

网络出版时间: 2024-12-26 15:43:21 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.r.20241226.1134.005>

## 参附注射液通过抑制铁死亡发挥 对缺氧缺血性脑损伤的保护作用

张晓彤<sup>1</sup> 张 萌<sup>1</sup> 李 刚<sup>2</sup> 胡 阳<sup>3</sup> 荀雅静<sup>3</sup> 丁 会<sup>1</sup> 沈栋林<sup>4</sup> 吴 铭<sup>1, #</sup>  
(徐州医科大学<sup>1</sup> 第一临床医学院、<sup>3</sup> 第二临床医学院 徐州 221000;  
徐州医科大学附属医院<sup>2</sup> 口腔科、<sup>4</sup> 儿科 徐州 221000)

**摘要** 目的 观察缺氧缺血时脑组织损伤情况及使用参附注射液(SFI)后的病理改变、铁死亡相关因子的表达,探讨SFI通过抑制铁死亡发挥对缺氧缺血性脑损伤(HIBD)的保护作用机制。方法 构建SD大鼠HIBD模型,并用SFI进行干预。HE染色观察脑组织病理改变;尼氏染色观察神经元存活情况;Western blot、免疫组织化学、免疫荧光法检测脑组织谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、二价金属离子转运蛋白1(DMT1)的表达;试剂盒检测还原型谷胱甘肽(GSH)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)及组织铁含量。体外培养小鼠小胶质细胞系(BV2),分为对照(Ctrl)组、氧糖剥夺(OGD)组、铁死亡诱导(Erastin)组、铁死亡抑制(Fer-1)组、SFI组、Erastin+SFI组,2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)活性氧(ROS)荧光探针检测ROS释放水平;免疫荧光染色观察细胞内GPX4、DMT1表达。结果 与Sham组相比,HIBD组大鼠脑组织中出现明显的神经细胞受损,GPX4表达下降( $P < 0.01$ ),DMT1表达升高( $P < 0.01$ ),GSH与SOD含量下降( $P < 0.01$ ),LDH、MDA及组织铁含量上升( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );而SFI干预后,与Sham组相比,GPX4表达升高( $P < 0.01$ ),DMT1表达下降( $P < 0.01$ ),GSH与SOD含量升高( $P < 0.01$ ),LDH、MDA及组织铁含量降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。BV2细胞实验显示:与Ctrl组相比,OGD组ROS含量明显升高且GPX4荧光强度表达明显下降、DMT1荧光强度上升( $P < 0.01$ );与OGD组相比,SFI组ROS含量降低,同时GPX4的表达升高,DMT1的表达降低( $P < 0.01$ )。结论 新生HIBD大鼠海马及皮质区损伤严重,GPX4表达下降、DMT1表达升高,提示铁死亡参与新生大鼠HIBD脑损伤,而SFI通过减少铁的聚集,减少ROS的产生,对HIBD实验动物模型和BV2细胞损伤模型具有保护作用。

**关键词** 缺氧缺血性脑损伤;铁死亡;氧化应激;氧糖剥夺;参附注射液;小胶质细胞

中图分类号 R 722.19

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)01-0031-10

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.01.005

### 新生儿缺氧缺血性脑损伤(hypoxic-ischemic

brain damage, HIBD)是一种脑组织缺氧缺血导致的脑损伤,是目前临床上导致新生儿出现残疾甚至死亡的主要原因,且针对HIBD临床上并无特异性治疗措施<sup>[1-2]</sup>。铁死亡(ferroptosis)是一种新提出的不同于一般细胞死亡的程序性死亡方式,近年来被诸多研究者发现其参与多种疾病的发病过程<sup>[3-4]</sup>。有研究<sup>[5-6]</sup>表明,脑部神经系统疾病与铁死亡相关。参附注射液(Shenfu injection, SFI)源自于祖国医学

2024-10-29 接收

基金项目:江苏省卫生健康委员会科研项目(编号:H2019004);江苏省研究生科研与实践创新计划(编号:KYCX22\_2911);江苏省大学生创新创业计划(编号:202010313048Y)

作者简介:张晓彤,女,硕士研究生;

吴 铭,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,通信作者,

E-mail: 14083054@qq.com

cartilage erosion and bone destruction in CIA in rats by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.

**Key words** puerarin; rheumatoid arthritis; CIA in rats; network pharmacology; Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway; synovial hyperplasia

**Fund programs** National Natural Science Foundation of China(No. 82160917); Project of the Scientific and Technology Department of Guizhou Province (Official Document of Guizhou Basic Scientific Research, 2023, General No. 435); Key Laboratory Project in Universities of Guizhou Province (Official Document of Guizhou Education and Technology, 2023, No. 017); Chinese Medicine, Ethnic Medicine Science and Technology Research Project of Guizhou Administration of Traditional Chinese Medicine (No. QZYY-2020-005)

**Corresponding author** Tang Fang, E-mail: 64550932@qq.com

经方参附汤 现代药理研究证实其具有多靶效应,可维持血流动力学稳定、改善微循环、保护重要脏器,具有较强的铁离子还原能力及抗氧化能力<sup>[7-8]</sup>。目前,临床上 HIBD 的干预药物比较少且主要集中在西药方面,关于中成药在 HIBD 中的作用研究较少。该研究通过构建 HIBD 实验动物模型和小鼠小胶质细胞系(BV-2 microglial cell line, BV2)细胞损伤模型,深入探讨铁死亡在 HIBD 发病机制中的作用,为临床进一步阐明 HIBD 发病机制提供新角度,并通过观察 SFI 对铁死亡的抑制作用及对 HIBD 实验模型的保护作用,为扩大中药应用领域提供一定的理论基础及实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 徐州医科大学实验动物中心提供 15 只健康成年 SD 大鼠,饲养条件为室温(20~26℃),光照条件为 12 h/12 h 明暗交替。动物合格证号: SCXK(苏)2020-0011。按照 1:2 雄雌比例进行交配繁殖,孕鼠单独喂养,待产鼠后选用日龄 3 d 的 SD 大鼠作为实验对象。该研究经徐州医科大学实验动物伦理道德委员会批准(批号: 202205A206)。

**1.2 试剂与仪器** HE 染色试剂盒、尼氏染色液(武汉赛维尔生物技术有限公司);谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)一抗、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗、荧光抗兔二抗、荧光抗鼠二抗、抗小鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(美国 proteintech 公司);二价金属离子转运蛋白 1(divalent metal transporter 1, DMT1)一抗(美国 AB-clonal 公司);铁死亡诱导剂(Erastin)、铁抑素-1(ferrostatin-1, Fer-1)(美国 MedChemExpress 公司);还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、组织铁测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);活性氧(reactive oxygen species, ROS)荧光探针(北京索莱宝科技有限公司)。正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司,型号: BX53/DP74);全波长酶标仪(美国 Bio-Tek 公司,型号: Synergy2);超高分辨激光扫描共聚焦显微镜(德国 Leica 公司,型号: STELLARIS 5);流式细胞仪(美国 BIO-RAD 公司,型号: FACScanto II)。

