

基于生物信息学探讨非酒精性脂肪性肝炎与铁死亡相关的关键基因及潜在中药预测

欧阳子琛^{1,2}, 李永顺^{1,2}, 陈树超^{1,2}, 李舒¹, 鲁艳平¹, 胡敬宝¹

1.广州中医药大学附属第七临床医学院, 广东 深圳 518133; 2.广州中医药大学研究生院, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 利用生物信息学分析来识别非酒精性脂肪性肝炎与铁死亡相关的关键基因, 并预测相关作用的中药。方法: 从基因芯片数据库 (GEO) 搜索并下载数据集, 通过 R 语言程序计算差异表达基因, 并进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 利用 STRING 数据库、Cytoscape 软件筛选出中心基因; 通过 FerrDb 数据库、基因集富集分析 (GSEA) 筛选出铁死亡相关的关键基因, 最后利用 HERB 数据库、COREMINE 数据库对关键基因进行中药预测, 并进行分子对接。结果: 分析共得出 143 个差异基因, GO、KEGG 富集主要集中在炎症反应通路; 构建 PPI 网络筛选出 Toll 样受体 4 (TLR4) 等 10 个基因作为中心基因, 通过 FerrDb 数据库筛选关键基因 TLR4, GSEA 分析提示 TLR4 高表达在铁死亡基因集中高度富集; 以 TLR4 为靶点预测出柴胡等 8 种中药和 7 种成分, 7 种成分与 TLR4 均能稳定结合。结论: 柴胡等中药的相关成分可能通过调控 TLR4 的表达, 影响肝脏细胞的铁死亡和炎症反应达到治疗非酒精性脂肪性肝炎的作用。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎; 生物信息学; 差异表达基因; 铁死亡; 中药

[中图分类号] R575.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2023) 07-0028-08

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2023.07.005

Study on the Key Genes Related to Ferroptosis in Nonalcoholic Steatohepatitis Based on Bioinformatics and Prediction of Potential Chinese Medicine

OUYANG Zichen, LI Yongshun, CHEN Shuchao, LI Shu, LU Yanping, HU Jingbao

Abstract: **Objective:** To identify the key genes related to ferroptosis in nonalcoholic steatohepatitis by bioinformatics analysis and predict the related effects of Chinese medicine. **Methods:** Data sets were searched and downloaded from Gene Expression Omnibus (GEO), differential expression genes were calculated by R language program, gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were carried out, and central genes were screened by STRING database and Cytoscape software. The key genes related to ferroptosis were screened through FerrDb database and gene set enrichment analysis (GSEA). At last, the HERB database and COREMINE database were used to predict the key genes of Chinese medicine, and molecular docking was carried out. **Results:** A total of 143 differentially expressed genes were identified. The enrichment of GO and KEGG mainly concentrated in the inflammatory response pathway. The PPI network was constructed to screen 10 genes such as toll-like receptor 4 (TLR4) as the central gene, and the FerrDb database was used to screen the key gene TLR4. GSEA analysis showed that the high expression of TLR4 was highly enriched in the

[收稿日期] 2022-09-29

[修回日期] 2023-01-06

[基金项目] 深圳市科技创新委员会博士基础启动项目 (20210795132528002); 深圳市宝安区科技计划项目 (20190508095339826)

[作者简介] 欧阳子琛 (1996-), 男, 在读硕士研究生, 规培医师, E-mail: 17674131170@163.com。

[通信作者] 胡敬宝 (1965-), 男, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: rzyjhj@126.com。

concentration of ferroptosis genes. With TLR4 as the target, 8 kinds of Chinese medicines such as Bupleuri Radix and 7 kinds of components were predicted, and the 7 kinds of components could combine with TLR4 stably. **Conclusion:** The related components of Bupleuri Radix and other Chinese medicines may affect the ferroptosis and inflammatory reaction of liver cells by regulating the expression of TLR4 to achieve the effect of treating nonalcoholic steatohepatitis.

Keywords: Nonalcoholic steatohepatitis; Bioinformatics; Differentially expressed genes; Ferroptosis; Chinese medicine

随着中国社会经济的快速发展和生活条件的改善,过去20年以来,非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)的患病率逐年上升^[1],已经超过病毒性肝病成为最常见的肝脏疾病,未来NAFLD以及相关并发症所带来的疾病预防与治疗负担将不断加重,已成为决策者和临床医生的主要关注点。NAFLD按病理改变分类,可分为单纯性脂肪肝(SFL)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)还有非酒精性脂肪性肝炎相关肝硬化。其中NASH是疾病进展的中间环节,NASH患者将会增加进展为肝硬化以及肝细胞癌(HCC)的风险,据统计9.2%的NASH患者有晚期肝纤维化,同时NASH相关的HCC患者的数量正在逐年增加^[2],并且高血压病、2型糖尿病、结直肠癌以及其他代谢相关疾病的发病风险也大大提高,严重威胁人民的健康安全。然而NASH的发病机制并不明确,目前最主要的理论是“二次打击”学说,“一次打击”为胰岛素抵抗和脂质代谢紊乱,“二次打击”为氧化应激和脂质过氧化,随着研究的深入,肠道菌群失调、自噬^[3-4]等学说也开始被广泛提及。目前临床常用的治疗方式主要包括:改变不良生活方式、代谢综合征相关药物治疗、肝脏损伤相关药物治疗,还包括减肥手术、肝移植等手术治疗^[5-6];但是目前药物和手术治疗都存在着成本高、复发率高、风险高等缺点;临床上中医药治疗NASH有着良好效果,并且中医药治疗NASH的机制研究也在不断推进,但机制研究主要体现在抗炎方面,因此从不同角度探讨中医药治疗NASH的机制具有一定的研究价值。

