

本文引用: 廖兴华, 庞河, 吴航, 魏波. 基于网络药理学探究黄芩苷抗骨肉瘤的作用机制及其与 SP600125 协同效应的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(10): 1845-1856.

## 基于网络药理学探究黄芩苷抗骨肉瘤的作用机制及其与 SP600125 协同效应的研究

廖兴华, 庞河, 吴航, 魏波\*

广东医科大学附属第一医院骨科中心, 广东 湛江 524001

**[摘要]** **目的** 本研究通过网络药理学和体外实验探讨黄芩苷治疗骨肉瘤的潜在靶点和作用机制以及其与 SP600125 协同效应的研究。**方法** 运用 PharmMapper, Swiss Target Prediction, Genecards, OMIM 和 TTD 数据库检索黄芩苷和骨肉瘤的潜在靶点。通过 STRING 平台构建蛋白质-蛋白质相互作用网络图和筛选核心靶点。使用 R 语言进行 GO 和 KEGG 富集分析。在 GEO 数据库筛选出骨肉瘤中的差异表达基因。采用分子对接方法评估其与核心靶点的结合潜力。利用 CCK-8 细胞增殖实验、细胞迁移实验、细胞凋亡检测、透射电子显微镜和 Western blot 验证其作用机制。**结果** 通过数据库确定 46 个黄芩苷治疗骨肉瘤的潜在靶点。通过蛋白质-蛋白质相互作用网络筛选出 23 个核心靶点。GO 和 KEGG 富集分析表明, 磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, PKB/AKT)通路和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路和凋亡通路在黄芩苷治疗骨肉瘤中起着关键作用。核心靶点与骨肉瘤差异性表达基因比对的结果发现, AKT1、热休克蛋白 90 $\alpha$  (heat shock protein 90 alpha, HSP90AA1)、膜联蛋白 A5(annexin A5, ANXA5)、细胞周期检验点激酶 1(checkpoint kinase 1, CHEK1)和尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase-type plasminogen activator, PLAU)在骨肉瘤组织中的表达高于正常骨组织。分子对接揭示黄芩苷与 AKT1、HSP90AA1、ANXA5、CHEK1 和 PLAU 靶点有较好的结合活性。体外细胞实验表明, 黄芩苷抑制 HOS 和 143B 骨肉瘤细胞的增殖和迁移, 并促进细胞凋亡。此外, 联合使用 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)抑制剂 SP600125 进一步增强了黄芩苷的抗骨肉瘤作用。透射电子显微镜显示, 黄芩苷增加骨肉瘤细胞内自噬小体的数量, 但与 SP600125 联合时, 黄芩苷诱导的自噬小体的增多会受到抑制。Western blot 分析结果表明, 黄芩苷抑制了 AKT1 蛋白的磷酸化和 p-AKT/AKT 表达水平, 并与 SP600125 共处理可增强该抑制作用。另外, 黄芩苷可诱导骨肉瘤细胞内 LC3-II 和 p62 以及 p-JNK/JNK 的表达, 但与 SP600125 联用会显著抑制此效应。**结论** 黄芩苷通过多靶点和多通路的相互作用发挥抗骨肉瘤效应。此外, SP600125 协同增强了黄芩苷治疗骨肉瘤的效应, 为骨肉瘤的治疗提供了研究依据和理论支持。

**[关键词]** 骨肉瘤; 黄芩苷; 网络药理学; 蛋白激酶 B1; 自噬; SP600125

**[中图分类号]** R285.5

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.10.018

## Mechanism of action of baicalin against osteosarcoma and its synergistic effects with SP600125 based on network pharmacology

LIAO Xinghua, PANG He, WU Hang, WEI Bo\*

Orthopedic Center, Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang, Guangdong 524001, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the potential targets and mechanism of action of baicalin in treating osteosarcoma and its synergistic effects with SP600125 by network pharmacology and in vitro experimentation. **Methods** Using PharmMapper, Swiss

**[收稿日期]** 2024-01-17

**[基金项目]** 广东省自然科学基金项目(2020A1515010003); 2021 年度广东省科技专项资金("大专项+任务清单")竞争性分配项目(2021A05234)。

**[通信作者]** \* 魏波, 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: webjxmc@163.com。

Target Prediction, Genecards, OMIM, and TTD databases, potential targets for baicalin and osteosarcoma were retrieved. A protein-protein interaction network was constructed and core targets were screened through the STRING platform. GO and KEGG enrichment analyses were performed using R language. Differentially expressed genes in osteosarcoma were identified from the GEO database. Molecular docking was employed to assess the binding potential with the core targets. The mechanism of action was validated through CCK8 cell proliferation assays, cell migration assays, apoptosis detection, transmission electron microscopy, and Western blot. **Results** Through database analysis, 46 potential targets for baicalin in the treatment of osteosarcoma were identified. Among these, 23 core targets were screened via the protein-protein interaction network. GO and KEGG enrichment analyses indicated that the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB/AKT) pathway, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, and the apoptosis pathway play pivotal roles in the treatment of osteosarcoma with baicalin. By comparing the core targets with differentially expressed genes in osteosarcoma, it was found that AKT1, heat shock protein 90 alpha (HSP90AA1), annexin A5 (ANXA5), checkpoint kinase 1 (CHK1), and urokinase-type plasminogen activator (PLAU) were expressed at higher levels in osteosarcoma tissues than in normal bone tissues. Molecular docking revealed that baicalin exhibited good binding activity with AKT1, HSP90AA1, ANXA5, CHK1, and PLAU targets. In vitro cell experiments demonstrated that baicalin inhibited the proliferation and migration of HOS and 143B osteosarcoma cells while promoting cell apoptosis. Furthermore, the combination with the c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor SP600125 further enhanced the anti-osteosarcoma effects of baicalin. Transmission electron microscopy showed that baicalin increased the number of autophagosomes within osteosarcoma cells, but this increase was inhibited when combined with SP600125. Western blot analysis indicated that baicalin inhibited the phosphorylation of AKT1 protein and reduced the p-AKT/AKT expression level, and cotreatment with SP600125 enhanced this inhibitory effect. Additionally, baicalin induced the expression of LC3-II, p62, and p-JNK/JNK in osteosarcoma cells, but this induction was significantly suppressed when combined with SP600125. **Conclusion** Baicalin exerts anti-osteosarcoma effects through interaction with multiple targets and pathways. Furthermore, SP600125 synergistically enhances the therapeutic efficacy of baicalin in treating osteosarcoma, providing research evidence and theoretical support for the treatment of this disease.

[**Keywords**] osteosarcoma; baicalin; network pharmacology; protein kinase B1; autophagy; SP600125

骨肉瘤是一种常见的原发性恶性骨肿瘤,好发于青少年,主要发生四肢长骨干骺端,如股骨远端和胫骨近端<sup>[1]</sup>。骨肉瘤以其高度的恶性特征而著称,具有快速的生长速度和转移能力,因此治疗起来相当困难,导致患者的致残率和死亡率较高<sup>[2]</sup>。据统计,骨肉瘤患者的综合5年生存率仅为60%~70%,而一旦出现远处转移或复发的情况,这一比例会骤降至20%,其中转移性病灶的存在是预后不良的主要因素<sup>[3]</sup>。在初次诊断时,已有80%的骨肉瘤患者体内存在可测量的转移性或微转移性病灶。因此,几乎所有患者在接受手术切除治疗后,还需要进行新辅助化学治疗<sup>[4-5]</sup>。目前,大剂量甲氨蝶呤联合阿霉素和顺铂的化疗方案已成为治疗骨肉瘤标准化学治疗方案。然而,由于其毒副作用,在临床应用受到一定的限制<sup>[6]</sup>。此外,对于已发生转移、复发或不可切除的肿瘤患者通常会对当前化学治疗方案产生耐药<sup>[7]</sup>。因此,寻找有效的新型抗骨肉瘤药物具有重要意义。

