

天麻素通过激活 GPX4/SLC7A11/FTH1 信号抑制铁死亡减轻新生小鼠缺氧缺血性脑损伤

郭涛^{1,2}, 陈柏霖¹, 石金沙¹, 匡显锋¹, 余腾跃¹, 魏嵩¹, 刘雄², 肖蓉¹, 李娟娟¹

¹昆明医科大学基础医学院人体解剖学与组织胚胎学系, 云南昆明 650500; ²昆明理工大学基础医学院解剖学教研室, 云南昆明 650500

摘要:目的 探讨天麻素(GAS)通过调控GPX4/SLC7A11/FTH1信号通路抑制神经元铁死亡的机制,并评估其在新生小鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)中的治疗效果。方法 选取24只出生后9~11 d的C57BL/6J新生小鼠,采用右侧颈总动脉结扎缺血,并置于92% N₂和8% O₂的环境中缺氧1 h,以建立HIBD模型。将小鼠随机分为假手术组(Sham)、缺氧缺血模型组(HIBD)、天麻素低剂量组(HIBD+GAS-L, 100 mg/kg)和天麻素高剂量组(HIBD+GAS-H, 200 mg/kg), 6只/组。持续腹腔给药3 d后,选取小鼠脑皮层缺血半暗带组织,通过HE染色、Nissl染色、Zea-Longa法评分检测其病理损伤,评估亚铁离子、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、二氢乙胺(DHE)的水平和铁死亡相关蛋白GPX4、SLC7A11和FTH1的表达,并电镜检测铁死亡的形态学特征变化。体外实验选用HT22神经细胞,添加天麻素及GPX4的抑制剂RSL3干预1 h,并进行缺氧缺糖2 h,分为对照组(Control)、氧糖剥夺组(OGD)、天麻素治疗组(OGD+GAS, 0.5 mmol/L)、RSL3干预组(OGD+RSL3, 10 μmol/L)、天麻素和RSL3联合组(OGD+GAS+RSL3)。通过Western blotting和免疫荧光双标染色检测铁死亡相关蛋白的表达变化,同时评价FerroOrange、DCFH-DA、BODIPY-C11、MDA、GSH、JC-1和细胞活性指标。结果 天麻素低剂量和高剂量组均表现出改善HIBD病理损伤及神经行为学评分的效果($P<0.05$),铁离子、脂质过氧化物及ROS的水平降低,抗氧化能力得到恢复($P<0.05$),电镜观察到线粒体的脊得到恢复。Western blotting和免疫荧光显示,天麻素的这种神经保护作用是通过激活GPX4、SLC7A11和FTH1信号的表达水平而实现的。此外,细胞模型得到了类似的结果,并且当GPX4信号被RSL3靶向抑制后,天麻素对Fe²⁺、ROS、BODIPY-C11和MDA的抑制作用被RSL3抵消($P<0.05$),同时,天麻素对GSH、细胞活力和线粒体膜电位水平的增强效果被RSL3减弱($P<0.05$)。结论 天麻素通过上调GPX4/SLC7A11/FTH1信号通路,抑制神经元的铁死亡,从而在新生小鼠HIBD中发挥神经保护作用。关键词:天麻素;缺氧缺血性脑损伤;氧糖剥夺;铁死亡;GPX4/SLC7A11/FTH1;神经元

Gastrodin inhibits ferroptosis to alleviate hypoxic-ischemic brain damage in neonatal mice by activating GPX4/SLC7A11/FTH1 signaling

GUO Tao^{1,2}, CHEN Bolin¹, SHI Jinsha¹, KUANG Xianfeng¹, YU Tengyue¹, WEI Song¹, LIU Xiong², XIAO Rong¹, LI Juanjuan¹

¹Department of Human Anatomy & Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; ²Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: Objective To evaluate the therapeutic effect of gastrodin against hypoxic-ischemic brain damage (HIBD) in neonatal mice and explore the role of GPX4/SLC7A11/FTH1 signaling in mediating its effect. **Methods** Twenty-four 9- to 11-day-old C57BL/6J mice were randomized equally into 4 groups for sham operation, HIBD modeling by right common carotid artery ligation and subsequent exposure to hypoxia for 1 h, or gastrodin treatment at 100 or 200 mg/kg before and at 1 and 2 days after modeling. The mice then underwent neurological assessment (Zea-Longa scores), and the cerebral cortical penumbra tissue were collected for HE and Nissl staining, detection of ferroptosis biomarkers and protein expressions of GPX4, SLC7A11, and FTH1 with Western blotting and immunofluorescence co-localization, and observation of mitochondrial ultrastructure with electron microscopy. In cultured HT22 neuronal cells with oxygen-glucose deprivation (OGD) for 2 h, the effects of pretreatments with 0.5 mmol/L gastrodin, 10 μmol/L RSL3 (a GPX4 inhibitor), alone or in combination, were analyzed on expressions of ferroptosis-related proteins, cellular Fe²⁺, ROS, lipid peroxidation, MDA, and GSH levels, mitochondrial membrane potential (JC-1), and cell viability. **Results** Gastrodin treatment at the two doses both significantly ameliorated HIBD and neurological deficits of the mice, reduced mitochondrial damage and Fe²⁺, MDA and ROS levels, increased GSH level, and upregulated GPX4, SLC7A11, and FTH1 protein expressions. In HT22 cells, gastrodin pretreatment obviously attenuated OGD-induced ferroptosis and improved cell viability and mitochondrial function. Co-treatment with RSL3 potentially abrogated the inhibitory effects of gastrodin on Fe²⁺, ROS, BODIPY-C11, and MDA levels and attenuated its protective effects on GSH level, cell viability, and mitochondrial membrane potential. **Conclusion** Gastrodin provides neuroprotective effects in neonatal mice with HIBD by suppressing neuronal ferroptosis via upregulating the GPX4/SLC7A11/FTH1 signaling pathway.

Keywords: gastrodin; hypoxic-ischemic brain damage; oxygen-glucose deprivation; ferroptosis; GPX4/SLC7A11/FTH1; neurons

收稿日期:2025-06-19

基金项目:国家自然科学基金(32460218, 31960194);昆明医科大学博士研究生创新基金(J114150330296),昆明医科大学大学生创新训练计划基金(2024CYD038, 2024CYD161)

Supported by National Natural Science Foundation of China (32460218, 31960194).

作者简介:郭涛,实验师,在读博士研究生,E-mail: 475612496@qq.com
通信作者:李娟娟,教授,博士生导师,E-mail: lijjuanjuan@kmmu.edu.cn

缺氧缺血性脑损伤(HIBD)是新生儿神经系统中一种严重的临床病症,是一种严重的新生儿神经系统损伤。该疾病不仅与高死亡率相关,而且还可能导致患儿长期的神经功能障碍,如运动障碍、认知障碍及癫痫等,严重影响患儿的生活质量^[1-3]。新生儿HIBD的发病机制复杂,涉及多个分子途径和细胞损伤模式,而先前的研究多集中于炎症、坏死和凋亡^[4]。铁死亡如何参与缺氧缺血性脑损伤的病理生理机制尚需进一步深入研究^[5],这是一种依赖于铁离子和脂质过氧化的程序性细胞死亡方式,具有明显的氧化应激特征^[6]。研究表明,铁死亡在神经元损伤、炎症反应以及氧化应激过程中发挥了重要作用,是缺氧缺血性脑损伤的重要致病机制之一^[7,8]。

