

# 基于网络药理学和实验验证探讨荆防颗粒对自身免疫性肝炎小鼠的治疗作用及作用机制

张永康<sup>1,2</sup>, 孙成宏<sup>2,3</sup>, 王西双<sup>2,3</sup>, 姚景春<sup>2,3</sup>, 张贵民<sup>1,2\*</sup>

1. 山东中医药大学药学院, 山东 济南 250300

2. 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

3. 鲁南制药集团股份有限公司 临沂市天然药物免疫药理毒理重点实验室, 山东 临沂 276006

**摘要:** **目的** 基于网络药理学及动物实验探讨荆防颗粒对自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 小鼠的治疗作用及作用机制。**方法** 通过 TCMSP 数据库筛选荆防颗粒的活性成分及其对应的靶点, 通过检索 Omim、Drugbank 和 GeneCards 数据库收集 AIH 相关的靶点, 进而得到荆防颗粒治疗 AIH 的关键靶点; 将获得的关键靶点导入 STRING 数据库进行分析, 并构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 通过 Cytoscape 软件可视化; 通过 Metascape 数据库对关键靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。通过建立刀豆蛋白 A 诱导的 AIH 小鼠模型探讨荆防颗粒治疗 AIH 的作用机制。**结果** 共筛选得到荆防颗粒中 159 个潜在活性成分和 269 个相关的靶点, 与 343 个 AIH 相关靶点取交集, 获得 25 个交集靶点。PPI 网络分析显示, 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、信号传导和转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 和 IL-8/CXC 型趋化因子配体 8 (CXC chemokine ligand 8, CXCL8) 等靶点可能为荆防颗粒治疗 AIH 的关键靶点; KEGG 通路富集分析得到炎症途径和凋亡相关途径信号通路。体内实验结果显示, 与模型组比较, 荆防颗粒显著减轻了刀豆蛋白 A 诱导的肝炎, 表现为小鼠存活率增加、肝细胞坏死减少、血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 荆防颗粒还通过抑制 IL-6/STAT3、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)/IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ /核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 通路进而调节多种细胞因子 (IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、CXCL-8) 的产生 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 从而发挥抗炎、抗凋亡作用。**结论** 荆防颗粒通过多成分、多靶点发挥治疗 AIH 的作用。

**关键词:** 荆防颗粒; 自身免疫性肝炎; 网络药理学; 炎症因子; IL-6/STAT3 信号通路; NLRP3/IL-1 $\beta$  信号通路; TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)05-1461-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.05.012

## Therapeutic effect and mechanism of Jingfang Granules on autoimmune hepatitis mice based on network pharmacology and experimental verification

ZHANG Yong-kang<sup>1,2</sup>, SUN Cheng-hong<sup>2,3</sup>, WANG Xi-shuang<sup>2,3</sup>, YAO Jing-chun<sup>2,3</sup>, ZHANG Gui-min<sup>1,2</sup>

1. College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250300, China

2. State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Chinese Traditional Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

3. Linyi Key Laboratory for Immunopharmacology and Immunotoxicology of Natural Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co. Ltd., Linyi 276006, China

**Abstract: Objective** To explore the therapeutic effect and mechanism of Jingfang Granules (荆防颗粒) on autoimmune hepatitis (AIH) mice based on network pharmacology and animal experiments. **Methods** The active components of Jingfang Granules and corresponding targets were screened by TCMSP database, and targets related to AIH were collected by Omim, Drugbank and

收稿日期: 2022-12-26

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2021CXGC010508)

作者简介: 张永康 (1997—), 男, 硕士, 主要从事中药药理学研究。E-mail: yongkangsd@163.com

\*通信作者: 张贵民, 研究员, 主要从事创新药物研发。E-mail: lunanzhangguimin@year.net

GeneCards databases, and then the key targets of Jingfang Granules in treating AIH were obtained. The obtained key targets are imported into STRING database for analysis, and protein-protein interaction (PPI) network was constructed and visualized by Cytoscape software. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of key targets were analyzed by Metascape database. AIH mice model induced by concanavalin A was established to explore the mechanism of Jingfang Granules in treating AIH. **Results** A total of 159 potential active components and 269 related targets in Jingfang Granules were screened, and 25 intersecting targets were obtained by intersecting with 343 AIH related targets. PPI network analysis showed that interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and IL-8/CXC chemokine ligand 8 (CXCL8) may be the key targets of Jingfang Granules in treating AIH. KEGG pathway enrichment analysis obtained inflammatory pathway and apoptosis-related pathway signal pathway. The experimental results *in vivo* showed that compared with model group, Jingfang Granules significantly reduced the hepatitis induced by concanavalin A, which showed that survival rate of mice was increased, necrosis of hepatocytes was decreased, activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum were decreased ( $P < 0.05, 0.01$ ). Jingfang Granules regulated the production of multiple cytokines including IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and CXCL-8 by inhibiting IL-6/STAT3, NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3)/IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ /nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathways ( $P < 0.05, 0.01$ ), thereby playing an anti-inflammatory and anti-apoptosis role. **Conclusion** Jingfang Granules plays a role in treating AIH through multi-components and multi-targets.

**Key words:** Jingfang Granules; autoimmune hepatitis; network pharmacology; inflammatory factors; IL-6/STAT3 signal pathway; NLRP3/IL-1 $\beta$  signal pathway; TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal pathway

自身免疫性肝炎 (autoimmune hepatitis, AIH) 是一种以肝实质损害为特征的炎症性疾病, 在亚太地区的发病率约为 0.005%~0.025%, 且呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>, 如果不及时治疗, 则会迅速发展为肝硬化和肝衰竭, 严重危害人类健康。AIH 的发病原因较为复杂, 临床上多以糖皮质激素如地塞米松磷酸钠注射液等进行治疗, 但极易引起机体诸多不良反应<sup>[2]</sup>。因此, 研究安全、有效和经济的治疗药物仍然是治疗 AIH 的临床需要。荆防颗粒组方来源于明代张时彻《摄生众妙方》中的荆防败毒散, 由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗、甘草 11 味中药组成, 具有畅达气机, 扶助正气, 消除风寒、湿热、痰瘀、气滞的作用, 广泛用于多种系统疾病的治疗<sup>[3-4]</sup>。现代药理学研究表明, 荆防颗粒具有良好的抗炎作用, 可增强机体免疫力, 保护肝脏的免疫功能<sup>[5-8]</sup>。

