

基于 SIRT1-FOXO1 信号通路探讨安脑平冲方对脑出血大鼠线粒体功能障碍的影响

王旭^{1,2}, 刘皓昕³, 练雨璐³, 王雯¹, 姜帆¹, 董焕¹, 吕笑¹, 郭纯^{1*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007; 2. 广州中医药大学, 广东广州 510006; 3. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: **目的** 探讨安脑平冲方对脑出血大鼠神经功能和脑神经细胞线粒体功能障碍的改善作用。**方法** 采用自体血注入法建立大鼠脑出血模型, 设置假手术组、模型组、中药组 (7.5 g/kg 安脑平冲方)、西药组 (5.4 mg/kg 依达拉奉右莛醇)、抑制剂组 (10 μg SIRT1 抑制剂 EX-527) 和抑制剂+中药组 (10 μg EX-527+7.5 g/kg 安脑平冲方)。给药 3 d 后采用 mNSS 法评估脑出血大鼠神经功能, 尼氏染色观察脑组织病理形态, 采用试剂盒检测脑组织 MDA、8-OHdG、ATP 水平及线粒体呼吸链复合物 (复合物 1、3、4)、抗氧化酶 (SOD、CAT、GPX) 活性, Western blot 法检测脑组织 SOD1、SOD2、CAT、GPX4、SIRT1、p-SIRT1、FOXO1、Ac-FOXO1 蛋白表达, 免疫荧光法检测脑组织 SIRT1、FOXO1 荧光强度。**结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠出血周围脑组织损伤严重, 氧化应激 (MDA、8-OHdG) 水平升高 ($P<0.01$), 线粒体功能 (ATP、复合物 1、3、4)、抗氧化酶 (SOD、CAT、GPX) 活性降低 ($P<0.01$), 抗氧化酶 (SOD1、SOD2、CAT) 蛋白表达降低 ($P<0.05$), SIRT1、FOXO1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组比较, 中药组和西药组大鼠神经功能缺损评分降低 ($P<0.01$), 神经元损伤减少, MDA、8-OHdG 水平降低 ($P<0.01$), ATP 水平及复合物 1、3、4、SOD、CAT、GPX 活性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), SOD1、SOD2、CAT 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), SIRT1、p-SIRT1、FOXO1 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Ac-FOXO1 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 而抑制剂组和抑制剂+中药组以上指标均无明显变化。**结论** 安脑平冲方能改善脑出血大鼠神经功能损伤, 减轻脑内线粒体功能障碍和氧化应激损伤, 其机制可能与调控 SIRT1-FOXO1 信号转导, 进而促进抗氧化酶活性和表达有关。

关键词: 安脑平冲方; 脑出血; SIRT1-FOXO1 信号通路; 神经功能; 线粒体功能障碍; 氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)05-1495-09

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2026.05.010

Effects of Annao Pingchong Decoction on mitochondrial dysfunction in rats with intracerebral hemorrhage based on SIRT1-FOXO1 signaling pathway

WANG Xu^{1,2}, LIU Hao-xin³, LIAN Yu-jun³, WANG Wen¹, JIANG Fan¹, DONG Huan¹, LÜ Xiao¹, GUO Chun^{1*}

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To explore the improvement effects of Annao Pingchong Decoction on neurological function and mitochondrial dysfunction of brain cells in rats with cerebral hemorrhage. **METHODS** The rat model of cerebral hemorrhage was established by autologous blood injection. The rats were divided into sham operation group, model group, traditional Chinese medicine (TCM) group (7.5 g/kg Annao Pingchong Decoction), western medicine group (5.4 mg/kg edaravone and dexborneol), inhibitor group (10 μg SIRT1 inhibitor EX-527) and

收稿日期: 2025-04-01

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2024JJ5316); 湖南省卫健委基金 (W2024201); 长沙市自然科学基金 (Kq2208208); 湖南中医药大学学院联合基金项目 (2024XYLH346)

作者简介: 王旭 (1997—), 男, 博士在读, 从事中医药防治脑病、代谢免疫疾病研究。E-mail: 2508135485@qq.com

* 通信作者: 郭纯 (1979—), 女, 博士, 研究员, 从事中医药防治脑病研究。E-mail: chunguosm@163.com

inhibitor+TCM group (10 μ g EX-527+7.5 g/kg Annao Pingchong Decoction). After 3 days of administration, the neurological function of rats with cerebral hemorrhage was evaluated by mNSS method. Nissl staining was used to observe the pathology of brain tissue. The levels of MDA, 8-OHdG and ATP in brain tissue and the activities of mitochondrial respiratory chain complexes (complexes 1, 3 and 4) and antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPX) were detected by kits. The protein expressions of SOD1, SOD2, CAT, GPX4, SIRT1, p-SIRT1, FOXO1 and Ac-FOXO1 in brain tissues were detected by Western blot. Immunofluorescence was used to detect the fluorescence intensity of SIRT1 and FOXO1 in brain tissue. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the brain tissue around the hemorrhage in the model group was seriously damaged, the levels of oxidative stress (MDA, 8-OHdG) increased ($P<0.01$), the mitochondrial function (ATP, complex 1, 3, 4) and the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX) decreased ($P<0.01$), the protein expressions of antioxidant enzymes (SOD1, SOD2, CAT) decreased ($P<0.05$), and the protein expressions of SIRT1 and FOXO1 increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the TCM group and the western medicine group showed reduced neurological deficit scores ($P<0.01$), decreased neuronal damage, and lower levels of MDA and 8-OHdG ($P<0.01$). The ATP level and the activities of complexes 1, 3, 4, SOD, CAT and GPX increased ($P<0.05$, $P<0.01$), the protein expressions of SOD1, SOD2 and CAT increased ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein expressions of SIRT1, p-SIRT1, and FOXO1 increased ($P<0.05$, $P<0.01$), while Ac-FOXO1 protein expression was decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). However, there was no significant change in the above indices in the inhibitor group and the inhibitor+TCM group. **CONCLUSION** Annao Pingchong Decoction can significantly improve neurological deficits in rats with cerebral hemorrhage and alleviate mitochondrial dysfunction and oxidative stress damage in the brain. The mechanism may be related to the regulation of the SIRT1-FOXO1 signaling pathway, thereby promoting the activities and expressions of antioxidant enzymes.

