

基于网络毒理学和代谢组学技术探究枳椇酮所致肝损伤的作用机制

杨津津¹, 孙梦迪¹, 徐晓敏¹, 王业豪¹, 柳长凤^{2*}

1. 黑龙江中医药大学 研究生院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 黑龙江中医药大学 中医药研究院, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘要: **目的** 整合网络毒理学与代谢组学技术探究枳椇酮的潜在肝毒性机制。**方法** 采用网络毒理学方法预测枳椇酮的化学成分靶点和肝损伤疾病潜在靶点, 并利用 AutoDock 分子对接验证其结合能力。建立枳椇酮诱导的小鼠肝损伤模型, 通过苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理学变化; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、 γ -谷氨酰转氨酶(GGT)水平, 评估肝功能损伤程度; 利用代谢组学技术对肝组织代谢谱进行分析, 筛选差异代谢物及相关代谢通路; 整合代谢组学与网络毒理学结果进行联合分析, 并通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测相关通路蛋白的表达。**结果** 网络毒理学分析共鉴定出 182 个交集靶点, 其中信号转导与转录激活因子 3(STAT3)、肿瘤蛋白 p53(TP53)、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)-6 等为关键靶点, KEGG 通路富集分析显示 IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞凋亡等显著富集。动物实验结果显示, 与对照组比较, 枳椇酮组可显著升高血清 ALT、AST、GGT 水平($P<0.01$), 诱导肝细胞坏死和炎症浸润。代谢组学鉴定出 39 个肝脏差异代谢物, 13 个血清差异代谢物, 主要涉及甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢等 22 条相关代谢途径; 多组学联合分析揭示花生四烯酸代谢为枳椇酮致肝损伤的关键通路, 且 IL-6、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、IL-1 β 、丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)与花生四烯酸代谢物具有显著相关性, 分子对接证实了枳椇酮与这些肝损伤相关靶点具有显著的结合活性, 提示枳椇酮通过调节 IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14 进而调控花生四烯酸、甘油磷脂代谢及嘌呤代谢代谢途径进而诱发小鼠肝损伤。Western blotting 验证进一步表明, 枳椇酮可显著上调 IL-6、IL-1 β 、MAPK14 的蛋白表达, 下调 GPX4 蛋白表达($P<0.001$)。**结论** 枳椇酮通过多靶点网络机制诱导肝损伤, 其潜在作用机制可能与激活 IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14 介导的炎症信号, 并调控甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢、花生四烯酸代谢等通路密切相关。

关键词: 枳椇酮; 肝损伤; 网络毒理学; 代谢组学; 花生四烯酸; 白细胞介素-6; 谷胱甘肽过氧化物酶 4

中图分类号: R99

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2026)09-2532-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2026.09.007

Mechanism of liver injury caused by fraxinellone through network toxicology and metabolomics

YANG Jinjin¹, SUN Mengdi¹, XU Xiaomin¹, WANG Yehao¹, LIU Changfeng²

1. Graduate School, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

2. Institute of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

Abstract: **Objective** To integrate network toxicology and metabolomics techniques to preliminarily explore the potential liver toxicity mechanism of fraxinellone. **Methods** The chemical component targets and potential liver injury disease targets of fraxinellone were predicted by network toxicology methods, and the binding ability was verified by AutoDock molecular docking. A mouse liver injury model induced by fraxinellone was established, and the pathological changes of liver tissues were observed by HE staining; the levels of serum ALT, AST, and GGT were detected by ELISA, to evaluate the degree of liver function damage. Liver tissue metabolic profile was analyzed by metabolomics technology to screen differential metabolites and related metabolic pathways, the combined analysis of metabolomics and network toxicology results was conducted, and the expression of related pathway proteins was detected by Western blotting. **Results** A total of 182 intersection targets were identified by network toxicology analysis, among which

收稿日期: 2026-06-04

基金项目: 国家重点研发计划中医药现代化重点专项项目(2022YFC3502104)

作者简介: 杨津津, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药性理论和药效物质基础研究。E-mail: 2788261885@qq.com

*通信作者: 柳长凤, 女, 医学博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向为中药药性理论和药效物质基础研究。E-mail: 365854733@qq.com

STAT3, TP53, TNF, IL-6, etc. were key targets. KEGG pathway enrichment analysis showed that the IL-17 signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, apoptosis, etc. were significantly enriched. The animal experiment results showed that compared with control group, the fraxinellone administration group were significantly increased the levels of serum ALT, AST, and GGT ($P < 0.01$), induce hepatocyte necrosis and inflammatory infiltration. Metabolomics identified 39 liver differential metabolites and 13 differential serum metabolites, mainly involving glycerophospholipid metabolism, purine metabolism, taurine and secondary taurine metabolism, etc. 22 related metabolic pathways. Integrated multi-omics analysis revealed that arachidonic acid metabolism was the key pathway of fraxinellone-induced liver injury, and IL-6, GPX4, IL-1 β , MAPK14 were significantly correlated with arachidonic acid metabolites. Molecular docking confirmed that fraxinellone had significant binding activity with these liver injury-related targets. Fraxinellone induces liver injury in mice by regulating IL-6, GPX4, IL-1 β , and MAPK14, which in turn modulate the metabolic pathways of arachidonic acid, glycerophospholipids, and purine metabolism. Western blotting verification further indicated that fraxinellone could significantly upregulate the protein expression of IL-6, IL-1 β , and MAPK14, and downregulate the expression of GPX4 ($P < 0.001$).

Conclusion Fraxinellone induces liver injury through a multi-target network mechanism. Its potential mechanism may be related to the activation of IL-6, GPX4, IL-1 β , MAPK14-mediated inflammatory signals and the regulation of glycerophospholipid metabolism, purine metabolism, taurine and secondary taurine metabolism, arachidonic acid metabolism, etc.

Key words: fraxinellone; liver injury; network toxicology; metabolomics; arachidonic acid; IL-6; GPX4

白鲜皮为芸香科植物白鲜的干燥根皮，是我国传统经典中药材，桉酮是从白鲜干燥根皮中分离得到的重要单体化合物，呈无色无味的棱柱状结晶（醋酸乙酯），相对分子质量为 232，可溶于乙醇、氯仿等有机溶剂^[1]。药理学研究表明，桉酮具有抗炎、抗肿瘤、抗纤维化、神经保护等多种生物活性，具备良好的开发前景^[2-3]。肝脏是机体代谢外源性药物、毒物的核心器官，也是最容易发生药物性损伤的靶器官。药物性肝损伤，是临床用药中常见的严重药品不良反应之一^[4]。药物在肝脏代谢时直接可损害肝细胞，进一步触发氧化应激、细胞凋亡级联反应和炎症应答，最终诱导急性肝损伤，临床表现为肝细胞坏死、炎症浸润和肝功能异常等^[5]。已有研究表明，桉酮及其基原药材白鲜皮均具有明确肝毒性，是典型具有有效-毒双重属性的中药材^[1]。动物实验亦证实，桉酮干预可导致小鼠血清转氨酶升高并激活磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）/蛋白激酶 B（Akt）信号通路，促进肝细胞凋亡而介导肝组织病理性损伤^[6-7]，明确了其体内肝毒性特征^[4]。机制层面，多数学者发现白鲜皮中的白鲜碱及其呋喃类化合物可被代谢激活为环氧化物代谢物^[8]，与蛋白质共价结合诱导肝毒性^[4]，且呋喃类化合物可以通过叠加效应协同诱导肝损伤^[9]。而桉酮分子结构中的呋喃环是其产生肝毒性的关键官能团^[10]，该特征结构可经细胞色素 P450 酶代谢活化，生成环氧化物、顺式烯二酮等高活性亲电中间体。此类活性代谢产物可与肝蛋白亲核基团发生共价结合，破坏肝细胞生理稳态，最终介导肝损伤的发生与进展^[11]。

