

基于网络药理学和实验验证分析鸡血藤治疗 卵巢癌的分子机制

朱时纯¹, 蔡俊³, 吴承玉^{1*}, 程春松^{2,3*}

(1. 南京中医药大学 中医学院·中西医结合学院, 江苏 南京 210023; 2. 中国科学院 庐山植物园 资源植物研究中心, 江西 九江 332900; 3. 澳门科技大学 中药质量研究国家重点实验室, 澳门 999078)

[摘要] 通过网络药理学和分子对接及体外细胞实验,对鸡血藤 *Spatholobi Caulis* 治疗卵巢癌(ovarian cancer, OC)的主要活性成分及其潜在的作用机制进行探讨。运用中药药理学数据库与分析平台(TCMSP)获取鸡血藤的主要活性成分及其预测靶点,通过 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DrugBank 数据库检索获得疾病基因。将疾病及药物预测靶点进行交集处理,筛选出共同的潜在治疗靶点。运用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“药物-成分-疾病-靶点”相互作用网络图;运用 STRING 数据库构建蛋白相互作用的 PPI 网络。运用 R 4.0.5 进行 GO 与 KEGG 功能富集分析。分析对接虚拟筛选的处理和优化由 Schrödinger Maestro 软件完成。该研究筛选出鸡血藤 23 个活性成分,涉及 75 个卵巢癌靶点及 178 个相关信号通路;网络分析结果表明鸡血藤可能通过作用于 GSK-3 β 、Bcl-2、Bax 等关键靶点,发挥抗卵巢癌作用;分子对接结果显示 GSK-3 β 与活性成分樱黄素结合活性较好。最后体外实验将筛选出的鸡血藤活性成分樱黄素对人卵巢癌细胞 SKOV3 进行核心靶点和通路的初步验证。采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况,使用流式细胞仪检测樱黄素对人卵巢癌细胞 SKOV3 凋亡的影响。运用 Western blot 法检测樱黄素靶点及相关调控蛋白的表达。体外细胞实验证明,樱黄素对卵巢癌细胞的增殖有明显的抑制作用,并且樱黄素对 SKOV3 有诱导凋亡的作用。Western blot 实验结果表明,樱黄素可以通过抑制 GSK-3 β 磷酸化的发生,调控下游 Bcl-2、Bax 蛋白的表达,诱导 SKOV3 细胞凋亡的发生。该研究揭示了网络药理学预测并指导实验设计的科学性,证实樱黄素可通过阻断 GSK-3 β /Bcl-2/Bax 细胞信号转导通路治疗卵巢癌,为鸡血藤治疗卵巢癌的机制研究提供依据。

[关键词] 网络药理学; 分子对接; 鸡血藤; 樱黄素; 卵巢癌

Molecular mechanism of *Spatholobi Caulis* in treatment of ovarian cancer based on network pharmacology and experimental verification

ZHU Shi-chun¹, CAI Jun³, WU Cheng-yu^{1*}, CHENG Chun-song^{2,3*}

(1. School of Traditional Chinese Medicine and School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. Resource Plant Research Center, Lushan Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Jiujiang 332900, China; 3. State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicines, Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China)

[Abstract] The present study explored the main active ingredients and the underlying mechanism of *Spatholobi Caulis* in the treatment of ovarian cancer (OC) by network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* cell experiments. The active ingredients and their predicted targets (AITs) were first acquired online with the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP). Theoretical disease targets (DTs) were obtained through professional databases including GeneCards, OMIM, PharmGkb, TTD, and DrugBank. The common targets in the intersection of AITs and DTs were used for the construction of a

[收稿日期] 2021-08-12

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81904092,81803997);江苏省中医药科技发展计划项目(YB201903)

[通信作者] *吴承玉,教授,博士生导师,主任中医师,E-mail: 290045@njucm.edu.cn; *程春松,中医师,副研究员,硕士生导师,E-mail: chengcs@lsbg.cn

[作者简介] 朱时纯,博士研究生,主治中医师,E-mail: 846280606@qq.com

"drug-ingredient-disease-target" network by Cytoscape 3.7.1. STRING database was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network. R 4.0.5 was used for GO and KEGG functional enrichment analyses. Schrödinger Maestro was used to perform and optimize the molecular docking and virtual screening. Twenty-three active ingredients of *Spatholobi Caulis* were screened out, involving 75 OC targets and 178 signaling pathways. Network analysis revealed that *Spatholobi Caulis* presumably exerted an anti-OC effect by acting on key protein targets such as GSK-3 β , Bcl-2, and Bax. Molecular docking showed that GSK-3 β possessed good binding activity to prunetin. *In vitro* cell experiments preliminarily verified the core targets and pathways of prunetin, the active ingredient of *Spatholobi Caulis* against human OC SKOV3 cells. CCK-8 assay was used to detect the cell proliferation, and flow cytometry was used to detect the effect of prunetin on apoptosis of human OC SKOV3 cells. The expression of prunetin targets and related regulatory proteins was detected by Western blot. *In vitro* cell experiments demonstrated that prunetin displayed significant inhibitory effects on the proliferation of OC cells and could induce apoptosis of SKOV3 cells. Western blot showed that prunetin could induce SKOV3 cell apoptosis by inhibiting GSK-3 β phosphorylation and regulating the expression of downstream Bcl-2 and Bax proteins. This study reveals the scientific nature of network pharmacology in the prediction and guidance of experimental design, confirming that prunetin can treat OC by blocking the GSK-3 β /Bcl-2/Bax cell signal transduction pathway. The findings are expected to provide a basis for the investigation of the mechanism of *Spatholobi Caulis* in the treatment of OC.

