

基于网络药理学及细胞实验探讨菊苣酸改善肝脏炎症的作用

蔡维维，王瑜彤，侯 豹，朱雪雪，文嫒媛，邱丽颖，孙海建*
(江南大学无锡医学院，江苏 无锡 214122)

摘要：目的 基于网络药理学预测菊苣酸改善肝脏炎症的作用并进行实验验证。方法 采用 PubChem、SwissTargetPrediction 数据库获得菊苣酸的潜在作用靶点；采用 GeneCards 数据库检索肝脏炎症相关的疾病靶点；将菊苣酸与肝脏炎症交集靶点进行基因本体（GO）富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路分析；利用 STRING 数据库和 Cytoscape 3. 10. 0 软件构建共同靶点蛋白相互作用（PPI）网络，取度值前十的核心靶点进行分子对接并可视化处理。通过构建 LPS 诱导 HepG2 细胞炎症模型，考察菊苣酸的抗炎作用以及对关键通路和靶点表达的影响。**结果** 网络药理学分析表明，菊苣酸和肝脏炎症共有靶点 77 个，菊苣酸改善肝脏炎症潜在核心靶点为 TNF、EGFR、MMP9、IL2、CASP3、TLR4、ESR1、ERBB2、MMP2、JUNPPI，并且可能与氧化应激相关的炎症信号通路相关；分子对接结果显示，菊苣酸与 TLR4、ESR1、MMP2 具有较好的结合活性。细胞实验结果表明，菊苣酸可通过调节 TLR4/NF-κB 通路，减少 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的分泌以及细胞内 ROS、超氧化物以及 Fe²⁺ 的积累，提高线粒体膜电位及 GPX4 蛋白的表达，改善 LPS 诱导的细胞炎症反应。**结论** 菊苣酸能改善 LPS 诱导的 HepG2 细胞炎症，其作用机制可能是通过调节 TLR4/NF-κB 通路，抑制炎症因子的表达，从而起到改善肝脏炎症的作用。
关键词：菊苣酸；肝脏炎症；网络药理学；分子对接；铁死亡；炎症因子；TLR4/NF-κB 通路；氧化应激
中图分类号：R285. 5；R966 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2025)12-4173-09
doi:10. 3969/j. issn. 1001-1528. 2025. 12. 046

肝脏作为人体最大的代谢器官，承担着解毒、营养合成、能量代谢等核心功能。然而，近年来随着人们生活习惯的改变以及各种环境因素的复杂化，肝脏疾病发生率显著上升，已经发展成为一个需要高度重视的公共卫生问题^[1-2]。肝脏炎症是多种急慢性肝病的核心病理过程，其发生机制涉及免疫细胞激活、细胞因子释放及氧化应激反应^[3-5]。全球疾病负担研究（global burden of disease study，GBD）显示，2020 年全球约 20% 肝病相关死亡归因于病毒性肝炎诱导的慢性炎症，而酒精性肝病和非酒精性脂肪性肝炎分别贡献了 15% 和 12% 的肝硬化病例^[6]。

菊苣酸（chicoric acid，CA）是一种天然的水溶性酚酸类化合物，主要以左旋型菊苣酸（L-CA）居多^[7]。现代药理学研究表明，菊苣酸作为一种天然产物，具有抗氧化、抗炎与免疫调节、降糖与代谢调节等多种药理活性^[8-10]。网络药理学作为一种整合系统生物学与多向药理学研究策略，为揭示单体化合物与疾病靶点间的复杂关联提供了系统性框架^[11-12]。本研究借助网络药理学，探究菊苣酸改善肝脏炎症的作用靶点，并通过细胞实验对预测机制进行验证。

1 材料

1.1 细胞株

HepG2 为人肝癌细胞株，购自普诺赛生命科

技有限公司。

1.2 药物与试剂

菊苣酸（批号 HY-N0457，美国 MCE 公司）。脂多糖（LPS，纯度 ≥99%）、超氧阴离子活性氧检测试剂盒（DHE）、线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）、线粒体超氧化物检测试剂盒（MitoSox Red）、CCK8 试剂盒（批号 HY-D1056、HY-D0079、HY-15534、HY-D1055、HY-K0301，美国 MCE 公司）；胎牛血清、DMEM 培养基（批号 SH30071. 03、SH30022，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；DAPI、Hoechst33342（货号 D9542、14533，德国 Merck 公司）；Fe²⁺ 检测探针（FerroOrange）试剂盒 [批号 F374，东仁化学科技（上海）有限公司]；IL-1β、TNF-α、IL-6 试剂盒（批号 H002-1-2、H052-1-2、H007-1-2，南京建成生物工程研究所有限公司）；核因子-κB p65（NF-κB p65）、磷酸化 NF-κB p65（p-NF-κB p65）、Toll 样受体 4（TLR4）、谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）抗体（批号 10745-1-AP、82335-1-RR、19811-1-AP、30388-1-AP，武汉三鹰生物技术有限公司）；辣根过氧化物酶（HRP）标记的山羊抗兔二抗（批号 ab6721，英国 Abcam 公司）。

1.3 仪器

Synergy H4 多功能微孔板检测仪（美国 BioTek 公司）；ME3002E 精密电子天平（瑞士梅特勒托利多公

收稿日期：2025-03-03
基金项目：国家自然科学基金项目（81700364，82170424，82300414，82370364）；无锡市软科学研究课题（KX-24-C009，KX-24-C160）；藏医药“十四五”规划内涵建设三期项目（2023zyygh04）
作者简介：蔡维维（1988—），女，硕士，实验师，从事天然产物研究与开发。Tel：15861445252，E-mail：caiweiwei@jiangnan. edu. cn
* 通信作者：孙海建（1989—），男，博士，教授，从事代谢性和炎症性疾病靶器官损伤和药物干预研究。Tel：13485047310，E-mail：sunhaijian927@ 163. com