**1.3 实验动物模型制备及实验分组** 实验动物为清洁级 3 d 龄 SD 大鼠,每只体质量 8~10 g,随机分为假手术(Sham)组、HIBD 组、LSFI 组、HSFI 组。参

照相关文献<sup>[9]</sup>制作新生大鼠 HIBD 模型: 3 d 龄新生 SD 大鼠采用吸入七氟烷的方式进行麻醉,将其处于仰卧位状态并用胶带将头部及其四肢进行固定;划开皮肤,将右颈总动脉进行游离,将丝线浸泡在碘伏中进行消毒然后对血管进行相应结扎,于双重结扎线中部将血管离断,而后将切口进行缝合;将新生大鼠置回母鼠身边进行休息 2 h,而后再放入低氧箱(气体配比: 8% 氧气、92% 氮气)中进行低氧 2 h,气体流速为(1~2) L/min。Sham 组: 该组新生大鼠仅划开颈部皮肤进行右颈总动脉游离但不进行血管离断,也不做结扎与低氧,缝合切口后置回母鼠身旁;HIBD 组: 通过“缺血+低氧”的方式建立动物实验模型;LSFI 组: 除与 HIBD 组做同样处理外,以腹腔注射的方式给予 SFI,剂量为 10 ml/kg,每日 1 次,维持 3 d;HSFI 组: 除与 HIBD 组做同样处理外,以腹腔注射的方式给予 SFI,剂量为 20 ml/kg,每日 1 次,维持 3 d。参照文献<sup>[10]</sup>制作 BV2 细胞氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型,将细胞随机分为 6 组: Ctrl 组、OGD 组(培养基由高糖培养基更换为无糖培养基并将 BV2 细胞放入三气培养箱中培养)、Erastin 组(Erastin 为 1  $\mu$ mol/L)、Fer-1 组(做与 OGD 组相同处理并加入 Fer-1,浓度为 1  $\mu$ mol/L)、SFI 组(做与 OGD 组相同处理并加入 SFI,浓度为 1  $\mu$ l/ml)、Erastin + SFI 组(浓度为 1  $\mu$ mol/L 的 Erastin 和浓度为 1  $\mu$ l/ml 的 SFI 等体积混匀)。

## 1.4 方法

**1.4.1 新生大鼠脑组织的获取** 依据参考文献获取脑组织<sup>[11]</sup>: 各组新生大鼠在造模 72 h 后断头取脑,称取脑组织,裂解蛋白,匀浆结束后转移至新的 EP 管,12 000 r/min,离心 15 min,吸取上清液,置于-80℃保存。新生 SD 大鼠于造模 72 h 后取材,充分暴露心脏,插入灌注针,剪开右心耳,快速灌注 50 ml 0.9% NaCl,右心耳流出处液体为无色透明后,灌注 4% 预冷的多聚甲醛 50 ml,待四肢抽搐及全身组织变硬后取材,固定。

**1.4.2 HE 染色** 将新生鼠脑组织进行石蜡包埋、切片,脱蜡,水化,苏木精、伊红依次染色后脱水、透明、中性树脂封片,于显微镜下观察神经细胞排列情况并在不同倍镜下拍照。

**1.4.3 尼氏染色** 水化前方法同 HE 染色,用 Nissl 染色液进行染色,冲洗干净后进行脱水,使用中性树脂进行封片,于显微镜下观察尼氏小体并拍照分析。

**1.4.4 免疫荧光** 水化前方法同 HE 染色,枸橼酸盐煮沸后放入切片,低火修复,冷却后用 PBS 清洗,

圈出组织后滴加封闭液,一抗过夜,次日加入对应荧光标记二抗,注意避光,洗涤后用 DAPI 进行核染色,封片,于显微镜下观察荧光强度并进行统计分析。

**1.4.5 免疫组化** 孵育一抗前方法同免疫荧光,次日滴加过氧化物增强剂后用相应源性二抗孵育,DAB 显色及苏木精染核,于显微镜下观察阳性细胞数表达并在不同倍镜下拍照。

**1.4.6 试剂盒检测** GSH、LDH、MDA、SOD 用 0.9% 氯化钠溶液制备 10% 组织匀浆液,提取上清液,按说明书配制所需试剂,顺序依次加入试剂,混匀,在对应波长下(GSH 为 405 nm,MDA 为 532 nm,LDH、SOD 为 450 nm)测定吸光度值。

**1.4.7 细胞计数试剂盒 8**(cell counting kit-8,CCK-8)检测细胞活性 在 96 孔板接种 BV2 细胞悬液,置于培养箱中培养 24 h,加入不同浓度的待测药物,孵育 12 h,加入一定的 CCK-8 试剂,孵育 4 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值。

**1.4.8 共聚焦镜下检测 ROS 荧光强度** 用培养基稀释 DCFH-DA ROS 荧光探针至终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ,避光操作,每孔加入一定量工作液,置于孵育箱 10~20 min,清洗之后加入培养基,于显微镜下观察荧光强度。

**1.4.9 流式细胞术检测 ROS 水平** 按照 1:1 000 比例稀释探针至终浓度,细胞收集后悬浮于稀释好的探针中,置于孵育箱中 20 min,每隔 3~5 min 颠倒混匀,使其充分接触,用 PBS 冲洗后制成单细胞悬液上机检测。

**1.4.10 细胞免疫荧光** 多聚甲醛固定处理后的细

胞,封闭 4  $^{\circ}\text{C}$  一抗过夜,次日洗涤后常温孵育与一抗同源的荧光二抗,注意避光,DAPI 染核封片,显微镜下观察荧光强度、拍照保存。

**1.5 统计学处理** 计量资料中符合正态分布的数据使用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )的方式表示,组间两两比较经正态分布检查、方差齐性检验后进行  $t$  检验;如果分布不符合正态分布则进行秩和检验。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 脑组织病理改变** 对各组新生大鼠脑组织石蜡切片进行 HE 染色,显微镜下可观察到:① Sham 组脑组织海马及皮质区神经细胞排列规整,层次清晰;神经细胞膜完整且细胞核正常处于居中位、核仁颜色深染,无明显异染色质。② HIBD 组海马及皮质区可见神经细胞排列失去规律,数量较 Ctrl 组明显减少;神经细胞结构紊乱,细胞质疏松,着色淡,出现空泡化现象,并伴有细胞坏死。③ HSFI 组神经细胞损伤情况得到明显改善,形态大致接近 Sham 组。见图 1。

**2.2 海马区神经元损伤情况** 使用尼氏染色液进行染色,于显微镜下观察神经元存活数量及出现的尼氏小体,对其进行拍照保存并进行统计。结果显示,各组间神经元数量存在显著差异( $F = 31.72$ ,  $P < 0.001$ )。Sham 组神经元中可观察到着色较深的尼氏小体,细胞形态正常,呈圆形,核仁清楚可见。与 Sham 组相比,HIBD 组可明显看到海马区脑组织神经元出现变性,细胞皱缩,部分胞核位置不正甚至

