

基于网络毒理学探讨草乌心脏毒性

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:**通过建立草乌活性成分-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草乌心脏毒性的作用机制。**方法:**通过中药系统药理学数据库和分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology, TCMSP)和毒性与基因比较数据库(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)筛选出草乌有毒候选成分。依据反向药效团匹配(PharmMapper)方法预测草乌毒性候选成分的作用靶点,与从人类基因数据库(GeneCards)中寻找到的心脏相关基因蛋白进行比对,筛选出重合的蛋白作为草乌的潜在的的心脏毒性靶点。采用 Cytoscape 软件构建草乌毒性候选成分-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 平台对靶点生物功能及涉及的通路进行分析,最后用 Discover Studio 软件对关键蛋白与草乌毒性候选成分的结合进行验证。**结果:**草乌中筛选得到 6 种有毒候选成分,涉及 27 个心脏毒性作用靶点,网络分析结果表明靶点主要是通过参与心脏磷代谢,磷酸化的监管等磷相关的代谢和调节,以及通过 FKBP1A, TGFB2, INSR 等靶点对心脏的代谢,发育及形态产生重要的影响,进而产生心脏毒性。**结论:**利用中药多成分-多靶点-多通路的特点,探究了草乌心脏毒性作用机制,并预测了其可能存在的毒性,为进一步开展草乌心脏毒性作用机制研究提供了新思路和新方法。

[关键词] 网络毒理学; 草乌; 心脏毒性; 通路分析; 分子对接

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5;R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)19-0161-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191425

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190401.1552.010.html>

[网络出版时间] 2019-04-04 9:26

Cardiotoxicity of Aconiti Kusnezoffii Radix Based on Network Toxicology

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:** The mechanism of action of cardiac toxicity of Radix Aconiti Agrestis was explored by establishing the active components – targets network of Radix Aconiti Agrestis, protein interaction network, the biological function and pathway network of targets, and using molecular docking technology. **Methods:** The Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) database and the Comparative Toxicogenomics Database (CTD) were used to filtrate the toxic candidates of Radix Aconiti Agrestis. Predicting the functional targets of toxic candidates of Radix Aconiti Agrestis by PharmMapper and compared with the cardiac related gene proteins found in the human gene database (GeneCards), and the overlapping proteins were selected as potential cardiac toxicity targets of Radix Aconiti Agrestis. The Cytoscape software was used to construct the network between toxic candidate components and targets. The protein interaction network was mapped by the String database combined with Cytoscape software. The biological functions of the targets and the involved pathways were

[收稿日期] 20181021(009)

[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(20180550342,2014020077);辽宁省“百千万人才”资助项目(2013921041)

[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

analyzed with the DAVID platform. The binding of the key proteins with certain toxic candidate components of Radix Aconiti Agrestis was verified by Discover Studio software finally. **Results:** There were six candidates for toxic ingredients, which involving 27 cardiac toxicity targets. Network analysis results show that the targets were mainly by participating in the heart of phosphorus metabolism, regulation and other related phosphorus metabolism and regulation of phosphorylation and FKBP1A, TGF4- β_2 , INSR targets to have an important impact on the metabolism, development and form of the heart, and further to have cardiac toxicity. **Conclusion:** Based on the characteristics of the multi-component, multi-target and multi-pathway of traditional Chinese medicine, the mechanism of cardiac toxicity of Radix Aconiti Agrestis was explored and its possible toxicity was predicted, which provided a new idea and method for further research on the mechanism of cardiac toxicity of Radix Aconiti Agrestis.

[**Key words**] network toxicology; Aconiti Kusnezoffii Radix; cardiotoxicity; path analysis; molecular docking

