

基于斑马鱼模型和加权网络毒理学的补骨脂挥发油肝毒性评价及毒性机制

陶亚茹¹, 庄秀萍¹, 程雪纯¹, 李思捷¹, 高宏达¹, 王书敬², 王 信², 傅春升^{2*}, 马传江^{2*}

1. 山东中医药大学 药学院, 山东 济南 250355

2. 山东中医药大学附属医院 药学部, 山东 济南 250011

摘要: **目的** 评价补骨脂挥发油的肝毒性作用并分析其潜在毒性机制。**方法** 采用肝脏具特异性荧光的 Tg (fabp10:EGFP) 转基因斑马鱼模型评价补骨脂挥发油对肝脏形态、荧光强度、生化指标及组织病理的影响; 利用气相色谱-质谱 (GC-MS) 对补骨脂挥发油化学成分进行系统表征; 通过成分占比和分子对接毒性系数加权, 运用网络毒理学策略筛选补骨脂挥发油肝毒性的核心靶点, 并利用基因本体 (GO) 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析其可能的毒性机制, 通过构建“药物-成分-靶点-通路”网络筛选出补骨脂挥发油潜在的肝毒性成分和靶点; 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法对相关核心靶点进行验证。**结果** 补骨脂挥发油可显著降低斑马鱼肝脏荧光面积及强度 ($P < 0.001$), 显著增加丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 和丙二醛 (MDA) 水平 ($P < 0.05$), 降低谷胱甘肽 (GSH) 水平 ($P < 0.001$), 并诱导肝细胞核萎缩、空泡化等病理损伤; GC-MS 共鉴定出补骨脂挥发油的 55 种成分, 以萜类化合物为主, 其中 42 种为首次从补骨脂中报道; 加权网络毒理学共筛选出细胞色素 P450 3A4 酶 (CYP3A4)、周期蛋白依赖性激酶 (CDK1)、热休克蛋白 90 α 型 1 (HSP90AA1)、低氧诱导因子 1A (HIF1A)、磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸 3-激酶催化亚基 α (PIK3CA) 5 个与补骨脂挥发油肝毒性相关的核心靶点, 毒性机制与细胞衰老、自噬、HIF-1 信号通路等相关, 氧化石竹烯、(-)-顺式-桃金娘醇、蓝桉醇等成分为补骨脂挥发油中潜在的肝毒性成分; qRT-PCR 结果显示补骨脂挥发油处理后斑马鱼中 CDK1、HIF1A 基因表达显著增加 ($P < 0.001$), PIK3CA 基因表达显著减少 ($P < 0.001$)。**结论** 补骨脂挥发油具有一定的肝毒性, 其机制与调控核心靶点、干预相关信号通路及毒性成分介导有关。

关键词: 补骨脂挥发油; 肝毒性; 斑马鱼模型; GC-MS; 加权网络毒理学; 氧化石竹烯; (-)-顺式-桃金娘醇; 蓝桉醇

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)03-0873-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.03.013

Hepatotoxicity evaluation and toxicity mechanism analysis of *Psoralea corylifolia* volatile oils based on zebrafish model and weighted network toxicology

TAO Yaru¹, ZHUANG Xiuping¹, CHENG Xuechun¹, LI Sijie¹, GAO Hongda¹, WANG Shujing², WANG Xin², FU Chunsheng², MA Chuanjiang²

1. School of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250011, China

Abstract: Objective To evaluate the hepatotoxicity of *Psoralea corylifolia* volatile oil and analyze its potential toxicity mechanism.

Methods The liver-specific fluorescent Tg (fabp10:EGFP) transgenic zebrafish model was employed to evaluate the effects of *P. corylifolia* volatile oil on liver morphology, fluorescence intensity, biochemical indicator and histopathology. GC-MS was utilized for systematic characterization of the chemical constituents in *P. corylifolia* volatile oil. By weighting the toxicity coefficients of components and molecular docking, the core targets of *P. corylifolia* volatile oil hepatotoxicity were screened using the network toxicology strategy, and the possible toxicity mechanisms were investigated with Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. Based on the “drug-component-target-pathway” network, the potential toxicity components and targets of *P. corylifolia* volatile oil were screened. qRT-PCR method was used to verify the relevant core

收稿日期: 2025-08-06

基金项目: 山东省中医药科技项目 (Z-2023005T)

作者简介: 陶亚茹, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制与药效评价。E-mail: 15910199427@163.com

*通信作者: 傅春升, 男, 教授, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药新药及质量控制研究。E-mail: yfuchunsheng@163.com

马传江, 男, 教授, 主任药师, 硕士生导师, 研究方向为中药质量控制与炮制原理研究。E-mail: mcj77777@163.com

targets. **Results** *P. corylifolia* volatile oil significantly reduced the area and intensity of liver fluorescence ($P < 0.01$), increased alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and malondialdehyde (MDA) levels ($P < 0.05$), decreased glutathione (GSH) levels ($P < 0.001$), and induced pathological damage such as liver cell nuclear atrophy and vacuolation. A total of 55 components of *P. corylifolia* volatile oil were identified by GC-MS, and terpenoids were the main components, of which 42 were reported from *P. corylifolia* for the first time. Five core targets, Cytochrome P450 3A4 enzyme (CYP3A4), cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), heat shock protein 90 alpha type 1 (HSP90AA1), hypoxia-inducible factor 1A (HIF1A), and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), related to the hepatotoxicity of *P. corylifolia* volatile oil were screened from weighted network toxicology. The toxic mechanism was related to cellular senescence, autophagy, HIF-1 signaling pathway and so on. Caryophyllene oxide, (-)-cis-myrtanol, globulol and other components were potential hepatotoxic components of *P. corylifolia* volatile oil. The results of qRT-PCR showed that the expression of CDK1 and HIF1A genes in zebrafish increased significantly ($P < 0.001$) and the expression of PIK3CA gene decreased significantly ($P < 0.001$) after treatment with *P. corylifolia* volatile oil. **Conclusion** The volatile oil from *P. corylifolia* exhibits certain hepatotoxicity, and its mechanism is related to the regulation of core targets, intervention in relevant signaling pathways, and mediation by toxic components.

Key words: *Psoralea corylifolia* L. volatile oil; hepatotoxicity; zebrafish model; GC-MS; weighted network toxicology; caryophyllene oxide, (-)-cis-myrtanol, globulol

补骨脂为豆科植物补骨脂 *Psoralea Corylifolia* L. 的干燥成熟果实^[1], 其性温, 味辛、苦, 归肾、脾经, 具有温肾助阳、纳气平喘、温脾止泻等功效, 临床多用于肾阳虚衰所致之阳痿遗精、遗尿频数、腰膝冷痛等证^[1]。《雷公炮炙论》中记载补骨脂“性本大燥, 毒”, 其中肝毒性是目前补骨脂毒性研究的热点, 也是制约其临床应用的主要因素^[2-3]。研究表明补骨脂可通过诱导氧化应激^[4]、线粒体功能障碍^[5]等多种途径诱导肝细胞毒性, 其肝毒性成分研究多聚焦于香豆素类(如补骨脂素、异补骨脂素)、黄酮类(如补骨脂甲素、补骨脂乙素)等成分^[6-7], 目前补骨脂肝毒性机制及成分尚未完全阐明, 进一步探讨补骨脂肝毒性成分及毒性机制, 对补骨脂临床应用具有重要意义。

挥发性成分与中药“辛香温燥”的属性密切相关, 补骨脂含有较多的挥发性成分, 然而补骨脂挥发油组分与其肝毒性之间是否存在关联目前尚未见相关研究报道。基于此, 本研究利用斑马鱼模型对补骨脂挥发油的肝毒性进行评价, 采用气相色谱-质谱联用技术(GC-MS)对补骨脂挥发油成分进行系统表征, 同时运用基于成分占比和分子对接毒性系数的加权网络毒理学策略探析补骨脂挥发油肝毒性机制及潜在的毒性成分, 并结合实时荧光定量PCR(qRT-PCR)方法对相关核心靶点进行验证, 本研究可为补骨脂安全性评价提供参考, 为补骨脂炮制减毒等研究提供支撑。

