

综合生物信息学与机器学习筛选非酒精性脂肪性肝炎的趋化因子相关核心基因

莫双阳¹, 伍文红¹, 韦海小¹, 覃海燕¹, 李 俩^{2*}

(1.广西医科大学附属柳州市人民医院消化内科, 广西 柳州 545006;

2.广西医科大学附属柳州市人民医院感染科, 广西 柳州 545006)

[摘要] 目的 综合运用生物信息学方法及机器学习算法筛选与非酒精性脂肪性肝炎相关的趋化因子核心基因。方法 公共数据库 GEO 下载非酒精性脂肪性肝病芯片数据集 GSE49541, 采用 R studio 软件进行差异分析筛选差异基因, 对差异基因进行 GO 功能注释和 KEGG 信号通路富集分析, 将差异基因与趋化因子通路相关基因集取交集获取趋化因子相关差异基因, 然后采用机器学习 LASSO 回归及 SVM-RFE 算法筛选核心基因, 通过 Genemania 数据库构建核心基因互作网络图, 构建核心基因列线图预测模型, 并通过 ROC 曲线验证列线图效能。结果 共筛选获取差异基因 148 个, GO 及 KEGG 富集分析提示差异基因富集于脂质代谢、趋化因子、细胞外基质等。最后筛选获得核心基因 CCL19、CD24、ROBO1、SLC12A2, 构建核心基因互作网络图, 基于核心基因建立 NASH 列线图预测模型, 该模型 ROC 曲线的 AUC=0.997, 95% 置信区间(confidence interval, CI)为 0.988~1.000。结论 CCL19、CD24、ROBO1、SLC12A2 可能与非酒精性脂肪性肝炎发生与进展密切相关, 有望成为诊断和精准治疗的潜在靶点。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝炎; 生物信息学; 机器学习; 趋化因子 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.02.008

[中图分类号] R575.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)02-0165-07

Integrated identification of the chemokine-related key genes underlying the progression of nonalcoholic steatohepatitis via bioinformatics and machine learning

MO Shuang-yang¹, WU Wen-hong¹, WEI Hai-xiao¹, QIN Hai-yan¹, LI Liang^{2*}

(1. Department of Gastroenterology, Liuzhou People's Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Liuzhou 545006, China; 2. Department of Infectious Diseases, Liuzhou People's Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Liuzhou 545006, China)

[Abstract] **Objective** To integratedly identify the chemokine-related key genes underlying the progression of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) via bioinformatics and machine learning. **Methods** The differentially expressed genes (DEGs) after download of NASH datasets GSE49541 from public database the Gene Expression Omnibus (GEO) were identified via R studio software. Further, the Gene Ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed. The DEGs and chemokine-related gene sets were intersected to identify the differentially expressed chemokine-related genes.

[收稿日期] 2023-03-16

[基金项目] 广西壮族自治区卫生与健康委员会自筹经费科研课题(Z20210082、Z-B20231296); 柳州市人民医院院内立项科研项目(lry202311、lry202309)

[作者简介] 莫双阳(1986-), 男, 壮族, 广西柳州人, 广西医科大学附属柳州市人民医院副主任医师, 医学博士研究生, 从事消化内科疾病诊治研究。

* 通信作者。E-mail: lzryjiaximoduo2016@163.com

Identification of the key genes was applied via machine learning LASSO regression and support vector machines-recursive feature elimination (SVM-RFE). The key gene interaction network was established via the GeneMANIA database. Then the key gene nomogram models in prediction were constructed and the effectiveness of nomograms was validated by receiver operator characteristic (ROC) curve. **Results** A total of 148 DEGs were identified. GO and KEGG analyses revealed that DEGs were mainly enriched in fatty acid metabolic process, chemokine signaling pathway, and extracellular matrix. Moreover, four key genes, including CCL19, CD24, ROBO1, and SLC12A2, were identified, and a key gene interaction network diagram was constructed. Based on the key genes, a NASH nomogram prediction model was established, with the area under the ROC curve (AUC) of 997 and 95% confidence interval (CI) of 0.988–1.000. **Conclusion** CCL19, CD24, ROBO1, and SLC12A2 might be closely related to the occurrence and development of NASH, and are expected to become potential targets for its early diagnosis and precise treatment.