现阶段关于桉酮肝毒性相关研究仍存在明显短板，整体研究仍较为浅显、零散，系统性不足^[12]，现有报道多局限于丙氨酸氨基转移酶（ALT）和天门冬氨酸氨基转移酶（AST）升高、肝组织坏死等表型描述^[6]，但尚未阐明桉酮致肝损伤的上游分子机制、核心调控靶点与系统性信号网络，极大限制了桉酮毒性机制的系统解析及其后续的安全开发与临床应用。本课题组开展前期毒理学研究，从分子与细胞层面证实了白鲜皮的潜在肝毒性，筛选确定桉酮、黄柏酮、茵芋碱是白鲜皮中主要的潜在毒性成分^[9]。前期基于斑马鱼幼鱼代谢组学研究发现，桉酮可显著扰乱不饱和脂肪酸、色氨酸、花生四烯酸及支链氨基酸（缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸）的生物合成通路，打破肝脏物质代谢稳态^[11]，从代谢层面佐证了桉酮的内在肝毒性。基于前期研究基础，本研究整合了网络毒理学与代谢组学技术，融合计算预测、代谢表型分析和实验验证多维度手段，深入探究桉酮诱导小鼠急性肝损伤的潜在分子机制。本研究结果旨在明确桉酮肝毒性的核心机制，为桉酮药用风险评估、后续减毒修饰、安全给药方案制定提供完整实验依据与理论支撑。同时为白鲜皮的合理开发、安全规范化临床应用提供科学依据。

1 网络毒理学研究方法

1.1 网络毒理学技术预测桉酮所致肝损伤靶标

通过化源网检索桉酮 CAS 号后，在 PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>）获取桉酮的作用靶标，在 Swiss Target Prediction（<http://www>）

swisstargetprediction.ch/) 在线数据库预测栲酮的作用靶标,删除重复靶标后合并;在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>) 数据库以“liver injury”为关键词检索获取药源性肝损伤和的相关靶点。在 Venny 2.1.0 网站中构建“栲酮”和“肝损伤”的韦恩图,取二者交集靶点,通过 Cytoscape 3.10.4,构建“成分-靶点”网络图。再将交集靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org>) 构建蛋白质相互作用(PPI)网络,生物体设置为智人,应用最小所需相互作用分数 0.90。并用 Cytoscape 3.10.4 进行可视化展示,根据度(degree)值筛选核心靶点。在 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>) 对交集靶点进行基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析,GO 术语涵盖生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF),分别将前 10 条和前 20 条项目导入微生信(www.bioinformatics.com.cn) 平台可视化分析。

1.2 分子对接实验

在 PubChem 数据库获取栲酮核心活性成分的 3D 结构作为配体。从 RCSBPDB 蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>) 下载 PDB 文件格式的靶点蛋白的 3D 晶体结构作为受体。通过 <https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php> 网站进行分子对接并计算结合能。

2 实验验证

2.1 实验动物及材料

清洁级(SPF 级) BALB/c 小鼠 20 只,体质量 18~22 g,购于辽宁长生生物科技有限公司,动物质量合格证号 SCXK(辽) 2020-0001,并获得黑龙江中医药大学伦理委员会批准,批准编号(2023062501)。小鼠在标准条件下[12 h 光/暗循环 7 d, (22±2) °C, (55±10%) 湿度]饲养,自由获取标准啮齿动物饲料和水以适应环境。

栲酮,质量分数≥98%,批号 B20136,购自上海源叶生物科技有限公司。戊巴比妥钠(德国 Merck 公司,货号 P11011);甲酸(天津市富宇精细化工有限公司,货号 64-18-6);乙腈(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,货号 E2230120);甲醇(北京迪马欧泰科技发展中心,货号 50102);AST、ALT 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(江苏晶美生物科技有限公司,货号 JM-00333F2、JM-00332F2);苏木素-伊红(HE)染色液(珠海贝索生物科技有限公司,货号 C203203);4%多聚甲醛固定液、胞

质肌动蛋白 1 (Anti-β-actin)、辣根过氧化物酶(HRP) 标记的兔抗山羊免疫球蛋白(Ig) G、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,白细胞介素(IL)-1β 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 G1101、GB15001-100、GB23204、G1214-100、GB11113); IL-6 抗体(沈阳万类生物科技有限公司,货号 WL02841)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 GB154327),丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14) 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 GB114685); RIPA 裂解液(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号 CR2212023); 增强型蛋白酶抑制剂混合液(货号 20033241); BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号 060723240112); Omni-ECL™超灵敏化学发光检测试剂盒(飞克级)(雅酶生物科技有限公司,货号 03791350)。

Eclipse E100 正置光学显微镜(日本 Nikon 公司); KZ-III-FP 研磨仪(武汉赛维尔生物科技有限公司); FRESCO17 台式高速冷冻离心机(美国 Thermo-Fisher 公司); AS60/220.R2 电子天平(波兰 Radwag 公司); KQ5200E 超声清洗仪(昆山市超声仪器有限公司); XEVO G2-XSQ-TOF 液质联用仪(美国 Waters 公司); QI3.0 分析软件(美国 Waters 公司); 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); M200Pro 酶标仪(美国 Thermo 公司); ChemiScope 5300 化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司)。

2.2 方法

2.2.1 动物分组及给药 适应 7 d 后,将 BALB/c 小鼠随机分为对照组和栲酮组,每组 10 只,给药前禁食 12 h,分别 ig 单次给予小鼠栲酮(40.95 mg/kg),剂量基于前期预实验与已有文献确定^[13],该剂量可稳定诱发明显肝脏损伤,故本研究选用此高剂量开展后续全部体内实验;溶剂 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)^[14],给药体积为 10 mL/kg,对照组给予等体积 CMC-Na,给药后 24 h 取材^[15]。

2.2.2 样本处理与收集 末次给药 24 h 后,称量小鼠体质量,然后进行小鼠眼眶取血,采血完毕后,采用颈椎脱位法处死小鼠。血清于 4 °C、5 000×g 离心 10 min 后取上清液,所得上清液用于试剂盒指标检测。快速剥离肝脏组织并用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净血渍,充分吸干水分后称质量,计算肝脏脏器指数(肝脏质量/体质量)。取部分肝组织,4%多聚甲醛固定,用于组织病理学检查、HE 染

色；剩余肝组织一部分立即经液氮速冻，置于 -80°C 保存，用于后续代谢组学和 Western blotting 分析。

2.2.3 小鼠肝病理学观察 将固定好的肝组织进行石蜡包埋，切片，HE 染色，中性树胶封片，光学显微镜下观察组织病理变化。

2.2.4 生化指标的检测 取 50 μL 血清，加生理盐水，按照 1:9 配制 10% 组织匀浆，采用 ELISA 方法检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (AST)、天门冬氨酸氨基转移酶 (ALT)、 γ -谷氨酰转移酶 (GGT) 指标水平，操作严格按照各试剂盒的说明书。

3 代谢组学检测及分析

3.1 肝脏样本制备及收集

精密称取小鼠肝组织 50 mg，加入 450 μL 生理盐水，置于 4°C 、60 Hz 研磨仪中匀浆 3 次，每次 60 s， 4°C 、13 000 r/min 离心 15 min，取 100 μL 上清至离心管中，加入 300 μL 预冷的蛋白质沉淀剂甲醇-乙腈 (2:1)，涡旋震荡 2 min，冰水浴超声 30 min， -20°C 静置 30 min， 4°C 、13 000 r/min 离心 15 min，取上清液。各样品抽取 150 μL 用于分析，溶液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤，加入进样瓶中备用。

3.2 UPLC-MS 检测条件

使用 ACQUITY UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm) 分离样品：柱温 40°C ；流速 0.4 mL/min；流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) 和乙腈 (B)，梯度洗脱 (0~0.5 min, 99%~80% A；0.5~2.5 min, 80%~40% A；2.5~4 min, 40%~34% A；4~5 min, 34%~20% A；5~7.5 min, 20%~14% A；7.5~8 min, 14%~1% A；8~9 min, 1% A)。进样量 5 μL 。质谱条件：电喷雾离子源 (ESI)，分别在正负离子模式下检测，正离子毛细管喷雾电压 2 000 V，负离子毛细管喷雾电压 1 000 V；正离子锥孔电压 60 V，负离子锥孔电压 70 V；离子源温度 120°C ；脱溶剂气温度 500°C ；脱溶剂气流速 1 000 L/h；锥孔气流速 50 L/h；碰撞能 15~45 eV。

3.3 数据处理

对 UPLC-Q-TOF-MS 生成的原始数据进行预处理，包括峰对齐、匹配、降噪和归一化。利用 ProgenesisQI 软件和 EZinfo2.0 软件 (集成在 MarkerLynx1.4 工作站中) 对小鼠血清和肝脏样本的数据进行分析。首先，采用主成分分析 (PCA) 和最小偏二乘判别分析 (OPLS-DA)，进行无监督统

计分析，筛选潜在的生物标志物；通过得分图 (Scoresplot) 可以直观地展示各组之间的分离程度，从而判断不同组别小鼠血清和肝脏样本的代谢轨迹相似性及其聚类情况。

