

## · 基础研究 ·

半夏厚朴汤及其拆方改善慢性间歇性  
低氧小鼠机体铁代谢杨新栋<sup>1, 2</sup> 赵亚硕<sup>1, 2</sup> 宋纪显<sup>1, 2</sup> 安继仁<sup>3</sup> 孙梦凡<sup>1, 2</sup> 贾翠玲<sup>1, 2</sup> 陈 琦<sup>1, 2</sup> 吉恩生<sup>1, 2</sup>

**摘要** 目的 观察半夏厚朴汤 (BHF) 及其拆方对慢性间歇性低氧 (CIH) 小鼠机体铁代谢的调节作用。方法 42 只雄性 C57BL/6N 小鼠随机分为常氧对照组 (Con)、CIH 模型组 (CIH)、全方组 (CIH+BHF)、苏叶组 (CIH+ 苏叶)、厚朴组 (CIH+ 厚朴)、行气组 (CIH+ 厚朴、苏叶)、化痰饮组 (CIH+ 半夏、茯苓、生姜), 每组 6 只。连续 CIH 暴露和灌胃给药处理 21 d 后检测相关指标。比色法检测血清铁, HE 染色观察肝脏及十二指肠形态结构、Perls' 染色观察肝脏、脾脏、十二指肠铁含量, Western Blot 及免疫组织化学染色检测肝脏铁调素 (hepcidin)、转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1)、铁泵蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1)、铁蛋白轻链 (ferritin light chain, FTL) 蛋白表达。结果 与 Con 组比较, CIH 组小鼠血清铁含量降低, 小肠黏膜 (十二指肠) 与肝脏组织结构损伤, 肝脏、小肠铁沉积增加 ( $P<0.05$ ), 脾脏铁含量减少 ( $P<0.05$ ), 肝脏 TfR1、FTL、hepcidin 蛋白表达升高 ( $P<0.05$ ), FPN1 蛋白表达下降 ( $P<0.05$ )。与 CIH 组比较, 全方组、行气组小鼠血清铁水平上调 ( $P<0.05$ ), 全方组、苏叶组、厚朴组、行气组小肠黏膜与肝脏组织形态较为完整, 肝脏、小肠铁沉积减轻 ( $P<0.05$ ), 全方组、行气组脾脏铁含量回升 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ), 全方及行气组肝脏 hepcidin、TfR1、FPN1 和 FTL 蛋白表达紊乱改善 ( $P<0.05$ )。结论 半夏厚朴汤及其拆方能够不同程度改善 CIH 暴露引起的铁代谢紊乱, 其中行气药可能发挥重要作用。

**关键词** 半夏厚朴汤; 铁代谢; 慢性间歇性低氧; 苏叶; 厚朴; 行气; 治痰先治气; 配伍; 中药复方

**Banxia Houpo Formula and Its Disassembled Prescriptions Improves Iron Metabolism in Mice with Chronic Intermittent Hypoxia** YANG Xin-yue<sup>1, 2</sup>, ZHAO Ya-shuo<sup>1, 2</sup>, SONG Ji-xian<sup>1, 2</sup>, AN Ji-ren<sup>3</sup>, SUN-Meng-fan<sup>1, 2</sup>, JIA Cui-ling<sup>1, 2</sup>, CHEN Qi<sup>1, 2</sup>, and JI En-sheng<sup>1, 2</sup> 1 Department of Physiology, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang (050200); 2 Hebei Technology Innovation Center of TCM Combined with Hydrogen Medicine, Shijiazhuang (050091); 3 Collage of Integrative Medicine, Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang (050200)

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of Banxia Houpo Formula (BHF) and its disassembled prescriptions on iron metabolism in mice with chronic intermittent hypoxia (CIH). **Methods** Forty-two male C57BL/6N mice were randomly divided into 7 groups: control group (Con), CIH model group (CIH), BHF group (CIH+BHF), Suyue group (CIH+*perilla leaf*), Houpo group (CIH+*Mangnolia officinalis*), Moving qi group (CIH+*perilla leaf*+*Mangnolia officinalis*), and Resolving phlegm and fluid retention group (CIH+*Pinellia ternate*, *Poria cocos*, and fresh ginger), 6 mice in each group. After 21 days of CIH exposure and intragastric administration, the indicators were detected. Serum iron was measured by colorimetric method, morphological structure of liver and duodenum was observed by hematoxylin-eosin staining, iron content and distribution in liver,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No.82004127); 河北省中医药管理局一般项目 (No.2023354); 河北省中医药管理局重点项目 (No.Z2022005)

作者单位: 1. 河北中医药大学生理学教研室 (石家庄 050200); 2. 河北省中医药结合氢医学技术创新中心 (石家庄 050091); 3. 河北中医药大学中西医结合学院 (石家庄 050200)

通讯作者: 吉恩生, Tel: 0311-89926098, E-mail: jesphy@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20240205.014

spleen, and duodenum were observed by Perls' staining, liver transferrin receptor 1 (TfR1), ferroportin 1 (FPN1), ferritin light chain (FTL) and hepcidin proteins were detected by Western Blot and immunohistochemical staining.

**Results** Compared with the Con group, the CIH group's serum iron level was lower, and the duodenal mucosa and liver tissue structure were damaged, iron deposition in the liver and small intestine increased ( $P<0.05$ ), the spleen's iron content reduced ( $P<0.05$ ). There was an increase in hepatic TfR1, FTL, hepcidin protein expression ( $P<0.05$ ), and a decrease in FPN1 protein expression ( $P<0.05$ ) in CIH group. Compared with the CIH group, the morphology of the small intestinal mucosa and liver tissue was relatively intact, and the iron deposition in the liver and intestine was reduced in the BHF, Suye, Houpo, and Moving qi groups ( $P<0.05$ ), while the spleen iron content increased in the BHF and Moving qi groups ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). In the BHF and Moving qi groups, the disordered expression of liver hepcidin, TfR1, FPN1, and FTL alleviated ( $P<0.05$ ).

**Conclusion** BHF and its disassembled prescriptions can alleviate the iron metabolism disorder caused by CIH exposure to varying degrees, and moving qi herbs may be particularly beneficial in this regard.

