

• XXXX •

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS探究苓桂术甘颗粒治疗代谢相关脂肪性肝炎的药效物质基础

姚池雁^{1,2}, 李良³, 闫明³, 王振中¹, 章晨峰³, 李明^{3*}, 谢雪^{3*}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司, 南京中医药大学, 中药制药过程控制与智能制造技术全国重点实验室, 南京 211112; 2. 南京中医药大学康缘中药学院, 南京 210023;
3. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏省海洋药物和现代中药创制重点实验室, 江苏连云港 222047)

[摘要] 目的:系统鉴定苓桂术甘颗粒(LGZGG)中的主要化学成分,探究其治疗代谢相关脂肪性肝炎(MASH)的药效物质基础。方法:采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)对LGZGG的化学成分进行系统分析;运用网络靶标分析技术,构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络及“复方-疾病-成分-靶点网络”,预测LGZGG治疗MASH的潜在药效物质及核心作用靶点;采用大孔吸附树脂富集潜在药效物质,通过UPLC-Q-TOF-MS/MS分析富集部位LGZGG-50%乙醇洗脱部位(LGZGG-50)的成分组成。以高脂、高胆固醇、高果糖饲料连续喂养12周构建MASH小鼠模型,将模型小鼠随机分为正常组、模型组、阳性药组(MGL-3196, 1 mg·kg⁻¹)、LGZGG组(以生药计, 34 g·kg⁻¹)、LGZGG-50组(以生药计, 34 g·kg⁻¹),通过检测血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平,结合苏木素-伊红(HE)、天狼星红染色观察肝组织病理形态变化,评价LGZGG及其富集部位LGZGG-50治疗MASH的体内药效,并通过蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化(p)-AMPK、沉默信息调节因子2相关酶1(SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体α(PPARα)、肉碱棕榈酰转移酶1A(CPT1A)蛋白表达水平,验证核心靶点的调控作用。结果:从LGZGG中鉴定出83个化学成分,其中包含黄酮类20个,萜类13个,有机酸类17个,氨基酸类7个,糖苷类11个,核苷类、芳香类和生物碱类各3个,苯丙素类和糖类各2个,核酸类、甾体类各1个。网络靶标分析获得交集靶点134个,核心靶点包括SIRT1、PPARα、核转录因子-κB亚基1(NFκB1)、白细胞介素-6(IL-6)等,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集主要涉及AMPK、PPAR等信号通路,复方-疾病-成分-靶点网络拓扑分析发现LGZGG中抗MASH的潜在药效物质为黄酮类和萜类化合物。富集部位LGZGG-50中黄酮与萜类在正负离子模式下相对含量分别为74.00%和62.41%,表明LGZGG-50可有效富集总黄酮和总萜。体内药效结果显示,与模型组比较,LGZGG组、LGZGG-50组均能明显降低MASH小鼠体质量、肝质量、血清TG、GLU、ALT水平($P<0.05$),LGZGG还能显著升高HDL-C水平($P<0.01$),两组均可改善肝组织病理损伤;Western blot检测结果显示,与模型组比较,LGZGG组p-AMPK/AMPK、SIRT1、PPARα、CPT1A蛋白表达明显增加($P<0.05$, $P<0.01$),LGZGG-50组p-AMPK/AMPK、CPT1A蛋白表达显著增加($P<0.01$)。结论:LGZGG对MASH具有明显改善作用,其主要药效物质可能为黄酮类和萜类化合物,作用机制可能与调控AMPK/SIRT1/PPARα信号通路、改善肝组织脂质代谢及病理损伤有关。

[关键词] 苓桂术甘颗粒; 化学成分; 鉴定; 代谢相关脂肪性肝炎; 超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)

[中图分类号] R242;R575;O657 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(XXXX)XX-0001-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260462

[网络出版地址]

[网络出版日期] XXXX-XX-XX [增强出版附件] 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Investigation on Pharmacodynamic Material Basis of Linggui Zhugan Granules for Metabolic Associated Steatohepatitis Based on UPLC-Q-TOF-MS/MS

YAO Chiyan^{1,2}, LI Liang³, YAN Ming³, WANG Zhenzhong¹, ZHANG Chenfeng³, LI Ming^{3*}, XIE Xue^{3*}

(1. State Key Laboratory of Technologies for Chinese Medicine Pharmaceutical Process Control and Intelligent

[收稿日期] 2026-01-27

[基金项目] 江苏省基础研究计划自然科学基金——前沿引领技术基础研究专项(BK20232014)

[第一作者] 姚池雁,在读硕士,从事中药制药技术与产品开发的研究,E-mail:yaochiyan2023@163.com

[通信作者] * 谢雪,博士,高级工程师,从事中药药效物质基础与创新中药研发的研究,E-mail:0115jenny@163.com;

* 李明,硕士,高级工程师,从事天然药物研究与开发,E-mail:20223111@njucm.edu.cn

Manufacture, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd. & Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 211112, China; 2. Kanion School of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 3. Jiangsu Key Laboratory on Innovation for Marine Medicine and Modern Chinese Medicine, Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222047, China)

[Abstract] **Objective:** To systematically identify the main chemical components of Linggui Zhugan granules (LGZGG), and to explore the pharmacodynamic substance basis for the treatment of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH). **Methods:** The chemical components of LGZGG were systematically analyzed by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). The protein-protein interaction (PPI) network and "compound prescription-disease-component-target" network were constructed by network target analysis to predict the potential pharmacodynamic substances and core targets of LGZGG in the treatment of MASH. The potential pharmacodynamic substances were enriched by macroporous adsorption resin, and the chemical composition of the LGZGG-50% ethanol elution fraction (LGZGG-50) was analyzed by UPLC-Q-TOF-MS/MS. The mouse model of MASH was established by feeding a high-fat, high-cholesterol, and high-fructose diet for 12 weeks. Mice were randomly allocated into normal, model, positive drug (MGL-3196, $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), LGZGG (crude drug, $34\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), LGZGG-50 (crude drug, $34\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) groups. The levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in the serum were measured, and the pathological changes in the liver tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Sirius red staining. The *in vivo* efficacy of LGZGG and LGZGG-50 in the treatment of MASH was evaluated on the basis of the findings. The expression levels of adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), silent information regulator 2-related enzyme 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α), and carnitine palmitoyltransferase 1A (CPT1A) in the liver tissue were determined by Western blot to verify the regulatory effects of core targets. **Results:** A total of 83 chemical components were identified from LGZGG, including 20 flavonoids, 13 terpenoids, 17 organic acids, 7 amino acids, 11 glycosides, 3 nucleosides, 3 aromatics, 3 alkaloids, 2 phenylpropanoids, 2 sugars, 1 nucleic acid, and 1 steroid. A total of 134 common targets were obtained by network target analysis. The core targets included SIRT1, PPAR α , nuclear factor-kappa B subunit 1 (NF κ B1), and interleukin-6 (IL-6). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis revealed that the targets were mainly enriched in the AMPK, PPAR and other signaling pathways. The topological analysis of the "compound prescription-disease-component-target" network showed that the potential pharmacodynamic substances of LGZGG against MASH were flavonoids and terpenoids. The relative content of flavonoids and terpenes in LGZGG-50 were 74.00% and 62.41% in positive and negative ion modes, respectively, indicating that LGZGG-50 effectively enriched total flavonoids and total terpenoids. The results of *in vivo* efficacy showed that compared with the model group, LGZGG and LGZGG-50 reduced the body weight, liver weight, serum TG, GLU, and ALT levels of MASH mice ($P<0.05$), and LGZGG additionally increased the HDL-C level ($P<0.05$). Both groups alleviated the pathological damage in the liver tissue. The results of Western blot showed that compared with the model group, the protein levels of p-AMPK/AMPK, SIRT1, PPAR α , and CPT1A were up-regulated in the LGZGG group ($P<0.05$), and those of p-AMPK/AMPK and CPT1A were up-regulated in the LGZGG-50 group ($P<0.05$). **Conclusion:** LGZGG ameliorates MASH, with the main pharmacodynamic substances being flavonoids and terpenoids. The mechanism may be related to the regulation of AMPK/SIRT1/PPAR α signaling pathway, improvement of lipid metabolism, and alleviation of pathological damage in the liver tissue.