[Key words] network pharmacology; molecular docking; *Spatholobi Caulis*; prunetin; ovarian cancer

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20211103.703

卵巢癌(ovarian cancer, OC)作为常见妇科恶性肿瘤,在女性生殖器官恶性肿瘤中发病率位居第3,约占所有女性恶性肿瘤的2.5%,病死率居妇科肿瘤首位^[1]。早期的非特异性症状导致大多数患者发现时即晚期,早期诊断的卵巢癌患者5年生存率可达92%,晚期卵巢癌预后不良,5年生存率不足30%^[2]。卵巢恶性肿瘤的标准治疗是肿瘤细胞减灭术和以铂类联合紫杉醇为基础的化疗,但化疗副作用一定程度降低了患者生活质量。中医药的使用在减轻化疗副作用、延长无进展生存期、改善生活质量方面已得到广泛认可。鸡血藤在中医临床作为治疗月经不调、带下病^[3]等常见病的妇科用药,因其活血祛瘀功效亦被用于卵巢癌的中医治疗^[4]。

鸡血藤 *Spatholobi Caulis* 来源于豆科植物密花豆 *Spatholobus suberectus* Dun 的干燥藤茎,味苦甘,性温,归肝、肾经^[5]。有活血补血、调经止痛、舒筋活络之功效,能“去瘀血,生新血”,乃“血分之圣药”^[6]。《本草备要》载:“鸡血藤,活血舒筋,治男女干血劳,一切虚损劳伤、吐血咯血、咳血嗽血,诸病要药。”^[7]随着现代药理学发展,鸡血藤用于治疗肿瘤的疗效逐渐受到关注^[8],其有效成分抗肿瘤作用也进一步得到验证。通过 UFLC-Triple、TOF-MS/MS 或者 UFLC-QTRAP-MS/MS 鉴定出鸡血藤中 50 种成分,包括 42 种黄酮类化合物、3 种有机酸、2 种香豆素和 3 种糖苷^[9]。另有研究在鸡血藤黄酮类抗肿瘤活性部位的色谱指纹图谱中指出黄酮类主要成分的

色谱峰^[10-11]。研究提出在肠道代谢酶和外排转运体的耦合影响下,6 种异黄酮(染料木素、黄豆苷元、芒柄花黄素、黄豆黄素、生物链素 A 和樱黄素)中樱黄素在空肠、回肠末端、结肠中的吸收显著高于其他 5 种异黄酮,且在十二指肠、回肠、空肠代谢速度显著降低^[12]。

网络药理学通过整合生物信息学、系统生物学中关于药物分子结构、作用机制、分子通路等信息,经过计算技术、神经网络等方式^[13]系统全面地呈现药物治疗作用。本研究通过运用网络药理学,构建成分-靶点-疾病作用网络,结合体外细胞实验深入探讨鸡血藤有效成分治疗 SKOV3 细胞的作用机制,为今后治疗卵巢癌中药研究提供方向和思路。

1 资料与方法

1.1 药物有效成分筛选

在 TCMS 数据库(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>)中检索鸡血藤,查找药物有效活性成分及作用靶点,设置口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$,类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件,并通过文献进行补充。

1.2 疾病相关基因查找

通过 GeneCards(<http://www.genecards.org/>)、OMIM(<http://omim.org/>)、PharmGkb(<http://www.pharmgkb.org/>)、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd>)、DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>) 5 个数据库,以“ovarian cancer”为关键词进行疾病相关基因查

找。将各数据库得到的疾病相关基因进行交集并删除重复基因,使用 PERL 软件绘制 Venn 图。使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 下载已证实的人类基因,利用 PERL 软件对药物靶点基因全称进行 symbol 转换。

1.3 药物靶点-疾病相关基因交集

使用 PERL 软件读取药物靶基因和疾病基因,提取基因名称,绘制 Venn 图,获得药物与疾病的交集基因。查找药物成分和靶基因的对应关系。

1.4 网络模型的构建与分析

使用 Cytoscape 3.8.0 软件及 JAVA 软件,构建“药物-成分-疾病-靶点”相互作用网络图,使用 Network Analyzer 功能对鸡血藤的主要活性成分进行分析。

1.5 蛋白互作网络构建

将药物靶点和疾病相关基因的交集输入到 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中检索 homo sapiens,按照 minimum required interaction score highest confidence (0.900) 进行设定,删除无连接的节点。使用构建蛋白相互作用的 PPI 网络,并根据蛋白之间的关联度进行排序。

使用插件 CytoNCA 提取网络中得分较高的节点,得到网络核心基因,使用 R 软件进行循环,找出每个打分中大于中位值的基因,过滤条件(中介中心性 51.299 406 44;接近中心性 0.401 977 956;度中心性 10;特征向量中心性 0.053 917 95;局部边连通性 4.593 406 593;网络中心性 5.759 848 485,得到基因列表。对第 2 个网络进行筛选,过滤条件为(中介中心性 15.416 291 67;接近中心性 0.588 235 294;度中心性 13;特征向量中心性 0.135 307 789;局部边连通性 7.111 111 111;网络中心性 8.222 222 222)。

1.6 通路富集分析

药物-疾病共同靶点 entrezID 的转换是由 R 软件中 Bioconductor 模块软件包“org.Hs.eg.db”运行完成。关键靶基因 GO 与 KEGG 功能富集分析由 R 软件中的“colorspace”“stringi”“ggplot2”和“DOSE”“clusterProfiler”“enrichplot”模块完成,根据已转换的 entrezID,结果以条形图和气泡图形式输出。过滤条件为 $P = 0.05$ 、 $Q = 0.05$,运行“pathview”模块绘制通路图。

