

【实验研究】

基于网络药理学的不同方法炮制的何首乌肝毒性机制探讨及实验验证

高峰¹, 唐瑜¹, 张依娜¹, 邹远荣¹, 乔佳欣¹, 卫培峰^{2*}

1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046

2. 陕西中医药大学第二附属医院, 陕西 咸阳 712000

摘要: **目的** 基于网络药理学及实验验证探讨制首乌肝毒性的机制。**方法** 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、中医药整合药理学研究平台(TCMIP v2.0)收集制首乌的活性成分和作用靶点。通过GeneCards和OMIM数据库获取肝损伤相关的靶点。用Venny图筛选获得两者的共同靶标后,利用STRING数据库进行蛋白质相互作用(PPI)网络分析,用Cytoscape软件构建药物-成分-靶点网络,并且利用R语言进行基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集。利用体内实验进一步验证何首乌不同炮制品的肝毒性。**结果** 分别获取制首乌活性成分30个,肝毒性相关靶点527个,制首乌活性成分与肝损伤的共同靶点48个,包括JUN、MAPK1、CYP3A4等。KEGG通路分析筛选了135条相关信号通路,显示非酒精性脂肪肝通路和TNF信号通路等可能在制首乌肝毒性中起关键作用。体内实验表明,炮制后的何首乌肝毒性有效减轻,以九蒸九晒法效果最好。**结论** 制首乌肝毒性具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点,九蒸九晒法制首乌引起肝毒性的程度最轻。

关键词: 何首乌; 制首乌; 网络药理学; 肝毒性; 九蒸九晒

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2022)08-1522-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.009

Discussion and experimental verification of hepatotoxicity mechanism of *Polygonum multiflorum* processed by different methods based on network pharmacology

GAO Feng¹, TANG Yu¹, ZHANG Yina¹, ZOU Yuanrong¹, QIAO Jiaxin¹, WEI Peifeng²

1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

2. The Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflori Preparata* based on network pharmacology and experimental verification. **Methods** The active components and action targets of *Radix Polygoni Multiflori Preparata* were collected by using the systematic pharmacology analysis platform of traditional Chinese medicine (TCMSP), and the integrated pharmacology research platform of traditional Chinese medicine (TCMIP). Liver injury related targets were obtained through Genecards and OMIM databases. After the common targets were screened by Venny diagram, PPI analysis was carried out by STRING database, the drug-component-target network was constructed by Cytoscape software, and GO enrichment analysis and KEGG pathway analysis were carried out by R language. Finally, the above results were further verified by *in vivo* experiments. **Results** 30 active components of *Radix Polygoni Multiflori Preparata*, and 527 hepatotoxicity related targets were obtained, and 48 common targets of *Radix Polygoni Multiflori Preparata* and liver injury were collected, including JUN, MAPK1, CYP3A4, etc. KEGG pathway analysis screened 135 related signal pathways, indicating that nonalcoholic fatty liver pathway and TNF signal pathway may play a key role in the hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflori Preparata*. *In vivo* experiments showed that processed *Radix Polygoni Multiflori* could effectively reduce the hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflori*, and the effect of processing of steamed for nine times and shined for nine times was the best. **Conclusion** Hepatotoxicity of *Radix Polygoni*

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81373988); 陕西省科技厅青年项目(2021JQ-728)

第一作者: 高峰(1982—), 女, 博士, 副教授, 从事中药药性理论研究。E-mail: 7204612@qq.com

*通信作者: 卫培峰, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事中药药性理论与中药新药临床研究。E-mail: peifeng_ad@163.com

Multiflora Preparata has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel synergy, which provides a theoretical basis for the further study of the complex mechanism of hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflora*.

Key words: *Polygonum multiflorum* Thunb.; *Radix Polygoni Multiflora Preparata*; network pharmacology; liver toxic; steamed for nine times and shined for nine times

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根。何首乌可分为生首乌和制首乌,功效性能亦有所不同,生首乌性平,味甘、苦,可解毒、消痈、截疟、润肠通便。制首乌性微温,味甘、苦,有补肝肾、强筋骨、益精血、乌须发、化浊降脂之功^[1-2]。近年来有关何首乌肝毒性的报道屡见不鲜^[3],国家食品药品监督管理局也多次发文提醒口服何首乌有发生肝损伤的风险,提醒广大医患对此应保持警惕,注意合理用药。何首乌炮制后肝毒性较生首乌下降,其作用机制有待进一步研究。

网络药理学是建立在药物-靶点-疾病多层次的网络基础上的新兴领域,其主要从多种靶点的相互作用来研究疾病的治疗,广泛用于医学领域^[4]。网络药理学可以与药物靶点筛选结合以便于寻找具有治疗价值的活性成分化合物,也可将中药质量标志物与化学成分分析相结合进行质量控制。中药复方制剂复杂的化学成分和分子机制在治疗疾病方面具有非常大的优势,因其针对于疾病的多种细胞过程,通常被认为是治疗复杂疾病的有效方法^[5]。中药治疗疾病的多靶点、多通路的特点与网络药理学的应用优势是一致的。因此,本研究采用网络药理学研究方法,构建药物-成分-靶点网络,通过基因本体论(GO)富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析和体内实验验证进一步研究制首乌肝毒性的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

