

# 基于网络药理学和实验验证探讨光甘草定治疗去势抵抗性前列腺癌的作用机制

谭武宾<sup>1,2</sup>,周松<sup>1</sup>,康海<sup>1</sup>,蒋湘勇<sup>1</sup>,毛正<sup>2</sup>,杨科<sup>1</sup>,李铁求<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>湖南省人民医院(湖南师范大学附属第一医院),长沙410002;<sup>2</sup>长沙县人民医院(湖南省人民医院星沙院区),长沙410100

**摘要:**本研究结合网络药理学、分子对接和体外细胞实验探讨光甘草定治疗去势抵抗性前列腺癌的作用机制。利用中药数据库 HERB、TCMIO、TCMSP、PharmMapper 和 BATMAN-TCM、Swiss Target Prediction 数据库共筛选出 248 个药物靶点,利用 DisGeNET 数据库收集到 683 个疾病靶点,通过韦恩图工具获取药物-疾病靶点 55 个。通过 PPI 分析以及拓扑学分析得到 AKT1、TP53、ESR1、EGFR 等 10 个核心靶点蛋白。使用 R studio 软件的“clusterProfiler”包进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析,GO 富集分析得到 847 个条目( $P < 0.01$ ),涉及对类固醇激素的反应、蛋白激酶 B 信号、对营养水平的反应等,KEGG 富集分析得到 PI3K/AKT 信号通路、蛋白聚糖在癌症中的作用、前列腺癌等 105 个相关信号通路( $P < 0.01$ )。运用 AutoDock 软件进行分子对接,结果表明光甘草定与核心靶点具有较好的结合性。CCK8 法检测细胞增殖发现光甘草定可抑制 PC-3 细胞增殖( $P < 0.05$ ),流式细胞术和 DAPI 染色镜下观察发现光甘草定可促进细胞凋亡( $P < 0.05$ ),Western blot 实验发现光甘草定可抑制 AKT 的磷酸化( $P < 0.05$ )。综上,初步研究发现光甘草定可能通过调控 AKT1、TP53、ESR1、EGFR 等核心蛋白以及 PI3K/AKT 等信号通路发挥抗去势抵抗性前列腺癌的作用。

**关键词:**光甘草定;去势抵抗性前列腺癌;网络药理学;分子对接

中图分类号:R285;R917

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)2-0310-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.2.015

## Molecular mechanism of glabridin in the treatment of castration-resistant prostate cancer based on network pharmacology and experimental verification

TAN Wu-bin<sup>1,2</sup>, ZHOU Song<sup>1</sup>, KANG Hai<sup>1</sup>,  
JIANG Xiang-yong<sup>1</sup>, MAO Zheng<sup>2</sup>, YANG Ke<sup>1</sup>, LI Tie-qiu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Hunan Provincial People's Hospital(The First Affiliated Hospital of Hunan Normal University), Changsha 410002, China;

<sup>2</sup>People's Hospital of Changsha County(Hunan Provincial People's Hospital Xingsha Branch), Changsha 410100, China

**Abstract:** To investigate the mechanism of action of glabridin in the treatment of castration-resistant prostate cancer (CRPC), we combined network pharmacology, molecular docking and *in vitro* cellular assays. A total of 248 drug targets were screened by HERB, TCMIO, TCMSP, PharmMapper and Batmant-TCM, Swiss Target Prediction database, and 683 disease targets were collected by DisGeNET database. Fifty-five drug-disease targets were obtained through the Venn diagram tool. Through PPI analysis and topological analysis, ten core target proteins such as AKT1, TP53, ESR1 and EGFR were obtained. The "clusterProfiler" package of R Studio software was used for GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. These targets are involved 847 GO items ( $P < 0.01$ ), involving response to steroid hormone, protein kinase B signaling, response to nutrient levels, etc. KEGG enrichment analysis revealed 105 signaling pathways related to PI3K/AKT signaling pathway, Proteoglycans in cancer, prostate cancer and other signaling pathways ( $P < 0.01$ ). The results of molecular docking using AutoDock software showed that glabridin had good binding ability with the core target. CCK8 assay showed that

收稿日期:2022-06-06

接受日期:2022-10-09

基金项目:湖南省中医药管理局项目(2021041);国家重点临床专科建设项目(2022-2);长沙市科技局项目(kq2208112)

\* 通信作者 E-mail:litieqiu@hunnu.edu.cn

glabridin could inhibit PC-3 cell proliferation ( $P < 0.01$ ), flow cytometry and DAPI staining showed that glabridin could promote cell apoptosis ( $P < 0.01$ ), and Western blot showed that glabridin could inhibit the phosphorylation of AKT ( $P < 0.01$ ). In conclusion, our initial findings show that Glabridin may regulate AKT1, TP53, ESRI, EGFR and other proteins and through some important signaling pathways such as PI3K/AKT signaling pathway exerted anti-castration-resistant prostate cancer effects.

