文章编号:1674-2869(2024)05-0534-09

2,7-二溴咔唑致肝损伤分子机制的网络毒理学辅助实验探讨

张巧云[1],姚敦璠[2],汪国威[*1],侯存闯[1],付 强[1],黄梦瑶[1]
1. 武汉工程大学绿色化工过程教育部重点实验室,环境生态与生物工程学院,湖北 武汉 430205;
2. 湖北科技学院医学部药学院,湖北 咸宁 437100

摘 要:环境污染物2,7-二溴咔唑(27-BCZ)显著引发肝脏毒性效应,研究其分子机制将在生态风险评估和毒性靶向治疗药物的开发中起到重要作用。证实0.05和0.15 μmol/L的27-BCZ可致斑马鱼肝损伤,引起肝脏ALT和AST水平升高,肝脏部分细胞溶解、胞核固缩和变性等。网络毒理学方法预测显示:27-BCZ致肝损伤的关键靶点为RXRα、MAPK1、HSP90AA1等,其机制主要涉及PI3K-Akt信号通路。分子对接表明27-BCZ与PI3K-Akt信号通路相关的核心靶点RXRα结合活性强。为验证网络毒理学预测的可靠性,用RT-qPCR检测肝组织PI3K-Akt信号通路介导凋亡相关基因的表达水平,结果显示:27-BCZ可显著降低肝脏*pi3k*、*akt*和*bcl-2*基因的表达水平,升高凋亡相关的*bax*和*caspase 3*基因的表达水平,这种降低或升高的趋势随着暴露浓度的升高进一步增强。综合预测与实验结果发现,27-BCZ致肝损伤可能与其下调肝脏PI3K-Akt信号通路引发肝细胞凋亡有关。本研究首次采用网络毒理学方法探究环境污染物的潜在肝脏毒性作用机制,为环境有机污染物毒性机制的研究提供了新的思路与方法。

关键词:卤代咔唑;肝脏毒性;RXRα靶点;PI3K-Akt信号通路
中图分类号:X131;R99 **文献标识码**:A **DOI**:10.19843/j.cnki.CN42-1779/TQ.202405004

Network toxicology-assisted experiments to explore 2,7-dibromocarbazole's hepatotoxic mechanism

***ZHANG Qiaoyun*[1], *YAO Dunfan*[2], *WANG Guowei*[*1], *HOU Cunchuang*[1], *FU Qiang*[1], *HUANG Mengyao*[1]**
1. Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Environmental Ecology and Biological Engineering, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430205, China;
2. School of Pharmacy, Xianning Medical College, Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China

Abstract: The environmental pollutant 2,7-dibromocarbazole (27-BCZ) significantly induces liver toxicity, thus identification of its molecular mechanism on liver toxicity play a vital role in ecological risk assessment and the development of therapeutics. This study confirmed that 0.05 μmol/L or 0.15 μmol/L 27-BCZ can induce liver damage in zebrafish due to partial cell lysis, nuclear pyknosis and denaturation, and an increase in ALT and AST in the liver. The network toxicology predicted that the key targets of 27-BCZ in inducing liver damage were RXRα, MAPK1, HSP90AA1, etc., and the mechanisms involved PI3K-Akt signaling pathways. The molecular docking results indicated that the core target RXRα associated with the PI3K-Akt signaling pathway had strong binding activity with 27-BCZ. To verify the feasibility of network toxicology

收稿日期:2024-05-09
基金项目:国家自然科学基金(21806047、41902314);湖北省教育厅科学基金(Q20211512);武汉工程大学研究生教育创新基金(CX2022567)
作者简介:张巧云,硕士研究生。Email: zhang_qiaoyun@126.com
***通信作者**:汪国威,博士,副教授。Email: gwwang@wit.edu.cn
引文格式:张巧云,姚敦璠,汪国威,等. 2,7-二溴咔唑致肝损伤分子机制的网络毒理学辅助实验探讨[J]. 武汉工程大学学报,2024,46(5):534-542.

prediction，RT-qPCR was used to detect apoptosis-related genes mediated by the PI3K-Akt signaling pathway in the liver. The results showed that 27-BCZ significantly reduced the transcriptional levels of genes *pi3k*，*akt*，and *bcl-2*，and significantly increased transcriptional levels of genes *bax* and *caspase 3* which are related to cell apoptosis. The trends of decrease or increase were further enhanced with increasing concentration of 27-BCZ. Based on the network toxicological and experimental results，we found that 27-BCZ-induced liver damage may be related to its downregulation of the PI3K-Akt signaling pathway and promotion of liver cell apoptosis. This is the first study that attempted using the network toxicology methods to explore the hepatic toxicity mechanisms of environmental pollutants，which provides new insight into investigation of the toxicity mechanism of environmental organic pollutants.

Keywords：polyhalogenated carbazoles；hepatotoxicity；RXRα；PI3K-Akt signaling pathway

卤代咔唑（polyhalogenated carbazoles，PHCZs）是一类具有持久性、生物累积性和毒性效应的卤代芳杂环有机物[1-3]。环境中PHCZs来源于人为过程的能源使用和化工、电子、医药等工业生产[4-6]；也来源于自然环境中部分真菌和藻类的氯/溴过氧化物酶催化转化[7]。2，7-二溴咔唑（2，7-dibromocarbazole，27-BCZ）是PHCZs的典型代表之一，具有高毒性和在环境样本中的高检出频率。近十年来，世界各地的研究发现包含27-BCZ在内的多种PHCZs在沉积物、空气、土壤和水生生物中存在[8-10]。例如，Wu等[1]调查了旧金山湾（美国）沉积物和生物样本，发现多种PHCZs。Jin和Hu等[11-12]在中国东海的水和鱼体内检出11种PHCZs，其中27-BCZ在水中质量浓度达2.8 ng·L^{-1}且27-BCZ在鱼体中的残留质量含量最高，为5.3 ng·g^{-1}。Jia等[13]在胶州湾周边湖泊水中检出多种PHCZs，总PHCZs质量浓度高达81.82 ng·L^{-1}。Yang等[14]总结了关于PHCZs的文献，发现中国和美国的地表水和河口沉积物中可高频检出27-BCZ和多种PHCZs。

