

基于体外细胞实验和网络药理学探讨槐定碱 治疗前列腺癌的作用机制

王 乐, 芦春斌*

暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632

摘要: 基于体外细胞实验、网络药理学和分子对接探讨槐定碱(sophoridine, SRI)对 DU-145 前列腺癌细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。MTT、克隆形成以及免疫荧光实验检测 SRI 对 DU-145 细胞增殖的影响, 流式细胞术检测细胞凋亡情况。qPCR 检测 Ki67、PCNA、Caspase-3/7、Bcl-2、Bax 以及 p38MAPK mRNA 表达。Western blot 检测 PCNA、Caspase-3、Bcl-2、Bax、p38MAPK 以及 p-p38MAPK 蛋白表达。利用 TCMSP、HERB、Swiss Target Prediction 和 PharmMapper 数据库获得 SRI 靶点, 利用 OMIM、GeneCards 数据库收集前列腺癌靶点, 并通过 Venny2.1.0 筛选两者的共同靶点。利用 STRING 数据库构建蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络, 采用 Cytoscape3.9.0 软件进行网络拓扑学分析以及 PPI 网络可视化。通过 DAVID 数据库进行 GO 富集和 KEGG 通路分析。采用 AutoDock1.5.6 软件进行分子对接。细胞实验结果表明 SRI 能显著抑制 DU-145 细胞的增殖, 并促进其凋亡。PPI 网络分析得到 ALB、MAPK1、CASP3、MAPK8、p38MAPK 等 16 个核心靶点。GO 富集分析得到 158 个条目($P < 0.01$), 主要集中在细胞凋亡过程、蛋白质磷酸化、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等。KEGG 富集分析得到 84 个信号通路($P < 0.01$), 涉及癌症通路、癌症中的蛋白多糖、MAPK 信号通路等。分子对接结果表明 SRI 与核心靶点 p38MAPK 能够稳定结合。qPCR 和 Western blot 结果证实 SRI 能促进 p38MAPK 的表达。综上, 本研究表明 SRI 能抑制 DU-145 前列腺癌细胞的增殖并促进其凋亡, 这可能与 p38MAPK 的激活有关。

关键词: 前列腺癌; 槐定碱; 增殖; 凋亡; p38MAPK

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2024)3-0528-13

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.3.016

Molecular mechanism of sophoridine in the treatment of prostate cancer based on cell experiments *in vitro* and network pharmacology

WANG Le, LU Chun-bin*

College of Life Science and Technologies, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: The effect of Sophoridine (SRI) on the proliferation and apoptosis of DU-145 prostate cancer cells, as well as its mechanism of action were investigated based on cell experiments *in vitro*, network pharmacology and molecular docking. MTT, colony formation, and immunofluorescence assays were used to detect the effects of SRI on DU-145 cell proliferation, and flow cytometry was used to detect cell apoptosis. qPCR was used to detect the mRNA expression of Ki67, PCNA, Caspase-3/7, Bcl-2, Bax and p38MAPK. The protein expression of PCNA, Caspase-3, Bcl-2, Bax, p38MAPK and p-p38MAPK were detected by Western blot. Several databases, including TCMSP, HERB, Swiss Target Prediction, and PharmMapper were utilized to obtain SRI targets and the OMIM and GeneCards databases were used to collect prostate cancer targets. Common targets between the two datasets were screened using Venny2.1.0. The STRING database was used to construct a protein-protein interaction (PPI) network, and network topology analysis and PPI network visualization were performed using Cytoscape3.9.0 software. GO enrichment and KEGG pathway analysis were performed by DAVID database. Molecular docking was performed using AutoDock1.5.6 software. The results of cell experiments showed that SRI significantly inhibited DU-145 cell proliferation and

promoted apoptosis. The PPI network analysis revealed 16 core targets including ALB, MAPK1, CASP3, MAPK8, and p38MAPK. The GO enrichment analysis yielded 158 entries ($P < 0.01$), were mainly concentrated in apoptosis process, protein phosphorylation, and protein serine/threonine/tyrosine kinase activity. KEGG enrichment analysis obtained 84 signaling pathways ($P < 0.01$), involving cancer pathways, proteoglycans in cancer, MAPK signaling pathway and other signaling pathways. Molecular docking results showed that SRI can stably bind to the core target p38MAPK. qPCR and Western blot results confirmed that SRI can promote the expression of p38MAPK. In conclusion, this study shows that SRI can inhibit the proliferation and promote apoptosis of DU-145 prostate cancer cells, which may be associated with p38MAPK activation.

Key words: prostate cancer; sophoridine; proliferation; apoptosis; p38MAPK

前列腺癌(prostate cancer, PCa)是全球中老年男性泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一。2020年全球男性新发癌症病例1 006万,死亡病例553万例,其中新发PCa病例141万例,死亡病例38万例,死亡发病比为27%,而中国新发PCa病例12万,死亡病例5万,PCa死亡发病比为41.7%^[1]。美国癌症协会2023年研究数据表明,PCa患病率居男性恶性肿瘤第一,约占比29%^[2]。目前,临床上治疗PCa的方案主要有雄激素剥夺疗法、根治性前列腺切除术、放化疗以及分子靶向治疗等^[3],然而这些治疗手段存在诸多副作用,且药物易产生耐药,造成部分患者预后较差,出现复发或进展^[4]。因此,寻找安全有效的PCa治疗新药物具有重要意义。

槐定碱(sophoridine, SRI)主要是从苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)中分离得到的一种四环喹啉西啶生物碱。研究表明SRI具有诸多的药理作用,包括抗炎、抗病毒和抗肿瘤等^[5]。2005年,盐酸槐定碱注射液被国家食品药品监督管理局批准用于临床上治疗恶性滋养细胞肿瘤^[6]。目前,SRI已被试用于胃肠道肿瘤肝转移的治疗^[7],同时大量报道证实SRI对结直肠癌、肺癌、胰腺癌等肿瘤也有较好的抑制作用^[8]。然而,SRI对PCa的影响及其可能的作用机制还不清楚。

网络药理学是一门以经典药理学、生物信息学,以及计算机科学等多学科理论为基础的新兴学科,广泛应用于药物开发以及药物作用机理研究。本文通过体外细胞实验研究SRI对DU-145细胞增殖、凋亡的影响,并结合网络药理学和分子对接技术探究其可能的作用机制,以期SRI临床治疗PCa提供理论依据和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 细胞及来源

