

· 经典名方 ·

## 基于铁死亡途径的侯氏黑散对缺血性脑卒中后骨骼肌损伤的 药效机制

祁琥<sup>1,2</sup>, 田丹<sup>3</sup>, 张雄伟<sup>1,2</sup>, 张泽洋<sup>1,2</sup>, 高元琳<sup>1,2</sup>, 姜燕宁<sup>1,2</sup>, 闵欣然<sup>1,2</sup>, 邹嘉敏<sup>1,2</sup>,  
曾九僧<sup>1,2</sup>, 曾南<sup>1,2\*</sup>, 杨若聪<sup>1,2\*</sup>

(1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 成都中医药大学西南特色中药资源国家重点实验室,  
成都 611137; 3. 成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 611137)

**【摘要】** 目的: 基于侯氏黑散(HSHS)“治大风, 四肢烦重”记载通过铁死亡途径探讨该方改善线栓法大鼠大脑中动脉阻断实验(MCAO)后肌肉组织损伤的药效作用。方法: 选用SD雄性大鼠作为研究载体, 共30只, 随机分为假手术组(Sham)、MCAO组、甲磺酸去铁胺组(DM)、HSHS高剂量组(HSHS-H, 0.54 g·kg<sup>-1</sup>)、HSHS低剂量组(HSHS-L, 0.27 g·kg<sup>-1</sup>), 每组6只。采用激光散斑系统评价MCAO模型稳定性, 连续灌胃给药7 d。给药期间, 采用行为学、影像学等实验方法, 系统评价MCAO后骨骼肌组织损伤及各给药组改善效果。采用苏木素-伊红(HE)染色法评价肌肉细胞横截面。采用免疫组化(IHC)检测比目鱼肌组织肿瘤蛋白53(p53)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4), 评估各给药组干预效果。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测GPX4、p53、成肌分化蛋白(MyoD1)、核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)、肌肉生长抑制素(Myostatin)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶1(MuRF1)和肌肉萎缩F盒蛋白(MAFbx)表达水平, 验证各组药物的改善效果。结果: 与MCAO组比较, HSHS可以增强卒中后大鼠运动能力, 促进肌肉再生, 提示其药理作用与抑制肌肉组织铁死亡来减少肌肉萎缩因子表达有关。行为学和影像学结果提示, 与MCAO组比较, HSHS可在第7天显著改善大鼠神经功能损伤( $P < 0.01$ ), 增强大鼠5 min运动距离与姿态控制能力( $P < 0.01$ ), 增强抓握力和促进肌肉生长( $P < 0.01$ ); 并稳定骨骼肌长度与质量( $P < 0.01$ ), 增加肌肉细胞横截面( $P < 0.01$ )。与MCAO组比较, HSHS明显促进组织谷胱甘肽(GSH)和超氧化物歧化酶(SOD)含量增加, 并抑制丙二醛(MDA)增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 铁死亡途径相关检测提示, HSHS可抑制MCAO模型肌肉组织p53阳性细胞率, 同时增加GPX4阳性细胞率( $P < 0.01$ )。HSHS通过促进GPX4、Nrf2、SLC7A11、MyoD1蛋白表达, 并抑制p53、Myostatin、MurRF1、MAFbx来减少肌肉铁死亡损伤来改善卒中后的肌肉功能下降( $P < 0.01$ )。结论: 参照《金匱要略》调服方式所制备的侯氏黑散, 可基于铁死亡途径同时降低缺血性脑卒中后骨骼肌的分解和增加骨骼肌组织内蛋白质的合成。

**【关键词】** 金匱要略; 侯氏黑散; 线栓法大鼠大脑中动脉阻断实验(MCAO); 铁死亡; 肌肉减少

**【中图分类号】** R259; R285; R242 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2025)20-0001-11

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfjx.20250143

**【网络出版地址】** <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250210.1631.004>

**【网络出版日期】** 2025-02-11 08:43:23 **【增强出版附件】** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



### Houshihei San Repairs Skeletal Muscle Injury After Ischaemic Stroke by Regulating Ferroptosis Pathway

QI Hu<sup>1,2</sup>, TIAN Dan<sup>3</sup>, ZHANG Xiongwei<sup>1,2</sup>, ZHANG Zeyang<sup>1,2</sup>, GAO Yuanlin<sup>1,2</sup>, JIANG Yanning<sup>1,2</sup>,  
MIN Xinran<sup>1,2</sup>, ZOU Jiamin<sup>1,2</sup>, ZENG Jiuse<sup>1,2</sup>, ZENG Nan<sup>1,2\*</sup>, YANG Ruocong<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;

**【收稿日期】** 2024-11-04

**【基金项目】** 国家自然科学基金青年科学基金项目(82104732); 2022年度“天府青城计划”天府名师项目(川青城第1206号); 四川省科技厅中央引导地方项目(2024ZYD0015)

**【第一作者】** 祁琥, 在读博士, 从事中药药效学与毒理学研究, E-mail: qihu@stu.cdutcm.edu.cn

**【通信作者】** \* 杨若聪, 讲师, 从事中药及中药复方药效研究, E-mail: yangruocong@163.com;

\* 曾南, 教授, 博士生导师, 从事中药药效学与毒理学研究, E-mail: 19932015@cdutcm.edu.cn

2. State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; 3. College of Acupuncture and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the pharmacodynamic effects of Houshihei San (HSHS) recorded with the effects of treating wind and limb heaviness on muscle tissue injury after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats through the ferroptosis pathway. **Methods:** Thirty SD male rats were selected and randomly grouped as follows: sham, MCAO, deferoxamine mesylate, high-dose HSHS (HSHS-H,  $0.54 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), and low-dose HSHS (HSHS-L,  $0.27 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), with 6 rats in each group. A laser scattering system was used to evaluate the stability of the MCAO model, and rats were administrated with corresponding agents by gavage for 7 days. During the administration period, behavioral, imaging and other methods were used to systematically evaluate the skeletal muscle tissue injury after MCAO and the therapeutic effect in each administration group. Hematoxylin-eosin staining was employed to evaluate the cross-section of muscle cells. Subsequently, immunohistochemistry was used to detect tumor suppressor p53 and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in the soleus tissue. Western blot was employed to determine the protein levels of p53, GPX4, myogenic differentiation 1 (MyoD1), nuclear factor E<sub>2</sub>-related factor 2 (Nrf2), Myostatin, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), muscle ring-finger protein-1 (MuRF1), and muscle atrophy F-box protein (MAFbx) to verify the therapeutic effect in each group. **Results:** Compared with the MCAO group, HSHS enhanced the locomotor ability and promoted muscle regeneration, which suggested that the pharmacological effects of HSHS were related to the inhibition of muscle tissue ferroptosis to reduce the expression of muscle atrophy factors. Behavioral and imaging results suggested that compared with the MCAO group, HSHS ameliorated neurological impairments in rats on day 7 ( $P<0.01$ ), enhanced 5-min locomotor distance and postural control ( $P<0.01$ ), strengthened grasping power and promoted muscle growth ( $P<0.01$ ), stabilized skeletal muscle length and weight ( $P<0.01$ ), and increased the cross-section of muscle cells ( $P<0.01$ ). Compared with the MCAO group, HSHS promoted the increases in glutathione and superoxide dismutase content and inhibited the increase in malondialdehyde content ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Ferroptosis pathway-related assays suggested that HSHS reduced the p53-positive cells and increased the GPX4-positive cells ( $P<0.01$ ). HSHS ameliorated muscle function decline after stroke by promoting the expression of GPX4, Nrf2, SLC7A11, and MyoD1 and inhibiting the expression of p53, Myostatin, MuRF1, and MAFbx to reduce ferroptosis in the muscle ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** HSHS, prepared with reference to the method in the *Synopsis of Golden Chamber*, can simultaneously reduce the myolysis and increase the protein synthesis in the skeletal muscle tissue after ischemic stroke by regulating the ferroptosis pathway.