化合物毒性是评估其生态风险的重要依据[2，15]。研究表明27-BCZ能诱导显著的类二噁英毒性机制的发育毒性，比如引起斑马鱼心胞水肿、卵黄囊胀大的心脏发育异常[16]。通过人脐静脉内皮细胞实验，人们发现27-BCZ通过增强表达血管生成素2（Ang2），诱发血管发育毒性[17]。Ji等[18]发现27-BCZ能够显著干扰小鼠肝脏代谢功能，引起糖代谢紊乱，显著提高血液碱性磷酸酶水平，引发肝脏毒性效应。目前，人们对27-BCZ致肝毒性的作用机理并不明确。

肝脏是重要的代谢和解毒器官，明确环境污染物对肝脏的危害及机制，有助于准确地评估其风险，制定有效的管理对策。不同于药物作用机制的研究具有一定的目标性，环境中污染物毒性机制研究没有明确的靶标，研究过程广泛而复杂。随着现代网络技术的发展和毒性数据集的丰富，网络毒理学应运而生。网络毒理学借助现代数据库集和智能计算筛选手段，通过构建网络模型来预测目标化合物的毒性作用靶点和信号通路[19-21]。一定程度上缩小化合物毒性作用机制研究范围。基于此，本研究将利用网络毒理学方法结合斑马鱼暴露实验，研究环境有机污染物27-BCZ导致肝脏损伤的分子机制，为明确27-BCZ的生态风险提供基础依据。

1　实验部分

1.1　材料与仪器

27-BCZ（CAS：136630-39-2，纯度≥98%）、二甲基亚砜、生物染料苏木精（CAS：517-28-2）和伊红（CAS：15086-94-9）以及其他溶剂购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；蛋白浓度测定试剂盒（P0012S）购自上海碧云天生物技术有限公司；丙氨酸氨基转移酶（alanine transaminase，ALT）和天冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase，AST）检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所；RNA提取Trizol试剂、反转录试剂盒（PrimeScript™ RT reagent Kit，No.RR047A）和荧光定量试剂盒（TB GreenR Premix EX Taq™，No.RR420A）购自宝日医生物技术有限公司。仪器包括电子天平（ME102，梅特勒）、离心机（Gentrifuge5424R，德国Eppenderf）、荧光定量RT-qPCR仪（LightCycler 480II，瑞士Roche）、显微镜（Cover-015，日本OLYMPUS）、多功能酶标仪（SpcctraMaxiD3，美国Molecular Devices）等。

1.2　27-BCZ对斑马鱼的暴露实验

野生型AB系斑马鱼购自中国科学院水生生物研究所，在时间比（以小时计）14∶10光暗循环和（27±1）℃水温的条件下适应性饲养2周以上。每

天按照斑马鱼质量分数2%~3%的比例投喂鱼用饲料，每天更换一半暴露液并清除食物残渣和粪便。适应期结束后，将斑马鱼随机分为3组，每组3个平行，每个平行60条鱼，养殖体积20 L。依据斑马鱼胚胎96 h半致死效应浓度[LC_{50}=(1.79±0.09) μmol/L][11]，设置浓度为0 μmol/L(溶剂空白对照)、0.05 μmol/L和0.15 μmol/L 3种27-BCZ暴露组，采用半静态暴露法共暴露培养24 d。

1.3 27-BCZ对斑马鱼肝功能和组织损伤分析

暴露结束后，收集各组肝组织样本并称重，一部分肝脏样品加入9倍的生理盐水匀浆肝组织。将匀浆液4 ℃ 2 500×g离心10 min；取上清液，采用蛋白试剂盒测定蛋白浓度；并参照相应试剂盒说明书检测斑马鱼肝脏功能AST和ALT活性，明确27-BCZ暴露后斑马鱼肝脏功能状况。一部分肝脏在质量分数4%多聚甲醛中固定24 h，将固定的组织块脱水、包埋、切片；随后将切片脱蜡，依次用苏木精和伊红(hematoxylin-eosin staining，HE)染色，再水化，并用中性树胶封片；在光学显微镜下观察各组肝脏的组织病理学变化[22]。

1.4 网络毒理学预测27-BCZ致肝损伤的潜在靶点

27-BCZ的3D结构图从Pub Chem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)获取，并保存为sdf格式，将其导入Pharm Mapper数据库(http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/)获取潜在靶点信息[23]。根据相似匹配原则，筛出潜在目标靶点，导入UniProt数据库(https://www.uniprot.org/)获取靶点标准化基因名称。以“Liver injury”为关键词在CTD数据库(https://ctdbase.org/)和Gene Cards(https://www.genecards.org/)检索与肝损伤相关的作用靶标[24]，结果导入UniProt数据库，获取肝损伤靶点标准基因名称。将交集靶标导入蛋白质互作数据库(https://string-db.org/)，利用Cytoscape 3.10.2构建蛋白互作网络，根据Degree值(基因的连接数)筛选出27-BCZ致肝损伤关键靶点[25]。

