

# 滨蒿内酯通过激活 NRF2/GPX4 通路抑制铁死亡 改善小鼠代谢功能障碍相关脂肪性肝病

郭 凯<sup>1</sup>, 曹后康<sup>1,2</sup>, 高 雅<sup>1,2\*</sup>, 张可锋<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>广西高校高发防治药理学重点实验室; <sup>2</sup>桂林医科大学药物研究所, 桂林 541199

**摘要:**探讨滨蒿内酯(scoparone, SCO)是否通过激活核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)通路抑制铁死亡,从而改善代谢功能障碍相关脂肪性肝病(metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD)。54 只雄性小鼠随机分为对照组( $n = 11$ )与高脂饮食造模组( $n = 43$ ),分别给予标准饲料或高脂饲料喂养 8 周后,随机抽取对照组和高脂饮食造模组小鼠( $n = 3$ /组)完成模型验证。确认模型建立成功后,将剩余造模组小鼠随机分为模型组、水飞蓟素组(150 mg/kg)和 SCO 低、中、高剂量组(50、100、150 mg/kg),每组 8 只,连续灌胃给药 4 周;同时建立油酸钠(sodium oleate, NaOA)诱导的 HepG2 细胞脂肪模型,给予 SCO(100  $\mu$ mol/L)干预,并联合 NRF2 抑制剂 ML385 进行通路依赖性验证。检测肝功能指标、肝脏组织病理形态改变情况以及脂质蓄积水平;测定氧化应激与铁死亡相关标志物;并通过 RT-qPCR 与 Western blot 分析 NRF2、GPX4、溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)及长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4)的表达水平。结果显示:与模型组相比,SCO 干预可改善肝功能指标与肝脂肪变性,减轻肝细胞脂质沉积,降低细胞内亚铁离子( $\text{Fe}^{2+}$ )蓄积,增强抗氧化能力;并促进 NRF2 核转位,上调 GPX4、SLC7A11 和 HO-1 的表达,同抑制 ACSL4 转录。值得注意的是,上述 SCO 介导的保护效应均可被 ML385 所逆转。综上所述,SCO 可通过激活 NRF2/GPX4 通路,协同增强抗氧化防御与抑制促铁死亡底物合成,从而有效抑制铁死亡、缓解 MASLD 肝损伤。

**关键词:**滨蒿内酯;NRF2;GPX4;代谢功能障碍相关脂肪性肝病;铁死亡

中图分类号:R285

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)9-1891-12

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.9.003

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.9.003

## Scoparone improves metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease in mice by activating the NRF2/GPX4 pathway to inhibit ferroptosis

GUO Kai<sup>1</sup>, CAO Hou-kang<sup>1,2</sup>, GAO Ya<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Ke-feng<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Pharmacology for Prevention and

Treatment of High Incidence Diseases in Guangxi Higher Education Institutions, Guilin

Medical University; <sup>2</sup>Institute of Pharmacological Research, Guilin Medical University, Guilin 541199, China

**Abstract:** This study aimed to investigate whether scoparone (SCO) ameliorates metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) by activating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) pathway to suppress ferroptosis. Fifty-four male mice were randomly divided into a control group ( $n = 11$ ) and a high-fat diet (HFD)-induced group ( $n = 43$ ), which were fed a standard diet or a HFD for eight weeks, respectively. Mice from the control group and the HFD-induced group ( $n = 3$  per group) were randomly selected for model verification. After confirming successful model construction, the remaining mice in the HFD-induced group were randomly divided into the MASLD model group, silymarin group (150 mg/kg), and low-dose, medium-dose, and high-dose SCO groups (50, 100, and 150 mg/kg), with eight mice in each group. All groups received intragastric administration for four consecutive weeks. Mean-

收稿日期:2025-12-01 接受日期:2026-03-12

基金项目:国家自然科学基金(82160811);国家自然科学基金青年基金(82505187);广西省自然科学基金(2023GXNSFAA026220);八桂青年拔尖人才项目(桂科发[2025]420号)

\* 通信作者 Tel:86-013457684046; E-mail: svidy@163.com, xueshengcailiao@163.com

while, a sodium oleate (NaOA)-induced HepG2 cell steatosis model was established, which was treated with SCO (100  $\mu\text{mol/L}$ ) alone or in combination with the NRF2 inhibitor ML385 for pathway dependency verification. Liver function indicators, hepatic histopathological changes, and lipid accumulation levels were detected; markers related to oxidative stress and ferroptosis were measured; and the expression levels of NRF2, GPX4, solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), heme oxygenase 1 (HO-1), and acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (ACSL4) were analyzed by RT-qPCR and Western blot. The results showed that compared with the MASLD model group, the SCO intervention improved liver function indicators, alleviated hepatic steatosis and intracellular lipid deposition, reduced intracellular ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) accumulation, and enhanced antioxidant capacity. Mechanistically, SCO promoted NRF2 nuclear translocation, upregulated the expression of GPX4, SLC7A11, and HO-1, and inhibited ACSL4 transcription. Notably, all protective effects mediated by SCO were reversed by ML385. In conclusion, SCO effectively inhibits ferroptosis and alleviates MASLD-related liver injury by activating the NRF2/GPX4 pathway, which synergistically enhances antioxidant defense and suppresses the synthesis of ferroptosis-promoting substrates.

**Key words:** scoparone; NRF2; GPX4; metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; ferroptosis

代谢功能障碍相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) 是全球发病率最高的慢性肝脏疾病, 核心特征为肝细胞内脂质异常沉积, 可进展为代谢功能障碍相关脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH)、肝纤维化、肝硬化, 乃至肝细胞癌, 严重危害人类健康<sup>[1]</sup>。其发病机制以“多重打击”假说为核心, 强调脂毒性物质蓄积、氧化应激增强、慢性炎症激活、代谢通路失调及表观遗传异常等多因素协同驱动疾病的发生发展<sup>[2]</sup>。研究发现, 特异性抑制铁死亡可有效缓解 MASH 中的肝细胞气球样变、炎症浸润及纤维化程度<sup>[3]</sup>, 提示铁死亡是极具转化前景的治疗靶点。

铁死亡是一种铁依赖性、脂质过氧化介导的细胞程序性死亡, 核心特征为谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 活性丧失、亚铁离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 蓄积及多不饱和脂肪酸磷脂的过度氧化<sup>[4]</sup>。其在 MASLD 病理进程中作用明确: 临床研究显示, MASLD 患者肝组织铁沉积水平与病情严重程度呈正相关<sup>[5]</sup>; 动物实验证实抑制铁死亡可改善小鼠肝脂肪变性及其肝损伤<sup>[6]</sup>; 机制层面, MASLD 状态下的铁过载与抗氧化系统功能紊乱共同构成了铁死亡的“易感微环境”, 而铁死亡的激活又加剧了脂毒性和炎症反应, 形成“铁过载-脂质过氧化-肝细胞损伤”的恶性循环, 进一步推动 MASLD 的病情进展<sup>[7]</sup>。综上所述, 靶向铁死亡通路以阻断 MASLD 进展的策略, 是推动相关新型治疗手段向临床转化的核心路径。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 是调控细胞氧化还原以及

铁死亡的关键因子。细胞氧化应激时, NRF2 可脱离 Kelch 样 ECH 关联蛋白 1 (kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1), 入核激活铁死亡抑制相关基因转录<sup>[8]</sup>。其中, GPX4 可利用谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 清除细胞内磷脂氢过氧化物, 阻断脂质过氧化<sup>[9]</sup>; 溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 可促进 GSH 合成, 增强 GPX4 活性<sup>[10]</sup>; 血红素加氧酶-1 (heme oxygenase 1, HO-1) 可降解血红素生成胆红素, 发挥抗氧化及铁代谢调节作用<sup>[11]</sup>。此外, NRF2 还可抑制长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 表达, 减少含多不饱和脂肪酸的磷脂的合成, 从源头抑制铁死亡启动<sup>[12]</sup>。近期研究表明, NRF2 通路功能缺陷在 MASLD 患者及动物模型中普遍存在, 激活 NRF2 可通过上调 GPX4 等基因表达, 改善肝脂肪变性及其肝损伤<sup>[3]</sup>。因此, 我们推测 NRF2/GPX4 轴可能是调控 MASLD 相关铁死亡的关键通路, 靶向该通路可为 MASLD 治疗提供新方向。

