

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research山奈酚通过调控 GPX4 介导的铁死亡及
NLRP3/Caspase - 1/GSDMD 改善大鼠
皮瓣缺血再灌注损伤的机制研究Research of kaempferol improves rat skin flap ischemia - reperfusion injury by
regulating GPX4 mediated iron death and NLRP3/Caspase - 1/GSDMD pathway刘 涛, 蒋振兴, 何志军,
李 岩, 陈 文, 李金鹏,
李 非, 魏晓涛, 白璧辉,
顾玉彪

(甘肃省中医院, 甘肃 兰州 730050)

LIU Tao, JIANG Zhen - xing,
HE Zhi - jun, LI Yan,
CHEN Wen, LI Jin - peng,
LI Fei, WEI Xiao - tao,
BAI Bi - hui, GU Yu - biao(Gansu Provincial Hospital of Traditional
Chinese Medicine, Lanzhou 730050,
Gansu Province, China)

基金项目: 国家自然科学基金地区项目基金
资助项目 (81860863、81660544、
82460942); 甘肃省联合科研基金重
大项目基金资助项目
(25JRRA1218); 甘肃省自然基金资
助项目(25JRRA275、25JRRA269)

作者简介: 刘涛(1990 -), 男, 主治医师, 主要
从事中医药治疗骨伤科疾病相关
工作和研究

通信作者: 蒋振兴, 主任医师, 硕士生导师
MP: 15002591775
E - mail: 15002591775@163.com

摘要:目的 探讨山奈酚(Kae)通过调控谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)介导的铁死亡及消皮素D(GSDMD)介导的细胞焦亡,对大鼠皮瓣缺血再灌注损伤(FIRI)的保护作用及其机制。方法 用McFarlane法建立大鼠背部皮瓣缺血再灌注模型。将91只SPF级SD大鼠随机分为假手术组、模型组、实验组、激动剂组、抑制剂组、联合激动剂组和联合抑制剂组,每组13只。造模成功后,试验组按 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 山奈酚灌胃给药;激动剂组腹腔注射 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)激活剂,每周1次;抑制剂组腹腔注射 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 双硫仑,每周1次;联合激动剂组腹腔注射 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NLRP3激活剂+ $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 山奈酚;联合抑制剂组腹腔注射 $30\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 双硫仑+ $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 山奈酚,连续干预2 w。观察皮瓣存活情况;用铁含量检测试剂盒检测组织铁含量;用酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-18水平;用免疫组化法检测增殖细胞核抗原(Ki67)和血小板内皮细胞黏附分子1(CD31)表达;用蛋白质印迹法检测GPX4、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶1(Caspase-1)和消皮素D-N-端结构域(GSDMD-NT)蛋白表达。结果 假手术组、模型组、实验组、激动剂组、抑制剂组、联合激动剂组和联合抑制剂组的皮瓣存活率分别为 $(96.73\pm 1.10)\%$ 、 $(67.04\pm 1.60)\%$ 、 $(85.39\pm 1.22)\%$ 、 $(57.96\pm 1.52)\%$ 、 $(75.80\pm 1.72)\%$ 、 $(80.28\pm 0.95)\%$ 和 $(90.49\pm 0.76)\%$,组织铁含量分别为 (11.57 ± 4.89) 、 (68.04 ± 7.64) 、 (43.87 ± 9.13) 、 (85.97 ± 8.41) 、 (47.78 ± 11.11) 、 (69.68 ± 6.17) 和 $(29.36\pm 7.66)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,IL-1 β 水平分别为 (43.83 ± 13.96) 、 (246.02 ± 37.60) 、 (172.19 ± 29.46) 、 (354.39 ± 36.05) 、 (153.56 ± 26.89) 、 (271.13 ± 39.54) 和 $(97.53\pm 24.67)\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$,CD31相对表达水平分别为 $6\ 694.96\pm 711.29$ 、 $2\ 126.32\pm 277.21$ 、 $3\ 592.33\pm 317.33$ 、 484.36 ± 56.24 、 $3\ 568.83\pm 316.65$ 、 $1\ 901.66\pm 383.85$ 和 $4\ 804.18\pm 360.03$,Ki67相对表达水平分别为 75.56 ± 6.57 、 24.11 ± 4.02 、 37.94 ± 4.08 、 12.17 ± 2.28 、 38.01 ± 3.80 、 24.32 ± 2.76 和 54.65 ± 7.01 ,GPX4相对表达水平分别为 0.92 ± 0.02 、 0.30 ± 0.07 、 0.47 ± 0.08 、 0.12 ± 0.04 、 0.47 ± 0.08 、 0.27 ± 0.07 和 0.62 ± 0.13 ,Caspase1相对表达水平分别为 0.08 ± 0.03 、 0.40 ± 0.07 、 0.29 ± 0.04 、 0.68 ± 0.07 、 0.28 ± 0.03 、 0.40 ± 0.06 和 0.18 ± 0.06 ,GSDMD相对表达水平分别为 0.06 ± 0.04 、 0.57 ± 0.05 、 0.30 ± 0.04 、 0.93 ± 0.09 、 0.30 ± 0.03 、 0.56 ± 0.07 和 0.16 ± 0.02 ,模型组与假手术组比较、实验组与模型组比较、联合激动剂组和联合抑制剂组与实验组比较,上述指标在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。结论 山奈酚可减轻大鼠皮瓣缺血再灌注损伤,其作用可能与上调GPX4表达、抑制铁死亡及调控NLRP3/Caspase-1/GSDMD焦亡通路有关。

