

益气活血利水汤调控 Nrf2/GPX4 信号通路抑制铁死亡改善肝纤维化大鼠的机制研究

刘晶晶¹, 周小琦², 王璐³, 童丽君¹, 戴琦^{3*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405;

3. 江西中医药大学附属医院, 江西 南昌 330006

摘要 目的: 研究益气活血利水汤通过激活核因子 - E2 相关因子 2 (Nrf2)/胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 信号通路抑制肝细胞铁死亡改善肝纤维化 (HF) 大鼠的作用机制。方法: 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组, 分别为对照组 (Control)、模型组 (Model)、中药组 (TCM)、中药 + 铁死亡抑制剂组 (TCM + Fer - 1)、中药 + 铁死亡抑制剂 + 自噬抑制剂组 (TCM + Fer - 1 + 3 - MA), 每组 8 只。造模采用 50% 四氯化碳 (CCl₄) 腹腔注射 (1.5 mL/kg), 每周 2 次, 持续 4 周。治疗各组给予相应药物, 其中益气活血利水汤通过灌胃给药 (2 mL/100 g), 铁死亡抑制剂 (Fer - 1, 1 mg/kg) 和细胞自噬抑制剂 (3 - MA, 15 mg/kg) 通过腹腔注射给药, 每日 1 次, 持续 4 周, 其余组给予等量生理盐水代替。HE 和 Masson 染色观察肝组织病理变化; 检测血清中天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、肿瘤坏死因子 α (TNF - α)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 以及血清和肝组织 Fe²⁺ 含量; 蛋白免疫印迹法 (WB) 检测肝组织 GPX4、Nrf2、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、转铁蛋白受体 1 (TFR1)、苺氯素 1 (Beclin - 1)、LC3 II/LC3 I 表达情况; 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 检测 Nrf2、GPX4 的 mRNA 表达情况。结果: 与 Control 比较, Model 肝组织出现大量脂肪性病变, 纤维化明显, 胶原容积显著上升, ASL、ALT、MDA、TNF - α 、Fe²⁺ 的含量显著升高 ($P < 0.05$), SOD 含量降低 ($P < 0.05$), GPX4、Nrf2、SLC7A11 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), TFR1、Beclin - 1 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), GPX4、Nrf2 的 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与 Model 比较, 给药干预各组肝脏组织病理显著改善, ASL、ALT、MDA、TNF - α 、血清及肝脏 Fe²⁺ 含量、TFR1 和 Beclin - 1 蛋白表达均不同程度降低 ($P < 0.05$); SOD 含量、GPX4 和 Nrf2 蛋白表达和 mRNA 表达、SLC7A11 的蛋白表达水平呈不同程度上升 ($P < 0.05$), 其中 LC3 II/LC3 I 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 益气活血利水汤通过调控 Nrf2/GPX4 信号通路抑制铁死亡改善肝纤维化大鼠。

关键词 肝纤维化; 益气活血利水汤; 铁死亡; Nrf2/GPX4; 细胞自噬

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1002 - 2392 (2026) 06 - 0018 - 07

DOI: 10.19664/j.cnki.1002 - 2392.260113

肝纤维化 (Hepatic fibrosis, HF) 是各种原因引起的肝损伤, 导致肝星状细胞 (HSC) 异常活化, 以致细胞外基质大量堆积破坏肝脏正常结构的一种损伤 - 修复反应^[1]。肝纤维化持续发展会转变成不可逆的肝硬化, 甚至发展为肝癌^[2], 因此及时进行抗肝纤维化治疗阻断其进一步发展显得尤为重要。中医药在抗肝纤维化方面有其特定优势, 近年来中药在防治肝脏疾病中广泛应用并有良好的疗效, 中药以其多途径、多靶

点、多层次的特点发挥防治 HF 的作用。益气活血利水汤是陈崑山教授研究肝纤维化/肝硬化的临证总结, 在前期研究^[3]中已经证实益气活血利水汤可有效治疗肝纤维化, 但其作用机制仍然不明确。

铁死亡是一种高度依赖铁调节的程序性细胞死亡方式^[4]。其特征在于细胞内脂质活性氧 (ROS) 的过量堆积和胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 的铁依赖性损耗和过量的失活所致^[5]。在肝纤维化发展成为肝硬化的病理进程中, 铁代谢失常一直都是重要的危险因素, 铁代谢平衡被破坏和肝细胞自身代谢紊乱与纤维化密切相关^[6]。在动物实验中, 有研究^[7]报道转铁蛋白在高膳食铁诱导的肝纤维化和四氯化碳 (CCl₄) 诱导鼠肝纤维化中起重要作用, 并且抑制铁死亡发现肝

收稿日期: 2025 - 01 - 07 修回日期: 2025 - 10 - 24

基金项目: 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ2200944)

