

网络药理学结合体外实验验证白屈菜红碱抗黑色素瘤的作用机制

李欣茹^{1,4}, 李哲^{1,3}, 王群¹, 韦美燕^{1,3}, 钱贵芸^{1,3}, 刘杰¹, 韩伟^{1,2,3*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

2. 贵州省道地药材种质创新与资源高效利用全省重点实验室, 贵州 贵阳 550025

3. 贵州中医药大学兽用中药制剂创新研发中心, 贵州 贵阳 550025

4. 上海中医药大学交叉科学研究院, 上海 201203

摘要: **目的** 采用网络药理学方法预测白屈菜红碱(CHE)抗黑色素瘤的作用机制,通过体外细胞实验验证作用机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库、Swiss Target Prediction 数据库预测 CHE 作用的靶点集, GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库收集黑色素瘤的相关靶点,获得 CHE 抗黑色素瘤的交集靶点;应用 STRING 数据库构建靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,并进行拓扑网络分析得到 CHE 抗黑色素瘤的核心靶基因;通过 DAVID 数据库进行基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;借助 AutoDock Vina 软件将核心靶基因与 CHE 进行分子对接。运用 CCK-8、乳酸脱氢酶(LDH)、流式细胞仪、Annexin V-FITC 染色和 Western blotting 实验验证 CHE 抗黑色素瘤 B16 细胞的作用机制。**结果** 网络药理学获得 CHE 抗黑色素瘤的交集靶点 46 个, PPI 网络核心蛋白为 MTOR、GSK3B、MAPK1、PIK3CA、BRAF 等; GO 富集涉及 228 个条目, 主要涉及信号转导、细胞凋亡和增殖调控等; KEGG 通路富集分析得到 137 个条目, 主要涉及癌症和磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 等信号通路; 分子对接结果表明 CHE 与关键靶点具有较好的结合活性。体外实验表明, CHE 能够明显抑制 B16 细胞增殖并诱导细胞凋亡, 能够显著降低 p-PI3K、p-Akt、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 蛋白的表达, 能够显著增加 Bax 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。**结论** CHE 具有抗黑色素瘤 B16 细胞增殖的作用, 该作用与 PI3K-Akt 信号通路密切相关, 其可通过下调 p-PI3K、p-Akt 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 上调促凋亡蛋白 Bax 的表达, 来抑制黑色素瘤 B16 细胞增殖并诱导其凋亡。

关键词: 白屈菜红碱; 黑色素瘤; 网络药理学; 细胞实验; B16 细胞; PI3K-Akt

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)01-0166-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.01.015

Combining network pharmacology with *in vitro* experiments to verify mechanism of action of chelerythrine against melanoma

LI Xinru^{1,4}, LI Zhe^{1,3}, WANG Qun¹, WEI Meiyun^{1,3}, QIAN Guiyun^{1,3}, LIU Jie¹, HAN Wei^{1,2,3}

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Germplasm Innovation and High-efficiency Utilization of Indigenous Medicinal Materials, Guiyang 550025, China

3. Innovation Research and Development Center of Veterinary Traditional Chinese Medicine Preparations, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

4. Institute of Interdisciplinary Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective To predict the mechanism of action of chelerythrine (CHE) against melanoma using network pharmacology, and to verify the mechanism of action through *in vitro* cell experiments. **Methods** The target sets of CHE were predicted through the TCMSP database and Swiss Target Prediction database. The relevant targets of melanoma were collected from the GeneCards, OMIM, and TTD databases to obtain the intersection targets of CHE against melanoma. The STRING database was applied to construct the

收稿日期: 2025-08-01

基金项目: 贵州省科技厅基础研究计划一般项目(黔科合基础-ZK [2022] 一般 472); 贵州中医药大学大学生创新创业训练计划项目(贵中医大创合字 [2022] 19 号); 贵州省高等学校中药民族药(苗药)新剂型新制剂工程研究中心(黔教技 [2022] 022 号); 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室(贵州医科大学)开放课题基金资助项目(黔教合 KY 字 [2019] 047 号)

作者简介: 李欣茹(2002—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事中药药理研究。E-mail: 907804272@qq.com

***通信作者:** 韩伟(1988—), 男, 讲师, 博士, 主要从事中药药理研究。E-mail: gyzyxyhan@163.com

protein-protein interaction network (PPI) of the targets, and topological network analysis was carried out to obtain the core target genes of CHE against melanoma. Gene Ontology (GO) function and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis was performed through the DAVID database. The AutoDock Vina software was used to perform molecular docking between the core target genes and CHE. CCK-8 assay, LDH assay, flow cytometry, Annexin V-FITC staining assay, and Western blotting assay were used to verify the mechanism of action of CHE against melanoma. **Results** Network pharmacology obtained 46 intersection targets of CHE against melanoma. The core proteins in the PPI network were MTOR, GSK3B, MAPK1, PIK3CA, BRAF, etc. GO enrichment involved 228 items, mainly related to signal transduction, regulation of apoptosis and cell proliferation, etc. KEGG pathway enrichment analysis obtained 137 items, mainly related to cancer and signaling pathways such as PI3K-Akt. The results of molecular docking showed that CHE had good binding activity with key targets. *In vitro* experiments showed that CHE could significantly inhibit the proliferation of B16 cells, induce apoptosis, significantly reduce the expression of p-PI3K, p-Akt, and Bcl-2 proteins, and significantly increase the expression of Bax protein. **Conclusion** CHE can inhibit the proliferation and induce apoptosis of melanoma B16 cells by down regulating the expression of p-PI3K, p-Akt and anti-apoptotic protein Bcl-2, and up regulating the expression of Pro apoptotic protein Bax. This study laid a foundation for the research and development of CHE as a potential candidate drug for melanoma treatment.

