

人参皂苷 F₂ 对胆汁淤积肝损伤小鼠抗炎、抗氧化、抗纤维化和抗凋亡的作用机制

徐华明^{1*}, 杨 柳¹, 闫五玲², 王培育¹, 郑思嘉¹, 刘延鑫¹, 杨 念¹, 张雪琳¹, 聂闪闪³, 付银娜², 邢伟鸽², 王富利²

1. 河南中医药大学, 河南 郑州 450046

2. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450008

3. 河南中医药大学第一附属医院, 河南 郑州 450000

摘 要: **目的** 探讨人参皂苷 F₂ (GF₂) 对 α -萘异硫氰酸酯 (ANIT) 诱导的胆汁淤积肝损伤 (CLI) 小鼠的作用及机制。**方法** 将 70 只雄性昆明小鼠随机分为 7 组 ($n=10$): 对照组、单给 GF₂ (100 mg·kg⁻¹) 组、模型组、熊去氧胆酸 (UDCA, 40 mg·kg⁻¹) 组和 GF₂ 低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg⁻¹) 组。小鼠连续 ig 给药 7 d, 于第 5 天 ig 给予 ANIT (100 mg·kg⁻¹) 建立胆汁淤积模型。自动生化仪测量血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平, 肝组织匀浆上清 MDA、SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶 (CAT) 水平; ELISA 法检测肝组织匀浆上清液中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 和脂多糖 (LPS) 水平; HE 染色和 Masson 染色进行肝组织病理学分析; TUNEL 染色观察肝细胞凋亡; 免疫组化法观察免疫细胞标志物[中性粒细胞标志物 CD11b 和 Ly6g、巨噬细胞标志物 F4/80 和 T 细胞标志物 CD3]、肝纤维化标志物[α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原 (Collagen I)]、Toll 样受体 4 (TLR4)/髓分化因子 88 (MyD88)/核因子 κ B (NF- κ B) 相关蛋白、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)/Smad 相关蛋白、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达; Western blotting 检测 TLR4/Myd88/NF- κ B、Nrf2/HO-1/NQO1 和 TGF- β 1/Smad、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)/Bax 通路蛋白表达。**结果** 与模型组比较, GF₂ 组 AST、ALT、ALP、TBA、TBIL 和 DBIL 水平显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), GF₂ 明显改善模型组肝细胞肿胀、空泡化、肝内炎症细胞浸润和坏死, 胆管增生和扩张; GF₂ 显著降低 ANIT 诱导的炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、LPS 水平 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 明显降低 CD11b、Ly6g、F4/80、CD3 表达, 显著降低 TLR4、Myd88、NF- κ B p65 和 pI κ B α 的蛋白表达 ($P<0.05$ 、0.01); GF₂ 组 MDA 水平降低, SOD、CAT 活性和 GSH 水平恢复, 差异显著 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 且上调 Nrf2 及其靶基因 HO-1 和 NQO1 蛋白的表达 ($P<0.05$ 、0.001); GF₂ 组肝纤维化明显减轻, α -SMA 和 Collagen I 表达明显下降, 且 TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001); GF₂ 减弱 CLI 小鼠的肝细胞凋亡程度, 显著降低促凋亡蛋白 Bax 的表达、显著增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P<0.05$ 、0.01)。**结论** CF₂ 可抑制 TLR4/Myd88/NF- κ B 通路减轻炎症反应、激活 Nrf2 通路减轻小鼠氧化损伤、抑制 TGF- β 1/Smad 通路减轻肝纤维化, 减轻 ANIT 诱导的细胞凋亡, 进而减轻胆汁淤积小鼠肝损伤。

关键词: 人参皂苷 F₂; 胆汁淤积; 肝损伤; 炎症; 氧化应激; 肝纤维化; 凋亡; TLR4/Myd88/NF- κ B 通路; Nrf2/HO-1/NQO1 通路; TGF- β 1/Smad 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)01-0038-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.01.004

Study on mechanism of ginsenoside F₂ on inflammation, oxidation, and fibrosis in mice with cholestatic liver injury

XU Huaming¹, YANG Liu¹, YAN Wuling², WANG Peiyu¹, ZHENG Sijia¹, LIU Yanxin¹, YANG Nian¹, ZHANG Xuelin¹, NIE Shanshan³, FU Yinna², XING Weige², WANG Fuli²

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China

2. The Third Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China

3. The First Affiliated Hospital, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China

收稿日期: 2024-07-18

基金项目: 2024 年度河南省中医药科学研究专项重点项目 (2024ZY1030)

*通信作者: 徐华明 (1977—), 男, 副教授, 博士研究生, 主要从事中西医结合消化疾病的临床与基础研究。E-mail: sirxu@foxmail.com

Abstract: Objective To investigate the effect of ginsenoside F₂ (GF₂) on α -naphthalene isothiocyanate (ANIT)-induced cholestatic liver injury (CLI) in mice and its mechanism. **Methods** 70 male Kunming mice were randomly divided into seven groups ($n = 10$): control group, single GF₂ (100 mg·kg⁻¹) group, model group, UDCA (40 mg·kg⁻¹) group, and low, medium, and high dose GF₂ (25, 50, 100 mg·kg⁻¹) groups. The mice were administered orally with the drugs for seven consecutive days, and ANIT (100 mg·kg⁻¹) was ig administered on the 5th day to establish a cholestasis model. The automatic biochemistry analyzer was used to measure serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bile acid (TBA), total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) levels, and the levels of MDA, SOD, GSH-Px, and catalase in the liver tissue homogenate supernatant; the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of inflammatory factors (tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin (IL)-6, IL-1 β , and LPS) in the liver tissue homogenate supernatant; hematoxylin and Masson staining were used for histopathological analysis of the liver tissue; TUNEL staining was used to observe hepatocyte apoptosis; immunohistochemistry was used to detect the expression of immune cell markers (neutrophil markers CD11b and Ly6g, macrophage markers F4/80 and T cell markers CD3), liver fibrosis markers (α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (Collagen I)), Toll-like receptor 4 (TLR4)/myeloid differentiation factor 88 (MyD88)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) related protein, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)/SMAD-associated protein, Bcl-2 associated X protein (Bax) protein expression. Western blotting was used to detect the expression of TLR4/Myd88/NF- κ B, Nrf2/HO-1/NQO1, TGF- β 1/Smad, B-lymphoblastoma-2 (Bcl-2)/Bax pathway proteins. **Results** Compared with the model group, the levels of AST, ALT, ALP, TBA, TBIL and DBIL were significantly lower in the GF₂ group ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and GF₂ significantly improved the liver cell swelling, vacuolization, intrahepatic inflammatory cell infiltration and necrosis, bile duct hyperplasia and dilation in the model group; GF₂ significantly lowered the levels of inflammatory factors TNF- α , IL-6, IL-1 β and LPS induced by ANIT ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and significantly lowered the expression of CD11b, Ly6g, F4/80, CD3, and significantly downregulated the protein expression of TLR4, Myd88, NF- κ B p65 and pI κ Ba ($P < 0.05, 0.01$); the level of MDA was lowered in the GF₂ group, and the activities of SOD and CAT and the level of GSH were restored, with significant differences ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the expression of Nrf2 and its target genes HO-1 and NQO1 was significantly upregulated ($P < 0.05, 0.001$); the degree of liver fibrosis was significantly alleviated in the GF₂ group, and the expression of α -SMA and Collagen I was significantly downregulated, and the expression of TGF- β 1, Smad2 and Smad3 was significantly downregulated ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); GF₂ weakened the degree of liver cell apoptosis in CLI mice, significantly decreased the expression of pro-apoptotic protein Bax and significantly increased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** CF₂ can inhibit the TLR4/Myd88/NF- κ B pathway to alleviate inflammatory responses, activate the Nrf2 pathway to alleviate oxidative damage in mice, inhibit the TGF- β 1/Smad pathway to alleviate liver fibrosis, alleviate cell apoptosis induced by ANIT, and thereby alleviate liver damage in cholestasis mice.

