

本文引用: 梁 祺, 吴海辉, 王珊珊, 杨 彤, 葛金文. 补阳还五汤调节铁代谢蛋白改善脑缺血神经元损伤的研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(1): 40-46.

# 补阳还五汤调节铁代谢蛋白改善脑缺血 神经元损伤的研究

梁 祺<sup>1</sup>, 吴海辉<sup>1</sup>, 王珊珊<sup>1</sup>, 杨 彤<sup>1</sup>, 葛金文<sup>1,2\*</sup>

1. 湖南中医药大学中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208;

2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410006

**[摘要]** **目的** 探讨补阳还五汤通过调节铁代谢转运蛋白改善脑缺血神经元损伤的作用机制。**方法** 选择大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系 PC12 细胞, 采用氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)造模建立体外脑缺血模型, 制备补阳还五汤含药血浆(极低、低、中、高剂量组), 其中极低、低、中、高剂量浓度比为 0.5:1:2:4。将细胞依次分为正常组、模型组、空白血浆组以及补阳还五汤含药血浆组(极低、低、中、高剂量组)。除正常组外, 其余各组造模 6 h 后分别给予等体积不同浓度含药血浆干预 24 h, 正常组和模型组为普通培养基培养, 其余组分别使用含 10%各自浓度含药血浆的基础培养基培养。CCK-8 筛选补阳还五汤含药血浆的最佳干预浓度。制备去铁酮含药血浆为阳性对照药。细胞分为正常组、模型组、补阳还五汤最佳血浆浓度组(低剂量组)、去铁酮组。正常组和模型组使用含有 10%空白血浆的基础培养基培养, 低剂量组和去铁酮组使用含 10%各自浓度含药血浆的基础培养基处理 24 h。分别进行细胞形态观察、细胞活力检测、活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定比较各组间细胞的损伤情况; 超氧化物歧化酶活力(superoxide dismutase, SOD)测定比较各组间清除氧自由基能力; 丙二醛含量(malondialdehyde, MDA)测定比较各组间细胞过氧化损伤程度; Western blot 检测铁代谢相关蛋白铁调素(hepcidin, HEP)、转铁蛋白受体(transferrin receptor, TFR)和膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN)的表达水平。**结果** 与模型组比较, 补阳还五汤组细胞损伤明显改善, 其中低剂量组 CCK-8 细胞活力明显提高( $P < 0.01$ ), ROS 含量显著下降( $P < 0.01$ ), SOD 活力明显上升( $P < 0.01$ ), MDA 含量下降( $P < 0.01$ ), TFR 和 HEP 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ), FPN 蛋白表达增加( $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义。**结论** 补阳还五汤可能通过抑制 TFR、HEP 表达, 促进 FPN 表达, 纠正脑缺血后铁稳态失衡, 发挥改善神经元损伤的作用。

**[关键词]** 脑缺血; 补阳还五汤; 含药血浆; 铁转运蛋白; 铁代谢

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.01.007

## Buyang Huanwu Decoction improved cerebral ischemia injury by regulating iron transporter

LIANG Qi<sup>1</sup>, WU Haihui<sup>1</sup>, WANG Shanshan<sup>1</sup>, YANG Tong<sup>1</sup>, GE Jinwen<sup>1,2\*</sup>

1. Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the mechanism of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) in improving cerebral ischemic neuronal injury by regulating iron metabolism transporter. **Methods** Rat adrenal pheochromocytoma cell line PC12 cells were

**[收稿日期]** 2022-08-12

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81774174); 湖南省研究生科研创新项目(CX20200795); 湖南省“国内一流培育学科”中西医结合开放基金项目(2020ZXYJH28)。