滨蒿内酯 (scoparone, SCO) 是从中药滨蒿中提取的天然香豆素类化合物<sup>[13]</sup>, 具有抗炎、抗氧化及保肝利胆等药理活性<sup>[14]</sup>。近年来, SCO 在代谢性疾病领域展现出良好的治疗潜力。已被证实: SCO 可通过调节单磷酸腺苷激活的蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)/过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR $\alpha$ ) 通路改善肝脏脂质蓄积<sup>[15]</sup>; 通过抑制核因子  $\kappa\text{B}$  (Nuclear Factor kappa-B, NF- $\kappa\text{B}$ ) 通路减轻非酒精性脂肪性肝炎小鼠的肝脏炎症反应<sup>[16]</sup>; 同时, SCO 还可

通过增强抗氧化酶活性缓解细胞氧化应激损伤<sup>[17]</sup>。值得注意的是,尽管 SCO 在代谢性肝病中的保肝作用已得到初步验证,但其是否通过调控铁死亡改善 MASLD,尤其是能否通过激活 NRF2/GPX4 通路介导铁死亡抑制效应发挥作用,目前尚未明确。基于上述研究背景,本研究以高脂饮食诱导的 MASLD 小鼠模型及油酸钠(sodium oleate, NaOA)刺激的 HepG2 细胞脂肪模型为研究对象,系统评价 SCO 的肝保护作用,同时聚焦 NRF2/GPX4 信号通路,通过分子、细胞及组织多维度实验,阐明 SCO 抑制铁死亡的机制,旨在为 MASLD 的治疗提供新的思路和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

54 只 SPF 级雄性昆明小鼠,6~8 周龄,体重 18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号:SCXK(湘)2021-0002。小鼠饲养于桂林医科大学实验动物中心 SPF 级动物房,饲养环境温度 22~26℃、相对湿度 40%~60%,自由进食、饮水,每隔 1 d 更换垫料 1 次。本动物实验已通过桂林医科大学动物实验伦理委员会批准,伦理授权编号:GLMC-IACUC-20241152。

#### 1.1.2 实验细胞

人肝癌细胞系 HepG2 细胞购自中国科学院细胞库(货号:SCSP-510)。

#### 1.1.3 实验试剂

滨蒿内酯(纯度:HPLC>98%,批号:B02501911 001,瑞芬思德丹生物科技有限公司);水飞蓟素(纯度:UV>80%,批号:M1120A,浙江万邦药业股份有限公司);高脂饲料(批号:20240623F,江苏协同医药生物工程);NaOA(批号:07501,德国 Sigma 公司);NRF2 抑制剂 ML385(批号:281591,英国 MCE 公司);丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(trilaurin, TG)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)试剂盒(批号:20241115、20240505、20240806、20240814、20241010、20241009、20230214、20250506,南京建成生物工程研究所);细胞亚铁比色法测试盒(批号:

WL04P0028557,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司);MTT 细胞增殖检测试剂盒、活性氧检测试剂盒(批号:240004023、240007010,北京索莱宝科技有限公司);线粒体提取试剂盒(批号:ATYK14161,武汉亚科因生物技术有限公司);线粒体膜电位检测试剂盒(批号:092723240401,上海碧云天生物技术有限公司);NRF2、HO-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号:00145457、00149390、10029187,武汉三鹰生物技术有限公司);SLC7A11、GPX4、ACSL4 抗体(批号:Ab307601、ab125066、ab155282,上海 Abcam 公司);二抗(批号:20001247,武汉三鹰生物技术有限公司)。

#### 1.1.4 实验仪器

HM315R 组织切片机(德国 MICROM 公司);YD-1900 冷冻切片机(金华益迪医疗设备有限公司);BX51 显微镜(日本 Olympus 公司);Epoch2 酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);Quant Studio3 荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Scientific);Mini-PROTEAN Tetra Cell 电泳仪和 Mini Trans-Blot Module 转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);GeneGnome XRQ 化学发光图像分析检测系统(英国 Syngene 公司);CKX53 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Heraeus Fresco 21 高速冷冻离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);DK-8D 恒温振荡器(上海一恒科学仪器有限公司);UW-2200H 电子天平(日本岛津公司);Tecan Spark 连续波长多功能微孔板检测仪(奥地利 Tecan 公司)。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物实验方法

54 只雄性昆明小鼠在标准条件下适应性喂养 1 周后,随机分为对照(control, Con;  $n = 11$ )组与高脂饮食造模组( $n = 43$ ),Con 组小鼠每日标准饮食饲养,高脂饮食造模组小鼠每日高脂饲料饲养。8 周后,随机抽取 Con 组和造模组小鼠( $n = 3$ /组)完成模型验证。建模成功依据:以血清 TC 和 TG 水平显著升高(与 Con 组比较,  $P < 0.05$ ),同时肝脏组织出现明显脂质沉积(油红 O 染色显示脂滴数量显著增多)作为高脂小鼠模型建立成功的判定标准。模型验证结果显示,造模组 3 只小鼠均满足上述指标要求。

确认模型建立成功后,其余高脂饮食造模组小鼠随机分为 5 组,每组 8 只,分别为:模型组(model, Mod);水飞蓟素组(silymarin, Sil; 150 mg/kg);SCO

低剂量组(low-dose SCO, SCO-L; 50 mg/kg); SCO 中剂量组(medium-dose SCO, SCO-M; 100 mg/kg); SCO 高剂量组(high-dose SCO, SCO-H; 150 mg/kg)。除 Con 组其余各组小鼠继续高脂饲料喂食, Con 组与 Mod 组每日灌胃等体积蒸馏水(10 ml/kg), 其余组分别按设定剂量每日灌胃相应药物, 持续 4 周<sup>[18]</sup>。实验期间, 每周定期称量小鼠体重, 每日记录摄食量, 并以每周 7 d 的摄食总量计算日均摄食量, 同时观察评估小鼠活动度、毛色、反应灵敏度等一般状态。末次给药后, 所有小鼠禁食不禁水 16 h, 随后经麻醉安乐死后, 采集血液样本用于血清生化指标检测, 并迅速分离肝脏组织, 用于后续病理学、分子生物学等相关分析。

### 1.2.2 肝组织病理学检测

小鼠安乐死后迅速解剖, 暴露肝脏观察其形态, 并拍照记录。取部分肝组织以 4% 多聚甲醛固定 48 h, 经梯度脱水、透化、石蜡包埋后制备 4  $\mu\text{m}$  切片, HE 染色后, 光镜下评估肝脏的病理改变状况。另取新鲜肝组织经 OCT 包埋、液氮速冻后制备 8 ~ 10  $\mu\text{m}$  冷冻切片, 经 60% 异丙醇处理, 油红 O 工作液染色 15 min, Mayer 苏木精复染核后, 观察肝细胞内脂滴蓄积情况。

