

基于网络药理学及分子对接探讨黄芩汤减轻子宫内 膜癌化疗不良反应的机制

杨思慧¹, 周凌², 谢景¹, 周怀君^{1,2*}

(1. 南京中医药大学 中西医结合鼓楼临床医学院, 南京 210008;

2. 南京大学医学院附属鼓楼医院妇产医学中心, 南京 210008)

[摘要] **目的:**基于实验及网络药理学和分子对接技术探讨黄芩汤是否可联合卡铂用于子宫内膜癌化疗及其具体机制。**方法:**构建裸鼠子宫内膜癌皮下移植瘤模型,当瘤体体积达100 mm³左右时,将24只裸鼠随机分为模型组、黄芩汤组(3.5 g·kg⁻¹)、卡铂组(50 mg·kg⁻¹)、联合组(黄芩汤3.5 g·kg⁻¹+卡铂50 mg·kg⁻¹),每组6只。模型组给予生理盐水200 μL灌胃,每日灌胃2次。每2日测量裸鼠皮下移植瘤的体积及裸鼠的体质量。给药20 d后取裸鼠血液做肾功能及血常规检测,并处死裸鼠取瘤称质量。结合实验结果,通过网络药理学预测黄芩汤联合卡铂可能的作用机制,并通过分子对接预测活性成分的结合部位。**结果:**黄芩汤组、卡铂组、联合组抑瘤率分别为8.87%、50.33%(*P*<0.05)、64.66%(*P*<0.01)。与模型组比较,卡铂组裸鼠体质量、白细胞、红细胞、血红蛋白下降,肌酐及尿酸明显上升(*P*<0.05);与卡铂组比较,联合组裸鼠体质量、白细胞、血红蛋白明显上升(*P*<0.05),肌酐及尿酸明显降低(*P*<0.05)。网络药理学筛选得到黄芩汤与卡铂副作用相关的活性成分114个,作用靶点200个,涉及的核心基因主要是热休克蛋白90AA1(HSP90AA1)、转录因子c-Jun(JUN)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)等,分子对接表明核心成分汉黄芩素、黄芩素、可与HSP90AA1形成稳定的蛋白复合体,是潜在的活性分子。京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析表明其可能与调节肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、白细胞介素-17(IL-17)信号通路、MAPK信号通路、Toll样受体(TLRs)信号通路相关。**结论:**黄芩汤未明显增强卡铂抑制子宫内
膜癌增殖的作用,但联合用药可缓解卡铂诱导的副作用,其机制可能与中药复杂的调控网络相关。

[关键词] 黄芩汤; 卡铂; 子宫内膜癌; 肾毒性; 血液系统毒性; 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)06-0167-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220315

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220113.1812.008.html>

[网络出版日期] 2022-1-14 13:58

Mechanism of Huangqintang in Alleviating Side Effect of Chemotherapy for Endometrial Cancer Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

YANG Si-hui¹, ZHOU Ling², XIE Jing¹, ZHOU Huai-jun^{1,2*}

(1. Nanjing Drum Tower Hospital Clinical College of Traditional Chinese and Western Medicine,

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210008, China;

2. Obstetrics and Gynecology Medicine Center, Nanjing Drum Tower Hospital,

The Affiliated Hospital of Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the utility and mechanism of Huangqintang combined with carboplatin in chemotherapy of endometrial cancer by experiments as well as network pharmacology and molecular docking. **Method:** The xenograft model of endometrial carcinoma was induced in BALB/c nude mice. When the tumor volume reached about 100 mm³, 24 nude mice were randomly assigned into a model

[收稿日期] 2021-11-14

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81972434,82172819)

[第一作者] 杨思慧,在读硕士,从事妇科肿瘤的中西医结合治疗研究,E-mail:y15639096461y@126.com

[通信作者] *周怀君,博士,主任医师,博士生导师,从事妇科肿瘤治疗的研究,E-mail:zhouhj2007@126.com

group, a Huangqintang group ($3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), a carboplatin group ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and a combination group ($3.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ Huangqintang + $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ carboplatin), with six mice in each group. The mice in the model group received 200 μL of normal saline by gavage, twice a day. The volume of the tumor and the body weight of the mice were measured every two days. After drug intervention for 20 days, the blood of the mice was collected for renal function and blood routine tests. Then the nude mice were euthanized and the tumor was weighted. In combination with the experimental results, the underlying mechanism of Huangqintang combined carboplatin was predicted through network pharmacology and the binding sites of active components were predicted by molecular docking. **Result:** The tumor inhibition rates of the Huangqintang group, the carboplatin group, and the combination group were 8.87%, 50.33% ($P<0.05$), and 64.66% ($P<0.01$), respectively. Compared with the results in the model group, the body weight, leukocyte, erythrocyte, and hemoglobin in the carboplatin group decreased, and creatinine and uric acid increased ($P<0.05$). Compared with the carboplatin group, the combination group showed increased body weight, leukocyte, and hemoglobin ($P<0.05$), and decreased creatinine and uric acid ($P<0.05$). A total of 114 potential active components of Huangqintang involved 200 targets related to the side effects of carboplatin. The core genes involved were mainly heat shock protein 90AA1 (HSP90AA1), transcription factor c-Jun (JUN), and mitogen-activated protein kinase (MAPK). Molecular docking showed that baicalein and wogonin could form a stable protein complex with HSP90AA1, serving as potential active molecules. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis revealed that it might be related to the regulation of tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, interleukin (IL)-17 signaling pathway, MAPK signaling pathway, and toll-like receptor pathway. **Conclusion:** Huangqintang has no obvious inhibitory effect on endometrial cancer, and the tumor suppression effect is not significantly enhanced after combination with carboplatin, but Huangqintang can alleviate carboplatin-induced side effects. The mechanism may be related to the complex network of Chinese medicine.

