基于 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 与网络药理学探讨桑树桑黄抗非小细胞肺癌有效成分及作用机制

刘 坤[1,2],王 纯[1],付鑫垚[1],
孔泽娟[3],王海英[4],赵庆生[5],程 华[3*],王军朋[6]

[1]河北经贸大学生物科学与工程学院;[2]河北经贸大学数学与统计学院,石家庄 050061;
[3]河北省科学院生物研究所,石家庄 050081;[4]河北纤华生物科技有限责任公司,石家庄 050200;
[5]中国科学院过程工程研究所,北京 100190;[6]河南大学淮河医院转化医学中心和感染免疫研究所,开封 475000

摘 要:探究桑树桑黄(*Sanghuangporus sanghuan*)子实体乙醇提取物(SSBEE)的生物活性成分及抗非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer,NSCLC)的作用及潜在的作用机制。本研究首先采用 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术检测 SSBEE 的主要活性成分,其次利用 Swiss ADME 和 Swiss Target Prediction 数据库确定 SSBEE 的潜在活性成分及作用靶点,并借助 GeneCards 数据库筛选疾病基因及对核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析和关键网络图构建,并同时通过分子对接和分子动力学评价 SSBEE 核心成分与潜在作用靶点蛋白的结合作用,最后通过 CCK-8 和 Western blot 实验评价 SSBEE 抗 NSCLC 的活性及其可能的作用机制。结果显示,从 SSBEE 中共鉴定出 54 个化合物,其中 19 个活性化合物主要作用于 PIK3CA、CTNNB1 等 15 个核心靶点,KEGG 富集分析发现其可能通过 HIF-1 和 PI3K-Akt 等多条通路发挥抗 NSCLC 的作用;分子对接和分子动力学显示 ulocladol 和染料木黄酮等对核心靶点 PIK3CA 等蛋白的亲和作用较好;功能验证实验结果显示 SSBEE(160 μg/mL)对 A549 的抑制率为 81.26%,其可以抑制靶点 PIK3CA 和 CTNNB1 的表达,证明了网络药理学分析的可靠性。该研究明确了桑树桑黄子实体乙醇提取物的活性成分及潜在作用机制,为桑树桑黄防治 NSCLC 提供了科学理论依据。

关键词:网络药理学;桑树桑黄;分子对接;分子动力学;非小细胞肺癌;UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS
中图分类号:R285 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-6880(2024)Suppl-0083-11
DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.S.012

Study on effective components of *Sanghuangporus sanghuang* and its action mechanism against non-small cell lung cancer based on UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS and network pharmacology

LIU Kun[1,2],WANG Chun[1],FU Xin-yao[1],
KONG Ze-juan[3],WANG Hai-ying[4],ZHAO Qing-sheng[5],CHENG Hua[3*],WANG Jun-peng[6]

[1]*College of Bioscience and Bioengineering,Hebei University of Economics and Business*;[2]*Department of Mathematics and Statistics,Hebei University of Economics and Business,Shijiazhuang 050061,China*;[3]*Institute of Biology,Hebei Academy of Science,Shijiazhuang 050081,China*;[4]*Hebei Xianhua Biotechnology Co.,Ltd.,Shijiazhuang 050200,China*;
[5]*Institute of Process Engineering,Chinese Academy of Sciences,Beijing 100190,China*;
[6]*Institute of Infection and Immunity of Huaihe Hospital,Henan University,Kaifeng 475000,China*

Abstract:To explore the bioactive constituents of *Sanghuangporus sanghuang* body ethanolic extract (SSBEE) and its anti-non-small cell lung cancer (NSCLC) effect and underlying mechanism of action,this study first used UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS technology to detect the main active components of SSBEE. Secondly,Swiss ADME and Swiss Target Prediction da-

收稿日期:2024-02-22 接受日期:2024-05-27
基金项目:河北省重点研发计划(21327109D);河北省科学院基本科研业务费制度试点项目(2024PF04)
*通信作者 E-mail:13933137792@139.com

天然产物研究与开发

tabases were used to determine the potential active components and targets of SSBEE, and GeneCards database was used to screen disease genes and perform GO and KEGG enrichment analysis on core targets. A key network diagram was constructed. Meanwhile, molecular docking and molecular dynamics were used to evaluate the binding between the core components of SSBEE and potential targets. Finally, CCK-8 and Western blot assays were used to evaluate the anti-NSCLC activity and possible mechanism of action of SSBEE. A total of 54 compounds were identified from SSBEE, among which 19 active compounds mainly acted on 15 core targets such as PIK3CA and CTNNB1. KEGG enrichment analysis found that it may play an anti-NSCLC role through multiple pathways such as HIF-1 and PI3K-Akt. Molecular docking and molecular dynamics showed that ulocladol and genistein had good affinity for core targets such as PIK3CA protein. Functional verification experiments showed that SSBEE (160 μg/mL) had an inhibition rate of 81.26% on A549, which could inhibit the expression of target proteins PIK3CA and CTNNB1. This study clarified the main active components and potential mechanism of action of the ethanol extract of the fruiting body of *S. sanghuang*, providing a scientific theoretical basis for the prevention and treatment of NSCLC with *S. sanghuang*.

