

黄药子致肝脏损伤的网络毒理学分析及验证

孙雅馨¹, 秦红岩², 臧凯宏^{1,3}, 罗慧英^{1,3*} (1.甘肃中医药大学药学院, 兰州 730000; 2.兰州大学第一医院, 兰州 730000; 3.甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

摘要: 目的 采用网络毒理学方法对黄药子导致肝脏损伤的毒理作用及机制进行预测, 并通过动物试验对预测结果进行验证。方法 通过 TCMSP 结合 TOXNET 筛选黄药子致肝损伤的毒性成分, 利用 Pharm Mapper 数据库预测黄药子毒性成分作用靶点, 应用 Gene Cards 和 CTD 筛选肝脏损伤靶点, 采用 Cytoscape 软件构建黄药子“毒性成分-靶点”及“毒性成分-肝脏损伤靶点”网络, 利用 STRING 数据库构建蛋白互作网络, 分析黄药子致肝脏损伤的关键靶点。通过 DAVID 平台对黄药子致肝损伤靶点进行通路富集分析。通过动物试验对黄药子致肝损伤的机制进行验证。结果 通过 TCMSP 获得黄药子 63 个成分, TOXNET 网站筛选出黄药子致肝损伤的 8 个毒性成分, 黄药子致肝损伤的关键靶点为 Akt1、INS、VEGFA; 其机制涉及 PI3K/Akt、HIF-1、Ras 以及 Rap1 等信号通路。动物试验结果表明, 黄药子水煎液可使血清 ALT、AST 和 ALP 水平升高, 肝脏组织中 MDA 含量升高及 SOD 和 GSH 活性降低, 黄药子可降低肝脏 p-Akt 与 p-PI3K 蛋白表达。结论 黄药子导致肝损伤是通过多成分、多靶点作用于多种信号通路的结果, 与其下调肝脏组织中 PI3K/Akt 信号通路有关。

关键词: 网络毒理学; 黄药子; 肝脏毒性; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)24-3057-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.24.001

引用本文: 孙雅馨, 秦红岩, 臧凯宏, 等. 黄药子致肝脏损伤的网络毒理学分析及验证[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(24): 3057-3063.

Network Toxicological Analysis and Verification of Liver Injury Induced by *Dioscorea Bulbifera* L.

SUN Yaxin¹, QIN Hongyan², ZANG Kaihong^{1,3}, LUO Huiying^{1,3*} (1.College of Medicine, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2.The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 3.Key Laboratory of Pharmacology and Toxicology of Traditional Chinese Medicine, Gansu Province, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To predict the toxicological effects and mechanisms of *Dioscorea bulbifera* L. causing liver damage by the network toxicology method, and verify the prediction results through animal experiments. **METHODS** TCMSP combined with TOXNET was used to screen the toxic components of *Dioscorea bulbifera* L. that caused liver damage, and the Pharm Mapper database was used to predict the target of the toxic components of *Dioscorea bulbifera* L.. Gene Cards and CTD were used to screen liver damage targets, and Cytoscape software was used to construct a network of “toxic components-targets” and “toxic components-liver damage targets” of *Dioscorea bulbifera* L.. The STRING database was used to construct a protein interaction network and analyze the key targets of *Dioscorea bulbifera* L. induced liver damage. Pathway enrichment analysis was performed on the targets of *Dioscorea bulbifera* L. induced liver damage through the DAVID platform. The mechanism of *Dioscorea bulbifera* L. induced liver damage was verified through animal experiments. **RESULTS** The 63 components of *Dioscorea bulbifera* L. were obtained through TCMSP. The TOXNET website screened out 8 toxic components of *Dioscorea bulbifera* L. that caused liver damage. The key targets of *Dioscorea bulbifera* L. caused liver damage were Akt1, INS, VEGFA. Its mechanism included many signal pathways, such as PI3K/Akt, HIF-1, Ras, Rap1, etc. The results of animal experiments showed that decoction of *Dioscorea bulbifera* L. could increase serum ALT, AST and ALP levels, increase the content of MDA in liver tissue and decrease SOD and GSH activities. *Dioscorea bulbifera* L. could reduce p-Akt and p-PI3K protein expression in liver. **CONCLUSION** The liver damage caused by *Dioscorea bulbifera* L. is the result of multiple signal pathways through multiple components and multiple targets. It is related to the reduction of the PI3K/Akt signal pathway in liver tissue.

