

· 经典名方 ·

基于 AMPK 信号通路探讨血府逐瘀汤治疗代谢相关脂肪性肝病的效果及机制

韩铭¹, 张颖¹, 孔令雅², 戴军¹, 张婷^{1*}, 马志红^{1,3*}

(1. 河北中医药大学 中西医结合学院, 石家庄 050200; 2. 河北医科大学 第三医院, 石家庄 050031;
3. 河北省离子通道功能与创新中药国际联合研究中心, 石家庄 050200)

[摘要] 目的:采用网络药理学和动物实验相结合方法,探究血府逐瘀汤(XFZYT)治疗代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)的作用机制。方法:采用网络药理学对XFZYT关键成分、治疗MAFLD的核心靶点及信号通路进行预测;动物实验采用喂食高胆固醇饲料(HCD)4周建立MAFLD大鼠模型,给予XFZYT低剂量(2 g·kg⁻¹)和XFZYT高剂量(4 g·kg⁻¹)干预2周。采用生化法检测血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转氨酶(ALT)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性及丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH),以及肝脏中TC和TG;采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;采用苏木素-伊红(HE)染色、油红O染色和DHE探针分别检测肝组织病理形态学、脂类沉积情况和ROS水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化(p)-AMPK、核因子E₂相关因子(Nrf2)、血红素氧合酶-1(HO-1)、核转录因子- κ B(NF- κ B)和p-NF- κ B的表达;采用液相色谱-串联质谱联用技术(LC-MS/MS)进行血清非靶向代谢组学分析。结果:经网络药理学分析获得XFZYT治疗MAFLD的潜在靶点155个,主要核心靶点有信号转导与转录激活因子3(STAT3)、蛋白激酶B1(Akt1)、TNF和IL-6等,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集通路主要涉及AMPK信号通路。动物实验结果表明,与CON组比较,MOD组大鼠出现了血脂紊乱、肝功能损伤和肝内明显脂类沉积与炎症表现,血清中AST、ALT、TC、TG、LDL、MDA含量水平明显升高($P<0.05$),HDL、GSH含量和SOD、CAT活性明显降低($P<0.05$),肝脏组织中Nrf2、HO-1、p-AMPK蛋白表达水平明显降低($P<0.05$),p-NF- κ B蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。与MOD组比较,XFZYT处理组大鼠血脂紊乱、肝功能损伤明显好转,肝内脂类沉积与炎症细胞浸润明显减少,血清中AST、ALT、TC、TG、LDL、MDA水平明显降低($P<0.05$),HDL、GSH含量和SOD、CAT活性水平明显升高($P<0.05$),肝脏组织中Nrf2、HO-1、p-AMPK蛋白表达水平明显升高($P<0.05$),p-NF- κ B蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。血清代谢组学分析显示,CON组与MOD组间存在差异代谢物511种,其中231种表达上调,280种表达下调;XFZYT组与MOD组间的差异代谢物有94种,其中51种表达上调,43种表达下调;94种差异代谢产物中有11种改变最为明显,主要涉及甘油酯代谢、胆固醇代谢、胰岛素抵抗等多条与AMPK相关的通路。结论:XFZYT可能通过调控AMPK信号通路对MAFLD大鼠发挥治疗作用。

[关键词] 血府逐瘀汤; 代谢相关脂肪性肝病; 网络药理学; 代谢组学; 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路

[中图分类号] R289;R259;R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)11-0001-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251904

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20251127.1446.003>

[网络出版日期] 2025-11-27 16:02:11 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Xuefu Zhuyutang Ameliorates Metabolic-associated Fatty Liver Disease via AMPK Signaling Pathway

HAN Ming¹, ZHANG Ying¹, KONG Lingya², DAI Jun¹, ZHANG Ting^{1*}, MA Zhihong^{1,3*}

(1. School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei University of Chinese Medicine,

[收稿日期] 2025-09-04

[基金项目] 河北省教育厅科学研究项目(ZD2021080)

[第一作者] 韩铭,在读硕士,从事中西医结合基础研究,E-mail:YJS20232039@hebcm.edu.cn

[通信作者] *马志红,博士,教授,从事代谢性疾病的中医药干预相关研究,E-mail:mazhihong@hebcm.edu.cn;

*张婷,硕士,实验师,从事炎症性疾病的中医药防治研究,E-mail:zhangting@hebcm.edu.cn

Shijiazhuang 050200, China; 2. The Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, China; 3. Hebei International Cooperation Center for Ion Channel Function and Innovative Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic mechanism of Xuefu Zhuyutang (XFZYT) for metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD) through integrated network pharmacology and animal experiments. **Methods:** Network pharmacology was utilized to predict the core components, key therapeutic targets, and signaling pathways of XFZYT in the treatment of MAFLD. For animal experiments, a rat model of MAFLD was established by feeding a high-cholesterol diet for 4 weeks. Intervention was then administered with low-dose ($2\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and high-dose ($4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) XFZYT for 2 weeks. Biochemical assays were performed to measure the serum levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein (HDL), and low-density lipoprotein (LDL). In addition, the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the serum were measured. The same way was adopted to measure the levels of TC and TG in the liver tissue. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to quantify the serum levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Histopathological evaluations included hematoxylin and eosin (HE) staining for liver tissue morphology, Oil Red O staining for lipid deposition, and dihydroethidium (DHE) probe staining for reactive oxygen species (ROS) levels. Western blot analysis was conducted to assess the protein levels of AMP-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated (p)-AMPK, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor-kappa B (NF- κ B), and p-NF- κ B in the liver tissue. Untargeted metabolomics analysis of the serum was performed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). **Results:** Network pharmacology analysis predicted 155 potential targets of XFZYT for MAFLD treatment, with core targets including signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), protein kinase B1 (Akt1), TNF, and IL-6. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment primarily implicated the AMPK signaling pathway. Animal experiments demonstrated that compared with the normal group, the model group exhibited dyslipidemia, hepatic function impairment, pronounced hepatic lipid deposition, and inflammatory manifestations, with elevated serum levels of AST, ALT, TC, TG, LDL, and MDA ($P<0.05$), reduced HDL and GSH levels plus decreased SOD and CAT activities ($P<0.05$), downregulated protein levels of Nrf2, HO-1, and p-AMPK ($P<0.05$), and upregulated protein level of p-NF- κ B ($P<0.05$) in the liver tissue. Compared with the model group, XFZYT intervention groups showed significant amelioration of dyslipidemia and hepatic function impairment, markedly reduced hepatic lipid deposition and inflammatory cell infiltration, decreased serum levels of AST, ALT, TC, TG, LDL, and MDA ($P<0.05$), increased HDL and GSH levels plus enhanced SOD and CAT activities ($P<0.05$), upregulated protein levels of Nrf2, HO-1, and p-AMPK ($P<0.05$), and downregulated protein level of p-NF- κ B ($P<0.05$). Serum metabolomics revealed 511 differentially expressed metabolites (231 upregulated and 280 downregulated) between normal and model groups, while XFZYT groups versus model group showed 94 differential metabolites (51 upregulated and 43 downregulated). Among them, 11 metabolites displayed the most significant alterations, with enriched pathways including glycerolipid metabolism, cholesterol metabolism, and insulin resistance, multiple of which demonstrated AMPK association. **Conclusion:** XFZYT alleviates MAFLD by regulating the AMPK signaling pathway and associated metabolic networks.

