

本文引用: 薛小嫣, 黎鹏程, 尹抗抗. 降脂理肝汤抑制铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病小鼠的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(3): 432-437.

降脂理肝汤抑制铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病小鼠的研究

薛小嫣¹, 黎鹏程^{1*}, 尹抗抗^{2*}

1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学资产与实验室管理处, 湖南 长沙 410006

[摘要] **目的** 研究降脂理肝汤对非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)小鼠的影响,并探究其中的作用机制。**方法** 将60只SPF级C57BL/6小鼠随机分成空白组、模型组、铁死亡抑制剂组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)和降脂理肝汤高、中、低剂量组($13.30, 6.60, 3.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。通过喂养12周高脂饲料(HFD)建立NAFLD模型。造模成功后,每组每天分别给对应的药物,连续6周。本实验检测小鼠血清中游离脂肪酸(FFA)、甘油三酯(TG)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)以及丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)的含量;采用油红O染色法和HE染色法检测肝脏脂质沉积和病理损伤情况;通过RT-qPCR检测肝组织中核因子E2相关因子2(Nrf2)、胱氨酸谷氨酸转运蛋白(SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的mRNA表达情况;通过Western blot检测肝组织中Nrf2、SLC7A11以及GPX4的蛋白表达情况。**结果** 与空白组相比,模型组小鼠肝脏重量和肝脏指数上升($P<0.05$),肝功能ALT、AST指标上升($P<0.01, P<0.05$),肝脏有明显的脂肪变性,肝小叶结构紊乱,Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白及mRNA表达显著下降($P<0.01$)。与模型组相比,铁死亡抑制剂组小鼠肝脏重量和肝脏指数下降($P<0.05, P<0.01$),肝小叶结构清晰,血清中ALT、AST和TG含量下降($P<0.01, P<0.05$),Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白及mRNA表达上升($P<0.01$)。高剂量降脂理肝汤组小鼠肝脏重量和肝脏指数下降($P<0.05$),肝功能显著改善,血脂FFA、TG下降($P<0.05, P<0.01$),Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白及mRNA的表达水平上调($P<0.05$)。降脂理肝汤中、低剂量组小鼠肝脏指数下降($P<0.05, P<0.01$),肝功能改善,血清中FFA、TG含量降低($P<0.05, P<0.01$)。**结论** 降脂理肝汤可降低血脂,改善肝功能,减轻NAFLD,这可能与抑制铁死亡相关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病;铁死亡;降脂理肝汤;Nrf2;SLC7A11;GPX4

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.03.006

Study on Jiangzhi Ligan Decoction inhibiting ferroptosis and alleviating non-alcoholic fatty liver disease in mice

XUE Xiaoyan¹, LI Pengcheng^{1*}, YIN Kangkang^{2*}

1. School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 2. Office of Asset & Laboratory Management, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Jiangzhi Ligan Decoction (JZLGD) on non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) mice and explore its mechanism of action. **Methods** Sixty SPF-grade C57BL/6 mice were randomly divided into blank group, model group, ferroptosis inhibitor group ($1\text{ mg}/\text{kg}$), and high-, medium-, and low-dose JZLGD groups ($13.30, 6.60, \text{ and } 3.30\text{ g}/\text{kg}$). The NAFLD model was established by feeding the mice high fat diet (HFD) for 12 weeks. After successful modelling, each group was given the corresponding medication daily for six consecutive weeks. In this experiment, the serum levels of free fatty acids (FFA), triglyceride (TG), aspartate aminotransferase (AST), and alanine aminotransferase (ALT) were determined in mice, the hepatic

