

【实验研究】

基于网络药理学和分子对接的鼓槌石斛素治疗宫颈癌作用机制探讨及实验验证

周吉^{1, 2#}, 郭振宇^{2#}, 李浩颖², 黄巧³, 李桐², 郭天瑶^{4*}

1. 长沙民政职业技术学院 医学院, 湖南 长沙 410004

2. 长沙医学院 第一临床学院, 湖南 长沙 410219

3. 长沙医学院 公共卫生学院, 湖南 长沙 410219

4. 中南大学湘雅二医院 病理科, 湖南 长沙 410012

摘要: 目的 采用网络药理学和分子对接方法, 探究鼓槌石斛素治疗宫颈癌的作用机制并进行体外实验验证。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP)、PharmMapper 和 SwissTarget Prediction 平台获得鼓槌石斛素的预测靶点; 在 GeneCards、TTD、OMIM、Disgenet、Drugbank 疾病数据库筛选宫颈癌的潜在靶点; 使用 R 软件 Venn 包获取鼓槌石斛素与宫颈癌的交集靶点基因, 利用 STRING 网站与 Cytoscape 软件获取蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 筛得核心靶点, 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; 运用 Autodock Vina 1.1.2 软件和 Pymol 软件进行鼓槌石斛素和核心靶点之间的分子对接和可视化分析。体外培养宫颈癌 SiHa 细胞, 用 0、50、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 鼓槌石斛素处理细胞, 采用 MTT 法、Transwell 实验分别检测鼓槌石斛素对细胞增殖、迁移和侵袭的影响, Western blotting 检测鼓槌石斛素对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、mTOR 关键蛋白的调控作用。结果 共得到 79 个鼓槌石斛素调控宫颈癌的潜在交集靶点, 按照网络拓扑分析中的度 (degree) 值筛选出 HSP90AA1、ESR1、PIK3CA、mTOR、MAPK1、ABL1、PARP1 等多个核心靶点; KEGG 富集筛选出 PI3K/Akt、Focal adhesion、细胞衰老、催乳素等 30 条信号通路; 分子对接结果显示, 其中靶蛋白 HSP90AA1、ESR1、PIK3CA、mTOR、MAPK1 与鼓槌石斛素结合能绝对值较高, 说明可能是鼓槌石斛素治疗宫颈癌的作用位点。细胞实验验证表明, 鼓槌石斛素处理 SiHa 细胞后, SiHa 细胞增殖明显减少 ($P < 0.01$), 且与鼓槌石斛素的浓度呈现负相关, 同时 SiHa 细胞的迁移和侵袭能力下降。鼓槌石斛素处理 SiHa 细胞后, 细胞中 p-PI3K、Akt、p-Akt 表达及 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 下调 ($P < 0.05$)。结论 鼓槌石斛素可通过多靶点、多通路发挥治疗宫颈癌的作用, 鼓槌石斛素可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的表达来影响宫颈癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 鼓槌石斛素; 宫颈癌; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 迁移; 侵袭**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2024) 05-0959-12**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.006

Exploring mechanism of action and experimental validation of chrysotoxine against cervical cancer based on network pharmacology and molecular docking

ZHOU Ji^{1, 2}, GUO Zhenyu², LI Haoying², HUANG Qiao³, LI Tong², GUO Tianyao⁴

1. Medical School, Changsha Social Work College, Changsha 410004, China

2. First Clinical College, Changsha Medical College, Changsha 410219, China

3. School of Public Health, Changsha Medical College, Changsha 410219, China

4. Department of Pathology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410012, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of chrysotoxine in the treatment of cervical cancer using network pharmacology and molecular docking and validate the results through cell-based experiments. **Methods** Predicted targets of chrysotoxine were

收稿日期: 2023-10-14**基金项目:** 湖南省教育厅项目 (18B538, 22C0682); 长沙医学院 ESI 学科专项 (2022CY033); 湖南省大学生创新创业训练计划 (湘教通 (2022)174 号-一般项目-4587); 湖南省卫生和计划生育委员会科研基金项目 (C20180139)***共同第一作者:** 周吉, 女, 博士, 研究方向为肿瘤分子生物学。E-mail: zhoujily0303@163.com

郭振宇, 男, 本科。E-mail: 1062680071@qq.com

***通信作者:** 郭天瑶, 男, 博士, 研究方向为肿瘤分子生物学。E-mail: guotianyao285@126.com

obtained by TCMSP, PharmMapper and SwissTarget Prediction platform. The potential targets of cervical cancer were screened in GeneCards, TTD, OMIM, Disgenet and Drugbank disease databases. R software Venn package was used to obtain common target genes of chrysotoxine and cervical cancer. STRING website and Cytoscape software were used to obtain the PPI network, screened the core targets, and analyzed them for GO and KEGG enrichment. Molecular docking and visualization between chrysotoxine and the core targets were conducted using Autodock Vina 1.1.2 and Pymol software. Cervical cancer cells SiHa were cultured and treated with 0, 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chrysotoxine *in vitro*, and the effects of chrysotoxine on cell proliferation, migration and invasion were detected by MTT assay and Transwell assay, respectively. The molecular mechanism of chrysotoxine against cervical cancer was performed by Western blotting, focusing on the regulatory proteins of p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, and mTOR in the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. **Results** A total of 79 potential common targets of chrysotoxine against cervical cancer were obtained, and then screened multiple core targets according to the degree value, such as: HSP90AA1, ESR1, PIK3CA, mTOR, MAPK1, ABL1, PARP1, et al. KEGG enrichment screened 30 pathways, including PI3K/Akt signaling pathway, Focal adhesion signaling pathway, cellular senescence signaling pathway, prolactin signaling pathway, et al. Molecular docking results showed that chrysotoxine had a higher affinity for target proteins, such as HSP90AA1, ESR1, PIK3CA, mTOR, and MAPK1, suggesting their potential role in chrysotoxine's anti-cervical cancer effects. Cellular experiments demonstrated that chrysotoxine significantly reduced the proliferation of SiHa cells ($P < 0.01$) and decreased their migration and invasion ability. Western blotting results further confirmed the down-regulation ($P < 0.05$) of p-PI3K, Akt, p-Akt, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt expression after treatment with chrysotoxine. **Conclusion** Chrysotoxine can exert therapeutic effects on cervical cancer through multi-targets and multi-pathways, and chrysotoxine may affect the proliferation and migration of cervical cancer cells by inhibiting the expression of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. These provide a reliable theoretical basis for the treatment of cervical cancer with chrysotoxine, and provide a new idea for the traditional Chinese medicine treatment of cervical cancer in the future.

