

蒋蕊竹,郑洋,汪磊,等. 肝窦内皮细胞通过间充质转换调控肝纤维化的分子作用机制及药物预测 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(7): 55-71.

Jiang RZ, Zheng Y, Wang L, et al. Molecular mechanism of action and drug prediction of hepatic sinusoidal endothelial cells for regulating hepatic fibrosis via mesenchymal transition [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(7): 55-71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.07.006

肝窦内皮细胞通过间充质转换调控肝纤维化的分子作用机制及药物预测

蒋蕊竹¹, 郑洋², 汪磊², 张荣武², 王佳慧², 廖喜琳^{3*}, 陈琼^{2*}

(1.广西中医药大学研究生学院, 南宁 530222; 2.广西中医药大学赛恩斯新医药学院, 南宁 530222;
3.广西中医药大学附设中医学校, 南宁 530009)

【摘要】目的 通过生物信息学、机器学习和细胞实验, 探究肝窦内皮细胞(LSECs)经间充质转换(EnMT)调控肝纤维化的分子机制, 并预测天然活性成分。**方法** 获取肝纤维化(HF)与 EnMT 基因矩阵, Limma 差异分析与 WGCNA 共表达网络分析后, 提取交集基因, 进行富集分析。结合随机森林、SVM-RFE 和网络拓扑分析, 筛选诊断基因, 进行免疫浸润分析和天然活性成分预测, 最后通过细胞实验对诊断基因的表达情况和预测成分的药理效果进行验证。**结果** 差异分析得到 EnMT 相关差异基因 3034 个, HF 相关差异基因 4133 个; WGCNA 分析得到 EnMT Hub 基因 4589 个, HF Hub 基因 763 个, 提取到 38 个交集基因, 主要富集于基底膜、ECM 受体相互作用等机制上。多维度分析筛选出 *CFP*、*COL4A2*、*ITGA1* 和 *GRPEL1* 作为诊断基因。免疫浸润分析显示诊断基因与肥大细胞静息状态、记忆 B 细胞及记忆 CD4⁺ T 细胞间密切相关。RT-PCR 结果表明, 在 Jagged1 诱导的模型组中, 4 个诊断基因的 mRNA 表达均显著增加 ($P < 0.05$)。预测成分谷甾醇、山奈酚和槲皮素与诊断基因间均具有良好的结合活性。ELISA 实验进一步证实, 3 种活性成分均能显著降低 Jagged1 诱导 LSECs 中 COL4A2 蛋白的表达, 以槲皮素的作用最为显著 ($P < 0.01$)。**结论** 本研究阐述了肝窦内皮细胞通过间充质转换参与肝纤维化病理进程的分子机制, 提出以 *CFP*、*COL4A2*、*ITGA1* 和 *GRPEL1* 为核心的诊断标志物体系, 发现槲皮素等天然活性成分能够通过靶向诊断基因, 发挥抗肝纤维化的药理作用。

【关键词】 间充质转换; 肝纤维化; 机器学习; 药物预测

【中图分类号】 R575.2; R-33; R329.2⁺5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 07-0055-17

Molecular mechanism of action and drug prediction of hepatic sinusoidal endothelial cells for regulating hepatic fibrosis via mesenchymal transition

JIANG Ruizhu¹, ZHENG Yang², WANG Lei², ZHANG Rongwu², WANG Jiahui², LIAO Xilin^{3*}, CHEN Qiong^{2*}

【基金项目】 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFBA026274, 2024GXNSFAA010235); 广西壮瑶药重点实验室基金资助项目 (GXZYKF2023-05); 广西中医药大学赛恩斯新医药学院科研项目 (2024ZYZ002, 2024ZZA003, 2024ZZB007, 2024ZZB010)。

【作者简介】 蒋蕊竹 (2001—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 老年性疾病的临床防治与护理。E-mail: 2740126720@qq.com

【通信作者】 廖喜琳 (1970—), 女, 本科, 主任护师, 研究方向: 老年性疾病的临床防治与护理。E-mail: 2535369326@qq.com

陈琼 (1985—), 本科, 高级实验师, 研究方向: 民族药防治慢性肝病。E-mail: 379108929@qq.com

* 共同通信作者

- (1. Graduate School, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222, China.
2. Faculty of Chinese Medicine Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530222.
3. Guangxi University of Chinese Medicine Affiliated School of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530009)

【Abstract】 Objective To investigate the molecular mechanism of hepatic fibrosis (HF) regulation by liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) via endothelial mesenchymal transition (EnMT), and to predict the natural active components using bioinformatics, machine learning, and cellular experiments. **Methods** HF and EnMT gene matrices were obtained and the intersecting genes were extracted and enriched using Limma difference analysis and weighted gene co-expression network analysis (WGCNA). The diagnostic genes were screened using a combination of random forest method, support vector machine-recursive feature elimination and network topology analysis, and immune infiltration analysis and prediction of natural active ingredients were performed. The expression of diagnostic genes and the pharmacological effects of the predicted ingredients were finally verified by cellular experiments. **Results** Differential analysis yielded 3034 EnMT-associated and 4133 HF-associated differential genes. WGCNA analysis yielded 4589 EnMT-associated Hub genes and 763 HF-associated Hub genes. Thirty-eight intersecting genes were extracted, which were mainly enriched in the pathways of basement membrane and extracellular matrix receptor interaction. Four diagnostic genes, *CFP*, *COL4A2*, *ITGA1*, and *GRPEL1*, were screened by multidimensional analysis. Immune infiltration analysis showed that the diagnostic genes were closely associated with mast cell resting state, memory B cells, and memory CD4⁺ T cells. Reverse transcription-polymerase chain reaction analysis showed significantly increased mRNA expression levels of the four diagnostic genes in the Jagged1-induced model group ($P < 0.05$). The predicted components, sterol, kaempferol, and quercetin, all had good binding activities with the diagnostic genes. Enzyme-linked immunosorbent assay result confirmed that all three active components significantly reduced the expression of collagen type IV $\alpha 2$ chain protein in Jagged1-induced LSECs, with quercetin having the most significant effect ($P < 0.01$). **Conclusions** This study elucidated the molecular mechanism of hepatic sinusoidal endothelial cells involved in the pathological process of HF through mesenchymal transition. We also propose a diagnostic marker system including *CFP*, *COL4A2*, *ITGA1*, and *GRPEL1* as core genes. The result also suggest that natural active ingredients, such as quercetin, may exert anti-HF pharmacological effects by targeting these diagnostic genes.

【Keywords】 mesenchymal transition; liver fibrosis; machine learning; drug prediction

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)指慢性肝损伤过程中,肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度积累及纤维组织发生异常沉积的病理过程^[1,2]。在 HF 发展过程中,肝脏微环境的各类细胞均发生了显著变化,其中肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)作为肝脏特异性血管内皮细胞,其形态与功能的改变对 HF 进程具有重要影响。LSECs 往往最先受到外界致病因素的影响^[3],通过结构和功能两方面的病理变化影响肝脏修复过程。血管内皮间质样转分化(endothelial mesenchymal transition, EnMT)指组织器官中的血管内皮细胞在特定情况下,能够转分化为具有间质样细胞形态和特征的过程。研究发现,血管内皮细胞在通过 EnMT 转变为肌成纤

维母细胞后,参与了心脏^[4,5]、肺^[6]、肾^[7]等多个器官的纤维化过程。这一发现不仅丰富了肌成纤维母细胞异质性来源的认识,也提示 LSECs 可能通过 EnMT 直接参与 HF 的发生发展。目前 LSECs 通过 EnMT 调控 HF 的分子机制有待深入阐明。因此,本研究通过生物信息学、机器学习和细胞实验,旨在揭示 LSECs 通过 EnMT 调控 HF 的作用机制,明确诊断标志物,预测天然活性成分,为 HF 的治疗提供新的理论依据。技术路线详见图 1。

1 材料和方法

1.1 细胞

细胞采用人肝窦内皮细胞(HHSEC)(美国

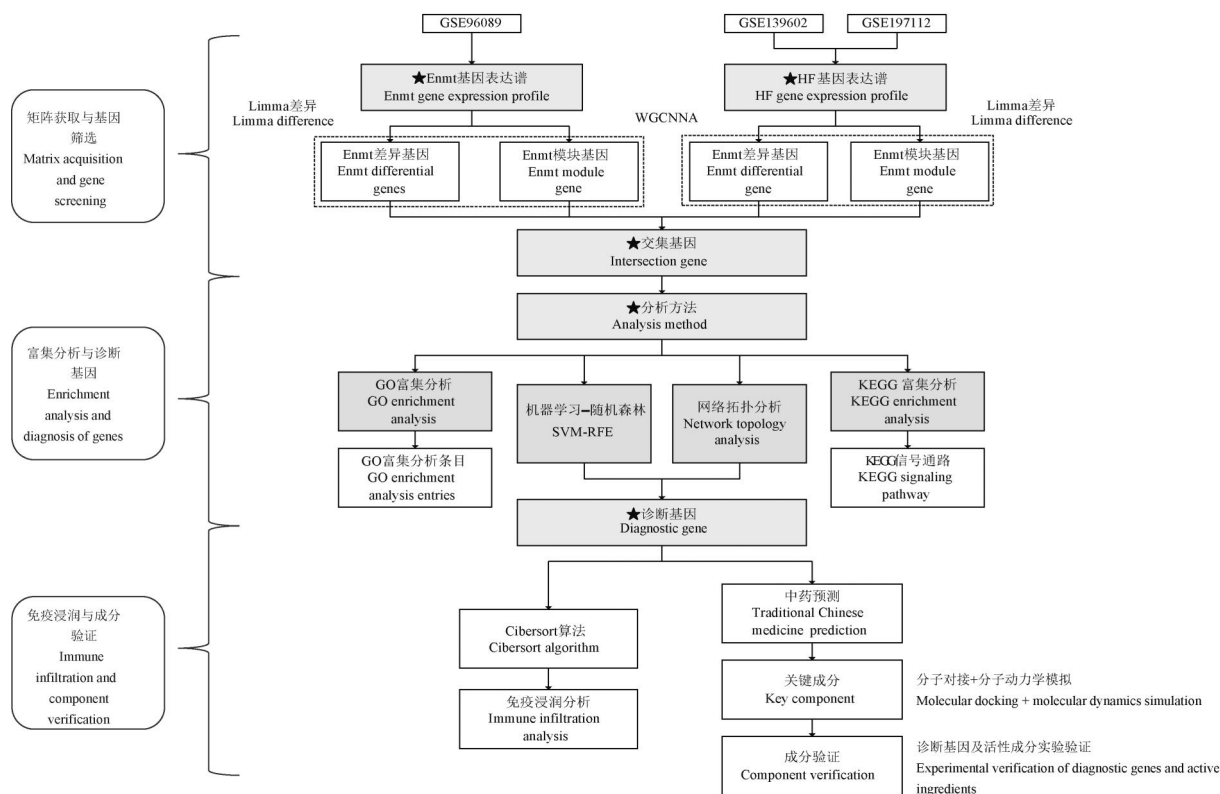


图 1 技术路线

Figure 1 Technical route

ScienCellTM 公司,货号:5000)。

1.2 主要试剂与仪器

山奈酚(上海源叶生物科技有限公司,货号:B21126);谷甾醇(上海源叶生物科技有限公司,货号:B21972);槲皮素(上海源叶生物科技有限公司,货号:B20527);TRIzol(Thermo Scientific,货号:15596026);逆转录试剂盒(北京索莱宝生物科技有限公司,货号:T2240);COL4A2 ELISA 试剂(上海酶联生物科技有限公司,货号:ml161572);Notch 激活剂 Jagged1(美国 Med Chem Ex-press 公司,批号:HY-P1846)。

