

脊髓伤方对脊髓型颈椎病大鼠神经功能和铁死亡的影响

杨汉立¹, 史 明¹, 刘春志¹, 林少湖¹, 胡明告², 卜献忠³, 钟远鸣⁴, 许 伟^{4*}
(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530001; 2. 广东中能建电力医院, 广东广州 510735; 3. 河南中医药大学第一附属医院, 河南郑州 450046; 4. 广西中医药大学第一附属医院, 广西南宁 530023)

摘要: **目的** 探讨脊髓伤方对脊髓型颈椎病 (CSM) 大鼠神经功能和铁死亡的影响。**方法** 制备 CSM 大鼠模型, 随机分为模型组、Fer-1 组 (2 g/kg Ferrostatin-1, 腹腔注射) 及脊髓伤方低、中、高剂量组 (9.7、19.4、38.8 g/kg, 灌胃), 另设假手术组, 每组 6 只。给药 4 周后, 记录大鼠 BBB 评分、斜板实验评分以评估其神经功能, HE 染色、Nissl 染色和普鲁士蓝染色分别观察大鼠脊髓组织病理变化、尼氏小体及铁离子沉积, 免疫荧光、RT-qPCR 和 Western blot 法检测大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1、TFRC、Cox2 mRNA、蛋白表达。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠术后 1 周、2 周、4 周 BBB 评分和斜板实验评分降低 ($P<0.05$), 脊髓组织出现明显空洞、细胞水肿及蓝色铁颗粒沉积, 脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 mRNA、蛋白表达降低 ($P<0.05$), TFRC、Cox2 mRNA、蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 脊髓伤方各剂量组和 Fer-1 组大鼠术后 1 周、2 周、4 周 BBB 评分和斜板实验评分升高 ($P<0.05$), 脊髓组织中空洞、细胞水肿及蓝色铁颗粒沉积减少, 脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 mRNA、蛋白表达升高 ($P<0.05$), TFRC、Cox2 mRNA、蛋白表达降低 ($P<0.05$)。**结论** 脊髓伤方可能通过调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路相关蛋白抑制铁死亡, 减少脊髓组织中铁颗粒沉积, 从而改善 CSM 大鼠神经功能。**关键词:** 脊髓伤方; 脊髓型颈椎病; Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路; 铁死亡; 神经功能
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3233-09
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.009

Effects of Jisuishang Formula on neurological function and ferroptosis in a rat model of cervical spondylotic myelopathy

YANG Han-li¹, SHI Ming¹, LIU Chun-zhi¹, LIN Shao-hu¹, HU Ming-gao², BU Xian-zhong³, ZHONG Yuan-ming⁴, XU Wei^{4*}
(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China; 2. Guangdong CEEC Electric Power Hospital, Guangzhou 510735, China; 3. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of Jisuishang Formula on neurological function and ferroptosis in a rat model of cervical spondylotic myelopathy (CSM). **METHODS** The CSM rat models were established and randomly assigned to the model group, the Fer-1 group (2 g/kg Ferrostatin-1 *via* intraperitoneal injection), the low-dose (9.7 g/kg, intragastrically), medium-dose (19.4 g/kg, intragastrically) and high-dose (38.8 g/kg, intragastrically) Jisuishang Formula groups, and the sham operation group, with 6 rats in each group. Following 4 weeks of treatment administration, BBB locomotor scores and oblique plate test result were recorded to assess their neurological function in rats. Histopathological evaluation utilized HE staining for spinal cord tissue pathology, Nissl staining for Nissl body visualization, and Prussian blue staining for iron ion deposition analysis. Protein expressions of Nrf2, SLC7A11, GPX4, HO-1, TFRC and Cox2 in spinal cord tissues was detected by immunofluorescence and

收稿日期: 2024-12-25
基金项目: 国家自然科学基金项目 (82260942); 广西青苗人才项目 (0502405915); 广西中医药大学校级课题项目 (XP023091)
作者简介: 杨汉立 (1995—), 男, 博士生, 从事脊柱脊髓疾病临床、基础研究。Tel: 13084912038, E-mail: 2038992307@qq.com
* 通信作者: 许 伟 (1989—), 男, 博士, 主治医师, 从事脊柱脊髓疾病临床、基础研究。Tel: 18178638353, E-mail: 1765239283@qq.com

Western blot, while mRNA expressions were quantified using RT-qPCR. **RESULTS** Compared to the sham group, the CSM model group exhibited significantly reduced BBB locomotor scores and inclined plane test performance at 1, 2 and 4 weeks post-operation ($P<0.05$); obvious tissue cavitation, cellular edema and Prussian blue positive iron deposition in spinal cord tissues; downregulated protein and mRNA expressions of Nrf2, SLC7A11, GPX4, HO-1 ($P<0.05$); and upregulated protein and mRNA expressions of TFRC and Cox2 ($P<0.05$). Compared to the model group, the Jisuishang Formula and Fer-1 intervention groups showed significantly improved BBB scores and inclined plane test result at 1, 2 and 4 weeks post-operation ($P<0.05$); reduced tissue cavitation, attenuated cellular edema and decreased Prussian blue positive iron deposition in spinal cord tissues; upregulated protein and mRNA expression of Nrf2, SLC7A11, GPX4 and HO-1 in spinal cord tissues ($P<0.05$); and downregulated protein and mRNA expressions of TFRC and Cox2 ($P<0.05$). **CONCLUSION** Targeting the Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway, Jisuishang Formula potentially suppresses ferroptosis and alleviates iron accumulation in spinal cord neurons, thereby improving neurological recovery in CSM rats.