网络药理学作为药物研究的新模式, 通过构建成分-靶点-疾病等相互作用网络, 对中药复方物质基础和作用机制研究提供新的方法<sup>[9-10]</sup>。本课题组前期研究表明, 荆防颗粒对刀豆蛋白 A (concanavalin A, Con A) 诱导的免疫性肝炎具有显著的保护作用, 但其作用机制尚不清楚。因此, 本研究旨在从网络药理学的角度预测荆防颗粒治疗 AIH 的成分、靶点和信号通路, 结合实验验证深入探究荆防颗粒对 AIH 的治疗作用及作用机制, 为临床上应用荆防颗粒治疗 AIH 提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠, 体质量 (28 $\pm$ 2) g, 8 周龄, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2021-0006, 使用许可证号 SYXK (鲁)-20180008。动物饲养于室温 (23 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 40%~70% 的环境中, 12 h 光暗循环, 自由进食饮水, 适应性喂养 7 d 后进行实验。动物实验经鲁南制药集团股份有限公司实验动物伦理委员会批准 (批准号 HN-IACUC-2022-097)。

### 1.2 药品与试剂

荆防颗粒 (国药准字 Z37020357, 批号 8022009004) 由山东新时代药业有限公司提供; 地塞米松磷酸钠注射液 (批号 2202160612) 由山东辰欣药业股份有限公司提供; Con A (批号 C2010) 购自美国 Sigma Aldrich 公司; 小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 检测试剂盒 (批号 H052-1) 购自南京建成生物工程研究所; 小鼠白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 检测试剂盒 (批号 ml063132-2)、小鼠 IL-6 检测试剂盒 (批号 ml1002293-2)、小鼠 IL-8/CXC 型趋化因子配体 8 (CXC chemokine ligand 8, CXCL8) 检测试剂盒 (批号 ml58632) 购自 Mlbio 公司; 磷酸化核因子- $\kappa$ B p65 (phosphorylated nuclear factor- $\kappa$ B p65, p-NF- $\kappa$ B p65) 抗体 (批号 80477)、NF- $\kappa$ B p65 抗体 (批号 8242)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated

protein 3, NLRP3) 抗体(批号 13158)、抗体分泌细胞(antibody-secreting cell, ASC) 抗体(批号 67824)、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cleaved cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1) 抗体(批号 89332)、IL-1 $\beta$  抗体(批号 27989)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体(批号 3498)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体(批号 5023)、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) 抗体(批号 3230)、磷酸化 JAK2 (phosphorylated JAK2, p-JAK2) 抗体(批号 3771)、信号传导和转录激活蛋白 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 抗体(批号 9139)、磷酸化 STAT3 (phosphorylated STAT3, p-STAT3) 抗体(批号 9145); 购自美国 CST 公司;  $\beta$ -actin 抗体(批号 AF0003) 购自 Beyotime; IL-6 抗体(批号 ab233706)、TNF- $\alpha$  抗体(批号 ab183218)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 ab6721)、HRP 标记的兔抗鼠二抗(批号 ab6728) 购自英国 Abcam 公司。

### 1.3 仪器

冷冻离心机(美国 Sigma 公司); Panoramic SCAN 图像扫描及分析系统(匈牙利 3D HISTECH 公司); Tissue-Tec<sup>®</sup> VIP<sup>™</sup> 5 Jr 型全封闭组织脱水机、Tissue-Tec<sup>®</sup> TEC<sup>™</sup> 5 组织包埋机(日本樱花检验仪器株式会社); RM2235 型轮转式病理切片机、HM1210 型组织摊片机、ST5020 型自动染色机(德国 Leica 公司); BX53 型生物显微镜(日本 Olympus 公司); ELX-800 型酶标仪(美国 Bio Tek 公司); BS-800 型全自动生化分析仪(深圳市迈瑞生物医学电子有限公司); DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-40D 型转移槽(北京六一生物科技有限公司); 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 荆防颗粒靶点的收集** 从《中国药典》2020 年版中查询荆防颗粒 11 味中药的性味与归经, 借助 TCMSP 数据库分别以荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗、甘草为关键词搜索各中药的化学成分。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性(drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$  为筛选标准, 获得荆防颗粒的活性成分及其预测靶点。将收集到的所有靶点输入 UnitProt 数据库进行标准化转换, 以获取目标基因名称。同时, 将目标基因导入 Cytoscape 3.7.0 软件, 通过度值确定荆防颗粒的关键活性成分。

**2.1.2 AIH 的疾病靶点检索** 使用 Omim 数据库(<https://www.omim.org/>)、Drugbank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)和 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>), 输入关键词“autoimmune hepatitis”筛选疾病目标, 将 3 个数据库中符合疾病的基因结果汇总后去重, 筛选得到最终 AIH 的相关靶点基因。

**2.1.3 荆防颗粒和 AIH 交集靶点基因的收集以及蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建** 使用 Venn 图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)将荆防颗粒成分靶点与 AIH 相关靶点取交集以获得荆防颗粒治疗 AIH 的关键靶点。将获得的关键靶点导入 STRING 数据库(<http://www.string-db.org>)获取 PPI 网络。同时, 将 PPI 网络图导入 Cytoscape 软件并可视化, 利用 CytoHubba 插件进行拓扑分析, 默认设置显示前 10 名的蛋白节点, 将度值和最大邻居组件(maximum neighborhood component, MNC)前 10 位的靶点作为核心靶点。

**2.1.4 基因本体(gene ontology, GO)功能及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析** 将获得的荆防颗粒治疗 AIH 的关键靶点上传 Metascape 数据库(<http://metascape.org>), 进行 KEGG 通路和 GO 功能富集分析。将校正  $P$  值  $\leq 0.01$  的项目进行筛选, 根据富集基因的校正  $P$  值来排序, 选取排名在前的相关信号通路, 然后通过生物信息学云平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)可视化上述分析并生成气泡图。最后, 通过 Cytoscape 软件建立活性成分-靶点网络图。

### 2.2 实验验证

**2.2.1 AIH 小鼠模型的建立** ICR 小鼠随机分为对照组、模型组及荆防颗粒低、中、高剂量(2、4、8 g/kg)组和地塞米松(0.8 mg/kg)组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组 iv 10 mg/kg Con A 建立 AIH 模型。模型建立后 1 h, 荆防颗粒各剂量组 ig 相应药物, 地塞米松组 ip 地塞米松磷酸钠注射液, 对照组和模型组 ig 等体积纯净水, 记录造模 24 h 后各组小鼠死亡率。小鼠 ip 1%戊巴比妥溶液麻醉后, 随机采集血清和肝组织样本。

**2.2.2 肝功能和血液生化分析** 将各组小鼠血液于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、3500 r/min 离心 10 min, 立即吸取上清液, 用全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶

(alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性。

**2.2.3 肝组织病理学分析** 取各组小鼠肝脏组织, 甲醛固定后, 经梯度乙醇脱水并制作石蜡切片, 用自动染色机对组织 (5  $\mu$ m) 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于光学显微镜下观察各组小鼠肝脏病理学的差异。根据肝脏 Knodell 评分系统<sup>[11]</sup>评价炎性细胞浸润和坏死程度: 0 分, 无炎性细胞渗透和坏死; 1 分, 轻度炎性细胞浸润和坏死; 2 分, 中度炎性细胞浸润和坏死; 3 分, 严重炎性细胞浸润和坏死。

**2.2.4 肝组织炎性因子水平检测** 取各组小鼠肝组织, 在 PBS 溶液中匀浆后 4  $^{\circ}$ C、12 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书测定 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 CXCL8 的含量。

**2.2.5 Western blotting 检测肝组织 p-NF- $\kappa$ B p65、NF- $\kappa$ B p65、NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、Bcl-2、Bax、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、IL-6 和 TNF- $\alpha$  蛋白表达** 取各组小鼠肝脏组织, 加入含有磷酸酶抑制剂和 PMSF 的 RIPA 裂解液, 提取总

蛋白, 按照 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入相应抗体, 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜; PBST 洗涤 3 次, 加入二抗, 室温孵育 2 h; PBST 洗涤 3 次, 加入 ECL 发光试剂显影, 采用凝胶成像系统成像, 并使用 Image J 软件分析条带灰度值。

**2.2.6 统计学分析** 实验数据通过 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析, 结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析。

### 3 结果

#### 3.1 荆防颗粒活性成分与靶点的筛选

通过 TCMSP 数据库检索荆防颗粒中的 11 味药中所有的潜在靶点, 以同时满足 OB $\geq$ 30% 和 DL $\geq$ 0.18 为筛选条件, 再通过 UniProt 数据库更正和删除重复项目后, 共鉴定出 269 个与荆防颗粒相关的非重复性靶点和 159 个活性成分。将信息导入 Cytoscape 软件分析荆防颗粒“中药-成分-靶点”网络, 度值排名前 10 位的活性成分见表 1。

表 1 荆防颗粒活性成分 (前 10)

Table 1 Active ingredients of Jingfang Granules (top 10)

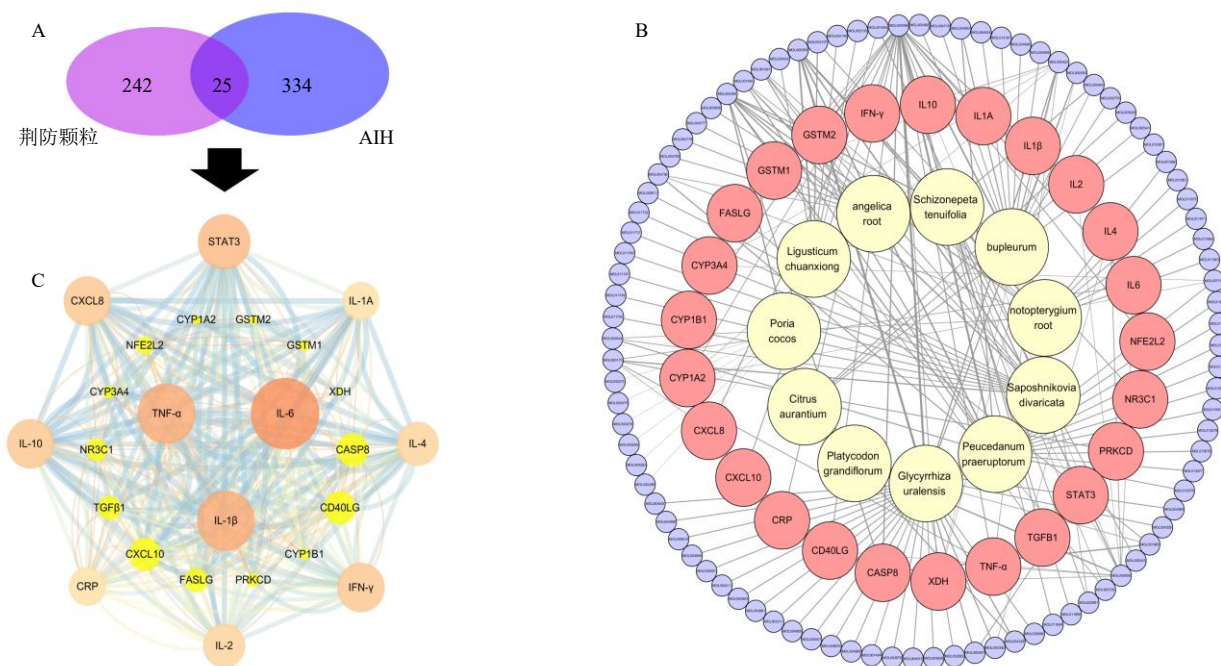
| 编号 | 成分                  | 度值 | CAS 号      | MOL ID   | OB/%  | DL   | 分类 | 归属                |
|----|---------------------|----|------------|----------|-------|------|----|-------------------|
| 1  | 槲皮素                 | 24 | 117-39-5   | MOL00098 | 46.43 | 0.28 | 黄酮 | 荆芥、柴胡、前胡、甘草       |
| 2  | 木犀草素                | 14 | 491-70-3   | MOL00006 | 36.16 | 0.25 | 黄酮 | 荆芥、桔梗             |
| 3  | $\beta$ -谷甾醇        | 10 | 83-46-5    | MOL00358 | 36.91 | 0.75 | 甾醇 | 荆芥、防风、羌活、前胡、独活、枳壳 |
| 4  | 山柰酚                 | 9  | 520-18-3   | MOL00422 | 41.88 | 0.24 | 黄酮 | 柴胡、甘草             |
| 5  | 汉黄芩素                | 8  | 632-85-9   | MOL00173 | 30.68 | 0.23 | 黄酮 | 荆芥、防风             |
| 6  | 丹参酮 II <sub>A</sub> | 7  | 568-72-9   | MOL07154 | 49.89 | 0.40 | 菲醌 | 柴胡、前胡             |
| 7  | 甘草查尔酮 A             | 6  | 58749-22-7 | MOL00497 | 40.79 | 0.29 | 黄酮 | 甘草                |
| 8  | 异鼠李素                | 6  | 480-19-3   | MOL00354 | 49.60 | 0.31 | 黄酮 | 柴胡、甘草             |
| 9  | 汉黄芩素                | 5  | 632-85-9   | MOL00173 | 30.68 | 0.23 | 黄酮 | 防风、甘草             |
| 10 | 柚皮素                 | 5  | 67604-48-2 | MOL04328 | 59.29 | 0.21 | 黄酮 | 枳壳、甘草             |

