

## 学科新探

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20250818003

基于代谢组学探讨苓桂术甘汤通过 LPC-PPAR $\alpha$  轴改善代谢功能障碍相关脂肪性肝炎的作用机制扫码获取更多  
论文拓展信息王亦融<sup>1,2</sup>, 王雪<sup>1,3</sup>, 郭海婧<sup>1,2</sup>, 孙昀泓<sup>1,4</sup>, 戴亮<sup>2,4</sup>, 毛熙妍<sup>5</sup>, 王凯<sup>3</sup>, 季光<sup>1,2</sup>, 周文君<sup>1,2</sup>

1. 上海中医药大学脾胃病研究所(上海 200032); 2. 经方与现代中药融合创新全国重点实验室(上海 201203);  
3. 上海中医药大学科技实验中心(上海 201203); 4. 上海中医药大学公共健康学院(上海 201203); 5. 上海中医药大学中西医结合学院(上海 201203)

**【摘要】** 目的 探讨苓桂术甘汤(LGZG)通过调控溶血磷脂酰胆碱(LPC)代谢改善蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)诱导的代谢功能障碍相关脂肪性肝炎(MASH)的作用机制。方法 ①采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)鉴定 LGZG 的化学成分,并借助网络药理学构建“成分-靶点-通路”网络,预测其核心作用通路。②MASH 模型 SD 大鼠随机分为模型组、LGZG 组(16.56 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)、维生素 E 组(40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)及正常对照组(n=6),干预 4 周。检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平及肝脏甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平,通过苏木精-伊红(HE)和油红 O 染色评估肝脏病理学变化与脂质沉积,采用 Western blot 法检测肝组织过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) $\alpha$ 、PPAR $\gamma$  共激活因子 1 $\alpha$ (PGC1 $\alpha$ )、肉碱棕榈酰转移酶 1a(CPT1a)及包含主要协同转运蛋白超家族结构域蛋白 2a(Mfsd2a)的蛋白表达;利用肝脏代谢组学分析 LPC 代谢谱的变化。③建立 AML12 肝细胞脂质沉积模型,LPC(18:0)干预后,通过细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测细胞活力,油红 O 染色及 TG 水平检测评估脂质沉积,Western blot 及荧光素酶报告基因实验验证 LPC(18:0)对 PPAR $\alpha$  通路的激活作用。结果 ①网络药理学分析提示 PPAR 信号通路是 LGZG 治疗 MASH 的潜在核心通路。②体内实验表明, LGZG 能显著降低 MASH 大鼠血清 ALT、AST 水平及肝脏 TG 水平,改善肝脏脂肪变性、炎症浸润及 NAS 评分,其机制与肝脏 PPAR $\alpha$ 、PGC1 $\alpha$ 、CPT1a 蛋白表达上调,以及磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶(p-ACC)水平提高有关;代谢组学研究发现 LGZG 显著回调了 MASH 大鼠肝脏中多种下调的 LPC,其中 LPC(18:0)水平显著升高,并伴随 Mfsd2a 转运蛋白表达的上调;相关性分析显示肝脏 TG 水平与 LPC(18:0)含量呈显著负相关。③细胞实验进一步证实,LPC(18:0)可剂量依赖性地降低肝细胞 TG 水平,激活 PPAR $\alpha$  转录活性,并上调 CPT1a 蛋白表达及 p-ACC/ACC 比值。结论 LGZG 可能通过调控 Mfsd2a 促进内源性 LPC(18:0)的积累,进而激活 PPAR $\alpha$  信号通路,从而通过促进脂肪酸 $\beta$ 氧化并抑制脂质从头合成的方式改善 MASH 肝脏脂代谢紊乱。

**【关键词】** 代谢功能障碍相关脂肪性肝炎;苓桂术甘汤;超高效液相色谱-串联质谱;网络药理学;代谢组学;脂质代谢;经典名方

## Exploring mechanism of Linggui Zhugan Decoction in ameliorating metabolic dysfunction-associated steatohepatitis via LPC-PPAR $\alpha$ axis based on metabolomics

WANG Yirong<sup>1,2</sup>, WANG Xue<sup>1,3</sup>, GUO Haijing<sup>1,2</sup>,  
SUN Yunhong<sup>1,4</sup>, DAI Liang<sup>2,4</sup>, MAO Xiyan<sup>5</sup>, WANG Kai<sup>3</sup>,  
JI Guang<sup>1,2</sup>, ZHOU Wenjun<sup>1,2</sup>

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81620108030);经方与现代中药融合创新全国重点实验室开放课题(LSLSKL20240130);国家资助博士后研究人员计划项目(GZB20250905)

[作者简介] 王亦融,女,硕士研究生,主要从事中药治疗代谢性疾病的研究工作

[通信作者] 周文君,副研究员,硕士研究生导师;

E-mail: zhouwenjun@shutcm.edu.cn

1. Institute of Digestive Diseases, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China;  
2. National Key Laboratory Project for the Integration and Innovation of Classic Prescriptions and Modern Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203,

China; 3. Science and Technology Experiment Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. School of Public Health, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 5. School of Integrative Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism by which Linggui Zhugan Decoction (LGZG) alleviates methionine-choline-deficient (MCD) diet-induced metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) via modulation of lysophosphatidylcholine (LPC) metabolism. **Methods** ①The chemical constituents of LGZG were identified using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF/MS), and a “compound-target-pathway” network was constructed via network pharmacology to predict the key signaling pathways involved. ②The MASH model SD rats were randomly divided into model group, LGZG group (16.56 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), vitamin E group (40 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and normal control group (n=6), with intervention for 4 weeks. The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in rat serum, as well as the levels of triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) in the liver were measured. Histopathological changes and lipid deposition of liver were assessed via hematoxylin-eosin (HE) and oil red O staining. Hepatic protein expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) $\alpha$ , PPAR $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ ), carnitine palmitoyltransferase 1a (CPT1a), and major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (Mfsd2a) were determined by Western blot. Hepatic metabolomics was employed to analyze alterations in the LPC metabolic profile. ③An AML12 hepatocyte lipid deposition model was established, and after intervention with LPC (18:0), the cell viability was determined by the CCK-8 assay, while lipid deposition was evaluated by oil red O staining and TG content measurement. The activation effect of the PPAR $\alpha$  pathway by LPC (18:0) was validated using Western blot and a luciferase reporter gene assay. **Results** ①Network pharmacology analysis indicated that the PPAR signaling pathway is a potential key pathway for LGZG in treating MASH. ②*In vivo* experiments showed that LGZG could significantly reduce the serum ALT and AST levels and hepatic TG level in the rats, as well as improve liver steatosis, inflammatory infiltration and NAS score. The mechanism is related to the upregulation of liver PPAR $\alpha$ , PGC1 $\alpha$ , and CPT1a protein expressions, as well as the increase in phosphorylated acetyl-CoA carboxylase (p-ACC) level. Metabolomics studies revealed that LGZG significantly reversed the downregulation of various LPCs in the liver of MASH rats. Among them, the level of LPC (18:0) significantly increased, accompanied by the upregulation of the Mfsd2a transporter protein expression. Correlation analysis revealed a significant inverse relationship between hepatic TG levels and LPC (18:0) content. ③Cell experiments further confirmed that LPC (18:0) could dose-dependently reduce the TG level in hepatocytes, activate PPAR $\alpha$  transcriptional activity, and up-regulate CPT1a protein expression and the p-ACC/ACC ratio. **Conclusions** LGZG may promote the accumulation of endogenous LPC (18:0) by regulating Mfsd2a, and then activate the PPAR $\alpha$  signaling pathway, thereby improving the lipid metabolism disorder in MASH liver by promoting fatty acid  $\beta$ -oxidation and inhibiting lipid de novo lipogenesis. **Keywords:** metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; Linggui Zhugan Decoction; UPLC-Q-TOF/MS; network pharmacology; metabolomics; lipid metabolism; classic famous formula

代谢功能障碍相关脂肪性肝炎 (metabolic dysfunction-associated steatohepatitis, MASH) 是代谢相关脂肪性肝病 (metabolic associated fatty liver disease, MAFLD) 进展的关键阶段, 其核心病理特征包括肝细胞脂肪变性、小叶炎症和气球样变, 常伴随进行性肝纤维化<sup>[1-2]</sup>。2023 年, 学界正式将非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD)/非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 更名为 MAFLD/MASH, 确立了代谢功能障碍在该病发病机制中的核心作用<sup>[3]</sup>。

本课题组前期开展了基于 793 例 NAFLD (MAFLD) 患者的流行病学研究<sup>[4]</sup>, 确立“脾阳虚证”为其核心病机, 并提出从“脾主散精”认识 NAFLD (MAFLD) 代谢异常的科学假说, 治疗则以“温阳化气、健脾利湿”的苓桂术甘汤 (LGZG) 为主方<sup>[5]</sup>。LGZG 源自《金匮要略》, 由茯苓、桂枝、白术、炙甘草

四味中药组成。中医理论中, “脾主散精”的核心内涵是将水谷精微 (饮食中的营养物质) 运化输布至全身脏腑组织; 磷脂作为构成细胞膜、参与代谢信号传导的关键脂质大类, 属“水谷精微”, 而溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 是磷脂代谢网络中的关键功能亚型; 二者的代谢稳态与功能协同, 是“脾主散精”功能正常的重要现代生物学体现。当“脾主散精”功能失调时, 水谷精微 (例如 LPC) 的代谢与输布障碍, 不仅导致其异常积聚形成“痰饮”, 更会因磷脂整体代谢网络紊乱、LPC 等活性亚型的生理信号功能丧失 (如无法有效激活 PPAR $\alpha$  通路) 加剧肝脏代谢紊乱与炎症损伤, 这正是 MASH 阶段“痰饮蕴结、肝失疏泄”的核心现代病理特征。LGZG 作为“健脾化饮”的代表方, 其“温阳化气、健脾利湿”之效, 本质上应包含通过恢复“脾主散精”功能、同步重塑磷脂

