

基于网络药理学及分子对接技术挖掘陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制

赵曼彤, 曹霞, 林佳子, 王晓, 杨梦茹, 梁蓝元, 岳义民, 钟璐阳, 杜杰勇, 余佳敏, 周彤, 李建华, 沈学娟, 王毅*, 舒尊鹏*

广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 通过网络药理学及分子对接技术挖掘陈皮通过理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的关键有效成分及作用靶点与通路, 以探究其可能的药效物质基础及潜在的分子机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库和分析平台对陈皮主要化学成分及相关作用靶点进行收集。从 GeneCards 数据库中检索理气、代谢相关脂肪性肝病相关靶点, 对理气靶点、代谢相关脂肪性肝病靶点与药效靶点进行映射, 得出陈皮理气功效治疗非酒精性脂肪肝的功效靶点。将功效靶点输入 STRING 数据库中得出蛋白相互作用 (PPI) 网络, 并用 Cytoscape 3.9.0 软件进行可视化。通过 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。筛选出陈皮关键活性化合物和靶基因后, 进行分子对接, 预测活性化合物与核心靶点的结合, 得出其可能作用的分子机制并构建“化合物-靶点-通路”网络图。**结果** 陈皮中共有 63 种活性成分和 540 个相应靶点, 理气靶点 580 个, 代谢相关脂肪性肝病靶点 478 个。最终筛选获得 56 个关键靶点和 16 个重要的信号通路, 包括磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B1 (Akt) 信号通路、Ras 信号通路、胰岛素信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路、核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路等。陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的主要成分为川陈皮素、柚皮素、橙皮苷等, 关键靶点为 Akt1、过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) α 、PPAR γ 、表皮生长因子受体 (EGFR) 等。分子对接显示柚皮素、川陈皮素、柚皮苷分别与 Akt1、PPAR γ 、原癌基因 c (JUN)、雌激素受体 α (ESR1)、PPAR α 结合良好。**结论** 陈皮中的柚皮素、川陈皮素、柚皮苷可能为其发挥理气功效的主要活性成分, 能够多靶点、多途径地调控氧化应激、炎症反应、脂质代谢等生物效应过程治疗非酒精性脂肪肝, 为陈皮在临床上治疗非酒精性脂肪肝的深入研究提供理论基础和科学依据。

关键词: 陈皮; 理气; 非酒精性脂肪肝; 网络药理学; 分子对接; 柚皮素; 川陈皮素; 柚皮苷

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)12-2945-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.006

Regulating qi mechanism of *Citrus Reticulata* for metabolic associated fatty liver disease based on network pharmacology and molecular docking techniques

ZHAO Man-tong, CAO Xia, LIN Jia-zi, WANG Xiao, YANG Meng-ru, LIANG Lan-yuan, YUE Yi-min, ZHONG Lu-yang, DU Jie-yong, YU Jia-min, ZHOU Tong, LI Jian-hua, SHEN Xue-juan, WANG Yi, SHU Zun-peng

Department of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To explore the key active ingredients and action targets and pathways of *Citrus Reticulata* in treatment of metabolic associated fatty liver disease through the effects of regulating qi by network pharmacology and molecular docking techniques, in order to investigate its possible pharmacological basis and potential molecular mechanisms. **Methods** The main chemical components and related targets of action of *Citrus Reticulata* were collected through the systematic pharmacology database

收稿日期: 2023-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (8217140778, 8214100583); 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2021A1515011697); 2021 年高校教师特色创新研究项目 (2021SWYY05)

作者简介: 赵曼彤, 女, 主要研究方向为中药及复方药效物质基础与作用机制研究及创新药物研究。E-mail: zhaomantong2021@163.com

***通信作者:** 舒尊鹏, 男, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为中药及复方药效物质基础与作用机制研究及创新药物研究。

E-mail: shuzunpen2010@163.com

王毅, 女, 讲师, 硕士, 主要研究方向为中国医学教育史及中药药性理论研究。E-mail: 784789997@qq.com

and analytical platform of traditional Chinese medicine. The disease related targets related to regulate qi and metabolic associated fatty liver disease were retrieved from the GeneCards database, and the regulate qi targets, metabolic associated fatty liver disease targets and pharmacodynamic targets were mapped to derive the efficacy targets of the regulate qi effect of *Citrus Reticulata* for the treatment of metabolic associated fatty liver disease. The efficacy targets were entered into the STRING database to derive a PPI interaction network and visualized using Cytoscape 3.9.0 software. The GO and KEGG pathways were enriched by the DAVID database. After screening the key active compounds and target genes of *Citrus Reticulata*, molecular docking was carried out to predict the binding of the active compounds to the core targets, to identify the possible molecular mechanisms of action and to construct a “compound – target – pathway” network map. **Results** A total of 63 active ingredients and 540 corresponding targets were identified in *Citrus Reticulata*, 580 in regulating qi and 478 in metabolic associated fatty liver disease. 56 Key targets and 16 important signaling pathways were identified, such as PI3K/Akt signaling pathway, Ras signaling pathway, insulin signaling pathway, AMPK signaling pathway, NF- κ B signaling pathway, etc. The main components of *Citrus Reticulata*'s regulating qi efficacy in treating metabolic associated fatty liver disease are nobiletin, naringenin, and hesperidin C, and the key targets are Akt1, PPAR α , PPAR γ , and EGFR. In addition, molecular docking showed that nobiletin, naringenin and hesperidin bound well to Akt1, PPAR γ , JUN, ESR1, and PPAR α , respectively. **Conclusion** Naringenin, nobiletin, and hesperidin in *Citrus Reticulata* may be the main active components for its rational qi effect, which can regulate the biological effect processes of oxidative stress, inflammatory response and lipid metabolism in treatment of metabolic associated fatty liver disease in a multi-target and multi-pathway manner, providing a theoretical basis and scientific basis for the in-depth study of *Citrus Reticulata* in treatment of metabolic associated fatty liver disease in clinical practice.