#### 3.2 荆防颗粒治疗 AIH 的关键靶点网络构建

通过 Genecard、OMIM 和 Drugbank 数据库共获得 761 个 AIH 疾病相关靶点, 汇总去重后, 共获得 343 个非重复性靶点。将 269 个荆防颗粒靶基因与 343 个潜在 AIH 相关靶基因取交集, 共获得 25 个交集靶点 (图 1-A), 为荆防颗粒治疗 AIH 的潜在靶点。应用 Cytoscape 软件对荆防颗粒治疗 AIH 的 25 个潜在靶点构建成成分-疾病靶点网络, 见图 1-B。将潜在靶点导入 STRING 数据库得到 PPI 网络, 进一步分析获得其核心网络, 并通过 Cytoscape 软件可视化, 见图 1-C。拓扑分析前 10 名的核心网络靶点包括 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、STAT3、CXCL8、IL-10、 $\gamma$  干扰素 (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、IL-4、Caspase-8 (CASP8) 和 C 反应蛋白 (C-reaction protein, CRP)。

#### 3.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

GO 功能富集分析主要包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。将 25 个潜在治疗靶点导入 Metascape 数据库后, 得到 GO 条目 689 个 ( $P < 0.01$ ), 生成了 BP、MF、CC 和 KEGG 富集分析结果。其中 BP 条目共 646 个, 主要涉及细胞因子的产生、炎症反应、凋亡信号通路和免疫过程; MF 条目 34 个, 主要参与细胞因子受体结合, 包括肿瘤坏死因子受体结合; CC 条目 9 个, 主要涉及质膜和囊泡 (图 2)。KEGG 通路富集分析筛选得到 93 条通路 ( $P < 0.01$ ), 结果表明, 荆防颗粒可能通过调节炎症反应、细胞因子、肝细胞坏死等信号通路治疗 AIH (图 3)。



A-荆防颗粒活性成分和 AIH 靶点的 Venn 图 B-荆防颗粒治疗 AIH 成分-靶点网络 C-荆防颗粒治疗 AIH 潜在靶点的 PPI 网络, 颜色越深节点越大代表其在网络中越重要

A-Venn diagram of active components and AIH targets of Jingfang Granules B-component-target network of Jingfang Granules in treating AIH C-PPI network of potential targets of Jingfang Granules in treating AIH, the darker the color, the bigger the nodes, which means that it is more important in the network

图 1 荆防颗粒治疗 AIH 的核心靶点和 PPI 网络

Fig. 1 Core target and PPI network of Jingfang Granules in treating AIH

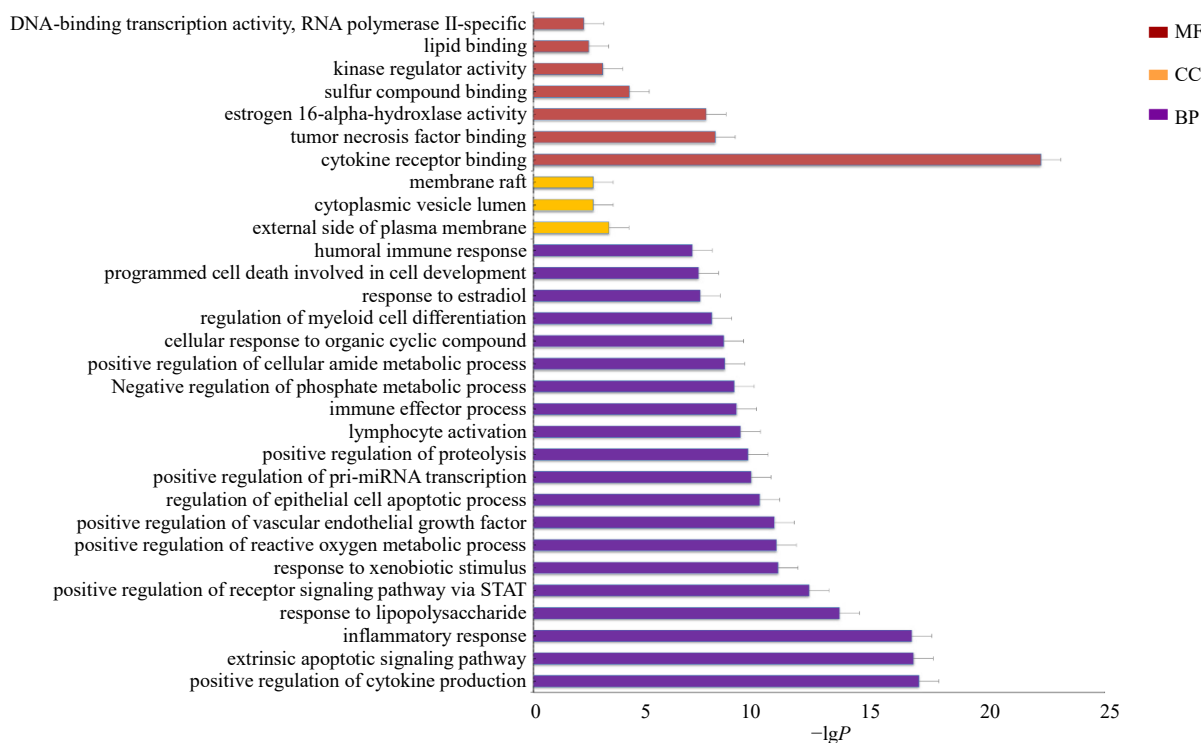


图 2 荆防颗粒治疗 AIH 靶点的 GO 功能富集分析

Fig. 2 GO function enrichment analysis of targets of Jingfang Granules in treating AIH



