

基于网络药理学与分子对接技术探讨大黄肝毒性的作用机制

黄巧波, 刘明平*

广州中医药大学 中药学教研室, 广东 广州 510006

摘要: **目的** 利用网络药理学和分子对接技术探讨大黄肝毒性的分子作用机制。**方法** 在 TCMSP 检索大黄活性成分及文献获取潜在肝毒性成分, 利用 Swiss Target Prediction 数据库获取成分靶点, 通过 GeneCards 和 OMIM 数据库获取人类肝毒性相关靶点。利用 STRING 数据库将 Venn 图获得成分与疾病共同靶标进行 (PPI) 网络分析, 用 Cytoscape 软件构建“大黄成分-肝毒性作用靶点”网络, 并且利用 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 功能富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) (KEGG) 通路富集。将部分肝毒性核心成分和关键靶点进行分子对接。**结果** 共获取大黄潜在肝毒性成分 21 种, 对应靶点 724 个, 人类肝毒性相关靶点 957 个, 大黄与肝毒性的共同靶点 151 个, 核心成分可能是大黄酸、大黄酚、 β -谷甾醇、大黄素-1-O- β -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚二葡萄糖苷、芦荟大黄素等, 关键靶点可能是白蛋白 (ALB)、蛋白激酶 B1 (Akt1)、肿瘤蛋白 p53 (TP53) 等。KEGG 通路显示癌症通路、前列腺癌通路等可能在大黄肝毒性中起关键作用。分子对接结果表明, 大黄肝毒性核心成分与关键靶点对接良好。**结论** 大黄通过多成分、多靶点、多通路机制导致肝毒性作用。

关键词: 大黄; 肝毒性; 网络药理学; 分子对接; 大黄酸; 大黄酚; β -谷甾醇

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)12-2965-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.008

Mechanism of hepatotoxicity of *Rhei Radix et Rhizoma* by network pharmacology and molecular docking

HUANG Qiao-bo, LIU Ming-ping

Department of Chinese Pharmacy, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of hepatotoxicity of *Rhei Radix et Rhizoma* by network pharmacology and molecular docking. **Methods** Potential hepatotoxic components of rhubarb were retrieved from TCMSP and literature. The component target was obtained by Swiss Target Prediction database, and the human hepatotoxic related targets were obtained by GeneCards and OMIM databases. The components obtained from Venn diagram and disease common targets were analyzed using STRING database for PPI network analysis, the “*Rhei Radix et Rhizoma* - hepatotoxicity targets” network was constructed using Cytoscape software, and the GO and KEGG pathway enrichment were performed using DAVID database. Some of the core components of hepatotoxicity were molecularly docked with key targets. **Results** A total of 724 targets corresponding to 21 potential hepatotoxic components of *Rhei Radix et Rhizoma*, 957 targets related to human hepatotoxicity, and 151 common targets of *Rhei Radix et Rhizoma* and hepatotoxicity were obtained. The core components of rhubarb may be rhein, chrysophanol, β -sitosterol, emodin-1-O- β -D-glucoside, emodin methyl ether diglucoside, aloe emodin, etc. The key targets may be ALB, AKT1, TP53, etc. KEGG pathway showed 139 signaling pathways indicating that cancer pathway and prostate cancer pathway may play a key role in the hepatotoxicity of *Rhei Radix et Rhizoma*. The results of molecular docking showed that the core components of *Rhei Radix et Rhizoma* hepatotoxicity interacted well with key targets. **Conclusion** *Rhei Radix et Rhizoma* causes hepatotoxicity through a multi-component, multi-target-multi-pathway mechanism.

