

# 丁基苯酞对线粒体呼吸链复合酶活性的影响

熊 杰, 冯亦璞\*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

**摘要** 目的: 阐明正丁基苯酞(*d*-3-*n*-butylphthalide, *d*t-NBP)改善缺血脑能量代谢的机制。方法: 用分光光度法测定局灶性脑缺血大鼠脑线粒体呼吸链复合酶 I, II, III 和 IV 活性的改变, 并观察 *d*t-NBP 对这些变化的影响。结果: 缺血时复合酶 II 活性升高, IV 的活性显著降低; 再灌后, 复合酶 I 活性升高, II 的活性降低。在缺血前 10 min 给予 *d*t-NBP (5 mg·kg<sup>-1</sup> 或 10 mg·kg<sup>-1</sup>, ip) 能逆转缺血-再灌引起的上述复合酶活性改变, 尤其是使缺血后急剧降低的复合酶 IV 活性得到明显提高。同时 NBP (*d*-, *l*-, *d*l-) 还能逆转低糖低氧造成的原代培养大鼠皮质细胞呼吸链复合酶 IV 活性降低。结论: NBP 能够改善缺血脑内能量状态是直接作用于脑线粒体的结果, 而 *d*t-NBP 起着主要作用。

**关键词** 正丁基苯酞; 局灶性脑缺血; 呼吸链复合酶; 培养神经细胞

丁基苯酞(*d*-*n*-butylphthalide, *d*t-NBP) 是源于天然的化学合成药物, 药理学实验表明有良好的抗脑缺血和脑保护作用, 尤其是能够明显提高缺血小鼠脑内 ATP 和磷酸肌酸(phosphocreatine) 水平, 从而显著改善缺血期 ATP 耗竭造成的脑线粒体结构与功能损伤<sup>[1~4]</sup>。为进一步阐明 *d*t-NBP 改善局灶性脑缺血大鼠脑内能量供应的机制, 我们采用插线法造成的大鼠大脑中动脉阻断(middle cerebral artery occlusion, MCAO)-再灌模型和原代培养大鼠皮质细胞, 从线粒体呼吸链电子传递的角度, 分析了 *d*t-NBP 预防给药对缺血 1 h 和再灌 3 h 及 6 h 时, 大鼠脑内线粒体呼吸链复合酶 I~IV 的活性, 以及它对原代培养大鼠皮层细胞低糖低氧处理 6 h 造成的呼吸链复合酶 IV 活性改变的影响。

## 材 料 与 方 法

**试剂与药品** *d*t-NBP 为本所合成室提供, 纯度 > 96%, 用 Tween 80 制成 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 混悬液。抗霉素(antimycin A) (混合型), 溶于 50% 乙醇中, 浓度为 100 μg·ml<sup>-1</sup>。鱼藤酮(rotenone), 溶于无水乙醇, 浓度为 0.5 mmol·L<sup>-1</sup>。CoQ<sub>10</sub>, 溶于丙酮, 浓

度为 6 mmol·L<sup>-1</sup>, 临用前以无水乙醇稀释 10 倍使用。NADH (reduced nicotina mide adenine dinucleotide), 临用前配制。以上试剂均购于 Sigma 公司。DCPIP (Sodium 2,6-dichlorophenolindophenol), 购于北京市化学试剂厂。细胞色素 C (cytochrome C), 购于上海生物技术研究所以, 使用前按要求处理。其它试剂均为国产分析纯。

Ubiquinol-10 (CoQ<sub>10</sub> 的还原型产物) 的制备参考文献<sup>[5,6]</sup> 略作修改。方法如下: 用前将 CoQ<sub>10</sub> 8.6 mg (10 μmol) 完全溶解于四氢呋喃 2 ml 中, 加入 NaBH<sub>4</sub> 1 mg, 反复吹打至溶液由黄色变为无色, 再加入无水乙醚 2 ml 萃取 2 次, 合并萃取液后, 挥干乙醚, 所得淡黄色粉末溶于 1 ml 四氢呋喃和乙醇的混合液(1:1), 即得 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的 ubiquinol-10, 以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> HCl 10 μl 酸化后使用。