草乌为毛茛科多年生草本植物北乌头的干燥块根。草乌的主要化学成分包括生物碱类化合物及多糖、挥发油等非生物碱类化合物。生物碱类化合物是草乌的活性成分及毒性成分。中乌头碱、次乌头碱、乌头碱等双酯类生物碱中是草乌的主要毒性成分^[1]。由于在临床使用时其治疗剂量和中毒剂量很接近,安全范围小,易发生中毒事件^[2]。草乌具有多种药理作用,主要有镇痛抗炎^[3],抗心率失常,强心抗休克等,在临床使用中常有神经,心血管系统毒性作用,胚胎毒性^[4]。对于乌头碱中毒,目前治疗上尚无特效解毒剂,仅能对证治疗。循环系统损害是急性乌头碱中毒最显著特点,而室性心律失常^[5]是最多见、最致命的危险因素和救治重点。目前,草乌心脏毒性主要机制为致心肌细胞线粒体能量代谢障碍,诱导心肌细胞凋亡,Na⁺通道异常致Na⁺内流等^[1]。草乌多成分、多靶点、多途径的作用特点,心脏中毒机制的深入研究较为困难。网络毒理学是指通过构建网络模型来描述研究对象的毒理学性质,通过对所建立网络模型因果关系分析,认识药物对机体的毒副作用并探讨其毒性机制等^[6]。网络毒理学为中药的毒理研究提供了全新的思路,通过构建网络模型来分析、预测中药的毒性成分,为进行有毒中药的毒性成分筛查、致毒机制及配伍禁忌研究提供了新的方法,为中药的实验研究与新药研发提供了理论依据,为提高中药的安全性和合理用药提供了新技术支持,也将进一步推进中药现代化的进程^[7]。心脏负责血液运行和输送气、营养物质及代谢产物,人体摄入的化学物质,多先经吸收入血,再由心血管系统运送到靶器官或靶组织进而发挥效用,心脏通常是最早与吸收物质接触的器官,研究药物是否具有心脏毒性以及作用机制对临床上安全合理用药有重要意义。因此将重点放在对草乌心

脏毒性的作用机制研究上是有依据可循的^[8]。本次研究首次运用了网络毒理学的方法,发现草乌可通过参与心脏发育(heart developme),心脏形态发育(heart morphogenesis)和磷的相关代谢过程对心脏产生毒副作用。

1 材料

中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmspsearch>); UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/uniprot/>); 毒性与基因比较数据库 CTD 数据库(<http://ctdbase.org/>); STRING 数据库(<https://string-db.org/>); DAVID 生物信息学资源(<https://david.ncifcrf.gov/>); 反向药效团匹配平台 pharmpmapper server; 人类基因数据库 GeneCards(<https://www.genecards.org/>); 蛋白质晶体结构数据库(Pharmaceutical DataBase, PDB, <https://www.rcsb.org/>); Discovery studio 3.0 软件; Cytoscape 3.6.1 软件(<http://www.Cytoscape.org>)。

2 方法

2.1 草乌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的化学成分,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 \geq 30%),类药性(DL \geq 0.18)的化合物^[9],并将这些化合物结构另存为 MOL2 格式的文件。

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,包括不同类型分子的毒理学数据以及来自各种生物体的毒理学数据等。

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,得出草乌中有毒的化合物成分。

2.2 草乌毒性化合物作用靶点预测 在 Pharm Mapper Server 中将从 CTD 数据库获得的草乌有毒化合物的二维结构的 MOL2 格式文件提交, 获取他们的潜在靶标候选物, 均按 fit score 由大到小排序, 分别筛选出每种化合物的前 100 个人类蛋白靶点, 去除重复的靶点, 整理出剩余的靶点, 利用 UniProt 数据库将这些靶蛋白转换成对应的基因名称。

2.3 心脏相关靶点的筛选 在 GeneCards 数据库中输入关键词“heart”, 收集和心脏相关的基因, 与上述 Pharm Mapper 服务器中返回的基因靶点进行匹配, 得到草乌有毒候选化合物的心脏毒性的潜在靶点。

2.4 候选化合物—心脏靶点网络构建 将候选化合物与草乌心脏毒性潜在靶点通过 Cytoscape 3.6.1 软件建立草乌成分—心脏靶点网络。化合物节点数 (degree) 表示化合物对应的预测心脏靶点的个数, 度值较大的化合物进行重点分析, 靶点的 degree 越大, 则这个靶点越有可能是化合物的关键作用靶点。

2.5 靶蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 为了更好地分析草乌心脏毒性靶点间的相互作用, 将草乌的心脏毒性的潜在靶点导入 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 generate style from statistics 工具中将靶点大小和颜色设置用于反映 degree 的大小, 边的粗细设置用于反映 combine score 的大小, 从而获得最终的蛋白互作网络。

2.6 代谢通路和生物过程分析 为了进一步研究草乌心脏毒性靶点群的协同作用情况, 采用 DAVID6.7 平台进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 富集分析和京都基因和基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析, 进行相关文献的查阅^[10-15], 得出草乌作用于心脏的毒理作用并进行通路和原理分析。

