

# 刺芒柄花素对脑卒中后自噬、炎症和氧化应激的交互作用

李友宽<sup>1</sup> 史焱<sup>2</sup> 段琳楠<sup>2</sup> 李昱静<sup>2</sup> 白帆<sup>2</sup> 武煜明<sup>1</sup> 郭涛<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>昆明卫生职业学院, 基础医学院, 昆明 650600; <sup>2</sup>昆明理工大学, 基础医学院, 昆明 650500)

**摘要** 刺芒柄花素(formononetin)广泛存在于三叶草和中药黄芪中, 是异黄酮家族的主要成员, 具有抗氧化、抗感染、抗凋亡、改善血液循环等药理作用, 在神经系统疾病如脑卒中的预防和治疗方面具有较大潜力。随着脑卒中的患病率逐年增加, 研究天然中草药对脑卒中神经损伤后的保护作用将具有重要意义。因此, 该文重点关注刺芒柄花素对脑卒中后神经细胞发生自噬、炎症和氧化应激等方面的作用及特点, 并探讨三者之间的相关性, 为脑卒中的基础研究和临床治疗提供新的借鉴。

**关键词** 刺芒柄花素; 脑卒中; 自噬; 炎症; 氧化应激; 神经保护

## Interaction of Formononetin on Autophagy, Inflammation and Oxidative Stress after Cerebral Stroke

LI Youkuan<sup>1</sup>, SHI Yan<sup>2</sup>, DUAN Linnan<sup>2</sup>, LI Yujing<sup>2</sup>, BAI Fan<sup>2</sup>, WU Yuming<sup>1</sup>, GUO Tao<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Basic Medicine, Kunming Health Vocational College, Kunming 650600, China;

<sup>2</sup>College of Basic Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

**Abstract** Formononetin is widely present in clover and Chinese medicine Astragalus membranaceus, and is a major member of the isoflavone family. It has antioxidant, anti-infection, anti-apoptosis, improving blood circulation and other pharmacological effects, and has great potential in the prevention and treatment of nervous system disease such as cerebral stroke. With the increasing incidence of cerebral stroke year by year, it will be of great significance to study the protective effects of natural Chinese herbal medicine on nerve injury after cerebral stroke. This article focuses on the effects of formononetin on autophagy, inflammation and oxidative stress of nerve cells after stroke, and discusses the correlation among the three mechanisms of action, providing new reference for basic research and clinical treatment of cerebral stroke.

**Keywords** formononetin; cerebral stroke; autophagy; inflammation; oxidative stress; neuroprotection

### 1 脑卒中与刺芒柄花素的研究现状

脑卒中(stroke)即脑中风, 随着老年人口的不断增长, 其发生率呈逐渐上升的趋势, 成为危害人类卫

生健康的重大疾病<sup>[1]</sup>。脑卒中具有极高的致残率和致死率, 80%的脑卒中发作以缺血性脑卒中为主, 其中大多数脑卒中患者机体会留下永久性神经系统损

收稿日期: 2023-06-28 接受日期: 2023-09-15

云南省教育厅科学研究基金(批准号: 2023J2216)、云南省省级大学生创新创业训练计划(批准号: S202210674138、S202210674140)和昆明理工大学课外学术科技创新基金(批准号: 2022ZK114)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18487383032, E-mail: 475612496@qq.com

Received: June 28, 2023 Accepted: September 15, 2023

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Yunnan Provincial Department of Education (Grant No.2023J2216), the Yunnan Provincial College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (Grant No.S202210674138, S202210674140), and the Extracurricular Academic Science and Technology Innovation Fund of Kunming University of Science and Technology (Grant No.2022ZK114)

\*Corresponding author. Tel: +86-18487383032, E-mail: 475612496@qq.com

伤,包括偏瘫和认知功能障碍等<sup>[2]</sup>。目前,人们对缺血性脑卒中已经有了深入的研究,国内外最常用的脑缺血的救治方法是溶栓疗法,但该治疗方法存在一定的时限性,且人们仍未找到针对缺血性脑卒中的特效药<sup>[3]</sup>。因此,寻找和开发新型药物迫在眉睫,而天然中草药药物活性物质在脑卒中中的保护作用为我们指明了研究方向。

