

基于网络药理学的雷公藤肾毒性机制探讨

郝俊霞, 高梓森, 高皓, 毕开顺, 王健, 李佐静*

(沈阳药科大学药学院, 制药工程学院, 医疗器械学院, 沈阳 110016)

[摘要] **目的:** 通过建立雷公藤活性成分-作用靶点、蛋白相互作用、靶点相应的生物功能和通路网络, 以及利用分子对接技术探讨雷公藤肾毒性的作用机制。**方法:** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)和毒性与基因比较数据库(CTD)筛选出雷公藤有毒候选化合物。用有机小分子生物活性数据 PubChem 数据库, 将所有的候选化合物都转化为标准的 Canonical SMILES 格式, 将 SMILES 格式文件导入 SwissTargetPrediction 平台, 进行靶点预测, 将 TCMSP 中相应化合物的靶点作为补充, 用 uniprot 将蛋白转换为对应的基因名称, 与从人类基因组注释数据库(GeneCards)中寻找到的肾脏相关基因蛋白进行比对, 筛选出重合的蛋白作为雷公藤潜在的肾脏毒性靶点。采用 Cytoscape 软件构建雷公藤毒性候选成分-作用靶点网络。通过 String 数据库结合 Cytoscape 软件绘制蛋白相互作用网络, 用 DAVID 生物信息资源对靶点生物功能及涉及的通路进行分析, 最后用 Glide 软件对关键蛋白与雷公藤毒性候选成分的结合进行验证。**结果:** 雷公藤中筛选得到 30 种有毒候选成分, 涉及 209 个肾脏毒性作用靶点, 网络分析结果表明雷公藤可通过氨基酸代谢、磷脂代谢、儿茶酚胺类物质代谢, 抑制肾脏有机阴离子转运体 Oat1, Oat2, Oat3 的功能, 以及诱导凋亡, 并参与丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路, JAK/STAT 信号通路, 血管内皮生长因子(VEGF)信号通路, Toll 样受体信号通路, ERBB 信号通路, FcεRI 信号通路, 过氧化物酶体增殖剂激活受体(PPAR)信号通路等对肾脏产生毒性。**结论:** 利用中药多成分-多靶点-多通路的特点, 探究了雷公藤肾脏毒性作用机制, 为进一步开展雷公藤肾脏毒性作用机制研究提供了新思路和新方法。

[关键词] 网络药理学; 雷公藤; 肾脏毒性; 通路分析; 分子对接

[中图分类号] R2-0; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)16-0142-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191638

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190506.1642.002.html>

[网络出版时间] 2019-05-08 14:04

Study on Mechanism of Nephrotoxicity of Tripterygii Radix et Rhizoma Based on Network Pharmacology

HAO Jun-xia, GAO Zi-sen, GAO Hao, BI Kai-shun, WANG Jian, LI Zuo-jing*

(School of Pharmacy, School of Pharmaceutical Engineering, School of Medical Devices,
Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of renal toxicity of Tripterygii Radix et Rhizoma by establishing the active component-target, protein interaction, biological function and pathway network corresponding to the target, and using molecular docking technology. **Method:** The traditional Chinese medicine (TCM) systems pharmacology database (TCMSP) and the comparative toxicogenomics database (CTD) were used to screen The toxic candidate compounds. In PubChem database, convert all candidate compounds into standard Canonical SMILES format, SMILES format file import SwissTargetPrediction platform, target prediction, will be the target of the corresponding compounds in TCMSP supplement with uniprot converts protein antipodal gene name, and from the human genome database (GeneCards) seek to compare the renal related gene protein, overlapping

[收稿日期] 20190323(014)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81303315);辽宁省自然科学基金项目(20180550342)

[第一作者] 郝俊霞,在读硕士,从事药理学信息学研究, E-mail: m13125540350_1@163.com

[通信作者] *李佐静,博士,副教授,硕士生导师,从事药理学信息学研究, E-mail: zuojing1006@foxmail.com

proteins were screened as potential renal toxicity targets of Tripterygii Radix et Rhizoma. Cytoscape software was used to construct the candidate components-target network of Tripterygii Radix et Rhizoma. Cytoscape software was combined with String database to draw the protein interaction network, DAVID platform was used to analyze the biological function of the target and the pathways involved, and Glide software was used to verify the combination of the key protein and the candidate components of tripterygiumwildiitoxicity. **Result:** The screening of 30 kinds of candidates for toxic ingredients of Tripterygii Radix et Rhizoma, involving 209 renal toxicity targets, network analysis results showed that Tripterygii Radix et Rhizoma by amino acid metabolism, phospholipid metabolism, catecholamine metabolism, inhibiting renal organic anion transporter Oat1, Oat2, Oat3 function, and inducing apoptosis, and participate in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways, JAK-STAT signaling pathway, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathways, Toll-like receptor signaling pathway, ERBB signaling pathway, FcεRI signaling pathway, peroxisome proliferators-activated receptors (PPAR) signaling pathway such as toxic to the kidneys. **Conclusion:** The mechanism of kidney toxicity of Tripterygii Radix et Rhizoma was explored by using the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway of TCM, which provided new ideas and methods for further research on the mechanism of kidney toxicity of Tripterygii Radix et Rhizoma.