植物天然有效成分,因其多靶点和多途径的协同作用,在肿瘤发生、发展、转移以及免疫调节等各

个阶段都展现出治疗潜力,成为抗肿瘤先导化合物的重要来源<sup>[8]</sup>。黄芩苷(Baicalin,  $C_{21}H_{18}O_{11}$ )是一种从黄芩植物中提取的黄酮类化合物,具备多种药理活性,包括抗氧化、抗肿瘤、抗菌和保护心脑血管功能等<sup>[9]</sup>。在抗肿瘤方面,黄芩苷表现出显著效果,并且对健康组织无显示毒性<sup>[9-10]</sup>。SP600125( $C_{14}H_{18}N_2O$ )是一种具有强大渗透能力的小分子化合物,它通过ATP竞争机制与JNK结合,有效地抑制了JNK1、JNK2和JNK3的活性,从而干扰了细胞的生物过程<sup>[11]</sup>。体内外的研究揭示,该化合物对多种肿瘤表现显著的治疗潜力,特别是对膀胱癌、骨肉瘤和肺癌等,其能够通过影响肿瘤细胞周期阻滞、抑制转移行为、促进凋亡和抑制自噬,以及增强肿瘤细胞对药物的敏感性来发挥作用<sup>[12]</sup>。

## 1 网络药理学方法

### 1.1 网络药理学数据库及软件

PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/>)

pharmmapper/), Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>), GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>), OMIM 数据库(<https://omim.org/>), TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>), DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>), STRING 数据库(<https://string-db.org/>), Venny 2.1 在线软件作图工具平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>), UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>), GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), Cytoscape 3.8.2 软件, R4.0.5 软件等。

### 1.2 黄芩苷-骨肉瘤共同靶点的筛选

通过 PubChem 数据库获取其化学结构信息。随后,将此结构数据输入到 PharmMapper 数据库中,筛选出 Norm Fit 值大于 0.6 的潜在靶点。同时,利用 Swiss Target Prediction 数据库进一步预测黄芩苷可能作用的靶点。通过 UniProt 数据库校正所获得靶点的名称。以“Osteosarcoma”作为关键词在 GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库中搜索与骨肉瘤相关的靶点。收集这些疾病相关靶点的信息后,使用 Venny 2.1 在线工具绘制韦恩图,找出药物靶点与疾病靶点之间的交集。最终,采用 Cytoscape 软件构建一个“疾病-靶点-成分”网络图。

### 1.3 靶点相互作用网络构建及核心靶点分析

将筛选出的共同靶点输入 STRING 数据库中检索共同靶点之间的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络关系。设置筛选条件为“Homo sapiens”以确保蛋白种类 Human,并将相互作用阈值设定为 0.4,以检索置信度较高的 PPI 网络数据。随后,将获得的 PPI 数据导入 Cytoscape 软件,绘制出详细的 PPI 网络图。接着,利用 Cytoscape 中的 NetworkAnalyzer 工具对 PPI 网络数据进行拓扑分析。基于 Degree 值参数进行排序,选取 Degree 值高于平均值的基因作为核心靶点。最后,使用 R 软件对选定的核心靶点进行数据可视化。

### 1.4 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R 软件结合 Bioconductor 生物信息学软件包,对筛选出的潜在靶点进行了基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)的富集分析,其中设定  $P < 0.05$  和  $Q < 0.05$  作为筛选条件。挑选各部分 GO 富集分析  $P$  值排名前 10 的条目,通过柱

状图形式呈现。富集分析基于  $P$  值排序,选出 KEGG 富集分析的前 30 个条目,并采用气泡图的方式展现了涉及的信号传导通路。

### 1.5 核心靶点的差异表达基因分析

从 GEO 数据库下载了 GSE99671 数据集,该数据集包括 18 例骨肉瘤组织和 18 例正常骨组织的序列文件。接着,提取了骨肉瘤患者的基因表达矩阵,并对数据进行了归一化处理,将原始的 Counts 数据转换成 TPM(transcripts per million),以实现表达量的标准化。然后利用平台注释文件对基因名进行注释。结合 PPI 分析确定的核心靶点与归一化后的基因表达数据,筛选出在正常样本和骨肉瘤样本之间表现出显著差异的差异表达基因。

### 1.6 分子对接

黄芩苷的结构来自 PubChem 数据库,然后导入 Schrödinger 软件经过加氢、结构优化和能量最小化保存后作为分子对接的配体。蛋白结构 AKT1(PDB ID:7NH5)、HSP90AA1(PDB ID:300I)、ANXA5(PDB ID:2XO3)、CHEK1(PDB ID:2HXL)和 PLAU(PDB ID:1C5Y)来自 RCSB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)。蛋白结构在 Schrödinger Maestro 软件进行处理,使用 Protein Preparation Wizard 模块去除蛋白结晶水,补充缺失的氢原子,修复缺失的肽键和肽段信息,进行能量最小化和几何结构的优化。在 Glide 模块中进行筛选时,根据蛋白结构的小分子配体确定对接位点,位点盒子大小设为  $15 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$ 。最后通过 Standard Precision Glide Docking 方法进行分子对接和筛选。对接后的复合物使用 Pymol2.1 软件进行可视化,分析黄芩苷和靶点蛋白的作用模式。

## 2 材料

### 2.1 主要药品和试剂

黄芩苷(HPLC  $\geq 98\%$ ;上海源叶生物科技有限公司,批号:B20570);SP600125(HPLC  $\geq 99.7\%$ ; Medchem Express 公司,批号:HY-12041);抗体 p-AKT1(批号:9018)、AKT1(批号:2938)、JNK(批号:9252)、p-JNK(批号:4668)、Bax(批号:2772)、Bcl-2(批号:4223)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(批号:7074)和抗小鼠 IgG(批号:7076)均购买于 Cell Signaling Technology 公司;抗体 p-AKT(批号:ab192623)、AKT(批号:ab179463)、LC3(批号:ab48394)和 p62(批

号:ab56416)抗体购买于 Abcam 公司;抗体GAPDH(批号:21612)购买于 Signalway Antibody 公司;1%青霉素-链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,批号:P1400);10%胎牛血清 FBS(批号:A5669401)、MEM基础培养基(批号:11095080)均购买于 Thermo Fisher Scientific 公司;ECL 显色剂(Zeta Life 公司,批号:310212);0.1%结晶紫(批号:C0121)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号:C1062M)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010S)、5X SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(批号:P0015)均购自碧云天生物技术研究所。

## 2.2 主要仪器

微孔板读取(型号:MK3, Thermo Fisher Scientific 公司);流式细胞仪(型号:FACSCelesta, BD Biosciences 公司);荧光成像系统(型号:Tanon-5200Multi, Tanon 公司);透射电子显微镜(型号:JEM-1400, JEOL 公司);超薄切片机(型号:Leica EM UC7, Leica Microsystems 公司)。

## 3 体外细胞实验

### 3.1 细胞培养

将 143B 和 HOS 骨肉瘤细胞以  $10 \times 10^5$  的密度接种在  $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$  的细胞培养瓶中,使用添加了 1%青霉素-链霉素混合液和 10%胎牛血清 FBS 的 MEM 基础培养基进行培养。细胞被放置在恒温  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱中。定期检查细胞的生长状态,并适时更换培养基。当细胞生长接近密集单层,即达到 80%~90%的融合度时,便进行传代操作。

### 3.2 CCK-8 检测细胞增殖实验

将骨肉瘤细胞悬液以每孔  $3.0 \times 10^3$  个细胞的密度接种于 96 孔板中,并在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱孵育 24 h。之后,细胞被不同浓度(0、20、40、80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )的黄芩苷或不同浓度(0、10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )SP600125 处理 48 h。若需联合使用 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度的 SP600125,则在黄芩苷干预前对细胞进行 4 h 的预处理。为了评估细胞活力,向每个孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 检测溶液,在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的条件下继续孵育 2~4 h,测定 450 nm 的波长的吸光度值。