1 材料

1.1 动物

Tg (fabp10: EGFP) 品系斑马鱼购自上海费曦

生物科技有限公司。

1.2 试剂

醋酸乙酯(批号 20170526, 质量分数 $\geq 99.5\%$)购自天津市富宇精细化工有限公司; 氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸镁(批号 240513D1、240418D2、240425D2、B231120, 质量分数均 $\geq 99.0\%$)购自西陇科学股份有限公司; 甲基纤维素(批号 S14012, 质量分数 $\geq 99.0\%$)购自上海源叶生物科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙二醛(MDA)检测试剂盒、苏木精-伊红(HE)染色试剂盒(批号 20240715、2407006、20240220、20242021、20241218)购自北京索莱宝科技有限公司; 4%多聚甲醛溶液(批号 GP24043041735)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; qRT-PCR 引物合成自上海生工生物有限公司; TRIzol 试剂(批号 S7130)购自北京索莱宝科技有限公司; 反转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒(批号 RT01032、P220701)均购自成都福际生物技术有限公司; 二甲基亚砷(DMSO)溶液(批号 EZ6789B127)购于广州赛国生物科技有限公司; 实验用水为娃哈哈纯净水。

1.3 药材

补骨脂购自安徽盛安堂药业有限公司, 产地: 云南楚雄, 批号 240602, 经山东中医药大学附属医院马传江教授鉴定, 为豆科植物补骨脂 *P. corylifolia* L. 的干燥成熟果实。

1.4 仪器

GCMS-QP2020 NX 四极杆型气相色谱质谱联用仪(日本岛津公司); EP214C 型万分之一电子天

平(瑞士 Mettler Toledo 公司); PGX-70A 型斑马鱼胚胎控光恒温培养箱(杭州川一实验仪器有限公司); SW-7 型荧光体式显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司); FSX100 型显微镜(日本 Olympus 公司); EG1150 型石蜡包埋机、RM2235 型石蜡切片机(德国 Leica 公司); StepOne plus 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 斑马鱼的养殖与繁育

雌雄斑马鱼隔离喂养,交替照明 14 h/黑暗 10 h,每日按时投喂刚孵化的丰年虾幼体。采集受精卵时,取性成熟的健康斑马鱼按雌雄 1:2 的比例放入带隔板的缸中,次日给予照明同时去除隔板,9:00~11:00 时收获受精卵。对受精卵进行消毒和洗涤后移入斑马鱼胚胎培养用水(1 L 纯净水中含 0.012 8 g KCl、0.048 4 g CaCl₂、0.293 2 g NaCl、0.08 g MgSO₄·7H₂O)中,(28.0±0.5)℃温度下控光培养。

2.2 补骨脂挥发油的制备

取补骨脂适量,粉碎过 3 号筛,置圆底烧瓶中,加入 2 倍量水浸泡 0.5 h,连接挥发油提取器,加热回流提取 3 h,分离上层油状液体,经无水硫酸钠干燥,即得补骨脂挥发油,得率为 1.06% (mL·g⁻¹)。

2.3 斑马鱼给药溶液的配制

取“2.2”项下制备的补骨脂挥发油适量,用等体积 DMSO 溶解后,加入斑马鱼胚胎培养用水,分别配制成一系列含补骨脂挥发油为 0.005%~0.200%浓度梯度的斑马鱼给药溶液,并确保各给药溶液中 DMSO 含量不超过 0.1%。

2.4 补骨脂挥发油对斑马鱼的肝损伤作用研究

2.4.1 斑马鱼的分组及给药 Tg (fabp10: EGFP) 品系斑马鱼幼鱼受精发育 72 h 后,挑选正常的斑马鱼幼鱼,移入 24 孔板中,每孔 15 条,分别暴露于 2 mL 低、中、高浓度(0.01%、0.05%、0.10%)的补骨脂挥发油中,同时设置对照组(斑马鱼胚胎培养用水)和 DMSO 组(0.1% DMSO),每组 3 个重复孔,(28.0±0.5)℃浸浴处理 72 h,观察并记录各组斑马鱼畸形和死亡情况。

2.4.2 斑马鱼的肝脏形态分析 药物处理 72 h 后,每组各取 6 条斑马鱼于适量 0.02%三卡因溶液中麻醉,在体视显微镜下固定于 4%甲基纤维素溶液中,使斑马鱼对眼侧卧于载玻片上,分别在明亮视野和荧光激发状态下,观察斑马鱼全身及肝脏形态情况并采集图像,利用 Image J 1.8.0 软件统计不同浓度

补骨脂挥发油对肝脏荧光面积及荧光强度的影响。

2.4.3 斑马鱼肝脏生化指标测定 药物处理 72 h 后,每组各取 30 条斑马鱼于适量 0.02%三卡因溶液中麻醉,纯净水漂洗 3 次后除去水分,将每组斑马鱼按照质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入磷酸盐缓冲液(PBS)中,在 4℃条件下对斑马鱼进行匀浆后,2500 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液按照试剂盒说明书操作,测定 ALT、AST、谷胱甘肽(GSH)和 MDA 的水平。

2.4.4 斑马鱼肝脏 HE 染色 药物处理 72 h 后,每组各取 6 条斑马鱼于适量 0.02%三卡因溶液中麻醉,再转入 4%多聚甲醛,固定 96 h 后,用梯度乙醇、二甲苯脱水,石蜡包埋,切成 4~5 μm 的薄片后进行 HE 染色,置于显微镜下观察各组斑马鱼肝脏组织病理状态并拍照。

2.5 补骨脂挥发油的 GC-MS 分析

2.5.1 供试品溶液的制备 取补骨脂挥发油,以 12 000 r·min⁻¹离心 10 min,取上清液,即得供试品溶液。

2.5.2 气相色谱条件 安捷伦 DB-WAX 气相色谱柱(60 m×0.25 mm×0.25 μm);进样口温度 260℃;载气为高纯氮气,体积流量 2.02 mL·min⁻¹,程序升温,初始温度 50℃,保持 51 min,然后以 10℃·min⁻¹的速率升温至 240℃,保持 20 min;进样量:0.2 μL,分流比 80:1。

2.5.3 质谱条件 电子轰击源(EI);电子能量 70 eV;离子源温度 230℃;接口温度 260℃;扫描质量范围 *m/z* 20~500;溶剂延迟 0.1 min;全扫描模式。应用质谱数据系统检索(美国 NIST 质谱检索数据库),结合相似度和保留时间确定化合物。

2.6 补骨脂挥发油致肝损伤的加权网络毒理学分析

2.6.1 补骨脂挥发油化学成分靶点基因的获取 将“2.5”项下鉴定的化学成分,导入 SuperPred (<https://prediction.charite.de/index.php>)、Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 平台进行靶点预测,以 Probability>0 为遴选条件,将化合物预测所得靶点汇总并去重后得到化合物靶点数据库。

2.6.2 疾病靶点基因的获取 以“liver injury”“liver damage”等为关键词,以“Homo sapiens”为限定词,在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://omim.org/>) 中获取疾病靶点。

2.6.3 补骨脂挥发油化学成分基因与疾病基因的交集靶点 利用 Venny 2.1.0 (<http://bioinfo.cnic.gov.cn/tools/venny/>) 平台, 分别输入成分和疾病的作用靶点, 绘制 Venny 图, 其中的交集靶点即为补骨脂挥发油致肝损伤的潜在作用靶点。

2.6.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 将从 Venny2.1.0 平台下载的交集靶点数据导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/htc/cgi/input.pl>) 构建蛋白 PPI 网络。筛选 Combined score ≥ 0.9 的靶点导入 Cytoscape 3.10.1 软件, 利用其内置插件 Centiscape2.2 进行核心靶点拓扑分析, 计算各靶点的中间中心性 (BC)、度中心性 (DC) 和接近中心性 (CC), 并根据此 3 个参数对靶点进行初步筛选, 得到关键靶点。

