

基于网络药理学和细胞实验探讨肉苁蓉苯乙醇苷对非酒精性脂肪性肝病的作用

王倩倩¹, 杨建华², 耿若愚¹, 赵 耀², 胡君萍^{1,3*}

(1. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆医科大学第一附属医院, 新疆 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆生物药械重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830017)

摘要: **目的** 研究肉苁蓉苯乙醇苷对非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的改善作用。**方法** 网络药理学预测肉苁蓉苯乙醇苷抗 NAFLD 的潜在机制。FFA 诱导 HepG2 细胞建立体外 NAFLD 模型, CCK-8 法检测细胞活性, 油红 O 染色观察细胞脂质沉积水平, 试剂盒检测细胞 TG、TC 水平, JC-1 染色荧光检测细胞线粒体膜电位, DCFH-DA 荧光探针检测细胞 ROS 水平, Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡情况, Western blot 法检测细胞 TNF- α 、PI3K、Akt、Bax 蛋白表达。**结果** 得到 10 个活性化合物, 77 个潜在靶点与抗 NAFLD 作用有关, 核心靶点为 TNF、NFKB1、TLR4 等。活性化合物与靶标之间具有良好的结合亲和力, 其中 TNF 更明显。与模型组比较, 肉苁蓉苯乙醇苷能减少 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂质积累 ($P<0.01$), 降低细胞内 TG、TC、ROS 水平 ($P<0.01$), 恢复 FFA 诱导的 HepG2 细胞线粒体膜电位, 减轻线粒体损伤, 减少细胞凋亡, 降低 Bax 蛋白表达 ($P<0.05$), 下调 TNF- α 、PI3K、Akt 蛋白表达 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 肉苁蓉苯乙醇苷能通过改善 FFA 诱导的 HepG2 细胞脂质沉积、线粒体功能障碍、氧化应激及细胞凋亡来发挥抗 NAFLD 作用, 可能与 TNF/PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 肉苁蓉苯乙醇苷; 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD); 脂质代谢; 氧化应激; 细胞凋亡; TNF/PI3K/Akt 信号通路; 网络药理学; 细胞实验

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3437-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.040

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver diseases, NAFLD) 是以肝细胞脂肪变性为特征的非酒精性慢性肝病^[1-2], 我国患病率高达 32.9%^[3-5], 其发病与胰岛素抵抗、氧化应激、肠道菌群失调等多种机制相关^[6], 临床表现为乏力、肝区不适、腹痛等, 严重时可发展为非酒精脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH)。目前, 本病治疗手段以生活方式干预为主, 虽然 2024 年 FDA 批准了首个相关药物 Rezdiffra, 但存在肝损伤、心血管疾病风险等不良反应。因此, 寻找高效安全的 NAFLD 治疗药物迫在眉睫。

中药具有多成分、多靶点、多途径的特点, 与 NAFLD 的复杂发病机制相适应, 在治疗 NAFLD 中具有独特优势。肉苁蓉为列当科植物肉苁蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉苁蓉 *Cistanche tubulosa* (Schenk) Wight 带鳞片的干燥肉质茎, 始载于《神农本草经》, 具有补肝肾、益精血、润肠通便的功效^[7], 主要活性成分苯乙醇苷有着抗炎、降脂、保肝等药理作用^[8-9], 然而目前尚无它在 NAFLD 方面的系统报道。本研究通过网络药理学对肉苁蓉

苯乙醇苷防治 NAFLD 的药效物质基础及潜在作用机制进行分析, 细胞实验探讨其作用机制, 以期为开发相关新型药物提供理论依据。

1 材料

1.1 网络药理学分析工具 TC MSP (<https://tcmsp.com/tcmssp.php>); CNKI (<https://www.cnki.net/>); PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>); PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); NetInfer (<http://lmmd.ecust.edu.cn/netinfer/>); SuperPred (http://prediction.charite.de/subpages/target_prediction.php); GeneCards (<https://www.genecards.org/>); DisGeNet (<http://www.disgenet.org/>); STRING 数据库 (<https://stringdb.org/>); Bioinformatics 在线分析软件 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>); Uniprot (<https://www.uniprot.org/>); RCSB 蛋白数据库 (<https://www.rcsb.org/>); Cytoscape 3.9.1 软件 (<https://cytoscape.org/>); R4.3.3 软件 (<https://www.r-project.org/>); AutoDock

收稿日期: 2024-12-10
基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160772); 新疆维吾尔自治区自然科学基金重点项目 (2021D01D11, 2022D01D14); 新疆天然药物有效成分与药物释放技术重点实验室项目 (XJDX1713); 新疆医科大学大学生创新训练项目 (X202310760033)
作者简介: 王倩倩 (1995—), 女, 博士生, 研究方向为新疆特色药用资源开发。Tel: 15700973198, E-mail: wq_q_smile@126.com
* 通信作者: 胡君萍 (1971—), 女, 博士, 教授, 研究方向为新疆特色药用资源开发。Tel: 13899853561, E-mail: hjp_yxy@163.com

