

• 药理与临床 •

基于网络药理学整合体内实验探究四物汤单味药组分治疗胆汁淤积性肝损伤的作用与机制

汪 乐¹, 李佳楠¹, 杨 洋², 曲姣蓉^{1*}, 李晓骄阳^{1*}

1. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

摘要: 目的 基于网络药理学整合体内实验对比四物汤中 4 种单味药 (川芎 *Chuanxiong Rhizoma*、白芍 *Paeoniae Radix Alba*、当归 *Angelicae Sinensis Radix*、熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata*) 治疗胆汁淤积性肝损伤 (cholestatic liver injury, CLI) 的药效差异, 并探讨各单味药的作用机制。方法 利用 TCMSP 数据库获取川芎、白芍、当归、熟地黄的主要活性成分及作用靶点, 通过 GeneCards 数据库获取 CLI 靶点, 使用 Cytoscape 3.10.1 软件分析并构建“单味药-活性成分-作用靶点”网络, 借助在线网站获取各单味药与 CLI 之间的交集靶点, 并绘制韦恩图。将靶点基因导入 DAVID 数据库进行基因富集分析。构建胆总管结扎 (bile duct ligation, BDL) 动物模型, 给予各单味药水提物后, 检测血清肝功能相关生化指标, 并对肝组织进行病理染色对比药效作用。同时结合 qRT-PCR 检测 CLI 相关靶点的基因表达。结果 网络药理学结果显示, 四物汤中川芎、白芍、当归、熟地黄与 CLI 之间均存在 3 个交集靶点 [核受体亚家族 3C 组成员 2 (nuclear receptor subfamily 3 group C member 2, *Nr3c2*)、类视黄醇 X 受体 (retinoid X receptor alpha, *Rxra*)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *Ptgs2*)]。通过体内验证实验表明白芍、川芎、当归、熟地黄水提物均可显著改善 CLI 以及相关的肝纤维化情况, 且均能下调上述 3 个共同靶点表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。此外, 白芍、川芎的体内抗 CLI 疗效优于当归、熟地黄提取物。结果还显示白芍与 CLI 有 18 个、川芎与 CLI 有 4 个与其他单味药不同的独立交集靶点, 而当归、熟地黄与 CLI 之间不存在独立的交集靶点。进一步生信分析发现, 白芍作用靶点基因富集于血管生成、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路; 川芎作用靶点富集于血管内皮、血管生成、血管生成因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 通路。进一步验证结果显示白芍通过下调肝脏中血管细胞黏附分子 (vascular cell adhesion molecule 1, *Vcam1*)、*Tnf*、有丝分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase 8, *Mapk8*)、AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶 (AKT serine/threonine kinase 1, *Akt1*) 表达改善 CLI, 川芎通过下调肝脏激酶插入结构域受体 (kinase insert domain receptor, *Kdr*)、*Mapk14* 表达改善 CLI。结论 四物汤中川芎、白芍、当归、熟地黄均能不同程度地改善胆汁淤积引起的肝损伤及纤维化, 它们通过靶向 *Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2* 共同改善 CLI。白芍、川芎改善 CLI 疗效优于当归、熟地黄, 前者可基于 TNF 信号通路而后者则是通过调控 VEGF 信号通路分别特异性改善 CLI。

关键词: 网络药理学; 四物汤; 白芍; 川芎; 当归; 熟地黄; 胆汁淤积性肝损伤; 肝纤维化; 肿瘤坏死因子通路; 血管生成因子通路; 氧化芍药苷; 洋川芎内酯 A; 阿魏酸; 5-羟甲基糠醛

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)05-1553-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.05.014

Effect and mechanism of individual components of Siwu Tang in treatment of cholestatic liver injury based on network pharmacology and experimental validation *in vivo*WANG Le¹, LI Jianan¹, YANG Yang², QU Jiaorong¹, LI Xiaojiaoyang¹

1. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

收稿日期: 2023-11-30

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274186)

作者简介: 汪 乐, 博士研究生, 研究方向为中药防治胆汁淤积性肝损伤。E-mail: leowang9405@163.com

*通信作者: 李晓骄阳, 教授, 博士生导师, 从事抗肝纤维化相关中药药理研究。E-mail: xiaojiaoyang.li@bucm.edu.cn

曲姣蓉, 讲师, 研究方向为中药及天然产物防治重度肝胆疾病。E-mail: qujiaorong@bucm.edu.cn

Abstract: Objective To compare the therapeutic effects of the individual components of Siwu Tang (四物汤, SWT) including Chuanxiong (*Chuanxiong Rhizoma*), Baishao (*Paeoniae Radix Alba*), Danggui (*Angelicae Sinensis Radix*), Shudihuang (*Rehmanniae Radix Praeparata*) in the treatment of cholestatic liver injury (CLI) and explored the related mechanisms based on network pharmacology and experimental validation *in vivo*. **Methods** The main active ingredients and targets of *Chuanxiong Rhizoma*, *Paeoniae Radix Alba*, *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* were obtained by TCMSP database. CLI targets were obtained by GeneCards database and “monomeric herb-active ingredient-target” network was analyzed and constructed by Cytoscape 3.10.1 software. Intersection targets between each monomeric herb and CLI were obtained using online resources, and Venn diagram was generated. The target genes were imported into DAVID database for gene enrichment analysis. Bile duct ligation (BDL) model was conducted, after administering the water extracts of each individual herb, serum biochemistry markers related to liver function were measured, and pathological staining was performed on liver tissue to compare the pharmacological effects. Moreover, qRT-PCR was employed to detect the gene expressions of CLI related targets. **Results** The results of network pharmacology revealed that *Chuanxiong Rhizoma*, *Paeoniae Radix Alba*, *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* in SWT shared three intersecting targets [nuclear receptor subfamily 3 group C member 2 (*Nr3c2*), retinoid X receptor alpha (*Rxra*) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*)] with CLI. *In vivo* validation experiments showed that water extracts of *Chuanxiong Rhizoma*, *Paeoniae Radix Alba*, *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* significantly improved CLI and related liver fibrosis, and downregulated the expressions of the three common targets mentioned above ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). In addition, the *in vivo* anti CLI efficacy of *Paeoniae Radix Alba* and *Chuanxiong Rhizoma* were better than that extracts of *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata*. The results also showed that there were 18 independent intersection targets between *Paeoniae Radix Alba* and CLI, and four independent intersection targets between *Chuanxiong Rhizoma* and CLI that were different from other individual herbs, while there were no independent intersection targets between *Angelicae Sinensis Radix*, *Rehmanniae Radix Praeparata* and CLI. Further bioinformatics analysis revealed that the target genes of *Paeoniae Radix Alba* were enriched in angiogenesis and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathways; The targets of *Chuanxiong Rhizoma* were enriched in vascular endothelium, angiogenesis and vascular endothelial growth factor (VEGF) pathways. Further validation results showed that *Paeoniae Radix Alba* improved CLI by downregulating the expressions of vascular cell adhesion molecule 1 (*Vcam1*), *Tnf*, mitogen activated protein kinase 8 (*Mapk8*), and AKT serine/threonine kinase 1 (*Akt1*) in liver, *Chuanxiong Rhizoma* improved CLI by downregulating the expressions of kinase insertion domain receptor (*Kdr*) and *Mapk14* in liver. **Conclusion** *Chuanxiong Rhizoma*, *Paeoniae Radix Alba*, *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* in SWT could ameliorate liver injury and fibrosis caused by cholestasis. They collectively improve CLI by targeting *Nr3c2*, *Rxra* and *Ptgs2*. *Paeoniae Radix Alba* and *Chuanxiong Rhizoma* exhibit superior efficacy in improving CLI compared to *Angelicae Sinensis Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata*. *Paeoniae Radix Alba* specifically improves CLI through TNF signaling pathway, while *Chuanxiong Rhizoma* achieves specificity in improving CLI through VEGF signaling pathway.

