

基于斑马鱼模型和网络药理学的甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用与机制研究

庄开颜^{1,2}, 高 硕^{1,3}, 柳 晴^{1,4}, 陈锡强^{1,2}, 刘可春^{1,2}, 张 云^{1,2*}, 夏 青^{1,2*}

1. 齐鲁工业大学(山东省科学院) 山东省科学院生物研究所, 山东 济南 250103

2. 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心, 山东 济南 250103

3. 河北大学 药学院, 河北 保定 071002

4. 山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355

摘要:目的 利用斑马鱼模型结合网络药理学, 研究甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性及作用机制, 探讨附子-甘草配伍减毒的现代科学内涵。方法 选用受精后48 h (48 hpf) 的健康野生型AB系斑马鱼, 脱膜后随机移入6孔板中, 每孔30枚。对照组加入新鲜养鱼水; 模型组和各药物处理组均给予乌头碱溶液, 终浓度均为10 $\mu\text{mol/L}$; 各药物组同时分别给予低、中、高浓度(10、50、100 $\mu\text{mol/L}$)的甘草酸、甘草素、甘草苷和低、中、高浓度(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)的异甘草素, 各组斑马鱼处理后放入恒温光照培养箱中培养至72 hpf, 在显微镜下记录斑马鱼20 s心跳并拍照, 计算心率, 并利用Image-Pro Plus 5.0软件计算心包面积, 筛选甘草中拮抗乌头碱心脏毒性的成分。通过心脏结构与功能分析、活性氧(ROS)和凋亡细胞检测, 进一步验证甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用。基于PharmMapper、Swiss Target Prediction、STITCH数据库收集乌头碱毒性作用靶点, 利用CTD、GeneCards、DisGeNET数据库, 以“心脏毒性”“心脏损伤”“心衰”为关键词检索靶点, 将上述两组靶点导入Draw venn在线绘图取交集, 得到乌头碱心脏毒性作用靶点集; 从PharmMapper数据库中收集甘草酸活性靶点集; 将2个靶点集共有靶点导入String数据库进行蛋白互作分析; 使用Cytoscape 3.6.0软件对结果进行拓扑分析, 以节点度值中位数为标准筛选重要靶点; 得到的靶点导入DAVID数据库, 进行GO和KEGG分析。**结果** 与对照组比较, 模型组幼鱼心包水肿显著($P<0.01$), 心率显著升高($P<0.01$); 与模型组比较, 甘草酸与异甘草素各浓度组、甘草苷高浓度组心包面积显著下降($P<0.01$), 甘草酸效果更加明显且呈浓度相关性; 甘草酸低和高浓度、甘草素高浓度和异甘草素低浓度拮抗乌头碱所致心率加快效果显著($P<0.05$ 、 0.01)。甘草酸可浓度相关性地拮抗乌头碱导致的斑马鱼心室短轴缩短率降低, 且高浓度组具有显著性差异($P<0.01$); 甘草酸显著抑制乌头碱诱导的斑马鱼体内活性氧生成($P<0.01$); 明显减弱乌头碱导致的细胞凋亡。甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性的作用机制可能与MAPK、GRB2、CDC42、EGFR、GSK3B、SRC等关键靶点, 以及PI3K-Akt、Ras、FoxO等信号通路相关。**结论** 甘草酸可以显著拮抗乌头碱心脏毒性, 可能通过调控PI3K-Akt、Ras信号通路等发挥作用。

关键词: 乌头碱; 甘草酸; 心脏毒性; 斑马鱼; 网络药理学; 甘草素; 甘草苷; 异甘草素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2021) 07-1368-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.07.002

Study of glycyrrhizic acid ameliorates cardiotoxicity of aconitine and potential mechanism based on zebrafish model and network pharmacology

ZHUANG Kaiyan^{1,2}, GAO Shuo^{1,3}, LIU Qing^{1,4}, CHEN Xiqiang^{1,2}, LIU Kechun^{1,2}, ZHANG Yun^{1,2}, XIA Qing^{1,2}

1. Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China

2. Engineering Research Center of Zebrafish Models for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Jinan 250103, China

3. Pharmacy College, Hebei University, Baoding 071002, China

4. Pharmacy College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective The zebrafish model and network pharmacology were used to study the effect of glycyrrhizic acid ameliorated the cardiotoxicity of aconitine and its mechanism, and to explore the modern scientific connotation of the compatibility to reduce the

收稿日期: 2021-05-28

基金项目: 山东省优秀青年人才基金项目(ZR2020YQ60); 齐鲁工业大学(山东省科学院)科教产融合创新试点工程项目(2020KJC-ZD08), 济南市“高校20条”资助项目(2020GXRC053)

第一作者: 庄开颜(1994—), 女, 硕士, 研究方向为基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331 E-mail: zkyrebekah@163.com

*通信作者: 张 云(1982—), 女, 博士, 研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331 E-mail: xiaohan_0818@163.com

夏 青(1988—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事基于斑马鱼模型的药物活性筛选与安全性评价。Tel: (0531)82605331 E-mail: sdxq1021@163.com

