

· 药理 ·

基于Nrf2信号通路探究参苓白术散调节铁死亡对酒精性肝损伤大鼠的影响

周相宇¹, 周素芳^{1,2*}, 李玉茹¹, 蔡世徽¹, 廖佳佳¹, 叶佐玉¹

(1. 贵州中医药大学第一临床医学院, 贵阳 550002;

2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001)

[摘要] 目的:观察参苓白术散通过调节核因子E₂相关因子2(Nrf2)信号通路的干预调节铁死亡对酒精性肝损伤大鼠的影响。方法:将40只SD大鼠随机分为模型组、多烯磷脂酰胆碱组、参苓白术散高、中、低剂量组,每组8只,另取8只SD大鼠作为正常组。模型组、多烯磷脂酰胆碱组、参苓白术散高、中、低剂量组予以10 mL·kg⁻¹灌胃造模,正常组予以等体积蒸馏水灌胃;每日灌酒4 h后,予以多烯磷脂酰胆碱组143.64 mg·kg⁻¹药物灌胃、参苓白术散高、中、低剂量组分别予以15、7.5、3.75 mg·kg⁻¹的药物,正常组与模型组予以等体积蒸馏水灌胃,灌胃连续6周。全自动生化仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、谷氨酰转氨酶(GGT)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)水平,生化检测法检测脂多糖(LPS)、丙二醇(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、铁离子(Fe²⁺)水平,苏木素-伊红(HE)和油红O染色观察肝脏病理变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、铁蛋白重链1(FTH1)、核转录因子-κB(NF-κB) mRNA表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1、p65、磷酸化(p)-p65蛋白表达。结果:与正常组比较,模型组肝功能(ALT、AST、GGT)、血脂(TC、TG)水平明显升高(P<0.05),肝脏出现明显脂肪变性,有大量脂肪沉积,氧化应激水平及炎症因子明显升高(P<0.05),Fe²⁺水平明显增高(P<0.05),Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1蛋白表达明显下调(P<0.05),p65、p-p65蛋白表达明显上调(P<0.05),Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1 mRNA表达明显下调(P<0.05),NF-κB mRNA表达明显上调(P<0.05);与模型组比较,参苓白术散高、中剂量组肝功能(ALT、AST、GGT)、血脂(TC、TG)水平明显下调(P<0.05),肝脏脂肪变性明显改善,脂肪沉积明显减少,氧化应激水平以及炎症因子明显降低(P<0.05),Fe²⁺水平明显降低(P<0.05),Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1蛋白表达明显上调(P<0.05),p65、p-p65蛋白表达明显下调(P<0.05),Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1 mRNA表达明显上调(P<0.05)、NF-κB mRNA表达明显下调(P<0.05)。结论:参苓白术散能够有效减少ALD大鼠肝损伤,调节脂肪变性与脂肪沉积,并在肝脏内发挥抗氧化与抗炎作用;其作用机制可能与上调Nrf2信号通路改善氧化应激的途径抑制肝细胞内铁死亡发生有关。

[关键词] 参苓白术散; 酒精性肝损伤; 核因子E₂相关因子2(Nrf2); 氧化应激; 铁死亡

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)05-0104-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221907

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20221019.1051.003.html>

[网络出版日期] 2022-10-19 11:55:09

Effect of Shenling Baizhusan on Alcoholic Liver Injury in Rats by Regulating Ferroptosis Based on Nrf2 Signaling Pathway

ZHOU Xiangyu¹, ZHOU Sufang^{1,2*}, LI Yuru¹, CAI Shiqin¹, LIAO Jijia¹, YE Zuoyu¹

(1. The First Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China; 2. First Affiliated Hospital of Guizhou University of TCM, Guiyang 550001, China)

[收稿日期] 2022-07-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460683);贵州省科技项目计划项目(黔科合支撑[2021]一般015)

[第一作者] 周相宇,在读硕士,从事中医药防治肝病、脾胃病研究,E-mail:877868961@qq.com

[通信作者] *周素芳,博士,主任医师,教授,博士生导师,从事中医药调节肠道微生态及保护肠黏膜、肝脾相关理论在消化系统运用的基础及临床研究,E-mail:zhufang2669@126.com

[Abstract] Objective: To observe the effect of Shenling Baizhusan on the intervention of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling pathway by regulating ferroptosis in rats with alcoholic liver injury. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into model group, polyene phosphatidylcholine group, and high, medium, and low-dose Shenling Baizhusan groups, with 8 rats in each group. Another 8 SD rats were taken as blank group. The model group, polyene phosphatidylcholine group, high, medium, and low-dose Shenling Baizhusan groups were given 10 mL·kg⁻¹ liquor by gavage for modeling, and the blank group was given equal volume of distilled water by gavage. After 4 h of daily alcoholic administration, 143.64 mg·kg⁻¹ of polyene phosphatidylcholine group was given to the polyene phosphatidylcholine group, 15, 7.5, 3.75 mg·kg⁻¹ of Shenling Baizhusan were given to Shenling Baizhusan high, medium, and low-dose groups, respectively, and the blank group and the model group were given equal volume of distilled water. The gavage lasted for 6 weeks. The levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamyl transpeptidase (GGT), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) were detected by automatic biochemical analyzer. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- β (IL- β) were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of lipopolysaccharide (LPS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and Fe⁺ were detected by biochemical assay. The pathological changes in the liver were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining. The mRNA expression levels of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), ferritin heavy polypeptide 1 (FTH1), and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The protein expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, FTH1, p65, and phosphorylation (p)-p65 were detected by Western blot. **Result:** As compared with the blank group, the levels of liver function (ALT, AST, and GGT) and blood lipids (TC and TG) in the model group were significantly increased ($P<0.05$). The liver showed obvious steatosis, with a large number of fat deposition, the oxidative stress and inflammatory factors were significantly increased ($P<0.05$), and the level of Fe⁺ was significantly increased in model group ($P<0.05$). The protein expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and FTH1 was significantly down-regulated ($P<0.05$), and those of p65 and p-p65 was significantly up-regulated in the model group ($P<0.05$). The mRNA expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and FTH1 were significantly down-regulated ($P<0.05$), and the mRNA expression level of NF- κ B was significantly up-regulated ($P<0.05$). As compared with the model group, the levels of liver function (ALT, AST, and GGT) and blood lipids (TC and TG) in the high-dose and medium-dose Shenling Baizhusan groups were significantly decreased ($P<0.05$), liver steatosis was significantly improved, fat deposition was significantly reduced, oxidative stress and inflammatory factors were significantly decreased ($P<0.05$), and Fe⁺ level was significantly decreased ($P<0.05$). In the high-dose and medium-dose Shenling Baizhusan, the protein expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and FTH1 were significantly up-regulated ($P<0.05$), and those of p65, p-p65 were significantly down-regulated ($P<0.05$). The mRNA expression levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and FTH1 were significantly up-regulated ($P<0.05$), and the mRNA expression level of NF- κ B was significantly down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** Shenling Baizhusan can effectively reduce liver injury in rats with ALD, regulate steatosis and fat deposition, and play an antioxidant and anti-inflammatory role in the liver. Its mechanism may be related to the inhibition of ferroptosis in hepatocytes by up-regulating the Nrf2 signaling pathway to improve oxidative stress

