博士导师新论

DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.07.001

基于网络药理学和动物实验验证大枣减附子神经毒性作用机制研究

陈丽华,王萍,谢淑鸿,吴璐
(江西中医药大学,江西 南昌 330004)

摘要:目的 基于网络药理学和动物实验研究大枣减附子神经毒性作用机制。方法 借助文献检索,通过中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)、中药分子机理的生物信息学分析工具(Bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine,BATMAN)和本草组鉴(HERB)数据库检索筛选出附子毒性成分和大枣活性成分;用 Swiss Target Prediction、PharmMapper 数据库预测毒性成分靶点,得到相应成分的靶点库;检索"nerve toxicity"和"toxic encephalopathy",建立疾病靶点库。然后取成分靶点与疾病靶点的交集,再对两交集靶点进行蛋白质-蛋白质相互作用(Protein-protein interaction,PPI)和京都基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析,实现附子神经毒性网络毒理学分析和大枣减附子神经毒性网络药理学分析,对比所涉及的大枣减毒信号通路与附子神经毒性信号通路,对大枣减毒的潜在作用机制进行预测。以 SD 大鼠为研究对象,研究附子与大枣配伍前后对大鼠脑组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(Malondialdehyde,MDA)的影响,以及对磷脂酰肌醇 3 激酶(Phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)、蛋白激酶 B(Protein kinase B,AKT)和缺氧诱导因子 1α(Hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)mRNA 表达水平的影响。结果 网络药理学整理获得附子潜在毒性成分 21 个,潜在毒性成分作用靶点 1169 个,其中神经毒性靶点 570 个;大枣活性成分 29 个,收集对应靶点 680 个,三者取交集得到大枣减附子神经毒性潜在作用靶点 76 个。PPI 网络分析显示,大枣减毒的核心成分为槲皮素、皂苷、生物碱类化合物,KEGG 通路分析富集到 171 条通路,主要涉及 PI3K-AKT 和 HIF-1α 等信号通路。动物实验结果显示,附子可导致大鼠脑组织氧化-抗氧化失调,诱发氧化应激,大枣配伍可抑制附子对脑组织的氧化损伤。实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction,q RT-PCR)实验结果显示,与正常组比较,附子使大鼠脑组织中 PI3K、AKT、HIF-1α mRNA 水平显著升高,与大枣配伍可使 PI3K、AKT、HIF-1α mRNA 的表达水平显著下降。结论 大枣减轻附子神经毒性作用与调控 PI3K/AKT/HIF-1 信号通路,减轻附子对大鼠脑组织造成的氧化应激损伤有关。研究结果为有毒中药的网络药理学研究提供了新的研究视角,为中药配伍减毒作用机制研究提供了新思路。

关键词:附子;大枣;神经毒性;网络药理学;实验验证
中图分类号:R285.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)07-0001-10

Investigating Mechanism of Dazao(Ziziphi Jujubae Fructus) in Attenuating Fuzi(Aconiti Lateralis Radix)-Induced Neurotoxicity:A Combined Approach of Network Pharmacology and Animal Experiments

CHEN Lihua,WANG Ping,XIE Shuhong,WU Lu
(Jiangxi University of Chinese Medicine,Nanchang 330004,Jiangxi,China)

Abstract:*Objective* To investigate the mechanism of Dazao(Ziziphi Jujubae Fructus) in reducing Fuzi(Aconiti Lateralis Radix)-induced neurotoxicity based on network pharmacology and animal experiments. *Methods* The toxic components of Fuzi(Aconiti Lateralis Radix) and active constituents of Dazao(Ziziphi Jujubae Fructus) were screened through literature retrieval

基金项目:国家自然科学基金项目(82160752);江西省中医药管理局科技计划项目(2020A0372);江西省"大学生创新创业训练计划"项目(S202410412061)

作者简介:陈丽华(1972-),女,江西崇仁人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中药新剂型与新技术。
通讯作者:吴璐(1981-),女,湖南长沙人,副教授,硕士,研究方向:中药新剂型、中药传统理论。E-mail:wulu456@126.com。

and database searches. Potential targets of toxic components were predicted using Swiss Target Prediction and PharmMapper databases, followed by construction of a comprehensive target library. A disease target library was established by retrieving "nerve toxicity" and "toxic encephalopathy" - related genes from biomedical databases. The intersection targets between component - related and disease - related targets were subsequently subjected to protein - protein interaction (PPI) network analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment. Comparative analysis of the identified detoxification pathways [from Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus)] and neurotoxicity pathways [from Fuzi (Aconiti Lateralis Radix)] was performed to predict the underlying detoxification mechanisms. Using SD rats as the animal model, a quantitative real - time polymerase chain reaction (qRT - PCR) was employed to investigate the effects of Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) and Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) combination therapy on mRNA expression levels of phosphatidylinositol 3 - kinase (PI3K), protein kinase B (AKT) and hypoxia inducible factor - 1α (HIF - 1α) in the brain tissues of the rats. *Results* Through network pharmacology analysis, it identified 21 potential toxic components and 1169 potential toxic targets in Fuzi (Aconiti Lateralis Radix), including 570 neurotoxic targets. There were 29 active components in Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) with 680 corresponding targets. Venn analysis identified 76 overlapping targets as the potential detoxification targets through which Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) counteracted Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) - induced neurotoxicity. PPI network pharmacology identified quercetin, saponins and specific alkaloids as the primary mediators of Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) detoxification effects against Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) neurotoxicity. The KEGG pathway analysis identified enrichment in 171 pathways, primarily involving signaling pathways such as the PI3K - AKT signaling pathway and HIF - 1 signaling pathway. In vivo studies revealed that Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) disrupted redox homeostasis in the rat brain, promoting oxidative stress, whereas co - administration with Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) effectively counteracted these pro - oxidative effects, q RT - PCR experiment results demonstrated that, compared with those of the control group, the mRNA levels of PI3K, AKT and HIF - 1α in the cerebral cortex and hippocampal tissues of the rats in the Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) group were significantly increased. Compared with those in the Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) group, the mRNA expression levels of PI3K, AKT and HIF - 1α in the cerebral cortex and hippocampus of rats in the Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) - Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) combination group were significantly decreased. *Conclusion* The neuroprotective effect of Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus) against Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) - induced neurotoxicity is mediated through modulation of the PI3K/AKT/HIF - 1 signaling pathway, thereby alleviating Fuzi (Aconiti Lateralis Radix) - triggered oxidative stress damage in rat brain tissues. These findings provide a novel perspective for network pharmacology research on toxic traditional Chinese herbs and offer new insights into the mechanism of toxicity reduction through herbal compatibility.