异黄酮类化合物芒柄花素(formononetin, FOR, 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮)又称刺芒柄花素、芒柄花黄素,来源于黄芪、甘草、葛根、红三轴草等豆科植物的提取物,是植物生物合成的重要中间体,具有保护植物免受环境胁迫或病害的作用<sup>[4]</sup>。以往的研究报道,刺芒柄花素具有抗炎、抗氧化、抗细胞凋亡及抗癌等一系列作用,其主要机制包括转录因子的调控、表观遗传靶点的调控、雌激素受体的调控、细胞周期的调控、凋亡的诱导以及生长和发育信号通路的调控,刺芒柄花素多用于治疗缺血性脑卒中后遗留的神经功能缺损<sup>[5]</sup>。

值得关注的是,脑缺血发生发展的机制与神经元的自噬(autophagy)作用相关,自噬水平又与炎症反应和氧化应激(oxidative stress)有着密不可分的关联。因此,刺芒柄花素可能通过对缺血性脑卒中后的自噬、炎症和氧化应激产生作用,达到抑制神经细胞凋亡和坏死的效果,进而发挥保护神经细胞的功能。本文将深入探讨刺芒柄花素对脑卒中的最新作用机理。

## 2 自噬在脑卒中后的作用及刺芒柄花素的干预效应

### 2.1 自噬的特点

自噬最先是从小肠中发现的,如同机体的“管家”一样,严格监控胞内损伤的细胞器及其错误折叠的蛋白质,自噬小泡首先将其吞噬后,再将其运输至溶酶体并与其结合形成自噬溶酶体,进行降解、回收和再利用<sup>[6]</sup>。简单来说,细胞自噬就是通过消化自身来为自己供能进而使细胞具有重获新生的功能。自噬是一把双刃剑,由多种自噬相关蛋白进行调控,可以维持细胞的动态平衡<sup>[7]</sup>。在病理环境下,机体因受外界刺激而启动自噬来维持自身内环境的稳态,适度的自噬发挥自我保护的作用,然而自噬的缺失会导致神经系统、代谢性疾病的发生。若刺激因子持续存在可诱导自噬的过度激活,自噬体的形成与

降解失衡,形成病理性蓄积,打破胞内平衡状态,最终使细胞走向凋亡或坏死。

### 2.2 自噬与脑卒中

脑组织对缺血缺氧极其敏感,脑卒中一旦发生,神经元将进行无氧糖酵解产生能量维持脑的生命活动,继而大量的乳酸堆积导致酸碱平衡失调、电解质紊乱、细胞通透性增加、细胞膜瓦解等一系列外界刺激,促使神经元启动自噬,并由复杂的信号通路调节自噬<sup>[8]</sup>。IRANPANAH等<sup>[9]</sup>在新生大鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型中发现雷帕霉素可以激活PI3K/AKT通路抑制mTOR下游生化反应,上调自噬表达发挥神经保护作用。Beclin-1是一种自噬相关蛋白,Bcl-2是一种抗凋亡蛋白,它们都参与自噬表达的调控,是诱发脑卒中自噬或神经元凋亡病理过程的关键,若抑制自噬相关蛋白的表达,下调失控的自噬水平,可以减少脑组织梗死区域<sup>[10]</sup>。一些自噬抑制剂的预处理可降低脑卒中自噬LC3II的表达水平<sup>[11]</sup>。LI等<sup>[12]</sup>通过建立氧糖剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)大鼠神经元模型,表明Bcl-2、LC3II/I、p62、p-AMPK表达水平升高,凋亡比例及Caspase 3、Bax表达水平降低,得出结论二苯乙烯苷通过促进AMPK通路的表达来上调神经元自噬继而抑制其凋亡。不可忽视的是,自噬在脑卒中中具有双重作用,适度活化的自噬与过度激活的自噬也许存在一个临界点,但目前尚未清楚它们之间具体的机制。

