

引用:郭曼曼,衡王琴,高黎明,陆杰霖,彭惠平,丁梦磊,汪怡.基于Nrf2/Gpx4通路抑制肝脏铁死亡探讨葛连芪参方对小鼠非酒精性脂肪性肝病的改善作用[J].中医药导报,2026,32(2):47-52.

基于Nrf2/Gpx4通路抑制肝脏铁死亡探讨 葛连芪参方对小鼠非酒精性脂肪性肝病的 改善作用*

郭曼曼¹,衡王琴²,高黎明¹,陆杰霖¹,彭惠平¹,丁梦磊¹,汪怡¹

(1.昆山市中医医院,江苏 昆山 215300;

2.南京中医药大学附属中西医结合医院,江苏 南京 210028)

[摘要] 目的:探讨葛连芪参方改善小鼠非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的作用机制。方法:将小鼠随机分为空白组、模型组、葛连芪参方高剂量组(25.0 g/kg)、葛连芪参方低剂量组(12.5 g/kg)和抑制剂组(葛连芪参方12.5 g/kg+隔天腹腔注射Nrf2抑制剂)。除空白组喂普通饲料外,其他组给予高脂饲料喂养12周,制备NAFLD模型;造模成功后,药物干预8周。采用HE和油红O染色观察肝脏病理及脂质沉积情况。试剂盒检测血清和肝脏脂质水平[总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]、肝功能指标[谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)]及氧化应激指标[还原性谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)]。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清炎症因子水平,包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)及白介素-8(IL-8)。Western blotting检测肝脏Nrf2、Gpx4、HO-1、xCT等蛋白表达情况。结果:高脂饲料造模后,模型组小鼠血清和肝脏脂质含量、肝功能指标及炎症因子水平显著升高($P<0.01$),肝脏亚铁离子、MDA含量上升,GSH、SOD、T-AOC水平显著下降($P<0.01$),肝组织呈现明显脂肪变性和脂质沉积。药物干预后,各给药组小鼠血清和肝脏TC、TG含量,血清ALT、AST水平,肝脏亚铁离子含量、MDA含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);肝脏SOD、T-AOC水平显著升高($P<0.01$)。此外,葛连芪参方高、低剂量组小鼠血清和肝脏LDL-C含量、血清TNF- α 、IL-6、IL-8水平显著降低($P<0.01$),肝脏GSH水平显著升高($P<0.01$);肝脏脂肪变性和脂质沉积明显缓解。Western blotting检测显示,模型组小鼠肝脏组织Nrf2、xCT、HO-1、Gpx4蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。治疗后,葛连芪参方高、低剂量组Nrf2、xCT、HO-1、Gpx4蛋白表达量明显升高($P<0.01$)。与葛连芪参方低剂量组比较,抑制剂组Nrf2、xCT、HO-1、Gpx4蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:葛连芪参方可有效改善小鼠非酒精性脂肪肝病,其作用机制可能与激活Nrf2/Gpx4通路抑制肝脏铁死亡有关。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝病;葛连芪参方;Nrf2/Gpx4通路;铁死亡;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2026)02-0047-06

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.02.008

Investigating the Ameliorative Effect of Gelian Qishen Formula (葛连芪参方) on Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Mice through Inhibiting Hepatic Ferroptosis via the Nrf2/Gpx4 Pathway

GUO Manman¹, HENG Wangqin², GAO Liming¹, LU Jieli¹, PENG Huiping¹, DING Menglei¹, WANG Yi¹

(1.Traditional Chinese Medicine Hospital of Kunshan, Kunshan Jiangsu 215300, China; 2.The Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing Jiangsu 210028, China)

[Abstract] Objective: To investigate the mechanism of Gelian Qishen formula (GQF) in ameliorating

*基金项目:江苏省苏州市临床重点病种诊疗技术专项(LCZX202229);昆山市社会发展项目(KS2233);昆山市中医药科技发展项目(KZYY2201、KZYY2209)