poison of *Radix Aconiti Laterlis Preparata* and *Radix Glycyrrhizae*. **Methods** Healthy wild-type AB zebrafish 48 h post fertilization (hpf) were randomly transplanted into 6-well plates with 30 fish per well after demilstration. The control group was added with fresh fish water. Model group and each drug treatment group were given aconitine solution, the final concentration was 10 $\mu\text{mol/L}$. Each drug group was given glycyrrhizic acid, glycyrrhizin, and liquiritin at low, medium and high concentrations (10, 50 and 100 $\mu\text{mol/L}$) and isoglycyrrhizin at low, medium and high concentrations (1, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$), respectively. Zebrafish in each group were treated and cultured in an incubator with constant temperature and light until 72 hpf. The zebrafish heart rate was recorded and photographed for 20 s under a microscope, and the heart rate was calculated. Image-Pro Plus 5.0 software was used to calculate the pericardial area, and the components antagonizing aconitine cardiotoxicity in licorice were screened. The antagonistic effect of glycyrrhizic acid against aconitine cardiotoxicity was further verified by analyzing cardiac structure and function, detecting reactive oxygen species (ROS) and apoptosis cells. Toxicity targets of aconitine were collected based on Pharmapper, Swiss Target Prediction and Stitch database, and "cardiotoxicity", "heart injury" and "heart failure" were used as keywords for Target retrieval by using CTD, GeneCards and DisgeNet databases. The above two groups of targets were imported into Draw Venn online mapping to obtain the intersection of the cardiac toxicity target set of aconitine. Glycyrrhizin active target sets were collected from PharmMapper database; The common targets of two target sets were imported into the STRING database for protein interaction analysis. Cytoscape 3.6.0 software was used to analyze the topology of the results, and the median of node degree was used as the standard to screen important targets. The obtained targets were imported into David database for GO and KEGG analysis. **Results** Compared with the control group, the edema of pericardium in model group was significantly higher ($P < 0.01$), and the heart rate was significantly higher ($P < 0.01$). Compared with model group, the pericardial area of glycyrrhizin and isoglycyrrhizin concentration groups and glycyrrhizin high concentration group were significantly decreased ($P < 0.01$), and the effect of glycyrrhizin was more obvious and concentration dependent. The effect of low and high concentrations of glycyrrhizic acid, high and low concentrations of glycyrrhizin and isoglycyrrhizin on the increased heart rate induced by aconitine was significant ($P < 0.05, 0.01$). Glycyrrhizin could concentration-dependent antagonize the decreased rate of ventricle shortening caused by aconitine, and the difference was significant in high concentration group ($P < 0.01$). Glycyrrhizin significantly inhibited the production of reactive oxygen species (ROS) in zebrafish induced by aconitine ($P < 0.01$). The apoptosis induced by aconitine was significantly reduced. The mechanism of glycyrrhizin antagonizing aconitine cardiotoxicity may be related to MAPK, GRB2, CDC42, EGFR, GSK3b, SRC and other key targets, as well as the PI3K-Akt, Ras, FoxO and other signaling pathways. **Conclusion** Glycyrrhizic acid significantly alleviated the cardiotoxicity of aconitine via regulating PI3K-Akt and Ras signaling pathways.

Key words: aconitine; glycyrrhizic acid; cardiotoxicity; zebrafish; network pharmacology; glycyrrhizin; liquiritin; isoglycyrrhizin

附子与甘草是七情配伍的经典药对,“附子之性急得甘草而后缓,附子之性毒得甘草而后解”,传统用药经验表明甘草可减轻附子毒性^[1]。研究表明心肌细胞存活率在附子-甘草合用时比附子单用时明显提高,琥珀酸脱氢酶、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ ATP酶的活性升高,可能是甘草发挥减毒作用的机制^[2]。附子的主要毒性成分和强心活性成分以双酯型生物碱为主,包括乌头碱、中乌头碱和次乌头碱等^[3-5]。乌头碱心脏毒性的机制与氧化应激、能量代谢、离子通道、细胞凋亡等有关^[6-8]。甘草附子合用,甘草次酸和乌头碱在体内络合,乌头碱的体内含量减少,生物利用度降低,从而实现减毒功效^[9-11]。朱玲英等^[12]通过体外温孵代谢实验,发现甘草可使肝药酶活性升高,加快附子毒性成分的代谢,从而减毒。甘草还可调节机体代谢环境,将附子相关的多种代谢物含量降低,减弱其毒副作用^[13]。甘草中的部分成分通过与附子中的毒性成分发生络合作用,产生沉淀或复合物,在人体胃肠

道中可实现不同步吸收,从而达到减毒增效结果^[14]。张硕峰^[15]发现甘草苷可剂量相关性减少乌头碱引起的小鼠死亡,说明甘草苷对乌头碱引发的急性毒性具有缓解作用。Gong等^[3]发现异甘草素通过诱导Nrf2通路激活解毒系统,这可能是甘草解毒的潜在机制。另有研究表明,甘草酸、甘草苷可能通过抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗心室重构等作用拮抗附子毒性^[16-18]。甘草酸、甘草素、甘草苷和异甘草素等甘草解毒成分拮抗乌头碱心脏毒性的差异尚未见报道,且其毒性作用机制有待进一步阐明。

斑马鱼与人类基因组同源性高,具有体外受精、生长周期短、早期胚胎透明、实验周期短、所需化合物量少、符合“3R”(替代、减少、优化)原则等优势^[5]。斑马鱼心脏结构和功能与哺乳动物高度相似,拥有与人类hERG通道相类似的zERG通道,使得斑马鱼成为心血管活性与安全性评价中的重要模式生物之一。网络药理学已成为中药药效与作用机制研究的一种有效技术手段。本研究利用斑

马鱼模型,评价甘草酸、甘草素、甘草苷、异甘草素对乌头碱心脏毒性的拮抗作用,并利用网络药理学预测甘草酸的减毒作用机制,为阐释附子-甘草配伍减毒的现代科学内涵提供参考。

1 材料

1.1 实验动物

本实验所用野生型AB斑马鱼和转基因斑马鱼Tg (cm1c2:EGFP)均由山东省科学院生物研究所斑马鱼药物筛选平台提供。斑马鱼成鱼在(28±0.5)℃下饲养,明暗周期为14 h/10 h,每日喂食2次。于前一天晚间选择健康的成年斑马鱼以雌雄比例2:2放入排卵盒,次日亮灯时抽板,2 h内收集鱼卵,鱼卵在28℃恒温光照培养箱中培养至受精后48 h(48 hpf)。

