

• 数据挖掘与循证医学 •

二陈汤治疗非酒精性脂肪性肝病燥湿化痰功效表征-靶点网络-物质基础整合研究

李 航¹, 李荣荣², 杜 航¹, 生立嵩^{3,4}, 郑 晖^{1*}, 孙 蓉^{1,3*}

1. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

2. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

3. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

4. 山东省中医药研究院, 山东 济南 250014

摘要: 目的 通过 Meta 分析、网络药理学分析及体内实验验证, 阐述二陈汤 (Erchen Decoction, ECD) 发挥燥湿化痰功效治疗非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的临床证据和潜在机制网络与物质基础和靶点验证的现代表征关系。方法 筛选符合纳入标准的 ECD 治疗 NAFLD 的临床随机对照研究, 进行质量评价和数据提取, 并运用 Revman 5.4 软件进行数据分析。筛选 ECD 和燥湿化痰类中药的活性成分及对应靶点, 运用 Cytoscape 3.10.1 等软件构建 ECD 燥湿化痰功效的“药物-活性成分-关键靶点”作用网络, 并将 ECD 燥湿化痰功效的关键靶点与 NAFLD 疾病靶点取交集, 通过 Matescape 平台对交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。根据网络药理学和现代物质基础研究, 构建 NAFLD 动物模型, 检测动物血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG) 水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和油红 O 染色检测肝脏组织病理变化; 利用实时定量逆转录聚合酶链反应 (real time fluorescence quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 技术对 ECD 治疗 NAFLD 的核心靶点进行实验验证。结果 Meta 分析显示, ECD 单独或联合其他方法治疗 NAFLD 的有效率明显高于对照组, 且在改善 ALT、AST、TC、TG 等指标方面均优于对照组。网络药理学研究共获得 ECD 活性成分 145 种, 相关靶点 392 个, 与燥湿化痰类中药靶点取交集后, 得到 ECD 燥湿化痰功效的关键作用靶点 37 个, 治疗 NAFLD 涉及过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARG)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β) 等 25 个关键靶点。富集分析揭示了 545 个生物学过程、13 个细胞组成成分、40 个分子功能和 136 条 KEGG 通路。其信号通路主要涉及脂质和动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝、细胞凋亡、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路等。动物实验结果表明, ECD 可以显著降低 NAFLD 小鼠血脂水平, 改善肝功能异常, 上调小鼠肝脏中 PPARG 和 Bcl-2 mRNA 的表达。结论 ECD 对 NAFLD 具有一定的治疗作用, 表现为发挥燥湿化痰功效, 降低 ALT、AST、TC、TG 水平, 改善肝细胞脂肪变性和积聚, 改善右肋不适或胀闷、周身困重、大便黏滞不爽等证候, 其功效作用网络与 PPARG、Bcl-2、PTGS2 等多个关键靶点以及脂质和动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝、细胞凋亡等信号通路有关, 共同发挥调节脂质代谢、改善肝细胞凋亡的作用。结合动物实验发现 PPARG 和 Bcl-2 可能是 ECD 发挥燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的核心靶点。

关键词: 二陈汤; 燥湿化痰; 非酒精性脂肪性肝病; 网络药理学; Meta 分析

中图分类号: R285.64; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)18-6283-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.18.018

Erchen Decoction treating non-alcoholic fatty liver disease: Integrated study on efficacy characterization of dampness and phlegm elimination, targeted network and material basis

收稿日期: 2024-04-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3502100); 山东大学高等医学研究院前沿学科发展基金 (GYY2023QY01)

作者简介: 李 航, 硕士研究生, 研究方向为消化系统疾病中药转化药理学。E-mail: hangli0626@163.com

*通信作者: 孙 蓉, 博士生导师, 教授, 从事中药药理学与毒理学研究。E-mail: sunrong107@163.com

郑 晖, 助理研究员, 从事中药心血管药理学与毒理学研究。E-mail: zhenghui@sdu.edu.cn

LI Hang¹, LI Rongrong², DU Hang¹, SHENG Lisong^{3,4}, ZHENG Hui¹, SUN Rong^{1,3}

1. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

3. Advanced Medical Research Institute, Shandong University, Jinan 250012, China

4. Shandong Academy of Chinese Medicine, Jinan 250014, China

Abstract: Objective To elucidate the clinical evidence and potential mechanism of Erchen Decoction (二陈汤, ECD) in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) through Meta-analysis combined with network pharmacology analysis and *in vivo* experiments verification. **Methods** Randomized controlled clinical studies of ECD in the treatment of NAFLD that met the inclusion criteria were screened, study quality evaluation and data extraction were conducted, and data analysis was performed using Revman 5.4 software. The active components and their corresponding targets from ECD and traditional Chinese medicines (TCMs) with dampness and phlegm elimination were screened. The “drug-active ingredient-key target” action network for the dampness and phlegm elimination efficacy of ECD was constructed by using Cytoscape 3.10.1 and other software, and the key target of the dampness and phlegm elimination efficacy of ECD was intersected with the disease target of NAFLD. The gene ontology (GO) function and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment of the intersection targets were analyzed using the Matescape platform. According to the network pharmacology and modern pharmacodynamic substance research, the animal model of NAFLD was constructed. Levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in serum were detected. The pathological changes of liver tissue were detected by hematoxylin-eosin (HE) staining and oil red O staining. And the core target of ECD in the treatment of NAFLD was verified by real-time fluorescence quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) technology. **Results** Meta-analysis showed that ECD had superior improvements in key indicators such as ALT, AST, TC and TG compared to the control group. A total of 145 active ingredients and 392 related targets were obtained from network pharmacology, and 37 key targets were obtained for the dampness and phlegm elimination effect of ECD, and 25 key targets such as peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARG), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), tumor protein p53 (TP53), glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) were involved in the treatment of NAFLD. Enrichment analysis revealed 545 biological processes, 13 cell components, 40 molecular functions and 136 KEGG pathways. The signaling pathways are mainly related to lipid and atherosclerosis, non-alcoholic fatty liver disease, apoptosis, phosphatidylinositol-3-hydroxykinase-protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, etc. The results of animal experiments showed that ECD could effectively reduce the levels of blood lipids and improve the liver function in NAFLD mice, and up-regulate the expression of *PPARG* and *Bcl-2* mRNA in the livers of mice. **Conclusion** ECD has a certain therapeutic effect on NAFLD, manifested by its ability to exert dampness and phlegm elimination effects, reducing levels of ALT, AST, TC, and TG, ameliorating the accumulation and degeneration of hepatocyte fat. It also improves symptoms such as right hypochondrium discomfort or swelling, heavy body, and unpleasant stool. The efficacy is associated with a network of key targets including PPARG, Bcl-2, PTGS2 and multiple signaling pathways such as lipid and atherosclerosis, non-alcoholic fatty liver disease and apoptosis. These collectively play a role in regulating lipid metabolism and reducing hepatocyte apoptosis. Combined with animal experiments, it was found that PPARG and Bcl-2 may be the core targets through which ECD exerts its dampness and phlegm elimination effects in the treatment of NAFLD.

Key words: Erchen Decoction; dampness and phlegm elimination; non-alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; Meta-analysis

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的肝损害因素所致的, 以肝细胞脂肪变性为主要特征的一种代谢性疾病, 其疾病进程主要包括非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 或不伴纤维化、肝硬化和肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) [1]。近年来, NAFLD 的患病率在

全球范围内呈现上升趋势, 其在一般人群中的患病率为 25%~30% [2], 造成了巨大的经济负担 [3]。目前, NAFLD 已成为我国第一大慢性肝病, 严重危害人民生命健康 [4]。

NAFLD 在病因、病机、症状体征等方面都归属于中医“胁痛”“肝癖”“积聚”“痰证”“痰浊”等范畴 [5]。多数医家认为, 本病的主要病因病机为饮食不调、情志失调、久病体虚等因素导致肝

体受损,无法疏泄调达;继而脾肾亏虚,水湿停聚,痰湿互结;最终,各种原因产生的热、痰、湿、浊、淤蕴结于肝体,从而导致本病的发生发展。二陈汤出自宋代《太平惠民和剂局方》,由半夏(汤洗 7 次)、橘红、茯苓、甘草(炙)、生姜和乌梅 6 味中药组成,其燥湿化痰、理气和中的组方方法是对宋之前治痰法则的总结,既能祛除已生之痰,又能杜绝痰之来源。二陈汤临床上已被广泛应用于 NAFLD 中痰浊内阻证的临床治疗,且疗效确切。

为了系统挖掘二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的高级别临床证据,本研究采用 Meta 分析探究其在临床应用中治疗 NAFLD 的有效性及安全性;对二陈汤和 6 味经典燥湿化痰类中药的共有靶点进行网络药理学分析,预测二陈汤治疗 NAFLD 的功效网络靶点和潜在作用机制;继而进行功效网络靶点和方中药味成分现代研究数据的相互印证,采用动物实验验证核心靶点,力求阐明二陈汤通过“燥湿化痰”功效治疗 NAFLD 的安全性、有效性、现代功效表征及核心靶点,为今后二陈汤的临床应用提供更加有力的科学理论支撑。

