

# 膈下逐瘀汤抑制铁死亡干预代谢相关脂肪性肝病的作用机制<sup>Δ</sup>

赵玉强<sup>1\*</sup>, 王自有<sup>1</sup>, 李安琪<sup>1</sup>, 赵佩然<sup>1</sup>, 王锐<sup>2</sup>, 杨婧<sup>1#</sup>(1. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R965;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2024)24-2977-07  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.24.03



**摘要** 目的 基于铁死亡角度探讨膈下逐瘀汤干预代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)的潜在作用机制。方法 借助网络药理学方法,筛选膈下逐瘀汤干预MAFLD铁死亡的中心靶点,并进行基因本体、京都基因和基因组数据库富集分析和分子对接。将发育正常的受精后3 d的斑马鱼幼鱼随机分为对照组、模型组(5 mmol/L 硫代乙酰胺)、异甘草酸镁组(阳性对照,5 mg/mL)和膈下逐瘀汤低、中、高质量浓度组(20、40、80 μg/mL,以生药量计),培养72 h后检测其体内丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、活性氧(ROS)、铁离子(Fe<sup>2+</sup>)含量,观察其肝组织细胞结构和肝脏脂肪变性情况,检测其沉默信息调节因子1(SIRT1)、核转录因子红系2相关因子2(Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)蛋白的表达水平。**结果** 膈下逐瘀汤潜在活性成分作用于MAFLD铁死亡的8个中心靶点包括肿瘤蛋白p53、SIRT1、Nrf2等;其富集于RNA聚合酶II启动子转录的正/负向调控等生物过程,细胞核、细胞质等细胞成分,蛋白质结合等分子功能,以及铁死亡、癌症途径等信号通路,且可与主要活性成分紧密结合。与模型组比较,各药物组斑马鱼幼鱼体内ALT、AST、TC、TG、MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>含量均显著降低,SOD、GSH含量均显著升高( $P<0.05$ ),其肝组织细胞病理损伤情况均有所改善、肝脏脂质蓄积均有所减少,SIRT1、Nrf2、GPX4蛋白的表达均显著上调( $P<0.05$ )。**结论** 膈下逐瘀汤可调节MAFLD模型斑马鱼幼鱼的脂质代谢,改善其氧化应激水平,维持其体内Fe<sup>2+</sup>稳态,抑制其铁死亡进程,上述作用可能与激活SIRT1/Nrf2/GPX4轴有关。**关键词** 膈下逐瘀汤;代谢相关脂肪性肝病;铁死亡;SIRT1/Nrf2/GPX4轴;网络药理学

## Mechanism of Gexia zhuyu decoction in the intervention of metabolic-associated fatty liver disease by inhibiting ferroptosis

ZHAO Yuqiang<sup>1</sup>, WANG Ziyou<sup>1</sup>, LI Anqi<sup>1</sup>, ZHAO Peiran<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>2</sup>, YANG Jing<sup>1</sup>(1. School of Basic Medical Sciences, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. School of Pharmacy, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE** To explore the potential mechanism of action of Gexia zhuyu decoction in the intervention of metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) based on ferroptosis. **METHODS** With the help of network pharmacology, the central targets of Gexia zhuyu decoction intervening in ferroptosis of MAFLD were screened, then gene ontology, Kyoto Encyclopedia Gene and Genomes enrichment analysis and molecular docking were performed. Juvenile zebrafish with normal development at 3 d post-fertilization were randomly divided into control group, model group (5 mmol/L thioacetamide), magnesium isoglycyrrhizinate group (positive control, 5 mg/mL), and Gexia zhuyu decoction low-, medium- and high-concentration groups (20, 40, 80 μg/mL, calculated by crude drugs). After cultured for 72 h, the contents of alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), reactive oxygen species (ROS) and Fe<sup>2+</sup> were determined; the cellular structure of the liver tissues and hepatic steatosis were observed; the protein expression of silence information regulator 1 (SIRT1), nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected. **RESULTS** The central targets of potential active ingredients of Gexia zhuyu decoction that act on ferroptosis in MAFLD included tumor proteins p53, SIRT1, Nrf2, etc., which were enriched in biological processes such as positive/negative regulation of RNA polymerase II promoter transcription, cellular components such as nucleus and cytoplasm, molecular functions such as protein binding, as well as signaling pathways such as ferroptosis and the cancer pathway, and they might be tightly linked to the main active ingredients. Compared with model group, the contents of ALT, AST, TC, TG, MDA, ROS and Fe<sup>2+</sup> were all decreased significantly in each administration group, while the contents of SOD and GSH

<sup>Δ</sup>基金项目 国家自然科学基金项目(No.82074271)  
\*第一作者 硕士研究生。研究方向:代谢相关脂肪性肝病相关机制。E-mail:zyq1883276938@163.com  
#通信作者 教授,硕士生导师,博士。研究方向:代谢相关脂肪性肝病相关机制研究及新药开发。E-mail:yangjingdr@sina.com

were increased significantly ( $P<0.05$ ); the pathological damage of liver tissue cells had improved, and the accumulation of liver lipids had decreased. The protein expressions of SIRT1, Nrf2 and GPX4 had been significantly upregulated ( $P<0.05$ ). **CONCLUSIONS** Gexia zhuyu decoction can regulate lipid metabolism, improve the level of oxidative stress, maintain  $Fe^{2+}$  homeostasis, and inhibit the process of ferroptosis in juvenile zebrafish with MAFLD, and the above effects may be related to the activation of the SIRT1/Nrf2/GPX4 axis.