### 1.2.3 细胞实验方法

HepG2 细胞接种于含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、饱和湿度的恒温细胞培养箱中培养; 每 2 ~ 3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞用于后续实验。采用 MTT 法筛选药物实验浓度: 首先, 将 HepG2 细胞接种于 96 孔板, 待贴壁融合达 70% ~ 80% 后, 分别暴露于 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mmol/L NaOA 中 24 h, 以确定 MASLD 细胞模型的造模浓度; 其次, 检测 0、10、20、40、60、80、100、120、140、160、180  $\mu\text{mol/L}$  SCO 对细胞活力的影响, 筛选无显著细胞毒性的干预浓度。处理结束后, 每孔加入 20  $\mu\text{L}$  5 mg/mL MTT 溶液, 继续孵育 4 h, 弃上清后加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO 溶解甲臞结晶, 于 490 nm 波长测定吸光度(A), 按公式(1)计算细胞存活率(R)。

$$R = (A_T - A_B) / (A_C - A_B) \times 100\% \quad (1)$$

式中,  $A_T$  为药物处理组吸光度;  $A_B$  为空白组吸光度;  $A_C$  为对照组吸光度。

细胞实验分组如下: ①对照(control, Con)组: 全程以 10% 空白血清 DMEM 培养; ②NaOA 模型组: 以选定浓度 NaOA 处理 24 h; ③SCO 干预组: NaOA

处理 24 h 后, 更换为含 SCO(DMSO 溶解, 终 DMSO 浓度  $\leq 0.1\%$ ) 的新鲜培养基, 继续干预 24 h; ④NRF2 通路抑制组(ML385): 细胞先经 1  $\mu\text{mol/L}$  NRF2 特异性抑制剂 ML385(DMSO 配制)预处理 1 h, 再接受 NaOA 及 SCO 序贯处理<sup>[18]</sup>。各组均设 3 个复孔, DMSO 溶剂终浓度保持一致( $\leq 0.1\%$ )。

### 1.2.4 生化指标检测

血液样本于 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 30 min 后, 以 3 000 r/min 离心 15 min 获取上清, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。依据相应检测试剂盒的操作指南, 分别测定血清中 ALT、AST、TC 及 TG 的水平。肝组织按 1:9(W/V) 比例加入预冷生理盐水, 冰浴匀浆后离心 10 min 取上清, 同步检测 MDA、SOD、GSH-Px 及  $\text{Fe}^{2+}$  的含量。HepG2 细胞经处理、PBS 洗涤、胰酶消化收集后, 超声破碎, 离心取上清, 同步检测其内 TC、TG 及  $\text{Fe}^{2+}$  的水平。

### 1.2.5 动物线粒体功能检测

线粒体提取: 按试剂盒说明书操作, 取约 100 mg 肝组织, PBS 冲洗后加入 1 mL 预冷 Lysis Buffer A(1 $\times$ ), 冰上研磨成匀浆; 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 重复离心 1 次, 收集上清后于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、11 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀经洗涤液洗涤后, 用预冷 Store Buffer 溶液重悬得纯化线粒体, 冰浴备用。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测: 采用 JC-1 荧光探针法, 将纯化线粒体与 JC-1 工作液混合, 37  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min 后使用多功能微孔板检测仪进行检测。检测参数设置: JC-1 聚合体(红光)激发光 525 nm, 发射光 590 nm; JC-1 单体(绿光)激发光 490 nm, 发射光 530 nm。以红/绿荧光强度比值表示 MMP 水平。

ATP 水平检测: 取约 100 mg 肝组织, 按 1:9(W/V) 加入预冷提取缓冲液, 充分匀浆后于沸水中加热 10 min 后, 12 000 r/min 离心, 取上清液, BCA 法测定上清液蛋白浓度; 随后按 ATP 检测试剂盒说明书, 测定各组样本的 ATP 含量。

### 1.2.6 细胞油红 O 染色

HepG2 细胞处理结束后, 弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 以 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, PBS 洗 3 次后, 60% 异丙醇脱水 2 min, 自然风干; 现配油红 O 工作液(油红 O 储备液: 3 mg/mL 异丙醇溶液, 使用前以 60% 异丙醇按 3:2 稀释, 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤)覆盖细胞, 室温避光染色 15 min, 蒸馏水轻洗 3 次, 苏木精复染细胞核 1 ~ 2 min, PBS 再次清洗, 加缓冲液, 于光学显微镜下观察胞质内红色脂滴沉积情况。

1.2.7 细胞活性氧染色

HepG2 细胞处理结束后,弃培养基,以预冷 PBS 洗涤 2 次,加入终浓度为 10 μmol/L 的 DCFH-DA 荧光探针,室温避光孵育 30 min,孵育结束后,弃染液,以 PBS 避光洗涤 3 次以彻底去除未进入细胞及未水解的探针;立即置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.8 细胞线粒体膜电位染色

HepG2 细胞按实验分组处理结束后,弃培养基,PBS 洗涤 2 次;加入 1 mL 工作浓度 JC-1 染色液(终浓度 2 μmol/L,以无血清 DMEM 稀释),于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中避光孵育 20 min;弃染液,以预冷 JC-1 染色缓冲液轻柔洗涤 2 次,去除未结合探针;立即置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.9 RT-qPCR 检测相关因子 mRNA 的表达

收集各组 HepG2 细胞或肝组织(约 1 × 10<sup>6</sup> 细胞或 30 mg 组织),加入 1 mL Trizol 充分裂解,室温静置 5 min 后,按说明书依次加入氯仿、异丙醇沉淀 RNA,75% 乙醇洗涤,DEPC 处理水溶解;所获 RNA 样品于-80 ℃ 保存备用。使用 NanoDrop 系统检测 RNA 的浓度与纯度。随后根据 ToloScript ALL 逆转录试剂盒进行基因组 gDNA 清除及逆转录反应。使用 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 试剂盒在 Quant Studio3 qPCR 系统上进行定量聚合酶链式反应。靶基因表达水平以 *GAPDH* 为内参基因进行标准化,并采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 法计算相对表达量。实验所用引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

| 基因<br>Gene     | 引物序列 Primer sequence (5'→3') |                           |
|----------------|------------------------------|---------------------------|
|                | 小鼠 Mouse                     | HepG2                     |
| <i>NFE2I2</i>  | F:TCTTGGAGTAAGTCGAGAAGTGT    | F:TCAGCGACGGAAAGACTATGA   |
|                | R:GTTGAAACTGAGCGAAAAAGGC     | R:CCACTGGTTTCTGACTGGATGT  |
| <i>HMOX1</i>   | F:AAGCCGAGAATGCTGAGTTCA      | F:AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC   |
|                | R:GCCGTGTAGATATGGTACAAGGA    | R:AAAGCCCTACAGCAACTGTCTG  |
| <i>ACSL4</i>   | F:CTCACCATTATATTGCTGCCTGT    | F:CATCCCTGGAGCAGATACTCT   |
|                | R:TCTCTTTGCCATAGCGTTTTTCT    | R:TCACTTAGGATTTCCCTGGTCC  |
| <i>SLS7A11</i> | F:GGCACCGTCATCGGATCAG        | F:TCTCCAAAGGAGGTTACCTGC   |
|                | R:CTCCACAGGCAGACCAGAAAA      | R:AGACTCCCCTCAGTAAAGTGAC  |
| <i>GPX4</i>    | F:GATGGAGCCCATTCTGAACC       | F:GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC |
|                | R:CCCTGTACTTATCCAGGCAGA      | R:CCGAACTGGTTACACGGGAA    |
| <i>GAPDH</i>   | F:AGGTCGGTGTGAACGGATTTC      | F:ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG  |
|                | R:TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA    | R:GCCATCACGCCACAGTTTC     |

1.2.10 Western blot 检测蛋白表达

肝组织及 HepG2 细胞样本于冰上以含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液裂解 30 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min 后取中层上清,BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳分离,湿转法转移至 NC 膜。后 5% 脱脂奶粉室温封闭 NC 膜 1 h。随后与特异性一抗 4 ℃ 孵育过夜。次日,TBST 洗膜 3 次后,加入 HPR 标记二抗,室温孵育 1 h,充分洗涤后,施加 ECL 试剂,于化学发光成像系统采集图像。最后,以 *GAPDH* 为内参,通过 ImageJ 计算目标蛋白的表达量。

