

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20251202006

基于 Foxm1/NF- κ B 轴探讨七味脂肝方改善饮食诱导小鼠代谢相关脂肪性肝炎的机制

宋德济¹, 圣 炜¹, 张梓琪¹, 卢丽丽², 舒祥兵³, 季 光¹, 张 莉¹

1. 上海中医药大学附属龙华医院脾胃病研究所/经方与现代中药融合创新全国重点实验室(上海 200032);
2. 上海中医药大学公共健康学院(上海 201203); 3. 上海市宝山区中西医结合医院老年病科(上海 201999)

【摘要】 目的 探究七味脂肝方(QWZG)改善饮食诱导的小鼠代谢相关脂肪性肝炎(MASH)的作用机制。**方法** 采用西方饮食喂养诱导 C57BL/6J 雄性小鼠 MASH 模型。第 18 周成模后, 小鼠随机分为模型组及 QWZG 低、中、高剂量干预组($n=8$), 另设对照组($n=8$)。各干预组给予相应剂量 QWZG 灌胃 6 周, 模型组及对照组给予等体积 0.9% 氯化钠溶液。治疗 6 周后测量各组小鼠体质量、肝质量、肝体比, 检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)含量; 通过苏木精-伊红(HE)染色法、油红 O 染色法评估小鼠肝组织病理学变化, 采用免疫组化检测肝组织巨噬细胞浸润; 利用转录组测序(RNA-seq)技术筛选 QWZG 影响的基因及通路, 并运用 Western blot 法与逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法对核心机制进行验证。**结果** 与模型组相比, QWZG 显著降低 MASH 小鼠的体质量、肝质量以及血清 ALT、AST、TC、TG 水平($P<0.05$), 减轻肝脏脂肪变性和气球样变以及巨噬细胞浸润, RNA-seq 结果显示 QWZG 干预显著下调小鼠肝脏叉头框蛋白 M1(Foxm1)的表达, 京都基因与基因组数据库(KEGG)富集分析发现 QWZG 能显著抑制核因子 κ B(NF- κ B)信号通路、细胞因子-细胞因子受体信号传导等炎症相关通路, 验证实验表明 QWZG 明显降低 MASH 小鼠 Foxm1 蛋白表达和 p65 磷酸化水平。**结论** QWZG 改善小鼠 MASH 的作用机制可能与下调 Foxm1 并抑制 NF- κ B 信号通路激活有关。

【关键词】 代谢相关脂肪性肝炎; 七味脂肝方; 叉头框蛋白 M1; 核因子 κ B 信号通路; 中药研究

Mechanism of Qiwei Zhigan Formula in ameliorating diet-induced metabolic dysfunction-associated steatohepatitis in mice: a study based on Foxm1/NF- κ B axis

SONG Deji¹, SHENG Wei¹, ZHANG Ziqi¹, LU Lili², SHU Xiangbing³, JI Guang¹, ZHANG Li¹

1. Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine/State Key Laboratory of Integration and Innovation of Classic Formula and Modern Chinese Medicine, Shanghai 200032, China; 2. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Geriatrics, Shanghai Baoshan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 201999, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Qiwei Zhigan Formula (QWZG) in ameliorating diet-induced metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) in mice. **Methods** A MASH model was established in male C57BL/6J mice by feeding a Western diet.

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82530124); 上海市自然科学基金项目(237R1447700)

[作者简介] 宋德济, 男, 硕士研究生, 主要从事中医药防治慢性肝病研究工作

[通信作者] 张莉, 研究员, 博士研究生导师;

E-mail: lzhang0706@shutcm.edu.cn

After successful modeling at week 18, mice were randomly divided into a model group and QWZG low-, medium-, and high-dose intervention groups ($n=8$ per group), with a normal control group ($n=8$). Mice in the intervention groups received corresponding doses of QWZG by gavage for 6 weeks, while the model and control groups received an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. After 6 weeks of treatment, body

weight, liver weight, and liver-to-body weight ratio were measured; serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), and triglyceride (TG) were detected. Hepatic histopathological changes were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining and Oil Red O staining, and hepatic macrophage infiltration was evaluated by immunohistochemistry. Transcriptome sequencing (RNA-seq) was used to identify genes and pathways modulated by QWZG, and Western blot and reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) were applied to validate the key mechanism. **Results** Compared with the model group, QWZG intervention significantly reduced body weight, liver weight, and serum levels of ALT, AST, TC, and TG in MASH mice ($P<0.05$), and alleviated hepatic steatosis, ballooning degeneration, and macrophage infiltration. RNA-seq results showed that QWZG intervention significantly downregulated the expression of forkhead box protein M1 (Foxm1) in mouse liver. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis revealed that inflammatory-related pathways such as the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway and cytokine-cytokine receptor interaction were significantly inhibited. Validation experiments confirmed that QWZG intervention markedly decreased Foxm1 protein expression and p65 phosphorylation levels in MASH mice. **Conclusion** The mechanism by which QWZG ameliorates MASH in mice may be associated with downregulating Foxm1 and inhibiting the activation of the NF- κ B signaling pathway.

Keywords: metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; Qiwei Zhigan Formula; forkhead box M1; NF- κ B signaling pathway; Chinese materia medica research

代谢相关脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) 是代谢功能障碍相关脂肪性肝病 (metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease, MASLD) 的进展阶段^[1], 组织学以肝脂肪变性、炎症及纤维化为特征。其中约 20% 的 MASH 患者将发展为肝硬化, 显著增加肝细胞癌 (HCC) 等终末期肝病的发生风险^[2-3], 已成为全球性公共卫生负担。虽已陆续出现靶向肝脏脂质代谢及系统代谢调节的新药, 但仍存在应答率有限、长期疗效不明等局限^[4-5]。因此探寻多靶点、整体调节的治疗策略具有重要临床价值。中医学秉持整体观念, 强调辨证论治的核心思想, 临床常用的中药复方具有多成分、多靶点协同作用的特性, 可同步调节 MASH 进程中复杂的脂质代谢、炎症反应及肝纤维化等病理环节, 为 MASH 的临床治疗提供独特思路和潜在替代路径。