中药系统药理学数据库与分析平台^[6](TCMSP, <https://tcmisp.com/tcmisp>)、中医药整合药理学研究平台 TCMIP v2.0^[7]、OMIM 数据库^[8](<https://omim.org/>)、Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)、网络拓扑数据分析软件 Cytoscape 3.7.1^[9], 蛋白质相互作用(PPI)平台 STRING 11.0^[10](<https://string-db.org/>)、R 4.1.0 软件及 Win 11 操作系统。

1.2 制首乌主要活性成分的筛选及作用靶点预测

制首乌采用黑豆汁制法进行炮制,采用 TCMSP(<https://tcmisp.com/tcmisp>)平台,以口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18为条件筛

选黑豆的主要活性成分。采用 TCMIP v2.0 筛选何首乌的主要活性成分。黑豆只作为炮制何首乌的一种必要的原材料,与何首乌炮制后是否产生新的活性成分,文献报道较少,故不纳入靶点考虑。将黑豆靶点与何首乌靶点合并即为制首乌的靶点。将 TCMSP、TCMIP 数据库中的靶点与 Uniprot 数据库进行匹配,从而得到靶点的基因名称。

1.3 疾病作用靶点预测

以“Liver toxic”为关键词在 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)、Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)搜索相关基因靶点,整合成肝损伤的疾病靶点,并用 Venny 图取制首乌靶点和肝毒性靶点的交集。

1.4 制首乌药物-疾病-靶点网络构建

Cytoscape 是一款图形化显示网络并进行分析和编辑的软件,可以利用自身以及第3方开发的大量功能插件针对网络问题进行深入分析。将“1.2”和“1.3”项得到的数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,构建制首乌药物-疾病-靶点网络。

1.5 靶标 PPI 网络的构建与核心靶点的筛选

在网络药理学研究中,STRING 数据库通常被应用于构建靶标蛋白之间的 PPI 网络。将 Venny 图处理后的肝毒性与制首乌成分的交集靶点去重后导入到 String 数据库中,设置 Organism 为“homo sapiens”后进行搜索,将基因数据取最高置信度(score≥0.9),处理好的数据导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,利用软件自带的 Network Analysis 插件进行网络拓扑分析,构建 PPI 网络并筛选核心靶点。

1.6 药物与疾病共有靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

运用 R 4.1.0 软件对肝毒性与制首乌成分交集靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,并对分析结果进行可视化处理。

1.7 实验验证

1.7.1 药物与试剂 何首乌原药材饮片购自陕西兴盛德药业公司,产地为四川,批号 20190322,由陕西中医药大学胡本祥教授鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根。黑豆购自咸阳市人人乐超市,批号:20190128。不同炮制工艺

制首乌参照《本草纲目》对何首乌采用九蒸九晒法炮制^[1]；制首乌药材饮片(批号:20210201)购自陕西兴盛德药业公司,主要产地为四川,为药典法清蒸制炮制品[药典制首乌,按照《中国药典》2020年版黑豆汁(取黑豆1 kg,加入8倍水,煮制4 h,滤过,黑豆汁滤液备用;豆渣再加水6倍,煮制3 h,滤过,合并滤液,浓缩至1.5倍量)伴蒸(100 kg何首乌用黑豆10 kg)进行炮制^[1]],由陕西中医药大学胡本祥教授鉴定,符合药典描述,炮制合格;雷公藤多苷片(批号:20210228,购自远大医药黄石飞云制药有限公司)。总胆红素(TBIL)试剂盒(批号:20210387)、直接胆红素(DBIL)试剂盒(批号:20210623),均购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.7.2 实验动物 雄性SD大鼠72只,体重(250±20)g,购自成都达硕实验动物有限公司,许可证号:SCXK(川)2015-030,动物实验经陕西中医药大学伦理委员会批准(SUCMDL202106250122)。

1.7.3 何首乌致大鼠肝损伤模型的建立 72只雄性SD大鼠适应性饲养1周后,随机分为9组,每组8只,即对照组,阳性药(雷公藤多苷片)组和试验药物组(生首乌组、药典制首乌组及一蒸一晒、三蒸三晒、五蒸五晒、七蒸七晒、九蒸九晒制首乌组),试验药物组分别ig相应水煎液5 mL·kg⁻¹(水煎液成分较为复杂,未进行成分分析,剂量为生药量2 g·kg⁻¹,相当于临床70 kg成年人日用量的6倍)。阳性对照组ig由0.9%氯化钠溶液配成的雷公藤多苷片悬浮液,对照组ig相应体积0.9%氯化钠溶液,每日1次,连续给药12周,即建立何首乌致肝损伤模型。末次给药后,大鼠禁食不禁水12 h,麻醉大鼠,腹主动脉取血后,3 000 r·min⁻¹离心10 min,各组进行分装并且标记,-20℃保存备用。取肝脏,称质量,然后用配好的10%甲醛溶液固定,冷藏保存。

1.7.4 血清生化指标和肝脏组织病理学检测 取-20℃保存的血清,常温解冻后按照DBIL、TBIL试剂盒操作步骤使用酶标仪进行检测,记录数据。另剪取小块肝脏组织,流水冲洗24~48 h;30%、50%乙醇先后分别浸泡1 h,75%乙醇浸泡过夜;95%乙醇浸泡2次,每次30 min,用1:1配制的无水乙醇和二甲苯溶液浸泡15 min,最后二甲苯浸泡2次,每次15 min;将脱水、透明过后的组织块放入60℃温箱中浸蜡80 min;石蜡包埋过后用切片机制片,展片捞片,烘干。制好的组织切片用HE染色试

