

基于网络药理学和分子对接技术分析川楝子致肝毒性机制

何山¹, 欧水平², 叶林虎³, 王森^{1*}, 吴大章^{1,4*}

1. 遵义医科大学 药学院, 贵州 遵义 563000
2. 遵义医科大学附属医院 药剂科, 贵州 遵义 563000
3. 华南理工大学附属第六医院, 广东 佛山 528000
4. 太极集团重庆桐君阁药厂有限公司, 重庆 401366

摘要: 目的 通过网络药理学及分子对接技术探究川楝子肝毒性机制。方法 通过 TCMSP、PubChem、SwissADME 数据库及文献检索筛选川楝子的潜在毒性成分, 利用 SwissTargetPrediction 数据库预测潜在毒性成分的作用靶点, 再通过 GeneCards 数据库搜索与肝脏损伤相关的靶点, 将毒性成分预测靶点与肝脏损伤靶点取交集靶点, 获得毒性成分肝脏潜在作用靶点, 再利用软件 Cytoscape 3.8.2 版进行毒性成分-预测靶点、毒性成分-潜在作用靶点、蛋白相互作用 (PPI) 网络、毒性成分-潜在作用靶点-核心通路网络的构建, 采用 AutoDock 1.5.6 版进行分子对接, 并应用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化示例。结果 筛选得到 6 个川楝子潜在毒性化合物, 分别是 toosendanin、meliassenin B、trichilin D、1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal、butenolide、5-hydroxymethylfurfural, 与肝脏损伤共同作用靶点 103 个。GO 和 KEGG 结果显示, 川楝子通过蛋白质磷酸化、凋亡过程的负调控、对异种生物刺激的反应、酶激活的正向调控等过程引起肝脏毒性。分子对接结果显示, 川楝子中 toosendanin、trichilin D、1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal 与关键靶点具有较好的结合能力。结论 应用网络药理学及分子对接技术对川楝子致肝毒成分、机制、靶点、通路进行了初步探索, 为进一步对川楝子的临床应用研究和效应机制提供数据支持。

关键词: 川楝子; 肝毒性; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)12-2955-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.007

Hepatotoxicity mechanism of *Toosendan Fructus* based on network pharmacology and molecular docking techniques

HE Shan¹, OU Shui-ping², YE Lin-hu³, WANG Sen¹, WU Da-zhang^{1,4}

1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China
2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China
3. The Sixth Affiliated Hospital of South China University of Technology, Foshan 528000, China
4. Chongqing Tongjunge Pharmaceutical Factory of Taiji Group, Chongqing 401366, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of hepatotoxicity of *Toosendan Fructus* by network pharmacology and molecular docking technique. **Methods** The potential toxic components of *Toosendan Fructus* were screened through TCMSP, PubChem, SwissADME databases, and literature search, the targets of potential toxic components were predicted using SwissTargetPrediction database, and then the targets related to liver injury were searched through GeneCards database, and the intersecting targets between the predicted targets of the toxic components and liver injury targets were taken to obtain the potential targets of action of the toxic components in the liver. The intersection target was taken to obtain the liver potential action target of toxic ingredients, and then the software Cytoscape version 3.8.2 was used for the construction of toxic ingredient-predicted target, toxic ingredient-potential action target, PPI network, and toxic ingredient-potential action target-core pathway network, and the molecular docking was carried out by using the version of AutoDock 1.5.6 and the open source software PyMOL was applied to visualize the docking results. The docking

收稿日期: 2023-08-23

基金项目: 遵义医科大学未来“医技名匠”人才培养计划(遵医未来医技名匠[2022]03)

作者简介: 何山, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为工业药学(药物制剂的研发与转化)。E-mail: 2805985404@qq.com

*通信作者: 王森, 男, 硕士研究生导师, 从事药物新剂型新制剂研究。E-mail: wangsen912912@126.com

吴大章, 男, 博士, 主任中药师, 从事中成药技术与工艺研究。E-mail: wdz100@163.com

results were visualized as examples. **Results** Six potentially toxic compounds of *Toosendan Fructus*, namely toosendanin, meliasenin B, trichilinin D, 1-*O*-tigloy-1-*O*-debenzoylohchinal, butenolide, and 5-hydroxymethylfurfural were screened for liver damage with common targets of action 103. GO and KEGG results showed that *Toosendan Fructus* induced hepatotoxicity through processes such as protein phosphorylation, negative regulation of apoptotic processes, response to xenobiotic stimuli, and positive regulation of enzyme activation. Molecular docking results showed that three potentially toxic components of *Toosendan Fructus*, toosendanin, trichilinin D, and 1-*O*-tigloy-1-*O*-debenzoylohchinal, had good binding capacity to the key targets. **Conclusion** The preliminary exploration of hepatotoxic components, mechanisms, targets, and pathways of *Toosendan Fructus* was carried out by applying network pharmacology and molecular docking techniques to provide data support for further clinical application studies and effect mechanisms of *Toosendan Fructus*.