通信作者:汪怡,女,主任中药师,研究方向为中药复方及医院制剂基础研究

non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in mice. Methods: Mice were randomly divided into a control group, model group, high-dose GQF group (25.0 g/kg), low-dose GQF group (12.5 g/kg), and inhibitor group (12.5 g/kg GQF administered concurrently with intraperitoneal injection of an Nrf2 inhibitor every other day). NAFLD was induced by feeding a high-fat diet (HFD) for 12 weeks to all groups except the control group, which was fed a standard diet, followed by 8 weeks of drug intervention. Hepatic pathology and lipid deposition were observed using HE and Oil Red O staining. Serum and hepatic lipid profiles [total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C)], liver function indices [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)], and oxidative stress markers [reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (T-AOC)] were measured using commercial assay kits. Serum inflammatory cytokines, including tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-8 (IL-8), were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expression levels of Nrf2, Gpx4, HO-1, and xCT in the liver were determined by Western blotting. Results: After HFD feeding, the model group showed significantly increased serum and hepatic lipid contents, liver function indices, and inflammatory cytokine levels ($P < 0.01$), along with elevated hepatic Fe²⁺ and MDA contents, and significantly decreased levels of GSH, SOD, and T-AOC ($P < 0.01$). Liver tissues exhibited marked steatosis and lipid deposition in model group. After intervention, all treatment groups showed significant reductions in serum and hepatic TC and TG levels, serum ALT and AST levels, and hepatic Fe²⁺ and MDA contents ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while hepatic SOD and T-AOC levels were significantly increased ($P < 0.01$). Furthermore, the high-dose GQF group and low-dose GQF group exhibited significantly decreased serum and hepatic LDL-C levels and serum TNF- α , IL-6, and IL-8 levels ($P < 0.01$), alongside significantly increased hepatic GSH levels ($P < 0.01$), with markedly alleviated hepatic steatosis and lipid deposition. Western blotting revealed that the protein expression levels of Nrf2, xCT, HO-1, and Gpx4 in the liver were significantly decreased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). After treatment, the protein expression levels of Nrf2, xCT, HO-1, and Gpx4 significantly increased in the high-dose GQF group and low-dose GQF group ($P < 0.01$). Compared with the low-dose GQF group, the inhibitor group showed significantly lower expression levels of Nrf2, xCT, HO-1, and Gpx4 proteins ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion: Gelian Qishen formula can effectively ameliorate NAFLD in mice, and the mechanism may be associated with activating the Nrf2/Gpx4 pathway to inhibit hepatic ferroptosis.

[Keywords] non-alcoholic fatty liver disease; Gelian Qishen formula; Nrf2/Gpx4 pathway; ferroptosis; mice

非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)指除过量饮酒和明确因素导致的肝损伤外,由肝脏脂质代谢异常、脂质过度累积引起的慢性肝脏疾病。NAFLD的发病机理目前尚未阐明,多认为与肥胖、遗传、氧化应激、胰岛素抵抗等因素有关^[1-3]。铁死亡是一种新型铁依赖型细胞程序性死亡方式。研究发现,铁死亡在NAFLD的发生发展中起重要作用,NAFLD中存在轻度到中度的肝脏铁负载,且肝脏铁累积通过诱导氧化应激和脂质过氧化反应损伤肝细胞^[4-5]。核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)是细胞防御过氧化应激的关键调节因子,铁死亡途径中绝大多数级联或相互作用的酶和蛋白质均受Nrf2的转录调控^[6]。谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, Gpx4)为Nrf2的下游靶点,是调节铁死亡的核心蛋白,可催化脂质过氧化物的还原反应,抑制铁死亡^[6]。高脂饮食诱导的小鼠或大鼠NAFLD模型中,Gpx4表达下降,促进肝脏铁死亡发生,加剧肝脏损伤;当激活Nrf2,Gpx4表达随之升高,可缓解NAFLD的进展^[7-8]。因此,激活Nrf2/Gpx4通路抑制肝脏铁死亡可作为NAFLD新的潜在治疗策略^[9-10]。

葛连芪参方为昆山市中医医院协定方,由葛根、黄连、黄芪、丹参、决明子等9味药材组成,该方是在院内制剂降脂脉安冲剂(苏药制字Z04000676)基础上加减化裁而来,临床上用于NAFLD的治疗。课题组前期预实验发现该方具有抗氧化、抗炎作用,可有效降低高脂饮食诱导的NAFLD小鼠脂质水平,缓解肝损伤,但其作用机制尚不明确。本实验建立了高脂饮食诱导的NAFLD小鼠模型,拟从激活Nrf2/Gpx4通路抑制肝脏铁死亡角度出发,观察葛连芪参方对NAFLD小鼠的治疗效果,阐明葛连芪参方干预NAFLD的分子机制。

1 材料

1.1 动物 75只SPF级C57BL/6J雄性小鼠,8周龄,购自江苏华创信诺医药科技有限公司,动物生产许可证号:SCXK(苏)2020-0009;动物质量合格证编号:202355425。本实验通过南京中医药大学伦理审查,伦理批准编号:AEWC-20230306-268。所有动物分笼饲养于江苏省中医药研究院实验动物中心SPF级动物房,温度20~25℃,湿度40%~60%,12 h/12 h昼夜交替照明。水、食均由动物中心提供,水为无菌水,食物为常规饲料和高脂饲料。