**[Keywords]** *Synopsis of Golden Chamber*; Houshihei San; middle cerebral artery occlusion (MCAO); ferroptosis; muscle loss

脑血管疾病是危害全球人类健康的“杀手”之一,其高致残率与致死率已成为当代科研和临床工作者关注的重点。在我国缺血性脑卒中(IS)患者占全部脑血管疾病的70%,其中55%~75%的脑卒中患者都存在肢体障碍<sup>[1]</sup>。肌肉的健康状态直接关系到卒中患者预后的生活质量。铁死亡最早由Dixon在2012年提出<sup>[2-3]</sup>,主要用于描述一种由于胱氨酸胞内转运受限,导致谷胱甘肽(GSH)的过度消耗与谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的失活发生的一种非正常细胞死亡<sup>[4]</sup>。铁死亡在这IS过程中扮演了重要角色<sup>[5]</sup>。

当前针对卒中与铁死亡的研究主要集中于如何减少栓塞带来神经损伤,缺乏改善卒中患者肢体症状的研究。最近的研究发现,铁死亡是一种重要的调节性细胞死亡<sup>[6]</sup>,可诱导骨骼肌细胞损伤死亡<sup>[7]</sup>。GSH作为肌肉组织中关键的抗氧化剂<sup>[8]</sup>,同时发挥增强肌肉的合成和抗衰的作用<sup>[9]</sup>,而GPX4可催化脂质氢过氧化物(L-OOH)转化为脂质醇(L-OH)来减少细胞增殖抑制作用同时减少活性氧

(ROS)在细胞膜上过度积累,来减少铁死亡损伤<sup>[10]</sup>。脑卒中引起的缺血和氧化应激增加了肌肉细胞内铁积累,促进脂质过氧化反应,破坏细胞膜,进而诱导铁死亡。这一过程通过影响GPX4和肿瘤蛋白53(p53)<sup>[11]</sup>等关键因子的变化,加剧铁积累。溶质载体家族7成员11(SLC7A11)和核因子E<sub>2</sub>相关因子2(Nrf2)蛋白表达变化在铁死亡信号通路中起到关键调节作用,进一步促进骨骼肌损伤<sup>[12]</sup>。肌肉生长抑制素(Myostatin)、肌肉细胞特异性泛素蛋白连接酶1(MuRF1)和肌肉萎缩F盒蛋白(MAFbx)作为肌肉萎缩的标志物已在众多研究中被证明<sup>[1,13-14]</sup>。针对卒中后肌肉铁死亡的研究尚为空白<sup>[15]</sup>,而GPX4与泛素化因子MaFbx和MuRF1在IS后肌肉中的变化机制可能是减少IS后肌肉萎缩具有前景的新方向<sup>[16]</sup>。本研究选用的阳性药物甲磺酸去铁胺(DM)是一种铁螯合剂,可与铁离子结合并作为解毒剂排出体外,被广泛用于减少铁在组织中的积累和沉积<sup>[10]</sup>。因此减少IS后的肌肉铁死亡损伤,可能是缺血性脑卒中后骨骼肌损伤的潜在治疗靶点。

《金匱要略》中对脑卒中的记载证候为“大风”，是一种阳虚血虚，风邪乘虚直入中经络，病重而传变迅速的病证<sup>[17]</sup>，其中“风”指代直中肌肉、脏腑的外感风邪<sup>[18]</sup>。《金匱要略》中对卒中的描述为“夫风之为病，当半身不遂，或但臂不遂者，此为痹。脉微而数，中风使然”。痹证作为中风后的主要特征之一，而《金匱要略》中酒服侯氏黑散(HSHS)具有针对卒中患者“大风痹痛，四肢烦重”的描述<sup>[19]</sup>。HSHS中主要成分绿原酸、异绿原酸已被报道具有降低ROS水平、Fe<sup>2+</sup>含量和脂质过氧化水平来改善心肌细胞铁死亡的效果<sup>[3]</sup>。前期研究发现相比于水服HSHS，温酒服HSHS在改善卒中后肌肉功能降低方面效果更佳，但并未对具体机制进行研究<sup>[20]</sup>。所以本研究以大脑中动脉闭塞模型(MCAO)所致IS动物模型为研究载体，按照《金匱要略》中所载HSHS的调服方式，基于铁死亡途径，探讨此经典名方对IS后对骨骼肌损伤的改善效果，以期HSHS“治大风，四肢烦重”的功效记载提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 30只SPF级SD雄性大鼠购自斯贝福生物技术(北京)有限公司(编号110324241104693358)，动物合格证号SCXK(京)2019-0010。大鼠饲养在SPF环境中，温度22~25℃，相对湿度40%~60%，适应性喂养1周。实验操作按照成都中医药大学实验动物伦理委员会制定的动物护理和使用指南进行，并获得了委员会的科学和伦理批准，批准号2024054。

**1.2 药品** HSHS组成：菊花40g、白术10g、青防风10g、桔梗8g、黄芩5g、细辛3g、干姜3g、人参3g、茯苓3g、当归3g、川芎3g、牡蛎3g、矾石3g、桂枝3g，以上中药饮片均购自四川省中药饮片有限公司，批号分别为220322、20220115、20220217、220307-73、220415-71、220518、220208、20220419、20211118、220401、20220506、220302、20220108、20220501，经成都中医药大学中药鉴定教研室严铸云教授鉴定，符合2020年版《中华人民共和国药典》要求<sup>[21]</sup>。将HSHS 400g用高速粉碎机进行梯度粉碎，过200目筛，制成极细粉末，用35℃的米酒<sup>[20]</sup>配置为0.054g·mL<sup>-1</sup>的药液备用。DM(美国MedChemExpress公司，批号138-14-7)。

**1.3 试剂** 注射用盐酸四胺和盐酸唑拉西洋(法国Virbac公司，批号#BN8LXLA)；胶原酶II(中国翌圣生物科技有限公司，批号40508ES76)；丙二醛

(MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒、GSH检测试剂盒、ROS检测试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司，批号分别为S0131S、S0101S、S0053、S0033S)；GPX4、p53、SLC7A11、原肌球蛋白调节蛋白(MyoD1)、Myostatin、MuRF1、MAFbx抗体(中国武汉三鹰生物技术有限公司，批号分别为67763-1-Ig、10442-1-AP、26864-1-AP、18943-1-AP、19142-1-AP、55456-1-AP、67172-1-Ig)；Nrf2抗体(美国CST公司，批号12721T)；磷酸化(p)-Nrf2(英国Abcam公司，批号ab76026)；甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(中国Servicebio公司，批号GB11002)；苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司，批号G1120)。

**1.4 仪器** Theromo3030型全波长多功能酶标仪、SA101B型小动物跑步机(中国SANS公司)；RFLSIⅢ型激光散斑活体系统(中国RFLSIⅢ瑞沃德公司)；FACSCantoⅡ型流式细胞仪(美国BD公司)；HSHS6型病理切片扫描仪(中国LT-DPTOP公司)；JB-P5型包埋机、TP1020型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)；Touch Image型接触式化学发光成像系统(中国E-lab公司)。

