

## 基于网络药理学和分子对接对金丝桃苷抗肝癌作用机制

张婷\*, 李娜, 宋小锋, 朱婷

(新乡医学院三全学院, 河南新乡 453003)

**[摘要]** 目的:采用网络药理学的方法,对金丝桃苷抗肝癌的作用机制进行探讨。方法:使用过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、药物基因相互作用数据库(DGIdb)、毒性与基因比较数据库(CTD)及SwissTargetPrediction数据库预测金丝桃苷的作用靶点。利用基因数据库(GeneCards)、在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM)等5个数据库,获得肝癌疾病相关靶点。二者取交集,即金丝桃苷抗肝癌作用靶点。采用在线注释及可视化整合分析工具(DAVID v2021q4)进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。Cytoscape 3.6.1软件构建作用靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,筛选出核心作用靶点,并对金丝桃苷与核心作用靶点亲和力进行分子对接验证。细胞活力实验观察金丝桃苷抗肝癌的作用;划痕实验观察金丝桃苷对肝癌细胞迁移的作用;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测金丝桃苷对关键靶基因胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)mRNA及蛋白表达的影响。结果:共获得金丝桃苷抗肝癌的相关基因45个,并筛选出核心靶基因6个。KEGG途径分析富集的信号通路包括凋亡信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路及癌症信号通路等。分子对接显示核心靶基因Caspase-3、TNF、雌激素受体1(ESR1)、MAPK3、过氧化氢酶(CAT)及环加氧酶2(PTGS2)与金丝桃苷亲和力较好,尤其与Caspase-3与MAPK3具有强烈的结合活性。另外细胞实验显示,与空白组比较金丝桃苷能减低肝癌细胞活力( $P<0.05$ ),抑制肝癌细胞迁移,同时升高Caspase-3 mRNA表达( $P<0.05$ ),降低MAPK3 mRNA表达( $P<0.05$ )。结论:金丝桃苷抗肝癌作用通过影响Caspase-3、TNF、ESR1、MAPK3、CAT、PTGS2等核心靶点,共同干预凋亡信号通路、TNF信号通路及癌症信号通路等,以达到抗肝癌的作用。

**[关键词]** 金丝桃苷; 网络药理学; 肝癌; 药理机制

**[中图分类号]** R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0183-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220811 **[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.20220329.1911.010.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-30 9:41

### Anti-liver Cancer Mechanism of Hypericin Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

ZHANG Ting\*, LI Na, SONG Xiaofeng, ZHU Ting

(Sanquan Medical College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of hypericin against liver cancer using network pharmacology. **Method:** The traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP), Drug Gene Interaction Database (DGIdb), Comparative Toxicogenomics Database (CTD) and SwissTargetPrediction were used to predict the targets of hypericin. Five databases including GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) were employed to obtain liver cancer-related targets. The intersection was performed to obtain the targets of hypericin against liver cancer. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v2021q4 was used for Gene Ontology (GO) function annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. The protein-

**[收稿日期]** 2021-11-23

**[基金项目]** 2019年度河南省高等学校青年骨干教师培养计划支持项目(2019GGJS296);新乡医学院三全学院科学研究培育基金项目(020520012)

**[通信作者]** \*张婷, 硕士, 副教授, 从事细胞分子生物学研究, E-mail: xt5054995@163.com

protein interaction (PPI) network of the targets was constructed by Cytoscape 3.6.1 to screen the core targets, and the affinity between hypericin and the core targets was verified by molecular docking. The effects of hypericin on liver cancer and the migration of liver cancer cells were observed by cell viability assay and wound healing assay, respectively, and its effects on the mRNA and protein expression of key targets cysteinyl aspartate-specific protease-3 (Caspase-3) and mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3) were detected by real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot, respectively. **Result:** A total of 45 genes related to the anti-liver cancer effect of hypericin were obtained, and six core target genes were screened. The signal pathways enriched by KEGG pathway analysis included apoptosis, tumor necrosis factor (TNF) and cancer signal pathways. Molecular docking showed that the core target genes Caspase-3, TNF, estrogen receptor 1 (ESR1), MAPK3, catalase (CAT) and cyclooxygenase 2 (PTGS2) had good affinity with hypericin, especially Caspase-3 and MAPK3. In addition, compared with the conditions in control group, cell experiments demonstrated that hypericin could reduce the viability of liver cancer cells ( $P < 0.05$ ), inhibit their migration, increase the mRNA expression of Caspase-3 ( $P < 0.05$ ) and decrease that of MAPK3 ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Hypericin exerted the anti-liver cancer effect by affecting the core targets such as Caspase-3, TNF, ESR1, MAPK3, CAT and PTGS2 and jointly interfering with apoptosis, TNF and cancer signal pathways.

**[Keywords]** hypericin; network pharmacology; liver cancer; pharmacological mechanism

肝癌是临床上常见的肝脏恶性肿瘤。发病率居世界第5位<sup>[1]</sup>。死亡率居世界第二<sup>[2]</sup>。目前手术切除是主要的治疗方法。但是一旦确诊,大多数患者已经处于晚期,此时只能通过药物而不能再进行手术治疗。临床上主要使用的是索拉非尼等一线治疗药物,但长期使用使患者容易产生耐受性和各种不良反应<sup>[3-4]</sup>。因此,探索有效的肝癌防治药物已成为当务之急。许多临床研究已经证明,中医药在改善晚期肝癌患者的症状<sup>[5]</sup>,减少肿瘤复发<sup>[6]</sup>,控制疾病进展<sup>[7]</sup>方面具有良好的效果。

