

基于网络药理学和动物实验探讨膈下逐瘀汤对非酒精性脂肪性肝病的影响

郭 嘉^{1,2}, 姚 政^{1,3,4}, 武俊紫^{1,3,4}, 冯晓昇^{1,3,4}, 朱晓松^{1,3,4}, 石安华^{1,3,4*}, 谭丽萍^{1,3,4*}
(1. 云南中医药大学基础医学院, 云南 昆明 650500; 2. 东台市中医院, 江苏 东台 224200; 3. 云南省中西医结合慢病防治重点实验室, 云南 昆明 650500; 4. 云南省中医证候微观辨证重点实验室, 云南 昆明 650500)

摘要: **目的** 探讨膈下逐瘀汤对非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的影响。**方法** TCMSP 数据库检索膈下逐瘀汤主要成分及 NAFLD 相关靶点, 对交集靶点进行 GO、KEGG 通路富集分析, 构建蛋白质-蛋白质相互作用网络 (PPI), 筛选干预 NAFLD 的作用机制及靶点。采用高脂饮食诱导构建 NAFLD 大鼠模型, 随机分为模型组、阿司匹林组 (9 mg/kg) 和膈下逐瘀汤低、中、高剂量组 (7.2、14.4、28.8 g/kg), 各给药组给予相应药物, 持续 12 周, 观察大鼠一般情况, HE、油红 O 染色观察肝组织病理变化, 检测肝功能 (ALT、AST)、脂质 (TC、TG、HDL-C、LDL-C)、炎症因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 水平, Western blot 法检测肝组织 ERK1/2、p-ERK1/2、MNK、p-MNK、eIF4E、p-eIF4E、HIF-1 α 蛋白表达。**结果** 共得到 144 个药物-疾病共同靶点, 膈下逐瘀汤可能通过抑制 ERK/MNK/eIF4E/HIF-1 α 炎症信号通路改善 NAFLD。与模型组比较, 膈下逐瘀汤各剂量组大鼠肝组织病理形态改善, ALT、AST、TC、TG 水平降低 ($P<0.01$), HDL-C 水平升高 ($P<0.01$), LDL-C 水平降低 ($P<0.01$), p-ERK、p-MNK、p-eIF4E、HIF-1 α 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。**结论** 膈下逐瘀汤对 NAFLD 炎症损伤具有良好的保护作用, 其主要机制可能与调节 HIF-1 信号通路中 ERK、MNK、eIF4E、HIF-1 α 关键蛋白的表达有关。

关键词: 膈下逐瘀汤; 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD); HIF-1 α 信号通路; 炎症; 网络药理学; 动物实验

中图分类号: R285.5; R966 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2025)10-3430-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.10.039

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是指肝细胞内脂肪过度沉积而非酒精或其他已知损害肝脏因素引起的临床病理综合征^[1], 已超越慢性肝炎成为我国第一大肝脏受损疾病^[2-3], 炎症贯穿本病的整个发生过程, 而减轻肝脏炎症反应可延缓其发展^[4]。中药具有多成分、多靶点的特点^[5], 在保护肝脏、治疗肝脏脂肪变性方面显示出优势^[6]。现代研究表明, 血瘀在 NAFLD 发展过程中扮演重要角色^[7]; 课题组前期研究发现, 膈下逐瘀汤可改善 NAFLD 大鼠肝脏脂质代谢紊乱, 降低血小板聚集率, 改善血瘀证^[8-9], 但其减轻炎症的具体机制仍不清楚。本研究利用网络药理学探究膈下逐瘀汤干预 NAFLD 炎症反应的机制, 并通过动物实验进行验证, 以期为该方临床应用提供参考依据。

1 材料

1.1 动物 60 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 180~220 g,

购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004], 于室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 50% 条件下适应性饲养 1 周。动物实验经云南中医药大学动物实验伦理委员会批准 (伦理编号 R-062021G005)。

1.2 试剂与药物 膈下逐瘀汤组方药材当归、桃仁、五灵脂、红花、甘草各 9 g, 乌药、川芎、丹皮、赤芍各 6 g, 枳壳 5 g, 香附、延胡索各 3 g, 均购自云南省中医医院门诊部药房, 经云南中医药大学刘景教授鉴定为正品, 委托云南省中医医院药剂科熬制浸膏, 每 1 g 约含 4.025 g 生药, 分装后保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。阿司匹林肠溶片 (批号 BJ70397, 拜耳医药保健有限公司)。高脂饲料 (配方 25% 蔗糖、15% 猪油、1% 胆固醇、5% 蛋黄粉、0.5% 胆酸盐)、普通饲料均由江苏省协同医药生物工程有限责任公司加工。谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)、甘油三酯

