

## 茵栀黄颗粒调控铁死亡缓解胆汁淤积性肝纤维化

蓝剑航<sup>1</sup>, 范桂芳<sup>1</sup>, 韩琦<sup>2\*</sup>, 刘闰平<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 生命科学学院, 北京 100029

**摘要:** **目的** 系统探讨茵栀黄颗粒对胆汁淤积性肝病 (CLD) 中铁死亡的调控效应及其潜在分子机制。**方法** 分别采用胆总管结扎 (BDL) 术与 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠构建 CLD 模型, 将小鼠随机分为对照组、模型组及茵栀黄颗粒低、高剂量 [3.51 (临床等效剂量)、7.02 g·kg<sup>-1</sup>] 组。通过计算肝、脾指数, 结合肝组织苏木素-伊红 (HE) 染色、Masson 染色及普鲁士蓝染色, 检测血清总胆汁酸 (TBA)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平, 系统评估茵栀黄颗粒对 CLD 的改善作用; 采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术检测肝组织中肝纤维化相关基因 (*Fn1*、*Colla1*、*Acta2*、*Krt19*)、炎症因子基因白细胞介素 1 $\beta$  (*Il-1 $\beta$* )、胆汁酸代谢相关基因 [法尼醇 X 受体 (*Nr1h4*)、小异源二聚体伴侣蛋白 (*Nr0b2*)]、胆酸合成关键基因胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 (*Cyp7a1*)、胆汁酸分泌转运蛋白编码基因胆盐输出泵 (*Abcb11*) 及胆汁酸摄取排泄相关基因 [钠-牛磺胆酸协同转运蛋白 (*Slc10a1*)、多药耐药相关蛋白 3 (*Abcc3*)] 的 mRNA 表达水平。通过网络药理学方法, 构建茵栀黄颗粒活性成分-作用靶点与 CLD 及铁死亡共同靶点的相互作用网络, 预测关键调控通路; 借助肝组织转录组学测序分析, 明确铁死亡通路在 CLD 模型中的富集特征; 采用生化试剂盒检测肝组织氧化应激指标 [丙二醛 (MDA)、脂质过氧化物 (LPO)、还原型谷胱甘肽 (GSH)] 及铁沉积水平, 通过 qRT-PCR 验证促铁死亡相关基因 [长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (*Acs14*)、铁蛋白重链 1 (*Fth1*)、铁蛋白受体 1 (*Tfrc*)、细胞色素 b-245  $\beta$  链 (*Cybb*)]、铁死亡保护相关基因 [谷胱甘肽过氧化物酶 4 (*Gpx4*)、半胱氨酸/谷氨酸逆向转运体 (*Slc7a11*)、甘氨酸转运蛋白 1 (*Slc6a9*)、GSH 合成限速酶 (*Gclc*)] 及花生四烯酸代谢通路脂氧合酶基因 [15 脂氧合酶 (*Alox15*)、5 脂氧合酶激活蛋白 (*Alox5ap*)、12 脂氧合酶 (*Alox12*)] 的 mRNA 表达变化。**结果** 茵栀黄颗粒虽未显著逆转模型组小鼠肝、脾指数的升高, 但高剂量组可显著降低血清 TBA、ALT、AST 水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 减轻肝组织铁颗粒沉积 ( $P < 0.01$ ), 同时降低肝组织 MDA、LPO 水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提升 GSH 水平 ( $P < 0.01$ )。qRT-PCR 结果显示, 与模型组相比, 高剂量茵栀黄颗粒干预后, 肝组织中 *Fn1*、*Colla1*、*Acta2*、*Krt19*、*Il-1 $\beta$* 、*Cyp7a1* 的 mRNA 表达显著下调 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 而 *Nr1h4*、*Nr0b2*、*Abcb11*、*Abcc3* 的 mRNA 表达显著上调 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 网络药理学分析筛选获得 55 个茵栀黄颗粒-CLD-铁死亡共有靶点, 提示其 20 种入血活性成分可能通过多成分协同作用靶向铁死亡相关通路; 基因集富集分析 (GSEA) 结果表明, 2 种胆汁淤积模型组的铁死亡相关基因集均较对照组显著富集; qRT-PCR 验证显示, 高剂量茵栀黄颗粒可显著下调促铁死亡基因 *Acs14*、*Tfrc* 的 mRNA 表达 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 上调铁死亡保护基因 *Gpx4*、*Slc7a11*、*Slc6a9*、*Gclc* 的 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。**结论** 茵栀黄颗粒可有效缓解 BDL 及 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠模型的肝脏纤维化、胆汁淤积及铁死亡病理进程, 其作用机制可能与调控铁死亡相关基因表达及改善氧化应激水平密切相关。

**关键词:** 茵栀黄颗粒; 胆汁淤积性肝病; 肝纤维化; 铁死亡; 氧化应激; 胆汁酸代谢

中图分类号: R285.5; R575.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2026)01-0119-13

DOI:10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.011

## Yinzhihuang Granule alleviate cholestatic liver fibrosis by regulating ferroptosis

LAN Jianhang<sup>1</sup>, FAN Guifang<sup>1</sup>, HAN Qi<sup>2</sup>, LIU Runping<sup>1</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

收稿日期: 2025-07-17

基金项目: 国家自然科学基金优秀青年科学基金资助项目 (82322075)

作者简介: 蓝剑航 (1998—), 硕士研究生, 研究方向为天然产物防治肝胆疾病。E-mail: lanjianhang2023@163.com

\*通信作者: 刘闰平, 博士, 教授, 研究方向为中医药防治消化系统疾病。E-mail: liurunping@bucm.edu.cn

韩琦, 博士, 副教授, 研究方向为中医药与肠道微生物。E-mail: hanqi@bucm.edu.cn

**Abstract: Objective** To systematically investigate the regulatory effect of Yinzhihuang Granule on ferroptosis in cholestatic liver disease (CLD) and its potential molecular mechanism. **Methods** CLD models were established by bile duct ligation (BDL) and *Mdr2*<sup>-/-</sup> gene-deficient mice. Mice were randomly divided into the control group, model group, and low- high-dose (3.51, 7.02 g·kg<sup>-1</sup>) Yinzhihuang Granule intervention groups. The improvement effect of Yinzhihuang Granule on CLD was evaluated by calculating the liver and spleen coefficients, combined with hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining, and Prussian blue staining of liver tissue, and by detecting the levels of serum total bile acid (TBA), alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST). The mRNA expression levels of liver fibrosis-related genes (*Fnl*, *Colla1*, *Acta2*, *Krt19*), inflammatory factor gene interleukin-1 $\beta$  (*Il-1 $\beta$* ), bile acid metabolism-related genes [farnesoid X receptor (*Nr1h4*), small heterodimer partner protein (*Nr0b2*)], key genes in bile acid synthesis [cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*Cyp7a1*)], bile acid secretion transporter-encoding gene bile salt export pump (*Abcb11*), and bile acid uptake and excretion-related genes [sodium-taurine bile acid cotransporter (*Slc10a1*), multidrug resistance-associated protein 3 (*Abcc3*)] in liver tissue were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) technology. The interaction network of active components of Yinzhihuang Granule-action targets and common targets of CLD and ferroptosis was constructed by network pharmacology methods to predict key regulatory pathways. The enrichment characteristics of the ferroptosis pathway in the CLD model were clarified by liver tissue transcriptome sequencing analysis. The levels of oxidative stress indicators [malondialdehyde (MDA), lipid peroxides (LPO), reduced glutathione (GSH)] and iron deposition in liver tissue were detected by biochemical kits, and the mRNA expression changes of ferroptosis-promoting genes [long-chain acyl-CoA synthetase 4 (*Acs14*), ferritin heavy chain 1 (*Fth1*), transferrin receptor 1 (*Tfrc*), cytochrome b-245  $\beta$  chain (*Cybb*)], ferroptosis-protective genes [glutathione peroxidase 4 (*Gpx4*), cystine/glutamate antiporter (*Slc7a11*), glycine transporter 1 (*Slc6a9*), glutamate-cysteine ligase (*Gclc*)], and arachidonic acid metabolism pathway lipoxygenase genes [15-lipoxygenase (*Alox15*), 5-lipoxygenase-activating protein (*Alox5ap*), 12-lipoxygenase (*Alox12*)] were verified by qRT-PCR. **Results** Although Yinzhihuang Granule did not significantly reverse the increase in liver and spleen coefficients in the model group, the high-dose group significantly reduced the levels of serum TBA, ALT, and AST ( $P < 0.01$ , 0.001), reduced iron particle deposition in liver tissue ( $P < 0.01$ , 0.001), and simultaneously decreased the levels of MDA and LPO in liver tissue ( $P < 0.05$ , 0.01), and increased the level of GSH ( $P < 0.01$ ). qRT-PCR results showed that compared with the model group, after high-dose Yinzhihuang Granule intervention, the mRNA expression of *Fnl*, *Colla1*, *Acta2*, *Krt19*, *Il-1 $\beta$* , and *Cyp7a1* in liver tissue was significantly downregulated ( $P < 0.01$ , 0.001), while the mRNA expression of *Nr1h4*, *Nr0b2*, *Abcb11*, and *Abcc3* was significantly upregulated ( $P < 0.01$ , 0.001). Network pharmacology analysis screened out 55 common targets of Yinzhihuang Granule-CLD-ferroptosis, suggesting that its 20 blood-active components may target ferroptosis-related pathways through multi-component synergy. The results of gene set enrichment analysis (GSEA) indicated that the ferroptosis-related gene sets in the two cholestasis model groups were significantly enriched compared with the control group. qRT-PCR verification showed that high-dose Yinzhihuang Granule could significantly down-regulate the mRNA expression of ferroptosis-promoting genes *Acs14*, *Tfrc*, ( $P < 0.01$ , 0.001), and up-regulate the mRNA expression of ferroptosis-protective genes *Gpx4*, *Slc7a11*, *Slc6a9*, and *Gclc* ( $P < 0.05$ , 0.01, 0.001). **Conclusion** Yinzhihuang Granule can effectively alleviate liver fibrosis, cholestasis and ferroptosis in BDL and *Mdr2*<sup>-/-</sup> mouse models, and its mechanism of action may be closely related to the regulation of ferroptosis-related gene expression and the improvement of oxidative stress levels.

