根据试剂盒说明书进行如下步骤:相应时间点取出细胞培养板置于冰上,加入 ATP 裂解液进行裂解后转入 EP 管离心并收集上清。在黑色 96 孔板中加入 0.1 mL 的 ATP 检测工作液,室温放置 5 min 除去本底。将 20 μL 的 ATP 样品或标准品加入已有 ATP 检测工作液的各孔中,用多功能酶标仪测定相对光单位值。根据标准曲线计算各组细胞 ATP 含量的绝对值,并将各组测得的 ATP 含量除以 Control 组的 ATP 含量,计算各组 ATP 的相对表达量。

1.2.7 TUNEL 荧光染色 细胞爬片用 0.02 mg/mL 蛋白酶 K 工作液 37 ℃孵育 15 min,TUNEL 混合液在 37 ℃条件下避光孵育 60 min,DAPI 染核 5 min,防荧光淬灭封片液封片。荧光显微镜观察并照像。

1.2.8 免疫细胞荧光染色与 TUNEL 染色的共定位 细胞爬片用含 0.3% Triton-100 的 PBS 溶液室温孵育 15 min,1%牛血清室温封闭 1 h,一抗(兔抗 AIF 或 EndoG 浓度均为 1∶100)4 ℃孵育过夜,羊抗兔荧光二抗(1∶1 000)室温孵育 1 h。对已经完成免疫细胞荧光染色的爬片继续进行 TUNEL 染色。荧光显微镜观察并照像,利用 Image J 软件对图像进行分析。

1.3 统计学分析

利用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计分析及柱状图绘制。数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验和单因素方差分析,以 $P<0.05$ 认为差异存在统计学意义。

2 结果

2.1 各组 PC12 细胞线粒体的形态、数量

透射电镜结果显示,Control 组和 OGDPC 组的线粒体主要呈长棒状或线性和球形,肿胀和空泡化少见;OGD/R 组的线粒体肿胀明显,空泡化严重,并出现大面积的嵴断裂或嵴溶解;与 OGD/R 组相比,OGDPC+OGD/R

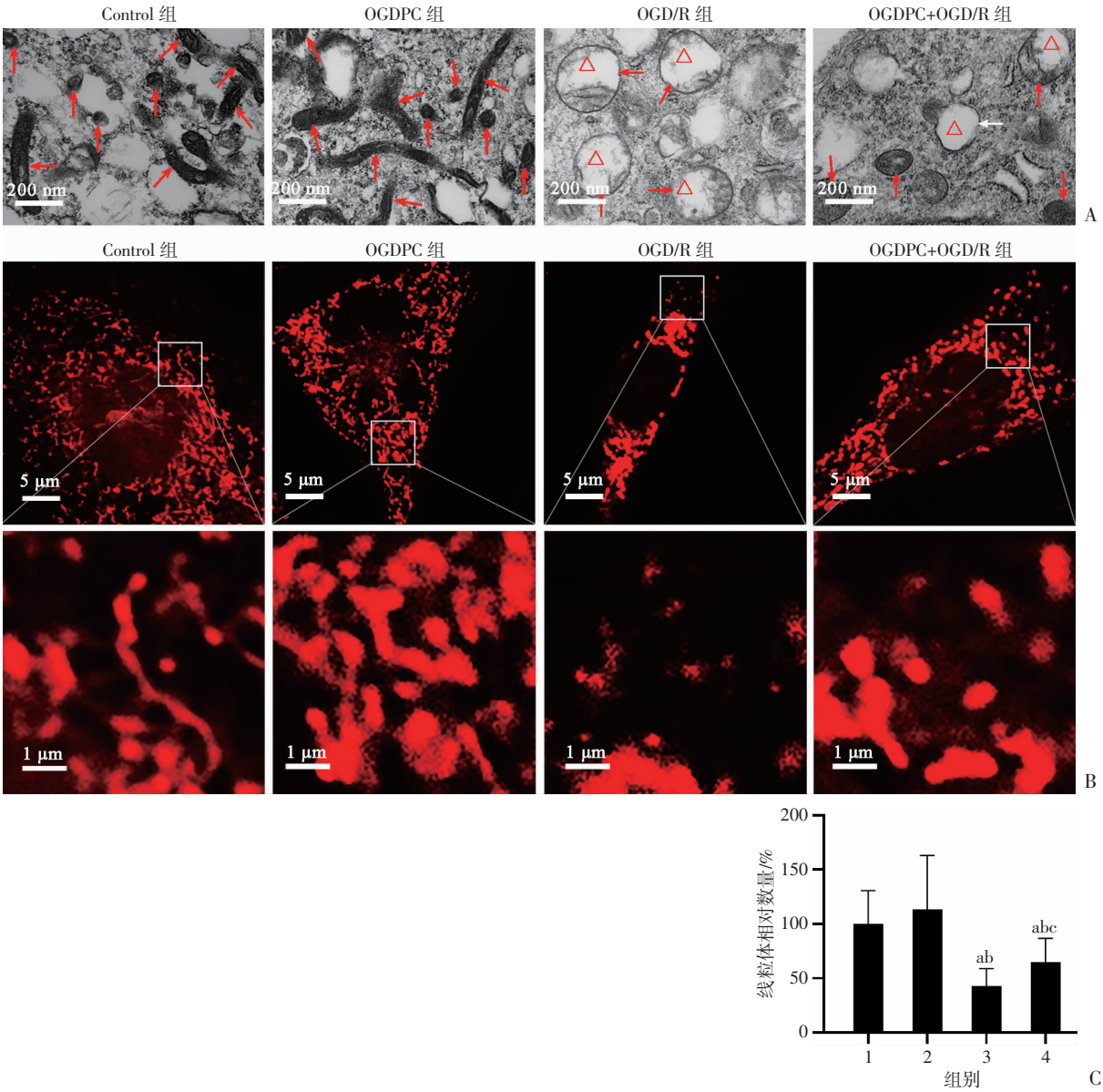
组线粒体肿胀及空泡化程度较轻,嵴断裂或溶解的程度也较轻(图 2A)。Mito-tracker 染色显示:与 Control 组及 OGDPC 组相比,OGD/R 组和 OGDPC+OGD/R 组线粒体数量减少($P<0.05$);但 OGDPC+OGD/R 组比 OGD/R 组线粒体数量相对增多($P<0.05$,图 2B、C)。

