

膈下逐瘀汤调控能量代谢与微循环改善代谢相关脂肪性肝炎的作用机制

刘星宇¹, 王丽寒¹, 艾楠¹, 王馨晨¹, 王锐², 杨婧^{1*}

1. 黑龙江中医药大学 基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 基于能量代谢与微循环探讨膈下逐瘀汤改善代谢相关脂肪性肝炎(MASH)的作用机制。**方法** 选取 8 dpf 斑马鱼, 随机分为对照组、模型组、洛伐他汀(阳性药, $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组和膈下逐瘀汤低、中、高质量浓度(20、50、 $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组, 除对照组外, 使用 4%浓度的果糖溶液建立 MASH 模型, 每 6 小时更换药液, 连续给药 72 h。观察水质中残留的饲料以判断各组斑马鱼进食情况, 观察斑马鱼幼鱼存活率、体长; 苏木精-伊红(HE)染色观察肝脏组织形态; 油红 O 染色观察肝脏面积及脂质沉积情况; 制备斑马鱼匀浆上清液, ELISA 试剂盒检测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、丙酮酸、葡萄糖、腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)酶、血管内皮生长因子(VEGF)、血管生成素 1(Ang-1)、Ang-2; 微循环仪下观察并记录尾部微血管的血流速度变化; Western blotting 检测沉默信息调节因子(SIRT1)、AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)、p-AMPK 蛋白的表达水平。**结果** 与模型组相比, 膈下逐瘀汤组斑马鱼存活率呈上升趋势但无明显差异, 体长和体质量明显下降($P<0.05$ 、 0.01); 斑马鱼肝脏面积显著减小($P<0.05$ 、 0.01), 脂滴明显减少, 染色明显减轻, 肝内脂质沉积减少; 肝细胞脂肪变性和气球样变得到明显改善; TC、TG 水平显著下降($P<0.05$ 、 0.01); 丙酮酸含量明显增加($P<0.05$ 、 0.01), 葡萄糖含量显著减少($P<0.05$ 、 0.01), ATP 酶活力水平明显增加($P<0.05$ 、 0.01), VEGF、Ang-1 水平明显降低($P<0.05$ 、 0.01), Ang-2 水平明显升高($P<0.05$ 、 0.01), 斑马鱼各部位血流速度显著增加($P<0.05$ 、 0.01), 斑马鱼 SIRT1、AMPK、p-AMPK 蛋白的表达水平明显上升($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** 膈下逐瘀汤可能通过改善微循环和激活 AMPK/SIRT1 信号通路来改善 MASH 斑马鱼的能量代谢, 进而减轻 MASH 引起的肝损伤。

关键词: 膈下逐瘀汤; 代谢相关脂肪性肝炎; 能量代谢; 微循环; AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK); 沉默信息调节因子(SIRT1)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)07-1753-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.07.005

Mechanism of Gexia Zhuyu Decoction in ameliorating metabolic-associated steatohepatitis through modulation of energy metabolism and microcirculation

LIU Xingyu¹, WANG Lihan¹, AI Nan¹, WANG Xinchun¹, WANG Rui², YANG Jing¹

1. Basic Medical College of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. College of Pharmacy of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Gexia Zhuyu Decoction in ameliorating metabolic-associated steatohepatitis (MASH) through modulating energy metabolism and microcirculation. **Methods** Zebrafish at 8 days post-fertilization (dpf) were randomly divided into a control group, a model group, a lovastatin (positive drug, $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) group, and low-, medium-, and high-concentration groups of Gexia Zhuyu Decoction (20, 50, and $80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Except for the control group, a 4% fructose solution was used to establish a MASH model. The drug solution was changed every 6 h and administered continuously for 72 h. The remaining feed in the water was observed to determine the feeding status of zebrafish in each group. The survival rate and body length of zebrafish larvae were observed. HE staining was used to observe the morphology of liver tissue. Oil Red O staining was used to observe the liver area and lipid deposition. Zebrafish homogenate supernatant was prepared, and ELISA kits were used to detect total cholesterol (TC), triglycerides (TG), pyruvate, glucose, adenine nucleoside triphosphate (ATP) enzyme, vascular endothelial growth factor (VEGF), angiopoietin 1 (Ang-1), and Ang-2. The blood flow velocity changes in the tail microvessels were observed and recorded under a

收稿日期: 2025-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(81603418); 黑龙江优秀青年人才项目(2020YQ05); 黑龙江中医药大学研究生创新科研项目(2024yjsx124)

作者简介: 刘星宇, 硕士研究生。E-mail: lxy69637@163.com

*通信作者: 杨婧, 教授, 硕士生导师, 从事代谢相关脂肪性肝病研究方向。E-mail: yangjingdx@sina.com

microcirculation instrument. Western blotting was used to detect the expression levels of silent information regulator 1 (SIRT1), AMP-activated protein kinase (AMPK), and p-AMPK proteins. **Results** Compared with the model group, the survival rate of zebrafish in the Gexia Zhuyu Decoction group showed an upward trend but no significant difference. The body length and body weight of zebrafish decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$). The liver area of zebrafish decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$), the lipid droplets decreased significantly, the staining was significantly reduced, and the lipid deposition in the liver was reduced. The fatty degeneration and ballooning degeneration of liver cells were significantly improved. The levels of TC and TG decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$). The content of pyruvate increased significantly ($P < 0.05, 0.01$), the content of glucose decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$), the activity level of ATPase increased significantly ($P < 0.05, 0.01$), the levels of VEGF and Ang-1 decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$), the level of Ang-2 increased significantly ($P < 0.05, 0.01$), and the blood flow velocity in various parts of zebrafish increased significantly ($P < 0.05, 0.01$). The expression levels of SIRT1, AMPK, and p-AMPK proteins in zebrafish increased significantly ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Gexia Zhuyu Decoction may improve the energy metabolism of MASH zebrafish by improving microcirculation and activating the AMPK/SIRT1 signaling pathway, thereby alleviating liver damage caused by MASH.