[Keywords] Huangqintang; carboplatin; endometrial cancer; nephrotoxicity; hematotoxicity; network pharmacology; molecular docking

子宫内膜癌作为妇科恶性肿瘤之一,严重威胁着妇女的生命和健康。据估计,2021年美国新发子宫内膜癌病例为66 570例,死亡病例为12 940例,其死亡率仅次于卵巢癌^[1]。随着我国医疗卫生事业的发展,子宫内膜癌5年生存率逐年提高,总体预后较好^[2],但晚期及复发性子宫内膜癌,预后仍不佳^[3]。子宫内膜癌的治疗主要根据患者的年龄、病理学类型和分子分型以及影像学检查等综合考虑,治疗上以手术为主,放疗和化疗是其常用的辅助手段^[4-5]。研究表明,对子宫内膜癌浆液性肿瘤和Ⅲ期或更高级别的任何组织学类型的子宫内膜癌使用化疗是必要的^[6],并且以铂类为基础的化疗被推荐用于子宫内膜癌化疗的一线治疗方案^[7]。然而根据临床经验,铂类药物的不良反应如血液系统损伤,消化道反应及肝肾损伤,常常造成患者不能耐受化疗,严重者甚至终止化疗过程。

中医药在恶性肿瘤的辅助治疗中有很好的疗效,在藏象理论的指导下,中医药在减轻化疗药物毒性中具有显著优势^[8]。黄芩汤被称为万世治痢之

祖剂,由黄芩、白芍、炙甘草、大枣4味中药组成,古代医家多用来治疗热痢,其病机乃胆胃不和,少阳邪热下迫阳明,而致下利时作^[9]。亦有医家认为根据黄芩汤的用药特点,其病机主要是“上焦热郁,中焦胃虚,下焦饮逆”^[10]。随着医学的发展,黄芩汤临床应用范围不断增加,在肿瘤的辅助治疗中也发挥了独特的优势,目前已有研究表明,以黄芩汤为基础开发出的成药PHY906可通过改变肿瘤免疫微环境从而增强索拉菲尼抑制肿瘤的效果^[11]。并且Ⅱ期临床试验证实PHY906可增强卡培他滨在肝癌、胰腺癌中的抗肿瘤效果,同时减轻患者的药物副反应,具有广阔的应用前景^[12]。

然而在子宫内膜癌的化疗中,黄芩汤能否与一线化疗药物卡铂联合用药,达到增效减毒的作用,尚不明确。本研究采用裸鼠子宫内膜癌皮下移植瘤模型,观察黄芩汤、卡铂及联合用药后,裸鼠瘤体的生长情况和血常规、肾功能指标的变化,并通过网络药理学和分子对接技术探讨黄芩汤联合卡铂治疗子宫内膜癌可能的分子机制,以期对黄芩汤用

于子宫内膜癌临床化疗提供实验依据,同时为临床治疗子宫内膜癌寻找更多有效的治疗方案和策略。

1 材料

1.1 细胞株与动物 人源子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株购自江苏凯基生物技术股份有限公司(编号 KG314)。SPF 级 BALB/c-nude 裸鼠 24 只,体质量(19.11±0.94) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 20210512Abzz0619000740,经统计学验证 24 只裸鼠体质量差异无统计学意义。饲养于南京大学医学院附属鼓楼医院动物研究中心屏障环境动物房,裸鼠在无病原体的环境中以 12 h 的光照和 12 h 的暗循环饲养,并允许自由进食和饮水。动物实验的开展取得了南京大学医学院附属鼓楼医院实验动物福利伦理审查,伦理审查批准号 2021AE01039。

