

基于整合网络毒理学和分子对接的补骨脂酚致肝毒性机制探讨

陈成龙, 姜欣洋, 刘兰玲, 史继童, 朱振龙, 赵东升*

山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355

摘要: 目的 基于网络毒理学和分子对接技术探究补骨脂酚致肝毒性的潜在机制。方法 通过TCM-BATMAN挖掘补骨脂酚靶点, DisGeNET挖掘肝毒性基因; Cytoscape 3.7.0分别构建补骨脂酚靶点和肝毒性基因蛋白互作关系(PPI)网络, 并Merge取交集, 运用软件中插件分析获得关键靶点, 构建生物学总调控网络, 并对其进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析; 分子对接评价补骨脂酚与潜在关键靶点结合的亲和力。结果 共获得补骨脂酚靶点3 952个, 肝毒性基因6 025个和交集基因2 221个。经分析, 补骨脂酚主要作用于TP53、HSP90AA1、EP300等关键靶点, 参与氧化应激反应与细胞增殖、分化、凋亡过程的调控, 涉及多种酶调控等生物过程, 主要通过PI3K-Akt、MAPK、细胞周期等信号通路引起肝毒性。补骨脂酚与EP300、HSP90AA1靶点的亲和力最强, 能够与二者的结合口袋形成较强的疏水作用, total score值为8.858 2、7.217 8。结论 补骨脂酚致肝毒性具有多靶点、多途径的作用规律, 主要通过PI3K-Akt、MAPK、细胞周期等信号通路引起肝毒性。

关键词: 补骨脂酚; 肝毒性; 网络毒理学; 分子对接; PI3K-Akt通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)02-0251-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.007

Mechanism of bakuchiol induced hepatotoxicity based on network toxicology and molecular docking

CHEN Chenglong, JIANG Xinyang, LIU Lanling, SHI Jitong, ZHU Zhenlong, ZHAO Dongsheng

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

Abstract: **Objective** To explore the potential mechanism of bakuchiol induced hepatotoxicity based on network toxicology and molecular docking. **Methods** TCM-BATMAN was used to mine drug targets, and DisGeNET was used to mine disease genes. Cytoscape3.7.0 was used to construct bakuchiol targets and hepatotoxic genes PPI network respectively, and Merge was used to obtain the intersection. The key targets were obtained by plug-in analysis of the software, and the overall regulatory network of biology was constructed. GO and KEGG were performed on key targets. The binding affinity of bakuchiol to potential target genes was evaluated by molecular docking. **Results** There were 3 952 component targets, 6 025 hepatotoxic genes and 2 221 intersection genes. Through in-depth analysis, bakuchiol mainly acted on TP53, HSP90AA1, EP300 and other key targets. It was mainly involved in the regulation of oxidative stress response and cell proliferation, differentiation and apoptosis, involving a variety of enzyme regulation and other biological processes, regulating PI3K-Akt, MAPK and cell cycle signaling pathways, causing hepatotoxicity. Bakuchiol had the strongest affinity with EP300 and HSP90AA1 target genes, and could form strong hydrophobic interaction with their binding pocket. The total score was 8.858 2 and 7.217 8. **Conclusion** Psoralen induced hepatotoxicity has the law of multi-target and multi-channel action, mainly through PI3K-Akt, MAPK, cell cycle and other signal pathways. **Key words:** bakuchiol; hepatotoxicity; network toxicology; molecular docking; PI3K-Akt signaling pathway

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L. 的干燥成熟果实, 性味辛、苦、温, 归肾、脾经, 为经典方剂四神丸、壮骨关节丸等的主要组成药物, 内服用于治疗肾虚、遗精等, 外敷用于治疗皮肤

收稿日期: 2021-07-17

基金项目: 山东省大学生创新创业训练计划项目(S202110441014); 国家自然科学基金资助项目(81903780); 山东省中医药科技发展计划项目(2019-0030); 山东中医药大学中药资源保护与质量评价青创团队支持项目

第一作者: 陈成龙(1999—), 男, 本科生, 主要从事计算机辅助药物设计研究。E-mail: Chemistrycl1023@163.com

*通信作者: 赵东升(1983—), 男, 博士, 讲师, 主要从事中药质量控制和安全性评价研究。E-mail: dongshengpw2008@163.com

病、白癜风等^[1]。补骨脂酚是补骨脂中含量最高的成分,质量分数为1.12%~5.14%^[2],具有抗炎、抗肿瘤、抗菌及抗病毒等作用^[3]。然而,补骨脂酚对肝细胞具有一定的毒性^[4],并且高剂量给药会引起大鼠肝不良反应^[5]。