Vina 1.5.7 软件 (<https://vina.scripps.edu/>)。

1.2 细胞株 人肝癌细胞 HepG2 细胞株购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 试剂与药物 肉苁蓉苯乙醇苷 (批号 201610, 纯度 $\geq 80\%$, 其中松果菊苷占 44.5%, 毛蕊花糖苷占 16.1%) 购自和田帝辰医药生物科技有限公司, 取 64.00 mg 粉末, 完全培养基溶解并定容至 10 mL, 得质量浓度为 6.40 mg/mL 的母液, 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 分装后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱。胎牛血清 (批号 0001654954) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; DMEM 培养基 (批号 6123083) 购自美国 Gibco 公司; 青-链霉素 (批号 WHAB23K141) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 油红 O 染色试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、活性氧检测试剂盒、Hoechst33342 染色液、牛血清白蛋白 V (BSA-V, 不含脂肪酸)、油酸钠、棕榈酸钠 (批号 22312006、0221101、2311004、240003001、54231206002、24240115003、24240124002) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 甘油三脂 (TG)、总胆固醇 (TC) 检测试剂盒 (批号 20240131) 均购自南京建成生物工程研究所; CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位试剂盒 (批号 LFL23125、AK20518) 均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 抗体 (批号 AB3630) 购自上海泊湾生物科技有限公司; Akt 抗体 (批号 R07160003) 购自沈阳万类生物科技有限公司; PI3K p85 抗体、 β -actin 抗体、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (批号 54f8512/4、00102209、20000758) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.4 仪器 Forma 371 CO₂ 细胞培养箱、HERASAFE KS18 生物安全柜、Multiskan GO 多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); TS2-S-SM 倒置生物显微镜 (日本 Nikon 公司); HHS-11-1 电热恒温水浴锅 (上海博迅医疗生物仪器股份有限公司); H1750R 高速台式冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); AB135-S 分析天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); Azure 600 化学发光曝光仪 (美国 Azure Biosystems 公司); DMI8-荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 成分获取及靶点预测 通过 TCMSP、CNKI、PubMed 数据库检索肉苁蓉苯乙醇苷成分, PubChem 数据库转化为标准的 SMILES 格式, Swiss Target Prediction、NetInfer、SuperPred 数据库预测其作用靶点。

2.1.2 治疗 NAFLD 潜在靶点筛选 通过 GEO 数据库下载 GSE89632 数据集, 筛选正常组、NAFLD 组差异基因, 阈值为 $P. \text{adjust}<0.05$, $|\log\text{FC}|>1$, 以 “non-alcoholic fatty liver disease” 为检索词, 分别在 GeneCards、DisGeNet 数据库中检索, 整理、去重后获取 NAFLD 相关疾病基因。再将肉苁蓉苯乙醇苷作用靶点与差异基因、疾病基因取交集, 即为治疗 NAFLD 潜在靶点。

2.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建 将交集靶点导入 STRING 数据库, 蛋白物种设置为 “*Homo sapiens*”, 最低相互作用阈值设置为 “high confidence > 0.400 ”, 并隐藏游离的靶标, 其余参数保持默认设置, 获得共有靶点蛋白互作网络关系, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件中进行拓扑分析及可视化。

2.1.4 GO、KEGG、DO 富集分析 采用 R 语言中的 R 包 org. Hs. eg. db, 将靶点 gene symbol 转换为对应的 EntrezID, clusterProfiler 包进行基因本体论 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 筛选条件为 $P. \text{adjust}<0.05$, $q<0.05$ Omicshare (<https://www.omicshare.com/>), 进行疾病本体论 (disease ontology, DO) 富集分析。根据富集分析结果, 明确肉苁蓉苯乙醇苷治疗靶点的基因功能及涉及的信号通路。

2.1.5 “化合物-靶点-通路” 网络构建 将活性成分、NAFLD、前 20 条 KEGG 通路及其涉及的靶点数据整合, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件构建 “成分-靶点-通路” 网络, “Analyze Network” 功能进行拓扑分析。

2.1.6 分子对接 在 PubChem 数据库中获取化合物分子 3D 结构的 SDF 格式, OpenBabel 软件转化为 PDB 格式。从 PBD 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中获取受体蛋白晶体结构的 PDB 格式文件, AutoDockTools 1.5.7、PyMOL 软件进行去水、加氢等操作。再采用 AutoDock Vina 软件实现蛋白和化合物的分子对接和评分, PyMOL 软件对结果进行可视化。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养 HepG2 细胞加入 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 青-链霉素), 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 每 2~3 d 换液 1 次。

2.2.2 FFA 造模剂配制 称取 50.0 mg 油酸钠, 加入 1 080 μL 0.1 mmol/L NaOH 溶液, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热溶解, 再加入 10% BSA 溶液至终体积为 10.8 mL, 得到终浓度为 15 mmol/L 的贮存液; 称取 23.0 mg 棕榈酸钠, 加入 540 μL 0.1 mmol/L NaOH 溶液, $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴加热溶解, 再加入 10% BSA 溶液至终体积为 5.4 mL, 得到终浓度为 15 mmol/L 的贮存液, 油酸与棕榈酸按 2 : 1 的比例迅速混匀, 得到 15 mmol/L FFA 诱导液, 0.22 μm 无菌滤膜过滤, 即得, 分装后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 使用前用完全培养基稀释。

2.2.3 CCK-8 法检测细胞活性 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL , 培养 24 h 至完全贴壁, 弃去培养液, PBS 清洗, 加入含肉苁蓉苯乙醇苷 (0、12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、FFA (0.25、0.5、1、2 mmol/L) 的完全培养基各 100 μL , 以不含细胞的孔为空白组, 不含药物的孔为对照组, 每组设 3 个复孔, 继续培养 24 h, 加入 10 μL CCK-8 试剂, 暗盒避光, 置于培养箱中继续培养 2 h, 测定 450 nm 波长处光密度 (OD), 计算细胞活性, 公式为细胞

活性 = $[(OD_{\text{给药组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

2.2.4 分组及给药 对照组, HepG2 细胞用完全培养基培养 24 h; 模型组, HepG2 细胞用含 FFA 完全培养基造模 24 h; 给药组, HepG2 细胞用含 FFA 完全培养基造模, 同时加入不同浓度 (25、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的肉苁蓉苯乙醇苷共处理 24 h。