[收稿日期]2024-12-27

[基金项目]湖南省自然科学基金面上项目(2022JJ30446);湖南省教育厅优秀青年基金项目(21B0393)。

[通信作者]* 黎鹏程,男,博士,教授,硕士研究生导师,E-mail:1356690565@qq.com;尹抗抗,男,硕士,实验师,E-mail:120494339@qq.com。

lipid deposition and pathological damage in liver tissue were examined by Oil Red O staining and HE staining, the mRNA expressions of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in liver tissue were checked by RT-qPCR, and the protein expressions of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in liver tissue were determined by Western blot. **Results** Compared with mice in the blank group, the mice in the model group exhibited increased liver weight and liver index ($P<0.05$), elevated liver function indicators ALT and AST ($P<0.01$, $P<0.05$), obvious steatosis in the liver, disordered hepatic lobule structure, and significantly reduced protein and mRNA expressions of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 ($P<0.01$). Compared with the model group, mice in the ferroptosis inhibitor group showed decreased liver weight and liver index ($P<0.05$, $P<0.01$), clear liver lobule structure, reduced serum levels of ALT, AST, and TG ($P<0.01$, $P<0.05$), and increased protein and mRNA expressions of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 ($P<0.01$). Mice in the high-dose JZLGD group showed decreased liver weight and liver index ($P<0.05$), significantly improved liver function, reduced blood lipids (TG and FFA) ($P<0.05$, $P<0.01$), and upregulated protein and mRNA expressions of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 ($P<0.05$). Mice in the medium- and low-dose JZLGD groups also showed decreased liver index ($P<0.05$, $P<0.01$), improved liver function, and reduced serum levels of FFA and TG ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** JZLGD can reduce blood lipids, improve liver function, and alleviate NAFLD, potentially through inhibiting ferroptosis.

[**Keywords**] non-alcoholic fatty liver disease; ferroptosis; Jiangzhi Ligan Decoction; Nrf2; SLC7A11; GPX4

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)指以肝细胞内脂肪过度堆积为特点的普遍的慢性肝病,与肥胖、胰岛素抵抗和糖尿病等多种代谢综合征密切相关^[1]。据WHO统计,NAFLD成年人患病率占全球人口的25.2%,且患病率呈现增加趋势^[2]。NAFLD增加了2型糖尿病、心血管疾病及慢性肾脏疾病的风险^[3]。随着疾病的发展,NAFLD还会发展为非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH),严重时甚至会发展为肝硬化和肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)^[4]。

铁死亡是新发现的一种不同于细胞凋亡、坏死和自噬的细胞死亡方式,其特征是铁依赖性的脂质过氧化物的累积,以及起着脂质过氧化物清除作用的还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)系统的破坏^[5]。YANG等^[6]研究显示,与正常饮食的小鼠相比,在代谢相关脂肪性肝病(metabolic associated fatty liver disease, MAFLD)模型中参与抑制铁死亡的关键蛋白谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)、胱氨酸/谷氨酸转运蛋白(solute carrier family 7, membrane 11, SLC7A11)和核因子E2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, Nrf2)的蛋白水平均有明显的降低。肝细胞在维持肝铁稳态中起着重要的作用。有研究表明,在大部分的NAFLD患者中存在着血清铁蛋白水平升高的情况^[7]。铁过载及脂质过氧化在铁死亡的发展中起着重要作用^[8]。这说明铁死亡与NAFLD发展的机制相关。

降脂理肝汤是临床常用经验方,具有良好的疗效,能够减轻NAFLD^[9-10]。韩静等^[11]研究表明,降脂理肝汤能够减轻NAFLD大鼠的炎症反应和氧化应激,改善NAFLD。本研究通过给小鼠喂食高脂饲料(high fat diet, HFD)构建NAFLD模型,并使用降脂

理肝汤或铁死亡抑制剂(ferrostatin-1)干预NAFLD小鼠,从铁死亡层面探讨降脂理肝汤对NAFLD小鼠的影响,为药物的使用提供可靠的实验数据。

1 材料

1.1 动物

60只SPF级C57BL/6小鼠,体质量18~22g,6~7周龄,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物许可证号:SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于湖南中医药大学实验动物中心,温度(22±2)℃,湿度50%~70%,12h/12h光暗交替循环周期。本研究符合湖南中医药大学动物实验管理与福利伦理委员会要求,审查批准编号:LL2022122601。

