

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research靶向代谢组学整合网络药理学研究
栀子的“自解毒”效应及机制Research of targeted metabolomics integrated network pharmacology on the
"self - detoxification" effect and mechanism of *Gardenia jasminoides Ellis*吕东霞^{1a}, 张帆^{1a,2}, 高昕^{1a},
张航星^{1a}, 王国旭², 饶志²,
魏玉辉^{1ab,2}(1. 兰州大学, a. 第一临床医学院; b. 药学院,
甘肃 兰州 730000; 2. 兰州大学 第一医院, 甘肃
兰州 730000)LÜ Dong - xia^{1a}, ZHANG Fan^{1a,2},
GAO Xin^{1a}, ZHANG Hang - xing^{1a},
WANG Guo - xu², RAO Zhi²,
WEI Yu - hui^{1ab,2}(1. a. The First School of Clinical
Medicine; b. School of Pharmacy,
Lanzhou University, Lanzhou 730000,
Gansu Province, China; 2. The First
Hospital of Lanzhou University, Lanzhou
730000, Gansu Province, China)基金项目: 国家自然科学基金资助项目
(82174067); 兰州大学 2024 年大学
生创新创业推荐基金资助项目
(202210730179)作者简介: 吕东霞(1999 -), 女, 硕士研究生, 主
要从事中药肝损伤方面的临床工作
和研究通信作者: 魏玉辉, 教授, 主任药师, 博士生导师
Tel: (0931) 8356510
E - mail: yhwei@lzu.edu.cn

摘要:目的 通过靶向代谢组学整合网络药理学研究栀子缓解其自身成分京尼平所致肝毒性的效应,即“自解毒”效应,并探讨其机制。方法 将昆明种雄性小鼠随机分为3组($n=8$),分别为空白组、对照组和实验组。空白组灌胃给予0.5%羧甲基纤维素钠(CMC - Na)空白溶剂,对照组灌胃给予 $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 京尼平,实验组灌胃给予 $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的京尼平和 $520\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的栀子水提物粉末。连续给药28 d后,用全自动生化分析仪检测血清生化指标,用苏木精伊红(HE)染色法进行肝组织病理学检测,用超高效液相色谱 - 串联质谱系统(UPLC - MS/MS)法定量分析差异代谢物并进行靶向代谢组学分析,并分别预测栀子活性化合物、京尼平和肝损伤相关的靶点。最后,整合代谢组学和网络药理学的结果筛选出栀子自解毒效应相关的潜在靶点。结果 实验组、对照组和空白组的谷丙转氨酶(ALT)分别为 (35.75 ± 8.50) 、 (53.00 ± 14.43) 和 $(37.38 \pm 3.11)\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$;谷草转氨酶(AST)分别为 (123.38 ± 31.40) 、 (146.50 ± 19.73) 和 $(115.75 \pm 17.44)\text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$;实验组的ALT与对照组比较显著降低,在统计学上差异有统计学意义($P<0.05$),试验组的AST与对照组比较,在统计学上差异无统计学意义($P>0.05$)。靶向代谢组学共筛选出8种特征性内源性代谢物,分别是延胡索酸、异柠檬酸、马来酸、鸟氨酸、氨基己二酸、异胆酸、哌啶酸和吡咯-2-羧酸,这8种差异代谢物诱导的代谢途径主要与精氨酸生物合成和三羧酸循环(TCA)代谢途径相关。结论 栀子主要通过影响精氨酸生物合成和TCA代谢途径,改善京尼平所致肝脏内源性代谢物的代谢紊乱,并作用于相应靶点改善炎症和氧化应激,缓解京尼平导致的肝损伤,发挥自解毒效应。

关键词: 栀子; 京尼平; 自解毒; 肝毒性; 靶向代谢组学

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.17.017

中图分类号: R28 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)17-2496-07

Abstract: Objective To investigate the effect of *Gardenia jasminoides Ellis* (Zhi - zi) in alleviating the hepatotoxicity induced by its constituent, genipin, which is called the "self - detoxification" effect, and to explore its mechanism through targeted metabolomics and integrated network pharmacology. **Methods** Male mice of the Kunming breed were randomly divided into three groups ($n=8$) including blank group, control group and experimental group. Blank group was administered a blank solvent 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC - Na) by gavage; control group was administered genipin by gavage at a dose of $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, and experimental group was administered $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ genipin and $520\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Zhi - zi aqueous

