

实验研究

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2026.z20251216001

参葛方对酒精性肝病小鼠肝脏损伤的保护作用及其相关机制

黄知礼^{1,2,3}, 冯俊华^{1,2,3}, 曹海霞⁴, 李茜^{1,2,3}, 纪龙珊^{1,2,3}, 梁晓晖^{1,2,3}, 高月求^{1,2,3}, 李曼^{1,2,3}

1. 上海中医药大学附属曙光医院细胞免疫实验室(上海 201203); 2. 上海市中医药研究院疫病研究所(上海 201203); 3. 上海中医药大学附属曙光医院肝病科(上海 201203); 4. 上海交通大学医学院附属新华医院(上海 200092)

【摘要】 目的 阐明参葛方(SGF)通过上调肝细胞脂联素受体 1(AdipoR1)-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2(CaMKK2)-腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路治疗酒精性肝病(ALD)的作用机制。**方法** ①采用网络药理学方法筛选 SGF 治疗 ALD 的活性成分及作用靶点,进而系统分析其潜在的治疗靶点与相关功能通路。②30 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组(Control)、模型组(Model)、SGF 低剂量组(SGF-L, 7.95 mg/g)、SGF 中剂量组(SGF-M, 15.9 mg/g)、SGF 高剂量组(SGF-H, 31.8 mg/g),每组 6 只。除对照组外,其余各组建立 ALD 小鼠模型(NIAAA 模型),用药组在造模的同时分别给予相应药物灌胃,而对照组与模型组则给予等体积 0.9% 氯化钠溶液,共干预 10 d。采用生化分析仪检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和甘油三酯(TG)水平及小鼠肝组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)检测小鼠肝组织炎症和纤维化相关基因表达水平;Western blot 法检测小鼠肝组织 AdipoR1、CaMKK2、AMPK 蛋白表达;苏木精-伊红(HE)、油红 O 染色和免疫组织化学法检测小鼠肝组织病理变化、脂质沉积及炎症细胞浸润情况。③以无水乙醇干预 HepG2 细胞,建立 ALD 细胞模型;并分别运用 si-AdipoR1、Dorsomorphin(AMPK 抑制剂)和 SGF 大鼠药物血清干预,验证 SGF 治疗 ALD 的作用靶点。**结果** ①网络药理学筛选出 CaMKK2 是 SGF 治疗 ALD 的潜在靶点,主要涉及 AMPK 以及钙离子相关信号通路。②与模型组相比,各用药组小鼠血清 ALT、AST、TG 水平均明显降低,肝脏促炎性细胞因子和胶原相关因子的 mRNA 水平均降低;肝脏炎症和脂质沉积均明显改善。③体外应用无水乙醇干预 HepG2 细胞可增加细胞脂质沉积,抑制 AdipoR1、CaMKK2 和 p-AMPK 蛋白表达,SGF 药物血清干预可上调 AdipoR1、CaMKK2 和 p-AMPK 蛋白表达,减少脂质沉积;si-AdipoR1 可抑制 SGF 对脂质沉积的改善作用以及 SGF 对 AdipoR1、CaMKK2 和 AMPK 的激活作用;Dorsomorphin 可抑制 SGF 对脂质沉积的改善作用以及 SGF 对 AMPK 的激活作用。**结论** SGF 通过激活 AdipoR1-CaMKK2-AMPK 信号通路,发挥治疗 ALD 的作用。

【关键词】 酒精性肝病;参葛方;脂质沉积;炎症;脂联素受体 1;钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2;腺苷酸活化蛋白激酶

Protective effect of Shenge Formula against liver injury in alcoholic liver disease in mice and its related mechanisms

Huang Zhili^{1,2,3}, Feng Junhua^{1,2,3}, Cao Haixia⁴, Li Qian^{1,2,3}, Ji Longshan^{1,2,3}, Liang Xiaohui^{1,2,3}, Gao Yueqiu^{1,2,3}, Li Man^{1,2,3}

[基金项目] 上海市中医临床重点实验室项目(20DZ2272200)

[作者简介] 黄知礼,男,硕士研究生,主要从事中医药防治慢性肝病的研究工作

[通信作者] 李曼,研究员,博士研究生导师;

E-mail: liman121000@shutcm.edu.cn

1. Department of Cellular Immunology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Institute of Infectious Diseases, Shanghai Academy of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 3. Department of Hepatology, Shuguang Hospital Affiliated

to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4.Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

Abstract: Objective To elucidate the mechanism of Shenge Formula (SGF) in the treatment of alcoholic liver disease (ALD) by up-regulating the adiponectin receptor 1 (AdipoR1)-calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2 (CaMKK2)-adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway in hepatocytes. **Methods** ① Network pharmacology was employed to screen the active components and potential targets of SGF for ALD treatment, followed by systematic analysis of its core therapeutic targets and related functional pathways. ② Thirty specific pathogen-free (SPF) healthy male C57BL/6J mice were randomly divided into five groups ($n=6$ per group): control group, model group, low-dose SGF group (SGF-L, 7.95 mg/g), medium-dose SGF group (SGF-M, 15.9 mg/g), and high-dose SGF group (SGF-H, 31.8 mg/g). Except for the control group, a mouse model of ALD (NIAAA) was established in all other groups. Concurrently with modeling, the treatment groups were administrated with corresponding drugs via gavage, while the control and model groups were given an equal volume of 0.9% sodium chloride solution for 10 consecutive days. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and triglyceride (TG), as well as hepatic levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), were measured. The mRNA expression levels of inflammation- and fibrosis-related genes in liver tissues were detected by reverse transcription quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Protein expression levels of AdipoR1, CaMKK2, and AMPK in liver tissues were determined by Western blot analysis. Hepatic pathological changes, lipid accumulation, and inflammatory cell infiltration were assessed by hematoxylin-eosin (HE) staining, Oil Red O staining, and immunohistochemistry. ③ An *in vitro* ALD cell model was constructed by treating HepG2 cells with absolute ethanol. Cells were further treated with SGF-containing rat serum, combined with AdipoR1 siRNA (si-AdipoR1) and Dorsomorphin (an AMPK inhibitor), to verify the key targets of SGF in ALD treatment. **Results** ① Network pharmacology identified CaMKK2 as a putative target of SGF against ALD, which was mainly involved in the AMPK and calcium-related signaling pathways. ② Compared with the model group, serum ALT, AST, and TG levels were significantly decreased in all SGF-treated groups, accompanied by down-regulated mRNA levels of hepatic pro-inflammatory factors and collagen-related factors, as well as markedly alleviated hepatic inflammation and lipid accumulation. ③ *In vitro* stimulation of HepG2 cells with absolute ethanol promoted intracellular lipid deposition and suppressed the protein expression of AdipoR1, CaMKK2, and phosphorylated AMPK (p-AMPK). Treatment with SGF-containing serum up-regulated AdipoR1, CaMKK2, and p-AMPK expression levels and reduced lipid accumulation. Transfection with si-AdipoR1 abolished the ameliorative effect of SGF on lipid deposition and its activation of AdipoR1, CaMKK2, and AMPK. Dorsomorphin abrogated SGF-mediated improvements in lipid deposition and SGF-triggered AMPK activation. **Conclusion** SGF exerts therapeutic effects against ALD via activation of the AdipoR1-CaMKK2-AMPK signaling pathway. **Keywords:** alcoholic liver disease; Shenge Formula; lipid accumulation; inflammation; AdipoR1; CaMKK2; AMPK

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是全球主要慢性肝脏疾病之一,其疾病负担在美国约占所有肝病病例的一半^[1]。随着社会的发展,我国饮酒人群的比例及ALD患者数量呈逐年上升趋势^[2]。ALD呈现为一个连续的疾病谱系,其病变范围从初期的单纯脂肪变性,涵盖酒精性脂肪性肝炎(ASH),最终有可能进展为肝硬化乃至肝细胞癌(HCC)^[3]。ALD的发生与氧化应激、炎症反应及脂质代谢紊乱密切相关,疾病进展伴随代谢产物不断累积,最终可能发展为肝癌^[3]。目前,戒酒仍是治疗ALD的主要方式,尚无其他特异性疗法^[4],因此,探寻有效的ALD治疗药物具有重要的临床意义。

在分子机制层面,ALD的发生发展与肝脏能量代谢失衡密切相关。长期乙醇摄入可通过抑制脂肪酸 β -氧化、促进脂质合成及诱导线粒体功能障碍,导致肝内脂质异常沉积,并伴随氧化应激和炎

症反应的持续激活^[5]。脂联素受体1(AdipoR1)是调控肝脏脂质代谢和能量稳态的重要受体,其激活可通过钙离子依赖性机制募集并激活钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶2(CaMKK2),进而磷酸化并激活腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)^[6-7]。AMPK作为细胞能量代谢的核心感知分子,能够对脂肪酸代谢进行重编程,即抑制其合成途径并同时激活氧化途径;并减轻肝脏内脂质沉积^[8]。已有研究^[9-10]表明,乙醇可抑制AdipoR1及其下游CaMKK2-AMPK信号通路活性,削弱机体对能量失衡的代偿调节能力,从而加重肝脏脂肪变性和炎症反应。因此,靶向调控AdipoR1/CaMKK2/AMPK信号轴,被认为是干预ALD发生发展的重要潜在策略。

基于健脾益肾、化湿祛痰、活血化瘀治则的参葛方(SGF)是上海市名中医高月教授治疗代谢相关脂肪性肝病的临床经验方(院内制剂:

Z20220016000)。临床研究证实该方可有效改善代谢相关脂肪性肝病患者的临床症状、降低腰臀比^[11],其机制在于促进肝脏脂质氧化,从而减少肝脏内脂质沉积^[12]。但是,SGF 治疗 ALD 的疗效及相关机制尚未明确。ALD 在中医理论中多归属于“胁痛”“黄疸”“积聚”“酒疸”等范畴,主要与长期饮酒损伤肝脾,导致湿热内蕴、气滞血瘀、肝肾不足有关^[13]。因此,基于健脾益肾、化湿祛痰、活血化痰治则的 SGF 可能是治疗 ALD 的潜在有效方药。本研究通过建立 ALD 小鼠模型(NIAAA 模型)^[14-15],研究 SGF 改善 ALD 模型小鼠的疗效及相关分子机制,以期为 ALD 治疗提供新的中药复方。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 选取 30 只 8 周龄、体质量大于 20 g 的 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠;另选用 10 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量为 170 g~210 g。所有动物均由浙江维通利华实验动物技术有限公司提供,饲养于上海南方模式生物研究中心 SPF 级屏障系统内,环境温度维持在(22±2)℃,相对湿度 55%~60%。所有大鼠均自由进食与饮水,维持 12 h 光照/12 h 黑暗周期。动物生产许可证号:SCXK(浙)2019-0001。动物使用许可证号:SYXK(沪)2019-0003。本实验方案获得上海南方模式生物研究中心伦理委员会的批准(伦理批号:20230003)。

1.1.2 分组与造模 雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组以及参葛方低剂量组(SGF-L, 7.95 mg/g)、参葛方中剂量组(SGF-M, 15.9 mg/g)和参葛方高剂量组(SGF-H, 31.8 mg/g)。使用 LD 酒精液体饲料(Lieber-DeCarli)饮食(对照)结合乙醇饮食,建立 NIAAA 模型^[14-15]。精确称取 225 g 干燥状态的混合对照饮食干粉,加入 860 mL 灭菌纯水后,采用合适的搅拌手段使两者充分融合,确保形成均一稳定的体系,最终配制为 1 L 对照液体饮食。该饮食需于 4℃条件下冷藏存放,且为保障其食用品质与实验可靠性,务必在 3 d 内使用完毕。乙醇饮食制备:称取 133 g 干燥的乙醇饮食干粉,依据实验设计中不同乙醇浓度的要求,分别加入对应剂量的麦芽糊精和不同体积的纯水。将所有组分充分搅拌至均匀状态,配制得到 1 L 不同乙醇浓度梯度的乙醇液体饮食,供后续模型组喂养时使用。

1.1.3 给药及取材 SGF 各剂量组给予相应浓度的药液灌胃,对照组及模型组则给予等体积 0.9% 氯化

钠溶液。每日灌胃 1 次,灌胃量为每 10 g 小鼠体质量灌胃 0.1 mL,自造模当天开始,连续干预 10 d。于第 11 天称重后,对模型组及 SGF 各剂量组小鼠 1 次性给予乙醇溶液(5 g/kg)灌胃;对照组小鼠则灌胃等体积麦芽糖糊精溶液(9 g/kg)。灌胃 9 h 后进行取材。使用 0.1% 戊巴比妥腹腔(每 10 g 体质量灌胃 0.1 mL)注射麻醉,毛细玻璃针从小鼠眼眶静脉丛取血。血液样本收集上清液并于-80℃冰箱保存。取小鼠肝脏,拍照并称重记录。快速切取肝右叶 2 块组织,分别浸泡于 4% 多聚甲醛固定液中进行固定或置于 OCT 胶包埋,OCT 胶于液氮中速冻后转存于-80℃冰箱,剩余肝脏组织置于-80℃冰箱保存。

1.1.4 细胞 人肝癌细胞 HepG2,由中国科学院上海细胞库提供。

1.1.5 药物与试剂 麦芽糖糊精溶液(9 g/kg):将 9 g 麦芽糖定容至最终体积为 20 mL 的水中,制备成 45% 麦芽糖糊精溶液。乙醇溶液(5 g/kg):将 6.6 mL 95% 乙醇和 13.4 mL 水混合制备成 31.5% 乙醇溶液,现配现用。SGF 由丹参 15 g、葛根 15 g、垂盆草 30 g、白术 15 g、片姜黄 15 g、女贞子 15 g 组成。实验药物购自上海中医药大学附属曙光医院中药房(院内制剂)。参葛颗粒 1 包为 10.7 g,42.8 g(4 包)相当于 1 剂 SGF 草药(105 g 草药)。根据给药公式[小鼠剂量(g/kg)=成人剂量(g)÷成人标准体质量(kg)×9],计算出与人等效剂量的小鼠的原方用药为 15.9 mg/g,折算成对应参葛颗粒给药剂量为 6.5 mg/g,低剂量为 3.25 mg/g,中剂量为 6.5 mg/g,高剂量为 13 mg/g。使用双蒸馏水进行溶解并浓缩至所需药物浓度,于 4℃冰箱保存备用。动物实验采用灌胃给药。

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号:SL7070-100ML),北京酷来博生物科技有限公司;加强型二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(批号:220105),茹创生物有限公司;TRIzol 试剂(批号:R401-01),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RNA 逆转录试剂盒(批号:R223-01),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;RNA 扩增试剂盒(批号:Q711-02),南京诺唯赞生物科技股份有限公司;油红染色试剂盒(批号:D027-1-4),南京建成生物工程研究所;胎牛血清(批号:F0193),德国 Merck 公司;DMEM 培养基(批号:MA0212),大连美仑生物技术有限公司;靶向脂联素受体 1 的小干扰 RNA(si-AdipoR1),美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Dorsomorphin(AMPK 抑制剂)(批号:866405-64-3),美国 MCE 公司;三溴乙醇(批

号:T903147-500g),上海麦克林生化科技股份有限公司; Western blot 抗体 p-AMPK、AMPK (批号分别为 2531、2532),美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.1.6 主要仪器 离心机(型号:5804R),德国 Eppendorf 公司;PCR 仪(型号:CFX384)、电泳转膜仪(型号:1645070)、化学发光凝胶成像系统(型号:12003153),美国 Bio-Rad 公司;全自动微孔板酶标仪(型号:Neo2),美国 BioTek 公司。

1.2 网络药理学分析 SGF 治疗 ALD 的活性成分及相关功能靶点 通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, https://www.tcm-sp-e.com/load_intro.php)数据库收集 SGF 中 6 味中药的化学成分。通过化学模组数据库(Pubchem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、预测化合物 ADME(吸收、分布、代谢、排泄)性质的在线数据库(SwissADME, <https://www.swissadme.ch/index.php>)、小分子预测靶点数据库(SwissTargetPrediction, <https://www.swisstargetprediction.ch/>)、中药成分与靶标蛋白相互作用分析体系数据库(BATMAN-TCM, <http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)在线工具预测 SGF 活性成分可能作用的靶标。通过人类基因数据库(Genecards, <https://www.genecards.org/>)、在线孟德尔数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)和疾病相关基因查询数据库(DisGeNET, <https://disgenet.com/>),以“酒精性肝病(ALD)”和“酒精性相关性肝病(ARLD)”为关键词搜索 ALD 相关靶点,并对获得的疾病相关靶点进行筛选去重后用于后续分析。通过基因/蛋白质相互作用关系检索工具(String, <https://string-db.org/>)对 SGF 活性成分和 ALD 疾病的交集靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI),将构建好的 PPI 图导入 Cytoscape3.9.1 软件,筛选潜在靶点。对 SGF 活性成分与 ALD 的交集靶点经注释、可视化和综合发现数据库(DAVID)进行基因本体(GO)富集分析及京都基因和基因组数据库(KEGG)分析,并通过 R 语言对通路富集分析的结果进行可视化处理。从 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载小分子配体的二维结构,再借助 Chem Office 软件将其转换为三维构型。以 RCSB PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)为来源,筛选出分辨率较高的靶点蛋白晶体结构作为分子对接的受体。使用 AutoDock Vina 1.5.6 软件执行分子对接计算,旨在分析蛋白与配体间的相互作用。依据各对接结果的分值高低,确定分子模拟的最优空间构象。借助

PyMOL 与 Discovery Studio 2019 软件实现可视化展示,输出化合物与关键氨基酸残基之间的二维相互作用图及三维分析图。通常,若结合能低于 -5.0 kcal/mol,提示二者具备较好的结合活性;若低于 -7.0 kcal/mol,则表明存在强烈的结合作用。

1.3 细胞验证实验

1.3.1 制备 SGF 药物血清 使用 SD 大鼠,将煎煮好的 SGF 中药液(中剂量,成人 1 天 2 包)按成人等效剂量 7 倍进行灌胃(10 mL/kg),连续 3 d,每天 2 次,第 4 天进行第 7 次灌胃后 1 h,腹主动脉取血, 3000 r/min 离心 10 min,分离血清后,经 56°C 、 30 min 灭活,过滤除菌。 -80°C 低温保存备用。

1.3.2 细胞培养 HepG2 细胞于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中进行培养,置于 37°C 恒温培养箱中,维持 5% CO_2 及饱和湿度的培养环境,细胞密度达 70%~90% 时进行传代。