2.2　各组 PC12 细胞 OGDH、PDHA1、COX4、HSP60 蛋白的表达

与 Control 组和 OGDPC 组相比,OGD/R 组的 OGDH、PDHA1 和 COX4 蛋白表达量都显著下降($P<0.05$),HSP60 蛋白的表达量则显著提高($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,OGDPC + OGD/R 组的 OGDH、PDHA1 和 COX4 蛋白表达水平提高($P<0.05$),HSP60 蛋白的表达水平下降($P<0.05$,图 3)。

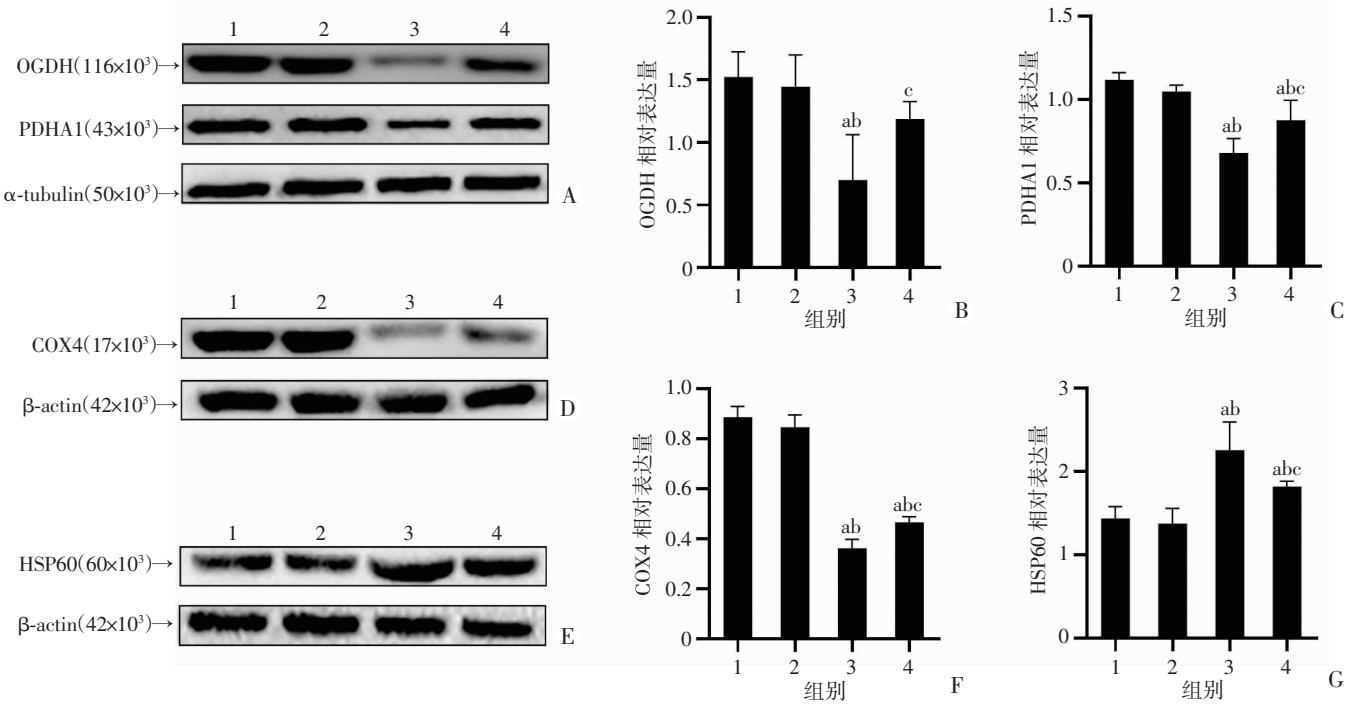
2.3　各组 PC12 细胞线粒体膜电位及 ATP 产量

Control 组和 OGDPC 组 JC-1 染色后的红色荧光强而绿色荧光很弱,2 组 ATP 产量无明显差异;与 Control 组和 OGDPC 组相比,OGD/R 组和 OGDPC+OGD/R 组的绿色荧光强度显著升高,而红色荧光强度有一定幅度降低,红/绿色荧光强度的比值显著降低($P<0.05$),ATP 产量也显著下降($P<0.05$);与 OGD/R 组相比,OGDPC+OGD/R 组红/绿色荧光强度的比值升高($P<0.05$),且 ATP 产量提高($P<0.05$,图 4)。