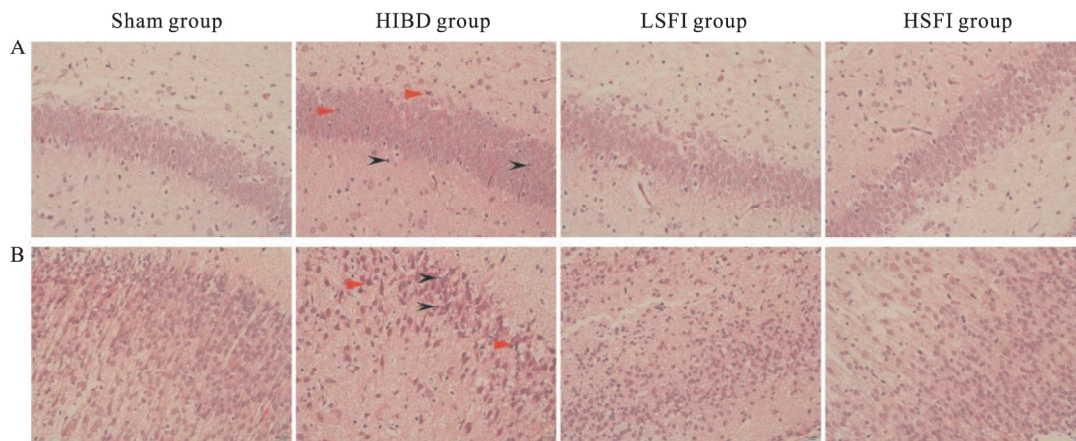


图 1 各组新生大鼠脑组织 HE 染色结果  $\times 400$

Fig.1 HE staining results of brain tissues of neonatal rats in each group  $\times 400$

A: Hippocampus in brain tissue; B: Cortical areas in brain tissue; Red arrow: Cell membrane rupture; Black arrow: Nuclear pyknosis.

溶解,空泡状明显,尼氏小体染色浅且数量明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );HSFI 组神经元损伤情况得到明显改善,尼氏小体数量也逐渐增多,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。该结果显示,发生 HIBD 的新生大鼠神经元受损现象增加,神经元变性增多,SFI 的使用可明显缓解这些损伤,发挥相应的保护作用。见图 2。

**2.3 各组新生大鼠脑组织 GPX4、DMT1 荧光表达强度** 通过免疫荧光染色观察各组新生大鼠脑组织 GPX4、DMT1 荧光强度表达并进行统计。结果显示,各组间在 GPX4、DMT1 的表达上存在差异( $F = 226.7, 361.7, P < 0.001$ )。GPX4、DMT1 染色阳性细胞多聚集在海马区且呈现红色荧光,细胞核染色均呈现蓝色荧光。结果显示,HIBD 组 GPX4 荧光表达强度较 Sham 组出现降低趋势( $P < 0.01$ ),而 DMT1 荧光强度表达较 Sham 组增强( $P < 0.01$ );使用 SFI 干预后,HSFI 组 GPX4 强度增强、DMT1 出现下降趋势( $P < 0.01$ )。见图 3。

**2.4 各组新生大鼠脑组织 DMT1 阳性细胞表达情况** 通过免疫组织化学染色法检测各组新生大鼠脑组织 DMT1 阳性细胞分布及表达情况并进行统计。结果显示,各组间在 DMT1 的表达在海马和皮质区均存在差异( $F = 31.21, 111.2, P < 0.001$ )。DMT1 阳性细胞染色呈现为棕黄色,主要分布在脑组织海马及皮质区。Sham 组海马及皮质区仅有少量阳性细胞表达;与 Sham 组相比,HIBD 组海马及皮质区出现大量阳性细胞聚集( $P < 0.01$ ),表明出现缺氧

缺血后,DMT1 表达出现显著提升;经过 SFI 干预后,可见棕黄色区域减少,DMT1 表达水平下降( $P < 0.01$ )。见图 4。

**2.5 各组大鼠 GSH、LDH、MDA、SOD、组织铁含量测定结果** 通过氧化应激反应相关试剂盒来检测各组新生大鼠 GSH、LDH、MDA、SOD 及组织铁含量变化情况并进行统计,结果显示,各组间在 GSH、LDH、MDA、SOD 及组织铁含量上存在显著差异( $F = 3.153, 13.20, 23.73, 260.5, 126.7, P < 0.05$ )。与 Sham 组相比,HIBD 组中 GSH 与 SOD 含量出现下降( $P < 0.01$ ),LDH、MDA 及组织铁含量出现明显增加趋势( $P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$ );通过使用 SFI 的及时干预治疗,HSFI 组的 GSH、LDH、MDA、SOD 及组织铁含量的趋势均回归正常范围( $P < 0.01, P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01$ )。这些结果表明 SFI 能够有效抑制 HIBD 实验动物氧化应激反应,提升机体抗氧化能力,从而发挥相应的保护作用。见图 5。

**2.6 CCK-8 法筛选 SFI、Erastin、Fer-1 最佳药物浓度** 不同浓度的 SFI、Erastin、Fer-1 作用于 BV2 细胞 12 h 后,通过 Cell Counting Kit-8 评估各组细胞生存活力。结果显示,随着药物浓度的进一步升高,细胞活力出现下降趋势,两者表现为负相关;与 Ctrl 组相比,当 SFI 浓度为  $1 \mu\text{l/ml}$  以内、Erastin 浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  以内、Fer-1 浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  以内时,细胞存活活力均在 90% 以上,说明该浓度下药物不产生细胞毒性,为安全药物浓度。故在后续实验中,采用以

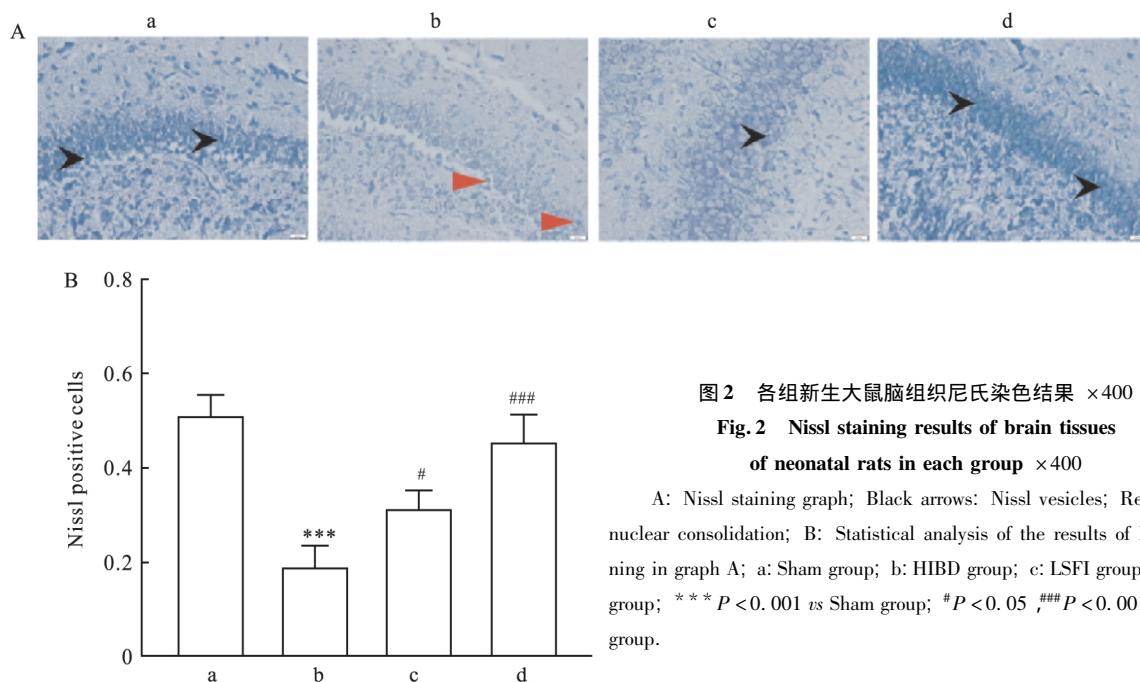


图 2 各组新生大鼠脑组织尼氏染色结果  $\times 400$

Fig. 2 Nissl staining results of brain tissues of neonatal rats in each group  $\times 400$