KEY WORDS: Jisuishang Formula; cervical spondylotic myelopathy; Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway; ferroptosis; neurological function

脊髓型颈椎病（cervical spondylotic myelopathy, CSM）是由于颈椎退变引起脊髓受压，从而导致神经功能障碍的一种常见退行性疾病^[1]，其主要病理特征包括脊髓缺血、氧化应激、炎症反应、神经元损伤等，严重影响患者生活质量^[2]。目前，CSM 的治疗方式以手术为主，但效果因个体和病情程度而有所差异，术后神经功能恢复有限^[3]。因此，探索有效的药物治疗方法，尤其是针对 CSM 神经损伤机制的干预策略显得尤为重要。近年来，铁死亡作为一种铁依赖性的细胞程序性死亡方式，在神经系统疾病中的作用备受关注，它通过脂质过氧化和氧化应激导致细胞死亡，与 CSM 神经元损伤机制密切相关。Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路是调控铁死亡的关键通路，其中 Nrf2 是重要的抗氧化转录因子，可激活下游抗氧化基因 SLC7A11 和 GPX4，调控细胞内谷胱甘肽（GSH）水平，抑制脂质过氧化和铁死亡^[4]。然而，目前关于铁死亡在 CSM 中的作用及其调控机制尚不明确。

中药在神经系统疾病的治疗中具有整体调节、多靶点作用的优势，其中脊髓伤方是一种以益气活血、通络止痛为主要功效的方剂，具有改善血液循环、减轻炎症反应的作用^[5]。本研究旨在探讨脊髓伤方在 CSM 模型大鼠中的作用，重点研究其是否通过调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路抑制铁死亡，从而促进神经功能恢复。

1 材料

1.1 动物 36 只 SD 大鼠，体质量 200~250 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK（湘）2019-0004]，饲养于广

西中医药大学动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK（桂）2024-0004]，环境温度（22±2）℃，相对湿度 50%~60%。实验前进行为期 1 周的适应性饲养，其间大鼠自由摄食进水，饲料及水均符合国家实验动物标准。本研究经广西中医药大学科学实验中心动物伦理委员会批准（伦理审批号 DW20231016-226），所有实验操作严格遵循动物实验伦理规范，在保障动物福利的同时最大限度减少其痛苦。

1.2 药物 脊髓伤方由黄芪 30 g、当归尾 10 g、地龙 10 g、赤芍 15 g、川芎 10 g、桃仁 12 g、红花 10 g、血竭 6 g、丹参 15 g、牛膝 15 g、大黄 15 g、炙甘草 6 g 组成，均购自广西中医药大学第一附属医院门诊中药房。基于成人参考剂量（154 g/50 kg）结合体表面积换算，设置大鼠低、中、高剂量分别为 9.7、19.4、38.8 g/kg。药材经 2 次煎煮后合并滤液，离心，加热浓缩，得到低、中、高剂量药液，质量浓度分别为 0.49、0.97、1.94 g/mL。

1.3 试剂 苏木素-伊红（HE）染色液、尼氏染色液（货号 BL700A、BL999A，合肥白鲨生物科技有限公司）；Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1、Cox2、GAPDH 抗体（货号 ab62352、ab307601、ab125066、ab68477、ab179800、ab8245，英国 Abcam 公司）；TFRC 抗体（货号 381603，成都正能生物技术有限责任公司）；山羊抗兔 IgG（H+L）HRP 二抗（货号 S0001，江苏亲科生物研究中心有限公司）；三色预染蛋白 Marker、无蛋白快速封闭液（货号 WJ103、PS108P，上海雅酶生物科技有限公司）；PVDF 膜（货号 ISEQ00010，德国

Millipore 公司)；铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1, 货号 HY-100579, 美国 MedChemExpress 公司)；免疫荧光封闭液、免疫染色通透液 (货号 P0260、P0096, 上海碧云天生物技术有限公司)。

1.4 仪器 垂直电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司)；Multiskan MK3 全波长酶标仪系统 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；UC90 成像系统 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 CSM 模型构建 参照文献 [6] 报道, 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉, 俯卧位固定, 术区剃毛消毒, 沿颈正中中线切开皮肤 (约 2~3 cm), 钝性分离筋膜肌肉暴露 C3-C5 椎板 (以 T2 椎体定位), 精细清除黄韧带, 于椎间隙植入 1.5 mm×0.7 mm×0.3 mm 吸水性膨胀材料 (聚乙烯醇丙稀酰胺交联水凝胶) 造成压迫; 假手术组除不植入压迫材料外, 其余操作同模型组。术后大鼠碘伏消毒, 分层缝合切口, 全程操作轻柔以减轻脊髓刺激, 加热毯保温至苏醒, 自由饮食, 每天行 2 次腹腔按摩辅助排尿直至自主功能恢复。

2.2 分组及给药 大鼠随机分为假手术组、模型组、Fer-1 组和脊髓伤方低、中、高剂量组, 每组 6 只, 按 “2.1” 项下方法造模, 假手术组和模型组每天灌胃生理盐水, Fer-1 组每天腹腔注射 2 mg/kg 相应溶液, 脊髓伤方低、中、高剂量组每天灌胃 9.7、19.4、38.8 g/kg 相应药液, 持续 4 周。

2.3 取材 大鼠末次给药 24 h 后禁食禁水, 腹腔注射 40 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉, 左心室灌注预冷生理盐水至躯体及尾部强直 (灌注充分标志), 取脊髓组织, 病理样本用 4% 多聚甲醛固定, Western blot 样本于冰上快速解剖 C3-C5 节段颈脊髓, -80 ℃ 冷冻保存。

2.4 BBB 评分 采用 BBB 评分量表系统化评估大鼠后肢运动功能恢复进程^[7]。分别在术后第 1、2、4 周观察大鼠自主行走表现, 包括 (1) 后肢步态协调性; (2) 髌、膝、踝关节活动范围; (3) 足底着地姿态与拖曳情况, 评分范围 0~21 分, 0 分表示后肢完全瘫痪无运动, 21 分表示运动功能恢复至正常水平。

2.5 斜板实验评分 将大鼠头朝上, 置于铺有防滑橡胶垫的可调倾角平台中 (身长轴与斜面平行), 以恒定 1 °/s 增加倾角, 记录能维持稳定姿势 ≥5 s 的临界角度 (精确至 1°), 连续 3 次, 每