代谢稳态与生理信号功能,进而逆转 MASH 病理进程的核心机制。作用机制上, LGZG 可通过激活甲状腺激素受体  $\beta 1$  (TR $\beta 1$ )-肉碱棕榈酰转移酶 1a (CPT1a) 轴促进脂肪酸氧化<sup>[6]</sup>、调控蛋白磷酸酶 1 调节亚基 3A/自噬相关基因 3 蛋白(PPP1R3A/ATG3)的 DNA 甲基化改善胰岛素抵抗<sup>[7]</sup>、靶向 PPP1R3C 平衡糖脂代谢<sup>[8]</sup>以及通过肠肝轴减轻肝脏炎症<sup>[9]</sup>。然而, LGZG 对 MASH 阶段脂质代谢紊乱的调控机制尚不明确,尤其在磷脂代谢重编程及关键脂质信号通路层面。

肝脏脂质代谢失调是 MASH 的核心机制<sup>[10]</sup>,其中过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) 作为肝脏脂肪酸氧化的主导调节因子<sup>[11]</sup>,其功能受损(表现为基因和蛋白表达显著降低,入核减少)是导致脂质堆积、驱动 MAFLD 向 MASH 进展的关键环节<sup>[12-13]</sup>。LPC 作为关键脂质信号分子,可通过激活 PPAR $\alpha$  等通路调控代谢稳态<sup>[14-16]</sup>。本研究结合超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-Q-TOF/MS)、网络药理学及代谢组学,揭示 LGZG 通过调控 LPC-PPAR $\alpha$  轴改善 MASH 的新机制,为“温阳化饮,健脾利湿”的科内内涵提供新依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠正常肝细胞 AML12 和 HEK293T 细胞,购于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 动物 24 只 SPF 级 SD 大鼠,9~10 周龄,体质量 300~350 g,购自上海吉辉实验动物技术有限公司。动物饲养于上海中医药大学动物实验中心 SPF 级屏障环境,温度(23±2)°C、湿度(50±10)%、12 h/12 h 明暗循环,自由摄食饮水。实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审批通过(批准号: PZSHUTCM201218010)。

1.1.3 药物与试剂 LGZG(批号: Z201101)由茯苓 55.2 g、桂枝 41.4 g、白术 41.4 g、甘草 27.6 g 组成,依据国家药监局批准上市的中药 3.1 类新药苓桂术甘颗粒的法定工艺提取制备<sup>[17-18]</sup>,由上海中医药大学中药学院张彤教授团队制备提供。维生素 E(VE, 批号: 03200701),购自上海信谊延安药业有限公司。

蛋氨酸胆碱缺乏饮食(MCD)饲料(批号: 21011101),苏州鼠一鼠二饲料科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)检测试剂盒(批号分别为 01ALT210107、01AST201111、02TG201209、

01CHOL201030),上海华臣生物试剂有限公司;油红 O(批号: SLBD5248V),美国 Sigma-Aldrich 公司;苏木精、伊红染色液(批号分别为 C210801、719033),珠海贝索生物科技有限公司;兔源 PPAR $\alpha$  多克隆抗体(批号: bs-3614),北京博奥森生物技术有限公司;乙酰辅酶 A 羧化酶(ACC)、磷酸化 ACC(p-ACC)单克隆抗体(批号分别为 3676、3661),美国 Cell Signaling Technology 公司;PPAR 家族共激活因子 1 $\alpha$ (PGC1 $\alpha$ )兔多克隆抗体、四色多重荧光免疫组化染色试剂盒(批号分别为 abs131496、abs50028),北京爱必信生物技术有限公司;CPT1a 单克隆抗体、包含主要协同转运蛋白超家族结构域蛋白 2a(Mfsd2a)兔多克隆抗体(批号分别为 A20746、A22116),武汉爱博泰克生物科技有限公司;辣根过氧化物酶(HRP)偶联  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)重组兔单克隆抗体(批号: ET1702-67),杭州华安生物技术有限公司;蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(批号分别为 04693132001、04906837001),上海罗氏制药有限公司;细胞计数试剂盒(CCK-8,批号: C0040),上海碧云天生物技术有限公司;Steady-Glo<sup>®</sup> 荧光素酶检测试剂(批号: E2510),普洛麦格(北京)生物技术有限公司;1-硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱[LPC(18:0)](批号: 855775),美国 Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids 公司。

1.1.4 主要仪器 全自动生化分析仪(型号: TBA-40FR),日本 Toshiba 公司;UPLC-Q-TOF/MS(型号: ACQUITY UPLC-X evo TQ-S),美国 Waters 公司;石蜡切片机(型号: RM2235)、全自动组织脱水机(型号: TP1020)、冷冻切片机(型号: CM1950)、光学显微镜(型号: DM1),德国 Leica 公司;冷冻离心机(型号: 5810R),德国 Eppendorf 公司;电子天平(型号: AL104),瑞士 Mettler Toledo Centrifuge 公司;全自动样品快速研磨仪(型号: Tissuelyser-24),上海净信科技发展有限公司;全自动化学发光系统(型号: Tanon 5200 Multi),上海净信科技发展有限公司;酶标仪(型号: Spectramax M3),美国 Molecular devices 公司。

1.2 UPLC-Q-TOF/MS 分析 LGZG 成分 取 LGZG 样品 0.5 g,加入体积分数为 50% 的甲醇 1 mL 超声提取(300 W, 40 kHz, 30 min),12 000 r/min 离心 5 min,上清液经 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8  $\mu$ m)分离,以体积分数为 0.1% 甲酸水-乙腈梯度洗脱(0.3 mL/min),质谱条件见附录 S1(见 OSID 码中),AB Sciex Triple TOF 4600 质谱检测(ESI 源,  $m/z$  50-1700)。

1.3 网络药理学分析 基于 UPLC-Q-TOF/MS 鉴定

出的 LGZG 化学成分,通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<https://swisstargetprediction.ch/>) 预测潜在靶点。以“Metabolic dysfunction-Associated Steatohepatitis”“MASH”“NASH”“nonalcoholic steatohepatitis”为关键词,在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、MalaCards (<https://www.malacards.org/>) 疾病靶点数据库中检索 MASH 相关靶点。并采用 Metascape 工具 (<https://metascape.org/gp/index.html>) 进行京都基因与基因组数据库 (KEGG) 通路富集分析,采用 Cytoscape 3.10.3 软件构建“成分-靶点-通路”网络。

1.4 动物实验分组与干预 24 只 SD 大鼠随机分为正常对照 (CON) 组、模型 (MASH) 组、LGZG 干预 (LGZG) 组和 VE 干预 (VE) 组 ( $n=6$ )。CON 组予基础饲料, MASH 组、LGZG 组和 VE 组均采用 MCD 饲料诱导 MASH 模型,造模 2 周后开始干预。CON 组和 MASH 组采用双蒸水灌胃, VE 组参照美国肝病研究学会 NAFLD 指南推荐剂量<sup>[19]</sup>,  $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃, LGZG 组采用生药  $16.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃 (LGZG 的临床等效剂量<sup>[9]</sup>), 持续 4 周。灌胃体积按  $10 \text{ mL/kg}$  体质量计算,每周根据体质量调整给药量。

1.5 样本采集与处理 干预结束后,大鼠禁食 12 h (自由饮水),经腹主动脉采血后,处理大鼠并迅速分离肝脏,称重记录。大鼠全血室温静置 3 h 后,  $3000 \text{ r/min}$  离心 15 min,分离获得血清,于  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存备用。

收集大鼠肝组织,分为三部分:一部分采用 4% 多聚甲醛溶液固定,常规石蜡包埋,制备  $5 \mu\text{m}$  切片,采用苏木精-伊红 (HE) 染色,用于形态学观察和 NAS 评分<sup>[20]</sup>;另一部分 OCT 组织包埋,制备  $10 \mu\text{m}$  冷冻切片,用于油红 O 染色观察脂质沉积情况;剩余肝组织  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存,用于 Western blot 及代谢组学分析。

## 1.6 检测指标与方法

1.6.1 血清生化及肝脏脂质检测 血清 ALT、AST 水平检测:取大鼠血清,采用全自动生化分析仪进行检测。肝组织 TG、TC 水平检测:取 25 mg 大鼠肝组织,加入 225  $\mu\text{L}$  预冷的丙酮-乙醇 (1:1) 后匀浆,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  静置过夜后,  $4000 \text{ r/min}$  离心 15 min,取上清按试剂盒说明书操作。

1.6.2 Western blot 法检测相关蛋白 取大鼠肝组织 50 mg,使用提前加入蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的放射免疫沉淀法 (RIPA) 裂解液提取肝组织总蛋白,二辛可酸 (BCA) 法进行蛋白定量。经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后,转印至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,5% 脱脂牛奶封闭

1 h,加入一抗 (PPAR $\alpha$ , 1:1 000; p-ACC/ACC, 1:1 000; CPT1a, 1:1 000; Mfsd2a, 1:1 000;  $\beta$ -actin, 1:50 000)  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜,加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h,超灵敏化学发光 (ECL) 显影后,以  $\beta$ -actin 为内参,采用 ImageJ 软件分析条带灰度值。

## 1.6.3 肝脏免疫荧光染色观察 PPAR $\alpha$ 入核情况

使用免疫荧光染色试剂盒中的试剂进行实验。石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化后,采用微波加热法进行抗原修复 (乙二胺四乙酸修复液,高火煮沸后低火维持 15 min),随后自然冷却。为消除内源性过氧化物酶活性,切片经 3% 双氧水处理 10 min,随后使用封闭液室温封闭 20 min。去除封闭液后,直接滴加稀释好的 PPAR $\alpha$  抗体 (按 1:500 稀释),室温振荡孵育 1 h,含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液 (TBST) 洗涤后,滴加 HRP 标记的二抗工作液,室温孵育 10 min。为增强信号,切片经 TBST 洗涤后,滴加荧光染料工作液 (按 1:100 稀释) 室温孵育 10 min,随后再次进行微波修复以稳定信号。最后,使用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 工作液复染细胞核 5 min, TBST 充分洗涤后,以抗荧光淬灭封片剂封片,并于荧光显微镜下观察及采集图像。

