

## 基于网络药理学及体外实验探讨青黄散 抗急性髓系白血病的分子机制

伍振辉, 张欢, 吴欣平, 周露, 曾英坚\*  
(江西中医药大学附属医院, 南昌 330006)

**[摘要]** 目的: 基于网络药理学与分子对接技术预测青黄散治疗急性髓系白血病(AML)的潜在活性靶点与信号通路, 通过体外细胞实验进一步验证其作用机制。方法: 基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、中医药综合数据库(TCMID)、TargetNet、SwissTargetPrediction数据库获取青黄散活性成分和作用靶点; 通过DrugBank、DisGeNET、GeneCards、在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)获取AML疾病相关靶点。筛选出青黄散与AML的共同靶点后, 使用STRING数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用网络分析, 并通过RStudio软件使用R语言及clusterProfiler、Bioconductor等进行基因本体论(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。同时应用Cytoscape软件进行“疾病-药物成分-靶点”与“化合物-靶点-通路”网络的构建。选取青黄散活性成分与“化合物-靶点-通路”网络排名前8个靶点进行分子对接。利用体外细胞实验及蛋白免疫印迹法(Western blot)进一步验证青黄散抗AML作用。结果: 预测结果显示青黄散主要活性成分11个, 收集青黄散与AML的共同靶点22个; KEGG通路分析结果显示磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路可能在青黄散治疗AML疾病中起到关键作用。“化合物-靶点-通路”网络分析显示排名前8的靶点包括Akt1、磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基 $\alpha$ (PIK3CA)、双特异性丝裂原活化蛋白激酶1(MAP2K1)、凋亡相关基因(TP53)、原癌基因丝苏氨酸蛋白激酶1(RAF1)、B细胞淋巴瘤-2基因(Bcl-2)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)和原癌基因(JUN)。分子对接结果表明3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷与MAP2K1、异牡荆素与PIK3CA、靛玉红与Bcl-2对接最优。细胞实验表明3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素和靛玉红可有效抑制AML细胞增殖, 并调控MAPK/PI3K信号通路, 抑制Bcl-2蛋白的表达。结论: 青黄散可通过多成分-多靶点-多途径方式协同作用治疗AML, 其作用机制可能与调控MAPK信号通路及PI3K/Akt信号通路有关。

**[关键词]** 青黄散; 急性髓系白血病; 网络药理学; 分子对接; 细胞实验

**[中图分类号]** R285; R289; R22; R2-031; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)07-0179-11

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220414 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220208.1001.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-02-08 10:52

### Molecular Mechanism of Qinghuangsan Against Acute Myeloid Leukemia Based on Network Pharmacology and *In Vitro* Experiments

WU Zhen-hui, ZHANG Huan, WU Xin-ping, ZHOU Lu, ZENG Ying-jian\*

(The Affiliated Hospital of Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To predict the therapeutic target genes and related signaling pathways of Qinghuangsan (QHP) in the treatment of acute myeloid leukemia (AML) by network pharmacology, molecular docking, and further clarify its mechanisms through *in vitro* cell experiment. **Method:** The active components and targets of QHP were retrieved from traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP), traditional Chinese medicine integrated database (TCMID), TargetNet and

**[收稿日期]** 2021-11-08

**[基金项目]** 江西省自然科学基金面上项目(20192BAB205100); 江西省中医药管理局临床研究基地建设项目(赣中医药科教字[2021]3号); 江西省卫生健康委科技计划项目(202210758); 江西省中医药管理局科技计划项目(2020A0184, 2021B651)

**[第一作者]** 伍振辉, 硕士, 从事中药药性与配伍机制研究, E-mail: wzh77580@163.com

**[通信作者]** \* 曾英坚, 博士, 主任中医师, 从事中医内科学血液病研究, Tel: 0791-86362653, E-mail: 13431762390@163.com

SwissTargetPrediction databases, and AML-related target genes were obtained by GeneCards and online mendelian inheritance in man (OMIM) databases. After screening the common targets of QHP and AML, the protein-protein interaction (PPI) network of the common targets was constructed with STRING, followed by gene ontology (GO) term and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis based on RStudio software and clusterProfiler, Bioconductor packages. At the same time, Cytoscape software is used to construct the network of "disease-component-target" and "compound-target-pathway". Select the active ingredients of QHP for molecular docking with the top 8 targets in the "compound-target-pathway" network. *In vitro* cell experiment and Western blot were used to further verify the anti-AML effect of QHP. **Result:** The prediction results show that there are 11 main active components of QHP, and 22 common targets of QHP and AML are collected. KEGG pathway analysis results show that phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways may play a key role in the treatment of AML disease by QHP. "Compound-target-pathway" network analysis showed that the top 8 targets include Akt1, phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA), mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1), TP53, serine/threonine kinase (RAF1), B cell lymphoma (Bcl)-2, cysteine aspartic acid specific protease (Caspase)-9 and JUN. Molecular docking results showed that 3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside was optimally docked with MAP2K1, isovitexin docked with PIK3CA, and indirubin docked with Bcl-2. Cell experiments show that 3-indolyl- $\beta$ -D-glucopyranoside, isovitexin and indirubin can effectively inhibit the proliferation of AML cells, regulate the MAPK/PI3K signaling pathway, and inhibit the expression of Bcl-2 protein. **Conclusion:** QHP can treat AML through "multi-component, multi-target, multi-pathway" synergistic treatment, and its mechanism of pharmacology may be related to the regulation of MAPK signaling pathway and PI3K/Akt signaling pathway.