1.2.11 统计学方法

所有数据采用 SPSS 软件进行统计分析,数据结

果以平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。对于两组间比较,若数据符合正态分布且方差齐性,则采用非配对双尾 *t* 检验;否则使用 Mann-Whitney U 检验进行分析。多组间比较,若满足正态分布和方差齐性条件,则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),并结合 Dunnett 多重比较校正进行事后检验;反之则采用非参数 Kruskal-Wallis 检验。*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 SCO 对 MASLD 小鼠肝脏组织病理学的影响

肝脏病理观察显示(见图 1),Con 组小鼠肝脏呈深红色、表面光滑,而 Mod 组小鼠肝脏呈淡黄色、表面油腻。HE 染色结果显示,Con 组肝细胞排列规

则、结构清晰,无明显脂肪变性;而 Mod 组小鼠肝小叶结构紊乱,出现大量脂肪空泡。油红 O 染色结果显示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠肝脏中脂滴积聚现象

象明显加重。与 Mod 组比较,Sil、SCO-L、SCO-M、SCO-H 组小鼠肝脏颜色和形态得到改善,肝细胞排列趋于整齐,脂滴积聚现象得到改善。

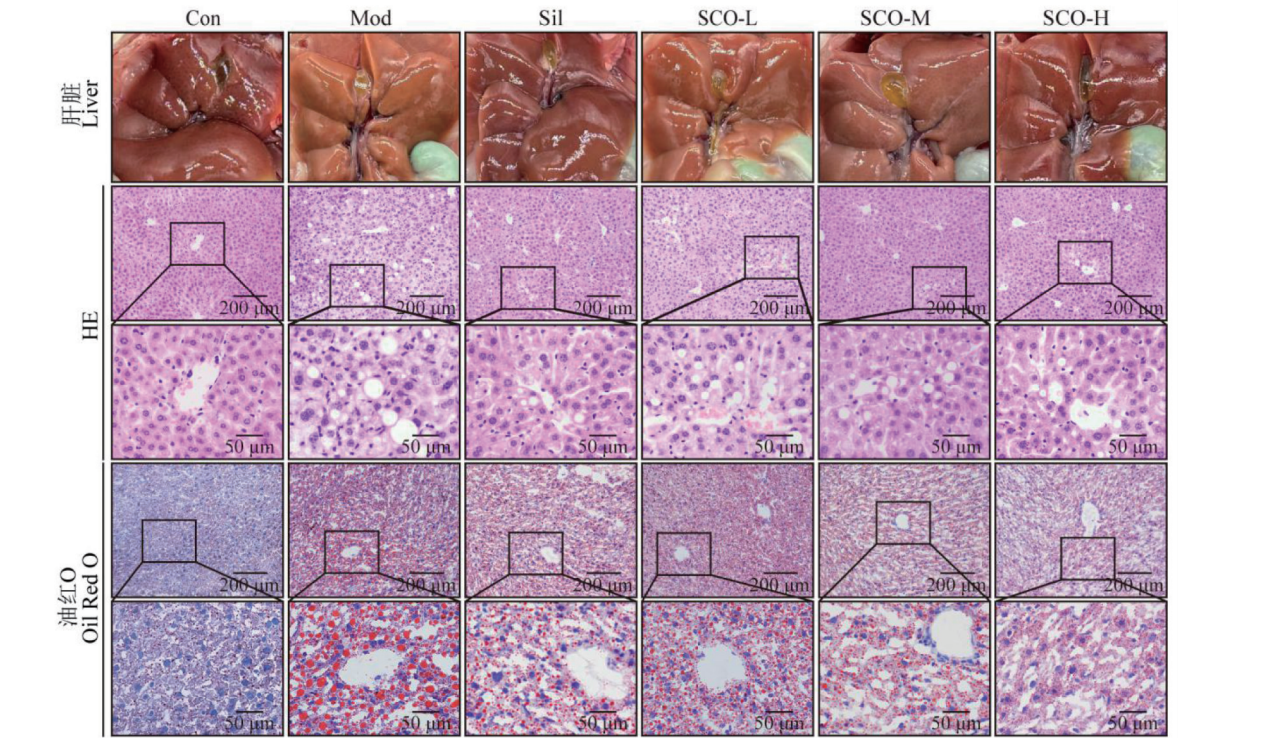


图1 肝脏拍摄图、肝组织 HE 和油红 O 染色图 ( × 200 )

Fig. 1 Liver photograph,HE and Oil Red O staining images of liver tissue ( × 200 )

2.2 SCO 对 MASLD 小鼠血清及肝组织各项指标的影响

在 12 周干预期间,各组小鼠基线体重无显著差异。干预前 8 周,Con 组小鼠体重呈缓慢生理性增长,摄食量稳定;其余各组小鼠体重迅速增加,且该阶段初期摄食量显著升高、进食速率加快,随干预时间延长,摄食量逐步回落。干预后 4 周,Mod 组小鼠

体重呈轻微下降趋势,但仍维持于 40 g 以上,摄食量明显减少;而 SCO 组和 Sil 组小鼠体重则显著降低,部分个体摄食行为趋于规律,摄食积极性有所回升(见图 2)。

生化指标结果显示(见图 3),与 Con 组相比,Mod 组小鼠血清中 ALT、AST、TC、TG 水平和肝组织中 MDA、Fe<sup>2+</sup> 水平显著升高( $P < 0.05$ ),SOD、GSH-

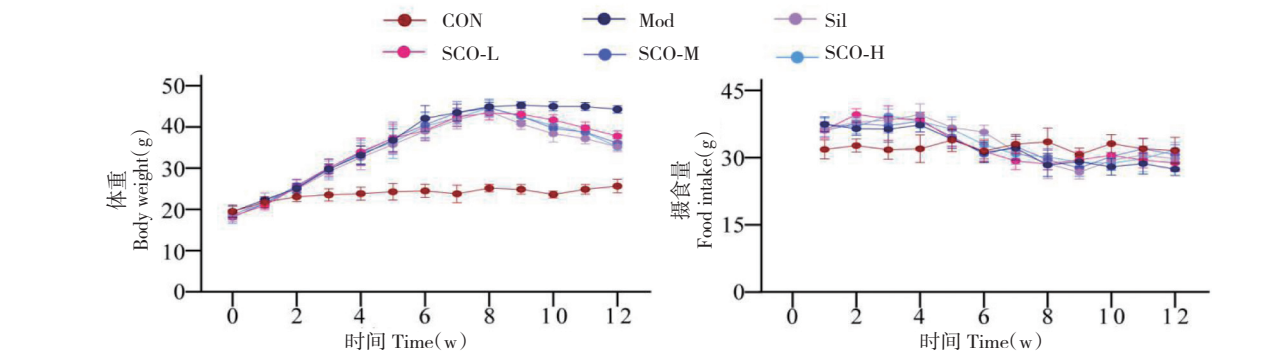


图2 各组小鼠体重与摄食量变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 2 Changes in body weight and food intake of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Px 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。与 Mod 组相比,SCO 和 silymarin 干预可降低血清中 AST、ALT、TG、TC 水平和肝组织中 MDA、 $\text{Fe}^{2+}$  的含量,提高 GSH-Px 和 SOD 的活性 ( $P < 0.05$ )。SCO-L 组 SOD 水平升高 ( $P > 0.05$ )无统计学意义。

肝组织线粒体功能检测结果显示(见图 4),与 Con 组相比,Mod 组小鼠肝组织 MMP 比率与 ATP 水平显著降低 ( $P < 0.05$ )。而与 Mod 组相比,经 SCO 和 silymarin 干预后,小鼠肝组织中 MMP 比率与 ATP 水平显著升高 ( $P < 0.05$ )。