作者简介: 刘晶晶 (1996 -), 女, 硕士, 从事肝胆脾胃病相关研究。

* 通信作者: 戴琦 (1970 -), 女, 硕士, 副教授, 主任中医师, 从事肝胆脾胃病相关研究。

纤维化得到有效改善。研究^[8]发现通过激活 Nrf2 和上调 GPX4 的表达水平,细胞内氧化应激水平显著降低,从而抑制了由铁死亡诱导剂(RSL3)诱导的肌细胞铁死亡;二甲双胍(METFORMIN)可上调非酒精性脂肪性肝病模型大鼠肝组织中 Nrf2 和 GPX4 的表达;且 brusatol(一种 Nrf2 抑制剂)能显著反转 METFORMIN 对 Nrf2/Gpx4 信号通路的激活作用以及对非酒精性脂肪性肝病模型大鼠肝脏的损伤,提示 METFORMIN 可能通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路,抑制铁死亡,改善肝脏损伤^[9]。在前期理论研究中,本课题组运用网络药理学和数据挖掘技术探索中药调控铁死亡治疗肝纤维化的用药规律及机制分析,并借助分子对接技术初步验证,得出黄芪、丹参是调控铁死亡治疗肝纤维化的重要中药,而黄芪-丹参是益气活血利水汤的核心药对。为此,本研究进一步探索益气活血利水汤干预肝纤维化的疗效机制,以铁死亡在肝纤维化肝细胞内发挥生物疗效为切入点,探究益气活血利水汤对该生物学过程的影响及相关信号靶标,研究其截断肝纤维化发生发展过程的作用特点,为其临床应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠,体质量 200 ~ 220 g,购于北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2019-0008]。饲养环境:温度 20 ~ 26 ℃;湿度 40% ~ 70%,实验室适应性饲养 1 周后开始实验。本实验由江西中医药大学实验动物伦理委员会批准[SCXK(赣)2018-0003]。

1.2 主要试剂和仪器

铁死亡抑制剂(Fer-1, J22HS189147, 上海源叶生物科技有限公司);细胞自噬抑制剂(3-MA, J22HS188439, 上海源叶生物科技有限公司);Masson 三色染色液(G1006, Servicebio);AST 试剂盒(70110, 山东博科生物);ALT 试剂盒(70111, 山东博科生物产业有限公司);血清铁(Fe)试剂盒(70142, 山东博科生物产业有限公司);TNF- α 试剂盒(E-EL-R2856c, Elabscience);MDA 试剂盒(E-EL-0060c, Elabscience);SOD 试剂盒(A001-3-2, 南京建成生物工程研究所);超纯 RNA 提取试剂盒(CW0581M, CW-BIO);Gsafe Red plus 核酸染料(GK20002, GLPBIO)。

高速台式冷冻离心机(H1750R, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);紫外分光光度计(NP80, Nano-Photometer);荧光 PCR 仪、实时超高灵敏度化学发光成像系统仪(CFXConnect™、Chemi Doc™ XRS+, 伯乐生命医学产品有限公司);全自动酶标仪(WD-2012B、DYY-6C, 北京六一仪器厂);全自动化学发光

图像分析系统(Tanon-5200, 上海天能科技有限公司)。

1.3 药物

益气活血利水汤组方:黄芪 50 g, 白术 30 g, 茯苓 30 g, 车前子 15 g, 葫芦壳 30 g, 当归 15 g, 三七 10 g, 丹参 20 g, 马鞭草 15 g, 柴胡 10 g, 郁金 10 g, 猪苓 30 g, 泽泻 20 g, 陈皮 10 g。益气活血利水汤成人每日服药量为 295 g(标准体重 70 kg)。根据《药理实验方法学》中人和动物体表面积等效剂量折算比表,大鼠的等效剂量为人临床剂量的 6.3 倍,计算得大鼠中剂量每日给药量为 26.5 g/kg。将益气活血利水汤加 8 ~ 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后,武火煮沸,文火煎煮 30 min,滤过;药渣再加 6 ~ 8 倍量水继续煎煮 20 min,滤过,合并两次滤液,以水浴锅或旋转蒸发仪浓缩至约 220 mL,即得含生药约 1.33 g/mL 的药液,冷藏备用。

1.4 动物分组及给药

将 40 只 SD 大鼠随机分为 5 组,分别为对照组(Control)、模型组(Model)、中药组(TCM)、中药+铁死亡抑制剂组(TCM+Fer-1)、中药+铁死亡抑制剂+自噬抑制剂组(TCM+Fer-1+3-MA),每组 8 只。造模采用 50% 四氯化碳(CCl₄)腹腔注射(1.5 mL/kg),每周 2 次,持续 4 周,对照组腹腔注射等量的生理盐水;给药各组给予相应药物,其中益气活血利水汤的给药方式为灌胃给药(2 mL/100 g),铁死亡抑制剂(Fer-1, 1 mg/kg)和细胞自噬抑制剂(3-MA)(15 mg/kg)给药方式均为腹腔注射,每日 1 次,持续 4 周,对照组和模型组以等量生理盐水代替。