Key words: *Rhei Radix et Rhizoma*; hepatotoxicity; network pharmacology; molecular docking; rhein; chrysophanol; β -sitosterol

大黄具有广泛的药理作用如调节胃肠道蠕动、保护肝细胞、促进胰液分泌等^[1], 其中蒽醌和鞣质

类成分对肝脏具有保护和损伤双向作用^[2-4], 大黄具有一定的肝毒性。因此, 进一步深入探究大黄的肝

收稿日期: 2023-09-22

作者简介: 黄巧波, 硕士研究生, 主要从事中药配伍及安全合理用药研究。E-mail: 2127369854@qq.com

*通信作者: 刘明平, 教授, 博士生导师, 主要从事中药配伍及安全合理用药研究。E-mail: liumingpingfly@163.com

毒性作用机制,减少不良反应具有重要的意义。近年来,网络药理学和分子对接技术在中药研究领域中的应用越来越受到关注^[5]。通过构建网络药理学可在复杂体系中寻找大黄毒性物质、预测已知化合物的不良反应^[6];分子对接技术可以通过模拟药物化合物与蛋白靶点的结合,预测它们的结合模式及结合自由能^[7],验证筛选的核心成分与关键靶标是否能有效结合。本研究将 2 种技术相结合探讨大黄肝毒性的核心成分、关键靶点及毒理机制,为进一步探究大黄的肝毒性提供了新的线索。

1 材料与方法

1.1 大黄活性成分和潜在肝毒性成分的筛选

TCMSP 数据库输入“大黄”,获得大黄活性成分,以生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18 为条件进行筛选。查找文献对筛选的大黄活性成分进行肝毒性验证和获取其他潜在肝毒性成分。

1.2 大黄活性及潜在肝毒性成分作用靶点的预测

在 PubChem 数据库输入 TCMSP 数据库获取的活性成分及文献获取的潜在肝毒性成分对应 InChIKey 信息,将大黄成分转化为标准 Canonical SMILES 格式,导入 SwissTargetPrediction 数据库,获得大黄活性及潜在肝毒性成分靶点,结合 TCMSP 数据库对大黄成分靶点进行补充。

1.3 人类肝毒性相关靶点的获取

在 GeneCards、OMIM 数据库中输入“liver toxic”,集合数据库靶点并去重得到人类肝毒性相关靶点。

1.4 预测大黄肝毒性潜在作用靶点

将 1.2 项下获取的大黄成分作用靶点与 1.3 项下获取的人类肝毒性相关靶点导入在线韦恩平台取交集,即可能是大黄肝毒性潜在作用靶点。

1.5 “大黄成分-肝毒性作用靶点”网络的构建及核心成分的筛选

将 1.1 项下收集的大黄活性及潜在肝毒性成分与 1.4 项下收集的大黄肝毒性潜在作用靶点导入通过 Cytoscape 3.9.1 软件,建立“大黄成分-肝毒性作用靶点”网络。利用 Network Analyzer 功能筛选该网络中 degree 值排名前 5 位的成分,即可能是大黄肝毒性核心成分。

1.6 蛋白相互作用(PPI)网络的构建及关键靶点的筛选

将 1.4 项下获得的大黄肝毒性潜在作用基因靶点导入 STRING 数据库,得到 PPI 网络图和蛋白靶

点相互作用数据,利用 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析。采用 Network Analyzer 功能筛选该网络中 degree 值排名前 5 位的靶点,即可能是大黄肝毒性关键靶点。

1.7 富集分析

将大黄肝毒性潜在作用靶点导入在 DAVID 数据库,进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析,并制作气泡图。

1.8 分子对接

采用 PDB、TCMSP 数据库获得蛋白质结构和核心成分结构,利用 AutoDock 软件将小分子和蛋白进行半柔性对接,Pymol 软件对部分构象进行可视化分析。

2 结果

2.1 大黄候选肝毒性成分

通过 TCMSP 数据库筛选得到候选活性成分共 16 种(表 1),其中番泻苷 E(sennoside E_{qt})未寻找到相关靶点,故舍弃。结合文献报道,具有肝毒性的大黄酸苷 A(rheinoside A)^[1]、大黄素甲醚(physcion)、大黄酚(chrysophanol)、大黄素(emodin)、没食子酸(gallic acid)^[2]、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate)^[8]6 种,共得到 21 种成分。