KEY WORDS: Annao Pingchong Decoction; cerebral hemorrhage; SIRT1-FOXO1 signaling pathway; neurological functions; mitochondrial dysfunction; oxidative stress

脑出血是指脑组织内部血管破裂出血导致的急性脑损伤,占全部中风疾病的27%,具有发病急、病情严重的特点,1个月内病死率为40%,1年内生存率仅为46%^[1-2],本病主要依靠手术治疗,但由于神经元的不可再生性,神经功能恢复面临严峻挑战。出血后引发的继发性脑损伤可导致神经元持续受损,加重神经功能缺损,但目前尚无有效药物能抑制该过程的发生与进展^[3]。线粒体功能障碍是脑出血后继发性脑损伤及神经元死亡的重要病理机制,它会产生过量活性氧并直接破坏细胞结构,导致后者死亡^[4],故抑制神经元氧化应激是脑出血后继发性脑损伤早期治疗中的有效策略。

细胞内FOXO1参与应激、增殖、凋亡、代谢等多种生物过程的调控^[5],它可通过促进SOD等抗氧化酶表达,从而减轻氧化应激对神经细胞的损伤^[6]。SIRT1是一种去乙酰化酶,可直接调控FOXO1的转录活性和稳定性^[7],在脑出血中激活后可减轻神经元氧化应激,发挥神经保护作用^[8],但其是否通过FOXO1-抗氧化酶通路来实现尚待进一步研究。

安脑平冲方具有良好的临床疗效,呈现抗氧化、抗凋亡作用^[9],但具体机制尚不明确。本研究通过建立脑出血大鼠模型,探讨安脑平冲方是否通过调控SIRT1-FOXO1通路来减轻氧化应激,促进神经功能恢复。

1 材料

1.1 仪器 LEGATO130脑立体定位仪、微量注射泵(美国KD Scientific公司);1710RN微量进样器(瑞士Hamilton公司);Enspire多功能酶标仪(美国PerkinElmer公司);STP-120自动组织干燥机、HM 325切片机(美国Thermo Fisher Scientific公司);BX43光学显微镜(日本Olympus公司);GelView 6000Pro II多功能图像工作站(广州博鹭腾生物科技有限公司)。

1.2 试剂与药物 安脑平冲方由龙骨30g、牡蛎30g、川牛膝15g、白蒺藜12g、钩藤12g、泽泻12g、白芍12g、栀子12g、牡丹皮12g、黄芩12g、大黄9g、甘草6g组成,均购自湖南中医药大学第一附属医院;依达拉奉右莰醇注射液(国药准字H20200007)购自先声药业有限公司;

SIRT1 抑制剂 EX-527 (货号 IE0650) 购自北京索莱宝科技有限公司。MDA、SOD、CAT、GPX 检测试剂盒、尼氏染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 货号 BC0025、BC0175、BC0205、BC1195、G1434); 8-OHdG 检测试剂盒 (江苏艾迪生生物科技有限公司, 批号 2302R30); 线粒体呼吸链复合物 1、3、4、ATP 检测试剂盒 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号 E-BC-K149-M、E-BC-K151-M、E-BC-K152-M、E-BC-F002); RIPA 裂解缓冲液 (武汉博士德生物工程有限公司, 货号 AR0105-100); BCA 蛋白检测试剂盒 (合肥白鲨生物科技有限公司, 货号 BL521A); SOD1、SOD2、CAT、GPX4、FOXO1、GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司, 货号 10269-1-AP、24127-1-AP、21260-1-AP、67763-1-Ig、18592-1-AP、60004-1-Ig); SIRT1 抗体 (英国 Abcam 公司, 货号 ab110304); p-SIRT1、Ac-FOXO1 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 货号 AF3474、AF2035); 荧光二抗 (美国 Jackson ImmunoResearch 公司, 批号 115-605-003/111-545-003); 含 DAPI 抗荧光衰减封片剂 (美国 SouthernBiotech 公司, 批号 0100-20)。

1.3 动物 雄性 SD 大鼠, 体质量 280~320 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], 饲养于湖南中医药大学第一附属医院医学创新实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2020-0010], 饲养环境温度 (24±2)℃, 相对湿度 50%~70%, 光照 12 h/黑暗 12 h, 自由摄食饮水。研究方案经湖南中医药大学第一医院实验动物伦理委员会批准 (批准号 ZYFY20231110-148)。

2 方法

2.1 药物制备 取安脑平冲方组方药材, 加水煎煮后浓缩至生药量 1.5 g/mL。EX-527 先用 DMSO 溶解, 制成储备液, 然后依次加入 PEG300、吐温-80 和 PBS, 混合均匀, 比例为 10%:40%:5%:45%, 得到 2 mg/mL 溶液; 对照溶剂不含 EX527, 制备方法同上。