铁死亡是一种以脂质过氧化为特征的铁依赖性非凋亡性细胞死亡,是近年来发现的一种细胞死亡途径。肝脏是铁的主要储存场所之一,许多慢性肝病都具有铁死亡的特征,如铁代谢异常和脂质过氧

化,表明铁死亡与慢性肝病密切相关^[7]。本研究运用生物信息学的方法寻找到正常肝组织和肝炎组织的差异表达基因,同时进一步筛选与铁死亡有关的基因,并进行潜在中药预测。

1 材料与方法

1.1 获取差异基因 通过公开的GEO数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)检索得到基因芯片,获得了人类NASH患者肝组织和正常人肝组织表达数据,将NASH患者的肝组织的表达基因作为NASH组,正常人肝组织的表达基因作为对照组。利用R语言程序的“limma”安装包对基因芯片数据进行归一化处理,将数据进行标准化,以 $|\log_2FC| \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 的临界值作为筛选条件,筛选出差异基因,其中负数代表下调,正数代表上调,并绘制出差异分析结果的火山图及热图。

1.2 功能与通路的富集分析 通过使用R语言程序的“clusterProfiler”对差异基因进行基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析,以获取差异基因的功能和途径,其中GO通路有生物过程(BP)、细胞成分(CC)和分子功能(MF)3个类型,分别展示每个类型的前5条通路和KEGG的前10条通路。

1.3 构建蛋白质互作网络并获取关键基因 将差异基因输入到STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>)构建出差异基因的蛋白质互作网络(PPI),为了避免出现过多游离的节点,在设置中选择隐藏网络中断开的节点。利用Cytoscape3.7.1软件将基因之间的关系可视化,进一步通过Cytoscape软件中cytoHubba插件的马修斯相关系数(MCC)算法计算各差异基因的分值,分值越高则在PPI网络中越关键,筛选出分值最高的前10个基因作为中心基因。

1.4 基因集富集分析(GSEA)与关键基因筛选 为了了解 DEGs 与铁死亡在基因层面的相关性,在 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/legacy/index.html>)获取铁死亡相关基因,将 DEGs 的中心基因与铁死亡相关基因进行交叉,筛选出与铁死亡相关的关键基因。并且使用 GSEA 软件 4.2.3 版本进行 GSEA 富集分析,根据关键基因的表达量将基因芯片样本分为关键基因高表达组和关键基因低表达组,以探讨关键基因和铁死亡之间的整体相关性。在分子特征数据库官网(<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/index.jsp>)下载“WP_FERROPTOSIS 基因集”作为背景,使用默认的加权富集法,随机组合设置为 1 000 次,对 NASH 组和对照组进行铁死亡相关基因的富集分析, $FDR < 0.25$, $NOM\ p\ 值 < 0.05$ 和 $|NES| > 1$ 被认为是显著的富集。

1.5 潜在中药预测 为了获取关键基因的潜在中药,通过 HERB 数据库(<http://herb.ac.cn>)、COREMINE 数据库(<https://coremine.com/medical>)找到与关键基因相关的中药以及相关成分,其中 COREMINE 数据库以 $P < 0.01$ 作为筛选标准,并通过将中药的成分与相关的成分进行匹配,筛选出潜在中药。

1.6 潜在中药成分分子对接 以关键基因作为受体,潜在中药的相关成分作为配体,进行分子对接。在 RCSB PDB 数据库中下载关键基因的 3D 结构,使用 Pymol 软件中去除水分子,去小分子配体等操作,并使用 AutoDock Tools 软件加氢;然后在 PubChem 数据库获取潜在中药相关成分的 2D 结构,并通过 ChemDraw 20.0 软件转化为 3D 结构;最后通过 AutoDock Tools 软件、AutoDock Vina 软件进行分子对接,使用 Pymol 软件将对接结果可视化。其

中对接结果结合强度可通过自由能判断,一般认为小于 $-5.0\ kcal/mol$ 表示有较好的结合活性,小于 $-7.0\ kcal/mol$ 表示有强烈的结合活性。

2 结果

2.1 NASH 的差异基因 见图 1~2。通过在 GEO 数据库检索得到基因芯片(GSE63067),该芯片包含 18 个样本,其中包括 2 个脂肪性变的肝组织 9 个 NASH 患者的肝组织组织和 7 个正常的肝组织。将 9 个 NASH 患者肝组织表达基因作为 NASH 组,7 个正常的肝组织的表达基因作为对照组,利用 R 语言程序的“limmar”安装包对其进行归一化处理,将数据进行标准化,以 $|\log_2FC| \geq 1$ 和 $P < 0.05$ 的临界值作为筛选条件,共得到 143 个差异基因,其中上调基因 105 个,下调基因 38 个。