[Key words] nonalcoholic steatohepatitis; bioinformatics; machine learning; chemokine

非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 的疾病谱包括单纯性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 及其相关肝硬化、肝细胞癌等^[1]。NAFL 很少伴有肝内炎症及纤维化, 是 NAFLD 低风险的可逆性阶段, 被认为是轻度 NAFLD^[2]; 相反 NASH 是 NAFLD 的疾病进展阶段, 可进展为肝纤维化、肝硬化及终末期肝功能衰竭^[3], 被认为是进展期 NAFLD^[4]。NAFLD 的发病机制与代谢综合征的各组分密切相关, 尤其是肥胖、2 型糖尿病和高血压^[5]。NAFL 向 NASH 进展的确切调控机制尚不完全明确, 目前 NASH 的诊断主要依靠影像学和组织学活检, 无可靠的分子诊断标记物^[6]。与 NAFL 相比, NASH 具有更强的炎症反应和免疫细胞浸润的特点^[7], 细胞因子^[8]、趋化因子^[9]及免疫细胞所致的炎症损伤和细胞凋亡在 NASH 进展中起着关键作用^[10]。趋化因子是损伤和炎症组织中炎症细胞运输、生长和活化的诱导剂, NASH 肥胖患者肝脏中趋化因子及其受体的表达升高^[9]。趋化因子可能是 NAFLD 进展至 NASH 的重要驱动因素。生物信息学可对特定疾病分子机制进行高通量研究^[6], 因此本研究将综合利用生物信息学方法及机器学习, 筛选 NAFL 向 NASH 进展的趋化因子通路相关核心基因, 为 NASH 提供潜在的诊断标志物。

1 材料与 方法

1.1 数据来源与处理 从公共数据库 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中检索并下载数据集 GSE49541。数据集 GSE49541 中包含 40

例轻度 NAFLD (mild NAFLD) 和 32 例进展期 NAFLD (advanced NAFLD) 肝组织活检标本相关基因芯片数据, 上述病例全部纳入研究, 并进行基因探针名与基因通用名转换, 数据集进行标准化。趋化因子通路相关基因集来源于 Genecards 数据库, 检索关键词为“chemokine and pathways”, 共检索获取 396 个趋化因子通路相关基因 (chemokine pathway related genes, CPRGs)。

1.2 差异分析与富集分析 利用 R studio 软件的 limma R 包对数据集 GSE49541 中轻度 NAFLD 组和进展期 NAFLD 组芯片数据进行基因表达差异分析, 筛选出 2 组间全部差异表达基因 (differently expressed genes, DEGs), 筛选标准为 $|\log_2\text{Fold Change(FC)}| > 0.585$ (FC 为差异倍数) ($P < 0.05$), 应用 ggplot2 R 包绘制差异基因火山图、热图。然后采用 clusterProfiler R, 对差异基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析和京都基因及基因组百科全书数据库 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 信号通路富集分析, 以了解其参与调控的生物学功能和信号通路, 筛选条件设定为调整后 $P < 0.05$, 使用在线工具微生信 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制桑椹图及弦图。

1.3 筛选差异表达的 FATGs 及基因相互作用网络构建 将 DEGs 与 396 个 CPRGs 取交集以筛选差异表达的 CPRGs, 并通过 R studio 软件通过 2 种机器学习算法 LASSO 回归及支持向量机一递归特征消除 (support vector machines-recursive feature elimination, SVM-RFE) 进一步筛选特征基因, 最后将两种算法获取的特征基因取交集获取核心基因。并通过在线数据库 Genemania (<http://genemania>

org/)构建核心基因相互作用网络图,进一步探索核心基因的生物功能。

1.4 构建预测进展期 NAFLD 列线图及受试者工作曲线图 并通过 ggDCA R 包,绘制核心基因预测进展期 NAFLD 的列线图(nomogram),并通过校准曲线、决策曲线(decision curve analysis, DCA)、临床影响曲线(clinical impact curve, CIC)评估列线图可靠性和临床获益情况,最后绘制相对应的受试者工作曲线(receiver operating characteristic, ROC),计算曲线下面积(area under the curve, AUC),最终评估筛选获取的趋化因子通路核心基因对进展期 NAFLD 的预测效能。

2 结果

2.1 筛选差异基因 在数据集 GSE49541 中共筛选获得 148 个 DEGs,其中表达上调基因 112 个,表达下调基因 36 个,绘制差异基因火山图(图 1A)及热图(图 1B)。

