DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20230911.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20230911.1309.002

清热祛浊胶囊通过抑制铁死亡治疗非酒精性脂肪肝炎的作用机制

李华君,吕树泉,王立新,刘爱茹,王亚男,苏秀海,王元松✉
(河北省沧州中西医结合医院,河北 沧州 314000)

[摘要] **目的**:探究清热祛浊胶囊(QRQZ)治疗非酒精性脂肪肝炎(NASH)的效果并从抑制铁死亡的角度探究其作用机制。**方法**:60只C57BL/6J小鼠适应性喂养1周后随机分为正常(Control)、模型(Model)、铁死亡抑制剂(Fer-1, 10 mg/kg, 灌胃)、低剂量QRQZ(QRQZL, 482 mg/kg, 灌胃)、中剂量QRQZ(QRQZM, 964 mg/kg, 灌胃)、高剂量QRQZ(QRQZH, 1 929 mg/kg, 灌胃)6组,每组10只。正常组给予正常饮食,另外5组实验组均给予胆碱缺乏(MCD)饮食。整个给药过程持续6周,每周统计小鼠体重,6周后采集小鼠血液,分离血清测定ALT与AST,采集小鼠肝脏称重后固定,取同一部位进行HE与油红O染色,观察肝组织病理学变化,采用试剂盒测定肝组织中TC、TG、总铁、GSH、GSSG水平,采用RT-qPCR检测*Gpx4* mRNA表达,采用Western blotting检测FTH1、FTL、GPX4蛋白表达。**结果**:与模型组相比,Fer-1与QRQZ治疗后,NASH小鼠体重与肝指数有所回升,肝组织病变得到不同程度的缓解,TC、TG、ALT、AST都有不同程度的好转,肝组织Fe水平明显下降,FTH1、FTL蛋白相对水平明显升高,GSH/GSSG明显上升,*Gpx4* mRNA以及GPX4蛋白的表达水平明显升高。**结论**:QRQZ可以通过促进GSH/GPX4抗氧化系统的表达以及抑制铁死亡缓解NASH小鼠的肝损伤。

[关键词] 非酒精性脂肪肝炎;清热祛浊胶囊;铁死亡;GPX4;抗氧化
[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1007-1237(2023)21-1620-05

The mechanism of Qingre Quzhuo capsule in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis by inhibiting ferroptosis

LI Hua-jun, LV Shu-quan, WANG Li-xin, LIU Ai-ru, WANG Ya-nan, SU Xiu-hai, WANG Yuan-song ✉
(*CangZhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine*, *Cangzhou* 314000, *China*)

[*Foundation Project*]: *Su Xiuhai National Famous Traditional Chinese Medicine Expert Inheritance Studio* [*Guozhong Pharmaceutical Renjiao Letter* (2022) *No.* 75]

[*Author*]: *LI Hua-jun*, *E-mail*: *lihj*1980@163.*com*.
[*Correspondence to*]: *WANG Yuan-song*, *Ph.D.*, *Chief Traditional Chinese Medicine Practitioner*, *E-mail*: 2426104415@*qq.com*.

Received: 2023-07-02 *Revised*: 2023-09-08 *JHMU*, 2023;29(21):1620-1624

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[ABSTRACT] **Objective**: To explore the effect of Qingre Quzhuo Capsule (QRQZ) in the treatment of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and to explore its mechanism from the perspective of inhibiting ferroptosis. **Methods**: 60 C57BL/6J mice were randomly divided into 6 groups: Control, model, ferroptosis inhibitor (Fer-1, 10 mg/kg, gavage), low-dose QRQZ (QRQZL, 482 mg/kg, gavage), medium-dose QRQZ (QRQZM, 964 mg/kg, gavage), and high-dose QRQZ (QRQZH, 1 929 mg/kg, gavage). The control group was given normal diet, and the other experimental groups were given MCD diet. The whole administration process lasted for 6 weeks. The body weight of mice was counted every week. After 6 weeks, the blood of mice was collected, and the serum was separated to determine ALT and AST. The liver of mice was weighed and fixed. The same part was