2.2 GO 与 KEGG 分析 见图 3~4。通过 R 语言程序对差异基因行 GO 和 KEGG 通路进行富集分析。发现富集的主要 KEGG 通路包括细胞因子-细胞因子受体相互作用、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体相互作用、趋化因子信号通路、细胞黏附分子、流体剪切应力与动脉粥样硬化、IL-17 信号通路、NF- κ B 信号通路、TNF 信号通路、HIF-1 信号通路等。富集的主要 GO 通路包括:炎症反应、白细胞迁移、中性粒细胞趋化性、中性粒细胞迁移、粒细胞趋化性、初级溶酶体、免疫受体活性、G 蛋白偶联受体结合、细胞因子活性、趋化因子受体结合。

2.3 PPI 网络构建与中心基因 见图 5。利用 STRING 数据库确定差异基因之间相互作用关系(图 5A),并利用 Cytoscape3.7.1 将作用关系进行可视化(图 5B),该网络有 78 个节点与 165 条边。通过 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件的 MCC 算法计算各

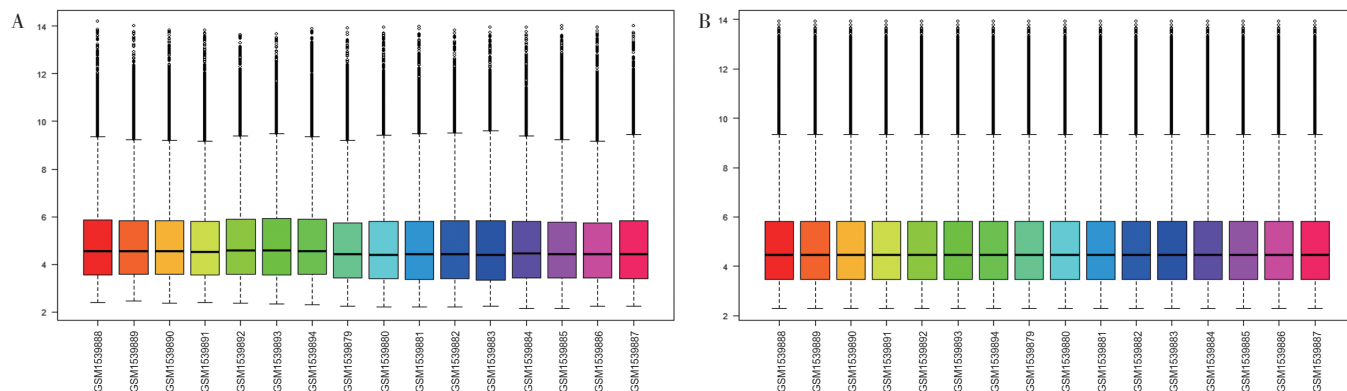


图1 数据标准化前(A)与数据标准化后(B)

差异基因的分数, 将其中分数最高的前 10 个基因作为 DEGs 的中心基因, 分别是 Toll 样受体 4(TLR4)、

ICAM1、CXCL1、SELL、FCGR3B、CCL20、CXCR2、TLR1、FGR、MMDA。

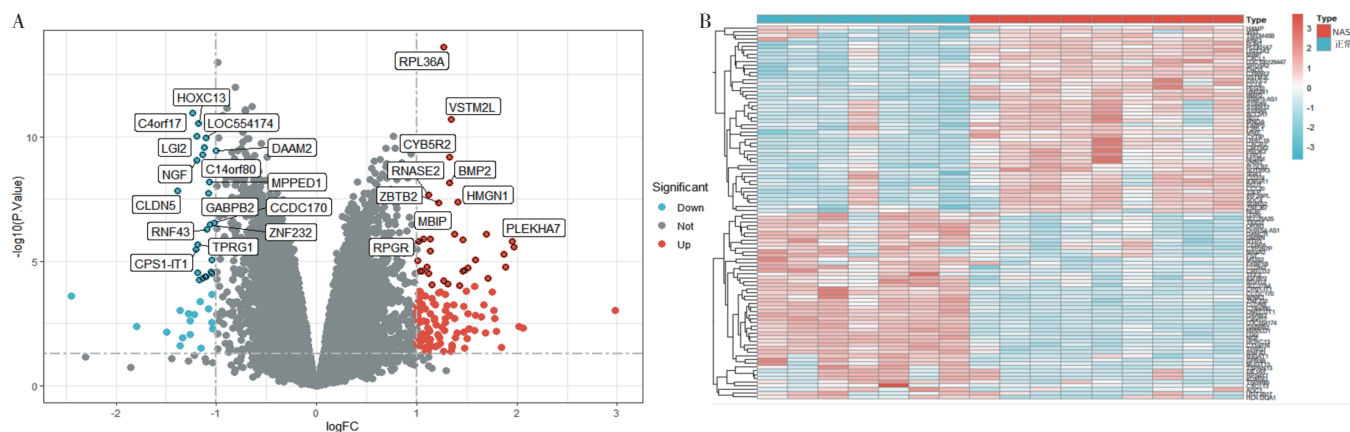


图2 差异基因火山图(A)与差异基因热图(B)

