

# 基于 AMPK/PI3K/AKT 通路探讨 清开灵口服液治疗 NAFLD 的作用机制\*

练利芳<sup>1</sup>, 张岳峰<sup>1</sup>, 周小琴<sup>2</sup>, 王秋芸<sup>2</sup>, 谢智勇<sup>1</sup>

1. 中山大学药学院(深圳), 广东 深圳 518107  
2. 广州白云山明兴制药有限公司, 广东 广州 510250

**摘要:** 非酒精性脂肪性肝病(NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease)作为全球第一大慢性肝病,其发病机制复杂,临床尚无特效治疗药物,故深入探索其干预策略具有重要意义。本研究构建了脂质累积模型,评估清开灵口服液(QKL, Qingkailing Oral Liquid)减轻 NAFLD 脂质累积的疗效,结合网络药理学筛选作用靶标,并通过 qPCR 和 Western Blot 分析关键信号通路基因及蛋白的表达水平。结果显示:①  $\varphi=0.5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$  的 QKL 干预 48 h 后, HepG2 和 AML-12 细胞脂质累积模型脂滴体积和数量均显著减少, TG 含量呈剂量依赖性降低,  $\varphi=2\%$  QKL 干预效果与 2 mmol/L 二甲双胍相当;② 网络药理学预测,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase)-蛋白激酶 B(Akt, protein kinase B)、腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase)等信号通路在 QKL 干预 NAFLD 中发挥重要作用,且 QKL 与 AMPK、PI3K 等靶点具有潜在的结合活性;③ QKL 可能通过双重调控 AMPK-SREBP1 与 PI3K-AKT-mTOR 信号通路,进而有效缓解肝细胞脂质蓄积。本研究基于“体外模型-网络药理学-实验验证”的策略,系统探讨 QKL 干预 NAFLD 脂质代谢的分子机制,为中药现代化及 NAFLD 治疗提供新的策略。

**关键词:** 清开灵口服液;非酒精性脂肪性肝病;网络药理学;AMPK-SREBP1 信号通路;PI3K-AKT-mTOR 信号通路  
**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 2097-0137(2026)03-0010-09

## Qingkailing Oral Liquid modulates AMPK/PI3K/AKT signaling to attenuate NAFLD pathogenesis

LIAN Lifang<sup>1</sup>, ZHANG Yuefeng<sup>1</sup>, ZHOU Xiaoqin<sup>2</sup>, WANG Qiuyun<sup>2</sup>, XIE Zhiyong<sup>1</sup>

1. School of Pharmaceutical Sciences (Shenzhen), Sun Yat-sen University, Shenzhen 518107, China  
2. Guangzhou Baiyunshan Mingxing Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510250, China

**Abstract:** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most prevalent and worldwide chronic liver disease. Due to the complex pathogenesis and lacking targeted therapies, it is critically significant to explore intervention strategies. In this study, we first established lipid accumulation models to evaluate the efficacy of Qingkailing Oral Liquid (QKL) in alleviating NAFLD-associated lipid accumulation.

\* 收稿日期: 2025-05-17 录用日期: 2025-07-14 网络首发日期: 2025-09-23

基金项目: 广州市科技计划项目(2023B03J1382)

作者简介: 练利芳(1991年生),女;研究方向: 中西医结合治疗代谢综合征;E-mail: lianlf@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 王秋芸(1985年生),女;研究方向: 药品研发;

E-mail: farahwgy@hotmail.com;

谢智勇(1974年生),男;研究方向: 肠道微生态学、代谢组学;

E-mail: xiezhzy@mail.sysu.edu.cn

(王秋芸、谢智勇为共同通信作者)



ZR20250084



ZR20250084

Network pharmacology was employed to screen potential therapeutic targets, followed by validation of key signaling pathway genes and proteins expression via qPCR and Western blot. The results showed that: ① After 48 h of treatment with  $\varphi=0.5\%$ , 1%, 2% QKL, both HepG2 and AML-12 lipid accumulation models exhibited a significant reduction in lipid droplet size and number. The triglyceride (TG) content decreased in a dose-dependent manner, with  $\varphi=2\%$  QKL showing comparable efficacy to 2 mmol/L metformin. Network pharmacology predicted that key pathways, including phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), play crucial roles in QKL-mediated intervention. Molecular docking suggested potential binding activity between QKL and targets such as AMPK and PI3K. ② QKL likely exerts its anti-lipid accumulation effects through dual regulation of the AMPK-SREBP1 and PI3K-AKT-mTOR signaling pathways, thereby effectively mitigating hepatic lipid deposition. ③ This study employed an integrated “*in vitro* modeling-network pharmacology-experimental validation” strategy to systematically investigate the molecular mechanisms by which QKL modulates lipid metabolism in NAFLD, providing novel insights for both modernization of traditional Chinese medicine and the development of therapeutic strategies against NAFLD.

**Key words:** Qingkailing Oral Liquid; non-alcoholic fatty liver disease; network pharmacology; AMPK-SREBP1 signaling pathway; PI3K-AKT-mTOR signaling pathway

非酒精性脂肪性肝病(NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease)是指患者无明显饮酒史情况下,在肝脏中沉积的代谢综合征(Deprince et al., 2020)。它被认为是代谢综合征在肝脏的表现,与一些代谢疾病、糖尿病共同促进心血管疾病发生、增加癌变风险并推动终末期肝病的进展,从而导致NAFLD患者死亡(Eslam et al., 2020)。目前,尚未有药物获批用于NAFLD治疗。尽管NAFLD是近代才被明确的疾病,传统中医文献中未见直接记载,但根据其临床症状,现代中医将其归为“胁痛”“肝癖”“肝胀”“肥气”等范畴,认为其病机与肝、脾、肾功能失调相关。2025年《中西医结合诊疗共识意见》将NAFLD分为四型:肝郁脾虚证、痰浊内阻证、湿热蕴结证及痰瘀互结证。基于辨证论治原则,中医针对不同证型施治,取得显著临床疗效(李军祥等, 2025)。

