

癫痫清颗粒含药血清抑制小胶质细胞铁死亡的机制研究^Δ

范广坤^{1*}, 齐越², 王籍贤¹, 陈巍³, 夏春鹏¹, 王一行¹, 赵玥^{3#}, 安阳⁴(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁大连 116600; 2. 徐州医药高等职业学校药学技术系, 江苏徐州 221116; 3. 辽宁中医药大学附属第二医院中药药理学室, 沈阳 110034; 4. 辽宁中医药大学研究生院, 沈阳 110847)

中图分类号 R965;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)03-0317-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.03.08



摘要 目的 探究癫痫清颗粒含药血清(DXQ)抑制小胶质细胞铁死亡的潜在机制。方法 取雄性SD大鼠,分别以生理盐水和癫痫清颗粒药液灌胃,制备正常血清和DXQ。取小鼠小胶质细胞BV2,将成功转染阴性对照小干扰RNA(si-NC)的细胞设为si-NC组,正常培养;将成功转染谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)小干扰RNA(si-GPX4)的细胞分为si-GPX4组、CsA组(1 μmol/L环孢素A)和DXQ-L、DXQ-M、DXQ-H组(5%、7%、10%DXQ),分别以相应药液和铁死亡诱导剂Erastin(10 μmol/L)干预。培养48 h后,检测各组细胞中总铁离子、谷胱甘肽(GSH)含量,活性氧(ROS)及线粒体内超氧化物的表达水平,线粒体膜电位及线粒体通透性转换孔(MPTP)开放情况,GPX4、亲环蛋白D(CypD) mRNA的表达情况,以及铁死亡相关蛋白[GPX4、转铁蛋白受体1(TfR1)、铁蛋白重链1(FTH1)],MPTP相关蛋白[腺苷酸转运蛋白(ANT)、细胞色素C(CytC)、线粒体钙单向转运体(MCU)、CypD]的表达情况。**结果** 与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中总铁离子含量、ROS及线粒体内超氧化物表达水平、MPTP开放程度、CypD蛋白及其mRNA以及TfR1、MCU蛋白的表达均显著升高或上调($P<0.01$),GSH含量、线粒体膜电位、GPX4蛋白及其mRNA以及FTH1、ANT、CytC蛋白的表达均显著降低或下调($P<0.01$);与si-GPX4组相比,DXQ-M、DXQ-H组细胞上述定量指标均普遍改善($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** DXQ可通过激活GSH/GPX4通路以增强细胞抗氧化能力,调控TfR1、FTH1蛋白表达以纠正铁离子稳态,抑制MPTP过度开放以改善线粒体功能,最终抑制小胶质细胞铁死亡。

关键词 癫痫清颗粒;线粒体通透性转换孔;GSH/GPX4通路;铁死亡;小胶质细胞

Mechanism of drug-containing serum of Dianxianqing granules in inhibiting microglial ferroptosis

FAN Guangkun¹, QI Yue², WANG Jixian¹, CHEN Wei³, XIA Chunpeng¹, WANG Yihang¹, ZHAO Yue³, AN Yang⁴
(1. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Liaoning Dalian 116600, China; 2. Dept. of Pharmaceutical Technology, Xuzhou Medical Higher Vocational School, Jiangsu Xuzhou 221116, China; 3. Dept. of Traditional Chinese Medicine Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China; 4. Graduate School, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To explore the potential mechanism by which drug-containing serum of Dianxianqing granules (DXQ) inhibits microglial ferroptosis. **METHODS** Male SD rats were given normal saline and Dianxianqing granules solution via intragastric administration to prepare normal serum and DXQ, respectively. Mice microglia BV2 cells were collected and successfully transfected with a negative control small interfering RNA (si-NC), and then they were included in the si-NC group and cultured under normal conditions. Cells successfully transfected with small interfering RNA targeting glutathione peroxidase 4 (GPX4) (si-GPX4) were divided into the si-GPX4 group, the CsA group (treated with 1 μmol/L cyclosporine A), and the DXQ-L, DXQ-M and DXQ-H groups (treated with 5%, 7% and 10% DXQ, respectively). These groups were subsequently treated with their corresponding drug solutions and ferroptosis inducer Erastin (10 μmol/L). The intracellular levels of total iron ions, glutathione (GSH), reactive oxygen species (ROS), and the expression of mitochondrial superoxide were determined in each group after 48 h of treatment. Additionally, mitochondrial membrane potential, the opening degree of mitochondrial permeability transition pore (MPTP), and mRNA expressions of GPX4 and cyclophilin D (CypD) were detected. Furthermore, the expressions of ferroptosis-related proteins [GPX4, transferrin receptor 1 (TfR1) and ferritin heavy chain 1 (FTH1)], as well as MPTP-related proteins [adenine nucleotide translocator (ANT), cytochrome C (CytC), mitochondrial calcium uniporter (MCU) and CypD] were assessed. **RESULTS** Compared with si-NC group, the levels of total iron ions and ROS, the

^Δ基金项目 国家自然科学基金面上项目(No.82575043);辽宁省博士科研启动基金计划项目(No.2025-BS-0702)