剂盒,按步骤染色,在显微镜下观察并拍照。

1.7.5 数据处理 采用SPSS 22.0软件进行分析处理,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示(当 $P < 0.05$ 时有统计学差异)。采用灰色关联度分析生首乌组及一蒸一晒、三蒸三晒、五蒸五晒、七蒸七晒、九蒸九晒制首乌组的DBIL、TBIL数据,评价各组致肝损伤的程度。

2 结果

2.1 药物靶点筛选结果

在TCMSP数据库中检索黑豆的活性成分,按照 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的标准筛选黑豆活性成分13个,活性成分对应靶点151个。在TCMIP数据库中检索到何首乌的活性成分15个,活性成分对应靶点396个,其中,槲皮素和二苯乙烯苷虽未收录到数据库中,但因其具有十分重要的研究意义,也将其补充到靶点成分中,槲皮素和二苯乙烯苷对应的靶点均为100个,将潜在靶标导入Uniprot数据库进行基因名称的校正,经过整合去重后得到药物的主要作用靶点共294个,并纳入分析。

2.2 疾病靶点的筛选结果及制首乌致肝损伤的有效靶点的确定

在Genecards数据库、OMIM数据库中筛选肝毒性的活性靶点527个,将制首乌的靶点与肝毒性靶点整理后采用Venny图取交集,得到制首乌致肝损伤的有效靶点48个。

2.3 制首乌药物-疾病-靶点网络构建结果

将“2.1”项得到的制首乌30个成分和制首乌-肝损伤48个交集靶点导入Cytoscape 3.7.1中,构建制首乌药物-疾病-靶点网络,并进行网络拓扑分析,结果如图1,该网络共有83个节点,162条边。Network Analyzer功能分析显示该网络中度(degree)值排名前10的成分见表1。

2.4 PPI网络的构建结果

通过String数据库分析48个映射得到的交集靶点,将数据进行分析之后导入Cytoscape 3.7.1软件,构建预测制首乌肝毒性相关靶点PPI网络,见图2,图中颜色越深,面积越大,表示靶点度值越大,在网络中越重要。该网络共有47个节点,288条边,用软件自带的Network Analysis插件进行网络拓扑分析,中间中心性(BC)平均值为0.020,接近中心性(CC)平均值为0.533,度值平均值为12.255。利用Cytoscape 3.7.1软件对PPI网络进行分析,对度值排名前10位的靶点进行可视化处理,见图3。

2.5 GO注释与KEGG基因通路富集分析结果

GO功能富集分析结果显示,47个潜在作用靶

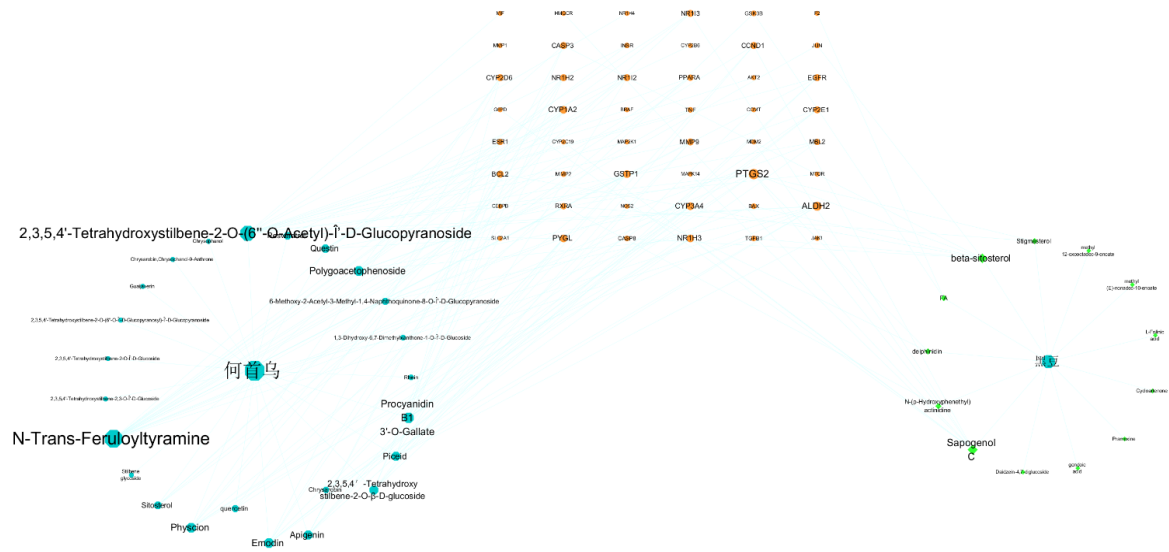


图1 制首乌肝毒性药物-疾病-靶点网络

Fig. 1 Drug-disease-target network of hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflori Preparata*

表1 制首乌肝毒性药物-疾病-靶点网络度值排名前10的成分信息

Table 1 Information of the top ten component in degree value of drug-disease-target network of hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflori Preparata*

成分名称	度值
N-反式阿魏酰酪胺(<i>N-trans-feruloyltyramine</i>)	99
2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2,3-O-β-D-葡萄糖苷(2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2,3-O-β-D-glucoside)	62
原花青素B1 3'-O-没食子酸酯(<i>procyanidin B1 3'-O-gallate</i>)	52
皂苷元C(<i>sapogenol C</i>)	40
β-谷甾醇(<i>beta-sitosterol</i>)	38
虎杖苷(<i>piceid</i>)	32
豆甾醇(<i>stigmasterol</i>)	31
大黄素甲醚(<i>physcion</i>)	22
大黄酸(<i>rhein</i>)	22
谷甾醇(<i>sitosterol</i>)	21