收稿日期: 2025-03-31
基金项目: 国家自然科学基金 (82360863); 云南省中青年学术与技术带头人后备人才项目 (202305AC060041); 云南省科技厅中医联合专项 (202001AZ070001-005, 202101AZ070001-041, 202301AZ070001-040); 江苏省盐城市卫健委医学科研项目 (YK2024231)
作者简介: 郭 嘉 (1989—), 男, 硕士, 从事中西医结合防治肝胆、肿瘤疾病的应用、基础研究。E-mail: 2386099719@qq.com
*通信作者: 石安华 (1977—), 男 (傣族), 博士, 教授, 从事中西医结合防治肝胆、肿瘤疾病的应用、基础研究。E-mail: 2697349858@qq.com
谭丽萍 (1984—), 女, 硕士, 实验师, 从事中西医结合防治肝胆、肿瘤疾病的应用、基础研究。Tel: (0871) 65918086, E-mail: 54747289@qq.com

(TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 试剂盒 (批号 20230729、20230731、20230727、20230727、20230726、20230726) 均购自南京建成生物工程研究所有限公司; 大鼠白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 检测试剂盒 (批号 202309、202309、202309) 均购自江苏酶免实业有限公司。

1.3 仪器 KA-1000 低速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); G-16C 高性能通用台式冷冻离心机 (德国 Sartorius 公司); BCD-650WPCX 低温冰箱 (合肥美菱股份有限公司); DW-86L626 超低温冰箱 (青岛海尔生物医疗股份有限公司); IMS-30 制冰机 (常熟市雪科电器有限公司); SQS-1000 玻片扫描影像系统 (深圳市生强科技有限公司); Synergy LX 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 药物活性成分与相关靶点筛选 借助中药系统药理学数据库及分析平台 (TCMSP)^[10] 查找膈下逐瘀汤各味中药活性成分和作用靶点, 并以口服利用度 (oralbioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件进行筛选^[11-12], 中药分子作用机制的生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM)^[11] 对 TCMSP 平台中没有的中药五灵脂进行检索, 检索条件为 Score ≥ 20 , $P < 0.05$ ^[13]。将 2 个数据库的成分预测靶点进行合并、去重, 建立膈下逐瘀汤活性成分-靶点数据库。并通过 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 对获得的药物靶点信息进行注释, 将基因全称转化为基因的 symbol。

2.1.2 靶点筛选 利用 GeneCards、OMIM、Pharm Gkb、TTD、Drug Bank、DisGeNET 数据库, 以“NAFLD”为关键词检索相关基因信息, R 语言安装 install.packages (“venn”) 包将数据库中的疾病靶点合并, 删除重复靶点, 取并集, 得到疾病相关基因, 并绘制韦恩图。

2.1.3 药物活性成分-疾病-作用通路网络构建 将活性成分与靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化处理, 构建膈下逐瘀汤活性成分-NAFLD 疾病靶点-作用通路网络图。

2.1.4 蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建 将共同靶点导入 STRING 数据库^[14] (<https://string-db.org>) 构建 PPI 网络, 导入 Cytoscape 3.9.1 软件中使其可视化, 内置插件 Network Analyze 进行拓扑分析, 相关参数包括节点连接度、介数中心性、接近中心性等, 数值越大, 节点越接近网络中心, 即在网络中越关键^[15-16]。

2.1.5 富集分析 采用 R 语言结合 Bioconductor 提供的基因数据分析工具, 进行基因本体 (gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。其中, 前者包括细胞组分 (cellularcomponent, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和生物过程 (biologicalprocess, BP) 3 个方面, 再对后者排名前三十的条目进行可视化, 通过 R 语言安装

Bioconductor: pathview 安装包, 导入数据绘制通路图。

2.1.6 分子对接 从 RSCB PDB 数据库中下载核心靶点蛋白的 3D 结构, 在 PubChem 数据库获取活性成分的化学结构, AutoDockTools-1.5.7 软件进行对接, PyMOL2.4 软件对结果进行可视化处理。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常组、模型组、阿司匹林组 (9 mg/kg) 和膈下逐瘀汤低、中、高剂量组 (分别为 7.2、14.4、28.8 g/kg, 按体表面积计算, 相当于临床等效量的 1、2、4 倍^[17]), 除正常组外, 其余各组大鼠给予高脂饲料喂养 8 周, 建立 NAFLD 模型。在造模的同时灌胃给药, 正常组和模型组给予等量生理盐水, 持续 12 周。

