

基于柴胡总皂苷拟靶向分析-机器学习-分子模拟的柴胡肝毒质量标志物筛选研究与毒性机制探讨

王 亮¹, 黄娜娜², 郭 威¹, 李 航², 杨菁华¹, 田雨晴¹, 凌伟恒², 秦 政², 孙 蓉^{2,3*}

1. 青岛大学附属山东省妇幼保健院, 山东 济南 250014

2. 山东大学齐鲁第二医院, 山东 济南 250033

3. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

摘要:目的 基于柴胡总皂苷 (total saikosaponins of *Bupleuri Radix*, TSS) 肝组织暴露成分与肝损伤表型的关联, 筛选柴胡肝毒性质量标志物 (hepatotoxicity quality marker, HQM), 并探讨其潜在作用机制。方法 采用不同剂量 TSS 干预 db/db 小鼠, 检测血清生化指标 [丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)] 及肝组织病理变化。采用超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱 (UPLC-QTOF-MS) 构建选择反应监测离子对数据库, 结合超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱 (UPLC-TSQ-MS/MS) 拟靶向分析表征柴胡药材、TSS 及肝组织中的相关成分。以 Δ ALT 为主要肝损伤表型、 Δ AST 为辅助参考指标, 采用偏最小二乘回归、灰色关联分析、Pearson 和 Spearman 相关分析评价肝组织暴露成分与肝损伤的关联, 并结合网络药理学、机器学习、分子对接及分子动力学模拟分析潜在作用靶点。结果 TSS 可显著降低 db/db 小鼠血清 TC 和 TG 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 但高剂量 TSS 同时升高 ALT 并加重肝组织损伤。拟靶向分析共鉴定了 TSS 中 39 个肝组织暴露成分, 偏最小二乘回归分析初步筛选得到 4 个候选成分; 经多方法交叉评价, 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 与肝损伤表型的关联证据较为一致, 被列为柴胡 HQM 的优先候选成分。机器学习筛选获得磷酸丙糖异构酶 1 (triosephosphate isomerase 1, TPI1)、细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1, CCNB1)、检查点激酶 1 (checkpoint kinase 1, CHEK1)、促红细胞生成素肝细胞受体 A2 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2, EPHA2)、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine kinase 1, AKT1)、极光激酶 A (aurora kinase A, AURKA) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) 7 个核心靶点, 富集分析提示其主要涉及细胞周期、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 及 p53 等信号通路。分子对接和分子动力学模拟支持上述候选 HQM 与相关核心靶点之间可能形成相对稳定的结合构象。结论 通过拟靶向技术表征“柴胡药材-TSS-肝组织暴露”成分传递过程, 结合肝损伤表型关联分析、机器学习和分子模拟, 将 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 列为柴胡 HQM 的优先候选成分, 为其后续确证及柴胡肝毒性物质基础研究提供依据。

关键词:柴胡; 柴胡总皂苷; 肝毒性; 质量标志物; 拟靶向分析; 机器学习; 分子对接; 分子动力学模拟; 6''-O-acetyl-saikosaponin a; 6''-O-acetyl-saikosaponin d

中图分类号: R282.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)20-8253-18

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.20.025

Screening of hepatotoxic quality Markers of *Bupleuri Radix* and toxicity mechanisms based on pseudotargeted analysis of total saikosaponins from *Bupleuri Radix*, machine learning and molecular simulation

WANG Liang¹, HUANG Nana², GUO Wei¹, LI Hang², YANG Jinghua¹, TIAN Yuqing¹, LING Weiheng², QIN Zheng², SUN Rong^{2,3}

1. Shandong Provincial Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to Qingdao University, Jinan 250014, China

2. The Second Cheeloo Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

3. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

收稿日期: 2026-07-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82274197); 国家自然科学基金资助项目 (81773997); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2024LFG005)

作者简介: 王 亮, 研究员, 研究方向为中药质量控制。E-mail: wliang81@163.com

*通信作者: 孙 蓉, 教授, 博士生导师, 从事中药药理与毒理研究。E-mail: sunrong107@163.com

Abstract: Objective To screen hepatotoxicity quality marker (HQM) of Chaihu (*Bupleuri Radix*) based on the associations between liver-exposed components of total saikosaponins of *Bupleuri Radix* (TSS) and liver injury phenotypes, and to investigate their potential mechanisms. **Methods** db/db mice were administered different doses of TSS, serum biochemical indicators [alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total cholesterol (TC), triglycerides (TG)] and pathological changes in liver tissue were detected. A selected reaction monitoring ion-pair database was established using ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF-MS). Pseudotargeted analysis using ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometry (UPLC-TSQ-MS/MS) was then performed to characterize relevant components in *Bupleuri Radix*, TSS and liver tissue. Δ ALT was used as the primary liver injury phenotype and Δ AST as a supplementary reference indicator, partial least squares regression (PLSR), grey relational analysis (GRA), Pearson correlation analysis and Spearman correlation analysis were employed to evaluate the associations between liver-exposed components and liver injury. Network pharmacology, machine learning, molecular docking and molecular dynamics simulations were further integrated to investigate potential targets. **Results** TSS significantly reduced levels of TC and TG in serum of db/db mice ($P < 0.05, 0.01$), but high-dose TSS also increased ALT and aggravates liver tissue damage. Pseudotargeted analysis identified 39 TSS-derived components exposed in liver tissue, and four candidate components were preliminarily selected using PLSR. Following cross-evaluation using multiple analytical methods, 6''-O-acetyl-saikosaponin a and 6''-O-acetyl-saikosaponin d showed relatively consistent associations with liver injury phenotypes and were therefore prioritized as candidate HQMs of *Bupleuri Radix*. Machine learning identified seven core targets, including triosephosphate isomerase 1 (TPI1), cyclin B1 (CCNB1), checkpoint kinase 1 (CHEK1), erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2 (EPHA2), serine/threonine kinase 1 (AKT1), aurora kinase A (AURKA) and cyclin-dependent kinase 2 (CDK2). Enrichment analysis indicated that these targets were mainly involved in the cell cycle, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) and p53 signaling pathways. Molecular docking and molecular dynamics simulations supported the possibility that the candidate HQMs could form relatively stable binding conformations with the corresponding core targets. **Conclusion** Pseudotargeted analysis was employed to characterize the transmission of constituents along the “*Bupleuri Radix*-TSS-liver exposure” chain. By integrating phenotypic association analysis of liver injury, machine learning and molecular simulations, 6''-O-acetyl-saikosaponin a and 6''-O-acetyl-saikosaponin d were prioritized as candidate HQMs of *Bupleuri Radix*. These findings provide a basis for their subsequent validation and for elucidating the material basis underlying the hepatotoxicity of *Bupleuri Radix*.

Key words: *Bupleuri Radix*; total saikosaponins of *Bupleuri Radix*; hepatotoxicity; quality marker; pseudotargeted analysis; machine learning; molecular docking; molecular dynamics simulation; 6''-O-acetyl-saikosaponin a; 6''-O-acetyl-saikosaponin d

柴胡 *Bupleuri Radix* 作为辛凉解表类中药，具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等功效^[1]。柴胡在临床常用于肝郁气滞相关病证，部分临床患者常合并肥胖、胰岛素抵抗、代谢紊乱等基础疾病。随着柴胡及其制剂在临床长期广泛应用，其药效与毒性并存的双重特性逐渐受到学界关注^[2]。传统中医理论素有“柴胡劫肝阴”的论述，提示柴胡长期、过量使用存在损伤肝脏的潜在风险，与现代药理学研究发现的柴胡肝毒性特征高度契合^[3-4]。柴胡总皂苷（total saikosaponins of *Bupleuri Radix*, TSS）是柴胡中重要的活性成分群，与其抗炎、保肝、免疫调节及脂质代谢调控等药效作用密切相关^[5]。研究显示，TSS 在一定剂量范围内具有显著的肝脏保护作用^[6-7]；但在高剂量或长期干预条件下，也可能诱发肝细胞损伤、肝功能异常及肝组织病理改变，其毒性主要与氧化应激失衡、肝细胞凋亡和炎症反应等机制相关^[8-9]。因此，TSS 是影响柴胡有效性与安全性的关键成分群，开展基于 TSS 的柴胡效毒质量

标志物（quality marker, Q-Marker）发现研究，对阐明柴胡效毒物质基础，构建基于效毒关联的柴胡质量控制体系具有重要意义。然而，TSS “药效-毒性”双向作用的剂量相关性特征及其在病理状态下的毒性特点尚未完全阐明，尤其是病理模型中 TSS 相关肝毒性物质基础及其动态变化规律仍缺乏系统研究，限制了柴胡的临床安全应用和聚焦现代疾病的进一步合理应用。

课题组前期在正常大鼠、小鼠中证实，TSS 可引起肝功能指标异常、肝细胞形态损伤，提示 TSS 具有肝脏损伤效应^[10-11]。但前期研究基于正常生理动物开展，不能反映病理状态下 TSS 的肝毒性特点及标志物变化规律。db/db 糖尿病小鼠因瘦素受体基因突变，可自发出现胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱、非酒精性脂肪肝、慢性肝损伤等系列病理改变，是研究糖尿病/脂肪肝状态下药物性肝损伤（drug-induced liver injury, DILI）的常用模型，与临床代谢异常人群特征更为契合^[12]。临床上代谢功能异常

患者用药时,更易出现药物相关肝损伤,是 TSS 肝毒性风险的重点关注人群。临床中不少存在糖脂代谢紊乱的患者亦会使用含柴胡方剂,因此,基于 db/db 小鼠开展 TSS 干预研究,有助于评价其在糖脂代谢紊乱状态下的肝毒性特征,是筛选和验证 TSS 肝毒 Q-Marker 的较理想模型。

TSS 成分复杂,其在肝脏靶器官中暴露谱的全面准确表征,是柴胡肝毒性 Q-Marker 研究的重要前提。但是,TSS 成分经体内吸收后在血浆、肝组织等生物样本中含量较低,易受内源性代谢物背景干扰。常规靶向分析灵敏度高但覆盖范围有限,非靶向分析又存在低丰度成分易被背景掩盖的问题,均难以全面表征 TSS 成分在肝脏中的暴露特征。拟靶向分析策略有机融合了高分辨率质谱广覆盖、高分辨的筛查优势与三重四极杆质谱高灵敏、高重现性的定量优势,通过从非靶向质谱数据中提取特征离子对并构建大规模离子对数据库,结合选择反应监测(selected reaction monitoring, SRM)模式,实现了广覆盖识别与稳定半定量的统一,有效弥补了非靶向分析“覆盖广但重现性不足”与靶向分析“准确但覆盖有限”之间的技术鸿沟^[13-14],为解析复杂成分的入血吸收、组织暴露及效-毒物质基础提供了重要技术支撑,已广泛应用于中药质量评价、成分鉴别和体内暴露表征及毒性机制研究等领域^[15-17]。

基于此,本研究以 db/db 小鼠为动物模型,聚焦代谢紊乱状态下 TSS 的肝毒性效应,在拟靶向分析技术精准表征 TSS 入肝暴露成分的基础上,建立入肝暴露成分与肝损伤表型的关联,筛选特异性肝毒性 Q-Marker,并结合机器学习、分子对接及分子动力学模拟初步探讨其肝毒性作用机制,以期完善 TSS 毒理学评价体系,为柴胡临床精准用药及肝损伤风险预警提供实验依据和理论支撑。

1 材料

1.1 动物

9 只 SFP 级雄性 C57BLKS/J-db/db 小鼠,3 只 SFP 级雄性 C57BLKS/J-wt/wt 小鼠,7 周龄,体质量(18±2)g,购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司,生产许可证号 SCXK(苏)2023-0009,动物质量合格证号 B202603270378。动物饲养于山东大学模式动物研究中心,室温 24~26℃,相对湿度 40%~60%,光照采用 12 h 昼夜交替模式,自由进食饮水。动物实验经山东大学齐鲁第二医院科研伦理委员会批准(批准号 KYLL2024876)。

