

脑泰方通过 Nrf2 调控抑制神经元铁死亡与焦亡减轻脑缺血再灌注损伤

王文凤¹, 廖君¹, 张秀丽¹, 聂慧芳¹, 杨彤¹, 刘欣艾¹, 梅志刚^{1*}, 葛金文^{2*}

(1. 湖南中医药大学 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013)

[摘要] 基于核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 探讨脑泰方 (Naotaifang, NTF) 对脑缺血再灌注损伤 (cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI) 神经元铁死亡和焦亡的影响。体内采用大脑中动脉栓塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 方法建立大鼠 CIRI 模型。SD 大鼠随机分为假手术组, 模型组, 脑泰方低、中、高剂量组 (4.5、9、18 g·kg⁻¹) 及丁苯酞组 (60 mg·kg⁻¹), 每组 15 只。造模完成后, 各治疗组连续灌胃 7 d, 每天 1 次, 假手术组及模型组给予同体积生理盐水灌胃。治疗完成后, 采用 Zea Longa 法进行神经功能评分; TTC 染色检测脑梗死体积; HE 染色观察细胞形态; ELISA 检测 Fe²⁺, 白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 及白细胞介素-18 (interleukin 18, IL-18) 水平, 生化检测丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量; Western blot 检测 Nrf2、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、NOD 样受体热蛋白结构域蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 及 Gasdermin D 蛋白 N 端片段 (GSDMD-N) 的表达。体外采用氧-糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 诱导 SH-SY5Y 细胞模拟 CIRI 体外细胞模型, 运用 si-Nrf2 转染技术探讨 Nrf2 对 OGD/R 细胞铁死亡和焦亡的影响及 NTF 的干预作用。Hoechst/PI 荧光染色及 LDH 释放试验检测细胞膜的损伤程度; GPX4 及 GSDMD 荧光染色检测细胞铁死亡及焦亡; 生化检测 Fe²⁺、MDA、GSH 含量; ELISA 检测 IL-1 β 、IL-18 炎症因子水平; Western blot 检测 Nrf2、GPX4、NLRP3 及 GSDMD-N 铁死亡及焦亡相关蛋白表达; 透射电镜观察细胞超微结构。结果表明, NTF 通过促进 Nrf2 的表达, 减轻神经元铁死亡和焦亡, 对 CIRI 产生明显的神经保护作用, 且 NTF 的保护作用呈剂量依赖性; NTF 通过 Nrf2 调控抑制神经元铁死亡和焦亡, 发挥 CIRI 后神经保护作用。综上所述, NTF 可通过 Nrf2 调控抑制神经元铁死亡与焦亡, 减轻脑缺血再灌注损伤。

[关键词] 脑泰方; 脑缺血再灌注损伤; Nrf2; 铁死亡; 焦亡

Naotaifang alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neuronal ferroptosis and pyroptosis through Nrf2 regulation

WANG Wen-feng¹, LIAO Jun¹, ZHANG Xiu-li¹, NIE Hui-fang¹, YANG Tong¹, LIU Xin-ai¹, MEI Zhi-gang^{1*}, GE Jin-wen^{2*}

(1. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and

Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410013, China)

[Abstract] This study aims to investigate the effects of Naotaifang (NTF) on neuronal ferroptosis and pyroptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI), with a focus on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2). A rat model of CIRI was established by middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R). Sprague-Dawley rats were randomly assigned to a sham group, a model group, low/medium/high-dose (4.5, 9, 18 g·kg⁻¹, respectively) NTF groups, and a butylphthalide (60 mg·kg⁻¹)

[收稿日期] 2025-08-14

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (82174167); 国家自然科学基金青年项目 (82405157); 湖南省教育厅科学研究项目 (24B0365); 湖南中医药大学校级科研项目 (2022XJZKC007); 湖南省大学生创新训练项目 (S202510541076)

[通信作者] * 葛金文, 教授, E-mail: 001267@hnucm.edu.cn; * 梅志刚, 教授, E-mail: meizhigang@hnucm.edu.cn

[作者简介] 王文凤, E-mail: 004647@hnucm.edu.cn

group ($n=15$ per group). After modeling, the treatment groups received corresponding agents by gavage once daily for 7 days, and the sham and model groups received an equal volume of normal saline. After treatment, the neurological function was assessed based on the Zea-Longa score, the infarct volume by TTC staining, and cellular morphology by HE staining. The levels of Fe^{2+} , interleukin- 1β (IL- 1β), and interleukin-18 (IL-18) were measured by ELISA, and those of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) by biochemical assays. Western blot was employed to examine the expression levels of Nrf2, glutathione peroxidase 4 (GPX4), NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3 (NLRP3), and the N-terminal fragment of gasdermin D (GSDMD-N). In the cell experiment, oxygen-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) was used to model CIRC in SH-SY5Y cells. siRNA-mediated Nrf2 knockdown (si-Nrf2) was employed to probe into the role of Nrf2 in OGD/R-induced ferroptosis and pyroptosis and the intervention effect of NTF. Membrane damage was evaluated by Hoechst/propidium iodide staining and LDH release, and GPX4 and GSDMD immunofluorescence was employed to indicate ferroptosis and pyroptosis, respectively. Fe^{2+} , MDA, and GSH were quantified biochemically, and the levels of IL- 1β and IL-18 by ELISA. The expression of Nrf2, GPX4, NLRP3, and GSDMD-N was quantified by Western blot. The cellular ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. The results of the animal experiment showed that NTF promoted the expression of Nrf2 to alleviate neuronal ferroptosis and pyroptosis, thus producing significant neuroprotection against CIRC in a dose-dependent manner. The results of the cell experiment showed that the neuroprotective effects of NTF after CIRC were mediated by Nrf2-dependent suppression of neuronal ferroptosis and pyroptosis. Taken together, NTF attenuates CIRC by suppressing neuronal ferroptosis and pyroptosis through Nrf2-mediated regulation.

[Key words] Naotaifang; cerebral ischemia-reperfusion injury; Nrf2; ferroptosis; pyroptosis

DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20251021.901

脑卒中作为威胁人类生命健康的主要疾病之一,在我国是致残率和致死率的首位病因,缺血性脑卒中在其中的占比约为 85%^[1]。急性缺血性脑卒中治疗的一个主要目标是恢复脑血流,而缺血后血流的再通可导致一系列“瀑布式”缺血级联反应加重脑组织损伤,即脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRC)^[2]。CIRC 会使脑组织细胞产生一系列损伤级联反应,包括离子平衡失调、氧化应激、炎症、血脑屏障破坏、细胞死亡等,这些级联反应相互影响,最终造成脑损伤^[3-4]。铁死亡^[5]和焦亡^[6]是 CIRC 后细胞死亡的重要方式。铁死亡是由高水平的铁依赖性脂质过氧化积累所引发的细胞死亡^[7]。焦亡是由炎症小体介导的依赖于半胱氨酸蛋白酶-1 (cysteine-requiring aspartate protease-1, caspase-1) 或 caspase-4/5/11 的炎症性细胞死亡^[8]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是细胞和生物体防御内源性和外源性压力源的主要调节因子,通过调控下游抗氧化反应元件 (antioxidant response elements, ARE) 维持氧化还原稳态^[9]。目前, Nrf2/ARE 通路已成为神经系统疾病的重要治疗靶点^[10]。研究发现,激活 Nrf2/ARE 信号通路不仅能通过上调抗氧化物酶水平减轻细胞铁死亡,还能调节抗炎基因表达并抑制炎症进展^[11-12]。细胞死亡的不同模式通常由类似的信号通路、细