1.5 肝组织病理观察

苏木素-伊红(HE)染色:大鼠肝脏组织石蜡切片基本处理后用苏木素染液处理、冲洗、分化,返蓝液返蓝,伊红染色后,依次经过脱水、封片,随后进行病理检查和评分^[10]。肝纤维化病理损害程度为五级:0 级表示无明显胶原纤维增生;I 级表示胶原纤维少量增生,中央静脉和门脉区有少量纤维索放射延伸,但无间隔形成;II 级表示胶原纤维明显增生,中央静脉和门脉区有较多纤维索向周围延伸,形成不完全间隔;III 级表示胶原纤维大量增生,少量假小叶形成;IV 级表示完全间隔增厚,大量假小叶形成。

Masson 染色:大鼠肝脏组织石蜡切片基本处理后,依次经重铬酸钾媒染液染色、室温过夜、孵育 30 min,苏木素染色、1% 盐酸酒精分化,苯胺蓝染色,切片脱水后用二甲苯透明切片、封片后显微镜下观察并采集图像。

1.6 血清中相关指标检测

全自动生化仪分别测定各组大鼠血清中肝功能指标丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST);采

用生化试剂盒检测大鼠血清中丙二醛 (MDA) 含量和过氧化物歧化酶(SOD) 活性,根据说明书步骤对样本进行处理,酶标仪测定。依照 ELISA 试剂盒说明书中指示,按步骤检测大鼠血清中炎症因子 TNF - α 的表达水平。

1.7 血清和肝组织 Fe²⁺ 含量检测

根据试剂盒说明书中指示,分别检测血清和肝组织 Fe²⁺ 含量。

1.8 蛋白免疫印迹法测定铁死亡相关蛋白和自噬相关蛋白表达

采用 RIPA 细胞裂解液提取肝脏组织蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。制备等量的蛋白样品进行 Western blot 检测,分析蛋白相对含量。所使用的抗体及对应的稀释倍数如表 1 所示。

表 1 WB 抗体列表

抗体名称	稀释倍数
Mouse Anti - B - Actin (HC201, TransGen Biotech)	2 000
Rabbit Anti Nrf2 (ab92946, Abcam)	2 000
Rabbit Anti SLC7A11 (26864 - 1 - AP, Proteintech)	1 000
Mouse Anti GPX4 (67763 - 1 - Ig, Proteintech)	2 000
Rabbit Anti Beclin - 1 (A21191, ABclonal)	2 000
Rabbit Anti LC3 (A5618, ABclonal)	1 000
Rabbit Anti TFRI (AF5343, Affinity)	1 000

1.9 qPCR 检测 Nrf2、GPX4 的 mRNA 表达水平

采用 Trizon 试剂提取大鼠肝脏组织中的总 RNA,提取其中的 mRNA,测定其浓度和纯度,逆转录合成 cDNA,采用荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR。以 β -

actin 作为内参,引物序列表 2 所示。

表 2 目的基因引物序列

引物名称	引物序列 (5' - 3')	引物长度/bp
β - actin F	GCCATGTACGTAGCCATCCA	19
β - actin R	GAACCGCTCATTTGCCGATAG	20
Nrf2 F	CTTCTGGGGATACAGTACAGCC	22
Nrf2 R	CTCCTTGGACATCATTTTCATTG	22
GPX4 F	CCGTCTGAGCCGCTTATT	18
GPX4 R	CACGCAACCCCTGTACTTAT	20

1.10 统计学分析

实验数据均采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 SPSS 20.0 进行统计学分析,采用 ANOVA 单因素方差分析,方差齐用 LSD 法;方差不齐则用 Tamhane T2 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。采用 Graphpad9.0 软件进行作图。

2 结果

2.1 对大鼠肝组织病理改变的影响

结果显示,Control 大鼠肝组织无明显病理变化,大鼠的肝小叶形态结构正常,肝细胞排列整齐;与 Control 比较,Model 肝损伤严重,肝细胞排列混乱,分不清正常结构,纤维结缔组织增生较多,生成假小叶,有脂肪空泡样结构生成;与 Model 比较,给药各组明显好转,肝细胞排列情况、假小叶生成、脂肪空泡样改变均有不同程度改善。其中 TCM + Fer - 1 病理改善程度优于 TCM,TCM + Fer - 1 + 3 - MA 病理改善程度优于 TCM + Fer - 1。上述结果证明肝纤维化大鼠模型造模成功,益气活血利水汤对 HF 有治疗作用。见图 1 和表 3。

