滋心滴丸干预非酒精性脂肪肝的潜在靶点与机制: 网络药理学分析及脂代谢信号通路验证

廖园红[1#], 贾雯倩[1#], 刘成东[1], 李 君[1,2], 王跃武[1,2*], 郑海英[3*]

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古 呼和浩特 010110; 2. 内蒙古自治区新药筛选工程研究中心, 内蒙古 呼和浩特 010110; 3. 内蒙古医科大学附属医院心内科, 内蒙古 呼和浩特 010110)

摘要: 为探讨蒙药滋心滴丸 (Zixin Dropping Pills, ZXDW) 治疗非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的作用机制, 本文结合网络药理学与动物实验开展研究。通过网络药理学筛选出ZXDW治疗NAFLD的59个核心靶点, 功能富集分析显示, 脂代谢通路和PI3K-AKT (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) 通路是其发挥治疗作用的关键通路。采用高脂饲料诱导ApoE$^{-/-}$小鼠建立NAFLD模型, 药效实验证实ZXDW可减轻小鼠肝脏脂质沉积、减少肝纤维化程度并缓解炎症反应。采用免疫荧光法和蛋白免疫印迹法对功能通路中的关键靶点进行验证, 结果显示, ZXDW可显著上调ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏中过氧化物酶体增殖物激活受体γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ)、肝X受体α (liver X receptor alpha, LXRα)、ATP结合盒转运子A1 (ATP-binding cassette subfamily A member 1, ABCA1) 和ATP结合盒转运子G1 (ATP-binding cassette subfamily G member 1, ABCG1) 蛋白的表达水平, 同时下调PI3K、AKT及核因子κB (nuclear factor-kappa B, NF-κB) 的表达水平。将ZXDW的主要成分与上述作用靶点进行分子对接, 结果表明木香烃内酯、牛黄胆酸和牛黄去氧胆酸可能是ZXDW治疗NAFLD的主要活性成分。本研究初步证实, ZXDW可通过脂代谢通路和PI3K-AKT通路缓解NAFLD, 为其临床应用提供了理论基础。本实验获得内蒙古医科大学动物伦理学会批准 (批准号: YKD202401262)。

关键词: 非酒精性脂肪肝; 脂代谢; 网络药理学; 滋心滴丸; 炎症

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)09-3433-09

Potential targets and mechanisms of Zixin Dropping Pills in intervening non-alcoholic fatty liver disease: Network pharmacology analysis and lipid metabolism signaling pathway verification

LIAO Yuan-hong[1#], JIA Wen-qian[1#], LIU Cheng-dong[1], LI Jun[1,2], WANG Yue-wu[1,2*], ZHENG Hai-ying[3*]

(*1. School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China; 2. New Drug Screening Engineering Research Center of Inner Mongolia Autonomous Region, Hohhot 010110, China; 3. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China*)

Abstract: To explore the mechanism of Mongolian medicine Zixin Dropping Pills (ZXDW) in treating non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), we combined network pharmacology with animal experiments. Network

收稿日期: 2025-10-06; 修回日期: 2026-04-08.

基金项目: 内蒙古自治区科技计划项目 (2023YFHH0082); 内蒙古医科大学博士启动基金项目 (YKD2024BSQD004); 内蒙古医科大学“致远”人才计划项目 (ZY20242115); 内蒙古自治区自然科学基金青年项目 (2025QN08035); 内蒙古自然科学基金面上项目 (2025LHMS08061); 内蒙古医科大学联合项目 (YKD2024LH016).

#共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 15847177513, E-mail: wywimmu@163.com;
Tel: 18586788874, E-mail: 119351860@qq.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2025-1182

pharmacology identified 59 core targets of ZXDW for NAFLD, and functional enrichment analysis revealed that lipid metabolism pathway and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-AKT) signaling pathway were the key involved pathways. Pharmacodynamic experiments on high-fat diet-induced NAFLD in ApoE$^{-/-}$ mice confirmed that ZXDW alleviated hepatic lipid deposition, fibrosis and inflammation. Immunofluorescence and Western blot verified key targets in the functional pathways, showing that ZXDW significantly upregulated hepatic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ), liver X receptor alpha (LXRα), ATP-binding cassette subfamily A member 1 (ABCA1) and ATP-binding cassette subfamily G member 1 (ABCG1) protein expression, while downregulating PI3K, AKT and nuclear factor-kappa B (NF-κB) expression in ApoE$^{-/-}$ mice. Molecular docking between main components of ZXDW and the above targets indicated that costunolide, taurocholic acid and taurodeoxycholic acid might be the main active components. This study preliminarily confirms that ZXDW alleviates NAFLD through lipid metabolism and PI3K-AKT pathways, providing a theoretical basis for its clinical application. The experiment was approved by the Animal Ethics Committee of Inner Mongolia Medical University (approval No. YKD202401262).

Key words: non-alcoholic fatty liver disease; lipid metabolism; network pharmacology; Zixin Dropping Pills; inflammation

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 作为全球最常见的慢性肝脏疾病, 其发病率随着肥胖、代谢综合征等代谢性疾病的流行呈持续攀升趋势, 已成为威胁公共健康的重要慢性疾病之一[1,2]。NAFLD病理机制复杂, 涉及脂质代谢紊乱、炎症反应失控、胰岛素抵抗等多环节交互作用, 目前临床缺乏安全有效的特异性治疗药物, 探索新型干预策略具有重要的临床需求与科学意义[3]。传统医学为NAFLD治疗提供了独特视角, 其中蒙药作为民族医药的重要组成部分, 凭借“整体调节、多靶点干预”的治疗优势, 在代谢性疾病领域展现出潜在应用价值[4-6]。滋心滴丸 (Zixin Dropping Pills, ZXDW) 是出自《中华人民共和国卫生部药品标准・蒙药分册》中的方剂[7], 其在心血管疾病治疗中的疗效已得到初步验证, 常作为临床常用蒙药制剂, 但关于其调控肝脏脂质代谢、干预NAFLD的作用及分子机制尚未明确, 亟待系统研究。

网络药理学作为融合系统生物学与多向药理学的新兴技术, 能够从“成分−靶点−通路”层面解析中药复方的复杂作用机制, 为民族药的现代化研究提供高效的技术支撑[8]。同时, ApoE$^{-/-}$小鼠作为经典的代谢性疾病动物模型, 在高脂饲料诱导下可稳定模拟人类NAFLD的病理特征, 是验证药物疗效及机制的理想实验载体[9,10]。基于此, 本研究将网络药理学预测与动物实验验证相结合, 构建“计算机模拟−体内实验验证”的研究框架, 旨在系统阐明蒙药滋心滴丸干预NAFLD的分子机制。