Key words: *Citrus Reticulata*; regulating qi; metabolic associated fatty liver disease; network pharmacology; molecular docking; naringenin; nobiletin; hesperidin

代谢相关脂肪性肝病是一种与胰岛素抵抗 (IR) 和遗传易感密切相关的代谢应激性肝损伤, 是排除酒精以外其他因素造成的肝脏弥漫性脂肪浸润, 包括单纯性脂肪肝及脂肪性肝炎, 其病理特征为肝细胞脂肪变与脂质蓄积^[1]。近年来, 随着我国人民生活水平的不断提高, 高糖、高脂的不良饮食以及习惯性长期久坐、缺乏运动的生活方式使人群患上代谢相关脂肪性肝病的风险提高^[2]。据统计, 近 10 年代谢相关脂肪性肝病的患病率逐年提高, 其在儿童中的患病率为 8%~12%, 在成人中的患病率为 25%~48%。已成为中国经济发达地区最常见的慢性肝病。代谢相关脂肪性肝病不仅会导致肝损伤, 同时也会导致 2 型糖尿病、心脑血管疾病等系列疾病的发生, 严重威胁我国人民的健康安全^[3-4]。由于其无特异性症状与体征的隐匿性, 迄今为止代谢相关脂肪性肝病的发病机制仍存在争议。目前, 西医临床上治疗代谢相关脂肪性肝病多采用调脂类药物, 但效果甚微^[5]。我国传统中医理论中未有“代谢相关脂肪性肝病”之名, 但根据临床病因可归属于“肝癖”“胁痛”“黄疸”“积聚”等范畴^[6], 其病机主要为过食肥甘厚腻之物, 或情志不调, 或久病体虚, 致使体内痰湿之邪大量聚集导致痰湿内阻, 阻碍脾气上升, 使脾失健运, 化脂膏痰浊于肝, 并留积于肝脏, 气机阻滞于中焦, 津液运行受阻, 气滞血瘀, 导致肾肝脾功能失调, 最终诱发代谢相

关脂肪性肝病^[7-8]。由此可知代谢相关脂肪性肝病的病变部位虽主要在肝, 但其治疗关键在脾。

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, 其种类分为“陈皮”和“广陈皮”^[9]。广陈皮为茶枝柑的栽培变种, 以广东新会 (茶枝柑的主产地) 所产的质量为优。陈皮含有丰富的黄酮、柠檬苦素、生物碱及挥发油等化合物^[10]。现代药理研究表明, 陈皮可用于咳嗽痰多、脾虚气滞^[11]。《本草分经》中记载“广陈皮, 辛、苦、温。入脾、肺气分, 能散、能和、能燥、能泻。利气调中, 消痰快膈, 宣通五脏, 统治百病”。《本草害利》中记载: “橘皮, 广东新会皮为胜, 陈久者良, 理气和中妙品”。《瘴症指南》中记载的“陈皮半夏汤”, 《宋·太平惠民和剂局方》中记载的“二陈汤”, 均以陈皮为主药, 发挥理气健脾、燥湿化痰之效, 为临床常用于调理中枢气机的要药。结合已有文献发现, 在治疗代谢相关脂肪性肝病的各类药物中, 理气中药的使用频次靠前; 在中药处方中, 陈皮的使用频率排名靠前^[12-13]。由此可见, 陈皮作为理气类药物对于代谢相关脂肪性肝病可能具有潜在的治疗作用。

目前已有研究表明陈皮具有改善代谢相关脂肪性肝病的作用, 但其发挥功效的药效物质基础与分子机制尚不明确^[14]。网络药理学是一个多学科的研究领域, 它将生物信息学、网络生物学与药理学

信息相整合,通过计算和药理学实验相结合的方法来预测药物在体内可能的作用机制^[15]。因此本实验利用网络药理学的方法,借助 TCMSP、GeneCards 等多个数据库对陈皮理气功效的活性化合物和潜在的蛋白靶点进行预测,采用 Cytoscape 构建“化合物-靶点-通路”网络,并利用分子对接技术验证陈皮中化合物与靶点的相互关系,探究陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的分子机制。

1 材料与方法

1.1 陈皮化合物、化合物潜在作用靶点、理气功效靶点、代谢相关脂肪性肝病疾病靶点的搜集

以“陈皮”为检索词,在中药系统药理学(TCMSP, <http://lsp.nwsuaf.edu.cn/tcmsp.php>)数据库中进行全成分的检索,通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库对陈皮现有靶点进行收集,利用 SwissTargetPrediction (<http://www.swiss-target-prediction.ch/>)数据库对陈皮潜在作用靶点进行预测,将所得成分与化合物靶点进行整合,得到药物成分与化合物靶点的数据集合。

以“regulating qi”“non-alcoholic fatty liver disease”为关键词,在 GeneCards (<http://www.GeneCards.org/>)数据库中进行检索,将获取的靶点结果进行筛选汇总后去重,得到理气功效与代谢相关脂肪性肝病疾病的相关靶点。

1.2 陈皮-理气映射靶点、陈皮-理气-代谢相关脂肪性肝病映射靶点的获取

将陈皮目标化合物靶点集合与理气靶点集合之后对二者进行映射,得到和陈皮-理气功效靶点;随后将陈皮-理气靶点与代谢相关脂肪性肝病靶点进行映射,得到陈皮-理气-代谢相关脂肪性肝病关键靶点。利用 JPOnline 在线作图工具,制作陈皮功效成分作用靶点与疾病靶点相交的 Venn 图。

1.3 陈皮理气功效关键化合物的筛选

参考以下条件对陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的主要功效成分进行筛选:(1)陈皮在《中国药典》2020 年版中规定的质量标志物;(2)通过 CNKI 文献数据库与 Web of Science 文献数据库检索陈皮理气功效与陈皮治疗代谢相关脂肪性肝病的活性化合物,得到陈皮目前已经被证明具有药理活性或在药物中含量较高的有效成分。