刘昌孝院士团队^[6]提出采用网络毒理学研究中药毒性的思路,通过构建复杂调控网络来挖掘研究对象的潜在致毒机制,可多维度视角阐释疾病的分子基础。中药肝毒性多靶点、多途径的复杂机制恰好符合网络毒理学的优势。因此,本研究基于“毒性-基因-靶点-药物”相互作用,整合靶点调控网络挖掘补骨脂酚致肝毒性的潜在机制,并利用分子对接技术对补骨脂酚与主要核心靶点进行初步验证,为后续补骨脂酚致肝毒性作用机制的深入研究提供一定的理论参考。

1 方法

1.1 靶点调控网络构建

通过TCM-BATMAN数据库检索补骨脂酚靶点,筛选标准:Score cutoff ≥ 5 。Uniprot数据库进行靶点名称标准化。

以“hepatotoxicity”为关键词在DisGeNET数据库(<https://www.disgenet.org/>)检索肝毒性相关基因。

1.2 靶点调控网络分析

Cytoscape 3.7.0中BisoGenet模块被设计用来评估从蛋白质组学或基因组学实验中获得的基因或蛋白质组之间功能关系的显著性,寻找蛋白-蛋白互作(PPI)关系,并可筛选得到关键靶点^[7]。本实验采用此模块进行基因扩充寻找药物或疾病的间接调控基因,分别构建补骨脂酚靶点和肝毒性基因PPI网络,利用Merge构建补骨脂酚靶点和肝毒性基因的PPI网络交集,以degree ≥ 2 倍中位数为筛选条件对靶点调控网络进行2次筛选,并对筛选后的网络进行模块分析,得到补骨脂酚致肝毒性的关键靶点^[8]。

1.3 基因本体(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析

采用R 64 4.0.3对关键靶点进行GO和KEGG分析,分别绘制排名前10位的GO过程及前30位的KEGG通路。Cytoscape 3.7.0构建生物学调控网络。

1.4 分子对接验证

采用Syby-X软件构建并优化分子,优化参数设置如下:采用Tripos力场,选择Gasteiger-Hückel电

荷,最大迭代系数设置为10 000,能量梯度限制在0.005 kcal/(mol·Å)(1 kcal=4.184 kJ, 1 Å=0.1 nm),未说明参数均设为默认值。

Hub基因排名前10位的靶点作为关键靶点,在RCSB(<http://www.rcsb.org/pdb/>)中获得含有天然配体的靶点结构,并进行受体预处理,包括去除水分子、金属离子等。通过SYBYL-X2.1软件中的Surflex-dock模块将成分与靶点分别进行对接,分子可视化采用Pymol实现。

2 结果

2.1 靶点调控网络构建结果

补骨脂酚靶点数目为387个,补骨脂酚靶点PPI网络中得到直接或间接作用靶点共3 952个,靶点之间的相互关系共有76 146条(图1)。肝毒性相关基因538个,肝毒性PPI网络中得到相关基因6 025个,靶点之间的相互关系共有144 737条。Merge获得补骨脂酚对肝毒性靶点调控网络图,得到作用靶点共2 221个,靶点之间的相互关系共有58 290条(图1)。

2.2 靶点调控网络分析结果

以degree ≥ 68 为筛选条件进行第1次筛选,得靶点541个,靶点之间相互关系22 090条,以degree ≥ 142 为条件进行第2次筛选,得靶点137个,靶点之间相互关系3 258条(图2-A)。MCODE插件对2次筛选后的网络进行模块分析,共得到7个靶点模块,并构建排名前3位的靶点网络图(图2-B~D),分析得到补骨脂酚导致肝毒性的潜在靶点127个,排名前10位的Hub基因见表1。