KEYWORDS: network toxicology; *Dioscorea bulbifera* L.; hepatotoxicity; PI3K/Akt signaling pathway

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(20JR10RA325)

作者简介: 孙雅馨, 女, 硕士生 Tel: 13519312616 E-mail: 1074560767@163.com *通信作者: 罗慧英, 女, 博士, 教授 Tel: 18919314848 E-mail: louria@163.com

黄药子是薯蓣科多年生草质藤本植物黄独 (*Dioscorea bulbifera* L.)的地下块茎,具有散结消癭、清热解毒的功效^[1],临床主要用于治疗甲状腺肿大、咽喉肿痛、百日咳等病症。现代药理学研究证明,黄药子具有抗菌消炎、抗病毒和抗肿瘤等生物活性^[2-6]。然而,黄药子具有较强的毒性,且毒理机制目前尚未完全明确,这极大地限制了其临床应用。本研究采用网络毒理学的方法对黄药子致肝损伤的毒性成分及毒理机制进行分析预测,并采用动物试验对其毒性机制进行验证,以初步阐明黄药子肝脏毒性的分子机制。

1 材料

1.1 数据库与软件

中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmbspw.com/tcmssp.php>);毒理学数据网络(TOXNET, <https://toxnet.nlm.nih.gov/>);反向药效团匹配数据库(Pharm Mapper, <http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>);PubChem 数据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>);蛋白质数据库(UniProt, <https://www.uniprot.org/>);人类基因数据库(Gene Cards, <https://www.genecards.org/>);比较毒理基因组学数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>);蛋白相互作用数据库(String, <https://string-db.org/>);Cytoscape 3.6.1 软件(<http://www.Cytoscape.org/>);DAVID 6.7(<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.2 试剂与仪器

生药黄药子(康美药业股份有限公司,产地:广东;批号:200203091)经甘肃中医药大学王明伟教授鉴定为薯蓣科植物黄独(*Dioscorea bulbifera* L.)的块茎;ALT、AST、ALP、SOD、MDA 和 GSH 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,批号分别为 20200715, 20200714, 20200831, 20200901, 20200902, 20191212;兔抗 p-PI3K、PI3K、p-Akt 和 Akt 抗体均购自 Cell Signaling 公司,批号分别为 0612020, 0412020, 0712020, 0512020。

SUNRISE 酶联免疫检测仪(瑞士 TECAN 公司);BS124S 电子天平(赛多利斯);3K30 型台式多功能高速低温离心机(美国 Sigma 公司);1645050 型基础电泳仪、Mini-PROTEAN Tetra 电泳槽和小型 Trans-Blot 转印槽均来自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 动物

SPF 级♂昆明种小鼠 30 只,体质量 18~22 g,

由甘肃中医药大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(甘)2015-0002。

2 方法

2.1 黄药子致肝脏损伤的网络毒理学分析

2.1.1 黄药子毒性成分的筛选及其作用靶点预测 利用 TCMSP 数据库^[7]检索黄药子所含的化学成分,将检索得到的黄药子化学成分输入 TOXNET 数据库中进行检索,筛选黄药子中具有毒性的化合物作为黄药子潜在毒性成分^[8]。Pharm Mapper 是以活性小分子为探针,搜寻潜在成分靶标并预测化合物作用靶点的数据库^[9]。本研究应用 PubChem 数据库下载黄药子潜在毒性成分化合物二维结构并将其文件导入 Pharm Mapper 数据库,预测黄药子毒性成分的靶点,根据相似性匹配原则对获得的靶点进行评分和排序,筛选出每种化合物排名前 100 的人类蛋白靶点,最后利用 UniProt 数据库将获取的靶点转换成基因名称。

2.1.2 黄药子毒性成分-靶点网络及毒性成分-肝损伤靶点网络构建 在 Gene Cards 和 CTD 数据库中输入关键词“Liver injury”,获取肝损伤相关靶点,将整理获得的肝损伤靶点导入 Cytoscape 软件构建肝损伤网络。同时将黄药子毒性成分和成分靶点数据导入 Cytoscape 软件构建黄药子毒性成分-靶点网络,最后将肝损伤网络与黄药子毒性成分-靶点网络进行映射,构建黄药子毒性成分-肝损伤靶点网络。

2.1.3 黄药子致肝损伤靶点蛋白互作网络及信号通路分析 为了分析黄药子致肝损伤的靶点间相互作用及黄药子致肝损伤的关键靶点,将黄药子致肝损伤靶点导入 STRING 数据库进行蛋白互作分析,下载蛋白互作的 TSV 结果导入 Cytoscape 软件以构建蛋白互作的可视化网络图,并利用 Cytoscape 软件的 CytoHubba 模块分析黄药子致肝损伤关键靶点。应用 DAVID 数据库对黄药子致肝损伤靶点进行通路富集分析以预测黄药子致肝损伤的主要信号通路。