extract powder by gavage. After 28 days of continuous administration, serum biochemical indicators were measured using an automated biochemical analyzer, liver tissue pathology was examined using hematoxylin and eosin (HE) staining, and differential metabolites were quantified and analyzed using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) for targeted metabolomics analysis. The targets associated with active compounds in Zhi-zi, genipin, and liver damage were predicted separately. Finally, the results of metabolomics and network pharmacology were integrated to screen the potential targets related to the self-detoxification effect of Zhi-zi. **Results** The alanine transaminase (ALT) levels in experimental group, control group and blank group were (35.75 ± 8.50) , (53.00 ± 14.43) and (37.38 ± 3.11) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively; the aspartate transaminase (AST) levels were (123.38 ± 31.40) , (146.50 ± 19.73) and (115.75 ± 17.44) $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. Compared with control group, experimental group showed significant decrease in ALT levels, with statistically significant difference ($P < 0.05$). Compared with control group, the AST levels in experimental group showed no statistically significant difference ($P > 0.05$). Targeted metabolomics identified 8 characteristic endogenous metabolites including fumaric acid, isocitric acid, maleic acid, ornithine, aminocaproic acid, isoLCA, pipercolic acid and pyrrole-2-carboxylic acid, and the metabolic pathways induced by these 8 differentially expressed metabolites were primarily associated with arginine biosynthesis and the tricarboxylic acid cycle (TCA) metabolic pathways. **Conclusion** Zhi-zi can improve the metabolic disorders of endogenous metabolites in the liver caused by genipin by affecting the arginine biosynthesis and the TCA metabolic pathway, and improve inflammation and oxidative stress by acting on the corresponding targets to alleviate the hepatic injuries caused by genipin and exerting the self-detoxification effect.

Key words: *Gardenia jasminoides Ellis*; genipin; self-detoxification; hepatotoxicity; targeted metabolomics

栀子(*Gardenia jasminoides Ellis*),茜草科植物,药用为其干燥成熟果实,功效丰富,药效显著,因中医临床在长期使用过程中未发现明显毒性,被归为无毒中药^[1]。然而,近年来有研究报道栀子存在肝毒性,限制了栀子的应用及研发^[2-3]。研究表明,栀子中的主要药理活性成分京尼平苷的肠道水解产物京尼平的明确肝毒性是栀子安全性被质疑的关键原因^[3]。有研究通过体内和体外实验明确了京尼平的肝毒性^[4],并发现栀子可缓解京尼所致肝毒性,即栀子存在“自解毒”效应,这可能是栀子作为中药使用无毒的主要原因,但相关机制有待明确。因此,本研究以小鼠为研究对象,用靶向代谢组学方法研究栀子的自解毒效应,并对其机制进行初步探讨,旨在为促进栀子的应用、研发与推广奠定基础,同时为中药的安全性、合理性和科学性的阐释以及中药毒性的研究和确证提供新的依据和研究思路。

材料与方法

1 材料

实验动物 SPF级昆明种雄性小鼠,鼠龄4周,体质量18~22 g,购自兰州生物制品研究所有限责任公司,生产许可证编号:SCXK(甘)2022-0001。于甘肃

省药品检验研究院饲养与实验,使用许可证编号:SCXK(甘)2020-0006,饲养温度20~25℃,湿度40%~60%,自由进食和饮水,定期更换消毒垫料。本研究由兰州大学第一临床医院伦理委员会审批通过(伦理批号:LDYYLL2021-77)。

药品与试剂 京尼平,批号:22031801,纯度:>98%,成都康邦生物科技有限公司生产;栀子中药饮片,批号:211202,符合《中国药典》^[5]2020版一部栀子项下的规定,且饮片中主要活性成分京尼平苷的含量为5.82%(g/g)>1.8%,含量亦符合药典规定,饮片样本保存于兰州大学第一医院药剂科,甘肃冠兰中药饮片公司生产;靶向代谢组学分析所用306种内源性物质的标准品和试剂,由麦特绘谱生物科技(上海)有限公司提供。

仪器 ACQUITY UPLC-Xevo TQ-S超高效液相色谱-串联质谱联用仪(ultra-performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry, UPLC-MS/MS),美国Waters Corporation公司产品;TBA-2000FR全自动生化分析仪,日本东芝医疗系统有限公司产品;Multiskan FC酶标仪,美国Thermo公司产品;LT-224S分析天平,北京赛多利斯公司产品;FD-1C-50冷冻干燥机,上海比朗仪器制造有限公司产品。