1.2 药物及试剂 carboplatin(MedChemExpress 公司, CAS 号 41575-94-4,纯度 ≥98%)。黄芩(*Scutellaria baicalensis*)、芍药(*Paeonia lactiflora*)、炙甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)和大枣(*Ziziphus jujuba*)饮片均购于南京中医药大学附属南京中医院(批号分别为 200111、20201013、2020815、201023),经药学部主任夏勤药师鉴定均为合格饮片。黄芩汤煎剂根据文献[13]制作。DMEM 培养基、胰酶(美国 Multicell 公司,货号分别为 319-006-CL、325-043-EL),胎牛血清(德国 PAN 公司,货号 ST30-3302),肌酐试剂盒(山东博科生物产业有限公司,批号 10106025Y),尿酸试剂盒(山东博科生物产业有限公司,批号 10510027w)。

1.3 仪器 DMIL LED 型倒置显微镜(德国 Leica 公司),Pico™ 21 型微量离心机、Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司),BY-320C 型医用离心机(北京白洋医疗器械有限公司),ME203E/02 型电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],BC-2800vet 型兽用全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),BK280 型全自动生化仪(山东博科生物产业有限公司),MX-F 型涡旋混合器(武汉赛维尔生物科技有限公司),DKZ-2 型电热恒温水槽(上海精宏实验设备有限公司)。

2 方法

2.1 Ishikawa 裸鼠皮下移植瘤制备 根据文献[14-15]的方法调整后造模。Ishikawa 细胞株使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,于 37 °C,5%CO₂ 恒温培养箱内培养。当细胞生长至 80% 时用 0.25% 的胰蛋白酶消化,收集细胞后 1 000 r·min⁻¹

离心 5 min(离心半径 16 cm),适量磷酸盐缓冲液重悬细胞,细胞计数后,与基质胶按照 1:1 的比例制备成肿瘤细胞悬液,于每只 BALB/c-nude 裸鼠右侧腋窝皮下注射肿瘤细胞悬液(约 8×10⁶ 个细胞/只) 0.2 mL,构建人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞荷瘤裸鼠模型,于 SPF 级动物房饲养,每天定时观察裸鼠接种部位情况,待长出实体肿瘤后,每 2 d 用游标卡尺测量移植瘤的长径(*a*)和短径(*b*),根据 $V=(a \times b^2)/2$ 计算肿瘤体积,同时用天平称取裸鼠体质量。

2.2 分组及样本的采集 当肿瘤体积达到 100 mm³ 左右时,将 24 只 BALB/c-nude 裸鼠随机分为模型组、黄芩汤组、卡铂组、联合组(黄芩汤+卡铂组),每组 6 只裸鼠,分组后保证各组动物之间,体质量及肿瘤体积差异无统计学意义。模型组给予等量生理盐水灌胃,每日 2 次,黄芩汤组根据“人和动物体表面积折算的系数”及预实验的结果和参考文献[16]等综合考虑,确定给药剂量为黄芩汤 3.5 g·kg⁻¹ 灌胃,每日 2 次(早 8 点、晚 8 点),每次 0.2 mL,每 4 d 为 1 个疗程;卡铂剂量为 50 mg·kg⁻¹ 腹腔注射^[17],每次 0.2 mL,每 4 d 注射 1 次,为 1 个疗程;联合组为卡铂腹腔注射 2 h 后给予黄芩汤 3.5 g·kg⁻¹ 灌胃,每次 0.2 mL,每日 2 次,至下一周期卡铂起始用药为 1 个疗程。于第 20 天晨起 8 时抽取裸鼠血液,裸鼠安乐死后剥离皮下移植瘤。

2.3 实验指标

2.3.1 抑瘤实验指标 取裸鼠皮下移植瘤,测量其质量及瘤体体积,计算肿瘤抑制率。肿瘤抑制率=(模型组平均瘤体质量-各用药组平均瘤体质量)/模型组平均瘤体质量×100%。

2.3.2 血常规及肾功能检测 取采集的裸鼠动脉血液用动物全血细胞计数仪检测各组裸鼠血液中白细胞、红细胞、血小板、血红蛋白的含量。用全自动生化仪检测各组裸鼠血液中肌酐、尿酸的含量。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 26.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据的统计分析。所有实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 *T* 检验,多组间数据比较运用单因素方差分析。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

3 网络药理学及分子对接探讨黄芩汤联合卡铂的作用机制

3.1 黄芩汤化学成分及其靶点的搜集 采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索黄芩汤方中的活性化学成分,以口服生物利用度(OB)≥30% 及药物相似性(DL)≥0.18 作为筛选条件,对化

合物进行筛选,获得黄芩汤的活性成分。并将黄芩汤的活性成分靶点用UniProt校正。

3.2 黄芩汤潜在靶点的预测 通过在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、治疗靶点数据库(TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp>)、遗传关联靶点数据库(GAD, <http://geneticassocationdb.nih.gov/>)中检索“肾损伤(kidney injury, renal injury)、肾毒性(nephrotoxicity)、骨髓抑制(myelosuppression)”,筛选已报道的,“gift”值大于均值的基因,剔除重复的基因,得到可能的靶标数据库。利用Image GP工具绘制维恩图整合黄芩汤改善肾毒性及血液系统毒性共同靶点。

