

## 生地黄、熟地黄水提取物通过抑制铁死亡进程改善肝缺血再灌注损伤的药效对比研究

张银浩<sup>#</sup>, 贾可欣<sup>#</sup>, 罗苒艺, 李晓骄阳\*

北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

**摘要:** 目的 对比熟地黄水提取物 (RRPAE) 与生地黄水提取物 (DRRAE) 治疗肝缺血再灌注损伤的药效和机制, 以期为临床患者更优的治疗选择提供科学依据。方法 将48只C57雄性小鼠随机分为8组(每组6只):假手术组,模型组,RRPAE低、中、高剂量(2.5、5.0、10.0 g·kg<sup>-1</sup>)组,DRRAE低、中、高剂量(2.5、5.0、10.0 g·kg<sup>-1</sup>)组。ig给药,假手术组和模型组ig 0.9%氯化钠溶液,每天1次,连续1周;各组小鼠于末次给药2 h后行手术建立小鼠肝缺血再灌注损伤模型,假手术组仅开腹不缺血,再灌注后6 h取材。检测各组小鼠肝脏、脾脏系数;苏木素-伊红染色观察各组小鼠肝脏组织病理学改变;试剂盒法检测小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)水平;试剂盒法检测小鼠肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、NO、丙二醛(MDA)水平;Western blotting法检测各组小鼠肝脏组织中铁死亡相关蛋白转铁蛋白(Transferrin)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、溶质载体家族39成员14(SLC39A14)、poly结合蛋白2(PCBP2)的表达水平。培养BRL肝细胞,用50、100、150 mg·mL<sup>-1</sup>的RRPAE处理1 h(对照组不加药)后,加野百合碱(500 μmol·L<sup>-1</sup>)或埃拉斯汀(10 μmol·L<sup>-1</sup>)处理24 h,试剂盒法分别检测细胞亚铁/总铁离子以及谷胱甘肽水平。结果 与模型组比较,经过RRPAE或DRRAE预给药后,给药组小鼠的肝脏、脾脏系数出现下降趋势,其中RRPAE低、高剂量组肝脏系数差异显著( $P < 0.05, 0.001$ );病理染色结果显示模型组肝脏出现明显的缺血-充血区和肝细胞坏死,经过RRPAE与DRRAE给药后肝细胞状态均有所恢复,且前者的效果明显优于后者。生化结果显示,与模型组相比,RRPAE可显著降低血清中肝损伤指标AST、ALT、LDH水平,升高NO含量;显著降低肝脏MDA水平,升高SOD和NO水平( $P < 0.05, 0.01$ );而DRRAE给药后对上述肝损伤及氧化应激相关指标的恢复作用整体并不显著。Western blotting实验结果显示,与模型组比较,RRPAE能够显著抑制促进铁死亡相关蛋白Transferrin、SLC39A14的表达,上调抑制铁死亡相关蛋白SLC7A11、PCBP2的表达( $P < 0.05, 0.001$ ),而DRRAE对铁死亡相关蛋白的调控并不明显。与模型组比较,RRPAE可上调野百合碱或铁死亡激动剂埃拉斯汀诱导的肝细胞培养基中亚铁/总铁离子以及谷胱甘肽水平( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。结论 熟地黄缓解肝缺血再灌注损伤效果更好,其作用机制可能与调控Transferrin、SLC7A11、SLC39A14、PCBP2蛋白的表达,抑制小鼠铁死亡进程有关。

**关键词:** 熟地黄水提取物; 生地黄水提取物; 肝缺血再灌注损伤; 氧化应激; 铁死亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)01-0046-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.006

## Comparative pharmacodynamic study of aqueous extract of *Rehmanniae Radix Praeparata* and drying *Rehmannia* root for amelioration of hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis process

ZHANG Yin hao, JIA Ke xin, LUO Ran yi, LI Xiao jia o yang

School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

**Abstract: Objective** Based on comparing the efficacy and mechanism of aqueous extracts of *Rehmanniae Radix Praeparata* (RRPAE) and drying *Rehmannia* root (DRR) for the treatment of hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI), to provide a better therapeutic option for clinical patients. **Method** Totally 48 mice were randomly divided into eight groups: the sham group, the model

收稿日期: 2023-10-14

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(82274186)

**#共同第一作者:** 张银浩, 硕士研究生, 研究方向为中医药治疗肝缺血再灌注损伤。E-mail: yinhao\_zhang2021@163.com

贾可欣, 博士研究生, 研究方向为中医药治疗肝缺血再灌注损伤。E-mail: kx.jia@foxmail.com

**\*通信作者:** 李晓骄阳, 教授, 博士生导师。E-mail: xiaojiaoyang.li@bucm.edu.cn

group, the low, medium, and high dose groups of RRP AE (2.5, 5.0 and 10.0 g·kg<sup>-1</sup>), and the low, medium, and high dose groups of DRRAE (2.5, 5.0 and 10.0 g·kg<sup>-1</sup>), with six mice in each group. After one week of pre-administration of different doses of RRP AE or DRRAE by ig, the mouse HIRI model was established, and the HE staining was used to observe the histopathological changes in the livers of the mice in each group. The kits were used to detect the levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), nitric oxide (NO) levels. The kits were used to detect mouse liver superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), and malondialdehyde (MDA) levels. Western blotting was used to detect ferroptosis-associated proteins in mouse liver tissues of each group: Transferrin, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), solute carrier family 39 member 14 (SLC39A14), and poly rC binding protein 2 (PCBP2). After culturing and treating BRL hepatocytes with monocrotaline (MCT, 500 μmol·L<sup>-1</sup>) or ferroptosis agonist erastin (10 μmol·L<sup>-1</sup>), different doses of RRP AE (50, 100, and 150 μg·mL<sup>-1</sup>) were administered for 24 h, and then the cellular ferrous iron/ total iron ions and glutathione content were detected. **Results** Compared with the model group, after pre-administration of RRP AE or DRRAE, the liver and spleen coefficients of mice in the treatment group showed a downward trend, with significant differences in liver coefficients in the low and high dose RRP AE groups ( $P < 0.05, 0.001$ ). HE staining results showed significant ischemia-reperfusion region and hepatocellular necrosis in the HIRI group, and the hepatocellular status was recovered after both RRP AE and DRRAE administration, and the former was significantly better than the latter. The biochemical results showed that compared with the model group, the serum levels of AST, ALT and LDH, which were indicators of liver injury, decreased significantly, while the level of NO increased significantly; the level of hepatic MDA decreased significantly, while the levels of SOD and NO increased significantly ( $P < 0.05, 0.01$ ), and the modulation effect of DRR on the above indicators of liver injury and oxidative stress was not significant. The results of Western blotting experiments showed that the RRP AE was able to significantly inhibit the expression of Transferrin and SLC39A14-related ferroptosis-promoting proteins, and down-regulate the expression of SLC7A11 and PCBP2-related ferroptosis-suppressing proteins ( $P < 0.05, 0.001$ ), whereas the DRRAE did not significantly regulate the above iron-death-related proteins. At the same time, RRP AE directly inhibited the ferroptosis process of hepatocytes induced by monocrotaline or ferroptosis agonist erastin, which was accompanied by an increase in ferrous iron/total iron ions and glutathione content in the cell culture medium ( $P < 0.05, 0.01, \text{ and } 0.001$ ). **Conclusion** The medicinal type of DRR with better effect in alleviating hepatic ischemia-reperfusion injury is RRP AE, and its mechanism of action may be related to the regulation of Transferrin, SLC7A11, SLC39A14, and PCBP2 protein expression and inhibition of ferroptosis process in mice.