**Key words:** glabridin; castration-resistant prostate cancer; network pharmacology; molecular docking

前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 是老年男性生殖系统肿瘤中最常见的恶性肿瘤, 许多早期对雄激素剥夺治疗有效, 但大多数终将从激素敏感性前列腺癌进展为去势抵抗性前列腺癌 (castration-resistant prostate cancer, CRPC)<sup>[1,2]</sup>。CRPC 是一种致死率较高、且具有高度侵袭性的前列腺癌, 有超过 84% 的 CRPC 患者会发生转移, 其生存中位数只有 20 个月左右<sup>[3,4]</sup>。虽然近几年新型化疗药、内分泌药物的出现, 但这些化疗药物存在诸多副作用, 且内分泌药物存在耐药的问题, 使得药物作用时间缩短。因此, 寻找新的药物对延缓去势抵抗的过程以及治疗 CRPC 具有重要意义。

光甘草定 (glabridin) 是一种从甘草中提取出的异黄酮类化合物, 具有广泛的生物学活性, 如抗炎、抗氧化、抗肿瘤、神经保护、抗骨质疏松症等<sup>[5]</sup>。据报道, 光甘草定在乳腺癌<sup>[6]</sup>、肝癌<sup>[7]</sup>、胃癌<sup>[8]</sup>、宫颈癌<sup>[9]</sup>中表现出良好的抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡的作用。然而, 光甘草定对 CRPC 的分子机制尚未完全明确。网络药理学是依托系统生物学, 将药理学、计算机科学和计算机网络相结合的方式, 为复杂疾病的药物发现和选择提供了新的思路<sup>[10]</sup>。为进一步探究光甘草定对 CRPC 的作用机制, 我们采用网络药理学、分子对接以及细胞实验的方法探讨其作用机制, 为今后的药物基础研究和临床应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物治疗靶点的预测

利用多个中药数据库尽可能全面收集光甘草定治疗靶点, 截止时间为 2021 年 10 月 25 日, 在 HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>)、TCMIO 数据库 (<http://tcmio.xielab.net/>)、TCMSP 数据库 (<https://tcmsp-e.com/>) 输入 “Glabridin” 收集靶点, 在 PharmMapper 数据库 (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>) 中上传光甘草定的 mol2 格式文件, 选择 “Human Protein Targets Only (v2010, 2241)” 预测治疗靶点, 在 BATMAN-TCM 数据库 ([\[dex.php/Home/Index/index\]\(http://dex.php/Home/Index/index\)\) 中输入光甘草定的 “PubChem\\_CID/InChI” 进行预测, 收集 “Score cutoff  \$\geq 20\$ ” 的预测靶点, 在 Swiss Target Prediction 数据库 \(<http://www.swisstargetprediction.ch/>\) 输入光甘草定的 “SMILES” 预测治疗靶点, 利用 Uniprot 数据库 \(<https://www.uniprot.org/>\) 进行靶点的校正并去重。](http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/in-</a></p></div><div data-bbox=)

### 1.2 疾病相关基因的收集

在 DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中输入关键词 “castration resistant prostate cancer”, 去除重复靶基因后收集 CRPC 相关的靶基因。随后, 利用韦恩图工具 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 将光甘草定治疗靶点映射到 CRPC 靶基因中获得药物-疾病共同靶点。通过建立各靶点节点、类型文件, 依次输入到 Cytoscape 3.7.2 软件中构建药物-靶点-疾病网络图。

### 1.3 蛋白互作网络分析及核心靶点的筛选

将以上共同靶点蛋白输入到 “STRING” 数据库 (<https://string-db.org/>) 中, Organism 选择 “Homo sapiens”, 最低交互分数 “minimum required interaction score” 设置为 0.400, 将结果以 TSV 格式下载保存, 运行 Cytoscape 3.7.2 软件, 导入下载文件, 使用 CytoHubba 插件进行网络拓扑学分析, 获得各靶点之间的连接度 (degree 值), 根据 degree 值大小获得光甘草定治疗 CRPC 的核心靶点, 并在软件中通过调节各节点颜色、大小等步骤制作蛋白-蛋白互作分析 (PPI) 网络图。

### 1.4 GO 基因本体和 KEGG 通路富集分析

使用 R studio 中的 bitr 函数进行蛋白 ID 与基因 ID 的转换, 注释包为 “org.Hs.eg.db” 包, 将 ID 名称转换为标准的基因编号 (ENTREZ ID), 并使用 “clusterProfiler” “ggplot2” 软件包 (R 3.6.3 for Windows) 进行 GO 功能富集分析, 包括生物学过程 (biological process, BP)、细胞学组分 (cytological component, CC)、分子生物学功能 (molecular function, MF) 和 KEGG 通路富集分析<sup>[11]</sup>。设置  $P < 0.01$  为具有统计学意义的富集结果, 将结果以柱形图和气泡图展示。

## 1.5 分子对接分析方法

在 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载相应的蛋白的 PDB 文件, TCMSp 数据库 (<https://tcmsp-e.com/>) 下载光甘草定的 mol2 格式文件, 运用 PyMOL2.4.0 软件对受体蛋白进行去水、去配体等操作, AutoDockTools-1.5.6 软件对蛋白进行加氢以及计算电荷处理等处理, 将受体蛋白和配体小分子分别转化为 pdbqt 格式, 利用插件“autogrid”及“autodock”进行活性位点对接, 对接过程中使用 Lamarckian genetic algorithm(LGA)算法。计算结合能(binding energy)(kJ/mol)来评估成分小分子与蛋白之间的结合活性, 一般小于-5.0 kJ/mol 的对接结合能被认为具有良好的结合相互作用。最后运用 PyMOL2.4.0 软件展示其结构模式。