Key words: Gexia Zhuyu Decoction; metabolic-associated steatohepatitis; energy metabolism; microcirculation; AMP-activated protein kinase (AMPK); silent information regulator 1 (SIRT1)

代谢相关脂肪性肝炎 (MASH) 是一种与内脏肥胖和代谢综合征密切相关的肝脏疾病, 脂肪毒性、氧化应激、肠道菌群失调等参与其发病过程, MASH 可进展为肝硬化及肝癌, 并加剧胰岛素抵抗与心血管风险^[1-3]。当前, MASH 的治疗以生活方式干预和靶向药物治疗为主, 但单一靶点局限性与多靶点药物相互作用风险限制其疗效^[4-5]。中医在慢性肝病治疗中经验丰富, 膈下逐瘀汤作为经典方剂, 研究证实其可抑制肝星状细胞增殖、促进其凋亡, 减轻肝损伤和肝纤维化, 以及调控多条信号通路发挥护肝作用^[6-9]。斑马鱼基因组与人类基因高度相似, 脂代谢通路相似, 且胚胎发育快、幼鱼体壁透明便于观察, 是研究 MASH 发病机制与治疗策略的理想动物模型^[10]。

能量代谢失调与肝脏疾病的发生密切相关, 可导致肝脏脂肪过度累积, 影响肝功能, 造成肝脏糖脂代谢紊乱及炎症, 加重肝脏的损伤^[11-14]。肝脏微循环是维持肝脏正常结构和发挥各项生理功能的基础, 微循环异常也可能导致肝脏功能障碍以及相关疾病发生^[15-16]。AMP 依赖的蛋白激酶 (AMPK) 作为代谢调控的关键枢纽, 通过磷酸化乙酰辅酶 A 羧化酶 (ACC)、调控 Caspase-6 轴等改善脂质代谢与肝损伤^[17-19]。

本研究建立 MASH 斑马鱼模型, 探讨膈下逐瘀汤改善 MASH 引起的微循环障碍和能量代谢障碍的作用机制, 为临床 MASH 的治疗提供用药参考。

1 材料

1.1 主要仪器

DM3000 光学显微镜、ESEN-AW-S1 斑马鱼养

殖系统 (北京爱生科技发展有限公司); RM2235 石蜡切片机、YD 冷冻台、YD-6L 石蜡组织包埋机、YD-A 生物组织烘片机、YD-B 组织摊片机 (浙江金华益迪医疗设备有限公司); WD-9423B 型化学发光分析仪、DYCZ-2DN 型电泳仪、WD-9405F 型脱色摇床、全自动化学发光成像系统 (北京六一生物科技有限公司); LT1002E 电子天平 (常熟市天量仪器有限公司)。

1.2 药品与主要试剂

膈下逐瘀汤组成主要为: 桃仁 (研泥) 9 g、五灵脂 (炒) 6 g、赤芍 6 g、丹皮 6 g、当归 9 g、元胡 3 g、川芎 6 g、乌药 6 g、甘草 9 g、红花 9 g、香附 4.5 g、枳壳 4.5 g。以上药材均购于黑龙江中医药大学附属第一医院, 经黑龙江中医药大学药学院中药资源教研室周博副教授鉴定分别为山桃 *Prunus davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子、复齿鼯鼠 *Trogopterus xanthipes* 的干燥粪便、川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch 的干燥根、毛茛科植物牡丹 *Paeonia suffruticosa* Andr. 的干燥根皮、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根、罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、樟科植物乌药 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的干燥块根、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花、莎草科植物莎草 *Cyperus rotundus* L. 的干燥根茎、芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 干燥未成熟果实。

洛伐他汀 (上海阿拉丁生化科技股份有限公

司, 批号 L107709); 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳液、快速转膜缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE、聚偏氟乙烯膜、组织固定液、RIPA 裂解液、苏木精染液、伊红染液、油红 O 染液 (武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 G2081-15、G2028-15、G2026-200T、G2175-50T、G6044 0.45、G1101、G2002、G1004、G1001、G1015); 总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG) (南京建成生物工程研究所, 批号 A111-2-1、A110-1-1); 斑马鱼培养液购自上海费曦生物科技有限公司; 血管内皮生长因子 (VEGF) 酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 批号 20210824); 血管生成素 1 (Ang-1)、血管生成素 2 (Ang-2) 试剂盒 (美国 MyBioSource 公司, 批号 MBS037768、MBS027332); 兔源沉寂信息调节因子 (SIRT1) 多克隆抗体 (批号 13161-1-A) 购自美国 Proteintech 公司; 鼠源 β -肌动蛋白 (β -actin) 单克隆抗体, Alexa Fluor® 488 标记的山羊抗鼠、山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab170325、ab150113、ab150077) 购自英国 Abcam 公司; AMPK 抗体、p-AMPK 抗体 (江苏亲科生物研究中心有限公司, 批号 AF6423、AF3423); 丙酮酸、葡萄糖检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号 S0202S、S0299S); Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -腺嘌呤核苷三磷酸 (ATP) 酶检测试剂盒、 Na^{+} 、 K^{+} -ATP 酶检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 A070-6-2、A070-2-2); ATP 酶活力检测试剂盒 (批号 E-BC-K831-M) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 实验动物

野生型 AB 系斑马鱼由杭州环特生物科技股份有限公司提供, 动物生产许可证号 SCXK(浙)2022-0003。将雌、雄斑马鱼分别饲养于 28 °C 水温的循环水系统中, 给予光照 14 h、黑暗 10 h 的光暗循环, 每日定时喂食丰年虾及颗粒饲料。雌、雄鱼比例为 1:1, 将雌、雄斑马鱼分别放置在孵育盒中用隔板隔开, 通过灯控控制其明暗状态, 于第 2 天 8:00 时左右抽板, 雌、雄鱼相互追逐行交配, 收集鱼卵, 每天换水, 吸出死胚。本动物实验方案由黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准 (编号 2021052701)。