**[第一作者]** 梁 祺, 女, 硕士研究生, 研究方向: 心脑血管疾病防治研究。

**[通信作者]** \* 葛金文, 男, 教授, 博士研究生导师, E-mail: emgjw@tom.com。

selected, and an in vitro cerebral ischemia model was established by oxygen-glucose deprivation (OGD). The plasma containing BYHWD (very low, low, medium and high dose) was prepared. The concentration ratio of very low, low, medium and high doses was 0.5:1:2:4. The cells were divided into normal group, model group, blank plasma group and BYHWD medicated plasma groups (very low, low, medium and high dose groups). Except for the normal group, the other groups were given the same volume and different concentrations of medicated plasma for 24 h after modeling for 6 h. The normal group and the model group were cultured in ordinary medium, and the other groups were cultured in basal medium containing 10% medicated plasma with different concentrations respectively. CCK-8 was used to screen the optimal intervention concentration of plasma containing BYHWD. The deferiprone medicated plasma was prepared as a positive control drug. The cells were divided into normal group, model group, BYHWD group with the optimal concentration (low dose group) and deferiprone group. Normal group and model group were cultured with basal medium containing 10% blank plasma. The low dose group and deferiprone group were treated with basal medium containing 10% medicated plasma of their respective concentrations for 24 h. Cell morphology observation, CCK-8 cell viability detection, and reactive oxygen species (ROS) measurement were performed to compare the damage of cells among the groups. The superoxide dismutase (SOD) activity was measured to compare the oxygen free radical scavenging ability among the groups. The level of malondialdehyde (MDA) was measured to compare the degree of cell peroxidative damage among the groups. The expression levels of iron metabolism-related proteins hepcidin (HEP), transferrin receptor (TFR) and ferroportin (FPN) were detected by Western blot. **Results** The viability of CCK-8 cells in the low-dose BYHWD group significantly increased ( $P<0.01$ ), the level of ROS was markedly reduced ( $P<0.01$ ), the activity of SOD was obviously increased ( $P<0.01$ ), the level of MDA was lower ( $P<0.01$ ), and the protein expression levels of TFR and HEP decreased ( $P<0.05$ ). The expression of FPN protein increased ( $P<0.01$ ). The difference was statistically significant. **Conclusion** BYHWD may play a role in improving neuronal damage by inhibiting the expression of TFR and HEP, promoting the expression of FPN, and correcting the imbalance of iron homeostasis after cerebral ischemia.

[**Keywords**] cerebral ischemia; Buyang Huanwu Decoction; medicated plasma; iron transporter; iron metabolism

脑缺血是指由于各种原因引起脑血管堵塞导致组织缺血缺氧坏死,出现偏瘫、意识障碍等以神经功能损伤为主的疾病。脑缺血是一个持续数小时甚至数天的空间以及时间变化的事件,发病机制复杂,自由基损伤、钙超载等许多病理生理过程参与了病程进展<sup>[1]</sup>。铁是机体必需的微量元素,参与了氧的转运与利用和髓鞘蛋白合成等过程,与脑发育和代谢等生理过程密切相关<sup>[2]</sup>。研究表明,在脑缺血后出现显著脑铁代谢紊乱,铁沉积会导致神经元损伤加重<sup>[3]</sup>。补阳还五汤是益气活血法的代表方,是中医临床治疗脑缺血的经典方剂。许多研究证明,补阳还五汤对脑缺血的治疗效果显著,能够降低脑缺血后铁沉积<sup>[4-6]</sup>。本研究通过细胞实验模拟半体内环境,以补阳还五汤为干预药物,探讨补阳还五汤调控脑缺血后铁稳态失衡,改善神经元损伤的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 动物来源

18只SPF级SD雄性大鼠,体质量200~220g,购

于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2019-0004,质量合格证号:430727201101237013]。饲养于湖南中医药大学实验动物中心[使用许可证编号:SYXK(湘)2019-0009]。环境温度(24.0±0.5)℃,相对湿度50%~60%,自由摄食,昼夜光照,适应性饲养3d。本研究经湖南中医药大学实验动物中心伦理委员会审查批准(伦理编号:LL201907230006)。

### 1.2 细胞来源

大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞系PC12细胞株,购自中国科学院上海细胞库,货号:TCR9。

### 1.3 药物制备

补阳还五汤药物组成:生黄芪120g,当归6g,赤芍5g,川芎3g,地龙3g,红花3g,桃仁3g(批号分别为2102003C、2102004C、2107008C、2109015C、2102001C、2103003C、2109002S)。中药均购自湖南中医药大学第一附属医院,经湖南中医药大学刘林副教授鉴定,符合2015年版《中国药典中药材及饮片彩色图鉴》规定<sup>[7]</sup>。取标准中药饮片加蒸馏水6~8倍量,分煎2次后混匀合并,滤过,浓缩至含生药2g/mL,

