·脂肪性肝病·

DOI：10.12449/JCH260715

2,5-二羟基苯甲酸对代谢相关脂肪性肝病体外细胞模型的影响及其作用机制

徐俊姣[1,2]，刘 彤[1,2]，刘素彤[1]，张丽慧[1]，宋艺佳[1,2]，吴文静[1,2]，崔蓓蕾[1,2]，管雅捷[1,2]，刘鸣昊[1,3,4,5]

1 河南中医药大学第一附属医院肝病(脾胃)诊疗中心，郑州 450000

2 河南中医药大学第一临床医学院，郑州 450003

3 河南省中医药科学院，郑州 450046

4 中西医防治重大疾病河南省协同创新中心，郑州 450046

5 豫药全产业链研发河南省协同创新中心，郑州 450046

通信作者：刘鸣昊，Liumh015@163.com（ORCID：0009-0001-7712-4605）

摘要：目的 探究2,5-二羟基苯甲酸(2,5-DHBA)治疗代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)潜在靶点和调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路的分子机制。**方法** 首先进行网络药理学研究，通过数据库筛选2,5-DHBA与MAFLD的共同作用靶点，进行分子对接与通路富集分析预测其潜在调控的生物学过程与信号通路。其次，进一步通过细胞(小鼠正常肝细胞AML-12)实验验证，通过细胞计数试剂盒8筛选2,5-DHBA 3个最佳干预浓度。将细胞分为5组：对照组、模型组(2 mmol/L的游离脂肪酸构建的MAFLD细胞模型)以及2,5-DHBA低、中、高3个干预剂量组(2 mmol/L的游离脂肪酸+3个不同浓度的2,5-DHBA)。采用油红O染色观察细胞内脂质沉积情况，荧光探针DCFH-DA检测细胞内活性氧的水平，生化法检测甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)含量；采用实时聚合酶链式反应与Western Blot检测基因及蛋白表达水平。多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用Tukey's检验。**结果** 共筛选出32个2,5-DHBA与MAFLD的共同作用靶点。在1.25～20 μmol/L浓度范围内，2,5-DHBA处理组自2.5 μmol/L浓度起，呈剂量依赖性提高AML-12细胞活力。选取最低起效浓度1.25 μmol/L、中间梯度浓度5 μmol/L及有效区间内最高安全浓度20 μmol/L作为低、中、高3个干预剂量。与模型组相比，1.25、5和20 μmol/L浓度的2,5-DHBA干预均能降低细胞内脂滴积累(P值均<0.05)；与模型组比较，3个剂量组TG和TC水平差异均有统计学意义(P值均＜0.05)。与对照组比较，模型组内ROS荧光强度显著升高(P<0.05)；与模型组相比，经5 μmol/L和20 μmol/L浓度的2,5-DHBA处理后，细胞内ROS水平呈剂量依赖性下降(P值均<0.05)；与模型组相比，5 μmol/L和20 μmol/L浓度的2,5-DHBA治疗显著下调了促脂生成基因固醇调节元件转录因子1、脂肪酸合成酶的mRNA表达水平，并上调了抗氧化核心基因核转录因子红系2相关因子2及其下游靶基因血红素加氧酶1的mRNA表达(P值均<0.05)。与对照组相比，模型组p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt表达均显著升高(P值均<0.05)；与模型组相比，经5 μmol/L的2,5-DHBA治疗后，p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt的蛋白表达水平均显著降低(P<0.05)。与对照组相比，模型组Nrf2、HO-1蛋白表达水平显著降低(P值均<0.05)；经1.25 μmol/L的2,5-DHBA治疗后Nrf2和HO-1蛋白水平均显著升高(P<0.05)。**结论** 网络药理学联合细胞实验证实，2,5-DHBA能通过调控PI3K/Akt信号通路，减轻脂质沉积与氧化应激，进而发挥治疗MAFLD的作用。

关键词：代谢相关脂肪性肝病；2,5-二羟基苯甲酸；磷酸肌醇3-激酶类

基金项目：国家自然科学基金(82575010，81904154，82205086)；河南省科技研发计划联合基金(优势学科培育类)(242301420096，242301420021)；河南省科技攻关计划(242102310500，232102310438)；河南省"双一流"创建学科中医学科学研究专项(HSRP-DFCTCM-2023-1-10)；河南省卫生健康委员会中医药传承创新专项(2023ZXZX1162)；河南省卫生健康委员会国家中医临床研究基地科研专项(2022JDZX114)；第九届中国科协青年人才托举工程(2023QNRC001)

Effect and mechanism of action of 2,5-dihydroxybenzoic acid on an *in vitro* cell model of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease

Xu Junjiao[1,2], *Liu Tong*[1,2], *Liu Sutong*[1], *Zhang Lihui*[1], *Song Yijia*[1,2], *Wu Wenjing*[1,2], *Cui Beilei*[1,2], *Guan Yajie*[1,2], *Liu Minghao*[1,3,4,5]

1. Liver Disease (Spleen & Stomach) Diagnosis and Treatment Center, The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 2. The First Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China; 3. Henan Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 4. Henan Provincial Collaborative Innovation Center of Prevention and Treatment of Major Diseases by Chinese and Western Medicine, Zhengzhou 450046, China; 5. Henan Provincial Collaborative Innovation Center of Research and Development on the Whole Industry Chain of Yu-Yao, Zhengzhou 450046, China

Corresponding author: Liu Minghao, Liumh015@163.com (ORCID: 0009-0001-7712-4605)

Abstract: Objective To investigate the potential targets of 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHBA) in the treatment of metabolic dysfunction-associated fatty liver disease (MAFLD) and the molecular mechanism by which it regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. **Methods** A network pharmacology analysis was performed at first, and related databases were used to obtain the common action targets of 2,5-DHBA and MAFLD, followed by molecular docking and pathway enrichment analysis to predict the potential biological processes and signaling pathways regulated by these targets. Then mouse normal hepatocytes AML-12 were used for cell experiments, and CCK-8 assay was used to determine the three optimal intervention concentrations of 2,5-DHBA. AML-12 cells were divided into control group, model group (cells cultured in a medium containing 2 mmol/L free fatty acid [FFA] to establish a cell model of MAFLD), and three 2,5-DHBA intervention groups (cells cultured with FFA and 2,5-DHBA at the three different concentrations of 1.25, 5, and 20 μmol/L, respectively). Oil red O staining was used to observe intracellular lipid accumulation; the fluorescent probe DCFH-DA was used to measure the level of intracellular reactive oxygen species (ROS); biochemical assays were used to measure the content of triglyceride (TG) and total cholesterol (TC); quantitative real-time PCR and Western Blot were used to measure the expression levels of related genes and proteins. A one-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups, and the Tukey's test was used for further comparison between two groups. **Results** A total of 32 common targets were obtained for 2,5-DHBA and MAFLD. Within a concentration range of 1.25—20 μmol/L, 2,5-DHBA treatment, starting from the concentration of 2.5 μmol/L, increased the viability of AML-12 cells in a dose-dependent manner. The minimum effective concentration of 1.25 μmol/L, the intermediate gradient concentration of 5 μmol/L, and the maximum safe concentration within the effective range of 20 μmol/L were selected for low-, middle-, and high-dose intervention, respectively. Compared with the model group, 2,5-DHBA intervention at concentrations of 1.25, 5, and 20 μmol/L could significantly reduce lipid droplet accumulation in cells (all $P<0.05$), and there were significant differences in TG and TC between the model group and the three intervention groups (all $P<0.05$). Compared with the control group, the model group had a significant increase in ROS fluorescence intensity ($P<0.05$), and compared with the model group, there was a dose-dependent reduction in intracellular ROS level after treatment with 5 μmol/L or 20 μmol/L 2,5-DHBA ($P<0.05$). Compared with the model group, 2,5-DHBA treatment at concentrations of 5 and 20 μmol/L significantly downregulated the mRNA expression levels of the lipogenic genes SREBf1 and FASN and upregulated the mRNA expression levels of the key antioxidant gene Nrf2 and its downstream target gene HO-1 (all $P<0.05$). Compared with the control group, the expression of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in the model group was significantly increased (all $P<0.05$). Compared with the model group, the protein expression levels of p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt were significantly decreased after 5 μmol/L 2,5-DHBA treatment ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression levels of Nrf2 and HO-1 protein in the model group were significantly decreased (all $P<0.05$). The protein levels of Nrf2 and HO-1 were significantly increased after treatment with 1.25 μmol/L 2,5-DHBA ($P<0.05$). **Conclusion** Network pharmacology and cellular experiments confirm that 2,5-DHBA can alleviate lipid deposition and oxidative stress by regulating the PI3K/Akt signaling pathway, thereby exerting a therapeutic effect on MAFLD.