A:透射电镜显示线粒体的超微结构　箭头:示线粒体;三角形:示线粒体空泡化部分;B:Mito-tracker 标记的各组 PC12 细胞的线粒体;C:不同组 PC12 细胞线粒体数量　1:Control 组;2:OGDPC 组;3:OGD/R 组;4:OGDPC+OGD/R 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 OGDPC 组比较;c:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

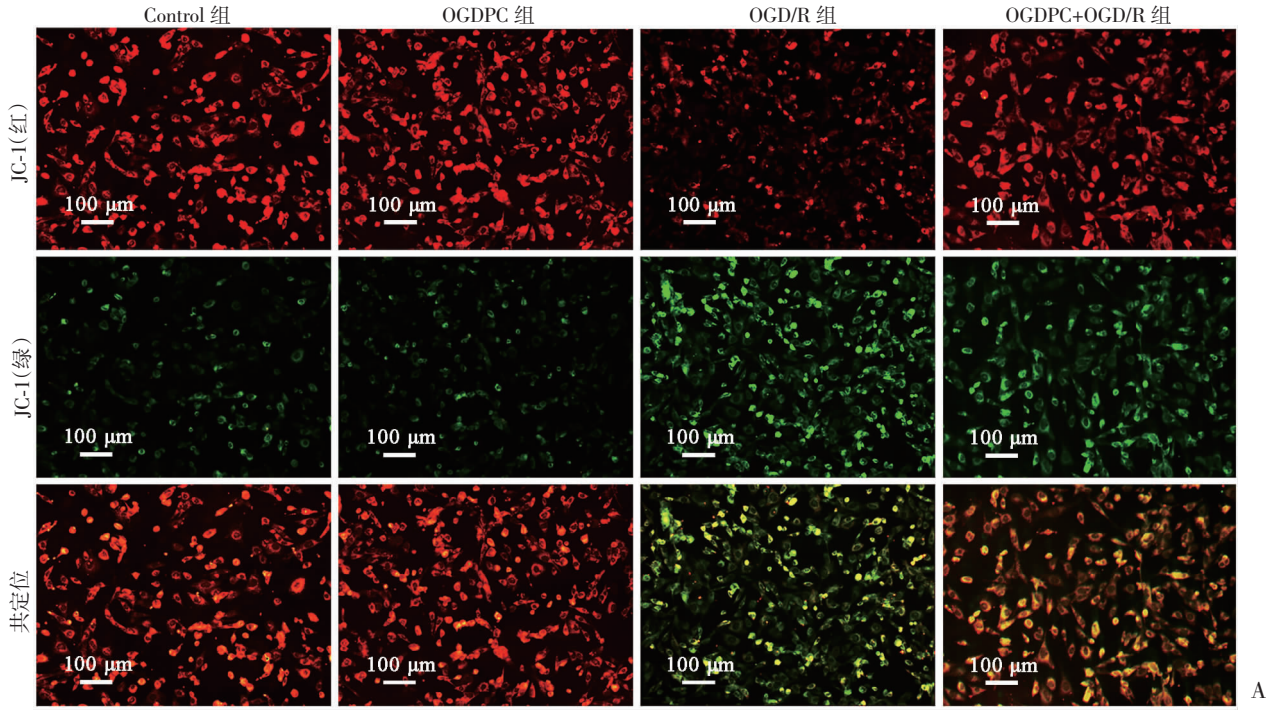
图 2　各组 PC12 细胞的线粒体形态及数量



1:Control 组;2:OGDPC 组;3:OGD/R 组;4:OGDPC+OGD/R 组;a: $P<0.05$,与 Control 组比较;b: $P<0.05$,与 OGDPC 组比较;c: $P<0.05$,与 OGD/R 组比较