再观察肝组织的病理切片 (包括 HE 染色和油红 O 染色), 确认模型是否成功建立。脂肪肝的病理诊断标准是在低倍镜下观察到肝细胞脂肪变性占肝小叶的 1/3~1/2 为轻度脂肪肝, 占 1/2~3/4 为中度脂肪肝, 占超过 3/4 为重度脂肪肝。

2.2.2 取材 给药结束后, 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (0.1 mL/100 g) 麻醉, 腹主动脉取血, 取一部分肝脏于 4% 多聚甲醛中固定, 其余部分用液氮速冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.2.3 脂质水平、肝功能指标检测 取大鼠腹主动脉血, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清, 严格按照试剂盒说明书检测 ALT、AST、TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平。取大鼠冷冻肝组织适量, 切碎, 匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 严格按照试剂盒说明书检测 TC、TG 水平。

2.2.4 HE 染色和油红 O 染色观察肝组织病理形态 取 4% 多聚甲醛固定的大鼠肝脏, 距肝大叶边缘约 0.5 cm 处切取组织 (约 1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.5 cm), 制备石蜡切片, 进行 HE 染色, 于显微镜下观察 NAFLD 脂肪变性和炎症情况。取大鼠冷冻肝脏同一部位的组织, 制备冷冻切片, 油红 O 染色, 在显微镜下观察肝细胞内脂滴分布。按照《NASH 临床研究网络病理工作指南》对 NAFLD 活动度积分 (NAFLD activity score, NAS) 进行半定量分析^[18], ①肝细胞脂肪变, 0 分 (<5%), 1 分 (5%~33%), 2 分 (34%~66%), 3 分 (>66%); ②小叶内炎症 (20 倍镜计数坏死灶), 0 分 (无), 1 分 (>2 个), 2 分 (2~4 个), 3 分 (>4 个); ③肝细胞气球样变, 0 分 (无), 1 分 (少见), 2 分 (多见)。

2.2.5 ELISA 法检测血清炎症因子水平 根据试剂盒说明书, 检测大鼠血清 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 水平。

2.2.6 Western blot 法检测肝组织相关通路蛋白表达 取大鼠冷冻肝组织适量, 加入含磷酸酶抑制剂的蛋白裂解液进行裂解, 离心, 取上清, 定量蛋白, 由不同浓度的 SDS-PAGE 胶进行电泳分离, 转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液封闭, 加一抗 ERK、p-ERK、MNK、p-MNK、eIF4E、p-

eIF4E、 β -actin、HIF-1 α ，4℃ 孵育过夜，次日加二抗，室温孵育 1 h，ECL 化学发光液显影。采用 Image J 软件计算目的蛋白相对表达量。

2.2.7 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，若方差齐，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 LSD 检验；若方差不齐，组间比较采用秩和检验，两两比较采用 Dunnett's T3 检验。 $P<0.05$ 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 共得到 273 种，其中当归 2 种、甘草 92 种、桃仁 23 种、红花 22 种、乌药 9 种、丹皮 11 种、赤芍 29 种、川芎 7 种、香附 18 种、延胡索 49 种、枳壳 5 种、五灵脂 6 种，删除重复项后最终有 202 种。

3.1.2 疾病、药物靶点基因 共得到 1 823 个与 NAFLD 相关的疾病基因，见图 1。共得到药物靶点基因 4 982 个，去重后为 251 个，再与 NAFLD 相关疾病基因进行比对，最终有 144 个交集靶点，见图 2。