金丝桃苷是一种主要存在于中草药中的类黄酮。它具有抗炎、抗氧化和血管保护作用。最近的研究表明金丝桃苷在多种肿瘤类型中具有抗癌作用。金丝桃苷可抑制多种癌细胞系中的细胞增殖、诱导凋亡、减少血管生成和诱导细胞周期阻滞<sup>[8]</sup>。金丝桃苷可改善肺癌<sup>[9]</sup>,胰腺癌<sup>[10]</sup>,前列腺癌<sup>[11]</sup>,结肠癌<sup>[12]</sup>等。此外据报道,金丝桃苷和槲皮素的组合对人类白血病细胞的生长具有协同抑制作用<sup>[13]</sup>。在一项使用小鼠皮肤肿瘤的研究中,金丝桃苷和茶多酚的组合也显示出协同抗癌作用<sup>[14]</sup>。另外也有研究表明,金丝桃苷对肝癌具有治疗作用,能抑制肝癌 HepG2 细胞增殖、促进细胞凋亡<sup>[15-16]</sup>。然而,金丝桃苷对肝癌的治疗作用机制尚不十分明确。

网络药理学作为现代中医药理学研究的一个新领域,可以利用许多现有的数据库、通路分析和网络分析来探索中药治疗疾病的作用机制<sup>[17-18]</sup>。网

络药理学主要研究相互作用组中的化合物和靶点。它适合于探索药物的作用机制及其在癌症治疗中的协同效应<sup>[19]</sup>。本研究利用网络药理学策略,对金丝桃苷抗肝癌疾病作用的潜在靶点和分子机制进行了系统地研究,报道如下。

## 1 方法

**1.1 化合物靶点搜集** 金丝桃苷的作用靶点从中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/>)、药物基因相互作用数据库(DGIdb, <https://www.dgidb.org/drugs/HYPEROSIDE>)、毒性与基因比较数据库(CTD, <http://ctdbase.org/>)及 SwissTargetPrediction ([http://www.swiss\\_target\\_prediction.ch/](http://www.swiss_target_prediction.ch/))数据库获得。选取人源靶点,合并删除重复靶点。

**1.2 肝癌疾病靶点搜集** 使用 liver cancer 及 liver carcinoma 作为关键词,搜索 DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>), 基因数据库(GeneCards, (<https://www.genecards.org/>), 治疗靶标数据库(TTD, <http://db.idrblab.net/ttd>), 人类疾病相关的基因与突变位点信息的数据库(DisgeNET, <http://www.disgenet.org/home/>), 在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM, <https://www.omim.org/>), 获得肝癌疾病相关靶点。合并所有获得的靶点,并去除重复的靶点。

**1.3 金丝桃苷抗肝癌作用靶点的获得** 金丝桃苷的作用靶点与肝癌疾病靶点使用韦恩图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)取交集,获得金丝桃苷抗肝癌作用靶点。

**1.4 金丝桃苷抗肝癌作用靶点蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析** 将金丝桃苷抗肝癌作用靶点蛋白上传到 STRING 11.5 数据库(<http://string-db.org>)获取 PPI 信息。置信度得分为 0.7 或更高的蛋白质相互作用以 TSV 格式导出。PPI 网络由 Cytoscape v3.6.1 可视化。

**1.5 金丝桃苷抗肝癌作用关键靶点的筛选** 使用 Cytoscape 中 Network analyzer 计算网络拓扑参数,包括度中心性(degree)、紧密中心性(closeness centrality)、介数中心性(betweenness centrality)及聚类系数(clustering coefficient)。其中网络被视为无向网络。度中心性、紧密中心性、介数中心性的数值越大,说明这个基因在网络中的作用越重要。

**1.6 金丝桃苷抗肝癌作用靶点的富集分析** 使用注释及可视化整合分析工具(DAVID v2021q4, <https://david.ncifcrf.gov/>)进行金丝桃苷抗肝癌作用靶点的富集分析的富集分析。富集分析包括基因本体(GO)分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析。GO 分析又包括细胞组分、分子功能、生物过程的分析。

**1.7 金丝桃苷与关键作用靶点的分子对接** 关键作用靶点蛋白的 X 射线晶体结构从蛋白质数据库(PDB)(<http://www.rcsb.org/>)中获得。金丝桃苷的 mol2 文件从 TCMSP 下载得到。使用 AutoDock tool 对蛋白质受体文件和配体文件进行处理,包括蛋白质结构的去水,加氢等。然后,将他们转换为 pdbqt 格式。使用 AutoDock vina 1.5.6 软件进行金丝桃苷与关键作用靶点的分子对接。选择结合能最低的结合模式进行进一步分析。使用 PyMOL 软件将金丝桃苷与关键作用靶蛋白之间的相互作用可视化并显示为 2D 图。

## 1.8 实验部分

**1.8.1 实验材料** 金丝桃苷(成都普瑞法科技开发有限公司,批号 482-36-0,纯度 >99%);噻唑蓝(MTT,美国 Sigma-Aldrich 公司);TRIzol<sup>®</sup>试剂(美国 Thermo Fisher 公司,货号 15596018);RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(宝日医生物技术有限公司,货号分别为 RR047A、RR820A);蛋白免疫印迹法(Western blot)及 IP 细胞裂解液、BeyoECL Plus(超敏 ECL 化学发光试剂盒)(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0013、P0018S);兔源丝裂原活化蛋白激酶 3(MAPK3)单克隆抗体、兔源胱天蛋白酶