1.7 成分-靶点分子对接

利用 PubChem 在线数据库 ([<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>\) 下载小分子配体 2D 结构,通过 Chemoffice 软件将 2D 结构转换为 3D。利用 Chem3D 进行能量最小化之后将所有的结构导入 Schrödinger 软件建立数据库,通过加氢、结构优化、能量最小化,保存后作为分子对接的配体分子数据库。在 UniProt 在线查询所选基因的蛋白 ID,通过蛋白 ID 在 PDB 中进行搜索,下载所选蛋白三维结构。分子图形系统 PyMOL 2.5.1 去除水分子和小分子配体。靶蛋白与化合物均使用 AutoDockTools 1.5.6 转化为 PDBQT 格式。最后,使用 Schrödinger Suites 进行分子对接作图分析。虚拟筛选的处理和优化是由 Schrödinger Maestro 软件中的 Glide 模块完成的。蛋白质处理利用 Protein Preparation Wizard 模块。对受体进行预处理、优化和最小化\(利用 OPLS3e 力场进行约束最小化\)^{\[14-15\]}。所有化合物均按 LigPre 模块的默认设置制备。在 Glide 模块中进行筛选时,导入制备好的受体,以在受体网格生成中指定合适的位置。选取蛋白的原配体作为 10 Å 盒子的质心。将原配体进行再对接,确认对接方法选择的可行性。通过 SP 对接对数据集进行筛选。分析小分子和靶蛋白的作用模式,得到与蛋白残基作用的情况,如产生的氢键作用、 \$\pi\$ - \$\pi\$ 相互作用、疏水相互作用等,推测拟筛的多肽是否与靶蛋白很好的结合。](http://pubchem.</p></div><div data-bbox=)

1.8 SKOV3 细胞体外实验

1.8.1 细胞株、药物、试剂及仪器 人卵巢癌 SKOV3 细胞株购于上海富衡生物科技有限公司,细胞体外培养于 McCoy's 5A 培养基+10%FBS 培养基中,供体外实验使用,取对数期生长的细胞进行实验。CO₂ 细胞培养箱(Heracell 150i,美国 Thermo 公司);樱黄素(prunetin, HPLC 纯度 $\geq 97\%$, CAS#552-59-0,批号 K16A10C95424) 购于上海源叶生物科技有限公司;McCoy's 5A 培养基(批号 L200508) 购于上海富衡生物科技有限公司;GSK-3 β (D5C5Z) (货号 12456S), p-GSK-3 β (S9) (货号 5558S), GAPDH (D16H11,货号 5174P) 均购于 CST 上海基因生物技术国际贸易有限公司;Bcl2 (ab32124)、Bax (ab32503) 购于上海 Abcam 生物科技有限公司。

1.8.2 CCK8 法检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期的 SKOV3 细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,接种于 96 孔板,100 μ L/孔。将培养板置于培养箱预培养 24 h 后,分别向培养板中加入不同剂

量樱黄素(40、80、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。将培养板在培养箱孵育 48 h。之后向每孔加入 10 μL 的 CCK-8 溶液。继续孵育 1 h 后,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度,并计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $(A_c - A_s) / A_c \times 100\%$; A_c 为对照组(含有细胞的培养基、CCK-8、不含药物)吸光度, A_s 为实验组(含有细胞的培养基、CCK-8、不同浓度的药物)吸光度。

1.8.3 Western blot 法检测相关蛋白表达 收集各处理组 SKOV3 细胞,提取总蛋白,按 BCA 试剂盒说明书步骤进行样本吸光度测定浓度,绘制标准曲线,进行蛋白定量;根据蛋白相对分子质量的不同,行 7.5% ~ 12.5% PAGE-SDS 凝胶电泳,蛋白转移到 PVDF 膜上,PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,各目标分子特异性一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,一抗包括 GSK-3 β 、p-GSK-3 β 、Bcl-2、Bax、GAPDH。1 \times TBST 洗涤,加入对应的二抗室温孵育 2 h。用 ECL 试剂盒发光液孵育,于暗盒内胶片曝光,显影蛋白条带,Band Scan 软件扫描灰度。

1.8.4 real-time PCR 检测 Bax、Bcl-2 表达水平 人卵巢癌 SKOV3 细胞株经过药物处理后,镜检检查细胞数,按照液氮速冻后,置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。使用 RNAqueousTM 提取总 RNA 分离试剂盒,按照操作说明提取分离总 RNA,所提取的总 RNA 用紫外分光光度计定量, $A_{260} / A_{280} > 1.8$,以随机引物进行逆转录合成 cDNA 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存。逆转录试剂盒为 Takara 的 PrimeScript RT Master Mix;RT-PCR 试剂盒采用 Genenode 公司产品。RT-PCR 使用引物由六合华大合成,引物序列如下。Bax 基因正反向引物为 A 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGT-3'; S 5'-ACA-AACATGGTCACGGTCTGC-3'。Bcl-2 基因正反向引物为 A 5'-AGATGTCCAGCCAGCTGCAC-3'; S 5'-TGT-TGACTTCACCTGTGGCC-3'。 β -actin 引物序列为 A 5'-CTCCTTAATCTCACGCACGATTTC-3'; S 5'-GTG-GGGCGCCCCAGGCACCA-3'。RT-PCR 条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 预变性,95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s 变性,58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 退火,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s 延伸,72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 再延伸,共 40 个循环。RT-PCR 生物学重复 3 次,而技术重复 6 次,去掉离群值后取均值作为一个生物学重复的结果。

1.8.5 流式细胞仪检测细胞凋亡实验方法 将 SKOV3 细胞铺至 6 孔板,密度为 2×10^5 个/mL,每孔 2 mL 培养基,培养过夜后,更换药物培养基继续养

24 h。PBS 洗涤细胞,1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,离心 5 min。采用 100 μL 1 \times binding buffer 续培重悬细胞。加入 1 μL Annexin V-FITC 和 2 μL PI staining solution,轻柔混匀,室温避光下反应 15 min,过滤后流式细胞仪检测。

1.8.6 统计学分析 所有实验数据使用 SPSS 21.0 软件分析处理, F 方差检验后,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间的差异进行 t 检验。 $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鸡血藤潜在活性成分及靶点的获取