DU-145细胞来自暨南大学免疫学系何贤辉课题组惠赠。

1.2 药品与试剂

SRI(批号221116,纯度>98%,成都植化纯生物技术有限公司);DMEM培养基(批号8122653,美国Gibco公司);胰酶(批号2458323,美国Gibco公司);FBS(批号12A299,上海吉泰依科赛生物科技有限公司);DMSO(批号Y190601,美国MP公司);MTT(批号829Z056,北京索莱宝科技有限公司);结晶紫(批号RS6527B219,上海瑞永生物科技有限公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号AK12112,武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);AG RNAex Pro RNA提取试剂(批号A4A0616,广州瑞真生物技术有限公司);Evo M-MLV反转录试剂预混液(批号A5A1512,广州瑞真生物技术有限公司);SYBR Green Pro Taq HS预混型qPCR试剂盒(批号A5A2693,广州瑞真生物技术有限公司);Ki67抗体(批号AC220907054,武汉赛维尔生物科技有限公司);FITC标记的山羊抗兔IgG(批号CR2203121,武汉赛维尔生物科技有限公司); β -actin抗体(批号AC230205002,武汉赛维尔生物科技有限公司);GAPDH抗体(批号AC221016006,武汉赛维尔生物科技有限公司);PCNA抗体(批号AC230612023,武汉赛维尔生物科技有限公司);Bax抗体(批号AC230612029,武汉赛维尔生物科技有限公司);p38MAPK抗体(批号1000220-9,艾博抗(上海)贸易有限公司);Anti-active + pro Caspase-3 Antibody(批号H660063003,杭州华安生物技术有限公司);Bcl-2抗体(批号10092580,艾比玛特医药科技(上海)有限公司);p-p38MAPK抗体(批号10049598,艾比玛特医药科技(上海)有限公司);Goat Anti-Rabbit Mouse IgG-HRP(批号10042368,艾比玛特医药科技(上海)有限公司);ECL发光液(批号2207149,美国Millipore公司);预染蛋白marker(10-180 kDa)(批号00785996,基因生物技术国际贸易(上海)有限公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号B1A9001249,北京鼎国昌盛生物技术有限责

任公司)。

1.3 主要仪器

CCL-170B-8 型二氧化碳细胞培养箱(新加坡 ESCO 公司); Synergy4 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司); CYTOFLEX 型细胞分析与检测系统(中国贝克曼库尔特国际贸易有限公司); CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司); Gene-GoomeHR 型化学发光凝胶成像系统(英国 Syngene 公司); LEICA CW4000 型核型分析系统(德国 LEICA 公司)等。

1.4 工具与数据库

1.4.1 工具

微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>); Venny2.1.0 在线工具(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>); Cytoscape3.9.0 软件; AutoDock1.5.6 软件; PyMol 软件; ImageJ 软件; GraphPad Prism9.0 软件等。

1.4.2 数据库

TCMSP 数据库(<https://tcmsp-e.com/>); HERB 数据库(<http://herb.ac.cn/Detail/?v=HBIN044394&label=Ingredient>); Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>); PharmMapper 数据库(<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>); Pubchem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#query=Sophoridine>); Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>); OMIM 数据库(<https://omim.org/>); GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>); STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>); DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.5 实验方法

1.5.1 细胞培养

DU-145 细胞,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中,用含 10% FBS、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基进行培养。取对数生长期的细胞进行实验。

1.5.2 MTT 法检测 SRI 对 DU-145 细胞增殖的影响

SRI 用 DMEM 培养基配成 60 mmol/L 母液,-20℃保存。收集生长良好的 DU-145 细胞,接种于 96 孔板,每孔 3 000 个细胞。将培养板置于培养箱培养 24 h 后,分别加入 0、0.0625、0.125、0.25、0.5、1、2、4、8、16 mmol/L 的 SRI,继续培养 24、48 h。移除培养基后向每孔加入无血清培养基 100 μL 和 MTT 溶液 20 μL,继续孵育 4 h 后移除培养基,每孔加入

DMSO 溶液 150 μL 进行避光摇床震荡 10 min,用酶标仪测定在 490 nm 处的吸光度,并计算细胞增殖抑制率。

1.5.3 克隆形成实验检测 SRI 对 DU-145 细胞增殖能力的影响

收集生长良好的 DU-145 细胞,接种于 6 孔板,每孔 1 000 个细胞。培养 24 h 后,分别加入 0.35、0.7、1.4 mmol/L 的 SRI 处理细胞 48 h。之后更换正常的完全培养基,继续培养 7 d 左右,细胞集落明显形成。4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min,1 × PBS 清洗 3 次,再用 0.1% 结晶紫溶液染色 10 min,1 × PBS 清洗 3 次。风干后拍照,使用 ImageJ 软件对细胞克隆形成数目进行统计与量化。

1.5.4 免疫荧光实验检测 SRI 对 DU-145 细胞 Ki67 蛋白表达的影响

收集生长良好的 DU-145 细胞,接种于预先放置细胞爬片的 24 孔板中,每孔 1 × 10⁴ 个细胞。培养 24 h 后,分别加入 0.35、0.7、1.4 mmol/L 的 SRI 处理细胞 48 h。1 × PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min,1 × PBS 清洗 3 次,0.5% Triton100 室温通透 20 min,1 × PBS 清洗 3 次,5% BSA 室温封闭 1 h,Ki67(1:1 000)4℃孵育过夜,1 × PBS 清洗 3 次。二抗(1:1 000)避光常温孵育 1 h,1 × PBS 清洗 3 次,DAPI 避光孵育 5 min,1 × PBS 清洗 3 次,载玻片上滴加适量抗荧光淬灭剂,盖上细胞爬片,荧光显微镜观察拍照。使用 ImageJ 软件对 DU-145 细胞 Ki67 蛋白表达情况进行统计与量化。

1.5.5 流式细胞术检测 SRI 对 DU-145 细胞凋亡的影响

收集生长良好的 DU-145 细胞,接种于 6 孔板中,每孔 2 × 10⁵ 个细胞。培养 24 h 后,分别加入 0.35、0.7、1.4 mmol/L 的 SRI 处理细胞 48 h。收集培养基和细胞,低速离心弃上清,加入 500 μL 1 × Annexin V Binding Buffer 重悬细胞,再加入 5 μL Annexin V-FITC Reagent 和 5 μL PI Reagent,轻轻混匀,避光孵育 15 min,上机检测。

1.5.6 网络药理学预测 SRI 治疗 PCa 的作用机制

通过 TCMSP、HERB、PharmMapper 和 Swiss Target Prediction 数据库收集 SRI 的药理靶点。首先,在 TCMSP 数据库和 HERB 数据库输入 SRI 的英文名称,收集药理靶点。然后,通过 PubChem 数据库获得 SRI 的二维结构和 Canonical SMILES。将 SRI

的二维结构上传到 PharmMapper 数据库,设置选择目标集:仅限人类蛋白质目标,筛选 SRI 作用靶点(Z 值>0)。同时,将 SRI 的 Canonical SMILES 导入 Swiss Target Prediction 数据库,并选择“智人”作为物种,筛选 SRI 作用靶点(Probably 值>0)。接下来,通过 UniProt 数据库对收集的 SRI 靶点进行注释。最后,将来自 TCMSp、HERB、PharmMapper 和 Swiss Target Prediction 四个不同数据库的数据集进行合并,删除重复靶点。

以“Prostate cancer”为关键词,在 GeneCards (“相关性评分”>10)、OMIM 数据库中进行检索 PCa 靶点。将来自 GeneCards、OMIM 数据库的数据集进行合并,剔除重复靶点。在 Venny2.1.0 在线工具中分别导入 SRI 与 PCa 的作用靶点,绘制韦恩图,可得到 SRI 与 PCa 的共同作用靶点。