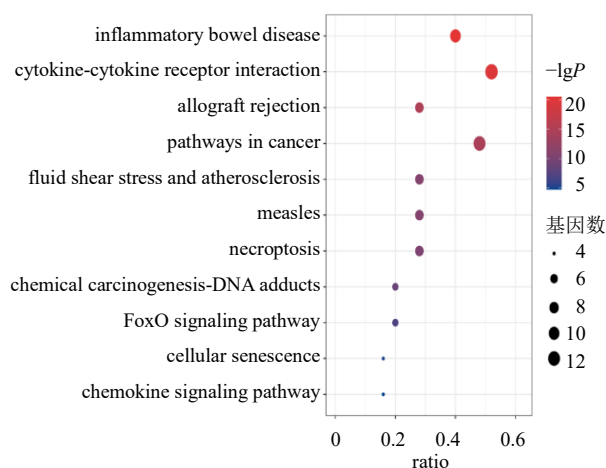
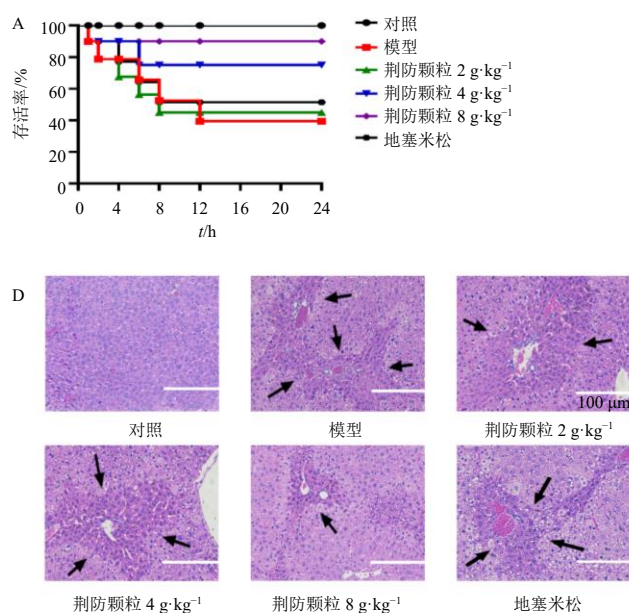


图 3 荆防颗粒治疗 AIH 靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 3 KEGG pathway enrichment analysis of targets of Jingfang Granules in treating AIH



A-各组小鼠存活率 B-各组小鼠血清中 ALT 活性 C-各组小鼠血清中 AST 活性 D-各组小鼠肝组织病理学特征 ( $\times 20$ , 箭头表示坏死的肝组织)、炎性细胞浸润和坏死程度评分 与对照组比较:  $*P < 0.05$   $**P < 0.01$   $***P < 0.001$ ; 与模型组比较:  $#P < 0.05$   $##P < 0.01$ , 下图同  
A-survival rate of mice in each group B-ALT activity in serum of mice in each group C-AST activity in serum of mice in each group D-pathological characteristics of liver tissue in each group ( $\times 20$ , arrow indicates necrotic liver tissue), score of inflammatory cell infiltration and necrosis degree  $*P < 0.05$   $**P < 0.01$   $***P < 0.001$  vs control group;  $#P < 0.05$   $##P < 0.01$  vs model group, same as below figures

图 4 荆防颗粒对 AIH 小鼠的保护作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 4 Protective effect of Jingfang Granules on AIH mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

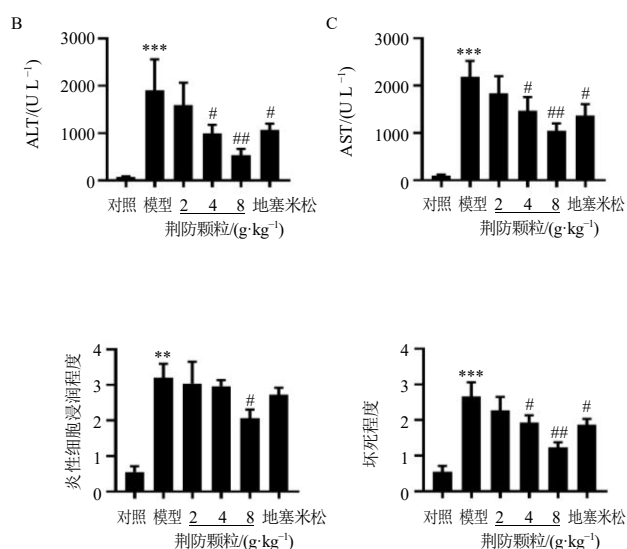
以上结果表明, 荆防颗粒可以减轻 Con A 诱导的 AIH 小鼠的肝损伤, 且药效优于地塞米松磷酸钠注射液。

### 3.5 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织炎症因子水平的影响

网络药理学结果和 KEGG 通路富集分析表明, 大多数确定的关键靶点在炎症细胞因子的相互作用

### 3.4 荆防颗粒对 AIH 模型小鼠的保护作用

通过建立 Con A 诱导的 AIH 小鼠模型, 验证网络药理学分析的结果。如图 4-A 所示, 模型组小鼠死亡率远高于对照组, 而各给药组小鼠死亡率均低于模型组, 且荆防颗粒中、高剂量组小鼠死亡率低于地塞米松组。如图 4-B、C 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高 ( $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 荆防颗粒中、高剂量组和地塞米松组血清中 ALT 和 AST 活性均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。如图 4-D 所示, 模型组小鼠肝组织出现明显的门脉炎症, 中央静脉周围出现严重的窦性充血以及点状或斑片状坏死; 给予荆防颗粒或地塞米松磷酸钠注射液治疗后, 小鼠肝脏中的炎症细胞浸润和细胞坏死受到显著抑制 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。



中富集。通过 ELISA 试剂盒检测肝组织中相关炎症因子水平, 如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 CXCL8 水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 与模型组比较, 荆防颗粒高剂量组 TNF- $\alpha$  水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 荆防颗粒中、高剂量组和地塞米松组 IL-1 $\beta$  水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 荆防颗粒高剂量组和地塞米松组 IL-6

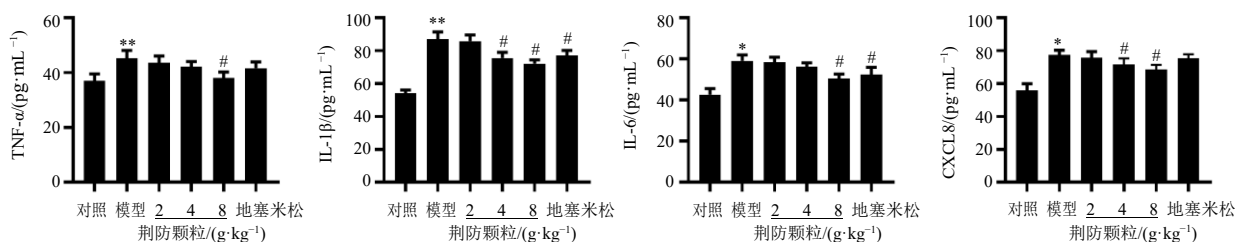


图 5 荆防颗粒对 AIH 小鼠的抗炎作用 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Anti-inflammatory effect of Jingfang Granules on AIH mice ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 荆防颗粒中、高剂量组 CXCL8 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 表明荆防颗粒对 ConA 诱导的 AIH 小鼠具有显著的抗炎作用。基于上述结果, 选择荆防颗粒高剂量 (8 g/kg) 组作为代表组, 探讨荆防颗粒治疗 AIH 的作用机制。