2.6.5 关键靶点的加权分析及核心靶点的筛选 为了构建补骨脂挥发油中成分与肝损伤靶点之间的加权网络, 将关键靶点与其对应关键成分的分子对接结合能绝对值作为毒性值, 各关键成分在质谱总离子流图中峰面积的归一化值作为剂量值, 分别对关键靶点 PPI 网络中的 BC、DC 和 CC 值进行加权, 具体加权公式如下:

$$T = \sum_{i \neq 0}^n \frac{I_i}{I}$$

T 代表毒性系数 (toxicity coefficient), I_i 代表关键靶点与对应关键成分的结合能, I 代表所有结合能之和, n 代表包含此靶点成分的个数

$$C = \sum_{i \neq 0}^n \frac{S_i}{S_{\max}}$$

C 代表成分占比系数 (component proportion coefficient), S_i 代表关键靶点所对应关键成分的质谱峰面积, S_{\max} 代表各成分峰面积中的最大值, n 代表包含此靶点成分的个数

BC、CC 和 DC 值的具体加权方式为 $T \times C \times BC$ 、 $T \times C \times CC$ 和 $T \times C \times DC$ 。

以 BC、CC 和 DC 的中位数二倍值作为标准, 筛选加权后 3 个值均大于中位数二倍值的关键靶点作为补骨脂挥发油成分致肝损伤的核心靶点。

2.6.6 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析 采用 DAVID 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) 对补骨脂挥发油致肝损伤的核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 均以 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义, 并将分析结果通过微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn>) 进行可视化。

2.6.7 “药物-成分-靶点-通路”网络构建 整理收集的数据, 借助 Cytoscape 3.10.1 软件构建“药物-成分-靶点-通路”网络, 筛选网络中度 (degree) 值较大的成分作为补骨脂挥发油中潜在的肝毒性成分。

2.7 补骨脂挥发油对肝毒性相关核心靶点基因表达的影响

按“2.4.1”项给药, 到达实验终点后, 收集各组斑马鱼匀浆, 按照试剂盒说明书提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')
<i>CDK1</i>	F: GGAGGGGATTCTGTTCTGCC R: TGCCGTTCTGTCCAGGTTT
<i>HIF1A</i>	F: GGCCATCTACAACACGACCA R: GATTTGGGGGAGGGGCATAG
<i>PIK3CA</i>	F: CGCAATGAGAGGATGAGCGA R: GATGCCCCATAACTCTCCCG

2.8 统计学处理

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 运用单因素方差分析方法分析组间差异, $P < 0.05$ 被认为具有统计学意义, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析及可视化。

3 结果

3.1 补骨脂挥发油对斑马鱼的肝损伤作用

3.1.1 补骨脂挥发油对斑马鱼死亡率和畸形率的影响 如表 2 所示, 对照组和 DMSO 组的斑马鱼均未出现死亡或畸形, 表明 DMSO 对斑马鱼肝脏无显著性影响。与对照组相比, 0.005% 补骨脂挥发油处理组斑马鱼的死亡率和畸形率无显著变化; 0.01% 和 0.05% 浓度处理组死亡率为 0, 但斑马鱼的畸形率显著上升 ($P < 0.01$)。0.1% 处理组的斑马鱼开始出现死亡, 畸形率也进一步增加 ($P < 0.001$)。当浓度升至 0.2% 时, 所有斑马鱼均死亡。综合以上结果, 本研究最终选择 0.01%、0.05% 和 0.10% 补骨脂挥发油浓度作为后续斑马鱼实验的给药浓度。

3.1.2 补骨脂挥发油对斑马鱼肝脏形态、肝脏荧光面积及荧光强度的影响 与对照组相比, DMSO 组斑马鱼肝脏形态、肝脏荧光面积和荧光强度均无显著性变化, 说明溶剂无毒性。如图 1 所示, 与对照

表 2 不同浓度的补骨脂挥发油对斑马鱼死亡率和畸形率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 2 Effects of different concentrations of *P. corylifolia* volatile oil on mortality and deformities in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	药物浓度/%	死亡率/%	畸形率/%
对照	—	0	0
DMSO	0.100	0	0
补骨脂挥发油	0.005	0	0
	0.010	0	24.45±3.14**
	0.050	0	44.44±6.28***
	0.100	13.33±5.44*	60.00±5.45***
	0.200	100.00	—

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

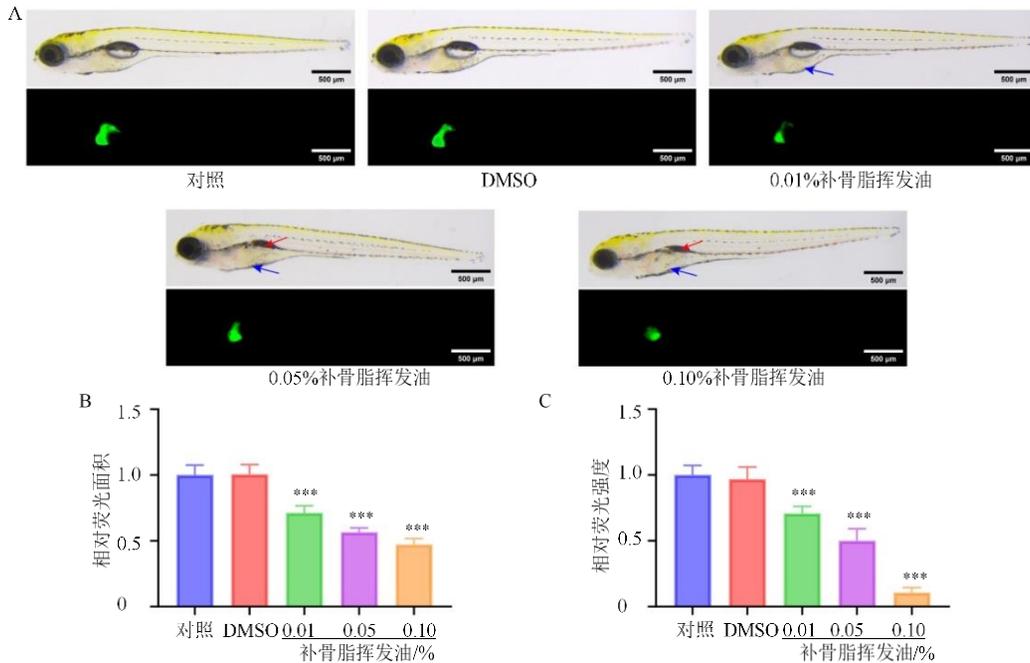
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

组及 DMSO 组相比, 补骨脂挥发油低、中、高浓度组斑马鱼肝脏荧光面积显著减小、肝脏荧光强度显著降低 ($P < 0.001$); 卵黄囊提供斑马鱼早期发育所需营养, 其中约 70% 的中性脂质需在肝脏中代谢^[8];

鱼鳔的正常发育依赖于肝脏合成的胆固醇等脂质供应, 中、高浓度组斑马鱼出现卵黄囊吸收延迟、鱼鳔缺失的情况, 表明斑马鱼肝脏脂质合成与代谢功能受损。以上结果表明补骨脂挥发油具有一定的肝脏毒性。

3.1.3 补骨脂挥发油对斑马鱼肝脏生化指标的影响 如图 2 所示, 与对照组相比, DMSO 组的各指标水平无明显变化, 经补骨脂挥发油处理后, 各剂量组斑马鱼幼鱼整体 AST、ALT 和 MDA 活性均显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), GSH 活性显著下降 ($P < 0.001$), 表明补骨脂挥发油具有一定的肝脏毒性。

3.1.4 补骨脂挥发油对斑马鱼肝组织病理变化的影响 如图 3 所示, HE 染色显示对照组及 DMSO 组肝细胞排列整齐, 细胞间连接紧密, 细胞核居中, 规则呈圆形。用低浓度和中浓度补骨脂挥发油处理的组中, 部分细胞出现萎缩和畸形。补骨脂挥发油高浓度组肝细胞显示更为严重的核萎缩畸形、细胞质溶解和空泡化。以上结果都进一步证明了补骨脂挥发油的肝毒性作用。