Key words: chrysotoxine; cervical cancer; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; migration; invasion

宫颈癌是全球第4大常见的女性恶性肿瘤,其发生和发展与感染人乳头瘤病毒(HPV)密切相关^[1-2]。2021年全球最新的癌症统计数据显示,宫颈癌新发约60.4万例(占43.2%),居妇科恶性肿瘤新发病例首位,同时宫颈癌也是导致妇科肿瘤患者死亡的主要原因^[3]。临床上以手术为主要治疗方法,放化疗为辅助的治疗方案,但对晚期患者的治疗效果并不理想。近年来,放化疗虽能有效控制病情,但效果仍不理想,放疗后的患者常发生厌食、脱发等不良反应^[4]。在当前宫颈癌新发病例率和病死率居高不下,而放疗和化疗效果十分有限的大环境下,急需寻找疗效好、副作用小和更安全的治疗药物。

传统中药中的许多单体成分具有一定的抗肿瘤效果,不仅能控制肿瘤生长,还可减少放化疗所带来的副作用,延长患者生存期,提高患者生存率^[5-6]。石斛自古有“药中黄金”的美称,石斛中含有多种化学物质,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理作用^[7-9]。有研究表明,石斛中联苳类化合物毛兰素、石斛酚等对宫颈癌都具有明显的抑制作用和治疗效果,具有一定的潜在治疗价值^[10-11],鼓槌石斛素作为一种石斛中天然联苳类化合物,研究发现,其具有抗肿瘤多药耐药性的作用,对肿瘤细胞株K562

的生长具有明显的抑制作用^[12-13]。但是,其治疗宫颈癌的研究较少,分子机制尚不明确。

网络药理学是将药物的药理作用和作用机制紧密结合,通过分析各种复杂和多级相互作用的关系网络,阐明药物分子的协同作用和潜在机制,构建“成分-靶点-疾病”之间的互作关系^[14-15]。本研究拟通过网络药理学和分子对接技术挖掘鼓槌石斛素对宫颈癌的潜在作用靶点和信号通路,构建出“鼓槌石斛素-靶点-宫颈癌疾病”之间的互作关系,系统、全面地研究鼓槌石斛素和宫颈癌之间的关系,并且从整体视角出发预测药物靶点,提升鼓槌石斛素作为新药开发的效率。同时进一步结合体外实验来揭示鼓槌石斛素抗宫颈癌的分子作用机制。这为中医药对宫颈癌的治疗提供一定的理论基础,并为今后治疗宫颈癌提供了新的研究思路。

1 方法

1.1 鼓槌石斛素抗宫颈癌网络药理学分析

1.1.1 鼓槌石斛素作用靶点预测 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>, Version 2.3)和 SwissTarget Prediciton 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中检索获得鼓槌石斛素预测靶点。利用

Uniprot 蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org/>)将得到的预测靶点进行对应的蛋白名与基因名互换,以“Homo sapiens”作为物种限定前提,整合预测靶点结果标准化,最后合并去重后得到鼓槌石斛素的潜在靶点。

1.1.2 宫颈癌疾病相关靶点筛选 运用 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、OMIM(<http://omim.org>)、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、Disgenet(<https://www.disgenet.org/>)、Drugbank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)以“cervical cancer”为检索词进行疾病相关靶点的检索,并绘制成分靶点与疾病靶点相关 Venn 图。

1.1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及核心靶点的筛选 将筛选得到的鼓槌石斛素药物靶点与宫颈癌疾病靶点通过 R 软件 Venn 包取交集,得到共同靶点。将筛选得到的共同靶点导入 String11.0 (<https://string-db.org>, version 11.0) 平台在线数据库,以研究目标靶蛋白之间的相互作用,设置物种为“Homo sapiens”,构建 PPI 网络模型,并导入到 Cytoscape 3.9.0 软件。选用软件中 CytoNCA 插件筛选网络拓扑参数,根据度(degree)值筛选出鼓槌石斛素作用宫颈癌的核心靶点。

1.1.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 用 R 语言包及 Bioconductor 插件进行 GO 和 KEGG 富集分析,使用 Cluster Profiler 等处理数据和分析数据,对鼓槌石斛素潜在的抗宫颈癌靶点进行 GO 功能分析,分为生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)3个模块;KEGG 富集通路用于预测药物作用靶点的主要信号通路。获得结果后对其进行可视化展示。

1.1.5 分子对接模拟 将鼓槌石斛素和 PPI 网络中度值排名最高的5个靶点开展分子对接验证。使用 Uniprot 蛋白质数据库进行蛋白名和基因名之间的转换,蛋白质受体的晶体结构从 RCSB 蛋白质数据库(<http://www.rcsb.org/>)中获取,主要活性成分的3D结构从 PubChem 数据库下载,使用 Chem3D 软件对小分子的能量最小化处理。PyMol 2.5 软件运行去加氢、除水分子等命令。接着定义对接的盒子,使其成为包裹蛋白合适的活性口袋。再运用 AutoDock Tool 将所有蛋白质和鼓槌石斛素的结构转换为 PDBqt 格式,使用 AutoDock Vina 通过半柔性对接,计算出配体和受体之间的结合亲和力,并用 PyMol 2.5 软件可视化分子对接结果。

1.2 鼓槌石斛素对宫颈癌细胞增殖、迁移、侵袭及相关蛋白表达的影响

1.2.1 细胞培养 人宫颈癌 SiHa 细胞系来自于中国国家细胞库(NCBC),在 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素(碧云天)、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素(碧云天)和 10% FBS 培养基(Gibco 公司)中培养,孵育于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中。

1.2.2 MTT 法检测宫颈癌 SiHa 细胞增殖 取对数生长期生长状态良好的 SiHa 细胞,以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板中,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温细胞培养箱中培养 24 h 后,设置不同浓度的[0(对照)、25、50、75、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]的鼓槌石斛素[陶术生物(TargetMol),中国,99.34%,批号 T27012]组,并同时设不加细胞(只含培养基)的空白组,每个浓度设置 5 个复孔,药物作用 24、48 h 后,每孔加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ MTT,继续在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 4 h,每孔加入 $150\text{ }\mu\text{L}$ 的 DMSO(上海碧云天生物技术有限公司)。振荡溶解甲瓚结晶,用多功能酶标仪(Bio-Tek)在 570 nm 处,测定吸光度(A 值)。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{药物}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.3 Transwell 实验检测细胞迁移和侵袭水平 使用 24 孔 Transwell 小室对 SiHa 细胞进行跨孔迁移测定;采用 Transwell 小室上室涂覆基质胶用于侵袭测定。不同浓度(0、50、75、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的鼓槌石斛素处理宫颈癌 SiHa 细胞 24 h 后,取给药后的 1×10^5 个细胞加入 Transwell 小室的上室,Transwell 小室的下室充满 20% FBS 的培养基。孵育 24 h 后,下表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色 15 min, PBS 清洗 3 次,用干净无菌的棉球轻拭 Transwell 小室上侧未迁移或未侵袭的细胞,每孔随机选取 5 个视野观察并拍照记录。

1.2.4 Western blotting 检测蛋白的表达 用不同浓度 0、50、 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的鼓槌石斛素处理细胞 24 h 后,收集细胞。在 RIPA 裂解缓冲液中冰上裂解。裂解液超声并离心 15 min,收集上清液。细胞裂解液在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移至 PVDF 膜,室温下将含 5% 脱脂牛奶的 TBS-T(0.1% 聚山梨酯)封闭阻断非特异性结合 1.5 h 后,然后分别与指定的一抗 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt (Cell signaling, 1:1 000)、mTOR(碧云天, 1:1 000)在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,接下来,用 PBST 洗涤膜 3 次,并在室温下与辣根过氧化物酶偶联(HRP 偶联)的二抗(ABclonal, 1:2 000)孵育 1.5 h,用 PBST 洗膜 3 次,使用化学发光试剂盒(沈阳万类生物科技有限公司)检测蛋白信

号,利用 Image J 图像分析软件进行相关灰度分析。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,其中多组间差异比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼓槌石斛素抗宫颈癌网络药理学结果

2.1.1 鼓槌石斛素药物作用靶点 从 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获取鼓槌石斛素结构模式。通过 TCMSP、SwissTarget Prediction 和 PharmMapper 数据库获取鼓槌石斛素的靶点,合并去重后共得到 97 个相关靶点集合。

2.1.2 宫颈癌疾病的靶点及鼓槌石斛素-宫颈癌的靶点 在 GeneCards、OMIM、TTD、Disgenet、DrugBank 等疾病数据库搜索“cervical cancer”,共得到与宫颈癌疾病相关靶点 7 992 个,见图 1。运用 R 语言软件提取鼓槌石斛素与宫颈癌之间共同靶点