1 材料

1.1 药物与试剂

辛伐他汀片(批号 W014386)购自杭州默沙东制药有限公司。法半夏(批号 211201)、陈皮(批号 230402)、茯苓(批号 230101)、炙甘草(批号 200501)和乌梅(批号 221101)购自山东百味堂中药饮片有限公司;生姜购自世纪生鲜超市;经山东大学孙蓉教授鉴定法半夏为天南星科植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎,陈皮为芸香科植物橘 *Citrus reticulata* Blanco 及其栽培变种的干燥成熟果皮,茯苓为多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw.) Wolf 的干燥菌核,甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和根茎,乌梅为蔷薇科植物梅 *Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. 的干燥近成熟果实,生姜为姜科植物姜 *Z. officinale* R. 的新鲜根茎。橙皮苷(批号 K09S11L123847, HPLC $\geq$ 98%)购自上海源叶生物科技有限公司;Trizol 试剂(批号 7E742D3)、逆转录试剂盒(批号 7E703F3)、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(批号 7E750E3)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。高脂饮食(脂肪含量 41%, RD Western Diet, 批号 23072919)、葡萄糖和结晶果糖(批号 23072919)购自 Research diet 公司。乙腈(批号

2020060301)、甲醇溶液(批号 2021042601)购自成都科隆公司,磷酸溶液(批号 20180110)购自天津科密欧公司。4%多聚甲醛(批号 BL539A)购自 Biosharp 公司,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(批号 G1120)、OCT 包埋剂(批号 YZ-4583-1EA)购自北京索莱宝公司,油红 O 试剂(批号 O0625)购自美国 Sigma 公司。丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)测试盒(批号 C009-2)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测试盒(批号 C009-2)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测试盒(批号 A111-1)和三酰甘油(triglyceride, TG)测试盒(批号 A110-1)购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物

36 只雄性 SFP 级 C57BL/6J 小鼠,8 周龄,体重(20 $\pm$ 2) g。动物来源于北京维通利华有限公司,生产许可证编号:SCXK(京)2021-0006,饲养于山东大学模式动物研究中心,室温 24~26 $^{\circ}$ C,湿度 40%~60%,昼夜 12 h 交替,自由进食和饮水。动物实验经山东大学第二医院科研伦理委员会批准(批准号 KYLL-2023-352)。

1.3 仪器

万分之一分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],C21-R2021 型多功能电磁炉(中国美的集团有限公司),Agilent 1260 Infinity II 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司),Multifuge X1 型离心机(赛默飞世尔科技公司),TC 型基因扩增仪(杭州博日科技有限公司),CFX96TM Optics Module (BIO-RAD 公司),基础型小动物麻醉机(深圳市瑞沃特生命科技有限公司),ASP6025 型组织脱水机、CM1860 型冰冻切片机(德国 Leica 仪器有限公司),Tissue-Tek 组织包埋机(日本 Sakura 公司),Minux S700 型轮转石蜡切片机(广东瑞沃德公司),KD-T 型组织摊烤片机(浙江科迪公司),S60 型数字病理切片扫描仪(日本滨松公司)。

2 方法

2.1 二陈汤治疗 NAFLD 的 Meta 分析

2.1.1 检索策略 在中国知网(CNKI)、维普(VIP)、万方数据(Wanfang Data)、Cochrane Library、PubMed 和 Embase 数据库中检索从建库至 2023 年 9 月 30 日有关二陈汤治疗 NAFLD 的临床随机对照试验(randomized controlled trial, RCT),同时追溯所有文献附录的参考文献。中文检索关键词包括二

陈汤、二陈汤加减方、加味二陈汤、非酒精性脂肪性肝病、非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎，英文检索关键词包括 Erchen Decoction、non-alcoholic fatty liver disease、NAFLD。

2.1.2 纳入标准 (1) 研究类型为临床 RCT；(2) 试验组和对照组为同期明确诊断为 NAFLD 的患者；(3) 试验组干预措施为加味二陈汤或加味二陈汤+常规化学药/中成药治疗，对照组为常规化学药/中成药治疗；(4) 试验组的加味二陈汤中至少含有半夏、陈皮、茯苓、甘草 4 味中药及其具体剂量；(5) 试验组和对照组结局指标完整，至少包括 ALT、AST 中 1 项肝功能指标和 TC、TG 中 1 项血脂指标。

2.1.3 排除标准 (1) 非 RCT；(2) 重复发表的文献；(3) 信息不完整或有明显逻辑错误的文献；(4) NAFLD 合并心脏病、糖尿病、病毒性肝炎、HCC 等其他疾病的研究；(5) 无法获得全文的文献。

2.1.4 文献质量评价和数据提取 用统一的质量评价标准和数据提取表格，由 2 位研究人员对每篇符合纳入标准的文献独立进行质量评价和数据提取，并进行交叉核对。如有异议，通过讨论或由第 3 位研究者协助解决。根据 Cochrane 协作评估工具制定的 RCT 质量评估标准，从选择偏倚、实施偏倚、测量偏倚、随访偏倚、报告偏倚和其他偏倚 6 个方面评价纳入研究文献的偏倚风险。数据提取内容主要包括作者姓名、发表时间、样本量、研究人群、干预措施和结局指标等。

2.1.5 数据分析及统计学方法 使用 RevMan 5.4 软件进行 Meta 分析。连续变量资料采用均数差 (mean difference, MD)，以 95% 可信区间 (confidence interval, CI) 表示；二分类变量资料采用比值比 (odds ratio, OR)，以 95% CI 表示。采用 P 值和 I^2 值评价合并研究间的异质性，若 $P < 0.1$ 、 $I^2 > 75\%$ 表明异质性显著，则进行敏感性分析或亚组分析，通过逐个剔除纳入研究的文献，寻找异质性原因；若 $P \geq 0.1$ 、 $50\% \leq I^2 \leq 75\%$ 表明异质性较大，则采用随机效应模型进行数据分析；若 $P > 0.1$ 、 $I^2 < 50\%$ 表明无异质性，则采用固定效应模型。

2.2 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的网络药理学研究

2.2.1 二陈汤活性成分获取和靶点预测 在 TCMSP、TCMID 和 STITCH 数据库中检索二陈汤中的半夏、橘红、茯苓、甘草、生姜、乌梅所包含的活性成分。通过设定口服生物利用度 (oral

bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的标准进行筛选，同时结合文献补充生姜和乌梅常见成分。通过 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 进行蛋白质标准化，物种选择 “Homo sapiens”，得到二陈汤的靶点。

2.2.2 燥湿化痰类中药活性成分获取和靶点预测 选择《中国药典》2020 年版和新世纪第 4 版《中药学》教材中均明确记载的半夏、陈皮、天南星、橘红、化橘红、佛手 6 味药作为燥湿化痰类代表中药。使用 “2.2.1” 中的方法对陈皮、天南星、化橘红、佛手 4 味药进行检索和筛选，将获取的结果与 “2.2.1” 中得到的半夏、橘红的活性成分和靶点进行合并，得到燥湿化痰类中药的活性成分和靶点信息。

2.2.3 二陈汤燥湿化痰功效 “药物-活性成分-关键靶点” 网络构建 通过 STRING 平台 (<http://string-db.org/>) 对二陈汤靶点构建蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络，将结果导入 Cytoscape 3.10.1 软件，创建二陈汤 “药物-活性成分-靶点” 网络。通过 STRING 平台对上述 6 味中药靶点构建 PPI 网络，将结果导入 Cytoscape 3.10.1 软件，使用 CytoNCA 插件计算度 (degree) 值，并基于度值的 2 倍中位数筛选出重要靶点。使用微生信网站交集处理燥湿化痰类中药预测的靶点，随后利用筛选得到的共有靶点构建燥湿化痰类中药功效作用网络。运用 Merge 功能将其与二陈汤功效作用网络进行交集处理，得到二陈汤发挥燥湿化痰功效的 “药物-活性成分-关键靶点” 网络。

2.2.4 NAFLD 疾病靶点检索 通过 CTD (<http://ctdbase.org/>)、PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<http://www.disgenet.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 等数据库，以关键词 “non-alcoholic fatty liver disease” 和 “NAFLD” 进行检索，合并 5 个数据库的信息并去除重复，以获取与 NAFLD 相关的疾病靶点信息。

2.2.5 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 交集靶点的相互作用网络构建 在 STRING 平台将 NAFLD 疾病靶点构建 PPI 网络并导入 Cytoscape 软件，通过 Merge 功能对 NAFLD 的 PPI 网络与二陈汤燥湿化痰功效的 “药物-活性成分-关键靶点” 网络取交集，并进行可视化分析，构建 “关键靶点互作网络”。

2.2.6 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的富

集分析 使用 Metascape (<https://Metascape.org/>) 网站对二陈汤燥湿化痰和 NAFLD 的交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。随后通过微生信网站对分析结果进行可视化分析, 以深入研究关键靶点涉及的主要分子生物学过程和信号通路。