胞器、共同的亚细胞位点,甚至被共同的死亡引发分子和效应分子所调控^[13]。Nrf2 是否是 CIRC 后神经细胞铁死亡及焦亡的关联蛋白值得进一步研究。

CIRC 属于中医“偏枯”“偏风”“薄厥”等“中风”范畴。本病多因肝肾阴亏,气血不足,气虚生瘀、积痰,痰瘀阻络,化火生风,致阴阳失调,气血逆乱。本虚标实,气虚血瘀是其主要病机。清代医家王清任创立了益气活血的经典名方“补阳还五汤”,葛金文教授团队在“补阳还五汤”基础上,结合临证心得体会创制了脑泰方 (Naotaifang, NTF) (发明专利号 ZL201110178359.4)。课题组前期研究发现 NTF 具有治疗气虚血瘀型脑梗死的临床功效^[14],可通过调节铁代谢、减少脂质过氧化物生成抑制缺血性脑卒中铁死亡^[15]。进一步研究发现,NTF 及其加味方通过激活 SIRT1 信号通路,抑制 NF- κ B 介导的炎症反应发挥脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用^[16]。那么,NTF 是否同时具有干预缺血性脑卒中后铁死亡及焦亡的治疗机制值得进一步探讨。基于此,本研究以 Nrf2 为切入点,通过体内大脑中动脉栓塞/再灌注 (middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R) 模型和体外氧-糖剥夺/再灌注 (oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 模型探讨脑泰方抗 CIRC 神经元铁死亡和焦亡的作用机制,为 CIRC 的治疗提供新的思路和理论依据。

1 材料

1.1 动物

90只SPF级SD雄性大鼠,体质量(260 ± 20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物合格证号SCXK(湘)2019-0004,由湖南中医药大学实验动物中心全封闭SPF环境下隔离饲养,实验动物使用许可证编号SCXK(湘)2019-0009。本实验已通过湖南中医药大学动物伦理委员会批准(编号LL2022052507),所有实验操作都严格按照其规定进行。

1.2 细胞

人神经母细胞瘤(SH-SY5Y)细胞购自长沙艾碧维生物科技有限公司。

1.3 药物

NTF由黄芪、川芎、僵蚕和地龙4种中药组成。黄芪40g,川芎15g,僵蚕15g,地龙10g的配方颗粒购自湖南中医药大学第一附属医院(批号065134132)。丁苯酞(*n*-butylphthalide, NBP)由石药集团恩必普药业有限公司生产(批号1182202125)。

1.4 试剂

细胞专用培养基(中国Abiowell公司,货号AW-MCH335);胰酶消化液(中国Abiowell公司,货号AWC0232);Nrf2抗体、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体、NOD样受体热蛋白结构域蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)抗体(美国Proteintech公司,货号分别为16396-1-AP、67763-1-Ig、19771-1-AP);Gasdermin-D(GSDMD)抗体(美国PTG公司,货号20770-1-AP);Gasdermin D蛋白N端片段(GSDMD-N)抗体(英国Abcam公司,货号ab215203);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记山羊抗兔二抗(长沙艾碧维生物科技有限公司,货号AWS0002);白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白细胞介素-18(interleukin 18, IL-18)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,货号分别为Z06040733、Z05030754);还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为A006-2-1、A003-1);ROS试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号S0033S);Hoechst 33342染色液(美国MedChemExpress生物科技有限公司,货号HY-15559);

PI染色液(美国MedChemExpress生物科技有限公司,货号HY-D0815)。

1.5 仪器

台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号H1650R);冷冻切片机(沈阳派诗哲医疗器械有限公司,型号PSZ-3550);全自动酶标洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司,型号PW-812);多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号MB-530);电热恒温培养箱(北京市永光明医疗仪器有限公司,型号DHP-500);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号DSZ2000X);荧光显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司,型号AE31E);直热式二氧化碳培养箱(上海三腾仪器有限公司,型号DH-160I)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 分组、造模及给药 90只SPF级SD雄性大鼠,适应性喂养7d后,按随机数字表法分为假手术组(sham组)、模型组(model组)、脑泰方低剂量组(NTF-L组)、脑泰方中剂量组(NTF-M组)、脑泰方高剂量组(NTF-H组)和丁苯酞组(NBP组),每组15只。除Sham组外,各组均参照Zea-Longa提出的可逆性大脑中动脉闭塞线栓法进行改良建立右侧MCAO/R模型^[17]。于MCAO/R术后24h进行干预,根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算:NTF临床剂量为 $80\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,换算后NTF-L组、NTF-M组和NTF-H组灌胃剂量分为4.5、9和 $18\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$,分别相当于60kg成年人临床剂量0.5、1、2倍;NBP临床剂量为 $0.6\text{ g}\cdot\text{d}^{-1}$,换算后NBP的灌胃剂量为 $60\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。model组及sham组给予同体积生理盐水,连续灌胃7d。

2.1.2 神经功能评分 将MCAO/R术后24h的大鼠从笼中取出,放在平坦的桌面上观察其活动的情况,并参考Zea Longa 5级4分制评分标准进行神经功能缺失双盲评分。0分,无神经损伤症状且活动正常;1分,提住大鼠尾巴时,病灶对侧前肢内收屈曲;2分,大鼠爬行时向对侧旋转;3分,大鼠站立或爬行时,肢体向对侧倾倒;4分,大鼠不能自行行走,意识障碍。分值越高,说明动物行为障碍越严重,1~3分提示造模成功。

2.1.3 TTC染色检测脑梗死体积 每组随机选取3只大鼠,以 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射2%戊巴比

妥钠,待大鼠麻醉后断头取脑,去除嗅球、小脑和低位脑干,将脑组织置于 -20°C 冰箱冷冻 20 min 后,按 2 mm 的厚度沿冠状面切成厚薄均匀的 5 片,然后放置于 2% TTC 染色液中, 37°C 避光孵育 30 min,15 min 翻面,使脑片均匀染色。染色成功后取出脑片放入 4%多聚甲醛中固定 24 h,然后按顺序排列并拍照。采用 ImageJ 软件分析脑梗死体积。

2.1.4 HE 染色 每组随机选取 3 只大鼠,2%戊巴比妥钠进行腹腔麻醉,然后依次用生理盐水和多聚甲醛对大鼠进行心脏灌注,灌注完全后,大鼠断头、取完整脑组织,放置于 4%多聚甲醛中固定,固定 24 h 后,脑组织进行乙醇梯度脱水、透明、浸蜡,石蜡包埋后切成厚度为 5 μm 的切片,常规 HE 染色,光镜 400 倍下观察各组大鼠脑组织病理形态。

2.1.5 生化检测缺血海马 Fe^{2+} 、MDA、GSH 铁死亡相关指标 大鼠缺血侧大脑海马组织,按 9 倍质量比加入冰生理盐水匀浆,以离心半径为 10 cm,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,取上清液检测 Fe^{2+} 、MDA、GSH,按相关试剂盒说明书操作。

2.1.6 ELISA 检测缺血海马 IL-1 β 、IL-18 焦亡炎症因子 大鼠缺血侧大脑海马组织,按 9 倍质量比加入冰生理盐水匀浆,以离心半径为 10 cm,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 10 min,取上清液检测 IL-1 β 、IL-18,按相关试剂盒说明书操作。

2.1.7 Western blot 检测 Nrf2、GPX4、NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达 大鼠缺血侧大脑海马组织,加蛋白裂解液提取脑组织总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离,冰上转膜,5%脱脂牛奶封闭,加入一抗, 4°C 孵育过夜,孵育结束,PBST 洗 3 次,每次 15 min,然后加入二抗,室温孵育 90 min,孵育结束,PBST 洗 3 次,每次 15 min。洗涤后,ECL 显色曝光,凝胶成像系统成像。使用 ImageJ 软件进行蛋白条带分析。