1.5 27-BCZ致肝损伤的GO和KEGG富集分析

将上述所得的关键靶点导入DAVID数据库(https://david.ncifcrf.gov/)，进行相关基因的基因本体论(Gene Ontology，GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG)通路富集分析。将得到的数据结果按照P值从小到大排序($P < 0.05$)，根据排序结果筛选出前8个GO分析条目和前20条KEGG富集通路并分析[26]。

1.6 核心靶点分子对接

根据Degree值筛选27-BCZ诱导肝损伤排名前5的核心靶点，以27-BCZ作为配体，核心靶点为受体蛋白，进行分子对接。分别在PubChem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)和RCSB PDB数据库(https://www.rcsb.org/)获取27-BCZ及核心靶点的3D结构，利用Pymol 2.5.7软件将配体和受体去水、去配体、加氢后，导入AutoDockTools 1.5.7进行对接，结果使用Pymol 2.5.7软件可视化展示[27]。

1.7 致肝损伤的PI3K-Akt信号通路基因检测验证

基于网络毒理学方法分析，发现PI3K-Akt信号通路和细胞凋亡机制是27-BCZ致斑马鱼肝细胞损伤的潜在原因。为进一步验证分析结果，本研究将通过RT-qPCR分析路径相关基因(*pi3k*、*akt*、*bcl-2*、*bax*和*caspase 3*)的表达水平[27]。每5只斑马鱼肝脏作为一个平行，每组3个平行，每个平行样品加入1 mL Trizol试剂进行组织匀浆。匀浆液使用氯仿提取后11 000 g，4 ℃离心18 min，上清液收集后加入等体积异丙醇沉淀RNA。沉淀通过12 000 g，4 ℃离心10 min收集，质量分数75%乙醇3次清洗后，冷冻干燥并复溶到50 μL无酶超纯水中。通过测定*OD*260/280值，评估RNA提取的纯度是否合格，根据合格的纯度数据设计反转录实验样品用量，然后RT-qPCR检测转录基因的表达量。实验条件如下：95 ℃ 10 min，95 ℃ 15 s，60 ℃ 30 s(40个循环)[28]。目标基因mRNA表达水平与管家基因*gapdh*进行标准化后，结果用$2^{-\Delta\Delta CT}$计算值表示。基因的登录号(genbank accession number)和引物列于表1[29]。

1.8 统计分析

应用SPSS 27.0软件进行统计学分析，计量资料以均值和标准偏差表示。将各组数据进行正态分布检验和方差齐性检验，方差齐性检验采用Levene Statistic方法，若服从正态分布，两组之间比较采用student's t检验，多组间比较采用单因素方差分析，若不符合正态分布，则采用非参数检验。不同英文字母(a、b和c)间存在显著性差异($P < 0.01$)，$P < 0.05$为差异有统计学意义。*表示显著性水平，*$P < 0.01$，**$P < 0.001$。

2 结果与讨论

2.1 斑马鱼肝损伤的病理观察和生理参数分析

组织病理学HE染色结果表明，空白对照组斑马鱼肝脏的肝细胞质均匀，肝细胞沿细胞索规则

表1　基因及其RT-qPCR检测的引物

Tab. 1　Genes and their primers used for RT-qPCR

基因	GenBank登录号	正向引物	反向引物
pi3k	NC_007134.7	ACATGGCTCTGCAAGATGCT	GGAGGCATCTCGGACCAAAA
akt	NC_007128.7	TCGGCAGGTGTCTTCTCAAT	ACCCATTGCCATACCACGAG
bcl-2	NC_007135.7	GACTCTGTGTTCCACCCGTT	AAAGGCTCCGATGGTCACTC
bax	NC_007114.7	GGCTATTTCAACCAGGGTTCC	TGCGAATCACCAATGCTGT
caspase 3	NC_007112.7	GACGCAAAGCGTGTGGATAC	GCCGATGTTGGGGTAGTTCA
gapdh	NC_007127.7	GGATCTGACAGTCCGTCTTGAGAA	CCATTGAAGTCAGTGGACACAACC

排列，细胞核呈规则圆形位于细胞中央[图1(a)]。与空白对照组相比，0.05和0.15 μmol/L 27-BCZ暴露组斑马鱼肝脏部分区域出现单个细胞溶解，胞核固缩变形并位于细胞边缘，胞核溶解，肝索排列稀疏且轻度紊乱[图1(b，c)]。使用Image J对多张平行处理的HE染色切片(最大400倍)定量分析，可得对照组、0.05 μmol/L组和0.15 μmol/L组的细胞核面积占总细胞面积百分比分别为(15.454±2.080)%、(13.926±1.410)%和(10.251±1.390)%[图1(d)]。这些结果表明27-BCZ暴露可造成一定剂量依赖性的肝损伤或肝毒性。

