

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.20.004

# 银杏内酯 K 通过 AMPK 介导的能量代谢和自噬缓解创伤性脑损伤 \*

白立曦<sup>1</sup> 史航<sup>2</sup> 许静<sup>1</sup> 段鹏<sup>1</sup> 徐之超<sup>1</sup> 王芳雨<sup>2Δ</sup> 杜俊凯<sup>1Δ</sup>

(1 西安交通大学第一附属医院急诊中心 陕西 西安 710061; 2 西安市人民医院(西安市第四医院)眼科 陕西 西安 710004)

**摘要 目的:**探讨银杏内酯 K(GK)对创伤性脑损伤(TBI)大鼠的治疗作用,并分析其对 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)活性的影响。**方法:**将大鼠分为 Sham 组、TBI 组、L-GK 组、M-GK 组、H-GK 组、H-GK+CC 组( $n=11$ )。Sham 组大鼠为假手术大鼠,其他组大鼠为颅脑损伤仪制作的 TBI 模型大鼠。Sham 组和 TBI 组大鼠灌胃 0.5%羧甲基纤维素钠。L-GK 组、M-GK 组、H-GK 组大鼠分别灌胃剂量为 2、4 和 8 mg/kg/d 的银杏内酯 K。H-GK+CC 组大鼠灌胃剂量 8 mg/kg/d 的银杏内酯 K,并腹腔注射剂量为 20 mg/kg/d 的 AMPK 抑制剂 Compound C(CC)。各组大鼠均给药 14 d。通过改良神经功能严重程度评分(mNSS)评价大鼠神经功能,采用 Morris 水迷宫实验评价大鼠认知功能,记录逃避潜伏期(EL)和 1 min 内穿越平台次数(NPC)。分别对大鼠脑组织切片进行 HE、Nissl 和 TUNEL 染色以及 Bax 和 Bcl-2 免疫组化染色。按照试剂盒说明检测大鼠脑组织 SOD、CAT、GSH-Px、MDA、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平,Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量。采用比色法检测血清 NO 和 T-NOS 水平。通过 Western blot 检测大鼠脑组织 p-AMPK $\alpha$  (Thr172)、p62 和 Beclin-1 蛋白表达水平。**结果:**与 Sham 组比较,TBI 组大鼠的 mNSS 评分和 EL 升高 ( $P<0.05$ ),NPC 降低 ( $P<0.05$ );HE 染色评分升高 ( $P<0.05$ );TUNEL 阳性率和 Bax 染色评分升高 ( $P<0.05$ ),Bcl-2 染色评分降低 ( $P<0.05$ );MDA、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO 和 T-NOS 水平升高 ( $P<0.05$ ),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平降低 ( $P<0.05$ );Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量降低 ( $P<0.05$ ),p-AMPK $\alpha$  (Thr172)和 Beclin-1 蛋白相对表达水平降低,p62 蛋白相对表达水平升高 ( $P<0.05$ )。与 TBI 组比较,L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组大鼠的 mNSS 评分和 EL 降低 ( $P<0.05$ ),NPC 升高 ( $P<0.05$ );HE 染色评分降低 ( $P<0.05$ );TUNEL 阳性率和 Bax 染色评分降低 ( $P<0.05$ ),Bcl-2 染色评分升高 ( $P<0.05$ );MDA、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO 和 T-NOS 水平降低 ( $P<0.05$ ),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平升高 ( $P<0.05$ );Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量升高 ( $P<0.05$ ),p-AMPK $\alpha$  (Thr172)和 Beclin-1 蛋白相对表达水平升高 ( $P<0.05$ ),p62 蛋白相对表达水平降低 ( $P<0.05$ )。与 H-GK 组比较,H-GK+CC 组大鼠的 mNSS 评分和 EL 升高 ( $P<0.05$ ),NPC 降低 ( $P<0.05$ );HE 染色评分升高 ( $P<0.05$ );TUNEL 阳性率和 Bax 染色评分升高 ( $P<0.05$ ),Bcl-2 染色评分降低 ( $P<0.05$ );MDA、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO 和 T-NOS 水平升高 ( $P<0.05$ ),SOD、CAT 和 GSH-Px 水平降低 ( $P<0.05$ );Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量降低 ( $P<0.05$ ),p-AMPK $\alpha$  (Thr172)和 Beclin-1 蛋白相对表达水平降低 ( $P<0.05$ ),p62 蛋白相对表达水平升高 ( $P<0.05$ )。**结论:**银杏内酯 K 通过改善 AMPK 介导的能量代谢和自噬缓解 TBI 大鼠的脑损伤。

**关键词:**银杏内酯 K;创伤性脑损伤;AMP 活化蛋白激酶;能量代谢;自噬

中图分类号:R651.1 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2024)20-3823-08

## Ginkgolide K Alleviates Traumatic Brain Injury through AMPK-mediated Energy Metabolism and Autophagy\*

BAI Li-xi<sup>1</sup>, SHI Hang<sup>2</sup>, XU Jing<sup>1</sup>, DUAN Peng<sup>1</sup>, XU Zhi-chao<sup>1</sup>, WANG Fang-yu<sup>2Δ</sup>, DU Jun-kai<sup>1Δ</sup>

(1 Emergency center, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, China;

2 Department of Ophthalmology, Xi'an People's Hospital (Xi'an Fourth Hospital), Xi'an, Shaanxi, 710004, China)

**ABSTRACT Objective:** To explore the possible role of ginkgolide K (GK) in the treatment of traumatic brain injury (TBI) and analyze its effect on AMP-activated protein kinase (AMPK) activity. **Methods:** Rats were divided into Sham group, TBI group, L-GK group, M-GK group, H-GK group, and H-GK+CC group ( $n=11$ ). Rats in Sham group was sham-operated rats, and rats in other groups were TBI model rats which made by craniocerebral injury instrument. Rats in Sham group and TBI group were administered 0.5% CMC-Na by intragastric administration. Rats in L-GK group, M-GK group, and H-GK group were administered 2, 4, and 8 mg/kg/d ginkgolide K respectively. Rats in H-GK+CC group were given with 8 mg/kg/d Ginkgolide K and intraperitoneally injected with 20 mg/kg/d of AMPK inhibitor Compound C (CC). Rats were all dosed for 14 days. Neurological function was assessed by the modified

\* 基金项目:陕西省自然科学基金研究计划项目(2018JM7152;2023-JC-QN-0883);西安市科技局创新能力强基计划-医学研究项目(22YXYJ0039);