**缺血再灌模型**<sup>[7,8]</sup> 及线粒体的制备<sup>[9]</sup> 体重 300~350 g ♂ Wistar 大鼠 50 只, 购自中国医学科学院实验动物繁殖中心。用插线法制备大脑中动脉阻断的缺血再灌模型。动物经水合氯醛(360 mg·kg<sup>-1</sup>, ip) 麻醉后, 沿颈正中切开, 仔细分离左侧颈内、颈外动脉(ICA, ECA), 将一根长 5.0 cm, 直径 0.26 mm 的圆头硅化尼龙线, 由 ECA 插入 ICA 约 2.0 cm, 阻断大脑中动脉开口处, 缺血 1 h, 小心抽出尼龙线(缺血组立即断头取脑), 结扎 ECA 开口, 伤口缝合后, 放回原笼, 分别再灌 3 h 和 6 h, 全过程保持室温 24~25 °C。给药组在缺血前 10 min ip *d*t-NBP 5 mg·kg<sup>-1</sup> 或 10 mg·kg<sup>-1</sup>。

收稿日期: 1998-04-08

基金项目: 国家科委 1035 工程基金(94-2D-01); 国家自然科学基金重大项目(29790122)

\* 联系人 Tel: (010) 63165173, Fax: (010) 63017757, E-mail: Feng YP @public.gb.com.cn

整个线粒体制备过程均在 4℃进行。手术动物到达再灌时间点后,立即断头,迅速取出完整缺血侧大脑于玻璃匀浆器中,加入 0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液 5 ml,用手匀浆 15 次。匀浆液铺于等体积 0.34 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液上,700×g 离心 10 min,取上清液缓慢加速至 5 000×g 离心 10 min,去上清液,沉淀混悬于 0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液 2.0 ml,于 5 000×g 离心 20 min,所得沉淀即为线粒体,重复离心清洗 1 次,悬于 0.25 mol·L<sup>-1</sup>蔗糖溶液,以 Lowry 法<sup>[10]</sup>测定蛋白含量,调节蛋白至 1 mg·ml<sup>-1</sup>, -20℃分装保存。

原代培养大鼠皮质细胞的低氧低糖损伤及线粒体的制备 参照 Choi<sup>[11]</sup>等神经细胞原代培养方法进行大鼠皮质细胞培养。孕期 16~18 d 清洁级 Wistar 大鼠用水合三氯乙醛(360 mg·kg<sup>-1</sup>, ip)麻醉,75%乙醇消毒腹部,于超净台内取出胎鼠皮层置于高糖(含 D-葡萄糖 4.5 g·L<sup>-1</sup>) DMEM 培养液中(含新生牛血清和马血清各 10%,青霉素和链霉素各 100 u·ml<sup>-1</sup>),经冲洗,吹打,分散,过滤后,细胞悬液以上述 DMEM 培养液调节细胞浓度至 10<sup>6</sup>个·ml<sup>-1</sup>,接种于预先用 0.01%多聚赖氨酸(分子量 >30 000)覆盖过的 250 ml 培养瓶(每瓶 15 ml),置 5% CO<sub>2</sub> 孵箱内孵育。培养细胞每 3~4 d 更换 1 次新鲜的含血清高糖 DMEM 培养液。培养至 d 5,瓶内加入终浓度为 10 μmol·L<sup>-1</sup>的阿糖胞苷处理细胞 24 h<sup>[12]</sup>。细胞培养至 14 d 分别换入 95% N<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> 饱和的低糖(含 D-葡萄糖 1.0 g·L<sup>-1</sup>) DMEM 培养液中,培养瓶内充入 N<sub>2</sub>,同时给药组分别加入终浓度为 1.0 和 10 μmol·L<sup>-1</sup>的 *d*, *t*, *dt* NBP 处理细胞达 6 h。

收集上述细胞进行线粒体制备<sup>[13]</sup>。细胞以缓冲液 1 (mmol·L<sup>-1</sup>: NaCl 134, KCl 5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7, Tris 2.5, pH 7.5) 清洗,重悬于 3.0 ml 缓冲液 2 (mmol·L<sup>-1</sup>: NaCl 10, CaCl<sub>2</sub> 1.5, Tris 10, pH 7.5),冰上放置 10 min,转入玻璃匀浆器中匀浆,立即加入缓冲液 3 (mmol·L<sup>-1</sup>: sucrose 2000, EDTA 35, Tris 50, pH 7.5) 0.6 ml 混匀,2 500 r·min<sup>-1</sup>离心 4 min,取上清液于 15 000 r·min<sup>-1</sup>离心 20 min,所得沉淀即为线粒体。以缓冲液 4 (mmol·L<sup>-1</sup>: mannitol 210, sucrose 70, Tris 5, EDTA 5, pH 7.5) 将所得线粒体清洗 2 次后,以 Lowry 法<sup>[10]</sup>测定蛋白含量,调节蛋白至 1 mg·ml<sup>-1</sup>, -20℃分装保存。