[Keywords] Linggui Zhugan granules; chemical component; identification; metabolic dysfunction-associated steatohepatitis; ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS)

苓桂术甘颗粒(LGZGG)是由苓桂术甘汤开发的现代制剂,系首个按中药注册分类3.1类及《古代经典名方目录》管理要求获批的复方制剂^[1]。传统临床临方调配汤剂,批次间药用物质差异较大,且煎煮过程中部分热敏性、挥发性等成分存在不可避免的含下降或损失^[2],成分间相互作用而出现沉淀或絮凝等现象致使有效成分损失^[3],临床用药的安全有效不能得到有效保障。苓桂术甘汤向LGZGG转化,通过系统研究明确生产工艺及关键工艺参数,既保证制剂与传统经典名方临床应用的

物质基础一致,又依托药材、饮片及制备全过程质量控制,来保障制剂批间质量稳定均一,为经典名方的现代化应用与临床安全有效提供重要支撑^[4]。虽然已有苓桂术甘汤的化学成分和药理作用的研究文献报道,但因其药材、饮片和制剂工艺并未经过严格控制,导致其物质基础代表性存在疑问。

代谢相关脂肪性肝炎(MASH),是代谢功能障碍相关性脂肪性肝病的一种亚型,典型病理特征为肝细胞脂肪变性、炎症和纤维化^[5]。目前临床有效治疗药物极为有限,仅有 resmetirom 获得美国食品

药品监督管理局批准。研究表明, LGZGG 能通过降低血脂水平、改善氧化应激及减轻炎症反应治疗 MASH^[6]。但目前对于 LGZGG 物质基础研究较薄弱, 其抗 MASH 的药效物质基础尚不明确, 故本研究采用超高效液相色谱-四级杆-飞行时间串联质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 对 LGZGG 的化学成分进行系统鉴定, 明确其化学成分, 通过网络靶标分析结合动物实验验证, 探究 LGZGG 对 MASH 模型小鼠的治疗作用及其治疗 MASH 的主要药效物质, 为其质量控制及临床应用提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器 Agilent 1290 型超高效液相色谱仪、Agilent 6538 Q-TOF 型质谱仪 (美国 Agilent 公司), Milli-Q 型超纯水仪 (美国密理博公司), METTLER TOLEDO XP6 型百万分之一电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司), BS-240VET 型全自动动物生化分析仪 (深圳迈瑞动物医疗科技股份有限公司), Power PacTM HC 型电泳仪、Trans-blot SD 型半干转印仪、Universal Hood II 型凝胶成像发光系统 (美国 Bio-Rad 公司), SZN71TR1ST2 型体视显微镜、E200MVR 型光学显微镜 (日本 Nikon 公司)。

1.2 药物与试剂 LGZGG 及其干膏粉 (江苏康缘药业股份有限公司, 批号分别为 240401、Z240401), 高脂高胆固醇高果糖饲料 [睿迪生物科技 (深圳) 有限公司, 货号 D09100310, 高脂高胆固醇高果糖成分, 其中 40% 脂肪供能、20% 果糖供能、2% 胆固醇供能], resmetirom (MGL-3196, 美国 AbMole 公司, 批号 M3184-02, 规格 500 mg/支), BeyoGel™ Plus PAGE 预制胶 (Tris-Gly, 10%, 15 孔)、增强型二辛可宁酸 (BCA) 蛋白检测试剂盒、放射免疫沉淀法裂解缓冲液 (RIPA) (上海碧云天生物技术有限公司, 批号分别为 A423250901、P0809S、P0038-100ml), 沉默信息调节因子 2 相关酶 1 (SIRT1) 抗体、过氧化物酶增殖受体 α (PPAR α) 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号分别为 100159882、105971923), 腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 抗体、磷酸化 (p)-AMPK 抗体、肉碱棕榈酰转移酶 1A (CPT1A) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) (美国 Cell Signaling Technology 公司, 批号分别为 21、27、1、16、31), 增强化学发光法 (ECL) 化学发光试剂盒 (美国赛默飞世尔科技公司, 批号 ZK39981)。芹糖甘草苷、芒柄花苷、异甘草素对照品 (上海诗丹德生物技术有限公司, 批号分别为 ST04390120、ST08800120、

ST09620120), 香豆素、新绿原酸、柚皮素对照品 (成都乐美天医药科技有限公司, 批号分别为 DST200503-013、DSTDX001505、DST230515100), 芒柄花素、甘草次酸、尿苷、肌苷、亮氨酸、精氨酸、4-羟基苯甲酸、琥珀酸、腺苷、肉桂醛、白术内酯 I、白术内酯 II、白术内酯 III、芍药苷、槲皮苷、儿茶素、表儿茶素、甘草苷对照品 (中国食品药品检定研究院, 批号分别为 111703-202401、110723-202316、110887-202305、140669-202007、110876-200204、140685-201305、101149-202204、110896-200001、110879-202204、110710-202223、111978-201501、111976201501、111978-202302、110736-202548、111538-202308、110877-202306、110878-202504、111610-202209), 以上对照品纯度均 $\geq 98\%$ 。甲醇、甲酸为质谱级, 水为自制超纯水, 其余试剂均为分析级。

1.3 动物 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购买于北京斯贝福生物科技股份有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2019-0010。动物饲养温度 20~26 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度保持在 30%~70%, 12 h 光照与黑夜循环, 实验期间动物自由饮水进食。

1.4 伦理 本实验经江苏康缘药业股份有限公司动物伦理委员会批准, 伦理编号 ky2025020501。

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 精密称定 LGZGG 0.500 g, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 加超纯水 50 mL, 称定质量, 超声 (功率 500 W, 频率 40 kHz) 30 min 溶解, 放冷后称定质量, 用超纯水补足减失的质量, 摇匀, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min (离心半径 7.0 cm, 下同), 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

2.2 对照品溶液制备 混合对照品 I 制备: 取对照品芹糖甘草苷、甘草苷、异甘草素、柚皮素、芒柄花素、芒柄花苷、4-羟基苯甲酸、琥珀酸、肉桂醛、香豆素、新绿原酸、白术内酯 III、白术内酯 I、白术内酯 II、儿茶素、表儿茶素、芍药苷、槲皮苷、甘草次酸各适量, 精密称定, 加甲醇溶解制成每 1 mL 含上述成分各 50 μg 的溶液。混合对照品溶液 II 制备: 取尿苷、肌苷、腺苷、亮氨酸、精氨酸各适量, 加超纯水溶解制成每 1 mL 含上述成分各 50 μg 的溶液。

2.3 检测条件 色谱条件为 Unsil 10-120 C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 10 μm), 流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液, B 为甲醇, 梯度洗脱 (0~20 min, 5%~45%B; 20~60 min, 45%~95%B), 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 流速 1 mL $\cdot$ min⁻¹, 进样量 10 μL 。质谱条件为电喷雾离子