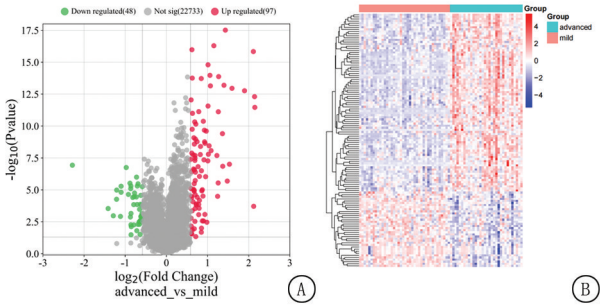


图 1 差异表达基因火山图与热图
A.GSE49541 差异基因火山图(红点表示上调基因,绿点表示下调基因,灰点表示无差异基因);B.GSE49541 差异基因热图(advanced 表示进展期 NAFLD 组, mild 表示轻度 NAFLD 组,红色表示上调,蓝色表示下调)

Figure 1 Volcano plot and heat map of differentially expressed genes

2.2 GO 功能注释及 KEGG 信号通路富集分析 将 148 个 DEGs 进行 GO 及 KEGG 信号通路富集分析。GO 功能富集分析结果显示,DEGs 主要参与脂肪酸代谢、三酰甘油代谢及脂质转运等生物学过程(图 2A)。KEGG 信号通路富集分析结果显示,DEGs 主要参与细胞外基质受体相互作用、趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号通路等(图 2B)。表明进展期 NAFLD 差异基因主要涉及脂类代谢生物学功能,并参与调控趋化因子、细胞因子、固有免疫等炎症相关通路和细胞外基质反应,结果与 NASH 脂质代谢紊乱、炎症失控、

细胞外基质增多所致肝纤维化的临床病理特征一致,提示炎症反应在 NASH 进展过程中扮演重要角色。

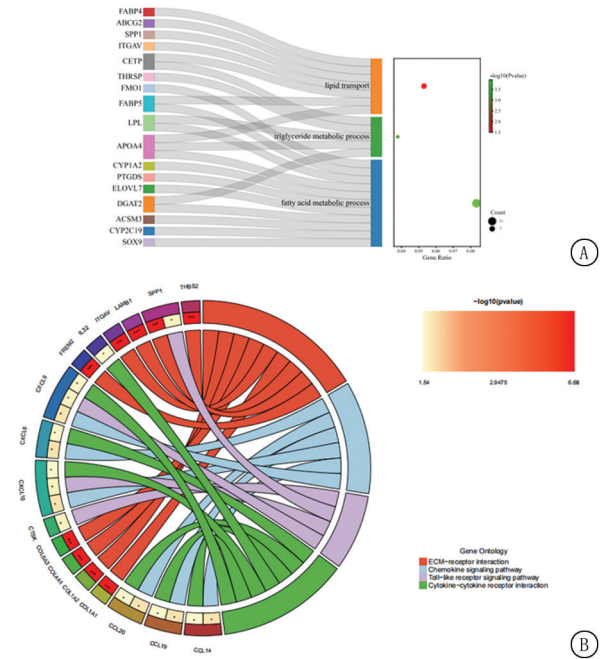


图 2 GO 及 KEGG 信号通路富集分析
A.GO 富集分析结果桑椹图;B.KEGG 信号通路富集分析结果弦图

Figure 2 GO and KEGG pathway enrichment analyses

2.3 筛选进展期 NAFLD 核心基因并构建基因相互作用网络图 采用维恩图展示 DEGs 与 396 个 CPRGs 取交集的结果,共筛选获取 7 个与趋化因子通路相关的差异基因 CXCL6、CCL20、CCL19、SLC12A2、ROBO1、SIGIRR 和 CD24(图 3A)。将上述 7 个基因纳入机器学习 LASSO 回归与 SVM-RFE 分别筛选特征基因,其中 LASSO 回归筛选获得 5 个特征基因,即 CCL19、CXCL6、SLC12A2、ROBO1、CD24(图 3B、3C),SVM-RFE 筛选获得 4 个特征基因,即 CD24、ROBO1、CCL19、SLC12A2(图 3D、3E)。最后将 2 种机器学习筛选获得的特征基因取交集,其中 CD24、ROBO1、CCL19、SLC12A2 均被两种算法纳入(图 3F),成为进展期 NAFLD 的趋化因子通路相关核心基因(简称核心基因)。

