

## 桃红四物汤抑制肝细胞双硫死亡改善肝纤维化的作用机制

霍子璇, 李佳楠<sup>#</sup>, 窦元枫, 徐喆, 曲姣蓉\*, 李晓骄阳\*

北京中医药大学生命科学院, 北京 100029

**摘要:** 目的 探讨桃红四物汤改善硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 诱导的肝细胞新型死亡模式——双硫死亡, 从而干预肝纤维化进展的作用机制。方法 利用高效液相色谱仪对桃红四物汤进行成分分析。建立 TAA 诱导的小鼠肝纤维化模型和 AML12 肝细胞模型, 给予桃红四物汤干预后, 采用转录组测序、生物信息学、qRT-PCR 和免疫荧光法探究桃红四物汤抑制肝细胞双硫死亡的作用机制。结果 TAA 可诱导双硫死亡标志基因如溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, *Slc7a11*)、溶质载体家族 3 成员 2 (solute carrier family 3 member 2, *Slc3a2*)、细丝蛋白 A (filamin A, *Flna*)、肌球蛋白重链 9 (myosin heavy chain 9, *Myh9*)、肌球蛋白重链 10 (myosin heavy chain 10, *Myh10*)、NCK 关联蛋白 1 (NCK associated protein 1, *Nckap1*) 及纤维化相关基因如肌动蛋白  $\alpha 2$  (actin alpha 2, *Acta2*)、I 型胶原蛋白  $\alpha 1$  链 (collagen type I alpha 1 chain, *Colla1*)、金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, *Timp1*) 表达显著上调 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ), 伴随 F-actin 收缩及烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,  $\text{NADP}^+$ )/NADPH 值升高 ( $P < 0.01$ )。给予桃红四物汤干预后, 细胞骨架基因 *Flna*、*Myh9*、*Myh10*、*Nckap1* 及肝纤维化相关基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ),  $\text{NADP}^+$ /NADPH 值显著降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞骨架的形态恢复。结论 桃红四物汤可通过有效缓解 TAA 诱导的肝细胞双硫死亡延缓肝纤维化进展, 为相关疾病及并发症的临床治疗提供理论依据。

**关键词:** 桃红四物汤; 肝纤维化; 双硫死亡; 肝细胞; 细胞骨架; F-actin

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)18-6632-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.18.013

## Mechanism of Taohong Siwu Decoction in inhibiting hepatocyte disulfidptosis and improving liver fibrosis

HUO Zixuan, LI Jianan, DOU Yuanfeng, XU Zhe, QU Jiaorong, LI Xiaojiaoyang

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

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism by which Taohong Siwu Decoction (桃红四物汤) ameliorates thioacetamide (TAA)-induced liver fibrosis via intervening in hepatocyte disulfidptosis, a novel model of hepatocyte death. **Methods** High performance liquid chromatography was used to analyze the components of Taohong Siwu Decoction. TAA-induced mouse liver fibrosis model and AML12 liver cell model were established, and after intervention with Taohong Siwu Decoction, the mechanism of Taohong Siwu Decoction in inhibiting hepatocyte disulfidptosis was investigated using transcriptome sequencing, bioinformatics, qRT-PCR and immunofluorescence methods. **Results** TAA could induce the up-regulation of disulfidptosis marker genes such as solute carrier family 7 member 11 (*Slc7a11*), solute carrier family 3 member 2 (*Slc3a2*), filamin A (*Flna*), myosin heavy chain 9 (*Myh9*), myosin heavy chain 10 (*Myh10*), NCK associated protein 1 (*Nckap1*) and fibrosis related genes such as actin alpha 2 (*Acta2*), collagen type I alpha 1 chain (*Colla1*), tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (*Timp1*) expressions ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ), accompanied by F-actin contraction and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ( $\text{NADP}^+$ )/NADPH value increased ( $P < 0.01$ ). After intervention with Taohong Siwu Decoction, the expressions of cytoskeletal genes *Flna*, *Myh9*, *Myh10*, *Nckap1* and liver fibrosis related genes were significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ), and  $\text{NADP}^+$ /NADPH value was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), the morphology

收稿日期: 2025-06-30

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (82404984); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2024-JYB-JBZD-055)

作者简介: 霍子璇, 硕士研究生, 研究方向为中药防治肝纤维化。E-mail: hzx13081839882@163.com

#共同第一作者: 李佳楠, 硕士研究生, 研究方向为中药防治胆汁淤积性肝损伤。E-mail: lijn0107@163.com

\*通信作者: 李晓骄阳, 教授, 博士生导师, 从事抗肝纤维化相关中药药理研究。E-mail: xiaojiaoyang.li@bucm.edu.cn

曲姣蓉, 讲师, 研究方向为中药及天然产物防治重度肝胆疾病。E-mail: qujiaorong@bucm.edu.cn

of cytoskeleton was restored. **Conclusion** Taohong Siwu Decoction could effectively alleviate TAA-induced hepatocyte disulfidptosis and delay the progression of liver fibrosis, providing a theoretical basis for the clinical treatment of related diseases and complications.

**Key words:** Taohong Siwu Decoction; liver fibrosis; disulfidptosis; hepatocytes; cytoskeleton; F-actin

肝纤维化以细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积累和纤维瘢痕形成为特征, 其诱因包括化学刺激、炎症蓄积、病毒感染等。我国包括肝纤维化在内的慢性肝病的死亡率约占全球 1/3<sup>[1-2]</sup>。在肝纤维化研究中, 已经有很多研究聚焦细胞的程序性死亡机制<sup>[3-4]</sup>。2023 年, 一种新型的细胞死亡模式——双硫死亡 (disulfidptosis) 被正式提出。该研究指出在葡萄糖饥饿条件下, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 供应受限, 此时如果细胞通过 system X 大量摄入胱氨酸, 将导致胱氨酸和其他二硫化物分子过度积累, 并在肌动蛋白骨架蛋白中形成异常二硫化物键, 最终导致肌动蛋白网络崩溃和双硫死亡<sup>[5]</sup>。其核心特点是细胞内异常积累的二硫化物诱发二硫化物应激, 细胞骨架中的二硫键含量异常, 最终破坏氧化还原稳态及细胞骨架的稳态导致细胞崩解。因此, 胱氨酸转运体蛋白溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 及溶质载体家族 3 成员 2 (solute carrier family 3 member 2, SLC3A2) 的高表达、NADPH 的耗竭、RAC1-WRC-F-actin 通路的激活均是双硫死亡发生的必要环节, 并由此与其他死亡模式区分。硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 破坏脂质代谢平衡诱导肝细胞损伤, 长期干预会导致 ECM 异常沉积。暴露于 TAA 下 6 周的大鼠, 其肝内糖酵解酶活性降低、线粒体呼吸延迟、葡萄糖醛酸化升高、磷酸戊糖途径激活以及肝细胞葡萄糖摄取能力损伤, 同时伴有抗氧化活性和大鼠肝脏氧化应激的发生<sup>[6]</sup>。这种葡萄糖糖耗竭的肝脏环境提示肝脏内可能发生了双硫死亡, 然而仍需要更多补充证据来证实。

桃红四物汤具有很强的活血化瘀、通络止痛的功效<sup>[7]</sup>。本课题组前期研究发现桃红四物汤及其加减方能够激活线粒体自噬、恢复细胞骨架稳态从而改善肝细胞损伤及肝纤维化<sup>[8-10]</sup>。此外, 有大量的药理学研究表明, 桃红四物汤中活性成分 (如阿魏酸、芍药苷、羟基红花黄色素 A 等) 具有调控多模式细胞死亡过程, 引导细胞命运的作用<sup>[11-13]</sup>。上述研究提示桃红四物汤可能具有调控细胞骨架的作用且参与调控双硫死亡这一新型死亡模型, 然而缺乏相