## 1.6 体外细胞实验方法

### 1.6.1 主要药物、试剂、仪器及细胞株

光甘草定(Glabridin, 货号: HY-N0393, 纯度: 99.87%, 购自美国 MCE 公司); CCK8 试剂盒(货号 C0038)购自上海碧云天公司; 1640 培养基(货号 C11875500BT)、胎牛血清(货号 42F7180K)、胰酶(货号 25200072)购自美国 Gibco 公司; 膜联蛋白 V-FITC 凋亡检测试剂盒(货号 640914)购自美国 Biolegend 公司; DAPI 染色液(货号 MBD0015)购自上海 Sigma 公司; Akt(货号 60203-2-Ig)、磷酸化 Akt(货号 66444-1-Ig)、PI3K(货号 60225-1-Ig)、GAPDH(货号 60004-1-Ig)抗体购自湖北 Proteintech 公司; 磷酸化 PI3K 抗体(货号 ab182651)购自 Abcam(中国上海); 流式细胞仪来自美国贝克曼库尔特有限公司, CO<sub>2</sub> 培养箱来自美国赛默飞世尔科技公司; 人前列腺癌细胞(PC-3)购自湖南丰晖细胞库, 细胞置于 1640 培养基培养, 培养环境: 含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 饱和湿度的培养箱。

### 1.6.2 药物溶液配置

取光甘草定(分子式: C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>)5mg 于 500 μL 离心管中, 在超净台下操作, 加入 308 μL 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解, 制备成 50 mmol/L 的浓缩溶液, 保存在-20 °C 冰箱中。

### 1.6.3 细胞增殖实验

取生长状态良好的细胞, 经胰酶消化、离心、重悬细胞, 调整细胞密度为 4 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 接种到 96 孔板中, 每孔加入 100 μL 细胞悬液。继续培养 24 h, 待细胞完全贴壁后将细胞分为 4 个实验组和 1 个空白组, 每组设置 3 个复孔, 实验组每孔加入含有药

物浓度梯度的培养基 100 μL (25、50、75、100 μmol/L), 空白组加入不含药物的培养基。培养 24 h 后弃除旧培养基, 每孔加入 CCK8 10 μL, 继续培养 2 h, 在酶联免疫检测仪上测定各孔在 450 nm 波长处的光吸收值。

### 1.6.4 细胞凋亡检测

将细胞以每孔 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的密度接种到 6 孔板中, 继续培养 24 h 后, 视细胞生长情况(贴壁状态)时弃除原来的培养基, 设定药物处理组(72 μmol/L)和空白对照组(0 μmol/L), 每组安排 6 个复孔, 依次向每孔加入 2 mL 相应的药物浓度培养基, 空白对照组即加入不含药物培养基。继续培养 24 h, 取每组的 3 个复孔细胞进行流式细胞术实验, 胰酶消化、离心、洗涤、重悬细胞, 调节其浓度为 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL, 然后取 100 μL 细胞悬浮于 5 mL 流式管中, 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide 混匀, 于室温避光孵育 15 min, 使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。接着取对数生长的细胞接种到 24 孔板中, 调整细胞密度为 4 × 10<sup>4</sup> 个/mL, 观察细胞 80% 贴壁后加入 1 mL 含有药物浓度(0、72 μmol/L)的培养基继续培养 24 h, 用 PBS 洗涤 2 次后用 4% 甲醛固定 5 min, 加入稀释的 DAPI 染液(1 μg/mL), 室温下避光染色 20 min 后用 PBS 洗涤 3 次, 于荧光显微镜下观察细胞形态变化。

### 1.6.5 目标通路相关蛋白的表达检测

将细胞以每孔 5 × 10<sup>5</sup> 个/mL 的密度接种到 6 孔板上, 用含有药物浓度(0、72 μmol/L)的培养基继续培养 24 h 后离心收集细胞, 用细胞裂解液 RIPA 裂解细胞, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 根据蛋白质的相对分子质量大小, 制备分离胶和 5% 的浓缩胶进行蛋白电泳分离, 然后将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 在室温下, 用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 1 h。然后, 添加以下稀释的一抗: PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:500)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:2 000)、GAPDH(1:5 000), 在 4 °C 下孵育过夜。用 PBST 洗膜 5 次后, 加入相应的二抗并在室温下培养 60 min, 再次洗膜 5 次。均匀地滴加体积 1:1 的 ECL A 和 B 混合液在膜上, 将胶片暴露在暗盒中开始曝光, 曝光结束后保存并导出图片, 用图像分析软件 Image J 对图像进行灰度分析。

## 1.7 统计学分析

应用 SPSS 25 统计软件分析处理数据, 应用 GraphPad Prism 8.0 软件进行作图分析, 计量资料以

(Mean  $\pm$  SD) 表示,多组均数比较使用单因素方差分析,两组均数比较采用成组  $t$  检验, $P < 0.05$  认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 药物治疗靶点以及疾病靶基因收集结果

通过检索和收集,在 HERB 数据库收集到 26 个,TCMIO 数据库收集到 7 个,TCMSP 数据库收集到 24 个,在 PharmMapper 数据库收集到 136 个,在 BATMAN-TCM 数据库收集到 28 个,在 Swiss Target

Prediction 数据库收集到 100 个,去重后得到 248 个药物治疗靶点。

在 DisGeNET 数据库中共收集到 683 个具有代表性靶基因。将以上获得光甘草定的 248 个预测靶点蛋白通过韦恩图工具映射至 CRPC 的靶基因中获得 55 个药物-疾病共同靶点,我们将这一部分称之为关键靶点蛋白/靶基因(见图 1)。将以上关键靶点以及药物、疾病制作成节点信息,导入 Cytoscape 软件中,绘制药物-靶点-疾病网络图(见图 2)。