**Key words:** Yinzhihuang Granule; cholestatic liver disease; liver fibrosis; ferroptosis; oxidative stress; bile acid metabolism

胆汁淤积性肝病 (CLD) 是以胆汁流动受阻为核心特征的肝脏疾病, 其发病机制复杂且尚未完全阐明, 涉及胆汁酸代谢紊乱、炎症反应失控、氧化应激过度及细胞死亡异常等多重病理生理过程<sup>[1]</sup>。尽管当前对 CLD 的研究已取得阶段性进展, 但诸多关键科学问题与临床瓶颈仍亟待突破。在治疗层面, 临床常用的熊去氧胆酸、奥贝胆酸等药物, 其临床有效率始终未能突破 60%, 难以满足治疗应答不佳患者的需求<sup>[2]</sup>。具体而言, 部分原发性胆汁性胆管炎患者对该类药物缺乏显著疗效, 而原发性硬

化性胆管炎患者的病死率及肝移植需求, 也未能通过现有治疗方案得到有效改善<sup>[3-4]</sup>。

铁死亡是近年来明确的一种铁依赖性脂质过氧化驱动的程序性细胞死亡方式, 已被证实与多种肝脏疾病的发生发展密切相关, 其核心特征包括铁代谢稳态失衡、脂质过氧化产物大量蓄积及抗氧化防御系统功能紊乱<sup>[5-6]</sup>。在 CLD 病理进程中, 铁死亡可能通过加剧氧化应激损伤与炎症反应放大效应, 进一步加重肝细胞损伤, 成为疾病进展的重要推动因素<sup>[7]</sup>。

茵栀黄颗粒是源自《伤寒论》的经典清热利湿

方剂,由茵陈、栀子、黄芩等药材配伍而成,具有清热解毒、利湿退黄的功效,在肝胆疾病临床治疗中应用广泛<sup>[8]</sup>。现代药理学研究证实,茵栀黄颗粒可通过调节胆汁酸代谢通路、抑制氧化应激损伤、减轻炎症反应等多靶点机制发挥保肝作用<sup>[9-11]</sup>。

在 CLD 动物模型研究中,*Mdr2* 基因敲除小鼠与胆总管结扎 (BDL) 小鼠是 2 种常用模型。其中,小鼠 *Mdr2* 基因与人 *Mdr3* 基因同源,其编码的负责脂质转运的多药耐药蛋白 3 (MDR3) 负责将胆管膜内侧的磷脂酰胆碱 (PC) 转运至外侧。*Mdr2* 基因敲除后,PC 无法正常分泌至胆汁中,导致胆汁中 PC 含量显著降低;而 PC 作为胆汁中胆固醇与胆盐的稳定因子,其缺乏会导致二者无法形成稳定混合胶束,进而引发胆盐游离化并造成胆管细胞损伤,最终诱导胆汁淤积发生<sup>[12]</sup>。

BDL 小鼠模型则通过手术结扎胆总管,可快速诱导胆汁淤积、胆管炎症及肝纤维化,其病理特征与人类急性 CLD 高度相似,因此被广泛用于 CLD 短期病理机制研究及药物对肝损伤、肝纤维化的干预效果评估<sup>[13]</sup>。本研究以 *Mdr2* 基因敲除小鼠和 BDL 小鼠为研究对象,结合肝组织学检测 [苏木素-伊红 (HE) 染色、Masson 染色]、血清生化指标检测、氧化应激指标测定及转录组学分析、网络药理学等多维度技术手段,系统评估茵栀黄颗粒对 CLD 的改善效应,并深入探讨其在 CLD 病理背景下对铁死亡的调控机制。

## 1 材料

### 1.1 主要试剂

茵栀黄颗粒 (3 g×10 袋,批号 09230281),鲁南制药集团;丙氨酸氨基转移酶 (ALT,货号 C009-2-1)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST, C010-2-1)、还原型谷胱甘肽 (GSH, 货号 A006-2-1)、丙二醛 (MDA, 货号 A003-1-2) 检测试剂盒、总胆汁酸 (TBA) 检测试剂盒 (货号 E003-2-1),南京建成生物工程研究所有限公司;铁离子 ( $\text{Fe}^{3+}$ ) 检测试剂盒 (货号 E-BC-K772-M) 与亚铁离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 检测试剂盒 (货号 E-BC-K773-M),武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;脂质过氧化物 (LPO) 含量检测试剂盒 (货号 BC5240)、普鲁士蓝染色试剂盒 (核固红法, 货号 G1422),北京索莱宝科技有限公司。

### 1.2 主要仪器

Spectramax i3x 型酶标仪,美国 Molecular Devices 公司;Real-Time PCR System, Quant Studio

TM 6 Flex; Apero VERSA 型超分辨显微组织成像仪,德国 Leica 公司。

## 1.3 实验动物

7 周龄雄性 C57BL/6J 野生型小鼠购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司 [生产许可证号 SCXK (京) 2019-0010]; C57BL/6J 背景的 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司提供 [生产许可证号 SCXK (沪) 2019-0002], *Mdr2*<sup>-/-</sup> 的 C57BL/6J 小鼠由 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 杂合子小鼠配对繁育获得,并进行基因型的检查鉴定。饲养期间,小鼠均给予标准饮食,全天自由饮用经湿热灭菌的超纯水。饲养环境严格维持恒温恒湿,温度精准控制在 24.6 °C,湿度调控为 55.5%,同时通过人工光照系统保障 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律。本研究所有动物实验方案均经北京中医药大学机构动物保护和使用委员会批准 (动物伦理号 BUCM-4-2022012001-1096),且严格遵循相关伦理规范及法规要求。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模、给药及取材

**2.1.1 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠 CLD 模型处理** 以 C57BL/6J 小鼠为对照组、*Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠为模型组,设茵栀黄颗粒低、高剂量组 [3.51 (临床等效剂量)、7.02 g·kg<sup>-1</sup>] 组,每组 6 只,茵栀黄颗粒组每日 ig 给予茵栀黄颗粒水溶液 1 次,连续 3 周,对照组与模型组同期给予等体积纯水,末次给药后次日取肝脏、血、胆汁,取材前小鼠禁食 6 h。

