

本文引用: 涂雅玲, 陈其华, 席建元, 祁 林, 赵多多, 喻环宇. 基于网络药理学探讨扶正解毒抗癌汤治疗黑色素瘤的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(1): 39–48.

基于网络药理学探讨扶正解毒抗癌汤治疗黑色素瘤的作用机制

涂雅玲¹, 陈其华^{1*}, 席建元¹, 祁 林¹, 赵多多², 喻环宇²

1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 **目的** 探讨扶正解毒抗癌汤(FZJDD)治疗黑色素瘤的分子机制。**方法** TCMSP 和 TCMID 的数据库和文献中检索 FZJDD 有效化学成分及各成分对应的作用靶点; GeneCards、OMIM、TTD 等数据查询库中筛选黑色素瘤相关靶点, 获得“药物-疾病”交集靶点, STRING 11.5 与 DAVID 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析获取核心靶点, Cytoscape 3.8.1 构建 FZJDD 治疗黑色素瘤中药-作用靶标-通路网络, GO 富集分析与 KEGG 富集分析获取 FZJDD 治疗黑色素瘤的关键生物学过程及信号通路。借助 qPCR 及 Western blot 方法验证相关信号通路关键蛋白的作用。**结果** 获得 FZJDD 有效成分 47 个, “药物-疾病”交集靶点 168 个, 富集到的信号通路主要包括磷脂酰肌醇三激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)等信号通路; 体外细胞实验显示, FZJDD 能够有效降低黑色素瘤 A375 细胞增殖, 抑制 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白 PI3K、AKT、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的蛋白及 mRNA 表达水平($P < 0.05$)。**结论** FZJDD 可以通过多成分、多靶点、多通路, 发挥抗炎、促进肿瘤细胞凋亡等作用治疗黑色素瘤, 其中对 PI3K/AKT 通路的调控可能是其关键机制。

〔关键词〕 扶正解毒抗癌汤; 黑色素瘤; PI3K/AKT 信号通路; 网络药理学; 作用机制

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.01.006

Mechanism of action of Fuzheng Jiedu Kang'ai Decoction in treating melanoma based on network pharmacology

TU Yaling¹, CHEN Qihua^{1*}, XI Jianyuan¹, QI Lin¹, ZHAO Duoduo², YU Huanyu²

1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 **Objective** To explore the molecular mechanism of Fuzheng Jiedu Kang'ai Decoction (FZJDD) in the treatment of melanoma. **Methods** The effective chemical components of FZJDD and their corresponding targets were retrieved from the databases and literature of TCMSP and TCMID. Melanoma-related targets were screened using databases such as GeneCard, OMIM, and TTD to obtain intersection targets of "drug-disease". Protein-protein interaction (PPI) network analysis was performed using STRING11.5 and DAVID databases to identify core targets. Cytoscape 3.8.1 was used to construct a Chinese medicines-action targets-pathway networks for FZJDD in treating melanoma. Gene ontology function (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis were conducted to identify the key biological processes and signaling pathways involved in treating melanoma with FZJDD. Quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot were used to validate the roles of key proteins in related signaling pathways. **Results** A total of 47 active components of FZJDD and 168 "drug-

〔收稿日期〕 2024-08-31

〔基金项目〕 湖南省研究生科研创新重点项目(CX20210680); 湖南省教育厅科学研究重点项目(21A0224); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目(23B0377); 湖南省中医药管理局中医药科研课题(C2024012); 2024 年湖南省大学生创新训练计划项目(S202410541030); 湖南中医药大学学院联合基金重点项目(2023XYLH002)。

〔通信作者〕 * 陈其华, 男, 教授, 主任医师, 博士研究生导师, E-mail: 1105165868@qq.com。

disease" intersection targets were identified. The enriched signaling pathways mainly included phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) signaling pathway, among others. In vitro cell experiments showed that FZJDD effectively inhibited the proliferation of melanoma A375 cells and suppressed the protein and mRNA expression levels of key proteins in PI3K/AKT signaling pathway, including PI3K, AKT, and the mammalian target of rapamycin (mTOR) ($P < 0.05$). **Conclusion** FZJDD can treat melanoma by exerting anti-inflammatory effects and promoting tumor cell apoptosis through multiple components, targets, and pathways, among which the regulation of the PI3K/AKT pathway may be its key mechanism.

[**Keywords**] Fuzheng Jiedu Kang'ai Decoction; melanoma; PI3K/AKT signaling pathway; network pharmacology; mechanism of action

黑色素瘤系源自表皮黑素细胞在活化或基因变异后所形成的肿瘤,其是遗传、体质与环境因素间错综复杂的交互作用的结果^[1-2],也是皮肤癌中临床症状最为显著、死亡率最高的一种类型^[3]。流行病学研究显示,在全球多数区域内黑色素瘤的发病率在男性群体中显著高于女性,且呈年轻化倾向,在 25~50 岁这一年龄段内本病发病率呈现出线性上升的趋势,给全球的医疗卫生系统带来了沉重的压力与负担^[4-6]。在当前的黑色素瘤的临床治疗中手术切除肿瘤及其周围正常组织仍是其核心治疗策略。对于那些肿瘤已经转移的患者,手术治疗难以彻底治愈,迄今为止化学治疗依旧是转移性黑色素瘤患者所依赖的主要治疗方案^[7-8],但多数患者在短时间内便面临继发性耐药的棘手难题,且化学治疗存在大量的毒副作用,因此探索临床有效且毒副作用小的治疗方法,以期实现更持久的治疗效果迫在眉睫^[9]。中医在黑色素瘤的治疗领域内展现出独特的优势,其治疗手段无论是内服还是外敷,均获得了一定成效^[10]。

中医学并无黑色素瘤这一病名,根据其症状、体征及发病特点等,可以将黑色素瘤归属于“黑痣”“黑疗”“恶疮”“失荣”等范畴^[11]。《诸病源候论·黑痣候》中记载:“黑痣者,风邪搏于血气,变化所生也。夫人血气充盛,则皮肤润悦,不生疵瑕,若虚损,则黑痣变生。”据此可以推断正虚是黑色素瘤病因之一^[12]。《医宗金鉴·卷六十四》中对其记载:“其证初起,状如痰核,推之不动,坚硬如石,皮色如常,日渐长大。由忧思、恚怒、气郁、血逆与火凝结而成,日久难愈……色现紫斑,腐烂浸淫,渗流血水,疮口开大,努肉高突,形似翻花瘤证。”由此可知,黑色素瘤的另一病因为邪毒壅实^[13]。扶正解毒抗癌汤(FZJDD)系陈其华教授团队历经多年临床实践与前人智慧结晶,该方秉承益气扶正、除瘤祛邪之核心理念,展现出显著的临床疗效,然其具体作用机制尚待深入探究。陈教授独辟蹊径,指出黑色素瘤之根源在于正气不足、血