**KEYWORDS** Banxia Houpo Formula; iron metabolism; chronic intermittent hypoxia; *perilla leaf*; *cortex magnoliae officinalis*; promoting the circulation of qi; treating qi before treating phlegm; compatibility; Chinese herbal compound

阻塞性呼吸睡眠暂停 (obstructive sleep apnea, OSA) 是指在睡眠期间反复出现的上气道阻塞, 主要表现为低通气和呼吸暂停, 引起慢性间歇性低氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH) 可导致机体多器官损伤<sup>[1, 2]</sup>。研究表明 OSA 可增加心血管、神经、内分泌系统疾病的风险<sup>[3-5]</sup>, 严重影响患者的生活质量。临床研究显示 OSA 患者的铁代谢失调与动脉粥样硬化风险增加相关, 这表明铁代谢可能是治疗 OSA 相关并发症的重要靶点<sup>[6]</sup>。

半夏厚朴汤 (Banxia Houpo Formula, BHF), 出自东汉张仲景《金匮要略·妇人杂病脉证并治篇》, 原文载: “妇人咽中如有炙脔, 半夏厚朴汤主之”。其核心病机为痰气交阻, 是治痰兼顾行气的代表方剂之一, 与 OSA 基本病机病位较为吻合。临床研究发现, 半夏厚朴汤可明显改善痰气互结型 OSA 患者的严重程度<sup>[7]</sup>, 同时动物实验也表明, 半夏厚朴汤可改善 CIH 小鼠机体铁代谢紊乱以及心脏铁超载<sup>[8, 9]</sup>。但尚不明确行气与化痰之法在半夏厚朴汤中是如何发挥协同作用的。

因此, 本研究将依据半夏厚朴汤痰气同治之配伍原则对其进行行气法、化痰饮法的拆方研究, 观察 CIH 处理后小鼠不同器官 (肝、脾、十二指肠) 铁代谢变化, 观察半夏厚朴汤行气法对 CIH 导致机体铁紊乱的调节作用, 试以现代研究手段窥探《丹溪心法》中 “治痰先治气” 化痰与行气配伍法之真意所在。

## 材料与方法

1. 动物 42 只 SPF 级雄性 C57BL/6N 小鼠, 2 月龄, 体质量 ( $20 \pm 2$ ) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号: SCXK (京)

2016-0006, 造模开始前, 所有动物于河北中医药大学 SPF 级动物实验中心适应性饲养 7 日, 模拟自然光照, 室内温度控制在 ( $22 \pm 2$ ) °C, 采用标准实验动物进食及水饲养。本实验经河北中医药大学动物实验伦理审查委员会批准 (No.DWLL202205004)。

2 药物 半夏 (产地: 四川)、厚朴 (产地: 四川)、茯苓 (产地: 安徽)、苏叶 (产地: 河北)、生姜 (产地: 河北), 上述饮片均购于河北中医药大学国医堂中药房, 由河北中医药大学中药教研室鉴定符合 2020 年版《中华人民共和国药典》<sup>[10]</sup> 规定。

3 主要试剂及仪器 通用型组织固定液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: G1101)、亚铁氰化钾 [西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 货号: V900181]、PBS 缓冲液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: G0002)、中性树胶 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G8590)、伊红 (北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1100)、封闭用山羊血清 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI9056)、过氧化物酶封闭液 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9311)、血清铁测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: A039-1-1)、总铁结合力测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 货号: A040-1-1)、铁调素 (hepcidin) 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 货号: DF6492)、转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1) 抗体 [赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司, 货号: 136890]、铁蛋白轻链 (ferritin light chain, FTL) 抗体 (英国艾博抗公司, 货号: ab109373)、铁泵蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1) 抗体 (美国 Alpha Diagnostic International 公司, 货号: MTP11-A)、放射免疫沉淀法裂解缓冲

液 (radio immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA buffer) 裂解液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: G2002)、脱脂奶粉 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号: GC310001)。

CIH 氧舱 (Oxyeycler Model 84, Bio Spherix 公司, 美国)、正置荧光显微镜 (DM5000 B, Leica 公司, 德国)、组织包埋机 (EG11508, Leica 公司, 德国)、全自动轮转切片机 (RM2255, Leica 公司, 德国)、蛋白电泳和转膜转移仪 (1658033, Bio-Rad 公司, 美国)、脱色摇床 (TS-8, 其林贝尔仪器制造有限公司, 中国)、恒温金属浴 (T803109102400, 赛默飞世尔科技公司, 美国)。

4 实验用药制备 半夏厚朴汤及其配伍按《方剂学》教材所提供的临床常用剂量<sup>[11]</sup>, 依据行气化痰的配伍法则, 将半夏厚朴汤拆分为: 全方组 (半夏 12 g 厚朴 9 g 茯苓 12 g 生姜 15 g 苏叶 6 g)、苏叶组 (苏叶 6 g)、厚朴组 (厚朴 9 g)、行气组 (苏叶 6 g 厚朴 9 g)、化痰饮组 (半夏 12 g 茯苓 12 g 生姜 15 g), 各组饮片按原方比例进行制备<sup>[12]</sup>, 具体方法如下: 将每组饮片放入锅中, 分别加入 800 mL 饮用水浸泡 30 min 左右, 加热至沸腾后, 计时 30 min, 取得滤液约 600 mL。再于剩余药渣中加入 500 mL 饮用水, 文火煎煮 30 min, 得到两次滤液约 400 mL。将两次的滤液混合, 并将其浓缩到 100 mL, 储存于 4 ℃。根据 Song JX 等<sup>[9]</sup>给药方法, 按临床上每日半夏厚朴汤生药量, 以临床成人 (70 kg) 用药量的 9 倍, 分别换算为每日小鼠的给药剂量, 全方组为 54 g, 苏叶组 6 g, 厚朴组 9 g, 行气组 15 g, 化痰饮组 39 g, 分别换算为每日小鼠给药浓度, 全方组:  $54 \text{ g}/70 \text{ kg} \times 9 = 7.01 \text{ g/kg}$ , 苏叶组:  $6 \text{ g}/70 \text{ kg} \times 9 = 0.79 \text{ g/kg}$ , 厚朴组:  $9 \text{ g}/70 \text{ kg} \times 9 = 1.17 \text{ g/kg}$ , 行气组:  $15 \text{ g}/70 \text{ kg} \times 9 = 1.93 \text{ g/kg}$ , 化痰饮组:  $39 \text{ g}/70 \text{ kg} \times 9 = 5.01 \text{ g/kg}$ , 最后按照临床成人的等效小鼠 (20 g) 剂量换算。