使用 STRING 数据库构建 PPI 网络。将 SRI 与 PCa 的共同作用靶点上传到 STRING 数据库中,物种选择 Homo sapiens,设置最低交互分数大于 0.4,其他参数保持默认设置。然后,我们选择“隐藏网络中断连接的节点”来更新 PPI 网络,结果保存 TSV 格式文件。运行 Cytoscape3.9.0 软件,导入 TSV 格式文件,使用 CytoNCA 插件进行网络拓扑学分析,获得各靶点之间的关联度(degree 值),并根据蛋白关联度进行排序。最后,degree 值排名前 10 的靶点确定为关键靶点。

使用 DAVID 数据库进行基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。将 SRI 与 PCa 的共同作用靶点导入 DAVID 数据库中,默认 DAVID 数据库参数设置。GO 富集分析包括生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)三部分。GO 和 KEGG 分析都应用 $P<0.01$ 作为截止值,以在每个类别中选择高度显著的富集项。根据富集靶点的数量进行排序,并使用微生信在线平台进行绘制 KEGG 气泡图和 GO 生物学过程图。

1.5.7 分子对接

在 PubChem 数据库获得 SRI 二级结构文件,导入 Chem3D 软件,转化为 3D 结构,并进行能量最小化,导出 mol2 格式文件,命名 SRI.mol2。SRI 结构文件导入 AutoDock1.5.6 软件,进行加氢、计算电荷处理后,设置为配体。在 PDB 数据库下载 p38MAPK 晶体结构(ID:2FSL),将 p38MAPK 晶体

结构导入 PyMol 软件,进行去水、去配体处理,然后在 AutoDock1.5.6 软件中进行加氢处理,设置为受体。将处理后的 p38MAPK、SRI 文件导入 AutoDock1.5.6 软件,采用盲对接方式,保存对接盒子参数。接着运行 autogrid4,保存 dock.dpf 文件,最后运行 autodock,设置半柔性对接,对接次数 50 次,结合能判断分子与蛋白的结合程度,再使用 PyMol 软件进行结果可视化。

1.5.8 qPCR 检测相关基因的 mRNA 表达水平

收集生长良好的 DU-145 细胞,接种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞。培养 24 h 后,分别加入 0.35、0.7、1.4 mmol/L 的 SRI 处理细胞 48 h。使用 AG RNAex Pro RNA 提取试剂提取总 RNA,所提取的总 RNA 用 Nano 定量, $A_{260}/A_{280} > 1.8$,以随机引物进行逆转录合成 cDNA 于 -80℃ 下保存。qPCR 引物由生工生物合成,引物序列见表 1。qPCR 条件为 95℃ 预变性 30 s、95℃ 变性 5 s、60℃ 退火 30 s,共 40 个循环。

表 1 qPCR 引物序列
Table 1 qPCR primer sequences

目的基因 Target gene	序列(5'-3') Sequences(5'-3')
GAPDH	F: TGACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG R: GTGTCGCTGTTGAAGTCAGAGGAG
P38MAPK	F: GTGCCCAGCGTTACCAGAAC R: GGAGAGCTTCTTCACTGCCACAC
Caspase-7	F: ACTGACAGGTATGGGCGTTC R: CGGCATTTGTATGGTCTCTT
Caspase-3	F: AGAGGGGATCGTTGTAGAAGTC R: ACAGTCCAGTTCTGTACCAGG
Bcl-2	F: TTTGAGTTCCGTTGGGGTCAT R: GCCCAGACTCACATCACCAAG
Bax	F: CGGGTTGTCGCCCTTTTCTA R: GTCCAATGTCCAGCCCATGA
PCNA	F: GCGTGAACCTCACCAGTATGT R: TCTTCGGCCCTTACTGTAATGA
Ki67	F: CCAAGCCACAGTCCAAGAGAAGTC R: TGCTGATGGTGTTCGTTTCTGAG

1.5.9 Western blot 检测相关蛋白的表达

收集生长良好的 DU-145 细胞,接种于 6 孔板中,每孔 2×10^5 个细胞。培养 24 h 后,分别加入 0.35、0.7、1.4 mmol/L 的 SRI 处理细胞 48 h。细胞裂解液冰上提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳,转至 0.22 μm PVDF 膜,5% BSA 室温封闭 1 h,一抗: GAPDH (1:2 000)、β-actin (1:2 000)、p38MAPK (1:2 000)、p-p38MAPK (1:2

000)、Anti-active + pro Caspase-3 Antibody (1 : 1 000)、Bcl-2 (1 : 1 000)、Bax (1 : 1 000)、PCNA (1 : 2 000)、4 ℃ 冰箱孵育过夜。次日,1 × TBST 洗膜 30 min,每次 10 min,用二抗(1 : 5 000)室温孵育 1 h,1 × TBST 洗膜 30 min,每次 10 min。ECL 发光液显色后,凝胶成像系统拍照,ImageJ 软件分析量化各条带灰度值。

1.5.10 统计学分析

使用 GraphPad Prism9.0 软件进行统计分析,所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组数据比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SRI 抑制 DU-145 细胞增殖

为了探究不同浓度 SRI 对 DU-145 细胞增殖能

力的影响,首先采用 MTT 实验来确定半数有效抑制浓度 IC₅₀。结果显示,与对照组相比,SRI 能明显抑制 DU-145 细胞的增殖能力,SRI 作用 24、48 h 的 IC₅₀ 分别为 2.47 ± 0.45、1.41 ± 0.17 mmol/L (见图 1)。根据 MTT 实验结果,后续实验分别用浓度为 0.35、0.7 和 1.4 mmol/L 的 SRI 处理 DU-145 细胞 48 h。克隆形成实验结果显示,SRI 处理 48 h 后,与对照组相比,SRI 组能明显抑制 DU-145 细胞集落形成(见图 2)。Ki67 免疫荧光实验结果显示,SRI 组 DU-145 细胞中 Ki67 蛋白的表达较对照组降低(见图 3)。qPCR 实验结果表明,与对照组相比,增殖相关基因 PCNA、Ki67 的 mRNA 表达水平下调(见图 4)。同时 Western blot 结果也证实 PCNA 蛋白表达水平下降(见图 5)。以上结果均表明 SRI 能抑制 DU-145 细胞的增殖。

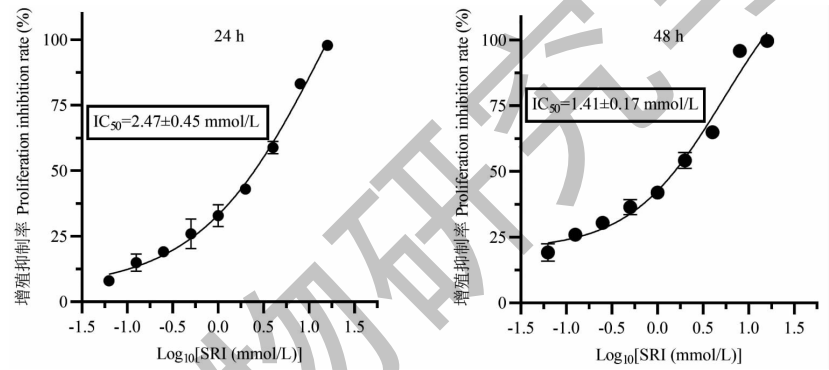


图 1 不同浓度槐定碱对 DU-145 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of SRI on DU-145 cell proliferation