1.2 药物与主要试剂

乌头碱(CAS号:302-27-2,批号:DST181028-006)、甘草酸(CAS号:1405-86-3,批号:DST180904-006)、甘草素(CAS号:578-86-9,批号:DST190214-010)、甘草苷(CAS号:551-155,批号:DST180906-009)和异甘草素(CAS号:961-29-5,批号:DST190719-016)均购自成都德思特生物技术有限公司,规格为20 mg, HPLC≥98%,5种化合物均用二甲基亚砜配制成母液,使用时再用新鲜养鱼水稀释成工作液。甲基纤维素(上海源叶生物科技有限公司,CAS号:9004-67-5,批号:Q22J9F63939,250 g);亚甲基蓝(国药集团化学试剂有限公司,CAS号:7220-79-3,批号:20110520,25 g);二甲基亚砜(生工生物工程(上海)股份有限公司,CAS号:67-68-5,批号:F508BA0021,500 mL);新鲜养鱼水中含有5 mmol/L NaCl、0.17 mmol/L KCl、0.4 mmol/L CaCl₂和0.16 mmol/L MgSO₄,活性氧(ROS)检测试剂盒(货号:S0033,批号:050719190606)购自碧云天生物技术有限公司。吖啶橙(AO)染色剂(货号:SigmaA6014)购自美国Sigma公司。

1.3 主要仪器

斑马鱼养殖系统(北京爱生科技有限公司);HPG280BX光照培养箱(哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);Zeiss AXIO zoom V16体视荧光显微镜(德国卡尔蔡司);OLYMPUS倒置荧光显微镜(奥林巴斯(中国)有限公司)。

2 方法

2.1 甘草中的4种化合物拮抗乌头碱心脏毒性比较

前期预试验结果表明,10 μmol/L乌头碱可导致斑马鱼心包增大、心动过速、静脉窦-动脉球(SV-

BA)距离增加、射血分数降低,引起明显的心脏毒性。本实验选用48 hpf健康野生型AB系斑马鱼,脱膜后随机移入6孔板中,每孔30枚。对照组加入新鲜养鱼水;模型组和各药物处理组均给予乌头碱溶液,终浓度均为10 μmol/L;各药物组同时分别给予低、中、高浓度(10、50、100 μmol/L)的甘草酸、甘草素、甘草苷,和低、中、高浓度(1.5、10 μmol/L)的异甘草素。各组斑马鱼处理后放入恒温光照培养箱中培养至72 hpf,在显微镜下记录斑马鱼20 s心跳并拍照,计算心率,并利用Image-Pro Plus 5.0软件计算心包面积。

2.2 甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用评价

选用48 hpf心肌细胞荧光标记的转基因斑马鱼Tg (cm1c2:EGFP),按照“2.1”中给药方法,给药组仅给予低、中、高浓度(10、50、100 μmol/L)甘草酸,给药24 h后,在倒置荧光显微镜下记录斑马鱼俯卧位心跳视频,利用cellSens Standard软件提取心室舒张末期和收缩末期图片。利用Image-Pro Plus 5.0软件测量心室舒张末期静脉窦-动脉球(SV-BA)距离;测量心室舒张末期和收缩末期短轴、长轴长度,计算短轴缩短率、射血分数、每搏输出量、心搏量,计算与对照组相对值。

2.3 活性氧(ROS)含量测定

按照“2.2”项中给药方法处理斑马鱼,给药24 h后,DCFH-DA荧光探针28℃避光孵育30 min,麻醉后在荧光显微镜下从侧面拍照。使用Image-Pro Plus 5.0软件统计斑马鱼心脏区域ROS含量,计算与对照组相对值。

2.4 吖啶橙(AO)染色

按照“2.2”项中给药方法处理斑马鱼,给药24 h后,AO染色液28℃避光孵育20 min,麻醉后在荧光显微镜下从侧面拍照,观察心肌细胞凋亡水平。

2.5 甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性网络药理学研究

2.5.1 甘草酸活性靶点与乌头碱心脏毒性靶点的收集 从PharmMapper、Swiss Target Prediction、STITCH数据库中收集乌头碱毒性作用靶点,利用CTD、GeneCards、DisGeNET数据库,以“心脏毒性”“心脏损伤”“心衰”为关键词,检索靶点。将上述两组靶点导入Draw venn在线绘图取交集,得到乌头碱心脏毒性作用靶点集。从PharmMapper数据库中收集甘草酸活性靶点集。

2.5.2 蛋白质相互网络构建与分析 使用Draw venn对“2.5.1”项中获得的2个靶点集取交集,将交集导入String数据库,选择人源,得到蛋白-蛋白网

络互作(PPI)结果,使用Cytoscape 3.6.0软件对结果进行拓扑分析,以节点度值中位数为标准筛选重要靶点。

2.5.3 生物学过程及通路富集分析 将“2.5.2”项中得到的靶点导入DAVID数据库,进行GO和KEGG分析,使用条形图对GO分析结果进行可视化处理,并用Omicshare 3.0数据库对关键通路进行可视化处理。