**[Keywords]** Qinghuangsan; acute myeloid leukemia; network pharmacology; molecular docking; cell experiment

急性髓系白血病(AML)是一种异质性恶性血液肿瘤,其特征在于髓系祖细胞快速大量增殖并逐渐取代骨髓正常造血细胞,且预后不良<sup>[1]</sup>。根据美国国立卫生研究院监测、流行病学和结果(SEER)数据库调查显示,2019年美国新增加AML病例达到21 450个,死亡病例达到10 920个<sup>[2]</sup>。AML多发于老年人群,70岁以上的AML患者,其5年总生存率不到5%<sup>[3]</sup>。AML疾病发展迅速,发病原因较为复杂,其高度异质性导致AML化疗后易复发。因此,研究疗效好、价格低廉的新型AML治疗药物已成为目前AML疾病药物研发的热点。传统中药具有多成分、多靶点、多途径特点,且价格低廉、副作用低,中医药现代化研究已成为目前AML疾病药物研发的新方向。

青黄散载于《景岳全书》《奇效良方》《世医得效方》等古籍,由青黛和雄黄组成。青黛咸,寒。归肝经,具有清热解毒,凉血消斑,泻火定惊之功效,用于温毒发斑,血热吐衄,胸痛咳血,口疮,疔瘰,喉痹,小儿惊痫<sup>[4]</sup>。雄黄辛,温;有毒。归肝、大肠经,具有解毒杀虫,燥湿祛痰,截疟之功效。用于痈肿

疔疮,蛇虫咬伤,虫积腹痛,惊痫,疟疾<sup>[4]</sup>。青黛与雄黄,寒热既济,通过配伍使用发挥解毒化痰之功效,是中医药治疗AML的常用方剂<sup>[5]</sup>,基础实验也证实青黄散组分对AML细胞具有一定的增殖抑制作用<sup>[6]</sup>,然而其作用机制尚未完全阐明。

本研究拟通过网络药理学与实验验证从多靶点、多途径探讨青黄散活性成分、AML疾病、基因、靶点、通路的相互作用,揭示青黄散治疗AML的潜在作用机制,以期为青黄散治疗AML的临床应用提供理论依据,见图1。

## 1 材料

药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmispw.com/index.php>);中医药综合数据库(TCMID, <http://www.megabionet.org/tcmid/>);SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>);TargetNet数据库(<http://targetnet.scbdd.com/calcnnet/index/>);DrugBank数据库(<https://go.drugbank.com/>);DisGeNET数据库(<https://www.disgenet.org/>);GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>);在线人类孟德尔遗传

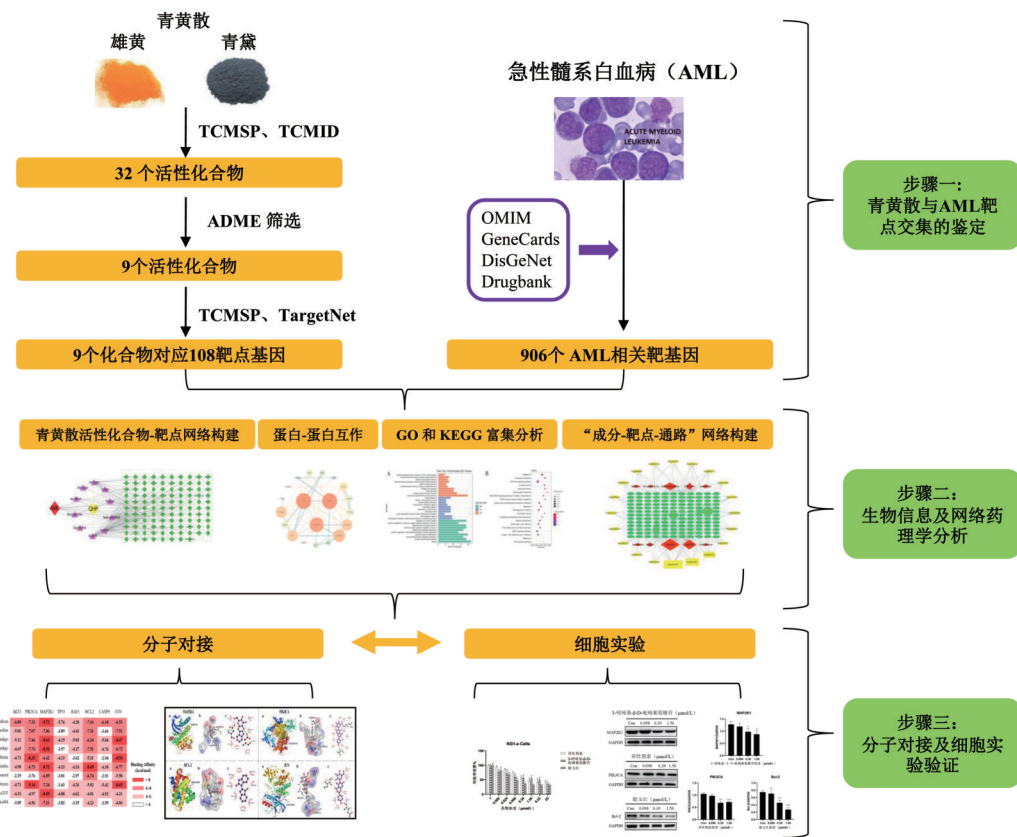


图1 研究工作流程

Fig. 1 Work flow chart of this research

数据库(OMIM, <https://omim.org/>); RCSB 蛋白数据库 (<https://www.rcsb.org/>); STRING 数据库 (<https://string-db.org/>); UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Venny 在线绘图网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>); Cytoscape 软件 (<https://cytoscape.org/>); RStudio 软件 (<https://www.rstudio.com/>); AutoDockTools 软件 (<http://autodock.scripps.edu/>); PyMOL 软件 (<https://pymol.org/2/>)。

## 2 方法

**2.1 青黄散活性成分筛选及靶点鉴定** 利用 TCMSP 数据库检索青黄散中青黛与雄黄 2 味中药的有效成分<sup>[7]</sup>,并以口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18 为检索标准<sup>[8]</sup>,得到青黄散中青黛的有效活性成分。因 TCMSP 数据库未检索到雄黄中药,故利用 TCMID 数据库检索雄黄中药的活性成分<sup>[9]</sup>。此外,利用 SwissTargetPrediction 数据库<sup>[10]</sup>及 TargetNet 数据库<sup>[11]</sup>检索青黄散中有效成分相对应的潜在活性靶点,并进行后续研究。

**2.2 AML 作用靶点与交集靶点的鉴定** 以“acute

myeloid leukemia”为关键词从 DrugBank<sup>[12]</sup>、DisGeNET<sup>[13]</sup>、GeneCards<sup>[14]</sup>及 OMIM<sup>[15]</sup>数据库检索并收集 AML 相关的疾病靶点,并利用 UniProt 数据库进行靶点蛋白与基因名称的转换<sup>[16]</sup>。合并 AML 所有作用靶点并去除重复靶点后,与青黄散有效成分的靶点取交集,通过 Venny 在线绘图工具进行展示。同时,利用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“疾病-药物成分-靶点”网络图。

## 2.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络的构建

STRING 数据库是一个已知和预测 PPI 的数据库<sup>[17]</sup>。将 2.2 项下获取的青黄散与 AML 交集靶点蛋白导入 STRING 数据库,选择生物种类为“Homo sapiens”。PPI 数据网络图中,每个节点代表一个蛋白质,节点之间的连接表示 2 个蛋白质之间的相互作用。生成的 PPI 网络图选择 TSV 格式下载,并将 TSV 文件导入 Cytoscape 软件中以构建 PPI 网络图<sup>[18]</sup>。

**2.4 生物信息学注释基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析** 为进一步研究青黄散治疗 AML 的分子作用机制,通过 RStudio 软件(Windows 3.6.0)使用 R 语言 clusterProfiler、org.