* 第一作者 硕士研究生。研究方向:神经药理学。E-mail: 17320070590@163.com

通信作者 研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药制剂药效物质基础及质量控制。E-mail:z.yue2008@163.com

expression level of mitochondrial superoxide, the opening degree of MPTP, protein and its mRNA expressions of CypD as well as protein expressions of TfR1 and MCU were increased or up-regulated significantly ($P < 0.01$); however, GSH content, mitochondrial membrane potential, protein and mRNA expressions of GPX4, and protein expressions of FTH1, ANT and CytC were decreased or down-regulated significantly ($P < 0.01$). Compared with the si-GPX4 group, the cells in the DXQ-M, DXQ-H groups showed a general improvement in the above quantitative indicators ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **CONCLUSIONS** DXQ can enhance antioxidant capacity by activating the GSH/GPX4 pathway, regulate the expressions of TfR1 and FTH1 protein to correct iron ion homeostasis, inhibit excessive opening of MPTP to improve mitochondrial function, and ultimately suppress microglial ferroptosis.

KEYWORDS Dianxianqing granules; mitochondrial permeability transition pore; GSH/GPX4 pathway; ferroptosis; microglia

铁死亡是一种铁依赖性程序性细胞死亡方式,以细胞内铁离子蓄积、脂质过氧化反应增强为核心特征,与多种神经退行性疾病的发生发展密切相关^[1]。小胶质细胞作为中枢神经系统固有的免疫细胞,具有较强的铁储存能力;但在疾病状态下,其内部会出现大量铁离子异常沉积,这一现象可诱发小胶质细胞自身铁死亡,是加速神经损伤的关键环节^[2]。线粒体作为细胞能量代谢的枢纽,其功能稳定性对抑制小胶质细胞铁死亡至关重要^[3]。线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是线粒体内外膜之间的非选择性通道,在维持线粒体正常功能中起关键作用^[4]。谷胱甘肽(glutathione, GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)通路是调控铁死亡的核心信号通路:当氧化应激发生时,MPTP过度开放会导致线粒体功能障碍,进而引起GSH合成减少、活性氧(reactive oxygen species, ROS)分泌增加、GPX4表达下调,最终诱发细胞铁死亡^[5]。

癫痫清颗粒为辽宁中医药大学附属第二医院的中药复方专利药(专利号ZL201110069494),由熟地黄、制何首乌、芍药(白芍)、石菖蒲、柴胡、郁金、知母等10味中药组成,具有熄风豁痰、通畅血脉、消散瘀滞、益智醒脑等功效^[6-7]。本课题组前期研究已证实,该药可通过调控小胶质细胞免疫微环境、抑制铁死亡、保护神经元来发挥改善神经退行性疾病的作用,且GPX4是其潜在作用靶点之一^[8]。基于MPTP与GSH/GPX4通路的关联,本研究拟采用铁死亡诱导剂Erastin诱导并联合GPX4基因沉默转染构建小胶质细胞铁死亡模型,以MPTP抑制剂——环孢素A(cyclosporine A, CsA)为阳性对照药,采用不同浓度癫痫清颗粒含药血清(简称“DXQ”)进行干预,探究该药通过调控GSH/GPX4通路抑制小胶质细胞铁死亡的潜在机制,以期对癫痫清颗粒治疗铁死亡相关神经退行性疾病提供新的理论依据和作用靶点。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用仪器主要包括CLM-170B-8-NF型恒温培养箱(新加坡ESCO公司)、DMI3000B型倒置荧光显微镜(德国Leica公司)、Infinite® 200 PRO型酶标仪(瑞士

Tecan公司)、041BR118462型垂直电泳槽湿转膜系统(美国Bio-Rad公司)、Azure 300型化学发光成像仪和Azure Cielo 6型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Azure Biosystems公司)等。

1.2 主要药品与试剂

癫痫清颗粒[批号20210310,规格为每包装8 g(每1 g颗粒相当于生药5.12 g)]由辽宁中医药大学附属第二医院提供;CsA对照品(阳性对照药,批号S2286,纯度99.98%)购自美国Selleck公司;汉克平衡盐溶液(Hank's balanced salt solution, HBSS;批号H1025)购自北京索莱宝科技有限公司;总铁离子(比色法)检测试剂盒(批号E1042)购自北京普利莱基因技术有限公司;GSH(微板法)检测试剂盒(批号A006-2-1)购自南京建成生物工程研究所有限公司;线粒体超氧化物红色荧光探针(Mito-SOX™ Red)试剂盒、Lipofectamine 3000转染试剂(批号分别为M36007、L3000015)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;鼠抗GSH单克隆抗体、鼠抗细胞色素C(cytochrome C, CytC)单克隆抗体、兔抗亲环蛋白D(cyclophilin D, CypD)多克隆抗体、兔抗线粒体钙单向转运体(mitochondrial calcium uniporter, MCU)多克隆抗体、兔抗转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1, TfR1)多克隆抗体、兔抗铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1, FTH1)多克隆抗体、兔抗腺苷酸转运蛋白(adenine nucleotide translocator, ANT)多克隆抗体、鼠抗β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(批号分别为67736-1-IG、66264-1-IG、12716-1-AP、26312-1-AP、10084-2-AP、11682-1-AP、30631-1-AP、66009-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;BV2细胞专用培养基、DMEM基础培养基(批号分别为CM-0493A、WHB824K221)均购自武汉普诺赛生命科技有限公司;增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、MPTP检测试剂盒、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)二抗、免疫荧光试剂盒[含AF555标记的驴抗鼠IgG(H+L)二抗]、焦碳酸二乙酯(批号分别为C2003S、C2009S、A0562、P0190、R0021)均购自上海碧云天生物技术股份有限公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、山羊抗鼠IgG(H+L)(亲和纯化)二抗(批号分别为ZB2301、ZB2305)均购自北京中杉金