本研究首先通过TCMSP数据库筛选ZXDW中的活性成分靶点, 结合Gencard、OMIM等疾病数据库获取NAFLD相关靶点, 通过交集分析确定药物−疾病共同靶点; 进一步利用String数据库与Cytoscape软件构建蛋白相互作用 (PPI) 网络, 筛选核心作用靶点, 并通过DAVID数据库进行GO功能富集与KEGG信号通路分析, 预测ZXDW干预NAFLD的潜在作用通路。在此基础上, 以ApoE$^{-/-}$小鼠为研究对象, 建立高脂饲料诱导的NAFLD模型, 设置空白组、模型组、辛伐他汀阳性对照组及ZXDW高、中、低剂量组, 通过连续8周灌胃给药, 结合肝脏免疫荧光染色、蛋白免疫印迹等分子生物学技术, 从组织与蛋白水平验证网络药理学预测的关键通路 [如脂代谢相关通路、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/核因子κB (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/nuclear factor-κB, PI3K-AKT-NF-κB) 信号通路] 及核心靶点 [过氧化物酶体增殖物激活受体γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ)、肝X受体α (liver X receptor alpha, LXRα)、ATP结合盒转运子A1 (ATP-binding cassette subfamily A member 1, ABCA1) 和ATP结合盒转运子G1 (ATP-binding cassette subfamily G member 1, ABCG1)] 蛋白的表达水平, 同时下调PI3K、AKT及核因子κB (nuclear factor-kappa B, NF-κB) 的表达变化。

材料与方法

实验动物及伦理批准 ApoE$^{-/-}$雄性小鼠 (8周龄, 20.5 ± 1.3 g) 30只由斯贝福 (中国北京) 生物技术有限公司 [许可证号:SCXK(京)2019-0010] 购得, 并在内蒙古医科大学的动物实验中心饲养, 确保其能自由获取食物和饮用水。为了排除环境因素对肠道菌群的影响, 所有小鼠均严格保留在无特定病原体 (SPF) 级别的实验室中。本研究中所有动物实验均经过内蒙古医

科大学动物伦理学会的批准 (YKD202401262)。

实验试剂 ABCA1 抗体 (货号: ab13556) 和 ABCG1 抗体 (货号: ab12656) 购自美国 Abcam 公司; p-PI3K 抗体 (货号: bs-3332R) 购自北京博奥森生物技术有限公司; PI3K 抗体 (货号: 60225-1-Ig)、p-AKT 抗体 (货号: 66444-1-Ig) 和 AKT 抗体 (货号: 10176-2-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG (货号: GB23303)、PPARγ 抗体 (货号: GB11164)、20× 柠檬酸抗原修复液 (pH 6.0, 货号: G1202)、20×Tris-EDTA 修复液 (pH 9.0, 货号: G1203)、20×Tris-EDTA 修复液 (pH 8.0, 货号: G1206); PBS 缓冲液 (货号: G0002)、牛血清白蛋白 (BSA, 货号: GC305010)、正常兔血清 (浓缩型, 货号: G1209)、超净快干封片胶 (货号: G1404)、组化试剂盒 DAB 显色剂 (货号: G1212)、二抗 (HRP 标记山羊抗兔, 货号: GB23303) 均购自武汉赛维尔生物科技公司; 羧甲基纤维素钠 (carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na) (批号: 20240621) 购自天津市津东天正精细化学试剂厂; 异戊巴比妥钠 (批号: 240201) 购自北京索莱宝科技有限公司。

ZXDW 治疗 NAFLD 的功能通路研究

成分靶点、疾病靶点的获取 通过 TCMSP 数据库 (https://www.tcmsp-e.com/load_intro.php?id=43) 获取成分, 根据口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) ≥ 30%, 药物的相似性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 筛选活性成分, 在 SwissTargetPrediction 数据库 (https://swisstargetprediction.ch/) 中进行靶点预测, 去除低可能性的靶点 (probability ≤ 0), 得到成分靶点。利用疾病数据库 Gencard (https://www.genecards.org/)、OMIM (https://www.omim.org/)、Disgent (https://www.disgenet.org/search) 以 non-alcoholic fatty liver 为关键词搜索疾病靶点, 去除重复靶点, 得到疾病靶点。将成分靶点与疾病靶点用 Venny 2.1.0 (http://www.liuxiaoyuyuan.cn/) 取交集, 得到交集靶点。

PPI 网络构建与核心靶点筛选 将潜在靶点导入 String (http://www.string-db.org/) 数据库, 获取蛋白相互作用信息, 导入 Cytoscape3.9.1 软件, 以平均节点度值 (degree) 大于 44、平均介数 (betweenness) 大于 365.966 063 113 162、最短路径 (clossness) 大于 0.001 529 051 987 767 58 为标准筛选, 得到核心靶点。

GO 和 KEGG 富集分析 将核心靶点导入 DAVID (https://david.ncifcrf.gov/) 数据库中, 得到 GO 和 KEGG 富集分析结果, 用微生信可视化平台进行可视化。

ApoE$^{-/-}$ 小鼠 NAFLD 模型建立 ApoE$^{-/-}$ 小鼠共分为空白组、模型组、辛伐他汀组以及 ZXDW 高、中、低剂量给药组, 每组 5 只。给药方法如下, 正常组: 始终喂食常规基础饲料 16 周 (第 7 周开始给予同剂量溶剂灌胃); 模型组: 普通饲料适应性喂养 1 周后, 高脂饲料喂食 15 周 (第 7 周开始给予同剂量溶剂灌胃); ZXDW 高、中、低剂量组: 普通饲料适应性喂养 1 周后, 高脂饲料喂食 15 周 (第 7 周开始给予 ZXDW 灌胃, 剂量为 1 840、920 和 460 mg·kg^{-1}); 阳性组: 普通饲料适应性喂养 1 周后, 高脂饲料喂食 15 周 (第 7 周开始给予辛伐他汀灌胃, 剂量为 2.628 5 mg·kg^{-1})。连续灌胃给药 8 周, 溶剂均使用 1% CMC-Na。实验结束前禁食不禁水 12 h, 异戊巴比妥钠 (45 mg·kg^{-1}) 腹腔麻醉, 无菌条件下解剖 ApoE$^{-/-}$ 小鼠, 取下肝脏组织, 用 PBS 浸洗后吸水纸吸干, 取部分肝脏组织于组织固定液中固定, 剩余部分于−80 ℃冻存。

