

# 基于网络药理学的茵陈术附汤抗石胆酸诱导的胆汁淤积性肝损伤作用机制研究

章林聪, 吴家胜, 田甜, 李园园, 王天明, 马越鸣\*

(上海中医药大学中药学院, 上海 201203)

**摘要:** 茵陈术附汤 (Yinchenzhufu decoction, YCZFD) 是治疗阴黄证的经典方剂, 可改善胆汁淤积性肝损伤, 但作用机制尚不完全清楚, 本文运用网络药理学、分子对接、动物实验和分子生物学方法, 探讨 YCZFD 抗胆汁淤积性肝损伤机制。采用石胆酸 (lithocholic acid, LCA) 诱导的急性胆汁淤积小鼠模型, 考察 YCZFD 给药 2 周对小鼠肝功能指标及肝脏组织形态学的影响。动物实验经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准, 伦理编号为: PZSHUTCM190823002。结果显示, YCZFD 可降低模型小鼠生化指标水平, 改善肝细胞损伤; 运用多个数据库预测 YCZFD 活性成分与胆汁淤积性肝损伤对应靶点。利用 String 数据库和 Cytoscape 软件构建交集靶点 PPI 网络 (protein-protein interaction networks), 显示 YCZFD 抗胆汁淤积性肝损伤可能核心靶点与肿瘤坏死因子、白介素-1 $\beta$ 、非受体酪氨酸激酶 Src、白介素-6 等有关, 基于 Metascape 平台进行 GO (gene ontology) 和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集分析, 发现 YCZFD 抗胆汁淤积性肝损伤可能与其调节肿瘤坏死因子信号通路、核因子- $\kappa$ B 信号通路、胆汁分泌等相关, 并运用了 AutoDockTools 软件对 YCZFD 影响的核心靶点和核心成分进行分子对接验证。为验证网络药理学结果, 采用 UPLC-MS/MS 方法测定小鼠肝脏中胆汁酸谱水平, 显示 YCZFD 使模型小鼠肝脏中游离胆汁酸、牛磺酸结合型胆汁酸和总胆汁酸水平明显下降; 通过 real-time PCR 和 Western blot 方法, 发现 YCZFD 干预可上调胆汁淤积小鼠肝脏法尼醇 X 受体及代谢酶 (尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 1a1)、外排转运体 (胆盐外排泵、多药耐药相关蛋白 2、多药耐药相关蛋白 3 等) 表达, 促进胆汁酸代谢和外排, 改善胆汁酸稳态, 抑制 NOD 样受体家族 3 活化介导的细胞焦亡及炎症反应, 改善胆汁淤积性肝损伤。

**关键词:** 茵陈术附汤; 石胆酸; 网络药理学; 胆汁淤积性肝损伤; 胆汁酸稳态; 细胞焦亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3366-13

## Protective mechanism of Yinchenzhufu decoction against cholestatic liver injury induced by lithic acid based on network pharmacology

ZHANG Lin-cong, WU Jia-sheng, TIAN Tian, LI Yuan-yuan, WANG Tian-ming, MA Yue-ming\*

(School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**Abstract:** Yinchenzhufu decoction (YCZFD) is a classic formula for treating Yin Huang syndrome, which can improve liver injury caused by cholestasis. However, the mechanism of action of YCZFD still remains unclear. This article used network pharmacology, molecular docking, animal experiments, and molecular biology methods to explore the mechanism of YCZFD in treating liver injury caused by cholestasis. A mouse model of acute cholestasis induced by lithocholic acid was used to investigate the effects of YCZFD on liver injury. The experimental procedures described in this paper were reviewed and approved by the Ethical Committee at the Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (approval NO. PZSHUTCM190823002). The results showed

收稿日期: 2023-05-04; 修回日期: 2023-05-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773871).

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51322386, E-mail: mayueming\_117@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0568

that YCZFD could reduce the levels of blood biochemical indicators and improve hepatocyte damage of cholestatic mice. Then, multiple databases were used to predict the corresponding targets of YCZFD active components on cholestatic liver injury. An intersection target protein-protein interaction (PPI) networks based on String database and Cytoscape software was used to demonstrate the possible core targets of YCZFD against cholestatic liver injury. The results indicated that core targets of YCZFD include tumor necrosis factor, interleukin- $1\beta$ , non-receptor tyrosine kinase Src, interleukin-6, etc. GO (gene ontology) and KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) enrichment analysis indicated that YCZFD may regulate the tumor necrosis factor signaling pathway, nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway, bile secretion, and other related factors to ameliorate the cholestatic liver injury. AutoDockTools software was used to perform molecular docking verification on the core targets and components of YCZFD. To verify the results of network pharmacology, UPLC-MS/MS method was used to determine the effect of YCZFD on levels of bile acid profiles in mouse liver tissues. It was found that treatment with YCZFD significantly reduced the content of free bile acids, taurine bound bile acids, and total bile acids in the liver tissues of cholestatic mice. Then, results from real time PCR and Western blot also found that YCZFD can upregulate the expression of hepatic nuclear receptor farnesoid X receptor, metabolizing enzyme (UDP glucuronidase transferase 1a1), and efflux transporters (bile salt export pump, multidrug resistance-associated protein 2, multidrug resistance-associated protein 3, etc) in cholestasis mice, promote bile acid metabolism and excretion, and improve bile acid homeostasis. Moreover, YCZFD can also inhibit pyroptosis and inflammation by regulating NOD-like receptors 3 pathway, thereby inhibiting cholestatic liver injury.

**Key words:** Yinchenzhufu decoction; lithocholic acid; network pharmacology; cholestatic liver injury; bile acid homeostasis; pyroptosis

胆汁淤积性肝病是由于各种因素引起的胆汁形成、分泌和/或胆汁排泄障碍而导致肝脏损伤的肝胆疾病<sup>[1]</sup>, 临床上发病率较高<sup>[2]</sup>。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) 是胆汁淤积性肝病临床常见类型。熊去氧胆酸 (ursodesoxycholic acid, UDCA) 和奥贝胆酸 (obeticholic acid, OCA) 是美国 FDA 批准用于治疗 PBC 患者的主要药物, 但约 40% 的患者对 UDCA 无应答, 5%~10% 的患者出现不耐受的现象<sup>[3]</sup>, OCA 的长期应用可能会引起严重的瘙痒和心血管风险等不良反应<sup>[4]</sup>, 临床研究显示贝特类药物有助于改善 PBC 的临床症状, 但对于 PSC 患者的作用尚不明确。针对胆汁淤积性肝病, 仍需要探索新的治疗策略。

胆汁淤积性肝病属于中医“黄疸”范畴, 茵陈术附汤 (Yinchenzhufu decoction, YCZFD) 是中医治疗阴黄证的代表方剂, 源于清朝程国彭所著的《医学心悟》, 具有“温阳化湿, 利胆退黄”之功。临床研究表明, 茵陈术附汤或其加减方治疗 PSC 等多种肝胆类疾病疗效确切<sup>[5,6]</sup>, 实验研究发现茵陈术附汤的作用机制可能与抑制细胞凋亡<sup>[7]</sup>、促进胆红素代谢<sup>[8]</sup>等有关。本课题组前期研究发现, 茵陈术附汤抗  $\alpha$ -萘异硫氰酸酯 (alpha-naphthyl isothiocyanate, ANIT) 诱导的急性胆汁淤积性肝损伤作用与逆转胆汁酸紊乱、减轻炎症反应有关<sup>[9]</sup>; 并对 1,4-二氢-3,5-吡啶二甲酸二乙酯 (3,5-diethoxycar-

bonyl-1,4-dihydroxycollidink, DDC) 诱导的慢性胆汁淤积性肝损伤也具有显著保护作用, 然而, 茵陈术附汤抗胆汁淤积性肝损伤的具体作用机制及网络靶点至今尚不清楚, 且模型形成皆由化学毒物引起。石胆酸 (lithocholic acid, LCA) 作为体内肝毒性最强的单体胆汁酸<sup>[10]</sup>, 与如 ANIT 和 DDC 等的化学毒物相比, 更能模拟人自然条件下引起的胆汁淤积性肝损伤, 且有研究表明胆汁淤积患者的循环血液中 LCA 水平升高<sup>[11]</sup>, LCA 诱导的小鼠模型也是经典的胆汁淤积性肝损伤模型<sup>[12]</sup>。网络药理学能从整体和系统方面阐释药物治疗疾病的多靶点效应, 有利于发现或鉴定中药的有效成分及作用靶点, 网络药理学研究为阐释中医方剂的复杂机制提供重要策略<sup>[13]</sup>。本研究基于网络药理学与动物实验验证相结合, 探索茵陈术附汤治疗胆汁淤积性肝损伤的作用靶点及通路, 阐明茵陈术附汤治疗胆汁淤积性肝病的作用机制, 为其进一步研发提供基础和科学依据。

