

护肝汤通过激活 AMPK/m-TOR 信号通路减少脂质合成减轻大鼠非酒精性脂肪性肝病

尚读¹, 李雯², 崔立华³, 陈明^{1,4}

¹天津中医药大学研究生院, 天津 301617; ²河南省商丘市妇幼保健院, 河南 商丘 476000; ³天津市南开医院中西医结合急腹症研究所, 天津 300100; ⁴天津市中西医结合医院(天津市南开医院)消化内科, 天津 300100

摘要:目的 基于网络药理学探究护肝汤(HGT)治疗非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的作用原理,并进行体内及体外实验验证。方法 采用网络药理学分析预测 HGT 抗 NAFLD 的有效成分及潜在靶点,利用 STRING 数据库构建蛋白相互作用(PPI)网络并筛选核心靶点,同时运用 Metascape 数据库对潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。最后,为进一步验证网络药理学预测结果,本研究通过构建高脂饮食(HFD)诱导 NAFLD 大鼠模型以及通过游离脂肪酸(FFA)诱导 HepG2 细胞模型进行实验验证。动物实验:取 56 只大鼠随机分为空白对照组(8 只)、空白+中药高剂量组(8 只)和造模组(40 只),采用 HFD 建立 NAFLD 模型。将造模组大鼠随机分为模型组、西药对照组和中药低、中、高剂量组(各 8 只),分别予以生理盐水 10 mL/kg、水飞蓟素 100 mg/kg 以及 HGT 5.13、10.26、20.52 g/kg 灌胃,连续 10 周。末次给药后通过全自动生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、低密度脂蛋白(LDL)、乳酸脱氢酶(LDH)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平,并进行肝脏组织病理学检测,RT-qPCR 法检测肝脏中乙酰辅酶 A 羧化酶 1(ACC1)、脂肪酸合成酶(FASN)、AMPK、m-TOR 的 mRNA 表达,Western blotting 法检测 ACC1、FASN、p-AMPK、p-mTOR 的蛋白表达。细胞实验:体外培养 HepG2 细胞,分别设置空白组(溶剂对照)、FFA(0.5、1、2、4 mmol/L)处理组、对照血清(CONs)和 HGT 含药血清(HGTs)(5%、10%、20%)处理组、AMPK 抑制剂(Compound C)及 mTOR 激活剂(MHY1485)处理组,通过 CCK-8 实验检测细胞活力,油红 O 染色试剂盒检测各组细胞脂质蓄积,并测定各组细胞 TC、TG 水平,RT-qPCR 法检测细胞中 ACC1、FASN、AMPK、m-TOR 的 mRNA 表达,Western blotting 法检测 ACC1、FASN、p-AMPK、p-mTOR 的蛋白表达,从而验证潜在治疗机制。结果 研究共筛选出 HGT 的活性成分 130 个,与 NAFLD 共同靶点 267 个,PPI 网络分析后筛选出核心基因节点 53 个,其中近一半都参与了脂质代谢;并且 HGT 治疗 NAFLD 与脂质与动脉粥样硬化信号通路、胰岛素抵抗信号通路、AMPK 信号通路等相关信号通路关系密切。实验验证结果表明,HGT 能够减轻 NAFLD 大鼠的肝损伤及脂质积累,并抑制 ACC1 和 FASN mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$);不同浓度的 HGTs 能够降低 FFA 诱导 HepG2 细胞中 TG、TC 水平,抑制 ACC1、FASN mRNA 和蛋白的表达($P<0.05$);体内外实验结果均显示 HGT 可激活 AMPK/m-TOR 信号通路,促进 p-AMPK 表达,抑制 p-mTOR 表达($P<0.05$);加入 Compound C 及 MHY1485 后,HGTs 对 p-AMPK、p-mTOR、ACC1、FASN 的调节作用受到不同程度的影响($P<0.05$)。结论 HGT 能够通过激活 AMPK/m-TOR 信号通路,减少脂质合成,从而减轻 NAFLD 的严重程度。

关键词:护肝汤;非酒精性脂肪性肝病;网络药理学;脂质代谢;AMPK/m-TOR

Hugan Decoction alleviates non-alcoholic fatty liver disease in rats by activating the AMPK/m-TOR signaling pathway and reducing lipid synthesis

SHANG Du¹, LI Wen², CUI Lihua³, CHEN Ming^{1,4}

¹Graduate School of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; ²Shangqiu Maternal and Child Health Center, Shangqiu 476000, China; ³Tianjin Institute of Integrative Medicine for Acute Abdominal Diseases, Tianjin 300100, China; ⁴Department of Gastroenterology, Tianjin Hospital of Integrative Medicine (Tianjin Nankai Hospital), Tianjin 300100, China

Abstract: Objective To explore therapeutic mechanism of *Hugan Tang* (*Hugan Decoction*, HGT) for alleviating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats. **Methods** Network pharmacology analysis was used to predict the active components of HGT against NAFLD and their potential targets, and the core targets were identified using the protein-protein interaction network, followed by GO and KEGG pathway enrichment analyses. A rat model of high-fat diet (HFD)-induced NAFLD was used to test the effects of saline, silymarin, and low-, moderate-, and high-dose HGT on serum levels of ALT, AST, LDL, LDH, TG and TC, liver histopathology, and protein and mRNA expressions of ACC1, FASN, AMPK and m-TOR. In free fatty acid (FFA)-induced HepG2 cells, the effects of blank and HGT-medicated sera, compound C (an AMPK inhibitor), and MHY1485 (a mTOR agonist) were tested on cell viability, intracellular lipid deposition, TC and TG levels, and expressions of ACC1, FASN, AMPK and m-TOR. **Results** We identified 130 active components in HGT, 267 common targets with NAFLD, and 53 core gene nodes, nearly half of which were involved in lipid metabolism. HGT treatment of NAFLD was closely associated with lipid

and atherosclerosis signaling, insulin resistance signaling, and AMPK signaling. In rat models of NAFLD, HGT significantly alleviated liver injury and lipid accumulation, and suppressed mRNA and protein expressions of ACC1 and FASN. In FFA-induced HepG2 cells, HGT-medicated serum obviously reduced TG and TC levels and inhibited ACC1 and FASN mRNA and protein expressions. The results of *in vitro* and *in vivo*

收稿日期:2025-06-06

基金项目:天津市卫生健康委中医、中西医结合科研项目(2023045);天津市中医药重点领域科研项目(2024019);天津市教委科研项目计划项目(2024ZD045)

作者简介:尚读,在读硕士研究生,E-mail: 17396225313@163.com

通信作者:陈明,教授,硕士生导师,E-mail: cmtjnk@sina.com

experiments both demonstrated that HGT activated the AMPK/mTOR signaling pathway by promoting p-AMPK expression and suppressing p-mTOR expression, and its regulatory effects on p-AMPK, p-mTOR, ACC1, and FASN were differentially modulated by compound C and MHY1485. **Conclusion** HGT alleviates NAFLD in rats by activating the AMPK/mTOR signaling pathway and reducing lipid synthesis.

Keywords: *Hugan* Dcoction; non-alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; lipid metabolism; AMPK/m-TOR

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)指在排除酒精和其它容易导致脂肪变性的可替代原因(如药物、饥饿、单基因疾病)的人群中,大于或等于5%的肝细胞表现为大泡性脂肪变^[1,2]。NAFLD已经是健康体检人群血清转氨酶增高的主要原因,目前已取代病毒性肝炎成为我国第一大慢性肝病,同时也是全球最常见的慢性肝病^[3-5]。全球NAFLD总患病率约为32.4%,男性(39.7%)高于女性(25.6%),且患病率呈逐年上升趋势^[4]。目前,针对NAFLD尚无正式批准的特效药,有学者指出对NAFLD人群进行分层级的规范化管理、多学科联合诊疗是阻断NAFLD进展、防止其向肝纤维化、肝硬化甚至肝癌演变的重要举措^[6]。而传统中医特有的整体观念、辨证论治思想,十分契合现代医学所倡导的精准化治疗;且中药具有多成分、多靶点、多途径的作用特点,使得中医中药治疗NAFLD的前景广阔。

在中医学中,NAFLD可纳入“肝癖”、“胁痛”、“痞满”、“积聚”等的范畴,其基本病机特点为肝郁脾虚,进一步导致了湿、痰、热、瘀等病理产物,共同参与NAFLD的发生发展^[7]。护肝汤(HGT)是我科结合多年治疗NAFLD的实践经验总结得出的临床验方,由中医经方四君子汤、大柴胡汤和茵陈蒿汤加减而成,由茯苓、党参、白术、甘草、柴胡、大黄、枳实、郁金、茵陈组成。本方借四君子汤健脾气以益气补虚、燥脾土以祛湿扶正,以期恢复脾脏运化之功能,正如仲景先师云:“见肝之病,知肝传脾,当先实脾”;同时搭配柴胡条达肝气,枳实宽中行气,郁金活血理气,大黄推陈致新,配茵陈清利湿热、攻下祛邪,予邪气以出路。诸药相伍,使脾气清、肝气顺、湿浊化、痰瘀消,共奏疏肝健脾,化湿祛浊之功。