Key words: chelerythrine; melanoma; network pharmacology; cell experiment; B16 cells; PI3K-Akt

黑色素瘤是一种恶性程度高、致死率高的恶性肿瘤^[1]。研究表明,在皮肤肿瘤死亡病例中,80%以上的死亡由黑色素瘤引起^[2]。我国每年新发黑色素瘤患者约 2 万例,且近年来其发病率呈持续上升趋势^[3]。至此,黑色素瘤已成为严重威胁人类生命安全的皮肤肿瘤类型。目前,黑色素瘤的常见治疗手段包括手术治疗、化学治疗和免疫治疗等,但这些方案仍存在局限性,如整体疗效有限、不良反应较为显著、免疫应答率低及耐药性等问题^[4]。此外,黑色素瘤的发病机制尚未明确,药物联合治疗方案也处于探索阶段。因此,为突破黑色素瘤治疗的局限性,有必要寻找有效的靶点来抑制黑色素瘤的发生发展,积极探索新型治疗黑色素瘤的手段。

白屈菜红碱(CHE)是从白屈菜、博落回、飞龙掌血和血水草等药用植物中提取的主要有效成分,是一种苯并菲啶生物碱类化合物^[5],具有苯并菲啶的母核结构,存在多个耦合的苯环和杂环。近年来,大量研究证实 CHE 具有广泛的药理活性^[6-8],除抗炎、抗菌等作用外,在抗肿瘤领域亦展现出突出潜力^[9-13],可通过多种途径对肝癌、胃癌、肺癌等肿瘤细胞发挥抑制增殖、诱导凋亡、阻滞细胞周期等作用^[14-20]。然而,关于 CHE 对黑色素瘤的作用及具体分子机制,目前研究仍较为匮乏,尚未能全面揭示其抗黑色素瘤的作用靶点与通路。鉴于黑色素瘤严峻的临床治疗现状,以及 CHE 潜在的抗肿瘤价值,本研究拟运用网络药理学方法^[21],预测 CHE 抗黑色素瘤的作用靶点与相关通路,再结合体外细胞实验进行验证,旨在深入探究 CHE 抗黑色素瘤

的作用机制,为其后续作为黑色素瘤治疗潜在候选药物的研发与应用提供理论依据和实验支持。

1 材料

1.1 细胞和试剂

小鼠 B16 黑色素瘤细胞(货号: ZQ0186)购自上海中乔新舟生物科技有限公司。CHE 原料药(货号: 34316-15-9,质量分数>98%)购自西安开来生物工程有限公司;胎牛血清(货号: C04001)购自上海逍鹏生物科技有限公司;CCK-8 试剂盒、 β -actin、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(货号: G4103、GB15003、GB23303)购自武汉赛维爾生物科技有限公司;Annexin V-FITC、乳酸脱氢酶(LDH)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液(货号: C1062S、C0016、P0012、P0013B)购自上海碧云天生物技术有限公司; p-蛋白激酶 B (p-Akt) 抗体(货号: WLP001A)购自沈阳万类生物科技有限公司; p-磷脂酰肌醇-3-激酶 (p-PI3K)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bax 抗体(货号: BS-6417R、BS-0032R、BS-0127R)购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 仪器

BPN-80CH (UV) 型二氧化碳培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); CKX53 型倒置生物显微镜(日本奥林巴斯光学工业股份有限公司); H2050R 型台式低速大容量离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); Multiskan Sky 型全波长酶标仪(赛默飞世尔科技公司); Accuri C6 型流式细胞仪(美国 BD 公司); Mini TBC 型小型湿式转印电泳系统、Mini P-4 型小型垂直电泳系统(北京凯元信瑞仪器

有限公司); SCG-W2000 型化学发光成像仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 CHE 作用靶点预测

利用 PubChem 数据库对 CHE 分子结构进行确定。将 CHE 的 SMILE name (在 PubChem 数据库中获取) 导入 Swiss Target Prediction 数据库中, 检索可得 CHE 的作用靶点集。

2.2 黑色素瘤相关疾病靶点及药物-疾病共同靶点获取

利用 Genecards、OMIM 和 TTD 数据库, 以“Melanoma”为关键词检索, 得到黑色素瘤相关作用靶点。使用 UniProt 数据库中 UniProt KB 功能, 输入疾病靶点名称, 获得相应靶点的 UniProt 号, 得到黑色素瘤相关靶点基因集。将 CHE 作用靶点与黑色素瘤疾病靶点通过 Venny2.1.0 平台绘制 Venn 图, 取交集靶点作为 CHE 抗黑色素瘤的潜在靶点进行机制探讨。

2.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络构建及可视化

将 CHE 对黑色素瘤的潜在作用靶点导入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络, 物种设定为“Homo sapiens”, 获得所预测靶点的相互作用关系。利用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 进行可视化, 并利用 CytoNCA 插件进行靶标蛋白的筛选处理, 通过插件中度 (degree) 值计算功能筛选得到药物-疾病作用核心靶点, 其中 degree 值越大, 通常成为核心靶点的概率越大^[22-23]。接着利用 Network Analyzer 工具的拓扑属性分析中介中心性 (BC), 数值越高, 通常代表该节点在网络信息流中的“媒介”作用越关键。

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

基于 DAVID 数据库对交集靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析得到靶点的功能水平分析结果, $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义, 筛选排名前 10 的结果。KEGG 通路分析, 限定只展示 $P < 0.01$ 的 KEGG 结果, 筛选排名前 20 的结果。将筛选出 CHE 抗黑色素瘤可能参与的生物学过程 (BP) 与涉及的信号通路, 利用 Bioinformatics 平台对结果进行可视化。

2.5 分子对接

使用 PubChem 数据平台检索得到 CHE 分子结构的 SDF 文件, 在蛋白结构 PDB 数据库下载核心靶蛋白的晶体结构 PDB 文件, 对蛋白进行能量最

小化和几何结构优化; 使用 AutoDockTools 软件处理 SDF 和 PDB 文件转换为 PDBQT 格式文件。最后使用 PyMol 软件运行 PDBQT 文件完成分子对接, 并将对接后化合物与蛋白形成的复合物进行可视化。

2.6 细胞培养

将 B16 细胞培养于含 10% 的胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养; 采用 0.25% 胰酶常规消化细胞并传代。

2.7 CCK-8 法检测细胞活性

取对数生长期的 B16 细胞以 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板, 过夜培养。基于前期已验证的有效剂量筛选结果^[9], 向各试验孔分别加入 57.4、114.8、229.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CHE 孵育 48 h, 每孔再加入 10 μL CCK-8 溶液处理细胞 2 h。使用酶标仪测量各孔在 450 nm 波长处的吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。

$$\text{存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.8 LDH 测定细胞毒性试验

细胞上清液 LDH 活性可以评价细胞膜损伤的情况进而测定药物对细胞的毒性。细胞接种、分组及给药同“2.7”项, 经 CHE 孵育 48 h 后, 收集细胞上清。根据 LDH 试剂盒操作说明测定各孔 LDH 浓度。

