

# CMS121 对氧糖剥夺再灌注神经元及缺血再灌注模型小鼠脑神经损伤的保护作用及其机制

赵志远<sup>1,2</sup> 赵睿<sup>1,2</sup> 刘文豪<sup>1,2</sup> 孙成建<sup>2</sup> 徐锐<sup>1,2</sup>

(1 青岛大学基础医学院,山东 青岛 266071; 2 青岛大学附属医院介入医学科)

**[摘要]** **目的** 研究 CMS121 对氧糖剥夺再灌注(OGD/R)神经元及缺血再灌注(I/R)模型小鼠脑神经损伤的保护作用及其机制。**方法** 将皮质神经元分为对照组、OGD/R 组和 OGD/R+CMS121 组,分别进行正常培养、OGD/R 处理和 OGD/R+CMS121 治疗处理。24 h 后,检测 3 组神经元的细胞活力和乳酸脱氢酶(LDH)释放水平。通过蛋白免疫印迹实验分析 3 组神经元再灌注 6、24 h 蛋白激酶 B(Akt)和磷酸化 Akt(p-Akt)的表达。将 C57BL/6J 小鼠随机分为 Sham 组、I/R 组和 I/R+CMS121 组,分别进行假手术、I/R 模型构建和 I/R 模型构建+CMS121 处理,再灌注 24 h 后,通过神经严重度评分(NSS)评估小鼠神经系统受损情况,通过 TTC 染色计算小鼠的脑梗死体积占全脑体积的比例。**结果** 3 组神经元的细胞活力和 LDH 释放水平比较差异有显著性( $F=71.21, 88.93, P<0.01$ );与 OGD/R 组相比,OGD/R+CMS121 组的神经元细胞活力升高,LDH 释放水平下降( $t=5.56, 11.63, P<0.05$ )。时间、分组、时间与分组交互作用对神经元 p-Akt 表达有明显影响( $F=13.48\sim 32.67, P<0.01$ ),对 Akt 的表达均无影响( $P>0.05$ )。再灌注 6 h,3 组神经元 p-Akt 表达比较差异均有显著性( $F=18.78, P<0.01$ ),与对照组比较,OGD/R 组和 OGD/R+CMS121 组神经元 p-Akt 表达均升高( $P<0.01$ ),且后两组间比较差异无显著性( $P>0.05$ );再灌注 24 h,3 组神经元 p-Akt 表达差异有显著性( $F=38.50, P<0.01$ ),OGD/R+CMS121 组神经元 p-Akt 表达较对照组和 OGD/R 组相比均升高( $P<0.01$ ),而 OGD/R 组和对照组间比较差异无显著性( $P>0.05$ )。3 组小鼠 NSS 和脑梗死体积占全脑体积比例比较差异有显著性( $F=20.24, 118.60, P<0.01$ );与 I/R 组相比,I/R+CMS121 组小鼠 NSS 降低,脑梗死体积减小( $P<0.05$ )。**结论** CMS121 对 OGD/R 处理的神经元和 I/R 模型小鼠的脑神经损伤有保护作用,这种保护作用可能是通过上调大脑皮质神经元 Akt 磷酸化水平实现的。

**[关键词]** 颅神经损伤;细胞低氧;葡萄糖;再灌注损伤;神经元;神经保护;小鼠,近交 C57BL

**[中图分类号]** R745.1;R338 **[文献标志码]** A

**NEUROPROTECTIVE EFFECTS AND MECHANISM OF CMS121 IN A NEURON MODEL OF OXYGEN-GLUCOSE DEPRIVATION/REPERFUSION AND A MOUSE MODEL OF ISCHEMIA-REPERFUSION** ZHAO Zhiyuan, ZHAO Rui, LIU Wenhao, SUN Chengjian, XU Rui (School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

