

基于UPLC-Q-TOF-MS/MS和网络毒理学的商陆致肝损伤潜在毒性成分及作用机制探讨

郭秀欢¹, 雷 艳¹, 黄宏威¹, 李梦雨¹, 华羽彤¹, 刘传鑫^{1,2*}, 袁瑞娟^{1*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 102488

2. 河南科技大学 临床医学院 河南科技大学第一附属医院 内分泌代谢科, 国家代谢病临床医学研究中心分中心, 河南省遗传罕见病医学重点实验室, 河南 洛阳 471003

摘要: 目的 基于超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析商陆水提物的化学成分,并结合网络毒理学和分子对接方法预测商陆致肝损伤的毒性成分和潜在的作用靶点及通路。方法 根据色谱峰保留时间、精确相对分子质量、二级质谱裂解碎片等信息,并结合文献数据,对商陆水提物化学成分进行分析鉴定。通过Swiss Target Prediction、TCMSP、ETCM和BATMAN-TCM数据库预测商陆成分靶点;通过CTD和GeneCards数据库筛选肝损伤靶点;采用String数据库和Cytoscape 3.7.1软件构建蛋白质相互作用(PPI)网络,并筛选核心靶点;利用Metascape数据库对核心靶点进行基因本体(GO)注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;应用Cytoscape 3.7.1软件构建“成分-核心靶点-通路”网络,并筛选核心成分。通过AutoDock Vina 1.2.0软件对核心成分和核心靶点进行分子对接验证。结果 利用UPLC-Q-TOF-MS/MS法从商陆水提物中共鉴定出40个化学成分,主要为三萜皂苷类及少量黄酮、酚酸、挥发油等。共获得101个共有靶点,筛选出26个核心靶点,包括ALB、TNF、AKT1等;涉及通路包括HIF-1信号通路、MAPK信号通路、PI3K-Akt信号通路、TNF信号通路等,与炎症、肝细胞凋亡、肝纤维化途径密切相关。筛选到6个核心成分进行分子对接,结果显示,美商陆苷F、美商陆皂苷元、商陆皂苷A、商陆皂苷元、山柰酚3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷及芥子酸与ALB、TNF、AKT1等靶点蛋白具有良好的结合活性。结论 商陆在大剂量使用时可能具有潜在的肝毒性,推测主要毒性成分可能为三萜皂苷类,通过促进炎症发生、调控肝纤维化进程、诱导肝细胞凋亡途径导致肝损伤。关键词: 商陆;肝损伤;毒性成分;UPLC-Q-TOF-MS/MS;网络毒理学;分子对接;美商陆苷F;美商陆皂苷元;商陆皂苷A;商陆皂苷元;山柰酚3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷;芥子酸
中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)01-0037-13
DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.006

Research on potential toxic components and mechanism of liver injury induced by *Phytolacca Radix* based on UPLC-Q-TOF-MS/MS and network toxicology

GUO Xiuhuan¹, LEI Yan¹, HUANG Hongwei¹, LI Mengyu¹, HUA Yutong¹, LIU Chuanxin^{1,2}, YUAN Ruijuan¹

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. Department of Metabolism and Endocrinology, Endocrine and Metabolic Disease Center, The First Affiliated Hospital, College of Clinical Medicine of Henan University of Science and Technology, Key Laboratory of Rare Hereditary Diseases of Henan, National Clinical Research Center for Metabolic Diseases in Luoyang, Luoyang 471003, China

Abstract: Objective To analyze the chemical components of *Phytolacca Radix* based on ultra performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS). And to predict the toxic components, potential targets and pathways of liver injury induced by *Phytolacca Radix* based on network toxicology and molecular docking. **Methods** According to the retention time of chromatographic peak, accurate molecular weight and fragmentation information of secondary mass spectrometry, combined with the literature data, the chemical components of *Phytolacca Radix* were analyzed and identified.

收稿日期: 2022-09-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(82173955)

第一作者: 郭秀欢(1998—), 硕士研究生。E-mail: rechenmeng98@163.com

*共同通信作者: 袁瑞娟, 博士, 副教授, 主要从事中药及动物药的成分分析及质量标准研究。E-mail: rjyuan@126.com

刘传鑫, 博士, 主要从事分析毒理学与临床分子诊断性研究。E-mail: 15222003775@163.com

The component targets of *Phytolacca Radix* were predicted by Swiss Target Prediction, TCMSP, ETCM and BATMAN-TCM Database. The liver injury targets were screened by CTD and GeneCards databases. By using String database and Cytoscape 3.7.1 software, PPI network was constructed and core targets were screened. By using Metascape database, Gene Ontology (GO) annotation and KEGG pathway enrichment were analyzed of core targets. Cytoscape 3.7.1 software was used to construct the "component-core target-pathway" network and screen the core components. The molecular docking verification of core components and core targets was performed by AutoDock Vina 1.2.0 software. **Results** A total of 40 chemical components were identified from the aqueous extract of *Phytolacca Radix*, mainly triterpenoid saponins, and a small amount of flavonoids, phenolic acids, volatile oil. A total of 101 common targets were obtained, and 26 core targets were screened, including ALB, TNF, AKT1, etc. The pathways involved include HIF-1 signaling pathway, MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway and so on, which are closely related to inflammation, hepatocyte apoptosis and hepatic fibrosis. Six core components were screened for molecular docking. The results showed that phytolaccoside F, phytolaccagenin, esculentoside A, esculentagenin, kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside and sinapic acid had good binding activities with ALB, TNF, AKT1 and other target proteins. **Conclusion** *Phytolacca Radix* may have potential hepatotoxicity when used in large doses. It is speculated that the main toxic components may be triterpenoid saponins, which play a role in liver injury by promoting inflammation, regulating liver fibrosis, and inducing hepatocyte apoptosis.

Key words: *Phytolacca Radix*; liver injury; toxic components; UPLC-Q-TOF-MS/MS; network toxicology; molecular docking; phytolaccoside F; phytolaccagenin; esculentoside A; esculentagenin; kaempferol 3-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside; sinapic acid

商陆始载于《神农本草经》，为商陆科植物商陆 *Phytolacca acinosa* Roxb. 或垂序商陆 *P. americana* L. 的干燥根，具有逐水消肿、通利二便的功效，外用可解毒散结，主治水肿胀满、二便不通、痈肿疮毒等症^[1-2]。现代药理研究发现，商陆具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗肿瘤、增强免疫、祛痰平喘等作用^[3]。但商陆的药理活性与毒性同时存在，其毒性主要表现为对肝脏及肾脏的损伤，临床应用受到了极大的限制^[4]。研究^[5-6]表明商陆皂苷 A 是商陆的有效成分，通过体内外肝毒性实验研究发现，大剂量的商陆皂苷 A 不仅使体外肝细胞发生不同程度的凋亡和坏死 (300~400 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)，且使小鼠的肝组织出现明显的病变 (剂量 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)，具有较强的毒性作用。目前仍缺少对商陆其他成分致肝毒性的系统研究，因此，科学系统地评价商陆的肝毒性，筛选其毒性成分、阐明其作用机制是一个亟需解决的问题。