司); Sorvall ST16R 冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Axio VertA1 蔡司倒置荧光显微镜 (德国 Zeiss 公司); LightCycler 480 II 全自动荧光定量 PCR 系统 (美国 Roche 公司); AX-SHS 超分辨激光共聚焦显微镜 (日本 Nikon 公司); Tanon-5200Multi 全自动化学发光分析仪 (上海天能生命科学有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析 运用 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 获取菊苣酸的预测靶点蛋白和基因名称。以“liver inflammation”为检索关键词, 使用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 获取肝脏炎症的相关靶点。随后, 通过 Draw Venn 软件分析菊苣酸潜在靶点与疾病靶点, 获得两者的交集靶点。然后, 运用 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 和 Cytoscape 3. 10. 0 软件分析并绘制 PPI 网络图。最后, 运用 Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) 对交集靶点进行 GO 功能分析和 KEGG 信号通路富集分析, 并借助微生信-在线生物信息分析平台对 GO 和 KEGG 结果进行可视化分析。

2.2 分子对接 筛选出 PPI 中 Degree 值前 10 位的潜在靶点, 运用 Discovery Studio 2020 版软件筛选出与菊苣酸有较高对接分数的靶点。随后利用 Autodock Vina 软件进行结合能分析, 对小分子和蛋白进行预处理, 活性位点为整个蛋白, 采用遗传算法进行构象采样和打分, 根据对接得分进行构象排序挑选最优构象进行结合模式分析。最后, 利用 PyMol 软件 (Version 3. 0. 3) 进行结果分析与绘图操作。

2.3 细胞培养 将 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 完全培养基中, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞融合度达到 80% 时进行传代及后续实验。

2.4 CCK8 检测细胞活力 将 HepG2 细胞按 8×10³ 个/孔的密度均匀接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 换成含不同浓度菊苣酸溶液 (0、5、10、20、50、100、200 μmol/L) 的新鲜培养基, 继续在培养箱中培养 24 h。随后, 换成含 10% CCK8 的新鲜培养基, 37 ℃避光孵育 30 min, 检测 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值, 计算细胞存活率。

同法铺板, 培养 24 h 后, 换成含不同浓度菊苣酸溶液 (0、5、10、20、50、100、200 μmol/L) 的新鲜培养基预培养 1 h, 随后每孔加入 LPS (给药质量终浓度为 5 μg/mL), 培养 24 h 后检测各组 OD 值, 计算细胞存活率。

2.5 DHE 染色检测 HepG2 细胞内 ROS 水平 将 HepG2 细胞以每孔 2×10⁵ 个的密度接种于 12 孔板中, 分为对照组、模型组 (5 μg/mL LPS, LPS 组) 和菊苣酸低、中、高剂量组 (5 μg/mL LPS 和 10、20、50 μmol/L 菊苣酸, LPS+CA-L、LPS+CA-M、LPS+CA-H 组)。待细胞贴壁后, 加入对应浓度的菊苣酸作用 1 h, 再加入 5 μg/mL LPS 作用 24 h。吸去上清培养基, 用 PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 DHE 染料 (1

: 1 000 无血清培养基稀释) 1 mL, 37 ℃避光孵育 30 min。再用 PBS 洗涤 3 次, 每孔加入 Hoechst33342 溶液, 37 ℃避光孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察各组细胞内的红色荧光强度。

2.6 JC-1 染色检测 HepG2 细胞膜电位变化 细胞分组处理同“2.5”项。弃去培养基, PBS 洗涤, 每孔中加入含 1 mg/L JC-1 的新鲜培养基 500 μL, 37 ℃避光培养 30 min, PBS 洗涤后, 于荧光显微镜下观察荧光强度。

2.7 MitoSOX Red 染色检测 HepG2 细胞线粒体中超氧化物含量变化 细胞分组处理同“2.5”项。PBS 洗涤 3 次, 每孔中加入含 1 μmol/L MitoSOX Red 染料的新鲜培养基 500 μL, 37 ℃避光培养 30 min, PBS 洗涤 3 次, 最后每孔中加入 DAPI 溶液, 37 ℃避光培养 10 min, PBS 洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察荧光强度。

2.8 FerroOrange 染色检测 HepG2 细胞中 Fe²⁺ 变化 细胞分组处理同“2.5”项。使用 FerroOrange 试剂盒检测各组细胞中游离 Fe²⁺, 于荧光显微镜下观察各组荧光强度。

2.9 ELISA 法检测细胞上清液 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平 细胞分组处理同“2.5”项。收集干预后的细胞培养液, 1 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 严格按照试剂盒说明书步骤操作, 检测细胞上清液 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平。

2.10 RT-qPCR 检测细胞 *GPX4*、*IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α* mRNA 表达 细胞分组处理同“2.5”项。收集各组细胞, 使用 TRIzol 试剂提取各组总 RNA 并逆转录成 cDNA 后, 用 SYBR Green 试剂盒进行荧光定量 PCR 检测, 采用 2^{-ΔΔCT} 法计算目的基因 *GPX4*、*IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α* mRNA 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'→3')
<i>TNF-α</i>	正向 CCCGACTATCTCGACTTTGC
	反向 GGTGAGGGTGTCTGAAGGA
<i>IL-1β</i>	正向 CGAATCTCCGACCACCACTA
	反向 CACATAAGCCTCGTTATCCC
<i>IL-6</i>	正向 CCACTACCCCCAGGAGAAGA
	反向 AGCTCTGGCTTGTTCTTCAC
<i>GPX4</i>	正向 CGCCAAAGTCTCCTAGGAACG
	反向 TATCGGCATGCAGATCGAC
<i>β-actin</i>	正向 CATGGAGTCTGTGGCATCC
	反向 CTCCTTCTGCATCCTGTCGG

2.11 激光共聚焦显微镜检测 NF-κB p65 蛋白表达情况 细胞接种于共聚焦小皿中, 分为对照组、LPS 组和菊苣酸 (50 μmol/L CA) 组。造模结束后, 加入 500 μL 4% 多聚甲醛固定液固定 30 min, 加入 0. 2% Triton-100X 室温孵育 15 min, 加入 5% BSA 溶液室温孵育 1 h, 滴加 NF-κB p65 抗体, 于 4 ℃冰箱中孵育过夜; 次日滴加荧光二抗室温孵育 1 h, 每孔中加入 DAPI 溶液 37 ℃避光孵育 10 min, PBS 清洗后使用共聚焦显微镜进行拍照。

2.12 Western blot 法检测细胞 *GPX4*、*TLR4* 和 p-NF-κB p65 蛋白表达 细胞分组处理同“2.5”项。收集各组细胞, 加 RIPA 裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 测定并调整

