本文引用: 陈思睿, 吴天鸿, 刘 洁, 张文青, 姚敬心, 何迎春, 史红健, 王贤文, 范婧莹. 基于网络药理学、分子对接、实验研究探讨白屈菜治疗鼻咽癌的物质基础及潜在机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 278-287.

基于网络药理学、分子对接、实验研究探讨白屈菜治疗鼻咽癌的物质基础及潜在机制

陈思睿[1],吴天鸿[1],刘 洁[1,2],张文青[1,2],姚敬心[1],何迎春[1,2]*,史红健[1],王贤文[2,3],范婧莹[1,2]*

1.湖南中医药大学,湖南 长沙 410208;2.中医药防治眼耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208;
3.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410007

〔摘要〕**目的** 运用网络药理学和分子对接技术预测白屈菜抗鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)的作用靶点和机制,并通过实验验证主要活性成分对NPC细胞增殖和凋亡的影响。**方法** 借助在线数据平台TCMSP、ETCM和BATMAN-TCM检索白屈菜的化学成分和作用靶点。通过GEO数据库检索NPC相关靶点,生信在线工具分析白屈菜与NPC的交集靶点。使用STRING构建共同靶点的PPI网络,运用Cytoscape 3.7.1获得核心靶点。通过R软件编程进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析。分子对接分析核心靶点与主要活性成分之间的结合情况。实验验证:(1)将5-8F细胞分为溶剂对照组、血根碱(2.5 μmol·L^{-1}、5 μmol·L^{-1})组、白屈菜红碱(2.5 μmol·L^{-1}、5 μmol·L^{-1})组、顺铂4 μg·mL^{-1}组。MTT检测白屈菜主要活性成分对NPC细胞增殖的影响。(2)将5-8F细胞分为溶剂对照组、血根碱5 μmol·L^{-1}组、白屈菜红碱5 μmol·L^{-1}组、顺铂4 μg·mL^{-1}组;Annexin-V FITC/PI双荧光染色法检测细胞凋亡;Western blot检测白屈菜主要活性成分对NPC细胞增殖、凋亡、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)和磷脂酰肌醇三激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B,AKT)信号通路关键蛋白的影响。**结果** 检索得到白屈菜37个主要活性成分和1 419个作用靶点。检索GEO数据库共收集到7 852个NPC疾病基因,白屈菜与NPC共有327个交集靶点,其中核心靶基因共10个,分别是EGFR、TP53、VEGFA、TNF、FN1、MMP9、JUN、FGF2、LYN、F2。GO分析主要涉及泛素蛋白连接酶结合、硫化物结合、整合素结合、肝素结合和糖胺聚糖结合,KEGG分析主要涉及MAPK、PI3K/AKT信号通路等,分子对接结果显示核心靶点与对应的活性成分具有良好的结合能力。实验验证显示,与溶剂对照组相比,血根碱和白屈菜红碱均明显降低NPC细胞相对增殖率(P<0.01),并提高细胞凋亡率(P<0.01),且血根碱和白屈菜红碱降低5-8F细胞中XIAP、PCNA、ERK1/2、AKT的蛋白表达水平(P<0.05或P<0.01)。**结论** 白屈菜可通过多成分、多靶点和多通路发挥抗NPC的作用,且经实验验证,血根碱和白屈菜红碱均可抑制NPC细胞增殖并诱导凋亡,其机制可能与MAPK信号通路、PI3K/AKT信号通路有关。

〔关键词〕鼻咽癌;网络药理学;分子对接;白屈菜;MAPK信号通路;PI3K/AKT信号通路

〔中图分类号〕R285 〔文献标志码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.015

Material basis and potential mechanism of Baiqucai (Chelidonii Herba) in treating nasopharyngeal carcinoma based on network pharmacology, molecular docking, and experimental research

CHEN Sirui[1], WU Tianhong[1], LIU Jie[1,2], ZHANG Wenqing[1,2], Yao Jingxin[1], HE Yingchun[1,2], SHI Hongjian[1], WANG Xianwen[2,3], FAN Jingying[1,2]**

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory for Prevention &

〔收稿日期〕2023-07-09

〔基金项目〕国家自然科学基金资助项目(81973914);湖南省中医药管理局项目(D2022105,B2023014);湖南省教育厅科研项目(21C0241,21B0358,22C0176);湖南中医药大学校级科研基金项目(2021XJJJ014);湖南中医药大学大学生创新课题(2022-165);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2021ZYX34);长沙市自然科学基金项目(kzd22008)。

〔通信作者〕* 范婧莹,女,硕士,讲师,E-mail:14248623@qq.com;何迎春,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:1305851329@qq.com。

Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China;
3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China

〔**Abstract**〕 **Objective** To predict the action targets and mechanism of Baiqucai (Chelidonii Herba) against nasopharyngeal carcinoma (NPC) by network pharmacology and molecular docking techniques, and to verify the effects of its main active ingredients on the proliferation and apoptosis of NPC cells through experiments. **Methods** Through the online platforms of TCMSP, ETCM, and BATMAN-TCM, the chemical constituents and action targets of Baiqucai (Chelidonii Herba) were searched. The relevant targets of NPC were retrieved through the GEO database, and the intersection targets of Baiqucai (Chelidonii Herba) and NPC were analyzed by Shengxin online tool. STRING was used to build a protein-protein interaction (PPI) network of the common targets, and Cytoscape 3.7.1 was used to obtain core targets. GO function and KEGG pathway enrichment analyses were performed by R software programming. The condition of binding between the core targets and the main active ingredients was analyzed by molecular docking. Experimental verification: (1) 5-8F cells were divided into solvent control, sanguinarine (2.5 μmol·L^{-1}, 5 μmol·L^{-1}), chelerythrine (2.5 μmol·L^{-1}, 5 μmol·L^{-1}), and cisplatin 4 μg·mL^{-1} groups; MTT was used to test the effects of the main active ingredients of Baiqucai (Chelidonii Herba) on the proliferation of NPC cells. (2) 5-8F cells were divided into solvent control, sanguinarine 5 μmol·L^{-1}, chelerythrine 5 μmol·L^{-1}, and cisplatin 4 μg·mL^{-1} groups; apoptosis was determined by Annexin-V FITC/PI double fluorescence staining; Western blot was used to measure the effects of the main active ingredients on the proliferation, apoptosis, as well as the key proteins of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathways of NPC cells. **Results** A total of 37 main active ingredients and 1 419 action targets of Baiqucai (Chelidonii Herba) were obtained. A total of 7 852 NPC disease genes were collected by searching the GEO database. There were 327 intersection targets between Baiqucai (Chelidonii Herba) and NPC, among which ten core target genes were EGFR, TP53, VEGFA, TNF, FN1, MMP9, JUN, FGF2, LYN, and F2. GO analysis mainly involved ubiquitin protein ligase binding, ubiquitin-like protein ligase binding, sulfur compound binding, integrin binding, heparin binding, and glycosaminoglycan binding. KEGG analysis mainly involved MAPK and PI3K/AKT signaling pathways. Molecular docking showed that the core targets had good binding ability with corresponding active ingredients. The experimental verification showed that compared with the solvent control group, sanguinarine and chelerythrine significantly reduced the relative proliferation rate of NPC cells (P<0.01), increased the apoptosis rate (P<0.01), and decreased the protein expression levels of XIAP, PCNA, ERK1/2, and AKT in 5-8F cells (P<0.05 or P<0.01). **Conclusion** Baiqucai (Chelidonii Herba) can play an anti-NPC role through multi-component, multi-target, and multi-pathway, and it has been verified by experiments that sanguinarine and chelerythrine can both inhibit the proliferation of NPC cells and induce apoptosis, the mechanism of which may be related to MAPK and PI3K/AKT signaling pathways.