[Keywords] Shenling Baizhusan; alcoholic liver injury; nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); oxidative stress; ferroptosis

酒精性肝病(ALD)是指由于长期摄入酒精导致肝细胞损伤,进而引发的一系列肝脏相关疾病,其疾病进展共分为酒精性脂肪肝,酒精性肝炎,酒

精诱导的肝纤维化,酒精诱导的肝硬化及酒精诱导的肝癌5个阶段^[1]。据相关数据统计表明,2016年全球约有33.4万人死于酒精性肝硬化和酒精所诱

导的慢性肝病,此外,死于与酒精相关的肝癌人数占肝癌死亡人数总量的30%^[2]。近年来随着我国经济的发展,酒精消费增加,导致酒精性肝病患病率不断增长,并且逐渐呈年轻化,对我国经济和公共卫生造成了严重负担^[3]。

ALD发病机制复杂,涉及乙醇代谢、细胞死亡、氧化应激、免疫调节、脂肪变性等多个方面^[4-6]。铁死亡是一种新型细胞死亡方式,当细胞内铁代谢出现紊乱,铁通过芬顿反应产生活性氧(ROS),消耗细胞内的谷胱甘肽(GSH),降低谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)活性,阻碍脂质过氧化物代谢,最终诱发铁死亡^[7-8]。研究发现,肝脏内铁过量积累会加速铁死亡发生,加重细胞肝损伤^[9]。

中医学认为ALD发病乃因过度饮酒损伤脾胃,脾失健运,运化失司,湿热毒内蕴,气血淤阻,痰邪湿热互结,滞留于中焦,气机不畅,则肝郁气滞,最终形成脾虚肝郁之症。因此,治疗ALD当从脾胃论治^[10],《难经》中便提出“实脾则肝自愈”的观点,见肝之病,当知传脾,以先安未受邪之地,阻断疾病传变途径,则邪无以传,病自愈。因此虽然ALD病位在肝,但其发病与脾胃密切相关,故治疗ALD多用健脾化湿、疏肝理气之法。参苓白术散出自《太平惠民和剂局方》,作为健脾益气的经典名方,在现代临床应用及基础研究中被证实对肝病具有良好的调节作用^[11-13],充分体现了“见肝之病,当知传脾”及“实脾则肝自愈”的理论观点。

现代药理发现参苓白术散能够通过调节多种信号通路改善不同的疾病,在基础研究中应用广泛^[14]。在课题组前期研究表明,参苓白术散能够通过下调Toll样受体4(TLR4)、髓样分化因子88(MyD88)等炎症信号改善酒精性肝病大鼠肝损伤,但更多相关机制尚未完全阐释^[14]。因此,本研究拟通过观察参苓白术散干预核因子E₂相关因子2(Nrf2)信号通路调节铁死亡对酒精性肝损伤的影响,对其作用机制进行深入探究。

1 材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠48只(SPF级),8周龄大小,体质量(220±20)g,购自湖南实验长沙天勤生物技术有限公司,实验动物合格证号SCXK(湘)2019-0014。分笼饲养于室温(22±2)℃、12 h光照昼夜交替的实验环境,不对饮食进行干预。本实验经贵州中医药大学实验动物伦理审查委员会批准,伦理审查批号20210061。

1.2 药品 参苓白术散(白扁豆颗粒15 g,批号

20030194;白术颗粒15 g,批号21090124;茯苓颗粒18 g,批号20060043,甘草颗粒6 g,批号20050054,桔梗颗粒10 g,批号20130013,莲子颗粒18 g,批号20040106,人参颗粒9 g,批号19090194,砂仁颗粒3 g,批号20080197,山药颗粒30 g,批号20090157,薏苡仁颗粒18 g,批号21100215,上述药材均使用颗粒剂型,厂家均为四川绿色药业科技有限公司;多烯磷脂酰胆碱胶囊(国药准字H20059010,批号CBJD053,规格228 mg/粒,赛诺菲制药有限公司)

1.3 试剂 红星二锅头(北京红星股份有限公司,批号2021113008), γ -谷氨酰基转移酶(GGT)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、总超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(WST-1法)、GSH试剂盒(微板法)、组织铁试剂盒(比色法)、内毒素试剂盒(鲎试剂法)(南京建成生物工程研究所,货号分别为C017-2-1、A003-1-1、A001-3-、A006-2-1、A039-2-1、E039-1-1);天门冬氨酸氨基转移酶(AST)试剂盒、丙氨酸氨基转移酶(ALT)试剂盒、甘油三酯(TG)试剂盒、总胆固醇(TC)试剂盒(长春汇力生物科技有限公司,货号分别为C072-a、C073-a、C019-a、C048-a);兔多克隆抗体Nrf2、血红素加氧酶-1(HO-1)、铁蛋白重链1(FTH1)、p65、磷酸化(p)-p65(Affinity Biosciences公司,货号分别为AF0639、AF5393、DF6278、AF2006、AF5006);兔多克隆抗体GPX4(ABclonal公司,货号A13309);兔多克隆抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,杭州贤至生物有限公司,货号AB-P-R 001);蛋白Marker(20~120 kDa)(GenScript公司,货号M00521);辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗小鼠二抗、HRP标记羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,货号分别为BA1051、BA1054);TRIzol(Ambion公司,批号15596-026);HiScript[®] II Q RT SuperMix (+gDNA wiper)(Vazyme公司,批号R223-01);大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、大鼠白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(科鹿生物科技由限公司,货号分别为ELK1396、ELK1272);苏木素(美国Sigma公司,货号H9627);伊红Y(水溶性)(国药集团,货号71014544)。