实时荧光定量 PCR 仪(Thermo Scientific,ABI QuantStudio6);酶标仪(Thermo Scientific,mullSKANMK3);离心机(Eppendorf,5425R);微量分光光度计(Thermo Scientific,NanoDrop)。

1.3 实验方法

1.3.1 数据标准化及去批次效应

从 NCBI 基因表达综合数据库(GEO)中获取“Hepatic fibrosis”“Endothelial Mesenchymal Transition”的基因表达矩阵和临床信息。应用 R 软件对数据进行标准化处理和去批次效应。

1.3.2 Limma 基因差异分析

使用 R 软件包对基因矩阵进行 Limma 差异分析,设定统计显著性阈值 $P < 0.05$ 且差异倍数 > 1.2 ,获取差异基因。

1.3.3 WGCNA

计算基因的 MAD (Median Absolute Deviation) 值,剔除 MAD 值最小的前 50% 基因,去除离群数据,计算软阈值 β 和邻接关系,构建无标度网络,并将邻接关系转化为拓扑重叠矩阵(TOM),计算不相似度(1-TOM);采用最小模块为 50 的动态树切割法进行层次聚类分析,识别并提取共表达基因模块信息,筛选 Hub 基因^[8]。

1.3.4 交集基因获取

取差异基因与模块基因进行 Venny 互作分析,获取交集基因。

1.3.5 富集分析

对交集基因进行基因本体(GO)功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

1.3.6 诊断基因筛选

通过随机森林(random forest, RF)、支持向量机递归特征消除(support vector machine-recursive

feature elimination, SVM-RFE) 和蛋白互作网络, 筛选最具特征性的基因。构建 LASSO-COX 回归模型分析诊断基因的生存影响, 防止过拟合^[9]。计算交叉验证准确度、F1 分数和 ROC 曲线下面积 (AUC), 全面评估基因标志物的分类性能。

1.3.7 免疫浸润分析

应用 CIBERSORT 算法评估诊断基因与免疫细胞浸润的相关性。计算 Pearson 相关系数进行筛选, $|r| \leq 0.4$ 为弱相关, $0.4 < |r| \leq 0.7$ 为中等强度相关, $|r| > 0.7$ 为高度相关^[10]。

1.3.8 关键成分预测

以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为标准, 筛选天然活性成分^[11], 构建成分-靶点网络。选取介度中心度 (betweenness centrality)、接近中心度 (closeness centrality)、度值 (degree) 较高的成分作为预测成分。

1.3.9 分子对接和分子动力学模拟

将预测成分和诊断基因进行分子对接, 结合分数越低, 则结合越紧密稳定^[12]。为进一步证明配体与蛋白质间结合的稳定性, 通过 GROMACS 程序进行分子动力学模拟轨迹。

1.3.10 诊断基因实验验证方法

用含 5% FBS 的 ECM 培养基进行 HHSEC 细胞培养, 置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱中培养, 待细胞长至单层后用于实验。用 Jagged1 (0.5 μg/mL) 或山奈酚 (50 μmol/L)、谷甾醇 (10 μmol/L)、槲皮素 (20 μmol/L) 或培养液处理细胞 24 h。之后通过 RT-PCR 检测诊断基因, 利用总 RNA 提取试剂 (TRIzol) 提取总的 RNA, 借助 Primer 5.0 软件, 引物由武汉巴菲尔生物科技公司负责。RT-PCR 引物如表 1 所示。按照逆转录试剂盒, 合成 cDNA, 反应的体系: 95 °C 1 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环, 以 β-actin 作为内参对照,

取 PCR 产物进行凝胶成像分析。

1.3.11 ELISA 检测活性成分对关键靶点表达的作用

将各组细胞按上述处理后, 以 5×10^3 /mL 细胞密度接种至 96 孔板中, 以 1226 r/min, 离心 20 min, 取上清液检测。按试剂盒说明书操作, 在酶标仪 450 nm 波长下测量吸光度值, 计算细胞上清液中 COL4A2 的含量。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件对数据进行处理, 计量资料以平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐时两组间比较用 *t* 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步组内比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 EnMT 和 HF 基因集

选定 EnMT 的基因芯片为 GSE96089, HF 的基因芯片为 GSE139602 和 GSE197112。数据处理后得到 EnMT 和 HF 基因集, 详细见图 2。

2.2 差异基因

Limma 筛选得到 EnMT 包含 3034 个差异基因, 其中上调基因 1674 个, 下调基因 1360 个。HF 包含 4133 个差异基因, 其中上调基因 1355 个, 下调基因 2778 个, 详细见图 3。

2.3 Hub 基因

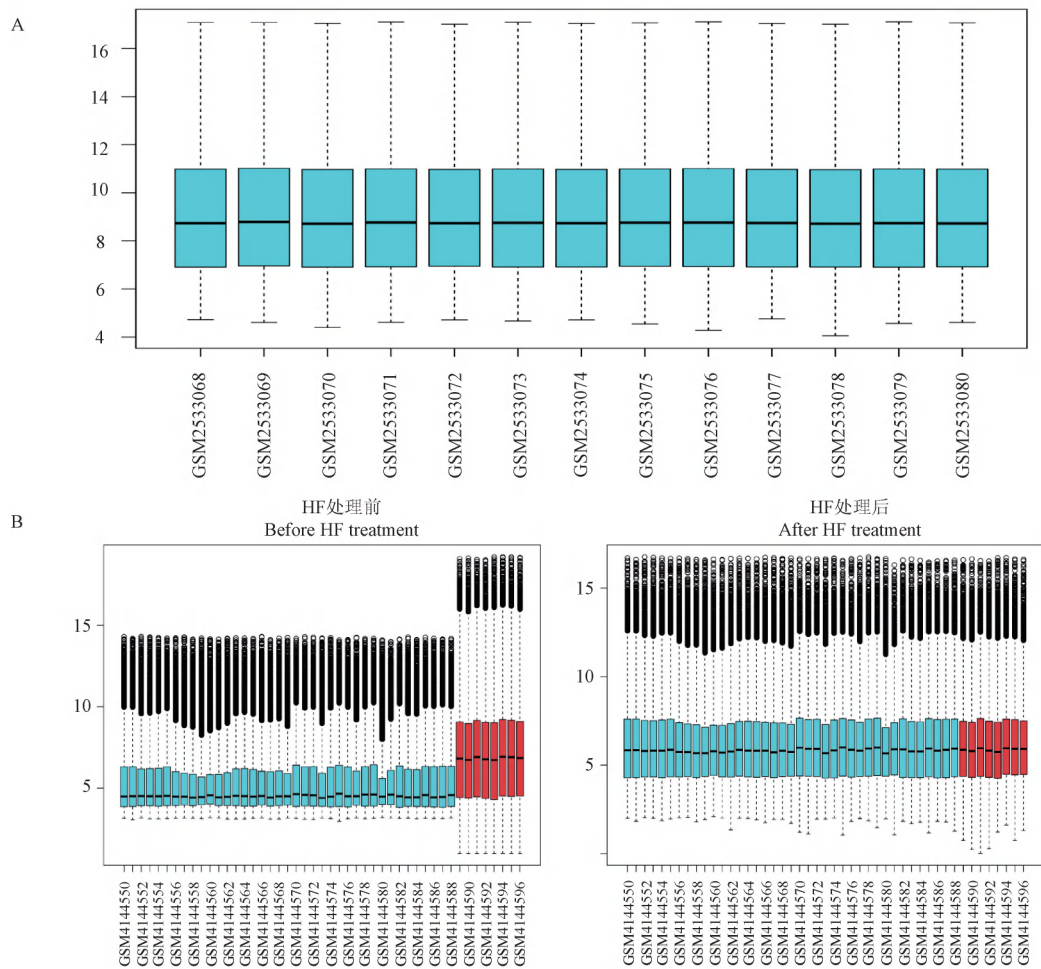
通过 WGCNA 分析, 获得 15 个 EnMT 相关基因共表达模块 (包含 4589 个 Hub 基因), 16 个 HF 相关基因共表达模块 (包含 763 个 Hub 基因), 详细见图 4~6。

2.4 交集基因

Venny 互作分析确定了 38 个交集基因, 详细见图 7。

表 1 RT-PCR 引物
Table 1 RT-PCR primers

名称 Name	上游引物序列 (5'-3') Upstream primer sequence (5'-3')	下游引物序列 (5'-3') Downstream primer sequence (5'-3')
CFP	GTAATCACCCCTGCTCCCAAG	TTGCCGCTTCGTGCTCTCC
COL4A2	CGGAGTTTGTGGATCGGATA	CCCCCGTTACACTCGATAAA
ITGA1	CTGGACATAGTCATAGTGTGGA	ACCTGTGTCTGTTTAGGACCA
GRPEL1	TTGGCACTGTCGTTACGGC	GGATCTGTCTTTGGCTCACAAT
β-actin	GCAGGAGTACGATGAGTCCG	CCTGACAATGACTCGAC



注:A;EnMT;B;HF。

图 2 基因箱式图

Note. A, EnMT. B, HF.

