基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003881

健脾柔肝汤通过调控Nrf2/HMOX1通路介导的铁死亡缓解CCl_4诱导的大鼠肝纤维化研究

徐永兴[1]，刘 俊[2]，杨 康[1]，曹文富[2]
（1.重庆医科大学中医药学院，重庆 401331；2.重庆医科大学附属第一医院中西医结合科，重庆 400016）

【摘 要】目的：从核因子E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）/血红素加氧酶1（heme oxygenase 1，HMOX1）信号通路介导的铁死亡角度，探讨健脾柔肝汤（Jianpi Rougan decoction，JPD）对CCl_4诱导的大鼠肝纤维化的影响及作用机制。**方法：**将72只SD（Sprague-Dawley）大鼠随机分为6组，正常对照组（Con）、模型组（CCl_4）、秋水仙碱组（colchicine，Col），以及健脾柔肝汤低、中、高剂量组（JPD-L、JPD-M、JPD-H），每组12只。大鼠肝纤维化模型通过腹腔注射橄榄油与CCl_4混合溶液（40%，3 mL/kg）建立，模型建立后健脾柔肝汤连续灌胃给药6周，对各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）水平和肝纤维化4项：层粘连蛋白（laminin，Ln）、透明质酸（hyaluronic acid，HA）、Ⅲ型胶原（collagen type Ⅲ，ColⅢ）、Ⅳ型胶原（collagen type Ⅳ，ColⅣ）水平进行检测；通过苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）、MASSON和天狼星染色观察肝组织形态学改变；并对大鼠肝组织中谷胱甘肽（glutathione，GSH）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）及亚铁离子（Fe^{2+}）含量进行检测；最后通过免疫组化（immunohistochemistry，IHC）和蛋白质免疫印迹（Western blot，WB）实验检测肝组织中肝纤维化相关蛋白α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）、胶原蛋白Ⅰ（Collagen Ⅰ）、铁死亡相关蛋白长链脂肪酸辅酶A连接酶4（acyl-CoA synthetase long-chain family member 4，ACSL4）、转铁蛋白受体1（transferrin receptor protein 1，TFR1）、铁蛋白重链1（ferritin heavy chain 1，FTH1）、谷胱甘肽过氧化物酶4（glutathione peroxidase 4，GPX4）及Nrf2/HMOX1信号通路Nrf2、HMOX1蛋白的表达。**结果：**与Con组相比，CCl_4组大鼠血清中ALT、AST水平，以及MDA和Fe^{2+}含量明显升高（$P<0.05$），而SOD、GSH水平则明显下降（$P<0.05$）；并在CCl_4组大鼠中观察到肝脏严重的病理损伤，包括肝细胞坏死、炎症细胞浸润及胶原纤维沉积；CCl_4组大鼠肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ及ACSL4、TFR1蛋白阳性表达均升高（$P<0.05$），而FTH1、GPX4及Nrf2、HMOX1蛋白的阳性表达均降低（$P<0.05$）。与CCl_4组比较，JPD各剂量组大鼠的血清ALT、AST和MDA、Fe^{2+}水平及肝组织中α-SMA、Collagen Ⅰ及ACSL4、TFR1蛋白含量均降低，在JPD-H组中较为明显（$P<0.05$）；同时SOD、GSH水平及FTH1、GPX4、Nrf2和HMOX1蛋白含量均升高，同样在JPD-H组中较为明显（$P<0.05$）。病理学结果显示，健脾柔肝汤能够明显缓解肝细胞坏死、炎症细胞浸润及胶原纤维沉积。**结论：**健脾柔肝汤能够通过激活Nrf2/HMOX1信号通路来改善肝脏功能，减轻由CCl_4诱导的大鼠肝纤维化，在临床肝纤维化治疗中具有一定潜力。

【关键词】健脾柔肝汤；肝纤维化；铁死亡；Nrf2/HMOX1信号通路
【中图分类号】R256.4 **【文献标志码】**A

Jianpi Rougan decoction alleviates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats by regulating ferroptosis mediated by the Nrf2/HMOX1 signaling pathway

Xu Yongxing[1]，*Liu Jun*[2]，*Yang Kang*[1]，*Cao Wenfu*[2]
（*1. College of Traditional Chinese Medicine，Chongqing Medical University；2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine，The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effect and mechanism of action of Jianpi Rougan decoction（JPD）on carbon tetrachloride（CCl_4）-induced liver fibrosis in rats from the perspective of ferroptosis mediated by the Nrf2/HMOX1 signaling pathway. ***Methods*：**A total of 72 Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group（Con group），model group（CCl_4 group），colchicine group（Col group），and low-，middle-，and high-dose JPD groups（JPD-L，JPD-M，and JPD-H groups），with 12 rats in each group，Intraperitoneal injection of a mixed solution of olive oil and CCl_4（40%，3 mL/kg）was performed to establish a rat model of liver fibrosis，and after modeling，JPD was given by gavage for 6 consecutive weeks，The serum levels of alanine aminotransferase（ALT）and aspartate aminotransferase（AST）were measured for the rats in each group，as well as the four indicators of liver fibrosis（laminin，hyaluronic acid，collagen type Ⅲ，and collagen type Ⅳ）；HE staining，Masson staining，and Sirius red staining were used to observe liver histomorphologi-

作者介绍：徐永兴，Email：602372261@qq.com，
研究方向：中医内科学，肝病方向。
通信作者：曹文富，Email：caowenfu2019120@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81573860）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250611.1057.002（2025-06-11）

cal changes; the contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and ferrous ion (Fe^{2+}) in rat liver tissue were also measured; immunohistochemistry and Western blot were used to measure the protein expression levels of liver fibrosis-related proteins (α-smooth muscle actin [α-SMA] and Collagen Ⅰ) and ferroptosis-related proteins (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 [ACSL4], transferrin receptor protein 1 [TFR1], ferritin heavy chain 1 [FTH1], and glutathione peroxidase 4 [GPX4]) in liver tissue, as well as nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase 1 (HMOX1) associated with the Nrf2/HMOX1 signaling pathway. ***Results***: Compared with the Con group, the CCl_4 group had significant increases in the serum levels of ALT and AST and the contents of MDA and Fe^{2+} d ($P<0.05$) and significant reductions in the levels of SOD and GSH ($P<0.05$), as well as severe liver pathological injury (including hepatocyte necrosis, inflammatory cell infiltration, and collagen fiber deposition), and there were significant increases in the positive expression of α-SMA, Collagen Ⅰ, ACSL4, and TFR1 and significant reductions in the positive expression of FTH1, GPX4, Nrf2, and HMOX1 in liver tissue ($P<0.05$), Compared with the CCl_4 group, the JPD-L, JPD-M, and JPD-H groups had significant reductions in the serum levels of ALT, AST, MDA, and Fe^{2+} and the contents of α-SMA, Collagen Ⅰ, ACSL4, and TFR1 in liver tissue, with significantly greater reductions in the JPD-H group ($P<0.05$); meanwhile, these three groups had significant increases in the levels of SOD and GSH and the contents of FTH1, GPX4, Nrf2, and HMOX1, with significantly greater increases in the JPD-H group ($P<0.05$), In addition, pathological results showed that JPD could significantly alleviate hepatocyte necrosis, inflammatory cell infiltration, and collagen fiber deposition. ***Conclusion***: JPD can improve liver function and alleviate CCl_4-induced liver fibrosis in rats by activating the Nrf2/HMOX1 signaling pathway, thereby showing a great potential in the clinical treatment of liver fibrosis.