关键词: 山奈酚;皮瓣缺血再灌注损伤;铁死亡;细胞焦亡;谷胱甘肽过氧化物酶4;消皮素D

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.07.011

中图分类号:R285.5 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2026)07-0968-07

Abstract: Objective To investigate the protective effect and underlying mechanism of kaempferol (Kae) on flap ischemia – reperfusion injury (FIRI) in rats by regulating glutathione peroxidase 4 (GPX4) – mediated ferroptosis and gasdermin D (GSDMD) – mediated pyroptosis. **Methods** McFarlane method was used to establish the ischemia – reperfusion model of rat dorsal flap. A total of 91 SPF SD rats were randomly divided into sham group, model group, experimental group, agonist group, inhibitor group, Kae + agonist group and Kae + inhibitor group, with 13 rats in each group. After successful modeling, the experimental group was given kaempferol $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ by gavage; the agonist group was intraperitoneally injected with $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NOD like receptor thermoprotein domain associated protein 3 (NLRP3) activator once a week; the inhibitor group was intraperitoneally injected with $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ disulfiram once a week; the Kae + agonist group received intraperitoneal injection of $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NLRP3 activator + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kaempferol; the Kae + inhibitor group received intraperitoneal injection of $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ disulfiram + $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kaempferol for 2 weeks. The iron content in tissues was detected by iron content detection kit; the levels of serum interleukin – 1 β (IL – 1 β) and IL – 18 were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); the expressions of proliferating cell nuclear antigen (Ki67) and platelet endothelial cell adhesion molecule – 1 (CD31) were detected by immunohistochemistry; the protein expressions of GPX4, Caspase – 1 and GSDMD – NT were detected by Western blot. **Results** The flap survival rates of the sham group, model group, experimental group, agonist group, inhibitor group, Kae + agonist group and Kae + inhibitor group were $(96.73 \pm 1.10)\%$, $(67.04 \pm 1.60)\%$, $(85.39 \pm 1.22)\%$, $(57.96 \pm 1.52)\%$, $(75.80 \pm 1.72)\%$, $(80.28 \pm 0.95)\%$ and $(90.49 \pm 0.76)\%$, respectively; the tissue iron content levels were (11.57 ± 4.89) , (68.04 ± 7.64) , (43.87 ± 9.13) , (85.97 ± 8.41) , (47.78 ± 11.11) , (69.68 ± 6.17) and $(29.36 \pm 7.66) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; the levels of IL – 1 β were (43.83 ± 13.96) , (246.02 ± 37.60) , (172.19 ± 29.46) , (354.39 ± 36.05) , (153.56 ± 26.89) , (271.13 ± 39.54) and $(97.53 \pm 24.67) \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively; the relative expression levels of CD31 were $6\ 694.96 \pm 711.29$, $2\ 126.32 \pm 277.21$, $3\ 592.33 \pm 317.33$, 484.36 ± 56.24 , $3\ 568.83 \pm 316.65$, $1\ 901.66 \pm 383.85$ and $4\ 804.18 \pm 360.03$, respectively; the relative expression levels of Ki67 were 75.56 ± 6.57 , 24.11 ± 4.02 , 37.94 ± 4.08 , 12.17 ± 2.28 , 38.01 ± 3.80 , 24.32 ± 2.76 and 54.65 ± 7.01 , respectively; the relative expression levels of GPX4 were 0.92 ± 0.02 , 0.30 ± 0.07 , 0.47 ± 0.08 , 0.12 ± 0.04 , 0.47 ± 0.08 , 0.27 ± 0.07 and 0.62 ± 0.13 , respectively; the relative expression levels of Caspase – 1 were 0.08 ± 0.03 , 0.40 ± 0.07 , 0.29 ± 0.04 , 0.68 ± 0.07 , 0.28 ± 0.03 , 0.40 ± 0.06 and 0.18 ± 0.06 , respectively; the relative expression levels of GSDMD were 0.06 ± 0.04 , 0.57 ± 0.05 , 0.30 ± 0.04 , 0.93 ± 0.09 , 0.30 ± 0.03 , 0.56 ± 0.07 and 0.16 ± 0.02 respectively. There were statistically significant differences in the above indexes between model group and sham group, between experimental group and model group, and between Kae + agonist group, Kae + inhibitor group and experimental group (all $P < 0.05$). **Conclusion** Kaempferol can alleviate flap ischemia – reperfusion injury in rats, and its protective effect may be related to upregulating GPX4 expression, inhibiting ferroptosis, and regulating the NLRP3/Caspase – 1/GSDMD pyroptosis signaling pathway.