2.2.5 油红 O 染色 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 24 孔板中, 每孔 1 mL, 培养 24 h 至完全贴壁, 按“2.2.4”项下分组后给药, 弃培养基, PBS 清洗 2 次, 加入油红 O 固定液, 室温下固定 30 min, 弃去, 蒸馏水清洗 2 次, 加入 60% 异丙醇浸洗 20 s, 弃去, 加入新配制的油红 O 染色液浸染 20 min, 弃去, 加入 60% 异丙醇漂洗 20 s, 水洗 5 次, 加入油红 O 缓冲液 1 min, 弃去, 加蒸馏水, 在显微镜下观察, 随机选取 3 个视野, 采用 Image J 软件对脂滴面积进行统计。

2.2.6 TG、TC 水平检测 将 HepG2 细胞接种于培养皿中, 待细胞长至 70% ~ 80% 时按“2.2.4”项下分组后给药, 每组设置 3 个重复。造模、给药结束后, 收集各组细胞, 按照试剂盒说明书在 500 nm 波长处测定吸光度, 计算 TC、TG 水平。

2.2.7 JC-1 荧光染色检测 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 至完全贴壁, 按“2.2.4”项下分组后给药, 弃培养基, PBS 溶液清洗 2 次, 每孔加入 1 mL JC-1 染色工作液, 孵育 20 min, JC-1 染色缓冲液清洗 2 次, 每孔加入 2 mL 完全培养基, 在荧光显微镜下避光观察。

2.2.8 细胞内 ROS 水平检测 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 至完全贴壁, 按“2.2.4”项下分组后给药, 弃培养基, PBS 溶液清洗 2 次, 每孔加入 1 mL 10 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 染色工作液, 孵育 20 min, 不含血清的培养基清洗 3 次, 在荧光显微镜下避光观察, 随机选取 5 个视野, 采用 Image J 软件对荧光强度进行统计。

2.2.9 Hoechst 33342 染色 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 至完全贴壁, 按“2.2.4”项下分组后给药, 弃培养基, PBS 溶液清洗 2 次, 每孔加入 1 mL Hoechst 33342 工作液, 染色 20 min, PBS 溶液清洗 3 次, 在荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。

2.2.10 Western blot 法检测细胞 TNF- α 、PI3K p85、Akt、Bax 蛋白表达 取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以 $1.5 \times 10^5/\text{mL}$ 密度接种于 6 孔板中, 每孔 2 mL, 培养 24 h 至完全贴壁, 按“2.2.4”项下分组后给药, 收集, PBS 溶液清洗 3 次, 加入细胞裂解液和 PMSF 溶液, 冰上裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 即总蛋白, BCA 蛋白定量盒测定含量, 上样, 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳, 切胶, 湿转法转至 PVDF 膜上, TBST 漂洗 5 min, 放入 5% 脱脂奶粉-TBST 溶液中室温封闭 1 h, TBST 洗膜,

加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜, 加入二抗, 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 发光试剂盒显影, 成像系统拍照, 采用 Image J 软件分析条带光密度值, 计算蛋白相对表达。

2.3 统计学分析 通过 GraphPad Prism 软件进行处理, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 活性成分及潜在靶点 基于课题组前期研究并结合数据库及文献报道, 根据药效活性选取代表性化合物^[10-11], 最终确定为毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷、松果菊苷、2'-乙酰毛蕊花糖苷、管花苷 A、管花苷 B、红景天苷、紫葳新苷 II、肉苁蓉苷 A、肉苁蓉苷 F。通过 Swiss Target Prediction 数据库预测得到 44 个靶点, NetInfer 数据库预测前 20 条靶点且得到 45 个靶点, SuperPred 数据库预测得到 118 个靶点, 合并去重, 得到 195 个活性成分靶点。其中, GSE89632 数据集中有 39 个 NAFLD 样本, 24 个正常样本, 筛选得到 589 个差异基因; GeneCards、DisGeNET 数据库中有 1 813 个 NAFLD 疾病基因, 合并去重, 得到 2 315 个疾病基因, 见图 1A~1B。再将化合物靶点与疾病靶点进行相互映射并绘制韦恩图, 得到 77 个交集靶点, 即肉苁蓉苯乙醇苷治疗 NAFLD 的潜在靶点, 见图 1C。

将交集靶点导入 STRING 数据库, 交互作用阈值 > 0.400, 去除游离节点, 借助 Cytoscape 软件可视化, 得到包含 75 个节点、408 条边的 PPI 网络, 见图 1D。利用 Cytoscape 软件内置的“Analyze Network”功能进行拓扑分析, 根据度值 (Degree) 排序, 筛选排名前 10 位的靶点, 即肉苁蓉苯乙醇苷抗 NAFLD 的关键靶点, 分别为 TNF、NFKB1、TLR4、HSP90AA1、ESR1、HIF1A、STAT1、APP、PRKACA、SMAD3。

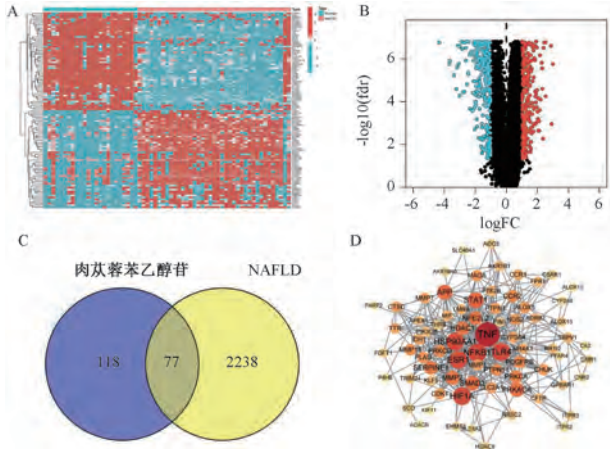


Figure 1 consists of four panels. Panel A is a heatmap showing the expression of differential genes in NAFLD, with a color scale from blue (low) to red (high). Panel B is a volcano plot showing the log2 fold change (logFC) on the x-axis and the negative log10 of the false discovery rate (-log10(fdr)) on the y-axis, with a significance threshold line. Panel C is a Venn diagram showing the overlap of 77 target genes between Aconitum benzoic alcohol glycoside (118 unique) and NAFLD (2238 unique). Panel D is a PPI network diagram showing the interactions between the 77 target genes, with nodes representing genes and edges representing interactions.