Key words: Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease; 2,5-Dihydroxybenzoic Acid; Phosphatidylinositol 3-Kinases

Research funding: National Natural Science Foundation of China (82575010, 81904154, 82205086); Henan Provincial Science and

Technology Research and Development Plan Joint Fund (Superior Discipline Cultivation Category) (242301420096, 242301420021); Henan Provincial Science and Technology Tackling Program (242102310500, 232102310438); "Double First-Class" Creation Discipline (Chinese Medicine) Scientific Research Special Project of Henan Province (HSRP-DFCTCM-2023-1-10); Henan Provincial Health Commission's Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Special Project (2023ZXZX1162); Henan Provincial Health Commission National Clinical Research Base of Tradition Chinese Medicine Scientific Research Project (2022JDZX114); The 9th Young Elite Scientist Sponsorship Program of the China Association for Science and Technology (2023QNRC001)

代谢相关脂肪性肝病(metabolic dysfunction-associated fatty liver disease, MAFLD)是一种进展性肝病,其早期特征为肝内脂肪过度沉积,可逐步进展为肝细胞损伤、炎症反应乃至晚期肝纤维化[1]。近年来,该疾病的患病率增长迅速[2],且随着生活水平的提高,其患病率呈逐年上升的趋势[3]。目前,临床上治疗MAFLD仍缺乏安全有效的药物,因此,寻找临床有效药物成为亟待解决的关键问题[4]。

对于MAFLD的发病机制,"多重打击"假说逐渐被接受认可[5]。该假说认为,MAFLD的发生发展与脂质代谢紊乱、线粒体功能障碍和肠道微生物功能改变等多种因素有关[6]。研究证实,肝脏内过度脂质堆积会打破脂肪分解与从头合成之间的平衡,从而影响脂类物质的正常分解代谢,进而引发肝脂肪变性并产生脂肪毒性[7]。同时,过度脂质堆积也会造成线粒体功能障碍[8],导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量生成和堆积,进而诱发氧化应激[9]。因此,减轻脂质堆积和抑制氧化应激成为治疗MAFLD的重要策略[10]。

2,5-二羟基苯甲酸(2,5-Dihydroxybenzoic acid, 2,5-DHBA)作为一种广泛存在于蔓越莓、葡萄、柑橘类水果、羽衣甘蓝、莲子等多种果蔬中的多酚类化合物,已被证实具有广泛的有益健康功效[11-12]。研究证实,2,5-DHBA可以通过增强脂肪酸氧化、刺激棕色脂肪组织的热生成,预防小鼠高脂肪和高果糖饮食引起的肥胖[13];同时,2,5-DHBA还能减少油酸诱导的HepG2细胞和高脂饮食喂养小鼠的肝脏脂质积累[14]。然而,2,5-DHBA改善MAFLD的具体分子机制尚不明确。

因此,本研究利用网络药理学方法,预测2,5-DHBA治疗MAFLD的潜在作用靶点,并探讨其关键靶点、相关生物学过程及信号通路。进一步通过构建MAFLD细胞模型,验证2,5-DHBA在抑制脂质堆积和氧化应激方面的疗效,从而为2,5-DHBA缓解MAFLD提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 本研究采用小鼠正常肝细胞AML-12,购于商城北纳创联生物科技有限公司(货号:BNCC338281),实验时传代至第4~5代。

1.1.2 实验用药 2,5-DHBA购于成都曼思特生物科技有限公司(货号:A1076),实验时使用二甲基亚砜稀释至所需浓度。

1.1.3 主要试剂 DMEM/F12培养基(货号:31330038,赛默飞世尔科技公司,美国)、胎牛血清(货号:A52567-01,赛默飞世尔科技公司,美国)、青链霉素混合液(100×)(货号:P1400,北京索莱宝科技有限公司)、胰蛋白酶-EDTA消化液(货号:T1300,北京索莱宝科技有限公司)、无血清细胞冻存液(科研级)(货号:FH7002,北京索莱宝科技有限公司)、1×PBS缓冲液(pH7.2~7.4)(货号:P1020,北京索莱宝科技有限公司)、油红O染色试剂盒(细胞专用)(货号:G1262,北京索莱宝科技有限公司)、细胞计数试剂盒8(cell counting kit-8, CCK8)(货号:GK10001, GLPBIO, 美国)、ROS试剂盒(货号:E-BC-K138-F,武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)、GAPDH(货号:60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司)、β-actin(货号:66009-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司)、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)[货号:T40115F,艾比玛特医药科技(上海)有限公司]、磷酸化PI3K(p-PI3K)[货号:T40116F,艾比玛特生物医药(上海)有限公司]、蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)[货号:T55561S,艾比玛特生物医药(上海)有限公司]、磷酸化Akt(p-Akt)[货号:PC0876,艾比玛特生物医药(上海)有限公司]、核转录因子红系2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)(货号:16396-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司)、血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)1[货号:T55113,艾比玛特生物医药(上海)有限公司]、HRP-标记二抗(货号:SA00001-2, SA00001-1,武汉三鹰生物技术有限公司)、特超敏ECL化学发光底物(货号:BL520A,北京兰杰柯科技有限公司)。

1.1.4 数据库 本研究所用数据库包括:MeSH Browser数据库(https://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html)、

OMIM 数据库（https://omim.org）、GeneCards 数据库（https://www.genecards.org）、PubChem 数据库（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov）、SwissADME 数据库（https://www.swissadme.ch）、SwissTargetPrediction 数据库（https://www.swisstargetprediction.ch）、STRING 数据库（https://cn.string-db.org）、Metascape 数据库（https://metascape.org）、微生信网络服务（https://www.bioinformatics.com.cn）、Uniprot 数据库（https://www.uniprot.org）。