目前针对成人缺血性脑卒中后铁死亡的研究多集中于Nrf2或ACSL4等通路,而发育阶段的新生儿缺氧缺血性脑损伤谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)和铁蛋白重链1(FTH1)等信号通路同样在铁死亡的发生中扮演了关键角色,三者功能密切相关。GPX4作为一种谷胱甘肽过氧化物酶,是防止脂质过氧化积累的关键酶,其活性下降会导致脂质过氧化物的积累,从而引发铁死亡^[9]。SLC7A11是system Xc-的重要组成部分,通过介导半胱氨酸的摄取并转运至细胞内,影响谷胱甘肽(GSH)的合成,而GSH是GPX4催化反应的必要辅因子。当SLC7A11表达或功能受到抑制时,细胞内GSH水平下降,导致GPX4活性降低^[10]。此外,FTH1通过调控铁代谢间接影响GPX4的活性,FTH1表达下调会导致细胞内游离铁离子水平升高,促进芬顿反应,增加脂质过氧化物的生成,从而加剧GPX4的负担^[11]。因此,这三者形成了一个相互依赖的调控网络,共同抵御铁死亡的威胁。最新研究指示,在铁死亡过程中,GPX4、SLC7A11和FTH1共同参与铁稳态的维持,抑制细胞内过量的铁离子积聚和氧化应激反应,从而减轻神经细胞的损伤^[12,13]。

天麻素作为一种从中药天麻中提取的天然化合物,具有抗氧化、抗炎、神经保护等多种生物活性^[14]。近年来的研究发现,天麻素在多种神经系统疾病中展现出了良好的治疗潜力。天麻素通过调节细胞内的氧化还原平衡、抑制ROS的产生和氧化应激反应以及改善线粒体功能等机制,降低铁离子的释放,可能间接支持GPX4的功能,从而抑制铁死亡,对缺氧缺血性脑损伤产生保护作用^[15-17]。课题组前期研究发现,天麻素通过PI3K/AKT或CCR5/AKT等通路改善胎鼠缺氧缺血性脑损伤后小胶质细胞介导的炎症反应^[3,18]。然而,天麻素在神经元中铁死亡的作用及其对GPX4/SLC7A11/FTH1信号通路的影响仍缺乏系统的研究。

本研究旨在探讨天麻素通过上调GPX4/SLC7A11/

FTH1信号通路抑制铁死亡,从而减轻新生小鼠缺氧缺血性脑损伤的作用机制。通过建立新生小鼠HIBD模型,分析天麻素对神经损伤、铁死亡标志物及相关信号通路的影响,探索天麻素的具体作用机制。希望通过这一研究,为新生儿缺氧缺血性脑损伤的临床治疗提供新的药物靶点和治疗策略,并进一步揭示天麻素在铁死亡中的调节作用,为未来的神经保护疗法提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞 动物实验采用SPF级C57BL/6J新生小鼠,鼠龄为9~11 d,体质量4~6 g,来源于昆明医科大学实验动物中心[许可证:SYXK(滇)2015-0002]。小鼠被饲养在常温(22±2℃)和12 h光暗周期的环境中,饮水和食物均为自由获取。所有实验操作均通过动物伦理委员会的批准(伦理批号:kmmu20240248),严格按照《实验动物管理条例》进行。细胞实验部分使用小鼠神经母细胞瘤细胞株HT22,该细胞系由四川大学华西医学中心高林波教授提供。HT22细胞在含10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素的DMEM培养基中培养,放置于37℃、5% CO₂的恒温培养箱中。细胞在对数生长期时进行实验,确保细胞状态稳定。

1.1.2 主要试剂和仪器 天麻素(纯度≥99.7%,昆明制药有限公司);异氟烷(瑞沃德生命科技有限公司);RSL3(Selleck);HE、Nissl、Dihydroethidium、DCFH-DA、BODIPY-C11和CCK-8检测试剂盒(北京碧云天);亚铁离子和JC-1检测试剂盒(北京索莱宝);丙二醛(MDA)及谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(南京建成);FerroOrange(日本同仁);DMEM培养基(BI);GPX4、SLC7A11、FTH1和β-actin抗体(ABclonal);NeuN抗体(Abcam)。缺氧小室(Billups-Rothenberg);恒温细胞培养箱、高速离心机和全自动酶标仪(Thermo);光学显微镜(Leica);透射电子显微镜(Hitachi);Western blotting电泳、转膜和化学发光成像系统(Bio-Rad)。胎牛血清(HyClone);青霉素/链霉素(Gibco)。

1.2 方法

1.2.1 HIBD模型建立及给药 体内实验:将24只新生小鼠随机分为假手术组(Sham)、模型组(HIBD)、天麻素低剂量组(HIBD+GAS-L,100 mg/kg)和天麻素高剂量组(HIBD+GAS-H,200 mg/kg),6只/组。手术前,小鼠通过异氟烷进行麻醉。在解剖显微镜的引导下,结扎右侧颈总动脉,并在近端和远端切口以阻断血流,随后小鼠被置于含92% N₂和8% O₂的低氧环境中1 h,以建立HIBD模型。假手术组仅暴露右侧颈总动脉,但未进行结扎或暴露于低氧环境。天麻素溶于生理盐水,在手术前1 d、手术时以及手术后1 d和2 d分别进行腹腔注

射给药。本实验选取第3天的脑皮层缺血半暗带组织进行后续检测。

1.2.2 OGD模型建立及细胞培养 体外实验将60%~80%生长密度的HT22神经细胞随机分为对照组(Control)、氧糖剥夺组(OGD)、天麻素治疗组(OGD+GAS, 0.5 mmol/L)、RSL3干预组(OGD+RSL3, 10 μ mol/L)、天麻素与RSL3联合组(OGD+GAS+RSL3)。在OGD前,使用天麻素或GPX4信号的抑制剂RSL3预处理1 h,随后将高糖更换为无糖培养基后,置于缺氧小室装置中,通入95% N₂和5% CO₂的混合气体进行缺氧缺糖2 h,以建立OGD模型。0.5%胰酶消化离心后收集细胞以用于后续实验。

1.2.3 神经功能损伤评分 采用Zea-Longa法对实验小鼠进行术后神经功能学评估。具体评分标准如下,1分:前肢轻度屈曲;2分:动物自主活动减少或运动迟缓;3分:轻微的侧偏或行走不稳;4分:对侧肢体协调功能明显受损;5分:动物无法独立行走,神经功能严重障碍。没有行为学症状的视为模型建立失败,被剔除。得分越高,表明神经功能损伤越严重。

1.2.4 HE及Nissl染色 为观察细胞的病理改变,采用HE和Nissl染色对小鼠进行组织学分析。实验动物颈脱处死后,于冰上迅速取出脑组织,30%蔗糖脱水后,4%多聚甲醛固定24 h。石蜡切片厚度为3 μ m,贴于载玻片上备用。HE染色分别经苏木精染色、自来水冲洗反蓝、1%盐酸酒精分化、伊红染色、乙醇脱水、二甲苯透明、封片等步骤。Nissl染色根据试剂盒说明书,用Nissl染液染色5 min,用于评估神经元胞体内尼氏小体的分布与完整性。染色完成后,用数字病理切片扫描系统进行成像,并放大倍数观测。

1.2.5 铁离子、活性氧(ROS)、脂质过氧化(BODIPY-C11)及线粒体膜电位(JC-1)检测 Fe²⁺水平检测:体内实验选用亚铁离子含量检测试剂盒,用提取液匀浆后离心获得上清,酶标仪在593 nm波长下测得样本吸光度;体外实验选用1 μ mol/L的FerroOrange荧光探针工作液,孵育细胞爬片30 min,不清洗直接在荧光显微镜下观察。ROS水平检测:体内实验选用Dihydroethidium(DHE)超氧化物阴离子荧光探针试剂盒,配置为10 μ mol/L的工作液,与脑切片一起在37 $^{\circ}$ C孵育1 h进行荧光探针装载。体外实验选用DCFH-DA荧光探针,孵育后以检测ROS水平。BODIPY-C11和JC-1荧光探针试剂盒通过在显微镜下观测细胞红色荧光与绿色荧光的比值以分别反映脂质过氧化及线粒体膜电位的水平的高低。