### 3.6 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织 IL-6/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 Bax 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), Bcl-2

蛋白表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 荆防颗粒高剂量组小鼠肝组织中 IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 和 Bax 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01), Bcl-2 蛋白表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ )。

### 3.7 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织 NLRP3/IL-1β 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肝组织中 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 和下游 IL-1β 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.05$ 、0.01), 表明模

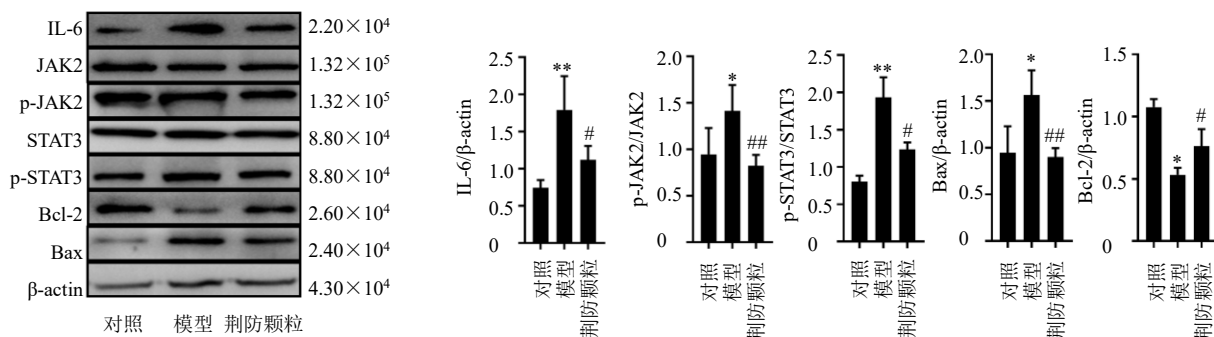


图 6 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织 IL-6/STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 Effect of Jingfang Granules on IL-6/STAT3 signal pathway related protein expressions in liver of AIH mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

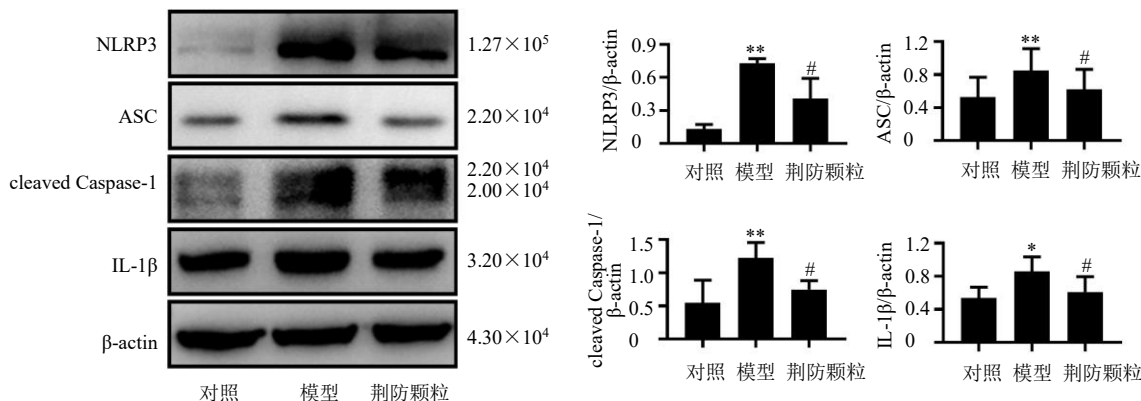


图 7 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织 NLRP3/IL-1β 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of Jingfang Granules on NLRP3/IL-1β signal pathway related protein expressions in liver of AIH mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

型组小鼠具有明显的炎症反应；与模型组比较，荆防颗粒高剂量组 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 和下游 IL-1 $\beta$  蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.8 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 8 所示，与对照组比较，模型组小鼠肝组

织中 TNF- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均显著升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组比较，荆防颗粒高剂量组 TNF- $\alpha$  和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )，表明荆防颗粒能够抑制 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的磷酸化水平。

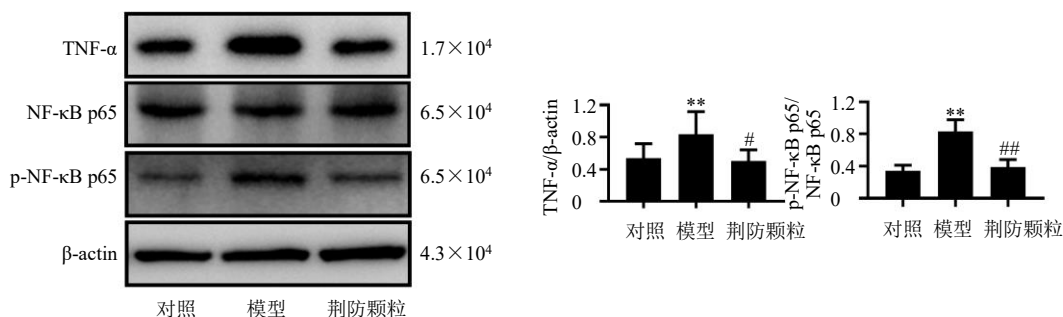


图 8 荆防颗粒对 AIH 小鼠肝组织 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 8 Effect of Jingfang Granules on TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signal pathway related protein expressions in liver of AIH mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

## 4 讨论

AIH 是一种典型的自身免疫性疾病，发生于任何年龄和种族<sup>[12-13]</sup>。几十年来对治疗 AIH 药物的研究表明，单一靶点药物难以解决所有问题<sup>[14]</sup>。近年来，中医药治疗 AIH 因其药理作用明显、不良反应少而受到越来越多的关注<sup>[15]</sup>。荆防颗粒具有改善能量代谢循环、解表驱汗、抗炎等作用<sup>[3-5,8,16]</sup>。研究表明，荆防颗粒通过降低促炎因子表达、抗氧化、调节转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )/Smad4 信号通路对 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠肝纤维化有明显的治疗作用<sup>[17]</sup>。此外，荆防颗粒还可以通过激活磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路发挥解酒保肝作用<sup>[18]</sup>。