**[ABSTRACT]** **Objective** To investigate the neuroprotective effects and mechanism of CMS121 in a neuron model of oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) and a mouse model of ischemia/reperfusion (I/R). **Methods** Cortical neurons were divided into control group (normal culture), OGD/R group (OGD/R model construction), and OGD/R+CMS121 group (OGD/R model construction plus treatment with CMS121). All neurons' viability and lactate dehydrogenase (LDH) release were assessed after 24 h of reperfusion. Western blotting was performed to measure the expression of protein kinase B (Akt) and phosphorylated Akt (p-Akt) in the neurons after 6 and 24 h of reperfusion. C57BL/6J mice were randomly divided into sham group (sham operation), I/R group (I/R model construction), and I/R+CMS121 group (I/R model construction plus treatment with CMS121). After 24 h of reperfusion, we assessed the neurological damage of the mice with the Neurological Severity Score (NSS), and calculated the brain infarct volume (as a percent of total brain volume) after 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride staining. **Results** There were significant differences in cell viability and LDH release between the three neuron groups ( $F=71.21, 88.93, P<0.01$ ). Compared with the OGD/R group, the OGD/R+CMS121 group showed significantly increased neuronal viability and significantly reduced LDH release ( $t=5.56, 11.63, P<0.05$ ). Time, group, and time  $\times$  group interaction significantly affected neuronal p-Akt expression ( $F=13.48\sim 32.67, P<0.01$ ), and showed no significant effects on Akt expression ( $P>0.05$ ). After 6 h reperfusion, a significant difference was observed in neuronal p-Akt expression between the three neuron groups ( $F=18.78, P<0.01$ ). Neuronal p-Akt expression was significantly increased in the OGD/R and OGD/R+CMS121 groups than in the control group ( $P<0.01$ ), and showed no significant difference between the OGD/R and OGD/R+CMS121 groups ( $P>0.05$ ). After 24 h reperfusion, p-Akt expression differed significantly between the three neuron groups ( $F=38.50, P<0.01$ ). The expression of p-Akt was significantly increased in the OGD/R+CMS121 group than in the control and OGD/R groups ( $P<0.01$ ), and showed no

significant difference between the OGD/R and control groups ( $P>0.05$ ). There were significant differences in the NSS score and infarct volume between the three mouse groups ( $F=20.24, 118.60, P<0.01$ ). Compared with the I/R group, the I/R+CMS121 group had

[收稿日期] 2022-12-12; [修订日期] 2023-02-19  
[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(ZR202102190696)  
[通讯作者] 徐锐,Email:Xray3236@126.com

a significantly decreased NSS score and a significantly reduced infarct volume ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** CMS121 has neuroprotective effects in the neuronal OGD/R model and mouse I/R model, possibly through upregulating Akt phosphorylation in cortical neurons.

[**KEY WORDS**] Cranial nerve injuries; Cell hypoxia; Glucose; Reperfusion injury; Neurons; Neuroprotection; Mice, inbred C57BL

缺血再灌注(I/R)脑损伤在中老年人群中具有发病率及致残性高等特点<sup>[1-3]</sup>,其发病机制复杂,其中炎症反应会加重 I/R 脑损伤<sup>[4]</sup>。近年来,乙酰辅酶 A 羧化酶 1(ACC1)被发现参与炎症反应过程,抑制 ACC1 能够抑制 I/R 脑损伤的神经炎症,从而减轻 I/R 脑损伤<sup>[5]</sup>。CMS121 是近年来发现的 ACC1 抑制剂<sup>[6-7]</sup>,在神经退行性疾病,特别是在阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)细胞模型以及动物模型中,能够通过维持线粒体的稳态、调节脂质代谢水平、减少炎症以及脂质过氧化等发挥神经保护作用<sup>[8-9]</sup>。然而,CMS121 是否能够作用于神经元并对 I/R 脑损伤产生影响,目前尚无文献报道。本研究旨在探索 CMS121 是否对 I/R 脑损伤神经元具有保护作用,并进一步探讨其作用机制。现将结果报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和材料

雄性 C57BL/6J 小鼠共 33 只,4~6 周龄,体重 20~25 g,购自于济南朋悦实验动物繁殖公司;CMS121 购自美国 MCE 公司;Neurobasal 培养基、B-27 补充剂和 L-谷氨酰胺购自美国 Gibco 公司;Cell Counting Kit-8 购自美国 Targetmol 公司;乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天公司;一抗抗蛋白激酶 B(Akt)、抗磷酸化 Akt(p-Akt)、Anti- $\beta$ -actin 和二抗羊抗兔购自武汉 Abclonal 公司;ECL 发光液购自大连美仑生物技术有限公司;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)、组织细胞固定液购自北京索莱宝公司。皮质神经元获赠于青岛大学神经再生与康复研究院。

### 1.2 体外实验

**1.2.1 皮质神经元分组及处理** 使用神经元的专用培养基(Neurobasal 培养基、含体积分数 0.02 的 B-27 补充剂和 0.5  $\mu\text{mol/L}$  的 L-谷氨酰胺)重新悬浮皮质神经元,将神经元分为对照组、氧糖剥夺再灌注(OGD/R)组和 OGD/R+CMS121 组,每组均按照  $2 \times 10^8$  个/L 和  $1 \times 10^9$  个/L 的密度分别接种于涂有多聚赖氨酸的 96 孔板和 6 孔板内,另设 1 组样品最大酶活性对照组,将细胞以  $2 \times 10^8$  个/L 密度接种