2 实验方法

2.1 梔子水提物粉末的制备

梔子饮片用10倍量的纯化水浸泡4 h,期间每15 min搅拌1次,随后加热,待沸腾后保持微沸不喷锅状态煎煮1 h后,趁热过滤;药渣继续加入10倍量的纯化水,如前法煎煮过滤,合并2次过滤后的药液;药液浓缩至原药液体积的1/10,转入冷冻干燥机配套的物料盘和瓶中,于 -80°C 冰箱冷冻24 h后,于 -55°C 、真空度 $<10\text{ Pa}$ 条件下冷冻干燥48 h,研磨过4目筛后获得梔子水提物粉末,以下简称为梔子粉末,提取率为32.75%,即:1 g粉末相当于3 g梔子原药材,梔子粉末中京尼平苷含量为 $(96.01 \pm 0.76)\text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.2 动物分组及处置方法

昆明种雄性小鼠24只,按体质量随机分为3组($n=8$),分别为空白组、对照组及实验组。其中,空白组灌胃给予0.5%羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose-Na, CMC-Na)空白溶剂,对照组灌胃给予 $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 京尼平,实验组灌胃给予含 $100\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的京尼平和按京尼平苷 $50\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的剂量校准后 $520\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的梔子粉末,每天给药1次,连续28 d。之后小鼠禁食6 h,次日称重、水合氯醛麻醉后,摘眼球取血,分离血清,处死分离肝脏,称重,拍照记录肝形态,计算肝系数(肝质量/体质量)。血清和肝组织样本获取后及时存储于 -80°C ,用于后续相关指标测定。

2.3 小鼠的血清生化指标

用全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的水平。

2.4 小鼠肝病理学分析

用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色法对小鼠的肝病理学进行分析,在未告知分组的情况下,由成都里来生物科技有限公司完成。

2.5 靶向代谢组学分析

用UPLC-MS/MS法定量分析肝组织中306种常见内源性物质的含量^[6],并以靶向代谢组学方法进行处理与分析,寻找特征变化的内源性物质,并阐释潜在的机制。

肝样本处理 快速称取肝组织10 mg,加入超纯水20 μL ,氧化锆珠匀浆3 min后,加入预冷的含内标的甲醇溶液120 μL ,继续匀浆3 min,以 $10\,363\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心20 min,取上清液至96孔板中,于Eppendorf epMotion工作站中在每孔中加入新配制的衍生化试剂20 μL ,将板密封,置于 30°C 衍生化

60 min,样品蒸发2 h。随后,加入预冷的50%甲醇溶液330 μL ,将板置于 -20°C 冷藏20 min,再于 4°C 下,以 $4\,880\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心30 min,取上清液135 μL ,转至新96孔板,每孔中加入10 μL 内标。同时制作标准,最后用于UPLC-MS/MS定量分析,方法学部分详见参考文献[6]。

UPLC-MS/MS分析 色谱条件:ACQUITY UPLC BEH C_{18} VanGuard 预柱($2.1\text{ mm} \times 5.0\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{mol}$),色谱柱为ACQUITY UPLC BEH C_{18} ($2.1\text{ mm} \times 100.0\text{ mm}$, $1.7\text{ }\mu\text{mol}$);柱温 40°C ;样品管理器温度 10°C ;流动相A相为0.1%甲酸水溶液,B相为乙腈:异丙醇(70:30);梯度洗脱程序为0~1 min(5% B),1~5 min(5%~30% B),5~9 min(30%~50% B),9~11 min(50%~78% B),11~13.5 min(78%~95% B),13.5~14 min(95%~100% B),14~16 min(100% B),16~16.1 min(100%~5% B),16.1~18 min(5% B);流速: $0.4\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$;进样体积5 μL 。质谱条件:电喷雾离子源正离子模式下电压1 500 V,负离子模式下电压2 000 V;离子源温度 150°C ;脱溶剂温度 550°C ;脱溶剂气流 $1\,000\text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 。质量控制(quality control, QC)样本为包含有测试混合对照品的样本、内标和混合的生物样本的混合物,与其他样本同步制备,每14个测试样品后进行QC样本测试,确保系统稳定性和分析结果的准确性。

数据统计与分析 用TMBQ软件对UPLC-MS/MS生成的原始数据文件进行处理,对每一个代谢物进行峰的集成、校准和定量,用iMAP平台进行数据处理、解释和可视化,并分别就空白组和对照组以及实验组进行2组间的多维和单维统计分析,多维统计分析用偏最小二乘判别分析(partial least square discriminant analysis, PLS-DA)和正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least square discriminant analysis, OPLS-DA),单维统计分析依据数据的正态性和方差齐性选取独立样本 t 检验、Mann-Whitney-Wilcoxon(U -test)进行2组间差异代谢物分析。结合多维统计分析结果以变量重要性投影(variable importance in projection, VIP) >1 和单维统计分析结果 $P<0.05$ 取交集筛选梔子自解毒的差异性代谢物,进行通路富集分析,并对比自解毒差异代谢物在3组间的变化趋势。