瘀毒聚,故本方融扶正与祛邪于一体,通过强化脾胃功能、促进气血生成以扶正气,同时强调清热解毒与活血化瘀,旨在消除病邪、抑制肿瘤发展。为进一步探索 FZJDD 治疗黑色素瘤的分子机制,本研究运用网络药理学研究,科学系统地探索其药效机制,并辅以细胞实验,进一步验证其作用路径与靶点,力求为临床应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 中药化学成分收集及靶点预测 使用中药系统药理学数据库分析平台(Traditional Chinese Medicine Database and Analysis Platform,TCMSP,<https://tcmsp-e.com>)及中药综合数据库分析平台(Traditional Chinese Medicine Integrated Database,TCMID,<https://www.megabion-et.org/tcmid>),针对黄芪、当归、三棱、莪术、半枝莲等中药材,设置口服生物利用度(oral bioavailability,OB) $\geq 30\%$ 、类药性(drug-likeness,DL) ≥ 0.18 、半衰期(half-life,HL) > 4 h 的筛选条件^[14],深入检索并筛选出高活性化学成分。随后,将筛选出的活性成分的“Mol ID”输入 TCMSP 数据库的“Related Targets”库中,以检索相应的靶点基因信息。进一步利用 UniProt 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org>)对收集到的靶点进行数据校准,并剔除无效及重复的靶点,最终获取标准化的基因名称。

1.1.2 黑色素瘤疾病靶点收集及预测 在 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man,<https://omim.org>)以及 TTD (Therapeutic Target Database,<http://db.idrblab.net/ttd>) 3 个数据库中,通过键入关键词“Melanoma”进行深度检索,旨在发掘与该疾病紧密相关的靶点信息^[15]。随后,导出包含这些基因靶点的 Excel 表格,进行筛选去重,以备后续分析使用。将获得的药物靶点基因和黑色素瘤疾病靶点基因进行映射,获得 FZJDD 治疗

黑色素瘤的靶点基因,并以韦恩图展示。

1.1.3 “药物-疾病-靶点”网络构建 利用 Cytoscape 3.8.1 软件,精准映射FZJDD在黑色素瘤治疗中的关键靶点基因及其活性成分;随后,依托 STRING 数据库(<https://string-db.org>)与 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络^[16]。

1.1.4 GO 富集分析和 KEGG 通路分析 将 FZJDD 治疗黑色素瘤的药物-疾病交集靶点上传至 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>),以 $P < 0.05$ 为筛选条件,对交集靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 富集分析。利用微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)将 GO 及 KEGG 通路富集结果绘制成柱状图和气泡图^[17-18]。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司,货号分别为 R8758、10099141);胰酶消化液、PBS 缓冲液、DNA 凝胶加样缓冲液(6×)、Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP 及 Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP(美国 Abiowell 公司,货号:AWC0232、AWC0409、AWR0103、AWS0001、AWS0002);磷脂酰肌醇三激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B(protein kinase B, AKT)、雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、 β 肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 proteintech 公司,货号分别为 20584-1-AP、10176-2-AP、12789-1-AP、66009-1-Ig)。超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-2FD);CO₂ 细胞培养箱(日本松下公司,型号:MCO-20AIC);S-23 高速台式离心机(湖南湘仪动力测试仪器有限公司,型号:H1650R);全自动酶标仪(南京贝登医疗股份有限公司,型号:B-2744);电泳仪(北京六一仪器厂,型号:DYY-2C)。其余设备均由湖南中医药大学科技创新中心提供。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞来源 本研究所使用的黑色素瘤 A375 细胞株,购自上海细胞研究所,由湖南中医药大学科技创新中心保存。

1.3.2 动物来源 选取 SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 200~220 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(湘)2019-0004。动物适应性饲养 3 d,饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心,环境温度范围 22~26 ℃,湿度范围 55%~60%,自由摄食,按实验动物 3R 原则给予人道

关怀。动物伦理批号:LL20210516025。

1.3.3 含药血清制备 本研究中 FZJDD(黄芪 20 g、当归 10 g、三棱 10 g、莪术 10 g、半枝莲 10 g)饮片购自湖南中医药大学第一附属医院中药房。按比例配制好药材进行煎药,将煎药液混合后过滤、去渣、浓缩。根据《中药药理实验方法学》^[19]中人与动物临床给药剂量换算后,借助旋转蒸发仪将其浓缩为 1.8 g/mL,置于无菌棕色瓶,4 ℃冰箱保存备用。SD 大鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为空白血清组及 FZJDD 组,其中空白血清组 15 只、FZJDD 组 15 只。FZJDD 组大鼠予以 2 倍临床等效剂量 FZJDD 水煎剂灌胃,每次 3 mL,每天 1 次;空白血清组大鼠予同体积蒸馏水灌胃。连续灌胃 7 d 后进行腹主动脉采血,经过离心(3 000 r/min 离心 5 min,离心半径 16 cm)、过滤、灭活后吸出上清液即为含药血清或空白血清。

1.3.4 细胞培养与分组 黑色素瘤 A375 细胞培养基由含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 组成,并置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。将黑色素瘤 A375 细胞分为 4 组,分为空白血清组、FZJDD 含药血清组、阳性药物组、联合用药组。空白血清组为黑色素瘤 A375 细胞给予空白血清干预;FZJDD 含药血清组给予 FZJDD 含药血清(最佳浓度 14.15%)干预;阳性药物组给予 30 μ mol/L 达卡巴嗪培养基干预;联合用药组给予 FZJDD 含药血清(最佳浓度 14.15%) + 30 μ mol/L 达卡巴嗪培养基干预。各组干预 24 h 后进行检测。根据前期实验结果显示,扶正解毒抗癌汤含药血清对黑色素瘤 A375 细胞 24 h 的 IC₅₀ 剂量为 14.15%,综合用药原则和此次实验的研究目的,拟选择 14.15% 的含药血清作为后续实验的干预浓度。