Hs.eg.db、ggplot2及Hmisc等<sup>[19-20]</sup>进行GO和KEGG通路富集分析。GO富集分析包括生物过程、细胞成分和分子功能。KEGG通路富集分析用于阐明青黄散治疗AML的潜在作用机制。本研究根据 $P$ 值大小,选择排名前10位的GO条目及排名前20的KEGG通路,利用RStudio软件绘制条形图和气泡图。

**2.5 “药物-靶点-通路”网络图的构建** 利用GO和KEGG数据信息,通过Cytoscape 3.7.1软件绘制青黄散治疗AML的“药物成分-靶点-通路”网络图<sup>[21]</sup>。

**2.6 分子对接** 为了进一步验证青黄散对AML的作用,应用分子对接技术筛选活性化合物和候选蛋白。分子对接技术是筛选药物的重要方法,从已知的候选蛋白质和小分子化合物入手,通过模拟几何形状和能量匹配来识别<sup>[22]</sup>。本研究使用RCSB蛋白质数据库检索相关蛋白质信息,下载目标蛋白质的3D结构文件作为受体。利用PyMOL 1.8软件和AutoDockTools 1.5.6软件对进行修改,包括分离原始配体、去除水分子、添加氢和修补氨基酸。将活性成分的Mol2结构设置为可旋转并通过Autodock Tools软件保存为“pdbqt”格式文件。最后,使用Autodock-vina 1.1.2软件进行分子对接。对接结果用PyMOL软件可视化,建立对接交互模式。

### 3 实验验证

**3.1 药物** 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷(上海源叶生物科技有限公司,货号S11170,纯度98%),异牡荆素、靛玉红(上海爱必信生物科技有限公司,货号分别为ABS47023192、ABS47000445,纯度均 $\geq$ 98%),青霉素-链霉素(上海碧云天生物技术有限公司,批号C0222,加入比例1%)。

**3.2 试剂** Roswell Park Memorial Institute(RPMI)1640培养基(Sigma-Aldrich公司,货号RHBH8770);胎牛血清(Gibco公司,货号42F7180K);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(江苏凯基生物科技有限公司,货号KGA317);BCA蛋白定量试剂盒、RIPA蛋白裂解液、苯甲基磺酰氟(PMSF)、BeyoECL试剂盒、SDS-PAGE上样缓冲液5 $\times$ (上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为062521210726、P0013B、020421210524、P0018AS、070121210811);牛血清白蛋白(BSA)(广州赛国生物科技有限公司,货号EZ4567D106);PVDF膜(美国Millipore公司);磷脂酰肌醇3-激酶催化亚基 $\alpha$ (PIK3CA)、双特异性丝裂原活化蛋白激酶1(MAP2K1)、B细胞淋巴瘤-2

(Bcl-2)(Bioworld Technology公司,货号分别为BS6052、AP0170、BS1511)。

**3.3 仪器** Multiskan FC型酶标仪、HERACELL 150i CO<sub>2</sub> incubator型CO<sub>2</sub>培养箱(美国Thermo公司);Allegra 21rcentrifuge型高速低温离心机(美国Beckman公司);Model DMi8 manual型倒置生物显微镜(德国Leica公司);PowerPac Basic型蛋白电泳与转移仪(美国Bio-Rad公司);Tanon-4100型天能凝胶成像系统(上海Tanon公司)。

**3.4 细胞培养** 人急性髓性白血病细胞KG1-a由南方医科大学郭坤元教授课题组惠赠。KG1-a细胞加入10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基(含1%青霉素-链霉素)置于5%CO<sub>2</sub>,37℃恒温培养箱培养。

**3.5 细胞增殖抑制实验** 分别取对数生长期的KG1-a细胞,离心5 min(转速800 r·min<sup>-1</sup>,离心半径300 mm),并制备成密度为5 $\times$ 10<sup>4</sup>个/mL的细胞悬液接种于96孔培养板,100  $\mu$ L/孔,培养24 h后待细胞密度接近80%,开始药物处理。实验分为溶剂组(细胞+完全培养基)、空白组(仅加入完全培养基)、不同浓度的3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红(0、0.006、0.024、0.098、0.39、1.56、6.25、25  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)组,每组设6个复孔。培养箱培养48 h。取出96孔板,各孔依次加入20  $\mu$ L的CCK-8溶液继续孵育1.5 h,结束后将96孔板振荡混匀10 min,450 nm波长处测定其吸光度 $A$ 。平行测定3次,计算细胞增殖抑制率。

**3.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)实验** KG1-a细胞接种于6孔板中,分别经不同浓度的3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红(0、0.098、0.39、1.56  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>)细胞48 h后,离心收集细胞,轻弹离心管底使细胞分散,加入RIPA裂解液,冰上裂解10 min。离心5 min(14 000  $\times$ g,半径300 mm)。吸取上清,通过BCA法测定细胞内蛋白含量。再向其余蛋白样品中加入其1/4体积的上样缓冲液,沸水浴10 min,离心5 min(转速12 000 r·min<sup>-1</sup>,离心半径300 mm),所得样品为制备好的蛋白样品。取蛋白样品10  $\mu$ g,经SDS-PAGE凝胶电泳、转膜、5%脱脂牛奶封闭。封闭结束后,加一抗溶液(PIK3CA稀释比例1:1 000,MAP2K1稀释比例1:500,Bcl-2稀释比例1:1 000),4℃冰箱孵育过夜。次日再分别加入二抗,室温避光孵育2 h, TBST清洗3次后,于红外荧光扫描成像系统进行拍照。由Image J软件(1.53a)分析各蛋白条带灰度

值。实验重复3次。

**3.7 统计学分析** 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行统计学分析,所有数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示。数据符合正态分布时,多组间样本均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),事后多重比较,两组间样本比较采用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验;若数据不呈正态分布且方差不齐,多组样本间比较采用非参数检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

