

温阳化瘀方改善大鼠脑缺血再灌注损伤的作用及机制研究[△]

谢婷婷*, 龚志英, 马威#, 莫雪妮(广西中医药大学中医药壮瑶医药研究院, 南宁 530023)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)11-1422-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.11.07



摘要 **目的** 基于核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号通路和线粒体铁死亡途径,研究温阳化瘀方对大鼠脑缺血再灌注损伤的改善作用及机制。**方法** 将SD大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平片组(10.8 mg/kg)、温阳化瘀方组(28 g/kg),每组24只。除假手术组外,其余各组大鼠均采用Longa线栓法构建大脑中动脉闭塞模型。造模成功后,各给药组大鼠灌胃相应药液(连续给药7 d或者14 d),假手术组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每天1次。分别于给药后第7、14天时,计算大鼠神经功能缺损评分;观察大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体超微结构;检测大鼠缺血侧脑组织中丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、Fe²⁺含量以及Nrf2、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、GPX4蛋白和mRNA表达水平。**结果** 给药后第7、14天时,与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体呈铁死亡典型改变,且随时间推移损伤持续加重;神经功能缺损评分和MDA、Fe²⁺含量均显著升高($P<0.05$),GSH含量以及Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白和mRNA表达水平均显著降低($P<0.05$)。与模型组比较,尼莫地平片组和温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体形态随时间推移逐步改善,上述定量指标均显著逆转($P<0.05$),且温阳化瘀方组大部分指标的改善效果均显著优于尼莫地平片组($P<0.05$)。**结论** 温阳化瘀方可改善大鼠脑缺血再灌注损伤,其作用机制可能与激活Nrf2/GPX4信号通路、抑制线粒体铁死亡有关。

关键词 温阳化瘀方;脑缺血再灌注损伤;Nrf2/GPX4信号通路;线粒体;铁死亡;神经元

Study on the effect and mechanism of Wenyang huayu formula in improving cerebral ischemia-reperfusion injury in rats

XIE Tingting, GONG Zhiying, MA Wei, MO Xueni (Institute of Traditional Chinese and Zhuang-Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the improving effect and mechanism of Wenyang huayu formula on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats based on nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway and mitochondrial ferroptosis pathway. **METHODS** SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Nimodipine tablet group (10.8 mg/kg), and Wenyang huayu formula group (28 g/kg), with 24 rats in each group. Except for the sham operation group, rats in other groups were all subjected to middle cerebral artery occlusion model by Longa thread occlusion method. After successful modeling, rats in each administration group were intragastrically gavaged with corresponding liquid for 7 days or 14 days, while rats in sham operation group and model group were given equal volume of normal saline once a day. At 7 and 14 days after administration, neurological deficit scores of rats were calculated; the ultrastructure of neuronal mitochondria in ischemic brain tissue of rats was observed; the contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and Fe²⁺, as well as the protein and mRNA expression levels of Nrf2, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and GPX4 in ischemic brain tissue of rats were detected. **RESULTS** At 7 and 14 days after administration, compared with the sham operation group, the neuronal mitochondria in ischemic brain tissue of rats in the model group showed typical changes of ferroptosis, and the injury continued to worsen over time; the neurological deficit scores, the contents of MDA and Fe²⁺ were significantly increased ($P<0.05$), while the content of GSH and the protein and mRNA expression levels of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 were significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the morphology of neuronal mitochondria in ischemic brain tissue of rats in Nimodipine tablet group and Wenyang huayu formula group was gradually improved over time, and the above quantitative

indicators were significantly reversed ($P<0.05$); moreover, the improvement effect of most indicators in Wenyang huayu formula group was significantly better than that in Nimodipine tablet group ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** Wenyang huayu formula can improve cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, and its mechanism may be related to activating Nrf2/

△基金项目 国家自然科学基金面上项目(No.81874453);广西中医药大学校级科研项目(No.2023QN006);广西自然科学基金项目(No.2020GXNSFAA297270)

* **第一作者** 讲师。研究方向:中医药防治脑血管病。E-mail: 571149577@qq.com

通信作者 讲师。研究方向:中医药防治脑血管病。E-mail: 512630027@qq.com

KEYWORDS Wenyang huayu formula; cerebral ischemia-reperfusion injury; Nrf2/GPX4 signaling pathway; mitochondrion; ferroptosis; neuron