〔**Keywords**〕 nasopharyngeal carcinoma: network pharmacology; molecular docking; Baiqucai (Chelidonii Herba); MAPK signaling pathway; PI3K/AKT signaling pathway

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma,NPC)是临床常见的头颈部恶性肿瘤之一,其恶性程度高,70%的患者被确诊时已是晚期[1-2]。以放疗和化疗相结合的综合治疗是目前治疗 NPC 的主要方法,但复发和远处转移仍是治疗失败的主要原因[3]。目前,中医药抗肿瘤药物日益受到关注,因其与化疗药物相比,在抑杀肿瘤细胞的同时,具有毒副作用小、不易产生耐药性等优势[4]。

白屈菜主产区位于我国东北部,是罂粟科属植物白屈菜的干燥全草,其性凉、味苦、有毒。白屈菜最早记载于《救荒本草》[5],具有止咳平喘、消肿、利尿、镇痛、解毒之功效。现代研究表明,白屈菜的生物活性成分在治疗癌症、呼吸道疾病、肝纤维化等方面具有研究价值[6]。且随着人工栽培及加工技术的提高,白屈菜的产量将在未来足以提供临床药用[7],这使其具有较高的商业前景。围绕白屈菜的抗肿瘤活性,研究发现其主要化学活性成分为异喹啉类生物碱,实验证实[8-9],白屈菜的有效成分可通过多途径抑制肿瘤细胞增殖、促进凋亡。目前,白屈菜已用于治疗多种肿瘤,如胃癌、食管癌、肝胆肿瘤和各种中晚期肿瘤腹转移等[10]。白屈菜的活性成分白屈菜红碱被证实在非小细胞肺癌[11]、宫颈癌[12]等肿瘤中,都具有

较好的疗效,但在 NPC 领域尚未被广泛应用。而另一主要活性成分血根碱在 NPC 领域中的相关研究报道也较少见。目前,白屈菜治疗 NPC 的物质基础及作用机制尚不明确。

因此,本研究基于网络药理学,构建白屈菜的活性成分、NPC 与药物靶点之间的相互作用网络,借助分子对接技术分析白屈菜主要活性成分与核心靶点的结合情况,最后通过实验验证白屈菜主要活性成分对 NPC 的作用,为揭示白屈菜治疗 NPC 的物质基础及潜在分子机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 白屈菜作用靶点的筛选

在 TCMSP(https://tcmsp-e.com/tcmsp.php)、ETCM(http://www.tcmip.cn/ETCM/)、BATMAN-TCM 数据库(http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/index.php/Home/Index/index),输入关键词“Baiqucai”“Chelidonium majus”,BATMAN-TCM 数据库选择 score>5 的靶点,合并上述结果得到白屈菜的活性成分和作用靶点,并通过 UniProt 数据中 reviewed(Swiss-Prot)and Human 矫正。

1.2 NPC 靶点的筛选

选择 GEO 数据库中与 NPC 相关的转录组数据集,分别为 GSE68799、GSE118719、GSE134884,具体信息见表 1。通过 R 语言 V 4.1.3“DEseq2”“limma”等分析 3 个转录组,选择 $P<0.05$,$|\log_2FC|>1$ 的基因为差异基因,合并所有差异基因为 NPC 靶点。最后,将白屈菜相关靶点与 NPC 相关靶点通过生信在线工具(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/)进行韦恩图映射,获得白屈菜治疗 NPC 作用的交集靶点。

表 1 GEO 数据库中与 NPC 相关的数据组数据集

GSE ID 号	正常/个	肿瘤/个
GSE68799	4	42
GSE118719	4	7
GSE134884	3	3

1.3 白屈菜治疗 NPC 模块靶点的筛选及其 PPI 网络构建

将映射后获得的白屈菜治疗 NPC 作用的交集靶点,在 STRING 数据库中获得靶点-靶点功能相关蛋白间的网络相互作用关系,选择的最小相互作用得分>0.700,得到靶点 PPI 网络图及其 tsv.数据。运用 Cytoscape 3.7.1 中 network analyzer,分析网络中自由度中位数和最大自由度等拓扑参数,选取 degree 前 10 的靶点作为核心靶点。

1.4 靶点的 GO 和 KEGG 通路富集分析

应用 R 语言 V4.1.3 中的“ClusterProfiler”等 R 包,对获得的核心靶点进行 GO 分析、KEGG 通路富集分析及可视化, 基因注释信息来自“org.Hs.eg.Db”,富集时的 p-value Cutoff=0.05,q-value-Cutoff=0.05。

1.5 分子对接

通过分子对接可以预测蛋白与小分子的结合能力。白屈菜的结构从 PubChem 数据库(https://pubchem.ncbi. nlm.nih.gov/)获取,对应的蛋白结构从PDB 数据库(https://www.rcsb.org/)获得。通过 Chem Bio Office 软件中的 3D Draw 模块将白屈菜活性成分结构进行最小能 MM2 力场优化,通过 Raccoon 软件转化为 PDBQT。通过 Autodock Vina 软件的配套工具 MGLTools 1.5.6 处理蛋白,加氢,Gasteiger 电荷,合并非极性氢等操作,保存 pdbqt 格式,为配体对接做好准备。

1.6 实验验证

1.6.1 细胞株 人 NPC 细胞株 5-8F 购自商城北纳创联生物科技有限公司,由本实验室传代培养。

1.6.2 药物与试剂 对照品血根碱(货号:B21412-20 mg,质量分数≥98%)、白屈菜红碱(货号:B20052-20 mg,质量分数≥98%)均购自上海源叶生物科技有限公司;5-氟尿嘧啶(大连美仑生物技术有限公司,货号:51-21-8);RPMI 1640 培养基 (美国 HyClone 公司,货号:PM150110);胎牛血清(美国 Gbico 公司,货号:04-001-1A);噻唑蓝(货号:M8180)、marker(货号:PR1910-100T) 均购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,货号:VBD53M1ZL3);BCA 蛋白定量试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,货号:70-PQ0012);脱脂奶粉[生工生物工程(上海)股份有限公司,货号:A600669-0250];顺铂(美国 Sigma 公司,批号:MKCM2435);蛋白激酶 B (protein kinase B,AKT)(货号:60203-2-Ig)、磷脂酰肌醇三激酶 (phosphatidylinositol 3-Kinase,PI3K)(货号:00070453)、GAPDH(货号:00113797)、β-actin(货号:10024215)购自美国 Proteintech 公司;ERK1/2(美国 Cell Signaling Technology 公司,货号:4695S);PCNA(北京博奥森生物技术有限公司,批号:AH08154079);Goat anti-Mouse 二抗(货号:926-68070)、Goat anti-Rabbit 二抗(货号:926-32211)均购自美国 Licor 公司。