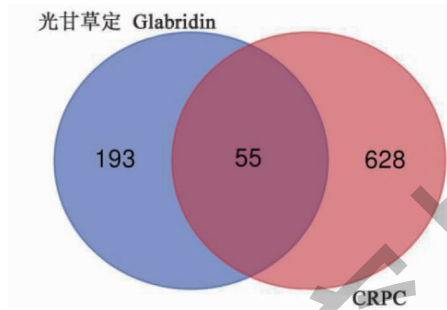


图 1 光甘草定与 CRPC 关键靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of glabridin and CRPC key targets

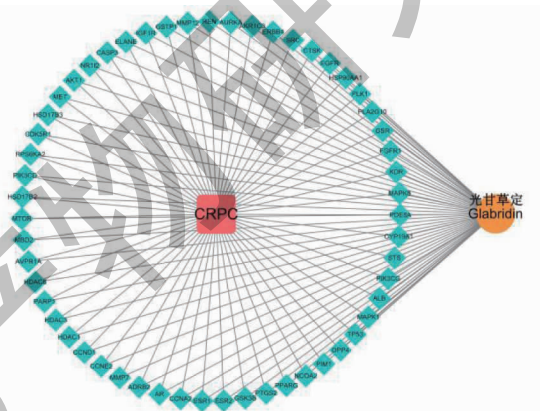


图 2 药物-靶点-疾病网络图

Fig. 2 Drug-target-disease network diagram

### 2.2 蛋白-蛋白相互作用网络分析结果

将以上 55 个关键靶点蛋白输入到“STRING”数据库中“Multiple proteins”窗口中,Organism 选择“Homo sapiens”,最低交互分数“minimum required interaction score”设置为 0.400,PPI 网络分析得出,该网络共有 55 节点,440 条边,平均节点度值(average node degree):16.0,PPI 富集  $P$  值(PPI enrichment  $P$ -value)  $< 1.0e-16$ ,将结果以 TSV 格式输出保存。将文件导入 Cytoscape 软件中,使用 CytoHubba 插件进行拓扑学分析,计算度值(degree 值),并绘制

PPI 分析网络图(见图 3A),取度值大小排名前 10 的蛋白作为核心靶点蛋白,并根据度值大小,取排名前 20 制作条形图(见图 3B)。

### 2.3 GO 基因本体和 KEGG 通路富集分析结果

使用 R studio 中的“clusterProfiler”软件包对以上 55 个靶基因进行 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,GO 分析富集到 847 个具体差异的条目( $P < 0.01$ ),其中 779 条 BP 涉及对类固醇激素的反应(response to steroid hormone)、蛋白激酶 B 信号(protein kinase B signaling)、对营养水平的反应(re-

sponse to nutrient levels)、蛋白激酶 B 信号的正向调节(positive regulation of protein kinase B signaling)等,16 条 CC 涉及转移酶复合物(transferase complex)、膜筏(membrane raft)、膜微结构域(membrane microdomain)、膜区(membrane region)等,52 条 MF 涉及组蛋白脱乙酰酶结合(histone deacetylase binding)、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性(transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性(protein serine/threonine kinase activity)、跨膜受体蛋白激酶活性(transmembrane receptor protein kinase activity)等,图 4 展示了 GO 富集分析每一类别具有差异的前 10 个条目。KEGG

分析富集到 105 个具有差异的信号通路( $P < 0.01$ ),包括磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)信号通路(PI3K-Akt signaling pathway)、蛋白聚糖在癌症中的作用(proteoglycans in cancer)、前列腺癌(prostate cancer)、化学致癌-受体激活(chemical carcinogenesis-receptor activation)、内分泌的抵抗(endocrine resistance)、甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)、乳腺癌(breast cancer)、卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染(kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection)等,图 5 展示了富集具有差异的前 20 个通路。

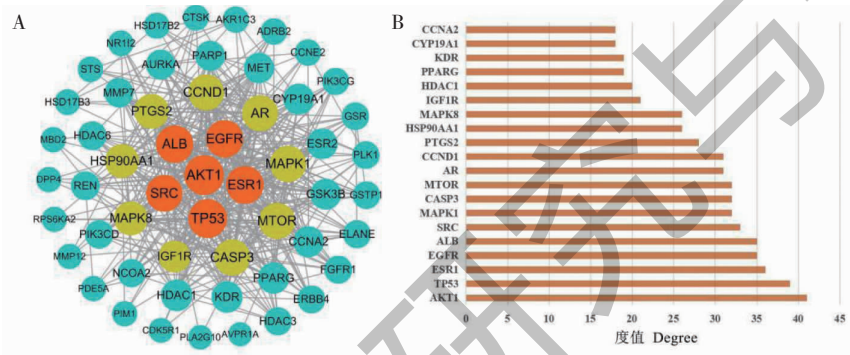


图 3 关键靶点蛋白 PPI 分析情况

Fig. 3 PPI analysis of key target proteins

注:网络图中节点越大、颜色越深表示连接度值越高。Note:In the network diagram, the larger the node and the darker the color, the higher the connectivity value.