**Key words:** aqueous extract of *Rehmanniae Radix Praeparata*; aqueous extract of drying *Rehmannia* root; hepatic ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; ferroptosis

在过去的几十年里,肝病上升为世界范围内导致死亡的主要原因之一,据统计,国内因肝病导致的相关死亡占总死亡人数的3%~6%<sup>[1]</sup>。肝缺血再灌注损伤(HIRI)是一种机体肝脏受缺血应激诱发的缺血缺氧阶段和内源性无菌性炎症介导的再灌注阶段的动态相互关联损伤过程,多见于患者休克复苏、内脏损伤、肝切除、肝移植术后等,如不加药物干预则可进一步导致肝功能障碍、肝纤维化甚或急慢性肝衰竭等<sup>[2]</sup>。而临床除了应用活性氧(ROS)抑制剂,如N-乙酰半胱氨酸(NAC)、硫普罗宁和水飞蓟素等药物以外,尚无特异有效的治疗药物可供选择<sup>[3-5]</sup>,因此,寻找并开发有效治疗药物,并深入研究其发病机制以寻找针对性治疗靶点,对HIRI病理机制阐述和临床患者的诊疗意义重大。

近年来,随着对HIRI研究的不断深入,缺血期氧化应激引起的无菌性炎症损伤被认为是HIRI的主流影响因素<sup>[6-7]</sup>。由于HIRI过程中会产生大量氧化自由基,这些自由基可导致强烈的氧化应激反

应,损伤肝脏细胞,引起局部强烈的免疫反应,产生大量细胞因子进而加剧肝脏损伤<sup>[8-9]</sup>。其中,铁死亡作为一种新型的调节性细胞死亡形式,以铁依赖性脂质过氧化物积累及ROS增多为特征<sup>[10]</sup>。研究显示,细胞内铁死亡与细胞内氧化还原反应、炎症反应息息相关<sup>[11-12]</sup>。来自芬顿反应、线粒体和NADPH氧化酶的ROS可驱动铁死亡,引发脂质过氧化(LPO)<sup>[13-14]</sup>。LPO的产生则会进一步诱导发生铁死亡的细胞释放损伤相关分子模式(DAMP),进而加剧局部免疫级联反应<sup>[15-16]</sup>。因此,在寻找改善HIRI新型治疗药物时应重点关注其是否介入氧化应激及铁死亡相关生物学过程。

地黄是玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根,可分为鲜地黄、干地黄(drying *Rehmannia* root)、熟地黄(*Rehmanniae Radix Praeparata*)等<sup>[17]</sup>。《药性论》有言,生地黄有“补虚损,温中下气,通血脉”的作用,《雷公炮制药性解》论熟地黄“为补血之剂,而心与肝,藏血生血者也,故能入焉”。中医理论认为,

HIRI的病机是“阴血亏虚,肝脉瘀阻”<sup>[18]</sup>。现代药理实验则进一步表明,地黄水提取物可以减轻肝脏氧化应激损伤、改善炎症反应以发挥肝保护作用<sup>[19-21]</sup>。此外,生地黄被证实有抗炎生血的药理作用,且其中主要发挥作用的有效成分为多糖类化合物<sup>[22-23]</sup>;同时,近年来熟地黄及其活性部位环烯醚萜类成分也因明确的抗炎、抗氧化等保肝作用被广泛研究<sup>[24-25]</sup>。然而,地黄是否可以有效改善HIRI以及其具体针对HIRI的主要有效炮制形式还不明确。本研究探讨地黄缓解HIRI的最佳药用类型,并基于多种药理学实验进一步探讨其可能的作用机制,以期临床患者提供更优的治疗选择。

## 1 材料

### 1.1 实验动物与细胞

雄性C57BL/6J小鼠(8周龄)48只,体质量22~24 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010,分笼饲养于12 h昼夜交替、适宜温度(22±2)°C的环境下,自由摄食饮水(为标准饲料及无菌双蒸水)。动物实验经北京中医药大学实验动物管理和使用委员会批准(BUCM-4-20200730023160)。

BRL肝细胞系,来源于ATCC细胞库。

### 1.2 药材与主要试剂

熟地黄和生地黄药材购自北京同仁堂健康药业股份有限公司,经北京中医药大学中药学院徐冰教授鉴定为正品饮片,符合《中国药典》2020年版饮片性状规定,为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥根,分别经九蒸九晒和无烟火烘烤而成。野百合碱和埃拉斯汀均购自上海源叶生物科技有限公司;异氟烷购自江苏恒丰强生物技术有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;铁离子检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;一氧化氮(NO)测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;磷酸盐缓冲液购自武汉赛维尔生物科技有限公司;RIPA蛋白裂解液、蛋白上样缓冲液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;四甲基乙二胺(TEMED)购自生工生物工程上海股份有限公司;转铁蛋白(Transferrin)一抗(货号17435-1-AP)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)一抗(货号26864-1-AP)和poly结合蛋白2(PCBP2)一抗(货号15070-

1-AP)购自Proteintech公司;溶质载体家族39成员14(SLC39A14)一抗(货号PA5-87880)购自Invitrogen科技公司; $\beta$ -actin一抗(货号4970s)购自Cell Signaling Technology公司;其他化学试剂购自上海源叶生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

UltiMate 3000液相色谱(美国Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA);超高速离心机(美国Thermo Scientific公司);移液枪(艾本德中国有限公司);涡旋混合器(武汉赛维尔生物科技有限公司);电泳仪、电转仪、ChemiDoc MP化学发光凝胶成像系统(伯乐生命医学产品上海有限公司);酶标仪(赛尔福医疗科技北京有限公司);呼吸麻醉系统(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 水提取物制备

取熟地黄和生地黄药材各5 g,净制后,将药材粉碎并浸泡1 h,用50 mL的蒸馏水通过冷凝回流法提取2次,用旋转蒸发器浓缩水提取物,滤过2次,浓缩冻干,即得熟地黄水提取物(aqueous extract of *Radix Rehmanniae Praeparata*, RRP AE)、生地黄水提取物(aqueous extract of drying *Rehmannia* root, DRRAE)冻干粉末。采用高效液相色谱法(HPLC)对毛蕊花糖苷、地黄苷D进行含量测定,质量分数总计不少于0.07%。

### 2.2 小鼠分组与给药

将48只C57雄性小鼠随机分为8组(每组6只):假手术组,模型组,RRPAE低、中、高剂量(2.5、5.0、10.0 g·kg<sup>-1</sup>)组,DRRAE低、中、高剂量(2.5、5.0、10.0 g·kg<sup>-1</sup>)组。预饲养适应环境1周后,ig给药,假手术组和模型组ig 0.9%氯化钠溶液,每天1次,连续1周。

