

基于网络毒理学联合逆转录组学研究山豆根中生物碱致大鼠肾损伤的作用机制研究

睦凌晖，段萌萌，王莹莹，冯梦培，王贤花，王华斌*

贵州中医药大学药学院，贵州贵阳

摘要：目的：借助网络毒理学、毒理实验和分子生物学方法，对山豆根主要生物碱苦参碱、槐定碱和金雀花碱对大鼠肾脏毒性作用靶点和通路展开深入研究。方法：通过网络毒理学筛选山豆根毒性成分及肾毒性靶点，结合STRING和Cytoscape构建PPI互作网络，David数据库富集GO、KEGG关键通路，结合毒理实验验证其通过调控BUN/SCr水平及诱发肾脏病理损伤的毒性机制，荧光定量PCR测定大鼠关键基因mRNA的变化。结果：网络毒理学研究的初步发现显示，山豆根中包含16种潜在毒性成分，这类成分大概会通过HSP90AA1、SRC、PIK3R1、AKT1、HSP90AB1、ESR1等196个不同靶点，对肾脏造成损伤。通过毒理实验结果发现三种生物碱均使肾的生化指标尿素氮和肌酐含量显著增加，同时引起肾组织的损伤，荧光定量PCR结果显示，山豆根可改变MAPK3、ATK1基因的mRNA表达水平。结论：山豆根中苦参碱、槐定碱以及金雀花碱引发大鼠肾损伤的机制，是多方面共同作用而产生的，为山豆根临床用药提供理论依据。

关键词：网络毒理学；山豆根；苦参碱；槐定碱；金雀花碱；肾毒性

Based on Network Toxicology Combined with Reverse Transcriptomics, this Study Explores the Mechanism of Alkaloids in Sophorae tonkinensis Causing Renal Injury in Rats

Linghui Sui, Mengmeng Duan, Yingying Wang, Mengpei Feng, Xianhua Wang, Huabin Wang*

School of Pharmacy, Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou

Abstract: Objective By means of network toxicology, toxicological experiments and molecular biology methods, an in-depth study was conducted on the toxic action targets and pathways of the main alkaloids of the root of the mountain bean, namely matrine, sophoridine and cytisine, on the kidneys of rats. Methods The toxic components and nephrotoxic targets of mung bean root were screened through network toxicology. The PPI interaction network was constructed by combining STRING and Cytoscape. The key pathways of GO and KEGG were enriched in the David database. The toxic mechanism of regulating BUN/SCr levels and inducing renal pathological damage was

* 基金项目：贵州中医药大学2024年大学生创新创业训练计划省级项目“基于网络毒理学联合逆转录组学研究山豆根中生物碱致大鼠肾损伤的作用机制研究”（S2024106621504）。

第一作者简介：睦凌晖，女，汉，湖南永州，贵州中医药大学，本科在读，研究方向为中药的药效物质及新药开发。

通讯作者简介：王华斌，男，汉，四川南充，贵州中医药大学，博士学位，研究方向为中药的药效物质作用机制及新药开发。

verified through toxicological experiments. The changes of key gene mRNA in rats were determined by fluorescence quantitative PCR. Results Preliminary findings from network toxicology studies show that *sophorae tonkinensis* contains 16 potentially toxic components, which can cause damage to the kidneys through approximately 196 different targets such as HSP90AA1, SRC, PIK3R1, AKT1, HSP90AB1, and ESR1. The results of toxicological experiments revealed that all three alkaloids significantly increased the biochemical indicators of urea nitrogen and creatinine in the kidneys, and simultaneously caused damage to renal tissue. The results of fluorescence quantitative PCR showed that the root of mung beans could alter the mRNA expression levels of MAPK3 and ATK1 genes. Conclusion The mechanism by which matrine, sophorine and rhododenine in the root of chickpea cause kidney injury in rats is the result of the combined action of multiple factors, providing a theoretical basis for the clinical use of chickpea root.