## 材料与方法

**实验动物** 健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重为  $20 \pm 2$  g, 购自上海维通利华实验动物有限公司, 许可证号为 SCXK (沪) 2021-0006, 于上海中医药大学动物实验中心清洁级饲养室饲养。动物实验经上海中医药大学实验动物福利与伦理委员会批准, 伦理编号为: PZSHUTCM190823002。

**药材** 茵陈 *Artemisia capillaris* Thunb. (210228 陕西)、蜜麸炒白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. (210430 浙江)、肉桂 *Cinnamomum cassia* Presl. (210429 广西)、熟附片 *Aconitum carmichaelii* Debx. (210309 四川)、干姜 *Zingiber officinale* Rosc. (210403 山东) 购买于上海康桥药业有限公司; 蜜炙甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. (2106034 内蒙古) 购买于四川新荷花中药饮片股份有限公司。所有中药饮片经上海中医药大学中药学院生药教研室吴新荣副教授鉴定。

**试剂** 玉米油 (8001-30-7)、石胆酸 (434-13-9) 购买于阿拉丁试剂有限公司; PCN (pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile, C3884) 购买于美国 APEXBIO 公司; 甲醛水溶液 (20190416)、异丙醇 (20170926)、无水乙醇 (20170918)、甲醇 (20170515)、氯仿 (20130115) 购买于国药集团化学试剂有限公司; 碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 测定试剂盒 (01ALP200212) 购买于北京润诺思医疗科技有限公司; 总胆汁酸 (total bile acid, TBA) 测定试剂盒 (ZCJULS005) 购买于上海执诚生物技术有限公司; 总胆红素 (total bilirubin, TBIL) 测定试剂盒 (60143000)、复合校准品 (50257657/28500)、正常值复合质控品 (50262932/28657)、病理值复合质控品 (50262933/28658) 购买于德国德赛诊断系统有限公司; 直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL) 检测试剂盒 (210120101)、多项生化质控品 (210115101) 购买于美康生物科技股份有限公司; 非定值复合质控品 (201113) 购买于上海惠中生物技术有限公司; 谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 测试盒 (C009-2-1)、谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 测试盒 (C010-2-1) 购买于南京建成科技有限公司; RNase free dH<sub>2</sub>O (D2215)、总 RNA 抽提试剂盒 (9109)、逆转录试剂盒 (RP047A)、SYBR®Premix Ex Taq™ II (RR820A) 购买于日本 TaKaRa 公司; TRIS (0794C099)、SDS (2875C153) 购买于美国 Amresco 公司; 快速封闭液 (P0252)、一抗稀释液 (P0256)、二抗稀释液 (P0258)、ECL 显影液 A/B (P0018AS-1/2) 购买于上海碧云天生物技术有限公司; PVDF 膜 (R9H447020) 购买于德国 Merck Millipore 公司。

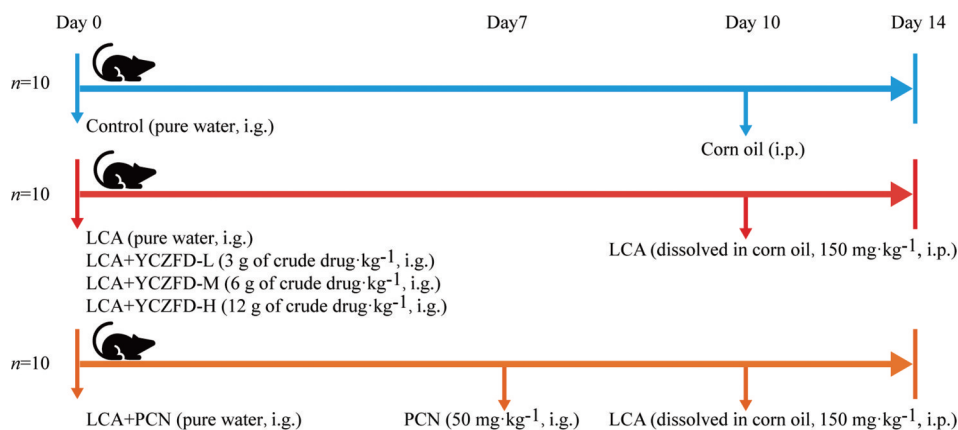
**抗体** NOD 样受体家族 3 (NOD-like receptors 3, NLRP3, ab263899)、白介素-18 (interleukin-18, IL-18, ab207323)、成孔蛋白 (gasdermin D, GSDMD, ab209845)、半胱氨酸蛋白酶 (cysteinyI aspartate specific proteinase, caspase-1, ab179515)、多药耐药相关蛋白 2 (multidrug resistance-associated protein 2, MRP2, ab203397) 购买于英国 Abcam 公司; 核受体亚家族 1 H 组成员 4 (nuclear receptor 1 subfamily group H member

4, NR1H4, 25055-1-AP) 购买于美国 Proteintech 公司; 含有 CARD 的适配器凋亡相关斑点样蛋白 (adaptor apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC, 67824T)、白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ , 12426S)、核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B, 8242S)、 $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 3700T) 购买于美国 Cell Signaling Technology 公司; 胆固醇 7 $\alpha$  羟化酶 (cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase, CYP7A1, A10615)、甾醇-27-羟化酶 (cytochrome P450 27A1, CYP27A1, A23250) 购自于武汉 ABclonal 生物科技有限公司。

**仪器** 东芝 TBA-40FR 生化分析仪 (日本东芝公司); XS105 电子天平 (Mettler Toledo 公司); 旋转蒸发仪 (上海申生科技有限公司); XMTD-8222 真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司); 5430R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 普通 PCR 仪、StepOnePlus 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); TissueLyserII 组织匀浆机 (德国 QIAGEN 公司); SIM-F140AY65 制冰机 (日本 SANYO 公司); FluorChem E 凝胶成像系统 (美国 Protein Simple 公司)。

**药物制备** 茵陈术附汤提取物粉末按照课题组前期<sup>[14]</sup>的方法制备: 取白术 (360 g)、肉桂 (60 g) 和干姜 (90 g), 通过水蒸气蒸馏法提取挥发油, 计算得率, 药渣与茵陈 (180 g)、熟附片 (90 g) 和蜜炙甘草 (180 g) 3 种原料混合, 分别用 10 倍量和 8 倍量的水, 煮沸后提取 1 h, 收集并合并两次滤液, 经冷冻干燥后获得提取物粉末, 并计算得率, 按文献<sup>[14]</sup>方法进行质量分析; 给药时, 按等量生药量, 将制备的浸膏粉经纯水溶解后, 与相应量的挥发油充分混匀后给药。

**动物分组及实验** 小鼠适应性饲养 1 周后, 根据体重随机分组: 正常组 (control)、模型对照组 (LCA)、茵陈术附汤低剂量组 (LCA+YCZFD-L)、茵陈术附汤中剂量组 (LCA+YCZFD-M)、茵陈术附汤高剂量组 (LCA+YCZFD-H) 及阳性药组 (LCA+PCN), LCA+YCZFD-L、M、H 组分别每 kg 体重灌胃给药 3、6、12 g 生药的 YCZFD, 连续给药 14 天, 每日 1 次, 其余各组灌胃等容量饮用水, 给药体积为 0.2 mL/10 g。于 YCZFD 组给药第 7 天开始, LCA+PCN 组灌胃给药 50 mg·kg<sup>-1</sup> PCN, 连续给药 7 天, 每日 1 次, 于 YCZFD 给药第 10 天造模, 除正常组外, 其余各组腹腔注射 150 mg·kg<sup>-1</sup> 石胆酸, 每日 1 次, 连续 4 天, 正常组给予等容量空白玉米油, 造模体积为 0.2 mL/10 g, 详情实验流程见图 1, 于第 14 天造模 12 h 后, 将各组实验动物麻醉后处死, 采集血、肝脏等样品。



**Figure 1** Experimental flow of Yinchenzhufu decoction (YCZFD) against lithocholic acid (LCA)-induced cholestatic liver injury in mice. PCN: Pregnenolone-16 $\alpha$ -carbonitrile

**血生化指标检测及肝脏组织 H&E 染色** 使用 ALT 和 AST 试剂盒测定血清 ALT 和 AST 的含量变化。使用全自动生化分析仪检测 ALP、TBA、TBIL 和 DBIL 的含量变化。对固定的肝大叶标本进行石蜡包埋、切片及 H&E 染色, 观察显微镜下肝脏病变情况, 实验由武汉塞维尔生物有限公司提供技术支持。

**成分相关靶点及疾病靶点预测** 根据课题组前期研究<sup>[14]</sup>获得茵陈术附汤体内化学成分, 在 Pubchem 中获得化学成分的 Canonical SMILES; 将此字符串输入 Swiss Target Prediction 数据库中进行靶点预测, 得到成分对应靶基因。以“cholestatic liver injury”为关键词分别在 GeneCards、OMIM、DisGeNET、DRUGBANK、PharmGKB 数据库中进行搜索, 将获取的疾病靶点上传至 Jvenc 网站绘制韦恩图, 去除重复靶点, 得到胆汁淤积性肝损伤 (cholestatic liver injury) 相关的基因靶点。通过 Venny 网站绘制韦恩图, 获得交集靶点, 并利用 Cytoscape3.7.2 软件构建药物化学成分-靶点网络图, 获得 YCZFD 治疗胆汁淤积性肝损伤可能的核心成分。