Key words: network pharmacology; Si-Wu-Tang; *Paeoniae Radix Alba*; *Chuanxiong Rhizoma*; *Angelicae Sinensis Radix*; *Rehmanniae Radix Praeparata*; cholestatic liver injury; liver fibrosis; tumor necrosis factor pathway; vascular endothelial growth factor pathway; oxypaeoniflora; senkyunolide A; ferulic acid; 5-hydroxymethylfurfural

胆汁淤积性肝损伤(cholestatic liver injury, CLI)是一种临床常见的肝脏损伤,以原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis, PSC)较为常见,其主要特征是由于胆汁的形成、分泌或排泄过程出现障碍,导致胆汁不能正常流向肠道,而在肝脏或胆道系统内积聚并引起脏器损伤和肝纤维化。这种疾病可以由多种原因引起,包括胆道梗阻、肝内胆管损伤遗传因素、肝胆系统结构异常、药物毒性、感染、肝自身免疫疾病等^[1]。熊去氧胆酸是大多数 CLI 的基础治疗药物,但它仍无法阻止部分

PBC 以及 PSC 患者的疾病进展,最终可能导致肝功能失代偿,需要进行肝移植治疗。一些新型抗胆汁淤积剂如核受体激动剂、利胆剂和胆汁酸合成抑制剂,可能会在一定程度上改善 CLI 及其相关并发症,但目前仍缺乏有效临床证据^[2-3]。因此,未来研究可致力于改变胆汁淤积、炎症、细胞存活以及改善纤维化等多个途径共同改善 CLI^[4],寻找相关全新治疗策略势在必行。

中医药以其一方多药、一药多成分的特点或许能为 CLI 更全面的治疗提供新的研究方向。四物汤最早见于晚唐时期蔺道人所著的《仙授理伤续断秘

方》，被用于外伤引起的瘀血和疼痛。随着研究的不断深入，四物汤逐渐在中医临床中得到广泛应用，并被认为是一种补血、活血、调经的经典方药，其核心成分包括当归、川芎、白芍、熟地黄 4 味药。作为补血调经的基础方剂，四物汤享有“妇科第一方”的美誉，有研究报道其通过提高抗氧化能力、调节血管生成来改善小鼠卵巢功能^[5-6]。此外，还有研究报道四物汤通过抑制肿瘤细胞转化产生的抑癌作用^[7-8]。近年来，大量实验研究发现，四物汤可通过调控机体免疫微环境、修复胆酸代谢稳态等途径有效改善因手术介入或化学药损伤导致的包括 CLI 在内的多种慢性肝病^[9-11]。四物汤以其补益气血功效，或益于改善肝脏组织的养分供应，从而改善 CLI。方中川芎入肝、胆经，具有活血化瘀、祛风止痛的功效；白芍则能养血敛阴、揉肝止痛；熟地味厚滋腻、滋补营血；当归补血和血，4 药合用，血虚得补，血滞得散^[12]。尽管大量文献已报道四物汤及其中分离所得多种活性成分（如川芎嗪、阿魏酸、芍药苷等）均可有效缓解 CLI，然而目前尚未有研究对于 4 种单味药的药效进行对比评估，因此筛选单味药及主要活性成分有助于进一步探究四物汤改善慢性肝病的作用与机制。

网络药理学在中医药领域的应用是一种整合计算机科学、网络科学和药理学的交叉学科研究方法。它主要通过大数据、网络分析和计算模型等技术手段，系统地研究中医药的药理学特性、作用机制、多成分相互作用等方面。网络药理学可以帮助揭示中医药中各成分的作用靶点，以及这些靶点之间的相互关系，从而更全面地理解中医药的药理学特性^[13]。前期有研究报道过四物汤复方的网络药理学，但本研究采用单味药的网络药理学，对比四物汤中各单味药的作用靶点。同时结合动物实验对四物汤中的单味药川芎、白芍、当归、熟地黄治疗 CLI 的药效及靶点进行验证，探讨了四物汤治疗 CLI 的作用机制，对进一步解释四物汤治疗肝胆疾病的科学内涵、临床应用以及挖掘四物汤中有效活性成分具有重要意义。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠，8 周龄，雌雄各半，体质量 22~24 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2019-0010。动物饲养于北京中医药大学实验动物中心，在正常条件下饲

养，周期为 12 h 光照/12 h 黑暗，提供无限量饲料和纯水。动物实验经北京中医药大学实验动物伦理委员会批准（批准号 BUCM-4-20200730023160）。

1.2 药材

川芎、熟地黄、白芍、当归饮片均购自北京同仁堂（集团）有限公司，经北京中医药大学中药学院中药药理教研室刘润平教授分别鉴定为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎、玄参科植物地黄 *Rehmannia glutinosa* Libosch. 的干燥块根的炮制加工品、毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根。

1.3 药品与试剂

丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT）试剂盒（批号 20231013）、天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）试剂盒（批号 20230802）、碱性磷酸酶（alkaline phosphatase, ALP）试剂盒（批号 20230802）、羟脯氨酸（hydroxyproline, HYP）试剂盒（批号 20230921）、总胆汁酸（total bile acid, TBA）试剂盒（批号 20231012）、总胆红素（total bilirubin, T-BIL）试剂盒（批号 20230817）均购自南京建成生物工程研究所；异氟烷（批号 20230502）购自江苏恒丰强生物技术有限公司；无水乙醇（批号 20231018）、异丙醇（批号 20220801315）均购自北京正程生物科技有限公司。

1.4 仪器

R500 型麻醉机（深圳市瑞沃德生命科技有限公司）；酶标仪（赛尔福医疗科技北京有限公司）；C1000 Touch 型 PCR 仪（美国 Bio-Rad 公司）；Centrisart® D-16C 型离心机（德国赛多利斯公司）；孵育箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；F6/10 型匀浆仪（上海净信实业发展有限公司）；Nano-800+型超微量核酸蛋白测定仪（上海嘉鹏科技有限公司）。

2 方法

2.1 四物汤单味药活性成分及靶点基因的获取

分别以川芎、白芍、熟地黄、当归为关键词在 TCMSP 数据库（<http://tcmsp.com/tcmsp.php>）进行检索，获取各单味药的相关活性成分及靶点。将检索后得到的活性成分以口服生物利用度（oral bioavailability, OB）≥30%及类药性（drug-likeness, DL）≥0.18^[14]为纳入标准对药物入血成分进行筛选，得到其潜在活性成分及对应靶点信息。将筛选

后得到成分及靶点信息整合汇总并去掉重复靶点后, 将靶点蛋白名依次输入 UniProt 数据库中得到标准基因名称并汇总。

2.2 CLI 靶点的获取

以 CLI 标准英文名称“cholestatic liver injury”为检索词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中进行检索, 得到 CLI 相关疾病靶点。并剔除在 UniProt 数据库中无对应 ID 号的靶点, 保留有对应标准基因名及 ID 号的靶点并进行汇总。

2.3 “药物-成分-作用靶点”网络构建及“药物-疾病”交集靶点获取

运用 Cytoscape 3.10.1 软件将“2.1”项下收集得到的活性成分及其相对应的靶点基因进行可视化处理, 分别构建川芎、白芍、熟地黄、当归的“药物-活性成分-作用靶点”网络。将上述所获取的各单味中药的作用靶点分别和疾病靶点导入生物信息学与进化基因组学 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 网站中, 即可得到川芎、白芍、熟地黄、当归与 CLI 之间的交集靶点, 并据此绘制韦恩图。

2.4 生物信息学分析

根据韦恩图的结果, 将起主要治疗作用的单味药物靶点基因数据导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>), 将物种设置为“Mus musculus”, 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, 根据 P 值从小到大, 筛选出药物作用靶点的主要生物过程及信号通路, GO 分析取前 10 位、KEGG 分析取前 20 位结果。并对数据进行可视化处理, 利用微生信网站 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 在线绘制 GO 分析条形图及 KEGG 富集分析气泡图, 用于后续分析及实验验证。

2.5 四物汤各单味药水提物的制备

分别称取川芎、白芍、熟地黄、当归饮片各 20 g, 打碎成粉末状后装入药包, 加入 200 mL 水, 在圆底烧瓶中浸泡 1 h, 之后的操作根据各药物性质的不同时间长短有所不同, 其中川芎加热回流 1.5 h, 滤过, 药渣以同样的方法再煮 1.5 h 并滤过^[15]; 白芍加热回流 2 h, 滤过, 药渣以同样的方法再煮 1.5 h 并滤过^[16]; 熟地黄、当归加热回流 30 min, 滤过, 药渣以同样的方法再煮 20 min 并滤过^[17-18]。将 2 次滤过后药液混合后进行抽滤, 所得液体通过旋蒸仪

浓缩至 50~100 mL, 收集浓缩药液, 取部分应用 HPLC 测定并采取外标法测定熟地黄水提物中 5-羟甲基糠醛质量浓度为 5.07 mg/mL、白芍水提物中氧化芍药苷质量浓度为 4.09 mg/mL、当归水提物中阿魏酸质量浓度为 1.6 mg/mL、川芎水提物中洋川芎内酯 A 质量浓度为 2.2 mg/mL。其余药液室温冷却后放置 -80 °C 冷冻过夜, 次日转移至冷冻干燥机, 直至冻干至粉末状, 收集水提物粉末待用。

2.6 动物实验

2.6.1 分组、造模与给药 采用随机分组法将 C57BL/6J 小鼠分成假手术组、模型组、川芎水提物组、白芍水提物组、熟地黄水提物组和当归水提物组, 每组 8 只 (雌雄各 4 只)。除假手术组外, 其余各组均进行胆总管结扎 (bile duct ligation, BDL) 手术。小鼠仰卧位固定于手术操作台, 持续异氟烷气体麻醉, 将小鼠腹部毛发剔除, 用医用碘伏和 75% 乙醇交替消毒, 在会阴上 1 cm 处剪开皮肤, 开口至剑突下 1 cm 左右, 逐层分离皮下筋膜及肌肉层, 暴露腹腔脏器, 并使用撑开器将两侧组织持续撑开, 用沾有 PBS 溶液的无菌棉签将小鼠的肝脏和胃肠朝上下不同方向拨开, 分离胆总管, 用 5-0 手术缝合线结扎胆总管, 结束后由内向外逐层缝合各层组织。假手术组同样进行腹部组织切开及缝合, 但不对胆总管进行结扎。参考文献报道^[19]选择最佳的水提物治疗剂量 (50 mg/kg), 各给药组 ig 相应药物, 术前 3 d 开始预给药, 术后恢复 2 d 后继续给药 4 d。

