

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20240925005

基于网络药理学和动物实验探讨参葛方治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制

方 森^{1,2}, 陈兆兰³, 朱敏莹⁴, 郑彦希¹, 李 曼^{1,2}, 高月求^{1,2}, 张 鑫^{1,2}, 吕 佳¹

1. 上海中医药大学附属曙光医院(上海 201203); 2. 上海市中医临床重点实验室(上海 201203); 3. 上海市闵行区马桥社区卫生服务中心(上海 201100); 4. 同济大学附属杨浦医院(上海 200090)

【摘要】 目的 探讨参葛方治疗代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)的作用机制。**方法** ①利用TCMSP、Uniprot、GeneCards、OMIM、DrugBank、PharmGKB数据库搜索参葛方活性成分和MAFLD相关靶点,采用String平台构建蛋白-蛋白相互作用网络,并进行京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析,利用Autodock Vina软件进行分子对接。②C57Bl/6J小鼠随机分为对照组、模型组、多烯磷脂酰胆碱组(0.205 2 g/kg)及低、中、高剂量药物组(3.9 g/kg、7.8 g/kg、15.6 g/kg参葛方)。采用ALMN饲料喂养20周造模后,对照组和模型组灌胃饮用水(每天0.3 mL/只),其余各组灌胃给予相应干预,共干预16周。干预结束后检测小鼠血清肝功能、血脂、炎症因子等生化指标。肝组织进行苏木精-伊红染色、油红O染色和天狼猩红染色并观察病理情况。实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法和Western blot法检测过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)信号通路表达。**结果** ①通过网络药理学筛选出参葛方治疗MAFLD的核心药物靶点6个及主要有效成分6个;通过分子对接后发现PPARA-槲皮素、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)-木犀草素、PPARG-槲皮素、PPARG-山柰酚和白细胞介素-6(IL-6)-槲皮素均显示有较强结合活性,表明参葛方可能通过PPARA、PPARG和IL-6等靶点发挥抗MAFLD的作用。②与模型组相比,参葛方高剂量组小鼠肝体比、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平显著降低($P<0.05$);肝组织病理炎症、脂肪沉积及纤维化方面均有明显改善;肝组织PPARG和固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)表达水平降低($P<0.05$),肉碱棕榈酰转移酶1A(CPT1A)和酰基辅酶A氧化酶1(ACOX1)表达水平升高($P<0.05$),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和IL-6表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论** 参葛方可通过抑制PPARA-CPT1A-ACOX1轴及下调PPARG表达,遏制MAFLD疾病进展。

【关键词】 代谢相关脂肪性肝病;参葛方;网络药理学;分子对接;作用机制;小鼠模型;中药研究

Exploring mechanism of Shenge Formula in treating metabolic associated fatty liver disease based on network pharmacology and animal experiments

FANG Miao^{1,2}, CHEN Zhaolan³, ZHU Minying⁴, ZHENG Yanxi¹, LI Man^{1,2}, GAO Yueqiu^{1,2}, ZHANG Xin^{1,2}, LYU Jia¹

1. Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Key Laboratory of Traditional Chinese Clinical Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Maqiao Community Health Service Center, Minhang District, Shanghai 201100, China; 4. Yangpu Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200090, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Shenge Formula in treating metabolic associated fatty liver disease (MAFLD). **Methods** ①TCMSP, Uniprot, GeneCards, OMIM, DrugBank and PharmGKB databases were used to search for active ingredients of Shenge Formula and gene targets of MAFLD. The protein-protein interaction network was constructed using the String platform, and Kyoto encyclopedia of genes and genomes

(KEGG) enrichment analysis was performed. Molecular docking was carried out using the Autodock Vina software. ②The C57Bl/6J mice were randomly divided into control group, model group, phosphatidylcholine group (0.205 2 g/kg), and low, medium and high-dose drug groups (3.9 g/kg, 7.8 g/kg, 15.6 g/kg of Shenge Formula). After 20 weeks of model establishment using the ALMN diet, the control group and the model group were given drinking water

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82004160, 82305184); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(zyyzdxk-2023060); 上海市卫健委卫生行业临床研究专项(202040237)

[作者简介] 方森,女,硕士研究生,主要从事中医药治疗慢性肝病的研究工作

[通信作者] 吕佳,副主任医师;E-mail:lvjia1030@163.com

by gavage (0.3 mL per rat per day), while the other groups were given corresponding interventions by gavage for a total of 16 weeks. After the intervention, the biochemical indicators such as liver function, blood lipids, and inflammatory factors in the mouse serum were detected. The liver tissue was stained with hematoxylin-eosin, oil red O and picosirius red, and the pathological conditions were observed. Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blot were used to detect the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPARA) signaling pathway. **Results** ① Through network pharmacology, 6 core drug targets and 6 main active ingredients for the treatment of MAFLD by Shenge Formula were identified; after molecular docking, it was found that PPARA-quercetin, peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARG)-luteolin, PPARG-quercetin, PPARG-kaempferol, and interleukin-6 (IL-6)-quercetin all showed strong binding activity, indicating that the Shenge Formula may exert anti-MAFLD effects through these targets such as PPARA, PPARG and IL-6. ② Compared with the model group, mice in the high-dose Shenge Formula group showed significantly reduced liver-to-body weight ratio, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels ($P<0.05$). Histopathological examination revealed marked improvements in hepatic inflammation, lipid deposition, and fibrosis. Furthermore, hepatic expression levels of PPARG and sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) were significantly decreased ($P<0.05$), while the expression levels of carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) and acyl-CoA oxidase 1 (ACOX1) were significantly increased ($P<0.05$). In addition, the expression levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-6 were significantly reduced ($P<0.05$). **Conclusions** Shenge Formula inhibits the progression of MAFLD by suppressing the PPARA-CPT1A-ACOX1 axis and downregulating the expression of PPARG.

Keywords: metabolic associated fatty liver disease; Shenge Formula; network pharmacology; molecular docking; mechanism of action; mouse model; Chinese materia medica research

代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD), 曾用名非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD), 是指有明确肝脏脂肪积聚 (肝脂肪变性) 的组织学 (肝活检)、影像学或血液生物标志物证据, 同时合并以下 3 项条件之一: 超重/肥胖、2 型糖尿病、代谢功能障碍的一种慢性肝病^[1]。代谢相关脂肪性肝病最终会进展到肝纤维化甚至肝恶性肿瘤, 是终末期肝病和肝移植的主要病因^[2]。除此之外, 有研究^[3]显示, MAFLD 作为一种内分泌疾病, 也是某些常见肝外肿瘤的高危因素, 例如结直肠癌肿瘤, 其机制可能与胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 水平升高有关。因此, 积极防治 MAFLD 具有重要的社会和经济意义。迄今为止, 全世界尚未有批准治疗 MAFLD 的药物上市, 中医药在治疗 MAFLD 上有独特优势, 在改善肝功能、纠正脂质代谢, 遏制肝纤维化进展方面均有疗效。

参葛方是上海中医药大学附属曙光医院肝病科治疗 MAFLD 的临床经验方, 在运动饮食控制的基础上联合参葛方治疗 MAFLD 在临床应用多年, 收效颇丰^[4-6]。参葛方由丹参、葛根、垂盆草、白术、片姜黄、女贞子组成。本研究基于网络药理学方法进行生物信息分析, 预测参葛方治疗 MAFLD 的作用机制, 然后通过建立 MAFLD 小鼠模型, 观察参葛方对肝功能、血脂代谢、组织炎症、脂质沉积及纤维化进展的影响, 且验证网络药理学预测的作用靶点^[7]。

1 材料与方法

1.1 网络药理学研究

1.1.1 参葛方化合物及靶点筛选 在 TCMSP 平台 (<http://tcmispw.com/tcmisp.php>) 搜索“丹参”“葛根”“片姜

黄”“垂盆草”“女贞子”“白术”的中药有效成分, 以“口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 ”为条件筛选活性化合物且查找靶点。通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 规范命名获取的蛋白靶点。

1.1.2 MAFLD 疾病靶点的筛选 基于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 及 DrugBank (<https://www.drugbank.com/>) 数据库中以“non-alcoholic steatohepatitis”“metabolic associated fatty liver disease”为检索式获取 MAFLD 相关疾病靶点, 合并并删除重复靶点。

1.1.3 活性化合物和 MAFLD 交集靶点的筛选 应用 R 和 Cytoscape 3.8.0 软件绘制中药小分子活性药物和 MAFLD 疾病靶点的交集图和连线图。在 String 平台输入药物和疾病交集靶点并构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络。

