◆实验研究◆

四君子汤合三子养亲汤治疗小鼠代谢相关脂肪性肝病作用和机制研究

丁俊瑶，黄萍，陈智炜，唐志鹏，宋海燕，郑培永

上海中医药大学附属龙华医院脾胃病研究所，上海 200032

［摘要］**目的：**基于健脾化痰法研究四君子汤合三子养亲汤（SJZ+SZ）对早期和进展期阶段小鼠代谢相关脂肪性肝病（MASLD）的作用及部分机制。**方法：**采用Gubra-Amylin NASH（GAN）饮食饲养C57BL/6J小鼠建立代谢相关脂肪肝（MASL）模型，分别用SJZ、SZ及SJZ+SZ灌胃干预4周。另外用高脂饲料联合高果糖/葡萄糖饮水诱导C57BL/6J小鼠建立代谢相关脂肪性肝炎（MASH）模型，用SZ、SJZ+SZ灌胃干预8周（由于在MASL小鼠实验中，SJZ在MASL模型中几无疗效，故不再对MASH小鼠设立SJZ组）。记录小鼠体质量、肝质量，观察小鼠肝组织病理变化，检测肝脂以及血清转氨酶、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）水平，采用蛋白质免疫印迹法检测肝组织炎症和纤维化相关分子水平。检测计算各组小鼠胰岛素抵抗指数（HOMA-IR），并用蛋白质免疫印迹法和RT-qPCR法检测肝组织IRS1/Akt活化及脂质合成相关分子的表达水平。**结果：**对于MASL小鼠模型，SJZ+SZ和SZ均使模型小鼠肝组织脂肪变性程度减轻，下调肝组织甘油三酯（TG）和血清转氨酶水平（$P<0.05$），SJZ对小鼠MASL无明显改善作用（$P>0.05$）。在MASH模型小鼠实验中，SJZ/SZ均能明显减轻MASH小鼠体质量、肝质量和肝组织病理损伤（$P<0.05$），降低肝组织TG含量和血清转氨酶、TNF-α水平（$P<0.05$），逆转肝组织炎症因子（白细胞介素-1β、肿瘤坏死因子-α、白细胞介素-10）和纤维化相关分子（转化生长因子-β_1、α-平滑肌肌动蛋白、Ⅰ型胶原蛋白-α1）的表达水平（$P<0.05$）；SZ对MASH小鼠上述指标效果不明显（$P>0.05$）。此外，SJZ+SZ显著下调MASH小鼠升高的血糖、胰岛素水平与HOMA-IR（$P<0.05$），逆转模型小鼠肝组织中下调的胰岛素受体底物1、苏氨酸蛋白激酶、乙酰辅酶A羧化酶磷酸化水平（$P<0.05$），并抑制脂质合成相关分子胆固醇调节元件结合蛋白1c、脂肪酸合酶的表达水平（$P<0.05$）；SZ对这些指标仅有下调趋势（$P>0.05$）。**结论：**SJZ对小鼠MASLD无明显作用，SZ仅对程度较轻的MASLD起到一定的改善作用，SJZ+SZ对不同程度的小鼠MASLD均有改善作用，调控胰岛素抵抗是其部分作用机制。

［关键词］代谢相关脂肪性肝病；四君子汤合三子养亲汤；健脾化痰；胰岛素抵抗；胰岛素受体底物1；苏氨酸蛋白激酶；乙酰辅酶A羧化酶

［中图分类号］R575.5 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2025）16-0190-10

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2025.16.036

［收稿日期］2025-02-07
［修回日期］2025-05-04
［基金项目］国家自然科学基金资助项目（82174287）；上海中医药大学科技发展项目（23KFL079）
［作者简介］丁俊瑶（1999-），女，硕士研究生在读，E-mail：dingjyo@163.com。
［通信作者］郑培永（1970-），男，研究员，E-mail：zpychina@sina.com。宋海燕（1975-），女，研究员，E-mail：songhy@126.com。

Study on Effects and Mechanisms of Sijunzi Decoction Combined with Sanzi Yangqin Decoction in Treating Mouse of MASLD

DING Junyao, HUANG Ping, CHEN Zhiwei, TANG Zhipeng, SONG Haiyan, ZHENG Peiyong

Institute of Digestive Diseases, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

Abstract: Objective: To investigate the effects and mechanisms of Sijunzi Decoction combined with Sanzi Yangqin Decoction (SJZ+SZ) on early and advanced stages of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) in mice, based on the method of fortifying the spleen and dissolving phlegm. **Methods:** The Gubra-Amylin NASH (GAN) diet was used to induce MASL in C57BL/6J mice. Mice were then treated with SJZ, SZ, or SJZ+SZ via gavage for four weeks. Additionally, metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH) was induced in C57BL/6J mice using a high-fat diet and high-fructose/glucose drinking water. These mice were treated with SZ or SJZ+SZ via gavage for eight weeks (since SJZ showed no significant effect in the MASL model, no SJZ group was set for the MASH model). Mouse body weight and liver weight were recorded; liver tissue pathology was observed; hepatic lipid levels and serum transaminases, as well as tumor necrosis factor-α (TNF-α) levels, were measured. Western Blot was used to detect the expression levels of inflammation and fibrosis-related molecules in liver tissue. The insulin resistance index (HOMA-IR) was calculated for each group of mice, and the expression levels of IRS1/Akt activation and lipid synthesis-related molecules in liver tissue were detected using Western Blot and RT-qPCR. **Results:** In the MASL mouse model, both SJZ+SZ and SZ reduced the degree of hepatic steatosis, decreased hepatic triglyceride (TG) levels and serum transaminase levels in model mice ($P<0.05$), while SJZ showed no significant improvement in MASL ($P>0.05$). In the MASH model mice experiment, SJZ or SZ significantly reduced body weight, liver weight, and liver tissue pathological damage in MASH mice ($P<0.05$), decreased hepatic TG content and serum transaminase and TNF-α levels ($P<0.05$), and reversed the expression levels of inflammatory factors (interleukin-1β, TNF-α, and interleukin-10) and fibrosis-related molecules (transforming growth factor-β_1, α-smooth muscle actin, and type Ⅰ collagen α1) in liver tissue ($P<0.05$); the SZ had no significant effect on these indicators in MASH mice ($P>0.05$). Additionally, SJZ+SZ significantly downregulated the elevated blood glucose, insulin levels, and HOMA-IR in MASH mice ($P<0.05$), reversed the downregulated levels of insulin receptor substrate 1, threonine protein kinase, and acetyl-CoA carboxylase phosphorylation in liver tissue of model mice ($P<0.05$), and inhibited the expression of lipid synthesis-related molecules, including sterol regulatory element-binding protein1c, and fatty acid synthase ($P<0.05$); SZ only showed a downward trend in these indicators ($P>0.05$). **Conclusion:** The SJZ had no significant effect on MASLD in mice. SZ only improved MASLD to a certain extent in the less severe cases. The SJZ+SZ improved MASLD in mice at different stages, with insulin resistance regulation being part of its mechanism of action.