Key words: *Toosendan Fructus*; hepatotoxicity; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt signaling pathway

川楝子又名川楝实，是楝科植物川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 的干燥成熟果实，主要分布在我国四川、湖南、湖北、贵州等地区，因入药以四川产为道地药材，故名为川楝子^[1]。川楝子中富含萜类、黄酮类、有机酸以及多糖等多种活性成分^[2]，具有抗炎、抗肿瘤、抗菌、消炎镇痛、驱虫等广泛药理作用^[3]。随着对川楝子的研究，发现其除了具有药理作用，还具有一定的毒性作用，在川楝子毒性方面的研究中，早期有报道称，在用川楝子进行驱虫时，发现有 28 例发生中毒现象，10 例死亡病例^[4]。近年来，通过对其毒性研究发现其具有肝毒性、妊娠毒性、肌无力、神经肌肉毒性^[5]、消化系统^[6]等，主要表现在胃肠道刺激和肝毒性方面。胃肠道刺激方面，有报道称服用川楝子的患者通常在服药后 1~2 h 内就会发生胃肠刺激反应^[7]。肝毒性方面，近年来，越来越多的文献研究表明川楝子确实可导致肝毒性，在报道的 92 例中药致药物性肝损伤的病例中，其使用的有大部分中药及制剂含有川楝子等成分^[8]；赵筱萍等^[9]快速筛查川楝子肝毒性成分并鉴定发现，川楝子中的 meliasenin B、trichilinin D、1-*O*-tigloy-1-*O*-debenzoylohchinal 可能引起肝毒性，王昆阳等^[6]研究中报道这 3 者是川楝子致肝毒性的物质基础。大多数认为毒性蛋白和川楝素类化合物是川楝子的毒性来源^[10]，但目前针对川楝子毒性物质基础和毒性机制尚未完全明确，因此，本研究通过网络药理学^[11]及分子对接技术探讨川楝子致肝毒性的物质基础和机制，以期为临床研究提供理论依据。

1 方法

1.1 川楝子候选毒性化合物的筛选

在中药药理数据库及分析平台 (TCMSP) 中输入“川楝子”进行搜索，获取川楝子活性化合物，并通过设置口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ ，类药性

(DL) ≥ 0.18 ，对川楝子活性成分进行筛选，然后将从 TCMSP 数据库中筛选出的化合物在 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中下载候选成分的化学结构。并将其上传至 Swiss ADME 平台 (<http://www.swissadme.ch>)，以肠胃吸收为“high”和类药性五原则 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) 中至少有 2 个结果是“yes”为标准进行筛选，得到川楝子的活性成分，将活性成分输入 CTD 数据库进行毒性筛选，结合文献报道^[9, 12, 13, 14]的毒性成分补充，最终确定川楝子潜在毒性成分。

1.2 川楝子潜在毒性成分靶点的预测

通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库下载毒性成分的 2D 结构的 sdf 格式文件，并将下载的毒性成分的 2D 结构式或标准的 Smiles 号导入 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 数据库中，属性设置为“homo sapiens”，分别进行不同毒性成分的靶点基因预测，并用 TCMSP 中已有的靶点进行补充。

1.3 肝脏相关靶点的获取

在 GeneCards 数据库中输入关键词“liver toxicity”进行检索，以 score 值中位数为标准，筛选 score 值大于中位数的靶点，即为肝脏相关靶点。

1.4 川楝子肝脏毒性潜在作用靶点预测

将川楝子毒性成分的靶点与肝脏损伤相关靶点上传到在线韦恩图 (www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/example.html)，以川楝子毒性成分靶点和肝毒性靶点进行作图，二者的交集即为川楝子的肝脏毒性潜在作用靶点。

1.5 川楝子“毒性成分 - 预测靶点”“毒性成分 - 潜在作用靶点”网络的构建

整理川楝子毒性成分与对应靶点信息及 1.4 项下的交集靶点信息，利用软件 Cytoscape 3.8.2 版构建川楝子“毒性成分 - 预测靶点”“毒性成分 - 潜在

作用靶点”网络图。

1.6 潜在作用靶点基因的蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建

将川楝子毒性成分靶点基因与肝脏损伤相关靶点基因的交集导入 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 中, 选定研究物种为 “Homo Sapiens”, 设置连接评分值 >0.7, 隐藏相互没有链接的蛋白, 得到 PPI 网络图。并应用软件 Cytoscape 3.8.2 版对网络进行可视化处理和分析。

1.7 靶点蛋白的基因功能和通路分析

应用生物学信息注册数据库 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) 对川楝子毒性成分肝脏潜在作用靶点进行基因本体 (GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 获得川楝子毒性成分对肝脏作用的主要生物过程和主要信号通路。并利用微生信数据库 (www.bioinformatics.con.cn) 在线构建 GO 功能富集网络图, 再利用软件 Cytoscape 3.8.2 版以 KEGG 分析结果中的显著通路数据信息构建川楝子致肝毒性的 “毒性成分 - 潜在靶点 - 核心通路” 网络图, 对该网络进行拓扑学性质分析, 筛选川楝子致肝毒性的核心成分及核心靶点。

1.8 分子对接

将待对接成分从 PubChem 数据库中下载结构的 sdf 格式文件, 通过 Open Babel (<https://openbabel.org>) 软件将 sdf 文件格式转化为 pdb 格式文件, 采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件对分子进行加氢和结构优化, 并输出其格式为 pdbqt 文件格式作为分子对接中的配体。从 PDB (<http://www.rcsb.org/>) 数据库下载带对接靶点 3D 结构, 对其结构进行预处理, 去除水分子和配体残基, 采用 AutoDock Tools 1.5.6 软件进行和加氢等操作, 输出其 pdbqt 格式作为分子对接中的受体。将受体与配体的 pdbqt 格式文件导入 AutoDock Tools 1.5.6 软件中获得相应毒性口袋, 设置 Gridbox 做标及大小, 运行 AutoDock Vina 脚本进行分子对接, 得到其结合情况评估参数 affinity 值, 并通过开源软件 Pymol 对其对接结果进行可视化。

2 结果

2.1 川楝子的潜在毒性化合物的筛选

在 TCMSP 数据库中共检索到 33 个川楝子活性化合物, 按照 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 筛选后得到 9 个活性化合物, 见表 1。通过 CTD 数据库和文献

搜索共搜集到 6 个毒性化合物 (通过筛选发现表 1 中的 9 个活性成分均没有肝毒性, 因此, 表 2 中的 6 个毒性成分均来自于文献报告, 并通过 CTD 数据库验证), 见表 2。

