Open Access
DOI:10.3724/zdxbyxb-2025-0622

中医药现代化

·专题报道·

肝豆灵调控SIRT1/FoxO3信号通路抑制铁死亡改善肝豆状核变性小鼠脑损伤

武凯健[1]，王　妮[1]，赵大鹏[2]，魏汪云[1]，张婉青[1]，张　静[1]

1. 安徽中医药大学第一附属医院脑病一科，安徽 合肥 230031
2. 青岛大学附属泰安市中心医院神经内科，山东 泰安 271000

［摘　要］ **目的**：通过调控沉默信息调节因子1（SIRT1）/叉头框蛋白质O3（FoxO3）信号通路介导的铁死亡探讨肝豆灵抗肝豆状核变性（又称威尔逊病）脑损伤的作用机制。**方法**：TX小鼠随机分为六组：模型对照组、肝豆灵组、白藜芦醇（SIRT1激活剂）组、肝豆灵+白藜芦醇组、EX-527（SIRT1抑制剂）组、肝豆灵+EX-527组，DL小鼠作为空白对照组。适应性饲养后，进行四周干预治疗，随后通过莫里斯水迷宫实验、悬挂实验和爬杆实验评估小鼠的神经功能；TUNEL法检测基底节组织细胞凋亡水平；2′，7′-二氯荧光素二乙酸酯（DCFH-DA）法分析小鼠基底节组织中活性氧水平，比色法检测基底组织中亚铁离子和丙二醛水平，免疫荧光法测定组织中SIRT1和FoxO3荧光强度，蛋白质印迹法检测SIRT1、FoxO3、谷胱甘肽过氧化物酶4（GPX4）、溶质载体超家族7成员11（SLC7A11）、长链酰基辅酶A合成酶4（ACSL4）、铁蛋白重链1（FTH1）及P53蛋白的表达水平；定量逆转录聚合酶链反应（qRT-PCR）检测*Sirt1*和*Foxo3*的mRNA表达。**结果**：与空白对照组比较，模型对照组神经功能损伤明显（小鼠逃逸时间延长，平台穿越频次减少，抓握评分降低，转向和爬杆时间延长），神经细胞凋亡增加，*Sirt1*转录和表达水平下降（均$P<0.01$），*Foxo3*的转录（$P<0.05$）和表达水平升高（$P<0.01$），且小鼠基底节组织中活性氧、亚铁离子、丙二醛水平上升（均$P<0.01$），抑铁死亡相关蛋白（GPX4、SLC7A11、FTH1）表达水平下降（均$P<0.01$），促铁死亡相关蛋白（P53、ACSL4）表达水平上升（均$P<0.05$）。肝豆灵和白藜芦醇单独干预后均能显著逆转上述现象，两者效果相当（均$P>0.05$），且肝豆灵与白藜芦醇联合干预呈现协同增效。EX-527则加剧模型小鼠的神经功能损伤、细胞凋亡和铁死亡（均$P<0.05$），而肝豆灵与EX-527联用后与模型对照组间的差异无统计学意义（均$P>0.05$）。**结论**：肝豆灵通过调控SIRT1/FoxO3信号通路抑制模型鼠神经细胞铁死亡的发生，从而改善其神经功能。

收稿日期（Received）：2025-08-12　修改返回日期（Revised）：2025-10-11　接受日期（Accepted）：2025-10-27　网络预发表日期（Online）：2026-02-09

基金项目（Funding）：安徽省自然科学基金（2508085MH224）；国家自然科学基金（82574976）；安徽省江淮名医培养工程（ahsjhmypygc20230076）；安徽省卫生健康科研项目（AHWJ2024Aa10102）；山东省中医药科技项目（M-2022083）

第一作者（First author）：武凯健，硕士研究生，主要从事中医药防治神经变性疾病研究；E-mail：wkjian202109@163.com；ORCID：0009-0000-6851-5383

通信作者（Corresponding author）：张　静，主任医师，硕士生导师，主要从事中医药防治神经变性疾病研究；E-mail：zj5125115@163.com；ORCID：0000-0003-4102-938X

［关键词］ 肝豆状核变性;威尔逊病;肝豆灵;神经损伤;铁死亡;SIRT1/FoxO3信号通路;小鼠
［中图分类号］ R741;R285 ［文献标志码］ A

Chinese medicine Gandouling attenuates brain injury in hepatolenticular degeneration mice by inhibiting ferroptosis via the SIRT1/FoxO3 signaling pathway

WU Kaijian[1], WANG Ni[1], ZHAO Dapeng[2], WEI Wangyun[1], ZHANG Wanqing[1], ZHANG Jing[1] (*1. First Department of Encephalopathy, the First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; 2. Department of Neurology, Tai'an Municipal Central Hospital Affiliated to Qingdao University, Tai'an 271000, Shandong Province, China*)
Corresponding author: ZHANG Jing, E-mail: zj5125115@163.com;ORCID:0000-0003-4102-938X

［**Abstract**］ **Objective**: To investigate the mechanism by which the Chinese medicine Gandouling protects against brain injury in hepatolenticular degeneration (Wilson disease) through regulation of the silence information regulator 1 (SIRT1)/forkhead box protein O3 (FoxO3) pathway-mediated ferroptosis. **Methods**: TX mice were randomly divided into six groups: model control, Gandouling, resveratrol (SIRT1 activator), Gandouling+resveratrol, EX-527 (SIRT1 inhibitor), and Gandouling+EX-527 groups, with DL mice serving as the blank control group. After four weeks of intervention, neurological function was assessed using the Morris water maze test, wire hanging test, and pole test. Apoptosis in basal ganglia tissue was detected by TUNEL assay. Reactive oxygen species (ROS) levels in basal ganglia tissue were measured using the DCFH-DA method, while ferrous iron (Fe^{2+}) and malondialdehyde (MDA) levels were determined by colorimetric assays. Immunofluorescence was used to evaluate the fluorescence intensity of SIRT1 and FoxO3. The protein expression levels of SIRT1, FoxO3, glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier superfamily 7 member 11 (SLC7A11), acid-CoA synthetase long-chain family 4 (ACSL4), ferritin heavy chain 1 (FTH1), and P53 were assessed by Western blotting, and the mRNA expression levels of *Sirt1* and *Foxo3* were quantified by qRT-PCR. **Results**: Compared with the blank control group, the model control group exhibited significant neurological impairments (prolonged escape latency, reduced platform crossing frequency, decreased grip score and prolonged turning and pole-climbing time), increased neuronal apoptosis, decreased transcription and expression of *Sirt1* (both $P<0.01$), increased transcription ($P<0.05$) and expression ($P<0.01$) of *Foxo3*, and elevated levels of ROS, Fe^{2+}, and MDA in basal ganglia tissue (all $P<0.01$). Expression levels of ferroptosis-inhibiting proteins (GPX4, SLC7A11, FTH1) were decreased (all $P<0.01$), while those of ferroptosis-promoting proteins (P53, ACSL4) were increased (both $P<0.05$). Both Gandouling and resveratrol monotherapy significantly reversed the above alterations with comparable efficacy between the two treatments (all $P>0.05$) and combined Gandouling and resveratrol treatment exhibited synergistic effects. EX-527 exacerbated neurological impairments, neuronal apoptosis and ferroptosis (all $P<0.05$). However, no significant differences were

observed between the Gandouling+EX-527 group and the model control group (all $P>0.05$). **Conclusion**: Gandouling inhibits neuronal ferroptosis by regulating the SIRT1/FoxO3 signaling pathway, thereby improving neurological function in model mice.