Keywords: Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease; Sijunzi Decoction combined with Sanzi Yangqin Decoction; Spleen-tonifying and phlegm-dissolving; Insulin resistance; Insulin receptor substrate 1; Threonine protein kinase; Acetyl-CoA carboxylase

代谢相关脂肪性肝病(MASLD)，又称非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)，是一种以肝脂肪变性为特征的慢性代谢应激性肝病，主要由于营养超负荷、遗传易感性和胰岛素抵抗等因素导致。MASLD可分为2个阶段，其中早期为代谢相关脂肪肝(MASL)，进展期为代谢相关脂肪性肝炎(MASH)。有部分MASH患者可进展为肝硬化甚至肝癌。随着肥胖、2型糖尿病等代谢性疾病的流行，MASLD全球发病率已超过30%，成为日益严峻的公共卫生问题[1]。但迄今仍然缺乏有效治疗方法，尤其对于其MASH阶段难以逆转。

中医学认为，MASLD多因脾虚痰湿中阻、气血运行不畅而引起，治疗以涤痰除湿、化瘀消脂为法。三子养亲汤出自《韩氏医通》，具有温肺化痰、降气消滞之功效。本课题组前期运用网络药理学分析推测三子养亲汤对MASLD有治疗作用[2]，并通过动物实验证实了其对MASL小鼠的效应[3]。中医学“治肝实脾”理论认为，“见肝之病，则知肝当传之于脾，当先实其脾气，无令受肝之病邪”，治疗肝病应同时调补脾脏。四君子汤出自《太平惠民和剂局方》，是健脾益气的代表方剂。本研究拟应用饮食诱导不同进展阶段的MASLD小鼠模型(MASL及MASH)，观察四君子汤合三子养亲汤的药效作用，并初步探讨其作用机制，以期获得治疗MASLD的有效方剂及相关依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6周龄雄性C57BL/6J小鼠54只，体质量19～21 g，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。动物生产许可证号：SCXK(沪)2022-0004。所有小鼠均饲养于上海中医药大学附属龙华医院SPF级动物房。饲养室内温度为20～24℃，平均湿度45%～65%，光照时间12 h(8:00-20:00)。本研究动物试验方案经上海中医药大学附属龙华医院实验动物和管理委员会批准(编号：LHERAW-23031)。

1.2 实验药物 三子养亲汤(紫苏子9 g，莱菔子9 g，白芥子9 g)和四君子汤(人参9 g，白术9 g，茯苓9 g，甘草6 g)均由上海中医药大学附属龙华医院制剂室代加工制成免煎颗粒剂(成人每天剂量分别重0.82 g与3.6 g)。

1.3 主要试剂与仪器 高脂高糖高胆固醇饲料[Gubra-Amylin NASH(GAN)饮食，40%能量来自脂肪，22%(质量比)果糖，2%(质量比)胆固醇]，南通特洛菲饲料科技有限公司产品(货号：TP2834040)；高脂饲料(HFD，60%能量来自脂肪)，美国Research Diets公司产品(货号：D12492)；甘油三酯(TG)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)及葡萄糖(GLU)测定试剂盒，南京建成生物工程研究所(货号：A110-1-1、C009-2-1、A154-2-1)；逆转录及PCR扩增试剂盒，艾科瑞生物科技有限公司(货号：AG11706、AG11740)；RIPA蛋白裂解液，碧云天生物技术有限公司(货号：P0013B)。微量BCA蛋白定量试剂盒，康为世纪生物科技有限公司(货号：CW0014S)；ECL发光底物，美国Millipore公司(货号：WBKLS0500)；抗体来源：Akt、Phospho-Akt(Ser473)、acetyl CoA carboxylase(ACC)、Phospho-Acetyl-CoA Carboxylase(P-ACC)、Phospho-IRS1(Tyr895)，美国Cell Signaling Technology公司(货号：9272、4058T、3676、11818、3070)；IRS1、β-actin，武汉爱博泰克生物科技有限公司(货号：A16902、AC026)。胰岛素、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)检测试剂盒，西唐生物有限公司(货号：F10930、F11630)。酶标仪，美国Bio-Tek公司(型号：SynergyH4)；实时荧光定量PCR仪，美国Aplied Biosystems公司(型号：StepOne Plus)；高速低温组织研磨仪，武汉赛维尔生物科技有限公司(型号：KZ-III-FP)；离心机，德国Eppendorf公司(型号：5430R)；组织脱水浸蜡机、石蜡包埋机、石蜡切片机，德国Leica公司(型号分别为TP1020、EG1150H、RM2235)；生物发光成像仪，上海天能科技有限公司(型号：Tanon 4600)。

