

硬尖神香草潜在致肝损伤作用的网络毒理分析

王佳新 吐尔逊帕夏·吾布力卡斯木 刘娟 王雅慧 麦合苏木·艾克木*

新疆医科大学维吾尔医学院

DOI:10.12238/bmtr.v6i5.10053

[摘要] 目的 通过网络毒理学方法初步探讨硬尖神香草潜在致肝损伤的作用及其机制。方法通过检索国内外文献及通过TCMSP结合TOXNET筛选神香草致肝损伤的毒性成分,并以SWISS数据库对其进行潜在靶点预测。通过检索OMIM, GeneCards和TTD等数据库收集肝损伤的疾病靶点。以Cytoscape软件构建化学成分-靶点网络-疾病分类网络,同时运用STRING数据库对靶点进行蛋白质相互作用分析,采用DAVID数据库对靶点进行通路富集分析。结果本研究共筛选出其23个活性成分,可作用于143个靶点,其中核心靶点包括PRKCA、BCL2、JAK2、PTPN11、MAPK3、MAPK1、HSP90AA1、SRC、TP53等,涉及信号通路包括Neuroactive ligand-receptor interaction、Hepatitis B、AGE-RAGE、EGFR等。结论硬尖神香草潜在致肝损伤作用可能与其作用于PRKCA、BCL2、JAK2、PTPN11、MAPK3、靶点及Hepatitis B、AGE-RAGE、EGFR信号通路有关。

[关键词] 硬尖神香草; 肝损伤; 作用机制

中图分类号: R322.4+7 文献标识码: A

Network Toxicological Analysis of the potential liver damage effect of *Hyssopus cuspidatus* Boriss

Jiaxin Wang Tuerxunpaxia·Wubulikasimu Juan Liu Yahui Wang Maihesumu Aikemu*

Institute of Traditional Uyghur Medicine of Xinjiang Medical University

[Abstract] Objective: To initially investigate the potential liver damage effect and mechanism of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. through Network Toxicological Analysis methods. Methods By searching domestic and foreign literature and using TCMSP combined with TOXNET to screen the toxic components of liver damage caused by *Vanilla chinensis*, and using SWISS database to predict potential targets. Disease targets for liver injury were collected by searching databases such as OMIM, GeneCards and TTD. Cytoscape software was used to build a chemical component-target network-disease classification network. At the same time, the STRING database was used to analyze protein interactions on the targets, and the DAVID database was used to conduct path enrichment analysis on the targets. Results A total of 23 active ingredients were screened in this study, which can act on 143 targets. The core targets include PRKCA, BCL2, JAK2, PTPN11, MAPK3, MAPK1, HSP90AA1, SRC, TP53, etc., and the signaling pathways involved include Neuroactive ligand-receptor interaction, Hepatitis B, AGE-RAGE, EGFR, etc. Conclusion The potential liver damage effect of *Hyssopus cuspidatus* Boriss. may be related to its action on PRKCA, BCL2, JAK2, PTPN11, MAPK3, target and Hepatitis B, AGE-RAGE, and EGFR signaling pathways.

[Key words] *Hyssopus cuspidatus* Boriss; liver damage; mechanism of action

引言

中药肝损伤 (Herbal-induced Liver Injury, HILI) 是指由中药、天然药物及其相关制剂引起的肝损伤。近年来,随着中草药在全球的广泛应用及药品不良反应监测体系的不断完善, HILI报道呈升高趋势, 中草药相关因素引起的药物性肝损 (Drug-Induced Liver Injury, DILI) 越来越受到关注。2020年版

《中国药典》将83种具有潜在毒性的中草药进行了分级, 其中低毒性药物占据31类, 中毒性有42类, 剧毒药物10类。常见的引起HILI的中药包括何首乌、大黄、补骨脂、雷公藤等。这些药物多含有生物碱、糖苷类、萜类内酯、蒽醌类和重金属等活性成分, 也是引起药物性肝损的最主要原因^[1-2]。由于中药的成分复杂、作用机制复杂以及药效与毒性之间的平衡, 中药引发肝损伤