3.4 差异代谢物的鉴定

根据 S-plot 图中所显示的潜在生物标志物在组间的变动趋势，采用变量重要性投影值 (VIP) >1 、 $P<0.05$ 作为筛选标准，以识别潜在的特征性生物标志物。

3.5 代谢通路分析

在 HMDB (<http://www.hmdb.ca/>) 代谢公共数据库、KEGG 数据库中检索进行匹配，得到代谢物信息，确定差异代谢物，在 Metaboanalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/home.xhtml>) 网站对其进行代谢通路富集，绘制代谢通路气泡图。通过对不同代谢物和网络毒理学筛选出来的共同靶点进行网络分析，制作基因-代谢物相互作用网络，并查阅相关文献进一步探索肝损伤相关的病理机制，用 Western blotting 进行验证。

3.6 统计学分析

采用 SPSS 26.0 软件进行分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，2 组数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 或独立样本 t 检验。

4 整合分析网络毒理学与代谢组学

4.1 基于 MetaboAnalyst 的基因靶点-差异代谢物网络分析

将网络药理学筛选到的交集基因靶点与差异代谢物数据集共同导入 MetaboAnalyst 6.0 在线分析平台中的 Network Analysis 模块，选择 “gene-metabolite interaction” 分析模式，设置物种为 homo sapiens，以默认参数构建基因-代谢物互作网络。完成网络构建后，进行通路富集分析，以 $P<0.05$ 为筛选阈值，筛选出显著富集的代谢通路为花生四烯酸代谢通路。提取花生四烯酸代谢通路中的基因靶点，结合通路富集的 P 值及基因在网络中的 degree，筛选出核心靶点基因作为后续 Western blotting 验证的目标靶点。

4.2 Western blotting 检测小鼠肝组织中 IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14 蛋白水平

提取小鼠肝组织总蛋白，BCA 法测蛋白浓度。SWE 快速高分辨电泳检测，免冰浴快速转膜将分离的蛋白样品转印至 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1 h 后，加入一抗：IL-6 (1:500)、GPX4

(1:500)、IL-1 β (1:500)、MAPK14 (1:3 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 第 2 天摇床 1 h, 用 TBST 清洗 4 次。分别与山羊抗兔二抗 (1:5 000)、山羊抗鼠二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h 后, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。滴加混合好的 ECL 发光液, 于化学发光仪成像系统中曝光成像。用 Image J 软件分析条带灰度值。

5 网络毒理学分析

5.1 桉酮所致肝损伤靶标

以“fraxinellone”为关键词, 在 PubChem 数据库找到 118 个靶点, 在 Swiss Target Prediction 数据库中找到 105 个靶点, 以“liver injury”为关键词,

在 GeneCards 数据库中找到 13 024 个毒性靶点; 共获得 182 个交叉靶点, 如图 1A 所示。将交集靶点导入 STRING 数据库中, 得到最低交互得分 ≥ 0.90 的 PPI 网络, 利用 Cytoscape 软件制作 PPI 网络图, 该网络共有 110 个节点, 共 356 条边, 见图 1B。

通过 GO 富集分析, 得 BP、MF、CC 富集条目分别为 631、63、144 条, 选取前 10 条生物学过程; KEGG 富集通路分析得到 157 条通路。以富集倍数和 P 值为指标, 选择排列前 20 位的富集分析绘制 KEGG 富集气泡图, 主要包括 IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞凋亡、C 型凝集素受体信号通路等多个通路, 见图 2。

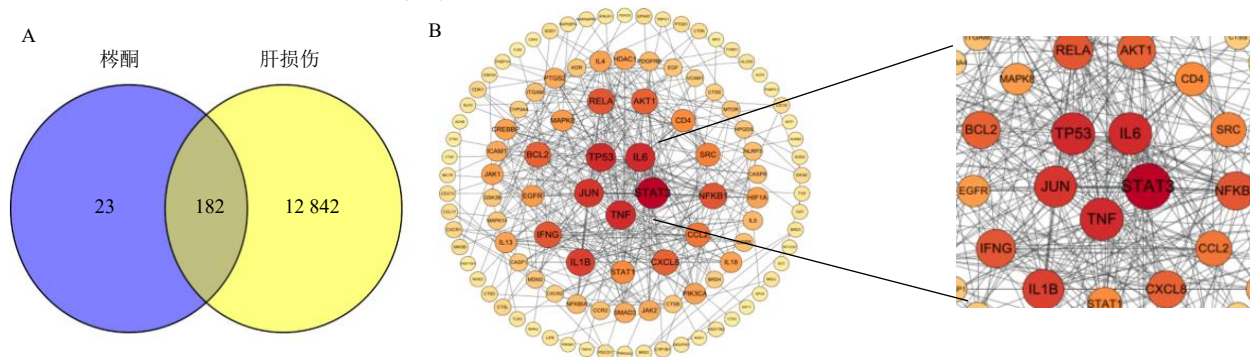


图 1 桉酮所致肝损伤毒性靶标的 Venn 图 (A)、PPI 网络图 (B)

Fig. 1 Venn diagram of hepatotoxicity toxicity targets caused by fraxinellone (A), and PPI network diagram (B)

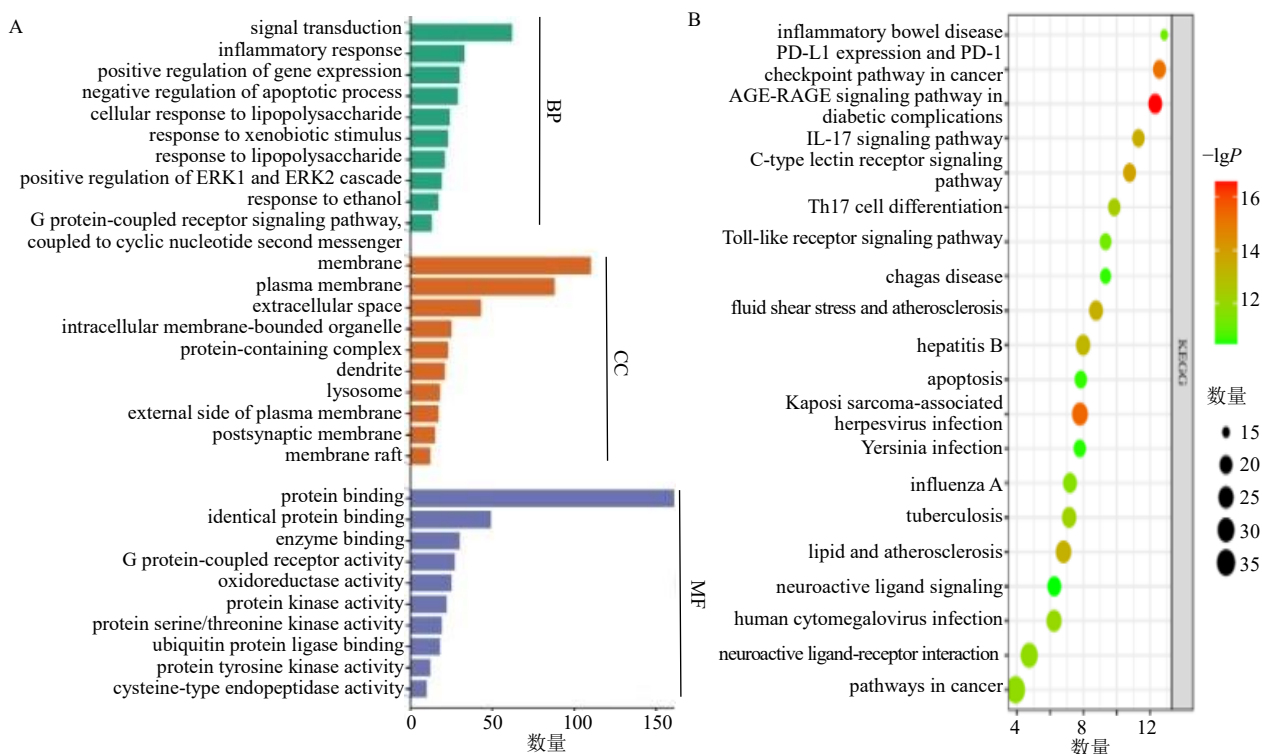


图 2 GO 功能富集 (A) 和 KEGG (B) 通路分析

Fig. 2 GO function enrichment (A) and KEGG pathway analysis (B)

5.2 分子对接验证

进行分子对接以评估枞酮与经网络药理学和代谢组学联合筛选出靶点 degree 值最大的 4 个靶点 (IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14) 的结合可行性。结果显示具有良好的结合亲和力, 枞酮与 IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14 对接分数分别-6.9、-7.2、