Figure 2 Genebox diagram

2.5 基因富集分析

GO 富集分析显示,交集基因主要富集于髓系白细胞介导的免疫调节等生物过程(BP,共1203条),基底膜、细胞外基质等细胞组分(CC,共169条)以及信号受体结合等分子功能(MF,共199条)。KEGG 通路富集分析得到 ECM 受体相互作用、PI3K-AKT 等 52 条信号通路,详细见图 8。

2.6 诊断基因

筛选出 *CFP*、*COL4A2*、*ITGA1* 和 *GRPEL1* 作为核心诊断基因(图 9、图 10)。SVM-RFE 模型的平均交叉验证准确度为 0.96,F1 分数为 0.97;随机森林模型的平均交叉验证准确度为 0.89,F1 分数为 0.94,均表明模型在区分样本特征时有较高的

准确性;ROC-AUC 分数 0.97,也表明模型具有较高的准确性和稳定性;LASSO-COX 模型进一步验证了模型的预测价值。

2.7 免疫浸润分析

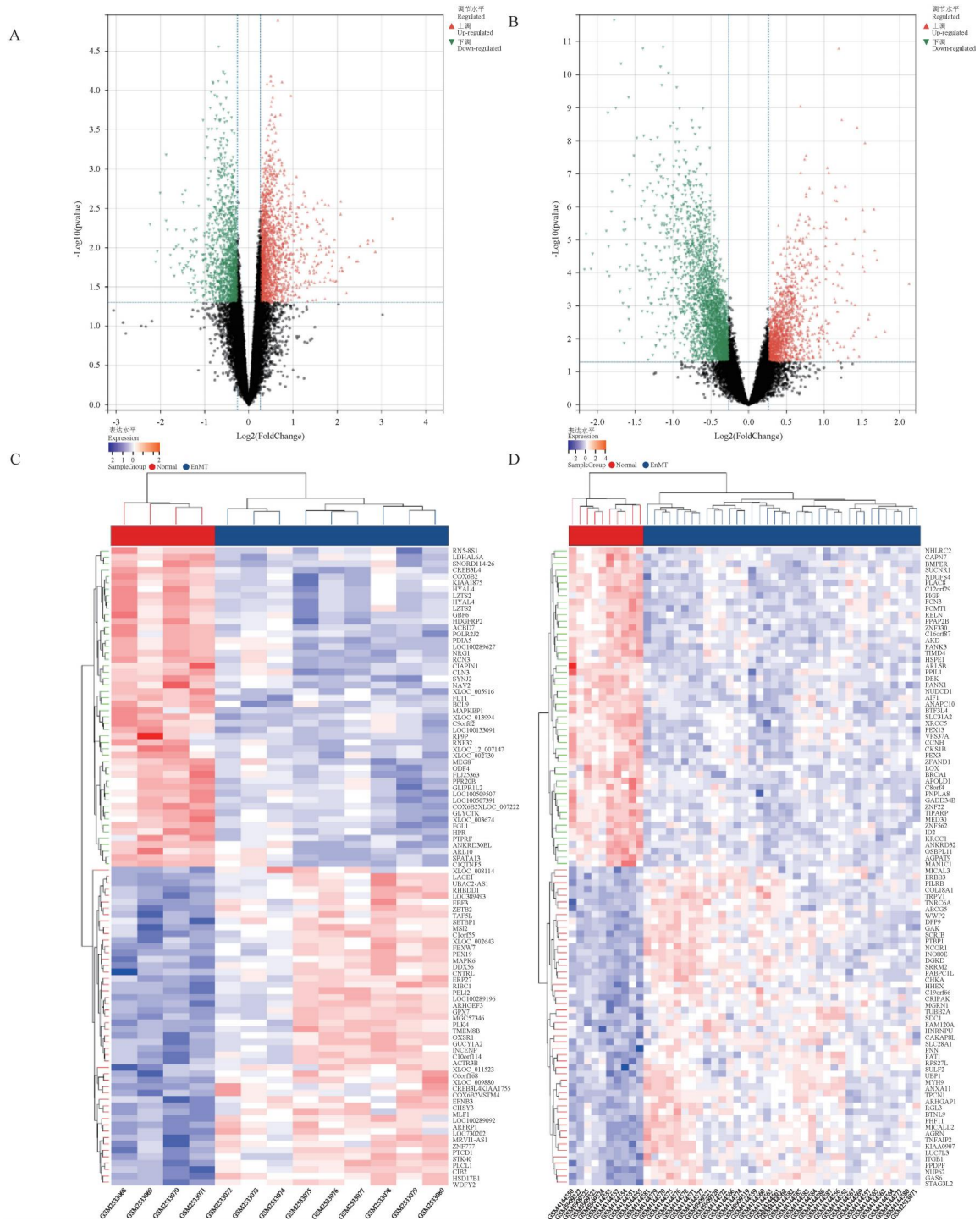
免疫细胞浸润分析显示,诊断基因与肥大细胞静息状态、记忆 B 细胞、记忆 CD4⁺ T 细胞间具有较高相关性,详细见图 11、图 12。

2.8 预测成分

通过系统药理学分析,预测谷甾醇(sitosterol)、山奈酚(kaempferol)和槲皮素(quercetin)作为靶向诊断基因的天然活性成分,详细见图 13。

2.9 预测成分验证

由于 *GRPEL1* 在 PDB 中无可用的实验结构,



注:A:EnMT 火山图;B:HF 火山图;C:EnMT 热图;D:HF 热图。

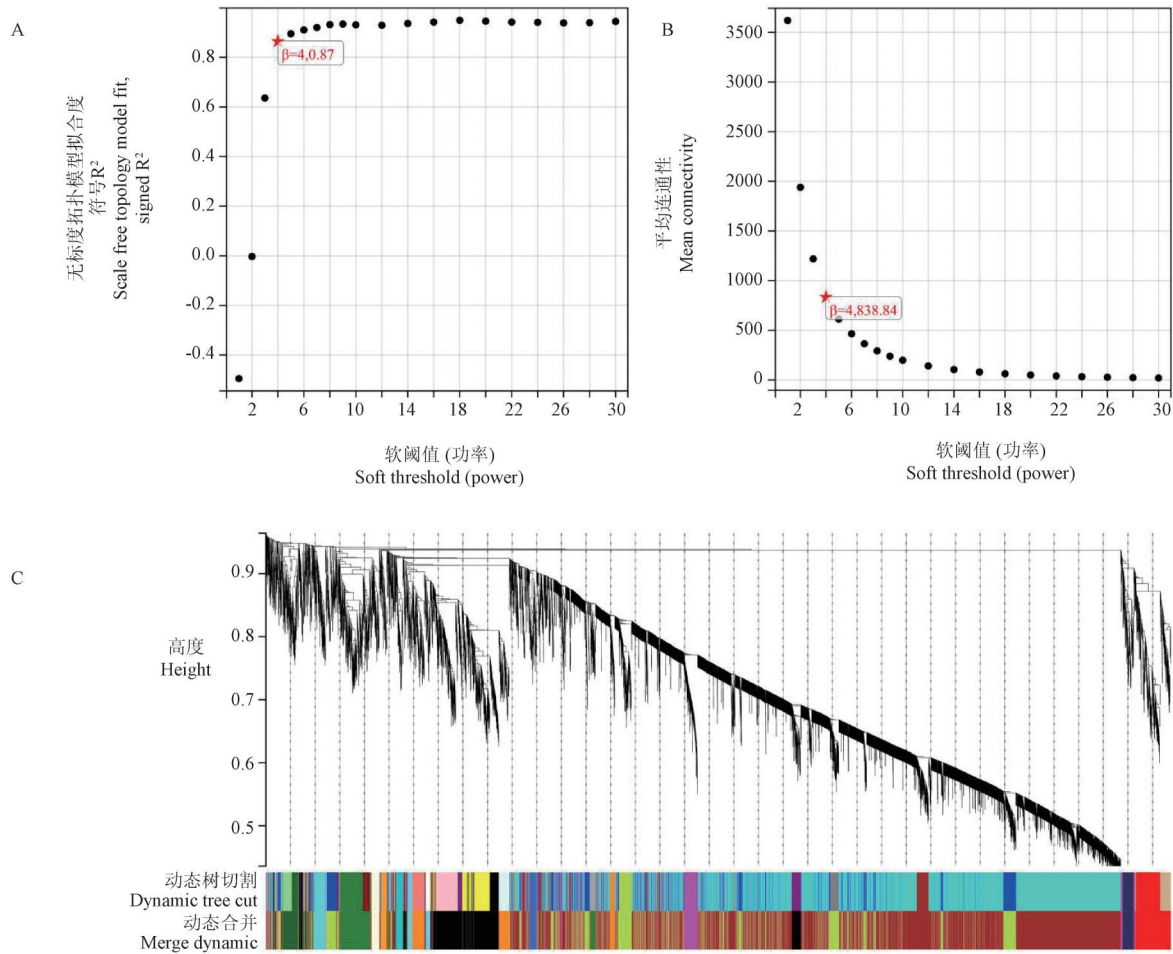
图3 差异基因分析

Note. A, Volcano map of EnMT. B, Volcano map of HF. C, Heat map of EnMT. D, Heat map of HF.

Figure 3 Differential gene analysis

因此不进行分子对接。将 CFP、COL4A2、ITGA1 与 3 种预测成分分别对接(表 2 和图 14),得到所有配体和蛋白之间均具有结合活性,其中槲皮素和 COL4A2 结合能最低。

将结合能最低的 3 个结果进行分子动力学模拟。RMSD 曲线发现所有结果均在 10 ns 后开始趋于稳定;RMSF 曲线发现 COL4A2-sitosterol 蛋白柔性在 0.05~0.3 Å 之间;COL4A2-kaempferol 蛋



注:A:标度独立性;B:平均连接度;C:生物模块与临床表型相关性分析。

图 4 EnMT 基因集的 WGCNA 分析

Note. A, Scale independence. B, Average connectivity. C, Correlation analysis between biological modules and clinical phenotypes.