缺血性脑卒中(ischemic stroke, IS)具有高发病率、高致残率及高死亡率的特点,是当前全球范围内的重大公共卫生问题^[1]。尽管溶栓及血管内取栓等血流重建手段显著提高了患者的血管再通率,但随之而来的脑缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤往往引发二次瀑布式神经损害,严重限制了IS的临床预后。因此,深入解析脑I/R损伤的病理演变规律,并寻找新的治疗IS的药物具有重要意义。

近年来的研究发现,线粒体铁死亡是介导脑I/R损伤的核心病理机制^[2]。铁死亡是一种由铁依赖性脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡方式。线粒体作为细胞能量代谢的中枢,不仅是铁代谢的重要场所,更是活性氧产生的源头与铁死亡攻击的核心靶点^[3]。核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)信号通路作为机体最主要的内源性铁死亡防御系统,可通过调控谷胱甘肽(glutathione, GSH)合成及脂质氢过氧化物降解,维持线粒体稳态^[4]。由此可知, Nrf2/GPX4 信号通路在拮抗脑I/R损伤后的脂质过氧化、维持线粒体结构与功能稳态中发挥着关键的调控作用。

中医认为, IS 及其引发的 I/R 损伤的病机实质多属“本虚标实”。其中,“阳气虚衰”为本,“瘀血内阻”为标。“阳虚”在微观层面常表现为线粒体生物功能代谢障碍,而“血瘀”则与微循环紊乱导致的铁盐沉积及氧化毒素积聚密切相关^[5]。温阳化瘀方作为临床验证有效的经典方剂,经本课题组前期研究证实能显著改善IS患者的神经功能评分,并降低D-二聚体水平,展现出良好的抗栓与神经修复作用^[6]。然而,该方能否通过激活Nrf2/GPX4信号通路、抑制线粒体铁死亡这一关键环节,尚缺乏系统的实验证据支持。基于此,本研究拟构建大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型以模拟脑IR损伤,聚焦脑I/R损伤的亚急性期与恢复期,从线粒体超微结构变化、铁代谢平衡及氧化还原稳态等多个维度,探讨温阳化瘀方改善脑I/R损伤的具体作用机制,以期为中医药精准防治IS提供实验依据与理论参考。

1 材料

1.1 主要仪器

5418R 型低温离心机购自德国 Eppendorf 公司; EPOCH2T 型全波长酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司; Power-

pas 型电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; KZ-III-F 型高速低温组织研磨仪购自武汉赛维尔生物科技有限公司; LightCycler480 II 高通量实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪购自瑞士 Roche 公司; NIKONDS-U3 型超灵敏多功能成像仪购自日本 Nikon 公司。

1.2 主要药品与试剂

温阳化瘀方由附片 20 g、淫羊藿 15 g、桂枝尖 15 g、石菖蒲 20 g、酒大黄 6 g、三七 15 g、苍术 15 g、炙甘草 6 g 组成,各药材均购自广西中医药大学第一附属医院药剂科。临用时将除附片外(附片单独先煎煮 2 h)的药材用适量清水浸泡 1 h,然后煎煮 30 min,过滤后药渣再煎煮 20 min;合并两次滤液并加热浓缩,制成 2 g/mL 的药液(以生药量计),密封保存备用。

尼莫地平片(国药准字 H14022821,规格 20 mg)购自正大青春宝药业有限公司;逆转录试剂盒、超敏 ECL 发光检测试剂盒(批号分别为 MR05101M、PW30701S)购自莫纳(武汉)生物科技有限公司;BCA 法蛋白浓度测定试剂盒、Fe²⁺试剂盒(批号分别为 PC0020、BC5415)购自北京索莱宝科技有限公司;兔源 Nrf2、溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、GPX4、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号分别为 10176-2-AP、14064-1-AP、11097-1-AP、ab8227)均购自英国 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 二抗(批号 GB23303)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;RIPA 裂解液(批号 P0013B)购自上海碧云天生物科技股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、GSH 试剂盒(货号分别为 A003-1、A006-2-1)均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 实验动物