5 造模分组 将 42 只 C57BL/6N 小鼠适应性饲养 7 d 后随机分为 7 组: 常氧对照组 (Con)、模型组 (CIH)、全方组 (CIH+BHF)、苏叶组 (CIH+苏叶)、厚朴组 (CIH+厚朴)、行气组 (CIH+苏叶、厚朴)、化痰饮组 (CIH+半夏、茯苓、生姜), 每组 6 只。参考 Zhao YS 等<sup>[13]</sup>OSA 小鼠制备方法, 将除常氧 Con 组外的其余 6 组放置于低氧舱内, 充入 100%  $\text{N}_2$  1.5 min, 使舱内  $\text{O}_2$  浓度降至 5%, 再充入 100%  $\text{O}_2$  1.5 min, 使  $\text{O}_2$  浓度回升至 21%, 每循环 3 min。同时将 Con 组置于充入空气的同等规格舱中, 连续

21 d, 每天上舱处理 8 h (9:00—17:00)。每天上舱前, 全方组、苏叶组、厚朴组、行气组、化痰饮组小鼠分别灌胃 0.3 mL 半夏厚朴汤全方、苏叶、厚朴、苏叶+厚朴以及半夏+茯苓+生姜水煎液, Con 与 CIH 组小鼠灌胃同等体积的生理盐水。在模型制备的第 21 d, 随机抽样检测小鼠血清铁水平, 以 Con 组与 CIH 组小鼠血清铁水平现显著性差异 ( $P < 0.05$ ) 时, 提示造模成功, 本研究模型存在一定个体差异, 已在实验结果中体现, 该差异为 CIH 的致病的特点之一, 不作为失败模型考虑。本次造模结束后, 各组小鼠无伤亡情况。

6 动物标本采集 造模结束后, 断食处理 12 h, 称量各组小鼠体重并记录。采用腹腔注射 15% 乌拉坦麻醉, 摘取眼球取血, 再将小鼠仰卧位固定于手术操作板上, 开腹, 摘取小鼠一部分肝脏、十二指肠、脾脏组织, 用预冷的生理盐水冲洗, 用滤纸吸取多余水渍后, 分放于 4% 多聚甲醛固定液中固定 10 h, 准备进行石蜡切片制作。再将一部分肝脏组织分放于冻存管中, 经过液氮降温后放入 -80 ℃ 保存, 待后续提取蛋白使用。

## 7 检测指标及方法

7.1 血清铁与总铁结合力 (total iron binding capacity, TIBC) 测定 (1) 血清铁检测: 将小鼠血液静置、离心取血清, 将血清与铁显色剂按比例配置, 在 100 ℃ 水中反应 5 min, 冷却后  $3\ 500 \times g$  离心 10 min, 取上清, 在 520 nm 处检测吸光度。(2) TIBC 检测: 将血清与标准铁 (179.1 mg/L) 混匀, 静置 5 min, 再重复混匀 4 次,  $3\ 500 \times g$  离心 10 min, 收集上清。将上清液按比例与铁显色剂混合, 100 ℃ 反应 5 min, 选波长为 520 nm, 检测吸收光度。

7.2 病理检测 采用 HE 染色观察肝脏、小肠组织形态。将组织包埋在石蜡中, 并制成 5  $\mu\text{m}$  石蜡切片。进行 HE 染色前, 对切片进行二甲苯脱腊和酒精梯度复水后, 用苏木精染色 3 min, 再用盐酸酒精分化液分化 5 s。在用伊红染色重染 3 min 之后, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 晾干后, 在光学显微镜下放大 200 倍观察组织形态学特征, 随机选取视野进行拍照。

7.3 组织铁含量检测 采用普鲁士蓝染色法 (Perls' staining) 观察肝脏、十二指肠以及脾脏三价铁的含量和分布。将 5  $\mu\text{m}$  石蜡切片进行二甲苯脱腊, 梯度酒精复水。采用 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  对石蜡切片常温封闭 30 min, PBS 清洗 3 次, 置于新配置 Perls' 染

液 (1% 亚铁氰化钾) 中常温避光反应 12 h, PBS 清洗 5 次, DAB 加强后, 用流水冲洗 1 h, 再进行脱水, 封片。显微镜下放大 50、200 及 400 倍观察肝脏、十二指肠和脾脏组织中铁的含量和分布, 每个标本随机选取视野进行拍照。最后使用 Image-Pro Plus 6.0 软件对所采集图像进行定量分析, 计算平均光密度。

**7.4 疫组织化学法检测肝脏组织 hepcidin 表达** 将石蜡切片脱蜡、酒精梯度复水。3%  $H_2O_2$  常温封闭 30 min 后, 对组织切片进行高温抗原修复 30 min, 待冷却至室温, 用 PBS 洗涤 3 次, 滴加山羊血清封闭 1 h, 37 ℃。吸取山羊血清后, 直接孵育 hepcidin 的 hepcidin 一抗 (山羊抗兔) (1:200), 湿盒中 4 ℃ 冰箱过夜。放置于室温 40 min, PBS 洗涤 3 次, 然后再滴加二抗 (山羊抗兔), 37 ℃, 孵育 40 min。PBS 洗涤 3 次, DAB 显色冲洗, 脱水, 透明, 封片。用显微镜随机选取视野拍照。