1.3.5 细胞增殖检测 采用 CCK-8 法^[20]检测各组黑色素瘤 A375 细胞增殖率,每组 6 个复孔,重复 3 次。具体步骤为:将黑色素瘤 A375 细胞悬液以每孔 1.0×10^5 个细胞的密度接种于 96 孔板中,并在 37 ℃、5% CO₂ 的细胞培养箱孵育 24 h。之后分组干预,对照组予空白血清干预,FZJDD 组给予 FZJDD 含药血清干预,阳性对照组予达卡巴嗪干预,联合对照组予 FZJDD 含药血清+达卡巴嗪干预。处理 24 h。采用 CCK-8 检测细胞抑制率,在 37 ℃、5% CO₂ 的条件下继续孵育 2 h,测定 450 nm 的波长的吸光度值。细胞抑制率(%)=(1-干预组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

1.3.6 qPCR 法检测 PI3K、AKT、mTOR mRNA 水平表达 选取处于对数生长期的黑色素瘤 A375 细胞, 分组干预, 细胞处理方法同 1.3.5, 用 Trizol 试剂提取各组 A375 细胞总 RNA, 按照试剂盒操作步骤进行逆转录合成 cDNA, PCR 扩增。以 β -actin 为内参, 再用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法求算目的基因的表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物方向	引物序列	引物长度/bp
PI3K	正向	GTCCGTCTCGAGAACTTGG	32
	反向	TGAGGCGTTTCTGGATTGC	
AKT	正向	CGCCTGCCCTTCTACAACCAG	29
	反向	GCATGATCTCCTTGGCATCCTC	
mTOR	正向	GCCCAGGCAGAAAACCTTACA	34
	反向	CGCAGGAAAGGCATGACGAA	
β -actin	正向	ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	22
	反向	TACTCCTGCTTGCTGATCCAC	

在无核酸酶的离心管中加入 TB Green Premix Ex Taq 10 μ L, 加上下游引物各 0.4 μ L, 加入第 1 步得到的 cDNA 模板 2 μ L, 混匀, 实时上机检测。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s 预变性, 95 $^{\circ}$ C 5 s 变性, 60 $^{\circ}$ C 30 s 退火, 同时收集荧光, 40 个循环。用相对表达量 $=2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式分析计算各个组的表达情况。

1.3.7 Western blot 法检测 PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达 黑色素瘤 A375 细胞在分组干预 24 h 后, 在 4 $^{\circ}$ C 环境下, 向适量的 RIPA 裂解液中加入预混的 PMSF (比例为 PMSF:RIPA=1:100)。使用细胞刮刀仔细地刮入 EP 管内, 并在冰上进行持续的裂解, 时长为 30 min, 后进行 30 s 的超声处理,

以确保细胞彻底裂解。裂解完成后, 提取各组 A375 细胞的蛋白裂解物, 12 000 r/min 离心 15 min, 离心半径 16 cm, 抽取上清液后按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用操作检测蛋白浓度。电泳后添加 5% 胎牛血清白蛋白 37 $^{\circ}$ C 封闭 1.5 h, 洗膜后添加 PI3K (1:1 000)、AKT (1:1 000)、mTOR (1:1 000) 抗体, 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h 显影, 结果运用 Image Lab 软件进行处理。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据统计学分析。所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 两两样本之间的比较则采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FZJDD 有效成分及治疗黑色素瘤潜在靶点

通过 TCMSP 检索, 以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 为筛选条件并剔除无效成分后, 共获取 FZJDD 有效成分 47 个, 成分对应的作用靶点 197 个, FZJDD 的“有效成分-作用靶点”网络图见图 1, 根据度值 (Degree) 及相关文献报道筛选活性成分, 其中槲皮素 (quercetin)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、豆甾醇 (stigmasterol)、芒柄花黄素 (formononetin)、山柰酚 (kaempferol)、木樨草素 (luteolin)、常春藤皂苷 (hederagenin)、汉黄芩素 (wogonin)、黄芪异黄酮苷 (7-O-methylisomucronulatol)、黄芩素 (baicalein) 等药物有效成分与多个作用靶点存在密切联系, 这些成分可能是 FZJDD 防治黑色素瘤的关键化合物。详见表 2。

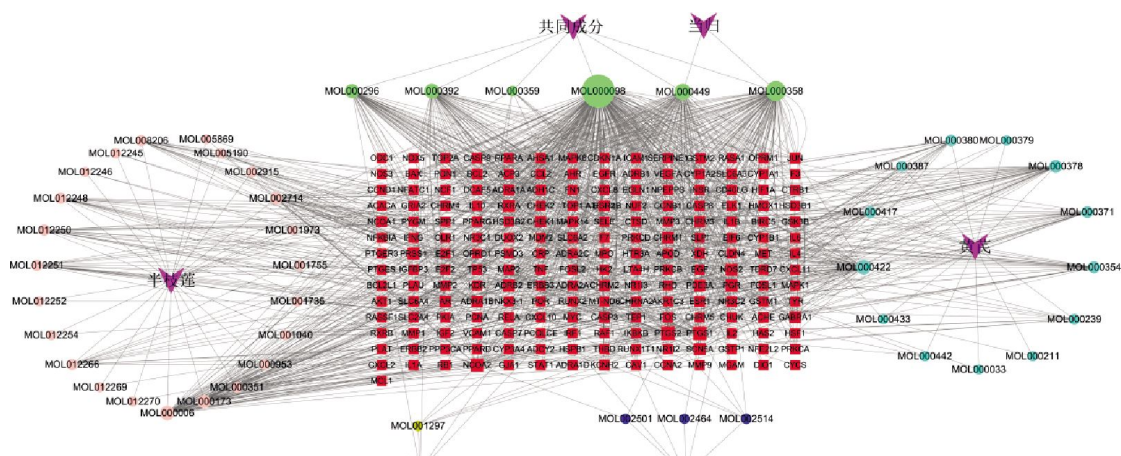


图 1 FZJDD“有效成分-作用靶点”网络图

Fig.1 "Active ingredient-target" network diagram of FZJDD

表 2 FZJDD 主要有效成分信息

Table 2 Information on main active ingredients of FZJDD

序号	MOL ID	英文名称	中文名称	Degree
1	MOL000098	quercetin	槲皮素	257
2	MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	113
3	MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	73
4	MOL000392	formononetin	芒柄花黄素	57
5	MOL000422	kaempferol	山柰酚	51
6	MOL000006	luteolin	木樨草素	51
7	MOL000296	hederagenin	常春藤皂苷	49
8	MOL000173	wogonin	汉黄芩素	38
9	MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	黄芪异黄烷苷	33
10	MOL002714	baicalein	黄芩素	30