清开灵口服液(QKL, Qingkailing Oral Liquid)是由胆酸、珍珠母、猪去氧胆酸、栀子、水牛角、板蓝根、黄芩苷和金银花组成的中药复方制剂,具有清热解毒、镇静安神等药理活性(吴锦云等, 2024)。方中胆酸与水牛角发挥清热解毒作用,黄芩苷配伍栀子呈燥湿泻火之效,珍珠母协同利湿平肝的疗效,该方剂多组分协同的作用机制与湿热蕴结证NAFLD的核心病机相契合(韦迎春等, 2011)。近年来的研究发现,包括京尼平苷(Wang et al., 2022)、黄芩苷(Hu et al., 2021; Zhang et al., 2022)及猪去氧

胆酸(Kuang et al., 2023)等在内的核心活性成分可通过多靶点、多通路机制干预NAFLD的病理进程,具体作用包括抑制肝细胞脂质蓄积、调节脂肪酸氧化与能量代谢、改善胰岛素抵抗与炎症反应及调控肠道菌群等。为了进一步深入理解QKL改善NAFLD脂质累积的科学内涵与其内在机制,本研究采用“体外模型构建-网络药理学预测-分子机制验证”的研究策略,从细胞、分子、通路的层面系统探讨QKL干预NAFLD脂质累积的分子机制,为QKL的现代化研究和临床应用提供新的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人肝癌细胞系 HepG2 细胞、小鼠正常肝细胞系 AML-12 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.1.2 试剂 清开灵口服液(广州白云山明兴制药有限公司);二甲双胍盐酸盐(上海麦克林生化科技股份有限公司);胎牛血清、MEM Alpha 培养基、DMEM/F-12 (1:1) 培养基(美国 Thermo Fisher); CCK-8 试剂(美国 APEX BIO);油红 O 染液(北京索莱宝科技有限公司);TG 试剂盒(南京建成科技有限公司);逆转录试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司);2 × SYBR Green Master Mix(美国 Selleck); qPCR 引物(生工生物工程(上海)股份有限公司);

兔源 AMPK 抗体、兔源 p-AMPK 抗体、兔源 SREBP1 抗体、兔源 p-PI3K 抗体、兔源 AKT 抗体、兔源 p-AKT 抗体、兔源 mTOR 抗体(艾博抗(北京)生物医药科技有限公司);棕榈酸、油酸(美国 Sigma)。

**1.1.3 仪器** 超净工作台(苏州净化设备有限公司);二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher);显微镜(日本 Nikon);酶标仪(美国 Bio-Rad),低温超速离心机(德国 Eppendorf);NanoDrop2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher);LightCycler 96 荧光定量 PCR 仪(美国 Roche);电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 细胞采用含  $\varphi=10\%$  胎牛血清完全培养基培养于 T75 细胞培养瓶中,于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\varphi=5\%$   $\text{CO}_2$  条件下连续培养。当细胞覆盖率超过 75% 传代 1 次,采用 5~15 代的细胞用于后续实验。采用等体积的 20 mmol/L 油酸溶液与 10 mmol/L 棕榈酸溶液混合后作为游离脂肪酸(FFA, free fatty acids),以 0.5 mmol/L 为终浓度诱导细胞造模。HepG2 细胞按  $2\times 10^5$  cells/mL 和 AML-12 细胞按  $1\times 10^5$  cells/mL 接种于 12 孔板中,共设 6 组,分别为空白组、模型组、二甲双胍(MET, metformin)组、清开灵口服液低中高( $\varphi=0.5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$ )剂量组,培养 48 h 后进行实验分析。

**1.2.2 油红 O 染色** 细胞经油红 O 染色试剂染色后,置于显微镜下观察。

**1.2.3 TG 含量测定** 按试剂说明书处理细胞,并用 BCA 法测定细胞内的蛋白并扣除。

**1.2.4 QKL 有效成分筛选和靶点预测** 于中药系统药理学数据库分析平台(TCMSP, Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform)中,以口服利用度(OB, oral bioavailability)  $\geq 30\%$ ,类药性(DL, drug likeness)  $\geq 0.18$  为条件筛选栀子、板蓝根、金银花的活性成分及相关靶点;于中药分子机制生物信息学注释数据库(BATMAN-TCM, A Bioinformatics Annotation Database for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine)中,以 Score  $\geq 20\%$ ,  $P \leq 0.05$  为条件筛选栀子、板蓝根、金银花、珍珠母、水牛角、胆酸、黄芩苷的活性成分,并将其活性成分在 TCMSP 中以 OB  $\geq 30\%$ , DL  $\geq 0.18$  为条件筛选相关靶点;于有机小分子生物活性数据库(PubChem)中获得猪去氧胆酸的 SMILES 表达式,输入 Swiss Target Prediction,以 Probability  $> 0$  为条件预测猪去氧胆酸的靶点。

以上所有靶点使用 Uniprot 校正为注释的官方基因,去重后即得 QKL 潜在靶点。

**1.2.5 NAFLD 靶点预测** 于人类基因数据库(Gene Cards)、DisGeNET、比较毒理基因组学数据库(CTD, The Comparative Toxicogenomics Database)中,以“Non-alcoholic fatty liver disease”为关键词,检索相关靶点,去重后即得 NAFLD 潜在靶点。

**1.2.6 “QKL-靶点-NAFLD”网络构建** 对 QKL 潜在靶点及 NAFLD 潜在靶点取交集,即得 QKL 可能作用于 NAFLD 的交集靶点。并用 Cytoscape 3.7.1 构建“QKL-靶点-NAFLD”的“药物-靶点-疾病”网络。

