

· 其他肝病 ·

DOI: 10.12449/JCH251123

丹葛解醒汤对酒精性肝病大鼠模型的改善作用及其机制分析

郭苏军^{1,2}, 周波^{1,2}, 马丽^{1,2}

1 宁夏医科大学中医学院, 银川 750004

2 宁夏少数民族医药现代化教育部重点实验室, 银川 750004

通信作者: 马丽, mali3549@163.com (ORCID: 0000-0002-6646-3484)

摘要: **目的** 探讨丹葛解醒汤对酒精性肝病(ALD)大鼠的改善作用,并基于肿瘤蛋白P53/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号通路分析其机制。**方法** 36只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、丹葛解醒汤组和复方益肝灵片组,每组9只。采用梯度灌胃56%酒精建立模型,同时灌胃给药,持续12周。实验结束收集大鼠血清和肝组织,检测大鼠血清中ALT、AST和TG水平,肝组织中丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、谷胱甘肽(GSH)和Fe²⁺水平;HE染色观察病理组织变化;油红O染色和普鲁士蓝染色分别观察肝组织脂肪及铁沉积情况;采用RT-qPCR和Western Blot法检测肝组织中P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1 mRNA和蛋白表达。计量资料多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** 与正常组相比,模型组肝细胞排列紊乱,结构不完整,有炎症细胞浸润和大量脂肪空泡;血清中AST、ALT、TG和肝组织MDA、ROS、Fe²⁺水平均升高(*P*值均<0.01),P53、NOX1、PTGS2 mRNA及蛋白表达均增加(*P*值均<0.01),血清GSH水平及肝组织GPX4、FTH1 mRNA及蛋白表达均降低(*P*值均<0.01)。与模型组相比,丹葛解醒汤组和复方益肝灵片组中大鼠肝细胞炎症减少,排列整齐,血清中AST、ALT、TG和肝组织MDA、ROS、Fe²⁺水平及P53、NOX1、PTGS2 mRNA及蛋白表达减少(*P*值均<0.05),GSH水平及肝组织GPX4、FTH1 mRNA和蛋白表达水平增加(*P*值均<0.05),肝组织脂肪变性改善和铁沉积减少(*P*值均<0.01)。**结论** 丹葛解醒汤可有效改善ALD大鼠疾病进展,其机制可能与调控P53/GPX4通路抑制铁死亡有关。

关键词: 肝疾病,酒精性;丹葛解醒汤;铁死亡;P53/GPX4;大鼠,Sprague-Dawley

基金项目: 宁夏自然科学基金(2023AAC03210);国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023209);2022年全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教函[2022]75号)

The mechanism of Dange Jiecheng decoction improving alcoholic liver disease in a rat model

GUO Sujun^{1,2}, ZHOU Bo^{1,2}, MA Li^{1,2}

1. School of Traditional Chinese Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China; 2. Key Laboratory of Modernization of Ethnic Minority Medicine, Ministry of Education, Yinchuan 750004, China

Corresponding author: MA Li, mali3549@163.com (ORCID: 0000-0002-6646-3484)

Abstract: Objective To investigate the effect of Dange Jiecheng decoction in improving alcoholic liver disease (ALD) in rats, as well as its mechanism of action based on the tumor protein P53/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. **Methods** A total of 36 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, Dange Jiecheng decoction group, and compound Yiganling tablets group, with 9 rats in each group. The rats were given gradient intragastric administration of 56% alcohol to establish a model of ALD, and meanwhile, the corresponding drug was given by gavage for 12 consecutive weeks. After the experiment ended, serum and liver tissue samples were collected to measure the serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and triglyceride (TG) and the levels of malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), and Fe²⁺; HE staining was used to observe histopathological changes, and oil red O staining and Prussian blue staining were used to observe fat and iron deposition in liver tissue, respectively; RT-qPCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of P53, glutathione peroxidase 4 (GPX4), NADPH oxidase 1 (NOX1), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and ferritin heavy chain 1 (FTH1)

in liver tissue. A one-way analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** Compared with the normal group, the model group had disordered arrangement and incomplete structure of hepatocytes with inflammatory cell infiltration and a large number of fat vacuoles, significant increases in the serum levels of AST, ALT, TG and the levels or activities of MDA, ROS, and Fe²⁺ in liver tissue (all *P*<0.01), significant increases in the mRNA and protein expression levels of P53, NOX1, and PTGS2 (all *P*<0.01), and significant reductions in the content of GSH in serum and the mRNA and protein expression levels of GPX4 and FTH1 in liver tissue (all *P*<0.01). Compared with the model group, the Dange Jiecheng decoction group and the compound Yiganling tablets group had ordered arrangement of hepatocytes with a reduction in inflammation, significant reductions in the serum levels of AST, ALT, and TG, the levels of MDA, ROS, and Fe²⁺ in liver tissue, and the mRNA and protein expression levels of P53, NOX1, and PTGS2 in liver tissue (all *P*<0.05), and significant increases in the content of GSH in serum and the mRNA and protein expression levels of GPX4 and FTH1 in liver tissue (all *P*<0.05), as well as an improvement in hepatic steatosis and a reduction in iron deposition (all *P*<0.01). **Conclusion** Dange Jiecheng decoction can effectively improve disease progression in rats with ALD, possibly by regulating the P53/GPX4 pathway and inhibiting ferroptosis.