本课题组前期研究发现HGT能有效降低糖尿病大鼠模型的肝功(ALT、AST)及血脂等水平,减轻大鼠肝脏脂肪变性程度^[8],并且经临床验证HGT在降血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)等方面疗效显著。然而,HGT调控NAFLD的具体分子机制尚不明确。本研究利用网络药理学预测结合体内、体外实验验证,深入探讨护肝汤改善NAFLD的作用机制,进一步优化其理论依据,从而更好的服务于临床实践。

1 材料和方法

1.1 动物

SPF级健康雄性Wistar大鼠56只,购于斯贝福(北京)生物技术有限公司[许可证号为SCXK(京)2019-0010],

体质量在170~190 g,周龄为6~7周,饲养于天津市中西医结合急腹症研究所动物平台中心,喂养环境温度 $22\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $40\%\pm 20\%$,自由进食及饮水。本研究动物实验经天津市中西医结合医院动物伦理委员批准(伦理批号:NKYY-DWLL-2023-172)。

1.2 细胞培养

本实验所使用的HepG2细胞株由中西医结合急腹症研究所袁向飞老师赠与。采用DMEM高糖完全培养基培养于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 的恒温培养箱中,隔日更换完全培养基。实验时选取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 药物与试剂

中药护肝汤颗粒剂购于天津市中西医结合医院颗粒药房,颗粒药生产厂家为北京康仁堂药业有限公司,中药药材和中药颗粒转换系数如下:大黄生药量9 g(颗粒量22.5 g)、郁金生药量10 g(颗粒量18.2 g)、枳实生药量10 g(颗粒量5 g)、白术生药量15 g(颗粒量115 g)、甘草生药量10 g(颗粒量33.3 g)、党参生药量15 g(颗粒量150 g)、柴胡生药量15 g(颗粒量37.5 g)、茯苓生药量15 g(颗粒量12 g)、茵陈生药量15 g(颗粒量33 g)。

大鼠正常饮食和高脂饮食饲料[赛诺生物科技(四平)有限公司];水飞蓟素(利加隆,MADAUS GMBH);油酸(macklin);棕榈酸(Sigma);CCK-8试剂盒(索莱宝);BCA蛋白定量检测试剂盒、逆转录试剂盒(赛维儿);Fatty Acid Synthase(FASN)抗体、Acetyl Coenzyme A carboxylase alpha(ACC1)抗体(Abcam);Phospho-AMPK alpha抗体、Phospho-mTOR抗体(Cell Signaling);Anti-GAPDH抗体(Servicebio)。Trypsin-EDTA(0.25%)、DMEM高糖培养基(GIBCO),青链霉素混合液(100 \times)、牛血清白蛋白BSA-V(不含脂肪酸)(索莱宝);胎牛血清(VivaCell);甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)测定试剂盒(南京建成);Compound C,AMPK抑制剂(MCE);MHY1485,mTOR激活剂(MCE)。

1.4 仪器

32HK型高速冷冻离心机(Hermle);HT-400B型电热恒温箱(上海赫田);T-360型酶标仪(中国科华KHB);G1150H+C型石蜡包埋机、SP 200S型全自动组织脱水机(Leica);LH-220型自动组织匀浆仪(Omni);NanoDrop ND-200分光光度计(Thermo);实时荧光定量PCR仪7500(Applied Biosystems Inc.);anon-4800 Multi型凝胶成像分析系统(上海天能);自动生化分析仪(MINDRAY)。

1.5 网络药理学预测

1.5.1 HGT有效成分筛选及潜在靶点预测 利用TCMSP数据库(https://www.tcmspe.com/load_intro.php?id=43),以口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18为条件,依次筛选出HGT中茯苓、党参、白术、甘草、柴胡、大黄、枳实、郁金、茵陈的有效活性成分,并逐一于PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得成分的SMILES结构式。再使用SwissADME平台(<http://www.swissadme.ch/>)以胃肠道吸收(GI absorption)的得分为“high”、类药性(druglike-ness)至少通过2个“Yes”进行筛选。随后将其SMILES信息输入至SwissTargetPrediction数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>),以获取潜在的化合物靶点,并选取Probability>0.1的靶点蛋白。

1.5.2 NAFLD疾病靶点的筛选及交集靶点基因的获取 在GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://cn.string-db.org/>)、TTD(<https://db.idrblab.net/ttd/>)、PharmGKB(<https://www.pharmgkb.org/>)数据库中以“Non-alcoholic fatty liver disease”为关键词进行检索,将其汇集并去重后得到NAFLD的疾病靶点基因。然后于Venny 2.10在线工具制作HGT与NAFLD的交集基因,从而得到HGT治疗NAFLD潜在作用靶点。

1.5.3 PPI网络的构建及核心靶点筛选 将交集基因导入STRING数据库(<https://cn.stringdb.org/>),物种设置为“Homo sapiens”,其他参数保持默认,构建交集蛋白相互作用(PPI)网络。随后,将之引入Cytoscape 3.9.1软件行可视化处理,并筛选出HGT治疗NAFLD的核心靶点。

1.5.4 GO及KEGG富集分析 将HGT治疗NAFLD的潜在靶点导入Metascape数据库(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>),分别进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析,选取富集程度最高的条目($P<0.01$),并借助微生信在线平台进行可视化分析,确定关键靶点及富集通路。

1.6 HGT对NAFLD大鼠肝脏的保护作用研究

1.6.1 分组、造模及给药 适应性喂养7 d后,采用随机数表法将大鼠随机分为7组,即正常饮食(ND)组、高脂饮食(HFD)组、HFD+HGT低剂量(L-HGT)组、HFD+HGT中剂量(M-HGT)组、HFD+HGT高剂量(H-HGT)组、HFD+水飞蓟素(Silymarin)组、ND+HGT高剂量(NH)组,8只/组。除ND组和NH组大鼠接受常规饲料喂养外,其余各组大鼠均持续接受10周的HFD,用于建立NAFLD模型。

依据人体与大鼠体表面积换算确定等效剂量:对于70 kg的患者,临床剂量为114 g/d。将该剂量换算为大鼠剂量,计算公式为 $114/70 \times 6.3 = 10.26$ g/kg,并以此作为大鼠的中剂量,设置低、高药量分别为中剂量的1/2倍和2倍数,所以低、高药量分别为5.13 g/kg及20.52 g/kg。

大鼠水飞蓟素给药量参考文献用量选用100 mg/kg^[9]。HGT及Silymarin组大鼠每日灌胃给予相应剂量HGT及水飞蓟素,而ND组和HFD组则给予等体积的生理盐水,1次/d,连续给药10周。

1.6.2 大鼠肝脏指数及血清生化指标的测定 在饲养期间观察各组大鼠毛色、活动、精神、饮食等,每周记录体质量变化,连续饲养10周后称取大鼠肝质量,并计算各组大鼠肝脏指数。最后一次灌胃相应药物后,大鼠禁食12 h,采集大鼠腹主动脉血液并离心,吸取上清后通过全自动生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、低密度脂蛋白(LDL)、乳酸脱氢酶(LDH)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)水平。

1.6.3 肝脏组织病理学检测 大鼠肝脏组织浸泡于10%多聚甲醛溶液中固定24 h后,分别采用石蜡包埋和OCT包埋两种方式处理。对于石蜡包埋的肝脏组织,将其切成3~5 μm厚度的切片进行苏木素伊红(HE)染色;对于OCT包埋的肝脏组织,切成5~10 μm厚度的切片进行油红O染色。最后均通过显微镜观察大鼠肝脏组织的病理形态变化。

1.6.4 RT-qPCR法检测肝脏中ACC1、FASN、AMPK、m-TOR的mRNA表达 使用Trizol法提取总RNA,并逆转录成cDNA,然后应用2×Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix试剂盒进行实时定量PCR(RT-qPCR)。内参基因定为GAPDH,并使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因的相对表达量,引物序列见表1,所有引物均由Sangon Biotech公司合成。

1.6.5 Western blotting法检测肝脏中ACC1、FASN、p-AMPK、p-mTOR的蛋白表达 称取30 mg~50 mg大鼠肝脏组织,加入预配好的RIPA裂解液置于全自动匀浆仪中充分匀浆处理。匀浆后的组织样本置于冰上充分裂解30 min,随后使用高速冷冻离心机离心,收取上清液,采用BCA试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经SDS-PAGE凝胶电泳分离后转至PVDF膜,用5%脱脂牛奶封闭2 h,再加入一抗(ACC1、FASN稀释比例1:5000、p-AMPK、p-mTOR)(稀释比例1:1000)后4℃冰箱孵育过夜。隔日用TBST溶液洗涤5次后加入二抗(稀释比例1:50 000),继续室温孵育2 h。再次使用TBST溶液洗涤5次后,使用化学发光显影剂进行显影,最后通过Image J软件分析条带灰度值。