表 1 TCMSP 数据库中川楝子的 9 个活性成分

Table 1 Nine active components of *Toosendan Fructus* in TCMSP database

Mol ID	成分	OB/%	DL
MOL001494	mandenol	42.00	0.19
MOL001495	ethyl linolenate	46.10	0.20
MOL002045	stigmaterol	43.41	0.76
MOL002047	melianone	40.73	0.81
MOL002048	nimboldin D	30.38	0.53
MOL002053	nimbolin A	32.11	0.34
MOL002056	(±)-balanophonin	54.74	0.40
MOL002058	medioresinol	57.20	0.62
MOL000098	quercetin	46.43	0.28

表 2 川楝子的毒性成分

Table 2 Toxic components of *Toosendan Fructus*

CAS 号	成分
1221262-77-6	meliasenin B
220698-24-8	trichilin D
58812-37-6	toosendanin
122688-84-0	1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal
1558056-69-1	butenolide
21300-07-2	5-hydroxymethylfurfural

2.2 川楝子 “毒性成分 - 预测靶点” 网络的构建

川楝子的毒性成分预测出 350 个作用靶点, 将毒性成分、靶点导入软件 Cytoscape 3.8.2 版中, 删除未连线靶点, 从而得到川楝子 “毒性成分 - 预测靶点” 网络图, 见图 1。在该网络图中, 共有 263 个节点, 686 条边, 其中圆形节点代表川楝子毒性成分的预测靶点, 菱形节点代表川楝子的毒性成分, 中间 “V” 节点代表川楝子。degree 值代表与该节点相连的边的数量, 在该网络图中, degree 值 >2 倍中位数的靶点中前 10 位的靶点有花生四烯酸 5-脂氧合酶 (ALOX5)、羧酸酯酶 2 (CES2)、羟基类固醇 11-β 脱氢酶 1 (HSD11B1)、双微粒体 2 (MDM2)、脾酪氨酸激酶 (SYK)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)、大麻素受体 1 (CNR1)、大麻素受体 2 (CNR2)、磷酸二酯酶 10A (PDE10A)。

2.3 川楝子致肝毒性 “毒性成分 - 潜在作用靶点” 网络的构建

在 GeneCards 中检索到关于肝脏损伤的基因, 并筛选出 score 值 \geq 中位数的靶点, 得 1 295 个肝脏

损伤靶点，与川楝子毒性成分预测靶点取交集，得到 103 个交集靶点，即为川楝子致肝毒性的潜在作用靶点，见图 2。

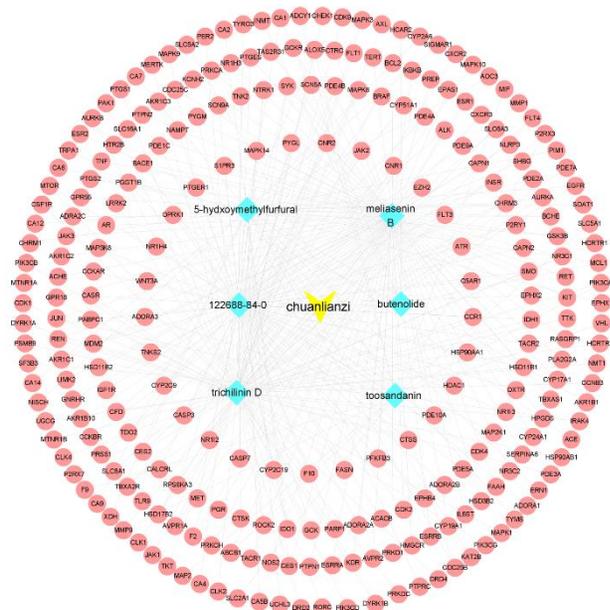


图 1 川楝子“毒性成分 - 预测靶点”网络

Fig. 1 “Toosendan Fructus toxic component - predictive target” network

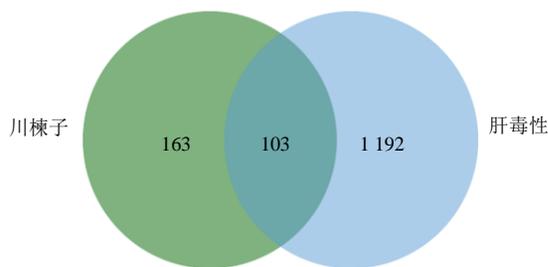


图 2 川楝子毒性成分预测靶点与肝脏损伤靶点交集

Fig. 2 Intersection of predicted targets of Toosendan Fructus toxicity components with liver injury targets

根据 103 个川楝子肝毒性潜在作用靶点，将其导入软件 Cytoscape 3.8.2 版中构建得到川楝子“毒性成分 - 肝脏潜在作用靶点”网络图，见图 3。在该网络图中，共有 110 个节点，包括 103 个靶点和 6 个毒性化合物，301 条边，图中菱形节点代表川楝子毒性成分，方形节点代表川楝子毒性成分致肝脏毒性潜在作用靶点。节点的 degree 值代表与该节点相连的边的数量，节点的大小与其 degree 值成正比，该网络中 degree > 2 倍中位数即 degree > 2 的靶点有 CES2、HSD11B1、MDM2、SYK、MAPK14、髓样细胞白血病蛋白 1 (MCL1)、表皮生长因子受体 (EGFR)、磷脂酰肌醇激酶-3 催化亚单位 α 基因