### 2.3 HIRI小鼠模型构建

各组小鼠于末次给药2 h后行HIRI手术<sup>[26]</sup>,术前禁食3 h,使用异氟烷进行呼吸麻醉,开腹后采用无创血管夹夹闭肝左、中叶的肝动脉、门静脉及胆管分支以诱导70%肝脏缺血,可观察到肝叶由鲜红色转变为暗红色。缺血60 min后,松开血管夹,此时缺血的肝脏迅速恢复鲜红色,关闭腹腔后恢复血液灌注。假手术组小鼠麻醉开腹后,暴露肝脏,60 min后进行缝合。各组小鼠手术期间维持动物体温在37 °C左右。

### 2.4 小鼠状态观察与取材

术后小鼠放在37 °C保温箱中持续观察生命体

征和一般活动状态,术后6 h,麻醉后开腹,取血并同时摘取肝脏、脾脏组织样本,计算肝脏、脾脏系数。用1 mL注射器采集各组小鼠下腔静脉血,静置1 h,8 000×g离心10 min并吸取上层血清,用于后续血清生化检测;分离并摘取各组小鼠肝脏组织,其中一块肝大叶组织(约0.5 cm×0.5 cm)固定于4%多聚甲醛,剩余肝脏组织液氮速冻后保存于-80 °C冰箱,用于后续相关试剂盒及蛋白水平的检测。

## 2.5 血清生化指标检测

每组选取6只小鼠的血清样本,参考试剂盒说明书,根据标准品绘制标准曲线。按照不同说明书要求,配制所需的反应溶液,分别于505、450、500、546 nm波长处检测各组小鼠血清中ALT、AST、LDH、NO水平。

## 2.6 肝脏组织病理学观察

取浸泡于4%多聚甲醛的小鼠肝组织进行脱水、石蜡包埋并切厚度为5 μm的冠状片。对制备好的病理切片经二甲苯脱蜡、乙醇脱水和蒸馏水清洗后,使用苏木素染色-伊红(HE)复染后,经二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜下观察肝小叶、肝索排列及肝细胞结构等组织细胞学变化。使用Suzuki评分<sup>[27]</sup>后的百分比作为HE评分标准反映肝细胞损伤及炎性细胞浸润情况。

## 2.7 肝组织中MDA、SOD、NO水平检测

严格按照试剂盒说明书进行操作,取存放于-80 °C的小鼠肝组织解冻并使用样品制备液在冰浴中进行匀浆,4 °C放置10 min后,12 000×g离心10 min。小心吸取上清液作为待测样品,按照试剂盒说明书检测肝组织中MDA、SOD和NO水平。

## 2.8 Western blotting 检测相关蛋白

取存放于-80 °C的小鼠肝组织解冻并使用RIPA裂解液制成匀浆,4 °C、8 000×g离心10 min,吸取上清液,用BCA蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白浓度。采用SDS-PAGE凝胶电泳分离蛋白,将蛋白转移至PVDF膜上,使用5%的脱脂奶粉封闭1 h,采用TBST洗净后分别加入Transferrin、SLC7A11、SLC39A14、PCBP2和β-actin一抗,4 °C孵育过夜。次日,取出PVDF膜并用TBST在摇床洗涤3次,每次7 min,然后室温孵育对应二抗2 h(二抗与稀释液比例为1:10 000),TBST液洗3次,每次7 min,在暗盒中加入ECL发光液显影,在曝光仪曝光并保存图像,用Image J软件计算蛋白灰度值,并进行统计学分析。

## 2.9 细胞培养及给药

BRL肝细胞系在添加了10%胎牛血清和1%青霉素G/链霉素的DMEM培养基中培养,培养温度为37 °C,二氧化碳浓度为5%。RRPAE经0.8、0.22 μm的超滤膜滤过后,在DMEM培养基中分别稀释至50、100、150 mg·mL<sup>-1</sup>。野百合碱用于模拟HIRI下的肝细胞损伤<sup>[28]</sup>,埃拉斯汀作为铁死亡反应的诱导剂。用50、100、150 mg·mL<sup>-1</sup>的RRPAE处理肝细胞1 h(对照组不加药)后,加野百合碱(500 μmol·L<sup>-1</sup>)或埃拉斯汀(10 μmol·L<sup>-1</sup>)处理24 h。处理结束后,收集细胞培养基,细胞用PBS轻轻冲洗进行后续实验。

## 2.10 细胞总铁亚铁及GSH检测方法

准备细胞培养基样品并检测其中铁离子及亚铁离子,同时收集细胞,使用冷热交替法破碎细胞,检测细胞内GSH水平。其中总铁离子含量、亚铁离子含量以及GSH含量严格按照试剂盒说明书进行操作,分别于510、593、420 nm处用酶标仪检测进行测定总铁离子、亚铁离子以及GSH的吸光度。

## 2.11 统计学方法

所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并独立重复至少3次,使用GraphPad Prism 9.0软件进行数据处理分析和制图,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 RRPAAE、DRRAE对HIRI小鼠肝脏、脾脏系数的影响

图1结果显示,与假手术组比较,模型组小鼠肝脏系数显著上升( $P < 0.05$ );与模型组比较,经过RRPAE或DRRAE预给药后,给药组小鼠的肝脏系数出现下降趋势,其中RRPAE低、高剂量组差异显著( $P < 0.05、0.001$ );表明RRPAE、DRRAE可降低肝脏的充血及水肿程度。随后用脾脏系数评估小鼠免疫功能的改变,与假手术组比较,模型组小鼠脾脏系数下降;与模型组比较,RRPAE预给药后脾脏系数下降,表明小鼠的免疫应激反应降低,而DRRAE预给药后,各剂量给药组的小鼠脾脏系数几乎不发生明显变化。

### 3.2 肝脏组织病理学观察

图2结果显示,假手术组小鼠的肝索排列规律呈放射状,肝细胞形态正常,中央静脉位置正常;模型组小鼠肝脏出现明显的肝小叶结构塌陷,细胞肿胀明显,肝血窦扩张充血或出现缺血苍白区,同时可见大片坏死区域、空泡样变性及少许坏死导致的