**1.2.7 蛋白相互作用(PPI, protein-protein interaction)网络的构建** 上传交集靶点于相互作用基因/蛋白质检索工具(String, Search Tool for Recurring Instances of Neighbouring Genes),设置物种为人,置信区间为 0.9,并隐藏网络断开的节点,获得蛋白互作信息后导入 Cytoscape 3.7.1 构建 PPI 网络。

**1.2.8 基因本体(GO, Gene Ontology)功能富集与京都基因与基因组百科全书(KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)通路富集分析** 上传交集靶点于 DAVID(Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery)数据库,设置物种为人,进行 GO 功能及 KEGG 通路富集分析,以伪发现率(FDR, false discovery rate)  $< 0.05$  进行筛选,获得 GO 功能中分子功能(MF, molecular function)、细胞组分(CC, cell components)、生物学过程(BP, biological process)条目以及 KEGG 富集通路,选取排名前 5 的 GO 功能分析结果及排名前 20 的 KEGG 通路绘制气泡图,并采用在线软件微生信进行可视化分析。

**1.2.9 QKL 治疗 NAFLD 的分子对接分析** 以“QKL-靶点-NAFLD”网络中排名靠前、重复成分及复方单体成分为条件进行筛选,获得槲皮素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、异欧前胡素、黄芩苷、猪去氧胆酸 7 种成分作为研究重点,并从 Pubchem 下载 SDF 格式的 3D 结构。以 KEGG 通路富集的关键靶点(AMPK、PI3K、AKT、mTOR)作为核心靶点,于蛋白质结构数据库(PDB, Protein Data Bank)下载核心靶点蛋白结构,导入薛定谔分子对接软件 Maestro。设置范德华力、静电相互作用及氢键等参数,使用“Ligand Docking”模块对接分子,对接完成之后保存氢键、疏水作用和静电相互作用等

信息。

**1.2.10 qPCR检测** HepG2细胞共设5组,分别为空白组、模型组、清开灵口服液低中高( $\varphi=0.5\%, 1\%, 2\%$ )剂量组,培养48 h后进行实验分析。细胞给药干预48 h之后,使用Trizol试剂提取细胞内的RNA,经逆转录反应合成cDNA,进行qPCR反应。qPCR程序如下:95 °C预变性5 min;随后进行45个循环的扩增反应(95 °C变性10 s,60 °C退火10 s,72 °C延伸10 s);熔解曲线分析阶段依次为95 °C 10 s,65 °C 60 s,97 °C 1 s;最终37 °C冷却30 s。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算细胞GAPDH、SREBP1、ACCI、FASN、PI3K、AKT和mTOR的mRNA相对表达量。相关引物序列见表1。

表1 qPCR引物  
Table 1 qPCR primers

基因	方向	序列(5'→3')
GAPDH	正向	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG
	反向	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
SREBP1	正向	CGGAACCATCTTGGCAACAGT
	反向	CGTTCTCAATGGCGTTGT
ACCI	正向	TCACACCTGAAGACCTTAAAGCC
	反向	AGCCCACACTGCTTGTACTG
FASN	正向	CACAGGGACAACCTGGAGTT
	反向	ACTCCACAGGTGGGAACAAG
PI3K	正向	TGGACGGCGAAGTAAAGCATT
	反向	AGTGTGACATTGAGGGAGTCG
AKT	正向	TCCTCCTCAAGAATGATGGCA
	反向	GTGCGTTCGATGACAGTGGT
mTOR	正向	GCAGATTTGCCAACTATCTTCGG
	反向	CAGCGGTAAAAGTGTCCTCC

**1.2.11 Western Blot实验** 细胞给药干预48 h之后终止培养,加入4 °C预冷PBS清洗,每孔加入200  $\mu$ L预冷的裂解液,刮下细胞至EP管中。离心吸取上清,按照BCA试剂盒的说明进行蛋白定量,改变Loading Buffer体积至各组细胞蛋白至相同质量,上样量为30  $\mu$ g,以80 V 30 min的条件电泳,转膜2 h后,室温封闭2 h。一抗4 °C孵育过夜,二抗室温孵育2 h后显影曝光。

**1.2.12 统计学分析** 实验数据以mean  $\pm$  SEM表示,用t test对组内空白组与模型组进行比较,模型组与给药组以One-way ANOVA进行多组比较, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 QKL对细胞脂质累积模型中脂质累积的影响

在HepG2和AML-12细胞脂质累积模型中,脂质多以大液滴形式蓄积。经 $\varphi=0.5\%, 1\%, 2\%$  QKL处理48 h后,脂质累积模型的脂滴体积和数量均显著减少。QKL可呈剂量依赖性降低脂质累积模型内的TG含量,结果见图1。其中, $\varphi=2\%$ 剂量的QKL降低脂质累积效果与2 mmol/L剂量的MET相当。

### 2.2 成分与疾病靶点

通过对TCMSP和BATMAN-TCM数据库进行筛选并去除重复值,获得QKL有效成分68个,相关靶点583个。通过对GeneCards、DisGeNET、CTD(inference score $\geq 100$ )的结果进行汇总并去除重复值,共获得NAFLD相关靶点3 128个。利用在线软件Venny 2.1.0,获得QKL治疗NAFLD主要作用靶点380个(图2)。

### 2.3 “QKL-靶点-NAFLD”网络构建

将380个交集靶点上传至STRING数据库,并将得到的蛋白互作预测结果导入Cytoscape 3.7.1进行重构,最终得到327个节点和1 551条边的网络图(增强出版:附图1)。

### 2.4 QKL与NAFLD交集核心靶点PPI网络构建与分析

使用Cytoscape 3.7.1构建“QKL-靶点-NAFLD”网络,该网络共有454个节点,2 189条边,提示QKL通过多化合物、多靶点、多途径发挥治疗NAFLD的作用(增强出版:附图2)。