2.7 分子对接 采用 Discover Studio 3.0 中的 CDOCKER 模块进行分子对接研究。本次分子对接的目的是为了验证通过网络分析筛选出的一些关键蛋白与候选化合物的结合程度, 即对网络分析的可靠性的验证。将 6 个候选化合物 (表 2) 均作为配体, 保存为 MOL2 格式, 在候选化合物—心脏靶点网络中, 靶点 degree 越高, 说明该靶点被候选化合物作用的可能性越大, 选择节点度最高的 8 个蛋白 (GSTA1, METAP2, F2, FKBP1A, CHEK1, MAOB,

TTR, REN), PPI 靶蛋白互作网络中起关键作用的 F2, CTSB, REN 3 个基因靶蛋白, 以及在生物过程分析中参与与有关心脏途径的蛋白 (FKBP1A, INSR, TGFB2) 和 KEGG 药物代谢通路涉及的的心脏靶蛋白 (GSTA1, MAOB, CYP2C8) 为受体, 去重后, 共 12 个受体蛋白。在 PDB 网站下载其 pdb 格式文件保存, 导入 DS 中进行分子对接。

3 结果

3.1 草乌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 TCMS 数据库中获取草乌目前已知成分 27 种, 根据口服生物利用度和类药性分析筛选出具有良好的 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 的化合物 8 种, 见表 1。CTD 数据库中获取 6 种草乌化合物毒性相关信息见表 2。

表 1 草乌成分筛选

Table 1 Screening results of components of Aconiti Kusnezoffii Radix

成分	OB/%	DL
karakoline	51.73	0.73
3-deoxyaconitine	30.96	0.24
3-acetylaconitine	37.05	0.20
crassicauline A	34.13	0.21
yunaconitine	33.56	0.20
napelline	34.48	0.72
izoteolin	39.53	0.51
hyaconitine	31.39	0.26

表 2 草乌候选毒性成分筛选

Table 2 Screening results of candidate toxic components of Aconiti Kusnezoffii Radix

MOL 号	成分名称	CAS 登记号	MeSH® 号
MOL004757	yunaconitine	70578-24-4	C069835
MOL004759	napelline	5008-52-6	C109326
MOL004763	izoteolin	95508-61-5	C044170
MOL000538	hyaconitine	6900-87-4	C058309
MOL004756	crassicauline A	79592-91-9	C576643
MOL004749	3-acetylaconitine	77181-26-1	C031321

3.2 候选化合物心脏靶点预测与筛选 Pharm Mapper 服务器的药效团数据是从 Target Bank, Drug Bank, Binding DB 和 PDTD 的所有目标中提取的, 存储了超过 7 000 基于受体的药效团模型 (涵盖 1 627 药物靶标信息, 其中 459 是人类蛋白质靶标)。本次从 Pharm Mapper 数据库得到 181 个人类蛋白质

靶标,利用 UniProt 数据库将靶蛋白转换成对应的基因名称后,与从 Genecards 中获取的人类心脏相关基因进行比对,筛选得到 27 种草乌心脏毒性的潜在靶点。

3.3 候选化合物—心脏靶点网络分析 图 1 为候选化合物—心脏靶点网络,其中包含了 33 个节点,97 条边。节点代表候选化合物或潜在心脏靶点(黄色椭圆节点表示候选化合物,红色和蓝色矩形节点均为潜在心脏靶点)边代表化合物和潜在心脏靶点间的相互关系。F2, REN, GSTA1 等红色节点与 6 个候选化合物均有联系,较为重要。

