

# 基于网络药理学和动物实验探讨橙皮素对非酒精性脂肪性肝病的保护作用

付祎珑<sup>1</sup>, 林益游<sup>1</sup>, 刘福才<sup>1</sup>, 陈林<sup>1</sup>, 邱剑楠<sup>1</sup>, 梁霄<sup>1,2\*</sup>, 窦晓兵<sup>1\*</sup>

(1. 浙江中医药大学生命科学学院, 浙江 杭州 310005; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院普外科, 浙江省肝脏疾病多组学精准诊治重点实验室, 浙江 杭州 310016)

**摘要:** **目的** 基于网络药理学和动物实验探讨橙皮素对非酒精性脂肪性肝病的保护作用。**方法** 通过 SwissTarget Prediction、pharmMapper、TargetNet 等数据库收集橙皮素的潜在靶点, 并通过 GeneCards、OMMI、DrugBank 等数据库筛选非酒精性脂肪性肝病的靶点, 构建“药物-靶点-疾病”网络; 基于蛋白质-蛋白质相互作用网络进行基因本体功能和通路富集分析, 并通过分子对接验证核心靶点。采用高脂饮食诱导非酒精性脂肪性肝病小鼠模型, 橙皮素 (150 mg/kg) 干预 4 周, 进行葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验。检测血清和肝脏代谢指标, HE 染色和油红 O 染色观察肝组织病理变化, Western blot 法检测 MAPK 信号通路相关蛋白表达。**结果** 网络药理学分析显示, 橙皮素与非酒精性脂肪性肝病共有 150 个交集靶点, 可能通过 MAPK 信号通路改善非酒精性脂肪性肝病, 并筛选得到可能的关键靶点 EGFR、ESR1、HSP90AA1、SRC、BCL2 等。体内实验结果表明, 橙皮素能改善非酒精性脂肪性肝病小鼠的代谢紊乱、肝脏炎症及脂质沉积, 降低血清 TC、TG、ALT、AST 水平及肝组织 TC、TG 水平, 改善胰岛素抵抗及葡萄糖耐量, 抑制 MAPK 信号通路中 p38、ERK1/2、JNK 磷酸化, 减轻肝脏损伤。**结论** 橙皮素与多种核心靶点具有较高的亲和力, 可能通过多靶点调控机制发挥对非酒精性脂肪性肝病的改善作用, 其机制可能与抑制 MAPK 信号通路、调节脂质代谢平衡及抑制炎症反应有关。

**关键词:** 橙皮素; 非酒精性脂肪性肝病; MAPK 信号通路; 网络药理学; 分子对接

**中图分类号:** R285.5; R966

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2025)09-3116-08

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.09.046

非酒精性脂肪性肝病是一种由代谢紊乱引起的慢性肝脏疾病, 通常伴随胰岛素抵抗、肥胖、遗传易感等多种因素<sup>[1-2]</sup>。其发病机制错综复杂, 主要特征为肝细胞内脂质异常堆积, 进而引发代谢应激及炎症反应<sup>[3-4]</sup>。在疾病进展过程中, 非酒精性脂肪性肝病可由单纯性脂肪肝逐渐演变为非酒精性脂肪性肝炎, 并进一步发展为肝纤维化、肝硬化, 甚至肝细胞癌<sup>[5]</sup>。近年来, 非酒精性脂肪性肝病的全球患病率持续上升, 中国在内的多数亚洲国家已超过 28%<sup>[6-8]</sup>, 预计至 2030 年, 总患病人口将增长 22%<sup>[9]</sup>。然而, 目前临床上尚无该病的特效药物<sup>[10]</sup>, 现有的治疗手段主要依赖于生活方式干预和辅助药物。因此, 开发有效安全的抗非酒精性脂肪性肝病新药具有重要意义。

橙皮素是广泛存在于芸香科植物中的黄酮类化合物, 是陈皮、枳壳等中药的主要生物活性成分<sup>[11]</sup>。研究表明, 橙皮素具有抗炎、抗氧化、降血脂等作用<sup>[12-14]</sup>, 在代谢性疾病中展现出潜在的治疗效果<sup>[15]</sup>。然而, 橙皮素对非酒精

性脂肪性肝病的具体作用机制尚不明确, 其作用靶点和参与的信号通路仍有待进一步研究。

本研究利用网络药理学结合分子对接及动物实验探究橙皮素干预非酒精性脂肪性肝病的潜在作用靶点和信号通路, 并验证其作用机制, 以期开发新型非酒精性脂肪性肝病药物提供科学依据。

## 1 材料

1.1 动物 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 24 只, 8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005], 饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (浙) 2021-0012]。本研究经浙江中医药大学实验动物管理与伦理委员会批准 (伦理审查号 IACUC-20240408-01)。所有动物均饲养于标准动物房中, 环境温度 23~24 ℃, 相对湿度 50%~70%, 12 h/12 h 昼夜循环, 自由摄取食物和水。

**收稿日期:** 2025-04-08

**基金项目:** 国家自然科学基金 (82374102, 82472718); 国家卫健委-浙江省卫生健康重大科技计划重大项目 (WKJ-ZJ-2407); 浙江省科技厅“领雁”计划项目 (2024C03049); 杭州市科技局农业与社会发展领域重点项目 (20231203A09)

**作者简介:** 付祎珑 (2000—), 女, 硕士生, 从事中药单体治疗非酒精性脂肪性肝病的作用机制研究。E-mail: 18970882008@163.com

\* **通信作者:** 梁霄 (1975—), 男, 博士, 教授, 从事构建肝癌全程个体化精准诊疗体系研究。E-mail: srshlx@zju.edu.cn  
窦晓兵 (1977—), 男, 博士, 教授, 从事代谢性疾病的分子机制及中医药防治研究。E-mail: xbdou77@163.com

