

基于网络药理学的四逆散保肝作用机制研究

冯贺龙, 王晓雪, 张福利*

黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150000

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨四逆散治疗慢性肝炎、脂肪肝与肝癌的物质基础和保肝的作用机制, 同时揭示四逆散治疗肝病“异病同治”的分子机制。**方法** 利用 TCMSP、CTD、Genecards、Omim 等数据库与相关文献检索四逆散有效化学成分、靶点和慢性肝炎、脂肪肝、肝癌疾病靶点; 利用 TBtools 软件获取四逆散保肝作用的潜在靶点; 利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“有效化学成分-靶点”网络与潜在靶点蛋白互作网络; 利用 Uniprot 数据库对潜在靶点进行注释; 利用 David 数据库对潜在靶点进行基因本体 (GO) 生物功能与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。**结果** 共获取四逆散有效化学成分 137 个、靶点 223 个, 慢性肝炎靶点 478 个, 脂肪肝靶点 17 277 个, 肝癌靶点 16 930 个, 四逆散保肝作用的潜在靶点 30 个。GO 生物功能与 KEGG 通路富集分析显示潜在靶点共涉及 178 个生物过程, 参与 51 条信号通路, 排名前 20 的通路中与肝病相关的有 9 条。**结论** 四逆散可能是通过调控 IL-6、VEGFA、EGFR、PPARG、CASP3 等潜在靶点和 HIF-1、TNF、PI3K-Akt 等相关信号通路, 发挥抗炎、抗氧化应激、抑制细胞凋亡等功能, 从而对肝脏起到保护作用。

关键词: 网络药理学; 异病同治; 四逆散; 保肝; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)24-6258-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.24.015

Mechanism of Sini Powder on protecting liver based on network pharmacology

FENG He-long, WANG Xiao-xue, ZHANG Fu-li

Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150000, China

Abstract: **Objective** To explore the material basis and hepatoprotective mechanism of Sini Powder in the treatment of chronic hepatitis, fatty liver and liver cancer based on network pharmacology, and reveal the molecular mechanism of Sini Powder in the treatment of liver diseases “treating different diseases with same treatment”. **Methods** The effective chemical constituents and targets of Sini Powder and the disease targets of chronic hepatitis, fatty liver and liver cancer were searched by TCMSP, CTD, Genecards, Omim and related literatures. The potential targets of hepatoprotective effect of Sini Powder were obtained by TBtools software, the interaction network of “effective chemical composition-target” and potential target proteins was constructed by Cytoscape 3.7.2 software, and the potential targets were annotated by Uniprot database. David database was used to analyze GO biological function and KEGG pathway enrichment of potential targets. **Results** A total of 137 effective chemical constituents, 223 targets, 478 targets for chronic hepatitis, 17277 targets for fatty liver, 16930 targets for liver cancer, and 30 potential targets for hepatoprotection were obtained. GO biological function and KEGG pathway enrichment analysis showed that a total of 178 biological processes and 51 pathways were involved in potential targets. Among the top 20 pathways, nine pathways were related to liver disease. **Conclusion** Sini Powder may play a protective role in liver by regulating potential targets such as IL-6, VEGFA, EGFR, PPARG, CASP3 and HIF-1, TNF, PI3K-Akt and other related signaling pathways to exert the functions of anti-inflammation, anti-oxidative stress and inhibition of apoptosis in order to protect liver.

Key words: network pharmacology; treating different diseases with same therapy; Sini Powder; liver protection; mechanism

四逆散是由柴胡、白芍、枳实、甘草 4 味中药组成的方剂, 首载于《伤寒论》。本方原治阳郁厥逆证, 《伤寒论·辨少阴病脉证并治》中记载“少阴病, 四逆, 其人或咳, 或悸, 或小便不利, 或腹中痛, 或泄利下重者, 四逆散主之”, 后经世代医家传承总

结, 多用作疏肝健脾的基础方, 附方亦有柴胡疏肝散、枳实芍药散等。四逆散方中柴胡疏肝解郁、升发阳气, 为君; 白芍敛阴养血、调达肝气, 为臣; 枳实理气解郁、泄热破结, 为佐; 甘草调和诸药、和中健脾, 为使, 四药合用, 共奏疏肝健脾之功。

收稿日期: 2020-06-17

作者简介: 冯贺龙 (1992—), 男, 在读博士, 主要从事中医药治疗内科疾病的基础与临床研究。Tel: 18846434844 E-mail: 378351964@qq.com

*通信作者 张福利, 男, 教授, 博士研究生导师。Tel: (0451)82196296 E-mail: fuli7505@163.com

四逆散临床多用于治疗消化系统、肝胆、妇科、泌尿系男科、儿科、神经系统、内分泌、外科等疾病,疗效确切,效果显著^[1]。现代药理学研究表明,四逆散具有改善肝纤维化程度、降低血清内毒素、调节基质降解、抑制肝癌细胞增殖等作用,在治疗脂肪肝、慢性肝炎、肝癌等肝脏疾病过程中,对肝脏具有保护作用^[2-5]。目前肝病致死人数在世界死亡总人数中约占 7.9%^[6],由于现有治疗方法效果不佳,临床中仍需新型有效的肝病防治药物,保肝药物的研究与开发具有广阔的科研和应用价值。

近年来,人们引入了网络药理学系统评估中药的药理作用,进而探索中药发挥药效的分子机制。通过对分子间相互作用网络和相关数据等进行可视化分析,研究人员可以全面系统地识别中药的靶蛋白并评估其对疾病的影响^[7-9]。吴丹等^[10]采用网络药理学方法探究了逍遥散治疗抑郁症与糖尿病“异病同治”的作用机制;何信用等^[11]应用网络药理学探究了黄连解毒汤治疗动脉粥样硬化的潜在分子机制;郑罗棋等^[12]通过网络药理学探究了吴茱萸致毒性的潜在分子机制。因此,基于网络的筛选在中药的二次开发和机制预测方面具有重要意义。本研究以目前已鉴定的四逆散中药物有效活性成分和潜在的肝病靶点为基础,进行四逆散的网络药理学研究,探究四逆散保肝的作用机制,旨为中医异病同治理论提供有力的科学依据。

1 材料与方法

1.1 四逆散有效化学成分与靶点的收集

在 TCMSP (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 数据库中检索四逆散方剂组成药物柴胡、白芍、枳实、甘草的有效化学成分及成分相应靶点,筛选条件为“口服利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ”“药物相似性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 ”,查阅文献,对四逆散有效成分和靶点进行补充。

1.2 四逆散“化学成分-靶点”网络的构建

将四逆散化学成分与靶点信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件中,对各药物化学成分进行形状、颜色识别标注,化学成分与靶点的关系用边表示,并基于介数中心性(betweenness centrality, BC)、接近中心性(closeness centrality, CCL)、集聚系数(clustering coefficient, CCF)、度值、节点邻居的平均连接度(neighborhood connectivity, NC)对该网络进行拓扑学分析。