### 2.3 刺芒柄花素对脑卒中后自噬的保护作用

中草药提取物刺芒柄花素在一定程度上也干预了脑卒中的自噬表达。WU等<sup>[13]</sup>通过建立了大鼠MCAO模型探究了刺芒柄花素的干预是否可以恢复受损后的脑神经功能,并且将实验组、假手术组、对照组的结果一一对比后,得出了刺芒柄花素能够显著增加神经元树突棘的数目以及促进p-AKT和p-ERK1/2的表达,说明了刺芒柄花素在PI3K/AKT信号通路的基础上参与了神经保护。LIANG等<sup>[14]</sup>报道,刺芒柄花素可以通过下调Bax与Bcl-2的比值,也得出了如上类似的结果。除此之外,HUANG等<sup>[15]</sup>在研究脑缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)的病理过程中得知刺芒柄花素可以通过增强溶酶体的酸化作用以及促进自噬的发生来逆转I/R带来的损伤。因此,刺芒柄花素可能直接或间接地对自噬产生一定的作用,进而达到

保护脑卒中后受损的神经细胞的效果。

### 3 炎症在脑卒中后的作用及刺芒柄花素的干预效应

#### 3.1 神经炎症反应的特点

神经炎症反应(inflammatory reaction)是指人体大脑在受到外界病原微生物的感染、意外损伤或者自身疾病的情况下发生的免疫反应。作为一种防御反应,可以帮助机体清除体内的有害物质,但同时也会加剧机体组织的损伤,影响脑的修复。神经炎症反应主要由胶质细胞介导,胶质细胞存在于中枢神经系统,是一种固有免疫细胞,平时在机体环境中处于静止状态,执行监视中枢神经系统环境的任务<sup>[16]</sup>。当大脑发生神经退行性病变时,核心坏死区神经小胶质细胞因无法获得能量而死亡,而在部分区域细胞存在一个缓冲期,发生大量的生化反应,如因乳酸堆积造成的酸中毒、钙离子的内流、神经递质的异常积聚、兴奋性毒性损伤等<sup>[17]</sup>。这些死亡和损伤的细胞会释放大量危险相关分子(damage-associated molecular patterns, DAMPs),通过作用于小胶质细胞的模式识别受体,以激活小胶质细胞。因此该过程存在一个救治窗口,能够进一步改变胶质细胞的命运走向。

#### 3.2 炎症反应与脑卒中

脑卒中后炎症反应主要发生在小胶质细胞中,小胶质细胞会被激活为M1型和M2型<sup>[18]</sup>。M1型主要分泌促炎因子,例如白介素、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和诱导型一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)等,同时会释放基质金属蛋白酶(matrix metalloprotein, MMP)破坏血脑屏障。M2型则会释放抗炎因子,例如IL-10、TGF- $\beta$ 、IL-4、IL-3、胰岛素样生长因子以及神经营养因子,用于保护脑组织。在缺血性脑卒中急性期内,以M2型为主,在亚急性期内以M1型为主。在大脑发生缺血性脑卒中的7天内, M2型会向M1型转变,促炎因子分泌水平增加,从而加重炎症反应和脑组织损伤<sup>[19]</sup>。因此,下调相关炎症因子、蛋白酶、自由基等的表达,即可抑制神经炎症反应,从而保护脑组织。ZHAO等<sup>[20]</sup>研究表明IL-1 $\beta$ 参与脑卒中后神经损伤的过程,抑制其表达可以减轻脑损伤。另外, CHEN等<sup>[21]</sup>用药物抑制MMP的活性,显著改善因脑卒中破坏血脑屏障(blood brain barrier, BBB)完整性带来的组织损伤及