(Caspase)-3 单克隆抗体(Abcam 公司,批号分别为 ab109282、ab197202);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)(碧云天生物技术有限公司,货号 A0208)。ROCHE LightCycler<sup>®</sup> 96 型 Real-time PCR 仪(瑞士 Roche 公司);Varioskan LUX 型多功能酶标仪(赛默飞世尔科技公司)。

**1.8.2 细胞活力测定** 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔的密度接种入 96 孔板中。在与不同浓度的金丝桃苷(0、25、50、100、150  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )孵育 24、48、72 h 后,分别加入 MTT 试剂,孵育 4 h 后,吸去上清,加入二甲亚砜,并使用酶标仪在 490 nm 处检测吸光度 *A*。

**1.8.3 细胞迁移实验<sup>[20]</sup>** 细胞接种于 6 孔板上。当细胞生长到 80% 汇合时,用无菌 20  $\mu\text{L}$  塑料移液管尖端刮取细胞单层,枪头垂直,不能倾斜。然后 PBS 清洗细胞 2 次。加入含有不同浓度金丝桃苷并仅含 2% 血清的培养基。于 72 h 后通过倒置显微镜观察划痕处的图像。

**1.8.4 Real-time PCR 检测关键靶点基因 Caspase-3、MAPK3 mRNA 的表达** 使用 TRIzol<sup>®</sup> 试剂从细胞中提取总 RNA。使用 PrimeScript RT 试剂盒将总 RNA 反向转录成互补 DNA。使用 SYBR 预混料 Taq 试剂盒(日本 Takara 公司)进行 Real-time PCR 反应。引物序列:甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)长度 20 bp,上游 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'、下游 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3';Caspase-3 长度 21 bp,上游 5'-CAGAAGATACCAGTGGAGGCC-3'、下游 5'-TTCCGGTTAACACGAGTGAGG-3',MAPK3 上游 5'-ACCTGATGGAGACTGACCTGT-3' 长度 21 bp、下游 5'-CGTTGGCGGAGTGGATGT-3' 长度 18 bp。相对表达分析的扩增条件采用两步法,95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s;然后 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  退火 20 s,共 40 次循环。按照  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 Caspase-3、MAPK3 相对表达量。

**1.8.5 Western blot 分析相关蛋白表达** 用 Western 及 IP 细胞裂解液从细胞中提取总蛋白。使用 BCA 蛋白质分析试剂盒对蛋白质浓度进行定量。通过 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量的蛋白质,并转移到 PVDF 膜上。膜在 37  $^{\circ}\text{C}$  下用 5% 脱脂乳在 TBST 中封闭 1 h,在 4  $^{\circ}\text{C}$  下与一抗(MAPK3, 1:1 000;Caspase-3, 1:5 000)孵育过夜。用 TBST 清洗膜,并进一步与辣根过氧化物酶结合的二抗(1:1 000)在 37  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 1 h。超敏 ECL 化学发光试剂盒用于检测蛋白质条带。以 GAPDH 作为内源

性对照。

**1.8.6 统计学分析** 数据使用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较使用 GraphPad Prism 7.0 进行单因素方差分析 (ANOVA),  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 金丝桃苷抗肝癌作用靶点的获得** 金丝桃苷化学结构见图1。将获得的70个金丝桃苷作用靶点和1999个肝癌靶点通过 Venny 图取交集,共得到45个交集靶点,即金丝桃苷抗肝癌作用靶点。见增强出版附加材料。

**2.2 金丝桃苷抗肝癌靶点蛋白的PPI网络图及核心靶点蛋白的筛选** 金丝桃苷抗肝癌靶点蛋白的PPI网络图见增强出版附加材料,共45个点,224条边。选取PPI网络中,度中心性、紧密中心性及介数中心性均较大的6个蛋白为核心靶点蛋白即 Caspase-3、肿瘤坏死因子(TNF)、雌激素受体1(ESR1)、MAPK3、过氧化氢酶(CAT)及环加氧酶2(PTGS2)。金丝桃苷与肝癌交集基因中核心靶点基因的拓扑学参数见表1。

表1 金丝桃苷与肝癌交集基因中核心靶点蛋白的拓扑学参数  
Table 1 Topological parameters of core target protein of anti-hepatoma targets of hypericin

蛋白名称	度中心性	紧密中心性	介数中心性	聚类系数
Caspase-3	27	0.764 705 88	0.115 926 74	0.450 142 45
TNF	26	0.750 000 00	0.100 517 76	0.470 769 23
ESR1	24	0.709 090 91	0.150 290 86	0.376 811 59
MAPK3	23	0.684 210 53	0.051 339 31	0.525 691 70
CAT	21	0.672 413 79	0.069 774 66	0.509 523 81
PTGS2	21	0.672 413 79	0.032 076 64	0.585 714 29

### 2.3 金丝桃苷抗肝癌作用靶点的GO分析结果

GO分析包括细胞组分、分子功能及生物过程的分析,见增强出版附加材料。金丝桃苷抗肝癌作用靶点蛋白的生物过程主要包括血红素结合、四吡咯结合、DNA-结合转录因子结合RNA聚合酶II-特异性DNA-结合转录因子结合等。细胞组分主要涉及氧化应激反应、细胞化学应激反应、活性氧反应等。分子功能主要集中在膜筏、膜微区、膜区等。

**2.4 金丝桃苷抗肝癌作用靶点的KEGG分析** 金丝桃苷抗肝癌作用靶点的KEGG分析结果见增强出版附加材料。富集显著性较高的通路主要包括凋亡信号通路、TNF信号通路及癌症信号通路等。表明金丝桃苷对主要通过以上通路来治疗肝癌。KEGG信号通路与靶点基因相互关系网络图见增强