ZXDW 的临床原始剂量为每人每天 6.0 克, 分两次提取。将 1.0 g 广枣、0.5 g 茯苓、0.5 g 当归、0.45 g 红花、0.37 g 栀子、0.18 g 藏红花共 3.00 g 混合进行醇提取, 提取率为 26.84%, 得到 0.81 g 醇提物。同时, 0.45 g 草果、0.51 g 木香、0.51 g 孜然、0.68 g 沉香、0.68 g 肉豆蔻和 0.11 g 阿魏共 2.94 g 混合粉碎后进行超临界 CO_2 提取, 提取率为 15%, 得到 0.44 g 挥发油。然后将醇提物 (0.81 g)、挥发油 (0.44 g) 以及人工牛黄 (0.06 g) 与适量的聚乙二醇和 Tween 80 混合制备滴丸, 总量为 3.03 g。考虑到正常成年人的平均体重 (60 kg) 和人鼠换算因子 (9.1), 小鼠的等效剂量计算如下: ZXDW 低剂量 = 3.03 g × 9.1/60 kg = 460 mg·kg^{-1}, ZXDW 中剂量 = 3.03 g × 9.1/60 kg × 2 = 920 mg·kg^{-1}, ZXDW 高剂量 = 3.03 g × 9.1/60 kg × 4 = 1 840 mg·kg^{-1}。其中, 3.03 g 滴丸中包括 1.31 g 的药物 (0.81 g 醇提物 + 0.44 g 超临界提取物 + 0.06 g 人工牛黄) 和 1.72 g 的赋形剂。

肝脏免疫荧光染色 取待检组织石蜡块, 通过 Leica 切片机切取厚度为 5 μm 的连续切片, 随后置于 65 ℃烤箱烘烤 2 h 以实现脱蜡; 接着按顺序将切片放入二甲苯 I、二甲苯 II 中各处理 10 min, 再依次经 100%、90%、80%、75% 的梯度乙醇各水化 5 min, 最后用 ddH_2O 冲洗 5 次, 每次 2 min。把切片浸入 pH 6.0 的柠檬酸盐缓冲液, 放入微波炉中用高火加热至沸腾, 之后切换为中低火维持 10 min, 待切片在室温下自然冷却后, 用 PBS 冲洗 3 次, 每次 4 min。后续进入封闭与孵育环节: 先使用 3% BSA 在室温下对切片封闭 35 min, 之后倾去封闭液; 分别向切片滴加 ABCA1 (1∶200)、ABCG1 (1∶150)、PPARγ (1∶300) 及 LXRα (1∶250) 一抗, 在 4 ℃环境下孵育过夜; 次日将切片复温 30 min, 用 PBS 冲洗 5 次, 每次 3 min; 再滴加 Alexa Fluor 488 标记、稀释比例 1∶500 的荧光二抗, 在室温避

光条件下孵育 1 h, 孵育后用 PBS 避光冲洗 5 次, 每次 5 min。最后进行染核与封片操作: 用 DAPI 对细胞核染色 5 min 后, 用 PBS 冲洗 5 次; 使用抗荧光淬灭剂进行封片, 之后通过激光共聚焦显微镜观察切片, 并借助 ImageJ 软件定量分析荧光强度, 以此验证目标蛋白的表达差异。

蛋白免疫印迹实验 将放置于−80 ℃冻存的肝脏组织用 RIPA 缓冲液 (1% PMSF) 裂解 30 min 提取蛋白质, 经蛋白定量后进行蛋白变性处理。配制十二烷基硫酸钠−聚丙烯酰氨凝胶 (SDS-PAGE), 凝胶固定后上样进行电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 90 min, 加一抗 ABCA1 (1∶1 000)、ABCG1 (1∶1 000)、*β*-actin (1∶2 000) 4 ℃孵育过夜, 洗膜, 加二抗 (1∶1 000) 室温孵育 1 h, 显影并拍照, Image J 6.0 软件分析其灰度值。

统计学分析 所有数据均使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据处理, 多组之间比较采用单因素方差分析, 两组之间比较采用 *t* 检验, 实验数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

结果

1 网络药理学筛选 ZXDW 抗 NAFLD 通路

1.1 核心靶点网络构建 通过 TCMSP 数据库筛选出活性大于 0 的成分靶点 699 个。利用疾病数据库 Gencard、OMIM 和 Disgent 得到相关靶点 3 008 个。将成分靶点与疾病靶点用 Venny 2.1 取交集, 得到 338 个交集靶点, 以交集靶点作为活性靶点, 导入 String 数据库, 以平均节点度值 (degree) 大于 44、平均介数 (betweenness) 大于 365.966 063 113 162、最短路径 (clossness) 大于 0.001 529 051 987 767 58 为标准, 得到 59 个核心靶点。结果见图 1。

1.2 核心靶点 GO 功能富集和 KEGG 信号通路分析 对 59 个核心靶点导入 DAVID 数据库进行 GO 富集分析和 KEGG 信号通路分析, 删除 $P > 0.05$ 的数据, 结果得到生物学过程 (biology process, BP) 83 个, 主要有 insulin receptor signaling pathway、DNA damage response 和 Ephrin receptor signaling pathway 等。分子功能 (molecular function, MF) 共涉及 85 个, 主要是关于 ATP binding、heme binding、protein kinase activity 和 nuclear receptor activity 等。细胞组分 (cellular function, CC) 共涉及 18 个, 主要有 caveola、cytosol and nucleus 等 (图 2)。KEGG 信号通路分析共得到 152 条信号通路, 主要包括 lipid and atherosclerosis、TNF signaling pathway、PPAR signaling pathway、PI3K-AKT signaling pathway 和 NF-kappa B signaling pathway 等 (图 3)。