Key words: kaempferol; flap ischemia – reperfusion injury; ferroptosis; pyroptosis; glutathione peroxidase 4; gasdermin D

皮瓣移植是显微外科修复创伤、肿瘤术后组织缺损的核心技术,但术后皮瓣缺血再灌注损伤(flap ischemia – reperfusion injury, FIRI)仍是导致皮瓣坏死的关键瓶颈,目前尚无特效防治药物^[1]。国内外最新研究证实,铁死亡与细胞焦亡的协同激活是 FIRI 进

展的核心机制,铁死亡抑制剂 Ferrostatin – 1、焦亡抑制剂双硫仑等候选药物虽在基础研究中有效,但存在靶向性差、稳定性不足、临床转化难的局限。谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 是铁死亡的核心调控蛋白, NOD 样受体家族含吡喃结构域

蛋白3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)/半胱天冬酶1 (Caspase-1)/焦孔素D (gasdermin D, GSDMD) 是介导细胞焦亡的关键通路, 2者共同调控 FIRI 的氧化应激与炎症级联反应^[2]。山奈酚具有抗炎、抗氧化的多重药理活性, 但其能否通过协同调控 GPX4 介导的铁死亡与焦亡通路改善 FIRI 仍需进一步研究^[3-5]。本研究旨在探讨山奈酚对大鼠 FIRI 的保护作用及分子机制, 为临床防治 FIRI 提供新的实验依据。

材料与方法

1 材料

实验动物 SPF级SD大鼠91只, 雄性, 体质量220~250 g, 购自兰州兽研所实验动物中心, 生产许可证号: SYXK(甘)2020-0010, 使用许可证号: SYXK(甘)2020-0010。本研究经中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物伦理委员会审批(伦理批号: LVRIAEC-2025-038)。饲养环境温度22~25℃, 湿度50%~60%, 12 h光暗循环, 适应性喂养1 w后开始实验。

试剂 山奈酚, 规格: 每支20 mg, 纯度: $\geq 98\%$, 批号: Y20241015, 上海源叶生物科技有限公司生产; NLRP3 激活剂, 规格: 每支5 mg, 纯度: $\geq 99\%$, 批号: SML1949-5MG-20240812、双硫仑, 规格: 每支1 g, 纯度: $\geq 98\%$, 批号: D7643-1G-20240720, 均由美国Sigma-Aldrich公司生产; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司生产; Per's 普鲁士蓝染色试剂盒和GPX4兔多克隆抗体, 均由湖北武汉三鹰生物技术有限公司生产; 铁含量检测试剂盒、大鼠白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒、IL-18 ELISA 试剂盒, 均由湖北武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司生产; GSDMD-NT 兔单克隆抗体、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (Cleaved Cysteine-aspartic protease-1, Cleaved Caspase-1) 兔单克隆抗体, 均由美国Affibotech公司生产; 血小板内皮细胞黏附分子-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, CD31) 兔多克隆抗体, 湖北武汉赛维尔生物科技有限公司生产; 肿瘤增殖抗原 (Ki67 antigen, Ki67) 兔单克隆抗体, 美国Novus Biologicals公司生产; β -肌动蛋白 (β -actin, β -actin) 鼠单克隆抗体, 北京天德悦生物科技有限责任公司生产; 超敏电化学发光 (electrochemiluminescence, ECL) 检测试剂盒, 湖北武

汉阿斯本生物技术有限公司生产。

仪器 RM2016 病理切片机, 德国徕卡仪器有限公司 Leica 产品; IX51 倒置荧光显微镜, 日本奥林巴斯株式会社 Olympus 产品; H-7650 透射电子显微镜, 日本日立高新技术株式会社 Hitachi 产品; Cmax plus 多功能酶标仪, 美国分子仪器公司 Molecular Devices 产品; DYY-6C 垂直蛋白电泳仪, 北京市六一仪器厂产品; ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统, 美国伯乐生命医学产品有限公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建^[6]

参考 McFarlane 法建立大鼠背部皮瓣缺血再灌注模型。用1%戊巴比妥钠 ($5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 腹腔麻醉后, 常规备皮、消毒, 于大鼠背部设计 $5 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ 随意型皮瓣, 分离皮瓣后阻断供血2 h, 再恢复血流1 h, 随后原位缝合固定。假手术组仅行皮瓣设计与分离, 不阻断血流, 其余各组均建立缺血再灌注模型。

2.2 动物分组与处理方法

将91只大鼠随机分为7组, 分别为假手术组、模型组、实验组、激动剂组、抑制剂组、联合激动剂组和联合抑制剂组, 每组13只。实验组于造模后24 h按 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃山奈酚溶液^[6] (二甲基亚砜进行溶解, 配制成 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液, 用生理盐水稀释至 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 连续给药2 w; 激动剂组于造模后当日腹腔注射 NLRP3 激活剂 ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每周1次, 连续给药2 w; 抑制剂组于造模后当日腹腔注射双硫仑 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每周1次, 连续给药2 w; 联合激动剂组在激动剂组基础上加用 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 山奈酚灌胃; 联合抑制剂组在抑制剂组基础上加用 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 山奈酚灌胃; 假手术组与模型组每日灌胃等体积生理盐水, 连续2 w。