注: A 为 NAFLD 差异基因热图, B 为 NAFLD 差异基因火山图, C 为 Venn 图, D 为 PPI 网络。

图 1 肉苁蓉苯乙醇苷与 NAFLD 共存靶标的相互作用图

3.1.2 GO、KEGG、DO 富集分析 GO 富集分析主要包括细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular

function, MF)、生物过程 (biological process, BP), 共得到符合筛选条件的 MF 有 93 条, CC 有 38 条, BP 有 989 条, 各选前 10 条进行可视化, 见图 2。结果显示, 肉苁蓉苯乙醇苷治疗 NAFLD 主要与炎症、细胞因子、代谢及免疫反应等相关。

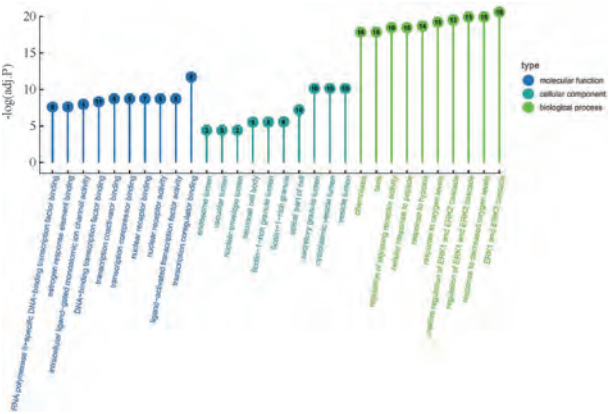


图 2 GO 富集分析图

KEGG 富集分析共得到 127 条通路, 绘制 P 值排名前 15 位者, 见图 3, 涉及内分泌代谢、免疫、细胞生长、死亡等。结果显示, 肉苁蓉苯乙醇苷治疗 NAFLD 主要与 AGE-RAGE 信号通路、炎症、细胞凋亡、雌激素信号通路、乙肝、脂质和动脉粥样硬化等有关。

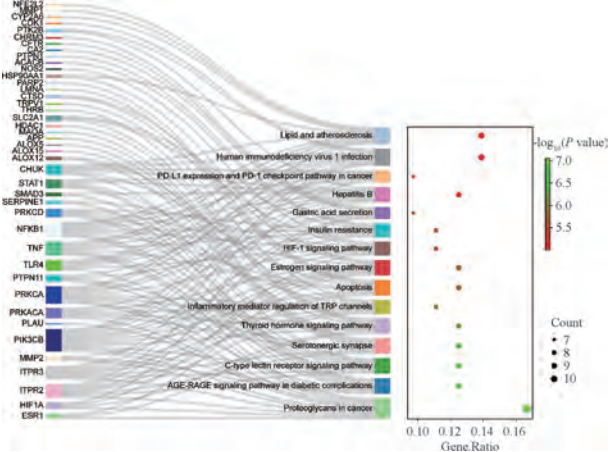


图 3 KEGG 富集分析图

DO 富集分析共得到 833 个与肉苁蓉苯乙醇苷治疗靶点相关的疾病, 对前 25 条进行可视化, 见图 4, 涉及代谢性疾病、免疫、动脉疾病、肥胖、肝脏疾病等, 均与 NAFLD 密切相关。

3.1.3 “化合物-靶点-通路”网络 将 KEGG 富集分析结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件中构建“成分-靶点-通路”网络, 其中绿色正方形节点为活性成分, 蓝色圆形节点为共同靶点, 橘色 V 形节点为通路, 见图 5。由此可知, 肉苁蓉苯乙醇苷通过多成分、多靶点、多通路发挥抗 NAFLD 作用, 其中松果菊苷、毛蕊花糖苷在苯乙醇苷中的含量较高, 而且是 2020 年版《中国药典》中肉苁蓉指标成分。