1.4 MASL模型制备及动物分组 小鼠适应性喂养1周后，按体质量采用随机区组法分组，取6只设为正常组(Control)给予常规饲料，其余小鼠给予GAN饮食诱导建立MASL模型。4周后，其余小鼠按体质量采用随机区组法分为模型(Model)组、三子养亲汤(SZ)组、四君子汤(SJZ)组、四君子汤合三子养亲汤(SJZ+SZ)组，每组6只，继续给予GAN饮食。药物干预组每日按《中药药理研究方法学》[4]中成人与小鼠按体表面积折算的等效剂量换算方法，分别以SZ组为106.6 mg/kg，SJZ组为468 mg/kg，SJZ+SZ组为574.6 mg/kg的剂量灌胃相应药物。Model组和Control组小鼠给予等量0.9%氯化钠溶液。4周后将小鼠禁食过夜后处死，收集血清及肝组织备用。

1.5 MASH模型制备及动物分组 小鼠适应性喂养1周后，按体质量采用随机区组法分组，取6只小鼠设为正常(Control)组，其余小鼠给予60% HFD联合高果糖/葡萄糖饮水诱导建立MASH模型。10周后，其余小鼠按体质量采用随机区组法分为模型(Model)组、三子养亲汤(SZ)组、四君子汤合三子养亲汤(SJZ+SZ)组(由于在MASL小鼠实验中，SJZ在MASL模型中几无疗效，故不再对MASH小鼠设立SJZ组)，每组6只，继续原饮食饮水，药物干预组同时每天灌胃给予相应药物，SZ、SJZ+SZ给药剂量同上。Model组和Control组小鼠给予等量0.9%氯化钠溶液。连续干预8周后小鼠禁食过夜后处死，收集血清及肝组织备用。

1.6 各指标检测方法 ①肝脂检测。将各组同等质量肝组织与无水乙醇按质量(g)：体积(mL)=1：9混合，使用低温组织研磨仪制备肝组织匀浆，取上清液与TG检测试剂盒中工作液混匀，37 ℃孵育10 min，应用酶标仪测定各孔在波长500 nm的吸光度(OD)值，根据标准品数值计算肝脏TG含量。②血清转氨酶检测。按照试剂盒操作步骤说明，将小鼠血清ALT检测试剂混匀孵育，用酶标仪测定各孔波长510 nm的OD值，并代入标准曲线计算相应的ALT水平。③肝组织苏木素-伊红(HE)染色及NAS评分。取小鼠5 mm×5 mm肝组织于4%多聚甲醛溶液中固定，脱水后进行石蜡包埋，制备5 μm组织切片后，进行HE染色，封片后于显微镜下观察并拍照。于光学显微镜(×200)下观察HE染色病理切片，对肝组织脂肪变性、肝小叶内炎症和气球样变等方面进行肝组织NAFLD活动度评分(NAS)，评分标准见表1。④实时荧光定量逆转录PCR(RT-qPCR)。取小鼠肝组织30 mg，加入Trizol试剂提取总RNA，在测定提取的总RNA浓度后采用Evo M-MLVRT Master Mix试剂逆转录得到cDNA。qPCR引物由上海闪晶分子生物科技有限公司合成，引物序列见表2。运用SYBR Green Pro Taq HS qPCR试剂配制反应体系。将配制好的反应体系放入StepOne Plus实时荧光定量PCR系统进行扩增，反应条件：95 ℃预变性30 s，循环1次；95 ℃变性5 s，60 ℃退火30 s，循环40次。以Actb作为内参，使用$2^{-\Delta\Delta CT}$法计算炎症相关分子[白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-10(IL-10)]、纤维化相关分子[转化生长因子-β_1(TGF-β_1)、α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)、Ⅰ型胶原α1链(col1α1)mRNA相对表达量]水平。⑤小鼠胰岛素抵抗指数及血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平检测。采用试剂盒检测小鼠空腹血糖(FPG)水平。应用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测空腹胰岛素(FINS)水平，按照测试盒说明书进行操作，用标准品绘制标准曲线，将各样本孔于450 nm的OD值代入曲线方程式计算各样本浓度值。根据公式HOMA-IR=FPG×INS÷22.5，代入计算得HOMA-IR值。应用ELISA检测血清TNF-α水平，步骤同上。⑥蛋白质免疫印迹法(Western Blot)。取小鼠肝组织30 mg，加入RIPA裂解液使用研磨仪进行研磨后取上清，采用BCA法测定蛋白浓度，加入蛋白上样缓冲液于95 ℃变性5 min，应用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳使条带分离，转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜。封闭后加入Akt、磷酸化Akt(P-Akt)、胰岛素受体底物1(IRS1)、磷酸化IRS1(P-IRS1)、乙酰辅酶A羧化酶(ACC)、磷酸化ACC(P-ACC)(1∶1000稀释)、内参蛋白β-actin(1∶50 000稀释)于4 ℃过夜孵育。加入二抗室温孵育1 h，浸润于发光液避光反应后使用全自动化学发光成像仪进行条带曝光并保存，使用Image J软件分析条带的灰度值，以确定小鼠肝组织胰岛素信号分子和脂质合成相关分子表达水平。

1.7 统计学方法 使用SPSS25.0软件进行统计学分析，用Graphpad Prism 8.0软件进行作图。计量资料以均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，其后2组间比较采用Dunnett检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组MASL小鼠体质量、肝质量比较 见表3。GAN饮食8周后，与Control组比较，Model组MASL小鼠体质量、肝质量增加($P<0.05$)。与Model组比较，SJZ+SZ组MASL小鼠体质量、肝质量降低($P<0.05$)。

表1 NAS评分表

组织学特征	0分	1分	2分	3分
脂肪变性(%)	<5	5~33	34~66	>66
肝细胞气球样变	无	少量	大量	-
小叶炎症	无	<2个	2~4个	>4个