在 TCMS 数据库中查找到鸡血藤的有效成分 68 个,按条件 $\text{OB} \geq 30\%$, $\text{DL} \geq 0.18$ 进行筛选得到 24 个有效活性成分,2 个化合物无对应作用靶点,予删除;并结合文献中异黄酮成分含量^[9]及肠道吸收利用率、排泄率^[12]补充鸡血藤的主要异黄酮类成分樱黄素^[10-11,16],共得到有效活性成分 23 个,检索到药物作用靶点 1 142 个,见表 1。

2.2 疾病作用靶点筛选

使用 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DrugBank 数据库以“ovarian cancer”为关键词进行检索,将 5 个数据库获得的疾病基因取交集获得 Venn 图。基于 GeneCards 获得 1 393 相关基因,基于 OMIM 筛选获得 172 个相关基因,基于 PharmGkb 获得 388 个相关基因,基于 TTD 获得 67 个相关基因,基于 DrugBank 获得 84 个相关基因。去重后共获得疾病靶点 1 789 个相关基因,两两数据库的交集共获得 148 个靶点,见图 1。

2.3 药物-疾病共同靶点交集

使用 PERL 在线软件将 23 个药物靶点和疾病基因进行交集,绘制 Venn 图,共获得 75 个药物-疾病共同靶点,见图 2。

2.4 网络模型的构建及分析

将上述步骤中收集到的 23 个鸡血藤活性成分、基因靶点以及相关卵巢癌信号通路信息,录入 Excel 表格并设定对应关系及属性,分别导入 Cytoscape 3.7.0 软件制作“成分-靶点-通路”图,根据网络拓扑学性质,选取度值(degree)较高药物活性成分节点(node)进行分析,连线(edge)较多的节点在该网络中可能主要起到抗肿瘤作用,利用 Network Analyzer 插件对结果进行分析,见图 3。

表1 鸡血藤活性成分及潜在的药物作用靶标的筛选

Table 1 Active ingredients of Spatholobi Caulis and the potential drug targets

Mol ID	化合物	OB/%	DL
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
MOL000033	(3 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 9 <i>S</i> , 10 <i>R</i> , 13 <i>R</i> , 14 <i>S</i> , 17 <i>R</i>)-10, 13-dimethyl-17-[(2 <i>R</i> , 5 <i>S</i>)-5-propan-2-yl]octan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL000392	formononetin	69.67	0.21
MOL000417	calycosin	47.75	0.24
MOL000449	stigmasterol	43.83	0.76
MOL000461	3, 7-dihydroxy-6-methoxy-dihydroflavonol	43.80	0.26
MOL000468	8- <i>O</i> -methylreyusi	70.32	0.27
MOL000469	3-hydroxystigmast-5-en-7-one	40.93	0.78
MOL000470	8- <i>C</i> - α -L-arabinosylluteolin	35.54	0.66
MOL000471	aloe-emodin	83.38	0.24
MOL000483	(<i>Z</i>)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)- <i>N</i> -[2-(4-hydroxyphenyl)ethyl]acrylamide	118.35	0.26
MOL000490	petunidin	30.05	0.31
MOL000492	(+)-catechin	54.83	0.24
MOL000493	campesterol	37.58	0.71
MOL000497	licochalcone A	40.79	0.29
MOL000500	vestitol	74.66	0.21
MOL000501	consume close grain	68.12	0.27
MOL000502	cajinin	68.80	0.27
MOL000503	medicagol	57.49	0.6
MOL000507	psi-baptigenin	70.12	0.31
MOL000006	luteolin	36.16	0.25
MOL000486	prunetin	5.41	0.24

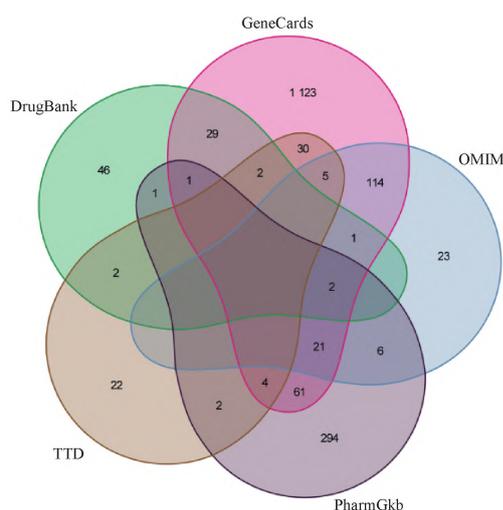


图1 鸡血藤潜在活性成分

Fig. 1 Potential active ingredients of Spatholobi Caulis

2.5 PPI 互作网络

在 STRING PPI 在线软件中导入 75 个共同靶点,物种项勾选为“homo sapiens”,通过数据库的信

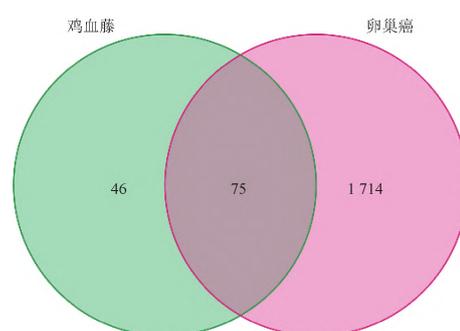


图2 鸡血藤活性物质药物靶点和卵巢癌病理相关基因韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of drug targets of Spatholobi Caulis active ingredients and ovarian cancer-related pathological genes

息得到蛋白质相互作用关系,构建 PPI 网络,见图 4;使用 CytoNCA 计算每个节点的分值并进行初步过滤;重复上述 CytoNCA 步骤,提取分数高的节点。其中节点代表蛋白,每条边则代表各个蛋白之间的相互作用关系。将下载的 tsv 文件用 R 语言进行处

