

网络药理学技术预测昆仑雪菊总黄酮治疗非小细胞肺癌作用及初步验证研究

伊丽米热·吾甫尔¹, 库热西·玉努斯², 王志滨³, 国鲁源¹, 吴桂霞^{1*}

¹新疆医科大学基础医学院; ²新疆医科大学维吾尔医学院; ³新疆医科大学第二临床医学院, 乌鲁木齐 830011

摘要:通过高效液相色谱法(HPLC)对昆仑雪菊总黄酮进行成分分析。利用网络药理学方法,构建“成分-靶点-通路”网络。基于预测结果,CCK8法检测不同浓度的昆仑雪菊总黄酮(Kunlun chrysanthemum total flavonoids,KCTF)对A549细胞的增殖抑制活性,流式细胞术检测细胞凋亡情况,细胞划痕实验观察KCTF对A549细胞迁移能力的影响。RT-qPCR检测Bax、Bcl-2和MMP-2基因的表达,Western blot检测相关凋亡蛋白Bax和Bcl-2的表达。结果显示,HPLC分析获得68个KCTF成分,经筛选后得27个活性成分,通过相关数据库平台构建出KCTF干预非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)相关靶点217个,KEGG通路富集分析结果显示,KCTF干预NSCLC的关键节点主要被富集在细胞增殖、凋亡和周期调控、病毒致癌及其他肿瘤通路等76条信号通路。细胞水平验证实验结果表明,KCTF明显抑制了A549细胞的增殖,促进细胞的凋亡,抑制细胞的迁移;RT-qPCR实验验证了KCTF上调Bax的表达以及下调Bcl-2和MMP-2基因的表达;Western blot结果表明KCTF明显上调Bax/Bcl-2蛋白的表达,诱导了细胞的凋亡。综上,KCTF可通过多靶点、多途径实现干预NSCLC的作用,其抗肿瘤活性可能与影响凋亡基因Bax及Bcl-2的表达有关。

关键词:昆仑雪菊总黄酮;非小细胞肺癌;网络药理学;靶点;信号通路

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)11-1936-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.11.017

Prediction of the effects of total flavonoids of Kunlun chrysanthemum in the treatment of non-small cell lung cancer by network pharmacology and its preliminary verification study

YILIMIRE · Wu-fu-er¹, KUREXI · Yu-nu-si², WANG Zhi-bin³, GUO Lu-yuan¹, WU Gui-xia^{1*}

¹School of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University; ²Uygur Medical Colleges;

³The Second Clinical Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: The composition analysis of the total flavonoids of Kunlun chrysanthemums was carried out by the high performance liquid chromatography (HPLC). The “component-target-pathway” network was constructed through the method of network pharmacology. Based on the prediction results, the CCK8 assay was used to detect the proliferation inhibitory activity of Kunlun chrysanthemum total flavonoids (KCTF) at different concentrations on A549 cells, flow cytometry was used to detect cell apoptosis, and a cell scratch assay was used to observe the effects of KCTF on migration ability of A549 cells. RT-qPCR was used to detect the expression of Bax, Bcl-2, and MMP-2 genes, and Western blot was used to detect the expression of related apoptotic proteins Bax and Bcl-2. The results showed that 68 KCTF components were obtained by HPLC analysis, 27 active components were obtained after screening, and 217 KCTF intervention non-small cell lung cancer (NSCLC) related targets were constructed through the relevant database platform. The results of KEGG pathway enrichment analysis showed that the key nodes of KCTF intervention in NSCLC were mainly enriched into 76 signaling pathways such as cell proliferation, apoptosis and cycle regulation, viral carcinogenesis, and other tumor pathways. The results of cell-level verification experiments showed that KCTF significantly inhibited the proliferation of A549 cells, promoted cell apoptosis, and inhibited cell migration;

收稿日期:2020-11-19

接受日期:2021-09-22

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01C218);新疆维吾尔自治区研究生科研创新项目(XJ2020G190)

*通信作者 Tel:86-991-2110311; E-mail:wuguixia_good@163.com

RT-qPCR experiments verified that KCTF up-regulated the expression of Bax and down-regulated the expression of Bcl-2 and MMP-2 genes; Western blot results showed that KCTF significantly up-regulates the expression of Bax/Bcl-2, and induces cell apoptosis. In summary, KCTF can intervene in NSCLC through multiple targets and multiple pathways, and its anti-tumor activity may be related to affecting the expression of apoptosis-related genes Bax and Bcl-2.