次间隔 5 min, 取平均值。最大耐受倾角增大时, 提示肢体肌力与神经肌肉协调性改善。

2.6 HE 染色、Nissl 染色及普鲁士蓝染色 取于 4% 多聚甲醛中固定的脊髓组织, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明处理, 石蜡包埋, 取出, 切片 5 μm, 在 65 ℃ 下烘烤 1 h 后染色, 中性树脂封片, 在光学显微镜下观察并采集图片。

2.7 免疫荧光染色观察 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 蛋白表达 取脊髓组织切片, 高压锅修复 10 min, 采用内源性过氧化物酶阻断剂阻断非特异性结合抗体 15 min, 0.1% Triton X-100 通透剂通透 10 min, 免疫荧光封闭液封闭 15 min, 加一抗 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 抗体, 在 4 ℃ 下孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 加二抗, 室温孵育 1 h, DAPI 核染色 5 min, 中性树脂封片, 于荧光倒置显微镜下观察并拍摄图片。

2.8 RT-qPCR 法检测脊髓组织 *Nrf2*、*SLC7A11*、*GPX4*、*HO-1*、*TFRC*、*Cox2* mRNA 表达 采用 TRIzol 法提取脊髓组织总 RNA, NanoDrop 微量分光光度计测定其浓度。取总 RNA 1 μg, 采用 PrimeScript RT 试剂盒逆转录, 反应条件为 42 ℃ 2 min, 50 ℃ 15 min, 85 ℃ 5 s, 4 ℃ 保存。在 QuantStudio 系统上进行实时荧光定量 PCR 扩增, 采用 SYBR Green 预混酶体系, 反应程序为 95 ℃ 预变性 10 min; 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火/延伸 45 s, 40 个循环。以 *GAPDH* 为内参, 通过 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 mRNA 相对表达量。引物由赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')
<i>Nrf2</i>	正向 CCACATTCTGGCCCTTGACC
	反向 CGCTCCTTAGGTAGGTCATC
<i>SLC7A11</i>	正向 AGGGCATACTCCAGAACACG
	反向 GGGACCAAAGACCTCCAGAA
<i>GPX4</i>	正向 CCGAGAGCTTTAATCGCGG
	反向 CATCGTAGCAAACGCGCTC
<i>HO-1</i>	正向 AACTTTTCAGGGCCAGGT
	反向 CTGGGCTCTCCTTGTTGC
<i>TFRC</i>	正向 TGGCAGTTCAGAATGATGGA
	反向 AGGCTGAACCGGTATATGA
<i>Cox2</i>	正向 TGAAACCCACTCCAAACACA
	反向 TGAAACCCACTCCAAACACA
<i>GAPDH</i>	正向 GCCTCCTCCAATTCAACCCT
	反向 CTCGTGGTTCACACCCATCA

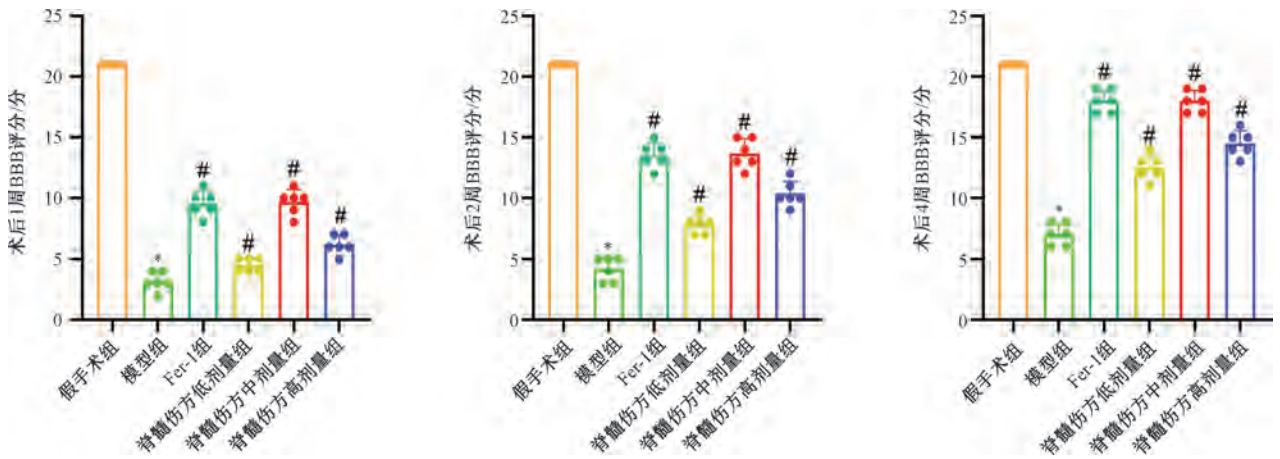
2.9 Western blot 法检测脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1、TFRC、Cox2 蛋白表达 脊髓组织加裂解液研磨裂解，4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min，取上清，即组织蛋白，采用 BCA 法测定浓度后将蛋白加热变性，制备 PAGE 凝胶，进行电泳分离，并将蛋白转印至 PVDF 膜上。PVDF 膜经无蛋白快速封闭液封闭处理，加一抗 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1、TFRC、Cox2 抗体，4 ℃ 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，加二抗，室温孵育。采用超敏 ECL 显色液进行显影，以 GAPDH 为内参，通过 Image J 软件分析目标蛋白相对表达量。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处