Keywords: Fuzi (Aconiti Lateralis Radix); Dazao (Ziziphi Jujubae Fructus); neurotoxicity; network pharmacology; experiment validation

附子有大毒，现代药理学研究表明，生附子对大鼠海马神经元有明显抑制作用[1]，其不同组分提取物均可造成一定的神经损伤[2-3]，所含双酯型生物碱也具有明显的神经毒性[4-5]。虽然乌头类中药的毒性已经被传统医学和现代研究广泛证实，但国内外因其使用不当中毒的事故仍常有发生[6-7]，目前我国一些地区还存在使用乌头类中药烹制药膳的习俗，煎煮、食用不当或误食常引起当地居民中毒。乌头类中药中毒多表现为心脏、神经毒性，甚至因神经中枢抑制导致死亡[8]。

对于附子（乌头类中药）中毒，古代文献流传下了很多配伍解毒方法，配伍药物包括大豆、远志、防风、大枣、饴糖等。如《神农本草经集注·解毒》补充提出"乌头、天雄、附子毒，用大豆汁、远志、防风、枣肌、并解之"；《本草经集注》言大枣"煞乌头毒"；《药对》谓大枣"杀乌头、天雄毒"等，可见古代早有用大枣配伍减乌头类中药毒性的用法。

大枣味甘，甘味中药具有补益、解毒、和百药的作用。大枣含生物碱类、黄酮类、三萜类、皂苷类、有机酸类、香豆素类、甾体类、核苷酸衍生物等活性成分，还含有糖苷类、氨基酸类、维生素、微量元素等营养物质，具有增强免疫力、抗肿瘤、抗氧化等广泛的药理活性[9]。有研究报道大枣能保护神经细胞免受神经毒素影响，具有刺激神经元分化、抗惊厥和认知障碍等神经保护作用[10-11]。

近年来，网络药理学因其与中医整体思维的一致性，在中药作用机制研究方面得到了广泛应用。对于有毒中药，除了"效"，还有"毒"，中药的毒性作用与活性作用一样具有"多组分、多靶点、多途径"的特征。目前，应用网络药理学研究有毒中药主要集中在毒性机制解析和功效 - 毒性平衡关系研究等方面[12-15]，在研究配伍减毒方面，网络药理学方法应用较少，且缺少具体的标准。

本研究先通过网络药理学方法对附子神经毒性机制进行分析，进一步探讨大枣减轻神经毒性作用的潜在有效成分和作用靶点及通路，然后采用整体动物实验进一步验证大枣减轻附子神经毒性的作用机制，为中药配伍减毒作用机制研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠，体质量（200 ± 20）g，由江西中医药大学实验动物科技中心提供，实验动物许可证号 SYXK（赣）2022 -

0002。动物实验方案已获得江西中医药大学实验动物管理伦理委员会批准。

1.2 药材与试剂

大枣药材(江西江中中药饮片有限公司,批号:201223);生附子药材(四川江油市中坝镇)。丙二醛(Malondialdehyde,MDA)试剂盒(南京建成科技有限公司,批号:A300-1-1);超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)试剂盒(南京建成科技有限公司,批号:A001-3-2);总RNA提取试剂盒(北京聚合美生物公司,批号:MF036-01);cDNA反转录试剂盒(北京聚合美生物公司,批号:MF949-01);实时荧光定量聚合酶链式反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction,q RT-PCR)试剂盒(北京聚合美生物公司,批号:MF013-01)。色谱纯乙腈、甲醇(美国Tedia公司),其他试剂均为分析纯,购于国药集团化学试剂有限公司,水为超纯水。

1.3 仪器

SCIENTZ-12冷冻干燥机(宁波新芝生物科技股份有限公司);N-1300旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司);BS124S电子天平(德国Sartorius公司);MK3酶标仪(美国Thermo公司);3-18K高速冷冻离心机(德国SIGMA公司);ABI7300梯度PCR仪(美国Applied Biosystems公司)。

2 方法

2.1 附子神经毒性的网络毒理学分析

2.1.1 附子毒性成分及其靶点的获取 以附子的标准中药名称"附子"或"FUZI"为检索词,利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)、中药分子机理的生物信息学分析工具(Bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine,BATMAN)和本草组鉴(HERB)数据库检索附子成分,再根据文献补充纳入因数据库时效性而遗漏的成分,搜集的所有成分导入公共比较毒理基因组学数据库(Comparative toxicogenomics database,CTD),筛选出潜在毒性成分。通过PubChem数据库获取毒性成分的Canonical SMILES格式,导入Swiss Target Prediction预测潜在毒性成分的作用靶点。未获取到SMILES号的成分,下载药物成分mol2或sdf结构,上传至PharmMapper查找靶点。将收集的靶点蛋白名称输入UniProt数据库,对蛋白质全称和编号进行转换得到标准化命名。最后Excel文件对相应的基因名称合并去重,建立附子潜在毒性成分作用靶点库。

2.1.2 附子毒性成分与神经毒性交集靶点的筛选 设置检索词"nerve toxicity"和"toxic encephalopathy",在GeneCards数据库进行检索,通过Excel格式导出,按照Relevance score≥10筛选出疾病相关靶点,组成神经毒性作用靶点库。并用韦恩图取附子靶点和神经毒性靶点的交集。

2.1.3 信号通路富集分析 附子神经毒性作用交集靶点degree值取中位数,大于中位数的靶点导入DAVID在线数据库,选择"Homo sapiens"物种,获取交集靶点,并进行京都基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路分析,根据P值大小进行排序,选取有统计学意义的条目,得到附子与神经毒性相关的信号通路。

2.2 大枣减附子神经毒性的网络药理学分析

2.2.1 大枣活性成分及其靶点的获取 TCMSP数据库查找大枣活性成分,以"口服生物利用度(Oral bioavailability,OB)"≥30%和"类药性(Drug-like,DL)"≥0.18为条件进行筛选。下载数据库中符合条件成分的靶点,并利用Swiss Target Prediction数据库和PharmMapper数据库同步收集靶点,Uniprot数据库校正命名不规范或错误的潜在靶点,所有成分靶点汇总去重,整理得到大枣化学成分作用靶点数据库。

2.2.2 大枣-附子神经毒性靶点的PPI网络构建 将大枣活性成分靶点与附子神经毒性相关靶点取交集,得到潜在大枣-附子神经毒性靶点,查看"Analysis"对网络图的描述,通过Cytoscape软件构建PPI网络。

2.2.3 信号通路富集分析 将大枣-附子神经毒性交集靶点导入DAVID平台列表中,筛选排名靠前的通路进行分析,使用微生信网站绘制KEGG气泡图,进行功能富集显著性可视化及注释分析,结合PPI筛选得到的关键靶点,阐释大枣减附子神经毒性的潜在作用机制。

2.2.4 成分-靶点-通路网络构建 构建大枣成分-靶点、靶点-通路数据集,导入Cytoscape 3.9.0软件,对附子毒性成分、附子神经毒性靶点、大枣潜在化学成分进行整合分析,构建大枣附子配伍减毒的调控网络。利用CytoCNA插件,选择degree、betweenness、closeness进行网络拓扑分析,点击"Layout"选项进行可视化处理。

2.3 实验验证

2.3.1 大枣提取物制备 大枣去核,取枣肉切块后置于60 ℃烘箱中烘干,干燥后取出,用10倍量水回流提取3次,合并提取液减压浓缩。浓缩到浓度为1 g/mL(按生药量计算),在4 ℃下储存备用。

2.3.2 附子提取物的制备 取附子生药材,用粉碎机打碎至长度为0.5~1 cm大小放入圆底烧瓶,加10倍量95%的乙醇进行回流提取,共提取3次,每次2 h,合并3次滤液,低温减压浓缩至附子提取物的浓度为8.4 g/mL(按生药量计算),提取液在4 ℃下储存备用。