2.3 图像分析法观察皮瓣存活情况^[7]

术后14 d, 用数码相机拍摄皮瓣外观, 用 Image J 软件计算皮瓣存活面积 (红润、有血运区域) 占总面积的百分比, 即皮瓣存活率。

2.4 HE 染色法检测组织病理学^[8]

术后14 d 将大鼠处死, 取皮瓣中央区域 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ 的组织, 用4%多聚甲醛固定24 h后进行石蜡包埋, 制作厚度为 $3 \mu\text{m}$ 的切片, 随后脱蜡至水, 用苏木素对细胞核染色5 min, 经1%盐酸分化30 s, 再用1%氨水返蓝, 接着用伊红染色2 min, 完成脱水透明后以中性树胶封片, 用光学显微镜观察组织水肿程度和炎性细胞浸润情况。

2.5 普鲁士蓝染色法联合铁含量检测试剂盒法检测组织铁含量

将切片脱蜡至水,用1:1配比的2%亚铁氰化钾-2%盐酸混合液染色30 min,经核固红复染5 min后脱水封片,用光学显微镜观察铁离子沉积形成的蓝色颗粒。取皮瓣组织100 mg制作匀浆,在4℃下以 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液,按照试剂盒说明书的步骤操作检测铁离子浓度。

2.6 ELISA 法检测炎症因子

采集大鼠腹主动脉血,在4℃下以 $3\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min获取血清,依据ELISA试剂盒的说明书检测血清IL-1 β 和IL-18水平,用酶标仪读取450 nm处的光密度,计算出各炎症因子的浓度。

2.7 免疫组化法检测细胞增殖与血管新生

取石蜡切片脱蜡至水,柠檬酸盐缓冲液高温高压抗原修复,3%过氧化氢室温封闭10 min,滴加Ki67和CD31一抗(稀释比1:200),4℃湿盒孵育过夜。次日磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤,滴加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗,室温孵育30 min,二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色,苏木素复染,脱水透明、封片。用光学显微镜随机选5个200倍高倍视野拍照,Ki67以阳性细胞百分比表示,CD31以阳性血管数(条/高倍视野)表示。

2.8 蛋白质印记法检测 GPX4、GSDMD - NT 和 Caspase -1 蛋白相对表达水平

提取皮瓣组织总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。每孔取蛋白40 μg 行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳电泳并转膜至聚偏氟乙烯膜,5%脱脂奶粉封闭1 h后,分别加入GPX4、Caspase-1、GSDMD-NT及 β -Actin一抗,4℃孵育过夜;次日,加入HRP标记二抗室温孵育30 min,ECL显色,用图像分析软件测定灰度值,并以目标蛋白与 β -actin灰度比表示蛋白相对表达量。

2.9 透射电镜法观察线粒体超微结构

取 1 mm^3 的皮瓣组织,用4%戊二醛固定24 h,用1%锇酸固定2 h,经梯度脱水后用环氧树脂包埋,制作70 nm的超薄切片,经醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色后,用透射电镜观察线粒体的形态,重点记录线粒体肿胀、嵴断裂的具体情况。

3 统计学处理

用SPSS 26.0软件进行统计学分析。计量资料经正态性检验后,符合正态分布者以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,组间两两比较用Tukey法。

结 果

1 山奈酚对大鼠皮瓣存活率的影响

术后2 w,模型组的皮瓣存活率显著低于假手术组($P < 0.05$),试验组的皮瓣存活率显著高于模型组($P < 0.05$),联合激动剂组的皮瓣存活率显著低于试验组($P < 0.05$),联合抑制剂组的皮瓣存活率显著高于试验组($P < 0.05$),见表1。

2 山奈酚对大鼠皮瓣组织病理学的影响

HE染色显示:假手术组皮瓣组织层次清晰,无明显水肿及炎性浸润;模型组组织水肿严重,真皮层大量炎性细胞浸润,胶原纤维断裂;试验组水肿减轻,炎性细胞浸润减少;联合激动剂组炎性浸润较山奈酚组加重,联合抑制剂组水肿及炎性浸润进一步减轻,见图1。

3 山奈酚对大鼠皮瓣组织铁含量的影响

普鲁士蓝染色显示,模型组皮瓣组织内蓝染铁沉积明显增多;与模型组比较,试验组铁沉积减少;联合激动剂组铁沉积较实验组增加,而联合抑制剂组进一步减少。铁含量检测试剂盒检测显示,模型组组织铁含量较假手术组显著升高($P < 0.01$);实验组较模型组显著降低($P < 0.05$);联合激动剂组较实验组显著升高($P < 0.05$),联合抑制剂组较实验组进一步显著降低($P < 0.05$),见表2。