西安市卫健委青年培育项目(2023qn08);西安市博士后创新基地科研项目(2023BSHCX02);

西安市人民医院(西安市第四医院)院级基金项目(2022LBSH04)

作者简介:白立曦(1989-),男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:创伤外科,E-mail: Bailixi89@163.com

Δ 通讯作者:王芳雨(1989-),女,博士研究生,主治医师,主要研究方向:自噬调控视网膜神经免疫炎症,E-mail: FangyuW9@163.com;

杜俊凯(1976-),男,博士研究生,硕士生导师,主任医师,主要研究方向:创伤和急腹症,E-mail: 68631784@qq.com

(收稿日期:2024-02-27 接受日期:2024-03-23)

Neurological Severity Score (mNSS). The Morris water maze test was used to evaluate cognitive function, and the escape latency (EL) and the number of platform crossings within 1 min (NPC) were recorded. Brain tissue sections were subjected to HE, Nissl and TUNEL staining as well as Bax and Bcl-2 immunohistochemical staining. The levels of SOD, CAT, GSH-Px, MDA, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$ , the activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase and the content of ATP in brain tissue were detected according to the kit instructions. The serum levels of NO and T-NOS were detected by colorimetry. The protein expression levels of p-AMPK $\alpha$  (Thr172), p62 and Beclin-1 in brain tissue were detected by Western blot. **Results:** Compared with Sham group, the mNSS score and EL of TBI group increased ( $P<0.05$ ), the NPC decreased ( $P<0.05$ ), the HE staining score increased ( $P<0.05$ ), the TUNEL positivity rate and Bax staining score increased ( $P<0.05$ ), the Bcl-2 staining score decreased ( $P<0.05$ ), the levels of MDA, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO and T-NOS increased ( $P<0.05$ ), the levels of SOD, CAT and GSH-Px decreased ( $P<0.05$ ), the activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase and ATP content decreased ( $P<0.05$ ), the relative expression levels of p-AMPK $\alpha$  (Thr172) and Beclin-1 protein decreased ( $P<0.05$ ), and the relative expression levels of p62 protein increased ( $P<0.05$ ). Compared with TBI group, the mNSS score and EL of L-GK, M-GK and H-GK groups decreased ( $P<0.05$ ), the NPC increased ( $P<0.05$ ), the HE staining score decreased ( $P<0.05$ ), the TUNEL positive rate and Bax staining score decreased ( $P<0.05$ ), the Bcl-2 staining score increased ( $P<0.05$ ), the levels of MDA, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO and T-NOS decreased ( $P<0.05$ ), the levels of SOD, CAT and GSH-Px increase ( $P<0.05$ ), the activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase and ATP content increased ( $P<0.05$ ), the relative expression level of p-AMPK $\alpha$  (Thr172) and Beclin-1 protein increased ( $P<0.05$ ), and the relative expression level of p62 protein decreased ( $P<0.05$ ). Compared with H-GK group, the mNSS score and EL of H-GK+CC group increased ( $P<0.05$ ), the NPC decreased ( $P<0.05$ ), the HE staining score increased ( $P<0.05$ ), the TUNEL positivity rate and Bax staining score increased ( $P<0.05$ ), the Bcl-2 staining score decreased ( $P<0.05$ ), the levels of SOD, CAT and GSH-Px decreased ( $P<0.05$ ), the levels of MDA, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , NO and T-NOS increased ( $P<0.05$ ), the activities of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase and ATP content decreased ( $P<0.05$ ), the relative expression levels of p-AMPK $\alpha$  (Thr172) and Beclin-1 protein decreased ( $P<0.05$ ), and the relative expression levels of p62 protein increased ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** Ginkgolide K could alleviate brain damage in TBI rats by improving AMPK-mediated energy metabolism and autophagy.

**Key words:** Ginkgolide K; Traumatic brain injury; AMP-activated protein kinase; Energy metabolism; Autophagy

**Chinese Library Classification(CLC):** R651.1 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2024)20-3823-08

## 前言

创伤性脑损伤(Traumatic brain injury, TBI)的病理过程非常复杂,一般分为原发性脑损伤和继发性脑损伤两个阶段。TBI通过继发性脑损伤触发一系列的病理生理反应,如氧化应激、炎症反应、能量耗竭和细胞凋亡,最终导致神经细胞死亡、脑水肿和神经功能障碍<sup>[1]</sup>。目前尚无有效的TBI临床治疗方法。银杏内酯是银杏叶中的具有生物活性的萜内酯,在治疗心血管疾病中充当抗血小板激活拮抗剂<sup>[2]</sup>。银杏内酯K(Ginkgolide K, GK)是银杏叶中的萜内酯类成分<sup>[3]</sup>。最近,银杏内酯K因其治疗缺血性中风的作用而引起了学者的关注。例如,银杏内酯K预处理通过抑制线粒体分裂和糖原合成酶激酶-3 $\beta$ 依赖性的线粒体膜通透性增加而减轻缺血性中风后的神经元损伤<sup>[4]</sup>。在体外,银杏内酯K预处理通过缓解氧化应激和线粒体功能障碍保护大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系(PC12)细胞免受H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>诱导的凋亡<sup>[5]</sup>。同样,银杏内酯K通过减轻氧化应激,抑制细胞凋亡并抑制Ca<sup>2+</sup>内流来保护PC12细胞免受谷氨酸诱导的细胞毒性<sup>[6]</sup>。连续5天应用银杏内酯K(2、4和8 mg/kg)预处理大鼠中动脉闭塞(Middle cerebral artery occlusion, MCAO)大鼠可显著减少梗死体积和脑含水量,改善神经功能<sup>[7]</sup>。上述文献提示在治疗TBI后继发性损伤方面有应用前景。

AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种调节各种代谢和分解代谢途径的细胞能量传感器,当被

激活后可减少ATP消耗并增加ATP合成<sup>[8]</sup>。TBI后的能量可利用性受到抑制,AMPK活性降低<sup>[9]</sup>。另外,AMPK通过活化自噬相关基因的表达直接或间接促进自噬<sup>[10]</sup>。自噬是一个进化上保守的过程,在维持细胞内稳态的各种生物学功能中起着至关重要的作用。细胞自噬通过溶酶体依赖的途径降解受损细胞器、蛋白质聚集体和入侵的病原体。自噬途径参与了TBI的发病机制<sup>[11]</sup>。在TBI动物模型中,自噬标记物如微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3)-II和Beclin-1显著增加,p62显著减少,表明TBI后自噬活性升高<sup>[12]</sup>。据报道,TBI后提高AMPK活性显著改善了动物模型的空间记忆能力<sup>[9]</sup>。研究表明,银杏内酯K通过AMPK/mTOR/ULK1信号通路诱导保护性自噬,促进氧糖剥夺(Oxygen-glucose deprivation, OGD)后星形胶质细胞的增殖和迁移<sup>[13]</sup>。本研究推测银杏内酯K可能通过激活AMPK在TBI后继发性损伤中发挥治疗作用。因此,本研究探讨了银杏内酯K对TBI大鼠的治疗作用,并分析了其对AMPK通路的影响,旨在为TBI的治疗药物研发提供候选资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验试剂 银杏内酯K(YT66464),北京伊塔生物科技有限公司。AMPK抑制剂Compound C(CC)(HY-13418A),美国MCE公司。羧甲基纤维素钠(CMC-Na)(C8621)、苏木素伊

红(HE)染液(G4520)、尼氏(Nissl)染液(G1430)、TUNEL 染液(T2195)、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶(BC0065)和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶(BC0960)活性检测试剂盒、ATP 含量检测试剂盒(BC0300),北京索莱宝科技有限公司。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)(A001-3-2)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)(A007-1-1)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)(A005-1-2)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)(A003-1-2)、白介素-1 $\beta$ (Interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )(H002-1-2)、IL-6(H007-1-1)和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (Tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )(H052-1-2)、一氧化氮(Nitric oxide, NO)(A012-1-2)、总一氧化氮合成酶(Nitric oxide synthase, T-NOS)(A014-2-2)试剂盒,南京建成生物工程研究所。B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bcl2-associated X, Bax)(AF0120)、B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)(AF6139)、p-AMPK $\alpha$ (Thr172)(AF3423)、腺苷酸激活蛋白激酶(Adenosine-activated protein kinase  $\alpha$ , AMPK $\alpha$ )(AF6423)、p62(AF5384)、自噬效应蛋白-1(Beclin-1)(AF5128)和  $\beta$ -actin(AF7018)一抗、IgG(H+L)HRP(S0001)二抗,美国 Affinity 公司。

**1.1.2 实验动物** SPF 级 8 周龄 SD 大鼠(体质量 280~350 g)购自西安交通大学实验动物中心,在 23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C,55 $\pm$ 5%湿度,12 h/12 h 循环照明动物房中饲养大鼠。

## 1.2 方法

**1.2.1 TBI 大鼠模型的制备** 参考文献<sup>[14]</sup>建立 TBI 大鼠模型。使用 3%异氟烷麻醉大鼠,在整个手术过程中维持 1.5%~2%异氟烷。将麻醉的大鼠置于脑立体定向仪上,使用微型磨钻在左顶骨钻半径 2 mm 的骨窗,使用美国 PSI TBI-0310 颅脑损伤仪以 5 m/s 的速度打击大鼠,停留时间 400 ms,深度 4.5 mm。造模大鼠术后缝合皮肤切口,放回笼中恢复,造模 12 h 后取存活的大鼠进行后续实验。60 只用于造模的大鼠中 55 只造模成功,成功率为 91.67%。假手术组大鼠接受相同的手术程序,但不进行打击造模。

**1.2.2 大鼠分组及治疗** 将大鼠分为 Sham 组、TBI 组、L-GK 组、M-GK 组、H-GK 组和 H-GK+CC 组(n=11)。Sham 组为假手术大鼠,其他组为模型大鼠。将银杏内酯 K 溶于 0.5%的 CMC-Na 中,Sham 组和 TBI 组大鼠灌胃 0.5%的 CMC-Na。L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组大鼠分别灌胃剂量为 2、4 和 8 mg/kg/d 的等体积银杏内酯 K<sup>[7]</sup>。H-GK+CC 组大鼠灌胃剂量为 8 mg/kg/d 的银杏内酯 K,并腹腔注射 20 mg/kg/d 的 CC<sup>[15]</sup>。各组大鼠均给药 14 d。

**1.2.3 大鼠神经功能评分** 通过改良神经功能严重程度评分(modified neurological severity scoring, mNSS)评价大鼠神经功能<sup>[16]</sup>。mNSS 神经功能障碍评分区间为 0~18 分,1~6 分,轻度;7~12 分,中度;13~18 分,重度。

**1.2.4 大鼠认知功能评价方法** 认知功能评价采用 Morris 水迷宫实验<sup>[17]</sup>。设备为北京智鼠多宝 DB001 Morris 水迷宫视频分析系统,该系统为装有 30 $^{\circ}$ C 温水的圆形水池(直径:150 cm;高:60 cm;水深:35 cm),配备视频分析系统。将逃生平台(直径 12 cm)放置在水池第一象限中心,平台上平面距水面 2 cm。通过定位航行实验记录大鼠登陆平台的时间,记为逃避潜伏期(EL)。然后撤去平台,通过空间探索实验记录大鼠 1 min 内穿越平台次数(NPC)。

**1.2.5 大鼠脑组织病理学染色** 无菌分离大鼠脑组织,PBS 清洗,4%多聚甲醛固定 24 h,脱水、浸蜡、包埋并切取 4  $\mu$ m 切片。按试剂盒说明进行 HE、Nissl 和 TUNEL 染色。从空泡化变性、神经元变形、核固缩、炎性细胞浸润等病理改变水平对 HE 染色进行病理评分,标准如下:0 分:无明显病理改变;1 分:轻度病理改变;2 分:中度病理改变;3 分:重度病理改变。TUNEL 染色中,在 400 $\times$ 放大倍数下统计 TUNEL 阳性率作为细胞凋亡评判指标。

**1.2.6 Bax 和 Bcl-2 免疫组织化学染色** 将大鼠脑组织石蜡切片常规脱蜡至水,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 5 min。将切片浸入 0.01M 柠檬酸钠缓冲液(pH6.0)中微波炉加热至沸腾,滴加封闭液,室温处理 20 min。将切片与 1:100 稀释的 Bax 和 Bcl-2 一抗在 4 $^{\circ}$ C 下染色过夜。然后将切片与 1:500 二抗在室温下孵育 1 h。3,3'-二氨基联苯胺用于显色。苏木精重新染色细胞核,显微镜下观察切片。Bax 和 Bcl-2 染色评分方法<sup>[18]</sup>如下:<5%阳性为 0 分;5%~20%阳性为 1 分;21%~40%阳性为 2 分;41%~60%阳性为 3 分;61%~80%阳性为 4 分;>80%阳性为 5 分。