蛋白浓度。然后进行蛋白变性，电泳、转膜、封闭、孵育一抗过夜，随后在室温下孵育对应的二抗 2 h，最后显影，并使用 Image J 软件对目的蛋白进行分析。

2.13 统计学分析 通过 GraphPad Prism 10.3 软件进行处理，计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两组间比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 菊苣酸与肝脏炎症潜在核心靶点的筛选 筛选得到菊苣酸潜在作用靶点有 100 个，通过 GeneCards 数据库收集得到肝脏炎症潜在作用靶点 11 254 个，以“relevance score”为筛选目标，通过中位数进行一步筛选，获得 5 735 个靶点作为疾病特异性靶点。将药物靶点与疾病靶点进行合集分析，共获得 77 个交集靶点，见图 1，并构建“菊苣酸-肝脏炎症-靶点”PPI 网络图，见图 2。采用 Cytoscape 对共同

靶点进行 PPI 网络的构建，见图 3，按 Degree 值排列，获得前 10 位潜在靶点为肿瘤坏死因子（TNF）、内皮细胞生长因子受体（EGFR）、基质金属肽酶 9（MMP9）、白细胞介素 2（IL2）、半胱氨酸蛋白酶-3（CASP3）、Toll 样受体 4（TLR4）、雌激素受体 1（ESR1）等。

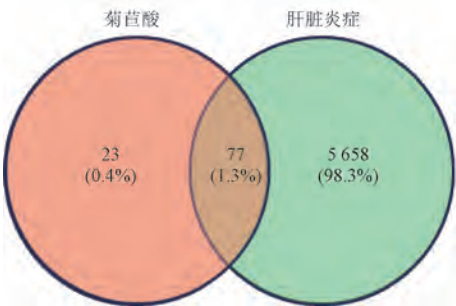


图 1 菊苣酸与肝脏炎症靶点交集 Venn 图

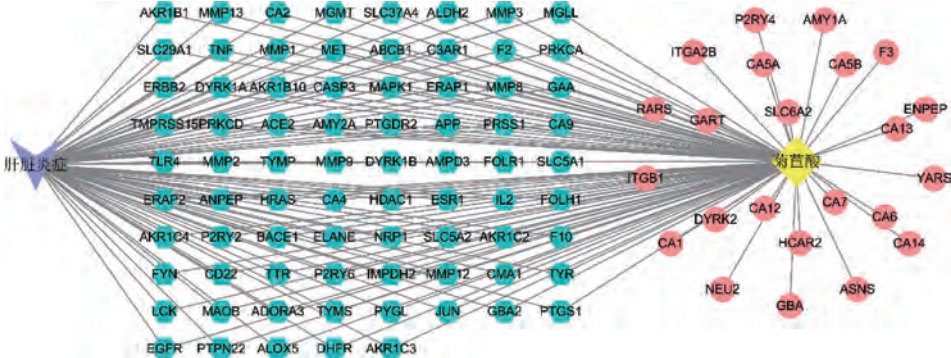


图 2 “菊苣酸-靶点-肝脏炎症”网络图

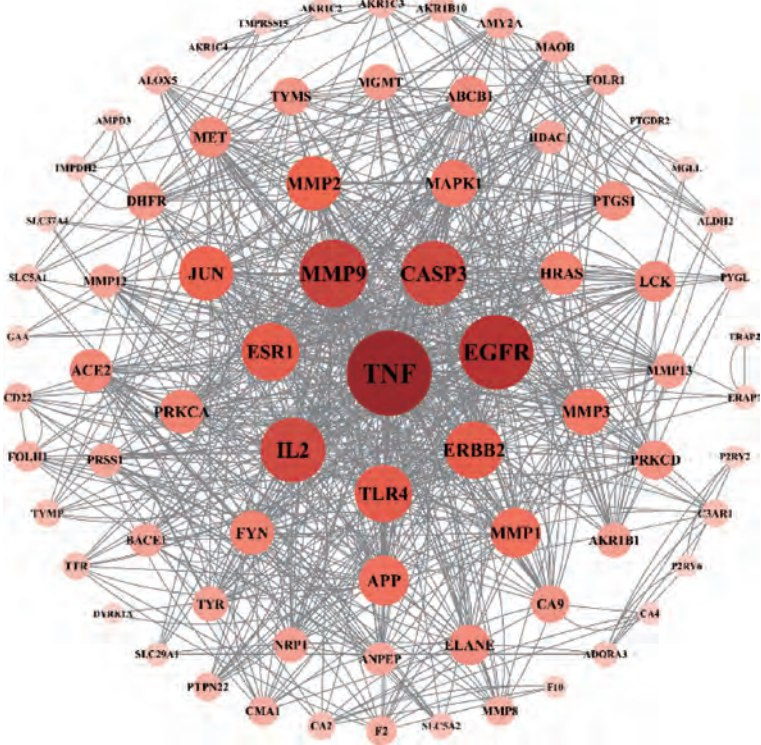


图 3 菊苣酸与肝脏炎症作用靶点 PPI 图

3.2 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 对菊苣酸与肝脏炎症的交集靶点进行 GO 功能富集分析，筛选出相关性最高的前 10 条反应过程，见图 4，分子功能（MF）主要包括内肽酶活性、酰胺结合、蛋白酪氨酸激酶活性、羧ylic 酸结合、信号受体激活剂活性等方面；生物过程（BP）主要包括炎症反应的调节、循环系统过程、对激素的反应、细胞对脂

质的反应、对创伤的反应、细胞活化的调控、免疫反应的正向调节、活性氧代谢过程的调控等方面；细胞组成（CC）主要包括细胞质核周区、囊泡腔、细胞顶端、细胞外基质等方面。同时，KEGG 通路富集分析筛选出 17 条信号通路，见图 5，主要包括化学致癌作用-活性氧、抗氧化性、叶酸合成等通路。