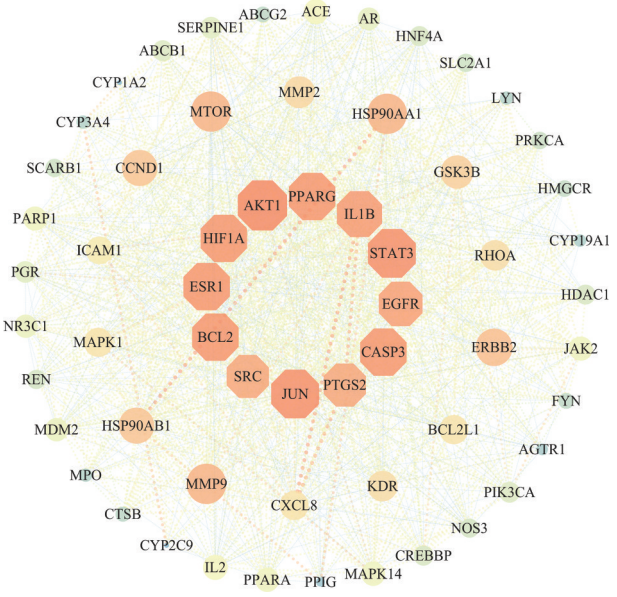


Figure 1 Diagram of core target interactions

2 网络药理学通路验证

为了验证网络药理学中预测的信号通路, 通过采用 ApoE$^{-/-}$ 小鼠进行药效学考察, 结果如图 4 所示, 正常组肝细胞形态正常、排列有序、胞质丰富, 未见变性及肿胀的细胞, 细胞边界清晰。模型组可见排列较乱及肿大的肝细胞, 细胞边界不清晰, 可发现细胞核已不在细胞中央, 异常细胞周围可见点状坏死。对比模型组, ZXDW 低、中、高剂量组及阳性药组的肝细胞排列较为整齐, 细胞肿胀和脂肪变性程度减轻, 炎性细胞浸润减少, 点状坏死减少 (图 4A、D)。相比对照组, 模型组胶原纤维生成明显; 对比模型组, ZXDW 低、中、高剂量组以及辛伐他汀组的胶原纤维明显减少 (图 4B、E)。油红 O 脂质染色结果显示 (图 4C、F), 高脂饲料导致肝脏脂质蓄积, 而 ZXDW 可有效促进脂质外排, 减少脂质蓄积。

通过肝脏组织免疫荧光染色技术检测发现, 高脂饲料喂养模型组小鼠肝脏中, 与胆固醇逆向转运及脂质代谢调控密切相关的关键分子表达呈现显著异常 (图 5、6)。其中, ABCA1 和 ABCG1 作为介导胆固醇跨膜转运的核心蛋白, 其荧光信号强度显著降低; 同时, 参与脂质代谢调控的核受体 PPAR*γ* 及 LXR*α* 的表达水平也明显下调, 提示高脂饮食可抑制肝脏脂质代谢相关通路的活性。

与之相反, 模型组小鼠肝脏中巨噬细胞特异性标志物半乳糖凝集素-3 (galectin-3, 又称 MAC-2) 的荧光阳性信号显著增强, 表明高脂饲料喂养可诱导肝脏巨噬细胞浸润, 加剧肝脏炎症反应。

而在给予 ZXDW 干预后, 上述高脂饲料诱导的异

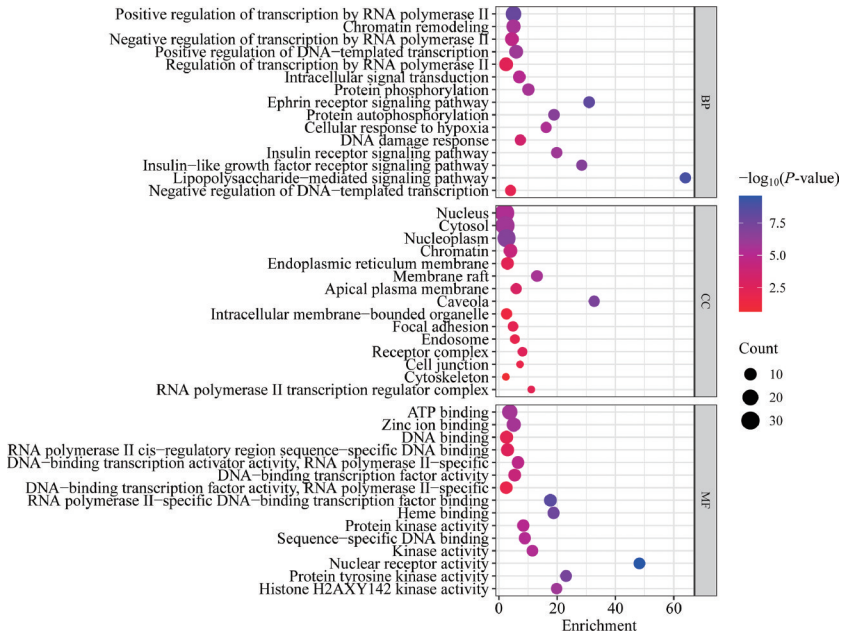


Figure 2 GO analysis bubble chart of ZXDW core targets. ZXDW: Zixin Dropping Pills

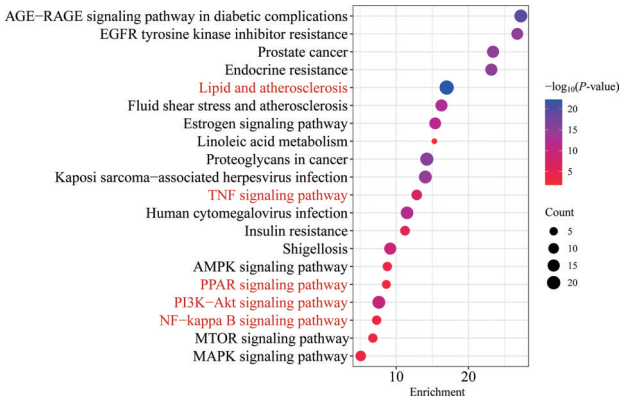


Figure 3 KEGG analysis bubble chart of ZXDW core targets

常表型得到显著改善: 肝脏组织中 ABCA1、ABCG1、PPARγ 及 LXRα 的表达水平较模型组均显著上调, 其荧光强度接近正常对照组水平; 同时, ZXDW 可有效抑制高脂饮食诱导的 MAC-2 阳性巨噬细胞浸润, 显著降低 MAC-2 的表达量, 提示 ZXDW 可能通过调控脂质代谢通路活性及抑制肝脏炎症反应, 发挥改善高脂饮食诱导的肝脏脂质代谢紊乱的作用。