1.6.3 主要仪器 倒置显微镜(日本 Olympus 公司,

型号:CKX31);CO_2 培养箱(上海赛默飞世尔公司,型号:HERAcell150i);微孔板分光光度计(美国 Biotek 公司,型号:800TS);双荧光细胞分析仪(美国 Nexcelom 公司,型号:Cellometer K2);高速冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司,型号:Microfuge 20R);多功能荧光成像仪(美国 Licor 公司,型号:Odyssey CLX);蓝箭快转仪(广州道一科学技术有限公司,型号:FTB95);电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司,型号:JY600HE)。

1.6.4　MTT 法检测细胞增殖能力　采用 MTT 实验法检测白屈菜主要活性成分中具有明显抗肿瘤作用的血根碱、白屈菜红碱对 NPC 细胞增殖的影响。取对数生长周期的 5-8F 细胞,用胰酶消化后收集细胞(5×10^3 个/孔)接种于 96 孔培养板中,于细胞培养箱中培养 7 h。待细胞贴壁后,吸弃原培养液,分别加入不同的含药培养液培养处理 24 h 和 48 h 后,吸弃上清液,每孔加入 100 μL MTT 工作液,37 ℃避光培养 4 h,再次弃上清液,加入 100 μL DMSO,避光摇晃 10 min 后,用酶标仪检测 490 nm 波长处 OD 值,计算细胞相对增殖率。细胞相对增殖率=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%。

1.6.5　Annexin-V FITC/PI 双荧光染色法检测细胞凋亡　5-8F 细胞经胰酶消化后,将细胞平铺于 6 cm 培养皿,待细胞贴壁后,加入相应的药物,待药物干预细胞 24 h 后,用不含 EDTA 的胰蛋白酶将细胞消化后收集细胞悬液,离心后保留细胞沉淀,然后用 100 μL 1×Blinding buffer 重悬,加入 5 μL FITC 和 5 μL PI 染液,室温下避光孵育 15 min 后终止染色,采用双荧光细胞分析仪检测细胞凋亡率。

1.6.6　Western blot 法检测相关蛋白表达水平　采用 Western blot 实验检测白屈菜主要活性成分中具有明显抗肿瘤作用的血根碱、白屈菜红碱对 NPC 细胞的影响。设置血根碱 5 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 组、白屈菜红碱 5 $\mu mol\cdot L^{-1}$ 组、溶剂对照组以及阳性对照组(顺铂 4 $\mu g\cdot mL^{-1}$ 组),处理 24 h 后,在冰上使用 PBS 清洗细胞,再向培养皿中加入 RIPA 裂解液,用细胞刮收集细胞碎片,置于离心管内。4 ℃裂解 30 min 后,将离心管置于提前预冷的离心机中按 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作,测定蛋白浓度。按 60 μg 上样量配制样品并变性。于 SDS-PAGE 凝胶电泳按 40 V,分离后 6 h,采用半干转膜仪转膜 20 min。用5%的脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗 XIAP(1∶1 000)、PCNA(1∶1 000)、ERK1/2(1∶1 000)和 AKT(1∶1 000)孵育过夜,第 2 天洗膜后,避光孵育荧光二抗(1∶10 000)2 h,洗膜,最后在 Odyssey 多功能荧光成像仪成像,Image studio 软件框选条带信号值。

1.7　统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件处理,计量资料实验数据服从正态分布,数据以"$\bar{x}\pm s$"表示。单因素设计和多组间计量资料比较采用单因素方差分析,多重比较则采用 *LSD* 法,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。结果分析图由 GraphPad Prism 8.0 软件制作完成。

2　结果

2.1　白屈菜活性成分和作用靶点筛选

如图 1 所示,根据限制条件对 TCMSP、BATMAN-TCM 数据库中白屈菜活性成分进行检索,去掉重复成分后共得到 37 个生物活性成分,通过 SwissTargetPrediction 等数据库检索药物靶点,去除重复项后经 UniProt 数据库矫正得到 1 419 个白屈菜靶点。

2.2　白屈菜治疗 NPC 作用靶点筛选及其 PPI 网络

检索 GEO 数据库,共收集到 7 852 个 NPC 疾病基因,通过生信在线工具获得白屈菜与 NPC 的交集靶点共 327 个,详见图 2。同时,应用 STRING 数据库收集 327 个靶点功能相关的 PPI 数据,构建白屈菜治疗 NPC 靶点及其功能相关 PPI 网络。详见图 3。

2.3　PPI 网络拓扑参数分析及核心靶点筛选

将映射得到的交集蛋白导入 Cytoscape 3.7.1,计算白屈菜抗 NPC 靶点及功能相关 PPI 网络的拓扑参数,可得靶点自由度的中位数为 5.662,最大自由度为 48,前 10 个核心靶点分别为:EGFR、TP53、VEGFA、TNF、FN1、MMP9、JUN、FGF2、LYN、F2。核心靶点所对应的活性成分如图 4 所示,主要活性成分包括:血根碱、白屈菜红碱、鹅去氧胆碱和氧化槐果碱等。

2.4　核心靶点的 GO 分析和 KEGG 通路富集分析

通过 R 语言相关的包对核心靶点进行GO 富集分析。其中,生物过程(biological processes,BP)主要涉及创伤治愈、神经发生调控和神经系统发育调控。细胞组分(cellular component,CC)主要涉及囊泡腔、膜筏、膜微区和含胶原的细胞外基质。分子功能(molecular function,MF)主要涉及泛素蛋白连接酶结合、硫化物结合、整合素结合、肝素结合和糖胺聚糖结合。详见图 5。KEGG 信号通路主要富集到 MAPK 信号通路、PI3K/AKT 信号通路。详见图6。