4 ℃储存备用。去铁酮片(批号 H20140379),购自加拿大奥贝泰制药有限公司,临用现配。

#### 1.4 主要试剂与仪器

PBS 缓冲液(批号:PB120327,武汉普诺赛生命科技有限公司);DMEM 高糖培养基(批号:PM150210,武汉普诺赛生命科技有限公司);DMEM 无糖培养基(批号:PM150270,武汉普诺赛生命科技有限公司);胰蛋白酶(批号:PB180226,武汉普诺赛生命科技有限公司);青链霉素(批号:PB180120,武汉普诺赛生命科技有限公司);CCK-8 试剂盒(批号:E-CK-A362,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);BCA 试剂盒(批号:E-BC-K318-M,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒(批号:E004-1-1,南京建成生物工程研究所);超氧化物歧化酶活力(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(批号:A001-3-2,南京建成生物工程研究所);丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(批号:A003-1-2,南京建成生物工程研究所);转铁蛋白受体(transferrin receptor, TFR)多克隆抗体(批号:A5865,武汉爱博泰克生物科技有限公司);铁调素(hepcidin, HEP)多克隆抗体(批号:ab30760, Abcam 公司);膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN)多克隆抗体(批号:ab58695, Abcam 公司);GAPDH 抗体(批号:10494-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司);山羊抗小鼠(批号:E-AB-1001,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);山羊抗兔(批号:E-AB-1003,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);甲醇(批号:10014118,国药集团化学试剂有限公司);Tween-20(批号:#T8220,北京索莱宝科技有限公司);ECL 化学发光底物(批号:170-5,伯乐生命医学产品(上海)有限公司);CO<sub>2</sub> 培养箱(型号:3131,赛默飞世尔科技公司);全自动化学发光成像分析系统(型号:Tanon5200,上海天能公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物处理

18 只 SD 雄性大鼠随机分为 6 组,分别予以极低、低、中、高剂量补阳还五汤药液、铁离子螯合剂去铁酮片和等量的生理盐水灌胃,1 mL/100 g,1 次/d。补阳还五汤中剂量为 25.8 g/kg(按 60 kg 成年人每日剂量生药为依据,大鼠剂量按体表面积换算,相当于临床等效剂量的 2 倍)。极低、低、中、高剂量浓度比

为 0.5:1:2:4。连续灌胃 7 d 后,末次给药 1 h 后腹主动脉采血,3.8% 枸橼酸钠抗凝(1:9),4 ℃、3000 r/min(离心半径  $r=15.9$  cm)离心 15 min 取上清液,0.22 μm 孔筛过滤灭菌后置于-80 ℃留存备用。各给药组各鼠血浆等量混合即为含药血浆,空白组各鼠血浆等量混合即为空白血浆。

### 2.2 细胞 OGD 模型建立

按照 GOLDBERG 等<sup>[8]</sup>的方法进行改良处理,细胞培养液换为预先通以缺氧混合气(94% N<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>+1% O<sub>2</sub>)30 min 的无糖培养液,随后将细胞立即置于缺氧密闭室内,继续通予缺氧混合气,于 37 ℃饱和湿度条件下培养。OGD 损伤 6 h 后进行药物干预<sup>[9-10]</sup>。

### 2.3 实验分组及给药

2.3.1 筛选补阳还五汤最佳给药浓度 细胞正常培养后分为正常组、模型组、空白血浆组、补阳还五汤含药血浆组(极低、低、中、高剂量组),共 7 组。采用三气培养箱进行氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)造模。根据罗银河和陈刚等<sup>[11-12]</sup>实验结果选择 10% 含药血浆进行实验,各组细胞造模后分别给予等体积相应 10% 含药血浆的培养基干预。继续培养 24 h 后进行细胞活力检测,同时显微镜下观测细胞生长形态。

2.3.2 药物干预各组细胞 确定补阳还五汤最佳给药浓度后,细胞分为正常组、模型组、补阳还五汤最佳含药血浆组(低剂量组)、去铁酮组,共 4 组。采用三气培养箱进行 OGD 造模。正常组和模型组使用含有 10% 空白血浆的基础培养基培养,补阳还五汤最佳含药血浆组和去铁酮组分别使用含 10% 各自药物的基础培养基处理。药物干预 24 h 后进行各项指标检测。

### 2.4 指标检测

2.4.1 CCK-8 法检测细胞活性 细胞接种于 96 孔板,除正常组外,其余各组完成 OGD 造模并进行含药血浆干预后,向每个孔中加入 CCK-8 溶液 10 μL,转移培养板到培养箱中孵育 1 h,然后在酶标仪 450 nm 处测量各组 OD 值并进行计算。

2.4.2 检测 ROS 含量 将 DCFH-DA 按照 1:1000 用无血清培养液稀释,终浓度为 10 μmol/L。细胞经过 OGD 造模后去除原有培养液,每个皿加入不少于 1 mL 稀释后的 DCFH-DA,充分盖住细胞。37 ℃下孵育 20 min。再用无血清培养液轻洗细胞 3 次,去除多余的 DCFH-DA。在荧光分光光度计下调整激

