

·实验研究·

本文引用: 马 强, 欧阳心怡, 颜思阳, 刘利娟, 周德生. 芒柄花素通过影响 ACSL4/LPCAT3/GPX4 表达缓解脑缺血再灌注损伤中神经元铁死亡[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(6): 989-999.

芒柄花素通过影响 ACSL4/LPCAT3/GPX4 表达缓解 脑缺血再灌注损伤中神经元铁死亡

马 强¹, 欧阳心怡¹, 颜思阳², 刘利娟², 周德生^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

〔摘要〕 **目的** 探讨芒柄花素在脑缺血再灌注损伤(CIRI)中是否通过调控 ACSL4/LPCAT3/GPX4 信号轴, 干预神经元铁死亡, 发挥神经保护作用。**方法** 采用改良线栓法建立大鼠大脑中动脉缺血再灌注(MCAO/R)模型, 设立假手术组, 模型组, 芒柄花素低、中、高剂量组及依达拉奉对照组。采用改良神经功能评分(mNSS)评分评估神经功能, HE、尼氏及镀银染色观察脑组织病理改变, TUNEL 染色检测神经元凋亡。同时检测 Fe²⁺、丙二醛(MDA)、脂质过氧化物(LPO)、还原型谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽(GSH/GSSG)及活性氧(ROS)水平以评价铁死亡程度, 并采用 Western blot、流式细胞术、免疫荧光检测铁死亡关键蛋白 ACSL4、LPCAT3、ALOX1 和 GPX4 表达。**结果** 与模型组相比, 芒柄花素显著改善大鼠神经功能缺损和组织病理改变, 降低凋亡细胞比例及铁死亡相关指标(Fe²⁺、MDA、LPO、ROS), 并提高抗氧化水平(GSH/GSSG)($P<0.05, P<0.01$)。Western blot 结果显示, 芒柄花素下调 ACSL4、LPCAT3、ALOX15 蛋白表达, 上调 GPX4 蛋白表达; 流式细胞术结果显示, 芒柄花素显著降低了 ACSL4/LPCAT3 双阳性细胞表达比例($P<0.01$); 免疫荧光结果显示芒柄花素降低了脑组织中 ACSL4 和 LPCAT3 表达水平($P<0.05, P<0.01$)。**结论** 芒柄花素可通过调控 ACSL4/LPCAT3/GPX4 蛋白表达, 抑制铁死亡, 缓解 CIRI 所致神经损伤, 为其在缺血性卒中辅助治疗中的应用提供理论支持。

〔关键词〕 脑缺血再灌注损伤; 芒柄花素; 铁死亡; ACSL4/LPCAT3/GPX4 轴; 神经保护

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.06.001

Formononetin alleviates neuronal ferroptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating ACSL4/LPCAT3/GPX4 expression

MA Qiang¹, OUYANG Xinyi¹, YAN Siyang², LIU Lijuan², ZHOU Desheng^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔Abstract〕 Objective To investigate whether formononetin exerts neuroprotective effects in cerebral ischemia-reperfusion injury (CIRI) by regulating the ACSL4/LPCAT3/GPX4 signaling axis to inhibit neuronal ferroptosis. **Methods** The modified suture method was used to establish a rat model of middle cerebral artery occlusion/reperfusion (MCAO/R). A sham operation group, a model group, low-, medium-, and high-dose formononetin (FMN) groups, and an edaravone control group were set up. Neurological function was assessed using the modified neurological severity score (mNSS). Histopathological changes in brain tissue were evaluated by HE, Nissl, and silver staining. Neuronal apoptosis was detected by TUNEL staining. The levels of Fe²⁺, MDA, LPO, GSH/GSSG, and ROS were simultaneously measured to assess ferroptosis, while Western blot, flow cytometry, and immunofluorescence were used to detect the expression of key ferroptosis-related proteins. **Results** Compared with the model group, formononetin significantly improved the neurological deficits and histopathological changes in rats, reduced the proportion of apoptotic cells and ferroptosis-related indicators (Fe²⁺, MDA, LPO, ROS), and increased antioxidant level (GSH/GSSG) ($P<0.05, P<0.01$). flow cytometry results showed

〔收稿日期〕2025-03-30

〔基金项目〕湖南省自然科学基金面上项目(2024JJ5313); 湖南中医药大学研究生创新课题(2023CX29)。

〔通信作者〕* 周德生, 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: 2478020529@qq.com。

that formononetin significantly reduced the expression ratio of ACSL4/LPCAT3 double-positive cells ($P<0.01$); immunofluorescence results showed that formononetin reduced the expression levels of ACSL4 and LPCAT3 in brain tissue ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Formononetin can inhibit ferroptosis by regulating the expression of ACSL4/LPCAT3/GPX4, alleviate nerve injury caused by CIRI, and provide theoretical support for its application in the adjuvant treatment of ischemic stroke.

[**Keywords**] cerebral ischemia-reperfusion injury; formononetin; ferroptosis; ACSL4/LPCAT3/GPX4 axis; neuroprotection

脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)是急性脑卒中,特别是缺血性脑卒中的重要发病机制之一,其发生机制复杂,涉及多种细胞死亡方式、炎症反应、氧化应激与自由基损伤等环节^[1-2]。目前,尽管溶栓和血管再通治疗可在一定程度上挽救缺血半暗带的脑组织,但再灌注过程往往伴随氧化应激加剧、炎症因子释放、线粒体功能障碍以及细胞程序性死亡激活等病理过程,进而造成继发性神经损伤,严重影响预后^[3]。因此,寻找有效的神经保护策略以减轻 CIRI 仍是当前中枢神经系统疾病防治研究的热点和难点。

近年来,铁死亡作为一种新型细胞程序性死亡方式,在 CIRI 中的重要作用逐渐受到关注^[4]。铁死亡不同于凋亡、坏死和自噬,具有铁离子依赖性和脂质过氧化积聚两大特征,其关键调控因子包括乙酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(acetyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)、溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3(lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3)、15-脂加氧酶(arachidonate 15-lipoxygenase, ALOX15)及谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)等^[5-6]。研究表明,ACSL4 可促进多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs)整合入膜脂质,为铁死亡提供底物基础^[7]; LPCAT3 可进一步将磷脂酰乙醇胺修饰为铁死亡靶向底物;ALOX15 可催化 PUFAs 氧化生成脂质过氧化物;而 GPX4 则作为抑制铁死亡的关键酶,能够清除细胞内的过氧化脂质^[8-9]。上述因子的动态变化共同决定了铁死亡的发生与进展。因此,从铁死亡信号通路入手,干预关键因子表达,有望成为缓解 CIRI 的重要靶点^[10]。

芒柄花素(formononetin, FMN)是一种广泛存在于豆科植物中的天然异黄酮类化合物,具有良好的脂溶性和生物活性,已在多种神经系统疾病模型中显示出抗氧化、抗炎及抗凋亡等神经保护作用^[11]。已有研究表明,芒柄花素可通过调节核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)通路、清除活性氧(reactive oxygen species, ROS)、稳定线粒体功能等机制减轻神经元损伤^[12-13]。然而,芒柄花素是否可通过调控铁死亡通路发挥神经保护