**PPI (protein-protein interaction) 网络构建** 将交集靶点上传 STRING 数据库构建 PPI 网络, 利用 Cytoscape3.7.2 软件对其进行分析, 获得 YCZFD 治疗胆汁淤积性肝损伤可能的关键靶点。

**富集通路分析** 使用 Metascape 数据库对交集靶点进行 GO (gene ontology) 和 KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes) 富集通路分析, 获得 YCZFD 治疗胆汁淤积性肝损伤的生物过程和潜在信号通路, 并作可视化分析。

**分子对接** 利用 Pubchem 获得核心成分的 2D 分子结构, 用 PDB 数据库获得关键靶点的三维结构, 通过 AutoDock Tools 软件进行分子对接验证, 并使用

PyMOL 软件作可视化分析。

**肝脏胆汁酸浓度检测** 取正常组、模型组及茵陈术附汤高剂量组小鼠肝组织, 加入纯水 (1:9) 匀浆后, 离心取上清, 同标准系列溶液, 加入 5  $\mu$ L D4-牛磺熊去氧胆酸 (D4-tauroursodeoxycholic acid, D4-TUDCA) 充分混匀后, 加入 150  $\mu$ L 乙腈, 涡旋振荡使蛋白沉淀, 离心后取上清液进样。

在 ACQUITY UPLC-Triple-Quadrupole 5500 质谱上利用 Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 mm  $\times$  100 mm, 1.7  $\mu$ m) 色谱柱进行色谱峰分离; 流动相为 A: 2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 醋酸铵含 0.01% 甲酸溶液, B: 乙腈/甲醇 (19:1, v/v) 含 0.01% 甲酸溶液, 自动进样器温度: 8  $^{\circ}$ C; 流速: 0.45 mL $\cdot$ min<sup>-1</sup>; 柱温: 45  $^{\circ}$ C; 进样体积: 5  $\mu$ L。洗脱程序如下 0~2 min: 20% B; 2~3 min: 20%~25% B; 3~6 min: 25% B; 6~8 min: 25%~35% B; 8~11.5 min: 35% B; 11.5~18 min: 35%~99% B; 18~19 min: 99% B; 19~20 min: 99%~20% B。

电喷雾离子源 (ESI): 离子源温度: 120  $^{\circ}$ C; 脱溶剂温度: 350  $^{\circ}$ C; 脱溶剂气 (N<sub>2</sub>) 流速: 600.0 L $\cdot$ h<sup>-1</sup>; 锥孔气 (N<sub>2</sub>) 流速: 5.0 L $\cdot$ h<sup>-1</sup>; 毛细管电压: 2.8 kV; 锥孔电压: 55 V; 扫描模式: 多反应监测 (MRM)。

采用 Analyst Software1.6 分析软件处理数据: 加权 ( $W=1/X^2$ ) 最小二乘法进行线性回归, 求出各成分的标准曲线, 各检测样品通过标准曲线计算得出含量。

**PCR 实验** 取正常组、模型组及茵陈术附汤高剂量组小鼠肝组织, 运用试剂盒提取总 RNA, 测定浓度后, 将 RNA 母液配置成 1 500 ng $\cdot$  $\mu$ L<sup>-1</sup> RNA 样品, 通过 EZB 试剂盒方法逆转录后, 使用 Step One Plus 仪器进行 real-time PCR 扩增, 检测与胆汁分泌相关的胆汁酸代谢酶、转运体、核受体、NF- $\kappa$ B、NLRP3 炎症小体及细胞焦亡相关靶点的 mRNA 表达, 目标基因相对表达量

以 GAPDH 作为内参, 通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行计算, 引物如表 1。

**Western blot 实验** 取正常组、模型组及茵陈术附汤高剂量组小鼠肝组织, 用含 1% PMSF 的 RIPA 提取总蛋白, 运用 BCA 法对蛋白含量进行测定, 获得蛋白母液, 根据不同目的蛋白分子量选择相应的 SDS-PAGE 凝胶后, 进行电泳分离及转膜, 一抗、二抗按说明书稀释, 一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h 后, 运用 Protein Simple 成像分析仪曝光及扫描, 结果通过内参  $\beta$ -actin 校正。

**统计学分析** 图表中结果以“均值  $\pm$  标准误”的形式表示。运用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐采用最小显著性差异法 (LSD)、方差不齐时采用 Dunnett's 进行两组间比较。当数据呈非正态分布时, 采用非参数 Kruskal-Wallis H 检验。  $P < 0.05$  被认为存在显著性差异。

## 结果

### 1 茵陈术附汤对 LCA 诱导的胆汁淤积性肝损伤的改善作用

结果由图 2A 可见, 与正常组相比, LCA 模型组小

鼠血清 ALT、AST、ALP、TBA、DBIL 和 TBIL 指标均显著升高, 茵陈术附汤干预治疗后, 与模型组相比, 茵陈术附汤可以显著降低胆汁淤积小鼠血清 ALT、ALP、TBA、DBIL 和 TBIL 水平。阳性药 PCN 对 LCA 诱导的胆汁淤积性肝损伤小鼠血生化指标均有降低作用。肝组织 H&E 染色结果显示, 正常组肝细胞形态正常, 排列规则, 无变性坏死现象; LCA 造模 4 天后, 模型组小鼠肝脏汇管区可见明显的胆管细胞增生、炎性细胞浸润及肝细胞坏死; 经茵陈术附汤干预后, 胆汁淤积小鼠肝脏病变均得到了明显改善, 汇管区炎症细胞浸润及肝细胞坏死面积显著减少 (图 2B)。

### 2 YCZFD 活性成分-预测靶点的获取

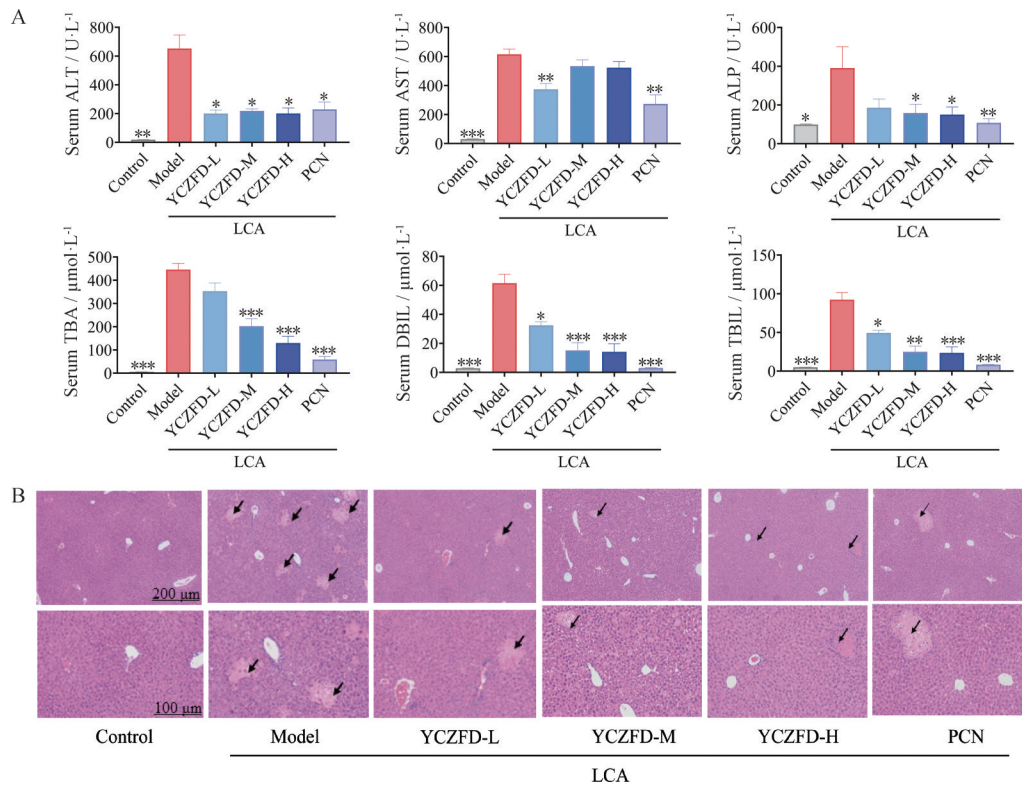
通过 Swiss Target Prediction 数据库对活性成分进行靶点预测, 将得到的成分对应靶点汇总后, 取 probability 值大于平均值的靶点, 并进行去重后共得到 735 个靶点。