表1 各组大鼠皮瓣存活率的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of flap survival rates in rats among different groups(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	Flap survival rates
Sham	13	96.73 $\pm$ 1.10
Model	13	67.04 $\pm$ 1.60*
Experimental	13	85.39 $\pm$ 1.22 [#]
Agonist	13	57.96 $\pm$ 1.52
Inhibitor	13	75.80 $\pm$ 1.72
Kae + agonist	13	80.28 $\pm$ 0.95 $^{\Delta}$
Kae + inhibitor	13	90.49 $\pm$ 0.76 $^{\Delta}$

Kae: Kaempferol; Sham group: Underwent identical surgery without ischemia - reperfusion; Model group: Establish a rat dorsal flap ischemia - reperfusion model; Experimental group: After modeling, $1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of kaempferol was administered; Agonist group: After modeling, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of NLRP3 agonist per week was administered intraperitoneally; Inhibitor group: After modeling, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of disulfiram per week was administered intraperitoneally; Kae + agonist group: On the basis of agonist group, $1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of kaempferol was administered; Kae + inhibitor group: On the basis of inhibitor group, $1.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of kaempferol was administered; Compared with sham group, * $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with experimental group, $^{\Delta}P < 0.05$.

4 山奈酚对大鼠皮瓣组织炎症因子水平的影响

ELISA 显示:与假手术组比较,模型组的 IL - 1 β 和 IL - 18 水平均显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组比较,实验组的 IL - 1 β 和 IL - 18 水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与实验组比较,联合激动剂组的上述指标均显著升高,而联合抑制剂组均显著降低(均 $P < 0.05$),见表3。

5 山奈酚对大鼠皮瓣组织 Ki67 和 CD31 表达的影响

免疫组织化学实验显示,模型组的 Ki67 阳性率和 CD31 阳性血管数均显著低于假手术组(均 $P < 0.01$);与模型组比较,实验组的 Ki67 阳性率和 CD31 阳性血管数均显著升高(均 $P < 0.05$);与实验

组比较,联合激动剂组的上述指标均显著降低,而联合抑制剂组均显著升高(均 $P < 0.05$),见表4。

6 山奈酚对大鼠皮瓣组织 GPX4、GSDMD 和 Caspase - 1 相关蛋白表达的影响

蛋白质印迹实验显示,与假手术组比较,模型组的 GPX4 蛋白相对表达水平显著降低,而 Caspase - 1 和 GSDMD - NT 蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P < 0.05$);与模型组比较,实验组的 GPX4 蛋白相对表达水平显著升高,Caspase - 1 和 GSDMD - NT 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$);与实验组比较,联合激动剂组的 GPX4 蛋白相对表达水平显著下降,Caspase - 1 和 GSDMD - NT 蛋白相对表达水平均显著升高,而联合抑制剂组的 GPX4 蛋白相对表达水平显著升高,Caspase - 1 和 GSDMD - NT 蛋白相对表达水平均显著下降(均 $P < 0.05$),见表5和图2。

7 山奈酚对大鼠皮瓣组织线粒体超微结构的影响

假手术组的线粒体形态规则,嵴清晰完整;模型组的线粒体显著肿胀,嵴断裂、减少甚至消失,出现铁死亡特征性改变;实验组的线粒体肿胀减轻,嵴断裂情况改善;联合激动剂组的线粒体损伤较实验组加重;联合抑制剂组的线粒体形态接近正常,嵴完整性进一步恢复,见图3。

表2 各组大鼠皮瓣组织铁含量的比较($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of iron content in flap tissue in rats among different groups($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	Iron
Sham	13	11.57 $\pm$ 4.89
Model	13	68.04 $\pm$ 7.64 *
Experimental	13	43.87 $\pm$ 9.13 #
Agonist	13	85.97 $\pm$ 8.41
Inhibitor	13	47.78 $\pm$ 11.11
Kae + agonist	13	69.68 $\pm$ 6.17 Δ
Kae + inhibitor	13	29.36 $\pm$ 7.66 Δ

Compared with sham group, * $P < 0.05$; Compared with model group,

$P < 0.05$; Compared with experimental group, $\Delta P < 0.05$.

表3 各组大鼠血清的白细胞介素 - 1 β (IL - 1 β) 和 IL - 18 水平的比较($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of serum interleukin - 1 β (IL - 1 β) and IL - 18 levels in rats among different groups($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	IL - 18	IL - 1 β
Sham	13	93.22 $\pm$ 41.06	43.83 $\pm$ 13.96
Model	13	485.79 $\pm$ 53.25 *	246.02 $\pm$ 37.60 *
Treatment	13	345.16 $\pm$ 74.52 #	172.19 $\pm$ 29.46 #
Agonist	13	585.64 $\pm$ 56.31	354.39 $\pm$ 36.05
Inhibitor	13	291.33 $\pm$ 41.39	153.56 $\pm$ 26.89
Kae + agonist	13	441.28 $\pm$ 61.91 Δ	271.13 $\pm$ 39.54 Δ
Kae + inhibitor	13	196.59 $\pm$ 26.32 Δ	97.53 $\pm$ 24.67 Δ

Compared with sham group, * $P < 0.05$; Compared with model group,

$P < 0.05$; Compared with experimental group, $\Delta P < 0.05$.