**2.1.2 BDL 小鼠 CLD 模型处理** 24 只 SPF 级别雄性 C57BL/6J 小鼠,适应性喂养 7 d 后随机分为对照组、模型组、茵栀黄颗粒低、高剂量 (3.51、7.02 g·kg<sup>-1</sup>) 组,每组 6 只。茵栀黄颗粒组预先给予茵栀黄颗粒水溶液预处理 3 d,对照组与模型组同期给予等体积纯水,第 4 天对模型组和茵栀黄颗粒组小鼠行 BDL 手术,术后观察 3 d,术后第 4 天茵栀黄颗粒组再次给予茵栀黄颗粒水溶液 3 d,对照组与模型组仍给予等体积纯水。BDL 模型采用腹部小切口暴露胆总管后行单结扎法建立。麻醉后对上腹部常规消毒,在肝门部轻柔分离组织,暴露胆总管,并以 5-0 缝线在靠近肝门侧做单一结扎,结扎力度以“部分阻断胆汁流动”但不完全闭塞为原则,以诱导中等程度胆汁淤积。随后复位肝门结构,分层缝合腹膜与皮肤。假手术组仅暴露胆管不结扎,所有鼠术后均给予保温及镇痛处理。术后第 7 天处死小鼠并采集血清与肝组织、胆汁用于后续检测。



## 2.2 肝组织 HE 染色

取小鼠肝组织肝大叶边长为 1 mm 的正方体组织块采用 4%多聚甲醛进行固定 24 h。随后依次经过梯度乙醇脱水、二甲苯透明化、石蜡包埋等步骤得到石蜡组织块。将石蜡组织块切成 4.5  $\mu\text{m}$  的切片贴于防脱载玻片上。切片经二甲苯脱蜡至水,依次用苏木素染液染细胞核(10 min)并水洗;用 1%盐酸酒精分化并水洗;用伊红染液染细胞质(1 min)并水洗。最后用梯度乙醇脱水、二甲苯透明化并使用中性树脂封片。所得肝脏组织病理切片采用 Aperio Versa 超分辨成像仪进行图像获取。

## 2.3 肝组织 Masson 染色

BDL 小鼠处死后取肝组织,4%多聚甲醛固定,常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明后石蜡包埋,切 3~5  $\mu\text{m}$  切片并烤片。切片经二甲苯脱蜡至水后,置于 Bouin 液中预处理以增强胶原显色,流水冲洗后用 Weigert 铁苏木精染核。再用 Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin 染细胞质和肌纤维,经磷钼酸/磷钨酸分化后,转入苯胺蓝染胶原纤维,随后经 1%醋酸处理、乙醇脱水、二甲苯透明,中性树脂封片。结果细胞核呈蓝紫色,细胞质及肌纤维为红色,胶原纤维为蓝色。所得肝脏组织病理切片采用 Aperio Versa 超分辨成像仪进行图像获取。

## 2.4 肝组织普鲁士蓝染色

按“2.2”项下方法制备 4.5  $\mu\text{m}$  肝组织石蜡切片,经二甲苯脱蜡至水化后,置于普鲁士蓝染色工作液中染色 1 h,染色结束后,蒸馏水冲洗切片以去除未结合的染料,再用核固红染液复染细胞核 10 min。最后经蒸馏水再次冲洗后,中性树脂封片。

## 2.5 肝脏、脾脏指数、TBA 及血清生化指标检测

末次给药次日取材时,对各组小鼠行异氟烷麻醉后颈椎脱臼处死,迅速打开腹腔,经腹主动脉采集全血,室温静置 30 min 后以 3000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离血清,根据试剂盒说明书测定 TBA 水平。处死后立即剥离肝脏及脾脏,滤纸轻拭表面血液,准确称量湿质量,计算肝脏指数和脾脏指数。按组织质量-0.9%氯化钠溶液体积=1:9 制备 10%肝组织匀浆,冰浴匀浆后 2 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清,按试剂盒说明检测 ALT、AST 含量。

肝脏(或脾脏)指数=肝脏(或脾脏)质量/体质量

## 2.6 肝组织总 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 含量测定

按 100 mg 肝组织加入 1 mL 总  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  试剂盒中的组织裂解/铁提取液配制 10%匀浆,冰浴裂

解 10 min, 15 000 $\times g$  离心 10 min, 取上清, 按试剂盒说明书检测肝组织总  $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  含量。

## 2.7 肝组织 MDA、GSH、LPO 水平检测

取肝组织剪碎后按组织质量-0.9%氯化钠溶液体积=1:9 配制 10%肝组织匀浆,冰浴匀浆后 3 500~4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 取上清, 按试剂盒说明书检测 MDA、GSH、LPO 水平。

## 2.8 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测检测肝组织中相关基因的 mRNA 表达水平

取各组小鼠肝大叶组织样本,每份投入 700  $\mu\text{L}$  Trizol 试剂进行匀浆处理。按照既定步骤依次添加氯仿、异丙醇、75%乙醇,以完成肝脏组织 RNA 的提取流程。严格遵循 Vazyme 逆转录及扩增试剂盒的指南将提取的 RNA 逆转录为 cDNA。在 qPCR 检测环节选用次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 1 (*Hprt1*) 作为内参基因,相关引物序列详见表 1。

## 2.9 转录组测序分析

提取各组小鼠肝组织的总 RNA 并利用 Agilent 2100 Bioanalyzer 精确检测 RNA 的完整性和总量以确保 RNA 质量符合后续实验要求。接着通过 Oligo (dT) 磁珠富集含有 polyA 尾的 mRNA,并在二价阳离子作用下将其破碎。随后依次合成第一链和第二链 cDNA 并使用 AMPure XP 系统对 cDNA 进行筛选,经过 PCR 扩增和纯化后构建出用于测序的文库。在 Illumina Novaseq 平台上对文库片段进行测序并生成 150 bp 的配对末端读数。随后对测序数据进行了生物信息学分析,包括数据质控、序列比对、新转录本预测、基因表达水平定量、差异基因分析、聚类-热图分析(使用 R studio 4.3.1)、基因本体(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析以及基因集富集分析(GSEA 4.3.2)。

## 2.10 网络药理学

首先通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://www.tcmsp-e.com/>),以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 且类药性(DL) $\geq 0.18$ 为筛选标准筛选茵栀黄颗粒的有效活性成分,再结合高通量实验与参考指导的中药数据库 HERB 2.0 (<http://47.92.70.12/>)补充 TCMSP 未收录的重要活性成分及其潜在靶点,对所得结果汇总并去除重复以获取茵栀黄颗粒活性成分对应的靶点。随后在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)与 GeneCard 数据库(<https://www.genecards.org/>)中,分别以“cholestatic liver disease”“cholestatic hepatitis”