3.3 核心靶点的富集 将药物-疾病共同的靶点基因导入STRING数据库,选用Multiple proteins工具,筛选物种为“Homo sapiens”,选择高置信度(high confidence, 0.9),获得蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,将其导入Cytoscape 3.8.2软件,通过Network Analyze分析网络拓扑参数,根据“Degree”将靶点进行筛选与排序。

3.4 基因本体(GO)功能富集和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将药物疾病共有靶点进行GO的生物过程(BP)、分子功能(MF)、细胞组分(CC)富集。使用R 4.0.3软件,引用stringi数据包,安装clusterProfiler、enrichplot、ggplot2软件包进行GO富集分析和KEGG通路分析。

3.5 分子对接

3.5.1 小分子结构准备与靶点蛋白结构的准备 从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载分子结构,将结构导入Schrodinger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。从蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载HSP90AA1(PDB ID: 3TUH)靶点蛋白晶体结构,将蛋白结构在Maestro 11.9平台进行处理,用Schrodinger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小化、以及几何结构的优化^[18]。

3.5.2 分子对接及对接结果筛选及分析 由Schrodinger Maestro软件Glide模块完成虚拟筛选处理和优化。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)。所有化合物均按LigPrep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,预测其活性位点,以在受体网格生成中活性位点位置。最后通过SP方法进行分子对接及筛选。通过分析化合物和靶点蛋白的作用模式,得到化合物与蛋白残基作用的情况,如产生的氢键作用、 π - π 相互作用、疏水相互作用等,再参考化合物的对接打分,推测拟筛的化合物是否具有与阳性化合物相似的活性作用。

4 结果

4.1 黄芩汤可减少卡铂对Ishikawa荷瘤裸鼠体质量的影响 模型组、黄芩汤组裸鼠活动度良好,皮肤光泽,进食正常。卡铂组裸鼠活动度较差,部分皮肤干燥脱屑,进食减少。联合组与卡铂组比较,裸鼠活动度及进食有所改善。给药开始后,每2日检测裸鼠体质量变化情况。模型组、黄芩汤组裸鼠体质量随实验进程未见明显变化,卡铂组裸鼠自第16天起体质量下降显著($P<0.01$);联合组裸鼠体质量较卡铂组明显增加($P<0.05$)。表明黄芩汤可改善卡铂所引起的裸鼠体质量的下降。见表1。

表1 黄芩汤联合卡铂对Ishikawa荷瘤裸鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Huangqintang combined with carboplatin on weight in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	体质量/g						
		0 d	4 d	8 d	12 d	16 d	18 d	20 d
模型组		18.59 \pm 0.52	18.40 \pm 0.85	17.94 \pm 1.17	18.25 \pm 1.01	18.08 \pm 0.95	18.49 \pm 1.06	18.35 \pm 0.89
黄芩汤组	3.5	19.10 \pm 1.33	18.27 \pm 1.25	18.02 \pm 0.86	18.30 \pm 0.86	18.24 \pm 0.99	18.37 \pm 0.95	18.05 \pm 0.77
卡铂组	0.05	19.33 \pm 0.50	17.60 \pm 0.44	17.50 \pm 1.02	17.17 \pm 0.88	16.72 \pm 0.78 ^{2,3)}	16.76 \pm 0.55 ^{2,3)}	16.24 \pm 0.56 ^{2,3)}
联合组	3.5+0.05	19.43 \pm 1.12	17.75 \pm 0.80	18.18 \pm 1.03	17.57 \pm 0.84	17.25 \pm 0.69	17.40 \pm 0.89	17.19 \pm 0.72 ^{1,4)}

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与黄芩汤比较³⁾ $P<0.05$;与卡铂组比较⁴⁾ $P<0.01$ (表3-4同)

4.2 黄芩汤联合卡铂对Ishikawa荷瘤裸鼠瘤体的影响 治疗5个疗程后,与模型组比较,单用黄芩汤对肿瘤质量影响不明显,卡铂组可明显降低荷瘤裸

鼠肿瘤质量及肿瘤体积($P<0.05$),联合组降低荷瘤裸鼠肿瘤质量及肿瘤体积更显著($P<0.01$),但与卡铂组比较,联合组抑制荷瘤裸鼠肿瘤质量及体积无

明显差异。黄芩汤联合卡铂对 Ishikawa 荷瘤裸鼠瘤体各指标的影响见表 2。

表 2 黄芩汤联合卡铂对 Ishikawa 荷瘤裸鼠肿瘤体积、肿瘤质量及抑瘤率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of Huangqintang combined with carboplatin on tumor weight, tumor volume and tumor inhibitory rate in mice ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤体质量/g	瘤体体积/mm ³	抑瘤率/%
模型组		1.62±0.53	977.0±477.10	
黄芩汤组	3.5	1.48±0.40	846.7±288.30	8.87
卡铂组	0.05	0.81±0.28 ^{1,3)}	499.6±202.60 ^{1,3)}	50.33
联合组	3.5+0.05	0.57±0.27 ^{2,3)}	383.3±182.80 ^{2,3)}	64.66