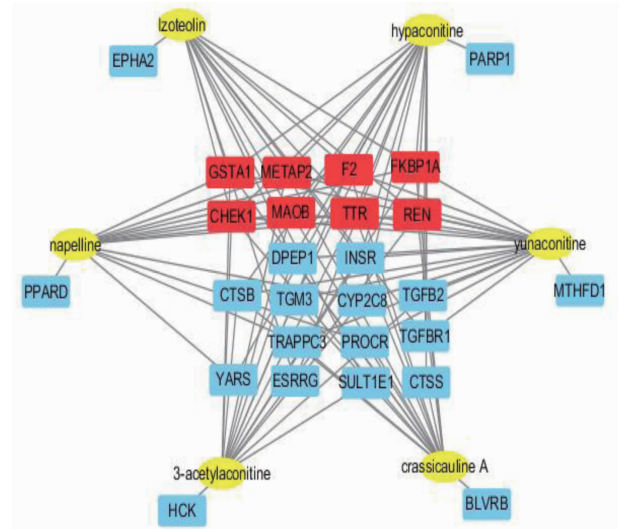


图 1 草乌毒性化合物-心脏靶点网络
Fig.1 Network of toxic compounds-cardiac targets

3.4 靶点 PPI 网络分析 将筛选出的草乌的 27 个心脏毒性潜在靶点导入 String 数据库中,获得蛋白相互作用关系(MAOB, TGM3, BLVRB, DPEP1, SULT1E1, TRAPPC3, ESRRG 7 个蛋白未参与蛋白互作),导入 Cytoscape 中构建蛋白互作网络(图 2),图 2 共涉及 20 个节点,23 条边。节点越大对应的 degree 越大,节点颜色由红变蓝对应的 degree 越大。边越粗,combine score 越大。degree = 6 的 F2, degree = 5 的 CTSB, degree = 4 的 REN 等靶蛋白与其他蛋白相互作用较强,度值大,在网络中发挥了关键作用。

3.5 草乌代谢通路和生物过程结果分析 使用 DAVID6.7 平台对 27 个草乌候选药物潜在心脏毒性作用靶点进行代谢通路和生物过程分析,筛选出 $P < 0.01$ [16] 的 GO 富集分析,对仅有的一条 kegg 通路进行分析。由 GO 富集分析结果见表 3,可知潜在靶点参与磷代谢、磷酸化、蛋白质修饰和代谢的调

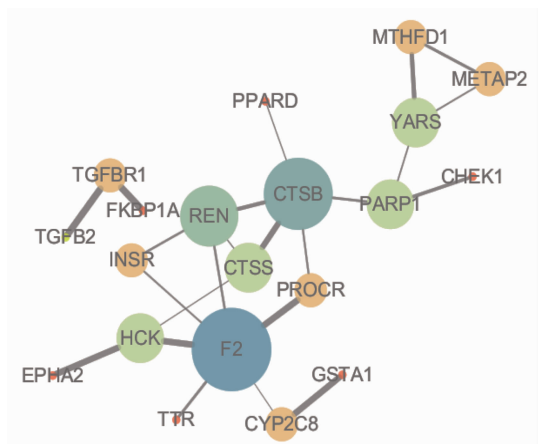


图 2 草乌心脏靶点相互作用网络
Fig. 2 Cardiac targets interaction network of Aconiti Kusnezoffii Radix

节,刺激反应,同时与心脏的发育和形态改变有着紧密的联系,形态改变会影响到心脏功能的变化,可能会对心脏产生了毒性。heart development 和 heart morphogenesis 过程中涉及到的蛋白为 FKBP1A, TGFB2, INSR 等。

肽基脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A, FKBP1A)可以调控 RYR1 钙离子通道,研究表明心肌细胞肌浆网膜上有 2 种钙释放通道 ryanodine 受体(RyR)通道和三磷酸肌醇受体(inositoltriphosphatereceptor, IP3R)通道^[17]。因 RyR 的密度明显高于 IP3R,故在调节心脏兴奋收缩偶联起关键作用,是调控胞浆钙离子浓度的重要蛋白。RyR 通道的过度磷酸化使 Ca^{2+} 舒张期外漏,反而导致心肌细胞内钙池舒张期 Ca^{2+} 耗竭,最终引起心力衰竭和心房颤动。

胰岛素抵抗是心衰发生的独立危险因素;另一方面,心衰患者也较普遍存在胰岛素抵抗,且有胰岛素抵抗的心衰患者预后更差。心肌胰岛素信号在缺血心脏保护及延缓心衰发生发展中具有重要作用^[12]。

转化生长因子- β_2 (transforming growth factor- β_2 , TGF- β_2)是高度保守的 TGF 超家族成员之一,具多种生物学作用。RXRA 基因敲除小鼠中 TGF- β_2 基因表达升高,心肌细胞凋亡增加,从而导致胚胎心脏流出道发育异常,推测 TGF- β_2 基因可能是圆锥动脉干畸形的致病易感基因。目前也有研究认为 TGF- β_2 不仅参与心脏内皮间充质的转化,也是诱导神经嵴细胞由心脏流出道迁移的趋化因子^[10]。