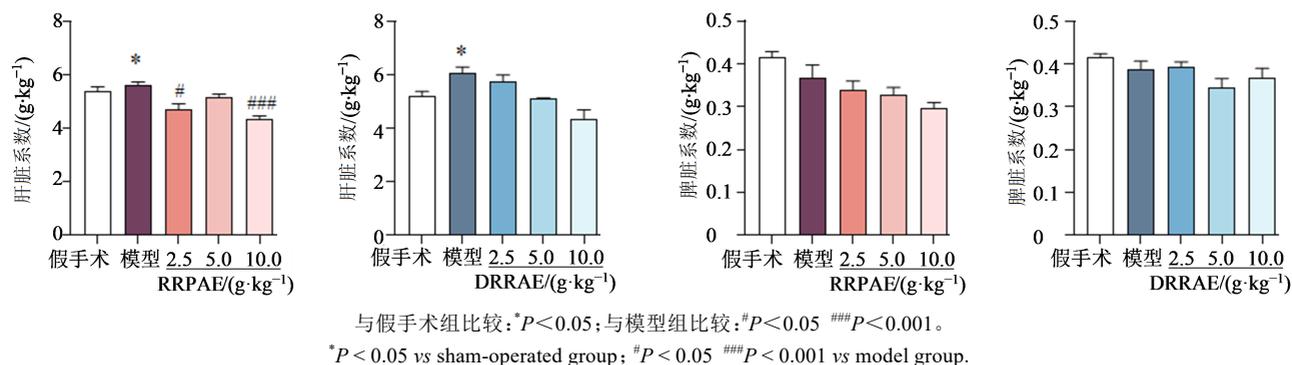


图1 RRPAE与DRRAE对HIRI小鼠肝脏、脾脏系数的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 1 Effects of RRPAE and DRRAE on hepatic and splenic coefficients in HIRI mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

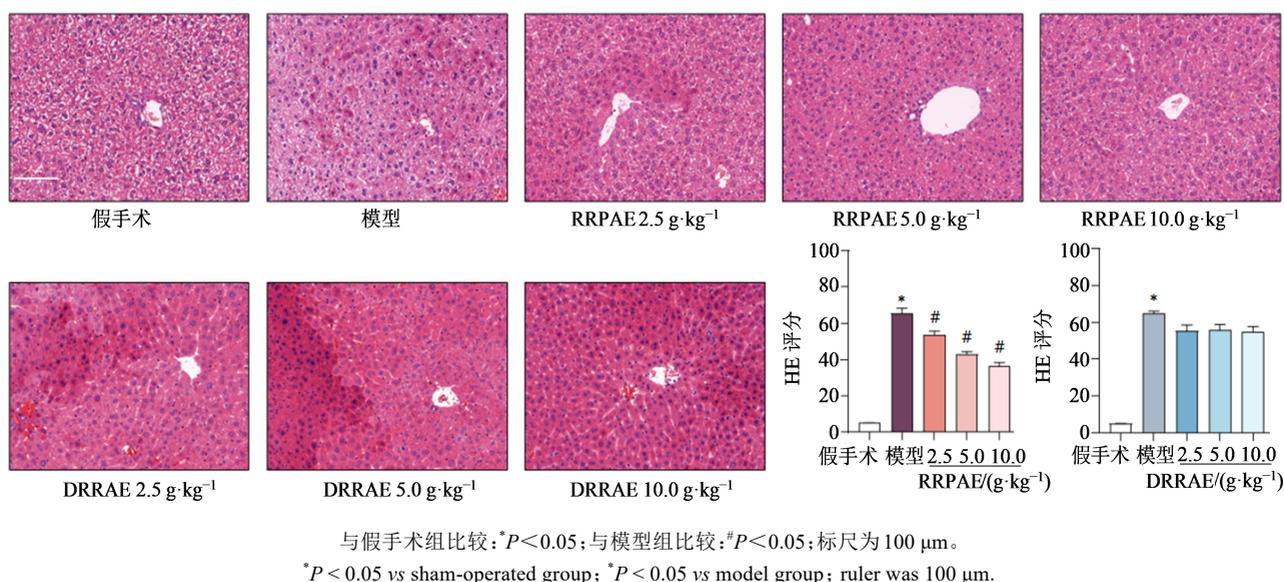


图2 HE染色观察各组小鼠肝脏病理学改变( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 2 HE staining to observe pathological changes in liver of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

气球样变;在RRPAE给药后,细胞肿胀程度减轻、空泡样变性及坏死减少,呈剂量相关性改善HIRI引起的损伤;而DRRAE给药后,坏死状况未见明显改善,依旧出现血窦膨胀、红细胞渗出、汇管区炎症细胞浸润的现象。与假手术组比较,模型组HE评分显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,RRPAE各剂量组HE评分显著下降( $P < 0.05$ )。

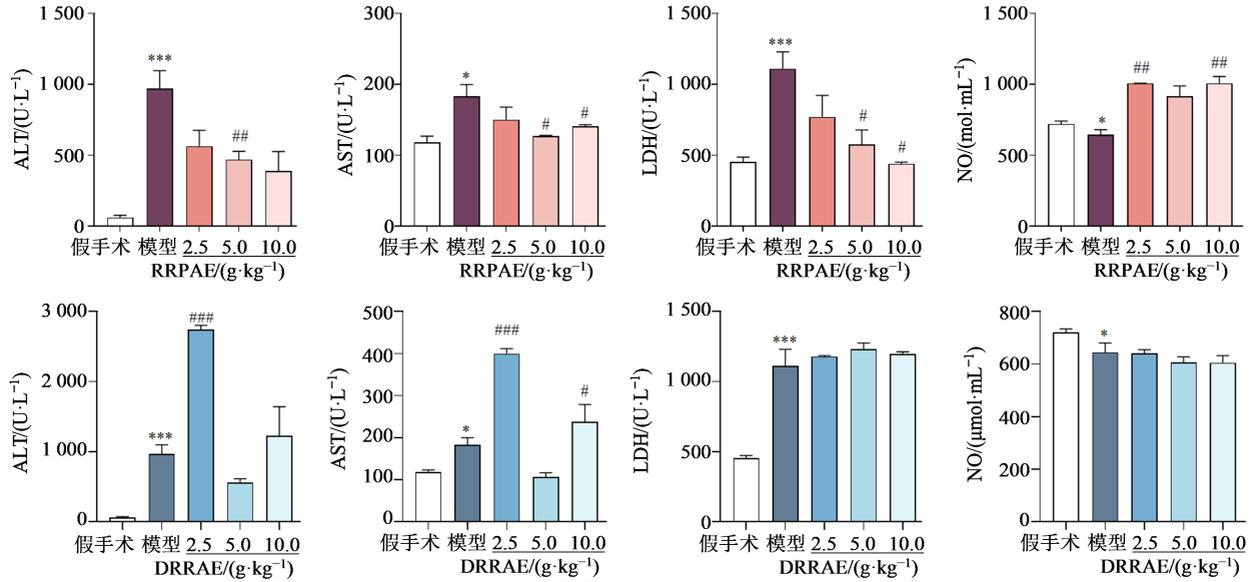
### 3.3 血清AST、ALT、LDH和NO水平检测

AST、ALT、LDH是肝常规检查中的酶类指标,其升高常用来表征肝细胞损伤情况,而NO作为一种反应性极强的自由基,能够松弛血管平滑肌,并参与炎症反应的进程。结果如图3所示,与假手术组比较,模型组血清AST、ALT、LDH水平显著升高( $P < 0.05, 0.001$ );与模型组比较,RRPAE中、高剂量组ALT、AST、LDH水平显著下降( $P < 0.05, 0.01$ ),低、高剂量组NO水平显著升高( $P < 0.01$ );而

对比RRPAE的有效保肝作用,DRRAE给药后无法逆转HIRI手术引起的ALT、AST、LDH升高,其中低剂量组在给药后AST、ALT水平显著升高,同时,DRRAE对血清中的NO水平影响较小,表明DRRAE难以逆转HIRI引起的以氧化应激为代表的肝脏损伤。