作用,目前研究尚不充分,尤其是在脑缺血再灌注背景下对铁死亡关键靶点的影响仍需进一步明确。

本研究以改良线栓法构建大鼠脑缺血再灌注(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)模型,系统评估芒柄花素对神经功能、组织形态及细胞死亡的干预效果,并结合 TUNEL 染色、铁死亡相关指标检测[亚铁离子(ferrous ion, Fe^{2+})、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、脂质过氧化物(lipid peroxidation, LPO)、还原型/氧化型谷胱甘肽比值(reduced glutathione/Oxidized glutathione ratio, GSH/GSSG ratio)]、二氢乙啶荧光探针(dihydroethidium, DHE)检测 ROS,全面揭示其抗氧化及抗铁死亡潜力。同时,采用流式细胞术、免疫荧光和 Western blot 等多种手段,检测铁死亡关键蛋白 ACSL4、LPCAT3、ALOX15 和 GPX4 的表达变化,进一步结合分子对接技术,预测芒柄花素与上述蛋白的结合位点和亲和力,以从结构水平验证其潜在靶向机制。旨在从多层面揭示芒柄花素对 CIRI 的保护作用及其分子机制,为临床脑卒中辅助治疗提供实验依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所用雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(220 ± 20) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号为 SCXK(湘)2021-0002。大鼠饲养于湖南中医药大学实验动物中心,许可证号:SYXK(湘)2024-0014,室温控制在 $22\sim 24$ °C,相对湿度 50%~60%,昼夜节律为 12 h 光照/12 h 黑暗,自由饮水、进食标准饲料,适应性饲养 1 周后开展实验。动物实验方案已获湖南中医药大学第一附属医院实验动物伦理委员会批准(ZYFY20231110-209)。

1.2 实验试剂

芒柄花素(质量分数 $\geq 98\%$,货号:HY-N0183)和依达拉奉(Edaravone, EDA,货号:HY-B0099)购自美国 MedChemExpress 公司;MCAO 栓线(型号:2636A2,线径 0.36 mm 系列)购自北京西浓科技有限公司;脑组织染色试剂包括 HE 染色液(货号:G1120)、尼氏染色液(货号:G1434)、银染试剂盒(货号:G3260),均购自北京索莱宝科技有限公司;TUNEL 细

胞凋亡试剂盒(显色法,货号:C1098)、MDA 检测试剂盒(货号:S0131)、GSH 检测试剂盒(货号:S0053)、RIPA 裂解液(货号:P0013B)、BCA 蛋白定量试剂盒(货号:P0010)及 ECL 发光液(货号:P0018S)均购自 Beyotime 公司;DHE ROS 检测试剂盒(货号:HR8821)购自北京百奥莱博科技有限公司;Fe²⁺检测试剂盒(货号:E-BC-K773-M)购自 Elabscience 公司;PVDF 膜(货号:IPVH00010)购自 Millipore 公司;ACSL4 抗体(货号:ab155282)、LPCAT3 抗体(货号:ab189830)、ALOX15 抗体(货号:ab244205)、GPX4 抗体(货号:ab125066)、 β -actin 抗体(货号:ab8226)及 HRP 标记二抗(货号分别为:ab205718、ab205719)均购自 Abcam 公司;免疫荧光相关抗体 Cy3-标记羊抗兔 IgG(货号:bs-0295G-Cy3)、FITC-标记羊抗鼠 IgG(货号:bs-0296G-FITC)及 DAPI 染色液(货号:C02-04001)均购自 Bioss 公司。

1.3 实验设备

电热恒温水浴锅(型号:HH-4)购自上海精宏实验设备有限公司;高速冷冻离心机(型号:5424R)购自德国 Eppendorf 公司;全波长酶标仪(型号:Multi-skan FC)购自美国 Thermo Scientific 公司;电泳仪及转膜系统(型号:Mini-PROTEAN Tetra System)和凝胶成像系统(型号:ChemiDoc XRS+)均购自美国 Bio-Rad 公司;荧光显微镜(型号:BX53)购自日本 Olympus 公司;石蜡切片机(型号:RM2016)与冰冻切片机(型号:CM1950)均购自德国 Leica 公司;组织匀浆器(型号:Mini-Beadbeater)购自美国 Biospec 公司;流式细胞仪(BD FACSCanto II)购自 BD Biosciences。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠 CIRI(MCAO/R)模型建立及分组处理 采用改良线栓法建立 MCAO/R 模型:使用戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)麻醉大鼠后取仰卧位,颈部正中切开,钝性分离暴露右侧颈总动脉(common carotid artery, CCA)、颈内动脉(internal carotid artery, ICA)和颈外动脉(external carotid artery, ECA)。在 CCA 和 ICA 近心端暂时夹闭,结扎 ECA 远心端并剪开小口,插入 MCAO 栓线(线径为 0.36 mm),从 ECA 插入 ICA,沿 ICA 缓慢推进至大脑中动脉(middle cerebral artery, MCA)起始部位[约(18±0.5) mm],松开动脉夹,固定线栓,维持缺血 2 h 后轻柔拔出线栓恢复 ICA 血流,再灌注 24 h。假手术组仅分离血管,不插线栓。术中保持动物体温在(37.0±0.5)℃。术后动物清醒后转移至温暖笼盒,自由饮水和进食。造模成功标

准为:mNSS 评分 \geq 1分,且 TTC 染色显示明显梗死区域^[13]。

实验大鼠随机分为 6 组,每组 10 只,具体分组及干预措施如下。(1)假手术组:仅分离颈动脉,不插线栓,每日腹腔注射生理盐水;(2)模型组:制备 MCAO/R 模型,每日腹腔注射生理盐水;(3)芒柄花素低剂量组:MCAO/R 模型,每日腹腔注射芒柄花素(10 mg·kg⁻¹);(4)芒柄花素中剂量组:MCAO/R 模型,每日腹腔注射芒柄花素(20 mg·kg⁻¹);(5)芒柄花素高剂量组:MCAO/R 模型,每日腹腔注射芒柄花素(40 mg·kg⁻¹)^[12];(6)依达拉奉组:MCAO/R 模型,每日腹腔注射依达拉奉(3.5 mg·kg⁻¹)。各组均连续给药 7 d。

1.4.2 改良神经功能缺损评分(modified neurological severity score, mNSS) 采用 mNSS 对大鼠 CIRI 后的神经功能进行评估。mNSS 评分包括运动功能(0~6分)、感觉功能(0~2分)、平衡功能(0~6分)和反射(0~4分)4个方面,总分为 0~18分,分数越高表示神经功能缺损越严重,评分细则详见参考文献[13],并结合本课题组前期研究实际操作流程加以实施。于治疗后 1、3、7 d,由两名对实验分组情况不知情的研究人员分别独立评分,并取平均值用于统计分析,评分越高表明大鼠神经功能损伤越严重。

1.4.3 HE、尼氏、镀银染色 取 4%多聚甲醛固定保存的 5 只大鼠脑组织,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并连续切成 4 μ m 厚冠状切片。分别进行 HE 染色和尼氏染色。HE 染色:切片脱蜡水化后,苏木素染色 5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇分化,流水冲洗后伊红染色 2 min;尼氏染色:切片脱蜡水化后,置于 0.5%甲苯胺蓝染液 37℃ 孵育 15 min,蒸馏水冲洗;镀银染色:切片脱蜡水化后置于银氨溶液 37℃ 孵育 25~30 min,0.5%甲醛溶液显色,5%硫代硫酸钠定影。染色后切片均经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,在光学显微镜下观察并记录神经元形态、核固缩、坏死、尼氏小体变化以及神经元轴突和神经纤维损伤情况,综合评估脑组织病理损伤程度。参照课题组前期^[13],对 HE 染色切片中的神经元排列、形态、出血、水肿及坏死等指标进行综合判定,评分范围为 0~4分,分值越高表示病理损伤越严重。采用 ImageJ 计算尼氏小体数目和银染阳性面积比。