Key words: Liver Diseases, Alcoholic; Dan Ge Jie Cheng Decoction; Ferroptosis; P53/GPX4; Rats, Sprague-Dawley

Research funding: Ningxia Natural Science Foundation (2023AAC03210); Construction Project of High-Level Key Disciplines in Traditional Chinese Medicine by the National Administration of Traditional Chinese Medicine (zyydxk-2023209); 2022 National Famous Old Chinese Medicine Experts Inheritance Workstation Construction Project (Guo Zhongyiyao Renjiao Han [2022] No. 75)

酒精性肝病(ALD)的发生与长期大量饮酒密切相关,酒精在肝脏内代谢过程中产生的毒性物质对肝细胞造成损伤,进而引发炎症、脂肪变性、纤维化及肝硬化等病理改变,不仅严重影响患者的生活质量,还可能导致肝衰竭、肝癌等严重并发症^[1-2]。流行病学报告显示,全球每年因肝病死亡的人数约有200万,占死亡人数的4%,我国ALD的死亡率亦呈逐年增长趋势^[3-4]。因此,全面深入探究ALD的发病机制,寻找理想的治疗药物与靶标,已成为临床上的迫切需求。

铁死亡是一种非典型的程序性细胞死亡方式,主要通过铁依赖的脂质过氧化反应导致细胞死亡^[5]。大量研究表明,铁死亡是ALD发生发展过程中的关键因素^[6]。酒精代谢过程中会产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),使肝脏处于氧化应激状态,进而引起脂质过氧化反应破坏细胞膜的完整性,导致肝细胞发生铁死亡^[7]。肿瘤蛋白P53是一种肿瘤抑制基因,直接调控多个与铁死亡相关的基因,影响ROS生成和铁死亡的过程^[8]。谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)是铁死亡的关键抑制因子,通过清除脂质过氧化物,降低细胞内氧化应激水平,影响细胞对铁死亡的敏感性^[9]。有研究证实,P53通过下调GPX4会促进肿瘤细胞发生铁死亡^[10]及加剧糖尿病脑缺血再灌注铁死亡^[11]。因此,P53/GPX4通路是调控铁死亡的重要机制。

丹葛解醒汤是由李东垣《脾胃论》中葛花解醒汤加减而来,有健脾化湿,活血调肝的功效。课题组前期通过网

络药理学证实丹葛解醒汤能通过P53、细胞周期蛋白D1、Fos原癌基因等多靶点治疗ALD^[12],并通过动物模型证明其可通过调控Kelch样ECH相关蛋白1/核转录因子红系2相关因子2信号通路,减轻氧化应激反应^[13],但是否通过调节铁死亡途径尚未可知。故本研究以铁死亡为视角,基于P53/GPX4信号通路,探讨丹葛解醒汤改善ALD的作用机制,以此为中医药防治ALD提供更全面的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 36只雄性SD大鼠,体质量180~200g,由宁夏医科大学实验动物中心提供[实验动物生产许可证号:SCXK(宁)2020-0001,实验动物使用许可证号:SCXK(宁)2025-0001]。饲养于宁夏医科大学实验动物中心,自由饮水进食。

1.1.2 药物与试剂 丹葛解醒汤中所用药物均购自宁夏医科大学附属中医医院^[13]。常规制备,浓缩至含生药2.8g/mL,冷藏储存备用。复方益肝灵片(吉林紫鑫药业股份有限公司,批号:Z22025133);56℃酒精(北京红星股份有限公司,批号:SC11511160310087);AST试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C010-2-1);ALT试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:C009-2-1);丙二醛(malondialdehyde,MDA)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A003-1-2);甘油三酯试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:A110-1-1);ROS试剂盒(南京建成生物

工程研究所,批号:E004-1-1);普鲁士蓝染色试剂盒(北京索来宝公司,批号:G1422);P53抗体(美国Affinity公司,批号:AF0879);GPX4抗体(美国Affinity公司,批号:DF6701);前列腺素内过氧化物合酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2,PTGS2)抗体(美国Affinity公司,批号:AF7003);烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶1(NADPH oxidase 1,NOX1)抗体(美国Affinity公司,批号:DF8684);铁蛋白重链1(ferritin heavy chain1,FTH1)抗体(美国Affinity公司,批号:DF6278);RNA提取液(武汉赛维尔科技有限公司,批号:G3013);SweScript All-in-One RT SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Remover)(武汉赛维尔科技有限公司,批号:G3337);2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix(武汉赛维尔科技有限公司,批号:G3326)。

1.1.3 仪器 Leica RM2255型石蜡切片机(上海徕卡显微系统有限公司);Aperio LV1型切片扫描仪(德国Leica公司);Amersham Imager 680RGB型超灵敏多功能成像仪(美国GE公司);Stepone Plus型荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国ABI公司);JXFSTPRP-CL型冷冻研磨机(上海净信);Neofuge 13R低温高速离心机(德国Eppendorf);LF-600T型Western Blot电泳及转膜系统(北京龙方科技有限公司);ETC811型PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 造模及分组 36只SD大鼠适应性喂养1周后,采用简单随机分组法分为正常组、模型组、丹葛解醒汤组和复方益肝片组,每组9只。上午正常组给予等剂量的蒸馏水灌胃,其余各组给予56%酒精灌胃(第1~3天4 mL·kg⁻¹·d⁻¹;第4~7天6 mL·kg⁻¹·d⁻¹;第7天后10 mL·kg⁻¹·d⁻¹)^[14],造模的同时灌胃给药(间隔8 h),丹葛解醒汤组每天按大鼠体质量12 g/kg灌胃丹葛解醒汤溶液,复方益肝片组碾碎稀释后每天按大鼠体质量21 mg/kg灌胃,正常组和模型组大鼠灌胃等体积蒸馏水作为对照,持续12周(所有剂量均根据《实验动物学》剂量进行等效剂量换算,参照60 kg成人剂量)。