A: Western blot 检测 OGDH 和 PDHA1 蛋白的表达;B、C:定量分析各组 OGDH 和 PDHA1 蛋白的表达水平;D、E: Western blot 检测 COX4 和 HSP60 蛋白的表达;F、G:定量分析各组 COX4 和 HSP60 蛋白的表达水平

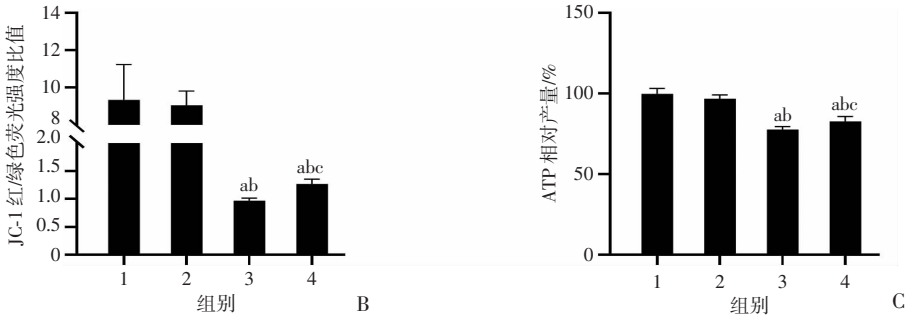
图 3 各组 PC12 细胞 OGDH、PDHA1、COX4、HSP60 蛋白的表达



A:各组 PC12 细胞 JC-1 染色的荧光图像

图 4 各组 PC12 细胞线粒体膜电位及 ATP 产量

(图 4B、C 续下图)



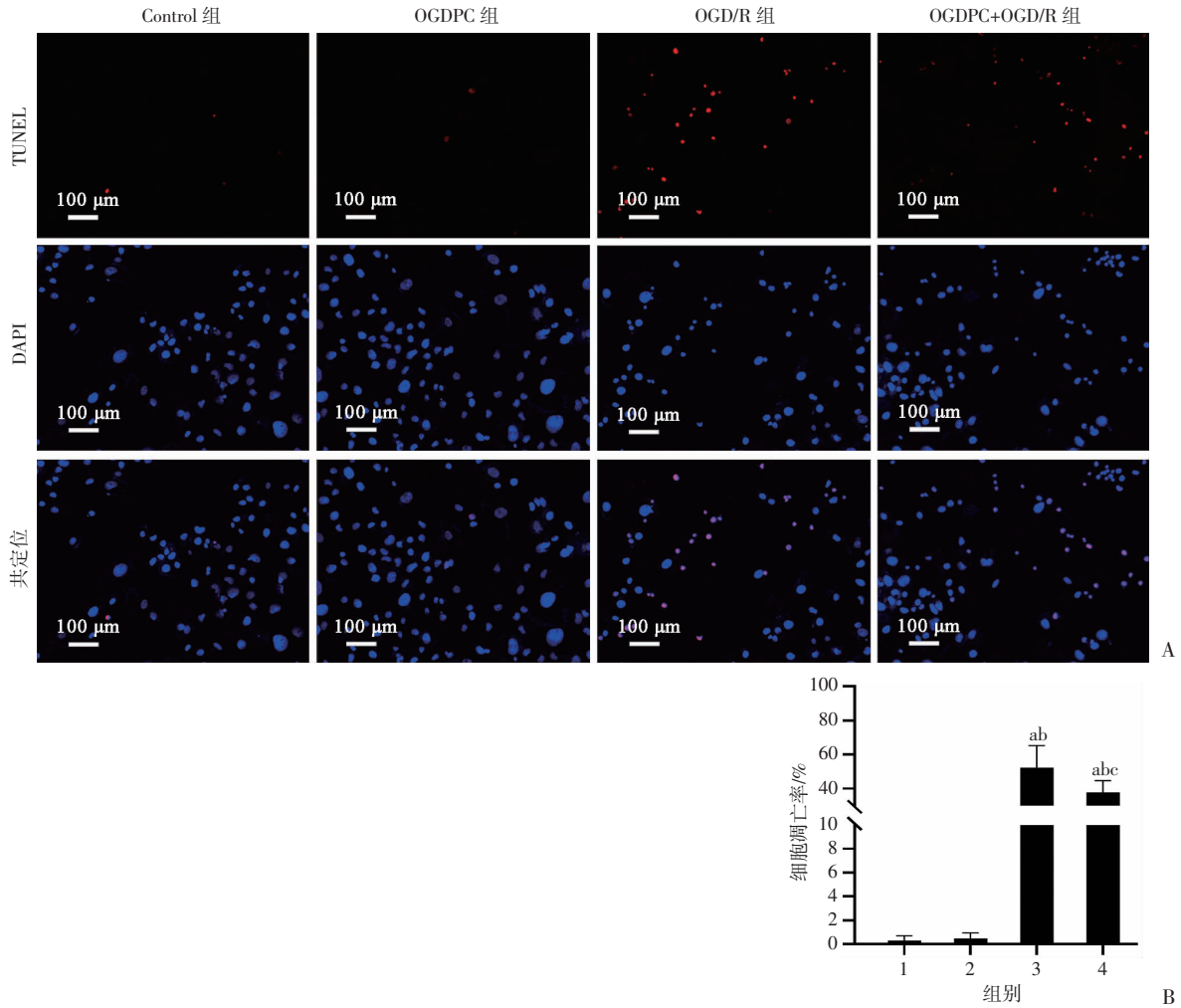
1:Control 组;2:OGDPC 组;3:OGD/R 组;4:OGDPC+OGD/R 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 OGDPC 组比较;c:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