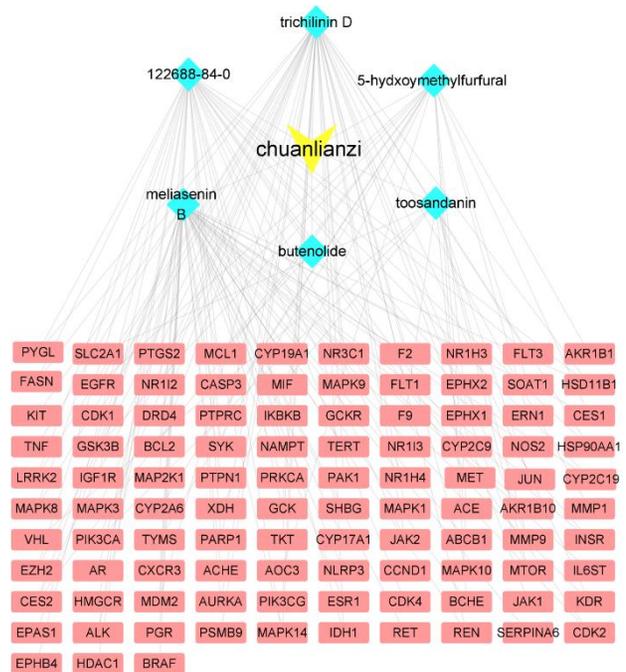


图 3 川楝子“毒性成分 - 肝脏潜在作用靶点”网络图

Fig. 3 Network diagram of “toxic constituents - potential liver targets” of Toosendan Fructus

(PIK3CA)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)。

2.4 川楝子致肝脏毒性潜在作用靶点的 PPI 网络的构建

将筛选出的川楝子肝脏毒性 103 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库在线分析，将分析结果数据导入 Cytoscape 3.8.2 软件中构建 PPI 网络，见图 4。该网络中共有 96 个节点，1 652 条边，网络中 degree 排名前 10 位的靶点为热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)、MAPK3、转录因子 AP-1 (JUN)、EGFR、MAPK1、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (CASP3)、PIK3CA、肿瘤坏死因子 (TNF)、雌激素受体 α (ESR1)、MAPK8，见表 3。

2.5 川楝子致肝毒性潜在靶点的 GO、KEGG 富集分析

川楝子致肝毒性的 103 个潜在毒性靶点在 GO 富集分析 ($P < 0.05$)，其中生物功能 (BP) 共富集 394 个条目，前 20 个条目涉及凋亡过程的负调控、对激酶活性的正向调控、蛋白质磷酸化、基因表达的正向调节、MAPK 级联的正调节、对 MAP 激酶活性的正向调节等过程；细胞组分 (CC) 共富集 60 个条目，前 20 个条目涉及受体复合体、胞质、核质体、浆膜、大分子复合体、内质网腔体等部位；分

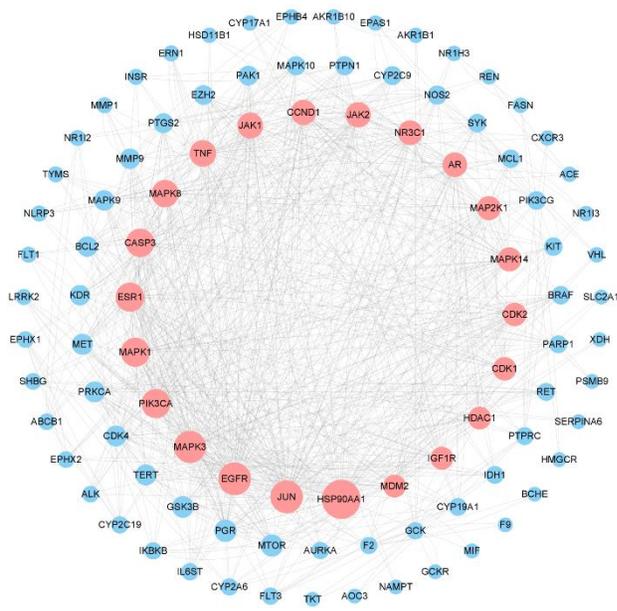


图 4 川楝子致肝毒性潜在作用靶点 PPI 网络

Fig. 4 PPI network of potential targets of *Toosendan Fructus* hepatotoxicity

表 3 PPI 网络中毒性潜在作用靶点 degree 值排名前 10 位的靶点

Table 3 Top 10 targets in the PPI network in terms of degree value for toxicity potential effect targets

基因	degree
<i>HSP90AA1</i>	80
<i>JUN</i>	60
<i>EGFR</i>	60
<i>MAPK3</i>	58
<i>MAPK1</i>	48
<i>PIK3CA</i>	48
<i>ESRI</i>	48
<i>CASP3</i>	46
<i>MAPK8</i>	42
<i>TNF</i>	40

子功能 (MF) 共富集 108 个条目, 前 20 个条目包括蛋白质丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性、蛋白酸激酶活性、ATP 结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性、酶结合等功能, 见图 5。川楝子致肝毒性的 103 个潜在靶点在 KEGG 富集中共富集到 154 条信号通路, 前 20 条通路包括癌症通路、前列腺癌通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抗性、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、卡波西肉瘤相关的疱疹病毒感染、乙型

肝炎、癌症中的碳代谢、催乳素信号通路、白细胞介素-17 (IL-17) 信号传导等通路, 见图 5。

2.6 川楝子致肝毒性“毒性成分-潜在作用靶点-核心通路”网络的构建

以 KEGG 富集分析中富集程度显著的通路构建川楝子致肝毒性“毒性成分-潜在作用靶点-核心通路”网络。该网络中共有 128 个节点, 1 004 条边, 网络中四边形节点代表潜在作用靶点; 圆形节点代表核心通路; 棱形节点代表毒性成分, 节点大小与其 degree 值呈正比, 见图 6。

在“毒性成分-潜在毒性作用靶点-核心通路”网络中, 毒性成分及 degree 值见表 4, 网络中靶点 degree 值排列在前 10 位的靶点为 MAPK1、MAPK3、PIK3CA、MAP2K1、EGFR、MAPK14、MAPK8、mTOR、MAPK10、JUN, 见表 5。