3 蛋白免疫印迹法验证肝脏脂代谢相关通路中蛋白表达

为进一步验证前期脂代谢通路相关机制研究结果的可靠性与生物学真实性, 本研究选取实验动物肝脏组织作为检测样本, 采用蛋白免疫印迹法对脂代谢调控通路中起核心介导作用的胆固醇流出相关转运蛋白 ABCA1 及 ABCG1 的表达水平进行靶向验证。结果如图 7 所示: 与正常饮食喂养的空白对照组相比, 长期高脂饲料喂养的 ApoE$^{-/-}$ 小鼠模型组肝脏组织中 ABCA1 与 ABCG1 的蛋白表达量均呈现统计学意义上的显著下调; 而与模型组相比, 不同剂量 ZXDW 干预组及阳性对照药辛伐他汀组小鼠肝脏中 ABCA1 和 ABCG1 的蛋白表达水平均出现明显回调, 进一步证明 ZXDW 通过上调肝脏中这两种核心转运蛋白的表达, 参与调控高脂诱导的异常脂代谢过程。

4 PI3K-AKT-NF-κB 通路对肝脏脂代谢的影响

在 NAFLD 的病理机制研究中, 网络药理学凭借多靶点、多通路的分析优势, 为揭示中药复方 ZXDW 的作用机制提供了重要线索。此前研究通过通路富集分析发现, ZXDW 对 NAFLD 的调控作用并非局限于单一信号通路, 还涉及 PI3K-AKT-NF-κB 信号通路。该通路作为细胞内关键的信号转导网络, 在脂质代谢紊乱引发的肝细胞炎症反应、细胞存活及代谢重编程中发挥核心调控作用, 其异常激活被证实与 NAFLD 的发生发展密切相关。

为进一步明确 ZXDW 通过调控 PI3K-AKT-NF-κB 信号通路干预 NAFLD 的具体分子机制, 排除网络药理学预测结果的假阳性干扰, 采用免疫组化和蛋白质免疫印迹法对该通路关键蛋白的表达及磷酸化水平进行验证。结果显示, 与正常对照组相比, 模型组大鼠肝组织中 p-PI3K/PI3K 比值、p-AKT/AKT 比值及 NF-κB 总蛋白表达水平均显著升高, 提示高脂饮食可通过激活 PI3K-AKT-NF-κB 通路加剧肝细胞损伤与炎症反应; 而经 ZXDW 干预后, 上述指标均出现显著的剂量依赖性降低, 且与模型组相比差异具有统计学意义

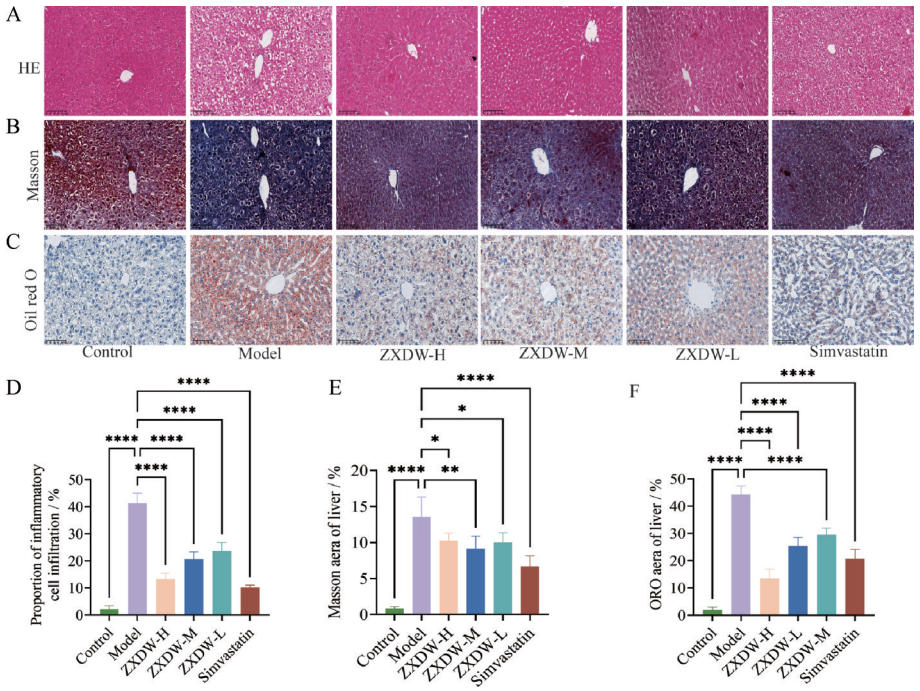


Figure 4 Pathological changes in the liver of each group treated with ZXDW. A: HE staining results of ZXDW treatment; B: Masson staining results of ZXDW treatment; C: Oil red O staining results of ZXDW treatment. Scale bar: 100 μm; D−F: Quantitative statistical charts of HE (D), Masson (E), and oil red O (F), respectively. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$. ZXDW-H: 1 840 mg·kg^{-1}; ZXDW-M: 920 mg·kg^{-1}; ZXDW-L: 460 mg·kg^{-1}; Simvastain: 2.628 5 mg·kg^{-1}