1.2 药材

柴胡饮片(批号 260301)购自山东百味堂中药饮片有限公司,经山东省妇幼保健院郭威研究员鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

TSS(质量分数为 70%,货号 S25577)、羧甲基纤维素钠(货号 S14016)及对照品柴胡皂苷 A(货号 B20146,质量分数≥98%)、柴胡皂苷 D(货号 B20150,质量分数≥98%)、柴胡皂苷 B2(货号 B20148,质量分数≥98%)、柴胡皂苷 C(货号 B20149,质量分数≥98%)、柴胡次皂苷 D(货号 B24459,质量分数≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)测试盒(批号 C009-2)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测试盒(批号 C009-2)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测试盒(批号 A111-1)、三酰甘油(triglyceride, TG)测试盒(批号 A110-1)购自南京建成生物工程研究所;甲醇(色谱级,批号 221019)、乙腈(色谱级,批号 F25P4T203)购自美国 Fisher Chemical 公司;甲酸(色谱纯,批号 20200204)购自天津大茂化学试剂厂。

1.4 仪器

X500R 型超高效液相色谱-飞行时间质谱联用仪(美国 SCIEX 公司);YS EXACT 9900MD 型超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用仪(英盛生物科技股份有限公司);Synergy UV 型超纯水机(美国密理博公司);SCIENTZ-48L 型冷冻高通量组织研磨器(宁波新芝生物科技股份有限公司);Jipad-1010AL 型可调速涡旋混合器(上海旌派仪器有限公司);CHT210R 型大容量高速台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);SQP 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司);AL104 型万分之一分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];R510-29 型小动物麻醉机-基础型、Minux S700 型轮转石蜡切片机(深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司);HistoCore PEGASUS 型组织脱水机(徕卡显微系统有限公司);Tissue-Tek 组织包埋机(日本 Sakura 公司);KD-T 型组织摊烤片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);S60 型数字病理切片扫描仪(日本滨松光子学株式会社)。

2 方法

2.1 动物分组与给药

适应性喂养 1 周后,将 9 只 db/db 小鼠随机分

为模型组和 TSS 低、高剂量 (80、320 mg/kg) 组, 每组 3 只, 另取 3 只 wt/wt 小鼠作为对照组。称取适量 TSS 粉末溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液中, 配制成 8、32 mg/mL 的 TSS 混悬液。TSS 组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 1 次/d, 连续给药 30 d。

2.2 血清中 TC、TG 水平和 ALT、AST 活性的检测

给药结束后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 异氟烷吸入麻醉, 眼球取血 0.6 mL。全血静置 0.5 h 后, 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清。按照试剂盒说明书检测血清中 TC、TG 水平和 ALT、AST 活性。

2.3 肝组织病理染色

各组小鼠取血后处死, 取肝组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋后制备 5 μm 厚的切片, 进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 用数字切片扫描仪扫描。

2.4 供试品和对照品溶液的制备

2.4.1 柴胡药材供试品溶液的制备 柴胡饮片粉碎, 过 3 号筛, 精密称取 1 g 粉末, 加入 50 mL 50% 甲醇水溶液, 53 kHz 超声提取 30 min, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4.2 TSS 供试品和各单体对照品溶液的制备 分别精密称取 TSS 和柴胡皂苷 A、柴胡皂苷 D、柴胡皂苷 B2、柴胡皂苷 C、柴胡次皂苷 D 对照品, 加入 50% 甲醇水溶液, 超声溶解, 配制成质量浓度均为 1 mg/mL 的溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.4.3 肝组织供试品溶液的制备 将肝组织样品常温解冻, 准确称取适量肝组织, 加入 10 倍体积超纯水制成 10% 组织匀浆液, 吸取 250 μL 组织匀浆液至 EP 管中, 加入 1 mL 乙腈沉淀蛋白, 涡旋 5 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min, 取 1 mL 上清液至 EP 管, 氮气吹干, 加入 100 μL 50% 甲醇水溶液复溶, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.5 拟靶向分析

2.5.1 色谱条件 Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ 色谱柱 (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~3 min, 10%~20% B; 3~7 min, 20%~35% B; 7~12 min, 35% B; 12~26 min, 35%~45% B; 26~30 min, 45%~100% B; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 ℃; 肝组织供试品进样量 5 μL; 柴胡药材、TSS 供试品溶液和各单体对照品溶液进样量 1 μL。

2.5.2 UPLC-QTOF-MS 分析条件 采用电喷雾离

子源, 负离子扫描模式, 喷雾电压为 -4 500 V, 离子源温度为 500 ℃, 扫描范围 m/z 100~1 200; 帘气、雾化气和辅助加热气均采用高纯氮气, 压力分别为 30、50、50 psi (1 psi=6.895 kPa); 碰撞气为高纯氮气, 扫描方式为信息依赖采集模式 (IDA), 候选离子 10 个。

2.5.3 UPLC-TSQ-MS/MS 分析条件 采用电喷雾离子源, 负离子扫描模式, 喷雾电压 -3 500 V, 离子传输管温度 325 ℃, 雾化气温度 350 ℃; 鞘气、辅助气均为高纯氮气, 体积流量分别为 50、10 arb; 碰撞气为高纯氮气, 扫描方式为 SRM。

2.5.4 SRM 离子对及碰撞能优化 采用“2.5.1”项下色谱条件, “2.5.2”项下质谱条件, 分别设置碰撞能 (CE) 为 -15、-25、-35、-45 V, 对 TSS 供试品进行 UPLC-QTOF-MS 采集。采用 MSDIAL v5.5 对获得的 wiff 数据文件进行分析, 经峰对齐、剔除同位素峰及无二级质谱的色谱峰后, 导出包含母离子和子离子信息的峰表。利用 Python 对不同碰撞能条件下获得的母离子-子离子信息进行整合, 以子离子响应强度最高为原则确定最佳碰撞能, 生成包含母离子、子离子及对应最佳 CE 值的 SRM 离子对列表。

2.5.5 拟靶向分析 采用“2.5.4”项下建立的 SRM 离子对数据库, 应用 UPLC-TSQ-MS/MS 对柴胡药材、TSS、对照品及肝组织供试品进行拟靶向分析。对于同一化合物不同加合离子或不同碎片离子对应的多个 SRM 离子对, 根据响应强度、信噪比及样品间的共检出情况进行筛选和去重。依据 UPLC-QTOF-MS 获得的精确相对分子质量、二级质谱碎片信息和保留时间, 结合文献报道及对照品信息对化合物进行定性, 最终获得各样品中目标成分的 SRM 峰面积矩阵, 用于后续肝组织暴露成分筛选及关联分析。

2.6 肝组织暴露成分与肝损伤表型的关联分析

采用偏最小二乘回归 (partial least squares regression, PLSR)、灰色关联分析 (grey relational analysis, GRA)、Pearson 和 Spearman 相关性分析, 从不同角度探索各肝组织暴露成分与肝损伤表型之间的关联。PLSR 模型采用 R^2_X 、 R^2_Y 和 Q^2 评价模型的解释能力、拟合程度及预测性能, 变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) 值和回归系数仅作为探索性变量筛选和关联方向判断的参考。

GRA 前分别对暴露成分峰面积和肝损伤表型

进行极差标准化,分辨系数设为 0.5。为减弱峰面积数据偏态分布及极端值的影响,Pearson 和 Spearman 相关性分析前对峰面积进行 $\log_2$ 转换,分别评价各暴露成分与 Δ ALT 和 Δ AST 之间的线性相关性及单调相关性。

候选成分的优先级主要依据各成分与 Δ ALT 的关联强度、方向及不同分析方法间的一致性,以其与 Δ AST 关联方向的一致性作为补充参考。在此基础上,进一步综合肝组织实际暴露水平、化学结构特征及后续分子对接和分子动力学模拟等证据,筛选柴胡肝毒性 Q-Marker。

2.7 基于网络药理学和机器学习的核心靶点筛选

为增强柴胡肝毒性 Q-Marker 筛选的合理性,采用机器学习对 DILI 的核心靶点进行筛选,并进一步采用分子对接和分子动力学模型考察候选成分与核心靶点的结合强度。

2.7.1 候选成分的靶点预测 通过 PharmMapper 数据库 (<https://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、Swiss TargetPrediction 数据库 (<http://swisstargetprediction.ch/>)、Super-PRED 数据库 (<https://prediction.charite.de/>) 对候选成分作用靶点进行预测分析,将预测相关靶基因合并去重得药物靶基因。

2.7.2 DILI 相关数据集处理 从 NCBI 的 GEO 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 下载 DILI 相关基因表达数据集 GSE102006、GSE54254 和 GSE136059。其中,GSE102006 和 GSE136059 作为训练集,GSE54254 作为独立验证集。为消除不同数据集间的批次效应,先采用替代变量分析 (surrogate variable analysis, SVA) 识别并校正潜在混杂因素,随后采用基于经验贝叶斯的 ComBat 算法对剩余批次效应进行校正,获得用于后续分析的标准化基因表达矩阵。

2.7.3 差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 分析 采用 R 语言 Limma 软件包对标准化后的基因表达矩阵进行差异表达分析,以 $FDR\text{-adjusted } P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{ 差异倍数 (fold change, FC) }| > 0.585$ 作为 DEGs 的筛选标准,并采用 ggplot2 软件包对分析结果进行可视化。

2.7.4 WGCNA 共表达网络分析 采用 R 语言 WGCNA 软件包构建加权基因共表达网络。通过样本层次聚类识别并剔除离群样本,随后利用 pickSoftThreshold 函数筛选最优软阈值,使网络满足无标度拓扑特征 (无标度网络拟合指数 $R^2 >$

0.85)。基于筛选得到的软阈值构建邻接矩阵,并进一步转换为拓扑重叠矩阵 (topological overlap matrix, TOM)。采用层次聚类结合动态树切割法识别基因共表达模块,设置最小模块基因数 (minModuleSize) 为 30,模块合并阈值 (mergeCutHeight) 为 0.25。通过计算模块特征基因 (module eigengene, ME) 与表型之间的 Pearson 相关系数筛选关键表型相关模块,筛选标准为 $|R| > 0.3$ 且 $P < 0.05$ 。根据模块隶属度 (module membership, MM/kME) 筛选模块内关键基因,阈值设定为 $kME > 0.8$ 。

2.7.5 候选肝损伤靶点筛选与蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将 WGCNA 关键模块基因、DEGs 与候选成分的预测靶基因取交集,获得其致肝损伤的候选靶点,采用 Venn 图进行可视化。随后,将交集基因导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>) 构建 PPI 网络,并依据网络拓扑参数筛选关键节点基因,最后利用 igraph 和 ggraph 软件包对 PPI 网络进行可视化。

2.7.6 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 采用 ClusterProfiler 软件包对关键节点基因进行 GO [生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)] 功能及 KEGG 通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为筛选标准,分析候选成分肝损伤相关基因的潜在生物学功能及信号通路。

2.7.7 机器学习模型构建及核心靶点筛选 为系统筛选候选成分致肝损伤的核心靶点,首先采用逐步广义线性回归 (Stepglm) 进行特征筛选,以单变量检验 $P < 0.01$ 作为特征纳入与剔除的统一判定阈值,分别设置双向逐步筛选和向后逐步筛选 2 种变量筛选策略,基于 AIC 准则迭代筛选最优特征子集。随后,将筛选得到的特征分别输入线性核支持向量机 (svmLinear) 和径向基核支持向量机 (svmRadial),svmLinear 固定惩罚系数 (C) = 1; svmRadial 同步优化核宽度 sigma 与惩罚系数 C , sigma 由训练集特征自适应估算, C 按照指数序列 2^{-2} 、 2^{-1} 、 2^0 遍历寻优;以交叉验证受试者工作特征曲线下面积 (area under the receiver operating characteristic curve, AUC) 为优化目标确定最优超参数组合。所有模型统一采用 5 折随机交叉验证完成超参数寻优,分层抽样策略保证每一折中阳性/阴