基因 79 个,并绘制 Venn 图,这些靶点被视为鼓槌石斛素与宫颈癌相互作用的潜在靶点,见图 2。

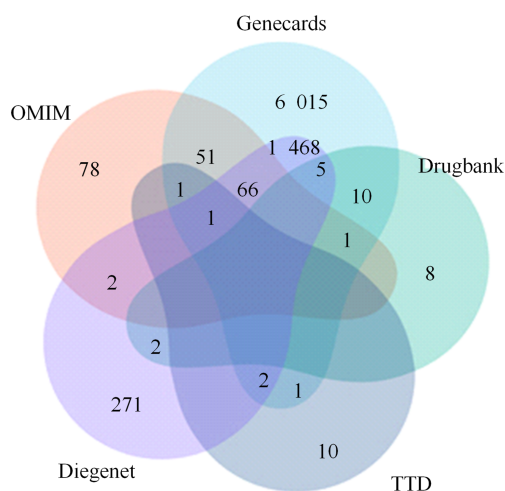


图1 宫颈癌疾病靶点筛选

Fig. 1 Cervical cancer targets

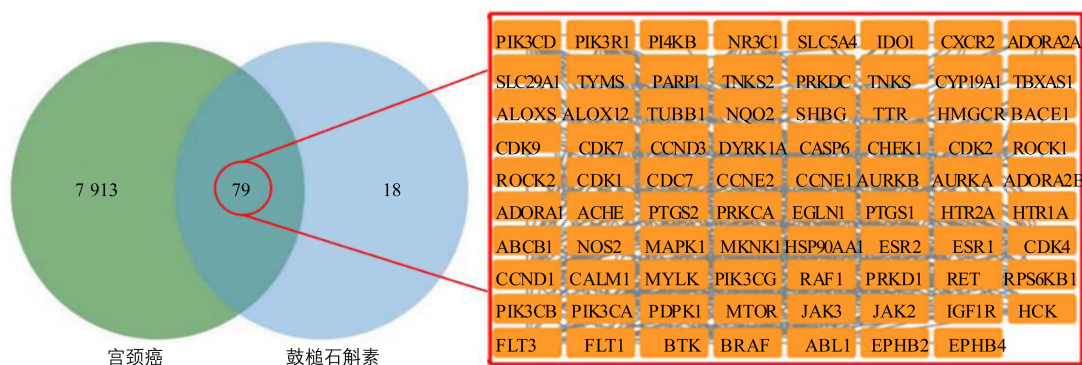


图2 鼓槌石斛素-宫颈癌的交集靶点

Fig. 2 Intersecting targets of chrysotoxine-cervical cancer

2.1.3 鼓槌石斛素对宫颈癌的作用靶点 PPI 网络及核心靶点蛋白 鼓槌石斛素对宫颈癌作用靶点的 PPI 网络图见图 3。共包括 79 个节点,535 条边。度值越大,节点越大,蛋白质间相互关系越密切。以大于度值平均值为筛选条件,其中较大度值的蛋白是鼓槌石斛素作用宫颈癌的关键靶点蛋白,分析可知,度值排名靠前的靶点为 HSP090AA1、ESR1、PIK3CA、mTOR、MAPK1、ABL1、PARP1、JAK2、PIK3R1,见图 4。

2.1.4 鼓槌石斛素与宫颈癌共有靶点的 GO 功能与 KEGG 通路富集分析 利用 R 语言包对 79 个交集的目标靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,GO 富集分

析包括:BP、CC、MF 3 个部分,以 $P < 0.05$ 为标准得到的所有数据中,取前 30 项 GO 注释条目(BP、CC、MF 各 10 项)、前 30 条 KEGG 信号通路,将结果进行可视化处理,见图 5 和 6。其中 BP 主要富集了蛋白质的 ADP-核糖化修饰、G 蛋白耦联腺蛋白受体、G 蛋白耦联嘌呤受体、环氧合酶通路等;CC 主要富集了细胞周期蛋白 E1-CDK2 复合物、磷脂酰肌醇-3-羟激酶复合物、细胞周期蛋白依赖激酶等;MF 主要富集了花生四烯酸酯 12-脂氧合酶、G 蛋白偶联腺苷受体活性、磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶活性等。通过 KEGG 通路富集分析,将得出前 30 条富集信息制成气泡图,其中颜色越深则表明富集程度越高,

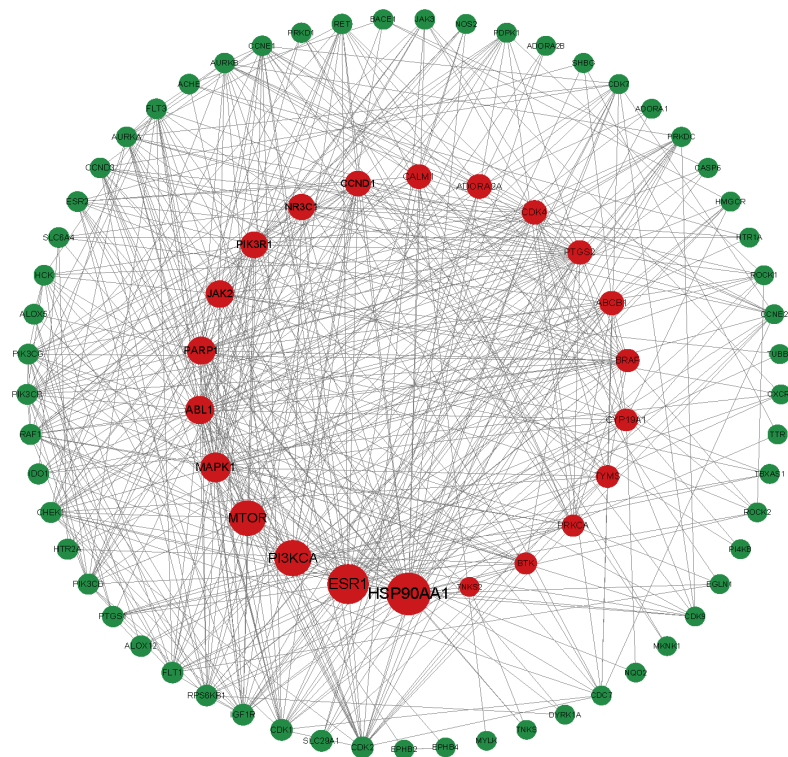


图3 鼓槌石斛素作用宫颈癌靶点的PPI网络

Fig. 3 PPI network diagram of targets for chrysotoxine-cervical cancer

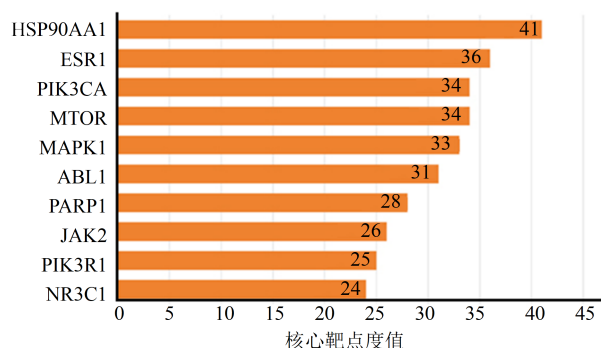


图4 鼓槌石斛素作用宫颈癌的核心靶点蛋白

Fig. 4 Core target proteins of chrysotoxine-cervical cancer

主要的富集通路包括:PI3K/Akt 信号通路、Focal adhesion 信号通路、细胞衰老信号通路、催乳素信号通路和 EGFR 等,这提示鼓槌石斛素可能通过与多个靶点相互结合,调控不同信号通路来发挥治疗宫颈癌的作用。

