

基于网络药理学、生物信息学及分子动力学模拟探讨冬虫夏草治疗非小细胞肺癌机制

梁鸿彬^{1,2}, 张晖², 史经龙^{1,2}, 雷蕾^{1,2}, 谢旖阳^{1,2}, 任川^{1,2}, 吴发胜^{2*}

1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530200

2. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530000

摘要: **目的** 利用生物信息学、网络药理学、分子对接、动力学模拟方法探讨冬虫夏草治疗非小细胞肺癌的关键靶点及其分子机制。**方法** 利用 TCMSP 数据库检索冬虫夏草的活性成分和靶点, 并利用 GEO 数据库获取与非小细胞肺癌相关的数据集, 使用 R 语言软件进行差异分析, 获取差异表达基因 (DEGs)。通过 WGCNA 分析确定与肿瘤发生密切相关的基因模块, 并取交集获取非小细胞肺癌的枢纽基因, 将这些枢纽基因与药物靶点进行映射, 利用 Cytoscape 软件构建“活性成分-疾病枢纽靶点”网络图。使用 String 数据库和 Cytoscape 构建靶标蛋白相互作用 (PPI) 网络, 筛选出关键靶点。利用 Enrichr 在线工具进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。利用 CB-Dock2 平台和 Discovery Studio 2021Client 软件对关键成分和靶点进行分子对接验证和可视化。最后利用 Gromacs v2022.03 软件对分子对接所得的复合物进行 100 ns 分子动力学模拟分析。**结果** 共筛选得到冬虫夏草活性成分 10 个, 自身靶点 276 个和作用于非小细胞肺癌的靶点 9 个, 通过对虫草甾醇和花生四烯酸 2 个核心成分富集分析提示, 主要涉及氧化物酶体增殖物激活受体 (PPAR) 信号通路、神经活性配体与受体的相互作用、脂肪细胞的脂肪分解调节、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路、叉头框转录因子 (FoxO) 信号通路等。分子对接结果显示, 虫草甾醇和花生四烯酸与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、1 型血管紧张素 II 受体 (AGTR1) 和内皮 PAS 结构域蛋白 1 (EPAS1) 这 3 个核心靶点具有良好的结合能力, 动力学模拟进一步验证虫草甾醇与 PPARG、AGTR1 复合物结合稳定。**结论** 冬虫夏草可能通过调控巨噬细胞极化、神经活性配体与受体、脂质代谢、氧化应激、免疫调节等过程, 多种协同作用发挥抗非小细胞肺癌作用。

关键词: 冬虫夏草; 非小细胞肺癌; 生物信息学; 网络药理学; 分子动力学; 虫草甾醇; 花生四烯酸; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ; 1 型血管紧张素 II 受体

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)09-2222-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.09.004

Mechanism of *Cordyceps* in treatment of non-small cell lung cancer based on network pharmacology, bioinformatics, and molecular dynamics simulation

LIANG Hongbin^{1,2}, ZHANG Hui², SHI Jinglong^{1,2}, LEI Lei^{1,2}, XIE Yiyang^{1,2}, REN Chuan^{1,2}, WU Fasheng²

1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

2. Ruikang Hospital affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530000, China

Abstract: Objective To explore the key targets of *Cordyceps* in treatment of non-small cell lung cancer, and its molecular mechanisms using bioinformatics, network pharmacology, molecular docking, and kinetic simulation. **Methods** The TCMSP database was used to retrieve the active ingredients and targets of *Cordyceps*, and the GEO database was used to obtain the datasets related to non-small cell lung cancer, and differential expression genes (DEGs) were obtained by differential analysis using R language software. The WGCNA analysis was used to identify the gene modules closely related to tumorigenesis, and the intersection was used to obtain the hub genes of non-small cell lung cancer, which were mapped to the drug targets, and Cytoscape software was used to construct the “active ingredient - disease hub targets” network diagram. The target protein interactions (PPI) network was constructed using the String database and Cytoscape, and the key targets were screened out. GO and KEGG enrichment analysis was performed

收稿日期: 2024-07-25

基金项目: 广西青年岐黄学者培养项目 (GXQH202422)

作者简介: 梁鸿彬, 男, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合肿瘤防治。E-mail: 837769976@qq.com

*通信作者: 吴发胜, 男, 博士, 主任医师, 研究方向为中西医结合肿瘤防治。E-mail: 840766676@qq.com

using Enrihr online tools. Molecular docking verification and visualization of key components and targets were performed using CB-Dock2 platform and Discovery Studio 2021Client software. Finally, 100 ns molecular dynamics simulations were performed on the complexes obtained from molecular docking using Gromacs v2022.03 software. **Results** A total of 10 active components of *Cordyceps* were screened, 276 self-targets and 9 non-small cell lung cancer targets. The enrichment analysis of the two core components, cordycesterol and arachidonic acid, suggested that they were mainly involved in the PPAR signaling pathway, the interaction between the neuroactive ligands and the receptor, the regulation of lipolysis of adipocytes, the AMPK signaling pathway, and the FoxO signaling pathway. The molecular docking results showed that cordycesterol and arachidonic acid had good binding ability with the three core targets of PPARG, AGTR1, and EPAS1, and the kinetic simulation further verified that the cordycesterol binds stably to the PPARG and AGTR1 complexes. **Conclusion** *Cordyceps* may exert anti- non-small cell lung cancer effects through multiple synergistic effects by modulating macrophage polarization, neuroactive ligands and receptors, lipid metabolism, oxidative stress, immunomodulation and other processes.

Key words: *Cordyceps*; non-small cell lung cancer; bioinformatics; network pharmacology; molecular dynamics; cordycesterol; arachidonic acid; PPARG; AGTR1

2022 年全球癌症流行病学调查结果显示,肺癌占全球癌症病例的 12.4%,其死亡率高达 18.4%,位居癌症相关死亡率之首^[1]。其中非小细胞肺癌占所有肺癌病例的 80%~85%^[2]。当前肺癌的主要治疗方法包括传统手术、化疗、放疗、免疫治疗和靶向治疗^[3]。这些治疗方法虽取得一定的疗效,但也产生许多问题,如肿瘤复发转移、耐药、毒副作用等,严重影响患者的生活质量。传统中药以其多成分、多靶点和整体调理的特点,有望在减轻不良反应、提高患者生活质量以及延长生存期方面发挥重要作用^[4-5]。

冬虫夏草,又称“蛹虫草”或“北虫草”,味甘性平,归肺、肾经,具有补肾益肺、止血化痰的功效^[6]。其在抗肿瘤、免疫调节等方面的作用引起了广泛关注,成为研究非小细胞肺癌治疗的一个重要方向。现代药理研究证实,冬虫夏草在多种肿瘤,包括非小细胞肺癌中表现出抗肿瘤作用^[7-9]。然而,其具体作用机制尚需进一步研究。近年来,随着生物信息学、网络药理学、分子动力学的发展^[10],能够更深入地探索中药的分子机制和潜在靶点,本研究旨在通过这些方法,为冬虫夏草在肺癌治疗中的应用提供科学依据和理论支持。

1 资料和方法

1.1 冬虫夏草活性成分及靶点的筛选

本研究使用 TCMSP 数据库(<https://old.tcmsp.com/tcmsp.php>)筛选冬虫夏草的有效成分,筛选条件为口服利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18。此外,添加文献报道的活性成分进行补充。筛选出的活性成分通过 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的“SMILE”格式进行检索。

最后,利用 SwissTargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)预测这些活性成分的相应靶点。