### 3.4 肝脏组织中SOD、MDA和NO水平检测

作为体内一种清除超氧阴离子自由基的抗氧化酶,SOD能够通过清除ROS防止氧化损伤。当产生大量氧化自由基时,体内NO水平会被抑制,因此NO水平也常被用来反应机体内氧化应激情况。MDA是脂质与氧自由基反应产生的产物,常用来表示脂质过氧化的程度。图4结果显示,与假手术组比较,模型组SOD、NO水平显著降低,MDA水平显著增加( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ );与模型组相比,RRPAE中、高剂量组小鼠肝脏中SOD、高剂量组



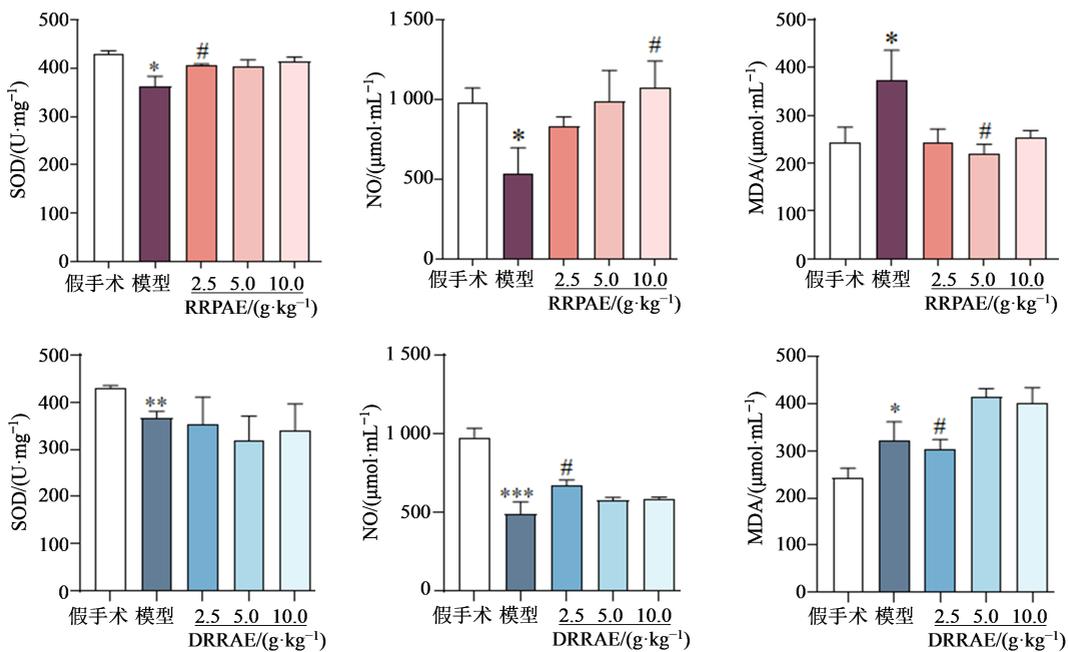
与假手术组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。  
\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs sham-operated group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图3 RRPAE、DRRAE对HIRI小鼠血清学指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 3 Effects of RRPAE and DRRAE on serological indicators in HIRI mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

NO水平显著升高( $P < 0.05$ ),中剂量组MDA水平显著降低( $P < 0.05$ )。DRRAE给药组的结果显示,与模型组小鼠相比,肝脏中SOD水平没有显著差异,但NO水平在低剂量给药组有一定程度的上升( $P < 0.05$ ),此外,DRRAE中、高剂量给药后肝内MDA水平未见明显减少,仅低剂量给药组表现出

抑制MDA水平的作用( $P < 0.05$ ),但其抑制MDA的效果远不及RRPAE给药组。结果提示,预先对HIRI小鼠进行RRPAE给药能够显著抑制其体内ROS产生,改善脂质过氧化;而预先给予DRRAE后,整体几乎难以逆转HIRI引起的肝脏氧化应激反应。



与假手术组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$ 。  
\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs sham-operated group; # $P < 0.05$  vs model group.

图4 RRPAE、DRRAE对HIRI小鼠肝脏氧化应激指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 4 Effects of RRPAE and DRRAE on oxidative stress in HIRI mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.5 各组小鼠肝脏组织铁死亡相关蛋白表达

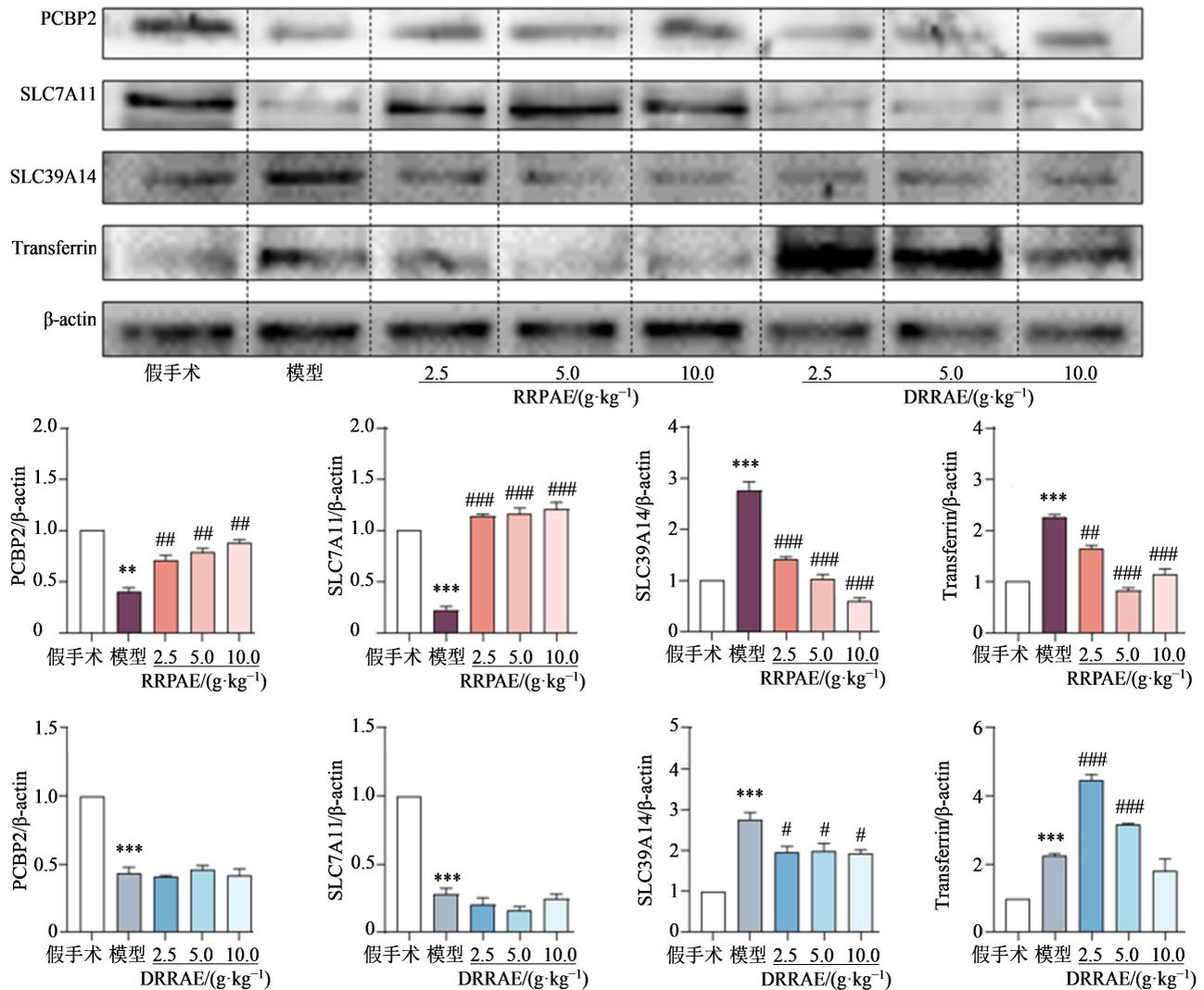
图 5 结果表明,与假手术组比较,模型组 PCBP2、SLC7A11 蛋白表达显著降低,Transferrin、SLC39A14 蛋白表达显著升高( $P < 0.01, 0.001$ );与模型组相比,RRPAE 给药组可显著上调 PCBP2、SLC7A11 蛋白表达,并显著下调 Transferrin、SLC39A14 蛋白表达( $P < 0.01, 0.001$ ),从而干预铁死亡进程;而 DRRAE 组仅表现出下调 SLC39A14 蛋白表达的作用( $P < 0.05$ ),对 PCBP2、SLC7A11、Transferrin 均无显著回调作用。与 DRRAE 给药组相比,RRPAE 给药组表现出更优的抗 HIRI 介导的铁死亡作用。