A: Nissl staining graph; Black arrows: Nissl vesicles; Red arrows: nuclear consolidation; B: Statistical analysis of the results of Nissl staining in graph A; a: Sham group; b: HIBD group; c: LSFI group; d: HSFI group; \*\*\*  $P < 0.001$  vs Sham group; #  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$  vs HIBD group.



上浓度进行进一步研究讨论。见图6。

**2.7 各组细胞 ROS 检测** 使用 DCFH-DA 荧光探针,以共聚焦显微镜下观察 ROS 荧光强度与流式细胞仪检测 ROS 释放水平两种实验方法展开实验,并

对 ROS 荧光强度进行统计,结果显示各组间存在显著差异( $F=507.1$   $P<0.001$ )。共聚焦显微镜下观察荧光强度结果显示:与 Ctrl 组相比,OGD 组细胞内 ROS 水平升高( $P<0.01$ );与 OGD 组相比,加入

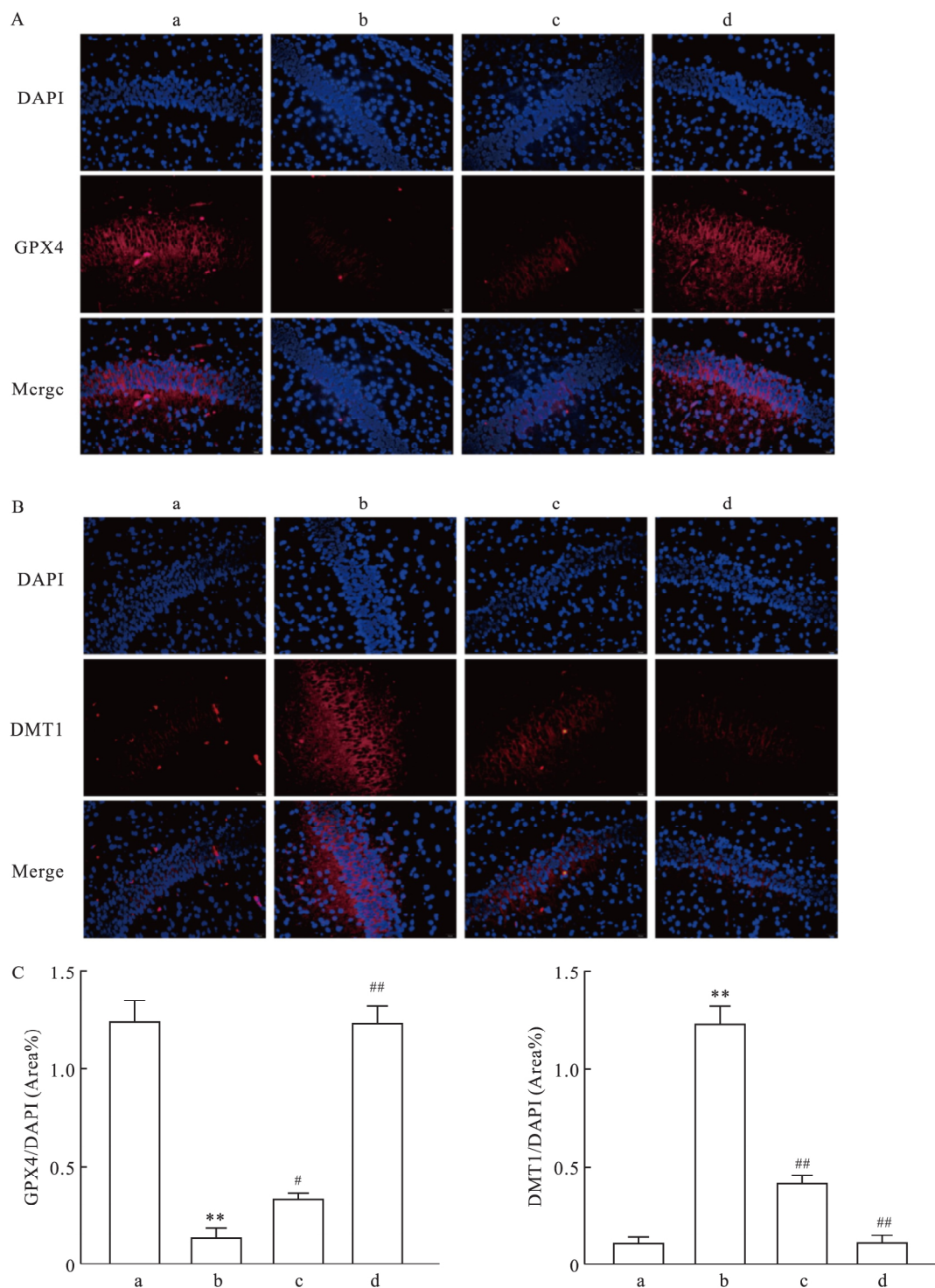


图3 各组新生大鼠脑组织海马区免疫荧光染色结果  $\times 400$

Fig. 3 Immunofluorescence staining results of the hippocampus of neonatal rats in each group  $\times 400$

A: Fluorescence expression of GPX4; B: Fluorescence expression of DMT1; C: Quantitative statistical analysis of the immunofluorescence staining results; a: Sham group; b: HIBD group; c: LSFI group; d: HSFI group; \*\*  $P<0.01$  vs Sham group; #  $P<0.05$ ; ##  $P<0.01$  vs HIBD group.