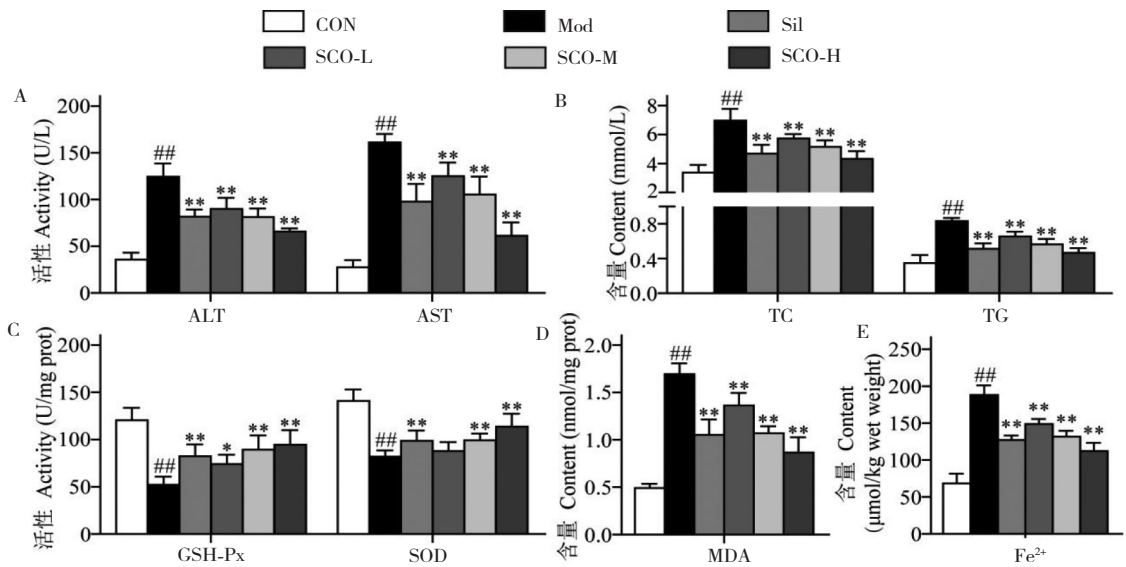


图 3 各组小鼠血清 (A、B) 及肝组织 (C-E) 相关生化指标检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Results of related biochemical parameter detection in serum (A,B) and liver tissue (C-E) of mice in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

注:与 Con 组比较,## $P < 0.01$ ;与 Mod 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。下同。Note:Compared with Con group,## $P < 0.01$ ;Compared with Mod group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ . The same below.

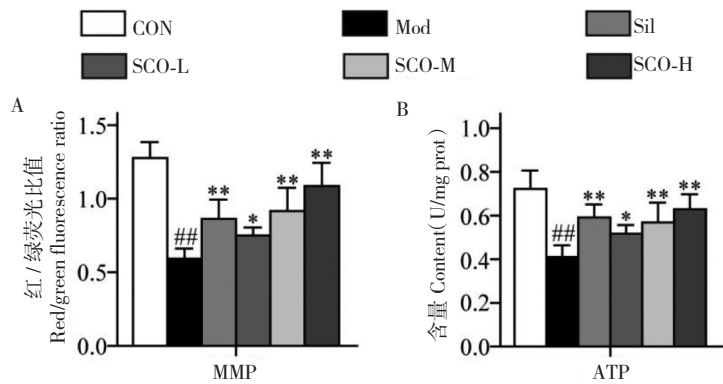


图 4 各组小鼠肝组织线粒体功能检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Detection results of mitochondrial function in liver tissue of mice from each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

2.3 SCO 对铁死亡相关因子的影响

RT-qPCR 结果显示(见图 5A),与 Con 组相比,Mod 组 *Nfe2l2*、*Hmox1*、*Slc7a11*、*Gpx4* 的 mRNA 表达显著下降;给予 SCO 治疗后可升高这些基因的表达 ( $P < 0.05$ )。与 Con 组相比,Mod 组肝脏中 *Acs14* 的 mRNA 表达水平显著升高;SCO 干预则可降低其

mRNA 表达 ( $P < 0.05$ )。Western blot 结果也显示(见图 5B),与 Con 组相比,SCO-H 组中 NRF2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达显著下调,而 ACSL4 蛋白表达显著升高;在给予 SCO 治疗后,上述结果得到逆转 ( $P < 0.05$ )。

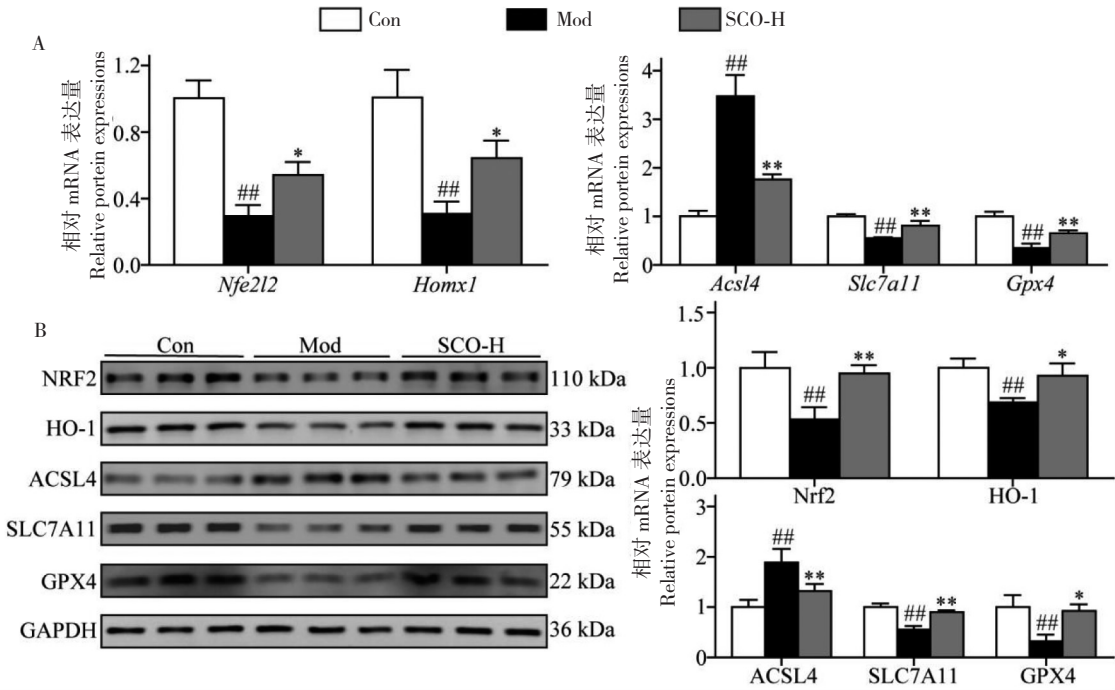


图5 SCO对MASLD小鼠肝组织mRNA(A)和蛋白(B)表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of SCO on mRNA (A) and protein (B) expression levels in liver tissues of mice with MASLD( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.4 SCO对HepG2细胞的保护作用

MTT实验结果显示(见图6):以0.3 mmol/L NaOA处理HepG2细胞24 h,细胞存活率维持在60%以上,符合MASLD细胞模型的造模效应,NaOA浓度超过0.3 mmol/L时细胞存活率降至50%以下;SCO干预实验中,SCO浓度未超过100  $\mu\text{mol/L}$

时,细胞存活率稳定维持在90%以上,无显著细胞毒性,SCO浓度超过100  $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞存活率明显受到抑制。综合模型构建效率与细胞耐受性,最终确定以0.3 mmol/L作为后续细胞模型NaOA的构建浓度,100  $\mu\text{mol/L}$ 作为SCO的体外干预浓度<sup>[19]</sup>。