[**Key words**] network pharmacology; Tripterygii Radix et Rhizoma; renal toxicity; path analysis; molecular docking

雷公藤是卫矛科雷公藤属雷公藤的干燥根及根茎,具有祛风除湿、活血化瘀、舒经通络、消肿止痛、杀虫止血、清热解毒等功效,临床常用于治疗各种原发性和继发性肾炎,包括慢性肾小球肾炎、肾病综合征、过敏性紫癜肾炎、狼疮性肾炎等疾病,疗效显著^[1]。但因其有大毒,尤其是主要活性成分二萜类和生物碱类毒性较强,极易致人体肾脏毒性反应,严重可致急性间质性肾炎、急性肾功能不全,甚至造成急性肾衰竭,很大程度上限制了其在临床上的应用^[2]。目前,除马兜铃酸类中药,报告最多的具有肾毒性风险的中药为雷公藤制剂^[3]。雷公藤多苷和雷公藤甲素是雷公藤引起肾毒性的成分,而雷公藤多苷、雷公藤甲素和雷公藤内酯醇是肾脏保护作用的主要成分。这种肾脏保护活性成分与肾毒性成分的重叠,是肾毒性差异的物质基础^[1]。在雷公藤肾毒性机制研究方面,有结果表明雷公藤可能通过血管内皮生长因子(VEGF)通路,改变肾近曲小管的屏障功能^[4];诱导凋亡^[5];丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路^[6];与氨基酸代谢、磷脂代谢、儿茶酚胺类物质代谢等有关;血清中肾上腺素浓度的升高可能与氧化应激和缺血密切相关^[7]。

本文应用网络药理学方法对雷公藤肾毒性的作用机制进行研究,除证明了以上结论外,还发现了雷公藤的肾毒性可能为通过抑制肾脏有机阴离子转运体 Oat1, Oat2, Oat3 的功能而实现^[8],为今后其肾毒性研究提供一定的理论基础。

1 材料和方法

1.1 数据库和软件 中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),毒性与基因比较数据库(CTD),人类基因组注释数据库(GeneCards), SwissTargetPrediction, 有机小分子生物活性数据 pubchem 数据库, Cytoscape 3.6.1, 生物信息资源 DAVID 6.7, 蛋白相互作用数据库 STRING, UniProt 数据库, 蛋白质晶体结构数据库(PDB), Glide 软件。

1.2 雷公藤成分化合物获取以及毒性查询 从 TCMSP 数据库中获得草乌目前已知化学成分,根据口服生物利用度和类药性筛选出具有良好的口服生物利用度(OB≥30%)和类药性(DL≥0.18)的化合物^[9]。CTD 数据库提供了环境化合物影响人类健康的数据信息,首次为全世界研究人员提供了多种毒理学信息。将从 TCMSP 数据库中筛选出的化合物直接输入 CTD 数据库中进行毒性查询,得到雷公藤中有毒的化合物成分。

1.3 雷公藤毒性化合物作用靶点预测 SwissTargetPrediction 是一个能精确预测生物活性分子靶点的服务器,它可以根据化学成分的 2D 和 3D 结构进行预测。共可预测 5 种不同来源的生物,基于 Daylight FP2 的分子指纹方法,并采用 Tanimoto 系数定义的相似度量方法^[10]。利用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库,将所有的化合物转化为标准的 Canonical SMILES 格式,将 SMILES 格式文件导入 SwissTargetPrediction

平台,将其属性设置为“homo sapiens”,预测活性化合物的潜在靶点并用 TCMSp 中已有的靶点进行补充,利用 UniProt 数据库将这些靶蛋白转换成对应的基因名称。

1.4 肾相关靶点的筛选 在 GeneCards 数据库中输入关键词“kidney”,收集和肾脏相关的基因,与上述收集到的基因靶点进行匹配,得到雷公藤有毒候选化合物的肾毒性的潜在靶点。

1.5 候选化合物-肾脏靶点网络构建 将候选化合物与雷公藤肾脏毒性潜在靶点通过 Cytoscape 3.6.1 软件建立雷公藤成分-肾脏靶点网络。化合物节点数 (degree) 表示化合物对应的预测肾脏靶点的个数,度值较大的化合物进行重点分析,靶点的节点数 (degree) 的度值越大,则这个靶点越有可能是化合物的关键作用靶点。

1.6 靶蛋白相互作用 (PPI) 网络构建 为了更好地分析雷公藤肾脏靶点间的相互作用,将雷公藤肾脏毒性潜在靶点导入 String 数据库,利用 Multiple proteins 工具,获取蛋白相互作用,并保存其 TSV 格式文件。将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.6.1 软件中,绘制蛋白相互作用网络,并对网络进行分析,在 Cytoscape 的从统计数据生成样式 generate style from statistics 工具中将靶点大小和颜色设置用于反映节点数的大小,边的粗细设置用于反应结合分数 (combine score) 的大小,从而获得最终的蛋白互作网络。

1.7 代谢通路和生物过程分析 为了进一步研究雷公藤肾脏毒性潜在靶点群的协同作用情况。采用 DAVID 6.7 平台进行基因本体 (GO) 富集分析和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析,进行相关文献的查阅得出雷公藤作用于肾脏的毒理作用机制^[11],并进行通路分析和生物过程分析。

1.8 分子对接 选取某些重要毒性成分和关键蛋白采用分子对接对他们的结合进行验证。Glide 是近似为完全系统搜索配体的构象、取向和空间位置的对接软件 Glide 对接过程中,蛋白质的结构是刚性的,而小分子的构象是柔性的。蛋白准备模块 Protein Preparation Wizard 在 OPLS-2005 分子力场下准备受体;以晶体复合物中的配体位置为对接中心,Receptor Grid Generation 生成格点文件;Ligpre 准备配体及其抑制剂。Ligand Docking 进行分子对接,选择标准精度 (SP) 对接,每个配体采用 5 000 个构象进行对接,保留 400 个构象进行优化,最后选取

G-Score 打分最优的前 50 个低能构象进行保存,其他参数保持默认值,对所得的结果进行分析。

2 结果

2.1 雷公藤中具有良好口服生物利用度和类药性的有毒化合物的筛选 从 TCMSp 数据库中获得草乌目前已知成分 144 种,根据口服生物利用度和类药性分析筛选出具有良好的口服生物利用度 ($OB \geq 30\%$) 和类药性 ($DL \geq 0.18$) 的化合物 51 种,见表 1。CTD 数据库中获取 30 种草乌化合物毒性相关信息,见表 2。

2.2 候选化合物肾脏靶点预测及筛选 由 SwissTargetPrediction 靶点预测以及 TCMSp 中补充靶点共得到 277 个靶点蛋白,利用 UniProt 数据库将靶蛋白转换成对应的基因名称后,与从 Genecards 中获取的 6 992 个人类肾脏相关基因进行比对,筛选得到 209 种草乌肾脏毒性的潜在靶点。