2.2 黄药子致肝脏损伤动物试验验证

2.2.1 黄药子水煎液制备 将 0.5 kg 黄药子干燥块茎粉碎,加入 8 倍量体积水常温浸泡 2 h,加热并保持微沸 30 min,收集滤液。药渣继续加 5 倍量体积水,加热并保持微沸 30 min,收集滤液。合并 2 次滤液并加热浓缩至 0.5 L,即 1 g·mL⁻¹(按

黄药子生药量计算),临用前加水稀释至所需浓度。

2.2.2 动物分组及给药 30 只小鼠适应性饲养 1 周后随机分为 3 组,即正常对照组(生理盐水)、黄药子低剂量组(黄药子水煎液 $20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和黄药子高剂量组(黄药子水煎液 $40\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。每日灌胃给药 1 次,连续 14 d。

2.2.3 血清及肝脏生化指标检测 动物最后一次给药 2 h 后,摘眼球取血,低温离心($3\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min),吸取上层血清,按试剂盒说明书测定血清中 ALT、AST 以及 ALP 水平。处死动物,称取适量肝脏组织,低温制成匀浆,离心($2\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min),吸取上清液,试剂盒检测 MDA 水平及 SOD 和 GSH 活性。

2.2.4 肝脏病理学检查 取适量肝脏组织,生理盐水洗去表面血污,经 4% 甲醛水溶液固定后修切、常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色、酒精梯度脱水、透明、封片,最后置于光学显微镜下观察。

2.2.5 免疫印迹检测肝脏组织蛋白表达 称取适量肝脏组织加入裂解液,低温匀浆,置于冰上裂解 20 min 后冻融 3 次,低温离心($8\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min),吸取上清,用 $5\times$ 上样缓冲液与蛋白样品按 1:4 的比例混合, $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min。将

样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,用 5% 的 BSA 进行封闭 1 h, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育一抗过夜,二抗室温孵育 1 h,使用 ECL 发光液显影,用 Image J 软件分析目的蛋白与内参蛋白的灰度值,根据相应内参的灰度值计算目的蛋白的相对表达量。

2.3 统计学处理

应用 SPSS 15.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐性时用 LSD 方法分析,方差不齐时用 Game-Howell 方法分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄药子致肝脏损伤的网络毒理学预测结果

3.1.1 黄药子毒性成分筛选及毒性成分-靶点网络构建 从 TCMSPP 数据库中检索得到黄药子已知成分 63 个,经 TOXNET 数据库筛选得到具有肝毒性的成分 8 个。用 Pharm Mapper 数据库共获得黄药子潜在毒性成分的作用靶点 478 个,应用 Cytoscape 3.6.1 软件构建黄药子毒性成分-靶点网络,结果见图 1。其中鱼尾形节点代表筛选获得的黄药子 8 个毒性成分,椭圆形节点代表黄药子 8 个毒性成分对应的 478 个靶点。