出血性转化。因此,可通过抑制缺血性脑卒中后各个阶段的神经炎症反应来达到保护脑组织的目的。

#### 3.3 刺芒柄花素对脑卒中后炎症反应的保护作用

刺芒柄花素可对缺血后损伤的脑细胞发挥抗炎作用,而神经炎症反应被认为是发生缺血性脑卒中后神经细胞死亡和神经血管受损的重要病理过程,可以加剧脑组织的受损程度和功能障碍。SALEEM等<sup>[22]</sup>给大鼠服用免疫抑制剂环磷酰胺,使大鼠体内炎症因子水平升高,炎症反应和氧化应激作用增强,给予刺芒柄花素干预后,抑制炎症的同时降低了细胞凋亡水平。LI等<sup>[23]</sup>在大鼠脑损伤模型上发现损伤区的炎性介质TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 释放水平增多,使用刺芒柄花素干预后促炎因子浓度降低,表明刺芒柄花素具有抗炎作用并保护受损的神经组织。顾民华等<sup>[24]</sup>通过建立大鼠MCAO模型利用相关实验来检测炎症因子mRNA的表达情况,得出刺芒柄花素可以抑制MMP的活性,减少炎症因子iNOS、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的表达水平,显著降低脑缺血后脑组织BBB的通透性,进而改善神经组织的受损。除此之外,刺芒柄花素可以通过下调脑缺血区核转录因子NF- $\kappa$ B和SphK1/S1P信号通路,抑制炎症因子的释放,发挥抗炎作用<sup>[25]</sup>。由此可见,刺芒柄花素可通过多通路降低促炎因子的释放,对神经炎症反应发挥抑制作用,减少脑梗死体积,从而在缺血性脑卒中中起到保护作用。

### 4 氧化应激在脑卒中后的作用及刺芒柄花素的干预效应

#### 4.1 氧化应激的特点

氧化应激(oxidative stress)是细胞内氧化与抗氧化平衡的一个过程,失衡状态下会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)的蓄积,而ROS是由细胞线粒体产生的,其本身是一种氧化反应中的副反应物。在正常生理条件下ROS被控制在较低水平,而在氧化应激反应条件下,ROS生成的量远远超过机体的代谢水平,可以造成细胞线粒体的功能失调,ATP供给不足,甚至可以损伤其他大分子物质以及细胞器,对细胞造成不可逆的损伤<sup>[26]</sup>。当前已知的自由基产物有丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)、脂质过氧化物(lipidperoxids, LPO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等。SOD和GSH-Px属于抗氧化酶,可

以降低中枢神经系统ROS的水平和抑制氧化应激的发展,从而保护神经系统,它们是反映氧化应激反应程度的金指标<sup>[27]</sup>。

## 4.2 氧化应激与脑卒中

氧化应激反应与脑卒中继发性神经细胞死亡密切相关,大脑因为其相对复杂的功能,具有较强的代谢作用,需要大量ATP的供给,但又因脑组织对ROS十分敏感,抗氧化损伤能力较低,所以氧化应激在缺血性脑卒中病理过程中可以被认为是一个至关重要的问题<sup>[28]</sup>。在正常情况下,脑内包含一些内源性的抗氧化酶如SOD、GSH-Px、CAT和外源性的抗氧化剂如维生素<sub>C/E</sub>,可以构建一个适度清除代谢废物而不损伤脑组织的平衡状态。而在发生缺血性脑卒中后,机体抗氧化物质大量消耗,抗氧化系统枯竭,无法阻止ROS的不断生成,引起蛋白质的结构功能障碍,核酸DNA和RNA的脂质过氧化,最终造成神经元功能紊乱甚至坏死和凋亡。WU等<sup>[29]</sup>和ZENG等<sup>[30]</sup>实验发现脑缺血后机体发生脑神经功能缺失、脑水肿、神经元死亡等现象以及MDA含量增加和SOD活性降低等指标的变化,表明MDA是LPO的最终产物。这些结果指明,脑卒中触发的氧化应激反应是神经元损伤或死亡的关键原因。

## 4.3 刺芒柄花素对脑卒中后氧化应激的保护作用

刺芒柄花素属黄酮类,其抗氧化的机制是其分子上的酚羟基,能与自由基发生竞争反应,最后终止自由基的链式反应。MU等<sup>[31]</sup>实验表明,在小鼠模型中采用不同剂量的刺芒柄花素,能有效提高抗氧化酶SOD、GSH-Px及CAT的水平,减少自由基的含量,增强机体抗氧化能力。LI等<sup>[23]</sup>通过刺芒柄花素处理后发现随着GSH-Px和SOD水平的升高,受损区域MDA含量减少,脑组织内的异常状态逐渐逆转。不仅如此,刺芒柄花素还可增加Sirt1蛋白水平,而Sirt1缺乏症可以阻断Nrf2/ARE信号通路的激活,进而改善氧化应激<sup>[32]</sup>。ALADAILEH等<sup>[33]</sup>和胡志平等<sup>[34]</sup>的研究揭示,刺芒柄花素可促进Nrf2/HO-1信号转导,从而抑制LPO及氧化应激反应,减轻小鼠脑水肿并改善其行为障碍,保护在脑卒中后因剧烈氧化应激反应造成的脑组织损伤。