1.3 疾病靶点的收集

在 CTD (<http://ctdbase.org>)、Genecards ([https://](https://www.genecards.org)

www.genecards.org)、Omim (<https://omim.org>) 数据库中检索关键词“fatty liver”“chronic hepatitis”“liver cancer”以收集脂肪肝、慢性肝炎和肝癌疾病靶点。在 CTD 与 Genecards 数据库检索结果中分别选择推理分数(inference score) > 20 、关联分数(relevance score) > 20 的疾病靶点。查阅文献,对疾病靶点进行补充。

1.4 四逆散保肝作用潜在靶点的处理

利用 TBtools 软件对四逆散靶点与疾病靶点进行交集比对,将四逆散治疗脂肪肝、慢性肝炎、肝癌 3 种疾病的靶点作为四逆散保肝作用的潜在靶点。利用 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>)对潜在靶点进行注释。将保肝作用潜在靶点信息导入 STRING 数据库(<https://string-db.org>),得到保肝作用潜在靶点蛋白互作网络(PPI)信息表,进一步将表中数据导入 Cytoscape 软件中,构建潜在靶点 PPI 网络,并进行拓扑学分析。该网络中节点大小与度值呈正相关,节点之间连线的颜色深浅、粗细程度与结合分数呈正相关。

1.5 基因本体(GO)生物功能与百科全书基因组(KEGG)通路富集分析

将保肝作用潜在靶点信息导入 Divid 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>),分别勾选生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组成(cellular component, CC)、KEGG 信号通路(KEGG pathways),得到潜在靶点的 GO 生物功能与 KEGG 通路富集分析结果。

2 结果

2.1 四逆散有效成分

如表 1 所示,TCMSP 数据库和文献共收集整理四逆散有效成分 137 个,包括来自柴胡 17 个、白芍 13 个、枳实 22 个、甘草 92 个,其中山柰酚(kaempferol)为柴胡、白芍、甘草共有有效成分,异鼠李素(isorhamnetin)、槲皮素(quercetin)为柴胡、甘草共有有效成分,白桦脂酸(mairin)、谷甾醇(sitosterol)为白芍、甘草共有有效成分,柚皮素(naringenin)为枳实、甘草共有有效成分。

2.2 四逆散“有效成分-靶点”网络

经数据库检索和文献补充,共获取四逆散靶点 223 个,包括柴胡 94 个、白芍 44 个、枳实 52 个、甘草 105 个。四逆散“有效化学成分-靶点”网络见图 1。该网络中共有 1 783 条边,336 个节点,包括来自有效成分节点 113 个、四逆散靶点节点 223 个,

表 1 四逆散有效成分信息

Table 1 Information of effective constituents of Sini Powder

编号	化学成分	OB/%	DL	来源
MOL001910	11 α ,12 α -epoxy-3 β ,23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28,12 β -olide	64.77	0.38	白芍
MOL001918	paeoniflorgenone	87.59	0.37	白芍
MOL001919	(3S,5R,8R,9R,10S,14S)-3,17-dihydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-2,3,5,6,7,9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15,16-dione	43.56	0.53	白芍
MOL001921	lactiflorin	49.12	0.80	白芍
MOL001924	paeoniflorin	53.87	0.79	白芍
MOL001925	isopaeoniflorin	68.18	0.40	白芍
MOL001928	albiflorin	66.64	0.33	白芍
MOL001930	benzoyl paeoniflorin	31.27	0.75	白芍
MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75	白芍
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24	白芍
MOL001645	linoleyl acetate	42.10	0.20	柴胡
MOL002776	baicalin	40.12	0.75	柴胡
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76	柴胡
MOL004598	3,5,6,7-tetramethoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)chromone	31.97	0.59	柴胡
MOL004609	areapillin	48.96	0.41	柴胡
MOL013187	cubebin	57.13	0.64	柴胡
MOL004624	longikaurin A	47.72	0.53	柴胡
MOL004628	octalupine	47.82	0.28	柴胡
MOL004644	sainfuran	79.91	0.23	柴胡
MOL004648	troxerutin	31.60	0.28	柴胡
MOL004653	(+)-anomalin	46.06	0.66	柴胡
MOL004702	saikosaponin	30.50	0.63	柴胡
MOL004718	α -spinasterol	42.98	0.76	柴胡
MOL000490	petunidin	30.05	0.31	柴胡
MOL013276	poncirin	36.55	0.74	枳实
MOL013277	isosinensetin	51.15	0.44	枳实
MOL013279	5,7,4'-trimethylapigenin	39.83	0.30	枳实
MOL013428	isosakuranetin-7-rutinoside	41.24	0.72	枳实
MOL013430	prangenin	43.60	0.29	枳实
MOL013433	prangenin hydrate	72.63	0.29	枳实
MOL013435	poncimarín	63.62	0.35	枳实
MOL013436	isoponcimarín	63.28	0.31	枳实
MOL013437	6-methoxy aurapten	31.24	0.30	枳实
MOL013440	citrusin B	40.80	0.71	枳实
MOL001798	hesperetin 7-neohesperidoside	71.17	0.27	枳实
MOL001803	sinensetin	50.56	0.45	枳实
MOL001941	ammidin	34.55	0.22	枳实
MOL013352	obacunone	43.29	0.77	枳实
MOL002914	eriodictiol (flavanone)	41.35	0.24	枳实
MOL005100	5,7-dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)chroman-4-one	47.74	0.27	枳实
MOL005828	nobiletin	61.67	0.52	枳实
MOL005849	didymin	38.55	0.24	枳实
MOL000006	luteolin	36.16	0.25	枳实
MOL007879	tetramethoxyluteolin	43.68	0.37	枳实
MOL009053	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	50.76	0.39	枳实
MOL001484	inermine	75.18	0.54	甘草
MOL001792	liquiritigenin	32.76	0.18	甘草
MOL002311	glycyrol	90.78	0.67	甘草
MOL000239	jaranol	50.83	0.29	甘草
MOL002565	medicarpin	49.22	0.34	甘草
MOL003656	lupiwighteone	51.64	0.37	甘草
MOL003896	7-methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.20	甘草
MOL000392	formononetin	69.67	0.21	甘草
MOL000417	calycosin	47.75	0.24	甘草
MOL004805	(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-8,8-dimethyl-2,3-dihydropyrano[2,3-f]chromen-4-one	31.79	0.72	甘草
MOL004806	euchrenone	30.29	0.57	甘草
MOL004808	glyasperin B	65.22	0.44	甘草
MOL004810	glyasperin F	75.84	0.54	甘草
MOL004811	glyasperin C	45.56	0.40	甘草
MOL004814	isotrifoliol	31.94	0.42	甘草
MOL004815	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	39.62	0.35	甘草
MOL004820	kanzonols W	50.48	0.52	甘草
MOL004824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25	0.63	甘草
MOL004827	semilicoisoflavone B	48.78	0.55	甘草
MOL004828	glepidotin A	44.72	0.35	甘草