## 2 方法

**2.1 MCAO模型的制备和给药** 根据体质量将30只大鼠随机分为5组，每组6只：假手术组(Sham)、MCAO组、DM组，HSHS高剂量组(HSHS-H)、HSHS低剂量组(HSHS-L)。除Sham组外其余组根据参考文献所示方法进行MCAO造模<sup>[22]</sup>。Sham组与MCAO组大鼠灌胃纯水，其余组灌胃相应浓度药液。大鼠按照每100g体质量给药1mL计算。大鼠灌胃剂量换算以成人人口服剂量3g·70kg<sup>-1</sup>为标准；HSHS-H为0.54g·kg<sup>-1</sup>，HSHS-L为0.27g·kg<sup>-1</sup>，送服按照《金匱要略》送服方式<sup>[20]</sup>，辅以35℃的米酒<sup>[20]</sup>。DM腹腔注射，给药剂量100mg·kg<sup>-1</sup><sup>[23-24]</sup>。

**2.2 MCAO模型稳定性评价** MCAO模型制备稳定性的评价采用激光散斑系统监测梗死侧的脑灌注，以各手术组梗死侧血流灌注无显著差异为标准。将麻醉且造模后的动物平放于采集板上，小心剪开头皮组织暴露头骨。系统按照以下参数调整：自动曝光，50Hz，波长671nm，max分辨率。采集的图像用平均灌流量(ROI)分析<sup>[15]</sup>。

**2.3 神经功能损伤评价(Zea-Longa评分)** 在MCAO术后第1、3、5、7天，对大鼠神经功能损伤进行评估。将各组动物置于测评场内适应5min，然后采用Zea-Longa 5级评分法。无损伤：0分；抬起时

左前爪不能完全伸展,1分;缓慢爬行和向对侧倾斜,2分;只有在受到刺激时才能行走且意识水平下降,3分;对刺激无反应,4分<sup>[20]</sup>。

**2.4 运动功能检测** 在MCAO术后第1、3、5、7天检测大鼠拉力,使用小动物拉力握力仪检测;让大鼠抓持在握力架上,拉动鼠尾,待大鼠离开拉力框时记录最大拉力。对各组大鼠分别进行3次连续记录,并计算其平均值。大鼠运动功能用小动物跑步机评估,参数为刺激电流1.50 mA,跑道速度 $10\text{ m}\cdot\text{min}^{-1}$ ,监测时间5 min,开启力竭刺激,采集结束记录数据。

**2.5 术后肢体平衡性检测** 在MCAO术后第1、3、5、7天使用双排平衡木检测大鼠后肢协调性,两根平衡杆直径1 cm、长115 cm、间距2.5 cm,末端置于水平面上;记录3 min内一只后爪掉下平衡杆或摔倒、摇摆的次数同时记录大鼠的抓握稳定时间。

**2.6 肌肉超声检测** 在MCAO术后第1和第7天通过超声监测大鼠肌肉厚度,使用异氟烷麻醉大鼠后,将大鼠置于水平架上保持侧躺释放大鼠后肢肌肉压力,探头 $45^\circ$ 检测大鼠患侧肌肉厚度;Vevo 3100小动物超声系统参数设置为肌肉扫描模式、100%电源使用比例、21 MHz、50 FPS、20 dB;采用 $45^\circ$ 平稳扫描肌肉系统抓拍模式。图片数据采集后使用Vevo Analysis软件分析。

**2.7 比目鱼肌的长度和质量检测** 在进行MCAO手术后的第7天,使用舒泰50麻醉各组大鼠,呈仰卧位固定;通过腹主动脉收集大鼠血液后,用玻璃钩小心剥离皮肤与肌肉并分离比目鱼肌,过程中注意避免人为拉伸损伤。所有组别大鼠比目鱼肌分别进行称质量、长度测量并记录后50%固定于4%多聚甲醛中备用,余下50%于液氮冻存储备用。

**2.8 HE染色检测比目鱼肌横截面积** 将固定在4%的多聚甲醛溶液中72 h后的比目鱼肌,按生产商的说明书进行HE染色,封片后在病理切片扫描仪下( $40\times$ )进行观察并记录。使用Image J进行肌肉横截面分析。

**2.9 吸光光度法检测比目鱼肌MDA、SOD、GSH水平** MDA检测方法:取比目鱼肌20 mg匀浆,加MDA工作液0.2 mL,100 °C加热15 min后冷却,1 000×g离心10 min(离心半径16.5 cm,下同),取上清200 μL用酶标仪在532 nm处测吸光度A。GSH检测方法:取液氮研磨的组织粉末10 mg,加入试剂盒配套提取液30 μL,涡旋混匀后,匀浆,4 °C静置10 min,10 000×g离心10 min,取上清测定GSH含

量。SOD检测方法:取比目鱼肌10 mg,加SOD制备液100 μL,4 °C匀浆,12 000×g离心3~5 min,取上清按试剂盒说明书检测总SOD活性。

**2.10 免疫组化检测比目鱼肌肌肉萎缩因子表达** 将固定于4%多聚甲醛中的比目鱼肌嵌入石蜡中并在相似位置沿横截面切成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 的切片,随后将摊在玻片上的石蜡片进行脱蜡、抗原、修复、阻断、封闭、一抗(p53和GPX4,稀释比均为1:400)4 °C孵育过夜;孵育二抗后用DAB显色、复染细胞核、脱水后封固,使用显微镜拍照后编号记录。使用Image J软件分析,细胞核为蓝色,阳性表达区域为棕色。

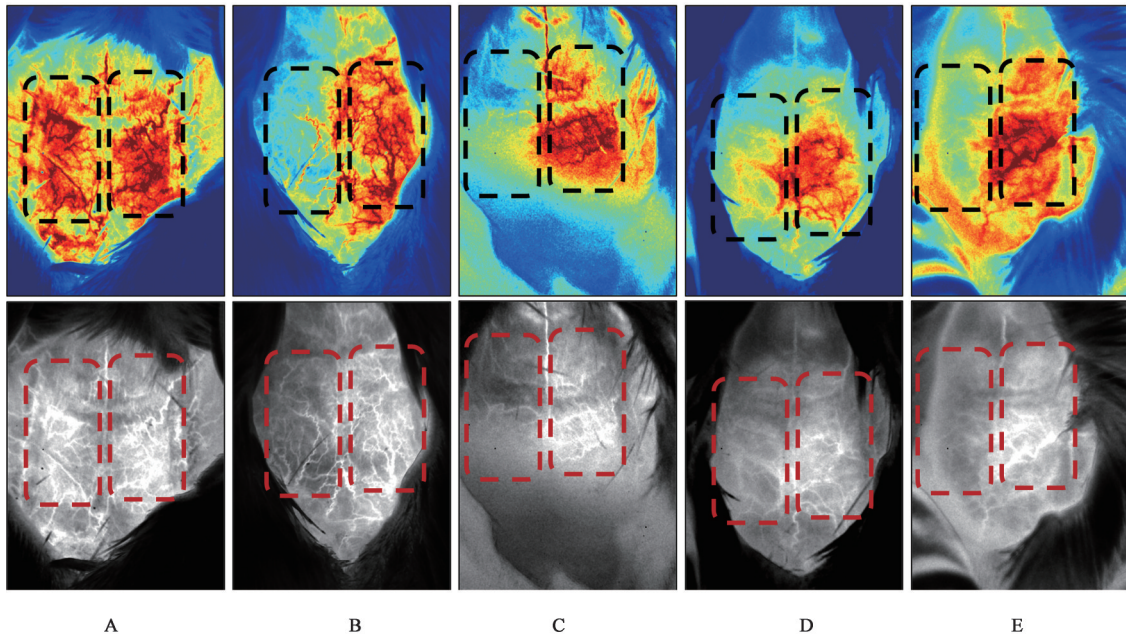
**2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肌肉组织MyoD1、Myostatin、MAFbx、MuRF1、SLC7A11、p-Nrf2蛋白表达** 对比目鱼肌组织进行免疫印迹分析。使用RIPA裂解大鼠比目鱼肌,并使用BCA测定蛋白质浓度并调整至一致浓度。样品在凝胶上电泳分离,然后用甲醇活化的PVDF膜转膜。用5%的BSA封闭PVDF膜40 min,26 °C封闭1.5 h;用特异性一抗MyoD1、Myostatin、MuRF1、SLC7A11(1:2 000),MAFbx(1:20 000),p-Nrf2(1:10 000),GAPDH(1:4 000),4 °C孵育12 h;用1×TBST洗膜5次共0.5 h后,用HRP标记二抗(1:5 000)26 °C孵育50 min,用1×TBST洗涤5次。使用化学发光试剂盒显影,用Image Lab 3.0和SPSS进行定量分析。

