红曲桔霉素致毒机理的网络药理学分析

唐光甫， 桂艳玲， 满海乔， 刘 畅， 赵杰宏*

（贵州中医药大学 贵州省生药学重点实验室，贵州 贵阳 550025）

摘要：为探讨红曲中桔霉素导致毒性的内在机理，通过搜索 Swiss Target Prediction、Similarity ensemble approach、Comparative Toxicogenomics Database 和 GeneCards 数据库，利用 Metascape、Kobas 3.0、Cytoscape 3.7.2 和 AutoDock 软件，开展了网络药理学分析。结果显示，通过筛选去重获得桔霉素与“liver toxicity”和“kidney toxicity”相关的潜在靶点 110 个，GO 富集分析功能条目 496 条，其中涉及分子功能、生物过程和细胞组成的条目分别为 97、354 和 45 条。KEGG 信号通路富集靶点数和显著性均较高的是肿瘤 MicroRNA 通路、肿瘤通路、乙型肝炎等通路。桔霉素可能通过 TP53、CASP3、MAPK3 和 ALB 等关键靶点导致肝肾毒性。分子对接实验证明，桔霉素与靶点可以结合，揭示了桔霉素导致肝肾毒性的潜在作用靶点和信号通路，为进一步研究桔霉素致毒机理和健康防护提供理论参考。

关键词：红曲霉；网络药理学；桔霉素；潜在靶点；肝肾毒性；分子对接

中图分类号：R 285；R 994.4 **文章编号：**1673-1689(2023)02-0090-07 **DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2023.02.013

Toxicity Mechanism of Citrinin in *Monascus* Analyzed by Network Pharmacology

TANG Guangfu， *GUI Yanling*， *MAN Haiqiao*， *LIU Chang*， *ZHAO Jiehong**

(Key Lab of Pharmacognostics of Guizhou Province, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

Abstract: In order to explore the mechanism of toxicity induced by citrinin in *Monascus*, the databases of Swiss Target Prediction, Similarity ensemble approach, Comparative Toxicogenomics Database and GeneCards were searched, and the software of Metascape, Kobas 3.0, Cytoscape 3.7.2 and AutoDock were employed for network pharmacology analysis. The results showed that a total of 110 potential targets, which showed the relationship between citrinin and liver toxicity as well as kidney toxicity, were achieved after filter and deduplication. There were 496 items enriched by GO analysis, including 97 molecular function, 354 biological process and 45 cell composition. The KEGG signal pathways with more enriched targets and higher significance mainly included MicroRNAs in cancer, Patyways in cancer, Hepatitis B and so on. Citrinin might induce hepatorenal toxicity through targets of TP53, CASP3, MAPK3 and ALB, and the molecular docking experiments showed that citrinin could bind to these targets. The potential targets and related signal pathways of

收稿日期：2021-08-01

基金项目：贵州省科技支撑计划项目(黔科合支撑[2019]2776 号)。

* **通信作者：**赵杰宏(1978—)，男，博士，教授，硕士研究生导师，主要从事药用微生物方面的研究。E-mail：105798711@qq.com

citrinin-induced hepatorenal toxicity were revealed, providing theoretical reference for further study on the mechanism of citrinin-induced toxicity and health protection.

Keywords: *Monascus*, network pharmacology, citrinin, potential target, liver and kidney toxicity, molecular docking

红曲是我国传统药食两用丝状真菌红曲霉(*Monascus* sp.)的特色发酵产物,距今已有上千年的生产及应用历史[1]。近年来,随着人们生活水平的提高和科技的逐步发展,红曲中的有效成分已被广泛应用,例如红曲中的红曲色素、麦角甾醇和洛伐他汀等许多有效成分被用于食品、保健品、医药、化妆品等行业。红曲中的洛伐他汀类物质和安卡黄素有抗癌作用,还能降低血脂水平,预防急性髓系白血病和神经系统疾病[2]。红曲色素还是应用广泛的食品着色剂。但是,自从 Blanc 等报道红曲菌株能够生产对人体有害的桔霉素以来[3],红曲霉及其制品的安全问题一直备受关注,这也给红曲产品的国内安全生产及国外输出带来了严峻的挑战。据报道,桔霉素对人体肾脏有毒性,会导致肾脏肿大等[4]。但至今对桔霉素致毒的分子机理并不清楚,因此利用网络药理学分析及分子对接来探讨桔霉素的致毒机制是当前亟待解决的问题。