2.6 网络药理学分析

在TCMSP(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)数据库中以“梔子”为关键词,筛选口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 的梔子活性成分和靶

点。在 Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/>) 数据库中预测栀子活性成分的靶点,将在 TC MSP 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库中靶点汇总并筛除重复值后得到栀子相关的靶点。在 TC MSP 数据库、PharmMapper 数据库 (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>) 和 SuperPred 数据库 (<https://prediction.charite.de/>) 中筛选京尼平相关靶点,整合 3 个数据库,去除重复值后将获得的数据信息作为京尼平的靶点。随后,以“chemical and drug induced liver injury”为关键词在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库中搜索肝损伤的靶点,整合 2 个数据库,去除重复值后,获得肝损伤相关靶点。用 Venny 2.1.0 在线网站 (<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>) 对获得的栀子成分靶点、肝损伤靶点和京尼平靶点取交集,获得栀子自解毒效应的可能靶点。

2.7 靶向代谢组学整合网络药理学分析

在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中搜索栀子自解毒效应差异性代谢物的 SMILES 号,在 SwissTargetPrediction 数据库进行代谢物靶点预测,筛选 Probability > 0 的靶点,最终整合网络药理学和代谢组学获得的靶点。

2.8 分子对接分析

用 Schrödinger 软件进行代谢物和靶点的分子对接。首先,通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库下载差异代谢物的结构,通过 UniProt (<https://www.uniprot.org/>) 数据库和 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库下载靶点蛋白的晶体结构。使用 Schrödinger 软件中的 Protein Preparation Workflow 模块处理靶点蛋白,包括补充缺失的侧链、去除水分子、补充缺失的环、能量优化等。同时使用 Ligprep 模块处理代谢物,保持默认参数。在 Receptor Grid Generation 模块,以蛋白晶体结构中存在的配体小分子的位置为对接格点的中心,构建对接盒子。根据完成的对接格点的中心,将处理过的代谢物与蛋白进行分子对接,对接过程保持默认参数。用 Pymol 软件将栀子自解毒靶点和相应代谢物之间的结合构象进行可视化^[7]。打分值越小,结合能越小,结合构象越稳定,配体和受体之间的亲和力越高。一般认为,当对接打分值 < -5 kcal · mol⁻¹ 时,结合构象较稳定,配体和蛋白之间相互作用的可能性更大^[8-9]。

3 统计学处理

用 Graphpad Prism 8.2.1 软件进行统计分析和绘

图,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间的比较用独立样本 *t* 检验,3 组及以上数据用单因素方差分析 (ANOVA),并进一步用 Tukey 事后检验进行多重比较。

结 果

1 栀子对小鼠血清生化指标的影响

实验组、对照组和空白组的 ALT 分别为 (35.75 ± 8.50)、(53.00 ± 14.43) 和 (37.38 ± 3.11) U · L⁻¹; AST 分别为 (123.38 ± 31.40)、(146.50 ± 19.73) 和 (115.75 ± 17.44) U · L⁻¹,实验组的 ALT 与对照组比较显著降低,在统计学上差异有统计学意义 (*P* < 0.05);实验组的 AST 与对照组比较,在统计学上差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。实验组、对照组和空白组的体质量分别为 (38.90 ± 3.68)、(54.93 ± 3.16) 和 (42.06 ± 2.46) g;肝与体质量比(肝系数)分别为 (0.04 ± 0.00)、(0.04 ± 0.00) 和 (0.04 ± 0.00) g · g⁻¹,实验组的体质量与对照组比较下降,但在统计学上差异无统计学意义 (*P* > 0.05),实验组的肝系数与对照组比较显著降低,在统计学上差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

2 栀子对小鼠肝病理学的影响

进一步考察肝组织病理学,发现京尼平给药后肝组织出现淋巴细胞浸润、中央静脉充血、肝细胞坏死等;栀子和京尼平合用后,发现肝颜色明显向正常恢复,京尼平引起的肝脏病理变化也明显改善,见图 1。