2.3 二陈汤燥湿化痰功效调脂、改善肝功能作用机制验证

2.3.1 药物制备及质量控制 取法半夏 15 g、陈皮 15 g、茯苓 9 g、甘草 4.5 g、乌梅 1 个 (3 g)、生姜 5 g, 加 8 倍蒸馏水浸泡 1 h 后, 武火煮沸后文火煎煮 0.5 h, 重复 2 次, 合并 2 次药液进行浓缩, 得到质量浓度分别为 0.669 5、1.339 0、2.678 0 g/mL 的二陈汤药液。

利用高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 方法检测二陈汤活性成分橙皮苷含量对其进行质量控制。精密称取橙皮苷对照品 1.1 mg, 加入 1 mL 甲醇, 得到 1.1 mg/mL 的对照品溶液。取 500 μ L 二陈汤药液 (1.399 g/mL), 加入 500 μ L 甲醇, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 得到供试品溶液。色谱条件: ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相为乙腈 (A) -0.1%磷酸水溶液 (B), 梯度洗脱: 0~15 min, 10%~35% A; 15~25 min, 35%~50% A; 25~35 min, 50%~35% A; 35~40 min, 35%~10% A; 40~45 min, 10% A。检测波长为 283 nm; 柱温为 30 $^{\circ}$ C; 进样量 5 μ L; 体积流量 1 mL/min。

2.3.2 实验动物分组与给药 适应性喂养 1 周后, 将 36 只小鼠随机分成对照组, 模型组, 二陈汤低、中、高剂量 (6.695、13.390、26.780 g/kg) 组和辛伐他汀 (5 mg/kg) 组, 每组 6 只。除对照组外, 其余各组给予高脂饮食和高糖饮水, 糖配方为结晶果糖 23.1 g/L, 葡萄糖 18.9 g/L, 共 8 周^[6], 自由进食与饮水。从第 5 周开始, 二陈汤各剂量组按照 25 mL/kg 体积 ig 给药, 辛伐他汀组 ig 给予 5 mg/kg 辛伐他汀, 1 次/d, 对照组 ig 给予同等体积蒸馏水。

2.3.3 血清指标检测 小鼠禁食不禁水 12 h 后, 异氟烷吸入麻醉, 眼球取血 0.6 mL。全血静置 0.5 h 后, 4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清。按照试剂盒说明书检测血清中 ALT、AST、TC、TG 水平。

2.3.4 肝脏组织病理染色 各组小鼠取血后处死,

留存其肝脏组织。将 4%多聚甲醛固定的肝组织石蜡包埋制备 5 μ m 切片, 进行 HE 染色。制备冰冻切片进行油红 O (oil red O,ORO) 染色, 用数字切片扫描仪扫描, 观察肝脏组织病理学变化。

2.3.5 实时定量逆转录聚合酶链反应 (real time fluorescence quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction, qRT-PCR) 分析 通过 Trizol 试剂抽提肝脏组织总 RNA, 将其逆转录为 cDNA, 随后参照 CFX96 Real Time PCR Detection System (Bio Rad) 的使用说明书进行 qRT-PCR 分析, 内参基因为磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法比较各组过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 和 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) mRNA 相对表达量。引物由铂尚生物技术 (上海) 有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列
PPARG	上游 5'-GCCGAGTCTGTGGGGATAAA-3'
	下游 5'-TCCGGCAGTTAAGATCACACC-3'
Bcl-2	上游 5'-CCAGCTAATGAAAGGGGAACC-3'
	下游 5'-CAGGGTGTGATAATGCCCCAA-3'
GAPDH	上游 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'
	下游 5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'

2.3.6 统计学分析 应用 Graph Pad Prism 9 软件进行数据统计, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 时差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 二陈汤发挥燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的 Meta 分析结果

3.1.1 文献筛选及基本特征 基于上述检索策略, 共检索到 125 篇中英文文献, 去除重复文献后, 得到 71 篇文献。在阅读题目和摘要进行初筛后, 选择了 17 篇文献进行仔细阅读。根据设定的纳入和排除标准剔除不符合标准的文献后, 最终纳入 8 篇 RCT 文献^[7-14], 共计 1 086 例患者, 其中试验组 557 例, 对照组 529 例, 具体筛选流程如图 1 所示, 文献基本特征见表 2。

3.1.2 文献质量评价 纳入的 8 篇 RCT 文献中, 1 篇采用了随机数字表法, 被评为低风险; 6 篇提及

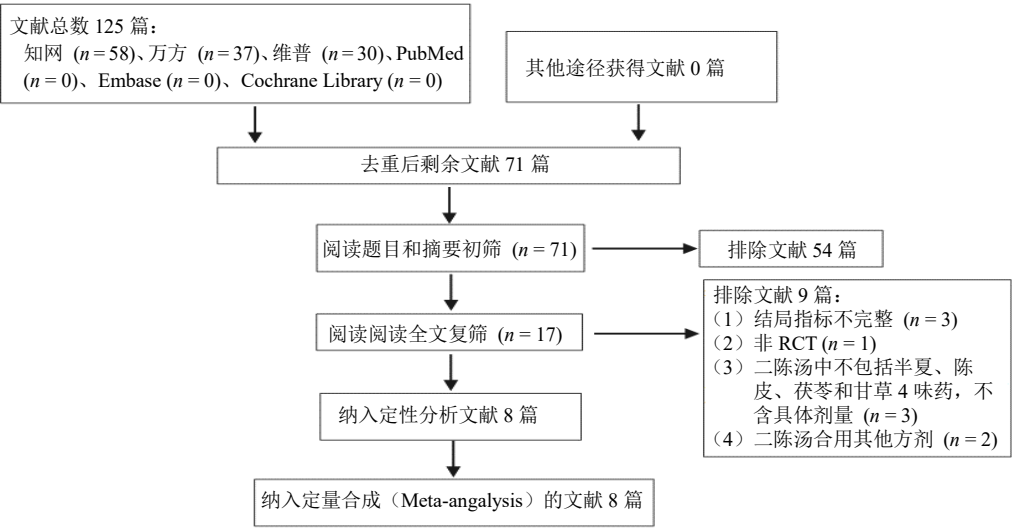


图 1 文献筛选流程图

Fig. 1 Flow chart of literature screening

表 2 纳入文献基本特征

Table 2 Basic characteristics of included literature

纳入研究	发表时间	总样本量 (试验组/对照组)	干预措施 (药物)		疗程/月	结局指标
			试验组	对照组		
祝娥 ^[7]	2013 年	180 (90/90)	加味二陈汤 (法半夏 15 g, 陈皮 15 g, 山楂 15 g, 蒲黄 10 g, 丹参 10 g, 白茯苓 8 g, 甘草 5 g, 生姜 3 g, 乌梅 2 个) + 脂必泰胶囊	脂必泰胶囊	3	①②③④⑤⑥⑦⑧
李格爱等 ^[8]	2017 年	171 (86/85)	二陈汤 (姜半夏 15 g, 陈皮 15 g, 茯苓 15 g, 甘草 5 g, 生姜 5 g, 乌梅 10 g) + 甘草酸二铵肠溶胶囊	甘草酸二铵肠溶胶囊	1	①②③④⑤
张鹏 ^[9]	2013 年	248 (137/111)	加味二陈汤 (姜半夏 6 g, 陈皮 12 g, 茯苓 15 g, 炙甘草 3 g, 乌梅 10 g, 生姜 10 g, 大贝母 15 g, 荷叶 30 g, 生山楂 30 g, 丹参 10 g)	凯西莱	2	①②④⑤
崔玉红 ^[10]	2018 年	50 (25/25)	加味二陈汤 (生山楂、薏苡仁各 30 g, 陈皮、丹参各 15 g, 易善复胶囊 半夏、茯苓、白术各 10 g, 生姜、乌梅、甘草各 5 g) + 易善复胶囊		1	①②③④⑤
冯红英 ^[11]	2013 年	126 (63/63)	加味二陈汤 (茯苓 15 g、生姜 10 g、大贝母 15 g、姜半夏 6 g、乌梅 10 g、陈皮 12 g、丹参 10 g)	凯西莱	2	①②④⑤
郭宗超 ^[12]	2018 年	80 (40/40)	苓术二陈汤 (茯苓、白术各 12 g, 法半夏 10 g, 陈皮、橘红 各 15 g, 乌梅、生姜、甘草各 6 g) + 熊去氧胆酸 + 普伐他汀钠	熊去氧胆酸 + 普伐他汀钠	2	①②③④⑤⑥⑦⑧
陈勇华等 ^[13]	2015 年	100 (50/50)	二术二陈汤 (陈皮 15 g, 法半夏 9 g, 茯苓 20 g, 甘草 10 g, 盐酸二甲双胍肠溶片 生姜 10 g, 苍术 10 g, 白术 15 g)		1	①②③④⑤
刘茵等 ^[14]	2013 年	131 (66/65)	加味二陈汤 (陈皮、茯苓各 15 g, 半夏、炙甘草、生姜各 5 g, 乌梅、柴胡、牡丹皮各 10 g, 黄芪、山楂、丹参各 20 g, 大黄 5 g, 泽泻、白术各 10 g) + 甘草酸二铵肠溶胶囊	甘草酸二铵肠溶胶囊	3	①②④⑤

①临床总有效率; ②ALT; ③AST; ④TC; ⑤TG; ⑥低密度脂蛋白胆固醇; ⑦高密度脂蛋白胆固醇; ⑧肝脏 CT 值。
①clinical total effective rate; ②ALT; ③AST; ④TC; ⑤TG; ⑥low-density lipoprotein cholesterol; ⑦high-density lipoprotein cholesterol; ⑧liver CT value.