2.6.2 血清样品的采集与处理 使用乌拉坦 (1.4 g/kg) ip 麻醉成功后, 从小鼠下腔静脉采集血样, 常温放置 30 min, 待其凝固后, 4 °C、6 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 置于 1.5 mL EP 管中, 即为血清样品。取部分血清稀释 5 倍, 用于血清生化指标检测, 其余放置于 -80 °C 冰箱储存。

2.6.3 肝脏组织病理变化观察 取血后, 小鼠脱颈椎处死, 解剖分离肝脏。取部分肝脏组织经福尔马林溶液固定, 石蜡包埋后进行连续切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 在超分辨显微组织成像系统下观察病理学变化。

2.6.4 肝损伤指标检测 参照试剂盒说明书检测小鼠血清中 ALT、AST、ALP 活性和 TBA、TBIL 含量, 同时检测肝组织中 HYP 水平。

2.6.5 肝组织基因表达检测 各组取部分肝脏组织, 按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。肌动蛋白 2 (actin alpha 2,

Acta2)、I 型胶原 $\alpha 1$ 链(collagen type I alpha 1 chain, *Colla1*)、基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, *Timp1*)、基质金属蛋白酶 12(matrix metalloproteinase 12, *Mmp12*)、*Mmp13*、*Mmp14*、核受体亚家族 3C 组成员 2(nuclear receptor subfamily 3 group C member 2, *Nr3c2*)、类视黄醇 X 受体(retinoid X receptor alpha, *Rxra*)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, *Ptgs2*)、血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule 1, *Vcam1*)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, *Tnf*)、有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase 8, *Mapk8*)、AKT 丝氨酸/苏氨酸激酶(AKT serine/threonine kinase 1, *Akt1*)、激酶插入结构域受体(kinase insert domain receptor, *Kdr*)、*Mapk14*、次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶 1(hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1, *Hprt1*)引物序列见表 1, 以 *Hprt1* 作为内参。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Acta2</i>	F: GCGTGGCTATTCCTTCGTGACTAC R: TCAGGCAGTTCGTAGCTCTTCTCC
<i>Colla1</i>	F: TGAACGTGGTGTACAAGGTC R: CCATCTTTACCAGGAGAACCAT
<i>Timp1</i>	F: GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC R: CTCCAGTTTGCAAGGGATAGAT
<i>Mmp12</i>	F: TGTACAGCATCTTAGAGCAGTG R: TATGTAGTCTACATCCTCACGC
<i>Mmp13</i>	F: CTTCTGATGATGACGTTCAAG R: GTCACACTTCTCTGGTGTTTTG
<i>Mmp14</i>	F: TATGGTTTACAAGTGACAGGCA R: AAACCTATCCGGAACACCACAG
<i>Nr3c2</i>	F: AGTCCAGACACCCACGAGAAAGG R: TTGAGCTGACCAGTCACACCATTG
<i>Rxra</i>	F: GAGCAGCACTGAGGATATCAAG R: GAAGGAGGCCATATTTCTGAG
<i>Ptgs2</i>	F: ATTCCAAACCAGCAGACTCATA R: CTTGAGTTTGAAGTGGTAACCG
<i>Vcam1</i>	F: GACATTTACCCAGTTTACAGGC R: TGACGGGAGTAAAGGTACTTC
<i>Tnf</i>	F: GTCCCCAAAGGGATGAGAAGT R: TTTGCTACGACGTGGGCTAC
<i>Mapk8</i>	F: TTGAAAACAGGCCTAAATACGC R: GTTTGTTATGCTCTGAGTCAGC
<i>Akt1</i>	F: TGCACAAACGAGGGGAATATAT R: CGTTCCTTGTAGCCAATAAAGG
<i>Kdr</i>	F: GTCATGGATCCAGATGAATTGC R: TCTTGTCGAATTCCAAAAGCGTC
<i>Mapk14</i>	F: AGGAATTCAATGACGTGTACCT R: AGGTCCCTGTGAATTATGTCAG
<i>Hprt1</i>	F: CCGAGGATTTGGAAAAAGTGTT R: CATCTCCTTCATGACATCTCGA

2.7 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行处理及分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间采用单因素方差(One-way ANOVA)分析。

3 结果

3.1 四物汤各单味药活性成分及靶点的获取、CLI 相关靶点的获取

通过 TCMS 数据库分别对川芎、白芍、当归、熟地黄活性成分的检索, 以及根据设定好的纳入标准 $OB \geq 30\%$ 及 $DL \geq 0.18$ 进行筛选, 共得到川芎的 6 个活性成分和 30 个药物作用靶点, 白芍共获取 7 个活性成分以及 90 个药物作用靶点, 熟地黄仅获取 2 个活性成分和 31 个药物作用靶点, 当归仅获取 2 个活性成分但包含 52 个药物靶点(活性成分见表 2)。根据获得的数据使用 Cytoscape 3.10.1 软件分别绘制川芎、白芍、当归、熟地黄的“药物-活性成分-作用靶点”网络(图 1)。通过对 Genecards 数据库的检索, 共获得 CLI 的 843 个相关靶点, 剔除在 UniProt 数据库中无对应 ID 号及标准基因名的靶点, 最终得到 753 个疾病靶点。结果显示川芎与白芍活性成分较多, 白芍与当归的作用靶点较多, 熟地黄的活性成分及作用靶点均较少。从网络药理学的角度分析, 川芎、白芍、当归的药理作用相对广泛, 而熟地黄的药理作用相对局限。

3.2 川芎、白芍、当归、熟地黄与 CLI 交集靶点的获取

将各单味药获取的靶点基因与 CLI 靶点基因分别导入生物信息学与进化基因组学网站, 得到川芎与 CLI 的 14 个交集靶点、白芍与 CLI 的 37 个交集

表 2 纳入网络药理学 4 种单味药中的活性成分

Table 2 Active ingredients included in four individual herbs in network pharmacology

Mol ID	成分	OB/%	DL	来源
MOL000211	丁子香酚	55.38	0.78	白芍
MOL000358	β -谷固醇	36.91	0.75	白芍、当归
MOL000359	谷甾醇	36.91	0.75	川芎、白芍、熟地黄
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	白芍
MOL000433	富马酸	68.96	0.71	川芎
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	熟地黄、当归
MOL000492	儿茶素	54.83	0.24	白芍
MOL001494	亚油酸乙酯	42.00	0.19	川芎
MOL001918	芍药苷元酮	87.59	0.37	白芍
MOL001924	芍药苷	53.87	0.79	白芍
MOL002135	杨梅酮	40.60	0.51	川芎
MOL002140	川芎嗪	65.95	0.27	川芎
MOL002157	川芎素内酯	42.31	0.71	川芎