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

引物	序列 (5'→3')	
纤维连接蛋白 1 ( <i>Fnl1</i> )	F: AGGCACAAGGTCCGAGAAGAG	R: TGAGTCATCCGTAGGCTGGTTC
I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链 ( <i>Colla1</i> )	F: TGAACGTGGTGTACAAGGTC	R: CCATCTTTACCAGGAGAACCAT
细胞角蛋白 19 ( <i>Krt19</i> )	F: GAGCAGATCCAGATAAGCAAGA	R: GTGACAGCTGGACTCCATAAC
转化生长因子 (TGF) $-\beta$	F: GACCTCAAGAGCTCTAACATCC	R: GTCATCCACAGACAGAGTAGG
白细胞介素 1 $\beta$ ( <i>Il-1<math>\beta</math></i> )	F: AATCTCACAGCAGCACATC	R: AGGAGCACTTCATCTGTTTAGG
胆固醇 7 $\alpha$ -羟化酶 ( <i>Cyp7a1</i> )	F: CAGAAGCATAGACCCAAGTG	R: GTAGCAGAAGGCATACATCC
$\alpha$ 平滑肌肌动蛋白 ( <i>Acta2</i> )	F: AGGGAGTGATGGTTGGAATGGG	R: GGTGATGATGCCGTGTTCTATCG
胆盐输出泵 ( <i>Acb11</i> )	F: TGACTACGACGTTGAGTTACAA	R: CTGGCAAATTTGATCATTTCCG
钠-牛磺胆酸协同转运蛋白 ( <i>Slc10a1</i> )	F: GCAAGATCAAGGCTCAGTTATG	R: CATCACAATGCTGAGGTTTCATG
长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 ( <i>Acs14</i> )	F: CAATAGAGCAGAGTACCCTGAG	R: TAGAACCAGTGGTGACATGAC
半胱氨酸/谷氨酸逆向转运体 ( <i>Slc7a11</i> )	F: CTATTTTACCACCATCAGTGCG	R: ATCGGGACTGCTAATGAGAATT
甘氨酸转运蛋白 1 ( <i>Slc6a9</i> )	F: GAGTCAAGTCTTCAGGGAAAGT	R: GTCAGGTAGTACATGATACCCG
谷胱甘肽过氧化物酶 4 ( <i>Gpx4</i> )	F: CCCGATATGCTGAGTGTGGTTTAC	R: TTTCTTGATTACTTCCTGGCTCCTG
铁蛋白重链 1 ( <i>Fth1</i> )	F: TAAAGAAACCAGACCGTGATGA	R: ATTCACACTCTTTTCCAAGTGC
铁蛋白受体 1 ( <i>Tfrc</i> )	F: TCACACTCTCTCAGCTTTAGTG	R: TGGTTTCTGAAGAGGGTTTCAT
GSH 合成限速酶 ( <i>Gclc</i> )	F: CTATCTGCCCAATTGTTATGGC	R: CCTCCCGTGTCTATCATCTAC
15-脂氧合酶 ( <i>Alox15</i> )	F: GAGCCTTCCTGACCTACAGC	R: ATTCCCACCACGTACCGATT
5-脂氧合酶激活蛋白 ( <i>Alox5ap</i> )	F: GGTCTACACTGCCAACCAGAA	R: TGGCTGCAAAGTAGTCCTGC
12-脂氧合酶 ( <i>Alox12</i> )	F: TGGCTAAGATCTGGGTCCGA	R: AGTCTGGGAGGCATCTCAT
细胞色素 b-245 $\beta$ 链 ( <i>Cybb</i> )	F: GAGGTTGGTTCGGTTTTGGC	R: ACCTTGGGGCACTTGACAAA
法尼醇 X 受体 ( <i>Nr1h4</i> )	F: GAGGTTGGTTCGGTTTTGGC	R: TTATTGAAAATCTCCGCCGAAC
小异源二聚体伴侣蛋白 ( <i>Nr0b2</i> )	F: CTCTCTTCCTGCTTGGGTTG	R: CAGCCAGTGAGGGTTGTG
多药耐药相关蛋白 3 ( <i>Abcc3</i> )	F: CCCTGCGTATGAACTTAGATC	R: CTGCCTCTGGCCAACACTG
<i>Hprt1</i>	F: CCGAGGATTTGGAAAAAGTGTT	R: CATCTCCTTCATGACATCTCGA

“ferroptosis”为检索词,检索 CLD 相关靶点与铁死亡相关靶点,通过 Bioinformatics 网站对上述 3 类靶点进行交集分析,筛选共有靶点并绘制 Venn 图。之后将筛选得到的共有靶点导入 Metascape 平台 (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>),设置富集条件  $P < 0.01$  进行通路分析以获取通路富集网络图,最后将该网络图及药物靶点信息导入 Cytoscape 3.7.1 软件,围绕铁死亡构建“通路-药物靶点-药物成分”网络及可视化。

## 2.11 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8.3.2 软件进行分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用 one-way-ANOVA 分析,  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 茵栀黄颗粒减轻 BDL 模型小鼠的肝纤维化和胆汁淤积

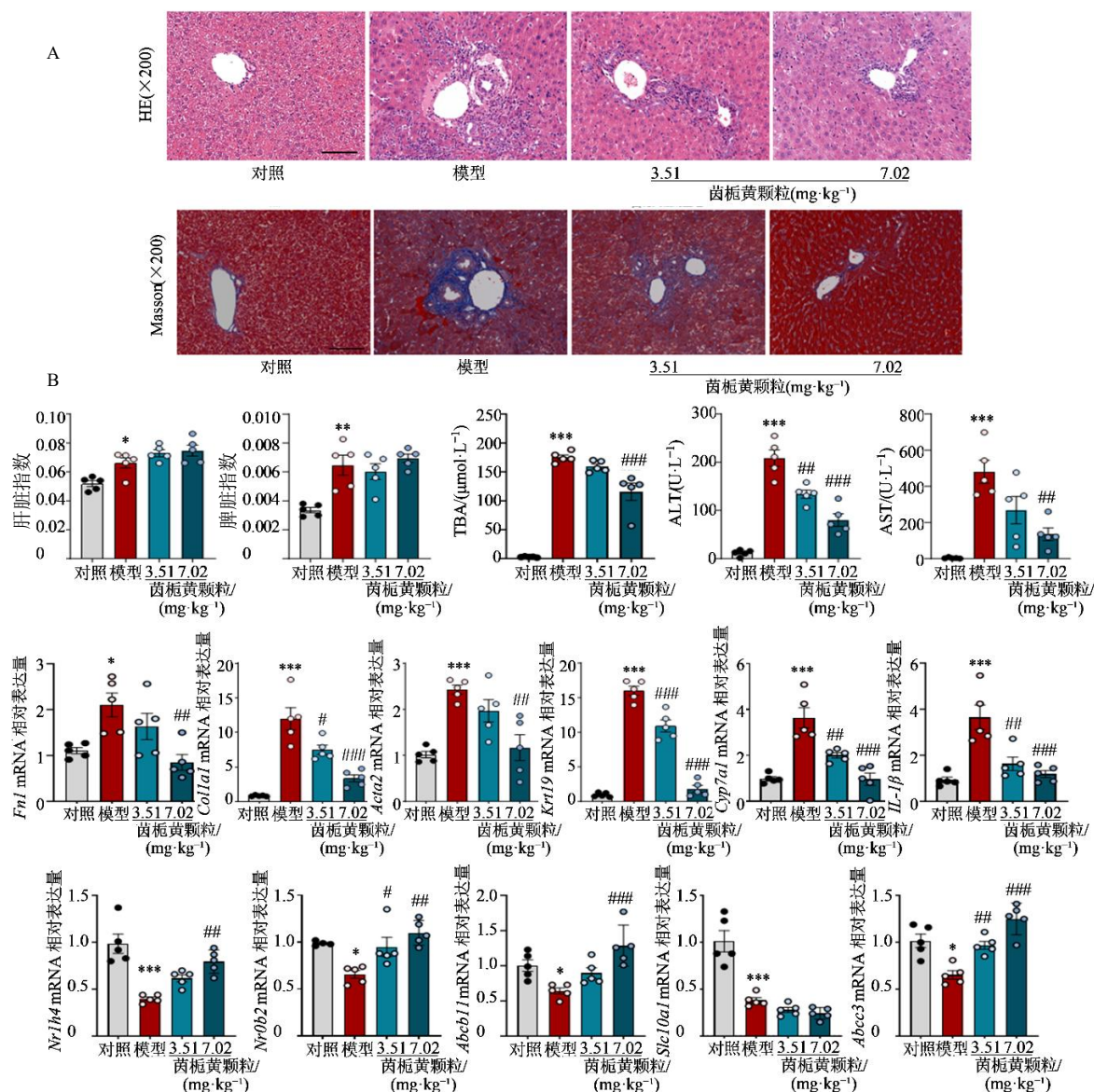
肝组织 HE 染色结果显示,与对照组相比,模

型组小鼠肝组织的肝小叶结构明显紊乱,肝细胞索排列失去正常秩序,可见不同程度肝细胞坏死及纤维组织增生,肝中央静脉与胆管周围均出现显著炎症细胞浸润;而给予茵栀黄颗粒低、高剂量干预后,上述病理损伤均得到改善(图 1)。

Masson 染色结果呈现类似趋势:对照组肝组织胶原纤维沉积极少,模型组则出现大量蓝色胶原纤维沉积,伴随明显纤维组织增生;经茵栀黄颗粒干预后,上述纤维化表现均有缓解(图 1)。

如图 1 所示,与对照组相比,模型组小鼠的肝、脾指数及血清 TBA、ALT、AST 含量均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ );茵栀黄颗粒处理虽未能逆转 BDL 小鼠肝、脾指数的升高,但茵栀黄颗粒高剂量组可显著降低血清 TBA 水平 ( $P < 0.001$ ),并显著下调 ALT 与 AST 水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

qRT-PCR 检测结果显示,与对照组相比,模型组小鼠肝组织中肝纤维化相关基因 (*Fnl1*、*Colla1*、



A-肝组织 HE 及 Masson 染色图, 标尺 100  $\mu\text{m}$ ; B-小鼠肝脾指数、TBA、血清生化指标及 qRT-PCR 检测结果; 与对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$ ; 与模型组比较: # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$ 。

A-HE and Masson staining images of liver tissues, scale bar 100  $\mu\text{m}$ ; B-liver and spleen index, TBA, serum biochemical indicators and qRT-PCR detection results of mice; \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs control group; # $P<0.05$  ## $P<0.01$  ### $P<0.001$  vs model group.