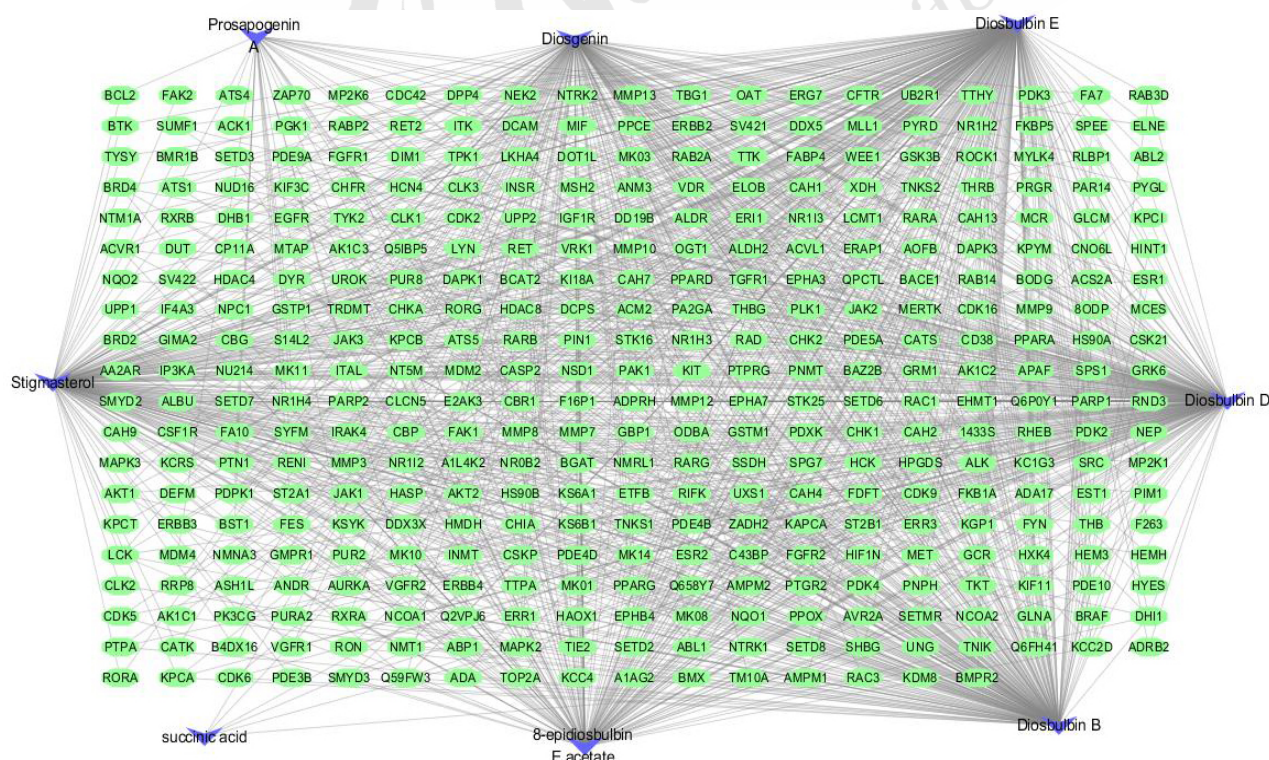


图 1 黄药子毒性成分-靶点网络图

Fig. 1 Toxic components-targets network of *Dioscorea bulbifera* L.

3.1.2 黄药子毒性成分-肝毒性靶点网络构建 利用 Gene Cards 和 CTD 数据库共收集整理得到 518 个肝脏损伤靶点, 将肝损伤靶点与黄药子毒性成分-靶点网络进行映射, 构建出黄药子毒性成分-肝损伤靶点网络并进行网络分析, 结果见图 2。结果显示, 节点的圆形面积越大, 表明其 Degree 值越高, 其在网络中关键程度越高。网络分析结果显示, 黄独素 B、黄独素 D 和黄独素 E 是黄药子中肝毒性的主要成分。

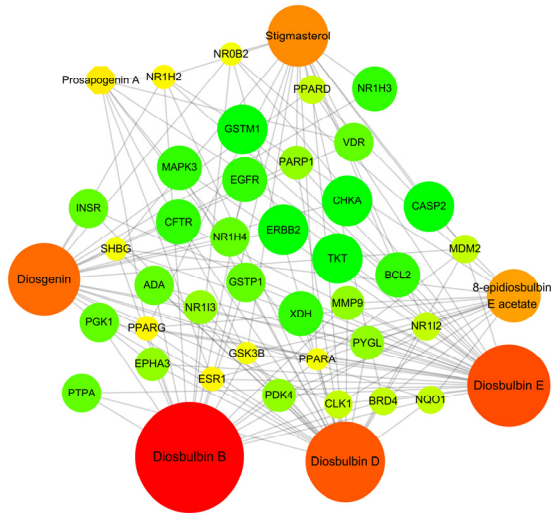


图 2 黄药子毒性成分-肝损伤靶点网络图
Fig. 2 Toxic components-targets of liver injury network of *Dioscorea bulbifera* L.

3.1.3 黄药子致肝损伤靶点蛋白互作分析 将黄药子致肝损伤靶点导入 STRING 数据库以分析肝损伤靶点的相互作用并用 Cytoscape 软件构建黄药子致肝损伤靶点蛋白互作网络, 结果见图 3a。利用 Cytoscape 软件的 CytoHbba 插件对蛋白互作网络进行分析, 获得黄药子导致肝损伤的排名前 10 位的关键靶点, 关键靶点依次是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶-1(Akt1)、胰岛素(INS)、血管内皮生长因子 A(VEGFA)、肿瘤坏死因子(TNF)、白蛋白(ALB)、MYC 原癌基因(MYC)、信号传导与活化转录因子 3(STAT3)、雌激素受体 1(ESR1)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)和钙黏蛋白 1(CDH1), 结果见图 3b。

3.1.4 黄药子致肝损伤的信号通路分析 利用 DAVID 平台对黄药子致肝损伤作用靶点进行通路富集分析, 根据靶标命中数量进行排序, 将排名前 20 的通路导入 Omicshare 平台进行可视化分析, 结果见图 4。结果表明, PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路、Ras 信号通路和 Rap1 信号通路等为黄药子导致肝脏损伤的主要信号通路。