商陆中化学成分包括三萜皂苷类、黄酮类、酚酸类、甾醇类等^[7]。目前对商陆化学成分的研究局限于单一成分的分离、鉴定、含量测定，不能反映商陆整体化学成分特征。借助超高效液相色谱-四级杆飞行时间串联质谱法 (UPLC-Q-TOF-MS/MS) 准确度高、通用性好、灵活敏捷的特点，可实现商陆中化学成分的快速分离和鉴定^[8]。中药是一个复杂的化学成分系统，一种中药所致的肝损伤，可能并非单一的毒性成分所致，还可能与其他的非毒性成分相关，且致肝毒性机制也十分复杂，涉及多个生物过程^[9]。网络毒理学可通过构建基因、蛋白、化合物

和毒性反应之间的网络，在复杂体系中寻找毒性物质，预测已知化合物的毒性作用，为解释其毒性机制提供有价值的信息^[10-11]。借助网络毒理学方法可快速有效地预测商陆致肝损伤的毒性成分和作用机制。基于此，本研究采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术分析商陆水提物中的主要化学成分，并以鉴定得到的化学成分为切入点，利用网络毒理学方法预测其致肝损伤的毒性成分、作用靶点及信号通路，进一步采用分子对接技术对核心成分和核心靶点进行验证，为深入阐明商陆致肝损伤的毒性物质基础及作用机制奠定基础，为后期细胞或动物水平的验证提供参考。

1 材料

1.1 仪器

ACQUITY UPLC I-Class 型超高效液相色谱仪、SYNAPT G2-Si Q-TOF/MS 型原位离子度高分辨质谱仪、ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)，美国 Waters 公司；Milli-Q 型超纯水仪 (美国 Millipore 公司)；数据处理软件 4.1 MassLynx, UNIFI (美国 Waters 公司)。

1.2 药材

商陆采购于河北安国市安兴中药饮片有限公司，由北京中医药大学中药鉴定系白贞芳副教授鉴定为商陆科植物商陆 *P. acinosa* Roxb. 的干燥根。

2 方法

2.1 商陆水提液的化学成分分析

2.1.1 供试品溶液的制备 取适量商陆药材，打粉。称取商陆药材粉末 25 g，依次加入 10 倍量

水(250 mL)和8倍量水(200 mL)回流提取2次,每次1 h, 8层纱布滤过,合并滤液。4 °C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 高速离心, 吸取上清液,进行UPLC-Q-TOF-MS/MS分析。

2.1.2 色谱条件 Waters ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相0.1% 甲酸水(A)-0.1% 甲酸乙腈(B), 梯度洗脱: 0~14 min, 98%~40% A; 14~16.5 min, 40%~2% A; 16.5~18 min, 2% A; 18~20 min, 2%~98% A, 体积流量0.3 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温40 °C, 进样量2 μL 。

2.1.3 质谱条件 采用电喷雾电离源(ESI), 选用正、负离子2种模式分别进行质谱检测分析。使用氮气作为辅助喷雾电离与脱溶剂气体, 设置温度为120 °C, 干燥气体积流量为10 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 雾化气气压为310 kPa; 脱溶剂氮气体积流量900 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$; 锥孔反吹氮气体积流量50 $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$; 毛细管电离电压为500 V, 锥孔电压为40 V; 碰撞能量为40~65 eV, 在 m/z 50~1 200 进行扫描。

2.2 商陆致肝损伤的网络毒理学研究

2.2.1 商陆化学成分靶点获取 利用 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/index.php>)、中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>)、ETCM(<http://www.ehbio.com/ETCM>)和BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)在线数据库对“2.1”项鉴定出的商陆化学成分的相关靶点进行预测。利用 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库, 限定物种为人源, 将以上获得的靶点转换成相应标准基因名, 整合得到商陆化学成分作用靶点。

2.2.2 商陆致肝损伤作用靶点获取 以“liver injury”“hepatotoxicity”为关键词, 通过 CTD(<http://ctdbase.org/>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库查找肝损伤的相关靶点, 在 UniProt 中转化为标准基因名, 整合去除重复项, 与获得的成分作用靶点进行映射比对, 得到的共有靶点为商陆致肝损伤的潜在作用靶点。

2.2.3 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建 将共有靶点导入 String(<https://string-db.org/>) 数据库, 限定物种为人源, 构建 PPI 网络。将结果导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 运用 CytoNCA 插件对网络进行拓扑学分析, 计算点度中心性(DC)、介度中心性(BC)和接近中心性(CC), 筛选出 DC、BC 及 CC 均大于平均值的靶点, 即核心靶点。

2.2.4 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百

科全书(KEGG)通路富集分析 采用 Metascape(<https://metascape.org/>) 数据库对核心靶点进行 GO 功能富集分析, 包括生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC), 限定物种为人源, 设定阈值 $P < 0.01$, 按 P 值排序, 分别筛选出排名前 10 的条目进行可视化。同时利用 Metascape 数据库对核心靶点进行 KEGG 信号通路富集, 按 P 值排序, 将与肝损伤无关的疾病通路剔除, 筛选出前 15 条信号通路进行可视化。

2.2.5 “成分-核心靶点-通路”网络的构建 将核心靶点及其涉及的化学成分与筛选出的前 15 条信号通路及其相关靶点导入 Cytoscape 3.7.1, 利用该软件中的 Merge 功能, 整合构建“成分-核心靶点-通路”网络图, 运用 CytoNCA 插件对网络中的成分节点进行拓扑学分析, 筛选出 DC、BC 及 CC 均大于平均值的成分作为核心成分。

2.3 分子对接验证

选取上述核心成分和 $\text{DC} \geq 50$ 的核心靶点进行分子对接分析。下载核心成分的化学结构文件, 通过 Chem3D 20.0 软件在 MN2 立场下使之能量最小化, 得到成分的 mol2 格式的 3D 结构信息。使用 AutoDock Tool 1.5.6 软件对配体小分子进行加氢、检测扭转中心及扭转键后, 保存为相应的 pdbqt 格式。从 PDB(<http://www.rcsb.org/>) 蛋白质数据库下载核心靶点, 利用 pymol 2.5.0 软件去除水分子和靶点蛋白中的原有配体, 以 pdb 格式保存。通过 AutoDock Tool 1.5.6 软件, 在受体上加氢后保存为相应的 pdbqt 格式。利用 AutoDock Vina 1.2.0 软件将处理好的成分配体与蛋白受体进行对接, 参数设置如下: exhaustiveness=10, energy range=5, num modes=20。对接完成后, 根据结合能绘制热图, 分析结合能大小, 使用 Pymol 2.5.0 软件对部分对接复合物进行可视化处理。

3 结果

3.1 商陆水提物化学成分的鉴定

商陆中化学成分复杂多样, 为尽可能多地鉴别其成分, 本研究采用正、负 2 种 ESI 电离模式对商陆的化学成分进行全扫描, 其具体基峰离子流色谱图(BPI)见图 1。基于 UNIFI 数据处理系统和 MassLynx 4.1 软件对商陆水提组分进行定性分析, 设定质量误差为 1.0×10^{-5} , 且响应值大于 1 000, 根据商陆化学成分相关文献报道^[7, 12-15] 建立数据库, 通过数据库比对, 得到商陆的化学成分 40 个, 包括 32 个三萜皂苷类化合