**2.12 统计学分析** 采用SPSS 21.0对数据进行统计分析,所有数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 进行表示,若数据符合正态分布,则采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及最小显著性差异法(LSD)检验组间差异;数据不符合正态分布或方差不齐,采用非参检验进行数据分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 MCAO模型稳定性评价** 在MCAO模型制备过程中使用激光散斑系统对所有动物进行梗死程度评价,左侧大脑血液灌注正常,右侧大脑出现缺血症状;并且与Sham组比较其余组梗死程度具有显著差异( $P<0.01$ ),且组间差异无统计学意义,证明MCAO模型造模成功。见图1、表1。

**3.2 HSHS对MCAO大鼠神经功能的影响** 与Sham组比较,从第1天起各造模组大鼠Zea-Longa评分显著升高( $P<0.01$ ),提示模型成功。第3天时HSHS-H组明显改善了大鼠神经功能损伤( $P<0.05$ ),但第5天这种改善效果没有进一步显著提升。第7天时,与MCAO组比较,DM组、HSHS-H



注: A. Sham组; B. MCAO组; C. DM组; D. HSHS-H组; E. HSHS-L组(图2-图5同)

图1 HSHS对MCAO大鼠左右脑灌注流量的影响

Fig. 1 Effect of HSHS on cerebral perfusion flow of right and left brain in MCAO rats

表1 HSHS对MCAO大鼠左右脑灌注流量的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of HSHS on cerebral perfusion flow of right and left brain in MCAO rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ ) PU

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	右脑灌注量	左脑灌注量
Sham组		1 200.00±72.28	1 205.60±76.59
MCAO组		1 163.40±63.01	739.80±44.44 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	1 169.00±47.43	748.60±47.29 <sup>1)</sup>
HSHS-H组	0.54	1 225.60±64.40	698.40±62.55 <sup>1)</sup>
HSHS-L组	0.27	1 232.20±56.74	726.00±81.81 <sup>1)</sup>

注: 与Sham组比较<sup>1)</sup>P<0.01; 与MCAO组比较<sup>2)</sup>P<0.05, <sup>3)</sup>P<0.01(表2-表10同)

表2 HSHS对MCAO大鼠Zea-Longa评分的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of HSHS on Zea-Longa scores in MCAO rats ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	第1天	第3天	第5天	第7天
MCAO组		3.80±0.45 <sup>1)</sup>	3.80±0.45 <sup>1)</sup>	3.40±0.55 <sup>1)</sup>	4.00±0.00 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	3.80±0.45 <sup>1)</sup>	3.80±0.45	2.40±0.55 <sup>2)</sup>	1.60±0.55 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	3.80±0.55 <sup>1)</sup>	2.80±0.84 <sup>2)</sup>	2.40±0.55 <sup>2)</sup>	1.80±0.45 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	3.80±0.45 <sup>1)</sup>	3.20±0.84	2.80±0.84	2.00±0.71 <sup>3)</sup>

注: Sham组各时间点评分均为0

**3.4 HSHS对MCAO大鼠拉力的影响** 与Sham组比较,各造模组大鼠拉力在术后出现显著降低(P<0.01),在第3~5天时最为显著(P<0.01);与MCAO组比较,第5天HSHS-H组大鼠拉力显著增加(P<0.01),第7天各给药组大鼠拉力均显著增加(P<0.01),并且HSHS-H组效果最佳,说明高剂量的HSHS可以显著提示卒中后动物的拉力水平。

组和HSHS-L组均显著改善了大鼠神经功能损伤,差异有统计学意义(P<0.01),并且HSHS-H效果最佳。见表2。

**3.3 HSHS对MCAO大鼠单位时间运动距离的影响** 与Sham组比较,术后第1天各造模组大鼠运动能力显著降低(P<0.01),这种运动耐力的损失一直持续到第3天;第5、7天,与MCAO组比较,各给药组大鼠单位时间运动距离得到了显著提高(P<0.01),提示侯氏黑散具有改善MCAO大鼠运动能力的效果。见表3。

见表4。

**3.5 HSHS对MCAO大鼠平衡能力的影响** 与Sham组比较,各造模组大鼠在术后第1~3天肢体稳定性都显著降低(P<0.01);与MCAO组比较,从第3天开始HSHS-H与HSHS-L组大鼠在平衡木上摇摆次数开始减少(P<0.01),第7天最为明显;与MCAO组比较,在第7天时给药组大鼠的稳定时间显著升高,

表3 HSHS对MCAO大鼠5 min内运动距离的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1天	第3天	第5天	第7天
Sham组		50.00±0.00	50.00±0.00	50.00±0.00	50.00±0.00
MCAO组		9.92±1.83 <sup>1)</sup>	7.72±2.27 <sup>1)</sup>	8.60±1.80 <sup>1)</sup>	7.30±0.31 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	11.00±2.34	10.22±2.91	20.88±4.41 <sup>3)</sup>	22.98±3.57 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	10.84±2.86	9.22±2.49	17.18±2.86 <sup>3)</sup>	21.06±3.64 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	11.12±2.13	9.16±2.69	15.82±4.66 <sup>3)</sup>	19.12±3.61 <sup>3)</sup>

表4 HSHS对MCAO大鼠拉力强度的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1天	第3天	第5天	第7天
Sham组		1 548.60±118.75	1 701.40±70.61	1 672.80±136.67	1 682.60±97.99
MCAO组		950.80±90.41 <sup>1)</sup>	784.00±100.09 <sup>1)</sup>	813.20±44.84 <sup>1)</sup>	677.80±40.70 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	1 017.80±123.68	812.80±137.44	909.60±99.86	1 030.00±109.09 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	1 002.20±59.11	885.60±44.65	1 059.40±99.38 <sup>2)</sup>	1 162.00±64.80 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	920.40±64.40	829.60±70.17	919.20±37.00	1 082.80±77.55 <sup>3)</sup>

差异有统计学意义( $P<0.01$ ),这可能与HSHS改善了大鼠肌力有关。见表5。

表5 HSHS对MCAO大鼠平衡木摇摆次数和稳定时间的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	摇摆次数/次				稳定时间/s			
		第1天	第3天	第5天	第7天	第1天	第3天	第5天	第7天
Sham组		1.20±1.64	1.40±2.19	1.40±1.14	1.00±1.22	180.00±0.00	180.00±0.00	180.00±0.00	180.00±0.00
MCAO组		24.40±8.91 <sup>1)</sup>	27.60±7.37 <sup>1)</sup>	35.60±6.58 <sup>1)</sup>	37.80±5.93 <sup>1)</sup>	120.40±14.15 <sup>1)</sup>	103.00±10.12 <sup>1)</sup>	81.40±11.82 <sup>1)</sup>	67.60±9.13 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	25.40±5.41	28.40±5.32	18.20±2.49 <sup>3)</sup>	11.60±4.04 <sup>3)</sup>	124.20±8.35	102.60±7.64	90.80±9.52	106.20±13.63 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	27.60±4.39	30.40±3.85	20.60±7.54 <sup>3)</sup>	10.80±4.92 <sup>3)</sup>	122.60±13.11	108.00±12.14	106.40±12.58 <sup>3)</sup>	117.80±15.51 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	25.00±5.52	30.00±8.97	21.20±5.89 <sup>3)</sup>	15.40±6.91 <sup>3)</sup>	123.20±15.21	105.40±13.69	98.80±11.99 <sup>2)</sup>	108.80±10.18 <sup>3)</sup>