性肝损伤样本比例与原始训练集保持一致,以减小类别比例差异对模型训练和评价的影响。以 AUC、准确率和 F1 值作为模型评价指标,横向对比全部模型并筛选综合性能最优的模型。依据特征在模型中的出现频率和重要性排序筛选候选核心基因。最后,采用 pheatmap 软件包绘制候选核心基因表达热图。

2.7.8 SHAP 解释分析 为提高机器学习模型的可解释性,采用 SHAP 算法对最优预测模型进行解释分析。计算各特征的 SHAP 值,量化其对模型预测结果的贡献,并通过 SHAP Summary Plot、SHAP Dependence Plot 及 SHAP Force Plot 对核心靶点的重要性、作用方向及其对单一样本预测结果的贡献进行可视化分析。

2.8 分子对接分析

采用 AutoDock Vina 对柴胡肝毒性 Q-Marker 与“2.7.7”项下筛选的核心靶点进行分子对接,评价其结合能及关键相互作用。候选成分结构经 AutoDockTools 加氢并转换为 PDBQT 格式作为配体;核心靶点蛋白三维结构下载自 RCSB PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>),经去水、加氢等预处理后保存为 PDBQT 格式作为受体。设置对接网格覆盖蛋白分子,采用 AutoDock Vina 计算受体-配体结合能。结合能越低,提示配体与靶蛋白结合稳定性越强;结合模式及关键相互作用用于后续机制分析。

2.9 分子动力学模拟分析

为验证分子对接所得受体-配体复合物的稳定性,采用 GROMACS 2026.2 软件进行 100 ns 分子

动力学模拟。蛋白采用 AMBER14SB_parmbsc1 全原子力场,配体拓扑文件基于 GAFF2 构建,并利用 Multiwfn 3.8 和 ORCA 6.0.1 计算 RESP2 原子电荷^[18]。模拟体系施加周期性边界条件,将各复合物置于立方体模拟盒中,采用 TIP3P 水模型进行溶剂化,加入 Na⁺和 Cl⁻使体系保持电中性,同时将 NaCl 浓度调节至 0.15 mol/L。首先进行 5 000 步能量最小化,随后分别在恒温-恒容(NVT)和恒温-恒压(NPT)系综下进行 100 ps 平衡模拟,最后开展 100 ns 分子动力学模拟。

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组对比采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 TSS 对 db/db 小鼠血脂、肝功能及肝组织病理变化的影响

如图 1-A、B 所示,与对照组比较,模型组小鼠存在明显的血脂代谢异常,TC、TG 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01),同时血清 ALT 活性显著升高 ($P < 0.01$),提示 db/db 小鼠在自发性糖脂代谢紊乱背景下已出现一定程度的肝细胞损伤。与模型组比较,TSS 各剂量组小鼠血清 TC、TG 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01),表明 TSS 可有效改善 db/db 小鼠的高脂血症,纠正机体脂代谢紊乱。肝功能指标检测结果显示,TSS 低剂量组血清 ALT 活性较模型组无显著变化,而 TSS 高剂量组 ALT 活性进一步显著升高 ($P < 0.01$),表明高剂量 TSS 可加重 db/db 小鼠肝细胞损伤。各组血清 AST 活性差异无统计学

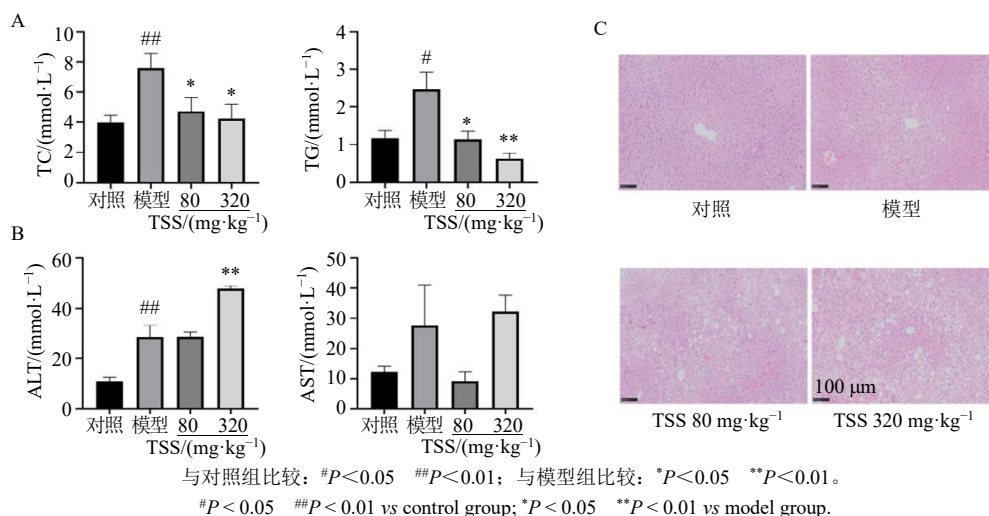


图 1 TSS 对 db/db 小鼠血脂 (A)、肝功能 (B) 及肝组织病理变化 (C, ×200) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effect of TSS on blood lipids (A), liver function (B) and liver tissue pathological changes (C, ×200) in db/db mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

意义,提示在本实验条件下,AST 对 TSS 诱导的肝损伤变化反映不敏感,因此后续分析主要以 ALT 及组织病理学改变作为肝损伤评价依据。

肝组织病理学结果(图 1-C)显示,对照组小鼠肝细胞排列较为规整,未见明显脂肪变性及坏死;模型组肝细胞肿胀明显,并伴有脂肪样变性,提示模型小鼠存在代谢异常相关肝损伤。与模型组相比,高剂量 TSS 干预后肝组织损伤进一步加重,表现为肝细胞排列紊乱加剧、气球样变性明显,并可见散在点状坏死。上述血清生化及病理学结果共同表明,TSS 可有效降低 db/db 小鼠血清 TC、TG 水平,改善机体血脂代谢紊乱,但高剂量 TSS 可在 db/db 小鼠代谢异常的病理背景下进一步加重肝脏

损伤。

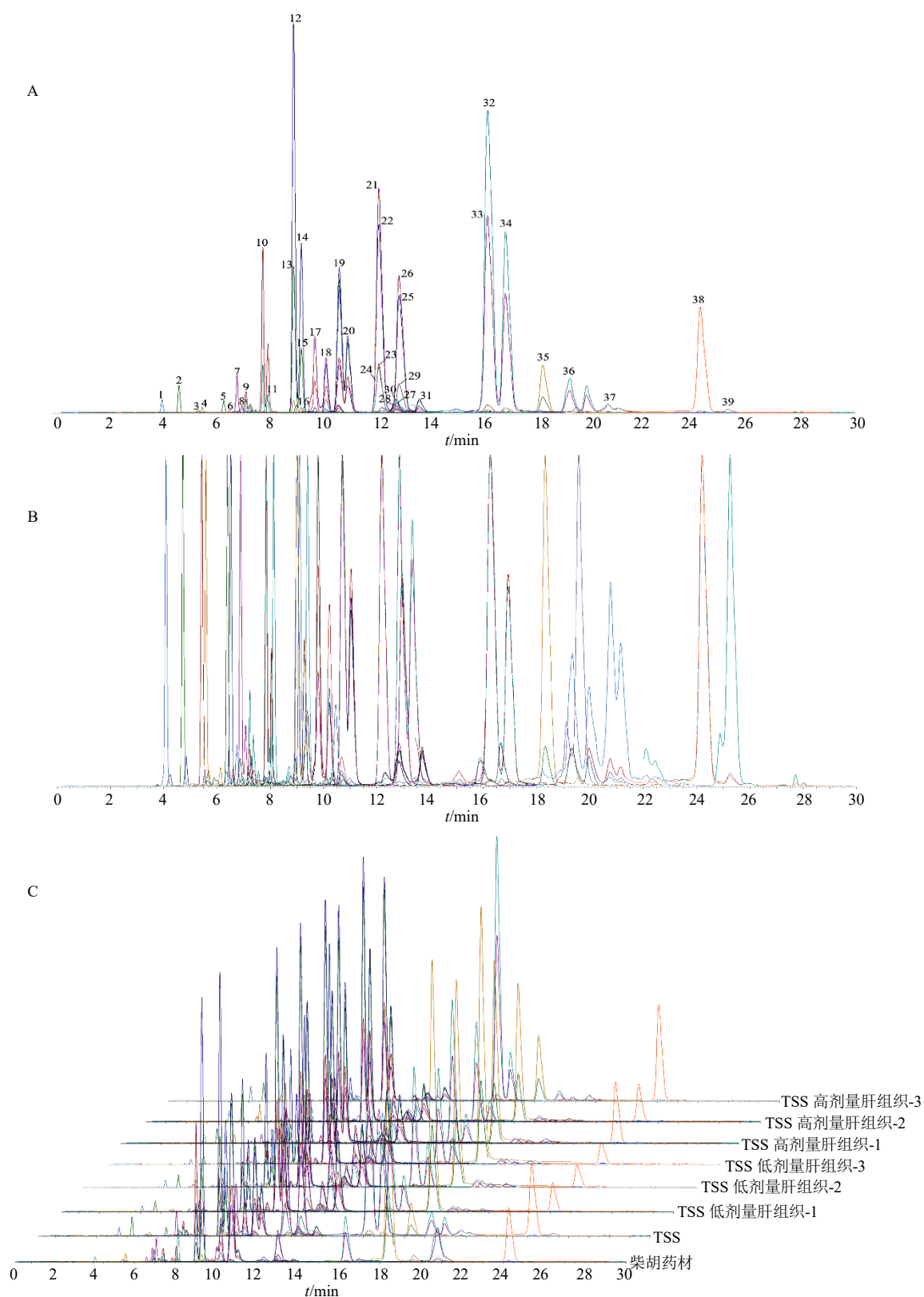
3.2 拟靶向分析结果

TSS 的 UPLC-QTOF-MS 分析质谱数据经 MSDIAL 进行峰提取和峰对齐后,共获得 392 个特征峰;进一步剔除同位素峰及无二级质谱信息的峰后,获得 218 个有效共有特征峰及其对应优化 CE 值,以此作为 SRM 离子对数据库,采用 UPLC-TSQ-MS/MS 对样品进行拟靶向分析,并利用 TraceFinder 软件进行色谱峰识别与峰面积积分。对同一化合物对应的不同加合离子或碎片离子信息进行筛选和去重后,最终获得 39 个目标成分,UPLC-QTOF-MS 定性结果见表 1,UPLC-TSQ-MS/MS 拟靶向色谱图见图 2。