1.2 GEO 数据库中非小细胞肺癌的数据采集和预处理

为了获取与非小细胞肺癌相关的数据集,本研究在 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)中使用关键词“non-small cell lung cancer”进行检索。按以下标准对数据进行筛选:(1)所有样本均来自人类;(2)所有数据集都包含匹配的癌症组织和正常组织样本;(3)数据集中至少包含 100 个样本。最终,选择并下载了 GSE33532 和 GSE45458 数据集。其中,GSE33532 数据集包括 80 个非小细胞肺癌样本和 20 个正常组织样本,GSE45458 数据集包括 80 个非小细胞肺癌和 30 个正常组织样本。随后,使用“NormalizeBetweenArrays”函数对 GSE33532 和 GSE45458 数据集进行均一化处理,并通过 R 语言中的“limma”包,按筛选条件 $P < 0.05$ 且 $|\log_2FC| \geq 1$,对这 2 个数据集的全基因表达谱进行差异基因分析以获取差异表达基因(DEGs)。

1.3 差异分析以及加权基因共表达网络分析(WGCNA)

基于 GSE33532 和 GSE45458 数据集全基因表达谱,使用“WGCNA”R 包进行 WGCNA。首先,利用 Pick Soft Threshold 函数估算软阈值,并基于此构建相关矩阵,然后计算拓扑重叠矩阵(TOM)。接着,使用“hclust”函数进行层次聚类,并根据拓扑重叠异度(1-TOM)对基因进行分组。通过“dynamic tree cut”算法确定基因模块,从中筛选出与肿瘤样本关系最显著的模块基因,供进一步分析。

1.4 获取非小细胞肺癌枢纽靶点和药物作用靶点

根据上述分析结果,收集了与冬虫夏草相关的靶点,并从 GSE33532 和 GSE45458 数据集的差异分析结果中获得了差异基因。利用 WGCNA 分析得到了最显著的模块基因。通过取交集,得到非小细胞肺癌的枢纽基因,并使用 Venny 2.1 软件绘制韦恩图。

1.5 药物活性成分与作用靶点网络的构建

将冬虫夏草治疗非小细胞肺癌的活性成分及药物作用靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件,构建冬虫夏草活性成分-非小细胞肺癌疾病枢纽靶点网络图,结合靶点 degree 值可视化分析该网络图,获得靶点、药物及疾病间的关系。根据 degree 值获取冬虫夏草候选成分中治疗非小细胞肺癌的主要药效成分。

1.6 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

利用 Enrichr 在线工具 (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。筛选 $P < 0.05$ 的 GO 富集条目和 KEGG 富集通路,并使用微生信在线绘图工具 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 绘制柱状图,展示冬虫夏草治疗非小细胞肺癌相关生物过程和信号通路。

1.7 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络筛选核心蛋白

将得到的作用靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>),设置物种为“homo sapiens”,最低互作阈值设置为高置信度 0.15,隐藏网络中未连接的节点,其余参数设置为默认,将网络信息保存为“tsv”格式文件并导入 Cytoscape 3.9.0 进行可视化分析。

1.8 分子对接分析

使用 CB-Dock2 (<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/php/index.php>) 平台对所选配体和靶点进行了分子对接分析。CB-Dock2 是一种基于 Auto Dock Vina 分析的分子对接工具,可以自动识别和分析配体与受体的结合位点,在提高分子对接准确性的同时简化了对接过程。从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中下载冬虫夏草关键成分化学结构“SDF”文件,将其导入 CB-Dock2 平台,并分别进行加 H 原子。同时,从 RCSB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 中获得关键靶点的晶体结构,并导入 CB-Dock2 平台进行了添加氢原子和删除所有水分子的处理。利用 CB-Dock2 计算了结合亲和能,并推算出能量最小的最佳对接模型。分子

可视化是建模研究分析和交流的一个关键方面。因此,使用 Discovery Studio 2021 Client 可视化软件分析配体与受体相互作用细节并绘制相互作用 2D 图。

1.9 分子动力学模拟

使用 Gromacs v2022.03 软件对分子对接所得的复合物进行 100 ns 分子动力学模拟,力场采用 CHARMM36。具体步骤及参数设置如下:(1)将复合物的“pdb”格式转成“gro”格式,复合物被视为 MD 模拟的初始结构;(2)使用 AmberTools22 软件对小分子 2 添加 Generalized Amber Force Field (GAFF) 力场,同时使用 Gaussian 16W 对小分子进行加氢和计算 RESP 电势操作,电势数据会添加到分子动力学体系拓扑文件中;(3)选用三点可转移分子间电位 (TIP3P) 溶剂溶解复合物,且蛋白质原子距离水盒子边缘最近距离至少为 1.2 nm,并通过添加适当数量的 Na^+ 和 Cl^- 来中和模拟系统电荷;(4)为了获得稳定的系统,采用最陡峭下降算法进行能量最小化 (EM);(5)在等温等容 (NVT) 系综中对溶质进行限制,将系统从 0 K 缓慢加热到 300 K,然后在等温等压 (NPT) 系综中以 300 K 的温度和 1 Bar ($1 \text{ Bar} = 1 \times 10^5 \text{ Pa}$) 的压力进行平衡;(6)对复合物进行 100 ns 的时间分子动力学模拟并保存模拟轨迹用于后续分析。根据 MD 模拟的结果,计算了复合物均方根偏差 (RMSD)、均方根波动 (RMSF)、回转半径 (Rg) 值、溶液可及表面积 (SASA) 和氢键 (H-bonds)。根据 RMSD 和 Rg 值,使用 Gromacs v2022.03 软件内置“g_sham”和“xpm2txt.py”脚本计算吉布斯自由能。此外,应用“MMPBSA.py v.16.0”脚本计算分子力学/泊松-玻尔兹曼表面积 (MM/PBSA) 计算复合物的结合自由能。

2 结果

2.1 冬虫夏草活性成分及作用靶点的收集和筛选

在 TCMSP 数据库中按 $\text{OB} \geq 30\%$ 和 $\text{DL} \geq 0.18$ 筛选标准检索冬虫夏草活性成分,获得了花生四烯酸、乙酸亚油酯、 β -谷固醇、过氧化麦角固醇、虫草甾醇、胆固醇棕榈酸酯和胆固醇等活性成分。此外结合已报道的文献, D -甘露糖是构成虫草多糖的主要成分^[11],虫草素和肉桂醛也是冬虫夏草重要质量控制成分^[12-13],故加入一并分析。在 SwissTarget Prediction 数据库中检索这些活性成分作用靶点,其中虫草素相关靶点并无相关资料,故剔除,得到了其余成分潜在的作用靶点,去除重复目标后,保留

了 276 个作用靶点，见表 1。

表 1 冬虫夏草活性成分及其靶点数
Table 1 Active ingredients and target numbers of *Cordyceps*

Mol ID	有效成分	靶点数	DL	OB/%
MOL001439	花生四烯酸	110	0.20	45.57
MOL001645	乙酸亚油酯	54	0.20	42.10
MOL000358	β -谷固醇	43	0.75	36.91
MOL011169	过氧化麦角固醇	23	0.82	44.39
MOL008998	虫草甾醇	111	0.77	39.52
MOL008999	胆固醇棕榈酸酯	51	0.45	31.05
MOL000953	胆固醇	46	0.68	37.87
MOL000991	肉桂醛	13	0.02	31.99
MOL002821	D-甘露糖	35	0.05	29.74
MOL009002	虫草素		0.78	17.36

2.2 疾病靶点基因差异分析与 WGCNA 分析

使用 R 软件的“limma”包对 GSE33532 和 GSE45458 数据集分别进行了基因差异分析。在 GSE33532 数据集中得到 2 212 个差异基因；在 GSE45458 数据集中，获得 793 个差异基因。将这些结果通过差异基因热图展示，见图 1。

在 GSE33532 和 GSE45458 数据集的 WGCNA 分析中，分别采用软阈值为 9、14，最小模块值为 50 来定义邻接矩阵，获得 10 个模块，除灰色模块外，见图 2。GSE33532 和 GSE45458 数据集模块基因与性状关联分析提示，ME turquoise 模块均最为显著，2 者分别包含 1 003、1 026 个基因，见图 3。