**1.2.7 大鼠脑组织氧化应激和炎症指标检测** 剪碎大鼠脑组织并研磨匀浆,4 $^{\circ}$ C、12000 $\times$ g 离心 5 min,取上清,按试剂盒说明检测 SOD、CAT、GSH-Px、MDA、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平。

**1.2.8 大鼠血清 NO 和 T-NOS 含量检测** 大鼠眼眶取血,4 $^{\circ}$ C、3000 $\times$ g 离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书采用比色法检测血清 NO 和 T-NOS 水平。

**1.2.9 脑组织 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性测定** 称取 0.1 g 大鼠脑组织,加入 1 mL 试剂进行冰浴匀浆。4 $^{\circ}$ C、8000 $\times$ g 离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书采用分光光度法检测 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性。

**1.2.10 脑组织 ATP 含量测定** 称取 0.1 g 大鼠脑组织,加入 1 mL 试剂进行冰浴匀浆。4 $^{\circ}$ C、8000 $\times$ g 离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书采用紫外分光光度法检测 ATP 含量。

**1.2.11 Western blot 检测大鼠脑组织蛋白表达水平** 大鼠脑组织样本进行匀浆处理,加入 RIPA 缓冲液裂解并提取蛋白,通过二辛可宁酸法测量总蛋白浓度。采用 10% SDS-PAGE 分离总蛋白,并转移到聚偏二氟乙烯膜。5%脱脂牛奶封闭膜 2 h 后,与 p-AMPK $\alpha$ (Thr172)(1:1000)、AMPK $\alpha$ (1:1000)、p62(1:1000)、Beclin-1(1:1000)和  $\beta$ -actin(1:1000)一抗在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。膜用 1 $\times$ TBST 清洗后,与二抗(1:1000)室温孵育 1 h。使用 ECL 显影,通过 Image J 软件对蛋白质条带灰度值进行定量, $\beta$ -actin 作为内参。

## 1.3 统计学分析

SPSS21.0 软件分析数据。采用单因素方差分析和 LSD-t 检验比较组间差异。显著水准: $P<0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 银杏内酯 K 对 TBI 大鼠神经功能和认知功能的影响

与 Sham 组比较,TBI 组的 mNSS 评分和 EL 升高( $P<0.05$ ),NPC 降低( $P<0.05$ )。与 TBI 组比较,L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组的 mNSS 评分和 EL 降低( $P<0.05$ ),NPC 升高( $P<0.05$ )。与 H-GK 组比较,H-GK+CC 组的 mNSS 评分和 EL 升高( $P<0.05$ ),NPC 降低( $P<0.05$ )。见表 1。

表 1 各组的 mNSS 评分、EL 和 NPC

Table 1 mNSS scores, EL and NPC of each group

Groups	mNSS score	EL (s)	NPC
Sham	0.00±0.00	20.99±1.48	7.69±0.56
TBI	11.73±2.10*	58.22±8.24 *	2.50±0.12 *
L-GK	8.27±1.56*#	48.42±4.63*#	3.79±0.25*#
M-GK	6.18±1.60*#	40.64±3.44*#	5.13±0.41*#
H-GK	4.36±1.43*#	29.58±2.22*#	5.93±0.35*#
H-GK+CC	8.09±1.64*#&	48.69±3.22*#&	3.95±0.30*#&
<i>F</i>	74.551	104.807	287.377
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, \**P*<0.05; Compared with TBI group, #*P*<0.05; Compared with H-GK group, &*P*<0.05.

### 2.2 银杏内酯 K 对 TBI 大鼠脑组织损伤和细胞凋亡的影响

HE 和 Nissl 染色显示, Sham 组大鼠脑组织无明显损伤。TBI 组大鼠脑组织神经元出现多处空泡化变性, 伴随神经元变形和核固缩、炎性细胞浸润等病变。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组大鼠的神经元损伤减轻。见图 1。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组大鼠的神经元损伤加重。Sham 组、TBI 组、L-GK 组、M-GK 组、H-GK 组和 H-GK+CC 组大鼠脑组织 HE 染色评分为 0.00±0.00、2.91±0.70、2.18±0.60、1.73±0.79、1.27±0.47 和 2.00±0.63(*F*=30.652, *P*<0.001)。与 Sham 组比较,

TBI 组的 HE 染色评分升高(*P*<0.05)。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组的 HE 染色评分降低(*P*<0.05)。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组的 HE 染色评分升高(*P*<0.05)。

与 Sham 组比较, TBI 组的 TUNEL 阳性率和 Bax 染色评分升高(*P*<0.05), Bcl-2 染色评分降低(*P*<0.05)。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组的 TUNEL 阳性率和 Bax 染色评分降低(*P*<0.05), Bcl-2 染色评分升高(*P*<0.05)。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组的 TUNEL 阳性率和 Bax 染色评分升高(*P*<0.05), Bcl-2 染色评分降低(*P*<0.05)。见图 2 和表 2。

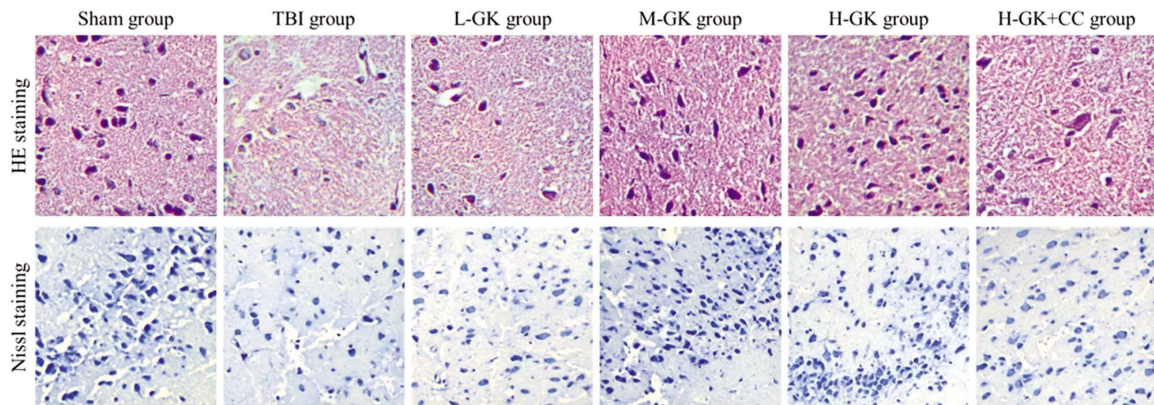


图 1 各组大鼠脑组织 HE 和 Nissl 染色(400×)

