

• 药理与临床 •

沙苑子总黄酮通过调节肝星状细胞铁代谢改善小鼠肝纤维化

周瑞娜^{1,2,3}, 王洋¹, 胡锦涛¹, 岳正刚¹, 陈琳^{1*}, 程敏^{2,3*}

1. 陕西省中药资源产业化协同创新中心, 秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育), 陕西省创新药物研究中心, 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712083
2. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046
3. 商洛学院, 陕西 商洛 726000

摘要: 目的 基于肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 铁代谢研究沙苑子总黄酮 (total flavonoids from *Astragali Complanati Semen*, TFACS) 对肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 小鼠的影响。方法 小鼠连续 8 周 ip 10% 四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 建立 HF 小鼠模型, HF 小鼠随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾 (100 mg/kg) 组和 TFACS 低、高剂量 (8、20 mg/kg) 组, 连续给药 6 周, 末次给药 16 h 后收集血清, 计算肝脏和脾脏指数; 采用全自动血清生化仪测定血清肝功能指标; 采用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 IV 型胶原蛋白 (collagen type IV, Col-IV)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、层黏蛋白 (laminin, LN) 和 III 型前胶原 (procollagen III, PCIII) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 和 Masson 染色观察肝组织病变和胶原沉积; 采用试剂盒测定肝组织中铁调素、铁以及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量; 采用普鲁士蓝染色观察肝组织中铁分布; 采用 Western blotting 检测肝组织中 I 型胶原蛋白 (Collagen I)、IV 型胶原蛋白 (Collagen IV)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 和转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFRC) 的表达。采用转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导 HSC-T6 细胞活化, CCK-8 法检测 TFACS 对细胞增殖的影响, 试剂盒测定细胞中 MDA 和铁含量, 采用免疫荧光法检测细胞中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平, 采用 Western blotting 检测细胞中 α -SMA 和 TFRC 蛋白的表达。结果 TFACS 显著降低 HF 小鼠的脾脏指数 ($P < 0.05$ 、 0.01), 降低血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 活性和 Col-IV、HA、LN、PCIII 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 改善 HF 小鼠肝细胞损伤、炎症浸润和胶原沉积, 减少肝组织铁染色面积 ($P < 0.05$), 降低肝组织中铁调素、铁和 MDA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并下调肝组织 Collagen I、Collagen IV、TFRC 和 α -SMA 蛋白表达 ($P < 0.05$)。此外, TFACS 可明显抑制 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01), 下调 TFRC 和 α -SMA 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并降低 MDA、ROS 和铁水平 ($P < 0.001$)。结论 TFACS 对 HF 具有保护作用, 其作用机制可能与调节 HSCs 铁代谢有关。

关键词: 沙苑子总黄酮; 肝纤维化; 肝星状细胞; 铁代谢; 沙苑子苷; 沙苑子苷 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)09-3131-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.011

Effect of total flavonoids from *Astragali Complanati Semen* on improving hepatic fibrosis in mice by regulating hepatic stellate cells iron metabolism

ZHOU Ruina^{1,2,3}, WANG Yang¹, HU Jinhang¹, YUE Zhenggang¹, CHEN Lin¹, CHENG Min^{2,3}

1. Shaanxi Collaborative Innovation Center of Chinese Medicine Resources Industrialization, State Key Laboratory of Research and Development of Characteristic Qin Medicine Resources (Cultivation), Shaanxi Innovative Drug Research Center, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712083, China

收稿日期: 2024-12-27

基金项目: 陕西省科技厅重点研发计划项目 (2024SF-YBXM-458, 2024NC-YBXM-263); 陕西省教育厅重点科学研究计划项目 (22JY019); 陕西省科技创新团队 (2022TD-56); 陕西高校青年创新团队建设项目 (2023); 秦创原中医药产业创新聚集区项目 (L2024-QCY-ZYYYJQ-X201); 陕西省重点研发计划-重点产业创新链(群)(社会发展领域) (2023-ZDLSF-58)

作者简介: 周瑞娜, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: zhouruina1209@163.com

*通信作者: 陈琳, 副教授, 硕士生导师, 从事中药物质基础及质量标准评价研究。E-mail: chanlin24@sina.com

程敏, 教授, 硕士生导师, 从事中药药效与作用机制研究。E-mail: exitxiaobai@163.com

2. College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

3. Shangluo University, Shangluo 726000, China

Abstract: Objective To study the effect of total flavonoids from Shayuanzi (*Astragali Complanati Semen*, TFACS) on hepatic fibrosis (HF) mice based on iron metabolism in hepatic stellate cells (HSCs). **Methods** HF mice model was established by ip 10% carbon tetrachloride (CCl₄) for eight consecutive weeks. HF mice were randomly divided into control group, model group, silibinin (100 mg/kg) group, and TFACS low-, high-dose (8, 20 mg/kg) groups. The mice were administered continuously for six weeks, and serum was collected 16 h after the last administration. Liver and spleen indexes were calculated; Serum liver function index was measured by automatic serum biochemical instrument; ELISA was used to measure the levels of collagen type IV (Col-IV), hyaluronic acid (HA), laminin (LN) and procollagen III (PCIII) in serum; The liver lesions and collagen deposition were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining; The contents of hepcidin, iron and MDA in liver tissue were determined by kit; The distribution of iron in liver tissue was observed by prussian blue staining; Western blotting was used to detect the expressions of Collagen I, Collagen IV, α -smooth muscle actin (α -SMA) and transferrin receptor (TFRC) in liver tissue. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) was used to induce the activation of HSC-T6 cells, and the effect of TFACS on the proliferation of cells was evaluated by CCK-8 method, the contents of MDA and iron in cells were determined by kits, the level of reactive oxygen species (ROS) in cells was detected by immunofluorescence method, the expressions of α -SMA and TFRC proteins in cells were detected by Western blotting. **Results** TFACS significantly reduced the spleen index of HF mice ($P < 0.05, 0.01$), reduced the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) and levels of Col-IV, HA, LN and PCIII in serum ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), improved liver cell injury, inflammatory infiltration and collagen deposition in HF mice, reduced the iron staining area of liver tissue ($P < 0.05$), decreased the levels of hepcidin, iron and MDA in liver tissue ($P < 0.05, 0.01$), and down-regulate the expressions of Collagen I, Collagen IV, TFRC and α -SMA proteins in liver tissue ($P < 0.05$). In addition, TFACS could significantly inhibit the proliferation of HSC-T6 cells induced by TGF- β 1 ($P < 0.05, 0.01$), down-regulate the expressions of TFRC and α -SMA proteins ($P < 0.05, 0.01$), and reduce MDA, ROS and iron levels ($P < 0.001$). **Conclusion** TFACS has a protective effect on HF, and its mechanism may be related to regulating iron metabolism in HSCs.