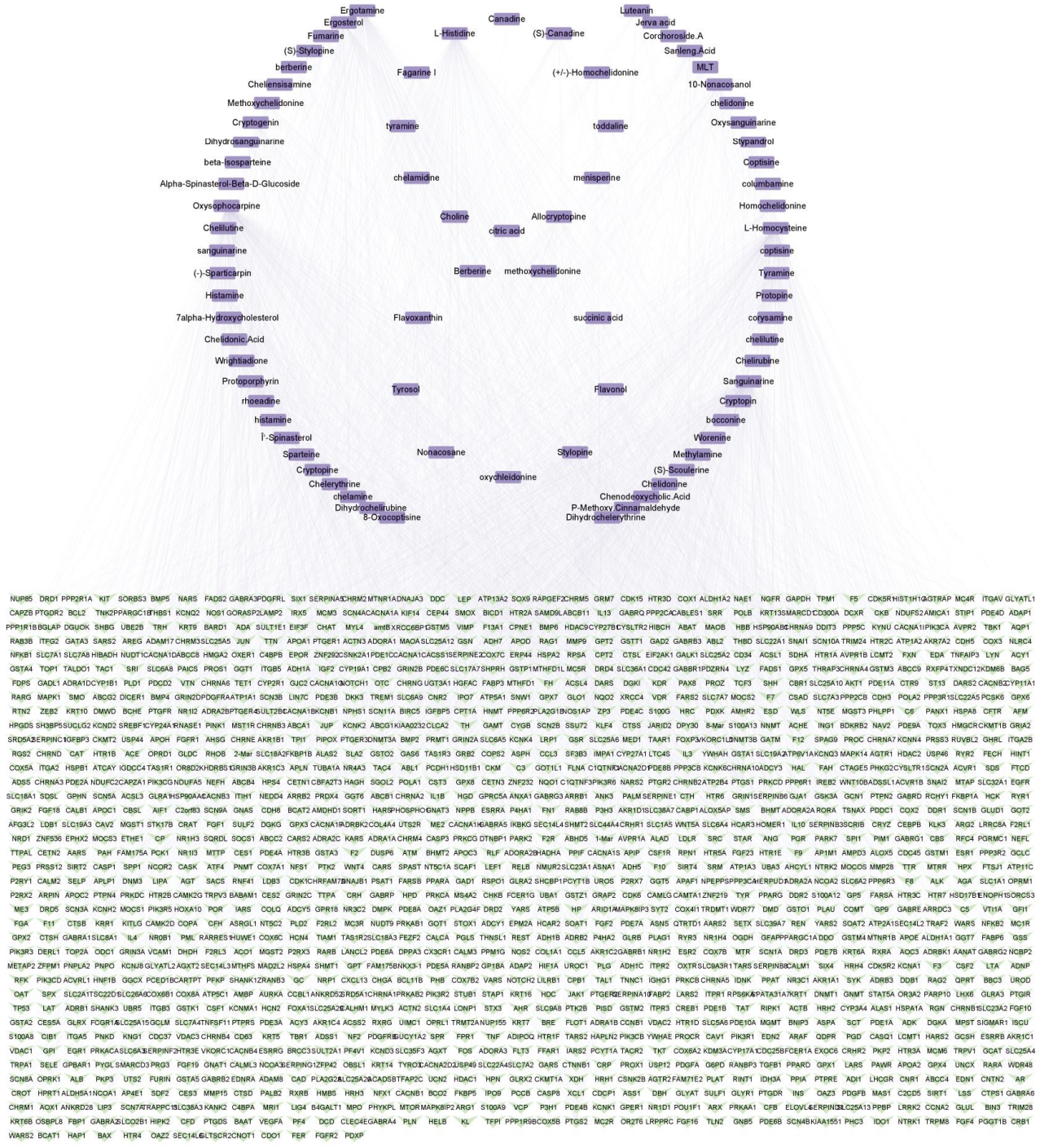

图 1 白屈菜的主要活性成分及作用靶点

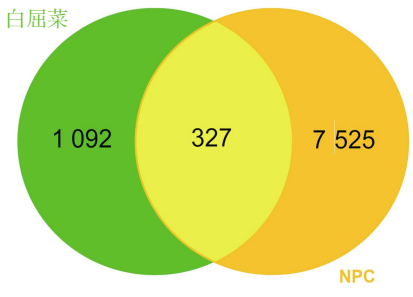

图 2 白屈菜活性成分靶点与 NPC 疾病靶点韦恩图

2.5 分子对接结果

通过 PDB 数据库搜索 10 个核心靶点相关的蛋白，建立合适的活性空腔盒子模型后，与对应的化合物进行分子对接，结果通过 pymol V 2.3 展示。在EGFR(PDB ID:5UGC)、TP53(PDB ID:2MWO)、VEGFA(PDB ID:5T89)、TNF(PDB ID:6OOY)、FN1(PDB ID:2CG6)，MMP9(PDB ID:4XCT)、JUN(PDB ID:2P33)、LYN(PDB ID:5XY1)、F2(PDB ID:1AE8)蛋白分子中，对应的分子与其对接的结果均小于 0(图 7)，而 FGF2 未找到合适的蛋白分子。图 8 展示了血根碱、白屈菜红碱与其对应的核心靶点之间具体的结合部位。