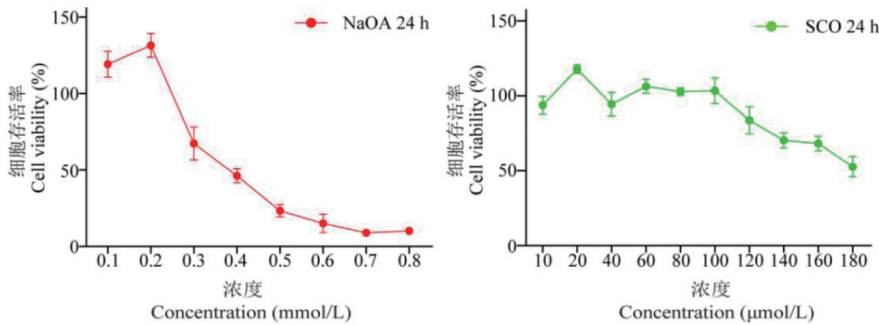


图6 NaOA诱导剂量筛选及SCO干预剂量筛选实验结果( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Experimental results of NaOA induction dose screening and SCO intervention dose screening ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

油红O染色结果显示(见图7),NaOA组细胞内出现大量大小不一的红色脂滴,密集分布于胞质中;SCO干预后,脂滴数量与面积明显减少,提示SCO可有效抑制NaOA诱导的细胞内脂质沉积,而加入NRF2抑制剂ML385后,SCO的降脂作用被抑

制,表明NRF2通路参与介导SCO改善肝细胞脂质代谢的保护效应。生化指标检测结果也显示(见图8),与Con组相比,NaOA显著升高了细胞中TC、TG和 $\text{Fe}^{2+}$ 的水平( $P < 0.05$ );SCO的干预可改善上述情况,但SCO的治疗作用会被NRF2抑制剂ML385抑制。

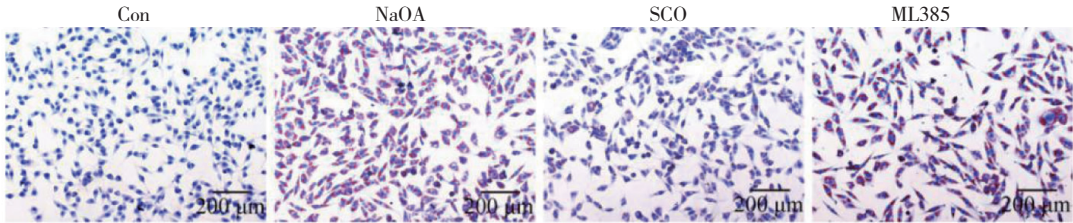


图 7 不同处理组 HepG2 细胞油红 O 染色结果 (× 200)

Fig. 7 Results of Oil Red O staining in HepG2 cells from different treatment groups (× 200)

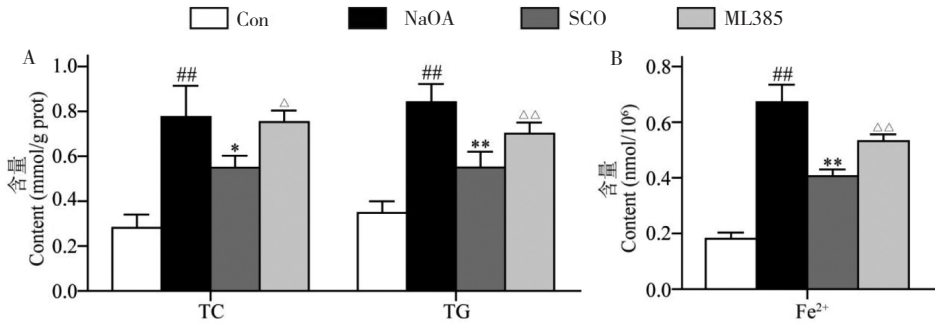


图 8 不同处理组 HepG2 细胞 TC、TG 水平 (A) 以及  $\text{Fe}^{2+}$  水平 (B) 检测结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 Detection results of TC and TG levels (A) and  $\text{Fe}^{2+}$  levels (B) of HepG2 cells in different treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

注:与 Con 组比较,## $P < 0.01$ ;与 NaOA 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 SCO 组比较,Δ $P < 0.05$ ,ΔΔ $P < 0.01$ 。下同。Note:Compared with Con group,## $P < 0.01$ ;Compared with NaOA group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with SCO group,Δ $P < 0.05$ ,ΔΔ $P < 0.01$ . The same below.

2.5 SCO 对 HepG2 细胞氧化应激与线粒体功能的影响

活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 荧光探针染色结果显示 (见图 9A、9C), Con 组 HepG2 细胞绿色荧光微弱,提示细胞基础 ROS 水平较低;NaOA 处理后荧光强度显著增强 ( $P < 0.05$ ),表明脂毒性刺激引发了明显的氧化应激反应;SCO 干预后,荧光信号强度减弱,提示 SCO 可有效抑制 NaOA 诱导的 ROS 蓄积;而联合 NRF2 抑制剂 ML385 预处理后,SCO 的抗氧化效应被明显削弱,荧光强度较 SCO 组明显升高 ( $P < 0.05$ ),进一步佐证 NRF2 通路在 SCO 调控氧化还原稳态中的关键作用。

JC-1 染色结果显示 (见图 9B、9D), Con 组细胞以红色荧光为主,绿色荧光微弱,表明线粒体膜电位完整;NaOA 处理后,红色荧光减弱,绿色荧光增强,红/绿荧光比值较 Con 组显著降低 ( $P < 0.05$ ),提示线粒体膜电位崩溃,功能受损;SCO 干预后,红色荧光强度部分恢复,红/绿荧光比值升高 ( $P < 0.05$ ),提示其对线粒体结构与功能具有一定保护作用;而 ML385 与 SCO 共处理后,削弱了 SCO 的保护效应,表明 NRF2 通路抑制可削弱 SCO 对线粒体的保护

效应。上述荧光分布变化趋势提示,SCO 可能通过 NRF2 通路维持线粒体膜电位稳态,从而减轻铁死亡相关的线粒体损伤。

2.6 SCO 对 NRF2 通路及铁死亡相关分子的调控作用

RT-qPCR 结果显示 (见图 10A), 与 Con 组相比,NaOA 组中 *NFE2L2*、*HMOX1*、*SLC7a11* 及 *GPX4* 的 mRNA 表达水平显著下降,而 *ACSL4* 的 mRNA 表达显著升高;SCO 干预可显著上调 *NFE2L2*、*HMOX1*、*SLC7a11* 与 *GPX4* 的转录水平,并抑制 *ACSL4* 的表达 ( $P < 0.05$ )。值得注意的是,ML385 组中,上述基因表达变化被明显逆转:*NFE2L2* 及其下游靶基因 *HMOX1*、*SLC7a11*、*GPX4* 的 mRNA 表达水平较 SCO 组显著降低,而 *ACSL4* 表达则显著回升 ( $P < 0.05$ ),提示 ML385 有效阻断了 SCO 对 NRF2 通路的激活作用。

Western blot 结果进一步证实 (见图 10B), NaOA 组中 NRF2、HO-1、SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达显著低于 Con 组,ACSL4 蛋白表达则显著高于 Con 组;而 SCO 干预可上调 NRF2 核转位及 HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达,并下调 ACSL4 的表达 ( $P$