2.9 流式细胞术分析及 Annexin V/FITC-PI 双染评价细胞凋亡

取对数生长期 B16 细胞, 以细胞密度为 2×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔培养板中, 培养 24 h, 用不同浓度 0 (对照)、57.4、114.8、229.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 CHE 孵育 48 h。收集细胞, 用冷磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤, 1 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 重悬于 100 μL 含有 2.5 μL Annexin V/FITC 和 1 μL PI 的结合缓冲液中并混匀。细胞在室温避光孵育 15 min。采用流式细胞仪和荧光显微镜对细胞进行分析。

2.10 Western blotting 法检测蛋白表达

取对数生长期的 B16 细胞接种于 6 孔板, 分组及给药同“2.7”项, 细胞贴壁后, 分别加入 CHE 孵育 48 h, 加入 RIPA 裂解液 30 min, 用刮刀将细胞刮下, 收集至离心管中, 将细胞 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 取上清液一部分样品进行 BCA 蛋白含量测定, 另一部分高温煮沸使其变性。样品进行 SDS-PAGE 电泳, 然后转膜仪湿转至 NC 膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液封闭 2 h, 加入一抗 (1:1 000) 4 °C 过夜, 第二天洗膜, 孵育二抗 (1:2 000) 室温避光孵育 2 h, 再次洗膜, 化学发光成像仪曝光, 统计处理灰度值。

2.11 统计分析

使用 Origin 8.0 软件进行。所有数据均以至少 3 次实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行组间比较。 $P < 0.05$ 被认为具有统计学显著性。

3 结果

3.1 CHE 与黑色素瘤作用靶点预测结果

从 Genecards、OMIM 和 TTD 数据库获得黑色素瘤相关的靶基因 2 117 个,TCMSP 和 Swiss Target Prediction 数据库预测 CHE 相关的靶点 116 个。将药物靶点映射到疾病靶点中,最终获得 CHE 抗黑色素瘤的潜在交集靶点 46 个(表 1),绘制 Venn 图(图 1-A)。

3.2 CHE 潜在作用靶点互作网络构建与分析

基于 STRING 平台获取 CHE 抗黑色素瘤靶点间的互作信息,在 Cytoscape 3.9.1 软件中进行可视化及分析,得到 CHE 抗黑色素瘤靶点 PPI 网络(图 1-B)。基于 MCODE 算法将庞大的 PPI 网络划分成若干个密度较高的子模块,不同的颜色节点代表它们属于不同的功能模块,同一个颜色(模块)内的蛋白可能参与相同或相似的 BP,节点大小与 Degree 值呈正相关。该网络包括 46 个节点,216 条边,利用 Network Analyzer 工具的拓扑属性分析中介中心性(BC)。将 PPI 网络中节点的 Degree 值和 BC 值均高于平均值的节点作为 CHE 抗黑色素瘤的核心靶点。经计算得到综合排名前 5 的可能是关键靶点,包括 MTOR、GSK3B、MAPK1、PIK3CA、BRAF(表 2)。

3.3 GO 与 KEGG 通路富集分析

本研究利用 DAVID 数据库对 CHE 抗黑色素瘤的潜在靶标进行 GO 和 KEGG 通路富集分析,以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判断标准。GO 功能富集分析共获得 228 条,其中 BP 156 条,主要涉及凋亡过程的负调控、蛋白磷酸化、氧化应激反应、细胞增殖正调控、MAPK 级联调控等;细胞组分(CC) 38 条,主要涉及胞浆、细胞质、核质、细胞膜、蛋白质复合物等;分子功能(MF) 34 条,主要涉及蛋白激酶活性、ATP 结合、酶结合、相同蛋白结合、蛋白质结合等。KEGG 通路富集分析结果显示,共获得 137 条信号通路,主要涉及 PI3K-Akt、ErbB、MAPK、mTOR、肿瘤等信号通路。结果表明,CHE 可能通过调控多种生物功能与信号通路,多途径发挥抗黑色素瘤的作用(图 2)。

表 1 CHE 与黑色素瘤的交集靶点信息

Table 1 Information of intersection targets between CHE and melanoma

序号	Uniport	基因
1	P15056	<i>BRAF</i>
2	P42336	<i>PIK3CA</i>
3	P35354	<i>PTGS2</i>
4	O14965	<i>AURKA</i>
5	Q9UBN7	<i>HDAC6</i>
6	Q16769	<i>QPCT</i>
7	Q92769	<i>HDAC2</i>
8	O96017	<i>CHEK2</i>
9	Q16539	<i>MAPK14</i>
10	P13726	<i>F3</i>
11	Q96EB6	<i>SIRT1</i>
12	P42345	<i>MTOR</i>
13	P23219	<i>COX2</i>
14	P42338	<i>PIK3CB</i>
15	O00329	<i>PIK3CD</i>
16	P48736	<i>PIK3CG</i>
17	P53350	<i>PLK1</i>
18	P28482	<i>MAPK1</i>
19	O14757	<i>CHEK1</i>
20	O60674	<i>JAK2</i>
21	P04629	<i>NTRK1</i>
22	P19634	<i>SLC9A1</i>
23	P37840	<i>SNCA</i>
24	P04818	<i>TYMS</i>
25	Q92934	<i>BAD</i>
26	P06401	<i>PGR</i>
27	P49841	<i>GSK3B</i>
28	P41279	<i>MAP3K8</i>
29	Q13547	<i>HDAC1</i>
30	Q14457	<i>BECN1</i>
31	O75116	<i>ROCK2</i>
32	P24864	<i>CCNE1</i>
33	P23443	<i>RPS6KB1</i>
34	Q9H492	<i>MAP1LC3A</i>
35	P53779	<i>MAPK10</i>
36	Q7Z2W7	<i>TRPM8</i>
37	Q16790	<i>CA9</i>
38	Q9Y263	<i>PLAA</i>
39	P00374	<i>DHFR</i>
40	P21980	<i>TGM2</i>
41	P51449	<i>RORC</i>
42	P17861	<i>XBPI</i>
43	O15379	<i>HDAC3</i>
44	Q12809	<i>KCNH2</i>
45	P0DMS8	<i>ADORA3</i>
46	P51812	<i>RPS6KA3</i>