1.3.3 细胞分组及造模 实验分为对照组、模型组、SGF 干预组、模型组+AMPK 抑制剂组、SGF+AMPK 抑制剂组;对照病毒对照组、对照病毒模型组、对照病毒 SGF 干预组、沉默 AdipoR1 模型组、沉默 AdipoR1 SGF 干预组。对于单纯乙醇处理的细胞分为两组:对照组采用 DMEM 完全培养基培养,培养 48 h,每 12 h 换液;乙醇处理组采用完全培养基中添加 100 mmol/L 乙醇,培养 48 h,每 12 h 换液。其中对照组和模型组在 24 h 后更换乙醇时加入大鼠血清,干预组加入 SGF 药物血清。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 检测血清肝功能、血脂水平 小鼠静脉血分离得血清后,委托上海中医药大学附属曙光医院检验科采用生化分析仪检测肝功能丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和甘油三酯(TG)水平。

1.4.2 HE 染色检测肝脏病理变化情况 制备的切片置于 60°C 烤箱中 1 h,放入二甲苯脱蜡、梯度乙醇逐级脱水。组织切片分别用苏木精及伊红染色 8 min,经自来水冲洗后,于显微镜下进行观察,最终以中性树脂封片固定。

1.4.3 油红 O 染色检测肝脏脂质沉积病理情况 制备的冰凍切片,室温干燥后 4% 多聚甲醛固定液浸泡 15 min,纯水冲洗后晾干,油红染液浸染 15 min 后 60% 异丙醇去除多余染料,纯水浸泡冲洗,苏木精染色,纯水浸泡冲洗,中性树脂封片,随后镜检。

1.4.4 免疫组织化学染色检测小鼠生长因子样

模体黏液样激素样受体(F4/80)和髓过氧化物酶(MPO) 肝组织石蜡切片经 60℃烘箱烤片后,进行二甲苯脱蜡及梯度乙醇水化。切片置于1×柠檬酸钠-乙二胺四乙酸(EDTA)修复液中,微波高火加热 5 min,再以低火加热 15 min 完成修复,自然冷却 60 min。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,用组化疏水笔圈定区域,3%过氧化氢和3%牛血清白蛋白(BSA)封闭各 10 min,再以 PBS 洗涤。随后用 10% BSA 室温封闭 60 min,滴加 F4/80 一抗,4℃孵育过夜。洗涤后加入二抗,室温孵育 1 h 后,再次洗涤。最后 DAB 显色,苏木精复染,经镜检后以中性树脂封片。

1.4.5 肝脏氧化应激水平 取出-80℃冰箱中的肝脏,根据试剂盒附带说明书中步骤进行操作,检测小鼠肝脏丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平。

1.4.6 实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)检测基因表达 小鼠肝组织总 RNA 经提取后,使用 HiScript II Q RT SuperMix (4 μL) 与 RNA 溶液 (16 μL, 含 1 μg 总 RNA) 配制成 20 μL 反应体系,在 50℃孵育 15 min 并于 85℃保持 5 s 完成逆转录反应,生成 cDNA。PCR 引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司设计提供。引物序列见表 1。扩增过程采用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂,在 95℃、2 min 预变性后,进行 95℃、10 s 与 60℃、30 s 的循环反应,共 40 个循环,获得 Ct 值。以 GAPDH 作为内参基因,结果按 2^{-ΔΔCt} 法计算。

1.4.7 Western blot 法检测小鼠肝组织和 HepG2 细胞中 AdipoR1、CaMKK2、p-AMPK 蛋白表达 将存放于-80℃下的小鼠肝组织和 6 孔板中的 HepG2 细胞以二辛可酸(BCA)法测定蛋白浓度,并制样。配制聚丙烯酰胺凝胶,样品等量上样,电泳条件为 80 V 运行 30 min,随后转为 120 V 继续电泳 80 min。之后在 400 mA 条件下湿转 60 min,将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,并用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。封闭结束后,加入 AdipoR1、CaMKK2 及 p-AMPK 一抗,于 4℃摇床上孵育过夜;次日回收一抗,含吐温-20 的 Tris-HCl 溶液(TBST)洗膜 3 次,每次 5 min,室温孵育二抗 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,配置增强型化学发光液(ECL),显影。

1.5 统计学方法 使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析和作图,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异若方差齐则使用多因素方差分析,若方差不齐则使用非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。染

表 1 引物序列

基因	引物序列	引物长度/ bp
TNF-α	上游:5'-CAGCGGTCCTATGCTC-3'	19
	下游:5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3'	22
IL-6	上游:5'-CTCCCAACAGACCTGCTATAC-3'	22
	下游:5'-CCATTGCACAACTCTTTCTCA-3'	22
IL-1β	上游:5'-GCAACTGTTCTCCTGAACTCAACT-3'	22
	下游:5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'	21
IL-10	上游:5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3'	21
	下游:5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'	20
IL-22	上游:5'-ATGAGTTTTTCCTTATGGGGAC-3'	23
	下游:5'-GCTGGAAGTTGACACCTCAA-3'	22
Col1α1	上游:5'-GCTCCTCTTAGGGGCACT-3'	19
	下游:5'-CCACGTCTCACCATTGGGG-3'	19
Col3α1	上游:5'-CTGTAACATGGAACTGGGGAAA-3'	23
	下游:5'-CCATAGCTGAACTGAAAACCAACC-3'	23
Col4α1	上游:5'-CTGGCACAAAAGGGACGAG-3'	19
	下游:5'-ACGTGGCCGAGAAATTTACCC-3'	20
GAPDH	上游:5'-GGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3'	20
	下游:5'-TGCTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'	21

注: TNF-α 为肿瘤坏死因子-α 基因, IL-6 为白细胞介素-6 基因, IL-1β 为白细胞介素-1β 基因, IL-10 为白细胞介素-10 基因, IL-22 为白细胞介素-22 基因, Col1α1 为 I 型胶原蛋白基因, Col3α1 为 III 型胶原蛋白基因, Col4α1 为 IV 型胶原蛋白基因, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因。

色图片导入 ImageJ 软件进行半定量分析。

2 结果

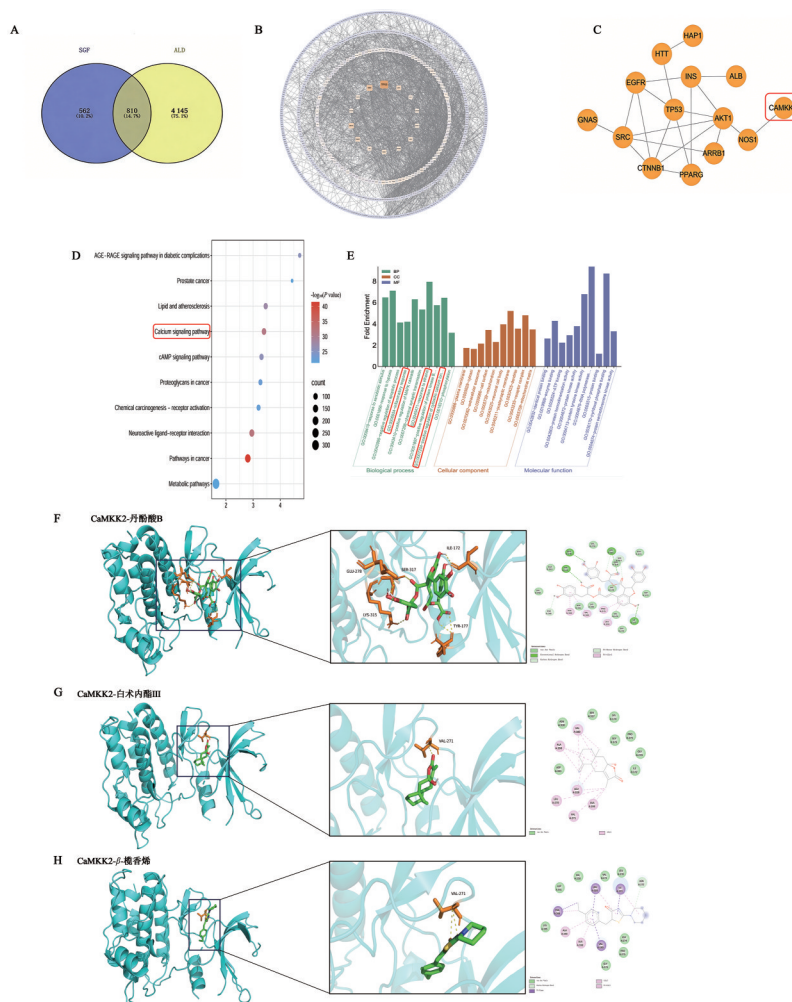
2.1 网络药理学筛选 SGF 改善 ALD 炎症和脂质沉积的相关信号通路

2.1.1 SGF 有效活性成分筛选及潜在相关靶点预测 以 OB≥30%、DL≥0.18 为筛选条件,从 TCMS 数据库中检索到 SGF 活性成分 98 个,通过 SwissADME 数据库进一步筛选 SGF 活性成分,获得 80 个 SGF 活性成分,其中包括丹酚酸 B、白术内酯 III、β-榄香烯等活性成分。通过 SwissTargetPrediction 数据库查询 SGF 活性成分相关靶点,以可能性≥0.1 为调节,并通过 BATMAN 数据库进行补充,清除重复项后最终得到 1 372 个靶点。通过 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 检索得到 ALD 相关基因共 9 035 个,清除重复项后最终得到 ALD 相关基因 4 955 个。二者取交集后得到个药物疾病共同靶点。见图 1。