2.5.4 成分-靶点-通路网络构建 使用Cytoscape 3.6.0软件,构建甘草酸成分-靶点-通路网络,成分、靶点和通路以节表示,它们之间的联系以边表示。

2.6 数据统计

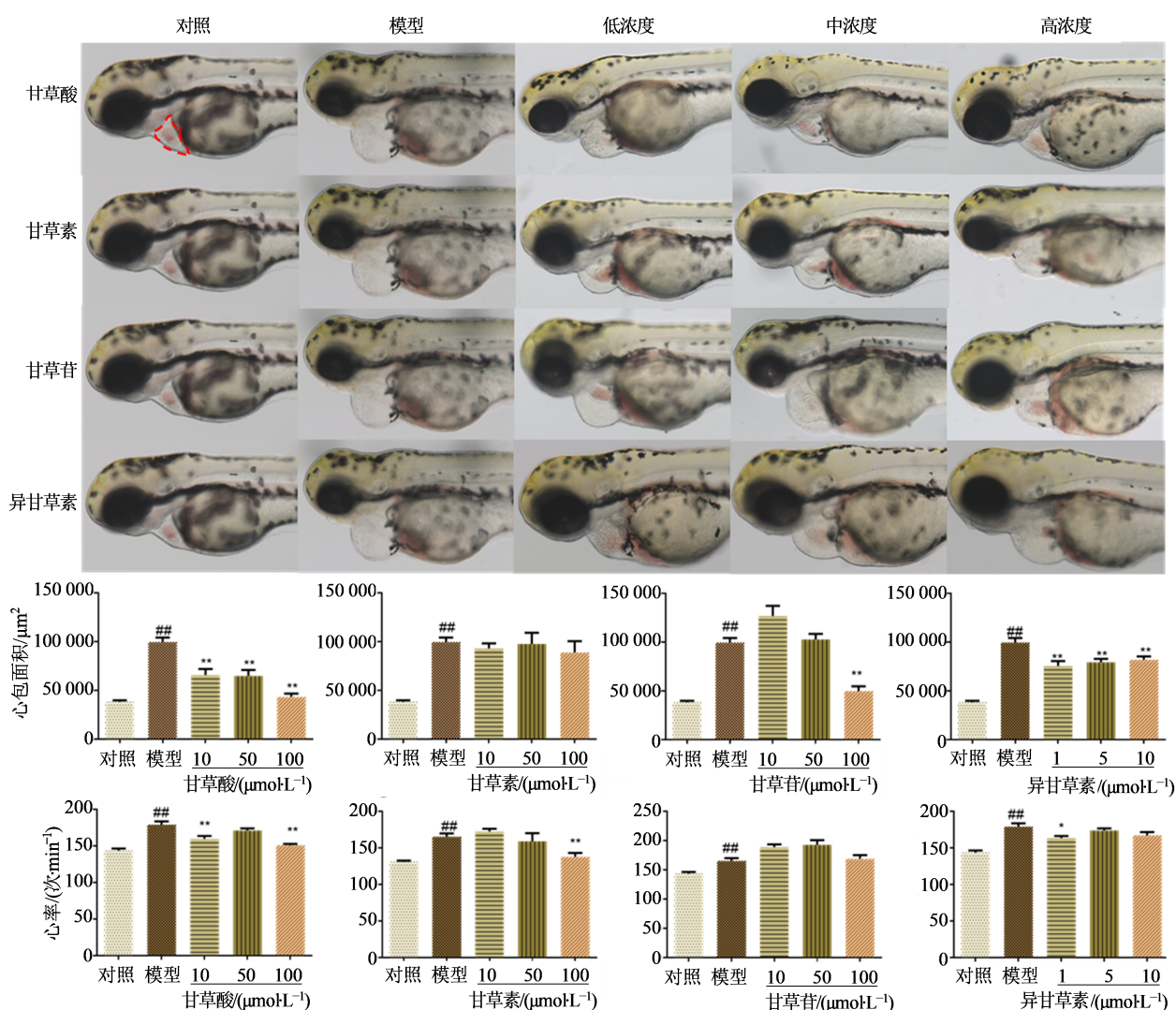
所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用GraphPad Prism 6进行数据统计,并进行单因素方差(one-way

ANOVA)分析。

3 结果

3.1 甘草中4种化合物拮抗乌头碱心脏毒性比较

如图1所示,与对照组比较,模型组幼鱼心包水肿明显,乌头碱可致斑马鱼心包面积由4 000 μm^2 增大至10 000 μm^2 ,差异显著($P < 0.01$);与模型组比较,甘草酸与异甘草素各浓度组均可明显减轻乌头碱所致心包水肿,心包面积显著下降($P < 0.01$),但甘草酸组效果更加明显且呈浓度相关性;甘草苷高浓度组也可拮抗乌头碱所致心包水肿,心包面积显著下降($P < 0.01$);甘草素各处理组均无显著性差异。与对照组比较,模型组心率显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,甘草酸低、高浓度,甘草素高浓度,和异甘草素低浓度拮抗



与对照组比较: $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$^{##}P < 0.01$ vs control group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs model group

图1 甘草中4种化合物拮抗乌头碱心脏毒性比较

Fig. 1 Comparison of four compounds in *Radix Glycyrrhizae* against aconitine-induced cardiotoxicity

乌头碱所致心率加快效果显著($P<0.05$ 、 0.01)。结果提示,甘草酸拮抗乌头碱所致心脏毒性效果最明显。

3.2 甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用评价结果

如图2所示,与对照组比较,模型组SV-BA距离显著增加($P<0.01$),射血分数、短轴缩短率、每搏输出量、心搏量均显著降低($P<0.01$);甘草酸对乌头碱导致的斑马鱼SV-BA距离增加和射血分数降低无明显的恢复作用。甘草酸可浓度相关性地拮抗乌头碱导致的斑马鱼心室短轴缩短率降低,且高浓度组具有显著性差异($P<0.01$)。甘草酸可一定程度上恢复乌头碱导致的斑马鱼每搏输出量、心搏量降低,差异无统计学意义。

3.3 ROS含量检测

如图3所示,与对照组比较,模型组心脏部位(红色虚线范围内)荧光强度明显增加,差异显著($P<0.01$);与模型组比较,甘草酸各浓度组心脏部位荧光强度均明显降低,差异显著($P<0.01$)。结果表明,甘

