基于网络药理学和实验验证探讨黄芩调控铁死亡逆转肿瘤耐药的作用机制

郑蕾[1,2]，贺超[1]，姜钰婷[1]，任田田[1]，梁珊珊[3*]，何昊[1,2*]

1. 西安医学院 药学院，陕西 西安　710021
2. 陕西省食品药品安全监测重点实验室，陕西 西安 710065
3. 大连大学附属中山医院 辽宁省乳腺及消化肿瘤分子标志物高通量筛选及靶向药物转化重点实验室，辽宁 大连 116001

摘　要：目的　利用网络药理学技术和实验研究方法探究黄芩活性成分调控铁死亡逆转肿瘤耐药的药效物质基础、潜在靶标及作用机制。**方法**　通过中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP），以生物利用度（OB）≥30%且类药性（DL）≥0.18 的条件筛选黄芩活性成分，使用 UniProt 数据库获得黄芩活性成分的对应靶点基因。在 GeneCards、OMIM 数据库中搜集肿瘤耐药的相关靶点。利用 Cytoscape 3.7.0 软件将获得的黄芩活性成分与肿瘤耐药的交集靶点，绘制“活性成分－作用靶点”网络，并借助 CytoHubba 插件获得活性成分度（degree）值排名，并分析关键核心靶点。通过 DAVID 数据库在线分析功能进行基因本体论（GO）功能和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。利用 FerrDb 数据库获取铁死亡过程中的调控基因，将其与黄芩活性成分参与逆转肿瘤耐药性的靶点基因取交集，获得黄芩通过调控铁死亡过程逆转肿瘤多药耐药性的靶点基因。利用 Discovery Studio 软件进行化合物和核心靶点的分子对接。取处于指数生长期的 ZR-75-30 和 HeLa 细胞，加入不同终浓度（12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L）的汉黄芩素培养 48 h，分别计算汉黄芩素联合铁死亡抑制剂（Fer-1 1 μmol/L）、诱导剂（Erastin 20 μmol/L 和 RSL3 8 μmol/L）对肿瘤细胞生长的抑制率，检测汉黄芩素对肿瘤细胞 ROS 活力的影响。采用 Western blotting 法验证肿瘤蛋白 53（TP53）的表达变化情况。**结果**　共筛选出黄芩中包括汉黄芩素、β-谷甾醇、黄芩素、豆甾醇、金合欢素等在内的 32 个活性成分，以及前列腺素内过氧化物合酶 2（PTGS2）、TP53、花生四烯酸-12-脂加氧酶（ALOX12）等在内 15 个作用靶标。通过介导白细胞介素-17（IL-17）、低氧诱导因子-1（HIF-1）、磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）-蛋白激酶 B（Akt）、肿瘤坏死因子（TNF）、C 型凝集素受体、神经营养因子等信号通路调控铁死亡，从而发挥逆转肿瘤多药耐药的作用。细胞增殖实验的结果表明，汉黄芩素表现出抑制肿瘤细胞 ZR-75-30 和 HeLa 细胞增殖的作用。与汉黄芩素组比较，汉黄芩素与 Fer-1 联用后细胞抑制率有所下降；与 Erastin 和 RSL-3 联用后对细胞抑制作用明显增强（P＜0.05、0.01）。与对照组相比，100 μmol/L 汉黄芩素可以显著促进 ZR-75-30 和 HeLa 细胞 ROS 含量以及 HeLa 细胞 TP53 蛋白表达的升高（P＜0.05）。汉黄芩素与 Fer-1 联用时 ROS 含量、TP53 蛋白表达明显下降；与 Erastin 和 RSL-3 联用后 ROS 含量、TP53 蛋白表达明显升高（P＜0.05、0.01）。**结论**　黄芩调控铁死亡逆转肿瘤耐药具有多成分、多靶点、多通路的作用特点，揭示了其药效物质和作用机制。

关键词：黄芩；铁死亡；肿瘤耐药；网络药理学；汉黄芩素；肿瘤蛋白 P53

中图分类号：R966　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1674 - 5515(2023)03 - 0519 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.03.005

Mechanism of *Scutellaria baicalensis* regulating ferroptosis to reverse tumor drug resistance based on network pharmacology and experimental verification

ZHENG Lei[1,2], HE Chao[1], JIANG Yu-ting[1], REN Tian-tian[1], LIANG Shan-shan[3], HE Hao[1,2]

1. School of Pharmacy, Xi’an Medical University, Xi’an 710021, China
2. Shaanxi Provincial Key Laboratory of Food and Drug Safety Monitoring,　Xi’an 710065, China
3. Liaoning Key Laboratory of High Throughput Screening of Molecular Markers for Breast and Digestive Tumors and Targeted Drug Transformation, Affiliated Zhongshan Hospital of Dalian University, Dalian 116001, China

收稿日期：2022-11-25

基金项目：教育部“春晖计划”合作科研项目（14）；陕西省卫生健康科研基金项目（2021E022）；陕西省自然科学基础研究计划面上项目（2021JM-489）；国际合作专项—大连与日本神户合作项目（2022YF19WZ046）；西安医学院校级科研项目（2021DXS57）

作者简介：郑蕾，博士，主要工作为中药药效物质与作用机制研究。E-mail: zhengleixa@163.com

***通信作者：**何昊，教授，博士，主要工作为中药药效物质与作用机制研究。E-mail: hehao313@163.com

梁珊珊，副研究员，博士，主要工作为肿瘤进化与新型抗肿瘤药物的研究。E-mail: liangshanshan@dlu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the pharmacodynamic material basis, potential targets and mechanism of the active ingredients of *Scutellaria baicalensis* regulating iron death to reverse tumor resistance based on network pharmacology and experimental methods. **Methods** To screen the active components of *Scutellaria baicalensis* through TCMSP datebase according to bioavailability (OB) ≥ 30% and medicine-like (DL) ≥ 0.18, and the corresponding target genes of active components of *Scutellaria baicalensis* were obtained by UniProt database. Related targets of drug resistance were collected from GeneCards and OMIM databases. Cytoscape 3.7.0 software was used to determine the intersection targets of the active ingredients of *Scutellaria baicalensis* and tumor resistance, plot the "active ingredients - target" network, and obtain the degree ranking of active ingredients by CytoHubba plugin, and analyze the key core targets. The GO function and the KEGG pathway enrichment were analyzed through the online analysis function of the DAVID database. FerrDb database was used to obtain the regulatory genes in the process of iron death, and their intersection with the target genes of *Scutellaria baicalensis* active ingredients involved in reversing tumor resistance was selected. Finally, the target gene of *Scutellaria baicalensis* was obtained to reverse multidrug resistance by regulating the process of iron death. The Discovery Studio software was used for molecular docking of compounds and core targets. ZR-75-30 and HeLa cells at exponential growth stage were cultured for 48 h with different final concentrations (12.5, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0 μmol/L) of wogonin. The inhibitory rates of wogonin combined with iron death inhibitor (Fer-1 1 μmol/L), inducer (Erastin 20 μmol/L and RSL3 8 μmol/L) on tumor cell growth were calculated, and the effects of wogonin on ROS activity of tumor cells were detected. The expression of tumor protein 53 (TP53) was verified by Western blotting. **Results** A total of 32 active ingredients including wogonin, β-sitosterol, baicalein, stigmasterol, and acacetin were selected from *Scutellaria baicalensis*, and 15 targets including PTGS2, TP53 and ALOX12 were selected. It regulates iron death by mediating IL-17, HIF-1, PI3K-Akt, TNF, C-type lectin receptor, tumor necrosis factor, neurotrophin, and other signaling pathways, thus playing a role in reversing tumor multidrug resistance. The results of cell proliferation experiment showed that wogonin could inhibit the proliferation of ZR-75-30 and HeLa cells. Compared with wogonin group, the cell inhibition rate of wogonin combined with Fer-1 was decreased,and the inhibitory effect of Erastin and RSL-3 on cells was significantly enhanced (P < 0.05, 0.01). Compared with the control group, 100 μmol/L wogonin significantly increased the ROS contents of ZR-75-30 and HeLa cells and the expression of TP53 protein in HeLa cells (P < 0.05). When wogonin was combined with Fer-1, ROS content and TP53 protein expression were decreased significantly. When wogonin was combined with Erastin and RSL-3, ROS content and TP53 protein expression were significantly increased after treatment (P < 0.05, 0.01). **Conclusion** The regulation of *Scutellaria baicalensis* on iron death and reversal of tumor resistance has the characteristics of multi-component, multi-target and multi-pathway action, revealing its pharmacodynamic substances and mechanism of action.