## 5 自噬、炎性和氧化应激在脑卒中后的交互作用

在整个脑卒中病理过程中,氧化应激和炎性反

应是两个早期事件,抵御外界刺激因子的同时对自身神经组织加重损害<sup>[35]</sup>。自噬在脑卒中后的双重作用已被证实。一方面,适度的自噬可对抗氧化应激和减弱神经炎症反应,维持正常神经组织新陈代谢。另一方面,失控的自噬连同前两者扰乱神经组织代谢水平,触发神经元的坏死和凋亡,对机体带来不可逆转的伤害。GHOSH等<sup>[36]</sup>的研究显示,转录因子Nrf2可以调节氧化应激反应,也可以激活小鼠海马体中的炎性细胞,增加炎性介质白介素、肿瘤坏死因子的含量,促进神经炎症反应的发生,同时伴随自噬作用的增强。然而,以往的研究很少会把三者联系在一起,氧化应激、炎症反应和自噬在脑卒中等一系列神经损伤疾病中交互相关,共同调节,并不是独立存在的(图1)。倘若三者的平衡失调将导致疾病朝着恶化的方向发展,深入了解其中的机制及其作用能够为脑卒中的精准治疗提供靶点。

### 5.1 自噬与炎症反应

自噬与炎症反应两者之间的作用并非单向调节,而是双向调节的,抑制炎症促进自噬水平,自噬也可引起一定程度的炎症反应。缺血性卒中发生后脑细胞处于一个缺血缺氧的环境,自噬可以经各类信号通路缓解胞内剧烈的炎症反应。因此,自噬与炎症反应之间既存在拮抗作用也存在协同作用。程明星等<sup>[37]</sup>发现随着脑缺血的发生,小胶质细胞由于获氧功能下降,炎症因子及缺氧诱导因子HIF-1 $\alpha$ 表达水平增高,使用干扰剂预处理后,促炎因子含量减少,自噬水平也降低。一些得到证实的信号通路如TLR4-自噬-NF- $\kappa$ B、miRNA-144-mTOR、IL-17A、AMPK-mTOR-p70S6K证明了脑卒中后自噬与炎症反应之间存在交互关系。

### 5.2 自噬与氧化应激

自噬与氧化应激相辅相成参与脑卒中的发生发展。ROS的蓄积引发线粒体的功能障碍,自噬随之激活自噬小体吞噬损伤的线粒体,维持胞内内环境的稳态。ROS过度积累引发氧化应激损伤时能够介导细胞自噬的发生,在一定程度上减轻了氧化应激带来的细胞损伤。相反,自噬也可以减少ROS的含量,若拮抗自噬作用,可加速诱导氧化应激促使细胞凋亡<sup>[38]</sup>。

### 5.3 炎症与氧化应激

一些学者如DE WOLDE等<sup>[39]</sup>发现ROS的蓄积还可以触发促炎因子的分泌,炎性细胞反过来也可以

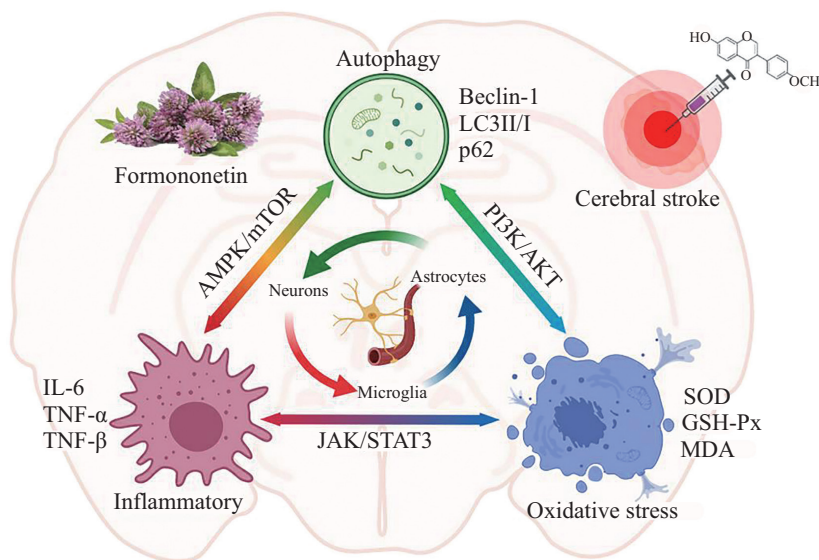


图1 自噬、炎症和氧化应激在脑卒中后的交互作用及刺芒柄花素的干预机制

Fig.1 The interaction of autophagy, inflammation and oxidative stress after cerebral stroke and the intervention mechanism of formononetin