发波长488 nm,发射波长 525 nm 进行检测。

**2.4.3 检测 SOD 活力** 细胞经 OGD 造模并进行含药血浆培养基干预,消化吹打后将细胞悬液转入离心管,1000 r/min(离心半径  $r=15.9$  cm)离心 10 min,弃上清,冰上裂解沉淀细胞 20 min,充分裂解后将样品 12 000 r/min(离心半径  $r=8.6$  cm)离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书配制工作液进行 SOD 检测,同时用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,按公式计算 SOD 活力。

**2.4.4 检测 MDA 含量** 细胞经 OGD 造模并进行含药血浆培养基干预,消化吹打后将细胞悬液转入离心管,1000 r/min(离心半径  $r=15.9$  cm)离心 10 min,弃上清,冰上裂解沉淀细胞 20 min,充分裂解后将样品 12 000 r/min(离心半径  $r=8.6$  cm)离心 10 min,取上清,按试剂盒说明书配制工作液进行 MDA 检测,同时用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,按公式计算 MDA 含量。

**2.4.5 Western blot 检测 TFR、HEP、FPN 蛋白的表达水平** 细胞经 OGD 造模并进行含药血浆培养基干预,洗涤后加入 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂,裂解后离心,取上清液并采用 BCA 测量蛋白浓度,制备 SDS 上样液,  $-80$  °C 保存。制备 10%分离胶和 5%浓缩胶,上样后进行蛋白电泳,转膜 1.5 h 后脱脂牛奶室温封闭 1 h, TBST 稀释一抗 (Hepcidin 稀释比为 1:500, TFR 稀释比为 1:1000, FPN 稀释比为 1:500, GAPDH 稀释比为 1:5000), 4 °C 孵育,过夜。次日洗膜,滴加相应二抗(山羊抗兔 1:8000、山羊抗小鼠 1:8000)后 37 °C 孵育 1 h,最后显色并进行分析。

## 2.5 统计学方法

数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析, GraphPad Prism 8.0 软件作图。组间比较符合正态分布和方差齐性用单因素方差分析,多重比较用 *Dunnnett-t* 检验,不符合正态分布使用非参数检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 筛选补阳还五汤含药血浆最佳给药浓度

与正常组比较,模型组细胞存活力出现显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,空白血浆组的细胞活力无统计学差异,而补阳还五汤各剂量含药血浆组的细胞活力均出现明显升高( $P < 0.05$ );与低剂量组比较,中剂量、高剂量含药血浆组的细胞活力出现明显下降( $P < 0.01$ ),极低剂量组细胞活力有下降趋势,无统计学差异。详见图 1。

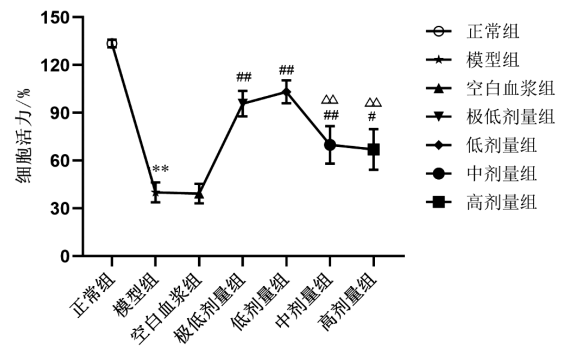


图 1 补阳还五汤含药血浆浓度梯度的细胞活性比较  
注:与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ;与低剂量组比较,△△ $P < 0.01$ 。

### 3.2 不同药物对细胞活力的影响

显微镜观察各组间细胞形态改变的结构如图 2 所示,正常组细胞形态规整,呈两级或多级,胞体大而明显,树突相互缠绕。与正常组比较,模型组细胞出现显著损伤,细胞数目明显减少,形态凌乱,树突明显稀疏、长度缩短,细胞活力显著降低( $P < 0.01$ );与模型组比较,低剂量组和去铁酮组的细胞损伤情况明显改善,细胞数目明显增加,形态明显规整,树突明显增加,细胞活力显著升高( $P < 0.01$ )。细胞活力检测结果见图 3。