Key words: Kunlun chrysanthemum total flavonoids; non-small cell lung cancer; network pharmacology; target; signaling pathway

肺癌是全球最常见的癌症之一。大约 85% 的肺癌是非小细胞肺癌 (non small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。临床对于肺癌的主要治疗手段有手术、化疗、放疗和生物治疗等。完全手术切除虽有效但前提是该疾病在医学上可操作且可适当分期^[2]。放、化疗药物具有非特异性,往往产生严重的毒副作用。中药因具有多靶点、多途径、多效应的作用特点在肿瘤的预防及治疗领域发挥了独特的作用。已有多种中药成分及其提取物被发现具有较好的抗肿瘤作用,如苦参碱、三羟异黄酮、紫杉醇等,其中一些已广泛地应用于临床^[3-5]。昆仑雪菊又被称作两色金鸡菊 (*Coreopsis tinctoria* Nutt.)。现代药效学研究表明新疆昆仑雪菊富含多酚类、黄酮类、多糖等多种化学成分^[6],其中黄酮类具有降血脂、调节血糖、抗肿瘤等重要的药理作用^[7,8]。但由于黄酮类成分多、靶点多、作用途径多,使其治疗疾病的分子机制研究存在一定困难。

网络药理学 (network pharmacology) 是基于系统生物学和多向药理学研究方法,通过构建“药物-靶点-疾病”的多层次相互作用网络,从整体水平上分析药物作用靶点及作用机制^[9]。本文通过应用网络药理学结合体外细胞实验,分析昆仑雪菊总黄酮 (Kunlun chrysanthemum total flavonoids, KCTF) 对 NSCLC 的抗癌成分及作用机制,为其后续的药物研发和临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人非小细胞肺癌细胞 (A549) 由新疆医科大学协同创新细胞库提供。

1.2 药品与试剂

DMEM 液体培养基和胎牛血清 (赛默飞世尔科技有限公司); Annexin V-FITC/PI 试剂盒 (美国 BD 公司); TRIzol Reagent (赛默飞世尔科技有限公司); 反转录试剂盒 (赛默飞世尔科技公司); QuantiNova SYBR Green 染料法 PCR 试剂盒 (凯基生物公司); RIPA 裂解液 (碧云天生物技术公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术公司); 兔单抗 Bax、

兔单抗 Bcl-2 (Abcam 公司, ab32503、ab32124); 小鼠单抗 β -actin (武汉博士德生物工程有限公司, BM0627); 昆仑雪菊 (新疆雪菊生物科技有限公司, 生产许可证号: QS650114020007)。

1.3 仪器

NovoCyte D2060R 流式细胞仪 (ACEA 公司); MF53 倒置荧光显微镜 (德国莱卡公司); ABI 7500 Real-Time PCR 仪 (Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 KCTF 的提取及纯化分离

60 °C 烘干箱内烘干雪菊, 研磨后过筛备用, 按照 1:60 投料比, 加入 80% 的乙醇, 超声萃取取超声 1.5 h 后过滤, 共三次。滤液经旋转蒸发仪蒸发浓缩得其浸膏。将粗黄酮浸膏装入大孔树脂的玻璃层析柱中, 经 12 h 浸泡后, 60% 乙醇洗脱, 收集洗脱液, 旋蒸后得 KCTF 纯化物, 经紫外分光光度计法测其总黄酮含量。

2.2 雪菊-类黄酮广靶代谢组分析

用 600 μ L 提取液 (50% 甲醇含 0.1% 甲酸) 复溶总黄酮纯化物, 涡旋 30 s 后冰水浴超声 15 min, 4 °C, 12 000 rpm 离心 15 min, 取上清于 2 mL 进样, UPLC BEH C_{18} 色谱柱 (1.7 μ m, 2.1 mm \times 150 mm) 上机检测。柱温箱温度设为 40 °C, 自动进样器温度设为 8 °C, 进样体积为 2 μ L。

2.3 应用网络药理学进行靶点预测及网络构建

2.3.1 KCTF 靶点预测

通过 HPLC 法得到 KCTF 的化合物组分, 从 TC-MPS (<https://isp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 中对 KCTF 的主要化合物分子进行吸收、分布、代谢、排泄和毒性 (ADME/T) 预测和评价。对符合药物口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 类药性值 (drug-like, DL) ≥ 0.18 的成分进行筛选, 得出总黄酮的有效活性成分。再通过 TCMSp 平台预测上述有效活性成分的靶点。将所有靶点通过 STRING (<https://www.string-db.org/>) 数据库以“Homo sapiens” (人属) 为关键词进行基因-蛋白名称转换。

2.3.2 NSCLC 相关靶点网络构建^[10]

通过 DiSGeNET (<http://www.disgenet.org/>),

以“Non-Small Cell Lung Carcinoma”为关键词检索 NSCLC 相关靶点,获得所有已知的与 NSCLC 有关的基因靶点。借助 STRING 数据库,输入上述关键靶点,物种限定设置为人类。将查询到的与 NSCLC 有关的靶点与 KCTF 有效活性成分的作用靶点取交集,筛选 KCTF 治疗 NSCLC 的潜在靶点。应用 STRING 数据库,输入上述潜在靶点,随后进行 PPI 网络构建与分析,获取关键靶点。