B:各组 PC12 细胞 JC-1 红/绿荧光强度比;C:各组 PC12 细胞 ATP 产量

续图 4 各组 PC12 细胞线粒体膜电位及 ATP 产量

2.4 各组 PC12 细胞的凋亡情况

Control 组和 OGDPC 组 TUNEL 阳性细胞少见;OGD/R 组和 OGDPC+OGD/R 组 TUNEL 阳性细胞数量明显增多,细胞凋亡率显著增高($P<0.05$);但 OGDPC+OGD/R 组与 OGD/R 组相比,细胞凋亡率下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5)。



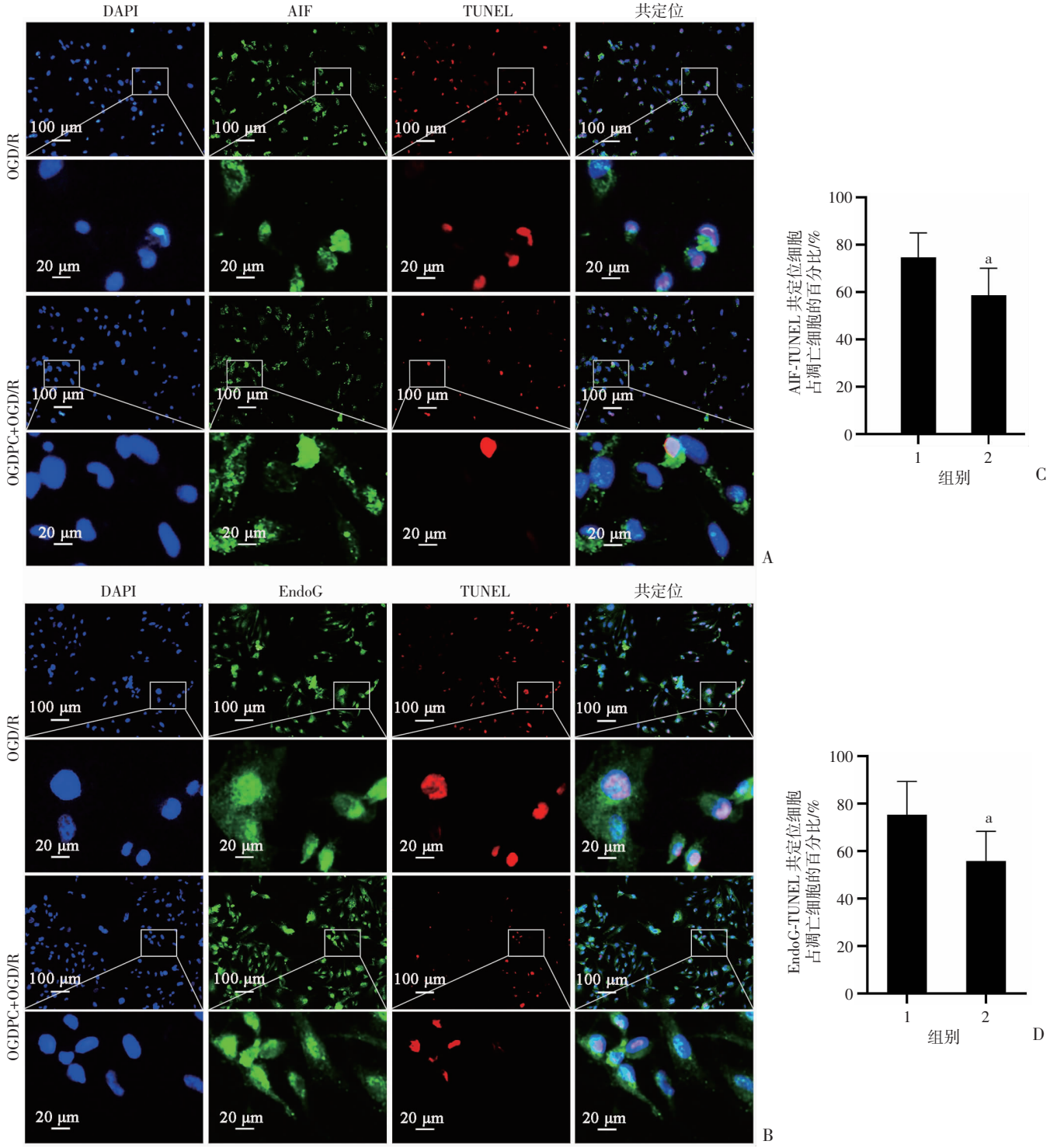
1:Control 组;2:OGDPC 组;3:OGD/R 组;4:OGDPC+OGD/R 组;a:$P<0.05$,与 Control 组比较;b:$P<0.05$,与 OGDPC 组比较;c:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