-5.4、-7.7 kcal/mol (1 cal=4.2 J), 枞酮在这些蛋白质的活性位点内形成了稳定的氢键和疏水相互作用, 见图 3。

6 动物实验结果

6.1 小鼠肝脏指数与肝病理学染色结果

与对照组相比, 枞酮组小鼠肝脏指数显著上升

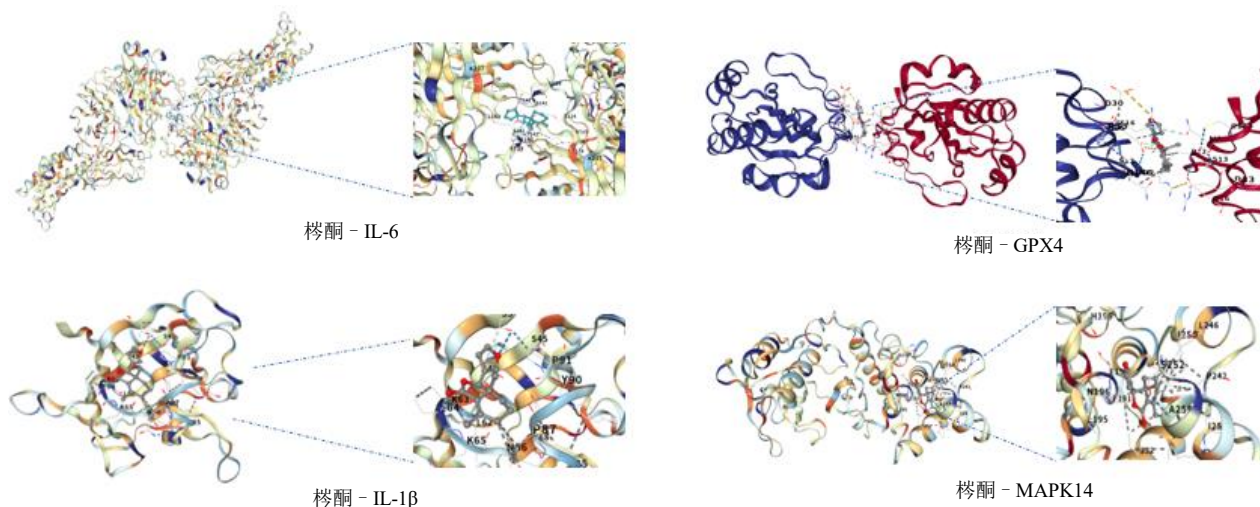


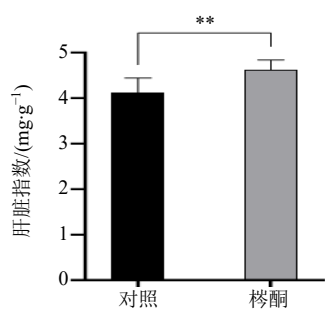
图 3 枞酮与选定靶点蛋白的分子对接结果

Fig. 3 Molecular docking results of fraxinellone with selected target proteins

($P<0.01$), 见图 4。对照组小鼠的肝小叶分界清晰, 肝细胞圆润, 排列规整, 相邻门管区无明显异常, 肝板整齐, 肝窦无明显扩张, 无明显炎症现象。而在枞酮组的小鼠肝组织中可见较大的肝细胞排列紊乱、坏死, 以及细胞核增大、碎裂或溶解, 出现炎症细胞的浸润等现象, 表明枞酮可致小鼠肝组织病理学损伤, 见图 5。

6.2 血清生化指标结果

与对照组小鼠相比, 枞酮组小鼠血清 AST、ALT、GGT 水平显著升高 ($P<0.01$), 见图 6。

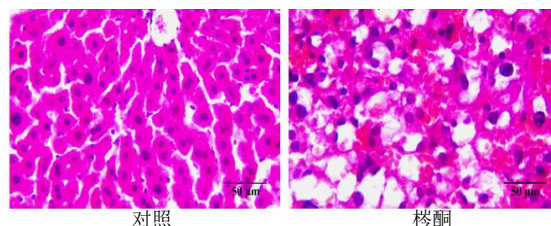


与对照组比较: ** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group.

图 4 小鼠肝脏指数变化图 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Fig. 4 Changes of liver index in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

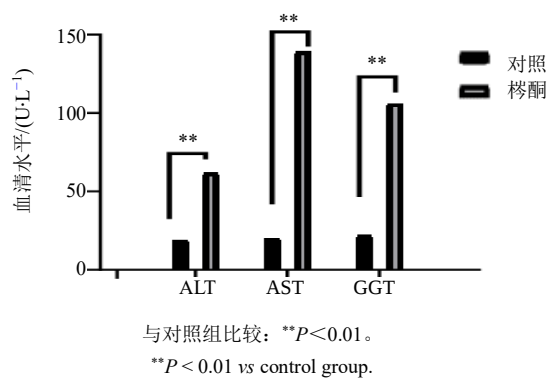


对照

枞酮

图 5 小鼠肝脏 HE 染色情况 ($\times 400$)

Fig. 5 HE staining of the mouse liver ($\times 400$)



与对照组比较: ** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group.

图 6 枞酮对小鼠血清中 ALT、AST、GGT 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 Effect of fraxinellone on the levels of ALT, AST and GGT in the serum of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

7 代谢组学分析

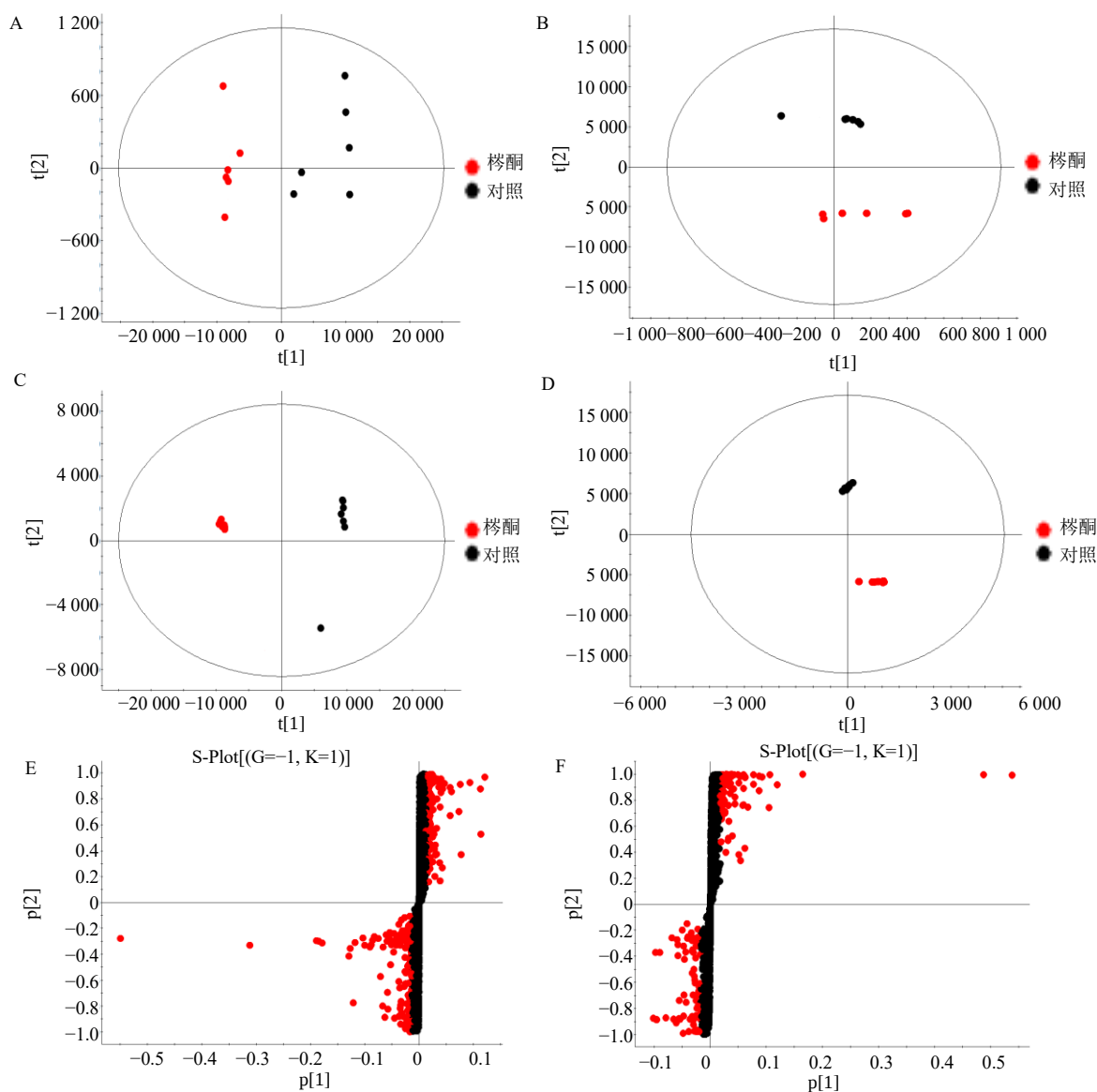
7.1 栲酮对小鼠肝组织、血清内容物的整体代谢轮廓的影响

主成分分析 (PCA) 评估不同组别的聚类情况。PCA 得分图显示, 在正负离子模式下, 对照组与栲酮组各个样本置于 95% 椭圆置信区间内, 位于不同区域, 样本均呈现清晰分离, 表明栲酮诱导了深刻的代谢扰动, 可导致小鼠肝脏内容物的代谢水平发生显著变化, 引发显著的代谢紊乱。建立 OPLS-DA