2.1.5 分子对接结果验证 分子对接分析可以预测和获得鼓槌石斛素与小分子的结合情况和相互作用力,从而进一步明确鼓槌石斛素治疗宫颈癌的关键靶标与活性成分之间结合程度与效果。当结合能(affinity) < 0 时,认为分子-蛋白质能自动结合;

结合能 < -21.0 kJ·mol⁻¹ 时,认为分子-蛋白质具有较好的结合性,且结合能越低提示结合的构象更加稳定。本研究选取鼓槌石斛素与筛选出的前 5 个核心靶点:热休克蛋白(HSP90AA1)、雌激素受体 1(ESR1)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PIK3CA)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、丝裂原活化蛋白激酶 1(MAPK1)进行分子对接,与上述靶点结合能分别为 -28.14、-29.4、-29.4、-31.2、-29.4 kJ·mol⁻¹,推测它们与鼓槌石斛素均有一定的结合潜力,见表 1。表明鼓槌石斛素能够很好地与关键核心靶点进行结合,一定程度验证了网络药理学鼓槌石斛素治疗宫颈癌推断的结果。氢键是主要的作用力,促使其牢固地结合到活性位点上,发现鼓槌石斛素均可与 HSP90AA1、ESR1、PIK3CA、mTOR、MAPK1 之间形成较强的氢键相互作用,其可视化的对接结果见图 7。

2.2 体外细胞实验结果

2.2.1 鼓槌石斛素对宫颈癌 SiHa 细胞增殖的影响 为了探究鼓槌石斛素是否影响宫颈癌的细胞生物学行为,利用不同浓度梯度的鼓槌石斛素处理宫颈癌 SiHa 细胞。通过观察发现,随着鼓槌石斛素处理浓度(0、50、75、100 μmol·mL⁻¹)的升高, SiHa 细胞出现肉眼可见的活力减弱,见图 8。通过 MTT 检

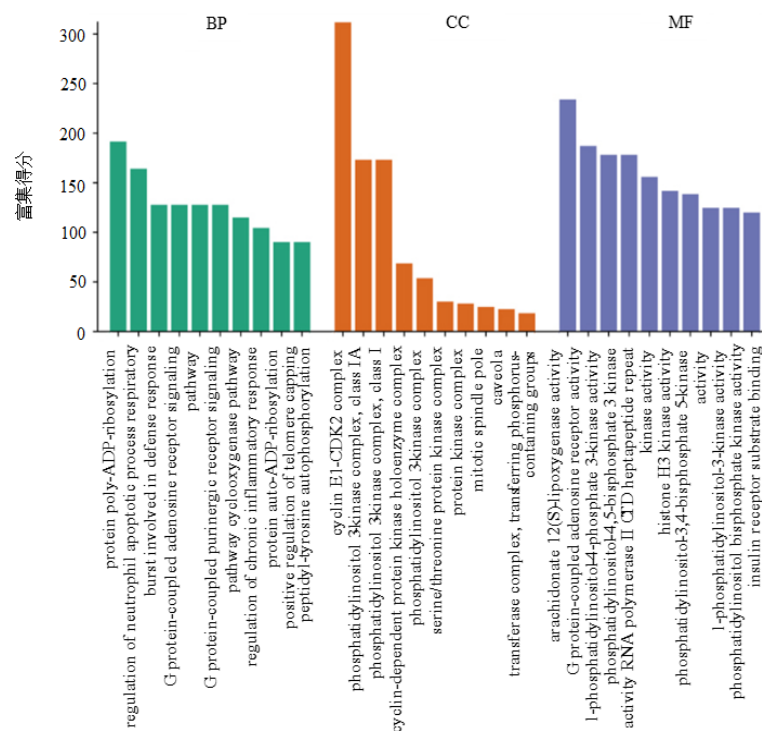


图 5 鼓槌石斛素作用宫颈癌靶点的 GO 富集分析

Fig. 5 GO enrichment analysis of targets for chrysotoxine-cervical cancer

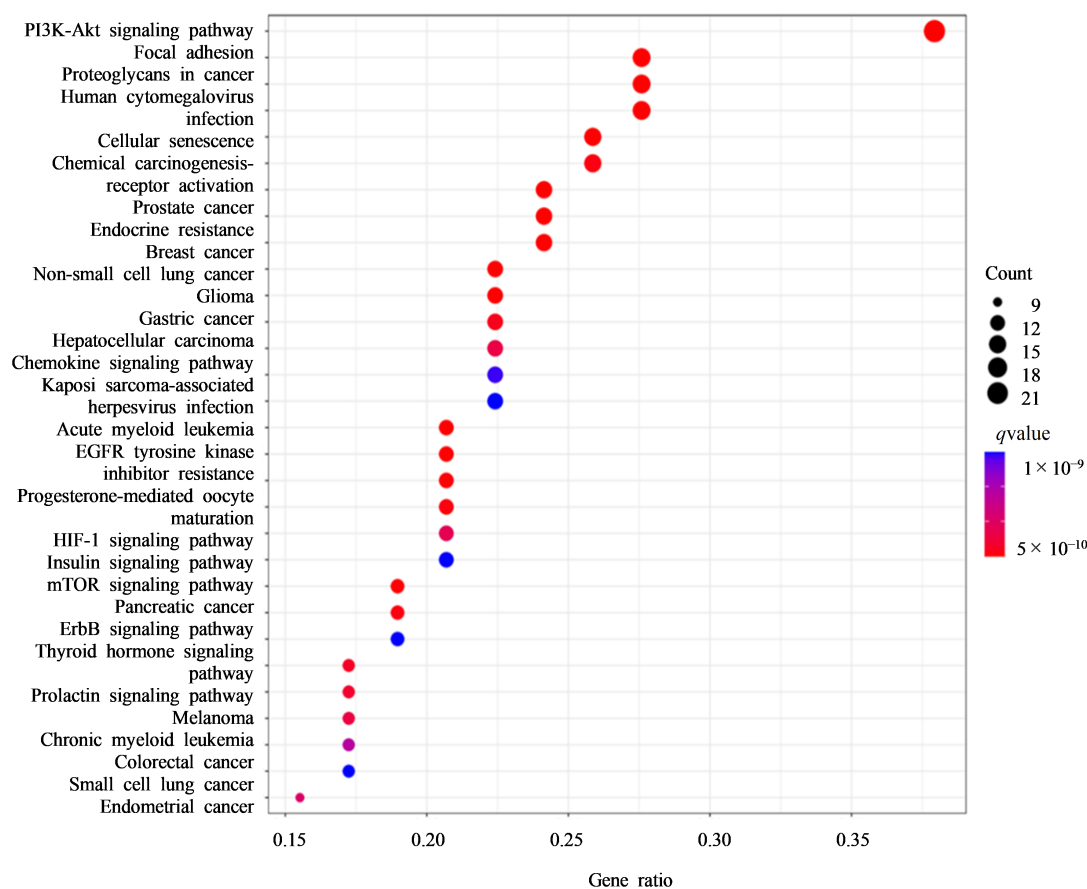


图 6 鼓槌石斛素作用宫颈癌靶点的 KEGG 通路分析

Fig. 6 KEGG pathway analysis of targets for chrysotoxine-cervical cancer

表 1 鼓槌石斛素与核心靶点的结合能
Table 1 Affinity between chrysotoxine and core target

配体	受体	PDB ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
鼓槌石斛素	HSP90AA1	1BYQ	-28.1
	ESR1	7BAA	-29.4
	PIK3CA	7K6M	-29.4
	mTOR	4DRI	-31.5
	MAPK1	6SLG	-29.4