Key words: total flavonoids from *Astragali Complanati Semen*; hepatic fibrosis; hepatic stellate cells; iron metabolism; complanatoside; complanatoside B

肝纤维化 (hepatic fibrosis, HF) 是各种慢性肝病的共同病理过程, 其特征为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的过度积累^[1]。肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 是产生 ECM 的主要肝细胞类型, HSCs 的活化导致纤维组织的沉积和瘢痕形成^[2]。在生理条件下, HSCs 呈现静息状态; 在外界损伤的刺激下, 静息的 HSCs 经过复杂的激活过程, 包括细胞骨架蛋白 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 的重新表达和 ECM 成分的过量产生, 并分化为增殖的肌成纤维细胞样细胞^[3-4]。目前, HF 的临床治疗主要是从病因入手, 尚无特效的抗 HF 药物^[5]。

沙苑子 *Astragali Complanati Semen* 为豆科植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Br. 的干燥成熟种子, 具有补肾助阳、养肝明目等功效^[6], 主产于陕西、山西、河北等地。现代药理学研究表明, 沙苑子可改善肝损伤的积累, 对急、慢性肝损伤均有保护作用^[7]。沙苑子总黄酮是从沙苑子中提取、纯化得到的具有生物活性的黄酮类化合物, 具有抗

癌、抗炎、保肝和抗纤维化等多种药理活性^[8]。本课题组前期研究发现, 沙苑子总黄酮对四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导的慢性肝损伤小鼠具有很好的保护作用, 蛋白质组学分析揭示了其保肝作用与局部黏附、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 和铁死亡等信号通路相关^[9]; 沙苑子总黄酮具有抗 HF 的作用, 可显著降低大鼠的肝脏纤维化程度, 改善肝脏功能, 降低 α -SMA 水平并抑制 HSCs 活化, 蛋白质组学进一步揭示其抗 HF 的作用与调节铁死亡和铁代谢通路相关。因此, 靶向铁死亡与纠正铁代谢紊乱可能是沙苑子总黄酮抗 HF 的重要分子机制之一。

近年研究发现, 铁代谢紊乱在 HF 中扮演重要角色。铁过载可诱导氧化应激, 促进 HSCs 活化并加速胶原沉积, 从而加重 HF^[10-12]。本研究采用 CCl₄ 诱导建立 HF 小鼠模型, 考察沙苑子总黄酮对 HF 小鼠肝功能、肝脏病理学改变、氧化应激以及铁代谢的影响, 进一步通过转化生长因子- β 1 (transforming

growth factor- β 1, TGF- β 1) 诱导活化的 HSC 模型考察沙苑子总黄酮对活化的 HSC 细胞中铁代谢、氧化应激以及相关靶点表达的影响, 为开发更有效的抗 HF 药物提供新的靶点和思路。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠, 体质量 (20 \pm 2) g, 6~8 周龄, 购自成都达硕实验动物有限公司, 合格证号 SCXK (川) 2020-030。动物饲养于陕西省中药资源产业化协同创新中心 SPF 级动物实验室, 许可证号 SYXK (陕) 2022-008。动物实验按照《陕西中医药大学动物实验指导原则》执行, 并经陕西中医药大学伦理委员会批准 (批准号 SUCMDL20240604001)。

HSC-T6 细胞购自北京北纳生物技术有限公司; LO-2 细胞购自上海欧维生物工程有限公司。

1.2 药材

沙苑子 (批号 2303001) 购自安国市聚药堂药业有限公司, 经陕西中医药大学岳正刚教授鉴定为豆科植物扁茎黄芪 *A. complanatus* R. Br. 的干燥成熟种子。

1.3 药品与试剂

水飞蓟宾胶囊 (0.35 mg/片, 批号 H20040299) 购自天津天士力圣特制药有限公司; CCl₄ (批号 20210102) 购自天津天力化学试剂有限公司; 橄榄油 (批号 243702221) 购自中央华业食品有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 140124019)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 140224014)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 试剂盒 (批号 140323014) 购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 S0131M) 购自碧云天生物技术有限公司; 小鼠 III 型前胶原 (procollagen III, PCIII) ELISA 试剂盒 (批号 20250305)、小鼠透明质酸 (hyaluronic acid, HA) ELISA 试剂盒 (批号 20250305)、小鼠层黏蛋白 (laminin, LN) ELISA 试剂盒 (批号 20250306)、小鼠 IV 型胶原蛋白 (collagen type IV, Col-IV) ELISA 试剂盒 (批号 20250306)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 测定试剂盒 (批号 20231207)、铁调素试剂盒 (批号 20231009)、组织铁含量试剂盒 (批号 20230713) 购自南京建成生物工程研究所; I 型胶原蛋白 (Collagen I) 抗体 (批号 14695-1-AP)、IV 型胶原蛋白 (Collagen IV) 抗体 (批号 19674-1-AP)、转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFRC) 抗体