模型, 对照组和栲酮给药组在 OPLS-DA 评分图中各个样本置于 95% 椭圆置信区间内, 明显位于不同的位置, 说明样本未发生过度拟合。从 S-plot 图中可以看出, 多数代谢产物离子聚集在坐标原点附近, 少数离子偏离原点, 偏离原点的离子表明两组之间存在差异, 见图 7、8。

7.2 栲酮对小鼠肝组织和血清内容物内源性潜在差异代谢物的影响

使用 Progenesis QI 软件筛选对照组与栲酮组间

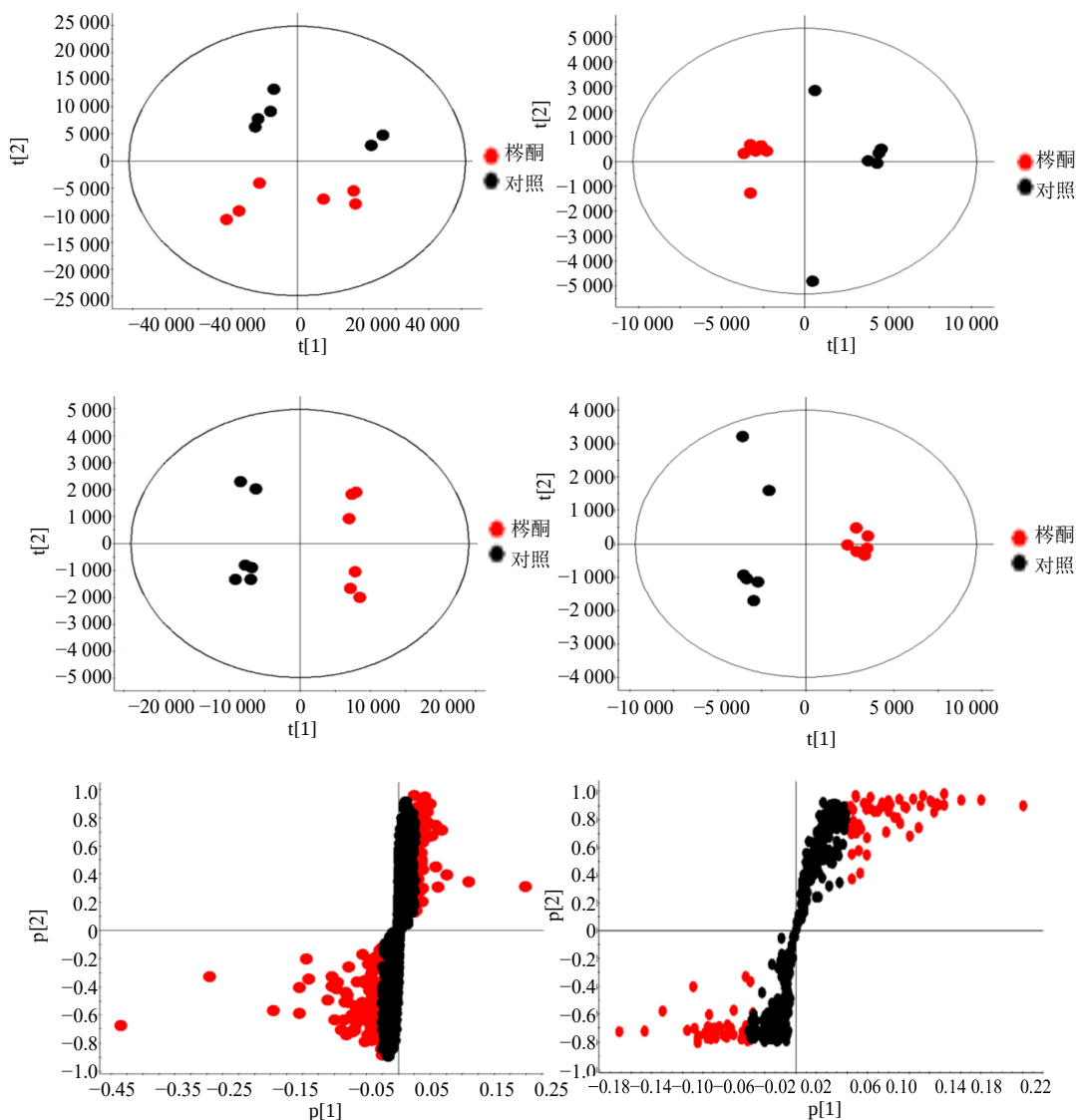


A-正离子模式下 PCA 分析图, B-负离子模式下 PCA 分析图, C-正离子模式下 OPLS-DA 图, D-负离子模式下 OPLS-DA 图, E-正离子模式下 S-Plot 分析图, F-负离子模式下 S-Plot 分析图。K: 对照组, G: 栲酮组。

A-PCA analysis diagram in positive ion mode, B-PCA analysis diagram in negative ion mode, C-OPLS-DA diagram in positive ion mode, D-OPLS-DA diagram in negative ion mode, E-S-Plot analysis diagram in positive ion mode, F-S-Plot analysis diagram in negative ion mode. K: control group, G: fraxinellone group.

图 7 栲酮对小鼠肝组织内容物代谢轮廓的影响

Fig. 7 Effect of fraxinellone on the metabolic profile of the contents in mouse liver tissue



A-正离子模式下 PCA 分析图, B-负离子模式下 PCA 分析图, C-正离子模式下 OPLS-DA 图, D-负离子模式下 OPLS-DA 图, E-正离子模式下 S-Plot 分析图, F-负离子模式下 S-Plot 分析图。

A-PCA analysis diagram in positive ion mode, B-PCA analysis diagram in negative ion mode, C-OPLS-DA diagram in positive ion mode, D-OPLS-DA diagram in negative ion mode, E-S-Plot analysis diagram in positive ion mode, F-S-Plot analysis diagram in negative ion mode.

图 8 桉酮对小鼠血清内容物代谢轮廓的影响

Fig. 8 Effect of fraxinellone on the metabolic profile of serum components in mice

的差异代谢物, 筛选 $VIP > 1$ 和 $P < 0.05$ 的数据, 使用人类代谢组数据库 (HMDB) 对筛选得到的碎片离子进行匹配。与对照组比较, 桉酮组肝组织共有 39 个差异代谢物, 其中 22 个代谢物明显上调, 17 个代谢物明显下调, 见表 1。与对照组比较, 桉酮组血清具有 13 个差异代谢物, 其中 9 个代谢物明显上调, 4 个代谢物明显下调, 见表 2。

7.3 桉酮对肝损伤小鼠模型代谢通路的影响

将肝组织和血清异代谢物导入 MetaboAnalyst 6.0 数据库进行通路分析, 见图 9。通路分析结果显

示具体涉及 22 条代谢通路, 见表 3。其中 $P < 0.05$ 且影响 Impact 值 > 0 的关键代谢途径主要为甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢等。上述通路的异常改变, 提示桉酮可能通过干扰代谢过程, 进而引发肝脏代谢紊乱, 为阐释桉酮肝毒性的分子机制提供了代谢组学依据。

8 整合分析网络毒理学与代谢组学

8.1 基于 MetaboAnalyst 的基因靶点 - 差异代谢物网络分析核心靶点

提取花生四烯酸代谢通路中的基因靶点, 结合

表 1 对照组与枳酮组肝脏差异代谢物

Table 1 Differential metabolites in the liver between control group and fraxinellone group