Keywords: Network Toxicology; *Sophorae tonkinensis*; Matrine; Sophoridine; Cytisine; Nephrotoxicity

中药是我国宝贵的资源,应用历史悠久,各类中药均含有多种成分,它们在发挥药用效果的同时,也可能对机体自身产生毒性作用,这种安全性既是中医药研究者关注的核心,也是临床安全用药工作的基础所在[1]。然而,近现代以来,中药在发挥良好药理活性时,频繁发生的中药毒性事件,中药的毒性问题越来越受到人们的关注,不仅影响临床安全性用药,也牵制中医药事业和产业健康发展及国际化进程,中药毒性的作用机制研究迫在眉睫。肾脏是药物代谢和排泄的关键场所,发挥着解毒、排泄、酸碱平衡、细胞稳态等作用[2]。药物性肾损伤的发生率逐年升高,大多数中药与复方制剂都是在肾脏内进行代谢、解毒和排泄过程[3]。所以,研究、探讨中药的肾毒性,对深入开展中药肾损害研究与防治,对于保证用药安全、减少和杜绝药源性肾病的发生及规范临床安全用药具有重要意义。

山豆根来源于豆科槐属植物越南槐 *Sophoratonkinensis* Gagnep.,其药用部位为干燥根及根茎,在发挥药效的同时对机体产生毒性[4]。

《中国药典》(2020年版)将其毒性级别记载为“有毒”[5]。山豆根生物碱是山豆根的主要成分[6],研究报道具有肾脏损伤毒性[7],但是,山豆根生物碱致肾脏损伤的作用机制还不明确,严重影响了山豆

根的临床用药安全性。故而,开展山豆根主要成分生物碱肾脏毒性的研究与分析,对深入推进山豆根肾损害相关研究及防治举措,确保用药安全性、减少并杜绝药源性肾病出现,有意义重大。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF级KM大鼠30只,体质量(200 ± 2)g,购自长沙市天勤生物技术有限公司,许可证号:SCXK(湘)2024-0021。饲养环境:室温(27 ± 1)℃,相对湿度(55 ± 5)%,自由饮水、摄食。经贵州中医药大学实验动物伦理委员会审查批准(20240607)。

1.2 药物

苦参碱(产家:安徽泽升科技股份有限公司,批号:GD260137),槐定碱(产家:上海麦克林生化科技股份有限公司,批号:C15650183),金雀花碱(产家:上海皓鸿生物医药科技股份有限公司,批号:L820728)。

1.3 试剂与仪器

BUN试剂盒(批号P2507090070022)、CRE试剂盒(批号P25071100478)购自辽宁库克生物技术有限

公司, 生理盐水(批号8250306332, 辰欣药业股份有限公司)。Multiskan Go型超微量全波长酶标仪、H1850R冷冻离心机(长沙高新技术产业开发区湘仪离心机仪器有限公司)。总RNA提取试剂盒(批号W9907)、逆转录试剂盒(批号W9110)、荧光定量试剂盒(批号W0026)均购自天根生化科技有限公司。

1.4 山豆根致大鼠肾毒性的网络毒理学研究

1.4.1 主要数据库和工具

成分获取: TCMSP数据(<http://tcmsp.com/tcmssp.php>), CTD数据库(<http://ctdbase.org/>), TOXNET数据库(<https://www.toxnet/index.html>), 化合物靶点获取: SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), PubChem数据库(<https://pubchem.org/>), 肾毒靶点获取: GeneCards数据库(<https://genecards.org/>), OMIM数据库(<https://www.omim.org/>), UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>), STRING数据库(<https://string-db.org/>), 功能预测: David 数据库(<https://metascape.org/>), 分析数据软件SPSS26.0, 可视化工具Cytoscape3.10.3。

1.4.2 山豆根成分收集和毒性筛选

借助中药系统药理学分析平台(TCMSP), 筛查山豆根的有效成分, 并调整口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%和类药性(drug likeness, DL)≥0.18, 得到山豆根的活性成分。通过基因组毒理数据库(CTD)和毒理学网络数据库(TOXNET)对得到的有效成分进行毒性查询, 收集山豆根的毒性成分。