源(ESI),采用正、负离子模式扫描,离子源温度120℃,裂解电压175 V,锥孔电压65 V,毛细管电压4 000 V,雾化气:氮气;干燥气温度350℃;干燥气体积流量10 L·min⁻¹;雾化气压力40 psi(1 psi≈6.895 kPa)一级质谱全扫描(分辨率22 000,扫描范围 m/z 50~1 500)二级质谱采用AUTO MSMS模式,碰撞能量10~40 eV。

2.4 数据分析 通过查阅大量文献,整理并归纳LGZGG中4味药材的化学成分,分别建立4味药材的化合物库。其中甘草共计467个化合物;茯苓共计131个化合物;白术共计139个化合物;桂枝共计535个化合物,最终自建数据库中各类药材化合物共计1 272个,包括化合物名称、分子式、结构式、精确相对分子质量、一级、二级特征碎片离子及所属化学类型等信息。取2.1项下的供试品溶液,采用2.3项下的色谱和质谱条件进行测定。将采集的质谱数据导入Qualitative Analysis 10.0软件进行数据分析,获取各化合物准确质量数及其一、二级质谱信息。根据化合物色谱保留时间、质荷比和二级质谱裂解碎片离子信息等,选择误差在 5×10^{-6} 以内的分子式与建立的数据库进行匹配,根据不同种类化合物的裂解规律,结合二级碎片离子信息进一步与文献比对,并使用已有对照品进行指认;对正、负离子模式下总离子流图中响应强度较高的黄酮和萜类化合物的峰面积进行归一化处理,计算其相对含量。

2.5 LGZGG治疗MASH药效物质基础的作用靶点分析

2.5.1 LGZGG治疗MASH靶点预测 将分析鉴定的化学成分通过PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得其SMILES式,并输入Swiss Target Prediction数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>),选择物种为“Homo sapiens”对成分靶点进行预测,保留可靠性>0的靶点。以“non-alcoholic steatohepatitis”“nonalcoholic steatosis heptitis”“MASH”“nonalcoholic steatohepatitis”等为关键词,分别在人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)、药物遗传学与药物基因组学知识库(PharmGKB, <https://www.pharmgkb.org/>)、疗效药靶数据库(TTD, <https://db.idrblab.net/ttd/>)、DrugBank(<https://go.drugbank.com/>)、疾病基因网络(DisGeNET, <https://disgenet.com/home/>)中,检索疾病对应靶点,筛选人源基因,合并各库结果

并去重,建立疾病相关基因数据集。将成分靶点与疾病靶点输入至微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)构建Venn图,获得交集靶点。

2.5.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建和核心靶点筛选 交集靶点上传至蛋白互作网络分析数据库(String, <https://string-db.org/>),构建PPI网络,将结果导入Cyto Scape 3.9.1软件进行可视化处理。运用cytoNCA插件,计算LGZGG治疗MASH互作网络中节点的介数中心性(BC)、接近中心性(CC)和度中心性(DC),取3个参数大于中位数为标准筛选,将筛选出的靶点构建子网络再次以上述条件进行筛选,得到核心靶点,以核心靶点的节点生成核心PPI网络,由此获得LGZGG改善MASH的关键靶点。

2.5.3 基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析 将交集靶点导入David数据库(<https://davidbioinformatics.nih.gov/>),选择物种“homo sapiens”,以错误发现率(FDR)<0.001为筛选条件,将GO功能前10项结果及KEGG富集分析出了20条与MASH有着重要联系的通路,最后将结果上传微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)制作绘图。

2.5.4 复方-疾病-成分-靶点网络构建 将获得的交集靶点及其对应的成分整理生成“Network”网络结构文件及“Type”属性分类文件,导入Cytoscape 3.9.1软件构建复方-成分-靶点-疾病关联网络图,利用cytoNCA插件进行网络拓扑分析,以BC、CC、DC大于中位数为条件筛选LGZGG治疗MASH的潜在药效物质。

2.6 LGZGG潜在药效物质富集 称取LGZGG干膏粉0.5 kg,加10倍量的50℃热水,充分搅拌,分离上清,沉淀再加10倍量的50℃热水,充分搅拌至溶解,合并溶液并减压浓缩至相对密度1.2,缓慢加入新鲜乙醇至溶液含醇量为70%(20℃),静置10 h,分离上清,4 000 r·min⁻¹离心10 min,合并醇沉上清液并减压浓缩至相对密度为1.1。取乙醇处理好的10 L的AB-8树脂装柱,纯化水冲洗至无味后上样,静态吸附2 h。分别用4 BV的纯化水和4 BV的50%乙醇洗脱,得到LGZGG的50%乙醇洗脱液(LGZGG-50),取样,用0.22 μm微孔滤膜过滤,取续滤液,在2.3项下条件进行液质解析。将LGZGG-50减压浓缩、干燥。

2.7 LGZGG治疗MASH的作用及机制验证

2.7.1 MASH小鼠模型的构建及分组、给药 选取C57BL/6J小鼠30只(体质量18~20 g,年龄8周),小鼠适应性喂养1周,根据体质量随机分为正常组(6只)和造模组(24只)。造模组动物采用高脂高胆固醇高果糖饲料进行喂养,饮食诱导周期为24周。造模成功标准:与正常组比较,体质量和血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)显著升高。高脂高胆固醇高果糖连续喂养诱导12周后,根据动物体质量及血清中ALT水平将造模组动物随机分为模型组、阳性药组(MGL-3196, 1 mg·kg⁻¹)、LGZGG组(以生药计, 34 g·kg·d⁻¹)、LGZGG-50组(以生药计, 34 g·kg·d⁻¹),共计4个组别。其中LGZGG组和LGZGG-50组给药剂量对应临床上LGZGG成人等效剂量。各组动物分别灌胃给予相应药物,正常组及模型组给予等体积超纯水,每天1次,连续12周。给药期间所有动物均正常饮水,除正常组外,其余组别继续给予高脂高胆固醇高果糖饲料。

2.7.2 体质量变化的测定 模型诱导周期内(共12周),每周一和周五称量1次小鼠体质量;药物治疗周期内(共12周),每周称量2次小鼠体质量,以监测供试品对小鼠体质量影响,末次给药后,所有小鼠禁食12 h,称量小鼠体质量。

2.7.3 小鼠样本采集和肝质量、肝脏指数检测 小鼠腹主动脉采血1.0 mL,置于无菌离心管中,4℃、3 000 r·min⁻¹离心10 min,吸取上清,用于肝功能和血脂相关指标。取血完成后,分离完整肝脏,称量肝质量,计算肝脏指数,肝脏指数=肝质量(g)/体质量(g)×100%、采集肝大叶部分肝脏组织100~150 mg,共2份,液氮冻存。

2.7.4 血清脂质代谢指标、肝功能检测 末次给药后,各组小鼠禁食12 h,小鼠腹主动脉采血,采集血液静置30 min,4℃离心机3 000 r·min⁻¹,离心10 min,分离血清,使用全自动生化分析仪检测血清中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平和血糖(GLU)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、ALT含量。

2.7.5 肝脏组织病理学检测 取肝脏固定于10%甲醛溶液中,固定好后取材,常规石蜡包埋,切片(4 μm),依次放入二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,进行苏木素-伊红(HE)染色和天狼星红染色,并在光学显微镜下观察小鼠肝组织病理学变化。参照《非酒精性脂肪肝炎活动性分级标准》^[7]对各实验组动物肝细胞脂肪变性、炎症浸润等行诊断、分析及评分,并综合计算NAS评分。