理，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

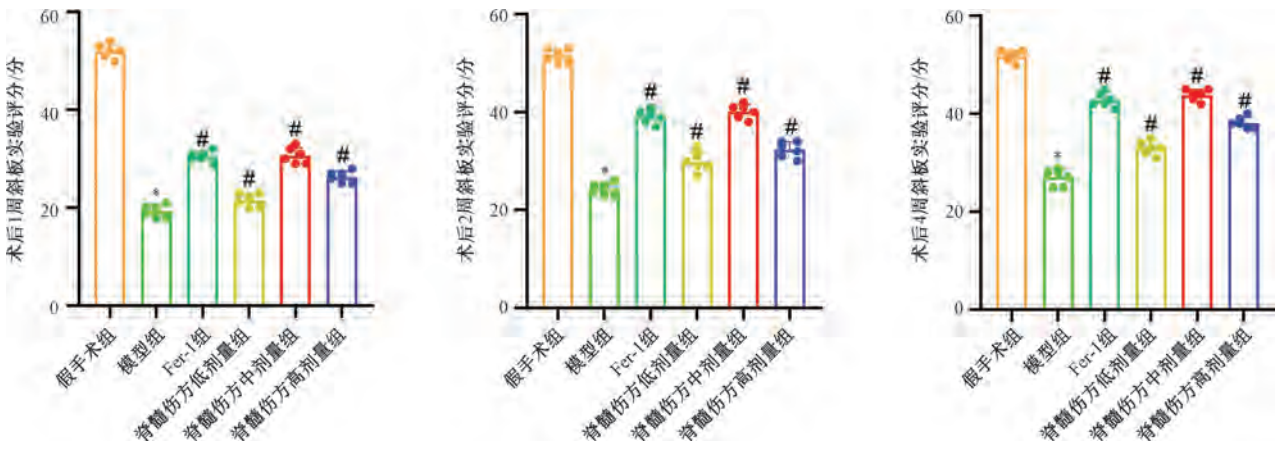
3.1 脊髓伤方对 CSM 大鼠 BBB 评分和斜板实验评分的影响 术前，各组 BBB 评分和斜板实验评分无显著差异 ($P>0.05$)。术后 1、2、4 周，与假手术组比较，模型组大鼠 BBB 评分和斜板实验评分降低 ($P<0.05$)，提示脊髓受压；与模型组比较，Fer-1 组、脊髓伤方各剂量组大鼠 BBB 评分和斜板实验评分升高 ($P<0.05$)，其中脊髓伤方中剂量组改善作用优于低、高剂量组，见图 1~2。



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

图 1 各组大鼠 BBB 评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Comparison of rat BBB score in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



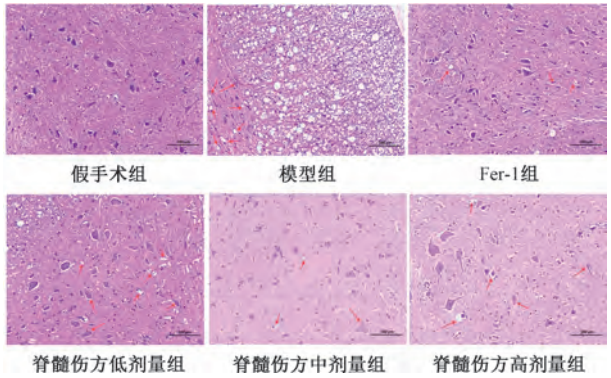
注：与假手术组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠斜板实验评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Comparison of rat inclined plane test score in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3.2 脊髓伤方对 CSM 大鼠脊髓组织病理结构的影响

3.2.1 HE 染色 假手术组脊髓组织结构完整，神经元形态正常，无明显病理改变；模型组脊髓组织结构紊乱、神经元数量显著减少，并伴有明显细胞坏死及空泡改变；Fer-1 组及脊髓伤方各剂量组均较模型组表现出不同程度的组织结构恢复，神经元形态改善，其中脊髓伤方中剂量组修复效果优于低、高剂量组，组织结构接近完整，神经元形态基本恢复正常，细胞坏死明显减少，见图 3。



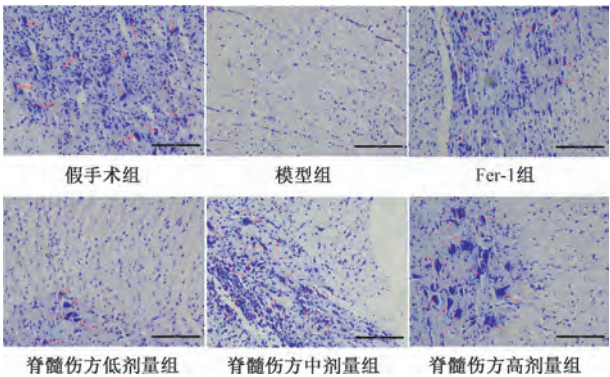
注：红色箭头指示处为异常形态神经元及脊髓组织空泡样变化。

图 3 各组大鼠脊髓组织 HE 染色 (×200)

Fig. 3 HE staining of rat spinal cord tissues in each group (×200)

3.2.2 Nissl 染色 假手术组神经元形态完整，尼氏小体分布均匀且染色清晰，未见明显病理变化；模型组神经元数量减少，尼氏小体明显溶解、分散甚至消失，表现出严重的神经损伤特征；Fer-1 组及脊髓伤方各剂量组神经元均有不同程度的改善，神经元形态逐渐恢复，尼氏小体数量增加且染色逐步加深，其中脊髓伤方中剂量组效果优于低、高剂量组，神经元数量增加，尼氏小体结构清晰，染色程度接近假手术组，表明其在神经修复和功能恢复方面具有显著优势，见图 4。

3.3 脊髓伤方对 CSM 大鼠脊髓组织铁离子沉积的影响 假手术组脊髓组织中几乎未见铁离子沉积，组织结构正常；模型组脊髓组织中可见大量蓝色铁染颗粒，主要分布于损伤区域，提示存在显著的铁离子沉积和氧化应激损伤；Fer-1 组及脊髓伤方各剂量组脊髓组织中铁离子沉积较模型组减少，蓝色染色颗粒分布减少，组织结构趋于恢复，其中脊髓伤方中剂量组改善效果优于低、高剂量组，铁离子沉积显著减少，染色颗粒稀疏，脊髓组织结构接近正常，表明其在减少氧化应激和促进组织修复方面

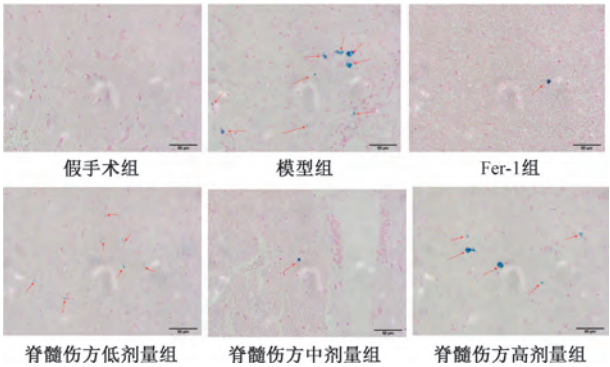


注：红色箭头指示处为尼氏小体。

图 4 各组大鼠脊髓组织 Nissl 染色 (×200)