3 栀子在小鼠中的靶向代谢组学分析

3.1 栀子自解毒内源性差异代谢物分析

通过 UPLC-MS/MS 对小鼠肝组织样本中 306 种常见内源性代谢物定量分析。将所有肝组织样本等量混合后得到 QC 样本。质控结果显示:QC 样本间相关性系数都大于 0.99,说明本次实验检测数据稳定,质控效果好,可以用于后续分析。306 种内源性代谢物中达到最低定量限并可测定的共 228 种,其余 78 种低于最低检测限而未测得。

用有监督的 PLS-DA 法评估测得药物对代谢物的影响,结果显示,空白组、对照组和实验组的代谢谱明显分离,这表示给药后肝的内源性代谢物存在显著变化,同时还发现实验组的代谢谱处于空白组和对照组之间,提示栀子可使京尼平所致肝损伤导致的代谢谱的变化向正常恢复。

为了进一步分析 2 组之间代谢谱的差异,筛选差异代谢物,用 OPLS-DA 分析方法,该方法可以过滤

与分组无关的噪音信号,更好的关注差异代谢物的变化。结果显示,在 OPLS - DA 模型中,空白组和对照组 ($R^2Y = 0.958$, $Q^2Y = 0.707$) 与对照组和实验组之间 ($R^2Y = 0.956$, $Q^2Y = 0.734$) 都明显分离,并且 OPLS - DA 模型不存在过度拟合。

根据上述多维统计分析的结果结合单维检验,以变量重要性投影 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 为标准来筛选可区分 3 组的特征性内源性代谢物,共筛选出 8 种特征性内源性代谢物,分别为延胡索酸、异柠檬酸、马来酸、鸟氨酸、氨基己二酸、异石胆酸、哌啶酸和吡咯 - 2 - 羧酸。与空白组相比,延胡索酸、异柠檬酸和马来酸显著升高,鸟氨酸、氨基己二酸、异石胆酸、哌啶酸

和吡咯 - 2 - 羧酸显著降低;而给予栀子后均可以使这 8 种代谢物恢复正常水平。特征性差异代谢物的变化情况用小提琴图表示,见图 2。实验说明,栀子可以通过逆转京尼平所致小鼠肝损伤情况下肝脏代谢紊乱发挥其“自解毒”效应。

3.2 栀子自解毒差异代谢物的通路分析

为进一步揭示这些差异代谢物引起代谢通路的变化以阐释栀子自解毒的机制,将上述获得的差异代谢物导入 Metaboanalyst 网站 (<https://www.metaboanalyst.ca/>) 进行通路分析,发现上述代谢物主要涉及 9 条代谢途径,其中精氨酸生物合成和 TCA 循环是参与栀子自解毒效应的主要代谢途径 ($P < 0.05$)。

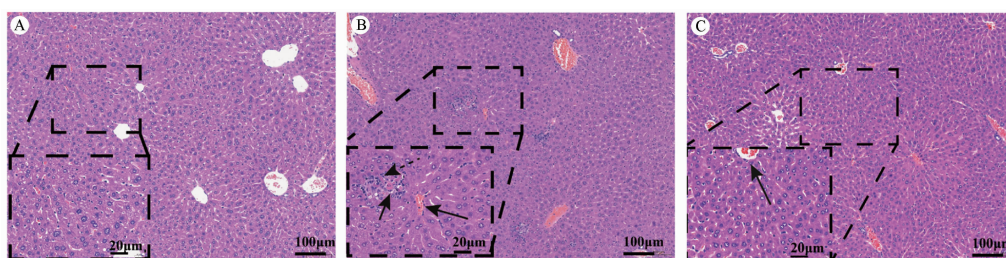


图 1 用苏木精 - 尹红 (HE) 染色法观察栀子对小鼠肝病理的影响 (比例尺: 100 μm 和 20 μm)

Figure 1 Observation of the effects of *Gardenia jasminoides* Ellis on mice liver pathology using the hematoxylin - eosin (HE) staining method (scale bars: 100 μm and 20 μm)

Short dashed arrows denote lymphocytic infiltration; Short solid arrows denote necroptosis; Long solid arrows denote central venous congestion; A: Blank group; B: Control group; C: Experimental group; Blank group: Administered 0.5% carboxymethyl cellulose (CMC - Na) by gavage; Control group: Administered genipin by gavage at a dose of $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; Experimental group: Administered $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ genipin and $520 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ Zhi - zi aqueous extract powder by gavage.