产生NADPH等酶类引发氧化应激反应。例如在探讨miR-31对小鼠MCAO模型的作用时,脑缺血后神经组织中的星状胶质细胞miR-31可作为上游物质调控下游PKDI基因抑制JAK/STAT3途径,发现胶质细胞诱导的炎症反应程度明显降低,继而减轻氧化应激带来的损伤<sup>[40]</sup>。

总之,对于自噬而言,氧化应激和神经炎症反应总是正向发展的,可以触发自噬,清除脑组织内受损物质,使脑细胞重获新生。反之,自噬可以在一定程度上削弱神经炎症反应和氧化应激反应,对两者的发展起到抑制作用。任意条件的失衡,都会加剧脑卒中神经组织的损伤,当三者都趋于平稳状态时,机体才会处于健康状态。

综上,脑卒中与神经炎症、氧化应激和自噬具有相关性,这三者共同介导脑卒中后的损伤与修复。目前的研究大多缺少综合考虑三者间的交互关系,其并非单一作用于任一疾病,而是共同维持机体的平衡。随着我国中医药的发展和认可度的提高,天然中草药活性物质如刺芒柄花素对脑卒中的干预效果被广泛关注。越来越多的研究发现,刺芒柄花素的药理学作用与细胞学机制能够直接或间接地影响脑卒中后的病理生理功能,同时对缺血性脑卒中受损后的神经细胞具有调控效应。不难发现,自噬、炎症和氧化应激的发生均会改变ROS标记物的表达水平,并且相关通路如AMPK/mTOR、

PI3K/AKT、JAK/STAT3、TLR4/NF- $\kappa$ B以及Nrf2/HO-1存在一定联系,任一机制的调控也会影响到其他信号通路。进一步地,自噬、炎症和氧化应激中的每一种进程都具有对机体适度有益过度损害的特点,而与其相对应的平衡点与临界值仍然是个未知的领域。或许未来可以通过研究具体的上游基因、下游编码蛋白或相关信号通路来探索各反应由坏到好的转变,这将为脑卒中的治疗提供有价值的研究基础。

### 参考文献 (References)

- [1] MEN J, WANG W, ZHAO J, et al. Effectiveness of exercise in reducing cerebral stroke risk factors: a systematic review and meta-analysis [J]. *Medicine*, 2022, 101(45): 31861.
- [2] GUO T, DENG Y H, DONG L L, et al. Autophagy elicits neuroprotection at the subacute phase of transient cerebral ischaemia but has few effects on neurological outcomes after permanent ischaemic stroke in rats [J]. *Curr Med Sci*, 2021, 41(4): 803-14.
- [3] MARTO J P, STRAMBO D, LIVIO F, et al. Drugs associated with ischemic stroke: a review for clinicians [J]. *Stroke*, 2021, 52(10): 646-59.
- [4] 高莉晶, 李婷, 原丽, 等. 刺芒柄花素对高糖诱导的H9C2心肌细胞损伤的作用机制 [J]. *中国临床药理学杂志 (GAO L J, LI T, YUAN L, et al. Effect and mechanism of formononetin on cell damage in H9C2 cardiomyocytes induced by high concentration of glucose [J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology)*, 2022, 38(23): 2820-4.
- [5] MA X, WANG J. Formononetin: a pathway to protect neurons [J]. *Front Integr Neurosci*, 2022, 16: 908378.
- [6] VARGAS J N S, HAMASAKI M, KAWABATA T, et al. The mech-

