

基于斑马鱼、HepG2 细胞实验及网络药理学的博落回醇提物肝毒性评价

罗文雯^{1,4}, 韩伟^{1,2,3}, 钱贵芸^{1,2,3}, 韦美燕^{1,2,3}, 李哲^{1,2*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025
2. 贵州中医药大学 兽用中药制剂创新研发中心, 贵州 贵阳 550025
3. 贵州中医药大学 药用高分子材料研究中心, 贵州 贵阳 550025
4. 成都中医药大学 药学院, 四川 成都 611137

摘要: 目的 开展博落回醇提物(MCEE)对斑马鱼和 HepG2 细胞的肝毒性评价, 通过网络药理学和分子对接预测主要活性成分血根碱和白屈菜红碱肝毒性潜在机制。方法 考察 MCEE (5、10、20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对受精 4 d 斑马鱼幼鱼死亡率的影响, 观察肝脏病理组织病变, 测定丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 和天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性; 采用 MTT、Hoechst 33342 染色法评价 MCEE (5、10、20、40、80、160、320、640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 HepG2 细胞增殖和细胞凋亡作用。通过 Swiss Target Prediction 数据库、Gene Cards、OMIM 和 MalaCards 数据库预测白屈菜红碱、血根碱和肝毒性交集靶点, STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI), 得到核心靶基因; 通过 David 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析, 利用 Autodock Vina 软件对核心靶点与白屈菜红碱、血根碱进行分子对接验证。结果 MCEE 的 10%致死质量浓度 (LC_{10}) 为 6.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 与对照组相比, MCEE 可使斑马鱼肝脏受损, 肝脏组织中出现大量空泡, 肝细胞排列紊乱、松散, 甚至出现组织结构降解, AST 和 ALT 活性均显著升高 ($P<0.01$); 与对照组相比, MCEE 抑制 HepG2 细胞增殖 ($P<0.05$ 、 0.01), 诱导细胞凋亡。网络药理学结果表明血根碱、白屈菜红碱和肝毒性交集靶点有 15 个, PPI 网络核心靶点为 GSK3B、MAPK1、MTOR、PIK3CG、PTGS2 等; GO 功能富集靶点主要富集于 TORC2 信号负调控细胞对营养的反应、线粒体外膜、MAP 激酶活性等过程; KEGG 通路富集分析发现血根碱、白屈菜红碱肝毒性与 VEGF 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等有关。分子对接结果显示白屈菜红碱、血根碱与关键靶蛋白 GSK3B、MAPK1、MTOR、PIK3CG、PTGS2 之间有良好的结合作用。结论 MCEE 具有一定的肝毒性, 可能与 TORC2 信号负调控细胞对营养的反应、线粒体外膜、MAP 激酶活性等过程, VEGF 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等有关。

关键词: 博落回; 肝毒性; 斑马鱼; HepG2 细胞; 网络药理学; 白屈菜红碱; 血根碱

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)11-3132-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.008

Evaluation of hepatotoxicity of ethanol extract of *Macleaya cordata* based on zebrafish, HepG2 cell experiments and network pharmacology

LUO Wenwen^{1,4}, HAN Wei^{1,2,3}, QIAN Guiyun^{1,2,3}, WEI Meiyun^{1,2,3}, LI Zhe^{1,2}

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
2. Innovation and R&D Center for Veterinary Traditional Chinese Medicine Preparations, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
3. Research Center for Medicinal Polymer Materials, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China
4. College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: Objective The hepatotoxicity of the methanol extract of *Macleaya cordata* (MCEE) on zebrafish and HepG2 cells was evaluated. The potential mechanisms of the hepatotoxicity of the main active components, sanguinarine and chelerythrine, were

收稿日期: 2025-05-02

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划一般项目 (黔科合基础-ZK[2022]一般 472); 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目 (贵中医大创合字[2022]78 号); 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室 (贵州医科大学) 开放课题基金资助项目 (黔教合 KY 字[2019]047 号); 贵州省高等学校中药民族药 (苗药) 新剂型新制剂工程研究中心项目 (黔教技[2022]022 号)

作者简介: 罗文雯 (2000—), 女, 硕士研究生, 主要从事中药药效及毒理研究。E-mail: 2772403610@qq.com

***通信作者:** 李哲 (1990—), 女, 讲师, 博士, 主要从事中医药对相关疾病的物质基础及作用机制研究。E-mail: lizhe033@gzy.edu.cn

predicted through network pharmacology and molecular docking. **Methods** The effects of MCEE (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the mortality of 4-day-old zebrafish larvae were investigated, and the liver pathological tissue lesions were observed. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. The effects of MCEE (5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on the proliferation and apoptosis of HepG2 cells were evaluated by MTT and Hoechst 33342 staining. The intersection targets of sanguinarine and chelerythrine hepatotoxicity were predicted through the Swiss Target Prediction database, Gene Cards, OMIM and MalaCards databases. The protein-protein interaction network (PPI) was constructed by the STRING database to obtain the core target genes. The Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were performed through the David database. The molecular docking was verified by the Autodock Vina software between the core targets and MCEE. **Results** The 10% lethal concentration (LC_{10}) of MCEE was 6.07 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Compared with the control group, MCEE could cause liver damage in zebrafish, with a large number of vacuoles in the liver tissue, disordered and loose arrangement of liver cells, and even degradation of tissue structure. The activities of AST and ALT were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the control group, MCEE inhibited the proliferation of HepG2 cells ($P < 0.05, 0.01$) and induced apoptosis. The network pharmacology results showed that there were 15 intersection targets of sanguinarine, chelerythrine and hepatotoxicity. The core targets of the PPI network were GSK3B, MAPK1, MTOR, PIK3CG, PTGS2, etc. The GO functional enrichment targets were mainly enriched in the processes of negative regulation of TORC2 signaling in response to nutrients, mitochondrial outer membrane, MAP kinase activity, etc. The KEGG pathway enrichment analysis found that the hepatotoxicity of sanguinarine and chelerythrine was related to the VEGF signaling pathway, mTOR signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, etc. The molecular docking results showed that sanguinarine and chelerythrine had good binding effects with the key target proteins GSK3B, MAPK1, MTOR, PIK3CG, PTGS2. **Conclusion** MCEE has certain hepatotoxicity, which may be related to the processes of negative regulation of TORC2 signaling in response to nutrients, mitochondrial outer membrane, MAP kinase activity, etc., as well as the VEGF signaling pathway, mTOR signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, etc.