表 1 大黄候选活性成分

Table 1 Candidate active ingredients of *Rhei Radix et Rhizoma*

Mol ID	Molecule Name	OB/%	DL
MOL002235	eupatin	50.80	0.41
MOL002251	mutatochrome	48.64	0.61
MOL002259	physciondiglucoside	41.65	0.63
MOL002260	procyanidin B-5,3'-O-gallate	31.99	0.32
MOL002268	rhein	47.07	0.28
MOL002276	sennoside E _{qt}	50.69	0.61
MOL002280	torachrysone-8-O-β-D-(6'-oxayl)-glucoside	43.02	0.74
MOL002281	toralactone	46.46	0.24
MOL002288	emodin-1-O-β-D-glucopyranoside	44.81	0.80
MOL002293	sennoside D _{qt}	61.06	0.61
MOL002297	daucosterol _{qt}	35.89	0.70
MOL002303	palmidin A	32.45	0.65
MOL000358	β-sitosterol	36.91	0.75
MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24
MOL000554	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside	30.25	0.67

2.2 大黄肝毒性潜在作用靶点的预测

利用 Swiss Target Prediction、TCMSP 数据库获得 21 种成分的作用靶点并去重共 724 个。GeneCards 中以 relevance score > 10 为条件进行筛选, 结合 OMIM 数据库去重后得到 957 个人类肝毒性相关靶点。采用在线韦恩工具对大黄成分作用靶点与人类肝毒性相关靶点进行交集, 获得共同靶点 151 个(图 1), 即为大黄肝毒性潜在作用靶点。

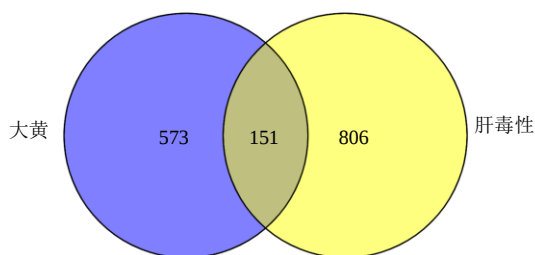


图 1 大黄成分 - 肝毒性靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of *Rhei Radix et Rhizoma* components - hepatic toxicity targets

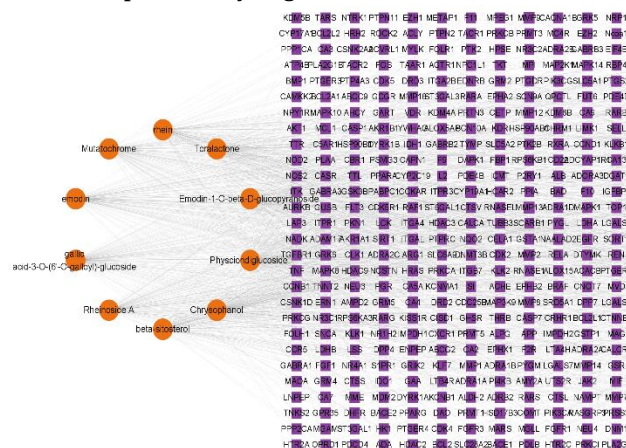


图 2 “大黄成分 - 肝毒性作用靶点”网络图

Fig. 2 Network diagram of “*Rhei Radix et Rhizoma* - hepatotoxicity targets”

表 2 大黄核心成分 degree 值

Table 2 Degree values of core components of *Rhei Radix et Rhizoma*

degree	成分中文名称	成分英文名称
107	大黄酚	chrysophanol
106	β-谷甾醇	β-sitosterol
105	大黄素-1-O-β-D-葡萄糖硫苷	emodin-1-O-β-D-glucopyranoside
105	大黄素	emodin
104	没食子酸-3-O-(6'-O-没食子酰基)-葡萄糖苷	gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside

BP 有 366 条, CC 有 40 条, MF 有 84 条。将排名前 10 位条目可视化, 见图 4。

2.3 “大黄成分 - 肝毒性作用靶点”网络图及核心成分

将上述得到的大黄候选肝毒性成分和肝毒性潜在作用靶点数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件中绘制“大黄成分 - 肝毒性作用靶点”网络图, 该网络包括 745 个节点(图 2)。Network Analyzer 功能分析显示, degree 值排名前 5 位的成分见表 2。确定为大黄肝毒性的核心成分。