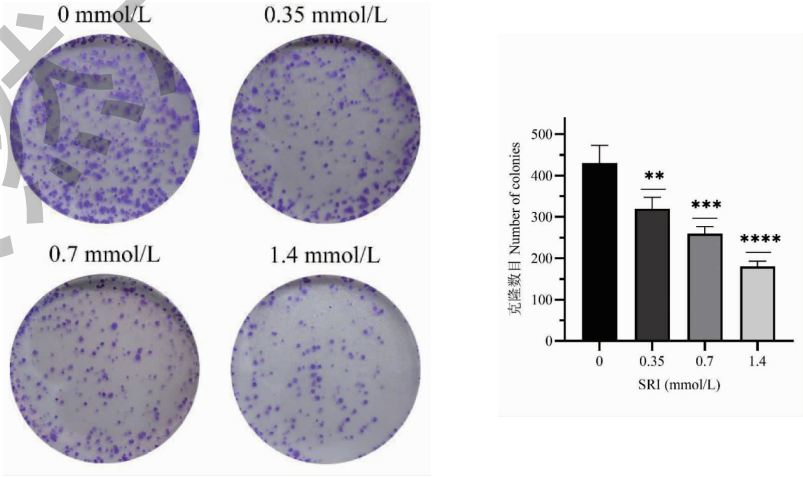


图 2 槐定碱对 DU-145 细胞克隆形成能力的影响

Fig. 2 Effect of SRI on the clone-forming ability of DU-145 cells

注:与对照组(SRI 0 mmol/L)比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001,*****P* < 0.0001;下同。Note:Compared with control group (SRI 0 mmol/L),**P* < 0.05,***P* < 0.01,****P* < 0.001,*****P* < 0.0001;the same below.

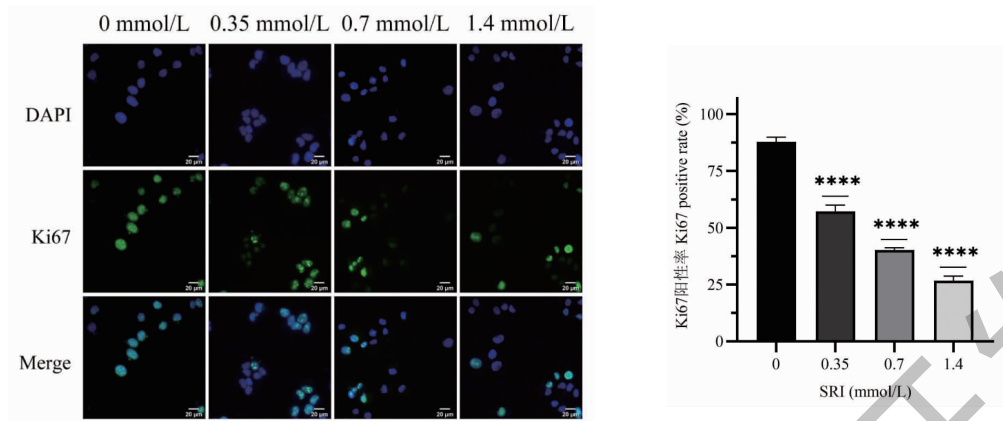


图3 槐定碱对 DU-145 细胞 Ki67 蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of SRI on Ki67 protein expression in DU-145 cells

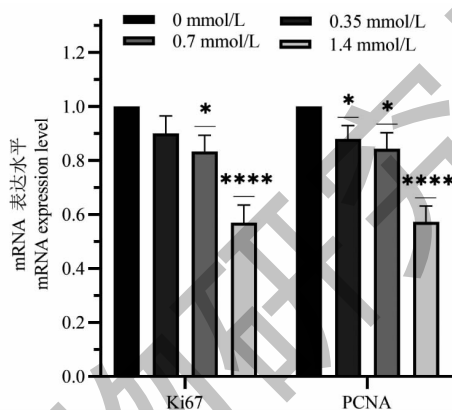


图4 槐定碱对 DU-145 细胞 Ki67、PCNA mRNA 表达的影响
Fig. 4 Effect of SRI on Ki67 and PCNA mRNA expression in DU-145 cells

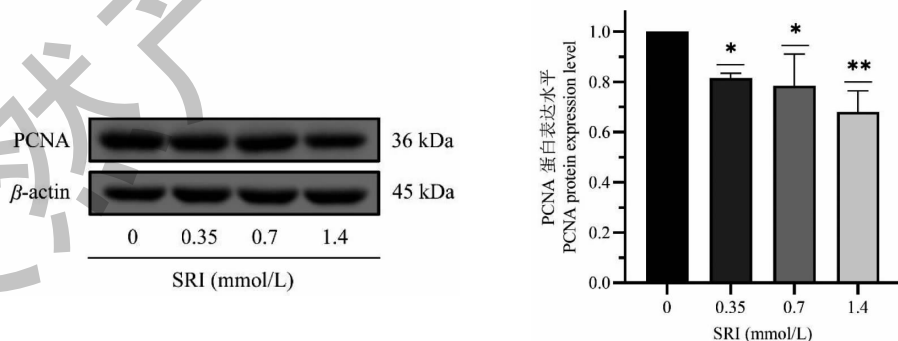


图5 槐定碱对 DU-145 细胞 PCNA 蛋白表达的影响
Fig. 5 Effect of SRI on PCNA protein expression in DU-145 cells

2.2 SRI 促进 DU-145 细胞的凋亡

为了研究 SRI 对 DU-145 细胞凋亡的影响,首先采用流式细胞凋亡实验来检测细胞的凋亡情况。SRI 处理 48 h 后,相比于对照组,随着 SRI 浓度增加,DU-145 细胞凋亡率逐渐增加,提示 SRI 能诱导

DU-145 细胞发生明显凋亡(见图 6)。qPCR 实验结果表明,与对照组相比,凋亡相关基因 Caspase-3、Caspase-7 mRNA 表达水平上调,Bcl-2 mRNA 表达水平下调,Bax mRNA 表达水平也有所降低,但 Bcl-2/Bax mRNA 表达水平比值是明显降低的(见图

7)。同时 Western blot 结果也表明 cleaved Caspase-3 + pro Caspase-3 的蛋白表达水平上调,Bcl-2 蛋白表达水平下调,Bax 蛋白表达水平有上调趋势,无显著性差异,Bcl-2/Bax 蛋白表达水平比值是明显降低的(见图 8),表明 SRI 能促进 DU-145 细胞的凋亡。