[Keywords] Xuefu Zhuyutang; metabolic-associated fatty liver disease; network pharmacology; metabolomics; AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway

代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)是遗传易感个体由于营养过剩和胰岛素抵抗(IR)引起的、以肝实质细胞内过量脂质沉积为特征的慢性进展性肝病^[1],其疾病谱包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎及其相关纤维化和肝硬化。本病已成为全球最常见的慢性肝病和健康体检人群血清转氨酶增高的主要原因^[2]。据统计全球患病率约为30%,且仍在持续上升^[3]。相较于西方国家,我国拥有更高的患病风险,成人MAFLD总体患病率约为33%^[4],已取代病毒性肝炎成为我国第一大慢性肝病^[5]。目前尚无针对MAFLD直接有效的治疗药物^[6],因此,开发有确切疗效的药物具有重要意义。

MAFLD的发病机制较为复杂,涉及氧化应激、脂质代谢、IR、炎症、肠道菌群失调和免疫系统的异常激活等多重打击因素^[7]。其中IR被认为是MAFLD发展的关键因素^[8]。由于IR导致脂肪分解,释放到血中的游离脂肪酸(FFA)增多,进而流入肝细胞内促进了甘油三酯(TG)的合成,引发肝细胞内脂质沉积。脂质过量沉积导致线粒体功能障碍,产生大量活性氧(ROS)和脂质过氧化产物,进一步促进炎性细胞因子释放,最终加剧炎症反应。因此,调节肝细胞内脂质代谢稳态对于阻断氧化应激-炎症级联反应、延缓MAFLD进展十分重要^[9]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)是真核细胞生物中广泛

存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是细胞代谢的关键能量传感器。当细胞内能量不足时 AMPK 被激活,进而调节脂类和碳水化合物的代谢,促进 ATP 生成,使细胞能量得以恢复^[10]。AMPK 活化后可抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)介导的炎症反应、增加核因子 E₂ 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶(HO)-1 的表达进而调节抗氧化酶的表达,发挥抗炎、抗氧化应激作用^[11]。MAFLD 肝脏脂质沉积和炎症等因素导致 AMPK 活性降低^[12],而活化该通路可通过调控脂类合成、脂肪酸氧化等途径改善 MAFLD 脂质代谢,并发挥抗炎、抗氧化作用^[13]。

MAFLD 属于中医“肝癖”“胁痛”“积聚”等范畴,主要病因病机为饮食不节、劳逸失常或情志所伤损伤肝脾,肝郁脾虚,气机运行不畅,水湿痰饮聚集,日久成痰化热,病入血分,损伤肝络,发为脂肪肝^[14],故应治以活血化瘀,行气散结。血府逐瘀汤(XFZYT)是活血化瘀治法的代表性方剂之一,出自清代王清任的《医林改错》,由桃仁、红花、地黄、当归、牛膝、赤芍、枳壳、甘草、川芎、桔梗、柴胡组成^[15],主要功效为活血化瘀,辅以行气散结。近年来,临床和动物实验均发现该药具有改善 MAFLD 的作用^[16-19],但该作用是否与激活 AMPK 有关尚不清楚。因此,本研究采用喂饲高胆固醇饲料(HCD)诱导 MAFLD 大鼠模型,给予 XFZYT 治疗,观察其对 MAFLD 疗效及 AMPK 相关信号通路的影响,以揭示其作用机制,为其用于 MAFLD 治疗提供依据。

1 材料

1.1 动物 35 只 8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重 200~210 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(辽)2020-0001。将大鼠置于标准环境饲养,通风良好,12 h 昼夜节律,室温 20~25 °C、相对湿度 40%~70%。

1.2 伦理 本课题实验方案经河北中医药大学动物实验伦理委员会审核批准(批准号 DWLL202203134)。

1.3 药品及试剂 红花、川芎、枳壳、炙甘草(河北仁心药业有限公司,批号分别为 13125016、02225011、24121809、05725011),北柴胡、炒桃仁、赤芍、当归、生地黄、桔梗(国药乐仁堂河北药业有限公司,批号分别为 25031105、25010901、25040107、25050814、24112906、2503034),牛膝(河北康益强药业有限公司,批号 25060401),由河北中医药大学郭秋红教授鉴定为正品;二甲双胍(石家庄欧意药业有限公司,批号 ACA5443);胆固醇、丙硫氧嘧啶

(上海麦克林生化科技股份有限公司,货号分别为 C6213、P815128);胆酸钠(北京奥博星生物技术有限公司,货号 01-144);HCD(河北医科大学监制);色谱纯甲醇、乙腈、甲酸、丙醇、水(美国 Fisher 公司);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆固醇(TC)、TG、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号分别为 C009-2-1、C0010-2-1、A111-1-1、A110-1-1、A020-2、A112-1-1、A001-3、A003-1、A007-1-1、A006-2-1);肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,货号分别为 EK382、EK306、EK301B);兔抗鼠一抗 HO-1、Nrf2(南京巴傲得生物科技有限公司,货号分别为 BS6626、BS1258);兔抗鼠一抗 AMPK、磷酸化(p)-AMPK、p-NF- κ B 和山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 辣根过氧化物酶(HRP)二抗(上海泊湾生物科技有限公司,货号分别为 CY5326、CY6029、CY6367、AB0101);兔抗鼠一抗 NF- κ B(江苏亲科生物有限公司,货号 AF5006);兔抗鼠一抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(南京赛戈巍生物科技有限公司,货号 52902);苏木素染色液、伊红染色液(珠海贝索生物技术有限公司,货号分别为 BA4097、BA4098),油红 O 染色液(北京索莱宝科技有限公司,货号 G1262)。

1.4 仪器 UHPLC-Exploris 240 型质谱仪、Varioskan LUX 型多功能微孔板读数仪(美国 Thermo Fisher 公司);ExionLC AD 型液相色谱系统(上海爱博才思分析仪器贸易有限公司);HSS T3 型色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m, 美国 Waters 公司);LNG-T88 型台式快速离心浓缩干燥器(太仓华美生化仪器厂);Centrifuge 5430R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);Fusion FX5 Spectra 型多功能成像系统(法国 Vilber Lourmat 公司);BX51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司);PowerPac basic 型电泳仪电源、Mini-PROTRAN Tetra 型小型垂直电泳槽、小型 Trans-Blot 型湿转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 中药药液制备 按北柴胡 3 g、炒桃仁 12 g、红花 9 g、炙甘草 6 g、牛膝 9 g、桔梗 4.5 g、赤芍 6 g、枳壳 6 g、当归 9 g、川芎 4.5 g、生地黄 9 g 配齐药物,药材在 500 mL 水中浸泡 30 min,用沸水煎煮 2 次,

每次30 min,然后合并滤液,浓缩至相当于XFZYT生药质量浓度 $2.25\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$,冷却后, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 成分-靶点-疾病网络构建 在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmsp.com>)预测上述成分的活性成分及其对应的作用靶点,合并剔重后利用Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)数据库,将限定物种设置为人类,继而对靶点名称进行转换,实现统一。在数据库GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>)中以“non-alcoholic fatty liver disease”“metabolic associated fatty liver disease”为关键词检索相关基因,并对各数据库的检索到相关靶点进行合并和剔重。使用微生信中的集合运算Venn(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)将上述中药复方调控网络得到的药物靶点和疾病靶点取交集,绘制韦恩图。将交集靶点上传至Cytoscape3.7.2软件中,构建中药复方调控网络图,实现作用机制可视化。

2.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将交集靶点上传至STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>),将物种设置为人,连接评分 >0.900 ,排除游离节点,构建PPI网络图。再将其导入Cytoscape3.7.2软件中,根据度值(Degree)的排序,前30位即治疗的核心基因。