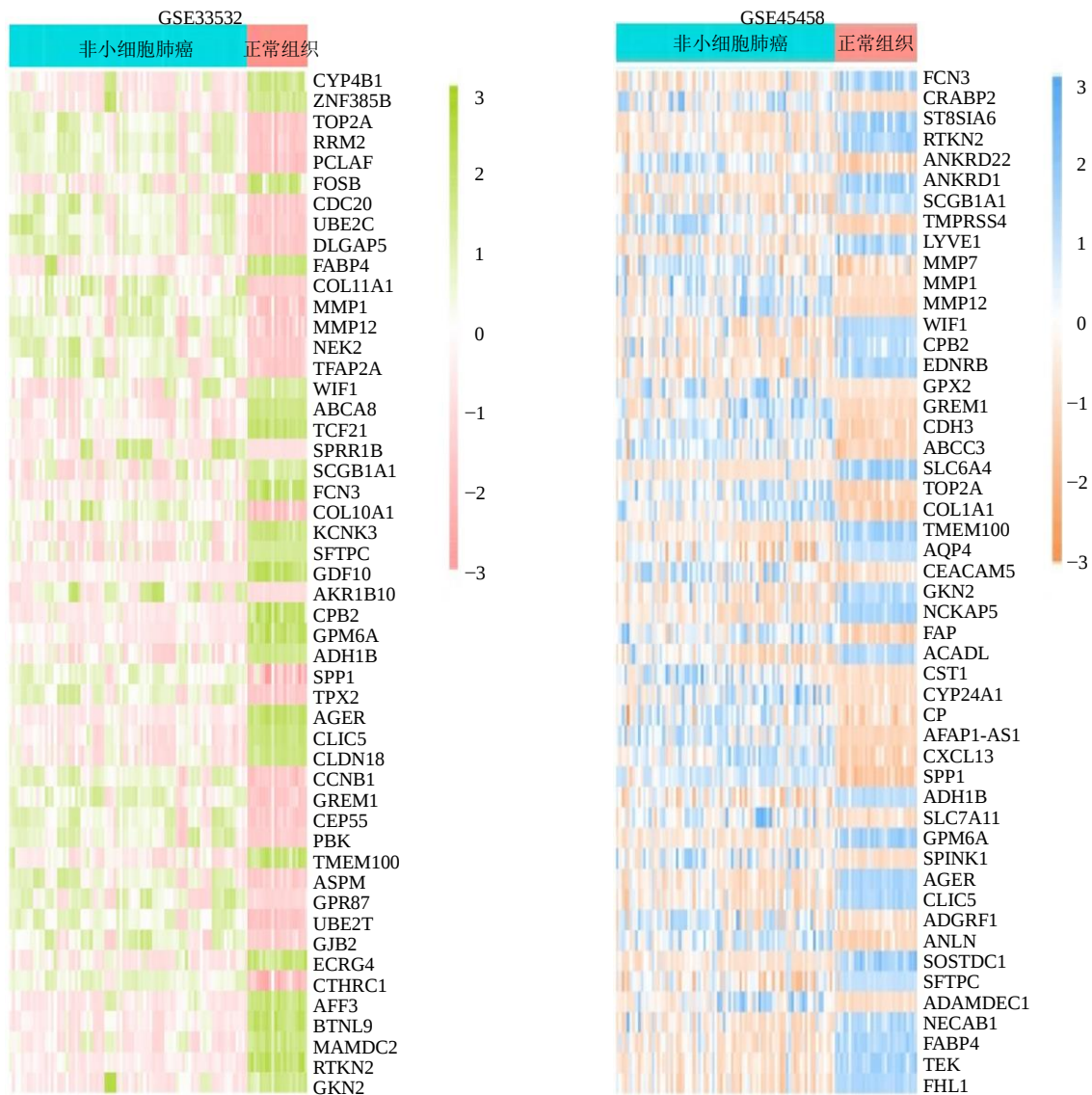


图 1 数据集差异分析热图
Fig. 1 Heat map of data set difference analysis

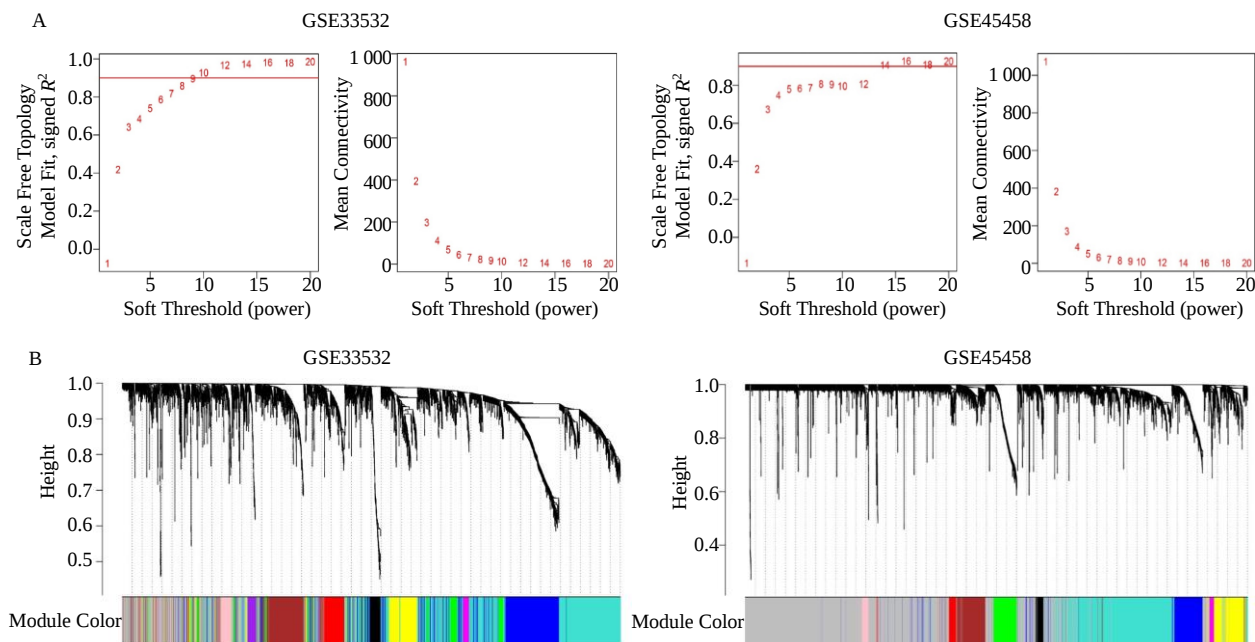


图 2 不同软阈值对应的 R^2 和基因邻接系数 (A) 及基因邻接系数层次聚类构建的基因树状图 (B)

Fig. 2 R^2 corresponding to gene adjacency coefficient (A) corresponding to different soft thresholds and gene adjacency coefficient hierarchical clustering tree (B)