1.2 药品与试剂 生黄芪(批号:230826)、紫丹参(批号:2330728)、葛根(批号:230810)、黄连(批号:230718)、泽泻(批号:230731)、决明子(批号:230619)、生山楂(批号:230809)、生麦芽(批号:230823)、荷叶(批号:230720)均购自苏州市天灵中药饮片有限公司,经昆山市中医医院药学部李青松主任中药师鉴定为正品;鹅胆子苦醇(批号:MUST-22110410)购自成都曼思特生物科技有限公司。

总胆固醇(total cholesterol,TC)含量检测试剂盒(批号:2401001)、甘油三酯(triglyceride,TG)含量检测试剂盒(批号:2401001)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)含量检测试剂盒(批号:2402001)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)含量检测试剂盒(批号:2401001)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase,GPT)活性检测试剂盒(批号:2401001)、谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase,GOT)活性检测试剂盒(批号:2401001)、还原性谷胱甘肽(glutathione,GSH)含量检测试剂盒(批号:2403003)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量检测试剂盒(批号:2402003)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性检测试剂盒(批号:2403004)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity,T-AOC)检测试剂盒(批号:2402002)、亚铁离子检测试剂盒(批号:2307002)均购自北京索莱宝科技有限公司。小鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α ,TNF- α)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测试剂盒(批号:202403);小鼠白介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)ELISA检测试剂盒(批号:202403);小鼠白介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(批号:202403);小鼠白介素-8(IL-8)ELISA检测试剂盒(批号:202403)均购自上海凯靖生物科技有限公司。BCA蛋白定量试剂盒(批号:091823240415)购自上海碧云天生物技术有限公司。RIPA裂解液(批号:23220386)购自北京兰杰柯科技有限公司。兔源-抗 α CT(批号:84a5792)、Nrf2(批号:2h43596)、HO-1(批号:80w1044)、Gpx4(批号:78p5366)、GAPDH(批号:62u0922)及HRP标记山羊抗兔二抗(批号:20001329)均购自江苏亲科生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 DW-2K型调温电热套(南通市通州申通电热器厂);RE-52CS型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);MLS-3751L-PC型高压蒸汽灭菌锅(松下健康医疗器械株式会社);BT 25S型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);Fresco 17型冷冻高速离心机(美国赛默飞世尔科技公司);BANDELIN mini 20型超声波细胞破碎仪(德国BANDELIN公司);Bio-Rad PowerPac型基础电泳仪、Bio-Rad XRS凝胶成像仪、Bio-Rad iMar酶标仪均购自美国伯乐生命医学产品有限公司。

2 方 法

2.1 动物分组与给药 葛连芪参汤剂由昆山市中医医院制剂中心提供。称取处方量各味饮片,加10倍水浸泡1 h,煎煮2次,1 h/次,合并煎煮液,浓缩至折生药量2 g/mL,灭菌,置4℃冰箱备用。

75只小鼠适应性饲养1周后,随机分成5组,分别为空白组、模型组、葛连芪参方高剂量组(25.0 g/kg)、葛连芪参方低

剂量组(12.5 g/kg)和抑制剂组。除空白组喂普通饲料,其他组给予高脂饲料喂养12周,制备NAFLD模型^[1]。造模后,模型组相较于空白组体质量显著增加,同时从空白组和模型组中随机抽取小鼠,采用HE染色法分析肝脏组织的病理变化,出现较多肝细胞脂肪变性、较多气球样变时判定造模成功。造模成功后,各组给予相应药物灌胃,1次/d,持续8周,抑制剂组给予葛连芪参方12.5 g/kg灌胃,参考文献[6],隔天以2 mg/kg剂量腹腔注射Nrf2抑制剂鹅胆子苦醇,空白组和模型组给予等量生理盐水替代。

2.2 小鼠血脂水平、肝功能和炎症因子检测 末次给药结束后,对小鼠进行麻醉,腹主动脉采血,装入抗凝离心管中,4℃、3 000 r/min离心10 min(离心半径为10 cm),收集血清。采血后颈椎脱臼处死小鼠,摘取肝脏组织。根据相关试剂盒说明书操作,检测各组小鼠血脂水平(TG、TC、HDL-C、LDL-C)、肝脏脂质水平(TG、TC、HDL-C、LDL-C)、肝功能指标(ALT、AST)和炎症因子水平(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、IL-8)。

2.3 肝组织亚铁离子水平和氧化应激指标检测 取新鲜肝脏组织,按比例加入提取液,冰浴下匀浆,4℃、10 000 r/min离心10 min(离心半径为10 cm),取上清,置冰上待测。按试剂盒说明书方法检测肝脏中亚铁离子水平和氧化应激指标(包括GSH、MDA、SOD、T-AOC)。