1.4.4 TUNEL 染色 取 4%多聚甲醛固定保存的 5 只大鼠脑组织,采用 TUNEL 染色试剂盒检测脑组织石蜡切片,严格按说明书操作。组织经 4%多聚甲醛

固定 24 h 后石蜡包埋,切片厚度为 4 μm 。切片经二甲苯脱蜡 2 次(每次 5~10 min),依次经无水乙醇、90%乙醇、70%乙醇及蒸馏水梯度水化。滴加 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 无 DNA 酶污染的蛋白酶 K,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 进行抗原修复,PBS 冲洗 3 次。随后于 3% H_2O_2 /PBS 中室温孵育 20 min 封闭内源性过氧化物酶,PBS 洗涤 3 次。按比例配制 TdT 酶与 Biotin-dUTP 的生物素标记液,每张切片滴加 50 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min,终止液终止反应后 PBS 冲洗 3 次。滴加 Streptavidin-HRP 工作液,室温孵育 30 min,PBS 洗涤后加 DAB 显色 5~10 min,显色结束后立即终止并 PBS 冲洗。可选苏木素复染细胞核,脱水、透明后中性树脂胶封片。TUNEL 阳性细胞核呈棕黄色,非凋亡细胞核呈蓝色,通过 ImageJ 软件计算阳性率(TUNEL 阳性细胞数/总细胞数)以定量评估细胞凋亡水平。

1.4.5 Fe^{2+} 、MDA、LPO、GSH 含量检测 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存的 5 只大鼠缺血侧脑组织,使用预冷生理盐水清洗去血,吸干后称重。按 1:9 的组织质量与裂解液体积比例,加入试剂盒提供的裂解液制备 10% 脑组织匀浆。于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下匀浆后,以 12 000 r/min(半径 8.4 cm)离心 10 min,取上清用于各项指标检测。

Fe^{2+} 含量采用亚铁离子比色法,组织匀浆与显色液反应后于 593 nm 波长测定 OD 值,通过标准曲线计算铁离子浓度,评估铁积聚水平;MDA 含量采用硫代巴比妥酸法,匀浆上清与检测液反应后 100 $^{\circ}\text{C}$ 加热 15 min,离心后于 532 nm 波长测定吸光度,反映脂质过氧化水平;LPO 含量采用比色法,匀浆上清与显色剂反应,95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 40 min 后在 535 nm 处测定吸光度,计算 LPO 浓度;GSH 含量通过 GSH/GSSG 检测试剂盒测定,匀浆经蛋白去除后与 DTNB 反应,412 nm 测吸光度,结合标准曲线换算 GSH 浓度,反映组织抗氧化能力。

1.4.6 ROS 含量检测 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存的 5 只大鼠缺血侧脑组织,于冰冻切片机上切成厚度为 10 μm 的冰冻切片,贴附于载玻片上。参照 DHE 活性氧检测试剂盒说明书进行操作:切片自然晾干片刻后,滴加 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DHE 荧光探针工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min;用 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,以充分去除未进入组织内的多余探针。用抗荧光淬灭封片剂封片后,于荧光显微镜下(激发波长约 518 nm,发射波长约 605 nm)观察并拍照记录红色荧光信号。采用 ImageJ 软件对图像中平均荧光强度进行半定量分析,平均荧光强度与组织内 ROS 水平呈正相关。

1.4.7 流式细胞术检测 ACSL4 与 LPCAT3 的共表达 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的 5 只大鼠缺血侧脑组织,加入含蛋白酶抑制剂的预冷 RIPA 裂解液按质量体积比 1:10 进行匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min(84 cm)离心 10 min,取上清,使用 BCA 法测定蛋白浓度。细胞悬液经 PBS 重悬、调整浓度后,封闭液封闭 30 min 以减少非特异性结合。随后加入兔抗 ACSL4 抗体(Abcam, 1:200)和小鼠抗 LPCAT3 抗体(Abcam, 1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h。PBS 洗涤后分别加入 PE 标记的羊抗兔 IgG 和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 二抗(Bioss, 1:300),室温避光孵育 30 min。经 PBS 充分洗涤、过滤后,使用 BD FACSCanto II 流式细胞仪进行检测。数据通过 FlowJo 10.0 软件分析,共表达细胞比例以 Q2 象限表示,用于评估铁死亡相关蛋白 ACSL4 和 LPCAT3 的表达变化。

1.4.8 ACSL4/LPCAT3 免疫荧光染色 取 4% 多聚甲醛固定的脑组织石蜡切片(厚度 4 μm),于二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化后 PBS 洗涤。将切片置于 pH 6.0 柠檬酸缓冲液中微波修复 15 min,自然冷却后 PBS 洗涤,0.3% Triton X-100 处理 10 min 以增加通透性。5% BSA 室温封闭 1 h 后,加入兔抗 ACSL4(1:200)与小鼠抗 LPCAT3(1:200)一抗混合液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日复温 30 min 后 PBS 洗涤,加入 Cy3 标记羊抗兔 IgG 和 FITC 标记羊抗鼠 IgG 二抗(1:300),避光孵育 1 h。DAPI 复染细胞核 5 min,PBS 洗净后封片。荧光显微镜下观察,ACSL4 阳性呈红色,LPCAT3 阳性呈绿色,细胞核呈蓝色。采用 ImageJ 软件对荧光强度进行半定量分析。

1.4.9 Western blot 检测 取-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻保存的大鼠缺血侧脑组织,加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,按质量体积比 1:10 制备匀浆,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min(84 mm)离心 10 min,取上清 BCA 法测定蛋白浓度。取 40 μg 等量蛋白加入加载缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳分离,并转膜至 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉在室温封闭 1 h,分别孵育一抗:ACSL4(1:3 000)、LPCAT3(1:2 000)、ALOX15(1:2 000)、GPX4(1:3 000)和 β -actin(1:5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日回温 30 min 后用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记二抗(1:8 000),室温孵育 1 h。洗膜后使用 ECL 显色液显色,并在化学发光成像系统下拍照。使用 ImageJ 软件对各条带灰度值进行分析,以目标蛋白/ β -actin 灰度值比值表示相对表达水平,用于后续统计分析。

1.4.10 统计学方法 所有实验数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。正态性检验采用 *Shapiro-Wilk* 检验,方差齐性检验采用 *Levene* 检验。对于同时满足正态分布和方差齐性的多组数据,采用单因素方差分析,并进行 *Tukey* 法或其他多重比较法的事后检验;对于不满足正态性或方差齐性的数据,采用 *Kruskal-Wallis* 秩和检验,并进行校正后的两两比较。mNSS 评分在第 1、3、7 天分别进行组间比较,依据数据特性选择相应方法分析干预效果。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芒柄花素改善 CIRI 的神经功能缺损