网络药理学是一门新兴学科,充分利用现代系统生物学理论,基于在线共享的数据库资源,通过构建网络模型将化学成分的作用靶点网络与人体致病靶点相结合,形成化学成分、靶点与疾病间的相互作用关系网,可以阐述成分-靶点-途径的相互关系,预测化学成分发挥作用的靶点和作用机制[5]。因此,采用网络药理学手段挖掘桔霉素的主要作用靶点和信号通路,预测桔霉素导致毒性的内在机制,将为进一步研究真菌毒素和开展健康防护提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 红曲桔霉素靶标预测

利用 TCMSP 数据库[6]、TCMID 数据库和文献检索到红曲中桔霉素的正确化学结构式,利用 ALOGPS2.1 (http://www.vcclab.org/lab/alogps/) 和 PubChem [7] (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) 在线平台,将红曲桔霉素结构图转化为 Canonical SMILES 标准格式,然后提交到 Swiss Target Prediction [8] (http://www.swisstargetprediction.ch/) 与 SEA (http://sea.bk-slab.org/) 数据库,预测桔霉素作用靶点,设置属性为"homo sapiens",将靶点概率值大于 0 的分子作为桔霉素有效靶点,然后在 UniProt 数据库[9]获取靶蛋白对应基因。利用 CTD 数据库[10] (http://ctdbase.org/)预测桔霉素的靶点和相关疾病。

1.2 疾病相关靶点的筛选

利用 GeneCards 数据库 (https://genecards.weizmann.ac.il/v3/) 对人类基因组的注释数据,以"liver toxicity"及"kidney toxicity"为关键词检索疾病相关基因,与桔霉素作用的靶标基因进行比对,最终筛选获得桔霉素与肝肾毒性相关的交集靶点。

1.3 相互作用网络图的构建

利用 Cytoscape 3.7.2 软件构建桔霉素与候选靶点相互作用网络图,然后将候选靶点导入 String 数据库,深入分析各个候选靶点间的相互作用,再把其中 node1 和 node2 核心数据在 Cytoscape 3.7.2 中建立相互作用网络。靶点大小和颜色展示了节点数和结合分数,从而获得核心蛋白质之间的相互作用网络[11-12]。

1.4 GO 注释和 KEGG 通路富集分析

利用在线工具 KOBAS 3.0(http://kobas.cbi.pku.edu.cn/)对桔霉素-靶点交集蛋白质靶标基因的 GO 注释和 KEGG 富集进行分析[13]。设定参考值 $P<0.05$,富集因子>1.5,最小计数值为 3,筛选桔霉素参与的生物学通路和相关的疾病通路。

