

补阳还五汤增强GPX4表达抑制铁死亡减轻脑缺血再灌注损伤

蔡国英^{1,2}, 刘均广^{1,2}, 叶佳蓓², 单玉栋², 周晓红², 高维娟^{2*}

(1.承德医学院基础医学院, 河北承德 067000; 2.河北中医学院)

摘要: **目的** 探讨补阳还五汤减轻脑缺血再灌注损伤是否通过增强GPX4的表达抑制铁死亡的机制。**方法** 选取健康雄性SD大鼠48只, 随机分为4组: 假手术组(Sham组)、模型组(MCAO/R组)、补阳还五汤组(BYHWD组)、阳性对照药组(DFO组)。所有实验动物均建MCAO/R模型(假手术组仅剥离)。BYHWD组给予补阳还五汤灌胃处理, DFO组给予DFO腹腔注射处理, 其余组予以生理盐水灌胃处理。再灌注72 h进行指标评定及取材。神经功能评分检测神经功能; TTC染色测定脑梗死面积; 尼氏染色观察脑组织形态结构; 生化试剂检测血清GSH、丙二醛(MDA)、脑组织铁含量; 免疫荧光和Western blot检测谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的蛋白表达。**结果** 与假手术组相比, 模型组大鼠神经功能损伤明显, 脑梗死体积增多, 脑组织病理学损伤明显, 尼氏体数量减少, 脑组织铁含量、血清MDA含量明显增加, 血清GSH含量、脑组织GPX4的蛋白表达显著降低($P<0.05$); 与模型组相比, 补阳还五汤组大鼠神经功能明显好转, 脑梗死体积降低, 脑组织病理学损伤减轻, 脑组织铁含量、血清MDA含量降低, 血清GSH含量、脑组织GPX4的蛋白表达显著增加($P<0.05$)。**结论** 补阳还五汤抑制脑缺血再灌注损伤可能通过增强GPX4的表达抑制铁死亡而发挥作用。

关键词: 脑缺血再灌注损伤; 补阳还五汤; 谷胱甘肽过氧化物酶4

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1004-6879(2024)01-0010-05

Study on the Effect of Buyang Huanwu Decoction on Enhancing the Expression of GPX4 and Inhibiting Ferroptosis to Alleviate Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury

CAI Guo-ying^{1,2}, LIU Jun-guang^{1,2}, YE Jia-bei², SHAN Yu-dong², ZHOU Xiao-hong², GAO Wei-juan^{2*}

(1. School of Basic Medicine, Chengde Medical University, Chengde, Hebei, 067000, China; 2. Hebei University of Traditional Chinese Medicine)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of Buyang Huanwu Decoction (BYHWD) in alleviating cerebral ischemia reperfusion injury by enhancing the expression of GPX4 and inhibiting iron death. **Methods** Forty-eight healthy male SD rats were randomly divided into 4 groups: sham operation group (Sham), model group (MCAO/R), Buyang Huanwu decoction group (BYHWD), and positive control drug group (deferrioxamine mesylate, DFO). All experimental animals were established MCAO/R model (sham operation group only stripped). Buyang Huanwu Decoction group (BYHWD) was given Buyang Huanwu Decoction by gavage, DFO group was given DFO by intraperitoneal injection, and other groups were given normal saline by gavage. The indexes were evaluated and materials were taken after 72 hours of reperfusion. Nerve function score was used to detect nerve function; the area of cerebral infarction was measured by TTC staining; Nessler's staining was used to observe the morphological structure of brain tissue; serum GSH, malondialdehyde (MDA) and iron content in brain tissue were detected with biochemical reagents; immunofluorescence and Western blot were used to detect the protein expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4). **Results** Compared with the sham-operated group, the rats in the model group had obvious neurological damage, increased cerebral infarction volume, obvious brain histopathological damage, decreased the number of nissl bodies, increased brain iron content and serum MDA content, and significantly decreased serum GSH

资助项目: 中央引导地方科技发展资金项目(206Z7706G); 河北省科技研发平台与新型研发机构建设专项(20567626H)

*通讯作者

content and GPX4 protein expression in brain tissue ($P<0.05$); compared with the model group, the nerve function of the rats in the Buyang Huanwu Decoction group was significantly improved, the volume of cerebral infarction was reduced, the pathological damage of brain tissue was reduced, the content of iron in brain tissue and serum MDA were decreased, and the content of serum GSH and the protein expression of GPX4 in brain tissue were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction can inhibit cerebral ischemia reperfusion injury by increasing the expression of GPX4 and inhibiting ferroptosis.