Key words: *Scutellaria baicalensis*; ferroptosis; tumor resistance; network pharmacology; wogonin; TP53

耐药性是肿瘤细胞在化疗药物作用过程中产生耐受的现象[1]，化疗耐药是限制化疗有效性的重要因素，越来越多的研究关注逆转化疗耐药的新途径——铁死亡[2]。铁死亡参与多种生化过程，包括氨基酸、铁和多聚不饱和脂肪酸的代谢等[3-6]。铁死亡与肿瘤等多种疾病密切相关，为临床治疗提供了新的思路和方法[7-11]。凋亡抵抗可引发肿瘤耐药，而铁死亡被证明涉及非凋亡途径，在本质上区别于细胞凋亡，故不受凋亡抵抗性机制影响，可以克服肿瘤细胞的多药耐药性。

中医药资源丰富，治疗遵循着整体观的思想，每味中药都含有多种活性成分和作用功效[12-13]，药效物质作用机制不清晰是中医药国际化的重大阻碍[14]。随着生物信息学的不断发展，2002 年中国科学家李梢就提出，中药可能通过发挥“微效多效”来调控复杂的疾病相关基因网络，最终产生“新兴”效应，提出了基于网络的中药方剂研究框架[15]。网络药理学从系统的角度衡量药物的调控作用，其整体性以及注重药物－疾病－靶点相互作用关系的特点与未来中药的发展趋势相吻合。

黄芩为唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根，据《中国药典》2020 年版记载其具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等多种生物活性[16]，但黄芩调控铁死亡逆转肿瘤多药耐药性的机制还尚不明确。本研究运用网络药理学方法，结合分子对接，初步探讨黄芩活性成分调控铁死亡逆转肿瘤耐药可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 黄芩活性成分筛选及靶点基因提取

通过中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP，https://tcmspw.com/tcmsp. php），筛选出黄芩的有效成分。参考经典的药物筛选研究方法，设定口服生物利用度（OB）≥30%且类药性（DL）≥0.18，筛选符合条件的黄芩活性成分。继续使用该

数据库查询所得活性成分对应的靶点。使用 UniProt 数据库（http://www.uniprot.org）检索上述靶点对应的人类基因官方简称，删除重复项，即得黄芩活性成分的对应靶点基因。

1.2　肿瘤耐药疾病靶点基因的筛选

在 GeneCards（https://www.genecards. org/）、OMIM（https://omim.org/）数据库中输入关键词“multidrug resistance of tumor”进行检索，搜集肿瘤耐药的相关靶点，去重后，即得疾病靶点基因。利用韦恩（Venn）图在线工具绘图，获得黄芩活性成分与肿瘤耐药的交集靶点，得到的交集靶点即为黄芩活性成分逆转肿瘤耐药的潜在作用靶点。

1.3　黄芩“药物－活性成分－靶标”网络图的构建

在 Excel 表格中建立黄芩各活性成分与预测靶点的对应关系，利用 Cytoscape 3.7.0 软件，绘制黄芩“药物－活性成分－靶标”网络图，并借助 CytoHubba 插件获得活性成分度（degree）值排名。

1.4　蛋白靶点相互作用（PPI）网络的构建和关键核心靶点的筛选

将所得交集靶点用 STRING 平台（https://string db.org）构建 PPI 网络模型，设定 Organism 选项为“homo sapiens”，其他参数设为默认值，构建 PPI 网络。用 Cytoscape 3.7.0，借助 CytoHubba 插件，采用 degree 拓扑算法，分析关键核心靶点，构建黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药性的靶点核心子网络图。

1.5　基因本体论（GO）功能和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析

通过 DAVID 数据库（https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp）在线分析功能，对获得的交集靶点数据进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。按 *P* 值及校正后的 *P* 值均＜0.01 的标准进行筛选，按校正后的 *P* 值由小到大排序，分别选取 GO 分析前 15 位、KEGG 分析前 15 位的结果进行绘图。使用 R 语言调用 GOplot2 包，通过 R studio 对富集分析的结果进行可视化绘图。

1.6　铁死亡调控基因获取及其与黄芩活性成分参与调控肿瘤多药耐药的靶基因进行综合分析

FerrDb 数据库（http://www.zhounan.org/ferrdb/）是 1 个关于铁死亡及其与疾病联系的标记基因和调控因子的数据库。利用这个数据库，获取检索到铁死亡过程中的标记基因、驱动基因和抑制基因，并将它们导出到 Excel 表中进行汇总整理。再将整理好的铁死亡调控基因和上述黄芩活性成分参与逆转肿瘤耐药性的靶点基因分别输入到 Venn 在线分析工具提取其交集靶点信息，即为黄芩通过调控铁死亡过程逆转肿瘤多药耐药性的靶点基因。使用 DAVID 数据库对得到的三者间的交集基因进行 KEGG 信号通路分析，导出结果至 Excel 表格绘制柱状图，并用 STRING 数据库构建 PPI 网络。

1.7　分子对接验证

为进一步验证活性成分与基因靶点之间的结合活性，利用分子对接模拟软件 Discovery Studio 对关键药效成分与核心靶点进行受体－配体对接模拟计算。对活性成分－疾病－靶点网络中的核心靶点进行分子对接，预测黄芩主要活性成分干预关键靶点。在 PubChem（https://pubchem. ncbi.nlm.nih.gov/）中得到相关成分的 2D 结构，在 PDB（https://www.rcsb.org/）数据库下载靶点的蛋白结构，之后将活性成分和靶点进行预处理（去除水分子、小分子配体并对蛋白受体加氢），用 Discovery Studio 软件进行化合物和核心靶点的分子对接。

1.8　体外实验验证

1.8.1　细胞、试剂及仪器　人乳腺癌 ZR-75-30、人宫颈癌 HeLa 细胞系均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库，在含 10%胎牛血清的培养基（含 100 U/mL 青霉素和链霉素）中，放置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中进行培养，每隔 2～3 d 传代 1 次。

MTT、DMSO 购于 Sigma 公司；胎牛血清、DMEM 和 RPMI 1640 培养基购于 HyClone 公司，Erastin、RSL3、Fer-1（货号 HY-15763、HY-100218A、HY-100579）购于 MCE 公司；活性氧（ROS，货号 BC5165）活性检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司；RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒购于陕西先锋生物科技有限公司；TP53 抗体（货号 sc-126）购于 SANTA CRUZ 公司，甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH，货号 10004129）购于 Proteintech 公司，二抗购于 Jackson Immuno Research Laboratories，HTRF®试剂盒购于 Cisbio 公司。汉黄芩素（质量分数≥98%，批号 yz161127，南京源植生物科技公司）。