2.4 核心基因并构建基因相互作用网络图 构建核心基因 CCL19、CD24、ROBO1、SLC12A2 的基因相互作用网络图,结果提示核心基因主要参与调控趋化因子反应、趋化因子调控通路、白细胞迁移、白细胞趋化性、淋巴细胞迁移等(图 4)。

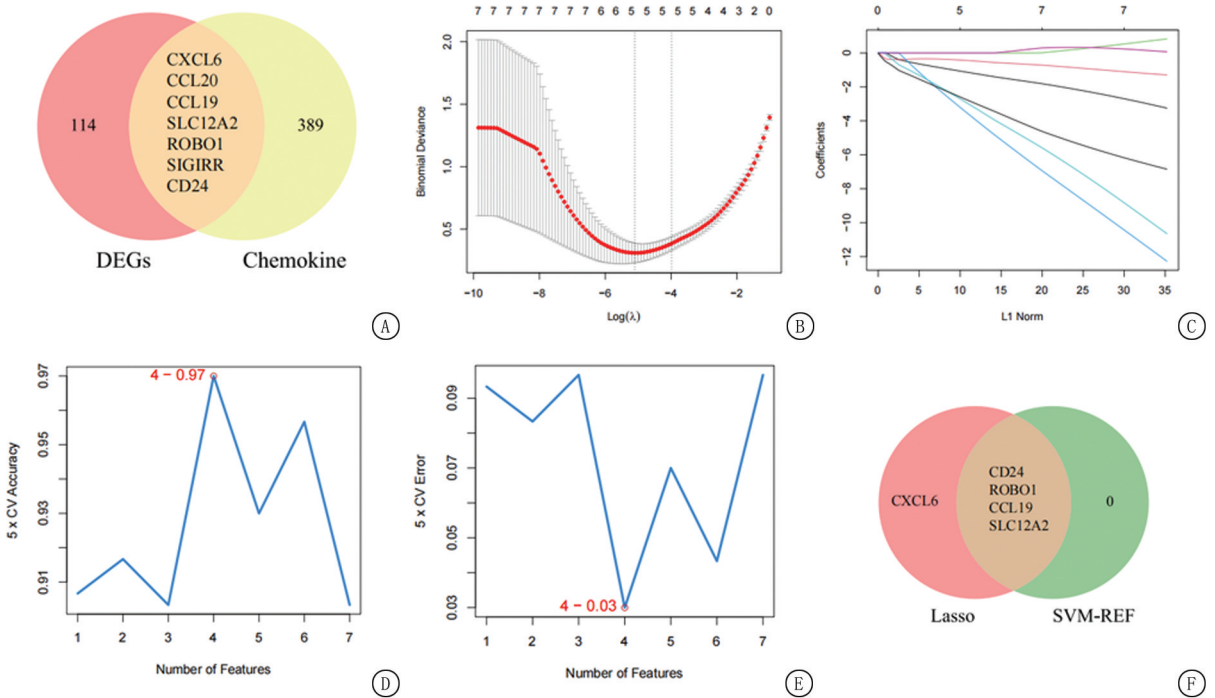


图3 差异表达的CPRGs维恩图、LASSO回归分析模型图、SVM-RFE模型图、核心基因维恩图

A.差异表达的CPRGs维恩图;B.LASSO回归特征筛选过程图;C.LASSO回归各变量的系数变化图;D.SVM-RFE筛选变量的模型图,纳入4个特征变量时,模型准确性最高为0.97;E.SVM-RFE筛选变量的模型图,纳入4个特征变量时,模型的错误率最低为0.03;F.核心基因维恩图

Figure 3 CPRGs Venn diagram, LASSO regression analysis model diagram, SVM-RFE model diagram, and key gene Venn diagram of diferential expression

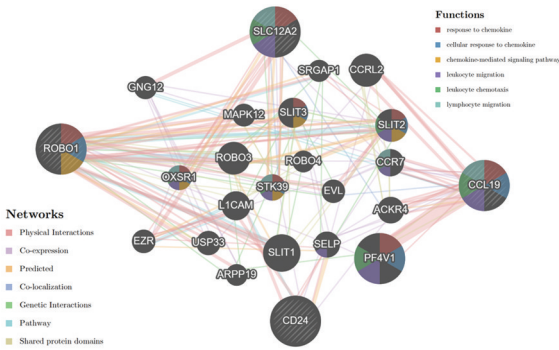


图4 核心基因互作网络图

(连线颜色表示基因间互相作用的类型,饼图不同颜色表示基因调控的不同生物学功能)