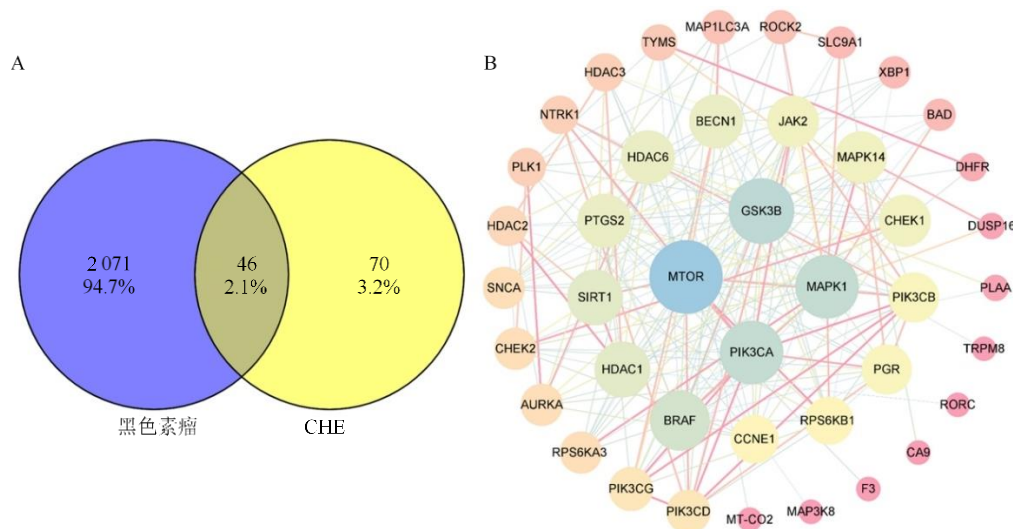


图 1 CHE 抗黑色素瘤的 Venn 图 (A) 和 PPI 网络图 (B)

Fig. 1 Venn diagram (A) and PPI network diagram (B) of CHE against melanoma

表 2 CHE 抗黑色素瘤的关键靶点基因

Table 2 Key target genes of CHE against melanoma

序号	Uniport	基因	BC 值	Degree 值
1	P42345	MTOR	0.165 549	26
2	P49841	GSK3B	0.086 718	22
3	P28482	MAPK1	0.160 248	21
4	P42336	PIK3CA	0.070 277	21
5	P15056	BRAF	0.167 959	19

3.4 分子对接

采用 Autodock Vina 1.5.7 软件对核心靶基因与 CHE 进行分子对接分析 (表 3)。数据显示 CHE 与各核心靶蛋白的结合自由能均 $< -20.95 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$, 表明二者具有较强的结合能力, CHE 与核心靶蛋白通过氢键作用力结合, 结合状态较为稳定。使用 Pymol 软件对分子对接情况进行可视化处理 (图 3)。

3.5 CHE 对 B16 细胞的抑制作用

为探究 CHE 对黑色素瘤 B16 细胞活力的影响, 本研究采用 CCK-8 法测定细胞增殖, 同时运用 LDH 法检测细胞毒性。CCK-8 实验结果显示, 随着 CHE 浓度的增加, B16 细胞的增殖受到显著抑制, 且抑制效果呈现明显的浓度相关性 ($P < 0.01$, 图 4-A)。而 LDH 检测结果表明, CHE 浓度上升的同时, 细胞内 LDH 含量随之增加 (图 4-B), 进一步证实了 CHE 对 B16 细胞的毒性作用。

3.6 CHE 诱导 B16 细胞凋亡

在流式细胞术检测中显示随着 CHE 浓度的逐

步递增, 细胞凋亡数量呈现出显著的上升趋势。而 Annexin V-FITC 和 PI 双染色实验同样表明, 相较于对照组, 不同浓度的 CHE 处理均能显著提升细胞凋亡率 ($P < 0.01$)。2 种检测方法从不同角度相互印证, 充分表明 CHE 能够有效诱导黑色素瘤 B16 细胞发生凋亡, 为其在黑色素瘤治疗中的潜在应用提供了有力的数据支撑 (图 5)。

3.7 CHE 抑制 B16 细胞癌症通路和 PI3K-Akt 信号通路关键蛋白的表达

随着 CHE 浓度的增加, p-Akt、p-PI3K 和 Bcl-2 蛋白的表达量逐渐下降 ($P < 0.01$), Bax 蛋白的表达量显著上升 ($P < 0.01$)。据此推测, CHE 可能通过抑制癌症通路和 PI3K-Akt 信号通路从而抑制 B16 细胞生长。见图 6。

4 讨论

本研究通过网络药理学与体外实验相结合的策略, 深入探究了 CHE 抗黑色素瘤的潜在机制, 研究结果为 CHE 作为黑色素瘤治疗药物的开发提供了多维度的理论依据。在网络药理学研究层面, 整合多个数据库获取 CHE 抗黑色素瘤的交集靶点, 并构建 PPI 网络。其中, MTOR、GSK3B、MAPK1、PIK3CA、BRAF 等核心蛋白在网络中占据关键地位。MTOR 是 PI3K-Akt 信号通路的关键下游分子, 参与细胞生长、增殖和代谢调控^[24]; GSK3B 是 PI3K-Akt 通路的下游靶分子, 同时参与凋亡信号调控^[25]; MAPK1 是 MAPK 通路的核心效应激酶, 介