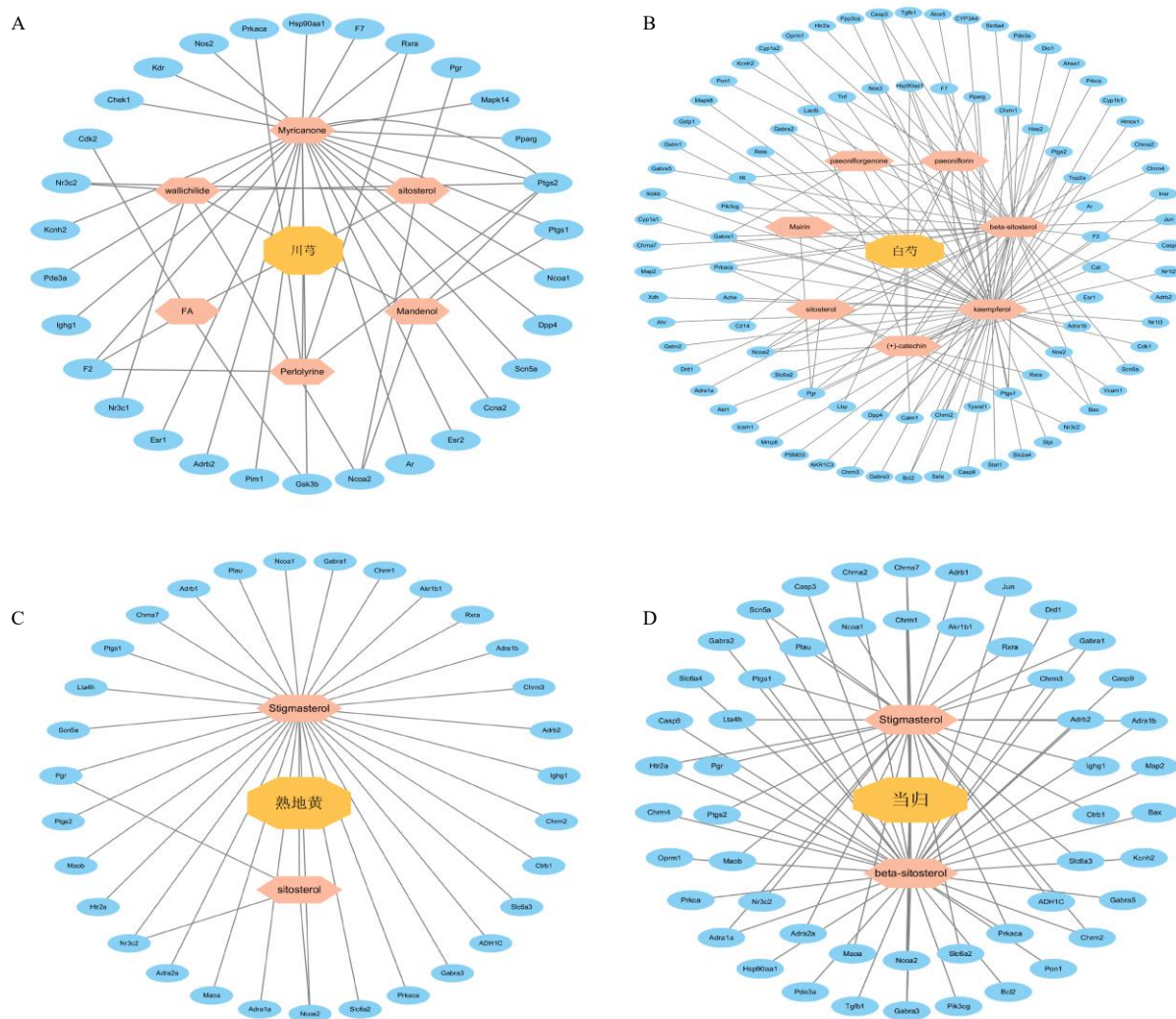


图 1 川芎 (A)、白芍 (B)、熟地黄 (C)、当归 (D) 活性成分及作用靶点网络

Fig. 1 Network of active ingredients and targets of *Chuanxiong Rhizoma* (A), *Paeoniae Radix Alba* (B), *Rehmanniae Radix Praeparata* (C) and *Angelicae Sinensis Radix* (D)

靶点、当归与 CLI 的 15 个交集靶点、熟地黄与 CLI 的 5 个交集靶点。并据此结果分别绘制韦恩图 (图 2)。结果显示, 川芎、白芍、当归、熟地黄分别有 46.7%、41.1%、28.8%、16.1% 的靶点基因可作用于 CLI。因此, 推测 4 味药均能作用于 CLI, 但川芎、白芍对 CLI 疗效的特异性明显高于当归、熟地黄。

3.3 基于体内 CLI 模型验证 4 种单味药药效及其关键单味药的药效机制

上述网络药理学结果表明, 白芍、川芎、当归、熟地黄与 CLI 之间均存在靶点交集, 故均存在改善 CLI 的可能, CLI 伴随着胆汁淤积、肝损伤以及肝纤维化等异常改变, 进一步通过 BDL 手术模型模拟 CLI 并评估单味药药效。

3.3.1 白芍、川芎、当归、熟地黄对 CLI 的改善作

用 如图 3 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠血清 ALT、AST 活性显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 经治疗后除熟地黄组外, 白芍、川芎、当归组对该指标均存在不同程度的改善 ($P < 0.05$ 、 0.001), 但各单味药治疗组之间差异并不显著, 表明四物汤各单味药均能改善 CLI, 其中白芍组的改善最为显著。同时, 对血清中 ALP 活性及 TBA、TBIL 含量检测结果表明, 白芍、川芎、当归、熟地黄均能改善 BDL 诱导的胆管损伤和胆汁淤积情况。熟地黄对 ALP 和 TBIL 改善不显著, 当归对 TBIL 改善不显著, 但仍呈现改善病理状态的趋势。白芍、川芎总体疗效略优于当归、熟地黄。进一步检测了肝组织中 HYP 的含量, 结果显示 BDL 术后小鼠肝脏出现了明显纤维化改变 ($P < 0.001$), 经治疗后白芍组、川芎组、

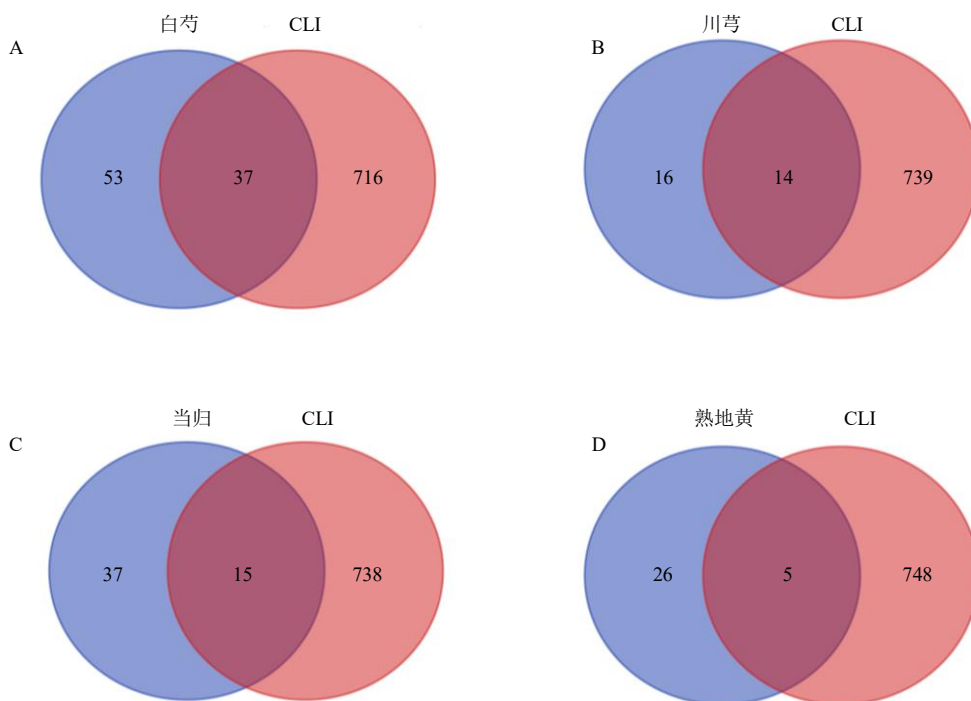
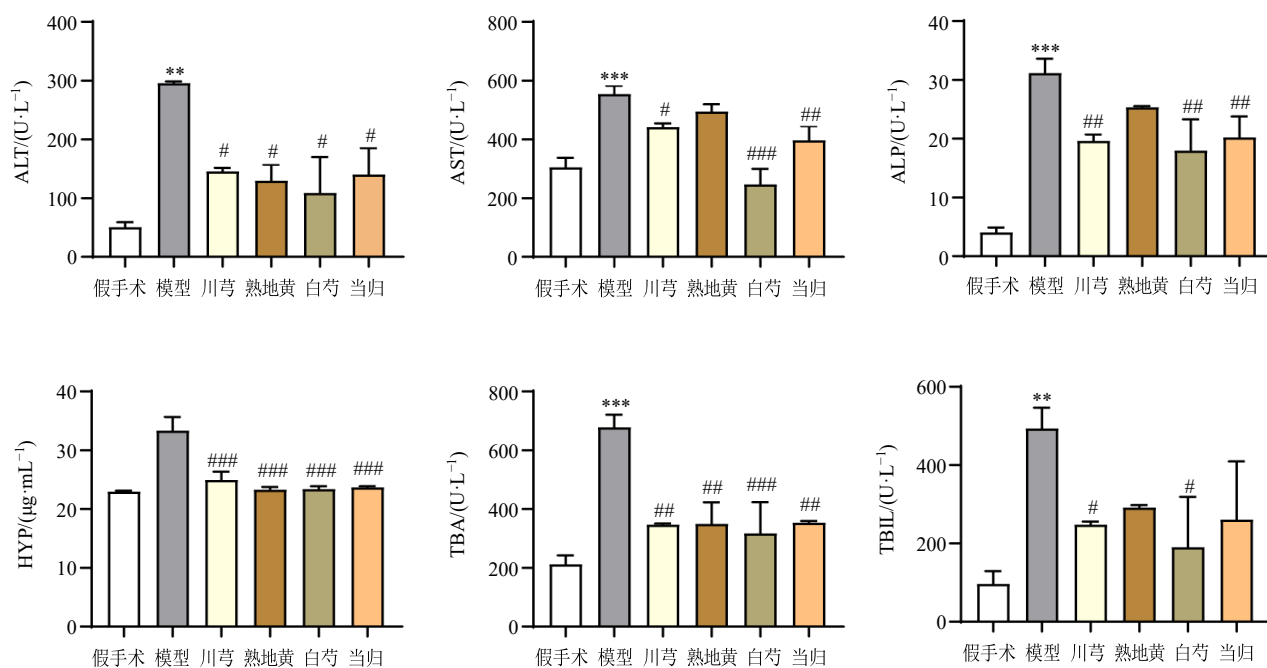