物, 3个黄酮类化合物, 2个挥发油与脂溶性成分, 以及3个其他类化合物。化合物的名称、保留时间、分子式、加和离子和裂解碎片等信息结果见表1。

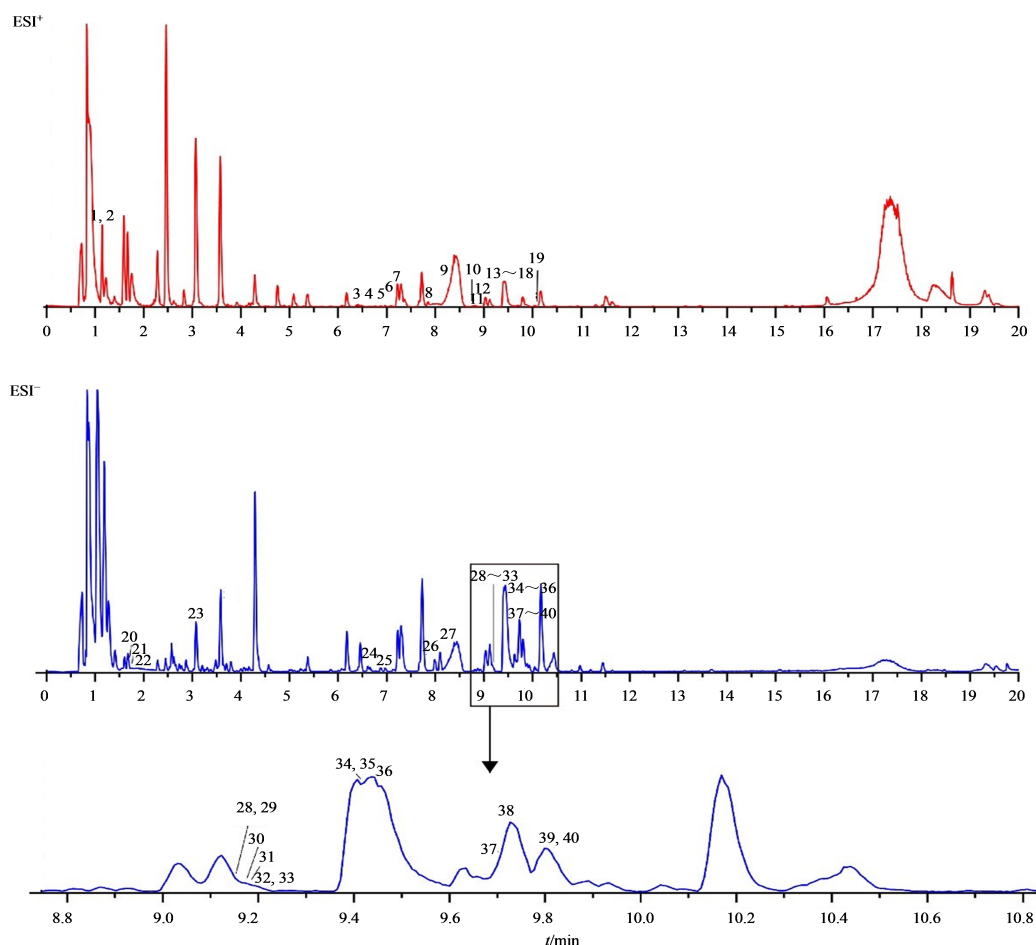


图1 商陆水提物的UPLC-Q-TOF-MS/MS基峰离子流色谱图

Fig. 1 BPI chromatogram of UPLC-Q-TOF-MS/MS of aqueous extract of *Phytolacca acinosa*

表1 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS的商陆化学成分分析

Table 1 Analysis of chemical constituents of *P. acinosa* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	t_R/min	加合离子	理论值 m/z	实测值 m/z	δ	碎片离子	分子式	化合物
S1	1.15	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	242.102 8	242.103 2	1.65	124.021 4、127.030 3、136.053 3、 179.033 3、191.077 7	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5$	芥子酸
S2	1.15	$[\text{M}+\text{K}]^+$	317.115 5	317.116 6	3.47	222.081 9、232.065 8、234.083 8、 236.098 4、248.098 2	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	邻苯二甲酸二丁酯
S3	6.38	$[\text{M}+\text{H}]^+$	547.327 1	547.327 9	1.46	483.314 0、487.310 0、493.288 0、 501.318 6、511.302 6、529.309 1	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8$	商陆皂苷元
S4	6.61	$[\text{M}+\text{H}]^+$	827.442 9	827.444 9	2.42	497.333 0、515.334 5、595.270 1、 653.298 9、663.370 2	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{16}$	商陆皂苷N-2
S5	6.74	$[\text{M}+\text{K}]^+$	613.314 3	613.314 4	0.16	151.069 7	$\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_8$	美商陆皂苷元A
S6	7.14	$[\text{M}+\text{NH}_4]^+$	1 152.580 2	1 152.579 0	0.87	963.487 1、1028.486 4、1051.486 9、 1 053.481 5、1 066.520 0	$\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{25}$	商陆皂苷K

续表1

峰号	t_R/min	加合离子	理论值 m/z	实测值 m/z	δ	碎片离子	分子式	化合物
S7	7.22	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1 003.475 0	1 003.477 0	1.99	149.048 8、314.130 4	$\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{O}_{22}$	商陆皂苷 M
S8	7.99	$[\text{M}+\text{H}+\text{Na}]^+$	813.427 3	813.432 6	6.52	503.288 9、563.289 2、641.286 3、 651.373 6、705.379 1	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$	商陆皂苷 N-1
S9	8.30	$[\text{M}+\text{H}]^+$	547.327 1	547.325 6	2.74	487.304 2、493.289 6、494.260 7、 501.317 5、511.301 8、529.312 5	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8$	acinospesigenin C
S10	8.76	$[\text{M}+\text{K}]^+$	481.308 4	481.309 6	2.49	147.107 8、225.167 7、239.171 8、 389.278 5	$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_3$	30-methyl-spergulagenate
S11	8.82	$[\text{M}+\text{H}]^+$	635.379 5	635.381 3	2.83	501.325 1、511.299 9、514.257 6、 515.341 7、529.316 8、547.322 7	$\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_{10}$	商陆皂苷 O
S12	9.03	$[\text{M}+\text{H}]^+$	531.332 2	531.332 0	0.38	451.292 5、455.317 6、465.295 6、 477.294 6	$\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_7$	acinospesigenin B
S13	9.42	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	169.095 3	169.094 7	3.55	67.046 5、69.025 5、73.018 9、 85.019 7	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$	赖氨酸
S14	9.42	$[\text{M}+\text{H}]^+$	665.390 1	665.395 3	7.82	571.290 1、593.341 2、611.353 7、 623.381 8、629.371 4、637.350 8	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{11}$	商陆皂苷 B
S15	9.43	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	791.419 4	791.424 5	6.45	676.386 4、677.381 9、687.370 4、 695.404 9、701.350 7	$\text{C}_{40}\text{H}_{64}\text{O}_{14}$	商陆皂苷 L1
S16	9.80	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	441.298 1	441.295 6	5.67	233.145 0、259.168 7、263.173 2、 287.203 0、319.236 1、387.257 8	$\text{C}_{26}\text{H}_{42}\text{O}_4$	邻苯二甲酸十四烷基酯
S17	9.80	$[\text{M}+\text{Na}]^+$	481.329 4	481.330 4	2.08	393.305 7、421.304 6、433.321 8、 441.292 3	$\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_4$	pokeberrygenin
S18	9.80	$[\text{M}+\text{H}]^+$	649.395 2	649.398 2	4.62	531.335 7、537.321 3、545.313 1、 552.270 7、573.311 3、595.370 7	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{10}$	美商陆苷 A
S19	10.09	$[\text{M}+\text{H}]^+$	681.385 0	681.387 9	4.26	151.068 0、453.326 9、465.294 2、 481.326 0、499.344 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{56}\text{O}_{12}$	商陆皂苷 P
S20	1.69	$[\text{M}-\text{H}]^-$	267.065 7	267.068 9	11.99	108.016 6	$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_4$	6-甲氧基-7-羟基黄酮
S21	1.74	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	507.113 9	507.118 2	8.48	244.034 6	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	山柰酚 3-O- β -D-吡喃葡萄糖苷
S22	1.75	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	539.103 7	539.101 2	4.64	159.030 9	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$	山柰酚 3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷
S23	3.59	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	291.134 5	291.136 2	5.84	142.067 0、186.058 4	$\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$	下箴刺桐碱
S24	6.62	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 149.533 0	1 149.543 0	8.88	531.339 4、645.354 5、663.381 6、 664.427 6、855.470 3、879.394 1	$\text{C}_{54}\text{H}_{86}\text{O}_{26}$	商陆皂苷 N
S25	6.98	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	1 031.506 0	1 031.497 0	8.92	663.384 9、677.392 1、747.431 8、 780.470 0、826.390 7	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{20}$	商陆皂苷 L
S26	8.00	$[\text{M}+\text{Cl}]^-$	649.350 7	649.352 0	2.00	485.262 0、515.311 3、517.321 1	$\text{C}_{36}\text{H}_{54}\text{O}_8$	isophytolaccagenin A
S27	8.43	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	695.364 3	695.371 4	10.22	349.195 3、366.240 7、387.212 2、 405.218 4、560.368 3、605.376 1	$\text{C}_{35}\text{H}_{54}\text{O}_{11}$	商陆皂苷 E
S28	9.15	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	1 033.486 0	1 033.491 0	4.74	847.442 8、862.369 3、886.393 2、 893.387 6、897.440 3	$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{21}$	商陆皂苷 Q