2 方法

2.1 膈下逐瘀汤水煎液制备

参考本课题组前期研究制备膈下逐瘀汤水煎

液^[20], 将所需药材用 10 倍量的水浸泡 60 min, 煎煮 2 次、每次 2 h, 将 2 次煎煮的药液混合。HPLC 检测结果显示, 膈下逐瘀汤羟基红花黄色素 A 的质量浓度大于 0.25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 阿魏酸质量浓度大于 0.22 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 膈下逐瘀汤最大耐受浓度测定

随机选取 5 dpf 的斑马鱼幼鱼 300 尾, 适应 3 d 后随机分为膈下逐瘀汤不同质量浓度 (0、20、50、80、100、120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 每组 50 尾, 每 6 小时更换全部药液, 连续给药 72 h, 喂食斑马鱼专用微颗粒饲料, 每天 3 次, 少量多餐, 喂食专用饲料对本实验无影响, 保证斑马鱼幼鱼生存的水质条件, 观察每组存活情况、畸形情况并统计。

2.3 斑马鱼模型建立及分组

选取 8 dpf 斑马鱼, 随机分为对照组、模型组、洛伐他汀 (阳性药, 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组和膈下逐瘀汤低、中、高质量浓度 (20、50、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 除对照组外, 使用 4% 浓度的果糖溶液建立 MASH 模型^[21], 对照组喂食斑马鱼专用微颗粒饲料, 模型组加入 4% 果糖, 各给药组加入 4% 果糖以及相应质量浓度的药液。每 6 小时更换全部药液, 连续给药 72 h。

2.4 斑马鱼幼鱼状态观察及身体指数测量

观察水质中残留的饲料以判断各组斑马鱼进食情况; 观察斑马鱼幼鱼存活情况, 并计算存活率。给药结束后, 用三卡因溶液麻醉各组斑马鱼幼鱼 3 min, 采用 Image J 软件在显微镜下对斑马鱼幼鱼的体长进行测量。

2.5 斑马鱼幼鱼病理切片及苏木精-伊红 (HE) 染色、油红 O 染色

对麻醉后的斑马鱼幼鱼进行固定、洗涤和梯度脱水。然后, 通过透明和浸蜡处理, 将组织包埋在石蜡中。使用切片机制作 4 μm 厚的组织切片, 并进行烤片处理。最后, 按照脱蜡、水化、染色、脱水和封片等步骤进行 HE 染色。

对幼鱼经过同样的固定及洗涤处理, 次日用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤后, 在丙二醇中进行梯度渗透, 并将幼鱼置于 0.5% 油红 O 溶液中过夜染色, 用丙二醇以及磷酸盐缓冲液 (PBS) 逐步洗涤。将染色的幼鱼保存在 80% 丙二醇中。随机选取 20~30 条幼鱼, 在体式显微镜下观察肝脏脂肪变性情况并记录拍照, 使用 Image J 软件测量各组斑马鱼肝脏面积。

2.6 样品制备

每组随机选取斑马鱼幼鱼 30 条,暴露于 0.05% 的三卡因溶液处死,用吸水纸将其表面水分吸干,准确称质量,按质量(g):体积(μL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的无水乙醇,冰水浴条件下,利用超声破碎机进行匀浆,离心 10 min,制成 10% 的匀浆上清液。

2.7 肝脏指标检测

取斑马鱼幼鱼组织匀浆上清液,按照 ELISA 检测试剂盒说明书依次将样品滴入孔板检测,对各组斑马鱼幼鱼匀浆上清液 TC、TG 的含量进行测定。

2.8 能量代谢指标检测

取斑马鱼幼鱼匀浆上清液,按照试剂盒说明书进行操作,检测各组斑马鱼的丙酮酸、葡萄糖以及 ATP 酶含量。

2.9 微循环指标检测

取斑马鱼幼鱼匀浆上清液,按 ELISA 试剂盒方法检测各组 VEGF、Ang-1、Ang-2 水平。将禁食 24 h 的斑马鱼幼鱼放置于三卡因溶液中麻醉 3 min,将其置于微循环仪下观察并记录尾部微血管的血流速度变化。

2.10 Western blotting 检测蛋白表达量

使用 RIPA 裂解液和超声破碎法从冷冻的斑马鱼幼鱼样品中提取蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,包括标准曲线制作和样品浓度计算。准备蛋白样品,进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上,并进行封闭、一抗二抗的孵育,使用 ECL 试剂进行化学发光检测,最后利用 Image J 软件分析蛋白表达量。

2.11 统计学分析

应用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两组间比较采用 LSD-*t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,作图用 Graphpad prism 软件。

3 结果

3.1 膈下逐瘀汤给药浓度确定

膈下逐瘀汤质量浓度为 0~80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,死亡率和畸形率为 0;在质量浓度为 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼死亡率为 0,畸形率为 12%;当质量浓度为 120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,死亡率为 20%,畸形率为 30%,尽管质量浓度在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,斑马鱼未出现死亡,但出现畸形,故选择 20、50、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 作为后续实验给药质量浓度。结果见表 1。

表 1 不同给药质量浓度对斑马鱼死亡率和畸形率的影响

Table 1 Effects of different concentrations of drug administration on mortality and deformity rates in zebrafish

膈下逐瘀汤/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	死亡率/%	畸形率/%
0	0	0
20	0	0
50	0	0
80	0	0
100	0	12
120	20	30

3.2 斑马鱼存活率及一般发育情况

观察水质中残留的饲料以判断各组斑马鱼进食情况,各组无明显差异。结果显示(表 2),与对照组相比,模型组斑马鱼幼鱼存活率下降,体长、体质量明显增加($P<0.01$);与模型组相比,膈下逐瘀汤组存活率呈上升趋势但无明显差异,体长和体质量明显下降($P<0.05$ 、 0.01),说明膈下逐瘀汤能有效降低幼鱼体质量。