2.2 体外实验

2.2.1 含药血浆的制备 20 只 SPF 级 SD 雄性大鼠,体质量(260 ± 20)g,适应性喂养 3 d 后,以 18 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 NTF 灌胃(依据前期动物实验结果),每天 1 次,连续灌胃 7 d。于第 7 天灌胃后 2 h,腹主动脉采血, 4°C 静置 2 h, 4°C 、1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,吸取上清液,0.22 μm 滤膜过滤除菌后至于 EP 管中, 56°C 水浴灭活 30 min,于 -80°C 冰箱中冷冻保存。

2.2.2 细胞分组及 OGD/R 处理 细胞分组:将体外培养的 SH-SY5Y 细胞分为 si-con 对照组、si-con+OGD/R 组、si-con+OGD/R+NTF 组、si-Nrf2+OGD/R 组、si-Nrf2+OGD/R+NTF 组。

OGD/R 处理具体步骤如下:使用 PBS 将细胞洗涤 2 次,以去除残留的培养基;将细胞加入无糖培养基中;将细胞置于 37°C 、94% N_2 、1% O_2 、5% CO_2 的细胞培养箱中,进行 4 h 的糖氧剥夺处理;将无糖培养基替换为完全培养基后,细胞重新置于 37°C 、5% CO_2 的细胞培养箱中,进行 24 h 的复氧培养,以模拟再灌注过程。

2.2.3 Hoechst/PI 荧光染色及乳酸脱氢酶(LDH)释放试验检测细胞膜的损伤程度 Hoechst/PI 荧光染色:SH-SY5Y 细胞分组处理完毕后,用 PBS 清洗 1 次,先加 1 mL 细胞染色缓冲液,再加入 5 μL Hoechst 33342 染色液, 37°C 孵育 7 min, 4°C 、1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去染液后加入 15 μL PI 染色液, 4°C 避光染色 20 min,离心弃去染液,PBS 清洗 1 次,在显微镜下查看各组荧光状态,并拍照。LDH 释放试验根据 LDH 测定试剂盒说明书上的步骤进行操作。

2.2.4 免疫荧光检测铁死亡蛋白 GPX4 及焦亡蛋白 GSDMD 的表达 将 SH-SY5Y 细胞放置在 4%多聚甲醛中固定 30 min,PBS 冲洗,加入 0.3%曲拉通,在 37°C 下进行通透处理 30 min,PBS 冲洗 3 次,1%牛血清白蛋白封闭液进行封闭处理 1 h,PBS 冲洗 3 次,加入一抗, 4°C 下孵育过夜,PBS 冲洗 3 次,加入二抗, 37°C 下孵育 90 min,PBS 冲洗 3 次,DAPI 工作液在 37°C 下染核 10 min,PBS 冲洗,缓冲甘油封片,并在荧光显微镜下观察荧光的表达强度及定位。

2.2.5 生化检测各组 Fe^{2+} 、GSH、MDA 铁死亡评价指标 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种于细胞培养板中,常规培养,造模及药物处理后, 4°C 、1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,用超声破碎破坏细胞膜后, 4°C 、1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后取上清液检测,严格依照说明书步骤测定 Fe^{2+} 、GSH 及 MDA 的含量。

2.2.6 ELISA 检测 IL-1 β 、IL-18 焦亡炎症因子 取对数生长期的 SH-SY5Y 细胞接种于细胞培养板中,常规培养,造模及药物处理后, 4°C 、1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,PBS 洗涤,于孔板中加入 1 mL 无血清培养基稀释的 DCFH-DA,于 37°C 下于黑暗中培养 20 min。具体按照试剂盒说明书步骤检测细胞中 IL-

1β 、IL-18 的含量。

2.2.7 Western blot 检测 各组 Nrf2、GPX4、NLRP3、GSDMD-N 等铁死亡及焦亡相关蛋白 取对数生长期 SH-SY5Y 细胞接种于细胞培养板中,常规培养后进行造模及药物处理,4 ℃、1 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 5 min,PBS 冲洗后加入裂解液,4 ℃、12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 15 min 取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶进行电泳分离,将蛋白转移至 PVDF 膜上。电转结束后,将 PVDF 膜浸泡于 PBST 封闭液中,室温孵育 1 h。将膜与一抗共同孵育,4 ℃ 过夜。PBST 洗膜 3 次,每次 15 min。再将膜与二抗室温孵育 90 min。孵育结束后,PBST 洗膜 3 次,每次 15 min。将 PVDF 膜与新鲜配制的增强型化学发光液(ECL)反应数秒,滤纸吸尽多余液体,于暗室中曝光显影。

2.2.8 透射电镜观察 各组细胞超微结构 取对数生长期 SH-SY5Y 细胞以 2.5% 戊二醛固定 12 h,PBS 冲洗后用 1% 锇酸后固定 2 h;按乙醇梯度脱水:30% 10 min、50% 10 min、70% 乙醇(含醋酸铀)3 h、80% 10 min、95% 15 min、100% 2 次各 50 min,继以环氧丙烷 30 min;随后用环氧丙烷-环氧树脂 1:1 浸润 2 h、纯树脂浸润 3 h,纯树脂包埋并于 40 ℃ 12 h、60 ℃ 48 h 固化;修块、超薄切片并以铜网捞片;2% 醋酸铀(乙醇)避光染色 8 min,70% 乙醇与超纯水各洗 3 次,再用 2.6% 枸橼酸铅染色 8 min,超纯水洗 3 次后室温干燥过夜;最后在透射电镜下观察并采集图像。

2.3 统计学分析

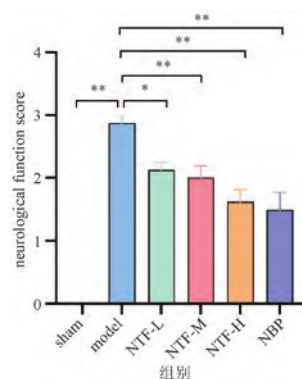
使用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。如果数据的方差齐,则多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);组间两两比较时,使用最小显著差值法(LSD);如果数据的方差不齐,则采用 Dunnett's 检验进行分析。采用 GraphPad Prism 7.0 软件绘制图表。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 表示差异具有显著性统计学意义。

3 结果

3.1 神经功能评分

sham 组大鼠活动正常,无神经损伤症状,model 组及各治疗组出现不同程度的神经功能损伤症状,与 sham 组比较,model 组大鼠神经功能评分显著升高($P < 0.01$);与 model 组比较,NTF-L 组大鼠神经

功能评分降低($P < 0.05$),NTF-M 组、NTF-H 组及 NBP 组大鼠神经功能评分显著降低($P < 0.01$),见图 1。



sham. 假手术组;model. 模型组;NTF-L. 脑泰方低剂量组;NTF-M. 脑泰方中剂量组;NTF-H. 脑泰方高剂量组;NBP. 丁苯酞组;2 组间比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图 2~11 同)。

图 1 各组大鼠 Zea-Longa 神经功能评分($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 1 Zea-Longa neurological function score for each group of rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.2 NTF 对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧脑梗死体积的影响