1.4 陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病蛋白相互作用(PPI)的分析及网络可视化的构建

将 56 个映射靶点输入到 STRING 数据库中,

选择“multiple proteins”,置信度蛋白参数评分值>0.4,去掉单一靶点进行分析,得到 PPI 网络关系图,并将数据结果以 TSV 格式导出。将输出数据导入 Cytoscape 3.9.0 中,对 PPI 网络进行可视化处理,并运用“network analyzer”功能对 PPI 网络进行拓扑参数的分析,根据 degree 值排序对节点的颜色深浅与大小进行调节,得到 PPI 关系可视化网络,挖掘网络中的核心作用靶点。

1.5 潜在靶标基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库是一个生物信息数据库,为大规模的基因蛋白提供综合的生物功能注释信息,将 1.2 项下所得到的药物-疾病靶点输入到 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库中进行靶点通路分析,筛选 $P<0.05$ 的通路作为分析的关键通路,并通过微生信在线作图工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)输出 GO、KEGG 通路富集分析气泡图。

1.6 陈皮理气功效的“化合物-靶点-通路”网络的构建

根据陈皮药物主要活性成分,及其所调控的关键靶点和靶点所关联的通路,利用 Cytoscape 3.9.0 构建“化合物-靶点-通路”网络。

1.7 分子对接

分子对接能够准确预测已知结构的小分子配体在合适蛋白配体的结合部位,并评估其结合模式和结合亲和力,是新药开发领域广泛使用的计算工具^[16]。本研究选择的候选蛋白来自于 PPI 网络中 degree 值较高的靶点,并在 RCSB-PDB 数据库中选择蛋白结构;选择对接的候选化合物为 1.3 项下得到的关键化合物,其三维结构来自 Pubchem 数据库。使用 AutoDock Vina 将这些功效化合物与蛋白对接,对接结果被导入 Pymol 进行三维可视化。

2 结果

2.1 陈皮潜在作用靶点与疾病靶点搜集情况

通过对 TCMSP、PubChem、SwissTarget Prediction 3 大数据库进行搜集与筛选共得到目标化合物 63 个,将其作为陈皮的候选成分,见表 1。进一步分析,陈皮中 63 个候选成分共获得了 540 个潜在作用靶点。另外,通过对 GeneCards 数据库进行代谢相关脂肪性肝病疾病靶点搜索,共得到 580 个与理气相关的靶点信息,478 个与代谢相关脂肪性肝病相关的靶点信息。

表 1 陈皮的活性成分

Table 1 Active ingredients of *Citrus Reticulata*

活性成分	OB/%	DL	活性成分	OB/%	DL
5-isopropyl-2-methylbicyclo[3.1.0]hex-2-ene	47.19	0.04	hepta-3	23.91	0.58
alpha-ocimene	21.43	0.02	naringin	6.92	0.78
cis-beta-ocimene	25.38	0.02	germacrene A	19.21	0.06
(L)-alpha-terpineol	48.80	0.03	tangeretin	21.38	0.43
decanal	29.81	0.02	citromitin	86.90	0.51
(-)-alpha-pinene	46.25	0.05	alpha-sinensal	57.79	0.06
neral	19.48	0.02	2-(2-butynyl)-cyclohexanone	47.78	0.03
()-2-carene	46.69	0.04	2,5,5-trimethylhepta-1,6-diene	44.34	0.02
(R)-linalool	39.80	0.02	2,6,11-trimethyldodecane	14.19	0.05
p-ocimene	15.06	0.02	22410-74-8	39.91	0.02
()-cuparene	38.26	0.07	(2S)-2-ethoxypentane	39.60	0.01
isovanillic acid	39.42	0.04	3-decyn-2-ol	39.33	0.02
antioxidant No. 33	26.74	0.06	isoprenol	65.72	0.00
DEP	52.19	0.07	4-acetylbenzoic acid	28.66	0.04
p-cymen-8-ol	32.26	0.03	6-hepten-1-ol	21.34	0.01
farnesane	3.13	0.04	cis-2,6-dimethyl-2,6-octadiene	21.10	0.01
[(3R)-3,7-dimethyloct-6-enyl] butanoate	21.03	0.06	eufin	0.26	0.01
O-thymol	43.28	0.03	nobiletin	61.67	0.52
(1S,5S)-1-isopropyl-4-methylenebicyclo[3.1.0]hexane	46.21	0.04	undecyl acetate	19.92	0.05
1-undecyne	33.99	0.02	neryl acetate	57.47	0.04
(E)-linalol pyranoxide	44.25	0.04	()-terpinen-4-ol	81.41	0.03
lauric acid	23.59	0.04	delta-amorphene	17.95	0.08
dodec-2-enal	31.95	0.03	vanillin	52.00	0.03
antak	16.85	0.02	β-terpineol	47.89	0.03
()-ledene	51.84	0.10	OYA	19.07	0.01
sitosterol	36.91	0.75	HMF	45.07	0.02
dimethyl anthranilate	65.87	0.04	p-coumaric acid	43.29	0.04
naringenin	59.29	0.21	stearic acid	17.83	0.14
hesperidin	13.33	0.67	(R)-p-menth-1-en-4-ol	32.16	0.03
5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one	47.74	0.27	hencosane	8.41	0.15
undecanal	22.90	0.03	(2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihydroxy-6-methylol-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methyl-tetrahydropyran-2-yl]oxy-tetrahydropyran-2-yl]oxy-5-hydroxy-2-(3-hydroxy-5-methoxy-phenyl)chroman-4-one	11.17	0.70
DIBP	49.63	0.13			