2.3.3 关键靶点的 KEGG 通路富集分析

通过 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对关键靶点进行 KEGG 通路富集分析,并通过 OmicShare (<http://www.omicshare.com>) 平台对结果进行可视化处理。

2.3.4 总黄酮-靶点-通路网络构建

应用 Cytoscape 3.6.0 软件绘制关键靶点-通路网络和 KCTF 化合物-关键靶点网络。最后将 KCTF 化合物-关键靶点网络和关键靶点-通路网络进行合并。建立 KCTF-靶点-通路网络。通过 Network analyzer 分析评价网络的拓扑结构特性。

2.4 昆仑雪菊总黄酮对 A549 细胞的抗癌作用

2.4.1 细胞培养

A549 细胞复苏后加入到 10% 的 DMEM 培养基中,置入 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,待细胞进入快速生长期后传代培养。

2.4.2 CCK8 法检测细胞活性

A549 细胞接种于 96 孔板中 (1×10^5 /孔),经 48 h 细胞融合时进行实验。不同浓度的雪菊总黄酮提取物 (400、800、1 600、2 400、3 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的药物 100 μL ,以 DDP 作为对照组,继续培养 24 h 后,每孔加入 CCK8 100 μL ,将培养液倾去,酶联仪 490 nm 波长测各孔的 OD 值。按照如下公式计算细胞抑制率,半数抑制浓度 (inhibitory concentration 50, IC₅₀) 值由 IC₅₀ 值计算软件求出。实验重复 3 次。

$$\text{细胞生长抑制率} = [1 - OD_{\text{实验}} / OD_{\text{对照}}] \times 100\%$$

2.4.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

A549 细胞接种至 6 孔板中,待细胞达到对数生长期后,分为三个处理组:阴性对照组;雪菊总黄酮干预组;阳性对照组 (顺铂,DDP),干预处理细胞 48 h,胰酶消化后收集细胞悬液,离心 5 min;PBS 洗涤、重悬后,取 100 μL 的细胞悬液与 Annexin V-FITC 5 μL 和 PI 5 μL 混匀后避光,室温孵育 45 min;流式上机检测,CELL Quest 软件分析。

2.4.4 细胞划痕实验观察细胞迁移

按“2.4.3”干预细胞 48 h 后,胰酶消化细胞;用完全培养基制备成 1×10^5 /mL 单细胞悬液,细胞接种于培养皿中间的 2 孔插件 Insert (70 μL /孔,即每孔 7×10^4 /孔),细胞长满 Insert 区域后用镊子移除 Insert。每隔 12 h 拍照记录。根据收集图片数据分析实验结果。

2.4.5 RT-qPCR 检测 A549 细胞 Bax、Bcl-2 和 MMP-2 mRNA 表达

收集“2.4.3”中平行处理的各组 A549 细胞,Trizol 提取总 RNA,按逆转录试剂盒说明书,获得 cDNA 后,以 SYBRGreen 荧光染料试剂盒进行实时荧光定量 PCR 扩增,反应条件设置为 95 °C 预变性 2 min;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,95 °C 延伸 15 s,共设置 40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法测定目的基因相对表达量。相关引物序列见表 1。

表 1 Real-Time PCR 所用引物列表

Table 1 Primer sequences used for Real-Time PCR

基因名称 Gene name	引物序列 (5'→3') Primer sequence (5'→3')
Bax	Forward: CCTGTGCACCAAGGTGCCGGA Reverse: CCACCCTGGTCTTGGATCCAGCCC
Bcl-2	Forward: GGAGGATGTGGCCTTCTTT Reverse: GTTCAGGTACTCAGTCATCCAC
MMP-2	Forward: GACAGGTGATCTTGACCAGAAT Reverse: AGGGCCGGACTCGTCATACT
β -actin	Forward: GGCGGCACCACCATGTACCCT Reverse: AGGGCCGGACTCGTCATACT

2.4.6 Western blot 检测 Bax、Bcl-2 的表达

收集“2.4.3”中平行处理的各组 A549 细胞,提取细胞总蛋白,测定蛋白浓度,电泳分离 40 μg 蛋白质,转移至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 PVDF 膜,室温 2 h。一抗 4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h, TBST 充分洗涤 PVDF 膜 5 次,5 min/次。化学发光法曝光至医用 X 胶片上,灰度值扫描后统计处理,重复三次。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件对实验数据进行统计。数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 KCTF 活性成分筛选

通过 HPLC 方法对 KCTF 进行广靶代谢组分析,共得出 68 个黄酮化合物,根据化合物的分子量

(MW)、口服生物利用度(OB)、类药性(DL)从 TC-MPS 获得 KCTF 的 23 个活性药效成分(OB \geq 30%, DL \geq 0.18),其中表儿茶素没食子酸酯、表没食子儿