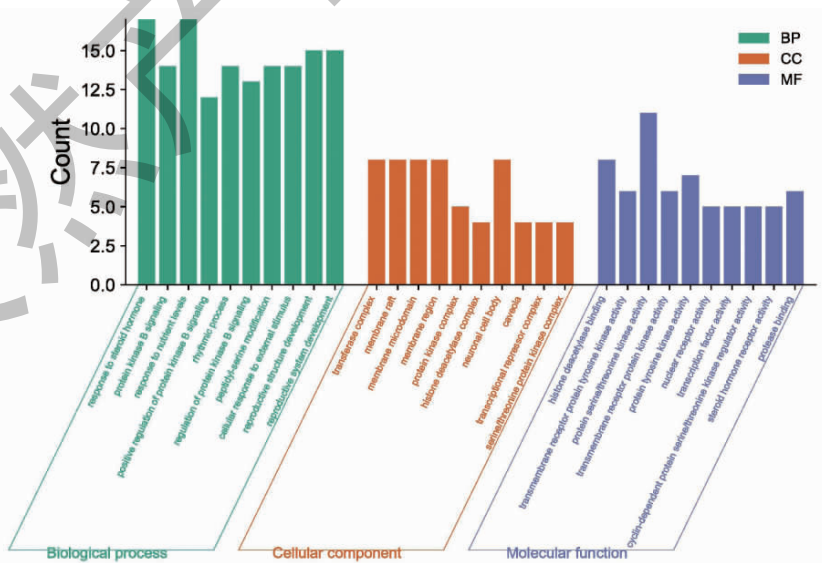


图 4 关键靶基因 GO 富集分析条目柱形图(前 10)

Fig. 4 Histogram of key target gene GO enrichment analysis items (top 10)

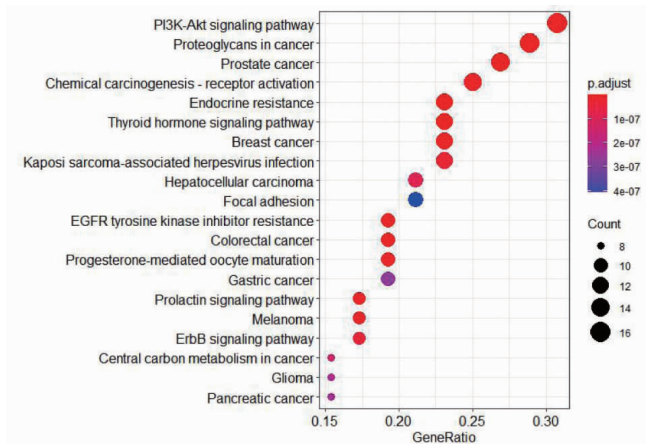


图 5 关键靶基因的 KEGG 通路富集分析气泡图(前 20)

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis of key target genes (top 20)

### 2.4 分子对接结果

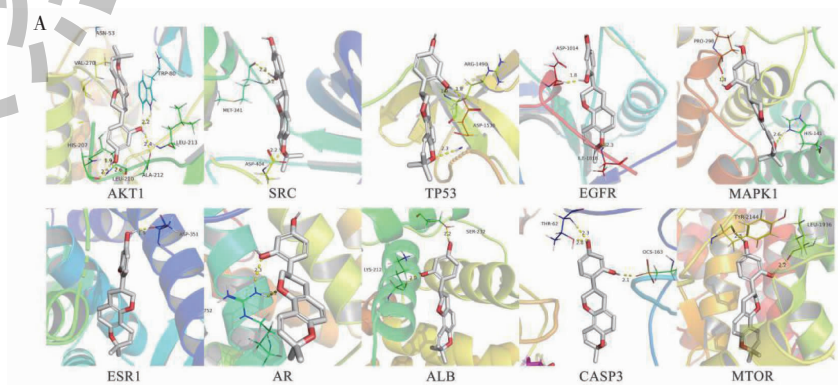
选择度值排名前 10 的核心靶点蛋白 (AKT1、TP53、ESR1、EGFR、ALB、SRC、MAPK1、CASP3、MTOR、AR) 与光甘草定进行分子对接, 运行 AutoDock 软件分别与光甘草定共进行 10 次分子对接。具体对接结合能结果见表 1, 由表可知, 所有对接结合能均 < -5 kJ/mol, 其中光甘草定与蛋白 AKT1 结合能最低, 其次是 SRC、TP53、EGFR, 对接结合能越低表明光甘草定与这些靶点结合亲和力越高, 提示其有更大可能作用于以上靶点, 影响靶点蛋白的结构和功能, 进而调控相应的信号通路。图 6 展示了光甘草定与各核心靶点的对接结构图, 由图可知, 光甘草定与核心靶点均有氢键相连, 特别是 AKT1 蛋白, 光甘草定与该蛋白的 TRP-50 残基有苯环共轭  $\pi$  键相连, 与 VAL-270、HIS-207、LEU-210、ALA-212 等残基有氢键相连, 说明光甘草定小分子与各核心靶点结合紧密, 进而表明, 光甘草定抗 CRPC 可

能是通过调节以上核心靶点来实现。

表 1 光甘草定与核心靶点分子对接结合能

Table 1 Docking and binding energy of glabridin and core target molecules

PDB 号 PDB number	靶点蛋白 Target protein	结合能 Binding energy (kJ/mol)
HHF	AKT1	-9.51
2BDJ	SRC	-8.55
6MXV	TP53	-8.17
5XGM	EGFR	-7.82
6C54	MAPK1	-7.57
7MSA	ESR1	-7.55
4O EZ	AR	-7.36
6EZQ	ALB	-7.27
3DEK	CASP3	-6.89
3JBZ	MTOR	-6.89