1.2.6 CCK-8、MDA及GSH检测 CCK-8、MDA和GSH水平严格按照试剂盒说明书实施。首先对组织或细胞进行上清液提取,于96孔板中添加对应的检测试

剂,并进行高温孵育后,置于酶标仪进行吸光度定量。

1.2.7 Western blotting实验 用BCA法提取细胞或组织样本中的总蛋白并测定浓度,确保上样量一致。依次进行SDS-PAGE凝胶电泳、PVDF膜蛋白转移,5%的脱脂奶粉封闭,一抗GPX4、SLC7A11、FTH1和 β -actin(1:1000)在4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST洗膜,加入HRP标记的二抗(1:2000)室温下孵育1 h,洗膜。最后,用化学发光试剂(ECL)显影,收集图像并使用Image J软件进行分析。

1.2.8 免疫荧光双标实验 脑切片和HT22细胞用PBS清洗,并用Triton X-100处理5 min以增加细胞膜的通透性。使用胎牛血清封闭抗原1 h,加入GPX4和NeuN(1:400)一抗的混合物在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,洗涤后,在使用Alexa Fluor™ 594标记的抗兔IgG和Alexa Fluor™ 488标记的抗小鼠IgG(1:800)二抗混合物避光孵育2 h。用含DAPI的抗淬灭封片剂封片,并在荧光显微镜下拍摄。

1.2.9 统计学分析 使用GraphPad Prism 9.5.1软件进行统计分析,计量数据以均数 \pm 标准差表示。方差齐性检验后,组间比较采用单因素方差分析,所有实验均独立重复3次,当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 天麻素改善新生小鼠HIBD的病理损伤及神经功能评分

HE染色结果显示,相比Sham组,HIBD模型组中神经细胞出现不同程度的水肿,细胞排列紊乱,细胞间隙扩大,以及大量炎性浸润;而天麻素低剂量和高剂量组能改善神经细胞形态,细胞排列较整齐,变性坏死的细胞减少(图1A)。Nissl染色发现,HIBD组的尼氏体数量显著减少($P < 0.001$);使用天麻素干预后,增加了尼氏体的数量($P < 0.001$,图1B、C)。Zea-Longa法神经功能评分显示,新生小鼠HIBD后,神经损伤明显加重($P < 0.001$);而在天麻素干预后,观察到神经功能损伤减轻,并呈剂量依赖性($P < 0.05$,图1D)。

2.2 天麻素减轻新生小鼠HIBD后铁死亡的发生

亚铁离子含量检测结果显示,与Sham组相比,HIBD后Fe²⁺发生沉积($P < 0.001$);而天麻素能够有效减少Fe²⁺的表达($P < 0.05$,图2A)。脂质过氧化及抗氧化标志物结果显示,相比Sham组,HIBD组中MDA的水平上调($P < 0.001$),且GSH的水平下降($P < 0.01$);天麻素干预可使MDA含量显著降低($P < 0.01$,图2B),并上调了GSH水平($P < 0.05$,图2C)。DHE荧光探针图像显示,HIBD后超氧化物ROS的红色荧光增强($P < 0.001$);相较于HIBD组,天麻素干预后,ROS的荧光表达减弱,降低了氧化应激的水平($P < 0.01$,图2D~E)。此外,通过电

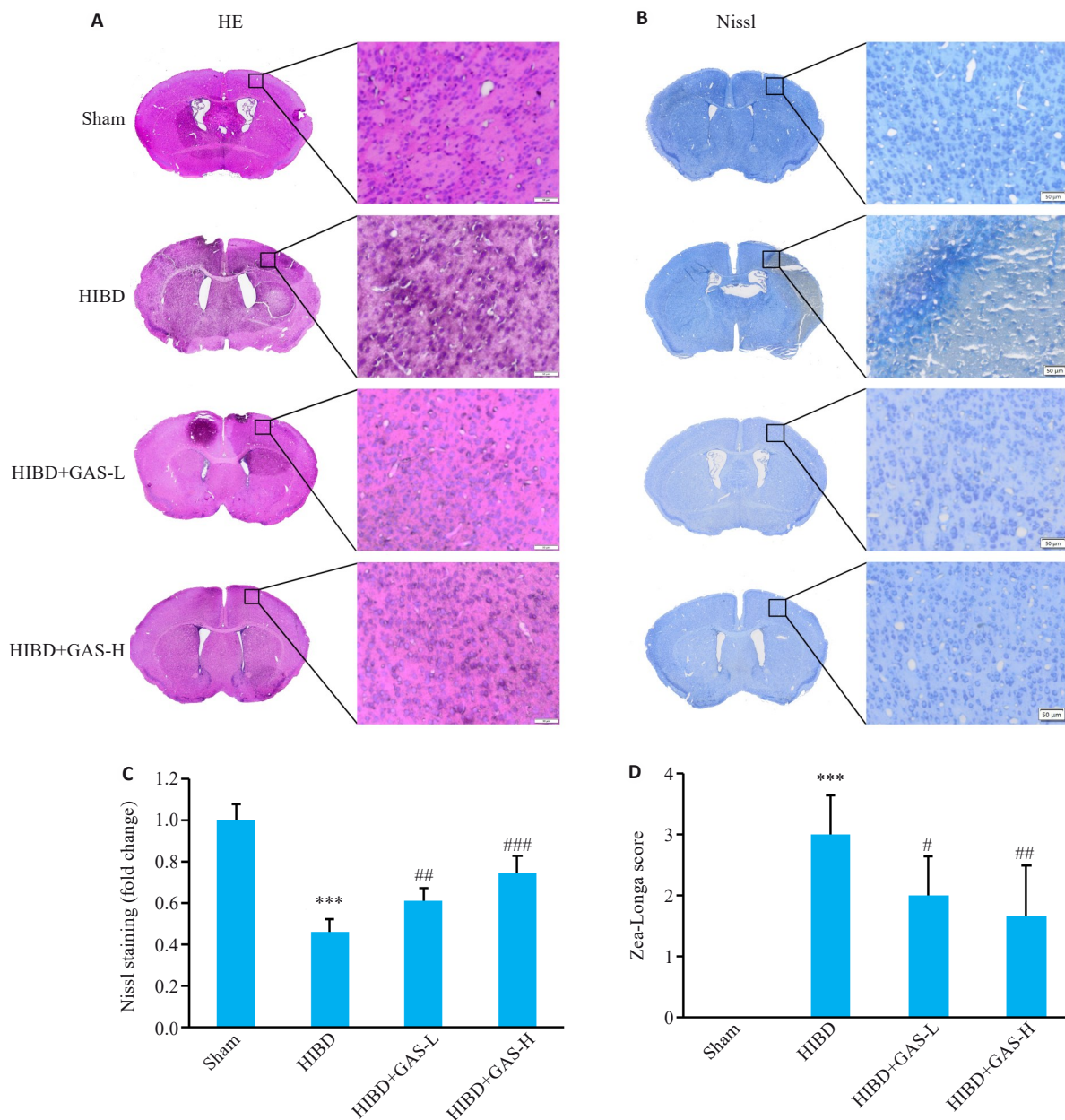


图1 天麻素在新生小鼠HIBD中发挥神经保护作用

Fig.1 Gastrodin produces neuroprotective effects in neonatal mice with HIBD. A: Representative images of HE staining. B, C: Representative images and count statistics of Nissl staining. D: Zea-Longa method for evaluating nerve function injury score. Scale bar=50 μm. *** $P<0.001$ vs Sham group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs HIBD group ($n=6$).