草酸可抑制乌头碱诱导的斑马鱼体内ROS生成。

3.4 吖啶橙染色结果

如图4所示,与对照比较,模型组斑马鱼心脏部位出现大量致密荧光点(白色箭头指示),说明乌头碱可使斑马鱼心脏区域发生细胞凋亡;与模型组比较,甘草酸组心脏区域荧光点明显减少,说明甘草酸可以减弱乌头碱导致的细胞凋亡。

3.5 网络药理学结果

3.5.1 甘草酸活性靶点与乌头碱毒性靶点PPI结果 共得到甘草酸活性靶点293个,乌头碱潜在毒性作用靶点306个,PPI结果见图5,拓扑分析结果以度值中位数筛选得到64个重要靶点,主要为ALB、EGFR、MAPK1、IGF1、SRC、CASP3、HSP90AA1、ESR1、MAPK8、MMP2等。

3.5.2 生物过程和通路富集分析结果 如图6所示,甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性GO-生物过程(BP)分析获得52个生物过程分析,其中29条具有显著性差异;GO-细胞组分(CC)分析获得7个细胞过程分析,其中2条具有显著性差异;GO-分子功

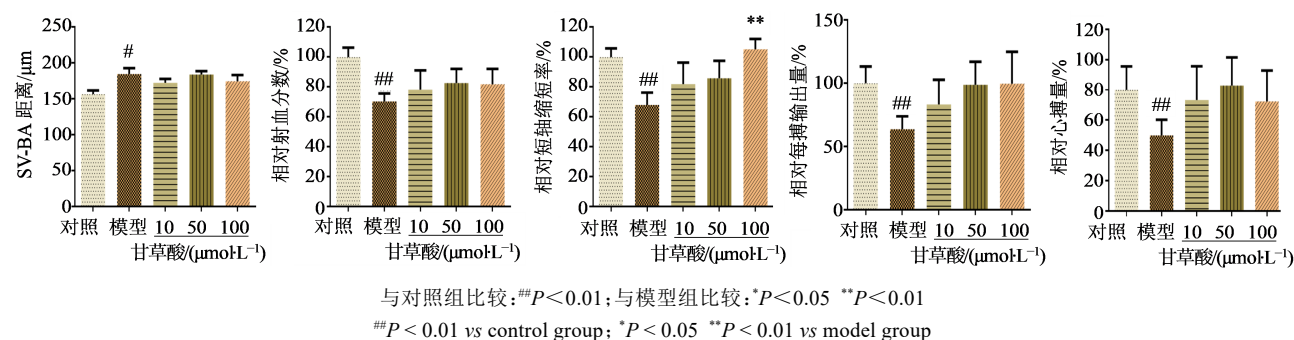


图2 甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性作用评价结果

Fig. 2 Results of glycyrrhizic acid against aconitine-induced cardiotoxicity

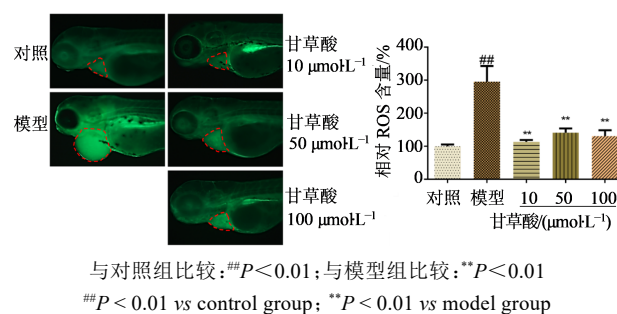


图3 ROS含量检测

Fig. 3 ROS content detection results

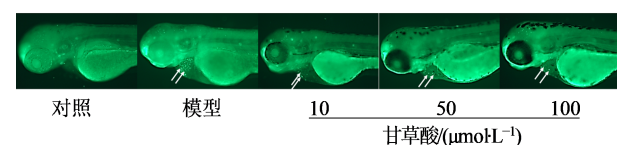


图4 吖啶橙染色结果

Fig. 4 Acridine orange staining results

能(MF)分析获得29个分子过程分析,其中19条具有显著性差异。KEGG Pathway分析设定 $P<0.01$,按照P值从小到大排列选取相关通路前20条,可视化处理结果如图7所示,甘草酸可能主要通过调控PI3K-Akt、Ras、FoxO等信号通路拮抗乌头碱心脏毒性。

3.5.3 成分-靶点-通路网络的构建与分析结果 如图8所示,该网络包含56个节点和229条边,其中MAPK、GRB2、CDC42、EGFR、GSK3B、SRC等度值较高,可能为甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性的关键靶点。

4 讨论

配伍减毒增效(存效)是历代医家实践与智慧的结晶,但是,配伍减毒多沿用历史经验,缺乏现代药理学实验数据支撑。附子-甘草药对堪称七情配伍的典范。现代研究表明甘草拮抗附子毒性的主