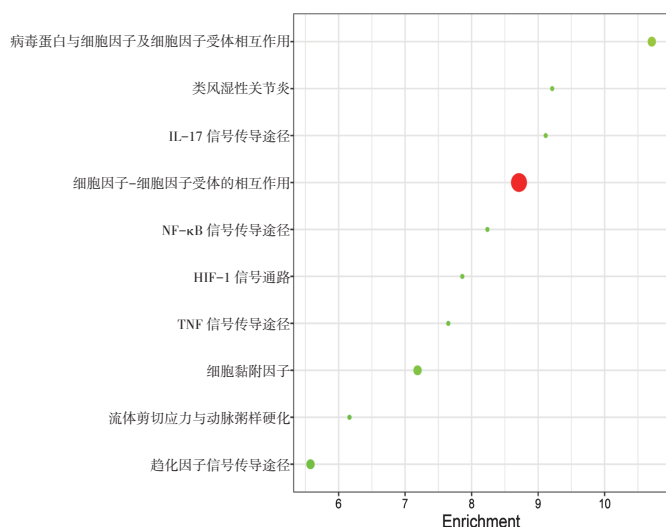


图3 KEGG 通路(前 10 条)

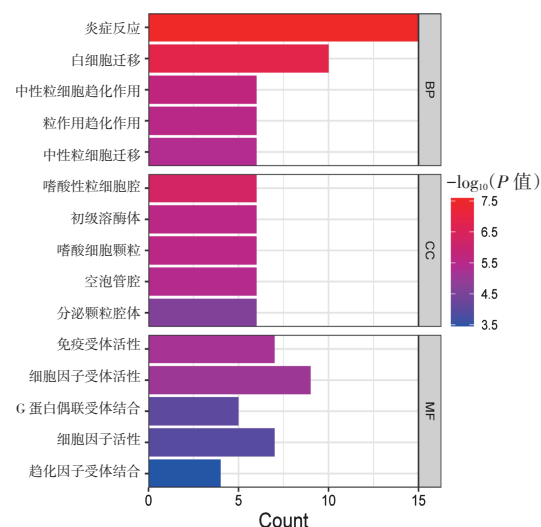


图4 GO 通路(各类型前 5 条)

2.4 关键基因与 GSEA 分析 见图 6。将 10 个中心基因与 173 个铁死亡相关基因用韦恩图取交集, 得出 1 个关键基因: TLR4, 为了进一步了解 TLR4 在 NASH 中表达与铁死亡的相关性, 将基因芯片样本按表达量中位数分为 TLR4 高表达组和 TLR4 低表达组, 以“WP_Ferroptosis 基因集”作为背景, 用 GSEA 软件 4.2.3 版本进行 GSEA 富集分析, 富集结果显示 NES=1.99, FDR<0.01, NOM p<0.01, 提示 TLR4 高表达在铁死亡基因集中高度富集, 说明 TLR4 在 NASH 中表达与铁死亡密切相关。

2.5 潜在中药的预测 通过 HERB 数据库与

COREMINE 数据库共筛选出三棱、丹参、川牛膝等 32 种中药和豆甾醇、丹酚酸 b、白藜芦醇等 17 种成分, 在 HERB 数据库检索这 32 种中药, 获得这 32 种中药的组成成分。将 32 种中药的成分与 17 种 TLR4 相关的成分进行匹配, 发现丹参、柴胡、人参、三棱、黄芩、赤芍、川牛膝、甘草共 8 种中药中包含 TLR4 相关豆甾醇、丹酚酸 b、葛根素、松属素、白藜芦醇、柴胡皂苷 a、薯蓣皂甙共 7 种成分。

2.6 分子对接验证 见图 7、表 1。通过 RCSB PDB 数据库中下载 TLR4 的 3D 结构作为受体, 在 PubChem 数据库获取豆甾醇、丹酚酸 b、白藜芦醇、

柴胡皂苷 a 等成分的 2D 结构, 转化为 3D 结构后作为配体, 使用 AutoDock Tools 软件、AutoDock Vina 软件进行分子对接, 对接结果提示, 豆甾醇、丹酚酸 b、白藜芦醇等成分与 TLR4 均有较好的结合活