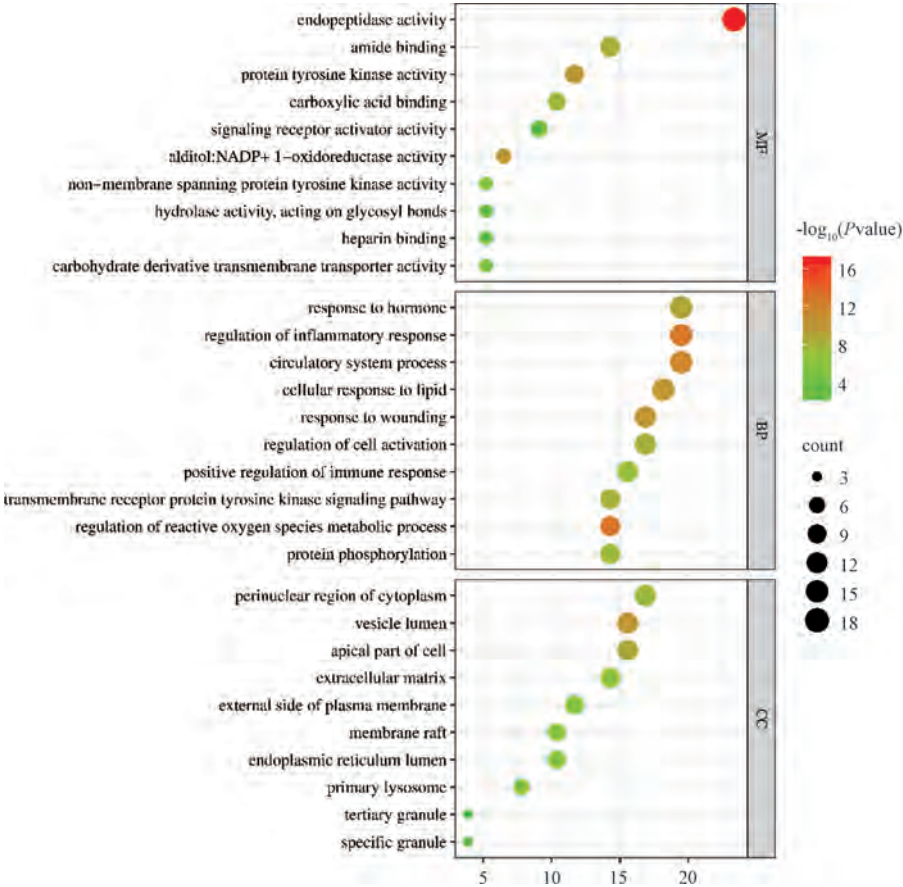


图 4 GO 功能富集分析（前 10 条）

3.3 分子对接 将“3.1”项筛选到的前 10 位靶点与菊苣酸分别进行分子对接，运用 Autodock Vina 软件分析结合能，结合能<-5 kcal/mol 说明蛋白可与活性成分自发结合，稳定性较好，得到 3 个结合能较低的靶点为 TLR4、MMP2、ESR1，见图 6。

3.4 菊苣酸作用浓度筛选 如图 7A 所示，0~200 μmol/L 菊苣酸对 HepG2 细胞活性无明显影响（ $P>0.05$ ），说明在此浓度范围内未表现出明显细胞毒性。如图 7B 所示，与对照组比较，LPS 具有诱导细胞增殖的作用（ $P<0.01$ ）；与 LPS 组比较，5~200 μmol/L（除 100 μmol/L 外）菊苣酸均可以逆转 LPS 的促增殖作用（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ）。因此，选用 10、20、50 μmol/L 作为后续实验剂量。

3.5 菊苣酸对 LPS 诱导的 HepG2 细胞氧化应激反应的影响 如图 8 所示，与对照组比较，LPS 组细胞内 ROS 表达和超氧化物的累积（MitoSox Red 染色）均增加（ $P<0.01$ ），线粒体膜电位（JC-1 染色）降低（ $P<0.01$ ）；与 LPS 组比较，菊苣酸各剂量组细胞内 ROS 表达和超氧化物

的累积均减少（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），线粒体膜电位升高（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），提示菊苣酸可以提高 HepG2 细胞的抗氧化能力。

3.6 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞内游离 Fe^{2+} 的影响 如图 9 所示，与对照组比较，LPS 组细胞内游离 Fe^{2+} 积累增加（ $P<0.01$ ）；与 LPS 组比较，菊苣酸各剂量组细胞质内 Fe^{2+} 的积累减少（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），表明细胞对铁死亡的敏感性降低。

3.7 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞上清液 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平的影响 如图 10 所示，与对照组比较，LPS 组细胞上清液中 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均升高（ $P<0.01$ ）；与 LPS 组比较，菊苣酸中、高剂量组细胞上清液中 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平均降低（ $P<0.05$ ， $P<0.01$ ），菊苣酸低剂量组细胞上清液中 IL-6、TNF-α 水平降低（ $P<0.05$ ）。

3.8 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞 *GPX4*、*IL-6*、*IL-1β*、*TNF-α* mRNA 表达的影响 如图 11 所示，与对照组比较，LPS 组细胞 *GPX4* mRNA 表达降低（ $P<0.01$ ），*IL-6*、*IL-1β*、