2.2.3 基因本体(GO)生物功能与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路分析 将在PPI网络中得到的核心靶点导入DAVID数据库,进行GO分类富集分析,包括细胞组分(CC)、生物过程(BP)和分子功能(MF);以及KEGG通路富集分析。根据基因数目排序,选取GO分类富集分析3个聚类分析前10的条目;根据富集在通路上的基因数目,由大到小进行排序,选取基因数目前20的KEGG通路,使用微生信网站(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对二者数据进行可视化处理。

2.3 动物实验

2.3.1 造模、分组及给药 大鼠随机分为正常组(CON组)、模型组(MOD组)、血府逐瘀汤低剂量组(XFZYT-L组)、血府逐瘀汤高剂量组(XFZYT-H组)及二甲双胍组(MET组),每组7只。适应性喂养7 d后,CON组继续给予基础饲料喂养,其余4组给予HCD喂养,共4周。HCD喂养2周后,依据《中药药理研究方法学》^[20]中大鼠和人的临床等效剂量折算公式分别计算XFZYT-L组和MET组给药剂

量,XFZYT-H组的给药剂量取XFZYT-L组的2倍。XFZYT-L、XFZYT-H组和MET组分别给予XFZYT $2.4\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和二甲双胍($150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃至实验结束。CON组和MOD组给予等容量生理盐水代替。

2.3.2 标本采集 末次给药结束后12 h禁食不禁水,称体质量后麻醉,经腹主动脉取血,采用颈椎脱位法处死大鼠。全血于室温静置待其充分凝固,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ (离心半径12.3 cm)条件下离心15 min,收集上清用于指标检测。取出肝组织,冷生理盐水冲洗,吸干水分后称质量,计算肝指数(肝指数=肝质量/体质量 $\times 100\%$)^[21]。取肝脏右叶相同部位组织部分放入4%多聚甲醛固定,用于病理组织学检查,部分放入液氮中冷冻,用于免疫荧光检测;其余肝组织分装于冻存管中, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.3.3 血清生化指标检测 按试剂盒说明检测血清中AST、ALT、SOD、CAT活性,及TC、TG、LDL、HDL、MDA、GSH含量。

2.3.4 肝脏生化指标检测 制备肝组织匀浆,按照试剂盒内说明书进行操作,检测肝脏TC、TG水平。

2.3.5 肝脏组织形态学检测 取固定好的肝组织,石蜡包埋切片,分别进行苏木素-伊红(HE)染色及油红O染色,于显微镜下观察肝脏组织形态学变化并采集图像分析。

2.3.6 肝脏二氢乙锭(DHE)染色 取冷冻的肝组织切片厚度为 $10\text{ }\mu\text{m}$,用二氢乙锭溶液在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光的条件下培养30 min,随后进行4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色,最后利用荧光显微镜对切片进行观察和拍照。

2.3.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝脏中AMPK相关通路蛋白表达 提取肝组织中的总蛋白,进行蛋白定量和制备蛋白样品。将肝组织蛋白样本在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶上进行电泳、转膜,膜浸于封闭液(含5%脱脂奶粉的TBST)中室温封闭2 h,用稀释后的HO-1、Nrf2、NF- κ B、p-NF- κ B、AMPK、p-AMPK(1:1 000)、GAPDH(1:5 000),一抗 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,随后加入二抗(1:5 000),室温孵育90 min,将膜浸于发光液中,避光显色,用Image J软件分析条带灰度值。

2.4 MAFLD大鼠血清代谢组学分析

2.4.1 色谱条件 制备好的样本经HSS T3色谱柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$)分离后进入质谱检测。流动相A为含0.1%甲酸的水-乙腈(95:5)溶液,流动相B为含0.1%甲酸的乙腈-异丙醇-水(47.5:47.5:5)

溶液,流速为 $0.40\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,柱温为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.4.2 质谱条件 质谱信号采集采用正负离子扫描模式,质量扫描范围为 $m/z\ 70\sim 1\ 050$ 。鞘气流速为 60 psi ($1\text{ psi}\approx 6.895\text{ kPa}$),辅助气流速为 20 psi ,辅助气加热温度为 $350\text{ }^{\circ}\text{C}$,毛细管温度为 $320\text{ }^{\circ}\text{C}$,正模式离子喷雾电压为 $3\ 400\text{ V}$,负模式离子喷雾电压为 $-3\ 000\text{ V}$,归一化的碰撞能为 $20、40、60\text{ eV}$ 循环碰撞能。一级质谱分辨率 $60\ 000$,二级质谱分辨率 $15\ 000$,采用DDA模式采集数据。

2.4.3 代谢物鉴定 使用 Progenesis QI (Waters Corporation, Milford, USA)进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐;同时将MS和MSMS质谱信息与代谢公共数据库HMDB (<http://www.hmdb.ca/>)和Metlin (<https://metlin.scripps.edu/>)及美吉生物自建库进行匹配,得到代谢物信息。

2.4.4 通路分析 将预处理后的数据矩阵进行分析,采用R语言中的ropls包(Version1.6.2)对其进行主成分分析(PCA)和正交最小偏二乘法-判别分析(OPLS-DA),并使用7次循环交互验证来评估模型的稳定性。显著差异代谢物的选择基于OPLS-DA模型得到的变量权重值(VIP) >1 和student's t 检验 $P<0.05$ 来确定显著差异代谢物。差异代谢物通过KEGG数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>)进行的代谢通路注释,获得差异代谢物参与的通路。Python软件包scipy.stats进行通路富集分析,并通过Fisher精确检验获得与实验处理最相关的生物学途径。

2.5 统计学方法 使用IBM SPSS 27.0软件进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据先进行正态性检验和方差齐性检验,若符合则采用单因素方差分析(One-way ANOVA),Tukey's HSD进行多重分析,若方差不齐则采用Welch ANOVA校正,并采用Dunnett's T_3 进行多重分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 XFZYT治疗MAFLD的网络药理学分析

3.1.1 XFZYT成分-靶点-疾病关系网络的构建 通过TCMSP、Uniprot数据库,共获得195种药物潜在活性成分,254个靶点基因;通过GeneCards、OMIM数据库获得1 336个疾病靶点,经Venn分析得93个交集靶点,构建成分-靶点-疾病关系网络,其中包含了206个节点和837条边。调控网络的构建更加直观反映XFZYT治疗MAFLD具有多成分、多靶点的特点。见增强出版附加材料。

3.1.2 XFZYT治疗MAFLD的PPI网络的构建 结果显示共有80个节点、430条边。Degree值排名前15的靶点分别是肿瘤蛋白p53(TP53)、TNF- α 、IL-6、蛋白激酶B(Akt)1、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、信号转导及转录激活因子(STAT)3、热休克蛋白90 α 家族A类成员1(HSP90AA1)、IL-1 β 、 γ 干扰素(IFN- γ)、IL-10、趋化因子2(CCL2)、CXC基序趋化因子配体8(CXCL8)、MYC、缺氧诱导因子1 α (HIF1A)、基质金属蛋白酶(MMP)-9。见增强出版附加材料。

3.1.3 XFZYT治疗MAFLD的GO和KEGG分析 使用DAVID数据库对得到的93个交集靶点进行GO富集和KEGG通路分析。GO富集分析得到2 209个BP条目,涉及RNA聚合酶II启动子转录的正调控、基因表达的正向调控、凋亡过程的负调控等过程;70条CC条目,涉及细胞质、细胞核、细胞质膜、细胞外隙等成分;115条MF条目,涉及蛋白结合、酶结合、DNA结合、蛋白激酶绑定等功能。根据基因数目排序,绘制3个聚类分析前10的条目。KEGG分析得到143个条目,筛选COUNT数目20个的通路,输入微生信网络,见增强出版附加材料。