2.3.3 动物实验 雄性SD大鼠24只,随机分成3组:正常组、附子组和配伍组,每组8只大鼠。正常组大鼠灌胃生理盐水,附子组大鼠按4 g/kg附子生药的剂量灌胃给予附子提取物,配伍组大鼠按4 g/kg附子生药:4 g/kg大枣生药剂量灌胃给予附子和大枣提取物,1次/d,连续15 d。大鼠末次给药后12 h后进行麻醉,解剖大鼠脑组织完整分离皮层、海马,用生理盐水冲洗干净后放入标记好的EP管中,迅速保存于-80 ℃超低温冰箱。

2.3.4 大鼠脑组织中氧化应激相关指标检测 取保存好的海马、皮层组织,按照组织重量(g):体积(mL)=1:9加预冷的生理盐水进行组织匀浆,制成10%的匀浆液,冷冻离心,收集上清液分装保存于-20 ℃冰箱用于后续指标检测。二辛可宁酸(Bicinchoninic acid,BCA)法测定总蛋白含量,采用MDA和SOD试剂盒测定活性。所有操作严格按试剂盒说明书进行。

2.3.5 qRT-PCR测定PI3K、AKT和HIF-1α mRNA表达 取大鼠海马和皮层组织适量,按照说明书方法提取总RNA并

合成 cDNA，进行 PCR 扩增。引物序列见表 1。以甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶（Glyceraldehyde -3- phosphate dehydrogenase，GAPDH）为参比基因，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表 1 引物序列

引物	序列（5'-3'）
PI3K	F：AATCATAGCCACAGATCCACT
	R：CTGTCCCCACTTTACTGAGC
AKT	F：CCACAGGTCGCTACTATGCC
	R：ACAGCCCGAAGTCCGTTATC
HIF-1α	F：ACCTTCATCGGAAACTCCAAAG
	R：ACTGTTAGGCTCAGGTGAACT
GAPDH	F：TGTGTCCGTCGTGGATCTGA
	R：TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据统计，组间均数比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组间均数的两两比较采用最小显著差数（LSD）法，方差不齐时用 Tamhane 检验，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 附子神经毒性的网络毒理学分析

3.1.1 附子主要毒性成分收集和筛选 通过 TPMSP、BATMAN、HERB 平台搜索及文献补充检索一共得到 176 个附子活性成分，将所有成分输入 CTD 数据库进行化合物检索，查找相应的毒理学作用。汇总到已有大量文献说明的附子毒性成分或潜在毒性成分共 22 个，见表 2。

表 2 中药附子中的主要毒性成分信息

分子 ID（或 CAS）	分子名	OB/（%）	DL
MOL001040	Aconitine	56.06	0.83
MOL002644	Beiwutine	44.09	0.77
MOL001039	Benzoylaconine	48.48	0.42
MOL000359	Benzoylmesaconine	52.47	0.44
MOL002648	Crassicauline A	64.89	0.81
MOL002652	Deoxyaconitine	58.36	0.85
73870-35-6	Foresaconitine	-	-
MOL005576	Honokiol	40.12	0.24
MOL002651	Hypaconitine	50.18	0.81
MOL002649	Isodelphinine	46.23	0.78
MOL000555	Juglone	37.15	0.07
MOL000675	Linoleic acid	41.90	0.14
-	8-Lipohypaconitine	-	-
MOL001	Magnolol	61.38	0.19
MOL001344	Mesaconitine	44.21	0.83
126266-35-1	Neojiangyouaconitine	-	-
545-57-3	Oxonitine	-	-
MOL000432	Palmitic acid	19.30	0.42
MOL001973	Uracil	61.84	0.20
70578-24-4	Yunaconitine	-	-
MOL013350	14-Deoxy-11,12-Didehydroandrographolide	47.15	0.23

3.1.2 附子潜在神经毒性靶点预测 经 GeneGard 平台收集的神经毒性靶点 570 个，将附子的靶点与神经毒性靶点整理后，利用韦恩图取交集，发现与附子神经毒性相关的靶点共有 154 个，结果见插页Ⅰ图 1。

3.1.3 附子-神经毒性网络分析 附子成分-神经毒性网络图拓扑分析显示，Palmitic acid（棕榈酸，degree=57）、Aconitine（乌头碱，degree=38）、Honokiol（和厚朴酚，degree=38）、Uracil（尿嘧啶，degree=37）、Benzoylaconine（苯甲酰乌头原碱，degree=33）、Foresaconitine（前乌头碱，degree=27）、Linoleic acid（亚油酸，degree=26）、Hypaconitine（次乌头碱，degree=25）、Mesaconitine（新乌头碱，degree=24）、Yunaconitine（云乌头碱，degree=24）、Neojiangyouaconitine（新江油乌头碱，degree=23）、Oxonitine（氧乌头碱，degree=21）、Deoxyaconitine（去氧乌头碱，degree=21）是附子产生神经毒性的主要成分，结果见插页Ⅰ图 2。

3.1.4 附子神经毒性潜在靶点信号通路富集分析 DAVID 数据库对 154 个附子神经毒性靶点进行通路富集分析，根据 P 值大小选取排序前 10 条的 KEGG 通路展示，结果见表 3。

表 3 附子神经毒性靶点富集相关通路

通路英文名	通路中文名	P 值	数量
Pathways in cancer	癌症信号通路	1.23276E-29	42
Proteoglycans in cancer	癌症中的蛋白多糖	1.47584E-19	24
Breast cancer	乳腺癌信号通路	1.03975E-18	21
Prostate cancer	前列腺癌信号通路	6.61404E-18	18
Chagas disease	恰加斯病信号通路	1.62025E-17	18
MAPK signaling pathway	MAPK 信号通路	3.66155E-17	25
PI3K-AKT signaling pathway	PI3K-AKT 信号通路	2.18226E-16	26
Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection	卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染	2.71647E-16	21
HIF-1 signaling pathway	HIF-1 信号通路	1.30507E-15	17
Human T-cell leukemia virus	癌症中枢碳代谢	4.00983E-15	21

3.2 大枣减附子神经毒性的网络药理学分析

3.2.1 大枣-附子神经毒性潜在靶点筛选及 PPI 网络分析 TSMSP 数据库筛选得到符合条件的大枣成分共 28 个，见表 4。共收集大枣活性成分靶点 680 个，与附子神经毒性靶点数据库相互映射，得到交集靶点 76 个。String 蛋白质相互作用数据库对 76 个交集靶点进行 PPI 网络构建，导入 Cytoscape 软件进行可视化处理，结果如插页Ⅱ图 3 所示，PPI 网络图共有 76 个节点，1299 条边，使用插件进行 degree 值分析，显示蛋白激酶 B（Protein kinase B，AKT）、促分裂原活化蛋白激酶 3（Mitogen-activated protein kinase 3，MAPK3）、肿瘤蛋白 p53（Tumor protein p53，TP53）、表皮生长因子受体（Epidermal growth factor receptor，EGFR）、胰岛素（Insulin，INS）、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（Mechanistic target of rapamycin kinase，mTOR）、血管内皮生长因子 A（Vascular endothelial growth factor A，VEGFA）等的聚集程度明显高于其他靶点，表明这几个基因可能是大枣发挥减毒作用的重要靶点。