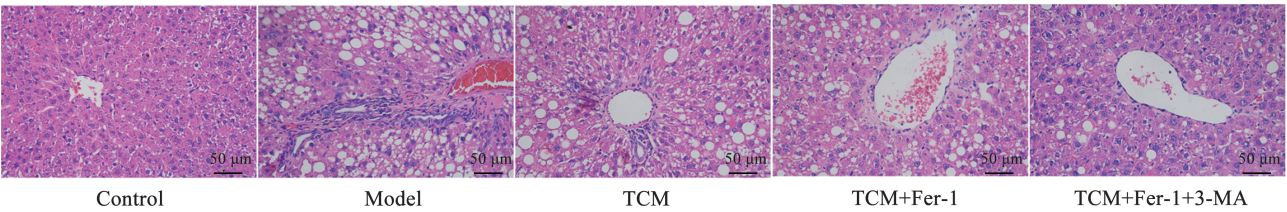


图 1 各组大鼠组织病理学情况 (HE, $\times 400$)

表 3 各组大鼠肝组织病理学分级分布 ($n = 8$, 只)

组别	病理损害程度分布				
	0 级	I 级	II 级	III 级	IV 级
Control	8	0	0	0	0
Model	0	0	0	3	5
TCM	0	4	2	1	1
TCM + Fer - 1	0	4	3	1	0
TCM + Fer - 1 + 3 - MA	0	5	2	1	0

2.2 对大鼠肝纤维化的影响

大鼠肝脏组织经 Masson 染色后胶原纤维呈蓝色,在显微镜下观察蓝色胶原纤维沉积可以判断造模后大鼠纤维化病理损伤严重程度。Control 大鼠肝脏内无明显蓝色胶原分布;而 Model 大鼠蓝色胶原沉积明显;与 Model 比较,给药干预各组胶原容积均明显下降 ($P < 0.05$),肝纤维化得到明显改善,其中 TCM + Fer - 1 纤维化改善程度优于 TCM,TCM + Fer - 1 + 3 - MA 纤维化改善程度优于 TCM + Fer - 1 ($P < 0.05$)。结果见图 2 和表 4。

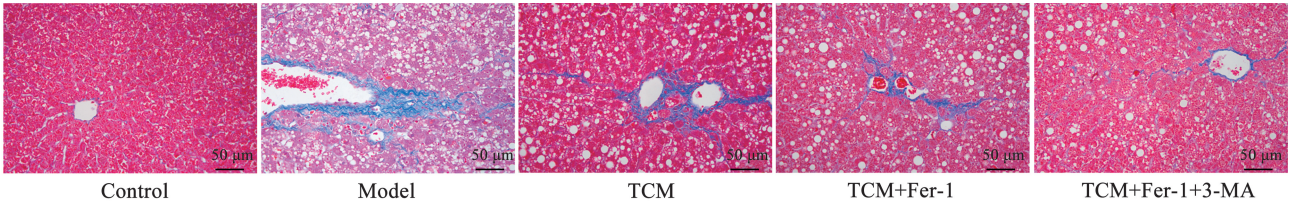


图 2 各组大鼠肝脏组织纤维化情况 (Masson, ×400)

表 4 各组大鼠 Masson 染色定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	Masson 定量
Control	0.04 ± 0.03
Model	0.57 ± 0.22 *
TCM	0.26 ± 0.09 #
TCM + Fer - 1	0.09 ± 0.01 #
TCM + Fer - 1 + 3 - MA	0.06 ± 0.04 #

注:与 Control 比较, * $P < 0.05$;与 Model 比较, # $P < 0.05$ 。

表 5 各组大鼠血清 ALT、AST、Fe、TNF - α、MDA、SOD 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TNF - α/(pg/mL)	MDA/(pg/mL)	SOD/(pg/mL)
Control	58.77 ± 6.01	112.20 ± 0.66	58.93 ± 4.67	461.84 ± 20.13	55.95 ± 2.03
Model	77.69 ± 0.48 *	138.07 ± 25.17 *	77.05 ± 12.94 *	546.46 ± 61.46 *	45.53 ± 0.46 *
TCM	59.32 ± 5.28 #	111.02 ± 4.22 #	51.04 ± 9.32 #	473.48 ± 21.15 #	51.32 ± 0.66 #
TCM + Fer - 1	51.14 ± 4.09 #	106.57 ± 6.70 #	55.61 ± 6.41 #	480.54 ± 25.37 #	58.31 ± 1.00 #
TCM + Fer - 1 + 3 - MA	49.47 ± 14.46 #	107.59 ± 6.40 #	43.41 ± 8.66 #	488.44 ± 23.85 #	48.81 ± 0.35

注:与 Control 比较, * $P < 0.05$;与 Model 比较, # $P < 0.05$ 。

2.4 对大鼠铁代谢的影响

与 Control 比较, Model 大鼠血清和肝组织 Fe^{2+} 水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与 Model 比较, TCM、TCM + Fer - 1、TCM + Fer - 1 + 3 - MA 三组均显著下降 ($P < 0.05$)。添加铁死亡抑制剂和自噬抑制剂干预效果与纯中药干预效果相同。见表 6。