性, 其中薯蓣皂苷、柴胡皂苷 a 与 TLR4 有强烈的结合活性, 中药柴胡中所包含豆甾醇、葛根素、柴胡皂苷 a、薯蓣皂苷 4 种成分都具有较高的结合活性。

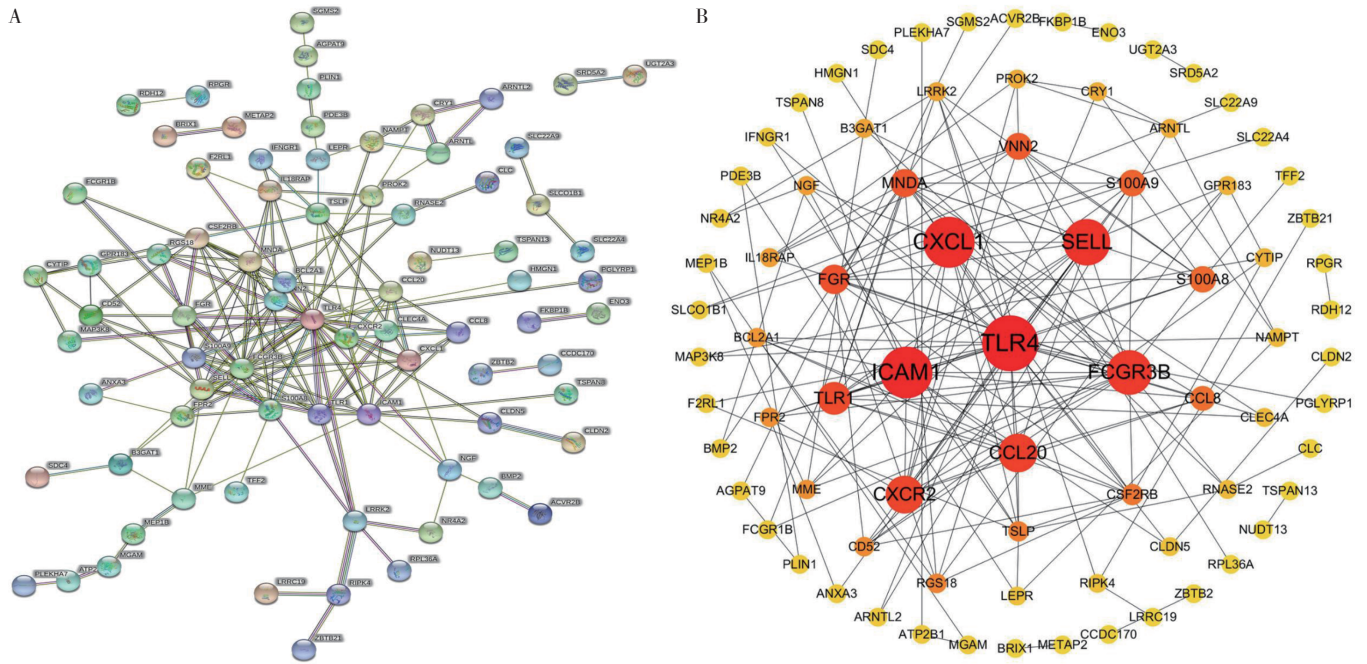


图 5 PPI 网络

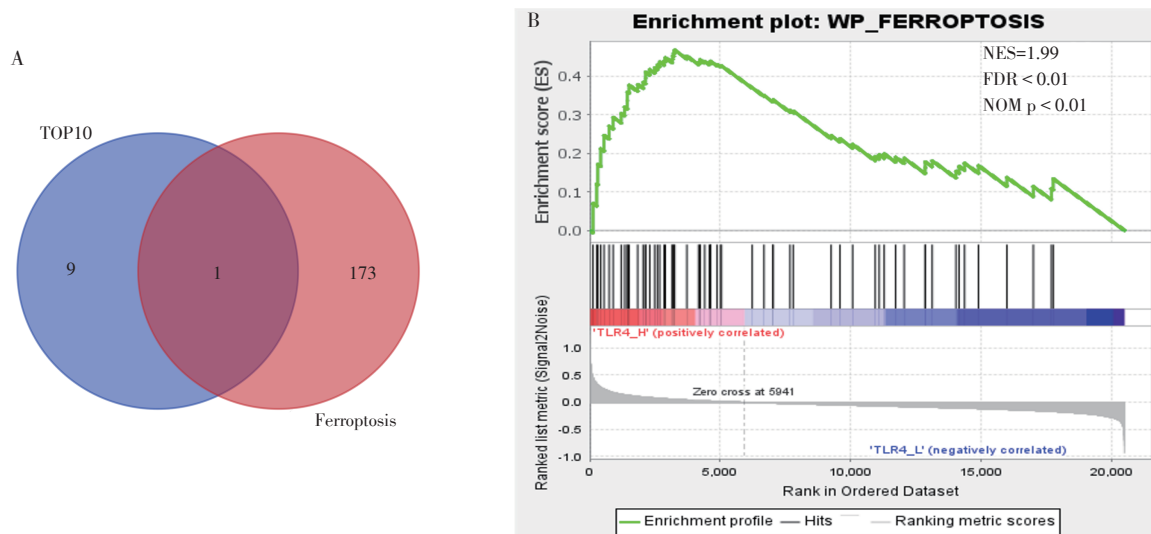


图 6 中心基因与铁死亡相关基因韦恩图(A)与 GSEA 分析结果(B)

3 讨论

NASH 是最常见的肝脏疾病之一, 它的发展与肝纤维化、肝硬化还有 HCC 密切相关, 本研究通过生物信息学的方法进行分析, 发现了关键基因 TLR4;