复合酶活性测定 按 Veitch 和 Dunkley 等的方

法<sup>[5,14]</sup>分别测定线粒体复合酶 I~IV 活性。复合酶 I~III 的测定缓冲液为: 35 mmol·L<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 mmol·L<sup>-1</sup> NaN<sub>3</sub>, pH 7.2, 测定温度均为 30℃,反应体积为 1 ml。

(1) 复合酶 I 活性的测定: 取线粒体蛋白 5~10 μg,于 -20℃/20℃冻融 3 次以达到最大反应速度,加入含有抗霉素 A 2 μg (复合酶 III 抑制剂), 60 μmol·L<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub>(电子传递中间体)的缓冲液 1 ml,混匀后加入 0.13 mmol·L<sup>-1</sup>的底物 NADH 启动反应,1 min 内测定 340 nm 处 NADH 吸收值的变化,表示复合酶 I 的活性。空白管则加入 5 μmol·L<sup>-1</sup> rotenone 抑制复合酶 I 的活性。

(2) 复合酶 II 活性的测定: 将线粒体蛋白约 5 μg 加入含有 88 μmol·L<sup>-1</sup> DCPIP(可接受还原型 FAD 的电子), 鱼藤酮 A 2 μg, 60 μmol·L<sup>-1</sup> CoQ<sub>10</sub> 的缓冲液 1 ml 中,加入新制 25 mmol·L<sup>-1</sup>琥珀酸钠启动反应。30℃温育 10 min 后,5~8 min 内测定 600 nm 处底物 DCPIP 吸收值的变化,以此表示复合酶 II 的活性。此时 DCPIP 的消光系数为 21 mmol·L<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>。

(3) 复合酶 III 活性的测定: 将线粒体蛋白 5~10 μg 加入含有 0.5 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 35.7 μmol·L<sup>-1</sup>氧化型细胞色素 C 的缓冲液 1 ml,30℃温育 5 min,加入终浓度为 100 μmol·L<sup>-1</sup>新配制 ubiquinol-10 启动反应,10 min 内测定 550 nm 处细胞色素 C 吸收值的变化,表示复合酶 III 的活性。

(4) 复合酶 IV 活性的测定: 取 200 mmol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 7.4) 0.5 ml,加入双蒸水 0.375 ml, 2%(v/v) Triton X-100 25 μl,线粒体蛋白 67 μl 约 20~30 μg 和细胞色素 C 33 μl(20 mg·ml<sup>-1</sup>,用前以过量 Vc 还原至 A<sub>550</sub>/A<sub>565</sub>>12),测定 550 nm 处细胞色素吸收值 A 的变化,表示复合酶 IV 的活性。

## 结 果

### 1 缺血及缺血再灌对线粒体呼吸链复合酶活性的影响

由图 1 可见,复合酶 I 的活性在缺血 1 h 无变化,经再灌 3 h,活性明显升高(由 1.148 升高到 2.572 μmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, P<0.01),再灌 6 h,恢复至正常水平。复合酶 II 活性在缺血 1 h 有明显升高(由 14.05 升高到 15.95 μmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>),而在再灌后 6 h 活性反而降低(降至 12.26 μmol·

mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>), 与对照组均有明显差异( $P < 0.05$ )。复合酶 III 的活性在缺血和再灌时变化不明显。复合酶 IV 的活性受缺血影响最大, 在缺血即时其活性显著降低(由 0.167 降至 0.09 μmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>,  $P < 0.01$ ), 在再灌后(3 h 和 6 h), 其活性迅速恢复到正常水平。

### 2 dt-NBP 对缺血及再灌期呼吸链复合酶活性的影响

由图 2 可看出, 缺血前 10 min ip dt-NBP 5 mg·kg<sup>-1</sup> 或 10 mg·kg<sup>-1</sup> 均可以明显改善由缺血再灌造成的复合酶 I, II 和 III 活性改变, 几乎使之恢复到正常水平。dt-NBP 能明显降低再灌 3 h 复合酶 I 活性的升高, 并恢复正常水平。对于复合酶 II, dt-NBP 能矫正它在缺血期的活性升高和再灌 6 h 的活性降低。dt-NBP 对复合酶 III 的活性基本无影响。