2.3 候选化合物一肾脏靶点网络分析 图 1 为雷公藤候选化合物一肾脏靶点网络,其中包含了 239 个节点和 545 条边,其中有 115 个靶点分别只与一种化合物相连,在图中被隐藏。239 个节点中包括 30 个候选毒性化合物和 209 个雷公藤肾脏毒性的潜在靶点。边代表化合物和潜在肾脏靶点间的相互关系。从蛋白靶点角度来看,较为重要的蛋白靶点前列腺素内过氧化物合酶 (PTGS) 2, PTGS1, NCOA2, 雄激素受体 (AR), β_2 肾上腺素能受体 (ADRB2), 雌激素受体 1 (ESR1), 孕激素受体 (PGR), 毒蕈碱型胆碱受体 M3 (CHRM3) 等。其中 PTGS2 和 PTGS1 分别与 23 和 18 种候选化合物存在相互关系。从化合物角度来看,山柰酚 (kaempferol), 雷公藤甲素 (triptolide), 蜜桔黄素 (nobiletin), β -谷甾醇 (beta-sitosterol) 和雷公藤二萜酸 B (triptoditerpenic acid B) 等化合物是雷公藤中较为重要的组分。其中,kaempferol 与 50 个靶点均存在相互关系。

2.4 靶点 PPI 网络分析 将筛选出的雷公藤肾脏毒性潜在靶点导入 String 数据库中,获得蛋白相互作用关系,将其保存为 TSV 文件,导入 Cytoscape 中构建蛋白互作网络。degree = 111 的蛋白激酶 B1 (Akt1), degree = 86 的血管内皮横生长因子 A (VEGFA), degree = 85 的 TP53, degree = 80 的肿瘤坏死因子 (TNF), degree = 74 的 PTGS2, degree = 73 的 MAPK8, degree = 71 的 STAT3, degree = 70 的 FOS, degree = 66 的 CASP3, degree = 64 的 CREB1 等靶蛋白与其他蛋白相互作用较强,度值大,在网络中

表 1 雷公藤成分筛选

Table 1 Screening of components of *Tripterygii Radix et Rhizoma*

Mol ID	化合物		OB/%	DL
	中文名称	英文名称		
MOL000296	常春藤皂苷元	hederagenin	36.91	0.75
MOL003182		(+)-medioresinol di-O-beta-D-glucopyranoside_qt	60.69	0.62
MOL003184	雷酚新内酯	81827-74-9 neotriptophenolide	45.42	0.53
MOL003185	雷酚萜醇	(1R, 4aR, 10aS)-5-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-7-isopropyl-8-methoxy-1,4a-dimethyl-4,9,10,10a-tetrahydro-3H-phenanthren-2-one (triptonoterpenol)	48.84	0.38
MOL003187	雷公藤甲素	triptolide	51.29	0.68
MOL003188	雷公藤氯内酯醇	tripchlorolide	78.72	0.72
MOL003189	雷公藤内酯甲	wiforlide A	35.66	0.72
MOL003192	雷公藤内酯酮 雷公藤羧内酯 雷藤酮	triptonide	67.66	0.70
MOL003196	雷酚内酯(山海棠素)	tryptophenolide	48.50	0.44
MOL003198		5alpha-benzoyl-4alpha-hydroxy-1beta,8alpha-dinicotinoyl-dihydro-agarofuran	35.26	0.72
MOL003199	5,8-二羟基-7-(4-羟基-5-甲基-香豆 粗-3-基)-香豆精	5,8-dihydroxy-7-(4-hydroxy-5-methylcoumarin-3yl)-coumarin	61.85	0.54
MOL003206	清艾菊素 A	canin	77.41	0.33
MOL003208	呋喃南蛇碱	celafurine	72.94	0.44
MOL003209	南蛇藤别桂皮酰胺碱	celalocinnine	83.47	0.59
MOL003210	滇南蛇藤碱	celapanine	30.18	0.82
MOL003211	南蛇藤黄素	celaxanthin	47.37	0.58
MOL003217	异黄腐醇	isoxanthohumol	56.81	0.39
MOL003222	藻纹苔酸 水杨嗉酸	salazinic acid	36.34	0.76
MOL003224	雷公藤内酯二醇	triptiotolnide	56.40	0.67
MOL003225	山海棠二萜内酯 A	hypodiolide A	76.13	0.49
MOL003229	雷公藤宁 B	triptinin B	34.73	0.32
MOL003231	雷公藤二萜酸 B	triptoditerpenic acid B	40.02	0.36
MOL003232	雷公藤弗定 B1	triptofordin B1	39.55	0.84
MOL003233	雷公藤弗定 B2	triptofordin B2	107.71	0.76
MOL003234	雷公藤弗定 C2	triptofordin C2	30.16	0.76
MOL003235	雷公藤弗定 D1	triptofordin D1	32.00	0.75
MOL003236	雷公藤弗定 D2	triptofordin D2	30.38	0.69
MOL003238	雷公藤弗定 F1	triptofordin F1	33.91	0.60
MOL003239	雷公藤弗定 F2	triptofordin F2	33.62	0.67
MOL003241	雷公藤弗定 F4	triptofordin F4	31.37	0.67
MOL003242	雷公藤弗定宁 A2	triptofordinine A2	30.78	0.47
MOL003244	雷公藤内酯酮	triptonide	68.45	0.68
MOL003245	雷酚二萜酸	triptonoditerpenic acid	42.56	0.39
MOL003248	雷酚萜甲醚	triptonoterpene	48.57	0.28
MOL003266	21-羟基-30-去甲基何帕烷-22-酮	21-hydroxy-30-norhopan-22-one	34.11	0.77
MOL003267	雷公藤碱己	wilformine	46.32	0.20