2.3 GO与KEGG富集分析结果

GO分析表明补骨脂酚致肝毒性涉及1 902条生物过程(BP),与DNA结合、转录因子活性的调控、氧化应激反应等BP有关;涉及166个细胞组分(CC),与黏着、细胞-基底连接、转录调节复合物等CC有关,涉及183个分子功能(MF),与泛素蛋白连接酶结合、泛素样蛋白连接酶结合、DNA结合转录因子结合等MF有关,结果见图3。KEGG分析结果表明补骨脂酚致肝毒性涉及134条通路,主要通路有PI3K-Akt、MAPK、癌症通现象路(如肿瘤miRNA代谢)和细胞周期等信号通路,结果见图4。

将关键靶点与通路、生物过程联合分析,构建补骨脂酚致肝毒性生物学总调控网络,除“2.2”项的关键靶点外,还发现CTNNB1、MDM2、EGFR、GRB2等靶点在补骨脂酚整合多通路、多效应致肝毒性中也起到非常重要的作用(图5)。进一步挖掘潜在生物学信息,构建生物学调控子网络,氧化应



Fig. 1 Regulatory network of bakuchiol on hepatotoxicity targets



A-补骨脂酚致肝毒性蛋白互作网络;B-模块化分析1;C-模块化分析2;D-模块化分析3

Fig. 2 Analysis results of target regulatory network

2.4 分子对接验证结果

构建了补骨脂酚结构(图 7-A),化合物对关键靶点具有不同的亲和力,与 EP300 靶点的亲和力最强, total score 为 8.858 2。RPS27A (2.170 6)、MYC(4.495 9)等靶点与补骨脂酚亲和力较弱,在调控网络中起次要作用,而 EP300、HSP90AA1(7.217 8)等靶点与补骨脂酚的亲和力较强,是调控补骨脂酚

表1 Hub基因(排名前10位)

Table 1 Ranking of Hub genes (top 10)

编号	基因	PDB ID	连接度
1	TP53	4AGQ	98
2	HSP90AA1	1BYQ	84
3	AKT1	3O96	81
4	MYC	6C4U	76
5	HDAC1	5ICN	73
6	UBC	6OI4	71
7	EGFR	1M17	71
8	EP300	3BIY	71
9	RPS27A	3NS8	70
10	HSPA8	3FZF	68

致肝毒性的主要靶点(图7-B)。

补骨脂酚能够较好地结合在EP300靶点的疏水口袋中,与Asp¹⁴⁴⁴、Ser¹⁴⁴⁰、Pro¹⁴⁴⁰、Leu¹³⁹⁸等残基发生了疏水作用,酚羟基氢作为氢键供体分别与Asp¹⁴⁴⁴、Asp¹⁴⁴⁵的羰基形成氢键,两个基团之间的氢键距离分别为0.36、0.30 nm(3.6、3.0Å),苯环为富电子的共轭体系,与Asp¹³⁹⁹形成共轭作用,分子之间的距离分别为0.30、0.34 nm(3.0、3.4Å),见图7-C。补骨脂酚的酚羟基氢作为氢键受体与HSP90AA1靶点中Lys¹¹²的氨基形成氢键(0.49 nm,4.9Å),作为氢键供体与Asn¹⁰⁶的羰基形成了氢键(0.29 nm,2.9Å),苯环与Phe¹³³中的苯环形成共轭作用(图7-D)。