1.1.4 京都基因和基因组数据库 (KEGG) 富集分析 取小分子药物和 MAFLD 的共同靶点, 使用 R 语言对其进行 KEGG 富集分析, 并列出排名前 20 的信号通路。

1.1.5 活性化合物和靶点蛋白的分子对接 通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取小分子配体的 2D 结构, 将 2D 结构输入 Chem Office 软件绘制其 3D 结构。运用 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 筛选蛋白靶点且分辨率较高的晶体结构作为分子对接受体。采用 AutoDock Vina 1.5.6 软件进行分子对接, 以探索蛋白配体的相互作用。比较对接结果的得分大小, 最终得到分子模拟的最优构象。利用 PyMOL 及 Discovery Studio 2019 软件进行可视化, 导出化合物与关键残基之间的相互作用 2D 图及 3D 分析图。一般来说当结合能小于 -5.0 kcal/mol 表明两者具有较好的结合活性, 小于 -7.0 kcal/mol 表明有强烈的结

合活性,结合能越低则说明两者结合活性越强,亲和力越高,构象也越稳定。

1.2 动物实验验证

1.2.1 材料

1.2.1.1 动物 雄性 C57BL/6J 小鼠 48 只, SPF 级, 8 周龄, 体质量 (20 ± 1.5) g, 购于浙江维通利华实验动物有限公司。动物生产许可证号: SCXK(浙)2019-0001; 动物使用许可证号: SYXK(沪)2017-0014。小鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心 SPF 级屏障系统中, 温度 26°C , 湿度 30%~60%, 小鼠自由饮水和摄食, 光照和黑暗昼夜交替。本实验所有操作处理过程均符合上海中医药大学实验动物伦理委员会规定(伦理批准号: PZSHUTCM210320005)。

1.2.1.2 药物与试剂 参葛方药物组成: 丹参 15 g、葛根 15 g、白术 15 g、片姜黄 15 g、女贞子 15 g、垂盆草 30 g, 混合后制备成参葛方颗粒(沪药制备字 Z20220016000, 批号: 202307082903), 由上海中医药大学附属曙光医院委托上海万仕诚药业有限公司生产。多烯磷脂酰胆碱(易善复, 批号: EBJD083), 购自赛诺菲(北京)制药有限公司。

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、油红 O 染色试剂盒、天狼猩红染色试剂盒(批号分别为 G1120、G1263、G1470), 北京索莱宝生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6 酶联免疫吸附分析(ELISA)检测试剂盒(批号分别为 RK00027、RK00008), 武汉爱博泰克生物科技有限公司; 过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT1A)、乙酰辅酶 A 氧化酶 1 (ACOX1)、固醇调节元件结合蛋白 1c (SREBP-1c)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体 (GAPDH)(批号分别为 ab126285、ab209350、ab234111、ab184032、ab3259、ab8245), 美国 Abcam 公司。

1.2.1.3 主要仪器 电子天平(型号: MX204/A), 梅特勒托利多科技(中国)有限公司; 低温离心机(型号: 5425R 和 5810R), 德国 Eppendorf 公司; 酶标仪(型号: Synergy H4), 美国 BioTek 仪器有限公司; 病理扫片机(型号: KF-PRO-120), 宁波江丰生物科技有限公司; 荧光定量 PCR 仪(型号: QuantStudio6), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 显影仪(型号: ChemiDoc), 美国 Bio-Rad 公司。

1.2.2 造模与干预方法 将 48 只小鼠随机分为对照组、模型组、多烯磷脂酰胆碱组及低、中、高剂量药物组, 每组 8 只。对照组用 AIN-93 饲料喂养, 其余 5 组均给予 ALMN 饲料(40% 反式脂肪酸、20% 果糖、2% 胆固醇), 20 周后开始用参葛方干预, 共干预 16 周。各剂量药物组给予参葛方颗粒剂灌胃, 低、中、高剂量分别为 3.9 g/kg、7.8 g/kg 和 15.6 g/kg(中剂量为临床等效剂量); 多

烯磷脂酰胆碱组灌胃给予多烯磷脂酰胆碱(0.205 2 g/kg)。以上 4 组给药体积均为每天 0.3 mL/只; 对照组和模型组灌胃饮用水(每天 0.3 mL/只)。每周监测各组小鼠体质量及采食量。末次给药 24 h 后取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 吸取上层血清, -80°C 保存。经门静脉穿刺用磷酸盐缓冲液(PBS)灌流后取小鼠肝脏, 冰上切割, 部分置于 4% 多聚甲醛中浸泡后用于制备石蜡切块, 部分液氮速冻后, -80°C 保存, 用于制备冰冻切片。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 生化指标 取小鼠外周血分离血清后直接测定, 送至上海中医药大学附属曙光医院检验科, 采用生化分析仪器检测肝功能[丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)]及总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、TNF- α 和 IL-6 水平。

1.2.3.2 HE 染色观察肝组织病理特征 采用 4% 多聚甲醛固定组织标本, 以保持细胞和组织结构的完整性。将固定的组织标本经过脱水、石蜡包埋后切片。然后在玻片上加入伊红染色剂 20 min, 加入苏木精染细胞核, 采用乙醇进行脱色, 清水冲洗后固定、风干、封片, 显微镜下直接观察和分析。

1.2.3.3 油红 O 染色检测脂肪积聚情况 组织切片上加入油红 O 染液, 均匀覆盖整个样本, 20 min 后, 将染液倒掉, PBS 冲洗后再加入苏木精染液, 染色细胞核, 2 min 后用 PBS 轻轻冲洗。将样本放置在通风处自然晾干后, 树脂封片并镜下观察。

1.2.3.4 天狼猩红染色检测纤维化程度 将准备好的石蜡切片, 脱蜡烤片后, 滴加天狼猩红染色剂, 在适当的时间和温度下, 进行染色反应。用 PBS 洗涤样本, 去除未结合的染料。使用适当的固定剂固定染色后的样本, 确保染色结果的稳定并在显微镜下观察。

1.2.3.5 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测相关基因表达 取 100 mg 的肝组织, 参考说明书用提取试剂盒提取组织总 RNA。按照逆转录试剂盒说明将 RNA 逆转录为 DNA。使用 SYBR Select Master Mix 试剂盒标记目标 DNA 后上机检测。扩增引物由生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。反应条件: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 45 个循环, 在最后一次循环结束后, 72°C 进一步延伸 5 min。各组均设 3 个复孔。采用甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因相对表达量。

1.2.3.6 Western blot 法检测相关蛋白表达 取鼠肝组织加入蛋白裂解液后研磨, 离心后提取蛋白, 二辛可酸(BCA)法定量。配制适当浓度的分离胶和浓缩胶, 蛋白样本与上样缓冲液混合, 煮沸变性, 每孔上样 20~50 μg 蛋白。恒压电泳分离蛋白, 恒流转膜, 5% 脱脂牛

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	引物长度/bp
PPARA	上游:CCCAAGGGAGGAATAGCTTCT	21
	下游:CTCTGCGATGCGGTTC	19
PPARG	上游:TATGGAGTGACATAGAGTGTGCT	23
	下游:CCACTTCAATCCACCCAGAAAG	22
CPT1A	上游:CTCCGCCTGAGCCATGAAG	19
	下游:CACCACTGATGATGCCATTCT	21
ACOX1	上游:TAACCTTCCTCACTCGAAGCCA	21
	下游:AGTTCCATGACCCATCTCTGTC	22
SREBP-1c	上游:CCAGGGACGACAGTGATGC	19
	下游:AGGGGAGGCTACCTCTTCAG	20
GAPDH	上游:TGGATTGAGCGCATTTGGTC	20
	下游:TTTGCACCTGCTACGTGTTGAT	21

注:PPARA为过氧化物酶体增殖物激活受体α基因,PPARG为过氧化物酶体增殖物激活受体γ基因,CPT1A为肉碱棕榈酰转移酶1A基因,ACOX1为乙酰辅酶A氧化酶1基因,SREBP-1c为固醇调节元件结合蛋白-1c基因,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

奶封闭非特异性结合位点。一抗(PPARA,1:2 000;PPARG,1:2 000;CPT1A,1:2 000;ACOX1,1:2 000;SREBP-1c,1:2 000;GAPDH,1:5 000)过夜孵育,羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育1 h。滴加化学发光底物,