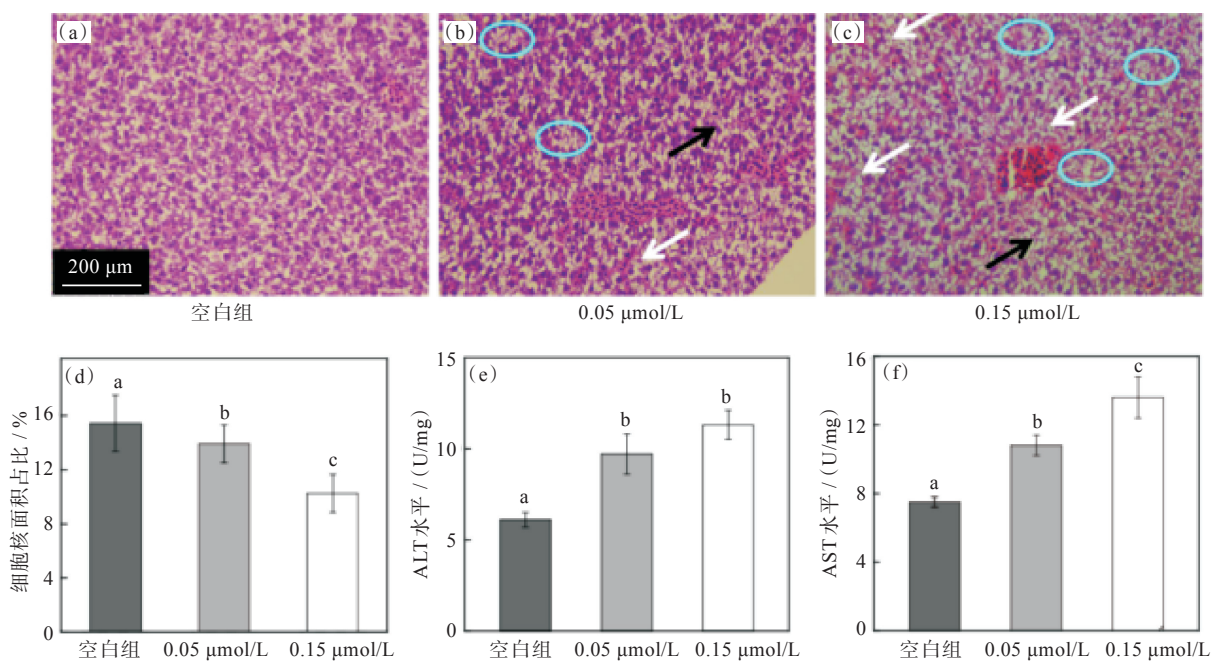
0.05和0.15 μmol/L 27-BCZ均可显著引起斑马鱼肝脏ALT和AST水平升高[图1(e，f)，$P<0.01$]，表明27-BCZ暴露所造成的损伤，会对肝脏的正常生理过程产生一定的影响。

2.2　27-BCZ致肝损伤潜在作用靶点预测

网络毒理学方法应用于探究27-BCZ致肝损伤的靶点机制。通过Pharm Mapper数据库共得到27-BCZ的潜在靶点302个，通过“Liver injury”为关键词在CTD和Gene Cards数据库得到与肝损伤相关的靶点共1 884个，取交集获得27-BCZ靶标与肝损伤相关的交集靶点149个。将交集靶点导入Cytoscape软件，得到“27-BCZ-Liver injury-靶点”互作网络拓扑分析图(图2)。多靶点错综复杂的网络结构，说明27-BCZ导致肝损伤是多靶点共同作用的结果。

2.3　27-BCZ诱导肝损伤靶点的GO分析和KEGG通路富集分析

在GO分析中，共得到生物过程(biological process，BP) 54条，主要涉及磷酸化(phosphorylation)、DNA的转录调控(regulation of transcription，DNA-templated)、细胞分化(cell differentiation)等[图3(a)]；细胞成分(cellular component，CC)共富集到12条，主要包括细胞核



注：图(b)和(c)中蓝色圆圈、黑色箭头和白色箭头分别表示细胞溶解、核固缩和核溶解。

图1　27-BCZ暴露致斑马鱼肝损伤

Fig. 1　27-BCZ induced zebrafish hepatic injury

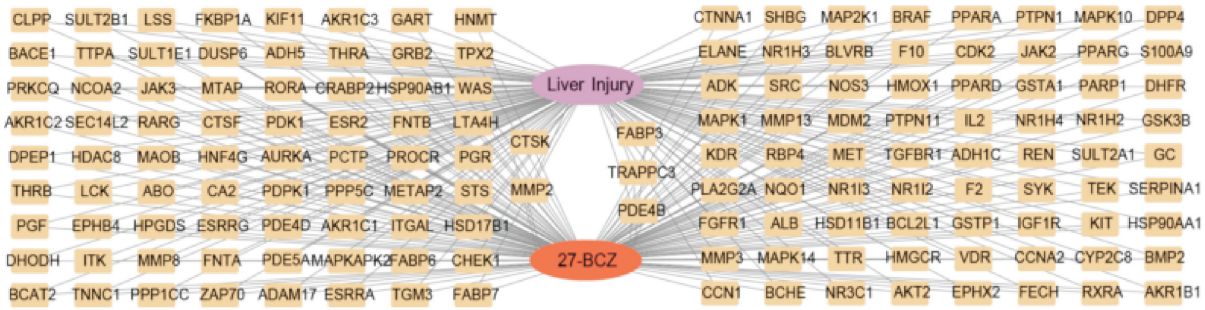


图2 “27-BCZ-Liver injury-靶点”网络图

Fig. 2 Network diagram of “27-BCZ-Liver injury-Targets”

(nucleus)、胞质(cytosol)、受体复合物(receptor complex)等;分子功能(molecular function,MF)共富集42条,主要涉及转移酶活性(transferase activity)、DNA结合(ATP binding)、核苷酸结合(nucleotide binding)等。

KEGG富集分析共得到相关代谢通路78条,将*P*值最小前20条通路排序[图3(b)],结果表明PI3K-Akt信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、MAPK信号通路(MAPK signaling pathway)、FoxO信号通路(FoxO signaling pathway)等为27-BCZ导致肝损伤的主要信号通路。