本课题组研发的七味脂肝方 (QWZG), 由酒豨莶草 12 g、垂盆草 12 g、海藻 4 g、煅牡蛎 12 g、山楂 4 g、虎杖 8 g、醋五味子 4 g 组成^[6], 具有解毒利湿、消痰散结、活血化痰的功效。前期动物实验研究^[6]表明, 该药物安全性良好, 并可有效改善肝脏组织学严重程度, 且已获得临床试验批件 (通知书编号: 2024LP00957)。然而, 其具体作用机制仍有待进一步阐明。本研究拟通过西方饮食诱导的 MASH 小鼠模型, 结合转录组测序 (RNA-seq) 分析, 确认 QWZG 对 MASH 的治疗效应, 并深入探究其核心作用机制是否与调控叉头框蛋白 M1 (Foxm1)/核因子 κ B (NF- κ B) 信号轴有关。本研究旨在为 QWZG 的

临床转化提供坚实的药理学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 6 周龄, 购于上海灵畅生物科技股份有限公司。动物生产许可证号: SCXK (沪) 2023-0003。动物使用许可证号: SYXK (沪) 2025-0008。所有小鼠均饲养于上海中医药大学实验动物中心的 SPF 级屏障环境中。环境条件恒定: 温度 (22±1) °C, 相对湿度 (60±5) %, 12 h/12 h 明暗交替循环, 自由进食与饮水。本研究的所有动物实验操作均遵循伦理规范, 并已通过上海中医药大学动物实验伦理委员会的审查批准 (伦理批准号: PZSHUTCM2401080008)。

1.1.2 药物与试剂 QWZG 为颗粒浸膏粉 (6.19 g 生药/g 浸膏粉), 由江苏康缘药业股份有限公司研制并提供; 西方饮食饲料 (批号: D12079B), 常州鼠一鼠二生物科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆固醇 (TC) 及甘油三酯 (TG) 试剂盒 (批号分别为 C009-2-1、C010-2-1、A111-1-1、A110-1-1), 南京建成生物工程研究所有限公司; SYBR Green Pro Taq HS 预混型定量聚合酶链反应 (qPCR) 试剂盒、Evo M-MLV 反转录试剂预混液 (批号分别为 A7A3060、A7A3072), 艾科瑞生物科技有限公司; 苏木精、伊红染色液 (批号分别为 HEMML-OT-500、EOY-10-OT-1L), 上海科汇生物技术有限公司; 油红 O 粉末 (批号: SHBN4938), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 二氨基联苯胺 (DAB) 浓缩型试

剂盒(批号:ZLI-9017),北京中衫金桥生物技术有限公司;多聚甲醛固定液与强效放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液(批号分别为P0099、P0013B),碧云天生物技术有限公司;磷酸化p65抗体、p65抗体(批号分别为AP1458、A11204),武汉爱博泰克生物科技有限公司;Foxm1抗体(批号:I1124),美国Santa Cruz公司;F4/80抗体(批号:70076),美国Cell Signaling Technology公司; β -肌动蛋白(β -actin,批号:R1207-1),杭州华安生物技术有限公司;生物素化山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(批号:BA1000),美国Vector公司;Omni-ECL™超灵敏化学发光检测试剂盒(批号:039C1498),上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 实时荧光定量PCR系统(型号:QuantStudio™ 6 Pro),美国Thermo Fisher Scientific公司;eBlot™ L2快速湿转仪(型号:L00980C),美国GenScript公司;酶标仪(型号:SynergyH4),美国BioTek公司;冰冻切片机、石蜡切片机、包埋机(型号分别为:CM1950、RM2235、EG1150H+C),德国Leica公司;显微镜(型号:Axiolab 5),德国Zeiss公司。

1.2 分组与造模 6周龄小鼠适应性饲养1周后,随机分为对照组($n=8$)、造模组($n=32$)。对照组小鼠给予常规饮食,造模组饲喂西方饮食,饲养18周确认MASH选模成功后^[7],开始给药干预。

1.3 干预 造模组小鼠随机分为QWZG低、中、高剂量组和模型组($n=8$)。将QWZG浸膏粉人鼠等效剂量 $[1.5\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})]$ 作为中剂量,半数剂量 $0.75\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 为低剂量,双倍剂量 $3\text{ g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ 作为高剂量进行灌胃给药。QWZG各组小鼠按每10 g小鼠体质量0.1 mL进行灌胃给药,模型组和对照组小鼠使用等体积0.9%氯化钠溶液灌胃,为期6周。干预结束后小鼠肝脏组织称量以后一部分浸入4%多聚甲醛溶液固定,剩余肝组织分装、液氮速冻后于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 体质量、肝质量及肝体比测定 使用电子秤每周固定时间称量小鼠体质量并记录。实验终点时,小鼠禁食不禁水12 h后称取终末体质量。取小鼠肝脏,称量肝质量,计算肝体比 $[\text{肝质量}(\text{g})/\text{体质量}(\text{g})\times 100\%]$ 。

1.4.2 血清生化指标检测 小鼠眼眶后静脉丛采血,全血室温静置2 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下3 000 r/min离心15 min,分离上层血清,分装后 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。严格按照

试剂盒说明书操作,使用酶标仪分别测定血清ALT、AST、TC及TG含量。

1.4.3 肝组织病理变化 肝组织经石蜡包埋后,切片(厚度 $4\text{ }\mu\text{m}$)。切片先后经二甲苯脱蜡及梯度乙醇复水,随后进行苏木精-伊红(HE)染色。染色后切片以蒸馏水短暂冲洗,再经二甲苯透明,最后以中性树脂封片。石蜡切片脱蜡至水,使用天狼星红染色液孵育30 min,流水冲洗后,中性树脂封片。染色后的切片由两位病理学专家独立阅片评估,根据脂肪肝活动度评分(NAS)系统对各组小鼠肝组织脂肪变性、气球样变和小叶内炎症程度进行评分。