3.2 XFZYT治疗MAFLD的动物实验

3.2.1 XFZYT对MAFLD大鼠一般情况的影响 在整个实验期间,CON组的大鼠精神状态良好,体毛致密光滑,MOD组大鼠的精神状态欠佳,毛发枯黄无光泽,脱落明显,活动能力下降,而XFZYT和二甲双胍给药后大鼠的毛色和活动能力较MOD组明显改善。

3.2.2 XFZYT对MAFLD大鼠血清血脂及肝功水平的影响 与CON组比较,MOD组血清TC、TG、LDL、AST、ALT水平明显升高,HDL含量明显降低($P<0.05$);与MOD组比较,经XFZYT和MET治疗后,血清TC、TG、LDL、AST、ALT水平明显降低,而HDL水平升高,其中XFZYT-H和MET组的疗效明显($P<0.05$)。见表1。

3.2.3 XFZYT对MAFLD大鼠肝脏脂质水平的影响 肉眼观察,CON组大鼠的肝脏呈红褐色,表面光滑,质地柔软有弹性;MOD组大鼠的肝脏呈淡红色,质脆,体积稍大;与MOD组比较,接受XFZYT和MET治疗大鼠的肝脏颜色、外观和质地均有不同程度的改善。油红O染色法显示,CON组细胞核呈蓝色,无明显红色脂滴,MOD组可以观察到大量颗粒状脂滴;与MOD组比较,XFZYT组和MET组的肝细胞脂滴堆积明显减少,见图1。与CON组比

表1 XFZYT对MAFLD大鼠血清血脂及肝功水平的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

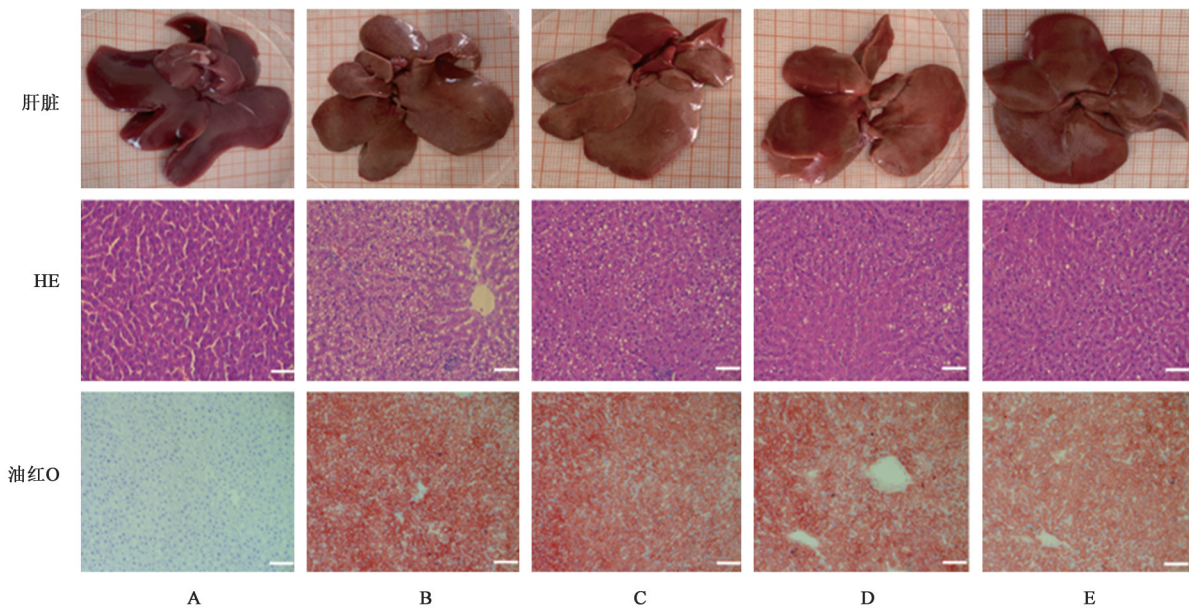
Table 1 Effect of XFZYT on serum levels of blood lipid and liver function in MAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL/mmol·L ⁻¹	LDL/mmol·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹
CON组		1.33±0.12	0.34±0.06	0.33±0.08	0.13±0.10	28.75±7.09	2.97±1.65
MOD组		3.39±0.42 ¹⁾	0.85±0.21 ¹⁾	0.17±0.02 ¹⁾	1.47±0.31 ¹⁾	96.39±38.29 ¹⁾	27.53±15.87 ¹⁾
XFZYT-L组	2	2.57±0.1 ²⁾	0.43±0.18	0.23±0.02 ²⁾	1.08±0.16	59.79±20.30	10.55±3.45 ²⁾
XFZYT-H组	4	2.45±0.14 ²⁾	0.38±0.07 ²⁾	0.30±0.07 ²⁾	0.89±0.53 ²⁾	43.43±25.43 ²⁾	8.15±6.28 ²⁾
MET组	0.15	2.28±0.29 ²⁾	0.34±0.09 ²⁾	0.33±0.07 ²⁾	0.92±0.22 ²⁾	46.51±20.57	8.95±3.39 ²⁾

注:与CON组比较¹⁾P<0.05;与MOD组比较²⁾P<0.05(表2-表5同)

较,MOD组肝脏组织中TC、TG水平及肝指数明显升高(P<0.05);与MOD组比较,XFZYT-H组和

MET组TC、TG水平及肝指数明显降低,差异有统计学意义(P<0.05)。见表2。



注:A.CON组;B.MOD组;C.XFZYT-L组;D.XFZYT-H组;E.MET组(图2、图3同)

图1 XFZYT对MAFLD大鼠肝脏组织学变化的影响(HE、油红O,×200)

Fig. 1 Effect of XFZYT on histomorphology of liver of MAFLD rats (HE, oil red O, ×200)

表2 XFZYT对MAFLD大鼠肝指数及肝脏脂质的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 2 Effect of XFZYT on liver indices and liver lipids in MAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肝指数	TC/mmol·g ⁻¹	TG/mmol·g ⁻¹
CON组		2.90±0.03	0.16±0.01	0.34±0.08
MOD组		4.32±0.02 ¹⁾	0.59±0.06 ¹⁾	1.03±0.19 ¹⁾
XFZYT-L组	2	3.86±0.03	0.45±0.10	0.75±0.04 ²⁾
XFZYT-H组	4	3.77±0.17 ²⁾	0.43±0.06 ²⁾	0.70±0.07 ²⁾
MET组	0.15	3.54±0.02 ²⁾	0.40±0.06 ²⁾	0.66±0.12 ²⁾

3.2.4 XFZYT对MAFLD大鼠肝脏病理损伤的影响 肝组织HE染色显示,CON组的肝小叶结构正常,肝细胞结构完整,排列紧密,而MOD组肝小叶

结构被破坏,肝细胞形态异常,肿胀增大,出现脂肪空泡和炎症细胞浸润。XFZYT组和MET组治疗后,肝细胞受损显著改善,脂质沉积和炎症细胞浸润明显减少。见图1。

3.2.5 XFZYT对MAFLD大鼠血清中炎症细胞因子的影响 与CON组比较,MOD组的IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平明显升高,差异有统计学意义(P<0.05);与MOD组比较,XFZYT-H组IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平均明显降低,差异有统计学意义(P<0.05),XFZYT-L组IL-6水平明显降低,差异有统计学意义(P<0.05),MET组IL-1 β 水平明显降低,差异有统计学意义(P<0.05)。见表3。