表2　qPCR引物序列

蛋白名称	基因名称	引物序列(5'→3')
β-肌动蛋白(β-actin)	Actb	上游:GAGACCTTCAACACCCCAGC 下游:ATGTCACGCACGATTTCCC
白介素-1β(IL-1β)	Il1b	上游:GCTTCAGGCAGGCAGTATCA 下游:TGCAGTTGTCTAATGGGAACG
白介素-10(IL-10)	Il10	上游:TGGACAACATACTGCTAACCGAC 下游:CCTGGGGCATCACTTCTACC
转化生长因子-β_1(TGF-β_1)	Tgfb1	上游:GGCGGTGCTCGCTTTGTA 下游:GATGGCGTTGTTGCGGTC
Ⅰ型胶原蛋白α1链(Col1α1)	Col1a1	上游:GAGGGCGAGTGCTGTGCT 下游:GTCCAGGGATGCCATCTCG
α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)	Acta2	上游:CCCTGAAGAGCATCCGACA 下游:CTCCAGAGTCCAGCACAATACC
脂肪酸合酶(FASN)	Fasn	上游:GTCAGATCTGCTGTTGAGCACAG 下游:AATGATGCCGTCAGGTTTCAG
固醇调节元件结合蛋白1c(SREBP-1c)	Srebf1	上游:ACAAAAGCAAATCACTGAAGGAC 下游:GGGCTCAGAGTCACTACCACC

表3　各组MASL小鼠体质量、肝质量比较($\bar{x}\pm s$)　g

组　别	鼠数	小鼠体质量	小鼠肝质量
Control组	6	24.20±0.97	1.01±0.08
Model组	6	27.60±0.51①	1.23±0.05①
SJZ+SZ组	6	25.73±0.63②	1.06±0.09②
SZ组	6	26.44±1.63	1.09±0.15
SJZ组	6	26.40±1.28	1.15±0.08

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.2　各组MASL小鼠肝组织HE染色结果比较　见图1。Control组肝组织结构清晰，肝细胞形态正常；Model组小鼠肝组织可见大量大小不一的脂滴空泡，散在少量炎性细胞浸润灶；SJZ+SZ组、SZ组与模型组相比肝组织脂滴减少，其中SJZ+SZ组改善效果更显著，而SJZ组无明显变化。

2.3　各组MASL小鼠肝组织病理NAS评分比较　见表4。与Control组比较，Model组NAS量表中的肝细胞脂肪变、小叶内炎症评分及总分升高($P<0.05$)。与Model组比较，SJZ+SZ组肝细胞脂肪变、小叶内炎症评分及总分有所降低($P<0.05$)，SZ组肝细胞脂肪变评分降低($P<0.05$)。SJZ+SZ组肝细胞脂肪变评分低于SZ组，但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表4　各组MASL小鼠肝组织病理NAS评分比较($\bar{x}\pm s$)　分

组　别	鼠数	肝细胞脂肪变	小叶内炎症	肝细胞气球样变	NAS总分
Control组	6	0	0	0	0
Model组	6	2.17±0.41①	1.17±0.41①	0	3.33±0.52①
SJZ+SZ组	6	1.00±0.63②	0.33±0.52②	0	1.33±0.82②
SZ组	6	1.17±0.41②	0.67±0.52	0	1.83±0.75
SJZ组	6	2.00±0.63	1.00±0.63	0	3.00±1.10

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.4　各组MASL小鼠肝组织TG、ALT水平比较　见表5。与Control组比较，Model组小鼠肝组织TG水平升高($P<0.05$)；与Model组比较，SJZ+SZ组和SZ组均使肝组织TG水平降低($P<0.05$)，SJZ+SZ组均值较SZ组略小，但2组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与Control组比较，Model组小鼠血清ALT水平显著上升($P<0.05$)；与Model组比较，SJZ+SZ组和SZ组干预使ALT水平显著下调($P<0.05$)。

2.5　各组MASH小鼠体质量、肝质量比较　见表6。HFD联合高果糖/葡萄糖饮水18周后，与Control组比较，Model组MASH小鼠体质量、肝质量增加($P<0.05$)。与Model组比较，SJZ+SZ组MASH小鼠体质量、肝质量降低($P<0.05$)。

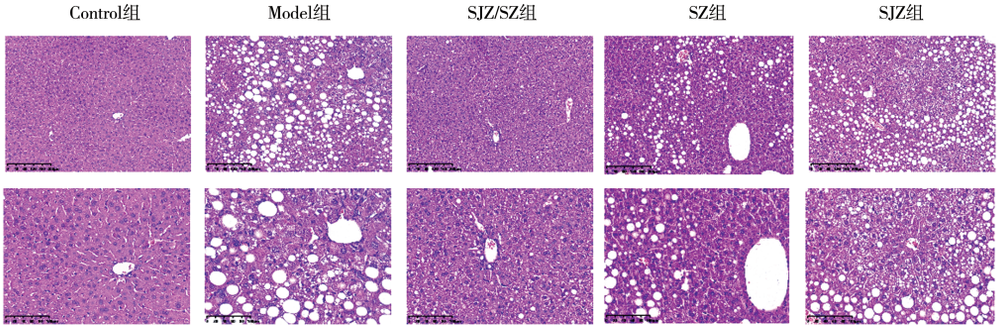


图1　各组MASL小鼠肝组织HE染色(上100×，下200×)

表5　各组MASL小鼠肝组织TG、ALT水平比较($\bar{x}\pm s$)

组　别	鼠数	肝组织TG(mmol/g)	血清ALT(U/L)
Control组	6	11.69±2.75	15.94±3.36
Model组	6	20.17±2.72①	24.66±6.47①
SJZ+SZ组	6	15.08±1.64②	16.09±2.58②
SZ组	6	15.56±4.34②	15.81±5.99②
SJZ组	6	16.27±2.68	16.92±2.26