**7.5 Western Blot 检测肝脏中 TfR1、FPN1、FTL 蛋白表达** 将肝组织剪碎后加入 RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂, 低温环境中破碎后, 4 ℃, 12 000  $\times g$  离心 20 min, 取上清液。用二喹啉甲酸 (bicin-choninic acid, BCA) 法测定蛋白质浓度, 按相应比例配制蛋白样后, 于金属浴中加热 5 min, 100 ℃。完成后, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 凝胶电泳, 湿转法将凝胶电泳分离的蛋白转移到聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 根据分子量进行切膜, 脱脂牛奶封闭 2 h。接着用三甲基三硫代磺酸钠-缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline with Tween, TBST) 洗涤 3 次, 每次 5 min, 分别孵育 TfR1 (1:2 000)、FPN1 (1:2 000)、FTL (1:2 000)、GAPDH (1:1 000) 抗体, 4 ℃ 过夜。第 2 天用 TBST 洗涤 3 次, 每次 15 min, 二抗在室温孵育 1 h 后, 清洗 3 次, 每次 10 min。将蛋白条带浸泡于配制好的发光液中避光静置 3 min, 吸去多余液体, 放入用凝胶成像系统中进行成像。最后通过 Image-Pro Plus 6.0 进行定量分析, 与相应内参 GAPDH 进行比较。

**8 统计学方法** 所有实验数据采用 IBM SPSS 20.0 统计软件进行分析, 数据均采用  $\bar{x} \pm se$  表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 动物一般情况 (表 1)** 造模前, 各组小鼠精神良好, 进食正常。造模第 7 d, 与 Con 组比较, CIH 组小鼠精神欠佳, 喜扎堆, 食欲不振; 与 CIH 组比较, 各治疗组小鼠精神尚可, 食欲正常; 各组大鼠毛发、饮水及二便无明显变化。模型制备第 21 d 小鼠进行称重, 与 Con 组比较, CIH 组小鼠体重增长最为缓慢; 与 CIH 组比较, 各治疗组小鼠体重有不同程度增加, 其中全方组体重增加最为明显 ( $P < 0.05$ )。与全方组比较, 化痰饮组小鼠体重增长较为缓慢 ( $P < 0.05$ )。

表 1 各组小鼠第 21 d 体重比较 (g,  $\bar{x} \pm s$ )

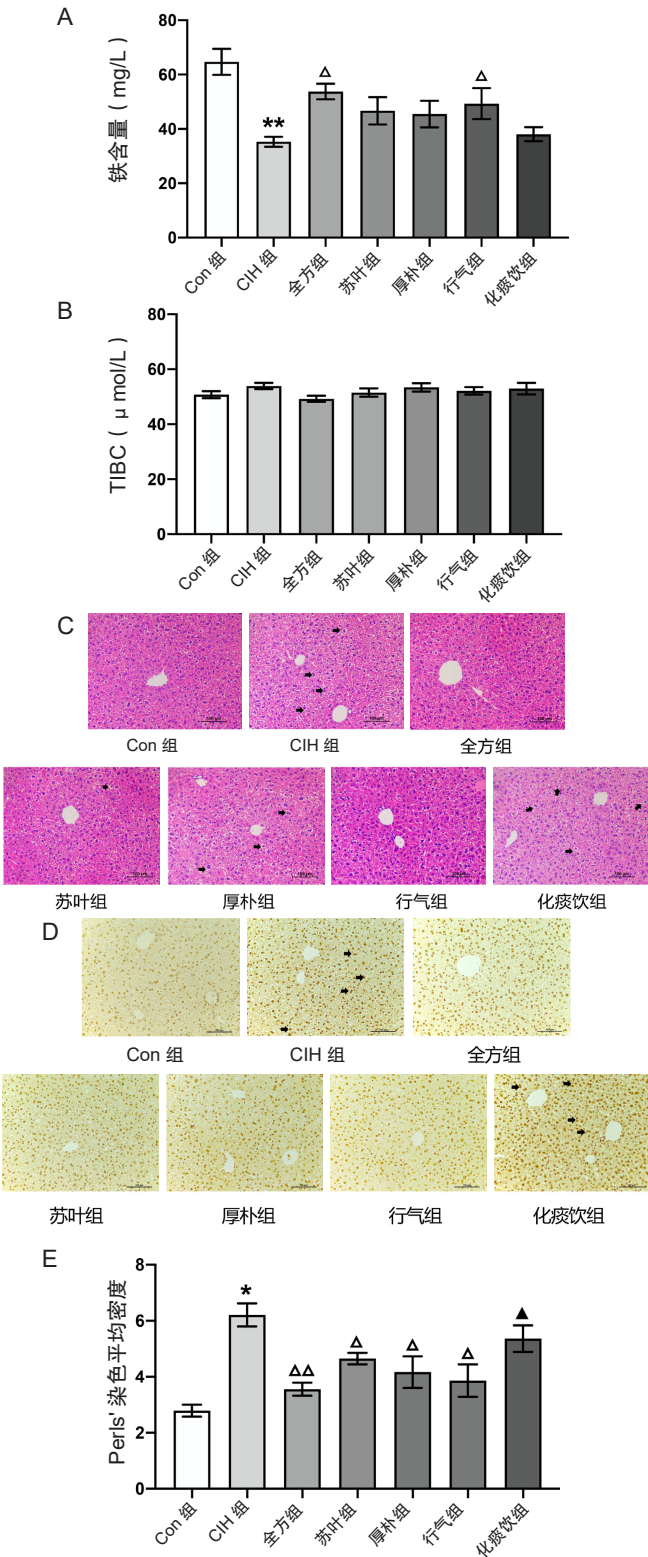
| 组别  | <i>n</i> | 体重                            |
|-----|----------|-------------------------------|
| Con | 6        | 24.90 $\pm$ 1.10              |
| CIH | 6        | 21.00 $\pm$ 0.50*             |
| 全方  | 6        | 22.80 $\pm$ 1.30 <sup>△</sup> |
| 苏叶  | 6        | 21.90 $\pm$ 1.60              |
| 厚朴  | 6        | 22.10 $\pm$ 0.60              |
| 行气  | 6        | 22.40 $\pm$ 0.90              |
| 化痰饮 | 6        | 20.50 $\pm$ 1.10 <sup>▲</sup> |

注: 与 Con 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 CIH 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ ; 与全方组比较, <sup>▲</sup> $P < 0.05$