1.2 实验方法

1.2.1 网络药理学预测 2,5-DHBA 和 MAFLD 的作用靶点及通路 （1）MAFLD 相关靶点获取。通过 MeSH Browser 数据库确定关键词“MAFLD、MAFL、MASH、NASH、MAFLD、NAFLD、Nonalcoholic fatty liver disease、Nonalcoholic steatohepatitis、Fatty liver, nonalcoholic、NAFL、Metabolic dysfunction-associated fatty liver disease”，根据关键词在 OMIM、GeneCards 数据库（阈值≥2）中确定相关基因，整合后删除重复条目。（2）2,5-DHBA 潜在靶点预测。从 PubChem 数据库获得所选化合物的标准简化分子输入行系统（SMILES）标识。将 SMILES 输入 SwissADME 数据库评估药代动力学性质，确定 2,5-DHBA 胃肠道吸收效率高（GI Absorption=High）且类药性至少两个参数为“yes”，随后将获得的 SMILES 提交至 SwissTargetPrediction 数据库以识别预测靶点。（3）蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein Interaction, PPI）网络构建和关键基因筛选。2,5-DHBA 和 MAFLD 的重叠靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络[15]，最小相互作用阈值设置为“最高置信度”（>0.4）。随后将网络分析结果导入 Cytoscape 3.7.0 进行进一步处理。通过 6 个关键拓扑参数（Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC、Network）的中位值识别关键基因靶点，并量化靶点的意义和相关性。（4）基因本体（gene ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes analysis, KEGG）通路富集分析。为检验与重叠靶点相关的潜在信号通路，使用 Metascape 数据库[16]进行 GO 和 KEGG 通路富集分析，设置为错误发现率 <0.05。GO 富集分析包括 3 个类别：生物过程（biological process，BP）、分子功能（molecular function，MF）和细胞组分（cell component，CC）。为进一步分析，选取显著富集的 BP、MF、CC 和 KEGG 通路，利用微生信网络服务进行可视化。（5）关键靶点的分子对接及分析。从 Uniprot 数据库获取相应靶点的 PDB 格式文件[17]，使用 PubChem 数据库获取 2,5-DHBA 的分子结构式并下载 2D 结构，将 2D 结构导入 Chem3D 23.1.1 软件获取 3D 结构。然后使用 AutoDockTools（v1.5.7）软件添加极性氢并分配电荷，所得结构以“pdbqt”格式保存。使用 AutoDock Vinna（v1.1.2）软件进行分子对接分析。结合能用于评估配体和受体之间的相互作用：结合能 < 0 kcal/mol 表示自发结合，而结合能 <−5 kcal/mol 表示稳定结合[18]。使用 PyMOL 3.1 软件对结果进行可视化。

1.2.2 细胞培养 AML-12 细胞培养于含 10% 胎牛血清和青霉素-链霉素溶液的 DMEM/F12 培养基中。

1.2.3 细胞活力测定及分组 AML-12 细胞在 96 孔板中培养，在对数生长阶段去除培养基后加入含不同浓度（0、1.25、2.5、5、10、20 和 40 μmol/L）2,5-DHBA 的 100 μL 样品溶液，处理 24 h 后添加 CCK8 溶液 10 μL，再孵育 1 h，使用 450 nm 波长测量吸光度，并将结果进行归一化处理[19]。根据 CCK8 结果，选取最低起效浓度、中间梯度浓度及有效区间内最高安全浓度作为低、中、高 3 个干预剂量，将细胞分为 5 组：对照组、模型组[游离脂肪酸（free fatty acid，FFA）构建的 MAFLD 细胞模型]和 2,5-DHBA 低、中、高 3 个干预剂量组（2 mmol/L 的 FFA+3 个不同浓度的 2,5-DHBA）。

1.2.4 细胞油红 O 染色 将 AML-12 细胞接种于 6 孔板中，每孔 3×10^5 个细胞，培养至超过 80% 的汇合度后将细胞暴露于 2 mmol/L FFA 溶液 24 h 以诱导细胞脂肪沉积[20]。然后分别添加 3 个干预剂量的 2,5-DHBA 培养 24 h 后，使用油红 O 试剂盒染色，显微镜下观察并获取图像。

1.2.5 ROS 检测 添加 DCFH-DA 荧光探针按照制造商提供的说明进行孵育，荧光显微镜下观察并获取图像。

1.2.6 Western Blot 检测 AML-12 细胞使用 RIPA 裂解缓冲液进行匀浆和裂解，随后以 12 000 r/min 的速度离心 10 min。蛋白质样品在 80 V 电压下，在 10% 聚丙烯酰胺十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳分离，随后转印至 PVDF 膜。使用含有 3% BSA 和 0.1% 吐温 20 的缓冲液的 5% 脱脂牛奶封闭膜，在 4 ℃下与特异性一抗孵育过夜，包括 GAPDH、β-Actin、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Nrf2 和 HO-1（稀释比例均为 1∶2 000）。TBST 洗膜 3 次，加入二抗（稀释比例均为 1∶10 000），TBST 洗膜 3 次后将膜浸于 1∶1 配制的 ECL 发光液中，避光条件下进行扫描。

1.2.7 实时聚合酶链式反应（real-time fluorescence polymerase chain reaction，real-time PCR） 使用 TRizol 试剂和总 RNA 提取试剂盒（货号：R1200，北京索莱宝科技有限公司）提取细胞 RNA，合成 cDNA 后，在 20 μL 体积下进行 real-time PCR，引物序列如表 1 所示。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

引物	方向	序列(5′-3′)
Nrf2	F	AAGCAGACGGAGGAGGAG
	R	GGAGGTGTTCAGGCAAGG
SREBF1	F	CATCCACATGGCTCTGAGTG
	R	CTCATCCACAAAGAAGCGGT
FASN	F	GAGAAAGCTTGCCAAACAGG
	R	GAGGGTCTTGCAGGAGACAG
HO-1	F	GCTCAACATCCAGCTCTTTGAGG
	R	GACAAAGTTCATGGCCCTGGGA
GAPDH	F	GTTCCCACCCTAGAAAGTCCA
	R	ACTTGGAGGAGGTTTGCTGG

注:Nrf2,核转录因子红系2相关因子2;SREBF1,固醇调控元件结合转录因子1;FASN,脂肪酸合成酶;HO-1,血红素加氧酶1;GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

1.2.8 统计学方法 采用GraphPad Prism 10软件进行统计和分析。各组数据均进行正态性检验和方差齐性检验,符合正态分布和方差齐性的数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey's检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