桥生物技术有限公司;PCR引物、GXP4小干扰RNA(si-GPX4)及其阴性对照(si-NC)(批号分别为B541019、1943183592、1941893178)均由生工生物工程(上海)股份有限公司提供。

1.3 实验动物和细胞

8周龄的SPF级雄性SD大鼠20只,体重180~220g,购自辽宁长生生物技术有限公司,生产许可证号为SCXK(辽)2023-0002。所有动物均常规饲养,实验方案已通过辽宁中医药大学附属第二医院实验动物伦理委员会审核批准(编号:LZYY250401)。

小鼠小胶质细胞系BV2(货号CL-0493A)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 DXQ的制备

选取大鼠20只,按体重随机分为空白组和癫痫清颗粒组。参照相关文献^[6],癫痫清颗粒组大鼠灌胃相应药液20g/kg(以生药量计;以水为溶剂,制成2g/mL的药液,灌胃体积为10mL/kg),空白组大鼠灌胃等体积水,每天1次,连续7d。末次给药1h后,大鼠以腹腔注射戊巴比妥钠(300mg/kg)麻醉后,采集腹主动脉血;血样以3000r/min离心15min,得DXQ和正常血清,不活化,于-80℃下保存,备用。

2.2 细胞培养及传代

将BV2细胞接种于专用培养基中,于37℃、5%CO₂条件下培养。当细胞融合度达90%时进行传代操作,每48h传代1次。

2.3 分组、造模与给药

取处于对数生长期的BV2细胞,按 2×10^5 个/mL、每孔500μL接种于6孔板中,于37℃、5%CO₂条件下培养,每48h换液1次,待细胞融合度为70%~80%时,按照Lipofectamine 3000试剂说明书方法进行转染(经实时荧光定量PCR法检测,若细胞中GPX4 mRNA的表达较正常细胞减少约50%,表明si-GPX4转染成功^[9])。将成功转染si-GPX4的细胞分为si-GPX4组、CsA组、DXQ-L组、DXQ-M组、DXQ-H组,将成功转染si-NC的细胞(经实时荧光定量PCR法检测,细胞中GPX4 mRNA表达及形态、存活率较正常细胞无明显变化)作为si-NC组。每组设置3个复孔。其中,DXQ-L、DXQ-M、DXQ-H组细胞分别加入含5%、7%、10%DXQ的专用培养基(浓度参考前期CCK-8实验结果设置),其余各组细胞均加入含10%正常血清的专用培养基;培养2h后,除si-NC组细胞加入等体积专用培养基外,其余各组细胞均加入含10μmol/L Erastin的专用培养基;培养24h后,CsA组细胞加入含1μmol/L CsA的专用培养基,其余各组细胞加入等体积专用培养基。

2.4 细胞中总铁离子、GSH含量检测

取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48h后,收集细胞,按照相应试剂盒说明书方法操作,使用酶标仪分别于550、405nm波长处检测各组细胞的总铁离子、GSH含量。

2.5 细胞中ROS及线粒体中超氧化物表达检测

采用荧光探针法检测。(1)ROS检测:取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48h后,吸弃培养基,每孔加入10μmol/L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯试剂200μL,于37℃下孵育20min;吸弃上清液,细胞用不含血清的DMEM培养基洗涤3次,加入抗荧光淬灭封片液适量后,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。使用Image J软件计算各组细胞内ROS阳性表达(呈绿色)的平均荧光强度,用以表示细胞内ROS的表达水平。(2)线粒体中超氧化物检测:取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48h后,吸弃培养基,每孔加入MitoSOX™ Red工作液500μL,于37℃下孵育30min;细胞用HBSS洗涤3次,加入抗荧光淬灭封片液适量后,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。使用Image J软件计算各组细胞线粒体中超氧化物阳性表达区域(呈红色)的平均荧光强度,用以表示细胞线粒体内超氧化物的表达水平。

