

基于生物信息学及实验验证白桦脂酸抑制铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病的作用机制

唐高俊¹, 胡杰¹, 罗莉¹, 吴欢¹, 张权², 张宝芳^{2*}

(1. 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550000; 2. 贵州医科大学附属医院, 贵阳 550000)

[摘要] 目的:通过生物信息学分析及实验验证,探究白桦脂酸(BA)抑制铁死亡改善非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的作用机制,为NAFLD基础研究及临床应用提供一定的参考。方法:生物信息学分析,从基因表达综合(GEO)数据库中下载了NAFLD的GSE89632和GSE63067的微阵列数据集,其次在铁死亡数据库中下载铁死亡相关基因,筛选NAFLD铁死亡差异性表达基因(DEGs),构建蛋白质互作网络(PPI)、基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;利用不同算法挖掘关键DEGs,对关键DEGs进行相关性分析、免疫浸润、免疫细胞差异分析,最小绝对收缩和选择算子(LASSO)回归分析对关键DEGs获取疾病特征基因,Cytoscape不同算法获取的关键基因与LASSO回归获取的疾病特征基因两者交集筛选核心基因,受试者工作特征曲线(ROC)对获取核心基因进行验证,分析NAFLD新潜在靶点并预测中药,对核心靶点和中药有效活性成分进行分子对接验证。动物实验验证,将50只C57BL小鼠随机分为正常组,模型组,白桦脂酸低、高剂量组,水飞蓟宾组,模型建立采用高脂高胆固醇饮食加2.5%的葡聚糖硫酸钠(DSS)自由饮方式,药物组连续灌胃24 d。取材检测各组小鼠的体质量及肝脏指数,苏木素-伊红(HE)染色评估肝脏脂滴沉积情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测谷胱甘肽过氧化物酶7(GPX7)、乳铁蛋白(LTF)、S100钙结合蛋白A8(S100A8)、铁死亡标志物谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)蛋白/mRNA表达水平。结果:数据分析出10个NAFLD铁死亡过程关键基因,包括SUMO特异性肽酶1(SEN1)、醛酮还原酶家族1成员C3(AKR1C3)等。LASSO-ROC分析确定GPX7、LTF、S100A8为核心基因[曲线下面积(AUC)=0.771~0.821]。KEGG富集显示差异基因参与铁死亡、高级糖基化终末产物/受体(AGE/RAGE)等信号通路。NAFLD铁死亡过程关键基因相关性分析显示,SEN1与AKR1C3等基因为显著正相关($P<0.01$),二肽基肽酶4(DPP4)与GPX7等基因为显著负相关($P<0.01$),免疫浸润分析结果显示,髓源性抑制细胞(MDSCs)、活化的树突状细胞等免疫细胞是浸润NAFLD参与铁死亡过程的主要免疫细胞;免疫细胞差异相关性分析发现GPX7与滤泡状辅助性T细胞等呈负相关($P<0.01$),而S100A8和髓源性抑制细胞呈正相关($P<0.01$)。动物实验发现,白桦脂酸干预NAFLD小鼠可显著降低小鼠肝脏指数,脂滴沉积;与正常组比较,模型组S100A8、ACSL4蛋白/mRNA表达水平显著升高($P<0.01$),LTF、GPX7、GPX4显著下降($P<0.01$),与模型组比较,水飞蓟宾组及白桦脂酸组可以部分逆转这一趋势,且呈药物剂量依赖。结论:白桦脂酸可能通过调控GPX7、LTF、S100A8抑制铁死亡进程,减轻肝脏炎症及脂质沉积,其机制与恢复GPX4活性、下调ACSL4表达相关。

[关键词] 生物信息学; 白桦脂酸; 分子对接; 非酒精性脂肪性肝病; 铁死亡

[中图分类号] R256.4;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)16-0160-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20250519

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250514.2024.001>

[网络出版日期] 2025-05-15 13:02:10 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Action Mechanism of Betulinic Acid in Inhibiting Ferroptosis and Improving Non-alcoholic Fatty Liver Disease Based on Bioinformatics and Experimental Validation

TANG Gaojun¹, HU Jie¹, LUO Li¹, WU Huan¹, ZHANG Quan², ZHANG Baofang^{2*}

(1. Clinical Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China;

[收稿日期] 2025-01-21

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(82060114);贵州省卫生健康委员会2024年科技基金项目(gzkwj2024-010);贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2024]—一般210);贵州医科大学感染性疾病与肝病研究重点实验室项目(2024FY-006)