2.3 网络药理学分析

2.3.1 获取 SRI 与 PCa 的共同靶点

为了研究 SRI 是如何影响 DU-145 细胞的增殖与凋亡,本研究利用网络药理学来初步研究其作用机制。首先获取 SRI 的作用靶点,通过检索和收集,在 HERB 数据库收集到 4 个,TCMSP 数据库收集到 2 个,PharmMapper 数据库收集到 68 个,Swiss Target Prediction 数据库收集到 56 个,去重后得到 127 个 SRI 药理靶点。在 GeneCards 数据库中共收集到 2

092 个靶点,OMIM 数据库中共收集 447 个靶点,去重后得到 2 407 个 PCa 治疗靶点。将以上收集的 SRI 靶点通过 Venny2. 1. 0 韦恩图工具映射至 PCa 的靶点中,获得 60 个药物-疾病共同靶点(见图 9)。

2.3.2 PPI 网络分析

本研究利用 STRING 数据库进行 PPI 网络分析,绘制 PPI 分析网络图(见图 10)。PPI 网络分析得出,该网络共有 60 个节点,410 条边,平均节点 degree 值:13.7,PPI 富集 P 值 $< 1.0e^{-16}$ 。根据 degree 值排序,degree 值前 10 的靶点作为核心靶点,分别是 ALB、TNF、IL6、CASP3、MAPK1、PPARG、MDM2、PGR、MAPK8、NR3C1、ABL1、MAPK14、PARP1、HDAC2、CDK2、GSK3B(见图 10)。

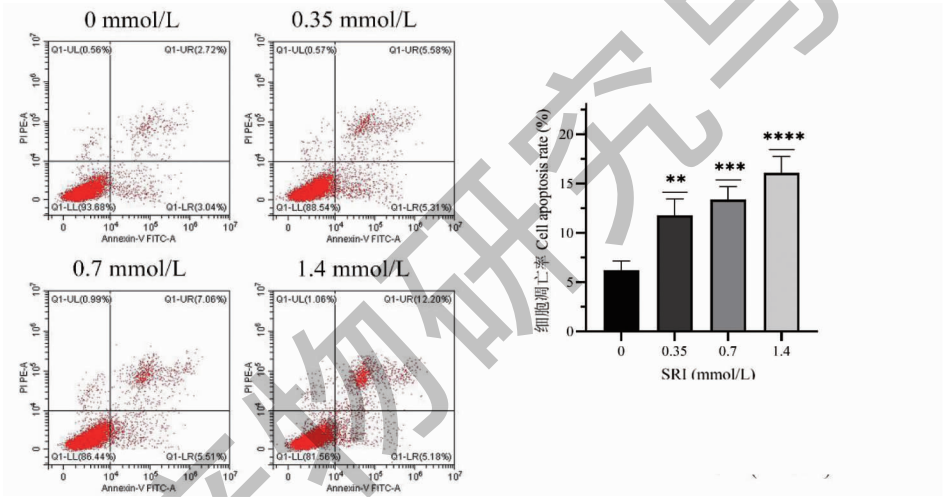


图 6 槐定碱对 DU-145 细胞凋亡的影响

Fig. 6 Effect of SRI on apoptosis of DU-145 cells

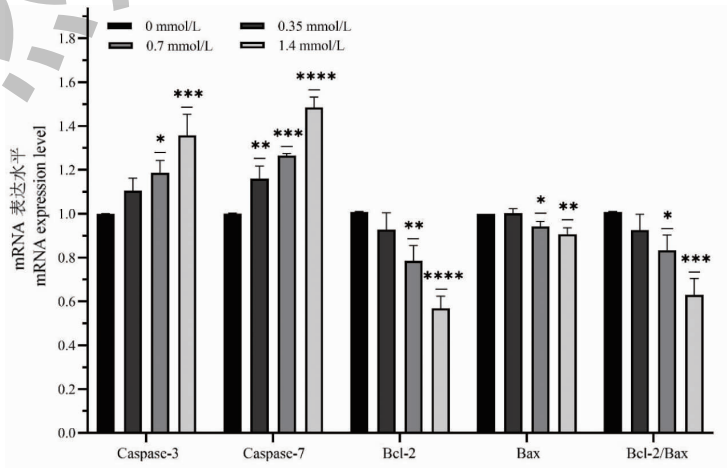


图 7 槐定碱对 DU-145 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达的影响

Fig. 7 Effect of SRI on the mRNA expression of apoptosis-related genes in DU-145 cells

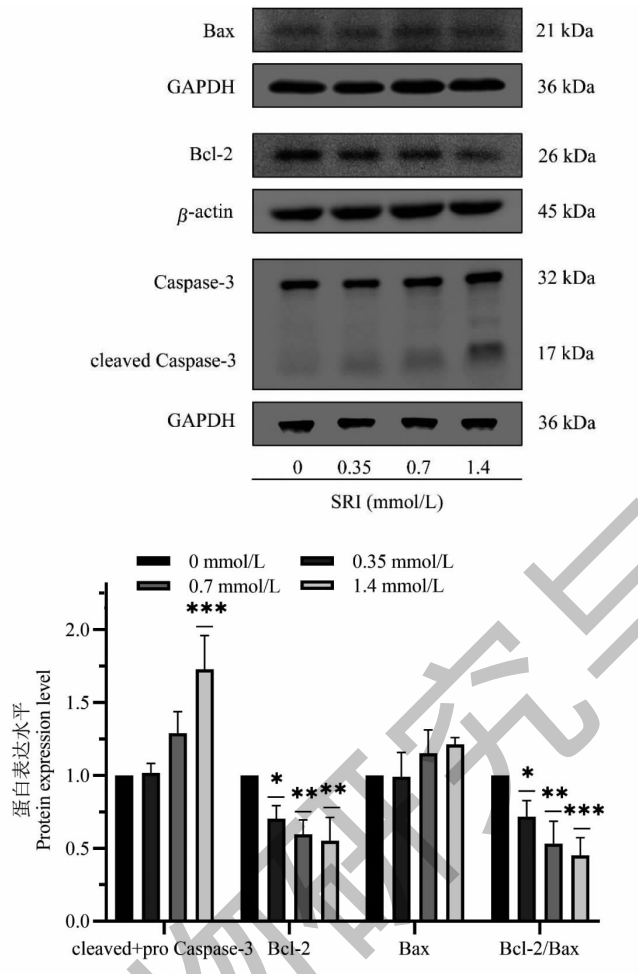


图 8 槐定碱对 DU-145 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Effect of SRI on the expression of apoptosis-related proteins in DU-145 cells