续表1

峰号	t_R/min	加合离子	理论值 m/z	实测值 m/z	δ	碎片离子	分子式	化合物
S29	9.15	$[\text{M}-\text{H}+\text{HCOO}]^-$	987.480 1	987.479 3	0.81	861.397 8、886.393 2、893.387 6、897.440 3、898.483 2	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{21}$	商陆皂苷 H
S30	9.17	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1 017.491 0	1 017.491 0	0.10	847.442 8、897.440 3、898.483 2、909.447 5、971.484 0、987.480 3	$\text{C}_{49}\text{H}_{78}\text{O}_{22}$	商陆皂苷 I
S31	9.18	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.337 3	515.340 5	6.21	427.315 5、455.324 2、467.321 4	$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6$	美商陆酸
S32	9.19	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	853.422 2	853.414 3	9.26	647.379 4、677.322 6、721.367 9、749.378 3	$\text{C}_{41}\text{H}_{62}\text{O}_{15}$	商陆皂苷 G
S33	9.19	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	871.432 7	871.431 3	1.61	749.378 3、791.426 7	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{16}$	商陆皂苷 A
S34	9.42	$[\text{M}+\text{Cl}]^-$	577.329 6	577.331 5	3.29	481.293 5、482.299 6、483.307 9、493.299 8、499.304 3、511.302 1	$\text{C}_{33}\text{H}_{50}\text{O}_6$	spergulagenic acid A
S35	9.42	$[\text{M}-\text{H}]^-$	531.332 2	531.333 4	2.26	469.297 4、481.293 5、482.299 6、483.307 9	$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_7$	美商陆皂苷元
S36	9.43	$[\text{M}+\text{CH}_3\text{COO}]^-$	871.432 7	871.436 2	4.02	648.346 3、651.342 7、663.373 9、745.381 0	$\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{O}_{16}$	商陆皂苷 F
S37	9.70	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	1 001.496 0	1 001.498 0	2.10	647.376 9、659.410 5、791.423 0、831.415 6、839.447 9、841.434 0	$\text{C}_{48}\text{H}_{76}\text{O}_{19}$	美商陆苷 F
S38	9.73	$[\text{M}+\text{HCOO}]^-$	739.390 5	739.390 4	0.14	329.230 7、330.196 0、351.190 3、453.277 1、531.324 1	$\text{C}_{37}\text{H}_{58}\text{O}_{12}$	商陆皂苷 D
S39	9.81	$[\text{M}+\text{HCOO}-\text{H}+\text{Cl}]^-$	855.437 8	855.441 1	3.86	515.337 1、543.254 9、629.364 7、647.380 1、661.357 4	$\text{C}_{42}\text{H}_{66}\text{O}_{15}$	商陆皂苷 C
S40	9.81	$[\text{M}-\text{H}]^-$	515.337 3	515.336 5	1.55	423.288 2、437.308 8、453.297 1	$\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_6$	acinospesigenin

3.2 商陆致肝损伤的网络毒理学研究

3.2.1 商陆致肝损伤作用靶点 利用 Swiss Target Prediction、TCMSP、ETCM 和 BATMAN-TCM 在线数据库对鉴定出的 40 个化学成分靶点进行预测,共得到 667 个商陆化学成分潜在作用靶点。

以“liver injury”“hepatotoxicity”为关键词,在 CTD 共得到 610 个靶点,在 GeneCards 取前 200 个靶点,通过 UniProt 数据库转化为标准基因靶点,经去重后共得到 705 个疾病靶点。将成分靶点与肝损伤靶点进行比对,得到 101 个共有靶点。

3.2.2 PPI 网络的构建及核心靶点筛选 将 101 个共有靶点导入 String 数据库,限定物种为人源,除去孤立靶点,获得靶点间相互作用关系,随后将结果导入 Cytoscape 3.7.1 软件,利用 CytoNCA 插件计算网络节点的 DC、BC 及 CC 值,筛选出 26 个同时满足 DC、BC 及 CC 均大于平均值的核心靶点,核心靶点及拓扑参数见表 2。

3.2.3 GO 生物功能及 KEGG 通路富集分析 通过 Metascape 数据库对 26 个核心靶点进行 GO 功能富集分析,共获得 674 个结果,分别筛选排名前 10 的

结果进行可视化,结果见图 2。其中 586 个与 BP 相关,主要涉及细胞对生长因子刺激的反应、对激素的反应、细胞运动的调控等;35 个与 CC 相关,主要涉及膜筏、膜微区、膜侧等;53 个与 MF 相关,主要涉及脂质结合、核受体活性、氧化还原活性等。KEGG 富集分析共获得 112 条通路($P < 0.01$),将与肝损伤无关的疾病通路剔除,选取通路中排名前 15 的通路进行可视化,结果见图 3。结果表明,与商陆致肝损伤作用密切相关的信号通路主要包括低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、磷脂酰肌醇-3 蛋白激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、Toll 样受体 (TLR) 信号通路等。

3.2.4 “成分-核心靶点-通路”网络 将核心靶点及其涉及的活性成分与前 15 条信号通路及其相关靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件,得到“成分-核心靶点-通路”网络,见图 4。结果显示该网络包括 80 个节点 (26 个靶点、39 个化合物、15 条信号通路) 和 261 条边。从化合物角度分析,每个化合物平均作用于