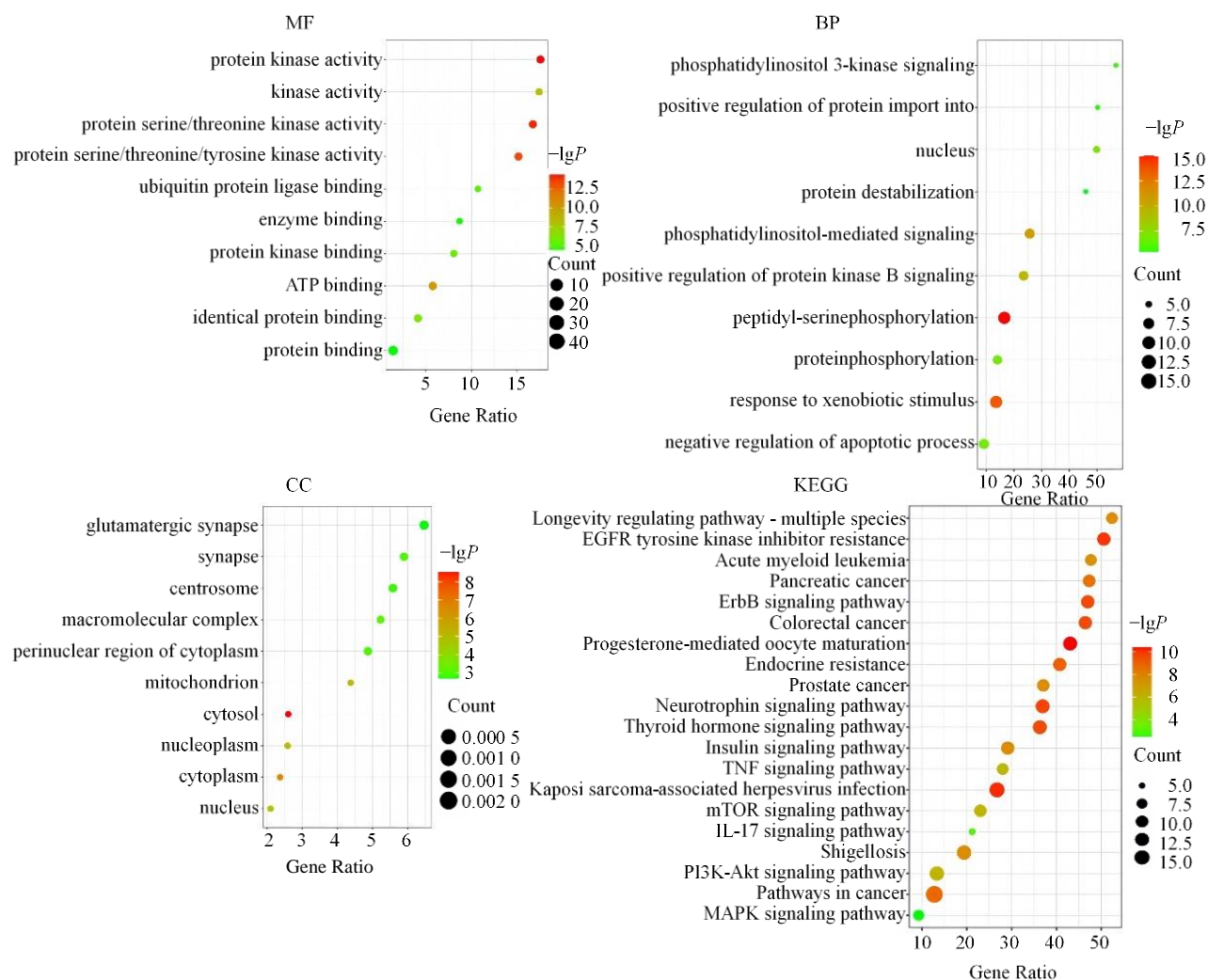


图 2 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 2 GO and KEGG pathway enrichment analysis

表 3 分子对接结合能

Table 3 Molecular docking binding energies

基因	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
MTOR	-32.26
GSK3B	-36.87
MAPK1	-30.59
PIK3CA	-37.29
BRAF	-30.17

导细胞增殖信号^[26]; PIK3CA 为 PI3K 的催化亚基编码基因, 是 PI3K-Akt 通路的启动分子^[27]; BRAF 作为 RAS-RAF-MEK-ERK 通路的重要成员, 其突变在黑色素瘤的发生发展中起核心驱动作用^[28]。这些核心靶点的确定, 为后续探究 CHE 作用机制锚定了方向。

GO 富集分析表明, CHE 作用靶点广泛参与信号转导、细胞凋亡和增殖调控等 BP, 与黑色素瘤的病理进程紧密相关。其中, BP 中凋亡过程的负调控、MAPK 级联调控等条目, 与核心靶点 BRAF、MAPK1、GSK3B 的功能直接关联; MF 中蛋白激酶活性、ATP 结合等, 进一步支持 CHE 通过靶向结合激酶类靶点 (如 PIK3CA、BRAF) 发挥作用。KEGG 通路富集分析显示: CHE 作用靶点主要富集于癌症、PI3K-Akt 等信号通路, 癌症信号通路包含 BRAF、MAPK1 等核心靶点, 介导肿瘤细胞异常增殖; PI3K-Akt 信号通路涵盖 PIK3CA、MTOR、GSK3B 等关键分子, 调控细胞存活与代谢。尽管 PI3K-Akt 通路在 137 条通路中排名未居首, 但其包含的核心靶点数量最多 (如 PIK3CA、MTOR、GSK3B),

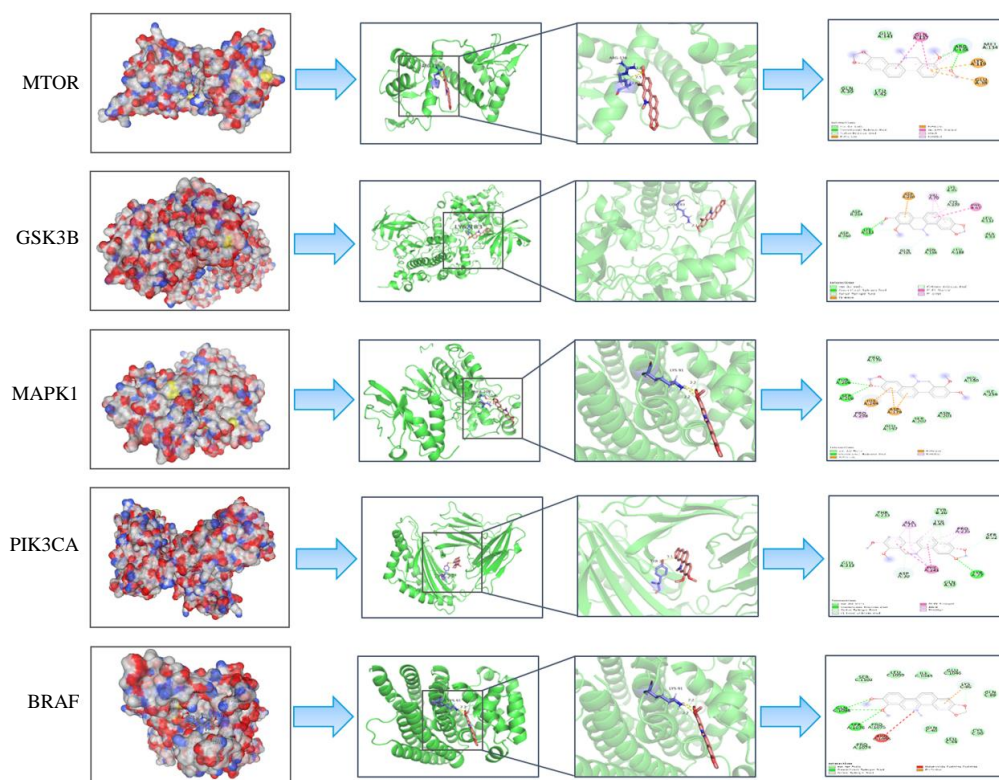
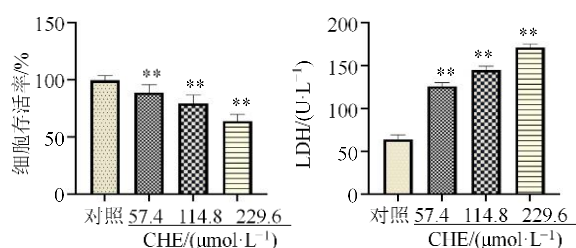