续表 1

Mol ID	化合物		OB/%	DL
	中文名称	英文名称		
MOL003278	大子五层龙酸	salaspermic acid	32.19	0.63
MOL003279	15-羟基雷公藤内酯醇	15-hydroxytriptolide	75.23	0.66
MOL003280	雷酚酮内酯	triptonolide	49.51	0.49
MOL000358	β -谷甾醇	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000211	丁子香酚	mairin	55.38	0.78
MOL00422	山柰酚	kaempferol	41.88	0.24
MOL00449	豆甾醇	stigmasterol	43.83	0.76
MOL002058	皮树脂醇	medioresinol	57.20	0.62
MOL003283	异落叶松脂素	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol(Isolariciresinol)	66.51	0.39
MOL004443	浙贝素	zhebeiresinol	58.72	0.19
MOL005828	蜜桔黄素	nobiletin	61.67	0.52
MOL007415		[(2S)-2- [(2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl] amino]-3-phenylpropyl acetate(N-benzoylphenylalanylphenylalinalin acetate)	58.02	0.52
MOL007535		(5S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,4,5,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,6-dione	33.12	0.79
MOL009386		3,3'-bis-(3,4-dihydro-4-hydroxy-6-methoxy)-2H-1-benzopyran	52.11	0.54
MOL011169	氧麦角甾醇	peroxyergosterol	44.39	0.82

发挥了关键作用。此外 ESR1, IL4, CXCR4, STAT1, PPARG, MAPK14 等蛋白节点的度值也比较强,结果见图 2。

2.5 雷公藤代谢通路和生物过程结果分析 使用 DAVID 6.7 平台对 209 个雷公藤候选药物潜在肾脏毒性作用靶点进行代谢通路和生物过程分析,最终得 1 053 条分析结果,其中有 55 条 KEGG 信号通路和 998 条 GO 生物过程分析。选取 $P < 0.05$ 的 KEGG 信号通路 44 条,见表 3, $P < 0.01$ 的 GO 生物过程分析 606 条,表 4 中仅显示按 P 值由小到大排序的前 30 条。

肾纤维化是各种原发性和继发性肾脏病进展到终末期肾衰(ESRD)的共同途径和主要病理学基础^[11]。MAPK 家族是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它的活性不仅受许多外源细胞生长、分化因子的诱导,而且也受到酪氨酸蛋白激酶及 G 蛋白/受体系统的调控。MAPK 通路是介导细胞反应的重要信号系统^[12]。p38 MAPK 信号通路介导了高糖诱导的肾小球系膜细胞 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达的改变,进而参与了糖尿病肾病的进展。MAPK 级联信号通路在体内一般也处于抑制状态,但当其受到膜

受体转换与传递的信号刺激,MAPK 可接收 MAPK 激酶(MKK)和 MKK 激酶(MKKK)的活化信号而被激活,表现为逐级磷酸化^[6]。MAPK 途径是所有 ERBB 受体下游的共同靶标,同时 MAPK 通路可通过 G 蛋白等分子与磷脂酰肌醇激酶(PI3K)通路相联通^[13]。

研究报道,JAK 信号转导和转录激活子 JAKs/STATs 信号途径除了参与 Ang II 介导的心血管效应,还参与肾脏局部 Ang II 水平增加所导致的肾功能损害^[14]。JAK 激酶一旦激活,即使其靶蛋白 STATs 磷酸化,快速转位到细胞核,结合到相关基因启动子的“调节单元”。JAKs/STATs 信号途径激活后直接诱导核内靶基因启动。

ERBB 信号通路,神经调节蛋白(NRG)在细胞的生存,迁移以及分化中扮演着重要的角色,其通过激活称为 ERBBs 蛋白的受体酪氨酸激酶(表皮生长因子受体的经典成员)进行一系列的信号转导。NRG1/ERBB 信号通路在神经发育,细胞增殖分化等生命过程中发挥着重要作用,与精神分裂症等神经发育异常所导致的疾病以及癌症,心力衰竭,心肌梗死等疾病的发生发展密切相关^[15]。

表 2 雷公藤候选毒性成分筛选

Table 2 Screening of candidate toxic components of *Tripterygii Radix et Rhizoma*

Mol ID	化合物		OB/%	DL
	中文名称	英文名称		
MOL000296	常春藤皂苷元	hederagenin	36.91	0.75
MOL003184	雷酚新内酯	neotriptophenolide	45.42	0.53
MOL003185	雷酚萜醇	(1R, 4aR, 10aS)-5-hydroxy-1-(hydroxymethyl)-7-isopropyl-8-methoxy-1,4a-dimethyl-4,9,10,10a-tetrahydro-3H-phenanthren-2-one (triptonoterpenol)	48.84	0.38
MOL003187	雷公藤甲素	triptolide	51.29	0.68
MOL003188	雷公藤氯内酯醇	tripchlorolide	78.72	0.72
MOL003189	雷公藤内酯甲	wiforlide A	35.66	0.72
MOL003192	雷公藤内酯酮	triptonide	67.66	0.70
MOL003196	雷酚内酯(山海棠素)	tryptophenolide	48.50	0.44
MOL003199	5,8-二羟基-7-(4-羟基-5-甲基-香豆粗-3-基)-香豆精	5,8-dihydroxy-7-(4-hydroxy-5-methylcoumarin-3-yl)-coumarin	61.85	0.54
MOL003206	清艾菊素	canin	77.41	0.33
MOL003211	南蛇藤黄素	celaxanthin	47.37	0.58
MOL003217	异黄腐醇	isoxanthohumol	56.81	0.39
MOL003222	水杨嗉酸	salazinic acid	36.34	0.76
MOL003225	山海棠二萜内酯 A	hypodiolide A	76.13	0.49
MOL003231	雷公藤二萜酸 B	triptoditerpenic acid B	40.02	0.36
MOL003244	雷公藤内酯酮	triptonide	68.45	0.68
MOL003245	雷酚二萜酸	triptonoditerpenic acid	42.56	0.39
MOL003278	大子五层龙酸	salaspermic acid	32.19	0.63
MOL003279	15-羟基雷公藤内酯醇	15-hydroxytriptolide	75.23	0.66
MOL003280	雷酚酮内酯	triptonolide	49.51	0.49
MOL000358	β -谷甾醇	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000211	丁子香萜	mairin	55.38	0.78
MOL00422	山柰酚	kaempferol	41.88	0.24
MOL00449	豆甾醇	stigmasterol	43.83	0.76
MOL002058	皮树脂醇	medioresinol	57.20	0.62
MOL003283	异落叶松脂素	(2R,3R,4S)-4-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)-7-methoxy-2,3-dimethylol-tetralin-6-ol (isolariciresinol)	66.51	0.39
MOL004443	浙贝素	zhebeiresinol	58.72	0.19
MOL005828	蜜桔黄素	nobiletin	61.67	0.52
MOL007415		[(2S)-2-[[[(2S)-2-(benzoylamino)-3-phenylpropanoyl]amino]-3-phenylpropyl]acetate (N-benzoylphenylalanylphenylalanyl acetate)	58.02	0.52
MOL007535		(5S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-17-[(1R,4R)-4-ethyl-1,5-dimethylhexyl]-10,13-dimethyl-2,4,5,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-3,6-dione (5 α -stigmastane-3,6-dione)	33.12	0.79
MOL011169	氧麦角甾醇	peroxyergosterol	44.39	0.82