【Key words】Jianpi Rougan decoction; liver fibrosis; ferroptosis; Nrf2/HMOX1 signaling pathway

肝纤维化由病毒性肝炎、酒精性肝病等慢性肝损伤引发，以肝细胞外基质过度沉积为特征，若不及时干预，会进展为肝硬化或肝功能衰竭[1]，在慢性乙肝、丙肝患者中尤为常见[2]。当前临床治疗以去除致病因素为主，现有抗纤维化药物疗效欠佳且有副作用，探寻更优治疗策略迫在眉睫[3]。

中医将肝纤维化归为“积聚”“胁痛”范畴，认为湿、热、瘀、毒是主要致病因素[4]。病机在于肝疏泄失职、脾失健运，导致气滞血瘀，主张疏肝健脾、化瘀通络、清热化湿（解毒），肝脾同治[5]。近年来，中药复方在抑制肝纤维化方面优势凸显[6]。健脾柔肝汤（Jianpi Rougan decoction，JPD）是重庆医科大学附属第一医院曹文富教授临床经验方，由黄芪、党参、丹参、赤芍、白术、茯苓、郁金、枳壳、柴胡、陈皮等中药配伍而成。研究表明，方中黄芪、党参、白术等多味药材的有效成分，能通过调节Toll样受体4（Toll-like receptor 4，TLR4）/核因子κB（nuclear factor kappa-B，NF-κB）、转化生长因子β1（transforming growth factor beta 1，TGF-β1）、Smad家族成员3（Smad family member 3，Smad3）、Janus激酶-信号转导及转录激活因子（Janus kinase-signal transducer and activator of transcription，JAK-STAT）、NF-κB等多种信号通路抑制肝纤维化，为其治疗肝纤维化提供了理论依据[7-10]。

铁死亡在肝纤维化的发生发展中作用突出，抑制铁死亡可减缓肝纤维化进程[11-12]。研究表明Nrf2/HMOX1信号通路能抑制铁死亡、减轻肝损伤，是治疗肝纤维化的潜在靶点[13]。秋水仙碱可改善肝功能指标，延缓肝纤维化的发展进程，常被用作抗肝纤维化药理学研究中的阳性药物[14-15]。

本研究采用腹腔注射橄榄油与CCl_4混合溶液建立肝纤维化大鼠模型，以秋水仙碱作为阳性药物，旨在探究健脾柔肝汤对大鼠肝纤维化的干预作用及机制，尤其关注其对Nrf2/HMOX1信号通路介导的铁死亡的调控。

1 材料与方法

1.1 实验动物

72只雄性无特定病原体（specific pathogen-free，SPF）级SD大鼠，8周龄体质量180~220 g，均购自重庆医科大学实验动物中心，该中心持有实验动物生产许可证号SCXK（渝）2018-0003，以及实验动物使用许可证号SYXK（渝）2018-0003。所有的大鼠均在（22±2）℃的恒温室中进行饲养，控制饲养环境相对湿度在40%~70%，明暗交替各12 h，杜绝外来病原体进入，自由饮食和饮水。本动物实验遵循国家相关管理规定和伦理要求，并获得重庆医科大学研究伦理委员会批准（批准号：IACUC-CQMU-2023-0057）。

1.2 主要试剂

健脾柔肝汤药物免煎颗粒由华润三九现代中药制药有限公司提供，批号：黄芪：2302004S、党参：2407004C、陈皮：2306004S、丹参：2303023S、郁金：2408001C、北柴胡：2409003C、枳壳：2406001C、茯苓：2312001C、赤芍：2208005S、白术：2407018C；秋水仙碱片（国药准字：H53020166云南植物药业有限公司）。

分析纯CCl_4橄榄油（货号C11576517、C11631395），购自上海麦克林生化科技有限公司；酶联免疫吸附测定法（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）试剂盒（货号201028HR4、201208HR3、201202TR1、201202IR3、201202IR4、201208LR2）均购自江苏晶美生物科技有限公司；谷胱甘

肽过氧化物酶4（glutathione peroxidase 4，GPX4）（货号AB125066）、长链脂肪酸辅酶A连接酶4（Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4，ACSL4）（货号AB155282）以及山羊抗兔免疫球蛋白G（immunoglobulin G，IgG）H&L（HRP）（货号AB205718）均由英国Abcam公司提供；转铁蛋白受体1（transferrin receptor protein 1，TFR1）（货号T56618）和铁蛋白重链1（ferritin heavy chain 1，FTH1）（货号T55648）则购自上海Abmart公司；此外，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）多克隆抗体（货号10494-1-AP）和血红素加氧酶1（heme oxygenase 1，HMOX1）（货号10701-1-AP）均来自武汉Proteintech公司；核因子红细胞2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）（货号AF0639）由江苏Affinity公司提供；抗α平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）（货号ab 124964）、购自Abcam公司；抗Ⅰ型胶原蛋白（Collagen Ⅰ）（No.E8I9Z）抗体购自Cell Signaling Technology（Danvers，MA，USA）公司；天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）测试盒（货号C010-2-1）和丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase，ALT）测试盒（货号C009-2-1）购自南京建成生物工程研究所。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE）蛋白上样缓冲液（货号P0015L）、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）（货号ST506）、放射免疫沉淀测定（radioimmunoprecipitation assay，RIPA）裂解液（货号P0013B）、BCA蛋白浓度测定试剂盒（货号P0010S）均购自上海碧云天生物技术有限公司；超灵敏增强型化学发光液（enhanced chemiluminescence solution，ECL）化学发光底物（货号BL520A）购自安徽Biosharp公司；聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜（IPVH00010）购自德国Merck公司；Page凝胶快速制备试剂盒（货号PG112）购自上海雅酶公司。

1.3 主要仪器

T-10匀浆机（德国IKA公司）；切片机（德国Leica）；AL204型电子天平（瑞士METTLER TOLEDO公司）；1-14K低温高速离心机（美国Sigma）；SYNERGY1酶标仪（美国BioTeK公司）；ODYSSEY FC化学发光仪（美国LI-COR公司）；MINI蛋白电泳及转印系统（美国Bio-Rad）；DP73相差显微镜（日本OLYMPUS公司）。

1.4 方法

1.4.1 造模、分组及给药 在对72只SD大鼠进行为期1周的适应性喂养后，随机选取其中12只作为正常对照组（Con组）。其余大鼠则通过腹腔注射初始剂量为5 mL/kg的40%CCl_4橄榄油溶液进行造模[16-17]。在接下来的3 d内，腹腔注射剂量调整为3 mL/kg，每周2次，持续6周。与之对应，正常组大鼠给予相应体积的橄榄油溶液。在整个造模过程中，共有15只大鼠死亡，死亡率达20.83%。最终，从中随机抽取了3只大鼠进行HE和Masson染色检查。结果显示，大鼠肝小叶正常结构明显被破坏，并伴有大量炎性细胞浸润及胶原纤维沉积，且肝细胞变性及坏死，表明造模成功。