Fig.1 HE and Nissl staining images of brain tissue in each group rats (400×)

### 2.3 银杏内酯 K 对 TBI 大鼠脑组织氧化应激和炎症的影响

与 Sham 组比较, TBI 组的 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平降低(*P*<0.05), MDA、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平升高(*P*<0.05)。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组的 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平升高(*P*<0.05), MDA、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平降低(*P*<0.05)。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组的 SOD、CAT 和 GSH-Px 水平降低(*P*<0.05), MDA、IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平升高(*P*<0.05)。见表 3 和表 4。

### 2.4 银杏内酯 K 对 TBI 大鼠血清 NO 和 T-NOS 的影响

与 Sham 组比较, TBI 组血清 NO 和 T-NOS 水平升高(*P*<0.05)。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组血清 NO 和 T-NOS 水平降低(*P*<0.05)。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组血清 NO 和 T-NOS 水平升高(*P*<0.05)。见表 5。

### 2.5 银杏内酯 K 对 TBI 大鼠脑组织 AMPK 介导的能量代谢和

### 自噬的影响

与 Sham 组比较, TBI 组大鼠脑组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量降低(*P*<0.05)。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组大鼠脑组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量升高(*P*<0.05)。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组大鼠脑组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量降低(*P*<0.05)。见表 6。

蛋白相对表达水平比较结果显示, 与 Sham 组比较, TBI 组脑组织中 p-AMPKα(Thr172)和 Beclin-1 降低(*P*<0.05), p62 升高(*P*<0.05)。与 TBI 组比较, L-GK 组、M-GK 组和 H-GK 组脑组织中 p-AMPKα(Thr172)和 Beclin-1 升高(*P*<0.05), p62 降低(*P*<0.05)。与 H-GK 组比较, H-GK+CC 组脑组织中 p-AMPKα(Thr172)和 Beclin-1 降低(*P*<0.05), p62 升高(*P*<0.05)。见图 3。

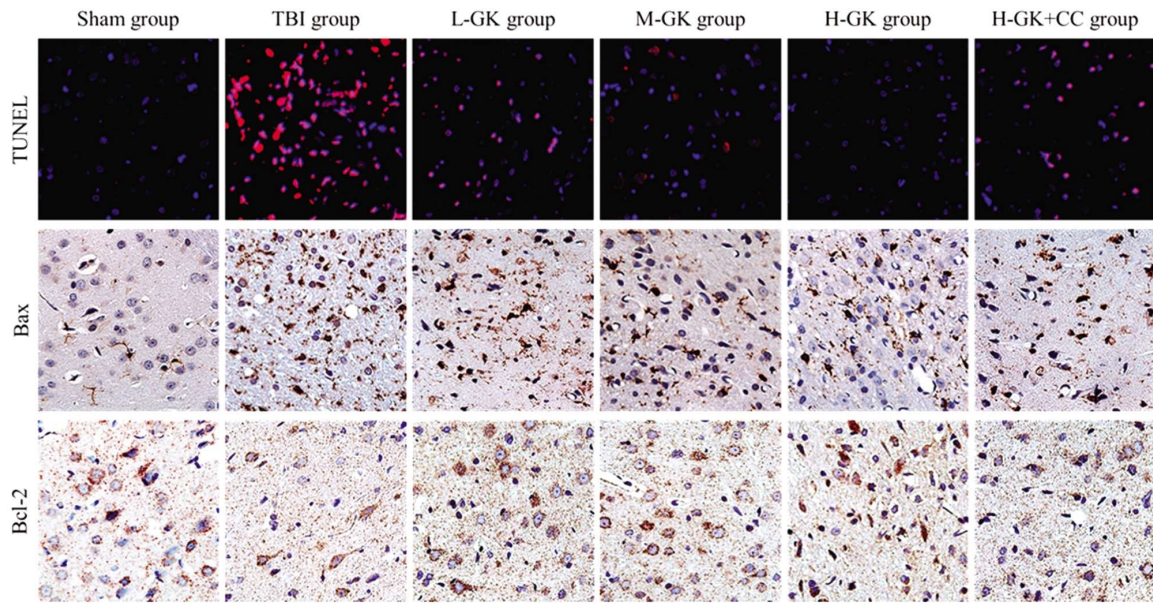


图 2 各组大鼠脑组织 TUNEL 染色以及 Bax 和 Bcl-2 免疫组化染色(400×)

Fig.2 TUNEL staining and Bax and Bcl-2 immunohistochemical staining of brain tissue in each group rats (400×)

表 2 各组大鼠脑组织 TUNEL 阳性率以及 Bax 和 Bcl-2 染色评分

Table 2 The positive rate of TUNEL and the staining scores of Bax and Bcl-2 in each group rats

Groups	TUNEL positive rate (%)	Bax staining score	Bcl-2 staining score
Sham	3.02±0.35	0.50±0.04	3.98±0.33
TBI	80.73±6.51*	3.95±0.32*	0.51±0.04*
L-GK	48.81±2.84*#	3.01±0.21*#	1.49±0.18*#
M-GK	32.73±1.73*#	2.33±0.12*#	2.32±0.19*#
H-GK	19.94±0.88*#	1.81±0.12*#	3.27±0.13*#
H-GK+CC	49.22±4.53*#&	3.00±0.17*#&	1.48±0.13*#&
<i>F</i>	642.446	456.921	511.236
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, \**P*<0.05; Compared with TBI group, #*P*<0.05; Compared with H-GK group, &*P*<0.05.

表 3 各组的脑组织氧化应激指标水平

Table 3 Levels of oxidative stress indexes in brain tissues of each group

Groups	SOD (U/mg protein)	CAT (U/mg protein)	GSH-Px (U/mg protein)	MDA (nmol/mg protein)
Sham	59.56±3.19	5.96±0.46	4.99±0.40	4.08±0.30
TBI	36.78±2.41*	3.19±0.21*	2.04±0.15*	9.39±0.53*
L-GK	43.88±2.28*#	3.85±0.22*#	2.62±0.19*#	8.19±0.50*#
M-GK	46.69±1.96*#	4.31±0.24*#	3.25±0.21*#	7.34±0.52*#
H-GK	51.17±2.61*#	4.61±0.40*#	3.68±0.25*#	6.21±0.38*#
H-GK+CC	42.10±2.85*#&	3.77±0.22*#&	2.81±0.18*#&	7.88±0.44*#&
<i>F</i>	103.325	106.732	192.686	180.867
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, \**P*<0.05; Compared with TBI group, #*P*<0.05; Compared with H-GK group, &*P*<0.05.