随机化但未明确随机化方法，被评为风险不明确；1 篇未提及分组方法，被评为高风险；所有文献均存在分配隐藏、未报道盲法应用情况，被评为风险不明确；所有文献结局资料完整，未发现选择性报告偏倚，被评为低风险；所有文献其他偏倚来源不清楚，被评为风险不明确。偏倚风险评估见图 2。

3.1.3 肝功能指标 ALT 变化情况 8 篇文献共收集病例 1 086 例，异质性检验结果显示 $P < 0.000\ 01$ 、 $I^2 = 97\%$ ，提示纳入研究的异质性显著。剔除 1 篇^[8]文献后，共 915 例病例纳入分析，治疗组 471 例，对照组 444 例，异质性降低（ $P = 0.12$ 、 $I^2 = 41\%$ ），

故采用固定效应模型。Meta 分析结果（图 3）提示试验组 ALT 水平低于对照组，差异有统计学意义 [$MD = -0.64$, 95% CI (-0.77, -0.51), $P < 0.000\ 01$]。

3.1.4 肝功能指标 AST 变化情况 6 篇文献共收集病例 712 例，异质性检验显示 $P < 0.000\ 01$ 、 $I^2 = 96\%$ ，提示纳入研究的异质性显著。剔除 1 篇^[8]文献后，共 541 例病例纳入分析，治疗组 271 例，对照组 270 例，异质性降低（ $P = 0.003$ 、 $I^2 = 75\%$ ），采用随机效应模型。Meta 分析结果（图 4）提示试验组 AST 水平低于对照组，差异有统计学意义 [$MD = -8.36$, 95% CI (-11.83, -4.91), $P < 0.000\ 01$]。

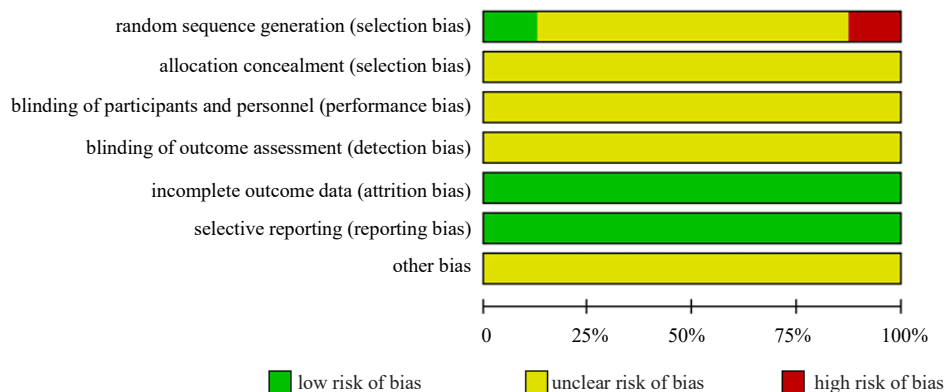


图 2 纳入文献的偏倚风险评估

Fig. 2 Bias risk assessment of included literature

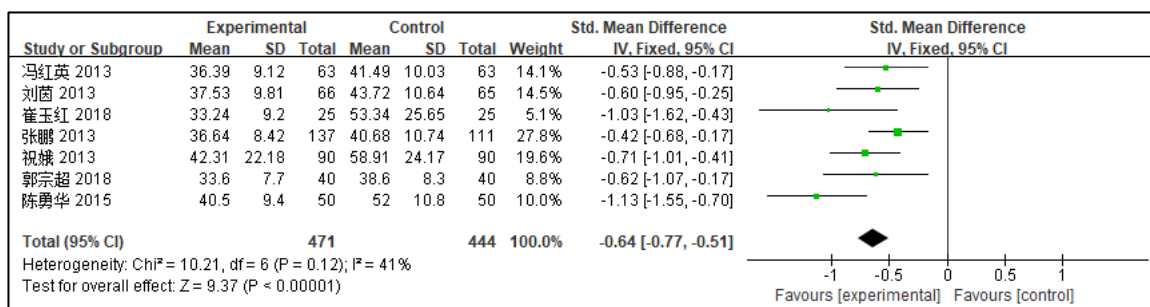


图 3 二陈汤对 NAFLD 患者 ALT 水平影响的森林图

Fig. 3 Forest plot of effects of Erchen Decoction on ALT levels in NAFLD patients

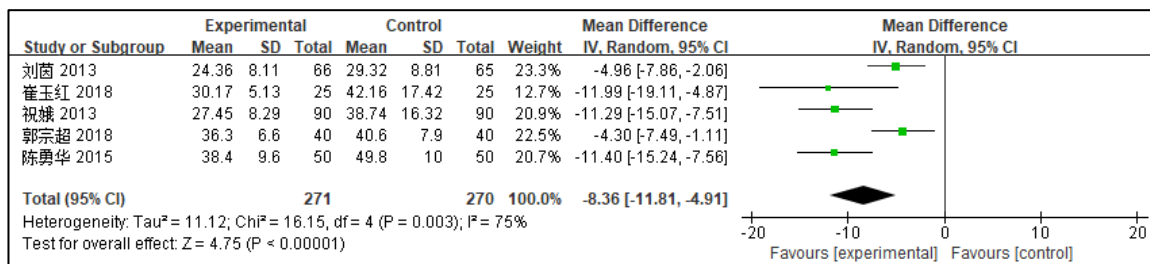


图 4 二陈汤对 NAFLD 患者 AST 水平影响的森林图

Fig. 4 Forest plot of effects of Erchen Decoction on AST levels in NAFLD patients

3.1.5 脂代谢指标 TC 变化情况 7 篇文献共收集病例 956 例, 异质性检验显示 $P < 0.000\ 01$ 、 $I^2 = 96\%$, 提示纳入研究的异质性显著。剔除 2 篇^[10,12]文献后, 共 825 例病例纳入分析, 治疗组 426 例,

对照组 399 例, 异质性降低 ($P = 0.39$ 、 $I^2 = 4\%$), 故采用固定效应模型。Meta 分析结果 (图 5) 提示试验组 TC 水平低于对照组, 差异有统计学意义 [$MD = -0.69$, 95% CI (-0.83, -0.55), $P < 0.000\ 01$]。

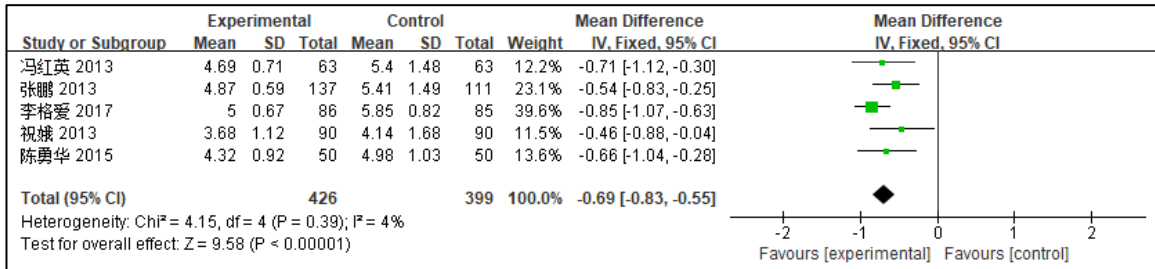


图 5 二陈汤对 NAFLD 患者 TC 水平影响的森林图

Fig. 5 Forest plot of effects of Erchen Decoction on TC levels in NAFLD patients

3.1.6 脂代谢指标 TG 变化情况 8 篇文献共收集病例 1 086 例, 异质性检验显示 $P < 0.000\ 01$ 、 $I^2 = 88\%$, 提示纳入研究的异质性显著。剔除 1 篇^[12]文献后, 共 1 006 例病例纳入分析, 治疗组 517 例, 对照组 489 例, 异质性降低 ($P = 0.000\ 8$ 、 $I^2 = 74\%$), 故采用随机效应模型。Meta 分析结果 (图 6) 提示试验组 TG 水平明显低于对照组, 差异有统计学意

义 [$MD = -0.55$, 95% CI (-0.75, -0.36), $P < 0.000\ 01$]。

3.1.7 临床总有效率变化情况 8 篇研究共收集病例 1 086 例, 治疗组 557 例, 对照组 529 例, 异质性检验显示 $P = 0.03$ 、 $I^2 = 55\%$, 提示纳入研究的异质性较大, 应采用随机效应模型。Meta 分析结果 (图 7) 提示试验组临床疗效明显优于对照组, 差异有统计学意义 [$OR = 5.20$, 95% CI (2.89, 9.33), $P < 0.000\ 01$]。