Key words: ginsenoside F₂; cholestasis; liver injury; inflammation; oxidative stress; liver fibrosis; apoptosis; TLR4/Myd88/NF- κ B pathway; Nrf2/HO-1/NQO1 pathway; TGF- β 1/Smad pathway

胆汁淤积性肝损伤 (CLI) 是由于胆汁代谢障碍, 导致其在肝内积聚, 进而损伤肝细胞的一种常见的消化系统疾病^[1]。如不及时治疗, 蓄积的毒性胆汁酸可导致急性肝毒性和胆管增生, 最终导致肝硬化甚至肝衰竭^[2]。部分患者对一线治疗药物熊去氧胆酸 (UDCA) 无应答, 奥贝胆酸 (OCA) 辅助治疗可能为某些患者提供额外的生化改善, 但对于严重瘙痒或晚期肝硬化患者的耐受性不佳^[3]。因此寻找有效、不良反应少的药物作为辅助用药至关重要。

人参皂苷是人参中最丰富的活性成分, 对多种疾病具有广泛的药理学功能^[4-7]。研究发现人参皂苷可以减轻 α -萘异硫氰酸酯 (ANIT) 诱导的 CLI 小鼠脂质代谢紊乱和氧化应激^[8], 其主要单体皂苷 Rg₁ 可通过抑制肝脏炎症和氧化应激减轻 CLI^[9]。其他

主要人参皂苷活性成分虽未见对 CLI 的报道研究, 但对病毒性肝炎、急性肝损伤和肝纤维化等各种肝脏疾病具有显著的预防和治疗作用, 如人参皂苷 F₂ (GF₂)、人参皂苷 Rg₃^[10]等。然而, GF₂ 作为人参皂苷重要活性成分之一, 对 CLI 是否具有协同作用尚未得到研究。尽管 GF₂ 在人参中的含量很低, 但对脂肪性肝病、癌症和皮肤炎症等疾病有改善作用^[11-13], 具有显著的抗炎和抗氧化的药理学功效^[14-15], 因此本研究探索 GF₂ 是否有治疗 CLI 的潜力。CLI 的发病机制复杂, 炎症反应、氧化应激、胆管细胞异常增生、纤维化和胆管反应都可以推动疾病进展^[16]。胆汁酸蓄积介导的炎症反应、氧化应激和肝纤维化是 CLI 的重要病理机制^[17-18]。因此, 抗炎、抗氧化、抗纤维化是目前 CLI 的研究方向。

ANIT 是一种肝细胞毒性和胆管毒性物质,能够直接损伤肝细胞和胆管上皮细胞,抑制肝脏内胆汁的分泌和排泄过程,使胆汁在肝内淤积,进而引发胆汁淤积性肝病^[19]。使用 ANIT 诱导小鼠 CLI 模型操作简单、易于复制、稳定性好,被广泛使用^[20-22]。因此本研究采用 ANIT 诱导的小鼠作为胆汁淤积肝损伤动物模型。

基于 GF₂ 具有抗炎和抗氧化的药理学功效,而炎症反应和氧化应激又介导 CLI 的疾病进展,且其对 CLI 的影响尚未见报道,因此本研究通过建立 CLI 小鼠模型,观察 GF₂ 对 CLI 小鼠抗炎、抗氧化和抗纤维化的作用机制。

1 材料

1.1 主要试剂

GF₂ (质量分数≥98%, 货号 62025-49-4) 购自南京源植生物科技有限公司; ANIT (质量分数 98%, 货号 N106389) 购自上海阿拉丁生物科技有限公司; 苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号 DKW502) 购自达科为生物技术有限公司; F4/80 和 CD3 抗体 (货号 S0B0227、S0B2132) 购自杭州斯达特生物科技有限公司; 抗体 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、Smad2、Smad3、GAPDH (货号 AF1032、BF8012、AF6449、AF3362、AF7021) 购自 Affinity 生物公司; 抗体 Ly6g、CD11b、髓分化因子 88 (MyD88)、血红素加氧酶 1 (HO-1)、醌氧化还原酶-1 (NQO1)、I 型胶原 (Collagen I) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) (货号 WLH4318、WL05285、WL02494、WL02400、WL04860、WL0088、WL01637) 购自上海万类生物技术有限公司; Toll 样受体 4 (TLR4) 和抗兔二抗 (IgG-HRP) (货号 abs13200、abs20040ss) 购自上海优宁维生物技术有限公司; 抗体核因子 κ B (NF- κ B) p65 和磷酸化 I κ B 激酶- α (pI κ B α) 购自美国 CST 公司; 核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 抗体 (货号 PA5-27882) 购自 Proteintech 公司; 丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT) 生化检测试剂盒 (货号 G4300、G4307) 购自武汉塞维爾公司; 白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (货号 BMS654、ESIL1B、88-7064-22) 购自赛默飞试剂公司; 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、碱性磷酸酶 (ALP)、总胆汁酸 (TBA) 检测试剂盒 (货号 S03030、S03040、S03038、S03074) 购自深圳雷杜生命科技有限公司; BCA 检

测试剂盒 (货号 G2026)、 β -actin 抗体 (货号 GB15003) 均购自武汉塞维爾生物科技有限公司; 总胆红素 (TBIL) 和直接胆红素 (DBIL) 检测试剂盒 (货号 C120、C119) 购自长春汇力生物技术有限公司; 脂多糖 (LPS) ELISA 试剂盒 (货号 IEB526Ge) 购自武汉优尔生科技公司; DAB 显色试剂盒 (货号 ZLI-9017) 购自中杉金桥公司; 超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (货号 A001-1、A005) 购自南京建成科技有限公司; Masson 三色染色和 EDTA 抗原修复液 (货号 G1340、C1034) 购自北京索莱宝公司; TUNEL 检测试剂盒 (货号 C1090) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

Chemray 800 全自动生化分析仪 (深圳雷杜公司); KZ-II 高速组织研磨仪 (赛维爾科技有限公司); D3024R 台式高速冷冻离心机 [大龙兴创实验仪器 (北京) 股份公司]; RT-3500 全自动洗板机 (雷杜生命科技有限公司); Epoch 酶标检测仪 (美国 BioTeK 公司); ASP300S 脱水机、RM2235 病理切片机 (德国徕卡公司); YABO400 包埋机 (常州市雅博电子设备有限公司); DSP360 染色封片一体机 (深圳达科为医疗设备有限公司); BX43 正置光学显微镜 (日本奥林巴斯)。

1.3 实验动物

8 周龄雄性昆明小鼠 70 只, 体质量 22~25 g, 购于河南省实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (豫) 2021-0015。动物饲养和实验均在河南中医药大学动物实验中心进行, 并经河南中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: DWLL202208002)。小鼠被安置在 20~24 °C 和 60%~70% 湿度的环境中, 接受 12 h 的光/暗循环, 标准实验室饮食和自由饮水。

2 方法

2.1 动物分组、给药、取材

适应性喂养 1 周后, 将小鼠随机分为 7 组 ($n=10$), 即对照组、单给 GF₂ (100 mg·kg⁻¹) 组、模型组、UDCA (40 mg·kg⁻¹) 组和 GF₂ 低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg⁻¹) 组。小鼠连续 ig 给药 7 d, 除对照组和单给 GF₂, 各组于第 5 天 ig 给予 ANIT (100 mg·kg⁻¹) 建立胆汁淤积模型。实验结束后下腔静脉取血、取肝脏用于后续实验。

2.2 血清肝功能和肝组织氧化应激指标水平检测

将全血样品在 4 °C 条件下以 3 000 r·min⁻¹ 离心

15 min, 使用自动生化仪测定上清液中 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL、DBIL、MDA、SOD、GSH-Px 水平。准确称取小鼠肝组织质量, 按质量 (mg) - 体积 (μL) 1 : 9 的比例加入 9 倍体积的匀浆介质, 冰水浴条件下, 机械匀浆, 制备成 10% 的匀浆液, $3\,000\text{ r min}^{-1}$ 离心 10 min 取上清液。根据试剂盒说明书测定 MDA、SOD、GSH-Px 和 CAT 水平。

2.3 ELISA 检测炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 LPS 水平

ELISA 法检测肝组织匀浆上清液中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 和 LPS 水平, 按试剂盒说明书操作, 依次进行封闭、加样、抗体工作液孵育、酶底物显色, 最后在酶标仪上于 450 nm 处, 以空白对照孔调零后测各孔吸光度 (A) 值。

2.4 肝组织 HE 染色、Masson 染色和 TUNEL 染色

肝脏样品保存在 4% 多聚甲醛中, 梯度乙醇脱水后包埋在石蜡中并切片 ($4\text{ }\mu\text{m}$)。石蜡脱水后, 进行常规 HE 染色。Masson 三色染色: 苏木素染色 5 min, 1% 盐酸分化, 流水冲洗数分钟, Masson 复合染色液 5 min, 1% 磷钨酸液处理 5 min, 亮绿染色液 (或苯胺蓝液) 复染 5 min, 1% 冰醋酸水处理 1 min。常规脱水透明, 中性树胶封固。TUNEL 染色: 脱蜡至水后滴加 $20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ 不含 DNase 的蛋白酶 K, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, 然后使用磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制的 3% 过氧化氢溶液于室温孵育 20 min, 以灭活切片内源的过氧化物酶, 洗涤后, 在样品上加 $50\text{ }\mu\text{L}$ 生物素标记液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 60 min, 洗涤后 DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 最后常规脱水透明, 封片, 显微镜下观察。