续图 6 (Continued Fig.6)

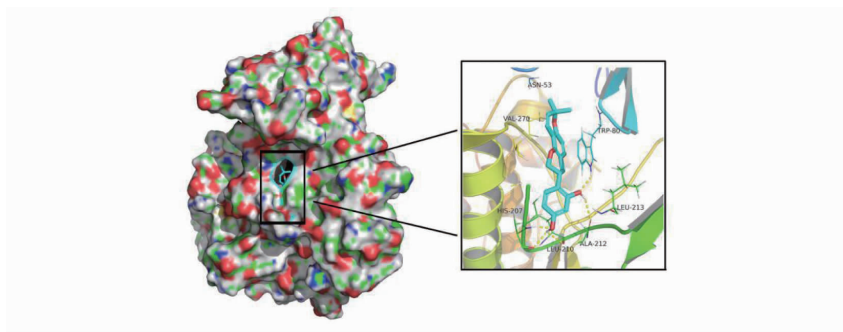


图6 甘草定与核心靶点的分子对接情况

Fig. 6 Molecular docking of glabridin with the core target

## 2.5 光甘草定抑制前列腺癌 PC-3 细胞增殖

通过细胞增殖 CCK8 实验观察不同浓度的光甘草定处理 PC-3 细胞 24、48 h 后的细胞活力情况, 结果发现与对照组相比, 光甘草定对 PC-3 细胞呈现出明显的抑制增殖作用 ( $P < 0.05$ ), 在 50 ~ 100  $\mu\text{mol/L}$  范围内, 细胞增殖抑制率在 24 h 内可达 50% 以上, 计算 24、48 h 时间点的半数有效抑制浓度  $\text{IC}_{50}$  分别为 72、66.9  $\mu\text{mol/L}$  (见图 7)。

## 2.6 光甘草定诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡

通过流式细胞术测定细胞凋亡率的变化, 如图 8A 所示, 药物处理组和对照组的细胞凋亡率分别为  $(6.9 \pm 0.31)\%$ 、 $(2.87 \pm 0.23)\%$ , 药物处理组细胞凋亡率高于对照组 ( $P < 0.05$ )。通过显微镜下观察

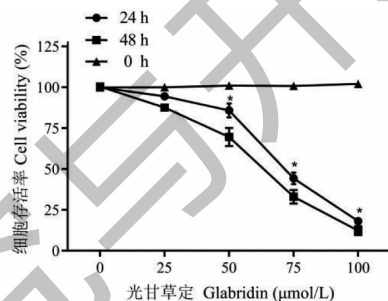


图7 CCK8 法检测不同浓度光甘草定对 PC-3 细胞的存活率的影响

Fig. 7 Effects of different concentrations of glabridin on the survival rate of PC-3 cells detected by CCK8 method  
注: 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ . Note: Compared with blank group, \*  $P < 0.05$ .

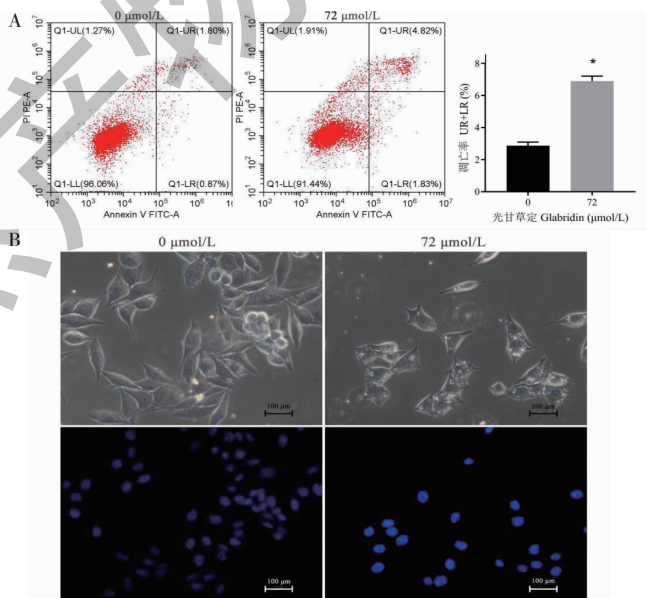


图8 光甘草定作用 PC-3 细胞 24 h 后细胞凋亡情况的变化

Fig. 8 Apoptotic changes of PC-3 cells treated with glabridin for 24 h

注: 图 8A: LL 为活细胞, LR 为早期凋亡细胞, UR 为晚期凋亡和死亡细胞, UL 为碎片及损伤细胞, 常规凋亡率可计算  $\text{UR} + \text{LR}$ ; 与空白组比较, \*  $P < 0.05$ . Note: Fig. 8A: LL is living cells, LR is early apoptotic cells, UR is late apoptotic and dead cells, UL is debris and injured cells. The common apoptosis rate can be calculated as  $\text{UR} + \text{LR}$ ; compared with blank group, \*  $P < 0.05$ .