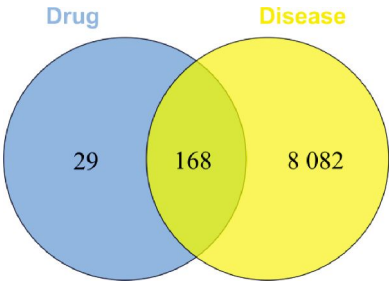


图 2 FZJDD 潜在活性成分与黑色素瘤相关靶点韦恩图

Fig.2 Veen diagram of potential active ingredients of FZJDD and melanoma related targets

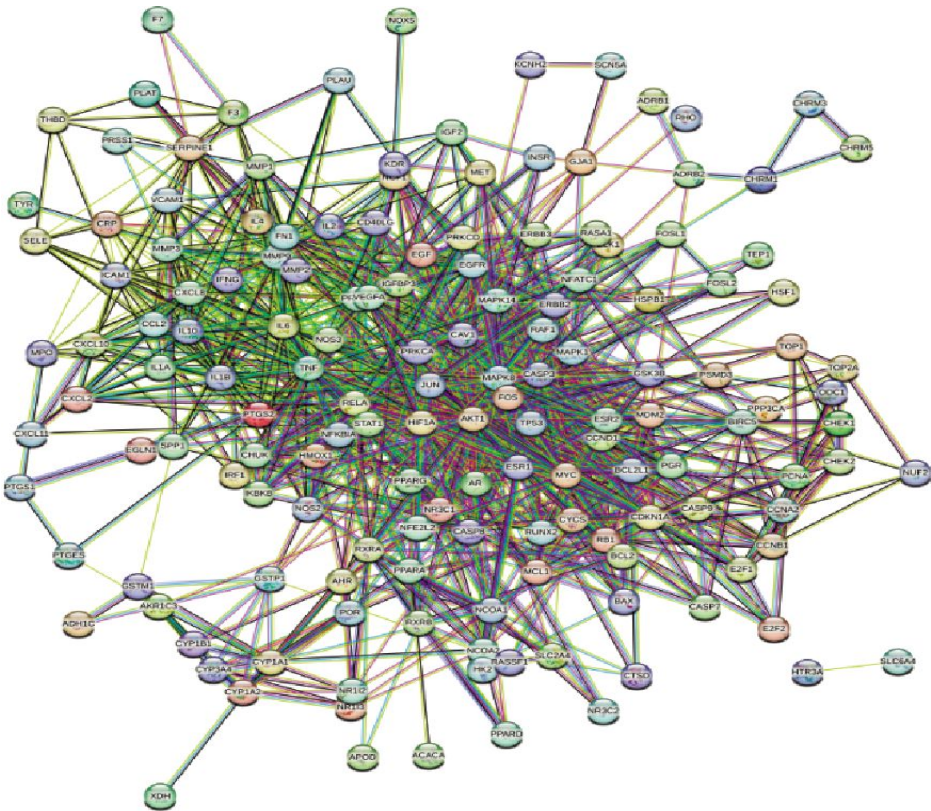


图 3 FZJDD 治疗黑色素瘤交集靶点的 PPI 网络图

Fig.3 PPI network of intersection targets for melanoma treatment by FZJDD

2.2 药物-疾病交集靶点获取

在 GeneCards、OMIM 及 TTD 数据库中筛选有关黑色素瘤的疾病靶点,将 3 个数据库的靶点基因进行合并,去重后共获得 8 250 个与黑色素瘤相关的靶点,将得到的基因经 UniProt 数据库校正。通过韦恩图将 FZJDD197 个作用靶点与黑色素瘤的 8 250 个靶点进行映射,共获得 168 个 FZJDD-黑色素瘤共同靶点。详见图 2。

2.3 PPI 网络构建及核心靶点筛选

将交集靶点导入 STRING 数据库进行 PPI 分析。FZJDD 治疗黑色素瘤的 PPI 预测见图 3。将网络文件保存为 TSV 格式,将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.8.1 软件绘制 PPI 网络,对网络进行拓扑分析,以 degree 值反映靶点大小及颜色,以 combined score 值反映边的粗细,从而构建 PPI 网络,如图 4 和图 5 所示,其中颜色越深,面积越大表示度值越大,该网络共包括 245 个结点和 1 566 条边,其中 AKT1、JUN、TP53、TNF、IL-6 为核心靶点。

2.4 GO 和 KEGG 通路富集分析

在 GO 富集分析中,富集到 374 条生物过程(biological process,BP)、39 条细胞组成(cell composition, CC)、85 条分子功能(molecular function,MF)条目。

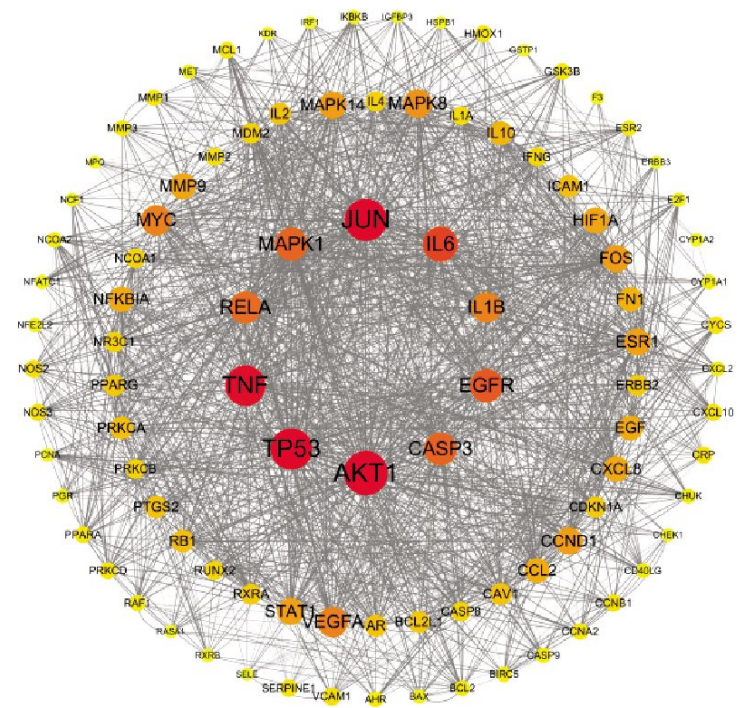


图 4 FZJDD 治疗黑色素瘤交集靶点的拓扑分析图

Fig.4 Topological analysis of intersection targets for melanoma treatment by FZJDD