[基金项目] 苏秀海全国名老中医药专家传承工作室[国中医药人教函(2022)75号]
[作者简介] 李华君,E-mail:lihj1980@163.com。
[通讯作者] 王元松,博士,主任中医师,E-mail:2426104415@qq.com。
[收稿日期] 2023-07-02 [修回日期] 2023-09-08 网络出版时间:2023-09-12 09:25:37

stained with HE and Oil Red O to observe the pathological changes of liver tissue. The levels of TC, TG, total iron, GSH and GSSG in liver tissue were measured by kit. The expression of *Gpx4* mRNA was detected by RT-qPCR, and the expression of FTH1, FTL and GPX4 protein was detected by Western blotting. **Results**: Compared with the model group, after treatment with Fer-1 and QRQZ, the body weight and liver index of NASH mice increased, the liver tissue lesions were alleviated, TC, TG, ALT and AST were improved, the liver tissue iron level decreased significantly, the relative levels of FTH1 and FTL proteins increased significantly, GSH/GSSG increased significantly, and the expression of *Gpx4* mRNA and GPX4 protein increased significantly. **Conclusion**: QRQZ alleviates liver injury in NASH mice by promoting the expression of GSH/GPX4 antioxidant system and inhibiting ferroptosis.

[**KEYWORDS**] Non-alcoholic steatohepatitis; Qingre Quzhuo Capsule; Ferroptosis; GPX4; Antioxidation

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)在全球的发病率为25%,是最常见的慢性肝病之一,也是导致肝硬化和肝细胞癌的主要原因之一[1]。非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)是NAFLD的进展阶段,其表现出的坏死性炎症以及更快的纤维化进展,加快了其向肝硬化和肝细胞癌的演变[2]。目前对NAFLD和NASH尚无特效治疗方法,仅有几种药物处于开发阶段,以至于临床仍然将改善生活方式与药物结合的综合疗法作为应对策略[3]。鉴于非酒精性脂肪肝和NASH的全球负担迅速增加,开发安全有效的药物延缓疾病进展已成为一个亟需解决的问题。

中医药及其有效成分在治疗NAFLD和NASH中有着许多出色的表现。九味清脂膏可通过改善内线粒体脂质过氧化,减少氧化应激反应而改善NASH的肝损伤[4]。黄芩汤通过抑制TLR2/MyD88/NF-κB信号通路和IL-23/IL-17轴治疗NASH[5]。葛根芩连汤通过抑制TLR4信号途径的抗氧化和抗炎反应来减轻NASH相关的肝损伤[6]。姜黄素通过上调Nrf2的表达从而治疗HFD诱导的NASH小鼠[7]。阐明中医药治疗NASH作用机制有利于推动中医药现代化进程。

清热祛浊胶囊(qingre quzhuo capsule, QRQZ)由桑白皮、黄连、知母、泽泻、枳实、红花、大黄、茯苓、山药、川牛漆10种中草药组成。临床研究表明QRQZ可以改善2型糖尿病患者的糖代谢指标,降低机体的炎性因子水平,改善血管内皮功能,治疗安全性良好。此外,有研究发现QRQZ可通过调节NASH小鼠肠道菌群,从而改善受损的肠道屏障并减少内毒素血症,抑制TLR4/NF-κB信号通路在肝脏的激活[8]。然而,QRQZ治疗NASH的作用机制尚不明晰。本研究拟使用QRQZ治疗蛋氨酸和胆碱缺乏(methionine and choline deficiency, MCD)饮食建立的NASH小鼠模型。首先研究QRQZ对NASH小鼠的治疗作用,之后研究QRQZ对NASH小鼠肝脏铁死亡以及GPX4的影响,以期阐明QRQZ治疗NASH的机制,为QRQZ临床应用治疗NASH提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物