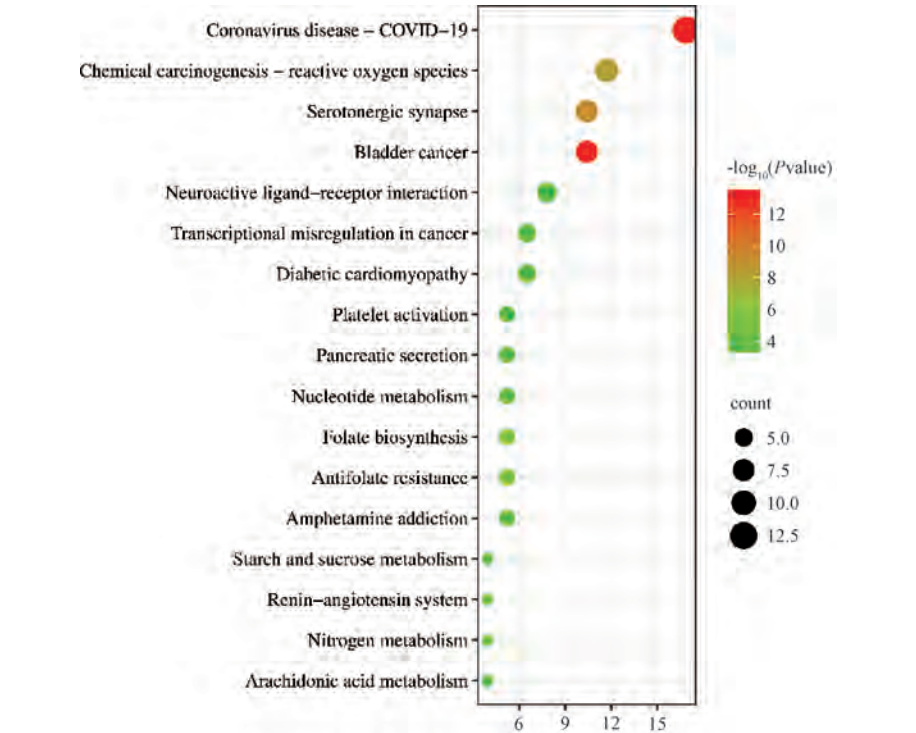
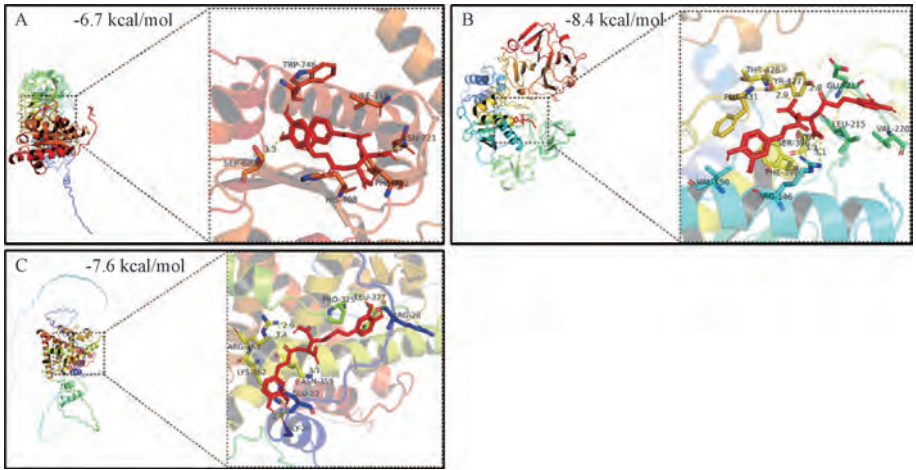
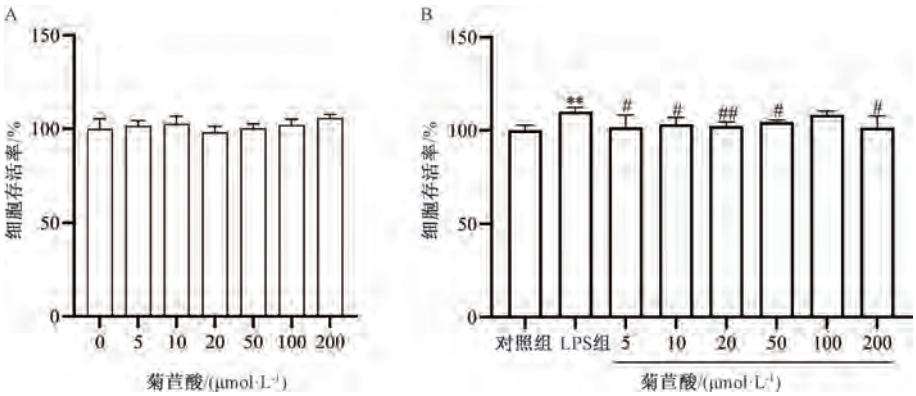


图 5 KEGG 功能富集分析



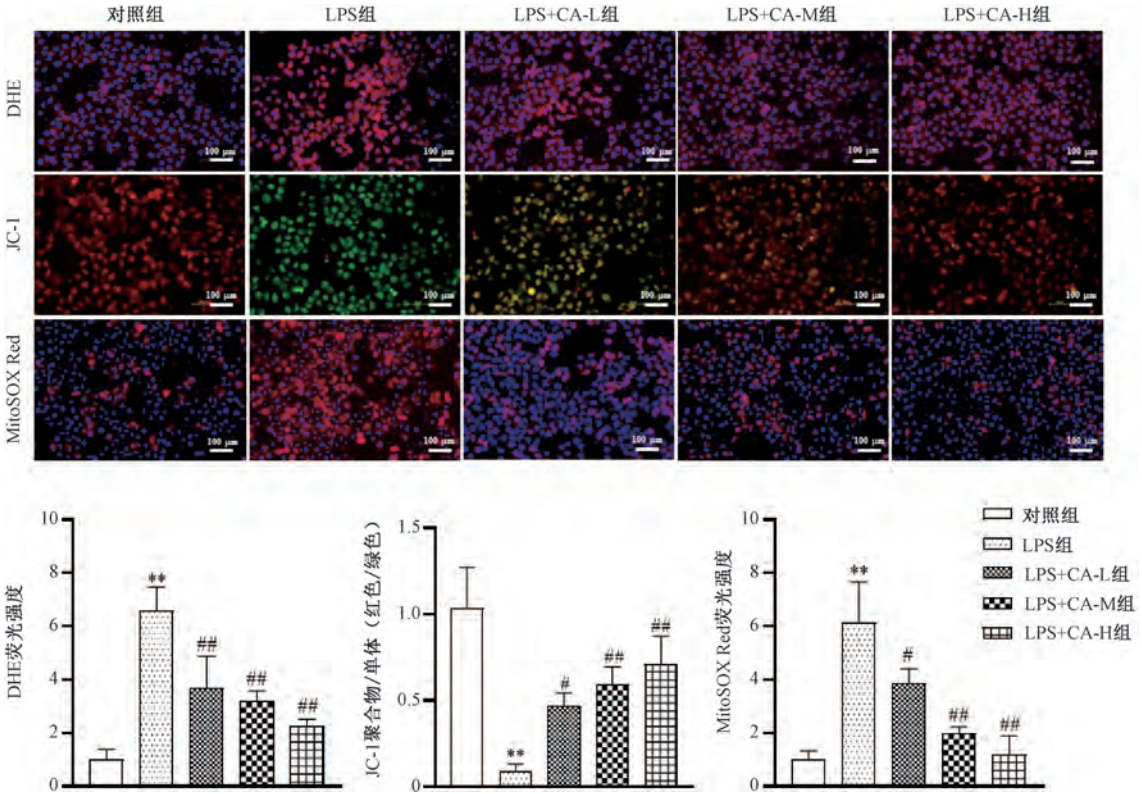
注：彩色部分为蛋白，红色部分为小分子，黄色虚线为氢键。A 为菊苣酸与 TLR4 对接，B 为菊苣酸与 MMP2 对接，C 为菊苣酸与 ESR1 对接。