图 3 CHE 抗黑色素瘤靶点蛋白的分子对接

Fig. 3 Molecular docking of CHE anti-melanoma target proteins

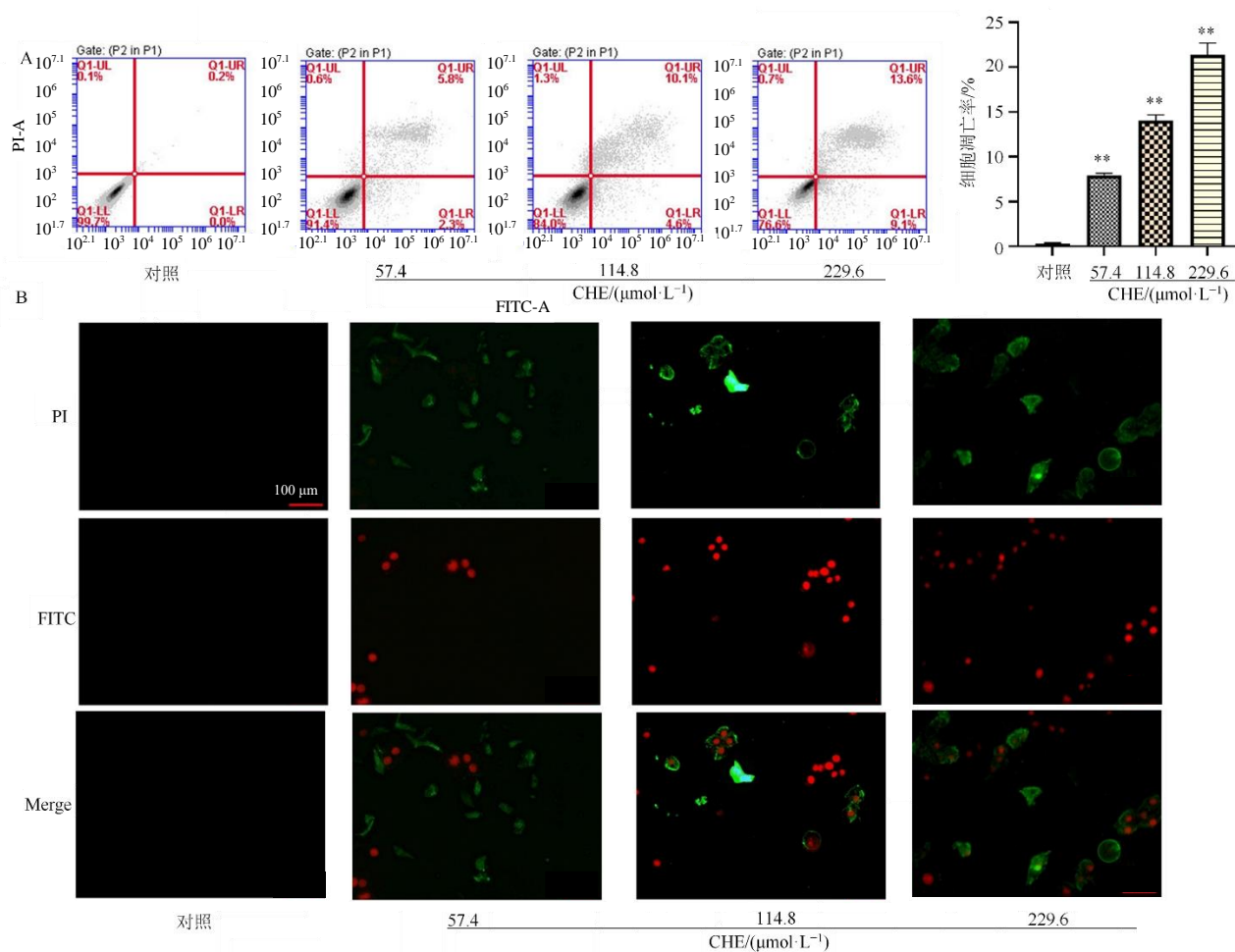
与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。** $P < 0.01$ vs control group.图 4 CHE 对 B16 细胞增殖的影响和细胞毒性 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)Fig. 4 Effect of CHE on proliferation and cytotoxicity on B16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

且与黑色素瘤的恶性表型密切相关, 因此成为本研究验证的重点通路。

分子对接实验进一步验证了 CHE 与核心靶点的结合活性: PIK3CA、GSK3B、MTOR 等 PI3K-Akt 通路核心分子, 以及 BRAF、MAPK1 等癌症通路关键靶点, 均与 CHE 形成稳定结合。这提示 CHE 可能通过直接结合这些靶点, 抑制其激酶活性, 进而阻断 PI3K-Akt 和癌症信号通路的信号传递, 为体外实验中通路分子的表达变化提供了结构基础。

体外实验结果与网络药理学预测高度契合, 有力证实了 CHE 的抗黑色素瘤活性。CCK-8 和 LDH 实验结果显示, CHE 能浓度相关性地抑制 B16 细胞增殖并产生细胞毒性, 直接表明其对黑色素瘤细胞的生长抑制作用^[29]。流式细胞术和 Annexin V/FITC-PI 双染实验结果显示, CHE 可诱导 B16 细胞凋亡, 且随着浓度升高, 凋亡细胞比例显著增加, 这与 GO 富集的凋亡调控 BP 一致。Western blotting 实验能够显著降低 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白的表达, 同时增加 Bax 蛋白的表达, 进一步揭示其分子机制。p-PI3K 是 PI3K 的磷酸化活性形式, 其下调直接反映核心靶点 PIK3CA 被 CHE 抑制后的功能状态; p-Akt 作为 PI3K-Akt 通路的下游效应分子, 其表达变化可验证该通路 (包含 PIK3CA、MTOR 等靶点) 的活性受抑; Bcl-2 虽未列入交集靶点, 但其与表 1 中凋亡相关靶点 BAD 共同调控凋亡平衡, 其下调与 Bax 上调协同促进凋亡, 与 GO 预测的凋亡过程一致。上述结果表明, CHE 通过抑制 PI3K-Akt 和癌症信号通路, 阻断细胞存活信号并打破凋亡平衡, 最终实现抗黑色素瘤作用^[30-31]。