1.2 药物与试剂

降脂理肝汤由泽泻10g、荷叶10g、丹参10g、郁金10g、决明子30g、海藻30g(批号:QW23032203、2022051302、HH23032102、HH23031305、2022101201、220901)组成,中药饮片均购买于湖南中医药大学第一附属医院门诊药房。降脂理肝汤用常规方式煎煮,减压浓缩成1g·mL⁻¹浓缩液,于4℃冰箱中保存备用。

Ferrostatin-1(批号:HY-100579)购自美国Med-ChemExpress 生物科技公司;生理盐水溶液(批号:C21061604)购自江西科伦药业有限公司;GPX4(货号:DF6701)、Nrf2(货号:AF0639)、SLC7A11(货号:DF12509)抗体均购于美国Affinity公司; β -肌动蛋白(β -actin,货号:66009-1-Ig)购自美国proteintech公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号:AWB0104)购自中国Abiowell公司;mRNA逆转录试剂盒(货号:CW2569)购自中国北京康为世纪公司。

1.3 仪器

Modular DPP 型全自动生化仪(瑞士罗氏公司); ChemiScope6100 型化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转膜仪(北京六一生物科技有限公司);PIKORE AL96 型荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司); H1650R 型台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);02387 型石蜡切片机(德国徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组

60 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠随机分成空白组、模型组、铁死亡抑制剂组($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)和降脂理肝汤高、中、低剂量组($13.30, 6.60, 3.30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 10 只。降脂理肝汤高、中、低剂量组给药剂量参照前期研究,按照动物给药剂量换算公式得出^[12-13]。

2.2 造模及给药

小鼠经过适应性喂养 1 周后,喂食 12 周高脂饲料造模^[14]。随机抽取 2 只小鼠肝脏进行 HE 染色,观察小鼠肝脏呈现不同程度的脂肪变性和气球样变,表示造模成功。将小鼠分成空白组,模型组,降脂理肝汤高、中、低剂量组,铁死亡抑制剂组。空白组小鼠在造模过程中喂食正常饲料。在造模结束后,对降脂理肝汤高、中、低剂量组小鼠分别灌胃生药 $13.30, 6.60, 3.30 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 对铁死亡抑制剂组的小鼠腹腔注射 $1 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 的 ferrostatin-1, 空白组和模型组每天灌胃等量生理盐水。连续 6 周。

2.3 血脂、肝功能检测

给药结束后,对小鼠进行摘眼球取血并存放于冻存管中,静置 2 h 后对称摆放入离心机中以 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速离心 15 min。离心结束后,取上层血清冷藏。采用全自动生化仪检测血清中游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)、甘油三酯(triglyceride, TG)和肝功能指标天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)的含量。

2.4 油红 O 染色

取新鲜小鼠肝组织置于固定液中放置在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定 24 h,取出固定好的肝组织放入 10%蔗糖溶液中脱水沉底,接着重复这个步骤将肝组织放在 20%, 30%蔗糖溶液中继续脱水沉底。然后进行 OTC 包埋,

冰冻切片。冰冻切片放入 60%异丙醇中浸洗 2 min,油红 O 染色液染色 10 min,将切片放入 60%异丙醇中调色,苏木素复染 1 min,1%盐酸乙醇中分化 3 s,流水返蓝后使用甘蓝明胶封片。最后将切片放入扫描机下拍照保存。