于涂有多聚赖氨酸的 96 孔板内,将孔板置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中静置培养。培养期间每 3 d 更换一次神经元专用培养基<sup>[10]</sup>。培养 7 d 后,对照组和最大酶活性对照组神经元不作其他处理,OGD/R 组神经元进行常规 OGD/R 处理。OGD/R 方法如下:一定质量的不同盐溶于去离子水当中,制备为脱氧无葡萄糖的细胞外溶液(具体的配方:NaCl 116 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L,  $\text{MgSO}_4$  0.8 mmol/L,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.0 mmol/L,  $\text{CaCl}_2$  1.8 mmol/L,  $\text{NaHCO}_3$  26 mmol/L),经 0.22  $\mu\text{m}$  的过滤器进行无菌处理。使用脱氧无葡萄糖的细胞外溶液替换孔板中的神经元专用培养基,并将孔板放置于含体积分数 0.95  $\text{N}_2$  和含体积分数 0.05  $\text{CO}_2$  的专用室在 37  $^{\circ}\text{C}$  的条件下培养 90 min;90 min 后将脱氧无葡萄糖的细胞外溶液更换为神经元专用培养基<sup>[11]</sup>。OGD/R+CMS121 组神经元同样进行 OGD 处理,并于再灌注时向孔板之中加入 20 nmol/L 的 CMS121<sup>[6]</sup>。将孔板轻轻摇匀后,静置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 0.05  $\text{CO}_2$  的恒温培养箱中继续培养。

**1.2.2 细胞活力检测** 对 1.2.1 中继续培养 24 h 的 96 孔板中的 3 组神经元进行细胞活力检测,具体方法如下:CCK8 和神经元专用培养基按照 1:9 的体积比配置为 CCK8 工作液。将 96 孔板中的神经元专用培养基更换为 100  $\mu\text{L}$  的 CCK8 工作液,另在未种植神经元的 96 孔中加入等量的 CCK8 工作液设为空白组,置于恒温培养箱中孵育 4~6 h。使用酶标仪测量各组溶液在波长 450 nm 处吸光度(A)值,细胞活力(%)=(处理组 A - 空白组 A)/(对照组 A - 空白组 A)  $\times 100\%$ ,以此计算细胞活力。实验重复 3 次,结果取均值。

**1.2.3 细胞 LDH 释放检测** 对 1.2.1 中继续培养 24 h 的 96 孔板中的 3 组神经元进行细胞 LDH 释放检测。按照 LDH 细胞毒性检测试剂盒说明书的要求,向 1.2.1 中样品最大酶活性对照组神经元孔板中加入 10  $\mu\text{L}$  的 LDH 释放试剂孵育 1 h,随后向 4 组神经元各孔中加入 LDH 检测工作液 60  $\mu\text{L}$ 。使用酶标仪测量各组溶液在波长 490 nm 处吸光度(A)值,并计算 LDH 释放量。LDH 释放量(%)=(处理组 A - 对照组 A)/(细胞最大酶活性 A - 对

对照组 A)  $\times 100\%$ 。实验重复 3 次,结果取均值。

## 1.2.4 蛋白免疫印迹(Western Blot)实验检测 3 组神经元再灌注不同时间 Akt、p-Akt 的表达水平

1.2.1 中 3 组 6 孔板中神经元再继续培养 6、24 h 时,分别使用 RIPA 裂解液冰上裂解 30 min,离心后吸取上清液,并置于 100 °C 干式恒温器中再孵育 15 min,制备为蛋白样品。通过 SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白质分离,在 300 mA、60 min 的条件下将蛋白转移到 PVDF 膜上。使用质量分数 0.05 的牛奶封闭液封闭 2 h,加入一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜后加入二抗室温孵育 2 h。使用 ECL 发光液在化学发光检测系统下进行显影。使用 Image J 软件分析蛋白的灰度值,并测定 3 组再灌注 6、24 h 后的 Akt 和 p-Akt 的表达水平。实验重复 3 次,结果取均值。

## 1.3 动物模型实验

1.3.1 分组及处理 将小鼠随机分为 Sham 组、I/R 组和 I/R+CMS121 组。I/R 组和 I/R+CMS121 组小鼠均使用线栓进行局灶脑 I/R 模型的构建<sup>[11]</sup>。本实验共使用 33 只小鼠,实验过程中 1 只小鼠死亡。采用 Zea Longa 评分评估小鼠神经功能缺损情况以确定模型制备情况,1~4 分为造模成功,因为 4 分小鼠损伤过于严重,故取 1~3 分小鼠入组<sup>[12]</sup>,最终入组 27 只小鼠,每组 9 只小鼠。I/R+CMS121 组在构建模型前后给予 CMS121 的体内治疗,即 CMS121 按照每次 25 mg/kg 的剂量,分别在 I/R 模型构建前 12 h 和再灌注后 0、3、6 h 经腹腔注射至模型小鼠体内。Sham 组进行假手术,小鼠同样进行大脑中动脉的切口及缝合,但不插入线栓。