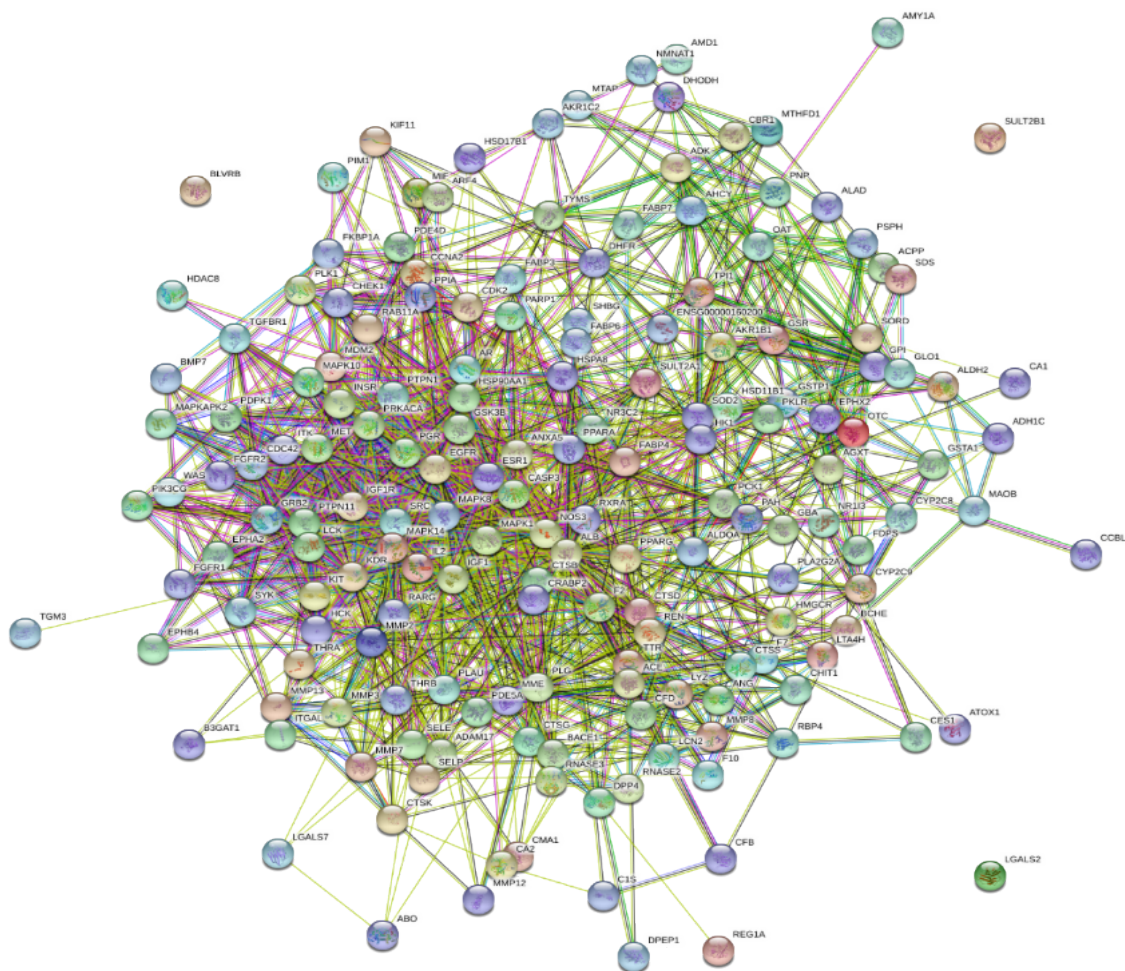


图5 基于STRING的甘草酸-乌头碱蛋白互作网络

Fig. 5 Glycyrrhizic acid-aconitine target interaction map based on STRING

要机制包括共煎降低乌头碱等毒性成分溶出,通过网络合作用降低体内毒性生物碱含量,并加快其体内代谢,通过抗氧化、抗凋亡等拮抗乌头碱心肌细胞毒性等^[16, 19-20]。本研究首次利用野生型AB系斑马鱼比较了甘草酸、甘草素、甘草苷、异甘草素等4种化合物对乌头碱所致斑马鱼心动过速及心包水肿的拮抗作用,发现4种化合物均具有一定的拮抗作用,其中甘草酸效果最好。采用心肌细胞荧光标记的转基因斑马鱼验证其拮抗作用,发现甘草酸可拮抗乌头碱导致的斑马鱼心室短轴缩短率降低,并对每搏输出量、心搏量降低具有一定的恢复趋势。该结果与李文等^[21]观察到的结果相符。ROS积累引起的氧化应激和细胞凋亡是药物毒副作用的机制之一^[22-23]。本研究进一步利用活体染色的方法,发现甘草酸可显著逆转乌头碱导致的心脏区域活性氧含量和凋亡细胞数量增加,该结果表明甘草酸通过抑制体内氧化应激和心肌细胞凋亡拮抗乌头碱心脏毒性。

网络药理学预测结果表明,MAPK1、GRB2、CDC42、EGFR、GSK3B、SRC等可能是甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性的关键靶点。MAPK1是与增殖、分化、转录调控和发育等有关的MAP激酶。GRB2是miR-378调控心肌细胞大小和心肌肥厚的直接靶点,在心脏成纤维细胞中,Ang II通过GRB2激活MAPK,研究表明GRB2与心脏纤维化之间存在联系^[24]。CDC42是小鼠抗心肌肥厚的分子开关,在压力负荷的心脏和心肌细胞中均可被多种激动剂特异性激活^[25]。EGFR已被证实与心肌缺血、心衰等多种心脏疾病密切相关^[26]。GSK3B编码的蛋白参与能量代谢、炎症、线粒体功能障碍和凋亡途径^[27]。SRC可激活MAPK、PI3K/Akt信号通路,参与细胞增殖、凋亡抑制^[28]。这些关键靶点均与心肌保护和心肌毒性密切相关,其在甘草酸拮抗乌头碱的心脏毒性中的作用有待进一步实验验证。GO-BP分析结果表明蛋白质自身磷酸化、蛋白分解、基因调控、RNA聚合酶调控等生物途径在甘草酸拮抗乌头碱



图6 GO功能分析



Fig. 7 Enrichment of KEGG

心脏毒性中起重要作用。KEGG 富集分析结果显示甘草酸主要通过调控雌激素、FoxO、PI3K-Akt、促性腺激素释放、T 细胞受体、Ras、肿瘤坏死因子、ErbB、VEGF、Rap1 等信号通路拮抗乌头碱心脏毒性。Ras