1.2.2 标本采集 给药结束后,所有大鼠禁食不禁水,3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔注射,腹主动脉取血,离心收集血清,于-80 °C冰箱保存;同时快速打开腹腔,取肝组织于液氮中保存,另取适宜大小的肝组织分别用4%多聚甲醛固定。每组选取6只进行后续检测和分析。

1.2.3 血清肝功能和血脂水平检测 微板法检测大鼠血清中AST和ALT;GPO-PAP酶法检测TG含量。

1.2.4 肝组织铁死亡相关指标检测 采用免疫荧光法检测各组肝组织内ROS水平;TBA法检测MDA含量;微量酶标法检测肝组织中谷胱甘肽(GSH)含量;比色法检测Fe²⁺含量。

1.2.5 油红O染色 将肝组织冰冻切片,固定洗涤处理后浸入油红O染液中染色,蒸馏水浸洗切片,随后用苏木素染液复染,洗涤后封片,于显微镜观察大鼠肝脏的脂质沉积情况。使用Image J软件分析油红O染色面积比。

1.2.6 普鲁士蓝染色 将组织切片脱蜡复水,放入普鲁士蓝染液中浸染,蒸馏水冲洗,然后进行核复染,再次蒸馏水冲洗,脱水透明后使用中性和树胶封片,显微镜下观察肝组织铁离子沉积情况。

1.2.7 RT-qPCR法检测肝组织中P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1 mRNA表达水平 从肝组织中提取总RNA,然后使用逆转录酶将mRNA转录成cDNA,接着在qPCR仪上进行扩增反应,设计并合成引物(武汉赛维尔科技有限公司),序列见表1。以GAPDH作为内参基因,通过RT-qPCR仪检测P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1基因及内参基因CT值,计算目的基因mRNA相对表达量。实验重复3次。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列(5'→3')	长度(bp)
NOX1	F:TCCTAAACTACCGACTCTTCCTCA	141
	R:ACTCATTGTCCCACATTGGTCTC	
GPX4	F:AGGCAGGAGCCAGGAAGTAATC	212
	R:ACCACGCAGCCGTTCCTATC	
FTH1	F:CGCCAGAACTACCACCAGGACT	184
	R:TCAGTTTCTCAGCATGTTCCCTC	
PTGS2	F:CGTTTGAAGAACTTACAGGAGAGAA	94
	R:AGCAGGGCGGGATACAGTT	
P53	F:GGTCCGACTATACCACTATCCACT	151
	R:CACAAACACGAACCTCAAAGCT	
GAPDH	F:CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG	138
	R:GGTGAAGAATGGGAGTTGCT	

1.2.8 Western Blot检测肝组织中P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1蛋白表达水平 取大鼠肝组织,加入裂解液提取总蛋白,研磨、离心、取上清并测蛋白浓度,于100 °C中变性。进行凝胶电泳、转膜、封闭,孵育一抗4 °C孵育过夜,加入二抗室温孵育2 h,ECL显影,并用Image J软件进行分析。实验重复3次。

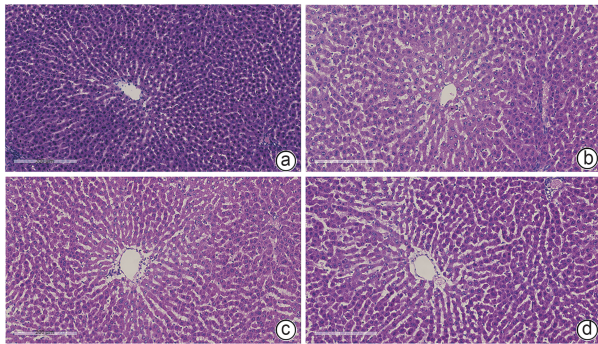
1.3 统计学方法 通过SPSS 21.0软件进行处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹葛解醒汤对ALD大鼠肝组织病理形态学的影响 与正常组相比,模型组肝细胞排列紊乱,结构不完整,有炎症细胞浸润和大量脂肪空泡;与模型组相比,丹葛解醒汤组和复方益肝灵片组的肝细胞排列整齐,呈索状排列,结构完整,少量炎症细胞的浸润和少量脂肪空泡(图1)。

2.2 丹葛解醒汤对ALD大鼠血脂和肝功能的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中TG、ALT和AST水平均明显升高(P 值均 <0.01);与模型组比较,各给药组大鼠血清中TG、ALT和AST水平均明显下降(P 值均 <0.01)(表2)。

2.3 丹葛解醒汤对ALD大鼠铁死亡相关指标的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织GSH水平明显降低($P<0.01$), Fe^{2+} 水平、MDA水平和ROS平均荧光表达强度均



注:a,正常组;b,模型组;c,丹葛解醒汤组;d,复方益肝灵片组。

图1 ALD大鼠肝组织病理情况(HE染色, $\times 100$)

Figure 1 Liver tissue pathological sections in rats with alcoholic liver disease (HE, $\times 100$)

显著升高(P 值均 <0.01);与模型组比较,丹葛解醒汤组和复方益肝灵片组大鼠肝组织GSH水平均明显升高(P 值均 <0.05), Fe^{2+} 水平、MDA水平和ROS平均荧光表达强度均显著降低(P 值均 <0.01)(表3、图2)。