Figure 4 Key gene interaction network

2.5 构建预测进展期NAFLD列线图(nomogram)及ROC曲线 利用核心基因CCL19、CD24、

ROBO1、SLC12A2 构建预测进展期 NAFLD 列线图模型(图 5A),列线图的校准曲线具有极高的拟合度(mean absolute error=0.014),提示列线图准确性较高(图 5B)。决策曲线提示联合使用核心基因构建的预测模型(nomogram)具有最好的临床决策价值(图 5C),临床影响曲线提示预测模型与临床实际诊断符合度较高(图 5D)。ROC 曲线提示用于诊断进展期 NAFLD 时,CCL19 的 AUC = 0.804,CD24 的 AUC = 0.941,ROBO1 的 AUC = 0.865,SLC12A2 的 AUC=0.884(图 5E),而联合使用 4 个核心基因的 nomogram 预测模型时 AUC=0.997,95%置信区间(confidence interval, CI)为 0.988~1.000(图 4F),提示预测模型具有极高的敏感度及特异度。

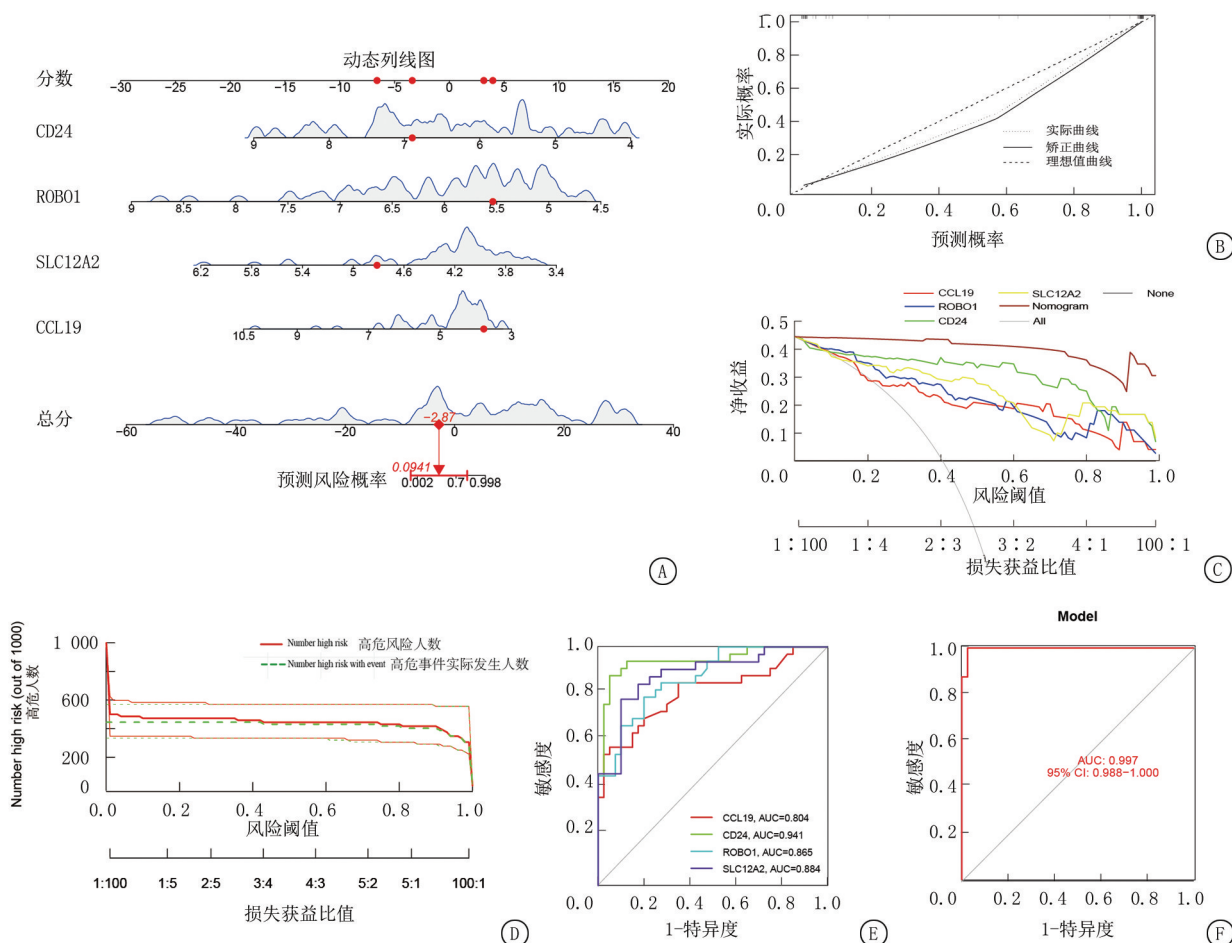


图5 核心基因预测进展期NAFLD列线图及ROC曲线

A.核心基因 CCL19、CD24、ROBO1、SLC12A2 预测进展期 NAFLD 的列线图 (nomogram); B.列线图模型的校准曲线图 (实线表示列线图预测曲线, 细虚线表示实际曲线, 粗虚线表示理想曲线); C.列线图模型的决策曲线 (横坐标表示风险概率阈值及损失获益比, 纵坐标表示净收益); D.列线图的临床影响曲线 (横坐标表示风险概率阈值及损失获益比, 纵坐标表示人数, 红色曲线表示在不同的概率阈值下, 被模型判定为进展期 NAFLD 的人数; 红色线条表示在不同的概率阈值下, 被模型判定为高风险且真的为进展期 NAFLD 的人数); E. 各核心基因预测进展期 NAFLD 的 ROC 曲线; F. 核心基因 nomogram 预测模型的 ROC 曲线

Figure 5 Nomogram and ROC curve of key genes in predicting the progressive NAFLD

3 讨论