### 3 讨论

TBI 是导致年轻人残疾的最常见原因,可以引起包括神经

系统(感觉运动障碍)、精神系统(抑郁和焦虑症状)和躯体系统(眩晕、耳鸣)在内的一系列症状。目前,减少 TBI 后的继发性损伤是治疗的关键,但临床中缺乏相关药物。银杏内酯 K 的脑保

护作用已被广泛报道<sup>[4,5,7,19-23]</sup>,然而其对 TBI 的治疗作用尚未揭示。本研究中,mNSS 评分和 Morris 水迷宫实验结果表明 2、4、8 mg/kg/d 的银杏内酯 K 灌胃 TBI 大鼠 14 d 显著改善了 TBI 大鼠的神经功能和认知功能;HE 和 Nissl 染色表明,银杏内酯

K 减轻了 TBI 大鼠脑组织损伤,促进了神经元存活;TUNEL 染色及 Bax 和 Bcl-2 的免疫组化染色结果表明,银杏内酯 K 抑制了 TBI 大鼠脑组织细胞凋亡。这些结果充分说明银杏内酯 K 具有治疗 TBI 后继发性损伤的潜力。

表 4 各组的脑组织炎症指标水平

Table 4 Levels of brain tissue inflammation indicators in each group

Groups	IL-1β (pg/mg prot)	IL-6 (pg/mg prot)	TNF-α (pg/mg prot)
Sham	23.60±1.20	14.14±0.75	30.95±0.83
TBI	48.27±1.26*	41.05±3.61*	71.05±4.80*
L-GK	38.58±1.51*#	32.51±2.14*#	56.41±2.98*#
M-GK	31.64±1.48*#	23.16±1.64*#	48.41±3.09*#
H-GK	27.29±1.11*#	16.89±1.38*#	39.06±2.29*#
H-GK+CC	37.62±2.52*#&	32.10±2.23*#&	56.44±2.75*#&
<i>F</i>	345.519	255.034	242.359
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, \**P*<0.05; Compared with TBI group, #*P*<0.05; Compared with H-GK group, &*P*<0.05.

表 5 各组的血清 NO 和 T-NOS 水平

Table 5 Serum levels of NO and T-NOS in each group

Groups	NO (μmol/L)	T-NOS (U/mL)
Sham	30.15±2.89	17.96±0.94
TBI	60.71±6.15*	37.05±2.35*
L-GK	50.04±5.08*#	32.26±2.06*#
M-GK	42.74±3.30*#	29.01±1.91*#
H-GK	36.96±3.77*#	22.91±1.00*#
H-GK+CC	48.97±4.41*#&	32.23±1.89*#&
<i>F</i>	65.518	170.258
<i>P</i>	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, \**P*<0.05; Compared with TBI group, #*P*<0.05; Compared with H-GK group, &*P*<0.05.

表 6 各组的脑组织中 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶和 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性以及 ATP 含量

Table 6 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase activities and ATP content in brain tissue of each group

Groups	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase (U/mg prot)	Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> -ATPase (U/mg prot)	ATP (μmol/g prot)
Sham	71.09±4.82	59.22±6.07	24.03±1.93
TBI	43.34±3.10*	37.29±2.28*	12.12±1.01*
L-GK	50.27±3.41*#	43.70±2.31*#	14.79±0.69*#
M-GK	55.75±3.44*#	49.87±3.25*#	17.84±1.98*#
H-GK	64.04±3.27*#	54.87±4.80*#	21.21±1.58*#
H-GK+CC	48.45±3.94*#&	44.83±1.89*#&	14.83±0.65*#&
<i>F</i>	61.054	39.216	109.203
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

Note: Compared with Sham group, \**P*<0.05; Compared with TBI group, #*P*<0.05; Compared with H-GK group, &*P*<0.05.

TBI 后的继发性损伤与活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)大量生成引起的氧化应激相关<sup>[24,25]</sup>,ROS 增加膜通透性和凋亡相关蛋白的表达,诱导神经元死亡<sup>[26]</sup>。另外,TBI 后的继发

性损伤也与神经炎症有关,TBI 后神经胶质细胞被激活,血脑屏障的通透性升高,导致各种氧化产物和细胞因子大量释放,最终引起组织损伤和神经元死亡<sup>[27]</sup>。目前,抗氧化和抗炎疗法

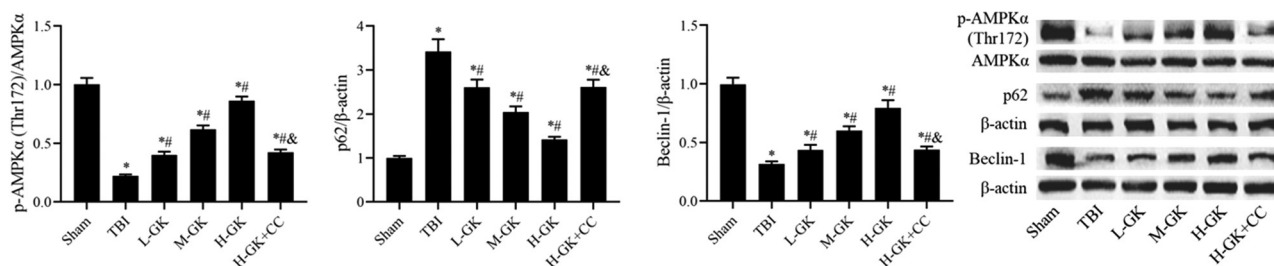


图3 各组大鼠脑组织 AMPK 介导的自噬相关蛋白表达水平

Fig.3 Expression levels of autophagy related proteins mediated by AMPK in brain tissues of each group rats

Note: Compared with Sham group, \* $P < 0.05$ ; Compared with TBI group, # $P < 0.05$ ; Compared with H-GK group, & $P < 0.05$ .