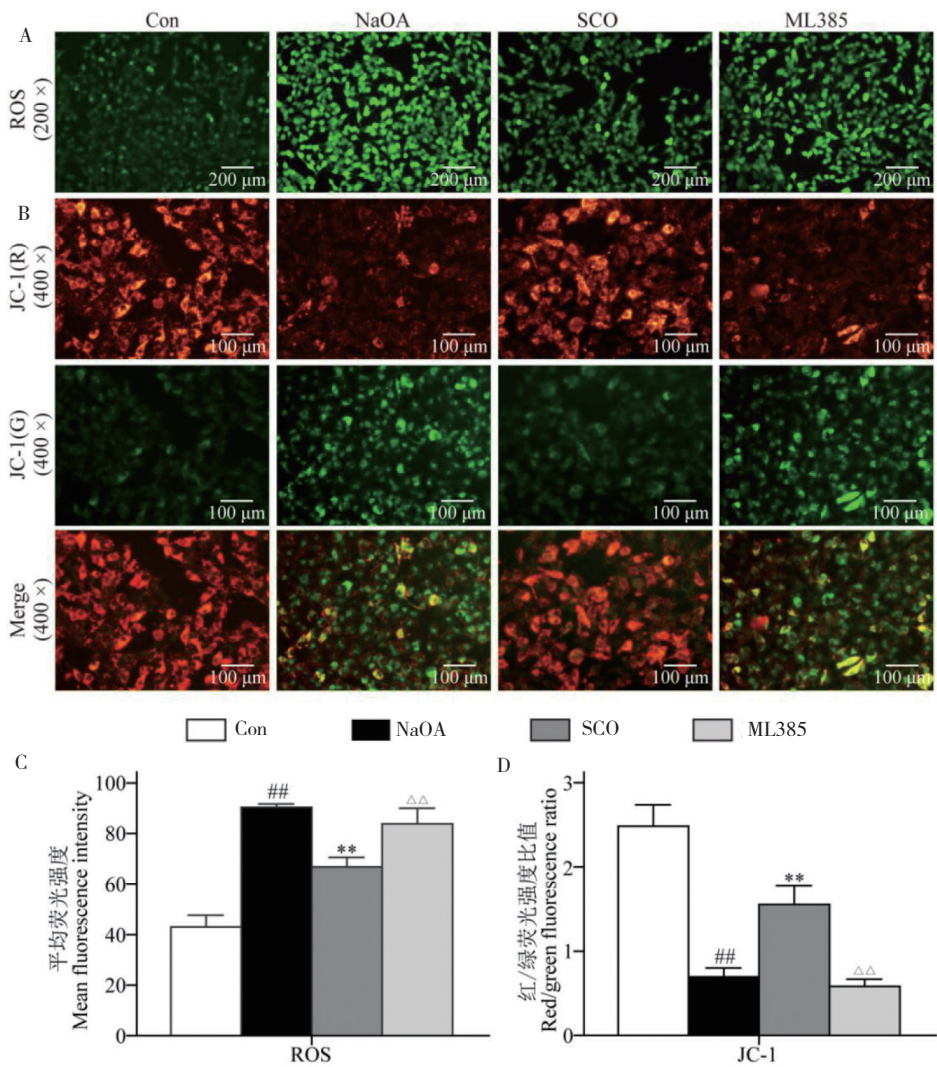


图9 不同处理组 HepG2 细胞 ROS 染色 (A) 和 JC-1 染色 (B) 以及荧光量化结果 (C、D) ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 9 ROS staining (A), JC-1 staining (B) and fluorescence quantification results (C, D) of HepG2 cells in different treatment groups ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

<0.05)。在 ML385 组中, NRF2 核蛋白及其下游 HO-1、GPX4、SLC7A11 的表达水平较 SCO 组显著下降, ACSL4 表达则相应升高 ( $P < 0.05$ ), 与 RT-qPCR 结果趋势一致, 表明 ML385 可有效拮抗 SCO 对 NRF2/GPX4 通路的激活效应。

3 讨论与结论

MASLD 作为当前全球范围内发病率持续攀升的慢性肝脏疾病, 其进展隐匿却后果严重, 是肝硬化与肝癌的重要前驱状态, 严重威胁着患者的生命健康和 生活质量。因此, 深入探究其发病机制以开发有效的防治策略至关重要。目前研究已证实, 铁死亡与 MASLD 之间存在密切的病理关系<sup>[20]</sup>。MASLD 的病理环境为铁死亡的发生创造了有利条

件, 即铁过载和抗氧化系统的崩溃; 而铁死亡的激活则会反过来推动 MASLD 向更严重的炎症、纤维化阶段发展<sup>[21]</sup>。在这一病理过程中, NRF2 信号通路作为抗氧化反应的主要调控者, 发挥着关键作用<sup>[22]</sup>。

本研究发现, 在高脂饮食诱导的 MASLD 小鼠模型以及 NaOA 刺激的 HepG2 细胞中, NRF2 通路活性受到显著抑制, 具体表现为 NRF2 核转位减少, 其下游靶基因 *HOMX1*、*SLC7a11* 与 *GPX4* 的表达明显下调。SLC7A11 是介导胱氨酸摄取的关键转运体, 其表达降低会导致细胞内胱氨酸供应不足, 进而限制 GSH 的合成。由于 GSH 是 GPX4 发挥酶活性所必需的辅助因子, GSH 的缺乏将直接削弱 GPX4

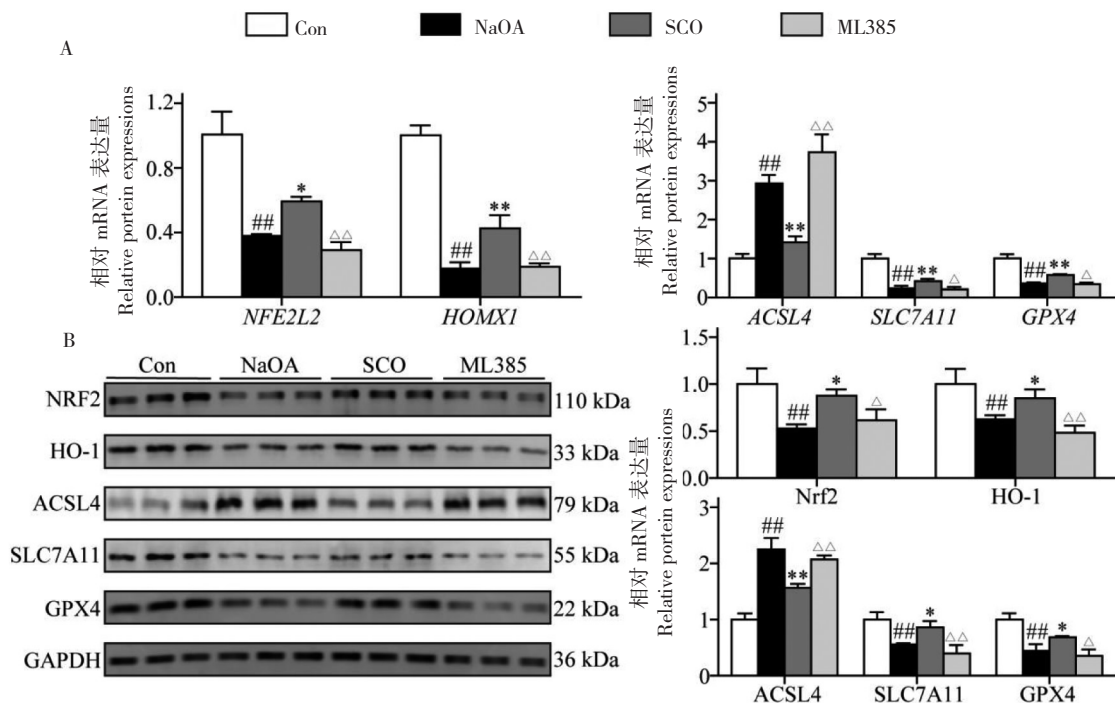


图 10 SCO 对 HepG2 细胞 mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effects of SCO on mRNA (A) and protein (B) expression levels in HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