1.4.3 毒性成分靶点预测

将得到的毒性成分输入有机小分子生物活性输入数据库PubChem获取毒性成分的SMILES号或2D结构; 将其SMILES号或2D结构输入SwissTargetsPrediction数据库, 并设置物种为“Homo sapiens”, 获取山豆根毒性成分的作用靶点, 对得到的结果进行整理并去重, 通过UniProt对靶点名称进行标准化。

1.4.4 肾毒性靶点预测分析与构建“成分-靶点”网络

在OMIM数据库和GeneCards数据库输入关键词“nephrotoxicity(肾毒性)”和“kidney injury(肾损伤)”, 收集肾毒性的靶点, 将两个数据库得到的靶点进行去重, 利用Venny图在线作图平台, 输入获得的靶点将毒性成分靶点与肾毒性靶点, 得到共同靶点, 建立“network”和“Type”文件, 将上述文件导入Cytoscape3.10.3软件建立网络进行可视化处理及拓扑学分析。

1.4.5 GO、KEGG 富集分析及关键靶点筛选

将毒性成分的肾毒性靶点导入STRING数据库, 设置置信度为0.900, 隐藏无关的节点, 得到蛋白间相互作用的网络。使用Cytoscape 3.8.2软件调整靶点网络, 并利用CytoHubba插件分析靶点度值(Degree), 网络节点的大小和颜色用来反应Degree值的大小。采用David平台, 进行GO、KEGG富集分析, 得到数据后利用微生信平台作图。借助BioGPS数据库筛选出在肾组织中有表达的基因。

1.5 山豆根致大鼠肾毒性作用机制

1.5.1 动物实验

根据文献资料[8]确定苦参碱、槐定碱、金雀花碱低、中、高剂量组给药剂量。30只SPF级SD大鼠, ♀♂各半, 适应性喂养3d, 随机将其分为10组, 每组3只, 分别是空白组(生理盐水)和三种药物的高、中、低剂量组(苦参碱: 62.5mg/kg, 31.3mg/kg, 15.6mg/kg; 槐定碱: 50.0mg/kg, 12.3mg/kg, 金雀花碱: 50.5mg/kg, 25.3mg/kg, 12.6mg/kg), 按照所算剂量连续灌胃给药5d, 每日1次, 空白组给予等容积生理盐水, 给药后密切观察并记录大鼠的反应, 于d6处死取材, 取材前禁食(不禁水)12h、称体质量并记录, 取血清、肾组织测定各项指标, 其它组织于-80℃条件下保存备用。

1.5.2 血清检测及组织病理学

采用眼眶静脉丛采血法收集0.5mL血液样

本, 室温静置120分钟后, 于4℃以2500r/min离心15min, 分离上清液; 采用BUN/SCR试剂盒, 通过超微量酶标仪测定血清BUN、SCR浓度。完整摘除大鼠双侧肾脏, 生理盐水冲洗去残留血液后, 立即浸入4%多聚甲醛固定液固定; 后续经石蜡包埋、切片及HE染色, 通过光学显微镜观察肾组织病理学改变并记录显微图像。

1.5.3 荧光定量PCR方法测定大鼠肾组织内关键基因的具体表达水平

对山豆根的关键靶基因进行验证操作, 从大鼠肾组织中提取总RNA, 再将其逆转录为cDNA。使用Primer5.0软件完成引物设计, 通过Talent荧光定量检测试剂盒调配反应液, 在伯乐荧光定量PCR仪上进行扩增反应; 实验对照选用GAPDH内参引物, 生物学重复设置3次, 基因相对含量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.5.4 数据统计分析

运用SPSS26.0统计软件对数据进行统计学分析, 数据表达采用 $\bar{x} \pm s$ 格式, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较环节选用LSD-t检验方法。