2.5 对大鼠肝组织中 GPX4、Nrf2、SLC7A11、TFR1、Beclin - 1、LC3 II/LC3 I 蛋白表达的影响

与 Control 比较, Model 大鼠 GPX4、Nrf2、SLC7A11 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), TFR1、Beclin - 1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$); 与 Model 比较, TCM、TCM + Fer - 1 两组 GPX4、Nrf2、SLC7A11 蛋白表达升高 ($P <$

2.3 对大鼠血清中 ALT、AST、TNF - α、MDA 和 SOD 的影响

与 Control 比较, Model 大鼠血清中 ALT、AST、TNF - α、MDA 的含量明显上升 ($P < 0.05$), SOD 活性降低 ($P < 0.05$); 与 Model 比较, TCM、TCM + Fer - 1、TCM + Fer - 1 + 3 - MA 三组 ALT、AST、TNF - α、MDA 的含量均不同程度下降 ($P < 0.05$), TCM、TCM + Fer - 1 两组 SOD 含量均上升 ($P < 0.05$), TCM + Fer - 1 + 3 - MA 的 SOD 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。其中炎症因子 (TNF - α) 在给药干预之后变化最显著。见表 5。

0.05), TFR1、Beclin - 1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$), 其中各组的 LC3 II/LC3 I 蛋白表达以及 TCM + Fer - 1 + 3 - MA 中 GPX4、TFR1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 7 及图 3。

表 6 各组大鼠血清和肝组织 Fe^{2+} 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8, \text{U/L}$)

组别	血清 Fe^{2+}	肝组织 Fe^{2+}
Control	22.35 ± 1.27	319.40 ± 0.20
Model	39.19 ± 0.55 *	378.19 ± 0.44 *
TCM	24.05 ± 2.59 #	336.87 ± 0.24 #
TCM + Fer - 1	24.86 ± 4.39 #	331.58 ± 0.42 #
TCM + Fer - 1 + 3 - MA	25.04 ± 2.59 #	313.01 ± 0.22 #

注:与 Control 比较, * $P < 0.05$;与 Model 比较, # $P < 0.05$ 。

表 7 各组大鼠 Nrf2、GPX4、SLC7A11、TFR1、Beclin - 1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Nrf2	GPX4	SLC7A11	TFR1	Beclin - 1
Control	0.52 ± 0.02	0.50 ± 0.07	0.78 ± 0.08	0.41 ± 0.06	0.37 ± 0.02
Model	0.24 ± 0.02 *	0.26 ± 0.10 *	0.23 ± 0.12 *	0.61 ± 0.09 *	0.77 ± 0.08 *
TCM	0.26 ± 0.02 #	0.64 ± 0.09 #	0.68 ± 0.07 #	0.37 ± 0.05 #	0.40 ± 0.05 #
TCM + Fer - 1	0.39 ± 0.02 #	0.52 ± 0.14 #	0.69 ± 0.03 #	0.58 ± 0.02 #	0.33 ± 0.03 #
TCM + Fer - 1 + 3 - MA	0.53 ± 0.04 #	0.13 ± 0.11	0.57 ± 0.04 #	0.68 ± 0.05	0.52 ± 0.06 #

注:与 Control 比较, * $P < 0.05$;与 Model 比较, # $P < 0.05$ 。

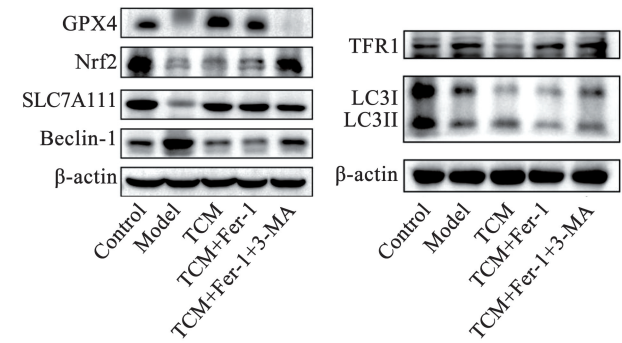


图 3 铁死亡相关蛋白及自噬相关蛋白表达印迹图

2.6 对大鼠肝组织中 Nrf2、GPX4 mRNA 表达的影响

与 Control 比较, Model 大鼠 Nrf2 和 GPX4 的 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 Model 比较, TCM、TCM + Fer - 1、TCM + Fer - 1 + 3 - MA 三组 Nrf2 和 GPX4 mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.05$)。其中 TCM + Fer - 1 + 3 - MA 干预效果最显著。见表 8。

表 8 各组大鼠 Nrf2、GPX4 mRNA 表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	Nrf2	GPX4
Control	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.11
Model	0.36 ± 0.03 *	0.55 ± 0.05 *
TCM	0.65 ± 0.04 #	0.71 ± 0.06 #
TCM + Fer - 1	0.53 ± 0.03 #	0.83 ± 0.11 #
TCM + Fer - 1 + 3 - MA	0.66 ± 0.03 #	0.93 ± 0.07 #

注:与 Control 比较, * $P < 0.05$; 与 Model 比较, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