1.7 HGT含药血清(HGTs)对FFA诱导HepG2细胞的影响

1.7.1 HGT含药血清的制备 选取20只6~7周龄雄性Wistar大鼠随机等分为HGT处理组和空白对照组,HGT处理组灌胃剂量为 $20.52 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,空白对照组则给予等量生理盐水。在第3天灌胃结束2 h后进行腹主动脉采血,将采集的血液在室温下静置30 min,3500 r/min离心10 min取上清液,56℃灭活30 min后过滤除菌、分

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences for RT-qPCR

Gene	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
r-GAPDH	AGATGGTGAAGGTCGGTGTG	CTGGAAGATGGTGTGGGTT
r-ACC1	GGAACATCCCCACGCTAAA	CATGCGTTGACAAGGTGGTG
r-FASN	TGTACCCTCTAGCTGGACCC	CCAGGCTAAGGGCAATGGAA
r-AMPK	TCAAAGCCGACCCAATGACA	CTTCCTTCGCACACGCAAAT
r-mTOR	ACCCATCCAACCTGATGCTG	TCGAGACCGGTAACCTCCAT
h-GAPDH	CAAAATCCATGGCACCCTCA	GACTCCACGACGTACTCAGC
h-ACC1	AGGAGCTGTCTATTCCGGGT	GGTCGCTCAGCCTGTACTTT
h-FASN	CCTGGCTGCCTACTACATCG	CACATTTCAAAGGCCACGCA
h-AMPK	TGCTTTTTGTCCAGGGCTTG	ATCCCCTAAAGAGAGGGCCA
h-mTOR	GCCACTGTGCGGATCATTTC	AGCGAATGTCAGGGTCAGGA

装, -80 °C保存备用。

1.7.2 细胞活性的测定与细胞分组 先取对数生长期的HepG2细胞接种于96孔板中,分别设置对照组、BSA组及不同浓度FFA组,待细胞贴壁后加入不同浓度(0.5、1、2、4 mmol/L)的FFA,处理24 h后以CCK-8试剂盒测定细胞活性,以确定FFA的最佳造模浓度。

为评价HGTs对FFA诱导的HepG2细胞活性的影响,将对数生长期的HepG2细胞分别给予5%、10%、20%、40%、60%对照血清(CONs)和HGTs处理24 h后,再用CCK-8试剂盒检测细胞活力,以确定HGTs的用药浓度。为了确定HGTs是否通过AMPK/m-TOR发挥作用,使用Compound C(CC, AMPK抑制剂)及MHY1485(MHY, mTOR激活剂)做进一步的通路验证。

1.7.3 细胞脂质蓄积的检测 采用油红O染色试剂盒检测各组细胞脂质蓄积,并使用TC、TG试剂盒测定各组细胞TC、TG水平,操作参照试剂盒说明书。

1.7.4 RT-qPCR法检测细胞中ACC1、FASN、AMPK、m-TOR的mRNA表达 采用RT-qPCR检测核心靶点ACC1、FASN、AMPK、m-TOR表达水平,具体步骤同1.6.4,引物序列见表1。

1.7.5 Western blotting法检测细胞中ACC1、FASN、p-AMPK、p-mTOR的蛋白表达 采用Western blotting法检测细胞中ACC1、FASN、p-AMPK、p-mTOR的蛋白表达,具体步骤同1.6.5。

1.8 统计学分析

运用GraphPad Prism 10.4.1及Excel 2003处理数据及作图,数据均以均数±标准差表示。计量资料满足正态分布及方差齐性检验时,多组间使用one-way ANOVA分析处理, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 HGT有效成分筛选及潜在靶点预测 从TCMSP

及SwissADME数据库中共筛选得到140种HGT有效成分,包括茯苓3种、党参6种、白术3种、甘草78种、柴胡11种、大黄3种、枳实19种、郁金6种、茵陈11种,合并去重后共计130种。利用SwissTargetPrediction平台预测这些有效成分的潜在靶点,删除重复值并校正后最终获得899个潜在靶点基因。

2.1.2 HGT与NAFLD的共同作用靶点 分别从GeneCards、OMIM、TTD、PharmGKB数据库中筛选出1337个、538个、23个、3个相关的疾病靶点,删除重复值并校正后最终获得1833个NAFLD疾病靶点基因。利用韦恩图获得HGT治疗NAFLD的潜在作用靶点共267个(图1A)。

2.1.3 PPI网络的构建与核心靶点筛选 将上述267个交集靶点导入STRING数据库,分析HGT治疗NAFLD的潜在作用靶点,构建PPI网络,并将之引入Cytoscape3.9.1软件进行可视化分析,删除游离节点后得到包含53个节点和986条边的网络。所以HGT治疗NAFLD的核心靶点基因有53个,而这其中几乎有一半都与脂质代谢相关(图1B)。

2.1.4 HGT治疗NAFLD靶点的GO及KEGG富集分析 将HGT治疗NAFLD的潜在作用靶点引至Metascape数据库中进行GO和KEGG富集分析。GO富集分析显示:生物过程(BP)涉及257个条目,细胞组分(CC)涉及96个条目,分子功能(MF)涉及178个条目,主要包括细胞对脂质的反应等(图1C)。HGT治疗NAFLD的KEGG富集分析涉及137个条目,主要包括癌症通路、脂质与动脉粥样硬化信号通路、胰岛素抵抗信号通路、AMPK信号通路等(图1D)。

2.2 体内动物实验验证

2.2.1 HGT对NAFLD大鼠体质量及肝脏形态的影响 造模给药10周后,与HFD组相比,HGT组大鼠体质量增长速度呈放缓趋势(图2A),且M-HGT、H-HGT、

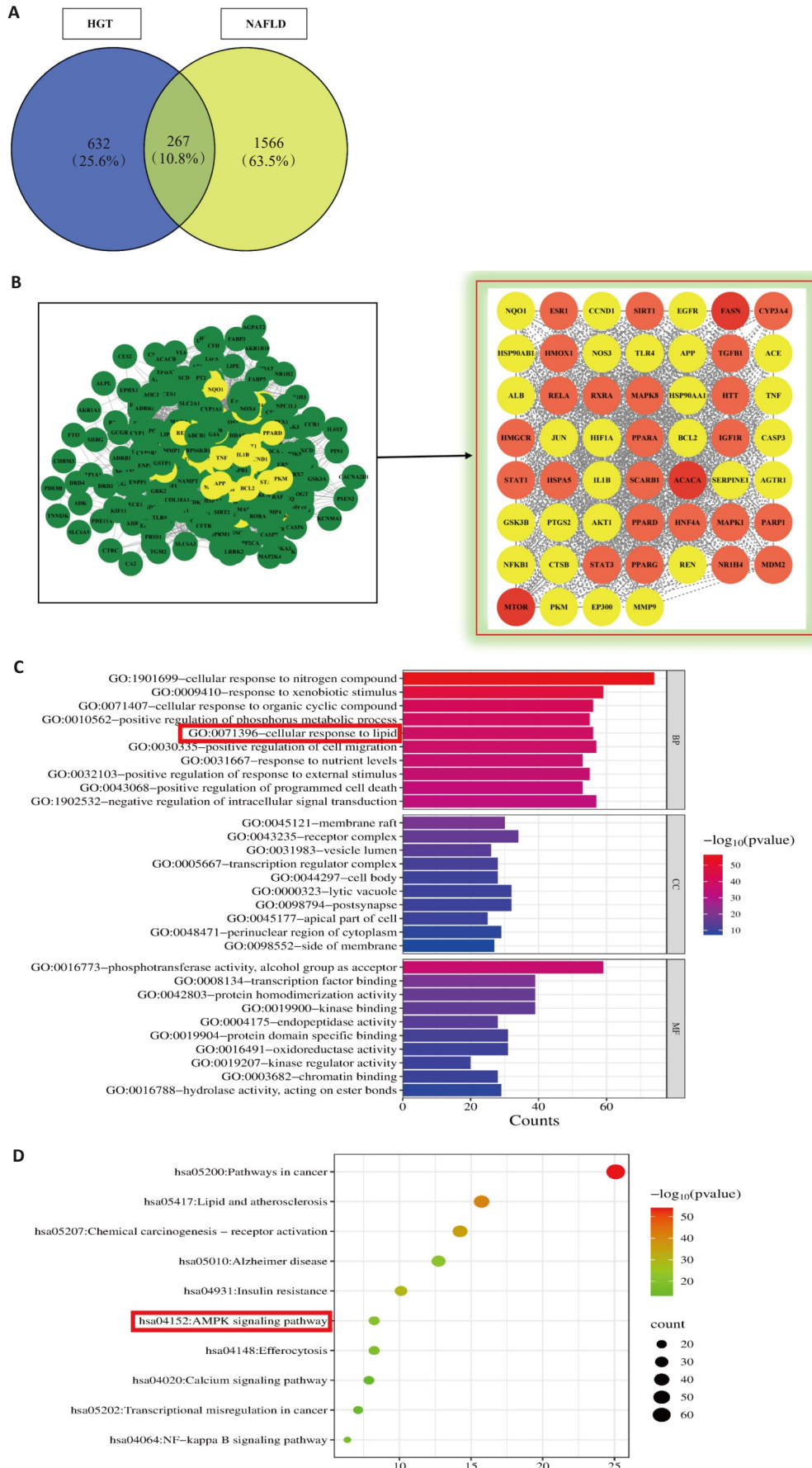


图1 HGT治疗NAFLD网络药理学分析

Fig. 1 Network pharmacology analysis of Hagan Decoction (HGT) for treatment of NAFLD. A: Venn diagram of HGT-NAFLD common targets. B: PPI network and core target screening of HGT for NAFLD treatment. C: GO enrichment analysis of potential targets of HGT for the treatment of NAFLD. D: Bubble chart of KEGG enrichment analysis of potential targets of HGT for treatment of NAFLD.