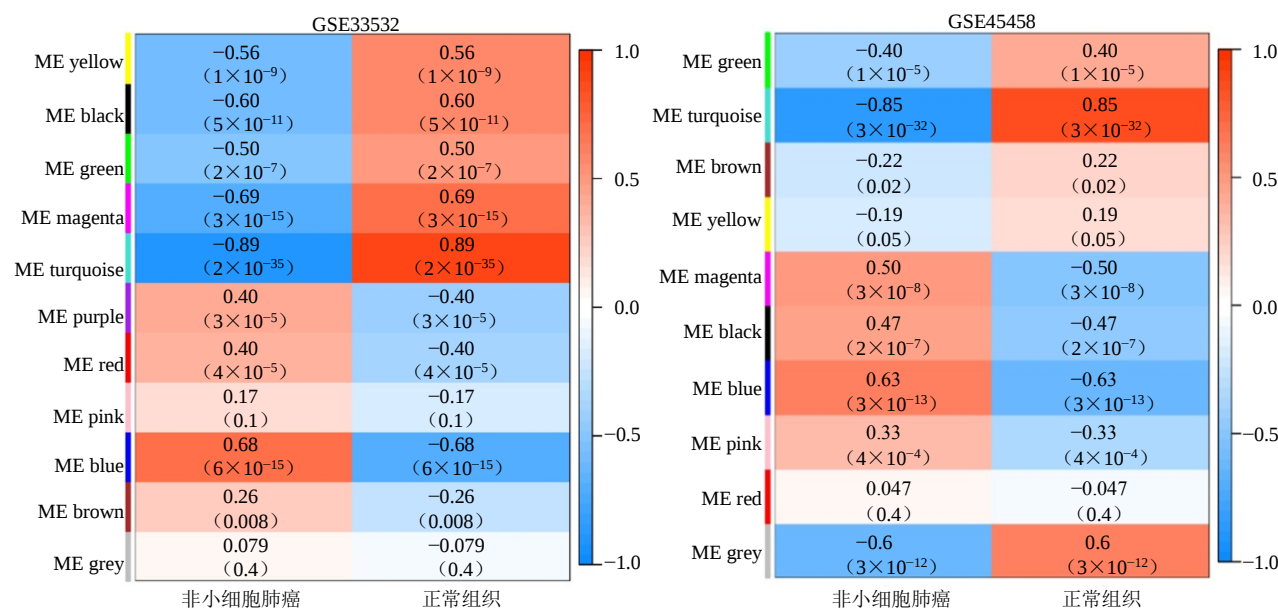


图 3 共表达基因模块与临床特征的关系

Fig. 3 Relationship between coexpressed gene modules and clinical features

2.3 非小细胞肺癌枢纽靶点和药物作用靶点

将 GSE33532 和 GSE45458 数据集差异分析得到 DEGs 以及 WGCNA 分析中的 ME turquoise 模块基因导入 Venny 2.1 软件进行交集分析。结果显示, 这 4 组基因共得到 308 个交集基因, 即非小细胞肺癌发病的枢纽基因, 见图 4A。同时绘制冬虫夏草靶点与非小细胞肺癌枢纽基因的韦恩图, 最终确定了

9 个关键靶点, 见图 4B。

2.4 活性成分 - 疾病交集靶点网络

将冬虫夏草中的活性成分和治疗非小细胞肺癌的作用靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件, 以绘制网络图。经分析后发现冬虫夏草中虫草甾醇 (degree = 112) 和花生四烯酸 (arachidonic acid, degree = 111) 2 种有效成分的 degree 值最大, 见图 5。

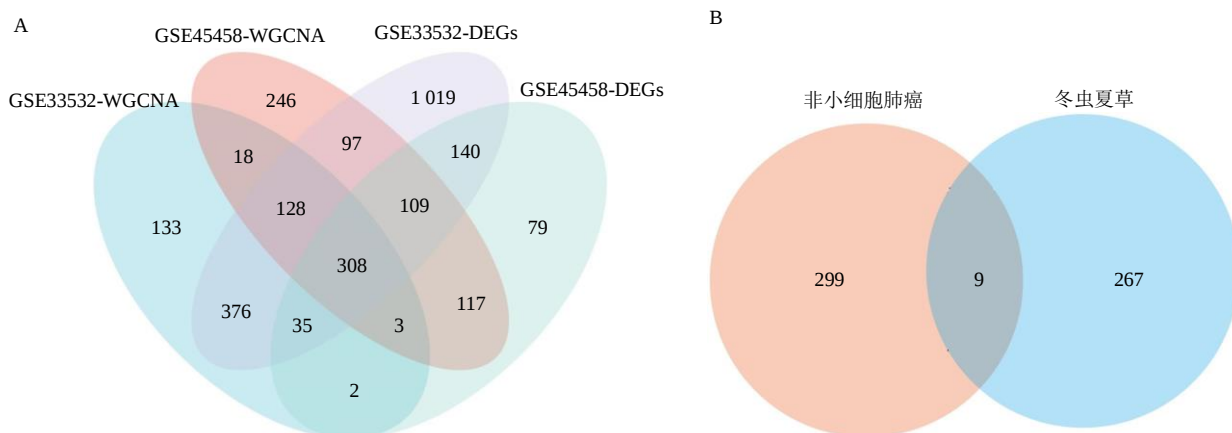


图 4 DEGs 与显著模块基因交集韦恩图 (A) 及冬虫夏草靶点与非小细胞肺癌枢纽靶点交集韦恩图 (B)

Fig. 4 Venn diagram of intersection of DEGs and significant module genes (A) and intersection of *Cordyceps* targets and key targets of non-small cell lung cancer (B)

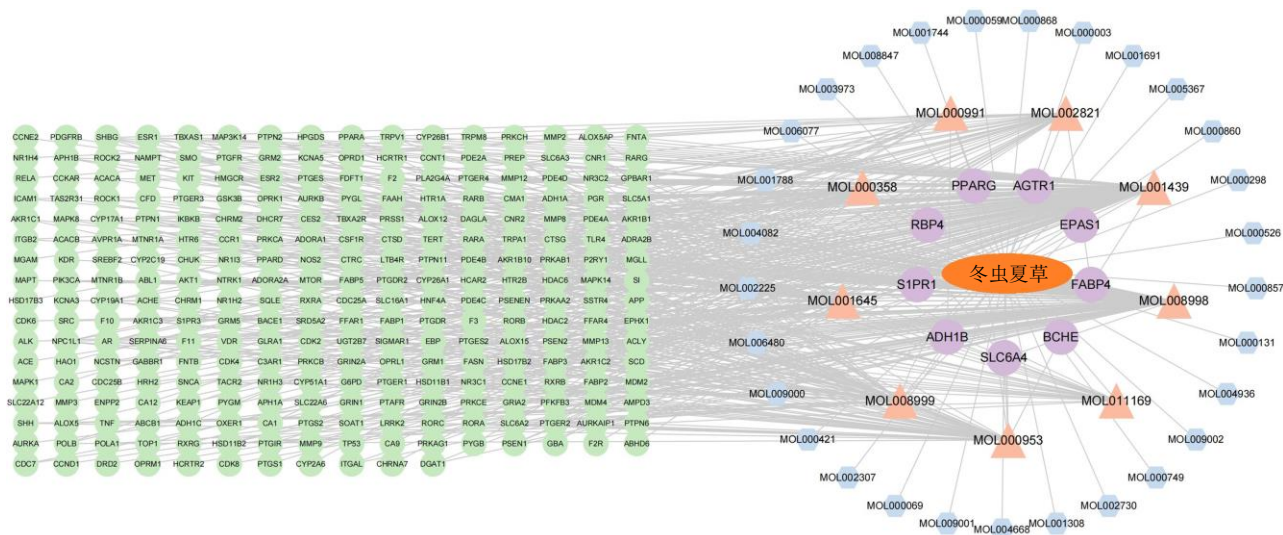


图 5 冬虫夏草有效成分 - 交集靶点网络图

Fig. 5 Effective components of *Cordyceps* - intersection target network

2.5 PPI 网络构建及核心靶点获取

将冬虫夏草治疗非小细胞肺癌的 9 个关键靶点导入 STRING 网络平台, 隐藏游离靶点, 得到的 PPI 网图, 将网络信息保存为“tsv”格式文件, 导入 Cytoscape 3.9.0 进行可视化分析, 筛选出过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPARG)、1 型血管紧张素 II 受体(AGTR1)和内皮 PAS 结构域蛋白 1(EPAS1)为核心靶点, 见图 6。

2.6 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析

本研究使用 Enrichr 数据对其进行 GO 和 KEGG 富集分析, 并根据 P 值进行排序, 选择前 10 位的结果进行可视化分析并绘制气泡图, 结果如图 7 所示, GO 富集分析显示作用靶点主要参与的生物过