TLR4 是 NASH 的差异表达基因, 在 PPI 中得分最高, 并存在关键通路 NF- κ B 信号传导途径中, 更让我们关注的是它与铁死亡密切相关。

NASH 中铁死亡的发生主要是通过二价铁或脂

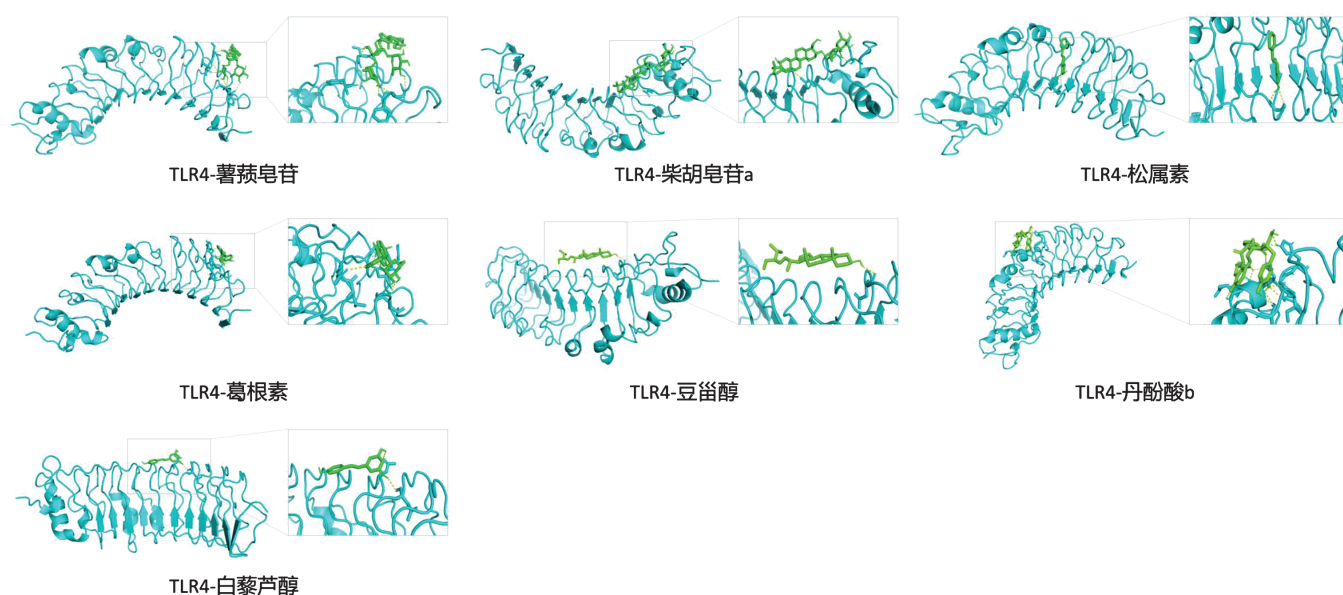


图7 分子对接

表1 分子对接结果

中药	化合物	PubChem ID	结合能(kcal/mol)
三棱、黄芩、赤芍、柴胡、人参	豆甾醇(stigmasterol)	50930798	-6.7
丹参	丹酚酸 b(salvianolic acid b)	92132738	-6.5
川牛膝、柴胡	葛根素(puerarin)	53384442	-6.8
甘草	松属素(pinocembrin)	122581171	-6.9
人参	白藜芦醇(resveratrol)	445154	-5.8
柴胡	柴胡皂苷 a(saikosaponin a)	138114182	-8.1
柴胡	薯蓣皂苷(dioscin)	52931449	-8.5

加氧酶的作用下催化细胞膜上不饱和脂肪酸发生脂质过氧化而引起^[8-9]。Vetuschi A等^[10]的研究发现,NASH模型小鼠体内铁沉积增加,研究结果表明氧化应激与铁积累是小鼠非酒精性脂肪肝的主要特征。Qi J等^[11]发现使用铁死亡抑制剂可抑制肝脏脂质过氧化及其相关的细胞死亡,从而降低NASH的严重程度。Tsurusaki S等^[12]通过对小鼠使用铁死亡抑制剂,结果发现铁死亡抑制,极大的保护肝细胞,并抑制随后的免疫细胞浸润和炎症反应,同时参与铁死亡途径的氧化磷脂酰乙醇胺的量增加。表明铁死亡作为引发脂肪性肝炎炎症的触发因素起着重要作用,并且可能是预防脂肪性肝炎发作的治疗靶点。并且近年来许多研究表明各种生物因子可通过影响铁死亡来改变NASH的进展^[13-15]。

通过将中心基因与铁死亡相关基因取交集得出了关键基因TLR4,并且用GSEA分析验证了TLR4

高表达在铁死亡基因集中高度富集,说明TLR4在NASH中表达与铁死亡密切相关。TLR4是存在于革兰氏阴性菌上的脂多糖(LPS)的特异性受体。Wang F等^[16]的研究表明,通过抑制TLR4,能够显著改善小鼠的NASH症状,有直接的抗炎作用,还能够抑制肝纤维化、肝脂质沉积以及减少肝细胞凋亡和循环炎症性细胞因子、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和胆固醇,对肝细胞癌有潜在的治疗作用。Wu J等^[17]的研究同样表明通过抑制肝脏TLR4/NF- κ B通路可以减轻炎症和肝脏脂质积累,达到治疗NASH的作用。其中TLR4与炎症反应中铁死亡的调节密切相关,Lv B等^[18]的研究表明TLR4的激活能够诱导铁死亡,增强铁死亡相关基因的表达,而抑制TLR4可以缓解氧化应激和线粒体损伤,抑制铁死亡。Feng R等^[19]的实验也同样证明TLR4在铁死亡和氧化应激中起重要作用。通过抑制TLR4的表达可降低氧化应激和铁