注:与模型组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01;与黄芩汤比较³⁾P<0.05

4.3 黄芩汤联合卡铂对 Ishikawa 荷瘤裸鼠血常规的影响 与模型组比较,黄芩汤组血常规未见明显变化,卡铂组白细胞、红细胞、血红蛋白降低,差异均具有明显统计学意义(P<0.05),血小板有降低趋

势,但差异无统计学意义;而与卡铂组比较,联合组白细胞、血红蛋白明显上升(P<0.05)。表明黄芩汤与卡铂联合用药后可改善卡铂引起的血液系统毒性。见表 3。

表 3 黄芩汤联合卡铂对 Ishikawa 荷瘤裸鼠血常规主要指标的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Huangqintang combined with carboplatin on routine blood of main indicators in mice ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	白细胞/(×10 ⁹)个/L	红细胞/(×10 ¹²)个/L	血红蛋白/g·L ⁻¹	血小板/(×10 ⁹)个/L
模型组		3.43±1.60	9.08±1.00	131.33±10.97	459.67±50.36
黄芩汤组	3.5	2.00±0.40	7.75±3.39	120.00±46.03	416.00±187.10
卡铂组	0.05	0.47±0.31 ^{1,3)}	4.02±1.36 ¹⁾	53.00±22.87 ²⁾	254.33±124.80
联合组	3.5+0.05	2.83±0.95 ⁴⁾	7.40±1.14	119.33±14.01 ⁴⁾	938.33±523.10

4.4 黄芩汤联合卡铂对 Ishikawa 荷瘤裸鼠肾功能及肾脏系数的影响 与模型组比较,各组间肾脏系数差异无统计学意义。但肾功能上组间有所差异。与模型组比较,黄芩汤组肌酐明显下降(P<0.05),卡

铂组肌酐差异无统计学意义,但尿酸较模型组明显升高(P<0.05),而联合组肌酐及尿酸均较卡铂组降低(P<0.05)。表明黄芩汤可改善卡铂所致的肾损伤。见表 4。

表 4 黄芩汤联合卡铂对 Ishikawa 荷瘤裸鼠血肌酐、尿酸及肾脏系数的影响 ($\bar{x}\pm s, n=4$)

Table 4 Effect of Huangqintang combined with carboplatin on serum creatinine, uric acid and coefficient of kidney in mice ($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肌酐/mol·L ⁻¹	尿酸/mol·L ⁻¹	肾脏系数
模型组		14.02±1.23	93.00±16.31	10.24±1.63
黄芩汤组	3.5	7.63±3.00 ¹⁾	108.80±29.36	8.23±1.54
卡铂组	0.05	15.70±0.95 ³⁾	431.50±220.80 ^{2,3)}	8.95±0.81
联合组	3.5+0.05	4.17±2.91 ^{2,4)}	83.25±30.58 ⁴⁾	9.42±0.57

5 网络药理学及分子对接技术分析黄芩汤缓解化疗副作用的机制

5.1 活性成分-基因靶点的获取 通过检索 TCMSMP 数据库,根据 OB≥30% 及 DL≥0.18 进行筛选,共得到黄芩汤中 140 种活性成分,经 UniProt 矫正后获得 2 141 个靶点。通过多个数据库检索肾毒性及血液毒性(骨髓抑制)的靶基因,筛选大于均值的靶基因,经汇总去重后,共得到 7 987 个可能的靶点,通过将黄芩汤活性成分靶点与肾毒性及血液毒性靶基因取交集后,获得可能的活性成分 114 个,基因靶点 200 个。

5.2 核心活性成分及核心基因靶点的富集 通过 string 数据库和 Cytoscape 3.8.2 软件,构建黄芩汤改善肾毒性及血液毒性的“活性成分-基因靶点”网络。并将黄芩汤内可能的改善副作用的活性成分按照度值大小进行排名,得到其前五的成分,见表 5。结合文献[19]液相色谱质谱分析得出的黄芩汤中的成分,猜想黄芩汤减轻卡铂化疗副作用的成分可能与汉黄芩素、黄芩素等相关。将富集的活性靶点根据度值进行排序,去除孤立靶点后,构建 PPI 网络,得到黄芩汤可能作用的核心基因靶点,其中位于前 10 的基因主要是热休克蛋白 90AA1(HSP90AA1)、

转录因子 c-Jun (JUN)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、蛋白激酶 B (Akt)、核转录因子 κ B p65 (RELA)、原癌基因 c-Fos (FOS)、雌激素受体 (ESR1)、 β -连环蛋白 (CTNNB1)、核受体视黄酸 X 受体 α (RXRA)、原癌基因 c-Myc (MYC)。