2.7.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝组织中AMPK、p-AMPK、SIRT1、PPARα、CPT1A蛋白表达 取各组小鼠肝组织约40 mg,加入适量RIPA裂解液后匀浆、裂解并提取蛋白,BCA测定蛋白浓度并将蛋白浓度归一化。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂牛奶室温封闭90 min, TBST洗涤3次,分别加入AMPK(1:1 000)、p-AMPK(1:1 000)、SIRT1(1:1 000)、CPT1A(1:1 000)、PPARα(1:1 000)、GAPDH(1:1 000)抗体,4℃孵育过夜后, TBST洗涤3次。二抗(1:1 000)孵育1.5 h, TBST洗涤3次。加入ECL显影液,于Chemi Doc XRS系统显影并拍照,使用Image J程序进行数据分析。

2.7.7 统计学分析 采用GraphPad Prism 10.1软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,先经方差齐性检验,若符合正态分布且方差齐再用 t 检验进行多组间单因素方差分析比较,组间多重比较采用Tukey法;不符合正态分布或方差不齐的数据:采用Kruskal-Wallis H 检验(非参数检验),组间多重比较采用Dunn法。 $P < 0.05$ 表示两组差异有统计学意义。

3 结果

3.1 LGZGG及LGZGG-50化学成分鉴定 从LGZGG共鉴定出了83个化学成分,包含黄酮类20个,萜类13个,有机酸类17个,氨基酸类7个,糖苷类11个,核苷类、芳香类和生物碱类各3个、苯丙素类和糖类各2个、核酸类、甾体类各1个,其中24个成分经对照品比对确认。见增强出版附加材料。

3.2 黄酮类化合物的结构鉴定 黄酮类化合物在自然界中以糖苷或游离态的形式存在,以2-苯基色原酮为母核,具有C₆-C₃-C₆的基本骨架^[8],因此黄酮类化合物表现出相似的裂解途径。游离态黄酮类化合物主要发生C环的裂解,生成一系列高丰度的特征性碎片离子,同时,若存在取代基,可出现取代基的部分或全部丢失。本研究共鉴定出刺芒柄花素、柚皮素、异甘草素等9个游离态黄酮化合物,以及甘草苷、芒柄花苷、芹糖甘草苷等11个黄酮苷类化合物。以刺芒柄花素为例阐述其可能的裂解规律。在刺芒柄花素(化合物62, m/z 269.080 4[M+H]⁺)的二级质谱中,因其存在CH₃O取代基,故易出现CH₃和CH₃OH等碎片丢失,形成碎片离子 m/z 254.056 3[M+H-CH₃]⁺、 m/z 237.053 6[M+H-CH₃OH]⁺;其次,C-环易发生裂解,形成碎片离子 m/z 213.098 9[M+H-C₂O₂]⁺、 m/z 137.029 9[M+H-

$\text{CH}_3\text{OH}-\text{C}_8\text{H}_4]^+$ 。

3.3 有机酸类化合物的结构鉴定 根据液质分析结果并参考相关文献^[9-10],从LGZGG中共解析出17个有机酸类化合物,该类化合物在ESI模式下有较高的响应,由于结构中包含羧基和酚羟基,因此质谱裂解的过程中容易丢失 H_2O 和 COOH ,且易在羰基处断裂形成碎片离子。以柠檬酸(化合物15)为例说明该类化合物结构鉴定过程。该化合物在负离子模式下,准分子离子峰为 m/z 191.021 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$,失去1分子水,产生碎片离子 m/z 173.008 7 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$,接着羰基处发生断裂形成 m/z 129.019 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2]^-$,随后丢失1分子 H_2O 产生 m/z 111.009 8 $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{CO}_2-\text{H}_2\text{O}]^-$ 。二级质谱图及可能的裂解途径见增强出版附加材料。

3.4 氨基酸类化合物的结构鉴定 根据液质分析结果并参考相关文献,该类化合物在ESI⁺模式下有较高的响应,由于结构中包含羧基和氨基,因此质谱裂解的过程中容易丢失氨基和羧基,且易在羰基处断裂形成碎片离子。比如L-精氨酸(m/z 175.119 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$)的二级质谱中,氨基的丢失产生碎片离子 m/z 116.070 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{N}_3]^+$,随后失去羧基产生碎片离子 m/z 70.065 4 $[\text{M}+\text{H}-\text{CH}_3\text{N}_3-\text{CH}_2\text{O}_2]^+$ 。据参考文献,并推测其可能的裂解途径见增强出版附加材料。

3.5 萜类化合物的结构鉴定 萜类是自然界中广泛存在的一类结构最多多样化的天然产物,异戊二烯单元(C_5H_8)首尾相连或聚合构成其基本的碳架,符合通式 $(\text{C}_5\text{H}_8)_n$ ($n \geq 2$)^[11]。根据含有的异戊二烯单元数量可分为单萜(C10)、倍半萜(C15)、二萜(C20)、三萜(C30)等^[12]。本研究共鉴定13个萜类化合物,其中甘草皂苷 G_2 、甘草次酸等为五环三萜类,白术内酯I、白术内酯II、白术内酯III等为倍半萜类。质谱裂解主要有2条途径。首先,五环三萜苷类化合物在质谱中优先脱去全部糖链生成游离三萜母核,随后发生碳环裂解;若分子中有羧基和/或羟基存在时,还会伴随取代基的丢失,从而形成高丰度的骨架离子。以甘草皂苷 G_2 (化合物78)为例,其在正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 839.407 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$,在二级质谱图,丢失所有的糖产生高丰度离子碎片 m/z 487.341 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_{12}]^+$,随后失去 H_2O 后又形成 m/z 469.331 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_{12}-\text{H}_2\text{O}]^+$,接着碳环的开裂产生碎片离子 m/z 235.168 7 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_{12}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2]^+$,进一步失去羧基形成碎片离子 m/z 189.163 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_{12}-\text{H}_2\text{O}-\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2-$

$\text{CH}_2\text{O}_2]^+$ 。根据裂解规律并结合参考文献推断该化合物为甘草皂苷 G_2 ^[13]。此外,不含糖基的萜类化合物可直接发生碳环裂解,形成一系列高丰度离子碎片。以甘草次酸(79)为例,其正离子模式下的准分子离子峰为 m/z 471.347 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$,B环开裂形成高丰度碎片离子 m/z 317.210 3 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}]^+$,接着C环开裂形成 m/z 177.163 1 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}-\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_3]^+$ 的高丰度碎片离子,C、E环都裂解则形成 m/z 135.116 2 $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}-\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_2]^+$ 。二级质谱图及可能的裂解规律见增强出版附加材料。

3.6 其他类化合物的鉴定 糖苷类化合物裂解途径主要是丢失分子中的糖从而形成高丰度的骨架离子。化合物12(m/z 337.078 3 $[\text{M}-\text{H}]^-$)的二级质谱可以看出,母离子失去葡萄糖形成 m/z 157.015 1 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6]^-$ 的高丰度碎片离子,结合参考文献推断化合物12为2-O- α -D-葡萄糖吡喃糖基-L-抗坏血酸。通过相似的方法,化合物33初步鉴定为龙胆酸-5-O- β -葡萄糖苷。

3.7 LGZGG成分-MASH交集靶点 将鉴定出的83个成分在Swiss Target Prediction检索,去重后得到药物成分靶点494个,将来自GeneCards、DisGeNET、OMIM、PharmGKB、TTD、DrugBank数据库的MASH靶点删除重复项后,共得到疾病靶点1 192个,将化合物靶点、疾病靶点制作Venn图,获得交集靶点134个。见增强出版附加材料。