图 6 菊苣酸与 TLR4、MMP2、ESR1 靶标蛋白分子对接模式图



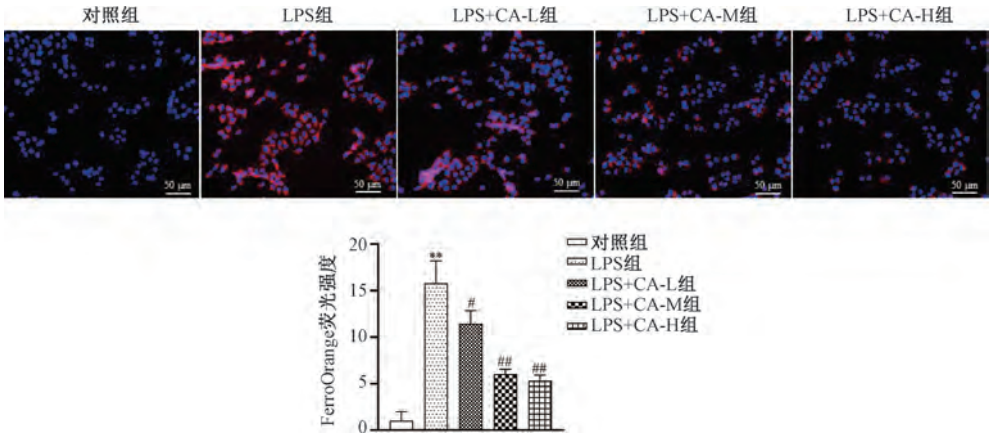
注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 7 菊苣酸对正常 HepG2 细胞（A）和 LPS 诱导的 HepG2 细胞（B）活力的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=4$ ）



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 8 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞氧化应激反应的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

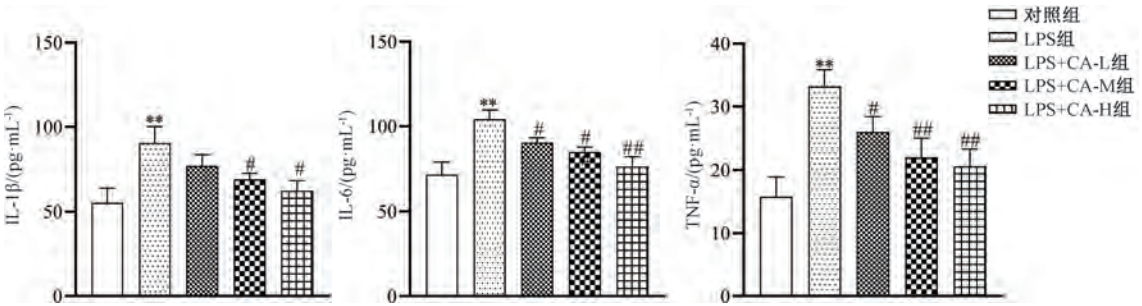
图 9 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞内游离 Fe^{2+} 的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

$TNF-\alpha$ mRNA 表达升高 ($P<0.01$)；与 LPS 组比较，菊苣酸各剂量组细胞 $GPX4$ mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)， $IL-6$ 、 $TNF-\alpha$ mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，菊苣酸中、高剂量组 $IL-1\beta$ mRNA 表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。

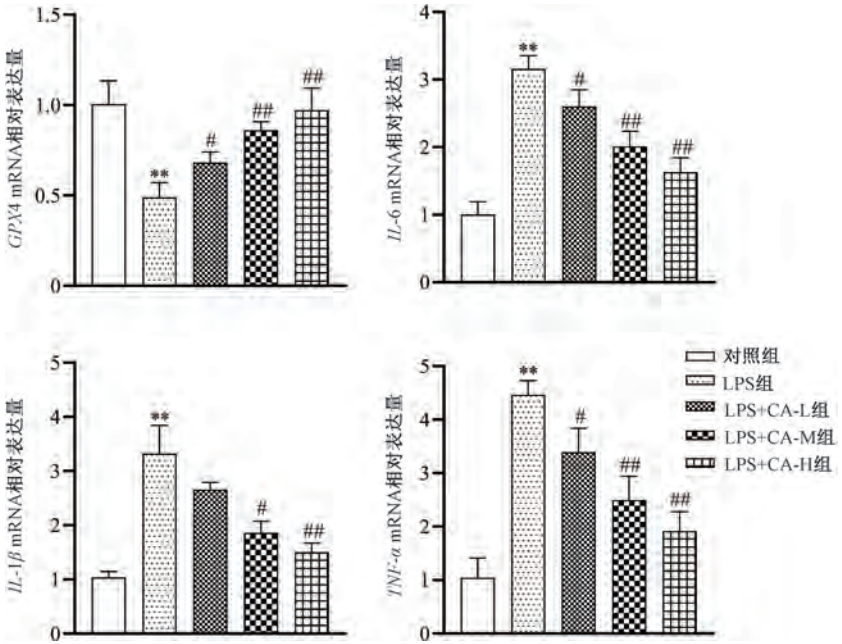
3.9 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞 NF- κ B p65 蛋白定位的影响 如图 12 所示，与对照组比较，LPS 组细胞核红色荧光强度增强，表明 NF- κ B p65 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；

与 LPS 组比较，菊苣酸 (50 μ mol/L) 组细胞核 NF- κ B p65 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。