表5 黄芩汤中前5个有效化合物基本信息

Table 5 Basic information of top5 effective compounds contained in Huangqintang

化合物ID	英文名称	中文名称	分子式	OB	DL	来源药物
MOL000098	quercetin	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	46.43	0.28	大枣
MOL000422	kaempferol	山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	41.88	0.24	白芍
MOL000173	wogonin	汉黄芩素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	30.68	0.23	黄芩
MOL0002714	baicalein	黄芩素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	33.52	0.21	黄芩
MOL002565	medicarpin	美迪紫檀素	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	49.22	0.34	甘草

5.3 GO富集分析和KEGG靶点通路注释分析 通过将校正 P 值 < 0.05 的项目进行筛选, 总共富集得到 2 080 条 BP, 183 项 MF, 95 项 CC。将每一部分最显著的前 10 条功能进行柱状图展示。见增强出版附加内容。GO 富集分析结果显示, 在生物过程中位于前三的是“response to drug”“response to oxidative”“cellular response to chemical stress”, 提示黄芩汤可能通过改善卡铂对血液及肾脏的应激作用, 从而发挥缓解不良反应的功效。通过 KEGG 通路注释分析得到黄芩汤改善血液毒性及肾损伤可能的靶点通路, 根据 $P < 0.05$ 为筛选条件并结合文献研究, 删除不相关的通路, 选取前 20 条富集的通路, 见增强出版附加材料。其主要通路为肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路, 白细胞介素 (IL)-17 信号通路, MAPK 信号通路, Toll 样受体 (TLRs) 信号通路等具有相关性。

5.4 分子对接结果 将筛选得到的汉黄芩素、黄芩素与位于前列的 HSP90AA1 靶点蛋白进行分子对接。进一步探讨黄芩汤中最有可能改善卡铂副作用的成分及机制。分子对接结果显示, 黄芩素、汉黄芩素的结合能分别为 -7.47 、 -7.16 , 结合位点均为氢键、疏水作用、 π -堆积。化合物与靶点蛋白存在很好的结合作用, 结合能均 $< -6 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ kcal} \approx 4.186 \text{ kJ}$)。

将对接后的复合物利用 PyMOL 2.1 软件进行可视化, 见增强出版附加内容。由化合物结构式可知, 汉黄芩素与黄芩素相似性极高, 两者均具有氢键供体以及有多个疏水环, 因此既能够与蛋白活性口袋形成氢键相互作用, 也可以与活性位点的疏水

性氨基酸形成疏水相互作用, 从而形成稳定的蛋白复合物。汉黄芩素与 HSP90AA1 有相互作用的氨基酸残基有赖氨酸-58 (LYS-58)、天冬酰胺-106 (ASN-106)、蛋氨酸-98 (MET-98)、天冬氨酸-93 (ASP-93) 等。黄芩素与 HSP90AA1 有相互作用的氨基酸残基有 LYS-58、甘氨酸-97 (GLY-97)、缬氨酸-186 (VAL-186)、MET-98 等, 以汉黄芩素为例, 其与 LYS-58、ASP-93 残基形成氢键相互作用, 氢键距离分别为 2.7 \AA 、 2.1 \AA , 氢键距离短、结合能力强, 对稳定小分子配体有着重要作用; 其疏水环与 ASN-106、MET-98 残基形成很强的疏水相互作用, 对稳定小分子存在一定的贡献。这些存在的氢键及疏水相互作用可以有效促使黄芩素与 HSP90AA1 蛋白形成稳定的复合物, 所以该化合物是一个潜在的有活性的小分子。

6 讨论

关于黄芩汤联合卡铂在子宫内膜癌治疗中的应用, 尚未见报道。因此本研究通过构建裸鼠皮下移植瘤模型, 观察黄芩汤联合卡铂对肿瘤体本身的作用及对化疗副作用的影响。实验结果表明, 黄芩汤联合卡铂的抑瘤率较卡铂组高, 但无统计学差异, 然而黄芩汤联合卡铂后对裸鼠体质量、血液系统及肾功能具有保护作用, 这表明黄芩汤具有改善卡铂不良反应的功效。

通过网络药理学分析, 将黄芩汤可能改善卡铂副作用的有效成分按照度值大小进行排序后发现, 其中位于前 5 的主要是槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、黄芩素、美迪紫檀素, 这 5 种成分中有 2 种是黄芩汤液相色谱中测出的主要成分, 即汉黄芩素、黄芩素。两者均来源于黄芩, 是黄芩中主要的黄酮类物质, 占黄芩干料比例分别达 10.11% 、 1.3% ^[21], 现代研究表明两者具有抗炎、抗氧化、肾脏保护, 增强免疫活性, 抗肿瘤等作用^[22-24]。同时对黄芩汤中可能改善卡铂副作用的基因进行富集后发现位于前三的是 HSP90AA、JUN、MAPK。HSP90AA, 热休克蛋白家族的一员, 是具有维持细胞稳态的关键分子伴侣蛋白, 做为非应激细胞中最丰富的细胞质蛋白之一, 其可在应激不利的条件下 (如热、缺氧、酸中毒等), 提高细胞对外界应激的抵抗力, 从而具有肾脏保护作用^[25-26]。笔者将汉黄芩素与黄芩素与 HSP90AA 分别进行分子对接发现, 两者可与 HSP90AA 形成稳定的蛋白复合物, 猜测黄芩汤联合卡铂后其肾功能较单用卡铂改善可能与其成分汉黄芩素、黄芩素调控肾脏组织 HSP90AA, 提高肾脏对卡铂造成的损