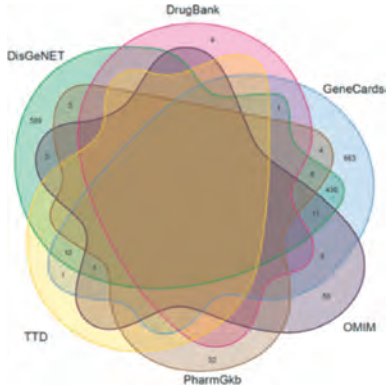


图 1 NAFLD 疾病基因筛选韦恩图



图 2 膈下逐瘀汤干预 NAFLD 韦恩图



图 3 膈下逐瘀汤干预 NAFLD PPI 网络图

3.1.3 PPI 网络和药物-成分-靶点网络 将 144 个交集靶

3432

点导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化，CytoNCA 插件进行网络拓扑学分析，根据“Betweenness”“Closeness”“Degree”“Eigenvector”“LAC”“Network”，筛选出核心靶点为 MAPK14、AKT1、HSP90AA1、ESR1、EGFR、FOS、MAPK1、NR3C1、RELA、TP53、STAT3、MYC、MAPK3、CTNNB1、HIF1A，见图 3。在节点分布上，桃仁、五灵脂、川芎、乌药等中药与 NAFLD 疾病相关成分较少；在交叠颜色上，膈下逐瘀汤中与 NAFLD 治疗相关的主要中药为红花、香附、甘草和枳壳，见图 4。

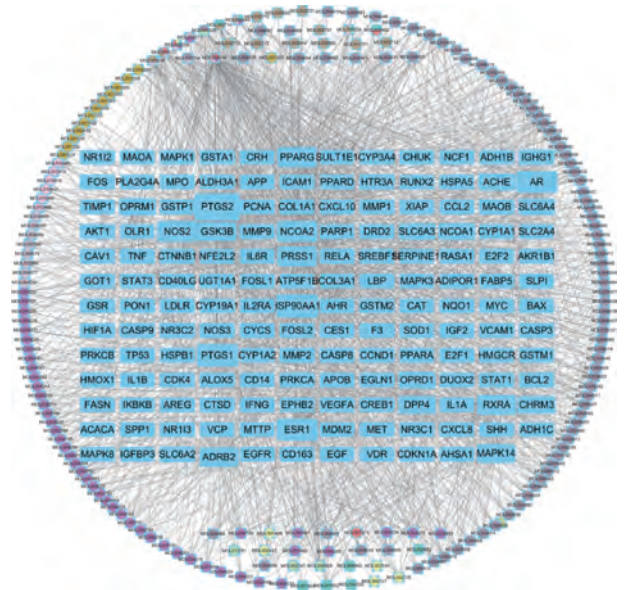


图 4 膈下逐瘀汤活性成分-NAFLD 治疗靶点调控网络图

3.1.4 GO、KEGG 通路富集分析 GO 通路富集分析显示，膈下逐瘀汤可调节异物刺激、氧化应激、细胞外刺激、脂多糖等多种生物过程，从而干预 NAFLD，影响其细胞基因的转录功能，见图 5A。KEGG 通路富集分析显示，膈下逐瘀汤有效成分可能通过 HIF-1 信号通路、脂肪代谢和动脉硬化等途径来干预 NAFLD，见图 5B。根据 P 值进行筛选，发现膈下逐瘀汤干预 NAFLD 炎症反应可能与 HIF-1 信号通路中的 ERK、MNK、eIF4E、HIF-1 α 表达有关，见图 5C。

3.1.5 分子对接 黄芩苷、槲皮素与 HIF-1 α 的最小对接结合能分别为-6.84、-5.01 kcal/mol，均小于-5.0 kcal/mol，表明两者对接情况良好，见图 6。

3.2 动物实验

3.2.1 膈下逐瘀汤对 NAFLD 大鼠肝组织形态的影响 正常组大鼠肝脏体积较小，颜色暗红，质地柔软，包膜光滑，边缘锐利；模型组大鼠肝脏体积增大，整体油腻呈黄色，质地稍软，表面呈现斑点状；阿司匹林组大鼠肝脏大小基本恢复到正常状态；膈下逐瘀汤各剂量组大鼠肝脏均较模型组有所改善，见图 7。

3.2.2 膈下逐瘀汤对 NAFLD 大鼠肝组织病理形态的影响 HE 染色显示，正常组大鼠肝组织结构完整，肝细胞环绕中央静脉向外放射状排列；模型组大鼠肝细胞出现大量