KEGG 药物代谢通路涉及 3 个心脏靶蛋白为

表 3 草乌 GO 生物过程分析

Table 3 Biological process analysis of Aconiti Kusnezoffii Radix

GO 生物过程	基因数目	百分比	P
regulation of protein kinase cascade	6	22.2	8.0×10^{-5}
positive regulation of protein kinase cascade	5	18.5	2.3×10^{-4}
protein amino acid phosphorylation	7	25.9	1.1×10^{-3}
protein maturation	4	14.8	1.4×10^{-3}
regulation of phosphorylation	6	22.2	1.4×10^{-3}
regulation of phosphorus metabolic process	6	22.2	1.7×10^{-3}
regulation of phosphate metabolic process	6	22.2	1.7×10^{-3}
positive regulation of signal transduction	5	18.5	2.0×10^{-3}
molting cycle process	3	11.1	2.7×10^{-3}
hair cycle process	3	11.1	2.7×10^{-3}
hair follicle development	3	11.1	2.7×10^{-3}
phosphorylation	7	25.9	2.8×10^{-3}
hair cycle	3	11.1	2.8×10^{-3}
molting cycle	3	11.1	2.8×10^{-3}
positive regulation of cell communication	5	18.5	2.9×10^{-3}
enzyme linked receptor protein signaling pathway	5	18.5	3.3×10^{-3}
regulation of protein amino acid phosphorylation	4	14.8	3.8×10^{-3}
response to hormone stimulus	5	18.5	4.3×10^{-3}
positive regulation of protein modification process	4	14.8	4.8×10^{-3}
wound healing	4	14.8	5.1×10^{-3}
response to endogenous stimulus	5	18.5	6.1×10^{-3}
heart development	4	14.8	7.0×10^{-3}
negative regulation of phosphatase activity	2	7.4	7.4×10^{-3}
phosphate metabolic process	7	25.9	7.4×10^{-3}
phosphorus metabolic process	7	25.9	7.4×10^{-3}
positive regulation of transport	4	14.8	7.8×10^{-3}
heart morphogenesis	3	11.1	8.0×10^{-3}
positive regulation of cellular protein metabolic process	4	14.8	8.8×10^{-3}
response to organic substance	6	22.2	9.0×10^{-3}
positive regulation of growth	3	11.1	9.5×10^{-3}
positive regulation of protein metabolic process	4	14.8	9.8×10^{-3}

GSTA1, MAOB, CYP2C8。其中 GSTA1, MAOB 蛋白是候选化合物—心脏靶点网络中度值最高的节点。谷胱甘肽 S-转移酶 A₁ (glutathione S-transferase A₁, GSTA₁) 主要与肝脏代谢有关; 含黄素胺氧化酶 B (flavin-containing amine oxidase B, MAOB) 为催化单胺氧化脱氨反应的酶, 作用于一级胺及其甲基化的

二、三级胺, 也作用于长链的二胺; 细胞色素 P450 2c8 (cytochrome P450 2C8, CYP2C8) 是 CYP2C 家族的重要成员之一, 参与催化约 5% 临床用药以及甾体、花生四烯酸等内源性化合物的代谢。CYP2C8 与其他种类的 CYP450 酶等共同调控乌头生物碱体内过程^[15]。

3.6 分子对接结果分析 分子对接就是把配体分子放在受体活性位点的位置, 然后按照几何互补, 能量互补和化学环境互补的原则来实时评价配体和受体相互作用的, 并找他们的最佳结合模式。选取草乌 12 个靶蛋白作为受体的信息见表 4。将对接的结果导出, 整理结果见表 5。-CDOCKER_ENERGY 值越高, 对接的结果越好。由表 5 中的值可知配体分子 izoteolin 与各个靶蛋白的对接的值均为正值, 对接效果好。候选毒性药物-靶点中节点度值最高的 2 个蛋白 F2 和 MAOB 分别与 izoteolin 对接的图, 见图 3, 4。izoteolin 与 F2 对接效果好最主要的原因是有 4 个氢键相互作用。izoteolin 与 MAOB 有 2 个氢键作用, 此外芳香环上有疏水和 π 相互作用, 对接效果好。

表 4 分子对接受体信息

Table 4 Molecular docking receptor information

蛋白	UniProt ID	基因
prothrombin	P00734	F2
glutathione s-transferase A ₁	P08263	GSTA ₁
methionine aminopeptidase 2	P50579	METAP2
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	P62942	FKBP1A
serine/threonine-protein kinase Chk1	O14757	CHEK1
amine oxidase [flavin-containing] B	P27338	MAOB
transthyretin	P02766	TTR
renin	P00797	REN
cathepsin B	P07858	CTSB
cytochrome P450	P10632	CYP2C8
insulin receptor	P06213	INSR
transforming growth factor beta-2 proprotein	P61812	TGFB2