2.7 分子对接

将“毒性成分-潜在毒性靶点-核心通路”网络中 degree 值前 5 位的靶点作为受体, 得到受体靶点为 MAPK1 (degree=21)、MAPK3 (degree=21)、PIK3CA (degree=19)、MAPK8 (degree=18)、MAPK10 (degree=17), 其 PDB ID 分别是 2y9q、4qtb、7jiu、2xrw、3oy1, 并将与受体对应的毒性成分作为对接的配体, 应用软件 AutoDock 1.5.6 版进行分子对接, 对接信息见表 6。其中 PIK3CA 和 MAPK8 均分别与 2 个毒性成分进行对接, 5 个受体与 trichilin D 对接, 以分子对接结合能作为评价对接结果验证的指标, 在所有对接结果中, 结合能均 < -1.5 kcal/mol (1 kcal=4.2 kJ), 表明关键毒性成分与关键靶点有较好的结合能力, 可以在不需要外界能量的条件下进行对接。

使用 PyMOL 软件对对接结果进行可视化示例, 图中主要显示为小分子配体和于其相结合的受体结合位点氨基酸, 均选用棍状结构显示, 见图 7。

3 讨论

近年来, 关于川楝子及其制剂肝毒性的文献报道越来越多, 在动物实验、细胞实验、以及不同的炮制工艺等实验中均验证了川楝子具有肝毒性。乌日汉等^[15]通过设计剂量差异验证了川楝子高剂量 (2.571 4 g/kg) 组导致小鼠肝脏的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 显著升高, 肝细胞发生明显的水胀以及出现大小不同的水泡; 中剂量组的甘油三酯 (TG) 显著升高, 个别肝细胞发生水胀、胞质疏松, 提示川楝子具有一定的

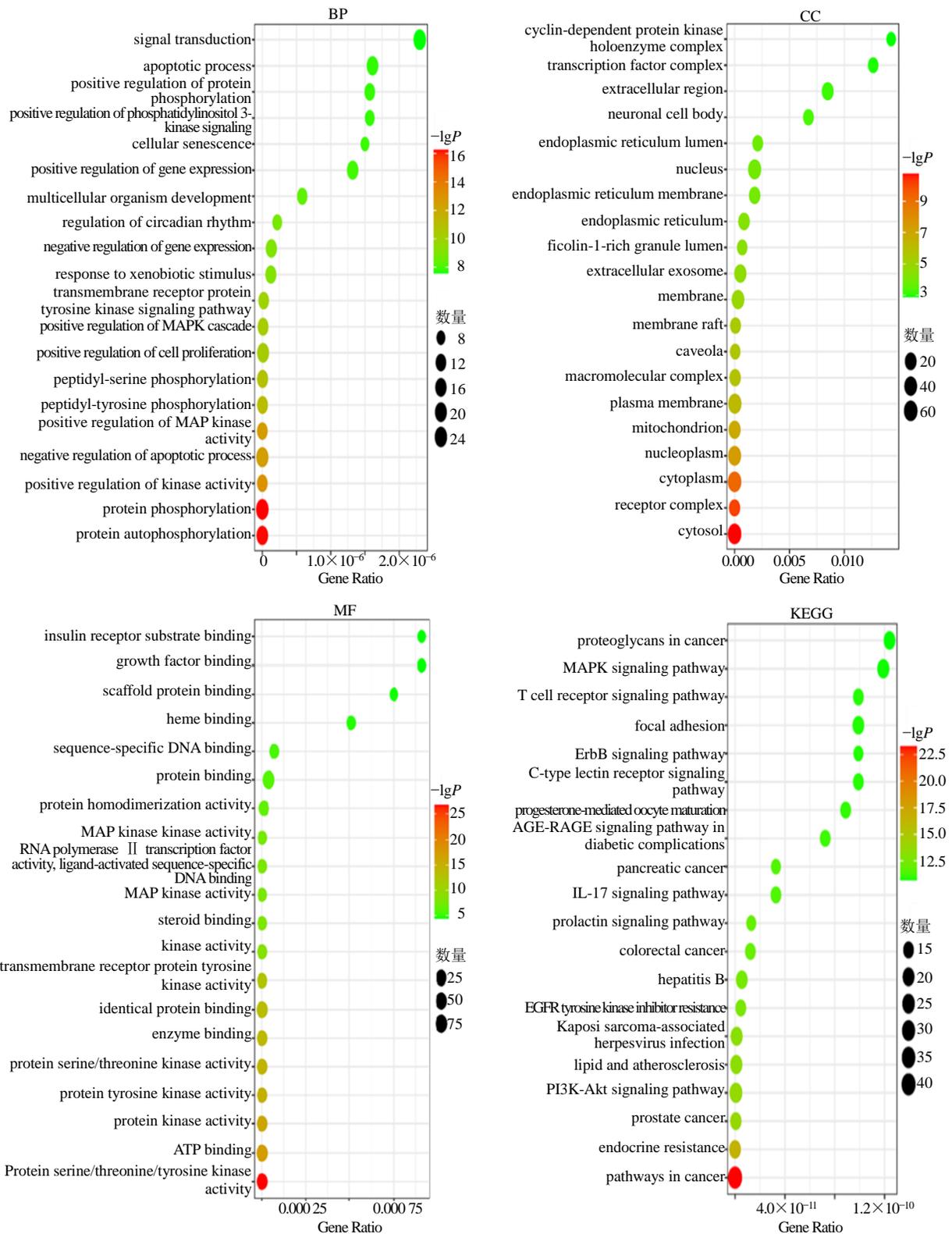


图 5 川楝子致肝毒性潜在作用靶点 GO 和 KEGG 分析

Fig. 5 GO and KEGG analysis of potential targets of *Toosendan Fructus* hepatotoxicity