[第一作者] 唐高俊,在读硕士,主治医师,从事非酒精性脂肪性肝病研究,E-mail:137090618@qq.com

[通信作者] *张宝芳,博士后,副教授,从事内科学肝病相关研究,E-mail:312368145@qq.com

2. *Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550000, China)*

[Abstract] **Objective:** This paper aims to investigate the action mechanism of betulinic acid (BA) in inhibiting ferroptosis and improving non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) through bioinformatics analysis and experimental validation, providing references for both basic research and clinical applications of NAFLD. **Methods:** Based on bioinformatics analysis, the NAFLD-related microarray datasets, GSE89632 and GSE63067, were downloaded from the gene expression omnibus (GEO) database. Ferroptosis-related genes were downloaded from the ferroptosis database, and differentially expressed genes (DEGs) related to NAFLD ferroptosis were screened to construct enrichment analyses of protein-protein interaction (PPI) networks, gene ontology (GO), and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). Different algorithms were used to mine key DEGs, which were further analyzed for correlation, immune infiltration, and immune cell differences of key DEGs. Least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) regression analysis was conducted to identify disease feature genes from the key DEGs. The intersection of key genes from various algorithms of Cytoscape and the disease feature genes identified through LASSO regression was used to select core genes. The survival curve, namely receiver operating characteristic (ROC) curve, was performed to validate these core genes. Potential new targets for NAFLD were analyzed and predicted, and molecular docking was used to verify the core targets and active components of traditional Chinese medicine. Animal experiment was conducted. Fifty C57BL/6J mice were randomly divided into the normal group, model group, low-dose/high-dose BA groups, and silymarin group. The model was established by feeding a high-fat and high-cholesterol diet combined with 2.5% dextran sulfate sodium (DSS) in drinking water, followed by continuous gavage for 24 days in the drug groups. Body weight and liver index of mice were measured at sampling, and hematoxylin and eosin (HE) staining was used to assess hepatic lipid droplet deposition. Western blot and real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) were performed to detect the expression levels of glutathione peroxidase 7 (GPX7), lactotransferrin (LTF), S100 calcium binding protein A8 (S100A8), ferroptosis markers GPX4, and acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) at the protein and mRNA levels. **Results:** Data analysis identified 10 key genes in the ferroptosis process of NAFLD, including SUMO-specific peptidase 1 (SEN1), aldo-keto reductase family 1 member C3 (AKR1C3), and others. Least absolute shrinkage and selection operator- receiver operating characteristic (LASSO-ROC) analysis confirmed that GPX7, LTF, and S100A8 were core genes [area under the curve(AUC)=0.771–0.821]. KEGG enrichment analysis revealed that these differentially expressed genes were involved in ferroptosis, advanced glycation end-products/receptor (AGE/RAGE), and other pathways. Correlation analysis of key genes in ferroptosis process of NAFLD showed significant positive correlations between SEN1 and AKR1C3 as well as other genes ($P<0.01$), and significant negative correlations between dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) and GPX7 as well as other genes ($P<0.01$). Immune infiltration analysis showed that myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), activated dendritic cells, and other immune cells were the primary immune cells infiltrating in NAFLD and involved in the ferroptosis process. Differential correlation analysis of immune cell revealed a significant negative correlation between GPX7 and follicular helper T cells as well as others ($P<0.01$), while S100A8 showed a significant positive correlation with MDSCs ($P<0.01$). In the animal experiments, NAFLD mice with BA intervention showed significantly reduced liver index and lipid droplet deposition. Compared to the normal group, the model group exhibited significantly increased proteins/mRNA levels of S100A8 and ACSL4 ($P<0.01$) and significantly decreased levels of LTF, GPX7, and GPX4 ($P<0.01$). In comparison with the model group, both the silymarin and BA groups partially reversed these trends in a dose-dependent manner. **Conclusion:** BA may inhibit the ferroptosis process and alleviate liver inflammation and lipid deposition by regulating GPX7, LTF, and S100A8. The mechanism is related to the restoration of GPX4 activity and downregulation of ACSL4 expression.

[Keywords] bioinformatics; betulinic acid; molecular docking; non-alcoholic fatty liver disease; ferroptosis

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)是一种潜在的严重疾病,影响着世界30%的人口^[1],已成为全球最普遍的慢性肝脏疾患之一^[2]。NAFLD包括从非酒精性脂肪肝(NAFL)到非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、纤维化和肝硬化等一系列疾病过程^[3]。NAFLD的发病机制仍处于探索阶段,目前在发病机制上占主导地位的仍然是“二次打击”学说^[4],“二次打击”导致肝细胞变性、坏死、炎性反应,严重者可进展至肝纤维化、肝硬化。NAFLD的患病率和对全球健康影响不断增加^[5],但对其发病机制的了解不完全,仍然缺乏有效的治疗策略。近年来,

广泛的研究揭示了铁死亡在肝病发病机制中的重要作用^[6-9]。铁死亡是一种独特的氧化细胞死亡类型,呈铁依赖性,与脂质过氧化有关^[9-10]。由于铁死亡广泛地参与到NAFLD疾病进程中,肝脏铁死亡在NAFLD发生和发展中的作用已被强调。肝细胞铁死亡可能会通过增加肝细胞肿胀、炎症和纤维化的可能性来加速NAFLD,从而加快从单纯脂肪变性到NASH的进展^[11-12]。因此,靶向抑制肝细胞铁死亡已被证实为延缓NAFLD疾病进程的关键治疗策略。

NAFLD迄今缺乏特效治疗药物,现阶段防治策略仍以调整生活方式与膳食结构优化为主^[13]。

在此背景下,中医药多靶点协同作用的治疗优势凸显。查阅中医典籍,未见NAFLD的直接病名记载,依据其临床表现可归类于“胁痛”“肥气”等证候范畴。《金匱要略》对病理积聚的阐释“积乃脏病,持久而不移;聚为腑疾,时作时止”^[14],系统性区分不同证型特征。现代大多数医家认为该病是由于素体肝郁脾虚,体内水液代谢障碍,导致痰浊淤积于肝脏,与“痰、食、湿、瘀”关系密切,从而把本病统一归属为“肝癖”范畴。结合中医的传统理论,通过网络药理学方法寻找到针对相关证候的中药单体,如槲皮素、山柰酚、白桦脂酸等^[15],从配伍的角度有助于解表清里、清热燥湿、燥湿化痰、生津润燥,正好切中NAFLD燥热伤津、湿热瘀结、痰瘀互结的病机。笔者采用了生物信息学及网络药理学等方法探究他们之间的机制,分子对接进行验证,最后选择白桦脂酸中药单体进行实验验证,为临床应用及基础研究提供一定的参考。

1 生物信息学分析

1.1 NAFLD靶点及铁死亡相关基因集获取 以“NAFLD”为关键词,在基因表达综合(GEO)数据库搜索与NAFLD相关的数据集,并通过R4.3.3对数据集进行数据合并分析,在铁死亡数据库中检索铁死亡相关基因。

1.2 NAFLD(DEGs)与铁死亡相关基因交集的获取 利用软件R(4.2.1)版本,R包:ggplot2[3.3.6],VennDiagram[1.7.3],并对结果进行可视化,获取NAFLD差异基因(DEGs)及铁死亡相关基因的交集,并绘制韦恩图;交集基因的热图、火山图、主成分分析(PCA)图及基因本体(GO)、京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。

1.3 通过蛋白质相互作用检索工具(String)数据库构建蛋白质PPI互作网络、Cytoscape 3.9.1软件 通过不同算法筛选关键基因在String 12.0数据库(<https://www.string-db.org>)中构建蛋白质-蛋白质相互作用网络,利用网络分析器(cytNCA)、分子复合物检测(Mcode)、枢纽节点分析工具(cytohub)3种不同算法,R包:ggplot2[3.3.6],VennDiagram[1.7.3]获取并得到疾病与铁死亡交集关键基因并构建关键基因网络图。

1.4 关键基因相关性分析 为了了解关键基因之间的关系,利用R及ggplot2包(3.3.6)进行可视化分析,并绘制关键基因的相关性热图。

1.5 最小绝对收缩和选择算子(LASSO)回归获取的疾病特征基因 接收者操作特征曲线(ROC)曲

线分析对获取核心基因进行验证LASSO回归筛选疾病可靠基因,有助于提高模型的预测能力和解释性,与Cytoscape 3.9.1软件不同算法筛选关键基因取交集获取核心基因。ROC曲线分析对获取核心基因进行验证。