Key words: *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br.; hepatotoxicity; zebrafish; HepG2 cells; network pharmacology; chelerythrine; sanguinarine

博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 作为罂粟科多年生草本植物, 在我国分布广泛, 资源丰富^[1], 其提取物富含白屈菜红碱、血根碱等生物活性成分, 在医药、兽药及农药领域展现出抗菌、抗炎、抗肿瘤等潜在应用价值, 已成为研究热点^[2]。然而, 随着应用范围扩大, 博落回的安全性问题, 尤其是肝毒性风险日益凸显。肝脏作为人体主要代谢和解毒器官, 对外源性物质的毒性作用极为敏感, 系统研究其肝毒性机制, 对保障博落回合理应用、规避肝脏损伤风险至关重要。

斑马鱼模型和 HepG2 细胞系是药物及天然产物肝毒性研究的重要工具^[3]。斑马鱼胚胎透明、发育迅速, 肝脏结构与功能接近人类, 通过观察幼鱼死亡率、肝脏病理变化及酶活性, 可快速评估肝毒性^[4]; HepG2 细胞保留人类肝细胞代谢特性, 借助 MTT、Hoechst 33342 染色等方法, 能从细胞层面深入探究肝毒性机制^[5]。两者结合可从整体动物和细胞水平互补验证, 显著提升肝毒性评价的准确性。

本研究基于斑马鱼和 HepG2 细胞模型, 全面评估博落回醇提取物 (MCEE) 的肝毒性, 并结合网络药理学和分子对接技术, 预测其主要活性成分血根碱和白屈菜红碱潜在肝毒性机制。通过整合体内

外实验与生物信息学分析, 旨在为 MCEE 的安全应用提供科学依据, 助力优化其应用方案, 推动博落回资源的合理开发与可持续利用。

1 材料

1.1 药材与主要试剂

博落回采集于贵州省贵阳市花溪区, 经贵州中医药大学中药鉴定教研室张爽讲师鉴定为罂粟科博落回属多年生草本植物博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. 全草。

血根碱对照品、白屈菜红碱对照品 (批号 AF8082793、AF9030102, 质量分数 $\geq 98\%$, 成都埃法生物科技有限公司); 胎牛血清 (货号 C04001, 上海逍鹏生物科技有限公司); MTT 试剂、Hoechst 33342 染色液、苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (批号 M8180、C0031、G1120, 北京索莱宝科技有限公司); 天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测试剂盒、丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 检测试剂盒 (批号 TE0131、TE0121, 北京雷根生物技术有限公司); DMEM 培养基、0.25% 胰蛋白酶消化液 (批号 G4511、G4001, 武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.2 主要仪器

LC-20AT 型高效液相色谱仪 (日本岛津公司);

RM2016 型组织切片机 (上海徕卡仪器有限公司); JB-P5 型包埋机 (武汉俊杰电子有限公司); XSP-C204 型生物显微镜 (重庆重光实业有限公司); Multiskan Sky 型全波长酶标仪 (赛默飞世尔科技公司); BPN-80CH (UV) 型二氧化碳培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); CKX53 型倒置荧光显微镜 (日本奥林巴斯光学工业股份有限公司); SW-CJ-1FD 型超净工作台 (上海尚道仪器设备有限公司)。

1.3 动物

正常野生 AB 型斑马鱼 (鱼龄约 3 个月, 雌雄各半) 购买于山东一溪月生物科技有限公司, 幼鱼由本实验室饲养繁殖。于水温 $(28.5 \pm 0.3)^\circ\text{C}$ 、pH 值为 7.2 ± 0.3 的环境中生长, 光照 14 h、黑暗 10 h 交替; 随机选取斑马鱼雌雄比为 1:2 放入孵育盒中自然受精产卵, 胚胎于 E3 培养液生长至幼鱼, 显微镜下观察胚胎发育情况^[6]。

人肝癌 HepG2 细胞 (批号 STCC10114P, 武汉赛维尔生物科技有限公司)。将 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37°C 、5% CO_2 恒温培养箱, 使用 0.25% 胰酶常规消化细胞并传代。

1.4 数据库与分析软件

TCMSP 数据库 (<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>); Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); GeneCard 数据库 (<https://www.genecards.org/>); OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>); TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>); STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>); UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); Metascape 数据库 (<https://metascape.org/gp/>); Venny2.1.0 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); Bioinformatics 平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>)。

2 方法

2.1 MCEE 的制备及血根碱、白屈菜红碱含量测定

2.1.1 MCEE 的制备 取干燥博落回药材 50.35 g, 粉碎后用 10 倍量 50% 乙醇回流提取 2 次, 每次 2 h, 合并滤液并浓缩, 真空干燥后粉碎得细粉 2.325 g, 该提取方法旨在富集博落回中的主要生物碱类成分。制备好的提取物细粉置于 -20°C 条件下保存备用。

2.1.2 色谱条件^[7] Thermo 色谱柱 ($250.0\text{ mm} \times$

4.6 mm , $5\text{ }\mu\text{m}$), 柱温 35°C , 波长 284 nm , 体积流量 $0.8\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量为 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。流动相为乙腈 (A)-0.1% 磷酸 (B), 洗脱条件: $0\sim 8\text{ min}$, 25% A; $8\sim 20\text{ min}$, 25% $\rightarrow$ 60% A; $20\sim 22\text{ min}$, 60% $\rightarrow$ 25% A; $22\sim 29\text{ min}$, 25% A; $29\sim 30\text{ min}$ 。

2.1.3 对照品、供试品溶液的制备 精密称取血根碱对照品 1.08 mg、白屈菜红碱对照品 1.05 mg, 将其分别置于 10 mL 量瓶中, 加入甲醇溶液稀释至刻度, 配制最终质量浓度为 $1.08\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的血根碱对照品和 $1.05\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的白屈菜红碱对照品溶液。取 MCEE 干燥粉末 17.08 mg 溶于 10 mL 量瓶, 加入甲醇溶液稀释至刻度, 得最终质量浓度为 $1.708\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。将对照品和供试品溶液注入 HPLC 仪, 计算峰面积, 进行血根碱和白屈菜红碱的含量测定。

2.2 MCEE 浓度筛选

取受精后 4 d 的斑马鱼幼鱼, 12 孔板每孔放置 20 尾, 分别暴露于不同质量浓度的 MCEE (5 、 10 、 20 、 40 、 80 、 160 、 320 、 $640\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 对照组不加药, 每组设置 3 孔重复。在 28.5°C 生化培养箱中暴露 24 h, 统计各组斑马鱼死亡数量, 及时移除死亡幼鱼并计算死亡率^[8]。

2.3 肝脏组织切片

随机选取受精 4 d 的斑马鱼幼鱼, 分别暴露于 MCEE (5 、 10 、 20 、 40 、 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 中孵育 24 h, 对照组不加药。使用 4% 多聚甲醛固定幼鱼 48 h, 经脱水、 65°C 石蜡包埋制成石蜡标本, 再用石蜡切片机切片, 进行 HE 染色后, 于显微镜下观察并拍照^[9]。

2.4 肝功能指标评价

将受精 4 d 的斑马鱼幼鱼放置于 12 孔板, 每孔 20 尾, 每组设置 3 孔重复, 分别用 MCEE (5 、 10 、 20 、 40 、 $80\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 孵育 24 h, 对照组不加药。收集每组 60 尾幼鱼, 加入磷酸盐缓冲液 (PBS, 1:9) 匀浆, $3\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 试剂盒法测定 ALT 和 AST 活性。

2.5 MTT 法测定 MCEE 对细胞存活率的影响

取对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 5 000 个接种于 96 孔板, 加入不同质量浓度的 MCEE (5 、 10 、 20 、 40 、 80 、 160 、 $320\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 对照组不加药, 每组设 6 个复孔。分别培养 24、48、72 h 后, 每孔加入 $5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$, 继续培养 4 h, 再加入二甲基亚砜 (DMSO) $100\text{ }\mu\text{L}$, 在酶标仪 490 nm

波长处测定吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.6 Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡情况