表1 青黄散所含的潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients in Qinghuangsan (QHP)

| 分子ID      | 英文名称  | 中文名称                               | PubChem CID | OB/%  | DL   | 药材 |
|-----------|---|------------------------------------|-------------|-------|------|----|
| MOL011100 | bisindigotin  | 靛蓝二聚体                              | 135545472   | 41.66 | 0.39 | 青黛 |
| MOL011105 | indican   | 3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷                   | 441564      | 34.9  | 0.23 | 青黛 |
| MOL011332 | (Quinoline) 10H-Quindoline  | 10H-吡啶并[3,2-b]喹啉                   | 98912       | 54.57 | 0.22 | 青黛 |
| MOL011335 | isoindigo   | 异靛蓝                                | 164610      | 94.3  | 0.26 | 青黛 |
| MOL001781 | indigo  | 靛蓝                                 | 10215       | 38.2  | 0.26 | 青黛 |
| MOL001810 | (Candinine) (6E)-6-(3-oxo-1H-indol-2-ylidene)indolo[2,1-b]quinazolin-12-one | 6-(3-氧代吡啶啉-2-亚基)吡啶酮[2,1-b]喹唑啉-12-酮 | 126674      | 45.28 | 0.89 | 青黛 |
| MOL002309 | indirubin   | 靛玉红                                | 10177       | 48.59 | 0.26 | 青黛 |
| MOL000358 | beta-sitosterol   | β-谷甾醇                              | 222284      | 36.91 | 0.75 | 青黛 |
| MOL002322 | isovitexin  | 异牡荆素                               | 162350      | 31.29 | 0.72 | 青黛 |
| -         | As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>  | 三氧化二砷                              | 14888       | N/A   | N/A  | 雄黄 |
| -         | As <sub>4</sub> S <sub>4</sub>  | 四硫化四砷                              | 139298      | N/A   | N/A  | 雄黄 |

**4.2 疾病靶点及青黄散治疗 AML 潜在靶点的获取** 通过 DrugBank、DisGeNET、GeneCards 及 OMIM 数据库共获得 AML 疾病靶点 906 个;通过 TCMSP 及 TCMID 数据库获得青黄散 10 个有效成分(因未检索到 bisindigotin 化合物的潜在活性靶点,故删除该化合物)治疗 AML 潜在靶点共 202 个,去除重复基因后共有 108 个。将收集的 906 个 AML 疾病靶点与 108 个青黄散潜在活性靶点进行匹配,利用 Venny 2.1 在线网站绘图,得到共同靶点 22 个,见增强出版附加材料。

**4.3 “疾病-药物成分-靶点”网络构建** 将 10 个活性化合物、青黄散有效成分的活性靶点及青黄散和 AML 的共同靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,构建“疾病-药物成分-靶点”网络图,见增强出版附加材料。网络图包含 120 个节点和 233 条边。这些活性化合物与多个 AML 靶点有关,As<sub>4</sub>S<sub>4</sub>(度值=60)、As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(度值=46)、β-谷甾醇(MOL000358,度值=38)、靛玉红(MOL002309,度值=33),靛蓝(MOL001781,度值=8)、异牡荆素(MOL002322,度

## 4 结果

**4.1 青黄散有效成分鉴定** 通过 TCMSP 数据库与 TCMID 数据库共获得青黄散的有效成分 32 种,其中青黛中有效成分 29 个,雄黄有效成分 2 个。在青黛 29 个有效成分中,有 9 个(31.0%)满足 TCMSP 数据库中 OB≥30% 和 DL≥0.18 的要求;而 TCMSP 数据库未检索到雄黄,故选择在 TCMID 数据库检索到雄黄的 2 个有效成分。因此,选择了 11 种有效成分作为候选化合物进行进一步分析。见表 1。

值=7)、Candinine(MOL001810,度值=6)、10H-吡啶并[3,2-b]喹啉(MOL011332,度值=5)、3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷(MOL011105,度值=5)、异靛蓝(MOL011335,度值=3)。网络中度值较高的化合物可能是青黄散治疗 AML 的潜在活性成分。

**4.4 PPI 网络构建** 将青黄散和 AML 共有的 22 个基因靶点导入 STRING 数据库,结果下载为 TSV 文件。将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.7.1 软件中,构建基因靶点网络图,见增强出版附加材料。通过对基因靶点网络的分析,发现该网络包括 20 个节点和 78 条边,平均节点度为 7.8,平均聚类系数为 0.74。度值越高,表示该节点在网络中发挥的调节作用越大。其中节点度值>7.8 的相互作用蛋白为原癌基因(JUN)、雌激素受体 1(ESR1)、胱天蛋白酶(Caspase)-3、Caspase-8、肿瘤坏死因子(TNF)、Caspase-9、前列腺素 G/H 合酶 2(PTGS2)、细胞周期检测点激酶 1(CHEK1)。这些核心靶点信息见表 2。

**4.5 GO 和 KEGG 富集分析** 为了进一步确定青黄

表2 青黄散抗AML的核心靶点信息

Table 2 Information on core targets of QHP against AML

| 蛋白                           | 简称    | ASPL  | BC    | CC <sup>1</sup> | CC <sup>2</sup> | 度值 |
|------------------------------|-------|-------|-------|-----------------|-----------------|----|
| Proto-oncogene protein       | JUN   | 1.211 | 0.130 | 0.826           | 0.495           | 15 |
| Estrogen receptor1           | ESR1  | 1.211 | 0.183 | 0.826           | 0.448           | 15 |
| Caspase-3                    | CASP3 | 1.263 | 0.073 | 0.792           | 0.571           | 14 |
| Caspase-8                    | CASP8 | 1.368 | 0.044 | 0.731           | 0.636           | 12 |
| Tumor necrosis factor        | TNF   | 1.421 | 0.068 | 0.704           | 0.618           | 11 |
| Caspase-9                    | CASP9 | 1.421 | 0.030 | 0.704           | 0.691           | 11 |
| Prostaglandin G/H synthase 2 | PTGS2 | 1.421 | 0.075 | 0.704           | 0.582           | 11 |
| checkpoint kinase 1          | CHEK1 | 1.579 | 0.075 | 0.633           | 0.611           | 9  |