2.5 免疫组织化学染色检测靶蛋白表达

肝组织切片常规脱水后, 使用 EDTA 进行高温抗原修复, 再用 3% H_2O_2 灭活 10 min, 封闭液封闭 1 h, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下与不同靶标一抗孵育 1 h: F4/80 (1 : 500)、CD3 (1 : 4 000)、CD11b (1 : 500)、Ly6g (1 : 400)、TLR4 (1 : 200)、Myd88 (1 : 400)、NF- κB p65 (1 : 1 600)、pIkBa (1 : 200)、Nrf2 (1 : 800)、HO-1 (1 : 200)、NQO1 (1 : 400)、Collagen I (1 : 200)、 α -SMA (1 : 500)、TGF- β 1 (1 : 200)、Smad2 (1 : 200)、Smad3 (1 : 200)、Bax (1 : 200)。用 Tris 缓冲盐水 (TBS) 洗涤 3 次后, 将切片与山羊抗兔二抗 (1 : 1 000) 孵育 30 min, 并使用 DAB 进行显色反应后, 使用苏木精对细胞核复染, 最后脱水透明封片进行观察。

2.6 Western blotting 检测肝组织相关蛋白表达

在含有蛋白酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解物中裂解肝组织, 离心后提取总蛋白, 并使用 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质, 转移到 PVDF 膜上进行 Western blotting 检测, 用 5% 脱脂奶密封后用 TBST 洗涤 3 次, 并与相应一抗在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜: TLR4 (1 : 2 000)、Myd88 (1 : 4 000)、NF- κB p65 (1 : 1 000)、pIkBa (1 : 1 000)、Nrf2 (1 : 5 000)、HO-1 (1 : 2 000)、NQO1 (1 : 1 000)、TGF- β 1 (1 : 2 000)、Smad2 (1 : 2 000)、Smad3 (1 : 2 000)、Bax (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、 β -actin (1 : 2 000)、GAPDH (1 : 9 000)。第 2 天, 洗涤膜并与山羊抗兔二抗一起孵育。最后, 使用 ECL 化学发光试剂对条带进行可视化和定量。

2.7 统计学处理

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析, 计量资料符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD- t 检验。

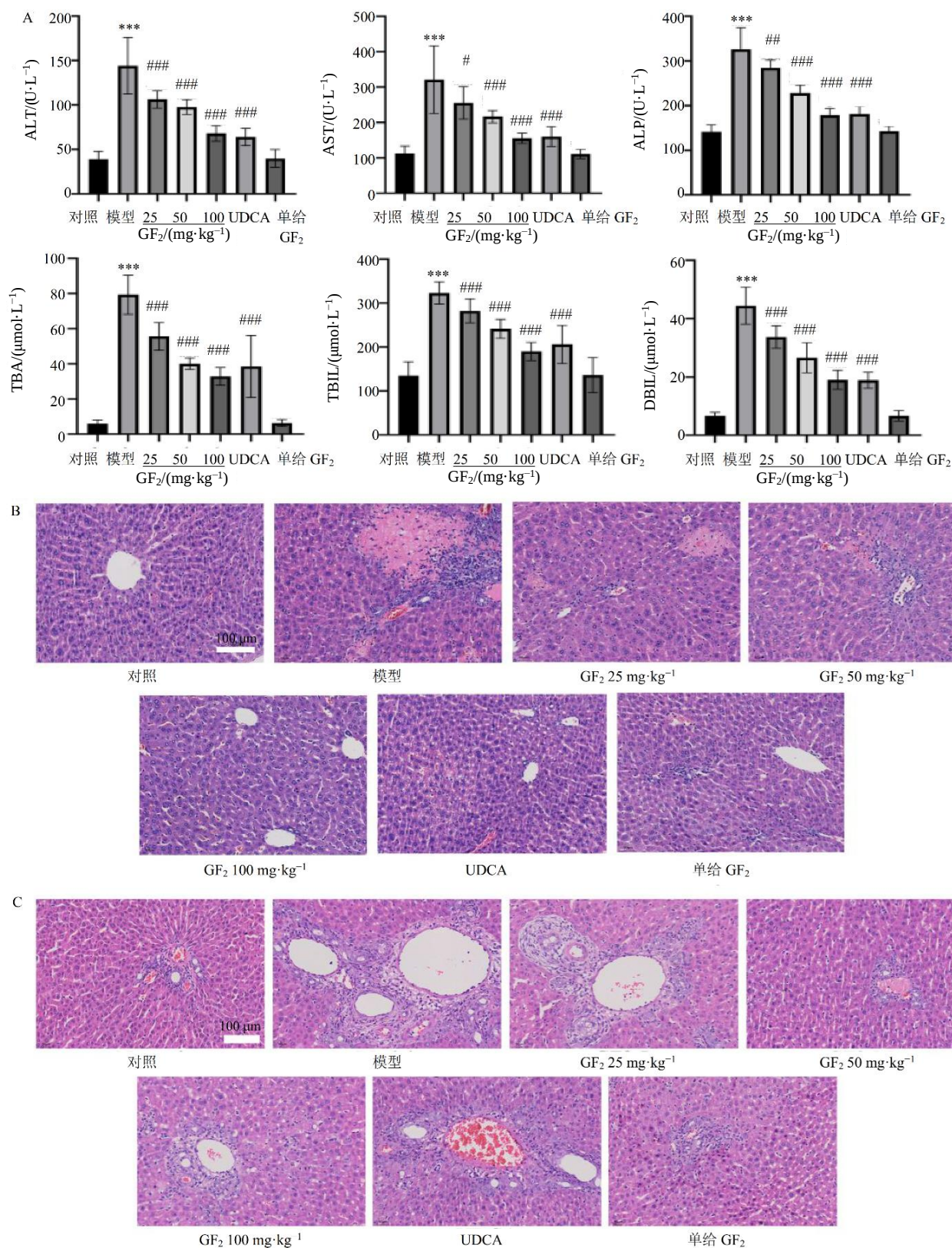
3 结果

3.1 GF₂ 减轻 ANIT 诱导的小鼠肝损伤

如图 1 所示, 与对照组相比, ANIT 诱导的小鼠血清 AST、ALT、ALP、TBA、TBIL 和 DBIL 水平显著升高 ($P < 0.001$), 提示肝功能损伤; 与模型组比较, UDCA ($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和 GF₂ 低、中、高剂量 (25 、 50 、 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组 AST、ALT、ALP、TBA、TBIL 和 DBIL 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 且 GF₂ 作用呈剂量相关性。HE 染色显示模型组肝细胞肿胀、空泡化、肝内炎症细胞浸润和坏死, 胆管增生和扩张, 这些病理变化是 CLI 的典型表现; GF₂ 以剂量相关地方式改善病理变化。

3.2 GF₂ 抑制 TLR4/NF- κB 通路减轻 ANIT 诱导的小鼠炎症损伤

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、LPS 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, GF₂ 显著降低了 ANIT 诱导的炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、LPS 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。与对照组比较, 模型组中性粒细胞标志物 CD11b 和 Ly6g、巨噬细胞标志物 F4/80 和 T 细胞标志物 CD3 表达明显增加; 与模型组比较, GF₂ 明显降低了 CD11b、Ly6g、F4/80、CD3 表达。