2 结果

2.1 山豆根毒性成分

将山豆根有效成分输入毒理学数据库中筛选,

共获得山豆根16个潜在毒性成分: 苦参碱, 槐定碱, 槐胺, 安纳基林, 5,7,4'-三羟基-6-异戊烯基异黄酮, subprogenin C, 黄羽扇豆魏特酮, 马卡因, 醉茄素 A, 大豆苷元-4,7-二葡萄糖苷, 槐芸香碱, Inermine, 山柰酚, 刺芒柄花素, 异鼠李素, 槲皮素, 各毒性成分以SDG1-SDG16编号, 用于后续作图及分析。

2.2 山豆根毒性成分靶标预测

从SwissTargetPrediction数据库得到山豆根毒性成分靶点信息1600个, 经过筛选、去重后得到靶点共365个。通过UniProt数据库将靶基因名称进行确认校正。

2.3 肾毒性靶标预测及“成分-靶点”网络构建

以“nephrotoxicity”和“kidney injury”为关键词, 通过GeneCards数据库和OMIM数据库最终获得共3776肾毒性相关靶点。对山豆根毒性成分靶点和肾毒性靶点取交集, 得到二者交集靶点196个, 作为山豆根致肾毒性的预测靶点, 山豆根毒性成分的交集靶点信息(图1)。图中黄色圆形代表药材山豆根(SDG), 橙色三角形代表潜在毒性成分, 蓝色菱形代表靶点。

2.4 靶点互作网络构建及分析

利用STRING数据库进行PPI网络构建, 将得

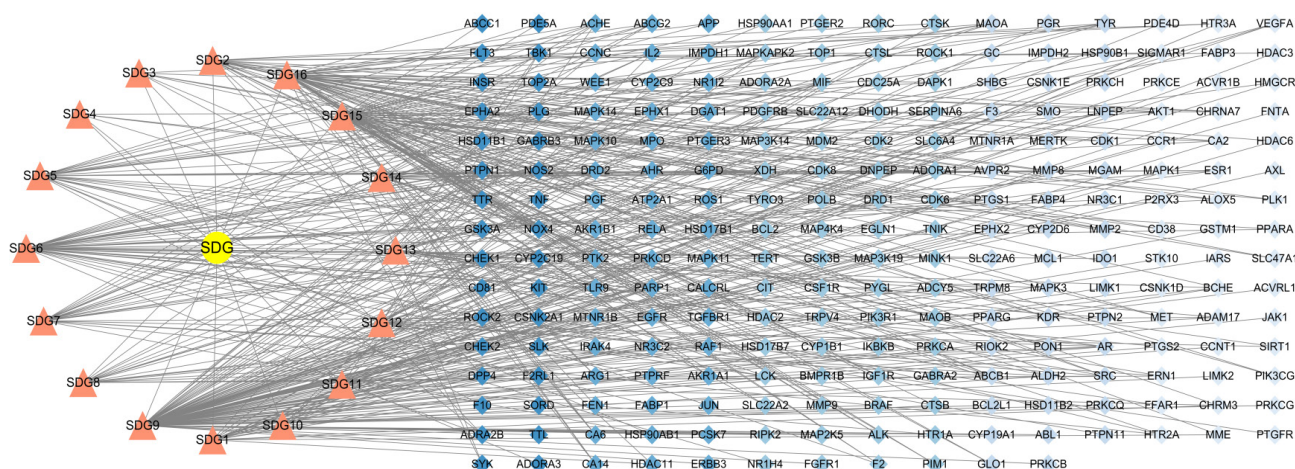


图1. “成分-靶点”网络

到的网络图导入Cytoscape3.10.3美化处理，如图2所示。网络图有196个节点，364条边，平均节点度值3.71，平均局部聚类系数0.422。网络拓扑分析结果表明，Degree值排名前六位的靶点有HSP90AA1(热休克蛋白90- α ，Degree=27)、SRC(非受体酪氨酸激酶，Degree=26)、PIK3R1(磷酸肌醇3-激酶，Degree=22)、AKT1(丝氨酸/苏氨酸激酶1，Degree=21)、HSP90AB1(90kDa热休克蛋白 α B1，Degree=18)、ESR1(人雌激素受体，Degree=16)。