图 1 茵栀黄颗粒减轻 BDL 模型小鼠肝纤维化和胆汁淤积 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 1 Yinzhihuang Granule alleviates liver fibrosis and cholestasis in BDL model mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

*Acta2*、*Krt19*) 的表达水平显著上调 ( $P<0.05$ 、 $0.001$ ), 经茵栀黄颗粒干预后这些基因的表达在高剂量组中均显著下调 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ); 炎症相关基因 *Il-1 $\beta$*  表达也呈现类似的下调趋势 ( $P<0.01$ )。

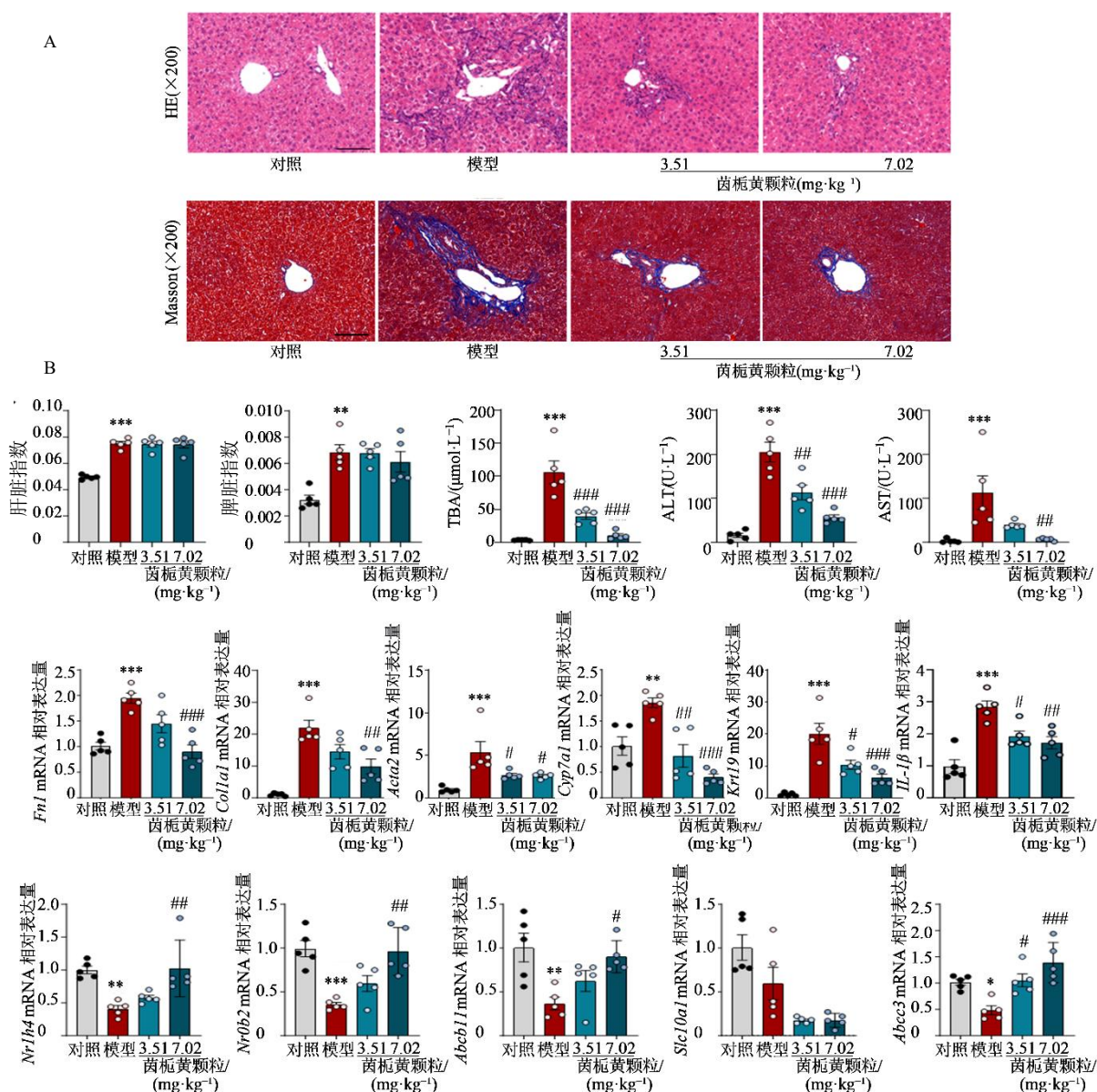
对胆汁酸代谢相关基因的分析表明, 与对照组相比, BDL 模型组小鼠肝组织中 *Nr1h4* 和 *Nr0b2* 的 mRNA 表达显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.001$ ), 胆酸合成关键基因 *Cyp7a1* 的 mRNA 表达则显著上调 ( $P<0.001$ ); 此外, 胆汁酸分泌关键转运蛋白编码基因 *Abcb11*, 以及参与胆汁酸摄取与排泄的 *Slc10a1*、

*Abcc3* 基因, 其 mRNA 表达在 BDL 模型组中均显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.001$ )。经高剂量茵栀黄颗粒干预后, 除 *Slc10a1* 外, 其余上述基因的 mRNA 表达水平均得到显著恢复 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ) (图 1)。综上所述, 茵栀黄颗粒可有效改善 BDL 模型小鼠的胆汁淤积及肝纤维化病理进程。

### 3.2 茵栀黄颗粒减轻 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠的肝纤维化和胆汁淤积

HE 染色结果显示 (图 2), *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠肝组织呈现典型胆汁淤积性肝损伤特征, 具体表现为肝小





A-肝组织 HE 及 Masson 染色图, 标尺 100 μm; B-小鼠肝脾指数、TBA、血清生化指标及 qRT-PCR 检测结果; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-HE and Masson staining images of liver tissues, scale bar 100 μm; B-liver and spleen index, TBA, serum biochemical indicators and qRT-PCR detection results of mice; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 2 茵栀黄颗粒减轻 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠的肝纤维化和胆汁淤积 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 2 Yinzhihuang Granule alleviate liver fibrosis and cholestasis in *Mdr2*<sup>-/-</sup> mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

叶结构紊乱、肝细胞索排列无序, 伴随广泛肝细胞坏死及中央静脉周围炎症细胞浸润; 经茵栀黄颗粒干预后, 其低、高剂量组小鼠的上述病理损伤均显著减轻(图 2)。Masson 染色结果进一步证实, *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠肝组织内可见大量胶原纤维沉积(蓝色染色区域), 而茵栀黄颗粒治疗组小鼠肝组织胶原沉积面积则显著缩小(图 2)。

如图 2 所示, 与对照组相比模型小鼠的肝、脾指数及血清 TBA、ALT、AST 含量均显著升高( $P <$

0.01、0.001)。茵栀黄颗粒处理虽未显著改变模型小鼠的肝、脾指数, 但可显著降低其血清 TBA、ALT 水平( $P < 0.01$ 、0.001), 同时, 茵栀黄颗粒高剂量干预组的 AST 水平亦显著降低( $P < 0.01$ )。

qRT-PCR 检测结果表明, 与对照组相比, 模型小鼠肝组织中肝纤维化相关基因 *Fnl*、*Colla1*、*Acta2* 及 *Krt19* 的表达水平显著上调( $P < 0.001$ ); 经茵栀黄颗粒干预后, 在高剂量组中上述基因的表达均有降低( $P < 0.05$ 、0.01、0.001, 图 2)。同时, 其肝组织炎症相关