过氧化物酶体增植物激活受体(PPARs)属于核受体家族成员,PPARs的作用与糖脂代谢、脂肪

形成、炎症及胰岛素敏感性等生物学功能紧密相关。PPARs有3种亚型,分别为PPAR α ,PPAR β 和

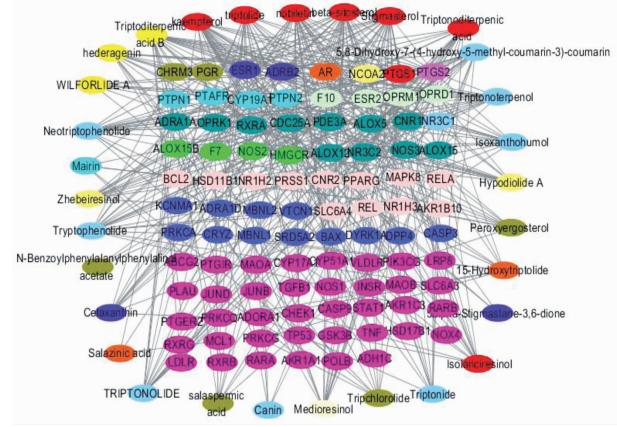


图 1 雷公藤毒性化合物-肾脏靶点网络
Fig.1 A network of toxic compounds-kidney target of Tripterygii Radix et Rhizoma

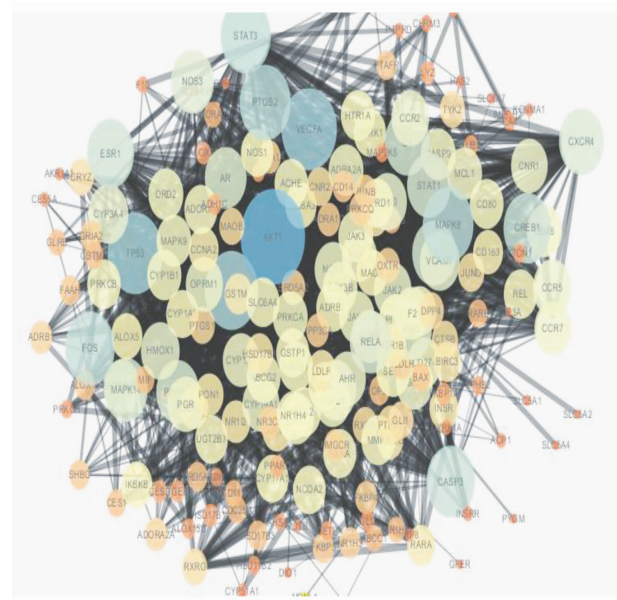


图 2 雷公藤肾脏靶点相互作用网络
Fig.2 Kidney target interaction network of Tripterygii Radix et Rhizoma

PPAR γ ^[16]。

由 GO 富集分析,可知潜在靶点参与调控细胞增殖,细胞凋亡,激素刺激反应,对类固醇、磷酸、氮化合物、核酸酶、核酸等大分子代谢过程的调控,生殖发育过程,磷酸化级联系统,RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控,G 蛋白信号-偶联到环核苷酸第二信使,转录的正调控,cyclic-nucleotide-mediated 信号,细胞内金属离子稳态,RNA 代谢过程的正向调控,氧水平反应,细胞离子体内平衡,蛋白质氨基酸磷酸化,细胞程序性死亡的正调控,细胞因子刺激反应,抗细胞凋亡,细胞化学体内平衡,应对缺氧,细胞死亡的正调控,细胞钙离子稳态,血液循环,金属离