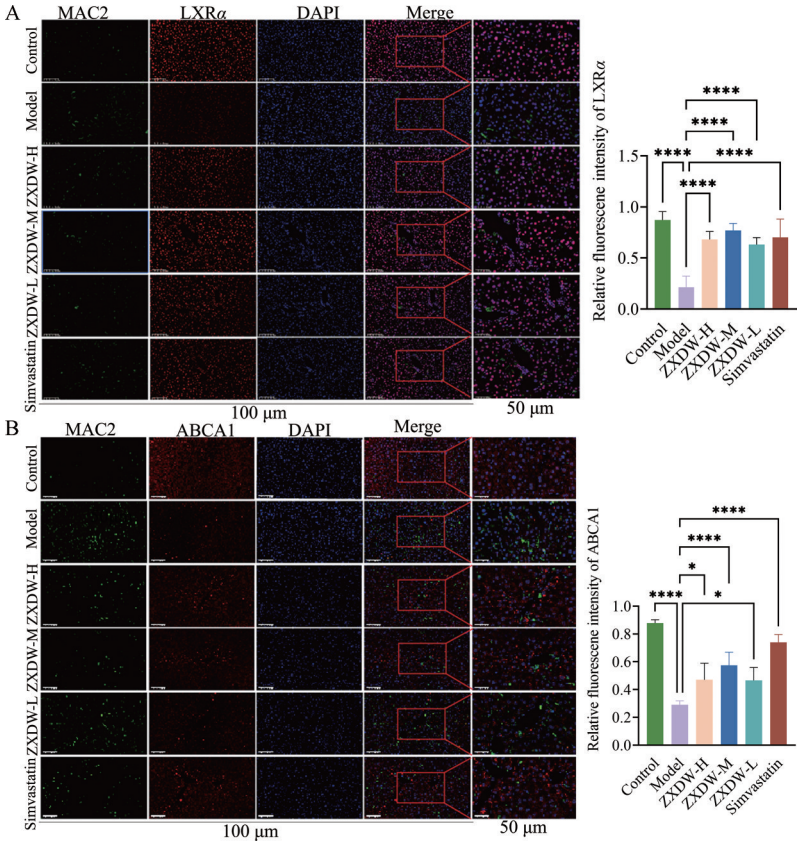


Figure 5 Immunofluorescence staining in ZXDW-treated NAFLD models. A: Immunofluorescence staining of MAC2 and LXR*α* in the livers of ApoE$^{-/-}$ mice in each group; B: Immunofluorescence staining of MAC2 and ABCA1 in the livers of ApoE$^{-/-}$ mice in each group. Scale bar: 100 μm, 50 μm. $n = 5$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.000\ 1$. LXR*α*: Liver X receptor alpha; ABCA1: ATP-binding cassette transporter A1; MAC2: Galectin-3

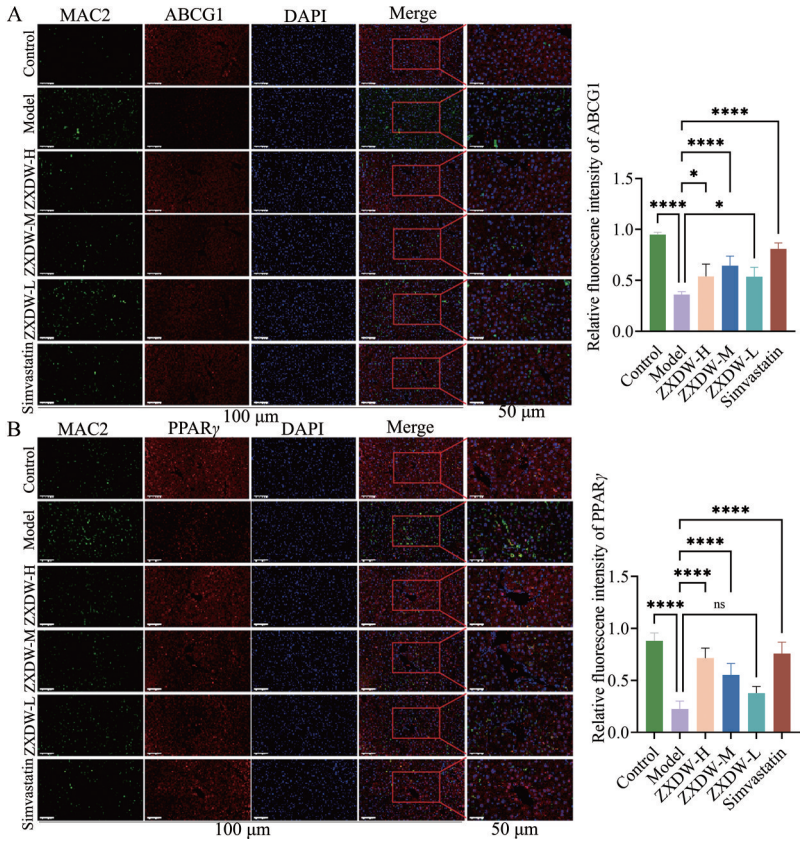


Figure 6 Liver-related macrophages and protein immunofluorescence staining after ZXDW treatment. A: Immunofluorescence staining of MAC2 and ABCG1 in the livers of ApoE$^{-/-}$ mice in each group; B: Immunofluorescence staining of MAC2 and PPARγ in the livers of ApoE$^{-/-}$ mice in each group. Scale bar: 100 μm, 50 μm. n = 5, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{****}P < 0.000\ 1$. ABCG1: ATP-binding cassette subfamily G member 1; PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

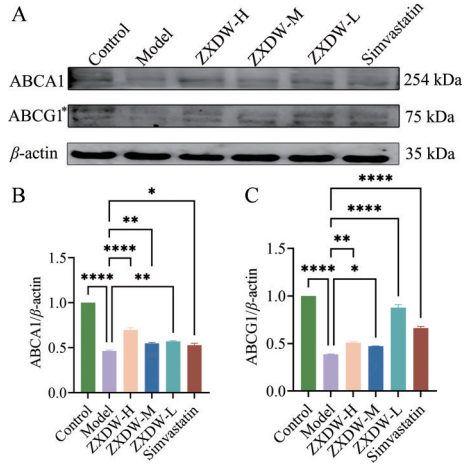


Figure 7 Protein expression levels of ABCA1/ABCG1 in the livers of ApoE$^{-/-}$ mice treated with ZXDW. n = 3, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{****}P < 0.000\ 1$

($P < 0.05$, 图 8)。

该结果不仅验证了网络药理学的预测结论, 更从蛋白水平证实 ZXDW 可通过抑制 PI3K-AKT-NF-κB 信号通路的过度激活, 减轻高脂诱导的肝脏炎症与代谢紊乱, 为其临床用于 NAFLD 治疗提供了可靠的分子机制依据。

5 与脂代谢通路密切相关的成分预测

为了进一步明确 ZXDW 具体成分对脂代谢通路的作用, 对 ZXDW 中 13 味药材的药典规定成分进行分子对接, 结果见表 1 所示, 根据对接结果发现木香烃内酯、牛黄胆酸和牛黄去氧胆酸与 PPARγ、LXRα、ABCA1、ABCG1、PI3K、AKT 以及 NF-κB 均结合较好。除了反式茴香脑和山柰酚外, 其余成分均与 PPARγ 结合稳定且差异不大。

讨论

NAFLD 作为全球性公共卫生问题, 其发病与脂质代谢紊乱、炎症反应密切相关[1,2]。蒙药凭借多成分、多靶点优势在肝病治疗中展现潜力, 本研究通过网络药理学结合动物实验, 系统揭示了 ZXDW 改善 NAFLD 的分子机制。