2.6 细胞线粒体膜电位及MPTP开放情况检测

(1)线粒体膜电位检测:取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48h后,吸弃培养基,细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次,每孔加入专用培养基和JC-1染色工作液各500μL,混匀,于37℃下孵育20min;吸弃上清液,细胞用JC-1染色缓冲液洗涤2次,加入专用培养基2mL后,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。使用Image J软件计算各组细胞内JC-1聚合物(呈红色)及JC-1单体(呈绿色)的平均光密度,用以表示细胞线粒体膜电位(红色荧光增强,表明线粒体膜电位升高;绿色荧光增强,表明线粒体膜电位降低)。(2)MPTP开放情况检测:取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48h后,吸弃培养基,细胞用PBS洗涤2次,加入黄绿素乙酰氧甲基酯染色液250μL,混匀,于37℃下避光孵育30min;吸弃染色液,加入37℃的专用培养基,再次于37℃下避光孵育30min;吸弃培养基,细胞用PBS洗涤3次,加入检测缓冲液后,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。使用Image J软件计算各组细胞内MPTP阳性表达(呈绿色)的平均荧光强度,用以表示细胞内MPTP开放情况(两者成反比)。

2.7 细胞中GPX4、CypD mRNA表达检测

采用实时荧光定量PCR法检测。取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48h

后,收集细胞,用PBS洗涤3次,加入Trizol试剂提取细胞中总RNA;待检测其浓度、纯度后,将其逆转录为cDNA;以此cDNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应体系包括:cDNA模板2 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 的正、反向引物(具体序列及扩增产物长度见表1)各0.4 μL ,SYBR Mix试剂10 μL ,焦碳酸二乙酯水7.2 μL 。PCR反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸45 s,共40个循环。以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算GPX4、CypD mRNA的表达水平,结果以si-NC组为参照进行归一化处理。

表1 PCR引物序列及扩增产物长度

目的基因	引物序列	产物长度/bp
GPX4	正向:5'-GCCAAAGTCTAGGAAACGC-3'	20
	反向:5'-CCGGTTGAAAGGTTTCAGGA-3'	
CypD	正向:5'-GGAGGTCATCTACGGAAGC-3'	20
	反向:5'-ATGCTTGCCATCTAGCCAGTC-3'	
β -actin	正向:5'-GATATCGCTGCGTGGTTCG-3'	19
	反向:5'-CATTCCACCATACCT-3'	

2.8 细胞中铁死亡、MPTP相关蛋白表达检测

采用免疫荧光法检测GPX4、CypD蛋白的表达情况。取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48 h后,吸弃培养基,细胞用PBS洗涤1次,再以4%多聚甲醛固定20 min,加入免疫荧光封闭液于室温下封闭10 min以减少非特异性结合;分别加入GPX4、CypD一抗(稀释比例分别为1:500、1:1 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;加入相应荧光二抗(稀释比例均为1:500),于室温下避光孵育1 h;加入DAPI染液,于室温染核5 min;以PBS洗涤细胞3次,加入抗荧光淬灭封片液适量后,置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。使用Image J软件计算各组细胞中GPX4、CypD蛋白阳性表达(分别呈红色、绿色)的平均光密度,用以表示各目的蛋白的表达水平。

采用Western blot法检测铁死亡相关蛋白(GPX4、TfR1、FTH1)、MPTP相关蛋白(ANT、CytC、MCU、CypD)蛋白的表达情况。取处于对数生长期的BV2细胞,按“2.3”项下方法分组、处理。培养48 h后,收集细胞,提取细胞中总蛋白,经定量后进行变性处理。取变性蛋白适量,经电泳分离后转膜,以封闭液于室温下封闭20 min;洗膜后,加入GPX4、TfR1、FTH1、ANT、CytC、CypD、MCU、 β -actin一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:2 000、1:1 500、1:1 000、1:1 000、1:6 000、1:30 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:3 000),于室温下孵育2 h;以TBST洗膜10 min \times 3次,滴加ECL发光液曝光、成像。使用Image J软件分析,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)条带的灰度值比值表示各目的蛋白的表达水平。

2.9 统计学方法

采用SPSS 27.0和GraphPad Prism 10软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步的组间两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 DXQ对细胞中总铁离子、GSH含量的影响

与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中总铁离子含量显著升高($P<0.01$),GSH含量显著降低($P<0.01$);与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H组、DXQ-M组细胞中总铁离子含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),GSH含量均显著升高($P<0.01$)。结果见图1。

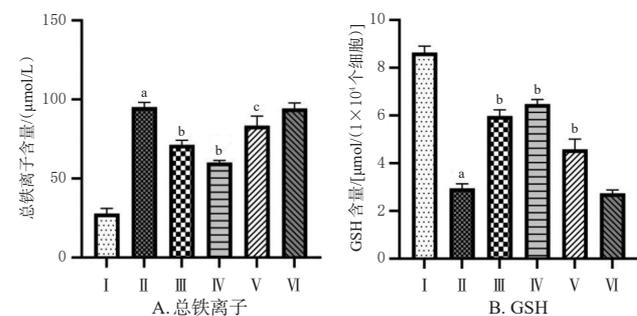


图1 各组细胞中总铁离子、GSH含量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)
I: si-NC组; II: si-GPX4组; III: CsA组; IV: DXQ-H组; V: DXQ-M组; VI: DXQ-L组; a: 与si-NC组相比, $P<0.01$; b: 与si-GPX4组相比, $P<0.01$; c: 与si-GPX4组相比, $P<0.05$ 。