1.6.4 肝脏代谢组学分析 本研究的肝脏代谢组学分析委托麦特绘谱生物科技 (上海) 有限公司完成 (编号: P402Y21H25)。精确称取约 10 mg 肝组织,加入 20  $\mu\text{L}$  预冷去离子水于研磨仪中匀浆 3 min,加入 120  $\mu\text{L}$  含内标的甲醇提取代谢物,再次匀浆 3 min,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $18000 \text{ r/min}$  离心 20 min。取 20  $\mu\text{L}$  上清至 96 孔板,每孔加入新鲜制备的衍生试剂 20  $\mu\text{L}$ ,封板,于  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  衍生化反应 60 min。衍生化后,样本蒸发 2 h,再加入 330  $\mu\text{L}$  50% 甲醇冰溶液 (体积分数) 稀释样本,进行样本重构。在  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  下放置保存 20 min,然后  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $4000 \text{ r/min}$  离心 30 min。将 135  $\mu\text{L}$  上清液移至 96 孔板,每孔加入内标 10  $\mu\text{L}$ ,与标准品一起进行 UPLC-Q-TOF/MS 检测。

原始数据经 TMBQ 软件 (v1.0) 完成峰识别、积分与定量;数据预处理后导入 iMAP 平台进行有监督的偏最小二乘判别分析 (PLS-DA)。以变量重要性投影 (VIP) 值大于 1.0 作为阈值,初步筛选出对组间区分贡献最大的代谢物。

1.7 细胞实验 AML12 细胞培养于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM/F12 完全培养基。以  $2.5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板,24 h 后替换为含 300  $\mu\text{mol/L}$  油酸 (OA)、150  $\mu\text{mol/L}$  棕榈酸 (PA) 和 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 DMEM/F12 完全培养基,联合刺激 AML12

肝细胞 48 h, 模拟肝细胞脂质沉积与代谢紊乱状态。同时给予终浓度为 5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的 LPC(18:0) 处理 48 h。

1.7.1 CCK-8 法检测 LPC(18:0) 对细胞存活率的影响 将 AML12 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 培养过夜贴壁后, 分别更换为含不同浓度 LPC(18:0) (0~640  $\mu\text{mol/L}$ ) 的培养液, 继续培养 24 h。弃去培养液, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1.5 h 后, 于 450 nm 波长下测定吸光度, 计算细胞存活率及 LPC(18:0) 的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

1.7.2 TG 水平测定检测细胞内脂质积聚 实验结束后, 吸弃培养基, PBS 清洗 AML12 细胞 2 次。每孔加入 80  $\mu\text{L}$  含酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解后, 收集细胞悬液并进行超声破碎后, 用于 TG 测定。按试剂盒说明, 将样本、标准品与工作液加入 96 孔板, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 10 min 后, 于 510 nm 波长下测定吸光度。同时使用 BCA 法测定上清液蛋白浓度, 对 TG 水平进行标准化, 计算 TG 水平。

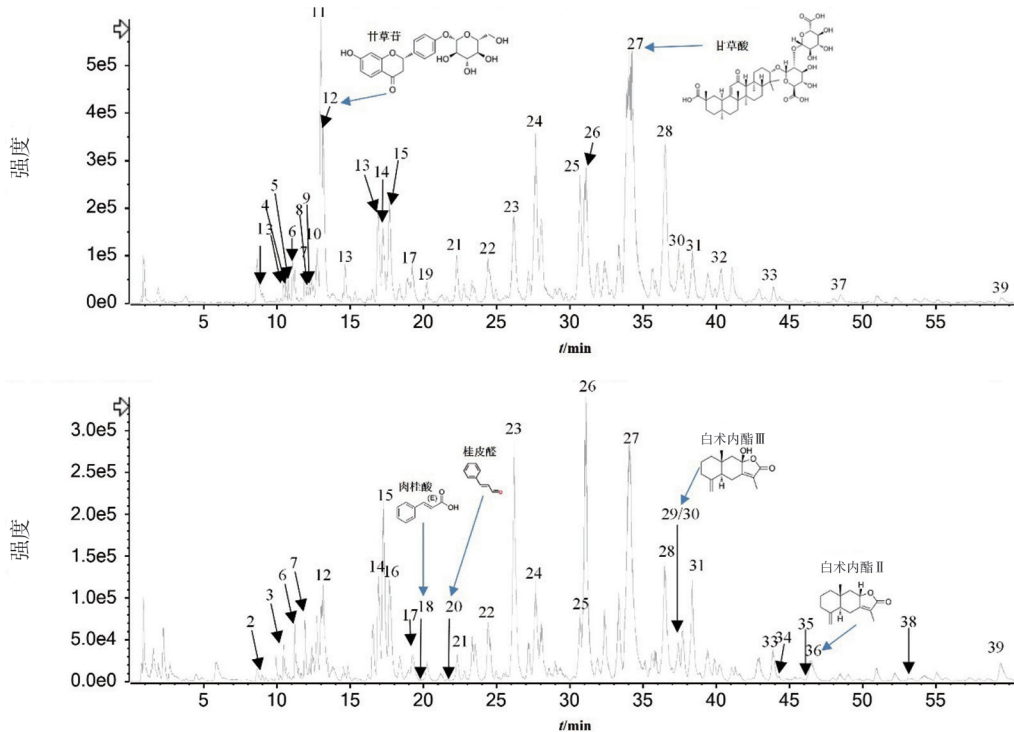
1.7.3 PPAR $\alpha$  荧光素酶报告基因分析转录情况

含有 PPAR $\alpha$  启动子-荧光素酶报告基因构建体 (GR-GAL4-PPAR $\alpha$ -LBD) 由吉满生物科技(上海)有限公司设计, 使用 HEK293T 细胞, 建立 HEK293-PPAR $\alpha$ -luc 细胞系, 给予 5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  LPC(18:0) 处理 24 h 后, 使用 Steady-Glo<sup>®</sup> 试剂检测荧光素酶活性。

1.8 统计学方法 采用 GraphPad Prism 8.4.2 软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间数据采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组数据之间比较采用独立样本  $t$  检验进行分析。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 LGZG 成分分析 本研究采用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对 LGZG 的化学成分进行分析, 共鉴定出 39 个化学成分, 见图 1、附录 S1 (见 OSID 码中)。主要包括: 桂枝和茯苓来源的三萜酸类 16 $\alpha$ -羟基松苓新酸、茯苓酸 A 及芳香族化合物肉桂酸、桂皮醛等, 白术特征性成分白术内酯 I ~ III, 以及甘草来源的甘草苷、甘草酸等黄酮类和三萜类等化学成分。



注: 图中黑色箭头指示各化学成分对应的色谱峰, 其旁数字编号与附表 S1 (见 OSID 码) 中的化学成分序号相对应, 部分化学成分的名称及化学式用蓝色箭头标出。

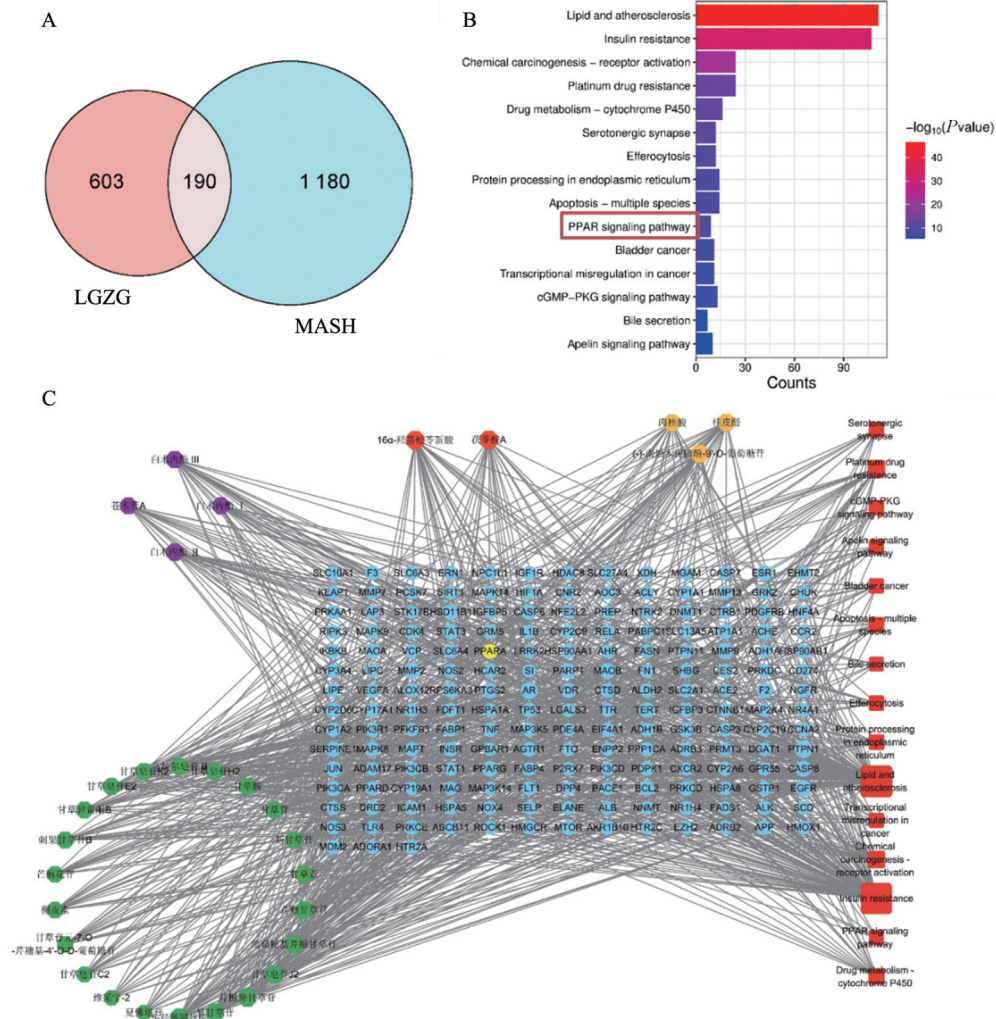
图 1 苓桂术甘汤 (LGZG) 的超高效液相色谱-串联质谱 (UPLC-Q-TOF/MS) 总离子流图 (正、负模式叠加)

2.2 网络药理学揭示 LGZG 通过激活 PPAR $\alpha$  信号通路治疗 MASH 的机制 通过 SwissTargetPrediction 公共数据库, 共获得 LGZG 成分潜在作用靶点 793 个;