与假手术组相比,模型组在各时间点均显示 mNSS 评分显著升高 ($P<0.01$),干预组中,芒柄花素各剂量组及依达拉奉阳性组在不同程度上均可降低 mNSS 评分,与模型组比较,芒柄花素中剂量和芒柄花素高剂量组在第 3 天和第 7 天均显著降低 mNSS 评分 ($P<0.01$),芒柄花素低剂量组在第 7 天亦明显降低 mNSS 评分 ($P<0.01$);依达拉奉组在第 3 天和第 7 天亦呈现 mNSS 评分显著降低 ($P<0.01$)。此外,芒柄花素中剂量、高剂量组及依达拉奉组在干预后呈现出时间依赖性的神经功能恢复趋势 ($P<0.01$)。详见表 1。

2.2 芒柄花素减轻 CIRI 大鼠脑组织病理损伤

假手术组海马区组织结构完整,神经元排列紧密有序,胞体圆整,核染色清晰,无明显病理损伤;模型组神经元排列紊乱,数量减少,胞体固缩、轮廓模糊,部分细胞出现核固缩、溶解及空泡变性,提示明

表 1 各组大鼠不同时间点 mNSS 评分比较(分, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

分组	1 d	3 d	7 d
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
模型组	14.00±0.67**	13.10±0.57**	12.10±0.57**
芒柄花素低剂量组	13.80±0.92**	12.50±0.85**#	10.80±0.92**#△△
芒柄花素中剂量组	12.70±0.82**	10.80±0.79**#△	8.60±0.84**#△△△
芒柄花素高剂量组	12.70±0.48**	10.40±0.52**#△△	7.60±0.52**#△△△
依达拉奉组	13.40±1.26**	9.90±1.10**#△△	7.20±0.92**#△△△

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,# $P<0.05$,# $P<0.01$;组内不同时间点间比较,1 d 比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;3 d 比较,△△ $P<0.05$,△△△ $P<0.01$ 。

显的脑组织病理损伤;芒柄花素低剂量组病理损伤略有缓解,神经元数量略增加,但仍有结构紊乱;芒柄花素中剂量组细胞排列较为规整,神经元密度提高;芒柄花素高剂量组组织结构明显改善,神经元形态完整,排列接近正常,病理改变显著减轻;依达拉奉组亦表现出良好的神经保护作用,神经元结构较为清晰,排列较整齐。详见图 1。

假手术组海马 CA1 区神经元排列紧密,胞体饱满,尼氏小体着色深且分布均匀;模型组神经元数量明显减少,排列紊乱,尼氏小体染色变浅甚至消失,提示神经元受损严重;芒柄花素低剂量组尼氏小体染色略增强,但神经元排列仍不规整;芒柄花素中剂量组神经元数量较模型组明显增多,染色增强,神经元形态逐渐恢复;芒柄花素高剂量组尼氏小体显著增多,染色加深,细胞排列规整,接近假手术组水平;依达拉奉组亦表现出良好的神经保护作用。详

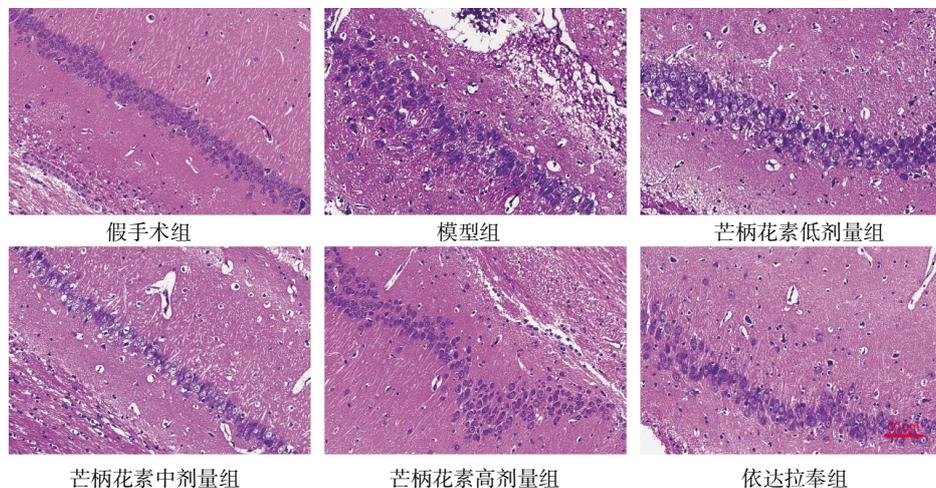


图 1 芒柄花素改善 MCAO/R 大鼠脑组织病理损伤的 HE 染色结果

Fig.1 HE staining results showing the improvement of pathological damage in brain tissue of MCAO/R rats by formononetin

见图 2。

假手术组神经纤维排列整齐致密,走向规整,染色均匀,结构完整;模型组神经纤维明显断裂、排列紊乱,染色不均匀且变浅,出现大量颗粒状或斑片状沉积,提示神经纤维变性严重。与模型组相比,芒柄花素干预各组均表现出不同程度的改善,其中芒柄花素低剂量组纤维结构略有修复,但仍存在断裂和染色减弱现象;芒柄花素中剂量组神经纤维排列较为整齐,染色增强,断裂减少;而芒柄花素高剂量组神经纤维走向清晰、染色加深,与依达拉奉组表现相近,提示其可有效减轻神经损伤。详见图 3。

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织病理学评分显著升高($P<0.01$),尼氏小体数目显著减少($P<0.01$),银染面积比显著降低($P<0.01$)。经芒柄花素干预后,各组病理学评分均不同程度下降,神经元数

量和神经纤维完整性得到改善。其中,芒柄花素低剂量组病理评分较模型组明显下降,尼氏小体数目和银染面积明显升高($P<0.01$);芒柄花素中剂量组病理评分明显降低($P<0.01$),尼氏小体数目和银染面积进一步升高($P<0.01$);芒柄花素高剂量组高剂量组评分下降($P<0.01$),尼氏小体数量明显增多($P<0.01$),银染阳性面积显著增加($P<0.01$);而依达拉奉组作为阳性对照,亦表现出明显神经保护作用,病理学评分明显下降($P<0.01$),尼氏小体数量明显增多($P<0.01$),银染阳性面积显著增加($P<0.01$)。详见表 2。

2.3 芒柄花素抑制 CIRI 大鼠脑组织神经元凋亡

TUNEL 染色结果显示,假手术组脑组织中几乎未见凋亡细胞,细胞核均呈蓝色;而模型组则出现大量棕黄色 TUNEL 阳性细胞($P<0.01$)。与模型组比

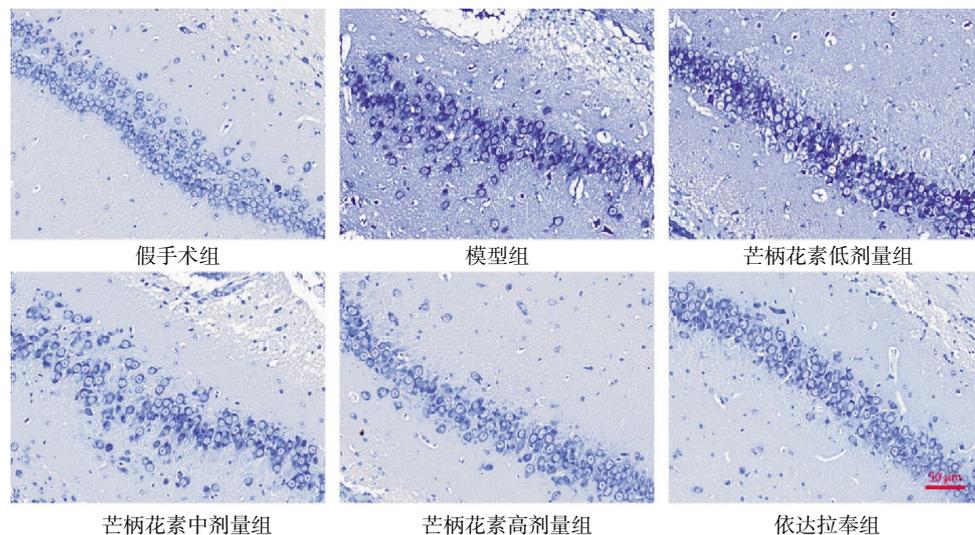


图 2 芒柄花素对 MCAO/R 大鼠脑组织神经元的保护作用(尼氏染色)