1.4.4 肝脏脂肪堆积情况 称取各组小鼠肝组织约50 mg,加入预冷无水乙醇-氯仿混合液(体积比1:1),冰浴匀浆制备组织悬液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下12 000 r/min离心15 min,收集上清液。分别按照TC和TG测定试剂盒说明书,采用酶比色法在酶标仪上检测吸光度值,根据标准曲线计算肝组织TC和TG含量,结果以每克肝组织中所含脂质的微摩尔数表示。另外,取冰冻切片($4\text{ }\mu\text{m}$),经4%多聚甲醛固定,磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗,油红O工作液染色孵育。继以60%异丙醇分色,PBS漂洗,以苏木精复染胞核,最后用80%甘油封片观察。在显微镜下以40倍的放大率观察肝脏组织切片脂肪堆积情况。使用ImageJ软件(版本1.53)对阳性区域进行定量分析,计算阳性面积占总面积的百分比。

1.4.5 免疫组织化学法检测肝组织F4/80表达 石蜡切片用二甲苯脱蜡,并在乙醇梯度稀释液中复水,抗原修复后冷却至室温后PBS清洗,为减少非特异性染色,依次进行内源性过氧化物酶阻断及血清封闭。加入一抗F4/80(1:200), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。翌日PBS冲洗3次后用生物素化山羊抗兔IgG在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min;二氨基联苯胺(DAB)染色5 min;苏木精染色1 min;中性树脂封片。用显微镜检测,F4/80阳性区域镜下呈棕褐色。

1.4.6 肝组织相关炎症因子mRNA表达水平 采用逆转录实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测肝组织白细胞介素(IL)- 1β 、IL-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α mRNA表达水平。取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中冻存的小鼠肝组织,以TRIzol法提取肝组织总RNA,以20 μL 体系根据Evo M-MLV反转录预混型试剂盒说明书将RNA逆转录成cDNA,反应条件: $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、15 min, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 s。根据SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒说明书进行扩增,反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、

30 s, 95 °C、5 s, 60 °C、30 s, 40 个循环。扩增引物均由上海闪晶分子生物科技有限公司设计合成, 序列见表 1。数据通过 Melt 曲线进行分析, 并用 β -actin 作为内参。每个样品进行 3 次重复, 扩增结束对其 Ct 值按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式进行归一化。

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
β -actin	上游: 5'-GAGACCTTCAACACCCAGC-3'	20
	下游: 5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'	19
IL-1 β	上游: 5'-GCTTCAGGCAGGCAGTATCA-3'	20
	下游: 5'-TGCAGTTGTCTAATGGGAACG-3'	21
IL-6	上游: 5'-AAATGATGGATGCTACCAAACTG-3'	23
	下游: 5'-CTCTGGCTTGTCTTTCTTGTATC-3'	25
TNF- α	上游: 5'-CCCTCCAGAAAAGACACCATG-3'	21
	下游: 5'-CACCCCGAAGTTCAGTAGACAG-3'	22

注: β -actin 为 β -肌动蛋白基因, IL-1 β 为白细胞介素-1 β 基因, IL-6 为白细胞介素-6 基因, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α 基因。

1.4.7 Western blot 法检测肝组织 Foxm1、p65、p-p65 表达 称取各组小鼠肝组织 20 mg, 冰上匀浆后充分裂解提取蛋白。采用二辛可酸(BCA)法进行蛋白定量, 加入上样缓冲液 95 °C 加热 10 min 进行蛋白变性。蛋白样品依次进行电泳、转膜、封闭后加入一抗 Foxm1(1:1 000)、p65(1:1 000)、p-p65(1:1 000) 及 β -actin(1:20 000), 4 °C 孵育过夜。洗膜后加入对应种属的二抗(1:50 000), 常温孵育 1 h。充分洗涤后, 浸泡于增强化学发光法(ECL)发光液中, 置于显影仪中拍照成像, 并使用 ImageJ 软件对灰度值进行统计分析。

1.4.8 转录组学分析差异基因 对照组、模型组和 QWZG 高剂量组小鼠肝脏组织进行转录组学测序, 每组 4 个样本, 提取肝组织 RNA 后, 采用 Oligo(dT) 磁珠富集带有 polyA 尾的 mRNA, 并使用离子打断法将其片段化至约 300 bp。以此 RNA 为模板, 通过随机引物和逆转录酶合成双链 cDNA。随后进行末端修复、加接头并 PCR 扩增富集文库, 最终筛选获得平均长度约 450 bp 的文库片段。利用 Agilent Bioanalyzer 对文库进行质量检测, 并根据有效浓度与目标数据量, 将不同 Index 标记的文库按比例混合、变性为单链。最终采用第二代测序技术(NGS), 基于 Illumina 测序平台, 对这些文库进行双末端(PE)测序, 测序工作由上海派森诺科技股份有限公司完成, 并通过派森诺基因云平台(<https://www.genescloud.cn/>)进行京都基因与基因组数据库

(KEGG)富集分析。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件分析实验数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先对数据进行正态性检验(Shapiro-Wilk 检验)和方差齐性检验(Levene 检验)。对于满足正态分布且方差齐的数据, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 组间两两比较采用 t 检验。对于数据不满足正态分布且方差不齐(Levene 检验 $P < 0.001$), 多组间比较采用 Kruskal-Wallis H 非参数检验。若整体差异有统计学意义, 进一步采用 Dunn-Bonferroni 事后检验进行两两比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