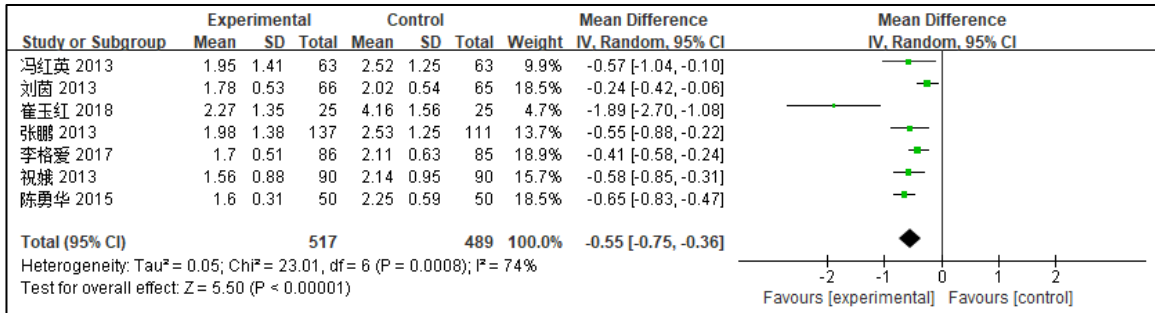


图 6 二陈汤对 NAFLD 患者 TG 水平影响的森林图

Fig. 6 Forest plot of effects of Erchen Decoction on TG levels in NAFLD patients

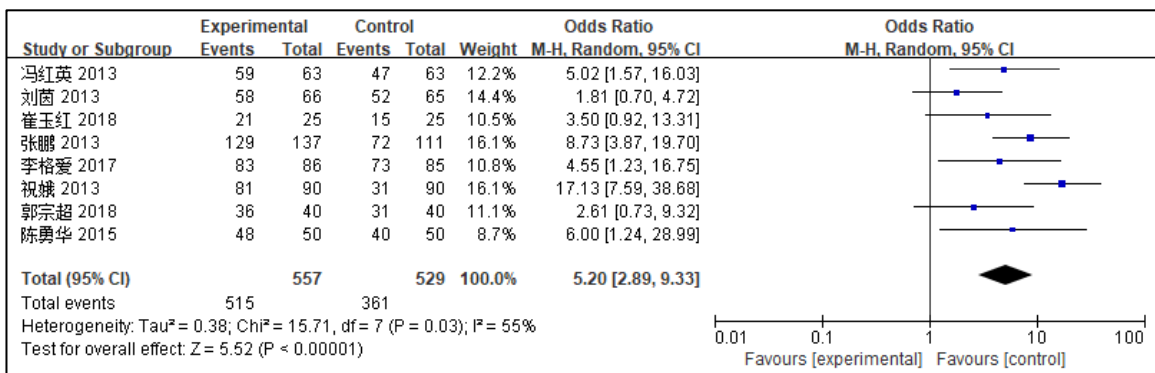


图 7 二陈汤治疗 NAFLD 临床总有效率的森林图

Fig. 7 Forest plot of clinical total overall efficacy of Erchen Decoction in treatment of NAFLD

3.2 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的网络药理学预测

3.2.1 二陈汤活性成分与作用靶点 基于上述研究方法,得到 145 种二陈汤活性成分。利用 UniProt 数据库将蛋白质标准化,得到 392 个二陈汤相关靶点。

3.2.2 燥湿化痰类中药活性成分与作用靶点 采用相同的方法,得到燥湿化痰类中药活性成分 34 种和 172 个相关靶点。

3.2.3 二陈汤燥湿化痰功效“药物-活性成分-关键靶点”网络构建 首先,通过 STRING 平台和 Cytoscape 3.9.1 软件创建二陈汤“药物-活性成分-靶点”网络。然后,通过 STRING 平台构建燥湿化痰

类中药 PPI 网络后,导入到 Cytoscape 3.9.1 软件计算度值,以度值大于 2 倍中位数进行筛选,得到重要靶点 34 个;利用微生信网站对每味燥湿化痰类中药预测的靶点取交集后得到共有靶点 9 个;将重要靶点和共同靶点合并得到燥湿化痰类中药功效靶点 39 个。最后,运用 Merge 功能将燥湿化痰类中药功效靶点与二陈汤功效作用网络进行交集,得到二陈汤燥湿化痰关键靶点 37 个,包括前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、PPARG、ESR2、核受体共激活因子 2 (nuclear receptor coactivator 2, NCOA2) 等靶点,并构建出二陈汤燥湿化痰功效的“药物-活性成分-关键靶点”网络(图 8)。

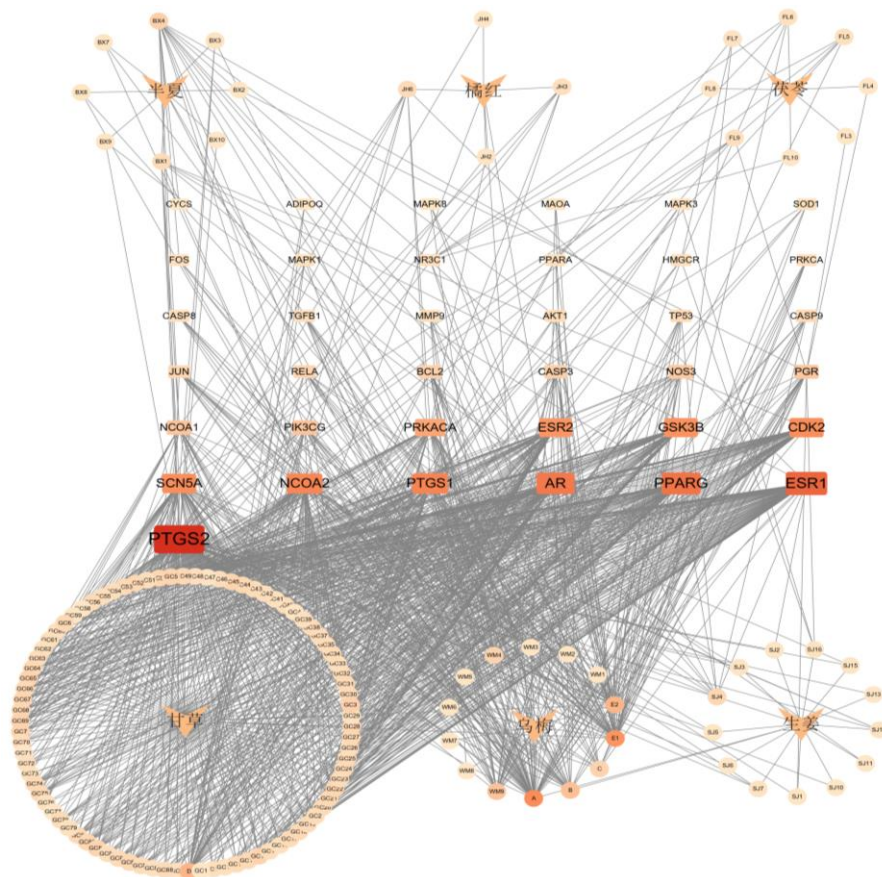


图 8 二陈汤燥湿化痰功效的“药物-活性成分-关键靶点”网络

Fig. 8 Network of “drug-active ingredients-key targets” for dampness and phlegm elimination efficacy of Erchen Decoction

3.2.4 NAFLD 的相关疾病靶点 通过检索得到与 NAFLD 密切相关的疾病靶点共 970 个,然后导入 STRING 平台绘制 PPI 网络并进行分析,结果显示有 883 个靶点参与蛋白互作, PPI 有 14 519 条,其间作用力的大小以线条的粗细表示(图 9)。

3.2.5 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的关

键靶点分析 利用 STRING 平台对二陈汤燥湿化痰所涉及的 37 个靶点进行 PPI 网络分析,并将 NAFLD 靶点 PPI 网络共同导入 Cytoscape 软件中,通过 Merge 功能取交集,得到二陈汤通过燥湿化痰治疗 NAFLD 的关键靶点 25 个,其度值以靶点的大小表示(图 10)。