2.1.2 SGF-ALD 的 PPI 网络构建和可视化 将 SGF 于 ALD 交集基因导入 String 网站,进行 PPI 网络构建,设置互动分数为 0.900,隐藏网络图中断开的连接点,最终导出结果,并将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件,计算网络节点中心得分,根据节点的中介中心性(BC)进行排序,前 15 位制作核心靶点。见图 1。

SGF-ALD 的 KEGG 通路富集分析和 GO 功能分析将 SGF-ALD 的 579 个交集基因导入 DAVID 数据库, 得到 KEGG 通路富集分析结果和 GO 功能富集分析结果。KEGG 结果显示, 主要涉及的通路有钙离子信号通路 (calcium signaling pathway)、cAMP 信号通路 (cAMP signaling pathway) 和 MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway) 等。GO 结果显示, 主要涉

及的 BP 有对细胞质钙离子浓度的正向调控 (positive regulation of cytosolic calcium ion concentration)、对乙醇的反应 (response to ethanol) 和炎症反应 (inflammatory response) 等。经上述靶点和通路分析均显示 CaMKK2 为主要候选靶点。见图 1。



注: A 为参葛方-酒精相关性肝病 (SGF-ALD) 韦恩图, B 为蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络图, C 为核心靶点 PPI 图, 图 D、E 为核心本体 (GO) 和京都基因与基因组数据库 (KEGG) 富集分析, F 为钙调蛋白依赖性蛋白激酶 2 (CaMKK2) 与丹酚酸 B 的分子对接图, G 为 CaMKK2 与白术内酯 III 的分子对接图, H 为 CaMKK2 与 β -榄香烯的分子对接图。

图 1 SGF-ALD 网络药理学可视化结果

2.1.3 活性化合物与潜在靶蛋白分子对接结果
将 CaMKK2 作为靶蛋白, 与丹酚酸 B、白术内酯 III、 β -榄香烯 3 个活性化合物小分子通过 Autodock Vina 软件进行分子对接。结果发现: CaMKK2-丹酚酸 B 的结合能为 -7.8 kcal/mol; CaMKK2-白术内酯 III 的结合能为 -8.4 kcal/mol; CaMKK2- β -榄香烯的结合能为 -8.8 kcal/mol。可视化结果见图 1。其中 CaMKK2 与 β -榄香烯的结合活性最强, 最小结合能为 -8.8 kcal/mol。

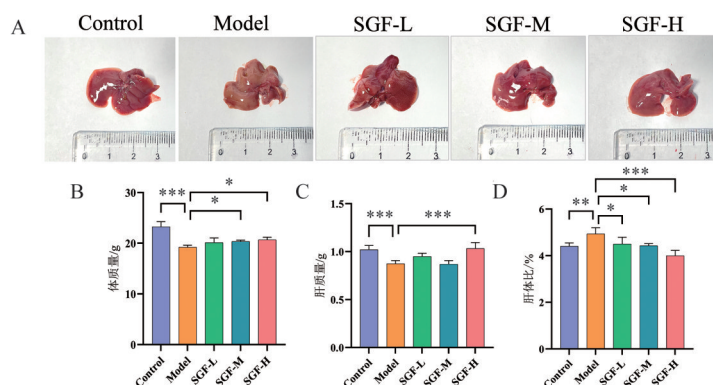
小分子苯环芳香 π 体系, 和 PHE268、LEU320、VAL180、ILE172 之间形成 π - σ 疏水作用, 是稳定芳香核心骨架、增强疏水结合亲和力的关键强相互作用。小分子芳香环、脂肪链区域, 与 ALA193、ALA330、LEU320、ILE172、PHE268 形成大范围烷基疏水堆叠, 大面积疏水接触极大提升整体结合稳定性, 是疏水驱动结合的主要来源。小分子右侧杂环区域, 和 ASN272 之间形成弱碳氢键, 提供额外的极

性取向固定力,辅助精准锚定配体空间构象。周边大量外围残基(LYS195、ASP331、VAL250/271、LEU270、GLY173/274、PRO275等)通过范德华力与小分子产生广泛弱接触,填充结合口袋空隙,优化整体空间匹配度。上述可以说明SGF中的活性成分通过作用CaMKK2靶点发挥治疗ALD的作用。

2.2 SGF对ALD模型小鼠的调节作用

2.2.1 SGF对ALD模型小鼠肝脏的改善作用 对

照组小鼠肝脏形态正常,表面光滑且大小适中;模型组肝脏表面明显粗糙并伴颗粒状改变。SGF-L组小鼠肝脏表面粗糙程度有所缓解;SGF-M、SGF-H组小鼠肝脏表面较为光滑,脾脏亦表现为红润且形态正常。与模型组小鼠相比,SGF-M组和SGF-H组小鼠体质量增加,SGF-H组小鼠肝脏体质量增加,3个剂量小鼠肝体比均降低($P<0.05$, $P<0.001$)。见图2。



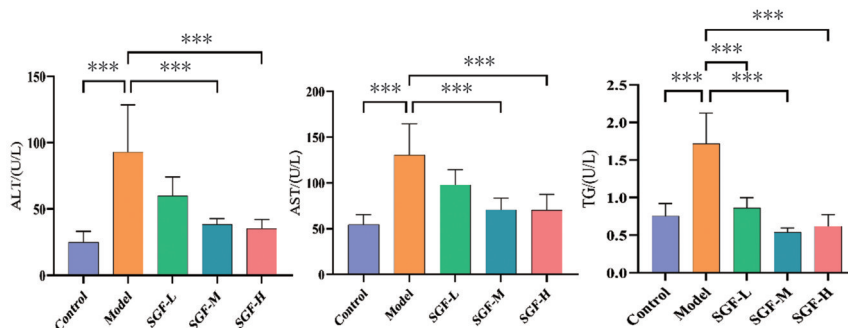
注:Control为对照组,Model为模型组,SGF-L为参葛方低剂量组,SGF-M为参葛方中剂量组,SGF-H为参葛方高剂量组。A为肝脏大体图,B为体质量图,C为肝质量图,D为肝体比图。与Model比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

图2 各组小鼠肝脏大体观以及肝体比数值比较

2.2.2 SGF对ALD模型小鼠生化指标的调节作用

与对照组相比,模型组小鼠血清生化指标ALT、AST及TG水平均呈显著升高($P<0.001$),经治疗后,SGF-L

组小鼠TG水平显著降低($P<0.001$),SGF-M、SGF-H组小鼠各生化指标均显著降低($P<0.001$)。提示SGF可减轻ALD模型小鼠肝脏炎症、改善脂质沉积。见图3。



注:ALT为丙氨酸氨基转移酶,AST为天冬氨酸氨基转移酶,TG为甘油三酯。Control为对照组,Model为模型组,SGF-L为参葛方低剂量组,SGF-M为参葛方中剂量组,SGF-H为参葛方高剂量组。与Model比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

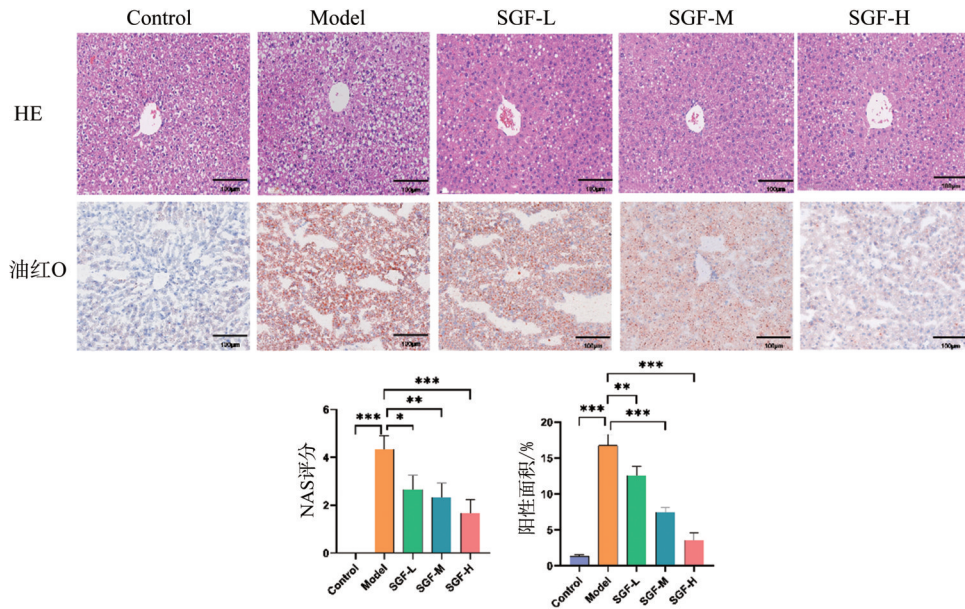
图3 各组小鼠血清生化指标比较

2.2.3 SGF对ALD小鼠肝脏炎症和脂质沉积的改善作用

HE染色观察发现,对照组小鼠肝脏组织结构表现正常,未出现显著病理改变;而在模型组中,小鼠肝细胞呈现明显的脂肪变性,并伴有点状及片状坏死灶,同时可见炎症细胞浸润,NAS评分明显升高($P<0.001$)。不同剂量SGF干预后,小鼠肝脏内脂质沉积和炎症细胞浸润得到显著减轻,NAS评分显著降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$),提示SGF可缓解乙醇