取对数生长期 HepG2 细胞, 调整密度至 $1.0 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$, 每孔 1 mL 接种于 6 孔培养板, 培养 24 h 待细胞贴壁。加入不同质量浓度 MCEE (5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 孵育 48 h, 对照组不加药, 吸出培养液并漂洗, 每孔加入 1 mL Hoechst 33342 染色液, 于培养箱中染色 30 min。用 PBS 洗涤 2~3 次后, 在倒置荧光显微镜下观察细胞凋亡形态^[10]。

2.7 MCEE 肝毒性作用靶点预测

基于本课题组前期研究^[11], 确定 MCEE 中血根碱和白屈菜红碱为主要活性成分, 将其导入 Swiss Target Prediction 数据库, 提取 “probability” 值 > 0 的潜在作用靶点并汇总。

2.8 肝毒性疾病靶点及药物-疾病共同靶点获取

通过 Gene Cards、OMIM 和 TTD 数据库, 以 “hepatotoxicity” 为关键词筛选肝毒性相关靶点, 去除重复基因。将 MCEE 毒性成分靶点与肝毒性靶点导入 Venny 2.1.0 网站, 绘制韦恩图, 获取药物-疾病共同靶点^[12]。

2.9 蛋白质-蛋白质互相作用 (PPI) 网络构建

将药物-疾病共同靶点导入 STRING 网站, 设置蛋白质类型为 Homo sapiens, 置信度 minimum required interaction score 为 0.900 并隐藏离散点, 输出 tsv 格式数据。将数据导入 Cytoscape_v3.8.0 软件, 通过 Analyze Network 功能, 依据度 (Degree) 值调整节点大小、颜色及边的粗细, 构建并可视化 PPI 网络图, 其中 Degree 值代表节点连接数, 数值越大节点越关键^[13]。

2.10 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析

利用 Metascape 数据库, 导入交集靶点, 设定物种为 “Homo sapiens”, 以假阳性率 (FDR) ≤ 0.05 为标准进行基因功能分析。将结果载入微生信网站可视化, 从生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 和分子功能 (MF) 3 个层次开展 GO 分析, 并通过 KEGG 分析肝毒性通路, 利用 Bioinformatics 平台可视化结果^[14]。

2.11 分子对接

根据 MCEE 毒性成分和核心靶点筛选结果, 结合临床药理实验及文献报道, 选取 Degree 值最大的 2 个毒性成分及核心靶点。在 RCSB PDB 网站下载受体文件 (PDB 格式), 经 Pymol 软件处理后保存为 PDB 格式; 在 Autodock 软件中进一步处理受体文件 (去水、加氢、计算电荷、改变原子类型), 保存为 PDBQT 格式。从 Pubchem 网站下载配体文件 (3Dsdf 格式), 经 OpenBabel-2.4.1 转换为 MOL2 格式, 再在 Autodock 中处理 (加极性氢、计算电荷、确定可旋转键), 保存为 PDBQT 格式。将受体和配体的 PDBQT 文件导入 AutoDockTools1.5.6 软件, 设置对接参数进行半柔性对接, 分析构象结合能和相互作用力, 筛选并保存最优构象, 最后用 Pymol 软件进行 3D 可视化分析。

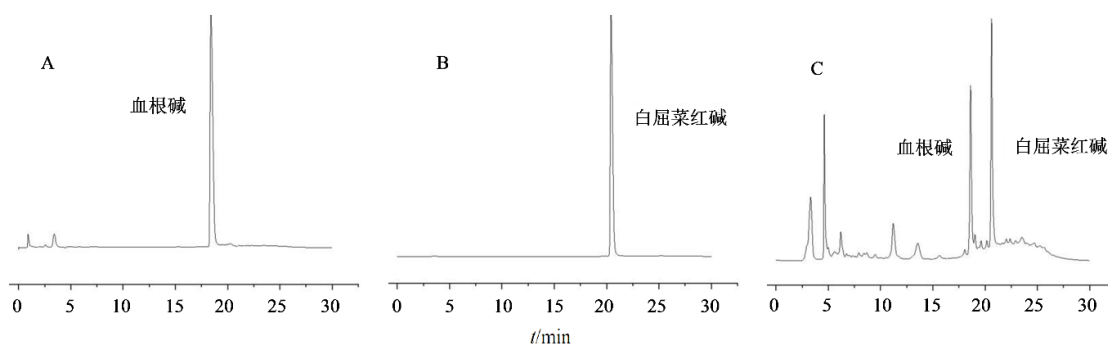
2.12 数据处理

采用 Graph Pad Prism 9.3.0 统计软件进行数据分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 MCEE 中血根碱、白屈菜红碱含量测定结果

采用 HPLC 法对 MCEE 中血根碱、白屈菜红碱进行含量测定。结果表明 (图 1), MCEE 中血根碱



A-血根碱对照品; B-白屈菜红碱对照品; C-供试品。

A-sanguinarine reference substance; B-chelerythrine reference substance; C-test sample.

图 1 MCEE 中血根碱和白屈菜红碱的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of sanguinarine and chelerythrine in MCEE

的保留时间 18.6 min, 与血根碱对照品的色谱峰保留时间相同; MCEE 中白屈菜红碱的保留时间 20.6 min, 与白屈菜红碱对照品的色谱峰保留时间相同。MCEE 中血根碱、白屈菜红碱的质量分数分别为 4.200、12.120 mg·g⁻¹, 在色谱图中是最明显的 2 个色谱峰。

3.2 胚胎发育

如图 2 所示, 斑马鱼胚胎发育进程清晰, 受精后 0.75 h 进入卵裂期, 2.2 h 进入囊胚期, 5.25 h 进

入肠胚期, 10 h 后进入体节期, 24 h 后进入咽部期, 48 h 后进入孵化期, 72 h 形成幼鱼^[15]。此时幼鱼全体透明, 便于进行各项观察。

3.3 “量-毒”曲线评价

利用 Graph Pad Prism 9.3.0 软件绘制 MCEE 对 4 d 斑马鱼幼鱼的“量-毒”曲线。经计算, MCEE 对斑马鱼幼鱼的 10%致死质量浓度(LC₁₀)为 6.07 μg·mL⁻¹ (图 3), 该结果直观反映了 MCEE 质量浓度与斑马鱼幼鱼毒性反应的关系。