清除磷脂氢过氧化物的能力<sup>[9]</sup>。SLC7A11 与 GPX4 表达的协同下调,共同构成了铁死亡启动的重要分子基础<sup>[23]</sup>。与此相一致的是,促铁死亡关键酶 ACSL4 的表达显著升高;同时,肝组织及细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  与 MDA 水平上升、线粒体膜电位下降以及 ROS 过度积累,整体呈现出典型的铁死亡特征性改变。在此病理背景下,SCO 干预可有效逆转上述异常情况。在体内实验中,SCO 能够改善肝脏脂肪变性,恢复肝功能指标。在体外实验中,SCO 亦能有效抑制 HepG2 细胞的脂滴沉积、ROS 生成以及线粒体功能障碍。机制研究表明,SCO 通过促进 NRF2 核转位,上调 HO-1、SLC7A11 与 GPX4 的表达,同时抑制 ACSL4 的表达,从而增强细胞的抗氧化防御能力,有效阻断脂质过氧化级联反应,发挥抗铁死亡的保护作用。

为深入探究 NRF2 通路在 SCO 抗铁死亡过程中所发挥的必要作用,本研究引入 NRF2 特异性抑制剂 ML385 进行实验。结果显示,ML385 可显著削弱 SCO 对脂代谢紊乱、氧化应激及线粒体损伤的改善作用,同时逆转 SCO 对 NRF2 下游靶点的调控效应。该“功能缺失”的实验证据,有效排除了可能存在的脱靶干扰因素,进一步证实了 SCO 对肝细胞所发挥的保护作用依赖于 NRF2 通路的激活,从而极

大地增强了本研究机制结论的可信度与科学性。

综上所述,本研究从多个层面系统阐明了 SCO 通过激活 NRF2/GPX4 通路抑制铁死亡,进而改善小鼠 MASLD 的关键机制。该机制的阐释不仅拓展了 SCO 在代谢性肝病中的药理学认知,也为靶向铁死亡通路开发 MASLD 干预新策略提供了实验依据与潜在候选分子。

**数据可用性声明:** 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.36253>) 中访问获取。

## 参考文献

- Hagström H, Shang Y, Hegmar H, et al. Natural history and progression of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2024, 9: 944-956.
- Zhang X, Lau HC, Yu J, et al. Pharmacological treatment for metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and related disorders: current and emerging therapeutic options [J]. *Pharmacol Rev*, 2025, 77: 100018.
- Yin XZ, Liu ZJ, Li C, et al. Hinokitiol ameliorates MASH in mice by therapeutic targeting of hepatic Nrf2 and inhibiting hepatocyte ferroptosis [J]. *Phytomedicine*, 2025, 139: 156472.
- Ru Q, Li YS, Chen L, et al. Iron homeostasis and ferroptosis

- in human diseases: mechanisms and therapeutic prospects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9: 271.
- 5 Maus M, López-Polo V, Mateo L, et al. Iron accumulation drives fibrosis, senescence and the senescence-associated secretory phenotype [J]. *Nat Metab*, 2023, 5: 2111-2130.
- 6 Guo TL, Yan WH, Cui X, et al. Liraglutide attenuates type 2 diabetes mellitus-associated non-alcoholic fatty liver disease by activating AMPK/ACC signaling and inhibiting ferroptosis [J]. *Mol Med*, 2023, 29: 132.
- 7 Chen JY, Li XP, Ge CD, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29: 467-480.
- 8 Jiang XY, Li WT, Ning Y, et al. Protective effect and mechanism of piperine on acute alcoholic liver injury in mice [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2025, 37: 1497-1503.
- 9 Huang B, Wang H, Liu S, et al. Palmitoylation-dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis [J]. *Nat Commun*, 2025, 16: 867.
- 10 He F, Zhang P, Liu JL, et al. ATF4 suppresses hepatocarcinogenesis by inducing SLC7A11 (xCT) to block stress-related ferroptosis [J]. *J Hepatol*, 2023, 79: 362-377.
- 11 Yang RY, Gao WH, Wang ZB, et al. Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction via Nrf2/HO-1/GPX4 axis [J]. *Phytomedicine*, 2024, 122: 155135.
- 12 Niu CY, Jiang DM, Guo YN, et al. Spermidine suppresses oxidative stress and ferroptosis by Nrf2/HO-1/GPX4 and Akt/FHC/ACSL4 pathway to alleviate ovarian damage [J]. *Life Sci*, 2023, 332: 122109.
- 13 Huang XY, Gao Y, Cao HK, et al. Effects of scoparone on non-alcoholic fatty liver disease revealed by RNA sequencing [J]. *Front Endocrinol* (Lausanne), 2022, 13: 1004284.
- 14 Hui YY, Wang XY, Yu ZH, et al. Scoparone as a therapeutic drug in liver diseases: Pharmacology, pharmacokinetics and molecular mechanisms of action [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105170.
- 15 Huang P, Yang LL, Liu T, et al. Scoparone alleviates nonalcoholic fatty liver disease by modulating the PPAR $\alpha$  signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 984: 177033.
- 16 Feng WD, Wang Y, Luo T, et al. Scoparone suppresses mitophagy-mediated NLRP3 inflammasome activation in inflammatory diseases [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44: 1238-1251.
- 17 Liu BB, Deng XL, Jiang QQ, et al. Scoparone improves hepatic inflammation and autophagy in mice with nonalcoholic steatohepatitis by regulating the ROS/P38/Nrf2 axis and PI3K/AKT/mTOR pathway in macrophages [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109895.
- 18 Wang ZR, Yao MR, Jiang LY, et al. Dexmedetomidine attenuates myocardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis via AMPK/GSK-3 $\beta$ /Nrf2 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154: 113572.
- 19 Song HQ, Yang RZ, Zhang JH, et al. Oleic acid-induced steatosis model establishment in LMH cells and its effect on lipid metabolism [J]. *Poult Sci*, 2023, 102: 102297.
- 20 Peleman C, Francque S, Berghe TV, et al. Emerging role of ferroptosis in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: revisiting hepatic lipid peroxidation [J]. *EBioMedicine*, 2024, 102: 105088.
- 21 Zhang JY, Li WY, Qiu XY, et al. Exploration of key markers driving ferroptosis in the progression of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *PLoS One*, 2025, 20: e0320399.
- 22 Xie LP, Zhou CY, Wu YT, et al. Wenqingyin suppresses ferroptosis in the pathogenesis of sepsis-induced liver injury by activating the Nrf2-mediated signaling pathway [J]. *Phyto-medicine*, 2023, 114: 154748.
- 23 Xie YX, Li YN, Xie YF, et al. CIRBP stabilizes *Slc7a11* mRNA to sustain the SLC7A11/GPX4 antioxidant axis and limit ferroptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Antioxidants* (Basel), 2025, 14: 930.

(上接第 2045 页)

- 19 Ren L, Shao YT, Qin SH, et al. Study on target identification and effect of saponin A on depressive disorder [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2024, 36: 44-51.
- 20 Zhang B, Zhang XL, Zhang CY, et al. Effect of Guanxin Danshen Formulation on diabetic kidney disease in db/db mice through regulation of Nrf2 pathway [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2020, 45: 2595-2600.
- 21 Zhou KD, Wang ST, Jin G, et al. Yishen Huashi Granules protect kidneys of db/db mice via p38 MAPK signaling pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2025, 31: 58-68.
- 22 Zuo WM, Li JP, Li CM, et al. Study on the effective substances and mechanism of *Halenia elliptica* D. Don in anti-hepatitis based on UPLC-Q-TOF-MS/MS combined network pharmacology and molecular docking [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2021, 33: 1946-1956.