Figure 4 WGCNA analysis of EnMT gene set

表 2 结合能信息

Table 2 Binding energy information

预测成分 Predictive component	结合能/(kcal/mol) Binding energy		
	CFP	COL4A2	ITGA1
谷甾醇 Sitosterol	-6.6	-7.6	-7.1
山奈酚 Kaempferol	-7.1	-8.5	-6.9
槲皮素 Quercetin	-6.9	-8.9	-6.8

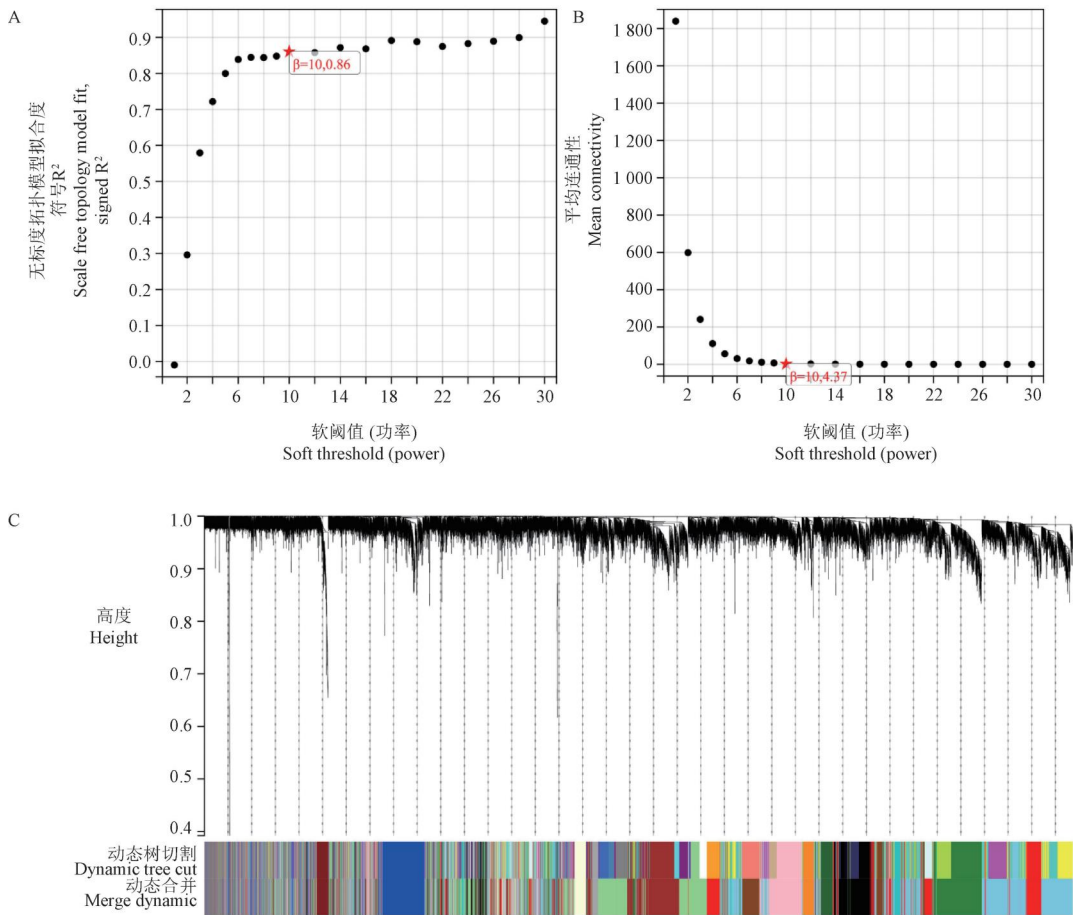
白柔性在 0.05~0.4 Å 之间;COL4A2-quercetin 蛋白柔性在 0.1~0.6 Å 之间(图 15)。波动范围均属于较低水平,表明结合位点具有相对刚性的特征,利于维持配体和蛋白质间的相互作用。

2.10 RT-PCR 检测诊断基因的表达情况

实验结果表明 CFP、COL4A2、ITGA1 和 GRPEL1 mRNA 在模型组表达均显著增加 ($P < 0.05$),详细见图 16。

2.11 活性成分对关键靶点表达的作用

分子对接的结果表明谷甾醇、山奈酚和槲皮素与 COL4A2 分子的对接活性最好,因此选择 COL4A2 与 3 种活性成分进行实验验证。ELISA 实验结果表明,模型组 COL4A2 表达较空白组显著增加 ($P < 0.01$),谷甾醇、山奈酚和槲皮素组 COL4A2 表达较模型组显著下降 ($P < 0.01$),其中槲皮素组 COL4A2 表达水平为 4 组中最低,详细见图 17。

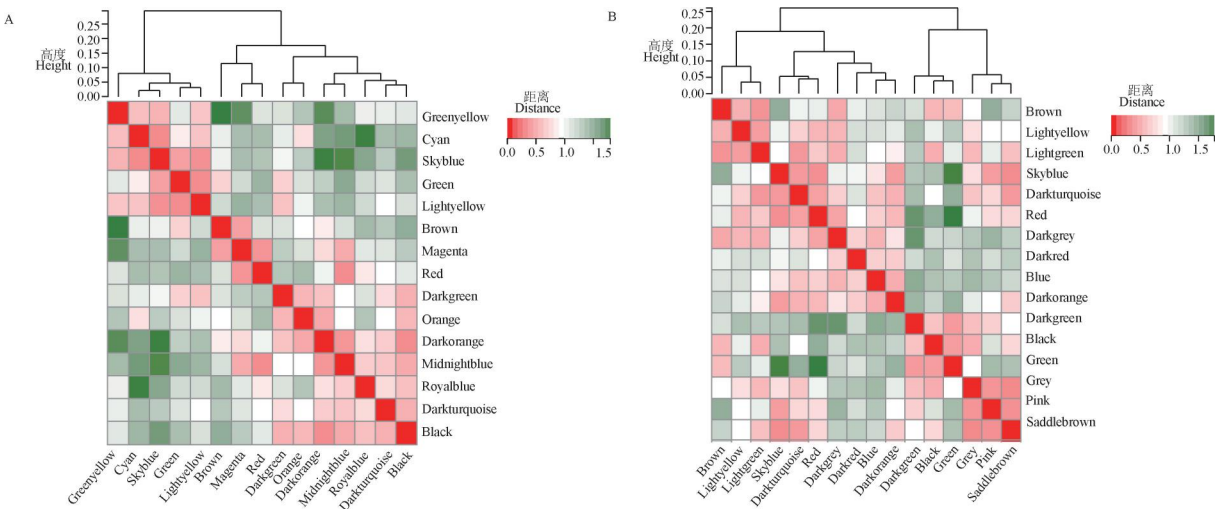


注:A:标度独立性;B:平均连接度;C:生物模块与临床表型相关性分析。

图 5 HF 基因集的 WGCNA 分析

Note. A, Scale independence. B, Average connectivity. C, Correlation analysis between biological modules and clinical phenotypes.

Figure 5 WGCNA analysis of HF gene set



注:A:EnMT 分析结果热图;B:HF 分析结果热图。

图 6 共表达模块与临床表型的相关性热图

Note. A, Heat map of EnMT analysis results. B, Heat map of HF analysis results.

Figure 6 Heat map of correlation between coexpression modules and clinical phenotypes

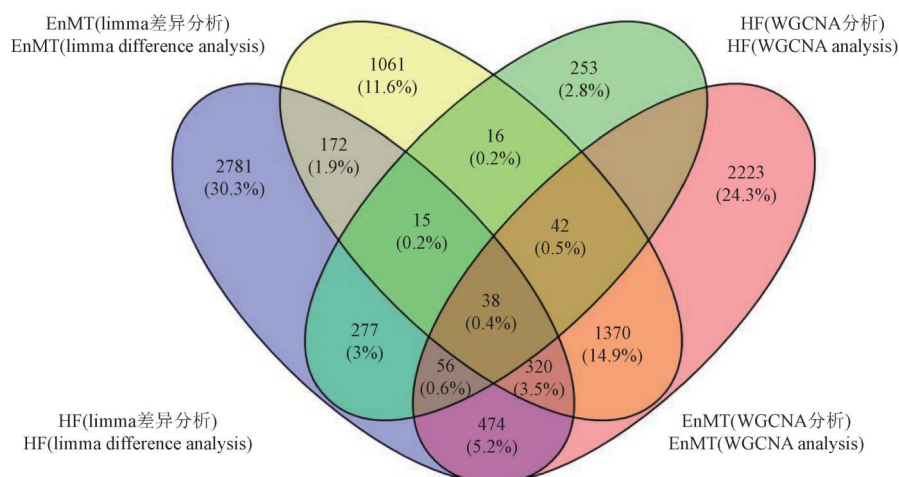
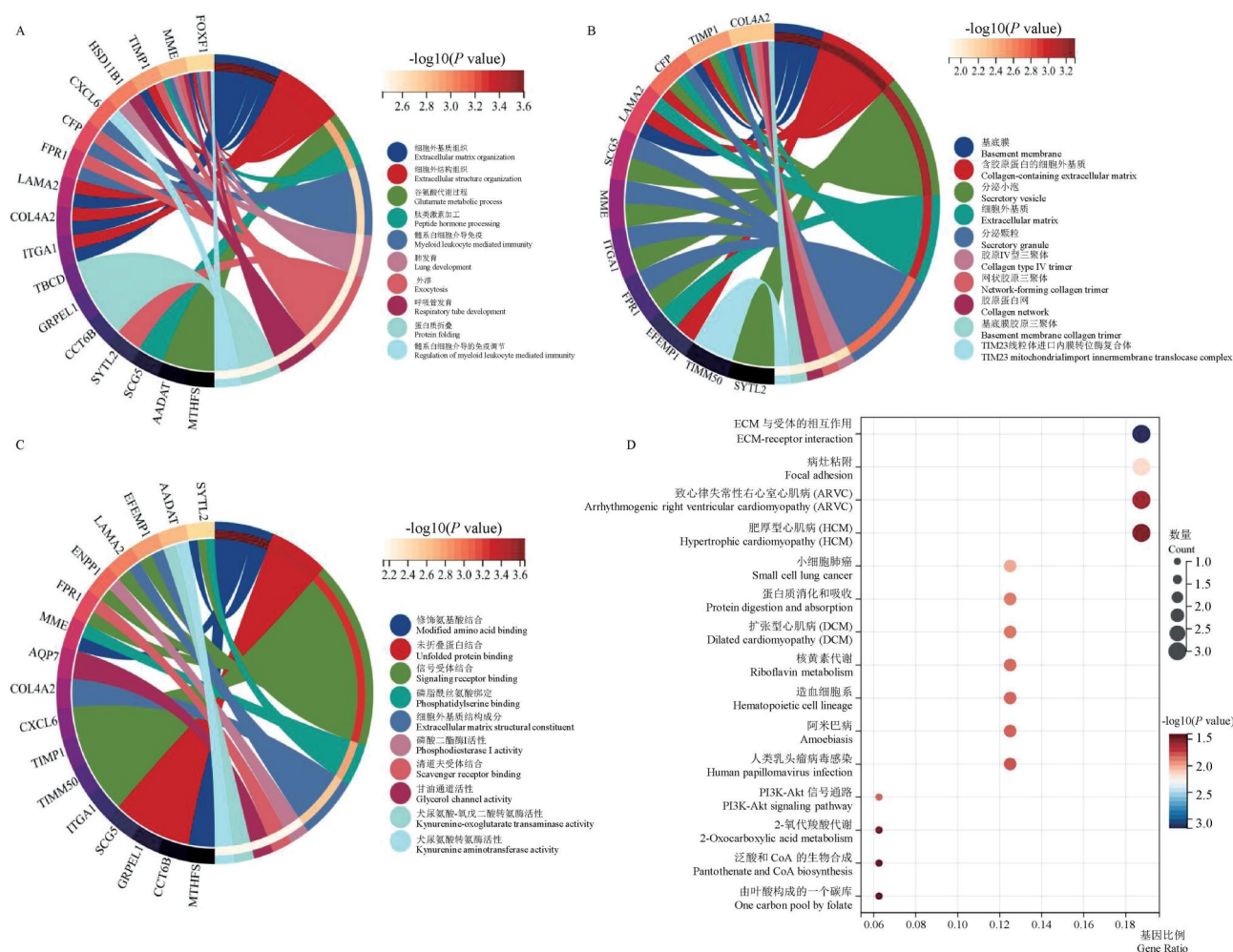