(批号 10084-2-AP)、 α -SMA 抗体 (批号 67735-1-Ig)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 60004-1-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 重组人 TGF- β 1 (批号 rcyc-htgfb1) 购自美国 InvivoGen 公司。

1.4 仪器

Agilent-1260 型高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司); Micro 17R 型微量低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 全自动血清生化仪 (深圳迈瑞生物医疗电子有限公司); KQ-300DE 型超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); N1210B 型旋转蒸发器 (上海艾朗仪器有限公司); UV-2600 型紫外分光光度计 (日本岛津公司); Tissuelyser-48 型研磨仪 (上海净信实业发展有限公司); ChemiDoc XRS+ 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 沙苑子总黄酮的制备

称取沙苑子药材粉末 850 g, 加 8 倍量 50% 甲醇超声提取 3 次, 每次 1 h, 合并滤液, 滤过, 60 $^{\circ}$ C 减压回收至无醇度, 得药材粗提浸膏。利用大孔树脂采用静态吸附-洗脱的实验方法, 筛选纯化后得到纯度为 56.62% 的沙苑子总黄酮 (9.5 g, 提取率约 1.1%), 采用 HPLC 法测定沙苑子总黄酮中沙苑子苷和沙苑子苷 B 的质量分数分别为 35.2、39.3 mg/g。

2.2 体内实验

2.2.1 造模、分组与给药 小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、水飞蓟宾 (100 mg/kg) 组和沙苑子总黄酮低、高剂量 (8、20 mg/kg) [6,13] 组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠 ip 10% CCl₄ (10 mL/kg), 2 次/周, 连续 8 周。第 2 周开始各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的橄榄油, 1 次/d, 连续 6 周。

2.2.2 血清中 ALT、AST、ALP 活性和 Col-IV、HA、LN、PCIII 水平的检测 末次给药 16 h 后, 小鼠眼底静脉丛取血后, 颈椎脱臼法处死, 收集血清, 静置 2 h 后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 10 min, 分离血清。采用全自动生化分析仪检测小鼠血清中 ALT、AST 和 ALP 活性, 采用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清中 Col-IV、HA、LN 和 PCIII 水平。

2.2.3 肝组织病理学观察 取各组小鼠肝组织, 于 4% 多聚甲醛固定液中固定, 石蜡包埋后切片 (5 μ m), 脱蜡后分别进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色, 于显微镜下观察肝组

织炎症反应及肝损伤程度。用 Image J 软件定量分析 Masson 染色结果,蓝色表示阳性染色面积。

2.2.4 肝组织普鲁士蓝染色 取各组小鼠肝组织石蜡切片,脱蜡至水,于 2%亚铁氰化钾和 2%盐酸混合液(1:1)中染色 30 min,蒸馏水洗涤 2 次。DAB 显色液滴染 5~10 min,显微镜下控制显色程度;苏木素染色 1 min,自来水洗涤,盐酸水溶液分化,氨水水溶液返蓝进行染核,最后脱水封片,在显微镜下观察并拍照。

2.2.5 肝组织铁调素、铁、MDA 含量的检测 取各组小鼠肝组织,按照试剂盒说明书检测铁调素、铁和 MDA 含量。

2.2.6 肝组织 Collagen I、Collagen IV、 α -SMA、TFRC 蛋白表达的检测 取各组小鼠肝组织 50 mg,加入 1.4 mL 含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(1:50)的 RIPA 裂解液,研磨后置冰上充分裂解 60 min,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5%脱脂牛奶中封闭 2 h;TBST 洗膜 3 次,15 min/次,分别加入 Collagen I(1:1 000)、Collagen IV(1:2 000)、 α -SMA(1:50 000)、TFRC(1:1 000)、GAPDH(1:50 000)抗体,4 °C 孵育过夜;洗膜后孵育二抗(1:10 000),洗膜后进行凝胶成像,采用 Image Lab 软件对条带进行灰度值分析。

2.3 体外实验

2.3.1 细胞培养 HSC-T6 细胞用含 10%胎牛血清和 5%双抗的 DMEM 培养基,LO-2 细胞用含 10%胎牛血清和 5%双抗的 RPMI 1640 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.3.2 细胞活力检测 取对数生长期的 HSC-T6 细胞或 LO-2 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h。实验组分别加入不同质量浓度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μ g/mL)的沙苑子总黄酮,对照组加入不含药物的培养基,处理 24 h。另设置不接种细胞和不含药物的空白孔,采用 CCK-8 法于 450 nm 处检测吸光度(A)值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

取对数生长期的 HSC-T6 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h。设置对照组、模型组和沙苑子总黄酮(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 μ g/mL)组,模型组和各给药组加入 TGF- β 1(10 ng/mL)处理,同时各给药组再加入不同质量浓度的

沙苑子总黄酮处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基。另设置不接种细胞和不含药物的空白孔,采用 CCK-8 法检测吸光度 A 值,并计算细胞存活率。

2.3.3 MDA、铁含量的检测 取对数生长期的 HSC-T6 细胞,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,培养 24 h。设置对照组、模型组和沙苑子总黄酮(0.2、0.5 μ g/mL)组,模型组和各给药组加入 TGF- β 1(10 ng/mL)处理,同时各给药组再加入不同质量浓度的沙苑子总黄酮处理 24 h。收集细胞,按试剂盒说明书测定 MDA 和铁含量。

2.3.4 ROS 水平的检测 按“2.3.3”项下方法进行分组,处理 24 h 后,弃去培养基,加入 300 μ L DCFH-DA 探针(10 μ mol/L),孵育 30 min。PBS 洗涤细胞 3 次,充分去除未进入细胞的 DCFH-DA,置倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.3.5 α -SMA、TFRC 蛋白表达的检测 取对数生长期的 HSC-T6 细胞,以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h。按“2.3.3”项下方法进行分组,处理 24 h 后,收集细胞,按“2.2.6”项下方法提取蛋白,采用 Western blotting 检测 α -SMA 和 TFRC 蛋白表达。