网络药理学综合了中药有效成分、相应靶点和相应疾病 3 个方面，并将其作为 3 种不同类型的节点，形成“成分-靶点-疾病”网络，揭示了中药治疗相关疾病的有效成分和作用机制<sup>[9]</sup>。李志杰等<sup>[19]</sup>通过网络药理学探究了苦黄颗粒治疗 AIH 的活性成分和作用机制。郝建亨等<sup>[20]</sup>通过网络药理学技术探究了丹参酮 II<sub>A</sub> 治疗 AIH 的潜在靶点与通路之间的关系。本研究通过网络药理学和实验验证探究荆防颗粒治疗 AIH 的作用机制，确定了槲皮素是荆防颗粒最重要的活性成分，其次是木犀草素、 $\beta$ -谷甾醇、山柰酚和汉黄芩素等。通过 Venn 图确定荆防颗粒

与 AIH 疾病相关的 25 个中心靶点。成分-靶点网络表明，荆防颗粒在 AIH 治疗中作用于多个靶点并产生协同效应。GO 功能和 KEGG 通路分析表明，大多数靶点在炎症和凋亡过程中富集。网络药理学分析未提供特定的信号通路靶点，但本研究从荆防颗粒治疗 AIH 相关的交叉靶点中发现了炎症和凋亡通路。PPI 网络显示 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、STAT3 和 CXCL8 是 5 个度值最大的靶点，这些靶点都表明了荆防颗粒对 AIH 的抗炎和抗凋亡特性，实际可能存在涉及更有效成分和作用机制的暗示。

Con A 诱导的 AIH 模型是一种具有代表性的、易于构建的 AIH 模拟模型，也是一种急性肝损伤模型，可导致高死亡率<sup>[21]</sup>。此外，Con A 诱导的 AIH 模型的典型特征为炎症细胞因子的分泌，ALT 和 AST 活性升高，肝细胞凋亡和坏死异常<sup>[22]</sup>。本研究结果表明，荆防颗粒能显著降低 Con A 诱导的 AIH 模型小鼠的死亡率、肝组织炎症和细胞凋亡，并能抑制 AIH 小鼠血清 ALT 和 AST 的活性。

异常的 IL-6/STAT3 信号通路在 AIH 的发生和发展中起着关键作用，抑制 IL-6/STAT3 信号通路可以减轻 Con A 诱导的肝损伤<sup>[23]</sup>。在自身免疫炎症性疾病模型中，分泌的 IL-6 通过 gp130 与受体结合，激活 JAK2 并触发 STAT3 通路，调节肝细胞凋亡<sup>[24]</sup>。Bcl-2 表达提高有利于增强细胞的抗凋亡功能，而 Bax 的增加则促进细胞凋亡。Bax/Bcl-2 值



通常用来表示细胞凋亡水平<sup>[25-26]</sup>。李翔子等<sup>[27]</sup>研究结果证实,荆防颗粒可以通过抑制 JAK2/STAT3 通路调节 T 淋巴细胞亚群的平衡,在荨麻疹动物模型中发挥抗炎作用,从而保护小鼠免受自身免疫性疾病。曹天佑等<sup>[28]</sup>研究证实,荆防颗粒可显著抑制由炎症导致的细胞凋亡。IL-1 $\beta$  在多种自身炎症性疾病中发挥重要的作用,IL-1 $\beta$  能够通过支持 T 细胞存活、上调淋巴细胞上的 IL-2 受体、促进 B 细胞增殖和 Th17 细胞分化来介导炎症反应<sup>[29]</sup>。NLRP3 是先天免疫的重要组成部分,由 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 组成,用于诱导 IL-1 $\beta$  的释放,在 AIH 肝脏炎症中起关键作用<sup>[30]</sup>。此外,IL-1 $\beta$  能与 IL-6 和 TNF- $\alpha$  产生协同作用,参与炎症细胞的释放和炎症通路的激活。TNF- $\alpha$  是一种炎症细胞因子,可以激活固有免疫途径并触发炎症反应<sup>[31]</sup>。TNF- $\alpha$  通过介导 NF- $\kappa$ B 的激活来刺激细胞因子的产生,并增强 AIH 的炎症反应<sup>[32]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种主要转录因子,介导 Con A 诱导的免疫炎症反应,并参与 TNF- $\alpha$  诱导的不同类型细胞中炎症蛋白的表达<sup>[33]</sup>。El-Agamy 等<sup>[34]</sup>阐明了 NF- $\kappa$ B 在 Con A 诱导的 AIH 发病机制中的作用,Con A 刺激 NF- $\kappa$ B 的磷酸化并启动和调节炎症过程,促进炎症细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  和 IFN- $\gamma$  的产生。本研究结果表明,荆防颗粒显著抑制了 AIH 模型小鼠肝组织中 STAT3、NLRP3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白的表达。荆防颗粒可能通过抑制 STAT3、NLRP3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,在细胞凋亡和炎症水平上对 AIH 产生抑制作用。因此,STAT3、NLRP3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路是荆防颗粒治疗 AIH 的关键靶点。

AIH 早期发病原因主要为 CD4<sup>+</sup> 细胞活化和释放 IL-1 $\beta$ 、IL-6、CXCL8、TNF- $\alpha$  等多种细胞因子<sup>[35-37]</sup>。这些细胞因子在 AIH 中被诱导,并导致相关的有害免疫反应<sup>[38]</sup>。而 Con A 诱导的 AIH 炎症反应主要由 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 CXCL8 的增加介导<sup>[36-37,39-40]</sup>。ELISA 和 Western blotting 结果表明,荆防颗粒显著抑制 STAT3、NLRP3 和 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白(IL-6、p-JAK2、p-STAT3、NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、p-NF- $\kappa$ B p65) 的表达,以上蛋白被激活后反过来刺激并调节炎症细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 CXCL8 的分泌。