死亡。

通过 TLR4 我们找到了与之相关的常见中药与成分,并将其进行匹配,获得了柴胡等 8 种中药和 7 种成分。分子对接结果提示,薯蓣皂苷与 TLR4 结合最为稳定,许多研究表明薯蓣皂苷通过改善细胞凋亡、氧化应激和炎症表现出对急性肝损伤的保护作用^[20-21],并且薯蓣皂苷可通过抑制 TLR4 的表达减弱肝星状细胞活化来减轻酒精性肝纤维化^[22]。更令我们关注的是针对 LPS 诱导的炎症性肝损伤,薯蓣皂苷不仅能显著降低血清 ALT、AST 水平,还能恢复 LPS 引起的细胞损伤,在这个过程中薯蓣皂苷也降低了 TLR4 过表达,有效抑制 TLR4 信号转导通路,显著降低细胞核中的 TLR4、骨髓分化初级反应基因 88 (MyD88)、p-IKK β 、p-p65 和 NF- κ B p65 水平及减少后续炎症介质的分泌^[23-25]。柴胡皂苷 a 同样与 TLR4 具有强烈的结合活性,柴胡皂苷 a 的抗炎作用与激活肝 X 受体 α (LXR α) 依赖的胆固醇流出途径有关^[26],它可通过消耗胆固醇和减少 TLR4 向脂筏的易位和 TLR4 的寡聚化来破坏脂筏,从而减弱 LPS 介导的氧化和炎症反应^[27]。并且柴胡皂苷 a 显著下调缺血再灌注大鼠模型脑中 TLR4 和 NF- κ B 的蛋白表达水平,能够抑制相关炎症反应。丹酚酸 b 同样能够抑制炎症反应中 TLR4 的表达^[28-29],同时丹酚酸 b 具有抗肥胖活性,可能通过调节肥胖小鼠的肠道微生物群丰度和 TLR4 信号通路来减轻体质量增加和胰岛素抵抗,这表明可能是一种很有前途的预防肥胖的候选药物^[30]。豆甾醇^[31-32]可以减轻炎症,同时可降低血浆胆固醇水平,抑制肠道胆固醇的吸收,对 NAFLD 有治疗作用。葛根素^[33]、松属素^[34]和白藜芦醇^[35]都能通过抑制 TLR4 的表达以发挥抗炎作用。

在这项研究中我们通过生物信息学、分子对接等方法,发现 NASH 中与铁死亡相关的关键基因 TLR4,并进一步发掘了潜在中药及成分,研究结果表明柴胡等中药及相关成分可能通过调控 TLR4 的表达,影响肝脏细胞的铁死亡和炎症反应达到治疗 NASH 的作用。总之,本研究利用生物信息学分析来识别 NASH 铁死亡相关的关键基因,并进一步预测相关作用的中药,为 NASH 的治疗提供新的靶点,也为中医药治疗 NASH 机制的研究提供了新的思路 and 理论依据。

[参考文献]

- [1] 吴挺丰,廖献花,钟碧慧. 中国部分地区非酒精性脂肪肝病的流行情况[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(6): 1370-1373.
- [2] ZOU H, GE Y, LEI Q, et al. Epidemiology and disease burden of non-alcoholic steatohepatitis in greater China: a systematic review[J]. Hepatol Int, 2022, 16(1): 27-37.
- [3] PAFILI K, RODEN M. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) from pathogenesis to treatment concepts in humans[J]. Mol Metab, 2021, 50: 101122.
- [4] ZHOU J, SINHA R A, YEN P M. The roles of autophagy and thyroid hormone in the pathogenesis and treatment of NAFLD[J]. Hepatoma Res, 2021, 7: 72.
- [5] ZHANG C, YANG M. Current Options and Future Directions for NAFLD and NASH Treatment[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(14): 7571.
- [6] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(5): 947-957.
- [7] ZHOU X, FU Y, LIU W, et al. Ferroptosis in Chronic Liver Diseases: Opportunities and Challenges[J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 928321.
- [8] MAGUSTO J, MAJDI A, GAUTHERON J. Cell death mechanisms in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Biol Aujourd'hui, 2020, 214(1-2): 1-13.
- [9] SHOJAIE L, IORGA A, DARA L. Cell Death in Liver Diseases: A Review[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(24): 9682.
- [10] VETUSCHI A, CAPPARIELLO A, ONORI P, et al. Ferroptosis resistance cooperates with cellular senescence in the overt stage of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis[J]. Eur J Histochem, 2022, 66(3): 3391.
- [11] QI J, KIM J W, ZHOU Z, et al. Ferroptosis Affects the Progression of Nonalcoholic Steatohepatitis via the Modulation of Lipid Peroxidation-Mediated Cell Death in Mice[J]. Am J Pathol, 2020, 190(1): 68-81.
- [12] TSURUSAKI S, TSUCHIYA Y, KOUMURA T, et al. Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 449.
- [13] LU D, XIA Q, YANG Z, et al. ENO3 promoted the progression of NASH by negatively regulating ferroptosis via elevation of GPX4 expression and lipid accumulation[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(8): 661.
- [14] LIU B, YI W, MAO X, et al. Enoyl coenzyme A hydratase 1 alleviates nonalcoholic steatohepatitis in mice by suppressing hepatic ferroptosis[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2021, 320(5): E925-E937.
- [15] WANG X, MA B, WEN X, et al. Bone morphogenetic protein 4 alleviates nonalcoholic steatohepatitis by inhibiting hepatic