CO_2 恒温培养箱（日本 SANYO 公司）；倒置显微镜（日本 Nikon 公司）；超净工作台（苏州安泰空气技术有限公司）；微量移液器（德国 Eppendorf 公司）；酶联免疫检测仪（美国 Bio-Rad 公司）；多标记微孔板酶标仪（美国 PErkin-Elmer 公司）；6 孔培养板、96 孔培养板（美国 Costar 公司）。

1.8.2 汉黄芩素对肿瘤增殖的影响 取处于指数生长期的 ZR-75-30 和 HeLa 细胞，消化、计数，以 4×10^4/mL 接种到 96 孔培养板中。待细胞贴壁后，加入不同终浓度（12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 μmol/L）的汉黄芩素及在此基础上分别设 Fer-1（1 μmol/L）组、Erastin（20 μmol/L）组、RSL-3（8 μmol/L）组及不加药的对照组，分别作用 48 h 后终止培养，每孔加入 20 μL MTT，37 ℃避光孵育 4 h，弃去，加入 150 μL DMSO，震荡 15 min，使结晶物充分溶解，在酶标仪 490 nm 波长下测定细胞吸光度（A）值，并分别计算各组肿瘤细胞生长的抑制率。

细胞增殖抑制率＝1－（$A_{实验}/A_{对照}$）

1.8.3 汉黄芩素对肿瘤细胞 ROS 活力的影响 取处于指数生长期的 ZR-75-30 和 HeLa 细胞，以 1×10^5/mL 接种于 6 孔培养板，加入 100 μmol/L 汉黄芩素，以及汉黄芩素（100 μmol/L）分别和 Fer-1（1 μmol/L）、Erastin（20 μmol/L）、RSL-3（8 μmol/L）作用 48 h，另设不加药的对照组。细胞营养液 3 000 r/min，4 ℃离心 10 min 取上清，按试剂盒操作步骤进行。

1.8.4 蛋白表达检测实验 取处于指数生长期的 ZR-75-30 和 HeLa 细胞，以 1×10^5/mL 接种于 6 孔培养板，加入 100 μmol/L 汉黄芩素，以及汉黄芩素（100 μmol/L）分别和 Fer-1（1 μmol/L）、Erastin（20 μmol/L）、RSL-3（8 μmol/L）作用 48 h，另设对照组，收集细胞并裂解，测定各样本蛋白浓度。按比例与上样缓冲液混匀，煮沸 5 min。制胶，行 10% 丙烯酰胺凝胶电泳，切胶、转膜、封闭、抗体孵育、显影，以 GAPDH 为内参，拍照并分析各条带 A 值。

1.8.5 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计学软件处理，实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，组间均数的比较采用 t 检验，组间两两比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 活性成分的筛选和获取

共得到 36 种黄芩活性成分，筛去无对应靶点的成分，最终得到 32 种黄芩活性成分，见表 1。

表 1 黄芩活性化合物信息

Table 1 Information of active components of *Scutellaria baicalensis*

编号	Mol ID	成分名称	中文名称	相对分子质量	OB/%	DL
HQ-01	MOL001689	acacetin	金合欢素	284.28	34.97	0.24
HQ-02	MOL000173	wogonin	汉黄芩素	284.28	30.68	0.23
HQ-03	MOL000228	(2*R*)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	山姜素	270.30	55.23	0.20
HQ-04	MOL002714	baicalein	黄芩素	270.25	33.52	0.21
HQ-05	MOL002909	5,7,2,5-tetrahydroxy-8,6-dimethoxyflavone	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮	376.34	33.82	0.45
HQ-06	MOL002910	carthamidin	红花素	288.27	41.15	0.24
HQ-07	MOL002913	dihydrobaicalin_qt	二氢黄芩苷_qt	272.27	40.04	0.21
HQ-08	MOL002914	eriodyctiol(flavanone)	圣草酚（黄烷酮）	288.27	41.35	0.24
HQ-09	MOL002915	salvigenin	丹参素	328.34	49.07	0.33
HQ-10	MOL002917	5,2',6'-trihydroxy-7,8-dimethoxyflavone	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮	330.31	45.05	0.33
HQ-11	MOL002925	5,7,2',6'-tetrahydroxyflavone	5,7,2',6'-四羟黄酮	286.25	37.01	0.24
HQ-12	MOL002927	skullcapflavone II	头骨黄酮 II	374.37	69.51	0.44
HQ-13	MOL002928	oroxylin a	千层纸素 A	284.28	41.37	0.23
HQ-14	MOL002932	panicolin	潘尼柯林	314.31	76.26	0.29
HQ-15	MOL002933	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮	300.28	36.56	0.27
HQ-16	MOL002934	NEOBAICALEIN	黄芩新素	374.37	104.34	0.44
HQ-17	MOL002937	DIHYDROOROXYLIN	二氢木蝴蝶素 A	286.30	66.06	0.23
HQ-18	MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	414.79	36.91	0.75
HQ-19	MOL000359	sitosterol	谷甾醇	414.79	36.91	0.75
HQ-20	MOL000525	norwogonin	去甲汉黄芩素	270.25	39.40	0.21
HQ-21	MOL000552	5,2'-dihydroxy-6,7,8-trimethoxyflavone	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮	344.34	31.71	0.35
HQ-22	MOL000073	ent-epicatechin	表儿茶素	290.29	48.96	0.24
HQ-23	MOL000449	stigmasterol	豆甾醇	412.77	43.83	0.76
HQ-24	MOL001458	coptisine	黄连碱	320.34	30.67	0.86
HQ-25	MOL001490	bis[(2*S*)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	双[(2*S*)-2-乙基己基]苯-1,2-二羧酸酯	390.62	43.59	0.35
HQ-26	MOL002879	diop	迪奥普	390.62	43.59	0.39

续表 1

编号	Mol ID	成分名称	中文名称	相对分子质量	OB/%	DL
HQ-27	MOL002897	epiberberine	表小檗碱	336.39	43.09	0.78
HQ-28	MOL008206	moslosooflavone	莫洛索黄酮	298.31	44.09	0.25
HQ-29	MOL010415	11,13-eicosadienoic acid, methyl ester	11,13-二十碳二烯酸甲酯	322.59	39.28	0.23
HQ-30	MOL012245	5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮	302.30	36.63	0.27
HQ-31	MOL012246	5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮	302.30	74.24	0.26
HQ-32	MOL012266	rivularin	黄芩黄酮	344.34	37.94	0.37

2.2　黄芩活性成分靶点与肿瘤多药耐药性靶点交集分析

通过 TCMSP 数据库，分别获得 32 种黄芩活性成分所对应人类的相关靶点蛋白名称。通过 UniPort 数据库将靶点蛋白校正为对应的人源物种靶标基因，去除无效的基因结果后有 500 个数据，再筛除重复的基因靶点后，最终得到 117 个黄芩活性成分的作用靶点；通过 GeneCards、OMIM 数据库检索到肿瘤多药耐药性相关靶点基因有 1 825 个。对二者取交集后，获得黄芩活性成分靶点与肿瘤耐药交集靶点基因 61 个，见图 1。