通过 Malacards 和 Genecards 数据库, 共获得 MASH 疾病靶点 1 370 个, 并获得药物-疾病交集靶点 190 个 (图 2A), 为 LGZG 治疗 MASH 的潜在靶点。对 190 个

靶点进行KEGG通路富集分析,并进一步构建“LGZG 成分-靶点-通路”互作网络。这些共同靶点显著富集于脂质与动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)、

胰岛素抵抗(Insulin resistance)等通路,PPAR信号通路(PPAR signaling pathway)位列第10(图2B、C)。本研究选择PPAR $\alpha$ 通路作为重点验证对象。



注:A为苓桂术甘汤(LGZG)化学靶点与代谢功能障碍相关脂肪性肝炎(MASH)疾病基因交集韦恩图,B为京都基因与基因组数据库(KEGG)通路富集分析气泡图(排名前15,按P值与基因比排序),C为“成分-靶点-通路”多层次网络拓扑图[节点大小按度值呈现,过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ (PPAR $\alpha$ )用黄色荧光标出]。

图2 网络药理学分析LGZG治疗MASH的作用机制及潜在靶点通路

2.3 LGZG改善MASH肝脏表型与脂质沉积的效应 与CON组相比,MASH组大鼠表现出典型的MCD模型特征:肝质量显著增加( $P<0.01$ ),同时伴随体质量减少( $P<0.01$ )。VE和LGZG干预后虽未显著影响大鼠体质量,但二者均能显著降低肝质量( $P<0.05$ )。见表1。

血清生化检测结果显示,MASH组大鼠血清ALT、AST水平较CON组均显著升高( $P<0.01$ );LGZG干预可显著降低AST水平( $P<0.01$ )及ALT水平( $P<0.05$ )。见表1。

肝脏组织病理学分析显示(图3A、B),MASH组

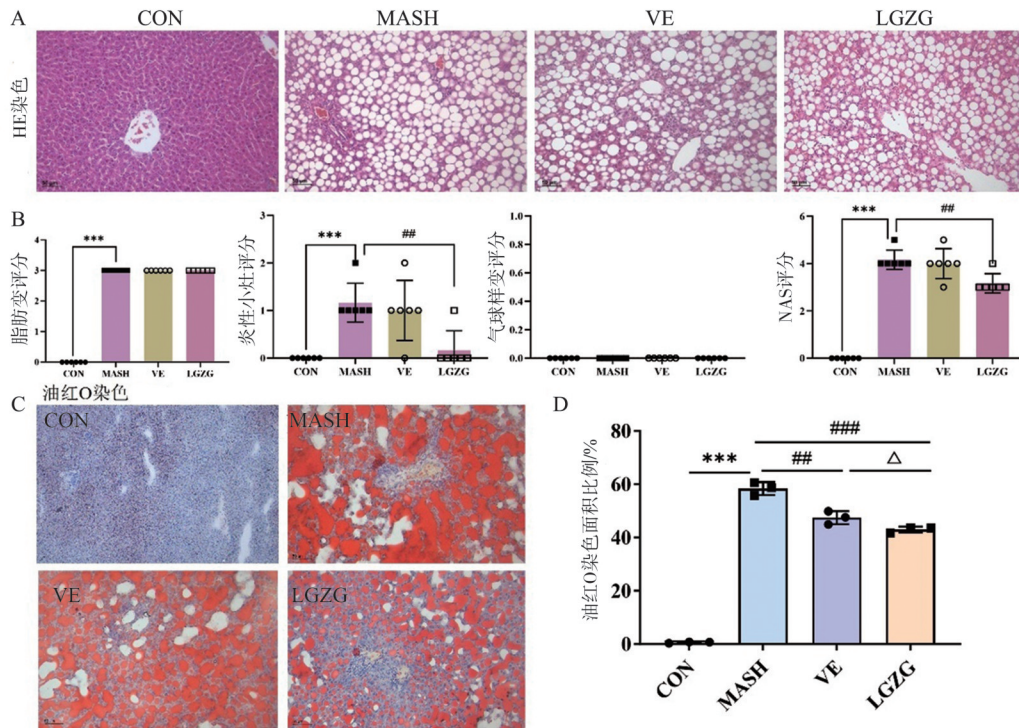
表1 MASH大鼠体质量、肝质量和血清生化指标比较( $n=6, \bar{x} \pm s$ )

组别	体质量/g	肝质量/g	ALT/(U/L)	AST/(U/L)
CON	493.62±22.00	10.88±0.78	37.83±3.71	150.33±17.94
MASH	340.97±26.31**	15.85±1.15**	166.83±54.17**	253.50±43.33**
VE	339.92±17.98	13.98±1.22#	105.50±18.45#	191.83±34.00#
LGZG	325.88±27.92	13.97±0.85#	105.17±34.60#	166.83±35.79##

注:CON为正常对照组,MASH为模型组,VE为维生素E干预组,LGZG为苓桂术甘汤干预组。ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天冬氨酸氨基转移酶。与CON比较,\*\* $P<0.01$ ;与MASH比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。

肝脏呈现严重的脂肪变性及炎症浸润,但未见明显气球样变。LGZG 干预显著减轻肝脏炎症( $P<0.01$ ), LGZG 组 NAS 评分较 MASH 组明显降低( $P<0.01$ )。油红 O 染色中红色表示脂滴,定量结果显示(图 3C、

D), LGZG 组肝组织脂滴面积显著小于 MASH 组( $P<0.01$ ), 且其改善脂肪变性的效果优于 VE 组( $P<0.05$ ), 表明 LGZG 组脂肪变性改善最显著。



注: CON 为正常对照组, MASH 为模型组, VE 为维生素 E 干预组, LGZG 为苓桂术甘汤干预组。A 为肝组织苏木精-伊红(HE)染色图( $\times 20$ ); B 为 NAS 评分统计图; C 为肝组织油红 O 染色图( $\times 20$ ); D 为油红 O 染色统计图。与 CON 比较,  $***P<0.001$ ; 与 MASH 比较,  $##P<0.01$ ,  $###P<0.001$ ; 与 VE 比较,  $\Delta P<0.05$ 。  $n=6, \bar{x}\pm s$ 。

图 3 LGZG 对代谢功能障碍相关脂肪性肝炎大鼠肝脏病理学及脂质沉积的影响

2.4 LGZG 激活 PPAR $\alpha$  通路促进脂肪酸  $\beta$  氧化及抑制肝脏脂质从头合成 对大鼠肝组织进行 Western blot 分析, 结果显示(图 4A、表 2), 与 CON 组相比, MASH 组 PPAR $\alpha$ 、PGC1 $\alpha$ 、CPT1a 蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ )。LGZG 干预可显著恢复 PPAR $\alpha$  和 PGC1 $\alpha$  蛋白表达水平( $P<0.01$ ), 并显著增加 CPT1a 蛋白表达水平( $P<0.05$ )。免疫荧光进一步证实(图 4B), LGZG 组肝细胞核 PPAR $\alpha$  荧光强度显著增强( $P<0.05$ ), 提示其转录活性被有效激活。

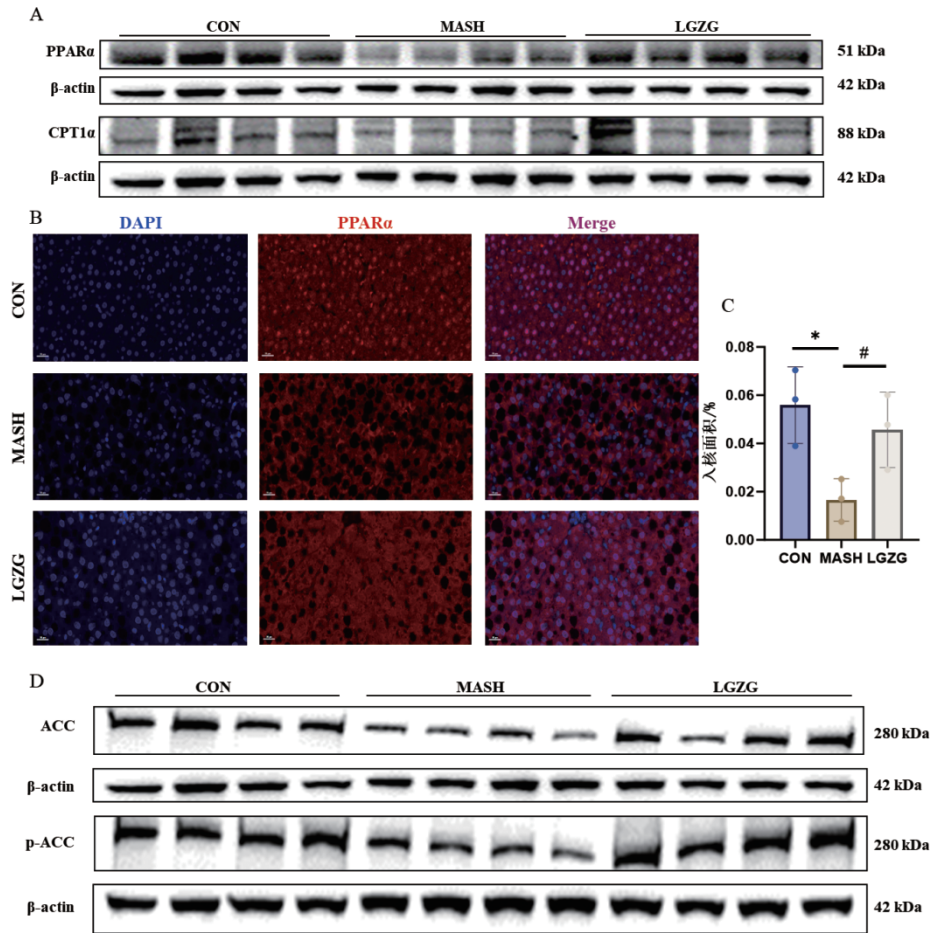
与 CON 组比较, MASH 组 ACC 及 p-ACC 蛋白表达水平均显著降低( $P<0.01$ ), ACC 蛋白表达水平的降低可能与 MCD 模型特征有关。LGZG 干预后, p-ACC 表达水平较 MASH 组显著升高( $P<0.01$ ), 磷酸化水平升高会导致 ACC 蛋白活性降低, 提示脂质从头合成受到抑制<sup>[21]</sup>。见图 4C、表 2。