**2 各组小鼠血清及肝脏铁水平比较 (图 1)** 与 Con 组比较, CIH 暴露后小鼠血清铁水平下降 ( $P < 0.01$ ), 肝脏组织细胞间隙增大, 细胞排列紊乱, 肝脏内铁含量增加 ( $P < 0.05$ )。与 CIH 组比较, 全方组和行气组治疗后血清铁水平提升 ( $P < 0.05$ ), 全方、苏叶、厚朴以及行气组小鼠肝脏组织形态大致正常, 细胞边界清晰, 排列较为整齐, 全方、苏叶、厚朴及行气组肝脏铁沉积减轻 ( $P < 0.05$ )。与全方组比较, 化痰饮组小鼠降血清铁水平降低, 肝脏细胞间隙较大, 铁沉积增多 ( $P < 0.05$ )。

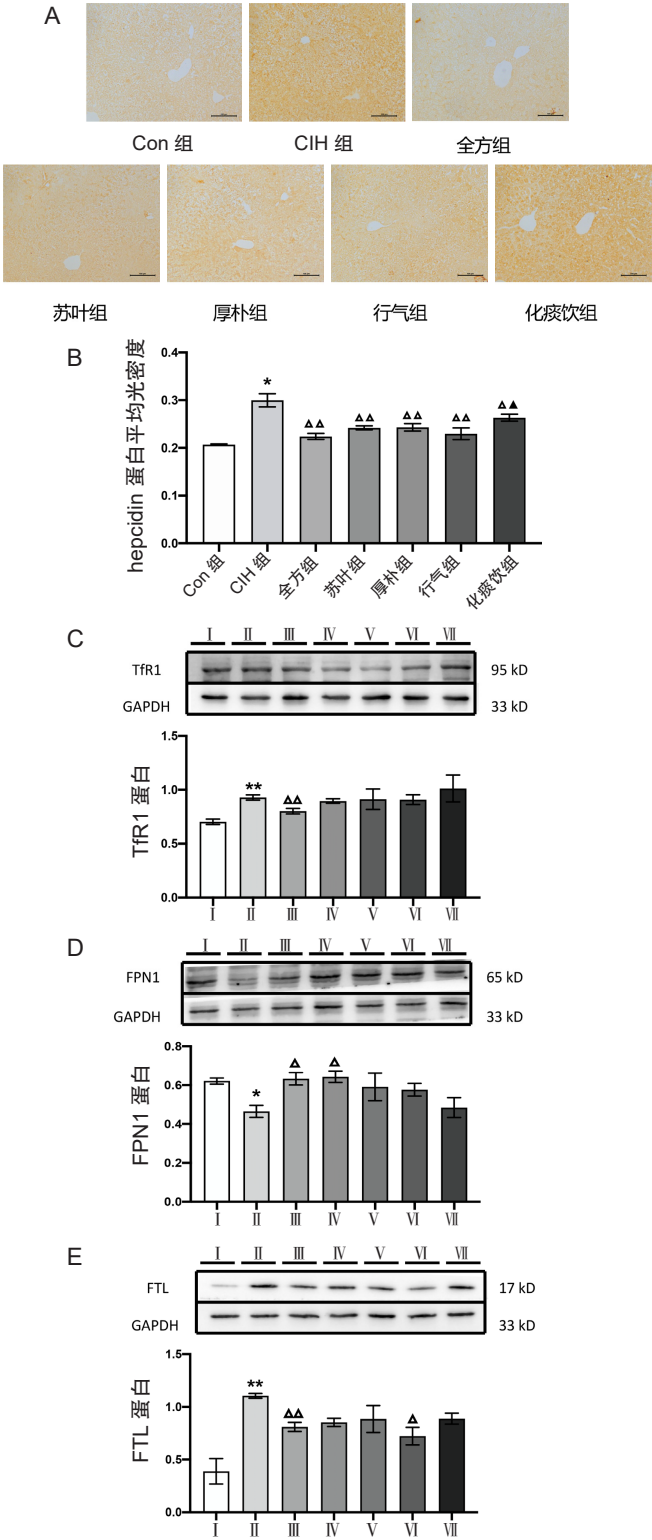
**3 各组小鼠肝脏中铁相关蛋白表达的比较 (图 2)** 与 Con 组比较, CIH 组小鼠肝脏 hepcidin、TfR1 及 FTL 蛋白表达水平上调 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 肝脏 FPN1 蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ )。与 CIH 组比较, 全方组及其各拆方组 hepcidin 表达均有不同程度下降 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 全方组 TfR1 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ), 全方组、苏叶组 FPN1 蛋白表达量增高 ( $P < 0.05$ ), 全方组、行气组 FTL 蛋白表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。与全方组比较, 化痰饮组小鼠肝脏 hepcidin 蛋白表达上升 ( $P < 0.05$ )。

**4 各组小鼠十二指肠黏膜组织形态和铁含量比较 (图 3)** 与 Con 组比较, CIH 小鼠十二指肠肠道



注: A 为各组小鼠血清铁含量比较; B 为各组小鼠血清总铁结合力比较; C 为各组小鼠肝脏组织病理变化 (HE,  $\times 200$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ ); D 为各组小鼠肝脏组织铁含量变化 (Perls' 染色,  $\times 200$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ ); E 为各组小鼠肝脏组织 Perls' 染色平均密度比较; 与 Con 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 CIH 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与全方组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; 箭头所指为肝细胞空泡处与沉积较为明显处