将剩余45只造模成功的SD大鼠随机分为5组：模型组（CCl_4）、秋水仙碱组（Col）、健脾柔肝汤低、中、高剂量组（JPD-L、JPD-M、JPD-H）。秋水仙碱组（0.1 mg/kg）给药，健脾柔肝汤由黄芪30 g、党参12 g、丹参12 g、赤芍12 g、白术12 g、茯苓12 g、郁金12 g、枳壳12 g、柴胡10 g、陈皮6 g组成，根据徐叔云的《药理实验方法学》对大鼠与人之间的剂量进行换算，上述10味药物总和130 g为体质量70 kg的成年人的使用剂量，换算成大鼠的使用剂量为[（130/70 kg）×6.25]即中剂量为11.61 g/kg，中剂量减半为低剂量，加倍为高剂量，即健脾柔肝汤低、中、高剂量组按5.81、11.61、23.22 g/kg给药。中剂量组加入等质量体积的沸水浸泡使其浓度为1 g/mL，低剂量组加入2倍质量体积的沸水浸泡使其浓度为0.5 g/mL，高剂量组加入1/2质量体积的沸水浸泡使其浓度为2 g/mL，200 g SD大鼠灌胃量低、中、高剂量组均为2.32 mL。正常对照组与模型组使用等体积的生理盐水灌胃，每日1次，持续6周，其间不限制饮食和饮水。

1.4.2 大鼠血清（ALT、AST）生化指标检测 2%的戊巴比妥按30 mg/kg腹腔注射麻醉大鼠后采用腹主动脉取血获取血清，采血后静置30 min，随后离心15 min，温度4 ℃，转速3 500 r/min，取上层血清。按照谷草转氨酶/AST/GOT测试盒（货号C010-2-1）和谷丙转氨酶/ALT/GPT测试盒（货号C009-2-1）试剂盒说明书，检测大鼠血清ALT、AST水平。

1.4.3 组织学分析 取部分肝左叶使用4%多聚甲醛固定48 h，随后使用梯度浓度的乙醇和二甲苯对肝组织进行常规脱水，然后石蜡包埋，切片，接着对切片进行苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）、马松（Masson）、天狼星（Sirius Red）染色，封片，最后在光学显微镜（BX53；Olympus，东京，日本）下观察肝组织的病理改变。

1.4.4 ELISA 根据ELISA试剂盒的操作说明，使用泉州九邦生物公司生产的透明质酸（hyaluronidase，HA，货号QZ-15723）、层粘连蛋白（laminin，LN，货号QZ-15677）、Ⅲ型胶原（collagen type Ⅲ，Col Ⅲ，货号QZ-14729）和Ⅳ型胶原（collagen type Ⅳ，Col Ⅳ，货号QZ-15741）试剂盒，对1.4.2中的血清进行检测。具体步骤如下：按要求在对应孔板中加入稀释好的标准品和待测样品，随后加入对应的抗体，控制温度在37 ℃进行反应60 min，接着洗涤孔板5次。然后加入A、B显色剂，在避光条件下显色15 min。最后加入终止液停止反应。测量450 nm处的吸光度（absorbance，A）值以确定各项指标的水平。

1.4.5 GSH、MDA、SOD、Fe^{2+}含量的检测 按照苏州格锐思生物科技有限公司生产的丙二醛（malondialdehyde，MDA）（货号G0110F）、还原型谷胱甘肽（glutathione，GSH）（货号G0206W）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）（货号G0101W）和亚铁（Fe^{2+}）（货号G1217F）试剂盒说明书对肝脏组织中GSH、MDA、SOD及Fe^{2+}含量进行检测。

1.4.6 免疫组化法检测相关蛋白表达 为了观察JPD对肝纤维化大鼠肝纤维化的影响，采用免疫组化检测α-SMA、Collagen Ⅰ、ACSL4、TFR1、FTH1、GPX4及Nrf2、HMOX1等蛋白的表达情况。步骤如下：首先，将肝组织石蜡切片脱蜡至水，然后依次进行pH 6.0的柠檬酸抗原修复，3%双氧水溶液阻断内源性过氧化物酶，胎牛血清封闭；随后，将切片与GPX4（1∶250）、ACSL4（1∶250）、FTH1（1∶100）、HMOX1（1∶500）、TFR1（1∶200）、Nrf2（1∶250）、α-SMA（1∶250）、Collagen Ⅰ（1∶500）等一抗室温孵育30 min；接着再二抗室温孵育30 min；洗涤；最后，使用DAB进行显色处理，复染细胞核，并在脱水后进行封片处理。用显微镜（BX53；Olympus，东京，日本）观察，采用Image J（美国国立卫生研究院，贝塞斯达）

软件对蛋白的表达量进行分析。

1.4.7 蛋白免疫印迹法（Western blot，WB）分析 将肝组织置于预冷的RIPA裂解液中（该裂解液中含有1%PMSF），以提取总蛋白。随后，利用BCA试剂盒（货号P0010S）对提取的蛋白含量进行测定。接下来，通过SDS-PAGE技术对总蛋白进行分离，并将分离后的蛋白转移至PVDF膜上。在室温下，使用5%脱脂牛奶进行封闭处理，持续时间为2 h。最后，加入一抗（GPX4、ACSL4、FTH1、HMOX1、TFR1、Nrf2、α-SMA及Collagen Ⅰ），在4 ℃下孵育过夜。接着，使用TBST洗涤3次，再用相应的二抗孵育1.5 h。最后，使用化学发光系统显影成像，通过Image J（美国国立卫生研究院，贝塞斯达）软件分析蛋白条带的灰度值。

1.5 统计学方法

应用Graphpad Prism 8.0绘制统计图，应用SPSS 26.0对数据进行分析，所有计量资料使用均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。采用单因素方差分析对多组间数据进行比较，Dunnett检验用于组间两两比较，检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 JPD改善大鼠肝功能

ALT、AST是评估肝功能的重要指标，当肝损伤发生时，ALT、AST水平会明显上升。在该研究中，与Con组相比，CCl_4组大鼠血清ALT、AST水平明显上升（F=15.140、4.258，均P<0.01）；而与CCl_4组相比，Col组和JPD-H组大鼠血清AST水平明显下降（F=4.258，P<0.05），Col组和JPD-L、JPD-M、JPD-H组大鼠血清ALT均明显下降（F=15.140，均P<0.01），表明健脾柔肝汤有效降低了肝损伤程度，见图1。

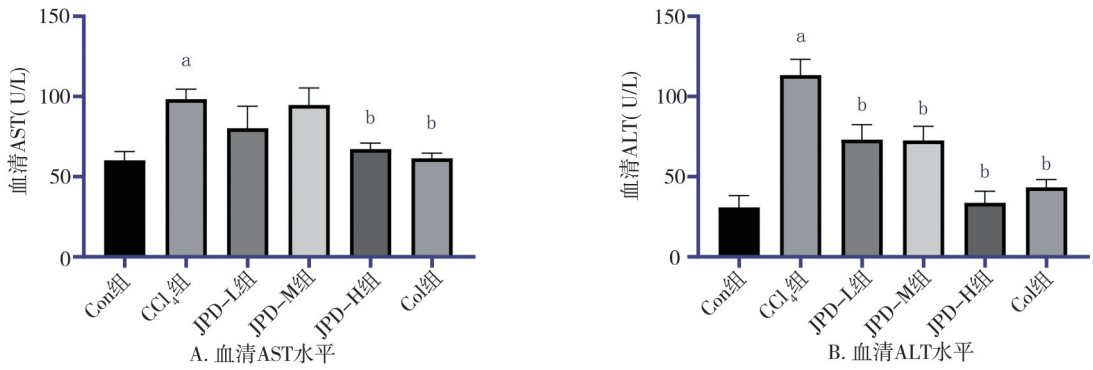
2.2 JPD改善大鼠的肝纤维化水平（HA、LN、ColⅢ、ColⅣ，HE染色）

ColⅢ、ColⅣ、Ln、HA是评估肝纤维化的重要临床指标。该课题组检测了这些蛋白在肝组织中的表达水平。结果显示，与Con组相比，CCl_4组中HA、LN、Col Ⅲ和Col Ⅳ水平明显升高（F=96.560、19.520、21.070、18.200，均P<0.001）；而与CCl_4组相比，Col组和JPD-M组、JPD-H组则明显降低了这些蛋白的表达水平（F=96.560、19.520、21.070、18.200，均P<0.001），见图2A~D。