上述结果提示, LGZG 通过激活 PPAR $\alpha$  促进  $\beta$  氧化及抑制脂质从头合成, 进而改善肝脏脂质代谢

紊乱。

2.5 LGZG 调控肝脏 LPC(18:0) 代谢及 Mfsd2a 表达分析 肝组织代谢组学分析结果显示(图 5A), CON 组、MASH 组和 LGZG 组的代谢谱在 PCA 中呈现显著分离( $P<0.01$ )。差异代谢物分析表明(图 5B), LPC 类代谢物在 LGZG 干预后的变化最为显著( $P<0.001$ )。由表 3 可知, 与 CON 组相比, MASH 组肝脏中 LPC(16:0)、LPC(18:0)、LPC(18:1)、LPC(18:2)、LPC(20:4)、LPC(22:6) 含量显著降低( $P<0.01$ ); 而经 LGZG 干预后, LPC(18:0) 及 LPC(22:6) 含量较 MASH 组显著上调( $P<0.05$ ), 其中 LPC(18:0) 回调最为明显( $P<0.01$ ), 上调了 2.3 倍。

Western blot 检测结果显示(图 5C、D), 与 MASH 组相比, LGZG 组 Mfsd2a 蛋白表达水平显著上调( $P<0.01$ )。这些结果表明, LGZG 可能通过调控 Mfsd2a 促进 LPC(18:0) 在肝脏内积累从而调控脂质代谢。



注:CON为正常对照组,MASH为模型组,LGZG为苓桂术甘汤干预组。PPAR $\alpha$ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ ,PGC1 $\alpha$ 为PPAR家族共激活因子1 $\alpha$ ,CPT1 $\alpha$ 为肉碱棕榈酰转移酶1 $\alpha$ , $\beta$ -actin为 $\beta$ -肌动蛋白(内参),DAPI为4',6-二脒基-2-苯基吡啶,ACC为乙酰辅酶A羧化酶,p-ACC为磷酸化ACC。A为脂肪酸 $\beta$ 氧化通路关键蛋白的Western blot检测图,B为肝组织PPAR $\alpha$ 免疫荧光染色检测图(红色表示PPAR $\alpha$ ,蓝色表示DAPI标记细胞核;标尺=20  $\mu$ m),C为肝组织PPAR $\alpha$ 免疫荧光染色统计图;D为脂质合成关键蛋白ACC及p-ACC的Western blot检测图。与CON比较,\* $P$ <0.05;与MASH比较,# $P$ <0.05; $n$ =6, $\bar{x}\pm s$ 。

图4 LGZG激活PPAR $\alpha$ 通路促进脂肪酸 $\beta$ 氧化并抑制脂质从头合成

表2 LGZG对脂肪酸氧化通路和脂质合成ACC通路蛋白表达的影响( $n=6, \bar{x}\pm s$ )

组别	PPAR $\alpha$	PGC1 $\alpha$	CPT1 $\alpha$	ACC	p-ACC
CON	1.96 $\pm$ 0.23	1.82 $\pm$ 0.25	1.07 $\pm$ 0.16	0.99 $\pm$ 0.15	1.09 $\pm$ 0.14
MASH	1.07 $\pm$ 0.20**	1.18 $\pm$ 0.14**	0.71 $\pm$ 0.10**	0.43 $\pm$ 0.11**	0.53 $\pm$ 0.14**
LGZG	2.06 $\pm$ 0.16##	2.60 $\pm$ 0.51##	1.14 $\pm$ 0.29#	0.89 $\pm$ 0.31#	1.18 $\pm$ 0.15##

注:CON为正常对照组,MASH为模型组,LGZG为苓桂术甘汤干预组,PPAR $\alpha$ 为过氧化物酶体增殖物激活受体 $\alpha$ ,PGC1 $\alpha$ 为PPAR家族共激活因子1 $\alpha$ ,CPT1 $\alpha$ 为肉碱棕榈酰转移酶1 $\alpha$ ,ACC为乙酰辅酶A羧化酶,p-ACC为磷酸化ACC。与CON比较,\*\* $P$ <0.01;与MASH比较,# $P$ <0.05,## $P$ <0.01。

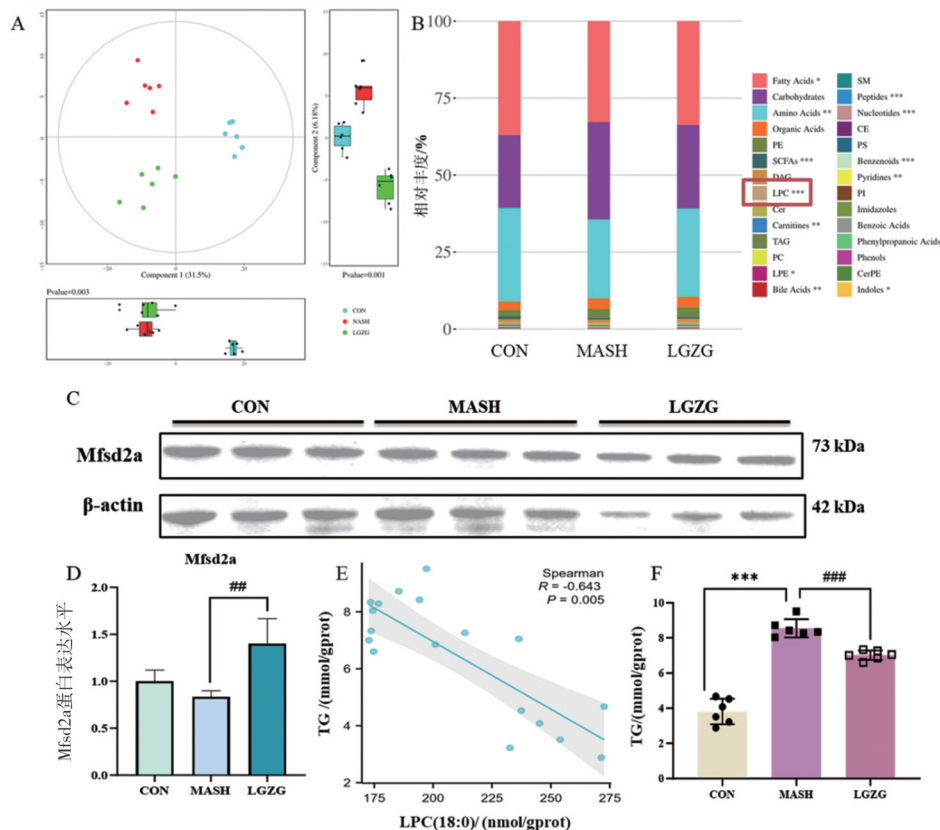
相关性分析显示(图5E),肝脏TG水平与LPC(18:0)含量呈显著负相关( $r=-0.643, P=0.005$ )。与MASH组比较,LGZG干预可显著降低肝脏TG水平( $P<0.01$ ),见图5F。

2.6 LGZG诱导的LPC(18:0)通过激活PPAR $\alpha$ 信号通路调控脂质代谢 为探究内源性代谢物LPC对脂质代谢的调控作用,鉴于肝脏代谢组学结果中LPC(18:0)含量较高且经LGZG干预后显著上调,我们选取LPC(18:0)在小鼠AML12肝细胞中进行功能验证。细胞毒性实验显示(图6A),LPC(18:0)对AML12细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)为136.62  $\mu$ mol/L,表明后续实验剂量处于安全范围。油红O染色结果显示(图6C),与CON组相比,油酸/棕榈酸模型(OAPA)组细胞内脂滴沉积显著增加( $P<0.01$ );而10  $\mu$ mol/L与20  $\mu$ mol/L LPC(18:0)干预均能显著减轻OAPA诱导的脂滴积累( $P<0.05, P<0.01$ )。TG水平测定进一步证实(图6B),各浓度LPC(18:0)均可显著降低OAPA诱导的TG水平升高( $P<0.05$ ),且呈剂量依赖性。

表3 LGZG对MASH大鼠肝脏LPC亚类含量的影响 (n=6,  $\bar{x}\pm s$ , nmol/gprot)