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

表6　各组MASH小鼠体质量、肝质量比较($\bar{x}\pm s$)　g

组　别	鼠数	小鼠体质量	小鼠肝质量
Control组	6	27.46±0.39	0.95±0.06
Model组	6	48.38±2.79①	1.98±0.59①
SJZ+SZ组	6	41.98±4.82②	1.21±0.45②
SZ组	6	47.53±5.41	1.70±0.61

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.6　各组MASH小鼠肝组织HE染色结果比较　见图2。正常组肝组织结构清晰，肝细胞大小一致；模型组小鼠肝组织出现严重弥漫性脂肪变性、肝细胞气球样变，并伴随局部炎症病灶；相较于模型组，SJZ+SZ组小鼠肝组织脂肪变性程度、气球样变及炎症灶均显著减轻，而SZ组改善不明显。

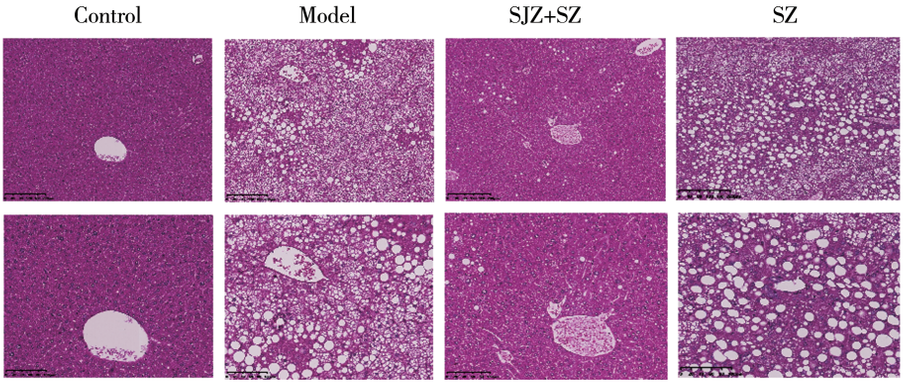


图2　各组MASH小鼠肝组织HE染色(上100×，下200×)

2.7　各组MASH小鼠肝组织病理NAS评分比较　见表7。与Control组比较，Model组NAS量表中的肝细胞脂肪变、小叶内炎症、肝细胞气球样变评分及总分升高($P<0.05$)。与Model组比较，SJZ+SZ组肝细胞脂肪变、小叶内炎症、肝细胞气球样变评分及总分均降低($P<0.05$)；SZ组NAS量表各项评分及总分差异无统计学意义($P>0.05$)。

表7　各组MASH小鼠肝组织病理NAS评分比较($\bar{x}\pm s$)　分

组　别	鼠数	肝细胞脂肪变	小叶内炎症	肝细胞气球样变	NAS总分
Control组	6	0	0	0	0
Model组	6	2.67±0.52①	2.00±0.63①	2.00±0.00①	6.67±1.03①
SJZ+SZ组	6	1.17±0.75②	1.00±0.63②	0.83±0.75②	3.17±1.17②
SZ组	6	2.33±0.52	1.67±0.52	1.83±0.41	5.83±1.17

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.8　各组MASH小鼠肝组织TG、ALT水平比较　见表8。与Control组比较，Model组小鼠肝组织TG、血清ALT含量均升高($P<0.05$)。与Model组比较，SJZ+SZ组小鼠肝组织TG、血清ALT含量显著下调($P<0.05$)；而SZ组小鼠肝组织TG、血清ALT含量差异无统计学意义($P>0.05$)。

表8　各组MASH小鼠肝组织TG、ALT水平比较($\bar{x}\pm s$)

组　别	鼠数	肝组织TG(mmol/L)	血清ALT(U/L)
Control组	6	19.53±1.42	24.94±11.86
Model组	6	25.49±2.05①	147.34±61.13①
SJZ+SZ组	6	18.99±3.99②	62.52±46.80②
SZ组	6	21.08±2.76	141.17±37.96

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.9　各组MASH小鼠肝组织IL-1β、IL-10 mRNA水平及血清TNF-α水平比较　见表9。与Control组比较，Model组小鼠肝组织中促炎因子IL-1β mRNA

水平上升（$P<0.05$），抗炎因子IL-10 mRNA水平下调（$P<0.05$）。与Model组比较，SJZ+SZ组IL-1β mRNA水平下降（$P<0.05$），IL-10 mRNA水平上升（$P<0.05$）；SZ组2项指标差异均无统计学意义（$P>0.05$）。此外，Model组血清TNF-α水平较Control组升高（$P<0.05$）；SJZ+SZ组血清中TNF-α水平较Model组降低（$P<0.05$）。

表9 各组MASH小鼠肝组织IL-1β、IL-10 mRNA水平及血清TNF-α水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	鼠数	IL-1β mRNA	IL-10 mRNA	TNF-α（pg/mL）
Control组	6	1.00±0.31	1.00±0.32	271.92±46.40
Model组	6	5.51±1.67①	0.77±0.31①	533.32±45.88①
SJZ+SZ组	6	1.46±0.34②	1.49±0.29②	343.70±53.96②
SZ组	6	2.91±1.09	1.19±0.37	466.63±54.00

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.10 各组肝组织TGF-β_1、Col1α1、α-SMA mRNA水平比较 见表10。与Control组比较，Model组小鼠肝组织纤维化相关分子TGF-β_1、α-SMA和Col1α1 mRNA水平升高（$P<0.05$）；与Model组比较，SJZ+SZ组TGF-β_1、α-SMA和Col1α1 mRNA水平均降低（$P<0.05$），而SZ组3项指标变化无统计学意义（$P>0.05$）。

表10 各组肝组织TGF-β_1、Col1α1、α-SMA mRNA水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	鼠数	TGF-β_1	α-SMA	Col1α1
Control组	6	1.00±0.16	1.00±0.43	1.00±0.65
Model组	6	3.39±1.60①	2.01±0.96①	2.86±0.89①
SJZ+SZ组	6	1.47±0.24②	0.82±0.72②	0.77±0.40②
SZ组	6	3.45±1.60	1.48±0.44	2.22±0.69