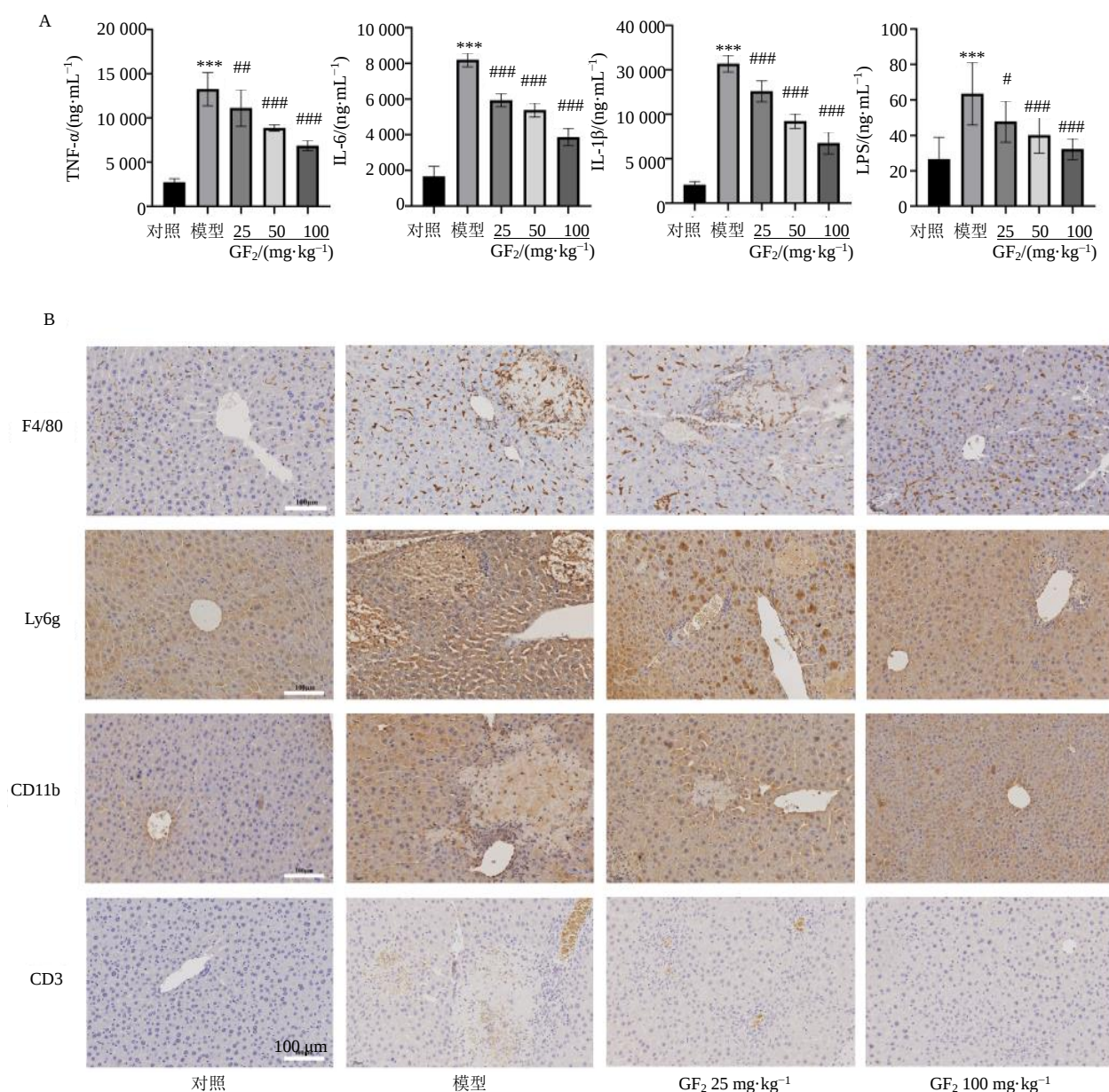


A-血清 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL、DBIL 水平; B-HE 染色肝切片的组织病理学结果 (比例尺, 100 μm); C-HE 染色观察肝脏胆管增生情况 (比例尺, 100 μm)。与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-Serum levels of ALT, AST, ALP, TBA, TBIL, and DBIL; B-Histopathological results of HE stained liver slices (bar, 100 μm); C-HE staining observation of hepatic bile duct hyperplasia (bar, 100 μm). *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 1 GF₂ 减轻 ANIT 诱导的小鼠肝损伤 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 1 GF₂ alleviates ANIT induced liver injury in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



A-肝组织炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β、LPS 表达水平; B-IHC 检测免疫细胞标志物 F4/80、Ly6g、CD11b、CD3 浸润结果 (比例尺: 100 μm)。与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-expression of inflammatory factors TNF-α, IL-6, IL-1 β, and LPS in liver tissue; B-IHC detection of immune cell markers F4/80, Ly6g, CD11b, CD3 infiltration results (scale bar: 100 μm). *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

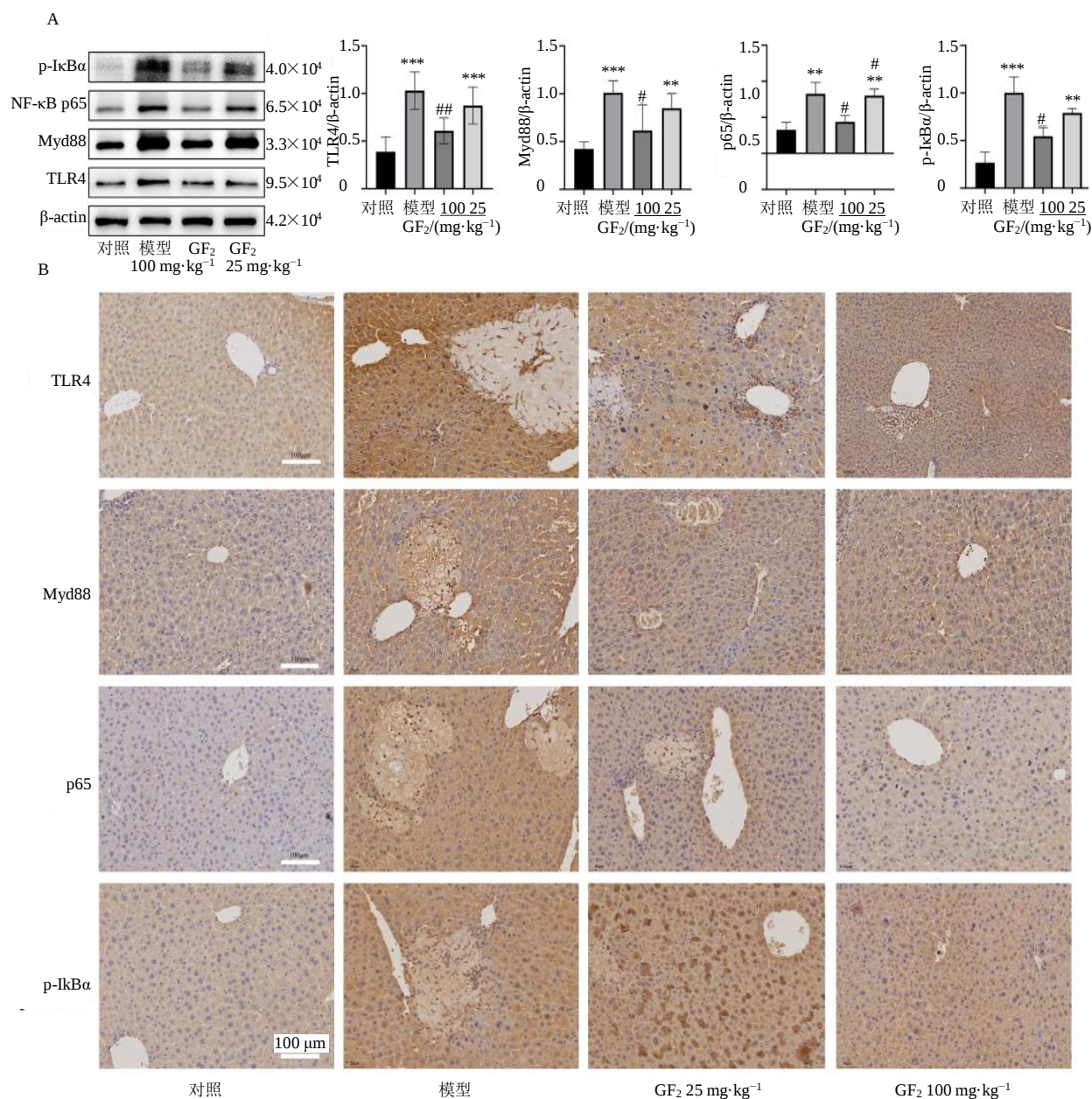
图 2 GF₂ 减弱 ANIT 诱导的小鼠肝组织炎症因子和免疫细胞浸润 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 2 GF₂ weakens expression of inflammatory factors and immune cells induced by ANIT in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Western blotting 和免疫组织化学检测炎症信号通路 TLR4/NF-κB 相关蛋白表达, 如图 3 所示, 与对照组相比, 模型组小鼠的 TLR4、Myd88、NF-κB p65 和 pIκBα 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, GF₂ 高剂量显著降低了这些蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果表明, GF₂ 可以通过抑制 TLR4/Myd88/NF-κB 通路来减轻 ANIT 诱导的小鼠炎症损伤。

3.3 GF₂ 激活 Nrf2/HO-1/NQO1 通路减轻 ANIT 诱导的小鼠氧化损伤

测定血清和组织中氧化应激标记物的水平以探究 GF₂ 对胆汁淤积小鼠氧化应激的影响 (图 4-A、B), 与对照组相比, 模型组小鼠 GSH-Px 耗竭, SOD 和 CAT 活性降低, MDA 水平升高, 均差异显著 ($P < 0.001$); 用 GF₂ 预处理后, MDA 水平降低, SOD、CAT 活性和 GSH 水平恢复, 差异显著



A-Western blotting 检测肝组织 TLR4、Myd88、NF-κB p65 和 p-IκBα 蛋白表达水平；B-IHC 检测 TLR4、Myd88、NF-κB p65 和 p-IκBα 表达（比例尺，100 μm）。与对照组比较：** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

A-Western blotting was used to detect the protein expression levels of TLR4, Myd88, NF-κB p65, and p-IκBα; B-IHC was used to detect the expression of TLR4, Myd88, NF-κB p65, and p-IκBα (scale bar, 100 μm). ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 3 GF₂ 抑制 TLR4/NF-κB 通路减轻 ANIT 诱导的小鼠炎症损伤 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 3 GF₂ inhibits TLR4/NF-κB pathway reduces ANIT induced inflammatory damage in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