茶素、芹菜素,紫云英苷 4 个成分含量较高将其纳入。共得到 27 个总黄酮的成分。KCTF 活性化合物的化学信息(见表 2)。

表 2 KCTF 主要的活性化合物

Table 2 Active ingredients of KCTF

分子编号 Molecule ID	化合物 Compound	分子量 Molecular weight	生物利用度 OB(%)	类药性 DL
MOL006821	表没食子儿茶素没食子酸酯 (-)-Epigallocatechin gallate	458.4	55.09	0.77
MOL001689	金合欢素 Acacetin	284.28	34.97	0.24
MOL004575	落新妇苷 Astilbin	450.43	36.46	0.74
MOL002714	黄芩素 Baicalein	270.25	33.52	0.21
MOL000492	儿茶素 Cianidanol	290.29	54.83	0.24
MOL002881	香叶木素 Diosmetin	300.28	31.14	0.27
MOL005190	圣草酚 Eriodictyol	288.27	71.79	0.24
MOL013179	漆黄素 Fisetin	286.25	52.6	0.24
MOL002563	高良姜素 Galangin	270.25	45.55	0.21
MOL005573	芫花素 Genkwanin	284.28	37.13	0.24
MOL008400	黄豆黄素 Glycitein	284.28	50.48	0.24
MOL002341	橙皮素 Hesperetin	302.3	70.31	0.27
MOL005530	羟基芫花素 Hydroxygenkwanin	300.28	36.47	0.27
MOL000354	异鼠李素 Isorhamnetin	316.28	49.6	0.31
MOL004564	山奈素 Kaempferide	300.28	73.41	0.27
MOL000422	山奈酚 Kaempferol	286.25	41.88	0.24
MOL000006	木犀草素 Luteolin	286.25	36.16	0.25
MOL000737	桑色素 Morin	302.25	46.23	0.27
MOL005828	川橙皮素 Nobiletin	402.43	61.67	0.52
MOL002844	乔松素 Pinocembrin	256.27	64.72	0.18
MOL000098	槲皮素 Quercetin	302.25	46.43	0.28
MOL001803	甜橙黄酮 Sinensetin	372.4	50.56	0.45
MOL004576	二氢槲皮素 Taxifolin	304.27	57.84	0.27

续表 2(Continued Tab. 2)

分子编号 Molecule ID	化合物 Compound	分子量 Molecular weight	生物利用率 OB(%)	类药性 DL
MOL006820	表儿茶素没食子酸酯 (-)-Epicatechin gallate	442.4	3.01	0.75
MOL006791	表没食子儿茶素 (-)-Epigallocatechin	306.29	24.18	0.27
MOL000008	芹菜素 Apigenin	270.25	23.06	0.21
MOL000561	紫云英苷 Astragalin	448.41	14.03	0.74

3.2 KCTF 干预 NSCLC 潜在靶点选择

KCTF 的 27 个活性成分(见表 2)从 TCMSP 数据库和 ETCM 数据库中预测到 891 个靶点,通过 STRING 数据库进行基因-蛋白名称转换及去除重复的靶基因,共得到 303 个化合物靶点。将 DiSGeNET 数据库搜索的靶点信息与 NSCLC 相关的靶点取交集得到 217 个 KCTF 对 NSCLC 潜在的作用靶点(见图 1)。

3.3 PPI 网络构建

将 217 个 KCTF 对 NSCLC 潜在的作用靶点导入 STRING 数据库,选择物种为人类,排除游离的无相互作用蛋白,将 minimum required interaction score

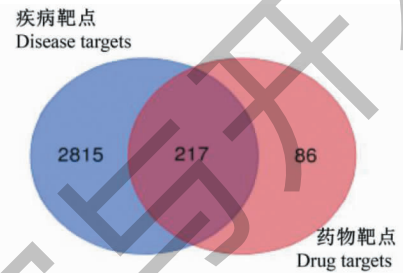


图 1 疾病靶点-药物靶点韦恩图

Fig. 1 Disease targets-drug targets Venn diagram

设置为大于 0.998,获得蛋白质相互作用关系,边越粗意味着 combine score 越大,根据 combine score 的大小制作出 68 个关键蛋白节点(见图 2)。