### 3.3 细胞迁移实验

为了评估黄芩苷或 SP600125 对骨肉瘤细胞迁移能力的影响,使用 Transwell 小室进行实验。首先,

将骨肉瘤细胞用 MEM 培养基重新悬浮,并取 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬液(含  $2.0 \times 10^4$  个细胞)加入 Transwell 小室的上室中。在下室中加入 500  $\mu\text{L}$  含有 10% FBS 的 MEM 培养基,然后放入恒温  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中静置培养 24 h。培养结束后,轻轻用棉签擦去上室内未发生迁移的细胞。对于迁移至膜内侧的细胞,使用甲醇固定 15 min,随后以 0.1%结晶紫染色 10 min。PBS 彻底清洗掉多余的染料。最后,在放大倍数 400 $\times$ 显微镜视野下观察染色后的细胞,并在随机选取的 5 个视野拍照。所得图片可通过 Image J 软件进行定量分析

### 3.4 流式细胞凋亡检测

为准确评估骨肉瘤细胞的凋亡比例,采用 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒检测。骨肉瘤细胞先经 80  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  黄芩苷单独处理或与 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  SP600125 联合处理 48 h。处理后,用 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 10  $\mu\text{L}$  碘化丙啶染色液对细胞进行染色,再加入 195  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 结合缓冲液重悬细胞。随后,在室温下将细胞避光孵育 30 min 以促进染料结合。孵育结束后,采用流式细胞仪对细胞样本进行检测,并通过 BD FACSDiva 软件来定量染色后的凋亡细胞比例。

### 3.5 透射电子显微镜观察及样品制备

前固定:骨肉瘤细胞在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下用 3%戊二醛固定 4 h,随后用 0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  二甲砷酸钠缓冲液换洗 3 次,每 2 h 一次。后固定:样本在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下用 1%锇酸浸泡 2 h,然后用 0.1  $\text{mol/L}$  二甲砷酸钠缓冲液冲洗 2 次,15 min/次。染色:室温下用饱和醋酸铀染料染色 2 h。脱水与渗透:样本依次在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  的 50%、70%乙醇和室温的 80%、90%乙醇中脱水,然后在室温下用 100%乙醇处理 2 次,接着用丙酮渗透 2 次,15 min/次。最后,样本在室温下用完全包埋液(Eponate12 环氧树脂)与丙酮的混合液(比例 1:1)渗透 3 h,然后比例 1:2 渗透 3 h,最后用完全包埋液渗透过夜。包埋:样本在  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  下用完全包埋液浸泡 12 h,然后在  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  条件移至包埋板并温育 48 h。超薄切片:使用超薄切片机制作 90 nm 厚的切片。电镜观察:使用透射电子显微镜在 80 kV 的工作电压下观察样本,并用 DigitalMicrograph 软件进行图像采集。

### 3.6 Western bolt 检测

收集经黄芩苷或与 SP600125 联合干预后的骨

肉瘤细胞沉淀,在4℃条件下加入适量预混有PMSF(PMSF:RIPA=1:100)的RIPA裂解液。使用细胞刮刀彻底将细胞碎片收集到EP管中,并在冰上持续裂解30 min。随后进行30 s的超声处理,以促进细胞充分裂解。完成裂解后,样本在4℃、12 000 r/min的条件下离心(离心半径9 cm)15 min,然后将上层清澈的蛋白溶液转移到新的EP管中。根据BCA蛋白浓度测定试剂盒的说明书配制BCA定量标准曲线,并测定及调整各组蛋白样品浓度一致。向每组蛋白样品加入适量的5X SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,混合均匀后在99℃下煮沸10 min使蛋白变性。使用配制好的10%或12% SDS-PAGE凝胶,每个样本孔道加载20 μg蛋白质,在100 V电压下电泳60 min进行分离。之后,在250 mA恒流条件下,将凝胶上的蛋白转印2.5 h至0.2 μm孔径的PVDF膜。PVDF膜用5%脱脂牛奶封闭60 min。根据Marker位置和目标蛋白,裁剪相应的膜片,并加入一抗p-AKT1、AKT1、JNK、p-JNK、p-AKT、AKT、Bax、Bcl-2、LC3、p62和GAPDH(均按1:1 000稀释)在4℃冰箱中孵育12 h。然后与相应的二抗(均按1:5 000稀释)在室温避光孵育1 h。最后,使用ECL显色剂结合荧光成像系统曝光膜上的蛋白条带。利用Image J软件对蛋白条带进行灰度值分析,并以GAPDH为内参计算目标蛋白的表达水平。

### 3.7 统计学分析

所有数据均表示为3次独立实验的“ $\bar{x} \pm s$ ”,并使用SPSS 25.0和GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析和绘图。对于两组间的比较,采用独立样本 $t$ 检验。当涉及3组及以上之间的统计分析时,则采

用单因素方差分析(ANOVA)配合Tukey事后多重比较检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 4 结果

### 4.1 黄芩苷治疗骨肉瘤的潜在靶点

在PharmMapper和Swiss Target Prediction数据库中检索后,确定了202个黄芩苷潜在作用靶点。同时,通过Genecards、OMIM和TTD数据库的筛选,发现了1 258个与骨肉瘤疾病相关的潜在靶点。对两组数据进行交集分析,揭示了46个共同靶点(图1A)。进一步整合这些共同靶点信息,绘制了“疾病-靶点-成分”交互网络图(图1B)。

### 4.2 黄芩苷治疗骨肉瘤核心靶点的筛选

通过STRING数据库检索黄芩苷治疗骨肉瘤的潜在作用数据,将数据整合并构建得到46个节点、317个边缘和3个同心圆的PPI网络图(图2A)。其中,节点的大小、颜色深浅变化根据Degree值大小变化。PPI数据进行拓扑分析,筛选Degree值大于平均分(23个)的基因作为核心靶点(图2B)。在核心靶基因中,AKT1(36边)、CASP3(33边)、EGFR(30边)、HSP90AA1(30边)、ESR1(29边)和TNF(29边)具有较高的连接节点度。

### 4.3 GO和KEGG富集分析

对46个共同靶点进行GO富集分析,得到涉及生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)的三大类别信息。GO分析的结果共富集到1 569条与BP相关的条目、29条与CC相关的条目