表 1 UPLC-QTOF-MS 定性结果

Table 1 Qualitative identification results of UPLC-QTOF-MS							
峰号	<i>t</i> _R /min	SRM1	SRM2	误差 (×10 ⁻⁶)	CE/V	分子式	成分
1	4.302	623.164 8	315.050 2	3.2	-35	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinoside ^[19]
2	4.913	535.182 1	160.053 2	-0.1	-35	C ₂₆ H ₃₂ O ₁₂	—
3	5.587	527.120 4	321.075 3	1.7	-35	C ₂₆ H ₂₄ O ₁₂	—
4	5.750	647.378 2	617.373 4	-3.2	-25	C ₂₈ H ₅₈ O ₁₄	—
5	6.512	897.450 3	851.445 4	2.3	-25		<i>O</i> -acetyl-bupleurosides V ^[20]
6	6.632	557.130 3	349.062 3	0.4	-15	C ₂₇ H ₂₅ O ₁₃	—
7	6.741	797.468 5	635.425 1	-0.9	-35	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	hydroxy-saikosaponin a ^[21]
8	7.027	797.466 3	635.414 6	-3.7	-35	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₄	hydroxy-saikosaponin d ^[20]
9	7.515	885.482 8	839.479 2	-0.8	-25	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₅	acetyl-hydroxy-saikosaponin a ^[22]
10	8.169	839.477 5	797.466 8	-2.8	-25	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₅	acetyl-hydroxy-saikosaponin d ^[22]
11*	8.278	971.523 4	925.511 3	1.3	-45	C ₄₈ H ₇₇ O ₁₇	saikosaponin c
12	9.272	857.427 6	811.480 9	-5.0	-45	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	saikosaponin b ₃ ^[20]
13	9.404	871.463 7	825.460 1		-25		—
14	9.614	857.421 2	811.483 6	-1.6	-35	C ₄₃ H ₇₁ O ₁₄	—
15	9.764	1 013.533 4	967.526 6	-0.6	-15	C ₅₀ H ₈₀ O ₁₈	6'''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin c ^[20]
16	10.209	857.489 1	811.483 5	-1.8	-45	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₄	saikosaponin b ₄ ^[20]
17	10.224	1 015.542 9	969.539 0		-15		—
18	11.234	899.479 7	853.492 3	-3.8	-15	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₅	2''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin b ₃ ^[20]
19*	11.266	825.384 9	779.453 0	-7.3	-45	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	saikosaponin a
20*	11.628	779.457 6	617.405 1	-1.4	-25	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	saikosaponin b ₂
21	13.080	853.410 3	811.483 0	4.5	-25	C ₃₉ H ₆₆ O ₂₀	—
22	13.069	899.499 4	853.490 5	-5.8	-15	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₅	6''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin b ₃ ^[23]
23	13.167	779.456 0	617.402 2	-3.5	-15	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	saikosaponin g ^[20]
24*	13.736	663.410 1	617.401 5	-7.1	-25	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	prosaikogenin d
25	13.815	825.461 4	779.457 5	-1.6	-35	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	saikosaponin b ₁ ^[24]
26	13.947	839.411 8	793.437 0	0.1	-25	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄	—
27	13.885	899.412 0	853.494 3	-1.4	-25	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₅	3''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin b ₂ ^[25]
28	13.951	853.424 8	811.486 2	-1.7	-45	C ₄₃ H ₆₅ O ₁₇	—
29	14.049	853.496 3	811.485 5	1.0	-35	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₅	6''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin b ₄ ^[26]
30	14.291	663.410 8	617.395 7	-0.8	-15	C ₃₆ H ₅₈ O ₈	prosaikogenin d isomer ^[23]
31	14.673	779.456 2	617.403 8	-3.2	-35	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	saikosaponin b ^[20]
32	17.207	867.392 0	821.465 5	-4.6	-35	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	6''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin a ^[20]
33	17.408	823.469 6	781.459 8	1.2	-25	C ₄₀ H ₇₂ O ₁₇	—
34	17.907	867.390 3	821.468 2	-1.3	-15	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	2''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin a ^[27]
35*	19.281	825.462 0	779.456 2	-3.3	-25	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	saikosaponin d
36	20.518	823.455 7	777.442 2	-1.1	-15	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₃	<i>E</i> -16-one-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucopyranosyl-(1→3)-β- <i>D</i> -fucopyranoside ^[28]
37	21.780	821.468 7	779.455 3	-0.7	-15	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	4''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin a ^[29]
38	25.171	867.472 6	821.466 9	-2.9	-15	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	6''- <i>O</i> -acetyl-saikosaponin d ^[20]
39	26.216	819.451 0	777.438 5	-1.9	-35	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	16-keto-acetylsaikosaponin a ^[23]

*经对照品确认。
* Confirmed by reference standard.



A-TSS 拟靶向色谱图; B-TSS 拟靶向标准化色谱图; C-柴胡药材、TSS 和肝组织样品 (TSS 低、高剂量组) 的拟靶向色谱叠加图。

A-pseudotargeted chromatogram of TSS; B-normalized pseudotargeted chromatogram of TSS; C-overlay of pseudotargeted chromatograms of *Bupleuri Radix*, TSS and liver tissue samples (TSS low- and high-dose groups).

图 2 拟靶向分析图谱

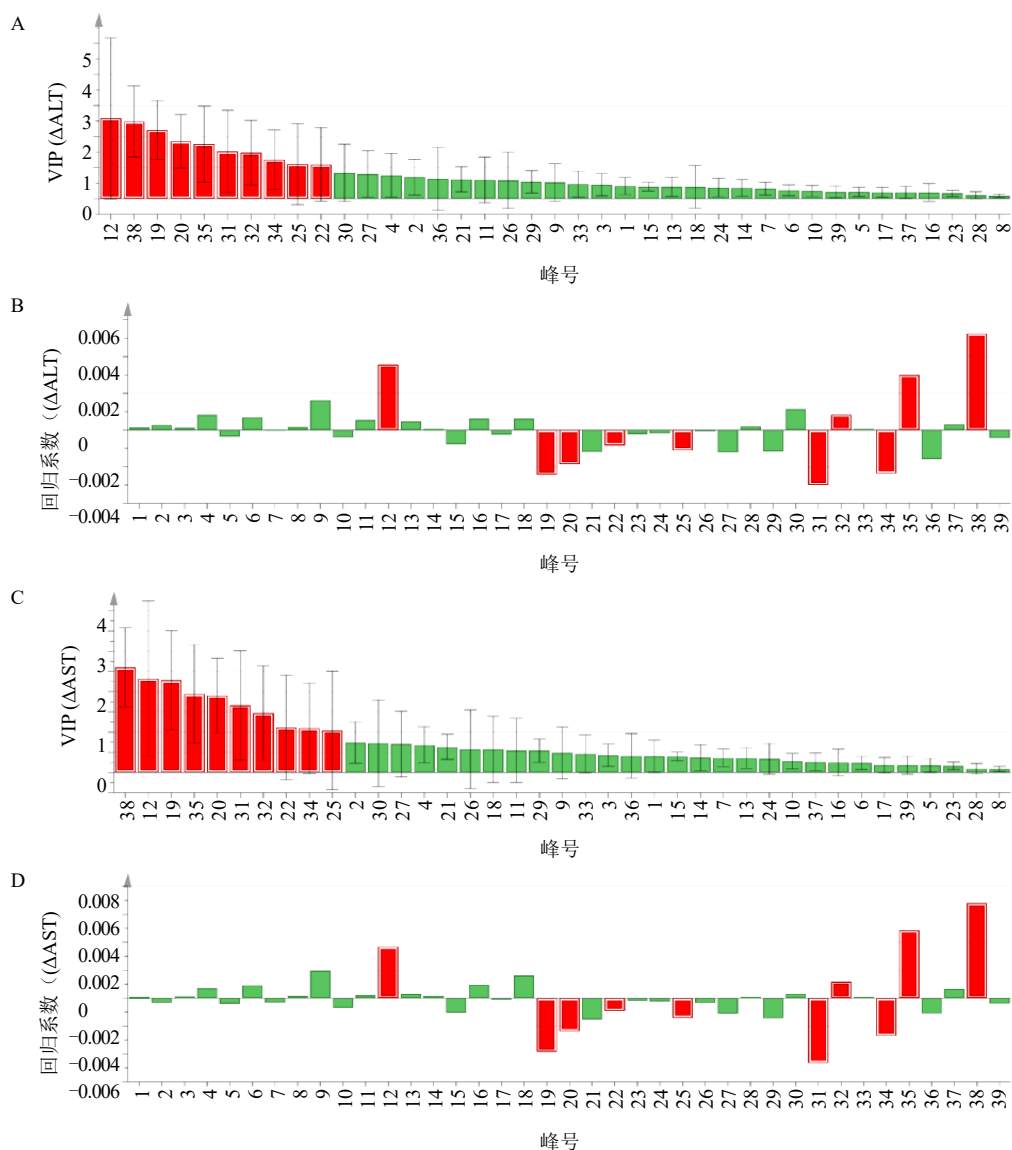
Fig. 2 Pseudotargeted analysis chromatograms

3.3 关联分析

3.3.1 PLSR 关联分析 以 39 个肝组织暴露成分的峰面积为自变量 (X), 分别以 ALT、AST 相对于模型组均值的变化值 (Δ ALT、 Δ AST) 为因变量 (Y), 建立 PLSR 模型, 见图 3。 Δ ALT 主模型的拟合参数为 $R^2_X=0.998$ 、 $R^2_Y=0.989$ 、 $Q^2=0.745$; Δ AST 参考模型的拟合参数为 $R^2_X=0.998$ 、 $R^2_Y=0.974$ 、 $Q^2=0.634$, 上述结果表明, PLSR 模型对现有样本具有较高拟合度, 但存在过拟合风险, 因此将 VIP 值和回归系数作为探索性变量筛选及关联方向判断的参考。根据 $VIP>1$ 筛选关键变量, Δ ALT 主模型和

Δ AST 参考模型均筛选得到 10 个关键成分 (图 3-A、C), 结果一致。结合回归系数分析 (图 3-B、D), 峰 12、32、35 和 38 在 2 种模型中均具有较高的 VIP 值, 且回归系数均为正值, 提示其暴露水平升高与 Δ ALT、 Δ AST 升高呈正相关, 可能与 TSS 诱导的肝损伤相关。

3.3.2 GRA、Pearson 和 Spearman 分析 对于自变量数量 39、样本量为 6 的典型高维小样本结构, 存在过拟合风险, 因此本研究在 PLSR 探索性变量筛选的基础上, 进一步通过 GRA 评价各成分与 Δ ALT、 Δ AST 变化序列的整体接近程度, 采用 Pearson



A- Δ ALT 模型 VIP 图; B- Δ ALT 模型回归系数图; C- Δ AST 模型 VIP 图; D- Δ AST 模型回归系数图。

A-VIP plot of Δ ALT model; B-regression coefficient plot of Δ ALT model; C-VIP plot of Δ AST model; D-regression coefficient plot of Δ AST model.