1.2 试剂与药物 橙皮素(上海融禾医药科技发展有限公司, 货号THT279); 60 kcal% 脂肪热量高脂鼠粮[戴茨生物科技(无锡)有限公司, 货号HF60]; 无水葡萄糖(厦门辉耀兴业科技有限公司, 货号G6172); 重组人胰岛素(北京索莱宝科技有限公司, 货号11061-68-0); 甘油三酯、总胆固醇试剂盒(南京建成生物工程研究所有限公司, 货号A110-1-1、A111-1-1); 苏木素染液、伊红染液、无蛋白快速封闭液(武汉赛维尔生物科技有限公司, 货号G1004、G1002、G2052); 改良油红O试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司, 货号C0158S、P0011); 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(江苏康为世纪生物科技股份有限公司, 货号CW2200S、CW2383S); RIPA裂解液、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG抗体(武汉博士德生物工程有限公司, 货号AR0105、BA1054、BA1050); 三色预染蛋白Marker、PAGE凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司, 货号WJ103、PG112); ERK1/2、p38、JNK、p-ERK1/2、p-p38、p-JNK、 $\beta$ -actin抗体(杭州华安生物技术有限公司, 货号ET1601-29、ET1702-65、ET1601-28、ET1603-22、ER2001-52、ET1609-42、M1210-2、HA1033)。

1.3 仪器 7020全自动生化分析仪(日本Hitachi公司); CM1900冰冻切片机、RM2235石蜡切片机(德国Leica公司); 安稳<sup>+</sup>血糖仪、血糖试纸(三诺生物传感股份有限公司); 数字切片扫描仪(日本Hamamatsu公司); 酶标仪[珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司]; Western blot电泳仪、转膜仪、SDS-PAGE凝胶系统、成像系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学记分子对接分析

2.1.1 橙皮素靶点的收集 以“hesperetin”为关键词, 从SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)、pharmMapper (<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>)、TargetNet (<http://targetnet.scbdd.com/>) 数据库中获取橙皮素的潜在靶点。

2.1.2 非酒精性脂肪性肝病疾病靶点的收集 以“non-alcoholic fatty liver disease”为关键词, 在GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://db.idrblab.org/ttd/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)、PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.org/ttd/>) 数据库检索非酒精性脂肪性肝病疾病靶点。

2.1.3 “药物-靶点-疾病”网络构建 将橙皮素靶点与非酒精性脂肪性肝病靶点导入Cytoscape 3.7.1软件, 获得交集靶点, 构建橙皮素抗非酒精性脂肪性肝病的“药物-靶点-疾病”网络。

2.1.4 蛋白质相互作用网络构建及核心靶点收集 将交集靶点导入STRING数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构

建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 并采用Cytoscape 3.8.0软件将其可视化。

2.1.5 GO功能和KEGG通路富集分析 采用R 4.2.1软件的ggplot2包对橙皮素抗非酒精性脂肪性肝病的潜在靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 生物功能富集分析和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。

2.1.6 分子对接 将PPI蛋白互作网络中度值排序前5位的靶点与橙皮素进行分子对接。从PubChem数据库中获取橙皮素活性成分的SDF文件, 将其作为配体文件。从PDB数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 获取核心靶点蛋白质受体文件。通过AutoDockTool软件对蛋白质受体进行去水、加氢等操作, AutoDockVina软件进行分子对接并计算结果, 结合能小于-5 kJ/mol, 说明橙皮素和关键靶点具有较好的结合活性。采用PyMOL软件对结果进行可视化。

### 2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药 24只小鼠适应性喂养1周后, 随机分为对照组、模型组、橙皮素组 (150 mg/kg), 每组8只。对照组小鼠给予普通饲料, 模型组与橙皮素组小鼠给予高脂饲料, 连续喂养12周, 构建非酒精性脂肪性肝病模型。每周称定小鼠体重, 从第8周后开始灌胃给予相应药物10 mL/kg, 对照组与模型组小鼠灌胃给予等体积生理盐水, 每天1次, 连续4周。

2.2.2 葡萄糖耐量试验和胰岛素耐量试验 采集小鼠尾静脉血, 检测空腹血糖, 记为0 min血糖值。葡萄糖耐量试验实验开始前禁食16 h, 每只小鼠腹腔注射葡萄糖溶液2.5 g/kg; 胰岛素耐量试验实验开始前禁食4 h, 每只小鼠腹腔注射胰岛素溶液0.75 U/kg。注射后分别于30、60、120 min采集尾静脉血, 检测血糖值, 绘制葡萄糖耐量曲线及胰岛素耐量曲线, 并计算曲线下面积。

2.2.3 血清和肝组织取材及肝脏指数检测 给药4周后, 所有小鼠禁食不禁水12 h, 麻醉后取血, 室温下静置30 min, 4℃、3 000 r/min离心15 min, 收集血清, 保存于-80℃冰箱中。取血样完成后, 处死小鼠, 迅速剥离肝脏, 称定肝质量, 并计算肝脏指数, 公式为肝脏指数 = (肝质量/体质量) × 100%。取各组小鼠相同部位少量肝组织, 4%多聚甲醛固定, 用于后续病理学检测, 剩余部分-80℃保存。

2.2.4 血液和肝脏生化指标检测 采用全自动生化分析仪检测小鼠血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平和丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性。取肝组织, 根据相关试剂盒说明书操作, 检测小鼠肝组织TC、TG水平。

2.2.5 HE染色观察肝组织病理学变化 肝组织经4%多聚甲醛固定后, 全自动组织脱水浸蜡, 石蜡包埋, 切取4  $\mu$ m切片; 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, 苏木素染色5 min, 返蓝、伊红染色3 min, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 封片,