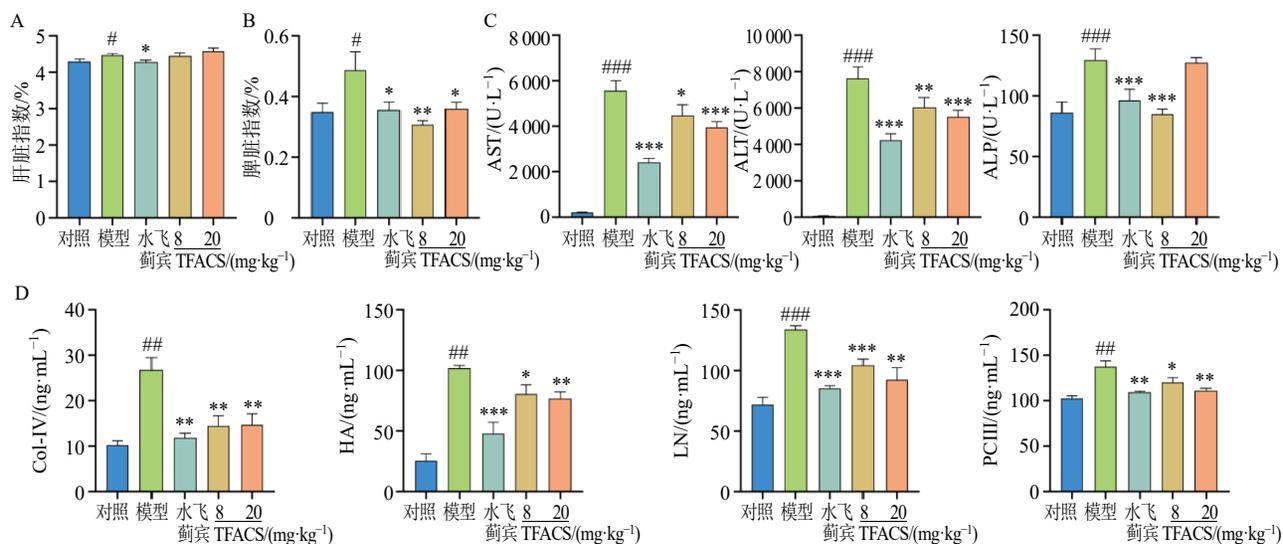
2.4 统计学分析

采用 IBM SPSS Statistics 26.0 和 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间数据比较采用 *t* 检验分析,用单因素方差分析法比较多组间差异。

3 结果

3.1 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠的保护作用

3.1.1 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝脏指数、脾脏指数、肝功能和肝纤四项的影响 如图 1-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠肝脏和脾脏指数显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,沙苑子总黄酮各剂量组小鼠的肝脏指数没有显著性差异,脾脏指数显著降低($P < 0.05$ 、0.01),水飞蓟宾组小鼠肝脏和脾脏指数显著降低($P < 0.05$)。肝酶的流出是反映肝损伤和肝毒性的指标。如图 1-C 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 ALT、AST 和 ALP 活性显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中 ALT、AST 活性均显著降低($P < 0.05$),沙苑子总黄酮低剂量组和水飞蓟宾组 ALP 活性显著降低($P < 0.001$)。如图 1-D 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中 Col-IV、HA、LN 和 PCIII



TFACS-沙苑子总黄酮; 与对照组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。
TFACS-total flavonoids from *Astragali Complanati Semen*; # $P < 0.05$ ### $P < 0.01$ #### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图1 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝脏指数 (A)、脾脏指数 (B)、肝功能 (C) 和肝纤四项 (D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Effect of total flavonoids from *Astragali Complanati Semen* (TFACS) on liver index (A), spleen index (B), liver function (C) and four indicators of hepatic fibrosis (D) in CCl₄-induced hepatic fibrosis mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