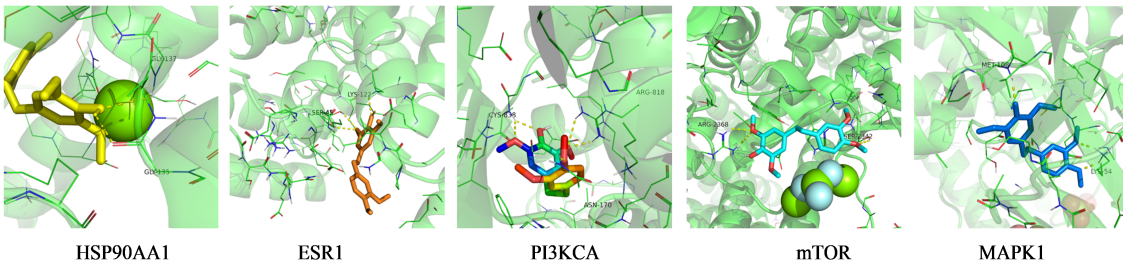


图 7 鼓槌石斛素与核心靶点的分子对接图
Fig. 7 Molecular docking of chrysotoxine and core targets

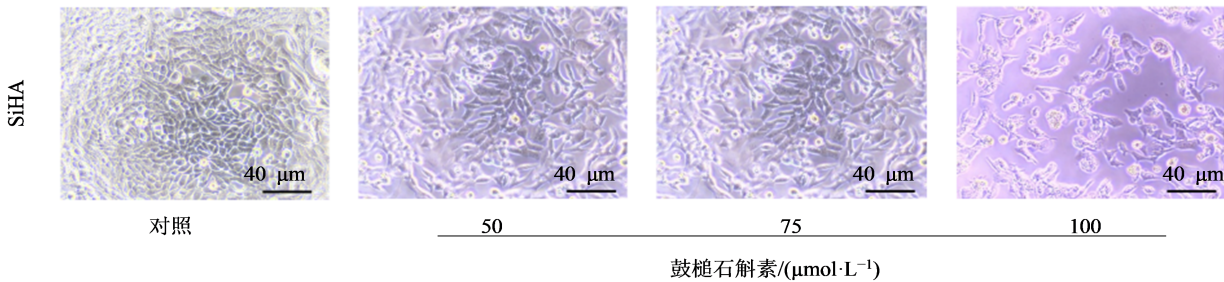


图 8 SiHa 细胞形态(×200)
Fig. 8 Morphology of SiHa cells(×200)

测增殖活性,发现 SiHa 细胞的活性随着鼓槌石斛素的浓度增加及培养时间的延长而下降。与对照组比较,鼓槌石斛素干预的 SiHa 细胞增殖率显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$),并与鼓槌石斛素浓度负相关,见图 9。说明了鼓槌石斛素能够抑制宫颈癌 SiHa 细胞的增殖。

2.2.2 鼓槌石斛素对宫颈癌 SiHa 细胞迁移和侵袭能力的影响 与对照组相比,鼓槌石斛素组 SiHa 细胞迁移和侵袭的个数都明显减少,说明宫颈癌 SiHa 细胞的迁移和侵袭的水平在鼓槌石斛素给药后明显降低,这提示鼓槌石斛素能够有效抑制 SiHa 细胞的迁移和侵袭能力,见图 10、11。

2.2.3 鼓槌石斛素对宫颈癌 SiHa 细胞 PI3K/Akt/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 结合 KEGG 通路富集和分子对接的结果,预测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可能参与了鼓槌石斛素对宫颈癌的治疗,因此

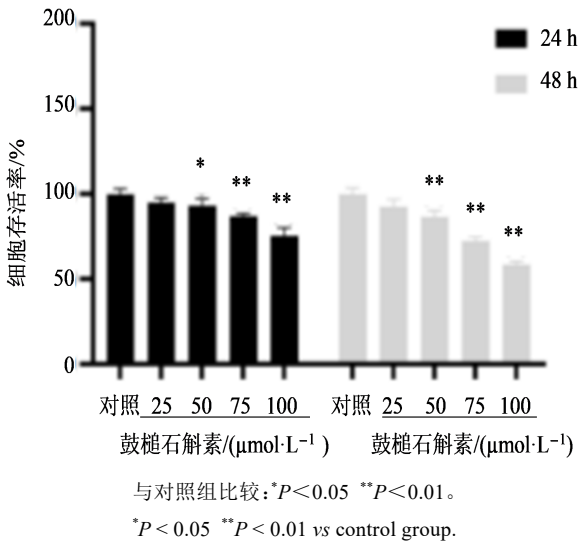


图 9 鼓槌石斛素对 SiHa 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)
Fig. 9 Effect of chrysotoxine on proliferation of SiHa cells($\bar{x}\pm s, n=5$)

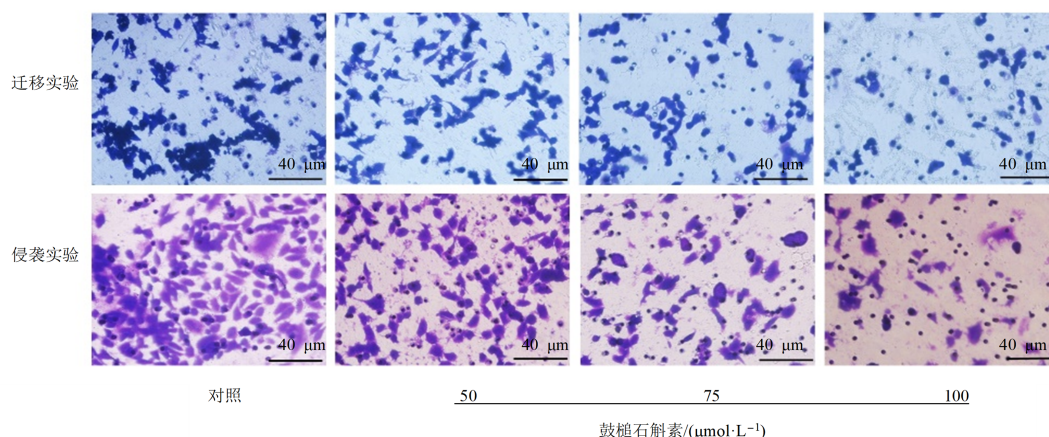
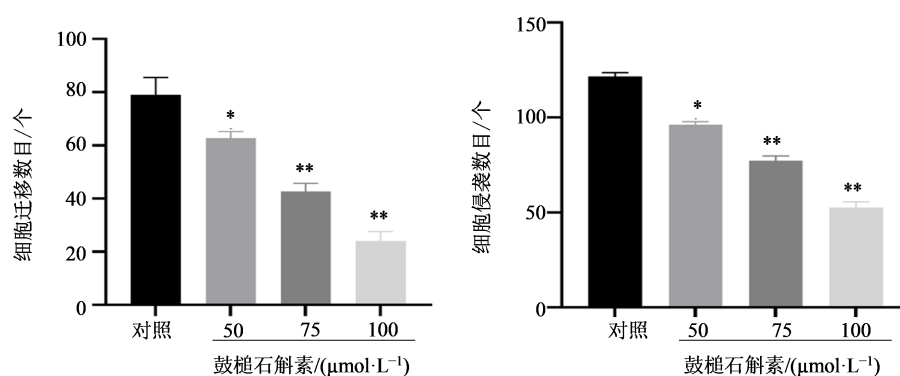


图 10 宫颈癌 SiHa 细胞的 Transwell 迁移实验和侵袭实验结果 (×200)
Fig. 10 Transwell migration assay and invasion assay of cervical cancer SiHa cells (×200)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 11 宫颈癌 SiHa 细胞的迁移数目