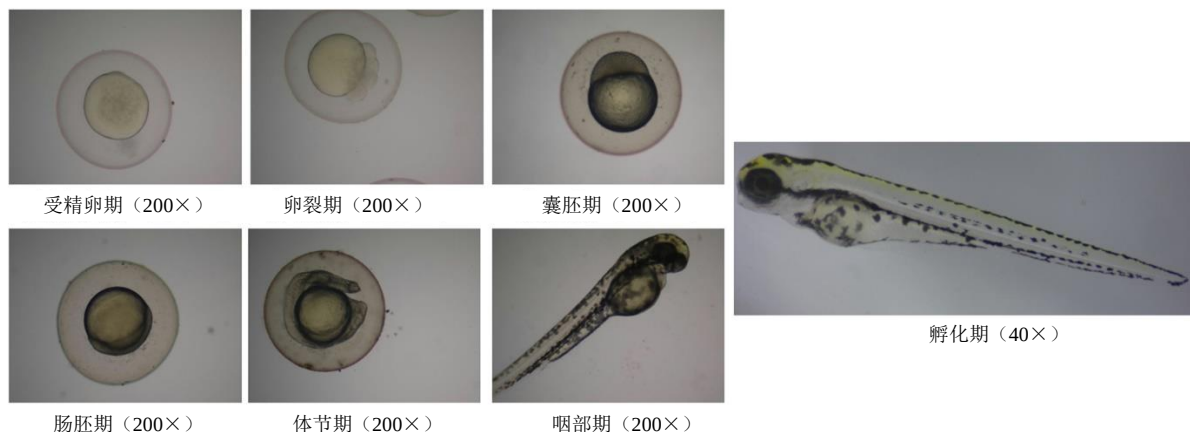


图 2 斑马鱼胚胎发育情况

Fig. 2 Developmental status of zebrafish embryos

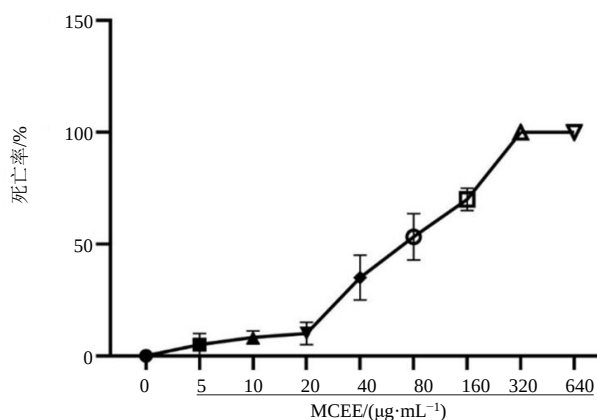


图 3 斑马鱼幼鱼经 MCEE 处理 24 h 的“量-毒”曲线
($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 “Dose-toxicity” curve of zebrafish larvae treated with MCEE for 24 h ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.4 斑马鱼肝脏组织结构评价

肝脏病理切片观察结果 (图 4) 显示, 对照组肝细胞形态基本正常, 排列紧实、有序; 5 μg·mL⁻¹ 的 MCEE 组无明显病变, 与对照组基本一致; 10、20 μg·mL⁻¹ 的 MCEE 组均有少量病变出现, 斑马鱼肝脏组织出现少量空泡, 肝细胞排列有些紊乱、松

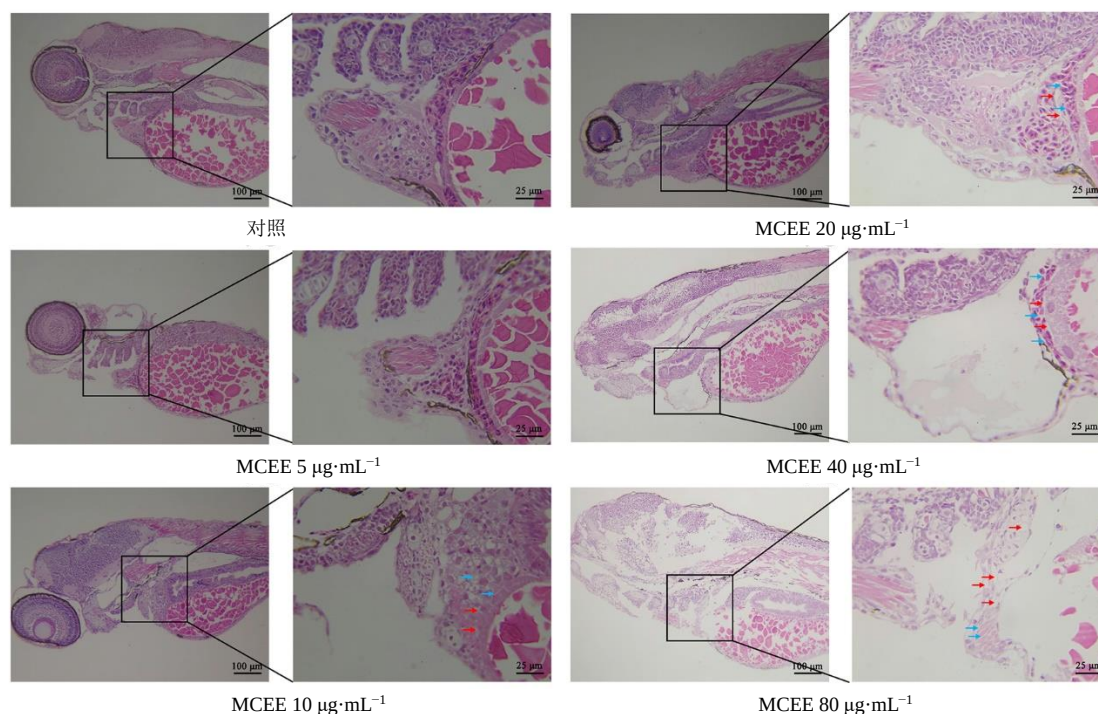
散; 而 40、80 μg·mL⁻¹ 的 MCEE 组均出现明显病变, 肝脏组织中出现大量空泡, 肝细胞排列紊乱、松散, 甚至出现组织结构降解。结果表明, MCEE 对斑马鱼肝脏组织结构具有明显破坏作用。

3.5 斑马鱼肝脏生化指标评价

ALT 和 AST 活性是评估肝毒性的重要传统标志物^[16], 结果显示, 与对照组比较, 经 MCEE 暴露处理 24 h 后, 10、20、40、80 μg·mL⁻¹ 组斑马鱼幼鱼的 AST 和 ALT 活性均显著升高 ($P<0.01$), 且随着 MCEE 质量浓度增加, 酶活性升高趋势愈发明显, 呈现出典型的质量浓度相关性 (图 5), 进一步证实 MCEE 对斑马鱼肝脏功能产生损害。

3.6 MCEE 对细胞存活率的影响

MTT 实验结果表明, 不同质量浓度 (5、10、20、40、80、160、320 μg·mL⁻¹) 的 MCEE 作用于 HepG2 细胞 24、48、72 h 后, 均能有效抑制细胞增殖 ($P<0.05$ 、 0.01)。并且随着 MCEE 药物浓度的增加, 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用逐渐增强, 呈现出明显的浓度相关性 (图 6), 结果表明, MCEE 对 HepG2 细胞具有显著的生长抑制效应。选取 5、10、20 μg·mL⁻¹、设置 48 h 孵育时间, 作为后续

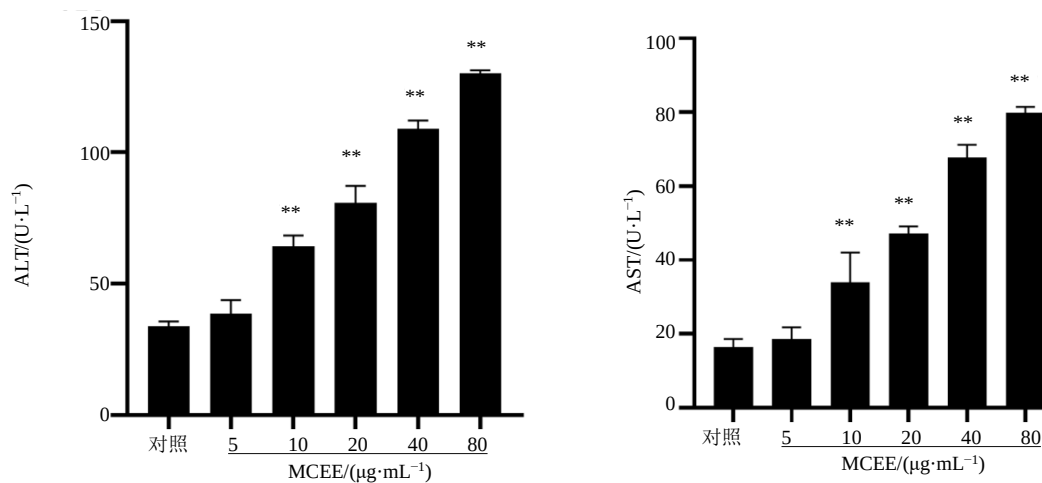


红箭头-肝脏组织中出现的空泡；蓝箭头-肝细胞排列紊乱、松散。

Red arrow-vacuoles appearing in liver tissue; Blue arrow-disordered and loose arrangement of liver cells.