HF 在中医古籍中并无对应病名, 但根据其表现, HF 可归属于“肝积”“胁痛”“积聚”等范畴^[11]。其病因病机可总结为本虚标实, 以肝、脾、肾三脏功能失调为本, 以气滞、血瘀、湿热、痰浊等病理因素为标, 当以益气活血、利湿化浊。而本研究所用的益气活血利水汤亦有益气活血、祛湿化浊之效, 并且在以往临床治疗中颇见奇效。西医学认为 HF 是肝损伤、氧化应激以及炎症反应相互作用的复杂过程^[12]。因此, 本研究通过 50% CCl₄ 建立 HF 大鼠模型, 结果显示, Model 大鼠肝脏结构排列紊乱, 出现大量脂肪性病变, 肝纤维化明显, 肝功能指标 ALT、AST 明显升高, 炎症水平、氧化水平显著升高, 表明 HF 模型构建成功。给予益气活血利水汤治疗后肝组织病变明显改善, 肝纤维化显著减少, ALT、AST 明显下降, 氧化应激水平和炎症水平也有所改善。初步证实了益气活血利水汤可以减低氧化应激损伤和炎症损伤, 改善肝纤维化。

铁死亡被证实与 HF 的过程息息相关。有研究通过生物信息学和动物实验发现, 五味子乙素能够抑制肝细胞铁死亡以改善炎症反应和脂质蓄积, 逆转肝纤维化从而缓解非酒精性脂肪性肝病的发生发展^[13]。

溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 是 System Xc - 结构的核子单元, 通过进口胱氨酸进行谷胱甘肽 (GSH) 合成来维持细胞氧化还原平衡, 减少有毒脂质堆积从而防止铁死亡^[14]。研究发现, 肝脏铁代谢紊乱会导致铁过载促进脂质过氧化, 从而加剧铁死亡的发生^[15-16]。蒙药德都红花 - 7 味散可以通过上调线粒体铁蛋白 (FTMT)、GPX4, 减轻铁蓄积抑制铁死亡的发生, 以减轻肝纤维化大鼠的慢性肝损伤^[17]。铁以 Fe³⁺ 形式存在于人体中, 其与细胞膜上的转铁蛋白 (TF) 结合形成复合物, 由转铁蛋白受体 1 (TFR1) 转运到细胞内还原为 Fe²⁺, 过量的 Fe²⁺ 通过芬顿反应催化产生 ROS, 引发脂质过氧化反应, 进一步诱发铁死亡^[18]。因此, 本研究以益气活血利水汤与铁死亡的关系为切入点, 探索益气活血利水汤能否通过调节铁死亡来达到改善大鼠肝脏损伤的目的。研究发现, Model 大鼠的铁死亡相关蛋白 SLC7A11、GPX4 表达降低, TFR1 表达升高, 且氧化应激相关指标检测显示, 大鼠体内 MDA、血清及肝组织 Fe²⁺ 水平升高, SOD 水平降低。由此证明, 肝损伤诱发了肝脏组织内的铁死亡。同时, 在单纯给予益气活血利水汤干预后, 铁死亡相关蛋白以及 MDA、SOD 得到缓解。并且在同时给予中药和铁死亡抑制剂双药干预效果与纯中药的干预效果相同, 提示益气活血利水汤可能通过缓解肝脏铁过载, 增强抗氧化系统的抗氧化能力从而抑制肝细胞铁死亡达到发挥抗 HF 效果。

为了进一步探索益气活血利水汤抑制铁死亡的具体机制, 对铁死亡的调控通路展开了相关研究。Nrf2 被认为是铁死亡中必不可少的调节因子之一^[19]。研究发现, 参苓白术散之所以能够发挥抗氧化和抗炎作用, 其中机制是通过上调 Nrf2 信号通路抑制肝细胞铁死亡, 从而改善肝纤维化^[20]。此外, 另一种重要的抗氧化信号通路 GPX4 被认为也与铁死亡息息相关^[21]。GPX4 具有独特的还原复合脂质中氢过氧化物的能力, 在酶促防御膜脂质过氧化中起关键作用^[22]。研究发现 GPX4 缺乏, 氧化应激水平会明显增加, 引起大量活性氧堆积, 最终诱导细胞铁死亡^[23], 一旦 GPX4 不能迅速降解磷脂质 (PL) 氢过氧化物 (PL - OOH, 如 AA - OOH), 多余的脂质过氧化物会导致铁死亡^[24]。有研究发现鸢尾素可通过 Nrf2/GPX4 信号通路抑制海马体神经细胞铁死亡, 从而改善脓毒性相关脑病 (SAE) 炎症微环境^[25]。由此, Nrf2/GPX4 轴是拮抗铁死亡的关键信号通路。因此, 本研究通过检测 Nrf2、GPX4 蛋白表达以及 mRNA 表达来探究益气活血利水汤是否通过 Nrf2/GPX4 信号通路抑制铁死亡。研究