镜检测铁死亡的形态学特征发现, HIBD后, 观察到线粒体的体积缩小, 线粒体嵴减少甚至消失, 膜密度增高, 外膜破裂等变化; 而天麻素的低剂量组和高剂量组均显示出明显的治疗效果, 线粒体的嵴得到部分恢复(图2F)。

2.3 天麻素在体内上调GPX4/SLC7A11/FTH1信号轴

Western blotting结果显示, 与Sham组相比, HIBD后3 d的新生小鼠脑皮层缺血半暗带组织中GPX4、SLC7A11和FTH1的蛋白表达水平均降低($P<0.01$); 而给与100 mg/kg和200 mg/kg两种剂量的天麻素治疗后, 相比HIBD组, 天麻素上调了GPX4、SLC7A11和

FTH1的蛋白表达水平($P<0.05$, 图3A~D)。此外, 将GPX4和神经元标记物NeuN进行免疫荧光双标结果显示, 与Sham组相比, HIBD后神经元中GPX4荧光强度减弱($P<0.001$); 而天麻素治疗后GPX4的荧光强度激活($P<0.01$, 图3E、F)。

2.4 RSL3在HT22细胞OGD后阻断天麻素对GPX4信号的激活作用

在细胞实验中, Western blotting结果显示, 与Control组相比, OGD后HT22神经元中GPX4、SLC7A11和FTH1的蛋白表达水平下降($P<0.001$); 而天麻素干预后GPX4、SLC7A11和FTH1的蛋白表达水

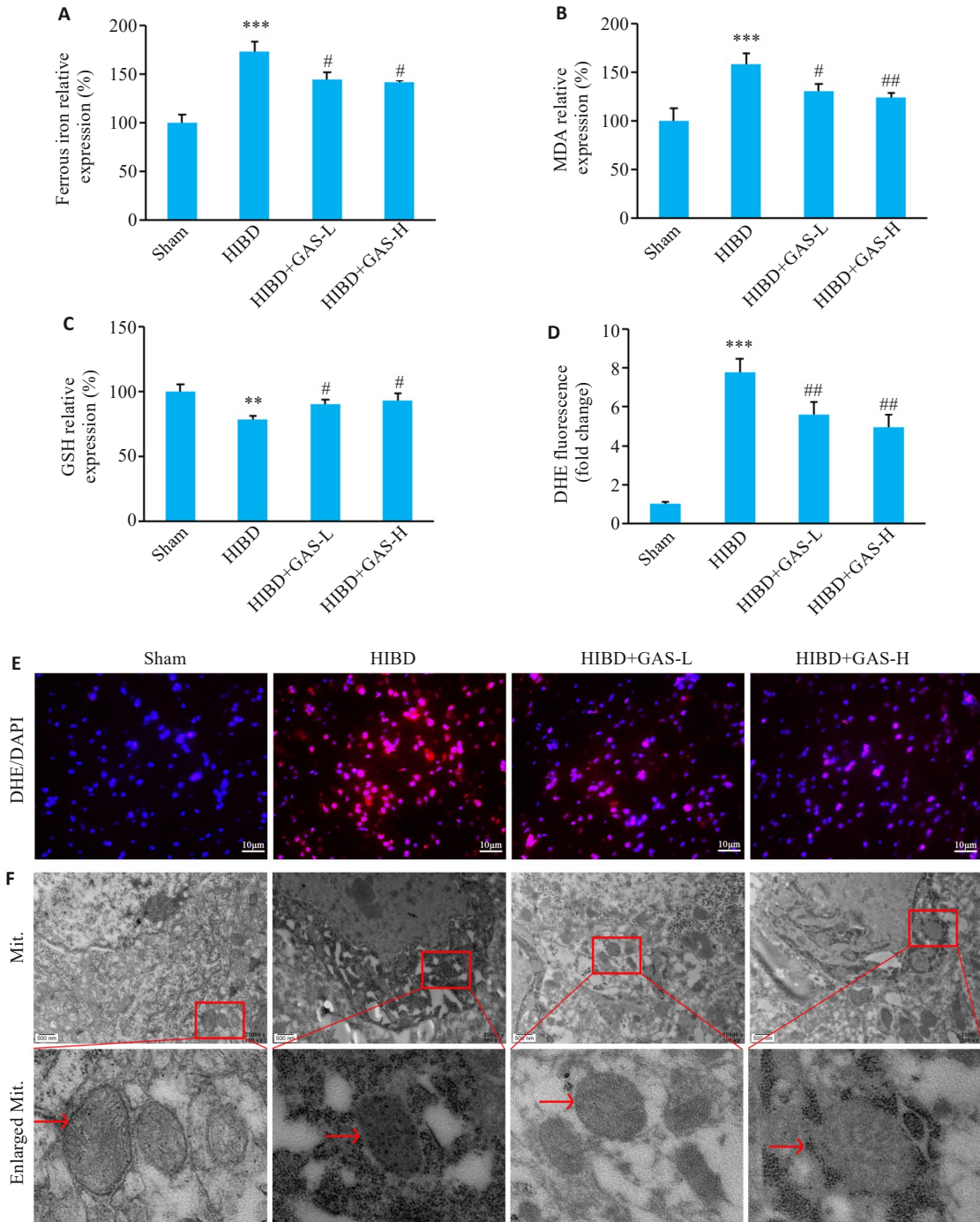


图2 天麻素对新生小鼠HIBD后Fe²⁺、MDA、GSH和DHE表达的影响

Fig.2 Effects of gastrodin on Fe²⁺, MDA, GSH and DHE levels in neonatal mice after HIBD. A-C: Relative levels of ferrous iron, MDA and GSH in different groups. D, E: Quantitative analysis and representative images of fluorescence intensity of DHE (Scale bar=10 μm). F: Representative images of mitochondrial structure observed by electron microscopy (Scale bar=500 nm). ***P*<0.01, ****P*<0.001 vs Sham group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01 vs HIBD group (*n*=3).

平升高(*P*<0.05)。相较于 OGD 组、OGD+RSL3 组、GPX4 及相关通路 SLC7A11 和 FTH1 的表达水平被 GPX4 的靶向抑制剂 RSL3 所减弱;同样,OGD+GAS+RSL3 组相较于 OGD+GAS 组,天麻素对 GPX4、SLC7A11 和 FTH1 蛋白的激活作用均被 RSL3 阻断(*P*<0.05,图 4A~D)。此外,免疫荧光双标与 Western blotting 的结果一致,RSL3 对 GPX4 信号的抑制,降低了天麻素对 GPX4/SLC7A11/FTH1 信号轴的激活(*P*<0.05,

图 4E、F)。

2.5 天麻素在体外通过激活 GPX4 抑制神经元铁死亡的发生

FerroOrange 荧光探针结果显示,与 Control 组相比,HT22 细胞 OGD 后 Fe²⁺ 的含量增高(*P*<0.01);而天麻素降低了 OGD 神经元中 Fe²⁺ 的沉积(*P*<0.05)。RSL3 干预后,天麻素降低铁离子沉积的保护作用被部分减弱(*P*<0.05,图 5A、D)。DCFH-DA (图 5B、E)、BODIPY-