肝脏毒性且毒性作用存在一定的剂量相关性，随剂量的增加而毒性增强。通过代谢组学验证了川楝子

肝毒性机制可能与 ABC 转运蛋白紊乱，氨基酸、嘌呤、嘧啶代谢有关^[16]；刘伟等^[17]和 Yu 等^[18]报道川

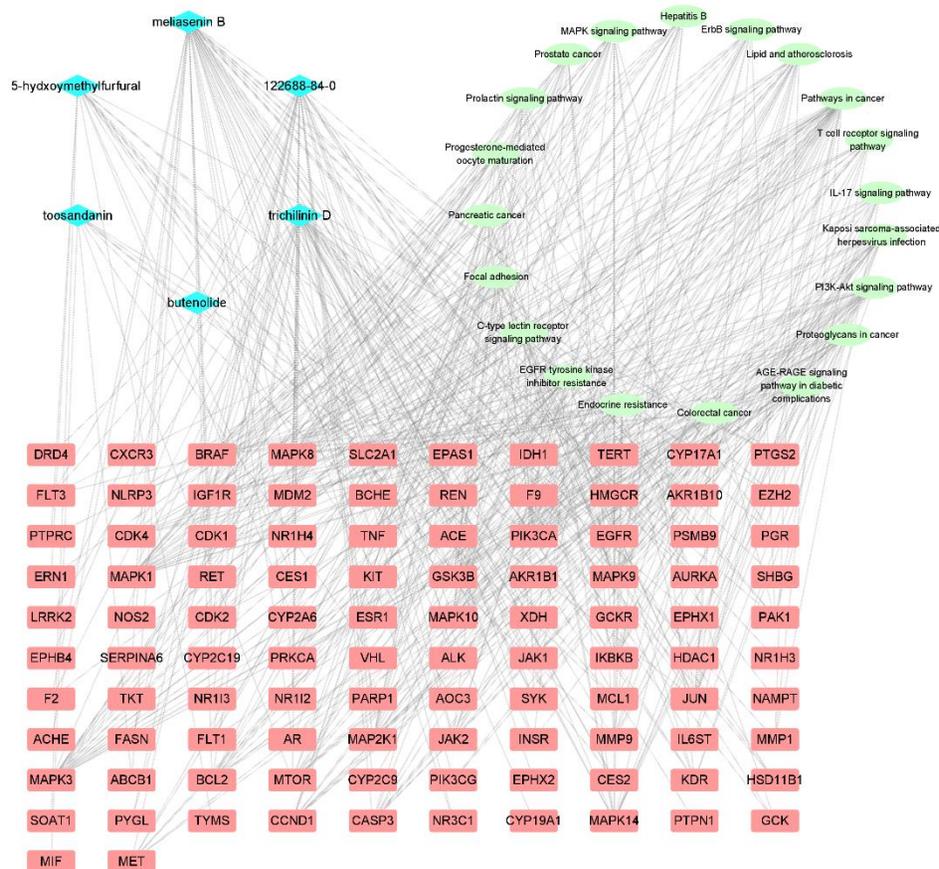


图 6 川楝子致肝毒性“毒性成分 - 潜在作用靶点 - 核心通路”网络

Fig. 6 *Toosendan Fructus* hepatotoxicity “toxic component - potential target - core pathway” network

表 4 关键毒性成分

Table 4 Key toxicological components

毒性成分	degree
meliassenin B	45
trichilin D	39
1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal	32
5-hydroxymethylfurfural	17
toosendanin	9
butenolide	1

表 5 关键靶点

Table 5 Key targets

靶点	degree
MAPK3	21
MAPK1	21
PIK3CA	19
MAPK8	18
MAPK10	17
MAP2K1	16
MAPK9	16
MAPK14	14
JUN	14
GSK3B	14

表 6 对接结合能

Table 6 Docking binding energy

基因	PDB 编码	对接成分	结合能/(kcal·mol ⁻¹)
MAPK1	2y9q	trichilin D	-3.9
MAPK3	4qtb	trichilin D	-3.3
PIK3CA	7jiu	toosendanin	-1.8
		trichilin D	-3.2
MAPK8	2xrw	1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal	-3.9
		trichilin D	-3.1
MAPK10	3oyl	trichilin D	-3.2

楝子可能通过 PI3K/Akt 信号、p53 信号和 PTEN 信号 3 种途径介导肝细胞凋亡而引起肝毒性；齐双岩等^[9]报道川楝子的肝毒性机制可能与炎症因子有关。川楝子因其存在的肝脏毒性作用，导致其临床应用受到一定的限制。