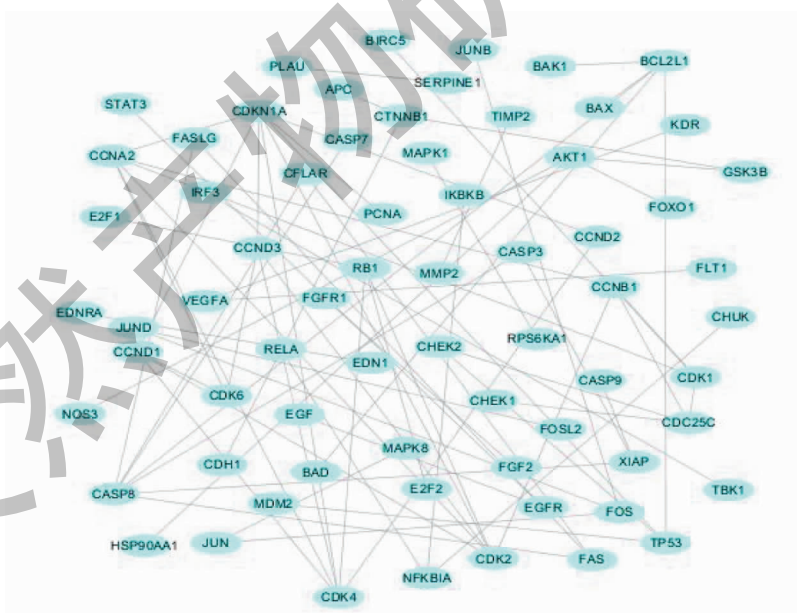


图 2 PPI 网络

Fig. 2 PPI network

3.4 KEGG 通路富集分析结果

KEGG 通路富集分析结果显示,88 个通路被富集, $P < 0.01$ 的通路有 76 条,依据 P 值大小,选择 P

值最小即相关度最高的 20 位,包括细胞凋亡(apoptosis)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)、细胞周

期 (cell cycle)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway) 等。总黄酮治疗 NSCLC 关键靶点 KEGG 通路富集结果见图 3。说明总黄酮有效成分

的作用靶点分布在不同的信号通路,通过多成分、多靶点互相调节发挥治疗 NSCLC 的作用。

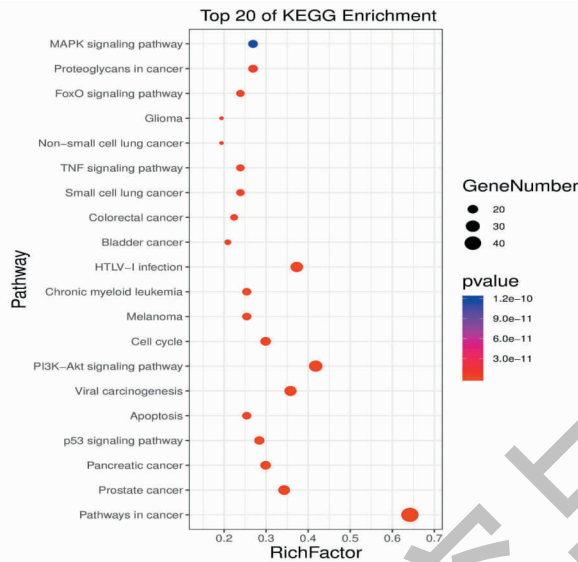


图 3 KEGG 通路分析

Fig. 3 KEGG pathway analysis

3.5 KCTF-靶点-通路网络分析

采用 Cytoscape 3.6.0 构建 KCTF-靶点-通路网络模型(见图 4),绿色三角形代表化合物,黄色圆形代表作用靶点,蓝色多边形代表通路。由 KEGG 反向分析得到的前 20 个通路中共有 65 个关键靶点。在 KCTF 的活性成分中表没食子儿茶素没食子酸酯((-)-epigallocatechin gallate)、槲皮素(querletin)、芹菜素(apigenin)、木犀草素(luteolin)、漆黄素(fisetin)、黄芩素(baicalein)、金合欢素(acacetin)的自由度较高,具有较多的作用靶点,可能在 KCTF 治疗 NSCLC 的过程中起到较为核心的作用。在关键靶点方面,HSP90AA1、TP53、AKT1、CCND1、RELA、CDKN1A、MAPK1、CDK4、RB1、CASP3、MDM2、EGFR、CASP9、BAX 的自由度均大于 15,有较多的活性成分配体。在前 20 条通路中自由度较大的通路为癌症的途径(pathways in cancer)、细胞凋亡(apoptosis)、PI3K-Akt 信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、HTLV-I 感染(HTLV-I infection)、病毒致癌(viral carcinogenesis)、细胞周期(cell cycle)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)、FoxO 信号通路(FoxO signaling pathway)自由度均大于 20,其中 PI3K-Akt 信号通路的自由度为 28。KCTF 有效成分作用靶点分布于的代谢通路,相互协调。

3.6 CCK8 法检测 KCTF 对 A549 细胞的生长抑制作用

CCK8 的结果表明,KCTF 对 A549 细胞的生长有明显的抑制作用,且浓度越高对细胞的增殖抑制作用越强;KCTF 干预 A549 细胞 24、48 及 72 h 后,计算 IC_{50} 值(24 h:2 408.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$;48 h:1 613.09 $\mu\text{g}/\text{mL}$;72 h:1 338.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$),结果表明 KCTF 对 A549 细胞的增殖抑制作用具有一定的时间依赖性。根据上述实验结果,将 KCTF 干预浓度确定为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,干预时间确定为 48 h,用于后续实验(见表 3)。