序号	<i>t_R</i>	<i>m/z</i>	离子模式	分子式	HMDB	名称	趋势
1	0.639 683 3	156.064 03	正	C ₇ H ₆ O ₃	HMDB0001895	水杨酸	↓**
2	0.682 500 0	212.031 97	正	C ₅ H ₁₂ NO ₇ P	HMDB0001128	5-磷酸糖胺	↓**
3	0.711 066 7	198.075 51	正	C ₉ H ₁₁ NO ₄	HMDB0000181	<i>L</i> -多巴	↓**
4	0.703 916 7	608.092 66	正	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₇ P ₂	HMDB0013112	尿苷二磷酸 <i>N</i> -乙酰半乳糖胺	↓**
5	1.387 566 7	146.047 16	正	C ₅ H ₉ NO ₅	HMDB0002273	4-羟基- <i>L</i> -谷氨酸	↓**
6	4.316 483 3	510.355 26	正	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	HMDB0012108	溶血磷脂酰胆碱	↑**
7	5.192 866 7	401.285 44	正	C ₂₂ H ₄₂ O ₇	HMDB0010331	棕榈酰葡萄糖醛酸	↑**
8	1.309 033 3	120.067 28	正	C ₇ H ₉ N ₂ O ⁺	HMDB0000699	1-甲基烟酰胺	↓**
9	0.761 033 3	136.062 52	正	C ₅ H ₅ N ₅	HMDB0000034	腺嘌呤	↓**
10	0.682 500 0	132.063 46	正	C ₅ H ₉ NO ₃	HMDB0002104	<i>L</i> -谷氨酸 γ-半醛	↑**
11	0.653 950 0	148.047 85	正	C ₅ H ₇ N ₃ O	HMDB0002894	5-甲基胞嘧啶	↓**
12	6.197 733 3	550.392 37	正	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	HMDB0010391	溶血磷脂酰胆碱	↑**
13	6.106 583 3	311.237 31	正	C ₂₂ H ₃₂ O ₂	HMDB0002183	二十二碳六烯酸	↑**
14	4.916 100 0	546.360 75	正	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	HMDB0010384	溶血磷脂酰胆碱	↑**
15	8.592 933 3	801.695 15	正	C ₄₆ H ₈₉ NO ₈	HMDB0010711	半乳糖醛酰胺 (d18:1/22:0)	↓**
16	0.718 200 0	613.161 29	正	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	HMDB0003337	氧化谷胱甘肽	↓**
17	4.701 950 0	570.359 77	正	C ₃₀ H ₅₂ NO ₇ P	HMDB0010402	溶血磷脂酰胆碱	↑**
18	7.025 783 3	205.097 42	正	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	HMDB0000929	<i>L</i> -色氨酸	↓**
19	0.625 400 0	154.060 86	负	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	HMDB0000177	<i>L</i> -组氨酸	↓**
20	2.513 766 7	514.287 77	负	C ₂₆ H ₄₅ NO ₇ S	HMDB0000036	牛胆酸	↑**
21	2.927 783 3	531.303 12	负	C ₂₇ H ₄₈ O ₈ S	HMDB0006888	5β-吡啶醇硫酸盐	↓**
22	5.066 016 7	506.326 61	负	C ₂₄ H ₄₇ NO ₇	HMDB0000596	<i>D</i> -葡萄糖- <i>N</i> -酰基糖氨酸	↑**
23	0.711 066 7	346.056 39	负	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	HMDB0000045	腺苷单磷酸	↓**
24	0.646 816 7	124.005 94	负	C ₂ H ₇ NO ₃ S	HMDB0000251	牛磺酸	↓**
25	1.216 233 3	267.073 95	负	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	HMDB0000195	肌苷	↓**
26	6.070 883 3	508.343 48	负	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	HMDB0012108	溶血磷脂酰胆碱	↑**
27	6.070 883 3	568.366 40	负	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	HMDB0010384	溶血磷脂酰胆碱	↑**
28	6.811 633 3	303.234 43	负	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	HMDB0001043	花生四烯酸	↑**
29	7.402 483 3	622.410 95	负	C ₃₀ H ₆₀ NO ₇ P	HMDB0010399	溶血磷脂酰胆碱	↑**
30	0.661 083 3	171.004 70	负	C ₃ H ₉ O ₆ P	HMDB0000126	甘油 3-磷酸	↓**
31	0.711 066 7	611.146 64	负	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	HMDB0003337	氧化谷胱甘肽	↑**
32	5.016 050 0	480.312 91	负	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	HMDB0010381	溶血磷脂酰胆碱	↑**
33	5.016 050 0	540.335 50	负	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	HMDB0010382	溶血磷脂酰胆碱	↑**
34	6.376 200 0	554.385 04	负	C ₂₆ H ₅₆ NO ₆ P	HMDB0011149	溶血磷脂酰胆碱	↑**
35	5.435 566 7	554.348 80	负	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	HMDB0012108	溶血磷脂酰胆碱	↑**
36	4.766 200 0	480.312 44	负	C ₂₃ H ₄₈ NO ₇ P	HMDB0010381	溶血磷脂酰胆碱	↑**
37	4.409 300 0	612.335 38	负	C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P	HMDB0010404	溶血磷脂酰胆碱	↑**
38	3.939 800 0	586.319 59	负	C ₂₈ H ₄₈ NO ₇ P	HMDB0010397	溶血磷脂酰胆碱	↑**
39	5.556 916 7	554.347 08	负	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	HMDB0012108	溶血磷脂酰胆碱	↑**

与对照组比较: ***P* < 0.01, ↑: 上调, ↓: 下调。

***P* < 0.01 vs control group. ↑: increase, ↓: decrease.

表 2 对照组与枳酮组血清差异代谢物

Table 2 Differential metabolites in serum between control group and fraxinellone group				
序号	HMDB	分子式	中文名称	趋势
1	HMDB10382	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱	↑**
2	HMDB07954	C ₄₅ H ₈₆ NO ₈ P	磷脂酰胆碱	↑*
3	HMDB09776	C ₄₇ H ₉₀ NO ₇ P	磷脂酰乙醇胺	↑*
4	HMDB08046	C ₄₆ H ₈₆ NO ₈ P	磷脂酰胆碱	↑*
5	HMDB0000289	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	尿酸	↓*
6	HMDB0000182	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	赖氨酸	↓*
7	HMDB0001388	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	α-亚麻酸	↑**
8	HMDB0007858	C ₃₇ H ₇₁ O ₈ P	磷脂醇	↑**
9	HMDB0010404	C ₃₀ H ₅₀ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱	↓*
10	HMDB12107	C ₄₇ H ₉₃ N ₂ O ₆ P	鞘磷脂	↓*
11	HMDB0012108	C ₂₅ H ₅₂ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱	↑**
12	HMDB0010384	C ₂₆ H ₅₄ NO ₇ P	溶血磷脂酰胆碱	↑**
13	HMDB0011148	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	磷脂酰胆碱	↑**

与对照组比较: **P*<0.05 ***P*<0.01, ↑: 上调, ↓: 下调。
P* < 0.05 *P* < 0.01 vs control group. ↑: increase, ↓: decrease.

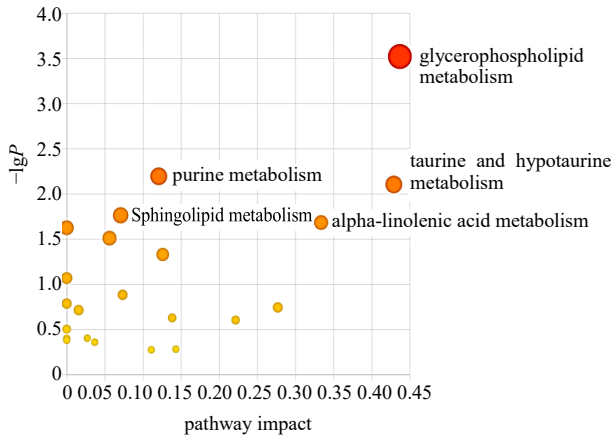


图 9 枳酮对小鼠肝损伤代谢通路影响的分析图

Fig. 9 Analysis diagram of the impact of fraxinellone on the metabolic pathways of liver injury in mice

通路富集的 *P* 值及基因在网络中的 degree 值, 见图 10。最终选定 IL-6、IL-1β、MAPK14、GPX4 共 4 个靶点作为后续 Western blotting 验证的目标靶点。

8.2 Western blotting 实验验证蛋白表达水平变化
Western blotting 检测结果显示, 与对照组相比, 枳酮组中 IL-6、IL-1β、MAPK14 的蛋白相对表达水平显著升高, GPX4 相对表达水平显著降低 (*P* < 0.001), 提示枳酮可诱导肝脏炎症, 见图 11。