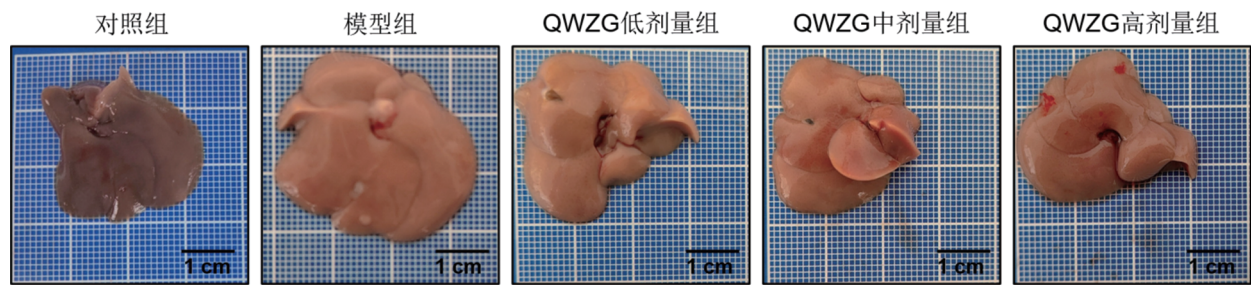
2 结果

2.1 QWZG 改善小鼠 MASH 表型

2.1.1 对小鼠体质量、肝质量、肝体比的影响 模型建立后, 模型组小鼠肝脏体积显著增大, 颜色呈浅黄或苍白, 表面油腻, 边缘钝圆。对照组小鼠肝脏颜色鲜红, 边缘锐利, 表面光滑, 质地柔软。与模型组相比, QWZG 低、中、高剂量组肝脏颜色逐渐恢复, 表面油腻感减轻, 边缘趋于锐利, 其中 QWZG 高剂量组恢复最为显著。见图 1。模型组小鼠体质量及肝脏体积较对照组显著增加($P < 0.001$); 与模型组比较, QWZG 中、高剂量组小鼠体质量显著降低($P < 0.05$)。此外, 各剂量组均能显著降低肝质量及肝体比($P < 0.05$), 且 QWZG 高剂量组逆转效果最为突出($P < 0.001$)。综上, QWZG 可显著改善 MASH 模型小鼠的体质量、肝质量及肝体比。见表 2。

2.1.2 对小鼠血清肝酶和 TC、TG 水平的影响 模型组小鼠血清肝酶(ALT、AST)及血脂(TC、TG)水平较对照组全面显著升高($P < 0.001$), 提示肝损伤与代谢紊乱。与模型组比较, QWZG 中、高剂量组能显著降低血清 ALT、AST 水平($P < 0.05$)。QWZG 高剂量组具有显著降低血清 TC 的作用($P < 0.05$); 而中、高剂量组 TG 水平均明显回落($P < 0.05$)。见表 2。

2.1.3 QWZG 减轻肝组织脂肪变性及气球样变 肝组织 HE 染色显示(图 2A), 模型组小鼠肝索结构紊乱, 并出现显著的肝细胞气球样变及脂肪变性。经 QWZG 干预后, 各剂量组上述病理损伤均呈剂量依赖性减轻。进一步采用脂肪肝活动度评分(NAS)系统, 该评分综合了脂肪变性、气球样变和小叶内炎症这 3 个核心病理特征。如图 2B 所示, 模型组的 NAS 评分显著高于对照组($P < 0.001$), 而 QWZG 治疗, 尤其是 QWZG 中、高剂量组, 能够显著降低 NAS



注:QWZG为七味脂肝方。

图1 各组小鼠肝脏大体形态

表2 各组小鼠体质量、肝质量、肝体比及血清生化指标比较(n=8, $\bar{x}\pm s$)

组别	肝质量/g	体质量/g	肝体比	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)
对照组	1.59±0.12	31.04±1.45	0.051±0.004	46.19±11.06	73.63±17.77	2.53±0.23	0.94±0.13
模型组	2.48±0.62***	42.40±3.63***	0.058±0.009	125.68±47.37***	187.45±48.44***	5.58±1.03***	1.28±0.24***
QWZG低剂量组	2.01±0.26 [△]	40.45±1.86	0.050±0.002 ^{△#}	100.45±38.09 [#]	166.90±29.47 ^{###}	5.27±0.55	1.10±0.13
QWZG中剂量组	2.00±0.43 [△]	39.85±2.39 [△]	0.050±0.009 [△]	69.55±46.17 ^{△△}	136.52±56.55 ^{△△###}	5.03±0.54	1.04±0.23 [△]
QWZG高剂量组	1.68±0.15 ^{△△△}	39.41±1.94 [△]	0.043±0.003 ^{△△△}	49.71±16.47 ^{△△△}	56.80±5.82 ^{△△△}	4.86±0.26 [△]	1.01±0.19 ^{△△}

注:ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天冬氨酸氨基转移酶,TC为总胆固醇,TG为甘油三酯,QWZG为七味脂肝方。与对照组比较,*** $P<0.001$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta P<0.001$;与QWZG高剂量组比较, $\#P<0.05$, $\##P<0.01$, $\###P<0.001$ 。

评分($P<0.05$),这从组织学评分角度客观证实了QWZG对MASH典型病理改变的改善作用。肝组织TC、TG以及油红O染色同步提示各剂量的QWZG皆可明显减少MASH小鼠肝组织脂质累积($P<0.05$),见图2A、C、D、E。