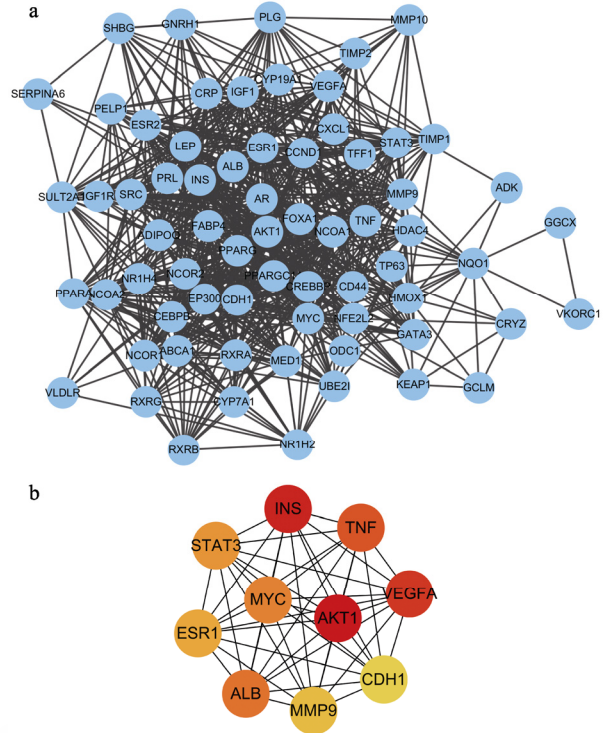


图 3 黄药子致肝损伤的靶点蛋白互作分析
a-黄药子肝毒性靶点的蛋白-蛋白互作分析图; b-黄药子致肝损伤的关键靶点。
Fig. 3 Analysis of target protein interaction in liver injury induced by *Dioscorea bulbifera* L.
a-the protein-protein interaction analysis chart of hepatotoxic target of *Dioscorea bulbifera* L.; b-key targets of liver injury induced by *Dioscorea bulbifera* L..

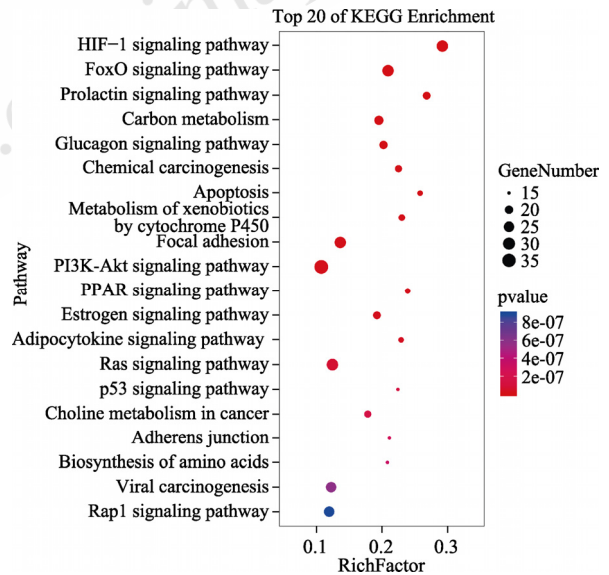


图 4 黄药子致肝损伤的毒性靶点富集分析
Fig. 4 Enrichment analysis of toxic targets in liver injury induced by *Dioscorea bulbifera* L.

3.2 黄药子致肝脏损伤动物试验验证

3.2.1 黄药子对小鼠肝功能及肝脏组织病理学的影响 黄药子水煎液连续灌胃 14 d 后, 与正常对

照组相比,黄药子低、高剂量组可引起血清 ALT、AST 和 ALP 水平升高,且高剂量组与正常对照组相比差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),结果见表 1。组织病理学结果表明,正常对照组动物肝脏组织、肝小叶结构正常,肝细胞索以中央静脉为中心呈放射状排列;黄药子低剂量组小鼠肝小叶结构正常,偶见肝细胞嗜酸变性及炎细胞浸润;黄药子高剂量组小鼠肝脏切片可见中央静脉周围肝细胞明显水肿,伴有嗜酸变性及脂肪变性,并有炎性细胞浸润,结果见图 5。以上研究结果说明,黄药子水煎液可诱发小鼠肝脏损伤,黄药子具有一定的肝脏毒性。