表4 各组大鼠皮瓣组织肿瘤增殖抗原(Ki67)和血小板内皮细胞黏附分子 - 1(CD31)表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of Ki67 antigen (Ki67) and platelet endothelial cell adhesion molecule (CD31) expression levels in flap tissue in rats among different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	<i>n</i>	CD31	Ki67
Sham	13	6 694.96 $\pm$ 711.29	75.56 $\pm$ 6.57
Model	13	2 126.32 $\pm$ 277.21 *	24.11 $\pm$ 4.02 *
Experimental	13	3 592.33 $\pm$ 317.33 #	37.94 $\pm$ 4.08 #
Agonist	13	484.36 $\pm$ 56.24	12.17 $\pm$ 2.28
Inhibitor	13	3 568.83 $\pm$ 316.65	38.01 $\pm$ 3.80
Kae + agonist	13	1 901.66 $\pm$ 383.85 Δ	24.32 $\pm$ 2.76 Δ
Kae + inhibitor	13	4 804.18 $\pm$ 360.03 Δ	54.65 $\pm$ 7.01 Δ

Compared with sham group, * $P < 0.05$; Compared with model group,

$P < 0.05$; Compared with experimental group, $\Delta P < 0.05$.

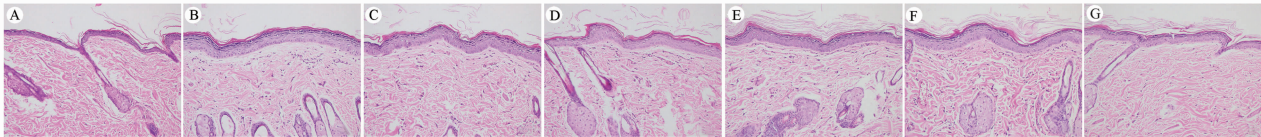


图1 苏木精 - 伊红(HE)染色法检测各组大鼠皮瓣组织结构($\times 200, 50 \mu\text{m}$)

Figure 1 Histological structure in each group of rat flaps detected by hematoxylin - eosin (HE) staining($\times 200, 50 \mu\text{m}$)

A: Sham group; B: Model group; C: Experimental group; D: Agonist group; E: Inhibitor group; F: Kae + agonist group; G: Kae + inhibitor group.

表5 各组大鼠皮瓣组织谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、焦孔素D(GSDMD)和半胱天冬酶1(Caspase-1)相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of glutathione peroxidase 4(GPX4), Gasdermin D(GSDMD) and Cysteine-specific proteinase 1(Caspase-1) protein relative expression levels in flap tissue in rats among different groups($\bar{x} \pm s$)

Group	n	GPX4	Caspase1	GSDMD
Sham	13	0.92 ± 0.02	0.08 ± 0.03	0.06 ± 0.04
Model	13	0.30 ± 0.07*	0.40 ± 0.07*	0.57 ± 0.05*
Experimental	13	0.47 ± 0.08#	0.29 ± 0.04#	0.30 ± 0.04#
Agonist	13	0.12 ± 0.04	0.68 ± 0.07	0.93 ± 0.09
Inhibitor	13	0.47 ± 0.08	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03
Kae + agonist	13	0.27 ± 0.07 [△]	0.40 ± 0.06 [△]	0.56 ± 0.07 [△]
Kae + inhibitor	13	0.62 ± 0.13 [△]	0.18 ± 0.06 [△]	0.16 ± 0.02 [△]

Compared with sham group, * $P < 0.05$; Compared with model group,

$P < 0.05$; Compared with experimental group, [△] $P < 0.05$.

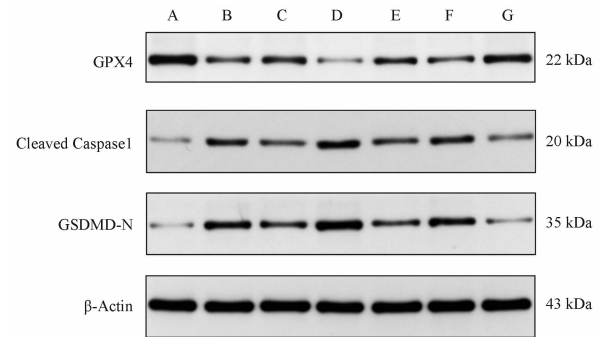


图2 蛋白质印记法检测各组大鼠皮瓣组织 GPX4、GSDMD 和 Caspase-1 蛋白相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of GPX4, GSDMD and Caspase-1 proteins in each group of rat flaps detected by Western blot A; Sham group; B; Model group; C; Experimental group; D; Agonist group; E; Inhibitor group; F; Kae + agonist group; G; Kae + inhibitor group.