3.2.6 XZFYD对MAFLD大鼠血清氧化应激指标的影响 与CON组比较,MOD组的SOD、CAT活

表3 XFZYT对MAFLD大鼠血清中炎症细胞因子含量的影响
($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 3 Effect of XFZYT on serum levels of inflammatory cytokines in MAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-6	TNF- α
CON组		55.28±13.01	76.22±15.31	5.36±2.04
MOD组		119.41±21.74 ¹⁾	99.15±4.90 ¹⁾	14.74±1.11 ¹⁾
XFZYT-L组	2	88.64±6.09	80.53±8.74 ²⁾	13.03±1.27
XFZYT-H组	4	66.13±20.78 ²⁾	79.38±9.86 ²⁾	10.94±2.35 ²⁾
MET组	0.15	67.44±18.99 ²⁾	86.46±8.87	13.36±0.93

性和血清GSH含量明显降低($P<0.05$),血清MDA含量明显增加($P<0.05$);与MOD组比较,XFZYT各给药组SOD活性、CAT活性和GSH含量明显增加($P<0.05$),MDA含量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表4。

3.2.7 XFZYT对MAFLD大鼠肝脏ROS的影响

在肝脏ROS切片中,与CON组比较,MOD组具有更高的荧光强度。经过XFZYT和MET干预后,荧光强度显著降低,这表明XFZYT和MET都可以减少肝脏中ROS的产生。见图2。

表4 XFZYT对MAFLD大鼠血清中氧化应激指标水平的影响($\bar{x}\pm s, n=7$)

Table 4 Effect of XFZYT on serum levels of oxidative stress indicators levels in MAFLD rats ($\bar{x}\pm s, n=7$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	CAT/U·mL ⁻¹	GSH/ μ mol·L ⁻¹	MDA/ μ mol·L ⁻¹
CON组		204.93±21.26	35.36±10.91	37.01±16.81	0.98±0.29
MOD组		136.82±25.00 ¹⁾	3.79±2.65 ¹⁾	2.41±1.39 ¹⁾	2.16±0.38 ¹⁾
XFZYT-L组	2	179.59±21.96 ²⁾	19.85±4.60 ²⁾	13.58±2.34 ²⁾	1.27±0.24 ²⁾
XFZYT-H组	4	197.11±41.02 ²⁾	21.50±9.69 ²⁾	16.30±5.54 ²⁾	1.16±0.30 ²⁾
MET组	0.15	179.23±8.42 ²⁾	24.11±16.63	21.13±11.51 ²⁾	1.20±0.23 ²⁾

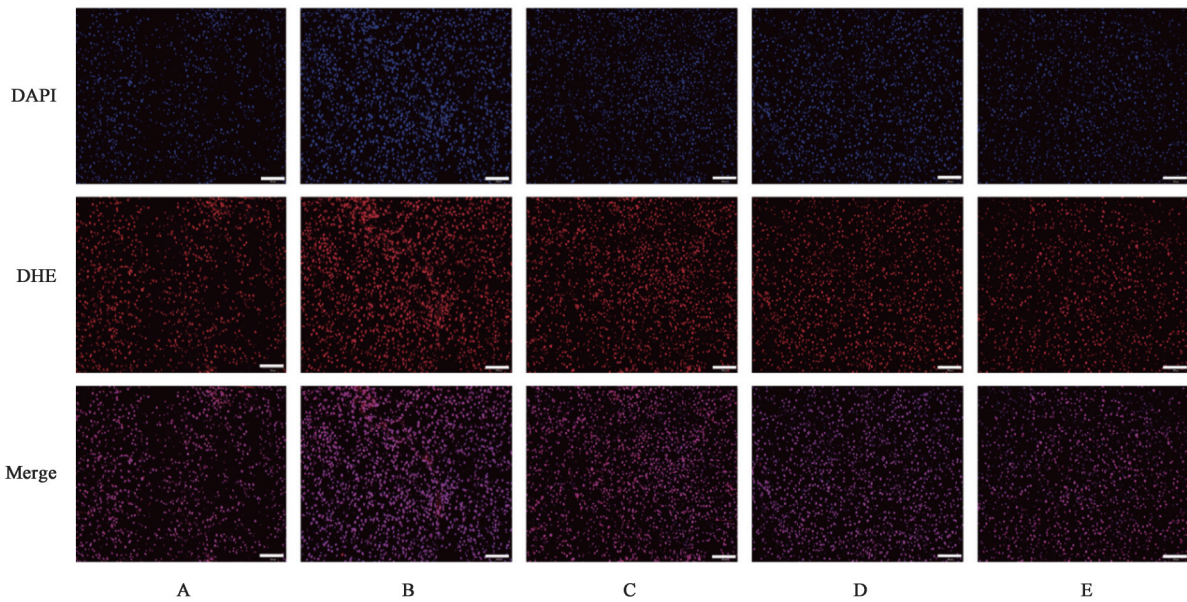


图2 XFZYT对MAFLD大鼠肝脏ROS的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 2 Effect of XFZYT on ROS of liver of MAFLD rats (IF, ×200)

3.2.8 XFZYT对MAFLD大鼠肝脏AMPK相关信号通路蛋白表达的影响 与CON组比较,MOD组p-AMPK、Nrf2和HO-1蛋白表达明显下降,p-NF- κ B表达明显升高($P<0.05$);与MOD组比较,XFZYT组和MET组的p-AMPK、Nrf2和HO-1蛋白表达明显升高($P<0.05$),XFZYT-H组、MET组p-NF- κ B表达明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表5、图3。

3.3 XFZYT对MAFLD大鼠血清代谢组学分析

3.3.1 代谢轮廓分析 各组大鼠血清的TIC见增强出版附加材料。结果显示,各组血清谱图的峰形及峰面积有一定差异,表明大鼠体内的代谢轮廓有所改变,部分代谢物水平发生变化。PCA结果显示,CON组与MOD组代谢物分布明显分离,表明MOD组大鼠血清代谢物较CON组发生明显改变。同时,XFZYT组与MOD组也有较大差别。各组间区分明

表 5 XFZYT 对 MAFLD 大鼠肝脏组织中 AMPK 相关信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of XFZYT on expression of AMPK pathway protein in liver tissue of MAFLD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HO-1/GAPDH	Nrf2/GAPDH	p-NF-κB/NF-κB	p-AMPK/AMPK
CON 组		1.02±0.02	0.87±0.02	0.74±0.02	1.11±0.08
MOD 组		0.67±0.01 ¹⁾	0.46±0.01 ¹⁾	1.49±0.05 ¹⁾	0.73±0.06 ¹⁾
XFZYT-L 组	2	0.97±0.01	0.79±0.04 ²⁾	1.14±0.05	1.03±0.05 ²⁾
XFZYT-H 组	4	1.04±0.08 ²⁾	0.68±0.02 ²⁾	1.03±0.01 ²⁾	1.06±0.01 ²⁾
MET 组	0.15	1.05±0.14 ²⁾	0.87±0.05 ²⁾	0.99±0.01 ²⁾	1.06±0.02 ²⁾

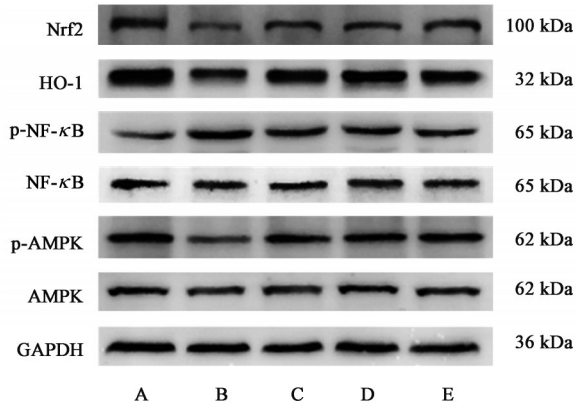


图 3 各组大鼠肝组织 AMPK 相关信号通路蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of AMPK-related signaling pathway protein expressions in liver tissues of each group of rats