显微镜下观察肝组织病理变化。并通过非酒精性脂肪性肝病活动度评分 (NAFLD activity score, NAS) 评价各组小鼠肝组织脂肪变性、小叶炎症、气球样变程度。脂肪变性、小叶炎症、气球样变程度越重, NAS 评分越高, 具体评分标准见表 1。

表 1 NAS 评分标准

组织学标志	评分标准	评分/分
脂肪变性	<5%	0
	5%~33%	1
	33%~66%	2
	>66%	3
小叶炎症	无	0
	<2	1
	2~4	2
气球样变	无	0
	不明显	1
	显著	2

2.2.6 油红 O 染色观察肝组织脂质沉积情况 将置于 4% 多聚甲醛中固定的肝组织取出, 浸于冰冻包埋剂中, 制备 8 μm 冰冻切片, 室温下晾干 5 min, 油红 O 染色工作液染色 15 min, 蒸馏水清洗, 75% 乙醇分化 10 s, 苏木素染色液复染核 30 s, 甘油明胶封片, 显微镜下观察肝脏脂质沉积情况, 分析油红 O 染色阳性面积。

2.2.7 Western blot 法检测肝组织 MAPK 信号通路相关蛋白表达 取 20 mg 新鲜肝组织, 用液氮研磨成粉末, 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解, 提取蛋白, BCA 法检测蛋白含量, 取等质量蛋白进行变性, 加入蛋白上样缓冲液后冷冻保存备用。制备 SDS-PAGE 凝胶, 上样, 电泳, 转移至 NC 膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, 分别加入 ERK1/2、p38、JNK、p-ERK1/2、p-p38、p-JNK、抗体 (1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜, 次日加入二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, 增强化学发光法显影, 以 β-actin 为内参, 通过 Image Lab 软件进行灰度值分析。

2.3 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理, 数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理学及分子对接结果

3.1.1 橙皮素与非酒精性脂肪性肝病的交集靶点 共获取橙皮素靶点 154 个, 非酒精性脂肪性肝病靶点 37 387 个, 两者交集靶点 150 个, 即为橙皮素抗非酒精性脂肪性肝病的潜在作用靶点, 见图 1。

3.1.2 “药物-靶点-疾病”网络构建 药物、疾病、共同靶点均以节点形式区分, 相互关系以边形式展示, 见图 2。

3.1.3 PPI 网络构建 由图 3 可知, 橙皮素改善非酒精性脂肪性肝病的核心靶点依据度值排序分别为 EGFR、ESR1、

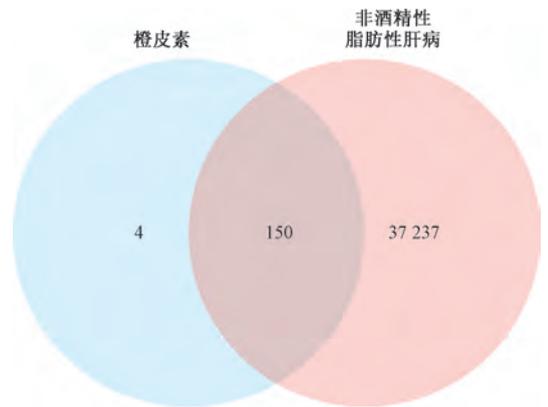


图 1 橙皮素-非酒精性脂肪性肝病交集靶点韦恩图

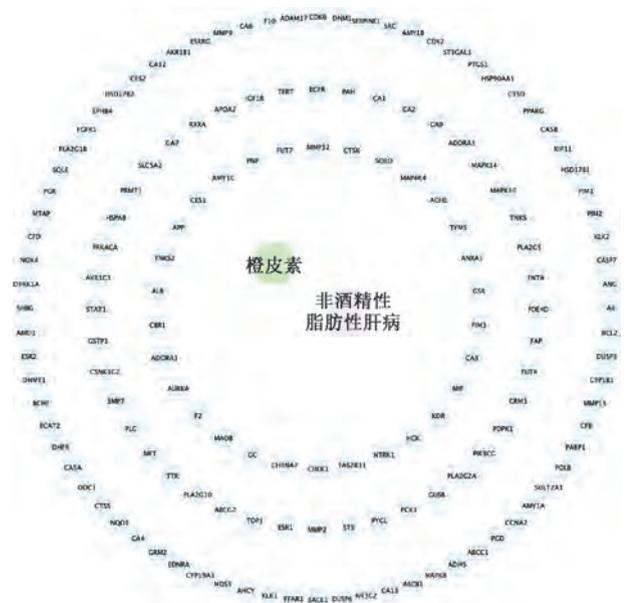


图 2 橙皮素-非酒精性脂肪性肝病“药物-靶点-疾病”网络

HSP90AA1、SRC、BCL2。这些共有靶点可能在橙皮素抗非酒精性脂肪性肝病中发挥关键作用。

3.1.4 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析 GO 功能富集分析结果显示, 生物过程 (biological process, BP) 主要涉及单碳代谢过程、对外来刺激的反应、对淀粉样蛋白的反应、对肽的反应、对氧化应激的反应; 细胞组分 (cellular component, CC) 主要涉及富 ficolin-1 颗粒腔、囊腔、细胞质囊腔相关组分; 分子功能 (molecular function, MF) 主要涉及碳酸盐脱水酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、水解酶活性等功能, 见图 4。KEGG 信号通路富集分析结果显示, 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病的改善作用机制主要涉及 MAPK 信号通路、雌激素信号通路、氮代谢、凋亡、FoxO 信号通路, 这些信号通路与非酒精性脂肪性肝病发病过程中的脂代谢、凋亡、自噬、炎症等反应密切相关, 见图 5。

3.1.5 分子对接 将橙皮素和 PPI 网络中排名前五的靶点 (EGFR、ESR1、HSP90AA1、SRC、BCL2) 进行分子对接, 结果显示, 橙皮素与五者的结合能分别为 -7.3、-7.6、