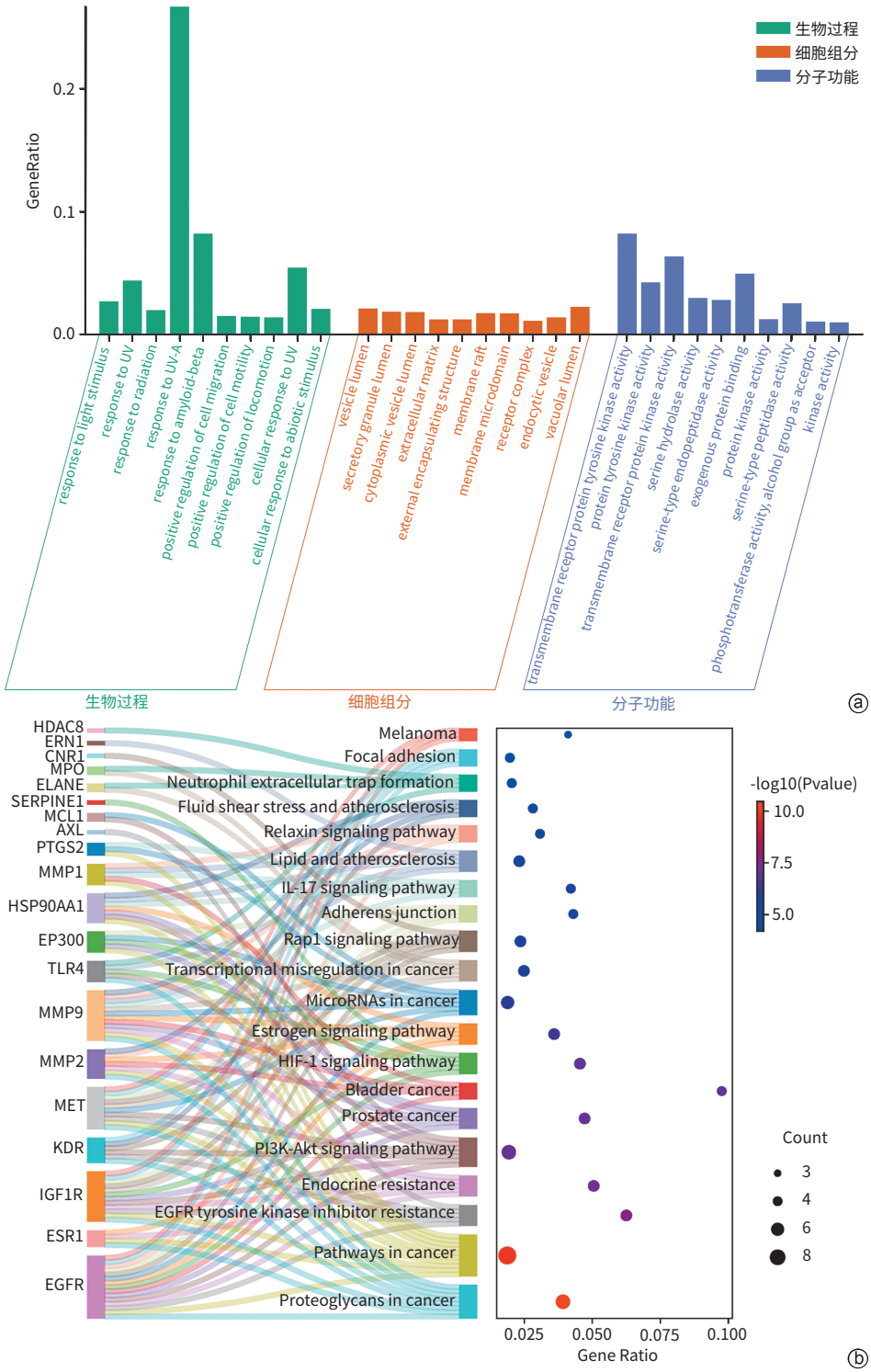
2.1 2,5-DHBA与MAFLD作用通路预测 为探究2,5-DHBA治疗MAFLD的分子机制,本研究首先通过网络药理学方法筛选2,5-DHBA治疗MAFLD的潜在作用靶点。从公共数据库中共获取100个2,5-DHBA预测靶点,同时基于既定阈值筛选出1 288个MAFLD相关靶点。将2组靶点取交集后,获得32个共同潜在作用靶点,随后,将其导入STRING数据库,以相互作用评分>0.4为阈值构建PPI网络。为进一步识别核心靶点,本研究将包含32个节点和171条边的PPI网络导入Cytoscape 3.7.0软件,利用CytoNCA插件进行拓扑分析。基于Betweenness、Closeness、Degree、Eigenvector、LAC、Network等6项拓扑参数的中位值进行筛选,最终确定了表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)、白蛋白、前列腺素内过氧化物合酶2、基质金属蛋白酶2、丝氨酸蛋白酶抑制剂家族E成员1、激酶插入域受体、髓细胞白血病1、间质-上皮转化因子、热休克蛋白90α家族A类成员1、多聚ADP核糖聚合酶1、基质金属蛋白酶9、雌激素受体1、Toll样受体4等13个关键靶点。为验证2,5-DHBA与核心靶点间的相互作用,对筛选出的13个关键靶点进行了分子对接分析。结果表明,2,5-DHBA与所有关键靶点的结合能均<−5 kcal/mol,表明其结合过程可自发进行且形成的复合物结构稳定。此外,利用PyMOL软件对代表性对接构象进行可视化,直观展示了其分子间相互作用模式。

为阐明2,5-DHBA治疗MAFLD的分子机制,本研究通过Metascape数据库对32个共同靶点进行了以"Homo sapiens"为条件的功能富集分析。筛选错误发现率<0.05的显著条目,并按富集显著性升序排列,分别提取BP、CC和MF前10项,以及KEGG通路前20项,利用微生信平台进行可视化展示(图1)。

分析结果显示,2,5-DHBA的潜在靶点主要富集于细胞迁移与运动等生物过程,在细胞组分层面主要分布于各类膜性腔室及细胞外基质,在分子功能上则集中于细胞信号转导和蛋白代谢相关活性。KEGG通路富集分析进一步表明,上述靶点显著富集于多条与代谢炎症及癌症密切相关的信号通路,包括PI3K/Akt、低氧诱导因子1、Ras相关蛋白1、白细胞介素17(interleukin-17,IL-17)信号通路等。同时,靶点亦涉及EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药、黏附连接与焦点黏附调控、流体剪切应力与动脉粥样硬化形成,以及中性粒细胞胞外陷阱形成等多种病理生理过程。上述结果提示,2,5-DHBA可能通过协同调控上述多通路,在调节代谢性炎症微环境方面发挥治疗效应。

2.2 2,5-DHBA减轻FFA诱导的AML-12细胞脂质堆积 CCK-8法检测结果显示,在1.25~20 μmol/L浓度范围内,2,5-DHBA处理组自2.5 μmol/L浓度起,呈剂量依赖性提高AML-12细胞活力,与未处理组相比差异有统计学意义(P值均<0.05)。根据CCK-8实验结果,选取最低起效浓度1.25 μmol/L、中间梯度浓度5 μmol/L及有效区间内最高安全浓度20 μmol/L作为低、中、高3个干预剂量用于后续实验。

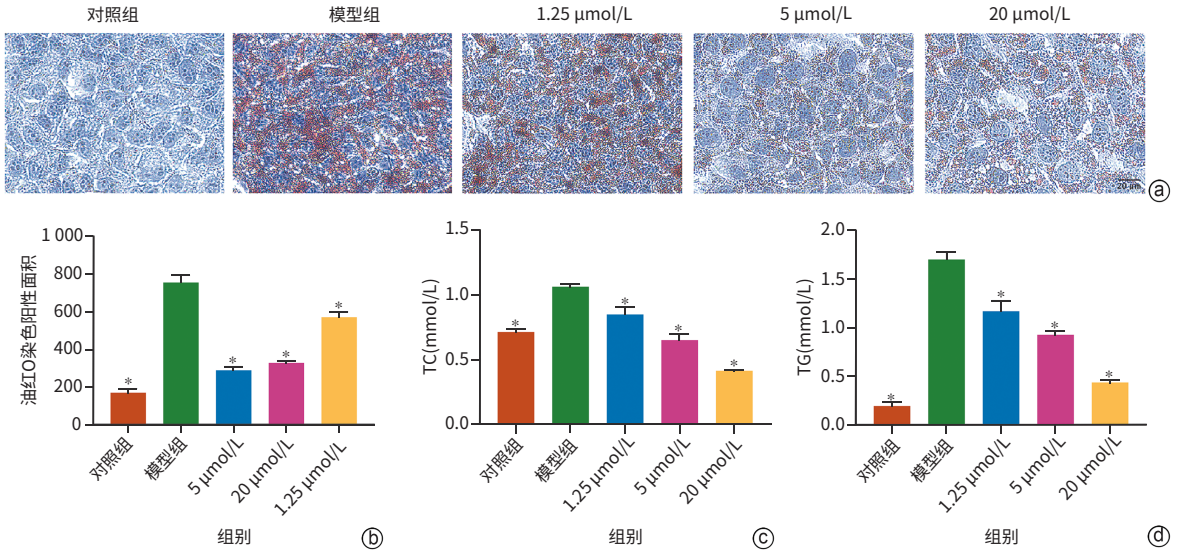
为探究2,5-DHBA对脂质代谢的改善作用,进一步检测了其对脂质积累的影响。油红O染色结果显示,与模型组相比,1.25、5和20 μmol/L浓度的2,5-DHBA干预均能降低细胞内脂滴积累(P值均<0.05)(图2a、b);同时,细胞内甘油三酯(triglyceride,TG)和总胆固醇(total cholesterol,TC)水平呈剂量依赖性下降,与模型组比较,3个剂量组TG和TC水平均明显下降(P值均<0.05)(图2c、d)。上述结果表明,FFA能够成功诱导AML-12细胞建立MAFLD模型,并且2,5-DHBA治疗能够有效缓解该模型中的脂质堆积。