引起的肝细胞脂肪变性和炎细胞浸润。见图3。

油红O染色结果显示:对照组小鼠肝细胞无明显红色脂滴,模型组小鼠肝细胞内有大量不规则红色脂滴聚集,阳性面积明显增加($P<0.001$);SGF-L、SGF-M、SGF-H组小鼠肝脏不规则红色脂滴聚集及阳性面积均明显减少,其中SGF-M、SGF-H组干预效果更为显著($P<0.01$, $P<0.001$)。提示SGF可减轻ALD模型小鼠肝脏炎症、改善脂质沉积。见图4。



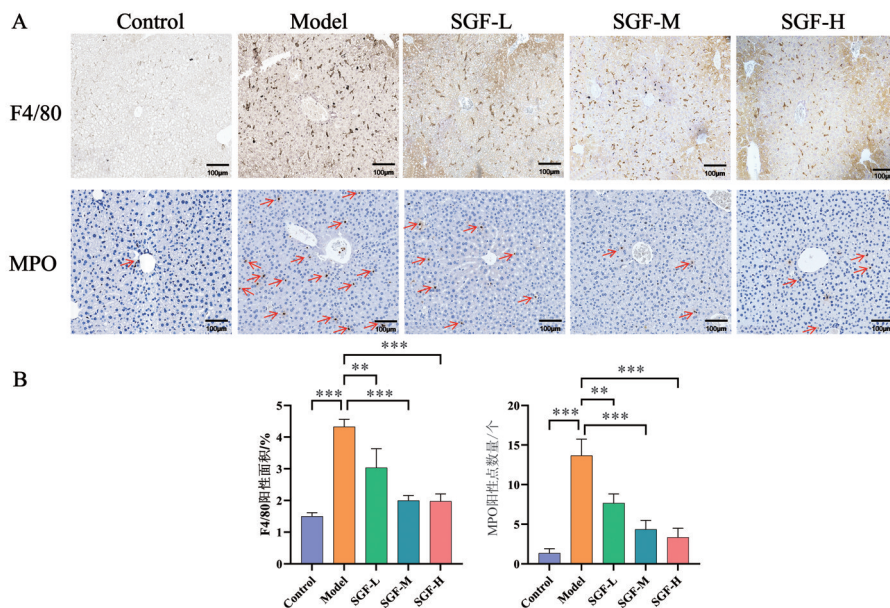
注: Control 为对照组, Model 为模型组, SGF-L 为参葛方低剂量组, SGF-M 为参葛方中剂量组, SGF-H 为参葛方高剂量组, NAS 评分为非酒精性脂肪性肝病活动度评分, HE 为苏木精-伊红染色, 标尺: 100 μm 。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

图4 各组小鼠肝组织病理染色情况比较($\times 200$)

2.2.4 SGF 减少 ALD 模型小鼠肝脏炎症细胞浸润

F4/80 及 MPO 染色结果表明, 与对照组小鼠相比, 模型组肝脏巨噬细胞和中性粒细胞的阳性数量显著增加($P < 0.001$)。经治疗后, SGF-L、SGF-M、SGF-H

组小鼠肝脏巨噬细胞以及中性粒细胞的阳性数量显著下降($P < 0.01$, $P < 0.001$)。提示 SGF 可抑制 ALD 模型小鼠肝脏炎症细胞浸润, 减轻炎症反应。见图 5。



注: F4/80 为小鼠含生长因子样模体黏液样激素样受体, MPO 为髓过氧化物酶。Control 为对照组, Model 为模型组, SGF-L 为参葛方低剂量组, SGF-M 为参葛方中剂量组, SGF-H 为参葛方高剂量组。A 为 F4/80 和 MPO 免疫组织化学染色图($\times 200$), B 为半定量统计图; 标尺: 100 μm 。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; $n = 6$, $\bar{x} \pm s$ 。

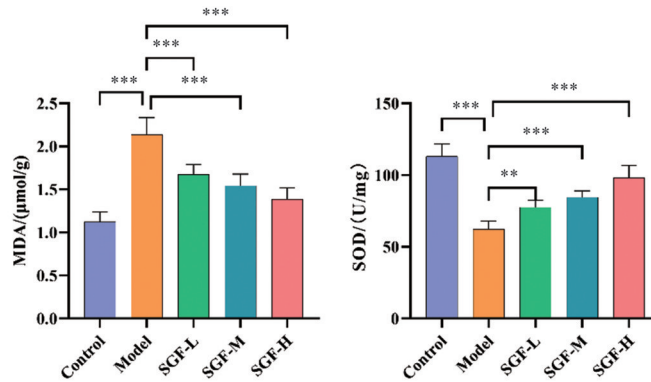
图5 各组小鼠肝脏巨噬细胞和中性粒细胞浸润比较

2.2.5 SGF 对各组小鼠肝脏氧化应激水平的影响

与对照组相比, 模型组小鼠肝脏的 MDA 含量显著

升高, 同时 SOD 活性相应降低($P < 0.001$), 经治疗后, SGF-L、SGF-M、SGF-H 组小鼠肝脏 MDA 表达水

平均显著降低($P<0.001$),SOD 水平平均显著升高($P<0.01, P<0.001$)。见图 6。

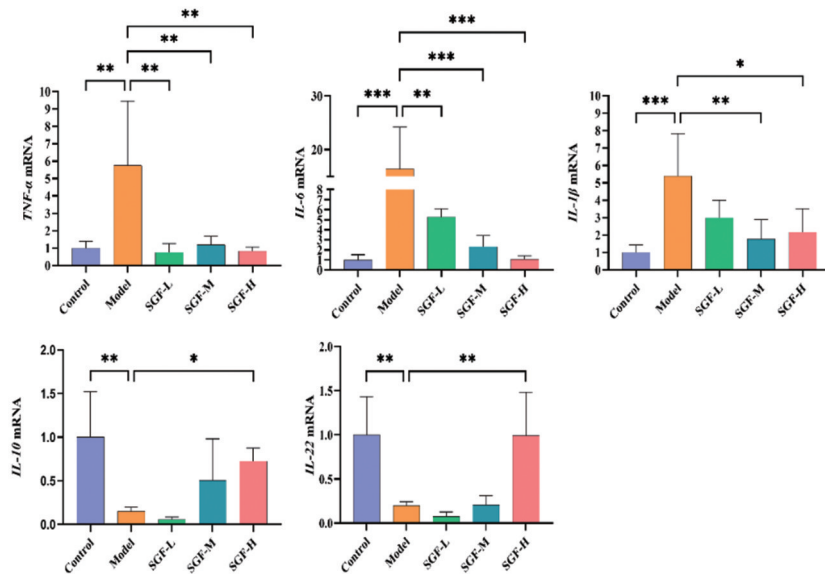


注:MDA 为丙二醛,SOD 为超氧化物歧化酶,Control 为对照组,Model 为模型组,SGF-L 为参葛方低剂量组,SGF-M 为参葛方中剂量组,SGF-H 为参葛方高剂量组。与 Model 比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

图 6 各组小鼠肝脏氧化应激水平比较

2.2.6 SGF 对 ALD 小鼠肝脏炎症因子的调节作用
与对照组相比,模型组小鼠肝组织中促炎性细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ mRNA 表达水平均显著升高($P<0.01$),而抗炎因子 $IL-10$ 、 $IL-22$ mRNA 表达水平则相应降低($P<0.01$)。各剂量 SGF 干预后,炎症因

子表达水平得到不同程度回调:SGF-L 组主要降低 $TNF-\alpha$ mRNA ($P<0.01$);SGF-M 与 SGF-H 组 $TNF-\alpha$ 、 $IL-6$ 、 $IL-1\beta$ mRNA 水平均显著下调($P<0.05$);SGF-H 组 $IL-10$ 、 $IL-22$ mRNA 的表达水平显著提升($P<0.01$)。见图 7。



注: $TNF-\alpha$ 为肿瘤坏死因子- α , IL 为白细胞介素。Control 为对照组,Model 为模型组,SGF-L 为参葛方低剂量组,SGF-M 为参葛方中剂量组,SGF-H 为参葛方高剂量组。与 Model 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=6, \bar{x} \pm s$ 。

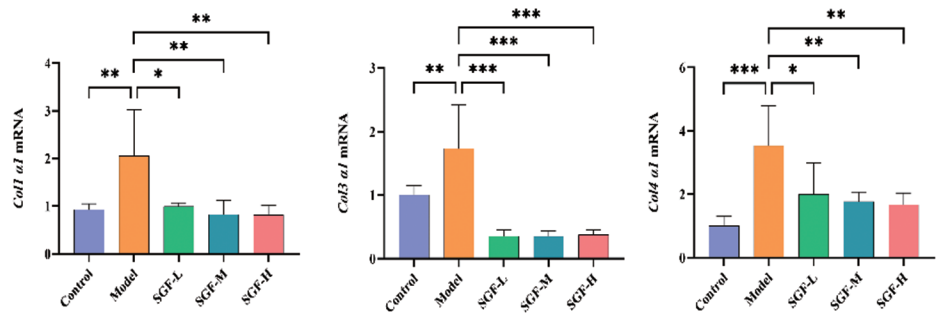
图 7 各组小鼠肝脏炎症因子表达水平比较

2.2.7 SGF 对 ALD 小鼠肝脏纤维化相关因子的调节作用
与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 $Col1\alpha1$ 、 $Col3\alpha1$ 、 $Col4\alpha1$ mRNA 表达水平均显著升高($P<0.01, P<0.001$);经治疗后,SGF-L、SGF-M、SGF-H 组小鼠肝组织 $Col1\alpha1$ 、 $Col3\alpha1$ 、 $Col4\alpha1$ mRNA 表达水平显著降低($P<0.05, P<0.01, P<0.001$)。见图 8。