表 2 各组斑马鱼幼鱼存活率、体长、体质量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 2 Comparison of survival rate, body length and body weight of zebrafish larvae in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	存活率/%	体长/mm	体质量/mg
对照	—	81.7 $\pm$ 7.5	4.41 $\pm$ 0.07	3.68 $\pm$ 0.07
模型	—	75.0 $\pm$ 5.5	6.11 $\pm$ 0.41 ^{##}	4.20 $\pm$ 0.46 ^{##}
洛伐他汀	4	81.7 $\pm$ 7.5	4.45 $\pm$ 0.04 ^{**}	3.83 $\pm$ 0.05 ^{**}
膈下逐瘀汤	20	76.7 $\pm$ 7.5	5.74 $\pm$ 0.07 [*]	4.02 $\pm$ 0.07 [*]
	50	78.3 $\pm$ 7.5	5.75 $\pm$ 0.11 [*]	4.03 $\pm$ 0.06 [*]
	80	80.0 $\pm$ 6.3	4.44 $\pm$ 0.04 ^{**}	3.78 $\pm$ 0.08 ^{**}

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

^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group。

3.3 油红 O 及 HE 染色

油红 O 染色结果显示 (图 1), 与对照组相比, 模型组斑马鱼幼鱼肝脏面积显著增大 ($P<0.01$), 含有大量染红的脂滴, 肝脏内可见明显的脂质沉积; 与模型组相比, 膈下逐瘀汤组斑马鱼肝脏面积显著减小 ($P<0.05$ 、 0.01), 脂滴明显减少, 染色明显减轻, 肝内脂质沉积减少, 肝脏受损程度得到明显改善; 与高剂量组相比, 低、中剂量组斑马鱼肝脏面积较大, 染色较深, 表明高剂量组干预治疗

MASH 的效果更加显著。

HE 染色结果显示 (图 2), 对照组斑马鱼幼鱼肝脏组织形态正常, 肝小叶完整, 肝细胞完整、排列紧密无液泡; 与对照组相比, 模型组斑马鱼幼鱼肝小叶结构异常, 出现不同程度的脂肪空泡, 肝细胞变形排列不规则, 可见少量炎症细胞浸润, 表现出 MASH 的典型特征; 与模型组相比, 膈下逐瘀汤组斑马鱼幼鱼的肝细胞脂肪变性和气球样变性得到明显改善。

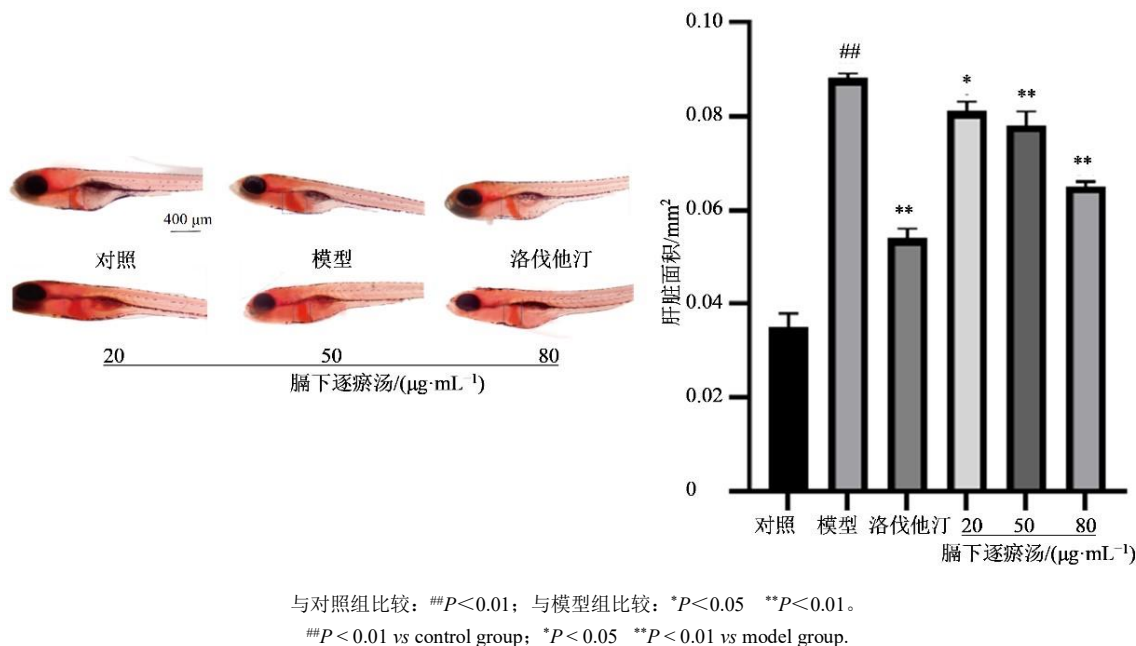


图 1 各组斑马鱼油红染色 ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Fig. 1 Oil red staining of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

3.4 肝脏生化指标

结果显示 (表 3), 与对照组相比, 模型组 TC、TG 水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 膈下逐瘀汤组出现不同程度 TC、TG 的水平下降 ($P<0.05$ 、 0.01), 表明膈下逐瘀汤可降低斑马鱼幼鱼的肝脂肪变性程度。

3.5 能量代谢指标

结果显示 (表 4), 与对照组相比, 模型组斑马鱼丙酮酸含量显著减少 ($P<0.01$), 葡萄糖含量显著增加 ($P<0.01$); 与模型组相比, 洛伐他汀和膈下逐瘀汤高、中剂量组斑马鱼丙酮酸含量明显增加 ($P<0.05$ 、 0.01), 葡萄糖含量显著减少 ($P<0.05$ 、 0.01)。

ATP 酶结果显示 (表 5), 与对照组相比较, 模型组肝脏 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶、总

ATP 酶活力显著下降 ($P<0.01$); 与模型组相比, 洛伐他汀和膈下逐瘀汤高、中剂量组 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶、总 ATP 酶活力水平明显增加 ($P<0.05$ 、 0.01)。