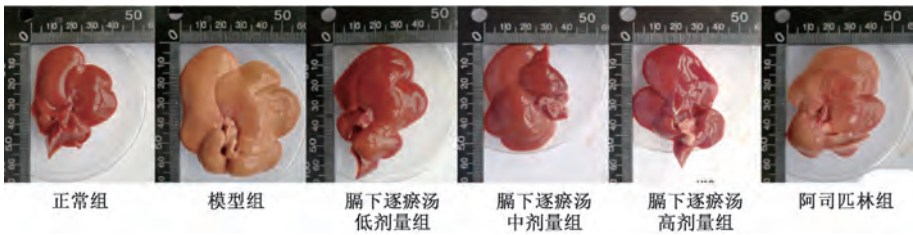


图 7 各组大鼠肝组织形态

性，肝脏接近正常水平，见图 8B、表 2。

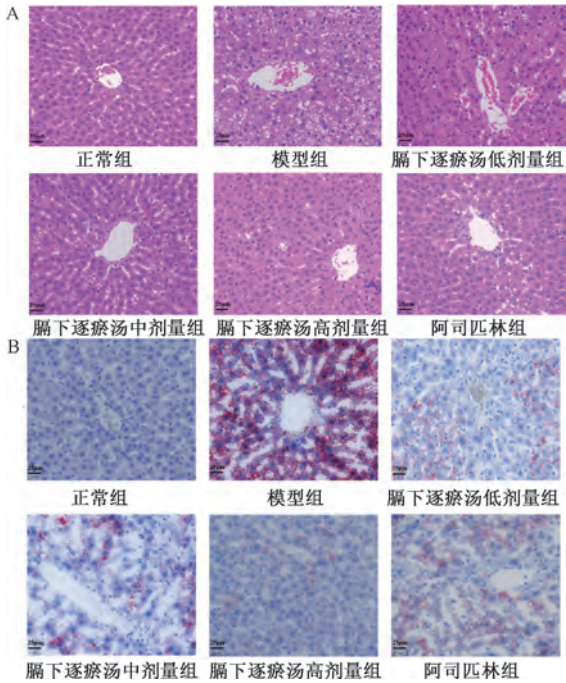


图 8 膈下逐瘀汤对 NAFLD 大鼠肝组织病理学的影响 (×400)

表 1 各组大鼠肝脏 NAS 评分比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	NAS 评分/分
正常组	0.00±0.00
模型组	6.50±0.93 *
膈下逐瘀汤低剂量组	4.75±1.17 ^{##}
膈下逐瘀汤中剂量组	4.00±0.76 ^{##}
膈下逐瘀汤高剂量组	3.13±0.83 ^{##}
阿司匹林组	4.13±0.83 ^{##}

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。

表 2 各组大鼠肝脏油红 O 染色阳性面积比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	油红 O 染色阳性面积/%
正常组	0.00±0.00
模型组	59.03±1.21 *
膈下逐瘀汤低剂量组	22.42±1.07 ^{##}
膈下逐瘀汤中剂量组	10.45±2.37 ^{##}
膈下逐瘀汤高剂量组	4.73±0.54 ^{##}
阿司匹林组	6.72±0.45 ^{##}

注：与正常组比较，* $P<0.05$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。

3.2.3 膈下逐瘀汤对 NAFLD 大鼠肝体比和脂质水平的影响 与正常组比较，模型组大鼠肝体比，血清 TC、TG、LDL-C 及肝组织 TC、TG 水平升高 ($P<0.01$)，HDL-C 水平降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠肝体比，血清 TC、TG、LDL-C 及肝组织 TC、TG 水平降低 ($P<0.01$)，HDL-C 水平升高 ($P<0.01$)，见表 3。

表 3 各组大鼠肝体比、脂质水平比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	肝体比/%	血清 TC	血清 TG	血清 HDL-C	血清 LDL-C	肝脏 TC	肝脏 TG
正常组	2.30±0.22	1.00±0.09	0.58±0.09	1.23±0.09	0.35±0.09	0.24±0.03	0.60±0.05
模型组	3.30±0.32 **	2.12±0.16 **	1.60±0.14 **	0.59±0.06 **	1.09±0.11 **	1.73±0.12 **	3.67±0.37 **
膈下逐瘀汤低剂量组	2.40±0.22 ^{##}	1.29±0.06 ^{##}	0.96±0.10 ^{##}	0.88±0.04 ^{##}	0.84±0.06 ^{##}	0.72±0.04 ^{##}	1.05±0.10 ^{##}
膈下逐瘀汤中剂量组	2.40±0.26 ^{##}	1.18±0.11 ^{##}	0.82±0.08 ^{##}	0.96±0.04 ^{##}	0.67±0.02 ^{##}	0.47±0.05 ^{##}	0.91±0.07 ^{##}
膈下逐瘀汤高剂量组	2.40±0.28 ^{##}	1.12±0.09 ^{##}	0.68±0.05 ^{##}	1.03±0.06 ^{##}	0.61±0.04 ^{##}	0.37±0.02 ^{##}	0.71±0.05 ^{##}
阿司匹林组	3.10±0.30	1.56±0.07 ^{##}	0.86±0.05 ^{##}	0.74±0.03 ^{##}	0.80±0.08 ^{##}	0.81±0.03 ^{##}	1.17±0.10 ^{##}