[**Key words**] Hepatolenticular degeneration; Wilson disease; Gandouling; Injury of nerve; Ferroptosis; SIRT1/FoxO3 signaling pathway; Mice

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2026, 55(3): 198-209.]

[**缩略语**] 威尔逊病(Wilson disease,WD);铜转运ATP酶β(ATPase copper transporting beta,ATP7B);谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4);沉默信息调节因子1(silence information regulator 1,SIRT1);叉头框蛋白质O3(forkhead box protein O3,FoxO3);溶质载体超家族7成员11(solute carrier superfamily 7 member 11,SLC7A11);烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide,NAD);磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS);免疫球蛋白G(immunoglobulin G,IgG);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH);原位末端转移酶标记(terminal-deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling,TUNEL);长链酰基辅酶A合成酶4(acid-CoA synthetase long-chain family 4,ACSL4);铁蛋白重链1(ferritin heavy chain 1,FTH1);增强化学发光(enhanced chemiluminescence,ECL);乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid,EDTA);聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR);4′,6-二脒基-2-苯基吲哚(4′,6-diamidino-2-phenylindole,DAPI);2′,7′-二氯荧光素二乙酸酯(2′,7′-dichlorodihydrofluorescein diacetate,DCFH-DA);酪胺信号放大技术(tyramide signal amplification,TSA);定量逆转录PCR(quantitative reverse transcription PCR,qRT-PCR);信使RNA(message RNA,mRNA);互补脱氧核糖核酸(complementary DNA,cDNA);十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate,SDS);SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE);磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K);蛋白激酶B(protein kinase B,PKB,Akt);核因子κB(nuclear factor-κB, NF-κB);哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)

肝豆状核变性又称WD,是一种由*ATP7B*基因突变引发机体铜代谢稳态失衡的常染色体隐性遗传病,全球患病率为1/50 000~1/30 000[1]。该病致使铜在大脑、肝脏等组织中过度累积[2],从而引起肝、脑、肾等多器官损坏。神经功能损伤是WD的核心症状,也是WD的重要诊断标准[3]。研究发现,WD患者存在广泛神经元丢失、轴突断裂和多灶性脱髓鞘等特征性改变[4-5]。如未及时治疗,将严重影响WD患者的生活质量,甚至危及生命[6]。因此,抑制WD导致的神经损伤对于WD治疗及患者预后具有重要意义。

目前,WD的一线治疗方案仍以金属螯合剂D-青霉胺为主,其驱铜疗效显著,但带来的神经毒性、血液及免疫系统损害等诸多不良反应严重限制了其在临床的应用,特别是对脑型WD患者,不推荐其作为首选治疗方案[7-8]。肝豆灵片(简称肝豆灵)作为治疗WD的中成药,临床应用已有数十年,对脑型WD患者疗效显著,且安全性高[9-10]。该药由大黄、黄连、姜黄、郁金、丹参以及莪术六味药材组成,临床研究证实其能显著改善WD患者的神经功能[9,11],但具体机制尚需进一步明确。

现代研究发现,铁死亡参与WD患者神经元损伤的发生及发展[12]。铁死亡是一种由铁离子催化的程序性细胞死亡方式,其主要特征是细胞内铁离子浓度增加、脂质过氧化物反应加剧以及抗氧化防御系统失调[13-14]。在WD患者中,铜代

谢紊乱与铁代谢紊乱并存[15-16]。机体内过度铜累积会影响胱氨酸吸收，诱导GPX4自噬降解，进而降低GPX4活性，扰乱细胞的抗氧化系统，活性氧大量积累，导致细胞内脂质、蛋白质、DNA进一步氧化损伤[17]，发生神经细胞铁死亡，从而损害WD患者的神经功能。因此，调节铁死亡对于改善WD患者的神经功能至关重要。SIRT1/FoxO3信号通路是铁死亡的重要调控通路。SIRT1作为NAD^+依赖的去乙酰化酶，可通过对FoxO3去乙酰化修饰精确调控其转录活性[18-19]。研究表明，该通路在增强抗氧化防御、维持铁稳态以及保护线粒体功能方面发挥重要作用[20]。进一步研究显示，SIRT1/FoxO3信号通路与铁死亡密切相关：在氧化应激状态下，FoxO3可抑制SLC7A11的转录活性，导致脂质过氧化物过度累积，从而诱导大鼠神经元发生铁死亡[21-22]。

本研究基于SIRT1/FoxO3信号通路介导的铁死亡，通过WD模型小鼠探讨肝豆灵对WD脑损伤的保护机制，以便更好地了解WD神经元分子水平的调节机制，并为肝豆灵作为改善WD神经功能药物提供科学证据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

54只6月龄TX雄性小鼠（品系号C3He-Atp7b^{tx-J}）和9只6月龄同系野生型DL雄性小鼠均购自美国Jackson Laboratory实验中心。所有小鼠均饲养在合肥综合性国家科学中心大健康研究院无特定病原体级动物房，湿度控制在50%~70%，温度控制在18~22 ℃，12 h光暗交替循环的环境下适应性喂养1周，所有小鼠单笼饲养，并允许自由活动和进食。

1.2 药物、试剂和仪器

肝豆灵为安徽中医药大学第一附属医院制剂中心产品（批准文号Z20050071）；SIRT1激活剂白藜芦醇（R817263-25g）、无水硫酸铜（C805233-250g）为中国上海麦克林生化科技股份有限公司产品；选择性SIRT1抑制剂EX-527（HY-15452）为美国MedChemExpress公司产品；PBS粉末（ZLI-9062）、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG（ZB-2305）、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG（ZB-2301）、小鼠抗GAPDH mAb（TA-08）为中国北京中杉金桥生物技术有限公司产品；放射免疫沉淀裂解液（P0013B）、Western快速转膜液（P0575-10L）、BCA蛋白浓度测定试剂盒（P0010S）、抗荧光淬灭封片剂（P0126）均为中国上海碧云天生物技术公司产品；蛋白酶K（B030）、抗荧光淬灭封片剂（B024）、TUNEL细胞凋亡检测试剂盒（B014）、0.5% Triton X-100（B025）为中国安徽欣乐生物技术有限公司产品；抗ACSL4抗体（ab155282）和重组抗SIRT1抗体（ab189494）为英国Abcam公司产品；P53单克隆抗体（60283-2-Ig）为美国Proteintech公司产品；抗SLC7A11抗体（bs-6883R）、抗FTH1兔单抗（bsm-54108R）、抗GPX4抗体（bs-3884R）、抗FOXO3A重组兔单抗（bsm-52076R）为中国北京博奥森生物技术有限公司产品；丙二醛测定试剂盒（A003-1）为中国南京建成生物工程研究所有限公司产品；亚铁离子比色法测试盒（E-BC-K773-M）为中国武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司产品；ECL超敏发光试剂盒（BL520A）、TRIVDS-EDTA抗原修复液（BL617A）为中国北京兰杰柯科技有限公司产品；辣根过氧化物酶标记鼠/兔二抗（KIT-5030）为中国福州迈新生物技术开发有限公司产品。

流式细胞仪（CytoFLEX）为美国Beckman公司产品；电泳仪（EPS-300）、电泳槽（VE-180）、转移电泳槽（VE-186）为中国上海天能生命科学有限公司产品；离心机（80-2）为中国上海和欣科教设备有限公司产品；高速冷冻离心机（JW-3021HR）为中国安徽嘉文仪器装备有限公司产品；PikoReal™实时定量PCR检测系统TCR0096为美国ThermoFisher Scientific公司产品；OneDrop 1000+超微量分光光度计为中国南京五义科技有限公司产品；生物组织自动脱水机（ZT-12M）、生物组织石蜡包埋机（YB-7LF）、摊烤片机（YT-7FB）为中国孝感市亚光医用电子技术有限公司产品；徕卡切片机（RM2016）为德国Leica公司产品；电热恒温鼓风干燥箱（DHG-9070）、隔水式恒温培养箱（GNP-9080）为中国上海三发科学仪器有限公司产品；数字切片扫描仪（Pannoramic MIDI Ⅱ）为匈牙利3DHISTECH公司产品；激光共聚焦显微镜（LSM 900）为德国Zeiss公司产品。