出版附加材料。

**2.5 分子对接结果** 将金丝桃苷与6个核心靶点蛋白 Caspase-3、TNF、ESR1、MAPK3、CAT、PTGS2 进行分子对接,结合能数据依次为-9.9、-8.1、-6.7、-9.2、-7.3、-7.9 kJ·mol<sup>-1</sup> (1 cal≈4.186 J)。结合能越小,说明对接越好。一般认为,结合能<-5.0 kJ·mol<sup>-1</sup>,表明这种成分与核心靶点蛋白结合性较好,结合能<-7.0 kJ·mol<sup>-1</sup>,表明此种物质与核心靶点蛋白有很强结合活性<sup>[21-22]</sup>。除金丝桃苷与ESR1的结合能为-6.7 kJ·mol<sup>-1</sup>外,其余的结合能均<-7.0 kJ·mol<sup>-1</sup>,说明金丝桃苷与核心靶点蛋白结合良好。尤其 Caspase-3 与 MAPK3 与金丝桃苷的结合能≤-9 kJ·mol<sup>-1</sup>,说明具有强烈的结合活性。金丝桃苷与核心靶点蛋白分子对接示意图见增强出版附加材料。

**2.6 金丝桃苷对细胞活力的影响** 由表2可见,与空白组比较,24 h时,金丝桃苷100、150 μmol·L<sup>-1</sup>均能明显降低肝癌细胞的活力 ( $P < 0.05$ )。48 h和72 h,金丝桃苷除25 μmol·L<sup>-1</sup>组外,其他浓度组(50、100、150 μmol·L<sup>-1</sup>)均能明显降低肝癌细胞的活力 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。不同浓度金丝桃苷(50、100、150 μmol·L<sup>-1</sup>)作用下 HepG2 细胞见图1。

表2 金丝桃苷对 HepG2 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )  
Table 2 Effect of hypericin on viability of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

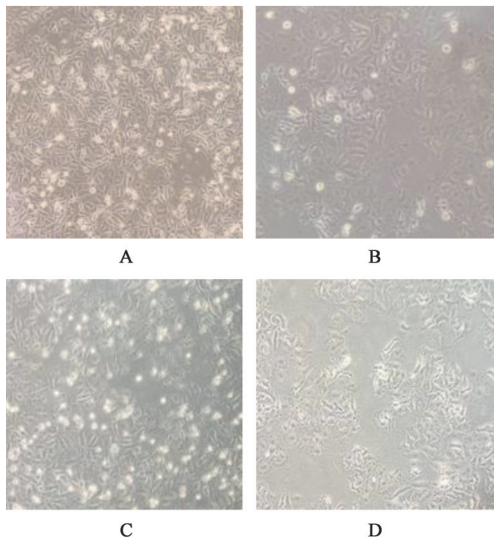
组别	剂量/μmol·L <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
空白组		0.45±0.11	0.62±0.14	0.79±0.15
金丝桃苷组	25	0.42±0.08	0.51±0.18	0.66±0.12
	50	0.38±0.07	0.47±0.16 <sup>1)</sup>	0.58±0.18 <sup>1)</sup>
	100	0.35±0.08 <sup>1)</sup>	0.41±0.12 <sup>2)</sup>	0.48±0.13 <sup>2)</sup>
	150	0.27±0.06 <sup>2)</sup>	0.36±0.09 <sup>2)</sup>	0.42±0.12 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

**2.7 金丝桃苷对肝癌细胞迁移的影响** 与空白组比较,不同浓度浓度的金丝桃苷(50、100、150 μmol·L<sup>-1</sup>)作用72 h后均能抑制 HepG2 细胞的迁移,其中150 μmol·L<sup>-1</sup>金丝桃苷组抑制能力强于100、50 μmol·L<sup>-1</sup>金丝桃苷组。见图2。

**2.8 金丝桃苷对关键靶点基因 Caspase-3、MAPK3 mRNA 表达的影响** 与空白组比较,金丝桃苷组(50、100、150 μmol·L<sup>-1</sup>)能明显降低 MAPK3 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),升高 Caspase-3 mRNA 表达 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见表3。

**2.9 金丝桃苷对关键靶点蛋白 Caspase-3、MAPK3 表达的影响** 与空白组比较,金丝桃苷组(50、100、



注: A. 空白组; B. 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组(图2、图3同)

图1 不同浓度金丝桃苷作用下HepG2细胞(电子显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 1 HepG2 cells treated with hyperin at different concentrations (microscope,  $\times 100$ )

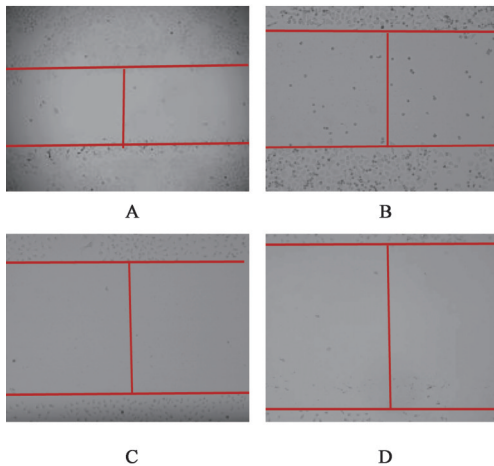


图2 不同浓度金丝桃苷对HepG2细胞迁移的影响( $\times 100$ )

Fig. 2 Effects of hyperin at different concentrations on migration of HepG2 cells ( $\times 100$ )