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。

3.2.4 膈下逐瘀汤对 NAFLD 大鼠肝功能指标和炎症因子水平的影响 与正常组比较，模型组大鼠血清 ALT、AST、IL-1β、IL-6、TNF-α 水平升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，

各给药组大鼠血清 ALT、AST、IL-1β、IL-6、TNF-α 水平降低 ($P<0.01$)，见表 4。

表 4 各组大鼠肝功能指标、炎症因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	IL-1β/(ng·L ⁻¹)	IL-6/(ng·L ⁻¹)	TNF-α/(ng·L ⁻¹)
正常组	50.92±1.97	48.59±2.82	9.66±1.69	59.12±3.80	107.40±7.22
模型组	111.41±5.30 **	112.28±5.04 **	64.75±4.68 **	148.09±11.80 **	371.27±8.90 **
膈下逐瘀汤低剂量组	78.60±2.15 ^{##}	83.01±1.81 ^{##}	48.60±2.19 ^{##}	92.34±5.34 ^{##}	264.85±17.19 ^{##}
膈下逐瘀汤中剂量组	68.04±2.50 ^{##}	75.25±2.23 ^{##}	34.68±4.36 ^{##}	76.09±5.96 ^{##}	195.69±8.80 ^{##}
膈下逐瘀汤高剂量组	58.62±3.14 ^{##}	63.67±2.08 ^{##}	18.31±1.54 ^{##}	61.52±4.11 ^{##}	149.51±9.86 ^{##}
阿司匹林组	73.12±3.80 ^{##}	74.90±1.78 ^{##}	26.08±1.84 ^{##}	71.09±7.65 ^{##}	175.17±6.18 ^{##}

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，^{##} $P<0.01$ 。

3.2.5 膈下逐瘀汤对 NAFLD 大鼠肝组织相关通路蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肝组织 p-ERK1/2、(p-ERK1/2)/ERK1/2、p-MNK、p-MNK/MNK、p-eIF4E、p-eIF4E/eIF4E、HIF-1α 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);

与模型组比较, 各给药组大鼠肝组织 p-ERK、p-ERK1/2/ERK1/2、p-MNK、p-MNK/MNK、p-eIF4E、p-eIF4E/eIF4E、HIF-1α 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见表 5、图 9。

表 5 各组大鼠肝组织相关通路蛋白表达比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	(p-ERK1/2)/ERK1/2	p-MNK/MNK	p-eIF4E/eIF4E	HIF-1α
正常组	0.29±0.05	0.44±0.19	0.14±0.07	0.19±0.06
模型组	1.07±0.09**	1.18±0.21*	1.14±0.14**	1.00±0.24**
膈下逐瘀汤低剂量组	0.90±0.06 [#]	0.76±0.07 [#]	0.91±0.26	0.58±0.18
膈下逐瘀汤中剂量组	0.41±0.07 ^{##}	0.68±0.16 [#]	0.52±0.23 [#]	0.42±0.06 [#]
膈下逐瘀汤高剂量组	0.40±0.06 ^{##}	0.62±0.11 [#]	0.30±0.11 ^{##}	0.32±0.05 ^{##}
阿司匹林组	0.47±0.04 ^{##}	0.75±0.10 [#]	0.54±0.09 ^{##}	0.43±0.15 ^{##}