3.2.2 交集靶点富集通路分析 DAVID 数据库对 76 个交集靶点进行通路富集分析，KEGG 富集分析得到通路 172 条，排名靠前的通路如插页Ⅱ图 4，其中在癌症、MAPK、PI3K-AKT、HIF-1 等信号通路中富集基因数量较大。

3.2.3 大枣成分-附子神经毒性靶点-通路网络图分析 Cytoscape 对数据处理后可视化如插页Ⅲ图 5，使用插件分析处

理得到大枣作用于附子神经毒性的关键性成分：Quercetin（槲皮素）、Mauritine D（滇刺枣碱 D）、Berberine（小檗碱）、Protoporphyrin（原卟啉）、beta－Sitosterol（β－谷甾醇）、Moupinamide（阿魏酰酪胺）、Coumestrol（迈斯托醇）、Fumarine（原阿片碱）、beta－Carotene（β－胡萝卜素）、Stepharine（光千金藤碱）、Stepholidine（左旋千金藤啶碱）、Nuciferin（荷叶碱）、Jujuboside C_qt（酸枣仁皂苷 C）等；附子发挥减毒作用的关键靶点为 AKT1（degree＝66）、MAPK3（degree＝66）、TP53（degree＝60）等 13 个靶点。

表 4 大枣 28 个相关成分信息

分子 ID	分子名	OB/（%）	DL
MOL012921	Stepharine	31.55	0.33
MOL012940	Spiradine A	113.52	0.61
MOL012946	Zizyphus saponin I_qt	32.69	0.62
MOL012961	Jujuboside A_qt	36.67	0.62
MOL012976	Coumestrol	32.49	0.34
MOL012980	Daechuine S6	46.48	0.79
MOL012981	Daechuine S7	44.82	0.83
MOL012986	Jujubasaponin V_qt	36.99	0.63
MOL012989	Jujuboside C_qt	40.26	0.62
MOL012992	Mauritine D	89.13	0.45
MOL001454	Berberine	36.86	0.78
MOL001522	（S）－Coclaurine	42.35	0.24
MOL000211	Mairin	55.38	0.78
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
MOL003410	Ziziphin_qt	66.95	0.62
MOL000358	Beta－sitosterol	36.91	0.75
MOL004350	Ruvoside_qt	36.12	0.76
MOL000492	（＋）－Catechin	54.83	0.24
MOL005360	Malkangunin	57.71	0.63
MOL000627	Stepholidine	33.11	0.54
MOL007213	Nuciferin	34.43	0.40
MOL000783	Protoporphyrin	30.86	0.56
MOL000787	Fumarine	59.26	0.83
MOL008034	21302－79－4	73.52	0.77
MOL008647	Moupinamide	86.71	0.26
MOL002773	Beta－carotene	37.18	0.58
MOL000096	（－）－Catechin	49.68	0.24
MOL000098	Quercetin	46.43	0.28

根据 P 值排序的 KEGG 信号通路分析结果见表 5，由表 5 可知，癌症信号通路、MAPK 信号通路、PI3K－AKT 信号通路、HIF－1 信号通路、癌症中的蛋白多糖、前列腺癌信号通路、mTOR 信号通路等相关通路与本研究关系密切，是出现比例较高的信号通路，可能是发挥作用的主要通路。

3.3 附子与大枣配伍对大鼠脑组织中 MDA 和 SOD 的影响

给药后大鼠海马和皮层中 MDA 含量和 SOD 活性测定结果见表 6。与正常组比较，附子组大鼠海马和皮层中 MDA 含量升高、SOD 活性降低，差异具有统计学意义（$P<0.05$）；与附子组相比，配伍组大鼠海马和皮层脑组织中的 MDA 含量降低、SOD 活性升高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。结果可见附子可导致大鼠脑组织氧化－抗氧化失调，诱发氧化应激；与大枣配伍能逆转附子对大鼠脑组织的氧化应激损伤。

表 5 大枣减附子神经毒性 KEGG 信号通路

通路英文名	通路中文名	P 值	数量
Pathways in cancer	癌症信号通路	4.59E－44	52
EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance	EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性	2.11E－43	31
MAPK signaling pathway	MAPK 信号通路	4.73E－39	41
PI3K－AKT signaling pathway	PI3K－AKT 信号通路	1.05E－38	43
HIF－1 signaling pathway	HIF－1 信号通路	1.97E－38	31
Proteoglycans in cancer	癌症中的蛋白多糖	1.60E－32	33
Prostate cancer	前列腺癌信号通路	5.20E－31	26
mTOR signaling pathway	mTOR 信号通路	4.92E－30	29
Breast cancer	乳腺癌信号通路	3.29E－29	28
Endocrine resistance	内分泌抵抗通路	3.78E－29	25

表 6 大鼠海马和皮层中 MDA 含量和 SOD 活性测定结果（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	海马		皮层	
	MDA/（nmol/mL）	SOD/（U/mgprot）	MDA/（nmol/mL）	SOD/（U/mgprot）
正常组	2.658±0.554	34.186±7.348	3.303±0.364	23.820±5.142
附子组	8.507±0.273*	23.399±3.963*	9.235±0.432*	19.176±7.478*
配伍组	4.304±1.114△	32.374±6.730△	7.708±0.587△	22.524±2.113△

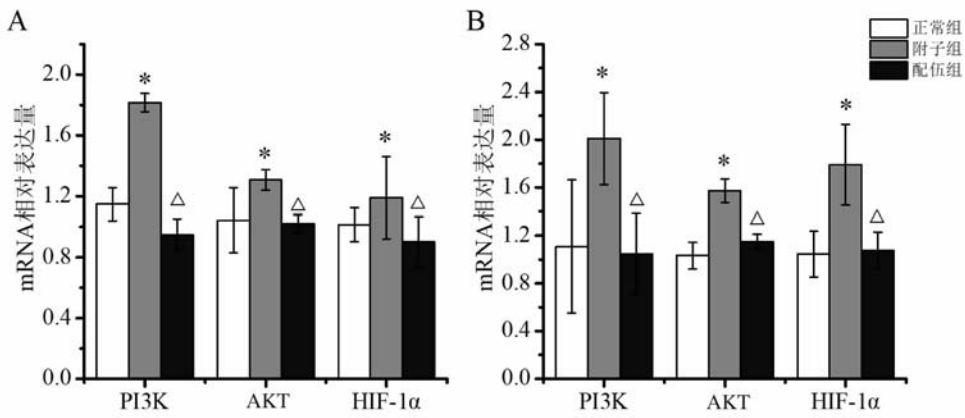
注：*与正常组比较，$P<0.05$；△与附子组比较，$P<0.05$。

3.4 附子与大枣配伍对大鼠脑组织 PI3K、AKT 和 HIF－1α mRNA 表达的影响

根据网络药理学分析，大枣减附子神经毒性的关键靶点为 AKT1、MAPK3、TP53、EGFR、mTOR、VEGFA、HIF－1α 和磷脂酰肌醇－3－激酶催化亚单位 α（Phosphatidylinositol－3－kinase，catalytic subunit alpha，PIK3CA）等；主要作用的信号通路为 PI3K－AKT 和 HIF－1 信号通路等。因此，本实验重点研究附子与大枣配伍对大鼠脑组织海马和皮层中 PI3K、AKT 和HIF－1α mRNA 表达的影响，结果见图 6。由图 6 可知，与正常组相比，附子组海马和皮层组织中 PI3K、AKT 和 HIF－1α mRNA 的表达均显著上升（$P<0.05$）；与附子组比较，附子与大枣配伍组大鼠海马和皮层组织中 PI3K、AKT 和 HIF－1α mRNA 的表达均显著下降（$P<0.05$）。