伤作用的抵抗,从而保护肾脏有关。

除此之外, JUN 隶属于原癌基因家族, 可参与细胞的增殖、炎症、迁移和侵袭等过程^[27]。MAPK 是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞增殖、生长发育及肿瘤发生和肿瘤耐药中具有重要作用^[28]。有研究表明对卡铂处理后的人骨髓细胞进行 RNA 高通量测序(RNA-seq)后发现 JUN 是其中位于前列的具有差异表达的基因^[29]。而对人造血干细胞进行单细胞 RNA 测序后发现 MAPK 的表达发生改变^[30]。这表明卡铂所致的骨髓抑制可能与调控 JUN、MAPK 相关, 其可能通过 JUN、MAPK 途径抑制造血干细胞和祖细胞的增殖而发生骨髓抑制, 从而导致外周血细胞的减少。网络药理学分析显示, 黄芩汤中有效成分可作用于 JUN、MAPK 基因, 这提示黄芩汤改善卡铂所致的骨髓抑制可能与此相关。

KEGG 通路分析显示, 黄芩汤改善卡铂不良反应的机制可能与 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、MAPK 信号通路、Toll 样受体信号通路相关。TNF 信号通路的激活可引起炎症的级联反应, 诱导炎症介质的产生, 并且 TNF 基因的多态性与急性肾损伤的发生具有相关性^[31]。IL-17 是一种主要由 T 辅助细胞 17 分泌的促炎细胞因子, 可与 IL-17 受体结合诱导其他炎性细胞因子[如白细胞介素-6、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)]、趋化因子、基质金属蛋白酶等的转录, 从而增加粒细胞的功能和数量^[32]。MAPK 作为胞内胞外信号传递者, 主要由细胞外信号调节激酶(ERK)、p38、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)组成, 在维持细胞增殖、生长过程起到了关键作用^[33]。Toll 样受体是哺乳动物体内一种模式识别受体, 可由信号感受器识别病原体相关分子模式(PAMPs)和内源性损伤相关分子模式(DAMPs)启动, 其中 DAMPs 包括众所周知的热休克蛋白(HSP), 在免疫反应及复杂的细胞过程中发挥作用。

因此, 本研究大胆的推测核心基因 HSP90AA、JUN、MAPK 与这些信号通路等形成了复杂的网络调控体系, 在黄芩汤减轻卡铂诱导的血液系统毒性及肾毒性的过程中发挥了重要作用。并且分子对接表明, 汉黄芩素与黄芩素可与 HSP90AA1 蛋白形成稳定的复合物, 是一个潜在的有活性的小分子, 具有新药开发的前景。

综上, 黄芩汤无明显抑制子宫内膜癌增殖的作用, 联合卡铂后其抑制子宫内膜癌的作用并未明显

增强, 但是其可以减轻卡铂的副作用, 例如肾毒性及血液系统毒性。综上所述, 在子宫内膜癌以卡铂为基础的化疗方案中引入黄芩汤口服是具有一定的临床意义的, 但仍需进行严谨的临床试验和分子生物学实验以探讨其具体可行性和分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2021[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(1):7-33.
- [2] WANG Z, GUO E, YANG B, et al. Trends and age-period-cohort effects on mortality of the three major gynecologic cancers in China from 1990 to 2019: Cervical, ovarian and uterine cancer [J]. Gynecol Oncol, 2021, 163(2):358-363.
- [3] XU Y, BURMEISTER C, HANNA R K, et al. Predictors of survival after recurrence in women with early-stage endometrial carcinoma [J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(6):1137-1142.
- [4] 谢玲玲, 林荣春, 林仲秋. 《2021 NCCN 子宫肿瘤临床实践指南(第1版)》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(1):75-81.
- [5] 程傲霜, 李晶, 林仲秋. 《2020 ESGO-ESTRO-ESP 子宫内膜癌患者管理指南》解读[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2021, 37(3):336-341.
- [6] BROOKS R A, FLEMING G F, LASTRA R R, et al. Current recommendations and recent progress in endometrial cancer [J]. CA Cancer J Clin, 2019, 69(4):258-279.
- [7] 金碧霞, 孔为民. 《国际妇产科联盟(FIGO)2018 癌症报告: 子宫内膜癌诊治指南》解读[J]. 中国临床医生杂志, 2019, 47(10):1155-1158.
- [8] 李闪闪, 魏丹丹, 蒋士卿. 基于藏象理论探讨化疗药的毒性[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5):198-205.
- [9] 田明敏. 《伤寒论》黄芩汤方证研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [10] 徐静波, 瞿溢谦, 叶海勇. 黄芩汤橐龠探析[J]. 新中医, 2020, 52(3):19-21.
- [11] LAM W, JIANG Z, GUAN F, et al. PHY906 (KD018), an adjuvant based on a 1800-year-old Chinese medicine, enhanced the anti-tumor activity of Sorafenib by changing the tumor microenvironment [J]. Sci Rep, 2015, 30(5):9384.
- [12] LIU S H, CHENG Y C. Old formula, new Rx: the journey of PHY906 as cancer adjuvant therapy [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 140(3):614-623.