注: 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$ 。

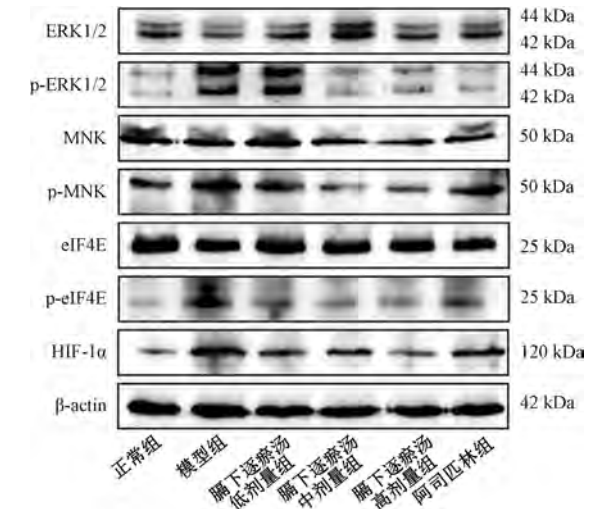


图 9 各组大鼠肝组织相关通路蛋白条带

4 讨论

膈下逐瘀汤君药为当归、赤芍、川芎, 功效养血行血; 臣药为桃仁、红花、五灵脂、丹皮, 功效破结散瘀; 佐药为香附、乌药、枳壳、元胡, 功效为行气止痛; 使药为甘草, 功效健脾和中、调和诸药, 全方共奏祛瘀消痞功效^[19]。长期摄入高脂食物会导致血脂升高, 血液黏稠度增加, 血液流动性降低, 血小板聚集增加, 在血管内皮受损的情况下容易形成血栓, 即为血瘀^[20]。随着 NAFLD 进展脂质负荷加重, 使得肝细胞肿胀, 导致肝窦变形, 微循环障碍血流减慢; 肝细胞营养水平下降, 导致肝细胞缺氧, 更容易在氧化应激状态下发生脂质过氧化, 进一步加剧肝细胞损伤诱发炎症^[21]。

本实验通过网络药理学, 共筛选出膈下逐瘀汤治疗 NAFLD 的潜在作用靶点 144 个, 经 PPI 网络及网络拓扑学分析得到 15 个核心蛋白靶点 (MAPK14、AKT1、HSP90AA1、ESR1、EGFR、FOS、MAPK1、NR3C1、RELA、TP53、STAT3、MYC、MAPK3、CTNNB1、HIF1A), 主要通过干预氧化应激、脂多糖反应、营养水平调节、对细菌来源分子的干预、活性氧调控等多种生物过程来防治 NAFLD。KEGG 通路富集分析显示, 脂质和动脉硬化、AGE-RAGE、HIF-1 等信号通路等与 NAFLD 治疗关系密切。

分子对接结果也证实, HIF-1α 与膈下逐瘀汤主要有效成分黄芩苷和槲皮素对接良好。

缺氧会加速炎症因子 (如 IL-1、IL-6、TNF-α) 的释放和炎症细胞的活化, 激活细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 的磷酸化^[22-23], 从而促进下游的促分裂原活化蛋白激酶相关蛋白激酶 MNKs (MNK1、MNK2) 并使其磷酸化^[24]。MNKs 可磷酸化其下游的真核翻译起始因子 4E (eIF4E), 增强其 eIF4E 与 mRNA 帽子的结合能力, 从而促进蛋白质的翻译过程^[25]; HIF 是一个由 α 和 β 亚基组成的异质蛋白复合物, 在低氧环境下氧敏感亚基 (α) 表达, 调控相关基因在某些组织中的表达^[26]; HIF-1α 作为调节细胞缺氧的重要因子, 其表达受 ERK1/2 调节^[27]; 磷酸化的 eIF4E 会使得 HIF-1α 启动转录, 进一步增加促炎细胞因子的表达, 导致炎症反应的继续加重。因此, 炎症因子激活 ERK/MNK/eIF4E/HIF-1α 信号通路会导致炎症反应进一步加重。

本实验以高脂饮食诱导的 NAFLD 大鼠为对象, 分别采用膈下逐瘀汤及阿司匹林干预。结果显示, 膈下逐瘀汤可显著改善模型大鼠肝功能, 减轻炎症反应; 显著改善模型大鼠脂质沉积, 减轻炎细胞浸润。研究表明, 阿司匹林能抑制脂质生物合成和炎症, 提高分解代谢改善 NAFLD^[28], 本实验也证实了它对 NAFLD 大鼠肝脏脂肪浸润、脂质沉积及炎症指标均有明显的改善作用。

综上所述, 膈下逐瘀汤可通过“从瘀论治”的角度干预 NAFLD, 其中炎症相关通路 ERK/MNK/EIF4E/HIF-1α 可能是其发挥作用的重要途径, 上述结果可为后续深入研究该方具体作用机制提供实验依据。

参考文献:

[1] Wong V W, Chan W K, Chitturi S, et al. Asia-Pacific Working Party on Non-alcoholic Fatty Liver Disease guidelines 2017-Part 1: Definition, risk factors and assessment[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2018, 33(1): 70-85.