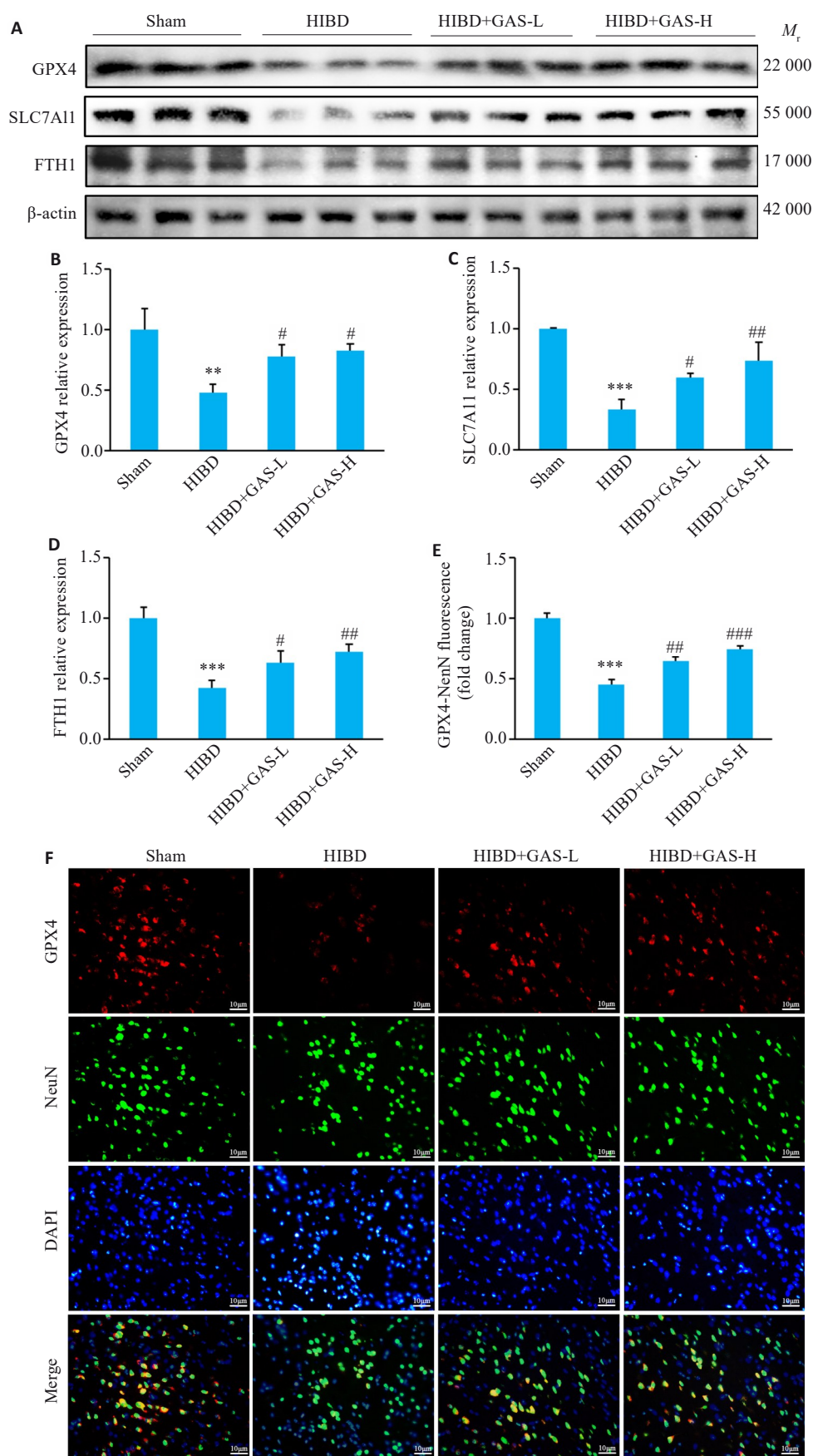


图3 天麻素对HIBD后脑皮层缺血半影区铁死亡相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of gastrodin on expressions of ferroptosis-related proteins in the ischemic penumbra of the cerebral cortex after HIBD. **A-D**: Western blotting protein bands of GPX4, SLC7A11 and FTH1 and their relative expression levels. **E, F**: Quantification and representative images of immunofluorescence double labeling of GPX4 and NeuN (Scale bar=10 μ m). ** P <0.01, *** P <0.001 vs Sham group; # P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001 vs HIBD group (n =3).

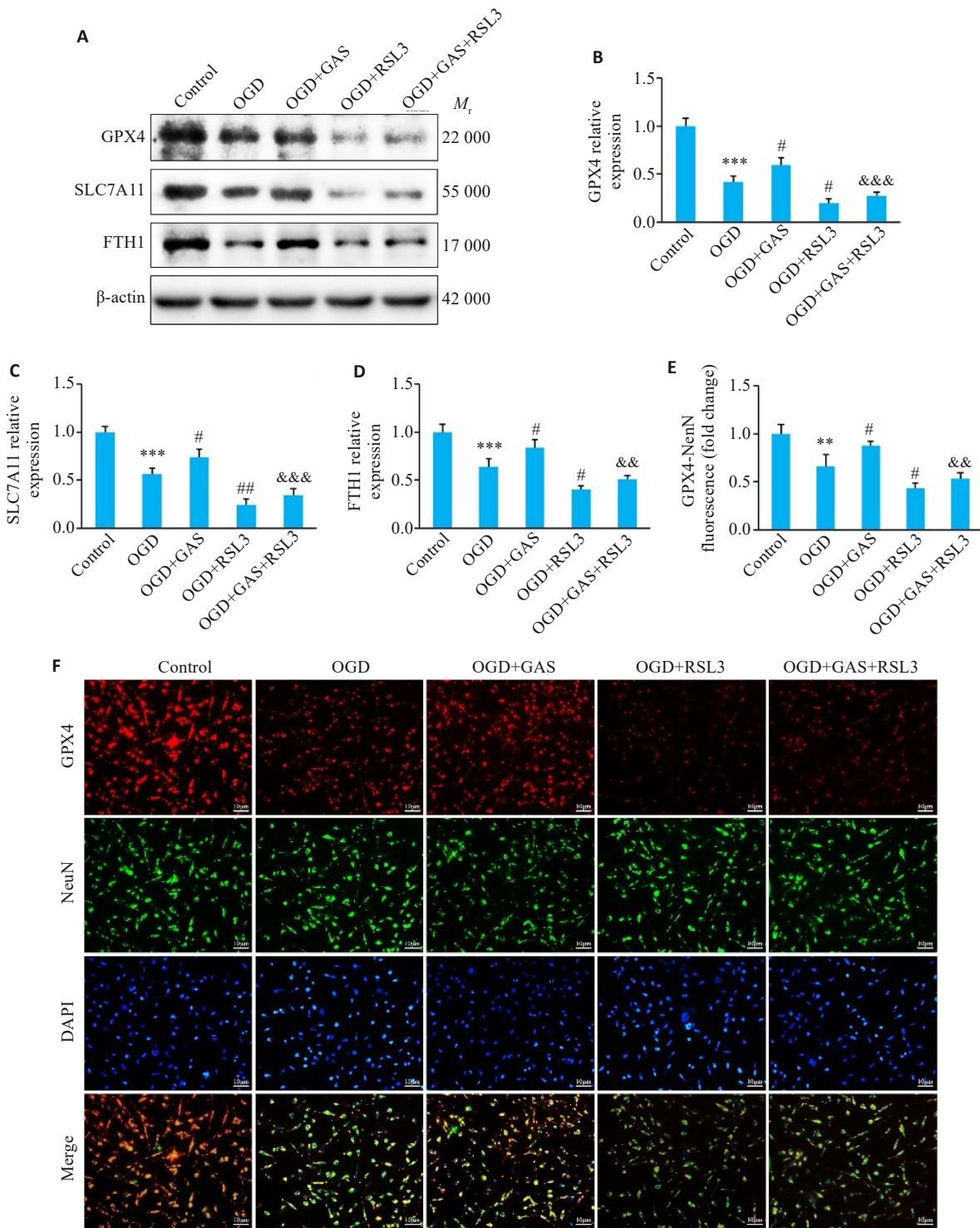


图4 天麻素对HT22神经元OGD后铁死亡相关蛋白表达的影响

Fig.4 Effects of gastrodin on expressions of ferroptosis-related proteins in HT22 neurons after oxygen-glucose deprivation (OGD). Western blotting (A-D) and immunofluorescence double labeling (E-F) were used to detect the expression levels of GPX4, SLC7A11 and FTH1 proteins. Scale bar=10 μ m. ** P <0.01, *** P <0.001 vs Control group; # P <0.05, ## P <0.01 vs OGD group, &# P <0.01, &&# P <0.001 vs OGD+GAS group (n =3).