表 1 黄药子水煎液对小鼠血清 ALT、AST 和 ALP 水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 1 Effect of decoction of *Dioscorea bulbifera* L. on ALT, AST and ALP levels in mice serum($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	ALP/ $\text{U} \cdot (100 \text{ mL})^{-1}$
正常对照组	—	16.34 $\pm$ 3.72	14.75 $\pm$ 2.37	16.25 $\pm$ 4.82
黄药子低剂量组	20	19.84 $\pm$ 4.33	16.98 $\pm$ 4.25	23.86 $\pm$ 1.96 ²⁾
黄药子高剂量组	40	40.19 $\pm$ 16.06 ²⁾³⁾	43.98 $\pm$ 24.18 ¹⁾³⁾	24.26 $\pm$ 2.51 ²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与黄药子低剂量组比较,³⁾ $P<0.05$ 。

Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$; compared with the *Dioscorea bulbifera* L. low-dose group, ³⁾ $P<0.05$.

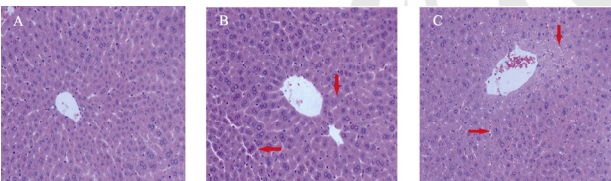


图 5 黄药子对小鼠肝脏病理组织学的影响(HE, 200 $\times$)

A—正常对照组; B—黄药子低剂量组; C—黄药子高剂量组。

Fig. 5 Effect of *Dioscorea bulbifera* L. on histopathology of liver in mice(HE, 200 $\times$)

A—normal control group; B—*Dioscorea bulbifera* L. low-dose group; C—*Dioscorea bulbifera* L. high-dose group.

3.2.2 黄药子对小鼠肝脏氧化应激的影响 与正常对照组相比,黄药子水煎液可明显升高肝脏 MDA 水平、降低 GSH 与 SOD 活性($P<0.01$),且其变化以黄药子高剂量组较为显著,提示黄药子可能通过诱导机体氧化应激导致肝损伤的发生。结果见表 2。

3.2.3 黄药子对肝脏组织信号通路的影响 根据网络毒理学预测结果,本研究结合概率值及靶基因数量排名,选择排名靠前的 PI3K/Akt 信号通路进行验证。与正常对照组相比,黄药子水煎液可引起肝组织中 p-Akt/Akt、p-PI3K/PI3K 蛋白相对

表达下调,其变化以黄药子高剂量组较为显著,提示黄药子导致的肝损伤与抑制肝脏组织中 PI3K/Akt 信号通路有关。结果见图 6。

表 2 黄药子水煎液对小鼠肝脏 MDA、SOD 和 GSH 影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab. 2 Effects of decoction of *Dioscorea bulbifera* L. on MDA, SOD and GSH in mice liver($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	MDA 含量/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD 活力/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	GSH 活力/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
正常对照组	—	1.22 $\pm$ 0.05	111.57 $\pm$ 5.40	79.16 $\pm$ 9.12
黄药子低剂量组	20	1.70 $\pm$ 0.21 ¹⁾	94.37 $\pm$ 6.24 ¹⁾	51.24 $\pm$ 9.12 ¹⁾
黄药子高剂量组	40	2.04 $\pm$ 0.37 ¹⁾²⁾	91.55 $\pm$ 5.35 ¹⁾	48.83 $\pm$ 16.47 ¹⁾²⁾

注:与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与黄药子低剂量组比较,²⁾ $P<0.05$ 。
Note: Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the *Dioscorea bulbifera* L. low-dose group, ²⁾ $P<0.05$.

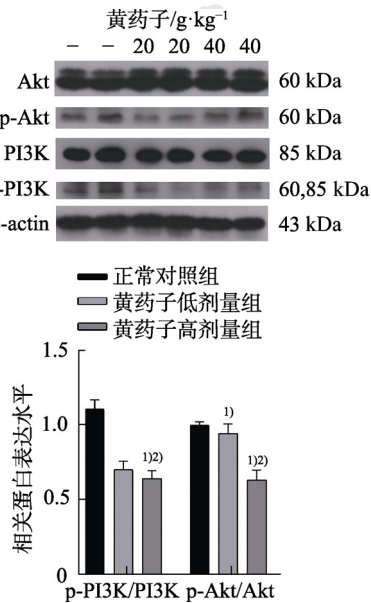


图 6 黄药子水煎液对小鼠肝脏 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与正常对照组比较,¹⁾ $P<0.01$;与黄药子低剂量组比较,²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 6 Effect of decoction of *Dioscorea bulbifera* L. on protein expression of PI3K/Akt signaling pathway in mice liver($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with the normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with the *Dioscorea bulbifera* L. low-dose group, ²⁾ $P<0.05$.