4 讨论

研究表明生物碱类化合物是草乌的活性成分及毒性成分, 其中中乌头碱、次乌头碱、乌头碱等双酯类生物碱中是草乌的主要毒性成分^[1]。心脏毒性是其毒性表现之一。其主要机制为致心肌细胞线粒体能量代谢障碍, 诱导心肌细胞凋亡, Na⁺ 通道异常致 Na⁺ 内流等。

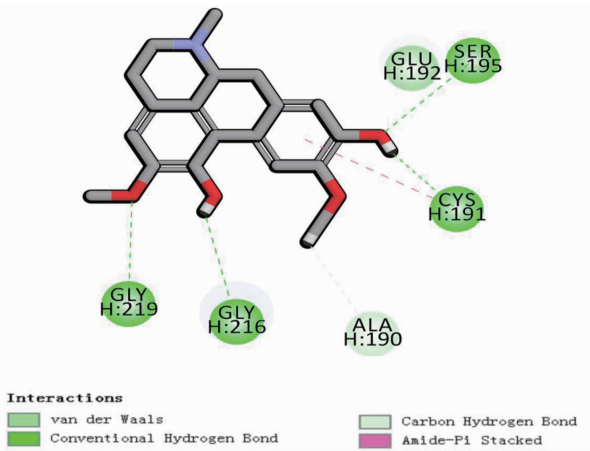


图 3 Izoteolin 对接 F2 (1A2C)

Fig. 3 Izoteolin-F2 (1A2C)

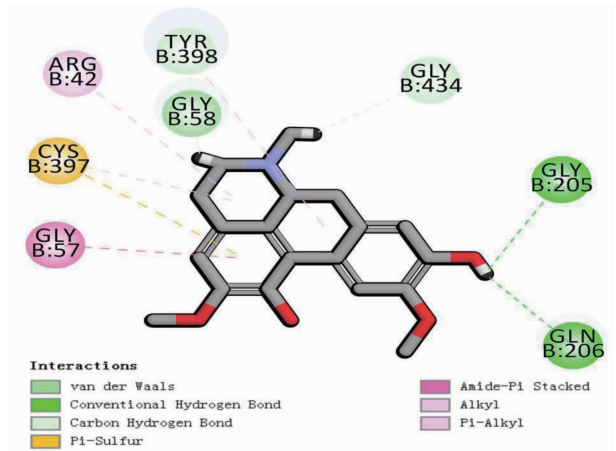


图 4 Izoteolin 对接 MAOB (1S2Q)

Fig. 4 Izoteolin-MAOB (1S2Q)

表 5 草乌候选毒性化合物分子对接

Table 5 Molecular docking of candidate toxic compounds of Aconiti Kusnezoffii Radix

基因	蛋白	pdb 编号	配体	- CDOCKER_ENERGY
F2	prothrombin	1A2C	MOL000538	- 61.524 8
			MOL004749	- 64.229 6
			MOL004756	- 70.860 8
			MOL004757	- 76.091 1
			MOL004759	- 112.483
			MOL004763	14.343 1
METAP2	methionine aminopeptidase 2	1B6A	MOL000538	- 85.427 9
			MOL004749	- 84.597 6
			MOL004756	- 78.011 8
			MOL004757	- 90.252
			MOL004759	- 109.448
			MOL004763	16.421
GSTA1	glutathione S-transferase A1	1GSE	MOL004763	9.441 57
MAOB	amine oxidase [flavin-containing]B	1S2Q	MOL004763	20.747
CHEK1	serine/threonine-protein kinase Chk1	2YDJ	MOL004759	- 117.659
			MOL004763	22.501 8
FKBP1A	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A	1J4R	MOL000538	- 74.295 4
			MOL004749	- 68.962
			MOL004756	- 76.043 1
			MOL004757	- 79.151 2
			MOL004759	- 113.944
			MOL004763	5.654 88