2.5 GO分析和KEGG分析及关键靶点筛选

使用David数据库对山豆根致肾毒性靶点行GO、KEGG富集分析 ($P<0.01$)，选取前10位结果可视化 (图3)。GO结果：生物学功能方面，主要参与表皮生长因子受体信号通路、凋亡过程负向调控、胰岛素样生长因子受体信号通路、蛋白质磷酸化等；细胞组分共90条，主要涉及细胞膜、受体复合体、蛋白复合物、顶端质膜等；分子功能主要与ATP结合、蛋白激酶活性、核受体、组蛋白H3Y41激酶活性受体等有关。KEGG共富集171条通路，主要为癌症途径、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐

药性、PI3K-Akt信号通路、前列腺癌、癌症中的蛋白聚糖、MAPK信号通路等，其中MAPK信号通路涉及CSF1R、FLT3、TNF、RELA、EGFR等32个靶点。结合靶点互作网络和BioGPS数据库，挑选出2个关键靶基因AKT1、MAPK3在肾组织中表达。

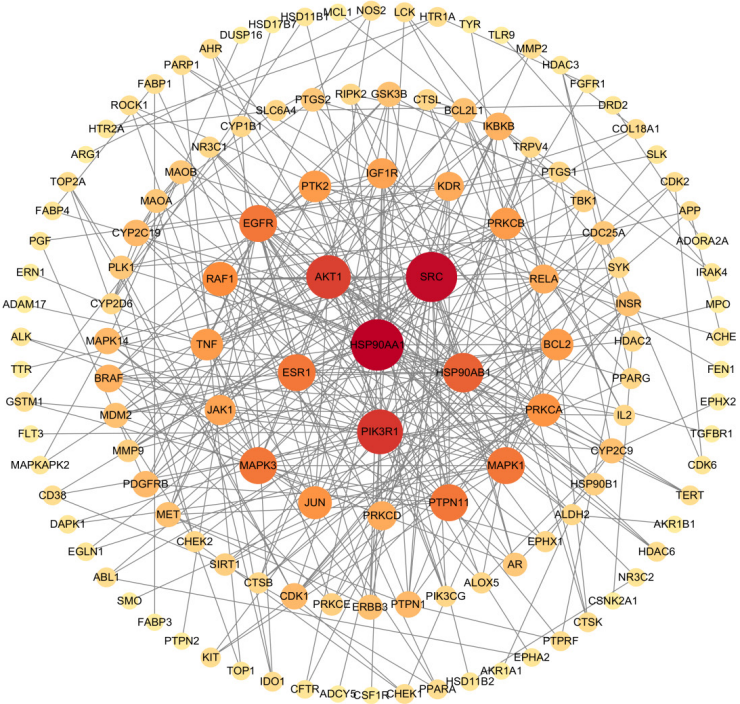
2.6 山豆根致大鼠体内BUN、SCr含量的影响

表1. 各组大鼠的血尿素氮与血清肌酐水平

药剂 Medication	剂量 Dose/ (mg·kg ⁻¹)	尿素氮 BUN/(mmol/L)	肌酐 Cr/(μ mol/L)
Control	—	7.27 $\pm$ 1.10	250.77 $\pm$ 15.79
苦参碱	62.5	15.31 $\pm$ 0.62	540.92 $\pm$ 297.09
	31.3	4.06 $\pm$ 0.38	119.44 $\pm$ 94.90
	15.6	3.39 $\pm$ 0.38	289.78 $\pm$ 165.18
槐定碱	50.0	21.70 $\pm$ 9.65*	519.97 $\pm$ 110.09
	25.0	34.04 $\pm$ 3.77*	338.10 $\pm$ 29.28
	12.3	29.16 $\pm$ 4.06*	192.85 $\pm$ 54.07
金雀花碱	50.5	27.42 $\pm$ 3.73*	563.24 $\pm$ 194.58
	25.3	26.83 $\pm$ 16.24*	1266.82 $\pm$ 268.74*
	12.6	11.38 $\pm$ 0.34	1364.61 $\pm$ 213.99*