4 讨论

黄药子用药历史悠久,具有广泛的临床应用价值,但因其肝脏毒性阻碍了黄药子在临床上的应用。目前对黄药子引起肝脏损伤的毒性成分、毒性机制尚不明确,本研究利用网络毒理学的方法对黄药子引起肝毒性的机制进行深入研究,研究表明,黄独素 B、黄独素 D、黄独素 E、薯蓣皂苷元等成分是黄药子导致肝脏损伤的主要毒性成分,提示这些成分是黄药子导致肝脏损伤的

物质基础。

通过黄药子致肝脏损伤靶点的蛋白互作网络分析发现, Akt1、VEGFA、TNF、MYC、STAT3 等 10 个靶点是黄药子导致肝脏损伤的关键靶点。其中 Akt1 是 PI3K/Akt 信号通路的下游效应分子, PI3K 激活后可使 Akt 磷酸化进而激活 PI3K/Akt 信号通路, PI3K/Akt 通路参与肝脏损伤的病理性改变。VEGFA 为血管内皮生长因子, 在血管生成以及内皮细胞生长中发挥重要作用, 同时, VEGFA 也是药物诱导的急性肝损伤的关键作用靶点, 在肝损伤后的再生过程中参与内皮细胞的增殖和存活, 诱导新血管生成, 导致炎症反应的发生, 促进肝炎、肝细胞癌等病程的发展^[10-12]。TNF 主要由巨噬细胞分泌, TNF- α 诱导的肝细胞凋亡与多种肝脏疾病有关, 包括病毒性肝炎、酒精性肝炎、缺血/再灌注肝损伤和暴发性肝功能衰竭, 因此 TNF- α 是导致肝损伤的主要因素之一^[13-14]。MYC 原癌基因以非特异性方式结合 DNA 的转录因子, MYC 在肝脏组织中过度表达, 可导致肝星状细胞活化、增殖和成肌纤维细胞分化, 进而导致肝纤维化的发生^[15]。STAT3 是一种细胞质信号转录因子, STAT3 是 JAK/STAT 信号通路的重要成员, 在介导肝脏损伤的过程中起着关键作用, 研究表明, STAT3 的持续激活可导致肝纤维化的发生, 在四氯化碳诱导的肝纤维化模型中, 葫芦素通过抑制 STAT3 减轻纤维化程度^[16]。由此可见, 黄药子的毒性成分可通过调节上述关键靶点而引起肝脏损伤。

对黄药子导致肝脏损伤靶点的富集分析显示, 黄药子的毒性成分主要通过 PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、FoxO 信号通路、Ras 等信号通路导致肝脏损伤。其中 PI3K/Akt 通路在细胞代谢、生长、细胞凋亡抑制和血管生成中起着重要作用, 下调 PI3K/Akt 信号通路可激活线粒体膜凋亡通路而导致肝细胞损伤, 研究发现, 成年小鼠肝脏中的 Akt1 和 Akt2 缺失会诱发肝细胞死亡和肝脏炎症, 采用 PI3K/Akt 抑制剂可明显增加小鼠肝脏损伤程度^[17]。当机体发生氧化应激时, 可引起 Akt 去磷酸化, 进而抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活, 促进细胞发生凋亡。PI3K/Akt 信号通路的激活依赖于一些因子与复合物, 其中包括 INS、VEGFA 等, 研究表明, 川芎嗪通过抑制 INS, 进而阻断 PI3K/Akt 通路, 可以抑制肝纤维化的发生^[18]。

为了验证以上预测结果, 本研究对黄药子致肝脏损伤的毒性机制进行实验验证。研究结果表明小鼠灌胃给药黄药子 20, 40 g·kg⁻¹ 可导致肝脏出现明显的病理组织学损伤, 小鼠血清中 ALT、AST、ALP 指标升高, 小鼠肝脏组织中 MDA 水平升高、GSH 及 SOD 活力降低, 表明黄药子可导致明显肝脏损伤。Western blotting 结果显示, 黄药子低、高剂量组肝组织中 PI3K、Akt 总蛋白表达无明显变化, 而 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达下调, 导致 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白相对表达降低, 提示黄药子所致肝毒性可能与 PI3K/Akt 信号通路下调有关。本研究应用整体动物试验对黄药子致肝损伤的机制进行了初步验证, 在一定程度上明确了网络毒理学预测药物毒理机制的可行性。后期将采用细胞实验对黄药子主要化学成分是否可诱发肝细胞损伤进行深入研究, 以明确黄药子致肝毒性的关键化学物质、分子机制及作用靶点, 为黄药子肝毒性的防治提供实验依据。