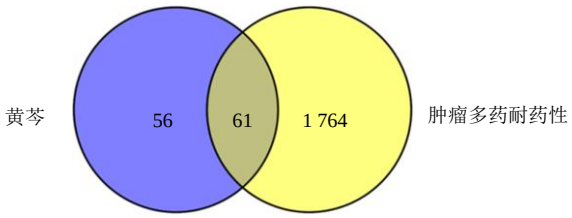


图 1　黄芩活性成分与肿瘤多药耐药性的共同靶标

Fig. 1　Active components of *Scutellaria baicalensis* and common targets of tumor multidrug resistance

2.3　活性成分－作用靶点网络的构建

运用 Cytoscape 3.7.0 软件构建出黄芩“药物－活性成分－靶标”网络图，见图 2。该网络中共有 150 个节点，自由度最大为 45，最小为 1，平均自由度为 7.093。大于平均自由度的主要活性成分有汉黄芩素、β-谷甾醇、黄芩素、豆甾醇、金合欢素等。同时在该网络中，汉黄芩素连接的边线最多，对应的靶点最多，相关联较多，在此网络中处于重要地位，可能提示汉黄芩素或许可以成为黄芩活性成分发挥逆转肿瘤耐药的关键成分。

2.4　构建黄芩活性成分逆转肿瘤耐药性的潜在作用靶标 PPI 网络

利用 STRING 数据库平台选择人源物种，获得靶标相互作用关系，其余参数设定为系统默认，并隐藏断开节点的靶点，绘制出 PPI 网络图，见图 3。PPI 网络图中共包含 61 个节点，代表了所有的预测靶点；646 条边线，代表了靶点之间的相互联系。

将 PPI 信息导入至 Cytoscape 软件，使用 Cytohubba 插件，寻找 Hub 基因。通过 degree 拓扑算法筛选排名前 10 位的关键靶点，见表 2。同时使用 Cytohubba 插件按照默认设置提取 PPI 网络中的核心子网络，见图 4。其中蛋白激酶 B1（Akt1）具有最高的 degree 值，能与 50 个靶点蛋白发生相互

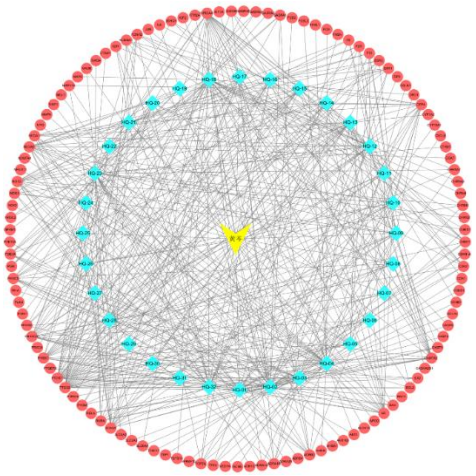


图 2　黄芩“药物－活性成分－靶标”网络图

Fig. 2　Network diagram of “drug-active ingredient-target” in *Scutellaria baicalensis*

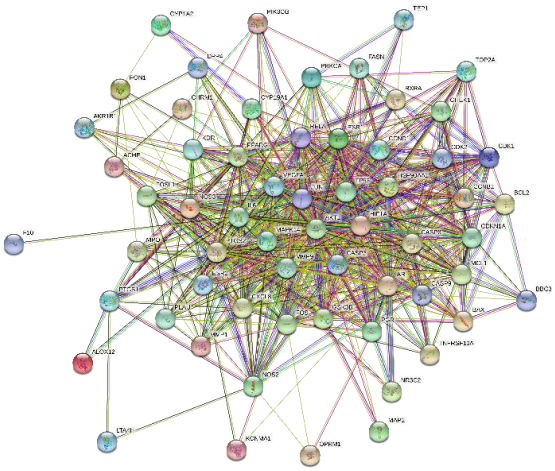


图 3　黄芩活性成分逆转肿瘤耐药潜在作用靶点 PPI 网络

Fig. 3　PPI network map of potential targets of *Scutellaria baicalensis* in reversing tumor drug resistance

表 2 核心靶点

Table 2 Core target results

基因	drgree	EPC
AKT1	50	16.964
TP53	47	17.133
IL-6	44	16.148
CASP3	43	16.771
JUN	41	16.528
VEGFA	41	15.979
PTGS2	40	16.668
CCND1	39	16.282
HSP90AA1	38	15.892
ESR1	37	16.366

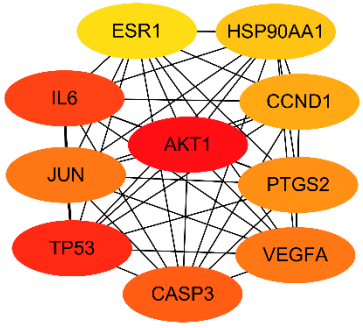


图 4 黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药性靶点核心子网络

Fig. 4 Active components in *Scutellaria baicalensis* reverse the core sub-network of tumor multi-drug resistance targets

作用关系；其次为肿瘤蛋白 p53（TP53）、半胱氨酸蛋白水解酶 3（CASP3）、白细胞介素（IL）-6、转录因子 AP-1（JUN）、血管内皮生长因子 A（VEGFA）、前列腺素内过氧化物合酶 2（PTGS2）、细胞周期蛋白 D1（CCND1）、热休克蛋白 90α 家族 A 类成员 1（HSP90AA1）、雌激素受体 1（ESR1），提示这些节点在整个网络中可能起着关键作用，是黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药性的关键靶点。核心子网络中的网络联系预示着在黄芩有效活性成分逆转肿瘤耐药机制中发挥着重要作用。

2.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果

利用 DAVID 数据库，对黄芩活性成分和肿瘤耐药交集靶标进行 GO 富集，设置 $P<0.01$ 进行筛选。将整理得到的数据上传到 R 语言数据库，对 GO 功能富集分析数据可视化作图，见图 5。GO 富集分析共获得生物过程（BP）1 209 个，细胞组分（CC）24 个，分子功能（MF）85 个，依据 *P* 值大小，分别列举每个模块前 15 的条目。由 GO 分析结果可知，这些基因 BP 主要涉及辐射应答、对脂多糖的反应、对细菌来源分子的反应、对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、对类固醇激素的反应、生殖系统发育、对光刺激的反应、老化、对金属离子的反应、细胞对非生物刺激的反应；CC 主要涉及细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、膜筏、膜微区、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、转录调节复合物、细胞器外膜、RNA 聚合酶 II 转录调节复合物；MF 主要涉及核受体活性、配体激活的转录因子活性、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、类固醇激素受体活性、转录共激活因子结合、泛素样蛋白连接酶结合、组蛋白激酶活性、四吡咯结合。表明黄芩可能通过这些过程逆转肿瘤耐药。

通过 KEGG 通路富集分析，共富集到 115 条通路（$P<0.01$）。将整理得到的数据上传到 R 语言数据库，对前 15 条 KEGG 信号通路富集分析结果进行可视化处理，见图 5，主要涉及磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）-蛋白激酶 B（Akt）信号通路、脂质和动脉粥样硬化、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染、乙型肝炎、人类巨细胞病毒感染、麻疹、化学致癌-受体激活、p53 信号通路、白介素-17 信号通路、爱泼斯坦-巴尔病毒感染、人类免疫缺陷病毒 1 感染、沙门氏菌感染、小细胞肺癌、前列腺癌、细胞凋亡、蛋白聚糖在癌症中的作用，还涉及松弛素信号通路、雌激素信号通路、低氧诱导因子-1（HIF-1）信号通路、肿瘤坏死因子（TNF）信号通路、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、甲状腺激素信号通路、血管内皮生长因子（VEGF）信号通路、神经营养因子信号通路等信号通路。KEGG 通路富集分析结果显示黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药与癌症、细胞凋亡、炎症、转录、激素调节、细胞周期、免疫等过程密切相关，提示了黄芩活性成分可能通过控制多种复杂生物途径来发挥对肿瘤多药耐药的逆转。