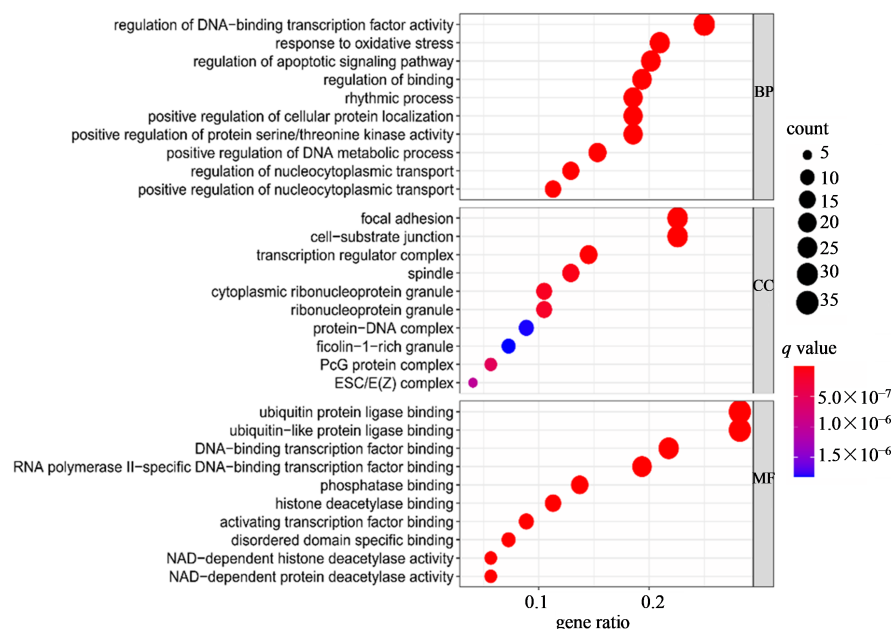


图3 GO富集分析

Fig. 3 Enrichment analysis of GO

3 讨论

药物引起的肝损伤可分为急性肝炎、肝细胞凋亡、胆汁淤积、脂肪性肝炎、肝硬化和肝腺瘤等^[5]。中药安全性备受关注,关于补骨脂致肝毒性研究已取得一定进展,潜在机制主要有氧化应激、线粒体损伤、胆汁酸失衡、肝脏脂肪变、抑制肝再生等^[9],但对于补骨脂致肝毒性作用及分子机制尚不明确。补骨脂酚是补骨脂的主要成分^[10],因其不良反应已成为限制补骨脂广泛应用的因素。因此,本研究基于网络毒理学探讨补骨脂致肝毒性作用的潜在机制。

通过靶点调控网络分析,获得TP53、HSP90AA1、EP300等10个肝毒性靶点,分子对接显示补骨脂酚

与HSP90AA1、EP300的亲和力较强。分析生物学总调控网络发现,CTNNB1、MDM2、EGFR、GRB2等靶点在整个调控中具有重要作用。富集分析结果显示,补骨脂致肝毒性的潜在靶点主要参与氧化应激反应与细胞增殖、分化、凋亡过程的调控,同时涉及多种酶的调控,如ATP酶活性、磷酸酯酶等,通过PI3K-Akt、MAPK和细胞周期等多个信号通路引起肝毒性。

抑癌基因TP53能够诱导细胞周期停滞、细胞衰老和凋亡,突变后其肿瘤抑制功能丧失,导致肝细胞不可控增殖^[11]。HSP90AA1、EP300在细胞增殖和分化过程中起重要作用,可促进肝细胞增殖,参与肝再生与肝癌过程^[12-13]。原癌基因CTNNB可编