2.5 HE 染色

将小鼠肝组织放在 4%的多聚甲醛溶液中固定。石蜡包埋。肝组织石蜡样本切片,厚度约 $4 \text{ }\mu\text{m}$,进行 HE 染色。将脱蜡后的切片 2 次放置于二甲苯溶液中。然后依次使用梯度乙醇(70%、80%、95%)进行脱水,脱水后进行苏木素染色,接着 1%盐酸乙醇分化,流水冲洗返蓝后进行伊红染色,最后进行梯度乙醇脱水。将切片 2 次放置于二甲苯溶液中透明。最后使用中性树脂密封切片,显微镜下观察。

2.6 RT-qPCR

在小鼠肝组织中加入法 Trizol 裂解液提取肝组织总 RNA。肝组织 RNA 为模板逆转录 cRNA。将逆转录产物进行定量 RT-PCR 分析。RT-qPCR 扩增条件: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min 预变性; 40 个 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 s 变性和 $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、30 s 退火循环。引物序列见表 1,以 β -actin 为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 计算目的基因的相对表达量。

表 1 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of genes

基因	引物	长度/bp
β -actin	正向 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	反向 TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	
Nrf2	正向 GCTCCTATGCGTGAATCCCAA	143
	反向 TTTGCCCTAAGCTCATCTCGT	
SLC7A11	正向 CATACTCCAGAACACGGGCAG	172
	反向 AACAAAAGCCAGCAAAGGACCA	
GPX4	正向 CATCGACGGGCACATGGTCT	138
	反向 PCCACACTCAGCATATCGGGCAT	

2.7 Western blot

在小鼠肝组织中加入 RIPA 裂解液提取肝组织总蛋白。使用 BCA 定量法测量蛋白浓度。在蛋白中加入上样缓冲液,金属浴变性。配制 10%分离胶和 4.8%浓缩胶。以 75 V 恒定电压电泳 130 min,待溴酚蓝跑至胶底部时停止电泳。以 300 mA 恒定电流转膜。脱脂奶粉封闭。一抗 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天 PBST 洗膜 3 次后使用二抗常温孵育 1 h,随后 PBST 洗膜 3 次。加入 ECL 化学发光液,凝胶成像系统显影,分析条带灰度值。

2.8 统计学分析

使用 SPSS 27.0 软件进行数据分析,所有数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。当数据符合正态性和方差齐性时,多组间的数据两两比较,使用 *One-way ANOVA* 分析,不符合正态性或方差齐性时,采用 *Kruskal-Wallis H* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠肝脏质量、肝脏指数和体质量的变化

与空白组小鼠相比,模型组小鼠的肝脏质量和肝脏指数增加($P<0.05$)。与模型组小鼠相比,铁死亡抑制剂组和降脂理肝汤高、中、低剂量组 NAFLD 小鼠的肝脏指数降低($P<0.05, P<0.01$),降脂理肝汤高剂量组和铁死亡抑制剂组 NAFLD 小鼠肝脏质量下降($P<0.05$)。体质量在各组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 2。

表 2 小鼠体质量、肝脏质量和肝脏指数($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 2 Body weight, liver weight, and liver index in mice ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	体质量/g	肝脏质量/g	肝脏指数/%
空白组	28.36±3.44	1.09±0.12	3.83±0.15
模型组	31.04±4.69	1.31±0.18 [#]	4.23±0.26 [#]
铁死亡抑制剂组	26.50±4.34	1.00±0.17 ^Δ	3.77±0.17 ^{ΔΔ}
降脂理肝汤高剂量组	28.56±5.60	1.10±0.16 ^Δ	3.87±0.26 ^Δ
降脂理肝汤中剂量组	30.21±5.42	1.19±0.20	3.96±0.18 ^Δ
降脂理肝汤低剂量组	30.26±4.79	1.15±0.19	3.79±0.25 ^{ΔΔ}

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

3.2 小鼠肝功能 ALT、AST 和血脂 TG、FFA 的变化

与空白组相比,模型组小鼠肝功能指标 ALT、AST 含量明显升高($P<0.01, P<0.05$)。与模型组相比,各给药组的 ALT 含量均显著降低($P<0.01$),降脂理