2.4 小鼠肝脏组织病理学变化

2.4.1 HE染色 取小鼠肝脏组织,用4%多聚甲醛固定,采用梯度乙醇脱水,石蜡包埋,然后切成4 μ m的薄片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,按常规HE染色进行,光学显微镜下观察小鼠肝脏组织病理形态学变化,拍摄图片。

2.4.2 油红O染色 将小鼠肝脏组织常规固定后,取肝组织分别在15%、30%蔗糖溶液中脱水,包埋OCT中,切10 μ m薄片,油红O染色,75%乙醇分化,苏木素复染,蒸馏水冲洗后1%盐酸乙醇分化,氨水返蓝,甘油明胶封片,倒置荧光显微镜下观察小鼠肝脏组织脂质变化情况,拍摄图片。

2.5 Western blotting检测相关蛋白表达情况 称取肝脏组织适量,加入RIPA裂解液提取组织蛋白。采用BCA法进行蛋白质定量,利用10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,然后冰浴条件下转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,商品化封闭液封闭1 h。将封闭后的PVDF膜与一抗在4℃下振荡孵育过夜。回收一抗,加入TBST,振荡洗涤(6次,5 min/次);加入同源二抗抗体,室温下振荡孵育2 h,回收二抗,加入TBST振荡洗涤(6次,5 min/次)。最后ECL显色,以GAPDH为内参照,分析膜上Nrf2、HO-1、Gpx4和 α CT蛋白的表达水平。

2.6 统计学方法 数据采用SPSS 26.0软件进行处理分析,所有数据均以“均数 \pm 标准差”表示($\bar{x}\pm s$)。计量资料符合正态分布,采用单因素方差分析(One-way ANOVA),满足方差齐性检验,各组间两两比较采用LSD法;方差不齐,采用Games-Howell法。若计量资料属于非正态分布资料,使用非参数检验,各组间两两比较采用Kruskal Wallis检验法。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 小鼠血脂水平、肝功能和炎症因子水平 与空白组比较,

模型组小鼠血清和肝脏TC、TG、LDL-C含量均升高($P<0.01$)。治疗后,葛连芪参方高、低剂量组TC、TG、LDL-C含量均降低($P<0.01$)。与葛连芪参方低剂量组比较,抑制剂组血清TG、LDL-C和肝脏LDL-C明显升高($P<0.05$),血清TC、肝脏TG有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表1)

与空白组比较,模型组小鼠肝功能指标出现显著异常,ALT和AST显著升高($P<0.01$),同时,炎症因子水平也显著升高($P<0.01$)。治疗后,葛连芪参方高、低剂量组ALT和AST均降低($P<0.01$);葛连芪参方高、低剂量组TNF- α 、IL-6、IL-8均显著降低($P<0.01$),高剂量组IL-1 β 显著降低($P<0.05$),低剂量组IL-1 β 有降低趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与葛连芪参方低剂量组比较,抑制剂组TNF- α 、IL-1 β 明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),AST、IL-8有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表2)

3.2 肝组织亚铁离子水平和氧化应激指标水平 与空白组比较,模型组小鼠肝脏亚铁离子含量、MDA含量显著升高($P<0.01$),GSH、SOD、T-AOC水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,药物干预后,葛连芪参方高、低剂量组亚铁离子含量、MDA含量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),GSH、SOD、T-AOC水平显著升高($P<0.01$)。与葛连芪参方低剂量组比较,抑制剂组GSH和T-AOC水平显著降低($P<0.01$),亚铁离子含量、MDA含量有升高趋势,但差异无统计学意义($P>0.05$)。(见表3)

3.3 NAFLD小鼠肝组织病理情况 空白组小鼠肝脏组织结构完整,细胞大小均匀、排列致密,细胞质清晰,细胞核位于细胞质中心,未见炎症细胞浸润;高脂饲料喂养造模后,模型组小鼠肝脏组织胞体肿胀似气球样,大量肝细胞脂肪变性,形成脂滴空泡,肝索排列紊乱,有明显的炎症细胞浸润。葛连芪参方给药干预后,肝脏组织脂肪变性减轻,脂滴变小,葛连

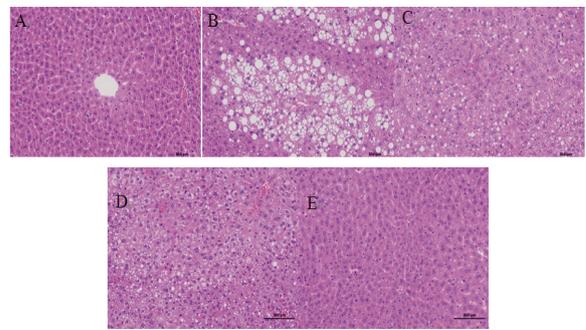
芪参方高剂量组改善情况最为明显。(见图1)