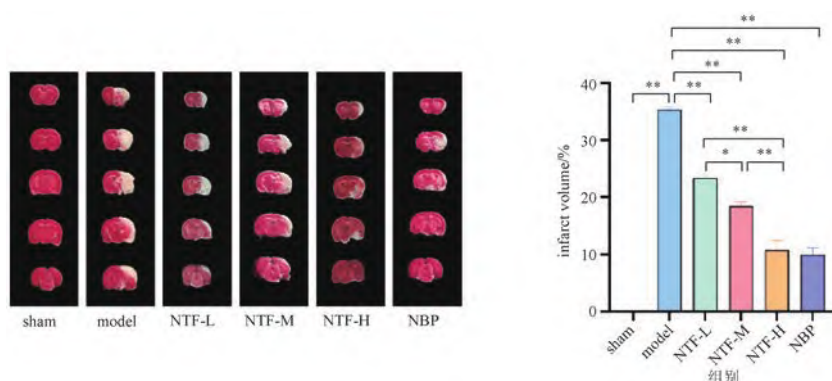
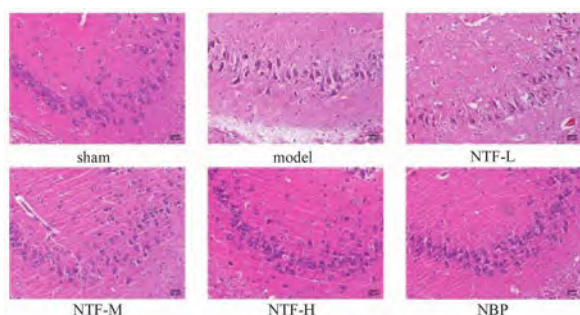
与 sham 组比较,model 组脑梗死体积明显增大($P < 0.01$);与 model 组比较,各治疗组脑梗死体积明显减少($P < 0.01$);与 NTF-L 组比较,NTF-M 组脑梗死体积减少($P < 0.05$),NTF-H 组脑梗死体积明显减少($P < 0.01$);与 NTF-M 组比较,NTF-H 组脑梗死体积明显减少($P < 0.01$),见图 2。

3.3 NTF 对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧海马 CA3 区神经细胞损伤的影响

sham 组海马 CA3 区神经细胞结构完整、排列整齐,细胞核呈圆形或椭圆形,核仁清晰,胞质均匀染色,无明显病理改变;model 组海马 CA3 区神经细胞结构被破坏,形成空泡,细胞间隙增宽、排列紊乱,细胞肿胀、破裂,核固缩并深染。不同剂量脑泰方治疗后,神经细胞数量增加,形态结构改善,细胞肿胀、核固缩减轻,空泡样改变减少,以 NTF-H 组效果最为明显,见图 3。

3.4 NTF 对脑缺血再灌注损伤大鼠缺血侧海马 Fe^{2+} 、MDA 及 GSH 的影响

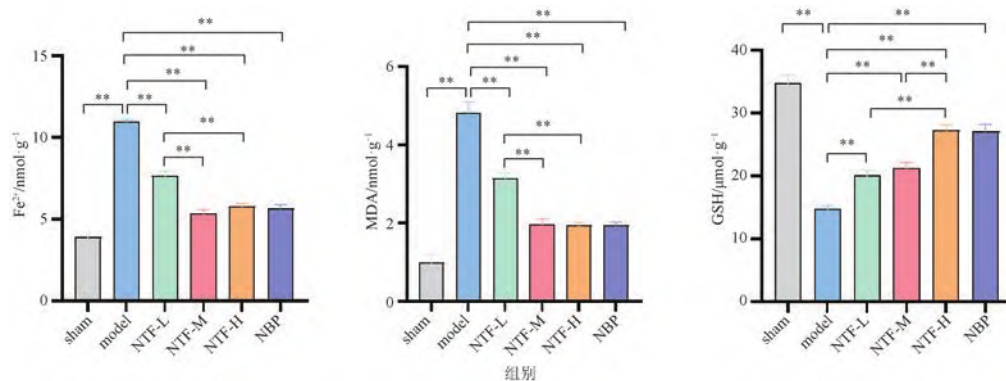
与 sham 组比较,model 组海马 Fe^{2+} 及 MDA 含量显著升高($P < 0.01$),GSH 含量显著降低($P < 0.01$);

图 2 各组大鼠 TTC 染色 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 2 TTC staining in each group of rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)图 3 各组大鼠缺血侧海马 CA3 区 HE 染色 ($\times 200$)Fig. 3 HE staining of CA3 area in ischemic hippocampus of rats in each group ($\times 200$)

与 model 组比较,各治疗组海马 Fe^{2+} 及 MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$), GSH 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与 NTF-L 组比较, NTF-M 组、NTF-H 组海马 Fe^{2+} 及 MDA 含量显著降低 ($P < 0.01$), NTF-H 组海马 MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$), 见图 4。

3.5 ELISA 检测 IL-1 β 、IL-18 焦亡炎症因子

与 sham 组比较, model 组 IL-1 β 、IL-18 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 model 组比较, 各治疗组 IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 NTF-L 组比较, NTF-M 组与 NTF-H 组 IL-1 β 、IL-18 水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 5。

图 4 各组大鼠缺血侧海马 Fe^{2+} 、MDA 及 GSH 含量 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 4 Levels of Fe^{2+} , MDA, and GSH in ischemic hippocampus of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.6 Western blot 检测 Nrf2、GPX4、NLRP3、GSDMD-N 蛋白

与 sham 组比较, model 组 Nrf2、GPX4 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$), NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与 model 组比较, 各治疗组 Nrf2、

GPX4 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与 NTF-L 组比较, NTF-H 组 Nrf2、GPX4 含量显著升高 ($P < 0.01$), NTF-M 组与 NTF-H 组 NLRP3、GSDMD-N 含量显著降低 ($P < 0.01$), 见图 6。以上研究结果表明, NTF

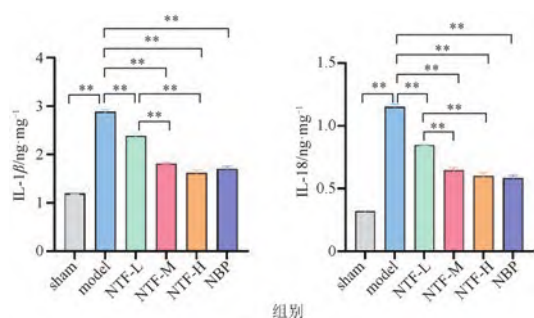
图5 各组大鼠缺血侧海马 IL-1 β 、IL-18 含量($\bar{x}\pm s, n=4$)

Fig. 5 Levels of IL-1 β and IL-18 in ischemic hippocampus of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=4$)

可能通过干预 Nrf2 抑制铁死亡以及脑缺血再灌注后神经元焦亡。

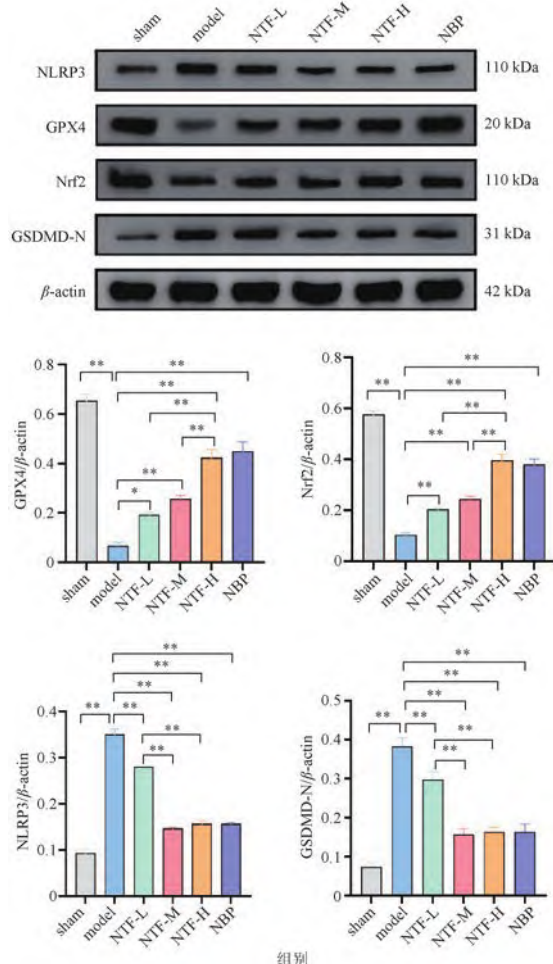
图6 大鼠缺血侧海马 Nrf2、GPX4、NLRP3 及 GSDMD-N 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 6 Protein expression of Nrf2, GPX4, NLRP3, and GSDMD-N in the ischemic hippocampus of rats ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.7 NTF 对各组细胞 Hoechst/PI 荧光染色及 LDH 活性的影响