**KEYWORDS** Gexia zhuyu decoction; metabolic-associated fatty liver disease; ferroptosis; SIRT1/Nrf2/GPX4 axis; network pharmacology

代谢相关脂肪性肝病(metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD)原名为非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD),是一种临床常见的慢性肝病,可进一步引发非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌,最终导致患者肝衰竭<sup>[1]</sup>。该病以肝脏脂肪蓄积为主要特征,不仅涉及传统的NAFLD,而且涵盖其他的肝脏代谢失调<sup>[2]</sup>。随着人们生活作息和膳食习惯的改变,MAFLD的发病率(全球约25%,亚洲约27%)逐年升高,已成为全球性健康问题之一<sup>[3]</sup>。目前,运动和饮食是干预MAFLD的有效手段,但上述手段存在一定的局限性(如患者无法坚持合理的治疗方案等),使得患者的治疗和预后受到影响<sup>[3]</sup>,因此有必要寻找新的治疗方法。

膈下逐瘀汤出自清代王清任的《医林改错》,具有活血化瘀、破瘀消结的功效,主要用于治疗肝炎、糖尿病和不孕症等。方中,当归、川芎、赤芍养血活血,桃仁、红花、五灵脂破血逐瘀,配香附、乌药、枳壳、延胡索、牡丹皮行气止痛,辅甘草调和诸药,是中医活血化瘀的经典方<sup>[4]</sup>。研究显示,膈下逐瘀汤具有抗肝纤维化的作用,可减轻四氯化碳所致的大鼠肝纤维化<sup>[5]</sup>。铁死亡是一种细胞程序性死亡的新形式,与其他典型的细胞死亡形式(如凋亡、坏死、热解、自噬依赖性细胞死亡)相比,铁死亡具有不同的生物化学、形态学和遗传学特征<sup>[6]</sup>。越来越多的证据表明,细胞铁死亡在MAFLD等慢性肝脏疾病的病理过程中具有关键作用<sup>[7]</sup>。可见,抑制细胞铁死亡可能成为未来治疗MAFLD的新策略。谷胱甘肽(glutathione, GSH)是铁死亡途径的调控因子之一,而研究表明,膈下逐瘀汤可增强肝组织中GSH抗氧化系统的活性<sup>[8]</sup>,提示该方可能影响MAFLD的铁死亡进程。为验证这一假设,本研究基于网络药理学和斑马鱼实验从铁死亡角度探究了膈下逐瘀汤干预MAFLD的作用机制,旨在为该病的临床治疗提供新思路。

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有Multiskan SkyHigh型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),DM3000型光学显微镜、RM2235型石蜡病理切片(德国Leica公司),WD-9423B型化学发光分析仪、DYCZ-2DN型电泳仪、WD-9405F型脱色摇床(北京六一生物科技有限公司),ES600型全自动包埋机(金华市华速科技有限公司)等。

### 1.2 主要药品与试剂

膈下逐瘀汤的组方药材包括当归、桃仁、甘草、红花、五灵脂、川芎、牡丹皮、赤芍、乌药、香附、枳壳、延胡索,上述药材饮片均购自黑龙江中医药大学第一附属医院中药房,经黑龙江中医药大学药学院中药资源教研室周博副教授鉴定均为真品。

异甘草酸镁注射液[批号20211101204,规格10 mL:50 mg(以 $C_{42}H_{60}MgO_{16}$ 计)]购自正大天晴药业集团股份有限公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)液、快速转膜缓冲液、BCA蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE凝胶、聚偏氟乙烯膜、组织固定液、RIPA裂解液、苏木精染液、伊红染液、油红O染液(批号分别为G2081-15、G2028-15、G2026-200T、G2175-50T、G6044-0.45、G1101、G2002、G1004、G1001、G1015)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔源沉默信息调节因子1(silence information regulator 1, SIRT1)多克隆抗体(批号13161-1-A)购自美国Proteintech公司;鼠源核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)单克隆抗体、鼠源谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)单克隆抗体(批号分别为sc-365949、sc-166570)均购自美国SantaCruz公司;鼠源 $\beta$ -肌动蛋白单克隆抗体和Alexa Fluor<sup>®</sup> 488标记的山羊抗鼠、山羊抗兔IgG二抗(批号分别为ab170325、ab150113、ab150077)均购自英国Abcam公司;总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、天冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)、丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、GSH、组织铁检测试剂盒(批号分别为A111-2-1、A110-1-1、C010-2-1、C009-3-1、E004-1-1、A003-1-2、A001-3-2、A005-1-2、A039-2-1)均购自南京建成生物工程研究所;硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA;批号B65934)购自上海源叶生物科技有限公司;斑马鱼培养液(每4 L水含海盐1.33 g、碳酸氢钠0.4 g、甲基蓝1.5 mL)购自上海费曦生物科技有限公司。

### 1.3 实验动物

实验用斑马鱼为健康AB系野生型斑马鱼,雌雄各半,购自杭州环特生物科技股份有限公司[动物生产许可证号SCXK(浙)2022-0003]。所有斑马鱼均于28 °C恒温、光(14 h)/暗(10 h)循环条件下适应性喂养1周。

分别取雌性和雄性斑马鱼1条,放在交配容器中,用隔板隔开,待适应后取出隔板让其自然交配,并在交配后的第2天早上收集胚胎。本动物实验方案由黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号2021052701)。