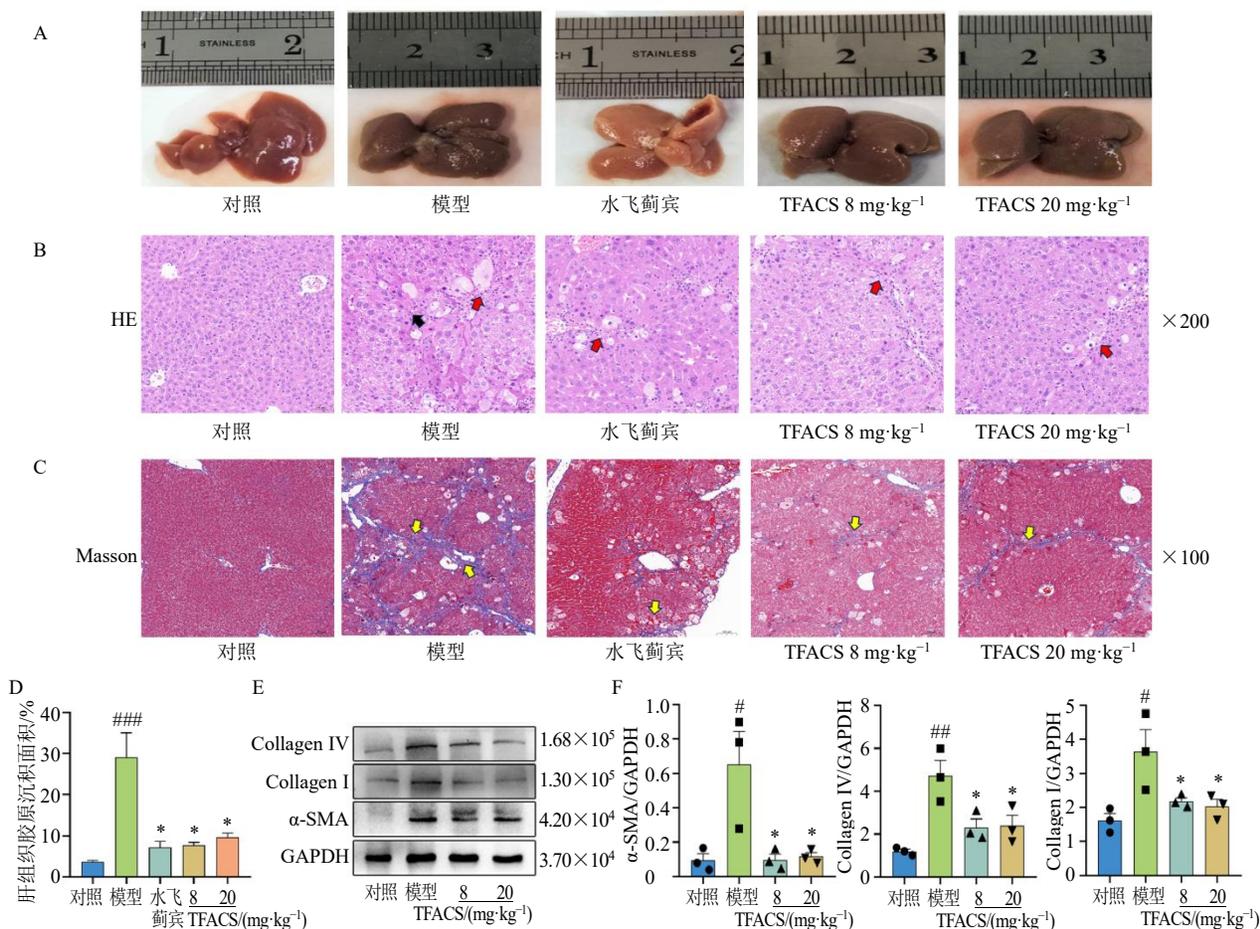
水平显著升高 ($P < 0.01, 0.001$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 Col-IV、HA、LN 和 PCIII 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 表明沙苑子总黄酮对 HF 小鼠的肝功能具有保护作用。

3.1.2 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝组织病理和 Collagen I、Collagen IV 和 α -SMA 蛋白表达的影响 肝活组织检查是 HF 诊断的“金标准” [5]。如图 2-A 所示, 对照组小鼠肝脏表面光洁, 红润; 模型组小鼠肝脏颜色暗淡, 表面有明显的粗大颗粒状物质; 与模型组相比, 各给药组小鼠肝脏均有不同程度的改善。对肝组织进行病理学观察, HE 染色结果 (图 2-B) 显示, 与对照组比较, 模型组出现明显的肝细胞脂肪变性、炎症细胞浸润; 与模型组比较, 各给药组肝细胞损伤和炎症浸润明显减少。Masson 染色结果 (图 2-C) 显示, 对照组小鼠肝组织细胞结构正常, 无明显胶原纤维产生; 模型组可见许多增生的胶原纤维; 各给药组小鼠肝组织中仍有少量胶原纤维, 但较模型组胶原纤维染色浅。对各组小鼠肝脏胶原纤维阳性面积进行量化分析, 结果见图 2-D, 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织胶原纤维阳性面积显著降低 ($P < 0.05$)。

Collagen I、Collagen IV 是肝纤维化形成的重要指标, α -SMA 是 HSC 活化的有效指标。采用 Western

blotting 检测肝组织 Collagen I、Collagen IV 和 α -SMA 蛋白表达, 如图 2-E、F 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 Collagen I、Collagen IV 和 α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠肝组织 Collagen I、Collagen IV 和 α -SMA 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 沙苑子总黄酮可明显抑制 CCl₄ 诱导的小鼠 HSC 活化, 改善 HF 程度。

3.1.3 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝组织中铁代谢的影响 普鲁士蓝染色可以将组织中微量的铁染成棕色。如图 3-A、B 所示, 对照组小鼠肝组织可见少量棕黄色区域; 肝细胞清晰可见; 模型组小鼠肝组织可见广泛分布的点状斑块。与模型组比较, 沙苑子总黄酮各剂量组肝组织棕黄色面积显著减少 ($P < 0.05$)。铁是维持正常生理功能所必需的元素, 但过量蓄积会对肝脏产生毒性作用。如图 3-C、D 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中铁调素和铁水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 沙苑子总黄酮各剂量组铁调素和铁水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。如图 3-E 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 沙苑子总黄酮各剂量组小鼠肝组织中 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。



A-各组小鼠肝组织形态; B-肝组织 HE 染色 (×200), 红色箭头表示肝细胞脂肪变性, 黑色箭头表示炎症细胞浸润; C-肝组织 Masson 染色 (×100), 黄色箭头表示胶原沉积; D-各组肝组织胶原沉积面积 (n=6); E、F-Western blotting 检测肝组织 Collagen I、Collagen IV和 α-SMA 蛋白表达 (n=3)。

A-morphology of liver tissue in each group of mice; B-HE staining of liver tissue (× 200), red arrows indicate hepatic steatosis, and black arrows indicate inflammatory cell infiltration; C-Masson staining of liver tissue (× 100), yellow arrows indicate collagen deposition; D-collagen deposition area in liver tissue of each group (n = 6); E, F-expressions of Collagen I, Collagen IV and α-SMA proteins in liver tissue detected by Western blotting (n = 3).