2.6 铁死亡调控基因的获取及其与黄芩活性成分抗肿瘤多药耐药性的靶基因进行综合分析

在 FerrDb 数据库中共获得铁死亡过程驱动基因 319 个，抑制因子 283 个，标记基因 11 个，汇总之后除去重复基因，最终得到 410 个与铁死亡过程相关的基因。将得到的 410 个铁死亡过程调控基因与上述黄芩活性成分与肿瘤多药耐药的 61 个交集靶点基因进行 Venn 分析，取交集，共得到 15 个基因既是黄芩活性成分的作用靶点又是逆转肿瘤多药耐药的治疗靶点，同时是铁死亡过程调控基因，见图 6，即为黄芩通过调控铁死亡过程逆转肿瘤多

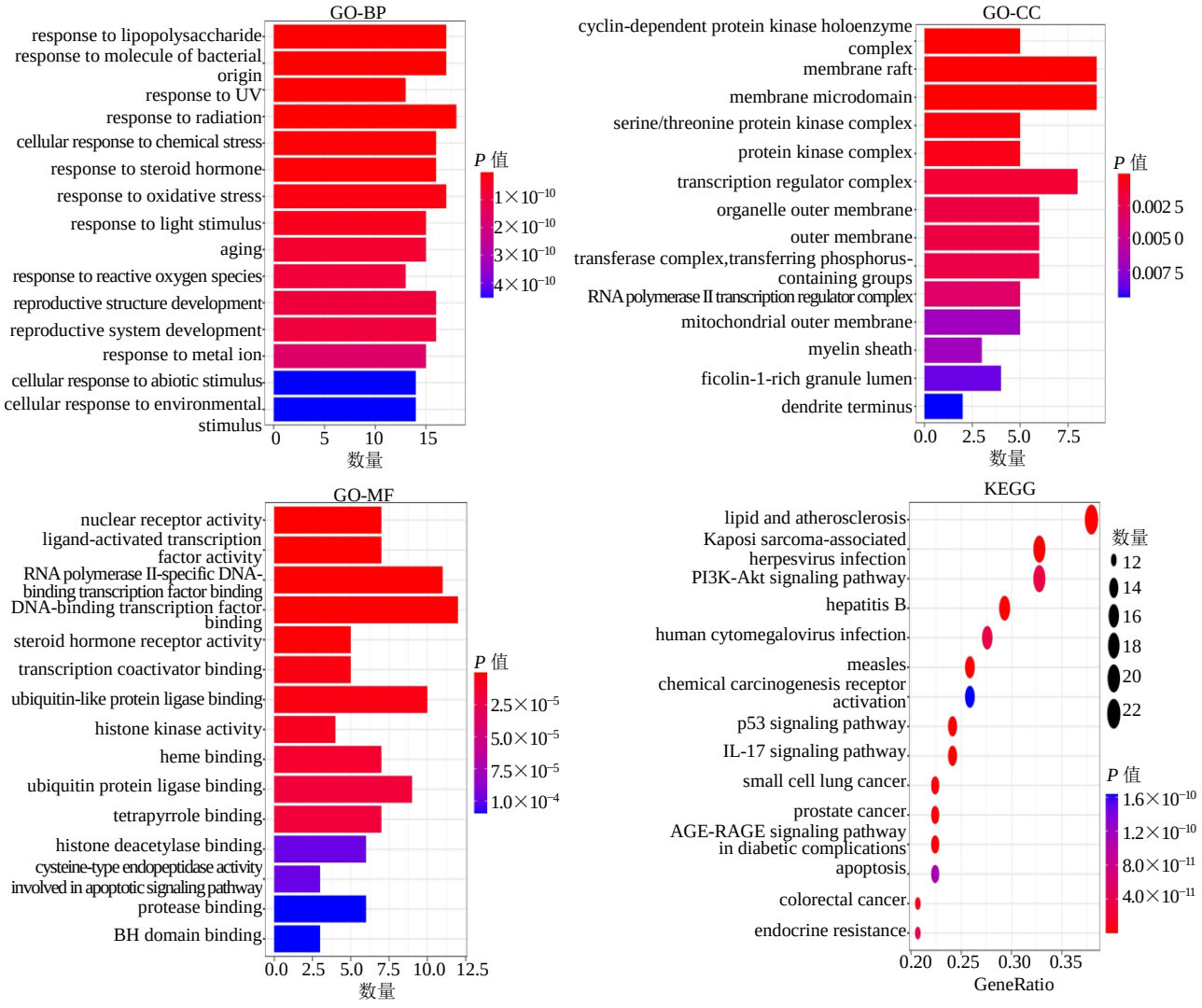


图 5　GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析

Fig. 5　GO analysis and KEGG pathway analysis

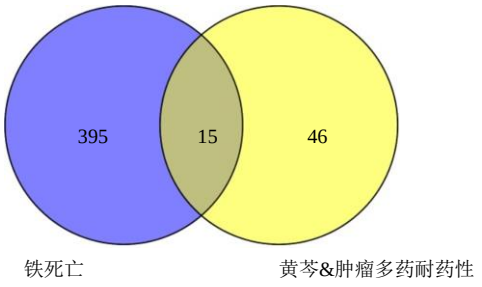


图 6　黄芩通过调控铁死亡过程逆转肿瘤多药耐药的作用靶点

Fig. 6　Targets reverses tumor multidrug resistance from *Scutellaria baicalensis* by regulating ferroptosis

药耐药的作用靶点。分别为 PTGS2、TP53、花生四烯酸-12-脂加氧酶（ALOX12）、二肽基肽酶 4（DPP4）、MAPK14、HIF-1A、IL-6、糖原合成酶激酶-3β（GSK3B）、蛋白激酶 Cα（PRKCA）、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ（PPARG）、周期素依赖性激酶抑制因子 1A（CDKN1A）、转录因子 AP-1（JUN）、一氧化氮合酶 2（NOS2）、v-rel 网状内皮细胞过多症病毒癌基因同源物 A（RELA）、AR。对这 15 个基因进行 KEGG 通路分析，筛选条件设为 $P<0.01$，将得到的富集分析结果进行整理，共富集到 181 条通路，对前 15 条 KEGG 信号通路富集分析结果进行可视化处理得到图 7 所示信号通路。

对上述 15 个基因绘制 PPI 网络图（图 8），其中有 15 个节点，1 个节点就代表了 1 个基因，74 条边线。从图中结果显示，这 15 个基因之间不需要其它基因参与即可相互作用，并且联系紧密。结合前面的分析结果，推测黄芩活性成分可以通过靶向 *PTGS2*、*TP53*、*ALOX12*、*DPP4*、*MAPK14*、*HIF-1A*、