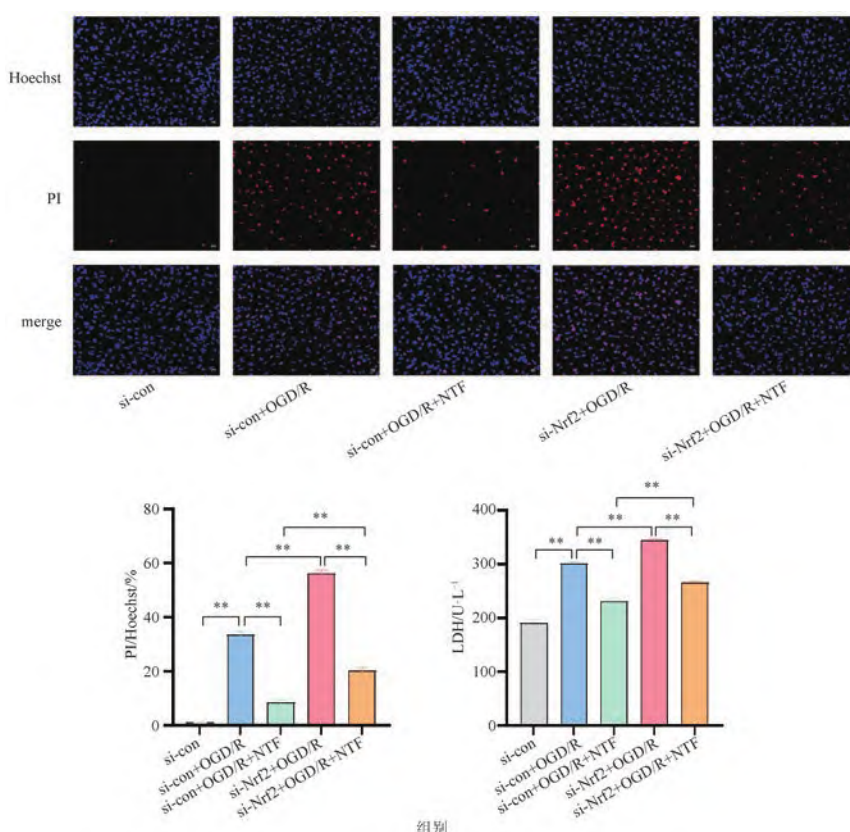
与 si-con 组比较, si-con+OGD/R 组细胞 PI 显示的红色荧光强度明显增强 ($P<0.01$)、LDH 活性明显升高 ($P<0.01$); 与 si-con+OGD/R 组比较, si-con+OGD/R+NTF 组细胞 PI 显示的红色荧光强度明显减弱 ($P<0.01$)、LDH 活性明显降低 ($P<0.01$), si-Nrf2+OGD/R 组细胞 PI 显示的红色荧光强度明显增强 ($P<0.01$)、LDH 活性明显升高 ($P<0.01$); 与 si-con+OGD/R+NTF 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 PI 显示的红色荧光强度明显增强 ($P<0.01$)、LDH 活性明显升高 ($P<0.01$); 与 si-Nrf2+OGD/R 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 PI 显示的红色荧光强度明显减弱 ($P<0.01$)、LDH 活性明显降低 ($P<0.01$), 见图 7。

3.8 NTF 对各组细胞铁死亡蛋白 GPX4 及焦亡蛋白 GSDMD 免疫荧光的影响

与 si-con 组比较, si-con+OGD/R 组细胞 GPX4 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$)、GSDMD 荧光强度明显增强 ($P<0.01$); 与 si-con+OGD/R 组比较, si-con+OGD/R+NTF 组细胞 GPX4 荧光强度明显增强 ($P<0.01$)、GSDMD 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$), si-Nrf2+OGD/R 组细胞 GPX4 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$)、GSDMD 荧光强度明显增强 ($P<0.01$); 与 si-con+OGD/R+NTF 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 GPX4 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$)、GSDMD 荧光强度明显增强 ($P<0.01$); 与 si-Nrf2+OGD/R 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 GPX4 荧光强度明显增强 ($P<0.01$)、GSDMD 荧光强度明显减弱 ($P<0.01$), 见图 8。

3.9 NTF 对各组细胞 Fe²⁺、MDA、GSH 含量的影响

与 si-con 组比较, si-con+OGD/R 组细胞 Fe²⁺、MDA 含量明显增多 ($P<0.01$), GSH 含量明显减少 ($P<0.01$); 与 si-con+OGD/R 组比较, si-con+OGD/R+NTF 组细胞 Fe²⁺、MDA 含量明显减少 ($P<0.01$), GSH 含量明显增多 ($P<0.01$), si-Nrf2+OGD/R 组细胞 Fe²⁺、MDA 含量明显增多 ($P<0.01$), GSH 含量明显减少 ($P<0.01$); 与 si-con+OGD/R+NTF 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 Fe²⁺、MDA 含量明显增多 ($P<0.01$), GSH 含量明显减少 ($P<0.01$); 与 si-Nrf2+OGD/R 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 Fe²⁺、MDA 含量明显减少 ($P<0.01$), GSH 含量明显



si-con. 敲低对照组; si-con+OGD/R. 模型组; si-con+OGD/R+NTF. 脑泰方组; si-Nrf2+OGD/R. 敲低 Nrf2 组; si-Nrf2+OGD/R+NTF. 敲低 Nrf2+脑泰方(图 8~11 同)。

图 7 各组细胞荧光染色及 LDH 活性($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Fluorescence staining and LDH activity in each group of cells($\times 100$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

增多($P < 0.01$), 见图 9。

3.10 NTF 对各组细胞 IL-1 β 、IL-18 炎症因子表达的影响

与 si-con 组比较, si-con+OGD/R 组细胞 IL-1 β 、IL-18 浓度明显升高($P < 0.01$); 与 si-con+OGD/R 组比较, si-con+OGD/R+NTF 组细胞 IL-1 β 、IL-18 浓度明显降低($P < 0.01$), si-Nrf2+OGD/R 组细胞 IL-1 β 、IL-18 浓度明显升高($P < 0.01$); 与 si-con+OGD/R+NTF 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 IL-1 β 、IL-18 浓度明显升高($P < 0.01$); 与 si-Nrf2+OGD/R 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 IL-1 β 、IL-18 浓度明显降低($P < 0.01$), 见图 10。