NAFLD 被认为是代谢综合征 (metabolic syndrome, MS) 的一种肝脏表现形式^[11], 脂质堆积、脂质过氧化、氧化应激损伤及炎症反应共同参与了 NAFLD 的发生与进展, NASH 被认为是一种进展期 NAFLD, 可导致肝硬化、肝细胞癌等终末期肝病^[12]。NAFLD 的发病机制较为复杂, 目前最为认可的是“二次打击”学说, 其中胰岛素抵抗及肝脏内过量脂质堆积导致的肝细胞脂肪变性为第一次打击^[13]。持续的肝脏炎症是从 NAFL 向 NASH 进展的关键驱动因素。肝细胞脂质过氧化加剧及氧化应激损伤, 线粒体功能障碍, 免疫细胞浸润, 炎症反应失控及细胞因子风暴等为第二次打击, 增加肝脏对炎性坏死敏感性, 从而加速 NASH 过程及肝纤维

化, 最终导致肝硬化及诱发 HCC^[14]。NASH 和 NAFL 的关键区别在于炎症和纤维化的存在, 而炎症和纤维化的出现与免疫细胞和免疫因子如趋化因子和细胞因子的作用密切相关^[15]。

趋化因子是一类通过趋化和激活白细胞参与免疫和炎症反应的趋化性细胞因子大家族, 迄今为止, 已鉴定出大约 70 余种表达于各种细胞类型和组织的趋化因子及趋化因子受体, 而参与趋化因子及趋化因子受体调控及效应的基因多达上百种, 共同构成了复杂的调控网络^[16]。趋化因子系统可调控肝脏的炎症, 临床和实验研究的证据表明, 趋化因子及其受体在 NAFLD 患者的肝脏中增加, 在诱导胰岛素抵抗、脂肪变性、炎症和肝脏纤维化中起关键作用^[17]。因此, 趋化因子通路相关基因在 NASH 发生和进展过程中可能起着关键的调控作用, 通过生

物信息学筛选与 NAFLD 进展密切相关的核心基因,具有重要的研究价值和可行性。

本研究采用生物信息方法和机器学习算法,通过分析公共数据库数据,进展期 NAFLD 组与轻度 NAFLD 组相比,共鉴定出 148 个表达量显著上调或下调的 DGEs,富集分析提示 DGEs 主要参与细胞外基质受体相互作用、趋化因子信号通路、细胞因子受体相互作用、Toll 样受体信号通路的调控,提示免疫炎症反应及趋化因子与进展期 NAFLD 的发生发展密切相关。经机器学习算法筛选,明确 CCL19、CD24、ROBO1、SLC12A2 为与 NAFLD 进展密切相关的核心基因,4 个基因均表现为一致性表达上调。基因相互作用网络提示核心基因主要参与调控趋化因子调控通路、白细胞趋化性、淋巴细胞迁移等,并构建了具有高效能的进展期 NAFLD 列线图(nomogram)预测模型,该模型具有极高的敏感性与特异性。