肝汤高、低剂量组和铁死亡抑制剂组小鼠的 AST 含量明显降低($P<0.01, P<0.05$),降脂理肝汤高、中、低剂量组小鼠血清中 FFA、TG 的水平降低($P<0.01, P<0.05$),铁死亡抑制剂组小鼠血清中 TG 的水平降低($P<0.05$)。详见表 3。

3.3 小鼠肝组织病理变化

油红 O 染色结果显示,模型组小鼠肝组织内脂肪变性程度加重,可见着大量脂滴空泡。与模型组相比,降脂理肝汤高、中、低剂量组和铁死亡抑制剂组小鼠肝细胞脂肪变性程度减轻,脂滴空泡减少。详见图 1。

HE 染色结果显示,空白组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞大小均匀,肝索排列整齐。与空白组相比,模型组小鼠肝索结构紊乱,肝细胞呈气球样变,炎细胞浸润伴小灶坏死。经各组药物干预后,小鼠肝小叶结构改善,间质有少量的炎性细胞浸润。详见图 2。

3.4 小鼠肝组织 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白及 mRNA 的表达

与空白组相比,模型组小鼠 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白的表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,铁死亡抑制剂组小鼠 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白的表达水平显著上调($P<0.01$),降脂理肝汤高剂量组小鼠 Nrf2、SLC7A11、GPX4 的蛋白表达水平提高($P<0.05$),降脂理肝汤中剂量组小鼠的 SLC7A11 蛋白表达水平上升($P<0.05$)。详见图 3、表 4。

RT-qPCR 结果表明,与空白组相比,模型组小鼠 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 的表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组相比,铁死亡抑制剂组小鼠的 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 的表达水平显著升高($P<0.01$),降脂理肝汤高剂量组小鼠 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 的表达提高($P<0.05$),降脂理肝汤低剂量组小鼠的 SLC7A11 的 mRNA 表达上升($P<0.05$)。见表 5。

表 3 小鼠血脂 TG、FFA 及肝功能 ALT、AST 的比较($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 3 Comparison of blood lipids (TG and FFA) and liver function indicators (ALT and AST) in mice ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	ALT/(IU·L ⁻¹)	AST/(IU·L ⁻¹)	FFA/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
空白组	36.64±4.67	164.44±50.50	0.79±0.09	0.74±0.09
模型组	55.89±10.06 ^{##}	262.07±59.53 [#]	0.94±0.26	0.71±0.07
铁死亡抑制剂组	38.39±8.65 ^{ΔΔ}	181.64±30.81 ^Δ	0.78±0.14	0.59±0.08 ^{ΔΔ}
降脂理肝汤高剂量组	35.51±3.74 ^{ΔΔ}	152.07±25.09 ^{ΔΔ}	0.63±0.12 ^{ΔΔ}	0.54±0.07 ^{##ΔΔ}
降脂理肝汤中剂量组	37.89±5.77 ^{ΔΔ}	186.04±33.45	0.52±0.07 ^{##ΔΔ}	0.43±0.08 ^{##ΔΔ}
降脂理肝汤低剂量组	36.20±5.68 ^{ΔΔ}	180.96±50.25 ^Δ	0.58±0.10 ^{ΔΔ}	0.49±0.13 ^{##ΔΔ}

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$ 。

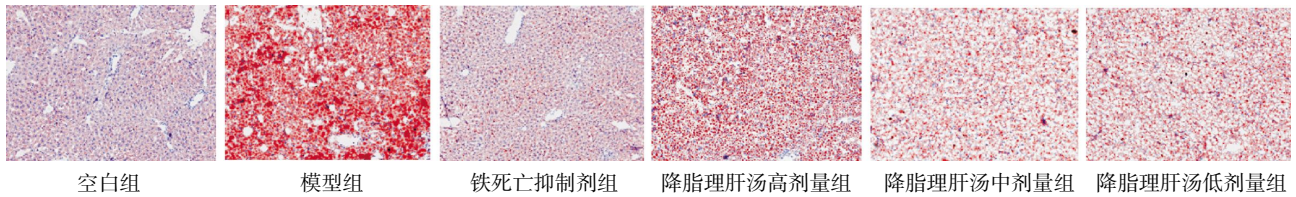


图 1 小鼠肝组织病理变化(油红 O, ×10)