结果发现, HF 模型大鼠的 Nrf2、GPX4 蛋白及 mRNA 表达显著降低。单纯给予中药干预后表达均增加, 且其铁死亡相关蛋白 SLC7A11、GPX4 表达增加、TFR1 表达降低。另外, 在同时给予中药与铁死亡抑制剂干预后效果与单纯中药显示相同治疗效果, 提示益气活血利水汤可能通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路拮抗肝铁死亡来改善 HF。

越来越多研究发现, 铁死亡受细胞自噬高度影响, 自噬可以促进铁死亡^[26-27], 然而, 也有研究表明, 自噬可以抑制铁死亡^[28-29], 认为自噬能够靶向降解铁死亡调节因子, 从而抑制铁死亡进展^[30]。本研究中, 初步检测了自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 II/LC3 I, 但是 LC3 II/LC3 I 蛋白表达差异无统计学意义。因此, 本研究自噬怎样参与调控且与铁死亡之间的关系并未得出有力证据, 后续将完善相关实验, 探究其具体机制。

综上所述, 益气活血利水汤可有效降低氧化应激水平和炎症反应, 调节铁代谢, 从而抑制铁死亡达到保护 HF 大鼠的效果, 其机制可能是通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路抑制肝细胞铁死亡的发生进而保护 HF 大鼠。

参考文献:

[1] HORN P, TACKE F. Metabolic reprogramming in liver fibrosis[J]. Cell Metab, 2024, 36(7): 1439-1455.

[2] HERNANDEZ-GEA V, FRIEDMAN S L. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 425-456.

[3] 戴琦, 罗勇兵, 李梦乔, 等. 益气活血利水汤抑制慢性肝纤维化大鼠肝脏 Wnt/ β -catenin 信号通路[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(4): 1697-1704.

[4] 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.

[5] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. Cell, 2017, 171(2): 273-285.

[6] GAO H, JIN Z M, BANDYOPADHYAY G, et al. Aberrant iron distribution via hepatocyte-stellate cell axis drives liver lipogenesis and fibrosis[J]. Cell Metab, 2022, 34(8): 1201-1213. e5.

[7] YU Y Y, JIANG L, WANG H, et al. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis[J]. Blood, 2020, 136(6): 726-739.

[8] 钟桂玲, 李文祥, 王贺, 等. 普罗布考经 Nrf2/Gpx4 途径抑制铁死亡保护 H9C2 心肌细胞[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(3): 462-467.

[9] 岳亚光, 檀薇薇, 王文川, 等. 二甲双胍经 Nrf2-Gpx4 通路抑制铁死亡并减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠的肝损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(10): 1848-1857.

[10] 袁丽萍, 陈怡, 王宝宇, 等. 美洲大蠊提取物对 CCl₄ 诱导的肝纤维化大鼠 NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(5): 107-113.

[11] 徐列明, 刘平, 沈锡中, 等. 肝纤维化中西医结合诊疗指南(2019 年版)[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(11): 1286-1295.

[12] PAROLA M, PINZANI M. Liver fibrosis in NAFLD/NASH: from pathophysiology towards diagnostic and therapeutic strategies[J]. Mol Aspects Med, 2024, 95: 101231.

[13] 朱智峰, 李文婷, 曹拥军, 等. 基于生物信息学探讨五味子乙素抑制铁死亡改善蛋氨酸胆碱缺乏诱导脂肪肝模型小鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(2): 74-83.

[14] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. Protein Cell, 2021, 12(8): 599-620.

[15] ZHANG Z L, GUO M, SHEN M, et al. The BRD7-P53-SLC25A28 axis regulates ferroptosis in hepatic stellate cells[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101619.

[16] DU K, OH S H, DUTTA R K, et al. Inhibiting xCT/SLC7A11 induces ferroptosis of myofibroblastic hepatic stellate cells but exacerbates chronic liver injury[J]. Liver Int, 2021, 41(9): 2214-2227.

[17] 韩志强, 巴图德力根, 薛兰, 等. 蒙药德都红花-7 味散对大鼠慢性肝损伤保护机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2022, 38(21): 2596-2599.

[18] 杨岚婷, 徐涛, 杨福情, 等. 转铁蛋白受体对铁过载所致大鼠心肌细胞铁死亡的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(8): 781-788.

[19] QIU M M, MA K, ZHANG J F, et al. Isoliquiritigenin as a modulator of the Nrf2 signaling pathway: potential therapeutic implications[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1395735.

[20] 周相宇, 周素芳, 李玉茹, 等. 基于 Nrf2 信号通路探究参苓白术散调节铁死亡对酒精性肝损伤大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(5): 104-113.

[21] SEIBT T M, PRONETH B, CONRAD M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication[J]. Free Radic Biol Med, 2019, 133: 144-152.

[22] PAN Q, LUO Y, XIA Q, et al. Ferroptosis and liver fibrosis[J]. Int J Med Sci, 2021, 18(15): 3361-3366.