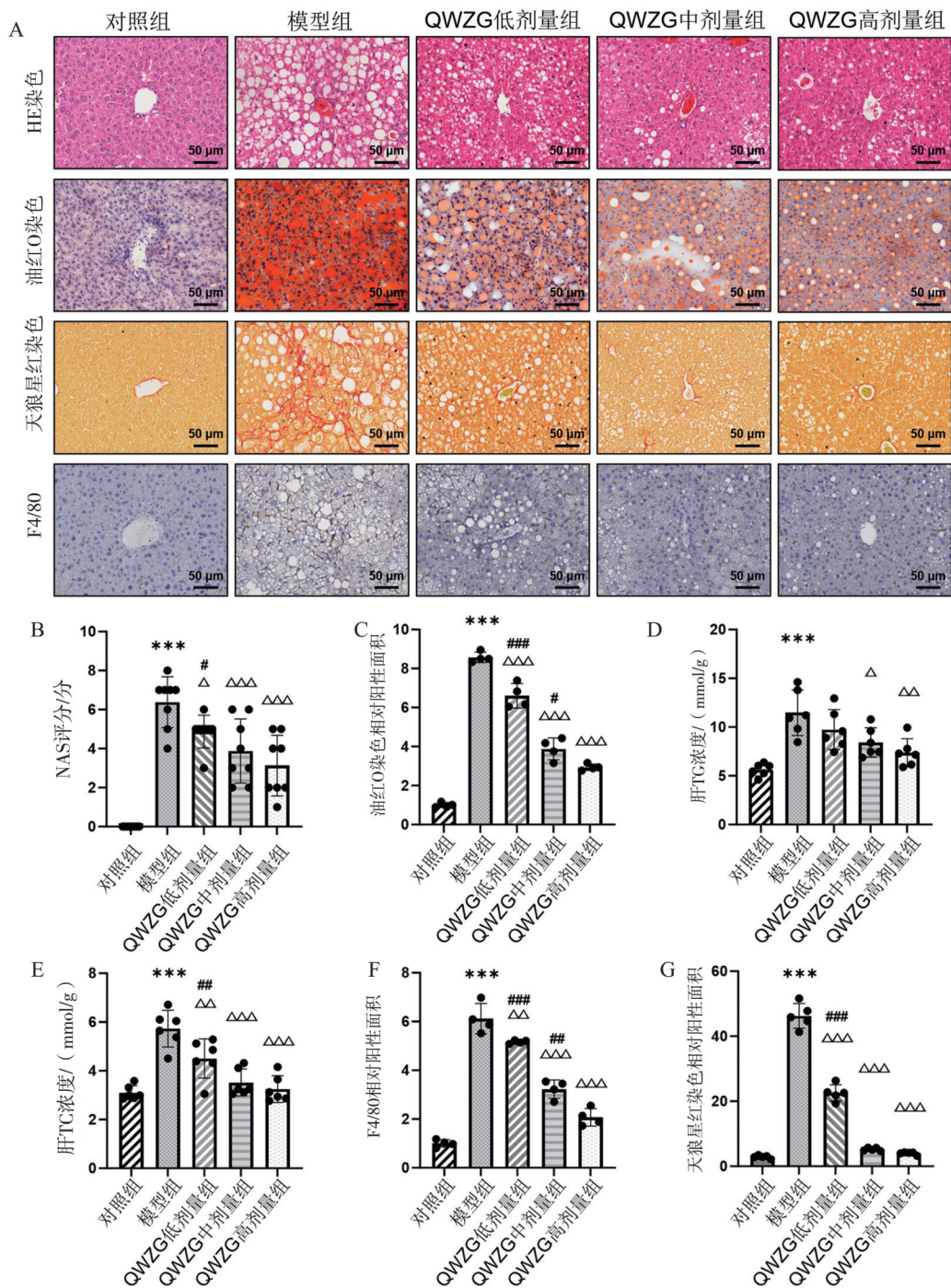
2.1.4 QWZG抑制肝脏巨噬细胞浸润 F4/80免疫组化染色显示,模型组肝脏中存在广泛的巨噬细胞浸润,表明强烈的炎症反应。与模型组相比,QWZG低剂量组F4/80相对阳性面积减少($P<0.01$),但仍可见局灶性聚集;QWZG中剂量组F4/80相对阳性面积进一步减少($P<0.001$),分布趋于稀疏;QWZG高剂量组肝组织中F4/80相对阳性面积显著减少($P<0.001$)。结果表明,QWZG可剂量依赖性地抑制MASH小鼠肝脏巨噬细胞浸润,改善肝脏炎症微环境。见图2A、F。

2.1.5 QWZG减轻MASH小鼠肝纤维化 采用天狼星红染色评估肝组织胶原沉积情况。如图2A所示,对照组小鼠肝组织仅在血管周围可见少量胶原纤维。模型组小鼠肝组织出现显著的胶原沉积,形成明显的纤维间隔($P<0.001$)。与模型组相比,QWZG低、中、高剂量组胶原沉积面积皆显著减少($P<0.001$),呈剂量依赖性趋势。定量分析结果见图2G。

2.2 基于转录组学筛选QWZG改善MASH的潜在靶点 为阐明QWZG的作用机制,我们将对照组、模型组和QWZG高剂量组小鼠肝脏组织进行转录

组学测序分析,主成分分析(PCA)显示,3组样本有显著差异,可明显区分。见图3A。差异表达分析共鉴定出两组重要的基因集:与对照组小鼠的正常肝脏组织相比,模型组小鼠肝脏组织1784个基因的异常表达(上调1220个,下调564个)。而QWZG干预则逆转了其中1574个基因的表达趋势,且绝大多数(1308个)表现为下调。见图3B。进一步取交集分析,发现800个基因是MASH异常表达且被QWZG共同回调的核心靶标($P<0.05$, $\log_2FC>1$)。见图3C。其中,模型组*Foxm1*、*Atf3*、*Erg2*、*Ly6d*及*Relb*等表达均显著上调,经QWZG处理后表达均显著下调。见图4。上述结果提示这些基因可能是QWZG治疗MASH的潜在靶点。通过KEGG富集分析筛选出细胞因子-细胞因子受体信号传导、NF- κ B信号通路等多个炎症与脂质代谢的相关通路。见图5。

2.3 QWZG下调*Foxm1*抑制NF- κ B通路 测序结果显示,*Foxm1*为QWZG下调最明显的基因之一,且*Foxm1*广泛参与炎症通路调节,我们对这一靶点进行验证。Western blot法结果显示,模型组小鼠肝脏中*Foxm1*蛋白表达水平较对照组升高2.6倍($P<0.001$),QWZG干预可明显降低*Foxm1*蛋白水平(图6A、B),与测序趋势一致。与此同时,我们检测了NF- κ B通路的关键分子。图6A、C结果显示,模型组中p65的磷酸化水平(p-p65/p65)显著升高($P<0.001$),而QWZG干预可降低p65的磷酸化水平($P<$