图 2 白芍 (A)、川芎 (B)、当归 (C)、熟地黄 (D) 与 CLI 靶点交集韦恩图

Fig. 2 Venn diagrams of intersection of *Paenoniae Radix Alba* (A), *Chuanxiong Rhizoma* (B), *Angelicae Sinensis Radix* (C), *Rehmanniae Radix Praeparata* (D) and CLI targets



与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下图同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 3 各组小鼠血清 ALT、AST、ALP 活性及 TBA、TBIL 水平和肝脏 HYP 含量 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 ALT, AST, ALP activities, TBA, TBIL levels in serum and HYP content in liver tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

当归组、熟地黄组小鼠 CLI 症状均明显减轻 ($P < 0.001$), 组间差异并不显著。据以上结果推测, 白芍、川芎可能具有更显著的抗 CLI 疗效。

肝脏 HE 染色结果见图 4, 与假手术组比较,

模型组可见明显肝汇管区结构破坏, 伴有大量炎性细胞浸润和胶原沉积, 经白芍、川芎、当归、熟地黄水提物治疗后上述病理改变均出现了不同程度的好转, 其中白芍组与川芎组的改善最为明显。

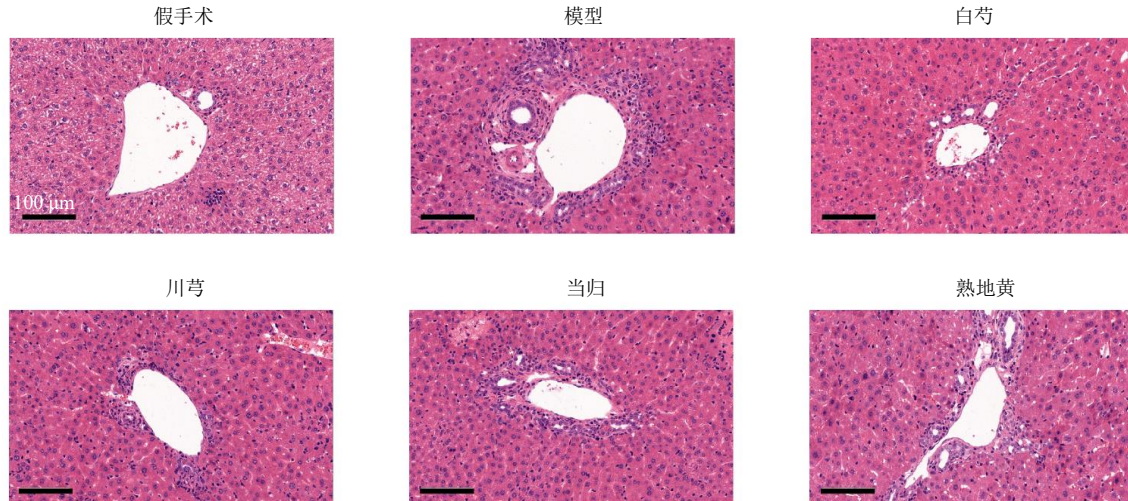


图 4 各组小鼠肝脏病理变化 (HE, ×20)

Fig. 4 Pathological changes in liver of mice in each group (HE, ×20)

为进一步检测各组小鼠 CLI 程度的变化, 检测了肝组织中 CLI 相关基因表达。如图 5 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝脏中 *Acta2*、*Colla1*、*Timp1*、*Mmp12*、*Mmp13*、*Mmp14* 基因表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 经白芍、川芎、当

归、熟地黄水提物治疗后均出现了不同程度的逆转, 其中当归、熟地黄对部分基因表达改善不显著, 白芍、川芎对以上基因表达均有显著改善 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 但各组间无统计学差异。结果表明, 川芎组与白芍组对 CLI 的改善作用最为明显。

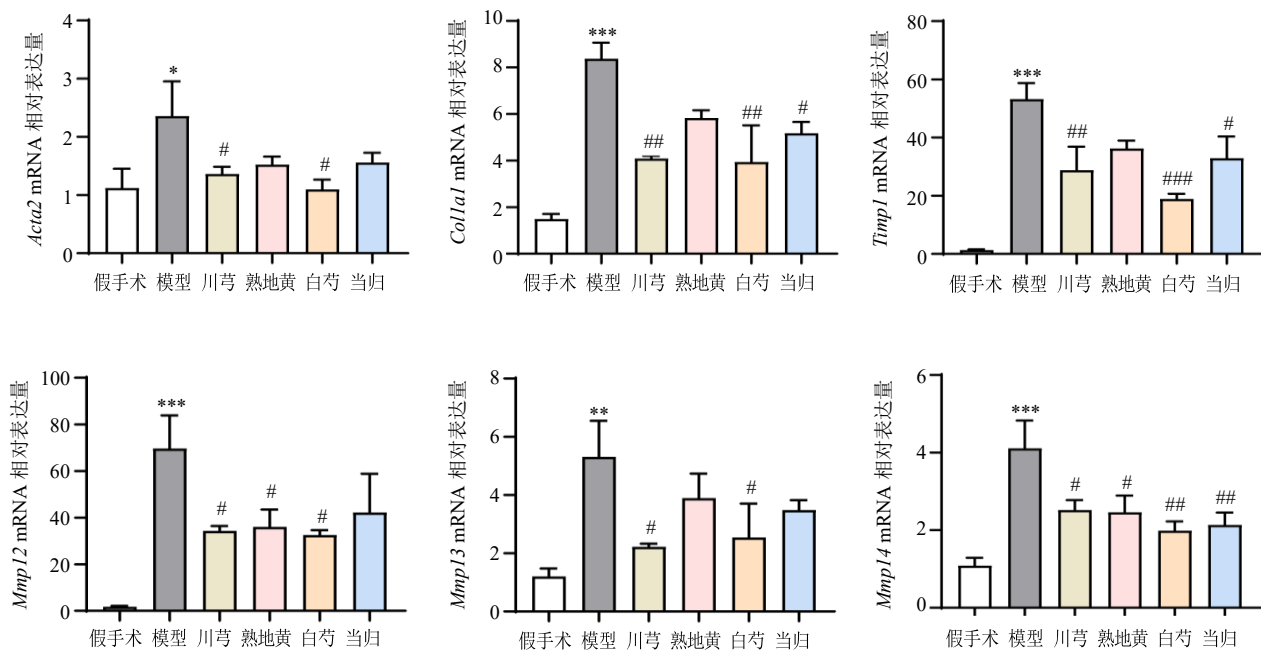


图 5 各组小鼠肝脏中 *Acta2*、*Colla1*、*Timp1*、*Mmp12*、*Mmp13*、*Mmp14* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 *Acta2*, *Colla1*, *Timp1*, *Mmp12*, *Mmp13* and *Mmp14* gene expressions in liver of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3.2 白芍、川芎、当归、熟地黄与 CLI 之间共同与独立交集靶点的获取 上述结果显示, 白芍、川芎、当归、熟地黄均能改善 CLI, 推测各单味药与 CLI 之间可能存在共同的交集靶点; 白芍与川芎对各项指标的改善显著优于当归组与熟地黄组, 推测白芍、川芎可能存在不同于熟地黄、当归的特异性靶向 CLI 的靶点。将各单味药与 CLI 的作用靶点共同输入生物信息学与进化基因组学网站, 并绘制韦恩图。结果显示, 白芍、川芎、当归、熟地黄与 CLI 共同交集靶点为 3 个。白芍与 CLI 独立的交集靶点有 18 个, 川芎与 CLI 独立的交集靶点有 4 个, 当归、熟地黄与 CLI 之间不存在独立于其他药物的交集靶点 (图 6)。

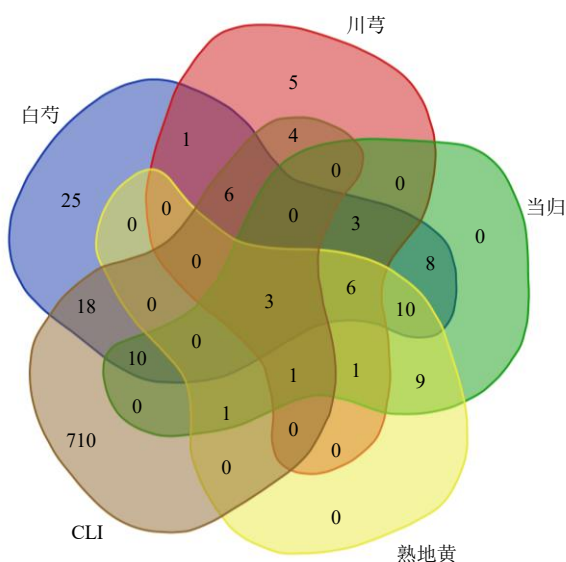


图 6 各单味药与 CLI 的共同与独立交集靶点

Fig. 6 Intersection of shared and unique targets between each individual herb and CLI

3.3.3 白芍、川芎、当归、熟地黄通过 3 个共同靶点改善 CLI 上述结果显示, 白芍、川芎、当归、熟地黄与 CLI 共同交集靶点为 3 个, 分别为 *Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2*, 使用 qRT-PCR 进一步验证了以上 3 个靶点基因在各组小鼠肝脏中的表达。如图 7 所示, 与假手术组比较, 模型组中 *Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2* 表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001); 经白芍、川芎、当归、熟地黄治疗后以上基因表达均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明白芍、川芎、当归、熟地黄可通过降低 *Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2* 的表达共同改善 CLI。