1.3 动物分组及处理

将54只TX小鼠随机分为六组：模型对照组、肝豆灵组、白藜芦醇组、肝豆灵+白藜芦醇组、EX-527组、肝豆灵+EX-527组，每组9只。将与上

述小鼠同品系的9只6月龄野生型DL雄性小鼠作为空白对照组。其中,肝豆灵为灌胃给药,每日给予0.486 g/kg;白藜芦醇为腹腔注射给药,每日给予50 mg/kg;EX-527为腹腔注射给药,每日给予5 mg/kg;空白对照组和模型对照组用等量等渗氯化钠溶液灌胃。以上药物每日均分为两次给予,连续给药四周后进行行为学检测。行为学实验结束后所有小鼠禁食12 h,然后腹腔注射1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,取出基底节组织,用4%多聚甲醇溶液固定或液氮处理,并于−80 ℃冰箱保存备用。

1.4 莫里斯水迷宫实验评估模型鼠空间学习和记忆能力

给药结束后第1天开始进行莫里斯水迷宫实验,包括定位航行能力检测和空间探索能力检测两部分,具体方法如下:首先进行定位航行能力训练,将小鼠面向水迷宫的池壁放入水中,记录小鼠找到水下隐藏平台的时间,即逃逸时间。小鼠每天训练四次,为期4 d,每次游泳间隔时间15 min以上。每次实验结束,待小鼠休息10 s后,将其擦干并放回饲养笼。第5天,所有动物完成定位航行能力检测后,进行空间探索能力检测。撤去池中水下平台,将小鼠从远离原平台的位置放入水中,运用数码相机观察并记录小鼠在60 s内平台穿越频次。

1.5 悬挂和爬杆实验评估模型鼠共济协调情况

给药结束后第1天开始进行悬挂实验和爬杆实验。悬挂实验:将小鼠的两个前肢悬挂在直径为1.5 mm的水平金属线上,观察其两只后爪抓握金属线的情况并评分。若小鼠两只后爪均能抓住金属线记3分,1只后爪抓住金属线记2分,两只后爪均不能抓住记1分,小鼠跌落记0分。爬杆实验:制作一根直径为8 mm、高度为50 cm的直木杆,杆的顶端装有用纱布包裹的小球,将小鼠放于木杆的顶端,使其头部位置向上,记录小鼠完全向下旋转和下降到地板所需的时间(分别为转向时间和爬杆时间)。所有小鼠都在测试前接受为期3 d(每天两次)的下杆行为训练,实验时连续测定五次,取平均值。

1.6 TUNEL法观察模型鼠基底节组织细胞凋亡

将固定在4%多聚甲醛溶液中的基底节组织依次进行石蜡包埋、切片(5 μm)、脱蜡、PBS洗涤后,在0.3% Triton X-100中渗透30 min,加入TUNEL反应液,37 ℃避光反应1 h后,加入DAPI复染,避光孵育10 min后封片,荧光显微镜拍照,每张切片选择6个视野,使用ImageJ统计每个视野中基底节组织中阳性细胞率(即凋亡细胞率)。

1.7 DCFH-DA法检测模型鼠基底节细胞中活性氧水平

将冻存的小鼠基底节组织制备成单细胞悬液,经1000×*g*离心10 min后获得细胞沉淀,加入浓度为10 μmol/L的DCFH-DA,在37 ℃恒温下孵育20 min,过程中多次混匀细胞,使其与探针充分结合,用PBS洗细胞两次,去除未进入细胞内的DCFH-DA,使用流式细胞仪检测活性氧水平,实验结果以荧光强度均值表示,实验重复三次。

1.8 比色法检测模型鼠基底节组织中亚铁离子和丙二醛水平

取适量冻存的小鼠基底节组织,组织匀浆后1000×*g*离心10 min后取上清液,按照亚铁离子比色法测试盒和丙二醛测定试剂盒操作说明书测定亚铁离子和丙二醛水平。在593 nm波长下测定样本中的铁离子与探针结合产物的吸光度值,并根据标准曲线计算亚铁离子水平。在532 nm波长下测定硫代巴比妥酸法生成的红色产物的吸光度值,换算为丙二醛含量。结果均按湿重或蛋白质浓度进行标准化处理。

1.9 TSA免疫荧光法评估模型鼠基底节组织中SIRT1和FoxO3蛋白表达

将1.6的小鼠基底节组织切片经pH值为9.0的EDTA抗原修复液进行抗原修复并脱蜡后,滴加山羊血清封闭液室温避光孵育30 min,加入一抗SIRT1(1∶300稀释)、FoxO3(1∶800稀释),37 ℃避光孵育60 min后用PBS冲洗三次,加入二抗避光孵化30 min,滴加适量稀释的TSA荧光染料,室温避光孵育10 min,DAPI染色细胞核后封片,使用荧光显微镜进行图像采集。使用ImageJ软件分析免疫荧光图片中SIRT1、FoxO3阳性区域面积,并计算平均荧光强度。

1.10 qRT-PCR检测模型鼠基底节组织中*Sirt1*和*Foxo3* mRNA表达

采用TRIzol法抽提小鼠基底节组织的RNA,进行逆转录反应,以RNA逆转录形成的cDNA为模板进行PCR。反应体系10 μL:2×SYBR Green预混液5 μL,上游、下游引物各1 μL,cDNA 1 μL,无RNA酶水2 μL。反应条件:95 ℃预变性1 min;

95 ℃变性20 s，60 ℃退火40 s，72 ℃延伸1 min，共40个循环。通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$法以*β-actin*为内参计算*Sirt1*、*Foxo3* mRNA表达，引物序列见表1。

1.11 蛋白质印迹法检测模型鼠基底节组织中SIRT1/FoxO3信号通路和铁死亡相关蛋白表达

取小鼠基底节组织100 mg，置离心管中，加入含0.6 mmol/L苯甲基磺酰氟的放射免疫沉淀裂解液600 μL及适量研磨珠，低温冷冻研磨仪研磨后（65 Hz、60 s），冰上静置裂解30 min。4 ℃、12 000×*g*离心15 min，取上清液，按1∶4加5×SDS-PAGE上样缓冲液，沸水浴15 min变性。配制10% SDS-PAGE胶及电泳液、转膜液，采用垂直电泳系统上样：浓缩胶80 V恒压30 min，分离胶120 V恒压60 min。湿转法300 mA恒流转膜至聚偏二氟乙烯膜，5%脱脂奶粉室温封闭2 h。4 ℃下加入一抗GAPDH（1∶1000稀释）、SIRT1（1∶1000稀释）、FoxO3（1∶1000稀释）、SLC7A11（1∶1000稀释）、ACSL4（1∶2000稀释）、FTH1（1∶2000稀释）、P53（1∶5000稀释）、GPX4（1∶1000稀释）孵育过夜，二抗（1∶20 000稀释）室温孵育1.2 h，再次用含吐温-20的Tris缓冲液洗涤三次。滴加ECL显色试剂，化学发光成像系统曝光。ImageJ软件定量分析目标蛋白质和内参GAPDH条带灰度值，以两者比值表示目标蛋白质相对表达水平。

表1 引物序列

Table 1 Sequences of primers

基因名称	正向引物（5′→3′）	反向引物（5′→3′）
β-actin	CCCATCTATGAGGGTTACGC	TTTAATGTCACGCACGATTTC
Sirt1	TGACCTCCTCATTGTTATTGG	ATTATGACATCGCAGTCTCCA
Foxo3	TGTCTATAACTTTGTGCTGCTG	CGGGAGGGCGTACGATT

β-actin：β-肌动蛋白；SIRT1：沉默信息调节因子1；FoxO3：叉头框蛋白质O3.