关研究证据。本研究采用 TAA 诱导的肝纤维化小鼠模型和体外肝细胞模型, 探究桃红四物汤对肝细胞双硫死亡的介入作用, 并揭示桃红四物汤对细胞骨架的调控作用, 明确该作用是否是桃红四物汤缓解肝细胞双硫死亡的核心机制, 从缓解新型肝细胞死亡模型视角为中药抗肝纤维化药理作用补充全新内涵。

## 1 材料

### 1.1 动物与细胞

SPF 级 C57BL/6J 小鼠, 8 周龄, 雌雄各半, 体重 22~24 g, 购自斯贝福 (北京) 生物技术有限公司, 许可证号 SCXK (京) 2024-0001。动物饲养于北京中医药大学动物中心, 温度 (22±2) °C, 相对湿度 (40±10) %, 12 h 光照/12 h 黑暗, 自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号 BUCM-2025031009-1150)。

小鼠 AML12 肝细胞 (批号 CRL-2254) 购自 ATCC。

### 1.2 药材

桃红四物汤由熟地黄、当归、白芍、川芎、桃仁、红花组成, 所有饮片均购自北京同仁堂 (集团) 有限公司, 经北京中医药大学中药学院中药药理教研室刘闰平教授鉴定分别为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根的炮制加工品、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 的干燥种子、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥管状花。

### 1.3 药品与试剂

硫代乙酰胺 (批号 A2121014, 质量分数 ≥98%) 及对照品地黄苷 (批号 M650989, 质量分数 ≥99%)、阿魏酸 (批号 A33754, 质量分数 ≥99%)、芍药苷 (批号 A04832, 质量分数 ≥99%)、苦杏仁苷 (批号 A22696, 质量分数 ≥98%)、羟基红花黄色素 A (批号 A889918, 质量分数 ≥98%) 购自阿拉丁试剂 (上海) 有限公司; 无水乙醇、异丙醇购自北京正程生物科技有限公司; 辅酶 II (NADP<sup>+</sup>/NADPH) 含量

测试盒(批号 20240409)购自南京建成生物工程研究所; Phalloidin 罗丹明标记鬼笔环肽(批号 20241221)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 K001123110)购自北京百瑞极生物科技有限公司。

## 1.4 仪器

R500 型麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司); SHE-3000 型酶标仪(赛尔福医疗科技北京有限公司); C1000 Touch 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); Centrisart® D-16C 型离心机(德国赛多利斯公司); 8000 系列直热式 CO<sub>2</sub> 孵育器(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); F6/10 型匀浆仪(上海净信实业发展有限公司); Nano-800+型微量核酸蛋白测定仪(上海嘉鹏科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 桃红四物汤冻干粉的制备

按照 4:3:3:3:2:2 的比例,分别称取熟地黄、当归、白芍、桃仁、川芎、红花 36、27、27、27、18、18 g,用打粉机打成细碎的粉末状后装入空药包,加入超纯水 2 L 没过药包,在圆底烧瓶静置浸泡 1.5 h,之后加热回流 1.5 h,滤过;药渣以同样的方法再煮 1.5 h,滤过,合并 2 次滤液,抽滤,旋蒸浓缩至 50 mL,装入冻干碗转移至-80 °C 冰箱冷冻过夜。次日,放入冷冻干燥机中,直至水分全部蒸发,变为粉末状,冻干粉末于-20 °C 冰箱保存备用。

### 2.2 桃红四物汤的成分分析

桃红四物汤冻干粉以蒸馏水制备成质量浓度为 5 mg/mL 的溶液,并用 0.22 μm 过滤器滤过,通过 HPLC-UV 对桃红四物汤进行成分分析。Ultimate AQ-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.1%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~15 min, 1% B; 15~25 min, 1%~14% B; 25~65 min, 14%~40% B; 65~75 min, 40%~60% B; 75~85 min, 60% B。体积流量 0.8 mL/min;进样体积 10 μL;检测波长 203 nm。

### 2.3 动物实验

#### 2.3.1 动物分组、造模与给药

(1) TAA 诱导的肝纤维化模型: C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和桃红四物汤低、中、高剂量(4.25、8.50、17.00 g/kg)组<sup>[9]</sup>,每组 8 只。小鼠连续 6 周 ip TAA 诱导肝纤维化模型,第 1 周注射剂量为 100 mg/kg,第 2 周注射剂量为 200

mg/kg,第 3 周开始注射剂量为 300 mg/kg。造模 1 h 后 ig 桃红四物汤,对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续给药 6 周。给药结束后,麻醉小鼠,下腔静脉取血,分离肝脏组织。

(2) 胆总管结扎(bile duct ligation, BDL)诱导的肝纤维化模型<sup>[8]</sup>: C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和模型组,每组 8 只。模型组小鼠利用异氟烷气体进行麻醉,在会阴上 1 cm 处剪开皮肤开口,暴露腹腔脏器,分离胆总管,用 5-0 手术缝合线结扎胆总管,结束后缝合各层组织。对照组同样进行腹部组织切开及缝合,但不结扎胆总管。造模结束后,麻醉小鼠,下腔静脉取血,分离肝脏组织。

(3) 四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)诱导的肝纤维化模型<sup>[4]</sup>: C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和模型组,每组 8 只。模型组小鼠 ig CCl<sub>4</sub> (1.6 mg/kg) 诱导肝纤维化模型,每 3 天 1 次,连续 4 周。对照组 ig 等体积的生理盐水。造模结束后,麻醉小鼠,下腔静脉取血,分离肝脏组织。

**2.3.2 肝脏病理变化观察** 各组肝脏组织于 4%多聚甲醛中固定后,脱水,石蜡包埋,切片,分别进行苏木素-伊红(HE)和天狼星红染色,于光学显微镜下观察并拍照。

**2.3.3 生物信息学分析** 按照试剂盒说明书提取小鼠肝脏组织总 RNA,将提取的核酸片段化,加上测序接头,构建可供测序的文库。使用 Illumina 测序平台进行双端测序,根据得到的测序基因结果,按照 *P* 值的大小筛选出适合的基因并导入到 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),选择物种为“Mus musculus”,进行基因本体(gene ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,根据 *P* 值排序,筛选出涉及的主要生物过程及信号通路,GO 分析取前 10 位、KEGG 分析取前 20 位结果。对数据进行可视化处理,利用 R 语言绘制 GO 分析条形图及 KEGG 富集分析气泡图。使用微生信网站(<https://www.bioinformatics.com.cn>)对差异基因绘制热图以及火山图。