表3 金丝桃苷对Caspase-3、MAPK3 mRNA的表达的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Effects of hyperin on mRNA expression of Caspase-3 and MAPK3 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-3	MAPK3
金丝桃苷低浓度组	50	1.48 $\pm$ 0.21 <sup>1)</sup>	0.83 $\pm$ 0.14 <sup>1)</sup>
金丝桃苷中浓度组	100	2.06 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>	0.68 $\pm$ 0.19 <sup>2)</sup>
金丝桃苷高浓度组	150	2.72 $\pm$ 0.28 <sup>2)</sup>	0.48 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>

注: 设空白组各指标 mRNA 相对表达量为 1; 与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ , <sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 4 同)

150  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能明显增加 Caspase-3 蛋白的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 降低 MAPK3 蛋白的表达( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ )。见图 3 和表 4。

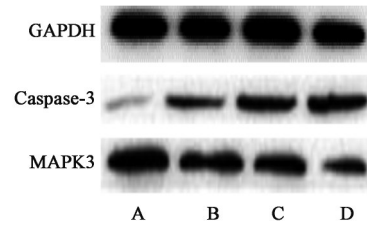


图3 金丝桃苷对关键靶点蛋白Caspase-3、MAPK3表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of hyperin on protein expression of Caspase-3 and MAPK3

表4 金丝桃苷对Caspase-3、MAPK3蛋白表达的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

Table 4 Effects of hyperin on protein expression of Caspase-3 and MAPK3 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Caspase-3 /GAPDH	MAPK3 /GAPDH
空白组		0.11 $\pm$ 0.03	0.84 $\pm$ 0.13
金丝桃苷低浓度组	50	0.23 $\pm$ 0.04 <sup>1)</sup>	0.69 $\pm$ 0.13 <sup>1)</sup>
金丝桃苷中浓度组	100	0.43 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>	0.52 $\pm$ 0.06 <sup>2)</sup>
金丝桃苷高浓度组	150	0.72 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>	0.33 $\pm$ 0.08 <sup>2)</sup>

### 3 讨论

金丝桃苷广泛存在于多种植物内。金丝桃苷是山楂<sup>[23]</sup>、黄蜀葵花<sup>[24]</sup>、地榆<sup>[25]</sup>、分心木<sup>[26]</sup>及金荞麦药材<sup>[27]</sup>中的主要黄酮类成分,也是这些药材质量控制的重要指标之一。现代研究表明,金丝桃苷具有抗氧化<sup>[28]</sup>、抗脑损伤<sup>[29]</sup>及心肌的保护作用<sup>[30]</sup>等。另外金丝桃苷对多种肿瘤的生长具有抑制作用<sup>[9-12,31-32]</sup>。肝癌是我国常见恶性肿瘤之一。体外研究发现,金丝桃苷对肝癌细胞的生长也具有较强的抑制作用<sup>[15-16]</sup>,但作用机制尚不明确。网络药理学是一种在系统水平上研究药物机制的创新方法<sup>[33]</sup>。它包括生物信息学、网络分析和实验方法,并集成了多种信息源<sup>[34]</sup>。因此,网络方法可以准确区分潜在的药物-靶点相互作用<sup>[35]</sup>。利用网络药理学策略,我们系统地研究了金丝桃苷抗肝癌疾病作用的潜在靶点和分子机制。首先,笔者通过对金丝桃苷的作用靶点和肝癌疾病靶点取交集获得了金丝桃苷抗肝癌的靶点。随后对金丝桃苷抗肝癌作用靶点蛋白的进行PPI网络分析并筛选出了关键靶点。然后,根据GO和KEGG对金丝桃苷抗肝癌的靶点进行富集分析,并构建了药物-靶点-途径网络。最后,通过分子对接验证了金丝桃苷与关键靶点分子之间的相互作用。另外通过实验验证了金丝桃苷对肝癌的作用及对关键靶点的影响。

金丝桃苷抗肝癌作用靶点的GO富集分析显

示,生物过程主要包括血红素结合、四吡咯结合、DNA-结合转录因子结合、RNA聚合酶II-特异性DNA-结合转录因子结合等。细胞组分主要涉及氧化应激反应、细胞化学应激反应、活性氧反应等。分子功能主要集中在膜筏、膜微区、膜区等。金丝桃苷抗肝癌作用靶点的KEGG分析显示,富集显著性较高的通路主要包括凋亡信号通路、TNF信号通路及癌症信号通路等。表明金丝桃苷对主要通过以上通路来治疗肝癌。凋亡是细胞的固有功能,是细胞增殖的逆过程<sup>[36]</sup>。通过触发细胞自杀程序而发生的细胞死亡称为凋亡。所谓凋亡程序的本质是细胞中负责感知、调节和执行细胞死亡信号的一组基因程序<sup>[37]</sup>。细胞凋亡是一种常见的主动性死亡,具有重要的生理和病理意义。在生理状态下,体细胞的死亡是一种非常普遍的现象,并且不断发生。然而,这种生理性死亡的实质是细胞凋亡,它是机体调节生长与死亡平衡的重要手段。它与细胞增殖一起保持体内细胞群的稳态。人体正常的生理过程离不开细胞凋亡。研究发现,xanthohumol通过诱导HepG2细胞的生长抑制、凋亡增强和Caspase-3活性提高,发挥抗癌作用<sup>[38]</sup>。另外肝脏中TNF-RI表达的调节和TNF基因多态性(TNF308.2)与肝癌的发生有关<sup>[39-40]</sup>。许多TNF依赖性基因和途径最近被证明在HCC周围的炎症微环境中失调,并且这种特异性炎症基因标记的存在与HCC患者的不良预后相关<sup>[41]</sup>,提示TNF信号通路即肿瘤坏死因子途径可能在肝癌的发生和发展中起着重要作用。