C11(图5C,F)与MDA(图5G)和GSH(图5H)试剂盒分别检测了HT22细胞中ROS、脂质过氧化和抗氧化产物的表达水平。结果显示,相比Control组,OGD组中ROS、BODIPY-C11绿光与红光的比值以及MDA表达增多(P <0.01),GSH表达减少(P <0.001);天麻素处理降低了OGD后神经元的ROS、BODIPY-C11、MDA产生

和GSH消耗(P <0.05)。而用RSL3干预后,天麻素对细胞内ROS水平的抑制作用被RSL3逆转(P <0.01),同样,RSL3减轻了天麻素对BODIPY-C11和MDA水平的下降(P <0.05),抵消了天麻素诱导的GSH水平的升高(P <0.05)。

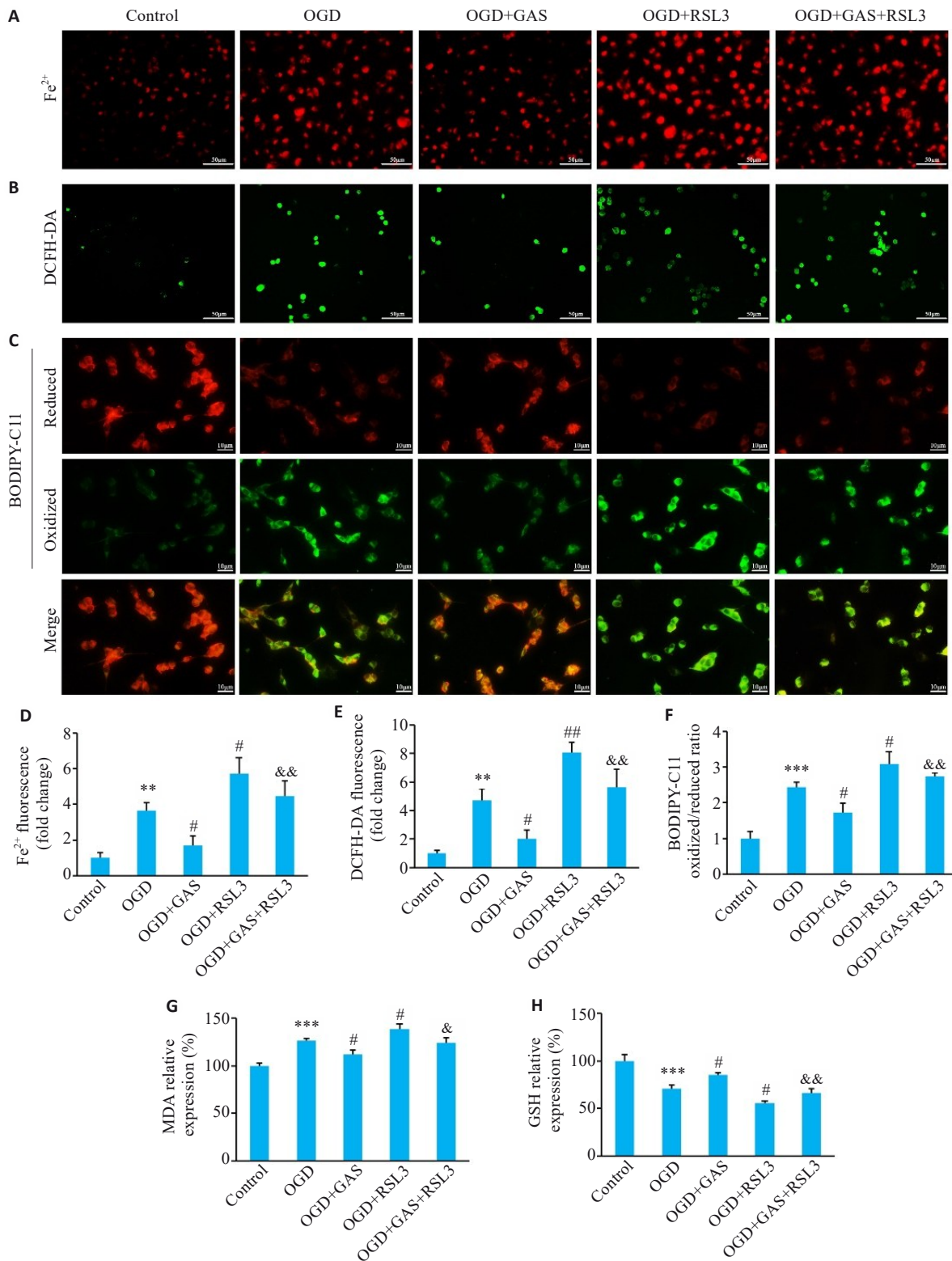


图5 天麻素对HT22神经元OGD后Fe²⁺、DCFH-DA、BODIPY-C11、MDA和GSH表达的影响

Fig.5 Effects of gastrodin on Fe²⁺, DCFH-DA, BODIPY-C11, MDA, and GSH levels in HT22 neurons after OGD. A, D: Representative images and quantification of Fe²⁺ level detected using the FerroOrange fluorescent probe (Scale bar=50 μm). B, E: Representative images and quantification of ROS detected using DCFH-DA fluorescent probe (Scale bar=50 μm). C, F, G: Representative images and quantification of lipid peroxidation using BODIPY-C11 fluorescent probe and MDA kit (Scale bar=10 μm). H: Quantification of antioxidant products by GSH. **P<0.01, ***P<0.001 vs Control group; #P<0.05, ##P<0.01 vs OGD group; &P<0.05, &&P<0.01 vs OGD+GAS group (n=3).

2.6 天麻素修复OGD诱导的细胞损伤和线粒体膜电位功能

CCK-8 检测结果显示,在HT22神经元OGD后,细

胞活力下降(P<0.001);而天麻素提高了OGD后的细胞活力,改善了神经元损伤(P<0.01)。添加RSL3后,不论OGD+RSL3组相较于OGD组,还是OGD+GAS+RSL3

组相较于OGD+GAS,RSL3抑制GPX4通路的同时降低了细胞的存活率($P<0.05$,图6A)。此外,JC-1荧光探针结果显示,与Control组相比,OGD后线粒体膜电位JC-1聚合物与JC-1单体的比率下降($P<0.001$);而天麻

素提高了线粒体膜电位水平($P<0.01$)。RSL3的干预,削弱了天麻素对线粒体膜电位水平的增强,红色荧光与绿色荧光比值降低($P<0.001$,图6B,C)。