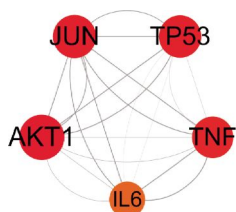


图 5 FZJDD 的 5 个核心药物靶基因

Fig.5 Five core drug target genes of FZJDD

以 $P < 0.05$ 为筛选条件,取前 10 个 GO 条目绘制气泡图,见图 6。根据 DAVID 筛得到 KEGG 通路 181 条,根据 $P < 0.05$ 筛选出 FZJDD 治疗黑色素瘤的通路 155 条,根据 P 值排序绘制排名前 20 位的 KEGG 气泡图,见图 7。可预测 FZJDD 对黑色素瘤的治疗作用主要涉及癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路、IL-17 信号通路、VEGF 信号通路等。

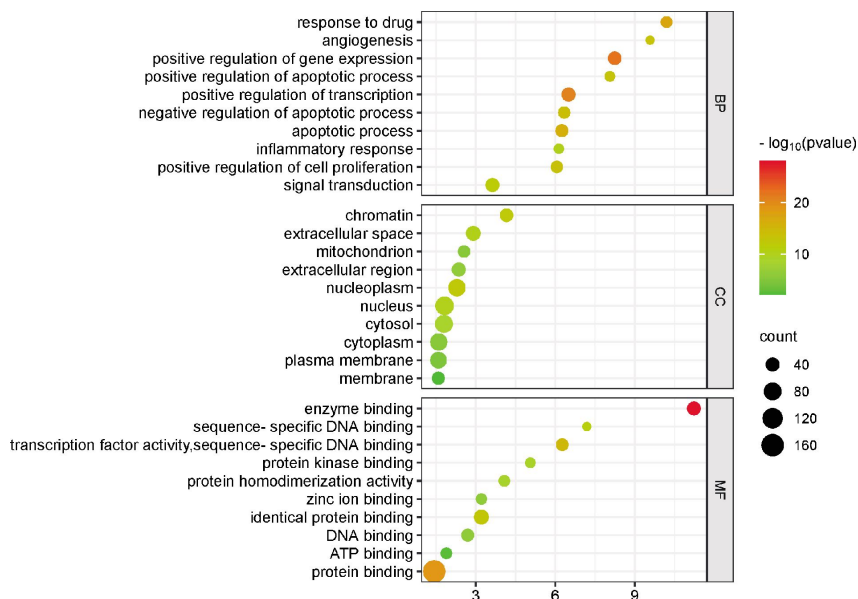


图 6 FZJDD 治疗黑色素瘤主要 GO 条目信息图

Fig.6 Main GO entry information for melanoma treatment by FZJDD

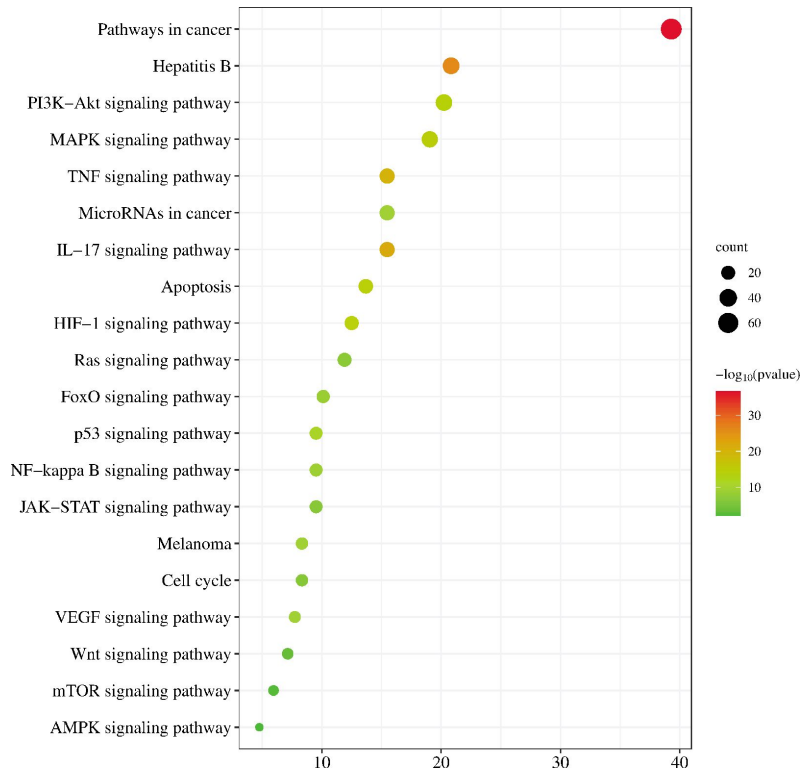


图 7 FZJDD 治疗黑色素瘤主要 KEGG 条目信息

Fig.7 Main KEGG entry information for melanoma treatment by FZJDD

2.5 “药物-成分-靶点-信号通路”网络构建

根据 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析的结果,并查阅相关文献,借 Cytoscape 3.8.1 软件构建“药物-成分-靶点-信号通路”网络。AKT 信号通路