3.6 HSHS对MCAO大鼠肌肉损失的影响 与Sham组比较,各造模组大鼠在MCAO手术后第1天肌肉厚度无显著差异。与Sham组比较,在第7天时MCAO组肌肉厚度显著降低( $P<0.01$ );与MCAO组比较,HSHS-H组肌肉厚度明显增加( $P<0.05$ ),并且HSHS-H组效果优于DM组。提示酒服HSHS具有改善卒中后肌肉减少的作用。见表6及增强出版附加材料。

3.7 HSHS对MCAO大鼠肌肉长度与质量的影响 与Sham比较,MCAO组比目鱼肌质量与长度都显著降低( $P<0.01$ )。与MCAO组比较,HSHS-H与HSHS-L明显减少了卒中后大鼠肌肉长度与质量的损失( $P<0.05$ ),并且HSHS-H改善效果显著( $P<0.01$ ),将肌肉长度与质量分别恢复至Sham组的71.99%和78.57%,说明酒服高剂量的HSHS改善卒中后大鼠肌肉重量和长度效果更佳。与Sham组比

表6 HSHS对MCAO大鼠肌肉厚度的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	第1天	第7天
Sham组		11.22±0.78	11.98±1.20
MCAO组		12.17±0.94	7.34±0.75 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	11.65±0.91	9.76±1.11 <sup>2)</sup>
HSHS-H组	0.54	11.56±1.16	10.19±1.88 <sup>2)</sup>
HSHS-L组	0.27	11.73±1.03	8.74±1.66

较,MCAO组大鼠比目鱼肌肌肉细胞横截面在术后第7天显著降低( $P<0.01$ ),并且伴随组织炎性浸润与细胞间隙扩大,细胞核部分内移与细胞形态改变。与MCAO组比较,HSHS-H与HSHS-L组肌肉细胞横截面得到显著改善,差异具有统计学意义( $P<0.01$ ),并且HSHS-H组对细胞形态与间隙也有显著效果。在减少细胞间炎性浸润方面DM组效果

更佳,这可能与DM直接抑制组织铁死亡有关。见 图2、表7。

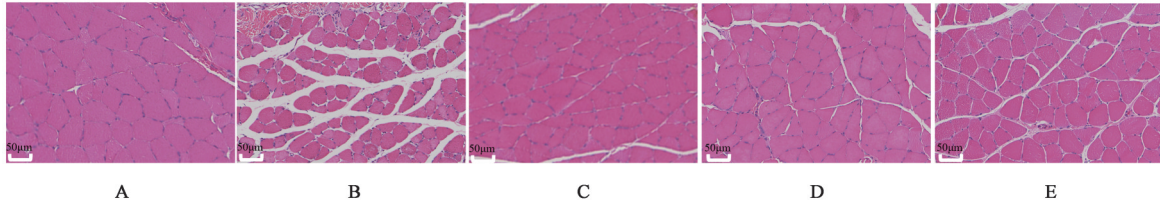


图2 HSHS对MCAO大鼠肌肉细胞横截面积的影响(HE,×40)

Fig. 2 Effect of HSHS on muscle cell cross-sectional area in MCAO rats (HE,×40)

表7 HSHS对MCAO大鼠肌肉长度与质量、细胞横截面积的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 7 Effect of HSHS on muscle length and weight, cell cross-sectional area in MCAO rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	肌肉长度/mm	肌肉质量/g	细胞横截面积/µm <sup>2</sup>
Sham组		21.28±2.06	0.14±0.01	2 716.47±89.97
MCAO组		11.52±2.21 <sup>1)</sup>	0.08±0.01 <sup>1)</sup>	1 569.67±66.30 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	15.74±2.42 <sup>3)</sup>	0.12±0.02 <sup>3)</sup>	2 346.73±115.40 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	15.32±1.95 <sup>3)</sup>	0.11±0.02 <sup>3)</sup>	2 260.00±98.42 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	14.23±0.84 <sup>2)</sup>	0.09±0.01 <sup>2)</sup>	2 128.40±134.15 <sup>3)</sup>

### 3.8 HSHS对MCAO大鼠肌肉铁死亡关键因子的影响

与Sham组比较,MCAO组肌肉组织中MDA含量显著升高( $P<0.01$ ),并且GSH和SOD水平显著降低( $P<0.01$ ),说明组织抗氧化能力降低。与

MCAO比较,DM组、HSHS-H组和HSHS-L组显著抑制了肌肉中MDA上调( $P<0.01$ ),并促进了GSH和SOD水平的增加。说明HSHS能够通过增强肌肉细胞抗氧化能力来改善卒中后肌肉损伤。见表8。

表8 HSHS对MCAO大鼠肌肉GSH、MDA、SOD水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

Table 8 Effect of HSHS on muscle GSH, MDA and SOD contents in MCAO rats ( $\bar{x}\pm s, n=5$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GSH/g·L <sup>-1</sup>	MDA/µmol·g <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>
Sham组		123.99±13.48	2.05±0.43	8.14±3.05
MCAO组		67.89±19.78 <sup>1)</sup>	8.28±2.41 <sup>1)</sup>	1.77±0.78 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	113.62±20.65 <sup>3)</sup>	2.57±0.67 <sup>3)</sup>	7.66±1.72 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	109.29±31.99 <sup>3)</sup>	2.94±0.97 <sup>3)</sup>	7.04±1.95 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	95.94±12.67 <sup>2)</sup>	3.26±0.54 <sup>3)</sup>	6.09±1.15 <sup>3)</sup>

### 3.9 HSHS对MCAO大鼠肌肉p53和GPX4的影响

与Sham组比较,MCAO组肌肉组织中促铁死亡关键因子p53表达显著升高( $P<0.01$ );与MCAO比较,DM组、HSHS-H组和HSHS-L组显著抑制肌肉中p53的上调( $P<0.01$ )。同时与Sham组比较,在MCAO造模后第7天肌肉细胞抗氧化关键因子GPX4表达显著降低( $P<0.01$ ),提示细胞铁死亡的发生。与MCAO组比较,第7天时给药组显著增加GPX4表达的肌肉细胞阳性率( $P<0.01$ ),说明HSHS能够通过增强肌肉细胞抗氧化来改善卒中后肌肉损伤。见图3、表9。

### 3.10 HSHS对MCAO大鼠铁死亡和肌肉萎缩关键因子的影响

与Sham组比较,MCAO组大鼠比目鱼肌铁死亡关键因子p-Nrf2、Nrf2、SLC7A11、GPX4

蛋白表达显著降低( $P<0.01$ ),p53蛋白表达显著升高( $P<0.01$ );提示组织铁死亡的发生。Myostatin、MaFbx、MuRF1表达显著升高( $P<0.01$ ),MyoD1表达显著降低( $P<0.01$ ),提示肌肉萎缩的发生。而HSHS-H和HSHS-L都显著促进Nrf2、p-Nrf2、SLC7A11、GPX4和MyoD1因子表达( $P<0.01$ ),并显著抑制p53、Myostatin、MaFbx、MuRF1表达( $P<0.01$ )。提示HSHS可以通过影响关键铁死亡因子来减少肌肉萎缩因子的表达改善卒中后的肌肉萎缩。见图4、表10。