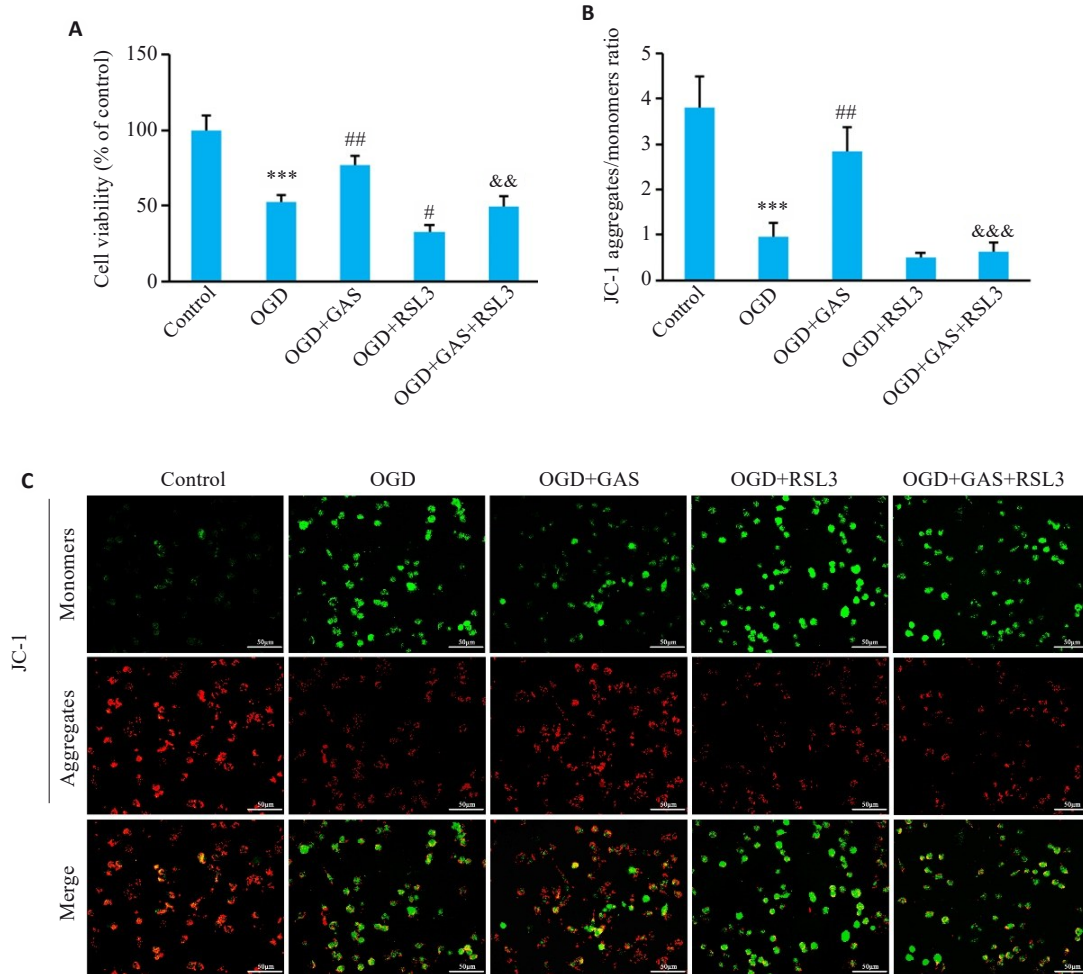


图6 天麻素对OGD诱导的细胞损伤中发挥神经保护作用

Fig.6 Neuroprotective effects of gastrodin against OGD-induced cell damage. A: CCK-8 assay of HT22 cell viability. B, C: Quantitative analysis and representative images of the ratio of mitochondrial membrane potential aggregates (red) and monomers (green) detected by JC-1. Scale bar=50 μm . *** $P<0.001$ vs Control group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs OGD group; && $P<0.01$, &&& $P<0.001$ vs OGD+GAS group ($n=3$).

3 讨论

本研究通过深入探讨天麻素对新生小鼠缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的神经保护作用,揭示了其通过激活GPX4/SLC7A11/FTH1信号通路抑制铁死亡的机制。这一发现不仅拓展了对天麻素神经保护作用分子机制的认识,也为开发基于抑制铁死亡的新型HIBD治疗策略提供了重要的实验依据和潜在靶点。

本实验证实,天麻素处理显著降低了HIBD模型新生小鼠的神经元损伤标志物及神经功能缺损评分。HE染色和Nissl染色结果表明,天麻素干预后,神经细胞形态得到了明显改善,水肿、炎性浸润和细胞排列紊乱的现象得到了有效缓解。此外,神经行为学评分结果也显

示,天麻素能够显著改善小鼠的运动功能,且剂量依赖性明显。体外实验进一步证实了体内的研究结果,天麻素能够提高OGD损伤后的HT22神经元活性,降低脂质过氧化物及氧化应激相关指标,并恢复了线粒体膜电位的表达水平,提示天麻素对新生小鼠缺氧缺血性脑损伤中发挥神经保护功能。

深入机制研究表明,天麻素能够有效促进GPX4的活化,显著上调其相关基因SLC7A11和FTH1的表达,这一作用在体内模型和体外模型中均得到了验证。GPX4是一种关键的抗氧化酶,广泛存在于多种细胞中,主要通过还原脂质过氧化物来保护细胞免受氧化损伤。GPX4的缺失或功能障碍被认为是引发铁死亡的

关键因素之一。在缺氧缺血性脑损伤中,谷胱甘肽的耗竭或GPX4蛋白的降解导致GPX4的活性降低,引发脂质过氧化物的积累,从而造成细胞死亡^[19]。此外,SLC7A11是一种氨基酸转运蛋白,主要负责半胱氨酸的跨膜转运,而半胱氨酸是谷胱甘肽合成的前体,谷胱甘肽在细胞内起到抗氧化作用。SLC7A11的表达在缺氧缺血后也受到抑制,导致胱氨酸摄取减少,谷胱甘肽合成受阻,进一步削弱了GPX4的功能,使细胞易于发生铁死亡^[20]。FTH1则是铁代谢的重要调控蛋白,其通过结合铁离子,减少自由铁的积累,防止铁离子引起的氧化应激反应。在缺氧缺血性脑损伤中,FTH1的减少则加剧了细胞内游离铁离子的积累,促进了脂质过氧化物的生成,增加铁死亡的风险^[21]。这些变化共同导致了神经元的铁死亡,进而加重了脑损伤。我们的研究发现,天麻素通过增强这一信号轴,显著逆转了HIBD诱导的GSH耗竭、BODIPY-C11和MDA积累以及ROS爆发,这些均是铁死亡的典型生化特征^[22,23]。体外实验中,使用GPX4特异性抑制剂RSL3可部分阻断天麻素的保护效应,进一步确证了GPX4/SLC7A11/FTH1信号通路在天麻素抗铁死亡和神经保护中的核心地位。

铁死亡是一种铁依赖性的、由脂质过氧化驱动的调节性细胞死亡形式,其在脑缺血再灌注损伤、神经退行性疾病中的作用日益受到关注^[24,25]。本研究观察到HIBD后脑组织中铁死亡关键标志物显著变化,如升高的 Fe^{2+} ,积累的BODIPY-C11、MDA和ROS,消耗的GSH,降低的细胞活性和较低的线粒体膜电位,并且还通过电镜观测到铁死亡发生后线粒体脊减少的形态学特征,明确提示铁死亡是HIBD神经元损伤的重要机制之一。天麻素通过激活GPX4通路,一方面增强细胞抗氧化能力,另一方面直接清除致命的脂质过氧化物,从源头遏制了铁死亡的级联反应。这种针对铁死亡关键驱动因素的干预,相较于仅针对凋亡或坏死的策略,可能提供更全面的神经保护^[26]。

天麻素作为中药天麻的主要活性单体成分,具有良好的药理活性和安全性^[27]。本研究揭示其通过激活GPX4这一核心抗氧化转录因子,协调调控SLC7A11和FTH1的表达,实现了对铁死亡的多环节抑制。这种作用于关键调控节点的特性,使其可能比单一靶点药物具有更优的神经保护效能和更低的副作用风险^[28,29]。鉴于目前临床上针对新生儿HIBD的有效神经保护药物仍然匮乏,且现有疗法(如低温)存在局限性或时间窗限制,我们的研究为探索天麻素或其衍生物作为HIBD辅助或替代治疗药物奠定了坚实的理论基础^[30]。其保护作用不仅限于神经元,也可能通过抑制神经胶质细胞的铁死亡减轻神经炎症,这有待进一步研究^[31]。