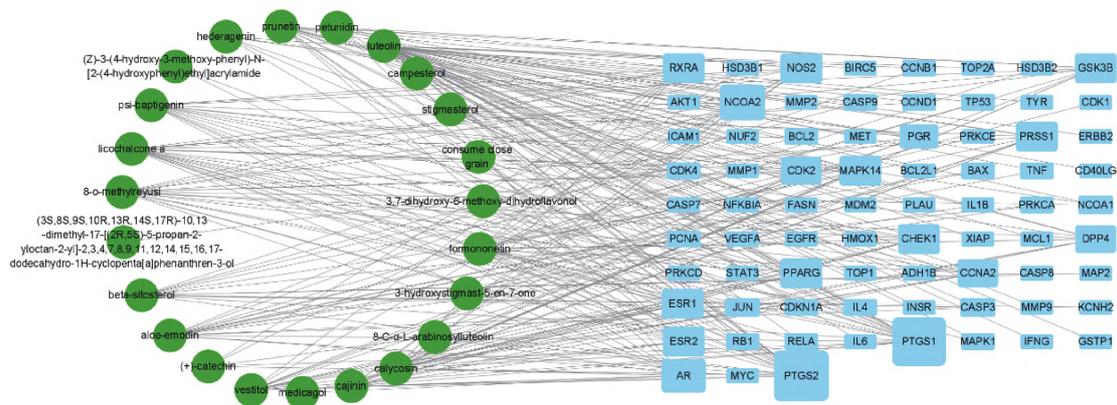
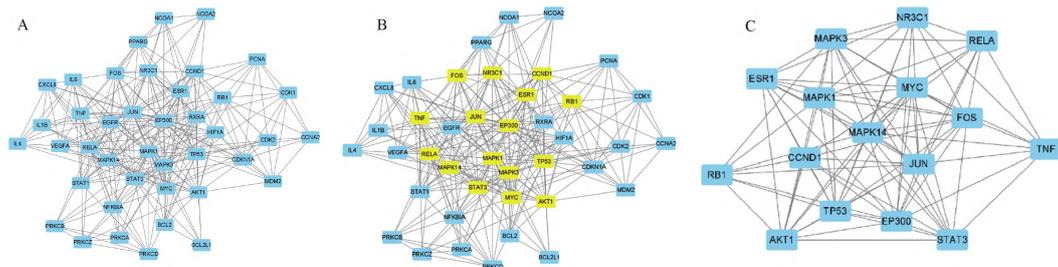


图 3 鸡血藤“成分-靶点-通路”网络

Fig. 3 "Active ingredient-target-pathway" network of Spatholobi Caulis

理,获得 AKT、Bax、Bcl-2 等抗肿瘤信号通路相关的 蛋白。



A. 初步筛选; B. 进一步筛选; C. 最终筛选。

图 4 蛋白互作核心网络图的构建

Fig. 4 Core PPI network

2.6 GO 富集分析

通过 R 软件对 75 个疾病-药物共同靶点进行分析,将基因本体 (gene ontology, GO) 进行生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 3 部分筛选,结果见图 5。GO 结果显示,交集基因集合共富集到 2 315 条 BP 通路中,基因数目>10 的 454 条通路,主要有对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应过程;交集基因集合共富集至 CC 表达通路中有 54 条,其中基因数目>10 的 17 条通路,主要与膜筏、膜微区、膜区有关;交集基因集合共富集至 163 个与 MF 相关的过程中,富集基因数目>10 的 21 条通路,主要与 DNA 结合转录因子、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子、泛素样蛋白连接酶有关。

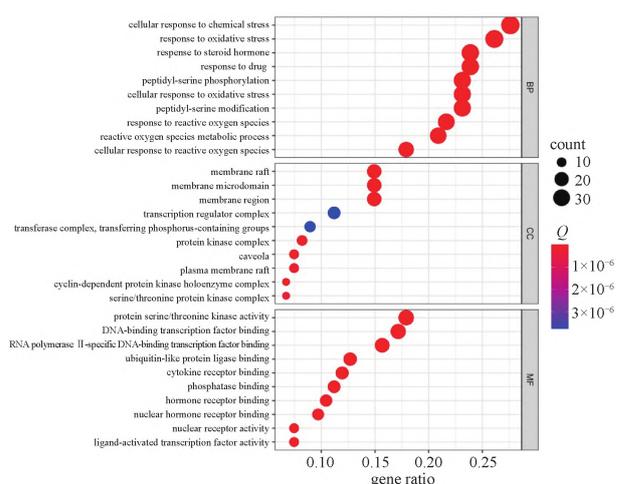


图 5 鸡血藤活性物质 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment of the active ingredients of Spatholobi Caulis

2.7 KEGG 通路分析

通过 R 软件对 75 个共同靶点运行后得到 169 条的 KEGG 通路,前 30 的功能富集 KEGG 气泡图结果见图 6。图中横坐标表示富集的数目,纵坐标代表 P , P 越小颜色越红, P 越大颜色越蓝。KEGG 通路富集分析结果显示共同的靶点主要富集在脂质与动脉粥样硬化、PI3K-AKT 信号通路、细胞衰老等信号通路上。

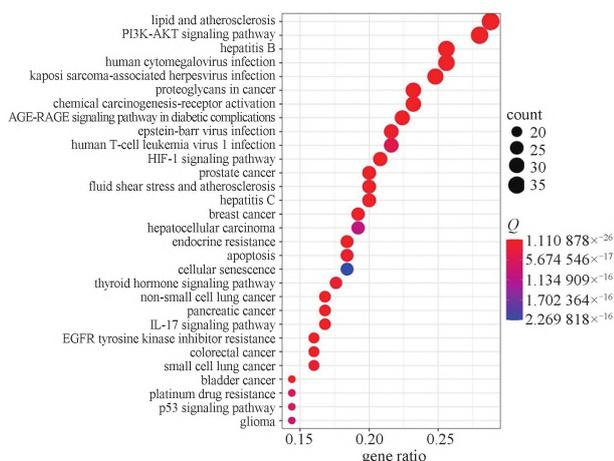


图 6 鸡血藤活性物质 KEGG 通路分析

Fig. 6 KEGG pathways of active ingredients of *Spatholobi Caulis*

2.8 分子对接

GSK-3 β 靶点蛋白晶体结构 (PDB ID 为 6PYS, 解析度 2.19 Å), 在 Maestro11.9 平台对蛋白结构进行处理,用 Schrödinger 的 Protein Preparation Wizard 处理蛋白,去除结晶水,补加缺失的氢原子,并修复缺失键信息,修补缺失肽段,最后对蛋白进行能量最 cajinin、psi-baptigenin、formononetin、prunetin、8-*O*-methylretusin、calycosin、vestitol、origin-ligand、小化、以及几何结构的优化。从 PubChem 数据库下载作用靶点为 GSK-3 β 的化合物 10 种 (petunidin、licochalcone), 将其作为配体备用。结合势能公式^[17]:

$$\Delta G_{\text{bind}} = C_{\text{lipo-lipo}} \sum f(T|r) + C_{\text{hbond-neuto-neut}} \sum g(\Delta r) h(\Delta\alpha) + C_{\text{hbond-charged-charged}} \sum g(\Delta r) h(\Delta\alpha) + C_{\text{max-metalion}} \sum f(T|m) + C_{\text{roth}} H_{\text{roth}} + C_{\text{polar-phob}} V_{\text{polar-phob}} + C_{\text{coul}} E_{\text{coul}} + C_{\text{vdw}} E_{\text{vdw}} + \text{solvationrms}$$

利用公式计算势能,多肽与蛋白的分子对接结果见表 2。

樱黄素与 GSK-3 β 蛋白的结合势能最低为

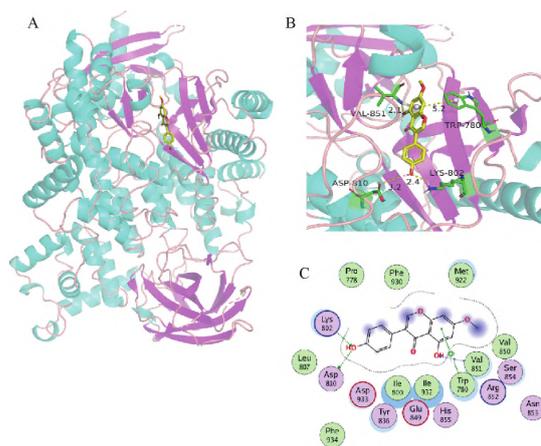
792

表 2 筛选化合物的分子对接结果

Table 2 Molecular docking of the screened compounds

肽类	结合势能 /kcal·mol ⁻¹	结合方式	均方根差 (RMSD)/Å
prunetin	-9.05	氢键、疏水相互作用、 π -堆积	1.91
petunidin	-8.90	氢键、疏水相互作用、 π -堆积	1.82
cajinin	-8.72	氢键、疏水相互作用、 π -堆积	2.12
psi-baptigenin	-8.66	氢键、疏水相互作用	2.01
formononetin	-8.08	氢键、疏水相互作用、 π -堆积	1.98
8- <i>O</i> -methylretusin	-7.89	氢键、疏水相互作用、 π -堆积	2.23
calycosin	-7.88	氢键、疏水相互作用、 π -堆积	2.16
vestitol	-7.57	氢键、疏水相互作用	2.08
origin-ligand	-7.54	氢键、疏水相互作用	2.13
licochalcone A	-7.34	氢键、疏水相互作用	2.26

-9.05 kcal·mol⁻¹, RMSD 为 1.91 Å, 小于 2 Å 显示对接位姿系统相对稳定。樱黄素与蛋白的结合位点包括 VAL-851、ASP-810、LYS-802、TRP-780 等氨基酸残基,与阳性化合物的接触的位点较一致 { [2 ~ (*R*)] -3-[7-azanyl-5-(cyclohexylamino) -[1, 2, 4] triazolo [1, 5-a] [1, 3, 5] triazin-2-yl] -2-cyano-propanamide 14H19N90}, 见图 7。对接结果还显示樱黄素能够与靶标蛋白有很好的结合,能够形成多个氢键相互作用,其结合力按贡献大小分别是氢键、疏水相互作用、 π -堆积,其氢键平均距离短,对稳定蛋白活性位点的小分子有着重要贡献。因此,樱黄素均能够很好的匹配 GSK-3 β 蛋白的活性口袋。



A. 分子对接复合物的三维结构; B. GSK-3 β 蛋白与 prunetin 的详细结合位点; C. GSK-3 β 蛋白与 prunetin 的详细结合位点; 绿色虚线代表氢键距离或 π 堆积。

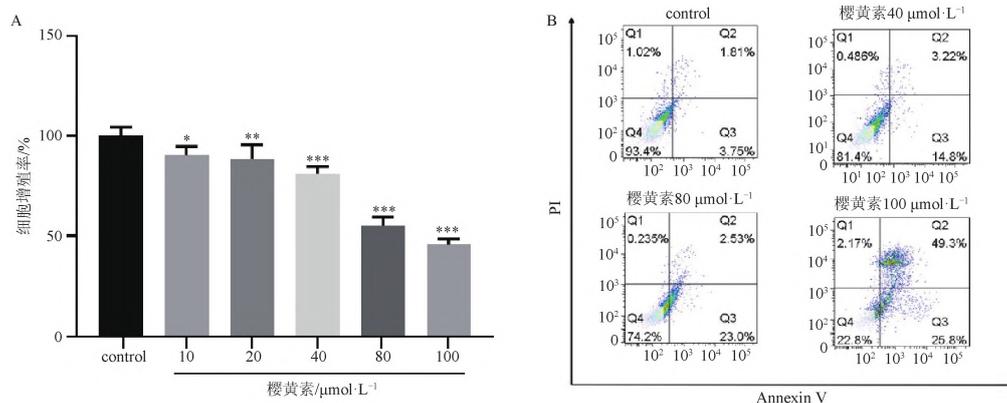
图 7 樱黄素与 GSK-3 β 蛋白的分子对接

Fig. 7 Molecular docking of prunetin to GSK-3 β

2.9 鸡血藤药效成分樱黄素干预卵巢癌体外实验研究

2.9.1 樱黄素对 SKOV3 细胞增殖抑制的影响 为了验证樱黄素是否是鸡血藤治疗卵巢癌的主要有效物质,运用 CCK-8 法检测 40、80、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 不同