的靶点交集数为 96。详见图 8。

2.6 FZJDD 对黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响

与空白血清组比较,FZJDD 与阳性药物细胞抑制率显著升高($P<0.05$);FZJDD 与阳性药物细胞抑

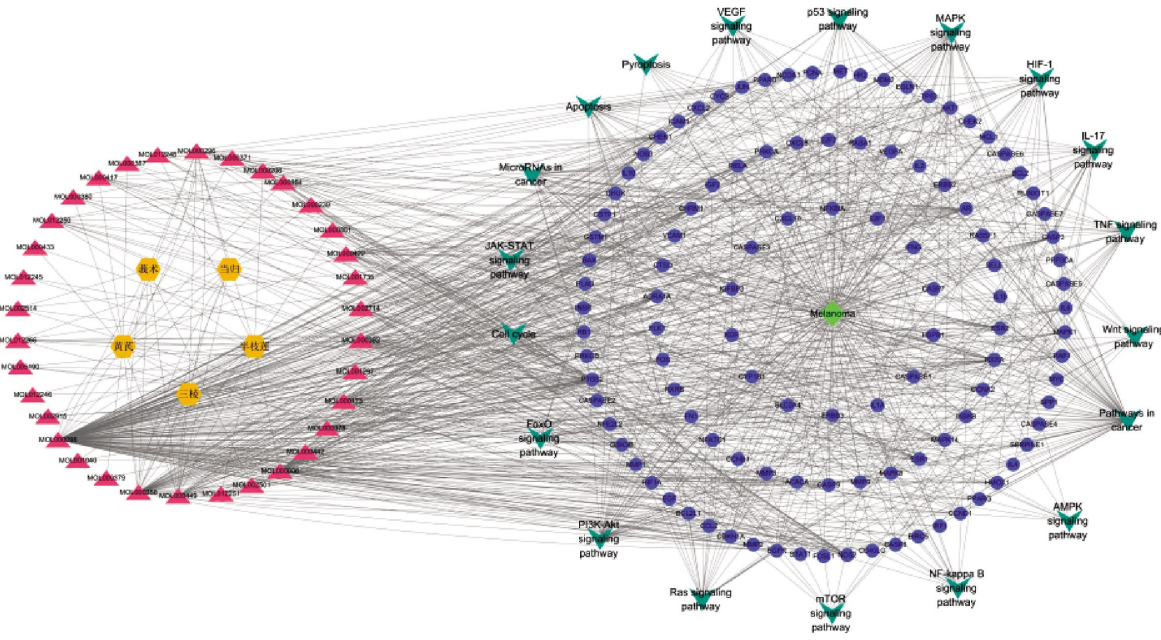


图 8 FZJDD 治疗黑色素瘤的“药物-成分-靶点-信号通路”网络图

Fig.8 "Drug-component-target-signal pathway" network for melanoma treatment by FZJDD
注:橙色圆形代表 FZJDD 的 5 种药物,红色三角形代表 FZJDD 的核心有效成分,黄色菱形代表黑色素瘤,蓝色圆形代表 FZJDD 有效成分治疗黑色素瘤的各作用靶点,绿色箭头代表其中涉及的信号通路。

制率比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 FZJDD 组、阳性药物组比较,联合用药组的细胞抑制率显著升高($P<0.05$)。详见图 9。

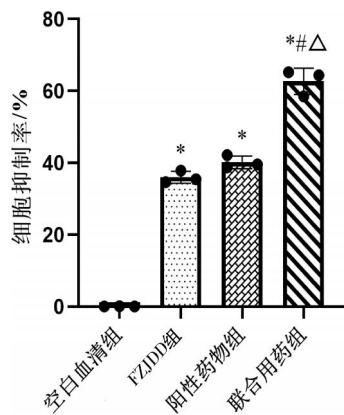


图 9 FZJDD 对黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响($n=3$)

Fig.9 Effects of FZJDD on the proliferation of melanoma A375 cells ($n=3$)

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$;与 FZJDD 组比较,* $P<0.05$;与阳性药物组比较,Δ $P<0.05$ 。

2.7 qPCR 检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 mRNA 的表达

与空白血清组比较,FZJDD 组与阳性药物组的 PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$);FZJDD 组与阳性药物组的 PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 FZJDD 组、阳性药物组比较,联合用药组的 PI3K、AKT、mTOR 的 mRNA 表达水平显著降低($P<0.05$)。详见图 10。

2.8 Western blot 法检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白水平的表达

与空白血清组比较,FZJDD 组与阳性药物组的 PI3K、AKT、mTOR 的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$);FZJDD 组与阳性药物组的 PI3K、AKT、mTOR 的蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P>0.05$);与 FZJDD 组、阳性药物组比较,联合用药组的 PI3K、AKT、mTOR 的蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。详见图 11。

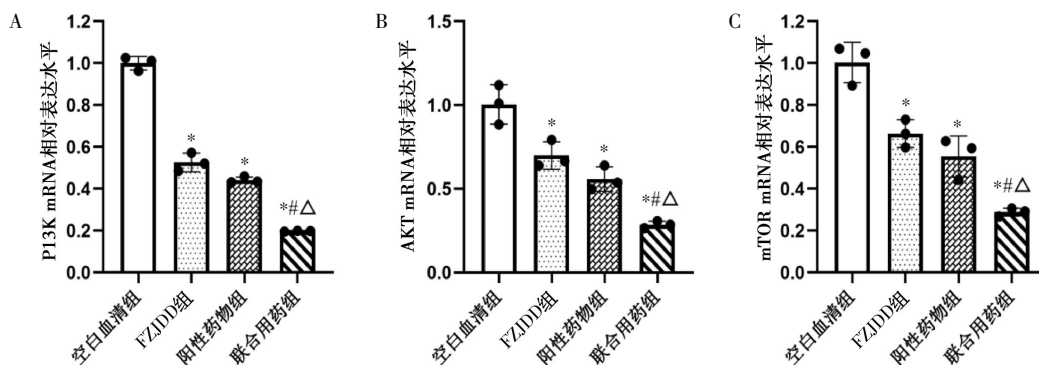


图 10 FZJDD 对 A375 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白 mRNA 表达水平的影响($n=3$)

Fig.10 Effects of FZJDD on mRNA expression levels of proteins related to PI3K/AKT signaling pathway in A375 cells ($n=3$)

注:与空白血清组比较,* $P<0.05$;与 FZJDD 组比较,* $P<0.05$;与阳性药物组比较,Δ $P<0.05$ 。

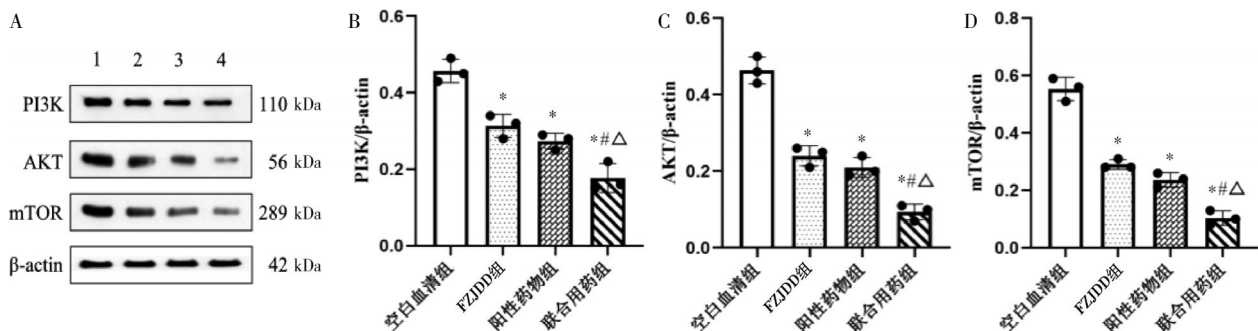


图 11 FZJDD 对 A375 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达水平的影响($n=3$)