续表 1

编号	化学成分	OB/%	DL	来源
MOL004829	glepidotin B	64.46	0.34	甘草
MOL004833	phaseolinisoflavan	32.01	0.45	甘草
MOL004835	glypallichalcone	61.60	0.19	甘草
MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2,2-dimethyl-5-chromenol	58.44	0.38	甘草
MOL004841	licochalcone B	76.76	0.19	甘草
MOL004848	licochalcone G	49.25	0.32	甘草
MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin	59.62	0.43	甘草
MOL004855	licoricone	63.58	0.47	甘草
MOL004856	gancaonin A	51.08	0.40	甘草
MOL004857	gancaonin B	48.79	0.45	甘草
MOL004860	licorice glycoside E	32.89	0.27	甘草
MOL004863	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	66.37	0.41	甘草
MOL004864	5,7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chromone	30.49	0.41	甘草
MOL004866	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5,7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl)chromone	44.15	0.41	甘草
MOL004879	glycyrin	52.61	0.47	甘草
MOL004882	licocoumarone	33.21	0.36	甘草
MOL004883	licoisoflavone	41.61	0.42	甘草
MOL004884	licoisoflavone B	38.93	0.55	甘草
MOL004885	licoisoflavanone	52.47	0.54	甘草
MOL004891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
MOL004898	(E)-3-[3,4-dihydroxy-5-(3-methylbut-2-enyl)phenyl]-1-(2,4-dihydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	46.27	0.31	甘草
MOL004903	liquiritin	65.69	0.74	甘草
MOL004904	licopyranocoumarin	80.36	0.65	甘草
MOL004905	3,22-dihydroxy-11-oxo- δ (12)-oleanene-27- α -methoxycarbonyl-29-oic acid	34.32	0.55	甘草
MOL004907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
MOL004908	glabridin	53.25	0.47	甘草
MOL004910	glabranin	52.90	0.31	甘草
MOL004911	glabrene	46.27	0.44	甘草
MOL004912	glabrone	52.51	0.50	甘草
MOL004913	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	48.14	0.43	甘草
MOL004914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.9	0.53	甘草
MOL004915	eurycarpin A	43.28	0.37	甘草
MOL004917	glycyroside	37.25	0.79	甘草
MOL004924	(-)-medicocarpin	40.99	0.95	甘草
MOL004935	sigmoidin-B	34.88	0.41	甘草
MOL004941	(2R)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one	71.12	0.18	甘草
MOL004945	(2S)-7-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl)chroman-4-one	36.57	0.32	甘草
MOL004948	isoglycyrol	44.7	0.84	甘草
MOL004949	isolicoflavonol	45.17	0.42	甘草
MOL004957	HMO	38.37	0.21	甘草
MOL004959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
MOL004961	3,3'-dimethylquercetin	46.45	0.33	甘草
MOL004966	3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin	43.71	0.57	甘草
MOL00497	licochalcone A	40.79	0.29	甘草
MOL004974	3'-methoxyglabridin	46.16	0.57	甘草
MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyrano[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	36.21	0.52	甘草
MOL004980	inflacoumarin A	39.71	0.33	甘草
MOL004985	icos-5-enoic acid	30.70	0.20	甘草
MOL004988	kanzonol F	32.47	0.89	甘草
MOL004989	6-prenylated eriodictyol	39.22	0.41	甘草
MOL004990	7,2',4'-trihydroxy-5-methoxy-3-arylcoumarin	83.71	0.27	甘草
MOL004991	7-acetoxy-2-methylisoflavone	38.92	0.26	甘草
MOL004993	8-prenylated eriodictyol	53.79	0.40	甘草
MOL004996	gadelaideic acid	30.70	0.20	甘草
MOL000500	vestitol	74.66	0.21	甘草
MOL005000	gancaonin G	60.44	0.39	甘草
MOL005001	gancaonin H	50.10	0.78	甘草
MOL005003	licoagrocarpin	58.81	0.58	甘草
MOL005007	glyasperins M	72.67	0.59	甘草
MOL005008	glycyrrhiza flavonol A	41.28	0.60	甘草
MOL005012	licoagroisoflavone	57.28	0.49	甘草
MOL005013	18 α -hydroxyglycyrrhetic acid	41.16	0.71	甘草
MOL005016	odoratin	49.95	0.30	甘草
MOL005017	phaseol	78.77	0.58	甘草
MOL005018	xambioona	54.85	0.87	甘草
MOL005020	dehydroglyasperins C	53.82	0.37	甘草
MOL000422	kaempferol	41.88	0.24	白芍、柴胡、甘草
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31	柴胡、甘草
MOL000098	quercetin	46.43	0.28	柴胡、甘草
MOL000211	mairin	55.38	0.78	白芍、甘草
MOL000359	sitosterol	36.91	0.75	白芍、甘草
MOL0004328	naringenin	59.29	0.21	枳实、甘草