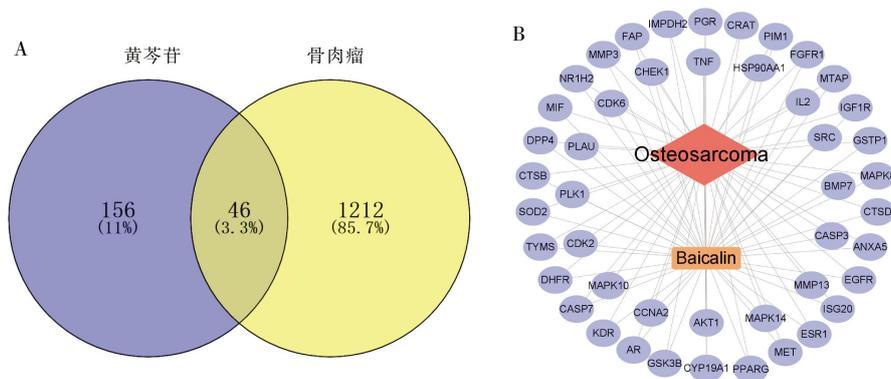


图1 黄芩苷与骨肉瘤相关的潜在靶点

Fig.1 Potential targets of baicalin related to osteosarcoma

注:A.黄芩苷和骨肉瘤相关靶点的韦恩图;B.骨肉瘤-靶点-黄芩苷相互作用网络图。

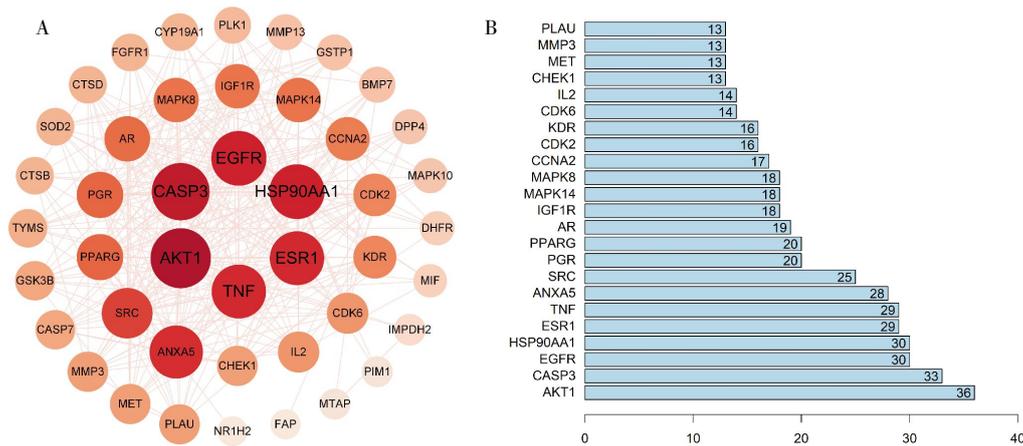


图 2 PPI 网络及核心靶点筛选

Fig.2 PPI network and core target screening

注: A.黄芩苷和骨肉瘤共同靶点的 PPI 网络图; B.条形图显示 Degree 值前 23 位的核心靶标。

以及 109 条与 MF 相关的过程。结果根据 *P* 值选取每部分排前 10 位的条目绘制柱状图(图 3A)。KEGG 富集分析筛选出 111 条黄芩苷治疗骨肉瘤相关的潜在通路,选取 *P* 值前 30 的通路绘制 KEGG 富集的气泡图,其中富含与癌症相关信号通路,如 PI3K/AKT 信号通路、MAPK 信号通路以及细胞凋亡等(图 3B)。

#### 4.4 核心靶点与骨肉瘤差异性表达基因的比对

PPI 的核心靶点(23 个)与 GEO 数据库的骨肉瘤基因进行差异性表达分析。结果显示 AKT1( $P < 0.01$ )、HSP90AA1( $P < 0.001$ )、ANXA5( $P < 0.01$ )、CHEK1( $P < 0.05$ )和 PLAU( $P < 0.05$ )在骨肉瘤组织中的表达高于正常骨组织(图 4)。然而,其他核心靶点基因,包括

EGFR、CASP3、ESR1、TNF、SRC、PGR、PPARG、AR、IGF1R、MAPK14、MAPK8、CCNA2、CDK2、KDR、CDK6、IL2、MET 和 MMP3,在骨肉瘤和正常骨组织之间的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

#### 4.5 核心靶点的分子对接分析

骨肉瘤差异表达的核心靶点 AKT1、HSP90AA1、ANXA5、CHEK1 和 PLAU 与黄芩苷进行分子对接,通过结合能和氢键相互作用来评价结合强度。根据结合模式清晰地显示出黄芩苷结构(图 5A)与靶蛋白活性位点相互作用的氨基酸残基。结合情况如下: AKT1(结合能:  $-10.94$  kcal/mol)活性位点的 GLN-79、ASN-54 和 ARG-273 氨基酸与黄芩苷形成氢键相