1.4 仪器 H1-16 KR型台式高速冷冻离心机(湖南可成仪器设备有限公司),Multiskan FC型酶标仪(美国Thermo Scientific公司),Chemray240型全自动生化分析仪(Rayto公司),Tissulyser-24型组织研磨器(上海净信公司),EDC-810型PCR仪(东胜创新生物科技有限公司);JY300型水平电泳仪、JY02S

型紫外分析仪(北京君意东方电泳设备有限公司),DYCZ-24DN型垂直电泳槽(北京六一仪器厂);SH-523型化学发光成像系统(杭州申花科技有限公司)

2 方法

2.1 ALD造模及给药 将48只SD大鼠适应性喂养1周后,参考文献[16-17]造模,将48只大鼠随机分为6组:正常组、模型组、参苓白术散高、中、低剂量组、多烯磷脂酰胆碱组,每组8只。ALD模型组每日上午10点予以56℃白酒灌胃(10 mL·kg⁻¹),正常组予以等体积蒸馏水灌胃,在造模的同时予以药物干预。ALD模型组大鼠高度白酒灌胃4 h后,参苓白术散高、中、低剂量组分别予以15、7.5、3.75 mg·kg⁻¹的药物灌胃,多烯磷脂酰胆碱组予以143.64 mg·kg⁻¹多烯磷脂酰胆碱胶囊灌胃,正常组与模型组予以同体积的蒸馏水灌胃(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),每日高度白酒灌胃造模1次,给药1次,连续6周。ALD模型大鼠白酒灌胃造模采用梯度递增剂量灌胃,造模前3 d予以4 mL·kg⁻¹高度白酒灌胃,第4~7天予以6 mL·kg⁻¹,第7天后予以10 mL·kg⁻¹。

2.2 标本采集 末次造模给药结束后,所有大鼠禁食禁水12 h,予以腹腔注射麻醉,从腹主动脉取得血标本5 mL;使用过量麻醉安乐死大鼠,冰上操作收集肝脏标本,并将肝脏标本分为3部分,取相同部位肝脏组织2块分装于4%多聚甲醛溶液固定保存;剩余1块同部位肝脏组织置于-80℃冰箱保存。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 肝功能、血脂、铁离子(Fe⁺)测定 取血操作同2.2项进行,大鼠麻醉后腹主动脉穿刺采血,血样室温静置20 min,室温2 500 r·min⁻¹离心20 min(离心半径4.5 cm),收集标本上清液置于5 mL微型离心管内,使用全自动生化仪检查测ALT、AST、GGT、TC、TG等指标。

2.3.2 炎症因子测定 取血操作同2.3.1项进行,按照试剂盒使用说明操作测定炎症因子(LPS、TNF-α、IL-1β)水平。

2.3.3 氧化应激指标、铁离子测定 肝脏标本采集操作同2.2,将收集的新鲜肝脏组织充分冰浴研磨,将匀浆液3 000 r·min⁻¹离心10 min(离心半径4.5 cm),取上清检测,样本处理好后测蛋白浓度,根据试剂盒说明进行操作测定MDA、SOD、GSH和Fe⁺。

2.3.4 肝脏组织病理观察 苏木素-伊红(HE)染色:取大鼠同一部位肝脏组织1块,浸入4%多聚甲

醛溶液中固定48 h,经组织脱水、包蜡切片后,HE染色,显微镜下观察肝脏病理变化;油红O染色:冰冻切片用甲醛-钙固定10 min,蒸馏水洗;60%异丙醇浸洗,油红O染液染10 min;60%异丙醇分色至背景无色,蒸馏水洗;Mayer苏木素复染数分钟,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗(蓝化)3 min;蒸馏水洗后水溶性封片剂封片,显微镜下观察肝脏病理变化。

2.3.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关mRNA表达情况 取-80℃冰箱中保存的新鲜冰冻肝脏组织,加入TRIzol试剂1 mL,用匀浆器研磨成浆,移至无RNase的1.5 mL微型离心管中,裂解10 min;加入三氯甲烷200 μL,剧烈颠倒混匀数次,室温放置5 min;低温(4℃)12 000 r·min⁻¹离心8 min(离心半径13.5 cm,下同);转移上层水相(约400 μL)于1.5 mL微型离心管中,加入异丙醇400 μL,混匀后室温静置10 min;低温(4℃)12 000 r·min⁻¹离心10 min;弃上清,加入无RNase的75%乙醇1 mL,涡旋混匀后,低温(4℃)10 000 r·min⁻¹离心5 min;弃上清,空气中干燥RNA沉淀5~10 min,将沉淀溶于DEPC 20 μL水中;取溶解后的RNA 2 μL用微量分光光度计测定吸光度A₂₆₀、A₂₈₀及A₂₆₀/A₂₈₀值,计算RNA的纯度和浓度;将总RNA放于-80℃冰箱内保存以备用。使用逆转录反应体系合成cRNA,并使用Real-time PCR扩增,根据基因序列设计引物。引物具体序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β-actin	上游 CACGATGGAGGGGCCGACTCATC	240
	下游 TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	
Nrf2	上游 ACCTAAAGCACAGCCAACA	347
	下游 TCTTCCCTCTCCTGCGTAT	
HO-1	上游 GAAACAAGCAGAACCCAGTC	225
	下游 AGAGGTCACCCAGGTAGCG	
GPX4	上游 ATTCCCGAGCCTTTCAACC	182
	下游 ACGCAACCCCTGTACTIONTATCC	
FTH1	上游 CCAGCGAGGTGGACGAATC	304
	下游 CAGGGTGTGCTGTCAAAGAGAT	
NF-κB	上游 GCATTCTGACCTTGCCATATC	183
	下游 TCCAGTCTCCGAGTGAAGC	