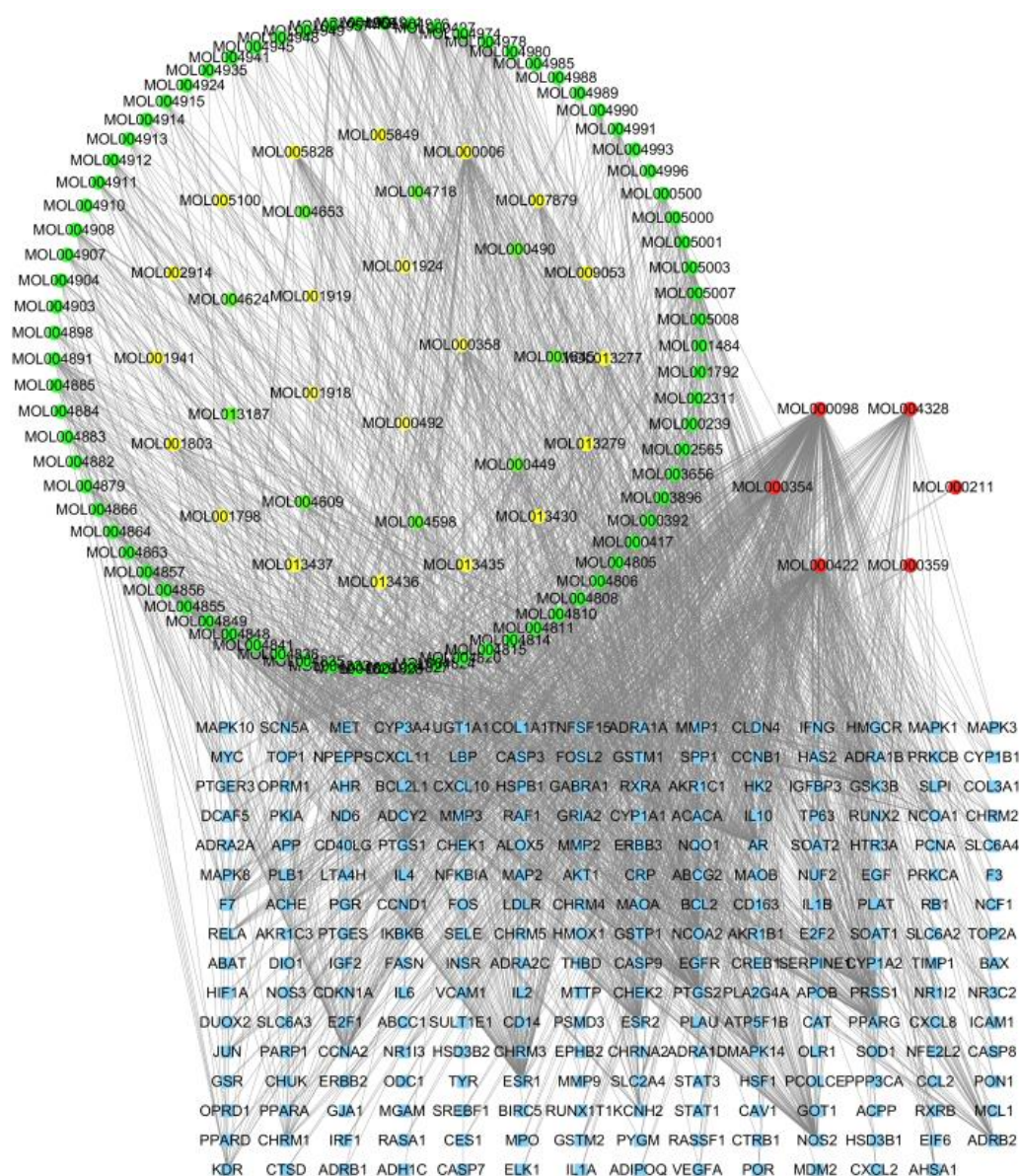


图 1 四逆散“有效成分-靶点”网络

Fig. 1 “Effective composition-target” network of Sini Powder

其中上方环形区域由内至外的节点依次为白芍、柴胡、枳实、甘草的有效成分，右侧红色环形区域节点为药物共有的有效成分，下方浅蓝色方形区域节点为四逆散靶点，网络中未存在孤立节点，显示出良好的连通性。进一步对该网络进行拓扑学分析，如表 2 所示，平均每个化学成分与 9.24 个靶点相互作用，28 个化学成分与 10 个以上的靶点相互作用，平均每个靶点与 9.01 个化学成分相互作用，18 个靶点与 10 个以上的化学成分相互作用。度值排名前 3 位的化学成分为槲皮素 (MOL000098)、山柰酚 (MOL000422)、异鼠李素 (MOL000354)，度值排名前 3 位的靶点为 ESR1、AR、PPARG。

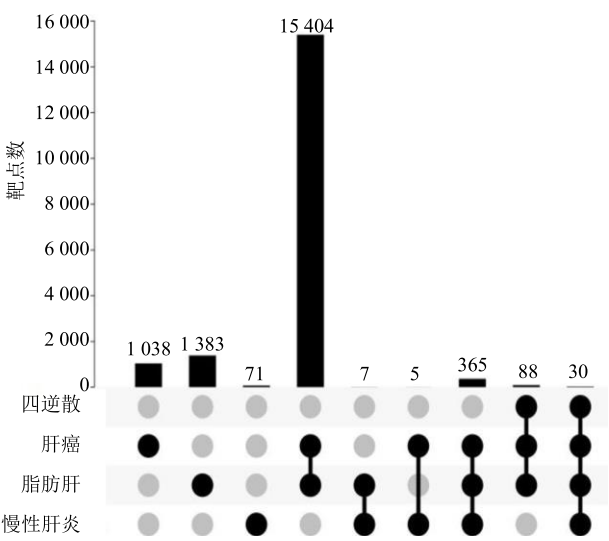
2.3 四逆散保肝作用的潜在靶点

经数据库检索和文献补充，共获取慢性肝炎靶点 478 个、脂肪肝靶点 17 277 个、肝癌靶点 16 930 个。利用 TBtools 软件将四逆散靶点与疾病靶点进行交集比对，如图 2 所示，得到四逆散保肝作

表 2 “有效成分-靶点”网络拓扑学分析

Table 2 Network topology analysis of “effective constituent-target”

节点属性	介数中心性	接近中心性	集聚系数	节点邻居的平均连接度	度值
有效成分	0.008	0.38	0	53.09	9.24
靶点	0.008	0.34	0	41.64	9.01



黑点由右至左分别表示四逆散治疗疾病的潜在靶点、各疾病之间交集靶点、去除潜在靶点与交集靶点后各疾病的单独靶点数量
From right to left, the dark dot indicates the potential targets of Sini Powder for treating diseases, the intersection targets between each disease, and the number of individual targets for each disease after removing the potential targets and the number of intersection targets

图 2 四逆散与疾病靶点交集对比图
Fig. 2 Comparison of intersection of Sini Powder and disease targets

用的潜在靶点 30 个。四逆散保肝作用潜在靶点信息见表 3。

2.4 四逆散保肝作用潜在靶点的 PPI 网络

进一步对该网络进行拓扑学分析,如图 3 所示,该网络 BC 为 0.02、CCL 为 0.62、CCF 为 0.73、NC 为 14.45、度值中位数为 12,网络中未出现孤立节点,显示良好的连通性,度值大于中位数且排名前 5 的潜在靶点依次为白细胞介素-6 (IL-6)、血管内皮生长因子(VEGFA)、表皮生长因子受体(EGFR)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)。

2.5 GO 生物功能与 KEGG 通路富集分析

经 David 数据库分析,GO 生物功能富集结果显示,保肝作用潜在靶点总计涉及 178 个生物过程 ($P<0.05$),属于 BP 的有 126 个,包括对药物的反应、凋亡过程的负调控、肝再生、基因表达的正调控、细胞对 IL-1 的反应等;属于 CC 的有 19 个,包括胞质溶胶、细胞外空间、细胞内膜结合细胞器、细胞质、脂筏等;属于 MF 的有 33 个,包括酶结合、转录因子结合、相同的蛋白质结合、蛋白质异二聚活性、蛋白质复合物结合等。GO 生物功能富集结