图 3 PLSR 模型 VIP 值和回归系数分析图

Fig. 3 VIP and regression coefficient plots of PLSR models

相关分析和 Spearman 秩相关分析评价各成分与肝损伤指标之间的线性相关性和单调相关性, 并通过分子模拟评价候选成分与相关靶点的结合能力及相互作用特征。最终结合 PLSR、GRA、Pearson、Spearman 和分子模拟分析结果, 对柴胡肝毒性 Q-Marker 进行综合评价。

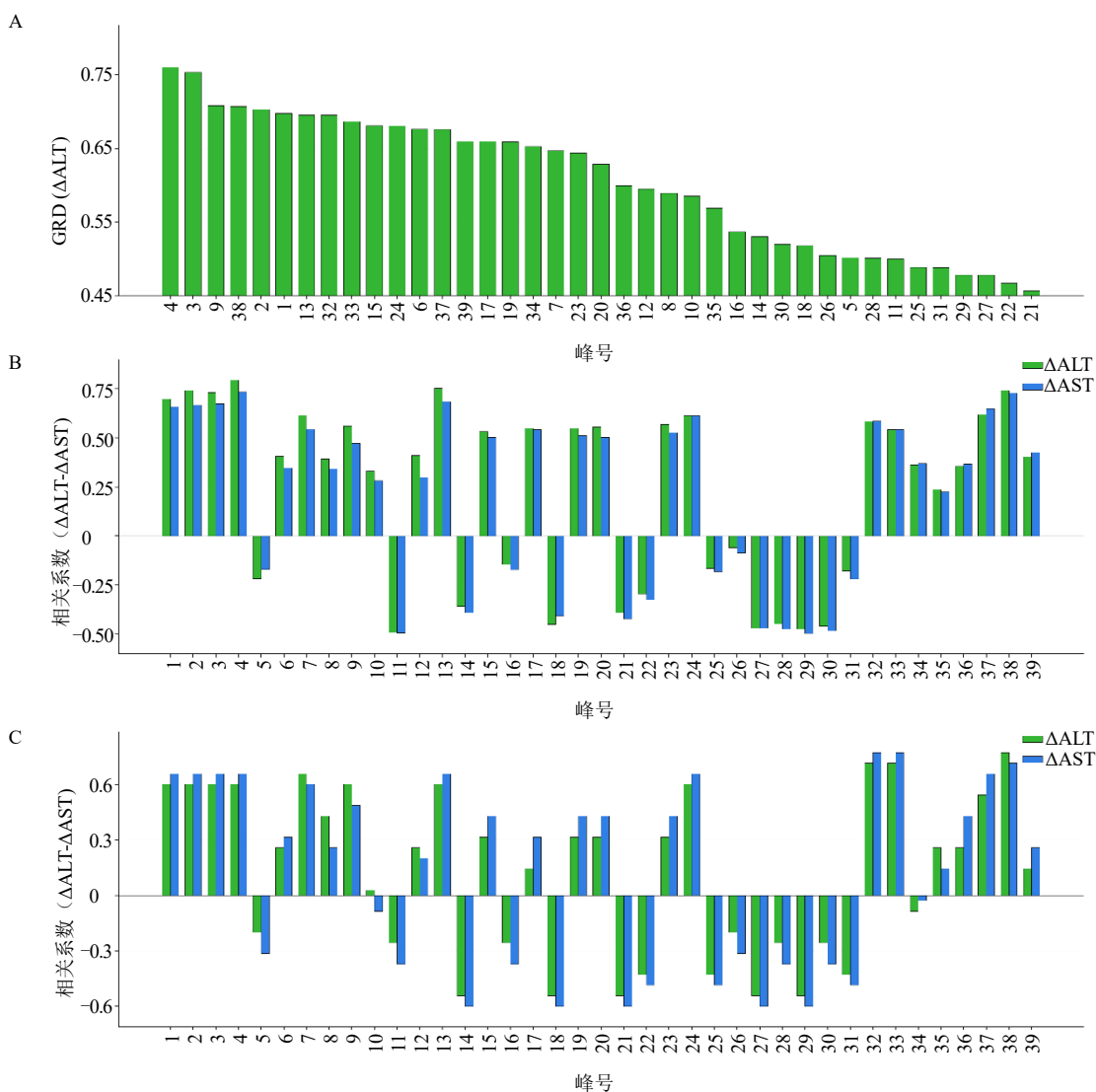
以 Δ ALT 作为主要肝损伤指标, Δ AST 作为辅助参考指标, 对 39 个肝组织暴露成分开展 GRA、Pearson 及 Spearman 相关分析, 结果见图 4。

GRA 显示, 各暴露成分与 Δ ALT 的灰色关联度 (grey relational degree, GRD) 为 0.457~0.760, 峰 38、32 与 Δ ALT 的 GRD 分别为 0.707 和 0.695,

分别排名第 4 位和第 8 位。相比之下, 峰 12、35 的 GRD 排名为第 22 位和第 25 位。

Pearson 相关分析显示, Δ ALT 与 Δ AST 呈高度正相关 ($r=0.973$, $P=0.001$), Spearman 秩相关分析亦显示二者具有高度一致的变化趋势 ($\rho=0.943$, $P=0.005$), 提示 Δ ALT 和 Δ AST 所反映的肝损伤变化具有较高一致性。

在相关程度较高的成分中, 峰 38 与 Δ ALT 和 Δ AST 的 Pearson 相关系数分别为 0.742 和 0.728, 分别排名第 4 位和第 2 位; 其 Spearman 相关系数分别为 0.771 和 0.714, 分别排名第 1 位和第 3 位。峰 32 与 Δ ALT 和 Δ AST 的 Pearson 相关系数分别为



A- Δ ALT 的 GRD 排序; B-Pearson 相关系数; C-Spearman 秩相关系数。

A-GRD ranking for Δ ALT; B-Pearson correlation coefficients; C-Spearman rank correlation coefficients.

图 4 肝组织暴露成分与肝损伤指标的 GRA 及相关分析

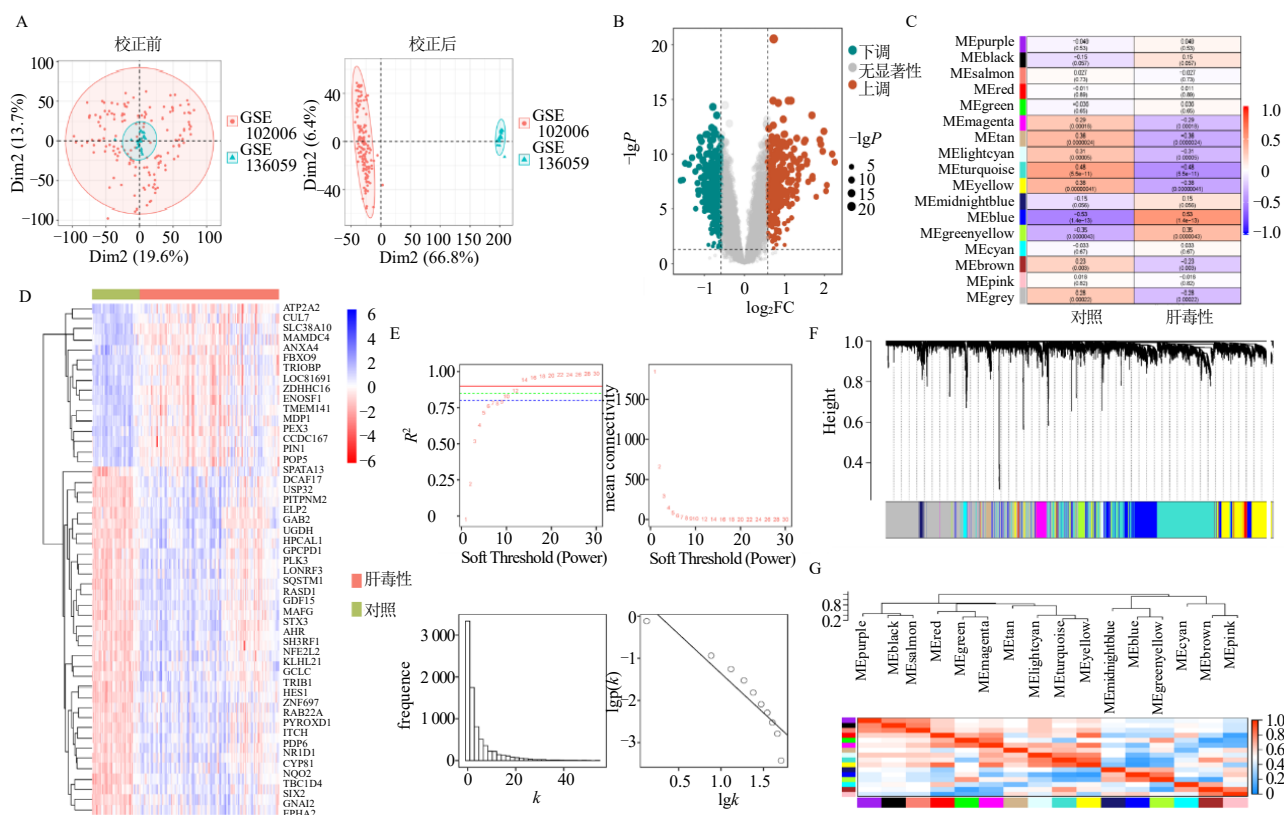
Fig. 4 GRA and correlation analyses between liver-exposed components and liver injury indicators

0.583 和 0.585, 分别排名第 10 位和第 9 位; 其 Spearman 相关系数分别为 0.714 和 0.771, 分别并列排名第 2 位和第 1 位。总体来看, 峰 38、32 在 Pearson 及 Spearman 分析中均表现出较高的正相关系数, 其中峰 38 在 2 种分析中的结果较为一致, 峰 32 的 Spearman 排名高于 Pearson 排名, 提示其与肝损伤指标之间可能具有较为稳定的单调变化趋势。

峰 12 与 Δ ALT 和 Δ AST 的 Pearson 相关系数分别为 0.410 和 0.298, 分别排名第 18 位和第 23 位; 其 Spearman 相关系数分别为 0.257 和 0.200, 分别并列排名第 18 位和排名第 22 位。峰 35 与 Δ ALT 和 Δ AST 的 Pearson 相关系数分别为 0.237 和 0.225, 均排名第 25 位; 其 Spearman 相关系数分别为 0.257 和 0.143, 分别并列排名第 18 位和排名第 23 位。Pearson 和 Spearman 分析均表明, 峰 12、35 与 Δ ALT 及 Δ AST 的相关程度相对较弱。

3.4 基于网络药理学与机器学习的核心靶点筛选

3.4.1 候选成分的靶点预测及 DILI 相关基因集构建 通过 3 个不同数据库全面预测了峰 12、32、35、38 的潜在作用靶点, 对所得数据集进行筛选并去重后, 共得到相关靶点 484 个。为减少批次效应的影响, 将数据集 GSE102006 和 GSE136059 合并后, 对合并后的基因表达矩阵进行了去批次效应处理。主成分分析 (principal component analysis, PCA) 结果 (图 5-A) 显示, 去批次效应处理之后, 数据分布明显改善。差异表达分析结果 (图 5-B、D) 表明, DILI 共导致 486 个基因表达发生显著变化。另外, WGCNA 分析方面, 首先确定了无尺度网络拓扑的最优软阈值功率 (β)。对功率值 1~20 的系统评估表明, $\beta=12$ 时加权基因共表达网络呈现无标度拓扑特征, 其节点度分布的双对数图显示决定系数 R^2 为 0.85 (图 5-E)。使用该参数, 构建了拓扑重叠矩阵, 并进行了层次聚类来识别共表达模块 (图



A-GSE102006 和 GSE136059 数据集批次校正前后的 PCA 结果; B-DEG 火山图; C-WGCNA 模块与 DILI 表型的相关性分析; D-DEG 聚类热图; E-WGCNA 软阈值筛选结果 ($\beta=12$, $R^2=0.85$); F-WGCNA 共表达模块聚类树; G-模块特征基因聚类树及模块邻接热图。
A-PCA of GSE102006 and GSE136059 datasets before and after batch effect correction; B-volcano plot of DEGs; C-correlation analysis between WGCNA modules and DILI phenotype; D-clustering heatmap of DEGs; E-soft-threshold selection for WGCNA ($\beta = 12$, $R^2 = 0.85$); F-WGCNA co-expression module clustering dendrogram; G-module eigengene clustering dendrogram and module adjacency heatmap.