健康状态下，HE染色肝脏可见结构完整的肝小叶，肝细胞分布均匀，排列整齐。在该研究中，HE染色镜下可见CCl_4组大鼠的肝小叶结构明显不完整。肝细胞排列杂乱无序，同时伴随着大量炎性细胞浸润和胶原纤维增生，甚至形成了假小叶。相比之下，Col组和JPD各剂量组大鼠的肝小叶结构较模型组更为整齐，炎性细胞浸润和纤维化程度明显改善，见图2E。

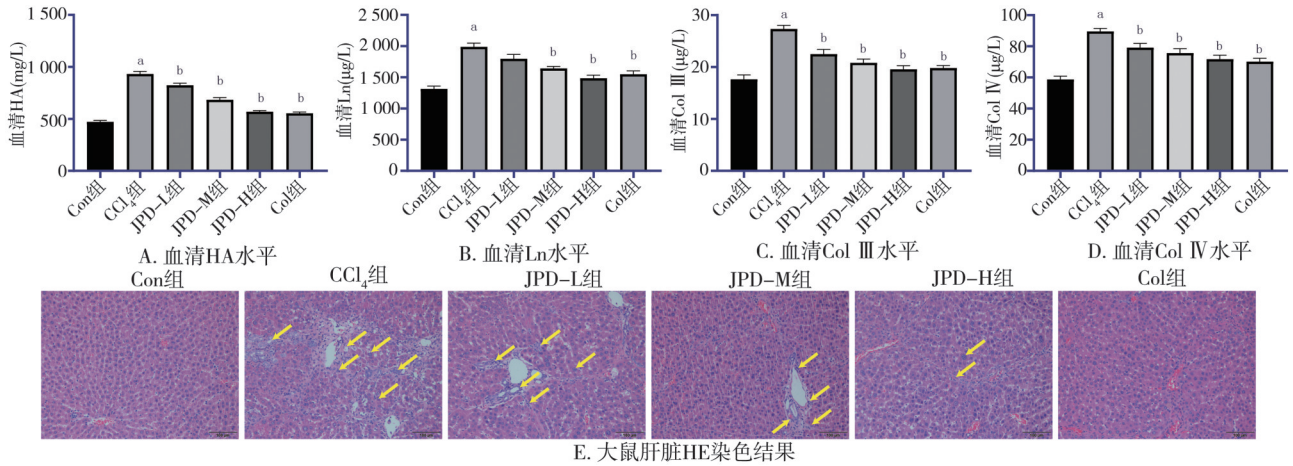
2.3 JPD明显改善肝组织病理损伤程度和胶原沉积

Masson染色结果显示Con组大鼠镜下可见肝小叶结构



注：a，与Con组比较，P<0.05；b，与CCl_4组相比较，P<0.05

图1 健脾柔肝汤对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠ALT、AST的影响（n=6）



注：a，与Con组比较，P<0.05；b，与CCl_4组相比较，P<0.05；黄色箭头，炎性细胞浸润和胶原纤维增生

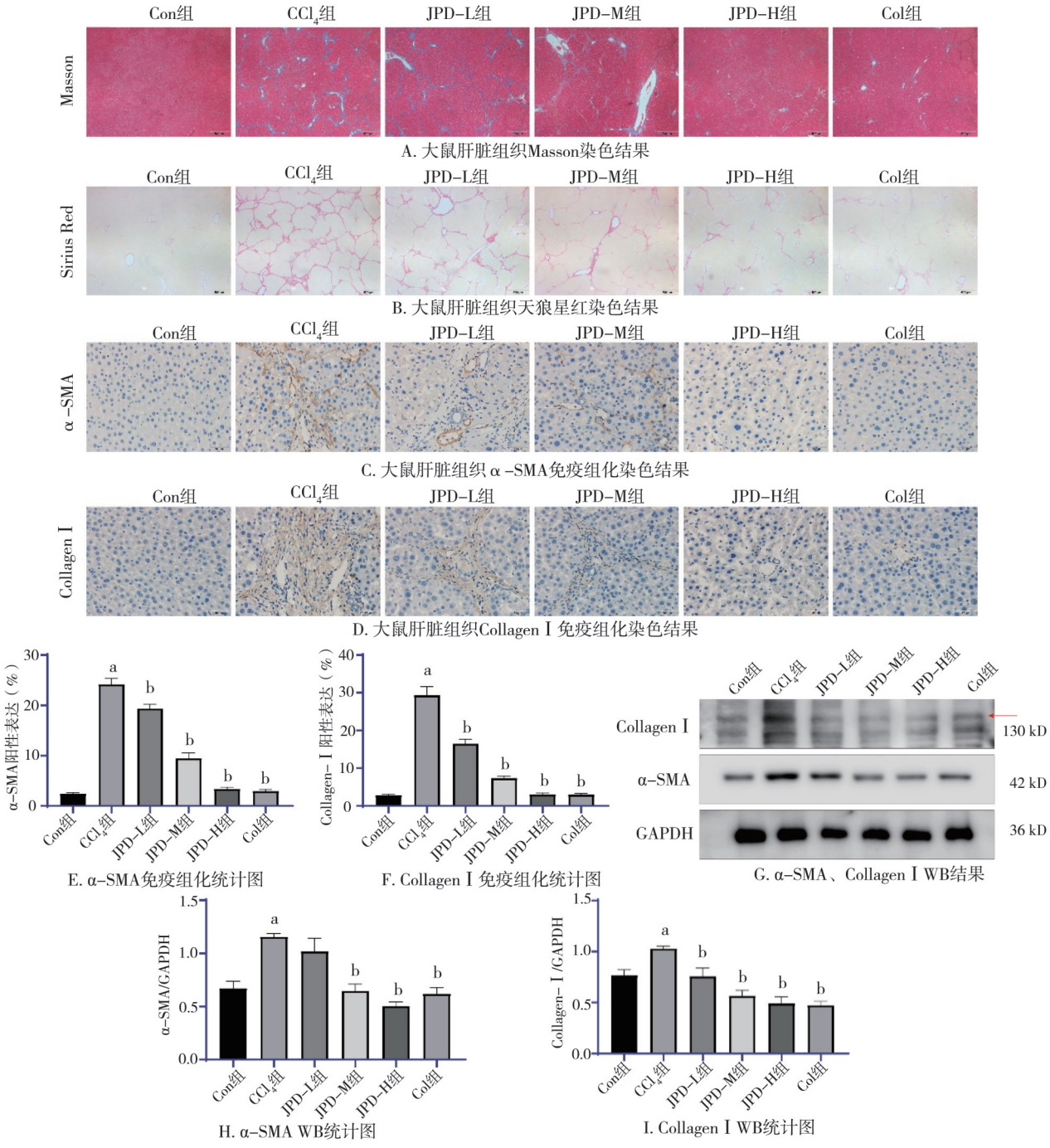
图2 健脾柔肝汤对CCl_4诱导的肝纤维化大鼠肝纤维化4项及HE病理染色的改变（n=6，HE：40×50 μm）

完整，肝细胞排列整齐，无蓝色胶原纤维沉积。而在CCl_4组大鼠中，肝小叶结构紊乱，可见明显假小叶形成以及大量蓝色胶原纤维沉积，表明CCl_4组大鼠肝脏发生严重纤维化。相比之下，Col组和JPD各剂量组大鼠的蓝色胶原纤维明显减少，纤维化在中央静脉周围和汇管区略有残留，但整体上有不同程度的改善，见图3A。天狼星红染色的结果同样表明，CCl_4组大鼠的门静脉和肝小叶周围的橙红色胶原纤维沉积明显增加，而Col组和JPD各剂量组中这些区域的胶原纤维积聚明显减少，见图3B。