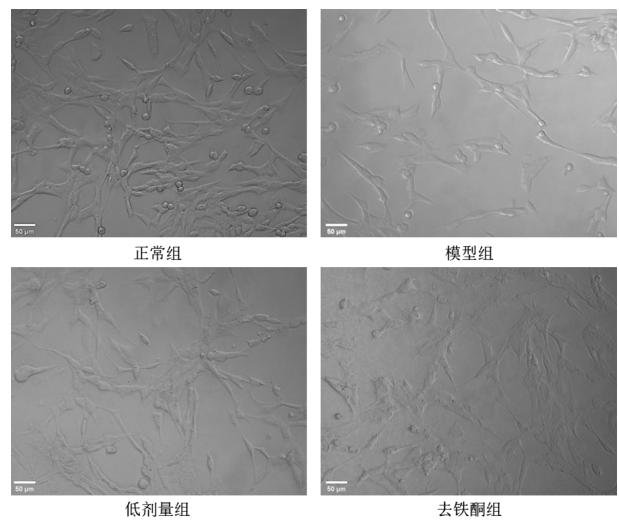


图 2 各组间细胞形态比较( $\times 200$ )

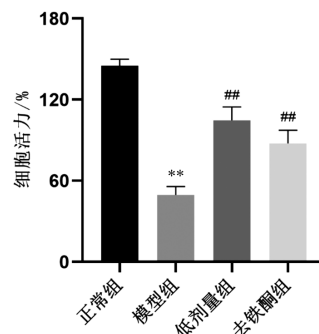


图 3 各组间细胞活力比较

注:与正常组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。

### 3.3 不同药物对各组间细胞 ROS 含量的影响

与正常组比较,模型组细胞损伤明显,ROS 含量急剧升高( $P<0.01$ );与模型组比较,低剂量组和去铁酮组的细胞 ROS 含量明显下降( $P<0.01$ )。详见图 4。

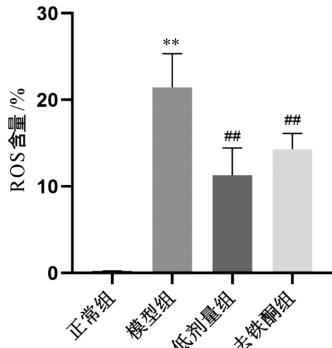


图 4 各组间细胞 ROS 含量比较

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

### 3.4 不同药物对各组间细胞 SOD 的影响

与正常组比较,模型组细胞 SOD 活力显著下降( $P<0.01$ );与模型组比较,低剂量组和去铁酮组的细胞 SOD 活力出现明显上升趋势( $P<0.05$ )。详见图 5。

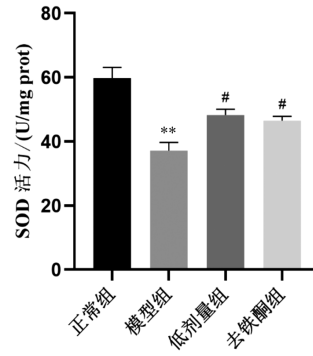


图 5 各组间细胞 SOD 活力比较

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ 。

### 3.5 不同药物对各组间细胞 MDA 的影响

与正常组比较,模型组细胞过氧化损伤明显,MDA 含量显著上升( $P<0.01$ );与模型组比较,低剂量组和去铁酮组的细胞 MDA 含量明显下降( $P<0.01$ )。详见图 6。

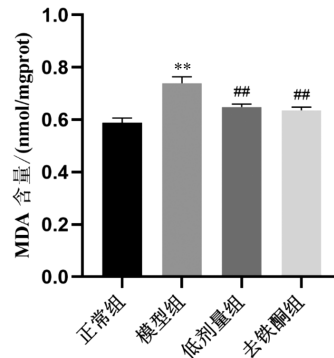


图 6 各组间 MDA 含量比较

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,## $P<0.01$ 。

### 3.6 Western blot 检测 TFR、HEP、FPN 蛋白的表达水平

与正常组比较,模型组 TFR 和 HEP 蛋白表达

显著增加( $P<0.01$ ),FPN 蛋白表达水平显著降低( $P<0.01$ );与模型组比较,低剂量组和去铁酮组 TFR 和 HEP 蛋白的相对表达量均有不同程度下降( $P<0.05$ ),FPN 蛋白表达水平明显升高( $P<0.01$ )。详见图 7。