Key words: cerebral ischemia reperfusion injury; Buyang Huanwu Decoction; glutathione peroxidase 4

补阳还五汤是治疗缺血性脑卒中的经典名方^[1]。脑缺血再灌注损伤(cerebral ischemia-reperfusion injury, CIRI)是缺血性脑卒中发生后通过药物溶栓或手术取栓重新恢复血流灌注对脑组织造成的进一步损伤,其病理机制十分复杂,可能导致各种病理变化和细胞死亡^[2,3]。铁死亡是一种铁依赖性的谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)失活的细胞死亡形式^[4]。GPX4是铁死亡过程中的关键调节因子,研究表明,细胞GPX4的缺乏或抑制会导致脂质过氧化诱发铁死亡,而增加GPX4水平或活性可以抑制铁死亡^[5]。GPX4成为了探索铁死亡在各类疾病中的治疗靶点^[6]。本研究主要探讨补阳还五汤减轻CIRI是否通过增强GPX4的表达抑制铁死亡,以期进一步阐明补阳还五汤治疗CIRI的作用机制,为临床治疗缺血性脑卒中提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级健康雄性SD大鼠48只,7~8周龄,体质量250~280 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号为SCXK(京)2016-0011,适应性饲养一周后开始实验。所有实验动物均依据伦理审查委员会关于《实验动物管理条例》的指导方针给予人道主义关怀。

1.2 实验药物

补阳还五汤药物组成:黄芪120 g、当归6 g、地龙3 g、桃仁3 g、赤芍5 g、红花3 g、川芎3 g,购自北京同仁堂药店。将药物经水浸泡软化30 min后,予以武火煮沸后文火煮,最后水煎液浓缩至100 mL,得到每1 mL补阳还五汤水煎液对应的生药量为1.43 g。甲磺酸去铁胺(deferoxamine, DFO)购自MedChemExpress公司,产品批号116349。

1.3 主要试剂

TTC染液、尼氏染液、兔抗 β -actin抗体、FITC-羊抗鼠

IgG荧光标记抗体(武汉塞维尔生物科技有限公司);鼠抗GPX4抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(武汉三鹰生物技术公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(上海碧云天生物技术有限公司);还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒、丙二醛(malonaldehyde, MDA)测定试剂盒、组织铁测定试剂盒(南京建成生物技术公司)。

1.4 主要仪器

MCAO栓线(北京西浓科技有限公司);PVDF膜(Millipore);组织包埋机、轮转切片机及显微拍照系统(Leica);电泳系统及半干转膜仪系统(Bio-Rad);近红外双色激光成像系统(LI-COR);高速低温组织研磨仪(武汉塞维尔生物科技有限公司);冷冻高速离心机、多功能酶标仪(Thermo)。

1.5 实验动物分组、造模及给药

将48只健康雄性SD大鼠随机分为4组:假手术组(Sham组)、模型组(MCAO/R组)、补阳还五汤组(BYHWD组)、阳性对照药组(DFO组),每组12只大鼠。除Sham组外,其余各组大鼠均参照文献^[7]建立MCAO模型,缺血2 h后再灌注72 h。造模结束后BYHWD组给予补阳还五汤水煎液灌胃处理,剂量参照实验室前期研究为14.3 g/kg/d。DFO组给予腹腔注射甲磺酸去铁胺5 mg/kg,剂量参照相关文献^[8]。假手术组和模型组均予以等剂量生理盐水灌胃处理。各组均为每24 h给药1次。

1.6 Zea Longa评分评估神经功能缺损情况

大鼠清醒后根据Zea Longa评分^[9],将评分为1~3分的大鼠入组,0分、4分予以剔除;评分标准:无神经功能缺损情况为0分;悬尾时对侧前爪屈曲,不能完全伸展,为1分;行走时不能走直线且出现“追尾”现象,即向对侧转圈,为2分;行走时向对侧倾倒为3分;无自主活动或意识丧失为

4分。

1.7 TTC染色检测脑梗死体积百分比

再灌注72 h后将大鼠麻醉并取出完整脑组织,经PBS清洗后置于模具中,-20℃冰冻30 min沿冠状面其切成6个2 mm厚的脑片,避光置于TTC染液中,放入37℃恒温箱中避光染色30 min,每15 min翻一次面使染色均匀。再用4%多聚甲醛固定液固定24 h,将其按顺序放置,相机拍摄后用Image J软件计算缺血侧脑梗死体积占总体积百分比。