## 4 讨论

研究显示,有三分之二的缺血性脑卒中患者都存在肢体运动障碍<sup>[1]</sup>。现阶段尚缺乏可靠的药物干预方案,现行各主要国家、组织临床诊疗指南中的

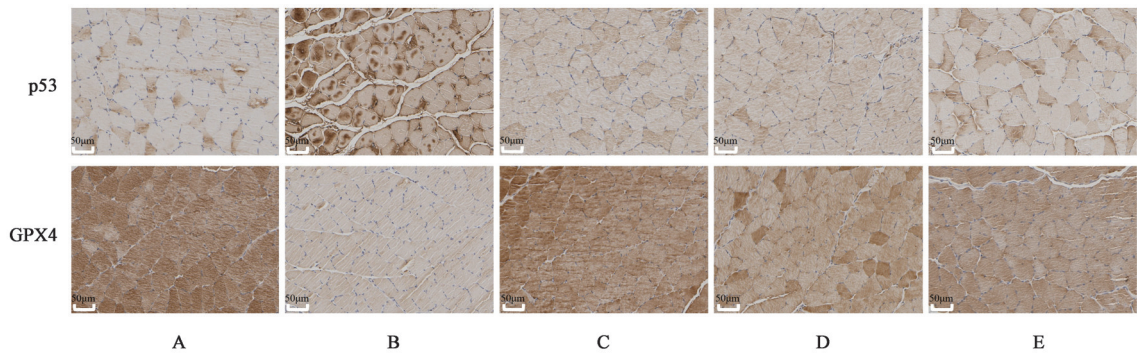


图3 HSHS对MCAO大鼠肌肉中p53和GPX4表达的影响(免疫组化,×40)

Fig. 3 Effect of HSHS on expression of p53 and GPX4 in muscle of MCAO rats (IHC, ×40)

表9 HSHS对MCAO大鼠肌肉中p53和GPX4表达的影响( $\bar{x}\pm s$ , n=6)

Table 9 Effect of HSHS on expression of p53 and GPX4 in muscle of MCAO rats ( $\bar{x}\pm s$ , n=6) %

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	p53阳性率	GPX4阳性率
Sham组		7.18±1.11	40.04±4.15
MCAO组		46.96±3.05 <sup>1)</sup>	10.73±1.60 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	17.98±6.02 <sup>3)</sup>	35.86±7.43 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	17.67±6.21 <sup>3)</sup>	32.45±3.66 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	21.34±3.99 <sup>3)</sup>	29.18±6.72 <sup>3)</sup>

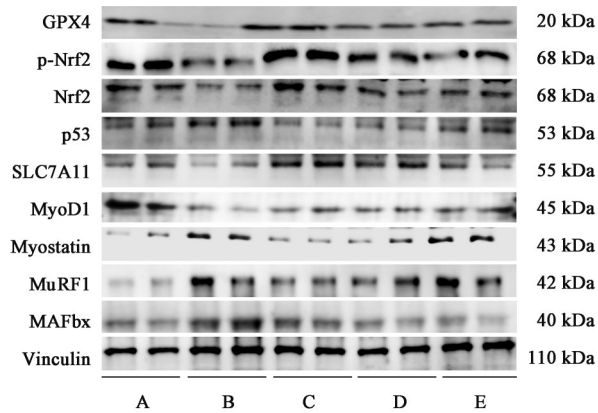


图4 MCAO大鼠肌肉铁死亡和萎缩因子相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of muscle ferroptosis and atrophic factors in MCAO rats

干预措施仍以理疗法为主<sup>[25-28]</sup>。中医药文化在针对脑卒中的康复治疗上有众多记载<sup>[29-30]</sup>,其中出自《金匱要略》中提到“治大风,四肢烦重”的HSHS就是针对脑卒中的经典名方。此方中菊花秋生,得金水之精,能制火而平木,木平则风息,火降则热除,故以为君;细辛、防风以祛风;黄芩、白术、人参健脾补气,对头晕目眩、四肢倦怠疗效明显;当归、川芎养血活血;茯苓通心气而行脾湿;桔梗以和膈气;干姜、桂枝助阳分而达四肢;牡蛎、矾石,酸敛涩收,又能化痰,解毒功效<sup>[31]</sup>。纵观HSHS的配伍,多味共

用,具有补脾胃,祛风邪,通血脉的功效<sup>[32]</sup>。从古至今,中成药以酒为引者颇多<sup>[33]</sup>。古方如薯蓣丸、肾气丸、天雄散等,后世方如活络丹、九分散、疏筋丸、七厘散等都可用黄酒送服<sup>[34-35]</sup>。同时HSHS作为《金匱要略》中的经典名方,以其独特的方后嘱“温酒调服”在卒中患者的康复治疗或其他“酒服”中药的疗效上是否具有增益效果是十分具有启发性的<sup>[20]</sup>。因此本研究基于传统记载与现有药理学研究基础,围绕HSHS“治大风,四肢烦重”的特点,阐述其改善卒中后肢体症状的药效作用与潜在机制。

当前对于脑卒中后的组织铁死亡损伤的研究主要集中于中枢健康,有报道指出在缺血性脑卒中动物模型中观察到不同程度的抗氧化剂GSH和GPX4活性的降低,ROS水平的升高,以及脑组织铁沉积现象<sup>[4,36]</sup>。在肌肉萎缩模型中检测到了过量积累的铁和脂质过氧化产物,这被认为是恶病质诱导的肌肉萎缩的主要原因之一<sup>[7]</sup>。在肌肉萎缩过程中,通过抑制系统Xc<sup>-</sup>的活性,可进一步减少GSH的合成并导致GPX4失活,从而显著降低组织的抗氧化能力。这一过程促进了脂质过氧化物的积累,并最终诱导铁死亡的发生。在ACSL4、LPCAT3以LOX的协同催化作用下,PUFA发生脂质过氧化反应,进而驱动铁死亡的进程<sup>[7]</sup>。铁死亡的关键因子SLC7A11含量降低伴随p53蛋白表达增加进一步MyoD1激活降低肌肉细胞的蛋白质合成<sup>[37]</sup>;同时p53作为关键因子促进肌肉萎缩标志物MuRF1和MAFbx的表达将促进肌肉蛋白质分解导致肌肉萎缩的发生<sup>[11]</sup>。而HSHS的众多有效成分已被报道具有对抗组织铁死亡的功效<sup>[38-39]</sup>,因此对HSHS改善铁死亡诱导的肌肉萎缩的进行进一步研究,可能为卒中后康复提供更多新的治疗靶点。

本研究结果显示,使用激光散斑归一化损伤状态后,HSHS可显著改善在体检测的各项指标。其

表10 HSHS对MCAO大鼠肌肉铁死亡和萎缩因子的影响( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 10 Effect of HSHS on muscle ferroptosis and atrophic factors in MCAO rats ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	GPX4/Vinculin	MAFbx/Vinculin	MuRF1/Vinculin	MyoD1/Vinculin	Myostatin/Vinculin
Sham组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
MCAO组		0.56±0.08 <sup>1)</sup>	1.71±0.09 <sup>1)</sup>	1.75±0.31 <sup>1)</sup>	0.59±0.07 <sup>1)</sup>	1.53±0.09 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	1.08±0.18 <sup>3)</sup>	1.07±0.14 <sup>3)</sup>	1.08±0.12 <sup>3)</sup>	1.09±0.03 <sup>3)</sup>	0.95±0.07 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	0.97±0.03 <sup>3)</sup>	0.99±0.11 <sup>3)</sup>	1.09±0.04 <sup>3)</sup>	0.99±0.06 <sup>3)</sup>	0.89±0.08 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	1.01±0.07 <sup>3)</sup>	0.93±0.16 <sup>3)</sup>	1.11±0.21 <sup>3)</sup>	0.91±0.08 <sup>3)</sup>	0.95±0.07 <sup>3)</sup>