注：a，GO功能富集分析结果，展示了BP、CC和MF中富集显著性前10的条目；b，KEGG通路富集分析前20的信号通路。MAFLD，代谢相关脂肪性肝病；GO，基因本体；KEGG，京都基因与基因组百科全书；HDAC8，组蛋白去乙酰化酶8；ERN1，内质网到细胞核信号转导1；CNR1，大麻素受体1；MPO，髓过氧化物酶；ELANE，中性粒细胞弹性蛋白酶；SERPINE1，丝氨酸蛋白酶抑制剂家族E成员1；MCL1，髓细胞白血病1；AXL，AXL受体酪氨酸激酶；PTGS2，前列腺素内过氧化物合酶2；MMP1，基质金属蛋白酶1；HSP90AA1，热休克蛋白90α家族A类成员1；EP300，蛋白乙酰转移酶P300；TLR4，Toll样受体4；MMP9，基质金属蛋白酶9；MMP2，基质金属蛋白酶2；MET，间质-上皮转化因子；KDR，激酶插入域受体；IGF1R，胰岛素样生长因子1受体；ESR1，雌激素受体1；EGFR，表皮生长因子受体；IL-17，白细胞介素17；Rap1，Ras相关蛋白1；HIF-1，低氧诱导因子1；PI3K-Akt，磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶B。

图1　2，5-DHBA治疗MAFLD靶点的GO与KEGG富集分析

Figure 1　GO and KEGG enrichment analysis of 2，5-DHBA for MAFLD targets



注：a，油红O染色结果（×400）；b，油红O染色定量分析；c，TC水平测定；d，TG水平测定。与模型组比较，*P<0.05。FFA，游离脂肪酸；TC，总胆固醇；TG，甘油三酯；2，5-DHBA，2，5-二羟基苯甲酸。

图2　2，5-DHBA减轻FFA诱导的AML-12细胞脂质堆积

Figure 2　2，5-DHBA alleviates FFA-induced lipid accumulation in AML-12 cells

2.3　2，5-DHBA在基因表达水平上调控脂质堆积和氧化应激　基于上述研究结果，为探究2，5-DHBA调控氧化应激的作用，本研究进一步通过DCFH-DA荧光探针检测细胞内ROS水平。结果显示，模型组内ROS荧光强度显著升高，经5 μmol/L和20 μmol/L浓度的2，5-DHBA处理后，细胞内ROS水平呈剂量依赖性下降（P值均<0.05）（图3a、b）；与模型组相比，5 μmol/L和20 μmol/L浓度的2，5-DHBA治疗显著下调了促脂生成基因固醇调控元件结合转录因子1（sterol regulatory element-binding transcription factor 1，SREBF1）、脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN）的mRNA表达水平（P值均<0.05）（图3c、d），并上调了抗氧化核心基因Nrf2及其下游靶基因HO-1的mRNA表达（图3e、f）。

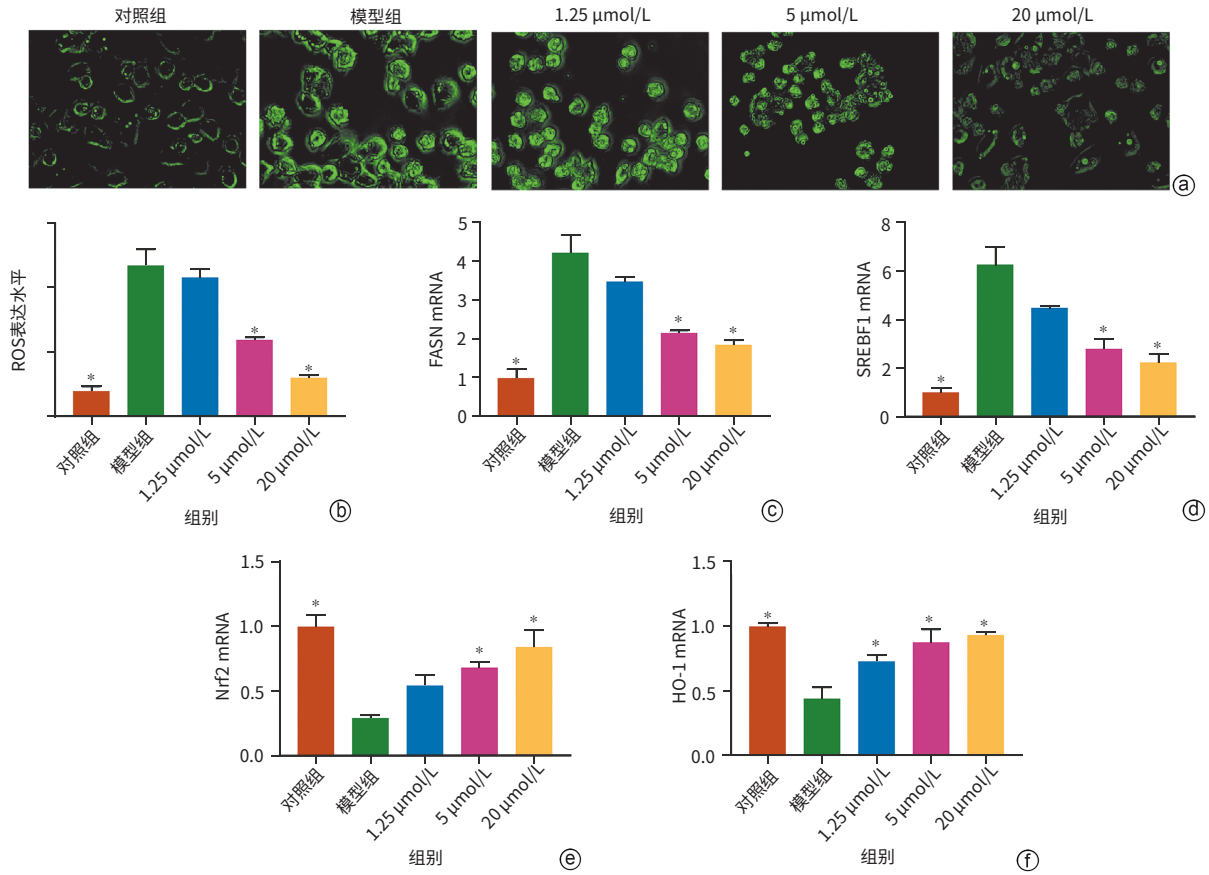
2.4　2，5-DHBA对FFA诱导的AML-12细胞中PI3K/Akt信号通路的影响　结合上述网络药理学和细胞实验结果，本研究进一步通过Western Blot实验探究2，5-DHBA调控PI3K/Akt信号通路的关键蛋白表达水平。结果显示，与模型组相比，经浓度为5 μmol/L的2，5-DHBA治疗后，p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt的蛋白表达水平均显著降低（P值均<0.05）（图4）。为进一步探究2，5-DHBA治疗MAFLD的机制，深入探究了氧化应激关键蛋白Nrf2及下游蛋白HO-1的表达水平。结果提示，与对照组相比，FFA干预后Nrf2及其下游蛋白HO-1表达水平降低（P值均<0.05），经1.25 μmol/L的2，5-DHBA治疗后Nrf2和HO-1蛋白水平均显著升高（P值均<0.05）（图5）。