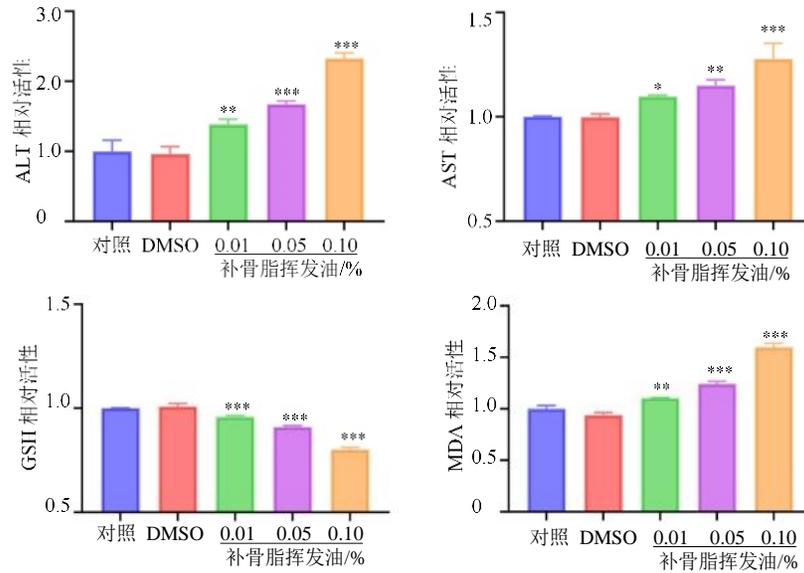


A-显微镜下斑马鱼整体形态及肝脏荧光图; B-斑马鱼肝脏荧光面积统计图; C-斑马鱼肝脏荧光强度统计图; 与对照组比较: *** $P < 0.001$; 蓝色箭头代表卵黄囊吸收延迟, 红色箭头代表鱼鳔缺失。

A-overall morphology and liver fluorescence of zebrafish under microscope; B-statistical map of the fluorescence area of zebrafish liver; C-statistical map of fluorescence intensity in zebrafish liver; *** $P < 0.001$ vs control group; Blue arrows represent delayed uptake of the yolk sac, red arrows represent absence of swim bladder.

图 1 不同浓度的补骨脂挥发油对斑马鱼肝脏形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Effect of different concentrations of *P. corylifolia* volatile oil on liver morphology in zebrafish ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 2 不同浓度的补骨脂挥发油对斑马鱼肝脏生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of different concentrations of *P. corylifolia* volatile oil on biochemical indexes of zebrafish liver ($\bar{x} \pm s, n=3$)

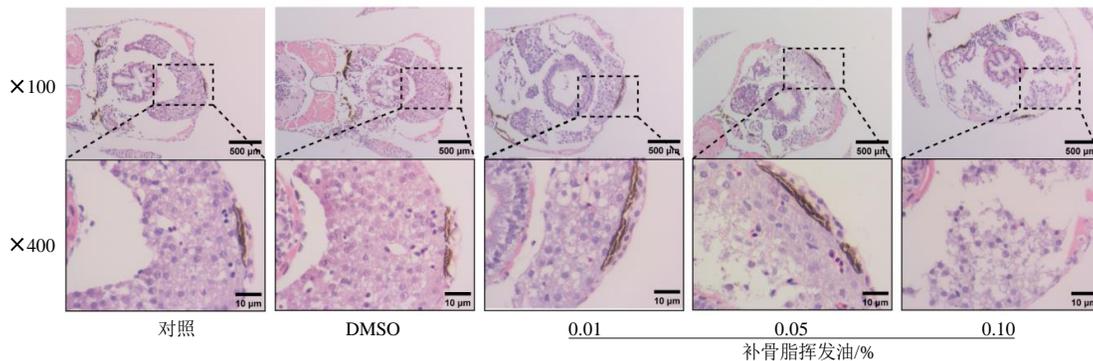


图 3 不同浓度的补骨脂挥发油对斑马鱼肝脏组织病理结构的影响

Fig. 3 Effect of different concentrations of *P. corylifolia* volatile oil on histopathological structure of zebrafish livers

3.2 GC-MS 分析结果

经 GC-MS 采集, 获得补骨脂挥发油的质谱数据信息, 总离子流图见图 4。经分析, 水蒸气蒸馏法所得补骨脂挥发油中检出 62 个色谱峰, 鉴定出 55 种成分, 如表 3 所示。其中含量最高的是氧化石竹烯, 占 25.77%。此外, 补骨脂挥发油中含有 19 种萜类化合物 (占 69.34%), 4 种酯类化合物 (占 2.59%) 和 2 种杂环化合物 (占 0.91%)。

3.3 加权网络毒理学分析结果

3.3.1 补骨脂挥发油致肝损伤的潜在作用靶点按照“2.6.1”项下方法筛选出 55 个活性成分以及汇总去重后的成分作用靶点 453 个。从 Gene Card 数据库、OMIM 数据库得到的肝损伤靶点共 5 062 个。