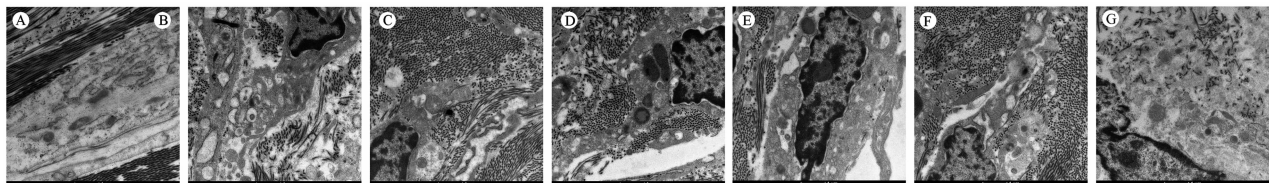


图3 透射电镜检测各组大鼠皮瓣组织线粒体超微结构($\times 8\,500, 1\,\mu\text{m}$)

Figure 3 The ultrastructure of mitochondria in each group of rat flaps detected by transmission electron microscopy($\times 8\,500, 1\,\mu\text{m}$)

A; Sham group; B; Model group; C; Experimental group; D; Agonist group; E; Inhibitor group; F; Kae + agonist group; G; Kae + inhibitor group.

讨论

皮瓣缺血再灌注损伤是影响皮瓣远期成活的重要病理基础,其发生发展涉及氧化应激、炎症反应、微循环障碍及细胞程序性死亡等多个环节。近年来,铁死亡和焦亡在缺血再灌注相关损伤中的作用逐渐受到重视,2者的协同激活被证实是驱动缺血组织损伤进展的核心机制^[8-9]。本研究显示,山奈酚可明显提高大鼠缺血再灌注皮瓣的存活率,减轻组织水肿与炎性细胞浸润,降低组织铁沉积和血清炎症因子水平,促进皮瓣组织细胞增殖与血管新生,并改善线粒体超微结构损伤,证实山奈酚对大鼠 FIRI 具有明确的保护作用。

铁死亡是一种依赖铁离子积聚和脂质过氧化的调控性细胞死亡方式,其核心特征包括细胞内铁超载、膜脂过氧化增强及线粒体超微结构异常。GPX4 是抑制铁死亡的重要调控分子,能够催化脂质过氧化物还原,从而维持细胞膜稳定性^[10]。FIRI 状态下,组织缺血缺氧及再灌注后氧化应激增强,可导致 GPX4 表达下降并诱发铁死亡。本研究中,模型组皮瓣组织铁沉积增加、铁含量升高、GPX4 表达下调,并伴有典型线粒体损伤;山奈酚干预后,组织铁含量下降,GPX4 表达升高,线粒

体形态损伤减轻,提示山奈酚可能通过增强 GPX4 相关抗氧化能力、抑制铁死亡而减轻 FIRI。

焦亡是一种高度促炎的细胞死亡方式,主要由 NLRP3 炎症小体活化介导,其核心机制为炎症小体激活后可促进 Caspase-1 裂解活化,活化的 Caspase-1 可进一步切割 GSDMD 释放具有膜孔形成活性的 GSDMD-NT, GSDMD-NT 可在细胞膜上形成孔道,导致细胞内容物外泄,同时促进 IL-1 β 、IL-18 等促炎因子的成熟与释放,进而放大局部炎症级联反应,加重缺血组织损伤^[11]。GSDMD-NT 可以在细胞膜上形成孔道,导致细胞内容物外泄,并促进 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子释放,从而放大局部炎症反应并加重组织损伤^[12-14]。本研究中,模型组 Caspase-1 和 GSDMD-NT 相对表达水平显著升高,同时 IL-1 β 和 IL-18 水平均显著升高,提示焦亡相关通路被激活;山奈酚干预后, Caspase-1 和 GSDMD-NT 相对表达水平显著下降, IL-1 β 和 IL-18 水平均显著降低,说明山奈酚可能通过抑制 NLRP3/Caspase-1/GSDMD 焦亡通路减轻局部炎症损伤。

为进一步验证山奈酚发挥保护作用的核心机制,本研究在山奈酚干预的基础上,分别联合 NLRP3 炎症

小体激动剂与焦亡抑制剂双硫仑进行干预。与实验组相比,联合激动剂组山奈酚对皮瓣存活的促进作用、炎症抑制效应、铁死亡改善作用及相关通路的调控效果均显著减弱;而联合抑制剂组山奈酚的上述保护作用进一步增强,证实山奈酚对 FIRI 的保护效应与调控 NLRP3/Caspase - 1/GSDMD 焦亡通路密切相关。同时,本研究还发现,山奈酚可以显著提高皮瓣组织 Ki67 阳性细胞比例及 CD31 阳性血管数,提示山奈酚可促进皮瓣组织细胞增殖与新生血管形成,改善皮瓣微循环状态,这一效应也与其抑制铁死亡和焦亡、减轻氧化应激与炎症损伤的作用密切相关,从组织修复层面进一步解释了山奈酚提高皮瓣存活率的内在机制。

本研究仍存在一定局限性。首先,焦亡部分主要检测了 Caspase - 1 和 GSDMD - NT 表达,缺乏对 NLRP3 蛋白表达及更直接焦亡证据的进一步验证;其次,铁死亡部分主要依据 GPX4、铁含量及线粒体超微结构变化进行判断,尚缺乏更多脂质过氧化相关指标的支持;此外,本研究仅基于动物实验,山奈酚在临床中的适用剂量、作用时窗及深层分子机制仍有待进一步研究^[15-17]。