Key words: network pharmacology; *Sanghuangporus sanghuang*; molecular docking; molecular dynamics; non-small cell lung cancer; UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS

肺癌的发病率和死亡率位居恶性肿瘤的首位[1,2],而非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)约占肺癌病例总数的85%[3]。目前化疗仍是治疗NSCLC的主要手段之一,但其肝肾毒性、不良反应均较大[4]。因此,寻找低毒高效且产生不良反应低的化疗药物和新的药物作用靶点是近年来研究抗NACLC的热点。

桑树桑黄(*Sanghuangporus sanghuang*)是桑黄的一种,主要分布于中国暖温带和温带多个省区省市,以及韩国、日本和缅甸等[5]。桑树桑黄中含有多酚、黄酮和萜等多种活性物质[6,7],且具有抗癌及增加免疫力等药理作用[8,9]。且目前已有关于桑树桑黄乙醇提取物防治肺癌的研究报道,其可抑制非小细胞肺癌A549细胞的增殖、迁移及入侵,其可能是通过抑制Bcl-2/Bax比率以及Cyclin D1和CDK4的表达发挥抗肺癌作用[10],到目前为止,仍未见到关于基于网络药理学、分子对接及分子动力学探究桑树桑黄防治NSCLC机制分析的研究报道。

因此,为探究桑树桑黄抗NSCLC的有效成分和其潜在作用机制,本实验首先采用UHPLC-Q- Exactive-Orbitrap-MS系统对桑树桑黄子实体乙醇提取物(SSBEE)中的化学成分进行鉴定,并利用网络药理学预测活性成分和抗NSCLC机制,最后通过分子对接和分子动力学模拟及和体外实验进行验证,为桑树桑黄防治NSCLC提供参。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

桑树桑黄(*S. sanghuang*)采自东北阿尔山,经河北经贸大学张香美教授鉴定并存放于河北经贸大学(NoF121725)。A549(人非小细胞肺癌细胞)由中国医学科学院基础所细胞中心提供。

Thermo fisher U3000超高性能液相色谱仪(美国Thermo Scientific公司);Q Exactive PlusTM Orbitrap质谱系统,配有加热电喷雾电离源(美国Thermo Scientific公司)。

5-氟尿嘧啶(批号:C12122658,上海麦克林生化科技股份有限公司);p110α(批号:Cst4257,Cst公司)和β-catenin抗体(批号:R23616,正能公司);HRP标记羊抗兔IgG(批号:BE0101,Bioeasy公司);β-actin(批号:AB0035,Abways公司);CCK8试剂盒(批号:22210343,北京索莱宝科技有限公司);乙腈和甲酸(色谱纯,Thermo Fisher公司);超纯水自制;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 桑树桑黄乙醇提取物成分分析

1.2.1 样品制备

称取100 g桑树桑黄子实体,按课题组原来方法[9]制备桑树桑黄子实体乙醇提取物(*Sanghuangporus sanghuang* body ethanolic extract, SSBEE),共获得8.42 g SSBEE干品,4 ℃保存。将100 mg提取物用甲醇复溶,定容至10 mL,过滤(0.22 μm)获得本研究的SSBEE溶液。

1.2.2 色谱条件

色谱柱为Waters BEH C_{18}(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),柱温为35 ℃,流速为0.2 mL/min。进样量为10 μL。流动相为甲醇(含0.1%甲酸)(A)和水(含0.1%甲酸)(B)。采用梯度程序:0~2 min, 90% B;2~42 min, 90% B;42~50 min, 0% B。

1.2.3 质谱条件

采用Q Exactive Orbitrap质谱仪(Thermo, CA,

USA)检测。喷雾电压,正极为 3.5 kV,负极为 3.2 kV;毛细管温度:320 ℃;护套气体流速(arb),40;辅气流速(arb),15;质量范围(m/z),正极 70 ~ 1 050,负极 100 ~ 1 500;全 MS 分辨率为 70 000;MS/MS 分辨率为 17 500。