图2 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝组织病理变化和 Collagen I、Collagen IV 和 α-SMA 蛋白表达的影响 (x̄ ± s)
 Fig. 2 Effect of TFACS on histopathological changes and protein expressions of Collagen I, Collagen IV and α-SMA in liver of CCl₄-induced HF mice (x̄ ± s)

TFRC 是介导铁离子进入细胞通道的关键成员之一, 在调节细胞铁代谢和维持铁平衡中发挥关键作用。研究表明, 下调 TFRC 表达可抑制铁的积累, 从而抑制铁死亡^[13]。如图 3-F、G 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 TFRC 蛋白表达水平显著升高 (P<0.05); 与模型组比较, 沙苑子总黄酮各剂量组小鼠肝组织 TFRC 蛋白表达水平显著降低 (P<0.05)。以上结果表明沙苑子总黄酮可能通过调节 HF 小鼠铁代谢和氧化应激, 从而改善 HF 程度。

3.2 沙苑子总黄酮对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖和活化的影响

如图 4-A 所示, 0.1~5 μg/mL 沙苑子总黄酮显

著抑制 HSC-T6 细胞的增殖 (P<0.05、0.01、0.001)。用 10 ng/mL TGF-β1 和不同质量浓度的沙苑子总黄酮处理 HSC-T6 细胞, 如图 4-B 所示, 与对照组比较, 模型组细胞存活率显著升高 (P<0.05); 与模型组比较, 0.1~5 μg/mL 沙苑子总黄酮显著抑制 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖 (P<0.05、0.01), 表明沙苑子总黄酮可抑制 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖。而在正常肝细胞 LO-2 中, 0.1~0.5 μg/mL 沙苑子总黄酮对 LO-2 细胞无明显毒性 (图 4-C), 1.0~10.0 μg/mL 沙苑子总黄酮显著抑制 LO-2 细胞活力 (P<0.05、0.01)。因此, 选用 0.2、0.5 μg/mL 沙苑子总黄酮进行后续机制研究。

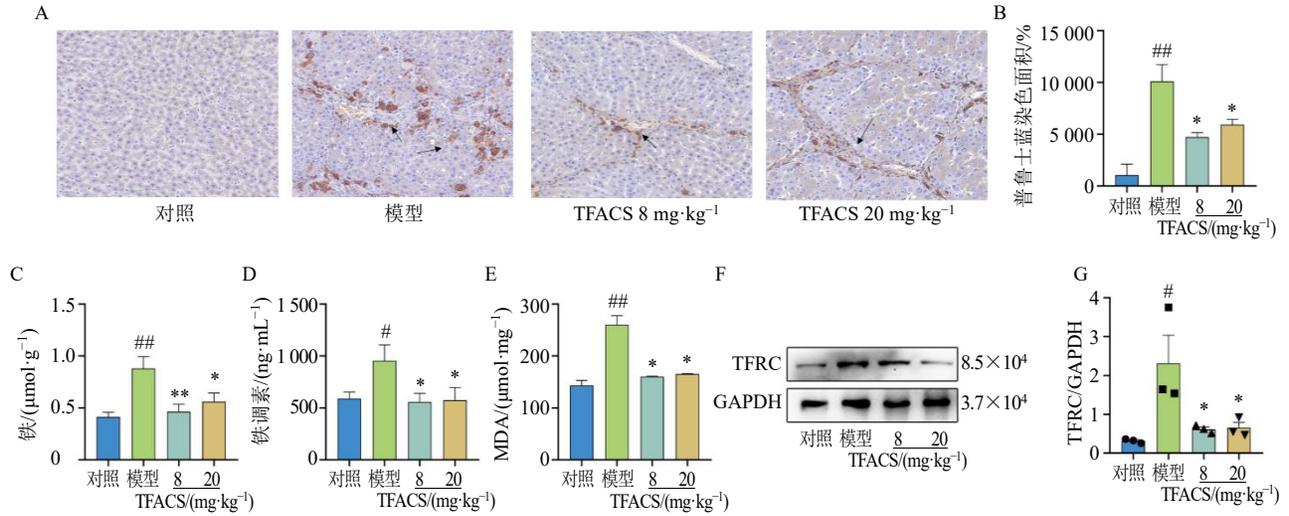


图3 沙苑子总黄酮对 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝组织中铁代谢的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 3 Effect of TFACS on iron metabolism in liver tissue of CCl₄-induced HF mice ($\bar{x} \pm s$)

A-肝组织普鲁士蓝染色 ($\times 200$), 箭头表示铁染色斑点; B-普鲁士蓝染色面积百分比 ($n=3$); C-肝组织铁含量 ($n=6$); D-肝组织铁调素含量 ($n=6$); E-肝组织 MDA 含量 ($n=6$); F、G-Western blotting 检测肝组织 TFRC 蛋白表达 ($n=3$)。A-Prussian blue staining of liver tissue ($\times 200$), arrows indicate iron staining spots; B-Prussian blue staining area percentage ($n=3$); C-iron content in liver tissue ($n=6$); D-hepcidin content in liver tissue ($n=6$); E-MDA content in liver tissue ($n=6$); F, G-TFRC protein expression in liver tissue detected by Western blotting ($n=3$).