60只SPF级6～8周龄健康雄性C57BL/6 J小鼠,体重20～22 g,购买于北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0008。每5只小鼠一笼,饲养温度(24±2)℃,相对湿度(55±5)%,明暗周期12 h,小鼠自由进食饮水。

1.2 药品与试剂

铁死亡抑制剂Fer-1(货号:HY-100579, MCE);清热祛浊胶囊(货号:Z20070040,河北省沧州中西医结合医院);BCA法微量蛋白检测试剂盒(货号:W041-1-1,南京建成生物工程研究所);牛血清白蛋白(货号:BSA,W071-1-1,南京建成生物工程研究所);改良油红O染液(货号:G1263,北京索莱宝科技有限公司);苏木素-伊红(H&E)染液(货号:D006-1-4,南京建成生物工程研究所);血清丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)测试盒(货号:C009-2-1)、天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)测试盒(货号:C010-2-1)、肝组织甘油三酯(Triglyceride, TG)测试盒(货号:A110-1-1)、总胆固醇(Total cholesterol, TC)测试盒(货号:A111-1-1)、总铁(Total iron content, Fe)测试盒(货号:A039-2-1)、谷胱甘肽(Glutathione, GSH)测试盒(货号:A006-2-1)、氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)测试盒(货号:A061-1-2)均购自南京建成生物工程研究所;一抗:重链铁蛋白(Ferritin heavy polypeptide 1, FTH1, 货号:K108517P)、轻链铁蛋白(Ferritin light polypeptide, FTL, 货号:K002972P)、谷胱甘肽过氧化物酶4(Glutathione Peroxidase 4, GPX4, 货号:K113159P);二抗:羊抗兔IgG-HRP(货号:SE134)均购自北京索莱宝科技有限公司;总RNA提取试剂盒(货号:#DP419)、cDNA反转录试剂盒

（货号：#KR116-02）、SYBR扩增试剂盒（货号：#P205-02）均购自天根生化科技（北京）有限公司。

1.3 仪器

STST FAX 2011全自动酶标仪（Awareness Technology Inc，USA）；PowerPAC Basic电泳仪和ChemiDoc XRS凝胶成像自动分析仪（Bio-Rad公司）；H3-18KR型高速冷冻离心机（湖南可成）；LEPGEN-96荧光定量PCR仪（北京乐普）。

1.4 造模、分组与给药

60只C57BL/6J小鼠适应性喂养1周后随机平均分为正常（Control）、模型（Model）、铁死亡抑制剂（Ferrostatin-1，Fer-1）、低剂量QRQZ（QRQZL）、中剂量QRQZ（QRQZM）、高剂量QRQZ（QRQZH）6组。正常组给予正常饮食，另外5组实验组均给予MCD饮食，Fer-1组每天接受10 mg/kg的Fer-1灌胃，QRQZL、QRQZM、QRQZH组每天分别给予482 mg/kg、964 mg/kg、1 929 mg/kg的QRQZ灌胃，QRQZ剂量根据等效剂量换算公式计算得出，其中中剂量为人等效剂量，正常与模型组每天分别接受等体积的生理盐水灌胃作为平行对照，每7天称量小鼠体重并记录。整个给药过程持续6周，6周后使用戊巴比妥钠对小鼠进行麻醉，从心脏中抽取血液后处死，将血置于离心机中分离出血清并存于－80 ℃。肝脏快速取出并称重，用于病理切片的肝组织应取于同一部位的肝叶，置于福尔马林溶液中固定，剩余部分的肝叶用锡纸包裹储存于－80 ℃。

1.5 病理学染色与生化检测

将固定好的肝组织制成石蜡切片，经H&E染色后光镜下观察各组肝组织大体的病变与炎症情况。将速冻的新鲜肝组织制作成冰冻切片，经油红O染色后光镜下观察肝组织内脂肪的聚集，此外，通过Image J软件对油红O染色中阳性区域进行量化，进一步评估各组小鼠肝组织脂质沉积水平。