[23] KIM K M, CHO S S, KI S H. Emerging roles of ferroptosis in liver pathophysiology[J]. Arch Pharm Res, 2020, 43(10): 985-996.

[24] LU Y Z, HU J J, CHEN L, et al. Ferroptosis as an emerging therapeutic target in liver diseases[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1196287.

[25] WANG J, ZHU Q, WANG Y, et al. Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis[J]. Free Radic Biol Med, 2022, 187: 171-184.

[26] AN P J, GAO Z G, SUN K, et al. Photothermal-enhanced inactivation of glutathione peroxidase for ferroptosis sensitized by an autophagy promoter[J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2019, 11(46): 42988-42997.

[27] LIU J, KUANG F M, KROEMER G, et al. Autophagy-dependent ferroptosis: machinery and regulation[J]. Cell Chem Biol, 2020, 27(4): 420-435.

[28] YAMADA K, ST CROIX C, STOLZ D B, et al. Compartmentalized mitochondrial ferroptosis converges with optineurin-mediated mitophagy to impact airway epithelial cell phenotypes and asthma outcomes[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 5818.

[29] ZHAI J N, CHEN Z G, ZHU Q, et al. Curcumin inhibits PAT-induced renal ferroptosis via the p62/Keap1/Nrf2 signalling pathway[J]. Toxicology, 2024, 506: 153863.

[30] WANG Y, YAN D, LIU J B, et al. Protein modification and degradation in ferroptosis[J]. Redox Biol, 2024, 75: 103259.

Mechanism of Yiqi Huoxue Lishui Decoction Regulating Nrf2/GPX4 Signaling Pathway to Inhibit Ferroptosis and Improve Liver Fibrosis in Rats

LIU Jingjing¹, ZHOU Xiaoqi², WANG Lu³, TONG Lijun¹, DAI Qi³

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

3. The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006, China

Abstract Objective: To investigate the mechanism by which Yiqi Huoxue Lishui Decoction ameliorates hepatic fibrosis (HF) in rats by inhibiting hepatocyte ferroptosis via activation of the nuclear factor - E2 - related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. Method: Forty Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups (n=8 per group): the control group (Control), model group (Model), traditional Chinese medicine group (TCM), traditional Chinese medicine + ferroptosis inhibitor group (TCM + Fer - 1), and traditional Chinese medicine + ferroptosis inhibitor + autophagy inhibitor group (TCM + Fer - 1 + 3 - MA). The model was established by intraperitoneal injection of a 50% carbon tetrachloride (CCl₄) solution (1.5 mL/kg), administered twice weekly for 4 weeks. Treatment groups received their respective interventions: the Yiqi Huoxue Lishui Decoction was administered via oral gavage (2 mL/100 g), while the ferroptosis inhibitor Ferrostatin - 1 (Fer - 1) (1 mg/kg) and the autophagy inhibitor 3 - Methyladenine (3 - MA) (15 mg/kg) were administered via intraperitoneal injection. All administrations were performed once daily for 4 weeks, while the other groups were given an equivalent volume of normal saline. Hepatic histopathological changes were evaluated using hematoxylin - eosin (HE) and Masson staining. Serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), tumor necrosis factor - α (TNF - α), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and Fe²⁺ content in serum and liver tissue were measured. Western blot (WB) was employed to assess protein expression of GPX4, Nrf2, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), transferring receptor 1 (TFR1), Beclin - 1, and the LC3 II/I ratio. Quantitative real - time polymerase chain reaction (qPCR) was utilized to determine mRNA expression levels of Nrf2 and GPX4. Results: Compared with the Control group, the Model group exhibited severe hepatic steatosis, significant fibrosis, elevated collagen deposition, increased serum AST, ALT, MDA, TNF - α , and Fe²⁺ levels, and reduced SOD activity ($P < 0.05$). Protein expression of GPX4, Nrf2, and SLC7A11 was upregulated, while TFR1 and Beclin - 1 expression increased, and mRNA levels of GPX4 and Nrf2 were markedly suppressed ($P < 0.05$). Intervention with Yiqi Huoxue Lishui Decoction and/or inhibitors significantly attenuated histopathological damage, reduced AST, ALT, MDA, TNF - α , Fe²⁺ levels, and downregulated TFR1 and Beclin - 1 expression ($P < 0.05$). Concurrently, SOD activity, GPX4 and Nrf2 protein/mRNA expression, and SLC7A11 protein levels were elevated ($P < 0.05$). No significant difference was observed in the LC3 II/I ratio across groups ($P > 0.05$). Conclusion: Yiqi Huoxue Lishui Decoction may ameliorate hepatic fibrosis by inhibiting ferroptosis through activation of the Nrf2/GPX4 signaling pathway.

Key words Liver fibrosis (HF); Yiqi Huoxue Lishui Decoction; Ferroptosis; Nrf2/GPX4; Autophagy