### 3 胆汁淤积性肝损伤疾病靶点筛选

通过 GeneCards 数据库得到胆汁淤积性肝损伤相关靶点 847 个、通过 OMIM 数据库获得 94 个、通过 DisGeNET 数据库获得 58 个、通过 DRUGBANK 数据库获得点 2 个、通过 PharmGKB 数据库获得 174 个。5 个数据库的检索结果合并、去重, 得到 954 个靶点。

**Table 1** Primers for real-time PCR. GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Nf- $\kappa$ b: Nuclear factor- $\kappa$ b; IL: Interleukin; TLR4: Toll-like receptor 4; NLRP3: NOD-like receptors 3; TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Ntcp: Na<sup>+</sup>-taurocholate co-transporting polypeptide; Oatp1b2: Organic anion transporting polypeptides 1b2; Mrp: Multidrug resistance-associated protein; Bsep: Bile salt export pump; Ugt1a1: UDP glucuronidase transferase 1a1; Cyp7a1: Cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase; Cyp27a1: Cytochrome P450 27a1; Cyp3a11: Cytochrome P450 3a11; Cyp2b10: Cytochrome P450 2b10; PXR: Pregnane X receptor; CAR: Constitutive androstane receptor; FXR: Farnesoid X receptor

Gene	Species	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapdh</i>	Mice	AGGTCGGTGTGAACGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA
<i>Nf-<math>\kappa</math>b</i>	Mice	ACTCCCACCTCCCAAAAAAC	CCACAGCTGAAGGACTCACA
<i>Il-6</i>	Mice	ACTCCCACCTCCCAAAAAAC	CCACAGCTGAAGGACTCACA
<i>Tlr4</i>	Mice	TGGACCTGAGCTTTAATCCC	GATTTACACCTGGATAAATCCAG
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	Mice	AACCTGCTGGTGTGTGACGTTT	CAGCACGAGGCTTTTTTGTGTG
<i>Nlrp3</i>	Mice	ATTACCCGCCGAGAAAGG	TCGCAGCAAAGATCCACACAG
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	Mice	GGTTCTCTCAAGGGACAAGG	TGGAAGACTCCTCCAGGTAT
<i>Ntcp</i>	Mice	CAAACCTCAGAAGGACCAACA	GTAGGAGGATTATCCCGTTGTG
<i>Oatp1b2</i>	Mice	GCACTGCGATGGATTACAGGAT	AGCTTTGGTGGGTGTAGCTTG
<i>Mrp3</i>	Mice	CTGGGTCCCTGCATCTAC	GCCGTCTTGAGCCTGGATAAC
<i>Mrp4</i>	Mice	CATCGCGTAACCGTCCTC	CCGCAGTTTTACTCCGCAG
<i>Bsep</i>	Mice	TCTGACTCAGTGATCTTCGCA	CCCATAAACATCAGCCAGTTGT
<i>Mrp2</i>	Mice	GCTGCTGAATAACTCAAGCAT	CACAACGAACACCTGCTTGG
<i>Ugt1a1</i>	Mice	GCTTCTCCGTACCTCTGTGTTG	GCTGCTGAATAACTCCAAGCAT
<i>Cyp7a1</i>	Mice	CCAGGCACAGGAGAGTACG	GGGCAAGTGCAGCACATAG
<i>Cyp27a1</i>	Mice	GAATCTAACAGGCCATGCT	AGGAGCTGGCACCTAGACT
<i>Cyp3a11</i>	Mice	GGATGAGATCGATGAGGCTCTG	CAGGTATTCCATCTCCATCACAGT
<i>Cyp2b10</i>	Mice	TGCTGTGCTTGAGCCAACC	CCACTAAACATTTGGGCTTCCT
<i>Pxr</i>	Mice	GATGGAGGTCTTCAAATCTGCC	CAGCCGACATTGCGTTTC
<i>Car</i>	Mice	CCCTGACAGACCCGGAGTTA	GCCGAGACTGTTGTTCCATAAT
<i>Fxr</i>	Mice	GGCAGAATCTGGATTTGGAATCG	GCTGAACCTTGAGGAAACGGG
<i>Mdr3</i>	Mice	CAGCAGTCAGTGTGCTTACAA	CAGCAGTCAGTGTGCTTACAA

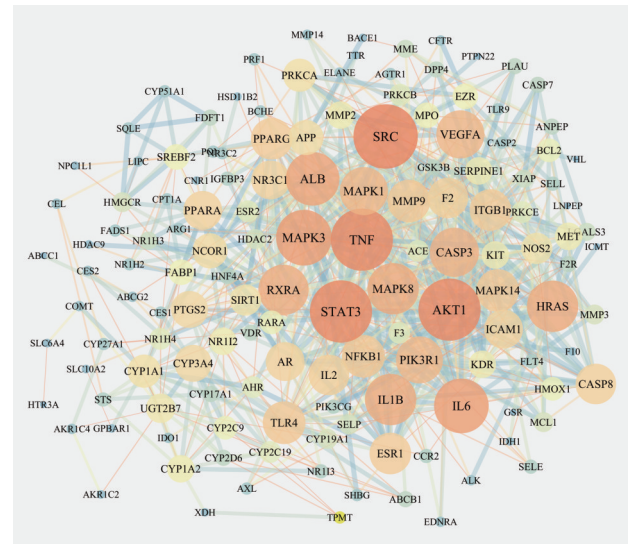


**Figure 2** Effect of YCZFD on liver injury in cholestatic mice. A: Biochemical analysis of the serum of mice from different groups. B: Histological analysis of liver tissues obtained from different groups. Hepatocyte necrosis and inflammatory cell infiltration in liver tissue sections was marked by arrow. YCZFD-L, YCZFD-M, YCZFD-H, refer to the administered dose of YCZFD as 3, 6, 12 g of crude drug·kg<sup>-1</sup> body weight, respectively. *n* = 9 (model group), *n* = 10 (others), mean ± SEM. \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs model group

#### 4 YCZFD 治疗胆汁淤积性肝损伤核心成分及关键靶点筛选

将茵陈术附汤成分对应的 735 个靶点和胆汁淤积性肝损伤的 954 个疾病靶点通过 Venny 网站构建韦恩图, 得到交集靶点 160 个。将 160 个潜在靶点处理后映射回活性成分后, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制可视化网络图。从图中分析得出, 茵陈术附汤治疗胆汁淤积性肝损伤的核心活性成分是: quercetin、7, 4'-dihydroxyflavone、atractylenolide I、capillarol、benzoylhypaconine、songoramine、chlorogenic acid、liquiritin、glycyrrhetic acid、formononetin。

将 160 个交集靶点上传至 STRING 数据库, 构建 PPI 网络, 之后利用 Cytoscape 软件构建可视化网络图 (图 3)。图中显示有 141 个节点, 726 条边。通过 Centiscape2.2 分析计算, 筛选出 degree 大于 44.662 42, betweenness centrality 大于 120.560 50、closeness centrality 大于 0.003 69 的靶点, 并取前 10, AKT1 基因编码的是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT serine/threonine kinase 1, AKT1)、信号转录及转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、丝裂原活化蛋白激酶 3 (mitogen-activated



**Figure 3** Protein-protein interaction (PPI) networks of YCZFD in the treatment of cholestasis liver injury

protein kinase 3, MAPK3)、白蛋白 (albumin, ALB)、非受体酪氨酸激酶 Src (non-receptor tyrosine kinase Src, SRC)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、IL1B、IL6、丝裂原活化蛋白激酶 1 (mitogen-activated protein kinase 1, MAPK1)、雌激素受体 1 (estrogen