Fig. 4 Nissl staining of rat spinal cord tissues in each group (×200)

具有较好的疗效，见图 5。



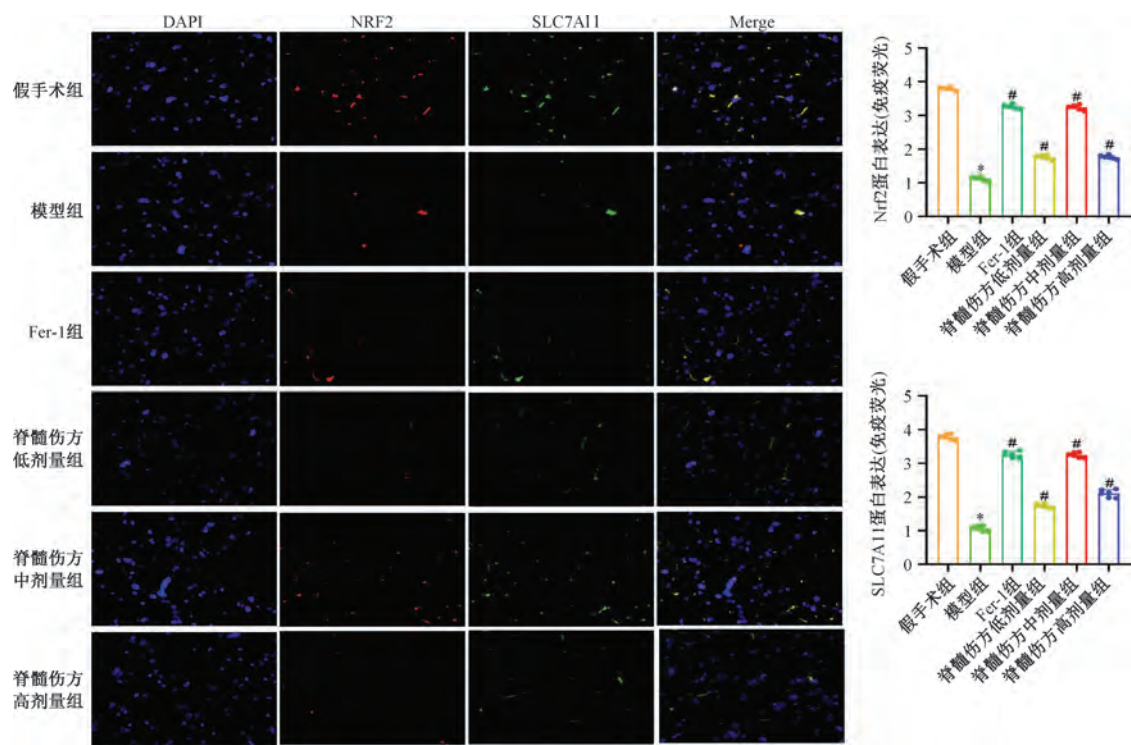
注：红色箭头指示处为铁离子沉积。

图 5 各组大鼠脊髓组织普鲁士蓝染色 (×400)

Fig. 5 Prussian blue staining of rat spinal cord tissues in each group (×400)

3.4 脊髓伤方对 CSM 大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 蛋白荧光表达的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织中 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 蛋白荧光表达强度降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，Fer-1 组、脊髓伤方各剂量组大鼠脊髓组织中 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 蛋白荧光表达强度升高 ($P<0.05$)，见图 6~7。

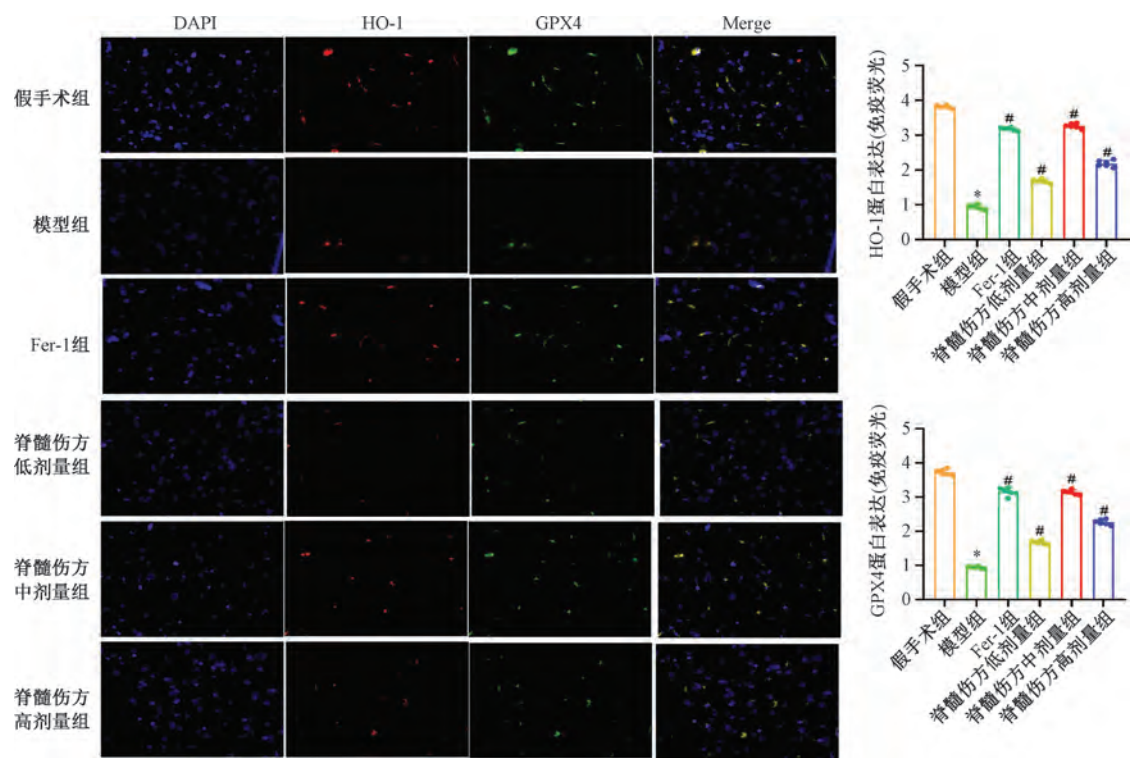
3.5 脊髓伤方对 CSM 大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1、TFRC、Cox2 mRNA 表达的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)，TFRC、Cox2 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，Fer-1 组、脊髓伤方各剂量组大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$)，TFRC、Cox2 mRNA