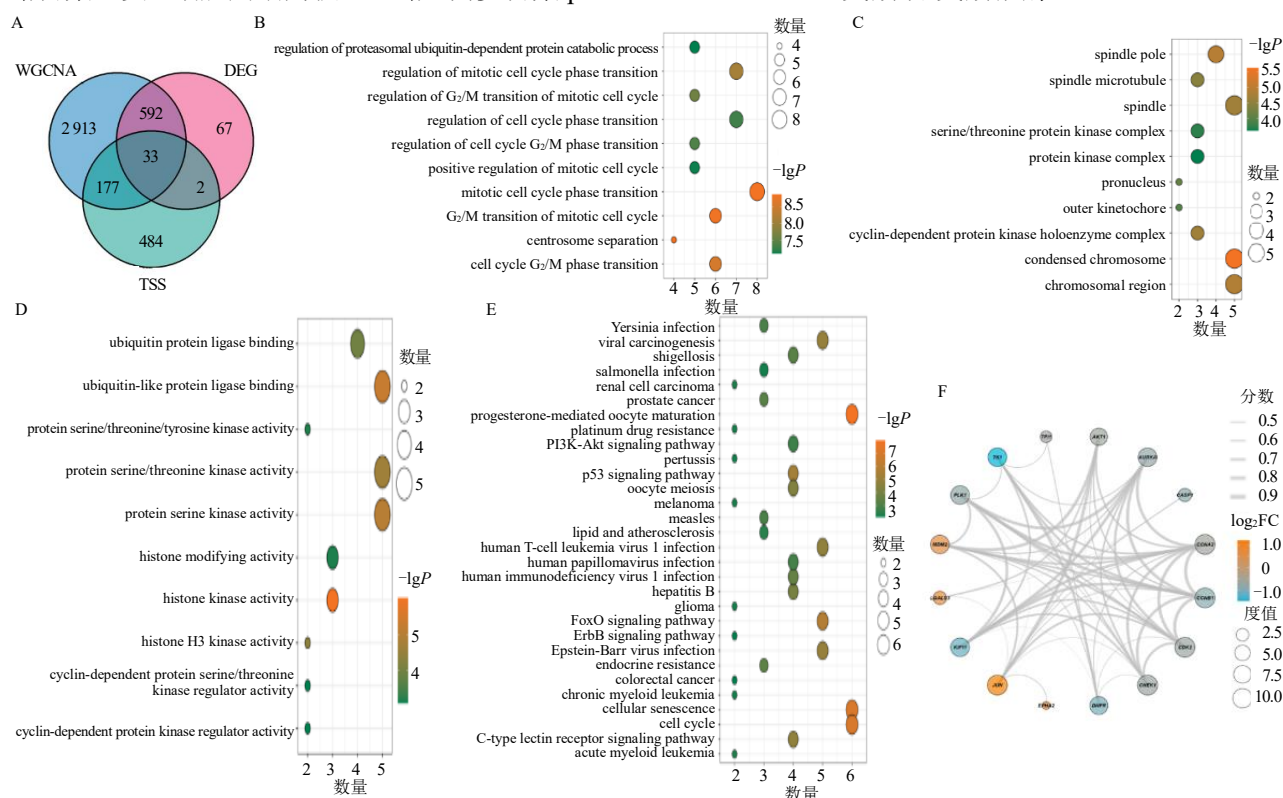
图 5 DILI 相关基因集的构建
Fig. 5 Construction of DILI-related gene set

5-F)。模块-特性关系分析确定了 17 个特定模块与药物性肝损伤之间的显著关联 ($P < 0.05$, 图 5-C)。为解析上述关键模块间的整体表达调控关联, 基于各模块特征基因构建邻接聚类树与相关性热图, 直观呈现模块间的协同表达模式 (图 5-G)。通过将传统分析中差异表达的基因与 WGCNA 中的模块基因相结合, 最终确定了 625 个 DILI 相关基因集。

3.4.2 候选成分相关肝损伤靶点筛选与功能富集分析 将峰 12、32、35、38 相关靶点与 DILI 相关基因集取交集, 确定了其作用于肝损伤过程中涉及的 33 个潜在作用靶点 (图 6-A)。通过 GO 和 KEGG 富集分析对靶蛋白的作用途径进行表征。富集结果表明, GO 三维注释结果高度协同: BP 集中于肝细胞有丝分裂 G₂/M 期转换、细胞周期调控及泛素依赖蛋白降解 (图 6-B); CC 主要定位于纺锤体、浓缩染色体与周期蛋白激酶复合体 (图 6-C); 分子功能以丝氨酸/苏氨酸激酶活性、泛素连接酶结合、组蛋白表观修饰为主 (图 6-D)。KEGG 通路富集证实, 细胞周期为核心通路, 同步富集 p53、

磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、FoxO 细胞应激通路及多条肿瘤、感染相关通路 (图 6-E)。综上, 峰 12、32、35、38 可能主要通过调节肝细胞周期激酶与泛素化修饰系统, 影响肝细胞 G₂/M 检查点稳态, 进而影响肝脏状态。

3.4.3 机器学习模型构建及核心靶点筛选 将 33 个潜在作用靶点导入 STRING 数据库, PPI 网络分析结果表明, 共有 16 个基因为核心靶点 (图 6-F)。通过对 16 个候选靶点机器学习分析, 构建了 4 个预测模型来识别与峰 12、32、35、38 肝损伤作用相关的核心基因。Stepglm[both]+svmRadial 组合模型在训练和验证阶段都显示出卓越的性能和最高的精度 (图 7-A), 共识别出磷酸丙糖异构酶 1 (triosephosphate isomerase 1, TP11)、细胞周期蛋白 B1 (cyclin B1, CCNB1)、检查点激酶 1 (checkpoint kinase 1, CHEK1)、促红细胞生成素肝细胞受体 A2 (erythropoietin-producing hepatocellular receptor A2, EPHA2)、丝氨酸/苏氨酸激酶 1 (serine/threonine

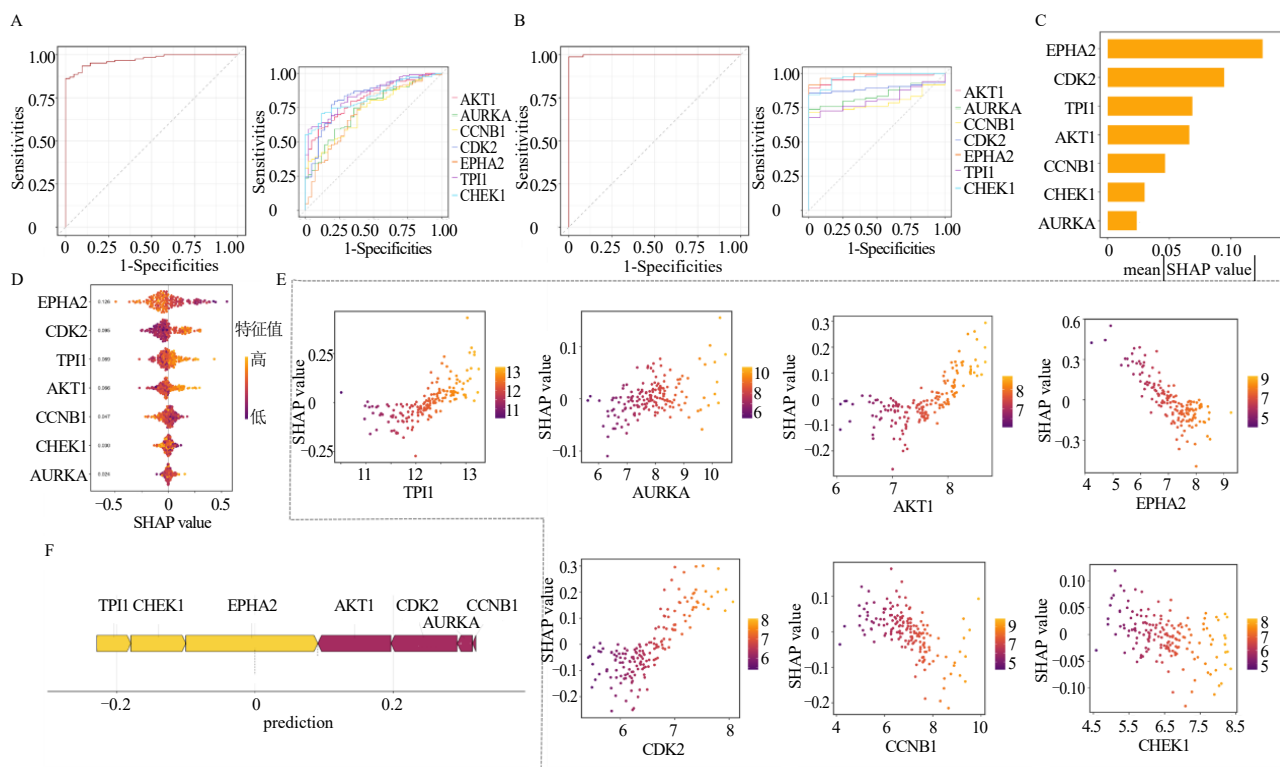


A-候选成分与 WGCNA 和 DEGs 的相关基因; B~D-GO 富集注释 BP、CC 和 MF 中的重叠基因; E-KEGG 分析显示重叠基因的丰富途径; F-PPI 网络可视化重叠基因之间的相互作用。

A-overlapping genes among predicted targets, WGCNA module genes and differentially expressed genes; B-D-GO enrichment analysis of overlapping genes, including BP, CC and MF; E-KEGG pathway enrichment analysis of overlapping genes; F-PPI network of overlapping genes.

图 6 候选成分相关的 DILI 靶点的确定

Fig. 6 Determination of DILI targets related to candidate compounds



A-模型在训练集中性能及关键基因的 ROC 曲线；B-模型在验证集中性能及关键基因的 ROC 曲线；C-根据特征重要性对顶级基因的排序；D-蜂群图，小蜂群图显示不同条件下的基因表达分布；E-关键基因的 SHAP 值分布散点图；F-基因对预测的贡献摘要图。

A-model performance in training set and ROC curves of key genes; B-model performance in validation set and ROC curves of key genes; C-ranking of top genes based on feature importance; D-bee colony diagrams, small bee colony diagrams show the distribution of gene expression under different conditions; E-scatter plot of SHAP value distribution of key genes; F-a summary chart of the contribution of genes to prediction.

图 7 候选成分导致肝损伤核心基因的鉴定

Fig. 7 Identification of core genes involved in liver injury induced by candidate compounds

kinase 1, AKT1)、极光激酶 A (aurora kinase A, AURKA) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (cyclin-dependent kinase 2, CDK2) 7 个关键基因。

3.4.4 SHAP 解释分析 ROC 曲线分析证明了这些核心基因的诊断潜力 (图 7-B、C), SHAP 分析显示 EPHA2 (0.126) 与 CDK2 (0.095) 是贡献最大的靶点 (图 7-D), CDK2、AKT1、TPI1、AURKA 表达上调会产生正向 SHAP 效应, 在本预测模型中与肝损伤风险升高呈正相关; EPHA2、CCNB1、CHEK1 的表达升高对应负向 SHAP 值, 在本模型中与肝损伤风险降低呈负相关, 其中 EPHA2 的关联效应最为突出: EPHA2 低表达时 SHAP 值显著为正, 对应更高的肝损伤预测风险, 随其表达量上升, 模型预测的肝损伤风险逐步下降 (图 7-E)。上述相关性为本机器学习模型输出的统计学关联线索, 各基因对肝损伤的调控功能仍需体内外实验进一步验证。力定向分析表明该样本 EPHA2 呈低表达状态, 是推动肝损伤高预测风险的主要因素, 叠

加 CHEK1 低表达、TPI1 高表达共同抬高肝损伤预测值; 中等表达水平的 AKT1、CDK2 对肝损伤预测风险的正向驱动效应较弱 (图 7-F)。

3.5 分子对接分析

采用分子对接方法评价 4 个候选成分与 7 个核心靶蛋白之间的潜在结合能力, 结果见图 8。所有候选成分-靶蛋白组合的预测结合能均低于 -6.50 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol), 其中, 6''-O-acetyl-saikosaponin a 与 AURKA、AKT1 和 EPHA2 的预测结合能分别为 -9.51 、 -9.43 和 -9.41 kcal/mol; 6''-O-acetyl-saikosaponin d 与 AKT1 和 CDK2 的预测结合能分别为 -9.32 和 -9.10 kcal/mol, 提示二者与上述靶蛋白具有相对较强的预测结合能力。saikosaponin b3 和 saikosaponin d 在与 7 个核心靶蛋白对接时获得的最低预测结合能分别为 -8.10 和 -8.70 kcal/mol。总体而言, 峰 32 (6''-O-acetyl-saikosaponin a) 和峰 38 (6''-O-acetyl-saikosaponin d) 的预测结合能力整体强于峰 12 (saikosaponin b3)