注: ASPL. 平均最短路径变化量; BC. 界定中心性; CC<sup>1</sup>. 接近中心性; CC<sup>2</sup>. 聚集系数

散治疗 AML 的分子作用机制, 推定靶点的功能特征, 本研究通过 RStudio 软件利用 ClusterProfiler 及 Bioconductor 等 R 包对关键靶点进行了 GO 和 KEGG 通路富集分析, 见增强出版附加材料。GO 富集分析显示了潜在靶点在生物过程、细胞组成和分子功能中显著富集的前 10 个 GO 条目。GO 富集分析表明, 青黄散关键核心靶点与生物过程中的衰老、肽基丝氨酸修饰及蛋白质自磷酸化等过程相关。细胞组成包括转移酶复合体、染色体区域和焦点黏附。青黄散的核心靶点也参与了分子功能, 包括蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性和血红素结合。为了分析青黄散可能对 AML 产生影响的基础 KEGG 途径, 进行了途径富集分析。KEGG 富集分析, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路表现出最多的相关基因靶点 (23 个), 而急性骨髓性白血病通路发现有 12 个靶点。

**4.6 化合物-靶点-通路网络分析** 基于 GO 和 KEGG 富集分析结果, 利用 Cytoscape 3.7.2 软件可视化构建青黄散治疗 AML 的“化合物-靶点-通路”网络, 将这些化合物、潜在靶标和相应通路连接起来, 见增强出版附加材料; 它包括 173 个节点 (10 个活性化合物节点、143 个潜在目标节点和 20 个通路节点) 和 485 个边。

**4.7 分子对接验证** 采用分子对接技术, 选择“化合物-靶点-通路”网络图中节点度值较高的核心靶点蛋白 [节点度值排名前 8 的核心靶点依次为 Akt1、PIK3CA、双特异性丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAP2K1)、凋亡相关基因 (TP53)、原癌基因丝苏氨酸蛋白激酶-1 (RAF1)、Bcl-2 基因、Caspase-9 和 JUN] 与青黄散 10 种活性化合物进行对接。最低结

合能热、化合物的分子对接见增强出版附加材料。在结合模式中, 显示了活性化合物 (sticks 模型) 在相对应蛋白质 (卡通模型) 上的整体结合位置; 活性化合物与相对应蛋白质上的关键残基之间的相互作用, 便于观察受体蛋白与配体小分子化合物之间的空间堆叠情况; 化合物和蛋白质氨基酸残基之间氢键和疏水 (堆积) 相互作用的二维平面图。

结合亲和力值  $< -7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  ( $1 \text{ kcal} \approx 4.186 \text{ kJ}$ ) 表明该化合物与蛋白质之间具有良好的结合活性<sup>[23]</sup>, 且结合亲和力值越低, 对接效果越好。异牡荆素与受体蛋白 PIK3CA、JUN 相结合, 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷与受体蛋白 MAP2K1 及靛玉红与受体蛋白 Bcl-2 蛋白结合, 见增强出版附加材料。异牡荆素分别与受体蛋白 PIK3CA 中氨基酸残基 Val852 (长度 3.06 Å) 和 Lys802 (长度 2.86 Å、2.88 Å) 形成氢键, 与氨基酸残基 Asp805、Ala775、Lys776、Ser774、Ile932、Met772、Met922、Val850、Glu849、Ile800、Ile848 及 Asp933 形成疏水作用方式相结合。异牡荆素通过与受体蛋白 JUN 中的氨基酸残基 Ile32 (2.82 Å) 和 Glu109 (2.59 Å) 形成氢键, 与氨基酸残基 Gln117、Asn114、Ile86、Met108、Ala53 及 Leu168 形成疏水作用后相结合。3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷与受体蛋白 MAP2K1 中的氨基酸残基 Asp208 (3.00 Å) 及 Asp-190 (2.86 Å) 形成氢键, 与氨基酸残基 Lys97、Leu215、Phe209、Ile216、Met219 及 Gly225 形成疏水作用后相结合。靛玉红通过与受体蛋白 Bcl-2 中的氨基酸残基 Val253、Phe254、Thr266、Leu267、Met250、Phe270、Phe228 及 Met231 形成疏水作用结合。

#### 4.8 实验验证

**4.8.1 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红对 KG1-a 细胞增殖的影响** 本实验采用 CCK-8 法检测不同浓度的 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红处理 KG1-a 细胞 48 h 对细胞增殖的变化, 见表 3。与空白组比较, 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷从  $0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  开始对 KG1-a 细胞增殖才有显著性抑制; 而异牡荆素、靛玉红均能显著抑制 KG1-a 细胞的增殖, 并呈浓度依赖性。

**4.8.2 青黄散有效成分 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红对 KG1-a 细胞中 MAP2K1、PIK3CA、Bcl-2 蛋白表达水平的影响** 基于分析的 4.7 项下分子对接对接结果, 分别研究 3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷对 MAP2K1 蛋白、异牡荆素对 PIK3CA、靛玉红对 Bcl-2 蛋白的影响。用不同浓度

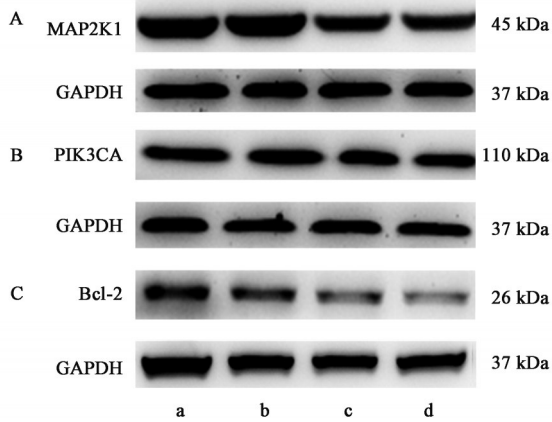
表3 不同浓度的3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红对KG1-a细胞抑制率( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 3 Inhibitory rates of different concentrations of indican, isovitexin, and indirubin on KG1-a cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 药物浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | KG1-a细胞抑制率/%             |                           |                           |
|---|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|   | 3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷         | 异牡荆素                      | 靛玉红                       |
| 0   | 100.00±7.38              | 100.00±2.54               | 100.00±4.62               |
| 0.006                                     | 98.88±4.45               | 94.37±4.16 <sup>1)</sup>  | 80.68±5.38 <sup>2)</sup>  |
| 0.024                                     | 99.98±12.75              | 85.67±3.39 <sup>2)</sup>  | 74.88±12.25 <sup>2)</sup> |
| 0.098                                     | 95.45±5.94               | 74.40±5.58 <sup>2)</sup>  | 64.04±6.73 <sup>2)</sup>  |
| 0.390                                     | 85.64±6.49 <sup>2)</sup> | 54.00±9.98 <sup>2)</sup>  | 59.26±8.87 <sup>2)</sup>  |
| 1.560                                     | 75.17±9.99 <sup>2)</sup> | 44.30±12.42 <sup>2)</sup> | 56.48±8.50 <sup>2)</sup>  |
| 6.25                                      | 64.07±8.93 <sup>2)</sup> | 39.96±14.37 <sup>2)</sup> | 50.98±7.18 <sup>2)</sup>  |
| 25  | 57.29±9.12 <sup>2)</sup> | 42.06±5.61 <sup>2)</sup>  | 38.49±5.07 <sup>2)</sup>  |