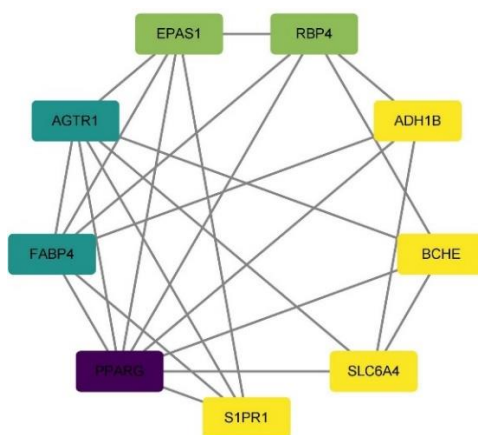


图 6 PPI 网络

Fig. 6 PPI network

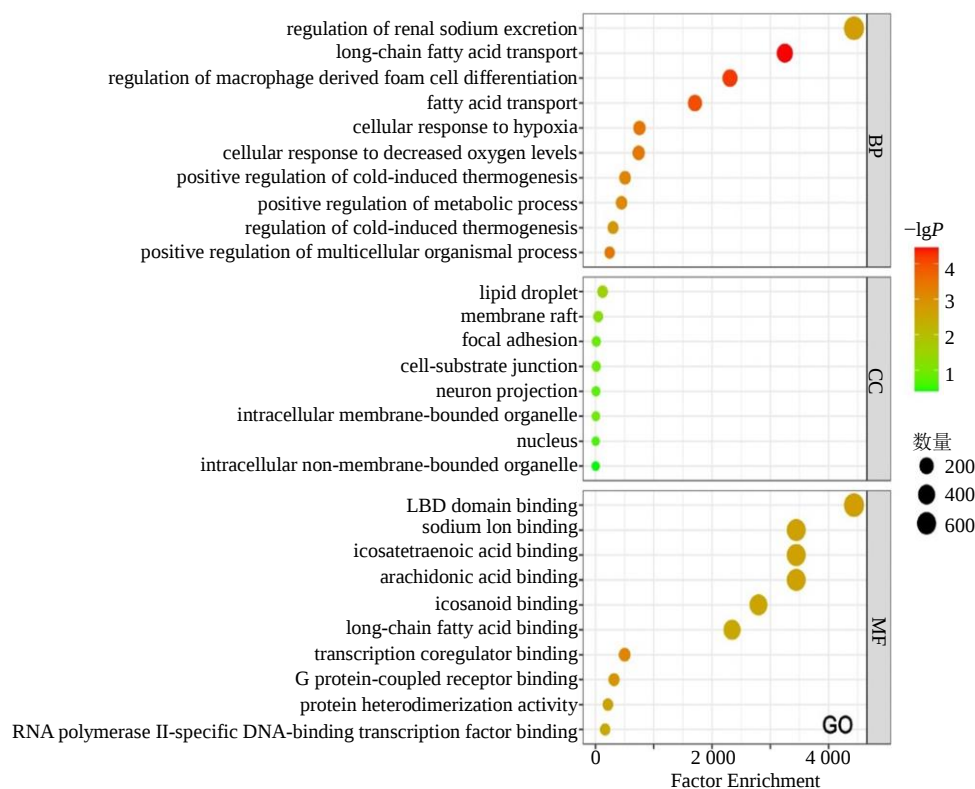


图 7 GO 功能分析

Fig. 7 GO function analysis

程 (BP) 有长链脂肪酸转运、巨噬细胞衍生泡沫细胞分化的调控、细胞对缺氧的反应等, 主要参与的细胞组成 (CC) 有细胞-基底交界处、细胞内无膜结构的细胞器等, 作用靶点主要参与的分子功能 (MF) 有二十碳四烯酸结合、长链脂肪酸结合、G 蛋白偶联受体结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合等。KEGG 信号通路富集提示冬虫夏草治疗非小细胞肺癌的 9 个作用靶点参与了 PPAR 信号通路、神经活性配体与受体的相互作用、脂肪细胞的脂肪分解调节、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路、叉头框转录因子 (FoxO) 信号通路等, 见图 8。

2.7 分子对接

基于 2.4、2.5 项下的分析结果, 针对冬虫夏草主要活性成分虫草甾醇和花生四烯酸, 以及核心靶点 PPARG、AGTR1 和 EPAS1 作为研究对象, 下载关键靶点晶体结构及活性成分“PDB”格式文件, 使用 CB-Dock2 平台分析虫草甾醇、花生四烯酸与 PPARG、AGTR1、EPAS1 分子间的相互作用, 对接分数见表 2, 使用 Discovery Studio 2021 Client 软件将活性成分和关键靶点之间的多种相互作用可视

化, 见图 9。

2.8 分子动力学模拟

基于 2.7 项下结果, 本研究筛选虫草甾醇对接较好的 2 个靶点, 虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合体系进行 100 ns 的 MD 模拟分析, 以研究分子对接得到的动态特性。包括 RMSD、RMSF、Rg、SASA 以及统计整个过程的氢键变化。如图 10 所示, 虫草甾醇-AGTR1 复合物的 RMSD 曲线自 60 ns 后体系趋于平衡, 且 RMSD 均值为 0.45 nm, 而虫草甾醇-PPARG 复合物的 RMSD 曲线自 44 ns 后体系趋于平衡, 且 RMSD 均值为 0.6 nm。虫草甾醇的 RMSD 曲线显示自 20 ns 后, 小分子的位置仅发生微小的变化。虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合物的 Rg 曲线全程维持平衡状态, 且 Rg 均值分别为 2.15 nm 和 2.55 nm。此外, SASA 分析显示虫草甾醇-AGTR1 复合物的 SASA 曲线自 4 ns 后体系趋于平衡, 且 SASA 均值为 170 nm², 而虫草甾醇-PPARG 复合物的 SASA 曲线自 60 ns 后体系趋于平衡, 且 SASA 均值为 195 nm²。RMSF 分析显示 AGTR1 的氨基酸残基在 130~140、170~180、230~240 区间存在较大的柔性, PPARG 的氨基酸残基在 40~