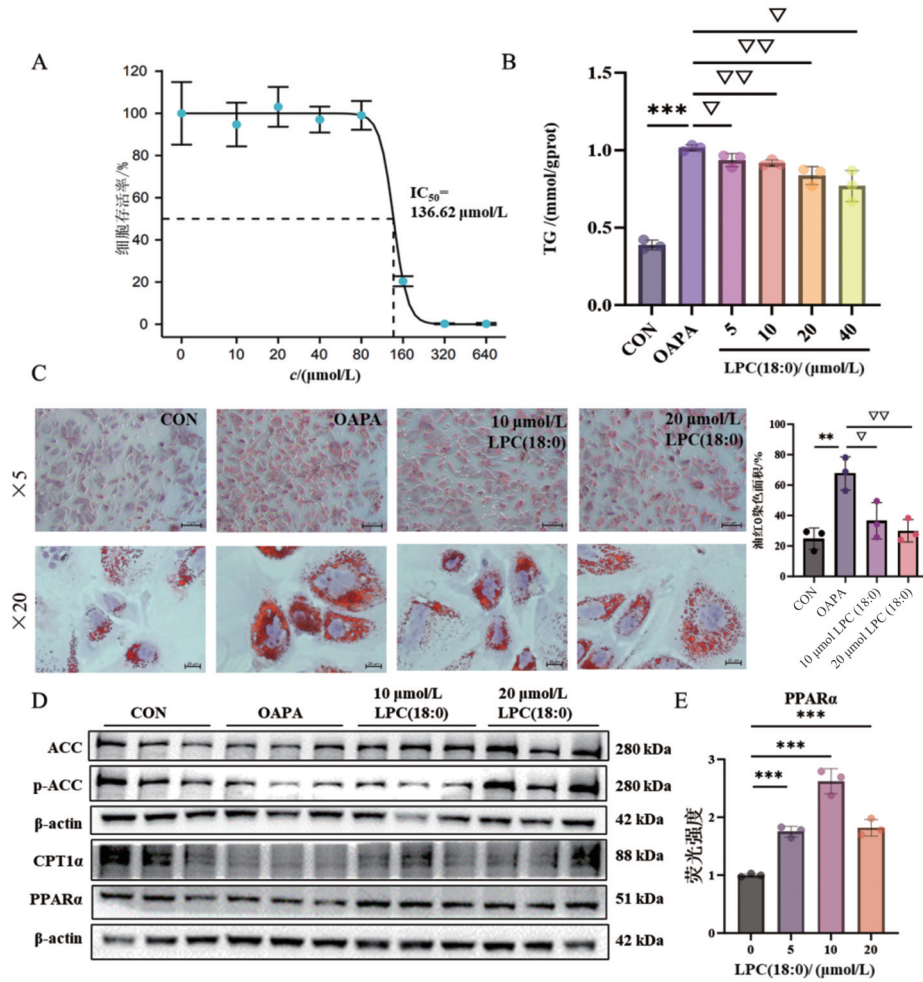
LPC亚类	CON	MASH	LGZG
LPC(16:0)	219.74±13.24	182.53±18.20**	186.68±31.11
LPC(16:1)	4.67±0.72	3.05±0.98	3.05±0.60
LPC(17:0)	10.40±1.33	3.14±0.47	3.83±1.05
LPC(18:0)	260.80±13.44	177.53±5.46**	208.88±21.78##
LPC(18:1)	66.86±6.29	38.13±6.95**	43.33±11.21
LPC(18:2)	178.93±6.32	90.63±9.72**	101.20±32.03
LPC(18:3)	3.98±0.30	2.15±0.09	2.56±0.28
LPC(20:0)	0.75±0.05	0.41±0.05	0.46±0.13
LPC(20:1)	3.43±0.66	1.42±0.33	1.80±0.58
LPC(20:2)	3.59±0.23	1.59±0.21	1.98±0.61
LPC(20:3)	14.78±0.72	5.18±0.32	6.29±0.93
LPC(20:4)	220.03±10.17	142.49±10.39**	154.4±21.37
LPC(20:5)	3.77±0.45	0.32±0.03	0.49±0.18
LPC(22:5)	6.52±1.38	10.96±1.33	26.21±9.43
LPC(22:6)	149.79±19.44	51.63±3.54**	78.06±22.64#
LPC(26:0)	0.05±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00

注:CON为正常对照组,MASH为模型组,LGZG为苓桂术甘汤干预组。LPC为溶血磷脂酰胆碱。与CON比较,\*\* $P<0.01$ ;与MASH比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 。



注:CON为正常对照组,MASH为模型组,LGZG为苓桂术甘汤干预组,Mfsd2a为包含主要协同转运蛋白超家族结构域蛋白2a,LPC为溶血磷脂酰胆碱。A为代谢组学主成分分析(PCA)得分箱线图,B为各组间差异显著代谢物类别相对丰度图,C为Mfsd2a蛋白Western blot检测图,D为Mfsd2a蛋白Western blot检测定量统计图,E为甘油三酯(TG)水平与LPC(18:0)含量的相关性分析散点图,F为各组大鼠肝脏TG水平定量统计图。与CON比较,\*\*\* $P<0.001$ ;与MASH比较,### $P<0.01$ ,### $P<0.001$ ;n=6, $\bar{x}\pm s$ 。

图5 LGZG对MASH大鼠肝组织LPC(18:0)代谢及Mfsd2a蛋白的影响



注: CON 为正常对照组, OAPA 为油酸/棕榈酸模型组, LPC(18:0) 为溶血磷脂酰胆碱 18:0 组。ACC 为乙酰辅酶 A 羧化酶, p-ACC 为磷酸化 ACC,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, CPT1a 为肉碱棕榈酰转移酶 1a, PPAR $\alpha$  为过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$ 。A 为 LPC(18:0) 对 AML12 肝细胞活力的影响(CCK-8 法), B 为不同浓度 LPC(18:0) 干预 48 h 对 AML12 细胞甘油三酯(TG) 水平的影响, C 为油红 O 染色检测 AML12 细胞脂质沉积情况(标尺=50  $\mu$ m), D 为 LPC(18:0) 干预后脂代谢相关蛋白的 Western blot 检测图, E 为 LPC(18:0) 对 PPAR $\alpha$  荧光素酶报告基因活性的影响。与 CON 比较, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; 与 OAPA 比较,  $\nabla P < 0.05$ ,  $\nabla\nabla P < 0.01$ ;  $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图 6 LPC(18:0) 通过激活 PPAR $\alpha$  通路改善肝细胞脂质沉积

Western blot 结果显示, 与 CON 组比较, OAPA 模型组 CPT1a 蛋白表达水平及 p-ACC/ACC 比值均显著降低( $P < 0.05$ )。10  $\mu$ mol/L 的 LPC(18:0) 干预可显著上调 CPT1a 及 PPAR $\alpha$  的蛋白表达水平( $P < 0.05$ ); 20  $\mu$ mol/L LPC(18:0) 干预则显著提高 p-ACC

蛋白表达水平( $P < 0.01$ )及 p-ACC/ACC 比值( $P < 0.05$ )。荧光素酶报告基因检测显示, LPC(18:0) 能有效激活 PPAR $\alpha$  转录活性, 其中 10  $\mu$ mol/L LPC(18:0) 的激动效应最为显著( $P < 0.01$ )。见图 5D、E, 表 4。

表 4 LPC(18:0) 对脂代谢蛋白表达的影响( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	ACC	p-ACC	p-ACC/ACC	CPT1a	PPAR $\alpha$
CON	0.57 $\pm$ 0.13	0.84 $\pm$ 0.22	1.45 $\pm$ 0.07	2.59 $\pm$ 0.80	1.68 $\pm$ 0.48
OAPA	0.57 $\pm$ 0.06	0.34 $\pm$ 0.15*	0.60 $\pm$ 0.32*	1.10 $\pm$ 0.05*	0.93 $\pm$ 0.04
10 $\mu$ mol/L LPC(18:0)	1.15 $\pm$ 0.52	0.46 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.17	1.53 $\pm$ 0.20 $\nabla$	1.07 $\pm$ 0.06 $\nabla$
20 $\mu$ mol/L LPC(18:0)	0.94 $\pm$ 0.12 $\nabla\nabla$	1.21 $\pm$ 0.18 $\nabla\nabla$	1.28 $\pm$ 0.16 $\nabla$	1.94 $\pm$ 0.71	1.33 $\pm$ 0.37

注: CON 为正常对照组, OAPA 为油酸/棕榈酸模型组, LPC(18:0) 为溶血磷脂酰胆碱 18:0 组。ACC 为乙酰辅酶 A 羧化酶, p-ACC 为磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, CPT1a 为肉碱棕榈酰转移酶 1a, PPAR $\alpha$  为过氧化物酶体增殖物激活受体  $\alpha$ 。与 CON 比较, \* $P < 0.05$ ; 与 OAPA 比较,  $\nabla P < 0.05$ ,  $\nabla\nabla P < 0.01$ ;  $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

综上,基于前期网络药理学研究结果提示 PPAR 信号通路重要性以及 PPAR $\alpha$  在 MASH 中的重要作用,本研究通过代谢组学锁定 LGZG 干预后显著变化的 LPC(18:0)为对象。其体外验证结果证实:LGZG 诱导升高的内源性 LPC(18:0)可通过激活 PPAR $\alpha$  信号通路,促进脂肪酸  $\beta$  氧化(表现为上调 CPT1a)并抑制脂质从头合成(表现为提高 p-ACC/ACC 比值),从而改善肝细胞脂质沉积。

### 3 讨论

MASH 是 MAFLD 进展为肝硬化及肝细胞癌的关键阶段。目前,一线治疗以生活方式干预为主,但患者依从性不足常会影响疗效。新型靶向药物(如甲状腺激素受体  $\beta$  激动剂)虽展示了治疗潜力,但其长期安全性及费用可及性仍是需要考量的因素<sup>[22-23]</sup>。中医药在代谢性疾病防治领域积累了丰富经验并展现出独特优势。经典名方 LGZG 源自《金匱要略》,是治疗“痰饮”病的代表方剂,临床研究<sup>[7,24]</sup>证实其可显著改善 MAFLD 脾阳虚证患者的胰岛素抵抗且安全性良好。本方以茯苓健脾利湿为君,桂枝温阳化气为臣,白术健脾燥湿为佐,甘草益气和中为使,四药配伍共奏“健脾利湿、温阳化饮”之功。药理学研究<sup>[25-26]</sup>表明,LGZG 兼具保肝、降脂、抗炎及促进脂质分解代谢等多重效应,契合其温化痰浊、振奋脾阳的中医治法。

本研究结合基于 UPLC-Q-TOF/MS 的化学物质组学、网络药理学、代谢组学、分子生物学及细胞生物学实验,揭示 LGZG 通过调控 LPC-PPAR $\alpha$  轴改善 MASH 肝脏脂质沉积代谢紊乱的作用机制。网络药理学分析提示,LGZG 显著调控 PPAR 信号通路。体内实验证实,LGZG 能有效改善 MASH 大鼠肝脏脂肪变性、炎症浸润及肝功能损伤,其机制在于双向调控肝脏脂代谢稳态:一方面,LGZG 通过显著上调 PPAR $\alpha$  及其共激活因子 PGC1 $\alpha$  蛋白表达,促进 PPAR $\alpha$  核转位以激活转录活性,进而诱导其下游靶基因 CPT1a(脂肪酸  $\beta$  氧化限速酶)的表达,促进脂肪酸  $\beta$  氧化<sup>[27-28]</sup>;另一方面,通过提高 p-ACC 表达水平及 p-ACC/ACC 比值,抑制 ACC 酶活性,从而抑制脂质从头合成<sup>[29-30]</sup>。这一“开源(促氧化)节流(抑合成)”的协同调控模式,精准诠释了 LGZG“温阳化气以消痰浊”(温化阳气促进痰湿运化消散)的中医科学内涵。