A:TUNEL 染色显示各组 PC12 细胞凋亡情况;B:各组 PC12 细胞凋亡率的定量分析

图 5 各组 PC12 细胞凋亡率

2.5　各组 PC12 细胞 AIF、EndoG 免疫荧光染色与 TUNEL 染色的共定位

OGD/R 组 PC12 细胞的部分 AIF、EndoG 较多聚集到 TUNEL 染色阳性的细胞核;而与 OGD/R 组相比,OGDPC+OGD/R 组的 AIF、EndoG 向 TUNEL 染色阳性细胞核的聚集减少(P <0.05,图 6)。



1:OGD/R 组;2:OGDPC+OGD/R 组;a:P<0.05,与 OGD/R 组比较

A、B:TUNEL 染色与 AIF 和 EndoG 免疫荧光染色共定位;C、D:AIF-TUNEL 和 EndoG-TUNEL 共定位细胞在凋亡细胞中的百分比

图 6　各组 PC12 细胞的 AIF 和 EndoG 免疫荧光染色与 TUNEL 染色共定位

3 讨论

维持线粒体结构和功能的完整是保护脑 I/R 的重要措施。线粒体的不同形态,尤其是线粒体嵴的完整程度,与多种生理和病理条件有关。细胞 ATP 的产生紧密依赖于线粒体结构和功能的完整性,线粒体嵴的形态和重构反映了线粒体的功能[9]。细胞实验表明,短暂的 OGDPC 可以使细胞在随后较长时间的 OGD/R 中增加 Akt 和 GSK3β 的活化、上调 Notch1 的表达和提高细胞活力[10-11],但 OGDPC 对 OGD/R 损伤后细胞中线粒体结构和功能的影响尚未阐明。本研究在 PC12 细胞上建立 OGD/R 模型,模拟神经元在 I/R 损伤中线粒体的变化。结果发现,在 OGD/R 损伤之前进行 OGDPC 干预可使 PC12 细胞的线粒体空泡化程度降低、线粒体嵴断裂或溶解减少,且线粒体数量增多。这提示 OGDPC 可减轻 OGD/R 损伤引起的 PC12 细胞的线粒体结构破坏和数量减少。

线粒体功能障碍被认为是诱导脑 I/R 损伤的关键因素[12]。当线粒体功能活跃时,线粒体膜电位较高,ATP 产量也较多;当线粒体功能减退时,线粒体膜电位下降甚至消失,ATP 产量也迅速下降。一旦 ATP 合成受阻,能量供应急剧下降,不仅引起细胞功能障碍,甚至导致细胞死亡。同时,一些线粒体相关蛋白的表达也可以间接反映线粒体的功能状态。OGDH 是三羧酸循环中的一个关键调控酶,可以通过感知细胞能量的状态,调节线粒体代谢。有研究发现,上调 OGDH 活性时,$NADP^+$/NADPH 比值下降,ATP 产生增加,线粒体功能增强[13]。OGDH 缺乏时,可诱发神经系统疾病,主要表现为发育迟缓、肌张力障碍、乳酸血症等[14]。PDHA1 是 PDH 复合体的重要组成部分之一,增强 PDHA1 的活性可促进葡萄糖酵解向有氧氧化的转移,从而增加细胞 ATP 产能。当 PDHA1 缺乏时,丙酮酸大量堆积,并转化为乳酸造成酸中毒。COX4 是线粒体生物遗传的标志之一,对维持细胞及线粒体结构的稳定具有重要意义,其活性关系线粒体的氧化磷酸化及 ATP 生成的水平[15]。HSP60 是一种伴侣蛋白,主要分布在线粒体基质中,其通常被用作线粒体应激强度和损伤的可靠指标[16]。本研究发现,PC12 细胞在 OGD/R 损伤后,线粒体膜电位及 ATP 水平都严重下降,OGDH、PDHA1 和 COX4 蛋白水平也下降,但 HSP60 蛋白水平上升,表明 OGD/R 能明显引起 PC12 细胞的线粒体功能障碍。经 OGDPC 干预的 PC12 细胞在受到 OGD/R 损伤时,线粒体膜电位和 ATP 水平及 OGDH、PDHA1、COX4 蛋白水平明显高于 OGD/R 组,而 HSP60 蛋白水平显著低于 OGD/R 组。以上结果说明 OGDPC 可能通过调控线粒体相关蛋白的表达改善 OGD/R 损伤引起的线粒体功能障碍。