1.3.2 小鼠神经严重度评分(NSS) 在经上述处理 24 h 后对 3 组小鼠进行 NSS<sup>[11]</sup>,以 NSS 表示小鼠神经功能受损情况。

1.3.3 TTC 染色和小鼠脑梗死体积测量 完成 NSS 后,将小鼠麻醉处死,各组随机选择 3 只小鼠分离脑组织。将脑组织短暂冰冻后,制备冠状切片。将切片浸泡于质量浓度为 20 g/L 的 TTC 溶液中,37 °C 下避光孵育 30 min。之后即使用质量浓度为 40 g/L 的多聚甲醛组织细胞固定液在 4 °C 下固定过夜。由于 TTC 是一种脂溶性光敏感复合物,可进入细胞,被活细胞内的脱氢酶还原为红色甲臢化合物。梗死区域组织坏死,脱氢酶活力丧失而呈现灰白色,非梗死区域则呈现红色。收集图像后,使用 Image J 软件分析小鼠脑梗死体积。

## 1.4 统计分析

使用 GraphPad Prism 软件进行统计学分析。

计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,Western Blot 实验结果采用析因设计的方差分析进行比较,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 3 组神经元的细胞活力和 LDH 释放量比较

细胞活力检测结果显示,对照组、OGD/R 组以及 OGD/R+CMS121 组神经元的细胞活力分别为  $(100.00 \pm 4.98)\%$ 、 $(58.79 \pm 3.11)\%$ 、 $(72.62 \pm 4.59)\%$ ,各组神经元细胞活力比较差异具有显著性 ( $F = 71.21, P < 0.01$ );与对照组相比,OGD/R 组神经元的细胞活力显著降低,差异具有显著意义 ( $t = 16.58, P < 0.01$ );与 OGD/R 组相比较,OGD/R+CMS121 组神经元的细胞活力得到显著改善,差异有显著性 ( $t = 5.56, P < 0.05$ )。

细胞 LDH 释放检测结果显示,对照组、OGD/R 组和 OGD/R+CMS121 组神经元 LDH 释放量分别为  $(16.64 \pm 0.84)\%$ 、 $(79.09 \pm 2.63)\%$ 、 $(40.19 \pm 9.64)\%$ ,各组神经元 LDH 释放量比较差异有显著性 ( $F = 88.93, P < 0.01$ );与对照组相比,OGD/R 组神经元 LDH 释放量增加,差异具有统计意义 ( $t = 18.67, P < 0.01$ );与 OGD/R 组相比较,OGD/R+CMS121 组 LDH 释放量下降,差异有统计意义 ( $t = 11.63, P < 0.01$ )。

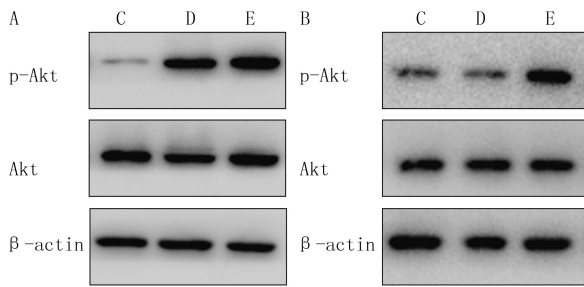
### 2.2 3 组神经元 OGD/R 不同时间点 Akt、p-Akt 相对表达量和 p-Akt/Akt 比较

析因设计的方差分析结果显示,时间对神经元 p-Akt/Akt、p-Akt 相对表达量有明显影响 ( $F_{\text{时间}} = 21.98, 27.55, P < 0.01$ );分组对神经元 p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量具有明显影响 ( $F_{\text{组间}} = 53.71, 32.67, P < 0.01$ );时间和分组的交互作用对神经元 p-Akt/Akt、p-Akt 相对表达量有明显影响 ( $F_{\text{交互}} = 13.46, 13.48, P < 0.01$ )。时间、分组、时间和分组交互作用对神经元 Akt 的相对表达量均无明显影响 ( $P > 0.05$ )。再灌注 6 h,3 组神经元 p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量比较差异有显著性 ( $F = 53.52, 18.78, P < 0.01$ );与对照组相比较,OGD/R 组和 OGD/R+CMS121 组神经元 p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量均升高 ( $P < 0.01$ );OGD/R 组和 OGD/R+CMS121 组神经元 p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。再灌注 24 h,3 组神经元 p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量比较差异有显著性 ( $F = 36.19, 38.50, P < 0.01$ );OGD/R+