本研究通过建立川楝子毒性成分 - 预测靶点、毒性成分 - 潜在作用靶点、蛋白质相互作用、生物功能和通路网络、毒性成分 - 潜在毒性作用靶点 -

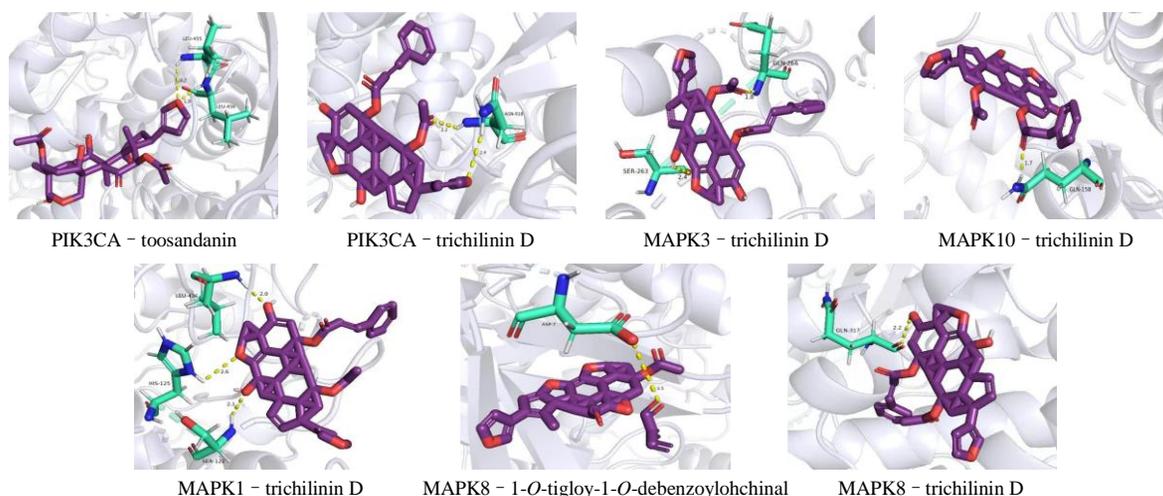


图 7 核心节点对接结果的可视化处理

Fig. 7 Visualization of core node docking results

核心通路网络以及分子对接技术探讨川楝子的肝毒性机制。本次筛选共得到 6 个毒性相关成分，川楝素 (toosendanin)、meliassenin B、trichilinin D、1-*O*-tigloyl-1-*O*-debenzoylohchinal、丁烯酸内酯 (butenolide)、5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural)。其中，对川楝素的肝毒性机制研究已有较多文献报道，目前已被报道的毒性机制包括 (1) 蛋白共价结合和修饰：Yu 等^[12]的报道称，川楝素在体内的代谢途径主要是酯解和与氨基酸结合，川楝素被细胞色素 P450 家族中的 CYP3A4 酶激活后会生成顺丁烯-1,4-双环中间体，该中间体易与氨基酸中的氨基和谷胱甘肽发生加成反应，这可能是川楝素产生肝毒性的原因。(2) 线粒体功能障碍：线粒体是合成能量物质 ATP 的主要场所，ATP 在细胞的生长、繁殖、代谢过程中起着关键作用，Zhang 等^[20]的研究称，川楝素通过使线粒体发生功能障碍，使线粒体膜电位和细胞内 ATP 水平降低，以及激活 caspase-8、9、3，进而诱导大鼠原代肝细胞死亡。(3) 细胞凋亡：细胞凋亡是由丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 的激活所介导发生的，有报道称，MiRNAs 可能是反映川楝素致肝毒性的潜在毒理学标志物^[17]。以此为依据，Zheng 等^[21]分析川楝子水提物染毒小鼠外周血中的 miRNAs 探讨川楝子致肝毒性机制，分析表明，川楝子诱导的肝脏毒性可能与细胞凋亡、细胞周期紊乱和线粒体功能障碍有关。(4) 氧化应激：齐双岩等^[19]通过川楝子大鼠给药与正常大鼠肝组织进行比较发现，川楝子给药大鼠的肝组织中的超氧化物歧化酶 (SOD) 显著下降，

丙二醛 (MDA) 显著上升， γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT) 显著上升，谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 显著降低，肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的含量升高，细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 阳性表达显著增强，提示川楝子的肝毒性机制可能与氧化应激和炎症反应有关。(5) 溶酶体功能障碍：Luo 等^[22]的研究报道称，川楝素通过抑制 TFEB 介导的溶酶体功能障碍抑制自噬通量可能是导致肝脏毒性的机制。近期 Chang 等^[23]的研究发现，肝细胞坏死、脂质代谢问题和线粒体功能障碍是川楝素致肝毒性的主要因素。除川楝素外，对其他毒性成分的机制研究较少，彭双清等^[13]的研究报道称丁烯酸内酯可能导致粒细胞增加，血浆蛋白减少而引发肝损伤。El Bohi 等^[14]的研究发现 5-hydroxymethylfurfural 不仅会产生遗传毒性和细胞凋亡，还能抑制小鼠的抗氧化机制，从而改变肝脏的结构和功能。

关键靶点 MAPK1、MAPK3、PIK3CA、MAPK8、MAPK10 涉及多条通路，其中 MAPK1、MAPK3 和 PIK3CA 均主要涉及 PI3K/Akt 信号通路。PI3K/Akt 信号通路可被细胞刺激或毒性损伤而激活，PI3K/Akt 通路与调控细胞生长增殖、细胞凋亡、代谢有关，PI3K 被激活后活化下游的 Akt 磷酸化，进一步促进肝损伤^[24-25]。MAPK3、MAPK1、MAPK8、MAPK10 均是 MAPKs 家族的重要成员，在调控细胞生长、增殖、凋亡等生物过程中起着重要作用，倪佳等^[26]通过克隆 MAPK3 证明 MAPK3 对肝、癌细胞的增殖、迁移以及侵袭具有促进作用。MAPK1 与 MAPK3 常共同组成 MAPK1/3，研究表明，

MAPK1/3 不仅与细胞的生理功能有关,还与细胞的生物过程(生长、增殖、分化、凋亡等)有关。MAPK8 又称 JNK1, Li 等^[27]研究称, MAPK8 (JNK1) 在肝细胞癌中可以通过促进 c-Myc 基因的表达和降低增殖抑制因子 p21 的表达来肿瘤的生长。MAPK10 (JNK3) 是多种生化信号的结合点,通过广泛影响细胞过程而在肿瘤的发生、发展过程中发挥着重要作用, Li 等^[27]的研究报道称, MAPK10 的表达是肝癌病人生存的重要预后因素; Li 等^[28]证实了 Circ-0000515 通过降低 MAPK10 的表达进而加重肝癌的恶性表达。PIK3CA 是 PI3K 的 α 亚基,是一种促癌基因^[29],近年来,研究发现 PIK3CA 在肝癌、胃癌、卵巢癌等多种恶性肿瘤中发生突变,是目前发现的在促癌基因中发生突变频率最高的基因之一^[30]。提示川楝子中毒性化合物可能通过对 PI3K/Akt 信号通路中相关靶蛋白的调控而引发肝毒性。