3.8 PPI网络构建和核心靶点筛选 将筛选出的134个交集靶点输入STRING数据库,所得结果导入Cytoscape 3.9.1,利用CytoNCA插件对各靶点网络特征进行拓扑分析,节点尺寸与颜色深度均与Dgree值正相关。筛选出核心靶点为白细胞介素-6(IL-6)、雌激素受体1(ESR1)、原癌基因(JUN)、SIRT1、PPAR α 、肿瘤坏死因子(TNF)、V-Rel网状内皮增生病毒癌基因同源物A(RELA)、信号转导与转录激活因子1(STAT1)、表皮生长因子受体(EGFR)、STAT3、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、核转录因子- κ B亚基1(NF κ B1)。见增强出版附加材料。

3.9 GO和KEGG富集分析 通过David数据库对134个交集靶点进行GO富集分析,共富集了774个条目,生物过程(BP)相关的有582条,与细胞组分(CC)相关的有55条,与分子功能(MF)相关的条目有137条。KEGG通路富集分析得到179条信号通路。以FDR<0.001为筛选条件,GO功能BP、CC、MF各选取筛选后的前10项结果,KEGG富集分析

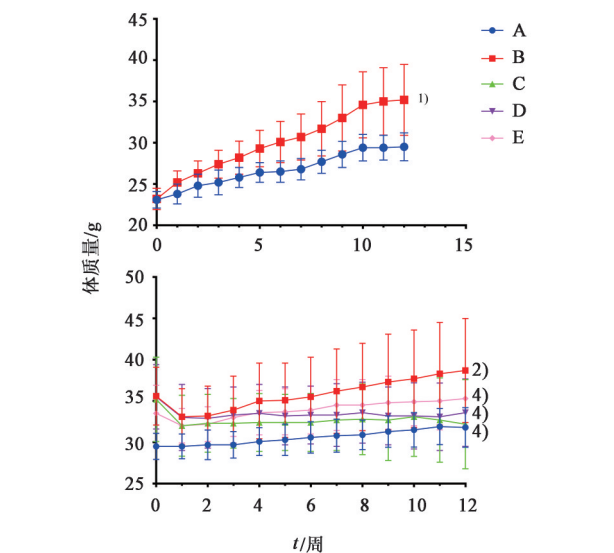
在筛选后的结果中选取20条与MASH有着重要联系的通路,最后将结果上传微生信平台制作绘图。GO结果显示LGZGG对MASH的治疗作用与脂质代谢和炎症反应相关;KEGG结果表明LGZGG治疗MASH可能是通过影响脂质和动脉粥样硬化通路、胰岛素抵抗通路、PPAR信号通路、AMPK信号通路等发挥作用。见增强出版附加材料。

3.10 复方-疾病-成分-靶点网络构建 将134个交集靶点及其对应的78个成分整理生成“Network”网络结构文件及“Type”属性分类文件,导入Cytoscape 3.9.1软件构建复方-成分-靶点-疾病关联网络图。以BC、CC、DC大于中位数为条件筛选出36个潜在活性成分,其中黄酮类和萜类共占比分别为77.7%,表明黄酮和萜类可能是LGZGG治疗MASH的潜在药效物质基础。见增强出版附加材料。

3.11 黄酮类、萜类成分富集 经预测LGZGG的主要活性成分共36个,黄酮类与萜类占比分别为41.6%、36.1%,共计77.7%。因此,为验证复方-疾病-成分-靶点网络筛选出的黄酮类和萜类是否具有改善MASH的作用,采用AB-8大孔吸附树脂结合乙醇梯度洗脱对其进行富集纯化,将LGZGG-50减压浓缩、干燥,粉碎,得LGZGG-50干浸膏粉。经UPLC-Q-TOF-MS/MS分析鉴定及峰面积归一化处理,明确LGZGG-50中总黄酮和总萜在正、负离子模式下的相对质量分数分别为74.00%和62.41%,表明50%乙醇洗脱有效富集了LGZGG中的黄酮和萜类成分,即LGZGG-50干浸膏粉可用于治疗MASH的药效研究。具体相对质量分数情况见增强出版附加材料。

3.12 对MASH模型小鼠体质量增长的影响 与正常组比较,模型组小鼠经高脂高胆固醇高果糖饮食诱导12周后体质量明显增长($P<0.05$),诱导24周后体质量显著增长($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组模型小鼠体质量呈现下降趋势,末次给药后体质量增长均有显著的抑制作用($P<0.01$);与LGZGG组比较,LGZGG-50组对模型小鼠体质量增长的抑制作用差异无统计学意义,见图1和表2。

3.13 对MASH模型小鼠肝质量和肝脏指数的影响 与正常组比较,模型组小鼠经高脂高胆固醇高果糖饮食诱导24周后,肝质量、肝脏指数显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组肝质量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),肝脏指数有一定程度的降低,但差异无统计学意义;与LGZGG组比较,LGZGG-50组



注:A.小鼠诱导周期体质量变化;B.给药周期内体质量变化
图1 各组小鼠在诱导周期和给药周期的体质量变化

Fig. 1 Changes in body weight of mice in each group during induction and administration cycles

表2 末次给药后各组MASH小鼠体质量比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 2 Comparison of body weight among MASH mice in each group after the last administration ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	体质量/g
正常组		30.00 ± 1.77
模型组		$42.45\pm 3.34^{2)}$
阳性药组	0.001	$32.23\pm 5.43^{4)}$
LGZGG组	34	$31.07\pm 1.70^{4)}$
LGZGG-50组	34	$33.87\pm 3.17^{4)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$;与LGZGG组比较⁵⁾ $P<0.05$,⁶⁾ $P<0.01$ (表3-表6同)

对MASH小鼠肝质量和肝脏指数表现为升高,差异无统计学意义,见表3。

表3 LGZGG、LGZGG-50对MASH小鼠肝质量和肝脏指数的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 3 Effects of LGZGG and LGZGG-50 on liver weight and liver index in MASH mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肝质量/g	肝脏指数/%
正常组		0.96 ± 0.13	3.20 ± 0.38
模型组		$2.27\pm 0.53^{2)}$	$5.68\pm 0.89^{2)}$
阳性药组	0.001	$1.30\pm 0.16^{4)}$	4.44 ± 0.39
LGZGG组	34	$1.60\pm 0.24^{4)}$	4.74 ± 0.45
LGZGG-50组	34	$1.73\pm 0.10^{3)}$	4.82 ± 0.32

3.14 对MASH模型小鼠血脂、血糖和肝损伤指标的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中TG、TC、LDL-C、GLU及ALT、AST水平均显著升高

($P<0.01$), HDL-C 显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性药组 TG、GLU、LDL-C、ALT 水平显著降低($P<0.01$), HDL-C 水平显著升高($P<0.01$), TC、AST 水平有降低趋势, 但差异无统计学意义; LGZGG 组、LGZGG-50 组小鼠 TG、GLU、ALT 水平均明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), TC、AST、LDL-C 水平有一定程度的降低, 但差异无统计学意义, LGZGG 组 H-DLC 水平显著升高($P<0.01$), LGZGG-50 组

H-DLC 有升高趋势, 但差异无统计学意义; 与 LGZGG 组比较, LGZGG-50 组对 MASH 小鼠 TG、GLU、ALT、LDL-C、AST 水平的降低稍弱, 差异无统计学意义, 但对 MASH 小鼠 TC 和 HDL-C 水平的影响差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。以上结果表明 LGZGG、LGZGG-50 可以改善 MASH 肝组织中的血脂代谢水平及肝损伤, 见表 4。