**2.3.4 qRT-PCR 检测相关基因表达** 按照试剂盒说明书提取肝脏组织总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析。引物序列:肌动蛋白 α2(actin α2, Acta2)上游引物 5'-GCGTGGCTATTCCTTCGTG-ACTAC-3',下游引物 5'-TCAGGCAGTTCGTAG-CTCTTCTCC-3'; I 型胶原 α1 链(collagen type I

alpha 1 chain, *Colla1*) 上游引物 5'-TGAACGTGGTGTACAAGGTC-3', 下游引物 5'-CCATCTTTACCAGGAGAACCAT-3'; 基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, *Timp1*) 上游引物 5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAA-GACC-3', 下游引物 5'-CTCCAGTTTGCAAGG-GATAGAT-3'; *Slc7a11* 上游引物 5'-CTATTTTACC-ACCATCAGTGCG-3', 下游引物 5'-ATCGGGACTGCTAATGAGAATT-3'; *Slc3a2* 上游引物 5'-CTATTTTACCACCATCAGTGCG-3', 下游引物 5'-ATCGGGACTGCTAATGAGAATT-3'; 细丝蛋白 A (filamin A, *Flna*) 上游引物 5'-GGAGTGCCAGCGGAGTTCG-3', 下游引物 5'-GCCACACCACAGGAGCCATC-3'; 肌球蛋白重链 9 (myosin heavy chain 9, *Myh9*) 上游引物 5'-GATCAATGTGACCGACTTCAC-3', 下游引物 5'-AAAGTCAGCCTGCTCTTTAGTC-3'; 肌球蛋白重链 10 (myosin heavy chain 10, *Myh10*) 上游引物 5'-TCGAGTGGAACCTTTATCGACTT-3', 下游引物 5'-CCTGAACCAGCTTTTCAACAAA-3'; NCK 关联蛋白 1 (NCK associated protein 1, *Nckap1*) 上游引物 5'-GGAAGCTAGCTCTTCAGAGTAG-3', 下游引物 5'-AGTTCTTTTAGTGACAGACCGTA-3'; *Hprt1* 上游引物 5'-CCGAGGATTTGGAAAAAGTGTT-3', 下游引物 5'-CATCTCCTTCATGACATCTCGA-3'。以 *Hprt1* 作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各基因的相对表达量。

## 2.4 细胞实验

**2.4.1 桃红四物汤含药血清的制备** 将 4 只雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组和桃红四物汤 (18 g/kg) 组<sup>[15]</sup>, 每组 2 只。小鼠 ig 生理盐水或桃红四物汤, 2 次/d, 连续给药 3 d。末次给药后 1 h, 下腔静脉取血。将血样于室温静置 1 h, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 置于 56 °C 恒温水浴锅中 30 min 以灭活血清, 用 0.22 μm 微孔滤膜进行滤过除菌, 于 -80 °C 保存备用。根据预实验结果采用 5%、10%、15% 含药血清进行后续实验。

**2.4.2 细胞分组及处理** AML12 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。设置对照组、模型组和桃红四物汤低、中、高剂量 (5%、10%、15% 含药血清) 组, 待细胞完全贴壁后, 加入 TAA (50 mmol/L) 处理 1 h, 再加入含药血清处理 24 h。

**2.4.3 NADP<sup>+</sup>/NADPH 水平的检测** 按“2.4.2”项下方法进行分组和给药, 根据试剂盒说明书测定 NADP<sup>+</sup>/NADPH 水平。

**2.4.4 qRT-PCR 检测 *Flna*、*Myh9*、*Myh10*、*Nckap1* 基因表达** 按“2.4.2”项下方法进行分组和给药, 收集细胞, 按“2.3.4”项下方法检测相关基因表达。

**2.4.5 免疫荧光观察细胞骨架形态** 按“2.4.2”项下方法进行分组和给药, 将细胞爬片放置于多聚甲醛中固定 1 h 后, 加入稀释后的罗丹明标记鬼笔环肽染色剂 (1:200), 孵育 2 h 后, 于共聚焦显微镜下观察并拍照。

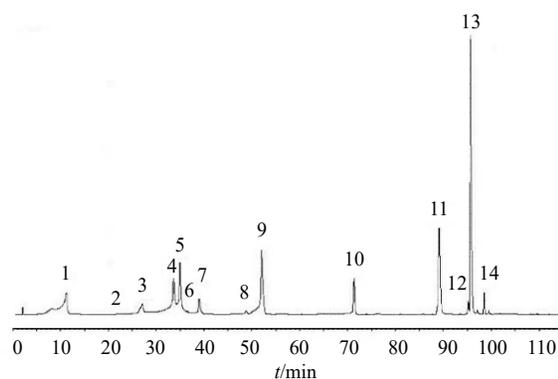
## 2.5 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行处理及分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

## 3 结果

### 3.1 桃红四物汤的成分分析

HPLC 结果显示, 在本研究中所制备的桃红四物汤水提物中共鉴定出 14 种代表性生物活性成分 (图 1), 其中毛蕊花糖苷、地黄苷 D 是熟地黄标志性成分, 阿魏酸是当归标志性成分, 苯甲芍药苷、芍药苷、氧化芍药苷是白芍标志性成分, 苦杏仁苷是桃仁标志性成分, 洋川芎内酯 A、川芎嗪是川芎标志性成分, 羟基红花素是红花标志性成分。其标志性成分含量在多批次桃红四物汤水提物中的稳定性较好 (表 1)。



1-5-羟甲基糠醛; 2-毛蕊花糖苷; 3-川芎嗪; 4-绿原酸; 5-氧化芍药苷; 6-苦杏仁苷; 7-羟基红花素; 8-芍药苷; 9-阿魏酸; 10-地黄苷 D; 11-槲皮素; 12-苯甲芍药苷; 13-山柰酚; 14-洋川芎内酯 A。  
1-5-hydroxymethylfurfural; 2-acteoside; 3-tetramethylpyrazine; 4-chlorogenic acid; 5-oxypaeoniflorin; 6-amygdalin; 7-hydroxysafflor yellow A; 8-paeoniflorin; 9-ferulic acid; 10-rehmannioside D; 11-quercetin; 12-benzoylpaeoniflorin; 13-kaempferol; 14-senkyunolide A.

图 1 桃红四物汤的 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of Taohong Siwu Decoction

表 1 桃红四物汤中 5 个标志性成分的含量

Table 1 Contents of five marker components in Taohong Siwu Decoction

批号	地黄苷 D/%	阿魏酸/%	芍药苷/%	苦杏仁苷/%	羟基红花黄色素 A/%
S1	0.190	0.502	0.655	1.254	0.337
S2	0.210	0.524	0.578	1.223	0.296
S3	0.180	0.537	0.573	1.301	0.315

### 3.2 桃红四物汤抗肝纤维化的药效作用

肝脏 HE 和天狼星红染色结果 (图 2) 显示, 与对照组比较, 模型组可见明显的肝汇管区结构破坏, 并且伴有大量炎性细胞浸润和胶原沉积; 经桃红四物汤治疗后, 上述病理损伤均出现不同程度改善。采用 qRT-PCR 检测各组肝脏中肝纤维化相关基因 *Acta2*、*Colla1*、*Timp1* 的表达水平 (图 3), 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝脏中肝纤维化相关基因 *Acta2*、*Colla1*、*Timp1* 表达水平显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 桃红四物汤高剂量组肝脏中 *Acta2*、*Colla1*、*Timp1* mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 提示桃红四物汤能够抑制胶原合成以改善肝纤维化。