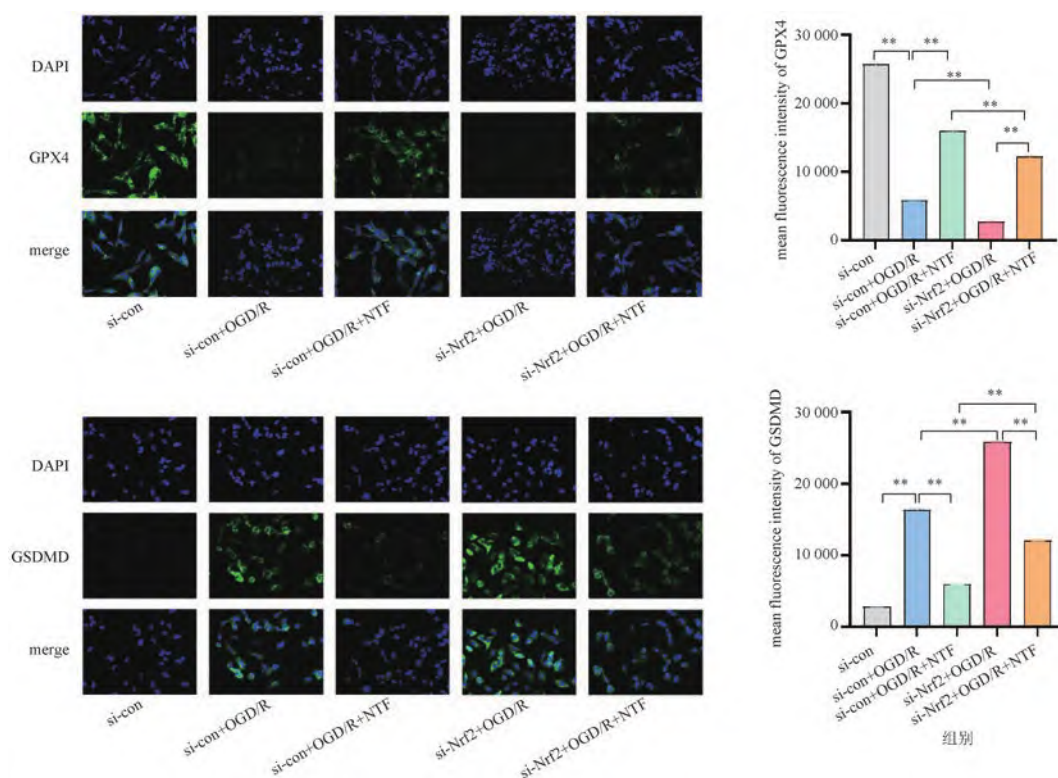
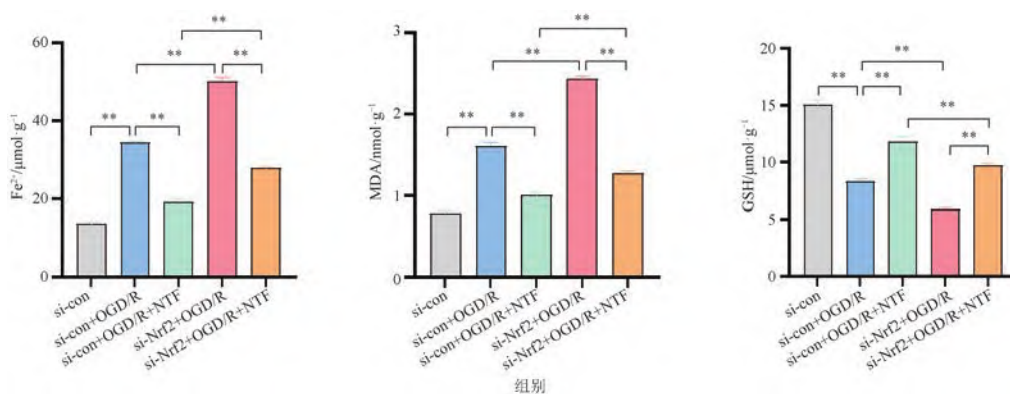
3.11 NTF 对各组细胞 Nrf2、GPX4、NLRP3、GSDMD-N 等铁死亡及焦亡相关蛋白表达的影响

与 si-con 组比较, si-con+OGD/R 组细胞 NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达明显增多($P < 0.01$), Nrf2、GPX4 蛋白表达明显减少($P < 0.01$); 与 si-con+

OGD/R 组比较, si-con+OGD/R+NTF 组细胞 NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达明显减少($P < 0.01$), Nrf2、GPX4 蛋白表达明显增多($P < 0.01$), si-Nrf2+OGD/R 组细胞 NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达明显增多($P < 0.01$), Nrf2 蛋白表达明显减少($P < 0.01$), GPX4 蛋白表达减少($P < 0.05$); 与 si-con+OGD/R+NTF 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达明显增多($P < 0.01$), Nrf2、GPX4 蛋白表达明显减少($P < 0.01$); 与 si-Nrf2+OGD/R 组比较, si-Nrf2+OGD/R+NTF 组细胞 NLRP3、GSDMD-N 蛋白表达明显减少($P < 0.01$), Nrf2、GPX4 蛋白表达明显增多($P < 0.01$), 见图 11。以上研究结果表明, 敲减 Nrf2 加剧了细胞铁死亡以及细胞焦亡。NTF 干预后可以激活 Nrf2 及相关通路, 抑制神经细胞铁死亡和焦亡。

3.12 NTF 对各组细胞超微结构的影响

si-con 组细胞核大而圆, 胞膜、核膜清晰连续,

图 8 各组细胞 GPX4 及 GSDMD 荧光染色 ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 8 Fluorescence staining of GPX4 and GSDMD in each group of cells ($\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)图 9 各组细胞 Fe^{2+} 、MDA 及 GSH 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 9 Levels of Fe^{2+} , MDA, and GSH in each group of cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

染色质分布均匀,无聚集,线粒体形态结构正常。si-con+OGD/R 组胞膜、核膜不连续,染色质不规则凝聚,内质网肿胀明显,线粒体内膜密度增加,外膜破裂,嵴减少或消失,形态异常;si-con+OGD/R+NTF 组胞膜、核膜稍不连续,染色质不规则凝聚,线粒体内膜密度增加,外膜破裂,嵴减少或消失,形态异常;si-Nrf2+OGD/R 组细胞肿胀,胞膜明显不连续,染色

质浓缩、分布不均,线粒体肿胀,嵴结构变粗,嵴出现溶解或消失,内质网肿胀明显。si-Nrf2+OGD/R+NTF 组胞膜、核膜尚清晰连续,染色质分布不均匀发生聚集,线粒体稍肿胀,嵴结构变粗,内质网微肿胀,见图 12。