图 7 Venny 互作分析图

Figure 7 Venny interaction analysis diagram



注: A:生物过程; B:细胞成分; C:分子功能; D:KEGG 通路富集分析。

图 8 基因富集分析

Note. A, Biological process. B, Cell component. C, Molecular function. D, KEGG pathway enrichment analysis.

Figure 8 Gene enrichment analysis

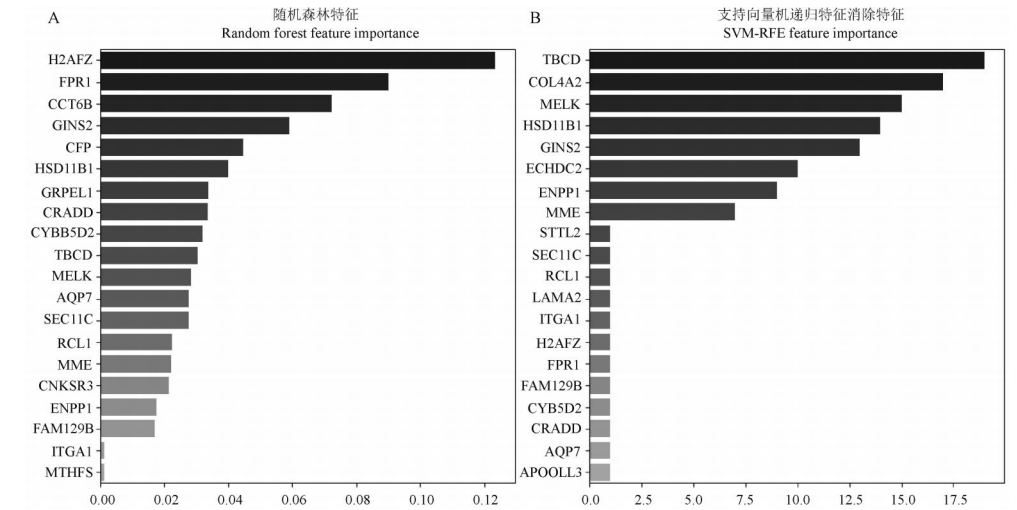
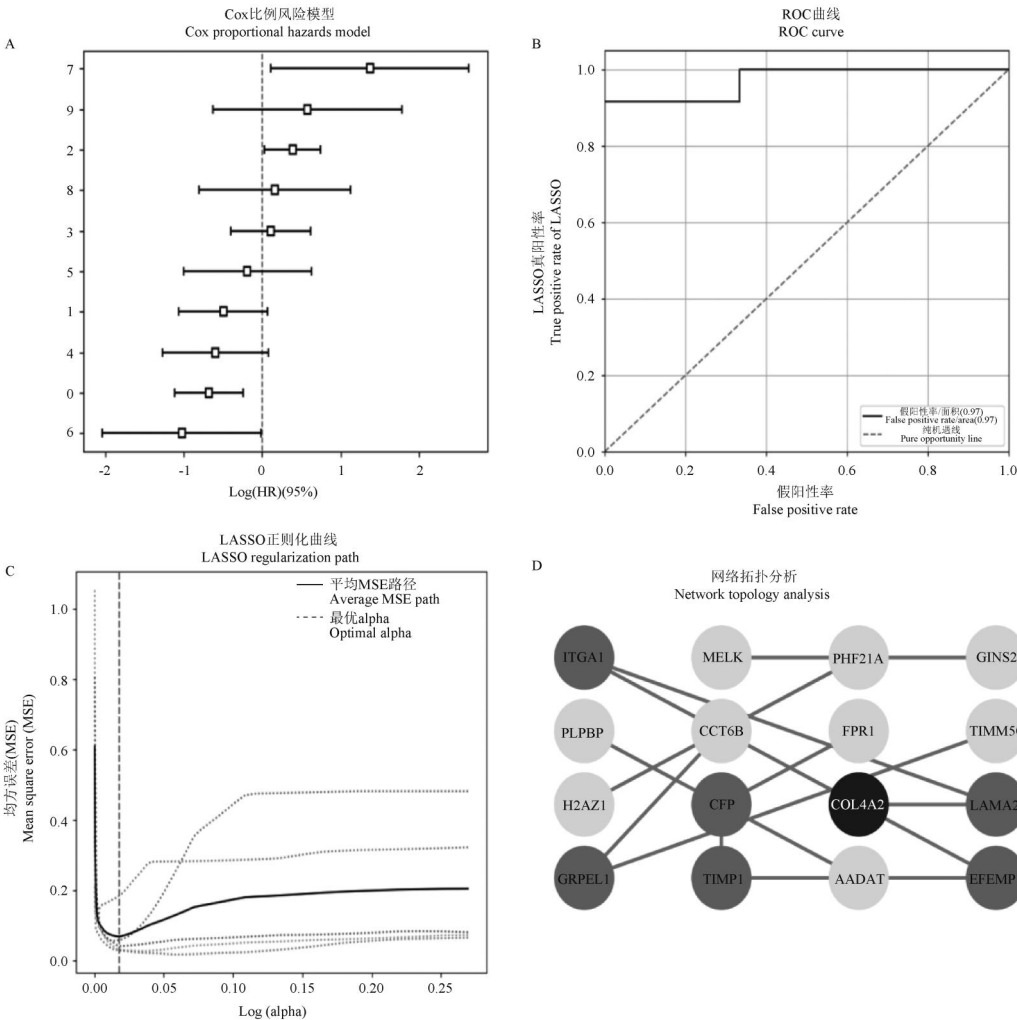


图 9 随机森林和 SVM-RFE 算法筛选

Figure 9 Random forest and SVM-RFE algorithm screening



注:A:Cox 比例风险模型的生存曲线;B:ROC-AUC;C:LASSO-COX 模型;D:蛋白互作网络。

图 10 模型验证以蛋白互作网络

Note. A, Survival curve of Cox proportional risk model. B, ROC-AUC. C, LASSO-COX model. D, Protein interaction network.