点经过 R 语言运行后得到 1 374 条生物过程(biological process, BP), 21 条细胞组成(cellular component, CC) 和 69 条分子功能(molecular function, MF), 将部分条目可视化, 如图4。BP 主要包括对脂多糖的反应、对细菌源性分子的反应、对类固醇激素的反应、脂肪酸代谢过程、肌细胞增殖、类固醇代谢过程、外源性药物分解代谢过程、平滑肌细胞增殖的调控、平滑肌细胞增殖、活性氧代谢过程的调控等; MF 主要包括核受体活性、配体激活转录因子活性、类固醇激素受体、氧化还原酶活性, 作用于成对供体, 结合或还原分子氧, 还原黄素或黄素蛋白作为一个供体, 并结合一个氧原子、类固醇羟化酶、血红素结合、四吡咯结合、单加氧酶活性等; CC 主要包括 RNA 聚合酶 II 转录调节复合物、转

录调节复合物、膜筏、膜微区、富含 ficolin-1 颗粒、富含 ficolin-1 颗粒腔、膜区等。

KEGG 通路富集分析显示, 制首乌肝毒性的相关通路共 117 条, 将 $P < 0.05$ 的通路可视化, 如图5所示, 主要包括内分泌抵抗、非酒精性脂肪肝、大肠癌、丙型肝炎、乙型肝炎、癌症中的蛋白多糖、前列腺癌、脂质与动脉粥样硬化、化学致癌-受体激活、IL-17 信号通路、人巨细胞病毒感染、胰岛素抵抗、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、肿瘤坏死因子信号通路、松弛素信号通路、膀胱癌、肺结核、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染等通路。

2.6 实验研究结果

2.6.1 何首乌不同炮制品对大鼠肝脏指数的影响

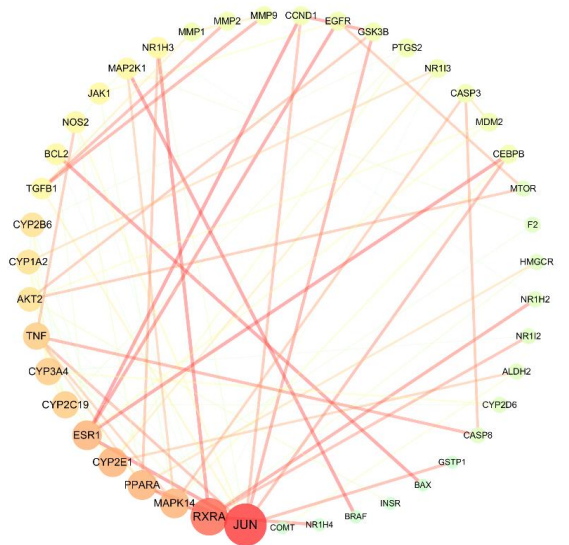


图2 制首乌肝毒性靶点PPI网络
Fig. 2 PPI network of hepatotoxicity targets of *Radix Polygoni Multiflora Preparata*

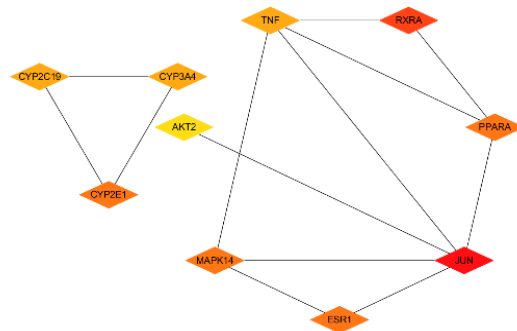


图3 制首乌肝毒性的核心靶点(度值前10位)
Fig. 3 Core targets of hepatotoxicity of *Radix Polygoni Multiflora Preparata* (top 10 in degree value)

实验结果表明,与对照组比较,其他组肝脏指数未见明显增加,九蒸九晒制首乌组肝脏指数显著增加($P < 0.01$);与生首乌组比较,九蒸九晒制首乌组及雷公藤多苷组肝脏指数显著增加($P < 0.05$ 、 0.01),见表2。

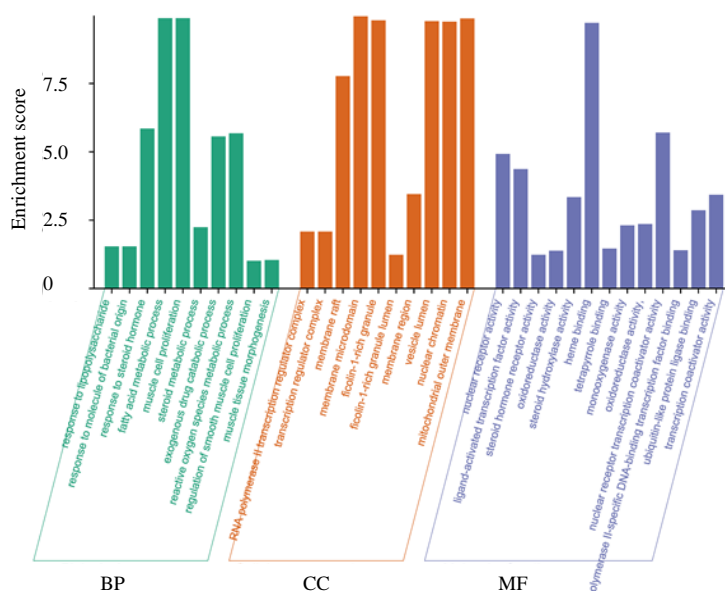


图4 制首乌肝毒性靶点的GO富集分析
Fig. 4 Go enrichment analysis of hepatotoxicity targets of *Radix Polygoni Multiflora Preparata*