网络药理学预测为机制研究提供了重要线索。本研究通过 TCMSP 数据库筛选 ZXDW 活性成分靶点, 与 Gencard 等数据库获取的 NAFLD 靶点取交集得

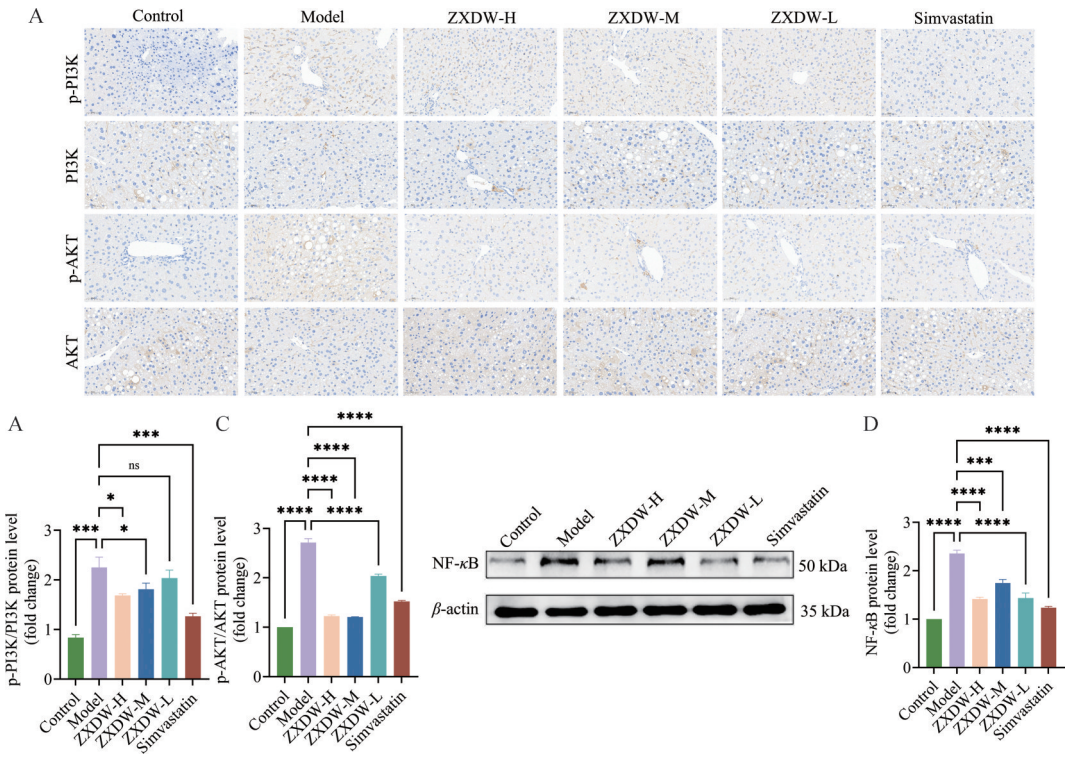


Figure 8 Protein expression levels of the PI3K-AKT-NF-κB pathway in the livers of ApoE$^{-/-}$ mice treated with ZXDW. Scale bar: 50 μm. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{*}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$

Table 1 Predicted binding energy results of characteristic components of ZXDW in each herb according to the pharmacopoeia with proteins related to lipid metabolism

Chinese medicine (latin name)	Index component/kcal·mol^{-1}	PPARγ	LXRα	ABCA1	ABCG1	PI3K	AKT	NF-κB
Angelicae Sinensis Radix (*Angelica sinensis*)	Ferulic acid	−6.8	−7.1	−5.6	−6.3	−7.1	−6.7	−6.5
Tsaoko Fructus (*Amomum tsaoko*)	Kaempferol	−4.5	−6.1	−4.8	−3.8	−4.7	−6.6	−5.2
Foeniculi Fructus (*Foeniculum vulgare*)	*trans*-Anethole	−3.7	−3.9	−4.4	−4.6	−5.3	−4.8	−6.2
Aucklandiae Radix (*Aucklandia lappa*)	Costunolide	−7.7	−7.4	−8.3	−7.5	−8.6	−8.4	−7.3
Aucklandiae Radix (*Aucklandia lappa*)	Dehydrocostus lactone	−6.3	−5.8	−7.1	−6.6	−6.3	−5.9	−7.3
Gardeniae Fructus (*Gardenia jasminoides*)	Geniposide	−6.7	−6.1	−5.7	−6.6	−6.3	−7.3	−7.1
Choerospondiatis Fructus (*Choerospondias axillaris*)	Gallic acid	−6.6	−5.1	−3.7	−4.4	−4.7	−5.3	−4.8
Carthami Flos (*Carthamus tinctorius*)	Hydroxysafflor yellow A	−6.3	−6.7	−4.6	−3.8	−4.4	−6.1	−3.8
Poria Cocos (*Poria cocos*)	Pachymic acid	−6.7	−6.4	−5.3	−5.5	−6.2	−5.1	−4.8
Aquilariae Lignum Resinatum (*Aquilaria sinensis*)	Agarotetrol	−6.3	−6.7	−5.5	−5.1	−5.8	−6.1	−6.3
Myristicae Semen (*Myristica fragrans*)	Dehydrodiisoeugenol	−6.1	−6.5	−6.8	−7.1	−5.8	−6.3	−4.8
Croci Stigma (*Crocus sativus*)	Crocin-I	−6.6	−6.4	−5.8	−7.3	−6.3	−5.5	−5.7
Croci Stigma (*Crocus sativus*)	Crocin-II	−6.7	−5.8	−7.1	−6.6	−5.9	−6.3	−5.8
Bovis Calculus (*Bos taurus domesticus*)	Taurocholic acid	−7.1	−6.8	−7.4	−8.1	−6.9	−8.4	−7.7
Bovis Calculus (*Bos taurus domesticus*)	Taurodeoxycholic acid	−6.8	−7.6	−6.4	−8.3	−8.7	−7.8	−7.9
Bovis Calculus (*Bos taurus domesticus*)	Bilirubin	−6.4	−7.3	−6.8	−6.3	−7.7	−7.2	−6.5
Ferulae Resina (*Ferula sinkiangensis*)	α-Pinene	−5.5	−6.3	−5.7	−4.3	−3.8	−6.1	−5.8