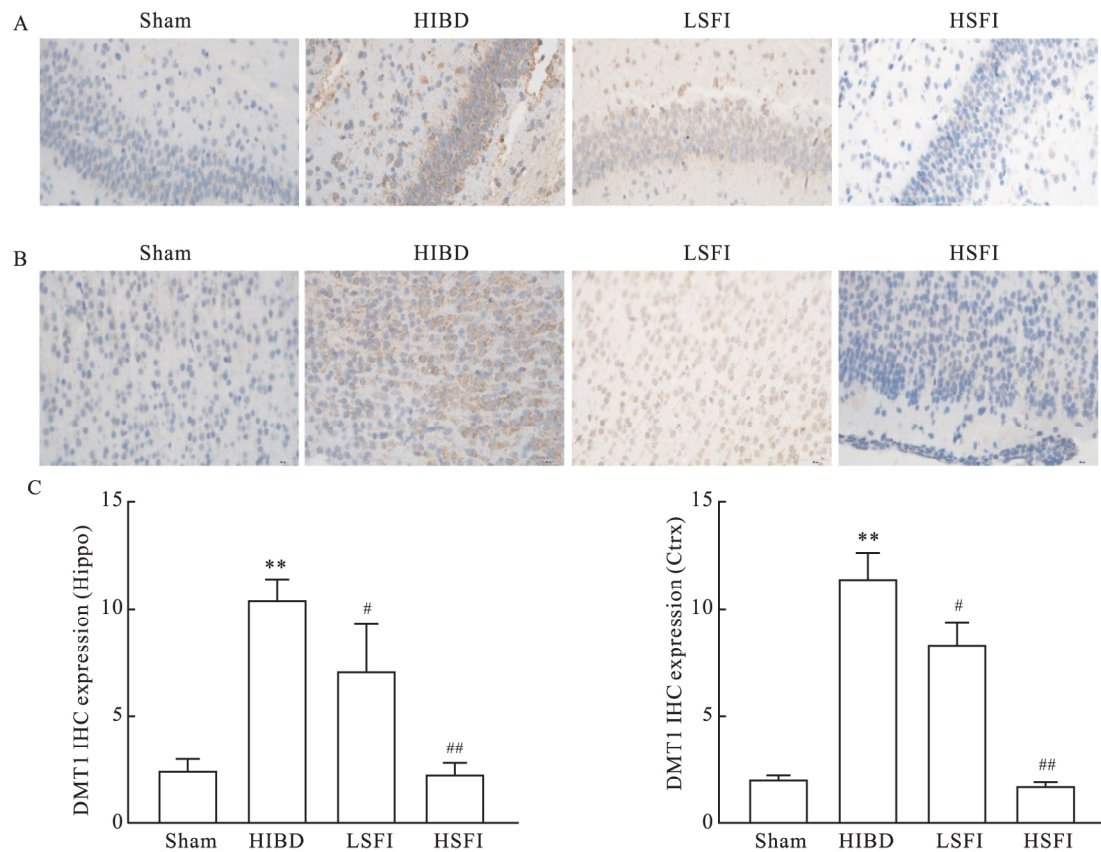


图4 各组新生大鼠脑组织免疫组织化学染色结果 ×400

Fig. 4 Immunohistochemical staining results of brain tissues of neonatal rats in each group ×400

A: DMT1 expression and distribution in the hippocampal region; B: DMT1 expression and distribution in the cortical region; C: Quantitative statistical analysis of the immunohistochemical staining results; \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs HIBD group.

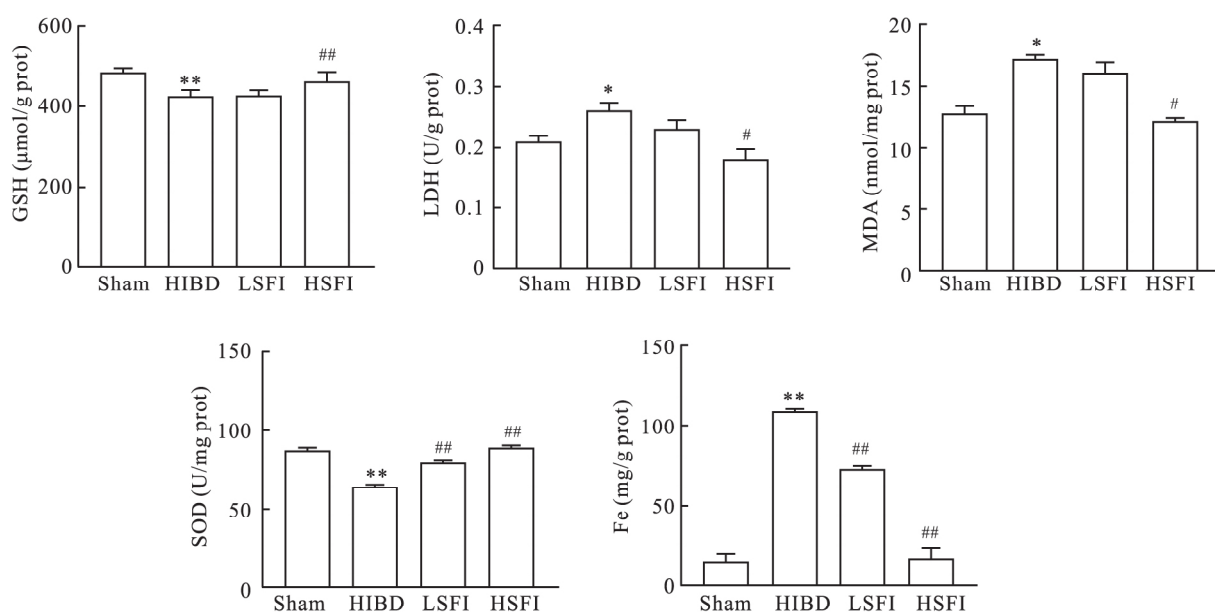


图5 各组新生大鼠脑组织试剂盒检测 GSH、LDH、MDA、SOD、组织铁含量表达水平

Fig. 5 Expression levels of GSH, LDH, MDA, SOD, and tissue iron content in the brain tissue of neonatal rats in each group using kit

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group; #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  vs HIBD group.

Fer-1 以及 SFI 药物干预后,ROS 水平降低 ( $P < 0.01$ )。流式细胞术结果显示,与 Ctrl 组相比,OGD 组峰值出现明显右移,与 OGD 组相比,加入 Fer-1 及 SFI 药物干预后,峰值出现左移。以上结果表明,OGD 与 Erastin 处理过的 BV2 细胞内可产生大量 ROS,SFI 能有效抑制 BV2 细胞损伤模型中 ROS 的产生,并且是通过抑制氧化应激反应来发挥相应保护作用的。见图 7。

**2.8 各组细胞 GPX4、DMT1 荧光强度表达** 采用免疫荧光法检测各组 BV2 细胞 GPX4、DMT1 的荧光表达强度。GPX4、DMT1 阳性细胞呈现红色荧光,所有细胞核均呈现蓝色荧光。结果显示各组间存在

差异( $F = 133.8, 79.72, P < 0.001$ ),与 Ctrl 组相比,OGD 组 GPX4 表达下降( $P < 0.01$ )、DMT1 表达出现提升( $P < 0.01$ );通过 Fer-1 与 SFI 的干预后,与 OGD 组相比,GPX4 表达上升( $P < 0.01$ )、DMT1 表达下降( $P < 0.01$ )。上述结果说明 BV2 细胞经 OGD 处理后出现铁死亡,而 SFI 的保护作用是通过抑制铁死亡途径发挥的,SFI 可有效减轻 BV2 细胞损伤。见图 8。