3.6 微循环指标

结果显示 (表 6), 与对照组相比, 模型组 VEGF、Ang-1 水平显著升高 ($P<0.01$), Ang-2 含量显著降低 ($P<0.01$); 与模型组相比, 洛伐他汀和膈下逐瘀汤高、中剂量组 VEGF、Ang-1 水平明显降低 ($P<0.05$ 、 0.01), Ang-2 水平明显升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 膈下逐瘀汤高剂量组治疗效果优于膈下逐瘀汤低、中剂量组。

血流速度结果显示 (表 7), 与对照组相比, 模型组斑马鱼背主动脉、心大静脉、髂外静脉、后心静脉血流速度均明显下降 ($P<0.01$); 与模型组相

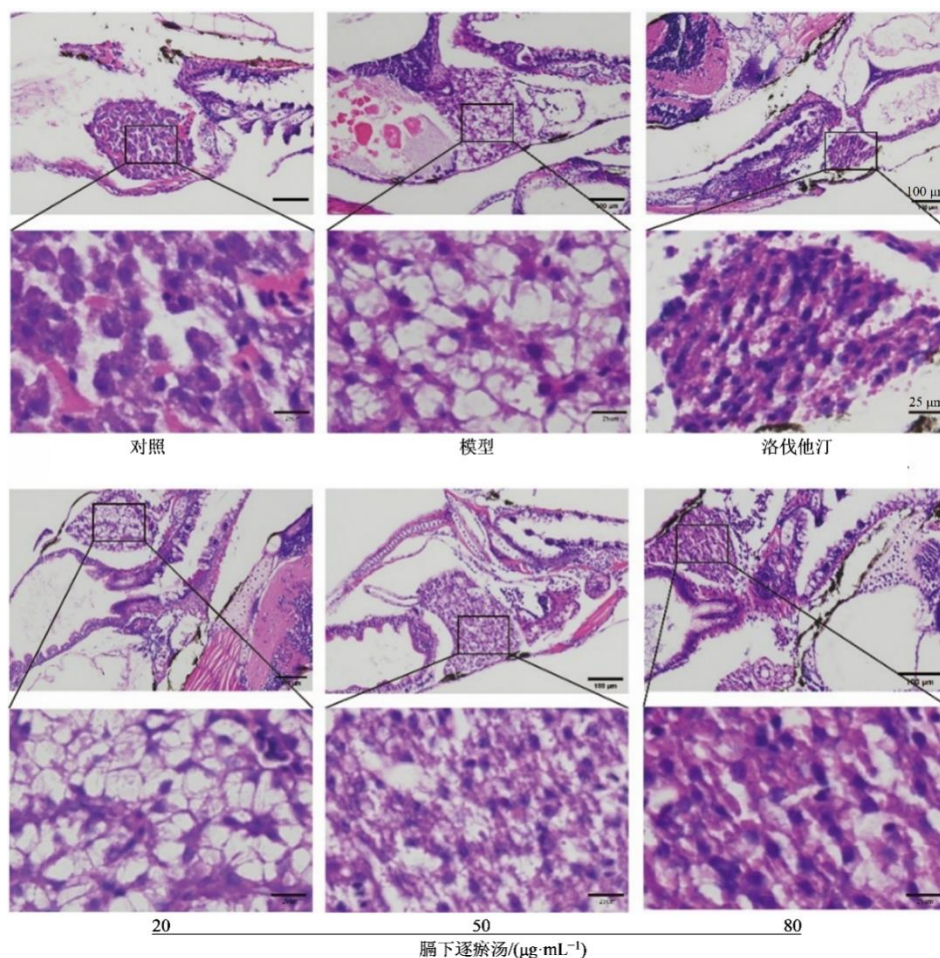


图 2 各组斑马鱼肝脏病理切片 HE 染色

Fig. 2 HE staining of pathological sections of zebrafish liver

表 3 各组斑马鱼 TC、TG 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Table 3 Comparison of TC and TG levels of zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TC/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	TG/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照	—	0.0110 ± 0.0003	0.0370 ± 0.0005
模型	—	$0.0170 \pm 0.0002^{##}$	$0.0650 \pm 0.0003^{##}$
洛伐他汀	4	$0.0110 \pm 0.0002^{**}$	$0.0380 \pm 0.0005^{**}$
膈下逐瘀汤	20	$0.0160 \pm 0.0003^*$	$0.0640 \pm 0.0003^*$
	50	$0.0160 \pm 0.0004^*$	$0.0640 \pm 0.0002^*$
	80	$0.0120 \pm 0.0004^{**}$	$0.0380 \pm 0.0005^{**}$

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

$^{##}P<0.01$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

表 4 斑马鱼幼鱼丙酮酸、葡萄糖含量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Table 4 Comparison of pyruvate and glucose contents in juvenile zebrafish ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	丙酮酸/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	葡萄糖/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照	—	29.15 ± 0.03	1.05 ± 0.07
模型	—	$17.72 \pm 0.44^{##}$	$2.33 \pm 0.06^{##}$
洛伐他汀	4	$28.64 \pm 0.61^{**}$	$1.08 \pm 0.02^{**}$
膈下逐瘀汤	20	18.53 ± 0.40	2.26 ± 0.04
	50	$18.61 \pm 0.34^*$	$2.25 \pm 0.03^*$
	80	$27.72 \pm 0.80^{**}$	$1.09 \pm 0.03^{**}$

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

$^{##}P<0.01$ vs control group; $^*P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

表 5 各组斑马鱼上清液 ATP 酶活力 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Table 5 Activity of ATPase in zebrafish supernatant of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	$\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP酶}/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$	$\text{Na}^{+}\text{-K}^{+}\text{-ATP酶活力}/(\text{U}\cdot\text{mg}^{-1})$	总ATP酶活力/($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照	—	1.88 ± 0.04	1.48 ± 0.04	1.65 ± 0.08
模型	—	$1.25 \pm 0.04^{##}$	$1.09 \pm 0.05^{##}$	$0.74 \pm 0.04^{##}$
洛伐他汀	4	$1.83 \pm 0.03^{**}$	$1.44 \pm 0.04^{**}$	$1.61 \pm 0.03^{**}$
膈下逐瘀汤	20	1.28 ± 0.05	1.12 ± 0.03	$0.81 \pm 0.01^{*}$
	50	$1.33 \pm 0.03^{*}$	$1.17 \pm 0.02^{*}$	$0.82 \pm 0.01^{*}$
	80	$1.72 \pm 0.06^{**}$	$1.46 \pm 0.05^{**}$	$1.43 \pm 0.03^{**}$