Fig.2 Protective effects of formononetin on neurons in brain tissue of MCAO/R rats (Nissl staining)

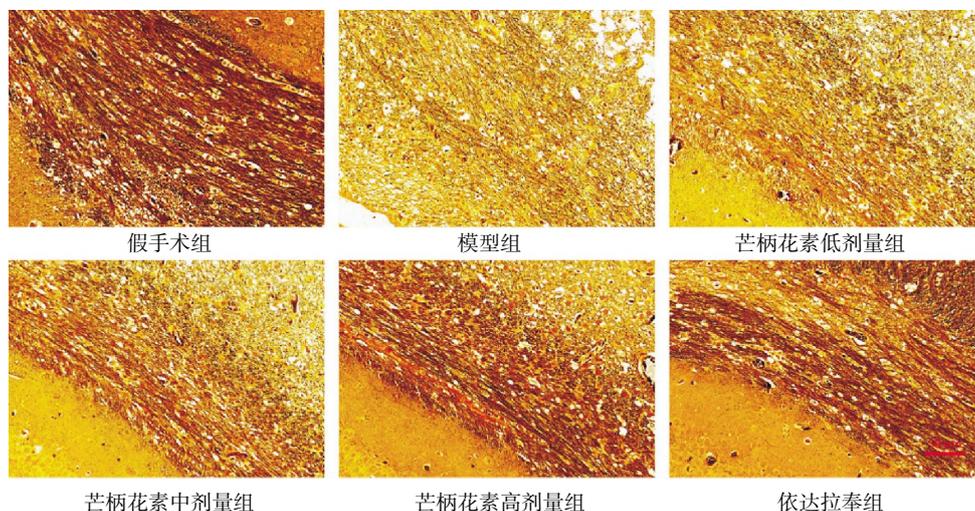


图 3 芒柄花素对 MCAO/R 大鼠脑组织神经纤维损伤的影响(镀银染色)

Fig.3 Effects of formononetin on nerve fiber damage in brain tissue of MCAO/R rats (silver staining)

表2 各组大鼠病理学评分、尼氏小体数目及银染面积比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Pathological scores, number of Nissl bodies, and silver-stained area ratio in each group of rats ($\bar{x}\pm s, n=5$)

分组	病理学评分/分	尼氏小体数目/个	银染面积比/%
假手术组	0.00±0.00	81.80±7.28	28.31±2.44
模型组	3.60±0.55**	49.80±9.53**	2.56±0.24**
芒柄花素低剂量组	3.00±0.82 [#]	59.40±4.72 ^{##}	8.50±0.52 ^{###}
芒柄花素中剂量组	2.40±0.55 ^{##}	63.60±8.26 ^{###}	9.90±1.28 ^{###}
芒柄花素高剂量组	2.00±0.71 ^{###}	65.00±1.58 ^{###}	16.46±2.12 ^{###}
依达拉奉组	1.67±0.52 ^{###}	72.40±7.23 ^{###}	23.49±1.21 ^{###}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

较,芒柄花素各剂量组均能有效减少 TUNEL 阳性细胞,其中高剂量组抑制效果最显著,且与依达拉奉组接近($P<0.01$)。详见图4、表3。

2.4 芒柄花素调节 CIRI 大鼠脑组织铁死亡相关指标

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 Fe^{2+} 浓度、MDA 及 LPO 水平显著升高($P<0.01$),而 GSH/GSSG 比值明显下降($P<0.01$)。芒柄花素干预后,各剂量组均可不同程度降低 Fe^{2+} 、MDA 及 LPO 水平,提高 GSH/GSSG 比值($P<0.05, P<0.01$),其中高剂量组在降低 Fe^{2+} 、MDA、LPO 水平及提高 GSH/GSSG 比值方面效果最佳,与模型组相比差异显著($P<0.01$)。详见表4。

2.5 芒柄花素降低 CIRI 大鼠脑组织 ROS 积累

与假手术组相比,模型组大鼠脑组织中 ROS 平均荧光强度显著升高($P<0.01$)。芒柄花素干预后,各剂量组 ROS 水平均明显下降,芒柄花素低剂量、芒

表3 各组大鼠 TUNEL 细胞比例($\%, \bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 TUNEL cell proportion of rats in each group ($\%, \bar{x}\pm s, n=5$)

分组	TUNEL 阳性细胞比例
假手术组	2.43±0.81
模型组	45.86±3.94**
芒柄花素低剂量组	38.67±3.29 [#]
芒柄花素中剂量组	28.24±2.79 ^{##}
芒柄花素高剂量组	18.83±2.17 ^{###}
依达拉奉组	15.61±1.84 ^{###}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

柄花素中剂量和芒柄花素高剂量,均显著低于模型组($P<0.01$)。阳性对照组依达拉奉亦显著降低 ROS 表达水平($P<0.01$),与芒柄花素高剂量组接近。详见图5、表5。

2.6 芒柄花素调控 ACSL4/LPCAT3 信号通路的表达

与假手术组相比,模型组脑组织 ACSL4/LPCAT3 双阳性细胞比例显著升高($P<0.01$)。芒柄花素干预后,芒柄花素低剂量、芒柄花素中剂量、芒柄花素高剂量组双阳性表达水平均显著低于模型组($P<0.01$)。依达拉奉组亦降低至 $52.30\%\pm 0.16\%$,与芒柄花素高剂量组接近。详见图6、表6。

假手术组中 ACSL4 与 LPCAT3 表达均较弱,荧光信号稀疏、分布均匀。与假手术组相比,模型组脑组织中 ACSL4 和 LPCAT3 表达水平显著增强,荧光强度明显升高($P<0.01$),提示 MCAO/R 可诱导铁死亡相关分子上调。芒柄花素干预后,两者荧光强度显著下降,芒柄花素各剂量组 ACSL4、LPCAT3 荧光强