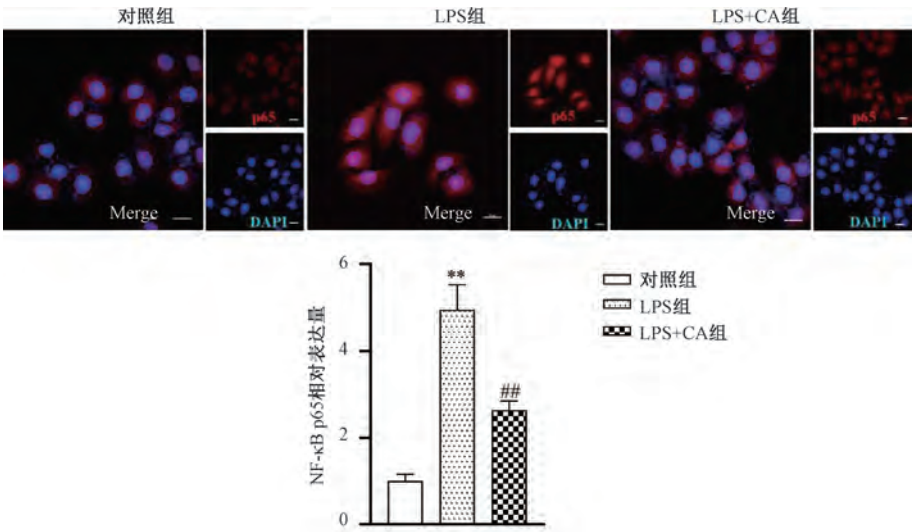
3.10 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞 $GPX4$ 、TLR4 和 p-NF- κ B p65 蛋白表达的影响 如图 13 所示，与对照组比较，LPS 组细胞 TLR4 和 p-p65 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)， $GPX4$ 蛋白表达降低 ($P<0.01$)；与 LPS 组比较，菊苣酸各剂量组细胞 TLR4 和 p-p65 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)， $GPX4$ 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



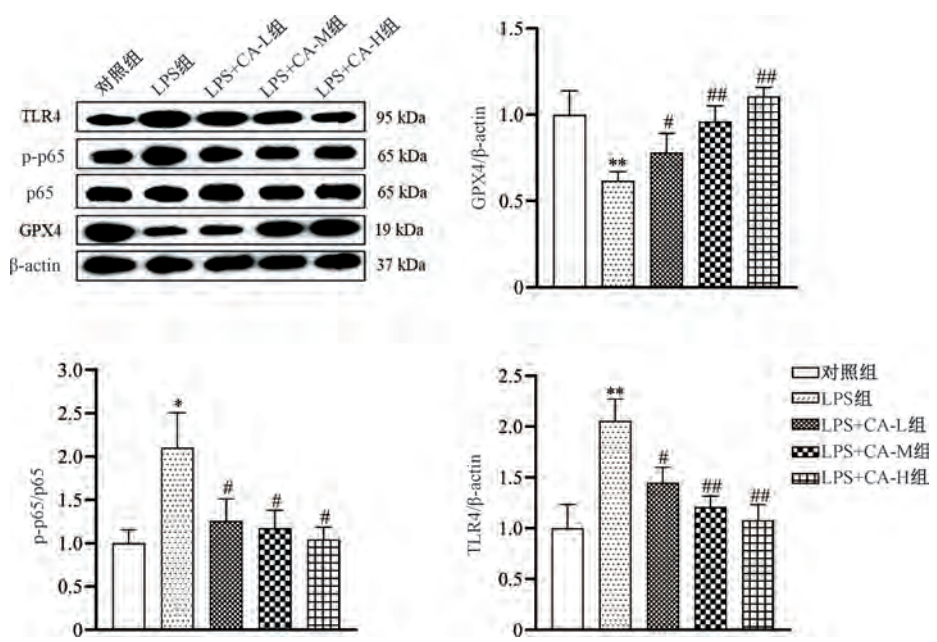
注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 10 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞上清液 IL-6、IL-1β、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 11 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞 GPX4、IL-6、IL-1β、TNF-α mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，## $P<0.01$ 。
图 12 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞核 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)



注：与对照组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 LPS 组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
图 13 菊苣酸对 LPS 诱导 HepG2 细胞 GPX4、TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

4 讨论

肝脏炎症是多种肝脏疾病（如病毒性肝炎、酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎、药物性肝损伤等）的核心病理过程。其发生机制涉及多种信号通路：（1）先天免疫系统激活（如 Toll 样受体/NF-κB 通路）导致促炎细胞因子（TNF-α、IL-6、IL-1β）过度释放；（2）氧化应激与抗氧化系统失衡，ROS 累积诱发肝细胞损伤；（3）NLRP3 炎症小体活化驱动炎症级联反应；（4）肝星状细胞（HSC）活化促进纤维化进展^[13-16]。现有治疗手段多针对单一靶点，疗效有限且副作用明显。因此，探索多靶点天然化合物调控肝脏炎症的机制具有重要价值。

网络药理学分析显示，菊苣酸可能通过调控 TNF、EGFR、MMP9、IL2、CASP3、TLR4、ESR1、ERBB2、MMP2、JUN 等核心靶点干预肝脏炎症。GO 富集分析表明，菊苣酸主要参与“炎症反应”“氧化应激反应”“细胞凋亡调控”等生物学过程；KEGG 通路富集分析进一步提示其可能通过调控 ROS 通路发挥作用。分子对接结果显示，菊苣酸与 TLR4、MMP2、ESR1 等关键蛋白结合能较低，提示其直接相互作用潜力，说明菊苣酸可能通过调控氧化应激、糖脂代谢等途径干预肝脏炎症。

TLR4 是 Toll 样受体家族中的重要成员，在免疫应答中可识别 LPS，启动 MyD88，激活 NF-κB，促进炎症因子和免疫相关基因（如 TNF-α、IL-1β、IL-6 等）的转录和表达，加剧炎症反应^[17-19]。本研究结果显示，在 LPS 诱导的 HepG2 细胞炎症模型中，菊苣酸可抑制 TNF-α、IL-6、IL-1β mRNA 表达，降低细胞上清中 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平，抑制 NF-κB p65 核转位，并下调 TLR4 以及 p-NF-κB p65 蛋白表达，说明菊苣酸可以通过抑制 TLR4/NF-κB 通路，抑制炎症过程的发生。