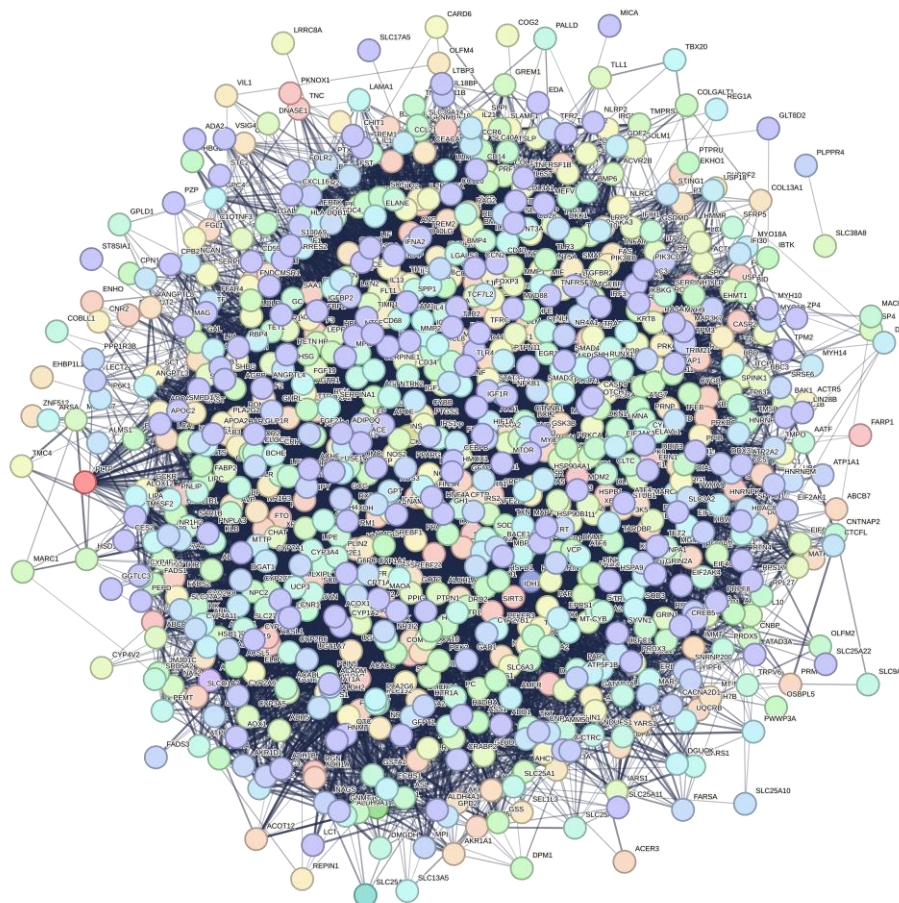


图 9 NAFLD 靶点 PPI 网络

Fig. 9 PPI network of targets for NAFLD

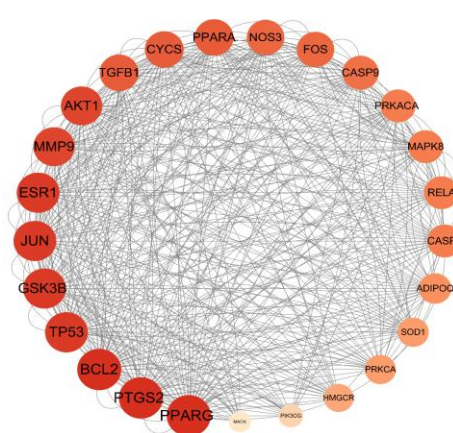


图 10 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 关键靶点作用网络

Fig. 10 Network of key targets for Erchen Decoction in treatment of NAFLD by dampness and phlegm elimination efficacy

3.2.6 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 交集靶点富集分析 GO 分析条目共有 598 个 ($P < 0.01$), 根据 P 值排序, 分别在生物过程、分子功能

和细胞组分中选出排名前 10 的条目进行做图 (图 11)。生物过程涉及氧化应激过程调控、程序性细胞死亡过程调控、细胞内信号转导过程调控、miRNA 转录和代谢过程调控等 545 个条目; 细胞组成涉及转录因子调节复合物、细胞器外膜、膜泡、线粒体膜等 13 个条目; 分子功能涉及 DNA 结合转录因子、蛋白激酶结合、泛素蛋白连接酶结合、转录辅助调节因子结合等 40 个条目。

KEGG 分析 ($P < 0.01$) 涉及通路共有 136 条, 根据 P 值排序, 排除癌症通路、肝炎、病毒感染等无关通路, 筛选出排名前 20 条相关通路做图 (图 12)。KEGG 通路包括脂质和动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝、细胞凋亡、磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路等。

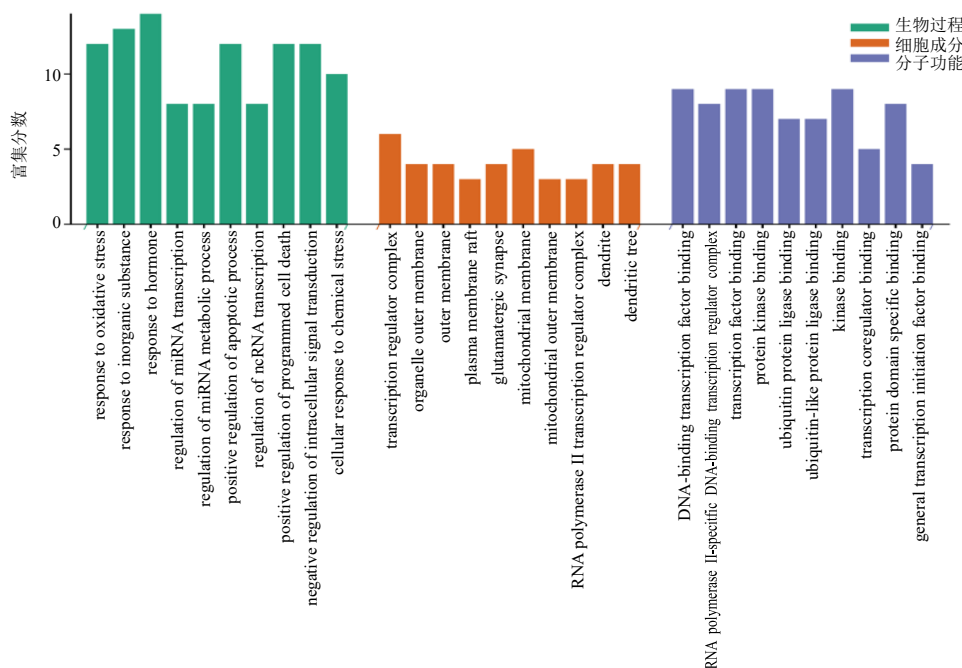


图 11 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 关键靶点的 GO 分析

Fig. 11 GO analysis of key targets for Erchen Decoction in treatment of NAFLD by dampness and phlegm elimination

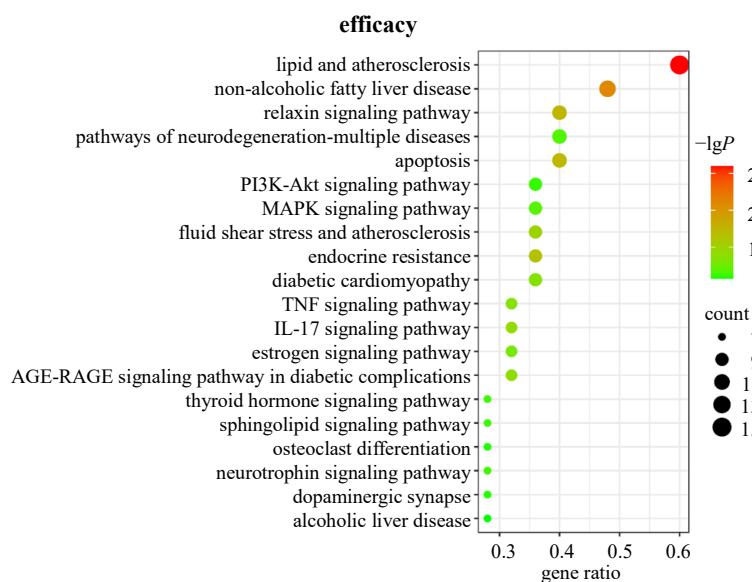


图 12 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 关键靶点的 KEGG 分析

Fig. 12 KEGG analysis of key targets for Erchen Decoction in treatment of NAFLD by dampness and phlegm elimination

3.3 二陈汤药物质量控制

将制备好的橙皮苷对照品溶液和二陈汤溶液各 5 μ L 注入色谱仪进行测定，色谱图如图 13 所示，采用外标一点法计算出二陈汤药液中橙皮苷质量分数为 1.93 mg/g。

3.4 二陈汤治疗 NAFLD 的动物实验结果

3.4.1 二陈汤对 NAFLD 小鼠肝功能及脂代谢水

平的影响 与对照组相比，模型组小鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；与模型组相比，二陈汤中、高剂量组小鼠血清 ALT、AST、TC、TG 水平均显著减低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，二陈汤低剂量组小鼠血清 ALT、AST、TG 水平均显著减低 ($P < 0.01$ 、 0.001) (图 14)。