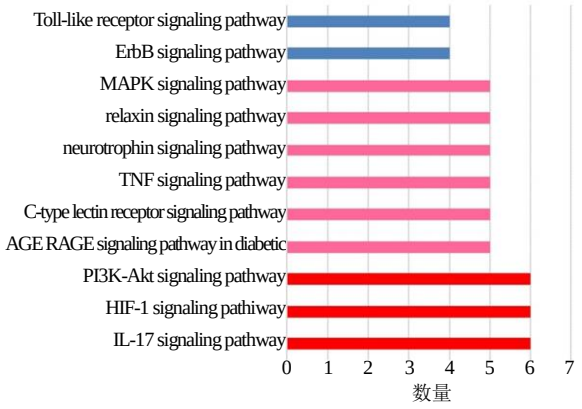


图 7 黄芩调控铁死亡过程逆转肿瘤多药耐药的信号通路

Fig. 7 Signaling pathway of tumor multidrug resistance reverses from *Scutellaria baicalensis* by regulating ferroptosis

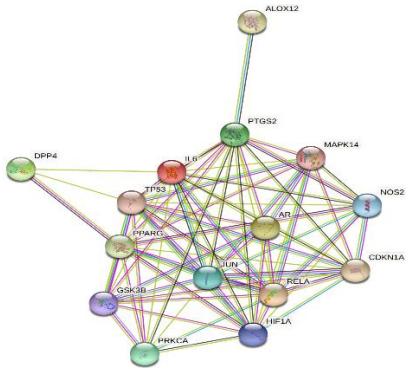


图 8 黄芩活性成分调控铁死亡逆转肿瘤多药耐药靶点间的 PPI 网络图

Fig. 8 PPI network among targets of multidrug resistance in tumor reversed by active components of *Scutellaria baicalensis* by regulating ferroptosis

IL-6、*GSK3B*、*PRKCA*、*PPARG*、*CDKN1A*、*JUN*、*NOS2*、*RELA*、*AR* 这些基因进而介导 IL-17、*HIF-1*、磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）-蛋白激酶 B（Akt）、TNF、C 型凝集素受体、神经营养因子、松弛素、MAPK、Toll 样受体等信号通路调控铁死亡途径，从而逆转肿瘤多药耐药的发生和进展。

2.7 分子对接验证结果

选取核心基因靶点靠前的 TP53、JUN 的靶蛋白与其对应的药物活性分子进行分子对接，选取得分最高的组构建 2D 的相互作用关系图，相互作用关系见图 9。采取刚性对接，利用 Discovery Studio 软件进行阳性药验证，结果见表 3、4。分子对接结果显示黄芩活性成分与核心靶点结合性能较好，验证了关键节点在黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药中的重要性，同时反映了该网络预测的可靠性。

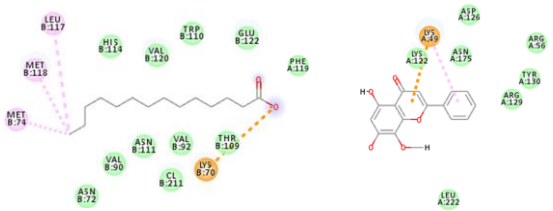


图 9 分子对接作用图

Fig. 9 Molecular docking

表 3 黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药核心靶蛋白与化合物结合活性得分

Table 3 Activity scores of active components from *Scutellaria baicalensis* reverse tumor multidrug resistance core target protein and compound binding

靶点	有效成分	得分
TP53	金合欢素	86.277 4
	汉黄芩素	80.288 3
	黄芩素	94.373 4
JUN	汉黄芩素	43.259 8
	β-谷甾醇	42.015 3

表 4 黄芩活性成分逆转肿瘤多药耐药核心靶点与化合物、阳性药结合活性得分比较

Table 4 Activity scores of comparison of the active components of *Scutellaria baicalensis* in reversing tumor multidrug resistance core target, compound and positive drug binding

靶点	化合物	得分	阳性药	得分
TP53	汉黄芩素	80.288 3	氟尿嘧啶	89.6915
JUN	β-谷甾醇	42.015 3	长春花碱	42.0014

2.8 汉黄芩素对肿瘤细胞增殖的影响

细胞增殖实验的结果表明，汉黄芩素可以表现出抑制肿瘤细胞 ZR-75-30 和 HeLa 细胞增殖的作用。如表 5、6 所示，Fer-1 有抑制铁死亡的作用，与汉黄芩素联用后细胞增殖抑制率较汉黄芩素组有所下降；Erastin 和 RSL-3 有促进铁死亡的作用，与汉黄芩素联用后对细胞增殖抑制作用明显增强（P＜0.05、0.01）。

2.9 汉黄芩素对肿瘤细胞 ROS 活力的影响

铁死亡发生时，表现为脂质过氧化增高，ROS 升高。如表 7 所示，与对照组相比，100 μmol/L 汉黄芩素可以显著促进 ZR-75-30 和 HeLa 细胞 ROS 含量升高（P＜0.05）。Fer-1 与 100 μmol/L 汉黄芩素联用时 ROS 含量明显下降；Erastin 和 RSL-3 与 100 μmol/L 汉黄芩素联用后，ROS 含量均明显升高（P＜0.05、0.01）。图 10 将 SOD 酶活力值以对照组 100%进行计算，可以更加直观的观察到上述变化。

表 5　汉黄芩素与铁死亡调控因子联用对 HeLa 细胞生长的抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 5　Inhibition rate of HeLa cell growth by wogonin combined with ferroptosis regulators ($\bar{x}\pm s, n=6$)

汉黄芩素浓度/(μmol·L^{-1})	HeLa 细胞增殖抑制率/%			
	汉黄芩素	汉黄芩素＋1 μmol·L^{-1} Fer	汉黄芩素＋20 μmol·L^{-1} Erastin	汉黄芩素＋8 μmol·L^{-1} RSL-3
0.0	—	−0.81±3.85	−0.90±7.08	28.25±4.53*
12.5	3.44±1.69	2.98±2.04	4.05±6.03	32.59±4.57*
25.0	8.98±1.22	5.61±7.99	10.69±6.51	36.64±4.55*
50.0	9.14±4.13	6.97±5.47	14.66±6.41	78.39±6.13**
100.0	12.52±1.05	9.06±8.43	31.41±7.13*	84.28±1.08**
200.0	21.06±2.02	10.56±6.92	50.96±5.37**	86.64±0.98**

与汉黄芩素组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* wogonin group

表 6　汉黄芩素与铁死亡调控因子联用对 ZR-75-30 细胞生长抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 6　Inhibition rate of ZA-75-30 cell growth by wogonin combined with ferroptosis regulators ($\bar{x}\pm s, n=6$)

汉黄芩素浓度/(μmol·L^{-1})	ZR-75-30 细胞增殖抑制率/%			
	汉黄芩素	汉黄芩素 1 μmol·L^{-1} Fer	汉黄芩素＋20 μmol·L^{-1} Erastin	汉黄芩素＋8 μmol·L^{-1} RSL-3
0.0	—	−1.97±5.37	3.23±5.11	8.71±4.39
12.5	5.87±5.88	4.00±6.65	8.51±7.77	11.00±8.51
25.0	8.88±0.56	5.64±5.72	13.75±6.83	12.99±3.15
50.0	12.72±3.82	8.30±3.14	14.80±5.67	45.63±7.05**
100.0	14.47±2.59	12.77±2.43	17.97±3.93	54.54±7.99**
200.0	19.31±3.87	15.23±5.37	40.09±2.74**	88.77±1.84**