本研究所用动物为健康雄性 SPF 级 Wistar 大鼠,6 周龄,体重为(200 $\pm$ 20)g。所有大鼠饲养于广西中医药大学 SPF 级动物房,正式实验前均适应性喂养 7 d,以确保能够自由饮水和进食。本实验经广西中医药大学实验动物伦理委员会审批通过,审批号为 DW20220511-078。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、尼莫地平片组(10.8 mg/kg,根据临床等效剂量换算而得)、温阳化瘀方组(28 g/kg;剂量参考文献[7]设置,以生药量计),每组 24 只。除假手术组外,其余各组大鼠均采用 Longa 线栓

法构建MCAO模型:大鼠禁食8~10 h后,腹腔注射1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉,仰卧固定并维持气道通畅;碘伏消毒后沿颈正中线作1~2 cm切口,逐层分离颈总动脉、颈外动脉及颈内动脉;结扎颈总动脉与颈外动脉近心段,动脉夹夹闭颈内动脉,于颈总动脉处作斜面小口,插入线栓至颈内动脉,系紧活结后缝合切口;缺血2 h后抽出10 mm线栓实施再灌注^[8]。假手术组仅暴露分离血管,不置入线栓,其余操作与造模组完全一致。造模后以大鼠出现提尾时右前肢内弯、左侧霍纳综合征、行走右倾、身体转圈等任一项神经功能缺损表现,作为造模成功的判定标准^[8]。造模过程中剔除不合格模型并及时补齐,保障实验有效性。

造模成功后,各给药组大鼠灌胃相应药液,假手术组、模型组大鼠灌胃等体积生理盐水,每日1次;各组随机选取12只大鼠连续给药7 d(以考察药物对脑I/R损伤亚急性期的影响),剩余12只大鼠连续给药14 d(以考察药物对脑I/R损伤恢复期的影响)。

2.2 大鼠神经功能缺损评分

分别于给药后第7、14天时,各组取6只大鼠采用Zea Longa 5分制法^[9]进行神经功能缺损评分,以动态评价温阳化癥方在脑I/R损伤亚急性期与恢复期对神经功能的保护与修复作用。

2.3 大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体的形态变化观察

分别于给药后第7、14天时,各组取3只大鼠剖取缺血侧脑组织,采用1%戊巴比妥钠麻醉后,于右心耳灌注生理盐水,再恒速注入1%戊二醛-3%多聚甲醛混合液进行固定;取大脑中动脉供血区脑组织制成1 mm³标本,再以1%锇酸避光固定2 h,经梯度乙醇脱水、包埋、切片(60~80 nm)后,依次采用2%醋酸铀避光染色8 min及2.6%枸橼酸铅溶液避CO₂染色5 min;经干燥处理后,采用透射电镜进行观察,并拍照。

2.4 大鼠缺血侧脑组织中MDA、GSH、Fe²⁺含量检测

分别于给药后第7、14天时,各组另取6只大鼠剖取缺血侧脑组织。取部分脑组织(剩余部分用于后续实验),按体积比1:9加入预冷生理盐水进行匀浆,再以2 500 r/min离心15 min,取上清液。根据试剂盒说明书方法操作,采用酶标仪分别于532、420、520 nm波长处测定吸光度,再根据相应公式计算大鼠缺血侧脑组织中MDA、GSH、Fe²⁺的含量。

2.5 大鼠缺血侧脑组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达检测

取“2.4”项下相应时间点大鼠缺血侧脑组织适量,加入研磨珠和裂解液于低温条件下研磨,离心取上清液;蛋白样品经BCA法定量后,加入上样缓冲液于100℃煮

沸变性。取变性后蛋白样品适量,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,再湿法转膜90 min;以TBST洗涤后,加入快速封闭液室温封闭15 min,再加入GPX4、SLC7A11、Nrf2、β-actin一抗(稀释度分别为1:2 000、1:1 000、1:2 000、1:5 000)于4℃下孵育过夜;次日,加入二抗(稀释度为1:10 000)室温孵育1 h。经ECL试剂显影处理后,采用多功能成像仪成像,再利用Image J软件分析条带灰度值。以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)的条带灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.6 大鼠缺血侧脑组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA表达检测