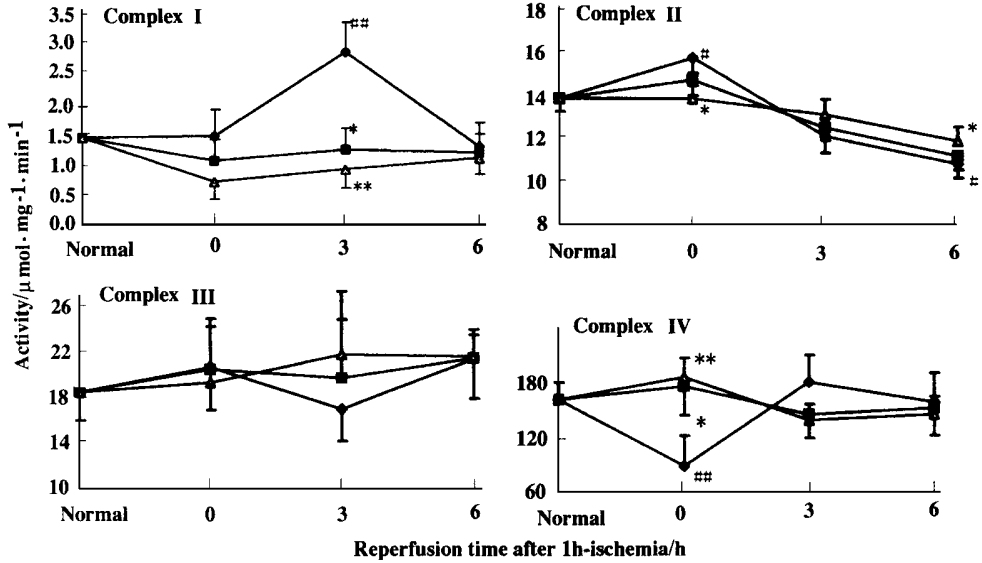


Fig 2 Effect of dt-NBP on the activities of complex I, II, III and IV of respiratory chain in transient middle cerebral artery occluded rat brain ( $n = 4 \sim 6$ ). dt-NBP was administrated 10 min before ischemia. \* (#)  $P < 0.05$ , \*\* (# #)  $P < 0.01$  compared with vehicle (normal) group. ◆—◆ vehicle; ■—■ dt-NBP 5 mg·kg<sup>-1</sup>; △—△ dt-NBP 10 mg·kg<sup>-1</sup>.

dt-NBP 对复合酶 IV 的作用最为明显, 剂量为 5 mg·kg<sup>-1</sup> 即能逆转复合酶 IV 在缺血期显著降低的活性(由缺血期的 0.09 提高到 0.178 μmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ), 恢复到正常水平, 剂量为 10 mg·kg<sup>-1</sup> 时作用更强, 其活性增加到 0.192 μmol·mg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>, 略高于正常组水平 ( $P < 0.01$ ); 对再灌后(3 h, 6 h) 升高的活性略有降低, 但与正常水平无显著差异。

### 3 NBP 对低糖低氧造成原代培养大鼠皮质细胞线粒体呼吸链复合酶 IV 活性改变的影响

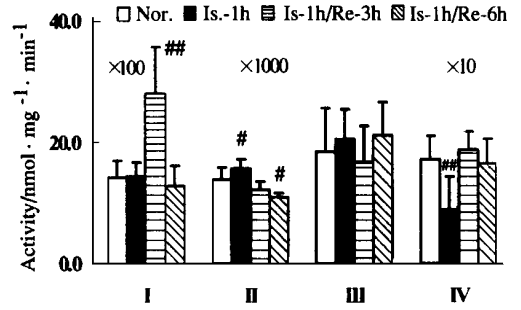


Fig 1 Changes in the activities of complex I, II, III and IV of respiratory chain in transient middle cerebral artery occluded rat brain.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4 \sim 6$ . #  $P < 0.05$ , # #  $P < 0.01$  compared with normal group. Nor: normal; Is: ischemia; Re: reperfusion. × 10, × 100, × 1000 represented that the exact activity were 10, 100, 1000 times of that in the figure.