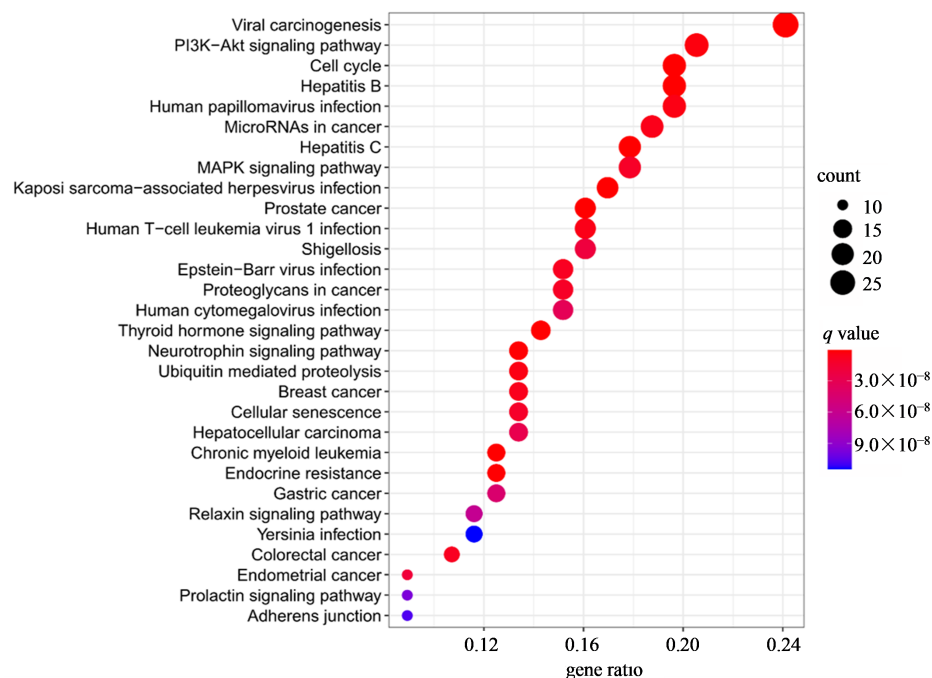


图4 KEGG富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of KEGG

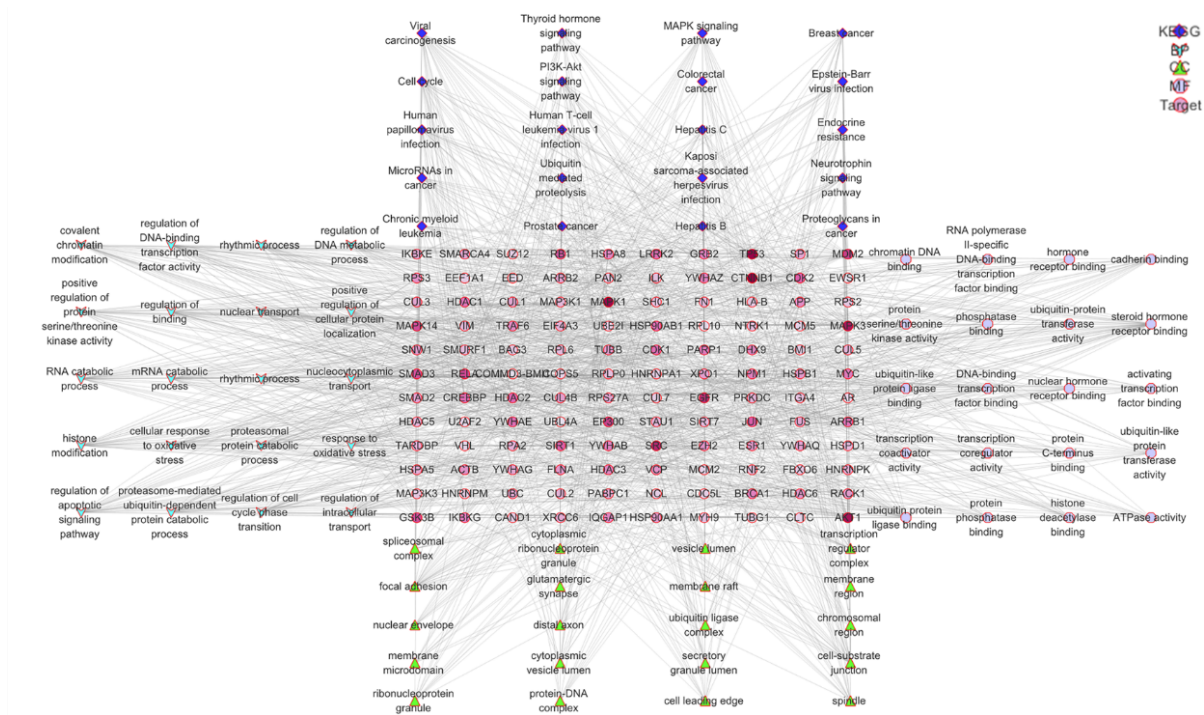


图5 生物学调控网络总图

Fig. 5 Overview of biological regulatory network

码 β -catenin 蛋白, β -catenin 发生突变后可导致癌症^[14]。MDM2 是 p53 抑制因子, MDM2-p53 轴在糖脂代谢紊乱的早期和晚期导致肝细胞损伤^[15]。GRB2 是 EGFR 和 MAPK 通路之间的衔接蛋白, 可通过 MAPK 通路促进肝再生^[16]。补骨脂水提物能降低雄性大鼠肝组织中超氧化物歧化酶、过氧化氢

酶及谷胱甘肽含量, 提高丙二醛和一氧化氮水平^[17]。补骨脂与药物配伍减毒时, 小鼠体内 ATP 酶活性降低, 维持了细胞内外离子平衡而降低毒性^[18]。在肝毒性患者体内, 胆汁排泄不畅时血清碱性磷酸酶升高^[19]。补骨脂通过上调肝细胞周期蛋白 E1, 使肝再生下降, 引起小鼠肝毒性^[20]。miRNA-378 可抑制