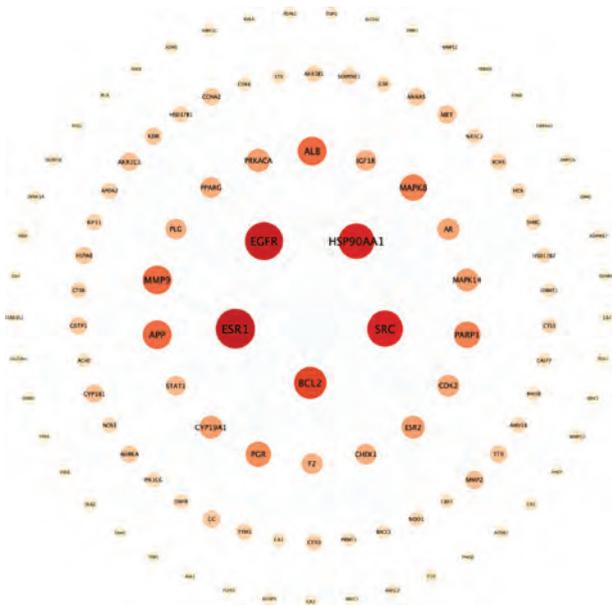


图3 橙皮素-非酒精性脂肪性肝病主要靶点 PPI 网络

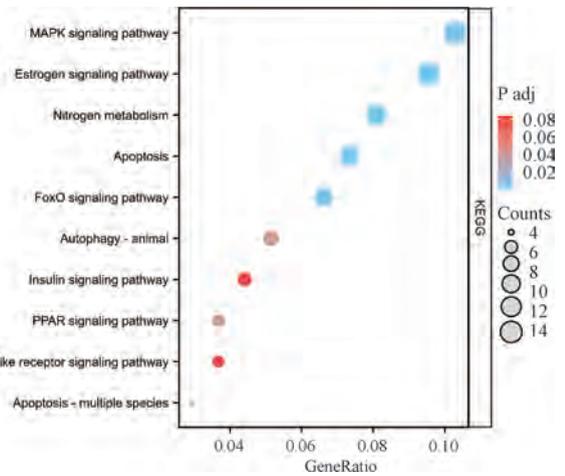


图5 橙皮素干预非酒精性脂肪性肝病靶点 KEGG 信号通路富集分析气泡图

-7.7、-7.1、-7.6 kJ/mol, 均小于-5 kJ/mol, 表明橙皮素和核心靶点均具有良好的结合能力。提示橙皮素可能通过这些关键靶点发挥抗非酒精性脂肪性肝病的作用, 见图6。

### 3.2 动物实验

3.2.1 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠体质量、肝质量及肝脏指数的影响 如图7所示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量、肝质量及肝脏指数升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 橙皮素组小鼠体质量、肝质量及肝脏指数降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明橙皮素能抑制高脂饮食诱导非酒精性脂肪性肝病小鼠体质量、肝质量及肝脏指数增加。

3.2.2 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠葡萄糖耐量和胰岛素抵抗的影响 如图8所示, 与对照组比较, 模型组小鼠的血糖曲线升高, 曲线下面积增加 ( $P < 0.01$ ), 表明模型组小鼠存在葡萄糖耐量减退及胰岛素抵抗; 与模型组比较, 橙皮素组小鼠血糖曲线降低, 曲线下面积缩小 ( $P < 0.01$ ), 表明橙皮素能够有效改善非酒精性脂肪性肝病引起的葡萄糖耐量并减轻胰岛素抵抗。

3.2.3 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠血清 TC、TG、ALT、AST 及肝组织 TC、TG 水平的影响 如图9所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清 TC、TG、ALT、AST 和肝组织 TC、TG 水平升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较,