2.4 27-BCZ致肝损伤靶点蛋白互作网络分析

将149个交集靶点导入String数据库,最低相互作用阈值设置为0.70,进行蛋白互作网络分析。结果总共包括149个节点和344条边,平均节点度值为4.62。Cytoscape软件将中心核心的30个靶点结果可视化(图4):椭圆节点表示蛋白靶点,边表示蛋白间关联,节点颜色深浅与度值(Degree)呈正相关。Degree愈大,评分愈高,靶点的作用愈关键。Degree评分较高的核心靶点包括丝裂原活化蛋白激酶1(mitogen-activated protein kinase 1,MAPK1)、热休克蛋白90α型1(heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1,HSP90AA1)、热休克蛋白90β型1(heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1,HSP90AB1)、维甲酸X受体α(retinoid X receptor α,RXRα)、核受体共激活因子1(nuclear receptor coactivator 1,NCOA1)等,是27-BCZ导致肝损伤的潜在核心靶点。

上述5个核心靶点均与PI3K-Akt信号通路有关[30-32],这一结果与KEGG信号通路富集分析结果一致,表明PI3K-Akt信号通路在27-BCZ致肝损伤中具有潜在重要作用。关键靶点中MAPK1又称细胞外调节蛋白激酶(ERK2),参与细胞生理和病理的调节,ERK2缺乏会改变ERK信号通路,减轻肝纤维化和炎症反应[33]。HSP90AA1和HSP90AB1是HSP90基因家族的一部分,在包括AKT在内的许多蛋白的稳定性中起着至关重要的作用[34]。NCOA1可诱导对转录激活至关重要的类固醇受体(核受体)的结构变化,NCOA1过表达

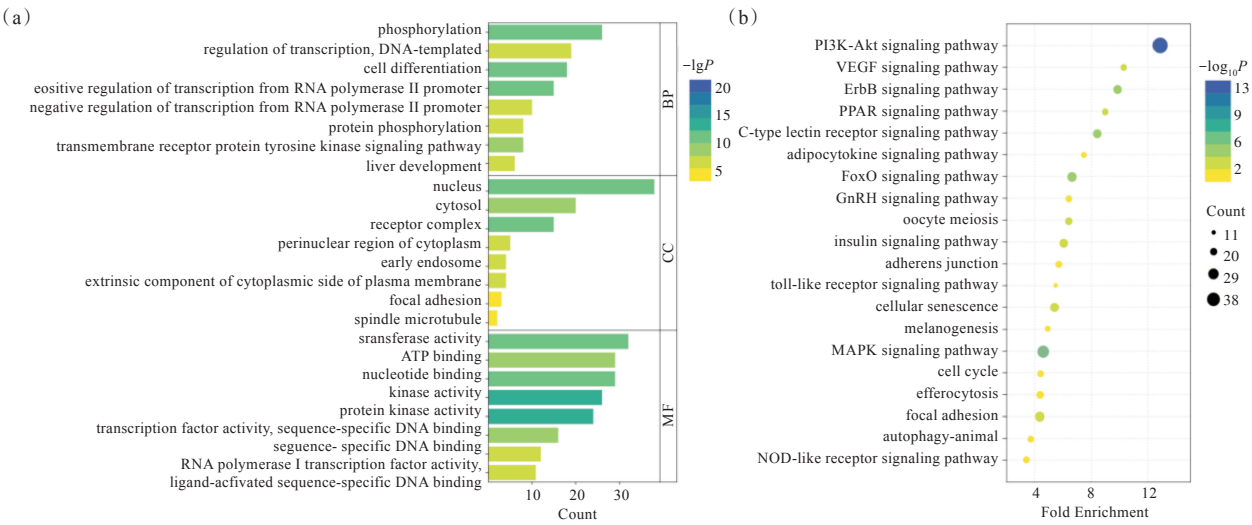


图3 27-BCZ致肝损伤靶点的GO分析和KEGG通路分析

Fig. 3 27-BCZ induced liver injury targets investigation by GO analysis and KEGG pathway analysis

可抑制氧化应激和激活 PI3K-Akt 通路，从而减轻内皮损伤[32]。RXRα 是一类配体依赖型转录因子，是核配体激活的转录因子家族的成员，RXRα 过表达会导致 AKT 磷酸化，通过影响 PI3K-Akt 通路发挥作用[35]。PI3K-Akt 信号通路在细胞代谢、生长和凋亡中起着重要作用，PI3K-Akt 通路参与众多肝脏损伤的病理变化，下调 PI3K-Akt 信号通路可激活线粒体膜凋亡，从而导致肝损伤[29, 36]。

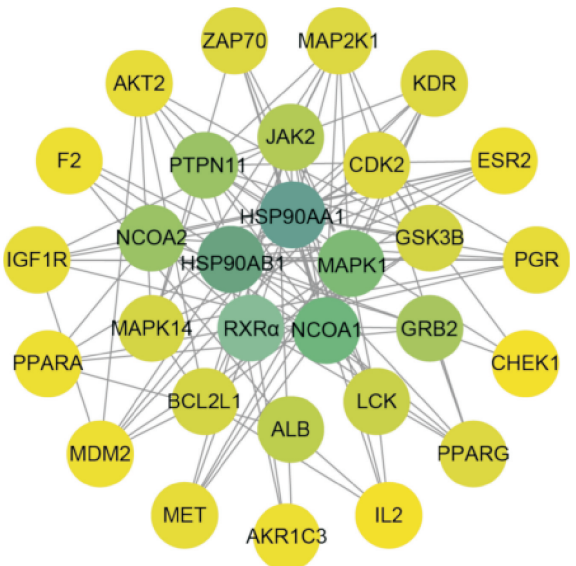


图 4　27-BCZ 致肝损伤的靶点蛋白互作分析

Fig. 4　Protein-protein target interaction network of liver injury induced by 27-BCZ