细胞凋亡形态变化,光甘草定处理后的细胞数量变少、体积变小、形态皱缩、细胞破裂增加。进一步通过荧光显微镜(200×)下观察 DAPI 染色后细胞核形态变化,光甘草定处理后部分细胞核出现折缝样改变且染色质浓缩,呈现出荧光表达增强(见图 8B)。结果表明,光甘草定在一定程度上可诱导 PC-3 细胞凋亡。

## 2.7 光甘草定抑制蛋白 AKT 的磷酸化

通过 Western blot 方法检测该通路相关蛋白

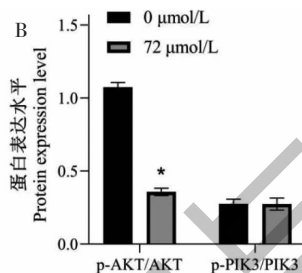
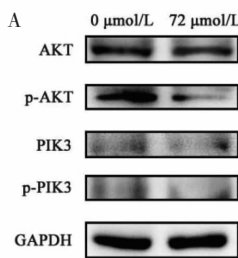


图9 光甘草定作用 PC-3 细胞后 PI3K、AKT、p-PI3K、p- AKT 表达的变化

Fig. 9 Changes in protein expression levels of PI3K, AKT, p-PI3K, p- AKT in PC-3 cells after treated with glabridin

注:与空白组相比, \*  $P < 0.05$ 。Note: Compared with blank group, \*  $P < 0.05$ 。

## 3 讨论与结论

近年来,中医药治疗前列腺癌,特别是在 CRPC 上取得显著的进展,中医药结合手术或者化学治疗具有缩小瘤体、降低 PSA、减少复发、延长其生存时间等效果<sup>[12-14]</sup>。不少研究报道提示甘草中的活性成分对 CRPC 的抑瘤作用显著,Gioti 等<sup>[15]</sup>研究发现光果甘草提取物(GGE)单独或与阿霉素联合使用对雄激素非依赖性前列腺癌细胞(PC-3 细胞)均具有抗增殖作用,并能够促进自噬相关基因如 LC3A、ULK1 和 AMBRA1 的表达增强。Zhang 等<sup>[16]</sup>研究发现异甘草素可抑制前列腺癌细胞(PC-3 和 22RV1)增殖,诱导细胞凋亡,阻滞 G2/M 细胞周期,并通过体内动物实验发现其可抑制 PC-3 异种移植瘤的生长。甘草表现出良好的抗 CRPC 活性,而甘草中的光甘草定是众多的黄酮类化合物中备受关注之一,具有良好的抗肿瘤活性,对于 CRPC 的作用机制值得我们去进一步挖掘。

与传统药理学相比,网络药理学为新药研发提供了全新的视角,为了更好地了解光甘草定对 CRPC 的作用机制,我们运用网络药理学的方法,通过 TCMIO 数据库、TCMSP 数据库、PharmMapper 数据库等数据库共收集到 683 个光甘草定作用靶点,通过韦恩图工具获得 55 个光甘草定作用于去势抵抗性前列腺癌的关键靶点,通过 PPI 蛋白互作网络

(PI3K、AKT、p-PI3K、p- AKT)的表达情况。结果显示,72 μmol/L 光甘草定作用于 PC-3 细胞 24 h 后,磷酸化的 AKT 蛋白的表达较未处理组相比显著降低( $P < 0.05$ ),总的 AKT 的表达量未发生明显变化,但磷酸化的 PI3K 蛋白和总的 PI3K 蛋白变化不明显(见图 9)。结果表明光甘草定能明显抑制 AKT 蛋白的磷酸化水平,这提示光甘草定可能通过调节 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的活性发挥抗肿瘤作用。

分析得到 AKT1、TP53、ESR1、EGFR、ALB 等 10 个核心靶点。GO 富集分析显示光甘草定主要通过调节蛋白磷酸化、氧化反应以及细胞周期等方面调控细胞代谢和细胞凋亡。分子对接进一步显示,光甘草定与 10 个核心靶点具有较好的对接活性,预测光甘草定可能通过调控这些核心靶点蛋白的表达,进而达到抗肿瘤作用。在这些核心靶点中,AKT1 蛋白的对接活性最高。AKT1 是 PI3K/AKT 信号通路中重要调控因子之一,参与肿瘤的多种生物学过程。在前列腺癌中,基于基因组和转录组谱发现,有多达 42% 的原发性前列腺癌和 100% 的转移性前列腺癌样本检测出 PI3K/AKT 通路成分的遗传变异和基因表达失调<sup>[17]</sup>。在早期有研究中提出,AKT 亚型(AKT1、AKT2)可能促进前列腺癌从雄激素敏感阶段转变为激素难治阶段<sup>[18]</sup>。在 CRPC 患者治疗的基础研究中,有研究报道,在 AKT1/2 敲除的去势抵抗性前列腺癌动物模型中发现,肿瘤在体内和体外转移灶明显减少<sup>[19]</sup>。可见,抑制 AKT1 的表达,有可能可改善 CRPC 患者的生存预后,应用 AKT1 抑制剂可能是 CRPC 患者一种有潜力的治疗方法。我们的研究在理论上提出光甘草定可能是一种 AKT1 抑制剂,但光甘草定能否成为有效的 AKT1 抑制剂应用于 CRPC 患者还有待今后进一步实验论证。