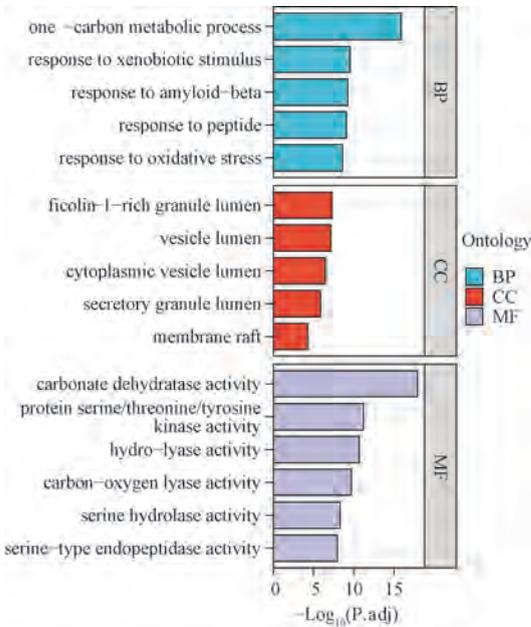


图4 橙皮素干预非酒精性脂肪性肝病靶点 GO 功能富集分析柱状图

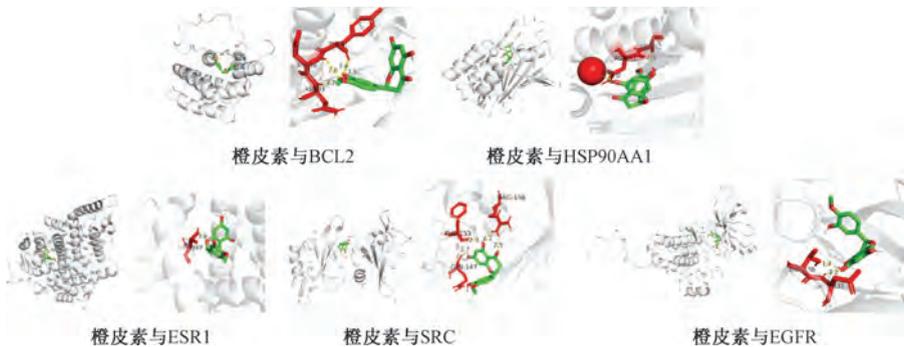
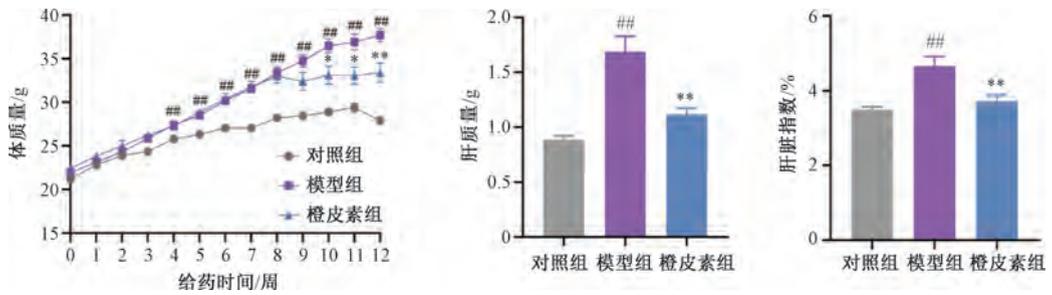
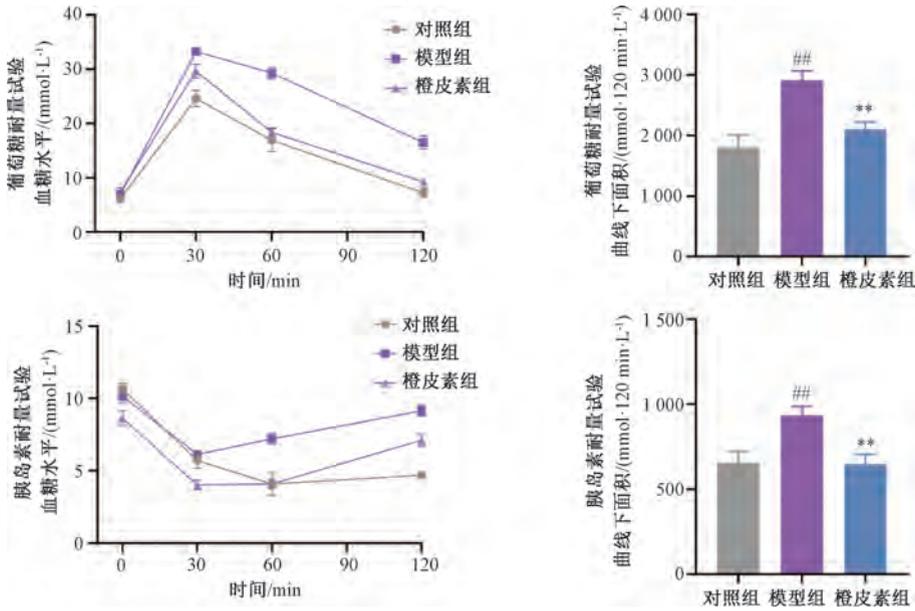


图6 橙皮素与核心靶点分子对接图



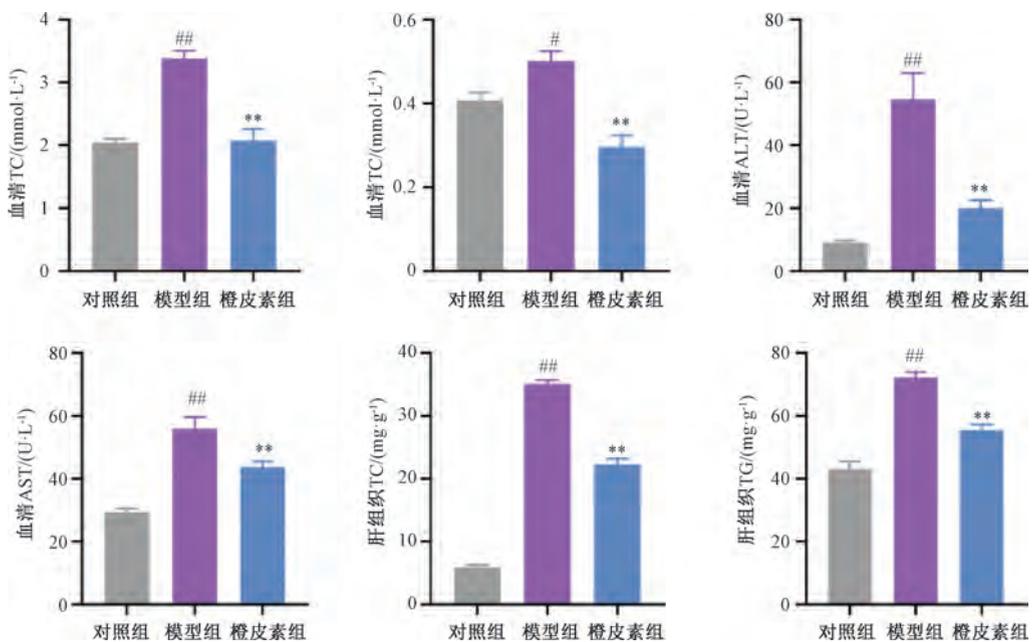
注：与对照组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ 。

图7 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠体质量、肝质量和肝指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



注：与对照组比较，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

图8 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠葡萄糖耐量和胰岛素抵抗的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )



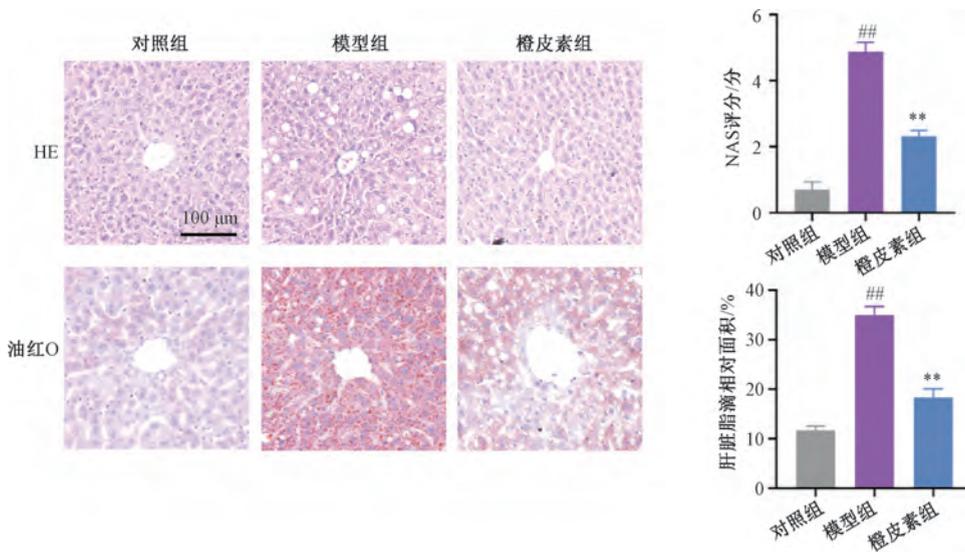
注：与对照组比较，<sup>#</sup> $P < 0.05$ ，<sup>##</sup> $P < 0.01$ ；与模型组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

图9 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠血清 TC、TG、ALT、AST 及肝组织 TC、TG 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

橙皮素组血清 TC、TG、ALT、AST 和肝组织 TC、TG 水平降低 ( $P < 0.01$ ), 提示橙皮素对高脂饮食导致的脂质代谢紊乱和肝损伤具有调节作用。

3.2.4 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠肝组织病理变化和脂肪堆积的影响 如图 10 所示, 对照组小鼠肝细胞形态正常, 肝小叶结构紧密排列, 无明显脂质变性或炎性细胞浸润; 模型组小鼠肝细胞出现严重的结构紊乱、大量脂质堆积及脂肪空泡现象, 且伴有炎细胞浸润; 橙皮素组小鼠

肝细胞形态结构改善, 脂质堆积和脂肪空泡减少, 几乎没有炎性细胞的存在。与对照组比较, 模型组小鼠 NAS 评分升高 ( $P < 0.01$ ), 脂滴相对面积增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 橙皮素组小鼠 NAS 评分降低 ( $P < 0.01$ ), 脂滴相对面积减少 ( $P < 0.01$ )。提示橙皮素能有效抑制肝脏脂肪变性和堆积, 降低脂肪变性程度, 同时缓解由高脂饮食诱导的肝脏炎症反应, 从而改善肝损伤。

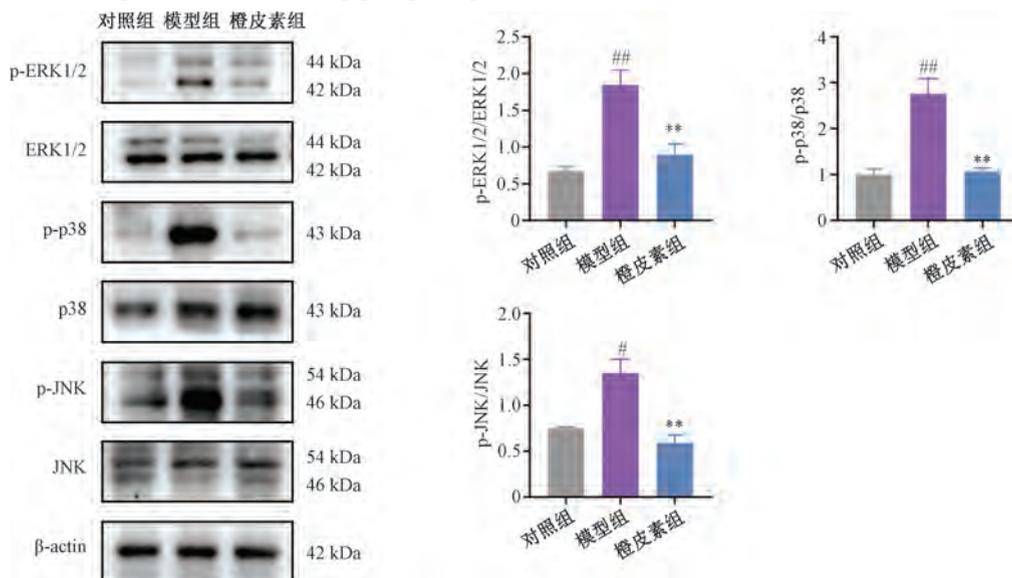


注: 与对照组比较, <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 10 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠肝组织病理变化和脂肪堆积的影响 ( $\times 100$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

3.2.5 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠肝组织 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 如图 11 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织 p-ERK1/2/ERK1/2、p-p38/p38、p-JNK/JNK 比值升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 橙皮素组小鼠肝组织 p-ERK1/2/ERK1/2、p-p38/p38、p-

JNK/JNK 比值降低 ( $P < 0.01$ ), 表明橙皮素可能通过抑制 MAPK 信号通路, 降低炎症因子和氧化应激反应, 缓解肝细胞损伤和脂质代谢异常, 从而发挥抗非酒精性脂肪性肝病的作用。



注: 与对照组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ 。

图 11 橙皮素对非酒精性脂肪性肝病小鼠肝组织 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 4 讨论