### 3 讨论

新生儿 HIBD 是目前临床上威胁新生儿生命以及发生急慢性脑部损伤的原因之一<sup>[12]</sup>,可出现多种

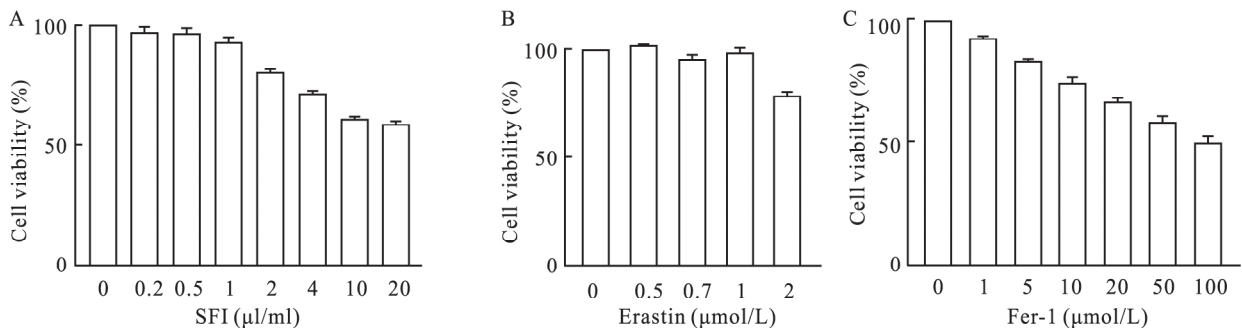


图 6 不同药物浓度处理下的 BV2 细胞 CCK-8 实验结果

Fig. 6 Results of CCK-8 experiments on BV2 cells treated with different drug concentrations

A: Effect of Shenfu injection on BV2 cell viability at different concentrations; B: Effect of Erastin on BV2 cell viability at different concentrations; C: Effect of Fer-1 on BV2 cell viability at different concentrations.

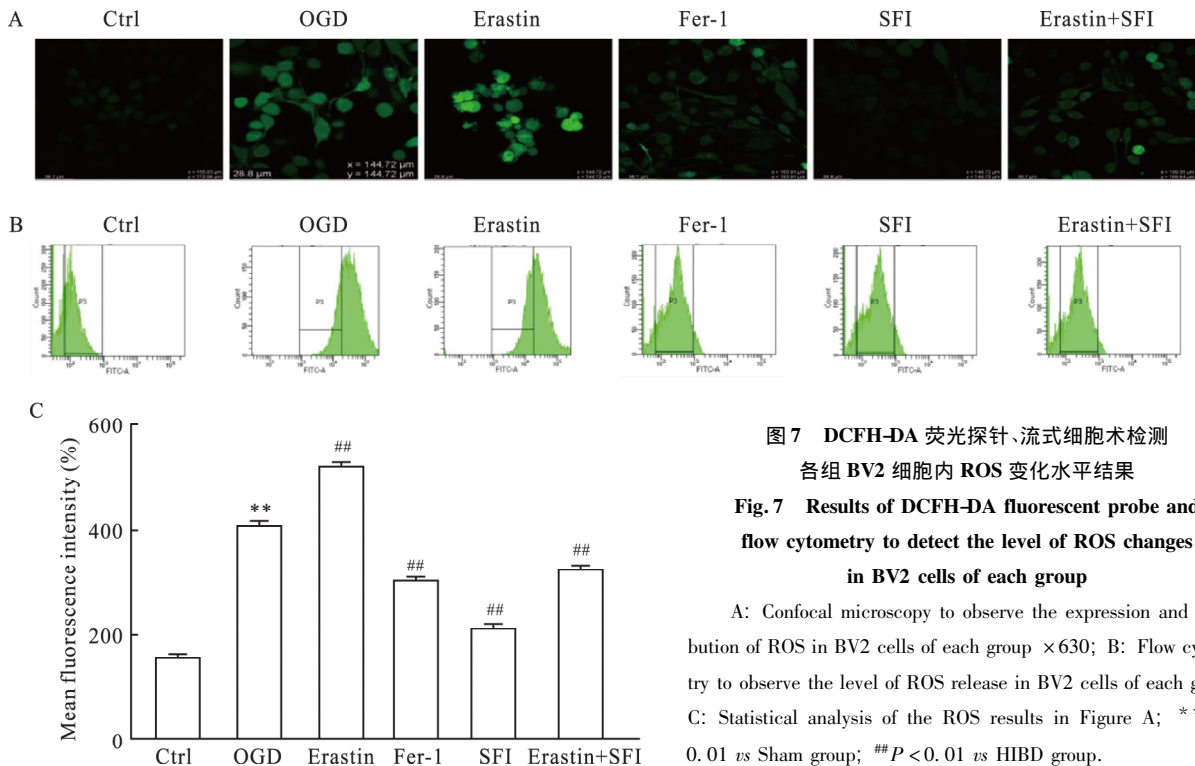


图 7 DCFH-DA 荧光探针、流式细胞术检测  
各组 BV2 细胞内 ROS 变化水平结果

Fig. 7 Results of DCFH-DA fluorescent probe and  
flow cytometry to detect the level of ROS changes  
in BV2 cells of each group

A: Confocal microscopy to observe the expression and distribution of ROS in BV2 cells of each group  $\times 630$ ; B: Flow cytometry to observe the level of ROS release in BV2 cells of each group; C: Statistical analysis of the ROS results in Figure A; \*\*  $P < 0.01$  vs Sham group; ##  $P < 0.01$  vs HIBD group.