与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织红色脂滴大量堆积,提示脏组织脂质沉积严重。葛连芪参方治疗后,脂质沉积明显缓解,其中葛连芪参方高剂量组缓解情况最佳。(见图2)

表3 各组小鼠肝组织亚铁离子水平和氧化应激

指标水平比较 ($\bar{x}\pm s$)						
组别	n	亚铁离子($\mu\text{mol/g}$)	GSH(mg/g)	MDA(nmol/g)	SOD(U/g)	T-AOC($\mu\text{mol/g}$)
空白组	6	0.11 \pm 0.02	3.01 \pm 0.84	7.20 \pm 2.06	738.54 \pm 172.87	144.89 \pm 37.05
模型组	6	0.18 \pm 0.02 ^a	2.05 \pm 0.49 ^a	16.38 \pm 4.54 ^a	432.38 \pm 112.50 ^a	59.69 \pm 18.41 ^a
抑制剂组	6	0.15 \pm 0.03	2.30 \pm 0.70 ^a	12.38 \pm 2.03	600.14 \pm 58.83	88.60 \pm 5.67 ^a
葛连芪参方低剂量组	6	0.12 \pm 0.03 ^b	3.29 \pm 0.82 ^b	10.68 \pm 1.90 ^b	598.13 \pm 116.44 ^b	108.34 \pm 11.63 ^b
葛连芪参方高剂量组	6	0.11 \pm 0.03 ^b	3.57 \pm 0.77 ^b	8.43 \pm 1.84 ^b	623.36 \pm 164.88 ^b	124.87 \pm 41.33 ^b
F		7.289	5.203	9.035	5.728	7.425
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与葛连芪参方低剂量组比较,^d $P<0.01$ 。



注:A.空白组;B.模型组;C.抑制剂组;D.葛连芪参方低剂量组;E.葛连芪参方高剂量组。

图1 各组小鼠肝脏组织 HE 染色病理图 ($\times 200$)

表1 各组小鼠血脂水平和肝脏脂质水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

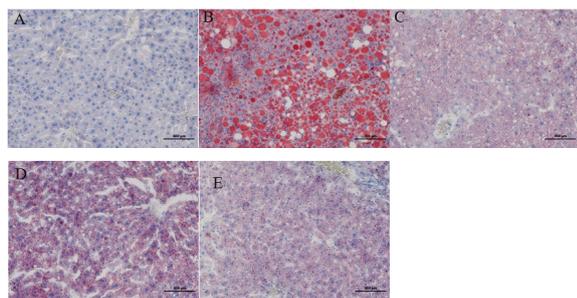
组别	n	血清TC(mmol/L)	血清TG(mg/dL)	血清LDL-C(mmol/L)	血清HDL-C(mmol/L)	肝脏TC($\mu\text{mol/g}$)	肝脏TG(mg/g)	肝脏LDL-C($\mu\text{mol/g}$)	肝脏HDL-C($\mu\text{mol/g}$)
空白组	6	0.08 \pm 0.01	19.66 \pm 6.86	8.10 \pm 2.17	0.10 \pm 0.02	8.75 \pm 1.36	17.18 \pm 4.94	12.24 \pm 1.53	3.58 \pm 1.60
模型组	6	0.55 \pm 0.02 ^a	33.15 \pm 10.52 ^a	29.03 \pm 5.96 ^a	0.39 \pm 0.10 ^a	60.66 \pm 4.96 ^a	89.76 \pm 17.50 ^a	29.53 \pm 4.02 ^a	6.63 \pm 1.51 ^a
抑制剂组	6	0.43 \pm 0.09	24.60 \pm 4.35 ^b	26.05 \pm 3.02 ^b	0.26 \pm 0.02	44.75 \pm 1.50	76.22 \pm 14.89	26.13 \pm 5.93 ^b	6.86 \pm 1.22
葛连芪参方低剂量组	6	0.35 \pm 0.02 ^b	19.66 \pm 3.69 ^b	19.38 \pm 5.88 ^b	0.20 \pm 0.08 ^b	45.95 \pm 7.61 ^b	71.15 \pm 7.73 ^b	20.58 \pm 5.24 ^b	6.19 \pm 0.53
葛连芪参方高剂量组	6	0.10 \pm 0.03 ^b	15.17 \pm 6.26 ^b	19.39 \pm 5.36 ^b	0.18 \pm 0.05 ^b	30.98 \pm 7.32 ^b	31.25 \pm 9.32 ^b	20.41 \pm 5.41 ^b	5.77 \pm 1.34
F		30.000	5.496	12.639	8.687	24.988	35.044	9.180	5.387
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$;与葛连芪参方低剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