2.3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 将肝脏组织剪碎后放入2 mL微型离心管中进

行清洗,然后每管加入裂解液 200 μL 置于自动匀浆机中匀浆;匀浆完成后将 EP 管置于冰上充分裂解 30 min;将裂解液移至 1.5 mL 微型离心管中,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下使用 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min。将提取的蛋白上清与 5 \times 蛋白上样缓冲液(体积比按照 4:1 混合),放入沸水中进行沸水浴 10 min 将蛋白变性。将总蛋白量 40 μg 的样本分别上样后进行电泳 60 min;电泳完成后根据 Marker 位置使用 PVDF 膜进行电转移;使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(封闭液)浸泡 PVDF 膜室温摇床封闭 2 h;用封闭液稀释相应的一抗,使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次,用 TBST 稀释标记 HRP 的二抗(1:10 000),使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,室温摇床孵育 2 h;TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次,将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1:1 比例混匀,滴加工作液于 PVDF 膜上,反应数分钟待荧光带明显后,用滤纸吸去多余的底物液,覆上保鲜膜,X 光胶片压片后依次放入显影液显影、定影液定影,冲洗胶片。晾干胶片,扫描胶片,用 IPP 分析胶片灰度值。

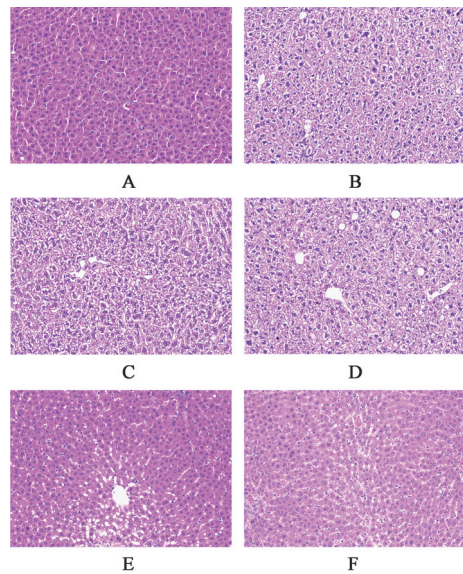
2.4 统计学方法 采用 Graphpad Prism 8.0 软件对所得数据结果分析,结果使用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,多组间比较使用多重比较分析,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ALD 大鼠肝脏病理的影响

3.1.1 肝脏 HE 染色 正常组肝细胞形态结构完整,肝细胞轮廓清晰,间质内未见纤维化增生,未见炎性细胞浸润;模型组肝细胞形态结构完整,大量肝细胞核消融固缩,视野内所有肝实质肝细胞脂质样变性,胞质浅染,间质内未见纤维化增生,未见炎性细胞浸润;参苓白术散低剂量组肝细胞形态结构完整,大量肝细胞核消融固缩,肝实质大量肝细胞脂质样变性,胞质浅染,间质内未见纤维化增生,未见炎性细胞浸润;参苓白术散中剂量组肝细胞形态结构完整,少量肝细胞核消融崩解,肝实质肝细胞有脂质样变性,胞质浅染,间质内未见纤维化增生,未见炎性细胞浸润;参苓白术散高剂量组肝细胞形态结构完整,肝细胞轮廓清晰,少量肝血窦轻微扩张,局部肝血窦间质形成聚集性脂肪样变性,间质内未见纤维化增生,未见炎性细胞浸润;多烯磷脂酰胆碱组肝细胞形态结构完整,肝细胞轮廓清晰,肝间质肝血窦有少量肝血窦扩张,间质内未见纤维化增生,未见炎性细胞浸润。见图 1。

3.1.2 肝脏油红 O 染色 与正常组比较,模型组肝细胞的细胞质内视野内大量橘红色的脂滴,表明脂肪沉积严重;与模型组比较,参苓白术散低剂量组肝细胞的细胞质内脂滴减少,但视野内仍可见大量脂滴,参苓白术散中、高剂量组、多烯磷脂酰胆碱组肝细胞的胞细胞内脂滴可见明显减少。见图 2。



注:A.正常组;B.模型组;C.多烯磷脂酰胆碱组;D.参苓白术散低剂量组;E.参苓白术散中剂量组;F.参苓白术散高剂量组(图2和图3同)

图1 参苓白术散对 ALD 大鼠肝脏病理的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Shenling Baizhusan on liver pathology in ALD rats (HE, $\times 200$)

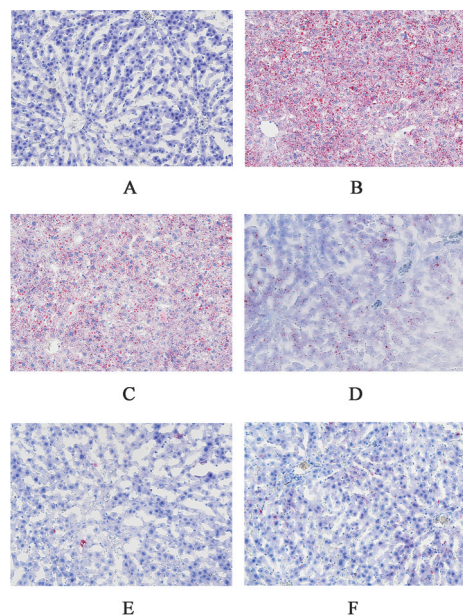


图2 参苓白术散对 ALD 大鼠肝脏病理的影响(油红 O, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Shenling Baizhusan on liver pathology in ALD rats (Oil red O, $\times 200$)

3.2 对ALD大鼠肝功能、血脂的影响 与正常组比较,模型组大鼠ALT、AST、GGT、TC、TG等指标明显增高($P<0.05$);与模型组比较,参苓白术散各剂

量组、多烯磷脂酰胆碱组ALT、AST、GGT、TC、TG等指标明显降低($P<0.05$),但参苓白术散低剂量组TG差异无统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表2 参苓白术散对ALD大鼠肝功能、血脂的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Shenling Baizhusan on liver function and blood lipid in ALD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	GGT/U·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹
正常组		31.460±7.306	51.110±8.336	73.020±18.620	2.469±0.601	1.844±0.541
模型组		79.870±6.797 ¹⁾	152.300±8.437 ¹⁾	209.670±19.420 ¹⁾	6.237±0.570 ¹⁾	4.432±0.526 ¹⁾
多烯磷脂酰胆碱组	143.64	44.040±4.402 ²⁾	69.970±7.484 ²⁾	99.990±12.950 ²⁾	3.130±0.513 ²⁾	2.501±0.417 ²⁾
参苓白术散低剂量组	3.75	66.430±5.251 ²⁾	121.60±8.027 ²⁾	170.900±12.110 ²⁾	5.104±0.570 ²⁾	3.841±0.457
参苓白术散中剂量组	7.5	56.300±8.915 ²⁾	90.580±6.111 ²⁾	125.600±12.780 ²⁾	4.299±0.559 ²⁾	3.090±0.555 ²⁾
参苓白术散高剂量组	15	39.480±5.060 ²⁾	61.570±5.834 ²⁾	87.640±13.330 ²⁾	2.961±0.510 ²⁾	2.170±0.323 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与模型组比较²⁾ $P<0.05$ (表3-表6同)