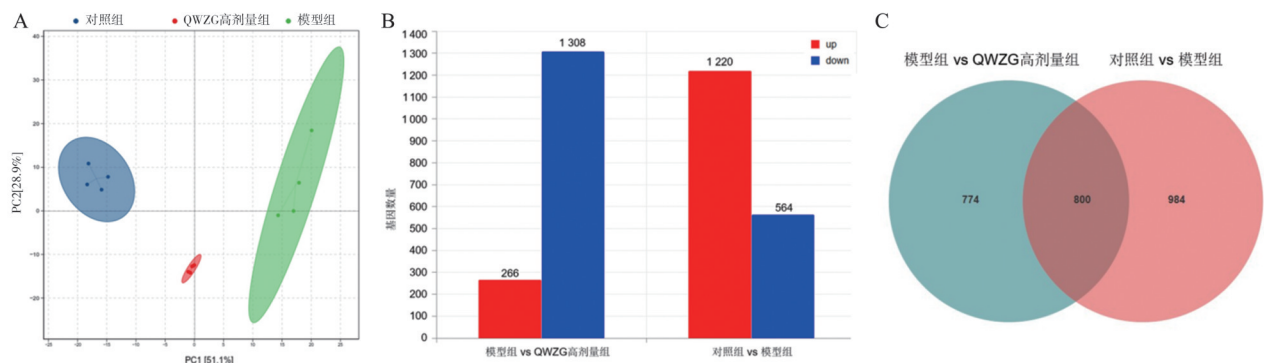


注: A 为各组小鼠肝脏苏木精-伊红(HE)染色($\times 40$)、油红 O 染色($\times 40$)、F4/80 免疫组化染色($\times 40$)以及天狼星红染色($\times 40$), B 为各组小鼠肝脏脂肪肝活动度评分(NAS), C 为各组小鼠肝脏油红 O 染色相对阳性面积统计, D 为各组小鼠肝脏组织甘油三酯(TG)水平检测, E 为各组小鼠肝脏组织总胆固醇(TC)水平检测, F 为 F4/80 免疫组织化学相对阳性面积统计, G 为各组小鼠肝脏天狼星红染色相对阳性面积统计。QWZG 为七味脂肝方。与对照组比较, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与 QWZG 高剂量组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; $n=8$, $\bar{x} \pm s$ 。

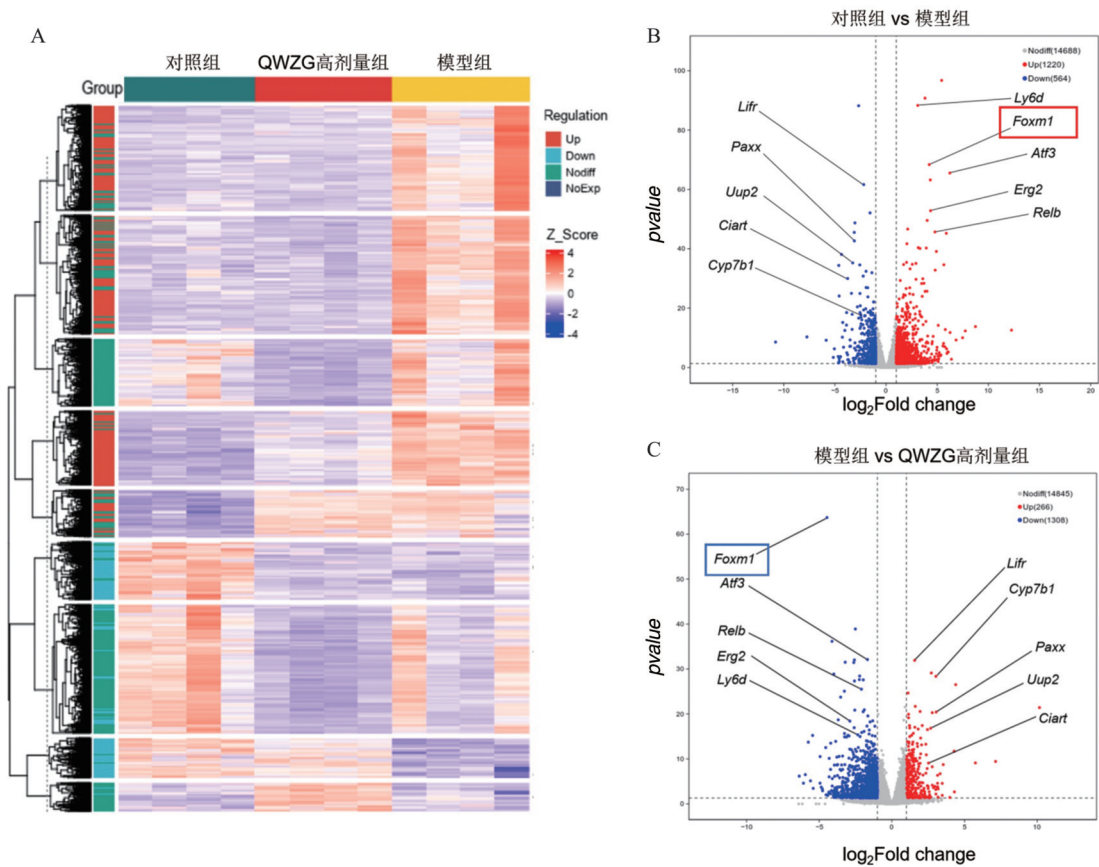
图2 各组小鼠肝组织病理比较

0.001)。此外,炎性细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 和 $IL-6$ mRNA 表达水平在模型组中显著上调($P < 0.001$, $P < 0.05$),亦被 QWZG 逆转(图 6D ~ F)。以上结果提示 QWZG 在降低 Foxm1 表达的同时,也减少了 p65 的