Fig. 11 Number of cells migrating of cervical cancer SiHa cells

Western blotting 实验检测了宫颈癌 SiHa 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 通路关键蛋白的表达。结果显示, 经鼓槌石斛素给药处理后, p-PI3K 与 p-Akt 的表达水平显著下降 ($P < 0.05$), 同时 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 显著降低 ($P < 0.05$), mTOR 蛋白的表达也明显减少 ($P < 0.05$), 见图 12、13。说明鼓槌石斛素可能通过抑制 SiHa 细胞中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的激活来有效抑制宫颈癌细胞的增殖能力和迁移及侵袭水平。

3 讨论

宫颈癌是常见的严重威胁女性身体健康的恶性肿瘤^[16]。由于宫颈癌细胞较强的增殖、侵袭和转移能力, 且宫颈癌患病年轻化的趋势明显, 对女性的身体健康造成严重的威胁, 影响患者的生活质量。在宫颈癌治疗中, 尽管放化疗取得了一定积极的临床效果, 但也存在着部分不可避免神经损

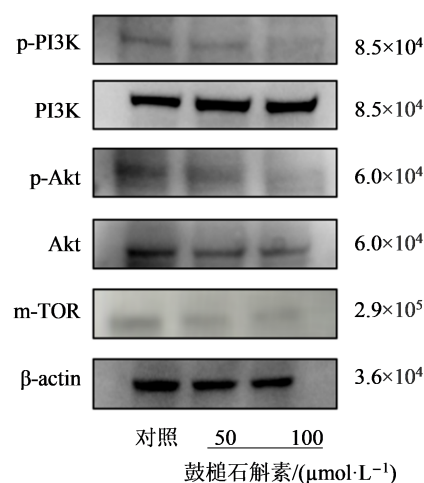


图 12 Western blotting 检测信号通路蛋白的表达

Fig. 12 Western blotting to detect expression of signaling pathway proteins

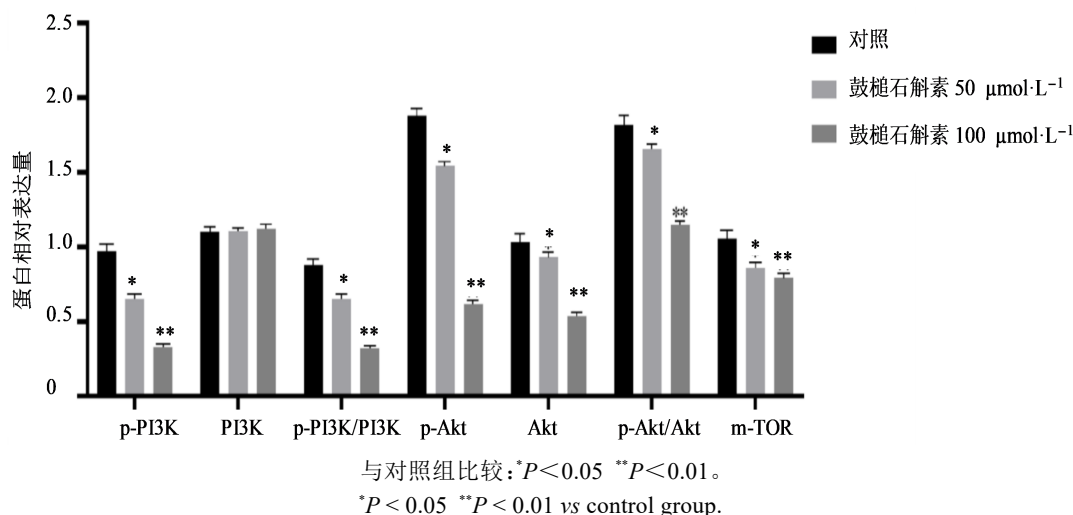


图 13 鼓槌石斛素对 SiHa 细胞中 PI3K/AKT/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 13 Effects of chrysotoxine on expression of proteins related to PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in SiHa cells

伤、肾毒性等不良反应,这对其临床应用造成了极大的限制^[17-18]。长期以来,中药以其经济、低毒、高效等优势在肿瘤防治过程中具有重要地位,越来越多的中药及成分被证实可通过抑制肿瘤细胞增殖、迁移和侵袭等发挥抗宫颈癌作用,在临床治疗中具有良好的应用价值^[19]。因此,在宫颈癌的发生发展过程中,不断探寻新型高效的抗宫颈癌中药及成分具有重大意义,同时也将为宫颈癌的治疗带来新的突破。

本研究借助网络药理学方法筛选出鼓槌石斛素抗宫颈癌的核心靶点,通过 GO 和 KEGG 富集,探索鼓槌石斛素作用于宫颈癌的潜在信号通路,通过分子对接技术可视化鼓槌石斛素与关键蛋白之间的互作关系,并开展体外细胞的相关实验,进一步验证了鼓槌石斛素具有抑制宫颈癌 SiHa 细胞活力的作用,通过 Transwell 实验检测了宫颈癌 SiHa 细胞的迁移和侵袭水平,证明了随着鼓槌石斛素浓度的升高,能有效抑制宫颈癌 SiHa 细胞的迁移能力,并降低了 SiHa 细胞的侵袭水平,这个过程可能通过调控 PI3K/AKT/mTOR 的信号通路完成的。

本研究首先通过网络药理学方法分析了鼓槌石斛素对宫颈癌的分子机制,其抗宫颈癌的核心靶点有: HSP90AA1、ESR1、PIK3CA、mTOR、MAPK1、ABL1、PARP1、JAK2、PIK3R1 等,这些关键靶点度值较高,提示以上靶点在治疗宫颈癌中可能发挥着重要作用。接着,分子对接结果表明 HSP90AA1、ESR1、PIK3CA、mTOR、MAPK1 蛋白与鼓槌石斛素均具有多个较强的氢键结合作用以及良好的结合能力。这提示,它们可能是药物与疾

病相互作用的关键节点。HSP90AA1 编码癌症伴侣蛋白 HSP90 α ,刺激生成肿瘤组织的新生血管而影响细胞的增殖与分化^[20]。血浆中的 HSP90 α 可作为宫颈癌早期可靠诊断以及术后治疗效果的评价指标,与肿瘤分期、分级、是否转移有关^[21]。有研究发现,姜黄素可能通过抑制 HSP90 蛋白的活性表现较强抗宫颈癌 HeLa 细胞的药物活性^[22]。ESR 是雌激素调节的转录因子。研究发现^[23],调控编码 ER α 的基因--雌激素受体 1 (ESR1) 的表达与宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞的迁移和侵袭性密切相关,并且 ESR1 的转录水平的降低与化疗耐药性有关^[24]。磷脂酰肌醇醇激酶 3 催化亚基 (PIK3CA) 作为一种致癌基因,参与细胞运动和黏附等生理功能的调控,PIK3CA 的表达与宫颈癌的癌前病变筛查、早期诊断、以及治疗和预后紧密相关^[25]。研究表明,给予 PIK3CA 相关抑制剂治疗的宫颈癌患者,检测其体内 PIK3CA 的突变状况可作为宫颈癌治疗效果的评价指标^[26]。作为 MAPK 信号通路的关键枢纽的丝裂原激酶蛋白激酶 1 (MAPK1),与细胞增殖、分化和转录调控等多种生命活动相关^[27],朱利红^[28]等研究表明,过表达 miR-198 能够靶向 MAPK1 而降低宫颈癌细胞的增殖和侵袭能力,诱导细胞的凋亡。