3.3 对ALD大鼠炎症因子的影响 与正常组比较,模型组大鼠LPS、TNF- α 、IL-1 β 明显增高,差异有明显统计学意义($P<0.05$);与模型组比

较,参苓白术散各组、多烯磷脂酰胆碱组LPS、TNF- α 、IL-1 β 明显降低,差异有明显统计学意义($P<0.05$)。见表3。

表3 参苓白术散对ALD大鼠炎症因子的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Shenling Baizhusan on inflammatory factors in ALD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	LPS/U·mL ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL- β /ng·L ⁻¹
正常组		0.789±0.089	32.860±4.122	24.660±3.474
模型组		1.614±0.271 ¹⁾	54.260±5.985 ¹⁾	44.850±5.059 ¹⁾
多烯磷脂酰胆碱组	143.64	0.985±0.075 ²⁾	37.670±7.880 ²⁾	26.610±3.332 ²⁾
参苓白术散低剂量组	3.75	1.326±0.081 ²⁾	45.640±3.539 ²⁾	38.630±3.782 ²⁾
参苓白术散中剂量组	7.5	1.021±0.126 ²⁾	38.560±4.262 ²⁾	29.590±3.843 ²⁾
参苓白术散高剂量组	15	0.899±0.060 ²⁾	34.820±3.288 ²⁾	26.350±4.033 ²⁾

3.4 对ALD大鼠氧化应激及Fe⁺的影响 与正常组比较,模型组大鼠GSH、SOD指标水平明显降低,MDA、Fe⁺含量明显增高($P<0.05$);与模型组比较,

参苓白术散高剂量组、多烯磷脂酰胆碱组GSH、SOD指标水平明显升高,MDA、Fe⁺含量明显降低($P<0.05$)。见表4。

表4 参苓白术散对ALD大鼠氧化应激及Fe⁺的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Shenling Baizhusan on oxidative stress and iron ion in ALD rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	GSH/ μ mol·g ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	Fe ⁺ / μ mol·g ⁻¹
正常组		198.500±23.440	6.438±0.716	111.800±5.736	11.190±1.094
模型组		115.400±15.980 ¹⁾	9.817±0.898 ¹⁾	54.650±9.091 ¹⁾	22.310±2.985 ¹⁾
多烯磷脂酰胆碱组	143.64	160.500±20.410 ²⁾	6.082±0.551 ²⁾	95.640±5.736 ²⁾	12.880±1.546 ²⁾
参苓白术散低剂量组	3.75	127.000±15.400	8.450±0.688 ²⁾	64.630±9.122	19.430±2.517
参苓白术散中剂量组	7.5	142.500±15.770	6.792±1.115 ²⁾	84.750±9.027 ²⁾	14.880±2.657 ²⁾
参苓白术散高剂量组	15	181.300±17.820 ²⁾	6.150±0.441 ²⁾	103.200±14.220 ²⁾	12.480±1.541 ²⁾

3.5 对ALD大鼠Nrf2、NF- κ B信号通路、铁死亡相关mRNA的影响 与正常组比较,模型组Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1 mRNA表达明显降低($P<0.05$),NF- κ B mRNA表达明显增高($P<0.05$);与模型组比较,参苓白术散中、高剂量组及多烯磷脂酰胆碱组

Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1 mRNA表达明显升高($P<0.05$),NF- κ B mRNA表达明显降低($P<0.05$)。见表5。

3.6 对ALD大鼠Nrf2、NF- κ B信号通路信号通路、铁死亡相关蛋白的影响 与正常组比较,模型组

表5 参苓白术散对ALD大鼠Nrf2、NF-κB信号通路、铁死亡mRNA表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Shenling Baizhusan on Nrf2, NF-κB signaling pathway and ferroptosis mRNA expression in ALD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Nrf2	HO-1	GPX4	FTH1	NF-κB
正常组		1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
模型组		0.420±0.161 ¹⁾	0.226±0.047 ¹⁾	0.434±0.077 ¹⁾	0.404±0.082 ¹⁾	2.794±0.550 ¹⁾
多烯磷脂酰胆碱组	143.64	0.825±0.168 ²⁾	0.896±0.241 ²⁾	0.837±0.134 ²⁾	0.827±0.159 ²⁾	1.317±0.340 ²⁾
参苓白术散低剂量组	3.75	0.716±0.0736 ²⁾	0.573±0.088 ²⁾	0.578±0.077	0.614±0.152	2.284±0.669
参苓白术散中剂量组	7.5	0.788±0.173 ²⁾	0.745±0.236 ²⁾	0.830±0.106 ²⁾	0.796±0.152 ²⁾	1.632±0.320 ²⁾
参苓白术散高剂量组	15	0.911±0.114 ²⁾	0.915±0.176 ²⁾	0.895±0.190 ²⁾	0.849±0.155 ²⁾	1.182±0.378 ²⁾

Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), p65、p-p65蛋白表达明显增高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 参苓白术散中、高剂量及多烯磷脂酰胆

碱组 Nrf2、HO-1、GPX4、FTH1蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$), p65、p-p65蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$)。见表6、图3。