### 2.5 GO及KEGG富集分析

结果表明,靶点基因主要参与细胞增殖的正向调节、RNA聚合酶II启动子转录的正调控等生物过程,与酶结合、蛋白质结合等细胞组分相关,分子功能有胞外空间、RNA聚合酶II转录因子复合物等;KEGG通路富集表明,QKL可能通过TNF信号通路、PI3K-Akt信号通路、AMPK信号通路等发挥治疗NAFLD的作用。结果如图3所示。

### 2.6 分子对接结果

AMPK、PI3K、AKT和mTOR蛋白原经典配体的自由能分别为-34.31 kJ/mol(Babkov et al., 2019)、-30.25 kJ/mol(Barsanti et al., 2014)、-47.99 kJ/mol(März et al., 2013)和-11.48 kJ/mol(Frech et al., 1997)。如图4所示,槲皮素和山柰酚与PI3K对接的自由能均低于原经典配体,AMPK与槲皮素对接的自由能与原经典配体接近,提示

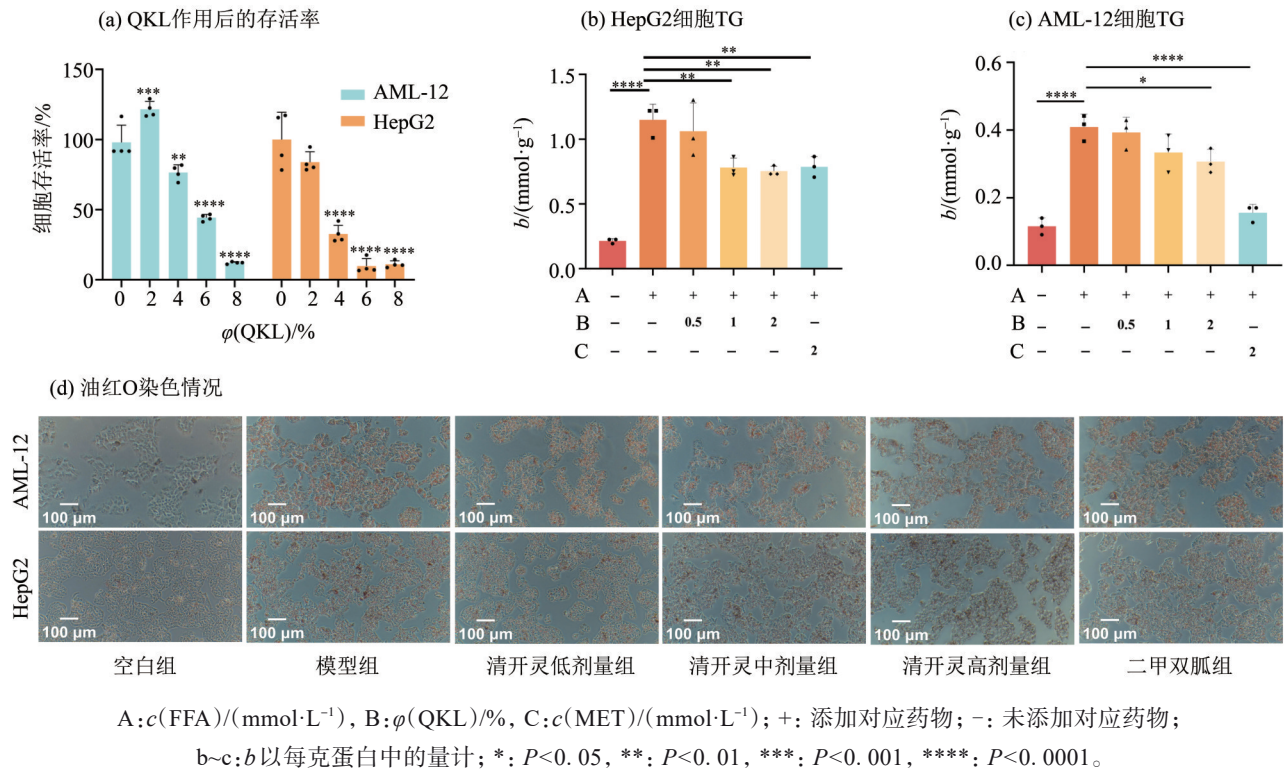


图1 QKL对细胞脂质累积的作用效果

Fig. 1 Effect of QKL on cellular lipid accumulation

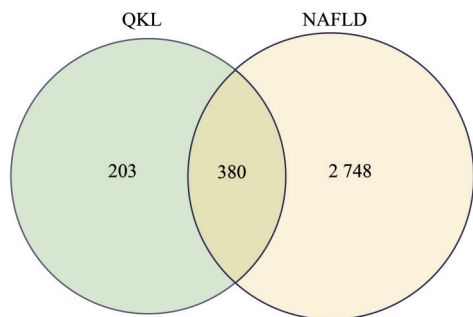


图2 QKL与NAFLD的交集靶点

Fig. 2 Intersection targets of QKL and NAFLD

QKL的活性成分具有潜在的结合活性。其中,猪去氧胆酸作为清开灵口服液的“君药”之一,与AMPK、PI3K、AKT和mTOR蛋白具有好的结合能力,对其对接进行可视化分析,结果如图5所示。