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表4-表6同)

的3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红(0、0.098、0.39、1.56  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理KG1-a细胞48 h后,MAP2K1、PIK3CA、Bcl-2蛋白均被下调。结合细胞增殖抑制实验结果,青黄散可能是通过抑制细胞生长和调节丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路 and PI3K 信号通路发挥抗急性髓系白血病的活性。见图2、表4-表6。



注:A. 3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷组;B. 异牡荆素组;C. 靛玉红组;a. 溶剂组;b~d. QHP0. 098, 0. 39, 1. 56  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图2 不同药物浓度组中KG1-a细胞MAP2K1、PIK3CA、Bcl-2蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoretic of MAP2K1, PIK3CA and Bcl-2 protein expression in KG1-a cells in different concentrations of indican, isovitexin, and indirubin

### 3 讨论

AML是一种骨髓造血系统高度异质性的恶性肿瘤血液疾病,尽管近年来AML临床治疗方案有显著改进,患者发病率和死亡率仍逐渐升高。目前认为,基因突变、化疗耐药、免疫逃逸及表观遗传学修饰是AML发生发展的重要病理机制<sup>[24]</sup>。中医认

表4 不同浓度的3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷对KG1-a细胞MAP2K1蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of different concentrations of indican on expression levels of MAP2K1 protein in KG1-a cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别                | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | MAP2K1/GAPDH            |
|-------------------|---|-------------------------|
| 溶剂组               |   | 1.27±0.12               |
| 3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷组 | 0.098                                   | 1.19±0.13               |
|                   | 0.39                                    | 0.97±0.13 <sup>1)</sup> |
|                   | 1.56                                    | 0.87±0.14 <sup>1)</sup> |

表5 不同浓度的异牡荆素对KG1-a细胞PIK3CA蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of different concentrations of isovitexin on expression levels of PIK3CA protein in KG1-a cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别    | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | PIK3CA/GAPDH            |
|-------|---|-------------------------|
| 溶剂组   |   | 1.05±0.04               |
| 异牡荆素组 | 0.098                                   | 0.97±0.07               |
|       | 0.39                                    | 0.68±0.07 <sup>2)</sup> |
|       | 1.56                                    | 0.71±0.02 <sup>2)</sup> |

表6 不同浓度的靛玉红对KG1-a细胞Bcl-2蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of different concentrations of indirubin on expression levels of Bcl-2 protein in KG1-a cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别   | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Bcl-2/GAPDH             |
|------|---|-------------------------|
| 溶剂组  |   | 0.75±0.05               |
| 靛玉红组 | 0.098                                   | 0.70±0.16               |
|      | 0.39                                    | 0.46±0.07 <sup>2)</sup> |
|      | 1.56                                    | 0.27±0.06 <sup>2)</sup> |

为,AML多伴有正气虚、阳偏衰,主要病机多为机体阴阳失调、正气衰败虚损、内耗精血,邪毒侵入血液,导致邪实正虚之证<sup>[25]</sup>。针对这种病机,治疗应

从“祛邪扶正”出发,以解毒祛瘀且补肾健脾。因此青黄散治疗AML是基于中医理论基础为指导。为了阐明青黄散对AML的治疗作用,本研究采用网络药理学、分子对接验证及实验验证等方法对青黄散活性成分和潜在作用机制进行了系统分析。

本研究通过系统分析青黄散活性成分-AML疾病靶点-信号通路网络,发现青黄散中有10个活性化合物,其中关键化合物主要为3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛蓝、靛玉红及三氧化二砷等。异牡荆素主要通过抑制PI3K/Akt信号通路调节肿瘤细胞上皮间质转化,抑制肿瘤细胞的迁移与侵袭<sup>[26]</sup>。靛玉红具有升高免疫性血小板减少症模型小鼠的外周血小板数及血红蛋白值,降低骨髓巨核细胞数,增加凝血功能等作用<sup>[27]</sup>。三氧化二砷通过激活线粒体凋亡途径及诱导AML细胞发生自噬,从而引起白血病细胞凋亡<sup>[28-29]</sup>。上述活性化合物在青黄散治疗AML过程中发挥了重要作用。

PPI分析显示,青黄散可能通过作用于PIK3CA、Akt1、MAP2K1、TP53、RAF1、Bcl-2、Caspase-9和JUN等靶点治疗AML。PI3K是一种由催化亚基(p110)和调节亚基(p85)构成的胞内磷脂酰肌醇激酶,与下游Akt1蛋白结合,调控白血病细胞的生长、增殖、凋亡及代谢等,在细胞信号转导过程中发挥重要作用。MAP2K1也被称为丝裂原活化蛋白激酶激酶1(MEK1),是大鼠肉瘤基因(Ras)/Raf/MEK/胞外信号调节激酶(ERK)通路中关键信号蛋白,其作为MEK家族的重要成员,在细胞分化、凋亡及肿瘤发生中起到关键作用。研究发现存在60%的白血病患者出现MAP2K1基因突变,而体外实验又证实MAP2K1基因突变的过表达导致白血病患者对艾代拉里斯(idelalisib)耐药<sup>[30]</sup>。同样地,TP53在AML细胞的增殖、衰老、DNA修复等过程中的核心作用也一直受到极大关注<sup>[31]</sup>。此外,激活后的RAF1可磷酸化MEK蛋白,与MAP2K1信号级联,从而引发多样化的生物效应<sup>[32]</sup>。Bcl-2、Caspase-9是AML细胞凋亡、分化与自噬等过程中的关键调节蛋白,其中Caspase-9的活性被认为是白血病细胞分化的核心因素<sup>[33-34]</sup>。作为原癌基因,JUN在AML多个遗传亚型中过多表达,ZHOU等<sup>[35]</sup>实验证实JUN可作为治疗AML疾病的活性靶点。综上所述,以上蛋白均作为青黄散治疗AML的重要作用靶点,这体现了传统中药多成分多靶点共同作用的优势特点。