到 338 个潜在靶点，进一步筛选出 59 个核心靶点。KEGG 富集分析显示，这些靶点主要富集于 PPAR 信号通路、PI3K-AKT-NF-κB 信号通路等，提示 ZXDW 可能通过调控脂质代谢与炎症反应发挥作用，这与蒙医学“三根失调”导致脂代谢异常的理论假说相契合[11-13]。

实验证实，ZXDW 可通过调控 PPARγ-LXRα-ABCA1/ABCG1 通路改善脂质代谢。胆固醇逆向转运障碍是 NAFLD 脂质蓄积的关键环节，ABCA1 与 ABCG1 作为胆固醇跨膜转运核心蛋白，其表达下调会导致肝脏脂质堆积。本研究发现，模型组小鼠肝脏中 ABCA1、ABCG1 表达显著降低，而 ZXDW 干预后二者表达呈剂量依赖性上调，且上游调控因子 PPARγ、LXRα 表达同步回升。这一结果表明 ZXDW 可激活 PPAR 信号通路，通过上调 LXRα 调控下游转运蛋白表达，促进胆固醇流出，与冠心七味片通过调节脂代谢改

善NAFLD的机制具有一致性[14]。

抑制PI3K-AKT-NF-κB通路是ZXDW减轻肝脏炎症的重要途径。高脂饮食可激活PI3K-AKT-NF-κB通路, 加剧肝细胞炎症损伤, 此前研究已证实该通路在肝损伤中起核心调控作用[15]。在本研究中, 模型组小鼠肝组织p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT比值及NF-κB表达显著升高, 而ZXDW干预后上述指标均明显降低, 同时巨噬细胞标志物MAC-2表达减少, 提示ZXDW可通过抑制该通路活性减轻肝脏炎症浸润, 这与竹节参总皂苷调控同类通路改善肝损伤的机制相似[12]。

在对ZXDW指标成分进行分子对接发现, 木香烃内酯、牛黄胆酸和牛黄去氧胆酸所有靶点均能稳定结合, 特别是木香烃内酯。另外, PPARγ与大多数指标成分均结合较好, 提示ZXDW可能是通过多成分协调作用, 并很可能是通过调节PPARγ激发下游通路而发挥作用。

综上, ZXDW通过激活PPARγ-LXRα-ABCA1/ABCG1通路改善脂质代谢, 抑制PI3K-AKT-NF-κB通路, 减轻炎症反应, 实现对NAFLD的协同治疗作用。本研究为蒙药治疗NAFLD提供了分子机制依据, 但仍存在不足, 如未明确核心活性成分, 后续需结合成分分析与细胞实验深入探索。

作者贡献: 廖园红、贾雯倩、刘成东负责实验; 廖园红、李君负责数据整理并撰写文章; 廖园红、王跃武、郑海英负责文章修改。

利益冲突: 无任何利益冲突。

References

[1] Monti E, Vianello C, Leoni I, et al. Gut microbiome modulation in hepatocellular carcinoma: Preventive role in NAFLD/NASH progression and potential applications in immunotherapy-based strategies [J]. Cells, 2025, 14: 84.

[2] Wong VW, Ekstedt M, Wong GL, et al. Changing epidemiology, global trends and implications for outcomes of NAFLD [J]. J Hepatol, 2023, 79: 842-852.

[3] Gao LL, Wang Y, Yan HF, et al. Characteristics of cardiometabolic risk in patients with different subtypes of non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Clin Hepat (临床肝胆病杂志), 2025, 41: 63-68.

[4] Yang DD, Wuyun SQ, Niu Y, et al. Traditional Mongolian medicine Qiqirigan-8 alleviates non-alcoholic fatty liver disease *via* restoring gut microbiota and metabolism [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1517082.

[5] Ma CL, Bao YL, Hereid SQRN, et al. Mechanistic elucidation of *Tricholoma mongolicum* polysaccharides in treating MAFLD *via* regulation of the gut microbiota-metabolite-ferroptosis axis: A multi-omics perspective [J]. J Agric Food Chem, 2025, 73: 17040-17056.

[6] Yang DD, Namila, Hashentuya, et al. Mongolian medicine Qiqirigan-8 inhibition of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway activation to ameliorate non-alcoholic steatohepatitis [J]. J Pharm Biomed Anal, 2025, 265: 116975.

[7] Chinese Pharmacopoeia Commission. Drug Standard of Ministry of Public Health of the Peoples Republic of China: Mongolian Medicine Volume (中华人民共和国卫生部药品标准·蒙药分册)[S]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998: 89.

[8] Yin F, Song ZY, Li FZ, et al. Study on Danggui-Shaoyao-San for treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. Drug Eval Res (药物评价研究), 2018, 41: 210-215.

[9] Stokman G, Van den Hoek AM, Denker Thorbekk D, et al. Dual targeting of hepatic fibrosis and atherogenesis by icosabutate, an engineered eicosapentaenoic acid derivative [J]. Liver Int, 2020, 40: 2860-2876.

[10] Nasiri-Ansari N, Nikolopoulou C, Papoutsi K, et al. Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in high fat diet fed ApoE$^{-/-}$ mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 818.

[11] Hao X, Liu J, Zhang Q, et al. Exploration of the pharmacodynamic substance basis and mechanism of Honghua Qinggan Shisanwei Pills in treating non-alcoholic fatty liver based on HPLC-Q-Exactive MS and network pharmacology [J]. Front Pharm Sci (药学前沿), 2024, 28: 365-380.

[12] Wu GY, Song TL, Tang L, et al. Total saponins of *Panax japonicus* alleviates CCl_4-induced acute liver injury in rats by regulating the PI3K/AktNF-κB signaling pathway [J]. J South Med Univ (南方医科大学学报), 2024, 44: 244-251.

[13] Ma YS, Su H, Zhao J, et al. Brief introduction to the understanding and treatment of coronary heart disease in Mongolian medicine [J]. J Med Pharm Chin Minor (中国民族医药杂志), 2022, 28: 71-73.

[14] Liao YH, Lu JK, Niu Y, et al. Study on anti-atherosclerosis mechanism of blood components of Guanxin Qiwei tablets based on HPLC-Q-Exactive-MS/MS and network pharmacology [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2025, 60: 449-458.

[15] Li S, Chen W. Therapeutic effect and mechanism of Erhuang Quzhi granules on non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2022, 57: 2743-2750.