### 3.6 RRPAE 对肝细胞内 GSH 和上清总铁/亚铁离子水平的影响

为了进一步确认 RRPAE 对于 HIRI 的保护作用

是依赖于抑制肝内铁死亡的发生,利用野百合碱诱导了肝细胞铁死亡模型并给予不同剂量 RRPAE,同时检测了细胞内 GSH 和培养基中的总铁、亚铁离子水平。与对照组比较,模型组 GSH、总铁/亚铁离子水平均显著降低( $P < 0.05, 0.001$ );与模型组相比,RRPAE 给药后细胞内 GSH 水平显著提高( $P < 0.01, 0.001$ ),说明细胞内脂质过氧化情况得以改善;同时 RRPAE 各浓度可显著上调细胞培养基中总铁离子水平,高浓度可以显著上调亚铁离子水平( $P < 0.05$ ),这表明 RRPAE 可促进细胞内铁离子外流和改善细胞内的铁离子蓄积程度(图 6-A)。

为进一步明确 RRPAE 改善细胞铁死亡的潜在机制,使用 System xc<sup>-</sup> 抑制剂即铁死亡激动剂埃拉斯汀诱导肝细胞发生铁死亡。与模型组比较,RRPAE 各浓度组 GSH、低浓度组总铁/亚铁离子水



与假手术组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs sham-operated group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 5 RRPAE、DRRAE 对肝脏内铁死亡相关蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 5 Effect of RRPAE and DRRAE on ferroptosis related proteins induced by HIRI in liver ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

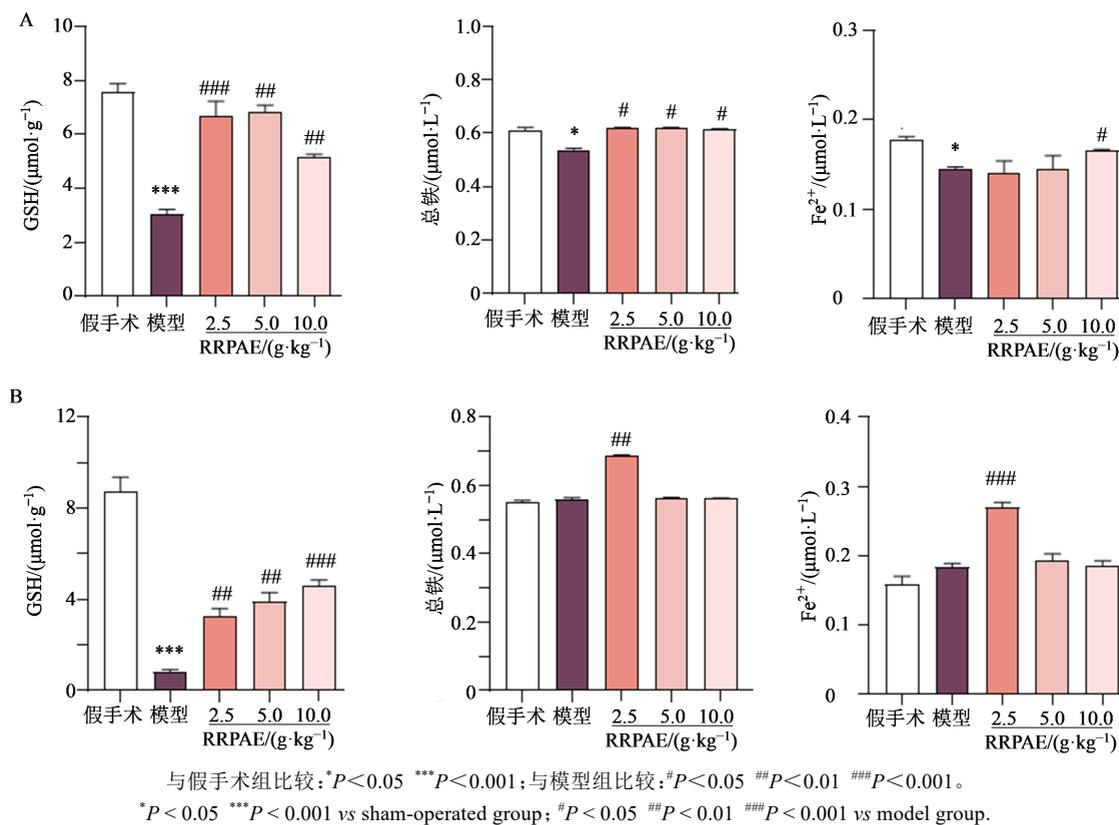


图6 RRP AE对野百合碱(A)、埃拉斯汀(B)诱导的肝细胞内总铁/亚铁离子和上清GSH水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )  
Fig. 6 Effects of RRP AE on total iron/ferrous ions and supernatant GSH levels induced by monocrotaline (A) and erastin (B) in liver cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

平显著升高( $P < 0.01, 0.001$ ),改善因System  $x_c^-$ 抑制诱导的细胞铁死亡(图6-B),进一步说明了RRP AE是基于多环节共同改善肝细胞内铁死亡。