2.6.2 肝脏病理检测结果 肝脏病理切片在光镜下观察发现,对照组肝细胞结构完整,无炎细胞浸润、肝细胞变性,间质未见炎症细胞浸润,肝组织结构清晰完整;生首乌组可见肝细胞有胞浆淡染、水样变性、水肿以及局部炎细胞浸润;制首乌组可见肝细胞有少量脂肪变性;雷公藤多苷组部分肝细胞可见胞浆疏松,轻度变性;一蒸一晒制首乌组和三蒸三晒制首乌组可见肝细胞有胞浆淡染、水样变性以及水肿;五蒸五晒制首乌组可见肝细胞有胞浆淡

染、水样变性;七蒸七晒制首乌组可见肝细胞有脂肪变性以及出血;九蒸九晒制首乌组可见肝细胞有少量脂肪变性,见图6。

2.6.3 何首乌不同炮制品对大鼠血清DBIL、TBIL水平的影响 TBIL、DBIL是反映肝功能的重要指标,是临床上常被用来检测肝损伤的指标^[12],肝脏是胆汁的分泌器官,如果肝脏发生病变,肝脏转变胆红素的能力会下降,进而导致血液中DBIL的升高,相反的,如果TBIL、DBIL升高,也从侧面反映出

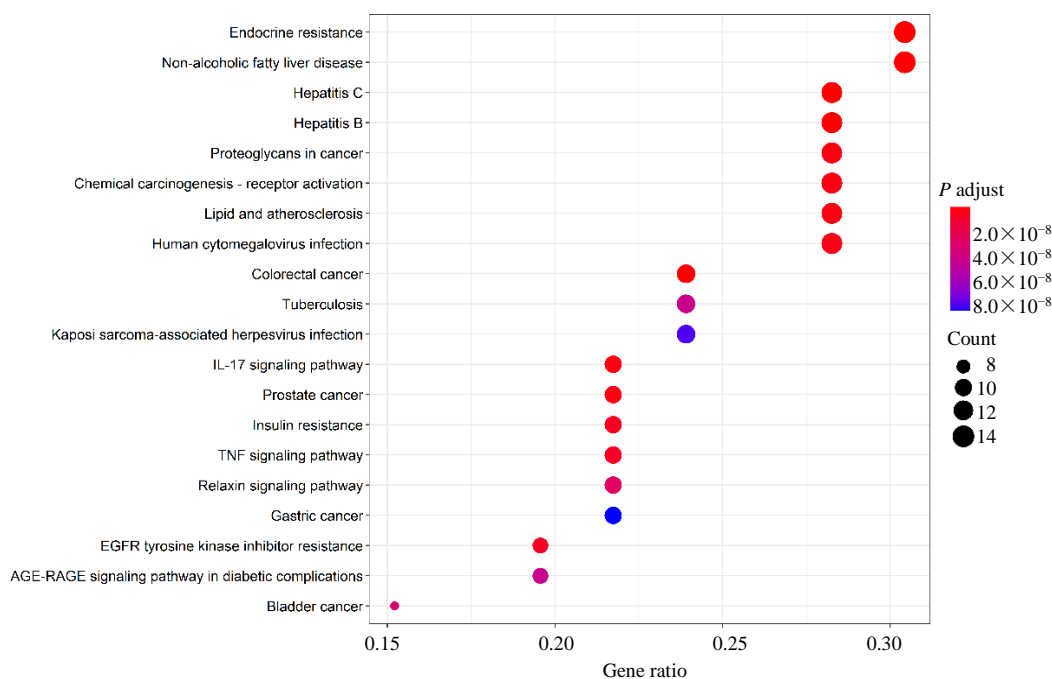


图5 制首乌肝毒性的KEGG通路分析

Fig. 5 Analysis of KEGG pathway of hepatotoxicity targets of *Radix Polygoni Multiflori Preparata*

表2 何首乌不同炮制品对大鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 2 Effects of different processed products of *Radix Polygoni Multiflori* on liver index in rats ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	体质量/g	肝质量/g	肝脏指数/%
对照	346±9	8.96±0.30	2.59±0.04
雷公藤多苷	332±39	9.08±1.13	2.73±0.14 [△]
药典法制首乌	322±15	8.11±0.63	2.51±0.15
生首乌	332±31	8.31±1.10	2.49±0.15
一蒸一晒制首乌	323±36	8.16±0.69	2.53±0.14
三蒸三晒制首乌	340±30	8.95±0.71	2.64±0.19
五蒸五晒制首乌	323±26	8.10±0.89	2.50±0.11
七蒸七晒制首乌	328±30	8.20±0.80	2.50±0.10
九蒸九晒制首乌	342±36	9.28±1.03	2.72±0.06 ^{**△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与生首乌组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs *Polygoni Multiflori Radix* group