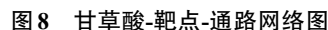


Fig. 8 Network of glycyrrhizic acid-target-pathway

相关蛋白能与雌激素结合,雌激素能激活PI3K信号通路,FoxO3a作为PI3K/Akt信号通路靶蛋白,能抗增殖和促进凋亡,T细胞受体信号通路可以介导细胞凋亡和自噬。FoxO信号通路与PI3K/Akt、MAPK等信号通路密切相关,ROS可激活FoxO1转录,进而调节氧化氢分解酶(Gatalase)和锰超氧化物歧化酶(MnSOD)活性,从而减少体内ROS含量,缓解氧化应激反应。炎症反应、氧化应激等均可激活PI3K/Akt信号通路,该通路可抑制Bax等促凋亡蛋白表达,促进XIAP等抗凋亡蛋白表达,从而抑制细胞凋亡。Liu等^[29]发现甘草酸通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路调节自噬,从而减轻内毒素诱导的肺损伤。Kao等^[30]发现甘草酸可以激活PI3K/Akt通路,降低体内活性氧含量,通过降低线粒体Bax/Bcl-2比例缓解凋亡,保护PC12细胞免受缺血性损伤。以上结果表明,细胞凋亡、细胞自噬、能量代谢可能是甘草酸减轻乌头碱所致心脏毒性的机制,PI3K-Akt信号通路可能在甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性中起主要作用。

本研究首次利用斑马鱼模型比较了甘草酸、甘草素、甘草苷、异甘草素等4种化合物对乌头碱所致斑马鱼心动过速及心包水肿的拮抗作用,其中甘草酸通过逆转体内ROS积累和心肌细胞凋亡,缓解乌头碱导致的斑马鱼心脏毒性。斑马鱼胚胎透明,心脏结构和功能与哺乳动物高度相似,在中药心脏毒性/活性评价中展现出独特的优势。本研究首次利用网络药理学方法预测了甘草酸拮抗乌头碱心脏毒性的潜在作用机制,但仍需更深入的分析 and 实验

验证。本研究为阐明附子-甘草配伍减毒的现代科学内涵提供了新依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李莹. 基于生物药剂学研究四逆汤中附子与甘草合煎减毒增效机制 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2013.
Li Y. Study on the attenuate and synergistic mechanism designed for mixed-decoction of *Radix Aconiti Lateralis Praeparata* and *Radix Glycyrrhizae* in Sini Decoction based on biopharmaceutics [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2013.
- [2] 周天梅, 杨洁红, 万海同, 等. 附子甘草主要成分配伍对乌头碱致大鼠传代心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(1): 22-26.
Zhou T M, Yang J H, Wan H T, et al. Protective effect of main component combinations of Fuzi (*Radix Aconiti Lateralis praeparata*) and Gancao (*Radix Glycyrrhizae*) on passage myocardial cells injured by aconitine in rats [J]. J Beijing Univ Tradit Chin Med, 2014, 37(1): 22-26.
- [3] Gong H, Zhang B K, Yan M, et al. A protective mechanism of licorice (*Glycyrrhiza uralensis*): isoliquiritigenin stimulates detoxification system via Nrf2 activation [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 162: 134-139.
- [4] 吴俊辉. 基于高效液相色谱-质谱联用技术同时测定复方中药多个指标成分的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
Wu J H. Simultaneous determination of multiple index components of compound Chinese medicine based on high performance liquid chromatography-mass spectrometry [D]. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2015
- [5] Min Z, Ying P, Wang M, et al. The influence of compatibility of Si-Ni decoction with metabolism in intestinal bacteria on transports of toxic diterpenoid alkaloids from processed aconite root across Caco-2 monolayers [J]. J Ethnopharmacol, 2018, 288: 164-178.
- [6] 张雪, 赵炳祥, 宋玉琴, 等. 乌头碱配伍人参皂苷 Rb₁ 对原代培养心肌细胞能量代谢的影响 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(9): 1785-1789.
Zhang X, Zhao B X, Song Y Q, et al. Compatibility effect of aconitine and ginsenosides Rb₁ on energy metabolism of primary cultured myocardial cells [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2015, 17(9): 1785-1789.
- [7] Suzuki K, Matsumoto A, Nishi Da H, et al. Termination of aconitine-induced atrial fibrillation by the KACH-channel blocker tertiapin: underlying electrophysiological mechanism [J]. J Pharmacol Sci, 2014, 125(4): 406-414.
- [8] Zhang S W, Liu Y, Huang G Z, et al. Aconitine alters connexin43 phosphorylation status and [Ca²⁺] oscillation patterns in cultured ventricular myocytes of neonatal rats [J]. Toxicol In Vitro, 2007, 21(8): 1476-1485.
- [9] 周静波. 附子配伍甘草、大黄、干姜调控药性物质基础研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2009.
Zhou J B. The study of *Radix Aconite Lateralis* *Preparata* compatibility *Radix Glycyrrhizae*, *Radix et Rhizoma Rhei* and *Rhizoma Zingiberis* control material foundation of herb property regulation [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2009.
- [10] 陈秋薇. "化学成分-汤液相态-毒效作用联合分析附子配伍甘草增效解毒作用" [D]. 成都: 成都中医药大学, 2014.
Chen Q W. Study on the compatibility mechanism between *Radix Aconiti Lateralis* and *Radix Glycyrrhizae* for toxicity reduction from the based on combinational analysis of "chemical composition-physicochemical property-pharmacologic action". [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2014.
- [11] 马鸿雁, 刘小彬, 李楠, 等. 乌头碱和甘草酸作用的研究 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(2): 208-209.
Ma H Y, Liu X B, Li N, et al. Study of interaction of aconitine and glycyrrhizic acid by HPLC [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2006, 17(2): 208-209.
- [12] 朱玲英, 沈红, 武洁. LC-MS/MS法体外测定肝匀浆液中乌头碱及其代谢产物 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(11): 1923-1928.
Zhu L Y, Shen H, Wu J. Effects of *Radix Glycyrrhizae* on *in vitro* liver metabolism of aconitine evaluated by LC-MS/MS [J]. J Pharm Anal, 2012, 32(11): 1923-1928.
- [13] Bo S, Ming Z, Zhang Q, et al. Metabonomics study of the effects of pretreatment with glycyrrhetic acid on mesaconitine-induced toxicity in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 154(3): 839-846.
- [14] 章津铭. 基于毒(效)组分"体外沉积、体内缓释"环节的附子-甘草配伍减毒作用机制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
Zhang J M. Study on the compatibility mechanism between *Radix Aconiti Lateralis* and *Radix Glycyrrhizae* for toxicity reduction based on the effect link that toxic and effective constituents deposit *in vitro* and sustained-release *in vivo* [D]. Chengdu: Chengdu University of TCM, 2012.
- [15] 张硕峰. 附子中三种双酯型生物碱的心脏毒效关系及甘草苷的干预作用 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
Zhang S F. Cardiac toxicity relationship of three diester alkaloids in aconite and intervention effect of glycyrrhizin [D]. Beijing: Beijing University of Chinese