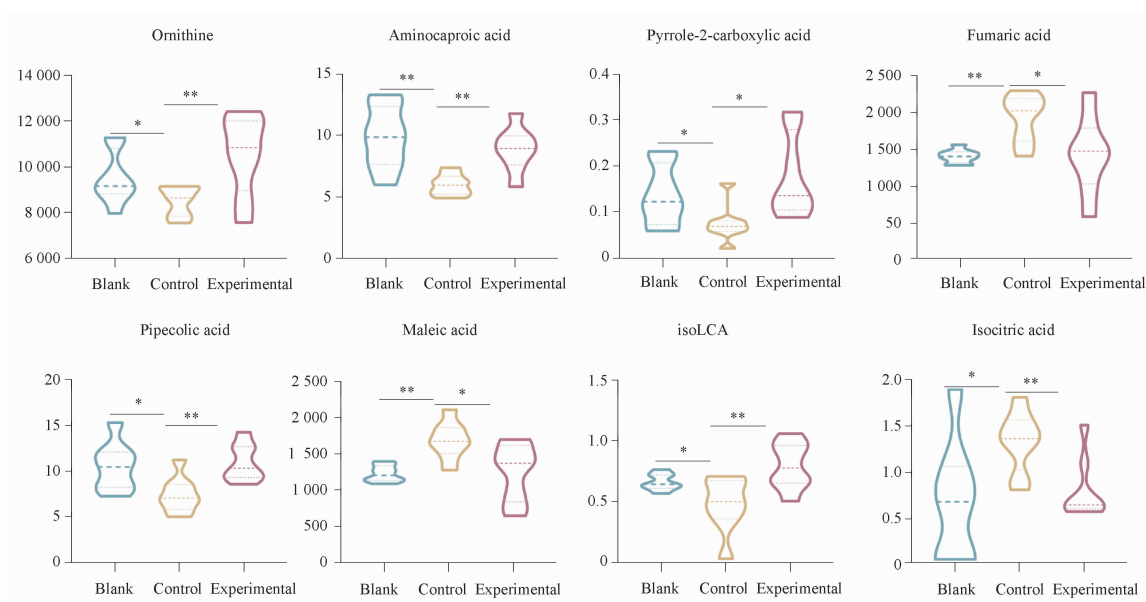


图 2 栀子对京尼平诱导的小鼠肝损伤的差异代谢物浓度变化图

Figure 2 Differential metabolite concentration changes of *Gardenia jasminoides* Ellis in mice with genipin - induced liver injury Compared with blank and control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4 栀子“自解毒”效应的网络药理学分析

在 TCSP 数据库和 SwissTargetPrediction 数据库中 获得 488 个 栀子 相关的 靶点。在 GeneCards 和 DisGeNET 数据库中共 获得 2 107 个 肝损伤的 靶点。在 TCMP、PharmMappe 和 SuperPred 数据库中 获得 342 个 京尼平 相关的 靶点。将 筛选 得到的 栀子 活性成分 靶点、肝损伤 靶点和 京尼平 相关 靶点 导入 到 Venny 2.1.0 软件 后, 获得 80 个 共同 靶点。通过 Cytoscape 插件 cytohubba 分析 网络 拓扑 结构, 在 80 个 靶点 中 进一步 筛选 出 *MAP2K1*、*HSP90AA1*、*MTOR*、*MMP9*、*GSK3B*、*MAPK1*、*STAT1*、*AKT1*、*SRC* 和 *CASP8* 为 排名前 10 的 核心 靶点, 可能 与 栀子 自解毒 效应 密切 相关。

5 栀子存在“自解毒”效应

在 SwissTargetPrediction 数据库中共 获得 105 个 差异 代谢物 的 靶点。将 此 结果 与 网络 药理学 筛选 到的 80 个 靶点 取 交集, 获得 8 个 共有 靶点, 分别是: *AR*、*HSD11B1*、*GPBAR1*、*A2*、*HMGCR*、*PTPN1*、*PLA2G2A* 和 *NOS2*, 这 8 个 靶点 可能 是 与 栀子 影响 相关 代谢 途径 而 发挥 自解毒 效应 相关 的 潜在 靶点。