注：与假手术组比较,*P<0.05；与模型组比较,#P<0.05。

图 6 各组大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11 蛋白荧光表达比较 (×400, $\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig. 6 Comparison of protein immunofluorescence expressions of Nrf2 and SLC7A11 in rat spinal cord tissues in each group (×400, $\bar{x}\pm s$, n=6)

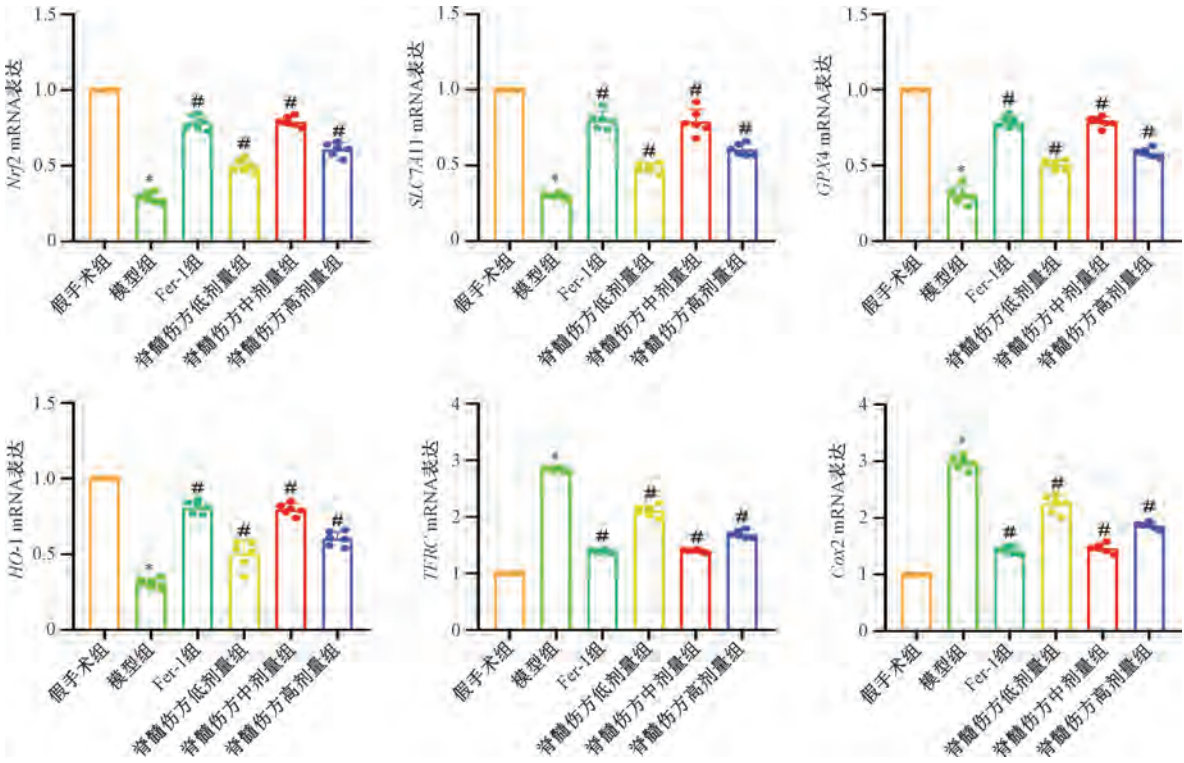


注：与假手术组比较,*P<0.05；与模型组比较,#P<0.05。

图 7 各组大鼠脊髓组织 HO-1、GPX4 蛋白荧光表达比较 (×400, $\bar{x}\pm s$, n=6)

Fig. 7 Comparison of protein immunofluorescence expressions of HO-1 and GPX4 in rat spinal cord tissues in each group (×400, $\bar{x}\pm s$, n=6)

表达降低 ($P<0.05$)，其中脊髓伤方中剂量组对以上基因表达的调控作用优于低、高剂量组，见图 8。



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

图 8 各组大鼠脊髓组织 *Nrf2*、*SLC7A11*、*GPX4*、*HO-1*、*TFRC*、*Cox2* mRNA 表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 8 Comparison of mRNA expressions of *Nrf2*, *SLC7A11*, *GPX4*, *HO-1*, *TFRC* and *Cox2* in rat spinal cord tissues in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