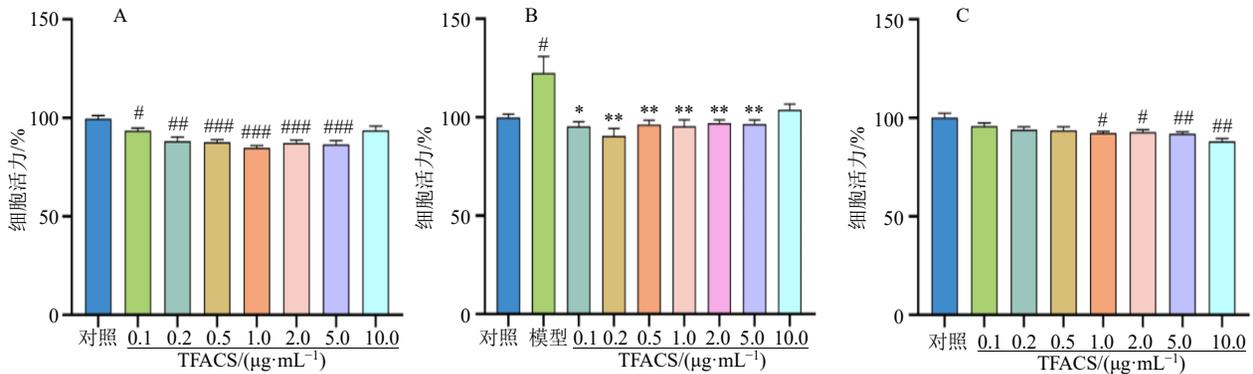


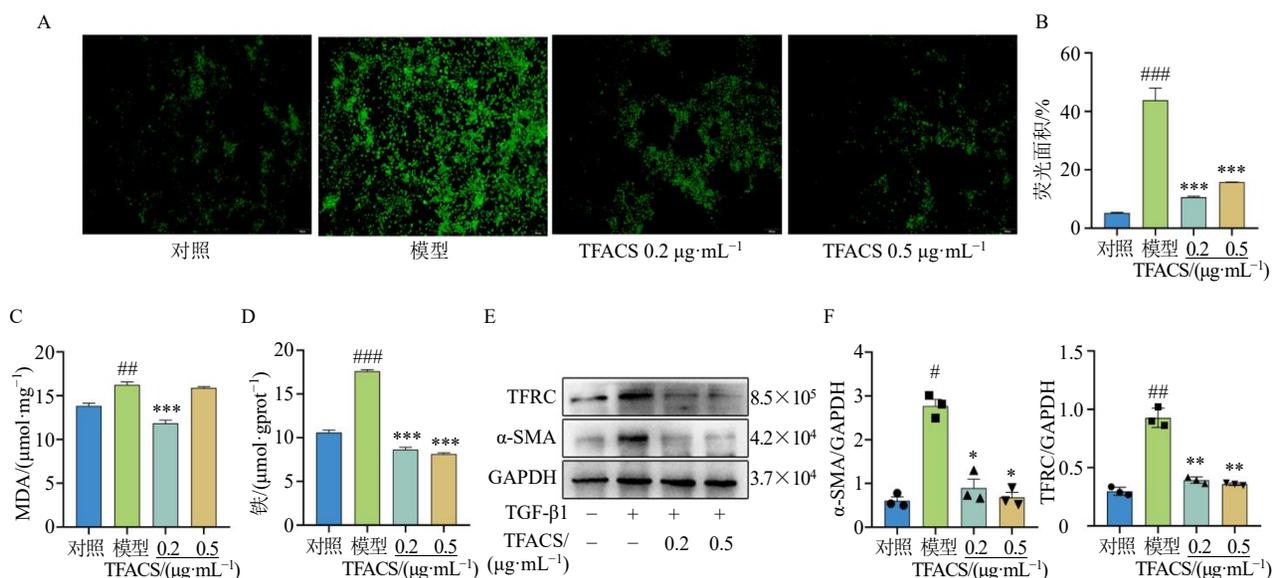
图4 沙苑子总黄酮对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞增殖和活化的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Fig. 4 Effect of TFACS on proliferation and activation of TGF- β 1-induced HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s$)

A-沙苑子总黄酮对 HSC-T6 细胞活力的影响 ($n=6$); B-沙苑子总黄酮对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞活力的影响 ($n=6$); C-沙苑子总黄酮对 LO-2 细胞活力的影响 ($n=6$)。A-effect of TFACS on viability of HSC-T6 cells ($n=6$); B-effect of TFACS on viability of HSC-T6 cells induced by TGF- β 1 ($n=6$); C-effect of TFACS on viability of LO-2 cells ($n=6$).

3.3 沙苑子总黄酮对 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞铁代谢的影响

如图 5-A~D 所示, 与对照组比较, 模型组 ROS、MDA 和铁水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 沙苑子总黄酮显著降低 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞中 ROS 和铁水平 ($P<0.001$), 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 沙苑子总黄酮显著降低 MDA 水平 ($P<0.001$)。

如图 5-E、F 所示, 与对照组比较, 模型组 HSC-T6 细胞中 TFRC 和 α -SMA 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 沙苑子总黄酮显著降低 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞中 TFRC 和 α -SMA 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。表明沙苑子总黄酮可以通过抑制 TFRC 的表达, 抑制氧化应激并调节铁代谢, 进而抑制 HSC 活化, 改善 HF。



A、B-ROS 水平 (×100, n=3); C-MDA 水平 (n=3); D-铁水平 (n=3); E、F-Western blotting 检测 α-SMA、TFRC 蛋白表达 (n=3)。
A, B-ROS level (× 100, n = 3); C-MDA level (n = 3); D-iron level (n = 3); E, F-α-SMA and TFRC protein expressions detected by Western blotting (n = 3).

图 5 沙苑子总黄酮对 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞铁代谢的影响 (x̄ ± s)

Fig. 5 Effect of TFACS on iron metabolism in TGF-β1-induced HSC-T6 cells (x̄ ± s)

4 讨论

HSCs 从静息状态到激活状态,进一步转化为肌成纤维细胞的过程是 HF 发生的关键^[14]。在此过程中,胶原纤维不断堆积,最终形成了严重的瘢痕。已有研究显示,抑制 HSCs 激活或诱导 HSCs 凋亡是防止 HF 向肝硬化乃至肝癌转化的重要途径^[15]。研究表明,黄酮类化合物可通过抑制 HSCs 激活和增殖、促进 HSCs 凋亡以及调节细胞基质沉积等,发挥抗 HF 的作用,如松树皮总黄酮通过调节细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 介导的自噬,下调 p-ERK1/2、自噬相关蛋白 LC3-II/I、Beclin 1 的表达,抑制 HSCs 激活^[16]。本研究在体内、外验证了沙苑子总黄酮抗 HF 活性,结果显示,在 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠模型中,沙苑子总黄酮能明显缓解 HF 小鼠肝组织中胶原纤维组织的增生和纤维化,减轻肝细胞水肿、坏死和炎性细胞浸润,增强肝功能,降低血清纤维化指标,降低肝组织中 Collagen I、Collagen IV 和 α-SMA 的表达;在 TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞中,沙苑子总黄酮可抑制细胞活力,降低 α-SMA 的表达。体内外实验表明沙苑子总黄酮可通过抑制 HSCs 活化改善 HF,但抑制 HSCs 活化的机制尚不明确。