表 4 LGZGG、LGZGG-50 对 MASH 小鼠 TG、TC、GLU、HDL-C、LDL-C、ALT、AST 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 4 Effects of LGZGG and LGZGG-50 on levels of TG, TC, GLU, HDL-C, LDL-C, ALT, AST in MASH mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

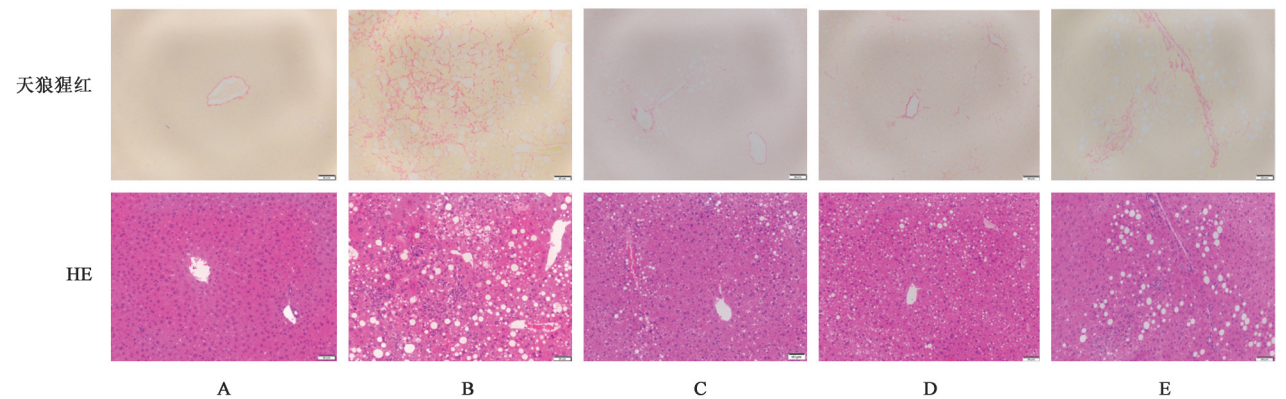
组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	GLU/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	HDL-C/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	LDL-C/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	ALT/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$
正常组		0.29±0.06	1.86±0.30	9.69±1.91	2.73±0.30	0.23±0.02	22.37±2.78	65.75±9.79
模型组		0.66±0.07 ²⁾	3.64±0.84 ²⁾	16.43±2.12 ²⁾	1.89±0.25 ²⁾	0.65±0.12 ²⁾	177.68±50.35 ²⁾	148.17±29.88 ²⁾
阳性药组	0.001	0.35±0.10 ⁴⁾	2.48±0.40	7.32±2.70 ⁴⁾	2.59±0.15 ⁴⁾	0.36±0.12 ⁴⁾	64.90±25.67 ⁴⁾	101.43±9.35
LGZGG 组	34	0.38±0.07 ⁴⁾	2.56±0.48	11.53±2.95 ⁴⁾	2.43±0.06 ⁴⁾	0.52±0.12	75.27±31.67 ⁴⁾	100.12±33.48
LGZGG-50 组	34	0.42±0.07 ⁴⁾	3.30±0.49 ⁵⁾	12.38±1.77 ³⁾	2.06±0.27 ⁶⁾	0.53±0.07	84.97±48.62 ⁴⁾	135.58±32.40

3.15 对 MASH 模型小鼠肝组织病理形态的影响 HE 染色结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织呈弥漫性重度脂肪变性, 见大小不一的圆形空泡, 以及局灶性炎细胞浸润, 病理评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性药组、LGZGG 组、LGZGG-50 组均能明显改善肝组织结构, 脂滴空泡减轻, 病理评分明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 与 LGZGG 组比较, LGZGG-50 组对 MASH 小鼠肝组织脂肪空泡减轻稍弱, 差异无统计学意义。天狼星红染色结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠肝纤维化变性显著, 病理评分显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, 阳性药组、LGZGG、LGZGG-50 组小鼠肝纤维化程度得到减弱, 差异无统计学意义; 与

LGZGG 组比较, LGZGG-50 组对 MASH 小鼠肝纤维化减弱程度差异无统计学意义, 见表 5、图 2。

表 5 LGZGG、LGZGG-50 对 MASH 模型小鼠肝组织病理评分的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 5 Effects of LGZGG and LGZGG-50 on pathological score of liver tissue in MASH model mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	HE 染色肝组织病理改变评分	天狼星红染色肝组织病理改变评分
正常组		0.57±0.53	0.00±0.00
模型组		5.00±0.63 ²⁾	2.00±1.41 ²⁾
阳性药组	0.001	3.17±0.41 ⁴⁾	0.83±0.75
LGZGG 组	34	3.67±1.03 ³⁾	1.00±0.63
LGZGG-50 组	34	3.83±0.75 ³⁾	1.00±1.26



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. LGZGG 组; E. LGZGG-50 组 (图 15 同)

图 2 LGZGG、LGZGG-50 对 MASH 小鼠肝组织病理的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Effects of LGZGG and LGZGG-50 on pathology of liver tissue in MASH mice ($\times 200$)

3.16 对小鼠 AMPK/SIRT1/PPAR α 信号通路蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组小鼠肝组织中

p-AMPK/AMPK 水平、SIRT1、PPAR α 和 CPT1A 蛋白表达量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$); 与模型组比

较,阳性药组、LGZGG组小鼠肝组织中 p-AMPK/AMPK、SIRT1、PPAR α 和 CPT1A 蛋白表达量明显增加 ($P<0.05$, $P<0.01$), LGZGG-50 组小鼠肝组织中 p-AMPK/AMPK、CPT1A 蛋白表达量显著增加 ($P<0.01$), SIRT1、PPAR α 蛋白表达量有一定程度的增加,差异无统计学意义;与 LGZGG 组比较, LGZGG-50 组 p-AMPK/AMPK 蛋白表达量增加程度明显弱于 LGZGG 组 ($P<0.05$),其余蛋白表达量增加程度稍弱,差异无统计学意义,见图 3 和表 6。

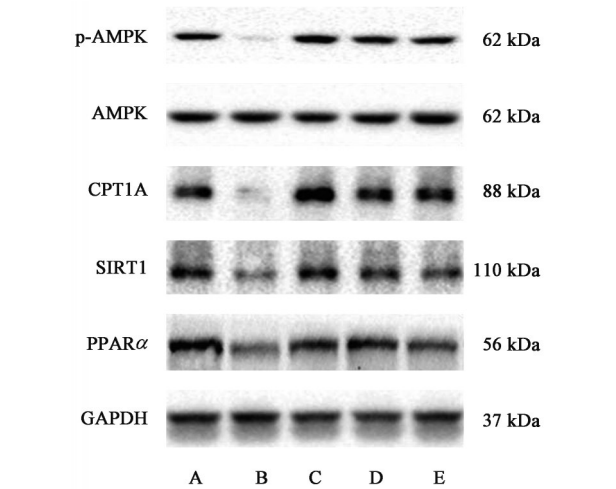


图3 MASH小鼠 AMPK/SIRT1/PPAR α 信号通路相关蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of AMPK/SIRT1/PPAR α signaling pathway related proteins expression in MASH mice