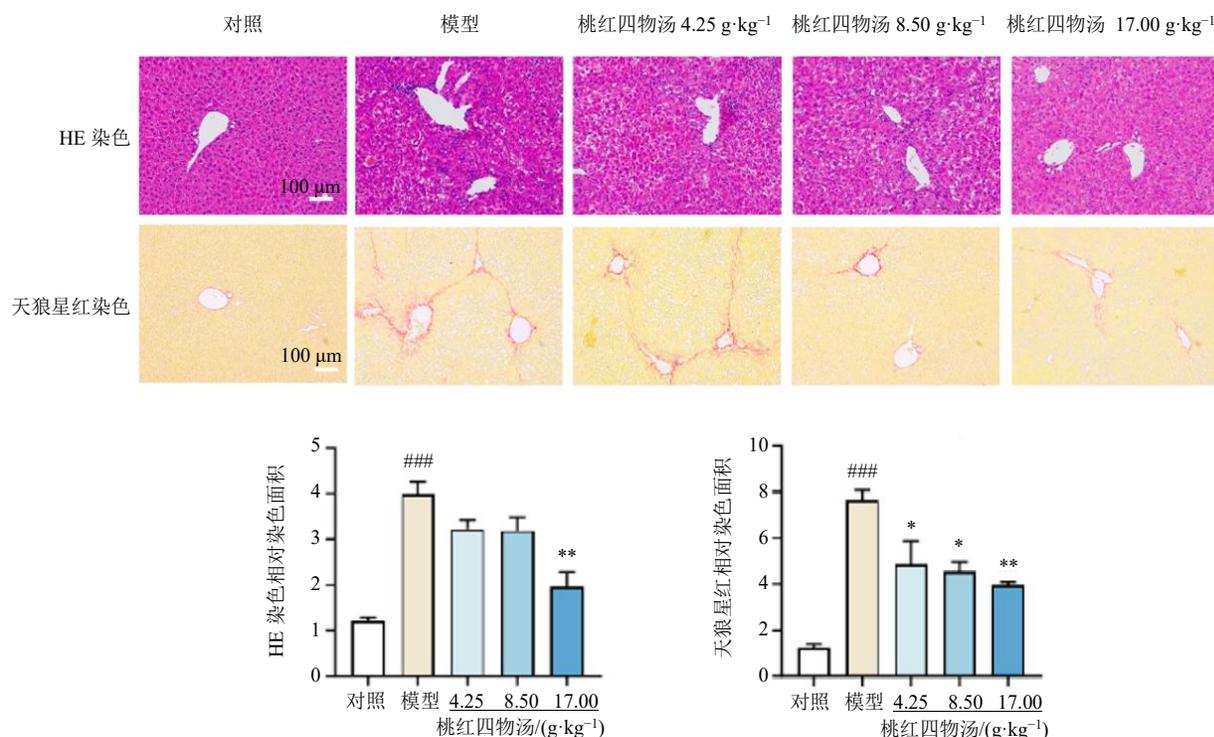
### 3.3 转录组测序分析与体内实验验证

对小鼠肝脏进行转录组测序以研究桃红四物

汤抗肝纤维化的作用机制, 按照  $P < 0.05$  筛选出 588 个差异基因, GO 分析结果显示差异基因富集于肌动蛋白细胞骨架、细胞黏附相关过程 (图 4-A)。GSEA 富集分析显示, 桃红四物汤显著下调了硫氨基酸代谢通路基因 (图 4-B)。提示桃红四物汤可能参与调节与双硫死亡密切相关的生物过程。

双硫死亡相关基因火山图 (图 5-A) 结果显示, 与对照组比较, 模型组双硫死亡的关键性基因 *Slc7a11*、*Slc3a2*、*Flna*、*Myh9*、*Myh10*、*Nckap1* 均呈上调趋势 (图 5-A)。热图 (图 5-B) 结果显示, 给予桃红四物汤治疗后, 双硫死亡的关键性基因 *Slc7a11*、*Slc3a2*、*Flna*、*Myh9*、*Myh10*、*Nckap1* 表达均降低。

采用 qRT-PCR 检测各组小鼠肝脏中双硫死亡的关键性基因表达, 结果如图 6-A 所示, 与对照组



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ , 下图同。

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group, same as below figures.

图 2 各组小鼠肝脏病理变化 (×20)

Fig. 2 Pathological changes in liver of mice in each group (×20)

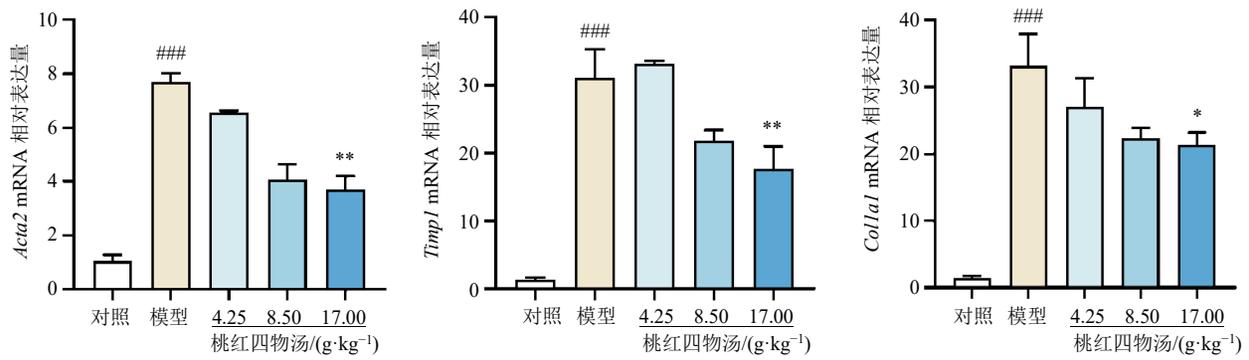


图3 各组小鼠肝脏肝纤维化相关基因表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Expression levels of liver fibrosis related genes in liver of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