1.6 核心基因免疫浸润及免疫细胞差异分析 为了探索疾病的免疫微环境,采用细胞类型识别通过估计RNA转录本的相对亚群(CIBERSORT,<http://CIBERSORT.stanford.edu/>)计算免疫细胞浸润评分,最后通过R对免疫细胞进行免疫浸润分析、免疫细胞差异分析、核心基因与差异免疫细胞相关性分析。

1.7 NAFLD相关中药单体预测及筛选 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)筛选有效活性成分,结合治疗NAFLD的相关研究^[15],最后选取治疗潜力较高的中药单体进行后续实验。

1.8 分子对接 使用蛋白晶体结构从通用蛋白质资源(UniPort)数据库中下载获得,小分子药物单体的3D结构从公共化学数据库(PubChem)数据库下载获得,本研究采用AutoDockVina 1.2.1软件^[16]进行分子对接工作,在对接开始之前,使用PyMOL 2.5.5^[17]对受体蛋白进行处理。对接时,全局搜索的详尽度设为8,其余参数保持默认设置。输出的打分最高的对接构象被认为是结合构象,最后使用PLIP及PyMOL 2.5.5对接结果进行可视化分析。

2 生物信息学结果

2.1 在GEO数据库中检索了NAFLD相关的基因表达微阵列 GSE63067和GSE89632两个数据集,分别包含2例单纯性肥胖患者、9例NASH患者、20例单纯性肥胖患者、19例NASH患者及24例健康人样本。得出了GSE63067和GSE89632两个数据集的合并分析数据。根据筛选条件, $\log_2FC$ 的绝对值 ≥ 0.5 ,以及 $P \leq 0.05$,识别出NAFLD(NAFLD)的差异表达基因(DEGs)共801个。此外,在铁死亡相关数据库中,筛选出了与铁死亡促进、抑制及铁死亡标记相关的基因,共计501个。

2.2 GO、KEGG富集分析 利用软件R及ggplot2包和VennDiagram包对结果进行可视化,得到NAFLD(DEGs)及铁死亡相关基因的交集基因32个。利用match函数及RComplexHeatmap包[2.13.1]进行热图的可视化,得到差异基因热图及差异基因PCA图。利用R包:ggplot2[3.3.6]对差异分析结果进行可视化, $\log_2FC$ 绝对值 > 0.5 , $P < 0.05$;

得到32个靶点基因的差异火山图。进行GO、KEGG富集分析,并对富集分析结果进行可视化,GO分析分别从基因的细胞组分、生物过程、分子功能方面进行注释富集分析。可见交集基因在脂质代谢、活性氧代谢、氧化还原代谢、应激反应、缺氧反应等功能富集,KEGG富集可见差异基因在高级糖基化终末产物/受体(AGE/RAGE)信号通路、酒精性肝病、NAFLD、铁死亡、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路、白细胞介素(IL)-17信号通路等上富集。根据不同分值绘制各通路之间的网状图。见增强出版附加材料。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析 在STRING 12.0数据库中构建交集基因,生物种类设定为智人、分数(Score)默认为0.4, $P=2.55\times 10^{-9}$,通过Cytoscape 3.9.1软件不同算法筛选关键基因,利用cytoNCA、Mcode、cytoHubbaMCC算法设置条件为前10个节点进行筛选,通过3种不同算法,对结果进行并集得到TNF、IL-1 β 、谷胱甘肽过氧化物酶7(GPX7)、血红素氧合酶1(HMOX1)、诱导型一氧化氮合酶(NOS2)、乳铁蛋白(LTF)、钙结合蛋白S100A8(S100A8)、干扰素调节因子3(IRF3)、干扰素 α 5(IFNA5)、脂联素(ADIPOQ)共10个关键基因。并通过Cytoscape 3.9.1构建核心基因蛋白互作网络及构建关键基因蛋白互作网络图。见增强出版附加材料。

2.4 关键基因相关性分析 为了了解已筛选出关键基因之间的关系,利用R及ggplot2包(3.3.6)进行可视化分析,根据不同颜色及P代表基因之间的相关性,结果显示,SUMO特异性肽酶1(SENP1)与醛酮还原酶家族1成员C3(AKR1C3),GPX7与15-脂氧合酶(ALOX15)、视黄酸受体应答蛋白2(RARRES2)与SENP1等基因呈正相关($P<0.01$),S100A8与 α B-晶状体蛋白(CRYAB),LTF与HEUPUD1,二肽基肽酶4(DPP4)与GPX7等基因呈负相关($P<0.01$)。见增强出版附加材料。

2.5 LASSO回归获取的疾病特征基因 通过对交集基因进行LASSO回归得到疾病特征基因13个,最后通过不同算法获取的关键基因与LASSO回归得到的特征基因取交集,获取核心基因为GPX7、LTF、S100A8。ROC曲线分析对获取核心基因进行验证。ROC结果显示GPX7[曲线下面积(AUC)=0.772]、LTF(AUC=0.821)、S100A8(AUC=0.771),3个核心基因的ROC曲线下面积都>0.7,因此,GPX7、LTF、S100A8 3个核心基因可能与NAFLD及

铁死亡过程密切相关。见增强出版附加材料。

2.6 核心基因免疫浸润及免疫细胞差异分析 根据一些学者的共识,免疫浸润同样参与到非肿瘤性疾病进程中,为了探索疾病的免疫微环境,对交集基因进行细胞类型识别通过估计RNA转录本的相对亚群(CIBERSORT)以估计混合细胞群中浸润免疫细胞的丰度。结果显示MDSC、T.follicular.helper.cell、Immature.dendritic.cell、Activated.dendritic.cell是浸润NAFLD参与铁死亡过程的主要免疫细胞。进一步研究NAFLD交集基因中免疫细胞差异性分析显示,活化树突状细胞($P=0.103$)差异无统计学意义,髓源性抑制细胞($P<0.01$),滤泡状辅助性T细胞($P<0.01$),未成熟的树突状细胞($P<0.01$),提示免疫细胞参与NAFLD铁死亡过程中,为了确定核心基因与差异免疫细胞之间的相互作用关系,研究发现GPX7与滤泡状辅助性T细胞、S100A8与活化树突状细胞呈负相关($P<0.01$),S100A8和髓源性抑制细胞呈显著正相关($P<0.01$)。以上结果表明免疫细胞可能与核心基因协同作用影响NAFLD疾病在铁死亡中的进程。见增强出版附加材料。

2.7 NAFLD相关中药单体预测及筛选 通过TCMSP疾病筛选有效活性成分,结合治疗NAFLD的相关研究^[15],得到山柰酚、槲皮素、白桦脂酸、汉黄芩素、黄芩苷、柚皮素等是治疗NAFLD的潜在药物靶点。最后选取了山柰酚、槲皮素、白桦脂酸3个治疗潜力较高的中药单体进行分子对接验证。