3.1.4 分子对接 将 PPI 网络中的排名前 5 位的关键靶点

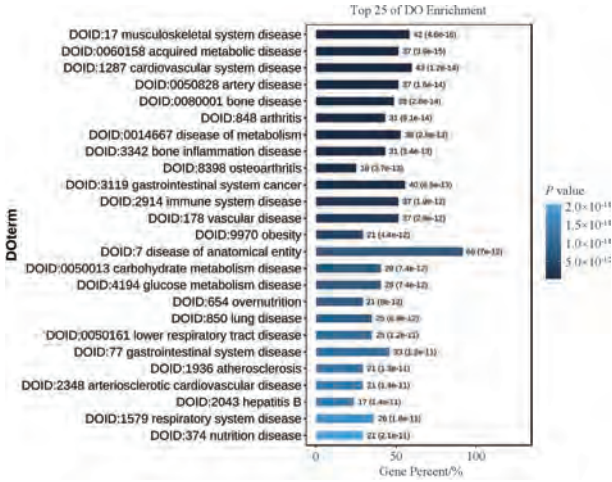


图 4 DO 富集分析图

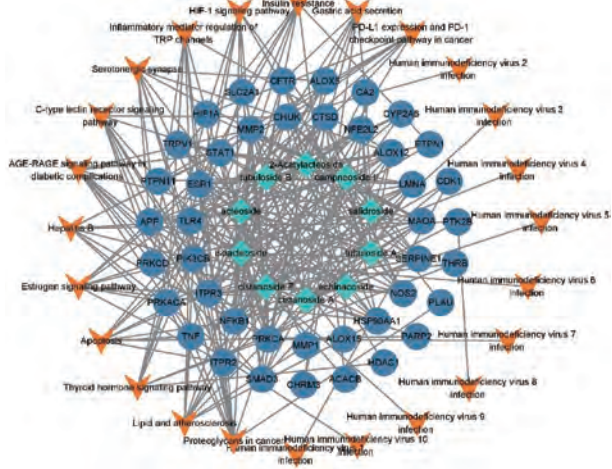


图 5 “化合物-靶点-通路”网络

TNF、NFKB1、TLR4、HSP90AA1、ESR1 分别与活性成分进行分子对接, 计算最低结合能, 见图 6。由此可知, 对接值均小于 -6 kcal/mol, 表明 10 种活性成分与 5 个靶点均具有很好的结合能力, 其中 TNF 最强。再利用 PyMOL 对部分对接结果进行可视化, 见图 7。

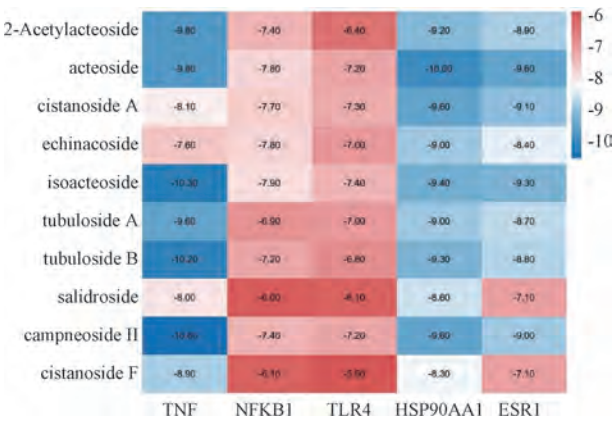
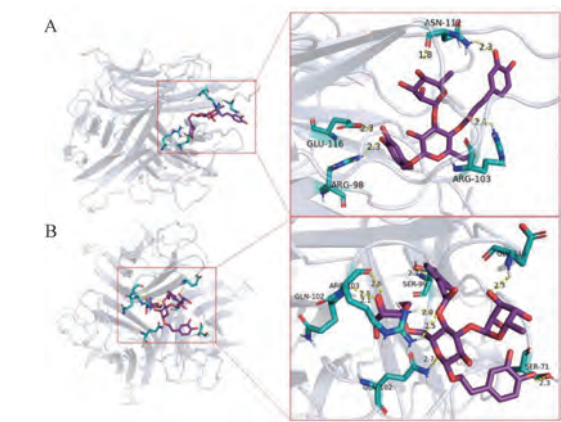


图 6 分子对接结合能热图

3.2 细胞实验
3.2.1 不同剂量 FFA 对 HepG2 细胞脂质蓄积的影响 如



注：A 为毛蕊花糖苷与 TNF 对接，B 为松果菊苷与 TNF 对接。

图 7 分子对接可视化图

图 8 所示，随着造模剂 FFA 浓度从 0.5 mmol/L 升至 2 mmol/L，红色脂滴数量逐渐增加，并融合形成大脂滴。

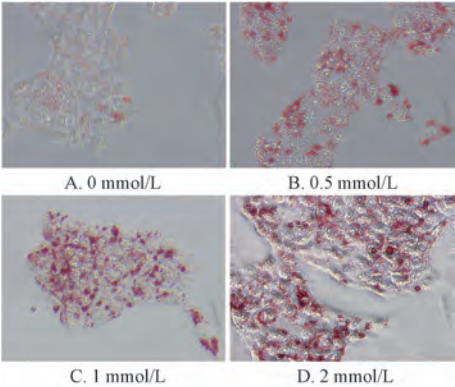
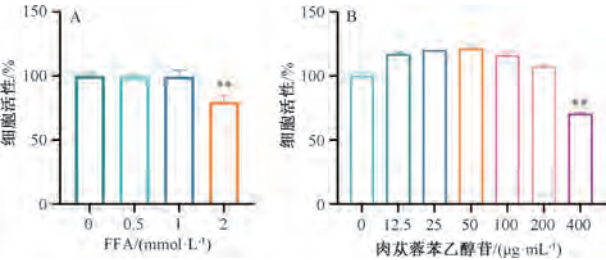


图 8 不同剂量 FFA 对 HepG2 细胞脂质蓄积的影响

3.2.2 FFA、肉苁蓉苯乙醇苷对 HepG2 细胞活性的影响 如图 9A 所示，1 mmol/L 及以下 FFA 对细胞活性无明显影响 ($P>0.05$)，结合“3.2.1”项下结果，本研究选用 1 mmol/L 作为造模剂量。如图 9B 所示，当细胞暴露于 200 $\mu\text{g/mL}$ 肉苁蓉苯乙醇苷时，其活性无明显变化 ($P>0.05$)；当后者质量浓度升至 400 $\mu\text{g/mL}$ 时，其活性受到抑制 ($P<0.01$)，因此，本研究分别选用 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 作为低、中、高给药质量浓度。