*平均值差值的显著性水平为 0.05。

和正常组相较，给药组大鼠表现出神情倦怠、



活动频次降低、进食欲望减弱、毛发枯乱无章。实验数据显示，苦参碱高剂量组、槐定碱高中剂量组、金雀花组中大鼠血清尿素氮和肌酐明显上升，不同药物的高剂量组均表现出明显的肾损伤，统计学差异显示，其中金雀花碱和槐定碱对肾的损伤影响较大。

2.7 肾组织病理组织学观察

正常组大鼠肾脏组织大小正常、形态规则，肾小球结构完整，无异常病变。苦参碱各剂量组肾小管上皮细胞体积增大，少数细胞核溶解消失、细胞

结构松散，局部间质见少量炎症细胞聚集。槐定碱剂量组上皮细胞肿胀，组织边界模糊、结构受损，管腔变形模糊有坏死迹象，伴严重炎症细胞浸润。金雀花剂量组肾小管上皮细胞肿胀变性、细胞核固缩，肾小管萎缩、上皮细胞扁平化，肾间质炎症细胞显著浸润，伴明显水肿、组织疏松，细胞核增大，且有水肿及纤维化迹象。

2.8 大鼠肾组织相关基因筛选

与正常组进行比较，山豆根能使MAPK3和AKT1发生显著变化，山豆根通过调节这两个基因

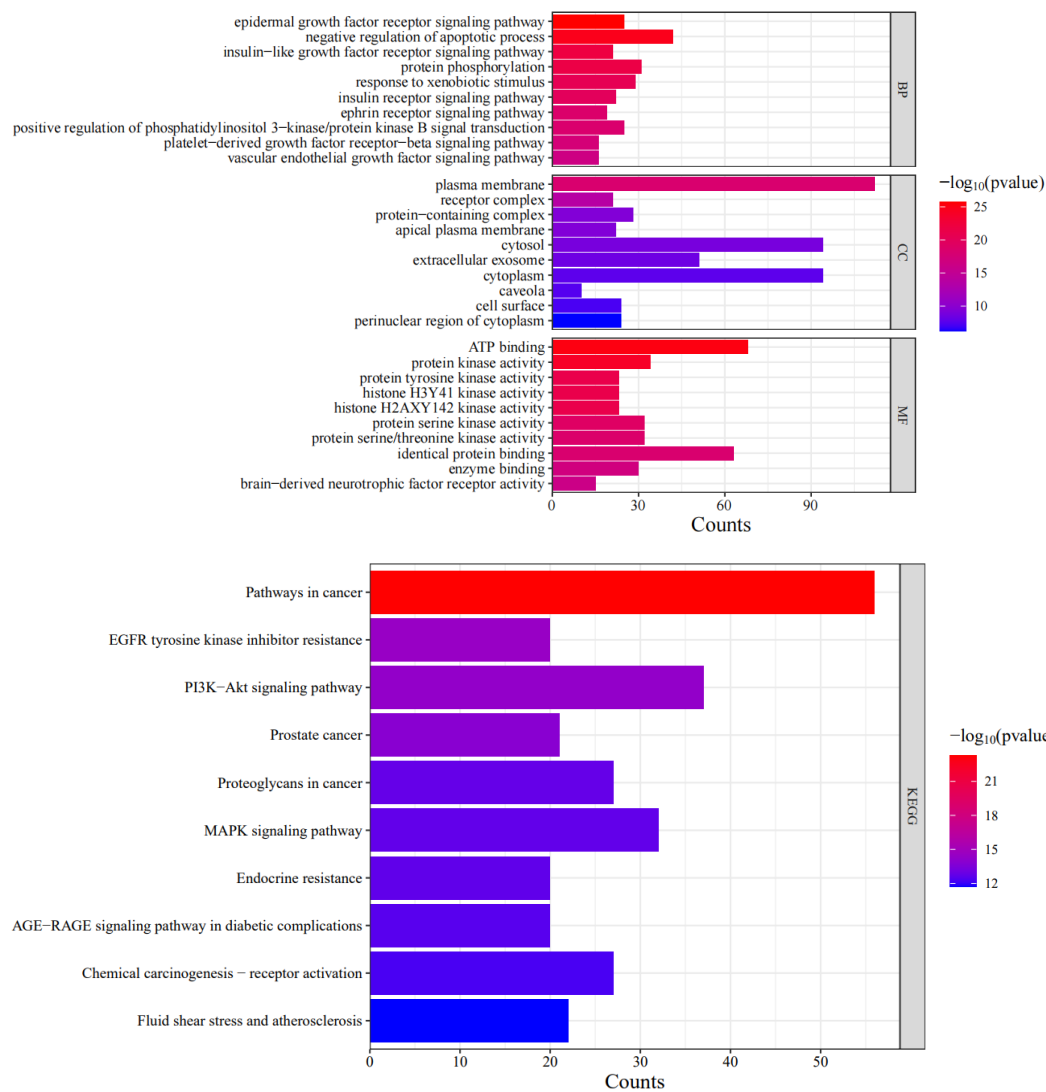


图3. GO功能富集分析及KEGG通路分析

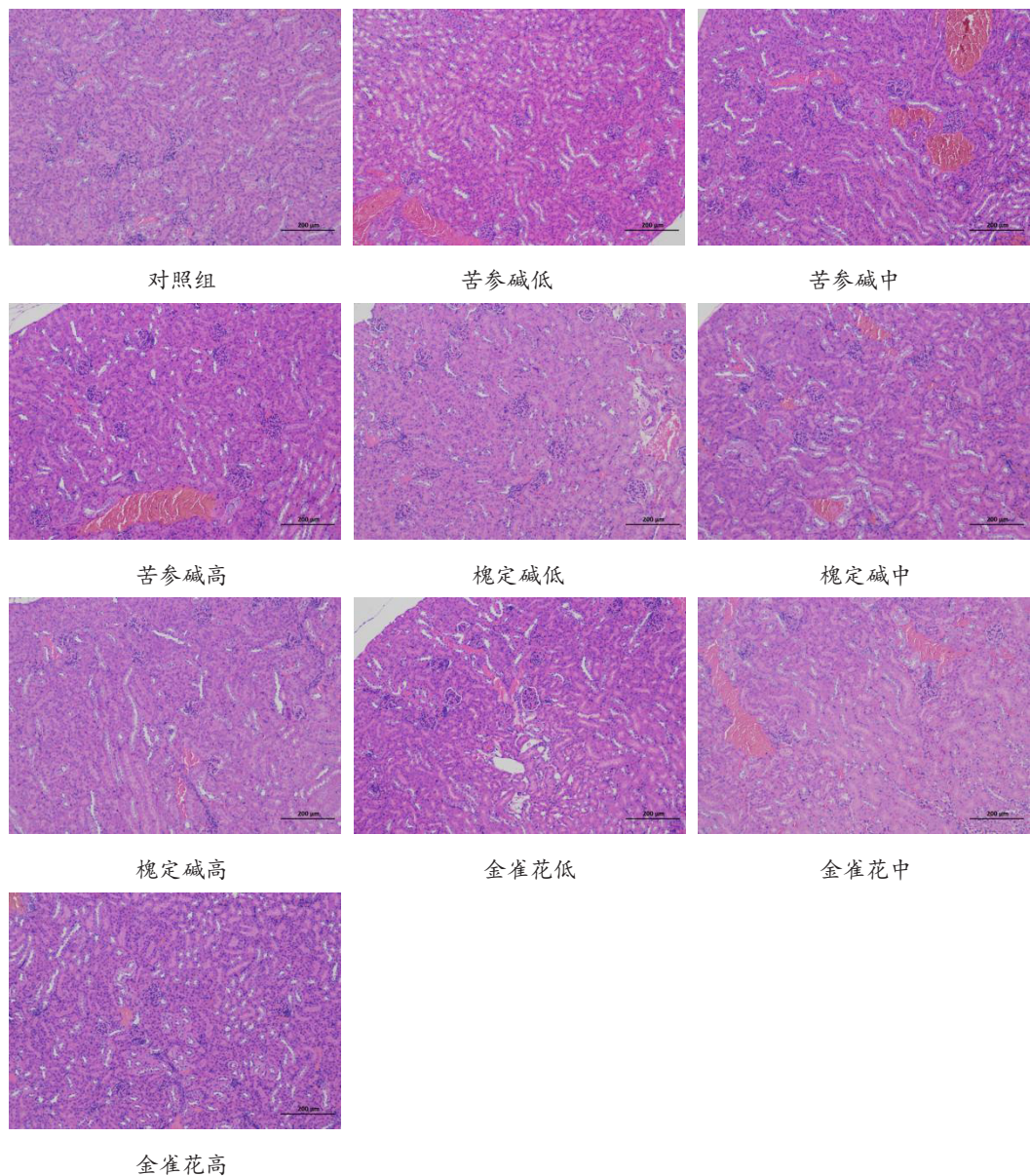