通过 KEGG 通路富集分析,预测了鼓槌石斛素防治宫颈癌的可能作用信号通路,结合鼓槌石斛素与关键核心蛋白的可视化对接,推测 PI3K/Akt/mTOR 信号通路在鼓槌石斛素抗宫颈癌作用中发挥重要作用。激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可抑制多种刺激诱发的细胞凋亡,促进肿瘤细胞的生存和增殖^[29-30],越来越多的发现证明,PI3K/Akt 信号通路

是宫颈癌发生发展的重要通路之一,且在多种癌症中起重要作用^[31-32]。激活的关键在于PI3K、Akt的磷酸化,而激活PI3K/Akt通路对细胞的增殖、迁移和侵袭起着重要的调控作用^[33]。Akt也称蛋白激酶B,是PI3K的关键信号转导因子和调节细胞生长的致癌基因。陈海燕等^[34]研究显示,花旗松素能够抑制宫颈癌SiHa细胞Akt磷酸化,减低宫颈癌SiHa细胞p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt比值的作用,通过降低PI3K/Akt/mTOR通路的活化来调控宫颈癌SiHa细胞的生物学行为。樊思轩等^[35]研究表明,甲基莲心碱能降低宫颈癌HeLa中p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt水平,有效抑制PI3K/Akt信号通路,进而抑制宫颈癌细胞的生长。本研究也同样发现,鼓槌石斛素能够有效降低宫颈癌SiHa细胞中p-PI3K、Akt、p-Akt的表达水平以及p-PI3K/PI3K和p-Akt/Akt说明鼓槌石斛素对宫颈癌细胞的抑制作用可能通过失活PI3K/Akt通路来实现。

mTOR是一种可以细胞生长、增殖、自噬等多种生物学过程的蛋白激酶。研究表明,Akt可活化mTOR,敲低G6PC能够使宫颈癌HeLa细胞Akt/mTOR信号通路失活,从而影响宫颈癌细胞增殖、侵袭及迁移等细胞生物学过程^[36],李颖等^[37]研究表明,KDR可调节PI3K/Akt/mTOR信号通路介导的宫颈癌增殖、迁移和侵袭过程,下调TP53INP1可限制宫颈癌细胞侵袭、迁移,其机制与调控PI3K/Akt/mTOR信号通路有关^[38]。本研究发现,鼓槌石斛素具有降低宫颈癌SiHa细胞mTOR蛋白表达的作用,提示鼓槌石斛素可通过抑制PI3K/Akt/mTOR通路的活化来发挥调控宫颈癌SiHa细胞的增殖、迁移和侵袭的作用。

综上所述,本实验运用网络药理学的方法和分子对接的技术证明鼓槌石斛素可通过多靶点、多通路发挥治疗宫颈癌的作用,并预测了鼓槌石斛素可能通过调控PI3K/Akt/mTOR信号通路来实现抗宫颈癌的治疗效果。最后采用细胞实验证明了鼓槌石斛素通过抑制宫颈癌的中的PI3K/Akt/mTOR信号通路来发挥抑制细胞增殖、迁移和侵袭的作用,也验证了本研究中网络药理学分析的结果。为鼓槌石斛素治疗宫颈癌提供了一定的理论价值,为宫颈癌新药的研究提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] de Sanjose S, Quint W G, Alemany L, et al. Human

papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: A retrospective cross-sectional worldwide study [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(11): 1048-1056.

[2] Herrero R, González P, Markowitz L E. Present status of human papillomavirus vaccine development and implementation [J]. *Lancet Oncol*, 2015, 16(5): e206-e216.

[3] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.

[4] 杨誉佳, 陆远富, 安强, 等. 藤梨根提取物对宫颈癌的抑制作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(7): 1710-1714, 1819-1820.

Yang Y J, Lu Y F, An Q, et al. Inhibition of *Actinidia arguta* extract on cervical cancer [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2019, 37(7): 1710-1714, 1819-1820.

[5] 李小江, 郭明歆, 孔凡铭, 等. 中药有效成分抗肿瘤活性及作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2020, 51(9): 2587-2592.

Li X J, Wu M X, Kong F M, et al. Review of anti-tumor activity and mechanism of Chinese materia medica active ingredients [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(9): 2587-2592.

[6] 陈鹰娜, 方芷若, 谢志豪. 中药抗肿瘤有效成分及其作用机制 [J]. *中药材*, 2023, 46(9): 2370-2374.

Chen Y N, Fang Z R, Xie Z H. Anti-tumor active ingredients of traditional Chinese medicine and their mechanisms of action [J]. *J Chin Med Mater*, 2023, 46(9): 2370-2374.

[7] 许婉琦, 王奕博, 孙志蓉. 石斛属植物抗肿瘤研究情况分析 [J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(1): 130-134.

Xu W Q, Wang Y B, Sun Z R. Antitumor research status analysis of *Dendrobium* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2017, 34(1): 130-134.

[8] 相萍萍, 王旭, 刘超. 铁皮石斛的最新应用研究 [J]. *西部中医药*, 2016, 29(1): 129-132.

Xiang P P, Wang X, Liu C. The latest study on TiePi ShiHu [J]. *West J Tradit Chin Med*, 2016, 29(1): 129-132.

[9] 邓光辉, 叶梦娟, 蔡肖, 等. 基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨霍山石斛治疗非酒精性脂肪肝的作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(16): 5244-5256.

Deng G H, Ye M J, Cai X, et al. Mechanisms of *Dendrobium huoshanense* against non-alcoholic fatty liver disease by network pharmacology combined with molecular docking and experimental validation [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2023, 54(16): 5244-5256.

[10] Li M T, He Y L, Peng C, et al. Erianin inhibits human cervical cancer cell through regulation of tumor protein p53 via the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(4): 5006-5012.