2.8 分子对接模拟技术是探究小分子与目标靶点相互作用的便捷有效手段 使用Vina 1.2.3软件对化合物槲皮素、白桦脂酸、山柰酚与GPX7、LTF、S100A8进行对接研究。一般认为,结合能<0的分子即可自行结合,数值越小结合力越强。当结合能 $\leq -5\text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ($1\text{ cal}\approx 4.186\text{ J}$)时,可视为该化学成分可与靶点有效结合。通过PyMol2.5.5对接结果进行可视化分析,见增强出版附加材料。

3 动物实验

3.1 药物、试剂及仪器 白桦脂酸、水飞蓟宾单体(美国MedChemExpress生物科技公司,货号分别为HY-10529、HY-N0779A,规格分别为10 mg/支、50 mg/支,纯度分别为99.06%、99.91%);高脂高胆固醇饲料定制于(江苏协同有限公司,具体配方如下,普通饲料占53.75%,胆固醇占5%,猪油占20%,胆酸钠占0.25%,果糖占20%,食盐占1%,按质量比混合、风干成型、辐照灭菌,然后将其存放于-20℃冰箱保存,规格3 kg/袋);葡聚糖硫酸钠(DSS,美国

MPBiomedicals公司,货号MB5535-T,规格5 g/瓶);苏木素-伊红(HE)染液套装(美国MedChemExpress生物科技有限公司,货号HY-K0315);GPX7、GPX4、ACSL4、LTF、S100A8、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗、山羊抗兔、山羊抗鼠二抗(武汉三鹰生物技术有限公司,货号分别为13501-1-AP、67763-1-1g、22401-1-AP、10933-1-AP、15792-1-AP、60004-1-1g、RGAR001、RGAM001);一步法彩色凝胶聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、蛋白酶抑制剂(武汉塞维尔生物技术有限公司,货号分别为CR2405026、CR2402043、20230209);OMEGA Total RNA提取试剂盒(美国Bio Tek公司,货号R6834-012);第三代高效第一链cDNA合成预混液(含基因组DNA去除酶)用于qPCR、通用型蓝色SYBR Green荧光定量qPCR预混液[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,货号分别为11141ES10、11141ES];蛋白质分子质量标准(Marker,上海雅酶生物有限公司,货号WJ103);蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(PMSF)、聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白浓度试剂盒、聚偏氟乙烯(PVDF)膜(北京索莱宝科技有限公司,货号分别为20230209、2310007、IPVH00010);异丙醇(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号I811925-500mL);SuperKine™超敏型ECL发光液(飞克级)(亚科因生物技术有限公司,货号BMU102-CN-100)。BG-Power600型电泳仪、BG-verMINI型垂直电泳槽、BG-verBLOT型转印电泳槽(北京百晶生物技术有限公司);800TS型酶标仪(美国BioTek公司);ABI StepOnePlus™型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Thermo Fisher公司);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);ECLIPSE TS100型光学显微镜(日本Nikon公司)。

3.2 动物 SPF级C57BL/6J小鼠,合格证号SCXK(川)2020-0034,健康雄性,共50只,年龄6~8周,体质量(20±2)g,SPF环境饲养于贵州医科大学临床研究中心动物实验室,动物实验条件,温度22~24℃,光照/黑暗周期12 h/12 h,湿度55%~60%,小鼠自由饮水,每周固定换垫料,所有动物实验应按照美国国立卫生研究院(NIH)的护理和使用指南进行。

3.3 伦理 本实验由贵州医科大学实验动物伦理委员会审批(伦理号2403642)。

3.4 分组、造模及给药 随机选取10只小鼠设为正常组,其余40只小鼠进行NAFLD造模,以高脂高胆固醇饮食及2.5%葡聚糖硫酸钠(DSS)为造模剂

进行高脂小鼠动物模型的构建^[18],以10 mg·kg⁻¹和30 mg·kg⁻¹的白桦脂酸单体为低剂量组和高剂量组小鼠进行为期10 d的灌胃预处理^[19],水飞蓟宾作为阳性药对同给药组处理方法(100 mg·kg⁻¹)^[20],第11天起对模型(MC)组、水飞蓟宾组、低剂量组及高剂量组进行为期7 d的高脂饮食饲养,第18天起对模型组、低剂量组及高剂量组进行高脂饮食饲养加2.5%DSS自由饮水联合处理7 d,在整个实验过程中,对低剂量组和高剂量组持续进行白桦脂酸单体溶液灌胃,水飞蓟宾组持续水飞蓟宾溶液灌胃,记录每组每天小鼠的体质量变化,每组小鼠自由饮食^[21-22],实验小鼠肝细胞内出现大小不一脂质空泡和气球样变为造模成功标准^[22]。造模方式见增强出版附加材料。

3.5 采集样本 给药结束后,称取体质量,麻醉后固定小鼠四肢,使用75%乙醇消毒腹部皮肤,剪开表皮,剖开腹腔,暴露内部器官,心脏灌注,待肝脏颜色变暗,分离肝脏组织,装至无菌离心管中,取1份速冻切片,进行HE染色,其余2份保存于-80℃冰箱。

3.6 HE染色切片和肝指数计算 将各组肝脏标本按病理检验标准作业程序(SOP)进行脱水、修剪、包埋、切片、染色、封片等处理,选择要观察的区域采集200倍图片,在光学显微镜下观察各组小鼠肝组织病理学改变。肝指数动物实验结束时,将小鼠禁食12 h,测量体质量。在深度麻醉下处死所有小鼠,进行取材。称取各组小鼠肝脏质量,计算肝指数。

3.7 Real-time PCR检测基因表达水平 解冻保存于-80℃冰箱的组织样本,匀浆裂解,乳化,在4℃环境下,离心提取总RNA,计算出RNA的纯度和浓度。逆转录成cDNA,以GAPDH为内参,PCR扩增程序95℃预变性2 min,循环1次,95℃变性10 s,60℃退火/延伸30 s,循环(40次)。引物序列见表1,反应结束后,根据相对定量法2^{-ΔΔC_T}计算出样品各蛋白的吸光度,每组重复实验3次,计算均值及标准差。检测各组小鼠肝组织中筛选核心基因GPX7、LTF、S100A8 mRNA及铁死亡相关基因GPX4、ACSL4 mRNA表达。

3.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏组织蛋白表达水平 解冻在-80℃冰箱冻存的肝脏组织,通过匀浆和裂解过程,提取蛋白质,配置十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶处理蛋白质,水浴加热,充分变性,冷却后上样,内参为GAPDH,孵育相应一抗(1:100 000)和二抗(稀释比1:

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 CCTCGTCCCGTAGACAAAATG	133
	下游 TGAGGTCAATGAAGGGGTCGT	
GPX4	上游 GCACATGGTCTGCCTGGATAAG	192
	下游 TCTTGATTACTTCTGGCTCCTG	
ACSL4	上游 GGAAAGCAAAGTGAAGGCGG	141
	下游 GCTCCCAGCTCCTCTACTGA	
LTF	上游 CCCAAACCATGCTGTAGTGCTC	100
	下游 ACACCTCTGTCCATTCTCTCCCAA	
S100A8	上游 AGTGTCTCTCAGTTTGTGCAGAATAT	110
	下游 TTTTATCACCATCGCAAGGAAGCTC	
GPX7	上游 ATCCGAGCAGGACTTCTACGACT	256
	下游 GCGGGCAAAGTTCTCAATCT	

8 000),使用Image J软件分析条带,计算出灰度值,归一化处理,将蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值,获得相对灰度值,进行统计分析,绘制数据表。

3.9 统计学分析 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS 27.0统计软件进行完全随机设计的单因素方差分析(One-way ANOVA),各样本均数之间的多重,比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验, $P<0.05$ 说明差异有统计学意义。

4 动物实验结果

4.1 白桦脂酸对NAFLD小鼠体质量及肝指数的影响 为了观察白桦脂酸对NAFLD肝脏脂质代谢的影响,本研究使用高脂高胆固醇饮食+2.5%DSS诱导NAFLD小鼠模型,观察不同治疗方法对体质量及肝指数的影响。本实验研究结果显示,与正常组比较,模型组体质量显著降低,肝指数显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,水飞蓟宾组及白桦脂酸低、高剂量组均体质量均显著减轻,肝指数显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表2。

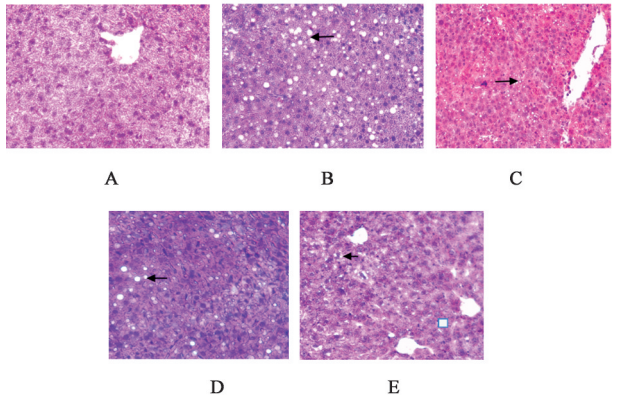
4.2 白桦脂酸对NAFLD小鼠组织病理学的影响 肝组织HE染色结果表明,与正常组比较,模型组小鼠肝细胞排列散乱,肝细胞出现明显的气球样变,同时可观察到明显的炎细胞浸润。与模型组比较,水飞蓟宾组小鼠肝细胞排列较模型组相比较为整齐,肝细胞气球样变、肝组织中炎细胞浸润较模型组减轻,白桦脂酸低、高剂量组,小鼠肝细胞排列较模型组相比更为整齐,肝细胞气球样变及肝组织中炎细胞浸润均有所缓解,表明白桦脂酸可能在治疗NAFLD方面具有较大潜力。见图1。

表2 白桦脂酸对NAFLD小鼠肝脏系数的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effect of betulinic acid on liver index in NAFLD mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	体质量/g	肝指数/%
正常组		31.48±1.37	2.70±0.10
模型组		26.55±0.72 ²⁾	4.03±0.15 ²⁾
水飞蓟宾组	100	24.87±0.75 ⁴⁾	2.88±0.11 ⁴⁾
白桦脂酸低剂量组	10	22.47±0.84 ⁴⁾	3.23±0.15 ⁴⁾
白桦脂酸高剂量组	30	20.55±0.84 ⁴⁾	3.03±0.15 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表3、表4同)



注:A.正常组;B.模型组;C.水飞蓟宾组;D.白桦脂酸低剂量组;E.白桦脂酸高剂量组(图2同)

图1 白桦脂酸对NAFLD小鼠肝脏组织的影响(HE,×200)

Fig. 1 Effect of betulinic acid on liver tissue of NAFLD mice (HE,×200)

4.3 白桦脂酸对NAFLD小鼠肝组织核心铁死亡基因mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组GPX7、GPX4、LTF mRNA明显下降($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组及白桦脂酸低、高剂量组GPX7、GPX4、LTF mRNA表达水平显著上调($P<0.01$)。与正常组比较,S100A8、ACSL4 mRNA表达水平显著增高($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组及白桦脂酸低、高剂量组S100A8、ACSL4 mRNA表达水平明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。见表3。

4.4 白桦脂酸对NAFLD小鼠肝组织LTF、GPX4、GPX7、S100A8和ACSL4蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组GPX7、GPX4、LTF蛋白表达显著减低($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组及白桦脂酸低、高剂量组GPX7、GPX4、LTF蛋白表达显著上调($P<0.01$)。与正常组比较,模型组S100A8、ACSL4显著增高($P<0.01$);与模型组比较,水飞蓟宾组及白桦脂酸低、高剂量组S100A8、ACSL4的蛋白表达明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。见表4、图2。

表3 白桦脂酸对NAFLD小鼠肝组织LTF、GPX4、GPX7、S100A8和ACSL4 mRNA表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of betulinic acid on mRNA expression levels of LTF, GPX4, GPX7, S100A8, and ACSL4 in liver tissue of mice in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	LTF	GPX4	GPX7	S100A8	ACSL4
模型组		0.79±0.04 ²⁾	0.82±0.02 ¹⁾	0.62±0.02 ²⁾	1.53±0.07 ²⁾	1.31±0.08 ²⁾
水飞蓟宾组	100	1.33±0.04 ⁴⁾	1.30±0.04 ⁴⁾	1.33±0.04 ⁴⁾	1.26±0.03 ⁴⁾	1.53±0.04 ³⁾
白桦脂酸低剂量组	10	1.80±0.05 ⁴⁾	1.69±0.14 ⁴⁾	1.69±0.04 ⁴⁾	0.43±0.03 ⁴⁾	0.52±0.08 ⁴⁾
白桦脂酸高剂量组	30	2.29±0.03 ⁴⁾	1.97±0.05 ⁴⁾	2.14±0.05 ⁴⁾	0.21±0.01 ⁴⁾	0.11±0.01 ⁴⁾