2.2 陈皮 - 理气 - 代谢相关脂肪性肝病映射靶点分析

为了进一步理解陈皮化合物成分与理气靶点之间的复杂关系,将陈皮目标化合物作用靶点与理气靶点经行映射,得到陈皮 - 理气映射靶点共 127 个,包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Akt1)、酪氨酸激酶 (SRC)、表皮生长因子受体 (EGFR)、原癌基因 c (JUN) 等;具有理气功效的药效成分 14 个,包括柚皮素 (naringenin)、川陈皮素 (nobiletin)、橘皮素 (tangeretin) 等,见图 1。将陈皮 - 理气靶点与 478 个代谢相关脂肪性肝病疾病靶点进行映射得到 56 个陈皮 - 理气 - 代谢相关脂肪性肝病关键靶点,包括 Akt1、VEGF、EGFR、JUN、雌激素受

体 α (ESR1) 等,见图 2。为了更好地展示药物作用靶点与疾病靶点之间的逻辑联系,本实验利用 VP Online 在线作图工具将陈皮药物靶点、理气功效靶点、代谢相关脂肪性肝病疾病靶点取交集,直观展示各个集合之间的特征关系,见图 3。

2.3 陈皮理气功效关键化合物的筛选

通过《中国药典》2020 年版和以发表文献^[17-18]中被证实陈皮理气功效与治疗代谢相关脂肪性肝病的药效成分,对 14 个候选成分进行筛选,发现陈皮发挥理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的有效成分主要为黄酮类物质,其中陈皮发挥理气功效的化合物为多甲氧基黄酮类物质 (包括川陈皮素、二氢川陈皮素、橘皮素) 和二氢黄酮类 (包括橙皮苷、

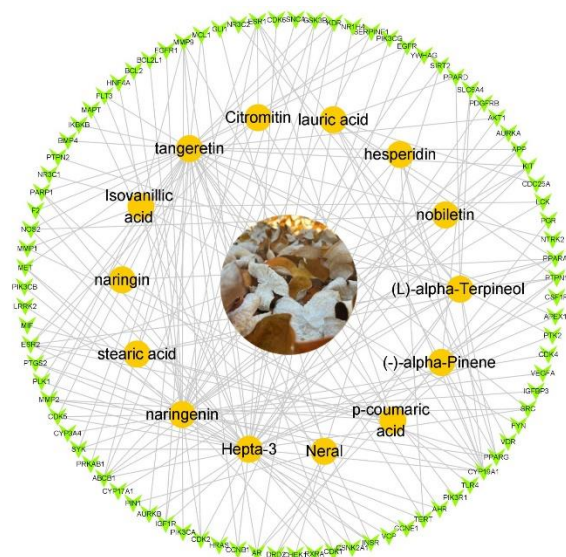


图 1 陈皮 - 理气药效成分、映射靶点图
Fig. 1 *Citrus Reticulata* - regulating *qi* pharmacological components, mapping targets

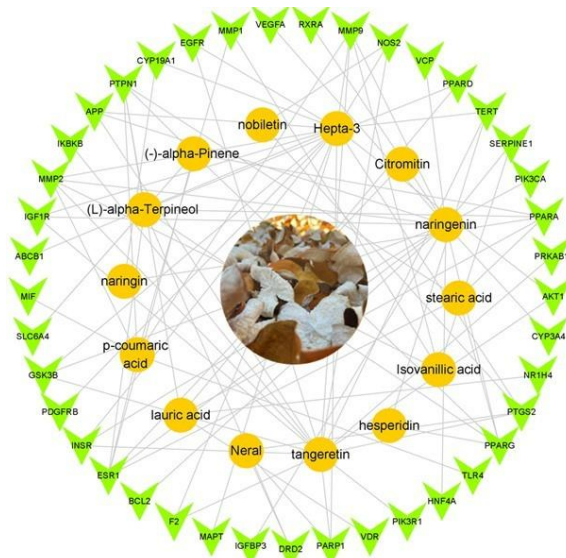


图 2 陈皮 - 理气 - 代谢相关脂肪性肝病药效成分、映射靶点图
Fig. 2 *Citrus Reticulata* - regulating *qi* - metabolic associated fatty liver disease pharmacodynamic components, mapping targets

柚皮素、柚皮苷^[18], 在具有理气功效的化合物中可治疗代谢相关脂肪性肝病的药效物质为川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柚皮素。

2.4 PPI 网络分析结果

将 STRING 数据库中得到的陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病靶点的 degree 值(表 2)。按照 degree 值大小进行排序, degree 值高的靶点有 Akt1、

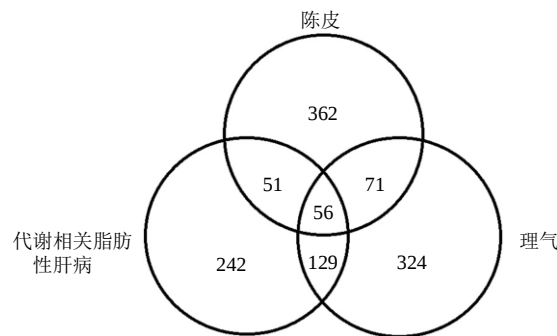


图 3 陈皮 - 理气 - 代谢相关脂肪性肝病交集靶点 Venn 图
Fig. 3 *Citrus Reticulata* - regulating *qi* - metabolic associated fatty liver disease intersecting target Venn diagram

表 2 陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病核心网络潜在靶点拓扑参数分析

Table 2 Analysis of potential target topology parameters of the core network of *Citrus Reticulata* in treatment of metabolic associated fatty liver disease by regulating *qi*

靶点	degree	介数中心度	紧密中心性
Akt1	49	0.135 981 197	0.901 639
VEGFA	41	0.034 804 177	0.797 101
ALB	41	0.061 853 121	0.797 101
EGFR	39	0.045 819 316	0.774 648
JUN	38	0.030 168 183	0.763 889
ESR1	36	0.042 997 699	0.733 333
CASP3	36	0.025 676 443	0.743 243
PPARG	34	0.050 989 116	0.723 684
MMP9	32	0.014 206 001	0.705 128
PTGS2	30	0.014 097 129	0.687 500
STAT1	29	0.013 149 392	0.679 012
MAPK8	28	0.013 352 288	0.670 732
TLR4	28	0.011 032 386	0.670 732
PPARA	26	0.029 793 941	0.654 762