铁的储存、排泄和再循环主要发生在肝脏^[17]。

肝脏中大量的铁离子沉积会导致脂质过氧化,增加 ROS 水平,对细胞和组织造成严重损伤^[18]。在生物体内铁离子主要以 Fe³⁺的形式与 TFRC 结合,经转运蛋白转运至胞内还原为 Fe²⁺,进而参与一系列的生理、生化过程。当机体铁代谢平衡失调时,过剩的 Fe²⁺堆积在细胞内,从而形成一个不稳定的铁池。Fe²⁺在芬顿过程中产生了大量的 ROS,这些 ROS 会导致细胞膜脂质过氧化,最终导致细胞的功能损伤和死亡^[16]。因此,维持体内铁代谢稳态是改善 HF 的关键。本研究通过免疫组化法和试剂盒测定了肝组织中 MDA 和铁离子的水平,结果显示,与对照组比较,CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝组织中铁染色面积显著升高,铁调素、铁水平以及 MDA 含量显著升高;与模型组比较,沙苑子总黄酮处理后明显减少了肝组织中铁染色面积,降低了铁调素、铁水平以及 MDA 含量。表明沙苑子总黄酮可通过抑制铁离子沉积,降低氧化应激来改善 HF。进一步采用 TGF-β1 诱导 HSC-T6 细胞活化,通过免疫荧光法和试剂盒测定了 HSC-T6 细胞中 ROS、MDA 含量和铁离子水平的变化,结果显示,与对照组比较,TGF-β1 诱导的 HSC-T6 细胞中 ROS、MDA 和铁离子含量显著增加;与模型组比较,沙苑子总黄酮处理后明显减少 ROS、MDA 以及铁的累积。表明沙苑子总黄酮可通过抑制 HSC-T6 细胞的铁代谢改善 HF。

TRFC 是一种位于细胞膜上的转铁蛋白受体,在调节细胞内铁浓度中起着至关重要的作用。TRFC 还监督铁的储存和利用,避免发生铁过载^[19]。为进一步验证维持铁代谢稳态在沙苑子总黄酮抗 HF 中的作用,本研究测定了 HF 小鼠和 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞中 TRFC 的表达情况。结果显示,沙苑子总黄酮能够显著下调 CCl₄ 诱导的 HF 小鼠肝组织和 TGF- β 1 诱导的 HSC-T6 细胞中 TRFC 的表达,表明沙苑子总黄酮可通过 TRFC 通路抑制铁代谢,减轻 HSCs 的活化,从而改善 HF。

在 HSCs 活化过程中,多种信号途径并非相互独立,而是相互协同、共同作用,形成了一种复杂的病理机制。因此,尽管在本研究中证实了 TRFC 所在的铁死亡信号通路在沙苑子总黄酮抗 HF 中的作用,但沙苑子总黄酮抑制 HSCs 活化的具体机制需要后续进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [2] Roehlen N, Crouchet E, Baumert T F. Liver fibrosis: Mechanistic concepts and therapeutic perspectives [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 875.
- [3] Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale J P, et al. Liver fibrosis and repair: Immune regulation of wound healing in a solid organ [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(3): 181-194.
- [4] Friedman S L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [5] 陆伦根, 尤红, 谢渭芬, 等. 肝纤维化诊断及治疗共识 (2019 年) [J]. *实用肝脏病杂志*, 2019, 22(6): 41-51.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 191.
- [7] Ng Y F, Tang P C, Sham T T, et al. *Semen Astragali Complanati*: An ethnopharmacological, phytochemical and pharmacological review [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 155(1): 39-53.
- [8] 罗小莉, 莫小春, 张强, 等. 沙苑子的化学成分及药理作用研究进展 [J]. *广西中医药大学学报*, 2020, 23(1): 72-75.
- [9] Chen L, Kong X, Zhou R N, et al. Proteomics reveals the pharmacological mechanism of flavonoids from *Astragali Complanati Semen* in preventing chronic liver injury [J]. *Phytomedicine*, 2024, 133: 155910.
- [10] Higashi T, Friedman S L, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42.
- [11] Gao H, Jin Z M, 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.
- [12] 方玲, 袁思雨, 彭灿, 等. 基于 HIF-1 α /SLC7A11 轴介导肝星状细胞铁死亡探讨香芹酚抗肝纤维化的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5494-5502.
- [13] Feng H Z, Schorpp K, Jin J, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker [J]. *Cell Rep*, 2020, 30(10): 3411-3423.
- [14] Hernandez-Gea V, Friedman S L. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-456.
- [15] 李浩, 吴勉华, 马艳霞, 等. 中药调控铁死亡抑制肝纤维化的研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2023, 39(6): 587-593.
- [16] 杨淑娟, 何英利, 马晓华, 等. 碧萝芷通过下调 ERK 磷酸化及自噬水平抑制 TGF- β 1 诱导的肝星状细胞活化 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(12): 2261-2265.
- [17] Regenboog M, Bohte A E, Akkerman E M, et al. Iron storage in liver, bone marrow and splenic gaucheroma reflects residual disease in type 1 gaucher disease patients on treatment [J]. *Br J Haematol*, 2017, 179(4): 635-647.
- [18] Zhao T M, Yu Z H, Zhou L, et al. Regulating Nrf2-GPx4 axis by bicyclol can prevent ferroptosis in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 380.
- [19] 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.

[责任编辑 李亚楠]