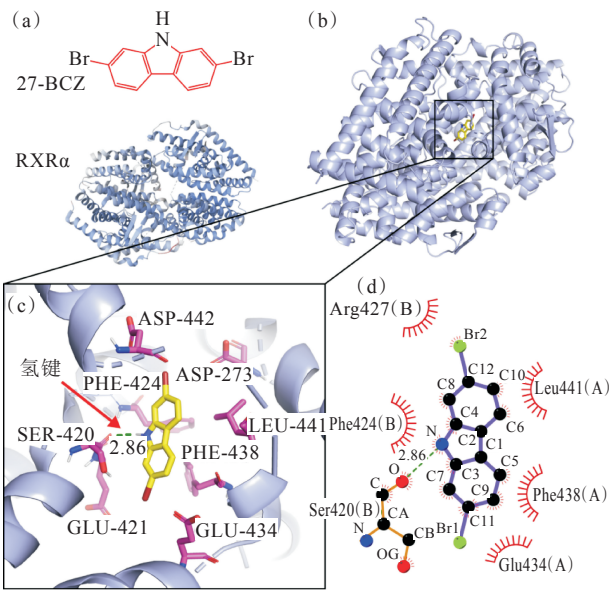
2.5　分子对接

进一步将前 5 个核心靶点与 27-BCZ 分别进行分子对接。结合能< −4.0 kcal·mol^{-1} 表示配体和靶点蛋白有较好的结合活性，< −7.0 kcal·mol^{-1} 表示配体和靶点蛋白有强的结合活性[37]。发现 27-BCZ 与 5 个核心靶点的结合能均小于−5.0 kcal·mol^{-1}，表明 27-BCZ 与 5 个核心靶点均能稳定结合（表 2）。其中 RXRα 与 27-BCZ 结合活性最高，结合能为−7.31 kcal·mol^{-1}，表明 27-BCZ 能与 RXRα 蛋白强结合。27-BCZ 与核心靶点 RXRα 分子对接的最优结合模式（图 5），显示 27-BCZ 很好结合到 RARα 蛋白口袋，27-BCZ 的氮原子与口袋中的支链 B 的 SER-420（B）氨基残基形成长度为 0.286 nm 的氢键[图 5(b)和(c)]。2D 图显示 27-BCZ 与 RXRα 结合除了氢键作用，还与 RXRα 的 A 和 B 链上的 Phe438（A）、Leu441（A）、Glu434（A）、Arg427（B）、Phe424（B）等残基有疏水相互作用[图 5(d)]。分子对接结果显示，27-BCZ 可能通过与 RXRα 结合，介导 PI3K-Akt 信号通路，诱发肝损伤。

表 2　27-BCZ 与核心靶点的对接结果

Tab. 2　Docking results between 27-BCZ and core targets

靶点	Uniprot ID	PDB ID	结合能 / (kcal/mol)
HSP90AA1	A5A6K9	2UWD	−5.70
HSP90AB1	P08238	3NMQ	−5.76
RXRα	P19793	3FC6	−7.31
NCOA1	Q15788	5NWX	−6.38
MAPK1	O94737	1PME	−6.61



注：27-BCZ 的氮原子与 SER-420（B）氨基残基形成长度为 0.286 nm 的氢键。

图 5　27-BCZ 与靶点蛋白 RXRα 的分子对接

Fig. 5　Docking views of 27-BCZ and RXRα

2.6　关键基因表达定量分析

为进一步探讨 27-BCZ 致肝损伤的分子过程和验证网络毒理学方法分析预测 27-BCZ 致肝损伤机制的可行性，基于对 PI3K-Akt 信号通路及其介导的凋亡路径的分析，筛选 5 个相关关键基因 *pi3k*（负责编码细胞内信号传递和代谢的重要酶）、*akt*（编码一种丝氨酸特异性蛋白激酶）、*bcl-2*（B 细胞淋巴瘤-2 基因）、*bax*（编码 Bcl-2 相关 X 蛋白）和 *caspase 3*（编码半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶），检测关键基因在 0.05 μmol/L 和 0.15 μmol/L 27-BCZ 暴露组斑马鱼肝脏内的表达水平。发现 PI3K-Akt 信号通路及其介导的凋亡路径的 *pi3k*、*akt* 和 *bcl-2* 转录水平显著降低（P<0.001），*bax* 和 *caspase 3* 转录水平显著升高（P<0.001），而且这种降低或升高的趋势随着暴露浓度的升高得到进一步的增强（图 6）。PI3K-Akt 信号通路是一种经典的信号转导通路[29, 38]，*pi3k* 和 *akt* 的转录异常，进一步介导其下游靶标如 *bax* 和 *bcl-2* 的基因及其相关蛋白的表达，参与细胞凋亡[39]。细胞凋亡的特

征是DNA断裂、细胞收缩和Bcl-2家族激活[40]；关键步骤是细胞色素c从线粒体释放，促进凋亡小体产生和*caspase 9*激活，进而激活*caspase 3*，促进细胞凋亡的进一步扩大，在组织损伤或病理中起重要作用[41]。

这些基因的异常表达表明27-BCZ诱导肝损伤与PI3K-Akt信号通路介导的细胞凋亡有关，这一结论与3，6-二氯咔唑（另一典型PHCZ单体）诱导黄颡鱼肝损伤的分子机制一致[27]，表明网络毒理学方法用于环境有机污染物毒性机制预测，具有一定可靠性。