CMS121 组 p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量较对照组和 OGD/R 组相比均升高 ( $P < 0.01$ ), OGD/R 组和对对照组相比, p-Akt/Akt 和 p-Akt 相对表达量比较差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见表 1, 图 1。

**表 1** 3 组神经元再灌注前及再灌注 6、24 h 的 p-Akt、Akt 相对表达量及 p-Akt/Akt 比较 ( $n=3, x \pm s$ )

分组	p-Akt 相对表达量	Akt 相对表达量	p-Akt/Akt
对照组			
再灌注前	0.47 ± 0.05	0.85 ± 0.02	0.55 ± 0.07
再灌注 6 h	0.52 ± 0.07	0.93 ± 0.11	0.56 ± 0.03
再灌注 24 h	0.47 ± 0.08	0.89 ± 0.08	0.53 ± 0.13
OGD/R 组			
再灌注前	0.45 ± 0.05	0.74 ± 0.12	0.62 ± 0.07
再灌注 6 h	0.91 ± 0.09	0.91 ± 0.13	1.01 ± 0.06
再灌注 24 h	0.52 ± 0.08	0.84 ± 0.04	0.62 ± 0.08
OGD/R+CMS121 组			
再灌注前	0.52 ± 0.05	0.83 ± 0.20	0.65 ± 0.15
再灌注 6 h	0.88 ± 0.07	0.74 ± 0.07	1.18 ± 0.12
再灌注 24 h	1.02 ± 0.16	0.81 ± 0.21	1.28 ± 0.13



A:再灌注 6 h, B:再灌注 24 h, C、D、E 分别为对照组、OGD/R 组、OGD/R+CMS121 组

**图 1** 3 组神经元 p-AKT、AKT 的表达

### 2.3 3 组小鼠 NSS 比较

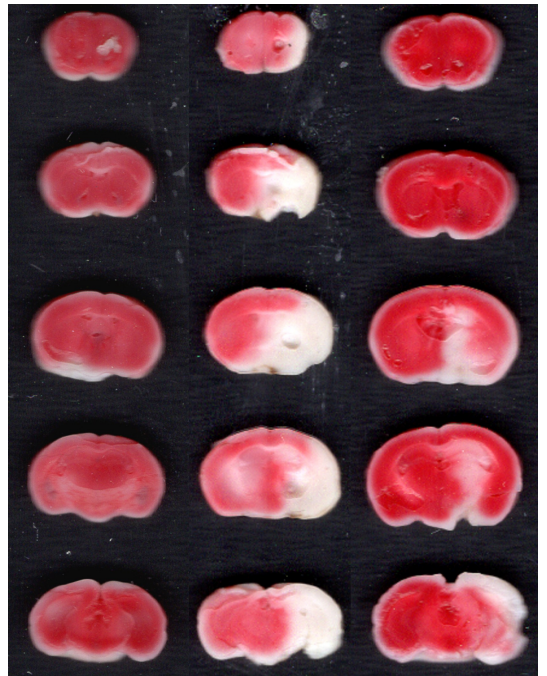
再灌注 24 h 以后, Sham 组、I/R 组以及 I/R+CMS121 组小鼠的 NSS 分别为  $0.01 \pm 0.01$ 、 $3.89 \pm 1.76$ 、 $2.33 \pm 1.41$ , 各组 NSS 比较差异均具有显著意义 ( $F = 20.24, P < 0.001$ ); 与 I/R 组相比, I/R+CMS121 组小鼠 NSS 明显降低 ( $P < 0.05$ )。

### 2.4 3 组小鼠脑梗死体积占全脑体积的比例比较

TTC 染色结果显示, Sham 组、I/R 组、I/R+CMS121 组小鼠的脑梗死体积占全脑体积的比例分别为  $(1.65 \pm 0.54)\%$ 、 $(36.71 \pm 2.40)\%$ 、 $(20.05 \pm 1.38)\%$ , 各组比较差异有显著性 ( $F = 118.60, P < 0.01$ ); I/R 组小鼠脑梗死体积占全脑体积的比例明显高于 Sham 组 ( $P < 0.01$ ); 与 I/R 组相比, I/R+CMS121 组小鼠脑梗死体积占全脑体积的比例明显降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