KEGG通路富集分析表明,青黄散通过多种信

号途径治疗AML,包括PI3K/Akt信号通路、MAPK信号通路、p53信号通路和凋亡信号通路等,这些通路在AML疾病发生发展过程中发挥重要作用。其中,凋亡信号通路是研究最为普遍的,也是最为重要的通路,诱导AML细胞凋亡已成为国内外学者研究治疗AML的一个主要热点<sup>[36-37]</sup>。逃避细胞凋亡是肿瘤细胞的重要特征,p53信号通路调控细胞分化、周期与凋亡等进程,p53可负向调节Ras/Raf/MEK/ERK通路,并克服AML细胞对凋亡通路抑制剂的抗性<sup>[38]</sup>。HAN等<sup>[39]</sup>选择Bcl-2抑制剂(Venetoclax)和MAPK信号通路抑制剂(cobimetinib)联用,对11种AML细胞亚系均表现出协同抑制细胞增殖的作用,体内实验也证实两种抑制剂联用后可降低AML异种移植瘤白血病小鼠的肿瘤负担。PI3K/Akt信号通路与MAPK信号通路在细胞生长发育过程中调控多种生物学效应,如细胞增殖、凋亡、衰老、分化和自噬等<sup>[40-43]</sup>。本研究结合KEGG通路富集分析结果及“化合物-靶点-通路”网络分析结果,推测青黄散治疗AML可能是3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素及靛玉红靶向调控PI3K和MAPK相关信号通路有关。

结合分子对接结果,发现青黄散中3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷与MAP2K1蛋白、异牡荆素对PIK3CA蛋白、靛玉红对Bcl-2蛋白的结合最优。细胞实验结果显示,3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红均显著抑制KG1-a细胞,而蛋白免疫印迹实验也表明3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红呈剂量依赖性下调MAP2K1、PIK3CA和Bcl-2蛋白的表达水平。有研究表明靛玉红通过多种信号途径诱导白血病细胞发生周期阻滞,并引起AML细胞凋亡<sup>[44]</sup>。因此,推测青黄散中3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷可能调控MAPK信号通路,异牡荆素调节PI3K信号通路,并通过信号级联反应抑制Bcl-2蛋白的表达,从而诱导AML细胞凋亡。然而,3-吡啶基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷与异牡荆素调控MAP2K1或PI3K通路并诱导AML细胞凋亡的机制相对复杂,具体作用机制仍未完全阐明。PI3K/Akt通路和MAPK通路与AML疾病的发生发展密切相关,PI3K/MAPK相关通路在AML患者的原始细胞中被激活,导致AML细胞增殖、存活和耐药<sup>[45-46]</sup>。已有研究证实Bcl-2作为PI3K/Akt信号通路下游重要效应因子,与凋亡负向调控紧密相关<sup>[47]</sup>。近期研究表明多种中药可通过作用于MAPK和PI3K/Akt双通路来诱导AML细胞凋亡。

AKHTAR等<sup>[48]</sup>研究曼陀罗和睡茄发现,其主要成分醉茄内酯可抑制PI3K/Akt通路及MAPK通路,上调聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)、Caspase-3蛋白的表达,从而诱导AML细胞凋亡。此外,YANG等<sup>[43]</sup>从中药粉防己中鉴定出有效成分防己诺林碱具有显著抗癌作用,该作者通过细胞实验及分子对接等研究发现防己诺林碱衍生物与Akt1具有高亲和力,可显著抑制MAPK通路和PI3K/Akt通路,并下调c-核蛋白类基因(C-myc)蛋白表达,诱导AML细胞周期停滞和凋亡。本实验的研究结果与上述文献报道一致,证实青黄散有效成分可基于MAPK通路和PI3K/Akt通路发挥治疗AML作用。

本研究具有部分局限性。首先,本研究选取的网络数据库具有实时更新特点,所以本研究结果只在一定层面上揭示青黄散抗AML白血病的分子机制。其次,本研究只做了分子对接和体外实验验证,且只选用AML细胞KG1-a细胞株,后续还应结合动物模型实验进行多维度的验证。研究青黄散是如何发挥治疗AML功效作用是一件非常重要的工作,AML是本课题组所在临床科室血液科的优势病种,基于前期工作研究<sup>[6]</sup>,本课题组后续研究除了MAPK通路和PI3K/Akt通路,后续还可选择p53信号通路进行深入研究。此外,虽然基于数据库研究发现3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红是青黄散最主要的活性成分,但仍不能完全代表青黄散,而且青黄散中雄黄与青黛不同配比也影响其活性疗效<sup>[49]</sup>,未来还需要深入研究验证。总而言之,还需要选择体外和体内模型来进一步探讨青黄散治疗AML的作用机制。

本研究基于网络药理学、分子对接技术及体外细胞实验初步研究了青黄散治疗AML的潜在作用机制,其研究表明,青黄散通过“多成分多靶点多途径”协同发挥治疗AML的作用。而在此过程中,3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素、靛玉红发挥了关键作用。此外,3-吡啶基-β-D-吡喃葡萄糖苷、异牡荆素分别通过调节MAPK通路和PI3K/Akt通路有效抑制AML细胞系(KG1-a细胞)的增殖。本研究为今后青黄散治疗AML的实验和临床研究提供新的理论依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] SHORT N J, RYTTING M E, CORTES J E. Acute myeloid leukaemia [J]. *Lancet*, 2018, 392 (10147):

593-606.

[2] SHALLIS R M, WANG R, DAVIDOFF A, et al. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges [J]. *Blood Rev*, 2019, 36: 70-87.

[3] SASAKI K, RAVANDI F, KADIA TM, et al. De novo acute myeloid leukemia: A population-based study of outcome in the United States based on the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database, 1980 to 2017 [J]. *Cancer*, 2021, 127 (12): 2049-2061.

[4] 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,2020.

[5] 孟威中, 缪文雄. 青黄散联合化疗治疗急性髓性白血病临床研究[J]. *西南国防医药*, 2016, 26(12): 1454-1456.

[6] 吴建伟, 黄建翔, 郑荣, 等. 青黄散组分抑制BCL-2、XIAP-1、c-IAP协同诱导KG1a细胞凋亡的实验研究[J]. *中国当代医药*, 2018, 25(18): 10-16.

[7] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13-18.

[8] GUO W, HUANG J, WANG N, et al. Integrating network pharmacology and pharmacological evaluation for deciphering the action mechanism of herbal formula zuojin pill in suppressing hepatocellular carcinoma[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1185.