2.2 脑出血模型建立 大鼠麻醉后, 于心尖搏动最强处取 50 μL 心脏动脉血, 以俯卧位固定于立体定位仪上, 调整脑立体定位仪使门齿沟水平低于耳间线水平 2.4 mm, 前后凶基本保持在同一水平线上, 头顶常规备皮消毒, 切开颅顶皮肤充分暴露前凶、冠状缝, 由前凶位置开始, 定位于冠状缝前

0.5 mm、中线左旁开 3 mm 处, 用钻孔针钻透颅骨, 开一直径约 2 mm 的小孔, 垂直向下进针。从颅骨面开始计算, 进针 6 mm 到达尾状核处, 使用微量注射泵和微量进样器先匀速注入 5 μL EX-527 溶液或对照溶剂, 再匀速注入 50 μL 自体血, 体积流量 5 μL/min, 注完后留针 10 min, 退针 2 mm, 再留针 4 min 后退针, 缝合切口并消毒。假手术组、模型组、中药组和西药组注入对照溶剂, 抑制剂组和抑制剂+中药组注入 EX527 溶液, 假手术组不注血。

2.3 分组及给药 大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为假手术组 (生理盐水, 灌胃)、模型组 (生理盐水, 灌胃)、中药组 (7.5 g/kg 安脑平冲方, 灌胃)、西药组 (5.4 mg/kg 依达拉奉右莰醇, 腹腔注射)、抑制剂组 (生理盐水, 灌胃) 和抑制剂+中药组。造模苏醒后给药 1 次, 之后每天灌胃 2 次或腹腔注射 1 次, 给药 3 d、末次给药 2 h 后取材。安脑平冲方、依达拉奉右莰醇给药剂量均通过人与大鼠体质量比进行换算, 即脑出血患者 1 d 的剂量, 并且前期研究发现, 安脑平冲方疗效不具有剂量依赖性, 因此本研究采用正常的单倍剂量进行实验^[9-10]。

2.4 神经功能评分 采用改良神经功能缺损评分 (mNSS) 评估脑出血大鼠的神经功能缺损, 其中运动功能检测包括提尾实验和行走实验, 最高 6 分; 感觉功能检测包括放置实验和本体感觉实验, 最高 2 分; 平衡木实验最高 6 分; 反射和异常运动包括耳廓反射、角膜反射、惊恐反射、癫痫抽搐肌张力障碍等, 最高 4 分, 分别在脑出血诱导后 6、24、48、72 h 进行。mNSS 评分范围为 0~18 分, 分值越高, 神经功能缺损越严重, 在造模后 6 h 首次进行, 结果为 8 分者纳入本实验。

2.5 氧化应激指标、线粒体呼吸链复合物活性、ATP、抗氧化酶活性检测 脑组织加入对应提取液, 冰浴匀浆裂解, 离心, 取上清液, 按照试剂盒说明书, 采用多功能酶标仪检测 MDA、8-OHdG、ATP 水平及线粒体呼吸链复合物 1、3、4, SOD, CAT, GPX 活性。

2.6 尼氏染色观察脑组织结构 脑组织在 4% 多聚甲醛中固定 3 d, 采用自动组织脱水机脱水, 石蜡包埋组织, 切片机切取 5 μm 冠状面切片, 常规脱蜡复水, 按照尼氏染色试剂盒说明书进行染色, 在光学显微镜下观察并拍照。

2.7 Western blot 法检测脑组织蛋白表达 收集出

血的纹状体脑组织，在冰上剪碎，预冷 PBS 冲洗，离心后取沉淀，加入 RIPA 裂解缓冲液匀浆，冰浴裂解 30 min，12 000 r/min 离心 10 min，收集上清，采用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度，凝胶电泳分离总蛋白，转移至 PVDF 膜，加入 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h，再加入一抗 SOD1 (1 : 20 000)、SOD2 (1 : 20 000)、CAT (1 : 8 000)、GPX4 (1 : 2 000)、SIRT1 (1 : 1 000)、p-SIRT1 (1 : 1 000)、FOXO1 (1 : 5 000)、Ac-FOXO1 (1 : 1 000)、GAPDH (1 : 200 000)，4 ℃ 孵育过夜，次日采用 TBST 洗涤，加入辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的二抗，室温孵育 1 h，滴加增强化学发光试剂，采用多功能图像工作站进行显影。

2.8 免疫荧光染色检测脑组织 SIRT1、FOXO1 表达 取脑组织石蜡切片，脱蜡复水后进行抗原修复，0.5% Triton X-100 通透 30 min，3% 牛血清白蛋白封闭 30 min，加入一抗 SIRT1 (1 : 1 000)、FOXO1 (1 : 500)，4 ℃ 孵育过夜，次日采用 PBS 缓冲液对切片进行清洗，加入荧光二抗 (1 : 500)，37 ℃ 避光孵育 1 h，再次洗片后晾干，以含 DAPI 的抗荧光衰减封片剂进行封片，在激光共聚焦显微镜下观察并拍照。