## 3 讨论

I/R 脑损伤的机制复杂, 目前国内外学者普遍



Sham组 I/R组 I/R+CMS121组

**图 2** 3 组小鼠脑梗死体积占全脑体积的比例比较

认为 I/R 损伤主要与细胞内线粒体和 NADPH 氧化酶中的自由基过度形成、兴奋性氨基酸毒性作用、细胞内钙超载、炎性反应等机制有关<sup>[13-14]</sup>。近年来能量代谢与神经系统疾病的关系被广泛关注<sup>[15-17]</sup>。尽管葡萄糖是脑组织能量来源的主要底物, 但利用其他循环底物如酮体脂肪酸等, 能够使脑组织适应能量缺乏的状态。其中 ACC1 是脂肪酸代谢的关键酶<sup>[18-19]</sup>。

目前研究表明, 通过影响 ACC1 的表达或活性来调节脂肪酸代谢, 能对肥胖、糖尿病、肿瘤等多种疾病起到治疗作用<sup>[20-22]</sup>。近几年来研究结果显示, ACC1 能够通过参与免疫炎症反应加重 I/R 脑损伤<sup>[5, 23]</sup>。CMS121 是 ACC1 的抑制剂, 近期研究显示 CMS121 在神经退行性病变如 AD 中, 显示出强大的神经保护作用<sup>[6-9]</sup>。然而, 对于 CMS121 在 I/R 脑损伤中的作用, 目前未见报道。本研究通过体内实验证明, CMS121 能够改善 OGD/R 处理的神经元的细胞活力, 并且能够抑制神经元的 LDH 释放, 这意味着 CMS121 能够减弱 OGD/R 诱导的神经元损伤, 减少神经元凋亡。体外实验研究结果显示, CMS121 治疗能够明显降低 I/R 脑损伤模型小鼠的 NSS, 减少 I/R 脑损伤模型小鼠的脑梗死体积, 进一步证实了 CMS121 对于 I/R 脑损伤具有神经保护作用。

Akt 的激活对于 I/R 脑损伤的神经元存活具有重要的影响<sup>[24]</sup>。Akt 通路能够调控 Bcl-2、Bax 以及

caspase-3 等线粒体相关凋亡蛋白的表达,参与 Nrf2 激活,促进神经元的存活,减轻 I/R 损伤<sup>[25-31]</sup>。根据以前的报道,在 I/R 的早期(3~6 h),缺血区域脑组织 Akt 会被激活,p-Akt 水平升高;而在 I/R 的晚期(12~24 h),该区域脑组织 p-Akt 水平降低<sup>[32]</sup>。本研究结果显示,再灌注 6 h 时,OGD/R 处理使神经元的 p-Akt 水平升高,CMS121 对该阶段的 p-Akt 水平影响不大。再灌注 24 h 时,OGD/R 处理的神经元 p-Akt 水平已经降低,而经过 CMS121 的治疗,24 h 时神经元 p-Akt 的水平仍旧升高。这可能表明,CMS121 可能是通过持续升高 p-Akt 的水平,发挥神经保护作用的。

综上所述,本研究结果显示,CMS121 对于 I/R 脑损伤具有神经保护作用。CMS121 能够持续升高大脑皮质神经元中的 p-Akt 水平,可能是通过激活 Akt 通路,发挥神经保护作用的。但 CMS121 如何通过 Akt 通路发挥神经保护作用还需要进一步研究确定。

**伦理批准和动物权利声明:**本研究涉及的所有动物实验均已通过青岛大学科学伦理委员会的审核批准(文件号 20211210C57332-0220-59220018)。所有实验过程均遵照《实验动物管理条例》的规定进行。**作者声明:**徐锐、孙成建、赵志远参与了研究设计;赵志远、赵睿、刘文豪参与了论文的写作和修改。所有作者均阅读并同意发表该论文。所有作者均声明不存在利益冲突。