1.12 统计学方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析，并使用GraphPad Prism 9.5.1软件绘图。符合正态分布的计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组独立样本比较采用*t*检验，两组数据间的相关性使用Pearson相关系数检验，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝豆灵改善模型鼠行为学实验结果

莫里斯水迷宫实验结果显示，与空白对照组比较，模型对照组逃逸时间延长、平台穿越频次减少（均$P<0.01$）。与模型对照组比较，肝豆灵组和白藜芦醇组逃逸时间均缩短，平台穿越频次均增加（均$P<0.01$），肝豆灵组和白藜芦醇组间差异均无统计学意义（均$P>0.05$）；肝豆灵+白藜芦醇组逃逸时间进一步缩短，平台穿越频次进一步增加。与模型对照组比较，EX-527组逃逸时间延长（$P<0.01$）、穿越平台频次减少（$P<0.05$），而肝豆灵+EX-527组与模型对照组间的差异无统计学意义（均$P>0.05$）。见表2。

悬挂实验结果显示，与空白对照组比较，模型对照组抓握评分降低（$P<0.01$）；与模型对照组比较，肝豆灵组和白藜芦醇组抓握评分均增加（均$P<0.05$），肝豆灵组和白藜芦醇组间差异无统计学意义（$P>0.05$）；肝豆灵+白藜芦醇组抓握评分进一步增加。与模型对照组比较，EX-527组抓握评分降低（$P<0.05$），而肝豆灵+EX-527组与模型对照组间的差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表2。

表2 各组行为学实验结果比较

Table 2 Behavioral experiment results in mice

（$\bar{x}\pm s$，n=9）

组　别	逃逸时间（s）	平台穿越频次（次/min）	抓握评分	转向时间（s）	爬杆时间（s）
空白对照组	23.72±2.73**	8.33±1.50**	2.78±0.44**	5.67±1.41**	10.67±1.58**
模型对照组	48.63±4.43	3.56±1.33	1.44±0.53	19.33±4.18	36.44±5.03
肝豆灵组	32.97±4.16**	6.44±1.42**	1.89±0.93*	10.33±2.29**	19.56±3.36**
白藜芦醇组	31.10±4.06**	5.56±0.88*	1.89±0.60*	11.44±2.79**	21.56±3.50**
肝豆灵+白藜芦醇组	26.37±4.32**	7.89±1.17**	2.44±0.73	6.67±1.58$^{**\#}$	14.00±3.24$^{**\#}$
EX-527组	51.38±4.95$^{**\#\#}$	2.56±0.73$^{*\#\#}$	1.00±0.71*	21.00±4.66$^{*\#\#}$	39.22±3.90$^{*\#}$
肝豆灵+EX-527组	46.50±7.91$^{\triangle\triangle}$	3.67±1.22$^{\triangle}$	1.44±0.88	20.33±4.74$^{\triangle}$	35.11±4.73$^{\triangle}$

与模型对照组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与肝豆灵组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与EX-527组比较，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$.

爬杆实验结果显示,与空白对照组比较,模型对照组转向、爬杆时间明显延长(均P<0.01);与模型对照组比较,肝豆灵组和白藜芦醇组转向和爬杆时间均缩短(均P<0.01),肝豆灵组和白藜芦醇组间差异均无统计学意义(均P>0.05);肝豆灵+白藜芦醇组转向和爬杆时间进一步缩短(均P<0.05)。与模型对照组比较,EX-527组转向和爬杆时间延长(均P<0.05),而肝豆灵+EX-527组与模型对照组结果相似(均P>0.05)。见表2。

上述结果表明,肝豆灵能改善模型鼠的空间学习、记忆和共济协调能力,提示模型鼠神经功能得到改善。

2.2 肝豆灵减少模型鼠基底节组织细胞凋亡

空白对照组基底节组织区域内细胞未见明显凋亡细胞(0.03±0.01),模型对照组(0.45±0.07)细胞凋亡相比空白对照组增多(P<0.01)。与模型对照组比较,肝豆灵组(0.23±0.04)和白藜芦醇组(0.24±0.03)细胞凋亡均减少(均P<0.01),肝豆灵组与白藜芦醇组细胞凋亡相当(P>0.05);肝豆灵+白藜芦醇组(0.13±0.01)细胞凋亡进一步减少。EX-527组(0.70±0.06)细胞凋亡较模型对照组增多(P<0.01),而肝豆灵+EX-527组(0.43±0.07)细胞凋亡与模型对照组相近(P>0.05)。见图1。结果提示,肝豆灵可以减轻模型鼠基底节组织细胞凋亡。

2.3 肝豆灵抑制模型鼠基底节组织细胞铁死亡

与空白对照组比较,模型对照组基底节组织中活性氧、丙二醛和亚铁离子水平均升高(均P<0.01);与模型对照组比较,肝豆灵组和白藜芦醇组活性氧、丙二醛和亚铁离子水平均下降(均P<0.05),肝豆灵组与白藜芦醇组结果相近(均P>0.05);肝豆灵+白藜芦醇组活性氧、丙二醛和亚铁离子水平进一步降低(均P<0.01)。活性氧、丙二醛和亚铁离子水平EX-527组较模型对照组升高(均P<0.01),而肝豆灵+EX-527组与模型对照组结果相近(均P>0.05)。见表3。结果提示,肝豆灵可以有效抑制模型鼠基底节组织细胞铁死亡发生。

2.4 肝豆灵调控模型鼠基底节组织铁死亡相关蛋白质的表达

与空白对照组比较,模型对照组基底节组织中SLC7A11、GPX4和FTH1表达均减少,P53和

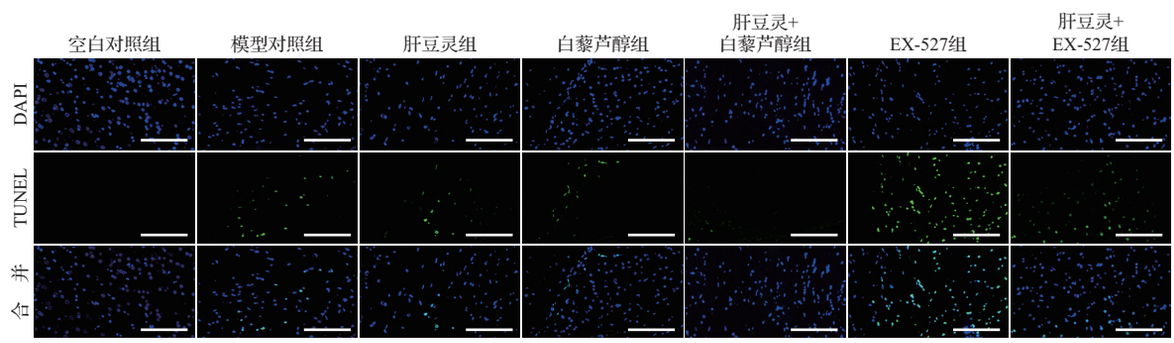
表3 各组基底节组织中活性氧、丙二醛和亚铁离子水平比较

Table 3 Levels of reactive oxygen species, malondiadehyde, and Fe^{2+} in basal ganglia tissues in mice

($\bar{x}\pm s$, n=9)

组 别	活性氧(a.u.)	丙二醛(nmol/mg蛋白)	亚铁离子(μmol/kg湿重)
空白对照组	27 851±891**	0.96±0.27**	128±15**
模型对照组	108 070±967	11.14±0.68	812±41
肝豆灵组	67 654±1253**	4.34±0.22**	543±17**
白藜芦醇组	73 631±1090**	4.63±0.49**	535±21*
肝豆灵+白藜芦醇组	40 769±685$^{**\#\#}$	2.57±0.29$^{**\#\#}$	305±29$^{**\#\#}$
EX-527组	127 815±2902$^{**\#\#}$	16.11±1.10$^{**\#\#}$	962±36$^{**\#\#}$
肝豆灵+EX-527组	87 869±3156$^{\triangle\triangle}$	11.39±0.78	833±18$^{\triangle}$

与模型对照组比较,$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01;与肝豆灵组比较,$^{\#\#}P$<0.01;与EX-527组比较,$^{\triangle}P$<0.05,$^{\triangle\triangle}P$<0.01.