Fig. 9 2D visualization of molecular docking results

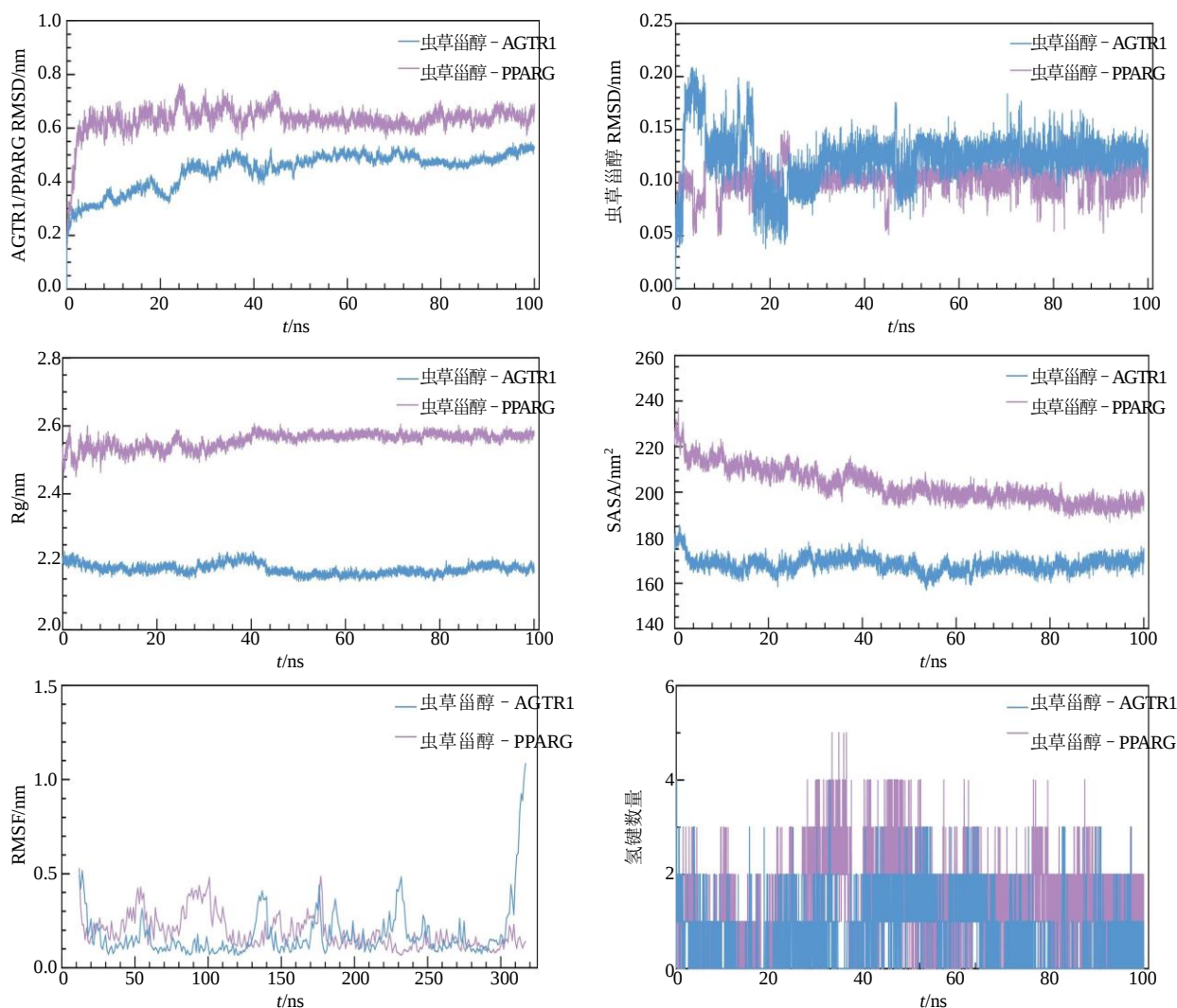


图 10 AGTR1/PPARG - AGTR1 复合物 100 ns 分子动力学模拟分析
Fig. 10 100 ns molecular dynamics simulation analysis of AGTR1/PPARG complex

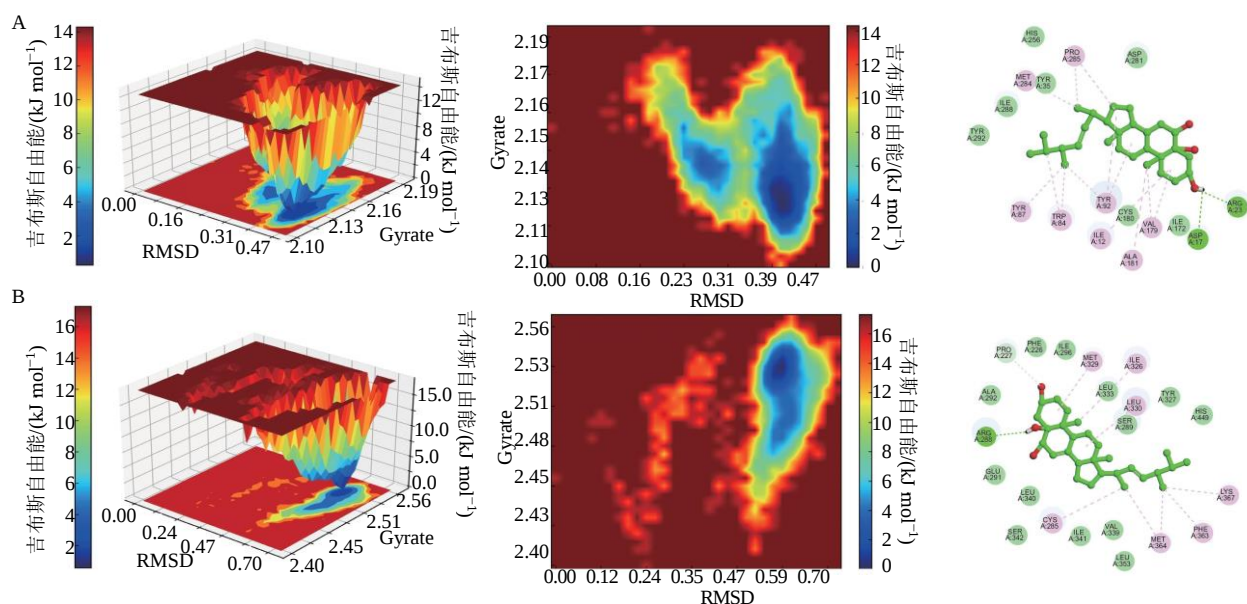


图 11 虫草甾醇 - AGTR1 (A) 和虫草甾醇 - PPARG (B) 复合物吉布斯自由能分析
Fig. 11 Gibbs free energy analysis of cordycepin - AGTR1 (A) and cordycepin - PPARG (B) complexes

复合物进行可视化分析发现,虫草甾醇-AGTR1 复合物可形成 2 根氢键,虫草甾醇-PPARG 复合物可形成 1 根氢键。

为了进一步了解虫草甾醇-AGTR1/PPARG-复合物的结合稳定程度,使用 MM/PBSA 方法计算最终的 10 ns 稳定 RMSD 轨迹来计算虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合物结合自由能。如表 3 所示,虫草甾醇-AGTR1 复合物的总结合自由能为-35.89 kJ/mol,其中范德华力为-46.18 kJ/mol,静电力-17.63 kJ/mol 和气相能量-63.82 kJ/mol,有利于虫草甾醇-AGTR1 复合物体系的稳定性。而虫草甾醇-PPARG 复合物的总结合自由能为-46.36 kJ/mol,其中范德华力-50.51 kJ/mol,静电力-26.72 kJ/mol 和气相能量-77.24 kJ/mol 有利于虫草甾醇-PPARG 复合物体系的稳定性。

表 3 虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合物结合自由能

贡献能	结合能/(kcal mol ⁻¹)	
	AGTR1	PPARG-
ΔVDW_{AALS}	-46.18	-50.51
ΔE_{elec}	-17.63	-26.72
ΔE_{surf}	-6.10	-6.88
ΔG_{gas}	-63.82	-77.24
$\Delta G_{solvation}$	27.93	30.88
ΔG_{Bind}	-35.89	-46.36

范德华相互作用能 (ΔVDW_{AALS}); 静电能 (ΔE_{elec}); 非极性溶剂化能 (ΔE_{surf}); 分子力学自由能 (ΔG_{gas}); 溶剂化自由能 ($\Delta G_{solvation}$); 总结合自由能 (ΔG_{Bind}) 是 ΔG_{gas} 和 $\Delta G_{solvation}$ 的总和。

Van der Waals interaction energy (ΔVDW_{AALS}); electrostatic energy (ΔE_{elec}); non-polar solvation energy (ΔE_{surf}); molecular mechanical free energy (ΔG_{gas}); free energy of solvation ($\Delta G_{solvation}$); the total binding free energy (ΔG_{Bind}) is the sum of ΔG_{gas} and $\Delta G_{solvation}$.