4 讨论

根据附子神经毒性的网络药理学分析，乌头碱、次乌头碱、新乌头碱等 13 个成分是与附子神经毒性相关的关键化合物。生附子中毒性最大且含量最高的一类生物碱是双酯型 C19 二萜生物碱，具有致神经毒性、损伤心血管、损伤肝肾功能等毒理作用[16－17]。尤其是乌头碱等 3 种双酯型生物碱，已被广泛研究证实是乌头类药材的主要毒性物质。此外，棕榈酸是血脂的重要组成成分，属于长链饱和脂肪酸。研究表明，棕榈酸通过增加神经细胞的氧化应激诱导细胞凋亡，产生神经毒性[18]。和厚朴酚在高剂量或长期使用时能影响神经元功能，细胞实验显示，和厚朴酚在大于 50 μmol/L 的浓度下能诱导神经元凋亡或抑制突触可塑性[19]。高剂量和厚朴酚可通过过度激活 γ－氨基丁酸（GABA）受体引发中枢神经抑制，甚至导致镇静过度、呼吸抑制等风险[20]。有研究表明，亚油酸易发生脂质过氧化，生成4－羟基壬烯醛和丙二醛等神经毒性物质，损害神经



注：* 与正常组比较，$P<0.05$；△与附子组比较，$P<0.05$。

图6 附子－大枣配伍对大鼠海马（A）和皮层（B）组织中 PI3K、AKT 和 HIF－1α mRNA 表达的影响

元膜结构和功能[21]；亚油酸过量还可促进促炎性前列腺素和白三烯的合成，加剧神经炎症[22]。

根据大枣减附子神经毒性的网络药理学分析，发现大枣中的黄酮类、皂苷类和生物碱类成分是发挥作用的主要成分；AKT1、MAPK3、TP53、EGFR、mTOR、VEGFA、HIF－1α、PIK3CA 等靶点是作用的关键靶点，除去癌症信号通路等常规通路外，MAPK 信号通路、PI3K－AKT 信号通路和 HIF－1 信号通路是作用的关键通路。现有研究证实，大枣所含多糖、黄酮、皂苷和生物碱类成分具有一定的神经保护作用[23]，如天然黄酮类化合物槲皮素通过发挥抗炎症、抗氧化应激、降血糖和抑制细胞凋亡等众多生物学效应功能，介导 MAPK、PI3K、AKT、糖原合成酶激酶－3β（Glycogen synthase kinase－3β，GSK－3β）等信号通路，治疗阿尔茨海默病、脑卒中等疾病，改善认知障碍，减轻神经损伤[24]。β－谷甾醇能参与氧化应激、炎症反应和凋亡途径，促进胚胎神经干细胞增殖及分化，可用于治疗神经退行性疾病等疾病[25－27]。异喹啉类生物碱成分小檗碱（黄连素）对大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞（PC12）表现出中等的神经营养活性，通过 Caspase 信号通路减弱 β 淀粉样蛋白（Aβ25－35）对原代海马神经元的毒性[28]。大枣多糖可减轻 Aβ 诱导的神经元损伤，改善学习记忆能力，还能通过清除自由基和增强 SOD、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH－Px）活性减轻氧化损伤，保护脑神经[29－30]。

PI3K－AKT 信号通路参与代谢、增殖、生长以及血管生成等过程，调控多种神经系统疾病的发生发展[31－32]。这条通路通过激活 mTOR 间接调控 HIF－1α 的活性及表达，HIF－1α 又调控许多下游基因如 VEGF。VEGF 为调节血管生成的生长因子，在生成血管、低氧适应中发挥关键作用。研究发现，降低海马组织中 PI3K、AKT 的蛋白表达，能缓解神经炎症，实现神经保护[33]。

氧化应激是神经系统疾病的共同病因之一，大脑对低氧十分敏感。已有文献证明[34]，持续激活的 PI3K－AKT 信号会抑制细胞自噬，导致受损蛋白质和细胞器（如线粒体）堆积，引起 SOD 活性下降和 MDA 含量升高[35]。HIF－1 的慢性激活也具有同样效应，有研究证明[36]，慢性 HIF－1 激活能导致 NADPH 氧化酶（NOX4）上调，活性氧爆发后消耗 SOD 并增加 MDA 的合成。ZHEN J L 等[37]发现 HIF－1α 持续激活后，大鼠海马区的 SOD 活性下降了 35%，而 MDA 含量升高了 1.8 倍。以上研究均说明了 PI3K－AKT 和 HIF－1 信号通路过度激活能加剧氧化应激与神经元的死亡。

本论文研究结果表明附子的神经毒性与能造成脑组织氧化应激损伤有关，大枣配伍给药后能通过回调脑组织中 PI3K－AKT 和 HIF－1 信号通路，降低附子对脑组织的氧化应激损伤，发挥配伍减毒的作用。研究结果为有毒中药的网络药理学研究提供了新的研究视角，为中药配伍减毒作用机制研究提供了新思路。

参考文献

[1] LI L Y, ZHANG L M, LIAO T T, et al. Advances on pharmacology and toxicology of aconitine[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2022, 36(4): 601－611.

[2] 王懿，孙蓉. 附子不同组分单次给药对小鼠神经毒性的“时－毒”关系研究[J]. 中国药物警戒，2014，11(6)：321－324.

[3] 李晓骄阳，栾永福，孙蓉. 附子不同组分对正常小鼠的急性毒性实验比较研究[J]. 中国药物警戒，2013，10(10)：583－587.

[4] 潘校琦，彭成. 附子神经毒性研究进展[J]. 世界中医药，2017，12(11)：2551－2554，2562.

[5] 钱真真，刘辉，杨巧宁，等. 附子不良反应的文献计量学分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志，2021，19(20)：3475－3480.

[6] SINGHUBER J, ZHU M, PRINZ S, et al. Aconitum in traditional Chinese medicine: a valuable drug or an unpredictable risk? [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 126(1): 18－30.

[7] BONANNO G, IPPOLITO M, MOSCARELLI A, et al. Accidental poisoning with Aconitum: Case report and review of the literature [J]. Clin Case Rep, 2020, 8(4): 696－698.

[8] 王丹，贾德贤，李真真，等. 草乌的安全性评价与风险控制措施的探讨[J]. 中国中药杂志，2018，43(15)：3093－3100.

[9] 陈熹，李玉洁，杨庆，等. 大枣现代研究开发进展与展望[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2015，17(3)：687－691.

[10] CHEN J P, YAN A L, LAM K Y C, et al. A chemically standardized extract of *Ziziphus jujuba* fruit (jujube) stimulates expressions

of neurotrophic factors and anti-oxidant enzymes in cultured astrocytes[J]. Phytother Res, 2014, 28(11): 1727-1730.