Silymarin组大鼠肝脏指数明显降低($P<0.05$,图2B);各给药组大鼠肝脏表面渐趋光滑平整,色泽较HFD组鲜艳红润,肿胀及油腻程度减少(图2C)。

2.2.2 HGT对NAFLD大鼠肝脏组织病理学的影响 HE染色显示:与ND组相比,HFD组超过65%的视野区域中可见大小不一的脂肪空泡,且胞核偏于一侧,肝小叶结构受损,肝索排列紊乱,肝血窦狭窄甚至消失,同时伴有炎症细胞浸润至肝小叶,符合NAFLD的诊断标

准。与HFD组相比,各HGT组及Silymarin组肝脏中空泡样病变明显改善,肝索排列渐趋整齐,炎症细胞浸润数量明显降低(图2D)。

2.2.3 HGT对NAFLD大鼠肝功能的影响 与ND组相比,HFD组大鼠血清中ALT和AST的活性增加($P<0.05$);而在经过HGT和Silymarin干预后,血清中肝酶的水平均明显下降,并且HGT表现出明显的剂量依赖性特征($P<0.05$,图2E、F)。

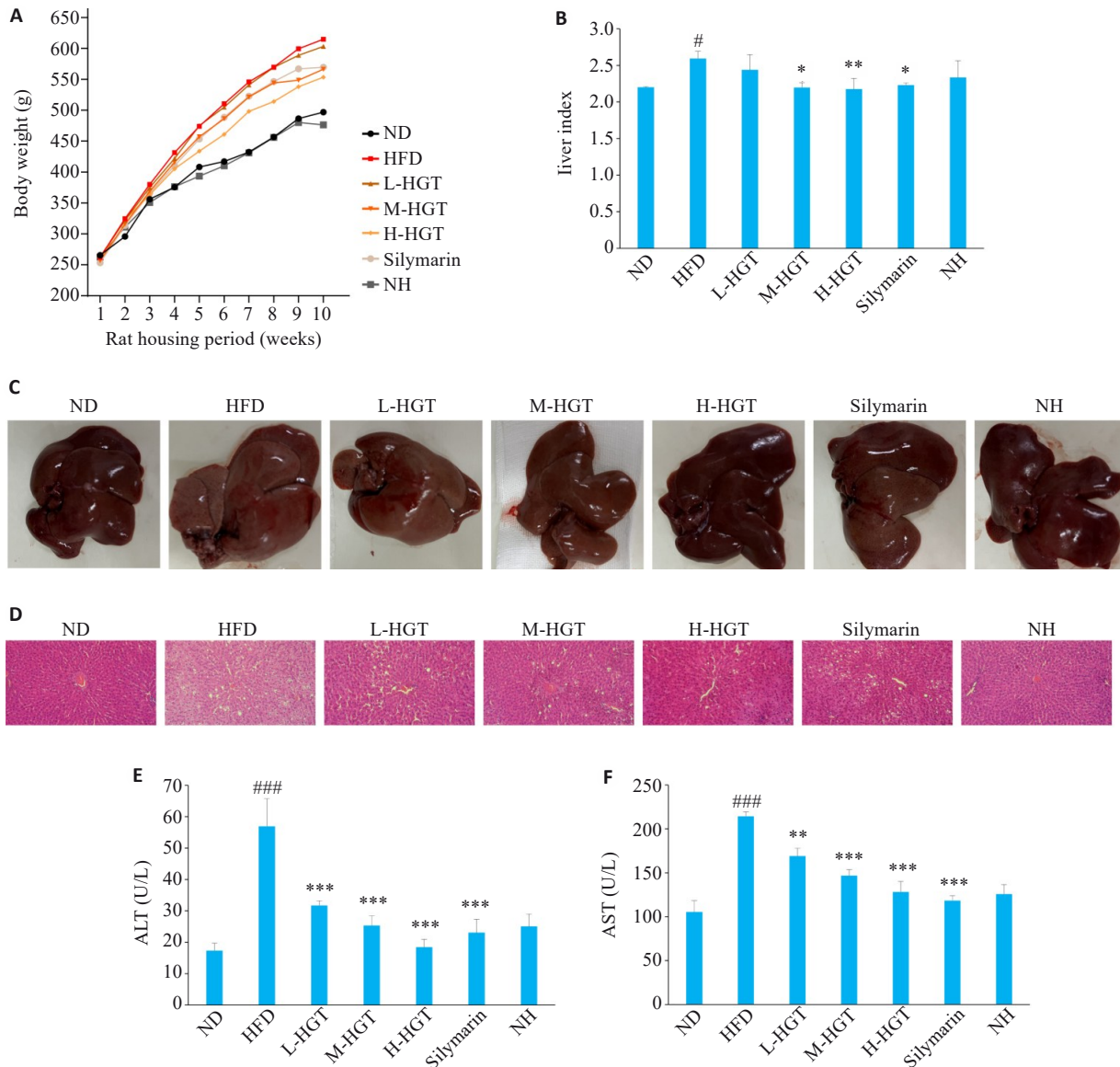


图2 HGT能够减轻NAFLD大鼠肝损伤

Fig.2 HGT attenuates liver injury in NAFLD rats. Effects of HGT on body weight (A), liver index (B) and liver morphology (C) in NAFLD rats (Mean±SD, n=8). D: Effects of HGT on hepatic histopathological changes in NAFLD rats (HE staining, original magnification: ×200). E, F: Effects of HGT on liver function in NAFLD rats (Mean±SD, n=8). [#] $P<0.05$, ^{###} $P<0.001$ vs ND group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs HFD group.

2.2.4 HGT对NAFLD大鼠脂质蓄积的影响 油红O染色结果显示,与ND组相比,HFD组大鼠肝脏组织中出现大量鲜红色脂滴,占镜下视野80%以上,细胞核蓝染,间质无色,脂质蓄积明显;与HFD组相比,各HGT组及

Silymarin组大鼠肝脏组织中红色脂滴明显减少,其中H-HGT组减少最为明显(图3A)。与ND组相比,HFD组大鼠血清TG、TC、LDL含量明显升高($P<0.05$),HDL含量则明显下降($P<0.05$);而在经过HGT和Silymarin

干预后,血清中TG、TC、LDL含量下降,HDL则呈升高趋势($P<0.05$,图3B~E)。

2.2.5 HGT对NAFLD大鼠肝脏脂质合成关键因子ACC1、FASN表达的影响 RT-qPCR结果显示(图3F、G):与ND组相比,HFD组肝脏ACC1、FASN mRNA表达明显上调($P<0.05$);与HFD组相比,HGT组及

Silymarin组肝脏ACC1、FASN mRNA均呈降低趋势($P<0.05$)。

Western blotting结果显示(图3H~J):与ND组对比,HFD组大鼠肝脏ACC1、FASN蛋白表达增高($P<0.05$);与HFD组相比,H-HGT组及Silymarin组ACC1及FASN表达降低($P<0.05$)。