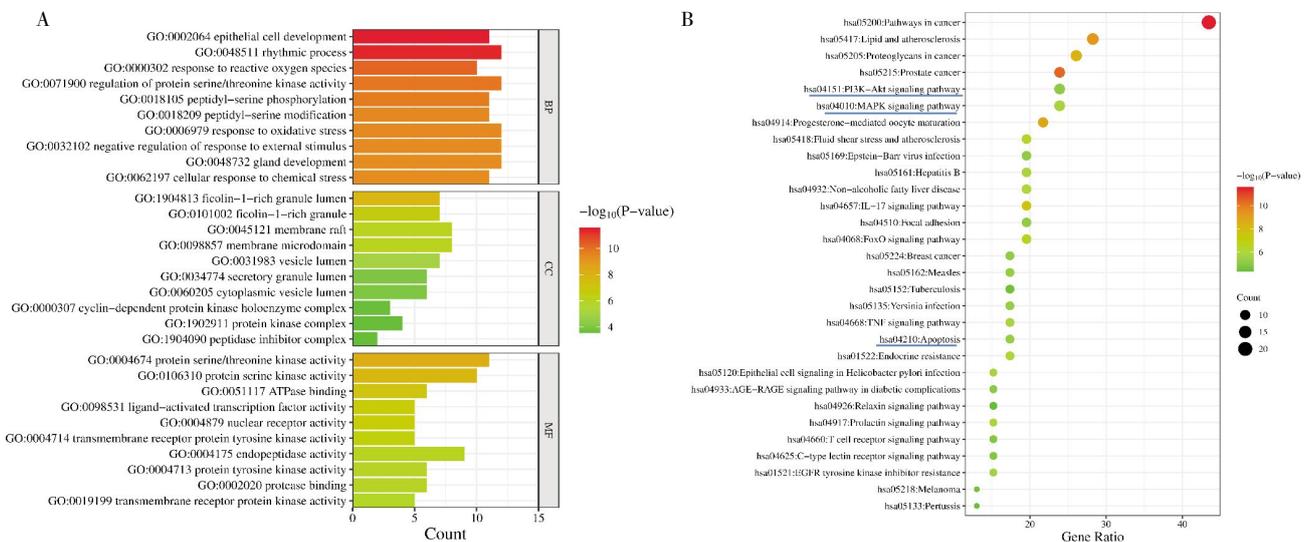


图 3 GO 和 KEGG 分析结果

Fig.3 Results of GO and KEGG analyses

注: A.靶基因 GO 富集分析; B.靶基因的 KEGG 富集分析。红色强度随 GO 或 KEGG 富集分析的显著性的增加而增加。

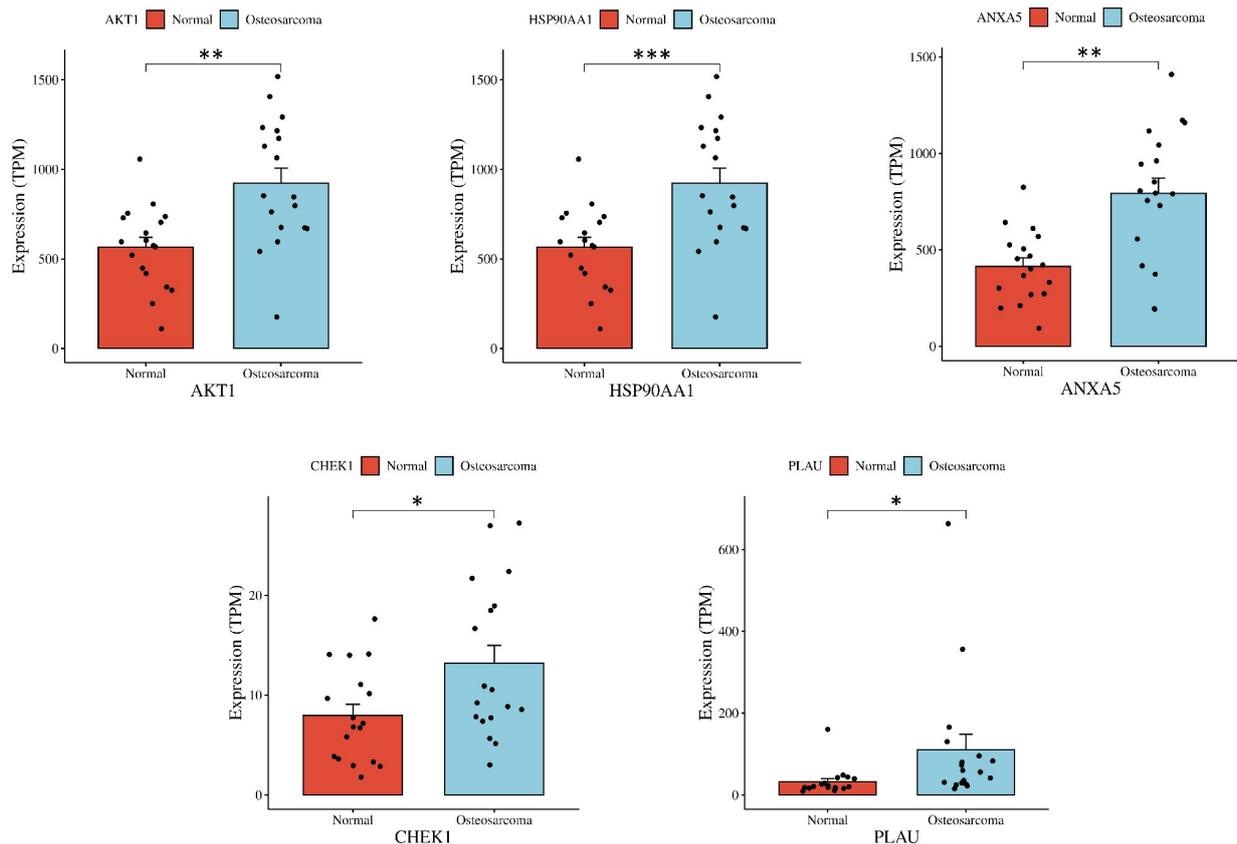


图4 核心靶点与骨肉瘤差异性基因的筛选

Fig.4 Screening of core targets and differential genes related to osteosarcoma

注:其中橙色代表 Normal 组(正常骨组织组);蓝色代表 Osteosarcoma(骨肉瘤组);黑色圆点显示骨肉瘤组织与正常骨组织的 TPM 值;与 Normal 组(正常组)相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 和\*\*\* $P<0.001$ 。

互作用(图 5B);HSP90AA1(结合能:-9.36 kcal/mol)活性位点的 ASN-106、LYS-112、ASN-52 和 LYS-58 氨基酸与黄芩苷形成氢键相互作用(图 5C);ANXA5(结合能:-8.62 kcal/mol)活性位点的 SER-246、ILE-244、GLN-3 和 VAL-4 氨基酸与黄芩苷形成氢键相互作用(图 5D);CHEK1(结合能:-9.11 kcal/mol)活性位点的 GLU-17、GLU-134、ASN-135、CYS-87 和 GLU-91 氨基酸与黄芩苷形成氢键相互作用(图 5E);PLAU(结合能:-8.64 kcal/mol)活性位点的 ASP-97、HIS-99 和 SER-195 氨基酸与黄芩苷形成氢键相互作用(图 5F)。

#### 4.6 黄芩苷对骨肉瘤细胞增殖及核心靶点 AKT1 的影响

CCK-8 细胞增殖结果显示,在 0~80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的黄芩苷浓度范围内,143B 和 HOS 骨肉瘤细胞活力均明显降低( $P<0.01$ )(图 6A)。鉴于黄芩苷与核心靶点 AKT1 具有很好的结合活性,并且 AKT1 在 PPI 网络中的 Degree 值最高,进一步通过 Western blot 实验

检测了黄芩苷对骨肉瘤细胞内 AKT1 蛋白水平变化的影响。与未处理的对照组相比,经黄芩苷处理后的 143B 细胞中 AKT1 蛋白的磷酸化水平显示出浓度依赖性的抑制效果( $P<0.01$ )(图 6B)。

#### 4.7 SP600125 增强黄芩苷抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭以及促进凋亡的作用

在研究 SP600125 单独或与黄芩苷联合对骨肉瘤细胞增殖、迁移和凋亡影响的过程中,CCK-8 细胞增殖实验结果揭示,相较于单独使用黄芩苷,其与 SP600125 的联合应用能显著协同抑制 143B 和 HOS 两种骨肉瘤细胞系的增殖能力( $P<0.05$ )。相比之下,SP600125 仅在 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下才显示出对骨肉瘤细胞的抑制效应( $P<0.01$ )(图 7A)。在细胞迁移实验中,与空白组相比,单独应用黄芩苷可以增强对细胞迁移的抑制率( $P<0.05$ )。而当 SP600125 与黄芩苷共处理时,这种联合作用可以进一步增强对细胞迁移能力的抑制效果( $P<0.05$ )(图 7B)。通过 Annexin V-FITC/PI 双染法评估细胞凋亡情况,流式细

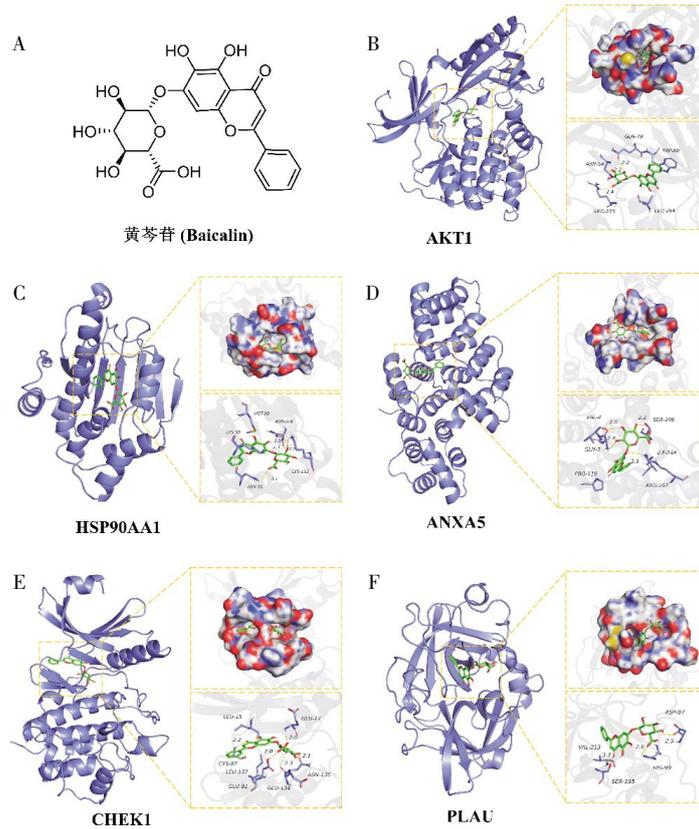


图 5 差异性表达的核心靶点的分子对接

Fig.5 Molecular docking of differentially expressed core targets

注:A.黄芩苷结构;B-F.黄芩苷通过氢键与 AKT1、HSP90AA1、ANXA5、CHEK1、PLAU 靶点的氨基酸结合。

胞凋亡结果显示,与未处理的空白组相比,单独应用黄芩苷能增加细胞的凋亡率( $P<0.01$ )。同时,SP600125 与黄芩苷共处理时,可进一步增强黄芩苷诱导的细胞凋亡效果( $P<0.05$ ) (图 7C)。此外,与空

白组相比,黄芩苷组的凋亡相关 Bcl-2 蛋白表达量显著下降( $P<0.01$ ),而 Bax 蛋白表达量则显著增加( $P<0.001$ )。当与SP600125 联合处理时,相较于单独使用黄芩苷组,Bcl-2 蛋白的表达量进一步降低( $P<$