随着全球肥胖和2型糖尿病患病率的不断上升,非酒精性脂肪性肝病已成为最常见的慢性肝病之一<sup>[16-17]</sup>,但目前缺乏针对性治疗措施,亟需探索新型药物靶点与治疗方案。近年来,天然产物在非酒精性脂肪性肝病治疗中的应用潜力显著<sup>[18]</sup>,橙皮素是广泛存在于柑橘类水果中的天然黄酮类化合物,具备广泛的药理活性<sup>[19-23]</sup>。然而,其治疗非酒精性脂肪性肝病的机制尚不明确,多集中于其抗氧化和抗炎特性的描述,而缺乏系统、深入的机制研究<sup>[24-25]</sup>。本研究通过网络药理学筛选橙皮素的潜在作用靶点,并结合非酒精性脂肪性肝病的疾病靶点,构建“药物-靶点-疾病”网络。结果表明,橙皮素可能通过多靶点、多途径发挥作用,其中MAPK信号通路尤为关键。分子对接分析发现,橙皮素可与EGFR、ESR1、HSP90AA1、SRC、BCL2等核心靶点结合,结合能均小于-5 kJ/mol,表明其具有较强的结合活性。GO和KEGG分析进一步揭示,橙皮素的作用机制涉及脂质代谢、氧化应激和炎症反应等多个生物过程。体内实验显示,橙皮素能降低非酒精性脂肪性肝病小鼠肝脏脂质沉积水平,并降低血清和肝组织TC、TG、ALT、AST等指标。同时,橙皮素能提高胰岛素敏感性,改善葡萄糖耐量,表现出良好的降脂及胰岛素抵抗作用。组织病理学结果表明,橙皮素能够减少肝脏中的脂质空泡及炎症细胞浸润,进一步验证其在改善脂质代谢紊乱及炎症反应方面具有较强的作用。

从分子机制角度来看,橙皮素通过与EGFR、ESR1、HSP90AA1、SRC、BCL2等靶点结合调控MAPK信号通路。EGFR是MAPK信号通路的上游关键受体,激活后通过RAS/RAF/MEK/ERK信号通路引发下游的信号级联反应<sup>[26]</sup>,在非酒精性脂肪性肝病中可能通过促进肝细胞的增殖和修复影响脂肪代谢<sup>[27-29]</sup>。ESR1作为雌激素受体,能通过ERK1/2调节肝脏脂肪沉积和抗氧化应激反应<sup>[30]</sup>,并通过抑制JNK和p38 MAPK信号通路减轻炎症反应<sup>[31]</sup>。HSP90AA1是一种分子伴侣蛋白,能够通过稳定MAPK通路中的关键激酶(如ERK、JNK、p38)来增强其活性,促进细胞的增殖、存活和应激反应<sup>[32-34]</sup>。SRC通过激活MAPK信号通路中的ERK、JNK和p38,调控细胞增殖、迁移和应激反应。在非酒精性脂肪性肝病中, SRC激酶可能通过MAPK信号通路加剧肝脏的脂肪沉积和纤维化<sup>[35-36]</sup>。BCL2在MAPK信号通路,特别是ERK1/2的调控下,延长细胞存活时间,抑制凋亡。在非酒精性脂肪性肝病中,MAPK信号通路的异常激活可能通过调节BCL2促进肝细胞的存活,导致脂肪沉积和肝脏纤维化<sup>[37-38]</sup>。Western blot结果显示,橙皮素能够抑制MAPK信号通路中p38、ERK1/2、JNK的磷酸化水平,提示其可能通过与EGFR、ESR1、HSP90AA1、SRC、BCL2等靶点的结合,从而抑制MAPK信号通路的激活,最终减少炎症反应、脂质堆积及肝细胞损伤。这些研究结果为橙皮素对非酒精性脂肪性肝病的干预作用提供了直接的实验验证,同时从分子机制层面说明

了橙皮素在抑制非酒精性脂肪性肝病中的潜在价值。

尽管本研究揭示了橙皮素在非酒精性脂肪性肝病治疗中的潜在作用机制,但仍存在一些局限性。网络药理学分析依赖于现有数据库,可能遗漏某些尚未发现的重要靶点。此外,尽管体内实验显示橙皮素在小鼠模型中具有良好作用,但在不同种属和人类患者中的适用性及安全性仍需进一步研究。未来的研究应重点关注橙皮素在大规模临床样本中的疗效评估,并通过多组学方法深入解析其多靶点调控机制。

综上所述,本研究通过网络药理学、分子对接及体内实验证实橙皮素可能通过抑制MAPK信号通路改善脂质代谢紊乱和炎症等发挥抗非酒精性脂肪性肝病的作用。本研究为橙皮素在非酒精性脂肪性肝病治疗中的应用提供了理论依据,同时为未来该病治疗药物的开发提供了新的思路。