CCL19 是趋化因子配体家族的一员,参与炎症反应正常淋巴细胞的再循环和归巢,它特异性地结合趋化因子受体 CCR7,并显示了对 T 淋巴细胞的趋化活性^[18]。本研究的 KEGG 富集分析和基因相互作用网络均提示,CCL19 参与了趋化因子信号通路与淋巴细胞迁移的调控,与文献报道相一致。有研究报道,在 NAFLD 患者中 CCL19 的表达与炎症信号通路[如 Toll 样受体 4(TLR4)和 NF- κ B]和促炎因子(IL-6 和 TNF- α)明显正相关,二甲双胍可显著抑制 CCL19 的高表达并改善

肝脏脂肪变性与炎症^[19]。CCL19/CCR7 信号通路可促进高脂饮食诱导的胰岛素抵抗和肥胖^[20]。因此,CCL19 及其信号通路可通过参与调控胰岛素抵抗、炎症反应、白细胞与淋巴细胞趋化迁移等,影响 NASH 的进展,有望成为精准治疗 NASH 的潜在靶点。

CD24 编码在成熟粒细胞和 B 细胞上表达的唾液糖蛋白,并调节向这些细胞发出的生长和分化信号,脂肪细胞祖细胞亚群表达 CD24 对体内白色脂肪组织功能重建至关重要^[21],而外周白色脂肪在胰岛素抵抗状态下的异常脂解,可导致大量游离脂肪酸转运及堆积于肝细胞内,诱发肝细胞脂肪变性^[22]。此外,CD24 的缺失可导致全身脂肪减少,葡萄糖稳态失衡和游离脂肪酸代谢紊乱^[21]。ROBO1 是分泌蛋白 Slit2 的受体,可参与调节细胞的生长和迁移。肝纤维化患者肝组织中 Slit2、ROBO1 的表达均显著升高,使用 ROBO1 的中和抗体拮抗其功能或使用 siRNA 抑制 ROBO1 的表达,均可降低肝

星状细胞表达纤维化标志物 α -SMA^[23]。CCN2/CTGF 可通过与 Slit2/ROBO 信号通路的互相调控而促进肝纤维化^[24]。SLC12A2 编码一种钠离子依赖的离子转运体,其突变会导致细胞代谢的改变^[25]。高脂饮食诱导的雄性 Wistar 大鼠 NAFLD 模型中 SLC12A2 表达上调^[26]。目前尚缺少 CD24、ROBO1、SLC12A2 与 NASH 进展相关的机制研究报道,从现有文献汇总分析,CD24、ROBO1、SLC12A2 可能通过影响外周脂肪细胞功能、脂肪酸代谢、细胞外基质调控等多种机制,调控 NASH 及其所致肝纤维化的进展,这将为今后 NASH 研究提供新的方向。

综上,通过综合运用生物信息方法和机器学习算法,通过分析数据集 GSE49541 芯片数据,提示与趋化因子通路相关的核心基因 CCL19、CD24、ROBO1、SLC12A2 表达上调,可能参与了 NAFLD 发生与 NASH 进展的调控,上述核心基因对进展期 NAFLD 具有较高的预测效能,有望成为今后 NASH 研究新的方向,并为进一步实验研究提供理论依据。

[参考文献]