9 讨论
药物性肝损伤是临床最常见、最严重的药品不良反应之一, 也是导致药物研发失败、上市后撤市或限制使用的重要原因。中药及相关制剂因其成分复杂、用药周期长、个体差异大等特点, 所致药物性肝损伤的机制研究尤为困难。深入解析中药毒性

表 3 枳酮对肝损伤小鼠代谢通路的影响

Table 3 Effects of fraxinellone on metabolic pathways in liver-injured mice					
序号	路径名称	高度相关个数/化合物总数	<i>P</i> 值	-lg <i>P</i>	Impact
1	甘油磷脂代谢	5/36	0.000 000 003	3.523 00	0.436 51
2	嘌呤代谢	5/70	0.006 350 000	2.197 20	0.120 56
3	牛磺酸和次牛磺酸代谢	2/8	0.007 827 000	2.106 40	0.428 57
4	鞘脂代谢	3/32	0.017 185 000	1.764 80	0.070 67
5	α-亚麻酸代谢	2/13	0.020 648 000	1.685 10	0.333 33
6	不饱和脂肪酸的生物合成	3/36	0.023 603 000	1.627 00	0.000 00
7	甘油脂代谢	2/16	0.030 750 000	1.512 20	0.056 07
8	醚脂代谢	2/20	0.046 630 000	1.331 30	0.125 79
9	亚油酸代谢	1/5	0.085 003 000	1.070 60	0.000 00

表 3 (续)

序号	路径名称	高度相关个数/化合物总数	P 值	-lgP	Impact
10	精氨酸和脯氨酸代谢	2/36	0.130 320 000	0.885 00	0.073 25
11	生物素代谢	1/10	0.163 020 000	0.787 76	0.000 00
12	花生四烯酸代谢	2/44	0.179 850 000	0.745 09	0.276 59
13	初级胆汁酸生物合成	2/46	0.192 690 000	0.715 14	0.015 63
14	烟碱酸盐和烟酰胺代谢	1/15	0.234 600 000	0.629 67	0.138 16
15	组氨酸代谢	1/16	0.248 190 000	0.605 22	0.221 31
16	β-丙氨酸代谢	1/21	0.312 720 000	0.504 84	0.000 00
17	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	1/28	0.394 160 000	0.404 32	0.000 00
18	谷胱甘肽代谢	1/28	0.394 160 000	0.404 32	0.026 98
19	赖氨酸降解	1/30	0.415 670 000	0.381 25	0.000 00
20	糖基磷脂酰基硅醇 (GPI) -锚定生物合成	1/32	0.436 440 000	0.360 08	0.036 65
21	色氨酸代谢	1/41	0.521 410 000	0.282 82	0.143 05
22	酪氨酸代谢	1/42	0.530 050 000	0.275 69	0.110 85

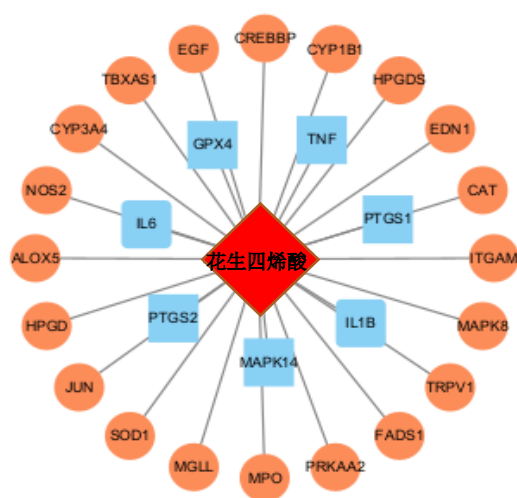
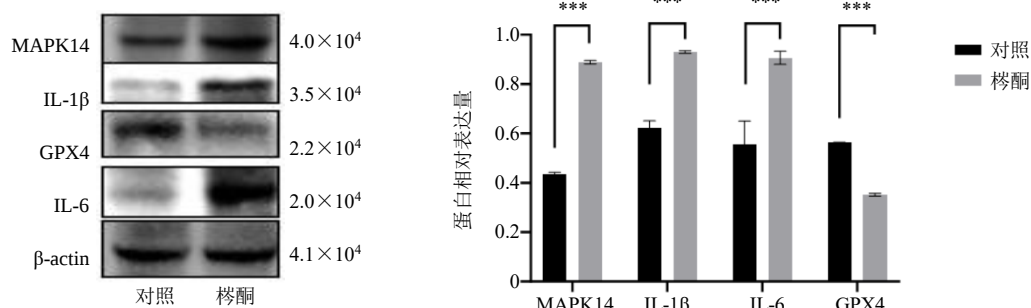


图 10 花生四烯酸代谢通路中的靶点

Fig. 10 Target points in the arachidonic acid metabolism pathway

成分诱导肝损伤的分子机制,对于保障临床用药安全、推动中药现代化发展具有迫切而重要的意义。桉酮作为白鲜皮的主要活性兼毒性单体,正是典型的效-毒共存中药成分,以其为切入点开展肝毒性机制研究,不仅可阐明白鲜皮致肝损伤的物质基础,亦可为中药药物性肝损伤的机制解析提供方法学借鉴。本研究整合网络毒理学、分子对接、动物模型、组织病理学、生化检测与非靶向代谢组学多种技术手段,探究桉酮致小鼠急性肝损伤的分子机制,结果提示桉酮可能经由多靶点、多通路介导肝脏炎症与代谢紊乱协同损伤,相关数据可为后续深入解析桉酮肝物质基础、毒性机制及完善白鲜皮临床安全用药评估提供一定实验依据与理论支撑。

本研究首先借助网络毒理学筛选桉酮与肝损伤的交集靶点,共得到 182 个共有靶点,其中信号转导和转录激活因子 3 (STAT3)、肿瘤蛋白 p53



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 11 肝脏组织 MAPK14、IL-1β、IL-6、GPX4 蛋白相对表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 11 Relative expression levels of MAPK14, IL-1β, IL-6, and GPX4 proteins in liver tissue ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

(TP53)、肿瘤坏死因子 (TNF)、IL-6、IL-1 β 、MAPK14 等被鉴定为核心靶点; KEGG 通路富集结果提示 IL-17 信号通路、Toll 样受体信号通路、细胞凋亡通路显著富集, 揭示炎症反应与细胞凋亡是栲酮肝损伤的核心病理环节。分子对接结果进一步证实, 栲酮与 IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14 蛋白结合能均处于 -5.4~-7.7 kcal/mol, 结合活性良好, 从分子相互作用层面佐证上述靶点为栲酮的关键作用位点, 也为后续动物实验验证指明了方向。

肝功能生化指标是评价肝损伤最经典、直观的判断依据。ALT、AST、GGT 是反应肝损伤的关键血清学指标, 广泛用于肝病临床诊断^[16-17]。其中 ALT 为肝损伤早期标志物之一^[18], AST、GGT 亦可反应肝脏病理损伤程度^[19-20]。本动物实验结果显示, 栲酮组小鼠血清 ALT、AST、GGT 水平较对照组显著升高, HE 染色结果进一步显示肝细胞排列紊乱、核固缩溶解、大量炎症细胞浸润等典型病理改变, 从宏观层面证实本小鼠急性肝损伤模型构建成功, 栲酮可明显破坏肝脏正常组织结构与生理功能, 与既往相关研究结论一致。

代谢组学技术能够全景呈现外源性物质干预后机体小分子代谢物的动态变化, 可从代谢稳态角度解析毒性发生机制。本研究通过 UPLC-MS 技术共筛选出 39 个肝脏差异代谢物, 包括 22 个上调代谢物与 17 个下调代谢物; 13 个血清差异代谢物, 其中 9 个代谢物明显上调, 4 个代谢物明显下调; 主要归属于甘油磷脂代谢、嘌呤代谢、牛磺酸和次牛磺酸代谢、花生四烯酸代谢四大核心通路。甘油磷脂是肝细胞膜的主要组成成分, 其代谢稳态直接决定细胞膜完整性。本研究发现多种溶血磷脂酰胆碱显著上调, 其大量蓄积会破坏肝细胞膜结构、增加细胞膜通透性, 诱发肝细胞坏死, 同时进一步放大炎症信号, 形成“膜损伤-炎症加剧”的恶性循环, 这也是栲酮诱导肝损伤的重要生化机制。嘌呤代谢紊乱在肝损伤进程中扮演重要角色。肝脏是嘌呤代谢的核心器官, 嘌呤代谢异常会导致腺苷、活性氧等有害物质大量累积^[21], 一方面造成肝细胞能量代谢障碍, 另一方面激活炎症小体, 促进促炎因子释放。本研究中腺嘌呤、肌苷等嘌呤类代谢物表达下调, 提示栲酮扰乱肝脏嘌呤代谢平衡, 加剧氧化应激与炎症反应。牛磺酸具备抗氧化、稳定肝细胞膜、调控胆汁代谢、清除活性氧的多重肝脏保护作用, 本实验检测到肝内牛磺酸含量显著降低、牛