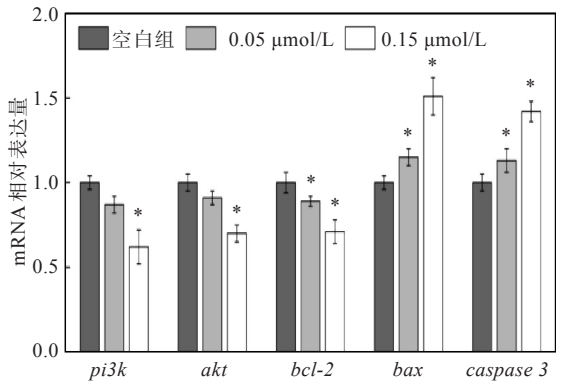


图6 PI3K-Akt介导细胞凋亡部分关键基因的mRNA表达水平

Fig. 6 mRNA expressions of genes related to PI3K-Akt mediated apoptosis

3 结 论

卤代咔唑27-BCZ暴露引起斑马鱼肝脏损伤，出现核固缩、溶解变性等病理变化。网络毒理学方法辅助斑马鱼暴露实验研究的一致结果，表明27-BCZ可能抑制肝细胞PI3K-Akt信号通路介导细胞凋亡，进而导致肝脏损伤。本研究在一定程度上，明确了网络毒理学方法应用于环境有机污染物毒性机制预测的可靠性。为深入研究27-BCZ致肝脏毒性的分子机制奠定了基础，同时也为环境有机污染物毒性机制的研究提供了新的思路与方法。

参考文献

[1] WU Y, TAN H L, SUTTON R, et al. From sediment to top predators: broad exposure of polyhalogenated carbazoles in San Francisco Bay (USA) [J]. Environmental Science and Technology, 2017, 51(4): 2038-2046.

[2] RIDDELL N, JIN U H, SAFE S, et al. Characterization and biological potency of mono- to tetra-halogenated carbazoles [J]. Environmental Science and Technology, 2015, 49(17): 10658-10666.

[3] JI C Y, SHEN C, ZHOU Y X, et al. AhR agonist activity confirmation of polyhalogenated carbazoles (PHCZs) using an integration of in vitro, in vivo, and in silico models [J]. Environmental Science and Technology, 2019, 53(24): 14716-14723.

[4] DUMUR F. Carbazole-based polymers as hosts for solution-processed organic light-emitting diodes: simplicity, efficacy [J]. Organic Electronics, 2015, 25: 345-361.

[5] KARON K, LAPKOWSKI M, JUOZAS G. Electrochemical and UV-Vis/ESR spectroelectrochemical properties of polymers obtained from isomeric 2, 7-and 3, 6-linked carbazole trimers; influence of the linking topology on polymers properties [J]. Electrochimica Acta, 2014, 123: 176-182.

[6] SUN Y X, YANG L L, ZHENG M H, et al. Industrial source identification of polyhalogenated carbazoles and preliminary assessment of their global emissions [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 3740.

[7] ZHANG M, LI P, WANG Q F, et al. Production of polyhalogenated carbazoles in Marine Red Alga Corallina officinalis: a possible natural source [J]. Environmental Science and Technology, 2023, 57(16): 6673-6681.

[8] FROMME H, MI W, LAHRZ T, et al. Occurrence of carbazoles in dust and air samples from different locations in Germany [J]. Science of the Total Environment, 2018, 610: 412-418.

[9] GUO J H, LI Z N, RANASINGHE P, et al. Spatial and temporal trends of polyhalogenated carbazoles in sediments of upper Great Lakes: insights into their origin [J]. Environmental Science and Technology, 2017, 51(1): 89-97.

[10] MUMBO J, PANDELOVA M, MERTES F, et al. The fingerprints of dioxin-like bromocarbazoles and chlorocarbazoles in selected forest soils in Germany [J]. Chemosphere, 2016, 162: 64-72.

[11] HU H M, ZHAO M R, GUO Y M, et al. Occurrence, bioaccumulation and potential risk of polyhalogenated carbazoles in marine organisms from the East China Sea [J]. Science of The Total Environment, 2022, 807: 150643.

[12] JIN H B, ZHAO N, HU H M, et al. Occurrence and partitioning of polyhalogenated carbazoles in seawater and sediment from East China Sea [J]. Water Research, 2021, 190: 116717.

[13] JIA Y X, CHENG J, SUN H F, et al. Sediment-water distribution and potential sources of

polyhalogenated carbazoles in a coastal river locating at a north metropolis, China [J]. Marine Pollution Bulletin, 2023, 189: 114790.

[14] YANG L, ZHANG H L, LI A, et al. Polyhalogenated carbazoles in freshwater and estuarine sediment from China and the United States: a multi-regional study [J]. Science of the Total Environment, 2021, 788: 147908.

[15] 郭远选，王静，周佳，等. 手性农药的环境行为及毒理学研究进展 [J]. 武汉工程大学学报，2023，45(6)：591-598.

[16] FANG M L, GUO J H, CHEN D, et al. Halogenated carbazoles induce cardiotoxicity in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2016, 35(10): 2523-2529.

[17] JI C Y, YUE S Q, GU J P, et al. 2,7-Dibromocarbazole interferes with tube formation in HUVECs by altering *Ang2* promoter DNA methylation status [J]. Science of the Total Environment, 2019, 697: 134156.

[18] JI C Y, LUO Y K, YANG J W, et al. Polyhalogenated carbazoles induce hepatic metabolic disorders in mice via alteration in gut microbiota [J]. Journal of Environmental Sciences, 2023, 127: 603-614.

[19] XIAO F Y, QIU J H, ZHAO Y. Exploring the potential toxicological mechanisms of Vine Tea on the liver based on network toxicology and transcriptomics [J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 855926.

[20] LIU C X, ZHANG C N, WANG W X, et al. Integrated metabolomics and network toxicology to reveal molecular mechanism of celastrol induced cardiotoxicity [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2019, 383: 114785.

[21] 杨长游，汤婷婷，刘秋美，等. 基于网络药理学探究防己茯苓汤治疗肾病综合征的成分与机制 [J]. 武汉工程大学学报，2023，45(5)：496-505.