3.3.4 白芍通过 TNF 通路改善 CLI 韦恩图结果显示, 白芍与 CLI 之间有 18 个独立交集靶点, 这与推测相符合。为进一步证实白芍是否通过这些交集靶点特异性改善了 CLI, 将白芍对应的靶点基因进行 GO 与 KEGG 分析, GO 分析选取 10 条主要结果显示, 发现白芍作用靶点富集于细胞凋亡、一氧化氮生物合成、炎症反应、血管内皮生长因子产生、血管生成、一氧化氮合酶活性、肝再生、细胞迁移、细胞黏附等生物过程。KEGG 分析结果选取 20 条主要信号通路, 选择了既往有大量研究报道与肝损伤相关^[20-22]的 TNF 信号通路, 并推测白芍可能通过 TNF 通路改善 CLI (图 8)。

通过 qRT-PCR 评估了白芍与 CLI 的 18 个独立交集靶点并富集于 TNF 通路中的 *Vcam1*、*Tnf*、*Mapk8*、*Akt1* 的表达水平, 如图 9 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠肝脏中以上基因表达均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 白芍治疗后能显著降低 BDL 术后以上基因的高表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明白芍可能通过 TNF 通路改善 CLI。

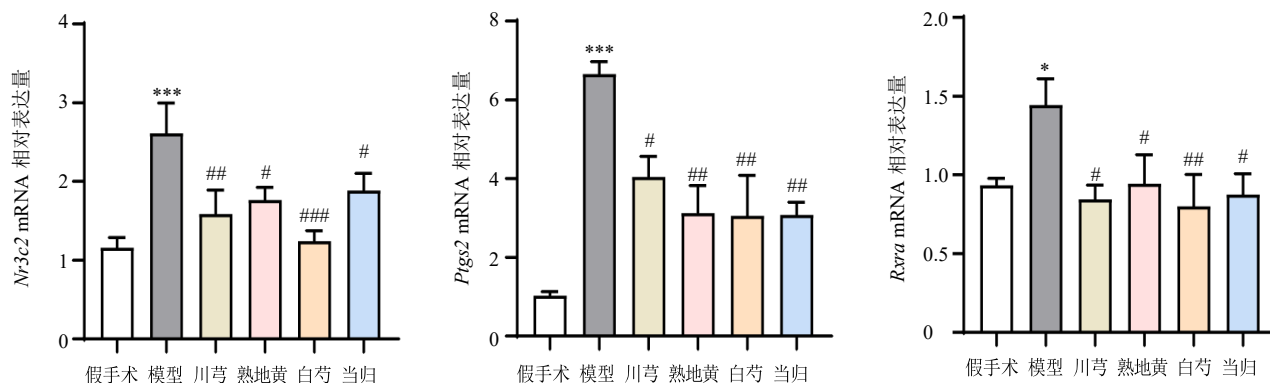


图 7 各组小鼠肝脏中 *Nr3c2*、*Ptgs2*、*Rxra* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 *Nr3c2*, *Ptgs2* and *Rxra* gene expressions in liver of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

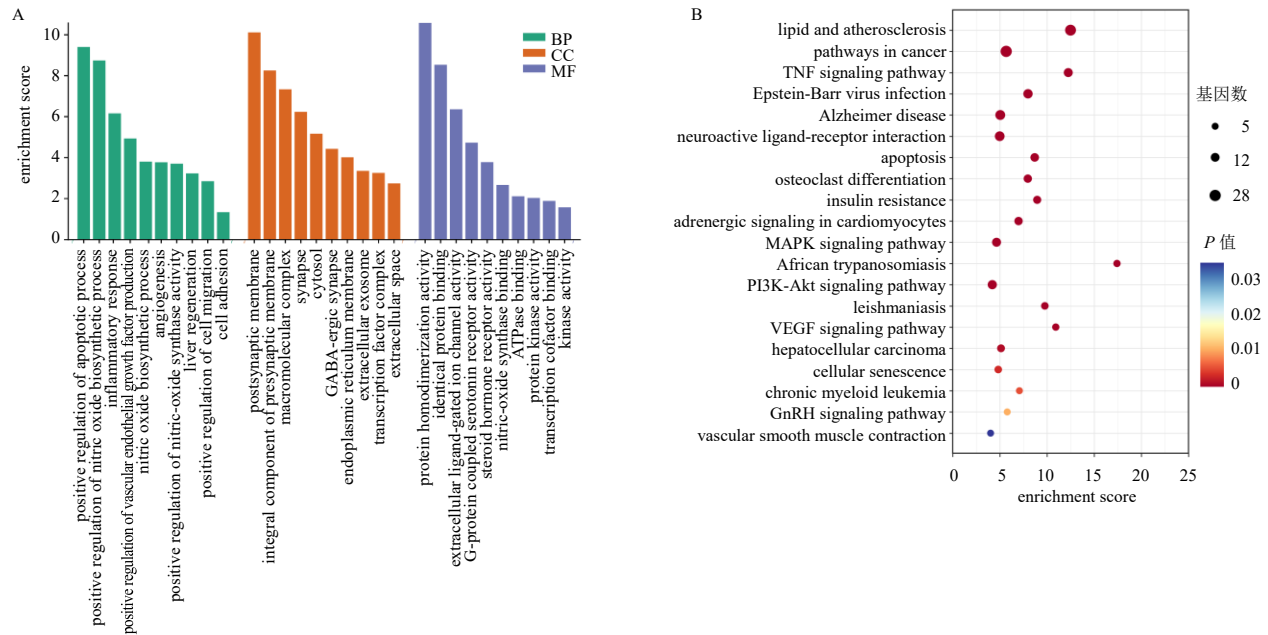
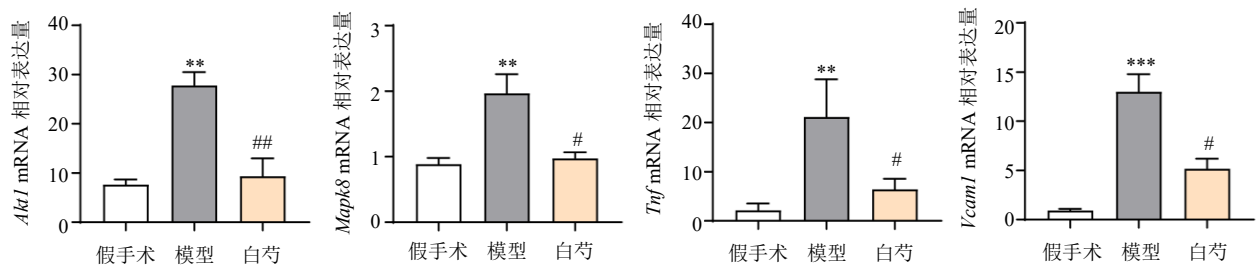


图 8 白芍 GO 分析柱状图 (A) 和 KEGG 分析气泡图 (B)

Fig. 8 Bar graph of GO analysis (A) and bubble graph of KEGG analysis (B) for *Paeoniae Radix Alba*图 9 各组小鼠肝脏中 *Akt1*、*Mapk8*、*Tnf*、*Vcam1* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)Fig. 9 *Akt1*, *Mapk8*, *Tnf* and *Vcam1* gene expressions in liver of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.3.5 川芎通过 VEGF 通路改善 CLI 根据韦恩图结果,发现川芎与 CLI 之间有 4 个独立交集靶点。将川芎的作用靶点进行 GO 与 KEGG 分析,GO 分析选取 10 条主要结果显示,川芎作用靶点富集于信号转导-一氧化氮合成、蛋白质磷酸化、细胞增殖、缺氧反应、血管内皮生长因子受体信号、细胞间信号传导、血管生成等生物过程。KEGG 分析结果选取前 20 条主要信号通路,考虑到既往大量研究结果显示 VEGF 通路于肝损伤过程密切相关^[23-25],推测川芎可能通过 VEGF 通路改善 CLI,选择 VEGF 通路进行后续研究(图 10)。

通过 qRT-PCR 评估了川芎与 CLI 的 4 个交集靶点并富集于 VEGF 通路中的 *Kdr*、*Mapk14* 的表达水平,如图 11 所示,与假手术组比较,模型组小鼠肝脏中以上基因表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、

0.001);与模型组比较,经川芎治疗后以上基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),表明川芎可能通过 VEGF 通路改善 CLI。

4 讨论

胆汁淤积可能由多种原因引起,除了肝胆相关疾病、胆道结构异常、药物、感染等因素外,近年来有研究报道了食物添加剂、膳食补充剂和肠外营养等所含的成分也可引发 CLI^[26]。CLI 可以导致黄疸、胆绞痛、消化不良、恶心、呕吐、皮肤瘙痒、腹胀等各种症状和并发症。CLI 涉及的病理机制复杂,病理过程较多,单一药物成分或靶点往往只能改善部分病理指标,且难以阻止疾病的进一步发展。而中医药具有一方多药、一药多成分,以及多通路、多靶点共同作用的特点,可从多方面协同改善胆汁淤积引起的肝损伤及肝纤维化。本研究通过数据库