图4. 大鼠肾脏组织的病理形态学表现 (HE×200倍)

的表达水平，从而致大鼠肾脏损伤。

3 讨论

网络毒理学分析显示，山豆根通过196个靶点（主要为HSP90AA1、SRC、PIK3R1等）参与肾损伤机制，这些靶点主要富集于癌症途径、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性、PI3K-Akt信号通路、前列腺癌、癌症中的蛋白聚糖、MAPK信号通路等，借助BioGPS数据库选出MAPK3和AKT1两个山豆根

致肾损伤的关键靶基因。肾相关生化指标显示，给药组大鼠血清Cr、BUN水平显著升高，各剂量组肾组织病理切片均有损伤（肾小管上皮细胞水肿、炎症细胞浸润，肾脏存在炎症反应）。荧光定量PCR检测关键基因表达表明，山豆根可显著改变肾毒性关键基因MAPK3、AKT1的mRNA表达水平。

综合网络毒理学、动物实验荧光定量PCR实验结果显示，给药组大鼠血液尿素氮及肌酐含量上

升, 肾组织病理学检查发现明显结构损伤, 可能通过调控MAPK3和AKT1两个关键基因的表达致肾损伤。

参考文献

- [1]周淑莹,沈益琴,朱苏美,等.传承背景下基于模型引导的中
药安全用药研究[J].中医药管理杂志,2023,31(22):72-74.
- [2]叶梦晗,张蕊,刘亚妮,等.慢性肾脏病(CKD)中肾脏药物转运
体变化的研究进展[J/OL].中国医院药学杂志:1-7.
- [3]杨帆,张晓云,高俊侠,等.加减补阳还五汤通过SIRT1途径
激活自噬改善糖尿病肾病小鼠肾组织损伤[J].天津中医
药,2024,41(04):495-502.
- [4]王晓雯,张月,胡璐瑶,等.UPLC-Q-TOF/MS结合网络药理学
和分子对接技术探讨山豆根抗肝癌的药效物质及作用机
制[J].天津中医药,2023,40(12):1595-1608.
- [5]国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中
国医药科技出版社,2020.
- [6]周思雨,陈金鹏,刘志东,等.山豆根的化学成分和药理作用
的研究进展[J].中草药,2021,52(05):1510-1521.
- [7]何倩倩,刘畅,权伟,等.基于网络毒理学和实验验证
探讨山豆根致大鼠肾毒性机制[J].中国药理学通
报,2023,39(04):766-773.
- [8]宋兵,韩崇选,张宏利.3种苦参生物碱对小鼠的毒性作用研
究[J].西北植物学报,2009,29(04):818-823.