## 【参考文献】

- [1] BOEHME A K, ESENWA C, ELKIND M S V. Stroke risk factors, genetics, and prevention[J]. *Circ Res*, 2017,120(3): 472-495.
- [2] YANG J L, MUKDA S, CHEN S D. Diverse roles of mitochondria in ischemic stroke[J]. *Redox Biol*, 2018,16:263-275.
- [3] THIANKHAW K, CHATTIPAKORN N, CHATTIPAKORN S C. The effects of hyperbaric oxygen therapy on the brain with middle cerebral artery occlusion[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(3):1677-1694.
- [4] JIN W N, GONZALES R, FENG Y, et al. Brain ischemia induces diversified neuroantigen-specific T-cell responses that exacerbate brain injury[J]. *Stroke*, 2018,49(6):1471-1478.
- [5] WANG X, ZHOU Y X, TANG D, et al. ACC<sub>1</sub> (acetyl coenzyme A carboxylase 1) is a potential immune modulatory target of cerebral ischemic stroke[J]. *Stroke*, 2019,50(7):1869-1878.
- [6] PRIOR M, CHIRUTA C, CURRAIS A, et al. Back to the future with phenotypic screening[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2014,5(7):503-513.
- [7] CURRAIS A, HUANG L, GOLDBERG J, et al. Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging[J]. *Elife*, 2019,8:e47866.
- [8] ATES G, GOLDBERG J, CURRAIS A, et al. CMS121, a fatty acid synthase inhibitor, protects against excess lipid peroxidation and inflammation and alleviates cognitive loss in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Redox Biol*, 2020,36:101648.
- [9] KEPCHIA D, CURRAIS A, DARGUSCH R, et al. Geroprotective effects of Alzheimer's disease drug candidates[J]. *Aging (Albany NY)*, 2021,13(3):3269-3289.
- [10] ZHANG Z L, WANG Q H, ZHAO X L, et al. YTHDC1 mitigates ischemic stroke by promoting Akt phosphorylation through destabilizing PTEN mRNA[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(11):977.
- [11] CUI Y, ZHANG Y, ZHAO X L, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuroinflammation[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 93: 312-321.
- [12] 卢小叶,吕倩忆,李棋龙,等. Zea-longa 评分与改良 Garcia 评分应用于针刺治疗 CIRI 大鼠神经功能缺损评估的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2021,41(9):1356-1360.
- [13] LIN L, WANG X, YU Z. Ischemia-reperfusion injury in the brain: Mechanisms and potential therapeutic strategies[J]. *Biochem Pharmacol (Los Angel)*, 2016,5(4):213.
- [14] DIRNAGL U, IADECOLA C, MOSKOWITZ M A. Pathobiology of ischaemic stroke: An integrated view[J]. *Trends Neurosci*, 1999,22(9):391-397.
- [15] SILVA-ADAYA D, GARZA-LOMBÓ C, GONSEBATT M E. Xenobiotic transport and metabolism in the human brain[J]. *Neurotoxicology*, 2021,86:125-138.
- [16] ZHANG S, LACHANCE B B, MATTSO M P, et al. Glucose metabolic crosstalk and regulation in brain function and diseases[J]. *Prog Neurobiol*, 2021,204:102089.
- [17] SERTBAS M, ULGEN K O. Unlocking human brain metabolism by genome-scale and multiomics metabolic models: Relevance for neurology research, health, and disease[J]. *OMICS A J Integr Biol*, 2018,22(7):455-467.
- [18] RAICHLER M E, GUSNARD D A. Appraising the brain's energy budget[J]. *PNAS*, 2002,99(16):10237-10239.
- [19] CAHILL G F Jr. Fuel metabolism in starvation[J]. *Annu Rev Nutr*, 2006,26:1-22.
- [20] FULLERTON M D, GALIC S, MARCINKO K, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin[J]. *Nat Med*, 2013,19(12):1649-1654.
- [21] YE B Y, YIN L, WANG Q W, et al. ACC<sub>1</sub> is overexpressed in liver cancers and contributes to the proliferation of human hepatoma Hep G2 cells and the rat liver cell line BRL 3A[J]. *Mol Med Rep*, 2019,19(5):3431-3440.
- [22] LALLY J S V, GHOSHAL S, DEPERALTA D K, et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation or the inhibitor ND-654 suppresses lipogenesis and hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Metab*, 2019,29(1):174-182.e5.