Fig.11 Effects of FZJDD on the expression levels of proteins related to PI3K/AKT signaling pathway in A375 cells ($n=3$)

注:A.Western blot 检测 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达情况,1.空白血清组,2. FZJDD 组,3.阳性药物组,4.联合用药组;B-D 为相关蛋白表达水平的柱状图;其中与空白血清组比较,* $P<0.05$;与 FZJDD 组比较,* $P<0.05$;与阳性对照组比较,Δ $P<0.05$ 。

3 讨论

PI3K/AKT 信号通路在黑色素瘤的发生和发展中起着至关重要的作用^[21-22]。PI3K/AKT 信号通路的异常激活通常与多种致癌因素有关,在黑色素瘤中 PI3K/AKT 通路的激活可以通过多种机制实现,如 PI3K 的基因突变、AKT 的过表达或 PTEN 的失活等^[23],最终导致肿瘤的形成和进展。PI3K/AKT 信号通路的抑制剂在黑色素瘤的治疗中显示出一定的潜力^[24-25]。此通路的激活能够通过增强肿瘤细胞的运动性并降低细胞之间的黏附性来促进肿瘤的侵入与转移^[26]。研究表明,PI3K/AKT 信号通路能够调控肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭、迁移及药物耐药等多个生物学过程,该信号通路在多种恶性肿瘤的发生、进展过程中处于持续的异常激活状态^[27]。黑色素瘤细胞培养及肿瘤患者活组织检查结果提示约有 70% 的恶性黑色素瘤患者体内存在 PI3K/AKT 信号通路异常活动,靶向 AKT 及其下游基因也被证明可以抑制小鼠黑色素瘤的发展^[28]。其中 PI3K 其表达对恶性肿瘤的发生、进展及预后存在重要影响,其可维持肿瘤细胞的恶性生物学行为并促进肿瘤细胞的增殖;AKT 是 PI3K 下游离子靶向电位调节中的关键分子之一,与恶性肿瘤细胞的生长、凋亡、侵袭密切相关,在药物耐药方面存在关键作用,可维持肿瘤细胞的恶性生物学行为;mTOR 是 PI3K/AKT 的下游激酶,可通过 AKT 的磷酸化和激活在细胞增殖的调节中发挥作用^[29]。激活 PI3K/AKT 信号通路后,AKT 的磷酸化激活 NF- κ B 抑制剂 I κ B 激酶,NF- κ B 发生核转位,进而激活或抑制下游细胞凋亡相关的靶蛋白,通过一系列的生物信号传递和级联反应,促进了肿瘤细胞的恶性生物学行为^[30]。研究显示多数的黑色素瘤病例体内 PI3K/AKT 信号通路表现为高度激活^[31]。陈明等^[32]研究证实,半枝莲的提取物半枝莲总黄酮能够抑制荷瘤小鼠体内黑色素瘤的生长,促进黑色素瘤细胞凋亡,并通过明显抑制 PI3K、AKT 及 mTOR 蛋白的表达起到抗肿瘤的作用,而 p-AKT 与 AKT 的表达量变化趋势一致。

本研究中通过网络药理学分析显示,FZJDD 中含槲皮素、 β -谷甾醇、豆甾醇等 47 个有效成分,交集靶点 168 个,结果表明 FZJDD 具有多类活性物质、多靶点、多通路及整体调控功能,富集信号通路主要包括癌症通路、PI3K/AKT 等信号通路,其中 PI3K/AKT 信号通路为 FZJDD 治疗黑色素瘤的主要

信号通路之一。此外核心药物靶基因分析显示,AKT、TNF、TP53、IL-6、JUN 等靶蛋白为 FZJDD 治疗黑色素瘤的核心靶点,均受 PI3K/AKT 信号通路所调控,其中 TNF 在众多恶性肿瘤中表现出强大的杀灭肿瘤或抑制肿瘤作用,同时表现出较强的免疫调节活性,能够促进人体免疫细胞杀伤癌细胞,此外,TNF 还表现出较强的抗炎症作用^[33]。TP53 基因是人体内的关键抑癌基因,TP53 基因突变在黑色素瘤患者中尤为常见,TP53 可通过转录合成细胞周期调控相关蛋白,在细胞增殖、凋亡、周期等方面起到极为重要的调控作用^[34]。IL-6 在激活与调节机体免疫功能及参与炎症反应中扮演着极为重要的角色,其能使炎症损伤程度加剧,同时对机体免疫功能造成影响,从而促进恶性肿瘤的进展^[35]。JUN 基因的作用主要在调控细胞恶变方面,其对恶性肿瘤的发生、发展及转归均存在重要作用^[36]。网络药理学预测 PI3K/AKT 信号的激活在黑色素瘤中起着重要作用,与黑色素瘤的发生、发展与预后密切相关,PI3K/AKT 信号通路可能成为黑色素瘤治疗的重要靶标通路。为了更好地验证网络药理学的结果,本研究采用细胞实验对 PI3K/AKT 信号通路的关键调控蛋白进行验证。体外细胞验证实验结果表明,FZJDD 能够有效抑制 PI3K、AKT、mTOR 蛋白磷酸化修饰表达,从而抑制 PI3K/AKT 信号通路关键蛋白 PI3K、AKT、mTOR 的蛋白及 mRNA 表达水平,说明 FZJDD 治疗黑色素瘤的可能机制与下调 PI3K/AKT 信号通路有关。

本文基于网络药理学研究方法及细胞实验验证对 FZJDD 治疗黑色素瘤进行初步研究,相对科学可靠地预测 FZJDD 治疗黑色素瘤的分子作用机制并加以验证,丰富了 FZJDD 治疗黑色素瘤的机制研究,为中医药治疗黑色素瘤提供了新思路,但中药成分复杂、靶点众多,其药效机制仍需要更进一步的研究探讨。

参考文献

- [1] SIEGEL R, GIAQUINTO A N, JEMAL A. Cancer statistics, 2024[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2024, 74: 12-49.
- [2] LIU M J, LAN Y N, ZHANG H L, et al. Analysing the causal relationship between potentially protective and risk factors and cutaneous melanoma: A mendelian randomization study[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2024, 38(1): 102-111.
- [3] ZHANG J, YE Z W, TOWNSEND D M, et al. Redox pathways in melanoma[M]//Advances in Cancer Research. Amsterdam: El-