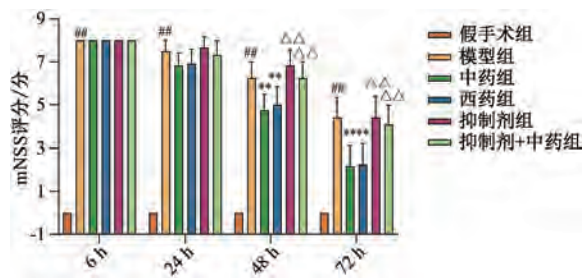
2.9 统计学分析 通过 GraphPad Prism 9 软件进行处理，符合正态性检验的计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，方差齐性者组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用 Turkey 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 安脑平冲方对脑出血大鼠神经功能的影响 随着时间延长，脑出血大鼠神经功能缺损评分呈降低趋势；在 48、72 h，中药组和西药组神经功能缺损评分低于模型组、抑制剂组和抑制剂+中药组 ($P < 0.01$)，提示安脑平冲方和依达拉奉右莰醇能促进脑出血大鼠神经功能恢复，而 SIRT1 抑制剂抑制了安脑平冲方恢复作用，见图 1。

3.2 安脑平冲方对脑出血大鼠神经细胞的影响 假手术组大鼠神经元胞体形态及尼氏小体正常，胞体饱满，分布均匀；模型组、抑制剂组和抑制剂+中药组大鼠出血周围脑组织出现水肿，细胞排列紊乱，胞体缩小，细胞核固缩，尼氏小体聚团皱缩，出血周围损伤面积较大；中药组和西药组大鼠出血周围脑组织水肿少，细胞损伤轻，出血周围损伤面积小，并且中药效果优于西药，见图 2。

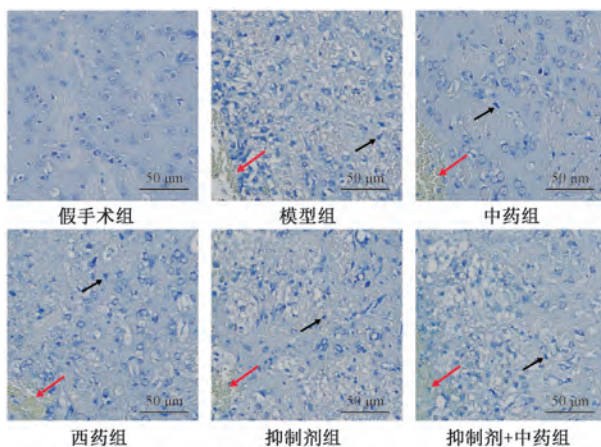
3.3 安脑平冲方对脑出血大鼠脑组织氧化应激的



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

图 1 各组大鼠神经功能缺损评分比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 1 Comparison of neurological deficit score of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)



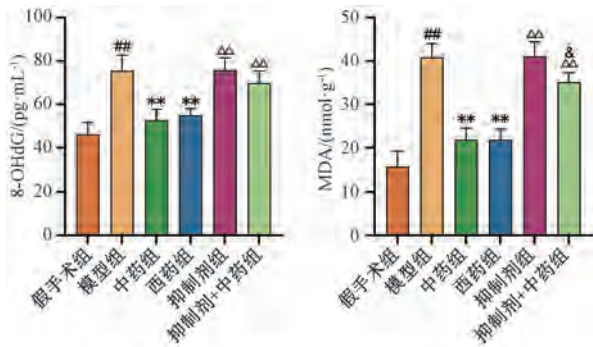
注：红色箭头指向脑出血区域，黑色箭头指向尼氏小体聚团皱缩。

图 2 各组大鼠脑组织尼氏染色 ($\times 200$)

Fig. 2 Nissl staining of brain tissue of rats in each group ($\times 200$)

影响 与假手术组比较，模型组大鼠脑组织 8-OHdG、MDA 水平升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，中药组和西药组大鼠脑组织 8-OHdG、MDA 水平降低 ($P < 0.01$)；与中药组比较，抑制剂组和抑制剂+中药组大鼠脑组织 8-OHdG、MDA 水平升高 ($P < 0.01$)；与抑制剂组比较，抑制剂+中药组大鼠脑组织 MDA 水平降低 ($P < 0.05$)，8-OHdG 水平有降低趋势，但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，见图 3。

3.4 安脑平冲方对脑出血大鼠脑组织线粒体功能的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脑组织呼吸链复合物 1、3、4 活性和 ATP 水平降低 ($P < 0.01$)；与模型组比较，中药组和西药组大鼠脑组织复合物 1、3、4 活性及 ATP 水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与中药组比较，抑制剂组和抑制剂+中药组大鼠脑组织复合物 1、3、4 活性及 ATP 水平

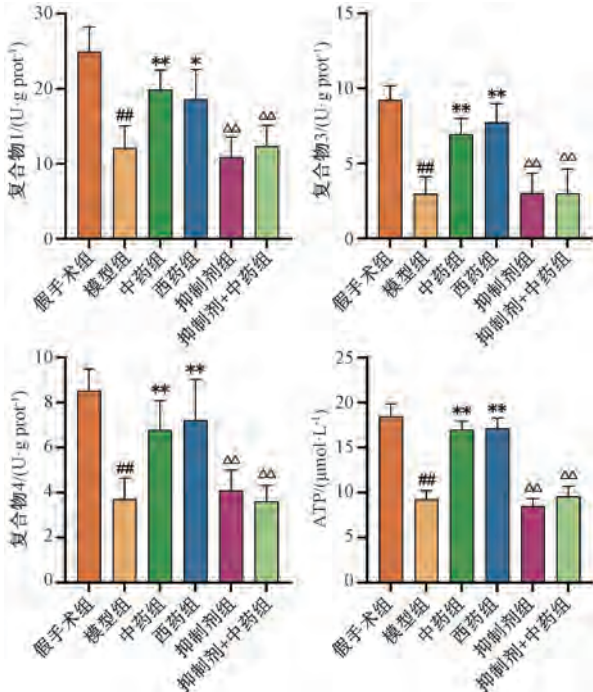


注：与假手术组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ ；与中药组比较，^{△△} $P < 0.01$ ；与抑制剂组比较，[&] $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠脑组织8-OHdG、MDA水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 3 Comparison of 8-OHdG and MDA levels in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