取“2.4”项下相应时间点大鼠缺血侧脑组织适量,加入MonzolTM ReagentPro预冷研磨,按试剂盒说明书方法提取总RNA,再根据逆转录试剂盒说明书方法合成cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增:95℃预变性30 s;95℃变性10 s,60℃退火/延伸30 s,共40个循环。以GAPDH为内参,采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的mRNA相对表达量。本研究所用引物由南宁捷尼斯生物科技有限公司设计并合成,具体信息见表1。

表1 引物序列和扩增产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
Nrf2	正向:CACATCCAGACAGACACCACT	126
	反向:CTACAAATGGGAATGTCTCTGC	
SLC7A11	正向:AAATTCTCATTAGCAGTCCCGAT	114
	反向:CAGCAAACACACCACCGTT	
GPX4	正向:CCCATTCCGAGCCTTTCAACC	138
	反向:ATCGATGCTCTTGGCTGCGAAT	
GAPDH	正向:ACAGCAACAGGGTGGTGAC	112
	反向:TTTGAGGGTGCAGCGAACT	

2.7 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件进行统计分析。符合正态分布且方差齐时,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。符合正态分布但方差不齐时,多组间比较采用Welch方差分析,进一步两两比较采用Tamhane's *T*₂检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 温阳化癥方对大鼠神经功能缺损评分的影响

给药后第7、14天时,假手术组大鼠均没有出现神经功能缺损症状(评分均为0);与假手术组比较,模型组大鼠出现明显的神经功能缺损症状,神经功能缺损评分显著升高($P<0.05$);与模型组比较,尼莫地平片组和温阳化癥方组大鼠神经功能缺损评分均显著降低($P<0.05$);与尼莫地平片组比较,温阳化癥方组大鼠神经功能缺损评分显著降低($P<0.05$)。结果见表2。

表2 各组大鼠不同时间点神经功能缺损评分比较($\bar{x} \pm s, n=6$, 分)

组别	第7天	第14天
假手术组	0	0
模型组	3.50±0.54 ^a	3.25±0.45 ^a
尼莫地平片组	2.17±0.75 ^b	1.75±0.45 ^b
温阳化瘀方组	1.33±0.51 ^{bc}	1.16±0.39 ^{bc}

a: 与同时时间点假手术组比较, $P<0.05$; b: 与同时时间点模型组比较, $P<0.05$; c: 与同时时间点尼莫地平片组比较, $P<0.05$ 。

3.2 温阳化瘀方对大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体形态的影响

给药后第7、14天时,假手术组大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体外膜完整、形态规整。模型组大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体呈铁死亡典型改变,且随时间推移损伤持续加重——给药后第7天时,线粒体数量减少、肿胀明显,嵴减少,膜及基质密度增大;给药后第14天时,线粒体肿胀加剧,胞体固缩,嵴大量断裂消失。尼莫地平片组和温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织神经元线粒体形态随时间推移逐步改善——给药后第7天时,线粒体大小均一、但肿胀明显,膜结构完整,基质溶解、嵴断裂;给药后第14天时,线粒体肿胀明显减轻,膜结构完整,嵴少量断裂。结果见图1。