的情况时有发生。因此,开展中药肝损伤研究对于了解中药的安全性和潜在风险至关重要。硬尖神香草是唇形科(Labiatae)神香草属硬尖神香草(*Hyssopus cuspidatus* Boriss.)的干燥全草,收载于《中华人民共和国卫生部药品标准:维吾尔药分册》(WS3-BW-0195-98),具有成熟及清除异常粘液质,发汗解毒,促进机体自然随和,止咳化痰,平喘利肺等功效,用于治疗哮喘、咳嗽感冒,肺炎等顽疾。《中华本草·维吾尔药卷》^[3]记载:其对肝有害,矫正药为大枣。但至今尚未见到硬尖神香草致肝损伤作用方面的研究报道。网络毒理学是一门结合计算机科学、生物信息学和毒理学的跨学科领域,旨在利用现代计算机技术和生物信息学方法来研究有毒物质对生物体的影响。网络毒理学通过整合大量的生物数据、化学数据和生物信息数据,以及建立相关的模型和算法,可以帮助学者更好地理解毒素与生物体健康之间的相互作用,从而有助于毒理学研究的发展和应用^[4-6]。因此,本研究采用网络毒理学的方法对硬尖神香草致肝损伤的毒性成分及毒理机制进行分析,旨在为其进一步深入研究奠定基础。

1 资料与方法

1.1 药物数据来源。DAVID6.7(<https://david.ncifcrf.gov/>)。运用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP,<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)；毒理学数据网络(TOXNET,<https://toxnet.nlm.nih.gov/>)；搜索核心药物组的活性成分,以口服利用度(Oral Bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、类药性(Drug Likeness, DL) ≥ 0.18 为条件进行查找筛选核心药组的主要活性成分和靶点。

1.2 疾病靶点获取。在GeneCards、OMIM以及TTD平台数据库中以“Liver injury”为关键词进行检索,筛选得到肝损伤疾病靶点。将主要活性成分靶点与疾病靶点查重筛选,利用Venn在线软件获取共同靶点Venn图,得到的共同靶点。

1.3 蛋白质相互作用网络(PPI)。通过STRING平台获取PPI蛋白互作网络,并导入Cytoscape v3.10.0进行拓扑分析,通过连接度(Degree值)的中位数筛选出核心药物组抗肝损伤的核心靶点,用cytoHubba计算出hub gene并且绘图。

1.4 构建活性成分-靶点-通路网络。为了更清晰地展示核心药组对抗肝损伤的作用机制,运用Cytoscape v3.10.0软件绘制成网络图,通过Degree值预测核心药组抗肝损伤作用的主要活性成分。

1.5 生物信息富集分析。将在获得的关键核心药组抗肝损伤潜在靶点,利用Metascape数据库进行基因本体GO(Gene Ontology)注释及京都基因与基因组百科全书KEGG(Kyoto encyclopedia of genes and genomes)通路富集分析。将上一步筛选出的与肝损伤相关的靶点映射到DAVID数据(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)中进行GO与KEGG富集分析,选取富集结果中P值小于0.05的前10个通路绘制气泡图,探索这些靶点所参与的生物过程、分子功能、细胞组成在慢性肝病的治疗中的生物学意义。

2 结果

2.1 潜在活性成分和靶点筛选。在TCMSP平台(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)上,得到符合要求的活性成分,

限定条件:类药性(DL) ≥ 0.18 和口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 。对于缺少靶点信息的成分在查阅相关文献后进行补充,并在Uniprot数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行规范化校正。去除重复的分子,最终发现芹菜素、alphaltolic acid、乙酸芳樟酯、oleanderolide、cryptomeridiol等23个符合要求的活性成分。通过Swiss(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)平台根据成分获取预测靶点,去除重复靶点后,发现靶点143个。