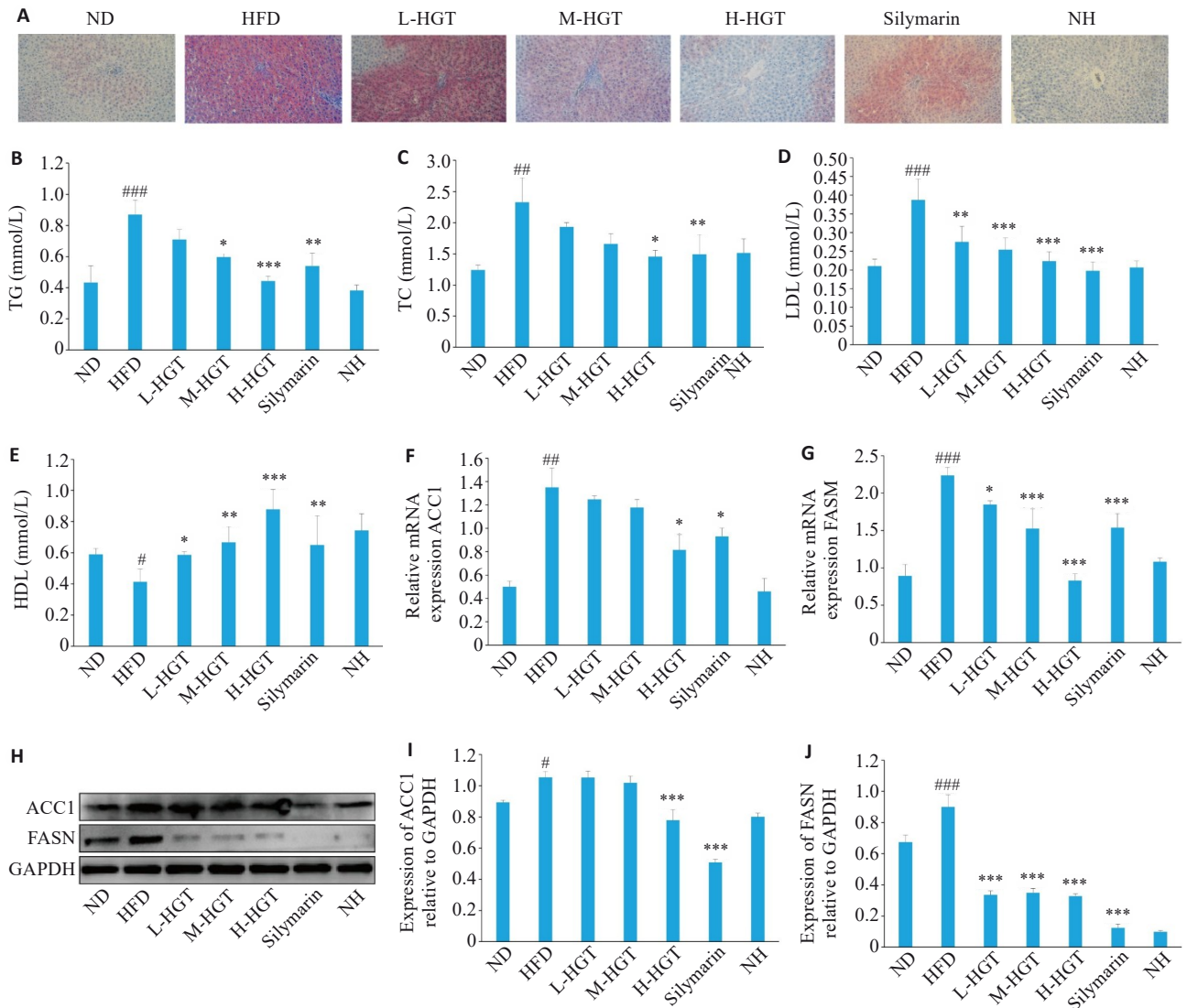


图3 HGT对NAFLD大鼠脂质水平的影响

Fig3 Effects of HGT on lipid deposition in NAFLD rats. A: Oil red O staining of liver tissues in NAFLD rats in different groups ($\times 200$). B-E: Effects of HGT on blood lipids in NAFLD rats. F, G: Effects of HGT on mRNA expressions of ACC1 and FASN in NAFLD rats (Mean \pm SD, n=8). H-J: Effects of HGT on protein expressions of ACC1 and FASN (Mean \pm SD, n=8). [#] $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs ND group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$, ^{***} $P<0.001$ vs HFD group.

2.3 体外细胞实验验证

2.3.1 HGTs对HepG2细胞活性的影响 采用不同浓度的FFA(0.5、1、2、4 mmol/L)处理HepG2细胞。0.5 mmol/L FFA处理HepG2细胞与对照组细胞活力无统计学意义($P>0.05$),其余各组FFA浓度均能抑制细胞活力($P<0.05$,图4A)。后续实验选用0.5 mmol/L FFA作为诱导HepG2细胞脂肪变浓度。

通过CCK-8实验检测不同浓度的HGTs与CONs对HepG2细胞活力的影响。结果显示5%、10%、20%的

HGTs与对应浓度的CONs相比细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$),40%、60% HGTs较对应浓度CONs细胞活力增强($P<0.05$,图4B)。故选用5%、10%、20% HGTs和CONs进行实验。

2.3.2 HGTs对HepG2细胞脂质蓄积的影响 与空白对照组(CON)比较,油红O染色显示FFA组HepG2细胞内红色脂滴明显增加;与CONs组比较,不同浓度HGTs组干预后肝细胞胞浆内的红色脂滴明显减少,其中20% HGTs组效果最为明显(图4C)。

与空白对照组相比,FFA处理后HepG2细胞中TG和TC含量明显升高($P<0.05$);与对应浓度的CONs组比较,HGTs组细胞内TG、TC均明显减少($P<0.05$,图4D,E)。2.3.3 HGTs对FFA诱导的HepG2细胞内脂质合成关键因子ACC1、FASN表达的影响 RT-qPCR结果显示(图4F、G):与空白对照组相比,FFA组HepG2细胞的ACC1、FASN mRNA水平均明显升高($P<0.05$);与对应浓度CONs组相比,各浓度HGTs组均能降低ACC1、

FASN的mRNA水平(其中对FASN的mRNA呈浓度依赖性下降)($P<0.05$)。

Western blotting结果显示(图4H~J):与空白对照组相比,FFA组ACC1、FASN蛋白表达水平均明显增加($P<0.05$);与不同浓度的CONs组相比,对应浓度的HGTs组ACC1蛋白表达明显减少($P<0.05$),除5%HGTs组不能降低细胞内FASN表达水平($P>0.05$),10%、20%HGTs组均能降低细胞内FASN表达($P<0.05$)。

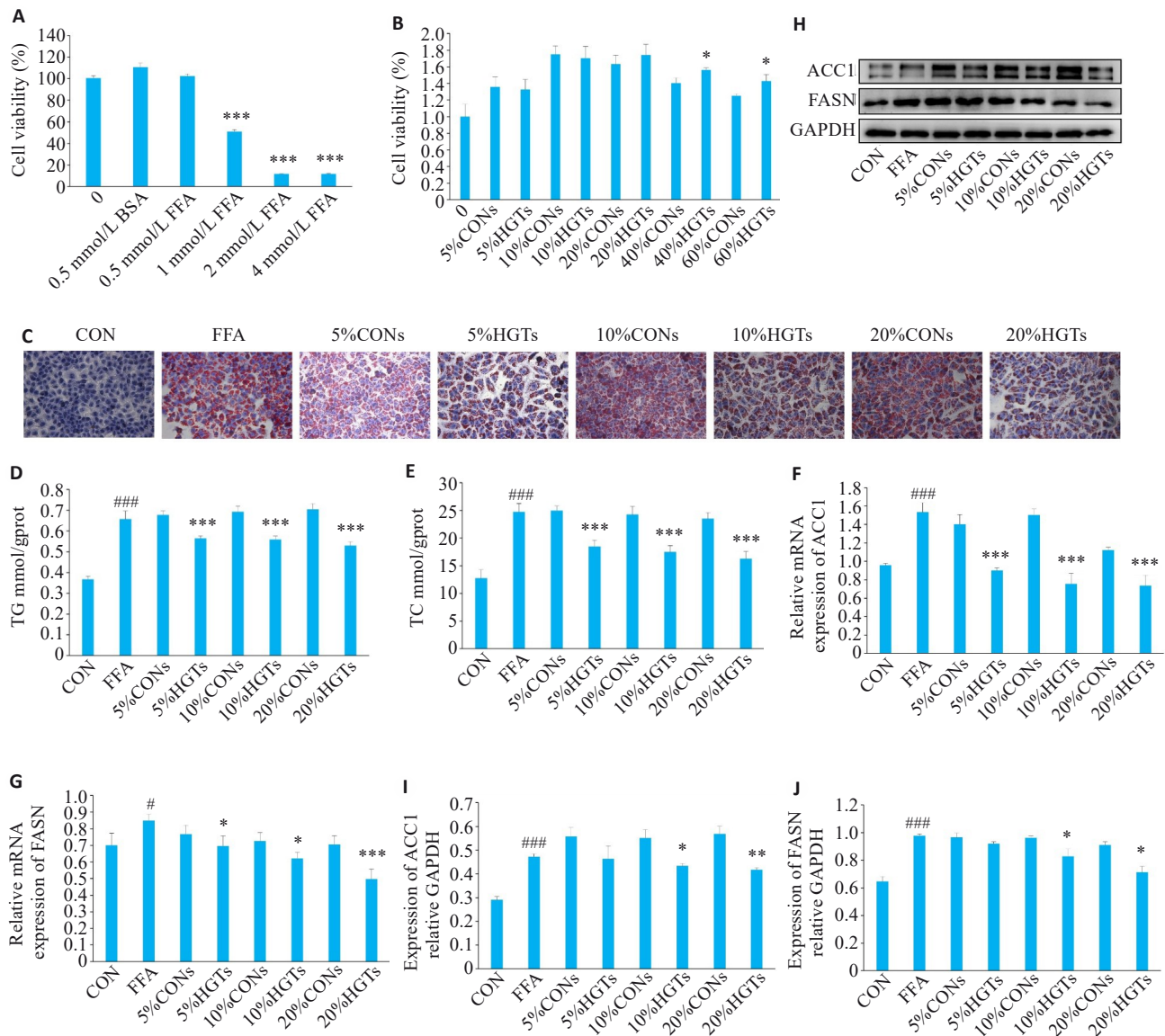


图4 HGT含药血清对HepG2细胞脂质沉积的影响

Fig. 4 Effects of HGT-mediated serum on lipid deposition in FFA-induced HepG2 cells. A, B: CCK-8 assay for assessing the effect of different concentrations of FFA and HGT-mediated serum on HepG2 cell viability. C: Oil red O staining of HepG2 cells ($\times 200$). D, E: Effects of HGT-mediated serum on TG and TC in FFA-induced HepG2 cells. F, G: Effects of HGT-mediated serum on mRNA expressions of ACC1 and FASN in FFA-induced HepG2 cells. H, J: Effects of HGT-mediated serum on protein expressions of ACC1 and FASN in FFA-induced HepG2 cells. $^{\#}P<0.05$, $^{###}P<0.001$ vs CON group; $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$ vs different concentrations of CONs groups.