1.8 尼氏染色观察神经元损伤情况

再灌注72 h后将大鼠麻醉并取出完整脑组织,用4%多聚甲醛固定液充分固定24 h以上,梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,制备厚度约5 μm的石蜡切片。将石蜡切片常规脱蜡至水,进行尼氏染液染色,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后,中性树胶封片,于显微镜下观察并拍照。

1.9 大鼠GSH、MDA、组织铁测定试剂盒含量检测

将取得的血清以及组织样本按标本处理的要求步骤进行离心、提取上清等操作,按说明书置于96孔板上样后,分别在420 nm、532 nm及520 nm波长下用酶标仪测定检测样品的吸光度,根据公式计算GSH、MDA、铁离子含量。

1.10 Western blot检测GPX4的蛋白表达水平

将冻存脑组织称量后冰上裂解,经匀浆、离心后BCA法测定,计算蛋白浓度。剩余上清液中加适量loading buffer变性,经SDS-PAGE电泳分离,半干转法转移到PVDF膜上;5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h,TBST洗膜后在I抗[GPX4抗体(1:2000)及内参照β-actin抗体(1:1000)]溶液中4℃孵育过夜,TBST洗膜,与相应种属的II抗(辣根过氧化物酶标记的IgG抗体)溶液室温孵育2 h,TBST洗膜。ECL显色剂避光孵育后曝光成像,使用凝胶成像系统采集图像,用Image J软件分析计算蛋白GPX4相对表达量。

1.11 统计学处理

采用SPSS 26.0、Image J和GraphPad Prism 8.0.1软件对所得实验数据进行分析。数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。服从正态分布及方差齐时采用单因素方差分析,不服从分布或者方差不齐时采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠神经功能的影响

Sham组大鼠神经功能正常,其余各组大鼠均出现不同程度神经功能缺损情况。与Sham组相比,MCAO/R组大鼠神经功能缺损明显,神经功能学评分增高,差异有显著性意义($P < 0.01$);与MCAO/R组相比,BYHWD组和DFO组大鼠神经功能缺损情况有所好转,神经功能学评分降低,差异有显著性意义($P < 0.05$),见图1。

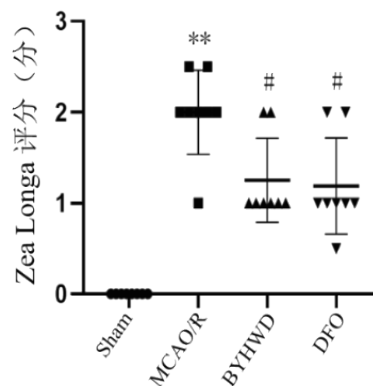


图1 Zea Longa评分观察各组大鼠神经功能缺损状况
($\bar{x} \pm s$; $n=8$)

** $P < 0.01$ vs Sham组; # $P < 0.05$ vs MCAO/R组

2.2 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织脑梗死体积的影响

如图2所示,Sham组大鼠脑片均为红色,未见白色梗死区域;与Sham组比较,MCAO/R组大鼠脑片出现大片明显的白色梗死区域,脑梗死体积明显增多($P < 0.01$);与MCAO/R组比较,BYHWD组和DFO组大鼠脑片白色梗死区域较少,脑梗死体积明显减少($P < 0.05$)。

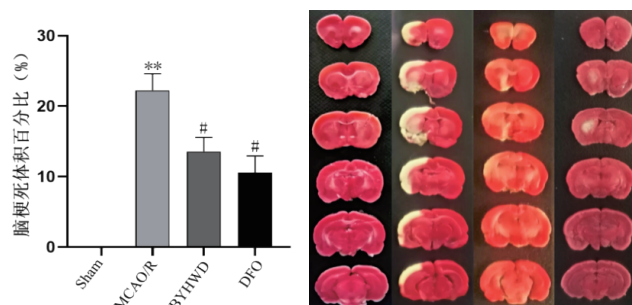


图2 大鼠脑梗死体积($\bar{x} \pm s$; $n=3$)