1.5 分子对接

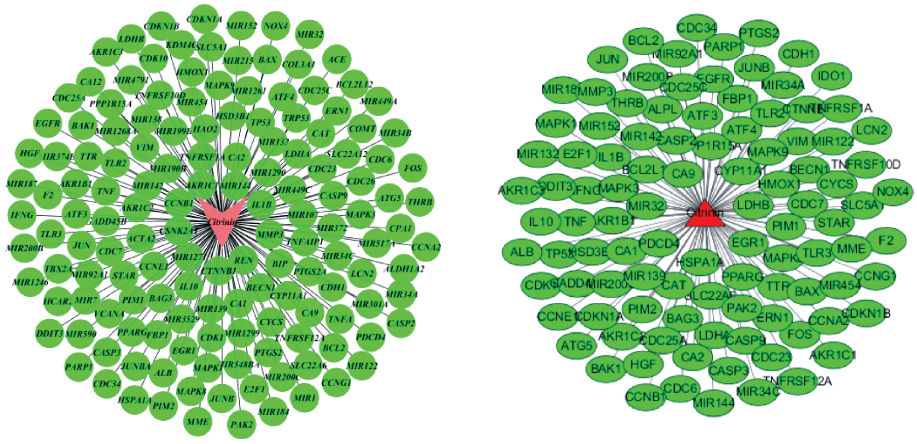
使用 Autodock 软件对桔霉素和 PPI 相互作用网络中 degree 值最大的 3 个关键靶点蛋白质进行分子对接。首先从 PDB 数据库(https://www.rcsb.org/)中分别下载关键靶点蛋白质对应的晶体结构,再从 PubChem 数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)下载桔霉素的化学结构并将其转换成 pdb 格式文件,最后用桔霉素分别与关键靶点蛋白质进行分子对接。

2 结果与分析

2.1 桔霉素致毒潜在靶点分析

利用 Swiss Target Prediction 数据库筛选到桔霉

素 33 个靶点,通过 CTD 数据库筛选到 118 个靶点,合并去重后得到桔霉素对应靶点 149 个,重复靶点为 CDC25A、CCNA2。通过 Cytoscape3.7.2 软件分析,构建出桔霉素–靶点作用网络,见图 1(a)。利用 GeneCards 数据库分别检索到与“liver toxicity”和“kidney toxicity”相关基因 7 374 和 7 864 个,合并去重后得到 8 000 个基因。把这些基因与桔霉素的 149 个靶点功能相对应,筛选到 110 个桔霉素致毒潜在靶点,见图 1(b)。



(a) (b)

图中粉红色和深红色节点表示桔霉素,绿色节点表示靶点。

图 1 桔霉素靶点分析和致毒潜在靶点分析

Fig. 1 Analysis of citrinin targets and potential toxicity targets

2.2 桔霉素导致肝肾毒性网络模型分析

利用 String 数据库分析了 110 个桔霉素潜在致毒靶点的相互作用关系,并在 Cytoscape 软件中构建核心靶点之间的互作网络(protein protein interaction,PPI),见图 2。结果显示,连接度较高的核心靶点有 TP53(degree=66)、CASP3(degree=61)、MAPK3(degree=63)、ALB(degree=52)、JUN(degree=50)、MAPK8(degree=50)、TNF(degree=50)、EGFR(degree=50)等,靶点两两间的互作程度各不相同。桔霉素作用的靶点包括 39 个 miRNA,其中 14 个 miRNA(miR122、miR132、miR139、miR142、miR144、miR152、miR187、miR200B、miR200C、miR32、miR34A、miR34C、miR454、miR92A1)与肝肾毒性相作用。

2.3 功能富集分析

利用 Metascape 数据库对 110 个预测靶点进行 GO 功能富集分析,共筛选得出 496 个条目,其中涉及分子功能(Molecular Function)、生物过程(Biological Process)和细胞组成(Cellular Component)的条目分别有 97、354 和 45 个。生物过程主要包括:药物响应、凋亡过程正调控、基因表达正调控、凋亡过程负调控、RNA 转录正调控等。细胞成分主要包括:胞质溶胶、核质、线粒体、细胞核周质、胞外间隙等。分子功能主要包括:蛋白质结合、酶结合、转录因子结合、蛋白激酶结合和蛋白质异源二聚体活性等,见图 3。