为了识别对结合自由能贡献最重要的残基,对虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合物结合口袋的氨基酸进行分解分析。总共发现 16、21 个残基分别对虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合物很重要,见图 12。对于虫草甾醇-AGTR1 复合物,发现 SER15、TRP84、VAL179、MET284、PRO285、ILE288 贡献最大。对于虫草甾醇-PPARG 复合物,发现 PHE226、CYS285、ARG288、ALA292、ILE326、MET329、LEU330、LEU333 和 VAL339 贡献最大。

3 讨论

冬虫夏草首载于公元 710 年最早的藏医学著作

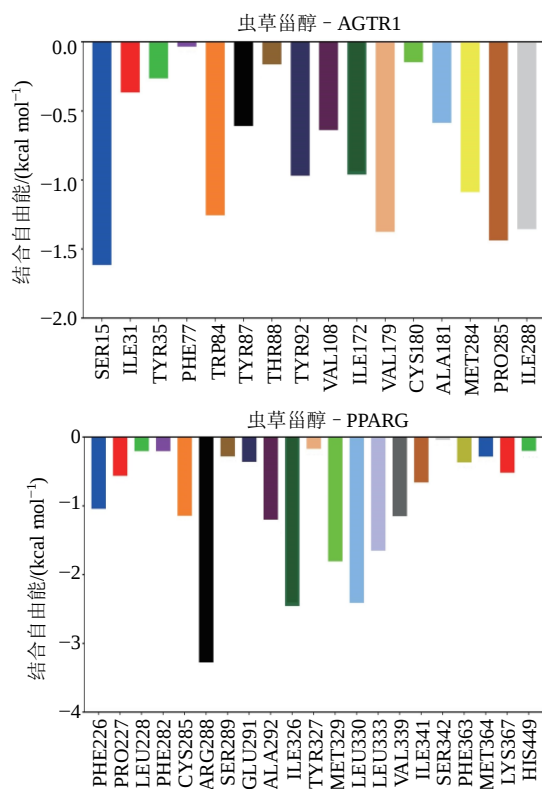


图 12 虫草甾醇-AGTR1/PPARG 复合物氨基酸结合自由能分解分析

Fig. 12 Analysis of amino acid binding free energy of cordycepin-AGTR1/PPARG complex

《医法月王论》,里面提到冬虫夏草能治疗肺部疾病,滋补肾阴、润肺、治肺病、培根病,并恢复身体失去的精气,调理全身机能。《内经》中有提到“正气存内,邪不可干”“邪之所凑,其气必虚”,肺癌之辨证,多属气虚。现代药理研究发现,冬虫夏草中含有核苷酸和核苷、多糖、蛋白质、多肽、氨基酸、甾醇和脂肪酸等多种活性成分。这些成分与多种药理作用有关,包括抗抗氧化、微生物、抗肿瘤、抗凋亡、抗炎免疫调节活性等^[14]。1 项临床试验发现,冬虫夏草用于肺癌辅助治疗中不仅改善了肿瘤缓解率、生活质量评分和免疫功能,而且降低了药物不良反应和放射性肺炎的发生率^[15]。本研究结果显示,冬虫夏草抗非小细胞肺癌的主要活性成分是虫草甾醇和花生四烯酸。虫草甾醇是一种存在于内生菌的次代谢物,属于植物甾醇类化合物,具有抗肿瘤特性,相关研究表明其可能通过诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖的方式抑制多种肿瘤细胞的生长,包括乳腺癌、肺癌和前列腺癌等^[16-17]。花生四烯酸其代谢产物与多种癌症的发生发展密切相关,在一定浓度下可抑制多种癌细胞的增殖和活力^[18]。

根据活性成分与疾病的作用靶点关系可以看出冬虫夏草的成分对于多个靶点具有调节作用,这些靶点之间存在着密切联系。为了进一步探究冬虫夏草在抗非小细胞肺癌中的作用机制,选择了PPARG、EPAS1、AGTR1这3个关键靶点进行探究,这些靶点在肺癌的发生和发展中发挥着重要的作用。PPARG被提议作为各种癌症的潜在治疗靶点之一,在肺癌细胞增殖和转移中起到抑制作用,且参与脂肪细胞的分化、脂质的代谢、外周葡萄糖的利用以及炎症反应^[19]。EPAS1是细胞应对低氧环境的关键转录因子,可能通过低氧诱导因子(HIF)信号通路促进肺癌的发生,与抗细胞凋亡、促进肿瘤血管生成、能量代谢的改变等作用相关^[20]。AGTR1涉及了肿瘤微环境的调控,AGTR1可通过磷脂酰肌醇激酶(P13K)/蛋白激酶B(Akt)通路抑制肺腺癌的进展^[21]。这些关键靶点与冬虫夏草的主要活性成分之间存在相互作用的映射关系,进一步验证了本研究的可靠性。这些活性成分能够作用于上述所有关键靶点,提示了冬虫夏草在治疗中的潜在价值。

GO分析和KEGG富集分析结果可知,冬虫夏草主要涉及的信号通路与作用机制都与肿瘤发展相关。PPAR家族有3个不同的成员,即PPAR α 、PPAR β/δ 和PPAR γ (PPARG)。Srivastava等^[22]报道,PPAR γ 可通过葡萄糖向脂肪酸氧化的代谢转换来增加活性氧(ROS)来抑制肿瘤生长。Hernandez-Quiles等^[23]研究表明,PPAR γ 可通过激活对应的靶基因转录调节免疫细胞和肿瘤细胞脂质代谢,并表明PPAR γ 反式抑制机制可能是驱动免疫细胞产生和分化的主要分子机制。Phan等^[24]发现PPAR γ 通过SUMO化介导的脂质合成会消耗烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH),导致线粒体ROS水平升高,破坏肺癌细胞内的氧化还原平衡,诱导氧化应激,从而抑制肺癌细胞增殖。AMPK是细胞代谢和生长的主要调节因子,可连接代谢和mTOR复合体-1m(TORC1)以应对低营养和能量条件^[25]。AMPK被认为是一种肺癌抑制因子,因为它可以作用于下游抑癌因子TSC2磷酸化来间接抑制mTORC1致癌信号传导,并进一步抑制促生长、促肿瘤通路,包括抑制细胞生长所需的脂肪酸合成^[26]。现有研究表明,FoxO转录因子可通过信号转导和转录调控参与能量代谢、细胞周期和抑制肿瘤治疗耐药性等过程并发挥重要作用^[27]。FoxO作为P13K/Akt通路的下游靶点,Akt诱导的磷酸化会导致FoxO1的抑制,

从而影响FoxO1的肿瘤抑制^[28]。考虑到Akt/FoxO1的特性,Wu等^[29]研究证实WT1相互作用蛋白通过减少Akt磷酸化增强FoxO1的表达,促进细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21Cip1和p27Kip1表达,导致非小细胞肺癌的G₁/S周期停滞。Wang等^[30]在1项表皮生长因子受体-络氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)研究表明,一种PPAR α 配体激动剂降低了ATP水平并增强了AMPK的磷酸化,激活的AMPK抑制Akt磷酸化并诱导FoxO1表达以启动内源性细胞凋亡途径,同时下调的PPAR α 增强了吉非替尼耐药细胞的细胞内胆固醇水平,促进了耐药细胞的脂质代谢,延缓耐药性。相关研究表明泡沫细胞可通过分泌炎症因子和促血管生成因子(如VEGF)影响肿瘤微环境,促进肿瘤生长和转移,抑制抗肿瘤免疫反应等。泡沫细胞内的脂质代谢产物还可通过调控代谢途径(如mTOR信号通路)影响肿瘤细胞的代谢状态和生存能力^[31-34]。神经活性配体及其受体在肿瘤,包括非小细胞肺癌的进展和转移中起到重要作用。如 β -肾上腺素能受体激活后,可通过环磷酸腺苷依赖蛋白激酶(cAMP/PKA)信号通路促进非小细胞肺癌细胞的增殖和存活^[35]。神经肽Y(NPY)、血管活性肠肽(VIP)等也通过其受体促进肿瘤细胞的增殖和侵袭^[36],神经营养因子(NGF)和脑源性神经营养因子(BDNF)通过其受体TrkA和TrkB调控肿瘤细胞的侵袭和转移。这些受体的激活可促进细胞骨架重组和基质金属蛋白酶的表达,从而增强细胞的侵袭能力。神经递质和神经肽不仅直接作用于肿瘤细胞,还可以通过调控肿瘤微环境中的其他细胞(如免疫细胞、成纤维细胞等)间接促进肿瘤生长^[37]。冬虫夏草其作用于多个与非小细胞肺癌相关信号通路,间接验证其可能参与多种调控途径发挥抗非小细胞肺癌作用。