表4 白桦脂酸对NAFLD小鼠肝组织LTF、GPX4、GPX7、S100A8和ACSL4蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of betulinic acid on protein expression of LTF, GPX4, GPX7, S100A8, and ACSL4 in liver tissue of mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	LTF/GAPDH	GPX4/GAPDH	GPX7/GAPDH	S100A8/GAPDH	ACSL4/GAPDH
正常组		1.15±0.08	0.73±0.03	0.43±0.04	0.73±0.04	1.96±0.07
模型组		0.29±0.02 ²⁾	0.43±0.03 ²⁾	0.18±0.01 ²⁾	0.89±0.03 ²⁾	2.45±0.11 ²⁾
水飞蓟宾组	100	0.71±0.01 ⁴⁾	0.83±0.02 ⁴⁾	0.78±.03 ⁴⁾	0.87±0.02 ³⁾	1.60±0.07 ⁴⁾
白桦脂酸低剂量组	10	0.83±0.02 ⁴⁾	1.19±0.01 ⁴⁾	0.96±.03 ⁴⁾	0.58±0.04 ⁴⁾	0.68±0.05 ⁴⁾
白桦脂酸高剂量组	30	1.01±0.05 ⁴⁾	1.39±0.09 ⁴⁾	1.29±.04 ⁴⁾	0.54±0.05 ⁴⁾	0.57±0.03 ⁴⁾

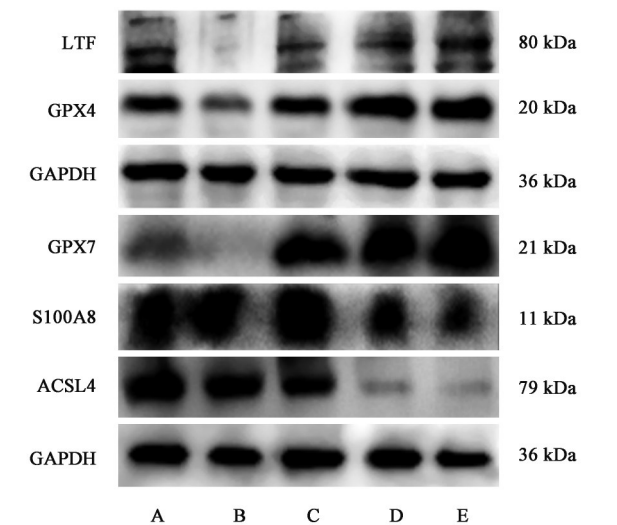


图2 各小组肝组织GPX7、LTF、S100A8、GPX4、ACSL4蛋白表达电泳

Fig. 2 Protein expression levels of GPX7, LTF, S100A8, GPX4, and ACSL4 in liver tissues of each group

5 讨论

NAFLD与全球日益流行的肥胖密切相关,并呈年轻化趋势,加之需要长期服药和病情难以遏制等弊病,为患者及社会医疗造成沉重的负担^[23]。在过去几十年中,细胞凋亡已被证明是肝细胞死亡的主要方式^[24]。而铁死亡是10年来发现的一种铁依赖性程序性细胞死亡类型,与NAFLD的疾病进程有关,但两者之间的致病关系和机制尚未完全揭示^[25]。寻找抵抗肝铁死亡的有效干预措施并阐明其机制成为治疗NAFLD的潜在途径。白桦脂酸是一种具有多种药理活性及生物活性的五环羽扇烷

型三萜类化合物,研究表明其有抗氧化应激及抗脂质过氧化、抑制脂肪生成、改善胰岛素抵抗和抗内质网应激等作用^[26]。但抑制铁死亡的相关报道较少见,本研究首先通过生物信息学筛选出了NAFLD与铁死亡相关的交集,分析验证筛选出NAFLD铁死亡相关的核心基因,通过分子对接验证了白桦脂酸与NAFLD铁死亡相关核心基因(LTF、S100A8、GPX7)结合良好,因此,笔者推测BA可能通过抑制铁死亡缓解NAFLD的进展。最后通过动物实验验证白桦脂酸治疗NAFLD的疗效并探究其机制。

抗氧化体系异常及脂质过氧化驱动在NAFLD铁死亡的进展中起着至关重要的作用^[27]。铁稳态失衡及GPX4大量失活引起的脂质过氧化反应被认为是驱动细胞铁死亡发生和细胞质膜结构与功能不可逆损伤的核心因素。脂质过氧化物和氢过氧化物可消耗大量的抗氧化剂GSH,降低机体的抗氧化水平^[28],当抗氧化剂GSH被大量消耗时,铁死亡增加。GPX4、GPX7是谷胱甘肽过氧化物酶家族中的成员,GPX与超氧化物歧化酶和过氧化氢酶作用,形成酶促抗氧化系统,减少活性氧(ROS)并减少脂质过氧化物的产生^[29]。ACSL4是多不饱和脂肪酸(PUFA)代谢的重要同工酶,决定了铁死亡敏感性^[30]。活化的ACSL4催化含多不饱和脂肪酸的脂质生物合成,促进脂质过氧化产物的积累,导致铁死亡。因此,本研究通过蛋白质免疫印记及PCR检测NAFLD小鼠肝组织中GPX7、GPX4、ACSL4 mRNA及蛋白水平以评估对NAFLD氧化应激、铁死亡的影响。与正常组

比较,NAFLD模型小鼠的GPX7、GPX4 mRNA及蛋白水平显著降低,ACSL4升高,白桦脂酸干预可增加NAFLD小鼠的GPX4、GPX7的mRNA及蛋白表达水平,降低ACSL4的mRNA及蛋白表达水平,从而改善肝脏氧化应激、减少脂质过氧化物的产生、降低肝细胞对铁死亡的敏感性,且白桦脂酸低、高剂量组之间mRNA、蛋白表达水平有差异,本实验研究发现白桦脂酸可通过增加抗氧化体系及减少脂质过氧化物产生抑制铁死亡,抑制铁死亡改善NAFLD的程度呈药物剂量依赖。

脂质代谢紊乱及炎症反应是NAFLD的重要特征,结合以上特征,本研究利用高脂高胆固醇饮食联合DSS建立NAFLD动物模型,研究发现NAFLD小鼠模型可见肝指数增高等NAFLD代谢特征,白桦脂酸可显著降低NAFLD小鼠的肝指数,减小肝脏大小,高脂高胆固醇饮食+DSS诱导NAFLD小鼠肝脏经HE染色可见肝细胞排列散乱,脂质蓄积,肝细胞气球样变及炎细胞浸润。白桦脂酸干预后可改善NAFLD小鼠肝细胞气球样变、脂质蓄积及炎细胞浸润。因此,白桦脂酸可通过改善NAFLD的脂质代谢发挥治疗作用。