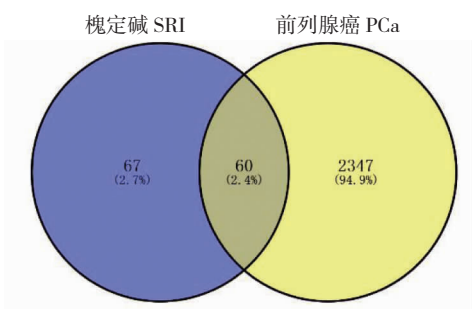


图 9 槐定碱与前列腺癌共同靶点韦恩图

Fig. 9 Venn diagram of SRI and PCa common targets

2.3.3 GO 与 KEGG 富集分析

本研究利用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析富集得到 158 个条目 ($P < 0.01$), 其中 BP 涉及基因表达的正向调节、RNA 聚合酶 II 启动子的转录、细胞凋亡过程、蛋白质磷酸

化等, CC 涉及细胞质、细胞核、核质等, MF 涉及蛋白质结合、ATP 结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性、蛋白激酶活性和锌离子结合等。图 11 展示了 GO 富集分析每一类别富集靶点数目前 10 的条目。KEGG 分析富集得到 84 个条目 ($P < 0.01$),

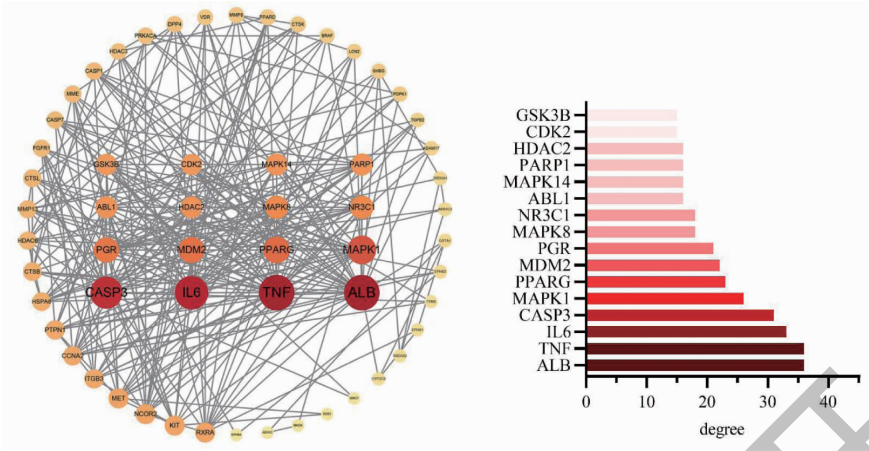


图 10 关键靶点蛋白 PPI 分析

Fig. 10 PPI analysis of key target protein

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

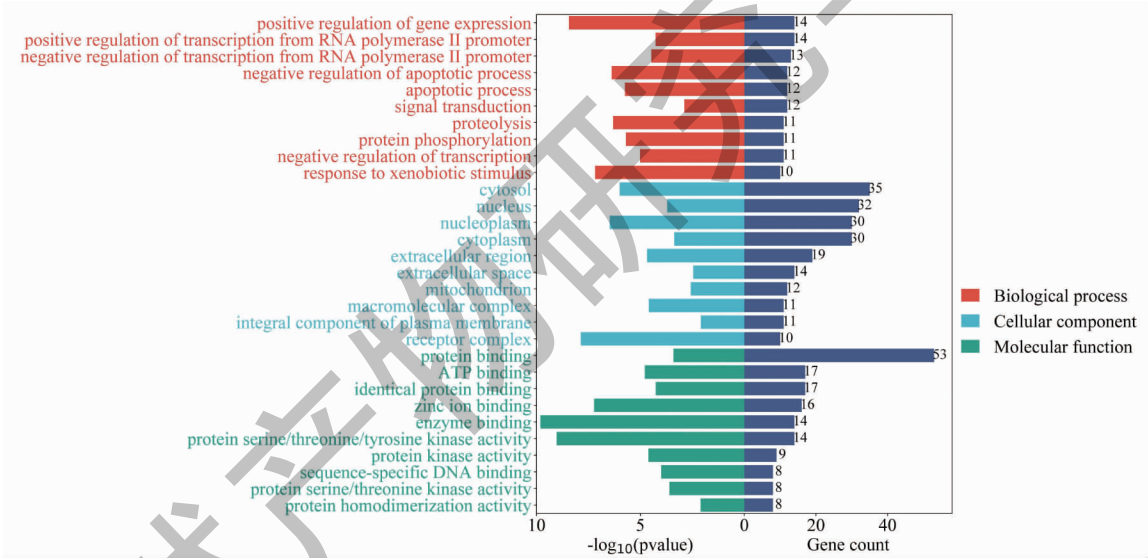


图 11 GO 富集分析条目条形图 (前 10)

Fig. 11 Bar chart of GO enrichment analysis items (top 10)

包括癌症通路、脂质和动脉粥样硬化、癌症中的蛋白聚糖、MAPK 信号通路等。根据富集靶点数目进行排序,选择前 10 个条目绘制 KEGG 气泡图 (见图 12)。SRI 可以通过 MAPK 信号通路影响 PCa 细胞的增殖、凋亡。

2.4 SRI 通过上调 p38MAPK 的表达影响 PCa DU-145 的增殖与凋亡

使用分子对接技术进行分析 SRI 与 p38MAPK 蛋白的相互作用,发现 SRI 可以与 p38MAPK 蛋白 (ID:2FSL) 的 ASP-88 残基形成氢键,且结合能是-

6.83 kcal/mol (<-5 kcal/mol), 说明 SRI 与 p38MAPK 蛋白能稳定结合 (见图 13)。本研究进一步检测 DU-145 细胞中 p38MAPK 的 mRNA 表达水平,p38MAPK、p-p38MAPK 的蛋白表达水平。结果显示随着 SRI 作用浓度的增加,p38MAPK 的 mRNA 表达水平发生上调 (见图 14),p-p38MAPK 蛋白表达水平发生上调,p38MAPK 蛋白表达水平无明显变化趋势,p-p38MAPK/p38MAPK 蛋白表达水平比值增高 (见图 15)。提示 SRI 通过激活 p38MAPK 来抑制 DU-145 细胞增殖并促进其凋亡。

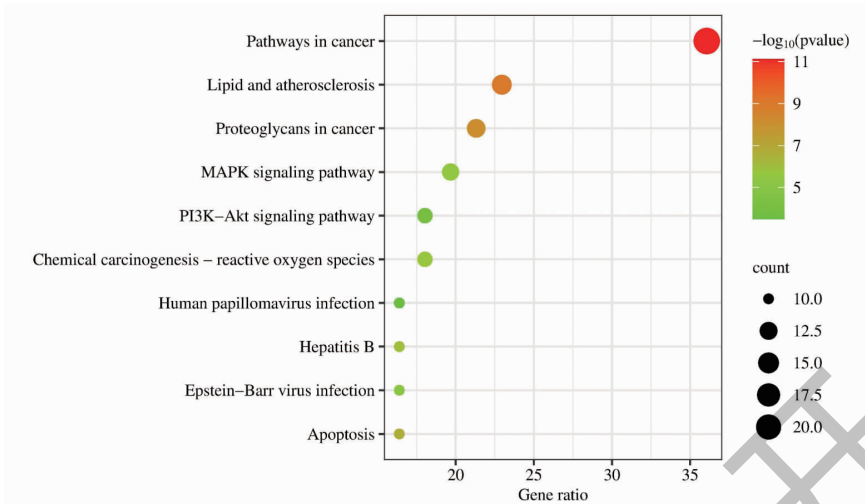


图 12 KEGG 通路富集分析气泡图(前 10)