降低 ($P < 0.01$)，见图4。



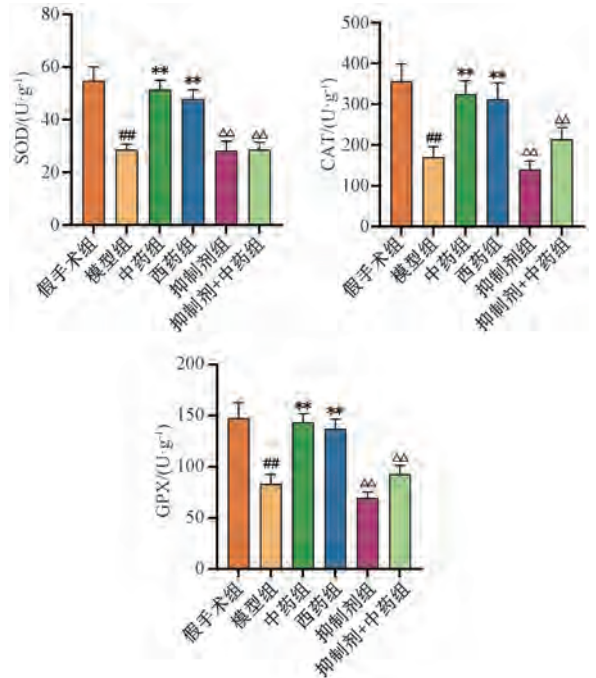
注：与假手术组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ ；与中药组比较，^{△△} $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠脑组织线粒体呼吸链复合物活性和ATP水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 4 Comparison of mitochondrial respiratory chain complexes activity and ATP level in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.5 安脑平冲方对脑出血大鼠脑组织抗氧化酶的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脑组织SOD、CAT、GPX活性和SOD1、SOD2、CAT蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与模型组比较，中药组

和西药组大鼠脑组织SOD、CAT、GPX活性和SOD1、SOD2、CAT蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与中药组比较，抑制剂和抑制剂+中药组大鼠脑组织SOD、CAT、GPX活性降低 ($P < 0.01$)，见图5~6。



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

图5 各组大鼠脑组织SOD、CAT、GPX活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

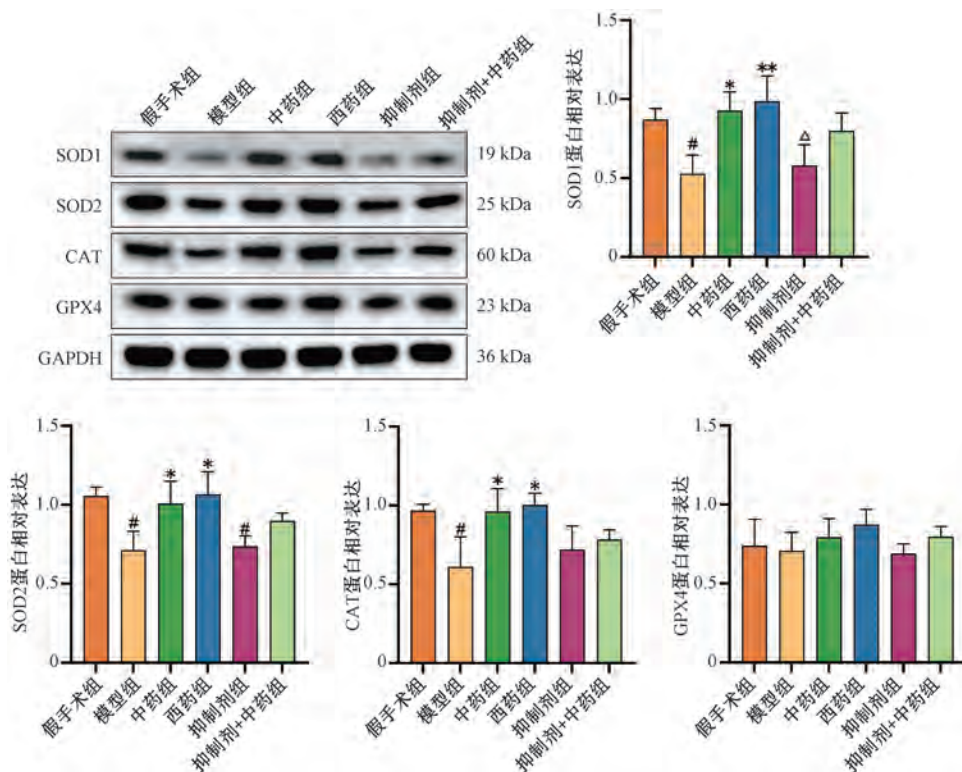
Fig. 5 Comparison of SOD, CAT and GPX activities in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.6 安脑平冲方对脑出血大鼠脑组织SIRT1、p-SIRT1、FOXO1、Ac-FOXO1表达的影响 与假手术组比较，模型组大鼠脑组织SIRT1、FOXO1蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与模型组比较，中药组和西药组大鼠脑组织SIRT1、FOXO1蛋白表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与中药组比较，抑制剂组和抑制剂+中药组大鼠脑组织SIRT1、FOXO1蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，见图7~8。

与模型组比较，中药组和西药组大鼠脑组织p-SIRT1表达升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)，Ac-FOXO1表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与中药组比较，抑制剂组和抑制剂+中药组大鼠脑组织p-SIRT1表达降低 ($P < 0.01$)，Ac-FOXO1表达升高 ($P < 0.01$)，见图7。