由表 1 可以看出, 低糖低氧处理 6 h, 原代培养大鼠皮质细胞线粒体呼吸链复合酶 IV 活性显著降低, 在低糖低氧损伤同时给予 NBP 处理, 无论 d, t 或 dt-NBP, 均可使这一降低的活性得到明显升高。其中 dt-NBP 作用最强, 在 1.0 μmol·L<sup>-1</sup> 即能够完全逆转低糖低氧造成的复合酶 IV 活性降低; t-NBP 在 10 μmol·L<sup>-1</sup> 亦可完全逆转低糖低氧造成的复合酶 IV 活性降低, 但在 1.0 μmol·L<sup>-1</sup> 未观察到类似作用。dt-NBP 的作用与 d-NBP 基本相同, 在 1.0 和 10 μmol·L<sup>-1</sup> 均可使低糖低氧造成的复合酶 V 活

性降低得到逆转。

**Tab 1 Effect of *d*, *t* and *dt*-NBP on the activity of complex IV of respiratory chain in cultured fetal rat cerebral neurons with 6 hr hypoxia/ hypoglycemia**

Group	Concentration / mol·L <sup>-1</sup>	Activity of complex IV / μmol·mg <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup>
Control		0.368 ± 0.026
6 hr hypoxia/ hypoglycemia		0.304 ± 0.024 <sup>##</sup>
<i>d</i> -NBP	10 <sup>-6</sup>	0.406 ± 0.083 <sup>*</sup>
	10 <sup>-5</sup>	0.400 ± 0.066 <sup>**</sup>
<i>t</i> -NBP	10 <sup>-6</sup>	0.267 ± 0.050
	10 <sup>-5</sup>	0.385 ± 0.062 <sup>*</sup>
<i>dt</i> -NBP	10 <sup>-6</sup>	0.395 ± 0.044 <sup>**</sup>
	10 <sup>-5</sup>	0.369 ± 0.018 <sup>*</sup>

*n* = 4,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> *P* < 0.01 compared with normal group, <sup>\*</sup> *P* < 0.05, <sup>\*\*</sup> *P* < 0.01 compared with hypoxia/ hypoglycemia group.

### 讨 论

脑作为能量代谢最活跃的器官,其储存能量十分有限,在血流中断时,仅能维持数分钟。能量的耗竭是局灶性缺血再灌引起的脑组织最初和最直接的损伤变化。线粒体作为细胞内能量生成和储存的主要场所,对缺血缺氧极为敏感,持续缺血 5 ~ 7 min,内膜(呼吸链)的结构和功能就会发生较大的改变,细胞死亡。

本实验表明,大鼠在 MCAO 1 h 后,直接需氧的呼吸链复合酶 IV 活性显著降低;此时复合酶 II 活性略有升高,推测可能是代偿反应所致。由于通过 FADH<sub>2</sub> 途径生成的能量较少,同时起关键性作用的复合酶 IV 活性降低,因而,在整体上造成缺血时能量供应急剧减少。随着再灌的开始,复合酶 IV 的活性迅速得到提高,同时复合酶 II 的活性恢复正常,使能量的生成迅速得以恢复;再灌时间延长到 6 h,复合物 II 的活性有所降低,但由于该途径的产效率较低,而且可能是对缺血时该酶活性增高的一种自发调节,同时复合酶 IV 的活性已恢复正常,因而对能量供应的影响不大。

根据本实验结果推测, MCAO 对线粒体呼吸链最重要也最明显的作用是显著降低复合酶 IV 的活性,而对复合酶 I ~ III 的影响相对较小。

在本实验中,给予 *dt*-NBP 后,不仅明显提高了缺血期急剧降低的复合酶 IV 的活性,而且使再灌 3 h 时升高的复合酶 I 活性降至正常水平,并对复合酶 II 表现出双向调节作用,使其活性在急性缺血期

和再灌期均保持在基本正常水平,提示 *dt*-NBP 有益于缺血期和再灌期脑内能量代谢的改善。

由于药效学试验已表明 *dt*-NBP 能够明显提高缺血区局部脑血流<sup>[4]</sup>,因而仅从整体动物水平尚难确定 *dt*-NBP 对呼吸链复合酶的作用机制,即究竟是直接作用于线粒体,还是继发于脑血流的改善。因此,我们进一步观察了 NBP 对原代培养神经细胞的作用。