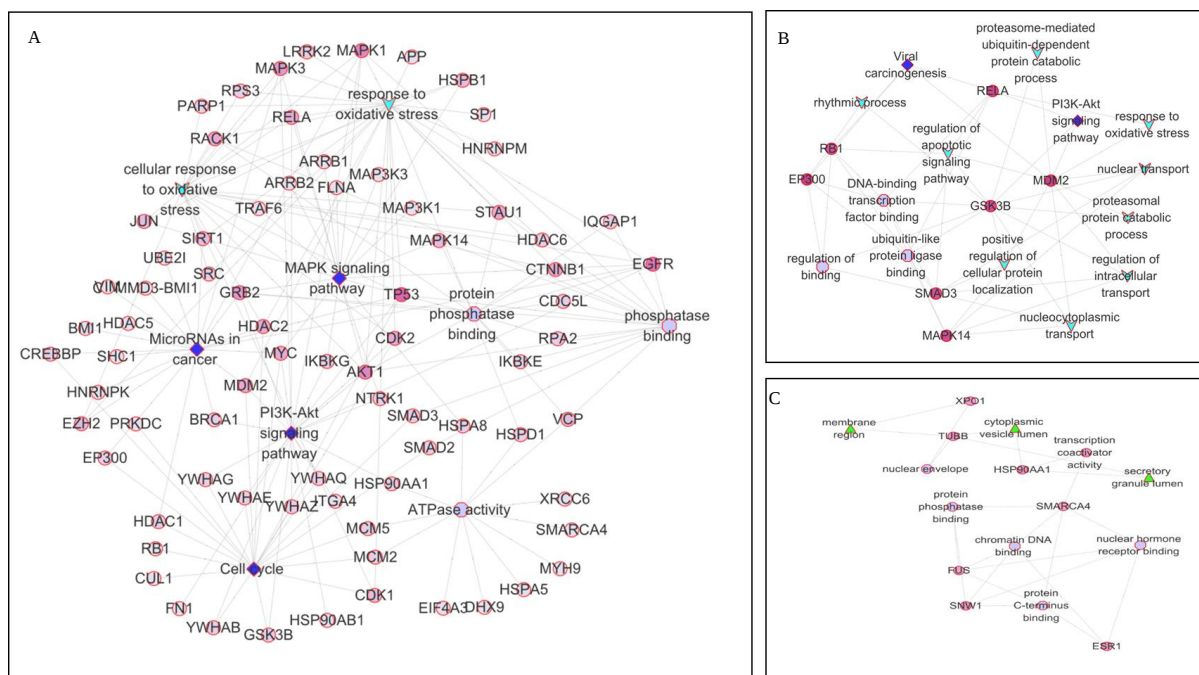
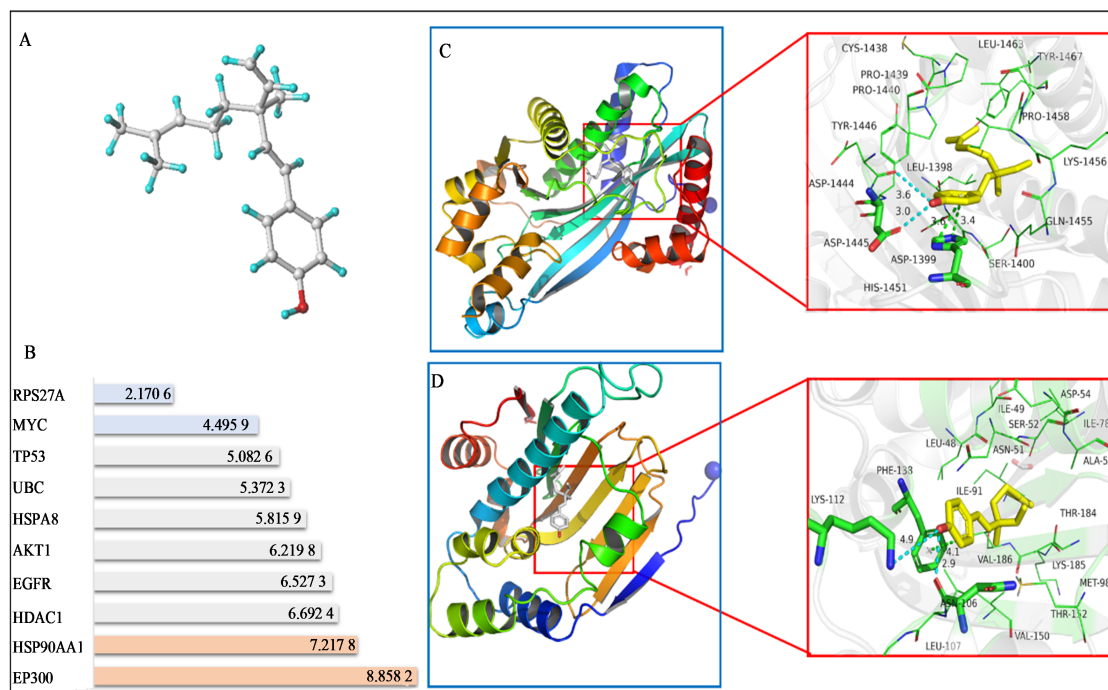