AKT1	-9.43	-9.32	-6.76	-8.70
AURKA	-9.51	-8.19	-6.75	-8.42
CCNB1	-7.92	-7.39	-6.95	-7.92
CDK2	-8.92	-9.10	-8.10	-8.54
CHEK1	-8.15	-8.15	-6.60	-7.89
EPHA2	-9.41	-7.76	-6.89	-7.55
TPI1	-7.39	-7.30	-7.45	-7.41
	6"-O-acetyl-saikosaponin a	6"-O-acetyl-saikosaponin d	saikosaponin b3	saikosaponin d

图 8 候选成分与核心靶点的分子对接结果

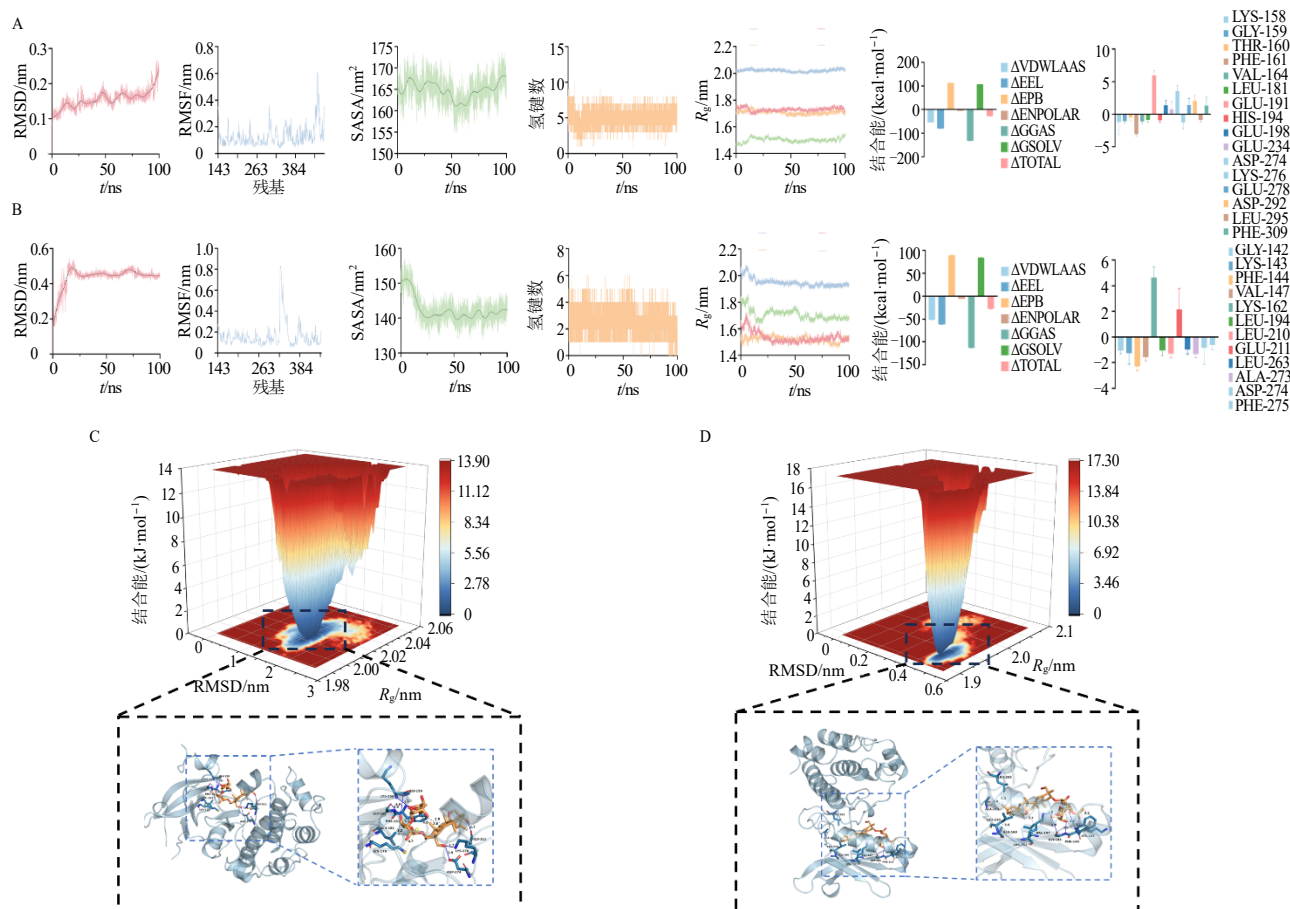
Fig. 8 Molecular docking results of candidate compounds with core target proteins

和峰 35 (saikosaponin d), 该趋势与“3.3”项下关联分析的筛选结果基本一致。

3.6 动力学模拟结果

分子动力学模拟是评估靶蛋白与生物活性化合物所形成蛋白-配体复合物稳定性的有力手段。本研究在分子对接结果基础上, 进一步采用 100 ns 分子动力学模拟评价 6"-O-acetyl-saikosaponin a-AURKA 和 6"-O-acetyl-saikosaponin d-AKT1 复合物的构象稳定性, 结果见图 9。

均方根偏差 (root-mean-square deviation, RMSD) 分析显示, 6"-O-acetyl-saikosaponin d-AKT1 复合物在模拟的大部分时间内维持在 0.10~0.20 nm, 模拟末期升高至约 0.25 nm, 提示体系后期发生了一定程度的构象调整, 但未出现持续性大幅漂移。6"-O-acetyl-saikosaponin a-AURKA 复合物的 RMSD 在模拟初期由约 0.15 nm 升高至约 0.45 nm,



A, C-6"-O-acetyl-saikosaponin d-AKT1; B, D-6"-O-acetyl-saikosaponin a-AURKA.

图 9 柴胡肝毒性 Q-Marker 与各优势靶蛋白的动力学模拟参数、结合能分解、Gibbs 自由能地貌图和结合构象

Fig. 9 Dynamic simulation parameters, binding energy decomposition, Gibbs free energy landscapes and binding conformations of hepatotoxic Q-Marker of *Bupleuri Radix* and each dominant target protein

随后主要稳定在 0.43~0.48 nm, 表明该体系经历初始构象松弛后进入相对稳定的平台期。均方根波动 (root mean square fluctuation, RMSF) 结果显示, AKT1 蛋白大多数残基的波动幅度较低, 仅少数局部区域表现出较高柔性; AURKA 蛋白第 278 位残基附近出现明显 RMSF 波动峰, 提示该区域具有较强的局部构象活动性。

回转半径 (radius of gyration, R_g) 和溶剂可及表面积 (solvent accessible surface area, SASA) 分析表明, 2 个复合物在 100 ns 模拟过程中均未出现持续性的结构扩张、整体松散或表面暴露程度显著改变。其中, 6''-O-acetyl-saikosaponin a-AURKA 复合物的 R_g 值和 SASA 在模拟初期经过一定调整后趋于稳定, 而 6''-O-acetyl-saikosaponin d-AKT1 复合物的相应参数整体波动较小, 说明 2 个体系均保持了相对稳定的结构紧致性和溶剂暴露状态。氢键分析进一步显示, 2 个复合物在模拟过程中均持续存在动态的蛋白质-配体氢键相互作用, 提示氢键可能参与维持配体在结合口袋中的相对稳定。

自由能景观分析显示, 2 个复合物均形成了较为集中且明显的低能构象盆地, 表明模拟过程中存在相对稳定的优势构象状态。由低能区域提取的代表性构象显示, 2 种候选成分均位于相应靶蛋白的结合口袋内。6''-O-acetyl-saikosaponin a-AURKA 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d-AKT1 复合物的 MM/PBSA 预测结合能分别为 -27.79、-27.54 kcal/mol。综上, 2 个复合物在 100 ns 模拟时间尺度内总体保持相对稳定, 为 6''-O-acetyl-saikosaponin a 与 AURKA 以及 6''-O-acetyl-saikosaponin d 与 AKT1 之间可能形成稳定结合构象提供了进一步的计算证据。

4 讨论

4.1 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 为优先候选柴胡肝毒性 Q-Marker

柴胡肝毒性 Q-Marker 的筛选应综合考虑成分的传递性、靶器官暴露、毒性表型关联、分析可测性及潜在作用机制, 由于样本量较小, 同时候选成分较多, 本研究以 Δ ALT 主模型, 结合 Δ AST 参考模型, 采用 PLSR、GRA、Pearson 和 Spearman 分析进行多方法交叉评价。结果显示, 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 与 Δ ALT、 Δ AST 总体呈较稳定的正向关联, 且不同分析方法间的具有较高的一致性。

拟靶向分析实现了相关成分在“柴胡药材-TSS-肝组织暴露”链条中的连续追踪, 表明 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 具有明确来源及肝组织实际暴露特征。二者在肝组织中的色谱响应和峰面积相对较高, 也体现出较好的可测性和暴露基础。柴胡皂苷 A 和 D 已报道具有肝毒性^[30-31], 化学结构上, 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 分别为柴胡皂苷 A 和 D 的 6''位乙酰化衍生物, 保留了原皂苷的三萜母核和糖链骨架结构, 具有较高的结构相似性。分子对接结果显示, 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 与机器学习挖掘的核心 DILI 靶点之间具有较强的预测结合能力, 分子动力学模拟也表明相应复合物在 100 ns 模拟过程中总体保持相对稳定。

因此, 综合多方法关联分析、拟靶向传递特征、峰面积、化学结构及分子模拟结果, 本研究将 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 列为柴胡肝毒性 Q-Marker 的优先候选成分, 用于后续重点验证。

4.2 db/db 模型中 TSS 的效毒双向作用特点

DILI 的发生不仅取决于药物本身的固有毒性, 还受到基础疾病和机体代谢状态的显著影响。因此, 在病理状态下评价中药安全性, 更接近其临床实际应用情境。db/db 小鼠因瘦素受体缺陷, 可自发出现肥胖、胰岛素抵抗、糖脂代谢紊乱及脂肪肝等病理特征, 是研究代谢异常背景下 DILI 的常用模型。

本研究结果显示, 模型组小鼠血清 TC、TG 水平及 ALT 活性升高, 肝组织出现明显脂肪样变性, 表明模型动物已存在糖脂代谢紊乱和基础性肝损伤。TSS 干预后, 血清 TC、TG 水平均明显降低, 提示 TSS 具有改善脂质代谢紊乱的治疗作用; 但其肝脏效应呈现明显的剂量差异。低剂量 TSS 在改善血脂的同时未引起 ALT 及肝组织损伤的明显加重, 而高剂量 TSS 虽然同样具有调血脂作用, 却进一步升高 ALT 活性, 并加重肝细胞气球样变性和点状坏死, 提示高剂量条件下其肝毒性效应逐渐显现。

上述结果表明, TSS 在代谢异常状态下具有“药效-毒性”双向作用特征, 这种效毒转化特征提示, TSS 的药效与毒性可能受到剂量、机体基础状态及肝脏耐受能力等因素共同调控。因此, 在柴胡及含柴胡制剂的质量评价和临床应用中, 不仅应关

注其调血脂等药效作用,还应重视其潜在的肝损伤风险,并进一步明确其量-效、量-毒关系及安全剂量范围。

4.3 基于拟靶向技术的 Q-Marker 筛选策略及优势

中药 Q-Marker 应具备传递性、可测性、有效性或安全性、特有性及复方配伍等基本特征^[32-33]。其中,传递性强调 Q-Marker 能够沿“药材-饮片-制剂-体内”过程稳定传递;有效性或安全性则要求 Q-Marker 能够真实反映药效或毒性物质基础。通过拟靶向分析方法,以中药原型成分为研究对象,可实现成分从药材向体内、尤其是靶器官暴露的连续追踪,将 Q-Marker 的“传递性”与“有效性/安全性”有机连接。相较传统靶向和非靶向分析技术,拟靶向分析策略提高了候选 Q-Marker 筛选的检出率、针对性和可信度,也进一步提高了候选 Q-Marker 筛选的生物学相关性,可为复杂中药效毒 Q-Marker 的筛选与确证研究提供重要的技术支撑。