表2 各组小鼠肝功能和炎症因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TNF- α /(ng/L)	IL-1 β /(ng/L)	IL-6/(ng/L)	IL-8/(ng/L)
空白组	6	25.28 \pm 4.51	74.69 \pm 6.86	144.66 \pm 7.59	72.91 \pm 4.90	30.71 \pm 0.80	32.22 \pm 2.83
模型组	6	68.28 \pm 6.10 ^a	167.71 \pm 19.13 ^a	182.13 \pm 11.57 ^a	84.08 \pm 6.96 ^a	35.47 \pm 2.28 ^a	38.29 \pm 2.57 ^a
抑制剂组	6	40.94 \pm 6.61 ^c	146.33 \pm 16.74	180.17 \pm 3.60 ^c	83.32 \pm 4.27 ^d	30.94 \pm 0.98	34.54 \pm 5.05
葛连芪参方低剂量组	6	51.25 \pm 4.55 ^c	137.44 \pm 4.68 ^c	162.35 \pm 6.47 ^c	80.64 \pm 7.92	31.10 \pm 1.97 ^c	32.17 \pm 3.19 ^c
葛连芪参方高剂量组	6	37.50 \pm 4.55 ^c	117.73 \pm 10.36 ^c	134.20 \pm 10.93 ^c	75.66 \pm 3.48 ^b	29.84 \pm 1.24 ^c	31.60 \pm 2.34 ^c
F		54.744	45.098	19.213	5.464	9.587	5.946
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

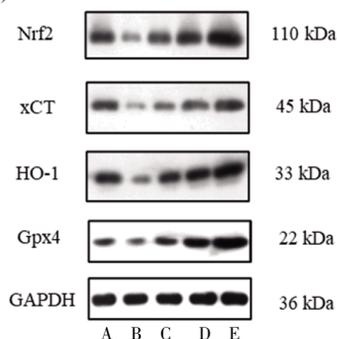
注:与空白组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$;与葛连芪参方低剂量组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。



注:A.空白组;B.模型组;C.抑制剂组;D.葛连芪参方低剂量组;E.葛连芪参方高剂量组。

图2 各组小鼠肝脏组织油红O染色病理图(×200)

3.4 Nrf2/Gpx4通路关键蛋白表达 与空白组比较,模型组小鼠肝脏组织Nrf2、xCT、HO-1、Gpx4蛋白表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。葛连芪参方灌胃治疗后,葛连芪参方低剂量组和高剂量组小鼠Nrf2、xCT、HO-1、Gpx4蛋白表达量明显升高($P<0.01$)。与葛连芪参方低剂量组比较,抑制剂组小鼠Nrf2、xCT、HO-1、Gpx4蛋白表达量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。(见图3、表4)



注:A.空白组;B.模型组;C.抑制剂组D.葛连芪参方低剂量组;E.葛连芪参方高剂量组。

图3 各组小鼠肝组织相关蛋白表达 Western blotting 条带图

表4 各组小鼠 Nrf2/Gpx4 通路关键蛋白表达情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Nrf2	xCT	Gpx4	HO-1
空白组	3	1.31 ± 0.07	1.09 ± 0.02	0.52 ± 0.02	1.48 ± 0.08
模型组	3	0.41 ± 0.01 ^b	0.27 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.02 ^a	0.92 ± 0.04 ^b
抑制剂组	3	1.10 ± 0.03 ^c	0.54 ± 0.01 ^d	0.55 ± 0.06 ^c	0.99 ± 0.01 ^c
葛连芪参方低剂量组	3	1.38 ± 0.11 ^c	0.77 ± 0.01 ^c	1.17 ± 0.11 ^c	1.11 ± 0.04 ^c
葛连芪参方高剂量组	3	1.67 ± 0.09 ^c	1.08 ± 0.05 ^c	1.64 ± 0.07 ^c	1.43 ± 0.03 ^c
F		148.145	77.282	111.552	615.411
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与空白组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型组比较,^c $P<0.01$;与葛连芪参方低剂量组比较,^d $P<0.05$,^e $P<0.01$ 。

4 讨 论

目前国内外尚没有治疗NAFLD的特效药物^[12]。研究发现,中医药在治疗NAFLD上显示出独特的优势^[13-15]。中医学将NAFLD归属为“胁痛”“积聚”“肝癖”等范畴,多因长期过食肥甘厚味,伤及脾胃,或久坐久卧,体丰积盛,脾虚失运,痰湿内聚,瘀阻经脉,痰瘀互阻,络脉不和,瘀阻肝络,滞留肝脏而致^[16]。治疗NAFLD当从脾胃入手,宜益气健脾,祛浊降脂,活血化瘀,疏理肝络^[16-17]。葛连芪参方以生黄芪、紫丹参为君药,能益