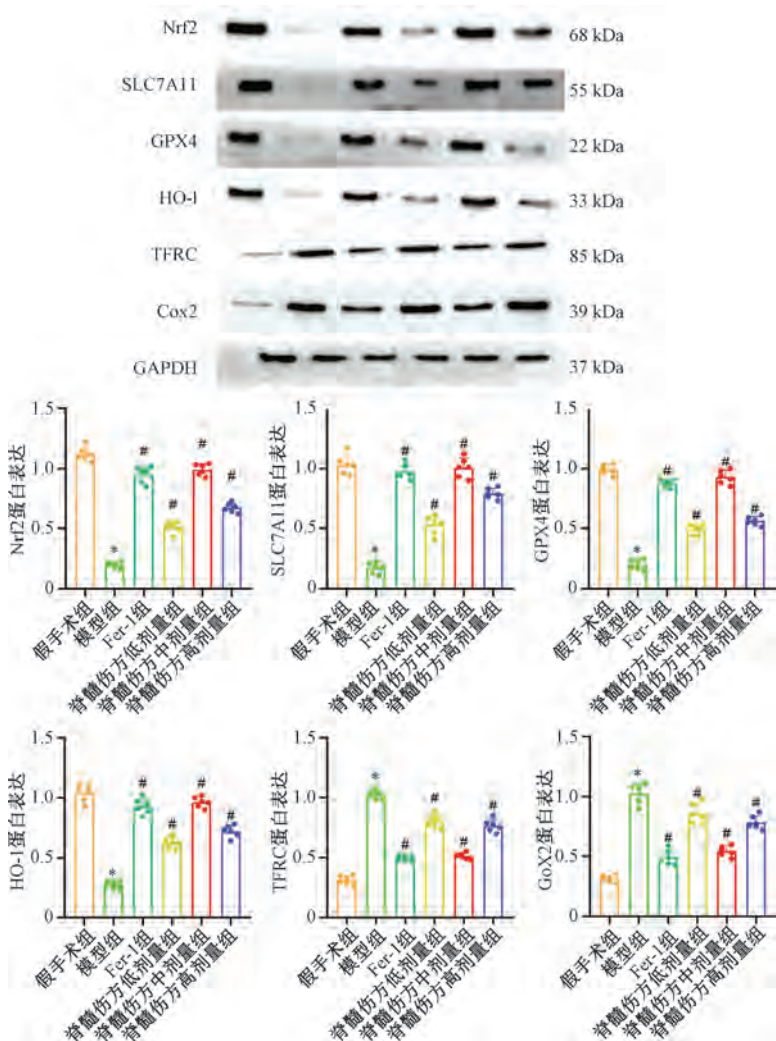
3.6 脊髓伤方对 CSM 大鼠脊髓组织 *Nrf2*、*SLC7A11*、*GPX4*、*HO-1*、*TFRC*、*Cox2* 蛋白表达的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脊髓组织 *Nrf2*、*SLC7A11*、*GPX4*、*HO-1* 蛋白表达降低 ($P<0.05$)，*TFRC*、*Cox2* 蛋白表达升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，*Fer-1* 组、脊髓伤方各剂量组大鼠 *Nrf2*、*SLC7A11*、*GPX4*、*HO-1* 表达升高 ($P<0.05$)，*TFRC*、*Cox2* 表达降低 ($P<0.05$)，其中脊髓伤方中剂量组对上述蛋白表达的调控作用优于低、高剂量组，见图 9。

4 讨论

CSM 是颈椎退行性病变引起的慢性进行性脊髓压迫，是中老年人中枢神经系统功能障碍的重要原因之一，脊髓长期受压、供血供氧不足、炎症反应等因素可致神经元损伤，进而发生神经功能障碍^[8]，尽管手术减压和药物治疗可缓解症状，但大多数患者神经功能恢复有限^[9]。近年来，铁死亡作为新型细胞死亡形式在 CSM 中的作用逐渐受到关注，它是一种由于铁代谢紊乱与活性氧

(ROS) 积累的非凋亡性死亡方式^[10]，其核心特征为细胞内脂质过氧化物异常堆积^[11]，这些过氧化物由 ROS 作用于多不饱和脂肪酸生成，若未被及时清除，则将破坏细胞膜结构和功能，引发细胞铁死亡^[12]，其标志包括 Fe^{2+} 升高、ROS 增多、GSH 耗竭及谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 活性下降^[13]。

在 CSM 发病过程中，脊髓受压致局部血供障碍和氧化应激增强，为铁死亡发生提供了条件，脊髓缺血缺氧可导致细胞代谢紊乱，自由铁释放与积聚，通过 Fenton 反应催化 ROS 生成，进而促进脂质过氧化^[14]；GSH 水平下降和 GPX4 活性减弱，使脂质过氧化物清除受限，持续堆积后引发细胞死亡^[15]。研究表明，铁死亡广泛参与帕金森病、阿尔茨海默病及急性脊髓损伤等多种神经系统疾病^[16-17]，提示它可能是一种广泛存在于神经系统病变中的病理机制。在铁死亡的调控网络中，核因子 E2 相关因子 2 (*Nrf2*) 作为关键的抗氧化转录因子，能激活多种下游抗氧化基因抑制铁死亡的发



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

图9 各组大鼠脊髓组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4、HO-1、TFRC、Cox2 蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Fig. 9 Comparison of protein expressions of Nrf2, SLC7A11, GPX4, HO-1, TFRC and Cox2 in rat spinal cord tissues in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

生^[18]，它通过结合抗氧化反应元件（ARE）调控目标基因表达，包括负责谷氨酰胺转运的 SLC7A11 和负责脂质过氧化物还原的 GPX4。

SLC7A11 是谷氨酰胺转运系统 Xc⁻ 的重要组成部分，与 Nrf2 密切相关，调控胞外半胱氨酸摄取和胞内谷氨酸输出维持细胞内 GSH 合成^[19]。半胱氨酸是 GSH 合成的关键前体，而 GSH 是 GPX4 活性所必需的底物^[20]，因此 SLC7A11 在铁死亡中起桥梁作用。在 CSM 相关铁死亡过程中，SLC7A11 功能障碍可致 GSH 耗竭，削弱 GPX4 清除脂质过氧化的能力，而 GPX4 可将脂质过氧化物还原为醇，保护细胞膜，其活性受 GSH 水平调控。本研究发现，与模型组比较，脊髓伤方组可促进 CSM 大鼠 Nrf2 表达，提高 SLC7A11、GPX4 蛋白表达，说明

该方可能通过调控 Nrf2 抑制铁死亡来改善神经功能；HE 染色、Nissl 染色及普鲁士蓝染色结果显示，CSM 大鼠脊髓损伤修复，尼氏小体增多，铁离子沉积减少，术后行为评分亦表明神经功能明显改善。