显, 聚集程度良好, 各组的代谢物水平均发生了明显变化。质量控制样本聚集, 仪器和样本稳定性良

好。置换检验得到正、负离子模式所有样本的 Q^2 (模型预测能力) 均低于 R^2 (模型解释度), Q^2 回归线与纵坐标轴交点 < 0 , 表明模型无过拟合现象并且可解释度与预测能力良好^[22]。见增强出版附加材料。

3.3.2 差异代谢物筛选 基于 PLS-DA 结果, 按 VIP 值 ≥ 1 、差异倍数 (FC) > 1.5 及 $P < 0.05$ 筛选差异代谢物。CON 组与 MOD 组间共有 511 种差异代谢物, 主要为脂肪酰类、羧酸及其衍生物、甘油磷脂、异戊二烯脂类、类固醇类物质等, 其中 231 种代谢物表达上调, 280 种代谢物表达下调。MOD 组与 XFZYT-L 组间共有 94 种差异代谢物, 主要为羧酸及其衍生物、有机含氧化合物、类固醇类物质、嘧啶核苷类、脂肪酰类等。其中 51 种代谢物表达上调, 43 种代谢物表达下调。其中, XFZYT 干预使 11 个代谢物含量明显改变, 见表 6 及增强出版附加材料。

表 6 XFZYT 对 MAFLD 大鼠潜在差异代谢物的影响

Table 6 Effect of XFZYT on potential differential metabolites in MAFLD rats

代谢物(英文名称)	代谢物(中文名称)	t_R/min^{-1}	m/z	加合式	分子式	调控趋势	HMDB ID
8-Deoxylactucin	8-去氧山莴苣苦素	5.89	261.11	M+H-H ₂ O, M+H	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	上升	HMDB0301858
Cer(d18:1/24:1(15Z))	-	6.85	692.62	M+FA-H	C ₄₂ H ₈₁ NO ₃	上升	HMDB0004953
Kynostatin 272	犬根抑素 272	7.46	702.22	M+Cl	C ₃₃ H ₄₁ N ₅ O ₆ S ₂	上升	HMDB0253811
8-Hydroxyluteolin 4'-methyl ether 8-glucoside-3'-sulfate	8-羟基木犀草素 4'-甲醚 8-葡萄糖苷-3'-硫酸盐	5.45	557.06	M-H	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₅ S	上升	HMDB0037333
(3-hydroxy-7-azaspiro[3.5]nonan-7-yl)-(3-methylfuran-2-yl)methanone	(3-羟基-7-氮杂螺[3.5]壬-7-基)-(3-甲基呋喃-2-基)甲酮	3.61	250.14	M+H	C ₁₄ H ₁₉ NO ₃	上升	-
Glucocapparin	白花菜苷	5.24	663.02	2M-H	(C ₈ H ₁₄ NO ₉ S ₁)'	上升	HMDB0038429; HMDB0304680
N-Sulfo-D-glucosamine	氨基葡萄糖硫酸钠盐	0.68	240.02	M-H ₂ O-H	C ₆ H ₁₃ NO ₈ S	上升	HMDB0001481
Dimethylellagic acid glucuronide	二甲基鞣花酸葡萄糖醛酸苷	5.24	524.10	M+NH ₄ , M+Na, M+H	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₄	上升	HMDB0251398
Malathion	马拉硫磷	5.97	329.03	M-H	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	上升	HMDB0014910
Asp Ile Ser	天冬氨酸、异亮氨酸、丝氨酸	2.25	334.16	M+H	C ₁₃ H ₂₃ N ₃ O ₇	下降	-
Fagomine	荞麦碱	0.70	148.10	M+H	C ₆ H ₁₃ NO ₃	下降	HMDB0033453

3.3.3 通路与功能分析 对 KEGG 注释结果进行富集分析, 获得差异代谢物富集较多的通路。

CON 组和 MOD 组的差异代谢物主要集中在甘油磷脂代谢、花生四烯酸代谢、环腺苷酸 (cAMP) 信号通

路等173条通路;MOD组与XFZYT-L组的差异代谢物主要集中在核苷酸代谢、甘油磷脂代谢、IR等104条通路。对潜在生物标志物所在通路进一步分析可知,XFZYT参与影响的主要通路为甘油酯代谢、胆固醇代谢、IR等28条通路。见增强出版附加材料。

4 讨论

随着生活水平的提高,MAFLD发病率逐年上升,由于其预后较差且无有效治疗药物,社会危害日益增加。中医理论中,MAFLD的形成与“气滞”“血瘀”“痰湿”等致病因素密切相关^[23]。其中,气滞血瘀为其发生发展的重要病理因素,因此,理气活血是主要治疗原则。XFZYT源自清代医家王清任的《医林改错》,具有疏肝理气、活血化瘀之功效,临床上应用其治疗MAFLD取得了良好的疗效^[17-18],并有效降低患者的血糖及血脂水平^[24-26]。现代药理研究表明,XFZYT可有效改善血脂紊乱及肝脏脂质沉积情况,但具体治疗机制尚未清晰^[16,19]。因此,本研究采用网络药理学结合动物实验方法对XFZYT治疗MAFLD的具体机制进行了探究,结果显示XFZYT可通过激活AMPK,进而调节下游炎症和氧化应激相关信号通路发挥肝保护作用。

网络药理学是一门基于系统生物学理论,通过生物系统网络分析进行多靶点药物分子设计,并针对特定信号节点进行筛选的新兴学科。中医复方具有多靶点、多层次的特点,其整体性、系统性与全面性与网络药理学的研究理念高度契合,因此网络药理学适用于中药复方药理机制的研究^[27]。本研究中,应用网络药理学对XFZYT治疗MAFLD的潜在靶点进行了筛选。结果显示AMPK信号通路在KEGG通路分析中显著富集且排名较为靠前,同时AMPK信号通路是多个核心靶点,如Akt1、STAT3、HIF1A等的关键上游调控因子,提示其为XFZYT治疗MAFLD的关键靶点。结合文献分析,AMPK信号通路参与代谢与炎症的调控,影响着MAFLD的进程,是治疗MAFLD的核心靶点^[28]。综合上述结果,AMPK信号通路可能是XFZYT改善MAFLD的关键靶点。

代谢紊乱是诱发MAFLD重要基础之一,因此,选用MAFLD动物模型时更偏向于具有代谢失调基础的MAFLD动物模型,通常使用饮食诱导产生的代谢性疾病和肝脏病变^[29]。因此本研究通过饲喂HCD构建了MAFLD大鼠模型。结果显示给予HCD喂养的MAFLD大鼠模型中存在血脂紊乱、肝

脏损伤和肝功能异常,提示造模成功,与前人研究相符^[29]。经XFZYT治疗后可有效缓解脂质代谢异常,减轻肝脏损伤及肝功能异常,与唐浩等^[16]、郭宏雅等^[19]研究结果相同。炎症和氧化应激损伤反应是MAFLD的主要发病机制之一。脂肪积聚引发肝脏产生ROS^[30],ROS生成的增加导致TNF- α 、IL-1 β 和IL-6等炎性细胞因子释放^[31],加剧肝细胞炎症。同时ROS还会导致脂质过氧化物(如MDA)的累积,消耗GSH、SOD和CAT等抗氧化物,从而造成肝损伤。本研究结果显示HCD诱导的MAFLD大鼠出现了明显的炎症和氧化应激,经XFZYT治疗可有效缓解MAFLD大鼠的炎症反应,减轻氧化应激,提示XFZYT可通过抗炎、抗氧化应激对MAFLD大鼠发挥肝保护作用。