胆酸异常升高, 说明栲酮破坏牛磺酸与次牛磺酸代谢通路, 削弱肝脏内源性抗氧化与解毒能力, 进一步加重肝组织损伤。

花生四烯酸代谢是连接脂质代谢与炎症反应的关键枢纽^[22], 花生四烯酸在体内可经多步代谢生成前列腺素、白三烯等强效促炎介质, 驱动炎症级联反应^[23]。本研究发现栲酮干预后肝内花生四烯酸含量明显上调, 结合网络毒理学预测结果, 推测花生四烯酸代谢异常可联动 IL-6、GPX4、IL-1 β 、MAPK14 等炎症靶点, 放大炎症损伤。Western blotting 实验结果验证了这一推测: 栲酮可显著上调 IL-6、IL-1 β 、MAPK14 蛋白表达, 下调 GPX4 蛋白表达, 促炎信号被持续激活。MAPK14 作为丝裂原活化蛋白激酶家族重要成员, 可介导外界毒性信号向胞内传导, 进一步诱导多种促炎因子转录与表达, 而 GPX4、IL-6、IL-1 β 等经典促炎因子又可反向激活 MAPK 信号通路, 形成正向反馈环路, 持续加重肝脏炎症、肝细胞凋亡与组织损伤。综合网络毒理学、代谢组学与分子生物学验证结果, 可梳理出栲酮致肝损伤的完整作用链条: 栲酮进入机体后, 一方面分子对接及蛋白表达结果提示其可能作用于 MAPK14、IL-6、IL-1 β 等炎症相关靶点, 进而诱导肝脏炎症反应; 另一方面扰乱肝脏甘油磷脂、嘌呤、牛磺酸、花生四烯酸等多条核心代谢通路, 造成肝细胞膜破损、氧化应激加剧、内源性保护物质减少、促炎脂质介质蓄积。代谢紊乱与炎症激活相互交织、协同放大, 最终引发肝细胞坏死、肝组织病理性损伤, 这也是栲酮发挥肝毒性核心机制。

上述发现从多组学层面揭示了栲酮致肝损伤的分子机制网络, 为理解其效-毒双重属性提供了实验基础。受限于研究条件与实验设计, 本研究仍存在若干有待完善之处: 其一, 仅设置单一给药剂量, 未探究栲酮肝损伤的量效与时效关系, 不同剂量、不同给药时长下毒性强弱、通路活化差异尚不明确; 其二, 本研究聚焦于炎症与代谢通路, 对于细胞凋亡、氧化应激、自噬等关联通路的交叉调控未开展深入验证; 其三, 仅在小鼠体内开展整体实验, 缺乏细胞水平机制佐证。后续研究可设置梯度给药剂量与时间梯度, 明确栲酮肝毒性的安全范围与毒性阈值; 结合肝细胞体外模型, 深入解析各通路之间的交叉调控关系; 同时围绕栲酮毒性关键呋喃环结构开展构效关系研究, 为后续减毒、改性及白鲜皮合理开发利用提供更全面的实验支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lu T, Peng S Y, Wang J H, *et al.* Fraxinellone ameliorates intracerebral hemorrhage-induced secondary brain injury by regulating Krüppel-like transcription factor 2 expression in rats [J]. *Brain Res Bull*, 2021, 177: 340-351.
- [2] Zheng B F, Yuan M M, Wang S L, *et al.* Fraxinellone alleviates kidney fibrosis by inhibiting CUG-binding protein 1-mediated fibroblast activation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 420: 115530.
- [3] He B, Zhang W K, He J M. Fraxinellone has anticancer activity by inducing osteosarcoma cell apoptosis via promoting excessive autophagy flux [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 653212.
- [4] 龙敏娟, 赵旭, 郭龙鑫, 等. 基于年龄校正的中西药肝脏不良反应监测大数据分析及中药皮肤用药风险警示 [J]. *中国药物警戒*, 2025, 22(3): 271-275.
- [5] 唐山珊, 张剑, 杨健, 等. 基于蛋白质组学探讨甘草次酸与甘草酸改善顺铂诱导急性肝损伤的作用机制 [J]. *中草药*, 2026, 57(11): 4224-4237.
- [6] Zhou H N, Liu Q W, Zhang J, *et al.* Cytochrome P450-mediated bioactivation: Implication for the liver injury induced by fraxinellone, a bioactive constituent from *Dictamn Cortex* [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(7): 1960-1968.
- [7] Liu S J, Ruan J X, Wang C, *et al.* Elucidation of *Cortex Dictamn Cortex* hepatotoxicity mechanism by integrated serum pharmacochimistry and metabolomics [J]. *Phytomedicine*, 2026, 150: 157631.
- [8] Wang S T, Bao J, Li J, *et al.* Fraxinellone induces hepatotoxicity in zebrafish through oxidative stress and the transporters pathway [J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2647.
- [9] 贺文杰, 孙慧娟, 邓戈宇, 等. 基于网络药理学和体外实验探究白鲜皮诱导铁死亡致肝损伤机制 [J]. *中南药学*, 2025, 23(12): 3544-3551.
- [10] Wu Y, Wang J Q, Wang Y N, *et al.* NMR-based metabolomic approach to understanding Zeng-Sheng-Ping-induced hepatotoxicity, and identifying possible toxic constituents by LC-MS profiles [J]. *J Pharmaceut Biomed*, 2022, 217: 114833.
- [11] 贾素霞, 徐晓敏, 沃佳美雪, 等. 基于代谢组学研究白鲜皮中化合物黄柏酮、梣酮致斑马鱼肝毒性的机制 [J]. *中药药理与临床*, 2025, 41(9): 71-76.
- [12] Pan J, Wu C, Tan R, *et al.* Difference in hepatotoxicity of furan-containing components in *Cortex Dictamn Cortex* correlates the efficiency of their metabolic activation [J]. *Phytomedicine*, 2023, 114: 154778.
- [13] 刘苏杰, 王宇, 邓巍, 等. 基于脂质组学探究梣酮致小鼠肝损伤的性别差异 [J]. *中南药学*, 2026, 24(4): 35-43.
- [14] Yan L, Mao J J, Shi W J, *et al.* Subchronic toxicity study of ferric oxide nanoparticles through intragastric administration: A 94-d, repeated dose study in Sprague Dawley rats [J]. *Regul Toxicol Pharm*, 2023, 140: 105381.
- [15] 吴凯丽. 白鲜皮肝损伤成分共价修饰肝脏蛋白过程研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2022.
- [16] 陈世佳. 血清 ALT、AST、GGT 检测在肝脏疾病诊断中应用 [J]. *中外医疗*, 2019, 38(5): 190-192.
- [17] 郑红琴, 魏慧聪. 血清 ALT、AST 和 GGT 水平检测在肝脏疾病诊断中的应用价值 [J]. *河南医学研究*, 2018, 27(24): 4467-4468.
- [18] 黄永泽. 玉米赤霉烯酮诱导小鼠肝纤维化的作用机制 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2025.
- [19] 徐博, 田晶, 马宁, 等. 肝损伤动物模型的研究进展 [J]. *中国当代医药*, 2019, 26(14): 38-40.
- [20] Mitrić A, Castellano I. Targeting gamma-glutamyl transpeptidase: A pleiotropic enzyme involved in glutathione metabolism and in the control of redox homeostasis [J]. *Free Radical Biol Med*, 2023, 208: 672-683.
- [21] Wang S, Gao S S, Zhou D X, *et al.* The role of the CD39-CD73-adenosine pathway in liver disease [J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 851-862.
- [22] Mazi T A, Shibata N M, Sarode G V, *et al.* Hepatic oxylipin profiles in mouse models of Wilson disease: New insights into early hepatic manifestations [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2024, 1869(2): 159446.
- [23] 李新存, 彭东辉, 王永福, 等. 基于代谢组学研究柴胡皂苷 C 对急性肝损伤小鼠的保护作用 [J]. *中国药房*, 2025, 36(5): 552-557.

【责任编辑 高源】