结果表明,在低糖低氧条件下,*d*、*t*和 *dt*-NBP 对线粒体复合酶 IV 的活性有类似于在整体动物水平的作用,使低糖低氧造成的线粒体复合酶 IV 活性降低得以恢复。由于离体细胞培养排除了整体动物血供增加的影响,因而这一作用表明 *d*、*t*和 *dt*-NBP 是直接作用于线粒体,提高线粒体对有限氧的利用率,从而增加细胞内能量合成。此时 *d*-NBP 的作用优于 *t*-NBP,说明这一作用有一定的立体选择性。

以上结果提示,NBP 提高缺血脑能量水平是直接作用于缺血区脑线粒体,改善呼吸链功能,尤其是提高缺血期呼吸链复合酶 IV 的结果。

### 参 考 文 献

- 1 冯亦璞,胡盾,张丽英. 丁基苯酞对小鼠全脑缺血的保护作用. 药理学报, 1995, **30**: 741
- 2 刘小光,冯亦璞. 丁基苯酞对局部脑缺血大鼠行为和病理改变的保护作用. 药理学报, 1995, **30**: 896
- 3 Deng WB, Feng YP. Effect of *dt*-n-butylphthaline on brain edema in rats subjected to focal cerebral ischemia. *Chin Med Sci J*, 1997, **12**: 102
- 4 Yan CH, Feng YP, Zhang JT. Effects of *dt*-3-n-butylphthalide on regional cerebral blood flow in middle cerebral artery occlusion rats. *Acta Pharmacol Sin*, 1998, **19**: 117
- 5 Hue L, Veitch K, Hombroeckx A. Global ischemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischemic damage. *Biochem J*, 1992, **281**: 709
- 6 Krahenbuhl S, Brass EP, Hoppel CL. Decreased activities of ubiquinol: Ferricytochrome c oxidoreductase (complex III) and ferrocytochrome c: oxygen oxidoreductase (complex IV) in liver mitochondria from rats with hydroxycobalamin [c-lactam] induced methylmalonic aciduria. *J Biol Chem*, 1991, **266**: 20998
- 7 Koizumi J, Yoshida Y, Nazakawa T. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*, 1986, **8**: 1

- 8 Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H. Interleukin 1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*, 1995, **26**: 676
- 9 Hogeboom GH. Fractionation of cell components of animal tissues. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods of Enzymology*. New York: Academic Press Inc., Publishers. 1965: 17
- 10 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, **193**: 265
- 11 Lobner D, Choi DW. Dipyridamole increases oxygen-glucose deprivation-induced injury in cortical cell culture. *Stroke*, 1994, **25**: 2085
- 12 Choi DW, Maulucci Gedde M, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*, 1987, **7**: 357
- 13 Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells — Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem*, 1974, **249**: 7991
- 14 Dunkley PR, Jarvie P, Heath JW. A rapid method for isolation of synaptosomes on percoll gradients. *Brain Res*, 1986, **372**: 115

## EFFECTS OF BUTYLPHTHALIDE ON THE ACTIVITIES OF COMPLEXES OF THE MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN

Xiong Jie( Xiong J) and Feng Yipu( Feng YP)

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100050)

**ABSTRACT** **AIM:** To study the effect of *dl*-3-*n*-butylphthalide (*dl*-NBP) on the function of mitochondrial respiratory chain and to elucidate the increasing effect of NBP on brain energy supply during cerebral ischemia. **METHODS:** Mitochondria were isolated from the brain of transient middle cerebral artery occluded (MCAO) rat and the activities of the four complexes of the respiratory chain were determined. **RESULTS:** The activity of complex IV was deeply decreased after 1 h ischemia. It was back to normal level when treated with NBP ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  or  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 10 min before ischemia). During the reperfusion period after ischemia, the activity of complex I was notably increased at 3 h, and that of complex II was decreased at 6 h. With NBP treatment, these altered activities also returned to normal level. In cultured neurons subjected to 6 h hypoxia/hypoglycemia, the same increasing effect of NBP (*d*, *l* or *dl*) on the activity of complex IV was also found, and *d*-NBP seemed to be more effective. **CONCLUSION:** NBP can act directly on complex IV to increase its activity. This action may play an important role in the increasing effect of NBP on brain energy supply during cerebral ischemia.

**KEY WORDS** *d*, *l*, *dl*-butylphthaline; middle cerebral artery occlusion (MCAO); complexes of respiratory chain; cultured neurons