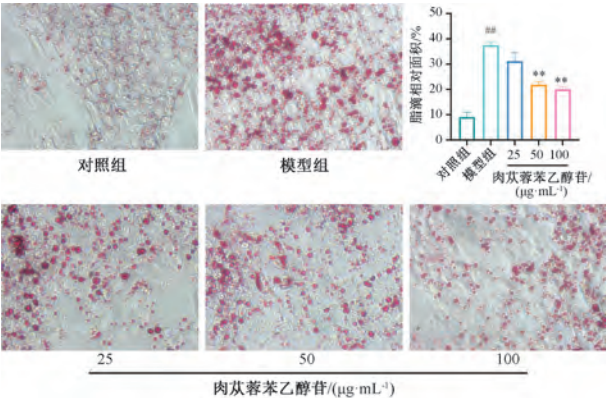


注：与对照组 (0 mmol/L 或 0 $\mu\text{g/mL}$) 比较，** $P<0.01$ 。

图 9 FFA、肉苁蓉苯乙醇苷对 HepG2 细胞活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

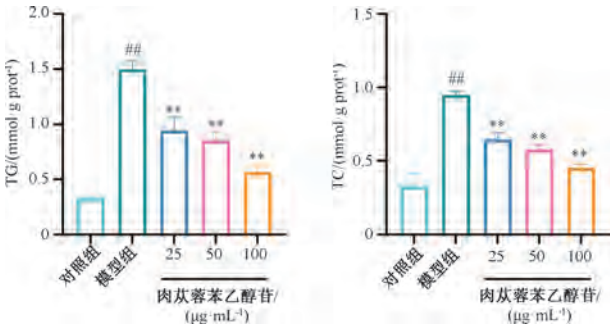
3.2.3 肉苁蓉苯乙醇苷对 FFA 诱导 HepG2 细胞脂质积累的影响 如图 10 所示，与对照组比较，模型组 HepG2 细

胞中出现大量红色脂滴 ($P<0.01$)，表明模型构建成功；与模型组比较，肉苁蓉苯乙醇苷 50、100 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞内红色脂滴均减少 ($P<0.01$)。如图 11 所示，与对照组比较，模型组细胞内 TG、TC 水平均升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，肉苁蓉苯乙醇苷各浓度组细胞内 TG、TC 水平均降低 ($P<0.01$)。



注：与对照组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图 10 各组细胞脂质积累 (油红 O 染色, $\times 400$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：与对照组比较，## $P<0.01$ ；与模型组比较，** $P<0.01$ 。

图 11 各组细胞 TG、TC 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

3.2.4 肉苁蓉苯乙醇苷对 FFA 诱导 HepG2 细胞线粒体损伤的影响 JC-1 可在正常线粒体基质中聚集形成聚合物，发出强烈的红色或橙色荧光；线粒体损伤会导致膜电位的下降或丧失，单体形式的 JC-1 只能存在于胞浆中，产生绿色荧光。如图 12 所示，对照组荧光以红橙色为主，仅有少量绿色，而模型组情况恰好相反；与模型组比较，肉苁蓉苯乙醇苷各浓度组绿色荧光减少，红色荧光增加。

3.2.5 肉苁蓉苯乙醇苷对 FFA 诱导 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响 如图 13 所示，与对照组比较，模型组荧光强度增加 ($P<0.01$)；与模型组比较，肉苁蓉苯乙醇苷各浓度组细胞内荧光强度减弱 ($P<0.01$)。

3.2.6 肉苁蓉苯乙醇苷对 FFA 诱导 HepG2 细胞凋亡的影响 Hoechst 33342 能透过胞膜完整的细胞嵌入细胞核，DNA 使其发出明亮的蓝色荧光，凋亡的细胞核染色增强，荧光更为明亮，呈圆状或固缩状、团块状结构，而非凋亡细胞核呈现荧光深浅不一的结构样特征。如图 14 所示，对照组仅有少量亮蓝色荧光，模型组有大量亮蓝色荧光，肉苁蓉苯乙醇苷各浓度组亮蓝色荧光强度弱于模型组。

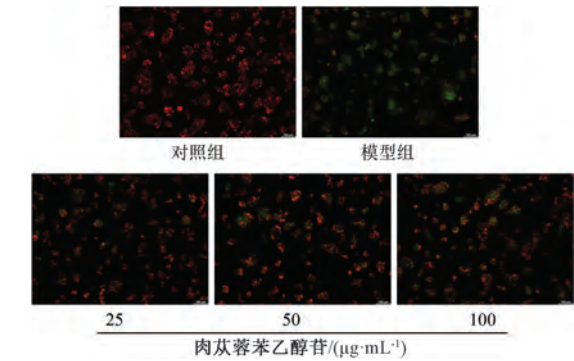
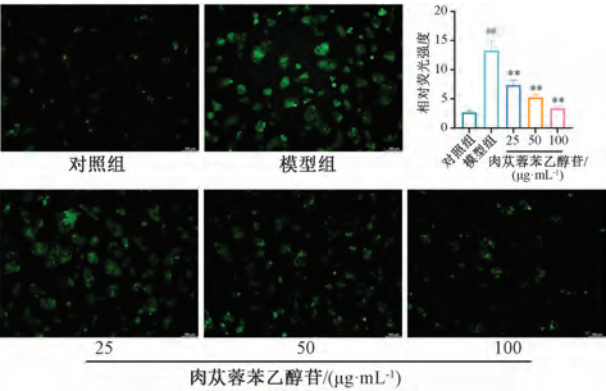


图 12 各组细胞 JC-1 染色 ($\times 100$)



注：与对照组比较， $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^{**}P<0.01$ 。

图 13 各组细胞 ROS 水平 (DCFH-DA, $\times 100$, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