血清ALT、AST采用相应试剂盒进行测定，肝组织TG、TC、Fe、GSH、GSSG采用相应试剂盒进行测定。

1.6 RT-qPCR检测*Gpx4* mRNA表达

按照总RNA提取试剂盒的方法从肝组织及细胞中提取总RNA，之后反转录获得cDNA，最后使用qPCR测定*Gpx4*的mRNA表达量。引物序列见表1，使用$2^{-\Delta\Delta CT}$法基于*β-actin*计算目标mRNA相对表达量。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因名称	引物序列（5′→3′）
Gpx4	上游：CCGTCTGAGCCGCTTACTTA
	下游：GTGACGATGCACACGAAACC
β-actin	上游：CCCCTGAACCCTAAGGCCA
	下游：ATGGCTACGTACATGGCTGG

1.7 Western blotting检测FTH1、FTL、GPX4蛋白表达

取30 mg肝组织提取总蛋白，使用BCA测定蛋白浓度。提取的蛋白质通过SDS-PAGE分离后电转到PVDF膜。使用5%脱脂奶粉溶液封闭膜1 h，随后用FTH1、FTL、GPX4的抗体在4 ℃下孵育过夜。用TBST清洗3次孵育后的膜，然后用HRP标记的二抗在室温下培养1 h，再次洗膜后经ECL化学发光显影，最后使用Image J软件对条带进行量化分析。

1.8 统计学分析

采用Excel 2021以及SPSS Pro在线数据分析平台进行数据分析，实验数据（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用t检验，$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