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

$^{##}P<0.01$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

表 6 各组斑马鱼 VEGF、Ang-1、Ang-2 含量 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Table 6 Levels of VEGF, Ang-1 and Ang-2 in zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	VEGF/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Ang-1/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)	Ang-2/($\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照	—	2.26 ± 0.05	0.021 ± 0.001	0.097 ± 0.004
模型	—	$3.26 \pm 0.05^{##}$	$0.040 \pm 0.001^{##}$	$0.035 \pm 0.001^{##}$
洛伐他汀	4	$2.36 \pm 0.10^{**}$	$0.023 \pm 0.001^{**}$	$0.092 \pm 0.007^{**}$
膈下逐瘀汤	20	3.16 ± 0.03	$0.038 \pm 0.001^{*}$	0.039 ± 0.001
	50	$3.13 \pm 0.04^{*}$	$0.037 \pm 0.001^{*}$	$0.042 \pm 0.001^{*}$
	80	$2.44 \pm 0.05^{**}$	$0.023 \pm 0.001^{**}$	$0.089 \pm 0.005^{**}$

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

$^{##}P<0.01$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

表 7 各组斑马鱼幼鱼背主动脉、心大静脉、髂外静脉和后心静脉血流速度 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Table 7 Blood flow velocity of DA, CA, CV and PCV of juvenile zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	血流速度/($\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$)			
		背主动脉	心大静脉	髂外静脉	后心静脉
对照	—	0.90 ± 0.02	0.34 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.63 ± 0.03
模型	—	$0.41 \pm 0.03^{##}$	$0.17 \pm 0.03^{##}$	$0.11 \pm 0.02^{##}$	$0.24 \pm 0.02^{##}$
洛伐他汀	4	$0.86 \pm 0.03^{**}$	$0.32 \pm 0.02^{**}$	$0.20 \pm 0.02^{**}$	$0.58 \pm 0.02^{**}$
膈下逐瘀汤	20	$0.48 \pm 0.05^{*}$	0.21 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.26 ± 0.03
	50	$0.48 \pm 0.06^{*}$	$0.22 \pm 0.07^{*}$	0.12 ± 0.01	$0.28 \pm 0.01^{*}$
	80	$0.81 \pm 0.03^{**}$	$0.30 \pm 0.02^{**}$	$0.15 \pm 0.01^{*}$	$0.56 \pm 0.02^{**}$

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

$^{##}P<0.01$ vs control group; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ vs model group.

比,膈下逐瘀汤高剂量组斑马鱼各部位血流速度显著增加($P<0.05$ 、 0.01),中剂量组斑马鱼幼鱼的背主动脉、心大静脉、后心静脉血流速度也明显增加($P<0.05$),表明膈下逐瘀汤可调节斑马鱼的血流速度。

3.7 蛋白表达

结果显示(图3),与对照组相比,模型组SIRT1、AMPK、p-AMPK蛋白的表达水平显著下降($P<0.01$);与模型组相比,洛伐他汀和膈下逐瘀汤高、中剂量组斑马鱼SIRT1、AMPK、p-AMPK蛋

白的表达水平明显上升($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明膈下逐瘀汤可以通过回调SIRT1、AMPK蛋白从而改善能量代谢的异常状态。

4 讨论

膈下逐瘀汤作为活血化瘀的经典方剂,临床上能够有效调节血脂,改善MASH^[21-22]。本研究基于能量代谢和微循环2方面,对膈下逐瘀汤改善MASH的作用机制进行研究,表明膈下逐瘀汤能够通过AMPK/SIRT1信号通路调节能量代谢和微循环,发挥其改善MASH的作用。

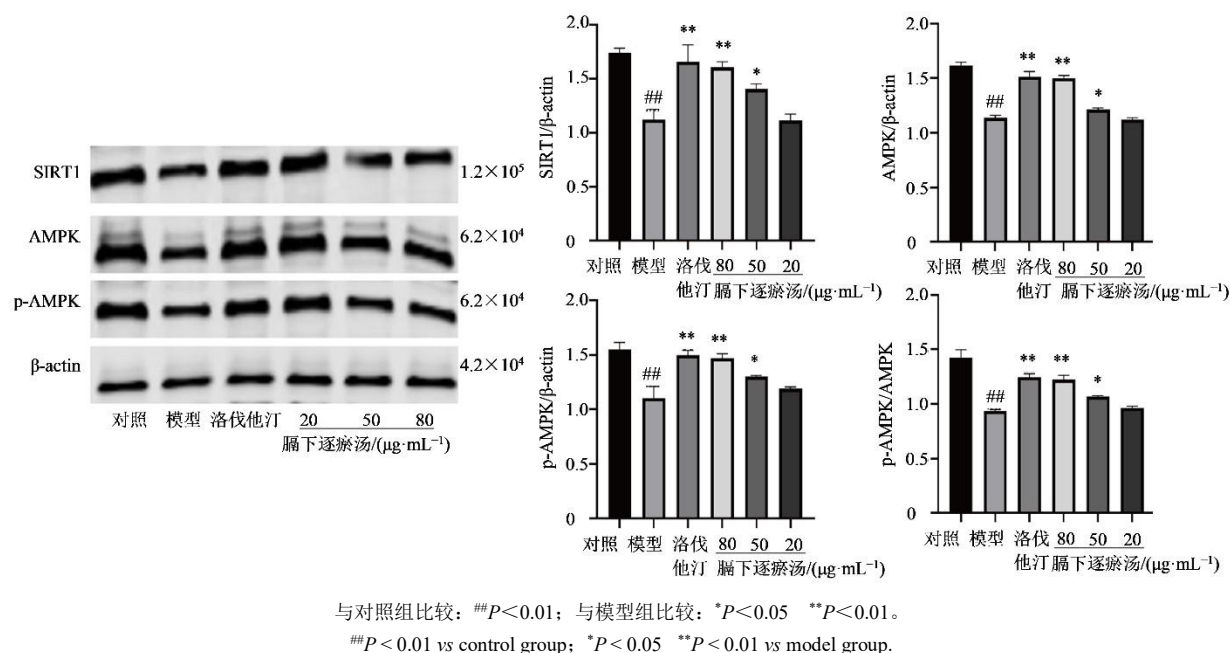


图 3 各组斑马鱼幼鱼蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

Fig. 3 Protein expression of juvenile zebrafish in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=30$)