3.3 温阳化瘀方对大鼠缺血侧脑组织中MDA、GSH、Fe²⁺含量的影响

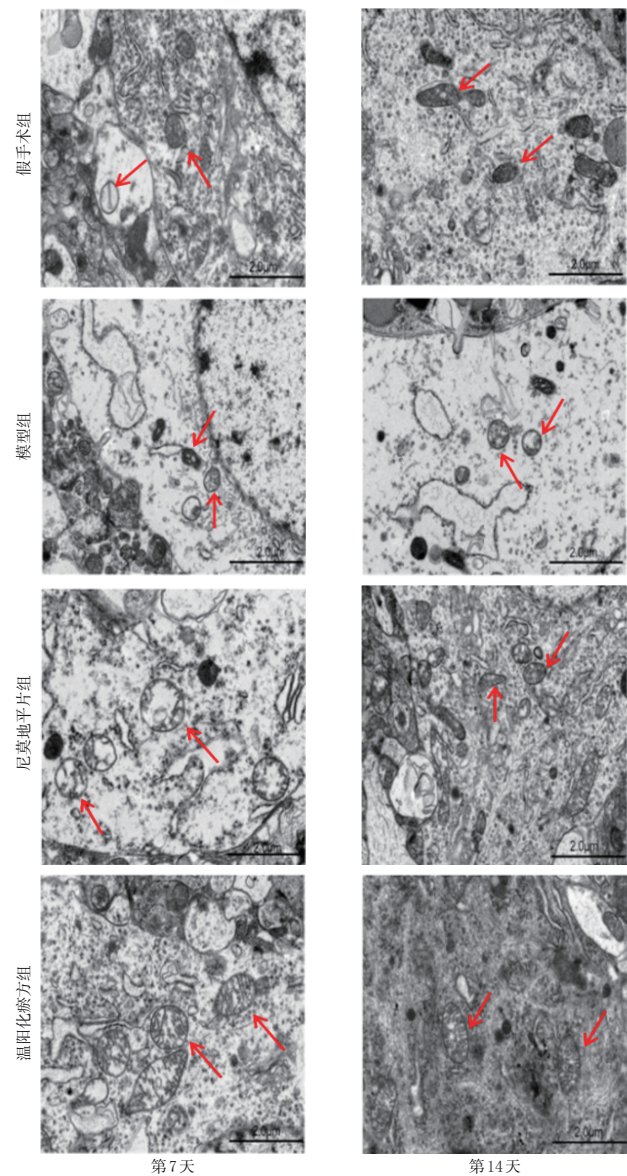
给药后第7、14天时,与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织中MDA、Fe²⁺含量均显著升高,GSH含量显著降低($P<0.05$);与模型组比较,尼莫地平片组和温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织中MDA、Fe²⁺含量均显著降低,GSH含量均显著升高($P<0.05$);与尼莫地平片组比较,温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织中MDA(给药后第7天除外)、Fe²⁺含量均显著降低,GSH含量(给药后第7天除外)显著升高($P<0.05$)。结果见表3。

3.4 温阳化瘀方对大鼠缺血侧脑组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达的影响

给药后第7、14天时,与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,尼莫地平片组和温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织中上述蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$);与尼莫地平片组比较,温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织中上述蛋白(第7天给药后SLC7A11、GPX4蛋白除外)表达水平均显著升高($P<0.05$)。结果见表4、图2。

3.5 温阳化瘀方对大鼠缺血侧脑组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA表达的影响

给药后第7、14天时,与假手术组比较,模型组大鼠缺血侧脑组织中Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA表达水



注:红色箭头所指为发生形态学改变的线粒体。
图1 各组大鼠不同时间点缺血侧脑组织神经元线粒体形态的观察结果(标尺为2.0 μm)

表3 各组大鼠不同时间点MDA、GSH、Fe²⁺含量比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	时间点	MDA/(nmol/mg prot)	GSH/(nmol/mg prot)	Fe ²⁺ /(nmol/g)
假手术组	第7天	16.08±1.12	13.62±0.95	7.12±0.58
	第14天	15.75±1.05	13.84±1.02	6.95±0.52
模型组	第7天	38.24±2.65 ^a	4.08±0.36 ^a	17.65±1.42 ^a
	第14天	37.42±2.72 ^a	4.35±0.42 ^a	17.12±1.38 ^a
尼莫地平片组	第7天	25.12±1.84 ^b	9.75±0.68 ^b	12.84±1.05 ^b
	第14天	22.31±1.62 ^b	10.46±0.81 ^b	10.95±0.88 ^b
温阳化瘀方组	第7天	24.36±1.57 ^b	10.32±0.72 ^b	11.72±0.91 ^{bc}
	第14天	18.25±1.34 ^{bc}	12.12±0.85 ^{bc}	8.54±0.68 ^{bc}