3.2 DXQ对细胞中ROS及线粒体中超氧化物表达的影响

与si-NC组相比,si-GPX4组细胞呈较强的绿、红色荧光,细胞中ROS、超氧化物的表达水平均显著升高($P<0.01$);与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H组、DXQ-M组细胞绿、红色荧光明显减弱,细胞中ROS、超氧化物的表达水平均显著降低($P<0.01$)。结果见图2(限于篇幅,荧光探针实验相关显微图可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1)。

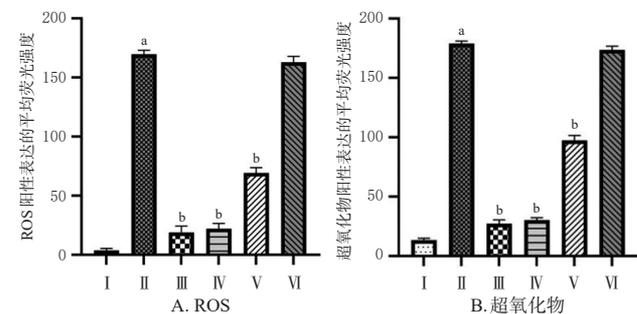


图2 各组细胞中ROS、线粒体中超氧化物表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)
I: si-NC组; II: si-GPX4组; III: CsA组; IV: DXQ-H组; V: DXQ-M组; VI: DXQ-L组; a: 与si-NC组相比, $P<0.01$; b: 与si-GPX4组相比, $P<0.01$ 。

3.3 DXQ对细胞线粒体膜电位及MPTP开放程度的影响

与si-NC组相比,si-GPX4组细胞线粒体膜电位显著降低($P<0.01$);与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H组、DXQ-M组细胞线粒体膜电位均显著升高($P<0.01$)。与si-NC组相比,si-GPX4组细胞MPTP开放程度显著增高($P<0.01$);与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H组、DXQ-M组细胞MPTP开放程度均显著降低($P<0.01$)。结果见表2(限于篇幅,线粒体膜电位及MPTP开放程度相关显微图可通过扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图2)。

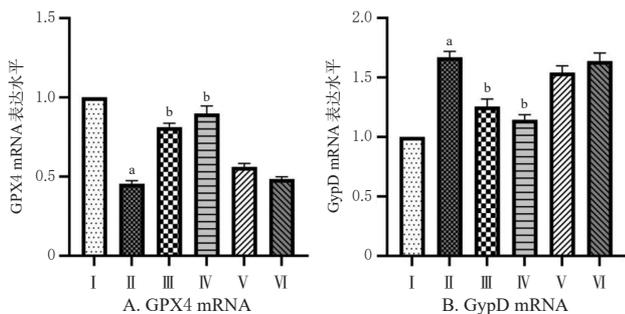
表2 各组细胞线粒体膜电位及MPTP开放程度比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	JC-1聚合物	JC-1单体	MPTP开放程度
si-NC组	129.28±2.08	12.42±2.09	214.43±4.04
si-GPX4组	32.19±3.00 ^a	107.48±2.52 ^a	75.83±3.22 ^a
CsA组	111.60±2.52 ^b	17.71±3.21 ^b	197.78±3.61 ^b
DXQ-H组	107.82±2.08 ^b	18.19±2.65 ^b	171.71±2.52 ^b
DXQ-M组	49.69±2.64 ^b	44.91±2.08 ^b	124.40±5.51 ^b
DXQ-L组	34.03±3.79	104.52±3.06	76.11±4.04

a:与si-NC组相比, $P<0.01$;b:与si-GPX4组相比, $P<0.01$ 。

3.4 DXQ对细胞中GPX4、CypD mRNA表达的影响

与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中GPX4 mRNA的表达显著下调($P<0.01$),CypD mRNA的表达显著上调($P<0.01$);与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H组细胞中GPX4 mRNA的表达均显著上调($P<0.01$),CypD mRNA的表达均显著下调($P<0.01$)。结果见图3。



I:si-NC组;II:si-GPX4组;III:CsA组;IV:DXQ-H组;V:DXQ-M组;VI:DXQ-L组;a:与si-NC组相比, $P<0.01$;b:与si-GPX4组相比, $P<0.01$ 。