- [1] 田爱平,杨永峰.非酒精性脂肪性肝病诊断—病理的重要性[J].临床肝胆志,2023,39(3):491-497.
- [2] Murphy SK, Yang H, Moylan CA, et al. Relationship between methylome and transcriptome in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Gastroenterology*, 2013, 145 (5): 1076-1087.
- [3] Camilleri M, Malhi H, Acosta A. Gastrointestinal complications of obesity[J]. *Gastroenterology*, 2017, 152(7): 1656-1670.
- [4] Kim MC, Park JG, Jang BI, et al. Liver fibrosis is associated with risk for colorectal adenoma in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2019, 98 (6): e14139.
- [5] Hagemann CA, Legart C, Møllerhøj MB, et al. A liver secretome gene signature-based approach for determining circulating biomarkers of NAFLD severity [J]. *PLoS One*, 2022, 17(10): e0275901.
- [6] Liu MJ, Jin H, Chen YB, et al. Screening of non-alcoholic steatohepatitis(NASH)-related datasets and identification of NASH-related genes [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2021, 14(5): 567-581.
- [7] Rajak S, Gupta P, Anjum B, et al. Role of AKR1B10 and AKR1B8 in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) in mouse [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2022, 1868(4): 166319.
- [8] Bocsan IC, Milaciu MV, Pop RM, et al. Cytokines genotype-phenotype correlation in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Oxid*

- Med Cell Longev,2017,2017:4297206.
- [9] Roh YS,Seki E. Chemokines and chemokine receptors in the development of NAFLD[J]. *Adv Exp Med Biol*,2018,1061:45–53.
- [10] Li S,Han S,Jin K, et al. SOCS2 Suppresses inflammation and apoptosis during NASH progression through limiting NF- κ B activation in macrophages[J]. *Int J Biol Sci*,2021,17(15):4165–4175.
- [11] 陈词,徐可树.脂肪肝与代谢性疾病[J].*肝博士*,2022,29(5):19–20.
- [12] 张瑞,李荣荣,王腊梅,等.氧化应激在非酒精性脂肪肝发病机制中的作用和潜在治疗靶点[J].*动物营养学报*,2022,34(12):7602–7615.
- [13] 刘晓燕,高卉.非酒精性脂肪性肝病的研究进展[J].*湖北科技学院学报(医学版)*,2019,33(4):364–368.
- [14] 曹颖,谢雯.非酒精性脂肪性肝病发病机制研究[J].*中国临床医生杂志*,2020,48(1):4–6.
- [15] Chung KW, Cho YE, Kim SJ, et al. Immune-related pathogenesis and therapeutic strategies of nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Arch Pharm Res*,2022,45(4):229–244.
- [16] Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors[J]. *Febs J*,2018,285:2944–2971.
- [17] Nagata N,Chen G,Xu L, et al. An update on the chemokine system in the development of NAFLD [J]. *Medicina (Kaunas)*,2022,58(6):761.
- [18] Yan Y,Chen R,Wang X, et al. CCL19 and CCR7 expression, signaling pathways, and adjuvant functions in viral infection and prevention[J]. *Front Cell Dev Biol*,2019,7:212.
- [19] Zhao J,Wang Y,Wu X, et al. Inhibition of CCL19 benefits non-alcoholic fatty liver disease by inhibiting TLR4/NF- κ B-p65 signaling[J]. *Mol Med Rep*,2018,18(5):4635–4642.
- [20] Sano T,Iwashita M,Nagayasu S, et al. Protection from diet-induced obesity and insulin resistance in mice lacking CCL19-CCR7 signaling[J]. *Obesity (Silver Spring)*,2015,23(7):1460–1471.
- [21] Huang S, Sun C, Hou Y, et al. A comprehensive bioinformatics analysis on multiple gene expression omnibus datasets of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Sci Rep*,2018,8(1):7630.
- [22] 阎利萍,左吉卉,吴明江,等.脂肪酸代谢与非酒精性脂肪肝病关系的研究进展[J].*中国医药科学*,2020,10(20):35–39,56.
- [23] Chang J, Lan T, Li C, et al. Activation of Slit2-Robo1 signaling promotes liver fibrosis[J]. *J Hepatol*,2015,63(6):1413–1420.
- [24] Pi L,Sun C,Jn Simon N, et al. CCN2/CTGF promotes liver fibrosis through crosstalk with the Slit2/Robo signaling[J]. *J Cell Commun Signal*,2023,17(1):137–150.
- [25] Omer S,Koumangoye R,Delpire E. A mutation in the Na-K-2Cl cotransporter-1 leads to changes in cellular metabolism [J]. *J Cell Physiol*,2020,235(10):7239–7250.
- [26] Cong S,Li Z,Yu L, et al. Integrative proteomic and lipidomic analysis of Kaili Sour Soup-mediated attenuation of high-fat diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in a rat model[J]. *Nutr Metab(Lond)*,2021,18(1):26.

(本文编辑:刘斯静)