### 2.7 QKL对HepG2细胞脂质累积模型中AMPK-SREBP1信号通路的影响

采用qPCR和Western Blot法,检测给予 $\varphi=0.5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$ 的QKL处理48 h后,HepG2细胞脂质累积模型中AMPK-SREBP1信号通路的核酸及蛋白表达水平。结果显示,与模型组相比,给药组细胞中AMPK-SREBP1信号通路的SREBP1、ACCI和FASN mRNA的表达量显著降低( $P < 0.01$ ),

p-AMPK/AMPK的蛋白表达水平呈剂量依赖性上调,SREBP1蛋白的表达水平显著下调( $P < 0.05$ ),其中,给药后的SREBP1基因和蛋白的变化趋势一致,结果如图6所示。QKL多成分多靶点的特性与SREBP1调控网络的复杂性协同作用,可能是其剂量-效应呈非线性关系的原因。

### 2.8 QKL对HepG2细胞脂质累积模型中PI3K-AKT-mTOR信号通路的影响

给予 $\varphi=0.5\%$ ,  $1\%$ ,  $2\%$ 的QKL处理48 h后,HepG2细胞脂质累积模型PI3K-AKT-mTOR信号通路中PI3K、AKT和mTOR的基因表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT和p-mTOR/mTOR蛋白表达水平显著降低( $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性,结果如图7所示。

## 3 讨论

NAFLD是一种与代谢相关的肝脏疾病,其主要的病理特征就是肝细胞中过度的脂质累积(Szczepaniak et al., 2005)。截至2022年,NAFLD的全球患病率超过32.4%(Riazi et al., 2022),已然对全球公共卫生产生严重挑战。近年来,中医药在NAFLD治疗中展现出独特的潜力(胡涛等, 2024),已有文献报道,QKL中金银花、板蓝根和栀子提取

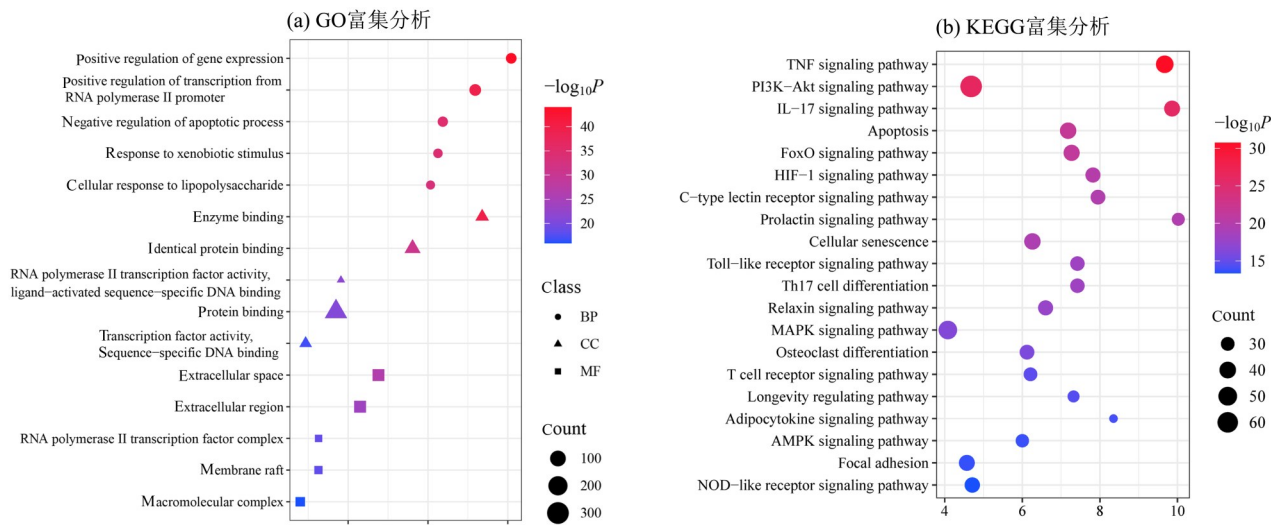


图 3 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of GO and KEGG

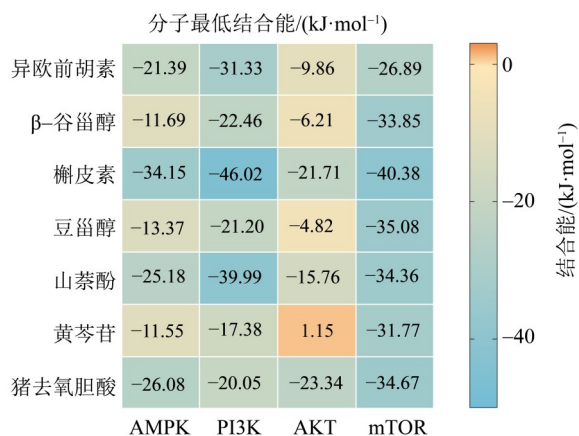


图 4 异欧前胡素等 7 种活性成分与关键靶点分子对接结果得分

Fig. 4 Scores of docking results of 7 active ingredients including isoimperatorin and core target molecules

物和黄芩苷、猪去氧胆酸单体成分可以通过抑制脂质累积和改善脂质代谢, 发挥治疗 NAFLD 的作用。

相较于汀类药物, MET 作为细胞脂质累积研究的阳性对照药物更具优势, 因其直接激活 AMPK 通路抑制脂质合成并促进脂肪酸氧化, 协同改善胰岛素抵抗 (Li et al., 2011), 且无肝毒性干扰 (严曾豪等, 2021)。由于 HepG2 细胞的脂肪变性易感性与原代人肝细胞相当, 且 AML-12 细胞在肝脏疾病研究中被广泛应用, 本实验采用 HepG2 细胞和 AML-12 细胞构建细胞脂质累积模型。经 0.5 mmol/L FFA 诱导之后, 模型组的脂质多以大液滴形式蓄积, 油红 O 染色和 TG 含量结果显示, 模型组与空白组的差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 提示模型构建成功,