表6 参苓白术散对ALD大鼠Nrf2、NF-κB信号通路信号通路、铁死亡相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Shenling Baizhusan on Nrf2, NF-κB signaling pathway and ferroptosis related protein in ALD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Nrf2/GAPDH	HO-1/GAPDH	GPX4/GAPDH	FTH1/GAPDH	p-p65/GAPDH	p65/GAPDH
正常组		0.738±0.029	0.689±0.035	0.664±0.063	0.611±0.029	0.113±0.012	0.427±0.056
模型组		0.335±0.022 ¹⁾	0.106±0.021 ¹⁾	0.203±0.044 ¹⁾	0.199±0.013 ¹⁾	0.502±0.041 ¹⁾	0.761±0.012 ¹⁾
多烯磷脂酰胆碱组	143.64	0.605±0.022 ²⁾	0.383±0.031 ²⁾	0.530±0.080 ²⁾	0.465±0.049 ²⁾	0.238±0.022 ²⁾	0.600±0.022 ²⁾
参苓白术散低剂量组	3.75	0.497±0.007 ²⁾	0.188±0.030 ²⁾	0.313±0.028	0.271±0.031	0.445±0.044	0.718±0.046
参苓白术散中剂量组	7.5	0.574±0.025 ²⁾	0.312±0.059 ²⁾	0.422±0.069 ²⁾	0.407±0.035 ²⁾	0.354±0.051 ²⁾	0.648±0.032 ²⁾
参苓白术散高剂量组	15	0.683±0.028 ²⁾	0.489±0.018 ²⁾	0.609±0.079 ²⁾	0.551±0.032 ²⁾	0.183±0.008 ²⁾	0.564±0.027 ²⁾

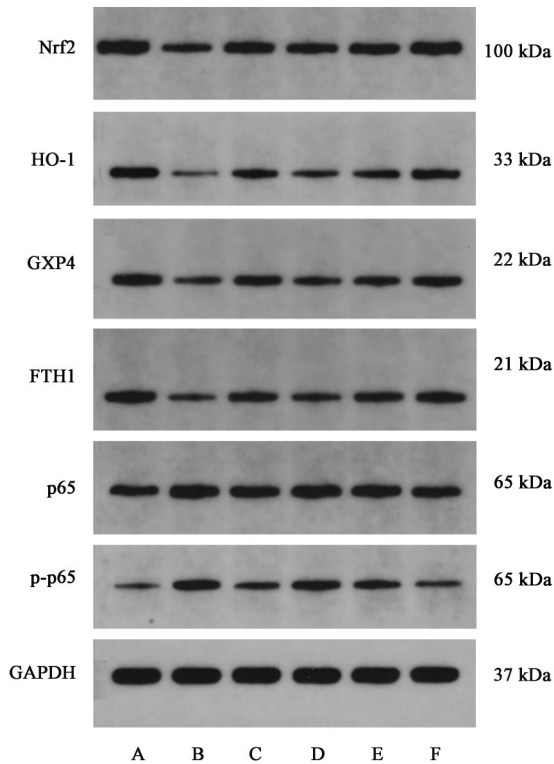


图3 各组大鼠Nrf2、NF-κB信号通路信号通路、铁死亡相关蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Nrf2, NF-κB signaling pathway and ferroptosis related protein in rats of each groups

4 讨论

由于我国经济快速发展与酒精文化的盛行, ALD发病率在我国逐年上升, 对人民群众生活健康以及经济造成严重负担。ALD在疾病进展的中后期(酒精性肝纤维化-酒精性肝硬化-与酒精性相关的肝癌)尚无良好的治疗方案, 且预后差, 死亡率高, 因此在疾病前期(酒精性脂肪肝-酒精性肝炎)防治具有重要意义。在中医学中尚无ALD病名, 历代医家根据ALD病因、病机、症状特点, 将其归属于“伤酒”“酒癖”“酒疸”“酒臌”等范畴。《黄帝内经·灵枢·论勇》云:“酒者, 水谷之精, 熟谷之液也, 其气慄悍, 其入于胃中, 则胃胀, 气上逆, 满于胸中, 肝浮胆横。”其认为酒乃熟谷之品, 入脾胃之后, 聚湿热邪毒停于中焦, 阻碍脾胃气机枢纽功能正常运作, 脾土阻滞, 气机及水液运化失司, 累及肝木, 肝失疏泻, 则全身气机失调, 滞则不通, 郁则不散。《金匮要略》明确提出“见肝之病, 当知传脾”的观点, 而《临证指南医案》也指出“肝病已久, 脾胃必需”的理念。因此, 现代医家在结合古代典籍及临床经验认为ALD酒毒湿邪为致病外因, 先天禀赋不足、脾胃虚弱为致病内因, 故治法多以健脾益胃、调肝理气、化湿祛毒为主^[18-20]。参苓白术散由白扁豆、白术、茯

苓、甘草、桔梗、莲子、人参、砂仁、山药、薏苡仁组成,方中君药人参、白术、茯苓健脾益气兼以渗湿,山药、莲子共助君药健脾益气,薏苡仁、白扁豆同辅茯苓、白术,增强其健脾渗湿之功,佐以砂仁醒脾行气、和胃化滞,桔梗宣通肺气,使水道通利,药物顺载上行,最后以甘草健脾和中,调和药性,诸药合用共奏健脾补中,行气化湿之效,使脾气健运,水湿毒邪得去,诸病皆除。

当肝细胞受到损伤时,细胞内ALT、AST、GGT将明显升高,因此笔者将血清中的ALS、AST、GGT指标作为肝损伤检测标志物^[21]。本研究发现,经乙醇诱导后的大鼠血清ALT、AST、GGT明显高于正常组,表明酒精性肝损伤模型造模成功。在经不同剂量的参苓白术散干预后,各组大鼠ALT、AST、GGT下降,表明参苓白术散对于酒精性肝损伤具有改善作用。研究表明,长期饮酒将降低氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPAR α)活性,进而抑制肝脏细胞自噬,增加肝脏毒性与脂肪变性,同时影响脂肪酸分解和脂肪细胞死亡,导致循环中的脂肪酸增加以及肝脏内的脂肪堆积^[22-23]。本研究结果表明,模型组大鼠肝脏病理结果出现脂肪变性,肝脏内可见大量脂粒沉积;TC、TG等指标明显高于正常组。经参苓白术散干预后,肝脏内脂肪变性得到不同程度的改善,TC、TG等明显下降。表明参苓白术散对于酒精性肝损伤导致的脂肪变性具有良好的改善作用。