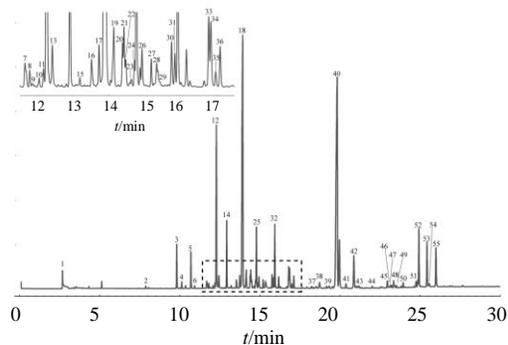


图 4 补骨脂挥发油总离子流图

Fig. 4 Total ion flow diagram for *P. corylifolia* volatile oils

分别将成分作用靶点、肝损伤靶点导入 Venny 2.1.0 平台制作 Venny 图, 获得交集靶点 336 个, 见图 5-A。

表 3 补骨脂挥发油成分分析结果

Table 3 Results of compositional analysis of *P. corylifolia* volatile oil

序号	t_R/min	分子式	化合物	相似度/%	相对含量%	类别
BU1	2.682	H ₂ S	硫化氢	97	0.86	无机化合物
BU2	7.876	C ₅ H ₅ N	吡啶	97	0.11	杂环化合物
BU3	9.807	C ₁₀ H ₁₈ O	(-)-顺式-桃金娘醇	84	1.93	萜类化合物
BU4	10.121	C ₈ H ₁₄ O	6-甲基-5-庚烯-2-酮	97	0.28	萜类化合物
BU5	10.693	C ₁₆ H ₂₆ O ₂	十一碳-10-炔酸 3-甲基丁-2-烯-1-基酯	84	1.57	酯类化合物
BU6	10.927	C ₉ H ₁₆ O	反-2,顺 6-壬二烯醇	82	0.11	小分子脂肪族化合物
BU7	11.677	C ₁₉ H ₃₀ O ₄	琥珀酸 3-甲基丁-2-烯-1-基香叶酯	76	0.41	酯类化合物
BU8	11.715	C ₁₀ H ₁₈	2,5-二甲基-1,6-辛二烯	83	0.16	萜类化合物
BU9	11.811	C ₁₀ H ₁₈ O	橙花醇	80	0.21	萜类化合物
BU10	12.074	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	反式氧化芳樟醇	93	0.09	萜类化合物
BU11	12.195	C ₁₅ H ₂₄	3,8-二甲基-5-(1-丙烯-2-基)-1,2,4,5,6,7,8,8a-八氢萹	79	0.29	萜类化合物
BU12	12.284	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	4-(2-甲基-3-亚甲基丁-4-基)-4,5-二氢-2(3 <i>H</i>)-呋喃酮	86	8.19	萜类化合物
BU13	12.439	C ₁₅ H ₂₄	α -古巴烯	95	0.67	萜类化合物
BU14	12.928	C ₁₀ H ₁₈ O	芳樟醇	98	2.90	萜类化合物
BU15	13.204	C ₁₄ H ₂₆ O ₂	2,4,7,9-四甲基-5-癸炔-4,7-二醇	80	0.10	萜类化合物
BU16	13.531	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	(<i>Z</i>)-3,8-二甲基-2,7-壬二烯酸甲酯	83	0.44	脂肪酸类化合物
BU17	13.738	C ₁₈ H ₃₄ O	2-辛基环丙烯-庚醇	85	0.52	萜类化合物
BU18	13.926	C ₁₅ H ₂₄	β -石竹烯	97	21.56	萜类化合物
BU19	14.150	C ₁₀ H ₁₆	1,5-二甲基-1,5-环辛二烯	82	1.12	萜类化合物
BU20	14.394	C ₁₅ H ₂₆	(1 <i>R</i> ,4 <i>a</i> ,7 <i>a</i> ,7 <i>b</i> β)-十氢-1,1,4 <i>a</i> ,7 <i>a</i> -四甲基-1 <i>H</i> -环丙 [e]萹	83	0.57	萜类化合物
BU21	14.433	C ₂₄ H ₃₈ O ₃	双[(2 <i>R</i> ,3 <i>a</i> S,4 <i>R</i> ,7 <i>a</i> S)-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-甲醇苯并呋喃-2-基]醚	84	0.80	杂环化合物
BU22	14.483	C ₁₅ H ₂₄	(-)-异香橙烯	93	0.40	萜类化合物
BU23	14.637	C ₁₀ H ₁₂ O	对烯丙基苯甲醚	87	0.16	芳香族化合物
BU24	14.724	C ₁₃ H ₂₄	3-十三炔	85	0.30	脂肪族多炔类
BU25	14.779	C ₁₅ H ₂₄	α -石竹烯	96	2.78	萜类化合物
BU26	14.935	C ₁₅ H ₂₄	(1 <i>R</i> ,4 <i>a</i> R,8 <i>a</i> S)-1-异丙基-7-甲基-4-亚甲基-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -八氢萹	88	0.54	萜类化合物
BU27	15.192	C ₁₅ H ₂₆ O	(1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-乙炔基-3-甲基-6-异丙基-2-丙烯-2-基环己醇	83	0.35	萜类化合物
BU28	15.341	C ₁₅ H ₂₄	(-)- α -桉叶烯	95	0.32	萜类化合物
BU29	15.380	C ₁₀ H ₁₆ O	柠檬醛	92	0.13	萜类化合物
BU30	15.758	C ₁₅ H ₂₄	δ -杜松烯	93	0.65	萜类化合物
BU31	15.850	C ₁₅ H ₂₄	γ -杜松烯	96	0.44	萜类化合物
BU32	15.929	C ₁₁ H ₂₀ O	[2-甲基-2-(4-甲基-3-戊烯基)环丙]-甲醇	92	2.86	萜类化合物
BU33	16.791	C ₁₀ H ₁₈ O	香叶醇	97	1.08	萜类化合物
BU34	16.851	C ₁₅ H ₂₂	菖蒲烯	81	1.17	萜类化合物
BU35	16.986	C ₁₃ H ₂₂ O	丙酮香叶酯	95	0.25	萜类化合物
BU36	17.111	C ₁₅ H ₂₄	β -榄香烯	84	0.67	萜类化合物
BU37	18.213	C ₁₅ H ₂₀	α -卡拉烯	94	0.11	萜类化合物
BU38	18.717	C ₁₂ H ₂₀	1,5-二甲基-2,3-二乙炔基环己烷	81	0.48	萜类化合物
BU39	19.320	C ₁₃ H ₂₂	1-甲基-2,4-双(1-甲基乙炔基)环己烷	88	0.20	萜类化合物
BU40	19.817	C ₁₅ H ₂₄ O	氧化石竹烯	94	25.77	萜类化合物
BU41	20.368	C ₁₅ H ₂₄ O	(4 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-1,5,9,9-四甲基-12-氧杂双环[9.1.0]十二碳-4,7-二烯	96	0.32	萜类化合物
BU42	20.861	C ₁₅ H ₂₄ O	葎草烯环氧化物 II	96	2.27	萜类化合物
BU43	21.180	C ₁₅ H ₂₆ O	(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,4 <i>a</i> S,8 <i>a</i> R)-1-异丙基-4,7-二甲基-1,2,3,4,4 <i>a</i> ,5,6,8 <i>a</i> -八氢萹-4 <i>a</i> -醇	90	0.22	萜类化合物

表 3 (续)

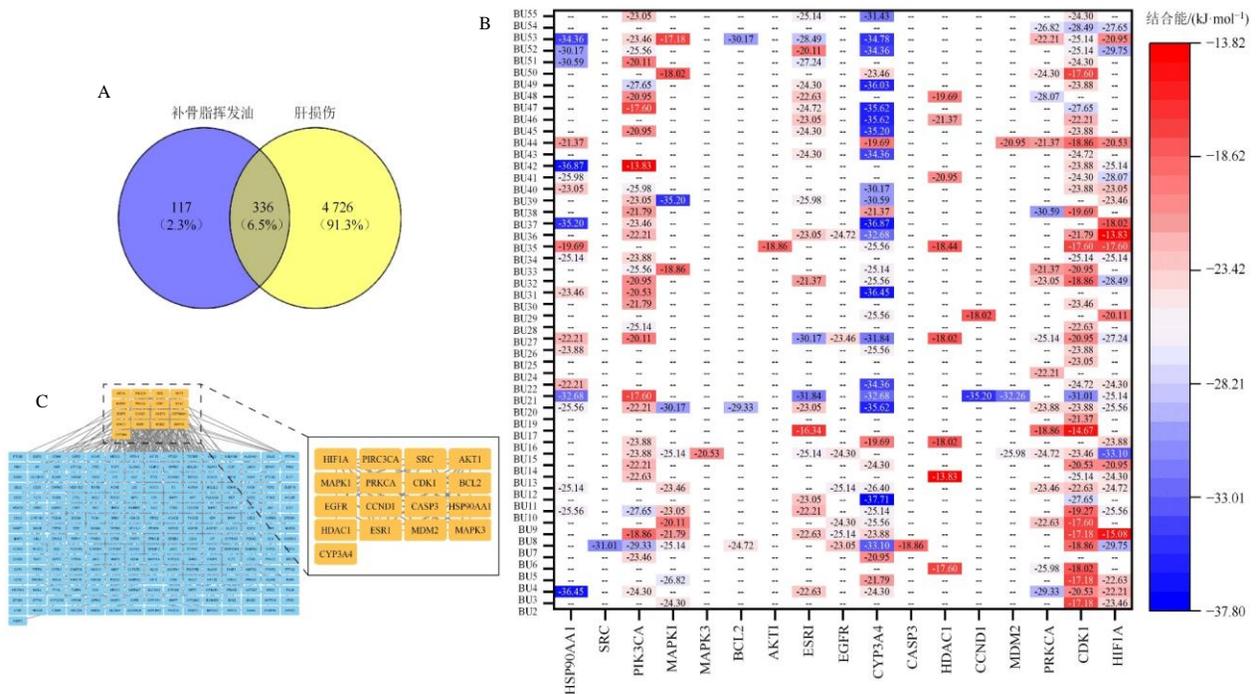
序号	t_R /min	分子式	化合物	相似度/%	相对含量/%	类别
BU44	22.005	C ₁₈ H ₃₆ O	植酮	87	0.13	萜类化合物
BU45	22.947	C ₁₅ H ₂₆ O	T-杜松醇	95	0.39	萜类化合物
BU46	23.138	C ₁₅ H ₂₆ O	(1S,3 α ,8R)-八氢-1,7 α -二甲基-5 α -异丙基-1,4 β -亚甲基-1H-茛-8-醇	92	0.14	萜类化合物
BU47	23.220	C ₁₅ H ₂₆ O	α -杜松醇	88	0.12	萜类化合物
BU48	23.341	C ₁₅ H ₂₄ O	2-(4a,8-二甲基-2,3,4,4a,5,6-六氢萘-2-基)丙-1-醇	81	0.43	醇类化合物
BU49	23.400	C ₁₅ H ₂₆ O	T-按叶油醇	84	0.11	萜类化合物
BU50	23.522	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	棕榈酸甲酯	92	0.17	酯类化合物
BU51	24.740	C ₁₅ H ₂₄ O	(1R,4E,8E)-6,6,9-三甲基-2-亚甲基-4,8-环十一碳二烯-1-醇	96	0.30	萜类化合物
BU52	24.918	C ₁₅ H ₂₄ O	1R,5S,9S-11,11-二甲基-4,8-双亚甲基双环[7.2.0]十一烷-5-醇	94	3.12	萜类化合物
BU53	25.422	C ₁₅ H ₂₆ O	蓝桉醇	83	2.63	萜类化合物
BU54	25.573	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	1-雄烯二醇	84	0.29	甾体化合物
BU55	25.986	C ₁₅ H ₂₄ O	(7S)-7-异丙基-4,10-亚甲基环癸-5-烯醇	83	2.38	萜类化合物