4 讨论

CIRI 是缺血性脑卒中的关键损伤环节,CIRI 会

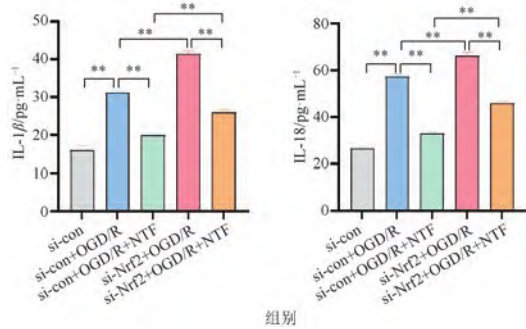
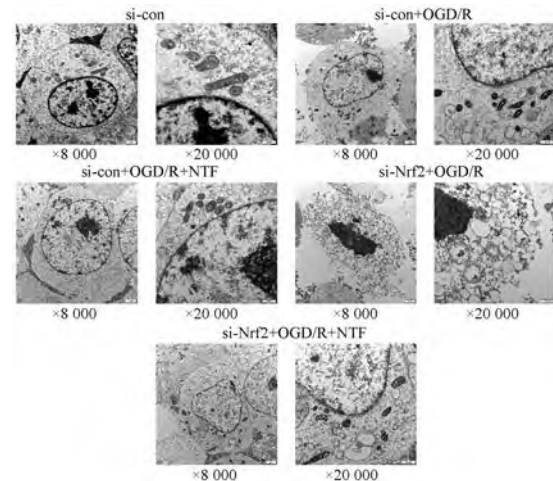
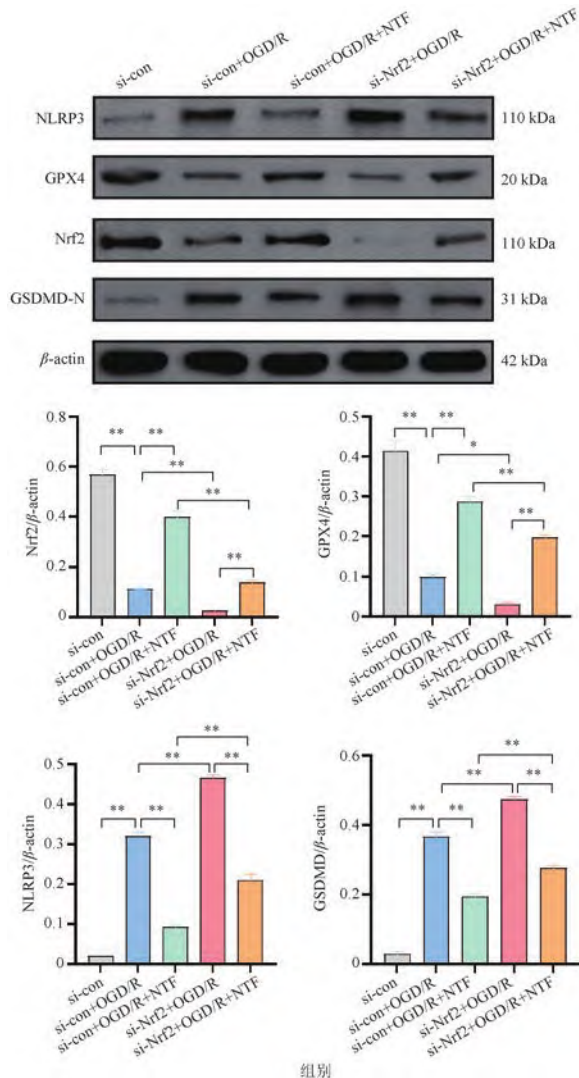
图10 各组细胞 IL-1 β 、IL-18 炎症因子含量($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 10 Levels of IL-1 β and IL-18 in each group of cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

图12 各组细胞透射电镜超微结构

Fig. 12 Transmission electron microscopy ultrastructure of each group of cells

图11 各组细胞 Nrf2、GPX4、NLRP3 及 GSDMD-N 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 11 Protein expression of Nrf2, GPX4, NLRP3, and GSDMD-N in each group of cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

使脑组织细胞产生氧化应激、炎症反应、细胞死亡等一系列损伤级联反应^[18-19]。卒中发生后,血脑屏障被破坏,游离铁和铁蛋白进入脑实质后通过 Fenton 反应将过氧化氢转化为羟基自由基,ROS 大量产生,导致细胞发生铁死亡^[20]。CIRI 时,ROS 二次暴发,进一步加剧了氧化应激、炎症和神经元死亡^[21]。研究表明:铁死亡中铁过载、GSH 消耗和 GPX4 失活、脂质过氧化等都参与缺血性卒中过程^[22]。Nrf2 信号通路通过增加谷氨酸-胱氨酸转运体的转运,增强 GPX4 的还原能力,抑制细胞铁死亡的发生^[23]。最新研究表明:通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 轴能改善 OGD/R 诱导的神经元铁死亡^[24]。细胞焦亡在缺血性脑损伤的进展中起着至关重要的作用^[25]。脑缺血及再灌注损伤后,脑缺血区出现 ASC 增多,依次激活 NLRP3 炎症小体和 caspase-1,伴随 IL-1 β 和 IL-18 的活化及 GSDMD-N 的破膜作用,引发了细胞焦亡^[6]。NLRP3 炎症小体是引起细胞焦亡的主要炎性复合物,在细胞焦亡中起着核心作用^[26]。研究表明^[27],通过抑制 NLRP3 炎症小体介导的细胞焦亡对脑缺血再灌注损伤的神经起保护作用。在 CIRI 中,Nrf2 表达的降低增强了 NLRP3 炎症小体的活性^[28]。研究发现,激活 Nrf2/GPX4 能抑制神经元细胞铁死亡^[23];激活 Nrf2/NLRP3 能抑制细胞焦亡^[29]。那么,Nrf2 可能是缺血性脑卒中后铁死亡与焦亡的关联靶点。

本课题组临床研究表明,由黄芪、川芎、僵蚕和

地龙组成的 NTF 具有益气活血、化痰通络之功效,是治疗气虚血瘀型脑梗死的有效方剂^[14]。前期研究表明,NTF 可能通过激活 HSF1/HSPB1 途径,调控铁代谢稳态平衡,抑制过量铁参与的 Fenton 反应所产生的 ROS 和随后脂质过氧化产物引起的缺血性脑卒中神经元铁死亡^[15]。NTF 能够通过提高 GPX4 蛋白与基因的表达量,抑制不饱和脂肪酸的氧化反应,减少脂质过氧化产物的累积以及 ROS 的沉积,减轻脑缺血造成的神经损伤^[30]。NTF 及其加味方通过激活 SIRT1 信号通路,抑制 NF- κ B 介导的炎症反应发挥脑缺血再灌注损伤大鼠脑保护作用^[16]。NBP 是从芹菜籽中提取并人工合成的光学异构体,目前被广泛应用于急性缺血性脑卒中的治疗^[31]。NBP 及其衍生物通过抑制氧化应激^[32]、炎症反应^[33]、细胞死亡等发挥 CIRI 的保护作用。研究发现,NBP 衍生物 10a 可通过 Nrf2 途径调节下游的抗氧化酶以减轻氧化损伤^[32];NBP 衍生物 CD21 可以抑制组织蛋白酶 B 介导的 NLRP3/ASC/caspase-1 通路,进而阻止 NLRP3 炎性小体的激活^[33]。因此,动物实验中以 NBP 为阳性对照药物。

本研究结果发现,各剂量组 NTF 均能降低 CIRI 大鼠脑梗死体积,改善海马 CA3 区神经细胞损伤,其中以 NTF-H 组效果最佳。缺血区 Nrf2 表达明显增加,Fe²⁺、MDA 表达减少,GSH、GPX4 蛋白表达显著增加;表明 NTF 可能是通过干预 Nrf2 显著减少 Fe²⁺聚集、提高 GSH 及 GPX4,减少脂质过氧化物生成,抑制铁死亡。同时实验研究发现,NTF 干预可降低大鼠缺血侧海马 IL-1 β 、IL-18 炎症因子表达,并显著减少大鼠缺血侧海马 NLRP3、GSDMD-N 焦亡蛋白含量;提示 NTF 可能通过干预 Nrf2 抑制脑缺血再灌注后神经元焦亡。为进一步探究 Nrf2、铁死亡和焦亡三者之间的调控机制,使用 siRNA 技术敲减了 SH-SY5Y 细胞中 Nrf2 的表达(即 si-Nrf2),并检测 si-Nrf2 组 SH-SY5Y 细胞对铁死亡和焦亡的影响及 NTF 的干预作用。研究结果显示,si-Nrf2 后,一方面降低了 GPX4 及 GSH 表达,提高了 Fe²⁺及 MDA 水平,加剧了细胞铁死亡;另一方面提高了 NLRP3、GSDMD 和 GSDMD-N 表达及 IL-1 β 、IL-18 炎症因子水平,加剧了细胞焦亡;Hoechst/PI 荧光染色及 LDH 释放试验表明细胞膜受到较严重的损伤;透射电镜显示细胞膜明显不连续,染色质浓缩、分布不均,线粒体肿胀,嵴出现溶解或消失,内质网肿胀等铁死亡