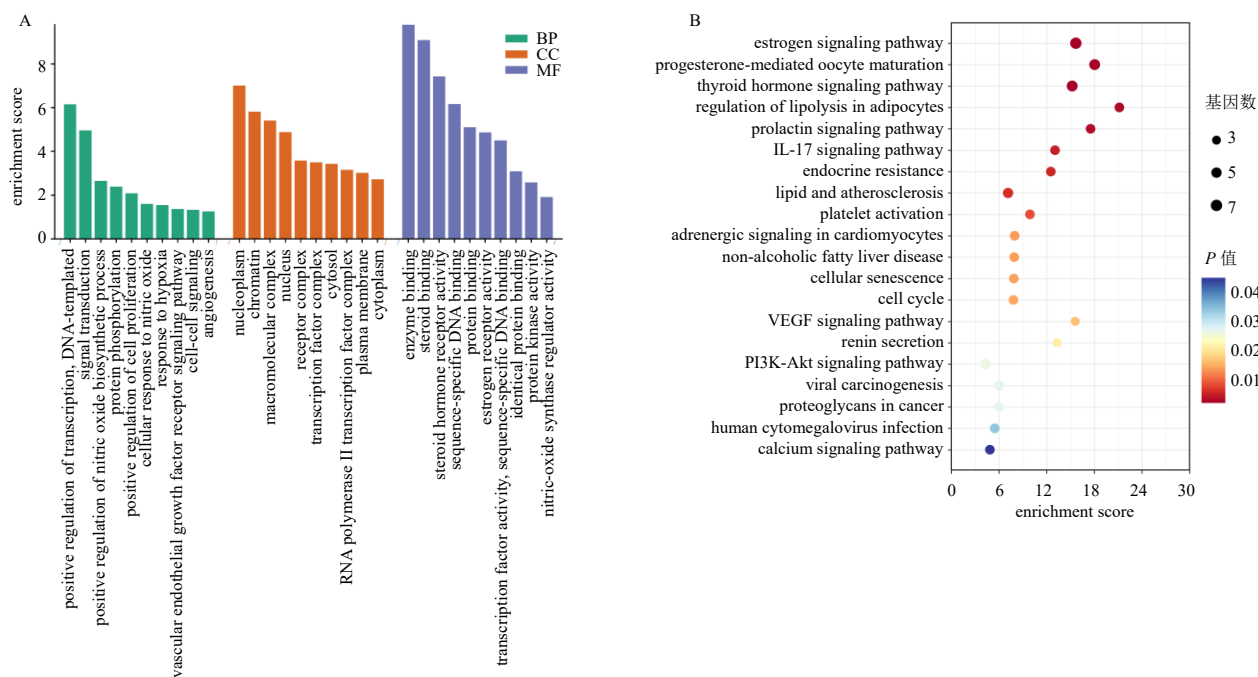


图 10 川芎 GO 分析柱状图 (A) 和 KEGG 分析气泡图 (B)

Fig. 10 Bar graph of GO analysis (A) and bubble graph of KEGG analysis (B) for *Chuanxiong Rhizoma*

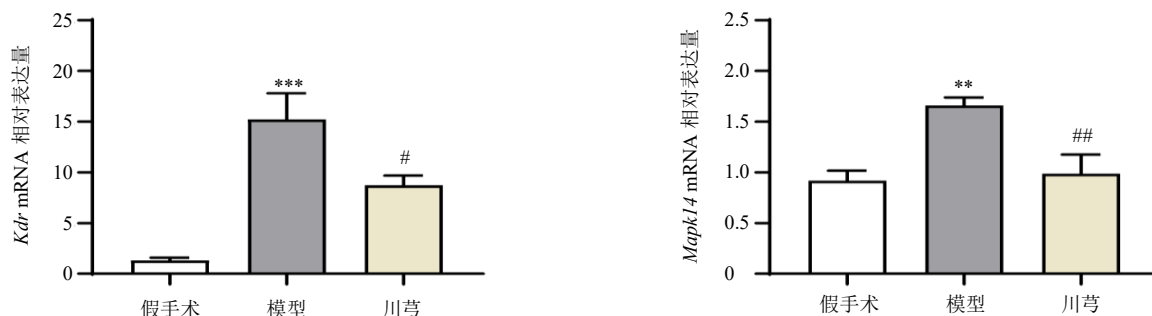


图 11 各组小鼠肝脏中 *Kdr*、*Mapk14* 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 11 *Kdr* and *Mapk14* gene expressions in liver of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

筛查，运用网络药理学方法构建了“四物汤单味药-治疗靶点-信号通路”网络，并结合体内实验评价药效，探讨四物汤治疗 CLI 的主要作用靶点和潜在作用机制。

以往已有大量研究报道了四物汤治疗肝胆相关疾病的研究。一项临床试验报道了四物汤对肝脏具有的保护作用^[9]。课题组前期研究发现四物汤不仅通过调节肠道微生物群和胆汁酸稳态，还通过调节免疫微环境以减少炎症反应、改善 CLI^[10-11]。但目前尚无报道四物汤中 4 味单药改善肝损伤的疗效对比研究，因此本研究对川芎、白芍、当归、熟地黄改善 CLI 进行了疗效比较。结果显示，川芎、白芍、

当归、熟地黄 4 个单味药均能改善 CLI。将 4 个单味药与 CLI 靶点取交集后发现它们通过 3 个共同靶点 (*Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2*) 作用于 CLI。因此推测白芍、川芎、当归、熟地黄可通过以上 3 个靶点共同改善肝损伤，qRT-PCR 结果显示，白芍、川芎、当归、熟地黄可能均能下调肝脏中 *Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2* 的表达。既往研究报道了这 3 个靶点均与肝胆疾病密切相关，NR3C2、PTGS2 参与调控小鼠肝缺血再灌注损伤^[27-28]，RXRA 在 HSC 激活以及促进 CLI 中发挥关键作用^[29]。表明川芎、白芍、当归、熟地黄可能通过调节 *Nr3c2*、*Rxra*、*Ptgs2* 共同改善了 CLI。

考虑到白芍、川芎、当归、熟地黄与 CLI 之间

交集靶点的差异性,以及川芎、白芍对 CLI 的改善明显优于当归、熟地黄,推测川芎、白芍与 CLI 之间是否存在相对独立的特异性作用靶点。进一步分析结果显示,白芍存在 18 个独立靶点作用于 CLI,川芎存在 4 个独立靶点作用与 CLI,而当归、熟地黄不存在独立作用靶点。对白芍的作用靶点进行 GO 分析,发现靶点富集于炎症、肝再生、血管生成等与肝损伤和纤维化密切相关的生物过程^[30-32],同时 KEGG 分析显示白芍靶点富集于 TNF 信号通路。进一步评估了白芍与 CLI 的独立交集靶点基因,发现 *Vcam1*、*Tnf*、*Mapk8*、*Akt1* 等基因均富集于 TNF 通路,且在模型组明显上调,而给予白芍治疗后明显下调,由此推测白芍可能通过 TNF 通路相关基因改善了 CLI。既往研究报道了 VCAM1 促进 LSEC 毛细血管化和肝纤维化^[33];抑制 TNF- α 可改善小鼠 BDL 后的肝星状细胞活化以及肝纤维化^[34];MAPK8 的表达与药物性肝损伤相关^[35];Akt 在肝损伤伴随的炎症、细胞增殖、迁移和纤维形成中有着重要的作用^[36],这些基因均显示出与肝损伤与肝纤维化的紧密相关性。此外,TNF 可作为上游基因诱导 VCAM1 表达^[37-38],而 VCAM1 可通过激活下游的 Akt 和 MAPK 信号传导来增强细胞的增殖和迁移^[39]。综上,推测白芍可能通过 TNF/VCAM1/Akt/MAPK 相关通路改善了 CLI,其具体机制仍有待于进一步研究,以确定其上下游及相互作用关系。此外,GO 富集分析显示川芎的作用靶点富集于与 CLI 密切相关的血管内皮生长因子、血管生成等生物过程;KEGG 分析显示川芎靶点富集于 VEGF 信号通路,这可能与特异性改善 CLI 有关。进一步评估了川芎与 CLI 的独立交集靶点基因,发现 *Kdr*、*Mapk14* 富集于 VEGF 通路,二者在模型组明显上调,而给予川芎治疗后明显下调,因此推测川芎通过 VEGF 通路改善 CLI。*Kdr* (VEGFR2) 作为血管内皮生长因子受体,与血管生成以及肝纤维化显著相关^[40-41],此外,抑制 MAPK14 可缓解酒精引起的肝损伤^[42],同时 MAPK14 为 VEGFA 的上游调节因子^[43]。因此,推测川芎可能通过 MAPK14/VEGF/VEGFR2 相关通路改善 CLI。