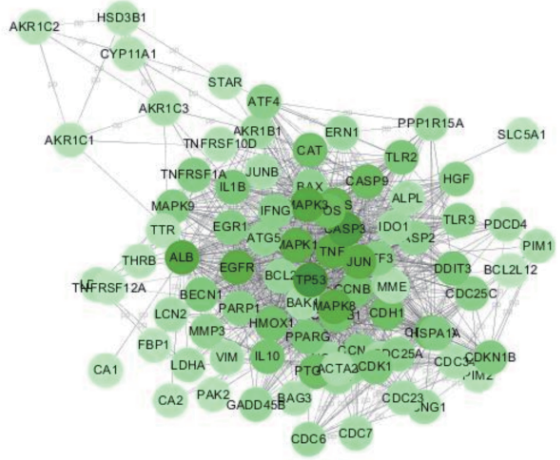


图 2 桔霉素致毒潜在靶点蛋白质互作网络图

Fig. 2 Protein interaction network of potential toxicity targets of citrinin

2.4 KEGG 信号通路分析及“成分–靶点–通路”网络的构建

对桔霉素导致肝肾毒性的潜在作用靶点通过 Kobas 3.0 在线 KEGG 分析表明,110 个靶点富集了 120 个炎症、免疫、病毒、肿瘤、疾病等相关信号通路

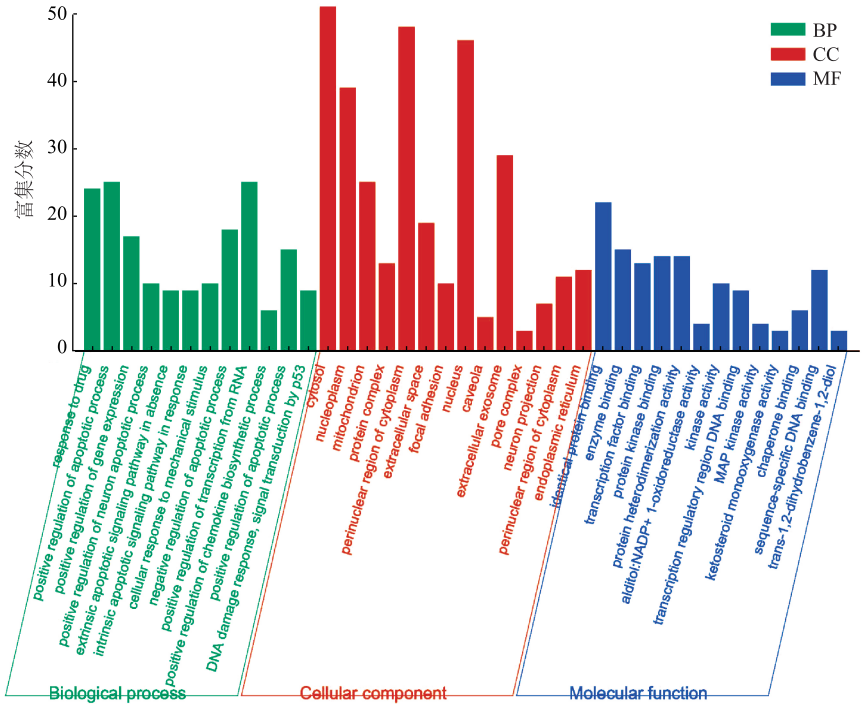


图 3　桔霉素潜在靶点 GO 分析

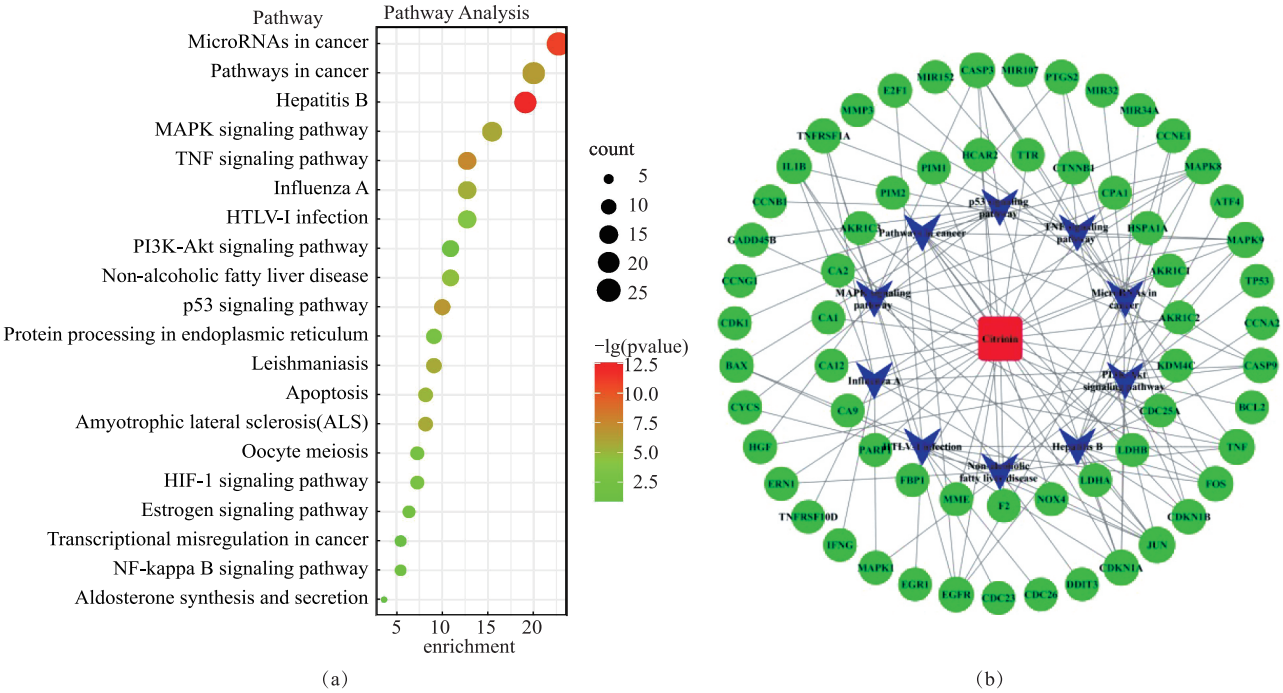
Fig. 3　GO analysis of citrinin potential targets

(P<0.05)，包括肿瘤 MicroRNA、肿瘤、乙型肝炎、MAPK、TNF、流感病毒 A、HTLV-1 感染、PI3K-Akt、非酒精性脂肪性肝、P53 等信号通路，其中富集靶点数和显著性均较高的是肿瘤 MicroRNA、肿瘤、乙型肝炎，见图 4(a)。将前 10 个主要通路与桔霉素潜在靶点构建网络模型，展示出“桔霉素-靶点-通路”之间多重作用关系，见图 4(b)。

鉴于利用 PPI 筛选的核心靶点 TP53、CASP3、MAPK3 作为常见蛋白质在桔霉素致毒的过程中可能不是直接致毒靶点，因此根据 KEGG 富集分析结果，结合靶点与通路，分析基因与疾病之间的相互作用，筛选到了一个新靶点 ALB(PDB ID:6YG9)。据文献[14]报道，ALB 可与黄曲霉毒素 B1 形成加合物和苯，是分子流行病学研究的生物标志物；ALB 也与许多治疗药物(β-内酰胺抗生素、乙酰水杨酸、对乙酰氨基酚、非甾体抗炎药)或其反应性代谢物形成加合物，用于研究反应性代谢物的产生并预测特殊的药物反应和毒性。