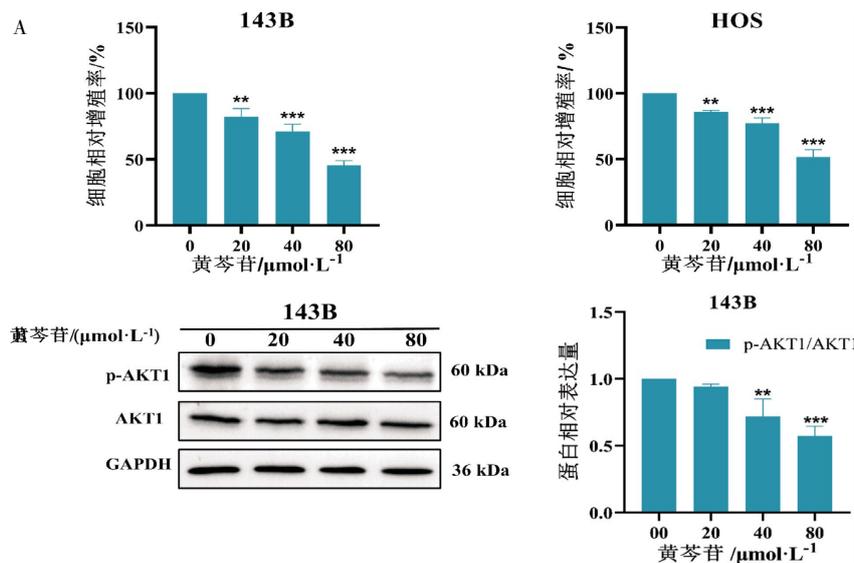


图 6 黄芩苷对骨肉瘤细胞的增殖和核心靶点 AKT1 的影响( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Fig.6 Effects of baicalin on proliferation of osteosarcoma cells and the core target AKT1 ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

注:A.CCK-8 法检测骨肉瘤细胞增殖;B.Western bolt 分析 AKT1 和 p-AKT1 蛋白的表达水平。与 0 浓度的黄芩苷组相比, \*\* $P<0.01$  和 \*\*\* $P<0.001$ 。

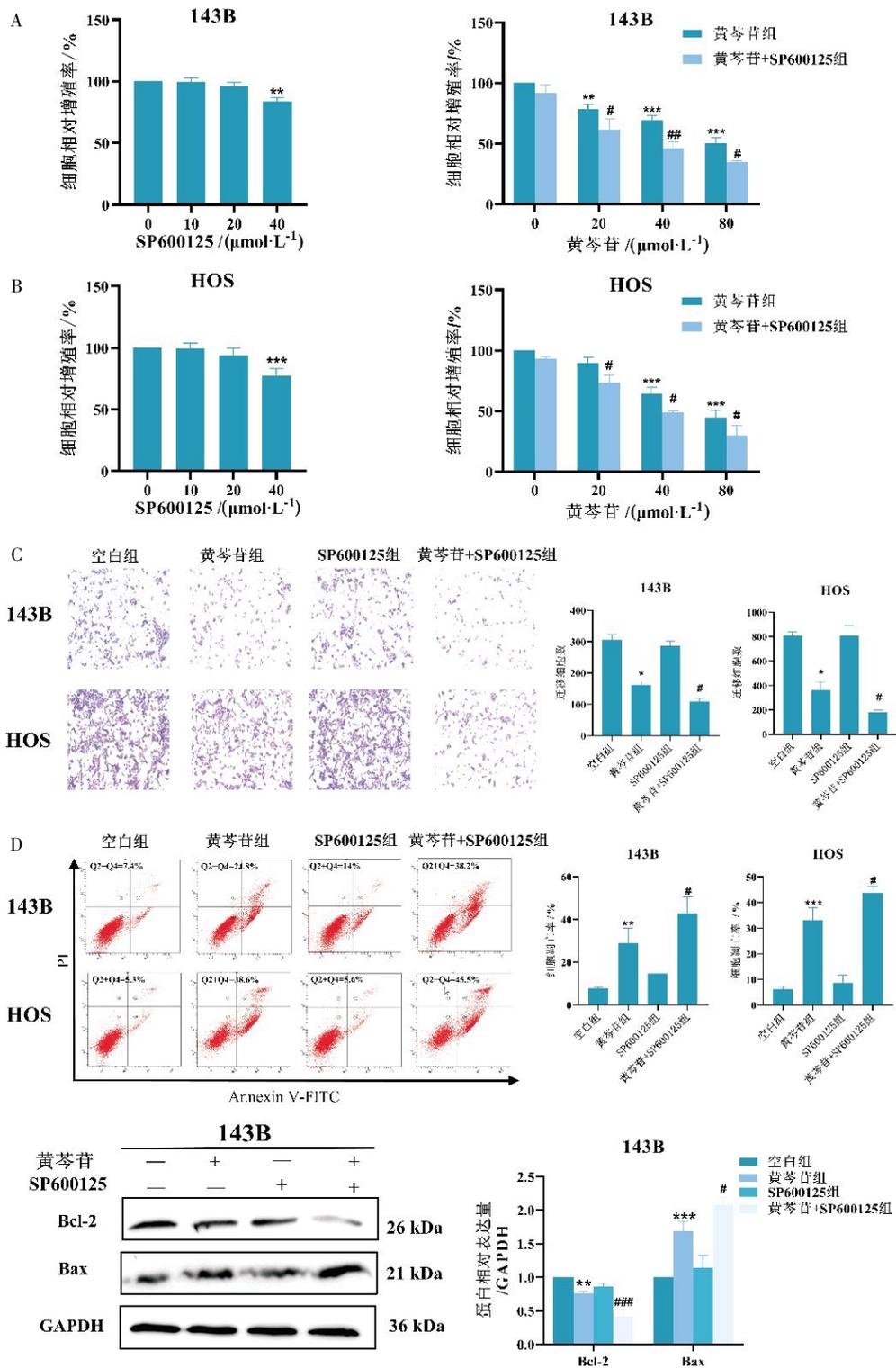


图 7 SP600125 增强黄芩苷抑制骨肉瘤细胞增殖和侵袭以及诱导凋亡的作用 ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Fig.7 SP600125 enhanced the effects of baicalin on inhibiting proliferation and invasion, as well as inducing apoptosis, in osteosarcoma cells ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

注:A.CCK-8 法检测 SP600125 单独或联合黄芩苷处理的骨肉瘤细胞活力;B.细胞迁移试验评估骨肉瘤细胞的迁移能力;显微镜放大倍数 400 $\times$ ;C.Annexin V-FITC/PI 双染法测定细胞的凋亡比例;D.Western blot 分析 Bcl-2 和 Bax 蛋白水平。与空白组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  和 \*\*\* $P<0.001$ ;与黄芩苷组相比, # $P<0.05$  和 ## $P<0.01$ 。

0.001),同时 Bax 蛋白的表达量也进一步增加( $P<0.05$ )。这一结果进一步验证了 SP600125 和黄芩苷在促进细胞凋亡方面的协同增效作用(图 7D)。

#### 4.8 SP600125 通过抑制 AKT 通路和调节自噬过程增强黄芩苷的抗骨肉瘤作用

KEGG 富集分析的结果揭示了黄芩苷抗骨肉瘤

作用与 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路的潜在关联。因此,本研究进一步检测了 PI3K/AKT 信号通路中 AKT 蛋白的表达变化。结果显示,黄芩苷的处理显著降低 p-AKT/AKT 的表达水平( $P<0.001$ ),并且联合 SP600125 共处理后,AKT 磷酸化水平得到进一步抑制( $P<0.05$ )(图 8A)。为了进一步探讨 JNK 抑制剂 SP600125 如何增强黄芩苷诱导的细胞死亡效应。在处理 143B 细胞时,应用了  $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的黄芩苷或与 SP600125 的联合处理。透射电子显微镜结果显示,经黄芩苷处理的骨肉瘤细胞内自噬小体的数量显著增加。然而,联合 SP600125 时,由黄芩苷诱导的自噬小体的增多被明显减弱(图 8B)。Western

blot 结果显示,黄芩苷处理组的 JNK 蛋白被磷酸化激活。此外,自噬相关蛋白 LC3-II 与 LC3-I 的比值以及 p62 蛋白的表达均因黄芩苷的处理而显著增加( $P<0.01$ )。然而,当使用 SP600125 抑制 JNK 时,黄芩苷所诱导的 143B 细胞中 p62 和 LC3-II 表达的激活被逆转( $P<0.05$ )(图 8C)。