1.3　桑树桑黄作用靶点预测

1.3.1　主要活性化合物筛选

借助 Swiss ADME 数据平台(http://www.swissadme.ch/)对已鉴定的化学成分进行筛选(类药性 5 项中至少有 4 个"yes",胃肠道吸收为"high"),再通过 Swiss Target Prediction 数据平台(http://www.swisstargetprediction.ch/),对符合筛选条件的化合物进行靶点预测。

1.3.2　潜在靶点筛选

通过 GeneCards(https://www.genecards.org)数据库搜索与"non small cell lung cancer"相关的靶点(Relevance score > 40),并运用 Venny 平台(https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)绘制韦恩图,将桑树桑黄药物成分所调控的靶点与疾病的靶点输入 Venny 平台,获得交集靶点。

1.3.3　核心靶点及 PPI 网络分析

通过 String 数据库(hops://stringdb.org/)分析桑树桑黄抗 NSCLC 的交集靶点,获得靶点蛋白质互作(protein-protein interaction,PPI)关系。将构建的 PPI 网络分析结果导入 Cytoscape 3.8.0,根据度中心性(degree centrality,DC)、介数中心性(betweenness centrality,BC)和接近中心性(closeness centrality,CC)3 个因素筛选核心靶点。

1.3.4　靶点功能通路富集分析

借助于 DAVID 数据库(hops://david.ncifcrgov/)对核心靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,整理分析数据(设定阈值 $P < 0.01$),利用 R 软件绘制柱状图与气泡图,用 Cytoscape 3.8.0 对成分-靶点-通路网络进行可视化分析。

1.4　关键成分和核心靶点的分子对接验证

从 RSCB 数据库(http://www.rcsb.org/)中下载核心蛋白靶点的蛋白质晶体结构。利用 PyRx 软件(https://pyrx.sourceforge.io/)进行分子对接,用 Discovery Studio 软件进行可视化,并通过 R 软件制作热图。

1.5　分子动力学分析

根据分子对接结果,选取具有强烈结合活性且与 NSCLC 相关性评分较高的靶点进行进一步的分子动力学模拟,考察小分子与靶蛋白结合的稳定性。

1.6　桑树桑黄抗肿瘤活性分析

参照本课题组前期的研究[9](CCK-8 法),检测 SSBEE 对肿瘤细胞 A549 细胞增殖的抑制活性。简言之,A549 细胞与不同浓度的 SSBBE(0、2.5、5、10、20、40、60、80、160 μg/mL)共孵育 24 h 后,添加 CCK-8 再孵育 1 h,450 nm 检测吸光度值(A),阳性药物为 5-氟尿嘧啶。按公式(1)计算抑制率(R)。

$$R = [1-(A_1-A_0)/(A_2-A_0)] \times 100\%$$

式中,A_0 为空白吸光度值;A_1 为样品吸光度值;A_2 为对照吸光度值。

1.7　分子生物学验证

将对数生长期的 A549 细胞(每孔 5×10^5)接种于 6 孔板中,继续培养 24 h。细胞经不同浓度 SSBEE(0、20、40、80、160 μg/mL)共培养 48 h。提取不同组细胞中的总蛋白,10% SDS-PAGE 电泳后,转移到 PVDF 膜上,4 ℃过夜封闭,把 PVDF 膜放置到一抗溶液中,37 ℃摇动孵育 1 h;洗膜后,用二抗 37 ℃孵育 1 h。化学发光凝胶成像(Image Lab 5.0),分析各组 PIK3CA 和 CTNNB1 基因编码的 p110α 和 β-catenin 蛋白条带的灰度值。一抗为 p110α 和 β-catenin 抗体,二抗为 HRP 标记羊抗小鼠 IgG,β-actin 为内参。

1.8　数据处理分析

使用 GraphPad Prism 9 软件分析,实验结果以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),$P \leqslant 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　桑树桑黄子实体乙醇提取物化学成分分析

通过 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 获取相应色谱质谱数据,利用 Compound discover 3.1.0.305 软件进行原始 Raw 质谱数据特征峰提取。采用 mzCloud 在线数据库和本地自建 mzVault 中药天然产物数据库进行特征峰鉴定,选取质量偏差 $< 5 \times 10^{-6}$、符合同位素分布及 mzVault Best Match > 80 以上的物质进行分析,最终分析出了化合物 54 个(见表 1),包括酚酸、黄酮、脂肪酸、萜和生物碱等多种成分,总离子流图(total ion chromatogram,TIC)见图 1。