3.7 流式细胞检测 KCTF 对 A549 细胞凋亡的影响

流式的结果表明,与阴性对照组相比,KCTF 干预组(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)干预 A549 细胞后明显促进了细胞的凋亡,差异有统计学意义($P < 0.01$)(见表 4、图 5)。

3.8 细胞划痕观察 KCTF 对 A549 细胞迁移的影响

细胞划痕后在 0、12、24、36 h 分别在镜下观察三组细胞划痕宽度恢复的情况,空白对照组基本保持原有的迁移能力,KCTF 干预组(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及阳性对照组在 12、24、36 h 细胞迁移受到抑制明显,说明 KCTF 对 A549 细胞有抑制肿瘤细胞迁移的能力(见表 5)。

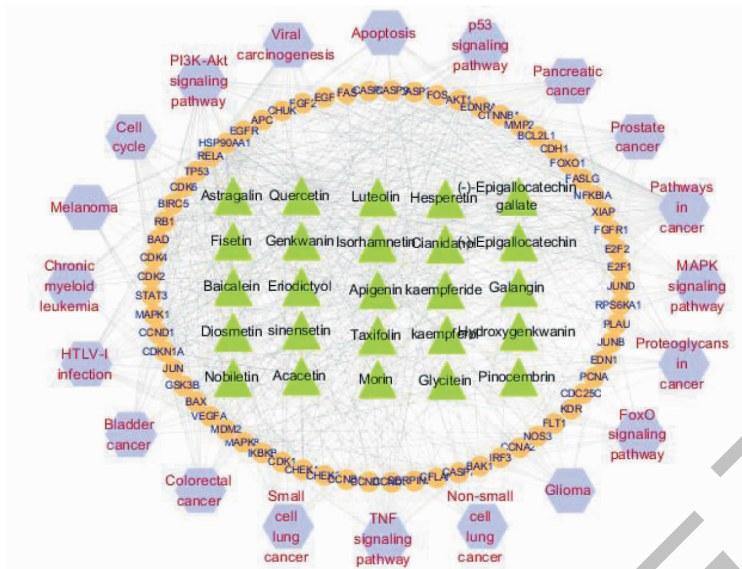


图4 KCTF-靶点-通路网络

Fig. 4 KCTF-target-pathways network

表3 KCTF对A549细胞的生长抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 3 Inhibitory effect of KCTF on A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	抑制率 Inhibition rate (%)		
	24 h	48 h	72 h
0	0.02 \pm 1.51	0.01 \pm 0.78	0.01 \pm 0.79
400	7.2 \pm 2.15 Δ	7.83 \pm 1.87 Δ	12.21 \pm 1.89 Δ
800	17.66 \pm 0.95 $\Delta\blacktriangle$	22.39 \pm 1.81 $\Delta\blacktriangle$	26.72 \pm 3.63 $\Delta\blacktriangle$
1 600	33.37 \pm 1.48 $\Delta\blacktriangle\nabla$	44.09 \pm 0.55 $\Delta\blacktriangle\nabla$	54.68 \pm 2.93 $\Delta\blacktriangle\nabla$
2 400	48.41 \pm 1.26 $\Delta\blacktriangle\nabla\blacktriangledown$	67.45 \pm 1.01 $\Delta\blacktriangle\nabla\blacktriangledown$	71.79 \pm 1.84 $\Delta\blacktriangle\nabla\blacktriangledown$
3 200	62.62 \pm 0.86 $\Delta\blacktriangle\nabla\blacktriangledown\blackstar$	81.96 \pm 1.06 $\Delta\blacktriangle\nabla\blacktriangledown\blackstar$	88.22 \pm 0.89 $\Delta\blacktriangle\nabla\blacktriangledown\blackstar$

注:与0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, $\Delta P < 0.01$;与400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, $\blacktriangle P < 0.01$;与800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, $\nabla P < 0.01$;与1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, $\blacktriangledown P < 0.01$;与2 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, $\blackstar P < 0.01$ 。

Note: Compared with 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\Delta P < 0.01$; Compared with 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\blacktriangle P < 0.01$; Compared with 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\nabla P < 0.01$; Compared with 1 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\blacktriangledown P < 0.01$; Compared with 2 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $\blackstar P < 0.01$.

表4 KCTF对A549细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 4 The apoptotic effect of KCTF on A549 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

分组 Group	凋亡率 Apoptosis rate (%)
阴性对照组 Negative control group	6.18 \pm 0.82
KCTF 干预组 KCTF intervention group	14.24 \pm 0.76 \blacktriangle
阳性对照组 Positive control group	14.32 \pm 1.31 \blacktriangle

注:与阴性对照组比较, $\blacktriangle P < 0.01$ 。

Note: Compared with the negative control group, $\blacktriangle P < 0.01$.