2.4 HGT通过AMPK/m-TOR信号通路调控NAFLD大鼠肝组织及FFA诱导HepG2细胞内脂质合成

2.4.1 HGT对NAFLD大鼠肝组织中AMPK/m-TOR信号通路的影响

RT-qPCR结果显示(图5A、B)AMPK

及m-TOR的mRNA表达水平在各处理组中差异无统计学意义。Western blotting结果显示(图5C~E):与ND组相比,HFD组大鼠肝组织中p-AMPK蛋白表达明显增高,而p-mTOR蛋白表达较之降低($P<0.05$);与HFD

组相比,各组 HGT 及 Silymarin 组 p-AMPK 表达升高 ($P<0.05$), H-HGT 组及 Silymarin 组 p-mTOR 蛋白表达则明显减少 ($P<0.05$)。

2.4.2 HGT 含药血清对 FFA 诱导 HepG2 细胞中 AMPK/m-TOR 信号通路蛋白的影响 RT-qPCR 结果显示(图 5 F、G) AMPK 及 m-TOR 的 mRNA 表达水平在各处理组中差异无统计学意义,同动物实验结果一致。Western

blotting 结果显示(图 5H~J):与空白对照组相比,FFA 组中 p-AMPK 和 p-mTOR 蛋白表达水平明显增高 ($P<0.05$)。与相同浓度 CONs 组相比,5% HGTs 组的 p-AMPK 蛋白表达增加 ($P<0.05$),但 p-mTOR 的表达未见变化 ($P>0.05$);相比之下,10% 和 20% HGTs 组的 p-AMPK 表达水平上调 ($P<0.05$),而 p-mTOR 的表达则下调 ($P<0.05$)。

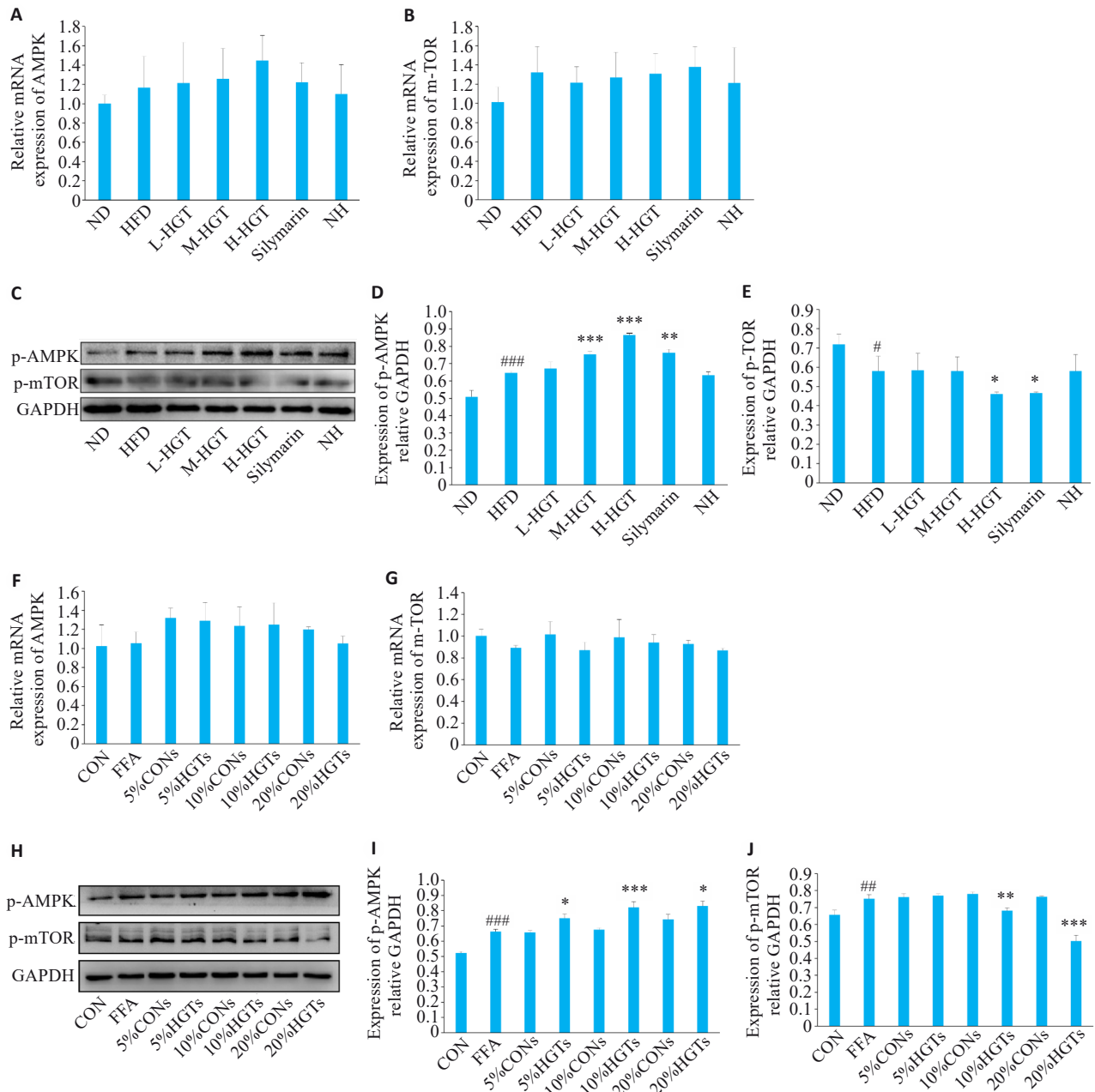


图 5 HGT 通过 AMPK/m-TOR 信号通路调控 NAFLD 大鼠肝组织及 FFA 诱导 HepG2 细胞内脂质合成

Fig.5 HGT regulates lipid synthesis in the liver of NAFLD rats and in FFA-induced HepG2 cells through the AMPK/m-TOR signaling pathway. **A, B:** Effects of HGT on mRNA expressions of AMPK and m-TOR in NAFLD rats (*Mean*±*SD*, *n*=8). **C-E:** Effects of HGT on AMPK/m-TOR pathway in NAFLD rats (*Mean*±*SD*, *n*=8). **F, G:** Effects of HGT-mediated serum on mRNA expressions of AMPK and m-TOR in FFA-induced HepG2 cells. **H-J:** Effects of HGT-mediated serum on AMPK/m-TOR signaling pathway in FFA-induced HepG2 cells. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs ND/CON group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ vs HFD/ different concentrations of CONs group.

2.4.3 HGT含药血清通过AMPK/m-TOR信号通路调控FFA诱导HepG2细胞脂质合成 前面显示10%的CONs与对应浓度的HGTs效果较佳,故选用10%HGTs和CONs进行后续实验。Western blotting结果显示(图6A、B):与CONs组相比,HGTs组p-AMPK蛋白表达明显增高,p-mTOR、ACC1、FASN水平降低($P<0.05$); CONs+CC组p-AMPK蛋白水平明显降低,同时p-mTOR、ACC1和FASN表达升高($P<0.05$)。与HGTs组相比,HGTs+CC组p-AMPK降低,而p-mTOR、ACC1

和FASN表达也有不同程度的升高。

Western blotting结果显示(图6C、D):与CONs组相比,HGTs组p-mTOR、ACC1、FASN蛋白表达明显降低($P<0.05$);加入MHY后则促进了p-mTOR、ACC1和FASN的表达(CONs+MHY)($P<0.05$)。与HGTs组相比,加入MHY后,HGTs对p-mTOR、ACC1和FASN的降低作用受到抑制,HGTs+MHY组中p-mTOR、ACC1和FASN的表达明显升高($P<0.05$)。