[11] WOJDYŁO A, FIGIEL A, LEGUA P, et al. Chemical composition, antioxidant capacity, and sensory quality of dried jujube fruits as affected by cultivar and drying method[J]. Food Chem, 2016, 207: 170-179.

[12] YANG M Q, CHEN C, MAO Y F, et al. Application of network pharmacology and molecular docking approach to explore active compounds and potential pharmacological mechanisms of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Lepidii Semen Descurainiae Semen for treatment of heart failure [J]. Medicine, 2022, 101(33): e30102.

[13] XIANG G L, GUO S, QIN J, et al. Comprehensive insight into the pharmacology, pharmacokinetics, toxicity, detoxification and extraction of hypaconitine from Aconitum plants[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 321: 117505.

[14] SONG J, HE G N, DAI L. A comprehensive review on celastrol, triptolide and triptonide: Insights on their pharmacological activity, toxicity, combination therapy, new dosage form and novel drug delivery routes[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 162: 114705.

[15] SHIN H K, PARK S M, CHOI M S, et al. Enhancing toxicity prediction for natural products in herbal medicine and dietary supplements: Integrating (Q)STR models and *in vitro* assays[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2025, 495: 117220.

[16] 陈荣昌, 孙桂波, 张强, 等. 附子毒性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(8): 1126-1129.

[17] 张晓晨, 郑清阁, 杨菁华, 等. 附子C19二萜生物碱结构及活性研究进展[J]. 中草药, 2020, 51(2): 531-541.

[18] NG Y W, SAY Y H. Palmitic acid induces neurotoxicity and glia-toxicity in SH-SY5Y human neuroblastoma and T98G human glioblastoma cells[J]. PeerJ, 2018, 6: e4696.

[19] LIN M C, LEE Y W, TSENG Y Y, et al. Honokiol induces autophagic apoptosis in neuroblastoma cells through a P53-dependent pathway[J]. Am J Chin Med, 2019, 47(4): 895-912.

[20] ALEXEEV M, GROSENBAUGH D K, MOTT D D, et al. The natural products magnolol and honokiol are positive allosteric modulators of both synaptic and extra-synaptic GABAA receptors[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(8): 2507-2514.

[21] ZARROUK A. Involvment of docosanoïc acid (C22=0), and of very long chain fatty acids (tetracosanoïc acid (C24=0), hexacosanoïc acid (C26=0) in Alzheimer's disease: biological and clinical aspects [J]. Journal of Neurochemistry, 2013, 2013: 2020127.

[22] CALDER P C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation[J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006, 75(3): 197-202.

[23] 陈剑平, 李中桂, 张尚斌, 等. 大枣神经保护作用的活性组分筛选及其作用机制研究[J]. 中国药房, 2016, 27(25): 3495-3498.

[24] 赵雨薇, 戴月英, 甄艳杰, 等. 槲皮素神经保护作用研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2021, 35(9): 644-645.

[25] MAHMOUDI R, GHAREGHANI M, ZIBARA K, et al. Alyssum homolocarpum seed oil (AHSO), containing natural alpha linolenic acid, stearic acid, myristic acid and β-sitosterol, increases proliferation and differentiation of neural stem cells *in vitro*[J]. BMC Complement Altern Med, 2019, 19(1): 113.

[26] SHI C, LUO X M, WANG J S, et al. Incorporation of β-sitosterol into the membrane prevents tumor necrosis factor-α-induced nuclear factor-κB activation and gonadotropin-releasing hormone decline[J]. Steroids, 2015, 96: 1-6.

[27] SHI C, WU F M, XU J. Incorporation of β-sitosterol into mitochondrial membrane enhances mitochondrial function by promoting inner mitochondrial membrane fluidity[J]. J Bioenerg Biomembr, 2013, 45(3): 301-305.

[28] LIANG Y B, HUANG M, JIANG X, et al. The neuroprotective effects of Berberine against amyloid β-protein-induced apoptosis in primary cultured hippocampal neurons *via* mitochondria-related caspase pathway[J]. Neurosci Lett, 2017, 655: 46-53.

[29] LIU Y, ZHAO X T, LIN T T, et al. Molecular mechanisms of polysaccharides from *Ziziphus jujuba* Mill var. spinosa seeds regulating the bioavailability of spinosin and preventing colitis[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 163: 1393-1402.

[30] LI J W, LIU Y F, FAN L P, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao[J]. Carbohydr Polym, 2011, 84(1): 390-394.

[31] HOU W C, LI S L, LI S N, et al. Screening and isolation of cyclooxygenase-2 inhibitors from Trifolium pratense L. *via* ultrafiltration, enzyme-immobilized magnetic beads, semi-preparative high-performance liquid chromatography and high-speed counter-current chromatography[J]. J Sep Sci, 2019, 42(6): 1133-1143.

[32] QIN X C, ZHANG X, LI P Y, et al. microRNA-185 activates PI3K/AKT signalling pathway to alleviate dopaminergic neuron damage *via* targeting IGF1 in Parkinson's disease[J]. J Drug Target, 2021, 29(8): 875-883.

[33] 高洋洋, 赵志英. PI3K/AKT信号通路及神经损伤的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(16): 3121-3125.

[34] GUO J Y, CHEN H Y, MATHEW R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis[J]. Genes Dev, 2011, 25(5): 460-470.

[35] ZHOU S F, WANG F, QI Q W, et al. Plumbagin induces cell cycle arrest and autophagy and suppresses epithelial to mesenchymal transition involving PI3K/AKT/mTOR-mediated pathway in human pancreatic cancer cells[J]. Drug Des Dev Ther, 2015, 2015: 537-560.

[36] DOMINY J E, VAZQUEZ F, PUIGSERVER P. Glycine decarboxylase cleaves a "malignant" metabolic path to promote tumor initiation[J]. Cancer Cell, 2012, 21(2): 143-145.

[37] ZHEN J L, WANG W P, ZHOU J J, et al. Chronic intermittent hypoxic preconditioning suppresses pilocarpine-induced seizures and associated hippocampal neurodegeneration[J]. Brain Res, 2014, 1563: 122-130.