receptor 1, ESR1), 提示这些靶点可能是茵陈术附汤治疗胆汁淤积性肝损伤的潜在关键靶点。

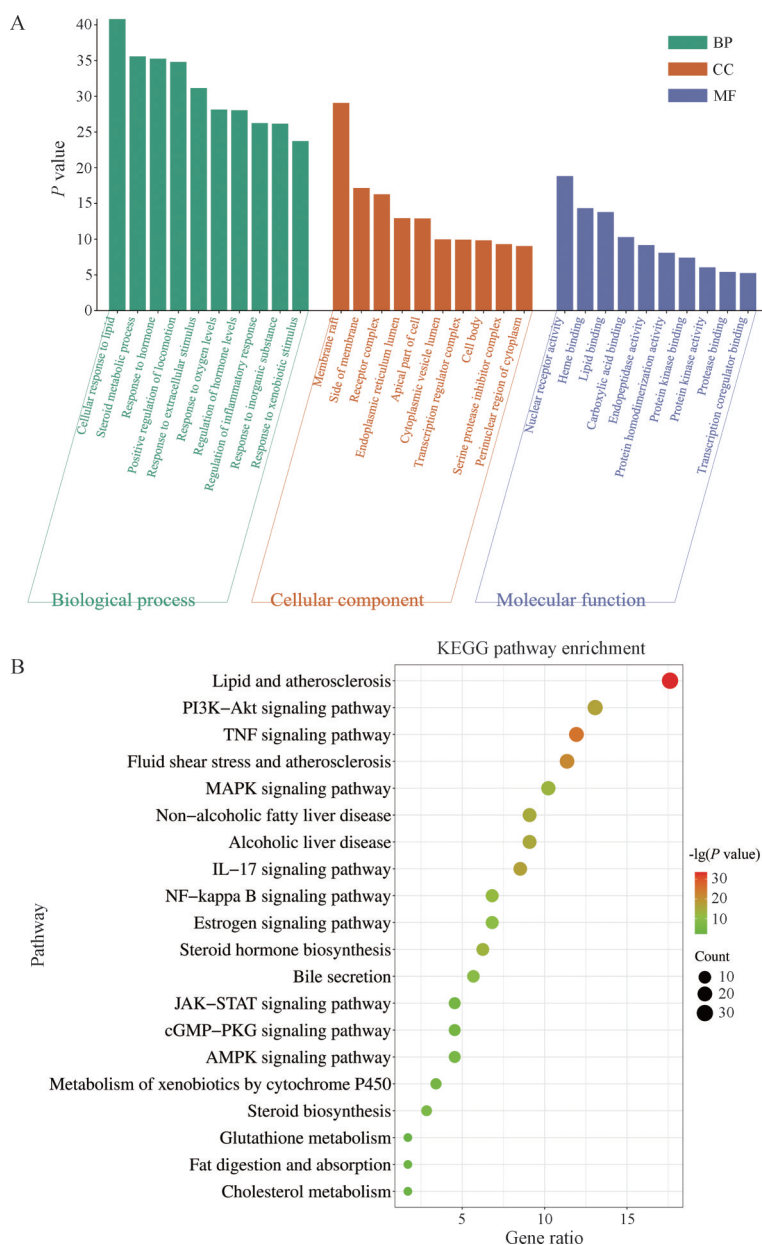
### 5 YCZFD 治疗胆汁淤积性肝损伤的 GO 与 KEGG 富集分析

将前面得到的 160 个交集靶点导入 Metascape 数据库, 对其进行 GO 生物功能富集分析, 共确定 1 995 个 GO 条目, 如图 4A 所示, 其中靶点经生物过程 (biological process, BP) 有 1 720 个条目, 主要涉及细胞对脂质的反应、类固醇代谢过程、炎症反应的调节等; 细胞组分 (cellular component, CC) 有 95 个条目, 主要涉及核受体活性、羧酸结合、蛋白激酶结合等; 分子功能 (molecular function, MF) 有 180 个条目, 主要涉及膜

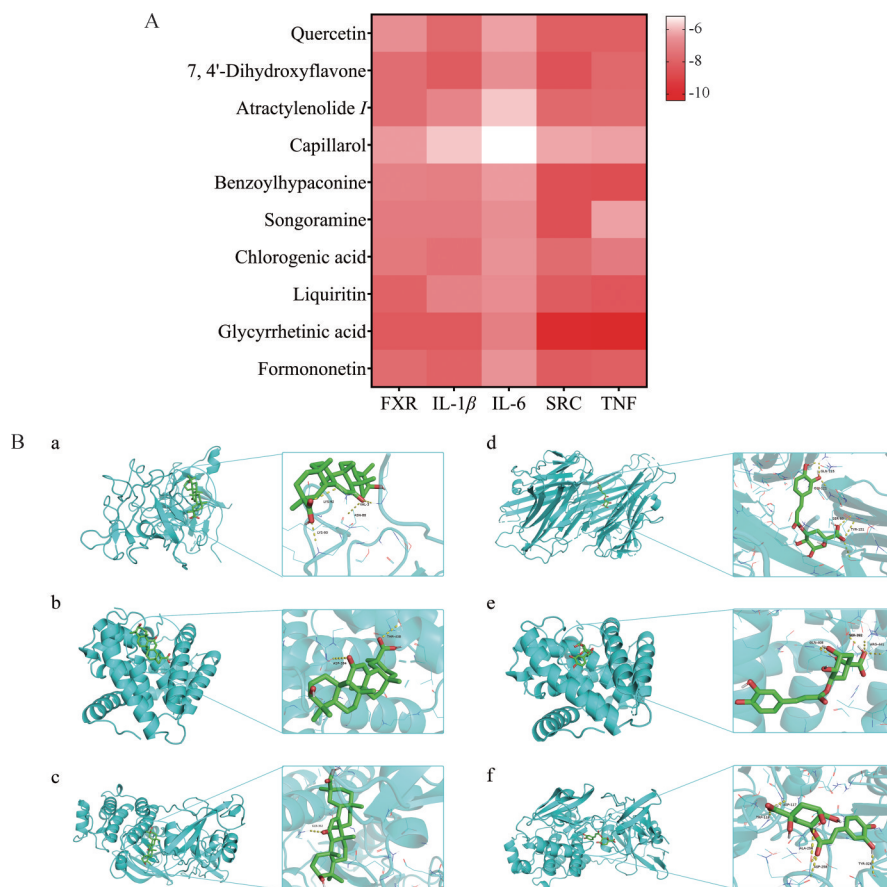
筏、受体复合物、丝氨酸蛋白酶抑制剂复合物等。KEGG 信号通路功能富集分析结果显示, 茵陈术附汤治疗胆汁淤积性肝损伤主要涉及 TNF 信号通路、NF- $\kappa$ B 信号通路、胆汁分泌 (bile secretion) 等 (图 4B)。

### 6 分子对接

将 YCZFD 核心活性成分及 PPI 网络分析中获取且与关键蛋白 SRC、IL1B、IL6、TNF、FXR 进行分子对接分析, 获得对接分数热点图 (图 5A)。分子对接结果显示, 10 个核心成分与 5 个关键靶蛋白的结合能均小于  $-5.0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ , 表明它们之间具有潜在的结合活性。运用 Pymol 软件做分子对接示意图, 展示氢键结合位点, 如图 5B 所示。



**Figure 4** Gene ontology (GO) analysis (A) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis (B) of YCZFD in the treatment of cholestasis liver injury



**Figure 5** Docking analysis of YCZFD core active components and key protein molecules. A: Heatmap of the docking scores between the core components in YCZFD and the key targets for the treatment of cholestatic liver injury; B: Molecular docking simulation of bioactive compounds-core targets. a: Glycyrrhetic acid docking IL-1 $\beta$  (docking score = -8.3); b: Glycyrrhetic acid docking FXR (docking score = -8.3); c: Glycyrrhetic acid docking SRC (docking score = -10.1); d: Chlorogenic acid docking TNF (docking score = -7.2); e: Chlorogenic acid docking FXR (docking score = -7.3); f: Chlorogenic acid docking SRC (docking score = -7.7)

## 7 YCZFD对LCA诱导的胆汁淤积小鼠肝脏胆汁酸水平的影响

与模型组相比,茵陈术附汤给药组小鼠肝脏胆汁酸如牛磺熊去氧胆酸(tauroursodeoxycholic acid, TUDCA)、牛磺去氧胆酸(taurodeoxycholic acid, TDCA)、牛磺鹅去氧胆酸(taurochenodeoxycholic acid, TCDCA)、牛磺胆酸(taurocholic acid, TCA)、牛磺石胆酸(tauroolithocholic acid, TLCA)、牛磺猪去氧胆酸(taurohyodeoxycholic acid, THDCA)、牛黄- $\alpha/\beta/\omega$ -鼠胆酸(tauro- $\alpha/\beta/\omega$ -muricholic acid, T- $\alpha/\beta/\omega$ -MCA)、去氧胆酸(deoxycholic acid, DCA)、鹅去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, CDCA)、LCA、 $\beta/\omega$ -鼠胆酸( $\beta/\omega$ -muricholic acid,  $\beta/\omega$ -MCA)等水平显著降低,胆汁酸分类分析结果显示,与模型组相比,茵陈术附汤组小鼠肝脏样本总胆汁酸、牛磺酸结合型胆汁酸和游离胆汁酸水平均显著降低(图6)。