## 2 方法与结果

### 2.1 网络药理学分析

#### 2.1.1 膈下逐瘀汤活性成分及对应靶点的筛选

在TCMSP数据库中检索膈下逐瘀汤12味中药的化学成分,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 $\geq 0.18$ 为标准筛选该方的潜在活性成分<sup>[9]</sup>;同时,以各组方药材名称为检索词,在中国知网中查询相关文献进行补充。将筛选得到的潜在活性成分导入PubChem数据库,查询各成分的化学结构并保存为“smiles”格式;将上述格式文件导入Swiss Target Prediction数据库,设置物种为“Homo sapiens”,以 $P>0$ 为阈值进行靶点预测<sup>[9]</sup>,得到潜在活性成分对应靶点;将膈下逐瘀汤的潜在活性成分及其对应靶点录入Cytoscape软件,构建“药物-成分-靶点”网络,并利用该软件的“CytoNCA”插件计算网络中各节点的度值(degree),获取排前10位的主要活性成分。

结果显示,共筛选得到潜在活性成分277个及对应靶点1 030个,由所得膈下逐瘀汤“药物-成分-靶点”网络(图略)可见,degree排前10位的主要活性成分依次为槲皮素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、谷甾醇、豆甾醇、异鼠李素、罗痛定、木犀草素、黄芩素、柚皮素。

#### 2.1.2 膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡的中心靶点筛选

利用GeneCards和OMIM数据库获得MAFLD相关靶点;从FerrDb数据库中筛选铁死亡相关靶点。将“2.1.1”项下所得膈下逐瘀汤潜在活性成分对应靶点、MAFLD相关靶点和铁死亡相关靶点取交集,并使用Venny 2.1.0在线工具绘制韦恩图,得到膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡的潜在靶点。将上述靶点导入STRING数据库构建蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,利用Cytoscape软件进行可视化展示,并利用该软件的“CytoNCA”插件计算各网络中节点degree、中介中心性(betweenness centrality, BC)、接近中心性(closeness centrality, CC)、度中心性(degree centrality, DC),根据上述参数的中位数进行二次筛选,得膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡的中心靶点<sup>[10]</sup>。

结果显示,共筛选得到MAFLD相关靶点1 788个、铁死亡相关靶点484个;由上述靶点与膈下逐瘀汤潜在活性成分对应靶点(1 030个)取交集的韦恩图(图略)可见,共得到三者交集靶点50个;由交集靶点的PPI网络(图略)及其degree、BC、CC等相关参数可知,膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡的中心靶点共8个,包括肿瘤蛋白p53(tumor protein p53, TP53)、JUN、低氧诱导因子1 $\alpha$ (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF1A)、信号转导及转录激活蛋白(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、SIRT1、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,

IL-1 $\beta$ )、Nrf2、酰基辅酶A合成酶长链家族成员(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)。

#### 2.1.3 中心靶点的富集分析

将“2.1.2”项下所得膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡的中心靶点导入DAVID数据库进行基因本体(gene ontology, GO)和京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析。其中,GO富集分析包括生物过程(biological process, BP)、细胞成分(cellular components, CC)和分子功能(molecular function, MF),KEGG富集以 $P<0.05$ 为标准筛选膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡所涉及的通路<sup>[10]</sup>。

GO富集分析结果(图1A)表明,中心靶点的BP主要涉及RNA聚合酶II启动子转录的正向/负向调控、基因表达的正向调控、细胞凋亡过程的正向调控、细胞对缺氧的反应、对药物的反应等;CC主要包括细胞核、细胞溶质、细胞质、核原形质等;MF主要包括蛋白质结合、酶结合、RNA聚合酶II核心启动子近端区序列特异性DNA结合、DNA结合等。KEGG通路分析结果显示,lgP排序前20条通路(图1B)除铁死亡本身外,还涉及癌症途径、结肠直肠癌、脂质和动脉粥样硬化、叉头框转录因子O信号通路、酒精性肝病、胰腺癌、志贺氏菌病等。

#### 2.1.4 分子对接

本研究将膈下逐瘀汤的主要活性成分与该方作用于MAFLD铁死亡过程的中心靶点进行分子对接,具体过程如下:利用TCMSP数据库下载主要活性成分(槲皮素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、谷甾醇、豆甾醇、异鼠李素、罗痛定、木犀草素、黄芩素、柚皮素)的结构图,以“SDF”格式保存;使用OpenBabel GUL软件将上述“SDF”格式文件转换为“PDB”格式,同时利用PDB数据库下载中心靶点(TP53、JUN、HIF1A、STAT3、SIRT1、IL-1 $\beta$ 、Nrf2、ACSL4)的三维结构图,保存为“PDB”格式;然后将主要活性成分及中心靶点的“PDB”格式文件导入AutoDock软件进行分子对接。由主要活性成分与中心靶点分子对接的结合能(图2)可知,SIRT1、Nrf2与各主要活性成分的结合能均较高,结合本课题组前期研究及既往研究结果<sup>[8,11]</sup>,本研究选择SIRT1/Nrf2/GPX4轴,从铁死亡角度分析膈下逐瘀汤干预MAFLD的潜在机制。

## 2.2 实验验证

### 2.2.1 药液的配制

参照《医林改错》和本课题组前期研究<sup>[9]</sup>,取膈下逐瘀汤各组方药材,按当归-桃仁-甘草-红花-五灵脂-川芎-牡丹皮-赤芍-乌药-香附-枳壳-延胡索质量比6:6:6:6:4:4:4:4:4:3:3:2混合,加10倍量水浸泡1h,以武火煮沸后再以文火煎1h,过滤;向药渣中加入8倍量水,以文火煎煮30min,过滤;合并2次滤液,经浓缩、冷冻干燥后,得膈下逐瘀汤冻干粉(得率约22.7%)。使用前,称取冻干粉适量,溶于磷酸盐缓冲液(PBS)中,配制成质量浓度为200 mg/mL(以生药量计,下同)的母液,再以PBS稀释至所需质量浓度。