本研究采用拟靶向分析策略,充分发挥高分辨率质谱广覆盖筛查和三重四极杆质谱高灵敏度、高重复性的优势,在保证检测覆盖度的同时,提高了肝组织中低丰度暴露成分的检出能力。最终获得 39 个肝组织暴露成分,并建立了 TSS 较为完整的肝组织暴露成分谱,为后续肝毒性关联分析提供了可靠的物质基础。

4.4 柴胡肝毒性 Q-Marker 的潜在作用机制

柴胡肝毒性 Q-Marker 不仅应具备明确的组织暴露特征,还应具有合理的生物学作用基础。因此,本研究进一步结合网络药理学、机器学习及分子模拟,从靶点和信号通路层面对候选柴胡肝毒性 Q-Marker 的潜在肝毒性机制进行了分析。

GO 和 KEGG 富集分析显示,候选柴胡肝毒性 Q-Marker 相关靶点主要涉及细胞周期调控、p53 及 PI3K/Akt 等信号通路,这些通路于肝细胞增殖、DNA 损伤修复、细胞周期检查点调控及细胞存活密切相关。真核细胞的细胞周期进程主要受细胞周期蛋白依赖性激酶调控,其中 CDK2 与 Cyclin E 结合并被激活后,可驱动细胞由 G₁ 期进入 S 期并启动 DNA 复制,已有研究表明 CDK2 异常表达与肝损伤相关^[34]。PI3K/Akt 信号通路是调控细胞存活、增殖及应激反应的重要信号轴,但在不同类型和阶段肝损伤中的作用可能存在差异^[35]。据此推测,候选柴胡肝毒性 Q-Marker 可能通过影响 AKT1、CDK2 等靶点,干扰细胞周期稳态及 PI3K/Akt 相关

信号转导,进而参与 TSS 相关肝损伤过程,但其具体作用方向和因果关系仍需进一步验证。

机器学习分析筛选出 EPHA2、AKT1、AURKA、CDK2、CCNB1、CHEK1 和 TPI1 共 7 个 DILI 核心靶点,其中 EPHA2 和 CDK2 在 SHAP 分析中对模型预测的贡献相对较高。分子对接结果显示,6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 与部分核心靶蛋白具有较强的预测结合能力;分子动力学模拟进一步表明,6''-O-acetyl-saikosaponin a-AURKA 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d-AKT1 复合物在 100 ns 模拟过程中总体保持相对稳定,为候选柴胡肝毒性 Q-Marker 与核心靶点之间可能存在稳定相互作用提供了计算依据。

4.5 研究局限性

其一,本研究未设置正常小鼠同等剂量 TSS 干预组,因此现有结果仅能说明 TSS 在 db/db 模型中呈现剂量相关的效毒变化,尚不能区分其肝损伤是 TSS 的直接毒性,还是代谢异常状态下易感性增强所致。后续需进一步增设正常动物给药组,并结合其他代谢性肝损伤模型进行验证。其二,本研究动物样本量较小,且 39 个肝组织暴露成分均基于同一批动物开展关联分析,可能存在统计效能不足、变量共线性、剂量混杂及候选成分选择偏倚。尽管采用 PLSR、GRA、Pearson 和 Spearman 分析进行交叉评价,但这些结果仍属于探索性证据。其三,本研究设置 2 个剂量和单一取材时间点,尚不足以完整揭示 TSS 及候选柴胡肝毒性 Q-Marker 的量-效、量-毒和时-毒关系,后续需扩大样本量,增加剂量梯度和观察时间点,并开展靶向定量验证。其四,6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 属于优先验证的候选柴胡肝毒性 Q-Marker,后续应结合成分单体干预、靶点表达检测及靶点抑制或基因干预实验,进一步验证候选柴胡肝毒性 Q-Marker、核心靶点与肝损伤表型之间的因果关系。

综上,本研究以拟靶向分析为核心,基于“柴胡药材-TSS-肝组织暴露”成分传递链,并结合肝损伤表型关联分析和分子模拟,构建了柴胡 HQM 筛选策略,将 6''-O-acetyl-saikosaponin a 和 6''-O-acetyl-saikosaponin d 列为优先候选柴胡肝毒性 Q-Marker;进一步结合机器学习与分子模拟,初步提示二者可能通过影响细胞周期及 PI3K/Akt 等相关信号通路参与 TSS 诱导的肝损伤,为柴胡肝毒性物质基础解

析及柴胡肝毒性 Q-Marker 的后续确证提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 301-302.
- [2] 叶耀辉, 沈华丹, 白云, 等. 基于 CiteSpace 的柴胡毒性研究热点及趋势的可视化分析 [J]. 药物评价研究, 2026, 49(3): 957-970.
- [3] 仇慧鑫, 张淑敏, 舒乐新, 等. 柴胡的毒性辨析及影响因素研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 6150-6158.
- [4] 牛源菲, 刘美婷, 时宇静, 等. 柴胡的化学成分、药理作用、炮制和毒性研究进展 [J]. 中国药物警戒, 2025, 22(9): 1073-1080.
- [5] 任建萍, 弓迎宾. 柴胡化学成分及药理作用研究进展 [J]. 环球中医药, 2026, 19(2): 375-392.
- [6] 江楠, 于靖, 杨莉, 等. 中药柴胡皂苷药理作用的研究进展 [J]. 环球中医药, 2018, 11(5): 796-800.
- [7] 王馨晨, 艾楠, 刘星宇, 等. 柴胡皂苷保肝作用的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(6): 1564-1568.
- [8] Yang Y, Chen H X, Sun J T, *et al.* Research progress on extraction, purification, biotransformation, pharmacological effects, toxicity, combined therapy and new dosage forms of saikosaponins [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 352: 120274.
- [9] Li X, Li X Y, Huang N N, *et al.* A comprehensive review and perspectives on pharmacology and toxicology of saikosaponins [J]. *Phytomedicine*, 2018, 50: 73-87.
- [10] 黄伟, 孙蓉, 张作平. 柴胡总皂苷粗提物多次给药对大鼠肝毒性的“量-时-毒”关系研究 [J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3344-3347.
- [11] 黄伟, 李晓骄阳, 孙蓉. 柴胡总皂苷对小鼠肝毒性“量-时-毒”关系研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(2): 81-85.
- [12] Hummel K P, Dickie M M, Coleman D L. Diabetes, a new mutation in the mouse [J]. *Science*, 1966, 153(3740): 1127-1128.
- [13] Chen S L, Kong H W, Lu X, *et al.* Pseudotargeted metabolomics method and its application in serum biomarker discovery for hepatocellular carcinoma based on ultra high-performance liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2013, 85(17): 8326-8333.
- [14] Zheng F J, Zhao X J, Zeng Z D, *et al.* Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Nat Protoc*, 2020, 15(8): 2519-2537.
- [15] Shu Y S, Liu Z L, Zhao S Y, *et al.* Integrated and global pseudotargeted metabolomics strategy applied to screening for quality control markers of *Citrus* TCMs [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2017, 409(20): 4849-4865.
- [16] Wang X Y, Jiang M T, Lou J, *et al.* Pseudotargeted metabolomics approach enabling the classification-induced ginsenoside characterization and differentiation of ginseng and its compound formulation products [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(3): 1735-1747.
- [17] Wu H F, Zhang W X, Lin H, *et al.* The pseudotargeted metabolomics study on the toxicity of Fuzi using ultraperformance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 6539675.
- [18] Lu T. A comprehensive electron wavefunction analysis toolbox for chemists, Multiwfn [J]. *J Chem Phys*, 2024, 161(8): 082503.
- [19] Zhu L, Liang Z T, Yi T, *et al.* Comparison of chemical profiles between the root and aerial parts from three *Bupleurum* species based on a UHPLC-QTOF-MS metabolomics approach [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17(1): 305.
- [20] Liu W X, Cheng X L, Kang R, *et al.* Systematic characterization and identification of saikosaponins in extracts from *Bupleurum marginatum* var. *stenophyllum* using UPLC-PDA-Q/TOF-MS [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 747987.
- [21] Shang J W, Wang J X, Yan P F, *et al.* Integrative strategy for quality control of *Radix Bupleuri* based on non-targeted metabolomic profiling and molecular networking [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2023, 415(5): 961-974.
- [22] Dai X Y, Ma J, Lu Q, *et al.* Investigation of the chemical constituents and hepatic-exposed components of the *Bupleuri Radix-Rhei Radix* et *Rhizoma* herbal pair based on UPLC-Q-orbitrap-MS analysis [J]. *Phytochem Anal*, 2026, 37(5): 761-791.
- [23] Chang P, Li Q. Chemical heterogeneity of two *Bupleurum Radix* species based on multiple mass spectrometry techniques [J]. *Arab J Chem*, 2026, 19: 5712025.
- [24] Xu L, Song R, Tian J X, *et al.* Analysis of saikosaponins in rat plasma by anionic adducts-based liquid chromatography tandem mass spectrometry method [J]. *Biomed Chromatogr*, 2012, 26(7): 808-815.
- [25] Seto H, Ōtake N, Kawai H, *et al.* Isolation of triterpenoid glycosides (saikosaponins) from *Bupleurum polyclonum* Y. Li et S. L. Pan and their chemical structures [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50(6): 1607-1611.
- [26] Huang H Q, Zhang X, Lin M, *et al.* Characterization and identification of saikosaponins in crude extracts from three *Bupleurum* species using LC-ESI-MS [J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(18): 3190-3201.

- [27] Zhang R, Li X C, Qu J X, *et al.* Intercropping with maize and sorghum-induced saikosaponin accumulation in *Bupleurum chinense* DC. by liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolomics [J]. *J Mass Spectrom*, 2024, 59(6): e5035.
- [28] Li D Q, Wu J, Liu L Y, *et al.* Cytotoxic triterpenoid glycosides (saikosaponins) from the roots of *Bupleurum chinense* [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(18): 3887-3892.
- [29] Jia A, Yang X H, Zou B, *et al.* Saikosaponins: A review of structures and pharmacological activities [J]. *Nat Prod Commun*, 2022, 17(5): 1934578X221094908.
- [30] Fan G F, Li X, Li F H, *et al.* Saikosaponin D exacerbates acetaminophen-induced liver injury by sabotaging GABARAP-SNARE complex assembly in protective autophagy [J]. *Phytomedicine*, 2025, 138: 156409.
- [31] Wang Y F, Ma R X, Zou B, *et al.* Endoplasmic reticulum stress regulates autophagic response that is involved in saikosaponin a-induced liver cell damage [J]. *Toxicol In Vitro*, 2023, 88: 105534.
- [32] 张铁军, 白钢, 陈常青, 等. 基于“五原则”的复方中药质量标志物 (Q-Marker) 研究路径 [J]. *中草药*, 2018, 49(1): 1-13.
- [33] 中华中医药学会《中药质量标志物研究技术指南》编写组. 中药质量标志物研究技术指南 [J]. *中草药*, 2025, 56(7): 2249-2252.
- [34] Dietrich C, Trub A, Ahn A, *et al.* INX-315, a selective CDK2 inhibitor, induces cell cycle arrest and senescence in solid tumors [J]. *Cancer Discov*, 2024, 14(3): 446-467.
- [35] 吴广阳, 宋添力, 唐浪, 等. 竹节参总皂苷缓解 CCl₄ 诱导的大鼠急性肝损伤: 基于调控 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路 [J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(2): 244-251.

[责任编辑 李亚楠]