EGFR、白蛋白 (ALB)、JUN、血管内皮生长因子 A (VEGFA)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 等, 可以认为这些靶点在陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病中起到主要的作用, 并在 Cytoscape 软件中建立 PPI 网络, 见图 4。

2.5 通路富集分析结果

在 DAVID 数据库中将陈皮理气功效治疗非酒精性的潜在作用靶点进行 KEGG、GO 通路富集分析。以 $P < 0.05$ 为筛选条件, GO 分析可通过富集

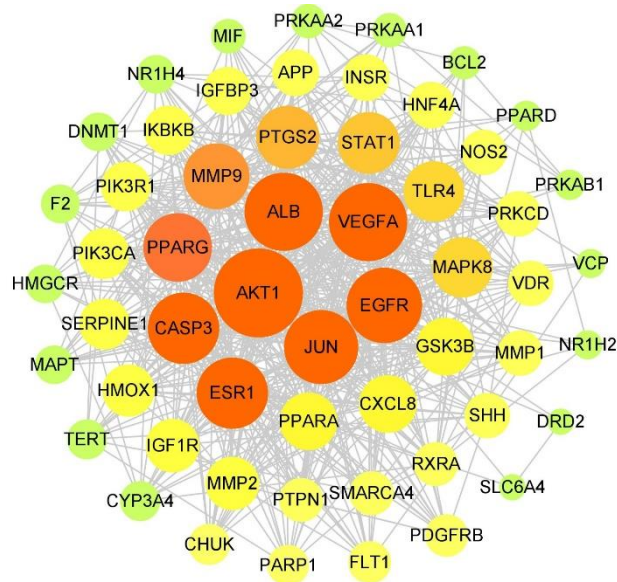


图 4 陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病 PPI 网络图

Fig. 4 PPI interaction network of *Citrus Reticulata* in treatment of metabolic associated fatty liver disease by regulating qi

得到蛋白靶点作用的生物过程 (BP), 分析结果提示陈皮发挥理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的 BP 显著富集在细胞凋亡、基因转录、葡萄糖稳态等 225 个 BP 中, GO 富集气泡图如图 5 所示。以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 得到关键的信号通路图如图 6 所示, KEGG 富集分析表示, 许多靶基因与细胞增殖凋亡通路, 如磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、Ras 信号通路; 免疫炎症相关通路, 如 Toll 样受体信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路; 胰岛素抵抗通路和代谢相关脂肪性肝病信号通路密切相关。

2.6 “化合物 - 靶点 - 通路”网络构建

将 5 个候选成分、56 个映射靶点与关键通路在 Cytoscape 软件中建立“化合物 - 靶点 - 通路”网络, 见图 7。其中川陈皮素、柚皮素、橙皮苷、柚皮苷、橘皮素为陈皮发挥理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的关键成分, Akt1、EGFR、ESR1、PPAR γ , PPAR α 、JUN、VEGFA 为陈皮发挥理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的关键靶点。

2.7 分子对接验证

将 PPI 网络筛选的 degree 值较大关键靶点与药物中对应的活性成分进行分子对接验证, 从 PDB 数据库获得所需文件: Akt1 (PDB ID: 6CCY)、PPAR γ (PDB ID: 2ATH)、PPAR α (PDB ID: 3VI8)、EGFR

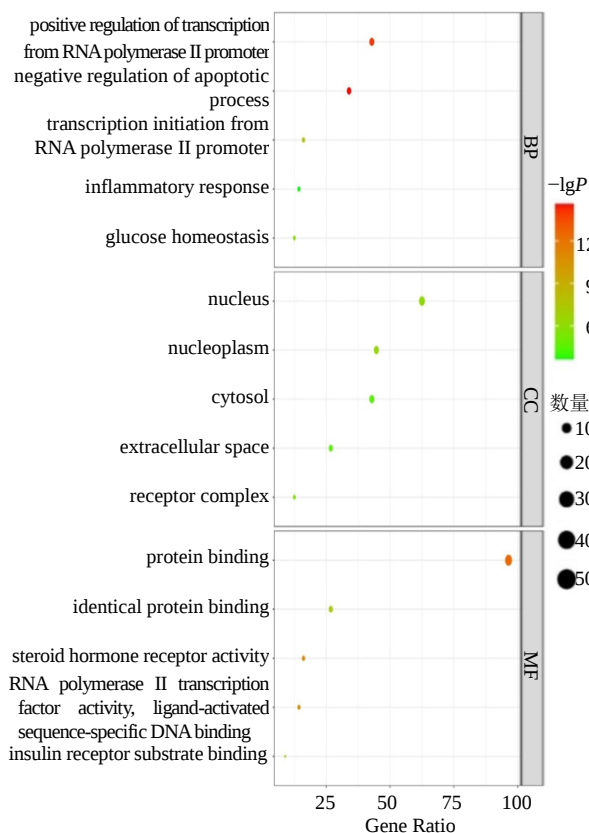


图 5 陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的 GO 富集分析气泡图

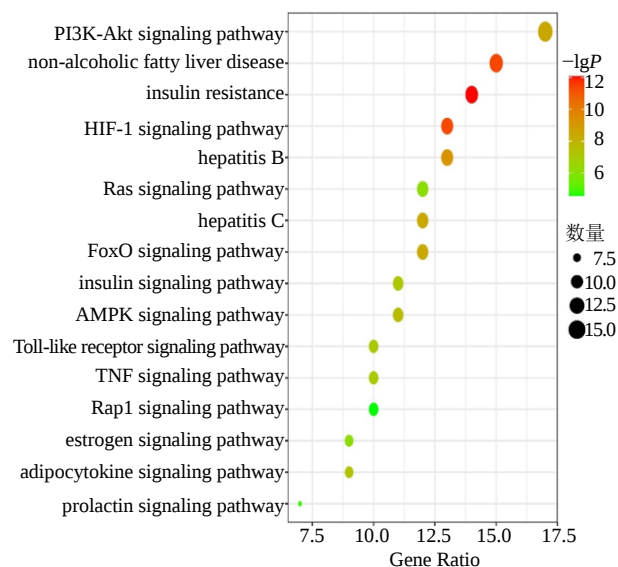
Fig. 5 Bubble plot of GO enrichment analysis of *Citrus Reticulata* in treatment of metabolic associated fatty liver disease by regulating qi