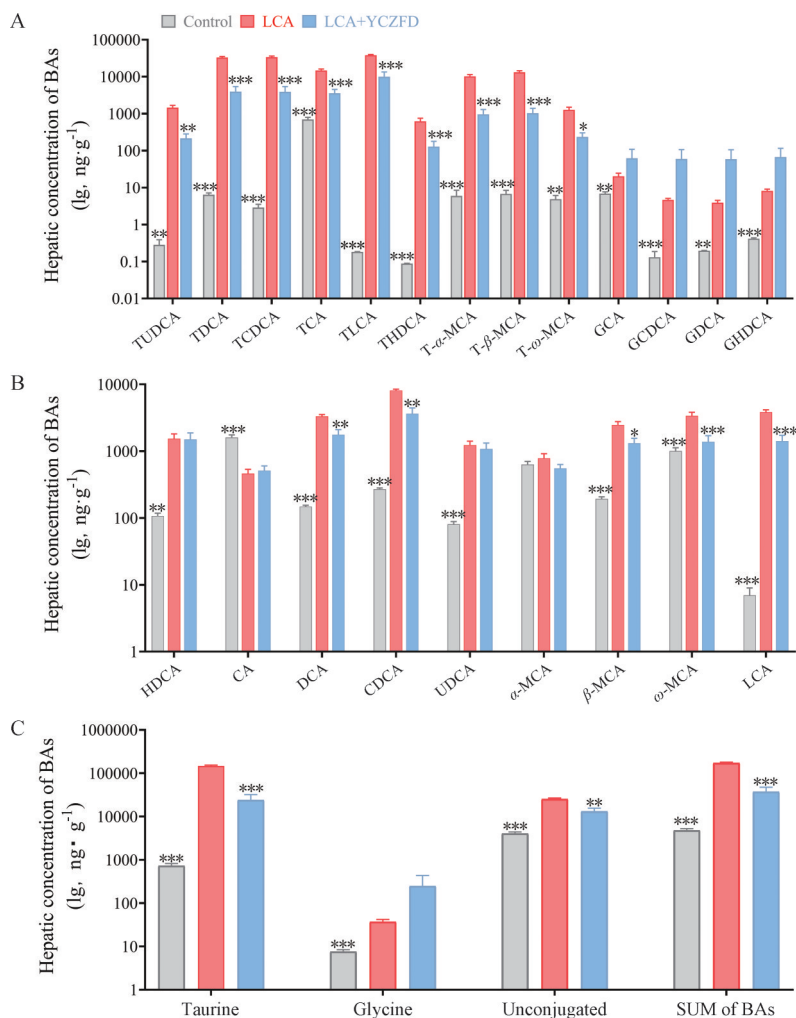
## 8 YCZFD对胆汁淤积性肝损伤小鼠胆汁酸核受体

## 及转运体/代谢酶表达的影响

如图7A结果所示,与正常组小鼠相比,模型组小鼠肝脏胆汁酸合成酶 *Cyp7a1*、*Cyp27a1*, II相代谢酶 *Ugt1a1*, 摄取转运体 *Ntcp*、*Oatp1b2*, 外排转运体 *Bsep*、*Mrp2*、*Mrp3*、*Mrp4*及核受体 *Fxr*、*Car*的mRNA表达均明显下调, YCZFD组核受体 *Fxr*、*Car*, 合成酶 *Cyp7a1*、*Cyp27a1*, 代谢酶 *Ugt1a1*, 摄取转运体 *Ntcp*、*Oatp1b2*及外排转运体 *Bsep*、*Mrp2*、*Mrp3*、*Mrp4*的mRNA表达出现了明显上调。与模型组小鼠相比, YCZFD可上调模型小鼠肝脏中FXR和MRP2的蛋白表达, 回调肝组织CYP7A1和CYP27A1的蛋白表达(图7B)。

## 9 YCZFD对胆汁淤积性肝损伤小鼠肝脏炎症及细胞焦亡的影响

如图8A所示, real-time PCR结果显示, 与正常组小鼠相比, 模型组小鼠肝脏中 *Tlr4*、*Nlrp3*及下游 *Il-1 $\beta$* 、*Il-6*、*Tnf- $\alpha$* 的mRNA表达显著上升, 提示模型组小鼠有明显的NLRP3通路活化和炎症反应发生, 经YCZFD



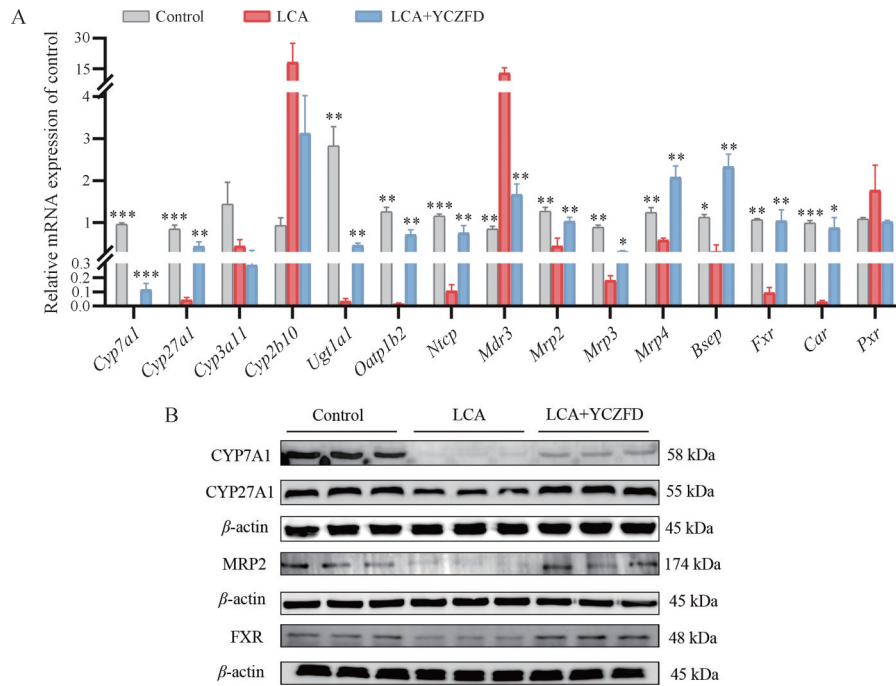
**Figure 6** Effects of YCZFD on the bile acid levels of liver tissues in LCA-induced cholestatic mice. A, B: Influence of YCZFD on individual bile acid of liver tissues of cholestatic mice; C: Influence of YCZFD on unconjugated, glycine-conjugated, taurine-conjugated bile acids and their sum of liver tissues of cholestatic mice. LCA+ YCZFD: LCA-induced mice pretreated with YCZFD at a dose of 12 g of crude drug·kg<sup>-1</sup>, the same as following figures. n = 9 (model group), n = 10 (others), mean ± SEM. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs LCA group

干预后,小鼠肝脏中 *Tlr4* 和 *Nlrp3* 及下游 *Il-1β*、*Il-6*、*Tnf-α* 的 mRNA 表达出现了明显的下调。如图 8B 所示,与正常组小鼠相比,模型组小鼠肝脏细胞 NF-κB、炎性小体 NLRP3、焦亡蛋白 GSDMD、ASC、caspase-1 及炎症因子 IL-1β、IL-18 蛋白表达水平显著升高,经 YCZFD 干预后, NF-κB、NLRP3、细胞焦亡及炎症因子蛋白表达显著降低,上述结果提示 YCZFD 抗胆汁淤积性肝损伤与其阻滞 NLRP3 通路活化、抑制细胞焦亡及炎症有关。

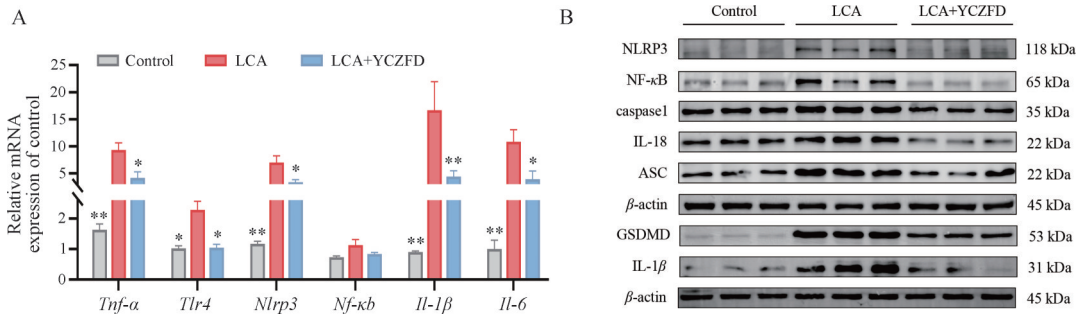
### 讨论

胆汁淤积是多种肝病常见病症,主要以胆汁流受阻及胆汁酸 (BAs) 肝细胞积聚<sup>[15]</sup>为主要特征,如未有效治疗,胆汁淤积可进展为肝纤维化、肝硬变甚至肝衰

竭<sup>[16]</sup>。茵陈术附汤治疗多种肝脏疾病疗效显著,前期研究发现茵陈术附汤具有抗胆汁淤积性肝损伤作用,但作用机制尚不完全清楚。LCA 是毒性胆汁酸成分之一,是诱发肝毒性的内源性物质,在肝病患者血清中显著增加<sup>[17]</sup>。正常情况下, LCA 主要在肝脏中转化为牛磺酸缀合物并转运至胆管,然而过量的 LCA 会导致间隙连接蛋白的丢失和胆汁渗透梯度的崩溃,从而导致 BAs 跨膜运动减少并随后在肝脏中积累<sup>[18]</sup>。在本研究中,肝组织病理形态显示 LCA 造模后,小鼠肝实质细胞明显坏死,经 YCZFD 干预后,小鼠肝实质细胞坏死得到改善,小鼠肝组织炎性浸润情况显著改善。ALT 和 AST 是肝损伤的标志物,在肝细胞中,ALT 主要存在于胞浆内,而大约 80% AST 存在于线粒体内<sup>[19]</sup>。当肝细胞膜受损,细胞膜通透性发生变化时,胞浆内的