图3 各组细胞中GPX4、CypD mRNA表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

表3 各组细胞中铁死亡、MPTP相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	免疫荧光法		Western blot法						
	GPX4	CypD	GPX4/ β -actin	TfR1/ β -actin	FTH1/ β -actin	MCU/ β -actin	ANT/ β -actin	CypD/ β -actin	CytC/ β -actin
si-NC组	59.10±1.53	6.51±1.49	1.59±0.07	0.05±0.01	1.55±0.07	0.27±0.01	1.32±0.06	0.18±0.01	1.14±0.05
si-GPX4组	14.01±1.53 ^a	52.79±1.31 ^a	0.83±0.04 ^a	1.12±0.05 ^a	0.65±0.03 ^a	1.23±0.06 ^a	0.03±0.01 ^a	0.97±0.05 ^a	0.15±0.01 ^a
CsA组	39.96±2.00 ^b	17.94±1.32 ^b	1.28±0.05 ^b	0.31±0.01 ^b	1.61±0.07 ^b	0.64±0.03 ^b	1.06±0.05 ^b	0.78±0.04 ^b	0.95±0.04 ^b
DXQ-H组	40.76±2.08 ^b	17.84±1.40 ^b	1.32±0.06 ^b	0.57±0.02 ^b	1.56±0.07 ^b	0.68±0.03 ^b	1.16±0.05 ^b	0.72±0.03 ^b	1.08±0.05 ^b
DXQ-M组	32.45±2.09 ^b	26.64±1.45 ^b	0.92±0.03	0.85±0.04 ^b	0.93±0.04 ^b	1.16±0.05	0.32±0.01 ^b	0.93±0.01	0.45±0.02 ^b
DXQ-L组	15.21±2.08	51.86±1.10	0.88±0.02	1.07±0.02	0.72±0.02	1.21±0.07	0.06±0.01	0.94±0.02	0.26±0.01 ^c

a:与si-NC组相比, $P<0.01$;b:与si-GPX4组相比, $P<0.01$;c:与si-GPX4组相比, $P<0.05$ 。

3.5 DXQ对细胞中铁死亡、MPTP相关蛋白表达的影响

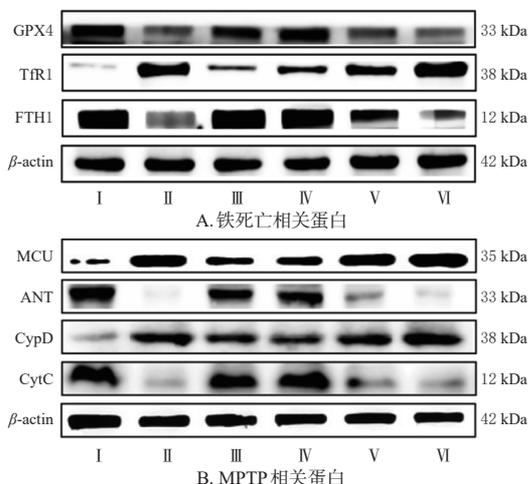
免疫荧光实验结果显示,CypD主要分布在线粒体中,呈绿色荧光;GPX4主要分布在细胞质中,呈红色荧光。与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中CypD蛋白表达显著上调($P<0.01$),GPX4蛋白表达显著下调($P<0.01$)。与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H组、DXQ-M组细胞中CypD蛋白表达均显著下调($P<0.01$),GPX4蛋白表达均显著上调($P<0.01$)。结果见表3(限于篇幅,免疫荧光染色结果可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图3)。

Western blot实验结果显示,与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中GPX4、FTH1、ANT、CytC蛋白表达均显著下调($P<0.01$),TfR1、MCU、CypD蛋白表达均显著上调($P<0.01$);与si-GPX4组相比,CsA组、DXQ-H、DXQ-M组细胞中GPX4(DXQ-M组除外)、FTH1、ANT、CytC蛋白和DXQ-L组细胞中CytC蛋白表达均显著上调($P<0.01$),CsA组、DXQ-H、DXQ-M组细胞中TfR1、MCU(DXQ-M组除外)、CypD(DXQ-M组除外)蛋白表达均显著下调($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结果见表3、图4。

4 讨论

癫痫清颗粒由10味常用中药组成,其中熟地黄、制何首乌可补肾填精益髓,芍药(白芍)可养血补血,柴胡可行气,知母可清热泻火,郁金、石菖蒲、胆南星主化痰,红花、水蛭主散瘀;诸药合用,在补肾补血的同时可调畅气机,助精血调达周身^[10]。现代药理学研究显示,癫痫清颗粒具有抗炎、抗氧化的作用,方中郁金的活性成分姜黄醇可抑制神经元铁死亡^[11];芍药(白芍)中的白芍总苷可通过抑制细胞铁死亡来改善肠缺血再灌注损伤^[12];知母中的知母皂苷元具有减轻氧糖剥夺/复糖复氧小鼠海马神经元铁死亡的作用^[13];柴胡中的柴胡皂苷A可通过白细胞介素/蛋白激酶B/胞外信号调节激酶通路来抑制神经元铁死亡^[14]。可见,该药具备抑制细胞铁死亡的物质基础。