** $P < 0.01$ vs Sham组; # $P < 0.05$ vs MCAO/R组

2.3 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织尼氏染

色的影响

尼氏染色结果显示,Sham组大鼠脑皮质神经细胞的形态结构均正常,可见数量较多的尼氏体,未见明显病理改变。与Sham组相比,MCAO/R组大鼠脑皮质半暗带区

神经细胞尼氏体明显减少,多见空泡样改变与胞核固缩等病理改变;与MCAO/R组相比,BYHWD组和DFO组大鼠脑皮质半暗带区神经细胞尼氏体增多,细胞损伤程度减轻。见图3。

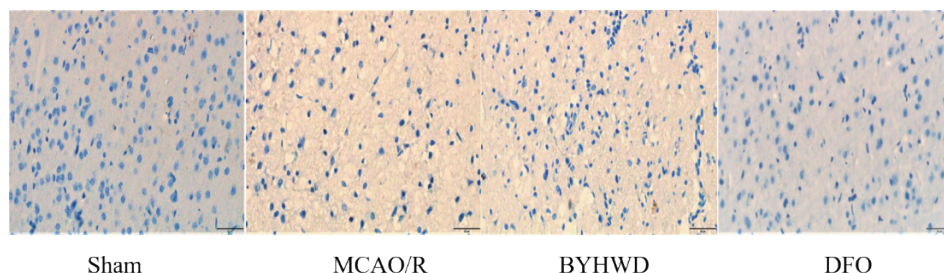


图3 大鼠脑组织尼氏染色($\bar{x} \pm s; n=3$)

2.4 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠脑组织铁含量和血清GSH、MDA含量的影响

与Sham组相比,MCAO/R组大鼠组织铁含量以及血清MDA水平明显升高,GSH水平明显降低($P<0.01$);

与MCAO/R组相比,BYHWD组和DFO组大鼠组织铁含量以及血清MDA水平明显降低,GSH水平明显升高($P<0.01$)。见图4。

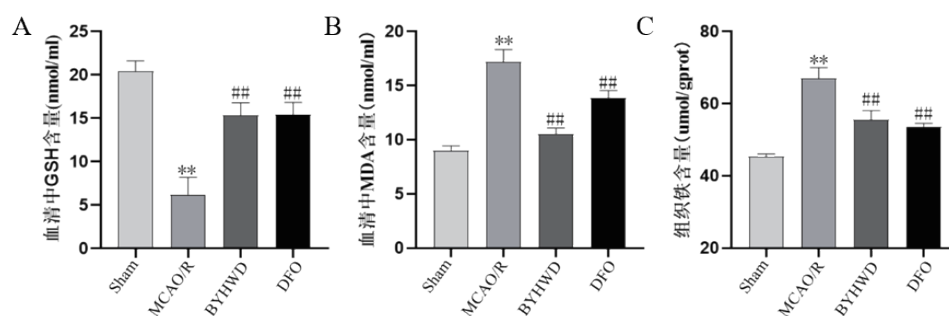


图4 大鼠血清中GSH含量、MDA含量以及脑组织铁含量($\bar{x} \pm s; n=3$)

A.脑组织GSH含量;B.脑组织MDA含量;C.脑组织Fe含量; ** $P<0.01$ vs Sham组; ## $P<0.01$ vs MCAO/R组

2.5 补阳还五汤对脑缺血再灌注损伤大鼠蛋白GPX4表达的影响

Western blotting结果如图5所示,与假手术组比较,模型组大鼠脑组织GPX4蛋白表达显著下降($P<0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠脑组织GPX4蛋白表达显著上调($P<0.05$)。



图5 大鼠蛋白GPX4表达($\bar{x} \pm s; n=3$)

** $P<0.01$ vs Sham组; # $P<0.05$; ## $P<0.01$ vs MCAO/R组

3 讨论

缺血性脑卒中是一类常见的神经系统疾病,致死率居于全球第二,且多数患者预后不良,是致残的主要原因^[10]。目前临床上对缺血性脑卒中的治疗方式是在一定的治疗时间窗内通过药物溶栓或手术取栓,但即便恢复再通后仍有半数左右患者因脑组织缺血再灌注损伤致死致残,行之有效的良药研发仍展现出巨大的未竟需求^[11]。中药复方具有多靶点多途径协同作用的效果^[12]。补阳还五汤出自清代名医王清任《医林改错》,是传统的中药复方,其通过抑制兴奋性氨基酸毒性、减轻钙超载、抑制氧自由基损伤等途径大幅改善患者预后^[13]。而补阳还五汤与CIRI在铁死亡之间的联系与作用机制仍需要更多的研