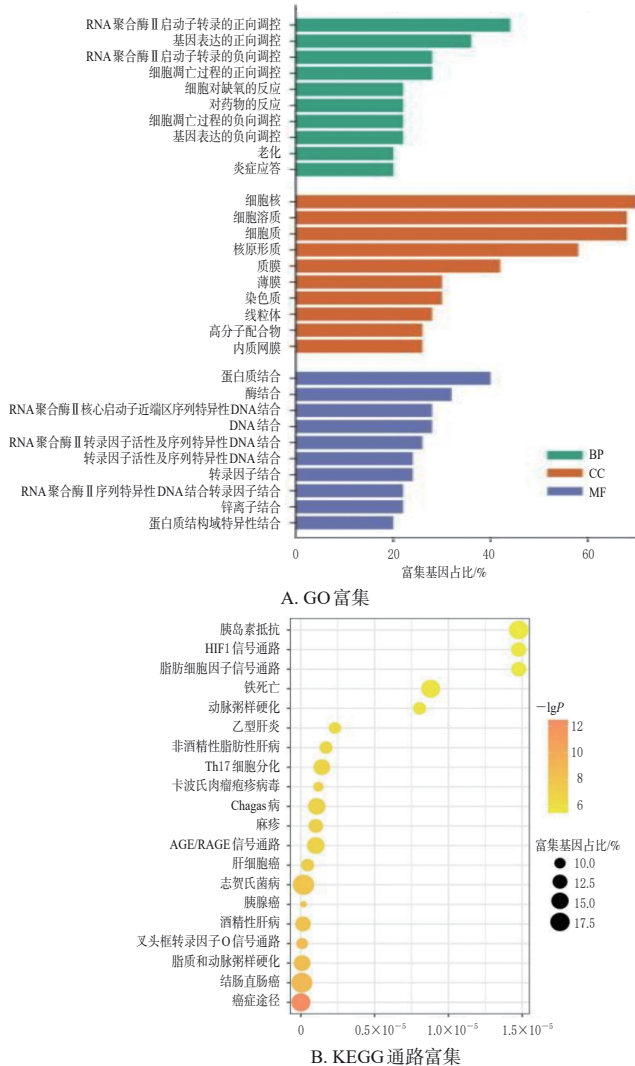


图1 中心靶点的GO富集及KEGG通路富集分析

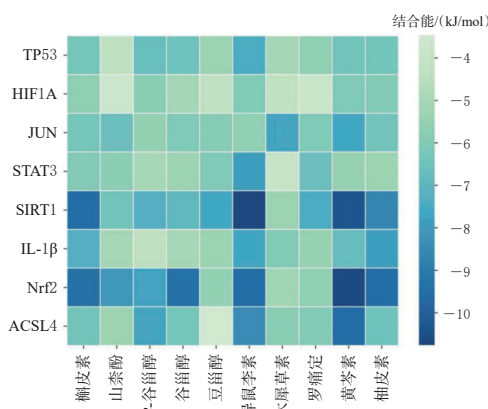


图2 膈下逐瘀汤基于铁死亡改善MAFLD的潜在靶点和主要活性成分的分子对接热图

### 2.2.2 膈下逐瘀汤干预浓度的确定

取斑马鱼胚胎,待其发育。取发育正常的受精后3 d(3 days post fertilization, 3 dpf)的斑马鱼幼鱼,置于6孔板中,随机分为不同质量浓度药物组(每个质量浓度30条),吸弃培养液,每孔加入0~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的膈下逐瘀汤药液6 mL,于28.5  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养,每隔24 h更换1

次药液并及时移去死亡的幼鱼。培养72 h后,观察并统计斑马鱼幼鱼的存活情况,绘制致死曲线。

结果(图3)显示,随着药物暴露浓度的升高,斑马鱼幼鱼死亡逐渐增多,有一定的浓度依赖趋势;膈下逐瘀汤的最大非致死浓度为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,但该剂量可导致幼鱼抽动;同时,笔者在实验中发现,该方的最大非致畸浓度为80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,故选取该浓度为高质量浓度,20、40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为低、中质量浓度,进行后续实验。

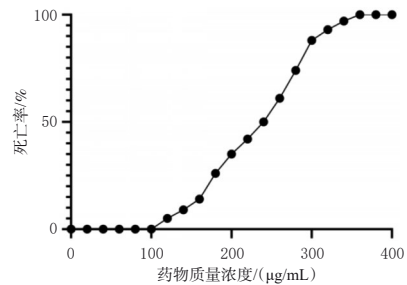


图3 不同质量浓度膈下逐瘀汤作用于斑马鱼幼鱼的致死曲线

### 2.2.3 分组、造模与给药

取正常发育的3 dpf斑马鱼幼鱼,置于6孔板中,随机分为对照组(con组)、模型组(mod组)、异甘草酸镁组(阳性对照,5 mg/mL)和膈下逐瘀汤低、中、高质量浓度组(20、40、80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。con组加入斑马鱼培养液6 mL,mod组加入TAA(终浓度为5 mmol/L,以斑马鱼培养液为溶剂,下同)6 mL,各药物组加入TAA 3 mL和相应质量浓度药液3 mL。各组斑马鱼幼鱼均在28  $^{\circ}\text{C}$ 恒温、光(14 h)/暗(10 h)循环条件下培养72 h,每天更换培养液或药液。TAA浓度、异甘草酸镁质量浓度参考本课题组前期研究和相关文献确定<sup>[8,12]</sup>。

### 2.2.4 斑马鱼幼鱼体内ALT、AST、TC、TG、MDA、SOD、GSH、ROS含量检测

按“2.2.3”项下方法分组(每组20条)、造模、给药。培养72 h后,取各组斑马鱼幼鱼,用预冷PBS清洗3次后,加入无水乙醇300  $\mu\text{L}$ 匀浆,按相应试剂盒说明书操作,以酶标仪检测其体内ALT、AST、TC、TG、MDA、SOD、GSH、ROS含量。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 25.0软件进行统计分析,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用SNK-*q*检验(检验水准 $\alpha=0.05$ ,统计方法下同)。