细胞凋亡主要由外源性途径(死亡受体途径)、内源性途径(线粒体途径)以及内质网途径进行调控[17]。AIF 是参与线粒体凋亡途径的重要因子。在没有凋亡刺激的情况下,AIF 对于线粒体获取能量以及电子传递链的功能至关重要,使 AIF 成为生存的必要蛋白[18]。但在凋亡刺激存在的情况下,线粒体 AIF 则被水解为具有凋亡潜能的蛋白质,从线粒体易位到胞核,并在此基础上诱导相应 DNA 片段化[19]。有研究表明,AIF 的过表达加重新生小鼠缺氧缺血性脑损伤[20],AIF 有望成为治疗围生期缺氧缺血性脑损伤有前景的靶点[21]。然而,AIF 的核易位对 OGD/R 损伤神经细胞的影响及机制尚不清楚。EndoG 是 AIF 介导的细胞凋亡途径中的重要调节因子之一[22]。线粒体损伤后,AIF 与 EndoG 都可从线粒体开放膜孔进入到细胞质,并最终转入到细胞核,从而加速细胞凋亡[23]。本实验结果显示,OGD/R 损伤诱发细胞凋亡,部分 AIF 和 EndoG 向 TUNEL 染色阳性的细胞核聚集;与 OGD/R 组相比,OGDPC+OGD/R 组细胞凋亡率下降,AIF 和 EndoG 向细胞核聚集减少。由此可推测,OGDPC 减少 OGD/R 损伤引起的细胞凋亡机制可能与抑制 AIF 和 EndoG 的核转位有一定联系,其可能通过这种方式减少线粒体途径介导的内源性细胞凋亡。然而,其确切的机制仍有待进一步研究。

综上所述,本研究在 PC12 细胞水平证实 OGDPC 可减轻 OGD/R 损伤导致的线粒体结构破坏和功能障碍,减少细胞凋亡,其机制可能与调控线粒体相关蛋白和抑制线粒体 AIF、EndoG 的核转位有关。但本实验仅在细胞水平进行研究,未在动物水平进一步探讨其机制,为本实验的不足之处。本课题组下一步将在动物水平探讨 IPC 对 I/R 损伤后线粒体质量控制的影响及机制,为临床 IPC 用于防治脑缺血提供更多实验依据。

参考文献:

[1] SHEHJAR F, MAKTABI B, RAHMAN Z A, *et al*. Stroke: molecular mechanisms and therapies: update on recent developments[J]. Neurochem Int, 2023, 162: 105458. DOI: 10.1016/j.neuint.2022.105458.

[2] WU M Y, YIANG G T, LIAO W T, *et al*. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1650-1667. DOI: 10.1159/000489241.

[3] WANG Y L, XIAO G X, HE S, *et al*. Protection against acute cerebral ischemia/reperfusion injury by QiShenYiQi *via* neuroinflammatory network mobilization [J]. Biomed

Pharmacother, 2020, 125: 109945. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109945.

[4] HAO Y L, XIN M Y, FENG L S, *et al*. Review cerebral ischemic tolerance and preconditioning: methods, mechanisms, clinical applications, and challenges[J]. Front Neurol, 2020, 11: 812. DOI: 10.3389/fneur.2020.00812.

[5] SECONDO A, PETROZZIELLO T, TEDESCHI V, *et al*. ORAI1/STIM1 interaction intervenes in stroke and in neuroprotection induced by ischemic preconditioning through store-operated calcium entry[J]. Stroke, 2019, 50(5): 1240-1249. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.024115.

[6] XIE W J, ZHU T, ZHANG S X, *et al*. Protective effects of Gypenoside XVII against cerebral ischemia/reperfusion injury *via* SIRT1-FOXO3A- and Hif1a-BNIP3-mediated mitochondrial autophagy[J]. J Transl Med, 2022, 20(1): 622. DOI: 10.1186/s12967-022-03830-9.