3　讨论

MAFLD是一种由非酒精性刺激诱发的肝脂质代谢紊乱性疾病，其特征为肝细胞内脂质过度蓄积[21]，该疾病可进一步发展为代谢相关脂肪性肝炎、肝纤维化及其他肝脏相关并发症[22]。由于MAFLD早期临床症状隐匿，目前尚缺乏明确有效的治疗手段[23]。

2，5-DHBA作为一种广泛存在于水果和蔬菜中的天然酚酸，研究证实其能够减轻MAFLD模型中的肝脏脂肪堆积及炎症细胞浸润，并可能降低患者肝内脂肪含量[24]。然而，关于2，5-DHBA治疗MAFLD的分子机制尚不明确。为进一步揭示其作用机制，本研究采用网络药理学方法筛选出2，5-DHBA干预MAFLD的潜在关键靶点，并通过分子对接验证了2，5-DHBA与这些靶点之间具有良好的结合亲和力。GO与KEGG富集分析提示，2，5-DHBA可能通过多通路协同发挥治疗作用。其中显著富集的通路包括PI3K-Akt信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药通路、低氧诱导因子1信号通路、IL-17信号通路以及中性粒细胞胞外诱捕网形成通路。上述通路在调控脂质代谢、炎症反应、细胞自噬及氧化应激等MAFLD关键病理环节中均具有重要作用[25-32]。

PI3K/Akt信号通路是糖脂代谢的核心调节器，其激活可通过促进Akt磷酸化参与脂质代谢调控[33-34]，从而减轻肝脏脂质堆积[35]。研究显示，调节PI3K/Akt



注：a，ROS荧光探针代表性图像（×400）；b，ROS定量分析；c～f，FASN、SREBF1、Nrf2和HO-1的mRNA表达水平。与模型组比较，*P<0.05。ROS，活性氧；FFA，游离脂肪酸；FASN，脂肪酸合成酶；SREBF1，固醇调控元件结合转录因子1；Nrf2，核转录因子红系2相关因子2；HO-1，血红素加氧酶1。

图3　2，5-DHBA减轻FFA诱导的AML-12细胞脂质沉积和氧化应激

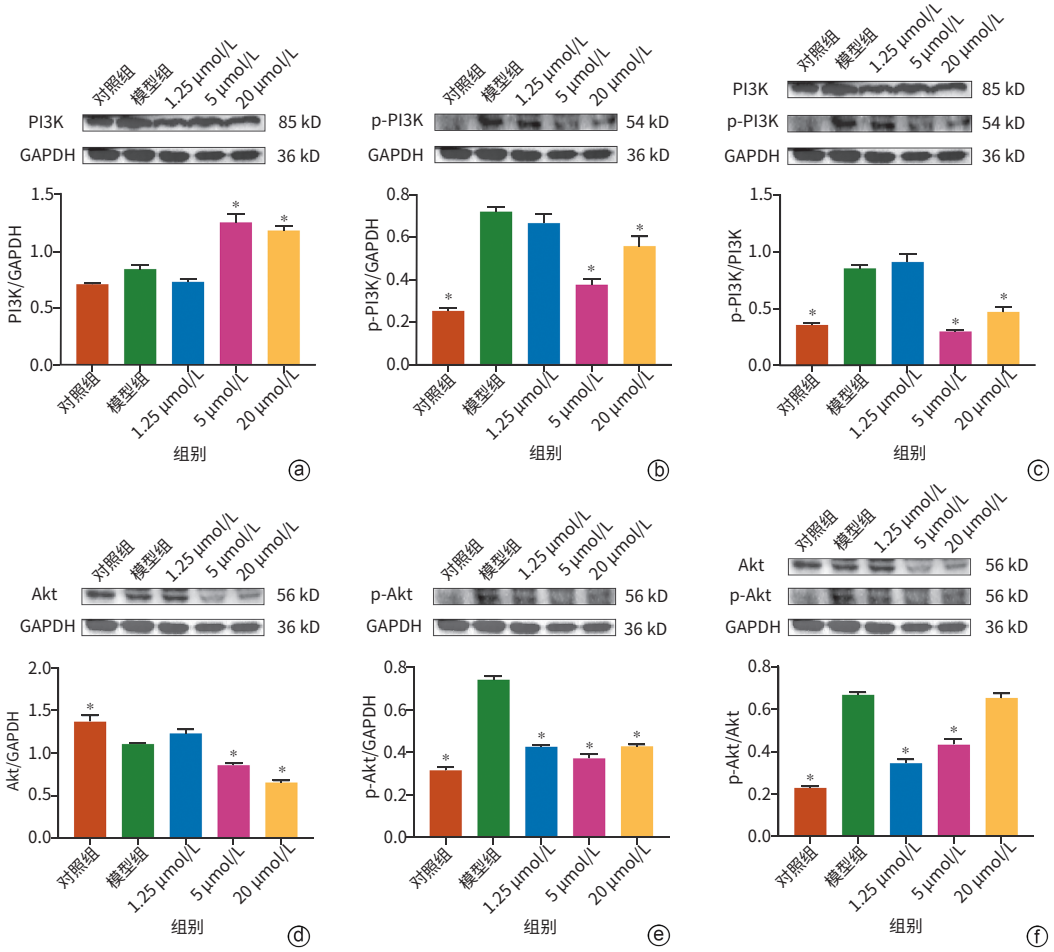
Figure 3　2，5-DHBA alleviates FFA-induced lipid deposition and oxidative stress in AML-12 cells

通路活性可改善糖脂代谢紊乱，进而治疗MAFLD[36-37]。此外，PI3K/Akt通路的异常激活也与氧化损伤密切相关[38]，PI3K/Akt通路的激活可调控Nrf2的表达，而Nrf2是调控脂质代谢和细胞氧化应激的关键转录因子[39]。Nrf2的活化有助于激活下游HO-1等抗氧化酶的表达，从而提高细胞的抗氧化能力，缓解氧化应激与脂质堆积[40-41]。上述证据提示，PI3K/Akt/Nrf2信号轴可通过改善肝脏脂质沉积与氧化应激，参与治疗MAFLD。

本研究采用FFA诱导AML-12细胞构建MAFLD体外模型，通过检测细胞内TG和TC含量以评估肝细胞内脂质堆积的情况。结果显示，与模型组相比，2，5-DHBA治疗后的细胞内的脂滴形成显著减少，且TG与TC水平也显著下降。这些结果初步表明，2，5-DHBA能够有效缓解FFA诱导的肝细胞脂质蓄积，改善肝脏脂代谢紊乱。

本研究进一步通过DCFH-DA荧光探针检测了各组细胞内ROS的水平，以评估细胞的氧化应激状态[42]，结果显示，与对照组相比，FFA组的ROS水平显著升高，表明成功诱导了AML-12细胞氧化应激；且经过2，5-DHBA治疗后，细胞内ROS荧光强度呈现剂量依赖性下降。real-time PCR进一步揭示了2，5-DHBA具有多靶点调控作用：一方面，2，5-DHBA显著下调了SREBF1及FASN的mRNA表达，SREBF1是调控脂肪生成的关键转录因子，抑制其表达能够直接减少FASN等脂源基因的转录[43]，从而在分子层面解释了2，5-DHBA能够降低肝细胞脂质合成的作用。另一方面，2，5-DHBA处理显著上调了Nrf2及其核心靶基因HO-1的转录水平，表明其有效激活了内源性抗氧化防御系统。