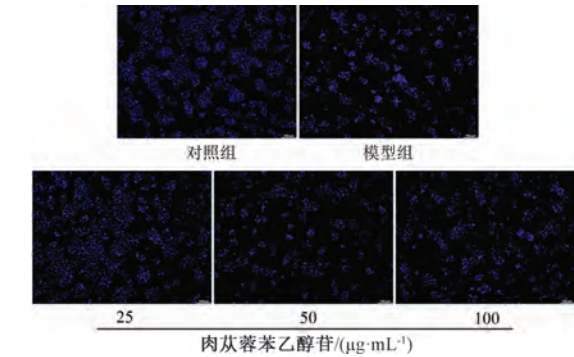
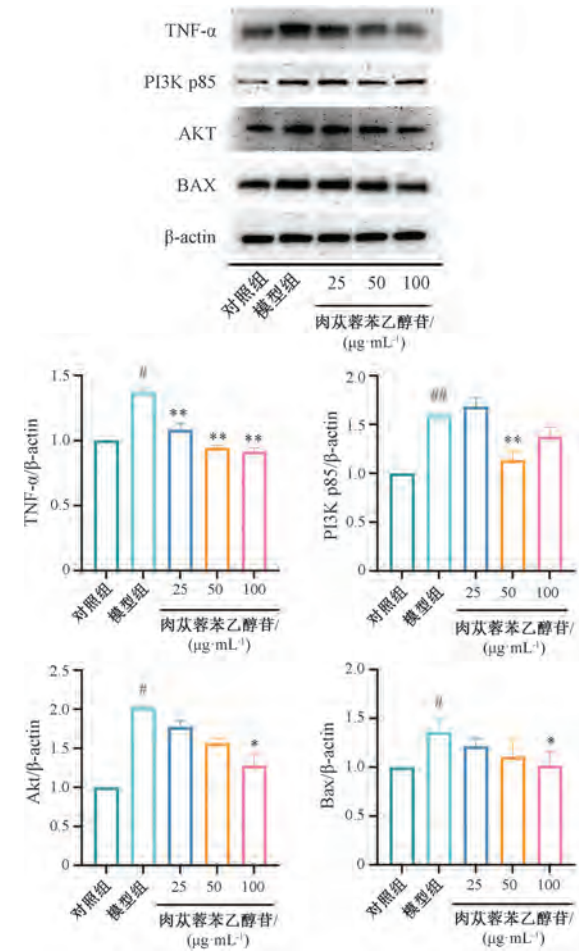


图 14 各组细胞 Hoechst 33342 荧光染色 ($\times 100$)

3.2.7 肉苁蓉苯乙醇苷对 FFA 诱导 HepG2 细胞 TNF/ PI3K/Akt 信号通路及 Bax 蛋白表达的影响 如图 15 所示，与对照组比较，模型组细胞 TNF- α 、PI3K p85、Akt、Bax 蛋白表达均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)；与模型组比较，肉苁蓉苯乙醇苷各浓度组细胞 TNF- α 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，肉苁蓉苯乙醇苷 50 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 PI3K p85 蛋白表达降低 ($P<0.01$)，肉苁蓉苯乙醇苷 100 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞 Akt、Bax 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)。

4 讨论

NAFLD 是一种与代谢紊乱相关的复杂肝病，其发病机制涉及脂质代谢失衡、胰岛素抵抗、氧化应激异常等多种因素^[12]。中医药近年来在防治 NAFLD 方面取得较大的进



注：与对照组比较， $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$ ；与模型组比较， $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ 。

图 15 各组细胞 TNF- α 、PI3K p85、Akt、Bax 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

展，有调节脂质代谢、抗炎、抗氧化应激等作用。现代研究发现，肉苁蓉苯乙醇苷能改善 NAFLD 病机，调节肝脏脂质代谢，控制氧化应激、炎症、纤维化等^[13-15]。

肝脏通过 β -氧化分解脂肪酸供能，CYP7A1 酶将胆固醇转化为胆汁酸以维持脂质稳态^[16-18]；在高脂环境下肝细胞脂质代谢失衡而过度堆积，诱发 NAFLD^[19]。本研究结果显示，FFA 诱导 HepG2 细胞模型中脂滴增多，TC、TG 水平升高；肉苁蓉苯乙醇苷可减少脂滴形成并降低 TC、TG 水平，从而改善肝细胞脂肪变性。

线粒体结构、功能异常会导致肝脏脂肪酸 β -氧化不足，从而引起 ROS 过度产生及脂质过氧化^[20]，同时过多的脂质积累导致氧化应激和过量 ROS 产生，后者又会导致线粒体功能损伤，进一步加重肝细胞脂肪变性^[21]。本研究结果显示，肉苁蓉苯乙醇苷能降低 FFA 诱导 HepG2 细胞内 ROS 水平，改善线粒体膜电位，并通过抑制 FFA 引起的氧化应激异常，从而缓解脂肪变性。

网络药理学显示，肉苁蓉苯乙醇苷抗 NAFLD 涉及代谢、细胞凋亡等多个通路。分子对接显示，肉苁蓉苯乙醇

昔活性化合物与多个靶点之间均具有良好的结合亲和力，尤其是肿瘤坏死因子（TNF），可能是相关关键途径。

TNF 通路是细胞信号传导中的关键路径，TNF- α 可与肝细胞膜上含死亡结构域的 TNFR1 受体结合，激活经典死亡受体通路，从而诱导肝细胞凋亡^[22]，还可通过旁分泌途径激活 PI3K/Akt 信号通路^[23-24]。已有研究证实，PI3K/Akt 信号通路异常与 NAFLD 进程中肝细胞脂质堆积、炎症反应及纤维化进展密切相关^[25]。本研究结果显示，肉苁蓉苯乙醇苷能抑制细胞凋亡，降低 TNF- α 、PI3K、Akt 蛋白表达，与网络药理学一致，进一步证实了 TNF/PI3K/Akt 信号通路在肉苁蓉苯乙醇苷抗 NAFLD 中的重要作用。

综上所述，肉苁蓉苯乙醇苷通过多过程、多通路对 NAFLD 发挥调控作用，并通过减少脂质沉积，抑制氧化应激，减轻线粒体损伤，抑制细胞凋亡，从而发挥对 NAFLD 的改善作用，可能与 TNF/PI3K/Akt 信号通路有关。本研究不仅为肉苁蓉苯乙醇苷在 NAFLD 治疗中的应用提供了依据，也为未来相关药物开发和临床研究指明了方向。

参考文献:

[1] 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.