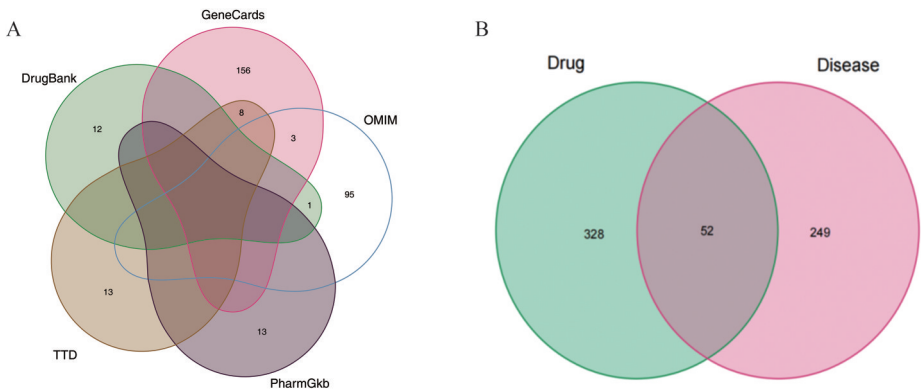
用凝胶成像系统检测。

1.2.4 统计学方法 折线和柱状图采用 GraphPad Prism9.0 软件绘制。染色图片使用 Image Pro Plus 软件进行半定量分析。实验数据使用 SPSS 25.0 软件统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析,若存在方差不齐则使用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学

2.1.1 参葛方活性化合物及靶点 检索 TCMSP 数据库,获得小分子活性成分:丹参 202 个,葛根 18 个,片姜黄 52 个,垂盆草 47 个,女贞子 80 个,白术 55 个。丹参中小分子作用靶点为 1 576 个,葛根为 995 个,片姜黄为 720 个,垂盆草为 596 个,女贞子为 1 026 个,白术为 774 个。删除重复数据,得共同靶点 380 个。基于 Genecards、OMIM、PharmGKB、TTD、Drugbank 等数据库检索 MAFLD 疾病相关作用靶点,删除重复后可得到 345 个靶点(图 1A),用 R 软件绘制交集靶点韦恩图,结果如图 1B 所示,可得到疾病与药物共同靶点 52 个。

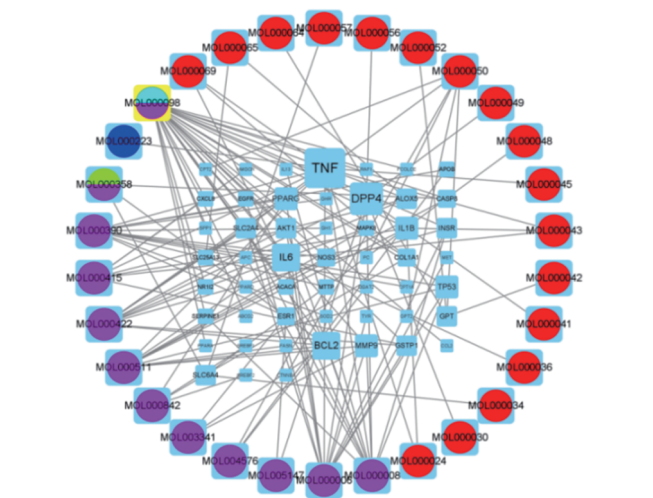


注:A为基于5个数据库检索代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)疾病相关靶点的交互图,B为参葛方药物和MAFLD疾病靶点交集图。

图 1 参葛方治疗 MAFLD 作用靶点韦恩图

采用 Cytoscape 软件构建“药物-有效成分-靶点”图,结果如图 2 所示。获得药物有效小分子化合物 30 个,且与 52 个疾病与药物共同靶点进行相关分析,综合网络节点拓扑值特征可以得到度中心性>10 的核心小分子化合物为槲皮素、木犀草素、芹菜素、大豆黄酮、山柰酚、熊果酸(表 2)。靶点连线最多的基因依次是 *TNF-α*、*DPP4*、*BCL-2*、*IL-6*、*TP53*、*MMP-9*、*PPARG* 和 *IL-1β*。

2.1.2 MAFLD 疾病靶点 将 MAFLD 和参葛方相关的 52 个共同靶点导入 String 平台构建 PPI 网络图(图 3A),通过提高信任评分到 0.7 及删除无连接靶点进一步明确核心靶点 48 个(图 3B)。在 Cytoscape 软件中绘制靶点链接图(图 4A),并通过插件对靶点进行进一步筛选,将 21 个核心基因绘制互作连线图(图 4B),并列岀紧密中心性为 1 的核心基因,结果见表 3。



注:宝蓝色代表丹参成分、绿色代表葛根成分、天蓝色代表垂盆草成分、红色代表白术成分、紫色代表女贞子成分。

图 2 “药物-有效成分-靶点”图

表2 核心活性成分网络节点拓扑值特征

活性成分编号	名称	度中心性	介数中心性	紧密中心性
MOL000098	槲皮素	28	0.477 690 73	0.421 875 00
MOL000006	木犀草素	13	0.088 938 80	0.318 897 63
MOL000008	芹菜素	12	0.082 801 01	0.318 897 63
MOL000390	大豆黄酮	12	0.206 750 28	0.311 538 46
MOL000422	山柰酚	11	0.108 894 46	0.355 363 15
MOL000511	熊果酸	10	0.061 763 81	0.304 511 27

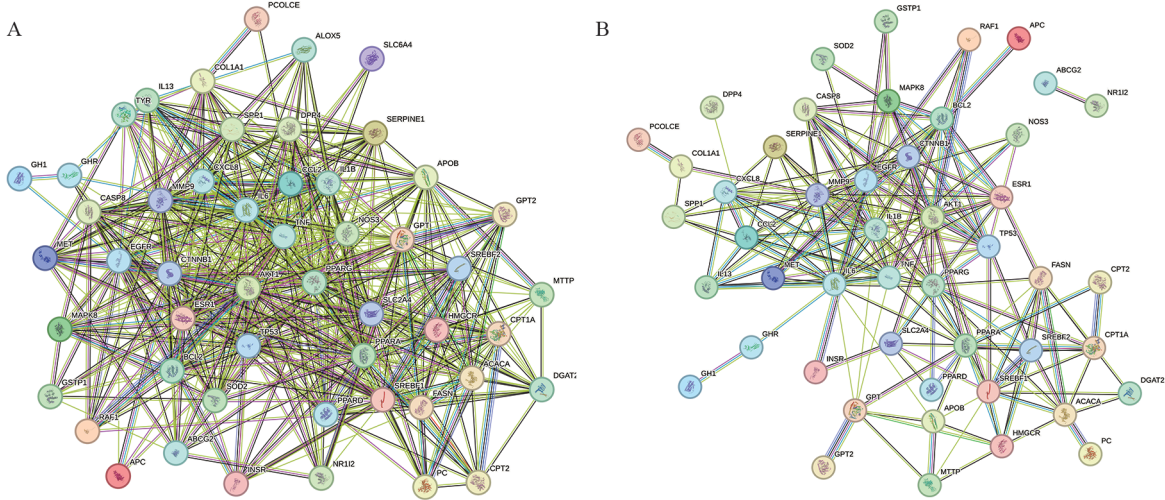
2.1.3 KEGG 通路富集分析 通过对 52 个潜在的靶点进行 KEGG 富集分析,得到脂质和动脉粥样硬化、酒精性肝病、晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体(AGE-RAGE)信号通路、代谢相关脂肪性肝病、IL-17 信号通路等 148 个信号通路,表 4 中列出根据 *P* 值排名前 20 的信号通路。其中重点关注代谢相关脂肪性肝病信号通路(hsa04657)靶点可以发现 PPARG、TNF- α 、蛋

表3 核心基因网络节点拓扑值特征

基因名称	度中心性	介数中心性	紧密中心性
PPARG	20	2.422 619 05	1
TP53	20	2.422 619 05	1
CCL2	20	2.422 619 05	1
TNF- α	20	2.422 619 05	1
AKT1	20	2.422 619 05	1
PPARA	20	2.422 619 05	1
IL-6	20	2.422 619 05	1
IL-1 β	20	2.422 619 05	1

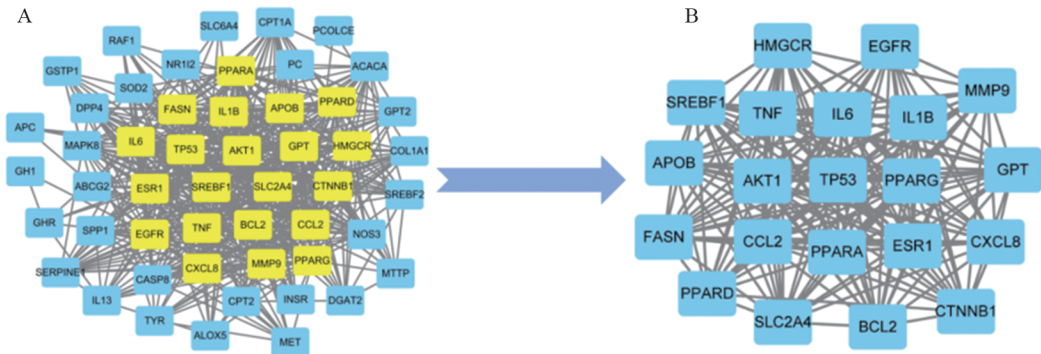
注:PPARG 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 基因,TP53 为肿瘤抑制蛋白 53 基因,CCL2 为趋化因子配体 2 基因,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 基因,AKT1 为蛋白激酶 B1 基因,PPARA 为过氧化物酶体增殖物激活受体 α 基因,IL-6 为白细胞介素-6 基因,IL-1 β 为白细胞介素-1 β 基因。