葡萄糖、丙酮酸、ATP 与能量代谢过程密切相关,在糖酵解中,葡萄糖作为初始底物经酶促反应生成丙酮酸与 ATP,丙酮酸作为糖酵解的最终产物,在有氧条件下进入线粒体内转化为乙酰辅酶 A,进入三羧酸循环继续产生大量 ATP^[23]。在 MASH 中,丙酮酸含量降低表明肝脏代谢紊乱,MASH 患者肝脏线粒体代谢通量增加但是氧化能力受损,导致活性氧生成增加和肝细胞损伤,丙酮酸含量降低影响三羧酸循环运行,加剧肝细胞损伤^[24]。葡萄糖水平升高可刺激胰岛素分泌增加从而导致胰岛素抵抗,并增加三羧酸循环活性与合成酰基辅酶 A,加剧肝脏脂肪生成和堆积,同时还可增加氧化应激,产生活性氧从而损伤肝细胞,加剧肝脏炎症^[25-26]。本实验中,模型组斑马鱼丙酮酸含量减少,葡萄糖水平升高,经治疗后,膈下逐瘀汤可使斑马鱼体内丙酮酸含量增加,葡萄糖含量减少,表明膈下逐瘀汤可能通过改善线粒体功能、调控血糖、以及氧化应激实现能量代谢平衡从而缓解 MASH 进程。

能量代谢过程涉及许多生物酶,其中 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶通过调控钙稳态影响细胞能量代谢, Na^{+} , K^{+} -ATP 酶可通过大量 ATP 供能维持细胞电学梯度,总 ATP 酶反映线粒体能力以及整体能量代谢状态^[27]。研究发现, Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶及 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶活性下降可抑制能量的产生,导致能量代

谢异常,其活性升高表明能量代谢得到改善^[28]。本研究结果显示,膈下逐瘀汤不同程度提高 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} , K^{+} -ATP 酶和总 ATP 酶活力水平,提高酶活性,增加能量产生,改善线粒体功能,进而通过调节代谢改善 MASH 进程。

AMPK 和 SIRT1 是 2 种在细胞能量感应和调节中起关键作用的分子,对调节 MASH 脂质积累和肝组织炎症反应至关重要^[29-30]。AMPK 激活能够抑制脂肪酸和胆固醇合成,同时促进脂肪酸的氧化,从而减少肝脂肪积累^[31]。SIRT1 是一种 NAD^{+} 依赖的去乙酰化酶,可通过与过氧化物酶体增殖物激活受体 α 、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (PGC-1 α) 等关键代谢调节因子相互作用,影响线粒体功能来调节能量代谢^[32]。本研究中,膈下逐瘀汤显著上调 SIRT1、AMPK、p-AMPK 的蛋白表达,同时上调 p-AMPK/AMPK 值表达水平,提示 AMPK/SIRT1 信号通路的激活可改善能量代谢异常。

微循环与各种血管活性因子密切相关,VEGF 通过促进内皮细胞增殖驱动血管生成^[32]。研究表明,MASH 患者的 VEGF 水平升高,促进血管生成加剧肝脏炎症以及纤维化,推动代谢相关脂肪性肝病 (NAFLD) 向 MASH 进展^[33-34]。Ang-1 可通过结合受体维持血管稳态,在 MASH 中,Ang-1 水平升

高, 肝脏血液和氧气供应增加, 血管生成增加^[35]; Ang-2 是 Ang-1 的拮抗剂, 可促进白细胞的迁移以及血管渗漏, 在 MASH 中, 病理性血管增多, Ang-1 水平升高, Ang-2 水平可能降低^[36]。研究结果显示, 模型组斑马鱼 VEGF 和 Ang-1 含量升高, Ang-2 含量降低, 经膈下逐瘀汤治疗后, 各组的 VEGF 以及 Ang-1 水平降低, Ang-2 水平升高。这表明, 膈下逐瘀汤可通过调控微循环, 减少肝组织炎症及损伤, 从而改善果糖诱导的 MASH 症状。