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.11 各组MASH小鼠FBG、FINS水平及HOMA-IR值比较 见表11。与Control组比较，Model组小鼠FBG、FINS水平与HOMA-IR值均显著上升（$P<0.05$）；与Model组比较，SJZ+SZ组FBG、FINS水平与HOMA-IR值均显著下降（$P<0.05$），SZ组小鼠FBG水平及HOMA-IR值显著下降（$P<0.05$），但FINS变化差异无统计学意义（$P>0.05$）；SJZ+SZ组HOMA-IR值较SZ组显著下降（$P<0.05$）。

表11 各组MASH小鼠FBG、FINS水平及HOMA-IR值比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	鼠数	FBG（mmol/L）	FINS（mIU/L）	HOMA-IR
Control组	6	0.69±0.23	22.25±4.57	0.69±0.33
Model组	6	7.81±2.68①	47.78±5.13①	15.40±4.95①
SJZ+SZ组	6	3.80±0.55②	28.34±4.11②	4.51±1.55②③
SZ组	6	5.20±1.56②	38.83±3.16	8.94±1.34②

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$；③与SZ组比较，$P<0.05$。

2.12 各组MASH小鼠肝组织P-IRS1/IRS1、P-Akt/Akt蛋白表达比较 见表12。与Control组比较，Model组小鼠肝组织胰岛素信号分子P-IRS1、P-Akt、P-IRS1/IRS1、P-Akt/Akt表达水平降低（$P<0.05$）；与Model组比较，SJZ+SZ组干预P-IRS1、P-Akt、P-IRS1/IRS1、P-Akt/Akt水平升高（$P<0.05$），SZ组仅P-Akt、P-Akt/Akt水平升高（$P<0.05$）。

2.13 各组MASH小鼠肝组织P-ACC/ACC蛋白表达比较 见表13。与Control组比较，Model组P-ACC、P-ACC/ACC水平显著降低（$P<0.05$）；与Model组比较，SJZ+SZ组P-ACC、P-ACC/ACC水平显著升高（$P<0.05$），SZ组对其有上调趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。

表12 各组MASH小鼠肝组织P-IRS1/IRS1、P-Akt/Akt蛋白表达比较（$\bar{x}\pm s$）

组 别	鼠数	IRS1	P-IRS1	P-IRS1/IRS1	Akt	P-Akt	P-Akt/Akt
Control组	6	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Model组	6	0.69±0.34	0.42±0.14①	0.56±0.21①	0.89±0.11	0.73±0.14①	0.82±0.09①
SJZ+SZ组	6	0.64±0.16	1.79±0.63②	1.23±0.37②	1.13±0.16	1.45±0.24②	1.25±0.08②
SZ组	6	0.78±0.40	0.93±0.62	0.85±0.21	1.08±0.31	1.13±0.06②	1.07±0.13②

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

表13　各组MASH小鼠肝组织P-ACC/ACC蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

分　组	鼠数	ACC	P-ACC	P-ACC/ACC
Control组	6	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
Model组	6	0.68±0.51	0.23±0.11①	0.39±0.18①
SJZ+SZ组	6	0.81±0.29	0.86±0.26②	0.75±0.13②
SZ组	6	0.66±0.32	0.47±0.40	0.52±0.09

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

2.14　各组MASH小鼠肝组织FASN、SREBP1c mRNA水平比较　见表14。与Control组比较，Model组FASN、SREBP1c mRNA表达水平显著升高($P<0.05$)；与Model组比较，SJZ+SZ组FASN、SREBP1c mRNA表达水平显著降低($P<0.05$)，SZ组对FASN、SREBP1c mRNA表达水平表达水平无明显影响($P>0.05$)。

表14　各组肝组织FASN、SREBP1c mRNA水平比较($\bar{x}\pm s$)

组　别	鼠数	FASN	SREBP1c
Control组	6	1.00±0.44	1.00±0.20
Model组	6	2.46±0.54①	1.86±0.44①
SJZ+SZ组	6	1.66±0.29②	1.30±0.30②
SZ组	6	1.97±0.35	1.69±0.75

注：①与Control组比较，$P<0.05$；②与Model组比较，$P<0.05$。

3　讨论

动物模型是研究疾病发生发展机制和有效治疗方法不可或缺的工具。临床前研究常用基因编辑或通过饮食、化学物质诱导动物模型[5]。基因编辑模型可用来验证特定分子在疾病进展中的作用，但与临床MASLD致病因素有所差异，且单基因改变不足以反映这种多因素疾病的发病机制，一般也需联合饮食或化学物质诱导建模[6]。化学物质诱导可快速建立MASLD模型，但同样其诱因不具有代表性[7]。相比之下，饮食诱导的营养失调性模型与临床MASLD的发生及演变过程最相似，更具有实用价值[8]。临床前研究多采用饮食诱导建立MASLD模型，其中高脂与高果糖联合诱导的动物模型与临床MASLD病理变化呈现最为相似的表型，尤其是MASH阶段[9]。为了更准确地模拟导致人类NASH病变的饮食，建立了一种含有高脂、高胆固醇和高糖的饮食模式，逐渐完善为GAN饮食[10]。研究表明，这种NASH饮食应用造模可以模拟NAFLD的不同进展阶段[11]。在有关高果糖玉米糖浆-55(55%果糖，45%葡萄糖)的研究中显示，果糖和葡萄糖组合比单独使用能更有效地促进肝脂肪变性[12]。另外，有研究发现，相比于单独喂养高脂饮食，使用高脂饮食联合液体果糖/葡萄糖喂养小鼠12周，肥胖和NAFLD相关表型加剧[13]。因此，本研究采用模拟西方快餐饮食的GAN或HFD联合高糖饮水饲喂小鼠不同时间建立早期和进展期MALLD模型(MASL和MASH)，以明确四君子汤合三子养亲汤(SJZ+SZ)的作用，并与SJZ、SZ单独干预的效应进行比较。