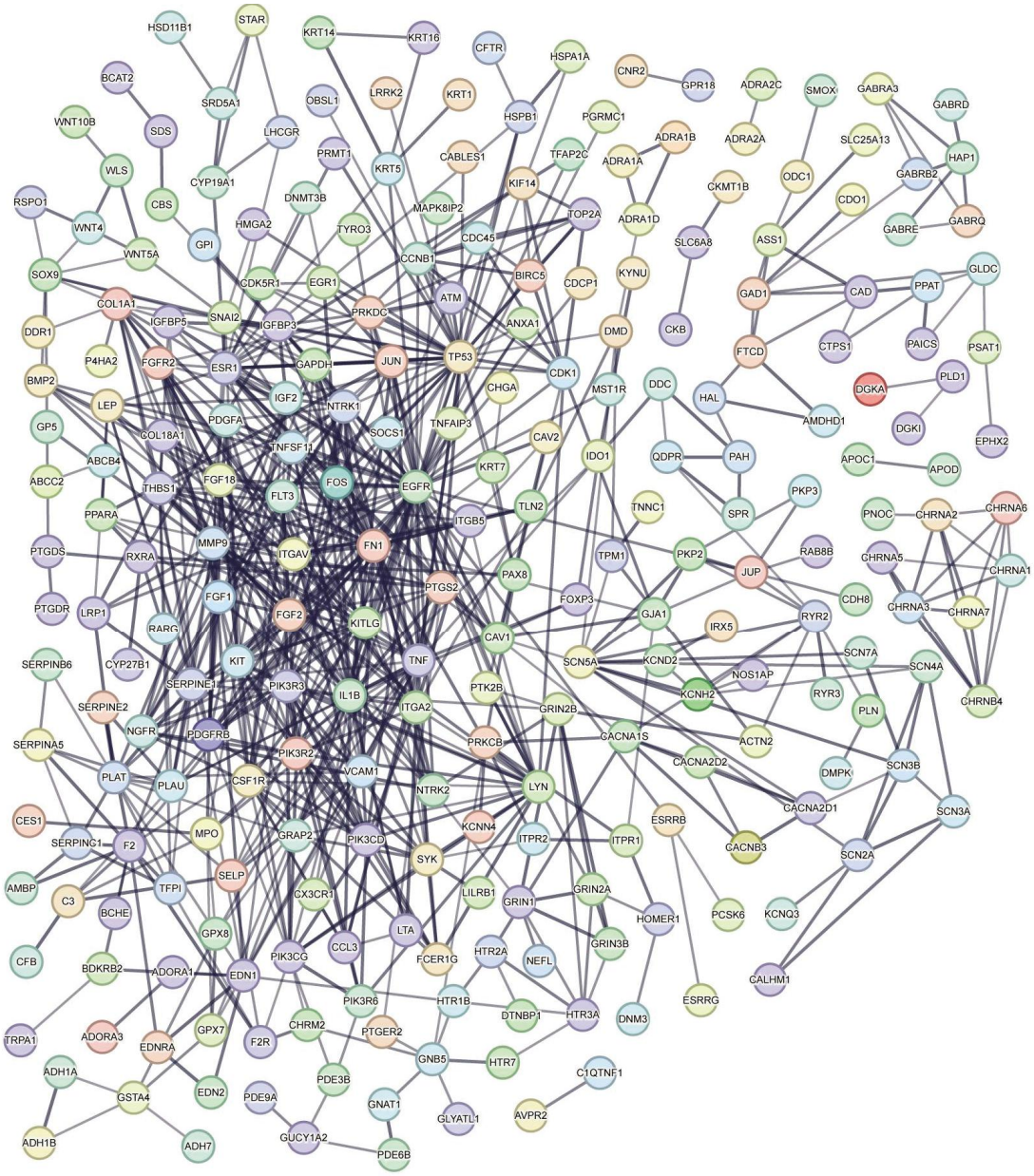

图 3　白屈菜治疗 NPC 靶点及其功能相关 PPI 网络图

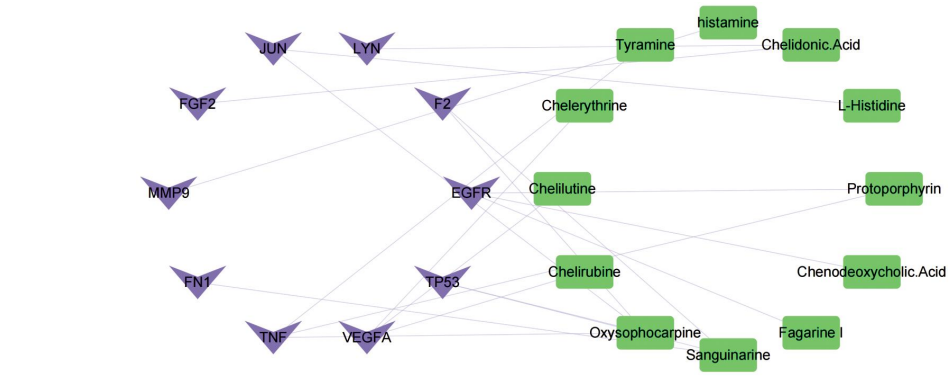

图 4　白屈菜抗 NPC 的核心靶点和主要成分

2.6　白屈菜主要活性成分抑制 NPC 细胞增殖

MTT 结果显示,与溶剂对照组比较,顺铂 4 μg·mL^{-1} 组、不同浓度的血根碱(2.5 μmol·L^{-1}、5 μmol·L^{-1})组和白屈菜红碱(2.5 μmol·L^{-1}、5 μmol·L^{-1})组分别作用于 NPC 5-8F 细胞 24、48 h 后,5-8F 细胞相对增殖率明显降低,差异具有统计学意义(P<0.01)。结果见图9。