给予 QKL 处理 48 h 后, 模型组细胞的脂滴数量和 TG 含量显著降低。其中,  $\varphi = 2\%$  QKL 干预脂质累积效果与 2 mmol/L MET 相当。为解析 QKL 的复杂成分和揭示其整体调控 NAFLD 的机制, 本研究采用网络药理学预测 QKL 改善 NAFLD 的作用机制, 结果提示, QKL 的作用靶点显著富集于炎症-代谢调控网络、缺氧应激响应和细胞命运调控相关通路。有意思的是, PI3K-AKT 信号通路和 AMPK 信号通路皆属于炎症-代谢调控网络, 且存在密切联系。

脂质累积是 NAFLD 最主要的病理特征, 是一个多靶点、多通路参与的复杂过程, 涉及 PI3K-AKT-mTOR (促进脂质合成)、AMPK-SREBP1 (抑制脂质合成)、PPAR (调节脂肪酸氧化)、肝脏 X 受体 (调控胆固醇代谢)、FXR (调节胆汁酸代谢) 和碳水化合物响应元件结合蛋白 (促进糖脂转化) 等多条机制通路 (Xu et al., 2022)。其中, AMPK-SREBP1 通路和 PI3K-AKT-mTOR 信号通路相互拮抗, 共同调节肝脏的脂质代谢。AMPK 在细胞和生理水平上调节全身的能量代谢 (Carling, 2004)。当细胞内的 AMP 与 ATP 比值升高时, AMPK  $\alpha$  亚基 Thr172 位点磷酸化, 导致 AMPK 激活。活化的 AMPK 可直接结合并磷酸化 SREBP-1c Ser372 位点, 抑制其核裂解、核移位及转录活性, 从而下调 ACC、FASN 和 SCD1 等相关脂肪酸合成基因的表达 (Zhang et al., 2009), 减少 TG 及胆固醇合成, 缓解 NAFLD 相关脂质蓄积 (Wang et al., 2017)。肝细胞内游离脂肪酸增加会促进脂质合成和抑制脂肪酸氧化, 进而引发肝脏脂肪累积异常产生胰岛素抵抗 (Li et al., 2018), 而胰

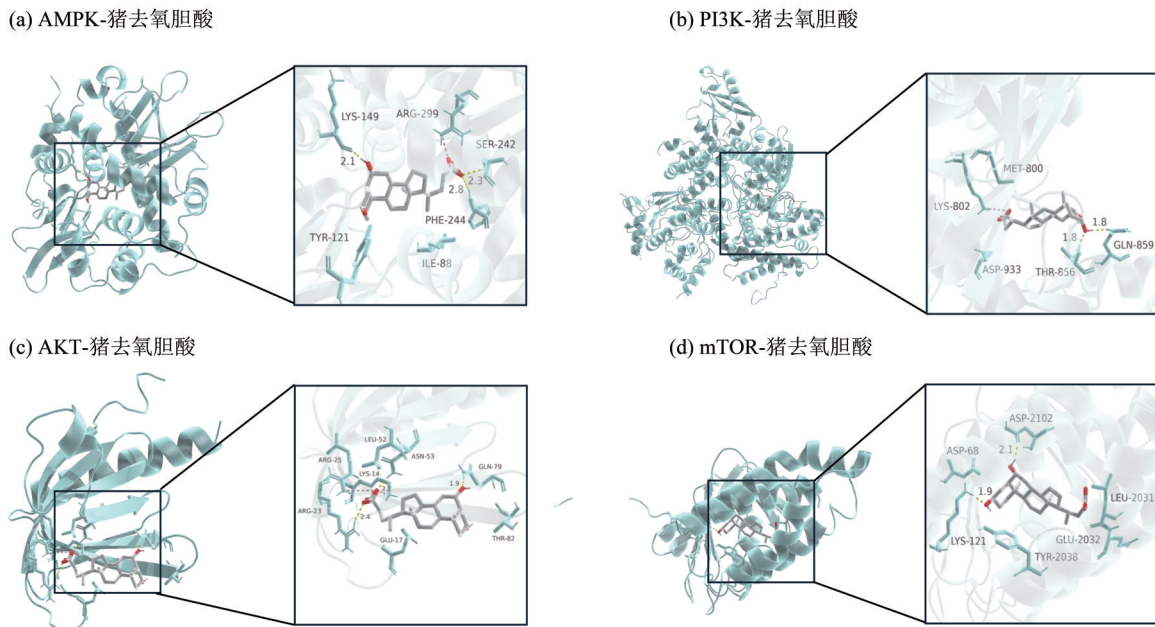
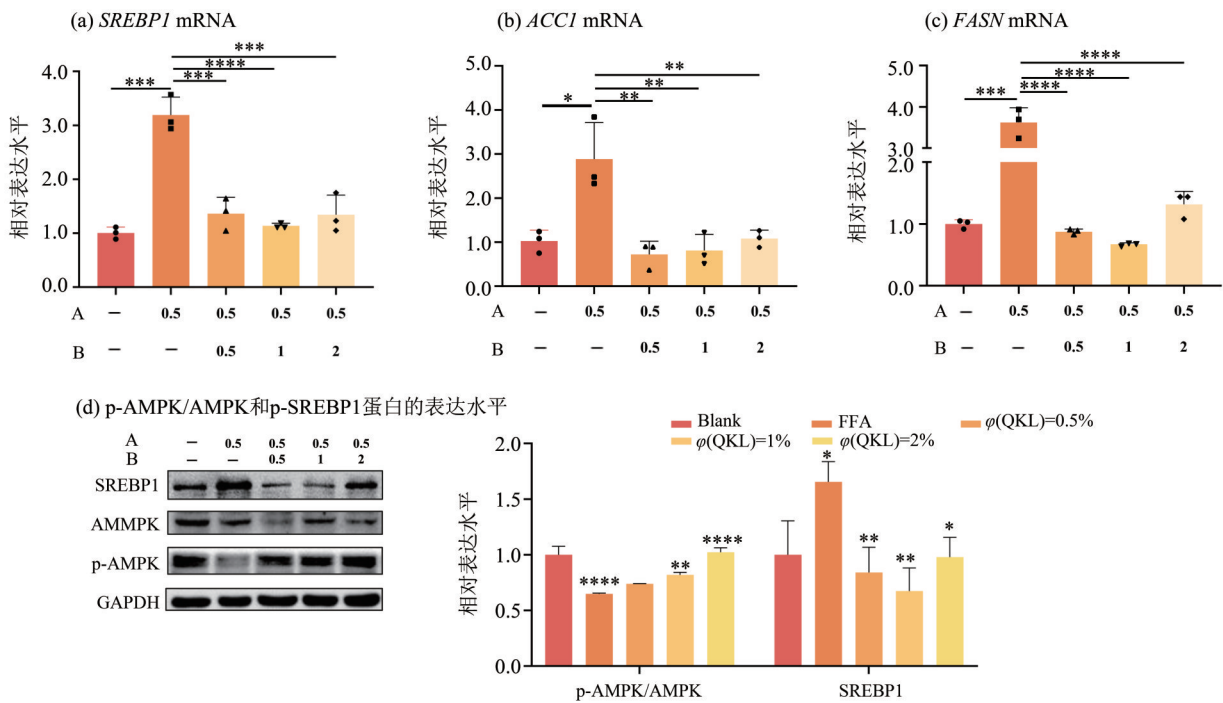