铁死亡作为一种铁依赖性非凋亡性细胞死亡形式,与坏死性凋亡、凋亡及自噬等其他程序性细胞死亡模式存在明显差异^[15]。从形态学特征看,铁死亡细胞呈现典



I: si-NC组; II: si-GPX4组; III: CsA组; IV: DXQ-H组; V: DXQ-M组; VI: DXQ-L组。

图4 各组细胞中铁死亡、MPTP相关蛋白表达的电泳图

型的坏死样改变(如细胞肿胀、质膜破裂),与以膜起泡和收缩为特征的凋亡细胞形成鲜明对比;从生化机制层面看,铁死亡表现为致死剂量的铁依赖性脂质过氧化^[16]。同时,有研究指出,在正常情况下,由铁离子-芬顿反应驱动的ROS爆发与以GSH/GPX4通路为核心的抗氧化系统处于动态平衡状态,从而维持细胞和生物体的稳态;而当机体处于感染或炎症等病理环境时,这种微妙的平衡可能被打破,进而导致细胞发生铁死亡^[17]。研究指出,GPX4在铁死亡过程中具有关键调控作用,其功能是将脂质过氧化物转化为无毒的脂质醇,从而抑制脂质过氧化反应^[18]。最新研究表明,GPX4可通过清除细胞内过氧化物、维持细胞存活来预防铁死亡;GPX4缺失或功能障碍会导致细胞内过氧化物积累,最终引发铁死亡;此外,作为抗氧化系统的关键组成部分,GSH/GPX4通路在防止脂质过氧化介导的铁死亡中具有重要意义,其中GPX4可作为调控铁死亡的关键节点^[19]。鉴于GPX4在铁死亡中的重要作用及其在多种疾病生理病理过程中的研究价值,本课题组采用小干扰RNA转染联合铁死亡诱导剂诱导构建小胶质细胞铁死亡模型,结果显示,与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中GPX4 mRNA及蛋白的表达均显著下调,同时细胞中GSH含量同步下降,且ROS表达水平显著升高。经中、高浓度DXQ干预后,细胞中GPX4 mRNA及蛋白(Western blot实验中的DXQ-M组除外)的表达均显著上调,GSH含量显著升高,ROS表达水平显著降低,提示癫痫清颗粒可激活GSH/GPX4通路,从而发挥抗氧化作用。

在铁代谢调控方面,细胞内铁离子的过量蓄积是铁死亡的必要前提;蓄积的铁离子与超氧化物形成“氧化-还原”闭环,持续再生催化型铁池,进而通过芬顿反应促

进ROS生成及脂质过氧化发生。TfR1负责介导细胞外铁离子内流,其表达上调会增加细胞的铁负荷;FTH1则负责将游离铁离子贮存于铁蛋白中,其表达下调会导致游离铁离子释放量增加;上述蛋白的表达失衡会直接引发细胞内铁超载,进而诱发铁死亡^[20]。本研究结果显示,与si-NC组相比,si-GPX4组细胞中总铁离子含量及线粒体内超氧化物的表达水平均显著升高,同时TfR1蛋白表达显著上调,FTH1蛋白表达显著下调;经中、高浓度DXQ干预后,细胞中总铁离子含量及线粒体内超氧化物的表达水平均显著降低,TfR1蛋白表达显著下调,FTH1蛋白表达显著上调,提示癫痫清颗粒能通过调控铁离子外流并增强铁蛋白贮存能力,降低细胞内铁负荷,进而抑制细胞铁死亡。

作为铁和氧化代谢的主要细胞器,线粒体对铁死亡具有明显影响。铁死亡会导致线粒体形态异常、三磷酸腺苷生成减少、线粒体膜电位变化、铁积累及脂质过氧化加重等一系列变化^[21]。MPTP是线粒体膜功能、铁死亡调控的关键结构,具有维持线粒体膜电位稳定、钙稳态及能量代谢平衡的作用;当GPX4表达下调或发生氧化应激时,MPTP会过度开放,直接导致线粒体膜电位崩塌、基质成分泄漏、ROS大量生成,进而破坏细胞内铁离子稳态,诱导小胶质细胞发生铁死亡^[22]。此外,MPTP的开放受CypD、ANT、MCU、CytC等蛋白的协同调控。其中CypD是MPTP的关键激活因子,其表达上调会促进MPTP开放^[20];ANT是MPTP的结构核心,其表达下调会削弱线粒体对MPTP开放的抑制能力^[23];MCU负责介导钙离子进入线粒体,其表达上调会导致线粒体钙超载,间接激活MPTP^[24];CytC的释放与MPTP的开放密切相关,其表达上调意味着MPTP开放程度降低^[25]。本研究结果显示,与si-NC组相比,si-GPX4组细胞MPTP开放程度显著升高——CypD蛋白及其mRNA、MCU蛋白表达均显著上调,ANT、CytC蛋白表达均显著下调,线粒体膜电位显著减低;经中、高浓度DXQ干预后,细胞MPTP开放程度显著降低——CypD蛋白及其mRNA、MCU蛋白表达均显著下调,ANT、CytC蛋白(含DXQ-L组)表达均显著上调,线粒体膜电位显著升高。这提示癫痫清颗粒可通过抑制MPTP开放来抑制小胶质细胞的铁死亡。

综上所述,DXQ可通过激活GSH/GPX4通路以增强细胞抗氧化能力,调控TfR1、FTH1蛋白表达以纠正铁离子稳态,抑制MPTP过度开放以改善线粒体功能,最终抑制小胶质细胞铁死亡。但DXQ的具体活性成分及其贡献程度,以及GPX4调控MPTP信号转导的具体途径尚需后续研究深入探索。