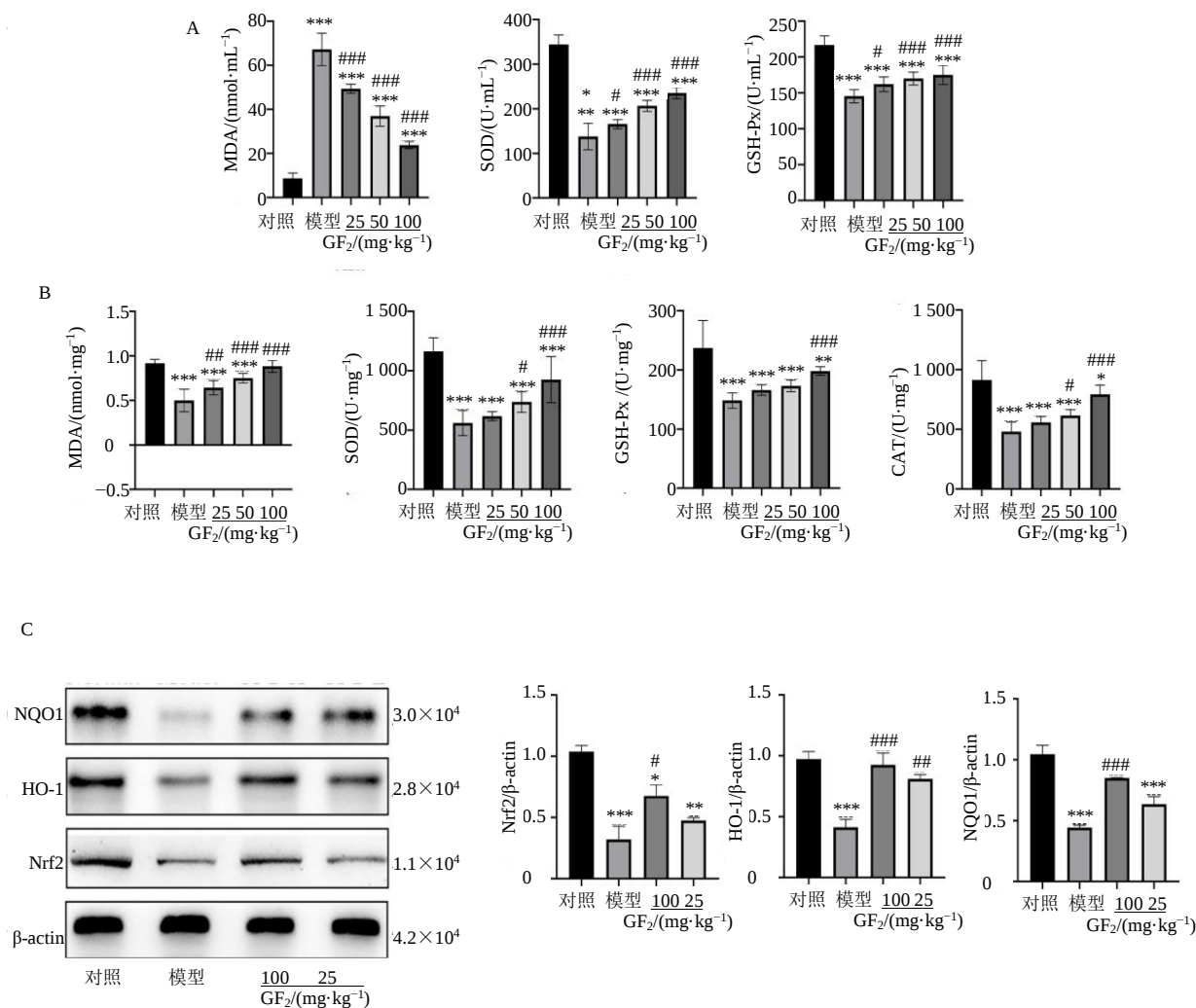
($P < 0.05$, 0.01, 0.001)。

由于 Nrf2 是对抗氧化应激的重要转录因子，因此使用 Western blotting 检测了 Nrf2 通路蛋白在肝组织中的表达（图 4-C），与对照组相比，模型组小鼠 Nrf2 蛋白及其靶基因 HO-1 和 NQO1 蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.001$)；与模型组相比，GF₂ 处

理可以恢复 Nrf2 及其靶基因 HO-1 和 NQO1 蛋白的表达，高剂量组差异显著 ($P < 0.05$, 0.001)。结果表明，GF₂ 预处理减轻了 ANIT 引起的氧化损伤。

3.4 GF₂ 抑制 TGFβ1/Smad 通路减轻 ANIT 诱导的小鼠肝纤维化

Masson 染色显示模型组小鼠肝脏存在严重纤



A-血清氧化应激标志物 MDA、SOD、GSH-Px 表达水平; B-肝组织 MDA、SOD、GSH-Px、CAT 表达水平; C-Western blotting 检测 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白的表达。与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

A-expression levels of serum oxidative stress markers MDA, SOD, and GSH-Px; B-expression levels of MDA, SOD, GSH-Px, and CAT in liver tissue; C-Western blotting was used to detect expression of Nrf2, HO-1, and NQO1 proteins. *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 4 GF₂ 激活 Nrf2/HO-1/NQO1 通路减轻 ANIT 诱导的小鼠氧化损伤 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 4 GF₂ activates Nrf2/HO-1/NQO1 pathway to alleviate ANIT induced oxidative damage in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

维化 (图 5-A); 与模型组比较, 各给药组肝纤维化明显减轻。免疫组织化学染色显示 (图 5-B), 与对照组相比, ANIT 诱导的小鼠肝脏中纤维化标志物 α -SMA 和 Collagen I 的表达增加; 与模型组比较, GF₂ 组 α -SMA 和 Collagen I 表达明显下降。

TGF- β 1/Smad 通路在肝纤维化的发展中起着关键作用 (图 6), 肝组织免疫组化和 Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠 TGF- β 1、Smad2 和 Smad3 的表达显著增加 ($P < 0.01$ 、0.001); 与模型组比较, GF₂ 高剂量组显著降低了

TGF- β 1、Smad2、Smad3 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 低剂量组显著降低了 TGF- β 1、Smad2 蛋白表达 ($P < 0.05$), 高剂量显示出比低剂量更好的改善效果。

3.5 GF₂ 减轻 ANIT 诱导的小鼠细胞凋亡

如图 7 所示, 肝组织 TUNEL 染色显示, 模型组小鼠的坏死区域中凋亡蛋白强阳性表达, GF₂ 预处理减弱了 CLI 小鼠的细胞凋亡程度。此外, 与对照组比较, 模型组 Bax 蛋白表达显著增加, Bcl-2 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001); 与模型组比较,