WB结果显示，与Con组相比，CCl_4组中α-SMA和Collagen Ⅰ蛋白表达明显升高（F=13.320、14.320，均P<0.05）；而与CCl_4组相比，Col组和JPD-M、JPD-H组则明显降低了这2种蛋白的表达（F=13.320、14.320，均P<0.01），见图3G~I。免疫组化分析结果与WB结果相符，见图3C~F。综上所述，本研究结果提示，JPD能有效减轻肝纤维化大鼠的肝损伤程度，降低胶原沉积。

2.4　JPD改善氧化应激水平和Fe^{2+}水平

与Con组相比，CCl_4组的MDA水平明显增加（F=20.790，P<0.001），同时GSH和SOD的水平则明显降低（F=17.110、12.740，均P<0.001）；经JPD各剂量组处理后，MDA



注：a，与Con组比较，P<0.05；b，与CCl_4组相比较，P<0.05

图3　健脾柔肝汤改善肝纤维化大鼠肝组织病理损伤程度和胶原沉积（Masson、天狼星红和免疫组化染色，n=6，40×50 μm；WB，n=3）

水平在JPD-M、JPD-H组明显降低（F=20.790，均P<0.01），GSH和SOD水平在JPD-H组明显回升（F=17.110、12.740，均P<0.01）。此外，该课题组进一步测定了游离Fe^{2+}水平，结果显示，与Con组对比，CCl_4组Fe^{2+}水平明显增加（F=18.740，P<0.001），而与CCl_4组相比JPD各剂量组处理后Fe^{2+}水平明显下降，以JPD-M、JPD-H组较为明显（F=18.740，P<0.001）。上述结果表明，JPD可能通过调节氧化应激和Fe^{2+}水平，减轻肝纤维化大鼠的肝损伤，见图4A~D。

2.5 JPD抑制肝纤维化大鼠的铁死亡水平

WB结果显示，与Con组相比，CCl_4组中ACSL4和TFR1蛋白表达明显增加（F=14.440、23.290，均P<0.001），而FTH1和GPX4蛋白表达明显降低（F=7.052、14.210，均P<0.01）。与CCl_4组相比，秋水仙碱以及JPD降低了ACSL4和TFR1蛋白水平，以JPD-H组较为明显（F=14.440、23.290，均P<0.05），同时上调了JPD各剂量组FTH1和GPX4蛋白的表达（F=7.052、14.210，均P<0.05），见图5A。同样，各组免疫组化分析结果与WB结果相符，见图5B。这些结果表明，JPD可能通过降低肝纤维化大鼠的铁死亡水平，延缓肝脏损伤的进展。

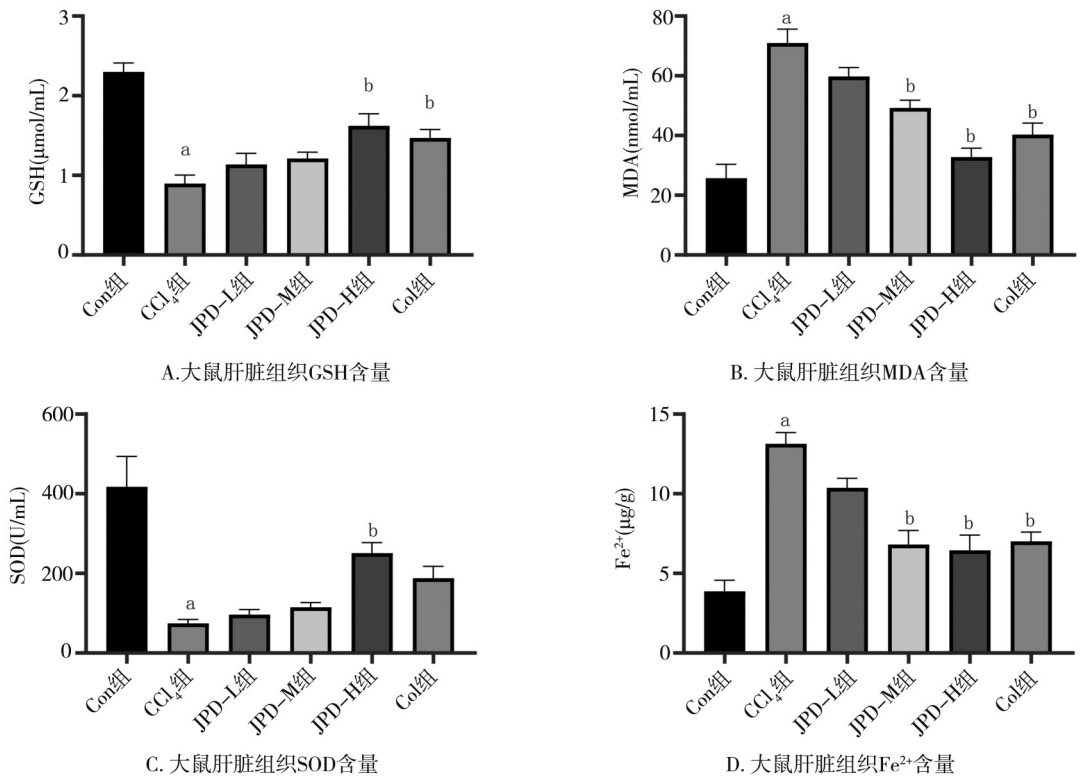
2.6 JPD可能通过激活Nrf2/血红素加氧酶1（heme oxygenase 1，HO-1）信号通路抑制铁死亡从而发挥肝脏保护作用

WB结果显示，与Con组相比，CCl_4组中的Nrf2和HMOX1蛋白表达明显降低（F=37.090、12.030，均P<0.001）；而与CCl_4组相比，Col组和JPD-M、JPD-H组这2种蛋白的表达水平均明显上升（F=37.090、12.030，均P<0.05），见图6A。同时，各组织的免疫组化染色结果也显示了类似的趋势，见图6B。综合上述结果，JPD可能通过激活Nrf2/HO-1信号通路，抑制铁死亡，从而发挥其肝脏保护作用。

3 讨 论

肝纤维化由多种慢性肝损伤因素引发，是持续的肝脏病理损伤与修复过程。病毒感染、长期酗酒、代谢紊乱和自身免疫性疾病等，是其常见病因[18-19]。这一病理过程会导致肝组织结构重塑和功能异常，严重时可进展为肝硬化，甚至肝癌[20]。因此，有效防控和逆转肝纤维化，是全球医学研究的重要课题[21-23]。肝星状细胞（hepatic stellate cells，HSC）富含铁离子，铁死亡通过调控HSC内铁离子含量和脂质过氧化水平，影响肝纤维化进程。靶向干预HSC铁死亡机制，有望为肝纤维化治疗开辟新途径[24-26]。随着中药在慢性肝病治疗中应用日益广泛，其安全性高、适应范围广、获取便捷等优势突出，在慢性疾病治疗中独具特色[27-29]。因此，以中药干预肝脏铁死亡为切入点，或许会成为未来防治肝纤维化的新方向。

该研究通过CCl_4诱导的大鼠肝纤维化模型，证实了健脾柔肝汤可有效缓解肝纤维化。健脾柔肝汤显著降低肝脏胶原纤维沉积等纤维化病理指标，降低血清ALT、AST水平，改善肝功能损伤。HE染色及Masson染色的病理分析进一步印证了健脾柔肝汤对肝组织结构的保护作用。细胞外基质（extracellular