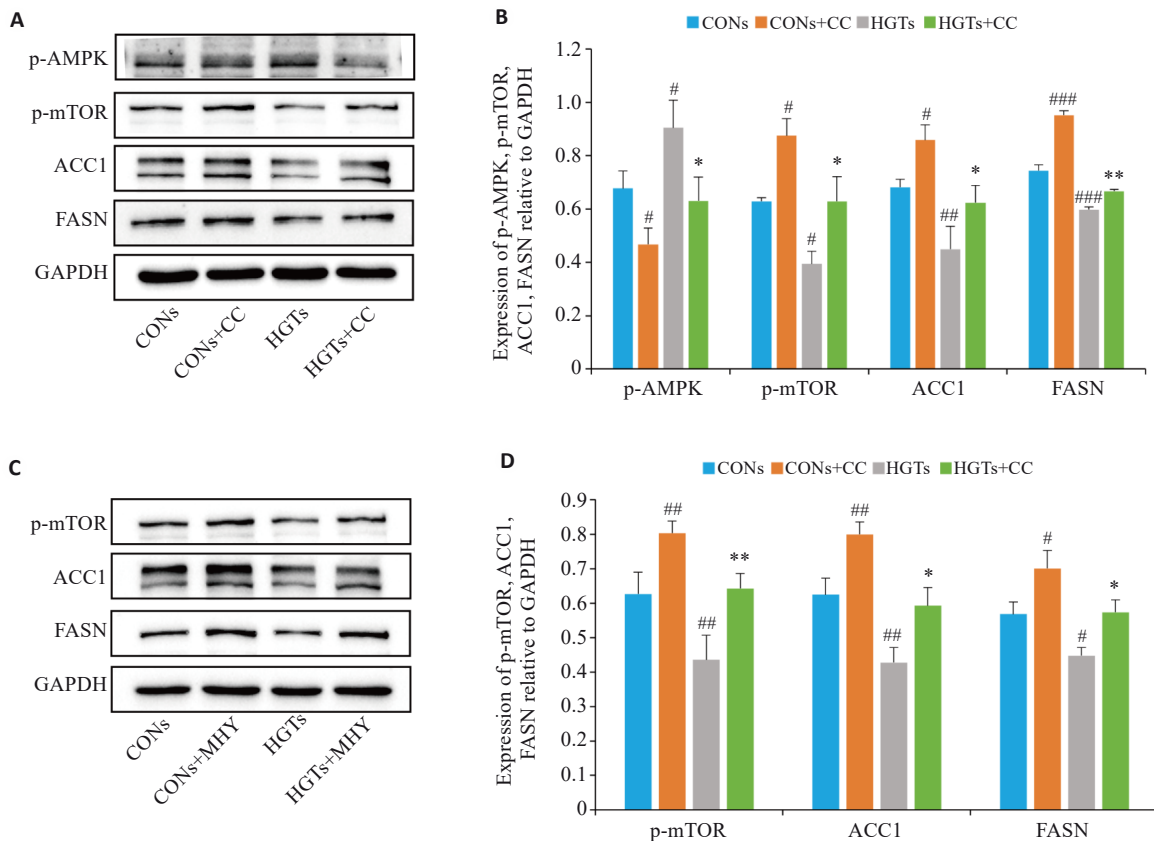


图6 HGT含药血清通过AMPK/m-TOR信号通路调控FFA诱导HepG2细胞脂质合成

Fig. 6 HGT-mediated serum regulates lipid synthesis in FFA-induced HepG2 cells via the AMPK/mTOR signaling pathway. A, B: Effect of compound C on AMPK/m-TOR signaling pathway proteins and lipid synthesis proteins ACC1 and FASN in FFA-induced HepG2 cells. C, D: Effects of the m-TOR activator (MHY) on m-TOR proteins and ACC1 and FASN proteins in FFA-induced HepG2 cells. [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$, ^{###} $P<0.001$ vs CONs group; ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ vs HGTs group.

3 讨论

本研究利用网络药理学预测结合实验验证的方法,初步探索了HGT治疗NAFLD的潜在作用机制。网络药理学发现哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(m-TOR)、脂肪酸合成酶(FASN)、乙酰辅酶A羧化酶 α (ACACA,又称ACC1)等核心靶点作用于脂质与动脉粥样硬化信号通路、AMPK等相关信号通路,从而多靶点、多途径改善NAFLD。最后通过体内、体外实验进一步验证HGT对FASN、ACC1及AMPK/m-TOR信号通路的作用。

本研究先通过HFD饮食建立NAFLD大鼠模型,从

体内层面探讨HGT对NAFLD大鼠的影响。研究结果显示,从生化指标、组织形态学检测以及血脂水平证实HFD能够成功诱导NAFLD模型,与既往研究结果一致^[10-12]。经HGT处理后,HGT各组大鼠体质量增长速度放缓,肝脏表面渐趋光滑平整,色泽较HFD组鲜艳红润,肿胀及油腻程度减少,同时肝小叶、肝索等结构的破坏较HFD组轻,肝脏脂滴空泡呈剂量依赖性降低,并且HGT能明显降低大鼠血清肝功能生化指标AST、ALT水平,降低TG、TC、LDL等脂质指标。说明HGT能够减少HFD诱导大鼠血清中的脂质水平。另一方面,通

过构建体外由FFA诱导HepG2细胞实验也证实,HGTs能显著降低HepG2细胞内TG、TC水平,且油红O染色亦表明在给予不同浓度的HGTs后,脂滴数量明显下降,肝细胞脂肪变性情况得到明显改善。

护肝汤由四君子汤、大柴胡汤以及茵陈蒿汤加减化裁而成,具有疏肝健脾,化湿祛浊之功。有研究表明^[13,14]四君子具有降低血清转氨酶活性与提高肝脏代谢之功,这可能是通过槲皮素、山柰酚、木犀草素等活性成分作用于STAT3、JUN、TNF、AKT1、TP53等靶点实现。另有研究证实^[15-17]大柴胡汤能够改善脂质沉积、炎症反应和氧化应激,从而减轻NAFLD的病理状态。此外现代药理学研究表明^[18],茵陈蒿汤可以改善血脂紊乱、肝功能、肝脏的脂肪变性及脂质沉积等情况,这或许是经过调控肠-肝轴降低肝脏TG的生成,从而发挥防治代谢相关性脂肪性肝病的作用。可见,HGT内多组分共同发挥保肝降脂作用。在本研究中,通过网络药理学分析发现,乙酰辅酶A羧化酶1(ACC1)和脂肪酸合成酶(FASN)是HGT作用于NAFLD的核心靶点。

ACC1是脂肪酸从头合成过程中第一个限速酶,能够催化乙酰辅酶A羧化为丙二酰辅酶A;随后由FASN催化形成16碳的饱和脂肪酸棕榈酸酯,这是脂肪酸从头合成的最后一步,所以脂肪酸合成限速酶ACC1和FASN是参与脂质合成的关键蛋白,可以促进脂肪酸的过度合成,加剧肝脏脂肪的积累,进而导致NAFLD的发生发展^[19,20]。在本研究中,ACC1、FASN在HFD诱导动物模型和FFA诱导HepG2细胞模型中均显著升高,与既往研究结果一致^[21-23]。HGT处理后,肝组织和细胞中ACC1和FASN表达水平显著下降,表现出良好的降低脂肪合成能力,从而减少肝组织脂肪积累。

KEGG通路富集分析发现AMPK/m-TOR信号通路在HGT改善NAFLD作用中扮演着举足轻重的角色。AMPK是一种广泛表达的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在NAFLD、肥胖和T2DM等代谢性疾病中,AMPK的激活在增加葡萄糖摄取、促进脂肪酸氧化、改善线粒体生物发生和自噬等方面发挥了重要作用,同时能够抑制脂肪酸、TC和蛋白质的合成^[24]。m-TOR通路处于细胞生长和代谢的中心,参与了NAFLD的发生发展,可以促进细胞脂质的合成,进一步加重脂质累积^[25]。最近很多实验发现,药用植物的有效成分可以通过AMPK/m-TOR通路减少肝脏脂滴。如Zhang等^[26]报道百里醌在HFD诱导的NAFLD小鼠体内和FFA诱导的体外HepG2细胞中激活AMPK/m-TOR信号通路,从而减少肝脂质累积,缓解肝脂肪变性。缪萍等^[27]发现白藜芦醇可调控AMPK/m-TOR信号通路来改善FFA诱导的AML-12细胞自噬功能和脂质代谢。可见,AMPK/m-TOR信号通路在天然药用植物对高脂诱导的肝损伤保护方面扮演着重要角色。

在本次实验中,通过观察发现动物及细胞中AMPK、m-TOR的mRNA总体表达水平没有统计学意义,进一步的研究表明HFD诱导NAFLD大鼠模型中p-AMPK的蛋白表达明显增加,p-mTOR的蛋白表达呈降低趋势,下游靶基因FASN、ACC1表达则明显增加,从而促进游离脂肪酸合成TG,形成脂滴贮存,加重肝细胞脂质蓄积现象;而HGT能够继续上调p-AMPK、下调p-mTOR,减少FASN、ACC1的表达。在FFA诱导的HepG2细胞模型中发现p-AMPK、p-mTOR、FASN、ACC1的蛋白表达均明显增加,HGTs也能够上调p-AMPK、下调p-mTOR,减少FASN、ACC1的表达;并且在10%CONs及10%HGTs组中加入AMPK抑制剂处理后,HGTs对p-AMPK的促进作用以及对p-mTOR、ACC1、FASN的抑制作用都受到不同程度的抑制;加入mTOR激活剂(MHY1485)后HGTs仍能够使p-mTOR、ACC1、FASN水平降低。说明护肝汤通过激活AMPK/m-TOR信号通路,减少FASN、ACC1的表达,从而减轻NAFLD模型中的脂肪蓄积。