采用GAN饮食诱导8周后，模型组小鼠体质量与肝质量增加，肝脏TG及血清ALT水平均较对照组升高，肝组织出现弥漫性脂肪变性，提示MASL造模成功。SJZ+SZ干预可显著改善肝组织脂肪变性及下调上述功肝能指标，SZ对肝脂肪变性、肝功能指标有改善但效果不如联合用药，而SJZ则无明显治疗效果。课题组前期结合网络药理学和体内实验，证明了SZ对HFD诱导的小鼠MASL有降脂保肝作用[4-5]，与本研究结果一致。既往有临床研究显示，SJZ联合易善复胶囊可改善MASLD患者症状，但无单独运用SJZ有效改善该疾病的研究报道[14]。虽有研究采用网络药理学预测SJZ可治疗该疾病[15]，但缺乏体内外实验验证。另外，本课题组既往应用SJZ干预MASL大鼠也显示无明显效应，这与本研究的结果一致[16]。值得注意的是，虽然单独应用健脾益气药SJZ无明显作用，但SZ联合SJZ对小鼠MASL的作用效果显著且优于单独使用SZ。

基于上述研究结果，进一步观察SJZ+SZ以及SZ对进展到MASH阶段的小鼠模型的作用。HFD联合高果糖/葡萄糖饮水8周后，小鼠体质量、肝质量显著增加，肝组织出现严重脂肪变性并伴有大量气球样变和炎性细胞浸润，提示MASH模型成功建立。SJZ+SZ干预后显著改善了MASH小鼠肝组织病理损害，降低小鼠体质量、肝质量及肝TG、血清ALT水平，而单独使用SZ的干预效果不显著。脂质代谢紊乱促进肝脂积聚导致肝损，继而可诱发炎症，NF-κB信号通路活化介导炎症因子表达变化，有助于募集和激活Kuffer细胞，促进MASH的进展[17]。本研究结果显示，SJZ+SZ干预可逆转模型组上调的小鼠肝组织促炎因子IL-1β和下调的抗炎因子IL-10，同时也可下调血清TNF-α水平。慢性炎症可将肝星状细胞激

活为成纤维细胞，分泌大量细胞外基质如Ⅰ型和Ⅲ型胶原蛋白，促进肝纤维化[18]。参与细胞外基质合成和降解的关键细胞因子TGF-β_1与纤维化的发生发展密切相关[19-20]，而α-SMA常被认为是肝星状细胞激活和纤维化生成的标志[21]。在本研究中，SJZ+SZ对MASH模型小鼠肝组织TGF-β_1、α-SMA与Col1α1的表达均有显著下调作用。这些结果提示SJZ+SZ可改善小鼠MASH，而单独使用SZ有改善趋势但不明显。

胰岛素由胰腺β细胞分泌，进入胰岛素敏感组织如肝脏、肌肉和脂肪组织中与胰岛素受体结合，活化IRS并进一步激活Akt。后者可通过调控叉头框转录因子O(FoxO)等多个信号途径介导胰岛素的大部分代谢作用，包括调节葡萄糖转运、脂质合成、糖异生和糖原合成等[22]。胰岛素抵抗是指细胞对胰岛素的反应下降的状态，可由脂毒性、炎症、高血糖以及这些因素导致的氧化应激、线粒体功能障碍和内质网应激等多种机制引起，诱导IR、IRS和Akt等胰岛素信号分子蛋白在多个残基上的抑制性磷酸化增加、激动性磷酸化下调[23]。在证实SJZ+SZ药物效应基础上，本研究基于胰岛素抵抗初步探讨其对MASLD的作用机制。在MASLD病理机制中，无论早期的“二次打击”还是近年来提出的“多次打击”学说，胰岛素抵抗都被认为是MASLD发生发展的关键环节[24]。其可导致脂肪组织功能障碍，促使脂肪水解产生过量脂肪酸并被运送蓄积于肝脏。肝脏胰岛素抵抗可促进新生脂肪合成，同时胰岛素对糖异生抑制作用的失效也可加重肝内脂质积累。肝脂肪变性则会进一步加剧脂毒性损伤，引发炎症、纤维化等一系列病理过程，促进MASLD进展[25]。本研究检测小鼠血清FPG、FINS水平并计算HOMA-IR值，结果显示这些指标在MASH模型小鼠中显著上调，SJZ+SZ干预可使其下调，提示SJZ+SZ可改善系统性胰岛素抵抗。此外，SJZ+SZ可逆转MASH小鼠肝组织中下调的IRS1与Akt的磷酸化水平，说明其可改善MASH小鼠肝脏胰岛素抵抗。ACC可促进脂肪酸从头合成及抑制脂肪酸氧化关键酶的活性，ACC磷酸化使其活性抑制，本研究发现SJZ+SZ可显著上调在模型小鼠肝组织中下降的磷酸化ACC水平。另外，脂肪酸合成酶FASN、促进脂质合成分子表达的核转录因子SREBP-1c在模型组肝组织上调，SJZ+SZ干预使其显著下调。这些结果表明SJZ+SZ改善MASLD的作用机制与调控肝脏及系统胰岛素抵抗相关。

MASLD归属于中医学胁痛、积聚、痞满、黄疸等范畴。随着生活方式改变，高脂高糖饮食加重了人体脾胃负担，导致脾运化升清功能受损。《证治准绳》云：“脾虚不分清浊，停留津液而痰生。”故痰浊内生，积聚于肝，进而会阻滞气机，气血运行不畅，促使MASLD的发生发展[26]。《景岳全书·杂证谟·痰饮》曰：“盖痰涎之化，本由水谷，使脾强胃健如少壮者流，则随食随化，皆成血气，焉得留而为痰。”一般认为MASLD的病机多以脾虚为根本[27]，故健脾化痰则可作为其治疗的关键切入点。本研究结果显示，祛痰方SZ联合健脾方SJZ对MASLD的作用更有效，而对于伴随较严重病理损伤且干预时间较长的MASH，缺少健脾治疗则几乎无疗效，也为健脾化痰、标本兼顾治则提供依据。