表 3 雷公藤 KEGG 通路分析
Table 3 KEGG pathway analysis of Tripterygii Radix et Rhizoma

KEGG 通路	基因数/个	百分比/%	P
癌症	37	17.8	1.6×10^{-11}
甾类激素生物合成	15	7.2	5.8×10^{-11}
神经活性物质受体配体相互作用	27	13.0	8.1×10^{-8}
雄激素和雌激素代谢	10	4.8	1.5×10^{-6}
小细胞肺癌	14	6.7	1.8×10^{-6}
胰腺癌	13	6.2	2.0×10^{-6}
前列腺癌	14	6.7	3.5×10^{-6}
非小细胞肺癌	11	5.3	5.5×10^{-6}
脂肪细胞因子	12	5.8	6.3×10^{-6}
大肠癌	13	6.2	1.1×10^{-5}
Toll 样受体	14	6.7	1.4×10^{-5}
T 细胞受体	14	6.7	3.0×10^{-5}
肌萎缩侧索硬化	10	4.8	3.4×10^{-5}
细胞凋亡	12	5.8	8.0×10^{-5}
细胞色素 P450 对外源生物的代谢作用	10	4.8	9.5×10^{-5}
VEGF 信号通路	11	5.3	1.1×10^{-4}
钠重吸收信号通路	8	3.8	2.5×10^{-4}
钙信号通路	16	7.7	4.0×10^{-4}
药物代谢	9	4.3	6.7×10^{-4}
排斥反应	7	3.4	8.1×10^{-4}
Progesterone-mediated 卵母细胞成熟	10	4.8	1.5×10^{-3}
神经营养因子	12	5.8	1.7×10^{-3}
花生四烯酸代谢	8	3.8	1.8×10^{-3}
药物代谢	7	3.4	2.1×10^{-3}
趋化因子信号通路	15	7.2	2.2×10^{-3}
血管平滑肌收缩	11	5.3	2.7×10^{-3}
Fc ϵ RI 信号通路	9	4.3	3.0×10^{-3}
肠免疫网络产生免疫球蛋白(Ig)A	7	3.4	4.2×10^{-3}
MAPK 信号通路	18	8.7	4.3×10^{-3}
氮代谢	5	2.4	5.4×10^{-3}
B 细胞受体信号通路	8	3.8	9.1×10^{-3}
急性骨髓性白血病	7	3.4	9.5×10^{-3}
甲状腺癌	5	2.4	1.2×10^{-2}
类节点受体信号通路	7	3.4	1.3×10^{-2}
神经胶质瘤	7	3.4	1.4×10^{-2}
二型糖尿病	6	2.9	1.6×10^{-2}
ERBB 信号通路	8	3.8	2.0×10^{-2}
PPAR 信号通路	7	3.4	2.1×10^{-2}
JAK/STAT 信号通路	11	5.3	2.4×10^{-2}
胰岛素信号通路	10	4.8	2.7×10^{-2}
移植宿主反应	5	2.4	3.4×10^{-2}
色氨酸代谢	5	2.4	3.7×10^{-2}
一型糖尿病	5	2.4	4.3×10^{-2}

表 4 雷公藤 GO 生物过程分析

Table 4 Biological process analysis of Tripterygii Radix et Rhizoma

GO 生物过程	基因数/个	百分比/%	P
对有机物的反应	54	26.0	3.8×10^{-23}
调控细胞增殖	55	26.4	3.5×10^{-22}
内源性刺激反应	38	18.3	2.9×10^{-19}
细胞内的信号级联	64	30.8	6.6×10^{-19}
激素刺激反应	35	16.8	6.3×10^{-18}
受伤反应	41	19.7	7.9×10^{-18}
凋亡调控	49	23.6	3.3×10^{-17}
细胞程序性死亡的调控	49	23.6	4.8×10^{-17}
细胞死亡调控	49	23.6	5.6×10^{-17}
对类固醇激素刺激的反应	26	12.5	7.2×10^{-17}
大分子代谢过程的正向调控	49	23.6	5.1×10^{-16}
对有机循环物质的反应	21	10.1	1.1×10^{-15}
多细胞生物过程的正向调控	27	13.0	2.6×10^{-15}
类固醇代谢过程	25	12.0	2.8×10^{-15}
多细胞生物过程的负调控	23	11.1	3.2×10^{-15}
氮化合物代谢过程的正向调控	41	19.7	7.3×10^{-15}
肽激素刺激反应	22	10.6	1.0×10^{-14}
药物反应	25	12.0	1.3×10^{-14}
生物合成过程的正向调控	42	20.2	1.8×10^{-14}
内稳定过程	43	20.7	5.2×10^{-14}
细胞生物合成过程的正向调控	41	19.7	5.7×10^{-14}
行为	34	16.3	7.3×10^{-14}
正调控核酸酶、核苷、核苷酸和核酸的代谢过程	39	18.8	7.3×10^{-14}
系统过程调节	28	13.5	1.0×10^{-13}
氧化还原	39	18.8	1.5×10^{-13}
运输正调节	24	11.5	2.4×10^{-13}
高分子生物合成过程的正向调控	39	18.8	3.2×10^{-13}
炎症反应	28	13.5	3.4×10^{-13}
细胞凋亡负调控	29	13.9	4.0×10^{-13}
细胞增殖的正调控	31	14.9	5.3×10^{-13}

子运输的调节,催化活性的正向调节,细胞定位的监管,钙离子转运的负调控,核苷酸,环核苷酸,脂质生物合成过程的调控。调节细胞因子的产生,调节突触传递等。

2.6 分子对接结果分析 选取候选成分-靶点网络中发现的重要毒性成分山柰酚,雷公藤甲素,蜜桔黄素, β -谷甾醇和雷公藤二萜酸 B 这 5 个分子作为配体,选取候选成分-靶点中度值较高的蛋白 PTGS2, NCOA2, AR 以及蛋白互作网络中度值较高的蛋白 Akt1, VEGFA, TP53, TNF, MAPK8, STAT3 这 9 个蛋

白作为受体利用 Glide 进行分子对接。配体和受体的信息见表 5 和 6。

表 5 配体信息

Table 5 Ligand information

Mol ID	化合物		Glide ID
	中文名	英文名	
MOL003187	雷公藤甲素	triptolide	107985
MOL003231	雷公藤二萜酸 B	triptoditerpenic acid B	192373
MOL00422	山柰酚	kaempferol	5280863
MOL000358	β -谷甾醇	beta-sitosterol	222284
MOL005828	蜜桔黄素	nobiletin	72344

表 6 受体信息

Table 6 Receptor information

基因	Uniprot ID	PDB ID
PTGS2	P35354	5IKR
VEGFA	P15692	1MJV
TNF	P01375	2AZ5
TP53	P04637	1TSR
MAPK8	P45983	1UKI
STAT3	P40763	5U5S,5AX3
NCOA2	Q15596	1T63
AR	P10275	1E3G
AKT1	P31749	5KCV

分子对接结果表明山柰酚与各个蛋白结合的都很好,蜜桔黄素与 PTGS2, VEGFA, MAPK8, STAT3, AKT1;雷公藤二萜酸 B 与 TNF, TP53, MAPK8, AR;雷公藤甲素与 MAPK8, NCOA2; β -谷甾醇与 TNF 和 TP53 均有较好的结合。图 3,4 分别为雷公藤甲素与 MAPK8, NCOA2 的作用图,可通过氢键相结合。提示雷公藤可能通过作用 MAPK8 和 NCOA2 蛋白产生肾脏毒性,MAPK8 与对接的 4 个配体对接的效果均较好,提示其可能为雷公藤产生肾毒性的关键蛋白。