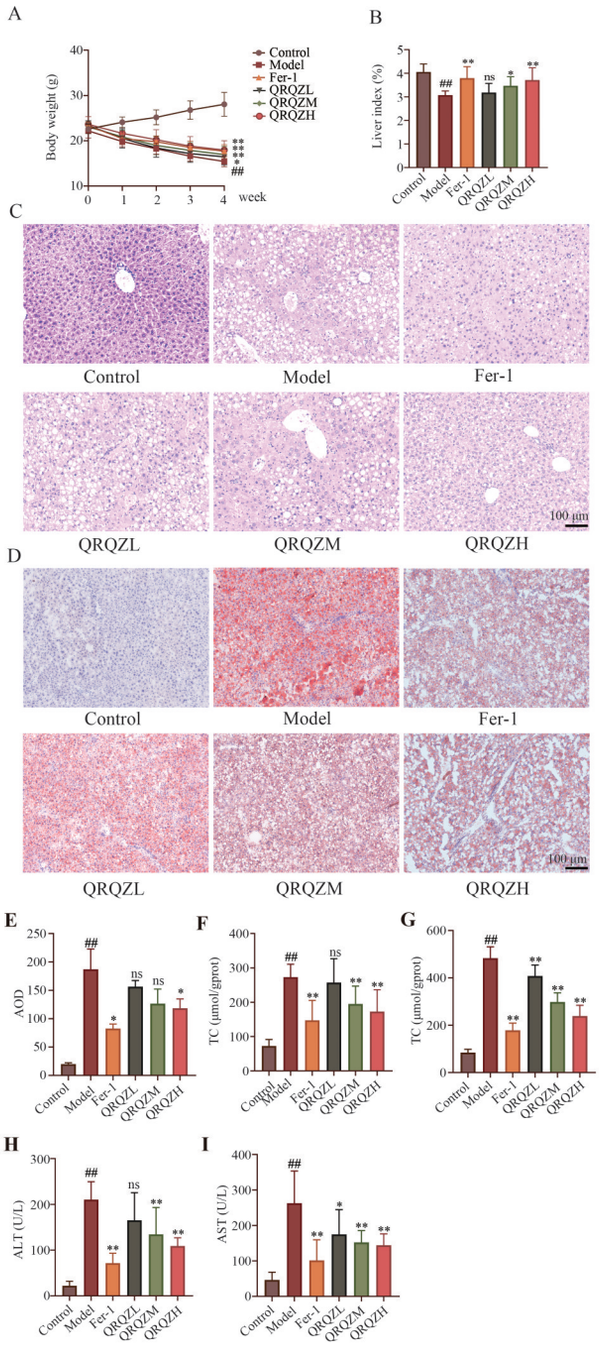
2.1 QRQZ对NASH小鼠的治疗作用

与正常组相比，模型组NASH小鼠体重以及肝指数明显降低，Fer-1与QRQZ治疗后，NASH小鼠体重与肝指数有所回升，其中Fer-1与QRQZH治疗效果最为明显（$P<0.01$，见图1A、B）。HE结果显示，正常组小鼠肝板排列整齐，结构正常；模型组NASH小鼠出现大量空泡样脂肪变性，肝板排列紊乱且有大量炎细胞浸润；Fer-1与QRQZ治疗后NASH小鼠肝脏脂肪滴空泡比例均显著下降，炎细胞浸润得到改善（见图1C）。油红O染色结果显示，模型组NASH小鼠肝脏脂肪样变严重，橘红色脂肪滴占据了细胞大部分面积；Fer-1与QRQZ治疗后NASH小鼠肝脏脂肪样变得到不同程度的缓解（$P<0.05$，见图1D、E）。此外，与正常组相比，模型组NASH小鼠肝脏中TC，TG含量以及血清中的ALT，AST活性均显著升高，Fer-1与QRQZ治疗后NASH小鼠TC、TG、ALT、AST相较模型组都有不同程度的好转（$P<0.01$，见图1F～I）。

2.2 QRQZ对NASH小鼠肝细胞铁死亡的影响

NASH小鼠肝组织Fe水平检测结果显示，模型组肝组织Fe水平较正常组明显升高，Fer-1与QRQZ治疗后，肝组织Fe水平明显下降，其中Fer-1与QRQZH治疗效果最为明显（$P<0.01$，见图2A）。

Western blotting结果显示，与正常组相比，模型



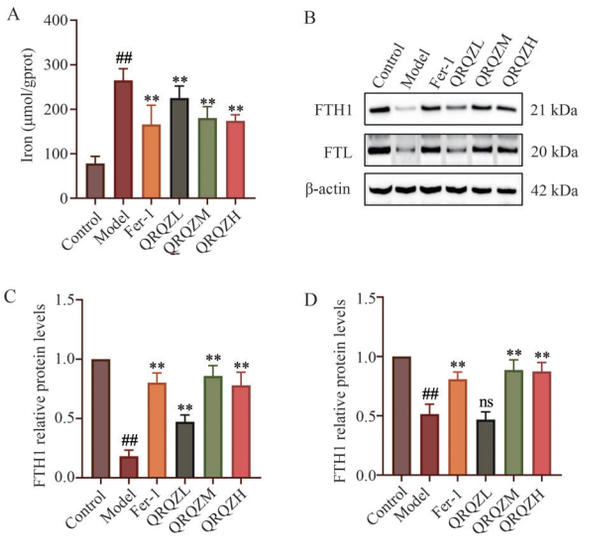
A、B：NASH小鼠体重与肝指数，n=10；C：HE染色，n=6；D：油红O染色，n=6；E：油红O量化，n=6；F，G：肝脏TC、TG含量，n=10；H，I：血清ALT、AST含量，n=10

与正常组比较，$^{\#\#}P<0.01$；与正常组比较，$^{\#}P<0.05$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$^{**}P<0.01$

图1 QRQZ对NASH小鼠的治疗作用

Fig 1 Treatment of QRQZ on NASH mice

组NASH小鼠肝组织中FTH1、FTL蛋白相对水平明显降低；与模型组相比，Fer-1、QRQZM、QRQZH组肝组织中FTH1、FTL蛋白相对水平明显升高（$P<0.01$，见图2B～D）。