- anisms and roles of selective autophagy in mammals [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2023, 24(3): 167-85.
- [7] 郭涛, 任璐, 何红云, 等. 自噬及其在缺血性脑中风中双重作用的研究进展[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*(GUO T, REN L, HE H Y, et al. Research progress on autophagy and its dual role in ischemic stroke [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-Cerebrovascular Disease*), 2019, 17(9): 1339-42.
- [8] 褚建波, 王征, 娄阳云, 等. 桃叶鸦葱黄酮调控神经元自噬和凋亡减轻大鼠脑缺血损伤[J]. *生命的化学*(CHU J B, WANG Z, LOU Y Y, et al. The flavonoids of *Scorzonera sinensis lipsch* regulate neuronal autophagy and apoptosis to reduce cerebral ischemia injury in rats [J]. *Chemistry of Life*), 2022, 42(5): 1026-34.
- [9] IRANPANAH A, KOOSHKI L, MORADI S Z, et al. The exosome-mediated PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in neurological diseases [J]. *Pharmaceutics*, 2023, 15(3): 1006.
- [10] LAN T, XU Y, LI S, et al. Cornin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by preventing autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2022, 23(1): 82.
- [11] LE GUERROUE F, BUNKER E N, ROSENCRANS W M, et al. TNIP1 inhibits selective autophagy via bipartite interaction with LC3/GABARAP and TAX1BP1 [J]. *Mol Cell*, 2023, 83(6): 927-41.
- [12] LI Y, HU K, LIANG M, et al. Stilbene glycoside upregulates SIRT3/AMPK to promotes neuronal mitochondrial autophagy and inhibit apoptosis in ischemic stroke [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2021, 30(2): 139-46.
- [13] WU Q L, CHENG Y Q, LIU A J, et al. Formononetin recovered injured nerve functions by enhancing synaptic plasticity in ischemic stroke rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.015.
- [14] LIANG K, YE Y, WANG Y, et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Neuro Sci*, 2014, 344(1/2): 100-4.
- [15] HUANG Z, LIU Y, HUANG X. Formononetin may protect aged hearts from ischemia/reperfusion damage by enhancing autophagic degradation [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(6): 4821-30.
- [16] BOWIRAT A. Immunosenescence and aging: neuroinflammation is a prominent feature of Alzheimer's disease and is a likely contributor to neurodegenerative disease pathogenesis [J]. *J Pers Med*, 2022, 12(11): 1817.
- [17] GUHA A, HUSAIN M A, SI Y, et al. RNA regulation of inflammatory responses in glia and its potential as a therapeutic target in central nervous system disorders [J]. *Glia*, 2023, 71(3): 485-508.
- [18] WANG R, ZHANG W. Isoliquiritigenin regulates microglial M1/M2 polarisation by mediating the P38/MAPK pathway in cerebral stroke [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(6): 828-36.
- [19] XIN M, FENG J, HAO Y, et al. Cyclic adenosine monophosphate in acute ischemic stroke: some to update, more to explore [J]. *J Neuro Sci*, 2020, 413: 116775.
- [20] ZHAO B, ZOU C J, ZHOU P. Delayed administration IL-1 $\beta$  neutralizing antibody improves cognitive function after transient global ischemia in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 303: 53-60.
- [21] CHEN H, GUAN B, CHEN X, et al. Baicalin attenuates blood-brain barrier disruption and hemorrhagic transformation and improves neurological outcome in ischemic stroke rats with delayed t-PA treatment: involvement of ONOO<sup>-</sup>-MMP-9 pathway [J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(5): 515-29.
- [22] SALEEM H, ALADAILEH F K, SWAILMI M H, et al. Renoprotective effect of formononetin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and inflammation in rat kidney [J]. *J Pharm Res Int*, 2021, 33(2): 26-37.
- [23] LI Z, DONG X, ZHANG J, et al. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism [J]. *J Neuro Sci*, 2014, 338(1/2): 112-7.
- [24] 顾民华, 洪文, 唐传其, 等. 芒柄花素保护前脑缺血再灌注损伤中的血脑屏障并抑制神经炎症[J]. *暨南大学学报(自然科学与医学版)*(GU M H, HONG W, TANG C Q, et al. Formononetin protects blood-brain barrier and inhibits neuroinflammation during focal cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Journal of Jinan University, Natural Science & Medicine Edition*), 2015, 36(1): 34-9.
- [25] 黄保胜, 王星, 李清泉, 等. 芒柄花素通过SphK1-SIP信号通路抑制大鼠局灶性脑缺血再灌注后的炎症反应[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*(HUANG B S, WANG X, LI Q Q, et al. Formononetin reduces inflammation in focal brain ischemia reperfusion rat via inhibiting sphingosine kinase 1/sphingosine 1-phosphate signaling pathway [J]. *Journal of Nanjing Medical University, Natural Sciences*), 2017, 37(10): 1239-42,56.
- [26] JENA A B, SAMAL R R, BHOL N K, et al. Cellular red-Ox system in health and disease: the latest update [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114606.
- [27] HUANG J, CHEN L, YAO Z M, et al. The role of mitochondrial dynamics in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114671.
- [28] LIU D, WANG H, ZHANG Y, et al. Protective effects of chlorogenic acid on cerebral ischemia/reperfusion injury rats by regulating oxidative stress-related Nrf2 pathway [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 51-60.
- [29] WU F, LAI S, FU D, et al. Neuroprotective effects and metabolomics study of protopanaxatriol (PPT) on cerebral ischemia/reperfusion injury *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1789.
- [30] ZENG X, ZHANG Y D, MA R Y, et al. Activated Drp1 regulates p62-mediated autophagic flux and aggravates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion via the ROS-RIP1/RIP3-exosome axis [J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1): 25.
- [31] MU H, BAI Y H, WANG S T, et al. Research on antioxidant effects and estrogenic effect of formononetin from *Trifolium pratense* (red clover) [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16(4): 314-9.
- [32] ZHUANG K, JIANG X, LIU R, et al. Formononetin activates the Nrf2/ARE signaling pathway via sirt1 to improve diabetic renal fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11: 616378.
- [33] ALADAILEH S H, HUSSEIN O E, ABUKHALIL M H, et al. Formononetin upregulates Nrf2/HO-1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate-induced rats [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 430.
- [34] 胡志平, 马俊, 陈彦蓉, 等. 刺芒柄花素激活脑外伤小鼠Nrf2/HO-1通路减轻脑水肿并改善行为障碍[J]. *中国实验诊断学*(HU Z P, MA J, CHEN Y R, et al. Formononetin activates Nrf2/HO-1 pathway to reduce brain edema and improve behavior disorder in mice with traumatic brain injury [J]. *Chinese Journal of Laboratory Diagnosis*), 2021, 25(6): 887-93.
- [35] RANA A K, SINGH D. Targeting glycogen synthase kinase-3 for oxidative stress and neuroinflammation: opportunities, challenges and future directions for cerebral stroke management [J]. *Neurophar-*