3.3.2 PPI网络构建与关键靶点筛选 将336个交集靶点导入 STRING 平台形成 PPI 关系图,利用 Cytoscape 3.10.1 软件中的 Centiscape2.2 插件,根据 BC>724.790 7、CC>0.084 7 和 DC>4.907 0 确定了 17 个关键靶点,见图 5-B。

3.3.3 成分-靶点分子对接结合预测 将 17 个关键靶点与相应关键成分使用 Autodock 4.2.6 软件进行分子对接,共对接 239 次,将结合能数据导入 OriginPro 2024 软件中制作热图,见图 5-C,图中颜色越偏向蓝色,说明结合能越小,代表靶点和成分

结合力越强;反之,图中颜色越偏向红色,说明结合能越大,代表靶点和成分结合力越弱。

3.3.4 关键靶点的加权分析及核心靶点的筛选 根据“2.6.5”项下的公式、分子对接的结合能结果和 GC-MS 分析结果中各成分的峰面积,对关键靶点进行加权,加权后的 BC、CC 和 DC 值见表 4。筛选 BC’、CC’和 DC’值大于中位数二倍值的靶点,最终筛选到 CYP3A4、CDK1、HSP90AA1、HIF1A、PIK3CA 5 个靶点作为补骨脂挥发油成分致肝损伤的核心靶点。



A-补骨脂挥发油成分与肝损伤靶点交集 Venny 图; B-关键靶点-关键成分结合能热图; C-PPI 网络图。

A-intersection of *P. corylifolia* volatile oil constituent targets with liver injury targets Venny diagrams; B-binding energy thermograms of key targets-key components; C-PPI network diagram.

图 5 补骨脂挥发油致肝损伤的网络毒理学加权前分析

Fig. 5 Network toxicology of *P. corylifolia* volatile oil causing liver injury before weighted analysis

表 4 关键靶点的 BC、CC 和 DC 值
Table 4 BC, CC and DC values for key targets

关键靶点	T	C	BC	CC	DC
AKT1	0.003 227 426	0.009 737 528	0.111 461 208	4.36×10^{-8}	0.000 659 970
BCL2	0.014 415 836	0.140 100 896	9.076 380 201	2.64×10^{-6}	0.042 413 102
CASP3	0.003 227 426	0.016 066 123	0.137 585 343	6.43×10^{-8}	0.000 725 931
CCND1	0.009 108 513	0.036 194 261	0.466 888 642	4.17×10^{-7}	0.003 956 111
CDK1	0.167 252 385	5.031 079 639	1 798.527 182	9.98×10^{-4}	9.256 060 741
CYP3A4	0.180 305 530	2.214 147 933	3 749.815 258	4.77×10^{-4}	6.786 792 969
EGFR	0.029 118 554	0.391 343 223	36.161 369 37	1.52×10^{-5}	0.227 906 976
ESR1	0.091 013 412	0.712 773 410	467.907 878 3	9.16×10^{-5}	1.297 438 797
HDAC1	0.025 317 364	0.161 941 437	11.253 96509	5.22×10^{-6}	0.053 299 093
HIF1A	0.118 052 069	2.234 184 066	1 460.273658	3.64×10^{-4}	2.637 500 518
HSP90AA1	0.091 443 735	1.925 613 253	1 512.036162	2.46×10^{-4}	4.930 387 514
MAPK1	0.053 575 271	0.555 622 113	77.641 635 88	4.09×10^{-5}	0.654 887 313
MAPK3	0.003 514 308	0.003 820 845	0.028 841 302	1.80×10^{-8}	0.000 281 980
MDM2	0.013 555 189	0.049 886 569	0.672 224 751	8.87×10^{-7}	0.008 114 663
PIK3CA	0.123 861 436	2.096 474 043	394.156 219 9	3.21×10^{-4}	6.232 134 844
PRKCA	0.070 859 930	0.861 286 135	112.458 111 8	7.26×10^{-5}	0.732 368 100
SRC	0.005 307 323	0.016 066 123	0.393 232 058	1.10×10^{-7}	0.002 472 775

3.3.5 GO 及 KEGG 通路富集分析 在 DAVID 平台上输入核心靶点信息, 进行 GO 功能注释和 KEGG 通路分析。GO 分析结果显示, 具有生物学过程 (BP) 10 条, 细胞成分 (CC) 2 条, 分子功能 (MF) 6 条, 见图 6-A。BP 主要涉及基因表达的正调控 (positive regulation of gene expression)、细胞迁移 (cell migration)、血管生成 (angiogenesis) 等方面; CC 主要涉及细胞质 (cytoplasm) 和细胞质基质 (cytosol); MF 主要涉及酶结合 (enzyme binding)、蛋白质丝氨酸激酶活性 (protein serine kinase activity)、泛素蛋白连接酶结合 (ubiquitin protein ligase binding) 等方面。KEGG 富集分析共获得 20 条信号通路, 主要涉及细胞衰老 (cellular senescence)、自噬 (autophagy-animal)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway) 等。根据 $P > 0.05$ 对所有信号通路进行筛选, 将筛选后得到的 12 条信号通路进行可视化, 见图 6-B。

3.3.6 “药物-成分-靶点-通路”网络构建 基于补骨脂挥发油的成分、核心靶点及 KEGG 通路富集分析结果, 整合数据并构建“药物-成分-靶点-通路”交互网络, 最终筛选出网络中 degree 值最大 (degree 值=5) 的 8 个成分: (-)-顺式-桃金娘醇 (BU3)、反式氧化芳樟醇 (BU10)、(1aR,4aα,7aα,7bβ)-十氢-1,1,4α,7α-四甲基-1H-环丙[e]萘 (BU20)、双