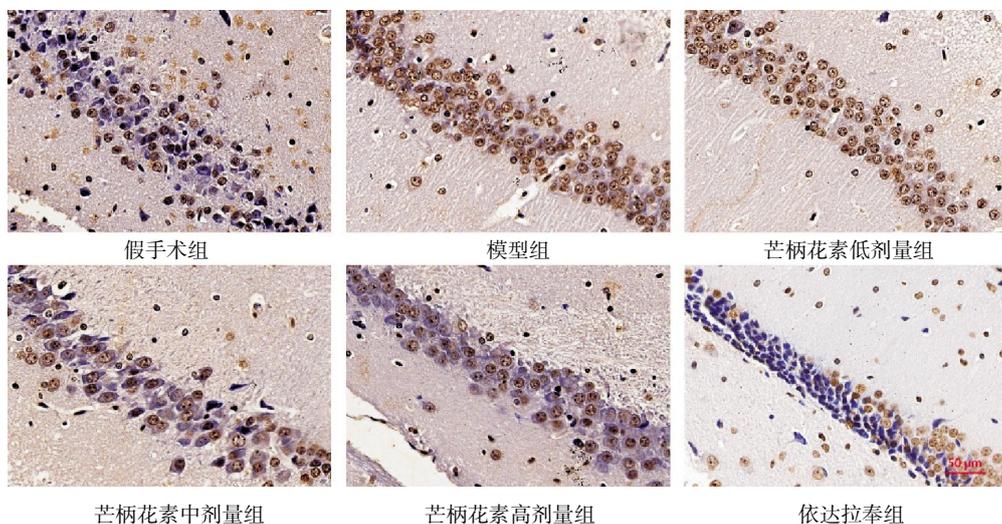


图4 TUNEL 染色显示各组大鼠脑组织细胞凋亡情况

Fig.4 TUNEL staining showing neuronal apoptosis in brain tissues of rats in each group

表 4 各组大鼠脑组织中铁死亡相关指标比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 4 Ferroptosis-related indicators in brain tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

分组	Fe ²⁺ /($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	LPO/($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	GSH/GSSG
假手术组	0.29±0.02	56.42±4.56	1.62±0.12	8.62±0.49
模型组	0.55±0.04**	109.23±7.05**	3.49±0.21**	3.08±0.47**
芒柄花素低剂量组	0.46±0.02 [#]	99.23±3.27 [#]	3.15±0.14 [#]	4.35±0.32 [#]
芒柄花素中剂量组	0.45±0.01 [#]	83.51±5.52 [#]	2.62±0.21 [#]	6.07±0.85 [#]
芒柄花素高剂量组	0.33±0.01 [#]	65.66±4.39 [#]	2.22±0.24 [#]	6.83±0.17 [#]
依达拉奉组	0.31±0.02 [#]	59.29±2.59 [#]	1.99±0.13 [#]	7.95±0.50 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,[#] $P<0.01$ 。

表 5 各组大鼠脑组织中 ROS 表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 5 ROS expression levels in brain tissues of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

分组	ROS 平均荧光强度
假手术组	18.59±1.62
模型组	82.4±7.91**
芒柄花素低剂量组	67.06±3.64 [#]
芒柄花素中剂量组	48.37±7.34 [#]
芒柄花素高剂量组	30.97±2.78 [#]
依达拉奉组	27.86±2.65 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

度均明显低于模型组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。依达拉奉组 ACSL4 和 LPCAT3 荧光强度与芒柄花素高剂量组相近。详见图 7、表 6。

2.7 芒柄花素调控铁死亡相关蛋白的表达

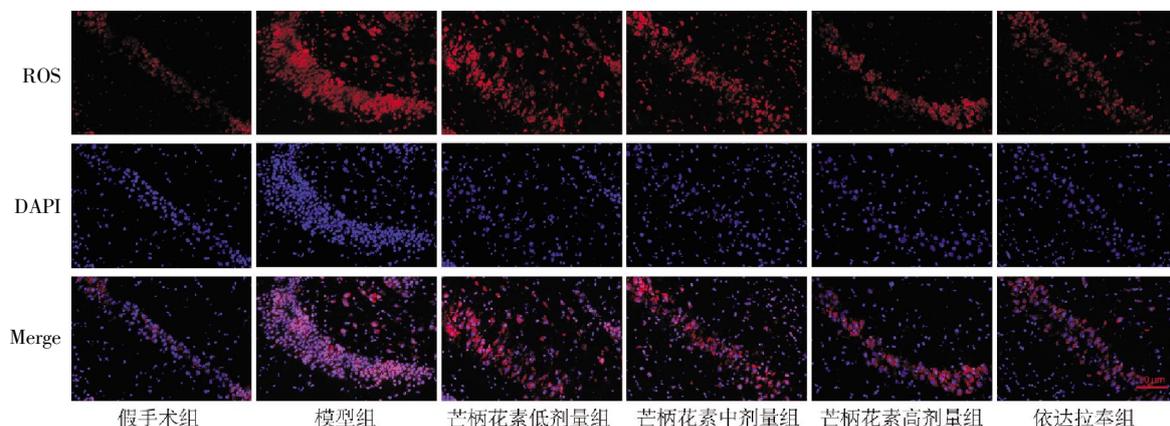
与假手术组相比,模型组中 ACSL4、LPCAT3 和 ALOX15 蛋白表达显著上调($P<0.01$),而 GPX4 表达显著下调($P<0.01$),提示铁死亡通路被激活。经芒柄花素干预后,ACSL4、LPCAT3 和 ALOX15 表达下降

($P<0.01$),GPX4 表达水平上调($P<0.01$)。详见图 8。

3 讨论

CIRI 作为缺血性脑卒中治疗中不可避免的继发性病理过程,是导致卒中后神经功能持续恶化和恢复受限的重要原因^[14]。缺血性脑卒中占全部脑卒中的 80%以上,且卒中后 1 年致残率高达 70%,复发率超过 25%^[15-17]。尽管现有以阿替普酶溶栓、机械取栓为代表的血管再通治疗在急性期发挥一定作用,但随后的氧化应激、炎症级联反应与细胞程序性死亡激活所导致的二次损伤仍未被有效遏制^[18]。近年来,铁死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式,因其在 CIRI 中介导继发性神经元损伤的关键作用,逐渐成为该领域研究的热点^[2,19]。在 CIRI 早期,细胞内铁负荷迅速升高,GPX4 表达下调,脂质 ROS 大量积聚,协同驱动铁死亡过程,是继发性神经损伤的重要推力之一^[4,20]。

本研究以 MCAO/R 动物模型为基础,从行为学、组织学、生化和分子水平系统评估了芒柄花

图 5 芒柄花素对 MCAO/R 大鼠脑组织 ROS 荧光的影响($\times 63$)Fig.5 Effects of formononetin on ROS fluorescence in brain tissue of MCAO/R rats ($\times 63$)