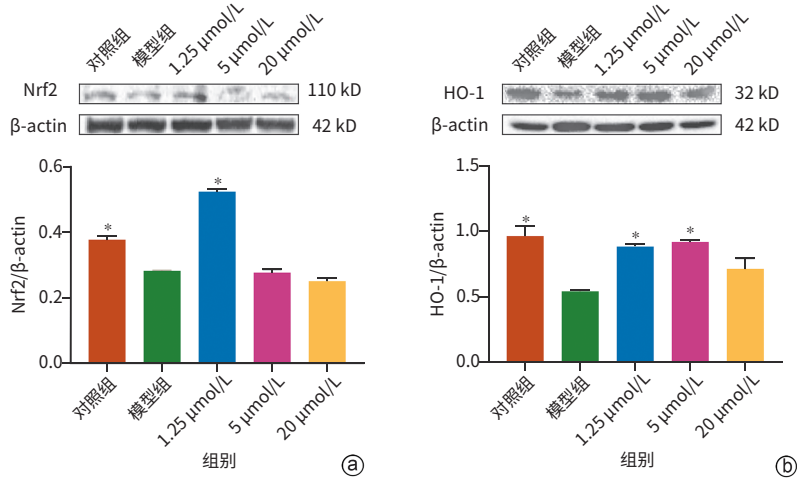
研究显示，Akt磷酸化是该通路激活的标志性产物，并可直接调控抗氧化核心因子Nrf2的表达[44]。本研究通过Western Blot检测了PI3K/Akt信号通路中关键蛋白



注：a、b，PI3K、p-PI3K的蛋白表达及相对表达量统计图；c，p-PI3K/PI3K的蛋白表达及相对表达量统计图；d、e，Akt、p-Akt的蛋白表达及相对表达量统计图；f，p-AKT/AKT的蛋白表达及相对表达量统计图。与模型组比较，*P<0.05。MAFLD，代谢相关脂肪性肝病；FFA，游离脂肪酸；PI3K，磷脂酰肌醇3-激酶；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；p-PI3K，磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶；Akt，蛋白激酶B；p-Akt，磷酸化蛋白激酶B。

图4　2，5-DHBA调节PI3K/AKT信号通路改善MAFLD

Figure 4　2，5-DHBA ameliorates MAFLD by modulating the PI3K/AKT signaling pathway



注：a，Nrf2的蛋白表达及相对表达量统计图；b，HO-1的蛋白表达及相对表达量统计图。与模型组比较，*P<0.05。Nrf2，核转录因子红系2相关因子2；HO-1，血红素加氧酶1；GAPDH，甘油醛-3-磷酸脱氢酶；2，5-DHBA，2，5-二羟基苯甲酸；MAFLD，代谢相关脂肪性肝病。

图5　2，5-DHBA抑制氧化应激改善MAFLD

Figure 5　2，5-DHBA inhibits oxidative stress to ameliorate MAFLD

的表达与磷酸化水平。结果显示,与FFA组相比,2,5-DHBA治疗会导致p-PI3K/PI3K与p-Akt/Akt比值降低。同时,作为该通路下游的核心转录因子,Nrf2的蛋白水平及其关键靶基因产物HO-1的总蛋白表达被2,5-DHBA显著上调。综上所述,推测2,5-DHBA能够通过抑制PI3K/Akt信号通路,促进Nrf2激活,从而改善MAFLD脂质代谢紊乱与氧化应激。

本研究综合网络药理学预测与细胞实验验证,初步揭示了天然多酚2,5-DHBA改善MAFLD的多靶点作用机制。结果显示,2,5-DHBA可能通过作用于EGFR、白蛋白、雌激素受体1、Toll样受体4等13个核心靶点,调控包括PI3K/Akt、低氧诱导因子1、IL-17等多条与脂质代谢、炎症及氧化应激密切相关的信号通路。实验部分发现,2,5-DHBA能够通过抑制PI3K/Akt信号通路,激活下游Nrf2/HO-1抗氧化轴,从而有效减轻肝细胞脂质堆积并缓解氧化应激。然而,本研究目前主要验证了2,5-DHBA治疗MAFLD与PI3K/Akt信号通路及Nrf2/HO-1抗氧化轴的相关性,对于2,5-DHBA调控PI3K/Akt/Nrf2信号通路的直接分子机制尚需进一步实验验证。此外,对于预测得到的EGFR、IL-17、中性粒细胞胞外诱捕网等其他相关信号通路,仍需开展深入的实验研究加以探索。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 徐俊姣负责提出研究思路,设计方案,获取数据及撰写原稿;刘彤、刘素彤和张丽慧负责校对和修改原稿;宋艺佳、吴文静、崔蓓蕾和管雅捷负责结果核查;刘鸣昊负责指导文章撰写并最后定稿。

参考文献:

[1] Machado M V, Diehl A M. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis[J]. Gastroenterology, 2016, 150(8): 1769-1777. DOI: 10.1053/j.gastro.2016.02.066.

[2] Younossi Z M, Golabi P, Paik J M, et al. The global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH): A systematic review[J]. Hepatology, 2023, 77(4): 1335-1347. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000004.

[3] Younossi Z M, Kalligeros M, Henry L. Epidemiology of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease[J]. Clin Mol Hepatol, 2025, 31(Suppl): S32-S50. DOI: 10.3350/cmh.2024.0431.

[4] Semmler G, Datz C, Trauner M. Eating, diet, and nutrition for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Clin Mol Hepatol, 2023, 29(Suppl): S244-S260. DOI: 10.3350/cmh.2022.0364.

[5] Devasia A G, Ramasamy A, Leo C H. Current therapeutic landscape for metabolic dysfunction-associated steatohepatitis[J]. Int J Mol Sci, 2025, 26(4): 1778. DOI: 10.3390/ijms26041778.

[6] Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis E A. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)[J]. Metabolism, 2016, 65(8): 1038-1048. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.

[7] Heeren J, Scheja L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism[J]. Mol Metab, 2021, 50: 101238. DOI: 10.1016/j.molmet.2021.101238.

[8] Li Y X, Yang P P, Ye J L, et al. Updated mechanisms of MASLD pathogenesis[J]. Lipids Health Dis, 2024, 23(1): 117. DOI: 10.1186/s12944-024-02108-x.

[9] Chen Z, Tian R F, She Z G, et al. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Free Radic Biol Med, 2020, 152: 116-141. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.02.025.

[10] Miura Y, Voican C, Sakai Y, et al. A computational model of the crosstalk between hepatocyte fatty acid metabolism and oxidative stress highlights the key enzymes, metabolites, and detoxification pathways in the context of MASLD[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2025, 495: 117185. DOI: 10.1016/j.taap.2024.117185.

[11] Yang K L, Chen J P, Zhang T Q, 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. DOI: 10.3389/fimmu.2022.949746.

[12] Abedi F, Razavi B M, Hosseinzadeh H. A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects[J]. Phytother Res, 2020, 34(4): 729-741. DOI: 10.1002/ptr.6573.

[13] Han X, Guo J L, Gao Y X, et al. Gentisic acid prevents diet-induced obesity in mice by accelerating the thermogenesis of brown adipose tissue[J]. Food Funct, 2021, 12(3): 1262-1270. DOI: 10.1039/d0fo02474k.

[14] Hsiang C Y, Hsu K T, Lo H Y, et al. 2, 5-dihydroxybenzoic acid ameliorates metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease by targeting the CCL2-CCR2 axis to reduce lipid accumulation[J]. Nutrients, 2025, 17(11): 1835. DOI: 10.3390/nu17111835.