2.4 丹葛解醒汤对ALD大鼠肝组织脂质蓄积的影响 与正常组相比,模型组大鼠肝细胞内脂滴增多($P<0.01$);与模型组相比,丹葛解醒汤和复方益肝灵片干预后大鼠肝细胞内脂滴明显减少(P 值均 <0.01)(表4、图3)。

2.5 丹葛解醒汤对ALD大鼠肝组织铁离子沉积的影响 与正常组相比,模型组大鼠肝组织内可见明显蓝色颗粒,表明铁离子沉积面积增加($P<0.01$);与模型组相比,各给药组大鼠肝组织铁离子沉积面积明显减少(P 值均 <0.01)(表5、图4)。

2.6 丹葛解醒汤对ALD大鼠肝组织P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织P53、NOX1、PTGS2 mRNA相对表达量均明显增加(P 值均 <0.01),GPX4和FTH1 mRNA相对表达量均明显减少(P 值均 <0.01);与模型组比较,丹葛解醒汤组和复方益肝灵片组大鼠肝组织P53、NOX1、PTGS2 mRNA相对表达量均明显降低(P 值均 <0.05),GPX4和FTH1 mRNA相对表达量均明显升高(P 值均 <0.05)(表6)。

2.7 丹葛解醒汤对ALD大鼠肝组织P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肝组织P53、NOX1、PTGS2蛋白表达增加(P 值均 <0.01),GPX4和FTH1蛋白表达减少(P 值均 <0.01);与模型组比较,丹葛解醒汤组和复方益肝灵片组大鼠肝组织

表2 ALD大鼠血脂和肝功能情况

Table 2 Blood lipids and liver function in rats with alcoholic liver disease

组别	动物数(只)	TG(mmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常组	6	0.04 \pm 0.01	10.24 \pm 1.35	33.23 \pm 0.92
模型组	6	2.84 \pm 0.22 ¹⁾	43.05 \pm 1.13 ¹⁾	60.99 \pm 0.51 ¹⁾
丹葛解醒汤组	6	1.29 \pm 0.01 ²⁾	13.02 \pm 0.92 ²⁾	35.93 \pm 0.87 ²⁾
复方益肝灵片组	6	2.24 \pm 0.02 ²⁾	34.35 \pm 2.33 ²⁾	35.97 \pm 3.68 ²⁾
F值		356.20	440.70	132.70
P值		$<0.000 1$	$<0.000 1$	$<0.000 1$

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$ 。

表3 ALD大鼠肝组织MDA、ROS、GSH和 Fe^{2+} 含量或活性情况

Table 3 The levels or activities of MDA, ROS, GSH, and Fe^{2+} in liver tissue of rats with alcoholic liver disease

组别	动物数(只)	Fe^{2+} (μ mol/gprot)	GSH(μ mol/gprot)	MDA(nmol/mL)	ROS荧光强度(%)
正常组	6	3.60 \pm 0.91	21.82 \pm 1.92	9.77 \pm 0.53	0.06 \pm 0.03
模型组	6	10.67 \pm 0.77 ¹⁾	6.76 \pm 1.33 ¹⁾	20.38 \pm 0.38 ¹⁾	32.75 \pm 2.19 ¹⁾
丹葛解醒汤组	6	5.74 \pm 0.32 ²⁾	16.96 \pm 1.13 ²⁾	10.77 \pm 0.38 ²⁾	8.46 \pm 2.70 ²⁾
复方益肝灵片组	6	7.83 \pm 0.66 ²⁾	11.70 \pm 1.63 ³⁾	12.44 \pm 3.36 ²⁾	20.58 \pm 1.59 ²⁾
F值		55.63	54.03	23.52	167.30
P值		$<0.000 1$	$<0.000 1$	0.000 3	$<0.000 1$

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$,3) $P<0.05$ 。

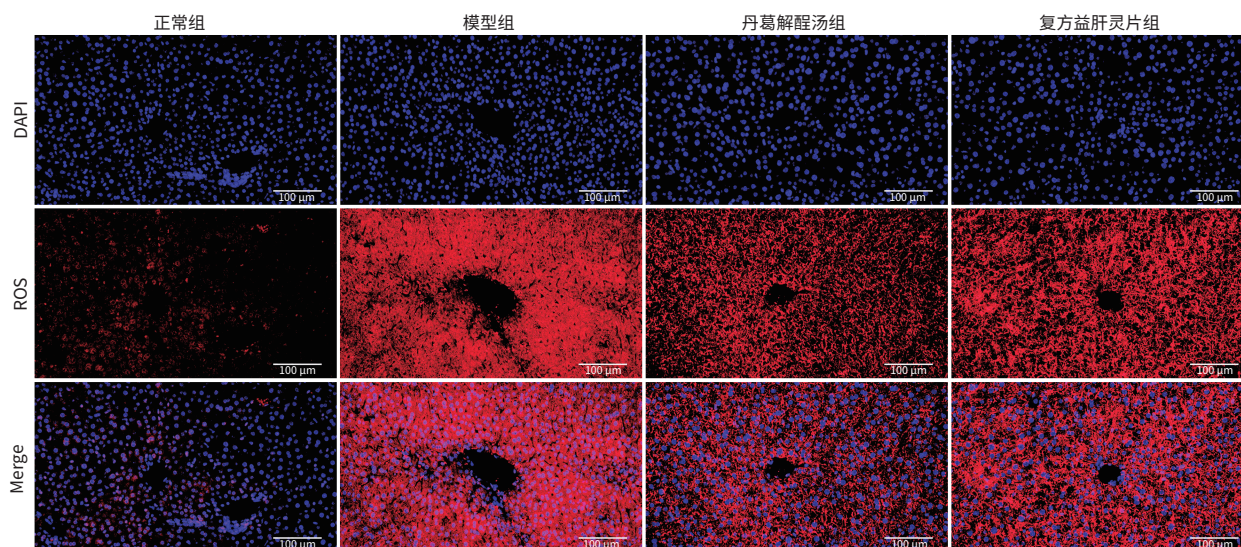


图2 ALD大鼠肝组织ROS水平(免疫荧光, ×200)