2.4 PPI 网络图及关键靶点

借助 STRING 数据库和 Cytoscape 3.9.1 软件得到 PPI 网络图, 共涉及 149 个节点(图 3)。Network Analyzer 功能分析显示, 该网络中 degree 值排名前 5 位的靶点见表 3。

2.5 GO 功能富集分析

利用 DIVAD 进行 GO 功能富集分析共获得生物过程 (BP) 745 个条目, 细胞组成 (CC) 83 个条目和分子功能 (MF) 162 个条目, 其中 $P < 0.01$,

2.6 KEGG 通路富集分析

利用 DIVAD 进行 KEGG 通路富集分析, 得到大黄肝毒性的相关通路共 164 条, 其中 $P < 0.01$ 的有 139 条, 排名前 10 位的通路可视化, 见图 5。

2.7 分子对接

选择上述网络图中 degree 值靠前的 5 种成分: 大黄酚、β-谷甾醇、大黄素-1-O-β-D-葡萄糖硫苷、大黄素甲醚二葡萄糖苷、大黄酸为分子对接配体; 选取 PPI 网络中 degree 值排名前 3 位的关键靶点 ALB、Akt1、TP53 为对接受体。小分子与蛋白结合能小于 -4.25 kcal/mol (1 cal = 4.184 J) 表示两者有一定的结合能力, 小于 -5.0 kcal/mol 表示有较好的结合能力, 小于 -7.0 kcal/mol 表示两者具备良好的结合能力^[9]。通

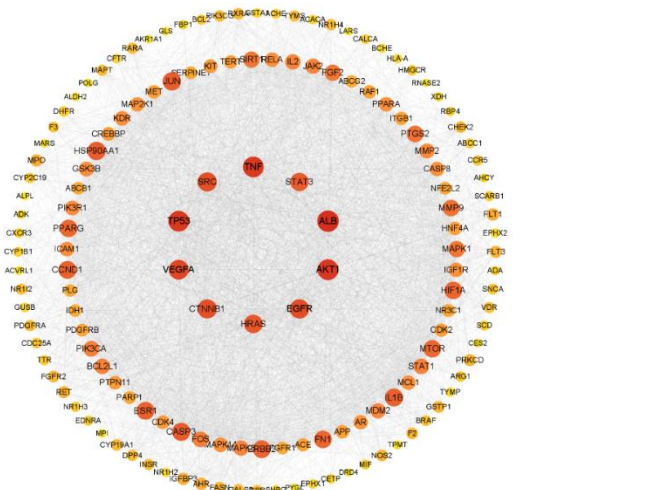


图 3 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network diagram

表 3 PPI 网络靶点 degree 值

Table 3 PPI network target degree value

degree	靶点中文名称	靶点英文名称
111	白蛋白	ALB
106	蛋白激酶 B1	Akt1
105	肿瘤蛋白 p53	TP53
105	肿瘤坏死因子	TNF
97	血管内皮生长因子 A	VEGFA

过 Autodock 软件进行分子对接并计算出结合能(表 4), 部分对接结果利用 Pymol 软件绘图, 见图 6。

3 讨论

大黄的主要肝毒性成分为蒽醌类成分和鞣质类。大黄成分 - 肝毒性靶点网络 degree 值前 10 位均为这两类成分。已有研究表明, 游离蒽醌类成分如大黄酚、大黄素、大黄酸、大黄素甲醚、芦荟大