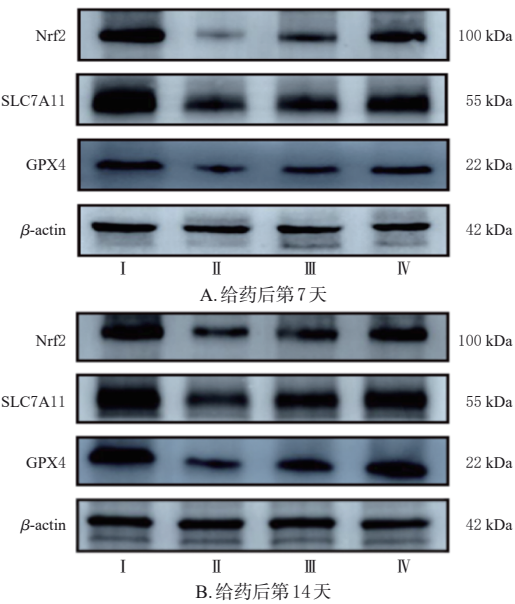
a: 与同时时间点假手术组比较, $P<0.05$; b: 与同时时间点模型组比较, $P<0.05$; c: 与同时时间点尼莫地平片组比较, $P<0.05$ 。

平均显著降低($P<0.05$);与模型组比较,尼莫地平片组和温阳化瘀方组大鼠缺血侧脑组织中上述mRNA表达水平均显著升高($P<0.05$);与尼莫地平片组比较,温阳

表4 各组大鼠不同时间点缺血侧脑组织中 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	时间点	Nrf2/ β -actin	SLC7A11/ β -actin	GPX4/ β -actin
假手术组	第7天	1.13 $\pm$ 0.03	1.14 $\pm$ 0.03	1.12 $\pm$ 0.01
	第14天	1.21 $\pm$ 0.02	1.19 $\pm$ 0.02	1.18 $\pm$ 0.02
模型组	第7天	0.39 $\pm$ 0.03 ^a	0.57 $\pm$ 0.12 ^a	0.46 $\pm$ 0.05 ^a
	第14天	0.53 $\pm$ 0.02 ^a	0.67 $\pm$ 0.03 ^a	0.50 $\pm$ 0.03 ^a
尼莫地平片组	第7天	0.65 $\pm$ 0.05 ^b	0.85 $\pm$ 0.06 ^b	0.82 $\pm$ 0.03 ^b
	第14天	0.89 $\pm$ 0.05 ^b	0.99 $\pm$ 0.02 ^b	0.87 $\pm$ 0.02 ^b
温阳化瘀方组	第7天	0.77 $\pm$ 0.07 ^{bc}	0.88 $\pm$ 0.05 ^b	0.87 $\pm$ 0.04 ^b
	第14天	0.98 $\pm$ 0.03 ^{bc}	1.06 $\pm$ 0.05 ^{bc}	0.96 $\pm$ 0.02 ^{bc}

a: 与同时时间点假手术组比较, $P<0.05$; b: 与同时时间点模型组比较, $P<0.05$; c: 与同时时间点尼莫地平片组比较, $P<0.05$ 。



I: 假手术组; II: 模型组; III: 尼莫地平片组; IV: 温阳化瘀方组。

图2 各组大鼠不同时间点缺血侧脑组织中 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达的电泳图

化瘀方组大鼠缺血侧脑组织中上述 mRNA (给药第 7 天后 SLC7A11、GPX4 mRNA 除外) 表达水平均显著升高 ($P<0.05$)。结果见表 5。

表5 各组大鼠不同时间点 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	时间点	Nrf2 mRNA	SLC7A11 mRNA	GPX4 mRNA
假手术组	第7天	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.11
	第14天	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.05
模型组	第7天	0.31 $\pm$ 0.02 ^a	0.25 $\pm$ 0.04 ^a	0.29 $\pm$ 0.02 ^a
	第14天	0.36 $\pm$ 0.02 ^a	0.36 $\pm$ 0.05 ^a	0.37 $\pm$ 0.03 ^a
尼莫地平片组	第7天	0.67 $\pm$ 0.01 ^b	0.54 $\pm$ 0.02 ^b	0.58 $\pm$ 0.05 ^b
	第14天	0.78 $\pm$ 0.01 ^b	0.67 $\pm$ 0.09 ^b	0.77 $\pm$ 0.04 ^b
温阳化瘀方组	第7天	0.73 $\pm$ 0.02 ^{bc}	0.65 $\pm$ 0.03 ^b	0.64 $\pm$ 0.02 ^b
	第14天	0.87 $\pm$ 0.02 ^{bc}	0.74 $\pm$ 0.11 ^{bc}	0.83 $\pm$ 0.06 ^{bc}

a: 与同时时间点假手术组比较, $P<0.05$; b: 与同时时间点模型组比较, $P<0.05$; c: 与同时时间点尼莫地平片组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