蓝色荧光指示细胞核;绿色荧光指示TUNEL阳性细胞(即凋亡细胞).空白对照组未见明显TUNEL阳性细胞,模型对照组TUNEL阳性细胞数明显增多.与模型对照组比较,肝豆灵组、白藜芦醇组TUNEL阳性细胞数明显减少,肝豆灵+白藜芦醇组阳性细胞数进一步减少;EX-527组TUNEL阳性细胞数明显增多;肝豆灵+EX-527组TUNEL阳性细胞数相近.标尺=50 μm. TUNEL:原位末端转移酶标记;DAPI:4′,6-二脒基-2-苯基吲哚.

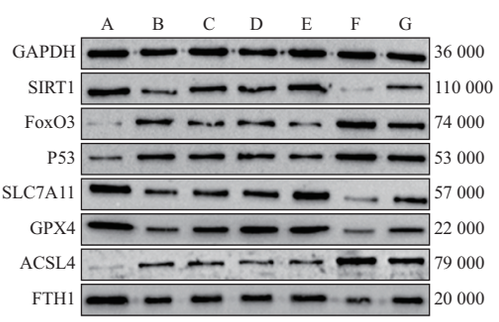
图1 各组基底节组织细胞凋亡情况(TUNEL法)

Figure 1 Apoptosis of basal ganglion cells in mice (TUNEL assay)

ACSL4表达增加（均P<0.05）；与模型对照组比较，肝豆灵组和白藜芦醇组SLC7A11、GPX4和FTH1表达均增加，P53和ACSL4表达均减少（均P<0.01），肝豆灵组与白藜芦醇组结果相似（均P>0.05）；肝豆灵+白藜芦醇组SLC7A11、GPX4和FTH1表达进一步增加（均P<0.01），P53和ACSL4表达进一步减少（均P<0.01）。与模型对照组比较，EX-527组SLC7A11、GPX4和FTH1表达减少，P53和ACSL4表达增加（均P<0.01），而肝豆灵+EX-527组与模型对照组结果相似（均P>0.05）。见图2和表4。结果提示，肝豆灵可以通过调控铁死亡相关蛋白表达抑制铁死亡发生。

2.5 肝豆灵调控模型鼠基底节组织SIRT1/FoxO3信号通路

与空白对照组比较，模型对照组*Sirt1*转录和表达减少（均P<0.01），*Foxo3*转录和表达增加（均P<0.05）；与模型对照组比较，肝豆灵组和白藜芦醇组*Sirt1*转录和表达均增加（均P<0.05），而*Foxo3*转录和表达均减少（均P<0.01），肝豆灵组和白藜芦醇组结果相似（均P>0.05）；肝豆灵+白藜芦醇组进一步激活*Sirt1*转录和表达（P<0.01），并抑制*Foxo3*转录和表达（P<0.01）；EX-527组*Sirt1*转录和表达减少（均P<0.05），*Foxo3*转录和表达增加（均P<0.01），而肝豆灵+EX-527组与模型对照组相似（均P>0.05）。*Sirt1*与*Foxo3*转录水平呈负相关（R=−0.9621，P<0.01）。见图3和表5。结果表明，肝豆灵通过SIRT1/FoxO3信号通路调控铁死亡相关蛋白表达，从而抑制铁死亡的发生。



A：空白对照组；B：模型对照组；C：肝豆灵组；D：白藜芦醇组；E：肝豆灵+白藜芦醇组；F：EX-527组；G：肝豆灵+EX-527组. GAPDH：甘油醛-3-磷酸脱氢酶；SIRT1：沉默信息调节因子1；FoxO3：叉头框蛋白质O3；SLC7A11：溶质载体超家族7成员11；GPX4：谷胱甘肽过氧化物酶4；ACSL4：长链酰基辅酶A合成酶4；FTH1：铁蛋白重链1.

图2 各组基底节组织中铁死亡相关蛋白质电泳图

Figure 2 Electrophoresis diagram of ferroptosis-related proteins in the basal ganglion tissues in mice

表4 各组基底节组织中铁死亡相关蛋白质表达水平比较

Table 4 Levels of ferroptosis-related proteins in the basal ganglion tissues in mice

（$\bar{x}\pm s$，n=9）

组　别	P53	ACSL4	SLC7A11	GPX4	FTH1
空白对照组	0.14±0.03**	0.11±0.01*	0.84±0.09**	0.93±0.06**	0.97±0.02**
模型对照组	0.67±0.03	0.46±0.06	0.35±0.02	0.39±0.04	0.52±0.05
肝豆灵组	0.50±0.03**	0.35±0.03**	0.60±0.04**	0.59±0.02**	0.69±0.10**
白藜芦醇组	0.50±0.02**	0.34±0.03**	0.60±0.01**	0.59±0.03**	0.68±0.06**
肝豆灵+白藜芦醇组	0.35±0.02**	0.21±0.02$^{**\#}$	0.71±0.03**	0.80±0.03$^{**\#}$	0.80±0.10**
EX-527组	0.94±0.03$^{**\#\#}$	0.72±0.04$^{**\#\#}$	0.25±0.03$^{**\#\#}$	0.28±0.04$^{**\#\#}$	0.41±0.03$^{**\#\#}$
肝豆灵+EX-527组	0.76±0.02$^{\triangle\triangle}$	0.55±0.05$^{\triangle}$	0.45±0.04	0.51±0.05$^{\triangle}$	0.60±0.04