Fig.1 Pathological changes in the liver tissue of mice (Oil Red O Staining, ×10)

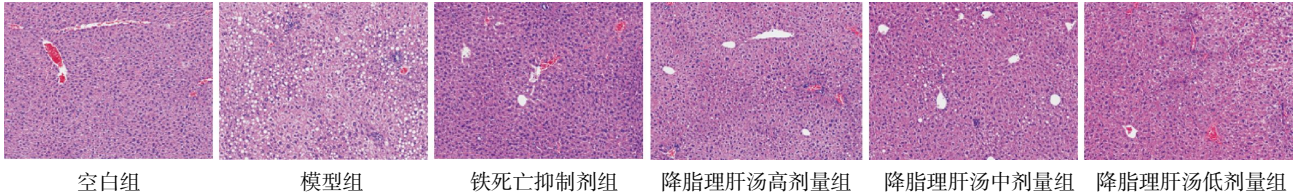


图 2 小鼠肝组织病理变化(HE, ×10)

Fig.2 Pathological changes in the liver tissue of mice (HE, ×10)

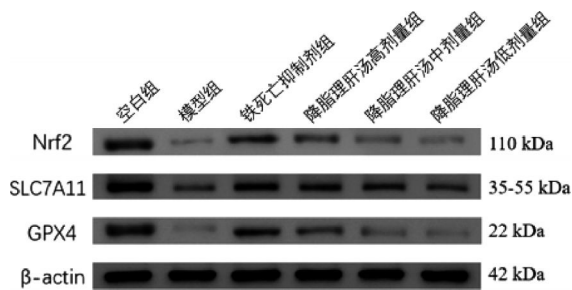


图 3 小鼠肝组织 Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白电泳

Fig.3 Electrophoresis of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 proteins in the liver tissue of mice

表 4 小鼠肝组织 Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 蛋白相对表达量的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 4 Comparison of relative protein expression levels of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in the liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Nrf2	SLC7A11	GPX4
空白组	0.397±0.005	0.547±0.014	0.443±0.014
模型组	0.073±0.014 ^{###}	0.101±0.014 ^{###}	0.083±0.010 ^{###}
铁死亡抑制剂组	0.270±0.015 ^{ΔΔ}	0.357±0.014 ^{ΔΔ}	0.300±0.009 ^{ΔΔ}
降脂理肝汤高剂量组	0.187±0.019 ^{##}	0.250±0.032 ^{##}	0.213±0.019 ^Δ
降脂理肝汤中剂量组	0.110±0.015 [*]	0.180±0.018 ^{##}	0.110±0.015 ^{###}
降脂理肝汤低剂量组	0.080±0.009 ^{###}	0.137±0.005 ^{###}	0.097±0.021 ^{###}

注:与正常组比较,^{*}P<0.05,^{##}P<0.01;与模型组比较,^ΔP<0.05,^{ΔΔ}P<0.01。表 5 小鼠肝组织 Nrf2、SLC7A11 和 GPX4 mRNA 相对表达量的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)Table 5 Comparison of relative mRNA expression levels of Nrf2, SLC7A11, and GPX4 in the liver tissue of mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Nrf2	SLC7A11	GPX4
空白组	0.993±0.012	0.972±0.025	1.002±0.022
模型组	0.162±0.016 ^{###}	0.078±0.005 ^{###}	0.087±0.009 ^{###}
铁死亡抑制剂组	0.797±0.021 ^{ΔΔ}	0.617±0.049 ^{ΔΔ}	0.585±0.038 ^{ΔΔ}
降脂理肝汤高剂量组	0.474±0.043 ^{##}	0.339±0.022 ^{##}	0.326±0.019 ^{##}
降脂理肝汤中剂量组	0.297±0.019 ^{###}	0.193±0.006 ^{###}	0.212±0.019 ^{###}
降脂理肝汤低剂量组	0.279±0.024 ^{###}	0.209±0.007 ^{##}	0.216±0.008 ^{###}