图5 猪去氧胆酸与核心靶标分子对接结果

Fig. 5 Docking results of hyodeoxycholic acid and core target molecules



A:  $c(\text{FFA})/(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$ , B:  $\varphi(\text{QKL})/\%$ ; -: 未添加对应药物;

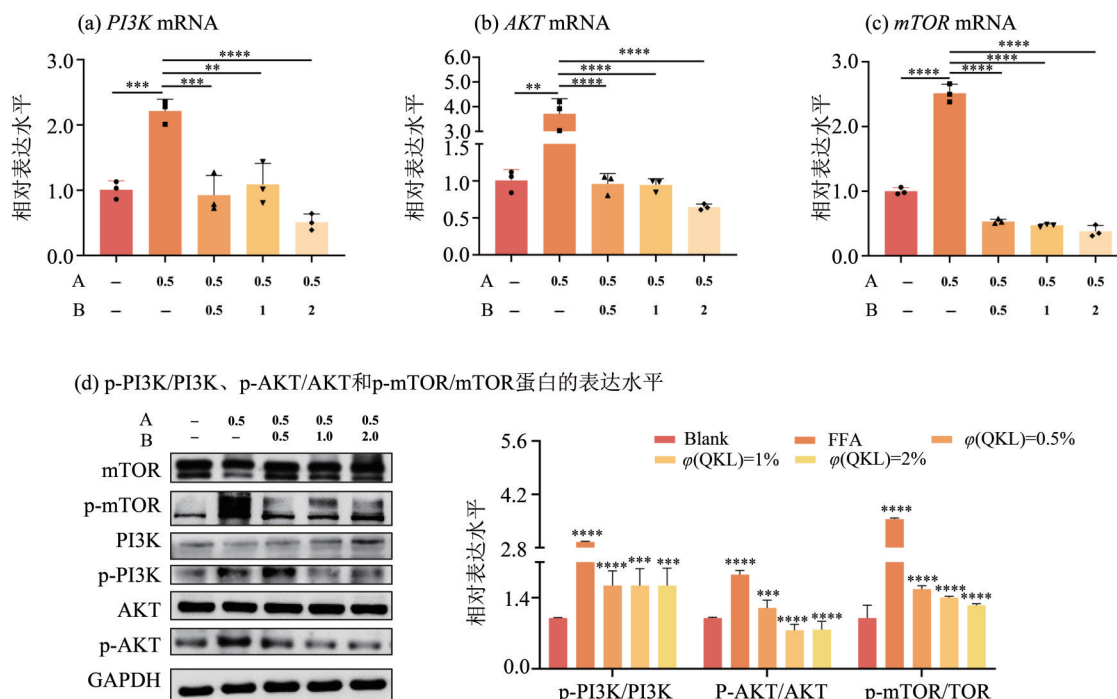
\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

图6 QKL对HepG2细胞脂质累积AMPK-SREBP1信号通路的影响

Fig. 6 Effect of QKL on lipid accumulation and the AMPK-SREBP1 pathway in HepG2 Cells

胰岛素抵抗程度与PI3K-AKT-mTOR信号通路的受损程度相关,且PI3K-AKT信号通路下游的mTORC1可以激活SREBP1,促进脂质合成基因的表达,加重肝脏脂质累积(Ardestani et al., 2018)。因此,PI3K-AKT-mTOR也被认为是治疗NAFLD的潜在靶点之

一。本研究的分子对接结果表明,QKL的核心活性成分槲皮素、山柰酚、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇、异欧前胡素、黄芩苷、猪去氧胆酸均可与4个关键核心靶点AMPK、PI3K、AKT、mTOR稳定结合。体外细胞基因和蛋白检测结果显示,QKL干预后,HepG2细胞



A: c(FFA)/(mmol·L<sup>-1</sup>), B:  $\varphi$ (QKL)/%; -: 未添加对应药物;

\*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ , \*\*\*\* :  $P < 0.0001$ .