Fig. 12 Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis (top 10)

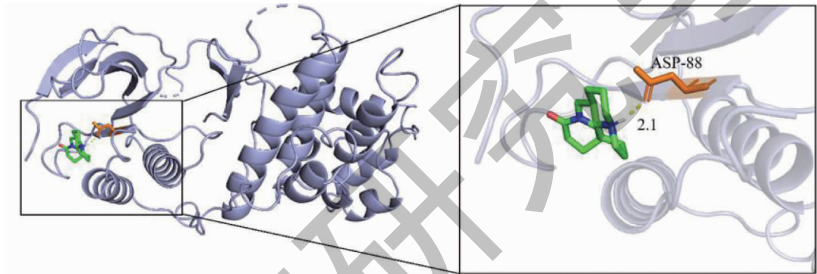


图 13 槐定碱与核心靶点 p38MAPK (ID:2FSL) 分子对接

Fig. 13 Molecular docking of SRI with the core target p38MAPK (ID:2FSL)

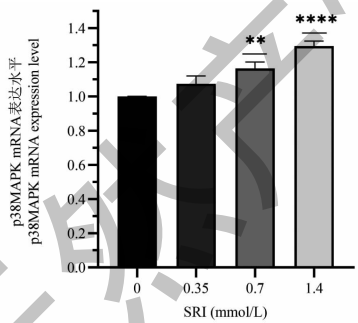


图 14 槐定碱对 DU-145 细胞 p38MAPK mRNA 表达的影响

Fig. 14 Effect of SRI on p38MAPK mRNA expression in DU-145 cells

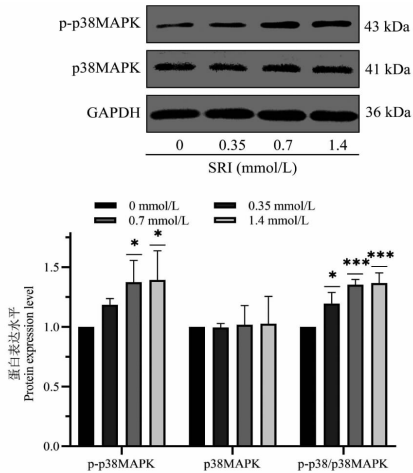


图 15 槐定碱对 DU-145 细胞 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达的影响

Fig. 15 Effect of SRI on the expression of p38MAPK and p-p38MAPK proteins in DU-145 cells

3 讨论与结论

PCa 是中老年男性中最常见的恶性肿瘤,容易产生耐药和转移,导致预后较差、复发率高^[9],因此,寻求治疗 PCa 新疗法变得非常迫切。中药的天然化学活性成分在恶性肿瘤的预防和治疗中发挥着重要作用^[10]。SRI 主要是从中药苦豆子中分离的

一种活性生物碱,具有多种药理活性,其中抗肿瘤活性尤为突出。2005 年,盐酸槐定碱注射液被中国食

品药品监督管理局批准为抗癌药物^[6]。SRI 在体内和体外对胃癌、肝癌、肺癌、结肠直肠癌、胰腺癌等多种肿瘤都表现出良好的抗肿瘤作用^[8]。SRI 可抑制多种肿瘤细胞的增殖和侵袭、促进癌细胞的凋亡和自噬。其作用与 PI3K/AKT、Wnt/B-catenin、MAPK/ERK 和细胞周期等通路有关^[11]。就目前研究而言, SRI 对 PCa 的作用及其确切机制仍不完全清楚。本研究通过体外细胞实验、网络药理学以及分子对接技术, 探讨 SRI 治疗 PCa 的分子机制, 为其临床应用提供一定的研究基础和理论依据。

高增殖率是恶性肿瘤细胞无限生长的一个重要特征, 因此抑制细胞增殖是治疗癌症的有效策略^[12]。在本研究中, 通过检测细胞活力、细胞克隆形成发现随着 SRI 作用浓度的增加, DU-145 细胞的生长受到明显抑制, 说明 SRI 具有抑制 DU-145 细胞增殖的能力。增殖细胞核蛋白 Ki67、PCNA 是一种细胞增殖的标记蛋白, 通常用作癌症诊断和治疗的预测和预后标记物^[13]。本研究通过免疫荧光以及 qPCR 检测 Ki67 在 DU-145 细胞中的表达, 发现 SRI 能明显抑制 Ki67 的表达, qPCR 以及 Western blot 检测发现 SRI 能明显降低 DU-145 细胞中 PCNA 的表达, 更进一步证明 SRI 对 DU-145 细胞具有抑制增殖的能力。

细胞凋亡是肿瘤细胞死亡的主要原因, 因此, 逃避细胞凋亡会导致肿瘤治疗产生抗性^[14]。Bcl-2 作为凋亡抑制因子在细胞凋亡的调控中起决定性作用^[15]。Bax 是 Bcl-2 的同源缀合配偶体, 是一种促凋亡蛋白, Bcl-2 与 Bax 的比值是衡量细胞凋亡效应的重要指标^[16]。Caspase-3 和 Caspase-7 是细胞凋亡的-executioner, 当细胞凋亡发生时, Caspase-3 和 Caspase-7 依次被上游 Caspase 蛋白裂解并激活。然后, 激活的 Caspase-3 和 Caspase-7 会切割多种下游底物, 最终引发凋亡级联反应^[17]。本研究通过流式细胞实验检测 SRI 处理 48 h 后 DU-145 细胞凋亡情况, 结果表明 SRI 能明显促进 DU-145 细胞的凋亡。因此, 我们进一步检测了凋亡相关因子的表达情况。qPCR 结果表明, SRI 能上调 Caspase-3、Caspase-7 的 mRNA 表达, 下调 Bcl-2 的 mRNA 表达, Bax 的 mRNA 表达水平也有所下调, 但 Bcl-2/Bax 的比值是显著降低的 ($P < 0.05$)。此外, Western blot 结果表明 SRI 能上调 cleaved-Caspase-3 蛋白表达, 下调 Bcl-2 的蛋白表达, 虽然 Bax 蛋白表达的上调没有显著性差异, 但 Bcl-2/Bax 的蛋白表达比值明显降低