脑 I/R 损伤是 IS 溶栓、取栓治疗后二次损伤的核心病理环节,其发病机制复杂,涉及氧化应激、线粒体功能障碍、铁死亡等^[8]。铁死亡作为一种铁依赖性脂质过氧

化驱动型细胞死亡方式,在脑 I/R 损伤中扮演关键角色,而线粒体作为铁死亡的核心靶点,其形态与功能的完整性直接决定神经元活性^[10-11]。Nrf2/GPX4 信号通路作为调控铁代谢与氧化应激平衡的核心通路,已成为干预脑 I/R 损伤的重要分子靶点^[12-13]。基于此,本研究基于“温阳化瘀”中医治法,系统探讨温阳化瘀方对脑 I/R 损伤大鼠的神经保护作用。

中医认为“阳虚”则无以温煦推动,“血瘀”则脉络失通,二者互为因果。在 IS 病理过程中,“阳虚”在微观层面对应神经元线粒体能量代谢的失衡,“血瘀”则对应微循环障碍,表现为红细胞渗出和血红素降解导致的游离铁积聚^[14-15]。温阳化瘀方中附片、淫羊藿可补火助阳,本质上具有激活细胞代谢的潜力;三七、酒大黄可活血通络,具有改善微血管通透性、减少游离铁积聚的作用;该方从整体层面实现了对神经功能的保护作用^[16]。本研究结果显示,模型组大鼠神经功能缺损严重,线粒体呈现典型铁死亡形态学特征,表现为线粒体皱缩、体积缩小、嵴减少或消失、膜密度增加;经温阳化瘀方干预后,模型大鼠神经功能缺损评分显著降低,线粒体皱缩缓解、嵴增多、水肿减轻,且给药后第 14 天时的改善作用更明显,并优于尼莫地平片组。这提示,温阳化瘀方对 MCAO 模型大鼠的神经功能缺损和铁死亡相关线粒体损伤具有改善作用。

铁代谢紊乱及随之而来的氧化应激是触发铁死亡的关键环节^[17]。本研究观察到,脑 I/R 后模型大鼠缺血侧脑组织中 Fe^{2+} 异常富集、MDA 含量升高且 GSH 大量消耗,这一微观层面的病理演变实质上是中医“瘀血生毒”理论的具象化反映。经温阳化瘀方干预 7、14 d 后,大鼠缺血侧脑组织中 Fe^{2+} 、MDA 含量均显著降低, GSH 含量显著升高。这提示温阳化瘀方可能通过阻断“血瘀-铁沉积-脂质过氧化”这一恶性级联反应,发挥改善脑 I/R 损伤的作用。

Nrf2/GPX4 信号通路是机体对抗脑 I/R 损伤中铁死亡的核心内源性防御轴,其功能失活是缺血神经元发生铁死亡的关键^[18]。脑 I/R 损伤后,氧化应激爆发与线粒体能量代谢障碍会抑制 Nrf2 核转位与转录活性,导致下游抗氧化防御系统崩溃,最终触发铁依赖性脂质过氧化与神经元死亡^[4]。Nrf2 作为抗氧化转录中枢,其激活与入核依赖稳定的能量供应与适宜的氧化还原微环境。活化的 Nrf2 可结合抗氧化反应元件,驱动下游 SLC7A11 与 GPX4 转录:SLC7A11 作为胱氨酸/谷氨酸反向转运体,介导细胞外胱氨酸摄取,为 GSH 合成提供原料;GPX4 是铁死亡关键负调控因子,以 GSH 为辅酶特异性还原脂质过氧化物,从根本上阻断铁死亡进

程^[19-20]。本研究结果显示,温阳化瘀方干预7、14 d后,大鼠缺血侧脑组织中 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白和 mRNA 表达均显著上调。这提示温阳化瘀方可有效逆转脑 I/R 损伤引发的 Nrf2/GPX4 信号通路抑制,通过增强内源性抗氧化防御功能,阻断铁依赖性脂质过氧化进程,进而抑制线粒体铁死亡,发挥神经保护作用。