- [13] XU D, HOU X, WANG O, et al. A four-component combination derived from Huang-Qin decoction significantly enhances anticancer activity of irinotecan [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(5):364-375.
- [14] DING L, DING Y, KONG X Y, et al. Dysregulation of Krüppel-like factor 12 in the development of endometrial cancer [J]. *Gynecol Oncol*, 2019, 152: 177-184.
- [15] WANG Y, GAO C, ZHANG Y, et al. Visfatin stimulates endometrial cancer cell proliferation via activation of PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signalling pathways[J]. *Gynecol Oncol*, 2016, 143(1):168-178.
- [16] 崔兴, 孙小琪, 郑伟, 等. 黄芩汤调控自噬干预小鼠肠道急性移植抗宿主病的机制[J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26(7):1057-1062.
- [17] SCHRAUWEN S, COENEGRACHTS L, CATTANEO A, et al. The antitumor effect of metformin with and without carboplatin on primary endometrioid endometrial carcinoma *in vivo* [J]. *Gynecol Oncol*, 2015, 138(2):378-382.
- [18] FAZI R, TINTORI C, BRAIA A, et al. Homology model-based virtual screening for the identification of human helicase DDX3 inhibitors[J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55(11):2443-2454.
- [19] YE M, LIU S, JIANG Z, et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of PHY906, a Chinese medicine formulation for cancer therapy [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(22):3593-3607.
- [20] FRIESNER R A, BANKS J L, MURPHY R B, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy[J]. *J Med Chem*, 2004, 47(7):1739-1749.
- [21] LI-WEBER M. New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of Scutellaria and its main active constituents wogonin, baicalein and baicalin[J]. *Cancer Treat Rev*, 2009, 35(1):57-68.
- [22] 朱亚南, 杨七妹, 张硕, 等. 黄芩苷与黄芩素药理作用及机制研究进展[J]. *时珍国医国药*, 2020, 31(4):921-925.
- [23] 肖炜明, 卜平, 龚卫娟. 汉黄芩素抗肿瘤和免疫调节作用的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(16):3004-3009.
- [24] 李彦萍, 龚焱婷, 王嘉馨, 等. 基于网络药理学的汉黄芩素抑制人结直肠癌细胞SW480增殖机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(8):1772-1778.
- [25] O'NEILL S, ROSS J A, WIGMORE S J, et al. The role of heat shock protein 90 in modulating ischemia-reperfusion injury in the kidney [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2012, 21(10):1535-1548.
- [26] 李润玖, 李锐, 张彧. 热休克蛋白生物学功能及其在肾损伤中作用的研究进展[J]. *中国急救复苏与灾害医学杂志*, 2008, 3(2):121-125.
- [27] 伍培, 赵建美. AP-1的研究进展[J]. *南通大学学报:医学版*, 2018, 38(1):41-45.
- [28] BRAICU C, BUSE M, BUSUIOC C, et al. A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(10):1618.
- [29] BJÖRN N, BADAM T V S, SPALINSKAS R, et al. Whole-genome sequencing and gene network modules predict gemcitabine/carboplatin-induced myelosuppression in non-small cell lung cancer patients [J]. *NPJ Syst Biol Appl*, 2020, 6(1):25.
- [30] BJÖRN N, JAKOBSEN I, LOTFI K, et al. Single-cell RNA sequencing of hematopoietic stem and progenitor cells treated with gemcitabine and carboplatin [J]. *Genes*, 2020, 11(5):549.
- [31] CHEN G, LIU B, LI H, et al. Ethnicity-stratified analysis of the association between TNF- α genetic polymorphisms and acute kidney injury: A systematic review and Meta-analysis[J]. *Biomed Res Int*, 2020, doi:10.1155/2020/5262351.
- [32] VELDHONEN M. Interleukin 17 is a chief orchestrator of immunity[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(6):612-621.
- [33] YOU Z, LIU S P, DU J, et al. Advancements in MAPK signaling pathways and MAPK-targeted therapies for ameloblastoma: A review[J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48(3):201-205.

[责任编辑 顾雪竹]