图 4 MCEE 对斑马鱼幼鱼肝脏 HE 染色结果

Fig. 4 Results of HE staining of liver of zebrafish larvae treated with MCEE



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group

图 5 MCEE 对斑马鱼幼鱼整体肝功能 ALT、AST 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=60$)

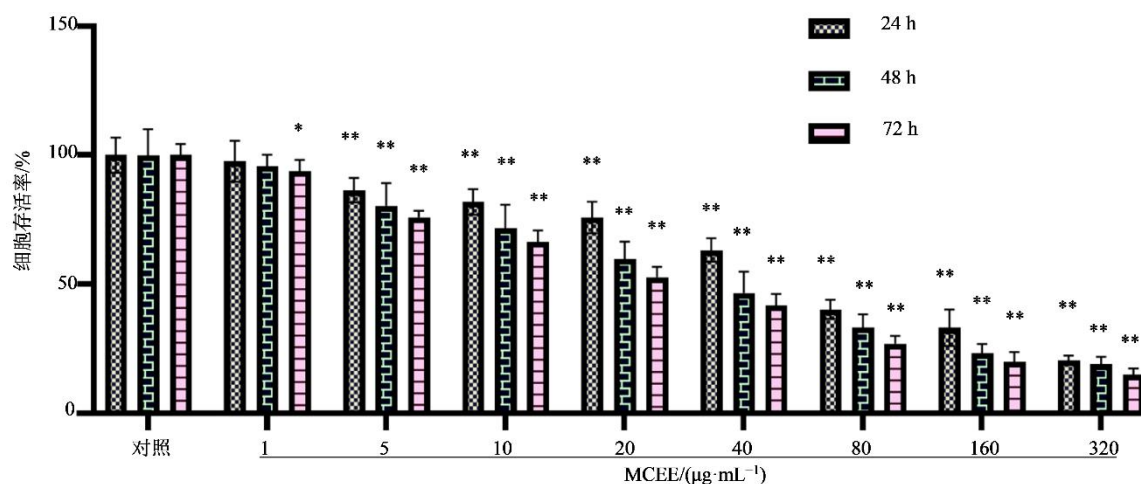
Fig. 5 Effects of MCEE on activities of ALT and AST overall liver function enzymes in zebrafish larvae ($\bar{x} \pm s$, $n=60$)

实验的处理条件。

3.7 Hoechst 33342 染色

经不同浓度 MCEE 作用于 HepG2 细胞 48 h 后, 白光视野下对照组细胞呈现规则的多边形轮廓, 胞质透亮且分布均匀, 展现出良好的细胞活性与形态完整性。相比之下, MCEE 组的细胞部分细胞体积缩

小形成圆形, 细胞边界变得模糊不清。在 Hoechst 33342 染色后, 对照组细胞在视野中呈均匀弱蓝色, 细胞核呈圆或卵圆形; 而 MCEE 组中凋亡细胞数量明显增多, 出现染色质凝集、细胞核着色深、核固缩、变形及碎裂等典型的细胞凋亡特征性变化 (图 7), 表明 MCEE 可诱导 HepG2 细胞发生凋亡^[17]。



与相同时间点对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group at same time point.

图 6 MCEE 对 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 Effects of MCEE on cell viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

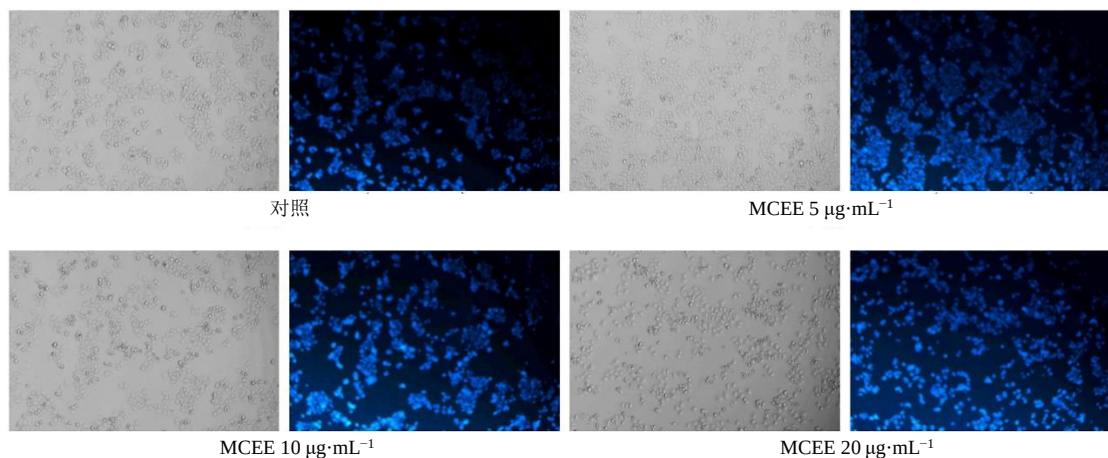


图 7 Hoechst 33342 染色观察 MCEE 处理的 HepG2 细胞核 ($\times 100$)

Fig. 7 Hoechst 33342 staining observation of HepG2 cell nuclei treated with MCEE ($\times 100$)

3.8 MCEE 肝毒性作用靶点预测

运用 Swiss Target Prediction 数据库对 MCEE 的主要活性成分血根碱和白屈菜红碱进行系统分析, 经筛选共获得 92 个潜在作用靶点。同时, 通过 Gene Cards、OMIM 和 MalaCards 数据库以“hepatotoxicity”为关键词筛选收集肝毒性相关的潜在靶点 710 个, 对 MCEE 活性成分潜在靶点和肝毒性靶点取交集, 获得交集靶点 15 个。基于上述结果, 利用 Venny 软件绘制毒性成分-疾病共同靶点韦恩图 (图 8)。

3.9 PPI 网络图及筛选核心靶点

将药物-疾病共同靶点导入 STRING 网站进行分析, 构建了 PPI 网络。通过 Cytoscape_v3.8.0 软件可视化后, 结果见图 9, 网络中部分节点的 Degree