3 讨论

根据对雷公藤多种候选化合物进行数据筛选以及 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,可以得出的雷公藤致肾毒性的机制为雷公藤可通过诱导凋亡对肾产生损伤。舒斌等^[5]发现雷公藤甲素可使大鼠肾脏细胞中细胞色素 C(Cyt C)由线粒体转移入胞浆,从而激活细胞凋亡内源性通路,诱导细胞凋亡。SHU 等^[17]研究表明体外培养的 HK-2 细胞经

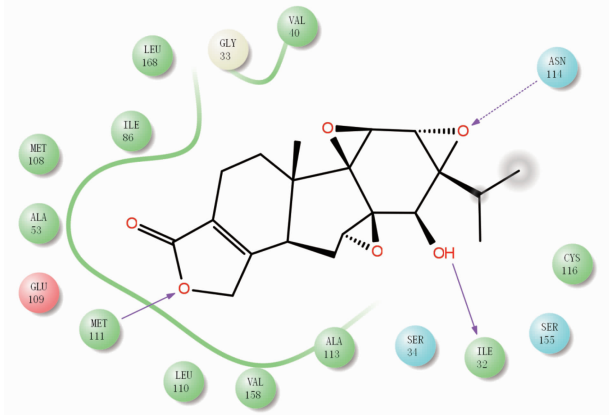


图 3 雷公藤甲素-有丝分裂原激活蛋白激酶 8 (PDBID-1UK1)
Fig. 3 Triptolide-MAPK8 (1UK1)

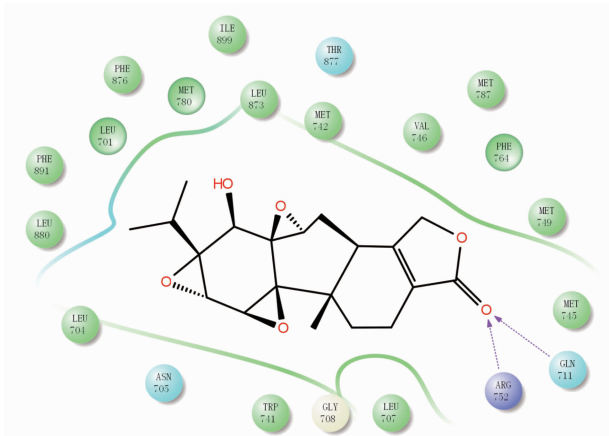


图 4 雷公藤甲素-细胞核受体共激活剂 2 (NCOA2) (PDB ID-1T63)
Fig. 4 Triptolide-NCOA2 (1T63)

TP 处理后其凋亡蛋白酶半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 被激活, 诱导凋亡, 并表现出剂量依赖性关系。杨帆^[18] 研究说明雷公藤可通过激活 Fas/FasL 介导的凋亡途径诱发肾小管上皮细胞凋亡。同时有研究表明由于近端肾小管是最常见的药物肾毒性损伤部位^[19]。雷公藤水提取物可使大鼠肾组织坏死广泛而严重, 会出现凋亡小体和条状坏死等现象^[20]。

雷公藤可能通过 MAPK 通路调节血管紧张素 II (Ang-II) 的表达而发挥毒性作用。Ang-II 是引起肾损伤的重要因子, 它可以对肾小球小动脉产生收缩作用, 还能够增加肾小球基底膜的通透性。肾脏血管的收缩可引起肾脏缺血缺氧, 而通透性增加会造成大分子物质从肾小球中滤出, 最终使尿量增加和产生蛋白尿, 从而发挥肾毒性作用, 此外, Ang-II 还可以通过诱导细胞凋亡以及介导多种炎症介质的表达, 参与到炎症引起的肾损伤过程中去^[21]。

雷公藤还可以通过 JAK/STAT 信号途径产生肾脏局部 Ang-II 水平增加所导致的肾功能损害。JAK/STAT 信号通路是介导肾脏炎症反应的一条主要的信号通路, 其中的 JAK2/STAT3 亚型是目前肾脏疾病中研究最广泛和深入的一种。高糖环境, Ang-II, 晚期糖基化终产物, 过氧化应激等均能激活 JAK2/STAT3 通路, 从而引起糖尿病肾脏疾病 (DKD) 肾组织炎症^[22]。

雷公藤可通过 VEGF 通路, 改变肾近曲小管的屏障功能, SUN 等^[4] 通过观察灌胃雷公藤甲素的 Wister 大鼠肾脏近曲小管的病理学改变, 发现近曲小管上皮细胞之间的紧密连接发生改变, 近曲小管上皮细胞彼此分开。

VEGFA 是维持肾小球毛细血管襻结构及肾小球滤过屏障 (GFB) 功能完整性的重要分子。VEGFA 与酪氨酸激酶受体 VEGFR-2 结合后可以通过一氧化氮依赖性通路激活腺苷酸环化酶和 cGMP, cGMP 可导致内皮通透性增加。研究表明血浆蛋白外渗可能是 VEGFA 介导内皮细胞迁徙的主要原因^[23]。离体实验中, 足细胞 VEGFA/VEGFR-2 的自分泌作用对维持足细胞生存起着十分关键的作用, 并且已经证实在慢性肾炎患者这种作用异常增强^[24-25]。

Toll 样蛋白受体 (TLRs) 是十分重要的天然免疫受体。人体共有 11 个 TLRs, 其中 TLR4 是研究最早和最多的, TLR4 在识别脂多糖 (LPS) 及介导炎症反应信号转导中起着十分重要作用, 并且它与 DN 肾损伤的关系也十分密切。研究证实 TLR4 在 DN 模型鼠肾组织中可以进行高表达。TLR4 介导的信号通路包括髓样分化因子 88 (MyD88) 依赖性途径和 MyD88 非依赖性途径。TLR4 与相应的配体结合后, 可启动快速的信号传递, 引起核转录因子- κ B (NF- κ B) 的活化或 I 型干扰素的产生, 从而引起下游炎症因子单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), TNF- α 等释放增加。研究表明 Ang-II 可以使体外培养的肾小球系膜细胞 TLR4 表达上调^[26]。