铁死亡是一种铁依赖性的程序性细胞死亡形式，其核心特征为在二价铁的作用下脂质过氧化物的异常积累及 GPX4 活性丧失导致的抗氧化防御系统崩溃^[20-21]。研究发现，TLR4 作为先天免疫系统的关键模式识别受体，可能通过调控铁死亡相关通路参与疾病进展。TLR4 激活后一方面可以诱导促炎因子表达，另一方面可以通过上调 NADPH 氧化酶（NOX）家族活性，导致 ROS 过量生成，进而加剧脂质过氧化^[22-23]。本研究结果显示，菊苣酸能够抑制细胞内 ROS 及超氧化物的积累，提高线粒体膜电位，证实其具有抗氧化应激作用。此外，菊苣酸可以降低 LPS 诱导的 HepG2 细胞中 Fe²⁺ 的积累，上调 GPX4 mRNA 和蛋白表达，说明菊苣酸能够抑制铁死亡过程的发生。这些结果与网络药理学预测高度吻合，表明菊苣酸通过协同调控 NF-κB、TLR4 及 ROS 通路抑制炎症反应。

综上所述，网络药理学和分子对接分析得到菊苣酸与肝脏炎症相关靶点的结合稳定。细胞实验验证结果表明菊苣酸可能通过抑制 LPS 与 TLR4 结合，抑制 TNF-α、IL-6、IL-1β 的表达，降低胞内 ROS、超氧化物以及 Fe²⁺ 的积累，抑制细胞炎症及铁死亡的发生。本研究为菊苣酸作为多靶点抗炎药物开发提供了实验依据，也为肝脏炎症疾病的天然药物干预策略提供了新思路。后续研究需进一步开展动物体内实验评价，完善菊苣酸的药理作用。

参考文献：

[1] Man S, Deng Y H, Ma Y, *et al.* Prevalence of liver steatosis and fibrosis in the general population and various high-risk populations: a nationwide study with 5.7 million adults in China[J]. *Gastroenterology*, 2023, 165(4): 1025-1040.
[2] Mikolašević I, Filipec Kanižaj T, Targher G. Nonalcoholic fatty

liver disease—a growing public health problem[J]. *Croat Med J*, 2021, 62(1): 1-3.

[3] Fredrickson G, Barrow F, Dietsche K, *et al.* Exercise of high intensity ameliorates hepatic inflammation and the progression of NASH[J]. *Mol Metab*, 2021, 53: 101270.

[4] Taru V, Szabo G, Mehal W, *et al.* Inflammasomes in chronic liver disease: hepatic injury, fibrosis progression and systemic inflammation[J]. *J Hepatol*, 2024, 81(5): 895-910.

[5] Liu B B, Deng X L, Jiang Q Q, *et al.* Scoparone improves hepatic inflammation and autophagy in mice with nonalcoholic steatohepatitis by regulating the ROS/P38/Nrf2 axis and PI3K/AKT/mTOR pathway in macrophages[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109895.

[6] Mezzano G, Juanola A, Cardenas A, *et al.* Global burden of disease: acute-on-chronic liver failure, a systematic review and meta-analysis[J]. *Gut*, 2022, 71(1): 148-155.

[7] 行倩文, 吴 华, 刘嘉华, 等. 低氧环境紫锥菊提取物-菊苣酸通过 PPAR 信号通路对 SD 大鼠肝脏组织脂肪合成的影响[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(1): 135-140.

[8] 王文胜, 吴 华, 陈鑫磊, 等. 菊苣酸通过介导 Nrf2 和 NF-κB 通路缓解低氧诱导的 H9c2 心肌细胞氧化应激[J]. *中国兽医科学*, 2024, 54(11): 1546-1553.

[9] Zhu X X, Zheng G L, Lu Q B, *et al.* Cichoric acid ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by inhibiting M1 macrophage polarization[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 976: 176696.

[10] 张天屹, 景奉堂, 吕绪桢, 等. 菊苣酸调节糖代谢的研究进展[J]. *现代中药研究与实践*, 2023, 37(4): 93-96.

[11] Zhang P, Zhang D F, Zhou W A, *et al.* Network pharmacology: towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine[J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25 (1): bbad518.

[12] 应思慧, 鲁 森, 陈忠正, 等. 基于细胞模型和网络药理学探究儿茶素抗炎、抗癌的构效关系[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(5): 18-29.

[13] Getachew A, Hussain M, Huang X, *et al.* Toll-like receptor 2 signaling in liver pathophysiology[J]. *Life Sci*, 2021, 284: 119941.

[14] Almalki W H, Almujri S S. Aging, ROS, and cellular senescence: a trilogy in the progression of liver fibrosis[J]. *Biogerontology*, 2024, 26(1): 10.

[15] Yu C Q, Chen P, Miao L Y, *et al.* The role of the NLRP3 inflammasome and programmed cell death in acute liver injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3067.

[16] Du K, Maeso-Díaz R, Oh S H, *et al.* Targeting YAP-mediated HSC death susceptibility and senescence for treatment of liver fibrosis[J]. *Hepatology*, 2023, 77(6): 1998-2015.

[17] Shaukat A, Rajput S A, Ali M, *et al.* Therapeutic administration of luteolin protects against *Escherichia coli*-derived lipopolysaccharide-triggered inflammatory response and oxidative injury[J]. *Acta Trop*, 2024, 255: 107236.

[18] Guo C Z, Ruan J C, Li Z H, *et al.* Cadmium promoted LPS-induced inflammation through TLR4/IκBα/NFκ-B signaling by increasing ROS-mediated incomplete autophagy[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 278: 116405.

[19] Wang N N, Li C H, Gao X, *et al.* Co-exposure to lead and high-fat diet aggravates systemic inflammation in mice by altering gut microbiota and the LPS/TLR4 pathway[J]. *Metallomics*, 2024, 16(5): mfae022.

[20] 李 欣, 陶 亮, 钟美娟, 等. 铁死亡参与肝疾病研究进展[J]. *浙江大学学报 (医学版)*, 2024, 53(6): 747-755.

[21] Jiang X J, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.

[22] Zhu K Y, Zhu X, Sun S H, *et al.* Inhibition of TLR4 prevents hippocampal hypoxic-ischemic injury by regulating ferroptosis in neonatal rats[J]. *Exp Neurol*, 2021, 345: 113828.

[23] Zhang D F, Wu C L, Ba D Y, *et al.* Ferroptosis contribute to neonicotinoid imidacloprid-evoked pyroptosis by activating the HMGB1-RAGE/TLR4-NF-κB signaling pathway[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 253: 114655.