- ferroptosis[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 234.
- [16] WANG F, STAPPENBECK F, TANG L Y, et al. Oxy210, a Semi-Synthetic Oxysterol, Exerts Anti-Inflammatory Effects in Macrophages via Inhibition of Toll-like Receptor (TLR) 4 and TLR2 Signaling and Modulation of Macrophage Polarization[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(10): 5478.
- [17] WU J, CHEN P, JU L, et al. Corydalis saxicola Bunting Total Alkaloids ameliorate diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by regulating hepatic PI3K/Akt and TLR4/NF- κ B pathways in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113132.
- [18] LV B, SHEN N, CHENG Z, et al. Strategies for Biomaterial-Based Spinal Cord Injury Repair via the TLR4-NF- κ B Signaling Pathway[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021, 9: 813169.
- [19] FENG R, XIONG Y, LEI Y, et al. Lysine-specific demethylase 1 aggravated oxidative stress and ferroptosis induced by renal ischemia and reperfusion injury through activation of TLR4/NOX4 pathway in mice[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26: 4254-4267.
- [20] ZHENG L, YIN L, XU L, et al. Protective effect of dioscin against thioacetamide-induced acute liver injury via FXR/AMPK signaling pathway in vivo[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 481-488.
- [21] ZHANG W, YIN L, TAO X, et al. Dioscin alleviates dimethylnitrosamine-induced acute liver injury through regulating apoptosis, oxidative stress and inflammation[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45: 193-201.
- [22] LIU M, XU Y, HAN X, et al. Dioscin alleviates alcoholic liver fibrosis by attenuating hepatic stellate cell activation via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 18038.
- [23] JIN S, GUAN T, WANG S, et al. Dioscin Alleviates Cisplatin-Induced Mucositis in Rats by Modulating Gut Microbiota, Enhancing Intestinal Barrier Function and Attenuating TLR4/NF- κ B Signaling Cascade[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(8): 4431.
- [24] HAN J, SHI G, LI W, et al. Preventive effect of dioscin against monosodium urate-mediated gouty arthritis through inhibiting inflammasome NLRP3 and TLR4/NF- κ B signaling pathway activation: an in vivo and in vitro study[J]. *J Nat Med*, 2021, 75(1): 37-47.
- [25] YAO H, HU C, YIN L, et al. Dioscin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory liver injury via regulating TLR4/MyD88 signal pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 36: 132-141.
- [26] WEI Z, WANG J, SHI M, et al. Saikosaponin a inhibits LPS-induced inflammatory response by inducing liver X receptor alpha activation in primary mouse macrophages[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31): 48995-49007.
- [27] FU Y, HU X, CAO Y, et al. Saikosaponin a inhibits lipopolysaccharide-oxidative stress and inflammation in Human umbilical vein endothelial cells via preventing TLR4 translocation into lipid rafts[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 89: 777-785.
- [28] WANG J, ZHANG Y, GUO L L, et al. Salvianolic acid B inhibits the TLR4-NF κ B-TNF α pathway and attenuates neonatal rat cardiomyocyte injury induced by lipopolysaccharide[J]. *Chin J Integr Med*, 2011, 17(10): 775-779.
- [29] WANG Y, CHEN G, YU X, et al. Salvianolic Acid B Ameliorates Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury Through Inhibiting TLR4/MyD88 Signaling Pathway[J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1503-1513.
- [30] LI L, LI R, ZHU R, et al. Salvianolic acid B prevents body weight gain and regulates gut microbiota and LPS/TLR4 signaling pathway in high-fat diet-induced obese mice[J]. *Food Funct*, 2020, 11(10): 8743-8756.
- [31] FRASINARIU O, SERBAN R, TRANDAFIR L M, et al. The Role of Phytosterols in Nonalcoholic Fatty Liver Disease[J]. *Nutrients*, 2022, 14(11): 2187.
- [32] BATT A K, XU G, HONDA A, et al. Stigmasterol reduces plasma cholesterol levels and inhibits hepatic synthesis and intestinal absorption in the rat[J]. *Metabolism*, 2006, 55(3): 292-299.
- [33] XU W, TANG M, WANG J, et al. Anti-inflammatory activities of puerarin in high-fat diet-fed rats with streptozotocin-induced gestational diabetes mellitus[J]. *Mol Biol Rep*, 2020, 47(10): 7537-7546.
- [34] YUE B, REN J, YU Z, et al. Pinocembrin alleviates ulcerative colitis in mice via regulating gut microbiota, suppressing TLR4/MD2/NF- κ B pathway and promoting intestinal barrier[J]. *Biosci Rep*, 2020, 40(7): 1-21.
- [35] TONG W, CHEN X, SONG X, et al. Resveratrol inhibits LPS-induced inflammation through suppressing the signaling cascades of TLR4-NF- κ B/MAPKs/IRF3[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1824-1834.

(责任编辑: 吴凌, 李海霞)