气健脾,疏肝散结;葛根和黄连为臣药,升阳清脾,化湿降浊;泽泻利水渗湿,山楂活血化瘀,麦芽甘温入胃,共为佐药;使药荷叶可清痰散瘀化浊,升发清气。全方切合NAFLD的病理病机,具有健脾疏肝、利湿祛浊化痰功效。

现代药理学研究发现,铁依赖型脂质过氧化物累积是导致NAFLD的重要因素之一,肝脏铁死亡被认为是NAFLD的早期事件,抑制铁死亡可有效缓解NAFLD^[18]。Nrf2是体内重要的抗氧化诱导型转录因子,其转录激活与铁死亡密切相关^[19]。通常情况下,Nrf2与其抑制蛋白Keap1结合,处于静息状态。当机体受到外界氧化应激或其他不利因子刺激后,Nrf2与Keap1解离活化后,游离的Nrf2进入细胞核与抗氧化元件结合,启动下游xCT、Gpx4、HO-1等蛋白的表达^[20]。Nrf2可通过上调Gpx4和xCT,提高GSH水平,减少脂质ROS累积,增强抗氧化防御,阻断铁死亡驱动的肝细胞损伤。HO-1蛋白是血红素降解途径中的关键酶,通过分解血红素产生具有抗氧化、抗炎和细胞保护作用的代谢产物,如胆红素、一氧化碳等,间接减轻细胞氧化损伤,逆转NAFLD进展^[21-22]。

本研究通过高脂饲料喂养制备小鼠NAFLD模型,结果发现,模型小鼠肝脏铁离子含量累积,脂质过氧化产物MDA含量显著升高,GSH含量显著下降,同时炎症因子水平显著上升。当给予葛连芪参方药物治疗后,小鼠血清炎症水平改善,肝脏铁离子水平、MDA含量下降,Nrf2、Gpx4、HO-1、xCT等蛋白表达升高,表明葛连芪参方可抑制铁死亡,缓解NAFLD小鼠氧化应激状态,高剂量组改善作用较低剂量组更为显著。同时给予Nrf2抑制剂鸦胆子苦醇和葛连芪参方药物组发挥抑制肝脏铁死亡缓解脂肪肝的药效作用相应减弱,说明葛连芪参方可能通过激活Nrf2/Gpx4通路治疗NAFLD。

综上所述,本研究观察了葛连芪参方对NAFLD小鼠的药效作用。研究结果表明,葛连芪参方可有效减轻NAFLD小鼠脂质累积和过氧化反应,保护肝功能,降低机体炎症水平。同时,阐明了葛连芪参方干预NAFLD的作用机制可能与激活Nrf2/Gpx4通路抑制小鼠肝脏铁死亡有关,为深入挖掘Nrf2上游靶点提供实验基础,也为该方临床应用和推广提供理论依据。

参考文献

- [1] 芦美华,李雯,崔立华,等.铁死亡在中医药治疗代谢相关性脂肪肝中的作用机制及研究进展[J].中国中西医结合外科杂志,2023,29(5):712-716.
- [2] 黎敏仪,甘海宁,黄雪君,等.银蓝调脂胶囊通过调节自噬治疗非酒精性脂肪肝的机制研究[J].中药新药与临床药理,2023,34(11):1495-1504.
- [3] 骆倩,罗涛,宋针珍,等.基于Nrf2/SLC7A11/GPX4通路探讨葛根苓连汤通过抑制铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病作用机制[J].中国比较医学杂志,2025,35(2):72-84.
- [4] 李余佳,王玲,金春,等.铁死亡的调控机制及其在肝疾病中的作用研究进展[J].中国药理学与毒理学杂志,2019,33(4):307-313.
- [5] 肖艳新,刘岩,许岭翎,等.铁死亡在非酒精性脂肪性肝病发病中作用的研究进展[J].基础医学与临床,2024,44(2):