综上所述，SJZ对小鼠MASLD无显著作用，SZ仅对程度较轻的MASL有改善作用，SJZ+SZ对早期和进展期阶段的MASLD均有显著改善作用，尤其在MASH小鼠模型中更能体现其优于SZ单独使用的药效。此外，SJZ+SZ的作用途径可能与调控胰岛素抵抗改善脂质代谢有关。SJZ和SZ均为常用经典方剂，本研究为其联合使用治疗MASLD的临床应用提供试验依据。同时依据“以方测证”理论，本研究结果通过药效佐证了脾虚为本、痰湿为标的MASLD中医病机及健脾化痰治则的正确性，有益于阐述中医药治疗的科学内涵。由于中医药具有多组分、多靶点的特性，后续我们将对SJZ+SZ的药效物质基础及其效应机制开展进一步的探究。

[参考文献]

[1] GBD 2017 Cirrhosis Collaborators. The global, regional, and national burden of cirrhosis by cause in 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the global burden of disease study 2017[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2020, 5(3): 245-266.

[2] LI Y, LIU Y, YANG M, et al. A study on the therapeutic efficacy of san zi yang qin decoction for non-alcoholic fatty liver disease and the underlying mechanism based on network pharmacology[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 8819245.

[3] 李怡萍，杨丽丽，郑昱，等. 三子养亲汤对非酒精性脂肪性肝病小鼠脂质代谢紊乱的调控作用[J]. 中成药，2022，44(3)：913-917.

[4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 3版. 北京：人民卫生出版社，2011：1302.

[5] OLIGSCHLAEGER Y, SHIRI-SVERDLOV R. NAFLD preclinical models: more than a handful, less of a Concern?[J]. Biomedicines, 2020, 8(2): 28.

[6] SANTHEKADUR P K, KUMAR D P, SANYAL A J. Preclinical models of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Hepatol, 2018, 68(2): 230-237.

[7] FLESSA C M, NASIRI-ANSARI N, KYROU I, et al. Genetic and diet-Induced animal models for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) Research[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(24): 15791.

[8] DENK H, ABUJA P M, ZATLOUKAL K. Animal models of NAFLD from the pathologist's point of view[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019, 1865(5): 929-942.

[9] IM Y R, HUNTER H, DE GRACIA HAHN D, et al. A systematic review of animal models of nafld finds high-fat, high-fructose diets most closely resemble human nafld[J]. Hepatology, 2021, 74(4): 1884-1901.

[10] GALLAGE S, AVILA J, RAMADORI P, et al. A researcher's guide to preclinical mouse NASH models[J]. Nat Metab, 2022, 4(12): 1632-1649.

[11] SVOP J V, FLEDELIUS C, MAX W E, et al. Temporal development of dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in syrian hamsters fed a high-fat, high-fructose, high-cholesterol diet[J]. Nutrients, 2021, 13(2): 604.

[12] MOCK K, LATEEF S, BENEDITO V A, et al. High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation[J]. J Nutr Biochem, 2017, 39: 32-39.

[13] LUO Y, WOODIE L N, GRAFF E C, et al. Role of liquid fructose/sucrose in regulating the hepatic transcriptome in a high-fat Western diet model of NAFLD[J]. J Nutr Biochem, 2023, 112: 109174.

[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] 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.

[16] 柳涛, 杨丽丽, 张莉, 等. 不同治法复方防治非酒精性单纯性脂肪肝的效应差异[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(10): 1120-1126.

[17] PILARTE K A, REICHERT E C, GREEN Y S, et al. Haf prevents hepatocyte apoptosis and progression to mash and hepatocellular carcinoma through transcriptional regulation of the nf-kappab pathway[J]. Hepatology, 2024, 10.1097.

[18] HAMMERICH L, TACKE F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023, 20(10): 633-646.

[19] PENG D, FU M, WANG M, et al. Targeting tgf-beta signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 104.

[20] VAN RIET S, JULIEN A, ATANASOV A, et al. The role of sinusoidal endothelial cells and timp1 in the regulation of fibrosis in a novel human liver 3d nash model[J]. Hepatol Commun, 2024, 8(3): e0374.

[21] XIA Y, WANG Y, XIONG Q, et al. Neutrophil extracellular traps promote mash fibrosis by metabolic reprogramming of hsc[J]. Hepatology, 2024, 10.1097.

[22] UEHARA K, SANTOLERI D, WHITLOCK A E G, et al. Insulin regulation of hepatic lipid homeostasis[J]. Compr Physiol, 2023, 13(3): 4785-4809.

[23] TAHAPARY D L, PRATISTHITA L B, FITRI N A, et al. Challenges in the diagnosis of insulin resistance: focusing on the role of homa-ir and tryglyceride/glucose index[J]. Diabetes Metab Syndr, 2022, 16(8): 102581.

[24] YANG K, CHEN J, ZHANG T, et al.Efficacy and safety of dietary polyphenol supplementation in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis[J]. Front Immunol, 2022, 13: 949746.

[25] SAKURAI Y, KUBOTA N, YAMAUCHI T, et al. Role of insulin resistance in MAFLD[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 4156.

[26] 尹艺晓, 胡义扬, 彭景华. 痰湿理论的源流及其在非酒精性脂肪性肝病中的应用研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2023, 38(4): 1689-1692.

[27] 赵洁, 丁睿哲, 丁婧, 等. 从脂质蓄积与“痰浊”论治非酒精性脂肪性肝病[J]. 中医学报, 2024, 39(10): 2076-2080.

（责任编辑：冯天保，邓乔丹）