铁元素是人体代谢过程中的必要微量元素,严密调控并维持细胞内铁储存和需求与血浆铁运输之间的精妙平衡^[31]。LTF是一种属于转铁蛋白家族的铁结合糖蛋白,在调节铁代谢中起着至关重要的作用^[32-33]。LTF已被证明具有抗氧化和抗炎特性,并对脂质稳态和非酒精性脂肪肝(NAFLD)发挥调节作用,但本团队对其调节机制的理解有限且不一致。有研究发现LTF可能通过靶向铁调素-铁转运蛋白(FPN)轴来增加肝细胞铁输出,然后通过非酶抗氧化系统维持肝脏氧化平衡,最终抑制肝细胞的死亡。LTF通过隔离细菌生长所必需的铁来增强宿主免疫防御^[34]。有相关研究发现LTF的铁结合特性有望成为帕金森病的安全治疗剂^[35]。在神经元中的缺失加剧了铁死亡和神经元功能障碍^[36]。脱辅基(apo)-LTF通过捕获游离铁和增加SLC7A11表达来减少ROS的产生,从而减轻铁死亡^[37]。LTF可有效减少肝铁积累并通过铁转运蛋白(FPN)提高肝铁输出,抑制肝细胞死亡^[38]。本研究结果显示,与正常组比较,NAFLD模型小鼠的LTF蛋白表达水平显著降低。水飞蓟宾和白桦脂酸的干预显著提高了NAFLD小鼠肝组织中LTF的mRNA/蛋白表达水平。上述研究结果表明,白桦脂酸在NAFLD治疗中通过调控LTF发挥改善NAFLD的作用。

S100A8称为髓相关蛋白(MRP8),是一种Ca²⁺结合蛋白,在HFD+AdCxl1诱导的NASH小鼠的脂肪组织中高度增加^[39-42],同样在2型糖尿病肥胖患者的内脏脂肪组织中S100A8和S100A9的表达较高^[40,43-44]。在脑出血(ICH)后通过调节S100A8/A9从而改善异常的脑铁代谢,抑制铁死亡,减轻ICH后的继发性脑损伤^[45]。尽管已有报道显示NASH患者血清S100A8/A9水平明显升高^[46]。然而,S100A8/A9在脂肪变性转为NASH进展中的作用尚未被报道,本实验通过动物实验验证发现在白桦脂酸干预后,S100A8在小鼠肝脏组织中mRNA、蛋白表达水平降低,这说明白桦脂酸在高脂饮食诱导的NAFLD模型中可能通过调控S100A8转录水平影响NAFLD的疾病进程。

综上所述,白桦脂酸可能通过调控GPX7、LTF、S100A8,恢复GPX4活性、下调ACSL4来抑制铁死亡,延缓NAFLD疾病进展。其机制可能是增强抗氧化系统、减少脂质过氧化物产生、调节肝细胞铁代谢、抑制炎症反应等机制共同发挥作用,然而本实验尚未在具体机制上进行深入研究,后续将开展细胞实验,结合前期筛选的核心靶点及分子之间调控关系进行深入研究,为NAFLD的新药开发提供一定的理论及实验支撑。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, PAIK J M, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review[J]. *Hepatology*, 2023, 77(4): 1335-1347.
- [2] STEFAN N, HÄRING H U, CUSI K. Non-alcoholic fatty liver disease: Causes, diagnosis, cardiometabolic consequences, and treatment strategies[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2019, 7(4): 313-324.
- [3] FRIEDMAN S L, NEUSCHWANDER-TETRI B A, RINELLA M, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [4] SAFARI Z, GÉRARD P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(8): 1541-1558.
- [5] 许耀珑, 赵佳欣, 杨立刚. 非酒精性脂肪性肝病流行现状及危险因素研究进展[J]. *中国全科医学*, 2024, 27(30): 3825-3834. XU Y L, ZHAO J X, YANG L G. Epidemic status and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Chin Gen Pract*, 2024, 27(30): 3825-3834.
- [6] ZHANG H, ZHANG E, HU H. Role of ferroptosis in non-alcoholic fatty liver disease and its implications for