本实验中模型组p-AMPK上调,脂质合成增加,而给药后p-AMPK继续上调,脂质合成却减少,分析可能原因如下:在NAFLD模型中,肝脏脂质代谢紊乱导致能量代谢异常,激活AMPK使其磷酸化程度增加,而AMPK的高表达能抑制m-TOR的信号转导,使自噬激活,影响脂质的分解功能,进而导致脂质在肝脏中的积累增加^[28-30]。给药后p-AMPK上调,AMPK可能直接磷酸化ACC1,抑制其活性,从而减少脂肪酸合成^[31-33]。另外在本实验中,p-mTOR在体内和体外实验中的变化趋势不一致,这可能是由于体内外实验模型的差异所致,肝脏在体内拥有着极为复杂的病生理环境,并且具有高度的组织结构和功能复杂性,不同区域的细胞可能受到不同的代谢和信号调控,m-TOR信号通路与其他代谢通路之间也存在复杂的交叉对话和反馈调节机制,而这些不同的代谢和信号均可能对m-TOR信号通路产生不同的调控作用,从而导致m-TOR的磷酸化水平下降;而在体外直接由FFA诱导HepG2细胞进行培养,直接将细胞暴露于高脂环境中,没有体内微环境的复杂性和动态性,导致p-mTOR水平升高,促进脂质合成^[34,35]。但无论是体内还是体外实验,HGT治疗后p-mTOR均呈显著降低,抑制脂质合成关键酶FASN、ACC1表达,减轻脂质积累。

综上所述,本研究初步探讨了HGT在治疗NAFLD中的作用及作用机制。通过网络药理学和体内体外实验验证了HGT治疗NAFLD的药效物质基础和潜在的作用靶点及通路(AMPK/mTOR信号通路),HGT能够缓解NAFLD大鼠模型及FFA诱导HepG2细胞的脂质蓄积,改善肝脏功能及减轻病理损伤。本研究结果为HGT在NAFLD治疗中的应用提供理论支持,进

一步为其临床开发奠定了科学依据。但本研究还有一定的局限性:本研究仅选取 HGT 通过激活 AMPK/mTOR 信号通路,从缓解脂质蓄积层次发挥其对 NAFLD 的保护作用进行了验证,而 AMPK/mTOR 信号通路也与自噬具有很强的关联(这也可能导致体内外 p-mTOR 水平变化不一致),HGT 是否通过调控自噬从而改善 NAFLD 尚需要进一步证实。此外,在核心靶点中还涉及到多个 MAPK 通路蛋白及炎症相关因子,未来可以对其他靶点和通路进行进一步的验证。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] 杨蕊旭,范建高. 欧洲代谢相关脂肪性肝病临床管理实践指南简介[J]. 实用肝脏病杂志, 2024, 27(5): 654-8.
- [2] Rinella ME, Neuschwander-Tetri BA, Siddiqui MS, et al. AASLD Practice Guidance on the clinical assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1797-835.
- [3] Cusi K, Isaacs S, Barb D, et al. American association of clinical endocrinology clinical practice guideline for the diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease in primary care and endocrinology clinical settings: co-sponsored by the American association for the study of liver diseases (AASLD) [J]. *Endocr Pract*, 2022, 28(5): 528-62.
- [4] Lou TW, Yang RX, Fan JG. The global burden of fatty liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2024, 13(1): 119-23.
- [5] Eslam M, George J. Reply to: correspondence on "a new definition for metabolic associated fatty liver disease: an international expert consensus statement" [J]. *J Hepatol*, 2020, 73(5): 1268-9.
- [6] 顾 荣,芮法娟,倪文婧,等. 非酒精性脂肪性肝病的规范化管理[J]. 实用肝脏病杂志, 2023, 26(4): 457-60.
- [7] 高改娅,李 莎,薛敬东,等. 非酒精性脂肪性肝病中医证型及证素研究[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(1): 89-93.
- [8] 陈 明,曹泽伟. 中药护肝汤干预糖尿病大鼠肝损伤的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3049-51.
- [9] Salvoza N, Giraudi PJ, Tiribelli C, et al. Natural compounds for counteracting nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): advantages and limitations of the suggested candidates[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(5): 2764.
- [10] 马春霞,陈振东,田旭东. 非酒精性脂肪性肝病动物模型制备及病证结合研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(12): 1616-25.
- [11] 杨宗慧,陈红刚,赵文龙,等. 大黄及有效成分治疗脂肪肝作用机制的研究进展[J]. 中药药理与临床, 2025, 41(7): 113-20.
- [12] 赵梓硕,朱玉光,马燕山,等. 不同高脂饲料配方对建立非酒精性脂肪肝大鼠模型的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2024, 29(5): 543-53.
- [13] 曾孟颜,姚嘉欣,张 茜,等. 基于网络药理学探讨四君子汤治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中医临床研究, 2022, 14(16): 1-8.
- [14] 徐 云. 四君子汤联合易善复胶囊对非酒精性脂肪肝的临床效果研究[J]. 心理月刊, 2019, 14(17): 221.
- [15] 王 敏,周 璐,孙 燕,等. 大柴胡汤及其“方剂要素”对NAFLD模型大鼠“肠-肝轴”作用的相关分析[J]. 世界中医药, 2021, 16(3): 430-6.
- [16] 钟光成,刘启华,麦灏铭,等. 基于网络药理学及实验验证探讨大柴胡汤抗非酒精性脂肪性肝病的作用机制[J]. 中药药理与临床, 2025, 41(3): 2-9.
- [17] Cui HT, Li YT, Wang YM, et al. Da-Chai-hu decoction ameliorates high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease through remodeling the gut microbiota and modulating the serum metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 584090.
- [18] 黄艳阳. 基于肠 TPH1-肝 HTR2A 轴探讨茵陈蒿汤干预代谢相关脂肪性肝病的作用机制[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2024.
- [19] Dorn C, Riener MO, Kirovski G, et al. Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2010, 3(5): 505-14.
- [20] Lally JSV, Ghoshal S, DePeralta DK, et al. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase by phosphorylation or the inhibitor ND-654 suppresses lipogenesis and hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Metab*, 2019, 29(1): 174-82.e5.
- [21] 李华君,吕树泉,张 辉,等. 清热祛浊胶囊对2型糖尿病合并非酒精性脂肪肝大鼠的治疗作用及机制[J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(3): 623-8.
- [22] 陈浩然. α -乳白蛋白肽对小鼠非酒精性脂肪肝的改善作用及机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2023.
- [23] 梁娟娟. L-茶氨酸抑制非酒精性脂肪性肝病的分子机制研究[D]. 南京: 南京师范大学, 2021.
- [24] 张明发,沈雅琴. 甘草及其有效成分抗脂肪肝和抗肥胖的研究进展[J]. 药物评价研究, 2015, 38(4): 439-47.
- [25] 邱晓远,胡德胜,杨梦灵,等. mTOR在非酒精性脂肪性肝病脂质代谢中的作用研究进展[J]. 中西医结合研究, 2024, 16(1): 50-3.
- [26] Zhang D, Zhang YH, Wang ZL, et al. Thymoquinone attenuates hepatic lipid accumulation by inducing autophagy via AMPK/mTOR/ULK1-dependent pathway in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(3): 781-97.
- [27] 缪 萍,卞尧尧,倪露露,等. 白藜芦醇调控AMPK/mTOR信号通路改善游离脂肪酸诱导的AML-12细胞自噬功能和脂质代谢[J]. 中药材, 2024, 47(11): 2859-63.
- [28] Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 2-11.
- [29] 张笑颜,王 谢,王 杰,等. 大黄酚调控AMPK/mTOR自噬信号通路改善Wilson病铜负荷大鼠认知功能[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(5): 578-84.
- [30] 王蓉芝,王琳雳,焦靖雯,等. 自噬途径降解肝脏脂滴的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(9): 1916-23.
- [31] 任前军,李 素,陈雨晴,等. 基于AMPK/ACC/CPT1A信号通路探讨D-柠檬烯对原代肝细胞脂肪变性的作用机制[J]. 中国药理学通报, 2025, 41(9): 1665-72.
- [32] 洪祝平,张建华,史月姣,等. 基于非酒精性脂肪肝细胞模型的荷叶水提物降脂作用机制研究[J]. 现代中药研究与实践, 2024, 38(2): 41-7.
- [33] 尚 志,胡银璐,徐圣麟,等. 芹糖葛根素对非酒精性脂肪肝小鼠肝脂代谢的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(11): 1598-602.
- [34] 陆建国,俞 松. mTOR信号通路与肿瘤研究进展[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(2): 199-202.
- [35] Feng JY, Qiu ST, Zhou SP, et al. mTOR: a potential new target in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9196.

(编辑:经 媛)