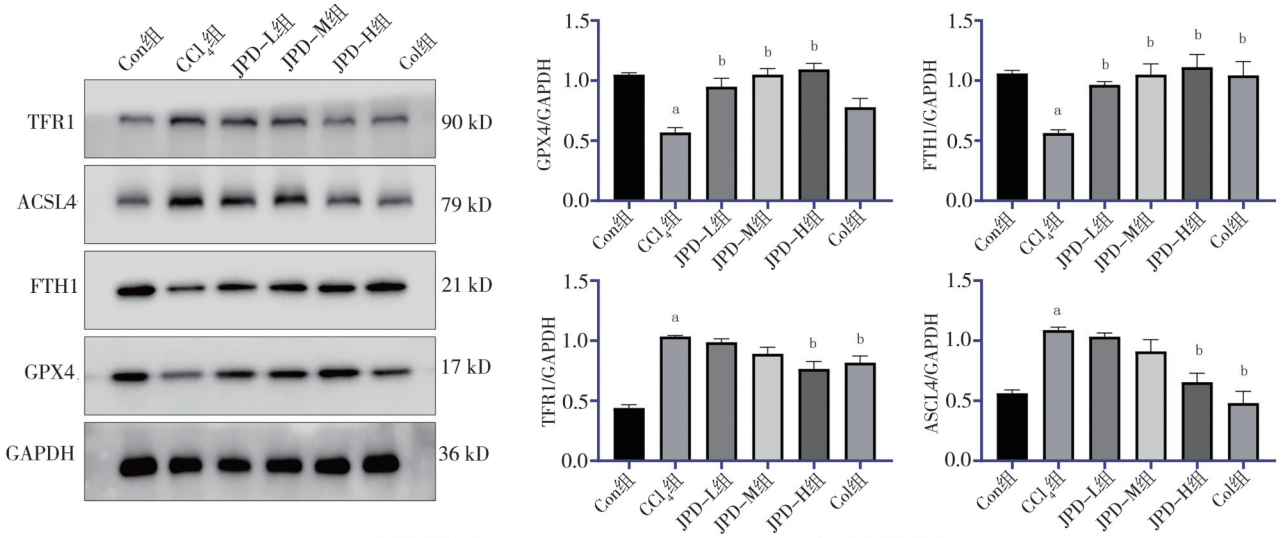


A.大鼠肝脏组织GSH含量　B. 大鼠肝脏组织MDA含量

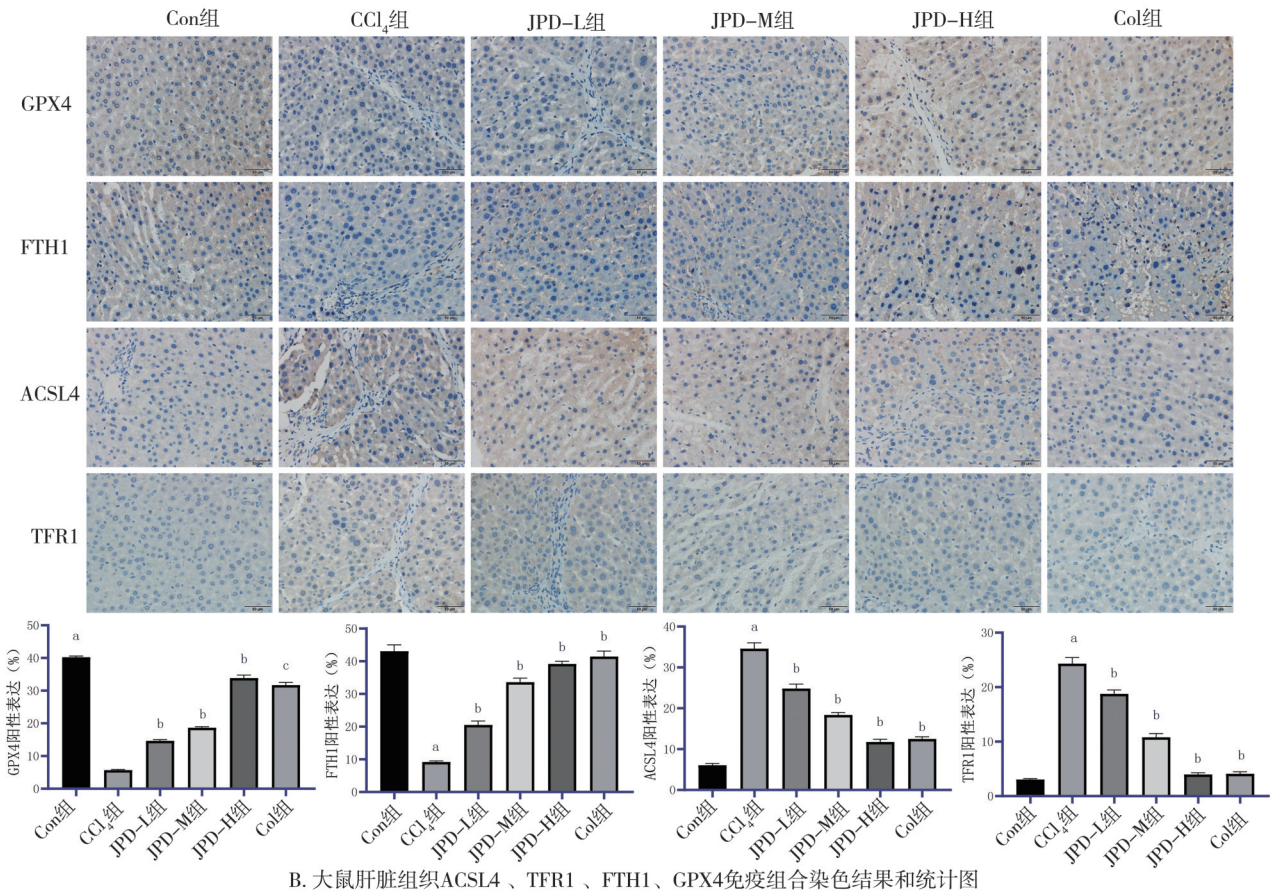
C. 大鼠肝脏组织SOD含量　D. 大鼠肝脏组织Fe^{2+}含量

注：a，与Con组比较，P<0.05；b，与CCl_4组相比较，P<0.05

图4　健脾柔肝汤改善肝纤维化大鼠的氧化应激水平和Fe^{2+}水平（n=6）



A. 大鼠肝脏组织ACSL4 、TFR1 、FTH1、GPX4 WB结果和统计图



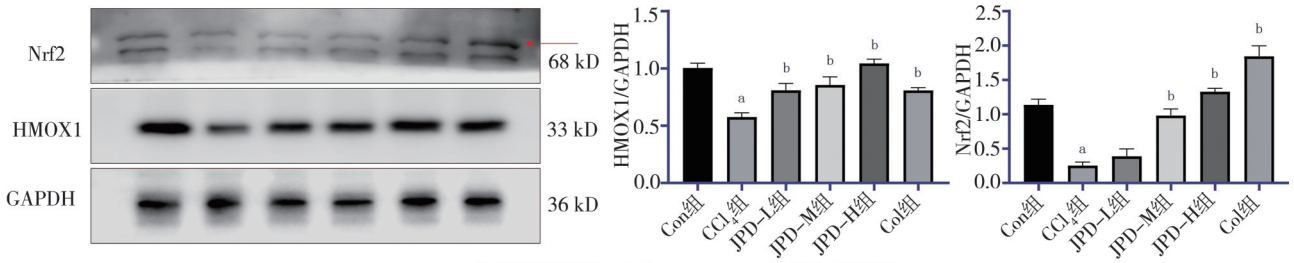
B. 大鼠肝脏组织ACSL4 、TFR1 、FTH1、GPX4免疫组合染色结果和统计图