2.5　分子对接结果

分子对接分析在 AutoDock 软件进行，将 PPI 网络前 3 位的靶蛋白质和 ALB 蛋白质分别与桔霉素进行分子对接验证。结果显示，桔霉素和靶蛋白质结合能分数均小于-20.92 kJ/mol，说明受体与配体可以自发结合，提示有较强的结合活性，见表 1。综合氢键、排斥作用、疏水作用、复合物空间效果，结合能越低，发生作用的可能性越大[15]。可视化分析表明，桔霉素可与靶点蛋白质周围氨基酸残基通过氢键等分子间作用力形成较为稳定的构象，其中 TP53 蛋白质中 GLY-1566 残基、LEU-1568 残基、ARG1583 残基和 ARG-1490 残基与桔霉素共存在 9 个氢键相互作用，均在功能域 53-BP1-Tudor 区间(1483-1604)；CASP3 蛋白质中 SER-150 残基、LYS-105 残基、ARG-147 残基和 ARG-149 残基与桔霉素共存在 5 个氢键相互作用，均在功能域 CASc 区间 (37-277)；MAPK3 蛋白质中 LEU-187 残基、ARG-165 残基和 ARG-189 残基与桔霉素共存在 6 个氢键相互作用，均在功能域 STKc-ERK1/2 like 区间 (36-370)；ALB 蛋白质中 LEU-182 残基、ARG-117 残基和 ARG-186 残基和 TYR-161 残基与桔霉素存在 7 个氢键相互作用，均在功能域区间(21-204、214-396、404-594)。以上 4 个靶蛋白质中 ALB 与桔霉素的结合能最低，为-37.91 kJ/mol，见图5。



图中红色正方形表示桔霉素,绿色圆圈表示潜在靶点,深蓝色箭头表示通路。

图 4　桔霉素潜在靶点 KEGG 气泡图和“化学成分–靶点–通路”网络

Fig. 4　KEGG bubble chart and chemical component–target–pathway network of the potential targets of citrinin

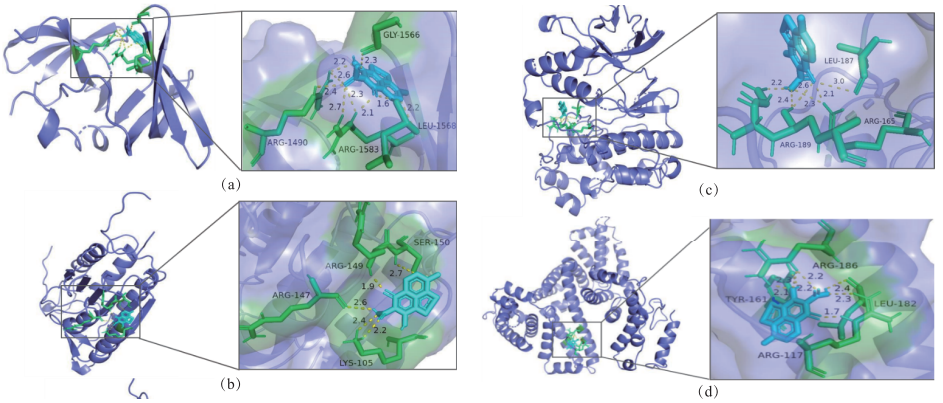
表 1　关键靶点结合能预测

Table 1　Prediction of binding energy of key targets

蛋白质	PDB ID	蛋白质序列号	结合能/(kJ/mol)
TP53	6VIP	Q12888	−35.73
CASP3	2J32	P42574	−24.48
MAPK3	4QTB	P27361	−35.10
ALB	6YG9	P02768	−37.91

3 结　语

桔霉素是一种真菌毒素,主要由青霉、曲霉和红曲霉生成,许多食品、饲料和中药材等容易被桔霉素污染,对人类健康造成一定的危害,但其致毒机制尚未明确,对其风险评估尚缺乏足够数据[16]。桔霉素常与另一种真菌毒素赭曲霉毒素 A 一起被发现,二者可以产生协同作用,增强其毒副作用,成为导致地方性肾病的原因之一[17]。桔霉素除了与肝肾



青色环状为桔霉素,附近棍棒结构是与桔霉素有氢键相互作用的氨基酸残基,黄色虚线为桔霉素和氨基酸残基之间形成的氢键。

图 5　桔霉素和 TP53(a)、CASP3(b)、MAPK3(c)和 ALB(d)的分子对接

Fig. 5　Molecular docking of citrinin with TP53 (a), CASP 3 (b), MAPK3 (c) and ALB (d)