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2/Vinculin	p-Nrf2/Vinculin	p53/Vinculin	MyoD1/Vinculin
Sham组		1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
MCAO组		0.53±0.01 <sup>1)</sup>	0.48±0.01 <sup>1)</sup>	1.65±0.14 <sup>1)</sup>	0.62±0.03 <sup>1)</sup>
DM组	0.10	1.11±0.03 <sup>3)</sup>	1.04±0.19 <sup>3)</sup>	0.98±0.05 <sup>3)</sup>	1.07±0.13 <sup>3)</sup>
HSHS-H组	0.54	1.04±0.06 <sup>3)</sup>	0.99±0.09 <sup>3)</sup>	1.13±0.05 <sup>3)</sup>	1.17±0.14 <sup>3)</sup>
HSHS-L组	0.27	0.79±0.10 <sup>3)</sup>	0.79±0.04 <sup>2)</sup>	1.12±0.21 <sup>3)</sup>	1.01±0.16 <sup>3)</sup>

中在增强拉力与姿态稳定性方面HSHS-H表现出了相比于其他治疗组更优秀的效果,这可能与HSHS中的药物富含多糖有关,这与先前的研究结果相似<sup>[40]</sup>。肌肉组织病理学的检测发现,HSHS高低剂量治疗组表现出了有效对抗MCAO术后的肌肉细胞横截面缩小的效果。同时与MCAO组相比HSHS-H组显著抑制了p53的表达和增强了GPX4的表达;Western blot结果也表现了一致的结果,提示HSHS能够通过增强组织氧化还原能力减少细胞铁死亡损伤。HSHS-H和HSHS-L通过激活Nrf2和p-Nrf2的表达,增强了抗氧化防御,抑制铁死亡相关的氧化损伤。Nrf2的激活进一步上调了SLC7A11和GPX4,协同减少了细胞内的过氧化物和脂质过氧化,减缓了铁死亡过程,保护了肌肉细胞。HSHS-H和HSHS-L上调了MyoD1,促进了肌肉修复与再生,改善了因铁死亡导致的肌肉萎缩。HSHS抑制了p53和Myostatin蛋白表达,减少了肌肉细胞凋亡和负向肌肉生长的信号,有效减缓了萎缩进程;与Sham组比较,MCAO组肌肉生长抑制因子Myostatin、MAFbx与MuRF1表达极显著升高提示IS后大鼠肌肉萎缩的发生;这种损伤在给药组治疗后得到了极显著改善,并且HSHS-H组效果最佳。这种效果可能与HSHS中丰富的绿原酸、异绿原酸和木犀草素等活性成分有关,这些成分已被报道有显著抑制细胞铁死亡、氧化应激和对抗肌肉萎缩的作用<sup>[41-42]</sup>。对各组大鼠比目鱼肌中的GSH、MDA、SOD含量检测发现,与Sham组相比MCAO组的GSH和SOD显著降,并且MDA含量显著上提示卒中后大鼠肌肉抗氧化系统的破坏,诱发脂质氧化应

激反应造成肌肉萎缩因子激活导致肌肉萎缩的发生,然而HSHS在稳定GSH、MDA、SOD含量变化方面表现出了明显作用,这可能与君药菊花中的众多抗氧化成分高度相关<sup>[43]</sup>。

综上所述,参照《金匱要略》调服方式所制备的HSHS显著改善了MCAO大鼠运动功能并促进体质量的恢复。HSHS通过增强抗氧化作用(提高GSH、MDA、SOD水平)来对抗铁死亡,降低肌肉萎缩因子的表达,从而促进肌肉恢复,为HSHS治疗卒中后肢体症状的进一步开发和临床应用提供了科学依据。然而,本研究仍有不足之处。尽管HSHS在动物模型中表现出显著效果,但是具体药效成分作用机制未完全阐明,尤其是活性单体对铁死亡与肌肉萎缩关键靶点的互作关系,因此接下来的研究将对HSHS具体关键活性单体的药效评价和作用机制进行深入探究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] QI H, TIAN D, LUAN F, et al. Pathophysiological changes of muscle after ischemic stroke: A secondary consequence of stroke injury[J]. *Neural Regen Res*, 2024, 19(4): 737-746.
- [2] CUI Y, ZHANG Y, ZHAO X, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuroinflammation[J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 93: 312-321.
- [3] 黄凯,李芳赫,唐家杨,等. 绿原酸通过减轻心肌细胞铁死亡改善心力衰竭(英文)[J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 11(2): 191-198.  
HUANG K, LI F H, TANG J Y, et al. Chlorogenic acid ameliorates heart failure by attenuating cardiomyocyte ferroptosis[J]. *J Tradit Chin Med*, 2024, 11(2): 191-198.