注:与正常组比较,^{*}P<0.05,^{##}P<0.01;与模型组比较,^ΔP<0.05,^{ΔΔ}P<0.01。

后,肝脏脂肪变性及气球样变均有明显的改善。降脂理肝汤是泽泻、丹参、决明子、郁金、荷叶和海藻 6 味中药组成的中药方。药方中泽泻降脂化浊,丹参活血化瘀,为君药;海藻软坚散结,决明子清肝利水,为臣药;郁金活血行气化瘀,为佐药;荷叶升清降浊,调和诸药,为使药。降脂理肝汤中多种药物协同作用对“多重打击”导致的 NAFLD 有良好的疗效。经网络药理学分析,降脂理肝汤中存在着多种活性成分,如丹参新酮、大黄素、槲皮素等^[16]。秦智等^[17]研究表明,丹参酮 II A 可上调 Nrf2 和 GPX4 的蛋白表达,抑制小鼠肝细胞铁死亡。JIANG 等^[18]研究表明,槲皮素可减轻 NAFLD 小鼠肝脏脂质过氧化,提高 GPX4 蛋白的表达,抑制铁死亡。降脂理肝汤可能通过丹参酮 II A 和槲皮素抑制铁死亡,改善 NAFLD。

Nrf2 是抗氧化的关键调节因子,可调控系统 Xc⁻、GPX4、FTL(铁蛋白轻链)和 FPN1(亚铁输出铁转运

4 讨论

NAFLD 临床表现为超过 5%的肝脏细胞脂肪变性,与多种代谢性综合征相关。“多重打击学说”是目前大多数学者认可的 NAFLD 发生发展机制^[15]。在本次实验中,模型组小鼠肝脏存在不同程度的肝细胞气球样变及脂肪变性,经降脂理肝汤干预之

蛋白1)等多个铁死亡相关因子^[19]。*SLC7A11*是系统Xc-的组成成分之一,可维持还原型谷胱甘肽(GSH)水平,并受Nrf2的转录调控^[20]。System Xc-/GSH/GPX4轴是调控铁死亡的经典通路。System Xc-可通过合成GSH对GPX4进行调控。GPX4可在GSH的辅助下将脂质过氧化过程产生的有毒的脂氢化合物(L-OOH)转化为无毒的脂质醇(L-OH),减少ROS的积累,改善铁死亡^[21]。脂质过氧化过程中易产生4-HNE、MDA以及ROS。ROS可介导脂质氧化的发生^[22]。过量的4-HNE和MDA会加重NAFLD。氧化应激在NAFLD的发展中起着重要的作用。因此,Nrf2、SLC7A11和GPX4表达的增加可减少肝脏氧化应激和脂质氧化的发生,减轻NAFLD。

在本次研究中,模型组小鼠肝脏指数上升,肝组织脂肪变性严重,肝功能下降,Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白及mRNA表达含量下降,这说明铁死亡发生促进NAFLD。NAFLD小鼠经铁死亡抑制剂及高剂量降脂理肝汤干预后,肝功能明显改善,同时Nrf2、SLC7A11和GPX4蛋白及mRNA表达含量上升。这说明铁死亡在NAFLD的发展中起促进作用,而高剂量降脂理肝汤可抑制铁死亡。