[22] HUANG M Y, HOU C C, ZHANG Q Y, et al. Tissue-specific accumulation, depuration and histopathological effects of 3,6-dichlorocarbazole and 2, 7-dibromocarbazole in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Aquatic Toxicology, 2024, 266: 106803.

[23] WANG X, SHEN Y H, WANG S W, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W356-W360.

[24] 孙雅馨，秦红岩，臧凯宏，等. 黄药子致肝脏损伤的网络毒理学分析及验证 [J]. 中国现代应用药学，2021，38(24)：3057-3063.

[25] 郭秀欢，雷艳，黄宏威，等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS和网络毒理学的商陆致肝损伤潜在毒性成分及作用机制探讨 [J]. 药物评价研究，2023，46(1)：37-49.

[26] 张林，王停，徐子瑛，等. 基于网络毒理学预测和细胞生物学验证的淫羊藿潜在肝毒性成分与机制研究 [J]. 中国中药杂志，2021，46(10)：2413-2423.

[27] LI S, XIE J, ZHANG D F, et al. Lycopene abolishes typical polyhalogenated carbazoles (PHCZs)-induced hepatic injury in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*): Involvement of ROS/PI3K-AKT/NF-κB signaling [J]. Fish Shellfish Immunol, 2023, 139: 108897.

[28] LI Y Y, LIAO H K, YAO H Y. Prevalence of antibiotic resistance genes in air-conditioning systems in hospitals, farms, and residences [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2019, 16(5): 683.

[29] GONG L H, ZHOU H L, WANG C, et al. Hepatoprotective effect of forsythiaside a against acetaminophen-induced liver injury in zebrafish: Coupling network pharmacology with biochemical pharmacology [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 271: 113890.

[30] YU Z L, JV Y N, CAI L, et al. Gambogic acid attenuates liver fibrosis by inhibiting the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways via inhibiting HSP90 [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2019, 371: 63-73.

[31] ZHU Y P, JING L, LI X Y, et al. Decabromodiphenyl ether disturbs hepatic glycolipid metabolism by regulating the PI3K/AKT/GLUT4 and mTOR/PPARγ/RXRα pathway in mice and L02 cells [J]. Science of the Total Environment, 2021, 763: 142936.

[32] QUAN X J, LIANG C L, SUN M Z, et al. Overexpression of steroid receptor coactivators alleviates hyperglycemia-induced endothelial cell injury in rats through activating the PI3K/Akt pathway [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2019, 40(5): 648-657.

[33] JENG K S, LU S J, WANG C H, et al. Liver fibrosis and inflammation under the control of ERK2 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(11): 3796.

[34] ZHANG M Y, MA L J, JIANG L, et al. Paeoniflorin protects against cisplatin-induced acute kidney injury through targeting Hsp90AA1-Akt protein-protein interaction [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 310: 116422.

[35] ZHANG R, LI H, ZHANG S S, et al. RXRα provokes tumor suppression through p53/p21/p16 and PI3K-AKT signaling pathways during stem cell differentiation and in cancer cells [J]. Cell Death and Disease, 2018, 9: 532.

[36] SUN W W, WANG M M, ZHAO J, et al. Sulindac selectively induces autophagic apoptosis of GABAergic neurons and alters motor behaviour in zebrafish [J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 5351.

[37] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. Plos One, 2013, 8(12): e83922.

[38] MARTINI M, DE SANTIS M C, BRACCINI L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. Annals of Medicine, 2014, 46(6): 372-383.

[39] XUAN F F, JIAN J, QIN F Z, et al. Bauhinia championii flavone inhibits apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Drug Design, Development and Therapy, 2015, 9: 5933-5945.

[40] JAESCHKE H, DUAN L, AKAKPO J Y, et al. The role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 118: 709-718.

[41] MCGILL M R, SHARPE M R, WILLIAMS C D, et al. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation [J]. Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(4): 1574-1583.

本文编辑:张 瑞

☆

(上接第496页)

[24] GU Z Y, CUI Z T, WANG Z J, et al. Carbon vacancies and hydroxyls in graphitic carbon nitride: promoted photocatalytic NO removal activity and mechanism [J]. Applied Catalysis B: Environmental, 2020, 279(1): 119376.

[25] PRABHAKARAN M P, VENUGOPAL J, GHASEMI-MOBARAKEH L, et al. Stem cells and nanostructures for advanced tissue regeneration. Biomedical applications of polymeric nanofibers [M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2011: 21-62.

[26] JACOBS G, JI Y, DAVIS B H, et al. Fischer-tropsch synthesis: temperature programmed EXAFS/XANES investigation of the influence of support type, cobalt loading, and noble metal promoter addition to the reduction behavior of cobalt oxide particles [J]. Applied Catalysis A: General, 2007, 333(2): 177-191.

[27] HE Z Q, SHI Y Q, GAO C, et al. BiOCl/$BiVO_4$ p-n heterojunction with enhanced photocatalytic activity under visible-light irradiation [J]. The Journal of Physical Chemistry C, 2013, 118(1): 389-398.

[28] SHI S, GONDAL M A, AL-SAADI A A, et al. Facile preparation of g-C_3N_4 modified BiOCl hybrid photocatalyst and vital role of frontier orbital energy levels of model compounds in photoactivity enhancement [J]. Journal of Colloid Interface Science, 2014, 416: 212-219.

[29] HE J Y, ZHANG D, WANG X J, et al. Phosphorylation of NiAl-layered double hydroxide nanosheets as a novel cocatalyst for photocatalytic hydrogen evolution [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2021, 46(36): 18977-18987.

本文编辑:张 瑞