用 分子 对接 的 方法 论证 特异性 差异 代谢物 与 栀子 自解毒 靶点 的 关系。将 筛选 获得 的 8 种 潜在 差异 代谢物: 延胡索酸、异柠檬酸、马来酸、鸟氨酸、氨基己二酸、异石胆酸、哌啶酸和吡咯-2-羧酸 分别 与 栀子 自解毒 作用 相关 的 潜在 靶点 (*AR*、*HSD11B1*、*GPBAR1*、*CA2*、*HMGCR*、*PTPN1*、*PLA2G2A* 和 *NOS2*) 进行 分子 对接, 来 考察 代谢物 和 靶点 之间 的 结合作用, 进一步 解释 栀子 自解毒 作用 的 分子 机制。结果显示, 栀子 自解毒 靶点 和 相应 差异 代谢物 之间 具有 很高 的 结合 能力, 其中 *GPBAR1* 与 异石胆酸 的 对接 打分 值为 $-6.33 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*HSD11B1* 与 异石胆酸 对接 打分 值为 $-7.55 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*PLA2G2A* 与 异柠檬酸 对接 打分 值为 $-8.47 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*CA2* 与 异柠檬酸 对接 打分 值为 $-8.33 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*PTPN1* 与 异柠檬酸 对接 打分 值为 $-7.80 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*HMGCR* 与 异柠檬酸 对接 打分 值为 $-5.79 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、*AR* 与 哌啶酸 的 对接 分数 对接 打分 值为 $-5.75 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 它们 之间 都 可以 形成 稳定 构象。

讨 论

栀子 是 茜草 科 植物 栀子 的 干燥 成熟 果实, 具有 丰富 多样 的 药理 活性, 为 常用 的 药食 同源 性 中药,

应用 范围 广泛。然而, 近年来 有 研究 报道 栀子 及其 主要 活性 成分 京尼平 存在 肝毒性, 严重 限制 了 栀子 的 应用 及 研发。前期 研究 表明, 临床 等效 剂量 的 栀子 不仅 无 明显 肝毒性, 而且 可 拮抗 其 主要 活性 成分 京尼平 所致 肝毒性, 即 可能 存在 “自解毒” 效应。课题组 前期 研究 发现, 相关 肝药酶 可 介导 京尼平 的 代谢 解毒, 而 栀子 可 通过 调控 相关 肝药酶 促进 京尼平 的 代谢 而 通过 “减量” 而 发挥 “自解毒” 效应, 但 其 是否 可 拮抗 京尼平 毒效 而 通过 “减毒” 缓解 京尼平 肝毒性 及 相关 靶点 仍有 待 研究。因此, 本研究 以 昆明 种 小鼠 为 研究 对象, 通过 靶向 代谢 组学 整合 网络 药理学 研究 栀子 的 自解毒 效应 并 初步 阐述 可能 的 机制。

前期 通过 分别 灌胃 给予 昆明 种 雄性 小鼠 不同 剂量 (25 、 50 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 的 京尼平 14 天和 28 天 以 明确 京尼平 所致 肝毒性 的 “量-时-毒” 关系。依据 前期 研究, 本 论文 选择 灌胃 给予 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 京尼平 诱导 肝毒性 以 考察 栀子 的 “自解毒” 效应。此外, 依据 前期 研究 基础 和 经验 以及 降低 栀子 饮片 批次 差异 的 影响, 栀子 水提物 的 给药 剂量 以 相当 于 其 主要 质控 成分 京尼平 苷 给药 剂量 为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 进行 校准, 结合 此次 栀子 水提物 中 京尼平 苷 含量 约为 $96 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 最终 换算 栀子 水提物 粉末 的 给药 剂量 为 $520 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。实验 显示, 栀子 可 显著 逆转 京尼平 引起 的 小鼠 体重 的 降低、肝系数 的 增加、血清 ALT 水平 的 升高, 并 显著 改善 京尼平 所致 肝细胞 坏死、炎症 细胞 浸润 等 病理 变化, 使其 向 正常 水平 恢复, 说明 栀子 确实 存在 “自解毒” 效应。该 自解毒 效应 的 发现 揭示 了 栀子 作为 传统 中药、以 水煎 液 形式 使用 时 未 发现 明显 肝毒性 的 主要 原因, 为 栀子 的 合理 使用 奠定 了 基础, 为 中药 不同 于 西药, 具有 其 独特 的 科学 合理性 提供 了 依据, 也为 中药 药效 和 毒效 的 研究 提供 了 新 的 思路。

内源性 代谢物 的 变化 是 反应 机体 生理 变化 的 敏感 指标, 并 与 病生理 机制 密切 相关^[10]。为 进一步 验证 栀子 的 自解毒 效应 并 初步 揭示 其 可能 机制, 本研究 进一步 采用 靶向 代谢 组学 方法 分析 正常 小鼠 肝 以及 给予 京尼平和 栀子 后 小鼠 肝组织 中 差异 代谢物 和 代谢 途径 的 变化。结果显示, 栀子 可使 京尼平 所致 肝中 内源性 代谢 产物, 尤其是 8 种 特征 性 代谢物——延胡索酸、异柠檬酸、马来酸、鸟氨酸、氨基己二酸、异石胆酸、哌啶酸 和 吡咯-2-羧酸 的 变化 向 正常 转变, 进一步 说明 栀子 存在 自解毒 效应。在此 基础 上, 通过 分析 发现, 这 8 种 代谢物