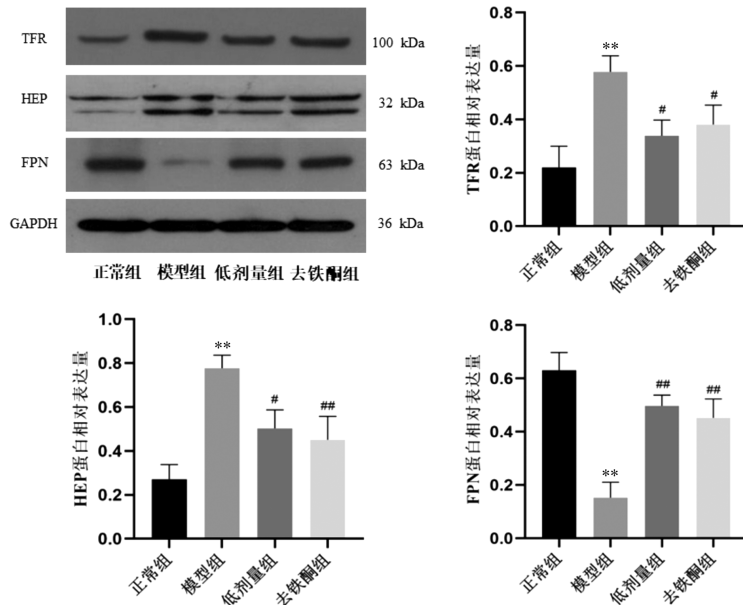


图 7 各组间 TFR、HEP、FPN 蛋白表达水平比较

注:与正常组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

## 4 讨论

临床调查数据显示,中国是世界上卒中发病率较高的国家之一,其中缺血性卒中占我国卒中分型的69.6%~70.8%<sup>[13-14]</sup>。研究发现,兴奋性毒性、离子失衡、氧化应激和细胞凋亡等因素均可导致脑组织功能障碍,从而加重脑卒中的损伤<sup>[15-16]</sup>。铁是人体最丰富的过渡金属元素,在生理状态下铁摄取、利用及储存处于稳态;病理情况下,铁超载可引起细胞内过氧化反应,铁稳态被打破<sup>[17]</sup>。铁聚集性沉积可导致肝脏、心脏等器官出现病变,脑卒中后铁沉积通过Fenton反应加重神经系统功能紊乱<sup>[18-19]</sup>。

TF是一类可逆的结合铁的糖蛋白,与TFR结合后形成复合体,通过胞吞方式将铁转运至细胞内<sup>[20-22]</sup>。FPN是目前已知唯一的膜铁输出蛋白,在各种细胞中FPN蛋白的表达普遍存在<sup>[23]</sup>。HEP被认为是机体铁代谢转运系统的主要调节分子,其表达受到炎症和激素等信号通路的调节<sup>[24-26]</sup>。研究发现,HEP能够与FPN直接作用,促进FPN内化降解,同时抑制十二指肠处的铁吸收和利用<sup>[27]</sup>,二者形成的HEP-FPN轴作用于人体参与了人体铁代谢的各个阶段,并维持铁的动态平衡,发挥调控机体铁稳态的作用<sup>[28-29]</sup>。

补阳还五汤是治疗中风气虚血瘀证的经典方剂,由清代医家王清任创立。黄芪补气升阳、养血通痹,为君药;当归活血祛瘀、补血,为臣药;赤芍散瘀止痛、活血凉血;川芎活血行气;地龙通络化瘀;桃仁祛瘀活血;红花活血通经、散瘀止痛。诸药同用,共奏活血通络祛瘀之效。研究发现,补阳还五汤中的药物成分具有扩张血管、改善微循环的作用,能够有效改善脑缺血组织损伤<sup>[30]</sup>。现代研究表明,补阳还五汤可以促进脑缺血损伤区域的血管生成,增加脑血流量,为梗死区域及周围组织输送氧气和营养物质,促进新生细胞向神经元分化,通过多途径、多靶点促进神经功能恢复等<sup>[31-32]</sup>。吴万丰等<sup>[33]</sup>通过分析补阳还五汤干预后缺血性卒中大鼠的肠道菌群以及血浆代谢产物,认为补阳还五汤通过抗氧化参与缺血性卒中的神经保护机制,并降低缺血性脑卒中血液高凝状态。临床资料分析表明,卒中恢复期使用补阳还五汤治疗有明显效果<sup>[34]</sup>。此外,由补阳还五汤临证化裁而研制的中药复方也可明显抑制神经细胞过氧化造成的损伤,减少脑神经细胞缺血性损害<sup>[35]</sup>。