白激酶 B1(AKT1)、PPARA、IL-6 和 IL-1 β 这 6 个靶点均出现在此信号通路上。



注:A 为参葛方和代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)共同 52 个靶点的蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络图,B 为提高信任评分进一步提取的核心靶点交互图。

图3 MAFLD 和参葛方共同作用靶点 PPI 图



注:A 为参葛方和代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)共同靶点的连线图,连线表示两者具有相关性,连线数目与核心地位正相关;B 为核心基因蛋白网络图,其度中心均为 20。

图4 MAFLD 和参葛方共同核心作用靶点

2.1.4 活性化合物与靶点蛋白分子对接结果 将 PPARA(6LXA)、PPARG(6K0T)、AKT1(1UNQ)、TNF- α (7YPC)、IL-6(8D82)和 IL-1 β (4GAF)作为靶点蛋白,查阅“药物-有效成分-靶点”分析中的网络节点对应关系,

与表 1 中的 6 个核心配体小分子通过 Autodock Vina 软件进行分子对接(表 5)。结果表明,PPARA-槲皮素、PPARG-木犀草素、PPARG-槲皮素、PPARG-山柰酚和 IL-6-槲皮素 5 对的结合能 < -7 kcal/mol,表明有较强的

表 4 参葛方治疗 MAFLD 的 KEGG 通路富集结果

序号	通路编号	通路名称	<i>P</i> 值	校准后 <i>P</i> 值	<i>q</i> 值
1	hsa04936	脂质与动脉粥样硬化	3.88×10^{-16}	8.81×10^{-14}	3.39×10^{-14}
2	hsa05417	酒精性肝病	1.97×10^{-13}	2.24×10^{-11}	8.61×10^{-12}
3	hsa04933	晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体(AGE-RAGE)	9.78×10^{-11}	7.47×10^{-9}	2.87×10^{-9}
4	hsa05418	流体剪切力与动脉粥样硬化	1.33×10^{-10}	7.53×10^{-9}	2.90×10^{-9}
5	hsa04932	胰岛素抵抗	4.31×10^{-10}	1.96×10^{-8}	7.54×10^{-9}
6	hsa04657	代谢相关脂肪性肝病	1.40×10^{-9}	5.29×10^{-8}	2.04×10^{-8}
7	hsa05142	白细胞介素-17(IL-17)	2.92×10^{-9}	9.45×10^{-8}	3.64×10^{-8}
8	hsa04931	南美锥虫病	4.86×10^{-9}	1.38×10^{-7}	5.31×10^{-8}
9	hsa05161	乙型肝炎	1.15×10^{-8}	2.91×10^{-7}	1.12×10^{-7}
10	hsa05210	腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)	1.58×10^{-8}	3.59×10^{-7}	1.38×10^{-7}
11	hsa05163	结直肠癌	2.22×10^{-8}	4.59×10^{-7}	1.77×10^{-7}
12	hsa05215	人类巨细胞病毒感染	4.12×10^{-8}	7.79×10^{-7}	3.00×10^{-7}
13	hsa01522	磷脂酰肌醇 3 激酶-蛋白激酶 B(PI3K-AKT)	4.47×10^{-8}	7.80×10^{-7}	3.00×10^{-7}
14	hsa04668	前列腺癌	1.46×10^{-7}	2.37×10^{-6}	9.14×10^{-7}
15	hsa04152	内分泌治疗抵抗	2.33×10^{-7}	3.50×10^{-6}	1.35×10^{-6}
16	hsa05144	Toll 样受体	2.47×10^{-7}	3.50×10^{-6}	1.35×10^{-6}
17	hsa05164	癌症蛋白聚糖	2.69×10^{-7}	3.59×10^{-6}	1.38×10^{-6}
18	hsa04068	肿瘤坏死因子(TNF)	4.30×10^{-7}	5.42×10^{-6}	2.09×10^{-6}
19	hsa04910	疟疾	6.06×10^{-7}	6.90×10^{-6}	2.66×10^{-6}
20	hsa05213	叉头框蛋白 O(FoxO)	6.08×10^{-7}	6.90×10^{-6}	2.66×10^{-6}

结合活性。可视化结果如图 5 所示,其中 PPARA 与槲皮素结合活性最强,最小结合能为 -8.4 kcal/mol ,其 ILE420、GLN413、PRO417、ASP419、LEU422、PHE423、PRO424 残基与槲皮素形成氢键相互作用力,ARG409 残基与槲皮素形成疏水相互作用力,HIS413、LEU412 残基与槲皮素形成范德华相互作用力(图 5A)。上述可以说明参葛方中的核心成分通过作用于 PPARA、PPARG 和 IL-6 等核心靶点发挥治疗 MAFLD 的作用。

2.2 动物实验结果

2.2.1 对小鼠体质量和采食量的影响 在参葛方干预起始阶段,对照组小鼠体质量偏低,其余组小鼠基线体质量未见显著差异($P>0.05$)。干预结束后,对照组小鼠体质量为 $(37.45\pm 2.12)\text{ g}$,模型组为 $(47.76\pm 2.13)\text{ g}$,低、中、高剂量药物组体质量分别为 $(47.54\pm 1.37)\text{ g}$ 、 $(44.90\pm 2.12)\text{ g}$ 、 $(41.65\pm 3.97)\text{ g}$,多烯磷脂酰胆碱组为 $(42.79\pm 4.50)\text{ g}$ 。中、高剂量药物组和多烯磷脂酰胆碱组体质量与模型组相比显著下降($P<0.05$)。见图 6。

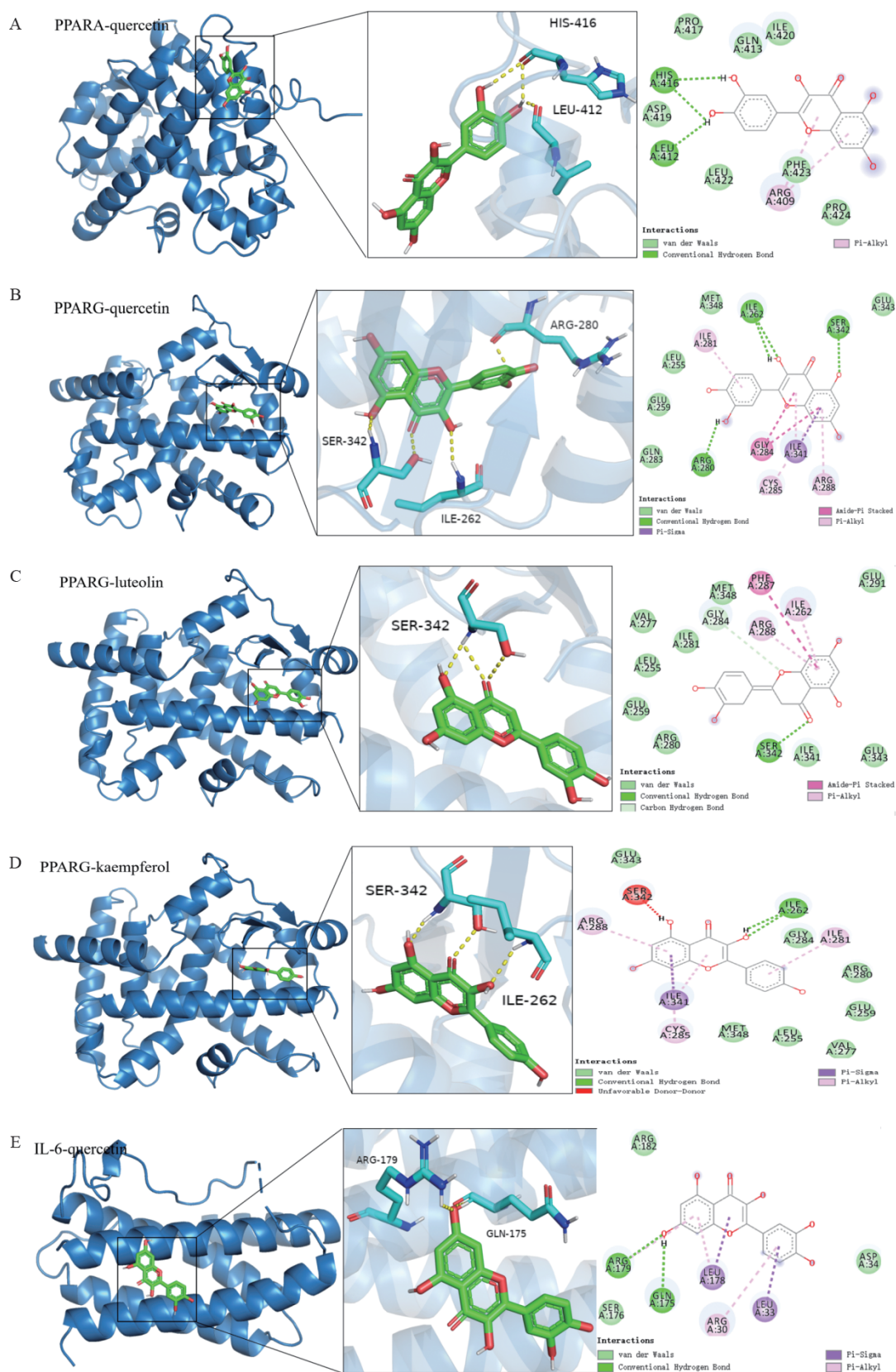
2.2.2 对小鼠肝组织大体及病理的影响 参葛方干预结束后,取小鼠肝脏组织,肉眼可见模型组小鼠肝脏相较于其他两组,颜色淡黄,体积偏大,质软,表面显著油腻感;高剂量药物组疗效最好,与模型组相比小鼠肝脏呈深红色,体积偏小,质量降低,质软,表面油腻感减弱;对照组小鼠肝脏则为显著的红褐色,表面无油腻感。对照组肝体比为 $(4.71\pm 0.53)\%$,模型组肝体比为 $(7.73\pm 0.64)\%$,高剂量药物组小鼠肝体比为 $(5.82\pm 0.63)\%$,与模型组相比显著降低($P<0.001$),见图 7。