- [15] LEE S M, LEE J M, AHN S J, et al. LI-RADS version 2017 versus version 2018: Diagnosis of hepatocellular carcinoma on gadoxetate disodium-enhanced MRI[J]. Radiology, 2019, 292(3):655-663.
- [16] TONG H F, LIANG H B, MO Z K, et al. Quantitative analysis of gadoxetic acid-enhanced magnetic resonance imaging predicts histological grade of hepatocellular carcinoma[J]. Clin Imaging, 2017,43:9-14.
- [17] SCHELHORN J, BEST J, DECHÈNE A, et al. Evaluation of combined Gd-EOB-DTPA and gadobutrol magnetic resonance imaging for the prediction of hepatocellular carcinoma grading[J]. Acta Radiol, 2016,57(8):932-938.
- [18] KATSUBE T, OKADA M, KUMANO S, et al. Estimation of liver function using T<sub>1</sub> mapping on Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging[J]. Invest Radiol, 2011,46(4):277-283.
- [19] YOON J H, LEE J M, KANG H J, et al. Quantitative assessment of liver function by using gadoxetic acid-enhanced MRI: Hepatocyte uptake ratio[J]. Radiology, 2019, 290(1):125-133.
- [20] UENO A, MASUGI Y, YAMAZAKI K, et al. OATP1B3 expression is strongly associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signalling and represents the transporter of gadoxetic acid in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2014,61(5):1080-1087.
- [21] 蒋宇,邱维加,周智鹏. Gd-EOB-DTPA 增强 MRI T<sub>1</sub> mapping 技术在肝脏疾病的应用进展[J]. 国际医学放射学杂志, 2019, 42(2):208-211.
- [22] FERNANDES J L, ROCHITTE C E. T<sub>1</sub> mapping: Technique and applications[J]. Magn Reson Imaging Clin N Am, 2015, 23(1):25-34.
- [23] DUAN T, JIANG H Y, XIA C C, et al. Assessing liver function in liver tumors patients: The performance of T<sub>1</sub> mapping and residual liver volume on Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI[J]. Front Med (Lausanne), 2020,7:215.
- [24] PAN S, WANG X Q, GUO Q Y. Quantitative assessment of hepatic fibrosis in chronic hepatitis B and C: T<sub>1</sub> mapping on Gd-EOB-DTPA-enhanced liver magnetic resonance imaging[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(18):2024-2035.
- [25] PENG Z P, LI C, CHAN T, et al. Quantitative evaluation of Gd-EOB-DTPA uptake in focal liver lesions by using T<sub>1</sub> mapping: Differences between hepatocellular carcinoma, hepatic focal nodular hyperplasia and cavernous hemangioma[J]. Oncotarget, 2017,8(39):65435-65444.
- [26] 徐萍,黄梦琪,廖冰,等. Gd-EOB-DTPA MRI 动态增强预测孤立性肝细胞癌微血管侵犯的单因素及多因素回归分析[J]. 影像诊断与介入放射学, 2017,26(1):31-36.
- [27] CHEN C Y, CHEN J, XIA C C, et al. T<sub>1</sub> mapping combined with Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging in predicting the pathologic grading of hepatocellular carcinoma[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2017,31(4):1029-1036.
- [28] PENG Z P, JIANG M J, CAI H S, et al. Gd-EOB-DTPA-enhanced magnetic resonance imaging combined with T<sub>1</sub> mapping predicts the degree of differentiation in hepatocellular carcinoma[J]. BMC Cancer, 2016,16:625.
- (本文编辑 耿波 厉建强)
- 
- (上接第 58 页)
- [23] ENDO Y, ONODERA A, OBATA-NINOMIYA K, et al. ACC<sub>1</sub> determines memory potential of individual CD4<sup>+</sup> T cells by regulating de novo fatty acid biosynthesis[J]. Nat Metab, 2019,1(2):261-275.
- [24] XU X S, CHUA C C, GAO J P, et al. Neuroprotective effect of humanin on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by a PI3K/Akt pathway[J]. Brain Res, 2008,1227:12-18.
- [25] LIN K H, KUO W W, JIANG A Z, et al. Tetramethylpyrazine ameliorated hypoxia-induced myocardial cell apoptosis via HIF-1 $\alpha$ /JNK/p38 and IGFBP<sub>3</sub>/BNIP<sub>3</sub> inhibition to upregulate PI3K/Akt survival signaling[J]. Cell Physiol Biochem, 2015,36(1):334-344.
- [26] YU Z H, CAI M, XIANG J, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neuroprotective effect of Tongxinluo against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016,181:8-19.
- [27] HOU Y Y, WANG K, WAN W J, et al. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats[J]. Genes Dis, 2018,5(3):245-255.
- [28] LI L T, ZHANG X J, CUI L L, et al. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice[J]. Brain Res, 2013,1497:32-39.
- [29] SHAH Z A, LI R C, THIMMULAPPA R K, et al. Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury[J]. Neuroscience, 2007,147(1):53-59.
- [30] LI M H, CHA Y N, SURH Y J. Peroxynitrite induces HO-1 expression via PI3K/Akt-dependent activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells[J]. Free Radic Biol Med, 2006,41(7):1079-1091.
- [31] LIU Q, JIN Z Q, XU Z L, et al. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Stress Chaperones, 2019,24(2):441-452.
- [32] WANG X T, PEI D S, XU J, et al. Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK<sub>1/2</sub> on ischemic brain injury[J]. Cell Signal, 2007,19(9):1844-1856.
- (本文编辑 耿波 厉建强)