浓度的樱黄素体外对人 SKOV3 细胞的抑制作用,见图 8A,当加入活性成分樱黄素后,SKOV3 细胞培养体系 6 h 后即出现增殖抑制作用。流式结果显示随着樱黄素剂量的增加,细胞凋亡随着增加,结果见图 8B。



control. 对照组; A. 樱黄素对卵巢癌 SKOV3 细胞增殖作用的检测; B. 流式细胞术检测樱黄素对卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的影响; 与 control 组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (图 9、10 同)。

图 8 樱黄素对卵巢癌的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 8 Inhibitory effects of prunetin on ovarian cancer ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.9.2 樱黄素对蛋白表达的影响 Western blot 实验显示随着樱黄素剂量的增加, p-GSK-3 β 表达下降, Bax 表达上升, Bcl-2 表达下降, 见图 9。结果表

明, 经樱黄素干预后的人卵巢癌 SKOV3 细胞可能出现 GSK-3 β 蛋白的磷酸化表达下降, 进而调控了 Bcl-2 水平下降及 Bax 水平升高。

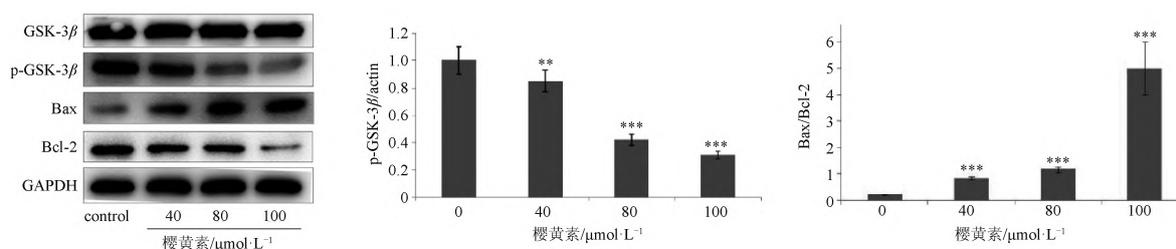


图 9 樱黄素对蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of prunetin on protein expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.9.3 人卵巢癌 SKOV3 细胞内 PI3K/AKT 信号通路相关基因表达水平 本研究还检测了樱黄素对人卵巢癌 SKOV3 细胞基因表达的影响, 见图 10, 可以发现樱黄素可以调控 Bcl-2 水平下降及 Bax 水平升高, 与 Western blot 的结果基本一致。

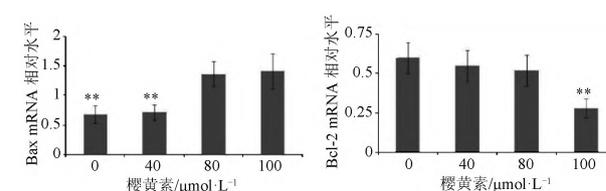


图 10 Q-PCR 检测樱黄素对卵巢癌 SKOV3 细胞信号通路相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Effect of prunetin on the expression of genes related to the signaling pathway in ovarian cancer SKOV3 cells by Q-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论

药理研究鸡血藤中黄酮类、甾醇类、三萜类、酚酸类、木脂素类、蒽醌类等^[18]有效化合物在抗肿瘤、抗氧化及双向调节酪氨酸酶、改善血液循环系统方

面疗效显著^[19],尤其是肿瘤患者治疗后贫血、白细胞减少、化疗后骨髓抑制等临床症状^[20-22]。随着鸡血藤抗肿瘤作用机制的研究,目前已经证实其在肺癌^[23]、胃癌^[16]中有明显疗效。研究证实鸡血藤柱色谱提取物可阻滞肺癌细胞系 A549 于 S 期和 G₂/M 期^[10],阻滞肠癌细胞系 HT229 于 G₂/M 期达到抗肿瘤作用^[24]。

本研究基于鸡血藤成分多、作用靶点多的研究思路,应用网络药理学技术,通过作用靶点构建鸡血藤治疗 OC 作用靶点的交互网络。体外细胞实验验证治疗 OC 作用相关的生物过程和通路,阐述并验证鸡血藤治疗 OC 的作用机制。

本研究中网络分析结果表明鸡血藤可能通过作用于 GSK-3 β 、Bcl-2、Bax 等关键靶点,PI3K-AKT、p53 等关键信号通路发挥抗 OC 作用。分子对接结果提示,鸡血藤活性成分樱黄素与 GSK-3 β 关键靶点结合性较好。体外细胞实验证实,樱黄素对人卵巢癌细胞 SKOV3 的增殖有明显的抑制作用。体外实验部分结果亦表明 GSK-3 β 磷酸化抑制后,Bcl-2 表达下降,Bax 表达显著上调。

PI3K/AKT 信号通路作为原癌基因信号通路,在细胞的生长、增殖、存活、转录及蛋白合成方面发挥重要作用^[25]。近年来研究证实,PI3K/AKT 信号通路不仅与细胞的增殖、凋亡等过程密切相关,还和细胞异常增殖及恶性转化密不可分^[26-30],在多种肿瘤中表现为高度激活状态,是多种抗癌药物的有效作用靶点之一。磷酸肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)是磷酸肌醇及肌醇的重要激酶,PI3K 激活后促进 AKT 的活化,活化后的 AKT 磷酸化激活或者抑制其下游靶蛋白,可通过 PI3K/AKT 信号通路直接调节凋亡相关蛋白 Bax、BAD、Bcl-2、caspase-9 等而抑制细胞的凋亡^[31]。此外,AKT 也通过直接磷酸化从而抑制 GSK-3 β 激酶活性,阻止细胞周期调控因子 cyclinD1 的降解,加快癌细胞 G₁/S 期的转换,从而促进肿瘤细胞的增殖。