图7 QKL对HepG2细胞脂质累积中PI3K-AKT-mTOR信号通路的影响

Fig. 7 Effect of QKL on lipid accumulation and the PI3K-AKT-mTOR pathway in HepG2 Cells

脂质累积模型中关键脂质合成基因 *SREBP1*、*ACCI*、*FASN* mRNA 的表达显著下调 ( $P < 0.01$ ), p-AMPK/AMPK 的蛋白表达量呈剂量依赖性增加, SREBP1 蛋白的表达量显著降低 ( $P < 0.05$ ); QKL 呈剂量依赖性降低 PI3K-AKT-mTOR 信号通路中 *PI3K*、*AKT* 和 *mTOR* 的基因表达水平,

以及其磷酸化蛋白 p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT 和 p-mTOR/mTOR 的表达水平。

综上所述, QKL 对 FFA 诱导的 HepG2 和 AML-12 细胞脂肪变性具有改善作用, 其作用机制可能与 QKL 激活 AMPK-SREBP1 和抑制 PI3K-AKT-mTOR 信号通路有关。

## 参考文献:

- 胡涛, 王冰钰, 苏薇薇, 等, 2024. 基于 UPLC-Zone TOF-MS/MS 联合网络药理学探讨脉复生防治 NAFLD 作用 [J]. 中山大学学报(自然科学版中英文), 63(5): 73-82.
- 李军祥, 白宇宁, 王允亮, 2025. 非酒精性脂肪性肝病中西医结合诊疗专家共识(2025年) [J]. 中国中西医结合消化杂志, 33(4): 339-350.
- 韦迎春, 张海燕, 杨明, 2011. 清开灵口服液临床应用的进展 [J]. 江西中医学院学报, 23(2): 92-94.
- 吴锦云, 蔡凯伟, 陈红英, 等, 2024. HPLC-MS/MS 法同时测定清开灵口服液中 7 种成分的含量 [J]. 中药新药与临床药理, 35(2): 257-262.
- 严曾豪, 张伟健, 吴灏, 等, 2021. 脑心通胶囊的物质基础及其改善代谢紊乱相关疾病作用及机制的研究进展 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 60(3): 12-18.
- ARDESTANI A, LUPSE B, KIDO Y, et al, 2018. mTORC1 signaling: A double-edged sword in diabetic  $\beta$  cells [J]. Cell Metab, 27(2): 314-331.
- BABKOV D A, ZHUKOVSKAYA O N, BORISOV A V, et al, 2019. Towards multi-target antidiabetic agents: Discovery of biphenyl-benzimidazole conjugates as AMPK activators [J]. Bioorg Med Chem Lett, 29(17): 2443-2447.
- BARSANTI P A, AVERSA R J, JIN X, et al, 2014. Structure-based drug design of novel potent and selective tetrahydropyrazolo [1, 5-a] pyrazines as ATR inhibitors [J]. ACS Med Chem Lett, 6(1): 37-41.
- CARLING D, 2004. The AMP-activated protein kinase

- cascade—A unifying system for energy control [J]. *Trends Biochem Sci*, 29(1): 18–24.
- DEPRINCE A, HAAS J T, STAELS B, 2020. Dysregulated lipid metabolism links NAFLD to cardiovascular disease [J]. *Mol Metab*, 42: 101092.
- ESLAM M, SANYAL A J, GEORGE J, et al, 2020. MAFLD: A consensus-driven proposed nomenclature for metabolic associated fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 158(7): 1999–2014.e1.
- FRECH M, ANDJELKOVIC M, INGLEEY E, et al, 1997. High affinity binding of inositol phosphates and phosphoinositides to the pleckstrin homology domain of RAC/protein kinase B and their influence on kinase activity [J]. *J Biol Chem*, 272(13): 8474–8481.
- HU Q, ZHANG W, WU Z, et al, 2021. Baicalin and the liver-gut system: Pharmacological bases explaining its therapeutic effects [J]. *Pharmacol Res*, 165: 105444.
- KUANG J, WANG J, LI Y, et al, 2023. Hyodeoxycholic acid alleviates non-alcoholic fatty liver disease through modulating the gut-liver axis [J]. *Cell Metab*, 35(10): 1752–1766.e8.
- LI S, WANG X, ZHANG J, et al, 2018. Exenatide ameliorates hepatic steatosis and attenuates fat mass and FTO gene expression through PI3K signaling pathway in non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Braz J Med Biol Res*, 51(8): e7299.
- LI Y, XU S, MIHAYLOVA M M, et al, 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice [J]. *Cell Metab*, 13(4): 376–388.
- MÄRZ A M, FABIAN A K, KOZANY C, et al, 2013. Large FK506-binding proteins shape the pharmacology of rapamycin [J]. *Mol Cell Biol*, 33(7): 1357–1367.
- RIAZI K, AZHARI H, CHARETTE J H, et al, 2022. The prevalence and incidence of NAFLD worldwide: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 7(9): 851–861.
- SZCZEPANIAK L S, NURENBERG P, LEONARD D, et al, 2005. Magnetic resonance spectroscopy to measure hepatic triglyceride content: Prevalence of hepatic steatosis in the general population [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288(2): E462–E468.
- WANG L F, WANG X N, HUANG C C, et al, 2017. Inhibition of NAMPT aggravates high fat diet-induced hepatic steatosis in mice through regulating Sirt1/AMPK $\alpha$ /SREBP1 signaling pathway [J]. *Lipids Health Dis*, 16(1): 82.
- WANG L, CHEN G, WU S, et al, 2022. Genipin improves lipid metabolism and sperm parameters in obese mice via regulation of miR-132 expression [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 54(9): 1278–1288.
- XU X, POULSEN K L, WU L, et al, 2022. Targeted therapeutics and novel signaling pathways in non-alcohol-associated fatty liver/steatohepatitis (NAFL/NASH) [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1): 287.
- ZHANG B B, ZHOU G, LI C, 2009. AMPK: An emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome [J]. *Cell Metab*, 9(5): 407–416.
- ZHANG Y, ZHANG Z, ZHANG Y, et al, 2022. Baicalin promotes the activation of brown and white adipose tissue through AMPK/PGC1 $\alpha$  pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 922: 174913.

(责任编辑 张 冰)