续表 5

基因	蛋白	pdb 编号	配体	- CDOCKER_ENERGY
TTR	Transthyretin	4N86	MOL000538	- 85.477 5
			MOL004749	- 79.056
			MOL004756	- 85.246 7
			MOL004757	- 84.060 9
			MOL004759	- 119.85
			MOL004763	0.544 362
REN	renin	1BIL(chainA)	MOL000538	- 66.082 4
			MOL004749	- 57.990 7
			MOL004756	- 88.891 8
			MOL004757	- 71.990 4
			MOL004759	- 100.028
			MOL004763	18.321 6
CTSB	cathepsin B	1CSB	MOL004759	- 105.195
			MOL004763	11.802 4
REN	renin	1BIL(chainB)	MOL000538	- 72.575 9
			MOL004749	- 130.348
			MOL004756	- 101.512
			MOL004757	- 81.463 2
			MOL004759	- 110.952
			MOL004763	18.130 7
CYP2C8	cytochrome P450	2NNH	MOL000538	- 60.313 3
			MOL004749	- 53.366 3
			MOL004756	- 62.655 4
			MOL004757	- 60.575 7
			MOL004759	- 104.251
			MOL004763	15.294 6
INSR	insulin receptor	1GAG	MOL000538	- 84.419 2
			MOL004749	- 68.743 3
			MOL004756	- 89.203 2
			MOL004757	- 87.947 7
			MOL004759	- 102.791
			MOL004763	20.301 5
			3W11(1)	MOL000538
		MOL004749		- 79.690 6
		MOL004756		- 83.582 5
		MOL004757		- 87.016 9
		MOL004759		- 118.743
		MOL004763		1.200 58
		3W11(2)		MOL000538
			MOL004749	- 80.225 8
MOL004756	- 92.726 4			
MOL004757	- 91.614 8			
MOL004759	- 116.606			
MOL004763	1.341			

续表 5

基因	蛋白	pdb 编号	配体	- CDOCKER_ENERGY
		3W11(3)	MOL000538	-77.449 6
			MOL004749	-69.337 1
			MOL004756	-81.4
			MOL004757	-86.969 9
			MOL004759	-113.74
			MOL004763	6.984 87
		3W11(4)	MOL000538	-78.743 4
			MOL004749	-74.227 7
			MOL004756	-79.000 5
			MOL004757	-86.830 7
			MOL004759	-116.744
			MOL004763	5.435 18

本研究在有毒成分靶点预测和筛选后,构建有毒成分和心脏相关靶点网络,得到 F2, CTSB, MAOB, CHEK1 等节点度值较高的靶点蛋白,作为草乌作用的主要靶标。PPI 网络分析得 F2, CTSB, REN 作为网路中的关键蛋白,分子对接结果证实这些关键蛋白与有毒成分对接良好。草乌的 GO 富集分析表明,草乌毒性成分会作用于 heart development 和 heart morphogenesis 过程,可预测草乌会影响到心脏的发育和形态改变。文献中可知,高剂量的生草乌可致胚胎毒性,可诱发卵黄囊生长和血管分化不良、生长迟缓及形态分化异常,严重者出现体节紊乱、小头、心脏发育迟滞(心小,停留在心管期)及心脏空泡等^[18]。生物过程 heart development 和 heart morphogenesis 过程中涉及到 TGF- β_2 可以促进心肌细胞 H9C2 的分裂与增殖^[19],差异性表达与心脏圆锥动脉干畸形临床表型的多态性密切相关^[20], RXRA 基因敲除小鼠中 TGF- β_2 基因表达升高,心肌细胞凋亡增加,从而导致胚胎心脏流出道发育异常^[10]。这与研究中表明草乌可通过对心肌细胞凋亡进行调控,产生强烈的心脏毒性作用的内容相符^[8]。生物过程 heart deveiopment 和 heart morphogenesis 过程中涉及到的蛋白 INSR 对于缺血心脏保护及延缓心衰发生发展中具有重要作用^[12]。肽基脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP1A, FKBP1A)可以通过调控心肌细胞肌浆网膜上 RYR1 钙离子通道,从而调控胞浆钙离子浓度,调节心脏兴奋收缩偶联。同时 GO 富集分析表明草乌可通过参与磷代谢,磷酸化的监管等关于磷的代谢和调节过程。推测草乌对于心脏急性

中毒机制可能是通过作用于 FKBP1A 调控 RYR 钙离子通道,使得细胞内钙离子浓度升高,心肌细胞内钙超负荷,产生严重心率失常。钙离子浓度的异常必然会引引起细胞内钠离子浓度的异常,同时草乌可通过上调 TGF- β_2 基因,使得心肌细胞凋亡增加,或通过磷酸化调节使 RYR 通道过度磷酸化, Ca²⁺ 舒张期外漏,导致心肌细胞内钙池舒张期 Ca²⁺ 耗竭,最终引起心力衰竭和心率失常。

同时在候选化合物—心脏靶点网络以及 PPI 蛋白网络中都重要的肾素 REN^[21],组织蛋白酶 CTSB^[22],凝血酶 F₂^[23]对于草乌导致心脏毒性的研究有一定的参考作用。肾素—血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)是人体重要的循环调节系统,通过对心脏,血管和肾脏的调节以维持机体生理功能的平衡。组织蛋白酶 CTSB 可通过对细胞凋亡的调节来参与对心脏的调节。