- macology, 2018, 139: 124-36.
- [36] GHOSH S, CHOUDHURY S, CHOWDHURY O, et al. Inflammation-induced behavioral changes is driven by alterations in Nrf2-dependent apoptosis and autophagy in mouse hippocampus: role of fluoxetine [J]. *Cell Signal*, 2020, 68: 109521.
- [37] 程明星, 李晨辉, 孟卫, 等. 小胶质细胞在缺血性脑卒中中的双重作用及机制[J]. *生理学报*(CHEN M X, LI C H, MENG W, et al. Dual roles and mechanism of microglia in ischemic stroke [J]. *Acta Physiologica Sinica*), 2021, 73(6): 963-72.
- [38] HUANG T, LIN Y, PANG Q, et al. The synergistic effect of TRPV1 on oxidative stress-induced autophagy and apoptosis in microglia [J]. *Anal Cell Pathol*, 2021, 2021: 7955791.
- [39] DE WOLDE S D, HULSKES R H, WEENINK R P, et al. The effects of hyperbaric oxygenation on oxidative stress, inflammation and angiogenesis [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1210.
- [40] 李洁, 车玉琴. miR-31对小鼠大脑中动脉闭塞后神经元炎症反应以及氧化应激损伤的影响[J]. *免疫学杂志*(LI J, CHE Y Q. Effects of miR-31 on neuronal inflammatory response and oxidative stress injury after middle cerebral artery occlusion in mice [J]. *Immunological Journal*), 2021, 37(5): 369-79.