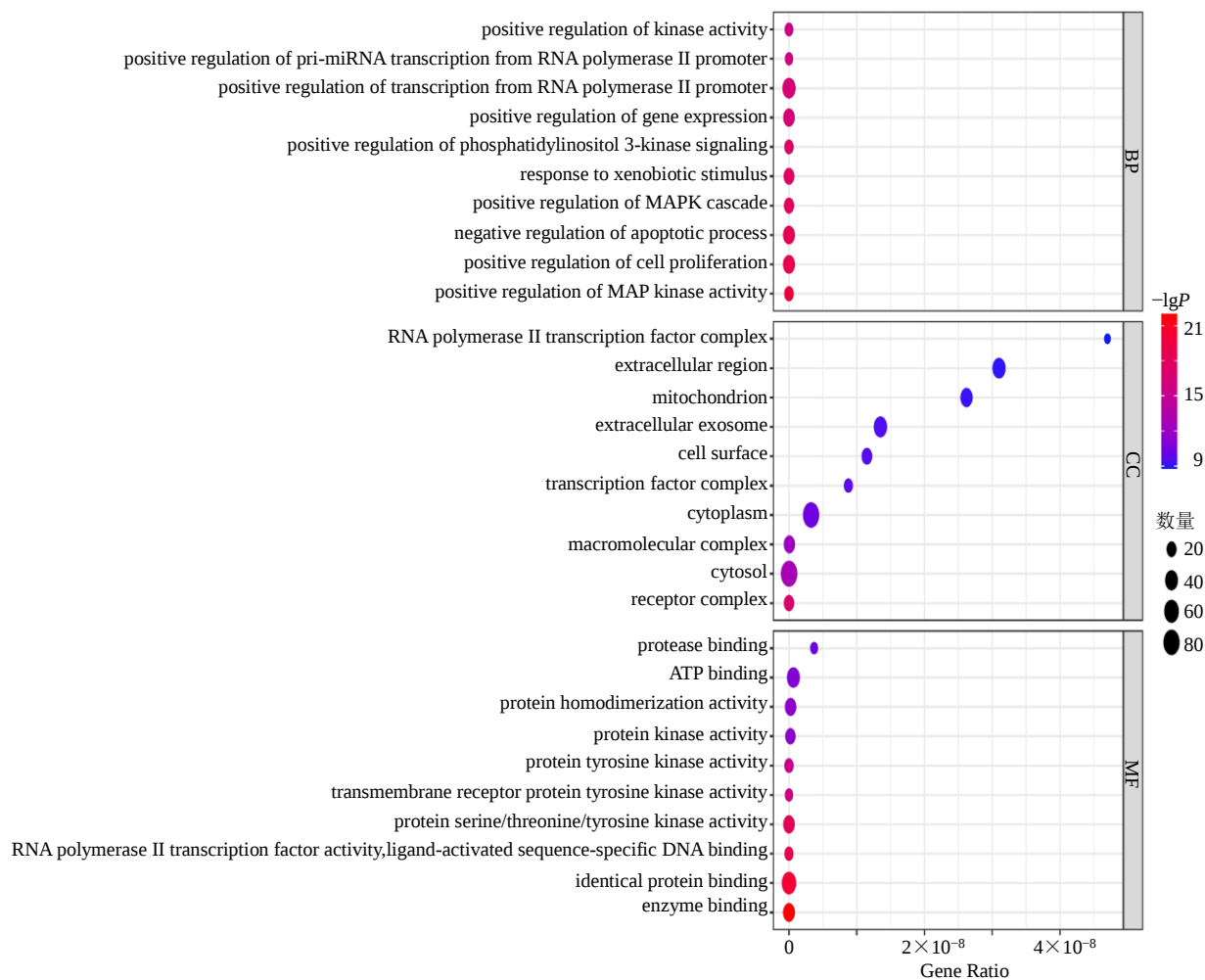


图 4 GO 功能分析

Fig. 4 GO function analysis

黄素等和结合型蒽醌苷如大黄素葡萄糖苷、芦荟大黄素葡萄糖苷等具有肝毒性, 毒性机制多表现在促

细胞凋亡、氧化应激、线粒体功能损伤等^[10-15]。而刘俊^[10]的研究结果表明, 结合型蒽醌类化合物溶解

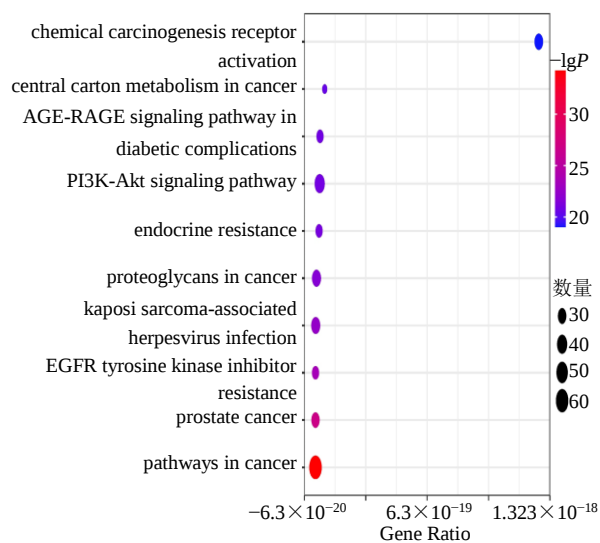


图 5 KEGG 通路分析

Fig. 5 KEGG pathway analysis

度较大, 大黄酸和大黄素甲醚溶解度较小。TCMSP 数据库筛选得到大黄活性成分结果显示, 游离大黄素和游离大黄素甲醚 OB 值均比其苷类成分低, 而游离大黄酸却相反。大黄酚 OB 值较低, 但成分 - 靶点网络中 degree 值最高, 分析其作用靶点可能在胃肠道, 通过作用于肠 - 肝轴而表现肝毒性。王敏等^[2, 16]研究证实, 大黄鞣质具有一定的肝损伤作用, 一般认为没食子酸的肝毒性大于儿茶素。

PPI 网络分析发现, ALB、Akt1、TP53、TNF、VEGFA 等靶点是大黄肝毒性的关键靶点。KEGG 富集分析显示, 大黄致肝损伤主要通路主要包括癌症通路、前列腺癌、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性等。另外, degree 值较高的还涉及磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /Akt 信号通路、癌症中的中心碳代谢、化学致癌 - 受体激活、白细胞介素 (IL) -17 信号通

表 4 大黄核心成分与关键靶点结合能

Table 4 Binding energy of core components of *Rhei Radix et Rhizoma* and key targets

靶点	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	chrysophanol	β -sitosterol	emodin-1-O- β -D-glucopyranoside	physciondiglucoside	rhein
ALB	-7.22	-7.58	-3.74	-2.87	-7.05
Akt1	-6.49	-10.27	-6.54	-5.15	-7.30
TP53	-7.47	-10.07	-8.18	-6.88	-7.21