基因 IL-1 $\beta$  的表达水平亦显著下调 ( $P < 0.01$ )。

对茵陈黄颗粒调控胆汁酸代谢相关基因表达的作用进一步评估显示, 模型组小鼠肝组织中 *Nr1h4*、*Nr0b2* 基因表达显著下调 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 胆酸合成关键基因 *Cyp7a1* 表达显著上调 ( $P < 0.01$ ), 而 *Abcb11*、*Abcc3* 基因表达则显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), *Slc10a1* 亦有一定程度下降。经茵陈黄颗粒处理后, 除 *Slc10a1* 外, 高剂量组中上述基因的表达水平均得到显著恢复 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。上述结果提示, 茵陈黄颗粒可有效改善 *Mdr2*<sup>+/−</sup> 小鼠的胆汁淤积状态及肝脏纤维化程度。

### 3.3 茵陈黄颗粒对 CLD 铁死亡的网络药理学与基因集富集分析

现有研究证实, 胆汁淤积性肝病与铁死亡存在密切关联<sup>[14-15]</sup>。鉴于茵陈黄可改善 *Mdr2*<sup>+/−</sup> 及 BDL 小鼠 CLD, 本研究基于网络药理学与基因组学技术, 进一步探讨其治疗作用与铁死亡的潜在关联。

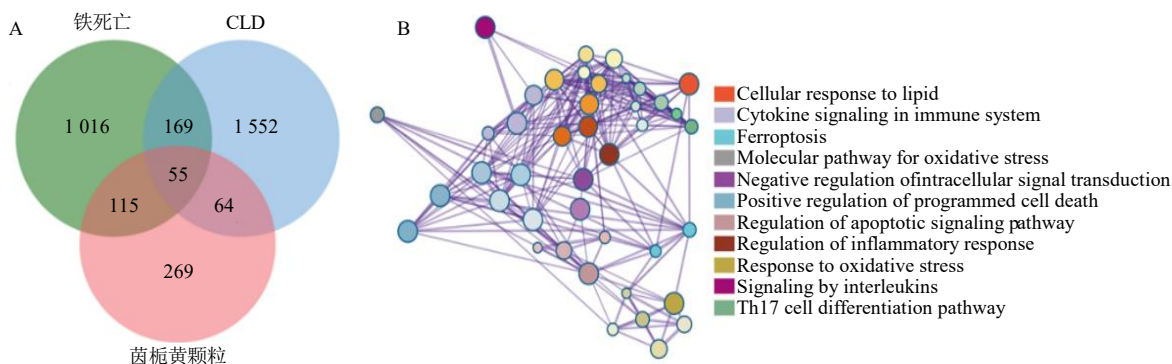


图 3 CLD-铁死亡-茵陈黄颗粒作用靶点的交集基因的韦恩图 (A) 和通路富集分析网络图 (B)

Fig. 3 Venn diagram of intersection genes of CLD, ferroptosis and Yinzhihuang Granule's action targets (A) and network diagram of pathway enrichment analysis (B)

进一步将通路富集结果及药物靶点信息导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 以“Ferroptosis”为核心构建可视化“药物成分-药物靶点-通路”交互网络图 (图 4)。该网络显示, 20 种茵陈黄颗粒入血成分与交集靶点形成交互调控关系, 提示茵陈黄颗粒可能通过多成分协同作用靶向铁死亡相关通路。

基因集富集分析 (GSEA) 结果显示, BDL 及 *Mdr2*<sup>+/−</sup> 两种胆汁淤积模型组中, 铁死亡相关基因集较对照组均显著富集 (图 5), 提示铁死亡信号通路在胆汁淤积性肝损伤过程中被激活。上述结果表明, 茵陈黄颗粒可能通过调控铁死亡通路, 缓解胆汁淤积及肝脏纤维化。

### 3.4 茵陈黄颗粒减轻 BDL 小鼠铁死亡相关指标

肝组织普鲁士蓝染色结果显示 (图 6), 与对照

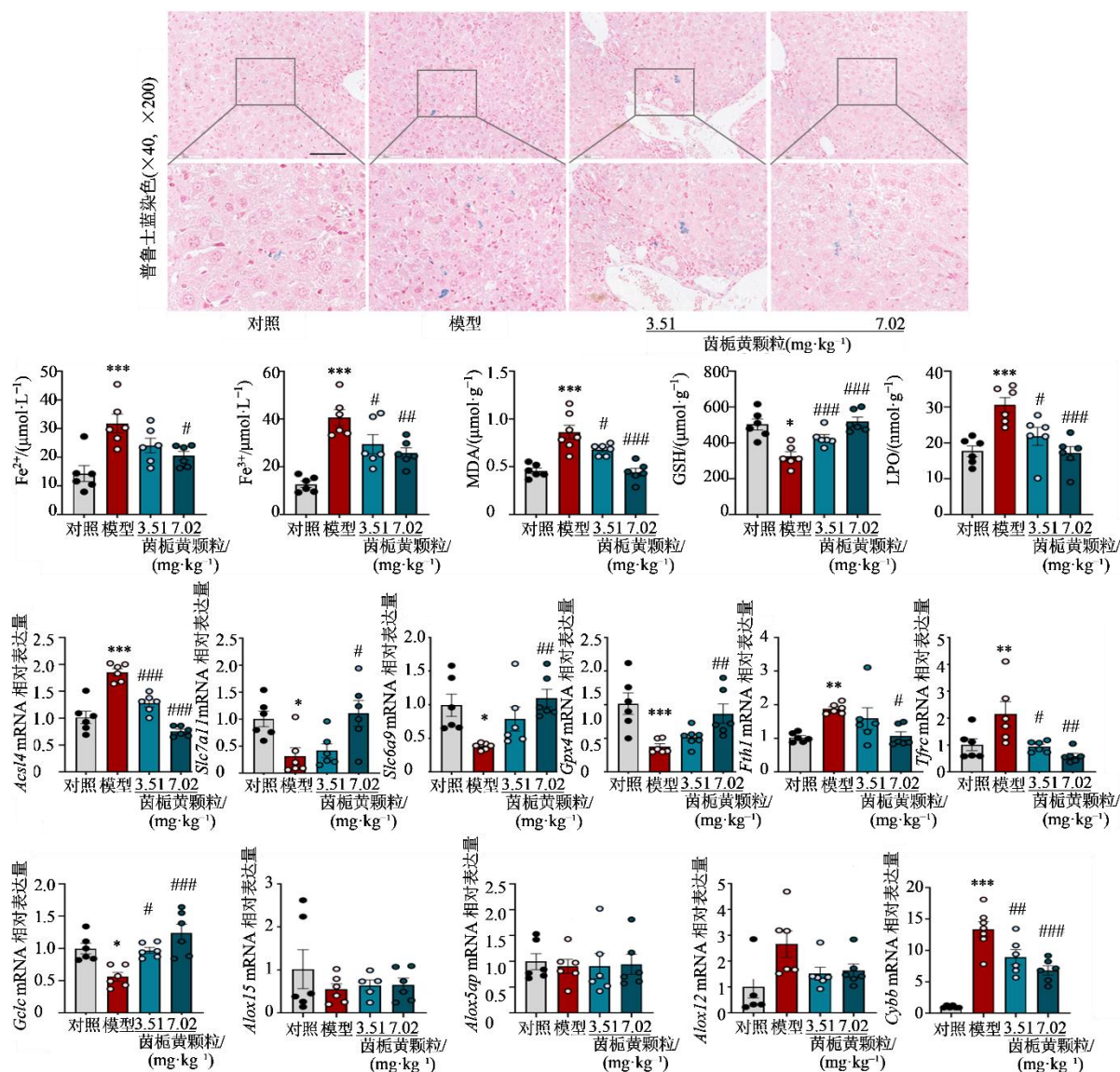
以茵陈黄颗粒组成药材 (茵陈、栀子、黄芩、金银花) 为关键词, 通过 TCMSP、HERB 2.0 数据库检索并整合其活性成分及对应靶点, 共获得 503 个茵陈黄颗粒潜在作用靶点。同时, 在 NCBI 与 GeneCards 数据库中, 分别以“cholestatic liver disease”“cholestatic hepatitis”“ferroptosis”为检索词, 筛选出 CLD 相关靶点 1 840 个及铁死亡相关靶点 1 355 个。通过生物信息学在线工具取上述靶点交集, 获得 55 个茵陈黄颗粒-CLD-铁死亡共有靶点, 并绘制韦恩图 (图 3)。将共有靶点导入 Metascape 网站进行通路富集分析, 结果显示这些靶点显著富集于铁死亡 (ferroptosis)、细胞对脂质的反应 (cellular response to lipid)、氧化应激分子通路 (molecular pathway for oxidative stress)、程序性细胞死亡的正调控 (positive regulation of programmed cell death)、氧化应激反应 (response to oxidative stress) 等铁死亡相关通路 (图 3)。