肝脏发生了不同程度的病变^[13]。实验结果显示,随着蒸晒次数的增多,对应的制首乌组的TBIL、DBIL水平逐渐降低。与对照组比较,雷公藤多苷组、生首乌组、一蒸一晒制首乌组、三蒸三晒制首乌组、五蒸五晒制首乌组、七蒸七晒制首乌组的TBIL水平显著升高($P < 0.05, 0.01$),所有试验组的DBIL水平均显著升高($P < 0.05, 0.01$);与生首乌组比较,雷公藤多苷组、七蒸七晒制首乌组、九蒸九晒制首乌组的TBIL水平显著降低($P < 0.05, 0.01$),九蒸九晒制首乌组

DBIL水平显著降低($P < 0.05$),结果见表3。

2.6.4 何首乌不同炮制品肝脏血清化学指标间的关联系数、关联度和关联序 以对照组的肝脏血清化学指标做为参考序列,将相对于对照组关联度最大者定义为最佳,即致肝损伤程度最低。根据关联度的大小,确定不同蒸晒次数制首乌贡献值大小为九蒸九晒制首乌组 > 七蒸七晒制首乌组 > 三蒸三晒制首乌组 > 五蒸五晒制首乌组 > 一蒸一晒制首乌组 > 生首乌组。结果表明,九蒸九晒制首乌具有较高的关联度,致肝损伤程度最低,结果见表4。

3 讨论

何首乌作为与灵芝、人参、冬虫夏草齐名的“四大仙草”之一,具有很强的补益作用和悠久的历史^[15]。黑豆汁炮制何首乌最早记载于唐代《仙授理伤续断秘方》中的“用黑豆酒煮七次”^[16]。而“九蒸九晒炮制法”则首次出现在《太平圣惠方》,之后经众人不断加以完善而日益成为炮制何首乌的主要手段。何首乌作为临床常见的补益药,其化学成分众多,目前已分离得到二苯乙烯苷、蒽醌类、黄酮类、没食子酸等诸多化学成分,已有研究表明,蒽醌类鞣质等成分具有一定的致肝损伤作用^[17-18]。本研究采用网络药理学方法对何首乌致肝损伤的主要靶点进行梳理,从分子水平层面分析何首乌致肝损伤的相关机制,旨在揭示何首乌致肝损伤“多成分

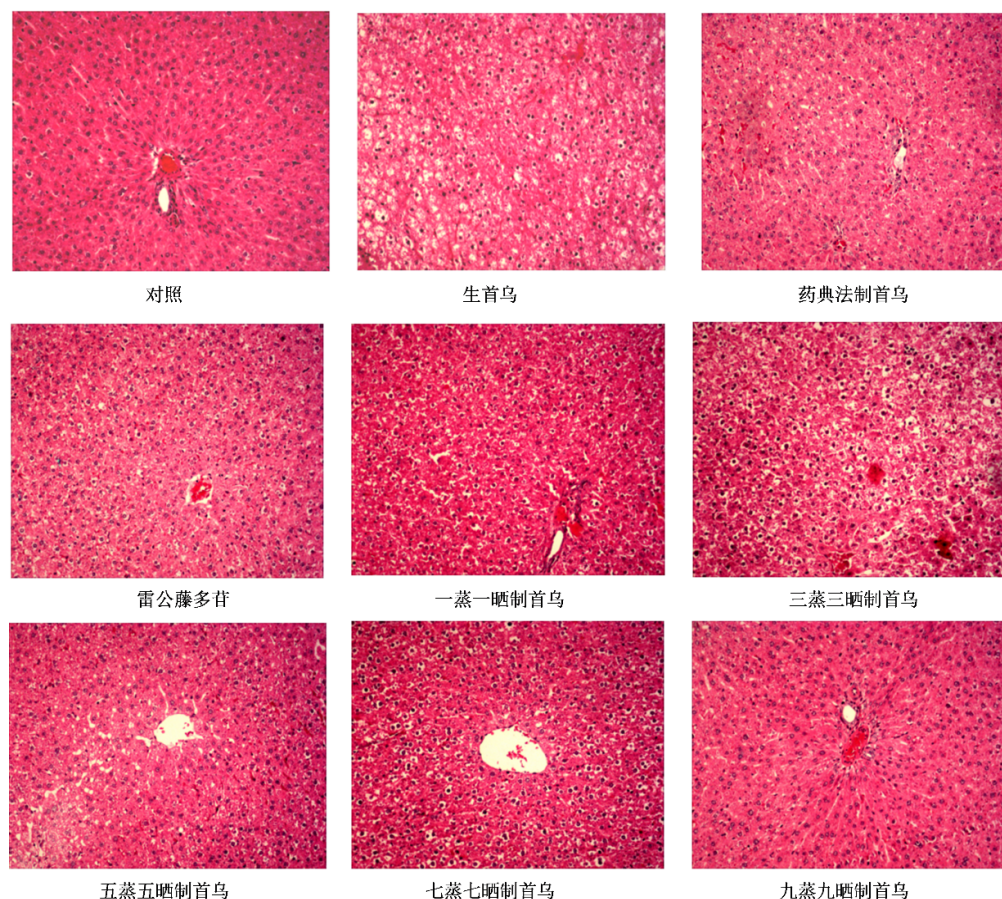


图 6 何首乌不同炮制品致大鼠肝脏损伤病理观察结果(HE,×100)