2.7　白屈菜主要活性成分诱导 NPC 细胞凋亡

与溶剂对照组比较,血根碱 5 μmol·L^{-1} 组、白

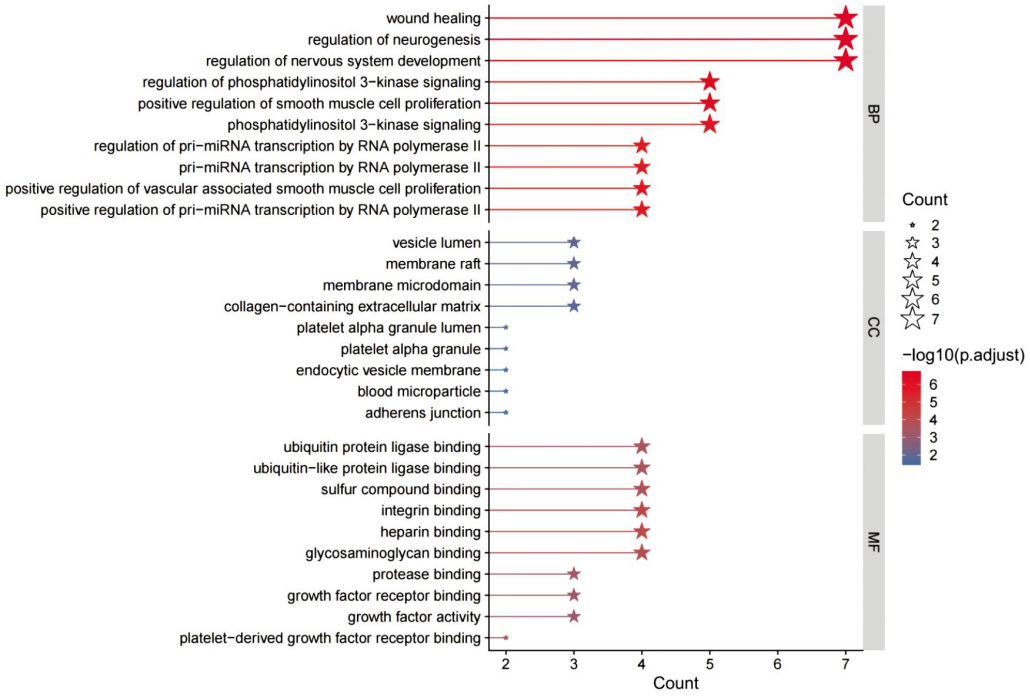

图 5 GO 功能分析星条图

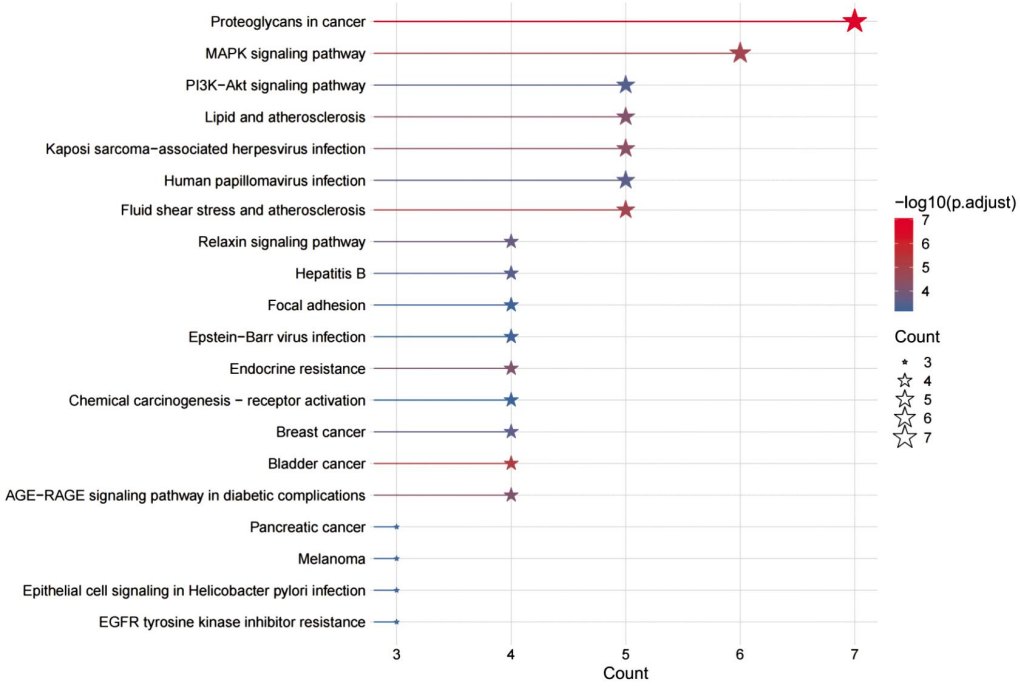

图 6 KEGG 富集分析结果

屈菜红碱 5 μmol·L^{-1} 组和顺铂 4 μg·mL^{-1} 组作用于 5-8F 细胞 24 h 后，细胞凋亡率均明显增高，差异具有统计学意义（P<0.01）。结果见图 10。

2.8 白屈菜主要活性成分对 NPC 细胞增殖和凋亡相关蛋白的影响

Western blot 结果显示，与溶剂对照组比较，血根碱 5 μmol·L^{-1} 组和白屈菜红碱 5 μmol·L^{-1} 组的增殖相关蛋白 PCNA 及凋亡相关蛋白 XIAP 的表达水平均降低，差异具有统计学意义（P<0.05 或 P<0.01）；顺铂 4 μg·mL^{-1} 组的凋亡相关蛋白 XIAP 的表达水显著降低，差异具有统计学意义（P<0.01），增殖相关蛋白 PCNA 的表达水平降低，但差异无统计学意义（P>0.05）。结果见图 11。

2.9 白屈菜主要活性成分对 NPC 细胞中 AKT、ERK1/2 表达水平的影响

与溶剂对照组比较，血根碱 5 μmol·L^{-1} 组、白屈菜红碱 5 μmol·L^{-1} 组、顺铂 4 μg·mL^{-1} 组中 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白 AKT 和 MAPK 信号通路关键蛋白 ERK1/2 的表达水平均显著降低，差异具有统计学意义（P<0.05 或 P<0.01）。结果见图 12。