综上,SGF 治疗 ALD 疗效显著,且高剂量组疗

效最佳,因此后续使用 SGF 高剂量组开展相关机制研究。

2.3 SGF 改善 ALD 模型小鼠肝脏炎症和脂质沉积的潜在机制
Western blot 法结果显示,与对照组相比,ALD 模型组小鼠肝组织 AdipoR1、CaMKK2 和 p-AMPK 蛋白表达水平均显著下降($P<0.05$);经 SGF 干预后,小鼠肝组织中 AdipoR1、CaMKK2 和 p-

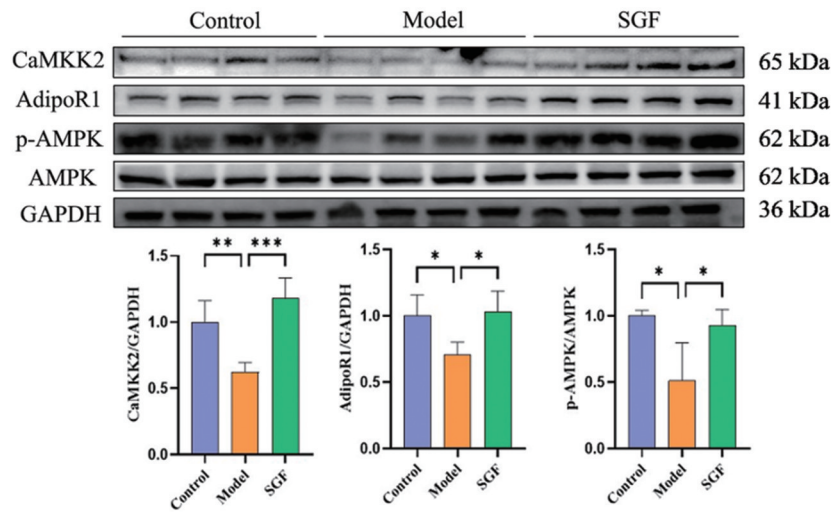


注:Col1 $\alpha 1$ 为I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链基因;Col3 $\alpha 1$ 为III型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链基因;Col4 $\alpha 1$ 为IV型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链基因。Control为对照组,Model为模型组,SGF-L为参葛方低剂量组,SGF-M为参葛方中剂量组,SGF-H为参葛方高剂量组。与Model比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=6$, $\bar{x}\pm s$ 。

图8 SGF对ALD模型小鼠肝脏纤维化相关因子mRNA表达的影响

AMPK蛋白表达水平均显著增加($P<0.05$, $P<0.01$)。提示SGF可能通过上调AdipoR1、CaMKK2表达水

平,激活AMPK信号通路改善ALD模型小鼠肝脏炎症和脂质沉积($P<0.05$, $P<0.001$)。见图9。



注:CaMKK2为钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶2,AdipoR1为脂联素受体1,p-AMPK为磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶,AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Control为对照组,Model为模型组,SGF为参葛方组。与Model比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$; $n=4$, $\bar{x}\pm s$ 。

图9 各组小鼠肝脏AdipoR1、CaMKK2、p-AMPK蛋白表达水平比较

2.4 SGF减少Ethanol诱导的HepG2细胞模型脂质沉积的潜在机制

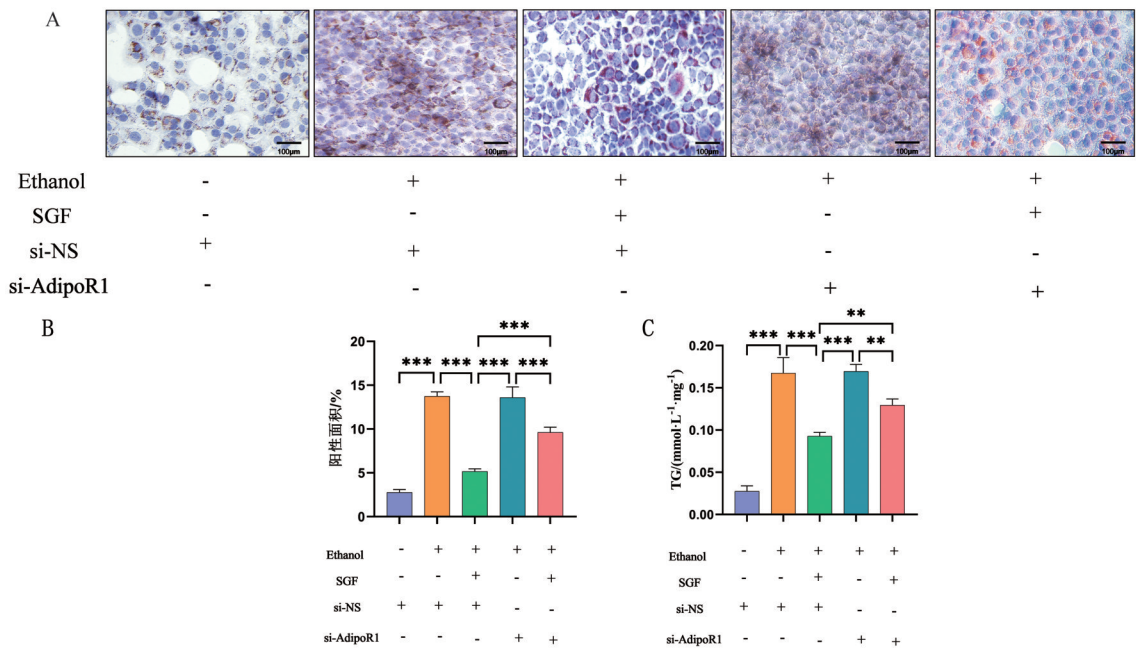
2.4.1 沉默AdipoR1可消除SGF对Ethanol诱导的HepG2细胞脂质沉积的改善作用 油红染色结果显示,Ethanol诱导HepG2细胞后,脂质沉积增加($P<0.001$),SGF干预后可以明显减少脂质沉积($P<0.001$);SGF干预同时沉默HepG2中AdipoR1的表达后,脂质沉积明显增加($P<0.001$),表明沉默AdipoR1会削弱SGF对Ethanol诱导HepG2的脂质沉积的抑制作用。见图10。

2.4.2 沉默AdipoR1可消除SGF对Ethanol诱导的HepG2细胞中AdipoR1下游信号通路的改善作用

Western blot法结果显示,Ethanol诱导HepG2后,

AdipoR1、CaMKK2和p-AMPK蛋白表达水平明显降低($P<0.05$, $P<0.001$);SGF干预后,AdipoR1、CaMKK2和p-AMPK蛋白表达水平明显升高($P<0.001$);SGF干预的同时沉默HepG2中AdipoR1的表达后,SGF对AdipoR1及其下游蛋白CaMKK2和p-AMPK的激活作用也被抑制($P<0.001$)。表明沉默AdipoR1可消除SGF对Ethanol诱导的HepG2细胞中AdipoR1及其下游信号通路的改善作用。见图11。

2.4.3 抑制AMPK信号可消除SGF对Ethanol诱导的HepG2细胞模型脂质沉积的改善作用 Ethanol诱导的HepG2细胞中脂质沉积明显增加($P<0.001$);与Ethanol组相比,SGF组细胞脂质沉积明显减少,AMPK抑制剂组细胞脂质沉积无明显变化,AMPK



注: Ethanol 为乙醇, SGF 为参葛方, si-NS 为沉默对照, si-AdipoR1 为沉默 AdipoR1, TG 为甘油三酯。A 为油红 O 染色结果($\times 200$); B 为阳性面积半定量图; C 为甘油三酯(TG); 标尺: $100\ \mu\text{m}$ 。“-”为不使用试剂, “+”为使用试剂。*** $P<0.01$, **** $P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