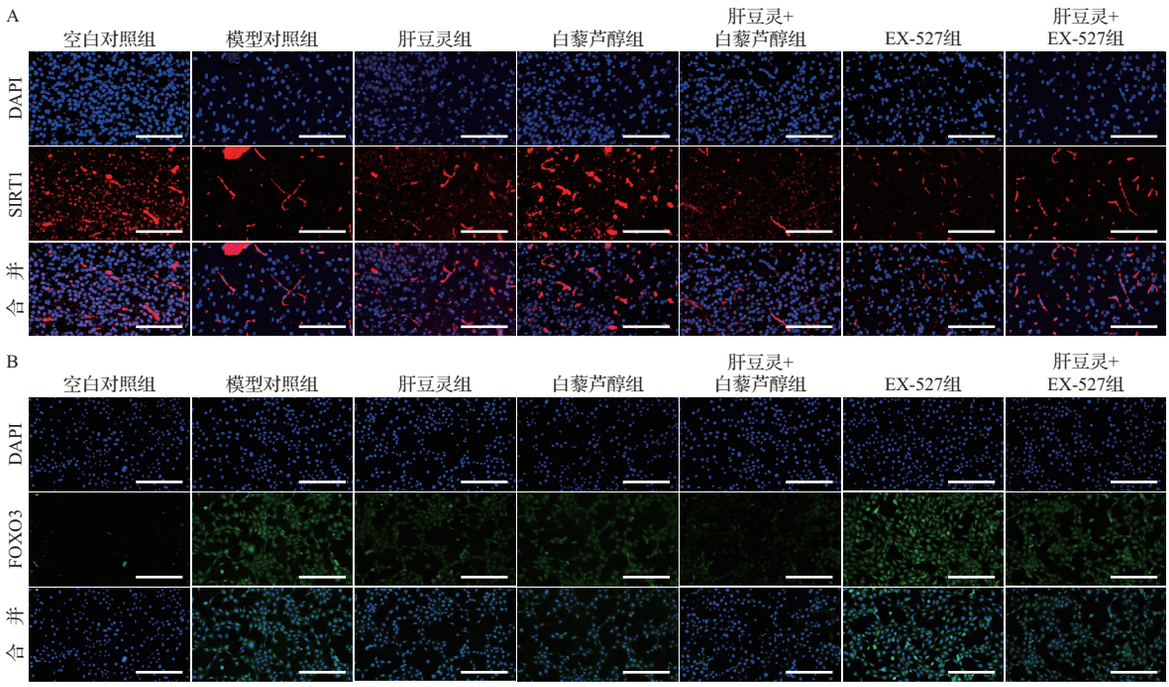
与模型对照组比较，$^{*}P$<0.05，$^{**}P$<0.01；与肝豆灵组比较，$^{\#}P$<0.05，$^{\#\#}P$<0.01；与EX-527组比较，$^{\triangle}P$<0.05，$^{\triangle\triangle}P$<0.01. ACSL4：长链酰基辅酶A合成酶4；SLC7A11：溶质载体超家族7成员11；GPX4：谷胱甘肽过氧化物酶4；FTH1：铁蛋白重链1.

3 讨　论

本文资料显示，SIRT1/FoxO3通路介导的铁死亡与模型鼠的神经损伤关系密切，肝豆灵可通过调节SIRT1/FoxO3信号通路抑制神经细胞活性氧产生，减轻氧化应激反应，阻碍铁死亡发生，从而改善模型鼠的神经功能。

研究选用的TX小鼠为*ATP7B*基因突变小鼠，因其与人有共同的突变位点常被应用于WD的实验研究[23]。运用莫里斯水迷宫、爬杆、抓握实验评估模型鼠神经功能，并应用SIRT1/FoxO3信号通路的激活及抑制来进一步验证SIRT1/FoxO3信号通路对模型鼠的神经功能调控作用。行为学研究发现，激活SIRT1/FoxO3信号通路可明显改善模型鼠的神经功能，而抑制该通路模型鼠神经功能损害进一步加重。肝豆灵能明显改善模型鼠神经功能，联合SIRT1激活剂白藜芦醇可增强疗效，而联合SIRT1抑制剂EX-527则会降低疗效。以上结果表明，肝豆灵改善模型鼠神经功能的机制可能与激活SIRT1/FoxO3信号通路有关。

本文资料显示，肝豆灵可通过抑制铁死亡及其信号转导来抑制基底节组织的神经元损伤。既往研究发现，*ATP7B*基因突变导致铜蓝蛋白合



A:SIRT1蛋白;B:FoxO3蛋白. 蓝色荧光指示细胞核,红色荧光指示SIRT1蛋白,绿色荧光指示FoxO3蛋白. 与空白对照组比较,模型对照组SIRT1荧光强度减弱,FoxO3荧光强度增强;与模型对照组比较,肝豆灵组、白藜芦醇组SIRT1荧光强度均有所增强,FoxO3荧光强度均减弱,两者联用后效果更加明显;相反,加入EX-527后SIRT1荧光强度减弱,FoxO3荧光强度增强;与肝豆灵组比较,肝豆灵+EX-527组SIRT1荧光强度降低,FoxO3荧光强度增强. 标尺=50 μm. SIRT1:沉默信息调节因子1;FoxO3:叉头框蛋白质O3;DAPI:4′,6-二脒基-2-苯基吲哚.

图3 各组基底节组织中SIRT1和FoxO3蛋白表达情况(免疫荧光法)

Figure 3 Expression of SIRT1 and FoxO3 in the basal ganglion tissues in mice (immunofluorescence method)

表5 各组基底节组织中SIRT1和FoxO3蛋白和mRNA表达水平比较

Table 5 Levels of SIRT1 and FoxO3 protein and mRNA in the basal ganglion tissues in mice

($\bar{x}\pm s$, n=9)

组 别	蛋白质(免疫荧光法)		蛋白质(蛋白质印迹法)		mRNA(qRT-PCR)	
	SIRT1	FoxO3	SIRT1	FoxO3	*Sirt1*	*Foxo3*
空白对照组	106.74±14.10**	12.23±2.30**	0.82±0.05**	0.10±0.01**	1.00±0.05**	1.01±0.18*
模型对照组	20.71±2.83	68.78±13.38	0.24±0.03	0.60±0.02	0.60±0.05	2.74±0.15
肝豆灵组	47.88±6.53**	31.85±6.27**	0.53±0.08**	0.47±0.04**	0.79±0.05*	1.93±0.12**
白藜芦醇组	48.46±4.59**	32.82±6.50**	0.55±0.05**	0.44±0.02**	0.77±0.02**	1.92±0.13**
肝豆灵+白藜芦醇组	72.83±6.59$^{**\#\#}$	12.79±3.02$^{**\#}$	0.65±0.06$^{**\#\#}$	0.32±0.02$^{**\#\#}$	0.91±0.02$^{**\#\#}$	1.58±0.16$^{*\#}$
EX-527组	8.55±2.06$^{**\#\#}$	82.31±8.30$^{**\#\#}$	0.14±0.02$^{**\#\#}$	0.72±0.02$^{*\#\#}$	0.46±0.04$^{*\#}$	3.41±0.04$^{**\#\#}$
肝豆灵+EX-527组	17.04±3.88$^{\triangle\triangle}$	63.61±14.61$^{\triangle}$	0.40±0.03	0.89±0.02	0.59±0.04	2.69±0.11

与模型对照组比较,$^{*}P$<0.05,$^{**}P$<0.01;与肝豆灵组比较,$^{\#}P$<0.05,$^{\#\#}P$<0.01;与EX-527组比较,$^{\triangle}P$<0.05,$^{\triangle\triangle}P$<0.01. SIRT1:沉默信息调节因子1;FoxO3:叉头框蛋白质O3;mRNA:信使RNA;qRT-PCR:定量逆转录聚合酶链反应.