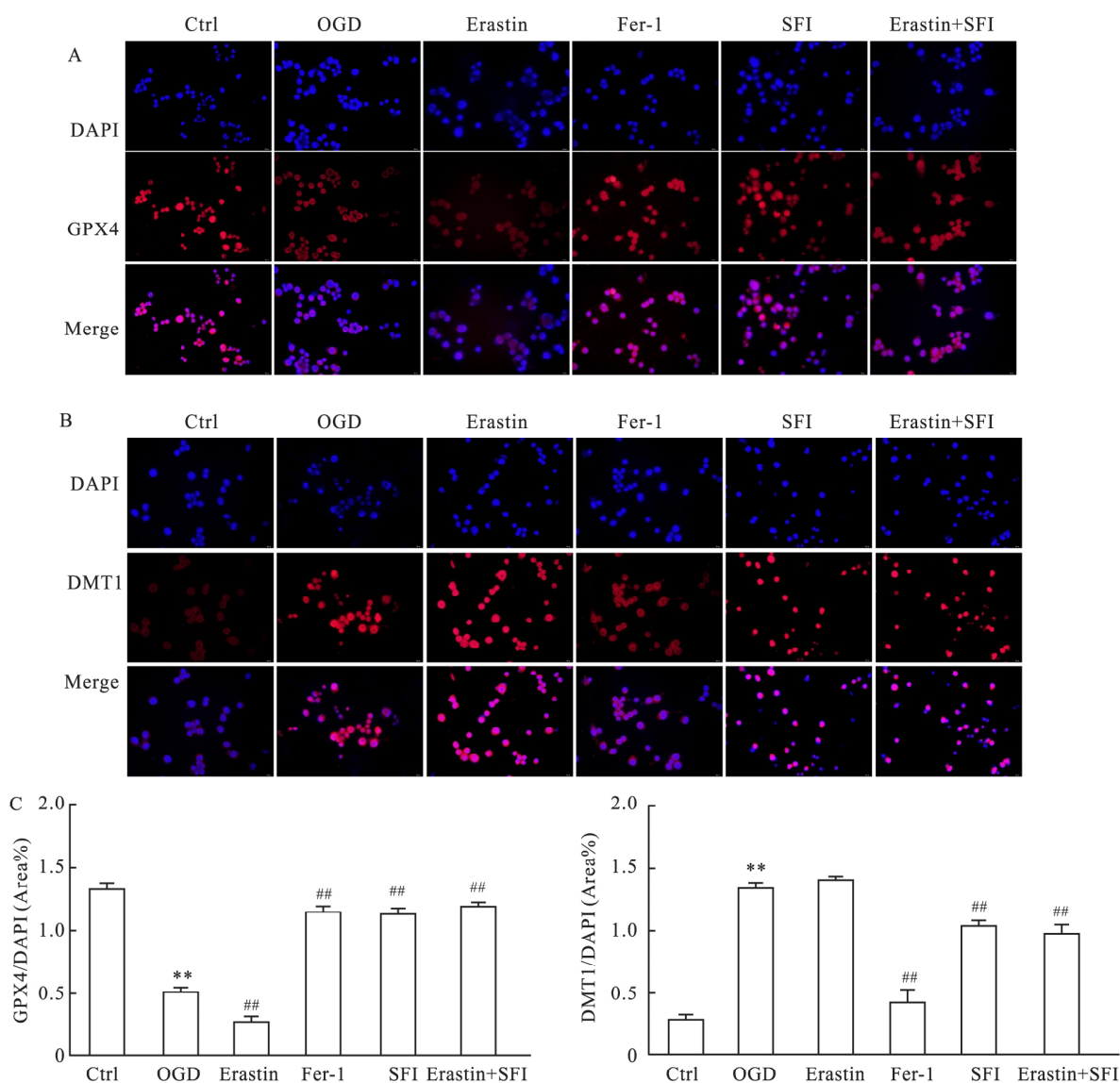


图8 免疫荧光染色检测各组 BV2 细胞 GPX4、DMT1 的表达结果 ×400

Fig.8 Results of immunofluorescence staining to detect the expression of GPX4 and DMT1 in BV2 cells of each group ×400

A: Expression and distribution of GPX4 in BV2 cells in each group; B: Expression and distribution of DMT1 in BV2 cells in each group; C: Statistical analysis of the immunofluorescence results in Figure A and B; \* $P < 0.01$  vs Ctrl group; ## $P < 0.01$  vs OGD group.

脑部受损表现,如智力发育低下、学习困难等,严重者甚至死亡,给家庭和社会带来沉重的压力。临床统计资料显示,我国出现新生儿死亡及年长儿发生残疾的原因居于首位的就是 HIBD<sup>[13]</sup>。而这一严重威胁新生儿生命健康的疾病,治疗方式却极少。因此,进一步阐明 HIBD 的发病原因及机制,是目前临床上亟需解决的难题,找出新的药物以及作用靶点,是降低新生儿死亡与残疾率的关键。

铁死亡不同于一般的细胞死亡方式,寻常抑制细胞死亡的药物对铁死亡无效。目前已经有研究证实,及时抗氧化治疗可有效缓解铁死亡带来的细胞损伤,从而大大降低发生铁死亡的神经元数量<sup>[14]</sup>。

SFI 源自于我国参附汤,经研究证实其对多种疾病均有治疗效果,有较强的铁离子还原能力及抗氧化能力<sup>[7]</sup>,对于对抗低氧缺血、降低血清炎症因子水平方面发挥着较强的疗效<sup>[15]</sup>,目前该药物在临床上普遍应用且安全性高。

本课题研究通过动物实验与细胞实验两方面展开,并通过预实验对 SFI 的浓度进行了相应的筛选与设定。研究结果表明, SFI 作为一种药物干预手段,能有效减轻海马及皮质区脑组织病理学损伤,其机制可能涉及提高 GPX4 水平、降低 DMT 水平,以及提升 GSH、SOD 含量,同时减少 LDH、MDA 及组织铁含量。这些发现揭示了 SFI 可通过抑制铁死亡



发挥对 HIBD 的保护作用。此外,细胞实验进一步证实了 SFI 在抑制铁死亡和减轻氧化应激反应损伤方面的效果。本实验结论与先前的研究<sup>[6,16-18]</sup>报道一致,表明新生 HIBD 大鼠发病过程与铁死亡这一途径密不可分。

综上所述,该研究证实 SFI 在 HIBD 实验动物模型及 BV2 细胞损伤模型中发挥着一定的保护作用,可减轻新生大鼠脑组织损伤,保护神经元,降低氧化应激反应。SFI 所发挥的保护作用与抑制铁死亡密切相关。因此, SFI 在 HIBD 的临床治疗方面可能具有良好的前景。然而,关于 SFI 应用于临床的安全性以及治疗效果,还需要大量的基础性实验研究及临床研究进行更深挖掘。