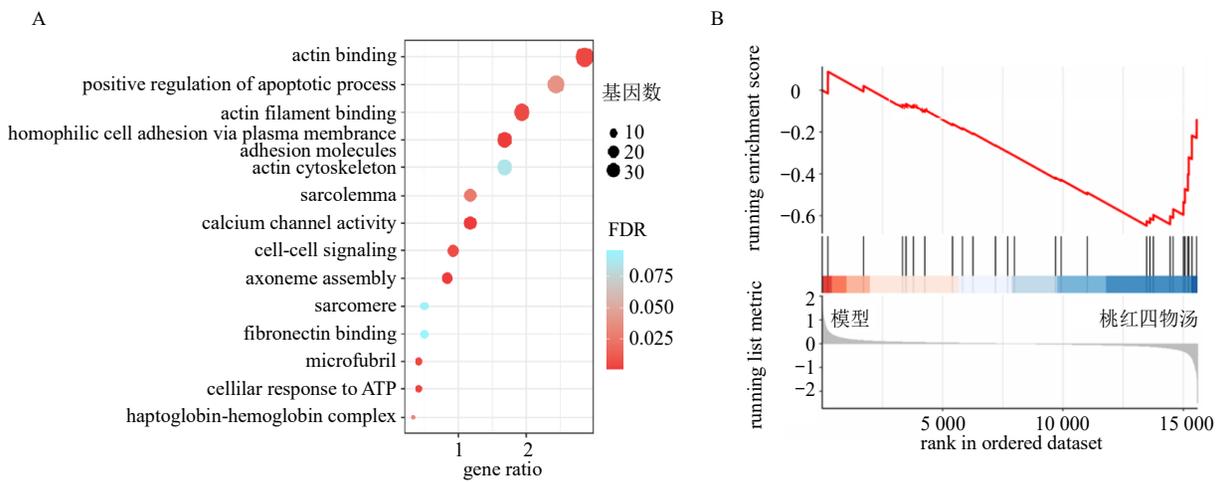


图4 差异基因的GO (A) 及GSEA (B) 分析结果

Fig. 4 GO (A) and GSEA (B) analysis results of differentially expressed genes

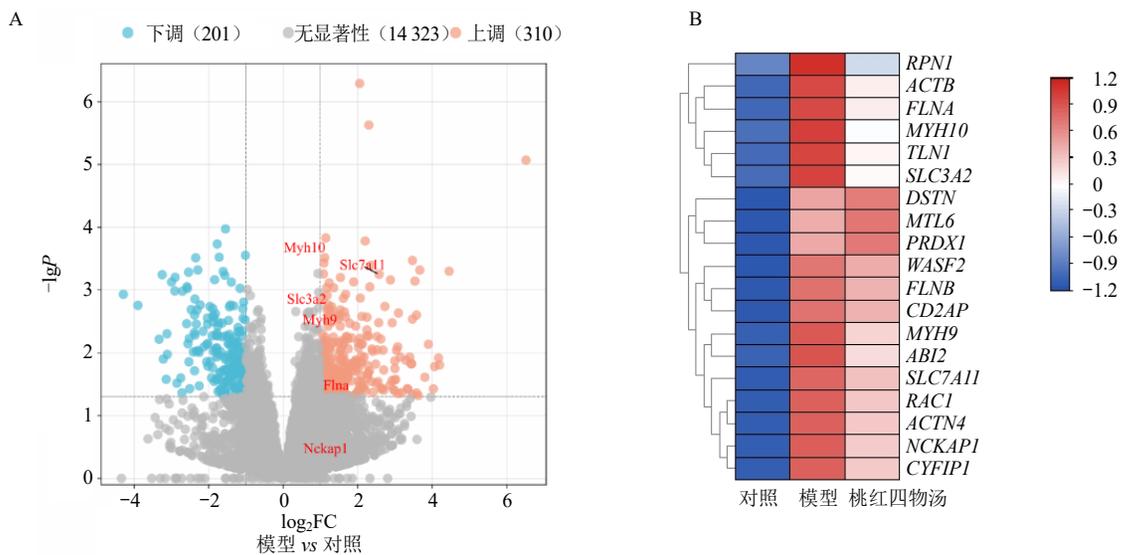


图5 双硫死亡相关基因火山图 (A) 及热图 (B)

Fig. 5 Volcano plot (A) and heatmap (B) of genes associated with disulfidptosis

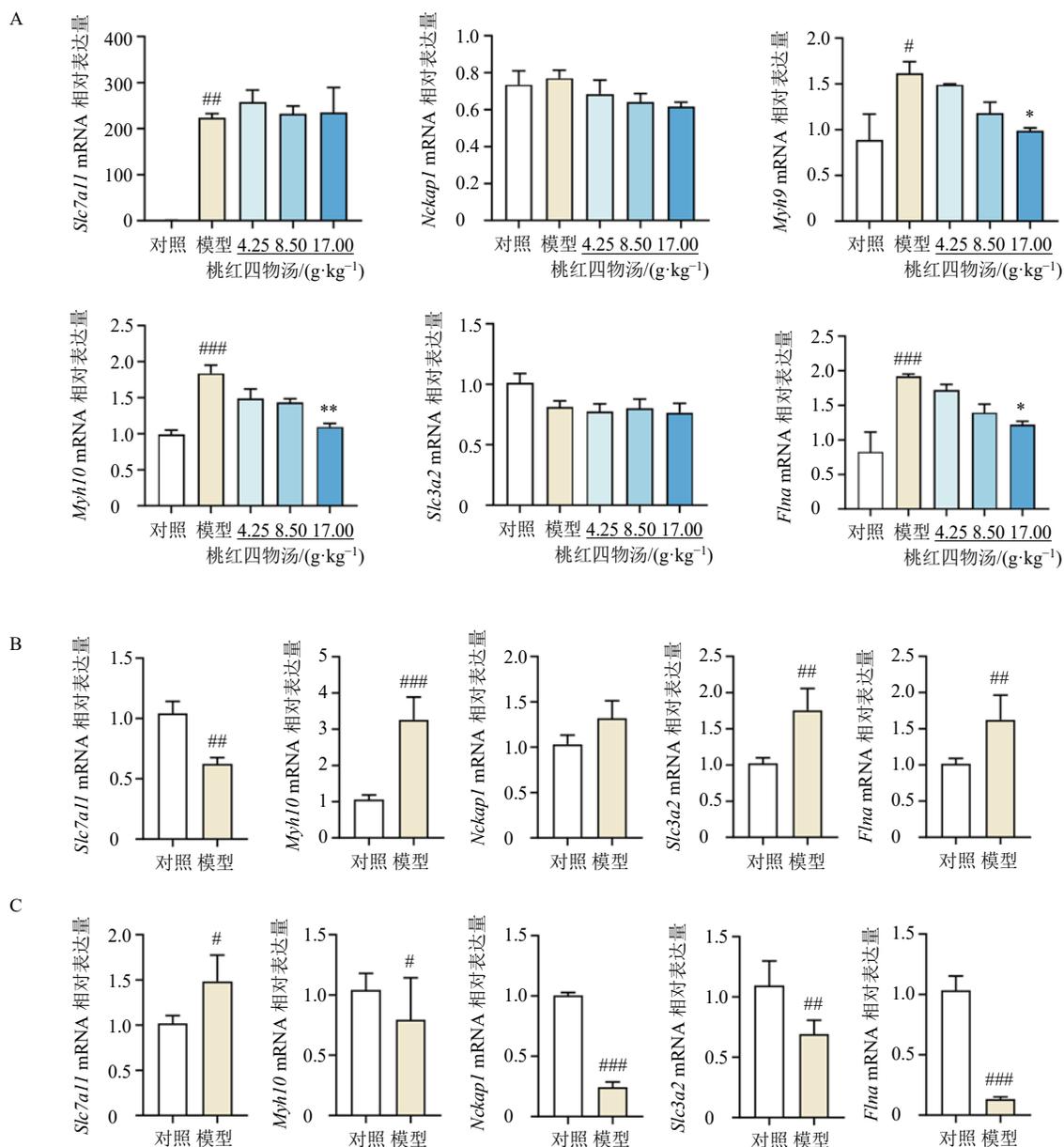


图 6 TAA (A)、CCl<sub>4</sub> (B)、BDL (C) 诱导的肝纤维化模型肝脏双硫死亡相关基因表达水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 6 Expression levels of disulfidptosis-related genes in liver of TAA (A), CCl<sub>4</sub> (B) and BDL (C) induced liver fibrosis models ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

比较, 模型组小鼠肝脏中 *Slc7a11* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明 TAA 可能导致葡萄糖应用障碍, *Slc7a11* 表达的显著上调为双硫死亡提供了必要条件; 给予桃红四物汤干预后, *Slc7a11* 或 *Slc3a2* 的表达无显著变化, 表明桃红四物汤并不干预 system X 系统。与对照组比较, 模型组中起到调控细胞骨架变化的基因 *Myh9*、*Myh10*、*Flna* 表达显著上调 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ); 给予高剂量的桃红四物汤干预后, *Myh9*、*Myh10*、*Flna* mRNA 表达水平显

著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 肌动蛋白聚合的 WAVE 调控复合体成员 *Nckap1* 表达降低, 提示桃红四物汤介入调控细胞骨架重塑基因表达。

同时关注双硫死亡是否存在于 CCl<sub>4</sub> 或 BDL 诱导的肝纤维化模型中, 结果见图 6-B、C, 与对照组比较, CCl<sub>4</sub> 诱导的肝纤维化模型小鼠肝脏中 *Myh10*、*Slc3a2*、*Flna* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), *Nckap1* mRNA 表达水平呈升高趋势, 而 *Slc7a11* mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ )。BDL

诱导的肝纤维化模型小鼠肝脏中 *Slc7a11* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 *Myh10*、*Nckap1*、*Slc3a2*、*Flna* mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001)。

### 3.4 桃红四物汤对 TAA 诱导的 AML12 细胞双硫死亡的影响

双硫死亡的发生有 3 个必需环节: ①胱氨酸转运体蛋白 *Slc7a11* 及 *Slc3a2* 的高表达; ②NADPH 的耗竭; ③RAC1-WRC-F-actin 通路的激活。进一步