的变化与精氨酸生物合成和 TCA 循环代谢途径相关。研究发现,精氨酸生物合成和 TCA 循环分别与机体的炎症和氧化应激密切相关^[11-12],结合已有研究,京尼平可诱导炎症和氧化应激而导致肝损伤,与此同时栀子具有显著的抗炎和抗氧化应激的能力,表明栀子可能通过改善京尼平所致炎症和氧化应激损伤而发挥自解毒效应。

在靶向代谢组学的基础上,进一步联合网络药理学分析发现,AR、HSD11B1、GPBAR1、CA2、HMGCR、PTPN1、PLA2G2A 和 NOS2 靶点可能是与栀子影响相关代谢物后发挥自解毒作用的潜在靶点。通过分子对接技术验证,这些靶点与所获得的 8 种特征性差异代谢物之间的确具有很高的结合力,表明这些靶点与相应差异代谢物之间存在相互作用。其中 HSD11B1、GPBAR1、PTPN1、PLA2G2A 和 NOS2 等靶点都与炎症和氧化应激反应密切相关。

本研究提示:结合靶向代谢组学、网络药理学和分子对接的结果,对栀子自解毒效应的分子机制进行初步阐释,栀子主要通过影响精氨酸生物合成和 TCA 循环代谢途径,改善京尼平所致肝脏内源性代谢物的代谢紊乱,从而作用于相应靶点以改善炎症和氧化应激损伤,最终缓解京尼平导致的肝损伤,发挥自解毒效应。然而,靶向代谢组学和网络药理学的方法探究栀子“自解毒”效应及机制仍存在局限性,其中网络药理学对于毒效靶点及相关通路的筛选高度依赖于已有研究和现有数据库,且为预测性结果,为今后研究提供了一定方向,但相关结论还需实验论证。因此,本论文为栀子自解毒效应分子机制的阐明奠定了基础并提供了方向,相关机制还有待进一步实验论证。

参考文献:

- [1] AHMED R, UL AIN HIRA N, WANG M, *et al.* Genipin, A natural blue colorant precursor: Source, extraction, properties, and applications [J/OL]. *Food Chem*, 2024, 434: 137498. 2023-09-18 [2025-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37741231>.
- [2] 杨新荣, 窦霞, 李国峰, 等. 栀子肝毒性防治的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(13): 4170—4176.
- [3] 卫璐戈, 张海虹, 李会芳. 栀子苷、京尼平、栀子蓝的体内外肝毒性对比研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(2): 311—314.
- [4] 王晓慧, 张帆, 王利军, 等. 京尼平苷和京尼平的肝毒性比较研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(1): 44—47.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 一部 2020 年版 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [6] XIE G, WANG L, CHEN T, *et al.* A metabolite array technology for precision medicine [J]. *Anal Chem*, 2021, 93(14): 5709—5717.
- [7] LIU X Y, WANG X L, QIU M C, *et al.* Exploring the protective effect and mechanism of buddlejae flos on sodium selenite-induced cataract in rats by network pharmacology, molecular docking, and experimental validation [J/OL]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 7776403. 2022-03-14 [2025-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35607520/>.
- [8] YU W J, LI X H, SUN Q F, *et al.* Metabolomics and network pharmacology reveal the mechanism of castanopsis honey against streptococcus pyogenes [J/OL]. *Food Chem*, 2024, 441: 138388. 2024-01-07 [2025-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38219368>.
- [9] WANG T T, LI S, WU Y K, *et al.* Mechanistic investigation of xuebijing for treatment of paraquat-induced pulmonary fibrosis by metabolomics and network pharmacology [J]. *Acs Omega*, 2021, 6(30): 19717—19730.
- [10] ANWARDEEN N R, DIBOUN I, MOKRAB Y, *et al.* Statistical methods and resources for biomarker discovery using metabolomics [J]. *BMC Bioinformatics*, 2023, 24(1): 250.
- [11] LI L, CUI H, ZHANG Y, *et al.* Baicalin ameliorates multidrug-resistant pseudomonas aeruginosa induced pulmonary inflammation in rat via arginine biosynthesis [J/OL]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 162: 114660. 2023-04-12 [2025-05-18]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37058819>.
- [12] CHOI I, SON H, BAEK J H. Tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediates: Regulators of immune responses [J]. *Life (Basel)*, 2021, 11(1): 69.

(收稿日期 2025-07-15)