表2 商陆致肝损伤核心靶点
Table 2 Core targets of liver injury induced by *P. acinosa*

UniProt ID	基因	蛋白名称	DC	BC	CC
P02768	<i>ALB</i>	albumin	80	1 380.553	0.833 5
P01375	<i>TNF</i>	tumor necrosis factor	67	547.206	0.757 8
P31749	<i>AKT1</i>	AKT serine/threonine kinase 1	65	531.564	0.746 2
P15692	<i>VEGFA</i>	vascular endothelial growth factor A	55	175.659	0.687 9
P05412	<i>JUN</i>	transcription factor AP-1 subunit Jun	55	232.757	0.687 9
P00533	<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor	53	255.822	0.683 1
P40763	<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3	51	148.097	0.669 0
P42574	<i>CASP3</i>	caspase-3	50	149.556	0.664 4
P35222	<i>CTNNA1</i>	catenin beta-1	49	255.304	0.659 9
P35354	<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	48	314.150	0.655 4
O00206	<i>TLR4</i>	toll-like receptor 4	47	111.847	0.651 0
C9J4T6	<i>CXCL8</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 8	46	96.591	0.646 7
P37231	<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	46	289.893	0.655 4
P03372	<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1	45	227.093	0.646 7
P42345	<i>MTOR</i>	mammalian target of rapamycin	44	91.195	0.634 0
Q07869	<i>PPARA</i>	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	41	299.368	0.625 8
P29474	<i>NOS3</i>	nitric oxide synthase 3	40	248.077	0.617 8
P04626	<i>ERBB2</i>	receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	38	87.363	0.613 9
P08183	<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette sub-family B member 1	36	162.595	0.606 3
P08684	<i>CYP3A4</i>	cytochrome P450 3A4	32	141.822	0.584 3
Q6NWT7	<i>CYP2E1</i>	cytochrome P450 2E1	31	107.171	0.577 4
P00747	<i>PLG</i>	plasminogen	30	239.078	0.577 4
P00734	<i>F2</i>	coagulation factor II	27	89.247	0.570 6
P11712	<i>CYP2C9</i>	cytochrome P450 2C9	27	86.202	0.554 3
P04114	<i>APOB</i>	apolipoprotein B-100	26	87.892	0.570 6
P04150	<i>NR3C1</i>	glucocorticoid receptor	26	217.571	0.564 0

4.74个靶点,其中与 ≥ 7 个靶点相连的化合物占12.82%。利用CytoNCA插件计算网络中成分节点的DC、BC及CC值,得到3者的平均值,筛选出5个同时满足DC、BC及CC均大于平均值的成分,分别为芥子酸、美商陆苷F、美商陆皂苷元、山柰酚3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、商陆皂苷元,并补充《中国药典》2020年版中的指标成分商陆皂苷A,共同作为核心成分。从靶点角度分析,每个靶点平均与7.11个化合物相互作用,其中与 ≥ 10 个靶点相连的化合物占19.23%,其中NR3C1连接了32个化合物,ABCB1连接了27个化合物,

CYP3A4连接了24个化合物,ALB连接了21个化合物,靶点与越多化合物相连,说明药物对该靶点的调控性越高。从通路角度分析,每条通路上平均有5.07个靶点,60%的通路上有5个及以上靶点。这些结果表明,化合物可通过不同靶点调节不同通路,不同化合物也可作用于同1个靶点同1个通路,符合中药多成分、多靶点、多通路的作用特点。

3.3 分子对接结果

当配体和受体的构象越稳定时,能量越低,结合的可能性越大,结合能 < 0 表示可以自发结合,该值越低则结合强度越大^[16]。选取表2中DC ≥ 50 的



图2 GO条目气泡图

Fig. 2 Bubble chart of GO entry

8个核心靶点和“3.2.4”项中得到的6个核心成分进行分子对接,结果见图5,所有成分结合能均 $\leq -20.93 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$,说明这些成分与靶点均具有较好的结合活性^[17]。使用Pymol 2.5.0软件对部分对接复合物进行可视化处理,结果见图6。

由图5和图6可知,芥子酸与ALB的结合活性最好,主要作用于其残基色氨酸(Trp)30。山柰酚3-*O*- α -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷与AKT1的结合活性最好,主要作用于其残基谷氨酰胺(Gln)79、203,缬氨酸(Val)271,丝氨酸(Ser)205,天冬氨酸(Asp)292,甘氨酸(Gly)294,苏氨酸(Thr)82。三萜皂苷类化合物美商陆昔F、美商陆皂昔元、商陆皂昔元和商陆皂昔A均与STAT3具有强烈的结合作用,其中商陆皂昔A主要作用于精氨

酸(Arg)877、879,异亮氨酸(Leu)881。该结果与网络毒理学筛选结果相一致,单一成分可作用于不同靶点,多种成分或同类成分也可作用于统一靶点,进一步验证了网络毒理学预测靶点的可靠性。

4 讨论

4.1 商陆致肝损伤的潜在毒性成分

采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术从商陆水提取物中鉴定出40个成分,包括32个三萜皂苷类化合物,3个黄酮类化合物,2个挥发油与脂溶性化合物,3个其他类化合物。选取鉴定的全部成分作为目标成分进行网络毒理学研究,构建“成分-核心靶点-通路”网络并进行拓扑学分析,结果表明有39个成分参与调控肝损伤的分子网络,其中芥子酸、美商陆昔F、美商陆皂昔元、山柰酚3-*O*- α -L-鼠李吡喃糖