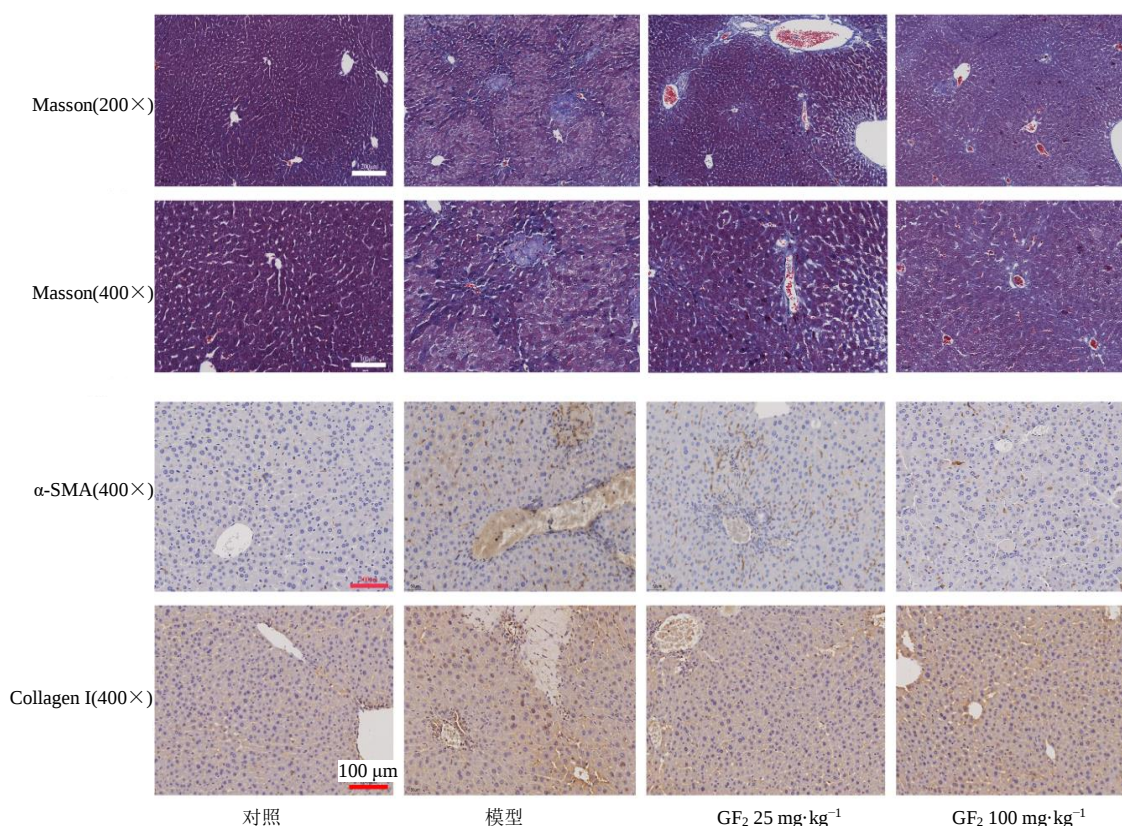


图 5 Masson 染色和免疫组化检测纤维化标志物 α -SMA、Collagen I 表达

Fig. 5 Masson staining and immunohistochemical detection of fibrosis markers α -SMA and Collagen I expression

GF₂ 显著降低促凋亡蛋白 Bax 的表达、显著增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05, 0.01$), 高剂量表现出比低剂量更好的作用。

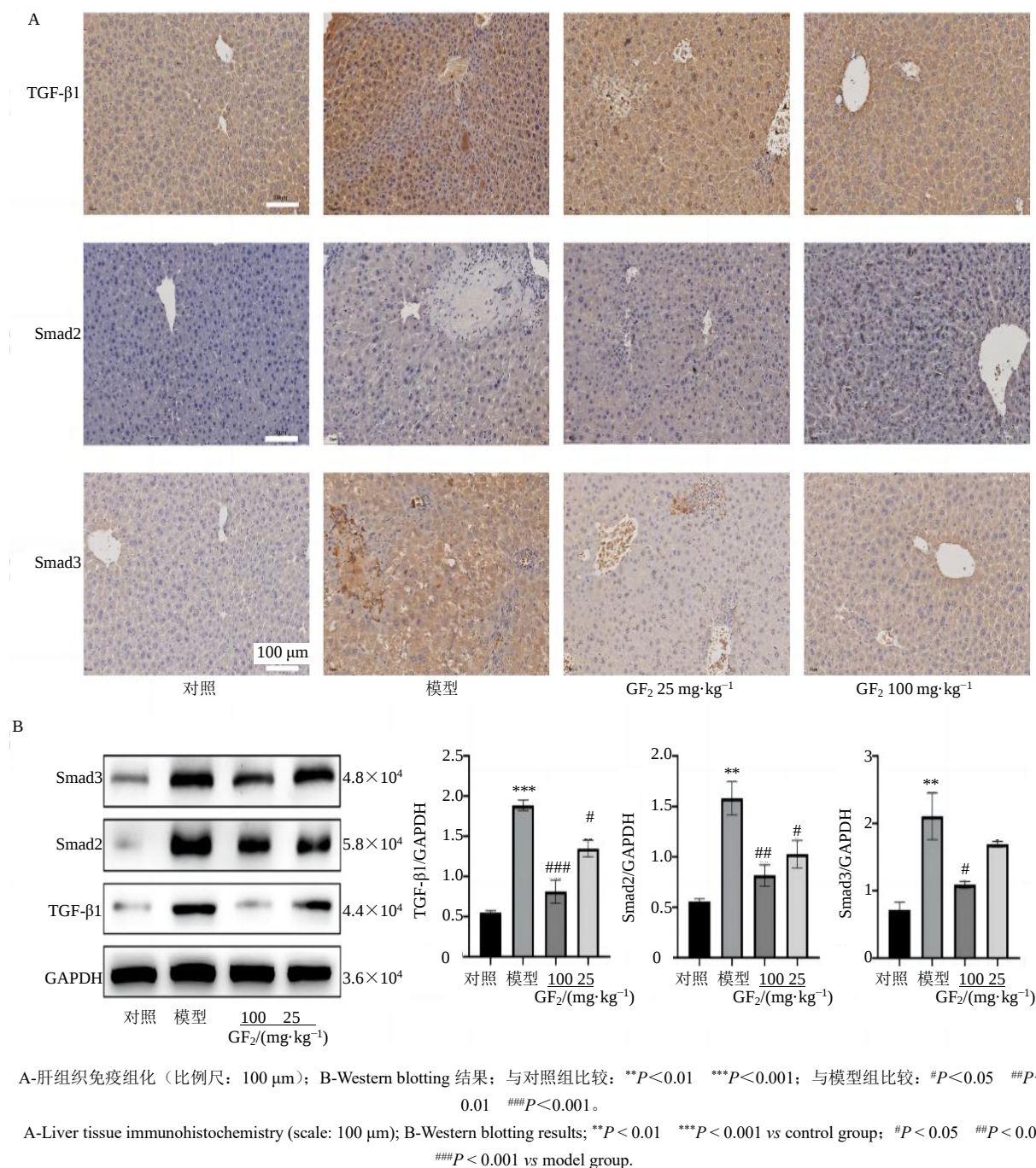
4 讨论

CLI 是由各种原因引起的胆汁代谢障碍, 导致肝脏和体循环中胆汁酸、胆固醇、胆红素和其他胆汁成分过度堆积引起的肝脏损伤^[23]。胆汁淤积与多种疾病密切相关, 是许多肝系疾病的共同病理特征^[24]。现有治疗药物熊去氧胆酸和奥贝胆酸疗效有限且副作用大, 因此开发多靶点且副作用少的药物意义重大^[25]。本研究发现 GF₂ 可以有效改善 ANIT 诱导小鼠的肝功能, 减轻肝脏病理损伤。

肝脏是先天免疫反应的重要器官, 并在代谢外源性物质, 包括细菌产物、环境毒素和食物抗原发挥重要作用。胆汁酸的毒性作用与其疏水性呈正比^[26]。在血液系统中, 中性粒细胞是抵御感染和组织损伤的第一道防线, 胆汁淤积发生时, 毒性胆汁酸充当炎症介质, 诱导中性粒细胞在肝组织中募集和浸润, 并引发中性粒细胞介导的炎症反应^[27]。本研究发现模型组有大量中性粒细胞浸润于肝组

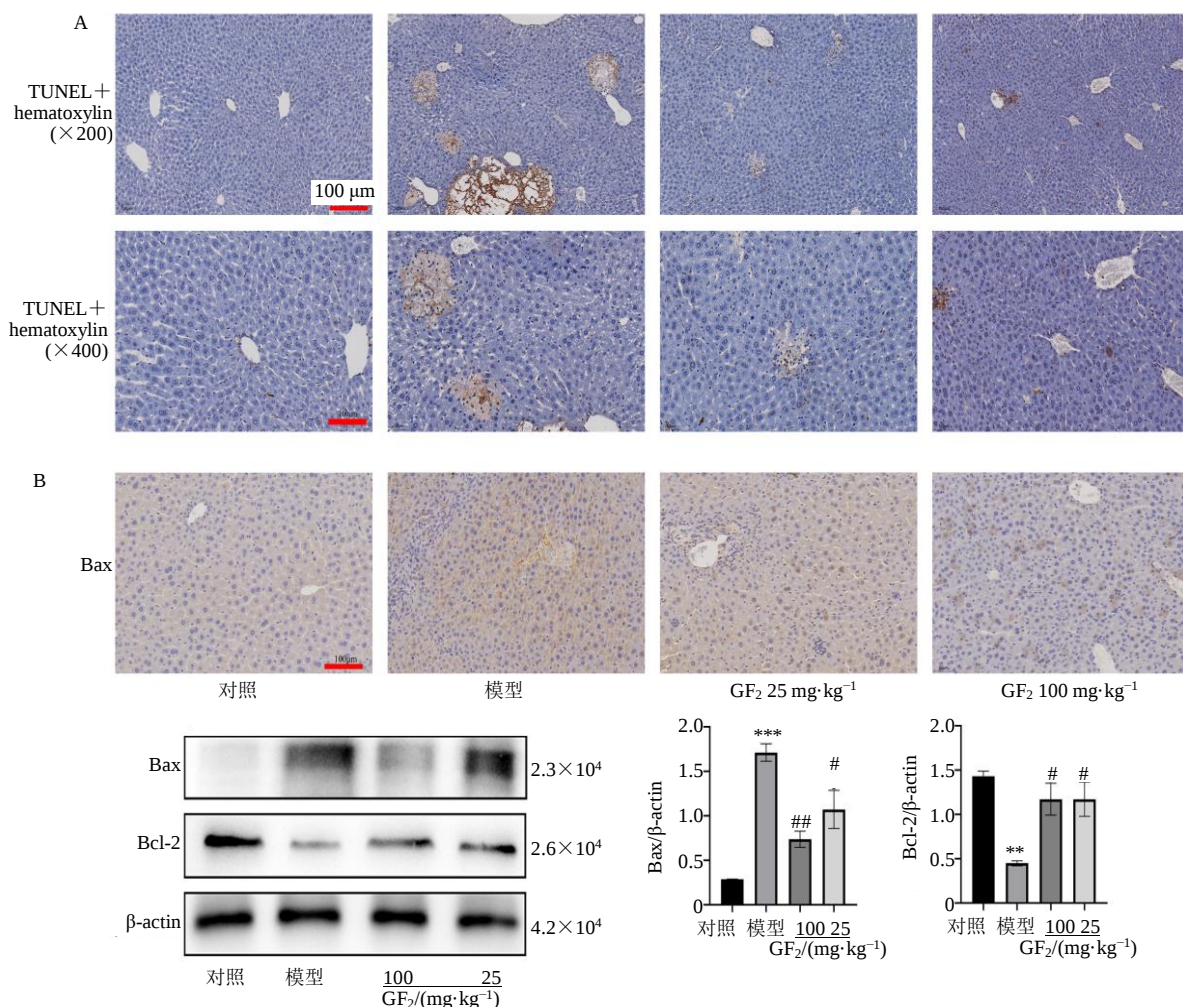
织坏死区, 进一步证实了它们在 CLI 中的关键作用。GF₂ ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 显著减轻炎症浸润, 改善肝组织的结构损伤, 恢复肝脏形态, 并降低中性粒细胞标志物 CD11b 和 Ly6g 的表达, 巨噬细胞标志物 F4/80 和 T 细胞标志物 CD3 表达。