上述表明,草乌对心脏的毒性作用是通过多组分,多靶点,多途径产生的。同时通过分子对接过程对关键蛋白 F₂, MAOB 与有毒成分 izoteolin 的结合进行了验证,证明了结果的准确性。

本研究首次运用网络毒理学的方法报道草乌的心脏毒性可能作用机制和途径,对于以后草乌的研究有一定的参考意义。

[参考文献]

[1] 田玥.草乌的毒性研究现状[J].医学信息,2015,28(1):371-371.
[2] 段斌.草乌中毒患者的急救探讨[J].中国医疗前沿,2009,4(19):31,33.

- [3] Kim S C, HA Y R, Kim Y S, et al. An outbreak of Caowu-intoxication after drinking home-brewed alcohol [J]. *Ko Mcl*, 2008, 19(3):339-345.
- [4] XIAO K, YAN G Y, WANG L, et al. Toxicity of Caowu on *in vitro* cultured rat embryos[J]. *J Sichuan Univer; Med Sci Edit*, 2008, 39(3):441.
- [5] CHAN T Y, Tomlinson B, Tse L K, et al. Aconitine poisoning due to Chinese herbal medicines: a review. [J]. *Vet Hum Toxicol*, 1994, 36(5):452-455.
- [6] 范晓辉,赵筱萍,金焯成,等.论建立网络毒理学及中药网络毒理学研究思路[J].*中国中药杂志*,2011,36(21):2920-2922.
- [7] 刘睿,李新宇,李亚卓,等.网络毒理学及其在中药毒性成分预测中的应用研究[J].*药物评价研究*,2018,41(5):709-715.
- [8] 张舒涵,李晋奇.乌头碱心脏毒性作用机制的研究进展[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2018,16(10):1366-1370.
- [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] 程菲,姜红堃. TBX1 基因可能通过调控 TGF- β_2 基因的表达参与心脏发育及先天性心脏病的发生[J].*中国中西医结合儿科学*,2018,10(1):36-39.
- [11] 豆亚伟. 儿童围心脏手术期强化胰岛素治疗的方法及机制研究[D]. 西安:第四军医大学, 2008.
- [12] 付锋. 缺血后心肌胰岛素抵抗促发缺血性心力衰竭及其机制[D]. 西安:第四军医大学, 2015.
- [13] 刘鑫馗,吴嘉瑞,张丹,等.基于网络药理学的附子-干姜药对治疗心力衰竭的作用机制分析[J].*中国实验方剂学杂志*,2017,23(21):212-219.
- [14] 吴秀君,郭涛.细胞色素 P450 2C8 基因多态性及其对药物代谢影响的研究进展[J].*中国临床药理学杂志*, 2013, 29(3):234-237.
- [15] 杨晓珊. CYP450 酶与 BCRP、MRP2 外排转运蛋白对单酯型及醇胺型乌头生物碱处置的作用和机制[D]. 广州:南方医科大学, 2014.
- [16] 杨欣,李亚辉,钱海兵,等.基于网络药理学及分子对接分析熊果酸抗炎风湿性关节炎的分子机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(18):207-214.
- [17] 陆彤,蒋彬.心肌细胞钙离子通道[J].*中国心脏起搏与心电生理杂志*,2008,22(6):477-482.
- [18] 肖凯,王莉,刘玉清,等.草乌的体外胚胎发育毒性研究[J].*毒理学杂志*,2007,21(4):317.
- [19] 王文文,田杰,郑敏,等. TGF- β_2 对心肌细胞 H9C2 转录因子表达的影响及其组蛋白 H3 乙酰化调控机制[J].*第三军医大学学报*,2013,35(7):639-643.
- [20] 邓建英.圆锥动脉干畸形与视黄酸信号传导通路关系的研究进展[J].*国际儿科学杂志*,2014,41(1):29-32.
- [21] 杨俊平,方五旺.血管紧张素转换酶 2 与心血管疾病[J].*安徽医药*,2013,17(5):861-863.
- [22] 林琳,李阳,刘云奇,等. CTSB 对人脐静脉血管内皮细胞系增殖及凋亡的影响[J].*现代生物医学进展*, 2016,16(4):611-615.
- [23] 李建良,梁慧,蔡淑珍,等.基于网络药理学探讨蒙药诃子解草乌心脏毒的机制研究[J].*药学报*,2018,53(10):1670-1679.

[责任编辑 张丰丰]