4 讨论

中药及其复方具有多成分协同、多靶点调控、多层次调节的复杂作用机制特征。因此,本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对 LGZGG 化学成分进行系统分析,共鉴定出 83 个成分,包括黄酮类、萜类等。结合网络靶标分析预测其治疗 MASH 的潜在功效物质为黄酮类和萜类,作用靶点为 SIRT1、PPAR α 等。在此基础上,对黄酮类和萜类进行富集纯化,获得富集部位 LGZGG-50,经 UPLC-Q-TOF-

MS/MS 分析和峰面积归一化处理,明确 LGZGG-50 有效富集了总黄酮和总萜。体内药效结果显示, LGZGG 及其富集部位 LGZGG-50 均可降低高脂高胆固醇高果糖饮食诱导的 MASH 模型小鼠血脂、血糖及肝损伤指标,减轻肝脏病理损伤,其作用可能与激活 AMPK/SIRT1/PPAR α 信号通路有关。

黄酮类和萜类成分在改善脂质代谢、炎症方面的药理作用已有相关文献报道。例如,异甘草素抑制巨噬细胞的炎症小体活化来缓解炎症反应抑制肝脂肪变性,并保护肝细胞免受脂肪堆积造成的氧化损伤^[14-15],白术内酯Ⅲ可以减轻肝脏氧化应激、炎症和纤维化^[16],芍药苷可以调节其肝脏脂质代谢基因 PPAR α 的表达^[17],甘草次酸可改善肝脏脂质沉积及炎性细胞因子的释放^[18]。本研究大孔吸附树脂富集部位 LGZGG-50 中总黄酮和总萜在正、负离子模式下的相对含量分别为 74.00% 和 62.41%,明确该部位为黄酮和萜部位。体内药效结果表明 LGZGG-50 可改善高脂高胆固醇高果糖饮食诱导的 MASH 模型小鼠脂质代谢,减轻肝脏病理损伤,提示黄酮和萜类可能是治疗 MASH 的主要药效物质。

MASH 发病的核心因素是脂质代谢紊乱,其对肝脏造成的“首次打击”,为 MASH 的发病创造了重要条件^[19]。MASH 发病后呈现出明显的脂质与糖代谢紊乱及肝损伤,表现为血清 TG、TC、GLU、LDL-C、ALT、AST 水平升高, HDL-C 水平降低^[20]。AMPK 信号通路不仅是生物抵抗脂质代谢紊乱的关键通路,还能抑制细胞增殖的关键蛋白而抑制炎症通路(如 NF- κ B)激活,从而减缓 MASH 疾病的发展^[21]。AMPK 通路的激活可提高 p-AMPK 水平,从而影响脂肪酸、胆固醇合成和脂肪酸氧化的一系列代谢蛋白来调节细胞脂质代谢^[22]。p-AMPK 通过增加氧化型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸/还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺/NADH)值,上调 NAD⁺ 依赖的组蛋白脱乙酰酶 SIRT1, SIRT1 又与 p-AMPK 协同作用,调节肝脏脂质代谢、肝脏氧化应激和脱乙酰化

表6 LGZGG、LGZGG-50对MASH小鼠 AMPK/SIRT1/PPAR α 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 6 Effects of LGZGG and LGZGG-50 on expression of AMPK/SIRT1/PPAR α signaling pathway related proteins in MASH mice ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	p-AMPK/AMPK	CPT1A/GAPDH	SIRT1/GAPDH	PPAR α /GAPDH
正常组		1.00±0.06	1.00±0.07	1.00±0.07	1.00±0.11
模型组		0.19±0.05 ²⁾	0.34±0.08 ²⁾	0.57±0.06 ²⁾	0.54±0.10 ¹⁾
阳性药组	0.001	1.22±0.03 ⁴⁾	1.47±0.19 ⁴⁾	1.01±0.14 ⁴⁾	0.92±0.17 ³⁾
LGZGG组	34	1.04±0.05 ⁴⁾	1.34±0.09 ⁴⁾	0.99±0.17 ⁴⁾	0.99±0.20 ³⁾
LGZGG-50组	34	0.79±0.09 ^{4,5)}	1.21±0.10 ⁴⁾	0.78±0.10	0.76±0.13

在一些转录调节因子抑制肝脏炎症中发挥有益作用^[23]。激活的SIRT1能促进MASH小鼠模型中脂质清除和脂肪酸氧化来调节肝脏脂质代谢^[24]。p-AMPK减少乙酰辅酶A向丙二酰辅酶A的转化,上调PPAR α 的表达^[25]。SIRT1利用NAD作为辅因子使细胞蛋白脱乙酰,从而调节代谢、抗炎等多种途径^[26]。研究表明,SIRT1的表达增加会正向调节PPAR α 水平^[27]。PPAR α 在肝脏中高度表达,刺激脂肪酸摄取和活化、过氧化物酶体脂肪酸氧化、酮体生成及脂肪酸延伸和去饱和^[28]。PPAR α 是肝脏 β 氧化和微粒体 ω 氧化的主要调控者^[29],通过转录激活脂肪酸 β 氧化关键限速酶CPT1A的表达,增加脂肪酸进入线粒体进行 β 氧化,从而有效降低TG和LDL-C水平并抑制JNK因子以减轻游离脂肪酸引起的炎症反应^[30]。综合网络靶标分析结果并查阅相关文献发现,AMPK、SIRT1、PPAR α 、CPT1A多重调节脂质代谢和线粒体功能来改善脂质代谢和炎症,是治疗MASH的重要靶点^[31],故对上述蛋白的表达进行了检测结果显示,LGZGG及其富集部位LGZGG-50均可改善MASH的作用可能与激活AMPK/SIRT1/PPAR α 信号通路有关,这一过程不仅直接调控脂肪酸合成与氧化、糖脂代谢平衡,还能交叉影响抑制炎症通路,形成多层次调控网络,契合MASH发病的核心机制。

综上所述,本研究通过成分鉴定和网络靶标分析,并结合体内药效评价,明确LGZGG具有改善MASH的作用,发现黄酮和萜类可能是LGZGG治疗MASH的药效物质,其作用可能与激活AMPK/SIRT1/PPAR α 通路有关。本研究不仅为LGZGG治疗MASH的药效物质基础提供了实验依据,也为今后LGZGG的药效物质基础的深入研究、质量标准提高与临床合理用药提供了参考依据。需要指出的是,本研究验证了黄酮类、萜类的整体富集部位药效,但未对单一核心成分进行单独药效验证,无法明确各成分的贡献度。后续通过体内外多模型系统评价黄酮类、萜类单体成分抗炎、抗氧化及改善脂质代谢的活性,明确单体成分的药效贡献度。

[利益冲突] 本研究保持学术独立性,与企业不存在干预性关联;本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 李玲,季光,张彤,等. 经典名方苓桂术甘汤复方制剂的研制[J]. 中成药,2023,45(10):3165-3172.
LI L, JI G, ZHANG T, et al. Development of compound