据报道, 损伤相关分子模式 (DAMPs) 激活的免疫反应是 CLI 的另一个重要机制^[28]。DAMPs 激活先天免疫系统中表达模式识别受体 (PRRs) 的细胞, TLR4 是介导信号传导的重要 PRR^[29]。一方面, 损伤的肝细胞和胆管细胞会释放 DAMPs, 另一方面, 由于肠肝循环, 当胆汁淤积发生时, 胆汁无法正常流入肠道, 导致肠道中有害细菌的过度生长, 并损害肠道屏障功能, 导致肠上皮通透性增加, 高水平的细菌内毒素 LPS 渗入体循环^[30]。TLR4/Myd88/NF- κ B 通路是负责宿主对 LPS 反应的主要先天免疫通路, 其通过上调炎症反应相关信号分子, 如 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 等, 促进炎症反应的启动和扩增, 参与炎症的发展^[31]。本研究发现 GF₂ 可以抑制 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号传导, 减少炎症因子的释放, 从而减轻炎症反应。

图 6 GF_2 抑制 TGF- β 1/Smad 通路减轻 ANIT 诱导的小鼠肝纤维化 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)Fig. 6 GF_2 inhibits TGF- β 1/Smad pathway reduces ANIT induced liver fibrosis in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

活性氧 (ROS) 水平升高引起的氧化还原平衡紊乱是 CLI 进展的一个重要因素^[32]。首先, 毒性胆汁酸的疏水性使其容易破坏膜稳定性, 并损伤线粒体等细胞器结构和功能, 导致氧自由基和脂质过氧化产物增加, 氧化还原平衡被打破, 同时, 毒性胆汁酸通过激活膜相关蛋白, 如 NADPH 氧化酶类, 催化生成 ROS^[33]。其次, 线粒体功能障碍会损害线粒体中的电子传递链, 导致电子泄漏和 ROS 的产生^[34]。

膜电位的不平衡导致线粒体通透性转换孔 (MPT) 的打开, ROS 和其他分子释放到基质中, 例如细胞色素 C (CytC) 进入细胞质, 并伴随着 Bax 表达增强以及 Bcl-2 表达减少, 从而诱导细胞凋亡并进一步加剧氧化应激^[35]。其次, 氧自由基和脂质过氧化产物会作用于线粒体 DNA (mtDNA), 导致其碱基序列发生改变, 进而引起线粒体功能异常, mtDNA 损伤影响 ATP 酶的活性, 当 ATP 酶活性降低时,



A-肝组织 TUNEL 染色；B-免疫组化检测凋亡蛋白 Bax 水平和 Western blotting 检测 Bax 和 Bcl-2 表达；与对照组比较：*** $P < 0.001$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

A-TUNEL staining of liver tissue; B-Immunohistochemical detection of apoptotic protein Bax levels and Western blotting detection of Bax and Bcl-2 expression. *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 GF_2 减轻 ANIT 诱导的小鼠细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 7 GF_2 inhibits TGF- $\beta 1$ /Smad pathway reduces ANIT induced liver fibrosis in mice ($\bar{x} \pm s, n=10$)

会影响到能量代谢，最终导致肝细胞死亡。此外，免疫细胞通过产生 ROS 和次氯酸（一种由髓过氧化物酶产生的强效氧化剂）来促进的细胞毒性^[36]。整个炎症过程都伴随着 ROS 产生增加。

Nrf2 是机体对氧化应激损伤反应中的一个重要转录因子，它可以诱导 HO-1、NQO1 和 SOD 等抗氧化酶发挥抗氧化作用^[37]。研究表明 Nrf2 激活剂可调节脂质代谢和氧化应激，减轻肝细胞损伤^[38]。在生理条件下，Nrf2 与 Keap1 形成同源二聚体，隔离在细胞质中并被泛素化抑制。当氧化-抗氧化剂平衡被破坏时，Keap1-Nrf2 复合物解离，Nrf2 易位到细胞核，启动抗氧化基因的转录^[39]。Nrf2 激活可抑制

氧化应激和炎症反应，调节 BA 稳态，并减轻胆汁淤积期间的纤维化^[40]。研究显示 Nrf2 基因敲除小鼠出现严重肝损伤、线粒体功能障碍和抗氧化反应降低表现^[41]。本研究结果表明， GF_2 激活 Nrf2，增加抗氧化剂 SOD、GSH-Px、CAT、HO-1 和 NQO1 的水平，降低 MDA 水平，并减轻 CLI 小鼠的细胞凋亡程度。

胆汁淤积导致的肝纤维化是其病理进展的又一重要机制^[42]。肝纤维化的发展机制涉及肝星状细胞（HSC）的激活、胶原沉积、炎症反应、氧化应激、细胞凋亡和坏死^[43]。预防和逆转肝纤维化对于治疗慢性肝病和预防肝硬化具有重大意义^[44]。HSC

的活化是肝纤维化发展的关键因素, 细胞外基质 (ECM) 过度沉积是肝纤维化的特征^[45]。TGF- β 1/Smad 信号通路在肝纤维化的发生发展中起着重要作用^[46]。TGF- β 1 是最重要的肝纤维化因子, Smad 蛋白是 TGF- β 1 的关键效应因子, 被激活时, 作为转录因子调节特定基因的转录, 促进肝纤维化相关蛋白如 Collagen I 的表达, 这些蛋白质是 ECM 的主要成分, 它们的过度表达会导致肝组织结构异常, 并最终发展为肝纤维化。本研究结果表明, GF₂ 对 TGF- β 1/Smad 通路的抑制减轻了 CLI 小鼠的肝纤维化, 并显著降低了 HSC 活化标志物 α -SMA 的表达和 ECM 主要成分 Collagen I 的蛋白表达。