图 10 沉默 AdipoR1 对 Ethanol 诱导的 HepG2 细胞模型脂质沉积的影响

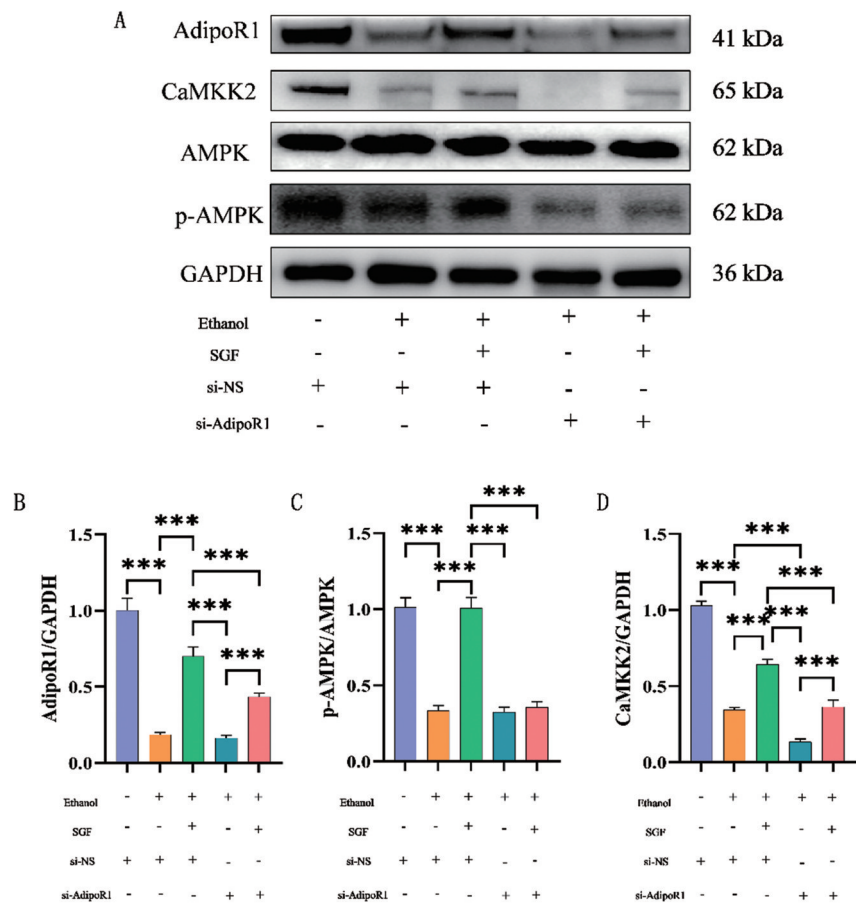
抑制剂+SGF 组细胞脂质沉积明显增加($P<0.001$); 与 AMPK 抑制剂组相比, AMPK 抑制剂+SGF 组细胞脂质沉积减少($P<0.01$)。Western blot 检测结果显示, AMPK 抑制剂可以抑制 SGF 激活的 AMPK 通路, 但对其上游蛋白无明显影响。结果提示, SGF 可能通过上调 AdipoR1、CaMKK2 表达, 激活 AMPK 信号通路改善 ALD 模型小鼠肝脏炎症和脂质沉积, 而不是直接激活 AMPK 信号通路。见图 12。

3 讨论

ALD 是由于长期过量饮酒导致的肝脏损伤, 其病理过程包括脂肪变性、炎症、纤维化, 甚至可进展为肝硬化和肝癌^[3], 加重疾病和社会负担, 且 ALD 患病率逐年上升^[2]。目前, 尚无美国食品药品监督管理局(FDA)批准的治疗 ALD 的有效药物。中医认为 ALD 多因长期酗酒, 酒毒湿热内蕴, 损伤肝脾; 湿热久羁, 阻滞气机, 导致肝郁气滞, 进而血行不畅, 形成瘀血, 终致湿热、瘀血、毒邪相互交结, 损伤肝络, 发为胁痛、黄疸、积聚(脂肪肝或肝硬化)。中医药治疗 ALD 有其独特优势^[16]。SGF 是由上海中医药大学附属曙光医院肝病科高月求教授研发治疗代谢相关脂肪性肝病的有效经验方, 临床疗效确切^[17], 能有效缓解患者的临床症状, 改善肝脏脂质沉积及肝功能异常, 调节血脂水平, 但其治疗 ALD 的疗效未得到验证。

SGF 由丹参、葛根、白术、垂盆草、片姜黄和女贞子 6 味中药组成。其中丹参与姜黄具有活血化瘀功效; 垂盆草和葛根可清热利湿、解毒; 白术健脾助运, 女贞子补益肝肾、扶正固本。治标(湿热瘀血)与治本(肝脾肾虚)结合, 避免祛邪伤正。SGF 功效作用正契合 ALD 的中医病机。本研究通过应用 SGF 干预 NIAAA 模型小鼠, 发现 SGF 能够有效改善乙醇引起的肝脏损伤和脂质沉积, 减轻肝脏炎症细胞浸润和氧化应激的水平, 提示 SGF 对酒精性肝脏损伤模型具有明确的保护作用。

本研究通过网络药理学筛选出 SGF 治疗 ALD 的排名前 15 位潜在核心蛋白靶点, 包括 CaMKK2、肿瘤蛋白 p53 (TP53)、类固醇受体辅激活因子 (SRC)、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (AKT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG) 等, 主要涉及代谢通路和钙信号通路。CaMKK2 是最通用的 CaMK 之一, 是体内能量平衡的强大调节剂^[18], 其磷酸化并激活 AMPK 以介导许多必需的生理和病理生理过程^[19-20]。CaMKK2 是 AMPK 的直接上游激酶, 而 AMPK 是细胞水平和全身能量平衡的关键调节因子, CaMKK2 可以结合 AMPK, 形成特殊的信号复合物^[21-22]。AMPK 是可以直接影响蛋白质表达或修饰以及脂质代谢相关因子的转录来调节脂质代谢过程的经典节点^[23]。例如, AMPK 通过直接磷酸化乙



注:CaMKK2为钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶2,AdipoR1为脂联素受体1,p-AMPK为磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶,AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。Ethanol为乙醇,SGF为参葛方,si-NS为沉默对照,si-AdipoR1为沉默AdipoR1。“-”为不使用试剂,“+”为使用试剂。A为相关蛋白的Western blot检测结果,B~D为半定量统计图。 $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$; $n=3$, $\bar{x}\pm s$ 。

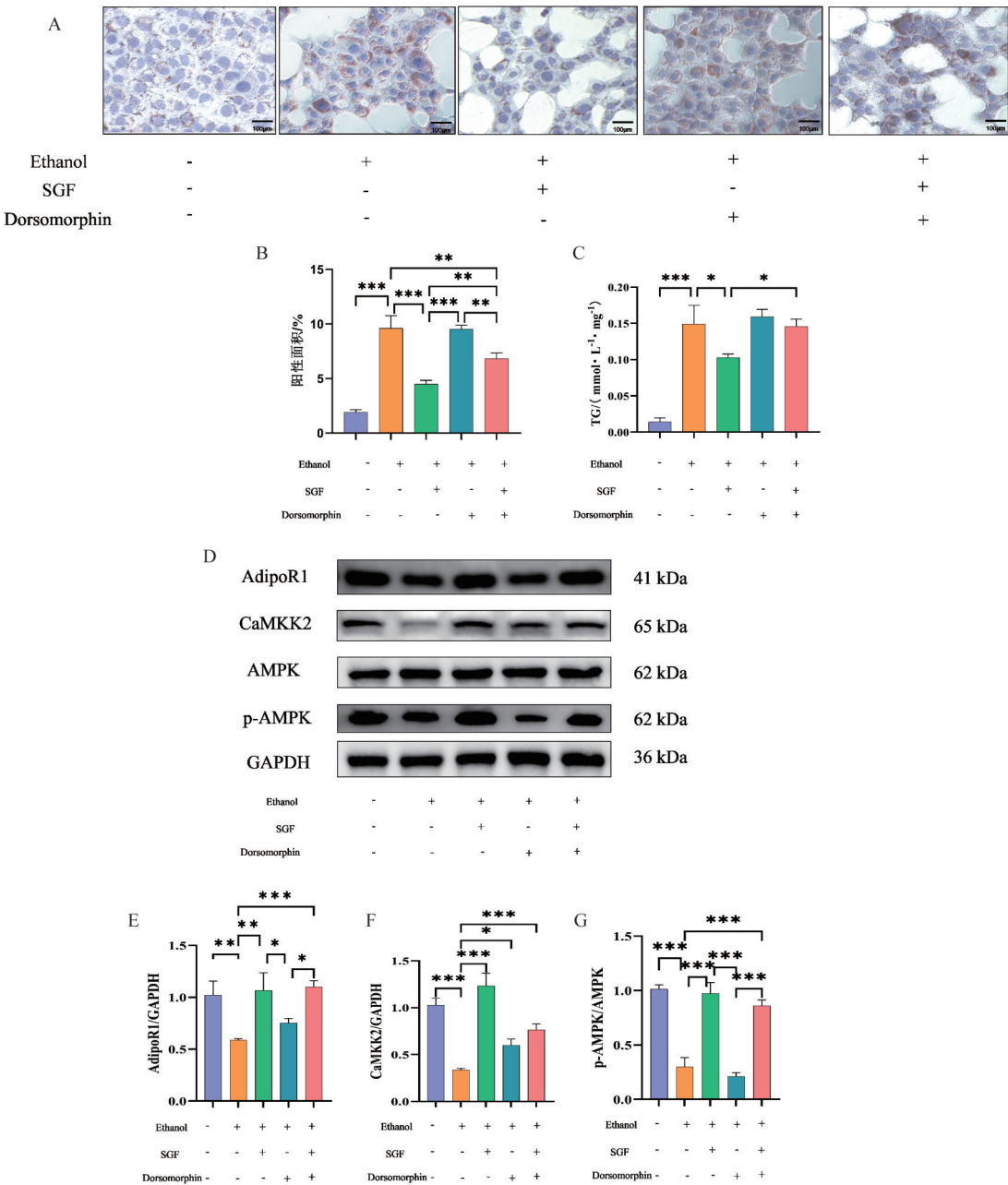
图 11 各组 HepG2 细胞模型中 AdipoR1、CaMKK2、p-AMPK 蛋白表达比较