Figure 2 ROS levels in liver tissue of rats with alcoholic liver disease (immunofluorescence, ×200)

表4 ALD大鼠肝组织脂质蓄积情况

Table 4 Lipid accumulation in liver tissue of rats with alcoholic liver disease

组别	动物数(只)	油红O染色面积(%)
正常组	6	1.05±0.11
模型组	6	6.51±0.22 ¹⁾
丹葛解醒汤组	6	1.77±0.11 ²⁾
复方益肝灵片组	6	3.22±0.04 ²⁾
F值		988.70
P值		<0.000 1

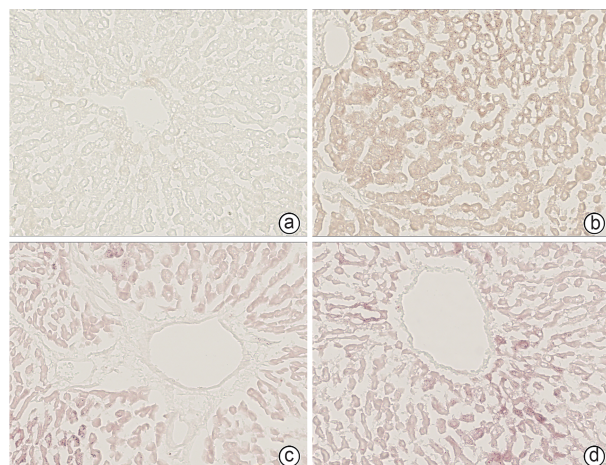
注:与正常组比较,1)P<0.01;与模型组比较,2)P<0.01。

表5 ALD大鼠肝组织铁沉积情况

Table 5 Iron deposition in liver tissue of rats with alcoholic liver disease

组别	动物数(只)	普鲁士蓝染色面积(%)
正常组	6	0.175±0.002
模型组	6	0.201±0.003 ¹⁾
丹葛解醒汤组	6	0.176±0.001 ²⁾
复方益肝灵片组	6	0.186±0.008 ²⁾
F值		24.06
P值		0.000 2

注:与正常组比较,1)P<0.01;与模型组比较,2)P<0.01。

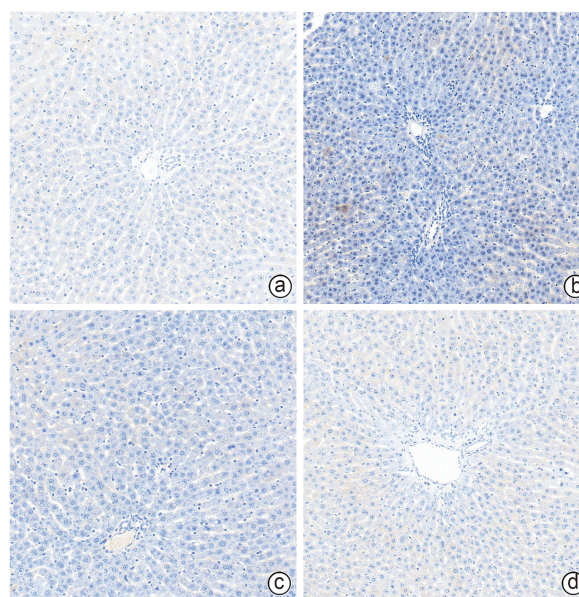


注:a,正常组;b,模型组;c,丹葛解醒汤组;d,复方益肝灵片组。

图3 ALD大鼠肝组织脂质蓄积情况(油红O染色, ×200)

Figure 3 Lipid accumulation in liver tissue of rats with alcoholic liver disease (oil red O staining, ×200)

P53、NOX1、PTGS2蛋白表达均明显降低(P 值均<0.05), GPX4和FTH1蛋白表达水平均明显升高(P 值均<0.05)(表7、图5)。



注:a,正常组;b,模型组;c,丹葛解醒汤组;d,复方益肝灵片组。

图4 ALD大鼠肝组织铁离子沉积情况(普鲁士蓝, ×100)

Figure 4 Iron ion deposition in liver tissue of rats with alcoholic liver disease (prussian blue staining, ×100)

表6 ALD大鼠P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1 mRNA相对表达量

Table 6 The mRNA expression of P53, GPX4, NOX1, PTGS2, and FTH1 in rats with alcoholic liver disease

组别	P53 mRNA	NOX1 mRNA	PTGS2 mRNA	GPX4 mRNA	FTH1 mRNA
正常组	1.02±0.24	1.01±0.13	1.01±0.17	1.01±0.13	1.01±0.13
模型组	2.17±0.29 ¹⁾	1.93±0.06 ¹⁾	1.49±0.13 ¹⁾	0.60±0.06 ¹⁾	0.62±0.05 ¹⁾
丹葛解醒汤组	1.34±0.25 ²⁾	1.38±0.10 ²⁾	1.08±0.08 ²⁾	0.81±0.05 ³⁾	0.83±0.02 ³⁾
复方益肝灵片组	1.63±0.09 ³⁾	1.67±0.07 ³⁾	1.19±0.08 ³⁾	0.80±0.04 ³⁾	0.79±0.02 ³⁾
F值	13.68	54.49	8.96	13.35	15.54
P值	0.001 6	<0.000 1	0.006 2	0.001 8	0.001 1