本研究中樱黄素抑制了卵巢癌细胞的增殖,促进细胞凋亡,同时分子对接的结果提示其可以靶向作用于 GSK-3 β 蛋白,这与 PI3K/AKT 信号通路有密切关系,为进一步阐明樱黄素治疗卵巢癌的作用机制提供了基础。综上所述,结合网络药理学及分子对接的结果,提示樱黄素可以从 PI3K/AKT 通路治疗卵巢癌。

[参考文献]

- [1] KOSSAI M, LEARY A, SCOZZEC J Y, et al. Ovarian cancer: a heterogeneous disease [J]. Pathobiology, 2018, 85 (1/2): 41.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115.
- [3] 陈锐. 妇科千金片临床应用解析 [J]. 中国社区医师, 2012, 28 (24): 15.
- [4] 赵延华. 周仲瑛辨治宫颈癌与卵巢癌学术传承及创新研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [5] 赵学敏. 本草纲目拾遗 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007: 214.
- [6] 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, 2015: 194.
- [7] 项长生, 胡国臣. 汪昂医学全书·本草备要. 卷一. 草部 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 1999: 385.
- [8] 富琦, 唐勇, 罗晓琴, 等. 鸡血藤 SSCe 体内抗肿瘤作用及机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(12): 1570.
- [9] MEI Y, WEI L, TAN M, et al. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Spatholobi Caulis by UFLC-Triple TOF-MS/MS and UFLC-QTRAP-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113803.
- [10] 王宏, 刘艺娜, 曾祖平, 等. 鸡血藤抗肿瘤活性部位 SSCe 指纹图谱的研究 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(18): 2525.
- [11] 崔艳君, 刘屏, 陈若芸. 鸡血藤有效成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 32(2): 42.
- [12] WANG S W J, CHEN J, JIA X, et al. Disposition of flavonoids via enteric recycling: structural effects and lack of correlations between *in vitro* and *in situ* metabolic properties [J]. Drug Metab Dispos, 2006, 34(11): 1837.
- [13] SHAO L. Network pharmacology evaluation method guidance-draft [J]. World J Tradit Chin Med, 2021, 7(1): 165.
- [14] RAJESWARI M, SANTHI N, BHUVANESWARI V. Pharmacophore and virtual screening of JAK3 inhibitors [J]. Bioinformatics, 2014, 10(3): 157.
- [15] FAZI R, TINTOR C, BRAI A, et al. Homology model-based virtual screening for the identification of human helicase DDX3 inhibitors [J]. J Chem Inf Model, 2015, 55(11): 2443.
- [16] VETRIVEL P, KIM S M, HA S E, et al. Compound prunetin induces cell death in gastric cancer cell with potent anti-proliferative properties: *in vitro* assay, molecular docking, dynamics, and ADMET studies [J]. Biomolecules, 2020, 10 (7): 1086.
- [17] FRIESNER R A, BANKS J L, MURPHY R B, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. I. Method and assessment of docking accuracy [J]. J Med Chem, 2004, 47(7): 1739.
- [18] 江珊, 鄢庆祥, 陈路, 等. 金鸡胶囊的化学成分和质量标准研究进展 [J]. 化学与生物工程, 2010, 36(12): 5.
- [19] 谭静, 林红强, 王涵, 等. 鸡血藤的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 中药与临床, 2018, 9(5): 61.
- [20] 姚惠, 杨维佳, 杨敏春, 等. 口服铁剂联合鸡血藤水煎液治疗缺铁性贫血对机体铁代谢的临床疗效及安全性分析 [J]. 中

- 华全科医学,2016,14(4):540.
- [21] 王妮佳,王嘉仡,孟宪生,等.基于3D微流控芯片分析鸡血藤总鞣质对宫颈癌细胞 HeLa 的药理作用[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(2):103.
- [22] 毕艺鸣,殷贝,范冠杰,等.基于分子对接的鸡血藤抗血栓活性成分的筛选研究[J].中国现代应用药学,2021,38(15):1803.
- [23] 陈康,金晨,程玉瑶,等.基于网络药理学和分子对接探讨鸡血藤治疗肺癌的分子作用机制[J].中国中药杂志,2021,46(4):837.
- [24] 唐勇,何薇,王玉芝,等.鸡血藤黄酮类组分抗肿瘤活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2007,13(2):51.
- [25] CARNERO A, BLANCO-APARICIO C, RENNER O, et al. The PTEN/PI3K/Akt signalling pathway in cancer, therapeutic implications[J]. Curr Cancer Drug Targets,2008,8(3):187.
- [26] SPANGLE J M, ROBERTS T M, ZHAO J J. The emerging role of PI3K/Akt-mediated epigenetic regulation in cancer [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer,2017,1868(1):123.
- [27] GAI J Q, SHENG X, QIN J M, et al. The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Int J Oncol,2016,48(1):338.
- [28] LIU X X, XIONG H P, HUANG J S, et al. Highly expressed long non-coding RNA CRNDE promotes cell proliferation through PI3K/Akt signalling in non-small cell lung carcinoma [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2017,44(8):895.
- [29] 李中辉,董旺,陈敏,等.大黄素下调 ILK/PI3K/Akt 信号通路抑制结肠癌 CACO-2 细胞增殖的机制研究[J].今日药学,2020,30(2):116.
- [30] 谭晖,王吉昌,董丹凤,等.五味子酯甲通过抑制 CCAT1 和 PI3K-AKT 信号通路抑制肺癌细胞的迁移和侵袭[J].世界中医药,2021,16(13):1966.
- [31] CIOLCZYK W D, GIL D, LAIDLER P, et al. Treatment of melanoma with selected inhibitors of signaling kinases effectively reduces proliferation and induces expression of cell cycle inhibitors [J]. Med Oncol,2017,35(1):7.

[责任编辑 陈玲]