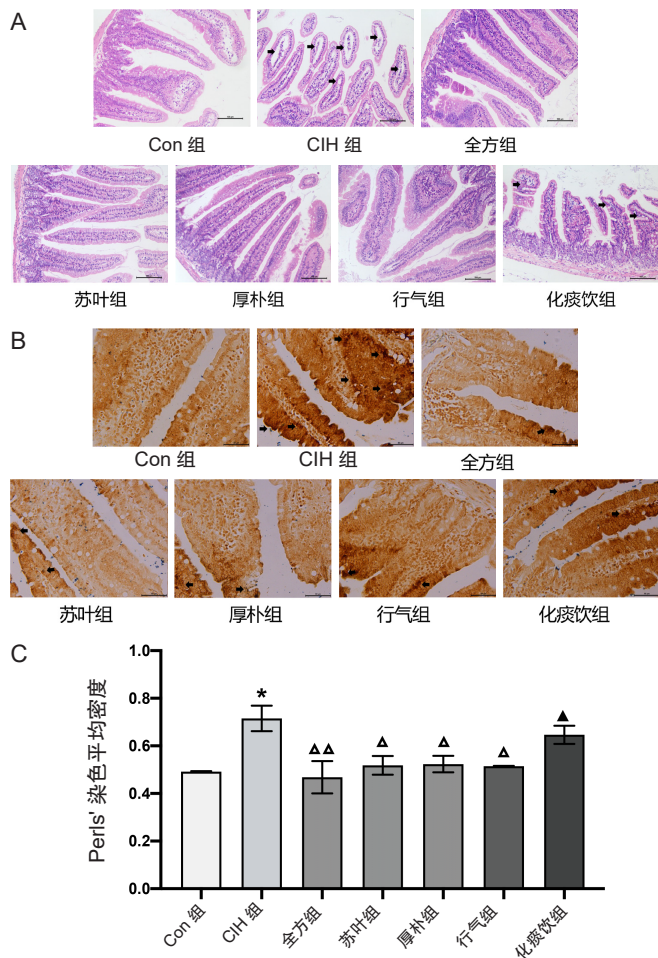
图 1 各组小鼠血清及肝脏铁水平比较



注: A 为各组小鼠肝脏内 hepcidin 蛋白表达情况 (IHC,  $\times 200$ , bar = 100  $\mu\text{m}$ ); B 为各组小鼠肝脏内 hepcidin IHC 切片平均光密度的比较; C 为各组小鼠肝脏内 TfR1 蛋白电泳图与蛋白的相对灰度值比较; D 为各组小鼠肝脏内 FPN1 蛋白电泳图与蛋白的相对灰度值比较; E 为各组小鼠肝脏内 FTL 蛋白电泳图与蛋白的相对灰度值比较; 与 Con 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 CIH 组比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与全方组比较,  $\Delta P < 0.05$ ;  $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与全方组比较,  $\Delta P < 0.05$ ; I 为 Con 组; II 为 CIH 组; III 为全方组; IV 为苏叶组; V 为厚朴组; VI 为行气组; VII 为化痰饮组

图 2 各组小鼠肝脏中铁相关蛋白表达比较

绒毛变短,黏膜组织间细胞间隙空泡增大,组织变薄,黏膜内铁含量增加 ( $P<0.05$ )。与 CIH 组比较,全方组及其各拆方组均有相应不同程度改善,全方、苏叶、厚朴以及行气组小肠铁沉积有所减轻 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。与全方组比较,化痰饮组小肠绒毛偏短,且铁沉积增加 ( $P<0.05$ )。



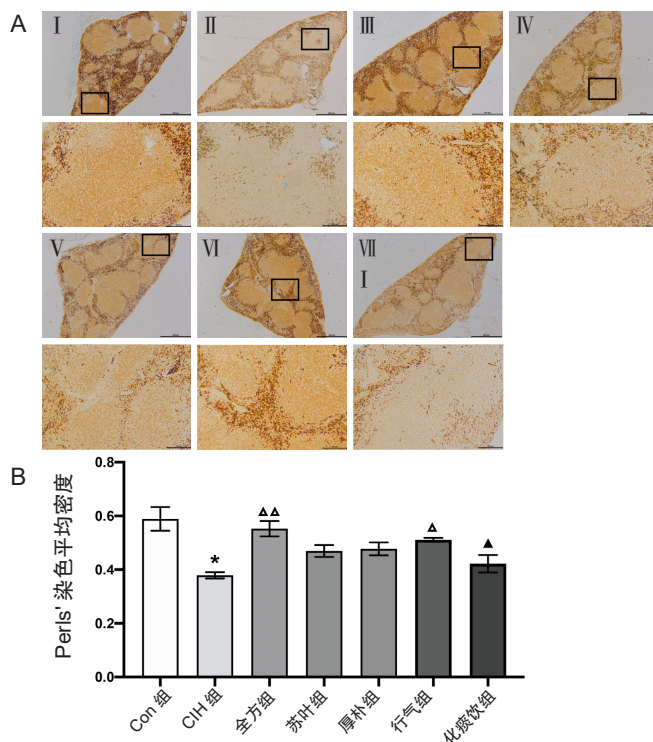
注:A为各组小鼠十二指肠病理变化(HE,  $\times 200$ , bar =  $100\ \mu\text{m}$ ); B为各组小鼠十二指肠铁含量变化(Perls'染色,  $\times 400$ , bar =  $50\ \mu\text{m}$ ); C为各组小鼠十二指肠 Perls'染色平均密度比较;与 Con 组比较, \* $P<0.05$ ;与 CIH 组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$ ;与全方组比较,  $\Delta P<0.05$ ;箭头所指为十二指肠铁沉积较为明显处

图3 各组小鼠十二指肠黏膜组织形态和铁含量的比较

5 各组小鼠脾脏内铁含量比较(图4)与 Con 组比较, CIH 组小鼠脾脏铁含量降低 ( $P<0.05$ )。与 CIH 组比较,全方组及行气组脾脏铁含量均得到不同程度的提升 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。与全方组比较,化痰饮组脾脏铁含量降低 ( $P<0.05$ )。

## 讨论

OSA 与中医学“鼾”“鼾眠”的概念相似<sup>[14]</sup>。临床调查发现痰湿型 OSA 较为普遍,“痰湿气郁”



注:A为各组小鼠脾脏铁含量变化(Perls'染色,第一排、第三排为  $\times 400$ , bar =  $50\ \mu\text{m}$ ;第二排、第四排为  $\times 50$ , bar =  $500\ \mu\text{m}$ ); B为各组小鼠十二指肠 Perls'染色平均密度比较;与 Con 组比较, \* $P<0.05$ ;与 CIH 组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$ ;其他治疗组与全方组比较,  $\Delta P<0.05$ ; I 为 Con 组; II 为 CIH 组; III 为全方组; IV 为苏叶组; V 为厚朴组; VI 为行气组; VII 为化痰饮组; A 图框内为铁沉积明显处