图 6 生物学调控子网络 I(A)、II(B)和 III(C)

Fig. 6 Biological regulatory subnetwork I (A), II (B) and III (C)



A-补骨脂酚结构; B-total score 排名; C-补骨脂酚-EP300 对接; D-补骨脂酚-HSP90AA1 对接
A-psoralen structure; B-total score ranking; C-psoralen-EP300; D-psoralen-HSP90AA1

图 7 分子对接结果

Fig. 7 Molecular docking results

鸟氨酸脱羧酶促进肝细胞再生, miRNA-21 为肝切除术后合成肝 DNA 所必须^[21]。FasL/Fas、TNF- α /TNF-R 是死亡受体介导的肝细胞凋亡及肝损伤的

主要通路, 且均受 PI3K/Akt 负调控, 通过激活 PI3K/Akt/mTOR 介导的自噬能有效改善肝损伤^[22]。MAPK 是 p38 α 在肝细胞增殖的负调节因子, 可减轻

活性氧的积累促进肝组织修复再生^[23]。

综上,补骨脂酚可能会促使肝细胞凋亡、引起肝炎及癌变等损伤。其损伤机制主要与胆汁酸失衡、肝脏脂肪变、抑制肝再生、氧化应激等反应相关,补骨脂酚致肝毒性的潜在机制涉及多靶点、多反应、多通路,该研究结果虽需进一步实验验证,但仍可为后续深入研究补骨脂酚致肝毒性的分子机制及补骨脂的安全评价提供一定的理论参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 鲁亚奇, 张 晓, 王 金 金, 等. 补骨脂化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 180-189.
Lu Y Q, Zhang X, Wang J J, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological actions of *Psoralea fructus* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2019, 25(3): 180-189.
- [2] Wang Y F, Wu B, Yang J, et al. A rapid method for the analysis of ten compounds in *Psoralea corylifolia* L. by UPLC [J]. Chromatographia, 2009, 70(1/2): 199-204.
- [3] Xin Z L, Wu X, Ji T, et al. Bakuchiol: A newly discovered warrior against organ damage [J]. Pharmacol Res, 2019, 141: 208-213.
- [4] 周 昆, 王安红, 柴丽娟, 等. 补骨脂酚对HepG2的细胞毒性及BSEP、NTCP、FXR、CYP7A1的影响 [J]. 毒理学杂志, 2015, 29(3): 193-196.
Zhou K, Wang A H, Chai L J, et al. Cytotoxicity of psoralen on HepG2 and effects of BSEP, NTCP, FXR and CYP7A1 [J]. J Toxicol, 2015, 29(3): 193-196.
- [5] Li Z J, Abulizi A, Zhao G L, et al. Bakuchiol contributes to the hepatotoxicity of *Psoralea corylifolia* in rats [J]. Phytother Res, 2017, 31(8): 1265-1272.
- [6] 刘 睿, 李新宇, 李亚卓, 等. 网络毒理学及其在中药毒性成分预测中的应用研究 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 709-715.
Liu R, Li X Y, Li Y Z, et al. Network toxicology and its application in predicting the toxicity of traditional Chinese medicine [J]. Drug Eval Res, 2018, 41(5): 709-715.
- [7] Martin A, Ochagavia M E, Rabasa L C, et al. BisoGenet: a new tool for gene network building, visualization and analysis [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11: 91.
- [8] 葛俊德, 黄娜娜, 李晓阳, 等. 火把花根片"异病同治"红斑狼疮和类风湿性关节炎的功效网络与机制探讨 [J]. 中草药, 2020, 51(16): 4223-4235.
Ge J D, Huang N N, Li X, et al. Study on efficacy network and mechanism of Huobahuagen Tablets "treating different diseases with same method" for lupus erythematosus and rheumatoid arthritis [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(16): 4223-4235.
- [9] 刘 巧, 郭延丽, 董泰玮, 等. 补骨脂肝损伤机制及减毒方法研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(11): 233-239.
Liu Q, Guo Y L, Dong T W, et al. Research progress on hepatotoxicity mechanism and attenuation methods of *psoraleae fructus* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2021, 27(11): 233-239.
- [10] 王 娟, 周植星, 杨 莉, 等. 补骨脂药材UPLC指纹图谱建立及12种主要成分含量测定 [J]. 中草药, 2021, 52(2): 552-557.