## 5 讨论

本研究通过网络药理学共筛出 46 个共同靶点,其中,AKT1、CASP3、EGFR、HSP90AA1、ESR1 和 TNF 等 23 个核心靶点与黄芩苷治疗骨肉瘤的机制密切相关。KEGG 富集显示,PI3K-AKT 信号通路、MAPK

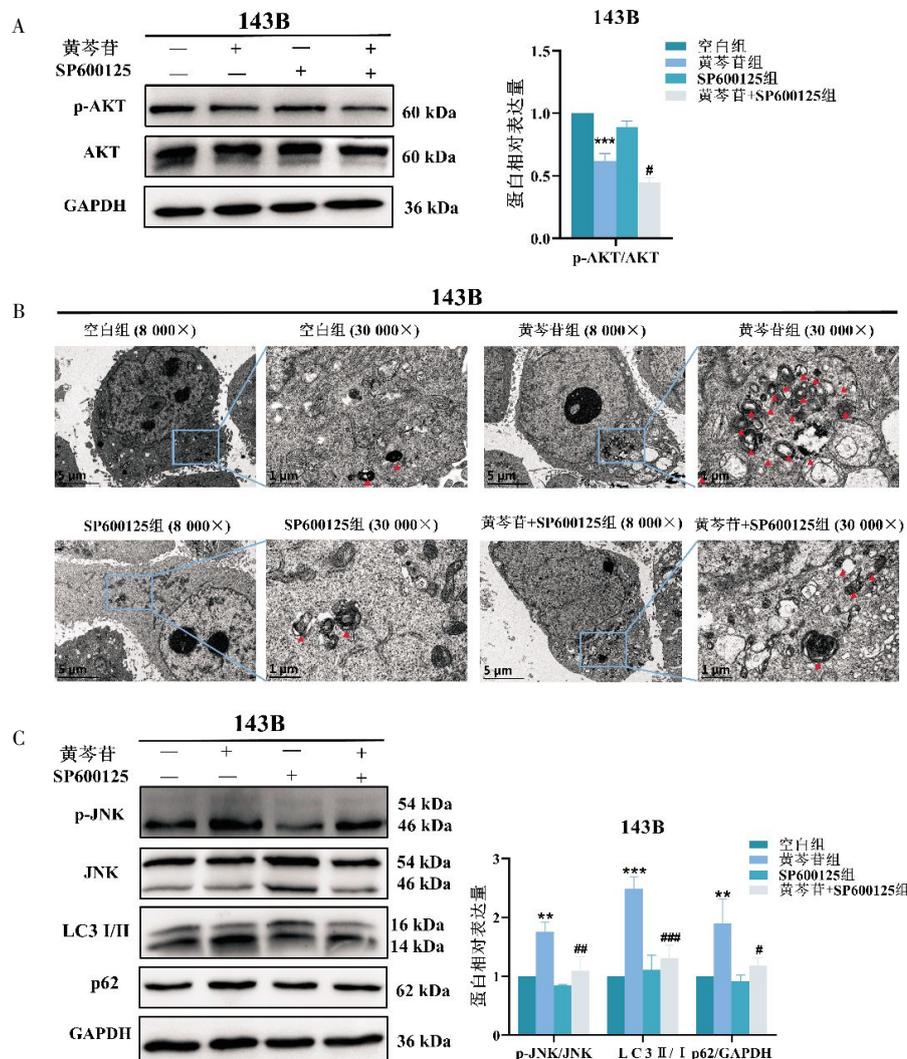


图 8 SP600125 通过抑制 AKT 通路和调节自噬过程增强黄芩苷抗骨肉瘤的作用( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

**Fig.8** SP600125 enhanced the anti-osteosarcoma effects of baicalin by inhibiting the AKT pathway and regulating the autophagy process ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

注:A.通过 Western blot 分析测定 p-AKT 和 AKT 的蛋白表达水平;B.通过透射电子显微镜观察 143B 细胞内的自噬小体数量。红色三角形指向自噬小体。低倍镜,×8 000;高倍率,×30 000;C.Western blot 分析 p-JNK、JNK、LC3 和 p62 蛋白表达水平。与空白组相比,\* $P<0.05$ ,\*\* $P<0.01$ 和\*\*\* $P<0.001$ ;与黄芩苷组对比,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$ 和### $P<0.01$ 。

信号通路以及细胞凋亡等参与黄芩苷抗骨肉瘤的机制。核心靶点 AKT1、HSP90AA1、ANXA5、CHEK1 和 PLA2 在骨肉瘤组织中的表达显著高于正常骨组织。分子对接显示,黄芩苷与这些靶点都有较强的结合潜力。其中,AKT1 与黄芩苷的结合具有很高的适配性,且在 PPI 网络中占据核心位置。另外,Western blot 结果显示,黄芩苷能降低 143B 细胞内 AKT1 蛋白的磷酸化水平,这为 AKT1 作为核心靶点提供了初步的验证。

骨肉瘤细胞的转移与预后不佳密切相关,是导致扩散、耐药及病情恶化的病理基础<sup>[13]</sup>。细胞凋亡机制是细胞受到特定信号的刺激,发生自主程序性细胞死亡,涉及染色质固缩、DNA 断裂和凋亡小体形成的过程<sup>[14]</sup>。Bax 与 Bcl-2 之间的比例变化能够影响线粒体膜电位,进而触发细胞色素 C 的释放,从而诱导 Caspase 系列反应,最终引发细胞凋亡<sup>[15]</sup>。目前,SP600125 能协同增强抗肿瘤药物的治疗效果已在多种癌症模型中得到证实,与其他抗肿瘤药物联合使用来减弱肿瘤的耐药性<sup>[16]</sup>。本研究通过 CCK-8 测定和细胞迁移实验揭示,黄芩苷显著抑制骨肉瘤细胞的增殖和迁移能力。流式细胞凋亡检测和 Western blot 揭示了黄芩苷能明显诱导的骨肉瘤细胞的凋亡比例增高。此外,当 SP600125 与黄芩苷联合应用时,结果显示 SP600125 能够协同增强黄芩苷抑制骨肉瘤细胞增殖和迁移的效果,并促进细胞凋亡。相比之下,单独使用 JNK 抑制剂 SP600125 对骨肉瘤细胞的影响却十分有限。

PI3K/AKT 通路在骨肉瘤中被固定激活,并参与调控骨肉瘤细胞的转移、凋亡和自噬等过程<sup>[17]</sup>。此外,抑制该通路及其相关上下游分子的活性已成为骨肉瘤治疗的重要策略<sup>[18]</sup>。JNK 是调控癌细胞凋亡和自噬的重要介质,它的激活在骨肉瘤细胞的生长、侵袭、凋亡和自噬等机制发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。研究表明,这两种信号通路存在相互干扰的现象,并组成一个复杂的调控网络<sup>[21]</sup>。有研究发现,SP600125 通过增强柴胡皂苷 D 对 AKT 通路的阻断作用,抑制骨肉瘤细胞的恶性特性,并激活 Caspase-3、Caspase-8 和 Caspase-9 依赖的细胞凋亡<sup>[22]</sup>。自噬的激活通常与骨肉瘤细胞的增殖、转移、凋亡、化疗耐药和免疫治疗有关<sup>[23]</sup>。自噬与凋亡之间的相互作用构成了一个复杂且精确的平衡系统,其中一种过程的激活或抑