#### 4 讨论

HIRI是肝脏移植术后不可规避的困局,同时被认为是导致术后并发症和死亡率的关键因素之一。其损伤进程常伴随肝脏氧化应激的加剧、不同形式的细胞凋亡及局部炎症反应或多脏器免疫串扰等,容易引发肝功能障碍、肝纤维化、甚至多器官损伤和移植器官排斥等系列术后并发症<sup>[29]</sup>。面对这种临床困境,目前常用的N-乙酰半胱氨酸尽管可通过刺激GSH合成、降低ROS产生,以缓解HIRI引起的氧化应激反应<sup>[30]</sup>,但其临床使用率及治疗效果一直不尽人意。因此,目前仍需找到更加安全有效的缓解HIRI风险的干预措施。

近年来,传统中医药在新药开发和老药新用中的地位逐渐被认识和重视。中医认为肝移植患者术后引起的炎症反应多属正虚邪实,虚实夹杂<sup>[18]</sup>。复方丹参片、小柴胡汤及芪参益气丸等复方或成药可改善氧化应激、炎症水平等改善HIRI;杜仲、丹参、葛根等中药也被证明可以通过降低体内MDA

及ROS水平,抑制氧化应激水平缓解HIRI<sup>[31-33]</sup>。与目前临床用药所面临的挑战相比,中药简便易得、治疗方法灵活且临床药效久经验证,因此在HIRI治疗中有巨大的开发潜力和药用价值。地黄是玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根,有生津滋阴,养血的功效。现代药理学研究亦表明,地黄提取物可以逆转氧化应激的破坏作用,同时抑制脂质过氧化,发挥抗氧化活性<sup>[34]</sup>。目前临床上地黄主要的药用类型为生地黄和熟地黄,两者的抗氧化活性和抗炎活性都被广泛研究和证实。基于目前对HIRI机制的研究和地黄性状功能的认识,本课题组期待能够通过构建熟地黄、生地黄的物质基础与药效的连接桥梁,确定地黄改善HIRI的作用机制。因此,本研究通过建立小鼠HIRI模型,对地黄2种主要药用类型的抗HIRI药效进行比较并探索其作用机制。

结果表明,与模型组相比,RRP AE预先给药后,肝细胞肿胀程度减轻、坏死区域明显减少,小鼠血清中AST、ALT、LDH水平显著降低,NO水平显著升高。同时肝内有抗氧化活性的SOD、NO水平明显上升,促脂质过氧化的MDA水平下降。这些结果表明,RRP AE可通过修复肝功能损伤及降低氧化

应激反应以缓解HIRI,且其功能发挥抑制脂质过氧化紧密关联。然而,病理结果显示DRRAE组中肝脏坏死区域和细胞排列紊乱程度均未见明显改善,说明DRRAE无法有效逆转HIRI引起的肝脏结构病变;同时,血生化结果也显示DRRAE给药后难以缓解HIRI过程中肝脏的功能受损情况。在调控氧化应激方面,DRRAE组肝脏内NO水平显著升高,低剂量的DRRAE MDA水平显著降低表现出部分抗脂质过氧化的作用。但是与RRPAE组相比,DRRAE组改善氧化应激的效果并不显著。此外,氧化应激可诱发细胞内产生大量ROS,导致脂质过氧化,引发铁死亡,进一步加剧氧化损伤<sup>[35]</sup>。考虑到脂质过氧化累积与铁死亡进程的相关性,进一步对RRPAE、DRRAE预给药后的HIRI小鼠肝脏进行了铁死亡相关蛋白的检测,结果同样显示,DRRAE组未表现出明显的抗铁死亡作用,而RRPAE组能够以剂量相关的方式抑制PCBP2、SLC7A11蛋白的表达,并显著促进Transferrin、SLC39A14蛋白的表达,改善铁死亡。体外细胞实验进一步证明,RRPAE可通过上调细胞培养基中总铁/亚铁离子水平和细胞内GSH水平,改善细胞内因野百合碱或者埃拉斯汀激动剂(调控GSH合成依赖的System xc途径)造成的铁离子蓄积和脂质过氧化。综合来看,RRPAE预给药后小鼠的抗HIRI效果更加明显,DRRAE个别剂量虽在一定程度上可以改善氧化应激损伤,但是其抗铁死亡作用并不显著,而RRPAE组不仅表现出更优的抗氧化应激效果,还能通过抑制铁死亡进程、减少ROS积聚、抑制脂质过氧化,发挥肝保护作用。因此,RRPAE对铁死亡进程的显著抑制作用可能是影响其产生优于DRRAE抗氧化作用的原因。

基于HIRI模型,不同炮制类型的地黄展现出不同的功效,而对于RRPAE经炮制后在HIRI小鼠上表现出优于DRRAE的药效差异,推测与地黄炮制前后化学成分的变化有关。研究表明,地黄主要含有环烯醚萜苷类、苯乙醇苷类、糖类、核苷类等成分<sup>[29]</sup>。生地黄的炮制后,梓醇、地黄苷A、益母草苷、毛蕊花糖苷、松果菊苷、肉苁蓉苷A等热稳定性较差的成分含量均降低,其降解程度主要与该类化合物所连接的糖的数目有关,例如其中糖苷类成分毛蕊花糖苷在炮制过程中可能发生转化,造成炮制后异毛蕊花糖苷含量升高<sup>[36]</sup>,亦提示,RRPAE经炮制后在HIRI小鼠上表现出优于DRRAE的治疗效果,可能与炮制前后化学成分的变化有关,后续可以通过筛选熟地黄中抗HIRI的有效成分,进行深入

药效学对比研究,锚定熟地黄缓解HIRI的主要有效部位。

相对于生地黄,经“九蒸九晒”炮制后的熟地黄展现出更优的缓解小鼠HIRI的肝保护效果,其具体治疗机制可能与熟地黄有效改善肝脏氧化应激损伤及抑制铁死亡密切相关。本研究结果从抑制肝脏氧化应激和铁死亡角度初步阐述了熟地黄相较于生地黄更适合用于治疗HIRI,一定程度上证明了RRPAE给药的有效性及其可行性,为熟地黄在相关肝病及其并发症治疗中的应用提供了新思路,也为临床一线用药的开发和推广提供了科学证据。此外,炮制后地黄成分变化带来的药效特点改变也提示了更深层次的探索重点和未来研究方向。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sarin S K, Kumar M, Eslam M, et al. Liver diseases in the Asia-Pacific region: A Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission [J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(2): 167-228.
- [2] Bardallo R G, Panisello-Roselló A, Sanchez-Nuno S, et al. Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury [J]. FEBS J, 2022, 289(18): 5463-5479.
- [3] Ntamo Y, Ziqubu K, Chellan N, et al. Clinical use of N-acetyl cysteine during liver transplantation: Implications of oxidative stress and inflammation as therapeutic targets [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 147: 112638.
- [4] Niu H, Sanabria-Cabrera J, Alvarez-Alvarez I, et al. Prevention and management of idiosyncratic drug-induced liver injury: Systematic review and Meta-analysis of randomised clinical trials [J]. Pharmacol Res, 2021, 164: 105404.
- [5] Kronborg T M, Ytting H, Hobolth L, et al. Novel anti-inflammatory treatments in cirrhosis. A literature-based study [J]. Front Med, 2021, 8: 718896.
- [6] Hirao H, Nakamura K, Kupiec-Weglinski J W. Liver ischaemia-reperfusion injury: A new understanding of the role of innate immunity [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(4): 239-256.
- [7] Tang S P, Mao X L, Chen Y H, et al. Reactive oxygen species induce fatty liver and ischemia-reperfusion injury by promoting inflammation and cell death [J]. Front Immunol, 2022, 13: 870239.
- [8] Kaltenmeier C, Wang R H, Popp B, et al. Role of immuno-inflammatory signals in liver ischemia-reperfusion injury [J]. Cells, 2022, 11(14): 2222.
- [9] Peng Y M, Yin Q, Yuan M X, et al. Role of hepatic