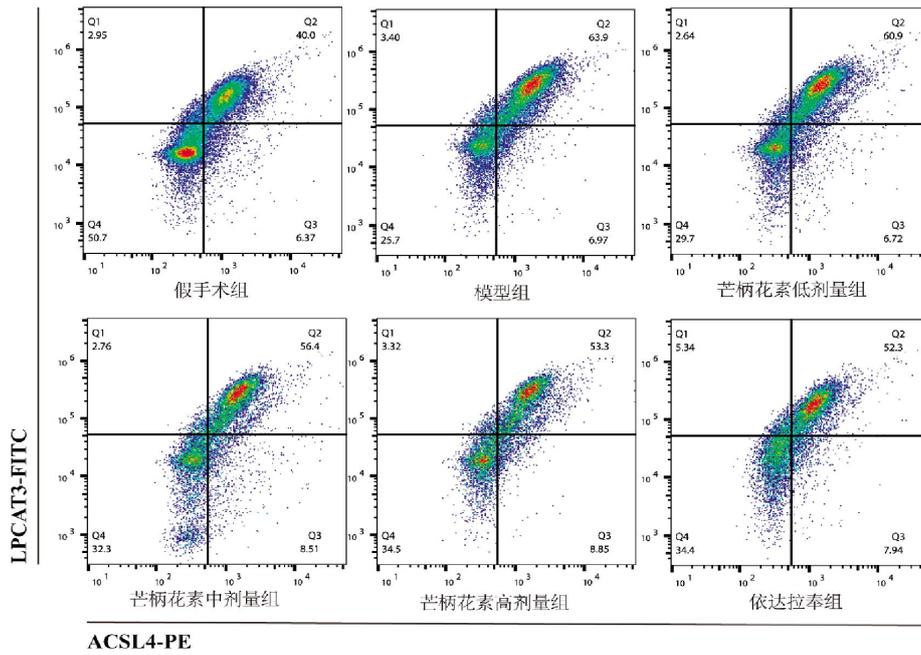


图 6 流式细胞术检测大鼠脑组织中 ACSL4+LPCAT3 共表达情况

Fig.6 The co-expression of ACSL4 and LPCAT3 in rat brain tissues by flow cytometry

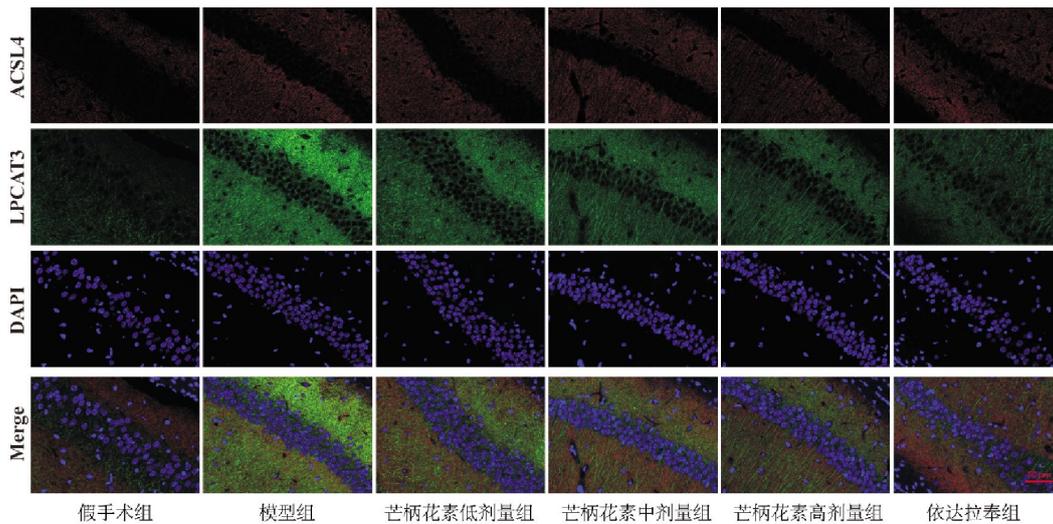


图 7 免疫荧光染色检测大鼠脑组织中 ACSL4/LPCAT3 表达情况($\times 63$)

Fig.7 Expression of ACSL4/LPCAT3 in rat brain tissues by immunofluorescence staining ($\times 63$)

表 6 大鼠脑组织中 ACSL4 和 LPCAT3 的定位定量表达 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 6 Localization and quantitative expressions of ACSL4 and LPCAT3 in rat brain tissues ($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	ACSL4+LPCAT3/%	ACSL4 强度	LPCAT3 强度
假手术组	39.94 \pm 0.24	15.34 \pm 1.12	22.68 \pm 1.39
模型组	63.90 \pm 0.27**	48.71 \pm 2.65**	66.43 \pm 3.18**
芒柄花素低剂量组	60.72 \pm 0.32 ^{##}	42.05 \pm 2.01 ^{##}	60.27 \pm 2.74 ^{##}
芒柄花素中剂量组	56.36 \pm 0.27 ^{##}	36.86 \pm 2.23 ^{##}	52.74 \pm 2.61 ^{##}
芒柄花素高剂量组	53.24 \pm 0.29 ^{##}	27.58 \pm 1.74 ^{##}	38.65 \pm 1.97 ^{##}
依达拉奉组	52.30 \pm 0.16 ^{##}	24.97 \pm 1.39 ^{##}	35.48 \pm 2.08 ^{##}

注:与假手术组比较, ** $P < 0.01$;与模型组比较, ^{##} $P < 0.01$ 。

素在缓解 CIRI 中的神经保护作用。mNSS 评分显示, 芒柄花素可显著改善神经功能缺损, 尤其在术后第 3 天和第 7 天疗效持续。组织学结果进一步证实其病理保护效应: 高剂量芒柄花素可显著减轻神经元排列紊乱、尼氏小体丢失及神经纤维断裂, 神经结构接近假手术组, 提示其具备促进组织修复的潜力。TUNEL 染色进一步表明, 芒柄花素可有效抑制 CIRI 所致的神经元凋亡, 表现出良好的抗细胞死亡能力, 且中高剂量效果接近阳性药物依达拉奉。此外, 芒柄花素显著降低 Fe^{2+} 浓度、MDA 与 LPO

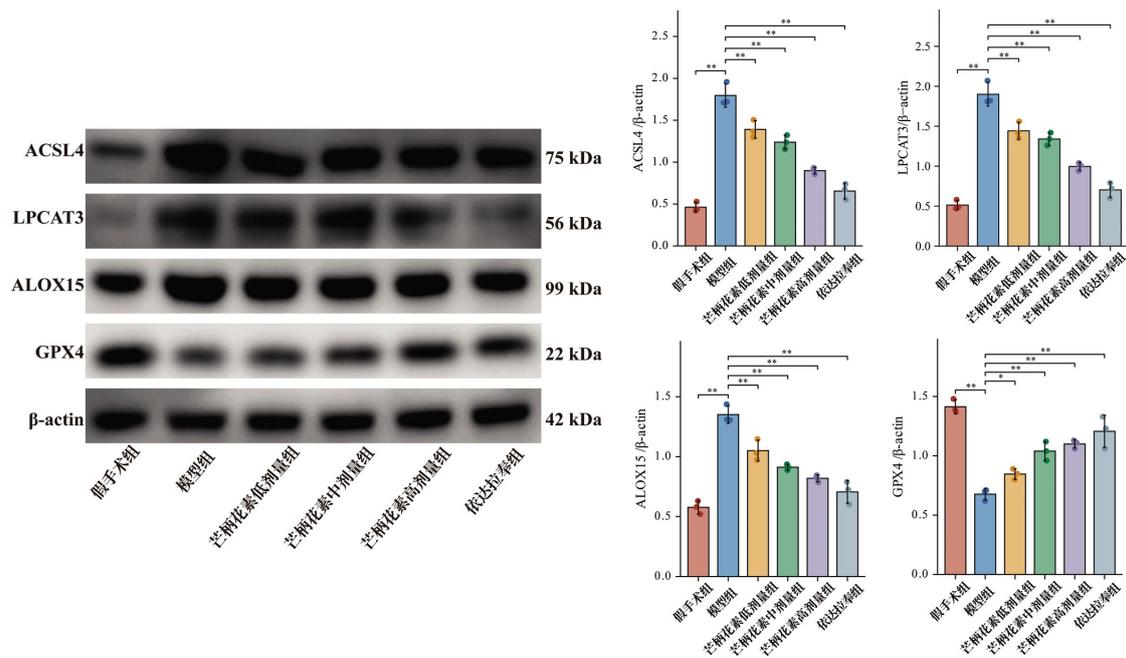


图 8 Western blot 检测大鼠脑组织中铁死亡相关蛋白表达的影响

Fig.8 Expressions of ferroptosis-related proteins in rat brain tissues by Western blot