Figure 10 Model validation with protein interaction network

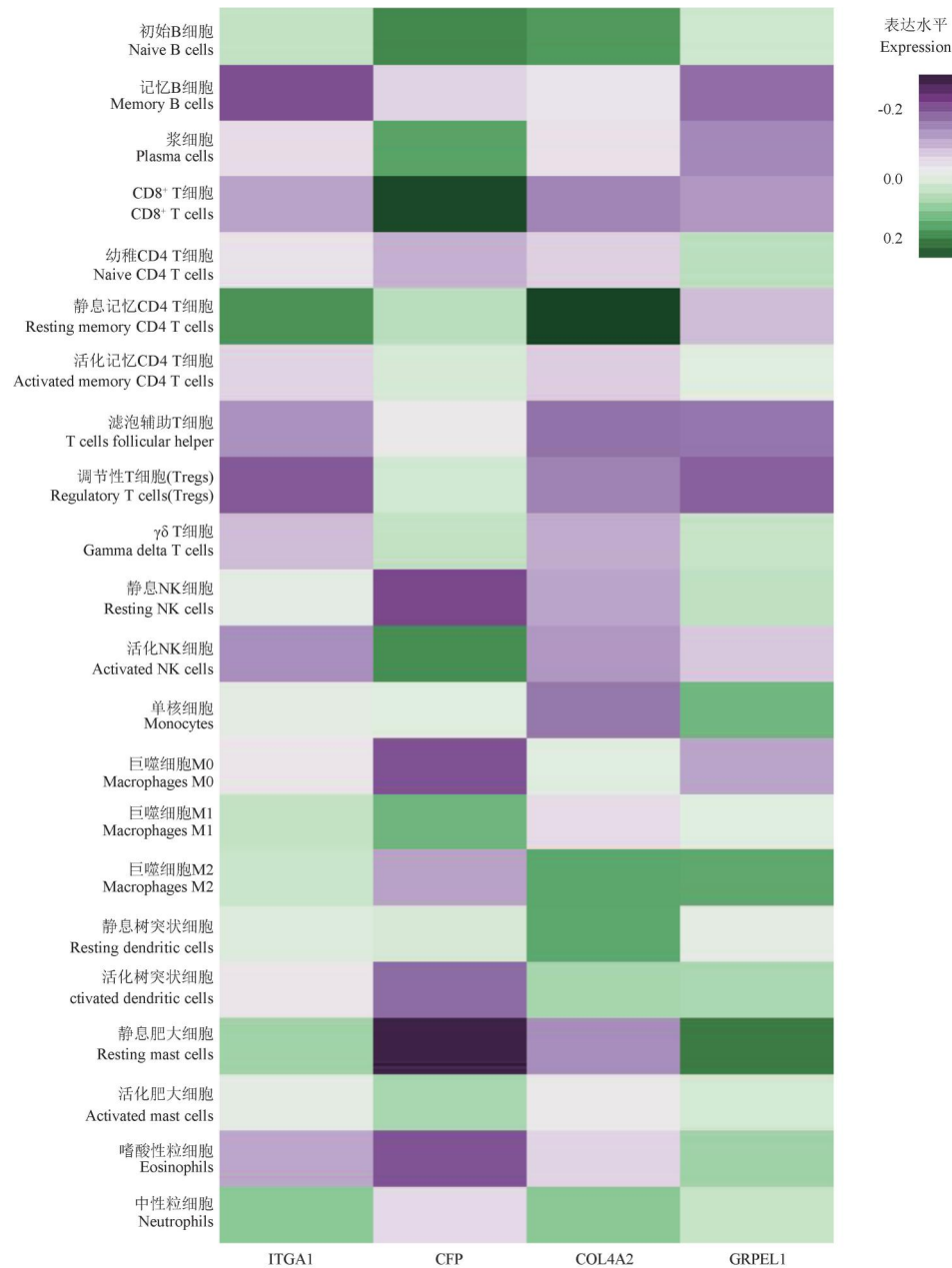


图 11 浸润结果热图

Figure 11 Heat map of infiltration results

3 讨论

肝纤维化(HF)是慢性肝病进展中的核心病理环节^[13],病理特征是肌纤维母细胞产生大量肝内细胞外基质(ECM),在纤维间隔和窦周间隙中过度积累,破坏正常肝小叶结构^[14]。内皮间质转分化(EnMT)是血管内皮细胞在发育或病理状态下,向间质样特征细胞发生转变的过程^[15,16]。NOTCH 信号通路深度参与肝纤维化,随肝纤维化的进展或消退而变化^[17]。NOTCH 受体和配体在

血管内皮中充分表达,被激活后会表现出 EnMT 的特征^[16,18],在肝窦内皮细胞(LSECs)中,内皮细胞 POFUT1 作为 NOTCH 信号重要的调节因子,能够诱导 LSECs 中纤维蛋白原的表达,加重肝纤维化^[19,20]。

本研究通过生物信息学和机器学习,筛选 CFP、COL4A2、ITGA1 和 GRPEL1 作为诊断基因,并通过参与基底膜形成、免疫微环境等多种机制,调控 PI3K-AKT、ECM 受体相互作用等多条通路,影响 LSECs 发生 EnMT,促进肝纤维化进展。

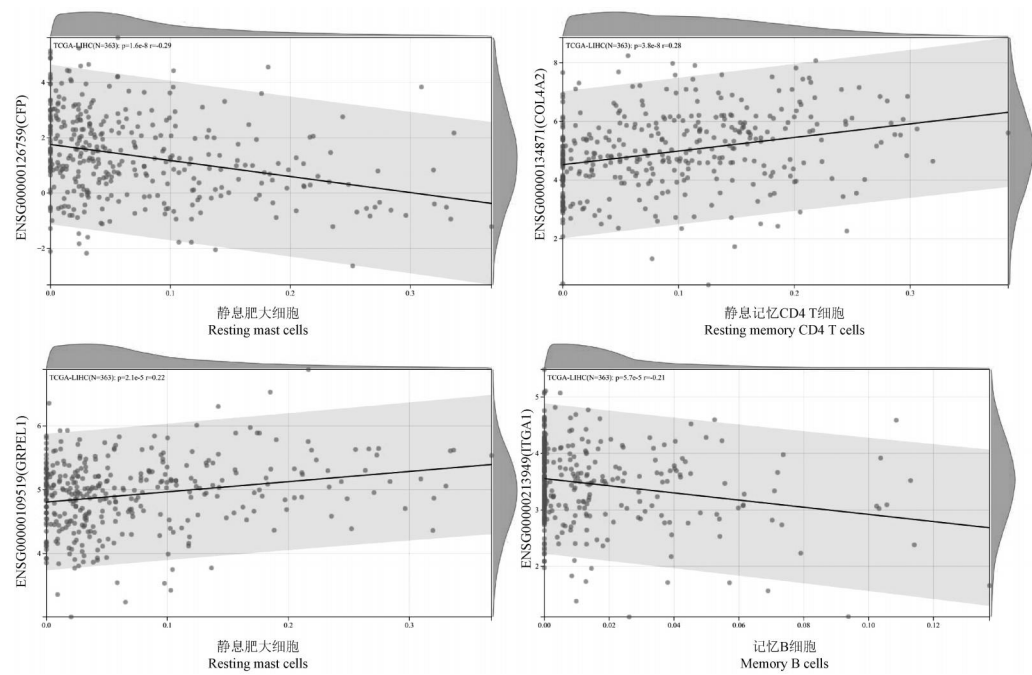


图 12 相关性分析
Figure 12 Correlation analysis

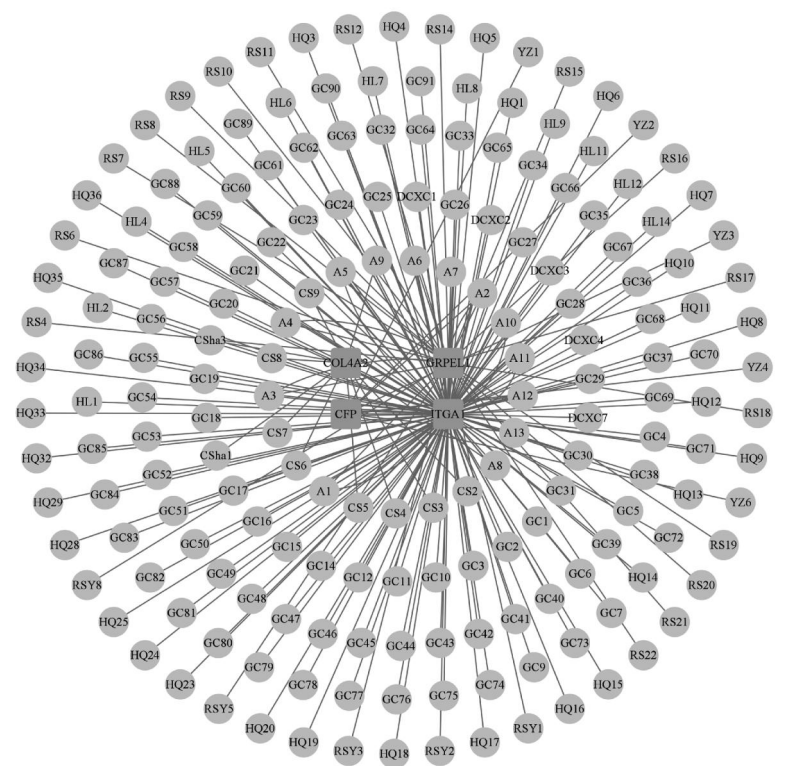
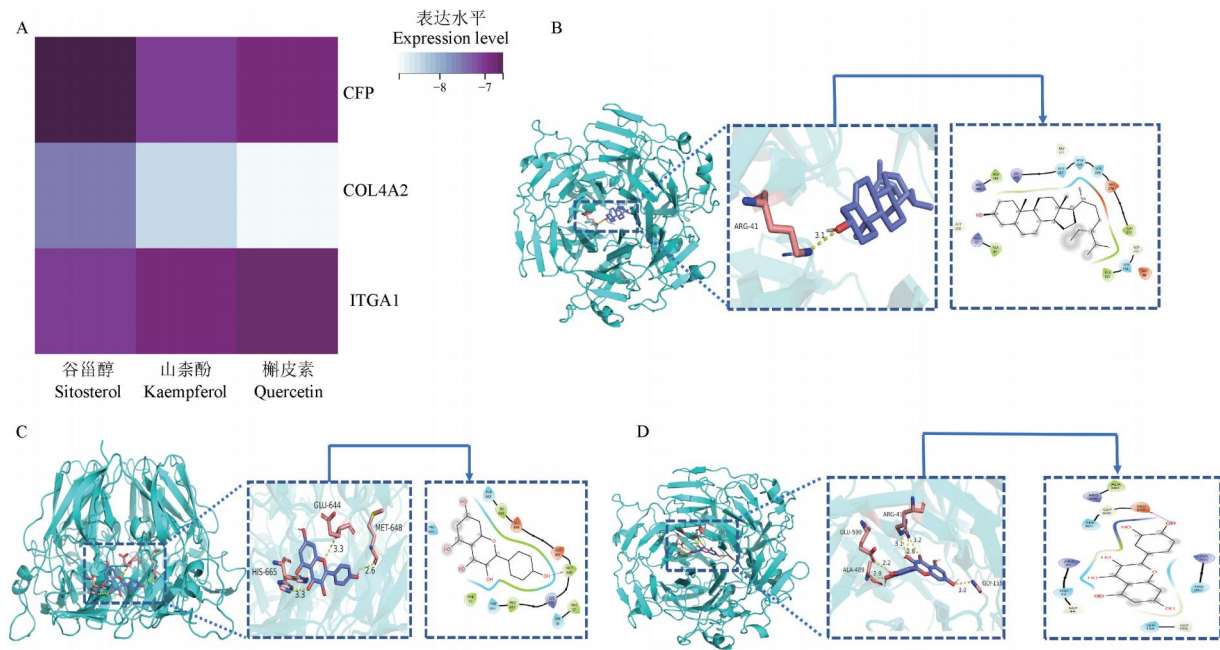


图 13 成分-靶点互作网络
Figure 13 Component-target interaction network

基于诊断基因预测到多种天然活性成分,经验证均具有较好的结合活性。体外实验通过构建 LSECs EnMT 模型,表明诊断基因在 LSECs 发生 EnMT 过程中,表达水平显著上调,进一步支持它

们在肝纤维化进程中的重要作用。ELISA 实验结果也表明,谷甾醇、山奈酚和槲皮素组 COL4A2 表达较模型组显著下降,提示预测的活性成分能够通过靶向诊断基因,发挥抗肝纤维化的作用。