本研究主要聚焦于GPX4/SLC7A11/FTH1轴,但

铁死亡调控网络复杂(如涉及ACSL4、FSP1、P53等分子),天麻素是否还通过其他通路协同作用尚需探究^[32]。此外,实验主要在新生小鼠模型中进行,其向临床转化的有效性、最佳给药剂量、时间窗及长期神经功能预后评估等关键问题,仍需通过更大型动物模型和严格的临床前研究进行深入验证。未来研究可结合基因敲除/敲入技术、多组学分析等手段,更全面地解析天麻素在HIBD中的神经保护网络。总之,本研究揭示了天麻素通过激活GPX4/SLC7A11/FTH1信号通路,抑制神经元铁死亡,减轻新生小鼠HIBD的潜在机制。天麻素作为一种天然药物,具有显著的神经保护作用,未来可能成为HIBD治疗的一个有效选择。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] De Palma ST, Hermans EC, Shamorkina TM, et al. Hypoxic preconditioning enhances the potential of mesenchymal stem cells to treat neonatal hypoxic-ischemic brain injury[J]. *Stroke*, 2025, 56(7): 1872-82.
- [2] Yang MM, Wang KX, Liu BY, et al. Correction to: hypoxic-ischemic encephalopathy: pathogenesis and promising therapies[J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(2): 2123.
- [3] 石金沙, 张皓南, 张幸霖, 等. 天麻素通过调节CCR5/AKT信号传导缓解新生小鼠缺血缺氧后小胶质细胞介导的炎症反应[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(10): 1850-7.
- [4] Deng QT, Parker E, Duan R, et al. Preconditioning and posttreatment strategies in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: recent advances and clinical challenges[J]. *Mol Neurobiol*, 2025, 62(8): 10020-44.
- [5] Zheng JY, Fang Y, Zhang M, et al. Mechanisms of ferroptosis in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats[J]. *Exp Neurol*, 2024, 372: 114641.
- [6] 郭涛, 左涵珺, 匡显锋, 等. 小胶质细胞介导的铁死亡在缺氧缺血性脑损伤中的研究进展[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2025, 41(6): 552-8.
- [7] Zhang XL, Luo JJ, Bharati L, et al. Protocatechuic acid suppresses ferroptosis to protect against hypoxic-ischemic encephalopathy by targeting the HIF-1 α /VEGFA axis[J]. *Phytomedicine*, 2025, 143: 156900.
- [8] Feng L, Yin XH, Hua QQ, et al. Advancements in understanding the role of ferroptosis in hypoxia-associated brain injury: a narrative review[J]. *Transl Pediatr*, 2024, 13(6): 963-75.
- [9] 张新月, 刘晨萌, 马瑜徽, 等. TXNIP/Trx-1/GPX4通路促进新生大鼠缺氧缺血后海马神经元铁死亡的作用机制[J]. *中国当代儿科杂志*, 2022, 24(9): 1053-60.
- [10] Tan XY, Zhang T, Ding XJ, et al. Iron overload facilitates neonatal hypoxic-ischemic brain damage via SLC7A11-mediated ferroptosis[J]. *J Neurosci Res*, 2023, 101(7): 1107-24.
- [11] Lin Q, Hu DW, Hao XH, et al. Effect of hypoxia-ischemia on the expression of iron-related proteins in neonatal rat brains[J]. *Neural Plast*, 2023, 2023: 4226139.

- [12] Chen HC, Wusiman Y, Zhao J, et al. Metabolomics analysis revealed the neuroprotective role of 2-phosphoglyceric acid in hypoxic-ischemic brain damage through GPX4/ACSL4 axis regulation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 971: 176539.
- [13] Zhang M, Liu ZM, Zhou W, et al. Ferrostatin-1 attenuates hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats by inhibiting ferroptosis[J]. *Transl Pediatr*, 2023, 12(11): 1944-70.
- [14] Qin WX, Du JQ, Wang F, et al. Gastrodin: a potential natural product for the prevention and treatment of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1554170.
- [15] Shi HL, Shi JS, Wang Z, et al. GAS reduced inflammatory responses in activated microglia by regulating the Ccr2/Akt/Gsk-3 β pathway[J]. *Mol Brain*, 2025, 18(1): 40.
- [16] Wang PX, Zuo HJ, Shi HL, et al. Gastrodin inhibits reactive astrocyte-mediated inflammation in hypoxic-ischemic brain damage through S100B/RAGE-Smad3 signaling[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2025, 57(6): 955-67.
- [17] 刘敏, 丁艳霞, 张业贵, 等. 天麻素对脑缺血大鼠纹状体BDNF、IL-6表达的影响[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2024, 29(4): 440-6.
- [18] 左涵珺, 段兆达, 王朝, 等. 天麻素经PI3K/AKT通路改善新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后小胶质细胞介导的炎症反应[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(9): 1712-9.
- [19] Xiao P, Huang HY, Zhao HS, et al. Edaravone dextran protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced blood-brain barrier damage by inhibiting ferroptosis *via* activation of nrf-2/HO-1/GPX4 signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 217: 116-25.
- [20] 邱政皓, 马雅萍, 马昌盛, 等. 枸杞多糖通过SLC7A11/GPX4通路抑制铁死亡减轻小鼠脑缺血再灌注损伤[J]. *神经解剖学杂志*, 2024, 40(5): 607-12.
- [21] Zhou YY, Wang YB, Wu XQ, et al. Carthamin yellow attenuates brain injury in a neonatal rat model of ischemic-hypoxic encephalopathy by inhibiting neuronal ferroptosis in the hippocampus[J]. *Transl Neurosci*, 2023, 14(1): 20220331.
- [22] Liu QL, Song TJ, Chen B, et al. Ferroptosis of brain microvascular endothelial cells contributes to hypoxia-induced blood-brain barrier injury[J]. *FASEB J*, 2023, 37(5): e22874.
- [23] Tian HY, Huang BY, Nie HF, et al. The interplay between mitochondrial dysfunction and ferroptosis during ischemia-associated central nervous system diseases[J]. *Brain Sci*, 2023, 13(10): 1367.
- [24] Abdulkarimov N, Kokabi K, Kunz J. Ferroptosis and iron homeostasis: molecular mechanisms and neurodegenerative disease implications[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2025, 14(5): 527.
- [25] 蒋欢, 白文娅, 邵建林. 铁死亡在脑缺血再灌注损伤机制中的研究进展[J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(7): 101-9.
- [26] Al-Ward H, Chen W, Gao WX, et al. Can miRNAs in MSCs-EVs offer a potential treatment for hypoxic-ischemic encephalopathy? [J]. *Stem Cell Rev Rep*, 2025, 21(1): 236-53.
- [27] Wang YL, Bai MT, Wang X, et al. Gastrodin: a comprehensive pharmacological review[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(6): 3781-802.
- [28] 张林落, 李长青, 皇玲玲, 等. 梓醇扶正制毒配伍从SLC7A11/GPX4通路抑制铁死亡减轻雷公藤甲素肝毒性[J]. *南方医科大学学报*, 2025, 45(4): 810-8.
- [29] Zhang JX, Liu ZJ, Zhao WJ, et al. Targeting KRAS sensitizes ferroptosis by coordinately regulating the TCA cycle and Nrf2-SLC7A11-GPX4 signaling in hepatocellular carcinoma[J]. *Smart Med*, 2025, 4(2): e70005.
- [30] Khanduja S, Kim J, Kang JK, et al. Hypoxic-ischemic brain injury in ECMO: pathophysiology, neuromonitoring, and therapeutic opportunities[J]. *Cells*, 2023, 12(11): 1546.
- [31] Zheng X, Gong TW, Yu WQ, et al. Study on cellular mechanism of improving inflammatory effect of gastrodin[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2025, 265(4): 249-59.
- [32] Salama RM, Darwish SF, Yehia R, et al. Lactoferrin alleviates gentamicin-induced acute kidney injury in rats by suppressing ferroptosis: Highlight on ACSL4, SLC7A11, NCOA4, FSP1 pathways and miR-378a-3p, LINC00618 expression[J]. *Food Chem Toxicol*, 2024, 193: 115027.

(编辑:余诗诗)