是治疗 TBI 患者的有效方向<sup>[28-31]</sup>。本研究表明银杏内酯 K 减轻了 TBI 大鼠脑组织氧化应激和炎症反应。其他学者指出,银杏内酯 K 可使 MCAO 大鼠血清和脑缺血组织中 MDA、NO、NOS 和 SOD 水平恢复正常,表明银杏内酯 K 通过其抗氧化作用在 MCAO 大鼠中表现出神经保护特性<sup>[7]</sup>。银杏内酯 K 改善了帕金森病小鼠步态功能障碍和多巴胺能神经元损失,并且将小胶质细胞转换为 M2 表型,减少了小胶质细胞介导的神经炎症<sup>[32]</sup>。因此,本研究认为银杏内酯 K 治疗 TBI 大鼠的机制与抗氧化和抗炎作用有关。

脑能量功能障碍已成为 TBI 预后的重要决定因素,TBI 患者大脑代谢研究表明,脑细胞主要能量底物(即葡萄糖)的可用性显著降低<sup>[33]</sup>。据报道,TBI 后大脑立即进入高代谢状态,此时葡萄糖利用率增加,长达 30 min<sup>[34]</sup>,在这种短暂的高代谢状态之后,大脑会经历长时间的低代谢,持续数天至数周<sup>[35,36]</sup>。因此,改善 TBI 后的脑能量代谢是一个很有前景的治疗领域<sup>[33]</sup>。本研究表明银杏内酯 K 提高了 TBI 大鼠脑组织  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$  酶活性以及 ATP 含量,从而提高了脑组织线粒体 ATP 产能。

自噬途径的激活在 TBI 中具有重要的神经保护作用,例如,二十二碳六烯酸可激活自噬通量从而改善认知功能并减少脑损伤<sup>[7]</sup>。Morin 通过增强轻度脑损伤的自噬来改善记忆损害<sup>[38]</sup>。艾氯胺酮通过增强自噬在 TBI 小鼠模型中发挥神经保护作用,其机制涉及 AMPK/mTOR 依赖的自噬<sup>[39]</sup>。自噬激活剂雷帕霉素改善了小鼠 TBI 后的认知功能,抑制了神经炎症<sup>[40]</sup>。然而,抑制自噬则会加剧先天免疫反应并加重脑损伤<sup>[41]</sup>。本研究表明银杏内酯 K 升高了 TBI 大鼠脑组织 Beclin-1 蛋白表达水平,降低了 p62 蛋白表达水平,从而激活了自噬。其他文献报道银杏内酯 K 预处理促进了 OGD 后星形胶质细胞的增殖和迁移,诱导了 OGD 后的自噬,如自噬相关蛋白 7、Beclin-1 蛋白的上调和微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)-II/LC3-I 的增加以及 p62 蛋白的下调<sup>[13]</sup>。这些结果说明银杏内酯 K 对自噬的激活作用可能也是其治疗 TBI 的机制。

AMPK 是一种同源三聚体复合物,通过调节代谢酶活性来影响 ATP 与 AMP 比率促进 ATP 的积累和生成<sup>[42]</sup>。AMPK 主要通过其  $\alpha$  亚基中的 Thr172 磷酸化来激活,进而促进 ATP 合成<sup>[42]</sup>。数据显示,TBI 后 24 h 即可检测到脑损伤皮质和海马的 AMPK Thr172 位点的磷酸化水平降低<sup>[9]</sup>。另外,最近的研究表明,AMPK 通过促进线粒体自噬提高线粒体稳态,进而保持 ATP 产能<sup>[43]</sup>。据报道,银杏内酯 K 预处理激活了 OGD 后星形胶质细胞中的 AMPK/m-TOR/ULK1 通路,而 AMPK 抑制剂 CC 阻断了银杏内酯 K 对 OGD 后星形胶质细胞增殖和迁移的

促进作用<sup>[13]</sup>。本研究中,银杏内酯 K 升高了 TBI 大鼠脑组织 AMPK $\alpha$  Thr172 位点的磷酸化水平,激活了 AMPK。此外,本研究使用银杏内酯 K 和 CC 同时处理 TBI 大鼠,结果证实 CC 减弱了银杏内酯 K 对 TBI 的治疗作用。由于 AMPK 不仅是能量消耗和生产的主要监管者,而且是自噬激活因子,其活性的减少限制了 ATP 生产而促进了 ATP 消耗,并降低了自噬活性,这可能解释了 TBI 后观察到的 ATP 水平和自噬活性的降低,而银杏内酯 K 通过激活 AMPK 有效提高了 ATP 合成和自噬活性,从而减轻了 TBI 大鼠的脑损伤。

综上所述,本研究表明银杏内酯 K 通过改善 AMPK 介导的能量代谢和自噬缓解 TBI 大鼠的脑损伤,银杏内酯 K 可能是治疗 TBI 的候选天然药物,而 AMPK 介导的能量代谢和自噬途径可能是 TBI 的新治疗靶标。

#### 参考文献(References)

- [1] Bardl S, Bardl M, Kornhuber ME. Dog-based multi-sensorial therapy of a patient with a "persistent vegetative state"--a case report [J]. Rehabilitation (Stuttg), 2013, 52(6): 399-405.
- [2] Andersen NH, Christensen NJ, Lassen PR, et al. Structure and absolute configuration of ginkgolide B characterized by IR- and VCD spectroscopy[J]. Chirality, 2010, 22(2): 217-223.
- [3] 楼凤昌,凌娅,唐于平,等.银杏内酯 K 的分离、纯化和结构鉴定[J].中国天然药物,2004,2(1): 11-15.
- [4] Zhou X, Wang HY, Wu B, et al. Ginkgolide K attenuates neuronal injury after ischemic stroke by inhibiting mitochondrial fission and GSK-3 $\beta$ -dependent increases in mitochondrial membrane permeability[J]. Oncotarget, 2017, 8(27): 44682-44693.
- [5] Ma S, Liu X, Xun Q, et al. Neuroprotective effect of Ginkgolide K against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced PC12 cell cytotoxicity by ameliorating mitochondrial dysfunction and oxidative stress [J]. Biol Pharm Bull, 2014, 37(2): 217-225.
- [6] Ma S, Liu H, Jiao H, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K on glutamate-induced cytotoxicity in PC 12 cells via inhibition of ROS generation and  $\text{Ca}^{2+}$  influx[J]. Neurotoxicology, 2012, 33(1): 59-69.
- [7] Ma S, Yin H, Chen L, et al. Neuroprotective effect of ginkgolide K against acute ischemic stroke in middle cerebral ischemia occlusion in rats[J]. J Nat Med, 2012, 66(1): 25-31.
- [8] Carling D. AMPK signalling in health and disease [J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 31-37.
- [9] Hill JL, Kobori N, Zhao J, et al. Traumatic brain injury decreases AMP-activated protein kinase activity and pharmacological enhancement of its activity improves cognitive outcome [J]. J Neurochem, 2016, 139(1): 106-119.
- [10] Li Y, Chen Y. AMPK and Autophagy [J]. Adv Exp Med Biol, 2019,