分子对接一般认为当结合能小于-5 kcal/mol(1 cal=4.2 J)时,化合物和靶蛋白的对接结果较好,结合能越低亲和力越大,发挥作用的可能性就越大。由本研究结果可知主要活性成分虫草甾醇和花生四烯酸与关键靶点PPARG、EPAS1和AGTR1均有较好的结合能力,所有对接结果中虫草甾醇与PPARG、AGTR1对接活性最好。为了进一步验证复合物的稳定性和其可能发挥的生物学作用提供理论支撑,筛选了虫草甾醇-AGTR1/PPARG复合物体系进行100 ns的MD模拟分析,RMSD结果显示它们结合较为稳定,RMSF显示虫草甾醇-

AGTR1/PPARG 之间存在较大的结构域柔性, Rg 较小表明其结合后结构更加紧凑, SASA 表示结合后表面积减小, 并且复合物之间许多氢键。吉布斯自由能显示两个复合物均能形成单一且尖锐的最低能量区, 表明其结合后存在一个最稳定、结构最紧凑的状态。综合分子动力学模拟结果, 可以认为虫草甾醇 - AGTR1/PPARG 相互作用对蛋白分子整体结构的稳定性、内部结构的稳定性、紧凑性、表面特征和相互作用强度等方面均表现出良好稳定性, 为预测其发挥生物学功能提供可靠的理论支撑。

综上所述, 本研究初步预测了冬虫夏草可能参与多种途径发挥抗肿瘤作用, 为冬虫夏草治疗非小细胞肺癌的药理研究及临床实际应用提供了一定的理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3): 229-263.
- [2] Nooreldeen R, Bach H. Current and future development in lung cancer diagnosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(16): 8661.
- [3] Ettinger D S, Wood D E, Aisner D L, *et al.* Non-small cell lung cancer, version 3.2022, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2022, 20(5): 497-530.
- [4] 陈倩倩, 王海龙, 郭政钰, 等. 消岩汤姑息治疗中晚期非小细胞肺癌的回顾性临床研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(5): 1620-1626.
- [5] Kong F M, Wang C R, Zhao L L, *et al.* Traditional Chinese medicines for non-small cell lung cancer: Therapies and mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2023, 15(4): 509-515.
- [6] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 155-168.
- [7] Wang Z, Wu X, Liang Y N, *et al.* Cordycepin induces apoptosis and inhibits proliferation of human lung cancer cell line H1975 via inhibiting the phosphorylation of EGFR [J]. *Molecules*, 2016, 21(10): 1267.
- [8] Tao X D, Ning Y, Zhao X W, *et al.* The effects of cordycepin on the cell proliferation, migration and apoptosis in human lung cancer cell lines A549 and NCI-H460 [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(7): 901-911.
- [9] Liao X Z, Gao Y, Zhao H W, *et al.* Cordycepin reverses cisplatin resistance in non-small cell lung cancer by activating AMPK and inhibiting AKT signaling pathway [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 8: 609285.
- [10] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的研究应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [11] 江琦. 蛹虫草多糖和虫草素的提取分离及活性研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2018.
- [12] Yang L Y, Li G L, Chai Z, *et al.* Synthesis of cordycepin: current scenario and future perspectives [J]. *Fungal Genet Biol*, 2020, 143: 103431.
- [13] 王殿振. 北虫草总生物碱的提取、纯化及部分生物活性的研究 [D]. 延安: 延安大学, 2017.
- [14] Krishna K V, Ulhas R S, Malaviya A. Bioactive compounds from *Cordyceps* and their therapeutic potential [J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2024, 44(5): 753-773.
- [15] Wang C R, Wang J W, Qi Y F. Adjuvant treatment with *Cordyceps sinensis* for lung cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 12: 118044.
- [16] Alam M B, Chowdhury N S, Sohrab M H, *et al.* Cerevisterol alleviates inflammation via suppression of MAPK/NF- κ B/AP-1 and activation of the Nrf2/HO-1 signaling cascade [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 199.
- [17] Matsuda H, Akaki J, Nakamura S, *et al.* Apoptosis-inducing effects of sterols from the dried powder of cultured mycelium of *Cordyceps sinensis* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2009, 57(4): 411-414.
- [18] Cantonero C, Sánchez-Collado J, Lopez J J, *et al.* Arachidonic acid attenuates cell proliferation, migration and viability by a mechanism independent on calcium entry [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3315.
- [19] Yaghoobizadeh M, Pishkar L, Basati G. Aberrant expression of peroxisome proliferator-activated receptors in colorectal cancer and their association with cancer progression and prognosis [J]. *Gastrointest Tumors*, 2020, 7(1-2): 11-20.
- [20] Lu X Q, Zhang W Y, Zhang J Y, *et al.* EPAS1, a hypoxia- and ferroptosis-related gene, promotes malignant behaviour of cervical cancer by ceRNA and super-enhancer [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(9): e18361.
- [21] Xiong L C, Wei Y H, Zhou X, *et al.* AGTR1 inhibits the progression of lung adenocarcinoma [J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 8535-8550.
- [22] Srivastava N, Kollipara R K, Singh D K, *et al.* Inhibition of cancer cell proliferation by PPAR γ is mediated by a metabolic switch that increases reactive oxygen species levels [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(4): 650-661.
- [23] Hernandez-Quiles M, Broekema M F, Kalkhoven E. PPAR γ in metabolism, immunity, and cancer: unified and diverse mechanisms of action [J]. *Front*

- Endocrinol*, 2021, 12: 624112.
- [24] Phan A N H, Vo V T A, Hua T N M, *et al.* Correction: PPAR γ sumoylation-mediated lipid accumulation in lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(14): 1473.
- [25] Keerthana C K, Rayginia T P, Shifana S C, *et al.* The role of AMPK in cancer metabolism and its impact on the immunomodulation of the tumor microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1114582.
- [26] Svensson R U, Parker S J, Eichner L J, *et al.* Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models [J]. *Nat Med*, 2016, 22(10): 1108-1119.
- [27] Ebrahimnezhad M, Natami M, Bakhtiari G H, *et al.* FOXO1, a tiny protein with intricate interactions: Promising therapeutic candidate in lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115900.
- [28] Du S Q, Zheng H. Role of FoxO transcription factors in aging and age-related metabolic and neurodegenerative diseases [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 188.
- [29] Wu Z Q, Qiu M H, Mi Z Y, *et al.* WT1-interacting protein inhibits cell proliferation and tumorigenicity in non-small-cell lung cancer via the AKT/FOXO1 axis [J]. *Mol Oncol*, 2019, 13(5): 1059-1074.
- [30] Wang M S, Han Q S, Jia Z R, *et al.* PPAR α agonist fenofibrate relieves acquired resistance to gefitinib in non-small cell lung cancer by promoting apoptosis via PPAR α /AMPK/AKT/FoxO1 pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(1): 167-176.
- [31] Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity [J]. *Ann Rev Pathol*, 2020, 15: 123-147.
- [32] Zheng T, Li S P, Zhang T, *et al.* Exosome-shuttled miR-150-5p from LPS-preconditioned mesenchymal stem cells down-regulate PI3K/Akt/mTOR pathway via Irs1 to enhance M2 macrophage polarization and confer protection against sepsis [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1397722.
- [33] Evans L, Milward K, Attanoos R, *et al.* Macrophage plasticity and function in the lung tumour microenvironment revealed in 3D heterotypic spheroid and explant models [J]. *Biomedicines*, 2021, 9(3): 302.
- [34] Colegio O R, Chu N Q, Szabo A L, *et al.* Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid [J]. *Nature*, 2014, 513(7519): 559-563.
- [35] Cole S W, Sood A K. Molecular pathways: Beta-adrenergic signaling in cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(5): 1201-1206.
- [36] Wu Y, Berisha A, Borniger J C. Neuropeptides in cancer: Friend and foe? [J]. *Adv Biol*, 2022, 6(9): 2200111.
- [37] Jiang S H, Hu L P, Wang X, *et al.* Neurotransmitters: emerging targets in cancer [J]. *Oncogene*, 2020, 39(3): 503-515.

[责任编辑 高源]