注:数据以均值±标准差表示($\bar{x}\pm s$, $n=3$)。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

等脂质过氧化产物水平,同时提升GSH/GSSG比值,提示其具有调节铁稳态与抗氧化应激的双重作用。ROS荧光检测进一步佐证了其清除氧自由基、缓解氧化应激的能力,且表现出剂量依赖性。与前期报道的芒柄花素具有抗凋亡、抗氧化的多重神经保护作用一致^[21-22]。

在机制层面,本研究发现芒柄花素可显著下调ACSL4、LPCAT3、ALOX15铁死亡正调因子的表达,并上调GPX4这一关键抗铁死亡蛋白的表达,形成“调脂-抗氧化-抑铁”多靶点调控机制网络。流式细胞术与免疫荧光染色结果一致性地证实了其在蛋白表达与细胞共表达水平上的抑制作用。

研究发现,GPX4基因过表达可显著抑制MCAO/R模型中神经元铁死亡进程,并提高动物生存率^[23];ACSL4敲减可逆转缺血诱导的脂质过氧化损伤并改善神经功能^[24]。此外,研究表明,芒柄花素可通过激活Nrf2/血红素氧合酶-1通路缓解氧化应激和线粒体功能障碍^[25-26]。本研究则进一步在铁死亡通路深度上拓展了其作用机制,首次系统验证其对ACSL4/LPCAT3/ALOX15/GPX4轴的调控潜力。本研究结果支持芒柄花素具有传统抗氧化、抗凋亡的特性,且可直接靶向铁死亡核心因子,是一种兼具多靶点、低

毒性和天然来源优势的潜在神经保护候选药物。其良好的分子结构基础及稳定的亲靶能力,使其在“天然小分子抑铁死亡药物”开发领域具有重要的应用前景^[27]。

综上所述,本研究从行为学、病理学、生化指标、信号蛋白调控及结构结合等多个层面系统验证了芒柄花素通过调控铁死亡通路缓解CIRI的作用机制,丰富了CIRI铁死亡病理机制的研究内涵,也为芒柄花素在脑卒中后的辅助治疗提供了坚实的理论基础与应用前景。

参考文献

- [1] ZHANG M, LIU Q, MENG H, et al. Ischemia-reperfusion injury: Molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2024, 9(1): 12.
- [2] ZHANG Q, JIA M, WANG Y F, et al. Cell death mechanisms in cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Neurochemical Research, 2022, 47(12): 3525-3542.
- [3] HE Q Y, WANG Y Q, FANG C, et al. Advancing stroke therapy: A deep dive into early phase of ischemic stroke and recanalization[J]. CNS Neuroscience & Therapeutics, 2024, 30(2): e14634.
- [4] HU X D, BAO Y T, LI M, et al. The role of ferroptosis and its mechanism in ischemic stroke[J]. Experimental Neurology, 2024,

- 372: 114630.
- [5] CHEN X, YU C H, KANG R, et al. Iron metabolism in ferroptosis[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 590226.
- [6] CHEN X, LI J B, KANG R, et al. Ferroptosis: Machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054–2081.
- [7] DING K Y, LIU C B, LI L, et al. Acyl-CoA synthase ACSL4: An essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism[J]. *Chinese Medical Journal*, 2023, 136(21): 2521–2537.
- [8] LEE J Y, KIM W K, BAE K H, et al. Lipid metabolism and ferroptosis[J]. *Biology*, 2021, 10(3): 184.
- [9] LIU J, KANG R, TANG D L. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(22): 7038–7050.
- [10] CHAI Z H, ZHENG J S, SHEN J. Mechanism of ferroptosis regulating ischemic stroke and pharmacologically inhibiting ferroptosis in treatment of ischemic stroke[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(7): e14865.
- [11] TIAN J, WANG X Q, TIAN Z. Focusing on formononetin: Recent perspectives for its neuroprotective potentials[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 905898.
- [12] LUO J, CAI Y D, WEI D L, et al. Formononetin alleviates cerebral ischemia–reperfusion injury in rats by targeting the PARP-1/PARG/Iduna signaling pathway[J]. *Brain Research*, 2024, 1829: 148845.
- [13] GONG C, FU X, MA Q, et al. Gastrodin: Modulating the xCT/GPX4 and ACSL4/LPCAT3 pathways to inhibit ferroptosis after ischemic stroke[J]. *Phytomedicine*, 2025, 136: 156331.
- [14] JURCAU A, SIMION A. Neuroinflammation in cerebral ischemia and ischemia/reperfusion injuries: From pathophysiology to therapeutic strategies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 23(1): 14.
- [15] COLLABORATORS G 2 D A I. Global incidence, prevalence, years lived with disability (YLDs), disability–adjusted life–years (DALYs), and healthy life expectancy (HALE) for 371 diseases and injuries in 204 countries and territories and 811 subnational locations, 1990–2021: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021[J]. *Lancet*, 2024, 403(10440): 2133–2161.
- [16] TU W J, WANG L D, Special Writing Group of China Stroke Surveillance Report. China stroke surveillance report 2021[J]. *Military Medical Research*, 2023, 10(1): 33.
- [17] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2023 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2024, 39(7): 625–660.
- [18] RABINSTEIN A A, ALBERS G W, BRINJIKJI W, et al. Factors that may contribute to poor outcome despite good reperfusion after acute endovascular stroke therapy[J]. *International Journal of Stroke*, 2019, 14(1): 23–31.
- [19] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron–dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [20] STOCKWELL B R, ANGELI J P F, BAYIR H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273–285.
- [21] PINGALE T D, GUPTA G L. Therapeutic effect of formononetin in 6-OHDA induced Parkinson disease in rats[J]. *Inflammopharmacology*, 2025, 33(4): 2179–2189.
- [22] ZHOU Z J, ZHANG P. Formononetin ameliorates the LPS–induced inflammatory response and apoptosis of neuronal cells via NF- κ B/NLRP3 signaling pathway[J]. *Functional & Integrative Genomics*, 2023, 23(4): 321.
- [23] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317–331.
- [24] CUI Y, ZHANG Y, ZHAO X L, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis–induced brain injury and neuroinflammation[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2021, 93: 312–321.
- [25] ALADAILEH S H, HUSSEIN O E, ABUKHALIL M H, et al. Formononetin upregulates Nrf2/HO–1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate–induced rats[J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 430.
- [26] WANG X T, KANG N X, LIU Y, et al. Formononetin exerts neuroprotection in Parkinson’s disease via the activation of the Nrf2 signaling pathway[J]. *Molecules*, 2024, 29(22): 5364.
- [27] WANG L Y, HUANG H M, LI X X, et al. A review on the research progress of traditional Chinese medicine with anti–cancer effect targeting ferroptosis[J]. *Chinese Medicine*, 2023, 18(1): 132.

(本文编辑 苏 维)