Fig. 6 Pathological result of liver injury in rats caused by different processed products of *Radix Polygoni Multiflori Preparata* (HE, × 100)

表 3 何首乌不同炮制品对大鼠血清DBIL、TBIL的影响
($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effects of different processed products of *Radix Polygoni Multiflori Preparata* on serum DBIL and TBIL in rats ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TBIL/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	DBIL/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	1.56±0.07	0.91±0.17
雷公藤多苷	3.26±0.68** Δ	2.83±0.68**
药典法制首乌	3.94±2.04	2.70±1.01*
生首乌	5.98±1.30**	3.81±0.87**
一蒸一晒制首乌	6.32±3.24*	2.95±2.75**
三蒸三晒制首乌	4.62±2.32*	2.75±0.99*
五蒸五晒制首乌	4.28±1.92*	2.69±1.09*
七蒸七晒制首乌	3.60±0.78* Δ	2.64±0.52**
九蒸九晒制首乌	2.24±0.74 $\Delta\Delta$	2.37±0.78* Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与生首乌组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs *Polygoni Multiflori Radix* group

表 4 何首乌不同炮制品肝损伤指标之间的关联系数、关联度和关联序

Table 4 Correlation coefficient, correlation degree and correlation order between liver injury indexes of different processed products of *Radix Polygoni Multiflori Preparata*

组别	关联系数 ^[14]		关联度	关联序
	TBIL	DBIL		
生首乌	0.467	0.385	0.474	6
一蒸一晒制首乌	0.480	0.582	0.446	5
三蒸三晒制首乌	0.572	0.510	0.613	3
五蒸五晒制首乌	0.519	0.611	0.606	4
七蒸七晒制首乌	0.687	0.527	0.676	2
九蒸九晒制首乌	0.576	0.800	0.942	1

多靶点-多通路”的特点。

PPI 网络分析也显示 JUN、CYP2E1、CYP3A4、CYP2C19 等基因在 PPI 网络中作用显著。JUN 家族中的 c-JUN 是 JNK 的底物原型,也是 JNK 通路的重要组成部分,在细胞增殖与分化过程中扮演着重要的角色, JNK 通路 与氧化应激密不可分,研究发现,

氧化应激会激活 JNK 通路,导致肝细胞凋亡异常,肝细胞凋亡异常则会导致急性肝损伤^[19-20]。研究证明,何首乌中所含的蒽醌类成分如大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚等是致肝损伤的主要成分^[21]。大黄素可明显提高 CYP450 各亚型 mRNA 的表达,可以随剂量的增加而逐渐诱导 CYP1A1、CYP1B1 的表达,对人体正常的肝细胞具有非常明显的损伤作用^[22]。何首乌水提物中的大黄素、大黄素甲醚等活性成分均可抑制 CYP1A2 的表达,因此,推测何首乌致肝损伤的主要成分与 CYP1A2 等 CYP450 酶的表达相关。

KEGG 富集分析显示,何首乌致肝损伤主要涉及到非酒精性脂肪肝通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路等。代谢相关脂肪性肝病(MAFLD)是指无过量饮酒和其他已知肝损伤因素存在的情况下,超过 5% 的肝细胞发生脂肪变性,包括一系列疾病:非酒精性脂肪肝(NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎(NASH)、纤维化和肝硬化^[23]。IL-17 是一个重要的促炎症细胞因子,在多种炎症反应及自身免疫性疾病病理过程中发挥关键作用^[24]。IL-17 信号通路与肝细胞的凋亡和自噬相关,激活 IL-7 信号通路可进一步诱导肝细胞凋亡和自噬,最终损害肝细胞和肝功能^[25]。制首乌致肝损伤还有一条重要的信号通路就是 TNF 信号通路,TNF 作为通路中的关键核心靶点,通常被认为是炎症反应的关键调节因子,炎症反应对肝脏呈“双向调节”作用,即可能有益,也可能有害,这取决于多种因素。轻度炎症反应可对肝脏有持续的保护作用,有助于组织修复并促进体内平衡的重建。但过度的炎症可导致肝细胞大量丢失,从而加剧各种肝脏疾病的严重性,包括缺血再灌注损伤、全身代谢改变,与不可逆的肝损伤、纤维化和癌变有关^[26-27]。

实验验证结果也表明,生首乌组及一蒸一晒、三蒸三晒、五蒸五晒、七蒸七晒、九蒸九晒制首乌组的 TBIL、DBIL 水平逐渐降低,可见随着九蒸九晒炮制法蒸晒次数的增加,制首乌对大鼠肝脏的损伤是逐渐减弱的,综上可知,九蒸九晒炮制法炮制的何首乌造成的肝毒性与炮制次数即蒸晒次数关系紧密,肝毒性总体呈现降低趋势,可知九蒸九晒法对何首乌减毒效果最好。

综上所述,制首乌肝毒性的机制可能是通过多个靶点作用于不同的通路来进行调节的,本研究采用了网络药理学的计算机模拟手段推测了制首乌肝毒性的潜在作用靶点与潜在的作用机制,采用 ig

水煎液制备大鼠肝毒性模型,检测了动物组织的相关指标,验证网络药理学预测的制首乌的肝毒性通路以及靶点之间的相关结果,为后续进一步通路验证奠定了理论基础。结果表明,九蒸九晒炮制方法可有效减轻制首乌的肝毒性,以九蒸九晒法效果最好。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020. Pharmacopoeia of The People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [2] 钟赣生. 中药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012. Zhong G S. *Chinese Medicine* [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2012.
- [3] 王婉茹, 洪滨, 单国顺. 何首乌肝毒性作用机制的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2020, 35(2): 378-382. Wang W R, Hong B, Shan G S. Research progress on mechanism of hepatotoxicity of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. *Drugs Clin*, 2020, 35(2): 378-382.
- [4] 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): 4119-412. Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(14): 4119-412.
- [5] Luo T T, Lu Y, Yan S K, et al. Network pharmacology in research of Chinese medicine formula: Methodology, application and prospective [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26(1): 72-80.
- [6] Ru J L, Li P, Wang J N, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [7] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, et al. ETCM: an encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [8] Amberger J S, Bocchini C A, Scott A F, et al. OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1038-D1043.
- [9] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [10] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(d1): D607-D613.