表 5 参葛方活性化合物与靶点分子对接结果

靶点蛋白	配体小分子	最小结合能/(kcal/mol)
PPARA	槲皮素(queracetin)	-8.4
PPARG	木犀草素(luteolin)	-7.7
PPARG	槲皮素(queracetin)	-7.7
PPARG	山柰酚(kaempferol)	-7.5
IL-6	槲皮素(queracetin)	-7.1
IL-6	木犀草素(luteolin)	-6.9
TNF- α	木犀草素(luteolin)	-6.9
PPARG	大豆黄酮(daidzein)	-6.8
TNF- α	芹菜素(apigenin)	-6.8
TNF- α	槲皮素(queracetin)	-6.8
TNF- α	山柰酚(kaempferol)	-6.7
IL-1 β	槲皮素(queracetin)	-6.6
AKT1	木犀草素(luteolin)	-6.5
AKT1	槲皮素(queracetin)	-6.4
IL-6	大豆黄酮(daidzein)	-6.4
TNF- α	大豆黄酮(daidzein)	-6.4
AKT1	芹菜素(apigenin)	-6.3
AKT1	山柰酚(kaempferol)	-6.2
TNF- α	熊果酸(Ursolic acid)	-3.7

注:PPARA 为过氧化物酶体增殖物激活受体 α ,PPARG 为过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ,IL-6 为白细胞介素-6,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,AKT1 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,IL-1 β 为白细胞介素-1 β 。

HE 染色后镜下观察,模型组鼠肝组织小叶结构紊乱,肝小叶内分布以大小泡混合的脂肪变性,可见较多气球样变,肝小叶内可见明显炎症细胞浸润。与模型



注:A为过氧化物酶体增殖物激活受体 α (PPARA)与槲皮素的分子对接可视化图,B、C和D为PPARG与槲皮素、木犀草素和山柰酚的分子对接可视化图,E为白细胞介素-6(IL-6)与槲皮素的分子对接可视化图。

图5 参葛方活性化合物与靶点的分子对接示意图

组相比,高剂量药物组肝组织脂肪变程度($P<0.05$)及炎症细胞浸润灶($P<0.05$)均有所减少。见图8。

天狼猩红染色观察鼠肝组织内纤维沉积情况。对

照组鼠肝组织中未见明确纤维沉积,模型组鼠肝脏组织出现大量染为红色的纤维组织。与模型组相比,高剂量药物组肝内纤维沉积程度显著减少($P<0.05$),与

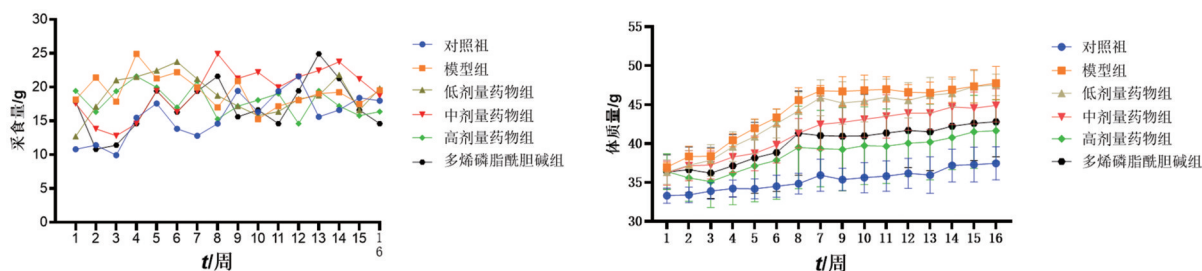
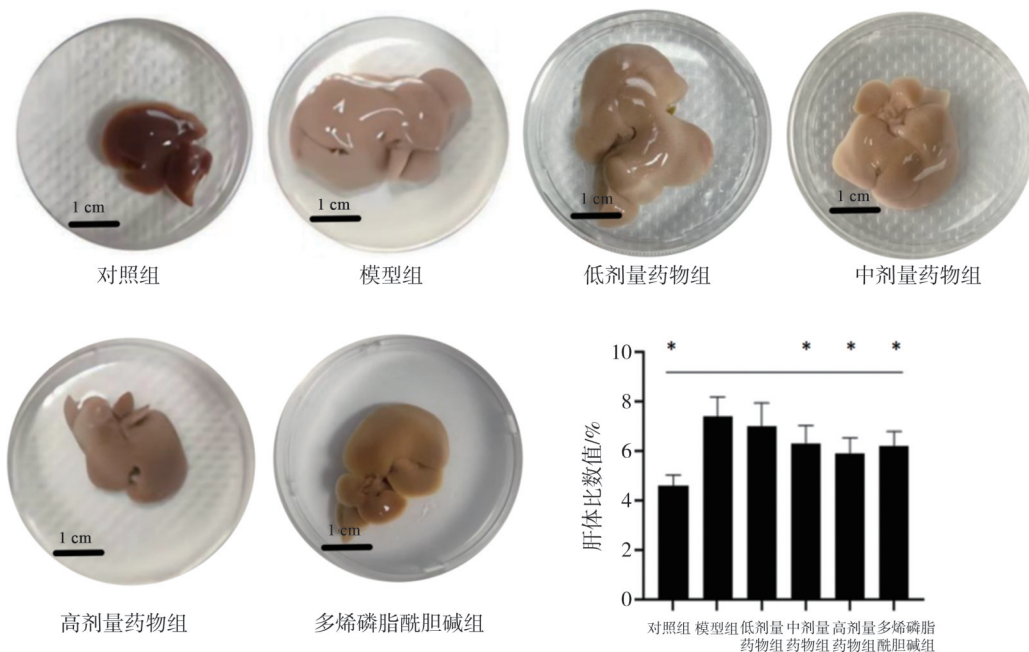
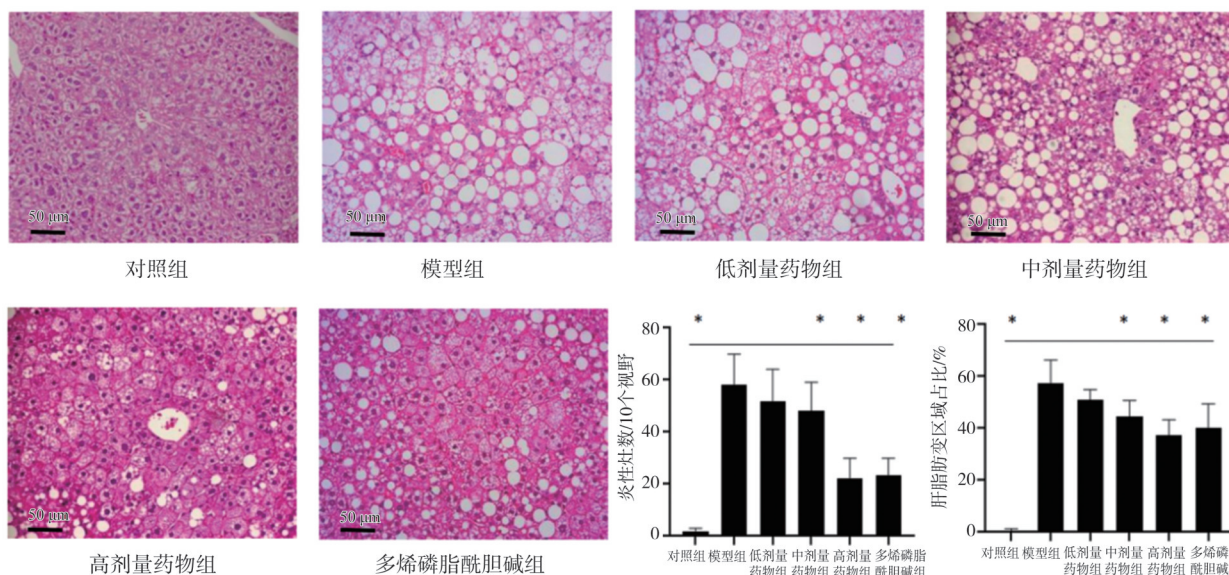