[9] XUE R, FANG Z, ZHANG M, et al. TCMID: Traditional Chinese Medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis[J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D1089-D1095.

[10] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47 (W1): W357-W364.

[11] YAO Z J, DONG J, CHE Y J, et al. TargetNet: a web service for predicting potential drug-target interaction profiling via multi-target SAR models [J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2016, 30(5): 413-424.

[12] WISHART D S, KNOX C, GUO A C, et al. DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (Database issue): D901-D906.

[13] PIÑERO J, BRAVO À, QUERALT-ROSINACH N, et al. DisGeNET: a comprehensive platform integrating information on human disease-associated genes and variants [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D833-

- D839.
- [14] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1. 30. 1-1. 30. 33.
- [15] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCOTT A F, et al. OMIM. org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1038-D1043.
- [16] UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480-D489.
- [17] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [18] SHANNON P, MARKIELA, OZIERO, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [19] ITO K, MURPHY D. Application of ggplot2 to pharmacometric graphics [J]. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*, 2013, 2(10): e79.
- [20] YU G, WANG L G, HAN Y, et al. clusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. *OMICS*, 2012, 16(5): 284-287.
- [21] OTASEK D, MORRIS J H, BOUÇAS J, et al. Cytoscape automation: Empowering workflow-based network analysis [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [22] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [23] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83922.
- [24] 杨程, 夏琳, 赫童, 等. 表观遗传学修饰在血液肿瘤中的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2020, 47(5): 386-398.
- [25] 方伟祯, 蔡振华, 古文深, 等. 急性髓系白血病中医分型与多项基因突变关系 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(11): 1328-1332.
- [26] ZHU H, ZHAO N, JIANG M. Isovitexin attenuates tumor growth in human colon cancer cells through the modulation of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(6): 741-749.
- [27] 石凤芹, 吕鹏, 何昊, 等. 靛玉红标准品与升血小板胶囊对ITP模型小鼠外周血小板数影响的比较 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2020, 28(6): 2039-2045.
- [28] LIU X J, WANG L N, ZHANG Z H, et al. Arsenic trioxide induces autophagic degradation of the FLT3-ITD mutated protein in FLT3-ITD acute myeloid leukemia cells [J]. *J Cancer*, 2020, 11(12): 3476-3482.
- [29] 沈明月, 吴晓龙, 崔思远, 等. 基于线粒体动力学探讨三氧化二砷联合槲皮素诱导人急性髓系白血病Kasumi-1细胞凋亡的作用机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(12): 5637-5641.
- [30] MURALI I, KASAR S, NAEEM A, et al. Activation of the MAPK pathway mediates resistance to PI3K inhibitors in chronic lymphocytic leukemia [J]. *Blood*, 2021, 138(1): 44-56.
- [31] BARBOSA K, LI S, ADAMS P D, et al. The role of TP53 in acute myeloid leukemia: Challenges and opportunities [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2019, 58(12): 875-888.
- [32] LI G, WANG K, LI Y, et al. Role of eIF3a in 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate-induced cell differentiation in human chronic myeloid leukemia K562 cells [J]. *Gene*, 2019, 683: 195-209.
- [33] KULSOOM B, SHAMSI T S, AFSAR N A, et al. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: Are we ready for Bcl-2-directed therapy? [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 403-416.
- [34] MADADI Z, AKBARI-BIRGANI S, MONFARED P D, et al. The non-apoptotic role of caspase-9 promotes differentiation in leukemic cells [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(12): 118524.
- [35] ZHOU C, MARTINEZ E, DI MARCANTONIO D, et al. JUN is a key transcriptional regulator of the unfolded protein response in acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2017, 31(5): 1196-1205.
- [36] RAHMANI M, NKWOCHA J, HAWKINS E, et al. Cotargeting Bcl-2 and PI3K induces Bax-dependent mitochondrial apoptosis in AML cells [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(11): 3075-3086.
- [37] YUAN M, SUN Z, MANTHARI R K, et al. Arsenic-induced autophagy regulates apoptosis in AML-12 cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2021, 72: 105074.
- [38] PAN R, RUVOLO V, MU H, et al. Synthetic lethality of combined Bcl-2 inhibition and p53 activation in AML: Mechanisms and superior antileukemic efficacy [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(6): 748-760.

- [39] HAN L, ZHANG Q, DAIL M, et al. Concomitant targeting of Bcl-2 with venetoclax and MAPK signaling with cobimetinib in acute myeloid leukemia models[J]. *Haematologica*, 2020, 105(3):697-707.
- [40] NEPSTAD I, HATFIELD K J, GRØNNINGSÆTER I S, et al. Effects of insulin and pathway inhibitors on the PI3K-Akt-mTOR phosphorylation profile in acute myeloid leukemia cells [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4:20.
- [41] JASEK-GAJDA E, JURKOWSKA H, JASIŃSKA M, et al. Targeting the MAPK/ERK and PI3K/Akt signaling pathways affects NRF2, Trx and GSH antioxidant systems in leukemia cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(7):633.
- [42] CHENG J, LI Y, LIU S, et al. CXCL8 derived from mesenchymal stromal cells supports survival and proliferation of acute myeloid leukemia cells through the PI3K/Akt pathway [J]. *FASEB J*, 2019, 33 (4) : 4755-4764.
- [43] YANG J, HU S, WANG C, et al. Fangchinoline derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis in human leukemia cell lines via suppression of the PI3K/Akt and MAPK signaling pathway [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 186: 111898.
- [44] HOESSEL R, LECLERC S, ENDICOTT J A, et al. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases[J]. *Nat Cell Biol*, 1999, 1(1):60-67.
- [45] MARTELLI AM, NYÅKERN M, TABELLINI G, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia [J]. *Leukemia*, 2006, 20 (6) : 911-928.
- [46] MILELLA M, KORNBLAU SM, ESTROV Z, et al. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(6):851-859.
- [47] ZHOU L, ZHAO Y. B7-H3 induces ovarian cancer drugs resistance through an PI3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 10205-10214.
- [48] AKHTAR N, BAIG M W, HAQ I U, et al. Withanolide metabolites inhibit PI3K/Akt and MAPK pro-survival pathways and induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. *Biomedicines*, 2020, 8(9):333.
- [49] 张敏, 吴青青, 李晨辉, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS/MS技术分析不同配伍比例雄黄对青黛入血成分的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13):79-86.

[责任编辑 顾雪竹]