组相比, 模型组小鼠肝组织出现弥漫性蓝色铁颗粒沉积, 茵陈黄颗粒低、高剂量组肝组织铁沉积则显著减轻 (图 6)。与对照组相比, 模型组小鼠肝组织总 Fe<sup>3+</sup> 及 Fe<sup>2+</sup> 水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 氧化应激相关指标 MDA、LPO 水平亦显著上调 ( $P < 0.001$ ), 而抗氧化指标 GSH 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。茵陈黄颗粒干预后, 可呈剂量相关性逆转上述指标的异常改变。

基因表达水平检测显示, 模型组促铁死亡相关基因 *Acsl4*、*Fth1*、*Tfrc*、*Cybb* 的 mRNA 表达显著上调 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 铁死亡保护相关基因 *Gpx4*、*Slc7a11*、*Slc6a9*、*Gclc* 的 mRNA 表达则显著下调 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。经茵陈黄颗粒干预后, 高剂量组促铁死亡基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.01$ ),



**Fig. 5 GSEA enrichment pathway analysis**



A-肝组织普鲁士蓝染色图, 标尺 100  $\mu\text{m}$ ; B-小鼠肝组织总铁、亚铁离子、MDA、GSH、LPO 水平及 qRT-PCR 检测结果; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-prussian blue staining of liver tissue, scale bar 100  $\mu\text{m}$ ; B-levels of total iron, ferrous ions, MDA, GSH, LPO in mouse liver tissue and qRT-PCR detection results; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 6 茵栀黄颗粒减轻 BDL 模型小鼠铁死亡相关指标 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 6 Yinzhihuang Granule reduce iron death-related indicators in BDL model mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

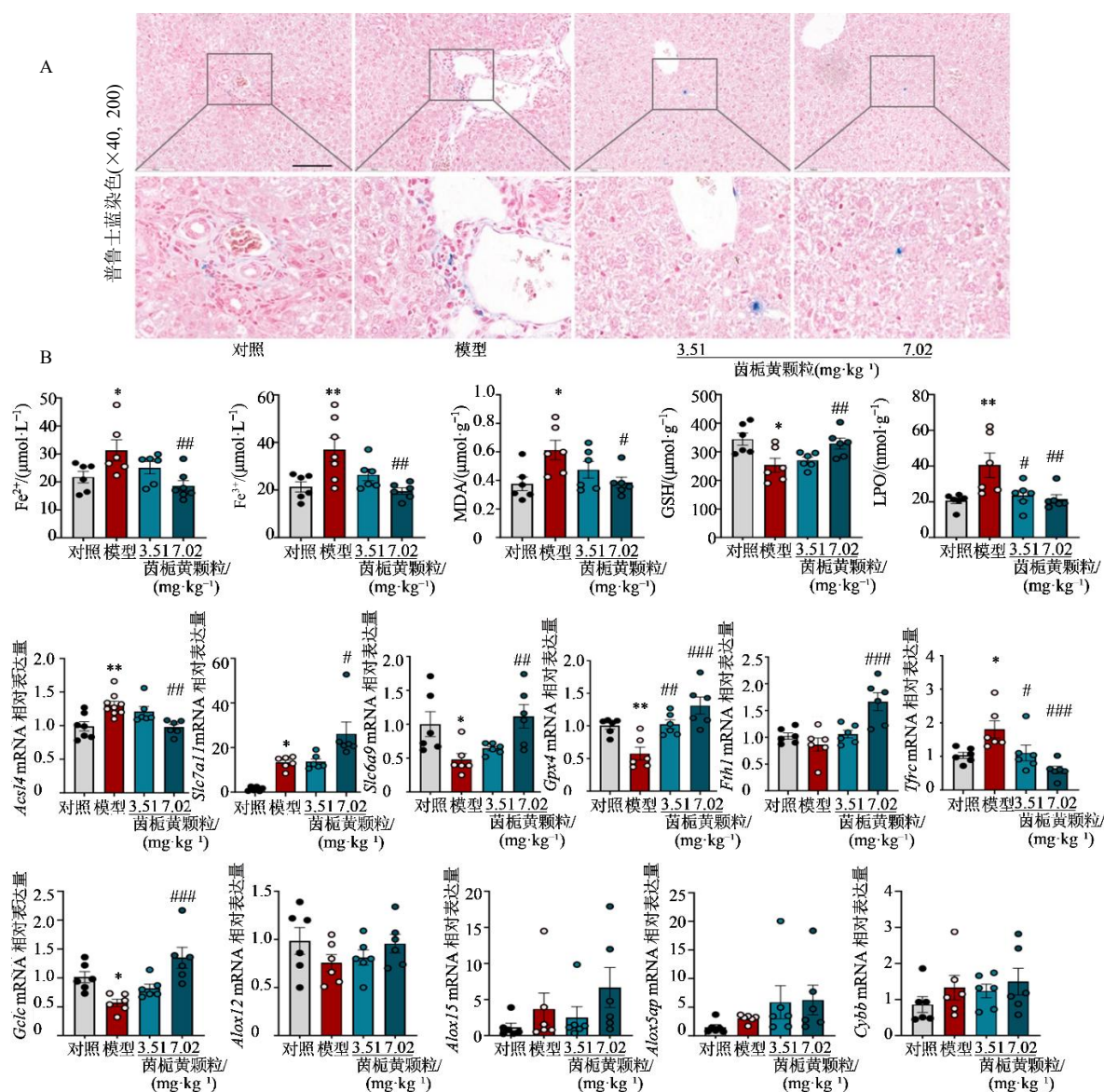
铁死亡保护基因表达显著上调 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。值得注意的是, 花生四烯酸代谢通路脂氧合酶基因 (*Alox15*、*Alox5ap*、*Alox12*) 在 BDL 模型组及茵栀黄颗粒低、高剂量干预组中的表达均无显著性差异。

综上, 茵栀黄颗粒可显著减少 BDL 模型小鼠肝组织铁沉积, 降低铁死亡相关氧化应激指标 (MDA、LPO) 水平, 同时提升抗氧化指标 (GSH) 水平。其作用机制可能与调控铁死亡相关基因的表达、进而抑制肝细胞铁死亡进程有关。

### 3.5 茵栀黄颗粒减轻 *Mdr2*<sup>+</sup> 小鼠铁死亡相关指标

普鲁士蓝染色结果显示 (图 7), 模型小鼠肝组织存在明显的弥漫性铁颗粒沉积 (蓝色颗粒), 而茵栀黄颗粒低剂量与高剂量干预均能有效减轻该铁超载的组织学表型 (图 7), 提示模型小鼠存在铁代谢紊乱, 且茵栀黄颗粒对其具有改善作用。生化指标检测表明, 模型小鼠肝组织中脂质过氧化标志物 MDA 和 LPO 水平显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), 抗氧化物质 GSH 含量显著降低 ( $P < 0.05$ ); 茵栀黄颗粒干预后在高剂量组可观察到上述指标的异常变化





A-肝组织普鲁士蓝染色图, 标尺 100 μm; B-小鼠肝组织总铁、亚铁离子、MDA、GSH、LPO 水平及 qRT-PCR 检测结果; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ 。

A-prussian blue staining of liver tissue, scale bar 100 μm; B-levels of total iron, ferrous ions, MDA, GSH, LPO in mouse liver tissue and qRT-PCR detection results; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group; # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs model group.