本研究结果表明, 膈下逐瘀汤可以减轻果糖诱导的 MASH 症状, 膈下逐瘀汤抗 MASH 的潜在机制可能与改善能量代谢障碍以及微循环障碍相关, 且与 AMPK/SIRT 信号通路的调节密切相关。本研究为膈下逐瘀汤治疗 MASH 的药物研发与选择提供科学数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Diehl A M, Day C. Cause, pathogenesis, and treatment of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(21): 2063-2072.
- [2] Geier A, Rinella M E, Balp M M, et al. Real-world burden of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2021, 19(5): 1020-1029.e7.
- [3] Lee K C, Wu P S, Lin H C. Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(1): 77-98.
- [4] Dufour J F, Caussy C, Loomba R. Combination therapy for non-alcoholic steatohepatitis: Rationale, opportunities and challenges [J]. *Gut*, 2020, 69(10): 1877-1884.
- [5] Savari F, Mard S A. Nonalcoholic steatohepatitis: A comprehensive updated review of risk factors, symptoms, and treatment [J]. *Heliyon*, 2024, 10(7): e28468.
- [6] Shi Y W, Fan J G. Current status and challenges in the drug treatment for fibrotic nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(5): 1191-1199.
- [7] Chen J, Chen H L, Cheng J C, et al. A Chinese herbal medicine, Gexia-Zhuyu Tang (GZT), prevents dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis through inhibition of hepatic stellate cells proliferation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 142(3): 811-818.
- [8] Deng Z M, Zhang S H, Ge S H, et al. Gexia-Zhuyu decoction attenuates carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice partly via liver angiogenesis mediated by myeloid cells [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 2835-2844.
- [9] Zhao Y W, Yang J, Niu J, et al. Pharmacodynamic evaluation of the Gexia Zhuyu decoction in the treatment of NAFLD and the molecular mechanism underlying the TRPM4 pathway regulation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 3364579.
- [10] Goessling W, Sadler K C. Zebrafish: An important tool for liver disease research [J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(6): 1361-1377.
- [11] Huby T, Gautier E L. Immune cell-mediated features of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Nat Rev Immunol*, 2022, 22(7): 429-443.
- [12] Li X, Sun R, Liu R P. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 144: 210-226.
- [13] van der Poorten D, Milner K L, Hui J, et al. Visceral fat: A key mediator of steatohepatitis in metabolic liver disease [J]. *Hepatology*, 2008, 48(2): 449-457.
- [14] Demir M, Bornstein S R, Mantzoros C S, et al. Liver fat as risk factor of hepatic and cardiometabolic diseases [J]. *Obes Rev*, 2023, 24(10): e13612.
- [15] Nasiri-Ansari N, Androutsakos T, Flessa C M, et al. Endothelial cell dysfunction and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD): A concise review [J]. *Cells*, 2022, 11(16): 2511.
- [16] Vollmar B, Menger M D. The hepatic microcirculation: Mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(4): 1269-1339.
- [17] Garcia D, Shaw R J. AMPK: Mechanisms of cellular energy sensing and restoration of metabolic balance [J]. *Mol Cell*, 2017, 66(6): 789-800.
- [18] Foretz M, Even P C, Viollet B. AMPK activation reduces hepatic lipid content by increasing fat oxidation *in vivo* [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2826.
- [19] Zhao P, Sun X L, Chagga C, et al. An AMPK-caspase-6 axis controls liver damage in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Science*, 2020, 367(6478): 652-660.
- [20] Zhao Y W, Yang J, Niu J, et al. Pharmacodynamic evaluation of the Gexia Zhuyu decoction in the treatment of NAFLD and the molecular mechanism underlying the TRPM4 pathway regulation [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 3364579.
- [21] 郑娜, 戴孟. 膈下逐瘀汤合二陈汤加减治疗非酒精性脂肪性肝炎临床研究 [J]. *新中医*, 2018, 50(11): 98-101.
- [22] Zheng N, Dai M. Clinical study on modified Gexia Zhuyu Tang combined with Erchen Tang for non alcoholic steatohepatitis [J]. *J New Chin Med*, 2018, 50(11): 98-101.
- [22] Alamri Z Z. The role of liver in metabolism: An updated

- review with physiological emphasis [J]. *Int J Basic Clin Pharmacol*, 2018, 7(11): 2271.
- [23] Hai Ly C, Lynch G S, Ryall J G. A metabolic roadmap for somatic stem cell fate [J]. *Cell Metab*, 2020, 31(6): 1052-1067.
- [24] Olek R A, Kujach S, Radak Z. Current knowledge about pyruvate supplementation: A brief review [J]. *Sports Med Health Sci*, 2024, 6(4): 295-301.
- [25] Gastaldelli A, Cusi K. From MASH to diabetes and from diabetes to MASH: Mechanisms and treatment options [J]. *JHEP Rep*, 2019, 1(4): 312-328.
- [26] Chakravarthy M V, Neuschwander-Tetri B A. The metabolic basis of nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Endocrinol Diabetes Metab*, 2020, 3(4): e00112.
- [27] Huang X P, Tan H, Chen B Y, et al. Astragalus extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(4): 449-454.
- [28] Chen L M, Qu B H, Wang H, et al. The effect of *Curculigo orchioides* (Xianmao) on kidney energy metabolism and the related mechanism in rats based on metabolomics [J]. *Food Sci Nutr*, 2021, 9(11): 6194-6212.
- [29] Fang C Q, Pan J H, Qu N, et al. The AMPK pathway in fatty liver disease [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 970292.
- [30] Singuru G, Pulipaka S, Shaikh A, et al. Therapeutic efficacy of mitochondria-targeted esculetin in the improvement of NAFLD-MASH via modulating AMPK-SIRT1 axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 124(Pt B): 111070.
- [31] 叶新宇, 李童希, 黄治伟, 等. AMPK 激活在非酒精性脂肪性肝病中的研究进展 [J]. *中华肝病杂志*, 2023, 31(11): 1220-1223.
- Ye X Y, Li T X, Huang Z W, et al. Research progress on AMPK activation in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Chin J Hepatol*, 2023, 31(11): 1220-1223.
- [32] Zhou R, Barnes K, Gibson S, et al. Dual-edged role of SIRT1 in energy metabolism and cardiovascular disease [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2024, 327(5): H1162-H1173.
- [33] 李娟, 张岭漪. 血管内皮生长因子与非酒精性脂肪性肝病 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2011, 27(8): 869-872.
- Li J, Zhang L Y. Vascular endothelial growth factor and nonalcoholic fatty liver disease [J]. *J Clin Hepatol*, 2011, 27(8): 869-872.
- [34] Lefere S, Devisscher L, Geerts A. Angiogenesis in the progression of non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Gastroenterol Belg*, 2020, 83(2): 301-307.
- [35] Liu H, Li S C, Xu Y Y, et al. Engeletin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by modulating the VEGF/vasohibin and Ang-1/Tie-2 pathways [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(10): e11028.
- [36] Orlandi P, Solini A, Banchi M, et al. Antiangiogenic drugs in MASH: Evidence of a possible new therapeutic approach [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, 14(10): 995.

[责任编辑 兰新新]