在 TAA 诱导的 AML12 细胞中探讨桃红四物汤对双硫死亡的调节机制。

**3.4.1 桃红四物汤对胱氨酸转运体蛋白 mRNA 表达的影响** 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 *Slc7a11* 和 *Slc3a2* 的 mRNA 表达水平呈升高趋势; 与模型组比较, 高剂量的桃红四物汤含药血清对 *Slc7a11* 和 *Slc3a2* 的表达趋势并不一致, 表明桃红四物汤对双硫死亡的调控并不主要依赖抑制胱氨酸向肝细胞内转运的过程。

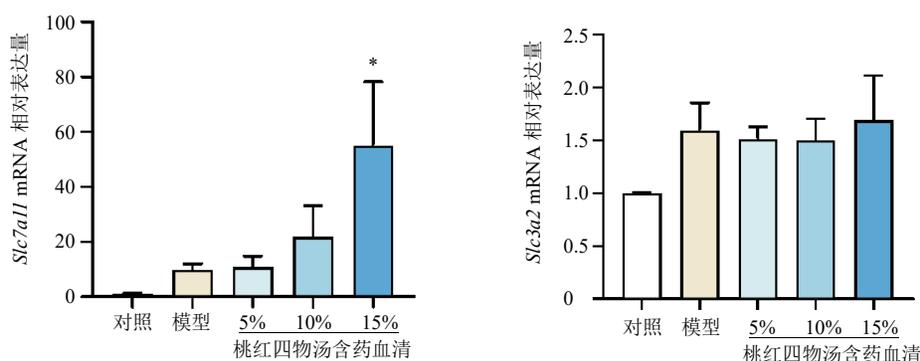


图 7 桃红四物汤对 TAA 诱导的 AML12 细胞胱氨酸转运体基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of Taohong Siwu Decoction on expressions of cysteine transporter genes in TAA-induced AML12 cells

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.4.2 桃红四物汤对 NADPH 含量的影响** 如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组  $NADP^+/NADPH$  值显著升高 ( $P < 0.01$ ), 表明此时能利用的 NADPH 缺乏; 与模型组比较, 桃红四物汤含药血清高剂量组  $NADP^+/NADPH$  值显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明桃红

四物汤可以有效改善 NADPH 的耗竭。

**3.4.3 桃红四物汤对肌动蛋白表达和细胞骨架的影响** 在双硫死亡过程中, 细胞骨架的形态会发生显著变化, 如 F-actin 的收缩、骨架解聚等, 这些变化将导致细胞解体死亡。因此, 采用 qRT-PCR 检测了导致 F-actin 垂直交联的 *Flna*、肌球蛋白 *Myh9*、*Myh10* 以及调节肌动蛋白聚合的 WAVE 调控复合体成员 *Nckap1* 的表达。结果如图 9 所示, TAA 诱导 AML12 细胞中 *Flna*、*Myh9*、*Myh10*、*Nckap1* 基因表达上调 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明细胞处于收缩状态; 与模型组比较, 桃红四物汤含药血清各剂量组 *Flna*、*Myh9*、*Myh10*、*Nckap1* 基因表达显著下调 ( $P < 0.05$ 、0.01、0.001), 与体内实验结果一致。进一步采用免疫荧光法观察细胞骨架形态, 结果如图 10 所示, 与对照组比较, 模型组 F-actin 发生大面积的收缩; 给予桃红四物汤含药血清干预后, 细胞骨架形态得到不同程度的恢复, 表明桃红四物汤可以缓解 TAA 诱导的 AML12 细胞骨架异常收缩。

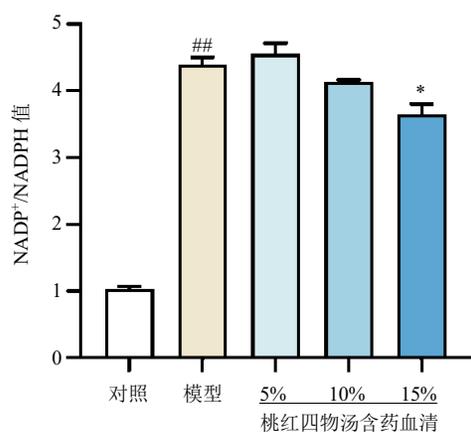


图 8 桃红四物汤对 TAA 诱导的 AML12 细胞  $NADP^+/NADPH$  值的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Effect of Taohong Siwu Decoction on  $NADP^+/NADPH$  value in TAA-induced AML12 cells

( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

## 4 讨论

肝纤维化为慢性肝损伤向肝硬化发展的关键

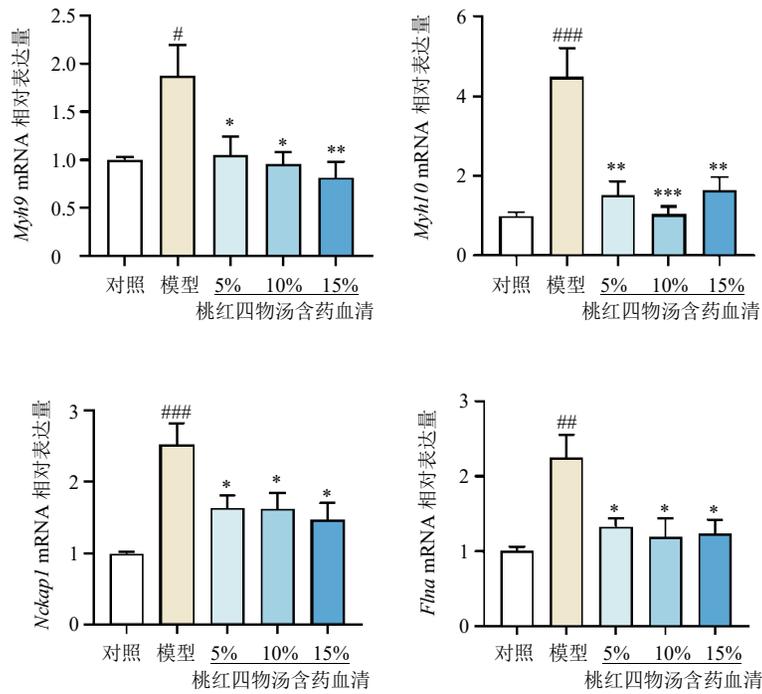


图 9 桃红四物汤对 TAA 诱导的 AML12 细胞肌动蛋白基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 Effect of Taohong Siwu Decoction on expressions of actin genes in TAA-induced AML12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