**Figure 7** Effect of YCZFD on nuclear receptors, transporters and metabolic enzymes in liver tissues of LCA induced cholestatic mice. A: Relative mRNA expression of nuclear receptors, metabolic enzymes, and transporters of liver tissues in different groups; B: Relative protein expression of FXR, MRP2, CYP7A1 and CYP27A1 of liver tissues in different groups.  $n = 5$  (A), mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs LCA group



**Figure 8** Effect of YCZFD on NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammatory pathway (A) and pyroptosis (B) in liver tissues of LCA induced cholestatic mice.  $n = 5$  (A), mean  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs LCA group

转氨酶便会释放入血,在急性肝损伤的情况下ALT漏出率大于AST,ALT反映肝细胞损伤的灵敏度较AST高<sup>[20]</sup>,本实验结果也显示茵陈术附汤干预后可显著改善肝功能指标ALT。ALP、TBIL和DBIL是胆汁淤积的指标<sup>[21,22]</sup>,由肝功能结果显示,LCA诱导后,胆汁淤积小鼠血清ALP、TBIL、DBIL、TBA水平显著升高,经由茵陈术附汤干预后,ALP、TBIL、DBIL、TBA水平都得到明显改善。本研究结果证实,YCZFD具有减轻LCA诱导的胆汁淤积性肝损伤作用。

网络药理学是研究中药或中药复方复杂网络机制的重要策略之一<sup>[23]</sup>。本实验通过构建PPI网络,发现茵陈术附汤治疗胆汁淤积性肝损伤关键靶点可能与其调控ATK1、STATS、MAPK3、ALB、SRC、TNF、IL1B、

IL6、MAPK1、ESR1等相关。SRC家族激酶是一组位于细胞内的非受体酪氨酸激酶<sup>[24]</sup>,研究发现PBC患者肝脏FGF19-SRC-FXR通路调控异常,小鼠体内SRC的下调阻断了FGF19诱导的FXR磷酸化,导致BA调控异常,进而加重胆汁淤积损伤<sup>[25]</sup>。促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6可激活MAPKs和JNK等多种细胞内信号转导途径刺激肝细胞炎症信号应答<sup>[26,27]</sup>。动物实验研究显示,由LCA诱导的胆汁淤积小鼠肝组织TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6的表达皆出现了明显的上调。YCZFD干预可降低这些炎症因子表达。TNF- $\alpha$ 与其受体结合既可以通过NF- $\kappa$ B介导的信号通路激活炎症通路<sup>[27]</sup>,也可以通过caspase-8<sup>[28]</sup>诱导凋亡通路。通过交集靶点的GO和KEGG富集通路分析发现,茵陈术

附汤抗胆汁淤积性肝损伤可能与其调控 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 信号通路、胆汁分泌等有关。已有研究表明 NF- $\kappa$ B 信号通路在肝脏疾病的发病机制中发挥关键作用<sup>[29]</sup>, 且在胆汁淤积性肝炎中起重要作用<sup>[30]</sup>, 研究还发现胆汁酸肝细胞聚集可驱动胆汁淤积性炎症<sup>[31]</sup>。综合网络药理学结果推测, 茵陈术附汤可能通过调控 NF- $\kappa$ B 信号通路、胆汁分泌等抑制胆汁淤积性肝损伤。

在验证网络药理学结果中, 动物实验结果显示, LCA 诱导的胆汁淤积小鼠肝脏胆汁酸水平升高, 经 YCZFD 干预后, 胆汁淤积小鼠肝脏中胆汁酸水平显著降低。有研究发现, 在胆汁淤积性肝损伤动物模型中, TCA、MCA、T- $\beta$ -MCA 等胆汁酸成分显著升高并引发肝脏炎症损伤<sup>[32]</sup>, 同时疏水性胆汁酸, 如 CDCA 在肝细胞内的滞留和积聚<sup>[33]</sup>被认为是胆汁淤积性肝损伤的重要原因<sup>[34]</sup>。胆汁酸稳态受核受体、转运体及代谢酶调控, 其中胆汁酸合成关键酶 CYP7A1 及 CYP27A1、摄取转运体 NTCP 及 OATP<sup>[35]</sup>和外排转运体 BSEP 及 MRP2<sup>[36]</sup>的表达均受到核受体 FXR 的调控。研究表明, 核受体 FXR 是 BAs 调控的中心分子, 是治疗胆汁淤积的关键靶点<sup>[37]</sup>。FXR 激活可诱导小异二聚体伴侣 (small heterodimer partner, SHP) 的转录<sup>[38]</sup>, 抑制胆汁酸合成酶 CYP7A1 和 CYP27A1 减少胆汁酸合成<sup>[39]</sup>, 抑制 NTCP 及 OATP, 减少胆汁酸摄取, 促进 BSEP 和 MRP2 表达, 增加胆汁酸外排。本研究发现 YCZFD 能上调胆汁淤积小鼠肝脏核受体 FXR 及外排转运体 *Bsep* 和 *Mrp2* 表达, 从而促进胆汁酸外排, 逆转胆汁酸稳态, 减轻胆汁淤积性肝损伤。实验模型组出现了 CYP7A1 及 CYP27A1 蛋白表达下调、*Ntcp* 及 *Oatp* 基因表达下调, 可能是胆汁淤积状态下, 胆汁酸在肝细胞内聚集, 合成酶和摄取转运体出现适应性下调, 而 YCZFD 干预后增强了胆汁酸外排转运, 降低了肝细胞胆汁酸聚集, CYP7A1、CYP27A1、*Ntcp* 及 *Oatp* 表现为适应性回调, 说明 YCZFD 激活 FXR 诱导外排体表达可能是其主要作用。此外, YCZFD 还可上调代谢酶 *Ugt1a1* 及外排转运体 *Mrp3*、*Mrp4* 的基因表达, 从而促进胆汁酸代谢和外排, 参与了逆转胆汁酸稳态、减轻胆汁淤积性肝损伤的作用。

NF- $\kappa$ B 通路在胆汁淤积性肝损伤中发挥关键作用, 无刺激信号时, p-NF- $\kappa$ B 位于胞质中, 与 NF- $\kappa$ B 抑制物 (inhibitor of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B) 结合为复合体形式, 其活性被抑制<sup>[40]</sup>, 炎症发生时, p-NF- $\kappa$ B 被转运至细胞核, 并激活下游靶标, 促进炎症细胞因子如 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达<sup>[41]</sup>, 驱动炎症反应, 加剧肝脏炎症及纤维化<sup>[42]</sup>。动物研究结果显示, 经 YCZFD 干预后, 小鼠肝脏中 NF- $\kappa$ B 蛋白表达显著降低, 炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、

*Tnf- $\alpha$*  和 *Tlr4* 的 mRNA 表达均显著下调, 研究结果提示 YCZFD 作用可能与其调节 NF- $\kappa$ B 通路有关。

研究表明, 细胞焦亡是胆汁淤积性肝损伤的新型机制, 经典的焦亡途径与 NLRP3 炎症小体活化有关, NLRP3 是一种细胞质多蛋白复合物, 由 NLRP3、ASC 及 caspase-1 组成<sup>[43]</sup>。活化的 NLRP3 炎症小体可促使 ASC 和 pro-caspase-1 裂解出具有蛋白水解活性的 caspase-1<sup>[44]</sup>, 活化的 caspase-1 通过裂解 GSDMD, 形成 N 端的 GSDMD<sup>[45]</sup>, 同时活化的 caspase-1 可以促使 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 裂解, 生成成熟的 IL-1 $\beta$  和 IL-18, 并通过 N 端 GSDMD 形成的质膜空隙释放<sup>[46]</sup>。NF- $\kappa$ B 可以调控炎症小体 NLRP3 的活化<sup>[47]</sup>, 实验结果显示 YCZFD 抑制了模型小鼠肝脏 NLRP3 通路活化, 降低了细胞焦亡蛋白 GSDMD、caspase 1 和 ASC 表达, 降低炎症因子 IL-1 $\beta$  和 IL-18 的蛋白水平, 改善了胆汁淤积小鼠肝组织细胞焦亡。

综上所述, YCZFD 具有抗 LCA 诱导的胆汁淤积性肝损伤作用。基于网络药理学、分子生物学及胆汁酸定量分析表明, YCZFD 抗胆汁淤积性肝损伤作用与其激活核受体 FXR, 上调胆汁酸外排转运体和 II 相代谢酶的表达, 促进胆汁酸的代谢与外排, 逆转胆汁酸稳态紊乱, 抑制由 NLRP3 介导的细胞焦亡及炎症等有关。