成受阻,引发次级铁超载[24],同时活性氧是铁死亡的核心驱动因素,铜离子可以通过芬顿反应催化羟基自由基生成,抑制GPX4活性,加剧细胞膜多不饱和脂肪酸过氧化[25-26]。这种氧化应激和铁代谢紊乱的恶性循环最终诱发神经元铁死亡,微观表现为线粒体结构受损、膜密度增加及脂质过氧化产物丙二醛水平明显上升[27],最终导致WD机体运动协调障碍和认知功能下降。此外,铜蓄积可通过抑制铁调素表达上调转铁蛋白受体1,从而导致细胞内游离铁池扩大[28]。在这种铁代谢紊乱与铜诱导的线粒体功能障碍共同作用下,ACSL4表达上调,催化多不饱和脂肪酸生成磷脂酰乙醇胺–花生四烯酸,并提高细胞膜对脂质过氧化的敏感性,进而导致铁死亡发

生[29-30]。本文资料显示，应用肝豆灵后模型鼠基底节组织细胞凋亡改善明显，其作用效果与白藜芦醇相当，且联合白藜芦醇可进一步抑制细胞凋亡，而联合EX-527时两者作用相互拮抗。表明肝豆灵可通过调控SIRT1/FoxO3信号通路抑制模型鼠基底节组织细胞凋亡水平。本文资料还显示，模型鼠基底节组织中亚铁离子、丙二醛及活性氧水平升高，GPX4、SLC7A11和FTH1表达下调，而ACSL4和P53表达上调，考虑铁死亡是参与WD神经损伤的重要作用机制，肝豆灵可逆转上述现象，进一步证实了肝豆灵对WD基底节组织细胞铁死亡的调控。

SIRT1/FoxO3信号通路在铁死亡的调控中具有重要作用。SIRT1作为一种高度保守的NAD^+依赖性脱乙酰酶，在细胞代谢、衰老、凋亡、炎症反应和氧化应激等过程中起着关键的调节作用，激活SIRT1可以导致FoxO3转录因子去乙酰化修饰，促进FoxO3与超氧化物歧化酶2抗氧化基因启动子区域结合[22,31]。FoxO3是叉头框蛋白质转录因子家族的重要成员，广泛参与调节细胞增殖、分化和代谢等过程[32]，并且对细胞的稳态调节具有关键作用。在急性脑损伤中，FoxO3表达影响了SLC7A11启动子的转录水平，促进了细胞氧化应激反应及铁死亡发生[20,33]，并且其还受SIRT1去乙酰化调节，亦与PI3K-Akt等多条信号转导通路存在相互作用关系[34-35]。SIRT1通过去乙酰化修饰增强FoxO3的DNA结合能力，能促进其靶基因锰超氧化物歧化酶和过氧化还原蛋白3转录，从而增强线粒体的抗氧化防御能力[36]。本文资料显示，肝豆灵可升高模型鼠基底节组织中*Sirt1*转录和表达，抑制*Foxo3*转录和表达，与SIRT1激活剂白藜芦效果相当，而与SIRT1抑制剂EX-527作用相反；且肝豆灵联合白藜芦醇可进一步激活SIRT1/FoxO3信号通路；而联合EX-527时，肝豆灵的通路激活作用受到了阻碍。以上结果证实，肝豆灵可通过激活SIRT1/FoxO3信号通路抑制基底节组织细胞铁死亡，从而改善模型鼠的神经功能。

本文资料中肝豆灵的效果是否存在剂量依赖性仍需进一步研究；SIRT1/FoxO3信号通路可能与P53、NF-κB、mTOR等其他诸多与细胞死亡和应激反应密切相关的信号网络存在交叉对话，肝豆灵是否通过同时调节多个并行通路来协同抑制铁死亡有待探索。尽管如此，肝豆灵具有激活SIRT1/FoxO3信号通路、抑制铁死亡信号转导进而改善WD神经功能损伤功能，这为其改善WD患者神经功能提供了科学证据。

本文附加文件见电子版。

志谢 本研究得到安徽省自然科学基金（2508085MH224）、国家自然科学基金（82574976）、安徽省江淮名医培养工程（ahsjhmypygc20230076）、安徽省卫生健康科研项目（AHWJ2024Aa10102）和山东省中医药科技项目（M-2022083）支持

Acknowledgements This study was supported by Anhui Provincial Natural Science Foundation of China (2508085MH224), National Natural Science Foundation of China (82574976), Anhui Provincial Jianghuai Famous Doctors Training Project (ahsjhmypygc20230076), Anhui Provincial Health Research Project (AHWJ2024Aa10102), and Traditional Chinese Medicine Science and Technology Project of Shandong Province (M-2022083)

作者贡献 武凯健、王妮、赵大鹏、魏汪云、张婉青和张静参与论文选题和设计或参与资料获取、分析或解释，起草研究论文或修改重要智力性内容，所有作者均已阅读并认可最终稿件，并对数据的完整性和安全性负责，具体见电子版

Author Contributions WU Kaijian, WANG Ni, ZHAO Dapeng, WEI Wangyun, ZHANG Wanqing and ZHANG Jing participated in brewing and designing experiments, or acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; drafting the work, or revising it critically for important intellectual content. All authors have read and approved the final manuscript, and take responsibility for the integrity and security of the data. See the electronic version for details

数据可用性 本研究的相关数据可根据合理请求从通信作者（E-mail：zj5125115@163.com）处获得

Data Availability All relevant data supporting the findings of this study can be accessed upon reasonable request from the corresponding author at zj5125115@163.com

医学伦理 本研究遵循国家和合肥综合性国家科学中心大健康研究院有关实验动物管理和使用的规定，通过合肥综合性国家科学中心大健康研究院实验动物福利与伦理委员会审查（IHM-AP-2024-051）

Ethical Approval All applicable national guidelines and

Institute of Health and Medicine of Hefei Comprehensive National Science Center regulations for the care and use of animals were followed, and the research protocol of animal experiments was approved by the Ethics Committee of Institute of Health and Medicine of Hefei Comprehensive National Science Center (IHM-AP-2024-051)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

Conflict of Interests The authors declare that there is no conflict of interests

©The author(s) 2026. This is an open access article under the CC BY-NC-ND 4.0 license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

参考文献(References)

[1] SANDAHL T D, LAURSEN T L, MUNK D E, et al. The prevalence of Wilson's disease: an update[J]. **Hepatology**, 2020, 71(2): 722-732.

[2] CZŁONKOWSKA A, LITWIN T, DUSEK P, et al. Wilson disease[J]. **Nat Rev Dis Primers**, 2018, 4(1): 21.

[3] European Association for the Study of the Liver. EASL clinical practice guidelines: Wilson's disease[J]. **J Hepatol**, 2012, 56(3): 671-685.

[4] PULAI S, BISWAS A, ROY A, et al. Clinical features, MRI brain, and MRS abnormalities of drug-naïve neurologic Wilson's disease[J]. **Neurol India**, 2014, 62(2): 153-158.

[5] POUJOIS A, MIKOL J, WOIMANT F. Wilson disease: brain pathology[M]//**Handbook of Clinical Neurology**. Amsterdam: Elsevier, 2017: 77-89.

[6] SOCHA P, CZLONKOWSKA A, JANCZYK W, et al. Wilson's disease-management and long term outcomes [J]. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, 2022, 56-57: 101768.

[7] TANG S, BAI L, HOU W, et al. Comparison of the effectiveness and safety of d-penicillamine and zinc salt treatment for symptomatic Wilson disease: a systematic review and meta-analysis[J]. **Front Pharmacol**, 2022, 13: 847436.

[8] ZHANG J, XIAO L, YANG W. Combined sodium Dimercaptopropanesulfonate and zinc versus D-penicillamine as first-line therapy for neurological Wilson's disease [J]. **BMC Neurol**, 2020, 20(1): 255.

[9] ZHANG J, LI L, CHEN H, et al. Clinical efficacy and safety of Gandouling plus low-dose D-penicillamine for treatment of Wilson's disease with neurological symptoms [J]. **J Tradit Chin Med**, 2018, 38(1): 89-94.

[10] 徐 磊, 张恩召, 王 慧, 等. 肝豆灵汤联合认知行为疗法治疗痰瘀互结型Wilson病冲动控制障碍的疗效[J]. **中国实验方剂学杂志**, 2023, 29(21): 147-154.
XU Lei, ZHANG Enzhao, WANG Hui, et al. Effect of gandouling decoction combined with cognitive behavioral therapy on impulse control disorders in Wilson's disease with syndrome of combined phlegm and stasis[J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2023, 29(21): 147-154. (in Chinese)

[11] ZHANG J, TANG L L, LI L Y, et al. Gandouling tablets inhibit excessive mitophagy in toxic milk (TX) model mouse of Wilson disease via Pink1/parkin pathway[J]. **Evid Based Complement Altern Med**, 2020, 2020: 3183714.