- preparation for famous classic prescription Linggui Zhugan decoction[J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(10): 3165-3172.
- [2] 刘冬涵,薛宇涛,罗菊元,等. 经典名方苓桂术甘汤的物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志,2019,44(24):5421-5428.
LIU D H, XUE Y T, LUO J Y, et al. Analysis on quality value transmitting of substance benchmarks of Linggui Zhugan decoction[J]. Chin J Chin Mater Med, 2019, 44(24): 5421-5428.
- [3] 何朝,浦益琼. 中药复方汤液的相态差异分析研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(15):259-266.
HE C, PU Y Q. Phase difference of traditional Chinese medicine compound decoction: A review[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(15): 259-266.
- [4] 赵晓霞,阳长明,韩炜,等. 试论按古代经典名方目录管理的中药复方制剂的基准样品研究[J]. 中国中药杂志,2024,49(12):3404-3408.
ZHAO X X, YANG C M, HAN W, et al. Discussion on reference sample research of traditional Chinese medicine compound preparations developed from catalogued ancient classical prescriptions[J]. Chin J Chin Mater Med, 2024, 49(12): 3404-3408.
- [5] 郭宗儒. 首创的治疗MASH瑞司美替罗的研制[J]. 药学学报, 2025, 60(12):3795-3798.
GUO Z R. The development of the first treatment of MASH resimeroterol[J]. Acta Pharm Sin, 2025, 60(12): 3795-3798.
- [6] 王倩静,王妍钰,王同丽,等. 苓桂术甘颗粒改善代谢功能障碍相关脂肪性肝炎的作用机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2026, 42(2):206-219.
WANG Q J, WANG Y X, WANG T L, et al. Mechanism of action of Linggui Zhugan granules in improving metabolic dysfunction-associated steato-hepatitis[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med, 2026, 42(2): 206-219.
- [7] 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.
- [8] LUO J, ZHU P F, LI X L, et al. Xin Sheng Hua granule ameliorate chemotherapy-induced blood deficiency syndrome through inhibiting JAK1/STAT1 pathway activation[J]. Fitoterapia, 2025, 183: 106571.
- [9] MEI Z, LI H, LI T, et al. Analysis of macroporous resin combined extraction and purification of polyphenols from *Agrimonia pilosa* Ledeb. and anti-tumor effect in vitro[J]. Molecules, 2025, 30(7): 1478.
- [10] 孙嘉文,李广涛,陈斌,等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS结合分子网络技术的浙江红山茶花成分分析及其抗炎活性评价[J]. 中草药,2025,56(12):4187-4205.
SUN J W, LI G T, CHEN B, et al. Rapid identification of chemical constituents in *Camellia chekiangoleosa* flower and its anti-inflammatory activity evaluation using UPLC-Q-TOF-MS/MS and molecular network technologies[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2025, 56(12): 4187-4205.
- [11] 苏雯清,杨晓男,梁凌玲,等. 萜类化学成分的药理作用研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2025,47(4):678-683.

- SU X W, YANG X N, LIANG L L, et al. Research progress on pharmacological effects of terpenoids chemical constituents[J]. J Youjiang Med Univ Natl, 2025, 47(4): 678-683.
- [12] 李伟国, 刘大苗, 财音青格乐. 天然萜类化合物在食品保鲜中应用现状及前景分析[J]. 食品科技, 2025, 50(7): 234-242.
- LI W G, LIU D M, CAI Y G L. Current application and future prospect of natural terpenoid in food preservation[J]. Food Sci Technol, 2025, 50(7): 234-242.
- [13] 袁传裕, 胡俊杰, 李娟, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的疏肝和胃汤化学成分、HPLC指纹图谱、化学模式识别及含量测定研究[J]. 中草药, 2024, 55(7): 2183-2196.
- YUAN C Y, HU J J, LI J, et al. Chemical composition, HPLC fingerprinting, chemical pattern recognition and content determination of Shugan Hewei decoction based on UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2024, 55(7): 2183-2196.
- [14] HU X, HU C, LIAO L, et al. Isoliquiritigenin limits inflammasome activation of macrophage via docking into Syk to alleviate murine non-alcoholic fatty liver disease[J]. Scand J Immunol, 2024, 100(1): e13371.
- 15KIM Y M, KIM T H, KIM Y W, et al. Inhibition of liver X receptor- α -dependent hepatic steatosis by isoliquiritigenin, a licorice antioxidant flavonoid, as mediated by JNK1 inhibition[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(11): 1722-1734.
- [16] 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.
- [17] 钱坤, 刘亚云, 张艳, 等. 中药抗非酒精性脂肪肝病分子机制的研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(19): 5083-5092.
- QIAN K, LIU Y Y, ZHANG Y, et al. Research progress on molecular mechanism of traditional Chinese medicine against non-alcoholic fatty liver disease[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2020, 51(19): 5083-5092.
- [18] YADONG F, WENJIN D, YING W, et al. Glycyrrhetic acid regulates impaired macrophage autophagic flux in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Front Immunol, 2022, 13: 959495.
- [19] 彭玉生, 刘丽, 王雪, 等. 代谢相关脂肪性肝炎(MASH)发病机制及中药成分干预研究进展[J]. 中药药理与临床, 2026, doi: 10.13412/j.cnki.zyyl.20251011.003.
- PENG Y S, LIU L, WANG X, et al. Pathogenesis of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis and the research progress of Chinese medicine component intervention[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2026, doi: 10.13412/j.cnki.zyyl.20251011.003.
- [20] Chinese Medical Association. Guidelines for the prevention and treatment of metabolic dysfunction-associated (non-alcoholic) fatty liver disease (Version 2024)[J]. Chin J Hepatol, 2024, 32(5): 418.
- [21] DAY E A, FORD R J, STEINBERG G R. AMPK as a therapeutic target for treating metabolic diseases[J]. Trends Endocrinol Metab, 2017, 28(8): 545-560.
- [22] FANG C, PAN J, QU N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease[J]. Front Physiol, 2022, 13: 970292.
- [23] CHYAU C C, WANG H F, ZHANG W J, et al. Antrodan alleviates high-fat and high-fructose diet-induced fatty liver disease in C57BL/6 mice model via AMPK/Sirt1/SREBP-1c/PPAR γ pathway[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(1): 360.
- [24] MUKHERJEE S, MO J, PAOLELLA L M, et al. SIRT3 is required for liver regeneration but not for the beneficial effect of nicotinamide riboside[J]. JCI Insight, 2021, 6(7): e147193.
- [25] 梁玉琴, 刘洁, 张驰, 等. 基于AMPK/PPAR α 信号通路和NLRP3炎性小体探讨黄芪赤风汤抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026, 32(1): 131-139.
- LIANG Y Q, LIU J, ZHANG C, et al. Exploring mechanism of anti-atherosclerosis effect of Huangqi Chifengtang based on AMPK/PPAR α signaling pathway and NLRP3 inflammasome[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2026, 32(1): 131-139.
- [26] NASSIR F, IBDAH J A. Sirtuins and nonalcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(46): 10084.
- [27] PURUSHOTHAM A, SCHUG T T, XU Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation[J]. Cell Metab, 2009, 9(4): 327-338.
- [28] RAKHSHANDEHROO M, SANDERSON L M, MATILAINEN M, et al. Comprehensive analysis of PPAR α -dependent regulation of hepatic lipid metabolism by expression profiling[J]. PPAR Res, 2007, 2007(1): 026839.
- [29] 朱书彤, 赵越. PPAR α 在肝脏相关疾病中作用的研究进展[J]. 生命科学, 2017, 29(5): 479-484.
- ZHU S T, ZHAO Y. Research process of PPAR α in liver diseases[J]. Chin Bull Life Sci, 2017, 29(5): 479-484.
- [30] LIANG K. Mitochondrial CPT1A: Insights into structure, function, and basis for drug development[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1160440.
- [31] 曹峰铭, 胡锋杰, 周英. AMPK通路介导中医药改善非酒精性脂肪肝的分子机制及研究进展[J]. 海南医科大学学报, 2026, 32(2): 148-160.
- CAO F M, HU F J, ZHOU Y. AMPK pathway mediates the molecular mechanism and research progress of traditional Chinese medicine to improve non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hainan Med Univ, 2026, 32(2): 148-160.

[责任编辑 王鑫]