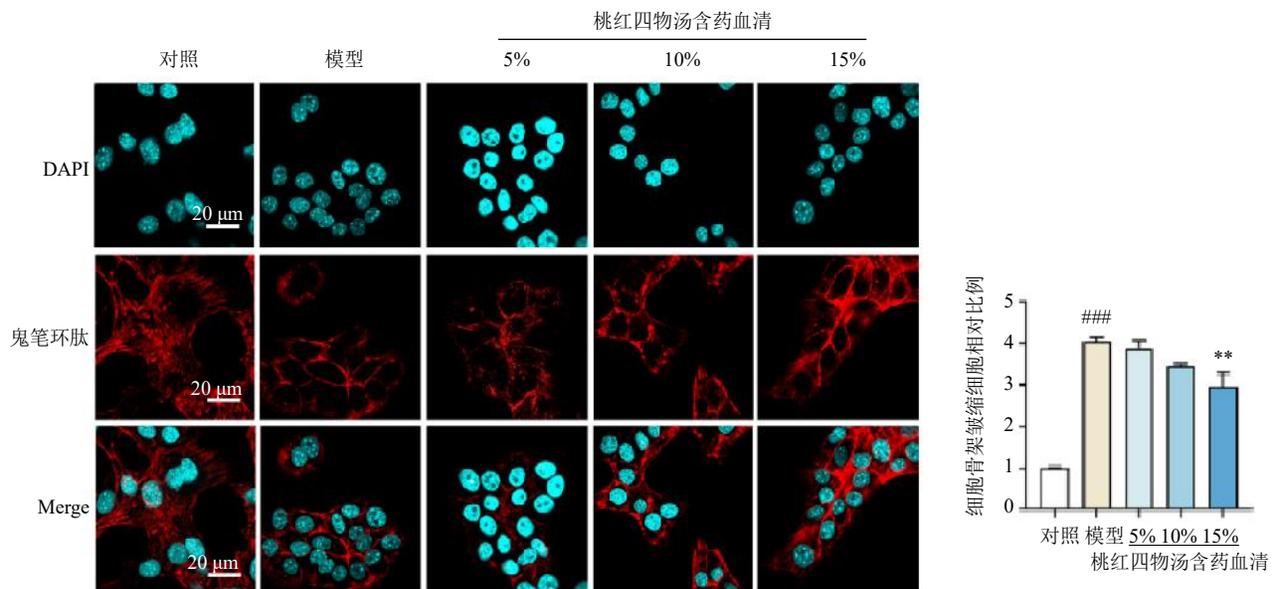


图 10 桃红四物汤对 TAA 诱导的 AML12 细胞细胞骨架的影响 ( $\times 100; \bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effect of Taohong Siwu Decoction on cytoskeleton of TAA-induced AML12 cells ( $\times 100; \bar{x} \pm s, n = 3$ )

病理阶段，传统肝纤维化治疗策略多集中于炎症抑制、氧化应激缓解或肝星状细胞（hepatic stellate cell, HSC）活化阻断<sup>[16-18]</sup>，而对调控细胞死亡模式的关注较少。近年来研究发现肝纤维化与肝细胞氧化应激及死亡模式异常密切相关<sup>[19]</sup>。本研究发现桃

红四物汤能够特异地抑制 TAA 诱导的新型细胞死亡程序——双硫死亡，有效保护肝脏发生纤维化后肝细胞减少双硫死亡，从而发挥抗肝纤维化的作用（图 11）。本研究既将中药干预新型细胞死亡机制相联系，也为肝纤维化治疗提供了新视角。

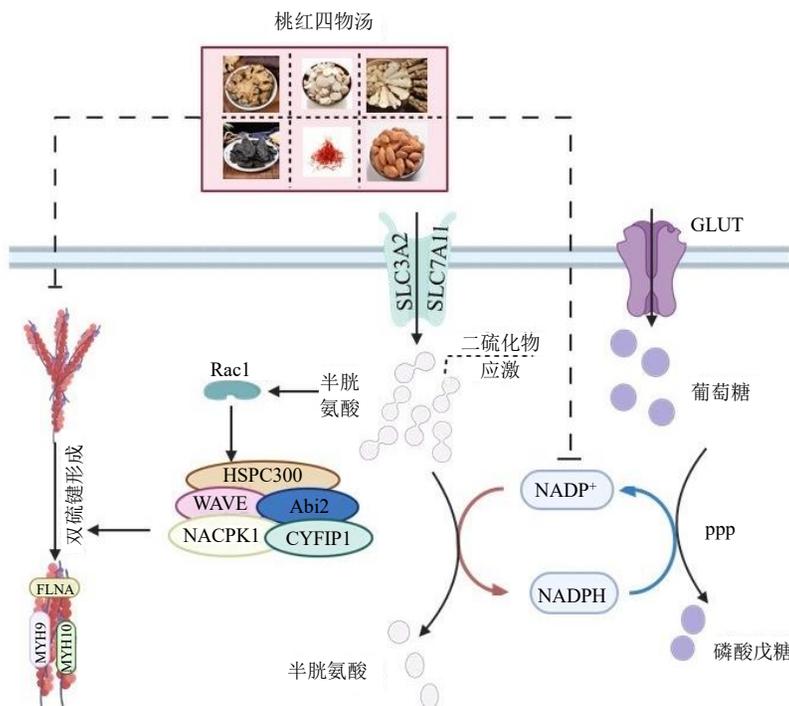


图 11 桃红四物汤抑制双硫死亡的作用机制

Fig. 11 Mechanism of Taohong Siwu Decoction in inhibiting disulfidptosis

研究显示,细胞凋亡和细胞焦亡等细胞死亡模式也介入肝纤维化的进程。肝细胞一旦发生凋亡,就会招募炎症细胞和释放促纤维化因子来激活HSC<sup>[20]</sup>。而细胞焦亡的发生则会诱导促炎因子释放,直接造成组织损伤,并创造持续促炎和促肝纤维化的微环境,强力驱动HSC活化和纤维化进展<sup>[21]</sup>。结合转录组测序分析结果,在TAA诱导的肝纤维化模型中,凋亡标志基因[如半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, *Casp3*)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(B-cell lymphoma-2 associated X protein, *Bax*)]和焦亡标志基因[如颗粒酶A(granzyme A, *Gzma*)、*Gzmb*]表达均上调;给予桃红四物汤干预后, *Casp3*、*Bax*、*Gzma*、*Gzmb*基因表达没有发生明显变化,表明这2种死亡虽然介入了TAA诱导的肝纤维化进程,但是桃红四物汤并不是通过抑制这2种死亡发挥作用的。因此,本研究深入探究桃红四物汤是否干预肝细胞的其他死亡模式。结果显示, TAA诱导AML12细胞及小鼠模型发生肝纤维化后,细胞骨架的形态、NADP<sup>+</sup>/NADPH值和双硫死亡相关基因表达都会发生变化。桃红四物汤作为活血化瘀、通络止痛的经典名方,在治疗肝纤维化方面已有相关研究与应用<sup>[10]</sup>。课题组前期研究发现桃红四物汤能够激活线

粒体自噬缓解肝纤维化,且桃红四物汤加减方能够调控细胞骨架进而缓解肝纤维化<sup>[8-9]</sup>。本研究结果显示,桃红四物汤改善肝纤维化的作用机制与调节细胞骨架密切相关,并通过上述调控作用阻断了肝细胞双硫死亡。

在肝纤维化早期,为满足HSC激活的能量需求,糖酵解大幅上调,体内的葡萄糖就会被大量分解利用<sup>[22]</sup>。随着肝纤维化进一步发展,重度肝纤维化或肝硬化患者由于胶原蛋白积累等原因导致葡萄糖摄取减少40%~50%<sup>[23]</sup>。肝脏中葡萄糖代谢降低,肝组织糖原储存耗尽<sup>[24]</sup>。因此,在重度肝纤维化时期,肝脏内处于葡萄糖饥饿状态,为双硫死亡提供了首个必要损伤病理条件。*Slc7a11*和*Slc3a2*介导胱氨酸转运,其高表达是双硫死亡的另一必要条件。本研究探讨了3种肝纤维化模型是否均能诱发双硫死亡,结果显示,在CCl<sub>4</sub>诱导的肝纤维化模型中,双硫死亡必须高表达的*Slc7a11*出现了显著下调,不构成双硫死亡形成的条件。在BDL诱导的肝纤维化模型中, *Slc7a11*显著上调,但双硫死亡其他相关基因(*Myh10*、*Slc3a2*、*Nckap1*、*Flna*)均显著下调,同样不构成双硫死亡发生条件。而在TAA诱导的体内外肝纤维化模型中, *Slc7a11*以及*Slc3a2*表达均显著上调,且双硫死亡相关基因均呈上调,