分子对接验证选择 5 个关键靶蛋白分别于对应的潜在毒性化合物进行分子对接,结果显示,川楝子潜在毒性成分川楝素、trichilin D、1-O-tigloyl-1-O-debenzoylohchinal 与 MAPK1、MAPK3、PIK3CA、MAPK8、MAPK10 具有较好的结合能力,结合文献对川楝子肝毒性和毒性成分的研究以及部分机制研究,提示网络药理学与分子对接预测川楝子致肝毒性的可靠性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 董庆海,李雅萌,吴福林,等. 川楝子的研究进展 [J]. 特产研究, 2018, 40(1): 63-68.
- [2] 陈彬,翁金月,金利思,等. 3 种炮制方法对川楝子中 6 种成分变化的影响考察 [J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2061-2064.
- [3] 魏舒婷,盛云华,唐黎明. 基于效-毒研究的川楝子临床应用分析 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 169-173.
- [4] 山生青. 浅谈中草药的不良反应与预防 [J]. 实用医技杂志, 1999(6): 417.
- [5] 李海波,马森菊,石丹枫,等. 川楝子的化学成分、药理作用及其毒性研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(15): 4059-4074.
- [6] 王昆阳,聂安政. 中药川楝子药理毒理探讨与合理用药思考 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(3): 54-58.
- [7] 熊彦红,齐双岩,金若敏,等. 川楝子对大鼠肝毒性的时效和量效关系研究 [J]. 江苏中医药, 2008(7): 83-85.
- [8] 郭英君,李京涛,常占杰. 92 例中药致药物性肝损伤临床分析 [J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(6): 453-454.
- [9] 赵筱萍,葛志伟,张玉峰,等. 川楝子中肝毒性成分的

快速筛查研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(11): 1820-1822.

- [10] 陈修平,王金华,杜冠华. 川楝子毒的历史认识与现代研究 [J]. 中药药理与临床, 2018, 34(4): 189-191.
- [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.
- [12] Yu J, Deng P, Zhong D, et al. Identification of amino acid and glutathione N-conjugates of toosendanin: Bioactivation of the furan ring mediated by CYP3A4 [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(9): 1598-1609.
- [13] 彭双清,吴敏,刘洪英,等. 镰刀菌毒素丁烯酸内酯对大鼠的急性毒性效应 [J]. 中国预防医学杂志, 2003(3): 4-6.
- [14] El Bohi K M, Ghoniem M H, Azab H H, et al. Extra virgin olive oil enhances the hepatic antioxidant defense and inhibits cytogenotoxic effects evoked by 5-hydroxy methylfurfural in mice [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(11): 11882-11891.
- [15] 乌日汉,毕力格,乌日罕,等. 川楝子亚急性毒性实验研究 [J]. 云南中医中药杂志, 2022, 43(9): 70-73.
- [16] 乌日汉,陈玉花,丽丽,等. 基于代谢组学的川楝子亚急性毒性机制初探 [J]. 中医药信息, 2021, 38(9): 27-34.
- [17] 刘伟,江梅,邵勇. 外泌体在肝病诊断中的作用研究进展 [J]. 肝脏, 2021, 26(3): 333-336.
- [18] Yu L, Zheng J, Li J, et al. Integrating serum exosomal microRNA and liver microRNA profiles disclose the function role of autophagy and mechanisms of *Fructus Meliae Toosendan*-induced hepatotoxicity in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109709.
- [19] 齐双岩,金若敏,刘红杰,等. 川楝子致大鼠肝毒性机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2008(16): 2045-2047.
- [20] Zhang S, Cao L, Wang Z R, et al. Anti-cancer effect of toosendanin and its underlying mechanisms [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2019, 21(3): 270-283.
- [21] Zheng J, Yu L, Chen W, et al. Circulating exosomal microRNAs reveal the mechanism of *Fructus Meliae Toosendan*-induced liver injury in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2832.
- [22] Luo L, Liang Y H, Fu Y Y, et al. Toosendanin induces hepatocyte damage by inhibiting autophagic flux via TFEB-mediated lysosomal dysfunction [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(12): 1509.
- [23] Chang H, Wang C, Gong L L, et al. An overview of *Fructus Meliae Toosendan*: Botany, traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 157: 113795.
- [24] 谷雪,付文娟,孙芳初,等. PI3K/Akt 信号通路与放射

- 性肝损伤的关系研究 [J]. 解放军预防医学杂志, 2018, 36(12): 1581-1584.
- [25] 张国燕, 尚军, 陈海娟, 等. 高良姜素通过调节 PI3K/AKT 信号通路抑制 DEN 诱发大鼠肝癌进展 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(1): 166-170.
- [26] 倪佳, 徐莹莹, 邓婉玲, 等. 人 MAPK3 基因克隆及其在肝细胞癌细胞中的作用 [J]. 遵义医科大学学报, 2022, 45(4): 463-469.
- [27] Li H, Li Y, Zhang Y, *et al.* MAPK10 Expression as a prognostic marker of the immunosuppressive tumor microenvironment in human hepatocellular carcinoma  [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 687371.
- [28] Li H, Li C M, Yuan R, *et al.* Circ_0000515 drives the progression of hepatocellular carcinoma by regulating MAPK10 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(11): 6014-6022.
- [29] Cao H, Xu Z, Wang J, *et al.* Functional role of SGK3 in PI3K/Pten driven liver tumor development [J]. *BMC Cancer*, 2019, 19(1): 343.
- [30] 刘林, 陈祯勇. 乳腺癌患者癌组织中 KRAS、PIK3CA 基因突变与临床病理特征及预后的关系 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(10): 1767-1774.

[责任编辑 高源]