A：NASH小鼠肝组织Fe水平，n=10；B：Western blotting结果，n=3. C、D：Western blotting量化，n=3

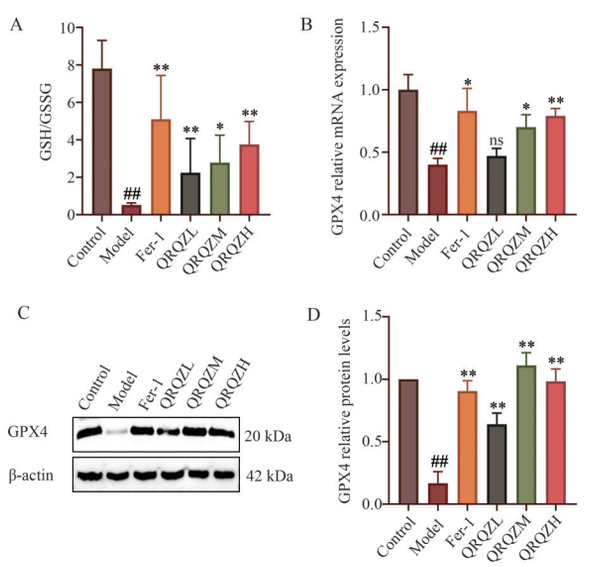
图2 QRQZ对NASH小鼠肝细胞铁死亡的影响

Fig2 Effect of QRQZ onhepatocyte ferroptosis in NASH mice

2.3 QRQZ对NASH小鼠GSH/GPX4通路的影响

NASH小鼠肝组织GSH/GSSG水平检测结果显示，模型组的肝组织GSH/GSSG相对正常组明显下降，Fer-1与QRQZ治疗后，肝组织GSH/GSSG明显上升（$P<0.01$，见图3A）。

RT-qPCR和Western blotting结果显示，与正常组相比，模型组的肝组织*Gpx4* mRNA以及GPX4蛋白的表达水平明显降低；与模型组相比，



A：GSH/GSSG水平，n=10；B：RT-qPCR结果，n=3；C：Western blotting结果，n=3；D：Western blotting量化，n=3

图3 QRQZ对NASH小鼠GPX4通路的影响

Fig 3 Effect of QRQZ on GPX4 pathway in NASH mice

Fer-1、QRQZM、QRQZH组肝组织*Gpx4* mRNA以及GPX4蛋白的表达水平明显升高（$P<0.01$，见图3B～D）。

3 讨论

MCD饮食通过减少小鼠对蛋氨酸和胆碱的摄入，导致极低密度脂蛋白合成减少，脂肪无法得到分解利用而不断积累，诱导肝细胞脂肪变性，之后迅速发展出渐进性肝炎以及纤维化反应，最终形成NASH，是目前常用的NASH造模方法之一[9]。本研究中，模型组小鼠肝指数增大，血清中ALT和AST水平显著升高，肝脏中TC和TG水平升高，HE和油红O染色显示模型小鼠肝脏有明显的脂肪变性，伴有大量炎细胞浸润，与NASH的病理变化一致。QRQZ治疗后，显著改善了NASH小鼠的肝功能异常，同时减少肝脂肪沉积。Fer-1表现出了与QRQZ相似的治疗效果，这提示QRQZ可能通过抑制肝细胞铁死亡来治疗NASH。