- [11] 李时珍. 本草纲目 [M]. 昆明: 云南人民出版社, 2011.
Li S Z. *Compendium of Materia Medica* [M]. Kunming: Yunnan People's Publishing House, 2011.
- [12] 全云云, 刘美辰, 周忆梦, 等. 何首乌肝毒性物质基础研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(9): 2007-2012.
Quan Y Y, Liu M C, Zhou Y M, et al. Investigation on hepatotoxicity material basis of *Polygoni Multiflori Radix* [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2018, 45(9): 2007-2012.
- [13] 孙 强. 生化检验项目对肝硬化的诊断价值分析 [J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(20): 36-38.
Sun Q. Analysis of the value of biochemical test items in the diagnosis of cirrhosis [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2021, 15(20): 36-38.
- [14] 谭学瑞. 医学灰关联理论方法与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2019.
Tan X R. *Method and Application of Medical Grey Correlation Theory* [M]. Beijing: Science Press, 2019.
- [15] 李钟琴. 中药"四大仙草"的真相 [J]. 健康管理, 2014(6): 17-19.
Li Z Q. The truth of Chinese medicine "four immortals" [J]. Heal Manag, 2014(6): 17-19.
- [16] 藺道人. 仙授理伤续断秘方·正体类要 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
Iris T R. *Xian Shu Li Shang Dipsacus Secret Formula Body Class* [M]. Beijing: People's Health Publishing House, 2006.
- [17] 孙向红, 孙玉维, 李 红, 等. 何首乌主要成分大黄素、大黄酸和二苯乙烯苷对肝细胞、肝癌细胞的影响 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(11): 1315-1317, 1319.
Sun X H, Sun Y W, Li H, et al. Influence of main component of Heshouwu such as emodin, Rhein and toluylene glycoside on hepatic cells and hepatoma carcinoma cell [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2010, 19(11): 1315-1317, 1319.
- [18] 吴 双. 何首乌水提物及EG大鼠肝微粒体代谢成分分析及肝细胞毒研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2017:92.
Wu S. Analysis of metabolic components of *Polygonum multiflorum* Thunb. aqueous extract and EG rat liver microsomes and study on liver cytotoxicity [D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2017: 92.
- [19] 袁 果, 叶倩伶, 冯 逢, 等. 基于JNK/c-Jun与p38MAPK信号通路的肝再生调控的双向平衡 [J]. 广西医学, 2021, 43(11): 1364-1366.
Yuan G, Ye Q L, Feng F, et al. Bidirectional balance of liver regeneration regulation based on JNK/c-Jun and p38MAPK signaling pathways [J]. Guangxi Med J, 2021, 43(11): 1364-1366.
- [20] 卢任玲, 金 蓉, 张子英, 等. 红花清肝十三味丸通过抑制JNK/c-Jun信号通路减轻大鼠急性肝损伤的研究 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 21-26.
Lu R L, Jin R, Zhang Z Y, et al. Honghua qinggan Shisanwei pill alleviates acute liver injury in rats by inhibiting JNK/c-Jun signaling pathway [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(3): 21-26.
- [21] 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]. 药学报, 2009, 44(8): 885-890.
Wang J B, Ma Y G, Zhang P, et al. Effect of processing on the chemical contents and hepatic and renal toxicity of rhubarb studied by canonical correlation analysis [J]. Acta Pharm Sin, 2009, 44(8): 885-890.
- [22] 汪美汐, 王宇光, 徐焕华, 等. 何首乌中大黄素对L02肝细胞CYP亚酶表达及细胞毒性的影响 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(11): 1543-1548.
Wang M X, Wang Y G, Xu H H, et al. Effects of emodin in *Polygonum multiflorum* on liver cytotoxicity and CYP450 isoenzymes expression in L02 cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(11): 1543-1548.
- [23] Maurice J, Manousou P. Non-alcoholic fatty liver disease [J]. Clin Med (Lond), 2018, 18(3): 245-250.
- [24] Qu F F, Gao H C, Zhu S, et al. TRAF6-dependent Act1 phosphorylation by the I κ B kinase-related kinases suppresses interleukin-17-induced NF- κ B activation [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(19): 3925-3937.
- [25] Zhao Y F, Li Y Y, Wang J M, et al. Fluoride induces apoptosis and autophagy through the IL-17 signaling pathway in mice hepatocytes [J]. Arch Toxicol, 2018, 92(11): 3277-3289.
- [26] Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation [J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 583-94.
- [27] Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, et al. Decoding cell death signals in liver inflammation [J]. J Hepatol, 2013, 59(3): 583-594.

[责任编辑 刘东博]