磷酸化水平,并抑制了下游炎性细胞因子的转录,表明 QWZG 改善 MASH 的效应与下调 Foxm1 表达及抑制 NF- κ B 通路活化密切相关。



注:A为主成分分析,B为差异基因统计结果,C为差异基因韦恩图。QWZG为七味脂肝方。
图3 转录组测序差异基因表达分析

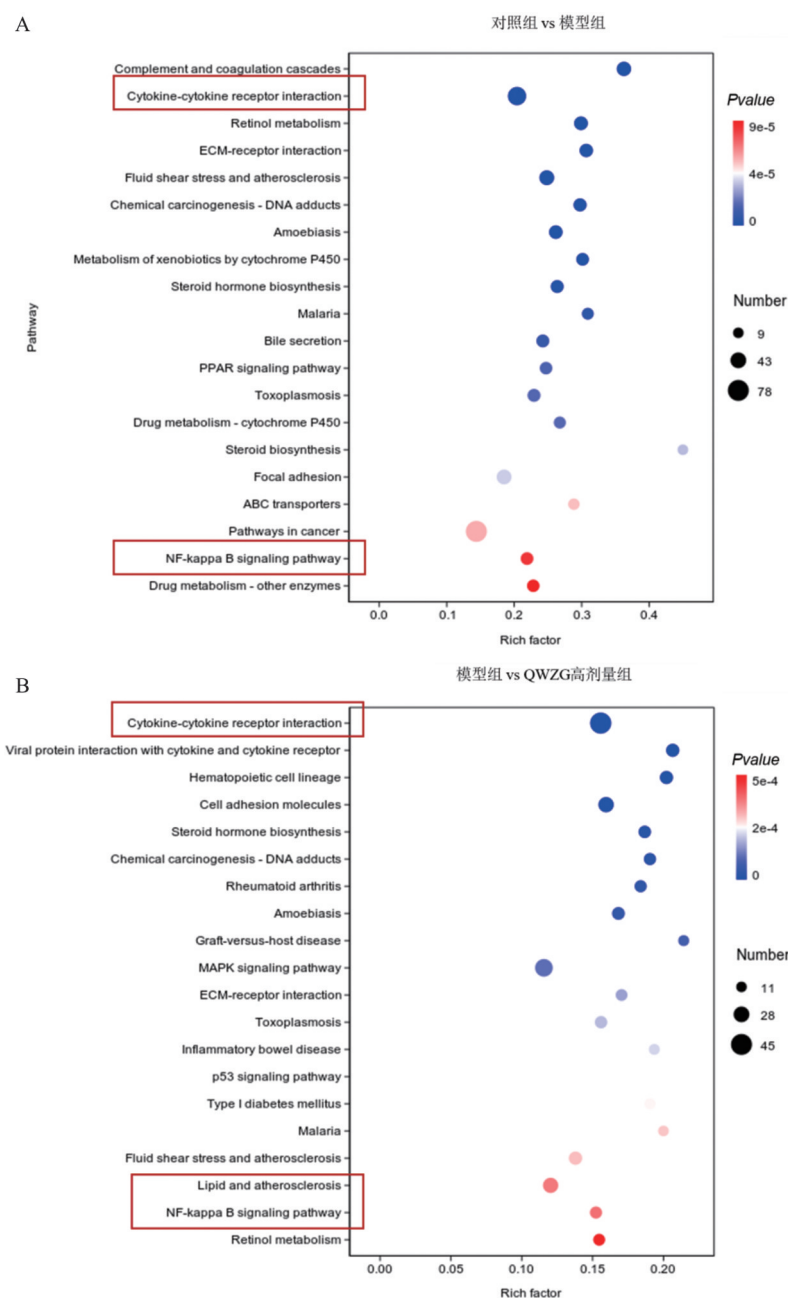


注:A为共同差异基因热图,B为对照组与模型组的差异基因火山分布图,C为模型组与七味脂肝方(QWZG)高剂量组差异基因火山分布图。
图4 共同差异基因聚类分析

3 讨论

MASLD或MASH在中医学中归属于“肥气”“肝积”“肝癖”等病症范畴^[8]。以饮食不节、劳逸失度、情志失调、久病体虚、禀赋不足为主要病因^[9]。脾虚运化失常为根本病机,痰饮、湿热、瘀血为主要病理因素。病位在肝,与脾、肾关系密切^[10]。七味脂肝方针对MASH痰瘀互结证;方中豨薟草,味辛,苦寒,性走窜开泄,善逐风湿诸毒^[11];垂盆草,味甘、淡,可

解毒利湿退黄^[12];两药同为君药,针对MASH湿热蕴毒核心病机,共奏利湿解毒退黄之效。煅牡蛎咸寒质重,能平肝潜阳,软坚散结^[13];山楂味酸入肝,可散瘀血,化浊降脂^[14];海藻为咸寒润下之品,可消痰软坚,行水逐瘀^[15];三药共为臣药消食化瘀,软坚散结功效,针对MASH食积痰瘀主要病机。虎杖为佐,性苦微寒,归肝经,协同解毒、化瘀、退黄之功效^[16]。五味子为使,性酸苦咸,酸味入肝,补五脏之气^[17]。全方湿痰瘀毒兼顾,开中有合,相辅相成。