代谢组学实验也提示了 LGZG 通过多成分协同作用,整体调节肝脏代谢微环境。我们在 LGZG 水

溶液以及大鼠血浆/肝脏中分别鉴定出了 39 种化学成分,其中 19 种入血成分和 5 种入肝成分(见 OSID 码的附录 S1、S2)。尽管网络药理学及既往研究<sup>[31-35]</sup>表明白术内酯 II、甘草次酸等都具有 PPAR $\alpha$  激动效应,但课题组前期的体外报告基因实验发现,这些 LGZG 的入肝单体成分对 PPAR $\alpha$  的激动效应普遍较弱,难以解释其在体内观察到的显著通路激活。因此,我们推测 LGZG 可能并非主要依赖直接激动 PPAR $\alpha$ ,而是通过多成分协同重塑肝脏内源性代谢网络间接调控该通路。

基于此,我们开展了脏器靶向代谢组学分析。结果显示,LGZG 干预后 LPC 类代谢物的变化最为显著,其中 LPC(18:0)水平显著上调 2.3 倍,免疫荧光也验证了 PPAR $\alpha$  激活后入核的情况,提示 LPC(18:0)可能作为 PPAR $\alpha$  内源性配体发挥作用。进一步的体外功能验证证实,LPC(18:0)能够高效、剂量依赖性地激活 PPAR $\alpha$  转录活性,其激动强度显著优于 LGZG 入肝单体成分。结合免疫荧光观察到的 PPAR $\alpha$  核转位增加,提示 LPC(18:0)可能作为关键的内源性 PPAR $\alpha$  配体发挥作用。因此,LGZG 的疗效机制更可能是:其含有的多种成分协同作用于肝脏代谢网络,促进了内源性 LPC(18:0)的生成或累积;升高的 LPC(18:0)作为强效激动剂,激活 PPAR $\alpha$  及其下游信号通路(促进 CPT1a 表达,提高 p-ACC/ACC 比值),从而改善脂质沉积。

这一以内源性代谢物为媒介的间接激活机制,与化学合成 PPAR $\alpha$  激动剂(如非诺贝特)的直接、强效激活有本质不同。后者虽效价明确,但常伴随组织选择性低、增加代谢负担及潜在副作用等局限<sup>[36]</sup>。LGZG 通过多成分协同重塑肝脏代谢微环境,促进内源性保护性配体 LPC(18:0)的生成与利用,从而更生理、更温和地激活 PPAR $\alpha$  信号,体现了中药复方通过系统调节内环境稳态实现治疗作用的独特优势。同时,相较于已有研究多聚焦于中药单体对 PPAR $\alpha$  的直接影响,本研究首次系统揭示了一个经典复方通过整体调控内源性磷脂代谢网络来激活该通路的完整图景,为理解中药复方“多靶点、整体调节”的特点提供了新的范式。

激活的 PPAR $\alpha$  通路一方面通过上调 CPT1a 表达促进脂肪酸  $\beta$  氧化,另一方面通过增强 ACC 磷酸化抑制 ACC 酶活性,减少丙二酰辅酶 A 生成,从而解除其对 CPT1a 的抑制,形成代谢正反馈调节。这种双途径协同作用在组织学层面得到验证:定量分析显示 LGZG 组油红 O 染色面积减少,与肝脏 TG 水

平显著降低的结果一致。该发现不仅为“LGZG 化痰饮”的传统功效提供了调节脂代谢平衡的现代科学阐释,也为开发靶向 LPC(18:0)-PPAR $\alpha$  轴的抗 MASH 药物研发提供了新思路。后续研究需通过 PPAR $\alpha$  基因敲除模型对此进行进一步验证。

Mfsd2a 作为肝脏特异性 LPC 转运载体<sup>[35]</sup>,协助将 LPC 类的脂质信号分子转运进入细胞内促进下游代谢信号传递,直接决定 LPC 胞内生物利用度及其下游信号激活效率。本研究发现 LGZG 显著上调肝脏 Mfsd2a 蛋白表达,且其表达变化与肝脏 LPC(18:0)水平及 PPAR $\alpha$  激活趋势一致。鉴于已有充分文献证实 Mfsd2a 在 LPC 跨膜转运中的基础作用<sup>[37-38]</sup>,并结合本研究观察到的相关性证据,我们推论 LGZG 可能通过上调 Mfsd2a 表达,促进 LPC(18:0)的胞内转运。虽然基于本研究揭示 LPC-PPAR $\alpha$  轴的整体调控的核心目标和实验资源限制,我们暂未进行 Mfsd2a 的基因敲低或过表达实验,但上述这一关联性结果有力支持了我们的推论。深入解析 Mfsd2a 在 LGZG 作用中的具体调控机制,特别是其与不同 LPC 亚类转运的关系,将是后续研究的重点。

此外,代谢组学分析还显示 LGZG 干预后肝脏中 LPC(20:4)、LPC(22:6)等亚类也有回调趋势。LPC(20:4)是花生四烯酸前体,参与炎症和免疫调节<sup>[39]</sup>。LPC(22:6)则以其神经保护作用闻名,研究显示其水平降低会影响二十二碳六烯酸(DHA)向大脑的运输<sup>[40]</sup>。这些 LPC 亚类可能也参与了 LGZG 的生物学效应。然而,基于 LPC(18:0)的变化幅度最为显著,与 PPAR $\alpha$  激活指标相关性最强,且其作为保护性脂质分子的功能已有较充分文献支持<sup>[41-43]</sup>,本研究选择以其为核心进行深入验证。其他 LPC 亚类的具体功能及其在 LGZG 抗 MASH 中的作用值得在未来工作中系统评价。

综上,本研究揭示了 LGZG 改善 MASH 的核心机制:通过多成分协同作用(可能涉及上调 Mfsd2a)促进保护性内源性代谢物的肝脏累积及胞内转运;胞内 LPC(18:0)作为关键信号分子,有效激活 PPAR $\alpha$  转录活性及其下游 PGC1 $\alpha$ /CPT1a 轴,显著促进脂肪酸 $\beta$ 氧化;LPC(18:0)与 LGZG 可能通过上调 p-ACC 水平,进而抑制 ACC 活性与脂质从头合成通路;在部分个体中,即便 p-ACC/ACC 比值未显著变化,p-ACC 的上调本身仍足以反映 ACC 的功能受到抑制。LGZG 调控“内源性代谢物[LPC(18:0)]-核受体(PPAR $\alpha$ )”轴的首次发现,不仅为经方“健脾利

湿、温阳化饮”的传统功效提供了“调节脂代谢平衡”的现代科学阐释,深化了对“痰饮”实质的认识(即与脂质代谢紊乱高度相关),也为开发基于该信号轴的 MASH 治疗新策略提供了重要科学依据。

本研究基于 MCD 饮食诱导的 MASH 大鼠及油酸/棕榈酸联合刺激诱导的体外肝细胞脂质沉积与代谢紊乱状态,初步证实“LPC(18:0)-PPAR $\alpha$ ”轴在 LGZG 降脂效应中的核心地位,但仍有 4 点局限:①尚未利用 PPAR $\alpha$  或 Mfsd2a 基因敲除模型验证该通路的必需性及限速作用;②除 LPC(18:0)外,回调的 LPC(20:4)、LPC(22:6)等是否具有独立或协同的 PPAR $\alpha$  激动活性尚待系统评价及探究其潜在的脂代谢/炎症调控作用;③需要通过“单体-复方”对比研究,解析 LGZG 具体暴露成分如何调控 LPC 生成酶或 Mfsd2a 表达;④本研究选用 MCD 模型,旨在剥离肥胖、胰岛素抵抗等全身性代谢因素的干扰,在高度纯粹的肝脏脂质代谢紊乱背景下,首次清晰揭示“LPC-PPAR $\alpha$  轴”这一核心内在机制。我们承认该模型与人类 MASH 的复杂表型存在差异,这也正是本研究结论需要在更多转化相关模型及临床研究中进一步验证的原因。值得指出的是,这一在简化模型中发现的核心信号轴,为在更复杂模型中探索其调控网络提供了关键信息。

#### 参考文献:

- [1] SANTOS J P M D, MAIO M C, LEMES M A, et al. Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and organokines: What is now and what will be in the future [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(1): 498.
- [2] LAZARUS J V, IVANCOVSKY WAJCMAN D, MARK H E, et al. Opportunities and challenges following approval of resmetirom for MASH liver disease [J]. Nat Med, 2024, 30(12): 3402-3405.
- [3] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: An international expert consensus statement [J]. J Hepatol, 2020, 73(1): 202-209.
- [4] 魏华凤,柳涛,邢练军,等. 793 例脂肪肝患者证候分布规律 [J]. 中西医结合学报, 2009, 7(5): 411-417.
- [5] 柳涛,刘保成,吴涛,等. 苓桂术甘汤治疗非酒精性脂肪性肝病——从经典到临床的转化医学研究 [J]. 上海中医药杂志, 2022, 56(5): 8-12.
- [6] LIU T, YANG L L, ZOU L, et al. Chinese medicine formula Lingguizhugan Decoction improves  $\beta$ -oxidation and metabolism of fatty acid in high-fat-diet-induced rat model of fatty liver disease [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2013, 2013: 1-9.
- [7] DAI L, XU J, LIU B, et al. Lingguizhugan Decoction, a Chinese herbal formula, improves insulin resistance in overweight/obese