“铁死亡”最早由Brent R Stockwell在2012年提出，它是一种铁离子依赖的新型细胞调节性死亡[10]。其生化特征区别于细胞凋亡、坏死、自噬、焦亡，其机制简单概括为细胞膜上铁依赖性的脂质过氧化物超限蓄积诱导细胞死亡[11]。生理情况下，细胞外的铁离子（Fe^{3+}）通过转铁蛋白进入细胞被还原为亚铁离子（Fe^{2+}），Fe^{2+}可以与铁蛋白（FTH1/FTL）结合储存于细胞内，也可被氧化成Fe^{3+}通过膜转铁蛋白转出细胞，参与体内铁循环，维持机体铁稳态[12]。肝脏是机体内重要的铁库，约占机体储存铁含量1/3，肝细胞脂肪变性以及肝纤维化的进程加剧会导致FTH1/FTL的大量降解以及游离铁的大量产生，使其对铁死亡的敏感性显著提升[13]。有研究表明铁死亡是脂肪肝中最先发生的细胞死亡形式，特异性抑制肝细胞铁死亡，肝组织炎症几乎被完全抑制[14]。本研究发现，使用QRQZ治疗后，NASH小鼠肝组织铁水平得到回调，铁蛋白FTH1、FTL相对表达水平上升，有效缓解了NASH小鼠肝损伤，这与铁死亡抑制剂Fer-1治疗后效果相似，提示QRQZ可以通过上调肝组织FTH1、FTL蛋白表达水平，下调肝组织铁水平而抑制肝细胞铁死亡改善NASH造成的肝损伤。

GSH/GPX4是针对脂质过氧化物蓄积的抗氧化系统，抑制GSH/GPX4系统会导致细胞膜过氧化损伤和铁死亡[15]。GSH在GPX4发挥抗氧化过程中发挥着重要的辅助作用，GSH缺乏将导致GPX4失活，而GPX4是已知的唯一能够直接清除脂质过氧化物的酶，在铁死亡的过程中发挥核心调控的作用，敲除GPX4相关基因或使用GPX4抑制剂（如RSL3）将会诱导细胞铁死亡[16]。本研究结果显示，使用QRQZ治疗后，NASH小鼠肝组织内GSH/GSSG明显上升，*Gpx4* mRNA以及GPX4蛋白的表达水平明显升高，表明QRQZ可以有效促进NASH小鼠肝脏中受抑制的GSH/GPX4抗氧化系统表达。

综上所述，QRQZ可以通过促进GSH/GPX4抗氧化系统表达以及抑制铁死亡缓解NASH小鼠的肝损伤。

作者贡献度说明：

李华君：撰写论文、分析数据；王立新、刘爱茹、王亚男：参与实验、分析数据；吕树泉：提出研究思路，设计实验方案；苏秀海：提出研究思路、技术及经费支持；王元松：技术支持、对论文提出指导意见。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes[J]. Hepatology, 2016, 64(1): 73-84.

2 Huby T, Gautier EL. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis[J]. Nature Rev Immunol, 2021, 22(7): 429-443.

3 Kakleas K, Christodouli F, Karavanaki K. Nonalcoholic fatty liver disease, insulin resistance, and sweeteners: A literature review[J]. Exp Rev Endocrinol Amp Metabol, 2020, 15(2): 83-93.

4 陆玮婷，史会连，刘丽娜，等. 九味清脂膏改善非酒精性脂肪肝炎小鼠肝脏炎症模型疗效观察[J]. 辽宁中医杂志，2023，50(3)：5.

5 严宝飞，戴仕林，刘圣金，等. 黄芩汤对非酒精性脂肪肝炎大鼠的作用及机制研究[J]. 中国医院药学杂志，2022，42(10)：6.

6 Zhang C, Xiao Q, Sheng J, et al. Gegen qinlian decoction abates nonalcoholic steatohepatitis associated liver injuries via anti-oxidative stress and anti-inflammatory response involved inhibition of toll-like receptor 4 signaling pat[J]. Biomed Amp Pharm, 2020, 126(1): 110076.

7 El-Hameed NMA, El-Aleem SAA, Khattab MA, et al. Curcumin activation of nuclear factor E2-related factor 2 gene (Nrf2): Prophylactic and therapeutic effect in non-alcoholic steatohepatitis (NASH)[J]. Life Sci, 2021, 285(15): 119983.

（下转第1631页）