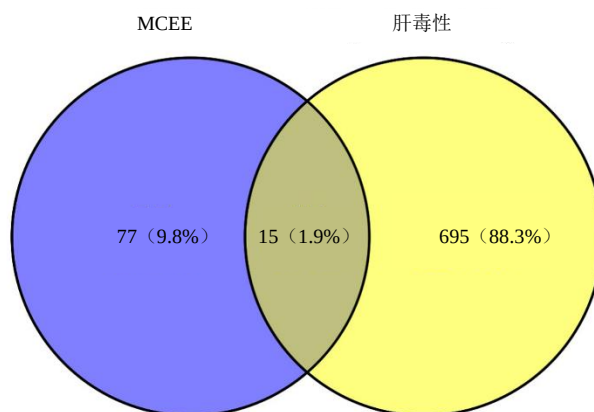


图 8 MCEE 活性成分及肝毒性交集靶点的韦恩图

Fig. 8 Venn diagram of intersection target sites of active ingredients of MCEE and hepatotoxicity

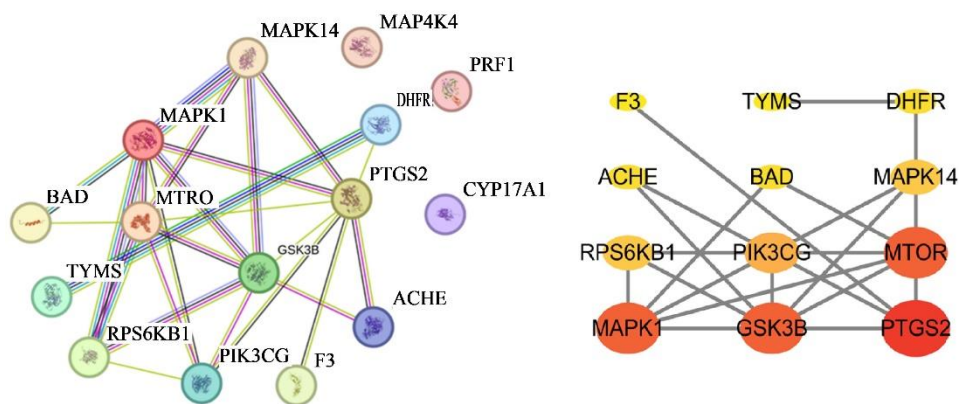


图 9 PPI 网络图

Fig. 9 PPI network diagram

值较高, 如 GSK3B、MAPK1、MTOR、PIK3CG、PTGS2 等, 这些节点连接的其他节点数量多, 表明其在 PPI 中处于核心地位^[18], 可能在 MCEE 肝毒性相关信号传导中发挥重要作用。节点大小和颜色深浅直观反映了 Degree 值的差异, 边的粗细则体现了

蛋白间结合率评分高低, 清晰展示了各蛋白间的相互作用关系。

3.10 GO 分析和 KEGG 通路分析

运用 Metascape 数据库对交集基因进行 GO 生物功能和 KEGG 通路富集分析^[19]。如图 10 所示,

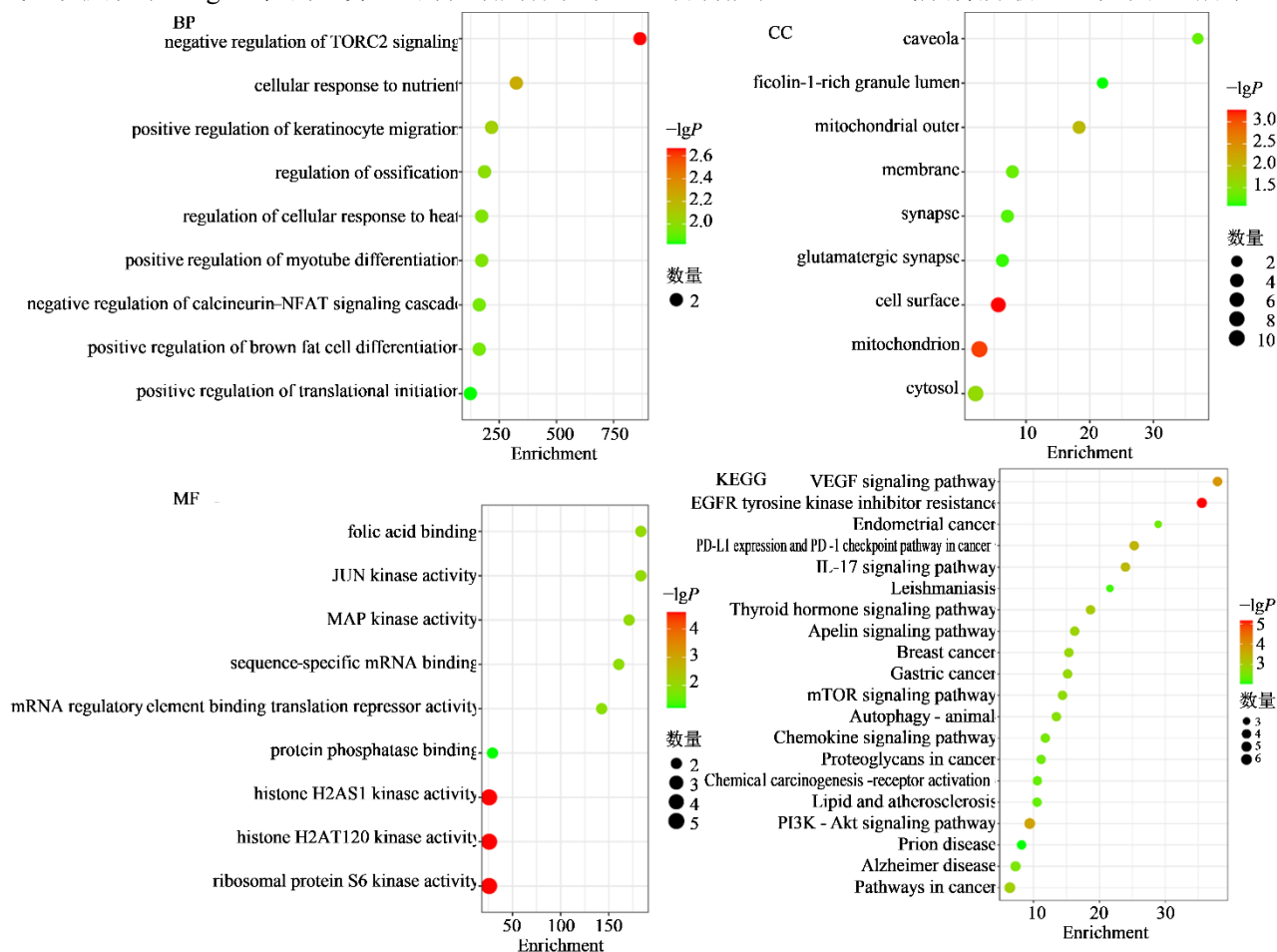


图 10 GO、KEGG 富集分析

Fig. 10 GO and KEGG enrichment analysis

GO 分析结果显示,在 BP 层面,共同靶点主要富集于 TORC2 信号负调控细胞对营养的反应、正调控角质形成细胞迁移、调控骨化等;CC 层面,集中在 线粒体外膜、突触、线粒体等;MF 层面,涉及 JUN 激酶活性、MAP 激酶活性、蛋白磷酸酶结合等。KEGG 通路富集分析表明,MCEE 肝毒性相关靶点显著富集 VEGF 信号通路、mTOR 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等,这些通路的异常激活或抑制可能与 MCEE 诱导的肝毒性密切相关。通过微生信网站和 Bioinformatics 平台可视化,直观呈现了富集结果的分布特征和关键通路信息。