综上,本研究基于网络药理学、生物信息学分析、体内动物模型和分子生物学手段,预测并验证了四物汤防治 CLI 的关键单味药及其作用靶点。发现四物汤中各单味药均能改善胆汁淤积引起的肝损伤及纤维化,4 个单味药共同通过靶向 *Nr3c2*、*Rxra*、

Ptgs2 发挥疗效。此外,川芎、白芍显示出更优药效,白芍通过调控 TNF 通路基因改善 CLI,而川芎改善 CLI 则与调控 VEGF 通路相关。本研究为传统方药四物汤及其组成的临床应用与机制研究提供了一定的科学依据,也为病理机制复杂的 CLI 治疗方案提供了理论指导。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Yokoda R T, Carey E J. Primary biliary cholangitis and primary sclerosing cholangitis [J]. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114(10): 1593-1605.
- [2] Hasegawa S, Yoneda M, Kurita Y, et al. Cholestatic liver disease: Current treatment strategies and new therapeutic agents [J]. *Drugs*, 2021, 81(10): 1181-1192.
- [3] Wagner M, Fickert P. Drug therapies for chronic cholestatic liver diseases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2020, 60: 503-527.
- [4] Mayo M J. Mechanisms and molecules: What are the treatment targets for primary biliary cholangitis? [J]. *Hepatology*, 2022, 76(2): 518-531.
- [5] Liu X, Song Y F, Zhou F R, et al. Network and experimental pharmacology on mechanism of Si-Wu-Tang improving ovarian function in a mouse model of premature ovarian failure induced by cyclophosphamide [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 301: 115842.
- [6] Zhou F R, Song Y F, Liu X, et al. Si-Wu-Tang facilitates ovarian function through improving ovarian microenvironment and angiogenesis in a mouse model of premature ovarian failure [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 280: 114431.
- [7] Liu M M, Huang K M, Yeung S, et al. Inhibition of neoplastic transformation and chemically-induced skin hyperplasia in mice by traditional Chinese medicinal formula Si-wu-Tang [J]. *Nutrients*, 2017, 9(3): 300.
- [8] Liu M M, Huang K M, Qian L, et al. Effects of bioactive constituents in the traditional Chinese medicinal formula Si-Wu-Tang on Nrf2 signaling and neoplastic cellular transformation [J]. *Phytomedicine*, 2018, 40: 1-9.
- [9] Chiu H F, Wu Y H, Shen Y C, et al. Antioxidant and physiological effects of Si-Wu-Tang on skin and liver: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Chin Med*, 2016, 11: 30.
- [10] Xue X Y, Wu J Z, Ding M N, et al. Si-Wu-Tang ameliorates fibrotic liver injury via modulating intestinal microbiota and bile acid homeostasis [J]. *Chin Med*, 2021, 16(1): 112.
- [11] Ma Z, Xue X Y, Bai J Z, et al. Si-Wu-Tang ameliorates bile

- duct ligation-induced liver fibrosis via modulating immune environment [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113834.
- [12] 李依洁, 贾可欣, 刘闰平, 等. 五法经典方辨治肝纤维化的现代药理作用研究概况 [J]. 中草药, 2022, 53(16): 5193-5204.
- [13] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [14] 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.
- [15] 汪刚, 刘莹, 侯雪峰, 等. 川芎提取物通过激活 Nrf2 通路对抗心肌缺血大鼠氧化应激损伤 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(24): 4834-4840.
- [16] 王红英, 周楠, 侯静静, 等. 白芍水提物及芍药苷改善环磷酰胺致白细胞减少的对比研究 [J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5): 447-449.
- [17] 梁梓雯, 胡雪灵, 钟文强, 等. 熟地黄酒提液通过外泌体 miR-29a-3p 调节 OVX 大鼠的脂代谢 [J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(5): 893-904.
- [18] 朱晓音, 杨福伟, 李春梅, 等. 当归提取物对 PC3、HeLa、MDA-MB-435 肿瘤细胞增殖的影响 [J]. 山东中医杂志, 2007, 26(11): 776-778.
- [19] Li Y J, Li F H, Ding M N, *et al*. Chuanxiong Rhizoma extracts prevent liver fibrosis via targeting CTCF-c-MYC-H19 pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(1): 82-93.
- [20] Gao H Q, Zhong Y M, Zhou L, *et al*. Kindlin-2 inhibits TNF/NF- κ B-Caspase 8 pathway in hepatocytes to maintain liver development and function [J]. *eLife*, 2023, 12: e81792.
- [21] Yang S, Kuang G, Zhang L K, *et al*. Mangiferin attenuates LPS/D-GalN-induced acute liver injury by promoting HO-1 in kupffer cells [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 285.
- [22] Li J T, Lu Q X, Peng M H, *et al*. Water extract from *Herpetospermum pedunculatum* attenuates oxidative stress and ferroptosis induced by acetaminophen via regulating Nrf2 and NF- κ B pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 305: 116069.
- [23] Menisy G M, Zakaria S, Suddek G M. Nilotinib alleviated acetaminophen-induced acute hepatic injury in mice through inhibiting HIF-1 α /VEGF-signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 112: 109268.
- [24] M Soliman S, Mosallam S, Mamdouh M A, *et al*. Design and optimization of cranberry extract loaded bile salt augmented liposomes for targeting of MCP-1/STAT3/VEGF signaling pathway in DMN-intoxicated liver in rats [J]. *Drug Deliv*, 2022, 29(1): 427-439.
- [25] Wang X D, Maretti-Mira A C, Wang L, *et al*. Liver-selective MMP-9 inhibition in the rat eliminates ischemia-reperfusion injury and accelerates liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2019, 69(1): 314-328.
- [26] Vilas-Boas V, Gijbels E, Jonckheer J, *et al*. Cholestatic liver injury induced by food additives, dietary supplements and parenteral nutrition [J]. *Environ Int*, 2020, 136: 105422.
- [27] Hou W, Wei B, Liu H S. The protective effect of *Panax notoginseng* mixture on hepatic ischemia/reperfusion injury in mice via regulating NR3C2, SRC, and GAPDH [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 756259.
- [28] Motiño O, Francés D E, Casanova N, *et al*. Protective role of hepatocyte cyclooxygenase-2 expression against liver ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Hepatology*, 2019, 70(2): 650-665.
- [29] He L, Yuan H, Liang J J, *et al*. Expression of hepatic stellate cell activation-related genes in HBV-, HCV-, and nonalcoholic fatty liver disease-associated fibrosis [J]. *PLoS One*, 2020, 15(5): e0233702.
- [30] Hammerich L, Tacke F. Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(10): 633-646.
- [31] Michalopoulos G K, Bhushan B. Liver regeneration: Biological and pathological mechanisms and implications [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(1): 40-55.
- [32] Rangaswamy C, Mailer R K, Englert H, *et al*. The contact system in liver injury [J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(4): 507-517.
- [33] Guo Q Q, Furuta K, Islam S, *et al*. Liver sinusoidal endothelial cell expressed vascular cell adhesion molecule 1 promotes liver fibrosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 983255.
- [34] Sundaram B, Behnke K, Belancic A, *et al*. iRhom2 inhibits bile duct obstruction-induced liver fibrosis [J]. *Sci Signal*, 2019, 12(605): eaax1194.
- [35] Younis N, Khan M I, Zahoor T, *et al*. Phytochemical and antioxidant screening of *Moringa oleifera* for its utilization in the management of hepatic injury [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1078896.
- [36] Reyes-Gordillo K, Shah R, Arellanes-Robledo J, *et al*. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease [J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1337.
- [37] Siegel R J, Singh A K, Panipinto P M, *et al*. Extracellular sulfatase-2 is overexpressed in rheumatoid arthritis and mediates the TNF- α -induced inflammatory activation of synovial fibroblasts [J]. *Cell Mol Immunol*, 2022, 19(10): 1185-1195.
- [38] Hensel J A, Nicholas S E, Kimble A L, *et al*. Splice factor

- polypyrimidine tract-binding protein 1 (Ptbp1) primes endothelial inflammation in atherogenic disturbed flow conditions [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(30): e2122227119.
- [39] Zhou Z, Zhou Q, Wu X, *et al.* VCAM-1 secreted from cancer-associated fibroblasts enhances the growth and invasion of lung cancer cells through AKT and MAPK signaling [J]. *Cancer Lett*, 2020, 473: 62-73.
- [40] Qiu C, Sha T T, Yin T H, *et al.* VEGFR2-targeted ultrasound molecular imaging of angiogenesis to evaluate liver allograft fibrosis [J]. *Biomater Sci*, 2021, 9(17): 5802-5811.
- [41] Xue X Y, Zhao X T, Wang J, *et al.* Carthami flos extract against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via alleviating angiogenesis in mice [J]. *Phytomedicine*, 2023, 108: 154517.
- [42] Park K H, Makki H M M, Kim S H, *et al.* Narirutin ameliorates alcohol-induced liver injury by targeting MAPK14 in zebrafish larvae [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115350.
- [43] Yang J, Xu H, Chen K, *et al.* Platelets-derived miR-200a-3p modulate the expression of ET-1 and VEGFA in endothelial cells by targeting MAPK14 [J]. *Front Physiol*, 2022, 13: 893102.

[责任编辑 李亚楠]