- Medicine, 2007.
- [16] 王利勤, 张宇燕, 何 昱, 等. 附子、甘草有效成分不同配伍比例对H9c2心肌细胞缺氧缺糖损伤的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(15): 1327-1331.
- Wang L Q, Zhang Y Y, He Y, et al. Effect of different compatibility proportion of active constituent of Fuzi (*Radix Aconiti Carmichaeli*) and Gancao (*Glycyrrhiza Uralensis*) on H9c2 myocardial cell with oxygen-glucose deprivation [J]. J Tradit Chin Med, 2016, 57(15): 1327-1331.
- [17] Wang L, Yu H, Zhang Y, et al. Effects of active components of Fuzi and Gancao compatibility on Bax, Bcl-2, and Caspase-3 in chronic heart failure rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 1-12.
- [18] 万嘉洋, 杨洁红, 虞 立, 等. 甘草次酸、甘草苷配伍次乌头碱对慢性心衰大鼠细胞凋亡通路的影响[J]. 中成药, 2017, 39(10): 2018-2023.
- Wan J Y, Yang J H, Yu L, et al. Influence of compatibility of glycyrrhetic acid, liquiritin and hyaconitine on apoptosis pathway in rats with chronic heart failure [J]. Chin Tradit Pat Med, 2017, 39(10): 2018-2023.
- [19] 林彦君, 游 宇, 季宁平, 等. HPLC-Q-TOF/MS指纹技术对比分析附子配伍炙甘草前后化学组分变化[J]. 中草药, 2014, 45(11): 1556-1560.
- Lin Y J, You Y, Ji N P, et al. Changes of chemical ingredients before and after compatibility of *Aconiti Lateralis Radix Praeparata* and *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma Praeparata cum Melle* analyzed by HPLC-Q-TOF/MS fingerprint technology [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2014, 45(11): 1556-1560.
- [20] 张宇燕, 杨洁红. 甘草中甘草苷的测定及与附子配伍前后含量的变化[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(7): 134-136.
- Zhang Y Y, Yang J H. Determination of liquiritin in licorice and its change before and after compatibility of licorice with aconite [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2008, 26(7): 134-136.
- [21] 李 文, 杨晓琴, 章津铭, 等. 甘草酸和甘草苷对乌头碱诱导斑马鱼心脏毒性的拮抗作用[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(3): 55-58.
- Li W, Yang X Q, Zhang J M, et al. The antagonistic effect of glycyrrhizic acid and liquiritin on aconitine induced cardiotoxicity in zebrafish [J]. Chin Med Pharmacol Clin, 2018, 34(3): 55-58.
- [22] 韦亚忠, 薛晓梅, 何 斌. 活性氧介导心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2021, 41(6): 1-4.
- Wei Y Z, Xue X M, He B. Research progress in myocardial ischemia-reperfusion injury mediated by mitochondrial reactive oxygen species [J]. J Shanghai Jiaotong Univ Med Sci, 2021, 41(6): 1-4.
- [23] Sun G B, Hong S, Meng X B, et al. Aconitine-induced Ca^{2+} overload causes arrhythmia and triggers apoptosis through p38 MAPK signaling pathway in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014, 279(1): 8-22.
- [24] Sun F, Zhuang Y, Zhu H, et al. LncRNA PCFL promotes cardiac fibrosis via miR-378/GRB2 pathway following myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 133: 188-198.
- [25] Maillet M, Lynch J M, Sanna B, et al. Cdc42 is an antihypertrophic molecular switch in the mouse heart [J]. J Clin Invest, 2009, 119(10): 3079-3088.
- [26] Peng K, Tian X, Qian Y, et al. Novel EGFR inhibitors attenuate cardiac hypertrophy induced by angiotensin II [J]. J Cell Mol Med, 2016, 20(3): 482-494.
- [27] Taylan E, Zayou F, Murali R, et al. Dual targeting of GSK3B and HDACs reduces tumor growth and improves survival in an ovarian cancer mouse model [J]. Gynecol Oncol, 2020, 159: 277-284.
- [28] Lin X, Wang G, Liu P, et al. Gallic acid suppresses colon cancer proliferation by inhibiting SRC and EGFR phosphorylation [J]. Exp Ther Med, 2021, 21(6): 1-11.
- [29] Liu W F, Huang S, Li Y L, et al. Glycyrrhizic acid from licorice down-regulates inflammatory responses via blocking MAPK and PI3K/Akt-dependent NF- κ B signalling pathways in TPA-induced skin inflammation [J]. Medchemcomm, 2019, 9(9): 1502-1510.
- [30] Kao T C, Shyu M H, Yen G C. Neuroprotective effects of glycyrrhizic acid and 18beta-glycyrrhetic acid in PC12 cells via modulation of the PI3K/Akt pathway [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(2): 754-761.

[责任编辑 兰新新]