注：a，与Con组比较，$P<0.05$；b，与CCl_4组相比较，$P<0.05$

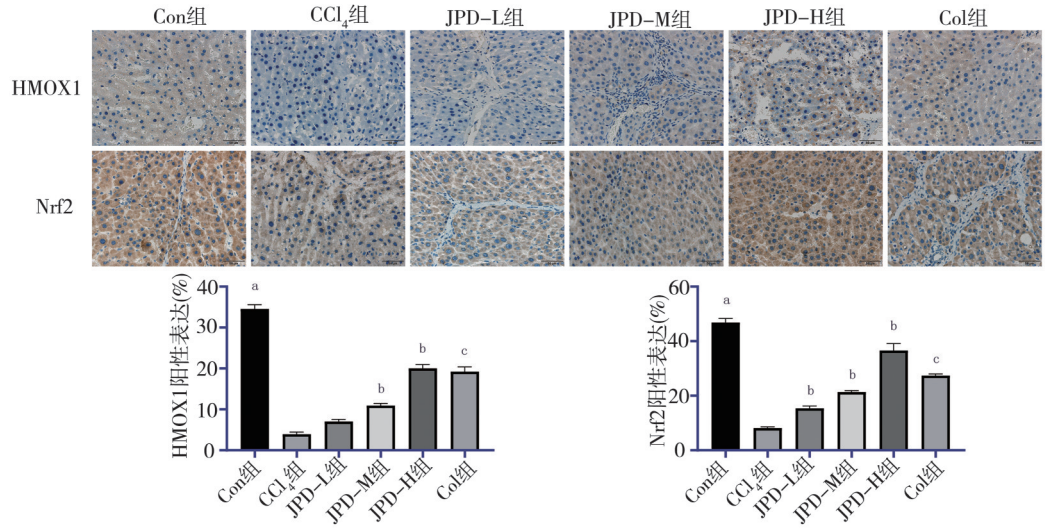
图5　健脾柔肝汤对肝脏中铁死亡关键蛋白ACSL4、TFR1、FTH1、GPX4表达水平的影响（免疫组化染色 $n=6$，40× 50 μm；WB $n=3$）

matrix，ECM）异常积聚，特别是ColⅢ、ColⅣ的过度沉积，是肝纤维化的关键特征。治疗组中，ColⅢ、ColⅣ表达显著下降，表明健脾柔肝汤可抑制纤维化进程。此外，肝纤维化时LN和HA水平明显升高，而健脾柔肝汤干预后，这些标志物水平显著降低，进一步验证了其抗纤维化疗效。上述结果为健脾柔肝汤治疗肝纤维化提供了有力支撑。

众所周知，铁死亡是一种铁依赖性、以脂质过氧化为特征的细胞死亡形式，铁死亡的发生伴随着Fe^{2+}的异常积累和脂质过氧化反应的增强[30]。随着Fe^{2+}的过度积累，细胞内活性氧（reactive oxygen species，ROS）的水平随之升高，进而引发脂质过氧化，这一



A. 大鼠肝脏组织Nrf2和HMOX1 WB结果和统计图



B. 大鼠肝脏组织Nrf2和HMOX1 免疫组化染色结果和统计图

注：a，与Con组比较，$P<0.05$；b，与CCl_4组相比较，$P<0.05$

图6　健脾柔肝汤对各组大鼠Nrf2/HO-1信号通路信号相关蛋白水平表达的影响（免疫组化染色 $n=6$，40×，标尺=50 μm；WB $n=3$）

过程加速了肝硬化的形成，增加了肝细胞癌的发生率[16,31-32]。该研究表明，健脾柔肝汤可降低肝纤维化组织Fe^{2+}水平，抑制铁死亡。改善SOD、MDA等抗氧化应激指标，减轻肝脂质过氧化损伤。通过对TFR1、ACSL4、GPX4、FTH1等铁死亡相关分子的检测发现，健脾柔肝汤可能通过调节铁死亡相关信号通路抑制肝纤维化，进而减轻肝损伤。

Nrf2/HMOX1通路作为调节细胞抗氧化应激和铁死亡的关键信号通路，在肝脏、心脏、肾脏疾病中发挥着重要的调节作用[33-35]。研究表明，Nrf2作为一种转录因子，能促进抗氧化基因如HMOX1的表达，进而减轻氧化应激和抑制细胞死亡[36]。该研究通过WB和免疫组化发现，健脾柔肝汤上调Nrf2和HMOX1表达，激活Nrf2/HMOX1信号通路，调控ACSL4、GPX4、TFR1等蛋白的表达，增强抗氧化能力，减轻CCl_4诱导的肝纤维化。

该研究结果为健脾柔肝汤在肝纤维化治疗中的应用提供了有力的实验依据，为肝纤维化的治疗提供了新的思路和研究方向。然而，由于该研究采用动物模型，其在临床应用中的疗效尚需大样本临床试验进一步验证。此外，健脾柔肝汤在不同类型的肝病中的应用潜力，如酒精性肝病、非酒精性脂肪肝病等，也值得进一步探索。未来的研究可以针对健脾柔肝汤的分子机制进行更深入的探讨，如通过基因编辑技术明确其关键调控分子，并探索其与其他细胞死亡途径（如自噬、凋亡等）的交互作用。

利益冲突　所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明　徐永兴：研究方案设计、实施研究、数据收集、分析数据、论文撰写；刘俊：实施研究、数据收集、分析数据；杨康：数据收集、分析数据；曹文富：实验技术指导、研究方案设计、论文修改

参　考　文　献

[1]　Ginès P, Krag A, Abraldes JG, et al. Liver cirrhosis[J]. Lancet, 2021, 398(10308): 1359-1376.

[2]　程　瑜，余　爽，代震宇，等. VWF:Ag在HBV相关性肝脏疾病中的临床作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2026，51(2)：271-278.
Cheng Y, Yu S, Dai ZY, et al. Clinical role of von Willebrand factor antigen in HBV-related liver diseases[J]. J Chongqing Med Univ, 2026, 51(2): 271-278.

[3]　Pei QY, Yi Q, Tang LL. Liver fibrosis resolution: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(11): 9671.

[4]　杨柳青，范　钦，白雅洁，等. 铁皮石斛多糖通过上皮-间质转化抗肝纤维化[J]. 中山大学学报（医学科学版），2024，45(1)：76-84.
Yang LQ, Fan Q, Bai YJ, et al. Dendrobium officinale polysaccharide alleviates hepatic fibrosis via epithelial-mesenchymal transition[J]. J Sun Yat Sen Univ Med Sci, 2024, 45(1): 76-84.