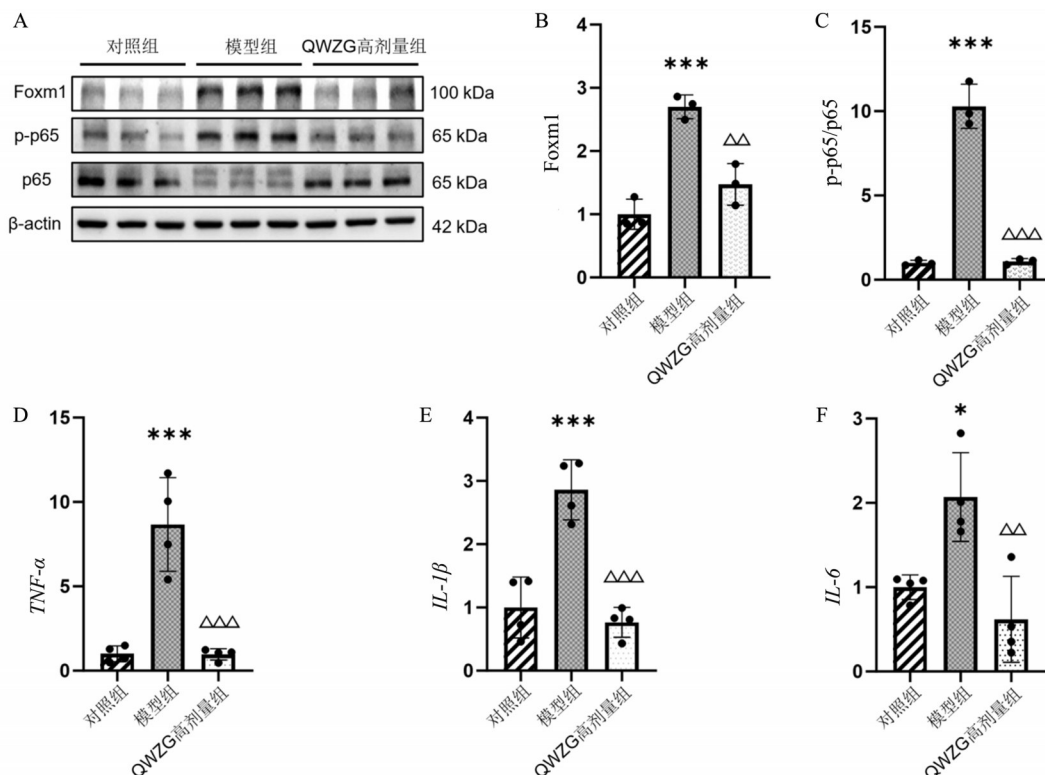


注: A 为对照组与模型组差异基因的京都基因与基因组数据库(KEGG)富集分析, B 为模型组与七味脂肝方(QWZG)高剂量组差异基因的 KEGG 富集分析。

图5 差异基因表达 KEGG 通路富集分析

MASH 的病理机制十分复杂^[18], 其中 NF- κ B 信号通路作为炎症反应的关键调控者, 在脂毒性、氧化应激等因素作用下激活并促进 p65 磷酸化, 启动 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等促炎性细胞因子及趋化因子转录, 最终导致肝细胞损伤、巨噬细胞浸润以推动疾病进展^[19-22]。Foxm1 作为一种关键的促增殖和促炎性细胞因子, 在多种肝脏疾病的疾病进程中受到关注。研究^[23-24]表明, 肝细胞特异性过表达 Foxm1 可诱发自发性肝脏炎症、巨噬细胞浸润及纤维化。

Foxm1 特异性敲除可直接降低 p65 的磷酸化水平, 从而抑制下游炎症反应的启动, 抑制炎性因子的释放减轻炎症损伤^[25-26]。基于此, 我们推测 Foxm1 可能作为调控 NF- κ B 炎症通路的核心靶点, 在 MASH 的治疗中发挥关键作用。本研究通过转录组学筛选并结合实验验证发现 MASH 模型小鼠肝脏中 Foxm1 在转录和蛋白水平上均显著上调, 且与 NF- κ B 通路活化呈正相关; 而 QWZG 干预显著逆转 Foxm1 的异常高表达, 同时抑制 p65 磷酸化, 并下调 TNF- α 、



注: A 为叉头框蛋白 M1 (Foxm1) 蛋白及 p65 磷酸化水平的蛋白印迹图, B、C 为对应蛋白表达的半定量分析 (均一化至 β-actin), D~F 为逆转录实时定量聚合酶链反应 (RT-qPCR) 检测 mRNA 表达。β-actin 为 β-肌动蛋白, TNF-α 为肿瘤坏死因子-α 基因, IL-1β 为白细胞介素-1β 基因, IL-6 为白细胞介素-6 基因, QWZG 为七味脂肝方, MASH 为代谢相关脂肪性肝炎, NF-κB 为核因子 κB。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组比较, Δ $P < 0.01$, ΔΔ $P < 0.001$ 。

图 6 QWZG 下调 MASH 小鼠肝脏 Foxm1 表达并抑制 NF-κB 通路激活

IL-1β 和 IL-6 等炎症因子的表达, 减少 F4/80 阳性巨噬细胞浸润。上述结果提示, QWZG 对 MASH 的改善作用可能与下调 Foxm1 表达、进而抑制 NF-κB 通路活化有关^[27-28], 但两者间的直接调控关系尚需进一步验证。

综上, 本研究不仅证实了 QWZG 对 MASH 的治疗效果, 还揭示了其作用机制与下调肝脏 Foxm1 表达并抑制 NF-κB 通路激活相关, 为 QWZG 治疗 MASH 提供了重要的药理学实验证据。然而, QWZG 和 Foxm1 在肝纤维化进程中的具体机制仍待进一步阐明, 其抗纤维化作用机制将是后续研究重点。

参考文献:

- [1] 杨蕊旭, 范建高. 欧洲代谢相关脂肪性肝病临床管理实践指南简介[J]. 实用肝脏病杂志, 2024, 27(5): 654-658.
- [2] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, PAIK J M, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review [J]. Hepatology, 2023, 77(4): 1335-1347.
- [3] 范建高, 徐小元, 南月敏, 等. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024 年版)[J]. 实用肝脏病杂志, 2024, 27(4):

494-510.

- [4] SOHN W, LEE Y S, KIM S S, et al. KASL clinical practice guidelines for the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease 2025 [J]. Clin Mol Hepatol, 2025, 31(Suppl): S1-S31.
- [5] European Association for the Study of the Liver (EASL), European Association for the Study of Diabetes (EASD), European Association for the Study of Obesity (EASO). EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines on the Management of Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD) [J]. Obesity facts, 2024, 17(4): 374-444.
- [6] 杨嘉宁, 赵一颖, 肖伟. 七味脂肝方对非酒精性脂肪性肝动物模型的药效学评价[J]. 药学实践与服务, 2024, 42(9): 389-398.
- [7] YANG M, QI X, LI N, et al. Western diet contributes to the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis in male mice via remodeling gut microbiota and increasing production of 2-oleoylglycerol [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 228.
- [8] 倪青, 庞晴. 代谢相关脂肪性肝病病证结合诊疗指南[J]. 世界中医药, 2024, 19(22): 3406-3419.
- [9] 吕婷婷, 孙涛, 李凯, 等. 吴明志运用柴胡郁金汤治疗非酒精性脂肪肝的临床经验[J]. 中国现代医生, 2020, 58(7): 137-140.

(下转第 85 页)