2.2 潜在疾病靶点获取。以“Liver injury”为关键词进行检索,从GeneCards、OMIM以及TTD平台数据库收集肝损伤疾病靶点并进行删除重复项,获得非酒精性脂肪肝病靶点9488个,与核心药物组活性成分预测靶点进行筛选后得到共同靶点,利用Venn在线软件获取共同靶点Venn图,得到潜在共同靶点218个。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建。PPI分析结果表明,共含有靶蛋白217个,靶蛋白相互连线1752条,平均度值为16.1,平均介数0.49。PPI网络图中的每一个节点表示一个蛋白质,节点间的边表示蛋白质间相互作用,粗细表示蛋白分子相互之间的作用强度,在整个网络中节点越大、颜色越深,对应度值越大;边越粗、颜色越深,两者之间联系越紧密,推测这些可能是核心药组发挥抗肝损伤的重要靶点,如图1所示。使用Cytoscape_v3.10.0软件进行网络分析并且将PPI整理绘图,如图3所示。Cytoscape_v3.10.0软件进行网络拓扑分析,以平均度值为依据,选取大于平均度值的靶点作为核心靶点,按照度值大小筛选出前10个靶点作为核心靶点,如图所示,核心药组可能主要通过以下核心靶点发挥抗肝损伤作用。对网络进行分析,选择度值排名前5位的活性成分作为核心处方的核心化学成分,分别是芹菜素、alphaltolic acid、乙酸芳樟酯、oleanderolide、cryptomeridiol,如图1所示。

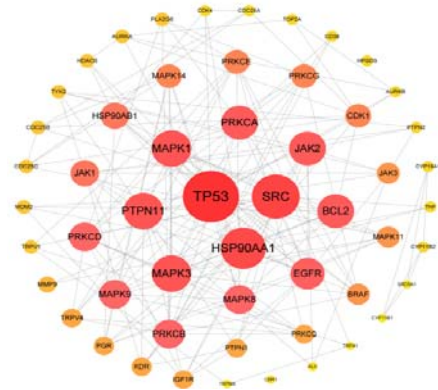


图1 蛋白质-蛋白质相互作用整理网络图

2.4 通路富集分析。运用DAVIDA平台(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)进行通路富集分析。通过KEGG分析,发现富集通路主要富集在AGE-RAGE信号通路、化学致癌作用-受体激活、乙型肝炎、肝癌中的蛋白聚糖等,推测关键其主要通过这些通路致肝损伤作用。GO富集分析,共发现了5086个通路。富集主要包括GOBP、GOMF、GOCC三个方面。GOBP主要涉及对细胞对化学刺激的反应、脂肪酸代谢过程、细胞对氧化刺激的反应、活性氧代

谢过程、对氧化应激的反应等; GOMF主要包括配体激活的转录因子活性、DNA结合转录因子结合、细胞因子受体结合、泛素样蛋白连接酶结合、类固醇激素受体活性等; GOCC主要包括膜筏、膜微结构域、膜区、质膜筏等。对KEGG与GO进行的通路分析, 设置了 $P < 0.01$ 为筛选条件, 取P值最小的前二十条通路进行分析, 通过“靶点-通路”网络拓扑分析, 如图2所示。

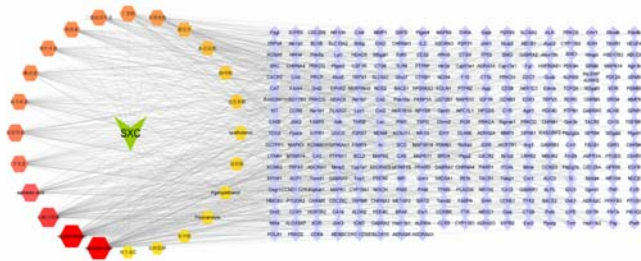


图2 毒性成分-肝损伤靶点网络

3 讨论

本研究通过网络毒理学方法对硬尖神香草潜在的致肝损伤作用及其机制进行了初步探讨, 筛选出硬尖神香草中的23个活性成分, 并预测其可能作用的143个靶点。这些成分与多个生物学过程和信号通路相关, 其中核心靶点和信号通路的发现为理解硬尖神香草的肝毒性提供了新的视角。

在本研究中鉴定出的核心靶点如PRKCA、BCL2、JAK2等与肝损伤存在潜在的紧密联系。PRKCA是一种蛋白激酶C, 在细胞的信号转导过程中发挥着重要作用。在肝脏中, 异常的PRKCA活性可能影响肝细胞的代谢、增殖和凋亡等过程^[9]。当硬尖神香草中的活性成分作用于PRKCA时, 可能干扰其正常的信号转导, 导致肝细胞功能紊乱, 进而引发肝损伤。BCL2是一个重要的凋亡调节因子, 其表达水平的改变会影响肝细胞的生存状态^[10]。如果硬尖神香草的成分影响了BCL2的正常功能, 可能打破肝细胞凋亡与存活的平衡, 促使肝损伤的发生。JAK2在细胞因子信号转导中具有关键作用。在肝脏炎症反应中, 细胞因子的信号转导异常与肝损伤密切相关^[11]。硬尖神香草作用于JAK2可能干扰细胞因子信号, 影响肝脏的免疫微环境, 从而对肝脏造成损害。