图4 各组小鼠脾脏内铁含量比较

为 OSA 基本的病机之一<sup>[15, 16]</sup>,临床主张运用行气化痰的半夏厚朴汤治疗,且效果良好<sup>[17-19]</sup>。此前本研究团队多项研究发现,半夏厚朴汤可较为明显改善 CIH 引起的机体代谢紊乱和多器官损伤<sup>[8, 20-22]</sup>,但半夏厚朴汤的行气化痰之法的作用机制尚不明确。因此,探索行气、化痰与铁代谢的作用关系,不仅有利于“治痰先治气”理论的理解,对于 OSA 的中医药防治也尤为必要。

近年来有报道称 CIH 和睡眠片段化对肠道微生物群、血清代谢组、肝脏和脂肪组织形态均有不良影响<sup>[22]</sup>。在此次实验中, CIH 不仅影响小鼠肝脏、十二指肠的形态学变化,其体内铁的吸收和调控也出现明显异常,而半夏厚朴汤具有保护机体组织、恢复铁代谢平衡的作用。

铁的吸收循环与肝、脾和十二指肠的调控密切相关。机体中的铁主要通过十二指肠吸收获得,食物中的  $\text{Fe}^{3+}$  被还原成  $\text{Fe}^{2+}$  后,进入肠上皮细胞,最后释放入血,参与机体铁循环<sup>[23]</sup>。同时,机体中还有部分铁来自脾脏巨噬细胞吞噬衰老红细胞而获得。肝脏是铁代谢过程中最重要的器官之一,可表达和分

泌 hepcidin, 并释放到血液中, 调控肠道铁的吸收和脾脏中铁的释放<sup>[24]</sup>。本研究发现小鼠在 CIH 暴露后肝脏组织形态出现异常且铁含量增加, 同时 hepcidin 与 TfR1 蛋白表达上升。高水平的 hepcidin 可降解 FPN1, 使其表达下降, 抑制肝脏细胞的铁释放<sup>[25]</sup>。TfR1 的上调, 表示 CIH 暴露可引起肝脏铁的摄取能力的增强。同时, 因受到大量铁沉积的刺激, FTL 也出现升高趋势, 表明 CIH 小鼠肝脏内出现了铁超载。本实验发现, 半夏厚朴汤及其拆方均有不同程度改善小鼠肝脏铁沉积作用, 其中除全方组外, 行气药的作用更为显著, 并且从实验数据中发现, 单纯化痰饮改善效果不明显。说明半夏厚朴汤中的行气药中可能存在调控 hepcidin 以及铁相关蛋白的关键成分。

铁的吸收主要发生在小肠。本实验发现, CIH 暴露还会引起小肠绒毛的结构损伤, 这可能会打破小肠原有吸收铁的形式。通过 Perls' 染色, 发现 CIH 暴露后小鼠十二指肠出现了较为明显的铁沉积, 这可能与肝脏分泌的 hepcidin 的调控, 引起小肠铁摄取增加有关<sup>[26, 27]</sup>, 说明 CIH 暴露可能引起了小鼠机体铁的吸收异常。半夏厚朴汤及其拆方有不同程度的改善和恢复小鼠十二指肠结构形态以及铁水平的作用。

脾脏具有储存铁的作用。本研究结果发现, 与肝脏、十二指肠趋势相反, 经过 CIH 暴露的小鼠, 脾脏铁含量明显降低, 说明有更多的铁参与到体循环当中, 并同时分配至其他器官, 加重其他靶器官的铁沉积。而半夏厚朴汤及其拆方治疗后可以缓解脾脏铁的流失, 其中行气药可能发挥了更为明显的作用, 单纯化痰药物对此改善不显著。

铁从食物中获取, 并参与构成血红蛋白, 是人体生长发育的重要物质, 根据现代医学对机体铁的吸收、转运和代谢生理的阐述, 可将人体所吸收的铁归入中医学“水谷精微”范畴的考量。而病理状态下机体铁代谢失衡导致的局部铁过载, 相应于中医学认为的机体气运不足酿生“痰饮”之病机。OSA 患者又多以痰湿气滞并见, 故试以行气化痰法的半夏厚朴汤治疗, 亦从以方测证的角度, 验证了痰气交阻可能是 OSA 主要病机之一。《丹溪心法》云:“善治痰者, 不治痰而治气。气顺则一身之津液亦随气而顺矣”<sup>[28]</sup>。半夏厚朴汤方由行气药苏叶、厚朴, 以及化痰饮药半夏、茯苓、生姜组成, 是治痰先治气、痰气同治的经典方剂之一。方中厚朴、苏叶虽不及他药用量之大, 但有着必不可少的价值。缘气滞则津液不布凝而成痰, 痰阻气机又可造成气滞<sup>[29]</sup>。由此可知痰之所生, 多因气为病, 而 OSA 所致的间歇性低氧(间歇性呼

吸不利)又为气滞之因。

本实验研究发现, 半夏厚朴汤中行气药(苏叶、厚朴)在 CIH 诱导的铁代谢紊乱中虽作用有限, 却在全方中发挥了较为重要的作用, 这正与“治痰先治气”的理论相应。然而“治痰先治气”的理论内涵仍然是审证求因、辨证论治, 旨在从痰的表象中辨出痰饮背后的病因<sup>[30]</sup>, 并非一味推崇行气药效用, 而忽略化痰药本身价值。而 OSA 患者的痰饮与气道塌陷所致的“气滞”关系密切, 推测这可能是行气法在上述实验中的作用更为突出的原因之一。同时, 在本研究中, 虽尚未观察到半夏厚朴汤中半夏、茯苓、生姜化痰饮药物在铁代谢中的显著作用, 但其在全方中的联合效用也不容忽视。正如, 在治疗组中仍以“痰气同治”的半夏厚朴汤全方效果最优, 最为得当, 这更体现了“治痰先治气, 痰气同治”的合理性。