图6 小鼠体质量和采食量变化情况



注:与模型组比较,* $P<0.05$; $n=8$, $\bar{x}\pm s$ 。

图7 肝脏大体及肝体比数值变化



注:与模型组比较,* $P<0.05$; $n=8$, $\bar{x}\pm s$ 。

图8 小鼠肝组织苏木精-伊红染色、炎性细胞浸润及脂肪变情况

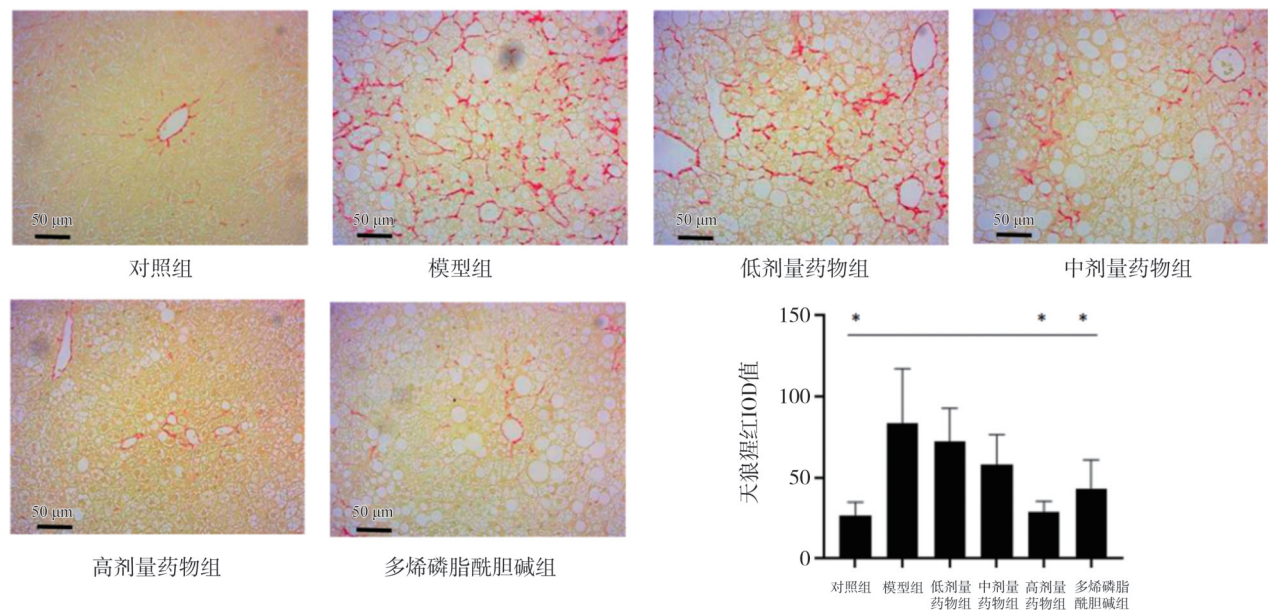
多烯磷脂酰胆碱组相比,参葛方干预后纤维化改善效果更优。见图9。

油红O染色后观察小鼠肝组织内脂肪沉积情况。

模型组小鼠肝组织脂肪变性明显,肝细胞肿胀变形,内含较大的脂肪滴,部分肝细胞细胞核偏移中央,出现大小泡混合性的脂肪变性。与模型组比较,高剂量药物

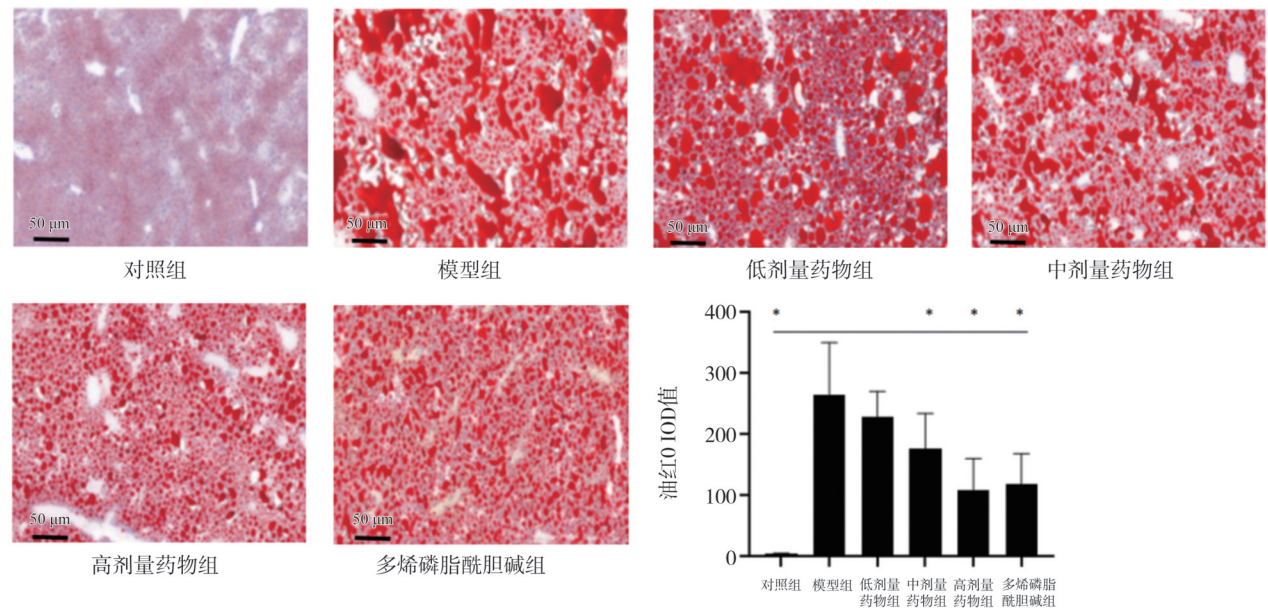
组小鼠肝脂肪积聚程度显著减轻($P<0.05$),对照组未见显著脂肪沉积。以上结果表明,参葛方干预 MAFLD