- sevier, 2024: 125–143.
- [4] CHERKAS E, KALAFATIS N E, MAROUS M R, et al. Iris melanoma: Review of clinical features, risks, management, and outcomes[J]. Clinics in Dermatology, 2024, 42(1): 62–70.
- [5] XU L B, ZHANG L, ZHANG S N, et al. Taxifolin inhibits melanoma proliferation/migration impeding USP18/Rac1/JNK/ β -catenin oncogenic signaling[J]. Phytomedicine, 2024, 123: 155199.
- [6] SERGI M C, FILONI E, TRIGGIANO G, et al. Mucosal melanoma: Epidemiology, clinical features, and treatment[J]. Current Oncology Reports, 2023, 25(11): 1247–1258.
- [7] TRAGER M H, GESKIN L J, SAMIE F H, et al. Biomarkers in melanoma and non-melanoma skin cancer prevention and risk stratification[J]. Experimental Dermatology, 2022, 31(1): 4–12.
- [8] PAMPENA R, PICCOLO V, MUSCIANESE M, et al. Melanoma in children: A systematic review and individual patient meta-analysis[J]. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology, 2023, 37(9): 1758–1776.
- [9] DAVIS L E, SHALIN S C, TACKETT A J. Current state of melanoma diagnosis and treatment[J]. Cancer Biology & Therapy, 2019, 20(11): 1366–1379.
- [10] 张琳婧, 梁羽茜, 王媛媛, 等. 黄芪和天花粉配伍治疗黑色素瘤的文献挖掘[J]. 中医药学报, 2019, 47(1): 43–47.
- [11] 刘玉昕. 治疗恶性黑色素瘤的中西医疗法对比[J]. 现代医学与健康研究电子杂志, 2018, 2(4): 172–173, 181.
- [12] 茅婧怡, 周洁, 张明, 等. 恶性黑色素瘤的中医药治疗及研究进展[J]. 世界临床药物, 2017, 38(6): 428–434.
- [13] 刘巧, 胡俊媛, 王俭, 等. 中医药治疗恶性黑色素瘤临床概况[J]. 河北中医, 2015, 37(6): 934–936, 937.
- [14] 李惠菁, 郜然然, 刘敏, 等. 基于数据挖掘和网络药理学探讨中医药治疗糖尿病牙周炎的组方规律及作用机制[J]. 中药新药与临床药理, 2024, 35(10): 1600–1610.
- [15] 雷鸣, 刘瑞, 陈思, 等. 基于网络药理学的清热止痒汤治疗湿疹的作用机制研究[J]. 新疆中医药, 2024, 42(5): 77–81.
- [16] 赵方圆, 李侯希尔, 吴家慧, 等. 基于网络药理学和体外实验探讨白芷皂苷的抗肿瘤机制[J]. 中南药学, 2024, 22(10): 2663–2669.
- [17] 楚欣欣, 潘思雨, 郭绅, 等. 网络药理学和分子对接法研究白杨素治疗肺动脉高压的机制[J]. 华西药理学杂志, 2024, 39(5): 509–514.
- [18] 王超, 蔡华俊, 王晨晖, 等. 网络药理学研究简鞘蛇菰治疗药源性肝损伤的机制[J]. 华西药理学杂志, 2024, 39(5): 515–521.
- [19] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [20] 敖丽, 王凯, 鲁晓岚, 等. 荧光显微镜联合 CCK8 法测定原花青素 B2 对胃癌细胞自噬和凋亡的影响[J]. 中国医疗设备, 2020, 35(S1): 82–84.
- [21] LONG G V, SWETTER S M, MENZIES A M, et al. Cutaneous melanoma[J]. Lancet, 2023, 402(10400): 485–502.
- [22] CARVAJAL R D, SACCO J J, JAGER M J, et al. Advances in the clinical management of uveal melanoma[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2023, 20(2): 99–115.
- [23] RASHID S, SHAUGHNESSY M, TSAO H. Melanoma classification and management in the era of molecular medicine[J]. Dermatologic Clinics, 2023, 41(1): 49–63.
- [24] LAZAROFF J, BOLOTIN D. Targeted therapy and immunotherapy in melanoma[J]. Dermatologic Clinics, 2023, 41(1): 65–77.
- [25] BRUNSGAARD E K, WU Y P, GROSSMAN D. Melanoma in skin of color: Part I. Epidemiology and clinical presentation[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2023, 89(3): 445–456.
- [26] 张秋艳, 张琳婧, 樊炜静, 等. 中西医靶向 PI3 K/Akt 信号通路治疗恶性黑色素瘤的研究进展[J]. 中医药学报, 2019, 47(4): 124–131.
- [27] ZAREMBA A, JANSEN P, MURALI R, et al. Genetic and methylation profiles distinguish benign, malignant and spitzoid melanocytic tumors[J]. International Journal of Cancer, 2022, 151(9): 1542–1554.
- [28] SAMARKINA A, YOUSSEF M K, OSTANO P, et al. Androgen receptor is a determinant of melanoma targeted drug resistance[J]. Nature Communications, 2023, 14(1): 6498.
- [29] LI Y H, ZHOU Y, ZHANG G J, et al. Successful treatment of metastatic vulvar malignant melanoma with toripalimab: A rare case report and review of the literature[J]. Medicine, 2022, 101(36): e30239.
- [30] HUNT S V, GARROTT H M, WILLIAMS M E, et al. Bilateral paraneoplastic orbital Myositis associated with malignant melanoma and multiple myeloma[J]. Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery, 2022, 38(3): e72–e75.
- [31] FANG P L, HAN Y K, QU Y H, et al. EIF3B stabilizes PTGS2 expression by counteracting MDM2-mediated ubiquitination to promote the development and progression of malignant melanoma[J]. Cancer Science, 2022, 113(12): 4181–4192.
- [32] 陈明, 王举涛, 吴珍妮, 等. 半枝莲总黄酮通过 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1358–1364.
- [33] DHARANIPRAGADA P, ZHANG X, LIU S X, et al. Blocking genomic instability prevents acquired resistance to MAPK inhibitor therapy in melanoma[J]. Cancer Discovery, 2023, 13(4): 880–909.
- [34] CHEN X Y, LI Y D, XIE Y H, et al. Nivolumab and relatlimab for the treatment of melanoma[J]. Drugs of Today, 2023, 59(2): 91–104.
- [35] BOJAR P, BURDAN F, WRONECKI L, et al. Melanoma of the gallbladder[J]. Folia Medica Cracoviensia, 2023, 63(2): 77–92.
- [36] FLAHERTY K T. A twenty year perspective on melanoma therapy[J]. Pigment Cell & Melanoma Research, 2023, 36(6): 563–575.

(本文编辑 苏维)