图 6 陈皮理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 6 KEGG pathway enrichment analysis bubble plots of *Citrus Reticulata* for metabolic associated fatty liver disease by regulating qi

明了“脾不升清”是肥胖产生及发展的病机关键之一,说明陈皮可发挥健脾理气的功效,干预肥胖所引发的代谢综合征疾病。二陈汤在中药古籍中具有理气健脾、燥湿化痰之功效,其主治湿痰、咳嗽痰多等症状,近年来临床中采用二陈汤治疗代谢相关脂肪性肝病,且疗效显著。石磊等^[22]发现二陈汤中的陈皮具有降低高脂饮食小鼠肝脏氧化应激的作用,减缓代谢相关脂肪性肝病病情的发展。但由于陈皮中所含化学成分复杂,调节的靶点众多,导致其发挥理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病的作用机制尚不明确。故本文采用网络药理学及分子对接方法探究陈皮潜在的药效物质基础及可能的作用通路,应用大数据挖掘的手段,从系统性、整体性和相关性探讨陈皮理气功效对代谢相关脂肪性肝病的改善作用,为陈皮的临床应用及功效开发提供了理论基础。

在陈皮药效物质的研究中,利用网络药理学收集并预筛选了陈皮的化学成分,共筛选出柚皮素、橙皮苷、柚皮苷、橘皮素、川陈皮素、二氢川陈皮素等 63 个主要活性化合物。根据文献报导,在上述成分中,橙皮苷对代谢相关脂肪性肝病大鼠肝脏有明显的保护作用,其可减少肝细胞脂肪变性,抑制汇管区炎性细胞浸润,减轻肝损伤程度^[23]。另有王焱等^[24]发现橙皮苷能降低代谢相关脂肪性肝病大鼠血清中 TNF- α 、白细胞介素(IL)-6 等炎症因子的水平,同时提高 IL-10 抗炎因子的水平,发挥改善代谢相关脂肪性肝病大鼠肝细胞的损伤作用。汪娇等^[25]通过建立代谢相关脂肪性肝病细胞模型,发现川陈皮素具有改善代谢相关脂肪性肝病脂肪功能障碍作用,其分子机制主要是川陈皮素通过抑制肝脏中 lncLSTR 上调,降低肝细胞脂质沉积,增加肝脏甘油三酯清除率。柚皮苷是发挥止咳化痰理气作用的主要功效成分,柚皮素为其代谢产物,具有抗炎、抗氧化等特性^[26]。此外,文献还报道了橘皮素可增加核因子 E₂ 相关因子 2 (Nrf2) 的核转位,上调其下游因子血红素加氧酶-1 (HO-1)、谷氨酰胺半胱氨酸连接酶亚基 (GCLC) 的表达,降低肝脏中的氧化应激,进而缓解代谢相关脂肪性肝病^[27]。柚皮素可减少脂肪的从头合成,增加脂肪酸氧化并改善代谢紊乱,减少代谢相关脂肪性肝病的发病风险^[28]。根据网络药理学预测及上述文献报道的共同论证,本研究最终确定柚皮素、橙皮苷、川陈皮素、橘皮素可能为陈皮利用理气功效治疗代谢相关脂肪性

肝病的主要药效物质基础。

基于上述陈皮利用理气功效抗代谢相关脂肪性肝病的药效物质基础研究后,对代谢相关脂肪性肝病的核心靶点和信号通路进行筛选与富集,得到相关蛋白靶点 56 个,通过 PPI 网络互作分析发现, Akt1、EGFR、PPAR α 、PPAR γ 、c-JUN 为陈皮通过理气功效发挥抗代谢相关脂肪性肝病核心网络中的关键靶点。根据相关研究表明, Akt1 可作为多条信号通路的交叉点,通过影响下游多种因子的活化,介导细胞凋亡和糖代谢过程^[29]。Xie 等^[30]发现脂联素可以通过 Akt1/叉头框蛋白 O1 (FoxO1) 信号通路,抑制 FoxO1 的表达,从而改善代谢相关脂肪性肝病。另有研究表明,内质网应激是肝脏炎症和代谢性肝病发病机制的重要过程, c-Jun 能够保护肝细胞免受内质网应激,调节肝细胞存活^[31]。Yan 等^[32]发现 JNK/c-Jun 能够直接结合先天免疫反应的关键调节因子 (C7ORF41) 的启动子,抑制 C7ORF41 的转录进而保护棕榈酸诱导的代谢相关脂肪性肝病小鼠的肝脏炎症。EGFR 属于 ErbB 受体酪氨酸激酶家族,其通过调控脂肪酸合成和脂肪分解的转录因子,在代谢相关脂肪性肝病小鼠模型的脂肪变性中发挥了重要作用^[33]。PPAR α 和 PPAR γ 是过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 核受体超家族中的 2 种亚型,在调节炎症和脂质等方面发挥作用。PPAR α 能够促进脂肪酸氧化、调节炎症、改善胰岛素敏感性。PPAR γ 能够调节脂肪组织的增殖与分化,减少肝细胞的脂肪生成;同时有研究发现, PPAR γ 的激动剂,能够抑制 TNF- α 、纤溶酶原激活物抑制因子-1 (PAI-1)、IL-6 等炎症因子的表达,间接减少炎症状态下炎症产物的生成,从而改善代谢相关脂肪性肝病^[34]。Goldwasser 等^[35]证明柚皮素是 PPAR α 和 PPAR γ 的激动剂,其可诱导 PPAR γ 调节脂肪酸氧化基因 (CYP4A11、ACOX),增加脂肪酸的氧化,进而逆转代谢相关脂肪性肝病的症状。基于上述文献报道, Akt1、EGFR、PPAR α 、PPAR γ 、c-JUN 等关键蛋白参与生物学过程中多个重要环节,因此认为这 5 种关键蛋白可能为代谢相关脂肪性肝病发病机制中重要调节因子。