与汉黄芩素组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* wogonin group

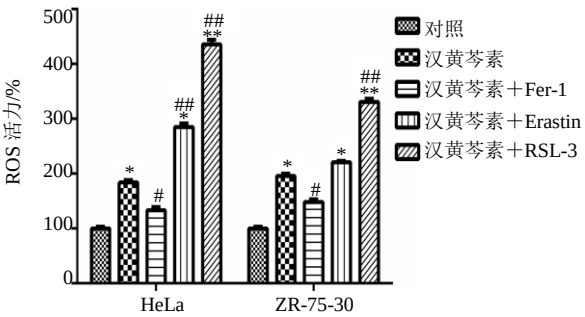
表 7　汉黄芩素与铁死亡调控因子联用对 ROS 活力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 7　Effect of wogonin combined with ferroptosis regulators on contents of ROS ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(μmol·L^{-1})	ROS 活力/U	
		HeLa	ZR-75-30
对照	—	14.98±0.53	16.16±0.53
汉黄芩素	100	27.56±0.63*	31.65±0.67*
汉黄芩素＋Fer-1	100＋1	19.96±0.88	23.98±0.86
汉黄芩素＋Erastin	100＋20	42.73±0.92*	35.66±0.37*
汉黄芩素＋RSL-3	100＋8	65.35±1.18**	53.49±0.89**

与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* control group



与对照组比较：$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$；与汉黄芩素组比较：$^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$

$^{*}P<0.05$　$^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$　$^{\#\#}P<0.01$ *vs* wogonin group

图 10　汉黄芩素与铁死亡调控因子联用对 ROS 活力的影响（以对照组为 100%）

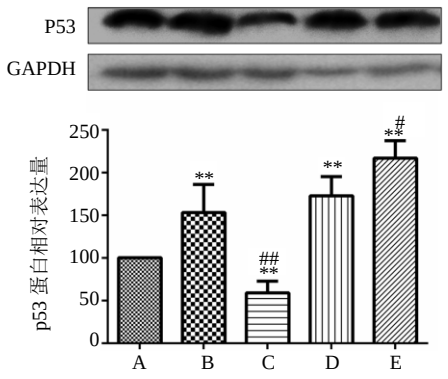
Fig. 10　Effect of wogonin combined with ferroptosis regulators on contents of ROS (control group as 100%)

2.10　汉黄芩素对 p53 蛋白水平的影响

在分子对接实验结果中，汉黄芩素与 p53 靶点的结合作用明确，因此本研究以 HeLa 细胞为模型，给予汉黄芩素和铁死亡相关因子 Fer-1、Erastin 和 RSL-3 后，经 Western blotting 实验验证 p53 蛋白表达变化情况。如图 11 所示，与对照组相比，100 μmol/L 汉黄芩素可以显著促进 HeLa 细胞 p53 蛋白水平升高（$P<0.01$）。Fer-1 与 100 μmol/L 汉黄芩素联用 p53 水平显著下降；Erastin 和 RSL-3 与 100 μmol/L 汉黄芩素联用后，TP53 水平明显升高（$P<0.01$）。

3　讨论

本研究通过 OB 和 DL 筛选出了黄芩活性成分的作用靶点，共得到 32 个黄芩有效活性成分所对应的靶标，并与肿瘤多药耐药相关靶点取交集，最终筛选出黄芩抗肿瘤耐药的“活性成分－靶点－疾病”网络，对网络中的核心靶点进行生物过程和信号通路分析。这些药物靶点的预测揭示了黄芩药物



A-对照 B-汉黄芩素 C-汉黄芩素＋Fer-1 D-汉黄芩素＋Erastin E-汉黄芩素＋RSL-3

与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$；与汉黄芩素组比较：$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$

A-control B-wogonin C-wogonin＋Fer-1 D-wogonin＋Erastin E-wogonin＋RSL-3

$^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ *vs* control group; $^{\#}P < 0.05$ $^{\#\#}P < 0.01$ *vs* wogonin group

图 11 汉黄芩素与铁死亡调控因子联用对 HeLa 细胞 p53 蛋白水平的影响（以对照组为 100%）

Fig. 11 Effect of wogonin combined with ferroptosis regulators on protein expression of p53 (control as 100%)

分子作用机制，对促进黄芩相关药物研发具有重要意义。本研究结果表明，黄芩逆转肿瘤耐药的重要活性成分有汉黄芩素、黄芩素、β-谷甾醇、金合欢素，并得到以 AKT1、NOS2、PTGS1、AR、PTGS2、DPP4 等为核心的 61 个黄芩逆转肿瘤多药耐药的作用靶标和 PI3K-Akt、TP53、HIF-1、MAPK、TNF、IL-17 等信号通路。对铁死亡调控基因进行筛选并与黄芩逆转肿瘤耐药的 61 个交集靶标进行综合分析，得到 PTGS2、TP53、ALOX12、DPP4、MAPK14、HIF-1A、IL6、GSK3B、PRKCA、PPARG、CDKN1A、JUN、NOS2、RELA、AR 共 15 个靶点，推测黄芩活性成分可能通过这些靶点进而介导 IL-17、HIF-1、PI3K-Akt、TNF、神经营养因子、MAPK、Toll 样受体等信号通路调控铁死亡，并在逆转肿瘤耐药中起作用。同时分子对接结果显示黄芩活性成分与核心靶点的结合性能较好，表明了对该网络信号传导机制的预测具有可靠性。最后通过细胞增殖、ROS 活力以及 Western blotting 实验进行验证。

克服肿瘤细胞多药耐药，提高抗癌药物疗效已成为肿瘤治疗中迫切解决的关键性课题。有研究发现，铁死亡可以改善化疗耐药。已报道的黄酮类化合物具有抗氧化、抗菌、抗炎、抗肿瘤的药理活性。在天然存在的化学成分中，黄酮类成分是迄今发现数量最多的具备肿瘤耐药逆转活性的然产物[17]。试验表明，黄芩中主要活性成分就是黄酮类化合物，如黄芩素、汉黄芩素和姜黄素等[18]。黄芩素具有抗肿瘤作用，姜黄素不仅可以维持肠道菌群的多样性，还具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。而黄芩素能抑制 P-gp 表达，近年研究也表明，黄芩单体联合化疗药治疗肿瘤有较好的防治效果[19-20]，而其活性成分黄芩素能增加谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）、降低转铁蛋白受体 1（TFR1）的表达来保护黑素细胞并且黄芩素通过与铁离子相互作用的方式来显著降低 ROS 水平[21]。而 GPX4 是触发铁死亡的关键调节因子，铁依赖的脂质过氧化反应是铁死亡的关键步骤[22]；ROS 失衡能引发铁死亡的发生；任何造成细胞内 ROS 累积和谷胱甘肽耗竭的相关代谢通路均可调控铁死亡，如铁代谢、谷胱甘肽代谢、脂质过氧化反应等[23]。这些均揭示了黄芩能调控铁死亡进而逆转肿瘤耐药。