图 7 茵栀黄颗粒减轻 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠铁死亡相关指标 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 7 Yinzhihuang Granule alleviate ferroptosis-related indicators in *Mdr2*<sup>-/-</sup> mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

被逆转, 表明其能有效调控 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠肝组织的氧化应激状态。

基因表达分析显示 (图 7), *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠肝组织中促铁死亡基因 *Acs14*、*Tfrc* 的 mRNA 表达水平显著上调, 而铁死亡抑制基因 *Gpx4*、*Slc6a9*、*Gclc* 的表达显著下调 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 茵栀黄颗粒高剂量给药后, 不仅显著抑制了部分促铁死亡基因的过度表达如 *Acs14*、*Tfrc*, 还逆转了铁死亡抑制基因的下调趋势。值得注意的是, 与 BDL 小鼠模型的实验结果 (图 6) 一致, 铁死亡相关花生

四烯酸代谢通路中的脂氧合酶基因 *Alox15*、*Alox5ap*、*Alox12* 在 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠各实验组间的表达水平未呈现显著性差异。

综上, 上述结果表明, 茵栀黄颗粒可有效改善 *Mdr2*<sup>-/-</sup> 小鼠肝组织的铁沉积与氧化应激异常, 并通过剂量相关性调控铁死亡相关基因的表达, 发挥对肝组织的保护作用。

#### 4 讨论

胆汁淤积与肝纤维化是多种肝脏疾病中常见的病理状态, 二者相互关联、协同加剧, 对人类健



康构成严重威胁。铁死亡作为一种铁依赖性程序性细胞死亡方式,与多种肝脏疾病的发生发展密切相关,其核心生物学特征表现为铁代谢紊乱、脂质过氧化产物累积及抗氧化防御系统失衡。在 CLD 中,铁死亡可能通过加剧氧化应激与炎症反应,进一步加重肝细胞损伤,因此深入探究 CLD 中铁死亡的调控机制,对于开发新型治疗策略具有重要的理论与临床意义<sup>[7]</sup>。

本研究结果表明,茵栀黄颗粒可显著改善 BDL 及 *Mdr2*<sup>-/-</sup>小鼠的胆汁淤积与肝纤维化表型,降低血清 TBA 水平,并减轻肝组织铁颗粒沉积。病理学检测结果显示,茵栀黄颗粒干预后,BDL 及 *Mdr2*<sup>-/-</sup>小鼠肝组织的肝小叶结构紊乱、纤维组织增生等病理损伤均得到显著改善。胆汁酸代谢在 CLD 的病理进程中发挥关键调控作用<sup>[16]</sup>,本研究转录组学数据提示,茵栀黄颗粒通过多维度调控胆汁酸转运相关基因的转录:一方面,显著上调胆汁酸肝外转运相关基因(*Abcb11*、*Abcc3*)的表达,从而缓解胆汁淤积压力;另一方面,显著抑制胆汁酸合成关键限速酶基因 *Cyp7a1* 的转录,减少胆汁酸生成,进而减轻肝损伤。

此外,茵栀黄颗粒可有效调节氧化应激相关指标,降低 MDA 与 LPO 水平,同时提升 GSH 含量,提示其具有显著的抗氧化应激活性。转录组学及 qRT-PCR 结果显示,茵栀黄颗粒高剂量组可显著下调促铁死亡基因(如 *Acs14*、*Tfrc*)的表达,同时上调铁死亡抑制基因(如 *Gpx4*、*Slc7a11*、*Slc6a9*、*Gclc*)的转录水平。网络药理学分析进一步揭示,茵栀黄颗粒中多种活性成分与铁死亡相关靶点形成多成分-多靶点的协同调控网络,提示其可能通过多成分协同作用靶向调控铁死亡相关通路。基于小鼠肝脏转录组数据的 GSEA 结果,进一步证实铁死亡通路在 BDL 及 *Mdr2*<sup>-/-</sup>小鼠模型中的显著富集,为茵栀黄颗粒对铁死亡的负调控作用提供支撑。

值得关注的是,两种模型的一致性结果显示,铁死亡相关花生四烯酸代谢通路中的脂氧合酶基因(*Alox15*、*Alox5ap*、*Alox12*)在各实验组间未呈现显著的表达差异。已有研究证实,茵栀黄颗粒的活性成分(如栀子苷、黄芩素)可通过激活 GPX4 通路抑制铁死亡进程<sup>[17-18]</sup>,结合本研究结果推测,茵栀黄颗粒抑制铁死亡的核心机制可能在于通过增强细胞抗氧化防御系统发挥作用,而非直接干预 ROS 生成源头或脂质氧化酶本身。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 张继平. 胆汁淤积性肝病的病理学诊断 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(6): 1093-1099.  
Zhang J P. Pathological diagnosis of cholestatic liver disease [J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(6): 1093-1099.
- [2] Chang J I, Kim J H, Sinn D H, et al. Clinical outcomes and validation of ursodeoxycholic acid response scores in patients with Korean primary biliary cholangitis: A multicenter cohort study [J]. Gut Liver, 2023, 17(4): 620-628.
- [3] Mayo M J. Mechanisms and molecules: What are the treatment targets for primary biliary cholangitis? [J]. Hepatology, 2022, 76(2): 518-531.
- [4] Bowlus C L, Kenney J T, Rice G, et al. Primary biliary cholangitis: Medical and specialty pharmacy management update [J]. J Manag Care Spec Pharm, 2016, 22(10-a-s Suppl): S3-S15.
- [5] 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.
- [6] Chen F Q, Kang R, Tang D L, et al. Ferroptosis: Principles and significance in health and disease [J]. J Hematol Oncol, 2024, 17(1): 41.
- [7] Chen J Y, Li X P, Ge C D, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(3): 467-480.
- [8] 李琴. 茵栀黄临床应用综述 [J]. 中国药物经济学, 2012, 7(3): 15-16.  
Li Q. Summary of clinical application of Yinzhihuang [J]. China J Pharm Econ, 2012, 7(3): 15-16.
- [9] 麻景梅, 麻朝朝, 李斯, 等. 茵栀黄化学成分及药理作用研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2021, 17(4): 202-206.  
Ma J M, Ma Z Z, Li S, et al. Advances in the study of chemical constituents and pharmacological effects of Yin-Zhi-Huang [J]. Asia Pac Tradit Med, 2021, 17(4): 202-206.
- [10] 郑加嘉, 黄清松, 吴蔓, 等. 茵栀黄注射液对小鼠免疫性肝损伤炎症因子含量的影响 [J]. 成都中医药大学学报, 2012, 35(4): 8-10.  
Zheng J J, Huang Q S, Wu M, et al. Influence of Yin-Zhi-Huang Injection on the content of cytokines in con A-induced immune liver injury in mice [J]. J Chengdu Univ Tradit Chin Med, 2012, 35(4): 8-10.
- [11] 崔鑫, 张成, 席俊羽, 等. 基于真实世界与靶点网络聚类的茵栀黄颗粒治疗黄疸的联合用药方案及分子机制分析 [J]. 中草药, 2023, 54(1): 210-221.

- Cui X, Zhang C, Xi J Y et al. Combination medication regimen and molecular mechanism analysis of Yinzhihuang Granule in treatment of jaundice based on real world and target network clustering [J]. Chin Herb Drugs, 2023, 54(1): 210-221.
- [12] Kullak-Ublick G A, Beuers U, Paumgartner G. Hepatobiliary transport [J]. J Hepatol, 2000, 32(1 Suppl): 3-18.
- [13] Xia J L, Dai C S, Michalopoulos G K, et al. Hepatocyte growth factor attenuates liver fibrosis induced by bile duct ligation [J]. Am J Pathol, 2006, 168(5): 1500-1512.
- [14] Tschuck J, Theilacker L, Rothenaigner I, et al. Farnesoid X receptor activation by bile acids suppresses lipid peroxidation and ferroptosis [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6908.
- [15] Guo Q, Wu Z Q, Wang K K, et al. Forsythiaside-a improved bile-duct-ligation-induced liver fibrosis in mice: The involvement of alleviating mitochondrial damage and ferroptosis in hepatocytes via activating Nrf2 [J]. Free Radic Biol Med, 2024, 222: 27-40.
- [16] 李静, 郑葵阳, 张蓓蓓. 胆汁酸代谢调节胆汁淤积性肝病的作用机制及药物研发 [J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(10): 2482-2487.
- Li J, Zheng K Y, Zhang B B. Mechanism of action of bile acid metabolism in regulating cholestatic liver disease and the research and development of drugs [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(10): 2482-2487.
- [17] Wen R J, Dong X, Zhuang H W, et al. Baicalin induces ferroptosis in osteosarcomas through a novel Nrf2/xCT/GPX4 regulatory axis [J]. Phytomedicine, 2023, 116: 154881.
- [18] Shen Y H, Wang X D, Shen X Y, et al. Geniposide possesses the protective effect on myocardial injury by inhibiting oxidative stress and ferroptosis via activation of the Grsfl/GPx4 axis [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 879870.

[责任编辑 孙英杰]