本实验通过模拟半体内环境,以补阳还五汤为干预药物,探讨其调控脑缺血后铁稳态失衡,改善神经元损伤的作用机制。由实验结果可得知不同浓度补阳还五汤对损伤神经元均具有一定改善作用,低剂量浓度改善作用最显著,细胞活性和形态较其他剂量组均有明显改善。去铁酮片中的主要成分去铁酮,一种与铁离子螯合清除机体多余铁的螯合剂。既往研究发现,去铁酮可以通过下调脑缺血后TFR的表达并上调FPN的表达,促进缺血后铁外排,降低缺血后铁的异常沉积<sup>[36]</sup>。当铁稳态失衡时,细胞摄铁量增加,排铁量减少,最终导致铁沉积。过量沉积的铁诱导ROS产生,激活氧化应激反应<sup>[37]</sup>。补阳还五汤干预后细胞活性的增加和ROS含量的降低趋势与去铁酮组基本一致,细胞的损伤形态明显改善。通过对造模后干预处理的细胞进行SOD与MDA检测结果表明,补阳还五汤和去铁酮进行干预后的细胞损伤情况与模型组相比得到改善,SOD活力显著上升,MDA含量下降,即细胞对抗自由基继发损伤的能力提高,并且部分细胞过氧化损伤有所改善。TF与TFR结合,将铁转运至细胞内后,诱导细胞内Smads信号转导蛋白磷酸化,p-Smads与Smad4结合并进入细胞核促进HEP的表达,HEP高表达可增加FPN的泛素化与降解,导致铁沉积,加重损伤<sup>[38]</sup>。通过实验数据可看出,与模型组比较,补阳还五汤和去铁酮进行干预后,TFR、HEP蛋白的表达明显降低,FPN表达明显增加,表明补阳还五汤可以改善细胞损伤后铁代谢转运蛋白紊乱的状态,TFR与HEP表达降低,减少铁离子输入,FPN表达增加,可有效促进铁外排。由此推测补阳还五汤可能是通过抑制TFR的表达,降低HEP的产生,改善下游FPN内化降解现象,在铁输入与输出蛋白的协同作用下,促进神经元损伤后铁沉积外排,增加细胞抗氧化能力,发挥改善脑缺血神经元损伤的作用。

## 参考文献

- [1] 杨皓雷,王金海,杜小正,等.程序性细胞死亡蛋白1及其配体1信号通路在缺血性卒中发病机制中的研究进展[J].中国脑血管病杂志,2022,19(9):653-656.
- [2] 赵源杰,秦歌,郑浩懿,等.铁死亡发生机制及其在雄性动物生殖中的研究进展[J].动物医学进展,2022,43(11):85-90.
- [3] 吴海辉,葛金文.铁调素在缺血性脑卒中后铁稳态失衡中的调控作用[J].医学综述,2021,27(18):3581-3586,3591.