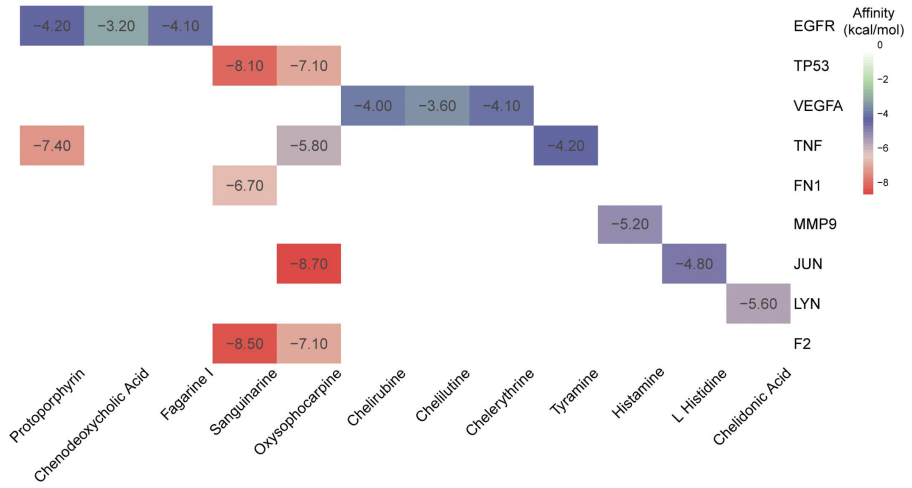

图 7　核心靶点与主要成分的结合能图

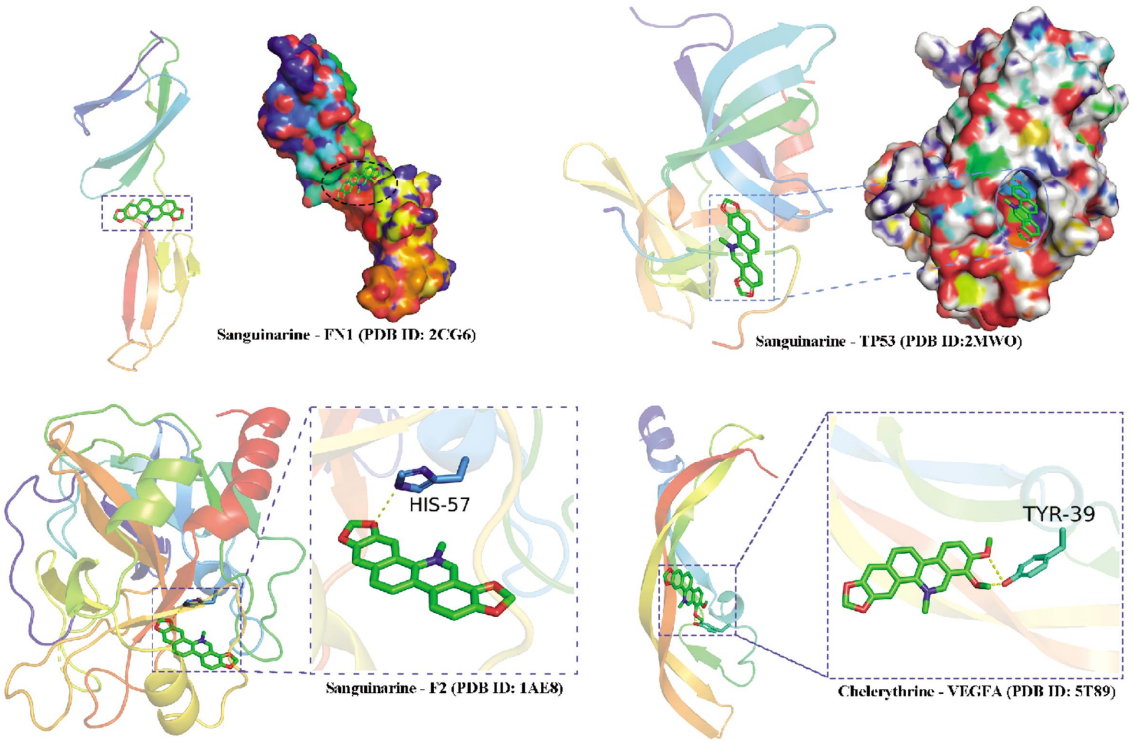

图 8　血根碱、白屈菜红碱与核心靶点的分子对接情况图

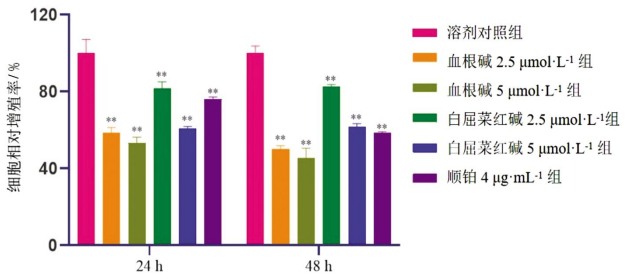

图 9　白屈菜主要活性成分对 5-8F 细胞增殖的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

注:与溶剂对照组相比,**P<0.01。

3　讨论

NPC 是一种上皮源性恶性肿瘤,目前其主要的治疗方法为放化疗。传统的化学药物虽疗效显著,但毒副作用大、易出现耐药性,如何有效改善,是临床较为关注的问题[13]。中医学认为,NPC 的主要病机为气虚染毒,治宜益气解毒。白屈菜性凉,味苦,具有较强的抗肿瘤活性,但其治疗 NPC 的物质基础及作用机制尚不明确。

网络药理学通过蛋白质组学、基因组学、生物信息学等数据库检索,从分子和整体水平进行中药的系统分析,获得中药的核心化学成分-蛋白靶点,明确中药的作用机制,为中药研究提供新的思路[14]。本研究基于网络药理学,挖掘白屈菜治疗 NPC 的物质基础和分子机制。通过数据库筛选,本研究共获得白屈菜的生物活性成分 37 个,并从活性成分-靶点

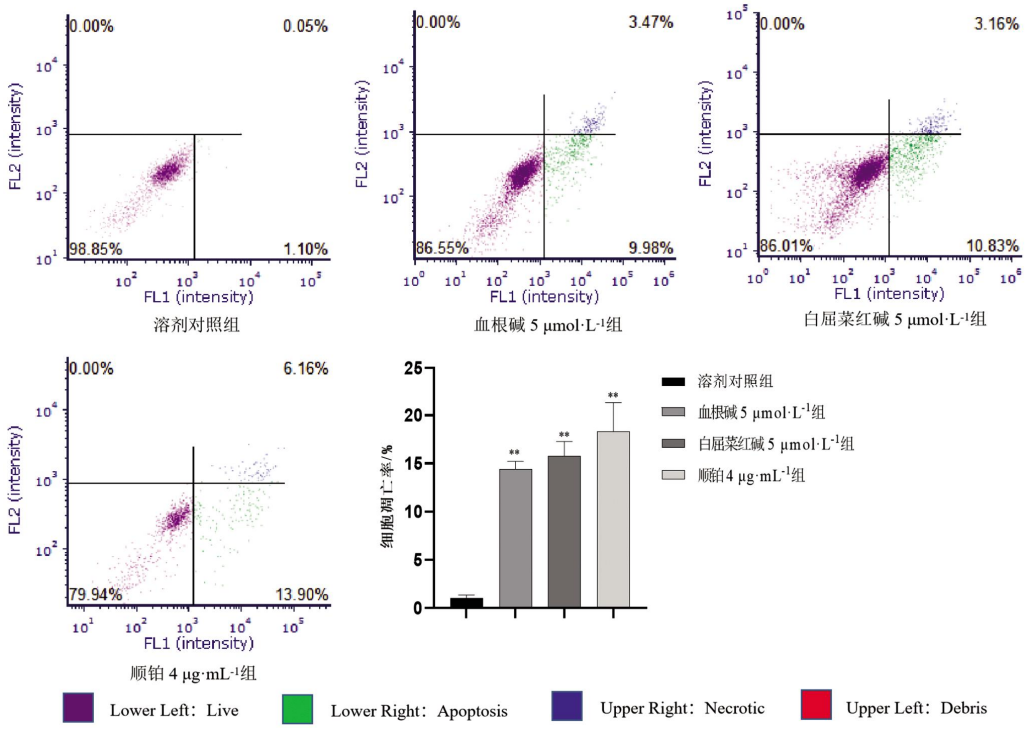

图 10 白屈菜主要活性成分对鼻咽癌 5-8F 细胞凋亡的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

注:与溶剂对照组相比,**P<0.01。

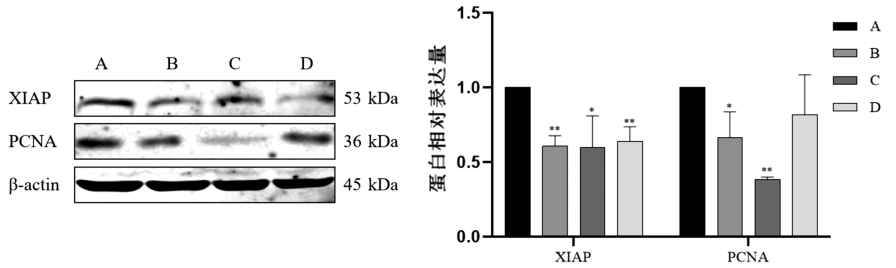

图 11 白屈菜主要成分对 PCNA、XIAP 蛋白表达水平的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

注:A.溶剂对照组;B.白屈菜红碱 5 μmol·L⁻¹ 组;C.血根碱 5 μmol·L⁻¹ 组;D.顺铂 4 μg·mL⁻¹ 组。与溶剂对照组相比,*P<0.05,**P<0.01。

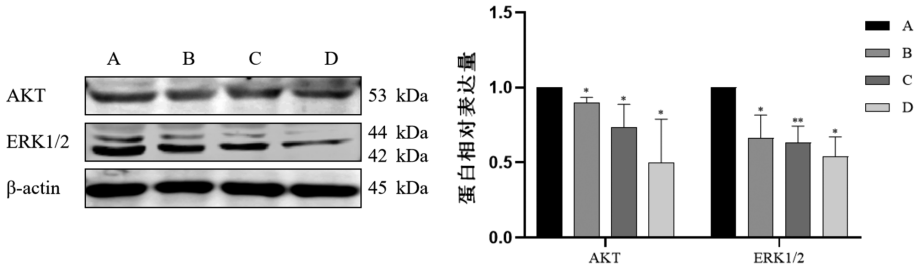

图 12 白屈菜主要成分对 AKT 和 ERK1/2 表达水平的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

注:A.溶剂对照组;B.白屈菜红碱 5 μmol·L⁻¹ 组;C.血根碱 5 μmol·L⁻¹ 组;D.顺铂 4 μg·mL⁻¹ 组。与溶剂对照组相比,*P<0.05,**P<0.01。