后,肝脏病理情况得到改善,疗效显著,见图 10。



注:与模型组比较,* $P<0.05$; $n=8$, $\bar{x}\pm s$ 。

图9 小鼠肝组织天狼猩红染色及胶原沉积情况



注:与模型组比较,* $P<0.05$; $n=8$, $\bar{x}\pm s$ 。

图10 小鼠肝组织油红O染色及脂肪沉积情况

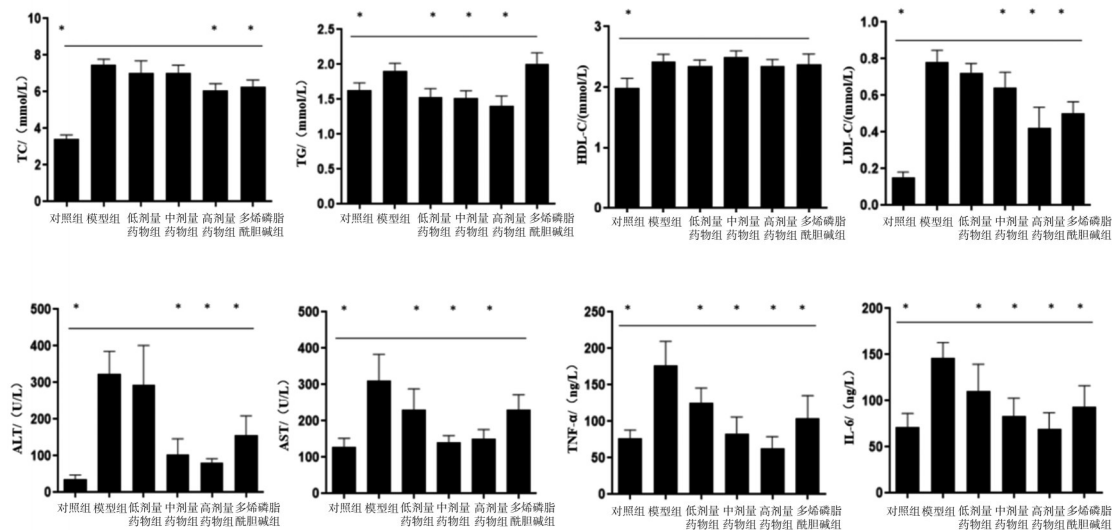
2.2.3 对小鼠血清生化指标的影响 药物干预结束后,检测血清 ALT、AST、TG、TC、LDL-C、HDL-C、TNF- α 和 IL-6 水平,结果显示高剂量组疗效最佳。与模型组相比,高剂量组小鼠 ALT、AST、TG、TC、LDL-C、TNF- α 及 IL-6 水平均显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$), HDL-C 未见显著差异($P>0.05$)。见图 11。

2.2.4 对小鼠肝组织 PPARA 信号通路表达的影响 参葛方干预 MAFLD 疗效显著,且高剂量组疗效最好,因此对高剂量药物组进一步开展机制研究。我们提取小鼠

肝组织总 RNA 后验证了 PPARA、PPARG、CPT1A、ACOX1、SREBP-1c 的 mRNA 表达水平。结果显示,与模型组相比,参葛方组小鼠肝组织 PPARA 和 SREBP-1c mRNA 表达未见显著差异($P>0.05$);PPARG mRNA 表达水平显著降低,CPT1A 和 ACOX1 的 mRNA 表达水平均显著升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。见图 12A~E。

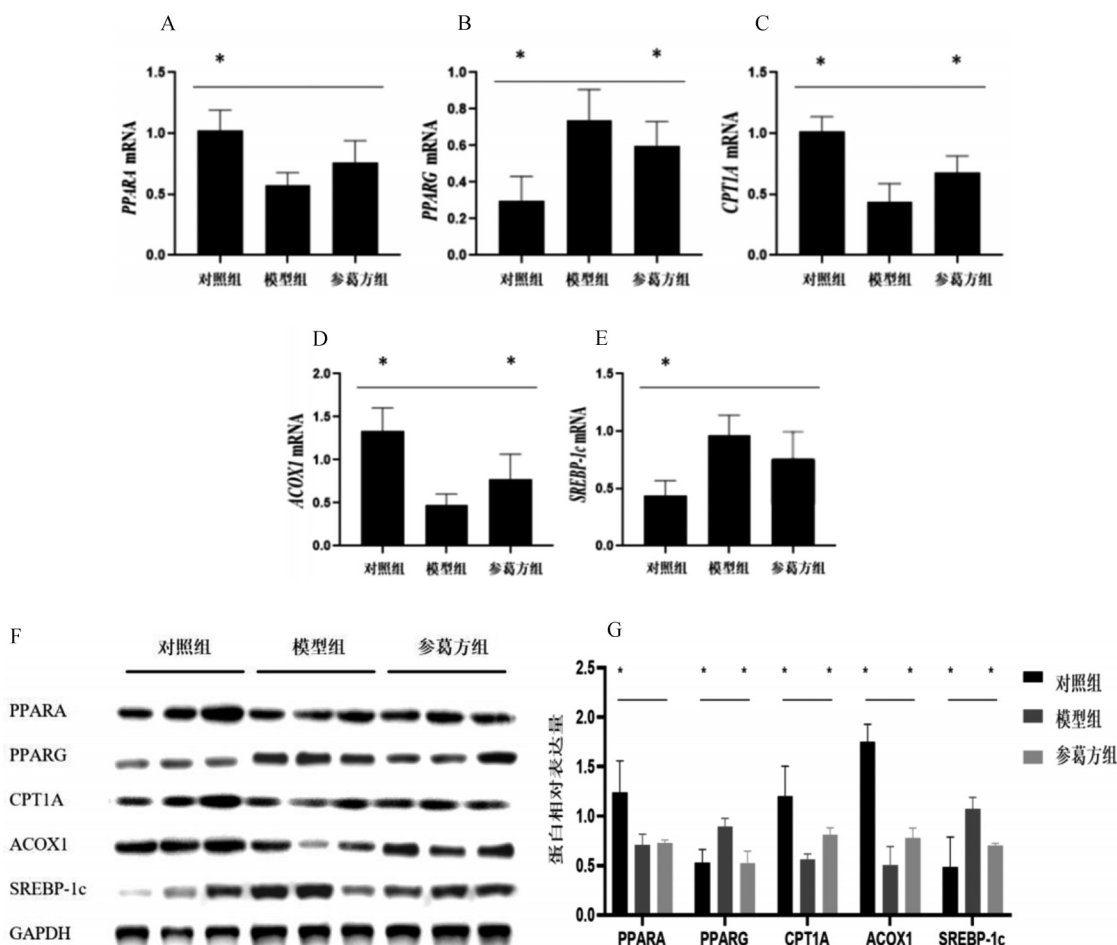
Western blot 结果显示,与模型组相比,参葛方组 PPARG 和 SREBP-1c 蛋白表达水平降低,CPT1A 和

ACOX1 蛋白表达水平升高, 差异均具有统计学意义 (见图 12F~G)。PPARA 蛋白表达水平未见显著差异 ($P>0.05$)。PPARA 蛋白表达水平未见显著差异 ($P>0.05$)。



注: TC 为总胆固醇, TG 为三酰甘油, HDL-C 为高密度脂蛋白, LDL-C 为低密度脂蛋白, ALT 为丙氨酸转氨酶, AST 为天冬氨酸转氨酶, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α, IL-6 为白细胞介素-6。与模型组比较, $*P<0.05$; $n=8$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 11 小鼠血清生化指标表达水平比较



注: PPARα 为过氧化物酶体增殖物激活受体α基因, PPARγ 为过氧化物酶体增殖物激活受体γ基因, CPT1A 为肉碱棕榈酰转移酶 1A 基因, ACOX1 为乙酰辅酶 A 氧化酶 1 基因, SREBP-1c 为固醇调节元件结合蛋白-1c 基因。A~E 为 PPARα、PPARγ、CPT1A、ACOX1、SREBP-1c mRNA 的实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应 (RT-qPCR) 检测结果, F 和 G 为相关蛋白的 Western blot 检测结果。参葛方组为高剂量药物组。与模型组比较, $*P<0.05$; $n=3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 12 小鼠肝组织 PPARA 信号通路蛋白和基因表达的比较

3 讨论

在历代中医古籍中没有“脂肪肝”疾病的明确记载,《难经·五十六难》中记载:“肝之积名曰肥气”,这是与脂肪肝相关最早的中医典籍记载。根据本病临床症状及病理产物可将其归于“积聚”“胁痛”“肝胀”“肝痞”“郁证”“湿阻”“痰浊”“肥气”等范畴。张声生教授认为“瘰”字对应古籍中“肥甘中满、湿热内壅”之意,与现代医学代谢综合征意义相近,倡议将 MAFLD 的中医病名定为“肝瘰”^[8]。赵文霞对大量文献进行统计分析,得出本病最主要的病理因素是痰、湿、瘀^[9]。参葛方为上海中医药大学附属曙光医院肝病科高月求教授治疗 MAFLD 的经验方,方中白术和葛根益气健脾、祛湿化痰,女贞子补益肝肾,丹参和片姜黄破血行气、祛瘀通络。诸药合用,共奏健脾祛痰、化湿祛瘀、活血消脂之效。方中君药丹参、葛根也是现代药理研究发现的治理脂肪肝的热点药物。现代研究^[10]显示丹参可调节血脂,改善肝内微循环,抑制内源性胆固醇的合成,减轻肝中三酰甘油含量及肝脏脂肪变性及纤维化程度,同时可通过增强氧化物酶体增植物激活受体的表达,有效逆转高脂饮食所致肝脂肪变性和炎症改变。葛根素可通过抑制糖异生、抑制相关信号通路,降低血糖血脂水平治疗 MAFLD^[11-12]。