3.9 RT-qPCR 检测 A549 细胞中 Bax、Bcl-2 和 MMP-2 mRNA 表达水平

与阴性对照组比较,KCTF 干预组(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)Bax 的 mRNA 表达水平上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 Bcl-2 和 MMP-2 的 mRNA 表达

水平与阴性对照组比较差异无统计学意义,但有下调趋势($P > 0.05$)(见表6)。

3.10 Western blot 检测 A549 细胞中 Bax/Bcl-2 蛋白的表达水平

如表7所示,与阴性对照组相比($n=3$),KCTF

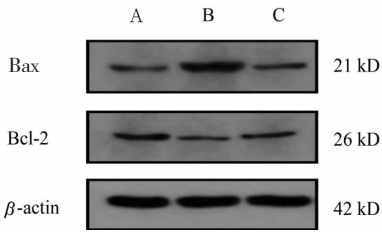


图6 KCTF对A549细胞中Bax/Bcl-2蛋白表达的影响

Fig. 6 The effect of KCTF on the expression of Bax and Bcl-2 protein in A549 cells

注:A:阴性对照组;B:KCTF干预组;C:阳性对照组。Note:A: Negative control group;B:KCTF intervention group;C:Positive control group.

酸酯、槲皮素、木犀草素、儿茶素等,已有大量的研究表明槲皮素、木犀草素等黄酮类对多种实体瘤有较好的抗癌活性^[11,12]。体外的细胞实验已表明,昆仑雪菊总黄酮对人结肠癌 HCT116 细胞、Caco-2 细胞具有明显的增殖抑制作用^[13]。但中药多成分、多靶点、多途径协同发挥药效的作用特点,使其作用机制的现代化研究存在困难。

2007年Hopkins^[14]提出的网络药理学,将药物、靶点、疾病的关系在网络中表现出来。利用网络药理学可以系统分析中药的组成成分,挖掘药物与疾病的共同作用靶点,进而分析生物学功能和信号通路,这种整体、系统的研究模式与中医药的整体观理论是相一致的。

在本研究中,通过TCMSP对KCTF的68个成分进行筛选,预测27个黄酮成分的891个靶点,与NSCLC靶点交集后,获得217个KCTF干预NSCLC的可能靶点。其中MAPK1、EGFR、Tp53、Akt、Bax、Bcl-2、Caspase 3等重要靶点与多个化学成分存在关系,表明KCTF各活性成分间存在着密切的协同关系。为进一步对KCTF干预NSCLC的作用机制进行分析,将二者关系进行PPI网络构建与KEGG生物通路富集分析,结果表明PI3K-Akt信号通路、Bax/Bcl-2抗凋亡信号通路、p53信号通路、MAPK信号通路等与KCTF抗癌作用有关。

诱导肿瘤细胞凋亡、阻遏周期、抑制迁移是抗癌药物主要的作用机制。研究表明许多植物黄酮(如姜黄素、原花青素、表没食子儿茶素没食子酸酯、槲皮素等)可以通过干扰PI3K-Akt信号通路,直接抑制PI3k或阻断PI3K-Akt信号通路,进一步调节其下游效应分子的表达,从而加速肿瘤细胞周期、促进细胞凋亡和抑制细胞增殖,达到抗肿瘤的作

用^[15,16]。Xiang等^[17]研究表明,槲皮素诱导HeLa细胞凋亡是通过下调PI3K-Akt信号通路中PI3k、Akt和Bcl-2表达,上调Bax表达,使细胞在G₀/G₁细胞周期阻滞。木犀草素可以通过抑制PI3K-Akt信号通路中MMP-2、MMP-9的表达抑制人黑色素瘤细胞的增殖,诱导其凋亡发挥抗癌活性^[18]。本研究细胞水平的实验结果表明,雪菊总黄酮明显抑制了A549细胞的增殖,促进了细胞的凋亡,抑制细胞的迁移,mRNA水平上验证了雪菊总黄酮上调Bax的表达及下调Bcl-2和MMP-2的表达。当细胞内Bax高表达时,细胞对死亡信号敏感,促进了细胞发生凋亡。当Bcl-2高表达时,Bcl-2可以和Bax形成异源二聚体,抑制细胞凋亡。所以细胞内Bax/Bcl-2的比例对决定细胞凋亡的敏感性起到重要作用,因此利用Western blot在细胞水平上的验证实验表明雪菊总黄酮明显上调Bax/Bcl-2的比值,促进了A549细胞的凋亡。结合网络药理学分析的结果,雪菊总黄酮可通过多靶点、多途径实现干预NSCLC的作用,其抗肿瘤活性可能与影响凋亡基因Bax及Bcl-2的表达有关。

本文在细胞水平观察到了雪菊总黄酮提取物对A549细胞的抗癌作用,但由于大孔树脂纯化总黄酮的得率较低,药物对细胞抑制率的IC₅₀较高,后续为进行体内的动物实验,将优化纯化方法,提高黄酮得率,降低药物使用浓度,结合网络药理学分析结果,进一步深入研究其抗癌的分子作用机制。