($P < 0.05$)。这些结果提示 SRI 可以调控凋亡相关因子的表达, 激活凋亡信号通路, 诱导 DU-145 细胞发生凋亡。

此外, 为了研究 SRI 影响 DU-145 细胞增殖凋亡的作用机制, 本研究通过网络药理学研究手段进行分析。我们通过 HERB、TCMSP、PharmMapper、Swiss Target Prediction 数据库共收集到 127 个 SRI 作用靶点, 通过 Venny2.1.0 在线工具获得 60 个 SRI 作用于 PCa 的共同靶点, 通过 PPI 网络分析得到 ALB、TNF、IL6、CASP3、MAPK1、PPARG、MDM2、PGR、MAPK8、NR3C1、ABL1、MAPK14、PARP1、HDAC2、CDK2、GSK3B 等 16 个核心靶点 (degree 值前 10)。其中 MAPK8、CASP3、MAPK1、MAPK14、TNF 核心靶点富集到 MAPK 信号通路中。GO 富集分析得到 158 个条目 ($P < 0.01$), 结果显示 SRI 可能主要通过调节基因表达、细胞凋亡过程、蛋白质磷酸化以及蛋白丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸激酶活性等方面发挥治疗 PCa 的作用。KEGG 通路富集分析结果显示癌症信号通路、癌症中的蛋白聚糖、MAPK 信号通路、化学致癌-活性氧、PI3K-AKT 信号通路、凋亡等 84 个信号通路 ($P < 0.01$)。其中最令人关注的是 MAPK 信号通路在 SRI 抗 PCa 过程中发挥的作用。分裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 可将细胞外信息传递至细胞核中, 在生理及病理过程中发挥重要的作用。哺乳动物细胞中存在 3 类 MAPK 家族成员: 细胞外信号调节激酶 (ERK)、c-JunN-末端蛋白激酶/应激活化蛋白激酶 (JNK/SAPK) 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK, 也称 MAPK14)^[18]。

p38MAPK 是一种应激活化蛋白激酶, 参与细胞增殖、分化、凋亡等众多生物学进程, 其激活后能发挥抑制细胞增殖, 促进凋亡的作用^[19]。研究发现, p38 通路激活后可降低 BGC-823 胃癌细胞的增殖活力, 使细胞阻滞于 G2/M 期^[20]。激活 p38MAPK, 可抑制 SMMC-7721 细胞增殖, 并启动细胞内 Caspase 信号级联最终诱发凋亡^[21]。此外, 有研究表明中药提取物可以激活 p38MAPK, 触发 Caspase 介导的凋亡级联反应, 诱导 Lewis 肺癌细胞以及 HSC-3、SCC-9 口腔癌细胞发生凋亡^[22,23]。p38MAPK 激酶在 PCa 的发生和发展过程中也起到重要作用。研究发现, 在前列腺上皮的恶性转化或骨转移性前列腺癌中, 激活 p38MAPK 能抵抗细胞增殖, 促进凋亡以及肿瘤休眠^[24,25]。同时其他研究表明, 多西他赛、熊

果酸等成分能增加 p38MAPK 的磷酸化水平,诱导 PCa 细胞发生衰老,抑制 PC-3、22Rv1 等多种 PCa 细胞的增殖,并促进其凋亡^[26,27]。因此本研究重点关注了 p38MAPK 蛋白激酶在 SRI 抗 PCa 中发挥的作用。利用分子对接技术验证 SRI 与 p38MAPK 蛋白的结合情况,结果显示 SRI 与 p38MAPK 蛋白能稳定结合,结合能是-6.83 kcal/mol。p-p38MAPK、p38MAPK 蛋白表达水平检测结果表明 SRI 能激活 p38MAPK 蛋白,p38MAPK 蛋白磷酸化水平发生上调,提示 SRI 可以通过激活 p38MAPK 蛋白,诱导凋亡途径发挥抗 PCa 的作用。

综上,SRI 能抑制 DU-145 细胞的增殖,并促进其凋亡,这可能与其对 p38MAPK 的激活作用有关。然而本研究仅探讨 SRI 在体外对 DU-145 细胞的影响,下一步将进行体内动物实验,进一步深入研究 SRI 抗 PCa 的作用机理。

参考文献

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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: 209-249.
- Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023[J]. CA Cancer J Clin, 2023, 73: 17-48.
- Sandhu S, Moore CM, Chiong E, et al. Prostate cancer[J]. Lancet, 2021, 398: 1075-1090.
- Tan WB, Zhou S, Kang H, et al. Molecular mechanism of glabridin in the treatment of castration-resistant prostate cancer based on network pharmacology and experimental verification[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2023, 35: 310-318.
- Long Y, Qiu G, Liu X, et al. Research progress on structural modification and biological activity of sophoridine[J]. Chem Res Appl(化学研究与应用), 2022, 34: 947-951.
- Li XM, Wu YG, Pan DX, et al. Sophoridine is a new antitumor medicine with new molecular structure[J]. Chin New Drugs J(中国新药杂志), 2006, 8: 654-657.
- Zhang L, Fan WJ, Fan XH, et al. The initial application of Sophoridine combined with lipiodol in TACE for liver metastases caused by gastroenteric tumor[J]. Contemp Med; Chin J Interv Radiol(当代医学:中国介入放射学), 2008, 3: 247-248.
- Ur Rashid H, Rasool S, Ali Y, et al. Anti-cancer potential of sophoridine and its derivatives: recent progress and future perspectives[J]. Bioorg Chem, 2020, 99: 103863.
- Van Son M, Peters M, Moerland M, et al. Focal salvage treatment of radiorecurrent prostate cancer: a narrative review of current strategies and future perspectives[J]. Cancers, 2018, 10: 480-498.
- Zhang X, Qiu H, Li C, et al. The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer[J]. Biosci Trends, 2021, 15: 283-298.
- Chen Y, Wang X, Ye D, et al. Research progress of sophoridine's pharmacological activities and its molecular mechanism: an updated review[J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1126636.
- Gaglia G, Kabraji S, Rammos D, et al. Temporal and spatial topography of cell proliferation in cancer[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24: 316-326.
- Jayaraman S, Pazhani J, Priya Veeraraghavan V, et al. PCNA and Ki67: Prognostic proliferation markers for oral cancer[J]. Oral Oncol, 2022, 130: 105943.
- Singh P, Lim B. Targeting apoptosis in cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2022, 24: 273-284.
- Zhang L, Lu Z, Zhao X. Targeting Bcl-2 for cancer therapy[J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021, 1876: 188569.
- Peña-Blanco A, García-Súez AJ. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis[J]. FEBS J, 2018, 285: 416-431.
- Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip[J]. Cell, 2009, 138: 838-854.
- Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells[J]. Cell Res, 2002, 12: 9-18.
- Zeng Z, Zhang H, Wang X, et al. Salvianolic acid B suppresses cell proliferation and induces apoptosis in osteosarcoma through p38-mediated reactive oxygen species generation[J]. Oncol Lett, 2018, 15: 2679-2685.
- Jiang X, Zhu X, Xu H, et al. Diallyl trisulfide suppresses tumor growth through the attenuation of Nrf2/Akt and activation of p38/JNK and potentiates cisplatin efficacy in gastric cancer treatment[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38: 1048-1058.
- Wei XT, Peng WH, Jiang Q, et al. Chrysin promotes SMMC-7721 cell apoptosis by regulating MAPKs signaling pathway[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2018, 38: 1187-1194.
- Cao C, Su Y, Han D, et al. Ginkgo biloba exocarp extracts induces apoptosis in Lewis lung cancer cells involving MAPK signaling pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 379-388.