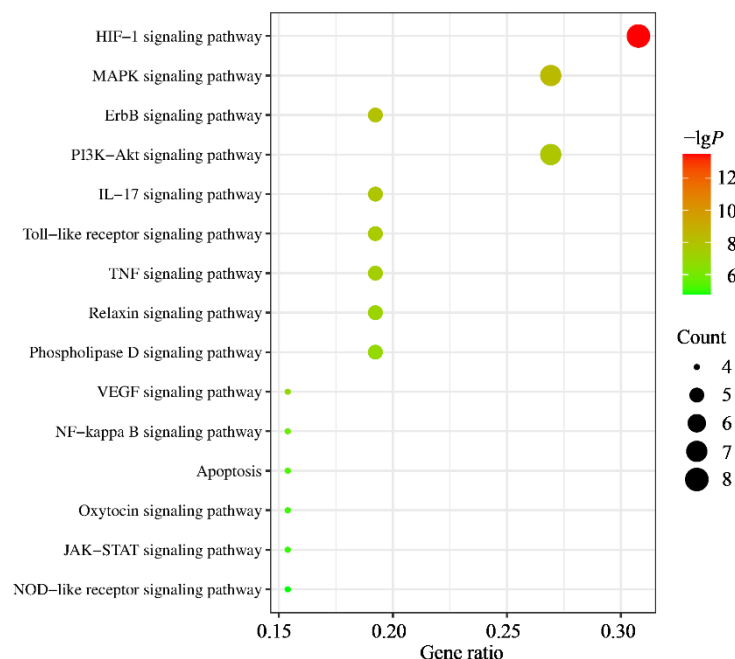


图3 KEGG条目气泡图

Fig. 3 Bubble chart of KEGG entry

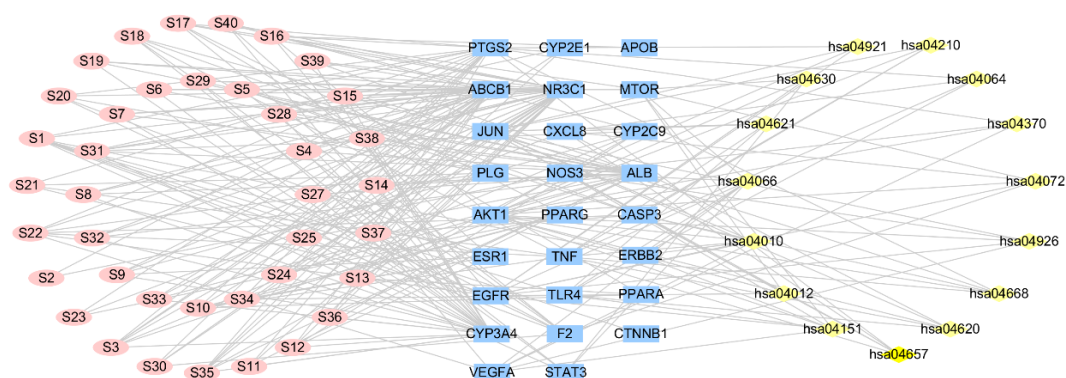


图4 “成分-核心靶点-通路”网络

Fig. 4 “Component-core target-pathway” network

基(1→2)-β-D-吡喃葡萄糖苷、商陆皂苷元等在调控网络中影响程度较大,补充药典中收录的商陆皂苷A,可共同作为核心成分,其中多数为皂苷类化合物,表明三萜皂苷类化合物可能是商陆致肝损伤的主要毒性成分。周倩等^[5]研究商陆皂苷A的肝毒性结果发现,在体外细胞实验中,300~400 μg·mL⁻¹的商陆皂苷A能使肝细胞发生不同程度的凋亡和坏死,在小鼠体内实验中,iv商陆皂苷A(10 mg·kg⁻¹)能使小鼠肝脏出现明显的肝细胞多灶性坏死及肝细胞再生现象。另外,程梓烨^[18]研究发现,商陆皂苷H和商陆皂苷B能显著促进TNF-α释放,从而引发炎症,其中商陆皂苷H还可诱导巨噬细胞分泌TNF。

4.2 商陆致肝损伤的潜在作用靶点

构建PPI网络并进行拓扑学分析,筛选出26个

核心靶点,ALB、TNF、AKT1、VEGFA、JUN、EGFR等靶点蛋白与其他蛋白相互作用较多,在网络中占据核心地位,推测有毒成分可能主要通过这些靶点发挥致肝损伤作用。AKT1是PI3K-Akt信号通路的下游调控因子,在细胞稳态的维持和分化中起一定作用^[19]。AKT经PI3K活化后生成磷酸化Akt(p-Akt),p-Akt可通过磷酸化调节一些和细胞凋亡直接或间接相关的底物蛋白,发挥促肿瘤细胞生存、促进细胞周期进展以及促生长作用,是PI3K-Akt信号通路的核心效应^[20]。研究显示,肝癌中PI3K-Akt信号通路是激活的,Akt信号通路的活化可以促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭,对肝癌的发生和发展有显著作用^[21-23]。KEGG通路分析得出,ATK1也参与了叉头样转录因子(FoxO)信号通路、TNF信号通路、

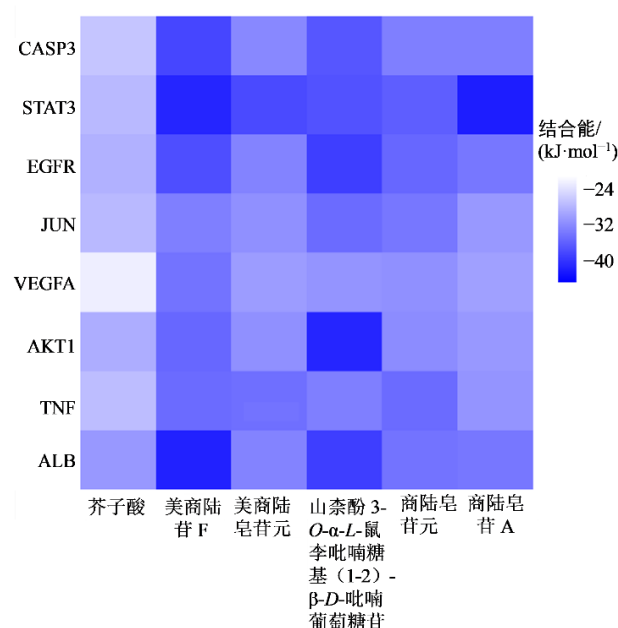


图5 商陆中6个核心成分与8个核心靶点的结合能热分析

Fig. 5 Binding energy thermal analysis of six core components and eight core targets in *Phytolacca Radix*

细胞凋亡信号通路等多条通路的调控,与细胞凋亡过程密切相关。白蛋白(ALB)是由肝脏上皮细胞分泌的蛋白成分,其表达主要与肝脏上皮细胞合成能力的改变有关,肝脏对于ALB的合成作用能够提高血清中ALB水平的上升,进而参与到自身免疫过程、营养物质循环、机体细胞代谢等生理过程^[24]。TNF分为TNF- α 、TNF- β 两种。TNF- α 既可以参与肝损伤,又能发挥保护作用,一方面能够激活肝细胞内的一系列信号通路,最终启动凋亡程序加速肝细胞的死亡,从而加重肝损伤的发生,另一方面能够快速进入损伤的肝细胞中,抑制肝细胞凋亡,同时促进上皮细胞增殖,促进肝损伤的修复过程^[25-27]。血管内皮生长因子A(VEGFA)是较为重要的促血管因子,有助于血管生成,与多种恶性肿瘤生长、侵袭和转移的过程相关^[28]。

本研究发现商陆中潜在毒性成分可与ALB、TNF、AKT1、VEGFA、JUN等多个靶点形成相互作用。采用分子对接技术考察核心成分和核心靶点的结合活性,结果表明美商陆苷F、美商陆皂苷元、商陆皂苷A、商陆皂苷元、山柰酚3-O- α -L-鼠李吡喃糖基(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷、芥子酸与肝损伤的关键靶点具有良好的结合活性,在一定程度上说明了借助网络毒理学预测商陆致肝损伤潜在毒性成分及其作用靶点的可靠性。

4.3 商陆致肝损伤的分子机制

对核心靶点进行KEGG通路富集分析,进一步说明它们在信号通路中的作用,结果发现,与商陆致肝损伤作用密切相关的信号通路主要包括HIF-1信号通路、MAPK信号通路、PI3K-Akt信号通路、TNF信号通路、Toll样受体信号通路等,与炎症、肝细胞凋亡、肝纤维化途径密切相关。

HIF-1是一种参与调节细胞适应低氧环境的转录因子,与肝损伤-肝纤维化的发展密切相关,其中,HIF-1 α 是HIF-1调控氧代谢的活性亚基,主要通过调控肝星状细胞(HSC)的自噬,从而活化HSC,而HSC被活化后会转变为纤维细胞,进而调节肝纤维化的发生发展^[29-30]。除HIF-1信号通路外,MAPK信号通路、PI3K-Akt信号通路、VEGF信号通路也参与调控肝纤维化的发生发展,MAPK信号通路和PI3K-Akt信号通路参与调控细胞内信号传导,其表达增加会促进肝纤维化的发展。VEGF信号通路调控血管生成,新生血管生成与肝纤维化发展密切相关,而HIF-1 α 可调节VEGF表达,从而促进肝纤维化进程^[29]。