本研究通过网络药理学方法筛选出 MAFLD 和参葛方共同靶点 52 个,拓扑分析进一步明确核心基因 15 个。KEGG 富集分析结果显示,参葛方可能通过参与脂质和动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、NAFLD、TNF 信号通路等多种信号通路治疗 MAFLD。其中,PPARA、PPARG、CPT1A、ACOX1、SREBP-1c 的表达在疾病进展中扮演了十分重要的角色。PPARA 是肝脏中表达最丰富的核受体之一,随着人类 MAFLD 疾病的发展,该基因的 mRNA 转录水平逐渐降低。全身和肝细胞特异性 PPARA 缺陷小鼠在高脂饮食、蛋氨酸和胆碱缺乏的饮食喂养后会产生严重的肝脏脂肪性肝炎,激活 PPARA 对代谢相关脂肪性肝炎具有预防和治愈性的影响^[13]。PPARA 是肝脏脂肪酸氧化的主要转录调控因子,通过激活下游靶基因促进脂肪酸分解代谢,通过上调 CPT1A 和 ACOX1 调控脂质的线粒体和过氧化物酶体 β 氧化^[14]。PPARA 通过拮抗 SREBP-1c 减少新生脂肪生成^[15],通过抑制 NF- κ B 和 AP-1 信号通路减少促炎性细胞因子(如 TNF- α 、IL-6)表达,并增强抗氧化酶活性,发挥抗炎和抗氧化作用^[16]。PPARA 可利用过氧化氢解毒,具有肝保护作用,通过上调大鼠硫酰胺诱导的肝纤维化中的过氧化氢酶表达来降低肝活性氧(ROS)水平。诱导生酮作用可通过 PPARA 介导的机制降低肝脏脂质过氧化和 ROS 生成,因为 β -羟基丁酸能

中和毒性脂肪酸衍生的醛类^[17]。PPARG 主要在脂肪组织、巨噬细胞和肝脏中表达,在葡萄糖代谢和胰岛素敏感性中发挥重要作用,促进脂肪的积累。人 PPARG 沉默突变体(PRO12ALA)和 PPARG 缺乏鼠均发现可以改善胰岛素抵抗。然而,目前尚不清楚是否应单独或联合其他疗法使用 PPARG 拮抗剂、激动剂或部分激动剂。尽管吡格列酮对 2 型糖尿病或胰岛素抵抗患者具有保护心血管的作用,但罗格列酮和吡格列酮因争议性问题已在欧洲市场撤市^[18-19]。对 PPARG 转录活性调控机制及其小分子调节作用的进一步研究,推动了选择性 PPARG 激动剂的开发。值得注意的是,肥胖中上调的周期素依赖性激酶 5(CDK5)可磷酸化 PPARG,导致胰岛素抵抗相关基因表达增加,这一发现促进了 PPARG 磷酸化抑制剂的研发。此外,同时靶向 PPARA 和 PPARG 的策略催生了双重 PPARA/G 激动剂(即格列扎类药物)。目前印度使用的新型 PPARA/G 激动剂沙格列扎(saroglitazar)副作用较少,并可改善血糖和血脂谱^[20-21]。PPARG 可直接激活 SREBP-1c,促进脂肪酸合酶(FASN)、乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)表达,加重肝脂肪变性^[22]。在晚期 MAFLD 中,PPARG 可能通过激活转化生长因子- β (TGF- β)信号通路促进肝星状细胞(HSCs)活化和胶原沉积^[23]。

基于已有文献研究结合网络药理学的预测,本研究推测参葛方可能通过抑制 PPARA 活性以及抑制 PPARG 的表达,发挥治疗 MAFLD 的作用。动物实验验证结果显示参葛方可以降低 MAFLD 小鼠的血脂、TNF- α 和 IL-6 水平,改善 MAFLD 小鼠异常肝功能、肝组织脂肪变性、炎症反应及纤维沉积,抑制肝组织 PPARG 和 SREBP-1c 表达,升高 CPT1A 和 ACOX1 水平。这些实验结果证实参葛方能抑制 PPARA 活性及下调 PPARG 表达,通过调控 PPARA-CPT1A-ACOX1 轴,减少肝细胞脂肪形成和积累,进一步降低 TNF- α 和 IL-6 的水平,遏制 MAFLD 的疾病进展,但其具体分子机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学会. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024 年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2024, 32(5): 418-434.
- [2] SCOTT L F, BRENT A N, MARY R, et al. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies[J]. Nat Med, 2018, 24(7): 908-922.
- [3] LIU Z Q, LIN C Q, SUO C, et al. Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease and the risk of 24 specific cancers[J]. Metabolism, 2022, 127: 154955.
- [4] 郑彦希, 余卓, 方森, 等. 参葛方对脂肪变性肝细胞氧化应激和线粒体功能的影响[J]. 上海中医药杂志, 2023, 57(2): 51-58.
- [5] 吕佳, 高月求, 方森, 等. 参葛方配合生活饮食干预治疗非酒精性脂肪性肝病的临床研究[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(S1):

- 38-40.
- [6] 麦静情, 高月求, 蔡峥, 等. 参葛方治疗脾虚痰浊型老年性非酒精性脂肪性肝炎的随机、双盲、安慰剂对照研究[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(4): 44-48.
- [7] YAN S H, ZHANG S B, DU A, et al. Network pharmacology-based identification of significant pathway for protection of Yinhuang granule in a mice model of metabolic-associated fatty liver disease [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153666.
- [8] 周强, 陶琳, 张声生. 代谢相关脂肪性肝病的中医认识及辨治[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(11): 6380-6384.
- [9] 张亮, 刘鸣昊, 赵文霞, 等. 基于中医“痰湿瘀”理论探讨 KCs 细胞焦亡与代谢相关脂肪性肝病的关系[J]. 中医药学报, 2022, 50(10): 16-20.
- [10] 莫新民, 刘锐, 李建平, 等. 丹参对非酒精性脂肪肝大鼠血清瘦素 Ghrelin 的影响[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(11): 2252-2254.
- [11] 胡波, 徐颖, 丁辉, 等. 葛根素通过抑制 I κ B α /NF- κ B p65 信号轴缓解大鼠非酒精性脂肪肝损伤[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(2): 366-372.
- [12] 施凯舜, 徐峥, 岳跃兵, 等. 葛根素对非酒精性脂肪肝小鼠糖脂代谢的影响及机制[J]. 浙江医学, 2023, 45(19): 2036-2040.
- [13] EMMANUEL D D, THIERRY C, ALEXANDER D N, et al. Inhibition of ATGL alleviates MASH via impaired PPAR α signalling that favours hydrophilic bile acid composition in mice [J]. *J Hepatol*, 2025, 82(4): 658-675.
- [14] LI Z Y, JIN Y, ZHAO H S, et al. Aurantio-obtusin regulates gut microbiota and serum metabolism to alleviate high-fat diet-induced obesity-associated non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Phytother Res*, 2025, 39(5): 1946-1965.
- [15] LENA S, ANNE K, VICTORIA KH, et al. Influence of genistein on hepatic lipid metabolism in an *in vitro* model of hepatic steatosis [J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 1156.
- [16] JOSEPH A D, FRANK M, MICHAEL K. NF- κ B and the link between inflammation and cancer [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 379-400.
- [17] XING G W, MENG L H, CAO S Y, et al. PPAR α alleviates iron overload-induced ferroptosis in mouse liver [J]. *EMBO Rep*, 2022, 23(8): e52280.
- [18] CHEN H, TIAN H B, WAN J, et al. PPAR- γ signaling in nonalcoholic fatty liver disease: Pathogenesis and therapeutic targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 245: 108391.
- [19] VICTORIA P, MARIA G, EFTYCHIA C, et al. Circulating tumor necrosis factor- α levels in non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and a meta-analysis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2021, 36(11): 3002-3014.
- [20] DEVARAJ E. Deciphering the molecular pathways of saroglitazar: A dual PPAR α/γ agonist for managing metabolic NAFLD [J]. *Metabolism*, 2024, 155: 155912.
- [21] SAMER G, MAZEN N, NICOLE L, et al. Saroglitazar, a PPAR- α/γ agonist, for treatment of nafld: a randomized controlled double-blind phase 2 trial [J]. *Hepatology*, 2021, 74(4): 1809-1824.
- [22] MATSUMOTO Y, ISHIMI Y, SUZUKI T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ /small heterodimer partner pathway prevents high fat diet-induced obesity and hepatic steatosis in Sprague-Dawley rats fed soybean meal [J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 75: 108250.
- [23] TOMITA K, TAMIYA G, ANDO S, et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Gut*, 2016, 55(3): 415-424.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2024-09-25