表 3 四逆散保肝作用的潜在靶点

Table 3 Potential targets of Sini Powder in protecting liver			
编号	UniprotID	基因简称	全称
1	Q6GRK0	CYP3A4	cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4
2	E2J5K4	LDLR	low density lipoprotein receptor
3	Q6L9M1	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
4	Q5VVP7	CRP	C-reactive protein
5	Q7Z5P3	PRSS1	protease, serine 1
6	G3V286	NF- κ BIA	NF- κ B inhibitor α
7	Q5H9B5	TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
8	E7EWW9	GSTM1	glutathione S-transferase mu 1
9	G3V5N9	FOS	Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit
10	S5FVK9	APOB	apolipoprotein B
11	U3M8N0	TYR	tyrosinase
12	C9JXR7	CASP3	caspase 3
13	A0N771	BCL2	BCL2, apoptosis regulator
14	Q6NVI2	CASP8	caspase 8
15	A0S0A6	NOS3	nitric oxide synthase 3
16	Q16591	MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
17	Q8WZA5	EGFR	epidermal growth factor receptor
18	Q14601	ICAM1	intercellular adhesion molecule 1
19	Q75MH2	IL-6	Interleukin-6
20	Q5J9B1	CYP1A1	cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1
21	Q2TAM5	RELA	RELA proto-oncogene, NF- κ B subunit
22	C9JQ78	POR	cytochrome p450 oxidoreductase
23	E9PBP6	MTTP	microsomal triglyceride transfer protein
24	Q6FI00	CCND1	cyclin D1
25	F8W9L0	HIF1A	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit
26	Q96FD9	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
27	Q96P90	PON1	paraoxonase 1
28	Q7Z6A3	PCNA	proliferating cell nuclear antigen
29	C9J3N8	HSPB1	heat shock protein family B (small) member 1
30	E2I973	NFE2L2	nuclear factor, erythroid 2 like 2

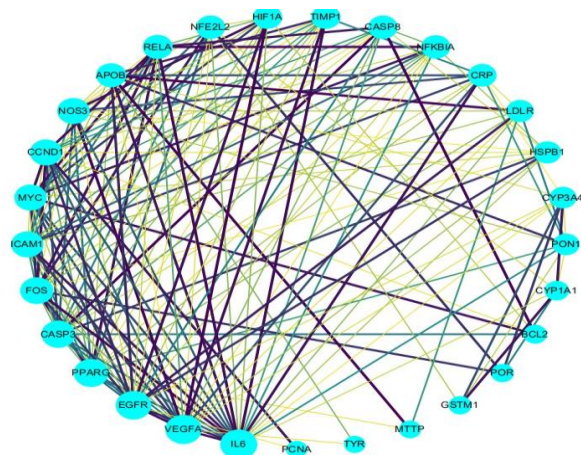


图 3 潜在靶点 PPI 网络

Fig. 3 Potential target PPI network

表 4 排名前 20 的潜在靶点 GO 生物功能富集分析结果

Table 4 Results of GO biological function enrichment analysis of potential targets in top 20

条目	类别	生物过程	基因数占比/%	P 值
GO:0042493	BP	response to drug	37.93	3.21×10^{-11}
GO:0019899	MF	enzyme binding	34.48	2.02×10^{-9}
GO:0043066	BP	negative regulation of apoptotic process	34.48	3.18×10^{-8}
GO:0097421	BP	liver regeneration	17.24	1.43×10^{-7}
GO:0010628	BP	positive regulation of gene expression	27.59	1.86×10^{-7}
GO:0008134	MF	transcription factor binding	27.59	3.10×10^{-7}
GO:0042802	MF	identical protein binding	34.48	2.05×10^{-6}
GO:0071347	BP	cellular response to interleukin-1	17.24	5.56×10^{-6}
GO:0007568	BP	aging	20.69	7.06×10^{-6}
GO:0046982	MF	protein heterodimerization activity	27.59	8.24×10^{-6}
GO:0032355	BP	response to estradiol	17.24	1.50×10^{-5}
GO:0043200	BP	response to amino acid	13.79	1.81×10^{-5}
GO:0071456	BP	cellular response to hypoxia	17.24	1.85×10^{-5}
GO:0045944	BP	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	34.48	1.92×10^{-5}
GO:0046677	BP	response to antibiotic	13.79	1.99×10^{-5}
GO:0032403	MF	protein complex binding	20.69	2.02×10^{-5}
GO:0009409	BP	response to cold	13.79	2.86×10^{-5}
GO:0071356	BP	cellular response to tumor necrosis factor	17.24	3.16×10^{-5}
GO:0001541	BP	ovarian follicle development	13.79	4.56×10^{-5}
GO:0009812	BP	flavonoid metabolic process	10.34	7.46×10^{-5}

表 5 排名前 20 的潜在靶点 KEGG 通路富集分析结果

Table 5 Results of KEGG pathway enrichment analysis of potential targets in top 20

编号	通路	基因数占比/%	P 值
hsa05161	hepatitis B	34.48	9.82×10^{-10}
hsa05200	pathways in cancer	44.83	2.71×10^{-9}
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	24.14	9.02×10^{-7}
hsa04668	TNF signaling pathway	24.14	1.71×10^{-6}
hsa05166	HTLV-I infection	27.59	2.34×10^{-5}
hsa05134	legionellosis	17.24	3.80×10^{-5}
hsa05145	toxoplasmosis	20.69	3.93×10^{-5}
hsa05210	colorectal cancer	17.24	6.57×10^{-5}
hsa04210	apoptosis	17.24	6.57×10^{-5}
hsa05222	small cell lung cancer	17.24	2.25×10^{-4}
hsa05215	prostate cancer	17.24	2.58×10^{-4}
hsa05219	bladder cancer	13.79	4.13×10^{-4}
hsa05168	herpes simplex infection	20.69	4.35×10^{-4}
hsa05142	chagas disease (American trypanosomiasis)	17.24	4.88×10^{-4}
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway	17.24	5.25×10^{-4}
hsa05205	proteoglycans in cancer	20.69	6.53×10^{-4}
hsa05169	Epstein-Barr virus infection	17.24	8.93×10^{-4}
hsa04621	NOD-like receptor signaling pathway	13.79	1.04×10^{-3}
hsa05416	viral myocarditis	13.79	1.09×10^{-3}
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	24.14	1.20×10^{-3}

果排名前 20 的条目见表 4。

KEGG 通路富集分析结果显示,潜在靶点总计参与 51 条信号通路 ($P < 0.05$), 包括乙肝、癌症的途径、缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、人类 T 淋巴细胞白血病病毒-1 (HTLV-I) 感染等。在排名前 20 的通路中与肝病相关的有 9 条, 包括乙肝、癌症通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、细胞凋亡、Toll 样受体信号通路、蛋白聚糖在癌症中、NOD 样受体信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路。KEGG 通路富集分析结果排名前 20 的条目见表 5。