结果(表1)显示,与con组比较,mod组斑马鱼幼鱼体内ALT、AST、TC、TG、MDA、ROS含量均显著升高,SOD、GSH含量均显著降低( $P<0.05$ );与mod组比较,各药物组斑马鱼幼鱼体内ALT、AST、TC、TG、MDA、ROS含量均显著降低,SOD、GSH含量均显著升高( $P<0.05$ )。

表1 膈下逐瘀汤对MAFLD模型斑马鱼幼鱼生化指标的影响( $\bar{x} \pm s, n=20$ )

组别	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TC/( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	TG/(mmol/mg)	MDA/(mmol/mg)	SOD/(U/mg)	GSH/( $\mu\text{mol}/\text{mg}$ )	ROS
con组	65.256 $\pm$ 6.378	3.200 $\pm$ 0.392	2.247 $\pm$ 0.060	0.052 $\pm$ 0.002	0.392 $\pm$ 0.019	26.309 $\pm$ 0.601	23.505 $\pm$ 1.301	3.343 $\pm$ 0.054
mod组	137.594 $\pm$ 7.189 <sup>a</sup>	7.653 $\pm$ 0.316 <sup>a</sup>	2.941 $\pm$ 0.090 <sup>a</sup>	0.083 $\pm$ 0.001 <sup>a</sup>	0.860 $\pm$ 0.032 <sup>a</sup>	12.882 $\pm$ 0.631 <sup>a</sup>	15.500 $\pm$ 0.714 <sup>a</sup>	6.746 $\pm$ 0.214 <sup>a</sup>
异甘草酸镁组	81.671 $\pm$ 2.044 <sup>b</sup>	3.814 $\pm$ 0.262 <sup>b</sup>	2.399 $\pm$ 0.029 <sup>b</sup>	0.065 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.576 $\pm$ 0.024 <sup>b</sup>	22.677 $\pm$ 0.910 <sup>b</sup>	21.436 $\pm$ 0.740 <sup>b</sup>	4.774 $\pm$ 0.434 <sup>b</sup>
膈下逐瘀汤低质量浓度组	108.548 $\pm$ 6.418 <sup>b</sup>	6.588 $\pm$ 0.167 <sup>b</sup>	2.757 $\pm$ 0.046 <sup>b</sup>	0.074 $\pm$ 0.004 <sup>b</sup>	0.745 $\pm$ 0.037 <sup>b</sup>	14.477 $\pm$ 0.451 <sup>b</sup>	17.793 $\pm$ 1.156 <sup>b</sup>	6.093 $\pm$ 0.157 <sup>b</sup>
膈下逐瘀汤中质量浓度组	91.228 $\pm$ 6.942 <sup>b</sup>	5.950 $\pm$ 0.388 <sup>b</sup>	2.477 $\pm$ 0.109 <sup>b</sup>	0.067 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.689 $\pm$ 0.030 <sup>b</sup>	17.213 $\pm$ 0.632 <sup>b</sup>	16.935 $\pm$ 0.553 <sup>b</sup>	4.276 $\pm$ 0.124 <sup>b</sup>
膈下逐瘀汤高质量浓度组	90.534 $\pm$ 2.554 <sup>b</sup>	5.835 $\pm$ 0.514 <sup>b</sup>	2.302 $\pm$ 0.070 <sup>b</sup>	0.057 $\pm$ 0.007 <sup>b</sup>	0.666 $\pm$ 0.031 <sup>b</sup>	21.417 $\pm$ 2.174 <sup>b</sup>	20.091 $\pm$ 0.358 <sup>b</sup>	5.247 $\pm$ 0.067 <sup>b</sup>

a: 与con组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与mod组比较,  $P < 0.05$ 。

### 2.2.5 斑马鱼幼鱼体内铁离子含量检测

按“2.2.3”项下方法分组(每组10条)、造模、给药。培养72 h后,取各组斑马鱼幼鱼,用预冷PBS清洗3次后,加入无水乙醇300  $\mu\text{L}$ 匀浆。按照相应试剂盒说明书和相关文献<sup>[13]</sup>操作,以酶标仪检测其体内铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )含量。

结果显示,con组斑马鱼幼鱼体内 $\text{Fe}^{2+}$ 含量为(12.43 $\pm$ 0.88)mg/g;与con组比较,mod组斑马鱼幼鱼体内 $\text{Fe}^{2+}$ 含量[(18.49 $\pm$ 0.56)mg/g]显著升高( $P < 0.05$ );与mod组比较,异甘草酸镁组和膈下逐瘀汤低、中、高质量浓度组斑马鱼幼鱼体内 $\text{Fe}^{2+}$ 含量[(13.55 $\pm$ 1.12)、(16.81 $\pm$ 0.46)、(16.48 $\pm$ 0.39)、(15.37 $\pm$ 0.90)mg/g]均显著降低( $P < 0.05$ )。