综上所述, 黄药子通过抑制 PI3K/Akt 信号通路, 降低机体对氧自由基的清除能力, 使肝细胞发生脂质过氧化, 出现水肿变性、嗜酸变性等病理学变化而导致肝毒性。动物实验研究结果与研究中采用网络毒理学对黄药子导致肝脏损伤的预测结果相吻合, 说明采用网络毒理学对药物导致的毒性机制以及毒性成分的预测具有一定的可靠性, 此研究为进一步深入研究黄药子导致肝脏毒性的机制奠定了基础, 同时也为中药毒性机制的研究提供了新的思路与方法。

REFERENCES

- [1] 钟赣生. 中药学(第 9 版)[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 1265-1266.
- [2] ZHAO X J, YAN X S, SUN D D. Pharmacological research and clinical progress of *Rhizoma Dioscoreae Bulbiferae*[J]. Drug Eval Res(药物评价研究), 2012, 35(2): 147-149.
- [3] WANG J M, JI L L, BRANFORD-WHITE C J, et al. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. Rhizome *in vivo*[J]. Fitoterapia, 2012, 83(2): 388-394.
- [4] HUANG P Y, CHEN N, LIN M Z. *Dioscorea bulbifera* decoction in the treatment of thyroid nodules on random parallel control[J]. J Pract Tradit Chin Intern Med(实用中医内科杂志), 2013, 27(24): 36-39.
- [5] CHANIAD P, WATTANAPIROMSAKUL C, PIANWANIT S, et al. Anti-HIV-1 integrase compounds from *Dioscorea bulbifera* and molecular docking study[J]. Pharm Biol, 2016, 54(6): 1077-1085.
- [6] HU J F, MA Y D, SONG Y. Preliminary study on antibacterial action of decoction of *Dioscorea bulbifera* L. *in vitro*[J].

- Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2007, 20(1): 13-15.
- [7] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014, 6(1): 13.
- [8] WEXLER P. TOXNET: an evolving web resource for toxicology and environmental health information[J]. Toxicology, 2001, 157(1/2): 3-10.
- [9] WANG X, SHEN Y H, WANG S W, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [10] CHENG S N, XU Y L, DAI X B, et al. Krüppel-like transcription factor 8 regulates VEGFA expression in hepatocellular carcinoma through PI3K/Akt signal pathway[J]. Tumor(肿瘤), 2014, 34(12): 1075-1081.
- [11] LIU J, WU W, GU D H, et al. Neovascularization aggravated hepatic fibrosis in combined hypoxia NASH rat model[J]. Chin J Hepatol(中华肝脏病杂志), 2017, 25(7): 517-522.
- [12] VALIZADEH A, MAJIDINIA M, SAMADI-KAFIL H, et al. The roles of signaling pathways in liver repair and regeneration[J]. J Cell Physiol, 2019. Doi: 10.1002/jcp.28336.
- [13] KALLIOLIAS G D, IVASHKIV L B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies[J]. Nat Rev Rheumatol, 2016, 12(1): 49-62.
- [14] SABERI B, DADABHAI A S, JANG Y Y, et al. Current management of alcoholic hepatitis and future therapies[J]. J Clin Transl Hepatol, 2016, 4(2): 113-122.
- [15] YUAN Q, ZHANG Z, HU X, et al. miR-374a/Myc axis modulates iron overload-induced production of ROS and the activation of hepatic stellate cells via TGF- β 1 and IL-6[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 515(3): 499-504.
- [16] HU Z, HAN Y, LIU Y, et al. CREBZF as a key regulator of STAT3 pathway in the control of liver regeneration in mice[J]. Hepatology, 2020, 71(4): 1421-1436.
- [17] REYES-GORDILLO K, SHAH R, ARELLANES-ROBLEDO J, et al. Akt1 and Akt2 isoforms play distinct roles in regulating the development of inflammation and fibrosis associated with alcoholic liver disease[J]. Cells, 2019, 8(11). Doi: 10.3390/cells8111337.
- [18] ZHANG F, ZHANG Z, KONG D, et al. Tetramethylpyrazine reduces glucose and insulin-induced activation of hepatic stellate cells by inhibiting insulin receptor-mediated PI3K/AKT and ERK pathways[J]. Mol Cell Endocrinol, 2014, 382(1): 197-204.

收稿日期: 2021-06-14

(本文责编: 沈倩)