3 讨论

肝脏在代谢、排毒、消化和维持体内平衡方面

起着至关重要的作用。我国大约有 3 亿人受各类肝病困扰, 针对肝病的预防与治疗一直是公共卫生领域的热门话题^[13]。慢性肝炎、脂肪肝、肝癌是 3 个具有代表性的肝脏疾病, 共同表现为产生慢性炎症, 肝伤口愈合反应异常, 出现肝纤维化, 进而导致肝细胞损伤、肝脏正常功能失调, 最终肝功能衰竭^[14]。中医理论认为脂肪肝、慢性肝炎、肝癌病位在肝, 且与脾脏密不可分, 病因包括饮食不节、情志失调、外感湿热疫毒等, 日久则伤及肝脾, 以致肝失疏泄、脾失健运、痰浊内生、阻滞气机、痰瘀互结而发病, 病机以肝郁脾虚为主, 故疏肝健脾、透邪解郁之法在疾病的治疗过程中尤为重要^[15-17]。四逆散中柴胡升清, 枳实降浊, 君臣互用, 肝脾调和、气机和畅; 白芍补阴, 兼以敛脾, 与甘草合用, 酸甘化阴、柔肝滋脾; 四药并用, 既可疏肝健脾, 亦可透邪解郁, 达到扶正祛邪的目的^[18], 这在理论上解释了四逆散在临床上用于脂肪肝、慢性肝炎、肝癌“异病同治”的原因。

本研究利用“有效成分-靶点”网络分析了四逆散中柴胡、白芍、枳实、甘草的有效成分, 进一步研究了化学成分与靶点之间的相互作用关系。该网络中度值排名前 3 位的化学成分依次为槲皮素、山柰酚、异鼠李素, 同属黄酮类。槲皮素与异鼠李素是柴胡、甘草中的有效成分, 具有多种生物和药理活性, 包括抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡等^[19-20]。Yang 等^[21]研究显示, 槲皮素可降低血清转氨酶水平, 减少 2 型糖尿病诱导的肝脏组织学改变, 恢复肝脏中关键酶水平, 减少 db/db 小鼠肝脏中的脂质蓄积, 促进非酒精性脂肪肝的恢复。此外, 槲皮素有强大的活性氧 (ROS) 清洗功能, 可以降低中、高浓度 ROS 产生的氧化应激反应, 抑制细胞凋亡或坏死, 减缓肝脏肿瘤细胞的增殖速度^[20,22]。Wu 等^[23]研究发现槲皮素可下调 Janus 激酶 2 (JAK2) 和信号传导和转录激活剂 3 (STAT3) 水平, 干扰 LM3 细胞的增殖和细胞周期分布, 诱导细胞凋亡, 抑制肝细胞癌的增殖分化。异鼠李素可以通过诱导巨噬细胞血红素氧合酶-1 (HO-1) 表达来降低脂多糖诱导的 ROS 产生、线粒体功能障碍和细胞凋亡^[24-25]。异鼠李素可以显著阻止四氯化碳 (CCl₄) 诱导的血清丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶水平的升高, 降低磷酸化 Smad 蛋白 (Smad3)、转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、组蛋白脱乙酰基酶 8 (α -SMA) 和纤溶酶原激活物抑制剂 1 (PAI-1) 表达, 从而预防肝纤

维化^[19]。山柰酚为柴胡、白芍、甘草的有效化学成分, 能够激活活化素受体样激酶 (ALK5) ATP 结合口袋的靶向结合, 抑制胶原蛋白的合成和肝星状细胞的活化, 下调 Smad2/3 磷酸化水平, 显著改善肝纤维化^[26]。此外, 研究表明, 食用富含山柰酚的食物可以降低罹患肝癌的风险, 与抑制细胞凋亡、下调上皮-间质 (EMT) 相关标记和 P13K-PKB 信号通路等作用机制有关^[27]。山柰酚还可以通过抑制 AKT、激活某些过氧化物酶体增殖物激活受体, 从而发挥降低体内三酰甘油的作用^[28]。

本研究在对“有效成分-靶点”和保肝作用潜在靶点 PPI 网络的分析中, 发现 PPARG 在两个网络中的度值均位于前 5 位; IL-6 在潜在靶点 PPI 网络中的度值位于第 1 位。PPARG 又名 PPARG γ , 在肝脏中, PPARG 的表达可以控制脂肪酸氧化、脂蛋白代谢、糖异生和酮体生物合成^[29]。PPARG 具有一个大的 Y 型配体结合袋, 可与配体灵活地相互作用。Wei 等^[30]通过对肝细胞 PPARG 缺乏小鼠的研究, 证明 PPARG 配体罗格列酮可通过 PPARG 依赖性方式抑制核因子- κ B (NF- κ B) /TNF- α 信号通路来改善肝脏的纤维化程度。PPARG 可以通过多种途径抑制肝脏肿瘤的进展, 德氮吡格-5620 (TNBG-5620) 可以诱导 PPARG 基因和蛋白质发生改变, 通过激活 PPARG 和下调增殖细胞核抗原 (PCNA), 发挥抗肝癌作用^[31]。在肝病的防治领域, IL-6 的应用始终存在争议。有学者认为, IL-6 是肝脏再生和防御各种肝脏疾病病原体的关键调节剂, IL-6 可以促进细胞增殖、血管新生和代谢, 并抑制细胞凋亡和氧化应激^[32]。也有学者认为, IL-6 的选择性抑制对肝病患者有益, IL-6 的过度表达会促进肝癌的发生^[33]。Scheller 等^[34]通过对 IL-6 及其配体的研究, 认为 IL-6 的再生或抗炎作用是通过经典信号传导介导的, 而 IL-6 的促炎反应则是由反信号传导介导的。

为了说明四逆散保肝作用潜在靶点的生物功能和作用机制, 本研究进行了 GO 生物功能和 KEGG 通路富集分析, 发现潜在靶点的生物功能主要集中在对药物的反应、酶结合、凋亡过程的负调控、肝再生、基因表达的正调控、细胞对肿瘤坏死因子的反应、类黄酮代谢过程等方面。通过对获得通路的分析, 发现保肝作用潜在靶点主要富集在乙肝、癌症通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、细胞凋亡、Toll 样受体信号通路、癌症中蛋白聚糖、NOD 样受体信号通路、PI3K-Akt 信号通路等与肝病相关