因此认为双硫死亡并不是在所有肝纤维化模型中都会发生的。

双硫死亡作为一种新发现的细胞死亡形式，其核心特征是肌动蛋白介导的细胞骨架中广泛二硫键积累，导致肌动蛋白收缩和细胞骨架破裂，最终使得细胞死亡<sup>[25]</sup>。体内、外模型中，桃红四物汤对TAA诱导的*Slc7a11*及*Slc3a2*表达的上调无明显作用，提示桃红四物汤并不通过调节这2个转运体蛋白的表达改善肝纤维化。TAA诱导的小鼠肝纤维化模型和AML12细胞中*Flna*、*Myh9*、*Myh10*及*Nckap1*表达上调。*Flna*和*Myh*家族蛋白（*Myh9/Myh10*）作为细胞骨架动力蛋白，其异常表达可能导致细胞膜稳定性下降以及收缩功能障碍<sup>[26-28]</sup>。*Nckap1*参与细胞黏附复合体形成<sup>[29]</sup>。*Flna*、*Myh9*、*Myh10*及*Nckap1*均为双硫死亡中的关键基因，其表达上调导致双硫死亡的发生。同时，TAA诱导的AML12细胞中NADP<sup>+</sup>/NADPH值明显升高，细胞骨架也出现皱缩变形。给予桃红四物汤干预后，细胞骨架动力蛋白的基因表达下调，NADP<sup>+</sup>/NADPH值降低，并且细胞骨架皱缩得到改善。表明桃红四物汤能够通过保护细胞骨架进而改善肝细胞的双硫死亡进程，缓解肝纤维化发生发展。

本研究采用TAA诱导小鼠及AML12细胞肝纤维化模型，发现桃红四物汤能够抑制TAA诱导的双硫死亡相关细胞骨架基因*Flna*、*Myh9*、*Myh10*及*Nckap1*的上调，增加细胞内NADPH，恢复细胞骨架收缩形态进而缓解双硫死亡，减轻肝纤维化。本研究从介入新型细胞死亡模式角度阐释了桃红四物汤缓解肝纤维化的作用机制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Atallah E, Grove J I, Crooks C, *et al.* Risk of liver fibrosis associated with long-term methotrexate therapy may be overestimated [J]. *J Hepatol*, 2023, 78(5): 989-997.
- [2] 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.
- [3] Yu Y L, Zhang S L, Xu Y F, *et al.* Oral delivery of ferroptosis inducers for effective treatment of hepatic fibrosis [J]. *Nano Res*, 2024, 17(8): 7621-7630.
- [4] Gaul S, Leszczynska A, Alegre F, *et al.* Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2021, 74(1): 156-167.
- [5] Liu X G, Nie L T, Zhang Y L, *et al.* Actin cytoskeleton vulnerability to disulfide stress mediates disulfidptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2023, 25(3): 404-414.
- [6] Semenovich D S, Andrianova N V, Zorova L D, *et al.* Fibrosis development linked to alterations in glucose and energy metabolism and prooxidant-antioxidant balance in experimental models of liver injury [J]. *Antioxidants: Basel*, 2023, 12(8): 1604.
- [7] 马川, 吴彦欣, 李敏敏, 等. 经典名方桃红四物汤抗血栓药效作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(23): 8035-8045.
- [8] Wang L, Qu J, Li J, *et al.* Si-Wu-Tang improves liver fibrosis by restoring liver sinusoidal endothelial cell functionality and reducing communication with hepatic stellate cells [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 179.
- [9] Wu J Z, Gong L P, Li Y F, *et al.* Tao-Hong-Si-Wu-Tang improves thioacetamide-induced liver fibrosis by reversing ACSL4-mediated lipid accumulation and promoting mitophagy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333: 118456.
- [10] Qu J, Xue X, Wang Z, *et al.* Si-Wu-Tang attenuates liver fibrosis via regulating lncRNA H19-dependent pathways involving cytoskeleton remodeling and ECM deposition [J]. *Chin J Nat Med*, 2024, 22(1): 31-46.
- [11] Hernandez-Gea V, Friedman S L. Pathogenesis of liver fibrosis [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-456.
- [12] Chen G W, Li C, Zhang L, *et al.* Hydroxysafflor yellow A and anhydrosafflor yellow B alleviate ferroptosis and parthanatos in PC12 cells injured by OGD/R [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 179: 1-10.
- [13] Kim T W. Paeoniflorin induces ER stress-mediated apoptotic cell death by generating Nox4-derived ROS under radiation in gastric cancer [J]. *Nutrients*, 2023, 15(24): 5092.
- [14] 李汉伟, 赵晖, 宋亚刚, 等. 熊果酸对四氯化碳致小鼠急性肝损伤的改善作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2025, 39(3): 191-198.
- [15] 陈新茹, 王慧芳, 周娴, 等. 桃红四物汤通过抑制NLRP3/Caspase-1介导的小胶质细胞焦亡减轻神经损伤的机制研究 [J]. *医学研究杂志*, 2025, 54(6): 57-63.
- [16] Zhang C Y, Liu S, Yang M. Treatment of liver fibrosis: Past, current, and future [J]. *World J Hepatol*, 15(6): 755-774.
- [17] Blas-García A, Apostolova N. Novel therapeutic approaches to liver fibrosis based on targeting oxidative stress [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(8): 1567.
- [18] Wang D, Tan Q Q, Zheng Q, *et al.* Tanshinone IIA attenuates hepatic stellate cell activation, oxidative stress, and liver fibrosis by inhibiting YAP signaling [J]. *Eur J*

- Histochem*, 2025, 69(3): 4218.
- [19] Kisseleva T, Brenner D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-166.
- [20] Canbay A, Friedman S, Gores G J. Apoptosis: The nexus of liver injury and fibrosis [J]. *Hepatology*, 2004, 39(2): 273-278.
- [21] Lu J L, Yu C X, Song L J. Programmed cell death in hepatic fibrosis: Current and perspectives [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 449.
- [22] Guo X, Zheng B, Wang J, *et al.* Exploring the mechanism of action of Chinese medicine in regulating liver fibrosis based on the alteration of glucose metabolic pathways [J]. *Phytother Res*, 2024, 38(10): 4865-4876.
- [23] Nielsen M F, Caumo A, Aagaard N K, *et al.* Contribution of defects in glucose uptake to carbohydrate intolerance in liver cirrhosis: Assessment during physiological glucose and insulin concentrations [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(6): G1135-G1143.
- [24] Yamanaka H, Genjida K, Yokota K, *et al.* Daily pattern of energy metabolism in cirrhosis [J]. *Nutrition*, 1999, 15(10): 749-754.
- [25] Liu X, Zhuang L, Gan B. Disulfidptosis: Disulfide stress-induced cell death [J]. *Trends Cell Biol*, 2024, 34(4): 327-337.
- [26] Wade E M, Goodin E A, Wang Y Q, *et al.* FLNA-filaminopathy skeletal phenotypes are not due to an osteoblast autonomous loss-of-function [J]. *Bone Rep*, 2023, 18: 101668.
- [27] Pecci A, Ma X F, Savoia A, *et al.* MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease [J]. *Gene*, 2018, 664: 152-167.
- [28] Hong H, Kim J, Kim J. Myosin heavy chain 10 (MYH10) is required for centriole migration during the biogenesis of primary cilia [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 461(1): 180-185.
- [29] Ma Q, Liu J, Li C, *et al.* miR-140-5p inhibits the proliferation, migration and invasion of vascular smooth muscle cells by suppressing the expression of NCKAP1 [J]. *Folia Histochem Cytobiol*, 2021, 59(1): 22-29.

[责任编辑 李亚楠]