[2] Paternostro R, Trauner M. Current treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Intern Med, 2022, 292(2): 190-204.

[3] Orei L A, Sanduzzi-Zamparelli M, Caballol B, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review, meta-analysis, and meta-

regression[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2022, 20(2): 283-292. e10.

[4] Arrese M, Cabrera D, Kalergis A M, *et al.* Innate immunity and inflammation in NAFLD/NASH [J]. *Dig Dis Sci*, 2016, 61(5): 1294-1303.

[5] Tanase D M, Gosav E M, Costea C F, *et al.* The intricate relationship between type 2 diabetes mellitus (T2DM), insulin resistance (IR), and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *J Diabetes Res*, 2020, 2020: 3920196.

[6] Liao X, Bu Y, Jia Q. Traditional Chinese medicine as supportive care for the management of liver cancer: Past, present, and future[J]. *Genes Dis*, 2020, 7(3): 370-379.

[7] 赵 浩, 刘剑刚, 雷 燕. 血脂异常血瘀证患者血液流动性和流变性观察[J]. *微循环学杂志*, 2015, 25(3): 23-26; 86.

[8] 李秀芳, 李松梅, 林 青, 等. 参苓白术散和膈下逐瘀汤对实验性脂肪肝早期的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2008, 18(2): 99-101.

[9] 尹 航. 膈下逐瘀汤抑制 S1P 相关炎性反应防治代谢相关脂肪性肝病的机制研究[D]. 昆明: 云南中医药大学, 2023.

[10] 赵苗青, 李 丰, 石彬彬, 等. 系统药理学 (VI) ——TCMSP 数据库及其应用[J]. *中医药信息*, 2020, 37(3): 22-29.

[11] Liu Z, Guo F, Wang Y, *et al.* BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 21146.

[12] 杨 婧, 赵耀伟, 牛 捷, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨减味膈下逐瘀汤治疗非酒精性脂肪肝作用机制研究[J]. *海南医学院学报*, 2022, 28(16): 1252-1260; 1267.

[13] Cai L, Kang Y J. Cell death and diabetic cardiomyopathy[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2003, 3(3): 219-228.

[14] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.

[15] Yang M, Chen J L, Xu L W, *et al.* Navigating traditional Chinese medicine network pharmacology and computational tools[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, 2013: 731969.

[16] Tang Y, Li M, Wang J X, *et al.* CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks[J]. *Biosystems*, 2015, 127: 67-72.

[17] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.

[18] 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.

[19] 刘中勇, 邓 鹏, 胡 丹. 膈下逐瘀汤现代临床应用研究[J]. *江西中医药*, 2012, 43(1): 75-80.

[20] 谭 丽, 管小琴, 王 倩. 维生素 E、亚硒酸钠对非酒精性脂肪肝作用的实验研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2007, 32(6): 606-609; 614.

[21] Hasegawa T, Ito Y, Wijeweera J, *et al.* Reduced inflammatory response and increased microcirculatory disturbances during hepatic ischemia-reperfusion injury in steatotic livers of ob/ob mice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(5): G1385-G1395.

[22] Ke Q D, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(5): 1469-1480.

[23] Reuter S, Gupta S C, Chaturvedi M M, *et al.* Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11): 1603-1616.

[24] Kim H J. Cell fate control by translation: mRNA translation initiation as a therapeutic target for cancer development and stem cell fate control[J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 665.

[25] Thoreen C C, Chantranupong L, Keys H R, *et al.* A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation[J]. *Nature*, 2012, 485(7396): 109-113.

[26] Rashid M, Zadeh L R, Baradaran B, *et al.* Up-down regulation of HIF-1α in cancer progression[J]. *Gene*, 2021, 798: 145796.

[27] You T, Li Y, Li B, *et al.* Caveolin-1 protects against liver damage exacerbated by acetaminophen in non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting the ERK/HIF-1α pathway[J]. *Mol Immunol*, 2023, 163: 104-115.

[28] Han Y M, Lee Y J, Jang Y N, *et al.* Aspirin improves nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis through regulation of the PPARδ-AMPK-PGC-1α pathway in dyslipidemic conditions[J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7806860.