在本研究发现涉及的信号通路如Hepatitis B、AGE-RAGE、EGFR等也为其潜在致肝损伤提供了合理的解释。Hepatitis B信号通路虽然与乙肝病毒感染相关, 但其中的一些关键分子和调节机制在其他类型的肝损伤中也可能发挥作用。硬尖神香草活性成分可能通过干扰这条通路中的某些环节, 引起肝细胞的炎症反应、纤维化等。AGE-RAGE信号通路与氧化应激和炎症反应密切相关。在肝脏中, AGE-RAGE通路的激活会导致活性氧(ROS)的产生增加, 引发炎症细胞的浸润和肝细胞的损伤。硬尖神香草可能通过作用于该通路中的靶点, 促进AGE-RAGE通路的异常激活, 从而导致肝损伤。EGFR信号通路在肝脏的生长、发育和修复过程中具有重要意义。如果硬尖神香草影响EGFR信号通路的正常功能, 可能会干扰肝脏细胞的正常生长和修复机制, 导致肝细胞功能异常和损伤。

尽管本研究通过网络毒理学方法提供了硬尖神香草致肝损伤的潜在机制, 但仍需通过实验研究进一步验证。下一步的研究我们将集中在其成分和靶点的实验验证上, 包括细胞实验和动物模型研究。本研究的发现对于指导硬尖神香草的临床安全使用具有重要意义。

总之, 本研究通过网络毒理学方法为硬尖神香草的肝毒性提供了新的见解, 并为未来的实验研究和临床应用提供了理论基础。

[资助项目]

新疆医科大学研究生创新创业项目, 项目编号: CXCY2024019。

[参考文献]

- [1]宋海波, 韩玲. 中药肝损伤的流行特点、风险因素及评价[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(4): 15.
- [2]杨立波. 中草药导致药物性肝损伤的现状及其研究进展[J]. 饮食保健, 2020, 7(34): 76-77.
- [3]国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草·维吾尔药卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.
- [4]唐璇, 韩佳寅, 潘辰, 等. 补骨脂肝损伤实验研究及网络毒理学预测研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, (2): 179-189.
- [5]卫博文, 王海燕, 曹丹, 等. 基于网络药理学探讨雷公藤治疗免疫性肝损伤“有故无殒”思想内涵[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(6): 7.
- [6]Xiaohui, FAN. Network toxicology and its application to traditional Chinese medicine[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2011.
- [7]Rui L, Xinyu L I, Yazhuo L I, et al. Network toxicology and its application in predicting the toxicity of traditional Chinese medicine[J]. Drug Evaluation Research, 2018.
- [8]AXY, BJX, CYZ, et al. Network toxicology and LC-MS-based metabolomics: New approaches for mechanism of action of toxic components in traditional Chinese medicines[J]. Chinese Herbal Medicines, 2019, 11(4): 357-363.
- [9]黄彭, 曲佳琳, 段文倩, 等. 基于网络药理学及实验验证探究清热利胆汤治疗胆汁淤积性肝损伤的作用机制[J]. 中草药, 2021, 52(15): 4577-4586.
- [10]冯玲, 黄朝霞, 李君兰, 等. 基于网络药理学与分子对接探讨当归丹参药对治疗急性肝损伤的作用机制[J]. 激光生物学报, 2024, 33(3): 243-252.
- [11]孙敏, 刘玉龙, 刘科, 等. 丹皮酚通过调控JAK2/STAT3信号通路改善酒精性肝损伤小鼠肝脏炎症与氧化应激损伤[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(6): 1078-1084.

作者简介:

王佳新(1999--), 男, 汉族, 江苏泰州人, 在读硕士, 研究方向: 维药药效物质基础及作用机理研究。

*通讯作者:

麦合苏木·艾克木(1980--), 男, 乌孜别克族, 新疆喀什人, 副教授, 研究方向: 维药作用机制及新药研发。