综上, 本实验结果证实“痰气同治”的半夏厚朴汤可改善 CIH 暴露后机体铁代谢的失衡, 并发现其中行气药可能发挥着核心作用, 而单纯化痰饮药虽作用有限, 却在全方中与行气药存在较为必要且有效的协同作用, 这为“治痰先治气法”治疗 CIH 暴露引起的铁代谢紊乱的可行性与合理性提供了科学依据。但本研究对于半夏厚朴汤中行气药与化痰饮药调节机体铁稳态联合作用的机制、主要成分及各成分之间的联合作用仍未明确, 还需进一步探索研究。

利益冲突: 无。

#### 参 考 文 献

- [1] Maspero C, Giannini L, Galbiati G, et al. Obstructive sleep apnea syndrome: A literature review [J]. *Minerva Stomatol*, 2015, 64 (2): 97-109.
- [2] DB K. Obstructive sleep apnea [J]. *Continuum (Minneapolis)*, 2020, 26 (4): 908-928.
- [3] Chew AY, Lee CH. Obstructive sleep apnoea and coronary revascularisation outcomes [J]. *AsiaIntervention*, 2023, 9 (2): 105-113.
- [4] Tian Q, Sun J, Li X, et al. Association between sleep apnoea and risk of cognitive impairment and Alzheimer's disease: A Meta-analysis of cohort-based studies [J]. *Sleep Breath*, 2023; doi: 10.1007/s11325-023-02934-w.
- [5] Du D, Zhang G, Xu D, et al. Prevalence and clinical characteristics of sleep disorders in chronic

- obstructive pulmonary disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Sleep Med*, 2023, 112: 282–290.
- [6] Ventsislava PG, Victor M, Ognian G, et al. Disregulation of iron metabolism and atherosclerotic changes in obstructive sleep apnoea [J]. *Eur Respir J*, 2021, 58 (10), 367–379.
- [7] 房芳, 邓立伟, 邓宏伟, 等. 加味半夏厚朴汤治疗痰气互结型阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的临床研究 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2018, 13 (12): 1715–1718.
- [8] 宋纪显, 赵亚硕, 杨新栋, 等. 半夏厚朴汤对慢性间歇性低氧引起的机体铁代谢失衡影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37 (6): 3523–3527.
- [9] Song JX, Zhao YS, Zhen YQ, et al. Banxia-Houpu decoction diminishes iron toxicity damage in heart induced by chronic intermittent hypoxia [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60 (1): 609–620.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 104, 123, 251, 263, 354.
- [11] 李冀. 方剂学 (全国中医药行业高等教育十二五规划教材) [M]. 第 10 版. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 167–168.
- [12] 王欢欢, 唐璇, 许静, 等. 半夏厚朴汤古法煎煮与现代煎煮的差异研究 [J]. *时珍国医国药*, 2020, 31 (10): 2386–2389.
- [13] Zhao YS, Tan M, Song JX, et al. Involvement of hepcidin in cognitive damage induced by chronic intermittent hypoxia in mice [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 8 (4): 8520967.
- [14] 金阳, 王至婉. 中医对阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的研究进展 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36 (6): 3475–3478.
- [15] 张爱华, 杨春艳, 苏婷, 等. 昆明地区 OSAHS 患者兼夹体质分布规律探析 [J]. *中国民族民间医药*, 2017, 26 (24): 4–7.
- [16] 魏玮, 荣培晶, 陈建德, 等. 虚、滞、瘀、郁——现代慢性疾病中医病机新认知 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40 (10): 1264–1267.
- [17] 连乐荣, 蒋紫云, 刘小虹, 等. 半夏厚朴汤对阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者炎症反应、氧化应激、血管内皮功能障碍的影响 [J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37 (9): 1636–1640.
- [18] 张元兵, 徐超, 刘良倚. 半夏厚朴汤治疗阻塞型睡眠呼吸暂停低通气综合征相关性慢性咳嗽初探 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32 (10): 4522–4524.
- [19] 芦慧, 梁振, 杨晓玲. 化痰行气消痰法治疗阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的疗效及对血清 IL-18、HIF-1  $\alpha$  的影响 [J]. *四川中医*, 2020, 38 (4): 91–94.
- [20] 陈琦, 赵亚硕, 宋纪显, 等. 半夏厚朴汤通过抑制炎症反应改善 CIH 小鼠肺脏损伤的机制研究 [J]. *世界科学技术 - 中医药现代化*, 2023, 25 (1): 351–358.
- [21] 刘寒, 郭亚净, 赵亚硕, 等. NLRP3/Caspase-1 通路对半夏厚朴汤干预慢性间歇性低氧小鼠肾脏炎症损伤中的作用 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2022, 38 (4): 295–299.
- [22] Yang XY, An JR, Dong Q, et al. Banxia-Houpu decoction inhibits iron overload and chronic intermittent hypoxia-induced neuroinflammation in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024; 318 (Pt B): 117078.
- [23] Wang F, Zou J, Xu H, et al. Effects of chronic intermittent hypoxia and chronic sleep fragmentation on gut microbiome, serum metabolome, liver and adipose tissue morphology [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13 (1): 820939.
- [24] Vogt AS, Arsiwala T, Mohsen M, et al. On iron metabolism and its regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (9): 4591.
- [25] Tomas G. The discovery of the iron-regulatory hormone hepcidin [J]. *Clin Chem*, 2019, 65 (10): 1330–1331.
- [26] 付丽娟, 段相林, 钱忠明, 等. 铁代谢与铁调素 hepcidin [J]. *生理科学进展*, 2005 (3): 233–236.
- [27] Cavey T, Latour C, Island ML, et al. Spleen iron, molybdenum, and manganese concentrations are coregulated in hepcidin-deficient and secondary iron overload models in mice [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (10): 11072–11081.
- [28] 元·朱丹溪撰, 田思胜校注. 丹溪心法 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 61–68.
- [29] 武俊华. 治痰必先治气, 治气应健脾温肾 [J]. *中医杂志*, 2010, 51 (S2): 68–69.
- [30] 邓艳芳, 宋亚南, 屈乐, 等. 《丹溪心法》治痰理论探析 [J]. *河南中医*, 2014, 34 (12): 2293–2296.

(收稿: 2023-09-11 在线: 2024-03-04)

责任编辑: 赵芳芳