近年来，多种基因和其编码蛋白被鉴定出可以调控铁死亡的进程，铁死亡是铁依赖的细胞内脂质 ROS 积累造成的细胞氧化性死亡形式。TP53 是一种经典肿瘤抑制因子，有研究表明，TP53 可以通过正反馈调节促进 ROS 的累积，从而诱导铁死亡[24]；TP53 通过抑制 SLC7A11（胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白的关键成分）的表达来抑制胱氨酸摄取，并且使细胞对铁死亡敏感[25]。*PTGS2* 基因表达上调，能使细胞内游离铁的水平增加和细胞中脂质过氧化水平上升，诱导铁死亡的发生，能促进铁死亡[26]。当引入铁死亡诱导剂 Erastin 进行试验发现胃癌细胞铁死亡减缓，结果证明了 ALOX12 表达能促进胃癌细胞铁死亡[26]。缺氧诱导因子 HIF-1 可以结合缺氧反应元件调节 100 多个基因的转录激活，从而调节肿瘤细胞对缺氧的适应，如 VEGF、促红细胞生成素（EPO）、转铁蛋白，这些基因与血管生成、免疫逃逸、代谢重编程、生长因子信号传导、侵袭、肿瘤进展和转移密切相关，其中铁代谢能引起细胞内 ROS 累积，是调控铁死亡的重要因素之一[27]。*JUN* 为一种原癌基因，*IL-6* 和 *JUN* 基因涉及脂肪细胞分化、氧化应激反应等生物过程，还具有与三价铁结合的分子功能，表明了 *JUN* 和 *IL-6* 基因可能是调控铁死亡的相关基因[28]。结合总结来看，本研究所得的 15 种基因都可能直接或间接作用参与铁死亡进程，进而逆转肿瘤耐药。铁死亡与铁代谢及

氧化应激关系密切。TNF 信号通路与细胞凋亡、程序性细胞死亡的正调控密切相关。PI3K/Akt 通路是 1 条与磷脂酰肌醇有关的信号通路，PI3K/Akt 信号通路的异常激活与肿瘤耐药的形成高度相关，以 PI3K/Akt 信号通路抑制剂为原理的药物能逆转肿瘤耐药[29]。HIF-1 信号通路可以诱导胃癌耐药相关分子的表达来介导胃癌细胞在缺氧条件下的黏附介导的多药耐药，表明 HIF-1 在缺氧诱导胃癌耐药中有重要作用[30]。本研究通过数据库挖掘分析出多条与铁死亡可能相关的信号通路，这些通路在黄芩活性成分逆转耐药的作用机制中发挥了重要作用。

综上，黄芩活性成分通过靶向多个关键靶点基因，进而激活多个信号通路来调控铁死亡，从而逆转肿瘤多药耐药的发生和进展。这也正体现了中药活性成分抗耐药作用多靶点、多通路的特点。通过细胞增殖实验也进一步确证了汉黄芩素可以通过铁死亡途径，抑制肿瘤细胞的生长作用，可通过对脂多糖的反应、对氧化应激的反应、细胞对化学应激的反应、对类固醇激素的反应等生物过程，响应过程的靶蛋白有 TP53、ALOX12、HIF-1 等，以及激活凋亡信号通路、程序性细胞死亡的正调控、PI3K/Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路等生物通路通过调控铁死亡来逆转肿瘤耐药。本研究可为黄芩活性成分调控铁死亡逆转肿瘤耐药的深入研究提供理论依据，也为实验开展和临床应用提供理论依据。

利益冲突　所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kreiter, S, Vormehr, M, van de Roemer N, *et al*. Mutant MHC class II epitopes drive therapeutic immune responses to cancer [J]. *Nature*, 2015, 520(7549): 692-696.

[2] 周昳雯, 张乐吟, 孙磊涛, 等. 中医药逆转化疗耐药的新兴策略和有效途径 [J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 927-930.

[3] Basit F, van Oppen L M, Schöckel L, *et al*. Mitochondrial complex I inhibition triggers a mitophagy-dependent ROS increase leading to necroptosis and ferroptosis in melanoma cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2716.

[4] Jiang L, Kon N, Li T, *et al*. p53 Promotes ferroptosis during ROS stress to suppress tumoigenesis [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(5): 465-465.

[5] Stockwell B R, Angeli J P F, Bayir H, *et al*. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.

[6] Conrad M, Pratt D A. The chemical basis of ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1137-1147.

[7] Lane D J R, Ayton S, Bush A I. Iron and Alzheimer's disease: An update on emerging mechanisms [J]. *Alzheimers Dis*, 2018, 64(s1): S379-S395.

[8] Tuo Q Z, Lei P, Jackman K A, *et al*. Tau-mediated iron export prevents ferroptotic damage after ischemic stroke [J]. *Mol Psychiatry*, 2017, 22(11): 1520-1530.

[9] Kinowaki Y, Kurata M, Ishibashi S, *et al*. Glutathione peroxidase 4 overexpression inhibits ROS-induced cell death in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Lab Invest*, 2018, 98(5): 609-619.

[10] Ma S, Henson E S, Chen Y, *et al*. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2307.

[11] Liang C, Zhang X, Yang M, *et al*. Recent progress in ferroptosis inducers for cancer therapy [J]. *Adv Mater*, 2019, 31(51): e1904197.

[12] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.

[13] 张俊华, 樊官伟, 张晗, 等. 组分中药理论的发展与应用 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(21): 4054-4058.

[14] 苑婕, 胡静, 贺虹, 等. 网络药理学在中医药现代化研究中的进展 [J]. 海南医学, 2020, 31(20): 2688-2691.

[15] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. 《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.

[16] 郑勇凤, 王佳婧, 傅超美, 等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展 [J]. 中成药, 2016, 38(1): 141-147.

[17] Palmeira A, Sousa E, H. Vasconcelos M, *et al*. Three decades of P-gp inhibitors: Skimming through several generations and scaffolds [J]. *Curr Med Chem*, 2012, 19(13): 1946-2025

[18] 庞溢媛, 秦雪梅, 杜冠华, 等. 基于衰老假说的黄芩黄酮药理作用及机制研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(13): 3207-3216.

[19] 陈晓亮, 马世龙, 杜金叶, 等. 黄芩中总黄酮提取工艺优化及抗肿瘤活性研究 [J]. 农业与技术, 2021, 41(11): 1-4.

[20] 杨艳秋, 刘贵军, 熊丽辉. 黄芩的主要成分对 Caco-2 细胞 P-gp 表达的影响 [J]. 中药材, 2016, 39(9): 2122-2125.

[21] 杨猛. 黄芩素对铁死亡参与氧化应激状态下黑素细胞保护作用的机制研究 [D]. 济南: 山东中医药大学, 2021.

[22] 马苗, 柴克霞. GPx4 在铁死亡中的作用及其与疾病相关性的研究进展 [J]. 中国临床研究, 2021, 34(5): 681-684.

[23] 程淇, 易晓芳. 铁死亡在肿瘤耐药中作用的研究进展 [J]. 中国癌症杂志, 2020, 30(2): 148-153.

[24] 孙鹏, 赵云富. p53 基因相关的细胞非经典死亡 [J]. 中

国肿瘤生物治疗杂志, 2019, 26(5): 577-582.
[25] 孙甜田. 新型铁死亡抑制剂的筛选及机制的初步研究 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2020.
[26] 高丽珍, 王俊青, 陈俊林, 等. miR-223 靶向 ALOX12 对胃癌细胞铁死亡影响的研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(23): 1805-1811.
[27] 唐文弟. 新型 HIF-1 抑制剂的设计、合成和抗肿瘤活性评价 [D]. 济南: 山东大学, 2020.
[28] 姜嫄, 黄锦明, 梁瑜祯, 等. 非酒精性脂肪性肝病铁死亡机制的基础研究 [J]. 广西医科大学学报, 2022, 39(1): 13-20.
[29] 汤庆丰, 孙健, 于卉, 等. 基于 PI3K/AKT 信号通路的中药抗肿瘤多药耐药作用研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(6): 78-82.
[30] 刘理礼. HIF-1 在缺氧诱导胃癌 MDR 中的机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2007.

[责任编辑 高源]