4 讨论

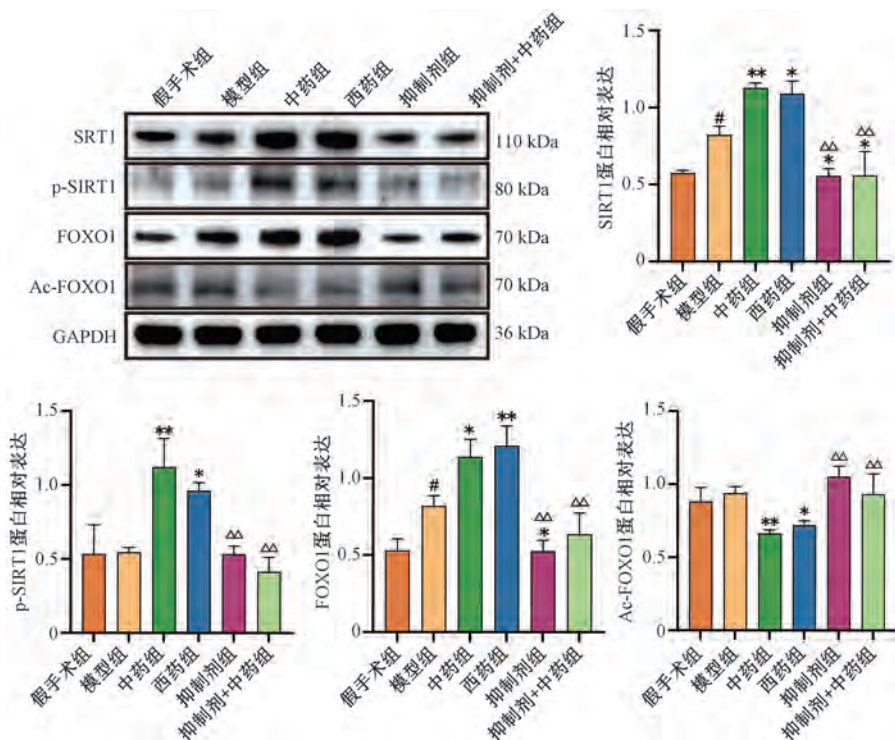
线粒体作为细胞能量中心，在脑出血后发生功



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

图6 各组大鼠脑组织SOD1、SOD2、CAT、GPX4蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

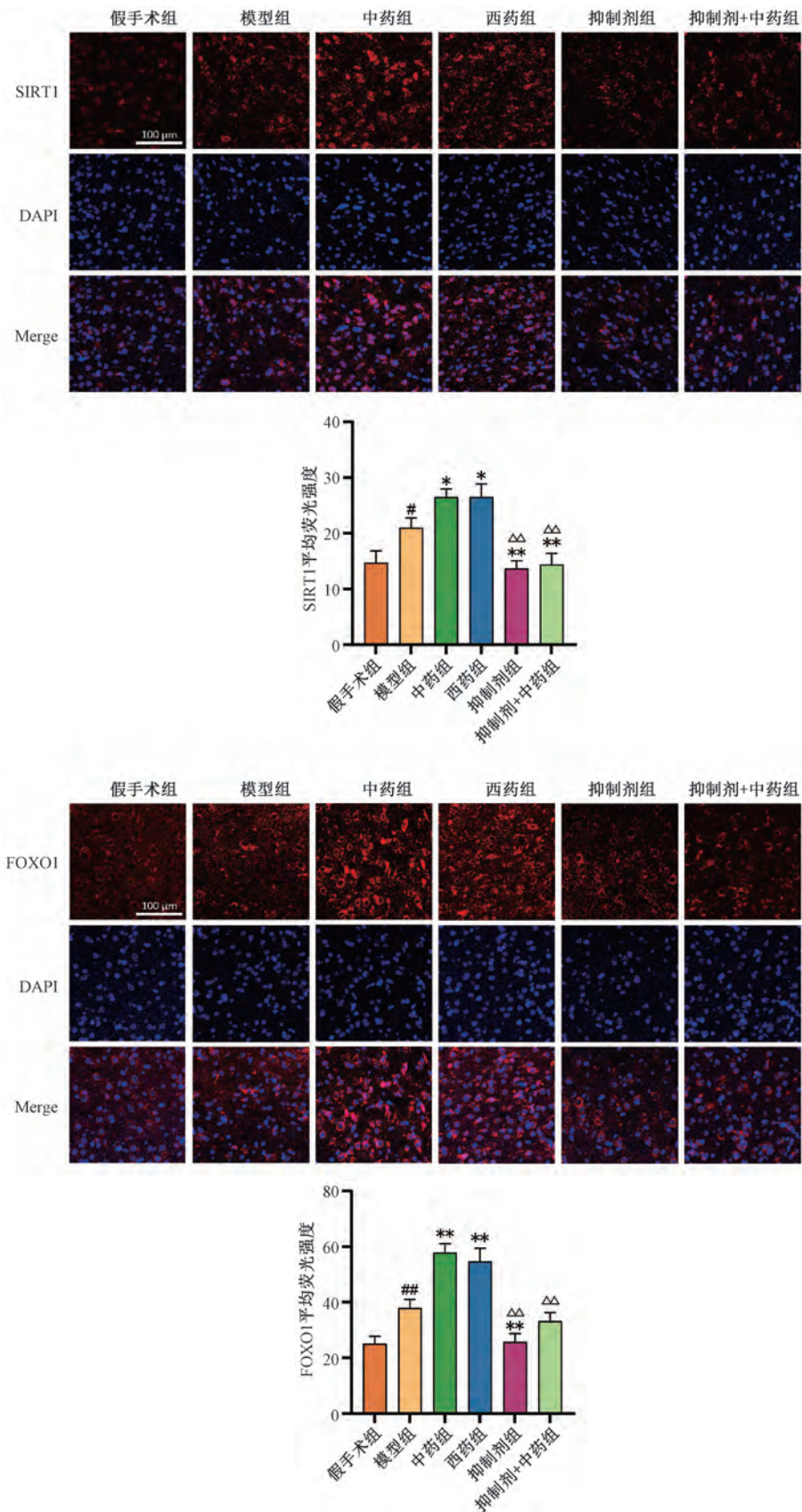
Fig. 6 Comparison of protein expressions of SOD1, SOD2, CAT and GPX4 in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