然而, 本研究仍存在一定局限性。网络药理学

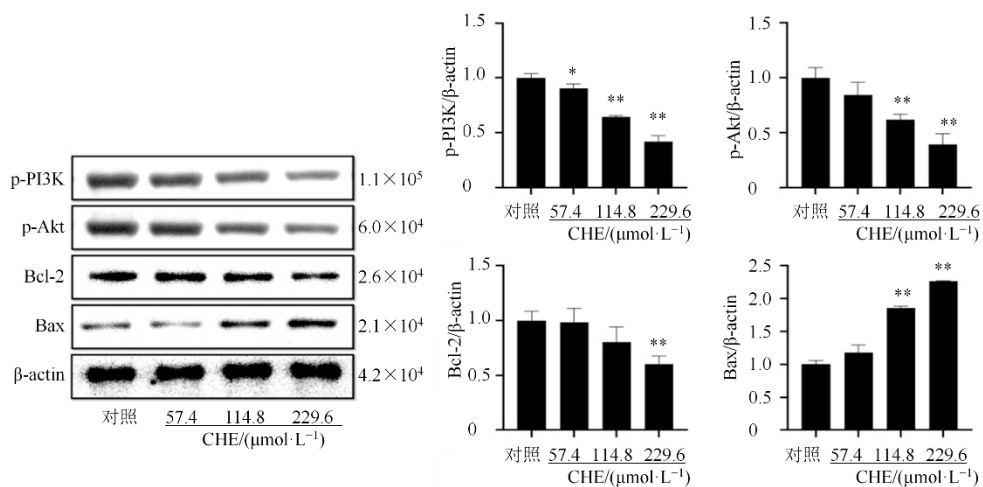


A-细胞凋亡流式图; B-Annexin V-FITC 和 PI 双染; 与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

A-Flow cytometry of cell apoptosis; B-Annexin V-FITC and PI double staining; ** $P < 0.01$ vs control group.

图 5 CHE 对 B16 细胞凋亡的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of CHE on apoptosis of B16 cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

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

图 6 CHE 对 B16 细胞 p-Akt、p-PI3K、Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of CHE on p-Akt, p-PI3K, Bcl-2 and Bax protein expression in B16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

分析基于现有数据库和算法预测,虽具有较高可信度,但部分预测结果仍需进一步实验验证;体外实验仅采用 B16 细胞系,未来需纳入更多黑色素瘤细胞模型及动物实验,以更全面评估 CHE 的抗肿瘤效果和安全性;此外, CHE 在体内的药动学特征、潜在的不良反应及与其他药物联合应用的效果等,均有待深入研究。

本研究通过网络药理学预测与体外实验验证,揭示了 CHE 抗黑色素瘤的多靶点、多通路作用机制,为其进一步开发为黑色素瘤治疗药物提供了理论依据和实验基础。后续研究可围绕上述不足展开深入探索,加速 CHE 向临床应用的转化进程。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Swetter S M, Johnson D, Albertini M R, et al. NCCN guidelines® insights: Melanoma: Cutaneous, version 2.2024 [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2024, 22(5): 290-298.
- [2] 郭冰玉, 回蕾, 常鹏, 等. 黑色素瘤靶向治疗的现状与展望 [J]. 中国美容整形外科杂志, 2018, 29(4): 243-245, 261.
Guo B Y, Hui Q, Chang P, et al. The current status and prospects of targeted therapy for melanoma [J]. Chin J Aesthetic Plast Surg, 2018, 29(4): 243-245, 261.
- [3] 武淑琴, 王远涵, 郑凯元, 等. 恶性黑色素瘤患者的预后及影响因素研究 [J]. 中国全科医学, 2024, 27(8): 942-947.
Wu S Q, Wang Y H, Zheng K Y, et al. Prognosis and influencing factors of patients with malignant melanoma [J]. Chin Gen Pract, 2024, 27(8): 942-947.
- [4] 方翠华, 潘茂华, 周隆参, 等. 黑色素瘤免疫治疗现状及研究进展 [J]. 昆明医科大学学报, 2023, 44(5): 175-179.
Fang C H, Pan M H, Zhou L C, et al. Current status and research progress of immunotherapy for melanoma [J]. J Kunming Med Univ, 2023, 44(5): 175-179.
- [5] Sukhotnik I, Bitterman S, Ben Shahr Y, et al. Effect of chelerythrine on intestinal cell turnover following intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model [J]. Eur J Pediatr Surg, 2017, 27(1): 36-43.
- [6] 牛凯琦, 周佳, 谭任博, 等. 白屈菜红碱对肿瘤疾病治疗作用的研究进展 [J]. 人参研究, 2025, 37(1): 89-93.
Niu K Q, Zhou J, Tan R B, et al. Research progress on the therapeutic effect of chelerythrine on tumor diseases [J]. Ginseng Res, 2025, 37(1): 89-93.
- [7] Danielewski M, Zielińska S, Matuszewska A, et al. Sanguinarine-chelerythrine fraction of *Coptis Chinensis* exerts anti-inflammatory activity in carrageenan paw oedema test in rats and reveals reduced gastrototoxicity [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 1504929.
- [8] 周志新. 白屈菜红碱对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌抗菌作用研究 [D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学, 2023.
Zhou Z X. Research on the antibacterial effect of chelerythrine against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2023.
- [9] 杨锦, 韩伟, 张永萍, 等. 白屈菜红碱纳米粒的制备及体外抗黑色素瘤活性评价 [J]. 中国药房, 2021, 32(24): 2980-2986.
Yang J, Han W, Zhang Y P, et al. Preparation of chelerythrine nanoparticles and evaluation of anti-melanoma activity *in vitro* [J]. China Pharm, 2021, 32(24): 2980-2986.
- [10] Yang L, Xie H J, Li Y Y, et al. Molecular mechanisms of platinum-based chemotherapy resistance in ovarian cancer (Review) [J]. Oncol Rep, 2022, 47(4): 82.
- [11] 张步鑫, 赵献敏, 成琼, 等. 白屈菜红碱对黑色素瘤 B16 细胞增殖抑制和凋亡诱导作用的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2018, 29(4): 793-795.
Zhang B X, Zhao X M, Cheng Q, et al. Experimental study on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in melanoma B16 cells by chelerythrine [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2018, 29(4): 793-795.
- [12] 郭莉. 白屈菜红碱通过调控 Ras/Raf/MAPK 信号通路诱导卵巢癌凋亡的机制研究 [D]. 深圳: 深圳大学, 2023.
Guo L. The mechanism of chelerythrine inducing apoptosis in ovarian cancer by regulating the Ras/Raf/MAPK signaling pathway [D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2023.
- [13] Tang Z H, Cao W X, Wang Z Y, et al. Induction of reactive oxygen species-stimulated distinctive autophagy by chelerythrine in non-small cell lung cancer cells [J]. Redox Biol, 2017, 12: 367-376.
- [14] 杨明慧, 雷钧涛, 张丹丹, 等. 白屈菜抗癌成分与作用的研究进展 [J]. 人参研究, 2017, 29(2): 55-57.
Yang M H, Lei J T, Zhang D D, et al. Recent advances in anticancer composition and effect of celandine [J]. Ginseng Res, 2017, 29(2): 55-57.
- [15] Lin W J, Huang J J, Yuan Z W, et al. Protein kinase C inhibitor chelerythrine selectively inhibits proliferation of triple-negative breast cancer cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2022.
- [16] 王佳慧. 白屈菜红碱脂质体的制备及其对非小细胞肺癌 HCC827 的抑制作用研究 [D]. 上海: 上海中医药大学