KEGG 通路富集结果显示,PI3K/AKT 信号通



路、蛋白聚糖在癌症、前列腺癌,化学致癌-受体激活、内分泌抵抗、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂抵抗等 105 个相关信号通路( $P < 0.01$ )。其中,最令人关注的是磷脂酰肌 3-激酶(PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(AKT)信号通路。PI3K/AKT 信号通路参与调控细胞代谢、生长、增殖、分化以及蛋白质合成等方面,在人类许多肿瘤中均检测到 PI3K/AKT 信号通路的突变。研究数据表明,有高达 70%~100% 的晚期前列腺癌患者会发生 PI3K 通路的调控失调<sup>[20]</sup>。并且发现,在激素敏感性前列腺癌向去势抵抗性前列腺癌进展过程中,PI3K/AKT 信号通路扮演着重要角色,其作用机制可能与雄激素受体(AR)信号通路相关调节有关,该信号通路成分可作为 CRPC 潜在的生物标志物<sup>[21]</sup>。目前,PI3K/AKT 信号通路相关的抑制剂比如 AZD5363 等已进入临床试验阶段,并且取得可观的疗效<sup>[22]</sup>。研究该通路相关的抑制剂对 CRPC 的治疗具有重大价值。

我们进一步通过 CCK8 法发现光甘草定可明显抑制 PC-3 细胞的增殖,流式细胞术和 DAPI 染色实验发现其可诱导细胞凋亡,镜下观察到细胞数量减少、形态皱缩。对于抗肿瘤的药物浓度的筛选,我们发现其 IC<sub>50</sub> 稍高,考虑与分子对接采取的是半柔性对接方式有关,相比柔性对接,半柔性对接计算的结合能偏低<sup>[23]</sup>。再者光甘草定作为天然抗氧化剂,其具有较强的抗氧化作用,但低剂量的天然抗氧化剂在抗肿瘤实验中未表现出较好的抗肿瘤活性,而高剂量对细胞产生毒性作用,其具体机制有待进一步探索<sup>[24,25]</sup>。结合网络药理学预测的 KEGG 信号通路结果,我们预测光甘草定对 PC-3 细胞的抑制作用可能主要与 PI3K/AKT 信号通路有关,进一步通过 Western blot 实验研究光甘草定对 PC-3 细胞 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响,结果发现光甘草定可明显抑制 AKT 蛋白的磷酸化过程。在我们的实验中观察到光甘草定能显著抑制磷酸化的 AKT 蛋白的表达,但是对磷酸化的 PI3K 蛋白表达抑制作用没有预期效果,经反复调整蛋白上样浓度和比例,严格规范操作后,该蛋白仍未明显显影,考虑原因可能与 p-PI3K 蛋白本身质量问题,效价不高有关。但是由于本次研究经费有限,未再更换其他产品的蛋白,在今后的实验中,我们将对该通路更多的相关蛋白进行分析,以验证我们的设想。

综上,本研究通过网络药理学分析并预测光甘草定对去势抵抗性前列腺癌的潜在作用机制,并通过分子对接以及体外细胞实验进一步分析验证,结

果表明光甘草定可抑制 PC-3 细胞增殖、诱导凋亡,其机制与 AKT 蛋白磷酸化过程有关,故我们推测,其发挥抗 CRPC 的作用机制可能主要通过调控 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白的磷酸化。本研究不仅为探究光甘草定治疗去势抵抗性前列腺癌的分子机制提供了研究思路,而且为甘草中黄酮类化合物的抗肿瘤药物研发和临床应用提供了一种有效方法。

#### 参考文献

- 1 Albertsen PC. Prostate cancer screening and treatment; where have we come from and where are we going? [J]. *Bju Int*, 2020, 126:218-224.
- 2 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA-Cancer J Clin*, 2020, 70:7-30.
- 3 Davies A, Conteduca V, Zoubeidi A, et al. Biological evolution of castration-resistant prostate cancer [J]. *Eur Urol Focus*, 2019, 5:147-154.
- 4 Vigneswaran HT, Warnqvist A, Andersson T, et al. Real world treatment utilization patterns in patients with castration-resistant prostate cancer [J]. *Scand J Urol*, 2021, 55:299-306.
- 5 Kapkoti DS, Singh S, Alam S, et al. *In vitro* antiproliferative activity of glabridin derivatives and their target identification [J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34:1735-1742.
- 6 Zhu K, Li K, Wang H, et al. Discovery of glabridin as potent inhibitor of epidermal growth factor receptor in SK-BR-3 Cell [J]. *Pharmacology*, 2019, 4:113-125.
- 7 Wang Z, Luo S, Wan Z, et al. Glabridin arrests cell cycle and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma by suppressing BRAF/MEK signaling pathway [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37:5837-5846.
- 8 Zhang L, Chen H, Wang M, et al. Effects of glabridin combined with 5-fluorouracil on the proliferation and apoptosis of gastric cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15:7037-7045.
- 9 Huang SX, Li CJ, Huang JF, et al. Effects of glabridin on proliferation, invasion and apoptosis of cervical cancer Hela cells and its mechanism [J]. *Mod Oncol (现代肿瘤医学)*, 2020, 28:3289-3293.
- 10 Luo TT, Lu Y, Yan SK, et al. Network pharmacology in research of chinese medicine formula: methodology, application and prospective [J]. *Chin J Integr Med*, 2020, 26:72-80.
- 11 Pei L, Shen X, Yan Y, et al. Virtual screening of the multi-pathway and multi-gene regulatory molecular mechanism of Dachengqi Decoction in the treatment of stroke based on network pharmacology [J]. *Comb Chem High T Scr*, 2020, 23:775-787.