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

图7 各组大鼠脑组织SIRT1、p-SIRT1、FOXO1、Ac-FOXO1蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 Comparison of protein expressions of SIRT1, p-SIRT1, FOXO1 and Ac-FOXO1 in brain tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与假手术组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与中药组比较， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠脑组织SIRT1、FOXO1蛋白荧光强度比较 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Comparison of fluorescence intensities of SIRT1 and FOXO1 proteins in brain tissue of rats in each group ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

能障碍，呼吸链和膜电位受损，导致能量生成障碍，大量产生超氧化物等活性氧，破坏细胞内氧化还原平衡，损伤生物大分子，加剧细胞死亡^[11-12]。在继发性脑损伤中，活性氧通过促炎、破坏血脑屏障等机制来损害中枢神经系统，阻碍神经修复^[13-14]。研究表明，褪黑素或依达拉奉等抗氧化剂可抑制氧化应激，改善线粒体功能，从而减轻神经损伤，促进功能恢复^[15]。本研究也证实，依达拉奉及安脑平冲方具有类似保护作用。

抗氧化酶 SOD、CAT、GPX 等能清除过量活性氧，从而保护线粒体功能，维持细胞内氧化还原平衡^[16]。同时，SOD 能调节 GSK-3 β 、Drp1 相关通路，通过减少线粒体分裂和细胞色素 C 产生来减轻线粒体功能障碍引起的细胞损伤^[17]。本研究发现，安脑平冲方通过提升抗氧化酶（不含 GPX4）活性与表达，从而缓解了脑组织氧化应激；该方虽增强了 GPX 总活性，但未改变其亚型 GPX4 表达，可能与不同同工酶的亚细胞定位差异有关，GPX4 通常定位在线粒体中^[18]，而其他 GPX 同工酶可能在细胞质或其他位置中发挥作用。

SIRT1 是一种去乙酰化酶，主要通过去乙酰化修饰蛋白质来调控细胞内生理功能^[19]。磷酸化修饰后的 SIRT1 增加了 Ac-FOXO1 的去乙酰化修饰，形成活性 FOXO1^[20]，从而促进抗氧化酶的基因转录和蛋白表达，参与调控细胞的氧化应激反应和抗氧化防御^[21-22]。本研究结果显示，安脑平冲方通过上调 SIRT1、FOXO1 表达，促进 SIRT1 磷酸化及 FOXO1 去乙酰化，从而增强抗氧化酶活性，减轻脑出血后脑损伤；使用 SIRT1 抑制剂 EX527 后该方疗效减弱，表明其神经保护作用依赖于 SIRT1 信号通路。值得注意的是，SIRT1 激活剂白藜芦醇是安脑平冲方中白藜芦醇所含成分，可通过 SIRT1/PI3K-Akt 通路来激活 FOXO1，从而改善线粒体功能^[23]，可能是大鼠给予安脑平冲方干预后其脑组织 SIRT1、FOXO1 表达增加的重要原因。

安脑平冲方是根据“冲脉”理论创制的临床经验方，临床疗效确切^[24]，具有抗炎、抗脑水肿作用^[10]。方中白藜芦醇^[23]、甘草酸^[25]、黄芩苷^[26]、芍药苷^[27]等成分能增加 SIRT1 活性和表达，从而缓解细胞炎症和氧化应激；黄芩苷、芍药苷、钩藤碱等成分能减轻脑出血后线粒体损伤和铁沉积，抑制细胞氧化应激，从而发挥神经保护作用^[28-30]。

综上所述，脑出血后脑组织神经元存在明显的

氧化应激反应，而安脑平冲方能明显改善脑出血大鼠神经功能缺损，并抑制神经元线粒体功能障碍导致的脑内氧化应激损伤，其机制与 SIRT1-FOXO1 信号通路激活后促进抗氧化酶活性和表达有关，可能是该方防治脑出血的重要分子机制，为中医药防治相关疾病的多通路、多靶点研究和临床应用提供了实验依据。