表 1 血根碱和白屈菜红碱与核心靶点的结合能

Table 1 Binding energies of sanguinarine and chelerythrine with core targets

名称	结合能/(kJ·mol ⁻¹)				
	GSK3B	MAPK	MTOR	PIK3CG	PTGS2
白屈菜红碱	-35.56	-38.49	-32.22	-33.05	-38.91
血根碱	-42.68	-42.68	-34.31	-41.42	-40.17

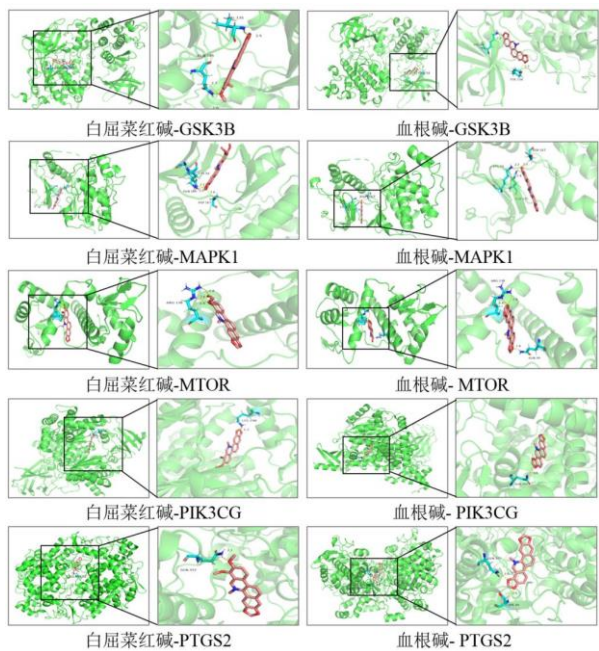


图 11 白屈菜红碱和血根碱与关键靶点分子对接结果

Fig. 11 Molecular docking results of chelerythrine and sanguinarine with key target

氨基酸残基的相互作用模式,进一步验证了 MCEE 毒性成分与关键靶点的特异性结合,为阐明 MCEE 肝毒性分子机制提供了结构生物学依据。

4 讨论

本研究通过斑马鱼模型、HepG2 细胞结合网络

3.11 分子对接

白屈菜红碱、血根碱 2 个化学成分与 Dgree 值排名前 5 的核心靶点进行分子对接,经 RCSB PDB、Pymol、Autodockvina 等软件一系列处理后,进行半柔性对接。结果显示,白屈菜红碱、血根碱与核心靶点之间存在较强的结合活性,部分复合物的构象结合能较低(表 1),如白屈菜红碱与 PTGS2 的结合能为-38.91 kJ·mol⁻¹,血根碱与 GSK3B、MAPK 的结合能为-42.68 kJ·mol⁻¹,且相互作用力(如氢键、疏水作用等)稳定。通过 Pymol 软件进行 3D 可视化分析(图 11),清晰展示了毒性成分与靶点

药理学与分子对接技术,系统揭示了 MCEE 的肝毒性及其潜在机制。斑马鱼实验中 MCEE 对 4 d 幼鱼的 LC₁₀为 6.07 μg·mL⁻¹,表明其在较低浓度下即可引发毒性反应。肝脏病理切片显示肝细胞排列紊乱、空泡化等典型脂肪变性特征,ALT 和 AST 活性显著升高且呈剂量相关性,证实 MCEE 可破坏斑马鱼肝脏组织结构并损伤肝功能。斑马鱼作为模式生物,其肝脏在生理功能和基因表达上与人类肝脏具有高度同源性,这一结果为 MCEE 的肝毒性提供了体内实验依据^[20-21]。

在细胞水平上 MTT 实验证实 MCEE 对 HepG2 细胞的增殖抑制作用呈浓度和时间相关性,Hoechst 33342 染色进一步显示 MCEE 可诱导细胞凋亡,伴随染色质凝集、核固缩等典型凋亡形态学改变。HepG2 细胞保留了人肝细胞的关键代谢酶系和功能,其结果从分子机制层面揭示了 MCEE 对肝脏细胞的直接毒性作用^[22-23]。

网络药理学分析发现 MCEE 活性成分(白屈菜红碱和血根碱)与肝毒性相关的交集靶点共 15 个,通过 PPI 网络筛选出 GSK3B、MAPK1、MTOR 等核心靶点。GO 功能富集分析显示,这些靶点主要参与 TORC2 信号对营养反应的调控、线粒体功能及 MAP 激酶活性等生物学过程;KEGG 通路富集则表明 MCEE 肝毒性可能与 VEGF、mTOR 及 PI3K-

Akt 等信号通路异常激活密切相关。这些通路在细胞增殖、凋亡、代谢及血管生成中起关键作用,其紊乱可能导致肝细胞损伤和功能障碍^[24-25]。

分子对接结果进一步验证了 MCEE 活性成分与核心靶点的结合能力。白屈菜红碱和血根碱与 GSK3B、MAPK1、PTGS2 等靶点的结合能均低于 $-32.22 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, 提示两者可通过与关键蛋白稳定结合, 干扰细胞内信号传导, 从而引发肝毒性。GSK3B 是 PI3K-Akt 通路的关键调控因子, 其异常激活可诱导肝细胞凋亡^[26]; MAPK1 参与细胞应激反应和炎症调节, 过度激活可能加剧肝脏氧化应激损伤^[27]。