AMPK是公认的治疗代谢性疾病的靶点^[32],激活的AMPK可调节炎症和氧化应激反应^[33],减缓MAFLD疾病进程。NF- κ B和Nrf2是分别调节炎症和氧化应激反应的2个关键转录因子^[34-35],激活AMPK可抑制NF- κ B信号通路从而减少TNF- α 等某些炎症细胞因子的释放,同时可激活Nrf2、调节下游蛋白HO-1的表达^[36],进而增加SOD和CAT等抗氧化酶的表达以阻止氧化应激和组织损伤^[37]。在本研究中,XFZYT可提高AMPK并减少NF- κ B的磷酸化水平,上调Nrf2、HO-1的蛋白表达,进一步提示该药的抗炎、抗氧化应激作用可能是通过活化AMPK实现的。

为进一步从代谢水平探究XFZYT治疗MAFLD的机制,本研究应用非靶向代谢组学对XFZYT治疗前后MAFLD大鼠血清进行分析。结果表明,MOD组大鼠体内代谢物水平与CON组大鼠明显不同,提示MAFLD可导致大鼠体内代谢紊乱,经过XFZYT治疗后,部分代谢紊乱状态被纠正,KEGG通路富集结果显示主要集中在缓解IR,调控脂肪细胞因子、MAPK、NF- κ B等信号通路,影响脂肪细胞脂解的调控、B细胞受体信号通路、糖尿病并发症中的AGE/RAGE信号通路等20条通路。其中部分通路如胆固醇代谢、甘油酯代谢^[38]、IR^[39]、HIF-1信号通路^[40]等由AMPK直接调控,部分通路如脂肪消化与吸收、脂肪细胞脂解调控^[38]、糖尿病并发症中的AGE/RAGE信号通路、胰岛素分泌、碳水化合物消化与吸收^[41]、MAPK信号通路^[42]等间接受其影响,其代谢水平改变可能与AMPK信号通路的调节相关。其中HIF-1信号通路的变化,与网络药理学PPI核心靶点中的HIF1A相互呼应;HIF-1信

号通路在肝脏脂质代谢调节中不可或缺^[43],并且也参与肝细胞的炎症与纤维化进程^[44],在MAFLD的疾病进程中发挥着重要的影响;AMPK信号通路可通过多种途径调控HIF-1 α 活性^[45-47],强烈提示HIF-1可能为XFZYT治疗MAFLD另一重要靶点,在后续研究中可围绕HIF-1信号通路进一步探究。当然,本研究尚存在一些不足之处。网络药理学分析大多依赖前期实验结果,分析所得的结果大多为研究较为成熟的通路及药物成分,分析药物与疾病关联度有余而创新性不足。非靶向代谢组学在代谢物的定性与定量方面仍存在一定的局限性,可能忽略了某些未知的或低丰度的代谢物,且只对大鼠血清进行测定,只能反映全身代谢水平的变化而未聚焦于肝脏。其中AMPK信号通路主要在细胞内表达,在血清中含量极少,因此,本研究中血清代谢组学结果未能检测到AMPK的变化可能与此有关,后续实验将开展组织代谢组学以明确其机制。

综上所述,本研究根据网络药理学分析预设XFZYT治疗MAFLD的效果及潜在机制,并通过动物实验进行验证,证明了XFZYT治疗MAFLD的大鼠具有良好的效果,且可能通过调节AMPK信号通路发挥作用;同时应用非靶向代谢组学对大鼠血清进行分析,探究MAFLD大鼠被XFZYT治疗前后血清代谢物水平变化与AMPK信号通路是否相关,间接证明XFZYT可能通过调节AMPK信号通路治疗MAFLD,同时探究XFZYT治疗MAFLD其他潜在机制。本研究为XFZYT治疗MAFLD的临床应用提供了理论依据和实验支持。未来将进一步设计实验,深入探究XFZYT的分子调控机制,以期为MAFLD的治疗提供新的思路及药物选择。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] RINELLA M E, NEUSCHWANDER-TETRI B A, SIDDIQUI M S, et al. AASLD practice guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2023, 77(5):1797-1835.
- [2] 范建高,徐小元,南月敏,等. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2024, 27(4):494-510.
FAN J G, XU X Y, NAN Y M, et al. Guidelines for the prevention and treatment of metabolic dysfunction-associated (non-alcoholic) fatty liver disease (version 2024)[J]. *J Pract Hepatol*, 2024, 27(4):494-510.
- [3] YOUNOSSI Z M, GOLABI P, PAIK J M, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)

- and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review[J]. *Hepatology*, 2023, 77(4):1335-1347.
- [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] LOU T W, YANG R X, FAN J G. The global burden of fatty liver disease: The major impact of China [J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2024, 13(1):119-123.
 - [6] 张璐璐,张建军,张秀平,等. 代谢相关脂肪性肝病的中医研究进展[J]. *世界中医药*, 2025, 20(5):860-866.
ZHANG L L, ZHANG J J, ZHANG X P, et al. Advances in traditional Chinese medicine research on metabolism-associated fatty liver disease [J]. *World Chin Med*, 2025, 20(5):860-866.
 - [7] YANG K, SONG M. New insights into the pathogenesis of metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD): Gut-liver-heart crosstalk [J]. *Nutrients*, 2023, 15(18):3970.
 - [8] PARTHASARATHY G, REVELO X, MALHI H. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: An overview [J]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(4):478-492.
 - [9] PERLA F M, PRELATI M, LAHORATO M, et al. The role of lipid and lipoprotein metabolism in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Children*, 2017, 4(6):46.
 - [10] MUNTEANU C, SCHWARTZ B. The effect of bioactive aliment compounds and micronutrients on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(4):903.
 - [11] PETSOUKI E, CABRERA S N S, HEISS E H. AMPK and NRF2: Interactive players in the same team for cellular homeostasis? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 190:75-93.
 - [12] QIU B, LAWAN A, XIROUCHAKI C E, et al. MKP1 promotes nonalcoholic steatohepatitis by suppressing AMPK activity through LKB1 nuclear retention [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1):5405.
 - [13] MOTTILLO E P, DESJARDINS E M, CRANE J D, et al. Lack of adipocyte AMPK exacerbates insulin resistance and hepatic steatosis through brown and beige adipose tissue function [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1):118-129.
 - [14] 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗专家共识(2025年)[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2025, 33(4):339-350.
Chinese Association of Integrative Medicine Digestive Diseases Committee. Expert consensus on integrated traditional Chinese and western medicine diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease (2025) [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Dig*, 2025, 33(4):339-350.
 - [15] 王君,唐浩,尹艺晓,等. 血府逐瘀汤及其各提取部位对高脂饮食诱导的代谢相关脂肪性肝病小鼠肝脏代谢物的影响 [J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(8):62-71.
WANG J, TANG H, YIN Y X, et al. Effects of Xuefu Zhuyu decoction and its fractions on liver metabolites in mice with high-fat diet-induced metabolic associated fatty liver disease [J]. *Shanghai J Tradit Chin Med*, 2024, 58(8):62-71.