参考文献：

- [1] Ren H, Han R, Chen X, et al. Potential therapeutic targets for intracerebral hemorrhage-associated inflammation: An update[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2020, 40(9): 1752-1768.
- [2] Seiffge D J, Fandler-Höfler S, Du Y, et al. Intracerebral haemorrhage—mechanisms, diagnosis and prospects for treatment and prevention[J]. *Nat Rev Neurol*, 2024, 20(12): 708-723.
- [3] Chen Y, Chen S, Chang J, et al. Perihematomal edema after intracerebral hemorrhage: an update on pathogenesis, risk factors, and therapeutic advances[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 740632.
- [4] Wu Z, Qu J, Zhang W, et al. Stress, epigenetics, and aging: unraveling the intricate crosstalk[J]. *Mol Cell*, 2024, 84(1): 34-54.
- [5] Xing Y Q, Li A, Yang Y, et al. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression[J]. *Life Sci*, 2018, 193: 124-131.
- [6] Zhao P, Lu Y, Wang Z. Naringenin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/FOXO1 signaling pathway in vitro[J]. *Acta Cir Bras*, 2023, 38: e380823.
- [7] Jalgaonkar M P, Parmar U M, Kulkarni Y A, et al. SIRT1-FOXOs activity regulates diabetic complications[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106014.
- [8] Zhou Y, Wang S, Li Y, et al. SIRT1/PGC-1 α signaling promotes mitochondrial functional recovery and reduces apoptosis after intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 10: 443.
- [9] Guo C, Zhou X, Wang X, et al. Annao Pingchong decoction alleviate the neurological impairment by attenuating neuroinflammation and apoptosis in intracerebral hemorrhage rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 310: 116298.
- [10] Wang X, Lin X, Chen Z, et al. Annao Pingchong decoction attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis following intracerebral hemorrhage via RAGE-NOX2/4 axis[J]. *Front Neurosci*, 2024, 18: 1491343.
- [11] Naznin F, Waise T, Fernyhough P. Antagonism of the muscarinic acetylcholine type 1 receptor enhances mitochondrial membrane potential and expression of respiratory chain components via AMPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells and primary neurons[J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(11):

- 6754-6770.
- [12] Masuda D, Nakanishi I, Ohkubo K, *et al.* Mitochondria play essential roles in intracellular protection against oxidative stress-which molecules among the ROS generated in the mitochondria can escape the mitochondria and contribute to signal activation in cytosol? [J]. *Biomolecules*, 2024, 14(1): 128.
- [13] Juan C A, Pérez de la Lastra J M, Plou F J, *et al.* The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9): 4642.
- [14] Zhang Y, Khan S, Liu Y, *et al.* Oxidative stress following intracerebral hemorrhage: from molecular mechanisms to therapeutic targets[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 847246.
- [15] Wang Z, Zhou F, Dou Y, *et al.* Melatonin alleviates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury in rats *via* suppressing apoptosis, inflammation, oxidative Stress, DNA damage, and mitochondria injury[J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(1): 74-91.
- [16] Liu B, Cao Y, Wang D, *et al.* Zhen-Wu-Tang induced mitophagy to protect mitochondrial function in chronic glomerulonephritis *via* PI3K/AKT/mTOR and AMPK pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 777670.
- [17] 李 卓, 陈梦璇, 汪苇杭, 等. Mn-SOD 通过 GSK-3 β 影响 HO-1 和 Drp1 的抗氧化应激减轻 MTX 相关肝细胞损伤[J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2022, 47(9): 1191-1199.
- [18] Tadokoro T, Ikeda M, Ide T, *et al.* Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(9): e132747.
- [19] Zhang W, Feng Y, Guo Q, *et al.* SIRT1 modulates cell cycle progression by regulating CHK2 acetylation-phosphorylation[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(2): 482-496.
- [20] Yao C, Guo G, Huang R, *et al.* Manual therapy regulates oxidative stress in aging rat lumbar intervertebral discs through the SIRT1/FOXO1 pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(5): 2400-2417.
- [21] Sun D, Chen S, Li S, *et al.* Enhancement of glycolysis-dependent DNA repair regulated by FOXO1 knockdown *via* PFKFB3 attenuates hyperglycemia-induced endothelial oxidative stress injury[J]. *Redox Biol*, 2023, 59: 102589.
- [22] Chen L, Xu W, Zhang Y, *et al.* Gandouling alleviates nerve injury through PI3K/Akt/FoxO1 and Sirt1/FoxO1 signaling pathway to inhibit autophagy in the rats model of Wilson's disease[J]. *Brain Behav*, 2023, 13(12): e3325.
- [23] Zhang Z, Tian J, Liu W, *et al.* Perfluorooctanoic acid exposure leads to defect in follicular development through disrupting the mitochondrial electron transport chain in granulosa cells[J]. *Sci Total Environ*, 2023, 905: 166954.
- [24] 周德生, 李煦昀, 林萃才, 等. 冲脉理论在出血性中风治疗中的运用[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(3): 521-522.
- [25] Qiong H, Han L, Zhang N, *et al.* Glycyrrhizin improves the pathogenesis of psoriasis partially through IL-17A and the SIRT1-STAT3 axis[J]. *BMC Immunol*, 2021, 22(1): 34.
- [26] Zhu Z, Yu M, Xu M, *et al.* Baicalin suppresses macrophage JNK-mediated adipose tissue inflammation to mitigate insulin resistance in obesity[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 332: 118355.
- [27] Li L, Wang H, Zhao S, *et al.* Paeoniflorin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting oxidative stress and inflammation *via* SIRT1/FOXO1a/SOD2 signaling in rats[J]. *Phytother Res*, 2022, 36(6): 2558-2571.
- [28] Duan L, Zhang Y, Yang Y, *et al.* Baicalin inhibits ferroptosis in intracerebral hemorrhage[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 629379.
- [29] Ren S, Wang Y, Zhang Y, *et al.* Paeoniflorin alleviates AngII-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells by regulating oxidative stress and Nrf2 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115253.
- [30] Zhang Y, Sun J, Zhu S, *et al.* The role of rhynchophylline in alleviating early brain injury following subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Brain Res*, 2016, 1631: 92-100.