- 学, 2020.
- Wang J H. Preparation and evaluation of chelerythrine liposomes for treatment of NSCLC HCC827 [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2020.
- [17] 刘金龙. 白屈菜红碱对三阴性乳腺癌抑制作用及机制研究 [D]. 长春: 长春中医药大学, 2022.
- Liu J L. Study on the inhibitory effect and mechanism of chelerythrine on triple-negative breast cancer [D]. Changchun: Changchun University of Chinese Medicine, 2022.
- [18] Zheng B, Wang Y X, Wu Z Y, et al. Design, synthesis and bioactive evaluation of topo I/c-MYC dual inhibitors to inhibit oral cancer via regulating the PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Molecules*, 2025, 30(4): 894.
- [19] 王鲁娇, 司文涛. 中医药干预 MAPK/NF- κ B 信号通路调控肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(21): 262-270.
- Wang L J, Si W T. Traditional Chinese medicine treats tumors via MAPK/NF- κ B signaling pathway: A review [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(21): 262-270.
- [20] 邹翔, 王雨蒙, 王嘉琪, 等. 白屈菜碱的药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2014, 29(11): 1326-1330.
- Zou X, Wang Y M, Wang J Q, et al. Research progress on pharmacological activities of chelidone [J]. *Drugs Clin*, 2014, 29(11): 1326-1330.
- [21] 梁晋如, 庞亚琪, 张亚云, 等. 基于网络药理学和实验验证探究六神凝胶治疗痤疮的作用机制 [J]. *中草药*, 2025, 56(9): 3165-3174.
- Liang J R, Pang Y Q, Zhang Y Y, et al. Mechanism of Liushen Gel in treatment of acne based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(9): 3165-3174.
- [22] 贾子贤, 史丽颖, 刘紫琳, 等. 基于网络药理学探究黄精抗阿尔兹海默症作用机制 [J]. *天津师范大学学报 (自然科学版)*, 2024, 44(6): 29-37.
- Jia Z X, Shi L Y, Liu Z L, et al. Exploration of the mechanism of Huangjing in the treatment of Alzheimer's disease based on network pharmacology [J]. *J Tianjin Norm Univ Nat Sci Ed*, 2024, 44(6): 29-37.
- [23] 柯昌虎, 吴亚晴, 黄慧敏, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨丹红注射液治疗急性心肌梗死的作用机制 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(5): 668-672.
- Ke C H, Wu Y Q, Huang H M, et al. Research on the mechanism of Danhong injection in the treatment of acute myocardial infarction based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2024, 40(5): 668-672.
- [24] 方正远, 岳冬辉. PI3K/AKT 信号通路流感病毒感染相关性研究 [J]. *吉林中医药*, 2022, 42(3): 370-372.
- Fang Z Y, Yue D H. Study on the correlation between the PI3K/AKT signaling pathway and influenza virus infection [J]. *Jilin J Chin Med*, 2022, 42(3): 370-372.
- [25] Deng S, Dai G, Chen S, et al. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/Akt/GSK3 β signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 602-608.
- [26] Hu Z Q, Wang H, Fu Y, et al. Gentiopicroside inhibits cell growth and migration on cervical cancer via the reciprocal MAPK/Akt signaling pathways [J]. *Nutr Cancer*, 2021, 73(8): 1459-1470.
- [27] Noorolayi S, Shajari N, Baghbani E, et al. The relation between PI3K/Akt signaling pathway and cancer [J]. *Gene*, 2019, 698: 120-128.
- [28] Lin S J, Jiang X F, Zhang G J, et al. The Chinese herbal formula ruyan Neixiao cream inhibits angiogenesis of precancerous breast lesions via regulation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. *Integr Cancer Ther*, 2022, 21: 15347354211069397.
- [29] Chmura S J, Dolan M E, Cha A, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(2): 737-742.
- [30] 刘鑫, 刘波, 孔令玉. 山柰酚调控 PI3K/Akt 信号通路对人肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭及迁移的抑制作用 [J]. *安徽医药*, 2025, 29(5): 903-908.
- Liu X, Liu B, Kong L Y. The inhibitory effects of kaempferol on the proliferation, invasion, and migration of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by modulating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Anhui Med Pharm J*, 2025, 29(5): 903-908.
- [31] 郭芳, 黎莉莉, 臧林泉. 莪术醇通过下调 Bcl-2 蛋白表达介导抗乳腺癌的机制研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(10): 1175-1178.
- Guo F, Li L L, Zang L Q. Study of mechanism of curcumol on mediating anti breast cancer via down-regulation the expression of Bcl-2 protein [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2018, 34(10): 1175-1178.