[7] MADUNGWE N B, FENG Y S, LIE M, *et al*. Mitochondrial inner membrane protein (mitofilin) knockdown induces cell death by apoptosis *via* an AIF-PARP-dependent mechanism and cell cycle arrest[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315(1): C28-C43. DOI: 10.1152/ajpcell.00230.2017.

[8] LI S, WANG T T, ZHAI L, *et al*. Picroside Ⅱ exerts a neuroprotective effect by inhibiting mPTP permeability and EndoG release after cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. J Mol Neurosci, 2018, 64(1): 144-155. DOI: 10.1007/s12031-017-1012-z.

[9] JIANG Y F, LIN H L, WANG L J, *et al*. Coordinated organization of mitochondrial lamellar cristae and gain of COX function during mitochondrial maturation in *Drosophila*[J]. Mol Biol Cell, 2020, 31(1): 18-26. DOI: 10.1091/mbc.E19-08-0450.

[10] ZHANG W, YU H, ZOU W, *et al*. Cbl-b and PI3K/Akt pathway are differently involved in oxygen-glucose deprivation preconditioning in PC12 cells[J]. Chin Med J, 2013, 126(21): 4132-4138.

[11] CHEN L, HUANG K, WANG R, *et al*. Neuroprotective effects of cerebral ischemic preconditioning in a rat middle cerebral artery occlusion model: the role of the Notch signaling pathway[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8168720. DOI: 10.1155/2018/8168720.

[12] RAVINDRAN S, KURIAN G A. Addressing the alterations in cerebral ischemia-reperfusion injury on the brain mitochondrial activity: a possible link to cognitive decline[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 518(1): 100-106. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.08.014.

[13] LU X, YANG P F, ZHAO X R, *et al*. OGDH mediates the inhibition of SIRT5 on cell proliferation and migration of gastric cancer[J]. Exp Cell Res, 2019, 382(2): 111483. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.06.028.

[14] YAP Z Y, STRUCINSKA K, MATSUZAKI S, *et al*. A biallelic pathogenic variant in the *OGDH* gene results in a neurological disorder with features of a mitochondrial disease[J]. J Inherit Metab Dis, 2021, 44(2): 388-400. DOI: 10.1002/jimd.12248.

[15] LV J, GUAN W K, YOU Q, *et al*. RIPC provides neuroprotection against ischemic stroke by suppressing apoptosis *via* the mitochondrial pathway[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 5361. DOI: 10.1038/s41598-020-62336-w.

[16] AFROZ S, BROWNLIE R, FODJE M, *et al*. The bovine herpesvirus-1 major tegument protein, VP8, interacts with host HSP60 concomitant with deregulation of mitochondrial function[J]. Virus Res, 2019, 261: 37-49. DOI: 10.1016/j.virusres.2018.12.006.

[17] HU H, TIAN M, DING C, *et al*. The C/EBP homologous protein (CHOP) transcription factor functions in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and microbial infection[J]. Front Immunol, 2018, 9: 3083. DOI: 10.3389/fimmu.2018.03083.

[18] JOZA N, SUSIN S A, DAUGAS E, *et al*. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death[J]. Nature, 2001, 410: 549-554. DOI: 10.1038/35069004.

[19] 刘娟, 贾迪, 杨丹. AIF 在细胞程序性死亡中的研究进展[J]. 生命的化学, 2020, 40(11): 2043-2047. DOI: 10.13488/j.smhx.20200249.
LIU J, JIA D, YANG D. Research progress on AIF in the process of programmed cell death[J]. Chem Life, 2020, 40(11): 2043-2047. DOI: 10.13488/j.smhx.20200249.

[20] LI T, LI K N, ZHANG S, *et al*. Overexpression of apoptosis inducing factor aggravates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(1): 77. DOI: 10.1038/s41419-020-2280-z.

[21] RODRIGUEZ J, LI T, XU Y R, *et al*. Role of apoptosis-inducing factor in perinatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. Neural Regen Res, 2021, 16(2): 205-213. DOI: 10.4103/1673-5374.290875.

[22] BENÍTEZ-GUZMÁN A, ARRIAGA-PIZANO L, MORÁN J, *et al*. Endonuclease G takes part in AIF-mediated caspase-independent apoptosis in *Mycobacterium bovis*-infected bovine macrophages[J]. Vet Res, 2018, 49(1): 69. DOI: 10.1186/s13567-018-0567-1.

[23] HU W L, DONG H Y, LI Y, *et al*. Bid-induced release of AIF/EndoG from mitochondria causes apoptosis of macrophages during infection with *Leptospira interrogans*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 471. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00471.

(收稿:2023-11-05;修回:2023-12-06)

(编辑 吴培红)