参考文献

- 1 Skricková J, Kadlec B, Venclíček O, et al. Lung cancer[J]. Cas Lek Cesk, 2018, 157(5):226-236.
- 2 Bunn PJ. Early-stage non-small-cell lung cancer: current perspectives in combined-modality therapy[J]. Clin Lung Cancer, 2004, 6(2):85-98.
- 3 Li L, Qi F, Wang K. Matrine restrains cell growth and metastasis by up-regulating linc00472 in bladder carcinoma[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12:1241-1251.
- 4 Imai SM, Dasgupta P, Kulkarni P, et al. Genistein represses HOTAIR/Chromatin remodeling pathways to suppress kidney cancer[J]. Cell Physiol Biochem, 2020, 54(1):53-70.
- 5 Fan L, Wang J, Xia C, et al. Glutathione-sensitive and folate-targeted nanoparticles loaded with paclitaxel to enhance oral squamous cell carcinoma therapy[J]. J Mater Chem B, 2020, 8:3113-3122.
- 6 Yang Y, Sun X, Liu J, et al. Quantitative and qualitative anal-

- ysis of flavonoids and phenolicacids in snow chrysanthemum (*Coreopsis tinctoria* Nutt.) by HPLC-DAD and UPLC-ESI-QTOF-MS [J]. *Molecules*,2016,21(10):1307.
- 7 Jing S, Zhang X, Yan LJ. Antioxidant activity, antitumor effect, and antiaging property of proanthocyanidins extracted from Kunlun chrysanthemum flowers [J]. *Oxid Med Cell Longev*,2015:983484.
 - 8 Zhang Y, Luo L, Li Z, et al. Anti-lipid peroxidation, α -glucosidase and α -amylase inhibitory effects of the extract of capitula of *Coreopsis tinctoria* Nutt and protection effects on high-fat/high-sugar and streptozotocin-induced type 2 diabetes in mice [J]. *Chem Biodivers*,2019,16(12):e1900514.
 - 9 Jiang HH, Tang K, Zhang HW, et al. Study on mechanisms of *Schisandra sphenanthera* for treating hepatic injury based on network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发),2020,32:759-768.
 - 10 Yu Y, Zhang G, Han T, et al. Application of network pharmacology in the study of traditional Chinese medicine formula [J]. *Chin J Clin Pharm* (中国临床药理学杂志),2020,36:813-817.
 - 11 Yu Q, Zhang M, Ying Q, et al. Decrease of AIM2 mediated by luteolin contributes to non-small cell lung cancer treatment [J]. *Cell Death Dis*,2019,10(3):218.
 - 12 Wang H, Luo Y, Qiao T, et al. Luteolin sensitizes the antitumor effect of cisplatin in drug-resistant ovarian cancer via induction of apoptosis and inhibition of cell migration and invasion [J]. *J Ovarian Res*,2018,11(1):93.
 - 13 Parhat M, Ling HC, Zhu QM, et al. Study on the antitumor activity of colorectal cancer cells *in vitro* from *Coreopsis tinctoria* flowers of Kunlun Mountain [J]. *J Anhui Agr Sci* (安徽农业科学),2015,43(20):146-148.
 - 14 Hopkins AL. Network pharmacology [J]. *Nat Biotechnol*,2007,25:1110-1111.
 - 15 Maiti P, Plemmons A, Dunbar GL. Combination treatment of berberine and solid lipid curcumin particles increased cell death and inhibited PI3K/Akt/mTOR pathway of human cultured glioblastoma cells more effectively than did individual treatments [J]. *PLoS One*,2019,14(12):e0225660.
 - 16 Sun S, Gong F, Liu P, et al. Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Gene*,2018,664:50-57.
 - 17 Xiang T, Fang Y, Wang SX. Quercetin suppresses HeLa cells by blocking PI3K/Akt pathway [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*,2014,34:740-744.
 - 18 Yao X, Jiang W, Yu, et al. Luteolin inhibits proliferation and induces apoptosis of human melanoma cells *in vivo* and *in vitro* by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/AKT pathway [J]. *Food Funct*,2019,10:703-712.
-
- (上接第 1835 页)
- 25 Zheng MZ, Shi DF, Liu CM, et al. The protective effect of hyperoside on the cultured PC12 cell injury induced by corticosterone [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药),2011,22:279-281.
 - 26 Zhang H, Feng SA, Deng AP, et al. The effect of epigallocatechin gallate on corticosterone injured neurons and the involved mechanism [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志),2017,37:843-846.
 - 27 Wu CC, Wu ZW, Luo JB. *Plant Essence Research* (植物精气研究) [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2006: 2.
 - 28 Du JP, Liu YT, Wu YJ. Fast-onset antidepressant potentials of essential oil of herbs [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志),2017,42:2006-2016.
 - 29 Wu LF. Preliminary study on the sleep-assisting effect of the natural aroma of four aromatic plants [J]. *Shanghai Agr Sci Technol* (上海农业科技),2011(4):22-24.