- [11] Kang H N, Sun Y M, Hu X J, et al. Gigantol inhibits proliferation and enhanced oxidative stress-mediated apoptosis through modulating of Wnt/ β -catenin signaling pathway in HeLa cells [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(1): e22944.
- [12] Ma G X. The activity of erianin and chrysotoxine from *dendrobium chrysotoxum* to reverse multidrug resistance in B16/h MDR-1 cells [J]. *J Chin Pharm Sci*, 1998(3): 30-34.
- [13] 王天山, 陆跃鸣, 马国祥, 等. 鼓槌石斛中化学成分对 K₅₆₂ 肿瘤细胞株生长抑制作用体外试验 [J]. *天然产物研究与开发*, 1997, 9(2): 1-3.
- Wang T S, Lu Y M, Ma G X, et al. *In vitro* inhibition activities of leukemia k₅₆₂ cells growth by constituents from *d. chrysotoxum* [J]. *NatProd Res Dev*, 1997, 9(2): 1-3.
- [14] 胡珉华, 冯元蓝, 周若愚, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨三七总皂苷干预异位骨化的作用机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 9(7): 948-958.
- Hu M H, Feng Y L, Zhou R Y, et al. Exploration on the mechanism of *Panax notoginseng* saponins in the treatment of heterotopic ossification based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2023, 9(7): 948-958.
- [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.
- Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of *Network Pharmacology Evaluation Method Guidance* [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [16] 李闪闪, 魏丹丹, 王红玲, 等. 中药单体调控宫颈癌信号通路的研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(2): 84-92.
- Li S S, Wei D D, Wang H L, et al. Research progress of single Chinese medicine in regulating signal pathway of cervical cancer [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(2): 84-92.
- [17] 付金平, 赵沁慧, 陈惠, 等. 柴胡桂枝干姜汤加减联合放疗对宫颈癌患者疗效及毒副反应的临床观察 [J/OL]. *中华中医药学刊*.
- Fu J P, Zhao Q H, Chen H, et al. Clinical observation on the curative effect and side effects of Chaihu Guizhi Ganjiang Tang combined with chemoradiotherapy in patients with cervical cancer [J/OL]. *Chin Arch Tradit Chin Med*.
- [18] 黄春兰, 洪慧勤, 孙颖芳, 等. 参芪抑瘤方联合放疗对中老年宫颈癌患者免疫功能及预后的影响 [J]. *中国当代医药*, 2022, 29(20): 88-91.
- Huang C L, Hong H Q, Sun Y F, et al. Effect of Shenqi Yiliu Formula combined with radiotherapy on immunefunction and prognosis of patients with middle and advanced cervical cancer [J]. *China Modern Med*, 2022, 29(20): 88-91.
- [19] 韩凤娟, 姜婷婷, 张茗. 中医药在宫颈癌治疗中的作用及其机制研究 [J]. *天津中医药大学学报*, 2018, 37(1): 80-83.
- Han F J, Jiang T T, Zhang M. Study on the function and mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of cervical cancer [J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med*, 2018, 37(1): 80-83.
- [20] Hou Q Y, Chen S H, An Q, et al. Extracellular Hsp90 α promotes tumor lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7747.
- [21] 陈莉萍, 曹婷, 李素芬, 等. Hsp90 α 及 SCC 在宫颈癌早期诊断及预后监测中的价值 [J]. *西部医学*, 2020, 32(1): 76-80.
- Chen L P, Cao T, Li S F, et al. The value of Hsp90 α and SCC in early diagnosis and prognosis monitoring of cervical cancer [J]. *Med J West China*, 2020, 32(1): 76-80.
- [22] 王静, 张雅雅, 刘涛, 等. Hsp90 潜在抑制剂姜黄素诱导人宫颈癌 Hela 细胞凋亡的机制 [J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(11): 2561-2565.
- Wang J, Zhang Y Y, Liu T, et al. The mechanisms of apoptosis in Hela cells induced by Hsp90 potential inhibitor curcumin [J]. *J Mod Oncol*, 2014, 22(11): 2561-2565.
- [23] Yi Y X, Liu Y Y, Wu W R, et al. Reconstruction and analysis of circRNA-miRNA-mRNA network in the pathology of cervical cancer [J]. *Oncol Rep*, 2019, 41(4): 2209-2225.
- [24] 沈兰, 陈春华, 叶冬云, 等. ESR1、MYOD1 和 hTERT 基因启动子 DNA 甲基化与宫颈癌放化疗敏感性的关系 [J]. *河北医药*, 2020, 42(1): 33-37.
- Shen L, Chen C H, Ye D Y, et al. Relationship between DNA methylation of ESR1, MYOD1, hTERT gene promoter and sensitivity to radiotherapy and chemotherapy in patients with cervical cancer [J]. *Hebei Med J*, 2020, 42(1): 33-37.
- [25] 陶雪娇, 王颖, 朱雪琼. PIK3CA 在宫颈癌中的研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(10): 8-11.
- Tao X J, Wang Y, Zhu X Q. Research progress of PIK3CA in cervical cancer [J]. *J Med Res*, 2014, 43(10): 8-11.
- [26] Husseinazadeh N, Husseinazadeh H D. mTOR inhibitors and their clinical application in cervical, endometrial and ovarian cancers: A critical review [J]. *Gynecol Oncol*, 2014, 133(2): 375-381.
- [27] 金玲, 徐天华, 王晓丽. 罗格列酮对乳腺癌 4T1 细胞迁移侵袭和 p38 MAPK 信号通路的影响 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2019, 24(8): 700-705.

- Jin L, Xu T H, Wang X L. Effects of rosiglitazone on migration and invasion of breast cancer 4T1 cells and p38 MAPK signaling pathway [J]. Chin Clin Oncol, 2019, 24 (8): 700-705.
- [28] 朱利红, 段树鹏, 秦海霞, 等. MiR-198 靶向 MAPK1 调控宫颈癌 HeLa 细胞增殖、凋亡和侵袭 [J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45(12): 959-964.
- Zhu L H, Duan S P, Qin H X, et al. MiR-198 targets MAPK1 to regulate proliferation, apoptosis and invasion of cervical cancer HeLa cells [J]. Cancer Res Prev Treat, 2018, 45(12): 959-964.
- [29] 陈明, 王举涛, 吴珍妮, 等. 半枝莲总黄酮通过 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 1358-1364.
- Chen M, Wang J T, Wu Z N, et al. Effect of total flavonoids in *Scutellaria barbata* in mediating autophagy in tumor cells via PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. China J Chin Mater Med, 2017, 42(7): 1358-1364.
- [30] 程卉, 张璇, 苏婧婧, 等. 新藤黄酸通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导黑色素瘤 B16 细胞凋亡的研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(9): 1666-1669.
- Cheng H, Zhang X, Su J J, et al. Study of gambogenic acid-induced apoptosis of melanoma B16 cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathways [J]. China J Chin Mater Med, 2014, 39(9): 1666-1669.
- [31] 王艳, 张金辉, 赵永辰, 等. 红杉黄酮通过下调 PI3K/AKT 信号通路抑制胃癌细胞增殖侵袭等干细胞特性 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2023, 28(5): 508-513.
- Wang Y, Zhang J H, Zhao Y C, et al. Sequoiaflavone inhibits stem cell properties such as proliferation and invasion of gastric cancer cells by down-regulating PI3K/AKT signaling pathway [J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2023, 28(5): 508-513.
- [32] Jiang N N, Dai Q J, Su X R, et al. Role of PI3K/AKT pathway in cancer: The framework of malignant behavior [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(6): 4587-4629.
- [33] Wang Q, Chen X Y, Hay N. Akt as a target for cancer therapy: More is not always better (lessons from studies in mice) [J]. Br J Cancer, 2017, 117(2): 159-163.
- [34] 陈海燕, 曾雪莉. 花旗松素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对宫颈癌 SiHa 细胞自噬、凋亡和衰老的影响 [J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(6): 789-796.
- Chen H Y, Zeng X L. Effects of taxifolin on autophagy, apoptosis and senescence of SiHa cells in cervical cancer through PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2022, 41(6): 789-796.
- [35] 樊思轩, 舒丽莎, 任美颖. 基于 PI3K/Akt 信号通路探讨甲基莲心碱对 HeLa 细胞的影响 [J]. 中成药, 2023, 45 (7): 2185-2192.
- Fan S X, Shu L S, Ren M Y. Effects of neferine on HeLa cells via PI3K/Akt signaling pathway [J]. Chin Tradit Pat Med, 2023, 45(7): 2185-2192.
- [36] 邓春玲, 朱坤, 刘涛瑞, 等. 敲低葡萄糖-6-磷酸酶催化亚基(G6PC)阻断 AKT/mTOR 通路抑制宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(6): 520-526.
- Deng C L, Zhu K, Liu T R, et al. G6PC knockdown blocks AKT/mTOR pathway to inhibit proliferation, invasion and migration of cervical cancer HeLa cells [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2021, 37(6): 520-526.
- [37] 李颖, 王凯, 胡莉. KDR 调节 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对宫颈癌增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(12): 2113-2120.
- Li Y, Wang K, Hu L. Influences of KDR on the proliferation, migration and invasion of cervical cancer by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Chin J Birth Health Hered, 2022, 30(12): 2113-2120.
- [38] 龙燕, 李卉, 吴玲艳. 下调 TP53INP1 基于 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对宫颈癌细胞凋亡、侵袭、迁移的影响 [J]. 河北医药, 2023, 9(3): 388-391.
- Long Y, Li H, Wu L Y. Effects of down-regulated TP53INP1 on apoptosis, invasion and migration of cervical cancer cells: Based on PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Hebei Med J, 2023, 9(3): 388-391.

[责任编辑 齐静雯]