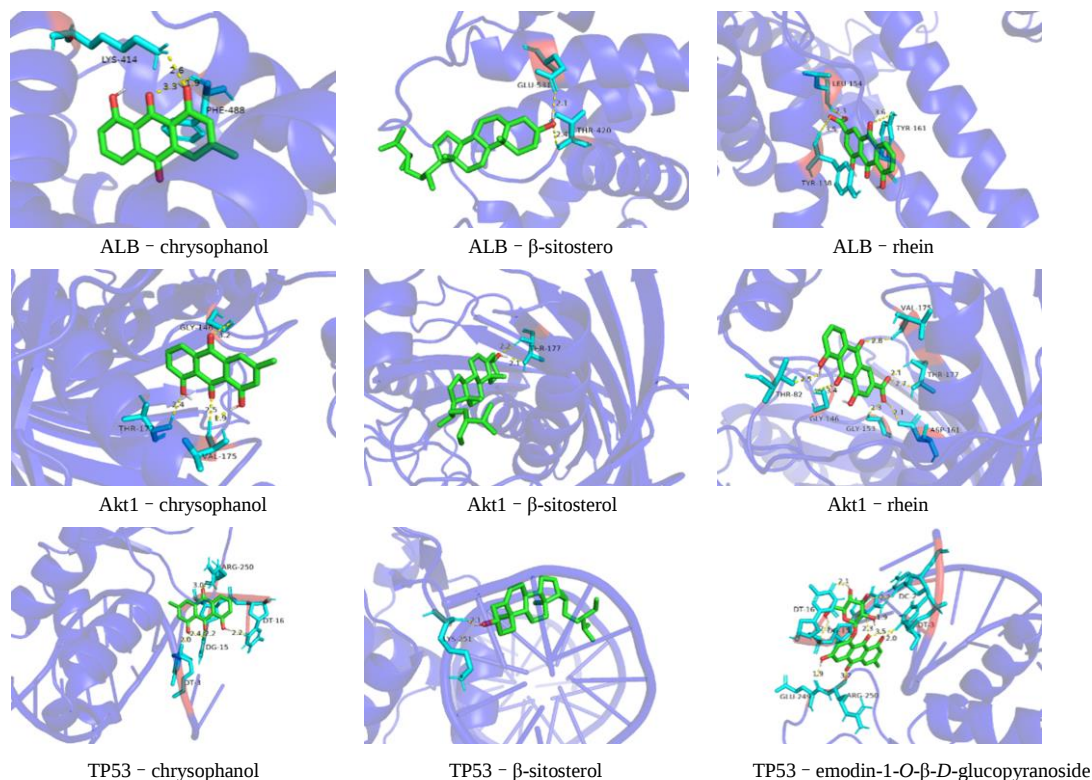


图 6 大黄肝毒性核心成分与关键靶点部分对接结果图

Fig. 6 Results of partial docking between core components of *Rhei Radix et Rhizoma* hepatotoxicity and key targets

路、TNF 信号通路等通路, 大黄致肝损伤的通路多涉及癌症与炎症反应等方面。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 金丽霞, 金丽军, 栾仲秋, 等. 大黄的化学成分和药理研究进展 [J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 121-126.
- [2] 覃鲁珊, 赵海平, 赵艳玲, 等. 大黄蒽醌与鞣质对大鼠肝脏的保护和损伤双向作用 [J]. 中国中西医结合杂志, 2014, 34(6): 698-703.
- [3] 胡樱凡, 向丽, 王平, 等. 大黄肝肾毒性及其减毒方法现代研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 34-41.
- [4] 李纪丰, 王瑞婕, 张宇欣, 等. 大黄素甲醚通过 HMGB1-NLRP3 信号通路缓解药物性肝损伤的作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(7): 2095-2102.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 分子对接方法在药物发现之外领域的应用 [J]. 北京工业大学学报, 2017, 43(12): 110-118.

- [8] 王伽伯, 马永刚, 张萍, 等. 炮制对大黄化学成分和肝肾毒性的影响及其典型相关分析 [J]. 药学学报, 2009, 44(8): 885-890.
- [9] 凌慧, 侯恩存, 赵艺蔓, 等. 小柴胡汤抗慢性乙型肝炎病毒相关肝细胞癌的机制研究 [J]. 中医药临床杂志, 2022, 34(1): 110-116.
- [10] 刘俊. 决明子中主要肝毒性蒽醌类成分鉴别及其毒性作用机制研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- [11] 卫培峰, 吴艳艳, 焦晨莉. 制何首乌及大黄酚对小鼠肝细胞凋亡的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 172-173.
- [12] 韦美金, 黄娟, 白俊其, 等. 大黄素对大鼠血清肝功能、肝脏转运蛋白及代谢酶 UGT1A1 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(7): 1551-1555.
- [13] 杨冬. 基于 MRP-氧化应激的大黄酸肝毒性及相关机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2022.
- [14] 全云云, 周忆梦, 刘美辰, 等. 斑马鱼模型筛选何首乌肝毒性的物质基础 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 52-57.
- [15] 汪祺, 王亚丹, 杨建波, 等. 基于体外肝代谢考察大黄素甲醚肝毒性作用 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2367-2372.
- [16] 王敏, 韩婷, 李春帅, 等. 大黄炮制前后的化学成分变化及其减毒研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(22): 3131-3138.

[责任编辑 高源]