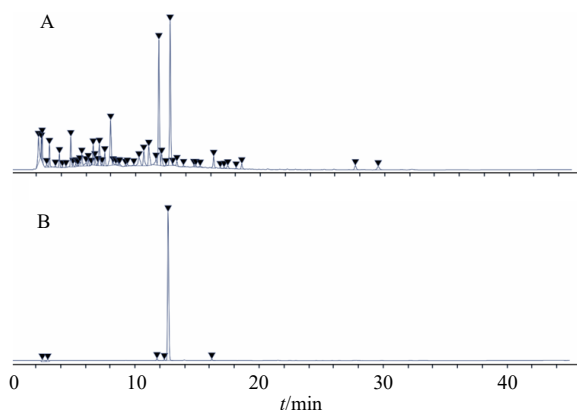
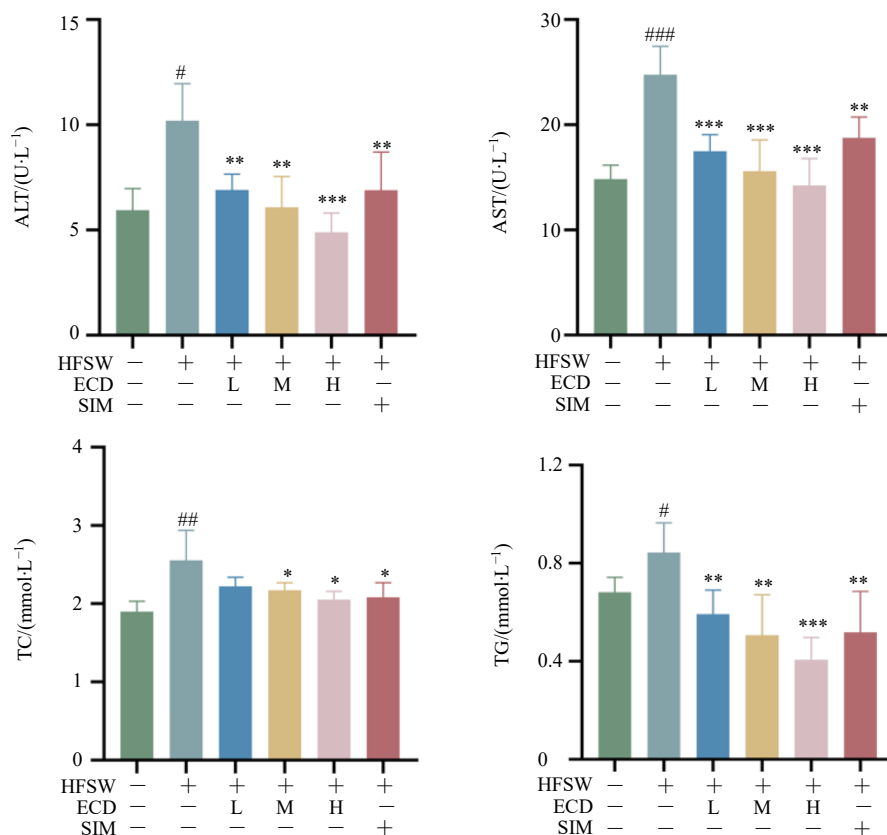


图 13 二陈汤 (A) 及橙皮苷对照品 (B) 的 HPLC
Fig. 13 HPLC of Erchen Decoction (A) and hesperidin (B)



HFSW-高脂饮食+高糖饮水; ECD-二陈汤; SIM-辛伐他汀; L-低剂量; M-中剂量; H-高剂量; 与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$; 下图同。

HFSW-high fat diet along with sweet drinking water, ECD- Erchen Decoction; SIM-simvastatin; L-low dose; M-medium dose; H-high dose; [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{***} $P<0.001$ vs model group; same as belows.

图 14 二陈汤对 NAFLD 小鼠血脂和肝功能水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 14 Effects of Erchen Decoction on blood lipid and liver function level in NAFLD mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

4 讨论

中医将 NAFLD 归为“肝癖”范畴, 中医药在辨证施治后取得一定疗效, 在病机上, 临床医家认

为 NAFLD 多以痰浊内阻证型为主, 湿痰瘀阻互结、痹阻肝络为基本病机, 患者表现为体态肥胖、右肋不适或胀闷、周身困重、大便黏滞不爽等临床证候,

3.4.2 二陈汤对 NAFLD 小鼠肝脏组织病理变化的影响 对小鼠肝脏组织进行 HE 染色和 ORO 染色 (图 15), 结果显示对照组肝细胞形态正常, 肝小叶分界清晰、排列规则; 与对照组比较, 模型组肝细胞肿胀、形态紊乱、出现严重的气球样变。经二陈汤治疗后, 与模型组相比, 肝细胞形态结构明显改善, 脂肪空泡显著减少, ORO 染色进一步证实了上述结果。

3.4.3 二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 预测靶点验证 与对照组相比, 模型组小鼠肝脏中 *PPARG* 和 *Bcl-2* mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01)。与模型组相比, 二陈汤干预能显著升高肝脏中 *PPARG* 和 *Bcl-2* mRNA 的含量 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001) (图 16)。

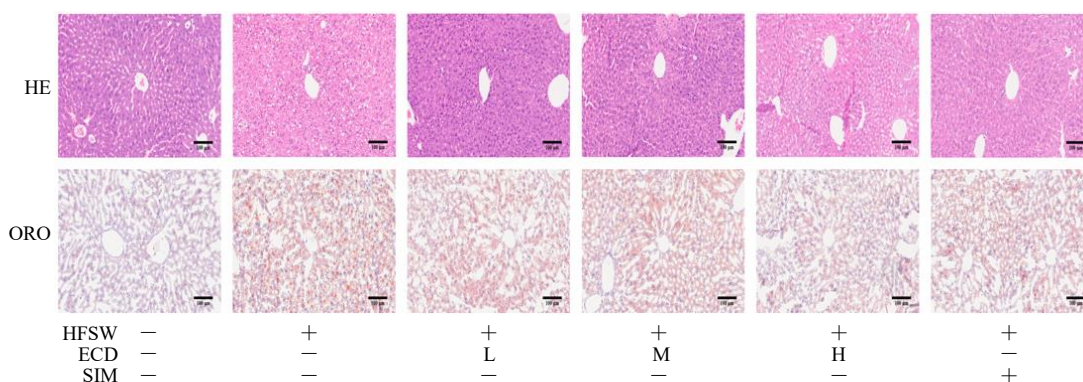


图 15 二陈汤对 NAFLD 小鼠肝脏组织病理变化的影响 ($\times 200$, 标尺=100 μm)

Fig. 15 Effects of Erchen Decoction on pathological liver changes of NAFLD mice ($\times 200$, scale bar = 100 μm)

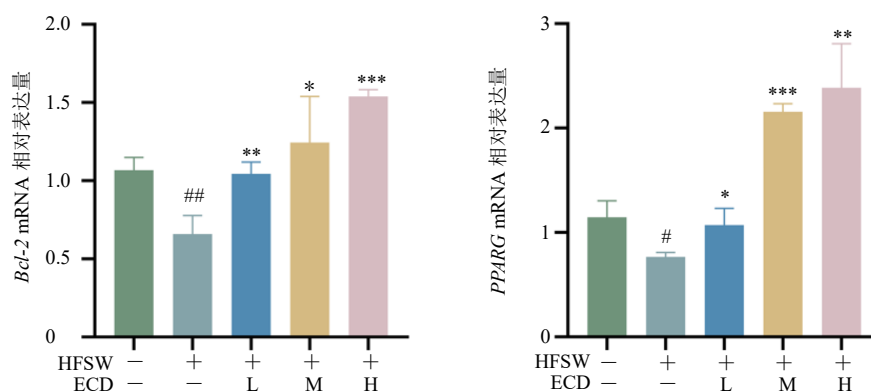


图 16 二陈汤对 NAFLD 小鼠肝脏 *Bcl-2* 和 *PPARG* mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 16 Effects of Erchen Decoction on levels of *Bcl-2* and *PPARG* mRNA in liver tissue of NAFLD mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

治则主要为健脾益气、化痰祛湿^[15]。二陈汤是健脾、祛痰、利湿的经典名方,被临床广泛用于 NAFLD 的治疗。方中半夏为君药,能燥湿化痰、降逆止呕;橘红既可理气行滞,又能燥湿化痰,为臣药;佐以茯苓渗湿健脾,增强祛痰之力;煎加生姜,不仅可制半夏之毒,又能协助半夏加强化痰之效;乌梅收敛肺气,防止君臣两药伤正之虞;甘草为佐使,健脾益气、调和诸药;诸药合用,共奏燥湿化痰之功,减少内湿积聚,促进痰浊消解。

本研究共纳入 8 篇文献进行了 Meta 分析研究,结果显示试验组临床疗效优于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.000\ 01$);试验组患者 ALT、AST、TC、TG 的改善情况均优于对照组,差异具有统计学意义 ($P < 0.000\ 01$);试验组改善右肋不适或胀闷、周身困重、大便黏滞不爽等证候的效果优于对照组;纳入研究的所有试验组患者均未出现不良反应,证实了二陈汤治疗 NAFLD 的安全性。但纳入的 8 篇文献均未明确随机及分组方法,均未

采用盲法,同时由于临床有效标准和试验组干预方法存在差异,这些因素在一定程度上都会影响结论的准确性。因此,亟需大样本、高质量、多中心的 RCT 来进一步验证二陈汤治疗 NAFLD 的有效性和安全性。

为进一步确认二陈汤通过“燥湿化痰”功效发挥治疗 NAFLD 的作用,本研究选择半夏、陈皮、天南星、橘红等经典燥湿化痰类中药的功效作用网络与二陈汤“药物-活性成分-靶点”网络取交集,构建了二陈汤燥湿化痰功效的“药物-成分-关键靶点”的网络。然后,将其关键靶点与 NAFLD 疾病靶点取交集,构建了二陈汤通过燥湿化痰功效治疗 NAFLD 关键靶点的作用网络,该网络包括 PPARG、Bcl-2、PTGS2、肿瘤蛋白 p53 (tumor protein p53, TP53)、糖原合酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β) 等 25 个潜在作用靶点。进一步的靶点 GO 分析涉及氧化应激过程调控、程序性细胞死亡过程调控、细胞内信号转导过程调控等生物过