- [16] 唐浩,尹艺晓,刘伟,等. 血府逐瘀汤及其不同提取部位对高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病小鼠模型的影响[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(12): 2728-2737.
TANG H, YIN Y X, LIU W, et al. Effects of Xuefu Zhuyu decoction and its extracts on a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-fat diet[J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(12): 2728-2737.
- [17] 陈以甦,林彩文. 血府逐瘀胶囊治疗非酒精性脂肪性肝病临床疗效分析[J]. 北京中医药, 2013, 32(5): 379-380.
CHEN Y J, LIN C W. Analysis of the clinical efficacy of Xuefu Zhuyu capsule in treating non-alcoholic fatty liver disease[J]. Beijing J Tradit Chin Med, 2013, 32(5): 379-380.
- [18] 褚乙晓,杜进璇. 非酒精性脂肪性肝病中医辨证施治的效果研究[J]. 吉林中医药, 2023, 43(5): 561-565.
CHU Y X, DU J X. Study on the treatment effect of non-alcoholic fatty liver disease based on TCM syndrome differentiation[J]. Jilin J Chin Med, 2023, 43(5): 561-565.
- [19] 郭宏雅,付远飞,刘惠婷,等. 血府逐瘀汤与加味二陈汤对小鼠非酒精性脂肪肝的作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(12): 71-77.
GUO H Y, FU Y F, LIU H T, et al. Comparison of effect of Xuefu Zhuyutang and modified erchentang on nonalcoholic fatty liver in mice[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2020, 26(12): 71-77.
- [20] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2006: 1167-1168.
CHEN Q. Pharmacological Research Methods of Traditional Chinese Medicine[M]. 2nd edition. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 1167-1168.
- [21] ZHOU J, ZHANG N, ALDHAHRANI A, et al. Puerarin ameliorates nonalcoholic fatty liver in rats by regulating hepatic lipid accumulation, oxidative stress, and inflammation[J]. Front Immunol, 2022, 13: 956688.
- [22] 李康,吕田田,崔荣治,等. 基于血清代谢组学探讨青翘、老翘对急性肺损伤大鼠的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(18): 89-97.
LI K, LV T T, CUI R Q, et al. Investigation of mechanism of Qingqiao and Laoqiao on acute lung injury rats based on serum metabolomics[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(18): 89-97.
- [23] 张莉,季光. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识(2023)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2024, 32(1): 1-7.
ZHANG L, JI G. Expert consensus on traditional Chinese medicine diagnosis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease(2023)[J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2024, 32(1): 1-7.
- [24] 李汉生,鲁德甫,张娟. 血府逐瘀汤联合阿托伐他汀治疗2型糖尿病下肢血管病变临床疗效[J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(3): 67-69.
LI H S, LU D P, ZHANG J. Clinical efficacy of Xuefu Zhuyu decoction combined with atorvastatin in treatment of type 2 diabetes mellitus with lower extremity vascular disease[J]. J Hubei Univ Chin Med, 2022, 24(3): 67-69.
- [25] 吕萍. 血府逐瘀汤治疗糖尿病周围神经病变疗效及其与氧化应激的关系[J]. 陕西中医, 2017, 38(6): 705-707.
LU P. The Efficacy of Xuefu Zhuyu decoction in treatment of diabetic peripheral neuropathy and its relationship with Oxidative stress[J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2017, 38(6): 705-707.
- [26] 王崇权,任丽艳. 血府逐瘀汤联合他汀类药物治疗高脂血症的疗效分析[J]. 中国医药指南, 2019, 17(2): 145-146.
WANG C Q, REN L Y. Efficacy analysis of Xuefu Zhuyu decoction combined with statins in the treatment of hyperlipidemia[J]. Guide China Med, 2019, 17(2): 145-146.
- [27] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 309: 116306.
- [28] DEHNAVI S, KIANI A, SADEGHI M, et al. Targeting AMPK by statins: A potential therapeutic approach [J]. Drugs, 2021, 81(8): 923-933.
- [29] CHUA D, LOW Z S, CHEAM G X, et al. Utility of human relevant preclinical animal models in navigating NAFLD to MAFLD paradigm[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 14762.
- [30] ZHANG S, HE Y, SEN B, et al. Reactive oxygen species and their applications toward enhanced lipid accumulation in oleaginous microorganisms [J]. Bioresour Technol, 2020, 307: 123234.
- [31] BIAO Y, CHEN J, LIU C, et al. Protective effect of Danshen Zexie decoction against non-alcoholic fatty liver disease through inhibition of ROS/NLRP3/IL-1 β pathway by Nrf2 signaling activation[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 877924.
- [32] ZHANG S Y, LAM T K T. Metabolic regulation by the intestinal metformin-AMPK axis[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2851.
- [33] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(4): 255-272.
- [34] GREGORIO E D, COLELL A, MORALES A, et al. Relevance of SIRT1-NF- κ B axis as therapeutic target to ameliorate inflammation in liver disease [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3858.
- [35] XU L, NAGATA N, OTA T. Impact of glucoraphanin-mediated activation of Nrf2 on non-alcoholic fatty liver disease with a focus on mitochondrial dysfunction[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 5920.
- [36] ZOU Y, CHEN Z, SUN C, et al. Exercise intervention mitigates pathological liver changes in NAFLD zebrafish by activating SIRT1/AMPK/NRF2 signaling [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(20): 10940.
- [37] PENGNET S, SUMARITHUM P, PHONGNU N, et al. Naringin attenuates fructose-induced NAFLD progression in rats through reducing endogenous triglyceride synthesis and activating the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Front Pharmacol,

- 2022,13:1049818.
- [38] WANG Q, LIU S, ZHAI A, et al. AMPK-mediated regulation of lipid metabolism by phosphorylation[J]. Biol Pharm Bull, 2018,41(7):985-993.
- [39] WANG Y, RIJAL B, XU M, et al. Renal denervation improves vascular endothelial dysfunction by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling activation in a rat model of type 2 diabetes mellitus with insulin resistance[J]. Acta Diabetol, 2020, 57(10):1227-1243.
- [40] MOLDOGAZIEVA N T, MOKHOSOEV I M, TERENCEV A A. Metabolic heterogeneity of cancer cells: An interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK [J]. Cancers, 2020, 12(4):862.
- [41] ENTEZARI M, HASHEMI D, TAHERIAZAM A, et al. AMPK signaling in diabetes mellitus, insulin resistance and diabetic complications: A pre-clinical and clinical investigation[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 146:112563.
- [42] YUAN J, DONG X, YAP J, et al. The MAPK and AMPK signalings: Interplay and implication in targeted cancer therapy [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1):113.
- [43] ARAI T, TANAKA M, GODA N. HIF-1-dependent lipin1 induction prevents excessive lipid accumulation in choline-deficient diet-induced fatty liver[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):14230.
- [44] MESARWI O A, MOYA E A, ZHEN X, et al. Hepatocyte HIF-1 and intermittent hypoxia independently impact liver fibrosis in murine nonalcoholic fatty liver disease[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2021, 65(4):390-402.
- [45] FAUBERT B, BOILY G, IZREIG S, et al. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth *in vivo*[J]. Cell Metab, 2013, 17(1):113-124.
- [46] YU Z, WANG J, LI T, et al. Melatonin promotes diabetic wound healing by mediating mitochondrial function in endothelial cells through the AMPK/SIRT1/HIF-1 α pathway [J]. Tissue Cell, 2025, 95:102884.
- [47] CHEN S, YIN C, LAO T, et al. AMPK-HDAC5 pathway facilitates nuclear accumulation of HIF-1 α and functional activation of HIF-1 by deacetylating Hsp70 in the cytosol[J]. Cell Cycle, 2015, 14(15):2520-2536.

[责任编辑 周冰冰]