相互作用网络构建结果中,得到其关键活性成分血根碱、白屈菜红碱等。研究表明,血根碱可通过影响多细胞靶点、酶的活性及 MAPK、PI3K/AKT 和NF-κB 等多个信号传导通路参与肿瘤的发生、发展[15]。针对 NPC,血根碱能够抑制 NPC 增殖、诱导自噬和凋亡, 其作用机制可能与调控 MAPK、PI3K/AKT 和 AMPK/mTOR 信号通路有关[16-18]。CHMURA 等[19]通过体外研究证实,白屈菜红碱对 9 种肿瘤细胞均具有抑制作用,且表现出细胞毒性[20]。这些网络药理学预测结果与近年来研究报道相吻合,说明基于网络药理学的方法预测中药有效成分具有一定的科学性和可行性。同时,本实验证实,血根碱和白屈菜红碱

能够明显抑制 NPC 细胞增殖并诱导细胞凋亡。

通过核心靶点分析得到白屈菜抗 NPC 的核心靶点主要有 EGFR、TP53、VEGFA、TNF、FN1、MMP9、JUN、FGF2、LYN、F2，主要涉及泛素蛋白连接酶结合、硫化物结合、整合素结合、肝素结合和糖胺聚糖结合等，并主要富集在 MAPK、PI3K/AKT 等信号通路。MAPK 信号通路的失调和过表达是癌症中最常见的改变，其主要的家族成员包括 ERK、JNK/SAPK 和P38MAPK[21-22]。胡晶等[23-24]研究发现，益气解毒方水提物可通过下调 MAPK/ERK 信号通路关键蛋白 p-c-Raf、p-MEK、p-ERK1/2 的表达，阻滞细胞周期，抑制 NPC 细胞增殖并诱导细胞凋亡。PI3K/AKT 信号通路在 NPC 生物学进展中发挥了重要作用，研究表明，益气解毒方可通过调控PI3K/AKT 信号通路诱导 NPC 细胞自噬并促进凋亡[25-26]。在本文Western blot 实验中，证实白屈菜相关活性成分白屈菜红碱、血根碱使 NPC 凋亡相关蛋白 XIAP、增殖相关蛋白 PCNA、MAPK 信号通路相关蛋白 ERK1/2、PI3K/AKT 通路相关蛋白 AKT 下调，佐证了网络药理学对白屈菜活性成分及相关通路靶点网络的有效性。

综上所述，本研究系统预测了白屈菜治疗 NPC 的作用机制，且证实了血根碱、白屈菜红碱是白屈菜抗 NPC 的重要物质基础，MAPK、PI3K/AKT 信号通路可能是其发挥抗 NPC 作用的重要机制，为白屈菜临床干预 NPC 提供了一定的理论依据。

参考文献

[1] 何文龙, 吕　炎, 胡云扬, 等. 放射联合药物治疗鼻咽癌的现状[J]. 实用癌症杂志, 2019, 34(2): 3.

[2] PETERSSON F. Nasopharyngeal carcinoma: A review[J]. Seminars in Diagnostic Pathology, 2015, 32(1): 54-73.

[3] 邱元正, 刘　超, 李　果. 鼻咽癌放射治疗的现状与对策[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2015, 21(6): 435-438.

[4] 黄自丽, 黄修燕, 郑　起. 中药抗肿瘤作用及其作用机制研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(3): 386-389.

[5] 山　尔.《〈救荒本草〉校释与研究》出版[J]. 中华医史杂志, 2007, 37(2): 1.

[6] 洪　波, 孟　琦, 江健梅, 等. 白屈菜生物碱研究进展[J]. 人参研究, 2022, 34(2): 58-62.

[7] 赵国成, 张国财. 白屈菜人工栽培及加工处理技术的研究[J]. 中国林副特产, 2022, 180(5): 22-24.

[8] 李学哲, 朴惠顺. 异喹啉类生物碱的抗肿瘤作用及机制的研究进展[J]. 华西药学杂志, 2014, 29(1): 94-97.

[9] 宗永立, 刘艳平. 白屈菜红碱对人胃癌 BGC823 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用[J]. 中草药, 2006, 37(7): 1054-1056.

[10] 邹　翔, 王雨蒙, 王嘉琪, 等. 白屈菜碱的药理作用研究进展[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1326-1330.

[11] 何　苗. 白屈菜红碱联合厄洛替尼抗非小细胞肺癌的作用机理研究[D]. 长春: 吉林大学, 2017.

[12] YANG T, XU R, SU Q, et al. Chelerythrine hydrochloride inhibits proliferation and induces mitochondrial apoptosis in cervical cancer cells via PI3K/BAD signaling pathway[J]. Toxicology in Vitro, 2020, 68: 104965-104965.

[13] 谢民强. 鼻咽癌治疗研究进展[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志, 2023, 29(6): 1-10.

[14] 刘鑫馗, 吴嘉瑞, 张　丹, 等. 基于网络药理学的参附汤作用机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 211-218.

[15] DING Z H, TANG S C, WEERASINGHE P, et al. The alkaloid sanguinarine is effective against multidrug resistance in human cervical cells via bimodal cell death[J]. Biochemical Pharmacology, 2002, 63(8): 1415-1421.

[16] 彭佳欣, 陶阳阳, 彭江敏, 等. 血根碱联用 5-氟尿嘧啶对鼻咽癌裸鼠移植瘤细胞自噬和凋亡的影响[J]. 中国药学杂志, 2022, 57(24): 2092-2098.

[17] 苏俐丹, 何迎春, 黄立中, 等. AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬在血根碱抑制鼻咽癌细胞增殖中的作用研究[J]. 中国免疫学杂志, 2022, 38(23): 2870-2875.

[18] 谭爱军. 血根碱通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖的研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.

[19] CHMURA S J, DOLAN M E, CHA A, et al. In vitro and in vivo activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay in vivo[J]. Clinical Cancer Research, 2000, 6(2): 737-742.

[20] 罗飞亚, 马新群, 林　飞. 白屈菜红碱对大鼠的长期毒性试验研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2014, 26(6): 459-462.

[21] GORRINI C, HARRIS I S, MAK T W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy[J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2013, 12: 931-947.

[22] 范慧宁, 张　靖, 朱金水. 血根碱抗肿瘤机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(18): 3323-3327.

[23] 胡　晶, 戴　娜, 徐冰雁, 等. 益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(6): 1221-1227.

[24] 胡　晶, 刘　洁, 徐冰雁, 等. MAPK/ERK 信号通路在益气解毒方水提物诱导鼻咽癌细胞凋亡中的作用[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(11): 1613-1621.

[25] 蔺　婷, 戴　娜, 罗晶婧, 等. 益气解毒方通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导鼻咽癌细胞自噬的研究[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(3): 1484-1488.

[26] 蔺　婷, 罗晶婧, 周芳亮, 等. 益气解毒方通过诱导自噬促进鼻咽癌细胞凋亡的作用研究[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(10): 1149-1158.

（本文编辑　贺慧娥）