Nrf2是抗氧化应激的重要调节蛋白。研究发现,长期摄入酒精会导致肝细胞对CYP2E1诱导增强,产生大量的ROS,导致机体发生氧化应激,导致脂质过氧化和肝细胞损伤,并且激活相关炎症途径^[24]。此外,饮酒会导致肠道通透性增加,肠道菌群出现移位,LPS等致病因素进入门静脉循环产生肠源性内毒素血症。内毒素血症会激活Kupffer细胞和TLR4受体,在TLR4的介导下NF- κ B激活并诱导促炎因子TNF- α 和IL-6的产生和释放^[25]。并且由于酒精的诱导,胱天蛋白酶-1(Caspase-1)会介导IL-1 β 成熟与分化^[26],IL-1 β 在酒精滥用后将通过分泌加速肝脏中的促炎细胞的生成,并且IL-1 β 在裂解之后将通过IL-1R1加重酒精诱导的肝脏脂肪变性、肝脏炎症以及肝损伤^[27]。氧化应激与炎症相互作用,有损细胞产生ROS激活炎症细胞,损伤相关分子模式(DAMPs)被TLR和NOD样受体所识别,激活与ALD相关的炎症通路,同时增强细胞因子、趋化因子、和粘附因子的表达,促进了免疫因子

激活^[28-30]。多项研究表明,增强Nrf2表达能降低ROS产生,抑制炎症因子表达^[31-33]。近年来有研究表明,Nrf2除在抗氧化应激中发挥着重要作用之外,在肝脏对有毒物质以及铁稳态中同样发挥着关键作用。当Nrf2表达缺失时,肝脏对肝毒物质的敏感性将大幅增加^[34]。在肝细胞中,Nrf2激活将增加NQO1、GCLC或GSTA1等细胞保护基因的转录,提高了细胞处理铁诱导的ROS能力。Nrf2还能通过储存组织内多余的铁、调节铁调素水平等途径在维持组织内铁稳态^[35]。此外,Nrf2还驱动铁诱导的BMP6在肝窦内皮细胞表达,从肝窦内皮细胞分泌的BMP6能够增加邻近肝细胞的铁调素合成^[36]。有研究表明^[37],Nrf2基因敲除大鼠对铁诱导的细胞死亡敏感度远远高于正常大鼠,并且会增加肝脏内铁沉积,使肝脏铁调素和铁蛋白表达增高,加重肝损伤以及坏死性炎症。

本研究结果发现,经酒精诱导的大鼠Nrf2、HO-1等蛋白表达和mRNA含量明显低于正常组大鼠,p65、p-p65蛋白表达上调,NF- κ B mRNA含量明显升高,表明在肝脏在氧化应激的刺激下其相关炎症通路被激活,因此LPS、TNF- α 、IL-1 β 及MDA水平明显高于正常组;经参苓白术散干预后,Nrf2、HO-1等表达明显上调,p65、p-p65、NF- κ B等表达下调,使MAD、LPS、TNF- α 、IL-1 β 等水平下降,表明参苓白术散能够有效改善酒精摄入所导致的氧化应激以及相关炎症水平。

铁死亡作为一种藉由脂质过氧化导致的铁依赖氧化细胞死亡程序,与氧化应激有着密切联系。细胞内Fe⁺与过氧化氢(H₂O₂)结合生成氢氧化物(OH⁻)和羟基(OH \cdot)等ROS,进而导致氧化应激发生。当氧化应激发生时消耗细胞内的GSH,抑制GXP4活性。GSH作为一种传统的抗氧化剂,能够减少细胞毒性和ROS产生,并且能够利用NADPH/H⁺作为辅因子将GSSG转化为GSH,缓解氧化应激^[38]。GPX4能够通过利用GSH将脂质过氧化氢物转化为脂醇,防止有毒脂质ROS形成与积累^[39]。FTH1能够通过抑制核受体共激活因子4(NCOA4)的途径缓解细胞内铁蛋白降解,抑制铁死亡。本研究发现,在ALD模型大鼠中,Fe⁺含量明显升高,GSH、SOD含量明显减少,出现了明显的铁过载和氧化应激,并且FTH1的蛋白表达和mRNA表达明显下调,表明肝细胞内可能发生了铁死亡。经参苓白术散干预后,各组Fe⁺含量减少,GSH、SOD含量增多,FTH1的蛋白表达和mRNA表达明显上调。

表明参苓白术散能够通过调节氧化应激清除 Fe^{+} ,上调FTH1表达明显,抑制铁死亡的发生。LIU等^[40]研究表明,对酒精诱导的肝细胞损伤使用Fratxin后能够抑制肝细胞内铁死亡,从而达到改善肝脏脂肪和氨基酸代谢紊乱的目的。另有研究发现,使用Fer-1能够抑制大鼠酒精性肝损所导致的铁死亡以及脂质过氧化,从而改善肝损伤^[41],与本研究一致。此外,在通过铁死亡干预非酒精性脂肪性肝病的研究中同样发现,当Nfr2信号通路被激活,肝细胞内铁死亡被抑制后,将改善大鼠肝脏损伤以及脂质代谢异常^[42-43]。

综上所述,参苓白术散能够有效减少ALD大鼠肝损伤,调节脂肪变性与脂肪沉积,并在肝脏内发挥抗氧化与抗炎作用;其作用机制可能与上调Nrf2信号通路改善氧化应激的途径抑制肝细胞内铁死亡发生有关。本研究结果初步阐释了参苓白术散从干预铁死亡的角度治疗酒精性肝损伤,但是由于中药复方成分相对复杂,后续对于其具体分子机制以及相关通路之间的联系仍需通过进行抑制剂阻断和基因靶点敲除或敲低等方式并结合网络药理学等进行更加深入详细的研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 酒精性肝病防治指南(2018更新版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2018, 26(3):188-194.

[2] BYASS P. The global burden of liver disease: A challenge for methods and for public health[J]. BMC Med, 2014, 12:159.

[3] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective [J]. J Hepatol, 2019, 71 (1) : 212-221.

[4] MUELLER S, PECCERELLA T, QIN H, et al. Carcinogenic etheno DNA adducts in alcoholic liver disease: Correlation with cytochrome P-4502E1 and fibrosis [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2018, 42 (2) : 252-259.

[5] LV X, CHEN Z, LI J, et al. Caffeine protects against alcoholic liver injury by attenuating inflammatory response and oxidative stress[J]. Inflamm Res, 2010, 59(8):635-645.

[6] PETRASEK J, BALA S, CSAK T, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent

alcoholic steatohepatitis in mice [J]. J Clin Invest, 2012, 122(10):3476-3489.