- subjects with non-alcoholic fatty liver disease: A translational approach[J]. *Front Med*, 2022, 16(5): 745-759.
- [ 8 ] DANG Y, HAO S, ZHOU W, et al. The traditional Chinese formulae Ling-gui-zhu-gan decoction alleviated non-alcoholic fatty liver disease via inhibiting PPP1R3C mediated molecules [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 8.
- [ 9 ] ZHU M, WANG X, WANG K, et al. Lingguizhugan Decoction improves non-alcoholic steatohepatitis partially by modulating gut microbiota and correlated metabolites [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1-17.
- [10] CLARE K, DILLON J F, BRENNAN P N. Reactive oxygen species and oxidative stress in the pathogenesis of MAFLD [J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2022, 10(5): 939-946.
- [11] TODISCO S, SANTARSIERO A, CONVERTINI P, et al. PPAR alpha as a metabolic modulator of the liver: Role in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) [J]. *Biology*, 2022, 11(5): 792.
- [12] GAWRIEH S, NOUREDDIN M, LOO N, et al. Saroglitazar, a PPAR-  $\alpha/\gamma$  agonist, for treatment of NAFLD: A randomized controlled double-blind phase 2 trial [J]. *Hepatology*, 2021, 74(4): 1809-1824.
- [13] YANG Y, YING P, JIA Z, et al. Hyperacmotone a alleviates non-alcoholic steatohepatitis via regulating PPAR $\alpha$  signaling [J]. *Phytomedicine*, 2025, 147: 157159.
- [14] KAWANO Y, NISHIUMI S, SAITO M, et al. Identification of lipid species linked to the progression of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Curr Drug Targets*, 2015, 16(12): 1293-1300.
- [15] PAUL B, LEWINSKA M, ANDERSEN J B. Lipid alterations in chronic liver disease and liver cancer [J]. *JHEP Rep*, 2022, 4(6): 100479.
- [16] MONTEALEGRE C, VERARDO V, LUISA MARINA M, et al. Analysis of glycerophospho- and sphingolipids by CE [J]. *Electrophoresis*, 2014, 35(6): 779-792.
- [17] 李玲,季光,张彤,等. 经典名方苓桂术甘汤复方制剂的研制 [J]. *中成药*, 2023, 45(10): 3165-3172.
- [18] 王青云. 2022年度中医药十大学术进展发布 [J]. *中医药管理杂志*, 2023, 31(5): 62.
- [19] NAN Y M, FU N, LI W C, et al. An interpretation of the AASLD practice guideline on the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease in 2017 [J]. *Chin J Hepatol*, 2017, 25(9): 687-694.
- [20] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Hepatology*, 2005, 41(6): 1313-1321.
- [21] THIMME GOWDA C, SIRAGANAHALLI ESHWARAIAH M, WANG J, et al. The AKAP12-PKA axis regulates lipid homeostasis during alcohol-associated liver disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1): 109.
- [22] WANG D, MIAO J, ZHANG L, et al. Research advances in the diagnosis and treatment of MASLD/MASH [J]. *Ann Med*, 2024, 57(1): 2445780.
- [23] KEAM S J. Resmetrom: first approval [J]. *Drugs*, 2024, 84(6): 729-735.
- [24] XU J, WANG R, YOU S, et al. Traditional Chinese medicine Lingguizhugan Decoction treating non-alcoholic fatty liver disease with spleen-yang deficiency pattern: Study protocol for a multicenter randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2020, 21(1): 512.
- [25] WU R, ZHAO D, AN R, et al. Lingui Zhugan Formula improves glucose and lipid levels and alters gut microbiota in high-fat diet-induced diabetic mice [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 918.
- [26] YANG L, LIN W, NUGENT C A, et al. Lingguizhugan Decoction protects against high-fat-diet-induced nonalcoholic fatty liver disease by alleviating oxidative stress and activating cholesterol secretion [J]. *Int J Genomics*, 2017, 2017: 2790-2864.
- [27] SONG S, ATTIA R R, CONNAUGHTON S, et al. Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) and PPAR gamma coactivator (PGC-1 $\alpha$ ) induce carnitine palmitoyltransferase IA (CPT-1A) via independent gene elements [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 325(1-2): 54-63.
- [28] LI C, XIONG L, YANG Y, et al. Sorafenib enhanced the function of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma by facilitating PPAR $\alpha$ -mediated fatty acid oxidation [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 34.
- [29] HARDIE D G. AMP-activated protein kinase-a journey from 1 to 100 downstream targets [J]. *Biochem J*, 2022, 479(22): 2327-2343.
- [30] LALLY J S V, GHOSHAL S, DEPERALTA D K, et al. Inhibition of acetyl-coA carboxylase by phosphorylation or the inhibitor ND-654 suppresses lipogenesis and hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 174-182.
- [31] YAN T, WANG H, CAO L, et al. Glycyrrhizin alleviates nonalcoholic steatohepatitis via modulating bile acids and meta-inflammation [J]. *Drug Metab Dispos*, 2018, 46(9): 1310-1319.
- [32] WANG C, DUAN X, SUN X, et al. Protective effects of glycyrrhizic acid from edible botanical glycyrrhiza glabra against non-alcoholic steatohepatitis in mice [J]. *Food Funct*, 2016, 7(9): 3716-3723.
- [33] WU Y, WANG M, YANG T, et al. Cinnamic acid ameliorates nonalcoholic fatty liver disease by suppressing hepatic lipogenesis and promoting fatty acid oxidation [J]. *Evid Based Complement Altern Med*, 2021, 2021: 1-13.
- [34] KONG D, MAI Z, CHEN Y, et al. ATL I, acts as a SIRT6 activator to alleviate hepatic steatosis in mice via suppression of NLRP3 inflammasome formation [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(12): 1526.
- [35] HE J, YANG Y, ZHANG F, et al. Effects of poria cocos extract on metabolic dysfunction-associated fatty liver disease via the FXR/PPAR $\alpha$ -SREBPs pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1007274.
- [36] KOSTAPANOS M S, FLORENTIN M, ELISAF M S. Fenofibrate and the kidney: An overview [J]. *Eur J Clin Invest*, 2013, 43

(5): 522-531.

[37] WOOD C A P, ZHANG J, AYDIN D, et al. Structure and mechanism of blood-brain-barrier lipid transporter MFSD2A [J]. Nature, 2021, 596(7872): 444-448.

[38] NGUYEN C, LEI H T, LAI L T F, et al. Lipid flipping in the omega-3 fatty-acid transporter [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2571.

[39] ZHU Y D, GUAN X Q, CHEN J, et al. Neobavaisoflavone induces bilirubin metabolizing enzyme UGT1A1 via PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  [J]. Front Pharmacol, 2021, 11: 628314.

[40] RIEDERER M, OJALA P J, HRZENJAK A, et al. Acyl chain-dependent effect of lysophosphatidylcholine on endothelial prostacyclin production [J]. J Lipid Res, 2010, 51(10): 2957-2966.

[41] TANAKA N, MATSUBARA T, KRAUSZ K W, et al. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis [J]. Hepatology, 2012, 56(1): 118-129.

[42] AUGUET T, BERTRAN L, CAPELLADES J, et al. LC/MS-based untargeted metabolomics analysis in women with morbid obesity and associated type 2 diabetes mellitus [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(9): 7761.

[43] LIU P, ZHU W, CHEN C, et al. The mechanisms of lysophosphatidylcholine in the development of diseases [J]. Life Sci, 2020, 247: 1-55.

编辑:杨轶舜

收稿日期:2025-08-18



(上接第 16 页)

[46] QI L Y, YANG J W, YAN S Y, et al. Acupuncture for the treatment of diarrhea-predominant irritable bowel syndrome: a pilot randomized clinical trial [J]. JAMA Netw Open, 2022, 5(12): e2248817.

[47] YANG Y, RAO K, ZHAN K, et al. Clinical evidence of acupuncture and moxibustion for irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Front Public Health, 2022, 10: 1022145.

[48] BAO C, WU L, SHI Y, et al. Long-term effect of moxibustion on irritable bowel syndrome with diarrhea: a randomized clinical trial [J]. Therap Adv Gastroenterol, 2022, 15: 17562848221075131.

[49] WANG Z, XU M, SHI Z, et al. Mild moxibustion for irritable bowel syndrome with diarrhea (IBS-D): a randomized controlled trial [J]. J Ethnopharmacol, 2022, 289: 115064.

[50] 马凤君,刘芳,张巍,等.隔药灸脐法治疗肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征临床研究[J].山东中医杂志,2025,44(1):66-71.

[51] 耿乐乐,黄辉,宣逸尘,等.混元灸治疗脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征:随机对照试验[J].中国针灸,2023,43(9):1028-1032.

[52] 邹维,毛靓瑶,刘敏,等.温针灸治疗脾胃虚弱证腹泻型肠易激综合征临床研究[J].山西中医,2019,40(12):1786-1788.

[53] 李国娜,马金丹,吴焕淦,等.针灸治疗女性腹泻型肠易激综合征的临床疗效观察及对血清丙二醛、总抗氧化能力的调节作用[J].世界中医药,2022,17(3):344-347.

[54] 李柏,苗莹,单旭,等.温针灸治疗腹泻型肠易激综合征临床疗效的 meta 分析[J].中国临床研究,2024,16(11):125-131.

[55] 杨敏,邹燃,张玲,等.针灸对肝郁脾虚型肠易激综合征患者精神心理状况影响的临床研究[J].湖北中医杂志,2020,42(5):51-54.

[56] 张红云,王海凤.针刺并热敏灸治疗肝郁脾虚型腹泻型肠易激综合征的临床观察[J].中国临床研究,2021,13(13):36-38.

[57] 赵峥嵘,王雅萱,徐芳园,等.隔药灸贴治疗脾肾阳虚型腹泻型肠易激综合征:随机对照试验[J].中国针灸,2023,43(6):617-621.

[58] 陈茜,周愉,董艳娇,等.针刺调神法治疗腹泻型肠易激综合征的 meta 分析[J].世界中医药,2020,15(4):2085-2096.

[59] 孙远征,王仕林,于天洋.“调神针法”联合电针治疗腹泻型肠易激综合征:随机对照研究[J].中国针灸,2021,41(1):13-16.

[60] ZHAO J, ZHENG H, WANG X, et al. Efficacy of acupuncture in refractory irritable bowel syndrome patients: a randomized controlled trial [J]. Front Med, 2024, 18(4): 678-689.

[61] 宣逸尘,刘静,黄毅勇,等.长蛇灸联合西药治疗脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征疗效观察[J].中国针灸,2021,41(2):133-136.

[62] 魏凌,邓玲,周超.温针灸联合嗜酸乳杆菌治疗肠易激综合征腹泻型患者临床疗效观察[J].湖北中医药大学学报,2022,24(1):97-99.

[63] 魏秀娟,靳红燕,严晓红.健脾调神温针灸治疗腹泻型肠易激综合征临床研究[J].陕西中医,2023,44(2):245-254.

[64] 苗诗雨,赵佳玥,杨元祯,等.基于人工智能的针灸临床诊疗技术研究进展[J].上海中医药杂志,2025,59(8):1-6.

编辑:严林

收稿日期:2025-12-10