Toll样受体信号通路和NF- κ B信号通路影响炎症的发生,该通路活化后,可参与调节IL-10、IL-6等炎症介质释放,并且可以介导炎症因子的产生,其机制在于,肝脏内过量的内毒素与细胞上的CD14结合,形成LPS-CD14受体,该受体会与TLR4结合并激活脂多糖(LPS)诱导的Toll样受体4(TLR4)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路,促进炎症相关细胞因子表达,而细胞因子反过来又会促进该信号通路的表达,最终促进炎症的发生发展^[31]。此外,花生四烯酸代谢通路与炎症介质的合成密切相关,可介导许多炎症因子生成,如单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、TNF、IL、IFN等^[32]。

巨噬细胞激活后会产生TNF- α ,参与肝细胞的凋亡过程,高浓度TNF会导致肝细胞变性、坏死,其机制主要为TNF- α 可以通过受体进入肝细胞,诱导肝细胞产生自由基,进而引起膜性结构损伤和DNA链断裂,导致肝细胞变性和坏死,最终引起肝细胞凋亡^[33]。

4.4 不足与局限性

本研究仍存在不足之处,对于相关靶点较多的化合物,缺乏正式实验数据支撑;以商陆水提取物中的成分为目标进行网络毒理学研究,与实际入血成分未必完全一致,且在中药实际使用中,中药的炮制及配伍也会造成其成分发生改变;网络毒理学实

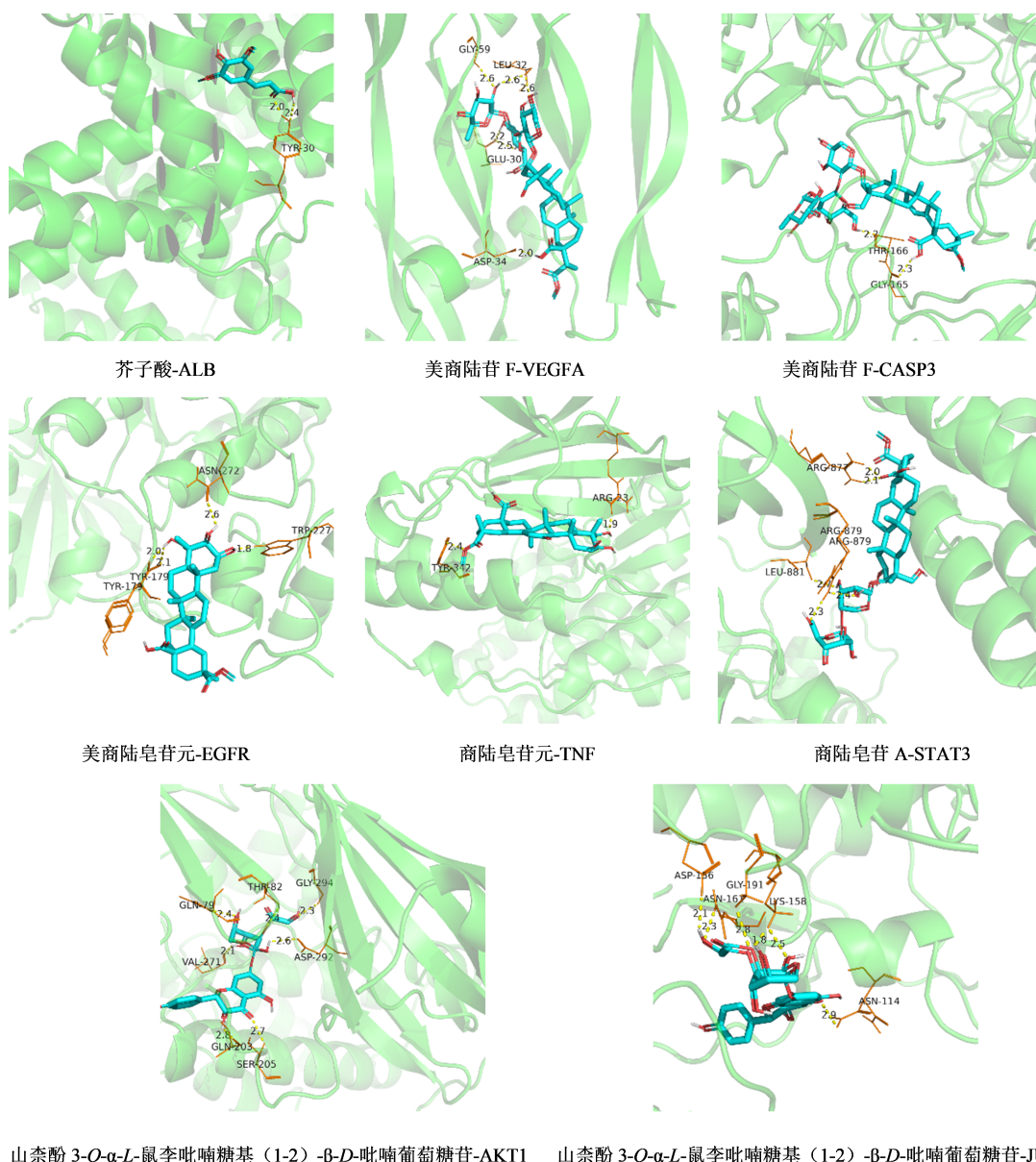


图6 商陆中核心成分-肝损伤核心蛋白对接模式

Fig. 6 Docking mode of core component-liver injury core protein in *Phytolaccae Radix*

验过程与中药剂量无关联,仅凭该实验结果无法完全肯定作用机制,需进一步实验验证。

5 结论

本研究利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术从商陆水提物中鉴定出 40 个化学成分,在此基础上,结合网络毒理学和分子对接技术,推测商陆致肝损伤的主要毒性成分可能为三萜皂苷类,通过多靶点、多通路来促进炎症发生,调控肝纤维化进程,诱导肝细胞凋亡,从而导致肝损伤发生。本研究为商陆致肝损伤的毒性物质基础和作用机制的深入研究奠定基础,为后期毒理学实验验证提供参考,同时说明了采用液质联用和网络毒理学相结合的方法初步预测毒性成分和作用机制具有一定的可靠性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020. Pharmacopoeia of the people's republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 吕瑞华, 冯 昭, 马添翼, 等. 商陆的研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(18): 4798-4808. Lv R H, Feng Z, Ma T Y, et al. Research progress of *Phytolaccae Radix* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51 (18): 4798-4808.
- [3] 李一飞, 姚广涛. 商陆药理作用及毒性研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 248-251. Li Y F, Yao G T. Review on pharmacological effects and