## 参考文献:

- [1] Guo X Y, Yin X Z, Liu Z J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) pathogenesis and natural products for prevention and treatment[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(24): 15489.
- [2] 中华医学会肝病学分会. 代谢相关(非酒精性)脂肪性肝病防治指南(2024年版)[J]. *中华肝脏病杂志*, 2024, 32(5): 418-434.
- [3] Trépo E, Valenti L. Update on NAFLD genetics: from new variants to the clinic[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(6): 1196-1209.
- [4] Kim Y S, Kim S G. Endoplasmic reticulum stress and autophagy dysregulation in alcoholic and non-alcoholic liver diseases[J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26(4): 715.
- [5] Pouwels S, Sakran N, Graham Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a review of pathophysiology, clinical management and effects of weight loss[J]. *BMC Endocr Disord*, 2022, 22(1): 63.
- [6] Younossi Z M, Wong G, Anstee Q M, et al. The global burden of liver disease[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2023, 21(8): 1978-1991.
- [7] Mitra S, De A, Chowdhury A. Epidemiology of non-alcoholic and alcoholic fatty liver diseases[J]. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 2020, 5: 16.
- [8] Henry L, Paik J, Younossi Z M. the epidemiologic burden of non-alcoholic fatty liver disease across the world[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2022, 56(6): 942-956.
- [9] Le M H, Le D M, Baez T C, et al. Global incidence of non-alcoholic fatty liver disease: A systematic review and meta-analysis of 63 studies and 1, 201, 807 persons[J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 287-295.
- [10] Beiriger J, Chauhan K, Khan A, et al. Advancements in understanding and treating NAFLD: A comprehensive review of metabolic-associated fatty liver disease and emerging therapies[J]. *Livers*, 2023, 3(4): 637-656.
- [11] 冯旭, 曾鑫, 梁希瑶, 等. 橙皮素药理活性以及开发技术的研究进展[J]. *广东化工*, 2023, 50(22): 74-75.

- [12] 翟鑫铎, 金敏, 刘宇. 橙皮素通过 Nrf2-ARE 通路对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(12): 1803-1807.
- [13] 罗善超, 唐继仁. 橙皮素抑制氧化应激影响软骨细胞的炎症退变[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26): 4184-4188.
- [14] 来利红, 汪晓东, 杨兰, 等. 橙皮素调控 Nrf2/ARE 通路改善载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(5): 821-827.
- [15] 罗娟, 楼迪栋, 肖巧巧, 等. 橙皮素通过 Nrf2/HO-1 信号通路对非酒精性脂肪肝体外模型氧化应激的保护作用[J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 1-6.
- [16] Cho E L, Ang C Z, Quek J, et al. Global prevalence of non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes mellitus: an updated systematic review and meta-analysis[J]. *Gut*, 2023, 72(11): 2138-2148.
- [17] Paik J M, Kabbara K, Eberly K E, et al. Global burden of NAFLD and chronic liver disease among adolescents and young adults[J]. *Hepatology*, 2022, 75(5): 1204-1217.
- [18] Rinella M E. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review[J]. *J Am Med Assoc*, 2015, 313(22): 2263-2273.
- [19] Zobeiri M, Belwal T, Parvizi F, et al. Naringenin and its nano-formulations for fatty liver: cellular modes of action and clinical perspective[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2018, 19(3): 196-205.
- [20] Naeini F, Namkhah Z, Ostadrahimi A, et al. A comprehensive systematic review of the effects of naringenin, a citrus-derived flavonoid, on risk factors for nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Adv Nutr*, 2021, 12(2): 413-428.
- [21] Van De Wier B, Koek G H, Bast A, et al. The potential of flavonoids in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2017, 57(4): 834-855.
- [22] Li L G, Qin Y M, Xin X J, et al. The great potential of flavonoids as candidate drugs for NAFLD[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 114991.
- [23] Yu C Y, Han D, Yu J F, et al. Exploration of potential targets and mechanisms of naringenin in the treatment of nonalcoholic fatty liver disease through network pharmacology[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102(42): e35460.
- [24] Tan P L, Jin L, Qin X, et al. Natural flavonoids: Potential therapeutic strategies for non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1005312.
- [25] Akhlaghi M. Non-alcoholic fatty liver disease: beneficial effects of flavonoids[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(10): 1559-1571.
- [26] Liu Q, Yu S N, Zhao W H, et al. EGFR-TKIs resistance via EGFR-independent signaling pathways[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17: 1-9.
- [27] Stabrauskiene J, Kopustinskiene D M, Lazauskas R, et al. Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(7): 1686.
- [28] Fang J X, Han Y, Meng J, et al. Relationship between non-alcoholic fatty liver and progressive fibrosis and serum 25-hydroxy vitamin D in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *BMC Endocr Disord*, 2024, 24(1): 108.
- [29] Song C, Long X, He J B, et al. Recent evaluation about inflammatory mechanisms in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1081334.
- [30] Tripathi M, Yen P M, Singh B K. Estrogen-related receptor alpha: an under-appreciated potential target for the treatment of metabolic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(5): 1645.
- [31] Xiang D, Yang J Y, Xu Y J, et al. Estrogen cholestasis induces gut and liver injury in rats involving in activating PI3K/Akt and MAPK signaling pathways[J]. *Life Sci*, 2021, 276: 119367.
- [32] Biebl M M, Buchner J. Structure, function, and regulation of the Hsp90 machinery[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11(9): a034017.
- [33] Sun P B, Wang Y Y, Gao T, et al. Hsp90 modulates human sperm capacitation via the Erk1/2 and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2021, 19(1): 39.
- [34] Tavakoli S, Adili A, Akbari M, et al. Inhibition effect of Hsp90 on TLR2, TLR4, and MAPK signaling pathway in melanoma *in vitro*[J]. *Gene Rep*, 2021, 24: 101234.
- [35] Caner A, Asik E, Ozpolat B. SRC signaling in cancer and tumor microenvironment[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2021, 1270: 57-71.
- [36] Gao Z R, Zhao G S, Lv Y F, et al. Anoikis-resistant human osteosarcoma cells display significant angiogenesis by activating the Src kinase-mediated MAPK pathway[J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(1): 235-245.
- [37] Gelen V, Sengul E, Yildirim S, et al. The role of GRP78/ATF6/IRE1 and caspase-3/Bax/Bcl2 signaling pathways in the protective effects of gallic acid against cadmium-induced liver damage in rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2023, 26(11): 1326.
- [38] Wu B, Wang R, Li S N, et al. Antifibrotic effects of fraxetin on carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by targeting NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , MAPKs and Bcl-2/Bax pathways[J]. *Pharmacol Rep*, 2019, 71(3): 409-416.