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$,3) $P<0.05$ 。

表7 ALD大鼠P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1蛋白表达情况

Table 7 The protein expression of P53, GPX4, NOX1, PTGS2, and FTH1 in rats with alcoholic liver disease

组别	P53	NOX1	PTGS2	GPX4	FTH1
正常组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	6.31±1.19 ¹⁾	1.57±0.08 ¹⁾	1.99±0.01 ¹⁾	0.49±0.01 ¹⁾	0.16±0.04 ¹⁾
丹葛解醒汤组	2.39±0.55 ²⁾	1.20±0.04 ²⁾	1.33±0.07 ²⁾	0.72±0.03 ²⁾	0.57±0.05 ²⁾
复方益肝灵片组	3.83±0.62 ²⁾	1.29±0.16 ³⁾	1.60±0.12 ²⁾	0.58±0.01 ²⁾	0.34±0.06 ³⁾
F值	169.10	19.62	58.82	613.60	115.20
P值	<0.000 1	0.000 5	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

注:与正常组比较,1) $P<0.01$;与模型组比较,2) $P<0.01$,3) $P<0.05$ 。

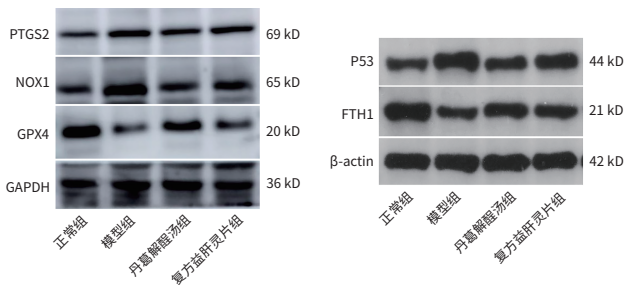


图5 各组大鼠肝组织P53、GPX4、NOX1、PTGS2、FTH1蛋白表达情况

Figure 5 Protein expression of P53, GPX4, NOX1, PTGS2, and FTH1 in liver tissue of rats from each group

3 讨论

中医学中ALD属于“酒疸”“酒癖”“酒臌”等范畴。课题组结合多年临床经验,认为ALD是因长期嗜酒导致酒毒湿热之邪蕴结体内,损肝伤脾,肝失疏泄则气机不畅,脾湿健运则痰湿内生。同时酒毒损伤肝络,则瘀血内结。基于此提出ALD的治疗原则为分消酒湿,理气健脾,活血调肝,组方丹葛解醒汤。丹葛解醒汤在葛花解醒汤“理气健脾、分消酒湿”的基础上加以丹参、当归、川芎、山楂活血化瘀,黄芩清热解毒,柴胡、枳实疏肝消痞;当归、白芍、枸杞养血柔肝。全方肝脾同调,活血化瘀,与ALD病机相吻合。本研究采用梯度灌酒法建立ALD模型,结果显示大鼠血清中AST、ALT、TG含量均升高,油红O染色显示肝组织出现明显的脂肪变性,提示给予梯度灌酒大鼠的肝功

能、血脂和肝脏脂质含量均升高,表明ALD模型成功建立。经丹葛解醒汤治疗后,肝组织脂肪变性明显改善,AST、ALT、TG含量显著降低,提示丹葛解醒汤对ALD具有一定的改善作用。

铁死亡是一种铁依赖的脂质过氧化产物积累引发的细胞死亡,其核心机制涉及铁代谢异常、ROS过度积累及脂质过氧化失衡^[15-16]。长期大量饮酒会损伤肝细胞,使得肝细胞内的铁释放到细胞外,在酒精等信号刺激下铁蛋白被送入溶酶体中将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ,释放到细胞质中,导致细胞内 Fe^{2+} 增多^[17]。大量的 Fe^{2+} 通过芬顿反应催化脂质过氧化物转化为高毒性羟基自由基,加剧了ROS的生成,ROS积累会攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化,生成MDA等产物^[18],发生氧化应激反应。正常情况下,GSH在GPX4的作用下,可以中和脂质过氧化物,维持细胞内氧化还原平衡,但酒精代谢产物乙醛会与GSH结合,使其消耗增加,促进脂质过氧化的反应^[17]。因此,当饮酒导致GSH耗竭时,则无法有效清除脂质过氧化物,从而诱发铁死亡^[19]。FTH1参与铁代谢,可储存铁离子,当FTH1功能异常时,会导致细胞内游离二价铁离子增多^[20]。国外研究也通过实验证实了FTH1是星形胶质细胞铁死亡的关键枢纽^[21]。本研究结果与此一致,与正常组相比,模型组大鼠的GSH活性降低,FTH1蛋白表达下降, Fe^{2+} 、ROS、MDA水平均显著升高,普鲁士蓝肝组织铁沉积增加,而经过丹葛解醒汤的干预后,GSH活性升

高, FTH1 蛋白表达增加, Fe^{2+} 、ROS、MDA 水平均显著降低, 普鲁士蓝肝组织铁沉积减少, 说明丹葛解醒汤通过上调 FTH1 表达水平, 减少大鼠肝细胞中 Fe^{2+} , 抑制芬顿反应, 减少 ROS、MDA 产生, 抑制脂质过氧化反应, 减少 GSH 的耗竭, 从而抑制肝细胞发生铁死亡。