参考文献

- [1] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4):266-282.
- [2] RYAN S K, ZELIC M, HAN Y N, et al. Microglia ferroptosis is regulated by SEC24B and contributes to neurodegeneration[J]. *Nat Neurosci*, 2023, 26(1):12-26.
- [3] LIU D C, LIU Z L, LIAO H X, et al. Ferroptosis as a potential therapeutic target for age-related macular degeneration[J]. *Drug Discov Today*, 2024, 29(4):103920.
- [4] ZOROV D B, JUHASZOVA M, SOLLOTT S J. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94(3):909-950.
- [5] MENDOZA A, PATEL P, ROBICHAUX D, et al. Inhibition of the MPTP and lipid peroxidation is additively protective against I/R injury[J]. *Circ Res*, 2024, 134(10):1292-1305.
- [6] 夏春鹏, 齐越, 董笑博, 等. 癫痫清颗粒通过调控 NLRP3/Caspase-1 通路对阿尔茨海默病小鼠 Tau 蛋白的影响[J]. *中成药*, 2024, 46(12):3968-3976.
- [7] 齐越, 贾冬, 张艳军, 等. 癫痫清颗粒介导线粒体自噬对 P301S 小鼠 tau 蛋白的影响[J]. *中国药房*, 2023, 34(14):1712-1718.
- [8] 王籍贤, 齐越, 黄培池, 等. 基于 FPN1/xCT/GPX4/ACSL4 信号通路探讨癫痫清含药血清对小胶质细胞铁死亡影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2025, 27(12):25-34.
- [9] 张波, 霍明东, 马俊, 等. 谷胱甘肽过氧化物酶 4 对结直肠癌细胞系 SW480 瑞格菲尼抵抗的影响及机制研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(6):647-650, 654.
- [10] 房小楠, 李昭, 贾冬, 等. 癫痫清颗粒对阿尔茨海默病小鼠模型细胞焦亡影响[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(1):20-25.
- [11] 李玥. 姜黄醇通过介导 NCOA4 抑制铁死亡发挥抗抑郁作用的实验研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2024.
- [12] 车轩, 郭依然, 赵国杰. 基于网络药理学和铁死亡探讨白芍总苷改善肠缺血再灌注的潜在作用机制[J]. *中南药学*, 2025, 23(8):2225-2231.
- [13] 丁林, 王彦阁, 王英, 等. 知母皂苷元减轻氧糖剥夺/复糖复氧小鼠海马神经元氧化应激和铁死亡的机制研究[J/OL]. *天然产物研究与开发*, 2025: 1-12[2025-11-22]. <https://link.cnki.net/urlid/51.1335.Q.20250520.1536.002>.
- [14] 汪惊涛. 柴胡皂苷 A 通过 IL-17/AKT/ERK 通路介导的铁死亡在降低颞叶癫痫发作中的机制研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2025.
- [15] 宋嘉昱, 赫一鸣, 周凯旋, 等. 铁死亡在脓毒性心肌病中的作用机制研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2022, 34(10):1107-1111.
- [16] CHEN X, LI J B, KANG R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9):2054-2081.
- [17] XU Y F, LI K X, ZHAO Y, et al. Role of ferroptosis in stroke[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2023, 43(1):205-222.
- [18] MA T Y, DU J T, ZHANG Y F, et al. GPX4-independent ferroptosis: a new strategy in disease's therapy[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):434.
- [19] HUANG B, WANG H, LIU S, et al. Palmitoylation-dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1):867.
- [20] BERNARDI P, GERLE C, HALESTRAP A P, et al. Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: controversies, consensus, recent advances, and future directions[J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8):1869-1885.
- [21] NIU B L, LEI X H, XU Q L, et al. Protecting mitochondria via inhibiting VDAC1 oligomerization alleviates ferroptosis in acetaminophen-induced acute liver injury[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2022, 38(3):505-530.
- [22] FEDOTCHEVA T, SHIMANOVSKY N, FEDOTCHEVA N. Specific features of mitochondrial dysfunction under conditions of ferroptosis induced by t-butylhydroperoxide and iron: protective role of the inhibitors of lipid peroxidation and mitochondrial permeability transition pore opening [J]. *Membranes*, 2023, 13(4):372.
- [23] BELOSLUDTSEVA N V, ILZORKINA A I, SEROV D A, et al. ANT-mediated inhibition of the permeability transition pore alleviates palmitate-induced mitochondrial dysfunction and lipotoxicity[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(9):1159.
- [24] KWONG J Q, LU X Y, CORRELL R N, et al. The mitochondrial calcium uniporter selectively matches metabolic output to acute contractile stress in the heart[J]. *Cell Rep*, 2015, 12(1):15-22.
- [25] FENG W Y, WANG J B, LI B D, et al. Graphene oxide leads to mitochondrial-dependent apoptosis by activating ROS-p53-MPTP pathway in intestinal cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2022, 146:106206.

(收稿日期:2025-09-02 修回日期:2025-12-26)

(编辑:张元媛)