- [4] 王晓宇. 补阳还五汤加减对气虚血瘀型中风的意义分析[J]. 中国实用医药, 2022, 17(2): 177-179.
- [5] 陈媛朋, 王鑫鑫, 郭亚萌, 等. 补阳还五汤防治缺血性脑卒中的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(5): 197-201.
- [6] 赵冯岩, 杨浩澜, 朱炎贞, 等. 基于网络药理学从铁死亡途径研究补阳还五汤调控缺血性脑卒中的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(7): 1065-1072.
- [7] 高学敏, 张德芹, 钟赣生, 等. 中国药典中药材及饮片彩色图鉴[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2015: 108, 328, 360, 410, 427, 754, 832.
- [8] GOLDBERG M P, CHOI D W. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: Calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury[J]. *Journal of Neuroscience*, 1993, 13(8): 3510-3524.
- [9] 李昕. 基于细胞焦亡机制探讨补肾复元汤对缺氧 PC12 细胞的保护作用[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [10] 郭冬芬, 任真奎, 胡玉梅, 等. miR-214-3p 对缺氧缺氧再灌注诱导 PC12 细胞凋亡的作用及机制[J]. 贵州医科大学学报, 2021, 46(7): 766-772.
- [11] 罗银河, 葛金文, 刘林, 等. 补阳还五汤含药血浆和血清对缺氧损伤大鼠 BMECs 纤溶系统和黏附分子表达影响及与体内实验的比较研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(8): 3241-3246.
- [12] 陈刚. 补阳还五汤及其有效组分对 VSMC 增殖的影响及细胞周期和 MAPK 信号转导机制的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2009.
- [13] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: Results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults[J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.
- [14] WU S, WU B, LIU M, et al. Stroke in China: advances and challenges in epidemiology, prevention, and management [J]. *Lancet Neurology*, 2019, 18(4): 394-405.
- [15] NIKSERESHT S, KHODAGHOLI F, AHMADIANI A. Protective effects of ex-527 on cerebral ischemia-reperfusion injury through necroptosis signaling pathway attenuation[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(2): 1816-1826.
- [16] YU Z, WENYAN T, XUEWEN S, et al. Immunological effects of the intraparenchymal administration of allogeneic and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells after the acute phase of middle cerebral artery occlusion in rats[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2018, 16(1): 339.
- [17] 王蕾, 王子琼, 于露, 等. 铁代谢及铁稳态失衡的研究进展[J]. 公共卫生与预防医学, 2022, 33(3): 118-122.
- [18] 方学贤, 蔡昭贤, 王浩, 等. 铁过载及铁死亡在心脏疾病中的研究进展[J]. 科学通报, 2019, 64(28): 2974-2987.
- [19] FARINA M, AVILA DS, DA ROCHA JB, et al. Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury[J]. *Neurochemistry International*, 2013, 62(5): 575-594.
- [20] 义水灵, 熊向源. 转铁蛋白在纳米靶向药物递送体系的应用[J]. 材料导报, 2021, 35(S2): 501-507.
- [21] 刘佩佩, 杨冬梅, 夏琼, 等. 转铁蛋白受体 1 与早期生长反应因子 4 在宫颈癌组织中的表达及其临床意义[J]. 现代免疫学, 2019, 39(4): 302-306.
- [22] JHAVERI A, DESHPANDE P, PATTNI B, et al. Transferrin-targeted, resveratrol-loaded liposomes for the treatment of glioblastoma [J]. *Journal of Controlled Release*, 2018, 277: 89-101.
- [23] 席悦, 杜玄一. 膜铁转运蛋白在肾性贫血中的研究进展[J]. 中国血液净化, 2021, 20(4): 273-276.
- [24] 亢必勃, 秦源, 张久聪. 铁调素调控与铁代谢相关疾病研究进展[J]. 生物技术通讯, 2018, 29(3): 442-445.
- [25] AROSIO P. New signaling pathways for hepcidin regulation[J]. *Blood*, 2014, 123(10): 1433-1434.
- [26] ZANELLA I, PAIARDI G, DI LORENZO D, et al. Iron absorption in celiac disease and nutraceutical effect of 7-Hydroxymatairesinol. Mini-Review[J]. *Molecules*, 2020, 25(9): 2041.
- [27] 陈蕾, 李楠, 许天敏, 等. 雌激素相关疾病中铁调素及其信号通路的研究[J]. 医学综述, 2022, 28(2): 252-258.
- [28] 陈春梅, 葛品, 郭翀. 人体铁代谢及其调控因素[J]. 基础医学与临床, 2022, 42(5): 818-823.
- [29] 苟峻琦, 付国齐, 黄禄勇, 等. 铁调素与冠心病关系的研究进展[J]. 心脑血管病防治, 2022, 22(2): 61-64, 77.
- [30] 王艳华. 补阳还五汤联合西药对急性高血压脑出血患者炎症因子及神经功能的影响[J]. 中医药临床杂志, 2019, 31(5): 919-921.
- [31] 张铁松, 黄思聪, 潘剑威. 补阳还五汤促缺血性脑卒中后血管生成机制的研究进展[J]. 中华危重症医学杂志(电子版), 2021, 14(6): 507-511.
- [32] 张琪, 李慢中, 冯雪枫, 等. 补阳还五汤对脑缺血大鼠梗死灶周围脑区新生神经细胞增殖、分化及 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2021, 44(11): 1002-1010.
- [33] 吴万丰, 聂慧芳, 胡立娟, 等. 补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群及其血浆代谢产物的影响[J]. 中草药, 2021, 52(1): 118-128.
- [34] 孟红. 补阳还五汤对缺血性脑卒中患者恢复期的作用研究[J]. 中国医药指南, 2019, 17(28): 174-175.
- [35] 余瑞宁, 方锐, 周月, 等. 葛金文教授基于“血实宜决, 气虚宜掣”运用脑泰方治疗高血压脑小血管病临证撷萃[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(3): 445-448.
- [36] 廖君, 黄娟, 石咏梅, 等. 去铁酮对脑缺血再灌注大鼠海马区铁跨膜转运蛋白表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(6): 577-582.
- [37] 谷正盛, 杜冰滢, 吴汶, 等. 中枢神经系统铁沉积与血管性认知障碍研究进展[J]. 海军军医大学学报, 2022, 43(3): 301-307.
- [38] LAN B, GE JW, CHENG SW, et al. Extract of Naotaifang, a compound Chinese herbal medicine, protects neuron ferroptosis induced by acute cerebral ischemia in rats[J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2020, 18(4): 344-350.