[7] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. Cell, 2012, 149(5) : 1060-1072.

[8] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22(4) :266-282.

[9] HARRISON-FINDIK D D, SCHAFER D, KLEIN E, et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression [J]. J Biol Chem, 2006, 281(32):22974-22982.

[10] 卢殿强, 邵铭. 邵铭教授从脾论治酒精性肝病[J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8(11):1160-1161.

[11] 周素芳, 刘闯, 李艺峰, 等. 参苓白术颗粒对酒精性肝病大鼠肝肠损伤的改善作用[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(7):4-7, 后插1和2.

[12] 王峰. 加味参苓白术散对非酒精性脂肪肝病效分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(12):1489, 1504.

[13] 吕锦珍, 徐拥建, 胡世平, 等. 参苓白术散对NAFLD大鼠肝细胞mTORC1/STAT3信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(2):6-12.

[14] 卢广英, 邢训颜, 王嘉响, 等. 经典名方参苓白术散的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(19):5171-5181.

[15] 赖靖江, 糕孝丽, 蒋凤仙, 等. 参苓白术散在多种疾病模型中的潜在作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(20):267-273.

[16] 中华中医药学会中药实验药理专业委员会. 酒精性肝损伤动物模型制备规范(草案)[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(3):1000-1003.

[17] 张茹, 曲中原, 杜娟. 基于Nrf2-HO-1/CYP2E1通路探讨五指毛桃醇提取物对酒精性肝损伤小鼠的抗氧化保护机制[J]. 中药新药与临床药理, 2021, 32(12):1769-1775.

[18] 彭景华, 方志红, 崔剑巍, 等. 健脾活血方对酒精复合内毒素脂多糖诱导的肝损伤大鼠库普弗细胞活化信号通路的干预[J]. 中西医结合学报, 2007, 5(3):302-306.

[19] 方俐晖, 郭志玲, 张轶斐, 等. 田德禄教授三期三脏辨治酒精性肝病经验[J]. 现代中医临床, 2021, 28(5):38-42.

[20] 刘江凯. 赵文霞分期辨治酒精性肝病经验介绍[J]. 新中医, 2021, 53(18):201-204.

[21] 朱平生, 焦炎杰, 付双楠, 等. 酒精致大鼠肝损伤早期

- 血清生物标志物水平的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(2):129-133.
- [22] PARKER R, KIM S J, GAO B. Alcohol, adipose tissue and liver disease: Mechanistic links and clinical considerations [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2018,15(1):50-59.
- [23] ZHONG W, ZHAO Y, TANG Y, et al. Chronic alcohol exposure stimulates adipose tissue lipolysis in mice: Role of reverse triglyceride transport in the pathogenesis of alcoholic steatosis [J]. Am J Pathol, 2012,180(3):998-1007.
- [24] DREGER H, WESTPHAL K, WILCK N, et al. Protection of vascular cells from oxidative stress by proteasome inhibition depends on Nrf2 [J]. Cardiovasc Res, 2009,85:395-403.
- [25] HU X, ZHOU R, LI H, et al. Alterations of gut microbiome and serum metabolome in coronary artery disease patients complicated with non-alcoholic fatty liver disease are associated with adverse cardiovascular outcomes [J]. Front Cardiovasc Med, 2021,8:805812.
- [26] DINARELLO C A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family [J]. Annu Rev Immunol, 2009,27:519-550.
- [27] PETRASEK J, BALA S, CSAK T, et al. IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice [J]. J Clin Invest, 2012,122(10):3476-3489.
- [28] KANY S, JANICOVA A, RELJA B. Innate immunity and alcohol [J]. J Clin Med, 2019,8(11):234.
- [29] KIM A, BELLAR A, MCMULLEN M R, et al. Functionally diverse inflammatory responses in peripheral and liver monocytes in alcohol-associated hepatitis [J]. Hepatol Commun, 2020,4(10):1459-1476.
- [30] XU M J, ZHOU Z, PARKER R, et al. Targeting inflammation for the treatment of alcoholic liver disease [J]. Pharmacol Ther, 2017,180:77-89.
- [31] LI X L, JIANG W, FAN W M, et al. Role of gut microbiota in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease with traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin(药学报), 2020,55:15-24.
- [32] MOHS A, OTTO T, SCHNEIDER K M, et al. Hepatocyte-specific Nrf2 activation controls fibrogenesis and carcinogenesis in steatohepatitis [J]. J Hepatol, 2021,74(3):638-648.
- [33] LI L, FU J, SUN J, et al. Is Nrf2-ARE a potential target in NAFLD mitigation? [J]. Curr Opin Toxicol, 2019,13:35-44.
- [34] SCHÖDEL J, RATCLIFFE P J. Mechanisms of hypoxia signalling: New implications for nephrology [J]. Nat Rev Nephrol, 2019,15:641-659.
- [35] SILVA-GOMES S, SANTOS A G, CALDAS C, et al. Transcription factor Nrf2 protects mice against dietary iron-induced liver injury by preventing hepatocytic cell death [J]. J Hepatol, 2014,60(2):354-361.
- [36] RISHI G, SUBRAMANIAM V N. The liver in regulation of iron homeostasis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2017,313:G157-G165.
- [37] HARRIS I S, DENICOLA G M. The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer [J]. Trends Cell Biol, 2020,30,440-451.
- [38] RAN Q, MOZOLEWSKA P. Gpx4 and Ferroptosis. In ferroptosis in health and disease [M]. Cham: Springer, 2019:99-109.
- [39] HOU W, XIE Y, SONG X, et al. Autophagy promotes ferroptosis by degradation of ferritin [J]. Autophagy, 2016,12(8):1425-1428.
- [40] LIU C Y, WANG M, YU H M, et al. Ferroptosis is involved in alcohol-induced cell death *in vivo* and *in vitro* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2020,84(8):1621-1628.
- [41] LIU J, HE H, WANG J, et al. Oxidative stress-dependent frataxin inhibition mediated alcoholic hepatocytotoxicity through ferroptosis [J]. Toxicology, 2020,445:152584.
- [42] 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.
- [43] 张新,陈文娜,宋囡,等. 丹萎片通过铁死亡途径减轻非酒精性脂肪性肝病模型小鼠肝脏氧化损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2021,37(12):2180-2188.

[责任编辑 周冰冰]