本研究提示:山奈酚可以明显减轻大鼠皮瓣缺血再灌注损伤,其作用可能与上调 GPX4 表达、抑制铁死亡及调控 NLRP3/Caspase - 1/GSDMD 焦亡通路有关。该结果为山奈酚用于改善 FIRI 提供了实验依据。

参考文献:

- [1] 李金鹏,郭婕,刘涛,等. 影响皮瓣存活的相关机制研究进展[J]. 协和医学杂志, 2025, 16(2): 416-422.
- [2] SHI Z, YUAN S, SHI L, *et al.* Programmed cell death in spinal cord injury pathogenesis and therapy[J/OL]. *Cell Prolif*, 2021, 54(3): e12992. 2021 - 03 - 31 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33506613/>.
- [3] WANG J, MAO J, WANG R, *et al.* Kaempferol protects against cerebral ischemia reperfusion injury through intervening oxidative and inflammatory stress induced apoptosis[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 424. 2020 - 04 - 15 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32351385/>.
- [4] 马岁录,何志军,刘涛,等. 基于TMT蛋白组学探讨消肿止痛合剂治疗皮瓣缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2023, 25(6): 1987-1997.
- [5] 何元旭,何志军,刘涛,等. 基于网络药理学研究消肿止痛合剂治疗皮瓣缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化, 2022, 24(7): 2644-2657.
- [6] WANG K, YANG J, DENG J, *et al.* Pinocembrin reduces pyroptosis to improve flap survival by modulating the TLR4/NF - κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(3): 167710.
- [7] YU W, LU J, HUANG X, *et al.* Exendin - 4 promotes ischemia - reperfusion flap survival by upregulating GPX4 to inhibit ferroptosis[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 984: 177029. 2024 - 12 - 05 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39366501/>.
- [8] WANG A, YANG J, DENG J, *et al.* Kaempferol promotes flap survival by inhibiting ferroptosis and inflammation through network pharmacology and *in vivo* experiments[J/OL]. *Wound Repair Regen*, 2025, 33(1): e13250. 2024 - 12 - 24 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39719508/>.
- [9] YU W, LU J, HUANG X, *et al.* Exendin - 4 promotes ischemia - reperfusion flap survival by upregulating GPX4 to inhibit ferroptosis[J/OL]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 984: 177029. 2024 - 12 - 05 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39366501/>.
- [10] YU G, CHEN Y, YANG N, *et al.* Apoptotic bodies derived from fibroblast - like cells in subcutaneous connective tissue inhibit ferroptosis in ischaemic flaps *via* the miR - 339 - 5p/KEAP1/Nrf2 axis[J/OL]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(24): e2307238. 2024 - 06 - 31 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38639443/>.
- [11] WANG K, WANG A, DENG J, *et al.* Rivaroxaban down - regulates pyroptosis and the TLR4/NF - κ B/NLRP3 signaling pathway to promote flap survival[J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 128: 111568. 2024 - 02 - 15 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38266447/>.
- [12] WANG K, XU P, WANG A, *et al.* Shuxuetong injection promotes skin flap survival by inhibiting pyroptosis mediated by the TLR4/NF - κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 355(Pt B): 120749.
- [13] WU P, XIAO Y, QING L, *et al.* Emodin activates autophagy to suppress oxidative stress and pyroptosis *via* mTOR - ULK1 signaling pathway and promotes multi - territory perforator flap survival[J/OL]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 704: 149688. 2024 - 04 - 16 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38387327/>.
- [14] YANG N, HUA R, LAI Y, *et al.* Microenvironment - adaptive nanomedicine MXene promotes flap survival by inhibiting ROS cascade and endothelial pyroptosis[J]. *J Nanobiotechnology*, 2025, 23(1): 282.
- [15] ZHU X, YU G, LV Y, *et al.* Neuregulin - 1, a member of the epidermal growth factor family, mitigates STING - mediated pyroptosis and necroptosis in ischaemic flaps[J/OL]. *Burns Trauma*, 2024, 12: tkae035. 2024 - 06 - 09 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38855574/>.
- [16] FANG P, CHENG S, LAI Y, *et al.* Pharmacodynamic insights into maresin 1: Enhancing flap viability *via* the keap1/Nrf2 axis to control ROS - driven apoptosis and ferroptosis[J/OL]. *Eur J Pharm Sci*, 2024, 203: 106923. 2024 - 12 - 01 [2026 - 02 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39368783/>.
- [17] YANG N, YU G, LAI Y, *et al.* A snake cathelicidin enhances transcription factor EB - mediated autophagy and alleviates ROS - induced pyroptosis after ischaemia - reperfusion injury of island skin flaps[J]. *Br J Pharmacol*, 2024, 181(7): 1068-1090.

(本文编辑:马凌云 投稿日期:2026-03-16)