近些年来, 越来越多的研究证实 P53 为调控铁死亡的关键因子^[22]。GPX4 与铁死亡在神经系统疾病、心血管系统疾病等多种疾病的发生发展中扮演关键角色^[23]。作为调节铁死亡的 P53 经典路径, GPX4 起到至关重要的作用。P53 蛋白通过直接结合 GPX4 基因启动子 P53 响应元件(P53-RE), 抑制其转录, 导致 GSH 消耗, 从而促进铁死亡的发生^[9]。有研究发现子宫内膜异位症大鼠模型中, 加味少腹逐瘀汤通过上调 P53、下调 GPX4 表达, 诱导异位子宫内膜组织发生铁死亡, 减轻炎症反应, 从而对子宫内膜异位症起到治疗作用^[24]; 鼠双微体基因 2 通过下调 P53 和上调 GPX4 抑制结肠癌细胞发生铁死亡^[25]。NOX1 和 PTGS2 作为铁死亡的关键标志物, 均可以生成 ROS, 引起脂质过氧化反应, 诱导铁死亡^[26]。有研究表明, 血管平滑肌细胞的分化与 NOX1 过表达引起铁死亡有关^[27]; 此外, PTGS2 作为中枢基因, 与冠状动脉粥样硬化的铁死亡呈正相关^[28]。而本实验结果表明, 与模型组相比, 丹葛解醒汤组大鼠 P53、PTGS2 和 NOX1 表达水平降低, GPX4 表达增高, 说明丹葛解醒汤通过下调 P53 蛋白, 促进 GPX4 的表达, 恢复 GPX4 的抗氧化能力, 且同时下调铁死亡标志物 PTGS2 和 NOX1, 减少 ROS, 来抑制脂质过氧化和铁死亡, 表明 P53/GPX4 信号通路可能是该方改善 ALD 的潜在作用靶点, 为临床防治 ALD 及药物研发提供一定的思路。

综上所述, 丹葛解醒汤可通过减轻肝脂肪变性, 抑制脂质过氧化和铁死亡来改善 ALD, 其机制可能与下调 P53 表达, 促进 GPX4 蛋白表达有关。本研究为中医药防治 ALD 提供了新的视角, 但是 ALD 的发病机制复杂, 丹葛解醒汤改善 ALD 的具体作用机制后续还需要结合体内外实验进一步阐明。

伦理学声明: 本研究方案经由宁夏医科大学实验动物伦理委员会审批, 批号: IACUC-NYLAC-2023-288, 符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 郭苏军负责收集数据, 资料分析, 撰写论文; 马丽参与课题设计, 拟定写作思路; 周波负责修改论文, 指导撰写文章并最后定稿。

参考文献:

- [1] WANG Q, ZHANG CR, TANG YM. Research advances in glucose and lipid metabolism disorders in different types of chronic liver diseases [J]. *J Clin Hepatol*, 2022, 38(8): 1937-1940. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.08.043.
王倩, 张宸瑞, 唐映梅. 不同类型慢性肝病糖脂代谢紊乱研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2022, 38(8): 1937-1940. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.08.043.
- [2] REHM J, SAMOKHVALOV AV, SHIELD KD. Global burden of alcoholic liver diseases[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 160-168. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.03.007.
- [3] GAO XX, LIU LX. Progress in the epidemiology and pathogenesis of alcoholic liver diseases[J/OL]. *Chin J Digest Med Imageol: Electronic Edition*, 2016, 6(2): 62-65. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2015.2016.02.004.
高潇雪, 刘立新. 酒精性肝病流行病学及发病机制研究进展[J/OL]. *中华消化病与影像杂志(电子版)*, 2016, 6(2): 62-65. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-2015.2016.02.004.
- [4] DEVARBHAVI H, ASRANI SK, ARAB JP, et al. Global burden of liver disease: 2023 update[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 516-537. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.
- [5] JIANG XJ, STOCKWELL BR, CONRAD M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- [6] LI X, TAO L, ZHONG MJ, et al. Ferroptosis and liver diseases[J]. *J Zhejiang Univ Med Sci*, 2024, 53(6): 747-755. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2024-0566.
李欣, 陶亮, 钟美娟, 等. 铁死亡参与肝病研究进展[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2024, 53(6): 747-755. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2024-0566.
- [7] MA YD, HU XY, KE R. Research progress on treatment of alcoholic liver disease based on ferroptosis mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2024, 26(11): 148-153. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842X.2024.11.029.
马伊笛, 胡晓阳, 客蕊. 中药经铁死亡途径治疗酒精性肝病研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2024, 26(11): 148-153. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842X.2024.11.029.
- [8] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons: The role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296. DOI: 10.1038/s41571-020-00462-0.
- [9] SEIBT TM, PRONETH B, CONRAD M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 144-152. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014.
- [10] JU Z, ZHANG R, YANG AG, et al. Mutant p53 promotes iron death of human colon and lung cancer cells by down-regulating glutathione peroxidase 4(GPX4) expression and increasing the production of lipid reactive oxygen species[J]. *Chin J Cell Mol Immunol*, 2022, 38(6): 522-527. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009378.
睢转, 张瑞, 杨安钢, 等. 突变型 p53 通过下调谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4) 表达和增加脂质活性氧产生促进人结肠癌和肺癌细胞的铁死亡[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2022, 38(6): 522-527. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.009378.
- [11] CHEN C, HUANG Y, XIA PP, et al. Long noncoding RNA Meg3 mediates ferroptosis induced by oxygen and glucose deprivation combined with hyperglycemia in rat brain microvascular endothelial cells, through modulating the p53/GPX4 axis[J]. *Eur J Histochem*, 2021, 65(3): 3224. DOI: 10.4081/ejh.2021.3224.
- [12] WANG M, MA L. Study on the mechanism of Dange Jiecheng Decoction on alcoholic liver disease based on network pharmacology and experimental verification[J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2023, 33(8): 716-722. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2023.008.009.
王铭, 马丽. 基于网络药理学与实验验证的丹葛解醒汤干预酒精性肝病机制研究[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2023, 33(8): 716-722. DOI: 10.3969/j.issn.1005-0264.2023.008.009.
- [13] WANG M, XU JH, MA L. Mechanism of action of Dange Jiecheng de-