### 2.2.6 斑马鱼幼鱼肝组织病理学观察

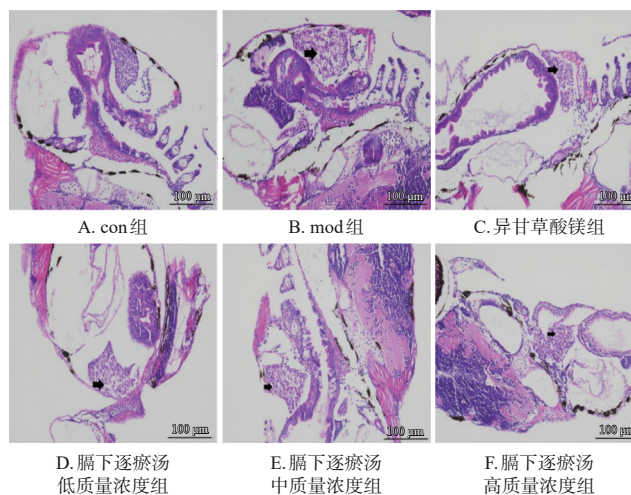
按“2.2.3”项下方法分组(每组20条)、造模、给药。培养72 h后,取各组斑马鱼幼鱼(每组10条),以4%组织固定液固定24 h,脱水后于65  $^{\circ}\text{C}$ 下进行石蜡包埋、切片,再使用苏木精、伊红染液染色10 min,使用显微镜观察其肝组织细胞结构。另取各组斑马鱼幼鱼(每组剩余10条),在4  $^{\circ}\text{C}$ 下以4%组织固定液固定过夜,用PBS洗涤3次,依次于室温下在25%、50%、75%、100%的1,2-丙二醇溶液中有序浸泡20 min,再于室温下以0.5%油红O染液染色12 h,用显微镜观察其肝脏脂肪变性情况。

苏木精-伊红(HE)染色结果(图4)显示,con组斑马鱼幼鱼肝组织细胞大小均一、形状规则、排列整齐,细胞核基本分布于细胞中心;细胞膜光滑,细胞器结构清晰,均匀分布在细胞质内。mod组斑马鱼幼鱼肝组织可见少量空泡,细胞质疏松。各药物组斑马鱼幼鱼的肝组织病理损伤较mod组均有所改善,但仍不及con组。

油红O染色结果(图5)显示,与con组比较,mod组斑马鱼幼鱼可见明显的肝脏肿大,肝组织染色呈深红色,轮廓不清晰,肝脏脂质蓄积严重;各药物组斑马鱼幼鱼肝组织颜色深于con组但浅于mod组,提示其肝脏脂质蓄积均较mod组有所减轻,但仍不及con组。

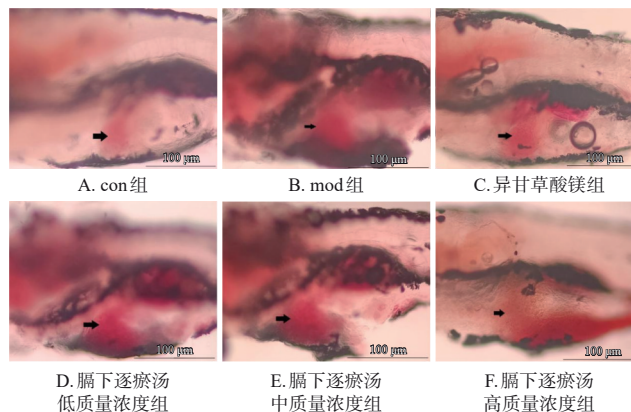
### 2.2.7 斑马鱼幼鱼体内SIRT1、Nrf2、GPX4蛋白表达检测

按“2.2.3”项下方法分组(每组30条)、造模、给药。培养72 h后,取各组斑马鱼幼鱼,使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液于冰上裂解、离心后收集上清液,使用BCA试剂盒检测蛋白浓度并作变性处理。取变性蛋白



箭头: 肝组织细胞结构损伤区域。

图4 膈下逐瘀汤对MAFLD模型斑马鱼幼鱼肝组织细胞结构影响的显微图(HE染色)



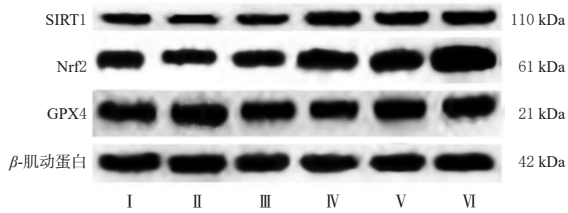
箭头: 肝脏脂质蓄积区域。

图5 膈下逐瘀汤对MAFLD模型斑马鱼幼鱼肝脏脂肪变性影响的显微图(油红O染色)

适量,进行10%SDS-PAGE分离并转移到聚偏氟乙烯膜上,以5%脱脂奶粉于室温下封闭2 h;加入SIRT1、Nrf2、GPX4、 $\beta$ -肌动蛋白一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:2 000),于4  $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例均为1:5 000),于室温下孵育1 h后,以化学发光试剂盒显色后成像。使用Image J软件对各蛋白条带灰度值进行分析,以 $\beta$ -肌动蛋白为内参,计算各目的蛋白的表达水平。

结果(图6、表2)显示,与con组比较,mod组斑马鱼幼鱼体内SIRT1、Nrf2、GPX4蛋白的表达均显著下调

( $P < 0.05$ );与 mod 组比较,各药物组斑马鱼幼鱼体内上述蛋白的表达均显著上调( $P < 0.05$ )。



I: con组; II: mod组; III: 异甘草酸镁组; IV: 膈下逐瘀汤低质量浓度组; V: 膈下逐瘀汤中质量浓度组; VI: 膈下逐瘀汤高质量浓度组。

图6 膈下逐瘀汤对MAFLD模型斑马鱼幼鱼体内相关蛋白表达影响的电泳图

表2 膈下逐瘀汤对MAFLD模型斑马鱼幼鱼体内相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 30$ )