另外本研究通过金丝桃苷抗肝癌靶点蛋白的PPI网络图对核心靶点蛋白进行了筛选。选取PPI网络图中,度中心性、紧密中心性及介数中心性均较大的6个蛋白为核心靶点蛋白即Caspase-3、TNF、ESR1、MAPK3、CAT、PTGS2。其中Caspase-3是细胞凋亡的关键执行者,负责细胞蛋白质的切割,导致染色质浓缩和DNA断裂,这是细胞凋亡的标志<sup>[42]</sup>。研究发现,金丝桃苷可增加宫颈癌细胞Caspase-3蛋白表达,促进细胞凋亡,抑制宫颈癌HeLa细胞生长<sup>[43]</sup>。金丝桃苷还可上调卵巢癌cleaved Caspase-3蛋白水平,抑制卵巢癌SKOV3细胞的增殖<sup>[44]</sup>。同样金丝桃苷可增加胃癌MKN-45细胞Caspase-3表达<sup>[45]</sup>。在过去的几十年中,人们还逐渐认识到慢性炎症在肝癌进展中起着非常重要的作用<sup>[46-47]</sup>,并发现TNF- $\alpha$ 在炎症相关肝细胞癌模型中具有促癌功能<sup>[48]</sup>。TNF- $\alpha$ 在与其受体结合后会激活不同的信号通路,包括炎症和应激相关通

路,如NF- $\kappa$ B、p38 MAPK和JNK通路等<sup>[49]</sup>。ESR1是一种类固醇受体,在调节肿瘤发生(如乳腺癌)中起着重要作用<sup>[50]</sup>。如果突变,ESR1在原发性恶性肿瘤转移过程中可以被激活。抑制ESR1基因活化可用于抗癌。研究发现,ESR1 mRNA在人类肝癌样本中表达上调,下调ESR1 mRNA表达对肝癌具有治疗作用<sup>[51]</sup>。MAPK3又称为细胞外信号调节激酶(ERK1),属于MAPK激酶家族,在MAPK/ERK信号级联反应中起重要作用。ERKs不仅可以磷酸化胞浆蛋白,而且可以磷酸化一些核内的转录因子如c-Fos、c-Jun、Elk-1、c-Myc和ATF2等,从而参与细胞增殖与分化的调控。MAPK/ERK信号通路在肝癌发生中起到至关重要的作用的<sup>[52]</sup>。尤其MAPK3从细胞质到细胞核的易位以及随后有丝分裂基因和细胞调节基因的转录激活密切相关<sup>[53]</sup>。周庆南等<sup>[54]</sup>发现,在正常肝组织、癌旁肝组织及肝癌组织中,MAPK3(ERK1)的表达呈逐级递增的趋势,MAPK3的过表达可能与肝癌的发生有关。另有文献报道,对MAPK/ERK信号通路的抑制是Sorafenib抗肝癌的重要机制之一<sup>[55]</sup>。CAT是一种抗氧化酶。氧化应激既是导致肝功能障碍的原因,也是所有肝脏损伤的病理生理基础<sup>[56]</sup>。研究发现,金丝桃苷可降低宫颈癌HeLa细胞CAT活力<sup>[43]</sup>。金丝桃苷还可明显降低结肠癌SW620细胞CAT mRNA的表达水平<sup>[57]</sup>。研究发现,PTGS2表达上调的HCC患者,PTGS2生物学活性加强,进而促进肿瘤生长的信号通路传导,使肿瘤侵袭转移的能力增加,而抑制肿瘤细胞增殖的能力降低,从而导致HCC患者术后无进展时间减少<sup>[58]</sup>。另有研究表明,PTGS2特异性抑制剂有抑制肝癌的作用<sup>[59-60]</sup>。

本研究通过分子对接验证了金丝桃苷与关键靶点分子之间的相互作用,结果表明金丝桃苷与核心靶点蛋白结合良好。尤其Caspase-3与MAPK3与金丝桃苷具有强烈的结合活性(结合能 $\leq -9 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ )。另外本研究通过细胞实验证实金丝桃苷能明显降低人肝癌细胞(HepG2)的活力( $P < 0.05, P < 0.01$ ),抑制肝癌细胞的迁移,与空白组比较同时明显降低MAPK3 mRNA及蛋白表达,与空白组比较升高Caspase-3 mRNA及蛋白表达,进而影响凋亡信号通路、TNF信号通路及癌症信号通路的活性,对肝癌起到治疗作用。