- stellate cells in liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 891868.
- [10] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [11] Barrera G. Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy [J]. *ISRN Oncol*, 2012, 2012: 137289.
- [12] Yu Y, Yan Y A, Niu F L, et al. Ferroptosis: A cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 193.
- [13] Tang D L, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: Molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [14] Rochette L, Lorin J, Zeller M, et al. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: Possible therapeutic targets? [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140(3): 239-257.
- [15] Linkermann A, Stockwell B R, Krautwald S, et al. Regulated cell death and inflammation: An auto-amplification loop causes organ failure [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(11): 759-767.
- [16] Land W G, Agostinis P, Gasser S, et al. Transplantation and damage-associated molecular patterns (DAMPs) [J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(12): 3338-3361.
- [17] 纪玉华, 王文丽, 杨赞, 等. 基于特征图谱和色彩图像技术的生地黄与熟地黄的差异比较研究 [J]. *中药材*, 2023 (8): 1912-1918.
- Ji Y H, Wang W L, Yang Z, et al. Study on the difference comparison of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* based on characteristic spectrum and color image technology [J]. *J Chin Med Mat*, 2023(8): 1912-1918.
- [18] 桂泽红, 马俊杰, 陈志强, 等. 肝移植术后中医辨证治疗探讨 [J]. *辽宁中医杂志*, 2007, 34(4): 426-427.
- Gui Z H, Ma J J, Chen Z Q, et al. Exploration of traditional Chinese medicine diagnosis and treatment for postoperative liver transplantation [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2007, 34(4): 426-427.
- [19] 陈琪, 孙满强, 李世超, 等. 地黄水提物对雷公藤甲素致肝损伤的减毒作用及抗氧化机制 [J]. *上海中医药大学学报*, 2020, 34(4): 47-52, 108.
- Chen Q, Sun M Q, Li S C, et al. Attenuation effects and antioxidant mechanisms of aqueous extract of *Rehmanniae Radix* on triptolide-induced liver injury [J]. *Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med*, 2020, 34(4): 47-52, 108.
- [20] Perry B, Zhang J Z, Saleh T, et al. Liuwei Dihuang, a traditional Chinese herbal formula, suppresses chronic inflammation and oxidative stress in obese rats [J]. *J Integr Med*, 2014, 12(5): 447-454.
- [21] 陈琪, 周静威, 孙满强, 等. 地黄水提物减轻雷公藤甲素所致肝脏氧化应激损伤的实验研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2020, 15(12): 2241-2245, 2251.
- Chen Q, Zhou J W, Sun M Q, et al. Combination of water extract of *Rehmannia Glutinosa* to reduce liver oxidative stress injury induced by triptolide [J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2020, 15(12): 2241-2245, 2251.
- [22] 陈金鹏, 张克霞, 刘毅, 等. 地黄化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(6): 1772-1784.
- Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(6): 1772-1784.
- [23] 葛楠, 闫广利, 孙晖, 等. 熟地黄药效物质基础研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 292-302.
- Ge N, Yan G L, Sun H, et al. Research progress on effective constituents in *Radix Rehmanniae Praeparata* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(1): 292-302.
- [24] 赵婧含, 李雪吴, 文轩, 等. 熟地黄的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药学报*, 2023, 51(6): 110-114.
- Zhao J H, Li X, Wu W X, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Radix Rehmanniae Praeparata* [J]. *Acta Chin Med Pharm*, 2023, 51(6): 110-114.
- [25] 王清泉, 宋景, 李亚男, 等. 地黄多糖的提取纯化及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(11): 3734-3744.
- Wang Q q, Song J, Li Y n, et al. Research progress on extraction, purification and pharmacological action of *Rehmannia glutinosa* polysaccharides [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(11): 3734-3744.
- [26] Jia K X, Zhang Y H, Luo R Y, et al. Acteoside ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury via reversing the senescent fate of liver sinusoidal endothelial cells and restoring compromised sinusoidal networks [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(15): 4967-4988.
- [27] Jia K X, Zhang Y H, Luo R Y, et al. Acteoside ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury via reversing the senescent fate of liver sinusoidal endothelial cells and restoring compromised sinusoidal networks [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(15): 4967-4988.
- [28] Gomez-Arroyo J G, Farkas L, Alhussaini A A, et al. The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(4): L363-L369.
- [29] Zhai Y, Petrowsky H, Hong J C, et al. Ischaemia-

- reperfusion injury in liver transplantation: From bench to bedside [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(2): 79-89.
- [30] Ding Q C, Guo R, Pei L H, et al. *N*-acetylcysteine alleviates high fat diet-induced hepatic steatosis and liver injury via regulating the intestinal microecology in mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(6): 3368-3380.
- [31] Xu Z, Dai X X, Su S L, et al. Investigation of dynamic accumulation and regularity of nine glycosides and saccharides in *Rehmannia glutinosa* by rapid quantitative analysis technology [J]. *J Sep Sci*, 2019, 42(8): 1489-1499.
- [32] 易小康. 丹参酮I通过调节Nrf2/HO-1信号通路在肝脏缺血再灌注损伤的保护作用研究 [D]. 泸州: 西南医科大学, 2022.
- Yi X K. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Rehmannia glutinosa* [J]. Luzhou: Southwest Medical University, 2022.
- [33] 余美林. 穴位注射葛根素预处理对肝缺血再灌注损伤氧化应激的影响 [D]. 南昌: 南昌大学, 2020.
- The effect of acupoint injection of puerarin pretreatment on oxidative stress in liver ischemia-reperfusion injury [D]. Nanchang: Nanchang University, 2020.
- [34] Platczak E, Kuzma L, Porada W, et al. Evaluation of antioxidant properties of methanolic extracts from leaves and roots of *Rehmannia Glutinosa* Libosch. in human blood [J]. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 2015, 72(4): 777-783.
- [35] Forcina G C, Dixon S J. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis [J]. *Proteomics*, 2019, 19(18): 1800311.
- [36] 王悦, 周巧, 张学兰, 等. HPLC法同时测定地黄及不同炮制品中8种成分的含量 [J]. *中药材*, 2021, 44(1): 64-68.
- Wang Y, Zhou Q, Zhang X L, et al. Simultaneous determination of eight compounds contents of *Rehmanniae Radix* and its different processed products by HPLC [J]. *J Chin Med Mat*, 2021, 44(1): 64-68.

[责任编辑 兰新新]