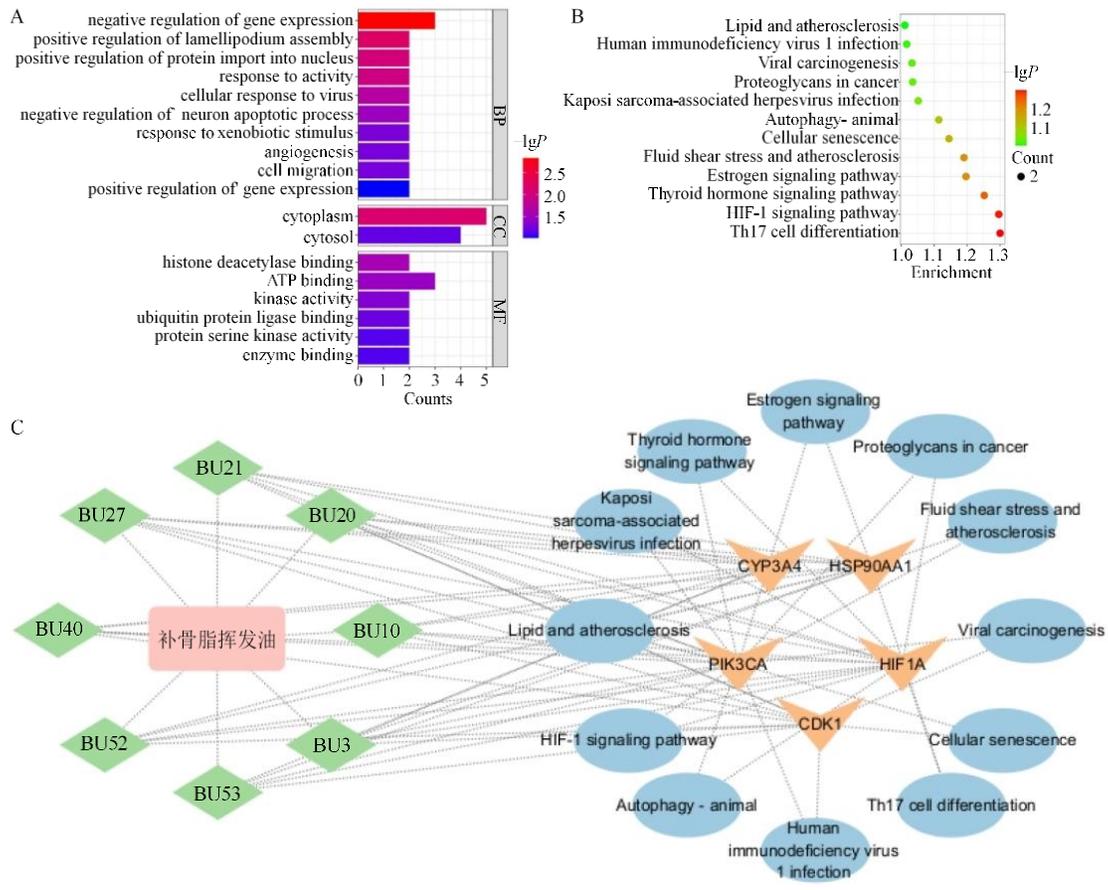
((2R,3aS,4R,7aS)-八氢-7,8,8-三甲基-4,7-甲醇苯并呋喃-2-基)醚 (BU21)、(1R,2S,3S,6S)-3-乙烯基-3-甲基-6-异丙基-2-丙烯-2-基环己醇 (BU27)、氧化石竹烯 (BU40)、1R,5S,9S-11,11-二甲基-4,8-双亚甲基双环 [7.2.0]十一烷-5-醇 (BU52)、蓝桉醇 (BU53), 认为是补骨脂挥发油致肝损伤的核心成分。如图 6-C 所示, 网络中共包含 26 个节点 (分别代表药物、潜在毒性成分、关键靶点及信号通路) 和 72 条边 (代表节点间的相互作用关系), 拓扑结构清晰呈现了各要素间的关联性。结果表明, 补骨脂挥发油致肝损伤的作用是通过“多成分-多靶点-多途径”的复杂机制实现的。

3.4 补骨脂挥发油对斑马鱼中相关核心靶点基因表达的影响

利用 qRT-PCR 方法对加权网络毒理学筛选出的补骨脂挥发油肝毒性的核心靶点 CDK1、HIF1A、PIK3CA 进行验证, 结果显示斑马鱼经不同浓度的补骨脂挥发油处理后, CDK1、HIF1A 基因表达较对照组显著增加 ($P < 0.001$), PIK3CA 基因表达较对照组显著减少, 见图 7。

4 讨论

本研究首次聚焦于补骨脂挥发油, 利用斑马鱼模型对其肝毒性进行评价研究, 明确了其肝毒性作用, 同时采用 GC-MS 方法鉴定出补骨脂挥发油的



A-GO 分析结果柱状图; B-KEGG 分析结果气泡图; C-“药物-核心成分-核心靶点-信号通路”网络图。

A-histogram of GO analysis results; B-bubble diagram of KEGG analysis results; C-network diagram of “drug-core ingredient-core target-signaling pathway”.

图 6 补骨脂挥发油致肝损伤的加权网络毒理学结果

Fig. 6 Weighted network toxicological results of liver injury caused by *P. corylifolia* volatile oil

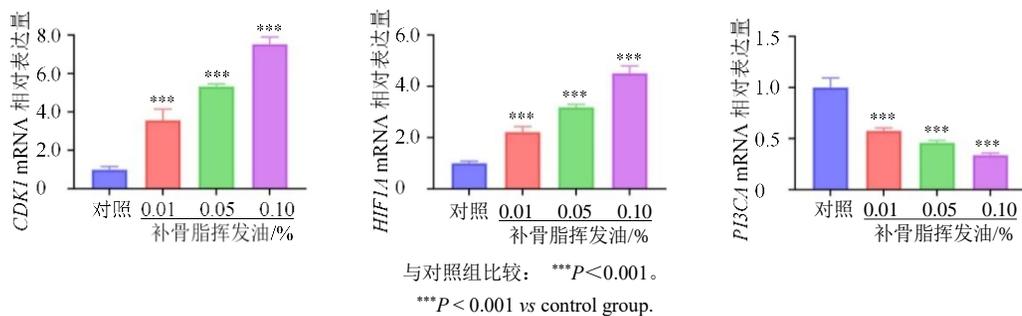


图 7 补骨脂挥发油对相关核心靶点基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of *P. corylifolia* volatile oil on gene expression of related core targets ($\bar{x} \pm s, n=3$)

55 种成分, 进一步结合加权网络毒理学筛选出氧化石竹烯等 8 种潜在的关键毒性成分, 对补骨脂安全性评价、临床合理应用、炮制减毒研究等具有重要意义。

斑马鱼具有繁殖速度快, 产卵数量高, 发育迅速的特点, 且斑马鱼胚胎和幼鱼通体透明, 结合肝脏特异性荧光标记可直接通过荧光显微镜观察肝

脏形态、面积和荧光强度的变化^[9]。本研究选用 Tg (fabp10: EGFP) 品系斑马鱼对补骨脂挥发油肝毒性进行了初步的评价研究, 实验结果显示, 补骨脂挥发油处理使斑马鱼表现出不同程度的肝损伤。与对照组相比, 暴露于各浓度补骨脂挥发油中的斑马鱼出现肝脏荧光面积显著减小与荧光强度显著降低的情况。ALT 和 AST 活性是传统评价肝毒性的

标志物, GSH 和 MDA 作为评价氧化应激的重要指标, 也被用于评估肝损伤情况, 因此本实验以 ALT、AST、GSH 和 MDA 为指标, 综合评估斑马鱼幼鱼的肝脏生化状态及氧化应激水平。结果表明经补骨脂挥发油处理后的斑马鱼 AST、ALT 和 MDA 活性均显著升高, GSH 活性显著下降, 且病理切片显示肝细胞萎缩畸形、空泡化等特征性损伤, 这提示补骨脂挥发油具有一定的肝毒性作用。后期将会采用大鼠等不同模式生物结合体外细胞实验等对补骨脂挥发油的肝脏毒性进行深入研究, 为补骨脂挥发油的肝毒性评价提供可靠的实验数据支撑。

为进一步明确补骨脂挥发油致肝毒性的物质基础, 本研究利用 GC-MS 技术对补骨脂挥发油成分进行了系统表征。结果显示, 在补骨脂挥发油中共解析出 55 种成分, 主要包括萜类、酯类成分, 其中氧化石竹烯 (25.77%) 和 β -石竹烯 (21.56%) 占比最多, 这与先前杨再波等^[10-11]利用顶空气相色谱-质谱法测定的补骨脂挥发油成分的结果基本相符, 另有研究分析出补骨脂挥发油中含有补骨脂酚等成分^[11], 但在本研究中并未检出, 可能是由于产地差异使补骨脂挥发油成分的生物合成过程受到不同的环境影响、提取工艺有差异或检测方法不同等, 具体原因仍需进一步的研究。可能是由于产地差异使补骨脂挥发油成分的生物合成过程受到不同的环境影响、提取工艺有差异或检测方法不同等, 具体原因仍需进一步的研究。

网络毒理学通过构建复杂调控网络来挖掘研究中药的潜在致毒机制, 多维度地阐明疾病的分子基础^[12]。传统网络药理学具有忽略成分丰度与毒性关联的局限性, 因此本研究为了探究补骨脂挥发油潜在的肝毒性成分和毒性机制, 创新性地对 GC-MS 解析到的成分进行了加权网络毒理学分析。基于成分占比和分子对接毒性系数, 分别对补骨脂挥发油致肝损伤关键靶点的 BC、CC 和 DC 值进行加权, 筛选出其肝毒性的核心靶点并进行富集分析, 探究补骨脂挥发油致肝损伤的潜在机制, 最后通过“药物-成分-靶点-通路”网络筛选补骨脂挥发油中潜在的肝毒性成分。结果显示, 加权网络毒理学筛选出 CYP3A4、CDK1、HSP90AA1、HIF1A、PIK3CA 5 个与补骨脂挥发油肝毒性相关的核心靶点, 其毒性机制可能与干预细胞衰老、自噬、HIF-1 信号通路等密切相关。通过构建“药物-成分-靶点-通路”网络筛选出 Degree 值较大的氧化石竹烯、(-)-顺式-桃