组别	SIRT1/ $\beta$ -肌动蛋白	Nrf2/ $\beta$ -肌动蛋白	GPX4/ $\beta$ -肌动蛋白
con组	0.57 ± 0.03	0.40 ± 0.08	0.81 ± 0.16
mod组	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.04 <sup>a</sup>
异甘草酸镁组	0.47 ± 0.13 <sup>b</sup>	0.26 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.82 ± 0.23 <sup>b</sup>
膈下逐瘀汤低质量浓度组	0.48 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.78 ± 0.10 <sup>b</sup>
膈下逐瘀汤中质量浓度组	0.78 ± 0.06 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.75 ± 0.05 <sup>b</sup>
膈下逐瘀汤高质量浓度组	0.79 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.14 <sup>b</sup>	0.92 ± 0.27 <sup>b</sup>

a: 与con组比较,  $P < 0.05$ ; b: 与mod组比较,  $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

在临床应用中,相较于靶点单一、毒副作用大、疗效差的化学药物,中药多组分、多途径、多靶点协同作用的优势日益凸显。本研究借助网络药理学分析方法和分子对接手段,挖掘膈下逐瘀汤作用于MAFLD铁死亡的潜在靶点及信号通路:首先,本研究通过检索TCMSP数据库和中国知网共获取膈下逐瘀汤的潜在活性成分277个,并检索得到相应靶点1030个;进一步根据预测结果构建“药物-成分-靶点”网络,得到该方主要活性成分,即槲皮素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、谷甾醇、豆甾醇、异鼠李素、罗痛定、木犀草素、黄芩素、柚皮素;然后,本研究将所得膈下逐瘀汤潜在活性成分对应靶点、MAFLD相关靶点和铁死亡相关靶点取交集并构建交集靶点PPI网络,确定了该方作用于MAFLD铁死亡的中心靶点,即TP53、JUN、HIF1A、STAT3、SIRT1、IL-1 $\beta$ 、Nrf2、ACSL4;最后,本研究继续对交集靶点进行GO富集和KEGG通路富集分析,并通过分子对接验证了主要活性成分和中心靶点的结合情况。上述结果提示,膈下逐瘀汤对MAFLD的干预作用可能是通过铁死亡相关通路来实现的。根据上述结果和既往研究<sup>[8,11]</sup>,本研究选择了SIRT1/Nrf2/GPX4轴,作为后续动物验证实验的切入点。

斑马鱼是常被用于发育和药物研究的优秀模型动物,具有成本低、发育快等优点,其胚胎及幼鱼的光学透明度有助于器官发育和生物过程的无创观察<sup>[14]</sup>。研究指出,与大部分哺乳动物一样,斑马鱼也会出现脂肪变性,可逐渐演变为MAFLD,并最终进展为肝细胞癌,可用于MAFLD的病理研究和药物干预评估<sup>[15]</sup>。基于此,

本研究选择TAA诱导的斑马鱼幼鱼MAFLD模型,从铁死亡角度初步验证膈下逐瘀汤对MAFLD的干预机制。

选自《医林改错》的膈下逐瘀汤可养血调肝、化瘀行滞,具有调节炎症因子和止痛等作用<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,膈下逐瘀汤可降低MAFLD模型斑马鱼幼鱼体内ALT、AST含量,减轻其肝损伤程度;可改善斑马鱼幼鱼肝脏脂肪变性和脂质蓄积,并可降低TC、TG含量;可降低MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup>含量,提高SOD、GSH含量,可见该方可调节MAFLD模型斑马鱼幼鱼的脂质代谢,改善氧化应激水平,维持其体内Fe<sup>2+</sup>稳态。

Nrf2是氧化应激相关基因表达的重要调节因子,可调节铁死亡调控因子GSH的表达,Nrf2信号通路的激活可使肝组织中GSH抗氧化活性增强<sup>[17]</sup>。可见,Nrf2可能是MAFLD的潜在治疗靶点。SIRT1可使Nrf2去乙酰化,并防止其泛素化,从而促进Nrf2在细胞核中的积累并增强其转录活性,故而靶向SIRT1可通过减少氧化应激和促进组织再生来减轻肝组织损伤<sup>[18]</sup>。GPX4在铁死亡过程中具有重要的调节作用,可将脂质过氧化氢转化为无毒的脂醇,从而阻断脂质过氧化物的发生;同时,GPX4可调控转换由铁积累所产生的磷脂过氧化<sup>[19]</sup>。如果铁死亡过程的任一环节受到破坏,GPX4的活性就会降低,从而导致过氧化物在细胞内积累,最终诱发铁死亡<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,与con组比较,mod组斑马鱼幼鱼体内SIRT1、Nrf2、GPX4蛋白的表达均显著下调,而膈下逐瘀汤可改善这一情况。与异甘草酸镁相同,膈下逐瘀汤可上调斑马鱼幼鱼体内SIRT1蛋白的表达,提高Nrf2的转录活性,进一步激活Nrf2信号通路,促使肝脏中GPX4的生物合成和GSH的含量增加,从而抑制MAFLD的铁死亡进程。

综上所述,本研究通过网络药理学分析和斑马鱼实验相结合的方法,基于铁死亡探究了膈下逐瘀汤干预MAFLD的多成分-多靶点-多通路的潜在机制,并通过斑马鱼幼鱼模型证实了该方可能通过激活SIRT1/Nrf2/GPX4轴来抑制铁死亡,从而改善MAFLD模型斑马鱼幼鱼肝组织的一系列病理变化,为临床治疗MAFLD和未来开发安全稳定地治疗MAFLD的相关药物提供了基础和新的思路。

### 参考文献

- [1] CANIVET C M, BOURSIER J, LOOMBA R. New nomenclature for nonalcoholic fatty liver disease: understanding metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, metabolic dysfunction- and alcohol-associated liver disease, and their implications in clinical practice[J]. *Semin Liver Dis*, 2024, 44(1): 35-42.
- [2] CASTILLO-NÚÑEZ Y, ALMEDA-VALDES P, GONZÁLEZ-GÁLVEZ G, et al. Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and atherosclerosis[J]. *Curr Diab Rep*, 2024, 24(7): 158-166.