此外，HO-1 是 Nrf2 的经典下游基因之一，能通过调节细胞铁稳态间接影响 GPX4 功能^[21]。HO-1 催化血红素分解，释放的铁离子可被贮存或代谢，但其过度激活可能引发铁过载和羟自由基积聚，促进铁死亡^[22]。与此同时，TFRC 是细胞摄铁的关键通路，过度表达会增加胞内游离铁水平，导致脂质过氧化反应增强，加剧铁死亡效应^[23]；Cox2 作为铁死亡及炎症反应中的重要因子，参与炎症介质合成^[24]。本研究发现，脊髓损伤可适度

激活 Nrf2 及其下游 HO-1，促进铁稳态调节并减少自由铁释放；Nrf2 可通过增强抗氧化酶表达，间接下调 TFRC 和 Cox2，减少铁摄取与炎症反应，从而抑制铁死亡的发生；HO-1 与 TFRC 在铁代谢中呈对立，适度调控 Nrf2 及其通路，有助于维持铁稳态、抑制铁死亡及其介导的神经损伤。

综上所述，脊髓伤方能有效改善 CSM 大鼠神经功能，其机制可能与调控 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路抑制铁死亡相关，并且该方可上调抗氧化蛋白表达，增强抗氧化能力，减少脂质过氧化和神经元损伤。

参考文献：

[1] 鲍小明, 任 坤, 张小平, 等. 显微镜与直视下颈椎前路椎间盘切除融合术比较[J]. 中国矫形外科杂志, 2023, 31(11): 974-979.

[2] 吴迪友, 黄家俊, 陶广义, 等. 葛根汤干预脊髓型颈椎病模型大鼠神经炎症反应和凋亡的作用[J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(20): 4249-4257.

[3] 李 莹, 王永魁, 尚利杰, 等. 颈后路微创椎管扩大成形术对颈椎间盘退变的影响[J]. 郑州大学学报 (医学版), 2020, 55(2): 278-281.

[4] 加秀凤, 周 勇, 张 超, 等. 基于 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路探讨首乌丸对卵巢早衰大鼠铁死亡的影响[J]. 世界科学技术 (中医药现代化), 2024, 26(10): 2615-2622.

[5] 卜献忠, 钟远鸣, 卜保献, 等. 脊髓伤方促进脊髓型颈椎病 (气虚血瘀证) 术后恢复的效果研究[J]. 时珍国医国药, 2023, 34(12): 2951-2955.

[6] Gao K, Niu J, Dang X. Neuroprotection of netrin-1 on neurological recovery via Wnt/ β -catenin signaling pathway after spinal cord injury[J]. *Neuroreport*, 2020, 31(7): 537-543.

[7] Basso D M, Beattie M S, Bresnahan J C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats[J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1): 1-21.

[8] Kang Y, Zhu R, Li S, *et al.* Erythropoietin inhibits ferroptosis and ameliorates neurological function after spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(4): 881-888.

[9] Huang W, Wu D, Cai C, *et al.* Inhibition of MST1 ameliorates neuronal apoptosis via GSK3 β / β -TrCP/NRF2 pathway in spinal cord injury accompanied by diabetes[J]. *Redox Biol*, 2024, 71: 103104.

[10] Yin Z, Wan B, Gong G, *et al.* ROS: executioner of regulating cell death in spinal cord injury[J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1330678.

[11] Zhao Y, Chen Y, Liu Z, *et al.* TXNIP knockdown protects rats

against bupivacaine-induced spinal neurotoxicity via the inhibition of oxidative stress and apoptosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 219: 1-16.

[12] Yu Z, Cheng X, Pan W, *et al.* The ferroptosis activity is associated with neurological recovery following chronic compressive spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(11): 2482-2488.

[13] Ohnishi T, Iwasaki N, Sudo H. Causes of and molecular targets for the treatment of intervertebral disc degeneration: a review[J]. *Cells*, 2022, 11(3): 394.

[14] 杜开颜, 祁晨旭, 曹静钰, 等. 铁死亡参与脊髓损伤调控的研究进展[J]. 生物技术进展, 2022, 12(6): 869-874.

[15] 段昭远, 吴明莉, 罗 萌, 等. 脊髓损伤后神经元铁死亡: 谷胱甘肽过氧化物酶 4 的调控[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(12): 1956-1962.

[16] Li Q S, Jia Y J. Ferroptosis: a critical player and potential therapeutic target in traumatic brain injury and spinal cord injury[J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(3): 506-512.

[17] 刘长兴, 郭心怡, 张雷雷, 等. 铁死亡与缺血性脑卒中及其中医药干预研究进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2022, 30(7): 135-140.

[18] Ou J, Liu X, Chen J, *et al.* Amelioration of arsenic-induced hepatic injury via sulfated glycosaminoglycan from swim bladder: modulation of Nrf2 pathway and amino acid metabolism[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 287: 138528.

[19] Zhang H, Pan J, Huang S, *et al.* Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes from doxorubicin-induced ferroptosis through the SLC7A11/GSH/GPx4 pathway by Keap1 S-sulphydration and Nrf2 activation[J]. *Redox Biol*, 2024, 70: 103066.

[20] Chen B, Fan P, Song X, *et al.* The role and possible mechanism of the ferroptosis-related SLC7A11/GSH/GPX4 pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 531.

[21] Yan P, Li X, He Y, *et al.* The synergistic protective effects of paeoniflorin and β -ecdysterone against cardiac hypertrophy through suppressing oxidative stress and ferroptosis[J]. *Cell Signal*, 2025, 125: 111509.

[22] Chen Y, Liu X, Chen B, *et al.* Selenium nanoparticles decorated by fucoidan induce ferroptosis in HepG2 cells[J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 289: 138841.

[23] Chen B Y, Pathak J L, Lin H Y, *et al.* Inflammation triggers chondrocyte ferroptosis in TMJOA via HIF-1 α /TFRC [J]. *J Dent Res*, 2024, 103(7): 712-722.

[24] Wang X, Gao M, Lu X, *et al.* Resveratrol alleviates Mono-2-ethylhexyl phthalate-induced mitophagy, ferroptosis, and immunological dysfunction in grass carp hepatocytes by regulating the Nrf2 pathway[J]. *J Environ Manage*, 2024, 371: 123235.