综上所述,本研究观察降脂理肝汤对NAFLD小鼠的影响,探讨NAFLD的发生发展机制,结果显示降脂理肝汤可改善肝功能,降低血脂,抑制铁死亡,改善NAFLD。然而,降脂理肝汤中是否存在其他单体抑制铁死亡,改善NAFLD,仍需要深入研究。

参考文献

- [1] 李开杨,石思,赵琦,等. 维生素D在非酒精性脂肪性肝病中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2024, 40(10): 1963-1968.
- [2] COTTER T G, RINELLA M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: The state of the disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851-1864.
- [3] LEE C H, LUI D T, LAM K S. Non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes: An update[J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2022, 13(6): 930-940.
- [4] GUO X Y, YIN X Z, LIU Z J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(24): 15489.
- [5] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(2): 1-13.
- [6] YANG M M, XIA L Q, SONG J, et al. Puerarin ameliorates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease by inhibiting ferroptosis and inflammation[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2023, 22(1): 8-16.
- [7] CORRADINI E, BUZZETTI E, DONGIOVANNI P, et al. Ceruloplasmin gene variants are associated with hyperferritinemia and increased liver iron in patients with NAFLD[J]. *Journal of Hepatology*, 2021, 75(3): 506-513.
- [8] SHEN X, YU Z Q, WEI C L, et al. Iron metabolism and ferroptosis in nonalcoholic fatty liver disease: What is our next step? [J]. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 2024, 326(6): E767-E775.
- [9] 张晓艳. 非酒精性脂肪肝病应用加味降脂理肝汤治疗的临床疗效[J]. *系统医学*, 2018, 3(16): 151-153.
- [10] 袁淑芬,叶璟,王丽琴,等. 降脂理肝汤联合针刺治疗非酒精性脂肪肝病临床疗效及安全性研究[J]. *中国现代医生*, 2022, 60(15): 132-135.
- [11] 韩静,李亚伟,刘艳萍,等. 降脂理肝汤对非酒精性脂肪肝病大鼠脂代谢及TNF- α 、MDA、APN水平的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(11): 2782-2785.
- [12] 叶兆伟. 中药药理学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 2015: 268.
- [13] 唐标,尹抗抗. 降脂理肝汤对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪肝病大鼠非经典的细胞焦亡途径的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(3): 267-271.
- [14] WU Y K, REN Z N, ZHU S L, et al. Sulforaphane ameliorates non-alcoholic fatty liver disease in mice by promoting FGF21/FGFR1 signaling pathway[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43(6): 1473-1483.
- [15] CHEN W Q, XU M J, XU M W, et al. Effects of betaine on non-alcoholic liver disease[J]. *Nutrition Research Reviews*, 2022, 35(1): 28-38.
- [16] 唐标,邓常清. 基于网络药理学的降脂理肝汤治疗非酒精性脂肪肝病作用机制研究[J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3493-3500.
- [17] 秦智,周敏. 丹参酮II A通过Nrf2信号通路抑制肝组织铁死亡对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(6): 1611-1620.
- [18] JIANG J J, ZHANG G F, ZHENG J Y, et al. Targeting mitochondrial ROS-mediated ferroptosis by quercetin alleviates high-fat diet-induced hepatic lipotoxicity[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 876550.
- [19] YAN R H, LIN B Y, JIN W W, et al. NRF2, a superstar of ferroptosis[J]. *Antioxidants*, 2023, 12(9): 1-25.
- [20] SU Z Y, LIU Y Q, WANG L, et al. Regulation of SLC7A11 as an unconventional checkpoint in tumorigenesis through ferroptosis[J]. *Genes & Diseases*, 2025, 12(1): 101254.
- [21] LIU M, KONG X Y, YAO Y, et al. The critical role and molecular mechanisms of ferroptosis in antioxidant systems: A narrative review[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(6): 1-15.
- [22] ZHAO S N, GUO Y, YIN X Z. Lipid peroxidation in ferroptosis and association with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2023, 28(12): 332.