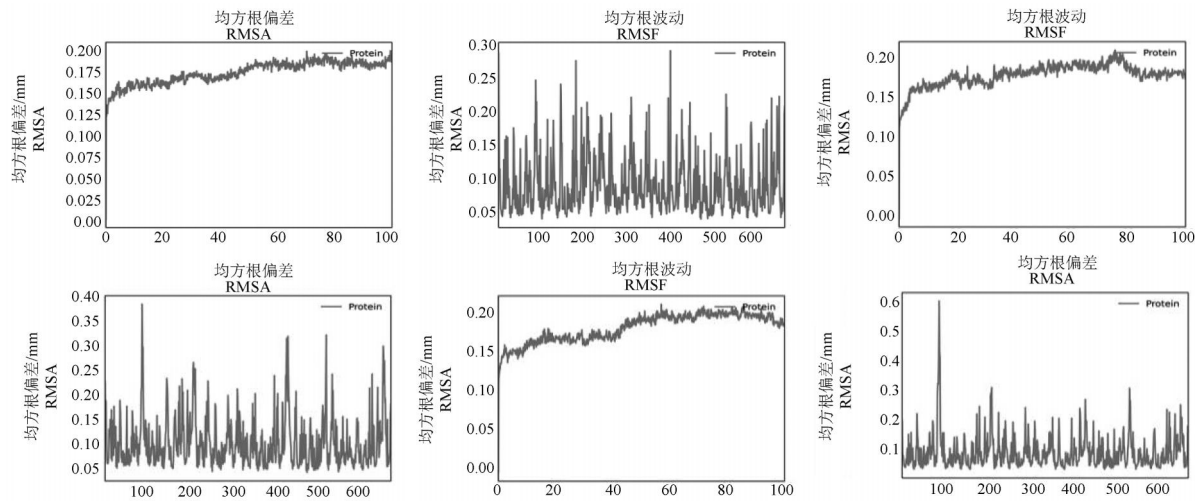


注:A:对接结果热图;B:COL4A2 和 sitosterol 对接结果;C:COL4A2 和 kaempferol 对接结果;D:COL4A2 和 quercetin 对接结果。

图 14 分子对接

Note. A, Connection result Heat map. B, Connection result between COL4A2 and sitosterol. C, Connection result between COL4A2 and kaempferol. D, Connection result between COL4A2 and quercetin.

Figure 14 Molecular docking



注:A:COL4A2 和 sitosterol 分子动力学模拟结果;B:COL4A2 和 kaempferol 分子动力学模拟结果;C:COL4A2 和 quercetin 分子动力学模拟结果。

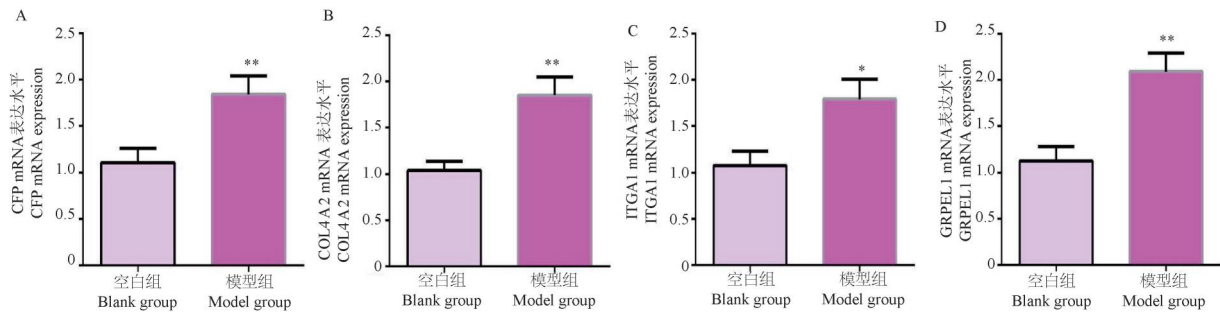
图 15 分子动力学模拟

Note. A, Molecular dynamics simulation results of COL4A2 and sitosterol. B, Molecular dynamics simulation results of COL4A2 and kaempferol. C, Molecular dynamics simulation results of COL4A2 and quercetin.

Figure 15 Molecular dynamics simulation

未折叠蛋白反应是肝脏炎症和纤维化的重要驱动因素^[21], GRPEL1 是线粒体未折叠蛋白反应的关键因子,改善线粒体的未折叠蛋白反应,

能够有效抑制 TGF- β 诱导的 EnMT 现象^[22]。在 Jagged1 诱导的 LSECs EnMT 模型中, GRPEL1 表达显著上调,提示 GRPEL1 可能作为线粒体应激

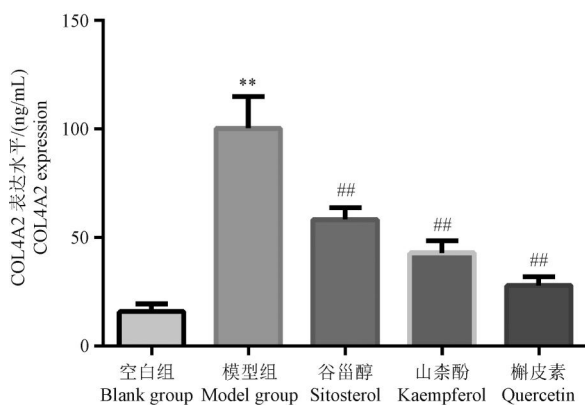


注:与空白组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 16 诊断基因的表达情况

Note. Compared with the blank group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 16 Expression of diagnostic genes



注:与空白组相比, ** $P<0.01$;与模型组相比, ## $P<0.01$ 。

图 17 活性成分对关键靶点表达的作用

Note. Compared with the blank group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, ## $P<0.01$.

Figure 17 Effect of active ingredients on the expression of key targets

反应的关键调节因子,在 LSECs 发生 EnMT 的过程中发挥重要作用,通过影响线粒体功能,调控细胞应激状态,进而影响 LSECs 的表型转变和功能改变。

CFP 是补系统中的正调节因子,补系统的异常激活与多种肝脏疾病的发生发展有关,包括肝纤维化^[23]。Jagged1 刺激 LSECs 后,CFP 表达显著上调,表明 CFP 参与 Notch 信号通路介导了 EnMT 过程。同时,CFP 可能通过促进补体级联反应,引起炎症反应,创造利于 LSECs 发生表型转变的微环境^[24]。

ITGA1 作为 I 型胶原结合受体,在细胞-ECM 相互作用中扮演重要角色,Jagged1 诱导的 LSECs 发生 EnMT 时,ITGA1 表达增加。ITGA1 通过多种机制参与肝纤维化进程,能够特异性结合胶原

蛋白,介导细胞与 ECM 粘附,促进细胞外基质重构^[25]。ITGA1 基因组的缺失能够促进细胞发生 EnMT^[26]。此外,ITGA1 还可能通过调节 LSECs 的黏附性^[27]和运动性^[28],维持内皮细胞特性,因此当其表达异常时,可能会干扰 LSECs 的正常功能,促进内皮细胞向间质样细胞转变。

COL4A2 是基底膜和细胞外基质中的关键组分,参与 ECM 的结构构建和稳态维持^[29],表达异常时,不仅能直接影响肝窦微环境结构,还能调节免疫细胞状态,间接影响肝纤维化进程^[30]。实验发现 COL4A2 的表达水平与肝纤维化的严重程度呈正相关。毛细血管化的 LSECs 通过发生 EnMT,主动参与肝窦周围 ECM 的沉积。在这一过程中,LSECs 丧失窗孔并形成基底膜^[31],而 COL4A2 作为基底膜的关键组分,其表达上调直接促进了这一病理变化。在 Jagged1 刺激下,LSECs 表达的 COL4A2 显著增加,提示 Notch 信号通路可能通过上调 COL4A2 表达,促进 LSECs 毛细血管化和 EnMT。此外,在本研究中,COL4A2 与 ITGA1 等相关基因主要富集于 PI3K-AKT、ECM 受体相互作用信号通路上。这两条经典通路不仅与非酒精性脂肪性肝炎相关肝纤维化^[32]、CCl₄ 诱导肝纤维化的小鼠模型^[33]密切相关,还共同构成了 Focal adhesion 信号通路的一部分。Focal adhesion 信号通路作为 ECM 产生和生化信号转导的枢纽,能直接诱导 EnMT,推动肝纤维化进程^[34]。

肥大细胞通过分泌多种细胞因子和活性物质,参与肝纤维化进程^[35]。记忆 B 细胞和 CD4⁺ T 细胞在适应性免疫反应中发挥关键作用,影响 LSECs 表型和功能^[36]。ECM 重构与免疫微环境

重塑间存在紧密而复杂的相互调控网络^[37], 诊断基因又与免疫细胞高度相关, 因此, 这些基因可能作为调控网络中的枢纽分子, 既参与 ECM 的合成和修饰, 又影响免疫细胞的活化。在药物预测上, 3 种天然活性成分均能显著降低 Jagged1 诱导 LSECs 中 COL4A2 蛋白的表达, 以槲皮素的作用最为显著。分子对接和分子动力学模拟也证实, 槲皮素与 COL4A2 间存在较强的结合力和稳定的蛋白柔性, 提示槲皮素的抗肝纤维化作用可能通过靶向 COL4A2 来实现。

本研究虽通过多种技术揭示了 EnMT 调控肝纤维化的分子机制, 提出以 CFP、COL4A2、ITGA1 和 GRPEL1 为核心的诊断标志物体系, 但仍存在一定的局限性, 诊断基因筛选主要基于体外实验和生物信息学分析, 所建立的 LSECs EnMT 模型可能无法完全模拟肝纤维化的复杂病理环境, 此外, 天然活性成分抗纤维化的作用机制也有待深入验证。尽管如此, 本研究为肝纤维化的机制研究、早期诊断和药物开发提供了新思路, 不仅深化了对肝纤维化发病机制的理解, 还为靶向药物的研发提供了理论依据, 未来研究可进一步验证诊断基因在不同病因肝纤维化中的表达模式和功能特点, 深入研究天然活性成分靶向诊断基因的作用机制, 为肝纤维化的临床治疗带来新突破。

参考文献:

- [1] 傅柳, 尚广彬, 陈中, 等. 中药逆转肝纤维化进程的研究概况 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 944-948.
FU L, SHANG G B, CHEN Z, et al. General situation of research on traditional Chinese medicine reversing the process of liver fibrosis [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2021, 32(4): 944-948.
- [2] 郑洋, 杨智荟, 李灿婷, 等. 莪术醇对肝星状细胞内质网应激和凋亡的作用研究 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(10): 1431-1435.
ZHENG Y, YANG Z H, LI C T, et al. Effect of curcumol on endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hepatic stellate cells [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(10): 1431-1435.
- [3] 钱家龙, 周梦泽, 胡庆华. 肝窦内皮细胞在肝脏疾病中的作用及相关治疗药物研究进展 [J]. 药学进展, 2024, 48(11): 813-822.
QIAN J L, ZHOU M Z, HU Q H. Advances in research on the role of liver sinusoidal endothelial cell in liver diseases and related therapeutic drugs [J]. Prog Pharm Sci, 2024, 48(11): 813-822.
- [4] ZEISBERG E M, TARNAVSKI O, ZEISBERG M, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis [J]. Nat Med, 2007, 13(8): 952-961.
- [5] WIDYANTORO B, EMOTO N, NAKAYAMA K, et al. Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition [J]. Circulation, 2010, 121(22): 2407-2418.
- [6] HASHIMOTO N, PHAN S H, IMAIZUMI K, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(2): 161-172.
- [7] ZEISBERG E M, POTENTA S E, SUGIMOTO H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge *via* endothelial-to-mesenchymal transition [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(12): 2282-2287.
- [8] 石胜军, 田斌群. 共表达网络分析筛选肾透明细胞癌进展相关基因 [J]. 现代泌尿外科杂志, 2018, 23(12): 910-916.
SHI S J, TIAN B Q. Co-expression network analysis identified hub genes associated with progression of human clear cell renal cell carcinoma [J]. J Mod Urol, 2018, 23(12): 910-916.
- [9] 刘孝生, 魏东升, 何信用, 等. 基于综合生物信息学和机器学习算法构建衰老相关分泌表型的骨关节炎预测模型 [J]. 中国医科大学学报, 2023, 52(12): 1092-1097, 1105.
LIU X S, WEI D S, HE X Y, et al. A predictive model of aging-related secretion phenotype for osteoarthritis constructed using integrated bioinformatics and machine learning [J]. J China Med Univ, 2023, 52(12): 1092-1097, 1105.
- [10] 袁心柱, 李玲琴, 杜欢, 等. 基于 CIBERSORT 反卷积算法研究狼疮肾炎的免疫浸润机制及潜在靶向中药预测 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(10): 2121-2129.
YUAN X Z, LI L Q, DU H, et al. Immune infiltration mechanism of lupus nephritis and prediction of potential traditional Chinese medicine targeting based on CIBERSORT deconvolution algorithm [J]. Chin J Immunol, 2024, 40(10): 2121-2129.
- [11] 王如烨, 章勤, 方晓红. 何氏育麟方治疗卵巢储备功能下降作用机制的网络药理学和分子对接研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2024, 34(1): 64-70.
WANG R Y, ZHANG Q, FANG X H. Network pharmacology and molecular docking study on the mechanism of He's Yulin recipe in treating the decline of ovarian reserve function [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West

- Med, 2024, 34(1): 64–70.
- [12] 李金泽, 崔开宇, 李东影, 等. 复方黄柏液涂剂对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌毒力和生物膜的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(8): 54–62.
- LI J Z, CUI K Y, LI D Y, et al. Effect of Fufang huangbai fluid paint on virulence and biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(8): 54–62.
- [13] 罗茂权, 黄菊芳, 黎敏航, 等. 中药治疗肝纤维化的用药规律研究 [J]. 广西医学, 2021, 43(1): 52–55, 136.
- LUO M Q, HUANG J F, LI M H, et al. Medication rule of Chinese medicine for treating liver fibrosis [J]. Guangxi Med J, 2021, 43(1): 52–55, 136.
- [14] 许皓, 阮柏, 历志文, 等. 血管内皮间质样转分化遗传示踪小鼠模型的构建及其在肝纤维化研究中的应用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(4): 832–836.
- XU H, RUAN B, LI Z W, et al. Establishment of a mouse model of vascular endothelial-mesenchymal transdifferentiation genetic tracing and its role in liver fibrosis studies [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(4): 832–836.
- [15] 曹佐锋. 低氧条件下心肌微血管内皮细胞间质转分化及氟伐他汀干预治疗的研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2011.
- CAO Z F. Study on myocardial microvascular endothelial-mesenchymal transition under hypoxic conditions and fluvastatin intervention therapy [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011.
- [16] 阮柏. 肝纤维化发生发展中肝血窦内皮细胞间质样转分化现象的发现及其调控机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- RUAN B. Discovery and regulatory mechanism of liver sinusoidal endothelial cell mesenchymal-like transition in the occurrence and development of liver fibrosis [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2017.
- [17] 纪少秀, 张恒耀, 张媛, 等. Notch 信号通路在肝纤维化中的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(6): 113–118.
- JI S X, ZHANG H Y, ZHANG Y, et al. Progress of research into Notch signaling pathway in liver fibrosis [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(6): 113–118.
- [18] 刘依, 尹玉洁, 李真, 等. 内皮间质转分化在器官纤维化中的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(6): 1014–1019.
- LIU Y, YIN Y J, LI Z, et al. Research progress of endothelial-mesenchymal transdifferentiation in fibrotic diseases [J]. Chin Pharmacol Bull, 2023, 39(6): 1014–1019.
- [19] HE S, LUO Y, MA W, et al. Endothelial POFUT1 controls injury-induced liver fibrosis by repressing fibrinogen synthesis [J]. J Hepatol, 2024, 81(1): 135–148.
- [20] 刘坤禹, 季慧范, HE S, 等. Journal of Hepatology 内皮细胞 POFUT1 通过抑制纤维蛋白原合成控制损伤诱导的肝纤维化 [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(8): 1537.
- LIU K Y, JI H F, HE S, et al. Journal of hepatology endothelial POFUT1 controls injury-induced liver fibrosis by repressing fibrinogen synthesis [J]. J Clin Hepatol, 2024, 40(8): 1537.
- [21] MALHI H, KAUFMAN R J. Endoplasmic reticulum stress in liver disease [J]. J Hepatol, 2011, 54(4): 795–809.
- [22] ZHANG M, WENG H, ZHENG J. NAD⁺ repletion inhibits the endothelial-to-mesenchymal transition induced by TGF- β in endothelial cells through improving mitochondrial unfolded protein response [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2019, 117: 105635.
- [23] THORGERSEN E B, BARRATT-DUE A, HAUGAA H, et al. The role of complement in liver injury, regeneration, and transplantation [J]. Hepatology, 2019, 70(2): 725–736.
- [24] PHIELER J, GARCIA-MARTIN R, LAMBRIS J D, et al. The role of the complement system in metabolic organs and metabolic diseases [J]. Semin Immunol, 2013, 25(1): 47–53.
- [25] TAN X, BANERJEE P, LIU X, et al. Transcriptional control of a collagen deposition and adhesion process that promotes lung adenocarcinoma growth and metastasis [J]. JCI Insight, 2022, 7(1): e153948.
- [26] CRUZ S P, ZHANG Q, DEVARAJAN R, et al. Dampened regulatory circuitry of TEAD1/ITGA1/ITGA2 promotes TGF β 1 signaling to orchestrate prostate cancer progression [J]. Adv Sci (Weinh), 2024, 11(11): e2305547.
- [27] HINTERMANN E, CHRISTEN U. The many roles of cell adhesion molecules in hepatic fibrosis [J]. Cells, 2019, 8(12): 1503.
- [28] PATSENKER E, STICKEL F. Role of integrins in fibrosing liver diseases [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(3): G425–G434.
- [29] NGANDU MPOYI E, CANTINI M, SIN Y Y, et al. Material-driven fibronectin assembly rescues matrix defects due to mutations in collagen IV in fibroblasts [J]. Biomaterials, 2020, 252: 120090.
- [30] WANG A, BU F T, LI J J, et al. microRNA-195-3p promotes hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by suppressing PTEN expression [J]. Toxicol Lett, 2022, 355: 88–99.
- [31] RUAN B, DUAN J L, XU H, et al. Capillarized liver sinusoidal endothelial cells undergo partial endothelial-mesenchymal transition to actively deposit sinusoidal ECM in liver fibrosis [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 671081.
- [32] GERHARD G S, LEGENDRE C, STILL C D, et al. Transcriptomic profiling of obesity-related nonalcoholic

- steatohepatitis reveals a core set of fibrosis-specific genes [J]. J Endocr Soc, 2018, 2(7): 710-726.
- [33] GONG Z, TANG J, XIANG T, et al. Genome-wide identification of long noncoding RNAs in CCl₄-induced liver fibrosis *via* RNA sequencing [J]. Mol Med Rep, 2018, 18 (1): 299-307.
- [34] CHEN Y, FAN Y, GUO D Y, et al. Study on the relationship between hepatic fibrosis and epithelial-mesenchymal transition in intrahepatic cells [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129: 110413.
- [35] HUANG S, WU H, LUO F, et al. Exploring the role of mast cells in the progression of liver disease [J]. Front Physiol, 2022, 13: 964887.
- [36] CACCAMO N, JOOSTEN S A, OTTENHOFF T H M, et al. Atypical human effector/memory CD4⁺ T cells with a naive-like phenotype [J]. Front Immunol, 2018, 9: 2832.
- [37] YUAN Z, LI Y, ZHANG S, et al. Extracellular matrix remodeling in tumor progression and immune escape: from mechanisms to treatments [J]. Mol Cancer, 2023, 22 (1): 48.
- [收稿日期]2025-03-15

编者·读者·作者

《中国比较医学杂志》2025 年征订启事

《中国比较医学杂志》由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与人类生命与健康密切相关的实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,重点刊载比较医学成果和进展。要求来稿数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。开设栏目:研究报告、综述与专论、研究快报、研究简讯、技术与方法、经验交流、学术动态、国外研究进展、学术信息、简讯等。读者对象:农牧渔业、医学、药学、环保、生物、体育、国防等单位的科技工作者、教育工作者、管理人员以及有关的生产者、大专院校学生等。

刊期及订价:月刊,大 16 开本,180 页。月末出版。每期 50 元,全年 12 期,共计 600 元。邮发代号:82-917。

汇款方式:银行转帐:中国农业银行股份有限公司北京潘家园支行

帐号:11220201040003764

单位抬头全称:中国实验动物学会

请注明订刊数量,并写明刊物寄往地址及收件人。收到汇款后,我们会及时将发票寄给您。