毒性有关外,还有胚胎和胎儿毒性,目前桔霉素的基因毒性和致突变作用仍存在争议[18],其毒性作用也可能与生物系统中桔霉素介导的氧化应激和线粒体功能障碍有关[19]。

作者运用网络药理学分析获得桔霉素致肝肾毒性的核心靶点8个,提示桔霉素可能主要通过影响这些关键靶点来发挥作用。通过KEGG信号通路富集分析发现,肿瘤MicroRNA、肿瘤、乙型肝炎3个信号通路的富集度和显著性最高。可见桔霉素致毒与肿瘤相关,因此控制桔毒素的产生对提高红曲产品的安全性非常重要。通过采用桔霉素与4个核心靶点进行分子对接,验证了桔霉素与核心靶点有较好的结合能力,其结合能均小于-20.92 kJ/mol,可通过氢键形成稳定构象,均位于靶蛋白质的功能域区间。靶蛋白质p53的激活剂ASPP1、ASPP2和抑制剂iASPP都属于ASPP家族成员,除了DNA结合域之外,ASPP家族成员还与p53富含脯氨酸的区域结合[20-21],该区域集中在p53的C端[22],与桔霉素的结合区域类似;在CASP3的抑制剂中,外源NO在体内可以通过对CASP3的Cys-163残基亚硝化作用来抑制CASP3活性,从而抑制凋亡[23],且NO的作用位点也处于CASP3的CASc功能域;由Merck公司开发的ERK1/2抑制剂SCH772984的共晶结构表明,吲唑环与铰链区的Asp104和Met106形成核心氢键作用,吡咯烷与Lys52形成另一个关键的氢键,导致变构[24]。SCH772984和桔霉素均能结合在MAPK3的STKc-ERK1/2 like功能域,这些初步证实了网络药理学预测的桔霉素致毒靶点和通路比较可信。

但是网络药理学对成分和靶点之间关系的分析仍然处于生物信息分析层面,各个数据库的筛选机制、算法和数据容量等均存在差异,因此每个数据库筛选的靶点会有差异,从而导致结果的离散。在计算两个相似或相同的疾病时,重合性也往往较低,因此作者通过Swiss Target Prediction和CTD数据仅筛选到2个重复的靶点。部分数据库的数据内容还不完善,仅对部分小分子化合物在少数靶点蛋白质上进行了筛选评价,因此本研究未通过SEA数据库筛选到桔霉素作用的靶点,故预测的结果仍需要基础研究和临床试验进一步验证。

红曲霉富含麦角固醇、洛伐他汀[25]、γ-氨基丁酸和红曲色素等活性成分,也大多存在桔霉素[26-27]。为更有效开发利用红曲霉及其产品,深入研究桔霉素的致毒机理非常重要。作者用网络药理学分析了红曲中桔霉素、致病靶标和信号通路在分子层面上的相互作用网络,初步获得桔霉素致毒的分子作用途径,为进一步的实验研究和临床验证提供理论依据。

参考文献:

[1] 傅金泉.中国红曲及其实用技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997:1-7.
[2] XIONG Z,CAO X,WEN Q,et al. An overview of the bioactivity of monacolin K/lovastatin[J]. **Food and Chemical Toxicology**,2019,131:110585.
[3] BLANC P J,LORET M O,GOMA G. Production of citrinin by various species of *Monascus*[J]. **Biotechnology Letters**,1995,17(3):291-294.
[4] 角田广,辰野高司,上野芳夫. 真菌毒素图解[M]. 北京:人民卫生出版社,1983:1-2.
[5] MA Y M,ZHANG X Z,SU Z Z,et al. Insight into the molecular mechanism of a herbal injection by integrating network pharmacology and *in vitro*[J]. **Journal of Ethnopharmacology**,2015,173:91-99.
[6] RU J L,LI P,WANG J N,et al. TCMSP:A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. **Journal of Cheminformatics**,2014,6:13.
[7] ZHOU Z,CHEN B,CHEN S,et al. Applications of network pharmacology in traditional Chinese medicine research[J]. **Evidence-Base Complementary and Alternative Medicine**,2020(2020):1646905.
[8] DAINA A,MICHIELIN O,ZOETE V. Swiss target prediction:updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. **Nucleic Acids Research**,2019,47(W1):W357-W364.
[9] The UniProt Consortium. UniProt:the universal protein knowledgebase[J]. **Nucleic Acids Research**,2017,45(D1):158-169.
[10] DAVIS A P,WIEGERS T C,WIEGERS J,et al. CTD anatomy:analyzing chemical-induced phenotypes and exposures from an anatomical perspective,with implications for environmental health studies[J]. **Current Research Toxicology**,2021,2:128-139.