Wang J, Zhou Z X, Yang L, et al. Establishment of UHPLC fingerprint and determination of 12 main components in *Psoraleae Fructus* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(2): 552-557.
- [11] Lin S Q, Jia F J, Zhang C Y, et al. Actinomycin V suppresses human non-small-cell lung carcinoma A549 cells by inducing G2/M phase arrest and apoptosis via the p53-dependent pathway [J]. Mar Drugs, 2019, 17(10): 572.
- [12] Xiang X, You X M, Li L Q. Expression of HSP90AA1/HSPA8 in hepatocellular carcinoma patients with depression [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11: 3013-3023.
- [13] 张 才, 朱仲玲, 阎 昭. EP300/CBP在肿瘤中的研究现状和进展 [J]. 天津医科大学学报, 2020, 26(5): 502-505.
Zhang C, Zhu Z L, Yan Z. Research status and progress of EP300/CBP in tumor [J]. J Tianjin Med Univ, 2020, 26(5): 502-505.
- [14] Pinyol R, Sia D, Llovet J M. Immune exclusion-wnt/CTNNB1 class predicts resistance to immunotherapies in HCC [J]. Clin Cancer Res, 2019, 25(7): 2021-2023.
- [15] Cao H, Chen X S, Wang Z J, et al. The role of MDM2-p53 axis dysfunction in the hepatocellular carcinoma transformation [J]. Cell Death Discov, 2020, 6: 53.
- [16] 张新宇, 安 输, 郭晓汐, 等. 生长因子受体结合蛋白2(Grb2)的生理功能 [J]. 中国细胞生物学学报, 2015, 37(7): 1029-1035.
Zhang X Y, An S, Guo X X, et al. Physiological function of growth factor receptor bound protein 2(Grb2) [J]. Chin J Cell Biol, 2015, 37(7): 1029-1035.
- [17] 阿卜杜米吉提·阿卜力孜. 维药补骨脂的肝毒性及机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.
Abulizi A. Study on the hepatotoxicity mechanism of traditional Uygur medicine *Psoralea corylifolia* [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University, 2018.
- [18] 宋晓玲, 李 峰, 崔光志. 补骨脂、生地黄对正常大鼠体

- 温及ATP酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(3): 160-162.
- Song X L, Li F, Cui G Z. Effect of psoraleae fructus and rehmanniae *Radix* on body temperature and ATPase activity in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2013, 19(3): 160-162.
- [19] 白慧媛, 俸 珊. 五味子乙素对氯氮平致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 药学报, 2017, 52(3): 390-396.
- Bai H Y, Feng S. Protection effects of schizandrin B against liver injury induced by clozapine in mice [J]. Acta Pharm Sin, 2017, 52(3): 390-396.
- [20] Zhou W, Chen X, Zhao G L, et al. Psoralen induced liver injury by attenuating liver regenerative capability [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1179.
- [21] Song G S, Sharma A D, Roll G R, et al. microRNAs control hepatocyte proliferation during liver regeneration [J]. Hepatology, 2010, 51(5): 1735-1743.
- [22] 黄 倩, 李京涛, 刘永刚, 等. mTOR 相关信号通路介导的自噬对肝损伤的调控作用 [J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(11): 2621-2625.
- Huang Q, Li J T, Liu Y G, et al. Regulatory effect of mTOR pathway-mediated autophagy in liver injury [J]. J Clin Hepatol, 2020, 36(11): 2621-2625.
- [23] Fortier M, Cadoux M, Boussetta N, et al. Hepatospecific ablation of p38 α MAPK governs liver regeneration through modulation of inflammatory response to CCl₄-induced acute injury [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 14614.

[责任编辑 刘东博]