金娘醇、蓝桉醇等 8 个成分, 认为是补骨脂挥发油的潜在毒性成分。有研究发现, 氧化石竹烯能够直接抑制线粒体电子传递链复合物, 干扰电子传递过程, 进而影响线粒体的能量代谢, 从而产生线粒体毒性, 这提示了氧化石竹烯可能通过影响线粒体功能引起肝损伤^[13]。氧化石竹烯还能通过上调铁自噬相关蛋白 LC3II 和 NCOA4, 促进铁离子蓄积, 导致脂质过氧化和细胞死亡, 若正常肝脏细胞受此影响则可能引发肝损伤, 这一机制在肝癌治疗中可能有益, 但若正常肝细胞受影响, 则可能引发肝损伤^[14]。CDK1 及其伴侣蛋白 Cyclin A2/B1 在肝纤维化患者和小鼠模型中表达上调, 促进 HSCs 的活化和增殖, 使用 CDK1 抑制剂可诱导 HSCs 凋亡和细胞周期阻滞, 从而减轻肝纤维化, 显示出靶点 CDK1 在肝损伤中的重要作用^[15]。另有研究显示酒精诱导的肝损伤会导致肝脏缺氧环境的形成, 而 HIF1A 作为响应缺氧的关键转录因子, 通过调节脂滴结合蛋白 ADFP 和硬脂酰辅酶 A 脱氢酶等分子, 促进脂肪变性, 并通过调控炎症因子如 IL-6 和 TNF- α 的表达, 加剧肝损伤^[16]。PIK3CA 能激活细胞生长、存活、增殖、运动和形态的信号级联^[17], 通过抑制 PIK3CA 能加重死亡受体介导的肝细胞凋亡和肝损伤^[18]。利用 qRT-PCR 法对加权网络毒理学筛选的补骨脂挥发油致肝损伤核心靶点进行验证, 结果显示补骨脂挥发油处理后斑马鱼中 CDK1、HIF1A 基因表达显著增加, PIK3CA 基因表达显著减少, 说明补骨脂挥发油能够通过影响相关核心靶点造成肝毒性。本研究中加权网络毒理学的应用, 弥补了传统的网络毒理学对“成分占比-毒性”关系和多成分协同毒性作用的忽视, 可为其他植物挥发油或中药复方的安全性评价提供方法学参考。后续仍需要设计合理的实验对加权网络药理学筛选出的补骨脂挥发油关键毒性单体成分及通路进行验证, 进一步明确补骨脂肝毒性的物质基础和作用机制, 为补骨脂炮制减毒和临床合理应用提供实验依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王芳, 王雯, 何晓劲, 等. 补骨脂炮制历史沿革及现代研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2024, 42(10): 193-199. Wang F, Wang W, He X J, et al. History and research progress of Buguzhi (*Psoraleae Fructus*) processing [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2024, 42(10): 193-199.
- [2] 陈超, 朱兰, 刘丽红, 等. 文献来源的补骨脂及其制剂引起药物性肝损伤特点探析 [J]. 中国药物警戒, 2023,

- 20(4): 449-453.
- Chen C, Zhu L, Liu L H, et al. Characteristics of *Psoralea corylifolia* induced liver injury [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2023, 20(4): 449-453.
- [3] 赵竟成, 李治建, 霍仕霞, 等. 基于斑马鱼模型的补骨脂不同炮制品水提物急性毒性及肝毒性差异比较 [J]. *中草药*, 2024, 55(1): 101-113.
- Zhao J C, Li Z J, Huo S X, et al. Comparison of acute toxicity and hepatotoxicity of water extracts from different processed products of *Psoraleae Fructus* based on zebrafish model [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(1): 101-113.
- [4] 张婧茜, 殷佳, 曲晓琳, 等. 五味子配伍对补骨脂致肝细胞氧化损伤和内质网应激的影响 [J]. *中国药房*, 2022, 33(9): 1088-1093.
- Zhang J X, Yin J, Qu X L, et al. Effects of compatibility of *Schisandra chinensis* on *Psoralea corylifolia*-induced oxidative damage and endoplasmic reticulum stress in hepatocytes [J]. *China Pharm*, 2022, 33(9): 1088-1093.
- [5] 董熠, 刘丽佳, 韩璐雯, 等. 香豆素类化学成分的药理作用及毒性机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(16): 5462-5472.
- Dong Y, Liu L J, Han L W, et al. Research progress on pharmacological action and toxicity mechanism of coumarins [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(16): 5462-5472.
- [6] Lin M M, Li Y Y, Cao B, et al. Bavachin combined with epimedin B induce idiosyncratic liver injury under immunological stress conditions [J]. *Chem Biol Interact*, 2023, 386: 110774.
- [7] Jiang M, Wang X Y, Lv B, et al. Psoralen induces hepatotoxicity by covalently binding to glutathione-S-transferases and the hepatic cytochrome P450 [J]. *Phytomedicine*, 2022, 104: 154165.
- [8] 马瑞娇, 贾智莉, 王学芳, 等. 基于斑马鱼模型的抗结核药物肝脏毒性比较研究 [J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(9): 953-959.
- Ma R J, Jia Z L, Wang X F, et al. Comparative study on liver toxicity of anti-tuberculosis drugs based on the zebrafish model [J]. *Chin J Antibiot*, 2020, 45(9): 953-959.
- [9] Zhang Y, Han L W, He Q X, et al. A rapid assessment for predicting drug-induced hepatotoxicity using zebrafish [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2017, 84: 102-110.
- [10] 杨再波, 钟才宁, 邓维先, 等. 顶空气相色谱-质谱法分析补骨脂挥发油化学成分 [J]. *分析实验室*, 2008, 27(4): 87-90.
- Yang Z B, Zhong C N, Deng W X, et al. Analysis of chemical constituents of the essential oils from *Psoralea corylifolia* by headspace-GC-MS [J]. *Chin J Anal Lab*, 2008, 27(4): 87-90.
- [11] 姚三桃, 吉力, 徐植灵. 补骨脂挥发油的化学成分 [J]. *中国药学杂志*, 1995(7): 436.
- Yang S T, Ji L, Xu Z L. Chemical constituents of volatile oil from *Psoralea corylifolia* [J]. *Chin Pharm J*, 1995(7):436.
- [12] 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.
- [13] Monzote L, Stamberg W, Staniek K, et al. Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 240(3): 337-347.
- [14] 修志儒. 瑞香狼毒挥发油成分提取及单体氧化石竹烯抗肝癌作用机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- Xiu Z R. Study on the extraction of volatile oil from *Stellera chamaejasme* L and the mechanism of caryophyllene oxide against hepatoma [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2023.
- [15] Kang X M, Chen H X, Zhou Z W, et al. Targeting cyclin-dependent kinase 1 induces apoptosis and cell cycle arrest of activated hepatic stellate cells [J]. *Adv Biol*, 2024, 8(3): e2300403.
- [16] Nath B, Levin I, Csak T, et al. Hepatocyte-specific hypoxia-inducible factor-1 α is a determinant of lipid accumulation and liver injury in alcohol-induced steatosis in mice [J]. *Hepatology*, 2011, 53(5): 1526-1537.
- [17] Yamaguchi H, Yoshida S, Muroi E, et al. Phosphoinositide 3-kinase signaling pathway mediated by p110 α regulates invadopodia formation [J]. *J Cell Biol*, 2011, 193(7): 1275-1288.
- [18] Liu W, Jing Z T, Xue C R, et al. PI3K/AKT inhibitors aggravate death receptor-mediated hepatocyte apoptosis and liver injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 381: 114729.

[责任编辑 齐静雯]