[11] SZKLARCZYK D,MORRIS J H,COOK H,et al. The STRING database in 2017:quality-controlled protein-protein association networks,made broadly accessible[J]. **Nucleic Acids Research**,2017,45(D1):362-368.
[12] 张浩轩,陆进,杨月,等. 肺腺癌组织 B 细胞中乳清酸性蛋白 4- 二硫键核心结构域 2(WFDC2)的表达与患者生存率的相关性分析[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2019,35(5):425-433.
[13] 刘畅,刘雄伟,丁晶鑫,等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学的黄褐毛忍冬保肝活性成分及其潜在靶点研究[J]. 江苏大学学报(医学版),2021,31(1):73-82.
[14] SABBIONI B,TURESKY R J. Biomonitoring human albumin adducts:the past,the present,and the future[J]. **Chemical Research in Toxicology**,2017,30(1):332-366.
[15] 宗阳,丁美林,贾可可,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药,2020,51(4):836-844.
[16] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed[J]. **EFSA Journal**,2012,10(3):2605.
[17] GUPTA M,SASMAL D,BANDYOPADHYAY S,et al. Hematological changes produced in mice by ochratoxin A and citrinin [J]. **Toxicology**,1983,26(1):55-62.
[18] FILHO J,ISLAM M T,ALI E S ,et al. A comprehensive review on biological properties of citrinin[J]. **Food and Chemical Toxicology**,2017,110:130-141.
[19] CHAN W H. Citrinin induces apoptosis via a mitochondria-dependent pathway and inhibition of survival signals in embryonic stem cells,and causes developmental injury in blastocysts[J]. **Biochemical Journal**, 2007,404(2):317-326.
[20] BERGAMASCHI D,SAMUELS Y,SULLIVAN A,et al. iASPP preferentially binds p53 proline-rich region and modulates apoptotic function of codon 72-polymorphic p53[J]. **Nature Genetics**,2006,38(10):1133-1141.
[21] LI S,SHI G,YUAN H,et al. Abnormal expression pattern of the ASPP family of proteins in human non-small cell lung cancer and regulatory functions on apoptosis through p53 by iASPP[J]. **Oncoloy Reports**,2012,28(1):133-140.
[22] 胡丹. 骨肉瘤与肿瘤抑制基因 p53 关系的研究进展[J]. 福建医科大学学报,2002,36(1):109-112.
[23] ZECH B,KOHL R,VON KNETHEN A,et al. Nitricoxide donors inhibit formation of the Apaf-1/Caspase-9 apoptosome and activation of Caspase[J]. **Biochemical Journal**,2003,371(3):1055-1064.
[24] 梁停停,王文杰,郝思远,等. 小分子 ERK 抑制剂的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2020,51(3):260-269.
[25] PATEL S. Functional food red yeast rice(RYR) for metabolic syndrome amelioration:a review on pros and cons[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**,2016,32(5):87.
[26] WANG Y Z,JU X L,ZHOU Y G. The variability of citrinin productionin *Monascus* type cultures[J]. **Food Microbiology**,2005, 22(1):145-148.
[27] 付桂明,许杨,李燕萍,等. 产毒红曲菌中生物合成桔霉素基因 -pksCT 基因的保守性分析[J]. 食品科学,2008,29(3):359-363.