- toxicity of *Phytolacca* [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2011, 17(13): 248-251.
- [4] 黄宏威, 刘传鑫, 颜昌钰, 等. 商陆的化学成分与药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(3): 188-198.
Huang H W, Liu C X, Yan C Y, et al. Chemical constituents and pharmacological effects of *Phytolacca Radix* and prediction of quality markers: Research advances [J]. *J Int Pharm Res*, 2020, 47(3): 188-198.
- [5] 周倩, 姚广涛, 金若敏, 等. 商陆皂苷甲致肝毒性的研究 [J]. *中成药*, 2014, 36(1): 14-18.
Zhou Q, Yao G T, Jin R M, et al. Hepatotoxicity induced by esculentoside A [J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2014, 36(1): 14-18.
- [6] 张丛, 刘传鑫, 王铭爽, 等. 基于细胞代谢组学的商陆皂苷甲诱导HKC细胞损伤的机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(3): 443-450.
Zhang C, Liu C X, Wang M S, et al. Mechanism research of HKC cell injury induced by esculentoside A based on cell metabolomics [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(3): 443-450.
- [7] 王鹏程, 王秋红, 赵珊, 等. 商陆化学成分及药理作用和临床应用研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(18): 2722-2731.
Wang P C, Wang Q H, Zhao S, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects, and clinical applications of *Phytolacca Radix* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2014, 45(18): 2722-2731.
- [8] 黄壮壮, 刘峰, 孙宇宏, 等. UPLC-Q-TOF-MS^E技术结合UNIFI数据库快速定性分析补气通络颗粒的化学成分 [J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(4): 477-483.
Huang Z Z, Liu F, Sun Y H, et al. Rapid qualitative analysis of chemical constituents of Buqi Tongluo Granules by UPLC-Q-TOF-MS^E technology combined with UNIFI database [J]. *Northwest Pharm J*, 2019, 34(4): 477-483.
- [9] 罗琼, 杨涛, 刘成海. 中草药药源性肝损伤的研究难点 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2020, 30(1): 17-19, 23.
Luo Q, Yang T, Liu C H. Research difficulties of Chinese herbal medicine-induced liver injury [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis*, 2020, 30(1): 17-19, 23.
- [10] 范晓辉, 赵筱萍, 金烨成, 等. 论建立网络毒理学及中药网络毒理学研究思路 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(21): 2920-2922.
Fan X H, Zhao X P, Jin Y C, et al. Network toxicology and its application to traditional Chinese medicine [J]. *China J Chin Mater Med*, 2011, 36(21): 2920-2922.
- [11] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. «网络药理学评价方法指南»解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119-4129.
Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [12] 贾金萍, 秦雪梅, 李青山. 商陆化学成分和药理作用的研究进展 [J]. *山西医科大学学报*, 2003, 34(1): 89-92.
Jia J P, Qin X M, Li Q S. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Phytolacca Radix* [J]. *J Shanxi Med Univ*, 2003, 34(1): 89-92.
- [13] 刘斤秀. 商陆化学成分与质量分析研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.
Liu J X. Studies on the chemical constituents and quality control of *Radix Phytolacca* [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2007.
- [14] 赖道万. 商陆总皂苷及其总苷元的化学成分研究 [D]. 西安: 西北大学, 2008.
Lai D W. Study on the chemical constituents of the crude saponins and sapogenins from *Phytolacca esculenta* van Houtte [D]. Xi'an: Northwest University, 2008.
- [15] 黄国英, 刘星星. 中药商陆的药理及应用研究 [J]. *中国实用医药*, 2013, 8(15): 249-250.
Huang G Y, Liu X X. Study on pharmacology and application of Chinese medicine *Phytolacca Radix* [J]. *China Pract Med*, 2013, 8(15): 249-250.
- [16] 吴信华, 李长印, 曹园, 等. 基于LC/Q-TOF-MS整合网络药理学探讨潜阳育阴颗粒防治高血压肾损害的药效物质基础与作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(2): 116-129.
Wu X H, Li C Y, Cao Y, et al. Investigation of pharmacodynamic material basis and mechanism of Qianyang Yuyin granules against hypertensive renal damage based on LC/Q-TOF-MS and network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2021, 27(2): 116-129.
- [17] 孟颖, 蒋志涛, 严国俊, 等. UPLC-Q-TOF-MS、GC-MS联合网络药理学及分子对接技术分析经典名方清胃散治疗牙周炎的作用机制 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(10): 2778-2787.
Meng Y, Jiang Z T, Yan G J, et al. Mechanism of Qingwei Powder in treatment of periodontitis based on UPLC-Q-TOF-MS, GC-MS, network pharmacology and molecular docking [J]. *China J Chin Mater Med*, 2022, 47(10): 2778-2787.
- [18] 程梓烨. 商陆醋制法炮制减毒存效机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
Cheng Z Y. Study on the effect and mechanism of *Phytolacca Radix* after vinegar processing in toxicity reducing and efficacy retaining [D]. Nanjing: Nanjing University of Chinese Medicine, 2019.

- [19] Balasuriya N, McKenna M, Liu X G, et al. Phosphorylation-dependent inhibition of Akt1 [J]. *Genes*, 2018, 9(9): 450.
- [20] Hassan B, Akcakanat A, Holder A M, et al. Targeting the PI₃ kinase/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2013, 22(4): 641-664.
- [21] Wu Y T, Zhang Y S, Qin X C, et al. PI3K/AKT/mTOR pathway-related long non-coding RNAs: Roles and mechanisms in hepatocellular carcinoma [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 160: 105195.
- [22] Yang J L, Pi C C, Wang G H. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 699-707.
- [23] Garcia-Lezana T, Lopez-Canovas J L, Villanueva A. Signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 63-101.
- [24] Tian C Y, Zhu Y P, Liu Y J, et al. High albumin level is associated with regression of glucose metabolism disorders upon resolution of acute liver inflammation in hepatitis B-related cirrhosis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 721138.
- [25] Kalliolias G D, Ivashkiv L B. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(1): 49-62.
- [26] Yamamoto Y, Kuwahara A, Taniguchi Y, et al. Tumor necrosis factor alpha inhibits ovulation and induces granulosa cell death in rat ovaries [J]. *Reprod Med Biol*, 2015, 14(3): 107-115.
- [27] Liu X, Shi F, Li Y, et al. Post-translational modifications as key regulators of TNF-induced necroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2293.
- [28] Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases [J]. *J Biochem*, 2013, 153(1): 13-19.
- [29] 周丹, 张立婷, 李俊峰, 等. 缺氧诱导因子1 α 在肝纤维化发生发展中的作用机制 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(7): 1604-1607.
- Zhou D, Zhang L T, Li J F, et al. Mechanism of action of hypoxia-inducible factor 1 α in the development and progression of liver fibrosis [J]. *J Clin Hepatol*, 2019, 35(7): 1604-1607.
- [30] 彭瑾, 张义平. 缺氧与肝纤维化的关系及意义 [J]. *九江学院学报(自然科学版)*, 2018, 33(1): 86-89.
- Peng J, Zhang Y P. The relationship between hypoxia and hepatic fibrosis and its significance [J]. *J Jiujiang Univ Nat Sci Ed*, 2018, 33(1): 86-89.
- [31] 李树志, 刘铁军. 基于TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路探讨毒消肝清丸对肝硬化内毒素血症大鼠肝组织炎症反应的影响 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(9): 1958-1964.
- Li S Z, Liu T J. Effect of Duxiao Ganqing Pill on liver inflammation in rats with cirrhotic endotoxemia: An analysis based on the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Clin Hepatol*, 2019, 35(9): 1958-1964.
- [32] 任越, 姚美村, 霍晓乾, 等. 抗新型冠状病毒方剂基于花生四烯酸代谢通路防治"细胞因子风暴"的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(6): 1225-1231.
- Ren Y, Yao M C, Huo X Q, et al. Study on treatment of "cytokine storm" by anti-2019-nCoV prescriptions based on arachidonic acid metabolic pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(6): 1225-1231.
- [33] 杜珊, 王杰, 陈斌, 等. 温阳解毒化瘀颗粒对肝衰竭IETM大鼠TLR4 mRNA, TNF- α 及肝细胞凋亡的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(2): 26-32.
- Du S, Wang J, Chen B, et al. Effect of Wenyang Jiedu Huayu Granule on TLR4 mRNA, TNF- α and hepatocyte apoptosis in IETM rats with hepatic failure [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2020, 26(2): 26-32.

[责任编辑 刘东博]