酰辅酶 A 羧化酶 (ACC) 来调控总体脂质代谢,乙酰辅酶 A 羧化酶通过调节与脂质代谢相关的下游因子来稳定脂质水平和脂肪酸的合成与分解^[23-24]。越来越多的证据表明 CaMKK2 通过 AMPK 途径调节肝脏脂质代谢,提示 CaMKK2 的调节功能可能在肝脏脂质代谢中起重要作用^[25-26]。本研究结果显示,SGF 可以激活 CaMKK2 结合 AMPK 调节肝脏脂质代谢,从而减轻乙醇诱导的肝脏脂肪变性。

从转化医学角度看,CaMKK2 作为 ALD 潜在的治疗靶点尚未被充分开发。SGF 作为临床有效经验方,其活性成分群可能具备 CaMKK2 正向别构调节作用,未来可通过化学生物学手段分离并鉴定其中的关键活性单体,进而开发结构新颖的 CaMKK2 激动剂。此外,结合临床样本检测 ALD 患者肝脏 CaMKK2 表达水平与疾病严重程度的相关性,将有助于建立基于 CaMKK2 表达谱的 ALD 精准分型,为中医药个体化治疗提供生物标志物依据。

SGF 中活性成分包括丹酚酸 B、白术内酯Ⅲ、 β -榄香烯等。丹酚酸 B 可以通过活化 AMPK 通道促进脂肪酸氧化,改善肝内脂质沉积^[27]。白术主要成分白术内酯Ⅲ、白术多糖有健脾化湿的作用。白术内酯Ⅲ通过激活肝脏 AdipoR1 介导的 AMPK/SIRT1 信号通路实现治疗代谢相关脂肪性肝病^[28]。白术多糖能通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路减少巨噬细胞浸润来改善小鼠肝细胞脂肪变性、炎症反应和氧化应激^[29]。 β -榄香烯则能通过调控 CaMKK2/AMPK 通路改善肝脏脂质代谢^[24]。SGF 中各单体成分存在协同效应,通过作用于多个靶点与通路,共同发挥抗炎、抗氧化、调节脂质代谢及抗纤维化的功效。未来研究可进一步分离和验证这些单体成分的具体作用靶点,为开发新型抗 ALD 药物提供理论依据。此外,探索单体间的配伍增效机制,将有助于优化复方设计,提升临床疗效。

SGF 调控 CaMKK2-AMPK 通路的发现,不仅深



注:CaMKK2为钙调蛋白依赖性蛋白激酶2,AdipoR1为脂联素受体1,p-AMPK为磷酸化的腺苷酸活化蛋白激酶,AMPK为腺苷酸活化蛋白激酶,GAPDH为甘油醛-3-磷酸脱氢酶,TG为甘油三酯。Ethanol为乙醇,SGF为参葛方,Dorsomorphin为AMPK抑制剂。“-”为不使用试剂,“+”为使用试剂。A为油红O染色图($\times 200$),B为阳性面积半定量统计图,C为甘油三酯(TG)水平,D为相关蛋白的Western blot检测结果,E~G为半定量统计图;标尺:100 μm 。* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图12 SGF和AMPK抑制剂对Ethanol诱导的HepG2细胞模型脂质沉积比较

化了对ALD“湿热瘀毒”病机的现代生物学理解,也为基于该通路的抗ALD药物研发提供了新的候选方药与科学依据。后续研究应进一步利用组织特异性基因敲除小鼠、化学遗传学等技术手段,明确SGF核心成分与CaMKK2的直接互作关系,并开展多中心临床研究以验证其疗效与安全性。

综上所述,SGF可有效改善ALD模型小鼠肝脏

内脂质沉积、炎症反应、氧化应激水平,其机制与CaMKK2介导的钙信号通路及脂质代谢有关,SGF可通过激活AdipoR1-CaMKK2-AMPK信号通路实现治疗ALD。

参考文献:

[1] Jophlin L L, Singal A K, Bataller R, et al. ACG Clinical Guideline: Alcohol-Associated Liver Disease [J]. Am J

- Gastroenterol, 2024, 119(1): 30-54.
- [2] Feng X, Huang N, Wu Y, et al. Alcoholic liver disease in China: A disease influenced by complex social factors that should not be neglected [J]. J Clin Transl Hepatol, 2024, 12(7): 677-684.
- [3] Seitz H K, Bataller R, Cortez-Pinto H, et al. Alcoholic liver disease[J]. Nat Rev Dis Primers, 2018, 4(1): 16.
- [4] Avila M A, Dufour J F, Gerbes A L, et al. Recent advances in alcohol-related liver disease (ALD): summary of a Gut round table meeting[J]. Gut, 2020, 69(4): 764-780.
- [5] Gao B, Bataller R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets [J]. Gastroenterology, 2011, 141(5): 1572-1585.
- [6] Hawley S A, Pan D A, Mustard K J, et al. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase[J]. Cell Metab, 2005, 2(1): 9-19.
- [7] Miao Z, Sun Y, Feng Z, et al. CAMKK2-AMPK axis endows dietary calcium and phosphorus levels with regulatory effects on lipid metabolism in weaned piglets [J]. J Anim Sci Biotechnol, 2024, 15(1): 105.
- [8] Hardie D G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels [J]. Annu Rev Nutr, 2014, 34: 31-55.
- [9] Jiang Z, Zhou J, Zhou D, et al. The adiponectin-SIRT1-AMPK pathway in alcoholic fatty liver disease in the rat [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2015, 39(3): 424-433.
- [10] Gopal T, Ai W, Casey C A, et al. A review of the role of ethanol-induced adipose tissue dysfunction in alcohol-associated liver disease [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2021, 45(10): 1927-1939.
- [11] 高月求, 许小莉, 孙学华, 等. 参葛方联合行为干预治疗非酒精性脂肪性肝病的临床研究[C]//中华中医药学会内科肝胆病专业委员会. 中华中医药学会第十五届内科肝胆病学术会议暨国家中医药管理局专科专病协作组(肝病组、传染病组)会议论文集汇编. 济南: 中华中医药学会内科肝胆病专业委员会, 2012: 516-520.
- [12] 齐艳平, 李曼, 孙学华, 等. 参葛方防治大鼠非酒精性脂肪肝的实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(12): 156-160.
- [13] 张云城, 胡世平. 《金匱要略》对黄疸病的认识及其在临床上的应用[J]. 中国医学创新, 2017, 14(5): 93-96.
- [14] 高斌, 常彬霞, 徐明江. 慢性酒精喂养加急性酒精灌胃的酒精性肝病小鼠模型(NIAAA模型或Gao-Binge模型)[J]. 传染病信息, 2013, 26(5): 307-311.
- [15] Bertola A, Mathews S, Ki S H, et al. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model)[J]. Nat Protoc, 2013, 8(3): 627-637.
- [16] Gong P, Long H, Guo Y, et al. Chinese herbal medicines: The modulator of nonalcoholic fatty liver disease targeting oxidative stress[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 318(Pt B): 116927.
- [17] 方森, 张荣杰, 房华, 等. 参葛方联合生活饮食运动干预治疗肝功能异常代谢相关脂肪性肝病的临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(8): 41-44.
- [18] Mcaloon L M, Muller A G, Nay K, et al. CaMKK2: bridging the gap between Ca^{2+} signaling and energy-sensing [J]. Essays Biochem, 2024, 68(3): 309-320.
- [19] Dewenter M, Neef S, Vettel C, et al. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II activity persists during chronic β -adrenoceptor blockade in experimental and human heart failure [J]. Circ Heart Fail, 2017, 10(5): e003840.
- [20] Racioppi L, Means A R. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2: roles in signaling and pathophysiology [J]. J Biol Chem, 2012, 287(38): 31658-31665.
- [21] Chauhan A S, Liu X, Jing J, et al. STIM2 interacts with AMPK and regulates calcium-induced AMPK activation [J]. FASEB J, 2019, 33(2): 2957-2970.
- [22] Saikia R, Joseph J. AMPK: a key regulator of energy stress and calcium-induced autophagy [J]. J Mol Med (Berl), 2021, 99(11): 1539-1551.
- [23] Malik N, Shaw R J. The AMPK pathway: Molecular rejuvenation of metabolism and mitochondria [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2025, 41(1): 375-402.
- [24] Zhou Q, Gong L, Bao G, et al. β -Elemene improves morphine tolerance in bone cancer pain via *N*-methyl-*D*-aspartate receptor 2B subunit-mediated μ -opioid receptor [J/OL]. Comput Math Methods Med, 2022-09-17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36164617/>.
- [25] Wang Y Z, Lu J, Li Y Y, et al. microRNA-378b regulates ethanol-induced hepatic steatosis by targeting CaMKK2 to mediate lipid metabolism [J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 12659-12676.
- [26] Ortiz A R, Nay K, Stork B A, et al. Myeloid-specific CAMKK2 deficiency protects against diet-induced obesity and insulin resistance by rewiring metabolic gene expression and enhancing energy expenditure [J]. Mol Metab, 2025, 101: 102250.
- [27] Huang M Q, Zhou C J, Zhang Y P, et al. Salvianolic acid B ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in db/db mice through the AMPK pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(5): 933-943.
- [28] Li Q, Tan J X, He Y, et al. Atractylenolide III ameliorates non-alcoholic fatty liver disease by activating hepatic adiponectin receptor 1-mediated AMPK pathway [J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(4): 1594-1611.
- [29] Chen J, Yang S, Luo H, et al. Polysaccharide of atractylodes macrocephala Koidz alleviates NAFLD-induced hepatic inflammation in mice by modulating the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 141: 113014.

编辑:季春来

收稿日期:2025-12-16