- coction in a rat model of alcoholic liver disease based on the Kelch-like ECH-associated protein1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 signaling pathway[J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(5): 1119-1125. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.05.018.
王铭, 徐建虎, 马丽. 基于 Keap1/Nrf2 信号通路探讨丹葛解醒汤对酒精性肝病大鼠模型的作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(5): 1119-1125. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.05.018.
- [14] QI LMG, ZHANG J, DUAN HJ, et al. Comparison and evaluation of methods for establishing animal models of alcoholic liver disease[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(5): 153-161. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyj.20220627.001.
其乐木格, 张娟, 段海婧, 等. 酒精性肝病动物模型建立方法的比较与评价[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(5): 153-161. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyj.20220627.001.
- [15] YUAN HS, PRATTE J, GIARDINA C. Ferroptosis and its potential as a therapeutic target[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 186: 114486. DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114486.
- [16] SUN YT, CHEN P, ZHAI BT, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 127: 110108. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110108.
- [17] ZHUANG JL, RUAN FH, QIAN TM, et al. Ferroptosis and metabolic syndrome: From basic mechanism to therapeutic strategy[J]. Chin J Evid Based Cardiovasc Med, 2025, 17(2): 246-251. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2025.02.23.
庄金龙, 阮发晖, 钱涛铭, 等. 铁死亡与代谢综合征: 从基础机制到潜在治疗策略[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2025, 17(2): 246-251. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4055.2025.02.23.
- [18] LIU J, KANG R, TANG DL. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis[J]. FEBS J, 2022, 289(22): 7038-7050. DOI: 10.1111/febs.16059.
- [19] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: The role of GSH and GPx4[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 175-185. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.027.
- [20] TIAN Y, LU J, HAO XQ, et al. FTH1 inhibits ferroptosis through ferritinophagy in the 6-OHDA model of Parkinson's disease[J]. Neurotherapeutics, 2020, 17(4): 1796-1812. DOI: 10.1007/s13311-020-00929-z.
- [21] DANG YN, HE Q, YANG SY, et al. FTH1- and SAT1-induced astrocytic ferroptosis is involved in Alzheimer's disease: Evidence from single-cell transcriptomic analysis[J]. Pharmaceuticals (Basel), 2022, 15(10): 1177. DOI: 10.3390/ph15101177.
- [22] XU R, WANG WN, ZHANG WL. Ferroptosis and the bidirectional regulatory factor p53[J]. Cell Death Discov, 2023, 9(1): 197. DOI: 10.1038/s41420-023-01517-8.
- [23] ZHANG W, LIU Y, LIAO Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 174: 116512. DOI: 10.1016/j.biopha.2024.116512.
- [24] ZHANG ZL, LIN XY, WANG WR, et al. Effect of modified Shaofu Zhuyutang on ferroptosis in ectopic endometrial tissues of rats with endometriosis based on MDM4/p53/GPX4 signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2025, 31(4): 39-47. DOI: 10.13422/j.cnki.syfx.20242245.
张作良, 林祥羽, 王婉润, 等. 基于 MDM4/p53/GPX4 信号通路探讨加味少腹逐瘀汤对子宫内膜异位症大鼠异位子宫内膜组织铁死亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(4): 39-47. DOI: 10.13422/j.cnki.syfx.20242245.
- [25] ZHANG JH, HUO H, XU RQ, et al. Effect of MDM2 on ferroptosis in colon cancer cells through the P53/GPX4 pathway[J/OL]. J Yunnan Minzu Univ Nat Sci Ed, 2025. [Epub ahead of print]
张金华, 霍虹, 许瑞琪, 等. MDM2 通过 P53/GPX4 通路对结肠癌细胞铁死亡的影响[J/OL]. 云南民族大学学报(自然科学版), 2025. [网络首发]
- [26] GONG W, WANG Y, LI Q, et al. Regulation of SLC7A11 by LncRNA GPRC5D-AS1 mediates ferroptosis in skeletal muscle: Mechanistic exploration of sarcopenia[J]. Front Mol Biosci, 2025, 12: 1557218. DOI: 10.3389/fmolb.2025.1557218.
- [27] YU XY, WU WW, HAO JJ, et al. Ginger protects against vein graft remodeling by precisely modulating ferroptotic stress in vascular smooth muscle cell dedifferentiation[J]. J Pharm Anal, 2025, 15(2): 101053. DOI: 10.1016/j.jpah.2024.101053.
- [28] ZHOU YQ, ZHOU HX, HUA L, et al. Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of *PTGS2* as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 171: 55-68. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.009.

收稿日期: 2025-06-12; 录用日期: 2025-08-12

本文编辑: 刘晓红

引证本文: GUO SJ, ZHOU B, MA L. The mechanism of Dange Jiecheng decoction improving alcoholic liver disease in a rat model[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(11): 2351-2358.
郭苏军, 周波, 马丽. 丹葛解醒汤对酒精性肝病大鼠模型的改善作用及其机制分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(11): 2351-2358.