**作者贡献:** 章林聪负责完成动物实验、网络药理学分析、分子生物学检测与论文撰写; 田甜、王天明、李圆圆参与动物实验处理及数据处理; 吴家胜协助撰写并修订文章; 马越鸣指导研究思路、设计研究方法并修订文章。

**利益冲突:** 全体作者声明本研究内容无任何利益冲突。

## References

- [1] Poupon R. Cholestasis and cholestatic liver diseases [J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2009, 33: 778-788.
- [2] Lamba M, Ngu JH, Stedman CAM. Trends in incidence of autoimmune liver diseases and increasing incidence of autoimmune hepatitis [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2021, 19: 573-579.
- [3] Gijbels E, Vilas-Boas V, Deferm N, et al. Mechanisms and *in vitro* models of drug-induced cholestasis [J]. *Arch Toxicol*, 2019, 93: 1169-1186.
- [4] Sheng FF, Lu LG. Etiology of cholestatic liver disease [J]. *J Pract Hepatol* (实用肝病杂志), 2016, 19: 644-646.
- [5] Zhang XL. Observation on therapeutic effect of Yinchenzhu decoction combined with Wendan decoction in patients with hepatitis B cirrhosis combined with ascites [J]. *Contemp Med Symp* (当代医药论丛), 2020, 18: 201-203.
- [6] Zhu FH, Yang WN, Li F. Study on effect of Yinchenzhu decoction

- tion in the treatment of liver failure complicated by refractory jaundice [J]. *Shaanxi J Tradit Chin Med (陕西中医)*, 2021, 42: 304-307.
- [7] Zhang JJ, He GX, Zhang CZ. Hepatocyte apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in Yin-Jaundice rats [J]. *J Integra Med (中西医结合学报)*, 2003, 1: 116-118.
- [8] Yang XS, Qu CJ. Effect of Yinchenzhufu decoction on  $\beta$ -glucuronidase content and UDPGT activity in Yin-Jaundice rats [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med (辽宁中医杂志)*, 2007, 360: 688-689.
- [9] Wang GF, Li YY, Shi R, et al. Yinchenzhufu decoction protects against alpha-naphthylisothiocyanate-induced acute cholestatic liver injury in mice by ameliorating disordered bile acid homeostasis and inhibiting inflammatory responses [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 254: 112672.
- [10] El-Agamy DS, Almaramhy HH, Ahmed N, et al. Anti-inflammatory effects of vardenafil against cholestatic liver damage in mice: a mechanistic study [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47: 523-534.
- [11] Chen P, Zeng H, Wang Y, et al. Low dose of oleanolic acid protects against lithocholic acid-induced cholestasis in mice: potential involvement of nuclear factor-E2-related factor 2-mediated upregulation of multidrug resistance-associated proteins [J]. *Drug Metab Dispos*, 2014, 42: 844-852.
- [12] Miyata M, Nomoto M, Sotodate F, et al. Possible protective role of pregnenolone-16 alpha-carbonitrile in lithocholic acid-induced hepatotoxicity through enhanced hepatic lipogenesis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 636: 145-154.
- [13] Mao LS, Zhu XH. Application progress of network pharmacology in traditional Chinese medicine [J]. *J Tradit Chin Med (中医药管理杂志)*, 2021, 29: 98-102.
- [14] Wang Q, Jiang P, Ye FY, et al. Identification and pharmacokinetics of multiple constituents in rat plasma after oral administration of Yinchenzhufu decoction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 153: 714-724.
- [15] Hilscher MB, Kamath PS, Eaton JE. Cholestatic liver diseases: a primer for generalists and subspecialists [J]. *Mayo Clin Proc*, 2020, 95: 2263-2279.
- [16] Fuchs CD, Paumgartner G, Wahlström A, et al. Metabolic preconditioning protects BSEP/ABCB11<sup>-/-</sup> mice against cholestatic liver injury [J]. *J Hepatol*, 2017, 66: 95-101.
- [17] Festi D, Morselli Labate AM, Roda A, et al. Diagnostic effectiveness of serum bile acids in liver diseases as evaluated by multivariate statistical methods [J]. *Hepatology*, 1983, 3: 707-713.
- [18] Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis [J]. *N Engl J Med*, 1998, 339: 1217-1227.
- [19] Song HF, Xu P. New serological markers for liver damage [J]. *World Chin J Digestol (世界华人消化杂志)*, 2017, 25: 2681-2688.
- [20] Zhang LJ. Determination of serum transaminases and its clinical significance [J]. *Guide China Med (中国医药指南)*, 2012, 10: 298-299.
- [21] Meng XL. Clinical value of biochemical test in the diagnosis of liver cirrhosis [J]. *Guide China Med (中国医药指南)*, 2020, 18: 113-114.
- [22] Mei HY. Value of total bilirubin, total bile acid and prealbumin in diagnosis of liver diseases [J]. *Contemp Med (当代医学)*, 2016, 22: 98-99.
- [23] Cao H, Li S, Xie R, et al. Exploring the mechanism of Dangguiliuhuang decoction against hepatic fibrosis by network pharmacology and experimental validation [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 187.
- [24] Patel A, Sabbineni H, Clarke A, et al. Novel roles of Src in cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition, vascular permeability, microinvasion and metastasis [J]. *Life Sci*, 2016, 157: 52-61.
- [25] Byun S, Kim DH, Ryerson D, et al. Postprandial FGF19-induced phosphorylation by Src is critical for FXR function in bile acid homeostasis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 2590.
- [26] Sharanek A, Burban A, Ciriaci N, et al. Pro-inflammatory cytokines enhance dilatation of bile canaliculi caused by cholestatic antibiotics [J]. *Toxicol In Vitro*, 2019, 58: 51-59.
- [27] Wang Q, Song GC, Weng FY, et al. Hepatoprotective effects of glycyrrhetic acid on lithocholic acid-induced cholestatic liver injury through choleric and anti-inflammatory mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 881231.
- [28] McConnell BB, Yang VW. The role of inflammation in the pathogenesis of colorectal cancer [J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*, 2009, 5: 69-74.
- [29] Ahmadi A, Niknahad H, Li H, et al. The inhibition of NF $\kappa$ B signaling and inflammatory response as a strategy for blunting bile acid-induced hepatic and renal toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2021, 349: 12-29.
- [30] Yang M, Ramachandran A, Yan HM, et al. Osteopontin is an initial mediator of inflammation and liver injury during obstructive cholestasis after bile duct ligation in mice [J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224: 186-195.
- [31] Li M, Cai SY, Boyer JL. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver [J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 56: 45-53.
- [32] Zhang Y, Hong JY, Rockwell CE, et al. Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver [J]. *Liver international*, 2012, 32: 58-69.
- [33] Perez MJ, Briz O. Bile-acid-induced cell injury and protection [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 1677-1689.
- [34] Attili AF, Angelico M, Cantafora A, et al. Bile acid-induced liver toxicity: relation to the hydrophobic-hydrophilic balance of bile acids [J]. *Med Hypotheses*, 1986, 19: 57-69.
- [35] Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, et al. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis [J]. *Cell*, 2000, 102: 731-744.
- [36] Denson LA, Sturm E, Echevarria W, et al. The orphan nuclear

- receptor, SHP, mediates bile acid-induced inhibition of the rat bile acid transporter, NTCP [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121: 140-147.
- [37] Zhu QN, Xie HM, Zhang D, et al. Hepatic bile acids and bile acid-related gene expression in pregnant and lactating rats [J]. *PeerJ*, 2013, 1: e143.
- [38] Baptissart M, Vega A, Martinot E, et al. Farnesoid X receptor alpha: a molecular link between bile acids and steroid signaling? [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70: 4511-4526.
- [39] Goodwin B, Jones SA, Price RR, et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LXR-1 represses bile acid biosynthesis [J]. *Mol Cell*, 2000, 6: 517-526.
- [40] Shi H, Dong L, Jiang J, et al. Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Toxicology*, 2013, 303: 107-114.
- [41] Qiao Y, Wang P, Qi J, et al. TLR-induced NF- $\kappa$ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586: 1022-1026.
- [42] Wang S, Xie X, Lei T, et al. Statins attenuate activation of the NLRP3 inflammasome by oxidized LDL or TNF $\alpha$  in vascular endothelial cells through a PXR-dependent mechanism [J]. *Mol Pharmacol*, 2017, 92: 256-264.
- [43] Sharma BR, Kanneganti TD. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases [J]. *Nat Immunol*, 2021, 22: 550-559.
- [44] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death [J]. *Nature*, 2015, 526: 660-665.
- [45] Broz P, Pelegrín P, Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2020, 20: 143-157.
- [46] Swanson KV, Deng M, Ting JP. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics [J]. *Nat Rev Immunol*, 2019, 19: 477-489.
- [47] Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, et al. NF- $\kappa$ B restricts inflammasome activation *via* elimination of damaged mitochondria [J]. *Cell*, 2016, 164: 896-910.