程,而 KEGG 分析则涉及脂质和动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝、细胞凋亡、PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路等。这些结果预测了二陈汤治疗 NAFLD 的潜在功效机制和靶点网络。

现代医学的“多重打击”学说部分解释了 NAFLD 的发病机制,即脂代谢失衡导致肝细胞内脂质过量沉积,进而导致细胞应激(包括氧化应激和内质网应激)、炎症小体激活和细胞凋亡,并随后刺激组织再生和纤维化形成^[16-18]。二陈汤以其燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的物质基础涉及多种能与

靶标相互作用的药效物质。例如,半夏中的 β -谷甾醇^[19-20]、橘红中的川陈皮素^[21]、茯苓中的茯苓多糖^[22]、生姜醇提物和姜黄素^[23-24]、乌梅中熊果酸^[25-26]、甘草中的黄酮和甘草酸^[27]等物质均具有调节血脂代谢、减少肝细胞脂质沉积的作用。同时,橘红中的川陈皮素和茯苓中茯苓多糖还可以通过抑制肝细胞凋亡和炎症应激通路,发挥肝脏保护作用^[23,28]。这些成分是二陈汤发挥燥湿化痰功效治疗 NAFLD 的物质基础,其调控机制主要与 PPARG 和 Bcl-2 相关,具体机制见表 3。

表 3 二陈汤主要活性成分治疗 NAFLD 的物质基础和作用机制
Table 3 Material basis and mechanism of main active ingredients in Erchen Decoction in treatment of NAFLD

中药	活性成分	作用机制
半夏	β -谷甾醇	改善血脂代谢,清除氧自由基,抗氧化,继而发挥保护肝细胞的功效
橘红	川陈皮素	促进 Bcl-2 的表达,抑制细胞凋亡,改善炎症反应;抑制肝脏载脂蛋白 C2 基因表达的下调,增加三酰甘油的清除率
茯苓	茯苓多糖	调节脂质代谢,减轻脂质过氧化;抑制肝细胞凋亡和炎症应激通路,保护肝细胞
生姜	姜黄素	增强肝脏脂肪代谢相关酶活性的活性,调节低密度脂蛋白和 TG 的代谢
乌梅	熊果酸	调控 PPARG 基因以及脂质合成关键酶基因表达,降低 TG 水平,发挥调脂作用
甘草	黄酮、二氢黄酮 甘草酸、甘草次酸	调控 PPARG 基因表达,参与体内脂质代谢,改善肝组织病理特征,具有肝脏保护功能

基于网络药理学预测结果和现代功效物质研究,本研究通过构建 NAFLD 小鼠模型,对靶点 PPARG 和 Bcl-2 进行了 qRT-PCR 实验验证。PPARG 可以通过调节肝脏 X 受体 α (liver X receptor α , LXR α) 的转录,进而调控下游信号因子,调节胆固醇流出,减轻其引起的炎症反应^[29],而 Bcl-2 的表达上调能减少肝细胞凋亡,从而延缓 NAFLD 疾病的进展^[30]。体内实验结果表明,二陈汤可以改善 NAFLD 小鼠肝功能和脂代谢指标,改善肝细胞脂肪变性和积聚,增加 NAFLD 小鼠肝脏中 PPARG 和 Bcl-2 mRNA 表达。因此,二陈汤燥湿化痰功效物质主要通过 PPARG 和 Bcl-2 实现多方位、多途径、全周期的治疗作用。

综上所述,二陈汤临床治疗 NAFLD “燥湿化痰”功效现代表征为改善痰湿证候,降低 ALT、AST、TC、TG 水平,改善肝细胞脂肪变性和积聚;其功效网络与 PPARG、Bcl-2、PTGS2、TP53、GSK-3 β 等多个关键靶点以及脂质和动脉粥样硬化、细胞凋亡等信号通路相关,共同发挥调节脂质代谢、改善肝细胞凋亡的作用。结合其功效物质基础分析及

动物实验验证,发现 PPARG 和 Bcl-2 可能是二陈汤燥湿化痰治疗 NAFLD 的核心靶点,为二陈汤治疗 NAFLD 提供了“源于中医理论-基于数据挖掘-证于基础研究”的系统研究证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Han S K, Baik S K, Kim M Y. Non-alcoholic fatty liver disease: Definition and subtypes [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2023, 29(Suppl): S5-S16.

[2] 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.

[3] El-Kassas M, Cabezas J, Coz P I, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: Current global burden [J]. *Semin Liver Dis*, 2022, 42(3): 401-412.

[4] Fan J G, Kim S U, Wong V W. New trends on obesity and NAFLD in Asia [J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4): 862-873.

[5] 中华中医药学会脾胃病分会. 非酒精性脂肪性肝病中医诊疗专家共识意见 (2017) [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, 33(12): 2270-2274.

- [6] Li X, Ge J D, Li Y J, *et al.* Integrative lipidomic and transcriptomic study unravels the therapeutic effects of saikosaponins A and D on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3527-3541.
- [7] 祝端. 中药联合饮食控制、运动干预治疗非酒精性脂肪肝的临床疗效 [J]. 中外医学研究, 2013, 11(19): 42-43.
- [8] 李格爱, 覃贵岸, 黄岳宁. 二陈汤联合甘草酸二铵肠溶胶囊治疗非酒精性脂肪性肝炎 86 例疗效观察 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(7): 46-47.
- [9] 张鹏. ECD 加味治疗非酒精性脂肪肝 137 例临床研究 [J]. 江苏中医药, 2013, 45(2): 33-34.
- [10] 崔玉红. ECD 加味治疗非酒精性脂肪肝临床疗效观察 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(4): 59-60.
- [11] 冯红英. ECD 加味治疗非酒精性脂肪肝 126 例临床疗效观察 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(9): 170-171.
- [12] 郭宗超. 苓术 ECD 联合西药治疗非酒精性脂肪性肝病(痰湿内停) 随机平行对照研究 [J]. 实用中医内科杂志, 2018, 32(5): 33-36.
- [13] 陈勇华, 谢定邦. 二术 ECD 治疗非酒精性脂肪性肝病 50 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(7): 43-45.
- [14] 刘茵, 陈莲, 唐冬梅. 加味 ECD 联合甘草酸二铵肠溶胶囊治疗非酒精性脂肪性肝炎 [J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(4): 672-674.
- [15] 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共识意见 (2017 年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(11): 805-811.
- [16] Clayton-Chubb D, Kemp W, Majeed A, *et al.* Understanding NAFLD: From case identification to interventions, outcomes, and future perspectives [J]. *Nutrients*, 2023, 15(3): 687.
- [17] Friedman S L, Neuschwander-Tetri B A, Rinella M, *et al.* Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [18] Sanyal A J. Past, present and future perspectives in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(6): 377-386.
- [19] 何华康. 半夏的化学成分及其药理作用的研究进展 [J]. 当代医药论丛, 2020, 18(7): 18-20.
- [20] 杨立军, 高涵, 罗伟, 等. 半夏研究进展及展望 [J]. 安徽农学通报, 2023, 29(2): 33-38.
- [21] 石磊, 杨鹏, 郭舜, 等. 二陈汤对非酒精性脂肪肝 CYP2E1 及线粒体能量代谢的影响 [J]. 中国药师, 2017, 20(2): 205-207.
- [22] 高满军, 赵宝清, 莫启贵, 等. 茯苓的化学成分及其调节糖脂代谢的研究进展 [J]. 湖北科技学院学报: 医学版, 2023, 37(3): 272-276.
- [23] 张淑娟, 张育贵, 辛二旦, 等. 生姜药理作用研究进展 [J]. 甘肃中医药大学学报, 2020, 37(6): 79-81.
- [24] Fu Y S, Chen T H, Weng L B, *et al.* Pharmacological properties and underlying mechanisms of curcumin and prospects in medicinal potential [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 141: 111888.
- [25] 王秀英, 李淑华, 胡东芳, 等. 乌梅对照品: 熊果酸降脂作用试验研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(12): 12-13.
- [26] 孙蓉, 吕兰俊, 王平, 等. 乌梅在 ECD 中作用的研究 [J]. 中药药理与临床, 2002(5): 3-5.
- [27] 谢瑞强, 王长福. 炙甘草化学成分和药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(4): 84-89.
- [28] 石安华, 范英昌, 姚政, 等. 川陈皮素对非酒精性脂肪性肝病大鼠肝细胞凋亡的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2019, 42(3): 1-9.
- [29] 张援, 杨卓, 王群, 等. 涤痰汤调控 PPAR γ -LXR-ABCA1/ABCG1 通路介导胆固醇流出改善非酒精性脂肪肝的机制研究 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(11): 111-115.
- [30] Li X, Wang J, Gong X, *et al.* Upregulation of BCL-2 by acridone derivative through gene promoter i-motif for alleviating liver damage of NAFLD/NASH [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(15): 8255-8268.

[责任编辑 潘明佳]