- 260-264.
- [6] 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.
- [7] JIANG Z, SUN H, MIAO J E, et al. The natural flavone acacetin protects against high-fat diet-induced lipid accumulation in the liver via the endoplasmic reticulum stress/ferroptosis pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, 640: 183-191.
- [8] 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大鼠肝脏的保护作用[J].中国中药杂志,2024,49(6):1611-1620.
- [9] YE Q Y, JIANG Y, WU D, et al. Atractylodin alleviates nonalcoholic fatty liver disease by regulating Nrf2-mediated ferroptosis[J]. *Heliyon*, 2023, 9(7):e18321.
- [10] GAO G, XIE Z S, LI E W, et al. Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis[J]. *J Nat Med*, 2021, 75(3):540-552.
- [11] 江云,高月求,朱明清,等.C57BL/6小鼠非酒精性脂肪肝模型的建立研究[J].蚌埠医学院学报,2018,43(5):573-576.
- [12] GOLABI P, SAYINER M, FAZEL Y, et al. Current complications and challenges in nonalcoholic steatohepatitis screening and diagnosis[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 10(1):63-71.
- [13] 刘素彤,于中杰,赵文霞.中药治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J].临床肝胆病杂志,2021,37(2):458-462.
- [14] 兴安,萨仁高娃.1998—2023年中药治疗非酒精性脂肪性肝病研究文献可视化分析[J].中国中医药图书情报杂志, 2024, 48(2): 158-165.
- [15] 陈睿,刘雪莹,师荟荟,等.中药治疗非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].世界临床药物,2025,46(2):138-142.
- [16] 中华中医药学会脾胃病分会.非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识(2023)[J].中国中西医结合消化杂志,2024, 32(1):1-7.
- [17] 彭惠平,杨菊,吴坚芳,等.降脂脉安冲剂治疗非酒精性脂肪性肝病40例临床研究[J].江苏中医药,2014,46(5):32-33.
- [18] 余臣祖,张朝宁,张燕.黄金胶囊通过铁死亡对非酒精性脂肪肝病大鼠的防治作用研究[J].中国现代应用药学, 2024, 41(15):2058-2065.
- [19] BATHISH B, ROBERTSON H, DILLON J F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis and mechanisms by which it is ameliorated by activation of the CNC-bZIP transcription factor Nrf2 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 188: 221-261. [20] 杨炆,张小波,张永,等.基于Nrf2-GPX4铁死亡轴探讨黄连-红曲对小鼠非酒精性脂肪肝的影响[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(20):30-36.
- [21] 侯书鹏.银杏内酯B通过Nrf2/HO-1通路抑制糖尿病大鼠肝损伤机制研究[J].陕西中医,2021,42(8):1005-1009.
- [22] 曹佳岑,张宏坤,赵文,等.血红素氧合酶1调节铁死亡在非酒精性脂肪性肝病中的研究进展[J].中国全科医学, 2024, 27(14):1782-1788.

(收稿日期:2025-05-07 编辑:罗英姣)

(上接第35页)

- [13] 林方政,陈树东,林定坤,等.基于筋骨失衡论慢性筋骨病的辨证分型理念及治疗[J].上海中医药杂志,2021,55(12):6-11.
- [14] 刘迪一.中医“筋”理论研究[D].北京:中国中医科学院,2019.
- [15] 张俊武.新编实用医学词典[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1994:886.
- [16] 庞青民,赵欲晓,邵素菊,等.醒脑开窍针刺法通过调控mTOR-EAAT2通路影响脑卒中后痉挛大鼠大脑皮层神经递质代谢[J].中国病理生理杂志,2021,37(11):2001-2007.
- [17] 梁文锐,伍明,杜灿荣,等.不同频率重复经颅磁刺激对脊髓损伤大鼠肌痉挛及运动功能的影响及机制研究[J].按摩与康复医学,2021,12(23):39-41,45.
- [18] 马婧,陈慧敏,张凌韬,等.运动疲劳小鼠皮层-纹状体突触可塑性受损的机制研究[J].中国体育科技,2022,58(1):65-71.
- [19] 马忆南.闭合性软组织损伤造模方法及存在问题的研究[J].中国现代医学杂志,2014,24(3):20-23.
- [20] HUANG Q M, LV J J, RUANSHIQ M, et al. Spontaneous electrical activities at myofascial trigger points at different stages of recovery from injury in a rat model[J]. *Acupunct Med*, 2015, 33(4):319-324.
- [21] 郭少卿,徐基民,马彦韬,等.基于筋膜触发点的研究探讨针灸穴位和经络本质[J].中国针灸,2021,41(6):633-640.
- [22] 杨玉龙,杨文明,汪瀚,等.基于数字化肌肉功能评估系统Myoton PRO探讨肝豆状核变性患者肌张力与临床特征及中医证型的相关性[J/OL].中国实验方剂学杂志,1-8 [2025-03-25].<https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20241896>.
- [23] KURASHINA W, IJIMA Y, SASANUMA H, et al. Evaluation of muscle stiffness in adhesive capsulitis with Myoton PRO[J]. *JSES Int*, 2023, 7(1):25-29.
- [24] 艾珏萍.揉法对兔骨骼肌钝性损伤组织机化期修复相关蛋白Fibronectin、CTGF表达的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2021.
- [25] 禾学晶,张巧德,陈颜霞,等.松肌复式推拿对肌肉劳损治疗效果的例证及有关机制探讨[J].实用医药杂志,2018, 35(5):397-399.

(收稿日期:2025-03-26 编辑:蒋凯彪)