基于网络药理学和动物实验验证的大枣减附子神经毒性作用机制研究

（正文见 1－7 页）

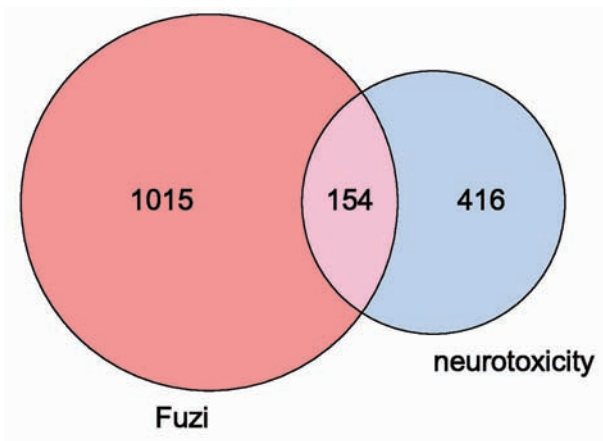


图 1　附子毒性成分预测靶点与神经毒性靶点交集韦恩图

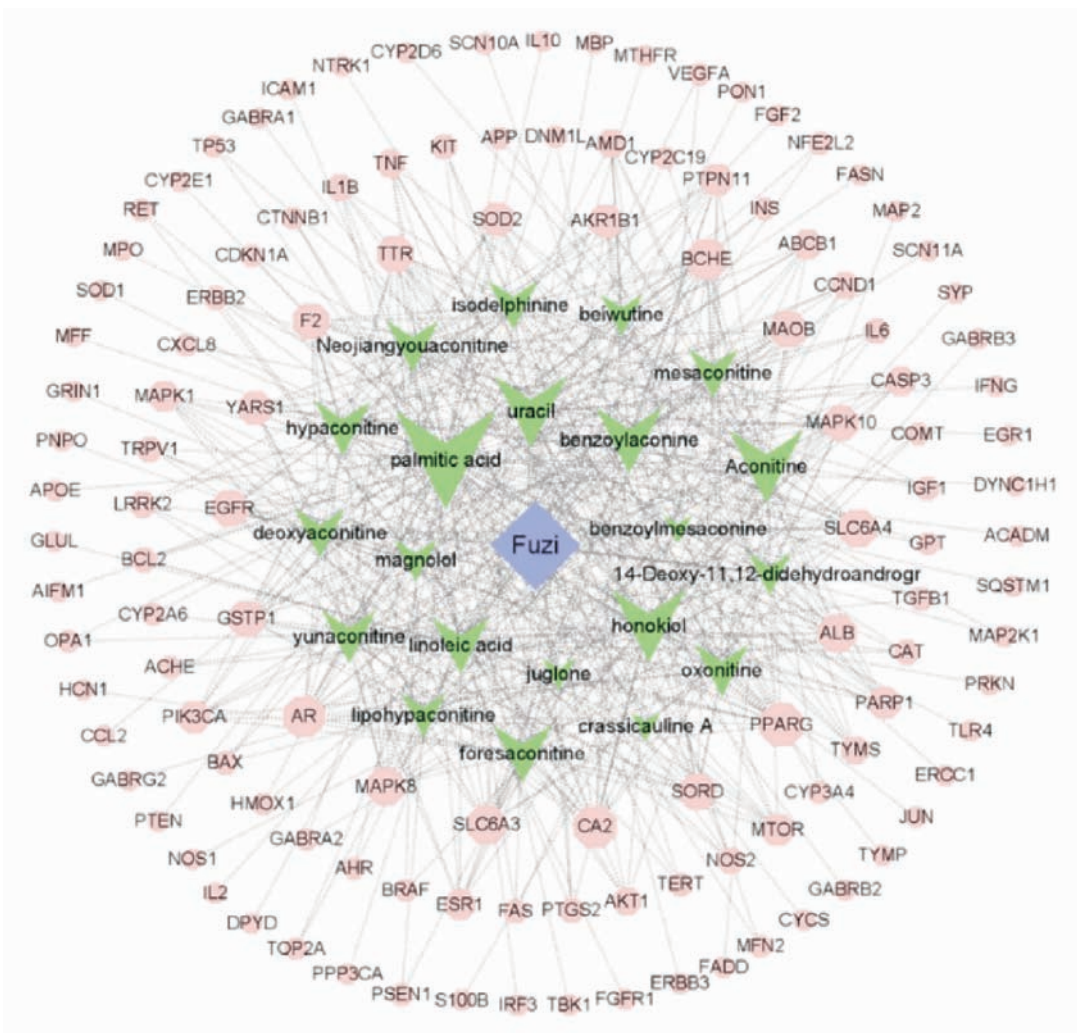


图 2　附子成分－神经毒性网络分析图

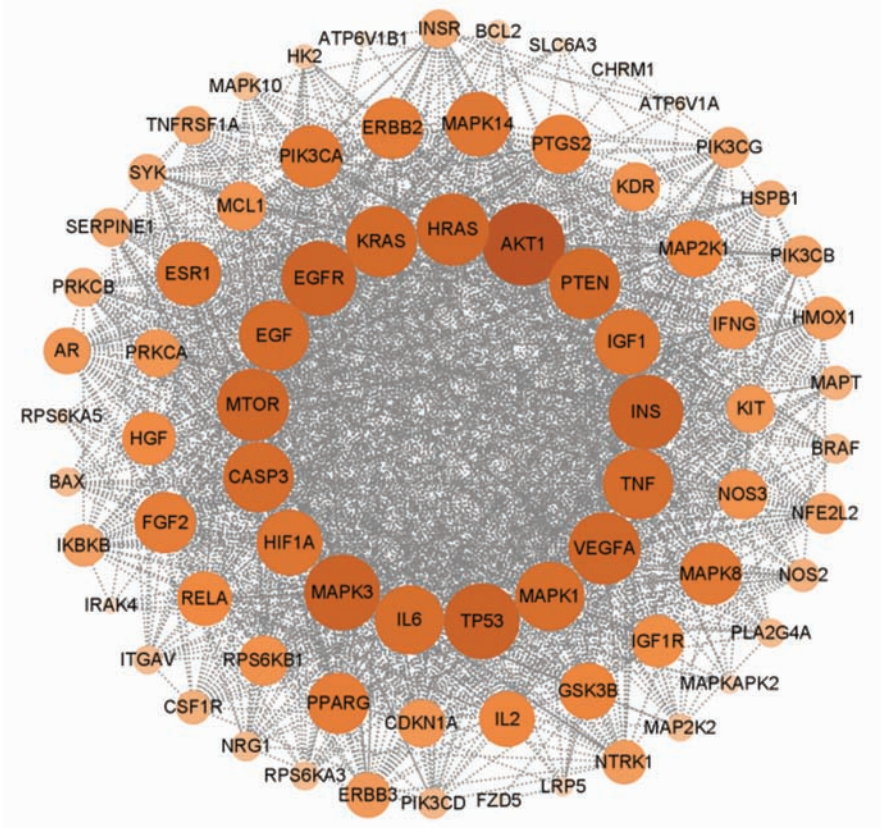


图 3　大枣减附子神经毒性靶点网络图