的信号通路中。HIF-1 是缺氧反应的中心调节剂,也是血管生成、炎症和代谢的关键调控因子,参与一系列肝脏病理学的发展,包括肝纤维化、免疫系统的激活、肝癌等^[35]。环腺苷酸依赖性转录因子 ATF-3 的缺乏会激活 HIF-1 信号通路,促进肝细胞凋亡和炎症反应;肝细胞中 HIF-1 α 基因的敲除对肝纤维化具有保护作用^[36-37]。TNF 在炎症、细胞增殖、凋亡中起着重要作用^[38],根据其结构与功能分为 TNF- α 和 TNF- β 。研究表明,TNF- α 的过度表达会引起肝细胞凋亡^[39];TNF- α 会通过上调与脂质代谢、炎症细胞因子和肝纤维化相关的分子,引起肝损伤^[40]。Liu 等^[41]研究证明通过激活 NF- κ B 信号通路可以防止 TNF- α 诱导的肝损伤。PI3K-AKT 通路可直接或间接调控重要的表观遗传修饰因子,参与 PI3K 的致癌过程,该途径在各种类型的癌症中涉及多种生物学过程,在癌症中的异常激活将导致细胞周期异常进展、黏附、运动改变、抑制细胞凋亡和诱导血管生成^[41-45]。

脂肪肝、慢性肝炎、肝癌的疾病进展与免疫炎症、氧化应激和细胞凋亡等有关^[46-48]。研究表明,TNF- α 、IL-6 等炎症介质的表达,孕烷 X 受体(PXR)、PPAR α 等核因子的改变,caspase 酶的激活,促炎细胞因子级联反应、免疫反应的出现,人体细胞原癌基因 c-myc、Pokemom 的激活,抑癌基因 NOR1、micro-RNA-26a 的抑制等会导致肝纤维化,引起肝细胞损伤和肝脏正常功能失调,最终导致肝功能衰竭^[14]。这与本研究预测结果中的免疫炎症、氧化应激、细胞凋亡和 HIF-1、TNF、PI3K-Akt 等相关信号通路具有一致性。现代药理研究表明,四逆散能够促进 Bcl-2 相关细胞死亡激动剂表达,抑制 Bax 蛋白表达,下调 CASP3、TNF- α 水平,发挥抗肝损伤作用^[49];诱导肝脏干细胞 WB-F344 增殖分化,促进肝损伤修复^[50];通过降低大鼠血清中 TGF- β 1 水平,阻断 JAK-STAT3 信号通路,促进肝星状细胞(HSC)凋亡,降低肝组织中 I、II、IV 型胶原水平,下调金属蛋白酶组织抑制剂 1(TIMP-1)和 TGF- β 1 水平,从而治疗肝纤维化^[4,51-53];通过调节 MAPKs/NF- κ B 途径抑制脂多糖致 Raw264.7 的细胞炎症,发挥抗炎作用^[54];通过 ROS 依赖的 Sirt1-p53 凋亡途径,抑制肝癌细胞 HepG2 生长^[55]。以上对四逆散的实验研究在一定程度上验证了四逆散基于中医理论“异病同治”模式下治疗脂肪肝、慢性肝炎、肝癌的分子机制,但四逆散治疗脂肪肝、

肝癌与慢性肝炎的分子机制是否涉及肝再生、类黄酮代谢过程、Toll 样受体、NOD 样受体信号通路等仍需进一步的体内外实验进行验证。

综上所述,四逆散可能是通过调控 IL-6、VEGFA、EGFR、PPARG、CASP3 等潜在靶点和 HIF-1、TNF、PI3K-Akt 等相关信号通路,发挥抗炎、抗氧化应激、抑制细胞凋亡等功能,对肝脏起到保护作用。本研究利用网络药理学方法揭示了四逆散治疗肝病“异病同治”的分子机制。

参考文献

- [1] 张放放. 四逆散临床研究综述 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(43): 118-119.
- [2] 徐晓杰. 复方四逆散对慢性肝炎肝纤维化疗效的临床病理分析 [J]. 中医临床研究, 2017, 9(29): 57-58.
- [3] 傅克模, 莫耘松. 加味四逆散对肝硬化患者肝功能及肠黏膜屏障功能的保护作用 [J]. 中国现代医生, 2014, 52(10): 105-107.
- [4] 郭怡. 四逆散加减联合多烯磷脂酰胆碱治疗酒精性肝纤维化疗效及对肝纤维化指标、TIMP-1、TGF- β 1 的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(24): 2645-2648.
- [5] 王玮, 伊莉雅, 高健美. 四逆散对 HepG2 移植性肝癌裸鼠 Sirt1 和 p53 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 16-18.
- [6] Melo A P S, França E B, Malta D C, *et al.* Mortality due to cirrhosis, liver cancer, and disorders attributed to alcohol use: Global burden of disease in Brazil, 1990 and 2015 [J]. *Rev Bras Epidemiol*, 2017, 20(Suppl 1): 61-74.
- [7] 冉倩, 楼冠华, 曾海蓉, 等. 基于 UPLC-Q-Orbitrap HRMS 和网络药理学分析胆黄连的泻肝胆实火机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 181-189.
- [8] 王梁凤, 柳小莉, 李慧婷, 等. 基于网络药理学的枳实挥发油治疗慢性传输型便秘的机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1909-1917.
- [9] 周珊珊, 艾中柱, 李伟男, 等. 大黄抗肾脏纤维化的网络药理学及其活性成分的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(10): 163-172.
- [10] 吴丹, 高耀, 向欢, 等. 逍遥散“异病同治”抑郁症和糖尿病的网络药理学作用机制研究 [J]. 中草药, 2019, 50(8): 1818-1827.
- [11] 何信用, 郑思成, 王群, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗动脉粥样硬化的潜在分子机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(3): 687-696.
- [12] 郑罗棋, 惠慧, 田港, 等. 基于网络药理学吴茱萸致肝毒性机制研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 419-425.
- [13] Wang F S, Fan J G, Zhang Z, *et al.* The global burden of