及焦亡改变。而 NTF 干预后,可以激活 Nrf2 及相关通路,同时抑制神经细胞铁死亡和焦亡。

综上所述,NTF 能提高 Nrf2 的表达,抑制神经元铁死亡和焦亡,发挥 CIRI 神经保护的双重机制,揭示了 NTF 协同抑制 2 种程序性细胞死亡方式的分子机制。最后要说明的是,本实验中 si-Nrf2+OGD/R+NTF 组的设置,验证了中药 NTF 在治疗 CIRI 中具有多靶点、多途径的独特优势;NTF 不仅能通过激活 Nrf2 信号通路抑制神经细胞铁死亡和焦亡,同时也能通过其他作用途径和靶点发挥神经保护作用。与 NBP 相比,NTF 不仅在动物实验中展现出与 NBP 相当的保护作用,而且在细胞实验中构建了以 Nrf2 为枢纽,同步抑制铁死亡与焦亡的“同轴双控”机制链,呈明确的剂量依赖与多靶点调控。因此,NTF 在以“Nrf2 为枢纽,铁死亡与焦亡双轴”调控上较丁苯酞更占优势。这一发现为进一步研究 NTF 的作用机制提供了广阔的思路 and 空间,也展示了对 NTF 进行精准深入研究的挑战性和复杂性,这正是葛金文教授团队几十年来持续研究 NTF 治疗 IS、不断探索 NTF 脑保护作用的动力所在,也是中医学赋予研究者的信心所在。然而,本研究仍有以下不足:一是时间点设置单一,有必要设置脑缺血再灌注后 24 h、48 h、72 h 等早期时间点的指标检测,以动态评估 NTF 的疗效;二是机制验证不够深入,还需进一步明确 Nrf2 与 GPX4、NLRP3 三者之间的上下游调控网络及铁死亡和焦亡的交互机制。课题组将进一步完善后续的实验,为 NTF 抗 CIRI 的作用机制提供更为全面的理论基础。

[参考文献]

- [1] 刘乐,余超,廖逸文,等. 1990—2019 年中国缺血性脑卒中疾病负担变化分析[J]. 中国循证医学杂志,2022,22(9):993.
- [2] 石晓花,莽靖,徐忠信. 脑缺血再灌注损伤细胞死亡模式的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版),2022,48(6):1635.
- [3] KHOSHNAMEH S E, WINLOW W, FARZANEH M, et al. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke[J]. *Neurol Sci*, 2017, 38(7): 1167.
- [4] PUIG B, BRENNAN S, MAGNUS T. Molecular communication of a dying neuron in stroke[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2834.
- [5] LI L, HAO Y, ZHAO Y, et al. Ferroptosis is associated with oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced Sertoli cell death[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 3051.
- [6] ZHANG D P, QIAN J H, ZHANG P, et al. Gasdermin D serves as a key executioner of pyroptosis in experimental cerebral

- ischemia and reperfusion model both *in vivo* and *in vitro* [J]. J Neurosci Res, 2019, 97(6): 645.
- [7] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369.
- [8] CRUZ C M, RINNA A, FORMAN H J, et al. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages[J]. J Biol Chem, 2007, 282(5): 2871.
- [9] TONELLI C, CHIO I I C, TUVESON D A. Transcriptional regulation by Nrf2[J]. Antioxid Redox Signal, 2018, 29(17): 1727.
- [10] LEONARDO C C, DORÉ S. Dietary flavonoids are neuroprotective through Nrf2-coordinated induction of endogenous cytoprotective proteins[J]. Nutr Neurosci, 2011, 14(5): 226.
- [11] KRAJKA-KUŹNIAK V, PALUSZCZAK J, BAER-DUBOWSKA W. The Nrf2-ARE signaling pathway: an update on its regulation and possible role in cancer prevention and treatment [J]. Pharmacol Rep, 2017, 69(3): 393.
- [12] AHMED S M, LUO L, NAMANI A, et al. Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(2): 585.
- [13] SCHERZ-SHOVAL R, SHVETS E, FASS E, et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4[J]. EMBO J, 2007, 26(7): 1749.
- [14] 贺运河, 郝晓元, 葛金文. 脑泰方治疗气虚血瘀证脑梗塞临床研究[J]. 中国中医急症, 2001, 10(6): 319.
- [15] 饶政清, 梅志刚, 葛金文, 等. 脑泰方调控细胞铁转运抑制铁死亡保护脑卒中缺血损伤的机制研究[J]. 中草药, 2021, 52(21): 6552.
- [16] 岳姣姣, 李华华. 加味脑泰方通过 SIRT1 途径减轻脑缺血再灌注损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(6): 494.
- [17] LONGA E Z, WEINSTEIN P R, CARLSON S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84.
- [18] ALLEN C L, BAYRAKTUTAN U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke[J]. Int J Stroke, 2009, 4(6): 461.
- [19] STROWIG T, HENAO-MEJIA J, ELINAV E, et al. Inflammasomes in health and disease[J]. Nature, 2012, 481: 278.
- [20] KELL D B. Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases [J]. BMC Med Genomics, 2009, 2: 2.
- [21] WU M Y, YIANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1650.
- [22] LIU J, GUO Z N, YAN X L, et al. Crosstalk between autophagy and ferroptosis and its putative role in ischemic stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2020, 14: 577403.
- [23] 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.
- [24] YUAN Y, ZHAI Y, CHEN J J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 923.
- [25] CHEN C X, HUANG J, TU G Q, et al. NAMPT inhibitor protects ischemic neuronal injury in rat brain via anti-neuroinflammation[J]. Neuroscience, 2017, 356: 193.
- [26] PLACE D E, KANNEGANTI T D. Recent advances in inflammasome biology[J]. Curr Opin Immunol, 2018, 50: 32.
- [27] PENG J L, WANG H X, GONG Z, et al. Idebenone attenuates cerebral inflammatory injury in ischemia and reperfusion via dampening NLRP3 inflammasome activity [J]. Mol Immunol, 2020, 123: 74.
- [28] HOU Y H, WANG Y T, HE Q, et al. Nrf2 inhibits NLRP3 inflammasome activation through regulating Trx1/TXNIP complex in cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Behav Brain Res, 2018, 336: 32.
- [29] PANG Y, ZHANG P C, LU R R, et al. Salvianolic acid B modulates caspase-1-mediated pyroptosis in renal ischemia-reperfusion injury via Nrf2 pathway[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 541426.
- [30] 贺超, 廖君, 兰斌, 等. 脑泰方对脑梗死后铁死亡-脂质代谢通路蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(11): 5491.
- [31] MARCO-CONTELLS J, ZHANG Y H. From seeds of *Apium graveolens* Linn. to a cerebral ischemia medicine: the long journey of 3-*n*-butylphthalide [J]. J Med Chem, 2020, 63: 12485.
- [32] LI X, WANG X, MIAO L, et al. Design, synthesis, and neuroprotective effects of novel hybrid compounds containing edaravone analogue and 3-*n*-butylphthalide ring-opened derivatives [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 556: 99.
- [33] LI X, SHI M Q, CHEN C, et al. Phthalide derivative CD21 ameliorates ischemic brain injury in a mouse model of global cerebral ischemia: involvement of inhibition of NLRP3 [J]. Int Immunopharmacol, 2020, 86: 106714.

[责任编辑 丁广治]