[5] 刘 定，曹洪欣，潘富珍. 从“五脏相关”理论探讨肝纤维化病机变化特点[J]. 中华中医药杂志，2021，36(8)：4512-4514.
Liu D，Cao HX，Pan FZ. Discussion on characteristics of pathological changes of hepatic fibrosis based on the theory of “correlation between five Zang viscera”[J]. China J Tradit Chin Med Pharm，2021，36(8)：4512-4514.
[6] 韦柳婷，高松林，吴 凡，等. 专利中药复方治疗肝纤维化的用药规律及机制研究[J]. 科学技术与工程，2024，24(8)：3133-3144.
Wei LT，Gao SL，Wu F，et al. Medication regularity and mechanism of patented Chinese herbal compounds in treating hepatic fibrosis[J]. Sci Technol Eng，2024，24(8)：3133-3144.
[7] Sun X，Zheng YQ，Tian YQ，et al. *Astragalus* polysaccharide alleviates alcoholic-induced hepatic fibrosis by inhibiting polymerase I and transcript release factor and the TLR4/JNK/NF-κB/MyD88 pathway[J]. J Ethnopharmacol，2023，314：116662.
[8] Meng XQ，Kuang HX，Wang QH，et al. A polysaccharide from *Codonopsis pilosula* roots attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis *via* modulation of TLR4/NF-κB and TGF-β1/Smad3 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol，2023，119：110180.
[9] 孙 梦，钟 杨，杨涵珺，等. 地黄梓醇抗糖脂代谢紊乱相关疾病及其机制的研究进展[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(7)：849-859.
Sun M，Zhong Y，Yang HJ，et al. Research progress on the mechanisms of action of catalpol from Rehmannia glutinosa against glycolipid metabolic disorders and related diseases[J]. J Chongqing Med Univ，2025，50(7)：849-859.
[10] Zhao QQ，Bai JW，Chen YW，et al. An optimized herbal combination for the treatment of liver fibrosis：Hub genes，bioactive ingredients，and molecular mechanisms[J]. J Ethnopharmacol，2022，297：115567.
[11] Chen JY，Li XP，Ge CD，et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease[J]. Cell Death Differ，2022，29(3)：467-480.
[12] Horn P，Tacke F. Metabolic reprogramming in liver fibrosis[J]. Cell Metab，2024，36(7)：1439-1455.
[13] Shi HL，Duan XH，Dong JC，et al. RNA-seq combined network pharmacology reveals that Fu-Gan-Wan（FGW）inhibits liver fibrosis *via* NF-κB/CCL2/CCR2 and lipid peroxidation *via* Nrf2/HMOX1 signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol，2024，326：117963.
[14] Xue XY，Zhao XT，Wang J，et al. Carthami *Flos* extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis *via* alleviating angiogenesis in mice[J]. Phytomedicine，2023，108：154517.
[15] Fraisse T，Savey L，Hentgen V，et al. Non-amyloid liver involvement in familial Mediterranean fever：a systematic literature review[J]. Liver Int，2020，40(6)：1269-1277.
[16] Bi YG，Liu SL，Qin X，et al. FUNDC1 interacts with GPx4 to govern hepatic ferroptosis and fibrotic injury through a mitophagy-dependent manner[J]. J Adv Res，2024，55：45-60.
[17] Liu MX，Gu YY，Nie WY，et al. Formononetin induces ferroptosis in activated hepatic stellate cells to attenuate liver fibrosis by targeting NADPH oxidase 4[J]. Phytother Res，2024，38(12)：5988-6003.
[18] Parola M，Pinzani M. Liver fibrosis：Pathophysiology，pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med，2019，65：37-55.
[19] 程广文，丁 红，陈 坤，等. 实时双幅联合弹性成像在慢性肝病肝纤维化与炎症分层诊断中的价值[J/OL]. 中华医学超声杂志(电子版)，2023，20(1)：63-69.
Cheng GW，Ding H，Chen K，et al. Value of real-time dual-mode elastography in diagnosis of liver fibrosis and inflammation in patients with chronic liver disease[J/OL]. Chin J Med Ultrasound Electron Ed，2023，20(1)：63-69.
[20] Dhar D，Baglieri J，Kisseleva T，et al. Mechanisms of liver fibrosis and its role in liver cancer[J]. Exp Biol Med（Maywood），2020，245(2)：96-108.
[21] Pan Q，Luo Y，Xia Q，et al. Ferroptosis and liver fibrosis[J]. Int J Med Sci，2021，18(15)：3361-3366.
[22] Li L，Zhu ZJ. Pharmacological modulation of ferroptosis as a therapeutic target for liver fibrosis[J]. Front Pharmacol，2023，13：1071844.
[23] Tang R，Luo J，Zhu XX，et al. Recent progress in the effect of ferroptosis of HSCs on the development of liver fibrosis[J]. Front Mol Biosci，2023，10：1258870.
[24] Shen M，Li YJ，Wang YQ，et al. N^6-methyladenosine modification regulates ferroptosis through autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells[J]. Redox Biol，2021，47：102151.
[25] Zhang ZL，Yao Z，Wang L，et al. Activation of ferritinophagy is required for the RNA-binding protein ELAVL1/HuR to regulate ferroptosis in hepatic stellate cells[J]. Autophagy，2018，14(12)：2083-2103.
[26] Cho SS，Yang JH，Lee JH，et al. Ferroptosis contribute to hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis[J]. Free Radic Biol Med，2022，193(Pt 2)：620-637.
[27] Xu FP，Zhang H，Chen JM，et al. Recent progress on the application of compound formulas of traditional Chinese medicine in clinical trials and basic research *in vivo* for chronic liver disease[J]. J Ethnopharmacol，2024，321：117514.
[28] Zhou HL，Ma C，Wang C，et al. Research progress in use of traditional Chinese medicine monomer for treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Eur J Pharmacol，2021，898：173976.
[29] Yang ZH，Wang JH，Zhao TJ，et al. Mitochondrial structure and function：a new direction for the targeted treatment of chronic liver disease with Chinese herbal medicine[J]. J Ethnopharmacol，2024，334：118461.
[30] Kong ZY，Liu R，Cheng YR. Artesunate alleviates liver fibrosis by regulating ferroptosis signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother，2019，109：2043-2053.
[31] Wu AM，Feng B，Yu J，et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis[J]. Redox Biol，2021，46：102131.
[32] Ajoolabady A，Tang DL，Kroemer G，et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma：mechanisms and targeted therapy[J]. Br J Cancer，2023，128(2)：190-205.
[33] Wu XN，Xue F，Zhang N，et al. Global burden of liver cirrhosis and other chronic liver diseases caused by specific etiologies from 1990 to 2019[J]. BMC Public Health，2024，24(1)：363.
[34] 顾永鹏，刘 洁，朱贞宝，等. 核孔蛋白43在肝细胞癌组织中的表达及其对患者预后和肝癌细胞增殖与迁移的影响[J]. 中华消化外科杂志，2024，23(11)：1437-1444.
Gu YP，Liu J，Zhu ZB，et al. Expression of nucleoporin 43 in hepatocellular carcinoma tissues and its impact on prognosis of patients and proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. Chin J Dig Surg，2024，23(11)：1437-1444.
[35] Ramli FF，Ali A，Ibrahim N'. Molecular-signaling pathways of ginsenosides Rb in myocardial ischemia-reperfusion injury：a mini review[J]. Int J Med Sci，2022，19(1)：65-73.
[36] Parga JA，Rodriguez-Perez AI，Garcia-Garrote M，et al. Angiotensin Ⅱ induces oxidative stress and upregulates neuroprotective signaling from the NRF2 and KLF9 pathway in dopaminergic cells[J]. Free Radic Biol Med，2018，129：394-406.

（**收稿**：2025-01-16；**修回**：2025-04-08；**录用**：2025-05-17）
（责任编辑：曾 玲）
本文引用格式：
徐永兴，刘 俊，杨 康，等. 健脾柔肝汤通过调控Nrf2/HMOX1通路介导的铁死亡缓解CCl_4诱导的大鼠肝纤维化研究[J]. 重庆医科大学学报，2026，51(6)：850-858.