本研究中仅在细胞实验水平对金丝桃苷抗肝癌作用及对分子对接亲和力最高的2个关键靶点进行了初步验证,其余的关键靶点仍需要进一步的进

行实验验证。另外下一步拟开展动物实验对金丝桃苷治疗肝癌的疗效及作用机制进行探讨。

综上所述,本研究应用网络药理学的方法对金丝桃苷抗肝癌作用靶点及通路进行分析。结果显示,金丝桃苷抗肝癌作用通过影响 Caspase-3、TNF、ESR1、MAPK3、CAT、PTGS2 等核心靶点,共同干预凋亡信号通路、TNF 信号通路及癌症信号通路等,以达到抗肝癌的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] SUN X, LI L, MA H G, et al. Bisindolylmaleimide alkaloid BMA-155Cl induces autophagy and apoptosis in human hepatocarcinoma HepG-2 cells through the NF- $\kappa$ B p65 pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(4):524-538.
- [2] ZHOU J, SUN H C, WANG Z, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in china [J]. *Liver Cancer*, 2018, 7(3):235-260.
- [3] SANTONI M, CONTI A, DE GIORGI U, et al. Risk of gastrointestinal events with sorafenib, sunitinib and pazopanib in patients with solid tumors: A systematic review and Meta-analysis of clinical trials [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(4):763-773.
- [4] RANDRUP HANSEN C, GRIMM D, et al. Effects and side effects of using sorafenib and sunitinib in the treatment of metastatic renal cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2):461.
- [5] TANG K Y, DU S L, WANG Q L, et al. Traditional Chinese medicine targeting cancer stem cells as an alternative treatment for hepatocellular carcinoma [J]. *J Integr Med*, 2020, 18(3):196-202.
- [6] CHENG Y, NI S, CHEN Y, et al. Erzhū Qinggan Jiedu recipe improves the clinical outcome of hepatocellular cancer after surgical resection: A case-control retrospective study [J]. *Intern Med J*, 2021, 51(6):853-860.
- [7] WANG X, WANG N, CHENG F, et al. Chinese medicines for prevention and treatment of human hepatocellular carcinoma: Current progress on pharmacological actions and mechanisms [J]. *J Integr Med*, 2015, 13(3):142-164.
- [8] GAO L L, FENG L, YAO S T, et al. Molecular mechanisms of celery seed extract induced apoptosis via s phase cell cycle arrest in the BGC-823 human stomach cancer cell line [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(10):2601-2606.
- [9] LI J P, LIAO X H, XIANG Y, et al. Hyperoside and let-7a-5p synergistically inhibits lung cancer cell proliferation via inducing G<sub>1</sub>/S phase arrest [J]. *Gene*, 2018, 679:232-240.
- [10] BOUKES G J, VAN D E VENTER M. The apoptotic and autophagic properties of two natural occurring prodrugs, hyperoside and hypoxoside, against pancreatic cancer cell lines [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83:617-626.
- [11] YANG F Q, LIU M, LI W, et al. Combination of quercetin and hyperoside inhibits prostate cancer cell growth and metastasis via regulation of microRNA-21 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2):1085-1092.
- [12] ZHANG Y, DONG H, ZHANG J, et al. Inhibitory effect of hyperoside isolated from *Zanthoxylum bungeanum* leaves on SW620 human colorectal cancer cells via induction of the p53 signaling pathway and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2):1125-1132.
- [13] MERTENS-TALCOTT S U, TALCOTT S T, PERCIVAL S S. Low concentrations of quercetin and ellagic acid synergistically influence proliferation, cytotoxicity and apoptosis in MOLT-4 human leukemia cells [J]. *J Nutr*, 2003, 133(8):2669-2674.
- [14] PLOS ONE STAFF. Retraction: Resveratrol and black tea polyphenol combination synergistically suppress mouse skin tumors growth by inhibition of activated MAPKs and p53 [J]. *PLoS One*, 2019, 14(4):e0215980.
- [15] 王婷,张金超,陈瑶,等. 6种淫羊藿黄酮抗氧化和抗肿瘤活性的比较 [J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(8):715-718.
- [16] 蒋参,熊慧生,巫桁棵,等. 金丝桃苷介导 P53/Caspase 通路对人肝癌 HepG<sub>2</sub> 细胞增殖和凋亡的调节作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(12):1832-1836.
- [17] GAO L, WANG X D, NIU Y Y, et al. Molecular targets of Chinese herbs: A clinical study of hepatoma based on network pharmacology [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:24944.
- [18] GUO Q, ZHENG K, FAN D, et al. Wu-Tou decoction in rheumatoid arthritis: Integrating network pharmacology and *in vivo* pharmacological evaluation [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:230.
- [19] MAO Y, HAO J, JIN Z Q, et al. Network pharmacology-based and clinically relevant prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbs in metastatic breast cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(16):27007-27021.
- [20] LU P. Inhibitory effects of hyperoside on lung cancer