- liver disease: The major impact of China [J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [14] Aydin M M, Akcali K C. Liver fibrosis [J]. *Turk J Gastroenterol*, 2018, 29(1): 14-21.
- [15] 赵利孟. 加味四逆散治疗原发性肝癌的效果观察 [J]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(29): 149.
- [16] 宋琳, 陈策, 李承潇, 等. 四逆散对非酒精性脂肪性肝炎大鼠的肝保护作用研究 [J]. 河北中医药学报, 2019, 34(3): 1-4.
- [17] 杨亚娟, 庄玉卿, 王雪红. 四逆散加减穴位贴联合多烯磷脂酰胆碱治疗肝郁脾虚型慢性乙型肝炎临床观察 [J]. 中医临床研究, 2019, 11(13): 69-71.
- [18] 章美玲, 胡珂. 胡珂运用四逆散及其合方治疗脾胃病经验 [J]. 心血管外科杂志: 电子版, 2019, 8(4): 234.
- [19] Ahmed O M, Ahmed A A, Fahim H I, *et al.* Quercetin and naringenin abate diethylnitrosamine/acetylamino fluorene-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats: The roles of oxidative stress, inflammation and cell apoptosis [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2019, doi:10.1080/01480545.2019.1683187.
- [20] Yang J H, Kim S C, Kim K M, *et al.* Isorhamnetin attenuates liver fibrosis by inhibiting TGF- β /Smad signaling and relieving oxidative stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 783: 92-102.
- [21] Yang H, Yang T T, Heng C, *et al.* Quercetin improves nonalcoholic fatty liver by ameliorating inflammation, oxidative stress, and lipid metabolism in db/db mice [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(12): 3140-3152.
- [22] Fernández-Palanca P, Fondevila F, Méndez-Blanco C, *et al.* Antitumor effects of quercetin in hepatocarcinoma *in vitro* and *in vivo* models: A systematic review [J]. *Nutrients*, 2019, 11(12): 2875.
- [23] Wu L W, Li J J, Liu T, *et al.* Quercetin shows anti-tumor effect in hepatocellular carcinoma LM3 cells by abrogating JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(10): 4806-4820.
- [24] Seo K, Yang J H, Kim S C, *et al.* The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: A potential role of HO-1 [J]. *Inflammation*, 2014, 37(3): 712-722.
- [25] Yang J H, Shin B Y, Han J Y, *et al.* Isorhamnetin protects against oxidative stress by activating Nrf2 and inducing the expression of its target genes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 274(2): 293-301.
- [26] Xu T F, Huang S, Huang Q R, *et al.* Kaempferol attenuates liver fibrosis by inhibiting activin receptor-like kinase 5 [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(9): 6403-6410.
- [27] Imran M, Salehi B, Sharifi-Rad J, *et al.* Kaempferol: A key emphasis to its anticancer potential [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2277.
- [28] Hoang M H, Jia Y Y, Lee J H, *et al.* Kaempferol reduces hepatic triglyceride accumulation by inhibiting Akt [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(11): e13034.
- [29] Sauer S. Ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(10): 688-704.
- [30] Wei Z, Zhao D, Zhang Y, *et al.* Rosiglitazone ameliorates bile duct ligation-induced liver fibrosis by down-regulating NF- κ B-TNF- α signaling pathway in a PPAR γ -dependent manner [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(4): 854-860.
- [31] Hu X L, Wan C M, Gan Z J, *et al.* TNBG-5602, a novel derivative of quinoxaline, inhibits liver cancer growth via upregulating peroxisome proliferator-activated receptor γ *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2019, 71(11): 1684-1694.
- [32] Naseem S, Hussain T, Manzoor S. Interleukin-6: A promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 39: 36-45.
- [33] Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6): 1403-1415.
- [34] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(5): 878-888.
- [35] Anavi S, Hahn-Obercyger M, Madar Z, *et al.* Mechanism for HIF-1 activation by cholesterol under normoxia: A redox signaling pathway for liver damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 71: 61-69.
- [36] Han J, He Y P, Zhao H, *et al.* Hypoxia inducible factor-1 promotes liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease by activating PTEN/p65 signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14735-14744.
- [37] Zhu Q, Wang H, Jiang B, *et al.* Loss of ATF3 exacerbates liver damage through the activation of mTOR/p70S6K/HIF-1 α signaling pathway in liver inflammatory injury [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9): 910.
- [38] Quickelberghe E V, Sutter D D, Loo G V, *et al.* A protein-protein interaction map of the TNF-induced NF- κ B signal transduction pathway [J]. *Sci Data*, 2018, 5: 180289.
- [39] Jiang Z Q, Ma Y X, Li M H, *et al.* 5-Hydroxymethylfurfural protects against ER stress-induced apoptosis in GalN/TNF- α -injured L02 hepatocytes through regulating the PERK-eIF2 α signaling pathway [J]. *Chin J Nat Med*, 2015, 13(12): 896-905.

- [40] Kakino S, Ohki T, Nakayama H, *et al.* Pivotal role of TNF- α in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease in a murine model [J]. *Horm Metab Res*, 2018, 50(1): 80-87.
- [41] Liu Y M, Zhu L L, Liang S T, *et al.* Galactose protects hepatocytes against TNF- α -induced apoptosis by promoting activation of the NF- κ B signaling pathway in acute liver failure [J]. *Lab Invest*, 2015, 95(5): 504-514.
- [42] Ge J C, Wang Y X, Chen Z B, *et al.* Integrin alpha 7 correlates with poor clinical outcomes, and it regulates cell proliferation, apoptosis and stemness via PTK2-PI3K-Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Signal*, 2020, 66: 109465.
- [43] Tewari D, Patni P, Bishayee A, *et al.* Natural products targeting the PI3K-Akt-mTOR signaling pathway in cancer: A novel therapeutic strategy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, doi: 10.1016/j.semcancer.2019.12.008.
- [44] Takino J I, Sato T, Nagamine K, *et al.* The inhibition of Bax activation-induced apoptosis by RasGRP2 via R-Ras-PI3K-Akt signaling pathway in the endothelial cells [J]. *Sci Rep*, 2019, 9: 16717.
- [45] Yang Q, Jiang W, Hou P. Emerging role of PI3K/AKT in tumor-related epigenetic regulation [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 112-124.
- [46] Cobbina E, Akhlaghi F. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-pathogenesis, classification, and effect on drug metabolizing enzymes and transporters [J]. *Drug Metab Rev*, 2017, 49(2): 197-211.
- [47] Wu J L, Lin S, Wan B, *et al.* Pyroptosis in liver disease: New insights into disease mechanisms [J]. *Aging Dis*, 2019, 10(5): 1094-1108.
- [48] 郭若闻, 杨森, 曹林, 等. 原发性肝癌的中西医结合治疗进展 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2019, 29(6): 573-576.
- [49] 柴智, 樊慧杰, 王永辉, 等. 四逆散对雷公藤多苷所致急性肝损伤的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(2): 120-123.
- [50] 徐卫东, 钱元霞, 高静, 等. 四逆散含药血清对大鼠肝干细胞WB-F344增殖分化的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(2): 241-247.
- [51] 尚立芝, 王付, 苗小玲, 等. 四逆散加味抗肝纤维化的作用及机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(5): 207-211.
- [52] 王礼凤, 孙守才, 李长秦, 等. 加味四逆散对大鼠肝星状细胞株 HSC-T6JAK2-STAT3 信号通路的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(16): 1964-1965.
- [53] 郑旭锐, 孙守才, 李长秦, 等. 加味四逆散对肝纤维化大鼠肝组织I, III, IV型胶原影响的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(1): 177-178.
- [54] 范慧婕, 谭章斌, 赵晓山, 等. 四逆散通过 MAPKs/NF- κ B 途径保护脂多糖致 Raw264.7 的细胞炎症 [J]. 暨南大学学报: 自然科学与医学版, 2019, 40(1): 10-18.
- [55] 王玮, 伊莉雅, 高健美. 四逆散对 HepG2 移植性肝癌裸鼠 Sirt1 和 p53 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 16-18.