基于上述关键靶点的预测,进行了 KEGG 通路富集分析。结果表明,许多关键靶点与 PI3K/Akt 信号通路、Ras 信号通路、胰岛素信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路、核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路等密切相关。其中 PI3K/Akt 信号通路

和 AMPK 信号通路为胰岛素信号传导与胰岛素抵抗相关的关键途径,在代谢相关脂肪性肝病中发挥重要作用。胰岛素通过与胰岛素受体(InsR)结合,激发细胞内胰岛素受体底物 IRS 家族的磷酸化,磷酸化的 IRS 与 PI3K 的 p85 调节亚基的结合,导致其下游的信号分子 Akt 磷酸化,从而调节细胞的增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种活动^[36]。此外胰岛素除了活化 Akt 以促进脂肪形成外,还可激活 AMPK 促进脂肪酸的合成,而激活后的 AMPK 又可以间接抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1(mTORC1)以改善胰岛素抵抗,进而改善代谢相关脂肪性肝病^[37-38]。彭慧敏^[39]研究发现,川陈皮素能够活化 AMPK 信号通路,降低 3T3-L1 细胞中脂质的积累。理气消痰方中主要的药物为陈皮,此方具有理气健脾、燥湿化痰的功效,田曼等^[40]发现,理气消痰方可抑制 PI3K/Akt 信号通路激活,调控甲状腺肿大鼠模型的细胞凋亡/增殖,发挥理气功效对病症起到治疗效果。陈袁等^[41]发现,川陈皮素通过抑制 PI3K/Akt 通路的激活,促进代谢相关脂肪性肝病大鼠机体肝细胞自噬,减轻肝细胞脂肪变性,改善代谢相关脂肪性肝病的症状。由此推测,陈皮中的川陈皮素,可通过抑制 PI3K/Akt 通路的激活,发挥理气化痰的功效,促进代谢相关脂肪性肝病患者肝细胞的凋亡/增殖,达到改善代谢相关脂肪性肝病的目的。Bhattacharya 等^[42]揭示了,柚皮素通过上调 Akt1 蛋白,促进胰岛素信号通路的表达,增强 INS-1E 细胞中胰岛素分泌和葡萄糖敏感性,恢复胰岛 β 细胞中与脂毒性相关基因的调控,减轻代谢相关脂肪性肝病的脂毒性。Yang 等^[43]发现柚皮素通过 EGFR/PI3K/Akt 信号通路,下调活性氧(ROS)的产生,抑制 NF-κB 的活性,减少气道炎症过程中黏液的生成,发挥化痰理气作用。由此推测,柚皮素可通过抑制 EGFR 表达,影响 PI3K/Akt 信号通路,发挥理气作用;同时上调 Akt1 蛋白表达,促进胰岛素信号通路的传导,减轻代谢相关脂肪性肝病的脂毒性。基于上述讨论,推测 PI3K/Akt 信号通路、Ras 信号通路、胰岛素信号通路、AMPK 信号通路、NF-κB 信号通路与陈皮发挥理气功效治疗代谢相关脂肪性肝病密切相关。

综上所述,陈皮中的橘皮素、柚皮苷、柚皮素、川陈皮素、橙皮苷可能为其发挥理气功效的主要药效物质基础,其通过调节 Akt1、PPARγ、JUN、ESR1、PPARα 等蛋白靶点,调控 PI3K-Akt 信号通路、Ras

信号通路、胰岛素信号通路、AMPK 信号通路、NF-κB 信号通路等信号通路,发挥理气功效改善代谢相关脂肪性肝病的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组,中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 年更新版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 947-957.
- [2] 游春艳, 曾荣昆, 李桂萍, 等. 肥胖及超重人群非酒精性脂肪肝危险因素的分析 [J]. 云南医药, 2019, 40(1): 31-33.
- [3] 吴挺丰, 廖献花, 钟碧慧. 中国部分地区非酒精性脂肪肝病的流行情况 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(6): 1370-1373.
- [4] Younossi Z M, Henry L. Fatty liver through the ages: Nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Endocr Pract*, 2022, 28(2): 204-213.
- [5] 陈高峰, 郭静. 健脾疏肝方治疗非酒精性脂肪肝(肝郁脾虚证)临床观察 [J]. 光明中医, 2019, 34(10): 1520-1522.
- [6] 邹嘉曦, 冯全生. 冯全生从湿浊论治非酒精性脂肪肝经验 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(3): 1472-1474.
- [7] 王柏果, 程婉红, 唐聪聪, 等. 中医药治疗非酒精性脂肪肝的用药规律研究 [J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(1): 130-132.
- [8] 全美玲, 沈震, 夏爽. 自拟疏肝理气健脾汤联合西药治疗肝郁脾虚证非酒精性脂肪肝疗效观察 [J]. 四川中医, 2021, 39(10): 113-116.
- [9] 梁奕尧, 陈柏忠, 杨玉华, 等. 《中国药典》2020 版陈皮质量标准修订的研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2022, 42(2): 142-146.
- [10] 魏莹, 李文东, 杨武亮. HPLC 法测定不同贮存年限广陈皮药材中主要活性成分的含量 [J]. 中国药房, 2016, 27(15): 2131-2134.
- [11] 李卫霞. 陈皮的药理分析及临床应用研究 [J]. 医学理论与实践, 2018, 31(10): 1521-1522.
- [12] 陈海洋, 周慧敏, 胡旭. 基于数据挖掘的中医药治疗肥胖症用药规律研究 [J]. 甘肃科技, 2021, 37(12): 122-124.
- [13] 易鑫宇, 吕超, 周小博, 等. 中医药治疗非酒精性脂肪肝用药规律文献分析 [J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(11): 118-120.
- [14] Ke Z, Zhao Y, Tan S, et al. *Citrus reticulata* Blanco peel extract ameliorates hepatic steatosis, oxidative stress and inflammation in HF and MCD diet-induced NASH C57BL/6 J mice [J]. *J Nutr Biochem*, 2020, 83: 108426.
- [15] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.