### 参考文献

- [1] Finder M, Boylan G B, Twomey D, et al. Two-year neurodevelopmental outcomes after mild hypoxic ischemic encephalopathy in the era of therapeutic hypothermia [J]. *JAMA Pediatr*, 2020, 174(1): 48–55. doi: 10.1001/jamapediatrics.2019.4011.
- [2] Disdier C, Stonestreet B S. Hypoxic-ischemic-related cerebrovascular changes and potential therapeutic strategies in the neonatal brain [J]. *J Neurosci Res*, 2020, 98(7): 1468–84. doi: 10.1002/jnr.24590.
- [3] Wu Y, Song J, Wang Y, et al. The potential role of ferroptosis in neonatal brain injury [J]. *Front Neurosci*, 2019, 13: 115. doi: 10.3389/fnins.2019.00115.
- [4] Li J, Cao F, Yin H L, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11: 88. doi: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- [5] Hou L, Huang R, Sun F, et al. NADPH oxidase regulates paraquat and maneb-induced dopaminergic neurodegeneration through ferroptosis [J]. *Toxicology*, 2019, 417: 64–73. doi: 10.1016/j.tox.2019.02.011.
- [6] Gou Z, Su X, Hu X, et al. Melatonin improves hypoxic-ischemic brain damage through the Akt/Nrf2/Gpx4 signaling pathway [J]. *Brain Res Bull*, 2020, 163: 40–8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.07.011.
- [7] 代向东, 胡晓慧, 闫海峰, 等. 丹红、参麦和参附 3 种注射液抗氧化能力的研究 [J]. *天津中医药*, 2016, 33(2): 104–6. doi: 10.11656/j.issn.1672-1519.2016.02.11.
- [7] Dai X D, Hu X H, Yan H F, et al. Study on the antioxidant activities of Danhong, Shenmai and Shenfu injection [J]. *Tianjin J Tradit Chin Med*, 2016, 33(2): 104–6. doi: 10.11656/j.issn.1672-1519.2016.02.11.
- [8] Yang L J, Wang J, Tian Z F, et al. Shenfu injection attenuates neonatal hypoxic-ischemic brain damage in rat [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(9): 1571–4. doi: 10.1007/s10072-013-1288-x.
- [9] Wu G, Chen Z, Wang P, et al. Hydrogen inhalation protects hypoxic-ischemic brain damage by attenuating inflammation and apoptosis in neonatal rats [J]. *Exp Biol Med*, 2019, 244(12): 1017–27. doi: 10.1177/1535370219855399.
- [10] 吴芳, 左涵璐, 任雪琪, 等. 天麻素对氧糖剥夺诱导的小胶质细胞 Notch 信号通路的影响 [J]. *神经解剖学杂志*, 2022, 38(1): 38–44. doi: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2022.01.007.
- [10] Wu F, Zuo H J, Ren X Q, et al. Effects of ginsenoside on the Notch pathway in microglia induced by oxygen glucose deprivation [J]. *Chin J Neuroanat*, 2022, 38(1): 38–44. doi: 10.16557/j.cnki.1000-7547.2022.01.007.
- [11] 于海侠, 刘文强, 吴铭, 等. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤后内质网应激相关因子的表达及意义 [J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(9): 1475–80. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.025.
- [11] Yu H X, Liu W Q, Wu M, et al. Expression and significance of endoplasmic reticulum stress-related factors in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(9): 1475–80. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.09.025.
- [12] Bonifacio S L, Hutson S. The term newborn: Evaluation for hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. *Clin Perinatol*, 2021, 48(3): 681–95. doi: 10.1016/j.clp.2021.05.014.
- [13] Nakanishi K, Sato Y, Mizutani Y, et al. Rat umbilical cord blood cells attenuate hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44111. doi: 10.1038/srep44111.
- [14] Li Q, Han X, Lan X, et al. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(7): e90777. doi: 10.1172/jci.insight.90777.
- [15] 刘子璇, 刘文丽, 郝浩, 等. 参附注射液对脓毒症大鼠肺损伤的保护作用 [J]. *中国中医急症*, 2022, 31(2): 218–21, 232. doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2022.02.007.
- [15] Liu Z X, Liu W L, Hao H, et al. Protective effect of Shenfu injection on lung injury in septic rats [J]. *J Emerg Tradit Chin Med*, 2022, 31(2): 218–21, 232. doi: 10.3969/j.issn.1004-745X.2022.02.007.
- [16] Guardia Clausi M, Paez P M, Campagnoni A T, et al. Intranasal administration of aTf protects and repairs the neonatal white matter after a cerebral hypoxic-ischemic event [J]. *Glia*, 2012, 60(10): 1540–54. doi: 10.1002/glia.22374.
- [17] Rathnasamy G, Ling E A, Kaur C. Iron and iron regulatory proteins in amoeboid microglial cells are linked to oligodendrocyte death in hypoxic neonatal rat periventricular white matter through production of proinflammatory cytokines and reactive oxygen/nitrogen species [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(49): 17982–95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2250-11.2011.
- [18] El Bana S M, Maher S E, Gaber A F, et al. Serum and Urinary Malondialdehyde (MDA), Uric acid, and Protein as markers of perinatal asphyxia [J]. *Electron Physician*, 2016, 8(7): 2614–9. doi: 10.19082/2614.

## Protective effect of Shenfu injection against neonatal hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting the ferroptosis

Zhang Xiaotong<sup>1</sup>, Zhang Meng<sup>1</sup>, Li Gang<sup>2</sup>, Hu Yang<sup>3</sup>, Xun Yajing<sup>3</sup>, Ding Hui<sup>1</sup>, Shen Donglin<sup>4</sup>, Wu Ming<sup>1,4</sup>

(<sup>1</sup>The First Clinical Medical College, <sup>3</sup>The Second Clinical Medical College,

Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000; <sup>2</sup>Dept of Stomatology,

<sup>4</sup>Dept of Pediatrics, The Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou 221000)

**Abstract Objective** To observe the brain tissue injury during hypoxia-ischemia, as well as the pathological changes and the expression of ferroptosis-related factors after the use of Shenfu injection (SFI), and to explore the protective effect of SFI on hypoxic-ischemic brain injury (HIBD) by inhibiting ferroptosis. **Methods** An animal model of HIBD in SD rats was constructed and intervened with SFI. Pathologic changes in brain tissue were observed by HE staining methods. Nissen staining was used to observe neuron survival. Glutathione Peroxidase 4 (GPX4) and Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) expression were detected in brain tissue by Western blot, immunohistochemistry and immunofluorescence. Reduced Glutathione (GSH), Lactate Dehydrogenase (LDH), Malondialdehyde (MDA), Superoxide Dismutase (SOD) and tissue iron content were determined with the kits. BV-2 microglial cell line (BV2) cells were cultured *in vitro* and divided into control group (Ctrl group), oxygen-glucose deprivation group (OGD group), iron ferroptosis-inducing group (Erastin group), iron ferroptosis-inhibiting group (Fer-1 group), Shenfu injection group (SFI group), and Erastin + Shenfu injection group (Erastin + SFI group). 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) reactive oxygen species (ROS) fluorescent probe was used to detect the ROS release level; Immunofluorescence was used to observe intracellular GPX4, DMT1 expression.

**Results** Compared with the Sham group, rats in the HIBD group showed significant neuronal cell damage in brain tissue, decreased GPX4 expression ( $P < 0.01$ ), increased DMT1 expression ( $P < 0.01$ ), decreased GSH and SOD levels ( $P < 0.01$ ), and increased LDH, MDA and tissue iron levels ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). In contrast, after the intervention of SFI, GPX4 expression was elevated ( $P < 0.01$ ), DMT1 expression decreased ( $P < 0.01$ ), GSH and SOD levels were elevated ( $P < 0.01$ ), and LDH, MDA, and tissue iron levels decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The cells experiments showed that compared with the Ctrl group, the OGD group had a significantly higher ROS content and a decrease in the expression of GPX4 fluorescence intensity, and an increase in the fluorescence intensity of DMT1 ( $P < 0.01$ ), compared with the OGD group, the ROS content was reduced in the SFI group, while the expression of GPX4 was elevated and the expression of DMT1 was reduced ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Hippocampal and cortical regions are severely damaged after HIBD in neonatal rats, and their brain tissues show decreased expression of GPX4 and increased expression of DMT1. The above suggests that ferroptosis is involved in HIBD brain injury in neonatal rats. In contrast, Shenfu injection has a protective effect on HIBD experimental animal model and BV2 cell injury model by reducing iron aggregation and ROS production.

**Key words** hypoxic-ischemic brain damage; ferroptosis; oxidative stress; oxygen glucose deprivation; Shenfu injection; BV2 cells

**Fund Programs** Scientific Research Project of Jiangsu Health Commission (No. H2019004); Graduate Student Research and Innovation Program of Jiangsu Province (No. KYCX22\_2911); College Student Innovation and Entrepreneurship Training Project of Jiangsu Province (No. 202010313048Y)

**Corresponding author** Wu Ming, E-mail: 14083054@qq.com