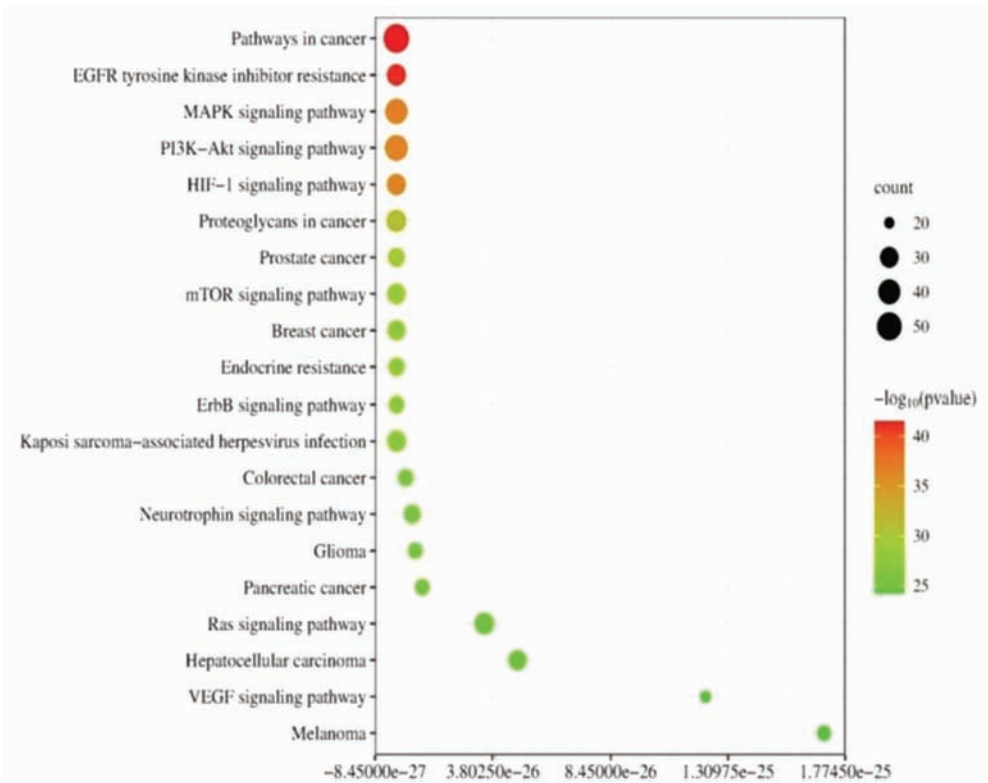


图 4　大枣减附子神经毒性靶点的前 20 条 KEGG 信号通路

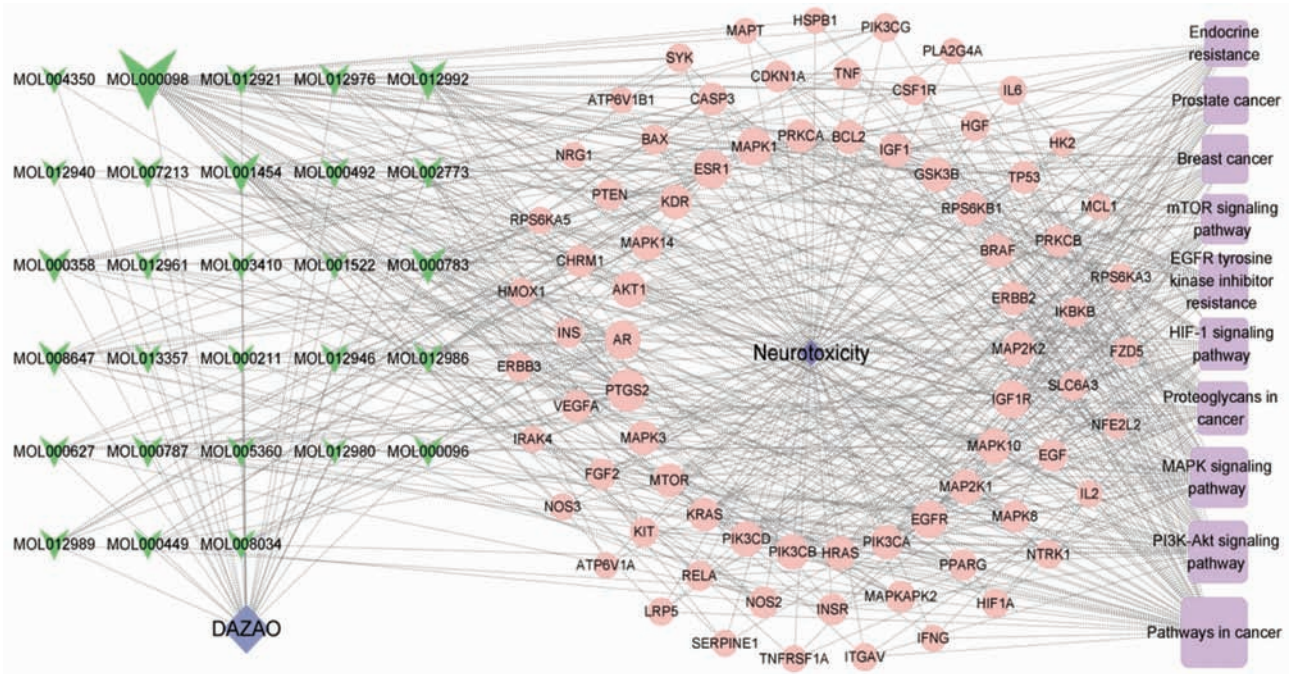


图 5　大枣减附子神经毒性成分 – 靶点 – 通路图

大黄及其有效成分治疗精神疾病研究进展

（正文见 105 – 112 页）

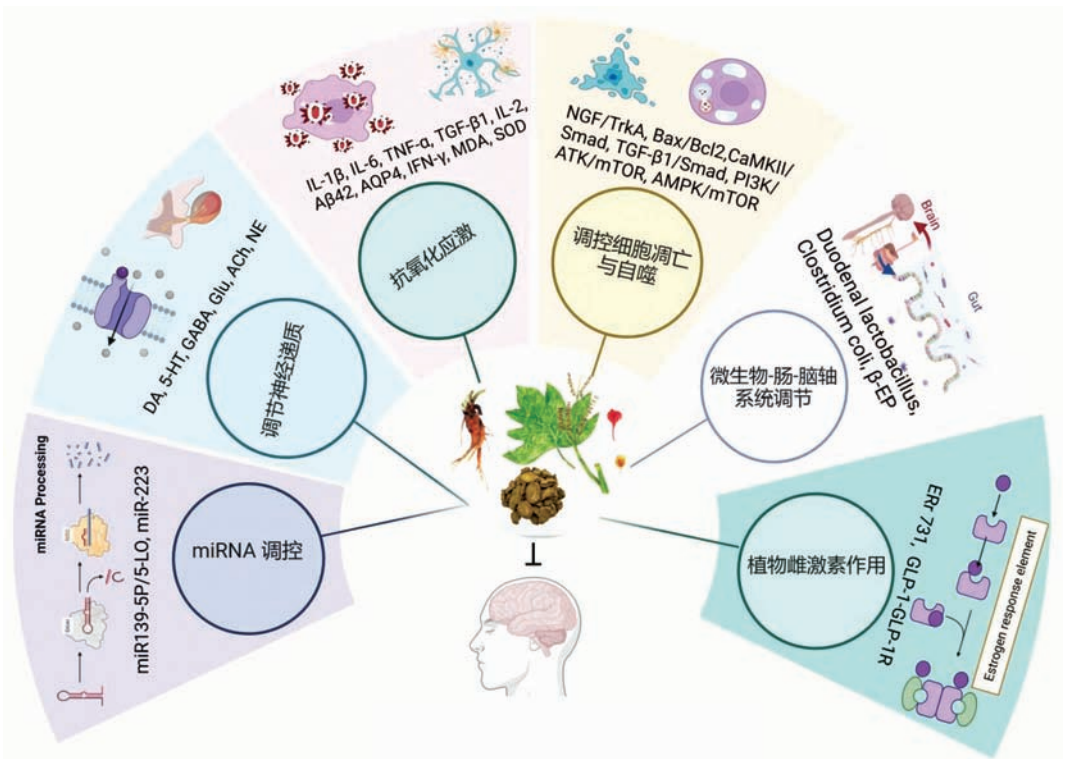


图 1　大黄治疗精神疾病的药理机制