常立娟等^[7] 的研究表明雷公藤对肾脏的毒性作用机制可能与氨基酸代谢、磷脂代谢、儿茶酚胺类物质代谢等有关。血清中肾上腺素浓度的升高可能与氧化应激和缺血这 2 个跟肾损伤密切相关的因素有关, 这与生物过程分析中的信息相符合。

研究表明川乌, 草乌等肾毒性中药的肾损害作用可能是通过抑制肾脏有机阴离子转运体 Oat1, Oat2, Oat3 的功能而实现^[8]。川乌及草乌的活性成

分也是其毒性成分,主要为双酯型生物碱,为二萜类,与雷公藤的化学成分较为相似。同时在雷公藤的 KEGG 通路分析和 GO 富集分析中有 Aldosterone-regulated 钠重吸收,钙信号通路以及钙离子转运以及稳态的调节。可推测雷公藤的肾毒性机制可能与此相同。

本研究表明雷公藤可通过参与氨基酸代谢、磷脂代谢、儿茶酚胺类物质代谢,通过抑制肾脏有机阴离子转运体 Oat1, Oat2, Oat3 的功能,以及诱导细胞凋亡产生肾脏毒性,并参与了 MAPK 信号通路, JAK/STAT 信号通路, VEGF 信号通路, Toll 样受体信号通路, ERBB 信号通路, Fc ϵ RI 信号通路, PPAR 信号通路等对肾脏产生毒性,为雷公藤肾毒性机制的研究提供了新的依据和方法。

[参考文献]

[1] 张琴,欧阳林旗,胡炜航,等.基于“有故无殒”思想的雷公藤肾毒性研究[J].中国药业,2016,25(20):25-29.

[2] 唐利宇,孟楣,江莹,等.扶正制毒配伍降低雷公藤肾毒性研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(7):229-234.

[3] 李艳,项丽玲,郭晖,等.机体因素在中药毒性发生中的地位[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(6):189-195.

[4] SUN L, LI H, HUANG X, et al. Triptolide alters barrier function in renal proximal tubular cells in rats [J]. Toxicol Lett, 2013, 223(1):96-102.

[5] 舒斌,黄啸,张陆勇,等.雷公藤甲素亚急性中毒对 Wistar 大鼠的肾脏毒性作用[J].云南中医学院学报,2009,32(5):32-35.

[6] 黄陈招,朱彩凤,朱斌. MAPK 信号转导通路与肾纤维化[J].国际泌尿系统杂志,2008,28(6):829-833.

[7] 常立娟,李佐静,李清,等.雷公藤致大鼠肾毒性血清代谢组学分析[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(24):89-94.

[8] 孙晨.十八种中药对小鼠肾脏三种主要有机阴离子转运体及部分及部分 Cyps 的影响[D].广州:广州中医药大学,2014.

[9] 师帅,胡元会,吴华芹,等.“丹参-三七”药对作用机制的网络药理学探讨[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(18):192-197.

[10] 林昶,杨欣,朱璨,等.新疆红花挥发油 GC-MS 分析及药理作用的分子机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(23):104-111.

[11] 姚兰,李均.肾纤维化 MAPK 相关信号通路及中医药干预的研究进展[J].中华中医药杂志,2015,30(7):

2431-2433.

[12] 田鲁,罗鹏程,王港,等.辛伐他汀调控 DAC-PKC 及 MAPK 信号通路改善 2 型糖尿病肾病患者肾功能的研究[J].临床肾脏病杂志,2015,15(2):82-85.

[13] 梁旭,李雁,李昕.基于网络药理学原理的黄芪-金银花药对干预急性呼吸窘迫综合征的分子机制研究[J].天津中医药,2019,36(2):188-194.

[14] 陈明霞,刘建勋,武曲星,等.桂皮醛经 JAK2/STAT3 通路抑制 VEGF 诱导的内皮细胞增殖、迁移及成管[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(8):28-33.

[15] 郭汝金,敖丽娟,李咏梅,等.神经调节蛋白 1-ErbB 信号通路的研究进展[J].中国康复医学杂志,2014,29(7):679-684.

[16] 任凯强,薛莱,黄波,等. PPARs 信号通路在小鼠糖尿病肝病中的作用[J].中国病理生理杂志,2018,34(3):555-560.

[17] SHU B, DUAN W, YAO J, et al. Caspase 3 is involved in the apoptosis induced by triptolide in HK-2 cells [J]. Toxicol In Vitro, 2009, 23(4):598-602.

[18] 杨帆.雷公藤甲素急性肾毒性作用机制及抗氧化剂维生素 C 对肾脏的保护作用的研究[D].武汉:华中科技大学,2011.

[19] 王品.青藤碱对肝再生的影响及肾毒性的实验研究[D].兰州:兰州大学,2012.

[20] 孙淑萍,李胜利,张小平,等.雷公藤根提取物致大鼠肾毒性探究[J].通化师范学院学报,2017,38(10):18-22.

[21] 王加伟. MMP-9 通过 p38 MAPK 信号通路上调人脐静脉内皮细胞血管紧张素转换酶表达[D].广州:广东药科大学,2017.

[22] Brosius F C, He J C. Jak inhibition and progressive kidney disease [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015, 24(1):88-95.

[23] 吴霞,王忠震,林兵,等.雷公藤毒性作用机制研究进展[J].中国医院药学杂志,2015,35(16):1519-1523.

[24] GUAN F, Villegas G, Teichman J, et al. Autocrine VEGF-A system in podocytes regulates podocin and its interaction with CD2AP [J]. Am J Renal Physiol, 2006, 291(2):422-428.

[25] Hohenstein B, Collin M, Foellmer C, et al. Autocrine VEGF-VEGFR loop on podocytes during glomerulonephritis in humans [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(10):3170-3180.

[26] 张莉,王瑜,杜桂英,等. Toll 样受体 4 在糖尿病肾病患者肾组织中的表达及厄贝沙坦的干预作用[J].华中科技大学学报:医学版,2017,46(1):40-45.

[责任编辑 孙丛丛]