综上所述,温阳化瘀方可改善大鼠脑 I/R 损伤;其作用机制可能与激活 Nrf2/GPX4 信号通路、抑制线粒体铁死亡有关。本研究验证了该方在中长期的神经修复作用,但观察节点仅局限于亚急性期与恢复期;鉴于缺血后铁死亡的启动与急性氧化应激多发生于再灌注早期,后续研究将增设超早期多时间点动态监测,以完整揭示该方在急性期至恢复期全过程的干预靶点与时效规律。

参考文献

- [1] DING C Y, WU Y Y, CHEN X Y, et al. Global, regional, and national burden and attributable risk factors of neurological disorders: the global burden of disease study 1990-2019[J]. *Front Public Health*, 2022, 10: 952161.
- [2] 刘英飞, 陈博威, 田丰铭, 等. 补阳还五汤通过 Cav-1 抑制铁死亡对脑缺血小鼠的神经保护作用[J]. *中成药*, 2024, 46(2): 605-610.
- [3] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [4] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPX4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152: 175-185.
- [5] 张美菱, 王琪格, 王杰, 等. 基于铁死亡探讨“阳气亏虚, 脾肾虚冷”与年龄相关疾病内在联系及附子的应用相关研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(4): 105-108.
- [6] 刘体勤. 温阳化瘀方治疗缺血性中风急性期(阳虚证)的临床疗效观察[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- [7] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [8] 魏颖, 王丽霞, 阴俊俊, 等. 基于 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路探讨失笑散对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能及铁死亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2026, 32(7): 22-31.
- [9] 李赛菲, 袁培培, 魏亚新, 等. 熟地黄通过抑制自噬和铁死亡改善缺血性脑卒中大鼠神经功能损伤[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(8): 26-33.
- [10] JIANG T C, MA W E, DONG W B, et al. Ferroptosis-associated transcriptional factors in neurological diseases: molecular mechanisms and therapeutic prospects[J]. *Exp Mol Med*, 2025, 57(12): 2763-2781.
- [11] WU Y G, LI Z, DING T, et al. Bidirectional regulation of neuronal autophagy in ischemic stroke: mechanisms and therapeutic potential[J]. *Ageing Res Rev*, 2025, 111: 102842.
- [12] 杜秋思, 刘丹红, 韦梦真, 等. 铁自噬与线粒体自噬在缺血性脑卒中中的研究进展[J]. *海南医科大学学报*, 2025, 31(9): 710-720.
- [13] 丁宁静, 李志平, 王海霞. 基于 Nrf2/GPX4 通路研究右美托咪定对缺血缺氧性脑损伤新生大鼠铁死亡及神经功能的影响[J]. *河北医药*, 2024, 46(17): 2586-2590.
- [14] 何宏盾, 韦亮, 孙诗杰, 等. 温阳逐瘀汤对肾虚证大鼠急性脑缺血损伤后 Wnt3a、 β -catenin 表达的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2024, 22(14): 2568-2574.
- [15] QIN N, LIU R J, DENG R, et al. Modulation of mitochondrial dysfunction: mechanisms and strategies for the use of natural products to treat stroke[J]. *Neural Regen Res*, 2026, 21(6): 2215-2226.
- [16] YANG Z Q, LUO Y R, YANG Z Q, et al. Mitochondrial dynamics dysfunction and neurodevelopmental disorders: from pathological mechanisms to clinical translation[J]. *Neural Regen Res*, 2026, 21(5): 1926-1946.
- [17] PATIL S, SINGH D. Ferroptosis at high altitude: interplay between hypobaric hypoxia and iron balance alteration in cells[J]. *Life Sci*, 2026, 385: 124148.
- [18] 周莉君, 杨洛琦, 杨圣洁, 等. 基于“因瘀致毒, 瘀毒致变”探析泛血管病的诊治[J]. *环球中医药*, 2025, 18(4): 799-802.
- [19] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. Nrf2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.
- [20] CHEN B X, FAN P, SONG X, et al. The role and possible mechanism of the ferroptosis-related SLC7A11/GSH/GPX4 pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 531.

(收稿日期: 2025-12-28 修回日期: 2026-05-18)

(本文责编: 唐晓莲)