- [ 3 ] CHAN W K, WONG V W, ADAMS L A, et al. MAFLD in adults: non-invasive tests for diagnosis and monitoring of MAFLD[J]. *Hepatol Int*, 2024, 18(Suppl. 2):909-921.
- [ 4 ] 石玲, 曹亚芳, 孙青凤. 膈下逐瘀汤联合中医外治法治疗子宫内膜异位症继发痛经(气滞血瘀型)的临床疗效观察[J]. *时珍国医国药*, 2023, 34(5):1147-1150.  
SHI L, CAO Y F, SUN Q F. Clinical observation of Gexia zhuyu decoction combined with external treatment of traditional Chinese medicine on dysmenorrhea secondary to endometriosis (qi stagnation and blood stasis type) [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2023, 34(5):1147-1150.
- [ 5 ] 孙旭, 熊芬, 黄育生, 等. 膈下逐瘀汤对四氯化碳诱导的肝纤维化大鼠 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(6):1945-1950.  
SUN X, XIONG F, HUANG Y S, et al. Effect of Gexia zhuyu decoction on Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in rats with hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2022, 44(6):1945-1950.
- [ 6 ] VINIK Y, MAIMON A, DUBEY V, et al. Programming a ferroptosis-to-apoptosis transition landscape revealed ferroptosis biomarkers and repressors for cancer therapy[J]. *Adv Sci*, 2024, 11(17):e2307263.
- [ 7 ] LIU S H, GAO Z S, HE W Q, et al. The gut microbiota metabolite glycochenodeoxycholate activates TFR-ACSL4-mediated ferroptosis to promote the development of environmental toxin-linked MAFLD[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt. 1):213-226.
- [ 8 ] 杨婧, 贾彦, 王蔚, 等. 膈下逐瘀汤对大鼠纤维化肝脏组织谷胱甘肽抗氧化系统的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(17):121-126.  
YANG J, JIA Y, WANG W, et al. Effects of Gexia zhuyutang on glutathione antioxidant system in liver tissue of rat with hepatic fibrosis[J]. *Chin J Exp Tradit Med Formulae*, 2017, 23(17):121-126.
- [ 9 ] ZHANG Y P, YUAN T H, LI Y S, et al. Network pharmacology analysis of the mechanisms of compound herba sarcandrae(Fufang zhongjiefeng) aerosol in chronic pharyngitis treatment[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15:2783-2803.
- [ 10 ] 冯海童, 祁玉麟, 冯雅雯, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨滋肾健脾化痰片对糖尿病视网膜病变的干预机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2024, 35(8):1197-1205.  
FENG H T, QI Y L, FENG Y W, et al. Exploring the intervention mechanism of Zishen jianpi huayu tablets on diabetic retinopathy based on network pharmacology, molecular docking and experimental validation[J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2024, 35(8):1197-1205.
- [ 11 ] DENG S H, LI J, LI L, et al. Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis via the Sirt1/Nrf2/Gpx4 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2023, 52(6):118.
- [ 12 ] 林丽婷, 王继森, 高天慧, 等. 蓬莪术醋制前后改善斑马鱼急性肝损伤的作用机制研究[J]. *中草药*, 2024, 55(8):2611-2619.  
LIN L T, WANG J S, GAO T H, et al. Mechanism of raw and vinegar-processed *Curcuma phaeocaulis* on improving acute liver injury in zebrafish[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(8):2611-2619.
- [ 13 ] WU Y J, ZHANG X L, CHEN J J, et al. Self-recovery study of fluoride-induced ferroptosis in the liver of zebrafish(*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2022, 251:106275.
- [ 14 ] GAO P, CHANG C, LIANG J L, et al. Embryonic amoxicillin exposure has limited impact on liver development but increases susceptibility to NAFLD in zebrafish larvae [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5):2744.
- [ 15 ] TONON F, FARRA R, ZENNARO C, et al. Xenograft zebrafish models for the development of novel anti-hepatocellular carcinoma molecules[J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(8):803.
- [ 16 ] 李杨, 刘丽. 基于网络药理学探讨膈下逐瘀汤加减方治疗慢性盆腔炎性疾病的作用机制[J]. *世界中西医结合杂志*, 2021, 16(10):1858-1864.  
LI Y, LIU L. The mechanism study of the treatment with chronic pelvic inflammatory diseases by modified Gexia zhuyu decoction based on the network pharmacology and molecular docking technology[J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2021, 16(10):1858-1864.
- [ 17 ] BOTROS S R, MATOUK A I, AMIN A, et al. Comparative effects of incretin-based therapy on doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats: the role of SIRT1/Nrf2/NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  signaling pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1353029.
- [ 18 ] XIE W X, DENG L, QIAN R, et al. Curculigoside attenuates endoplasmic reticulum stress-induced epithelial cell and fibroblast senescence by regulating the SIRT1-P300 signaling pathway[J]. *Antioxidants(Basel)*, 2024, 13(4):420.
- [ 19 ] XUE P P, ZHUANG H L, BAI T J, et al. Iron( II )-based metal-organic framework nanozyme for boosting tumor ferroptosis through inhibiting DNA damage repair and system Xc[J]. *J Nanobiotechnology*, 2024, 22(1):228.
- [ 20 ] BADGLEY M A, KREMER D M, MAURER H C, et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice[J]. *Science*, 2020, 368(6486):85-89.

(收稿日期:2024-05-13 修回日期:2024-11-03)

(编辑:张元媛)