- by inducing apoptosis and suppressing inflammatory response via caspase-3 and NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 82: 216-225.
- [21] ZHANG L, ZHAI Y Y, YAO W F, et al. The mechanism study of protecting kidney of Erzhi pill based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin*, 2019, 54: 877-885.
- [22] 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.
- [23] 周凌, 朱吟吟, 许生霞, 等. 超高效液相色谱法测定山楂原料、提取物和相关食品中金丝桃苷和异槲皮苷的含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20): 8156-8162.
- [24] 王鹏, 王玉, 梅菊, 等. 黄蜀葵花中金丝桃苷的提取工艺研究 [J]. *食品与发酵科技*, 2021, 57(3): 76-80, 89.
- [25] 朱前恒, 廖梅香, 丁芸, 等. HPLC同时测定地榆中没食子酸和金丝桃苷的含量 [J]. *广东化工*, 2021, 48(19): 179-180.
- [26] 李静, 贾文江, 曹望弟, 等. 高效液相色谱法同时测定分心木中芦丁、槲皮素、金丝桃苷含量 [J]. *中国药业*, 2021, 30(20): 61-63.
- [27] 阮洪生, 张兆远. HPLC法测定金荞麦药材中表儿茶素、金丝桃苷、槲皮苷的含量 [J]. *人参研究*, 2021, 33(4): 25-28.
- [28] 高健美. 金丝桃苷对 ECV-304 细胞氧化损伤的保护作用及机制研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2007.
- [29] 杨永康, 李静, 饶廷彩, 等. 金丝桃苷通过调节自噬水平减轻心肌梗死小鼠心脏及胸主动脉的损伤 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(6): 601-608.
- [30] 刘佳佳, 张栋旭, 曹建文, 等. 金丝桃苷预处理对脑缺血再灌注损伤小鼠的神经保护作用及机制探讨 [J]. *山东医药*, 2021, 61(20): 15-19.
- [31] 董靖雯, 况泽安, 殷明晓, 等. 金丝桃苷通过下调 PD-L1 表达发挥抗非小细胞肺癌作用研究 [J]. *药学报*, 2021, 56(10): 2817-2824.
- [32] 边宝丰, 张立军, 陈素华, 王丽红, 杨丽. 金丝桃苷经 Namp1/NAD/Sirt1 途径对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、迁移的影响 [J]. *中国药师*, 2021, 24(4): 624-629.
- [33] HOPKINS A L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [34] PARK M, PARK S Y, LEE H J, et al. A systems-level analysis of mechanisms of *Platycodon grandiflorum* based on a network pharmacological approach [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2841.
- [35] BOEZIO B, AUDOUZE K, DUCROT P, et al. Network-based approaches in pharmacology [J]. *Mol Inform*, 2017, 36(10): 10.
- [36] IWAZAWA J, OHUE S, HASHIMOTO N, et al. Clinical utility and limitations of tumor-feeder detection software for liver cancer embolization [J]. *Eur J Radiol*, 2013, 82(10): 1665-1671.
- [37] CHIE W C, BLAZEBYI J M, HSIAO C F, et al. International cross-cultural field validation of an European organization for research and treatment of cancer questionnaire module for patients with primary liver cancer, the European organization for research and treatment of cancer quality-of-life questionnaire HCC18 [J]. *Hepatology*, 2012, 55(4): 1122-1129.
- [38] ZHAO X, JIANG K, LIANG B, et al. Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- $\kappa$ B/p53-apoptosis signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2): 669-675.
- [39] CATALANO M G, FORTUNATI N, ARENA K, et al. Selective up-regulation of tumor necrosis factor receptor I in tumor-bearing rats with cancer-related cachexia [J]. *Int J Oncol*, 2003, 23: 429-436.
- [40] JENG J E, TSAI J F, CHUANG L Y, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  308.2 polymorphism is associated with advanced hepatic fibrosis and higher risk for hepatocellular carcinoma [J]. *Neoplasia* 2007, 9: 987-992.
- [41] HOSHIDA Y, VILLANUEVA A, KOBAYASHI M, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med* 2008, 359: 1995-2004.
- [42] ZHAO X, JIANG K, LIANG B, et al. Anticancer effect of xanthohumol induces growth inhibition and apoptosis of human liver cancer through NF- $\kappa$ B/p53-apoptosis signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(2): 669-675.
- [43] 王忠玲, 唐文哲, 林芳荣. 金丝桃苷对宫颈癌 HeLa 细胞凋亡及抗氧化能力的影响 [J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2019, 22(4): 402-407.
- [44] 徐里, 赵川, 张延武. 金丝桃苷对卵巢癌细胞增殖、凋亡、迁移以及侵袭的影响 [J]. *中成药*, 2018, 40(3): 702-706.
- [45] 刘海雯. 金丝桃苷诱导人胃癌细胞 MKN-45 凋亡及其机制研究 [D]. 锦州: 锦州医科大学, 2018.
- [46] BISHAYEE A. The role of inflammation and liver cancer [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 816: 401-435.
- [47] SUN B, KARIN M. Obesity, inflammation, and liver

- cancer[J]. *J Hepatol*, 2012, 56(3): 704-713.
- [48] RODERBURG C, GAUTHERON J, LUEDDE T. TNF-dependent signaling pathways in liver cancer: promising targets for therapeutic strategies? [J]. *Dig Dis*, 2012, 30(5): 500-507.
- [49] MARENGO A, ROSSO C, BUGIANESI E. Liver cancer: Connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 103-117.
- [50] CARAUSU M, BIDARD F C, CALLENS C, et al. ESR1 mutations: A new biomarker in breast cancer [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19: 599-611.
- [51] ZHAO F, QIN J, LIANG Y, et al. Exploring anti-liver cancer targets and mechanisms of oxyresveratrol: In silico and verified findings [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9939-9948.
- [52] WIESENAUER C A, YIP-SCHNEIDER M T, WANG Y, et al. Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *J Am Coll Surg*, 2004, 198(3): 410-421.
- [53] LENORMAND P, G PAGES, SARDET C, et al. MAP kinases: activation, subcellular localization and role in the control of cell proliferation [J]. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 1993, 28(28): 237.
- [54] 周庆南, 梁增文, 唐望先. 肝细胞癌及癌旁肝组织中 ERK1 的表达及其作用 [J]. *微创医学*, 2003, 22(4): 441-442.
- [55] LIU L, CAO Y, CHEN C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24): 11851-11858.
- [56] LI S, TAN H Y, WANG N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(11): 26087-26124.
- [57] ZHANG Y, DONG H, ZHANG J, et al. Inhibitory effect of hyperoside isolated from *Zanthoxylum bungeanum* leaves on SW620 human colorectal cancer cells via induction of the p53 signaling pathway and apoptosis [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(2): 1125-1132.
- [58] 刘春琳. PTGS2 基因单核苷酸多态性与肝细胞癌临床病理特征及预后关系研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2013.
- [59] BYE H, PRESCOTT NJ, MATEJCIC M, et al. Population-specific genetic associations with oesophageal squamous cell carcinoma in South Africa [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(12): 1855-1861.
- [60] KRISTINSSON J O, VAN WESTERVELD P, TE MORSCHE R H, et al. Cyclooxygenase-2 polymorphisms and the risk of esophageal adenocarcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(28): 3493-3497.

[责任编辑 顾雪竹]