- 1206: 85-108.
- [11] Feldmann LK, Le Priault F, Felzen V, et al. Proteasome and autophagy-mediated impairment of late long-term potentiation (L-LTP) after traumatic brain injury in the somatosensory cortex of mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 3048.
- [12] Sebastiani A, Gözl C, Sebastiani PG, et al. Sequestosome 1 deficiency delays, but does not prevent brain damage formation following acute brain injury in adult mice[J]. *Front Neurosci*, 2017, 11: 678.
- [13] Zhang Y, Miao JM. Ginkgolide K promotes astrocyte proliferation and migration after oxygen-glucose deprivation via inducing protective autophagy through the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 832: 96-103.
- [14] 王瑞辉, 郭新荣, 吴涛, 等. 使用电子颅脑损伤仪器制备大鼠颅脑损伤动物模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3): 675-676.
- [15] 李锐, 张黎, 于炎冰, 等. 抑制腺苷酸活化蛋白激酶活性对 MCAO 大鼠血脑屏障的保护作用及机制研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2015, 14(9): 910-917.
- [16] Chen J, Sanberg PR, Li Y, et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats[J]. *Stroke*, 2001, 32(11): 2682-2688.
- [17] 刘恒, 孙凡, 徐倩倩, 等. 黄芩苷对脑小血管病模型大鼠认知功能及脑内血管内皮生长因子和内皮抑素表达水平的影响[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2019, 45(5): 1080-1085.
- [18] Liu X, Fan L, Li J, et al. Mailuoning oral liquid attenuates convalescent cerebral ischemia by inhibiting AMPK/mTOR-associated apoptosis and promoting CREB/BDNF-mediated neuroprotection[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 317: 116731.
- [19] Chen M, Zou W, Chen M, et al. Ginkgolide K promotes angiogenesis in a middle cerebral artery occlusion mouse model via activating JAK2/STAT3 pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 221-229.
- [20] Li X, Huang L, Liu G, et al. Ginkgo diterpene lactones inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response in astrocytes via TLR4/NF- $\kappa$ B pathway in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112365.
- [21] Liu Q, Jin Z, Xu Z, 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.
- [22] Liu Q, Li X, Li L, et al. Ginkgolide K protects SH-SY5Y cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury by inhibiting the p38 and JNK signaling pathways[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(3): 3185-3192.
- [23] Wang S, Ouyang B, Aa J, et al. Pharmacokinetics and tissue distribution of ginkgolide A, ginkgolide B, and ginkgolide K after intravenous infusion of ginkgo diterpene lactones in a rat model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 126: 109-116.
- [24] Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic brain injury: an overview of epidemiology, pathophysiology, and medical management [J]. *Med Clin North Am*, 2020, 104(2): 213-238.
- [25] Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, et al. Mitochondria: hub of injury responses in the developing brain [J]. *Lancet Neurol*, 2014, 13(2): 217-232.
- [26] Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10(7): 481-494.
- [27] Jacquens A, Needham EJ, Zanier ER, et al. Neuro-inflammation modulation and post-traumatic brain injury lesions: from bench to bed-side[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11193.
- [28] Davis CK, Vemuganti R. Antioxidant therapies in traumatic brain injury[J]. *Neurochem Int*, 2022, 152: 105255.
- [29] Hall ED, Wang JA, Miller DM, et al. Newer pharmacological approaches for antioxidant neuroprotection in traumatic brain injury [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 145(Pt B): 247-258.
- [30] Kalra S, Malik R, Singh G, et al. Pathogenesis and management of traumatic brain injury (TBI): role of neuroinflammation and anti-inflammatory drugs[J]. *Inflammopharmacology*, 2022, 30(4): 1153-1166.
- [31] Xu X, Gao W, Cheng S, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory mechanisms of atorvastatin in a murine model of traumatic brain injury[J]. *J Neuroinflammation*, 2017, 14(1): 167.
- [32] Miao Q, Chai Z, Song LJ, et al. The neuroprotective effects and transdifferentiation of astrocytes into dopaminergic neurons of Ginkgolide K on Parkinson' disease mice [J]. *J Neuroimmunol*, 2022, 364: 577806.
- [33] Patet C, Suys T, Carteron L, et al. Cerebral Lactate Metabolism After Traumatic Brain Injury[J]. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2016, 16(4): 31.
- [34] Yoshino A, Hovda DA, Kawamata T, et al. Dynamic changes in local cerebral glucose utilization following cerebral conclusion in rats: evidence of a hyper- and subsequent hypometabolic state [J]. *Brain Res*, 1991, 561(1): 106-119.
- [35] Prins ML. Glucose metabolism in pediatric traumatic brain injury[J]. *Childs Nerv Syst*, 2017, 33(10): 1711-1718.
- [36] Xiong Y, Peterson PL, Lee CP. Alterations in cerebral energy metabolism induced by traumatic brain injury [J]. *Neurol Res*, 2001, 23(2-3): 129-138.
- [37] Yin Y, Li E, Sun G, et al. Effects of DHA on Hippocampal Autophagy and Lysosome Function After Traumatic Brain Injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(3): 2454-2470.
- [38] El-Gazar AA, Soubh AA, Mohamed EA, et al. Morin post-treatment confers neuroprotection in a novel rat model of mild repetitive traumatic brain injury by targeting dementia markers, APOE, autophagy and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway[J]. *Brain Res*, 2019, 1717: 104-116.
- [39] Tang Y, Liu Y, Zhou H, et al. Esketamine is neuroprotective against traumatic brain injury through its modulation of autophagy and oxidative stress via AMPK/mTOR-dependent TFEB nuclear translocation[J]. *Exp Neurol*, 2023, 366: 114436.
- [40] Campolo M, Casili G, Lanza M, et al. The inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in improving inflammatory response after traumatic brain injury[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 7855-7866.
- [41] Hegdekar N, Sarkar C, Bustos S, et al. Inhibition of autophagy in microglia and macrophages exacerbates innate immune responses and worsens brain injury outcomes[J]. *Autophagy*, 2023, 19(7): 2026-2044.
- [42] Yan Y, Zhou XE, Xu HE, et al. Structure and physiological regulation of AMPK[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3534.
- [43] Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(2): 121-135.