- [ 4 ] HU X, BAO Y, LI M, et al. The role of ferroptosis and its mechanism in ischemic stroke [J]. *Exp Neurol*, 2024, 372: 114630.
- [ 5 ] GUO J, TUO Q Z, LEI P. Iron, ferroptosis, and ischemic stroke [J]. *J Neurochem*, 2023, 165(4):487-520.
- [ 6 ] LIU X, WANG T, WANG W, et al. Emerging potential therapeutic targets of ferroptosis in skeletal diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:3112388.
- [ 7 ] WANG Y, ZHANG Z, JIAO W, et al. Ferroptosis and its role in skeletal muscle diseases [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 1051866.
- [ 8 ] JANG S, CHAPA-DUBOCQ X R, TYURINA Y Y, et al. Elucidating the contribution of mitochondrial glutathione to ferroptosis in cardiomyocytes [J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102021.
- [ 9 ] BENJAMIN D I, BRETT J O, BOTH P, et al. Multiomics reveals glutathione metabolism as a driver of bimodality during stem cell aging [J]. *Cell Metab*, 2023, 35(3):472-486.
- [10] YE Y, CHEN A, LI L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification [J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1259-1275.
- [11] MATSUMOTO C, SEKINE H, ZHANG N, et al. Role of p53 in cisplatin-induced myotube atrophy [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(11):1-6.
- [12] 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-sulfhydration and Nrf2 activation [J]. *Redox Biol*, 2024, 70: 103066.
- [13] FENG L, LI B, XI Y, et al. Aerobic exercise and resistance exercise alleviate skeletal muscle atrophy through IGF-1/IGF-1R-PI3K/Akt pathway in mice with myocardial infarction [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 322(2):C164-C176.
- [14] CHANGCHIEN C Y, LIN Y H, CHENG Y C, et al. Indoxyl sulfate induces myotube atrophy by ROS-ERK and JNK-MAFbx cascades [J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 304:43-51.
- [15] QI H, LI X, ZHANG X, et al. Ischemic stroke induces skeletal muscle damage and alters transcriptome profile in rats [J]. *J Clin Med*, 2023, 12(2):547.
- [16] WANG Z Z, XU H C, ZHOU H X, et al. Long-term detraining reverses the improvement of lifelong exercise on skeletal muscle ferroptosis and inflammation in aging rats: Fiber-type dependence of the Keap1/Nrf2 pathway [J]. *Biogerontology*, 2023, 24(5):753-769.
- [17] 练志润, 张家蔚, 赵子珺, 等. 侯氏黑散方证中“大风”内涵的考证 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2024, 30(9):1453-1456.
- [17] LIAN Z R, ZHANG J W, ZHAO Z J, et al. Examination of the connotation of "gale" in Hou Shi Hei San prescription evidence [J]. *J Basic Chin Med*, 2024, 30(9): 1453-1456.
- [18] 许燕, 许崇崇, 刘岳. 侯氏黑散方证思考及其临床应用探讨 [J]. *上海中医药杂志*, 2021, 55(6):37-40.
- [18] XU Y, XU C C, LIU Y. Discussion on formula syndrome and clinical application of Hou's Black powder [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2021, 55(6):37-40.
- [19] 丁元庆, 陈哲, 唐赛雪. 《金匱要略》对中风研究的贡献与影响 [J]. *山东中医药大学学报*, 2020, 44(5):468-472.
- [19] DING Y Q, CHEN Z, TANG S X. Contribution and influence of synopsis of golden chamber to the study of apoplexy [J]. *J Shandong Univ Tradit Chin Med*, 2020, 44(5):468-472.
- [20] QI H, GAO Y, ZHANG Z, et al. Houshihei San attenuates sarcopenia in middle cerebral artery occlusion (MCAO) rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 337(Pt3):118917.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [21] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China* [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020.
- [22] BAI S, LU X, PAN Q, et al. Cranial bone transport promotes angiogenesis, neurogenesis, and modulates meningeal lymphatic function in middle cerebral artery occlusion rats [J]. *Stroke*, 2022, 53(4):1373-1385.
- [23] CAO Y, LI Y, HE C, et al. Selective ferroptosis inhibitor liproxstatin-1 attenuates neurological deficits and neuroinflammation after subarachnoid hemorrhage [J]. *Neurosci Bull*, 2021, 37(4):535-549.
- [24] GUAN X, LI X, YANG X, et al. The neuroprotective effects of carvacrol on ischemia/reperfusion-induced hippocampal neuronal impairment by ferroptosis mitigation [J]. *Life Sci*, 2019, 235:116795.
- [25] POWERS W J, RABINSTEIN A A, ACKERSON T, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: 2019 update to the 2018 guidelines for the early management of acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American heart association/American stroke association [J]. *Stroke*, 2019, 50(12):e344-e418.
- [26] KWAKKEL G, STINEAR C, ESSERS B, et al. Motor rehabilitation after stroke: European stroke organisation (ESO) consensus-based definition and guiding framework [J]. *Eur Stroke J*, 2023, 8(4):880-894.
- [27] SHAROBEAM A, YAN B. Advanced imaging in acute ischemic stroke: An updated guide to the hub-and-spoke hospitals [J]. *Curr Opin Neurol*, 2022, 35(1):24-30.
- [28] POLLOCK A, BAER G, CAMPBELL P, et al. Physical rehabilitation approaches for the recovery of function and mobility following stroke [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2014, 2014(4):Cd001920.
- [29] 王海征, 张琪, 赵晖, 等. 侯氏黑散中风药、补虚药调控 AQP-4、Cx43 对脑缺血大鼠星形胶质细胞活化的影响 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(12):142-147.
- [29] WANG H Z, ZHANG Q, ZHAO H, et al. Effects of wind-dispelling drugs and tonics of Hou's Heisan prescription on

- the activation of astrocytes in cerebral ischemia rats regulated by AQP-4 and Cx43[J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2023, 30(12):142-147.
- [30] 乌凯迪, 宋莹, 王振, 等. 侯氏黑散治疗缺血性脑卒中现代药理研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(11):162-165.
- WU D K, SONG Y, WANG Z, et al. Progress of modern pharmacological research on Houshi Black San in the treatment of ischemic stroke[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2020, 22(11):162-165.
- [31] 辛小红, 范雪梅. 《金匱要略》侯氏黑散之我见[J]. *吉林中医药*, 2013, 33(7):723-725.
- XING X H, FAN X M. My opinion on Hou's Heisan in synopsis of the golden chamber[J]. *Jilin J Chin Med*, 2013, 33(7):723-725.
- [32] 张秋霞. 侯氏黑散治疗中风后遗症的机理探讨[J]. *北京中医*, 2002, 4:242-243.
- ZHANG Q X. Exploration of the mechanism of Hou's Heisan in the treatment of post-stroke sequelae[J]. *Beijing J Tradit Chin Med*, 2002, 4:242-243.
- [33] 王萍丽, 潘冬辉. 黄酒送服中药对药物疗效的影响分析[J]. *酿酒科技*, 2020, doi:10.13746/j.njkj.2019157.
- WANG P L, PAN D H. Influence of taking with Huangjiu on the therapeutic effects of traditional Chinese medicine [J]. *Liq Mak Sci Technol*, 2020, doi:10.13746/j.njkj.2019157.
- [34] 刘慧敏, 刘雪梅, 江雨柔, 等. 酒在中药制药与用药过程中的古今研究进展[J]. *中草药*, 2022, 53(11):3538-3549.
- LIU H M, LIU X M, JIANG Y R, et al. Ancient and modern research progress on liquor in process of traditional Chinese medicine pharmacy and medication [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2022, 53(11):3538-3549.
- [35] 欧则民, 李新健, 张冰冰, 等. 中药酒制法的研究现状及展望[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(12):28-32.
- OU Z M, LI X J, ZHANG B B, et al. Research status and prospect of Chinese medicine wine processing[J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2021, 39(12):28-32.
- [36] 王雅诗, 华祚玉, 张立新. 铁死亡及其抑制剂在中枢神经系统疾病中的研究进展[J]. *中国医科大学学报*, 2024, 53(3):276-281.
- WANG Y S, HUA Z Y, ZHANG L X. Progress in ferroptosis and its inhibitors in central nervous system diseases [J]. *J Chin Med Univ*, 2024, 53(3):276-281.
- [37] CASTILLERO E, ALAMDARI N, LECKER S H, et al. Suppression of atrogin-1 and MuRF1 prevents dexamethasone-induced atrophy of cultured myotubes [J]. *Metabolism*, 2013, 62(10):1495-1502.
- [38] WU X, WANG J, LI B, et al. Chlorogenic acid, rutin, and quercetin from *Lysimachia christinae* alleviate triptolide-induced multi-organ injury *in vivo* by modulating immunity and Akt/mTOR signal pathway to inhibit ferroptosis and apoptosis[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2023, 467:116479.
- [39] ZHAO Y, WANG C, YANG T, et al. Chlorogenic acid alleviates chronic stress-induced duodenal ferroptosis via the inhibition of the IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in rats [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(14):4353-4361.
- [40] GALBIATI M, MERONI M, BOIDO M, et al. Bicalutamide and trehalose ameliorate spinal and bulbar muscular atrophy pathology in mice [J]. *Neurotherapeutics*, 2023, 20(2):524-545.
- [41] 宗鑫. 保元解毒汤改善癌因性恶病质肌肉萎缩的转录组学分析及机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2020.
- ZONG X. Transcriptome analysis and mechanism of Baoyuan Jiedu decoction in improving cancer-induced muscle atrophy [D]. Jinan: Shandong University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [42] 杨佳丹, 向荣凤, 戴青, 等. 人参皂苷R<sub>g</sub>对模拟高原缺氧大鼠的抗疲劳效应和骨骼肌线粒体功能的影响[J]. *第三军医大学学报*, 2019, 41(2):110-115.
- YANG J D, XIANG R F, DAI Q, et al. Effects of ginsenoside R<sub>g</sub> on fatigue resistance and skeletal muscle mitochondrial function in rats exposed to a simulated altitude of 5 000 m[J]. *J Army Med Univ*, 2019, 41(2):110-115.
- [43] ZHANG H J, WANG B H, WANG X, et al. Handelin alleviates cachexia- and aging-induced skeletal muscle atrophy by improving protein homeostasis and inhibiting inflammation [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2024, 15(1):173-188.

[责任编辑 孙丛丛]