[2] 刘嘉玲, 孙劲晖. 非酒精性脂肪性肝病更名: 从代谢功能障碍相关脂肪肝异质性的“同病异治”[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2024, 32(5): 450-454.

[3] Shahbaz M, Almatooq H, Foucambert P, *et al.* A systematic review of the risk of non-alcoholic fatty liver disease in women with polycystic ovary syndrome[J]. *Cureus*, 2022, 14(10): 29928.

[4] Zhou J, Zhou F, Wang W, *et al.* Epidemiological features of NAFLD from 1999 to 2018 in China[J]. *Hepatology*, 2020, 71(5): 1851-1864.

[5] Estes C, Anstee Q M, Arias-Loste M T, *et al.* Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030[J]. *J Hepatol*, 2018, 69(4): 896-904.

[6] 程雅欣, 李 佳. 非酒精性脂肪性肝病与常见内分泌代谢性疾病的关系及临床治疗综述[J]. 解放军医学院学报, 2021, 42(9): 963-969.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 140.

[8] Ma C, Ju B, Liu J, *et al.* Phenylethanol glycosides from *Cistanche tubulosa* modulate the gut microbiota and cecal metabolites to ameliorate diabetic nephropathy induced by streptozotocin combined with high-fat diet in rats[J]. *J Med Food*, 2025, 28(3): 219-231.

[9] 王富江, 屠鹏飞, 曾克武, 等. 荒漠肉苁蓉总苷对酒精性肝损伤小鼠的保护作用研究[J]. 药学学报, 2021, 56(9): 2528-2535.

[10] 马 冲, 耿若愚, 杨建华, 等. 基于网络药理学和动物实验探讨管花肉苁蓉苯乙醇苷对糖尿病肾病的作用[J]. 中成药, 2024, 46(4): 1365-1372.

[11] 曹兆元, 刘建庭, 韩彦琪, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS

与网络药理学的肉苁蓉质量标志物研究[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(7): 1790-1801.

[12] Cotter T G, Rinella M. Nonalcoholic fatty liver disease 2020: the state of the disease[J]. *Gastroenterology*, 2020, 158(7): 1851-1864.

[13] 贾修滨, 刘春燕, 刘运超, 等. 基于 ACOX1-CPT2 基因表达变化探讨肉苁蓉苯乙醇苷对高脂饮食诱导 ApoE^{-/-}小鼠肝组织脂质代谢的改善作用[J]. 中国中医药科技, 2024, 31(1): 33-37.

[14] 许源慧, 元照耀, 刘金存, 等. 肉苁蓉苯乙醇苷对酒精性肝病模型小鼠脂质代谢稳态的改善作用及其机制[J]. 中国新药杂志, 2024, 33(7): 696-704.

[15] Qi X, Sun H, Liu J, *et al.* Phenylethanol glycoside from *Cistanche tubulosa* attenuates BSA-induced liver fibrosis in rats by modulating the gut microbiota-liver axis[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2024, 17(9): 1149.

[16] Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions? [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012, 36(9): 815-823.

[17] Cheema S K, Agellon L B. The murine and human cholesterol 7 α -hydroxylase gene promoters are differentially responsive to regulation by fatty acids mediated *via* peroxisome proliferator-activated receptor α [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(17): 12530-12536.

[18] Ikonen E, Olkkonen V M. Intracellular cholesterol trafficking[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2023, 15(8): a041404.

[19] Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, *et al.* Bile acid control of metabolism and inflammation in obesity, type 2 diabetes, dyslipidemia, and nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(7): 1679-1694. e3.

[20] Di Ciaula A, Passarella S, Shanmugam H, *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Mitochondria as players and targets of therapies? [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(10): 5375.

[21] Shit A, Park S, Lee Y, *et al.* Stimuli-responsive pressure-strain sensor-based conductive hydrogel for alleviated non-alcoholic fatty liver disease by scavenging reactive oxygen species in adipose tissue[J]. *Acta Biomater*, 2023, 171: 406-416.

[22] 陈 婷. 基于 TNF- α /PI3K/AKT 信号通路研究 PMG 对 CCl₄ 致急性肝损伤的保肝作用及机制[D]. 福州: 福建中医药大学, 2022.

[23] Yang S, Wang M, Li Z, *et al.* *Tripterygium wilfordii* Hook. f induced kidney injury through mediating inflammation *via* PI3K-Akt/HIF-1/TNF signaling pathway: a study of network toxicology and molecular docking[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(6): e36968.

[24] Liu Y, Liu D K, Wang Z W, *et al.* Baicalein alleviates TNF- α -induced apoptosis of human nucleus pulposus cells through PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 292.

[25] Pan M, Cai C, Li W, *et al.* Ebselen improves lipid metabolism by activating PI3K/Akt and inhibiting TLR4/JNK signaling pathway to alleviate nonalcoholic fatty liver[J]. *Cytokine*, 2024, 181: 156671.