本研究基于网络药理学和 AIH 小鼠模型,探究了荆防颗粒抗炎作用机制。荆防颗粒通过多成分、多靶点、多通路的协同作用发挥抗炎、抗凋亡作用

治疗 AIH,证实了网络药理学预测的结果,为荆防颗粒治疗 AIH 提供依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Tanaka A. Autoimmune hepatitis: 2019 update [J]. *Gut Liver*, 2020, 14(4): 430-438.
- [2] Dalekos G N, Koskinas J, Papatheodoridis G V. Hellenic association for the study of the liver clinical practice guidelines: Autoimmune hepatitis [J]. *Ann Gastroenterol*, 2019, 32(1): 1-23.
- [3] 梁红宝, 姜宇琨, 袁晓梅, 等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的荆防颗粒化学成分研究 [J]. *中草药*, 2022, 53(6): 1697-1708.
- [4] 赵琰, 胡杰, 张贵民, 等. 荆防败毒散的源流与应用 [J]. *环球中医药*, 2020, 13(11): 1996-2002.
- [5] 赵亚芳, 姜雨乔, 李郁茹, 等. 荆防颗粒对寒冷刺激诱导小鼠机体损伤的保护作用 [J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7455-7460.
- [6] 张奎, 陈红英, 马瑜. 荆防败毒散药效学研究 [J]. *河南中医*, 2009, 29(6): 601-602.
- [7] 冯群, 关永霞, 黄志艳, 等. 基于网络药理学和分子对接的荆防败毒散预防新型冠状病毒肺炎的活性成分研究 [J]. *药学实践杂志*, 2020, 38(6): 485-491.
- [8] 高铭, 张霞, 罗戴民, 等. 荆防颗粒对急性醉酒模型小鼠的解酒作用及作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(4): 1164-1172.
- [9] Jiang H, Mao T Y, Liu Y Y, *et al.* Protective effects and mechanisms of Yincheng Linggui Zhugan Decoction in HFD-induced nonalcoholic fatty liver disease rats based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 908128.
- [10] 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.
- [11] Hofer H, Oesterreicher C, Wrba F, Ferenci P, *et al.* Centrilobular necrosis in autoimmune hepatitis: A histological feature associated with acute clinical presentation [J]. *J Clin Pathol*, 2006, 59(3): 246-249.
- [12] Gatselis N K, Zachou K, Koukoulis G K, *et al.* Autoimmune hepatitis, one disease with many faces: Etiopathogenetic, clinico-laboratory and histological characteristics [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1): 60-83.
- [13] Czaja A J. Global disparities and their implications in the occurrence and outcome of autoimmune hepatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(9): 2277-2292.
- [14] Friedman S L, Neuschwander-Tetri B A, Rinella M, *et al.* Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies [J]. *Nat Med*, 2018, 24(7): 908-922.
- [15] Yang Y X, Zhang P, Wang Y Y, *et al.* Hepatoprotective effect of San-Cao Granule on con A-induced liver injury in mice and mechanisms of action exploration [J]. *Front*

- Pharmacol*, 2018, 9: 624.
- [16] 冀霞, 张作娟, 魏莉. 荆防颗粒联合阿奇霉素治疗成人支原体肺炎的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(8): 1703-1706.
- [17] 李郁茹, 赵亚芳, 程国良, 等. 荆防颗粒对 CCl<sub>4</sub> 诱导小鼠肝纤维化的治疗作用及其机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(22): 6127-6136.
- [18] 高铭, 杨若聪, 刘淇, 等. 基于生物信息技术探究荆防颗粒解酒保肝的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5683-5692.
- [19] 李志杰, 段钟平, 吴桥, 等. 基于网络药理学和分子对接的苦黄颗粒治疗自身免疫性肝炎的机制研究 [J]. 北京医学, 2021, 43(9): 894-898.
- [20] 郝健亨, 李振城, 孙薇丽. 丹参酮 II<sub>A</sub> 治疗自身免疫性肝炎的网络分析及实验验证 [J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(10): 1033-1040.
- [21] Abe T, Kawamura H, Kawabe S, *et al.* Liver injury due to sequential activation of natural killer cells and natural killer T cells by carrageenan [J]. *J Hepatol*, 2002, 36(5): 614-623.
- [22] Mao Y Q, Wang J B, Yu F J, *et al.* Ghrelin reduces liver impairment in a model of concanavalin A-induced acute hepatitis in mice [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5385-5396.
- [23] Wang K P, Song Z Z, Wang H J, *et al.* *Angelica sinensis* polysaccharide attenuates concanavalin A-induced liver injury in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 31: 140-148.
- [24] Arora S, Dev K, Agarwal B, *et al.* Macrophages: Their role, activation and polarization in pulmonary diseases [J]. *Immunobiology*, 2018, 223(4/5): 383-396.
- [25] Jin C N, Miao X, Zhong Y J, *et al.* The renoprotective effect of diosgenin on aristolochic acid I-induced renal injury in rats: Impact on apoptosis, mitochondrial dynamics and autophagy [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 7456-7467.
- [26] Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death [J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(12): 1099-1109.
- [27] 李翔子, 王西双, 范建伟, 等. 荆防合剂通过抑制 JAK2-STAT3 信号通路调节荨麻疹小鼠脾脏 T 淋巴细胞亚群的平衡 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(20): 5473-5480.
- [28] 曹天佑, 屈会化, 董利洋, 等. 荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(18): 5742-5749.
- [29] Lamkanfi M, Vande Walle L, Kanneganti T D. Deregulated inflammasome signaling in disease [J]. *Immunol Rev*, 2011, 243(1): 163-173.
- [30] Lu F F, Lan Z X, Xin Z Q, *et al.* Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3207-3221.
- [31] Yang C M, Yang C C, Hsu W H, *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced C-C motif chemokine ligand 20 expression through TNF receptor 1-dependent activation of EGFR/p38 MAPK and JNK1/2/FoxO1 or the NF- $\kappa$ B pathway in human cardiac fibroblasts [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(16): 9086.
- [32] Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- $\alpha$  signaling in macrophages [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2010, 20(2): 87-103.
- [33] Li X, Liu H C, Yao Q Y, *et al.* Quercetin protects mice from ConA-induced hepatitis by inhibiting HMGB1-TLR expression and down-regulating the nuclear factor kappa B pathway [J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 96-106.
- [34] El-Agamy D S. Pirfenidone ameliorates concanavalin A-induced hepatitis in mice via modulation of reactive oxygen species/nuclear factor kappa B signalling pathways [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(12): 1559-1566.
- [35] Wang Y Y, Zhou L, Li Y N, *et al.* The effects of berberine on concanavalin A-induced autoimmune hepatitis (AIH) in mice and the adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2017, 23: 6150-6161.
- [36] 魏莉, 李蕴铷. 地塞米松联合小剂量白细胞介素-2 治疗实验性自身免疫性肝炎 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2011, 20(10): 933-935.
- [37] 雷云洁, 杨晋辉. IL-8 与自身免疫性肝病的关系 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(2): 411-413.
- [38] Diao W L, Jin F F, Wang B, *et al.* The protective role of myeloid-derived suppressor cells in concanavalin A-induced hepatic injury [J]. *Protein Cell*, 2014, 5(9): 714-724.
- [39] Khan J, Noboru N, Young A, *et al.* Pro and anti-inflammatory cytokine levels (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10) in rat model of neuroma [J]. *Pathophysiology*, 2017, 24(3): 155-159.
- [40] Dai Q M, Li Y, Yu H Y, *et al.* Suppression of Th1 and Th17 responses and induction of Treg responses by IL-18-expressing plasmid gene combined with IL-4 on collagen-induced arthritis [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 5164715.

[责任编辑 李亚楠]