本研究初步探索了 GF₂ 对 CLI 的改善作用, 表明 GF₂ 可抑制 TLR4/NF- κ B 通路、激活 Nrf2/HO-1 并抑制 TGF- β 1/Smad 信号通路达到抗炎、抗氧化和抗纤维化的作用, 从而减轻 CLI。然而, GF₂ 最显著激活作用的通路靶标还需后续研究探索。炎症反应和氧化应激相互作用, 共同介导了 CLI 的病理进展, 然而介导其机制的关键通路之间的相互作用仍有待探索。研究发现 Nrf2/HO-1 负责上调具有细胞保护功能的多种基因的表达, 其激活可以抑制氧化应激和炎症反应, 调节胆汁酸稳态, 并减轻胆汁淤积期间的纤维化^[40], 后续将会对此通路进行正反验证对比, 以便更全面阐述 GF₂ 减轻 CLI 的药效机制, 为 GF₂ 作为 CLI 的辅助用药提供研究基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Méndez-Sánchez N, Coronel-Castillo C E, Ordoñez-Vázquez A L. Current therapies for cholestatic diseases [J]. Biomedicines, 2023, 11(6): 1713.
- [2] Song S L, Li X, Geng C, et al. Uncovering key molecules and immune landscape in cholestatic liver injury: Implications for pathogenesis and drug therapy [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1171512.
- [3] Mayo M J. Mechanisms and molecules: What are the treatment targets for primary biliary cholangitis ? [J]. Hepatology, 2022, 76(2): 518-531.
- [4] Im D S. Pro-resolving effect of ginsenosides as an anti-inflammatory mechanism of *Panax ginseng* [J]. Biomolecules, 2020, 10(3): 444.
- [5] Li J, Huang Q X, Yao Y, et al. Biotransformation, pharmacokinetics, and pharmacological activities of ginsenoside Rd against multiple diseases [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 909363.
- [6] Li J, Zhao J R, Wang X H, et al. Ginsenoside-a promising natural active ingredient with steroidal hormone activity [J]. Food Funct, 2024, 15(4): 1825-1839.
- [7] Park J D. Metabolism and drug interactions of Korean ginseng based on the pharmacokinetic properties of ginsenosides: Current status and future perspectives [J]. J Ginseng Res, 2024, 48(3): 253-265.
- [8] Li G D, Xu Y J, Gao Q Y, et al. Ginsenosides restore lipid and redox homeostasis in mice with intrahepatic cholestasis through SIRT1/AMPK pathways [J]. Nutrients, 2022, 14(19): 3938.
- [9] Gao Q Y, Li G D, Zu Y, et al. Ginsenoside Rg1 alleviates ANIT-induced cholestatic liver injury by inhibiting hepatic inflammation and oxidative stress via SIRT1 activation [J]. J Ethnopharmacol, 2024, 319(Pt 1): 117089.
- [10] Wang W H, Li K, Xiao W H. The pharmacological role of ginsenoside Rg₃ in liver diseases: A review on molecular mechanisms [J]. J Ginseng Res, 2024, 48(2): 129-139.
- [11] Li D X, Luo Z B, Zhu J, et al. Ginsenoside F₂-mediated intestinal microbiota and its metabolite propionic acid positively impact the gut-skin axis in atopic dermatitis mice [J]. J Agric Food Chem, 2024, 72(1): 339-350.
- [12] Kim K, Kim M H, Kang J I, et al. Ginsenoside F₂ restrains hepatic steatosis and inflammation by altering the binding affinity of liver X receptor coregulators [J]. J Ginseng Res, 2024, 48(1): 89-97.
- [13] Han S Q, You L, Hu Y Y, et al. Ginsenoside F₂ enhances glucose metabolism by modulating insulin signal transduction in human hepatocarcinoma cells [J]. J Ginseng Res, 2023, 47(3): 420-428.
- [14] Kim M H, Kim H H, Jeong J M, et al. Ginsenoside F₂ attenuates chronic-binge ethanol-induced liver injury by increasing regulatory T cells and decreasing Th17 cells [J]. J Ginseng Res, 2020, 44(6): 815-822.
- [15] Liu D, Zhang C, Sun H Y, et al. Protective effects of ginsenoside F₂ on hydrogen peroxide induced cell injury [J]. J Hyg Res, 2019, 48(3): 452-457.
- [16] Park J W, Kim J H, Kim S E, et al. Primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis: Current knowledge of pathogenesis and therapeutics [J]. Biomedicines, 2022, 10(6): 1288.
- [17] Zhuang Y, Ortega-Ribera M, Thevkar Nagesh P, et al. Bile acid-induced IRF3 phosphorylation mediates cell death, inflammatory responses, and fibrosis in cholestasis-induced liver and kidney injury via regulation of ZBP1 [J]. Hepatology, 2024, 79(4): 752-767.
- [18] Xu Z Q, Tang W, Xie Q L, et al. Dimethyl fumarate attenuates cholestatic liver injury by activating the NRF2

- and FXR pathways and suppressing NLRP3/GSDMD signaling in mice [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 432(2): 113781.
- [19] Gijbels E, Pieters A, De Muynck K, et al. Rodent models of cholestatic liver disease: A practical guide for translational research [J]. *Liver Int*, 2021, 41(4): 656-682.
- [20] Zou B, Zhang S, Li F L, et al. Gancao decoction attenuates hepatic necroptosis via activating caspase 8 in cholestatic liver injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 326: 117909.
- [21] Cao P, Gan J, Wu S L, et al. Molecular mechanisms of hepatoprotective effect of tectorigenin against ANIT-induced cholestatic liver injury: Role of FXR and Nrf2 pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 178: 113914.
- [22] 张清清, 曲颖, 蔡晓波, 等. 胆汁淤积性肝病动物模型构建的研究进展 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(7): 1754-1760.
- Zhang Q Q, Qu Y, Cai X B, et al. Research advances in animal models of cholestatic liver disease [J]. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(7): 1754-1760
- [23] Rini S S, Wibawa I D N. Evaluation and management of chronic cholestatic liver diseases [J]. *Middle East J Dig Dis*, 2023, 15(3): 148-155.
- [24] Meadows V, Yang Z N, Basaly V, et al. FXR friend-ChIPs in the enterohepatic system [J]. *Semin Liver Dis*, 2023, 43(3): 267-278.
- [25] Tanaka A. New therapies on the horizon for primary biliary cholangitis [J]. *Drugs*, 2024, 84(1): 1-15.
- [26] Ashby K, Navarro Almario E E, Tong W, et al. Review article: Therapeutic bile acids and the risks for hepatotoxicity [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(12): 1623-1638.
- [27] Zou M Z, Wang A Z, Wei J J, et al. An insight into the mechanism and molecular basis of dysfunctional immune response involved in cholestasis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 92: 107328.
- [28] Mihm S. Danger-associated molecular patterns (DAMPs): Molecular triggers for sterile inflammation in the liver [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 3104.
- [29] Gong T, Liu L, Jiang W, et al. DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20(2): 95-112.
- [30] Blesl A, Stadlbauer V. The gut-liver axis in cholestatic liver diseases [J]. *Nutrients*, 2021, 13(3): 1018.
- [31] Chen S N, Tan Y, Xiao X C, et al. Deletion of TLR4 attenuates lipopolysaccharide-induced acute liver injury by inhibiting inflammation and apoptosis [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(10): 1610-1619.
- [32] Pinto C, Ninfolle E, Benedetti A, et al. Involvement of autophagy in ageing and chronic cholestatic diseases [J]. *Cells*, 2021, 10(10): 2772.
- [33] Chen T H, Wang H C, Chang C J, et al. Mitochondrial glutathione in cellular redox homeostasis and disease manifestation [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1314.
- [34] Orozco-Aguilar J, Simon F, Cabello-Verrugio C. Redox-dependent effects in the physiopathological role of bile acids [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4847941.
- [35] Shi S J, Wang L, van der Laan L J W, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in liver transplantation and underlying diseases: New insights and therapeutics [J]. *Transplantation*, 2021, 105(11): 2362-2373.
- [36] Zhang Y F, Lu Y X, Ji H, et al. Anti-inflammatory, anti-oxidative stress and novel therapeutic targets for cholestatic liver injury [J]. *Biosci Trends*, 2019, 13(1): 23-31.
- [37] Zhou J M, Zheng Q X, Chen Z. The Nrf2 pathway in liver diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 826204.
- [38] Sun Y K, Zhang Y F, Xie L, et al. Progress in the treatment of drug-induced liver injury with natural products [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 183: 106361.
- [39] Baird L, Yamamoto M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099-20.
- [40] He L F, Guo C C, Peng C, et al. Advances of natural activators for Nrf2 signaling pathway on cholestatic liver injury protection: A review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 910: 174447.
- [41] Huang Z L, Wu Z Q, Zhang J N, et al. Andrographolide attenuated MCT-induced HSOS via regulating NRF2-initiated mitochondrial biogenesis and antioxidant response [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2023, 39(6): 3269-3285.
- [42] Zhang J, Lyu Z W, Li B, et al. P4HA2 induces hepatic ductular reaction and biliary fibrosis in chronic cholestatic liver diseases [J]. *Hepatology*, 2023, 78(1): 10-25.
- [43] Yang X, Li Q, Liu W T, et al. Mesenchymal stromal cells in hepatic fibrosis/cirrhosis: From pathogenesis to treatment [J]. *Cell Mol Immunol*, 2023, 20(6): 583-599.
- [44] Khanam A, Saleeb P G, Kottilil S. Pathophysiology and treatment options for hepatic fibrosis: Can it be completely cured ? [J]. *Cells*, 2021, 10(5): 1097.
- [45] Zhang X T, Zeng Y, Zhao L Y, et al. Targeting hepatic stellate cell death to reverse hepatic fibrosis [J]. *Curr Drug Targets*, 2023, 24(7): 568-583.
- [46] Xu F Y, Liu C W, Zhou D D, et al. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis [J]. *J Histochem Cytochem*, 2016, 64(3): 157-167.