- [16] Huang S Y, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking [J]. *Int J Mol Sci*, 2010, 11(8): 3016-3034.
- [17] 中国药典 [M]. 一部. 2020.
- [18] Gao S, Chen X, Yu Z, *et al.* Progress of research on the role of active ingredients of *Citri Reticulatae Pericarpium* in liver injury [J]. *Phymed*, 2023, 115: 154836.
- [19] 曹颖, 谢雯. 非酒精性脂肪性肝病发病机制研究 [J]. 中国临床医生杂志, 2020, 48(1): 4-6.
- [20] 刘莉丹, 刘晏. 健脾利湿法治疗非酒精性脂肪肝的研究进展 [J]. 中成药, 2021, 43(9): 2452-2456.
- [21] 姜萍, 张佳琪, 李晓. 升清与健脾理气药物抗高脂饮食诱导肥胖大鼠的作用及对脂联素和炎症因子的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(10): 676-680.
- [22] 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.
- [23] 王焱. 橙皮苷对大鼠非酒精性脂肪肝脂质代谢和炎症反应的影响及部分机制的研究 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2010.
- [24] 王焱, 李俊, 王保伟. 橙皮苷对非酒精性脂肪肝大鼠的保护作用及其机制的初探 [J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(5): 646-650.
- [25] 汪娇, 蒋鹏, 周建伟. 川陈皮素对非酒精性脂肪肝细胞的保护作用 and lncLSTR 的调控机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(6): 1129-1133.
- [26] 钟仁兴, 丁子禾, 杨燕妮, 等. 基于网络药理学分析的橘红痰咳液主治“痰、咳、喘”的药效物质基础与作用机制研究 [J]. 药学报, 2020, 55(9): 2134-2144.
- [27] Ke Z, Tan S, Li H, *et al.* Tangeretin improves hepatic steatosis and oxidative stress through the Nrf2 pathway in high fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease mice [J]. *Food Funct*, 2022, 13(5): 2782-2790.
- [28] Ke J Y, Kliewer K L, Hamad E M, *et al.* The flavonoid, naringenin, decreases adipose tissue mass and attenuates ovariectomy-associated metabolic disturbances in mice [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2015, 12: 1.
- [29] 陈凡, 叶俊梅, 张玉彬. Akt 在心血管疾病中的调控作用 [J]. 药学研究, 2018, 37(5): 291-294.
- [30] Xie X, Yan D, Li H, *et al.* Enhancement of adiponectin ameliorates nonalcoholic fatty liver disease via inhibition of FoxO1 in type I diabetic rats [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 6254340.
- [31] Fuest M, Willim K, MacNelly S, *et al.* The transcription factor c-Jun protects against sustained hepatic endoplasmic reticulum stress thereby promoting hepatocyte survival [J]. *Hepatology*, 2012, 55(2): 408-418.
- [32] Yan F J, Wang X, Wang S E, *et al.* C-Jun/C7ORF41/NF- κ B axis mediates hepatic inflammation and lipid accumulation in NAFLD [J]. *Biochem J*, 2020, 477(3): 691-708.
- [33] Bhushan B, Michalopoulos G K. Role of epidermal growth factor receptor in liver injury and lipid metabolism: Emerging new roles for an old receptor [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 324: 109090.
- [34] 张晓燕, 陈丽红, 管又飞. PPAR 家族及其与代谢综合征的关系 [J]. 生理科学进展, 2005(1): 6-12.
- [35] Goldwasser J, Cohen P Y, Yang E, *et al.* Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: Role of PPARalpha, PPARgamma and LXRalpha [J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12399.
- [36] 刘莉, 罗鹏, 周田田, 等. 厄贝沙坦对高血压合并 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗 IRS-1/PI3K/GLUT4 信号通路的影响 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(5): 563-568.
- [37] Li J, Wang T, Liu P, *et al.* Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD [J]. *Food Funct*, 2021, 12(9): 3898-3918.
- [38] Witczak C A, Sharoff C G, Goodyear L J, *et al.* AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: From structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65(23): 3737-3755.
- [39] 彭慧敏. 川陈皮素和橙皮苷对脂肪积累影响的研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [40] 田曼, 祁正亮. 基于 PI3K/Akt 信号途径探讨理气消癥方对结节性甲状腺肿大鼠的作用机制 [J]. 中国实用医药, 2021, 16(3): 206-208.
- [41] 陈袁, 赵倩, 康琪, 等. 川陈皮素对非酒精性脂肪肝大鼠降肝脂作用 [J]. 中国公共卫生, 2020, 36(11): 1574-1578.
- [42] Bhattacharya S, Oksbjerg N, Young J F, *et al.* Caffeic acid, naringenin and quercetin enhance glucose-stimulated insulin secretion and glucose sensitivity in INS-1E cells [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(7): 602-612.
- [43] Yang J, Li Q, Zhou X D, *et al.* Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF- κ B activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human airway epithelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1-2): 29-40.

[责任编辑 高源]