[12] WANG X, SHAO N, ZHANG X, et al. Ferulic acid activates SIRT1-mediated ferroptosis signaling pathway to improve cognition dysfunction in Wilson's disease[J]. **Neuropsychiatr Dis Treat**, 2023, 19: 2681-2696.

[13] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. **Cell**, 2022, 185(14): 2401-2421.

[14] 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.

[15] DUSEK P, LESCINSKIJ A, RUZICKA F, et al. Associations of brain atrophy and cerebral iron accumulation at MRI with clinical severity in Wilson disease[J]. **Radiology**, 2021, 299(3): 662-672.

[16] SHRIBMAN S, BOCCHETTA M, SUDRE C H, et al. Neuroimaging correlates of brain injury in Wilson's disease: a multimodal, whole-brain MRI study[J]. **Brain**, 2022, 145(1): 263-275.

[17] XUE Q, YAN D, CHEN X, et al. Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis[J]. **Autophagy**, 2023, 19(7): 1982-1996.

[18] ZHANG F, WANG S, GAN L, et al. Protective effects and mechanisms of sirtuins in the nervous system[J]. **Prog Neurobiol**, 2011, 95(3): 373-395.

[19] BRUNET A, SWEENEY L B, STURGILL J F, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase[J]. **Science**, 2004, 303(5666): 2011-2015.

[20] VAN HAU T, RUANKHAM W, SUWANJANG W, et al. Repurposing of nitroxoline drug for the prevention of neurodegeneration[J]. **Chem Res Toxicol**, 2019, 32 (11): 2182-2191.

[21] ZHONG S, CHEN W, WANG B, et al. Energy stress modulation of AMPK/FoxO3 signaling inhibits mitochondria-associated ferroptosis[J]. **Redox Biol**, 2023, 63: 102760.

[22] LIU C, TIAN Q, LI Z, et al. FOXO3a-BAP1 axis regulates neuronal ferroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage[J]. **Redox Biol**, 2025, 82: 103550.

[23] JOŃCZY A, LIPIŃSKI P, OGÓREK M, et al. Functional iron deficiency in toxic milk mutant mice (tx-J) despite high hepatic ferroportin: a critical role of decreased GPI-ceruloplasmin expression in liver macrophages[J]. **Metallomics**, 2019, 11(6): 1079-1092.

[24] PANTOPOULOS K. Inherited disorders of iron overload

[J]. **Front Nutr**, 2018, 5: 103.
[25] AUST S D, MOREHOUSE L A, THOMAS C E. Role of metals in oxygen radical reactions[J]. **J Free Radic Biol Med**, 1985, 1(1): 3-25.
[26] FU L H, WAN Y, QI C, et al. Nanocatalytic theranostics with glutathione depletion and enhanced reactive oxygen species generation for efficient cancer therapy[J/OL]. **Adv Mater**, 2021, 33(7): e2006892.
[27] ZHONG P, LI L, FENG X, et al. Neuronal ferroptosis and ferroptosis-mediated endoplasmic reticulum stress: implications in cognitive dysfunction induced by chronic intermittent hypoxia in mice[J]. **Int Immunopharmacol**, 2024, 138: 112579.
[28] MERLE U, TUMA S, HERRMANN T, et al. Evidence for a critical role of ceruloplasmin oxidase activity in iron metabolism of Wilson disease gene knockout mice [J]. **J Gastroenterol Hepatol**, 2010, 25(6): 1144-1150.
[29] LUO J, LI Y, LI Y, et al. Reversing ferroptosis resistance in breast cancer *via* tailored lipid and iron presentation[J]. **ACS Nano**, 2023, 17(24): 25257-25268.
[30] WANG R, LV Y, NI Z, et al. Intermittent hypoxia exacerbates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease by aggravating hepatic copper deficiency-induced ferroptosis[J/OL]. **FASEB J**, 2024, 38(13): e23788.
[31] SMITH J S, BRACHMANN C B, CELIC I, et al. A phylogenetically conserved NAD^+-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family[J]. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000, 97(12): 6658-6663.
[32] CALNAN D R, BRUNET A. The FoxO code[J]. **Oncogene**, 2008, 27(16): 2276-2288.
[33] NHO R S. FoxO3a and disease progression[J]. **World J Biol Chem**, 2014, 5(3): 346-354.
[34] TENBAUM S P, ORDÓÑEZ-MORÁN P, PUIG I, et al. β-catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer[J]. **Nat Med**, 2012, 18(6): 892-901.
[35] GELLHAUS B, BÖKER K O, SCHILLING A F, et al. Therapeutic consequences of targeting the IGF-1/PI3K/AKT/FOXO3 axis in sarcopenia: a narrative review[J]. **Cells**, 2023, 12(24): 2787.
[36] BOŠKOVIĆ M, ŽIVKOVIĆ M, KORIĆANAC G, et al. Walnut supplementation restores the SIRT1-FoxO3a-MnSOD/catalase axis in the heart, promotes an anti-inflammatory fatty acid profile in plasma, and lowers blood pressure on fructose-rich diet[J]. **Oxid Med Cell Longev**, 2021, 2021: 5543025.

［本文编辑　余　方　刘丽娜］

· 学术动态 ·

张丹教授、王睿研究员、李蓉教授领衔多中心研究结果为补充维生素D能否改善多囊卵巢综合征患者体外受精结局提供循证医学证据

2026年2月17日，浙江大学张丹教授与澳大利亚悉尼大学王睿研究员、北京大学李蓉教授合作在《英国医学杂志》（*The British Medical Journal*）发表了题为“Vitamin D supplementation before *in vitro* fertilisation in women with polycystic ovary syndrome: multicentre, double blind, placebo controlled, randomised clinical trial”的中国多中心随机对照试验论文（DOI：10.1136/bmj-2025-087438），为补充维生素D能否改善多囊卵巢综合征（PCOS）女性的体外受精结局这一问题提供了循证依据。

研究纳入2020年10月至2022年2月中国24家生殖医学中心计划接受体外受精胚胎移植术治疗的876例PCOS女性受试者。受试者按1∶1比例随机分配至干预组（口服维生素D，4000 IU/d）或安慰剂组，干预持续至扳机日，最长不超过90 d。研究主要结局指标为首次胚胎移植后的活产率。在改良意向性分析人群中（干预组435例，安慰剂组430例），两组活产率分别为52.0%（226/435）和50.2%（216/430），经中心校正后风险比（aRR）为1.03（95%CI：0.91~1.18），组间差异无统计学意义。干预组血清维生素D从基线平均16.5 ng/mL升高至扳机日32.3 ng/mL，高于安慰剂组同期水平（18.2 ng/mL），校正后平均差值为13.6 ng/mL（95%CI：10.9~16.3）。在严格遵循研究方案的受试者中（干预组327例，安慰剂组319例），两组活产率分别为56.9%和51.1%（aRR=1.11，95% CI：0.97~1.28），数值差异比意向性分析有所扩大，具有不可忽视的临床意义。安全性结局结果显示，两组严重卵巢过度刺激综合征及其他严重不良事件发生率均较低，组间比较无显著差异，表明每日补充4000 IU维生素D在此人群中的安全性良好。

浙江大学医学院附属妇产科医院/北京大学第三医院胡凯伦博士、浙江大学医学院附属妇产科医院廖婷婷博士、江西省妇幼保健院伍琼芳教授、南京医科大学附属第一医院马翔教授为论文第一作者。研究得到国家自然科学基金等资助。