- therapeutic strategies[J]. Biomedicines, 2021, 9(11): 1660.
- [7] TONG J, LI D, MENG H, et al. Targeting a novel inducible GPX4 alternative isoform to alleviate ferroptosis and treat metabolic-associated fatty liver disease[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(9): 3650-3666.
- [8] 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.
- ZHU Z F, LI W T, CAO Y J, et al. Bioinformatics reveals mechanism of *Schisandrin B* in inhibiting ferroptosis to ameliorate methionine and choline deficiency-induced fatty liver disease in mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(2): 74-83.
- [9] 储心乔, 彪雅宁, 顾颖, 等. 当归芍药散调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路干预非酒精性脂肪性肝病大鼠铁死亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(16): 35-42.
- CHU X Q, BIAO Y N, GU Y, et al. Danggui Shaoyaoan regulates Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway to prevent ferroptosis in rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(16): 35-42.
- [10] NGUYEN K T, MUN S H, YANG J, et al. The MARCHF6 E3 ubiquitin ligase acts as an NADPH sensor for the regulation of ferroptosis[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(8): 1239-1251.
- [11] WU S, YANG J, SUN G, et al. Macrophage extracellular traps aggravate iron overload-related liver ischaemia/reperfusion injury[J]. Br J Pharmacol, 2021, 178(18): 3783-3796.
- [12] QI J, KIM J W, ZHOU Z, et al. Ferroptosis affects the progression of nonalcoholic steatohepatitis via the modulation of lipid peroxidation-mediated cell death in mice[J]. Am J Pathol, 2020, 190(1): 68-81.
- [13] ATHYROS V G, POLYZOS S A, KOUNTOURAS J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease treatment in patients with type 2 diabetes mellitus; New kids on the block[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2020, 18(2): 172-181.
- [14] 张玉萍. 金匱要略(中医经典名著精选)[M]. 福州: 福建科技出版社, 2013.
- ZHANG Y P. Jingui Yaolue (Selected Masterpieces of Traditional Chinese Medicine Classics)[M]. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 2013.
- [15] 唐高俊, 胡杰, 张宝芳. 基于网络药理学和生物信息学探讨葛根芩连方治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中西医结合慢性病杂志, 2024, 1(1): 26-39.
- TANG G J, HU J, ZHANG B F. To explore the mechanism of Gegen Qinlian prescription in treating non-alcoholic fatty liver disease based on network pharmacology and bioinformatics[J]. Chin J Integr Med Chron Dis, 2024, 1(1): 26-39.
- [16] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, et al. AutoDock Vina 1. 2. 0: New docking methods, expanded force field, and python bindings[J]. J Chem Inf Model, 2021, 61(8): 3891-3898.
- [17] DELANO W L. PyMOL: An open-source molecular graphics tool[J]. CCP4 Newsl Protein Crystallogr, 2002, 40(1): 82-92.
- [18] 向珺昱. 青砖茶水提取物对非酒精性脂肪性肝病的预防作用及机制探讨[D]. 重庆: 三峡大学, 2023.
- XIANG J Y. Preventive effect and mechanism study of aqueous extract of Qing brick tea on non-alcoholic fatty liver disease[D]. Chongqing: China Three Gorges University, 2023.
- [19] KALRA J, LINGARAJU M C, MATHESH K, et al. Betulinic acid alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis and visceral pain in mice[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(3): 285-297.
- [20] SUN R, XU D, WEI Q, et al. Silybin ameliorates hepatic lipid accumulation and modulates global metabolism in an NAFLD mouse model[J]. Biomed Pharmacother, 2020, doi: 10. 1016/j. biopha. 2019. 109721.
- [21] BIBI S, DE SOUSA MORAES L F, LEBOW N, et al. Dietary green pea protects against DSS-induced colitis in mice challenged with high-fat diet[J]. Nutrients, 2017, 9(5): 509.
- [22] 万小雨, 曾俊豪, 张婉怡, 等. 非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的建立[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(16): 1925-1930.
- WAN X Y, ZENG J H, ZHANG W Y, et al. Establishment of mouse model of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Chin J Immunol, 2020, 36(16): 1925-1930.
- [23] WU Y, ZHENG Q, ZOU B, et al. The epidemiology of NAFLD in mainland China with analysis by adjusted gross regional domestic product: A Meta-analysis[J]. Hepatol Int, 2020, 14(2): 259-269.
- [24] TANAKA S, HIKITA H, TATSUMI T, et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice[J]. Hepatology, 2016, 64(6): 1994-2014.
- [25] FENG G, BYRNE C D, TARGHER G, et al. Ferroptosis and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: Is there a link?[J]. Liver Int, 2022, 42(7): 1496-1502.
- [26] 徐军, 王晋萍, 钱辰旭, 等. 白桦脂酸的研究进展[J]. 生命科学, 2011, 23(5): 8.
- XU J, WANG J P, QIAN C X, et al. Progress of study on betulinic acid[J]. Life Sci, 2011, 23(5): 8.
- [27] GUAN Q, WANG Z, HU K, et al. Melatonin ameliorates hepatic ferroptosis in NAFLD by inhibiting ER stress via the MT2/cAMP/PKA/IRE1 signaling pathway[J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(12): 3937-3950.
- [28] ZHANG L, WANG X, CUETO R, et al. Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation[J]. Redox Biol, 2019, 26: 101284.
- [29] BRIGELIUS-FLOHÉ R, MAIORINO M. Glutathione peroxidases[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(5): 3289-3303.
- [30] CUI Y, ZHANG Y, ZHAO X, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuroinflammation[J]. Brain Behav Immun, 2021, 93: 312-321.
- [31] GAO H, JIN Z, 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.
- [32] SIENKIEWICZ M, JAŚKIEWICZ A, TARASIUK A, et al. Lactoferrin: An overview of its main functions,

- immunomodulatory and antimicrobial role, and clinical significance[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2022, 62(22):6016-6033.
- [33] WANG J, XIU M, WANG J, et al. METTL16-SEN3-LTF axis confers ferroptosis resistance and facilitates tumorigenesis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1):78.
- [34] SINGH A, AHMAD N, VARADARAJAN A, et al. Lactoferrin, a potential iron-chelator as an adjunct treatment for mucormycosis-A comprehensive review[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 187:988-998.
- [35] XU S F, ZHANG Y H, WANG S, et al. Lactoferrin ameliorates dopaminergic neurodegeneration and motor deficits in MPTP-treated mice[J]. *Redox Biol*, 2019, 21:101090.
- [36] XIAO Z, SHEN D, LAN T, et al. Reduction of lactoferrin aggravates neuronal ferroptosis after intracerebral hemorrhagic stroke in hyperglycemic mice[J]. *Redox Biol*, 2022, 50:102256.
- [37] ZHANG Z, LU M, CHEN C, et al. Holo-lactoferrin: The link between ferroptosis and radiotherapy in triple-negative breast cancer[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7):3167-3182.
- [38] GUO C, XUE H, GUO T, et al. Recombinant human lactoferrin attenuates the progression of hepatosteatosis and hepatocellular death by regulating iron and lipid homeostasis in ob/ob mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(8):7183-7196.
- [39] WANG S, SONG R, WANG Z, et al. S100A8/A9 in inflammation[J]. *Front Immunol*, 2018, 9:1298.
- [40] KRAAKMAN M J, LEE M K, AL-SHAREA A, et al. Neutrophil-derived S100 calcium-binding proteins A8/A9 promote reticulated thrombocytosis and atherogenesis in diabetes[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(6):2133-2147.
- [41] PRUENSTER M, VOGL T, ROTH J, et al. S100A8/A9: From basic science to clinical application[J]. *Pharmacol Ther*, 2016, 167:120-131.
- [42] RYCKMAN C, VANDAL K, ROULEAU P, et al. Proinflammatory activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion[J]. *J Immunol*, 2003, 170(6):3233-3242.
- [43] NACKEN W, ROTH J, SORG C, et al. S100A9/S100A8: Myeloid representatives of the S100 protein family as prominent players in innate immunity[J]. *Microsc Res Tech*, 2003, 60(6):569-580.
- [44] SCHIOPU A, COTOI O S. S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease[J]. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013:828354.
- [45] YANG Y, LYU M, LIU R, et al. Tungsten-based polyoxometalate nanoclusters as ferroptosis inhibitors modulating S100A8/A9-mediated iron metabolism pathway for managing intracerebral haemorrhage[J]. *J Nanobiotechnol*, 2025, 23(1):122.
- [46] CATALÁN V, GÓMEZ-AMBROSI J, RODRÍGUEZ A, et al. Increased levels of calprotectin in obesity are related to macrophage content: Impact on inflammation and effect of weight loss[J]. *Mol Med*, 2011, 17(11/12):1157-1167.

[责任编辑 顾雪竹]