本研究首次将斑马鱼模型、细胞实验与网络药理学相结合, 多维度证实了 MCEE 的肝毒性并初步阐明其潜在机制。然而 MCEE 成分复杂, 除白屈菜红碱和血根碱外, 其他成分是否参与肝毒性作用仍需进一步探究。此外, 本研究仅揭示了 MCEE 与关键靶点的结合特性, 其在体内的动态代谢过程及对相关通路的上下游调控机制尚需通过基因敲除、动物长期毒性实验等深入研究。后续可围绕 MCEE 肝毒性的分子机制开展干预研究, 为博落回的安全应用提供更全面的科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Liu Z Q, Xu Y F, Liu W, et al. *Macleaya cordata* protopine total alkaloids as potential treatment for diarrhoea: Mechanistic insights and target identification [J]. Res Vet Sci, 2025, 189: 105633.
- [2] Lin L, Liu Y C, Huang J L, et al. Medicinal plants of the genus *Macleaya* (*Macleaya cordata*, *Macleaya microcarpa*): A review of their phytochemistry, pharmacology, and toxicology [J]. Phytother Res, 2018, 32(1): 19-48.
- [3] Ni X, Gao C, Zhu X L, et al. Isobavachalcone induces hepatotoxicity in zebrafish embryos and HepG2 cells via the System Xc--GSH-GPX4 signaling pathway in ferroptosis response [J]. J Appl Toxicol, 2024, 44(8): 1139-1152.
- [4] Park J, An G, Hong T, et al. Fenoxycarb induces cardiovascular, hepatic, and pancreatic toxicity in zebrafish larvae via ROS production, excessive inflammation, and apoptosis [J]. Sci Total Environ, 2025, 969: 178957.
- [5] Patil J, Bhattacharya S, Saoji S D, et al. Cabozantinib-phospholipid complex for enhanced solubility, bioavailability, and reduced toxicity in liver cancer [J]. Ther Deliv, 2025, 16(1): 25-41.
- [6] 袁士雅, 叶晨英, 陈亿婷, 等. 不同炮制程度栀子水提取物对斑马鱼模型的急性毒性及肝肾损伤 [J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(1): 247-252, 271.
Yuan S Y, Ye C Y, Chen Y T, et al. Acute toxicity and hepatorenal toxicity of aqueous extracts of Zhizi (*Gardeniae fructus*) from different degrees of processing in zebrafish model [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2025, 43(1): 247-252, 271.
- [7] 郭宇鸽. 小果博落回叶质量标准及其不同产地指纹图谱研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
Guo Y G. Study on quality standard of *Macleaya microcarpa* leaves and its fingerprint from different habitats [D]. Changsha: Hunan University of Chinese Medicine, 2012.
- [8] 范琦琦, 李芝奇, 陈美琳, 等. 基于斑马鱼模型的吴茱萸提取物肝毒性评价 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1768-1775.
Fan Q Q, Li Z Q, Chen M L, et al. Hepatotoxicity evaluation of *Euodiae Fructus* extract based on zebrafish model [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53(6): 1768-1775.
- [9] 原杨, 尚悦, 王鹏, 等. 基于斑马鱼模型的中药致肝脏毒性评价的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(5): 933-940.
Yuan Y, Shang Y, Wang P, et al. Research progress on evaluation of hepatotoxicity of traditional Chinese medicine based on zebrafish model [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(5): 933-940.
- [10] 李洁, 郑明明, 裴李圆, 等. α -亚麻酸植物甾醇酯调节 SIRT1 抑制油酸和胆固醇联合诱导的 HepG2 细胞焦亡 [J]. 营养学报, 2023, 45(3): 264-272.
Li J, Zheng M M, Pei L Y, et al. Plant sterol ester of α -linolenic acid inhibits pyroptosis induced by oleic acid plus cholesterol by regulating sirt1 in HepG2 cells [J]. Acta Nutr Sin, 2023, 45(3): 264-272.
- [11] 赵春丽, 周永强, 韩伟, 等. 博落回愈伤组织和悬浮细胞培养体系的建立及两种生物碱的积累 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(6): 1458-1460.
Zhao C L, Zhou Y Q, Han W, et al. Establishment of callus and suspension cell culture system of *Macleaya cordata* and accumulation of two alkaloids [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2020, 31(6): 1458-1460.
- [12] 曾春晖, 邢丽蓉, 陈海鹏, 等. 基于生物信息学预测川楝子肝毒性及实验探讨炮制减毒原理 [J]. 中华中医药学刊, 2025, 43(4): 1-6, 259-261.

- Zeng C H, Xing L R, Chen H P, et al. Principles of processing method reducing hepatotoxicity of Chuanlianzi (*Toosendan Fructus*): Bioinformatics prediction and experiment validation [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2025, 43(4): 1-6, 259-261.
- [13] Wang X Y, Yang X Y, Liu C, et al. Serum pharmacochemistry combined with network pharmacology reveals the hepatotoxicity mechanism of *Alangium chinense* (Lour.) Harms [J]. J Ethnopharmacol, 2025, 340: 119312.
- [14] Yuan H J, Han Q C, Yu H, et al. Calycosin treats acute myocardial infarction via NLRP3 inflammasome: Bioinformatics, network pharmacology and experimental validation [J]. Eur J Pharmacol, 2025, 997: 177621.
- [15] Szopa A, Herbet M, Pachuta-Stec A, et al. Evaluation of developmental toxicity in zebrafish embryos and antiproliferative potential against human tumor cell lines of new derivatives containing 4-nitrophenyl group [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2023, 458: 116325.
- [16] 赵晓然, 陈微, 高杰, 等. 基于模式生物斑马鱼的甘草对何首乌致特异肝损伤的保护作用研究 [J]. 中华中医药杂志, 2024, 39(5): 2491-2497.
- Zhao X R, Chen W, Gao J, et al. Study on the protective effect of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. based on the model organism zebrafish on specific heterogeneous liver injury caused by *Polygonum multiflorum* Thunb [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2024, 39(5): 2491-2497.
- [17] Mu J S, Liu T R, Jiang L, et al. The traditional Chinese medicine baicalein potently inhibits gastric cancer cells [J]. J Cancer, 2016, 7(4): 453-461.
- [18] Liu H Q, Yang S L, Chen B, et al. Integrating network pharmacology and molecular docking to explore the pharmacological mechanism of tanshinone II_A in improving chronic obstructive pulmonary disease [J]. Medicine (Baltimore), 2025, 104(12): e41638.
- [19] Ji K S, Han M Z, Yang M Q, et al. Integrated Meta-analysis and network pharmacology analysis: Evaluation of Zhigancao Decoction as treatment for diabetic cardiomyopathy [J]. Front Cardiovasc Med, 2025, 12: 1454647.
- [20] Wu M Q, Bian J H, Han S, et al. Characterization of hepatotoxic effects induced by pyraclostrobin in human HepG2 cells and zebrafish larvae [J]. Chemosphere, 2023, 340: 139732.
- [21] Rodrigues L C, Godoi A B, Fais V C, et al. Zebrafish embryo-larval testing reveals differential toxicity of new psychoactive substances [J]. Toxicol Rep, 2025, 14: 102018.
- [22] Wang S, Bauer B, Hintzsche H. P25-17 Mixture toxicity of perfluoroalkyl substances (PFAS) in zebrafish larvae and HepG2 cells [J]. Toxicol Lett, 2024, 399: S359.
- [23] Ullah R, Alqahtani A S, Shahat A A, et al. The antiproliferative effects of *Marrubium vulgare*, and toxicity screening in zebrafish embryos [J]. J King Saud Univ Sci, 2024, 36(7): 103241.
- [24] Song S, Qiu R L, Huang Y, et al. Study on the mechanism of hepatotoxicity of *Aucklandia Radix* through liver metabolomics and network pharmacology [J]. Toxicol Res (Camb), 2024, 13(4): tfae123.
- [25] Wang Y Z, Cheng W N, Wang X N, et al. Integrated metabolomics and network pharmacology revealing the mechanism of arsenic-induced hepatotoxicity in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2023, 178: 113913.
- [26] Yin Y H, Qi Y P, Zhang K, et al. Integrating metabolomics and network toxicology to reveal the mechanism of hypoaconitine-induced hepatotoxicity in mice [J]. Pestic Biochem Physiol, 2024, 202: 105950.
- [27] 侯宇芯, 任晋宏, 姚红, 等. 基于网络药理学探讨黄芪抗阿霉素心肌细胞毒性的作用机制 [J]. 山西大学学报(自然科学版), 2023, 46(3): 708-720.
- Hou Y X, Ren J H, Yao H, et al. To explore the mechanism of *Astragali Radix* against doxorubicin cardiomyocyte toxicity based on network pharmacology [J]. J Shanxi Univ (Nat Sci Ed), 2023, 46(3): 708-720.

[责任编辑 兰新新]