制可以显著影响另一种过程的活性。此相互作用涉及众多信号通路及调节蛋白,包括 Caspase-8、P53、Bcl-2 和 JNK 等<sup>[24]</sup>。在自噬过程中,细胞质内 LC3 被水解成 LC3-I,与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3-II 连接于自噬小体膜中<sup>[25]</sup>。此外,p62 的表达与肿瘤形成、癌症促进和化疗耐药有关,是自噬的适配体<sup>[26]</sup>的 LC3-II 和 p62-Nrf2 表达,活化凋亡相关蛋白的表达,触发自噬向凋亡的转换,增强 C-2 抗膀胱癌的敏感性<sup>[27]</sup>。此外,SP600125 通过抑制 JNK 调控的自噬增强非小细胞肺癌细胞对 mTORC1/2 抑制剂的敏感性<sup>[28]</sup>。同时,在另一项研究中发现 p62 被 pKAL 以 ROS 依赖的方式显著上调,而 SP600125 抑制 JNK 介导 p62 的下调增强 pKAL 诱导的结直肠癌细胞凋亡<sup>[29]</sup>。本研究结果显示,黄芩苷和 SP600125 的联合应用能够有效抑制 AKT 的磷酸化,表明 AKT 通路参与其抗骨肉瘤的作用机制。透射电子显微镜观察显示,黄芩苷的处理能显著增加骨肉瘤细胞中自噬小体的数量。然而,当联用 SP600125 时,黄芩苷所诱导的自噬小体的增加受到抑制。另外,黄芩苷能增加自噬相关蛋白 LC3-II 和 p62 的表达水平,以及促进 JNK 的磷酸化,而这种现象被 JNK 抑制剂 SP600125 所逆转。此外,SP600125 的共处理增强了黄芩苷所诱导的细胞凋亡效应,这表明 SP600125 通过调节自噬过程,与黄芩苷协同发挥抗骨肉瘤的治疗效能。

综上所述,本研究运用了网络药理学和分子对接系统性分析黄芩苷抗骨肉瘤的潜在分子靶点和通路机制。在体外实验中,黄芩苷显著地抑制了骨肉瘤细胞的增殖与迁移,并有效地诱导骨肉瘤细胞凋亡。当与 JNK 抑制剂 SP600125 联合使用时,这一组合疗法通过降低 AKT 的磷酸化水平和调节自噬过程,进一步强化了对骨肉瘤治疗的协同效应。黄芩苷展现出针对多个靶点及其相应信号通路的显著作用,显示了其作为一种新型抗骨肉瘤药物的潜力。特别是与 SP600125 联合使用的策略,为骨肉瘤的治疗提供了新的方向。

## 参考文献

- [1] BIELACK S S, HECKER-NOLTING S, BLATTMANN C, et al. Advances in the management of osteosarcoma[J]. *F1000Research*, 2016, 5: 2767.
- [2] BIELACK S, JÜRGENS H, JUNDT G, et al. Osteosarcoma: The

- COSS experience[J]. *Cancer Treatment and Research*, 2009, 152: 289–308.
- [3] YU X B, YUSTEIN J T, XU J M. Research models and mesenchymal/epithelial plasticity of osteosarcoma[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11(1): 94.
- [4] MEYERS P A, GORLICK R. Osteosarcoma[J]. *Pediatric Clinics of North America*, 1997, 44(4): 973–989.
- [5] POSTHUMADEBOER J, WITLOX M A, KASPERS G J, et al. Molecular alterations as target for therapy in metastatic osteosarcoma: A review of literature[J]. *Clinical & Experimental Metastasis*, 2011, 28(5): 493–503.
- [6] PRUDOWSKY Z D, YUSTEIN J T. Recent insights into therapy resistance in osteosarcoma[J]. *Cancers*, 2020, 13(1): 83.
- [7] CZARNECKA A M, SYNORADZKI K, FIRLEJ W, et al. Molecular biology of osteosarcoma[J]. *Cancers*, 2020, 12(8): 2130.
- [8] ZHANG Y, LOU Y N, WANG J B, et al. Research status and molecular mechanism of the traditional Chinese medicine and antitumor therapy combined strategy based on tumor microenvironment[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 609705.
- [9] SINGH S, MEENA A, LUQMAN S. Baicalin mediated regulation of key signaling pathways in cancer[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 164: 105387.
- [10] WEN Y Q, WANG Y Z, ZHAO C X, et al. The pharmacological efficacy of baicalin in inflammatory diseases[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9317.
- [11] ENNIS B W, FULTZ K E, SMITH K A, et al. Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and tumor cell proliferation by a small molecule inhibitor of c-Jun N-terminal kinase[J]. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2005, 313(1): 325–332.
- [12] WU Q H, WU W D, JACEVIC V, et al. Selective inhibitors for JNK signalling: A potential targeted therapy in cancer[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2020, 35(1): 574–583.
- [13] CHONG Z X, YEAP S K, HO W Y. Unraveling the roles of miRNAs in regulating epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in osteosarcoma[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 172: 105818.
- [14] KOREN E, FUCHS Y. Modes of regulated cell death in cancer[J]. *Cancer Discovery*, 2021, 11(2): 245–265.
- [15] CZABOTAR P E, GARCIA-SAEZ A J. Mechanisms of BCL-2 family proteins in mitochondrial apoptosis[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24: 732–748.
- [16] 莫艳秀, 彭凌音, 刘峻彤, 等. SP600125 在肿瘤发生发展中的作用机制研究进展[J]. *湘南学院学报(医学版)*, 2022, 24(2): 68–73.
- [17] ZHANG J, YU X H, YAN Y G, et al. PI3K/akt signaling in osteosarcoma[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 444: 182–192.
- [18] KHEZRI M R, JAFARI R, YOUSEFI K, et al. The PI3K/AKT signaling pathway in cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic interventions[J]. *Experimental and Molecular Pathology*, 2022, 127: 104787.
- [19] BUBICI C, PAPA S. JNK signalling in cancer: In need of new, smarter therapeutic targets[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2014, 171(1): 24–37.
- [20] 李国东, 蔡郑东, 张寅权, 等. 丝裂原活化蛋白激酶信号通路相关基因在人骨肉瘤中的表达[J]. *中华肿瘤杂志*, 2009, 31(5): 340–345.
- [21] ZHAO H F, WANG J, TONY TO S S. The phosphatidylinositol 3-kinase/akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? (review)[J]. *International Journal of Oncology*, 2015, 47(2): 429–436.
- [22] GAO T, ZHAO P, YU X L, et al. Use of Saikosaponin D and JNK inhibitor SP600125, alone or in combination, inhibits malignant properties of human osteosarcoma U2 cells[J]. *American Journal of Translational Research*, 2019, 11(4): 2070–2080.
- [23] NING B, LIU Y X, HUANG T H, et al. Autophagy and its role in osteosarcoma[J]. *Cancer Medicine*, 2023, 12(5): 5676–5687.
- [24] DAS S, SHUKLA N, SINGH S S, et al. Mechanism of interaction between autophagy and apoptosis in cancer[J]. *Apoptosis*, 2021, 26(9/10): 512–533.
- [25] HECKMANN B L, GREEN D R. LC3-associated phagocytosis at a glance[J]. *Journal of Cell Science*, 2019, 132(5): jcs222984.
- [26] KATSURAGI Y, ICHIMURA Y, KOMATSU M. p62SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor[J]. *The FEBS Journal*, 2015, 282(24): 4672–4678.
- [27] YU H Y, WU C L, WANG X Y, et al. SP600125 enhances C-2-induced cell death by the switch from autophagy to apoptosis in bladder cancer cells[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 448.
- [28] JIN H O, HONG S E, PARK J A, et al. Inhibition of JNK-mediated autophagy enhances NSCLC cell sensitivity to mTORC1/2 inhibitors[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28945.
- [29] JUNG E J, PARAMANANTHAM A, KIM H J, et al. Artemisia annua L. polyphenol-induced cell death is ROS-independently enhanced by inhibition of JNK in HCT116 colorectal cancer cells[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1366.