[15] Bajpai A K, Davuluri S, Tiwary K, et al. Systematic comparison of the protein-protein interaction databases from a user´s perspective[J]. J Biomed Inform, 2020, 103: 103380. DOI: 10.1016/j.jbi.2020.103380.

[16] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1523. DOI: 10.1038/s41467-019-09234-6.

[17] Aniceto N, Martinho N, Rufino I, et al. LigExtract: Large-scale automated identification of ligands from protein structures in the protein data bank[J]. Genomics Proteomics Bioinformatics, 2025, 23(4): qzaf018. DOI: 10.1093/gpbjnl/qzaf018.

[18] Li Z Q, Guo C Q, Wang T J, et al. Exploring the mechanism of PFTrDA on human hepatic metabolic diseases based on network toxicology and molecular docking[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 38872. DOI: 10.1038/s41598-025-22665-0.

[19] Snigireva A V, Morenkov O S, Skarga Y Y, et al. A 2, 5-dihydroxybenzoic acid-gelatin conjugate inhibits the basal and Hsp90-stimulated migration and invasion of tumor cells[J]. J Funct Biomater, 2020, 11(2): 39. DOI: 10.3390/jfb11020039.

[20] Baidya R, Gautheron J, Crawford D H G, et al. Inhibition of MLKL attenuates necroptotic cell death in a murine cell model of ischaemia injury[J]. J Clin Med, 2021, 10(2): 212. DOI: 10.3390/jcm10020212.

[21] Geh D, Anstee Q M, Reeves H L. NAFLD-associated HCC: Progress and opportunities[J]. J Hepatocell Carcinoma, 2021, 8: 223-239. DOI: 10.2147/JHC.S272213.

[22] Abdelmalek M F. Nonalcoholic fatty liver disease: Another leap forward[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(2): 85-86. DOI: 10.1038/s41575-020-00406-0.

[23] Jurek J M, Zablocka-sowinska K, Clavero mestres H, et al. The impact of dietary interventions on metabolic outcomes in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) and comorbid conditions, including obesity and type 2 diabetes[J]. Nutrients, 2025, 17(7): 1257. DOI: 10.3390/nu17071257.

[24] Yaskolka meir A, Rinott E, Tsaban G, et al. Effect of green-

Mediterranean diet on intrahepatic fat: The DIRECT PLUS randomised controlled trial[J]. Gut, 2021, 70(11): 2085-2095. DOI: 10.1136/gutjnl-2020-323106.

[25] Wang Z W, Jin Z, Xiong Z F. Research progress of epidermal growth factor receptor in metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease and related diseases[J]. Diabetes Obes Metab, 2025, 27(10): 5418-5431. DOI: 10.1111/dom.16653.

[26] Lv M F, Zhai Y X, Yu H, et al. Linarin alleviates high-fat diet-induced NAFLD via modulating the PI3K/Akt/mTOR pathway, autophagy, and gut microbiota[J]. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids, 2025, 1870(7): 159666. DOI: 10.1016/j.bbalip.2025.159666.

[27] Hai S P, Li X T, Xie E L, et al. Intestinal IL-33 promotes microbiota-derived trimethylamine N-oxide synthesis and drives metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease progression by exerting dual regulation on HIF-1α[J]. Hepatology, 2025, 82(1): 184-198. DOI: 10.1097/HEP.0000000000000985.

[28] Ogawa N, Seki A, Nasti A, et al. Therapeutic effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on ER stress in a murine model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis: An *in vivo* and *in vitro* study[J]. Stem Cell Res Ther, 2025, 16(1): 349. DOI: 10.1186/s13287-025-04482-4.

[29] Dömer D, Walther T, Möller S, et al. Neutrophil extracellular traps activate proinflammatory functions of human neutrophils[J]. Front Immunol, 2021, 12: 636954. DOI: 10.3389/fimmu.2021.636954.

[30] van der Windt D J, Sud V, Zhang H J, et al. Neutrophil extracellular traps promote inflammation and development of hepatocellular carcinoma in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Hepatology, 2018, 68(4): 1347-1360. DOI: 10.1002/hep.29914.

[31] Shahzad M H, Rayes R F, Cools-lartigue J, et al. Neutrophil extracellular traps in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2026, 26(2): 104-117. DOI: 10.1038/s41568-025-00888-7.

[32] Feješ A, Belvončíková P, Bečka E, et al. Myeloperoxidase, extracellular DNA and neutrophil extracellular trap formation in the animal models of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2025, 31(27): 106166. DOI: 10.3748/wjg.v31.i27.106166.

[33] Xiao H M, Sun X H, Lin Z Y, et al. Gentiopicroside targets PAQR3 to activate the PI3K/AKT signaling pathway and ameliorate disordered glucose and lipid metabolism[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(6): 2887-2904. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.12.023.

[34] Lien E C, Dibble C C, Toker A. PI3K signaling in cancer: Beyond AKT[J]. Curr Opin Cell Biol, 2017, 45: 62-71. DOI: 10.1016/j.ceb.2017.02.007.

[35] Wang Z, Wang L Y, Hou Y C, et al. Dietary carbohydrate-to-protein caloric ratio availability affects hepatic fat deposition via the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Food Res Int, 2025, 219: 117035. DOI: 10.1016/j.foodres.2025.117035.

[36] Yuan Y W, Gong M X, Pan R L, et al. Artificially fermented dark loose tea ameliorates metabolic-associated fatty liver disease by activating the PI3K/AKT signalling pathway and regulating gut microbiota dysbiosis[J]. Food Chem X, 2025, 31: 103099. DOI: 10.1016/j.fochx.2025.103099.

[37] Li J D, Wang T Q, Liu P 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. DOI: 10.1039/d0fo02736G.

[38] Li L P, Huang L Y, Lei R C, et al. DEHP and DBP, common phthalates, induce glucose metabolism disorders in rats via oxidative damage of PI3K/Akt/GLUT4 signaling[J]. Environ Pollut, 2024, 341: 122948. DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122948.

[39] Liu S N, Pi J B, Zhang Q. Signal amplification in the KEAP1-NRF2-ARE antioxidant response pathway[J]. Redox Biol, 2022, 54: 102389. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102389.

[40] Zhang Y M, Zhang Z G. Modulating nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and heme oxygenase-1 in liver-brain axis disorders[J]. World J Psychiatry, 2025, 15(9): 108382. DOI: 10.5498/wjp.v15.i9.108382.

[41] Cheng Y, Gao Y, Li J, et al. TrkB agonist N-acetyl serotonin promotes functional recovery after traumatic brain injury by suppressing ferroptosis via the PI3K/Akt/Nrf2/Ferritin H pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 194: 184-198. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.12.002.

[42] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. Curr Biol, 2014, 24(10): R453-R462. DOI: 10.1016/j.cub.2014.03.034.

[43] Li Y, Xu S Q, Mihaylova M M, et al. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice[J]. Cell Metab, 2011, 13(4): 376-388. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.03.009.

[44] Salazar M, Rojo A I, Velasco D, et al. Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2[J]. J Biol Chem, 2006, 281(21): 14841-14851. DOI: 10.1074/jbc.M513737200.

收稿日期：2026-01-03；**录用日期：**2026-04-02

本文编辑：林姣

引证本文：徐俊姣, 刘彤, 刘素彤, 等. 2,5-二羟基苯甲酸对代谢相关脂肪性肝病体外细胞模型的影响及其作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2026, 42(7): 1586-1596.

Xu Junjiao, Liu Tong, Liu Sutong, et al. Effect and mechanism of action of 2, 5-dihydroxybenzoic acid on an *in vitro* cell model of metabolic associated fatty liver disease[J]. J Clin Hepatol, 2026, 42(7): 1586-1596.