天然产物研究与开发

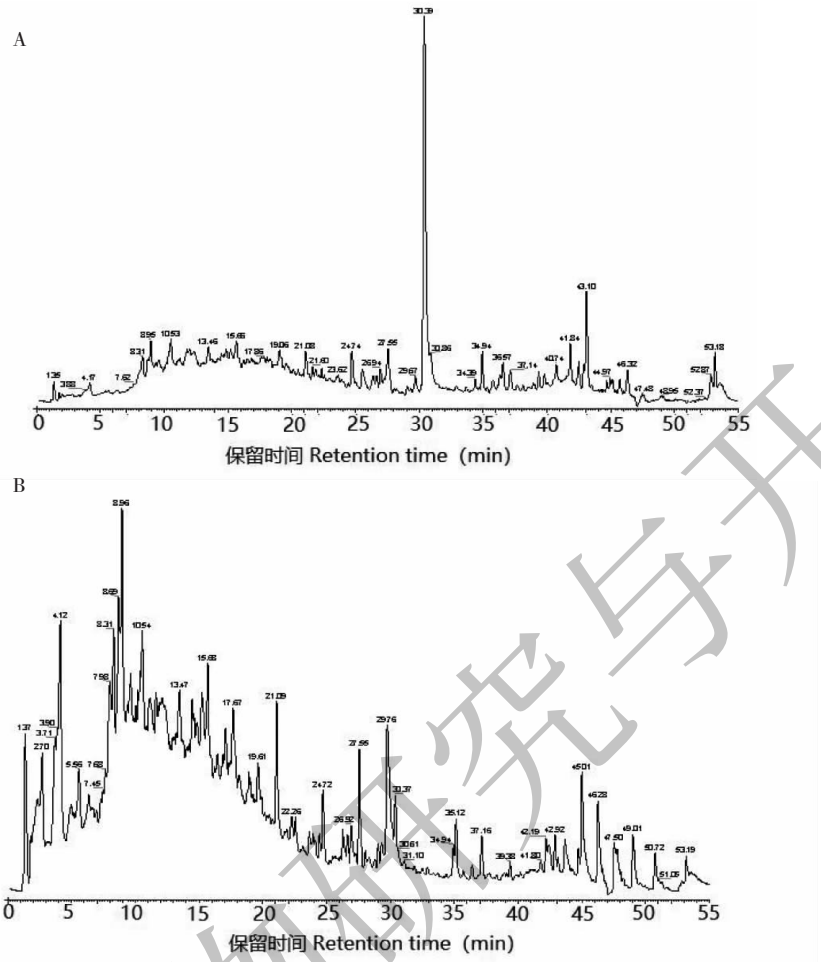

图 1 桑树桑黄乙醇提取物正离子模式(A)和负离子模式(B)TIC 图

Fig. 1 TIC diagram in positive ion mode (A) and in negative ion mode (B) of ethanol extract from *S. sanghuang*

表 1 SSBEE 中化学成分分析

Table 1 Identification analysis of components from SSBEE

编号 No	t_R (min)	化合物 Compound	离子模式 Ion mode	质荷比 m/z 实测值 Measured value	质荷比 m/z 理论值 Theoretical value	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	分子式 Formula
1	1.286	α,α-海藻糖 α,α-Trehalose	$[M-H]^-$	341.1082	341.1083	0.15	$C_{12}H_{22}O_{11}$
2	1.293	*D*-(-)-甘露醇 *D*-(-)-Mannitol	$[M-H]^-$	181.0711	181.0712	0.66	$C_6H_{14}O_6$
3	1.307	*D*-(+)-阿糖醇 *D*-(+)-Arabitol	$[M-H]^-$	151.0605	151.0605	0.02	$C_5H_{12}O_5$
4	1.388	原儿茶酸 Protocatechuic acid	$[M-H]^-$	153.0186	153.0187	0.32	$C_7H_6O_4$
5	1.752	腺苷 Adenosine	$[M+H]^+$	268.1053	268.1050	-1.05	$C_{10}H_{13}N_5O_4$
6	1.753	烟酸 Nicotinic acid	$[M+H]^+$	124.0400	124.0401	0.89	$C_6H_5NO_2$
7	1.753	丁二酸 Succinic acid	$[M-H]^-$	117.0186	117.0186	0.08	$C_4H_6O_4$
8	1.786	间苯二酚 Resorcinol	$[M-H]^-$	109.0288	109.0287	-0.55	$C_6H_6O_2$
9	1.831	没食子酸 Gallic acid	$[M-H]^-$	169.0135	169.0136	0.41	$C_7H_6O_5$
10	2.695	邻苯二酚 Catechol	$[M-H]^-$	109.0288	109.0287	-0.55	$C_6H_6O_2$
11	3.306	8-羟基喹啉 8-Hydroxyquinoline	$[M+H]^+$	146.0609	146.0608	-0.25	C_9H_7NO
12	4.176	3,4-二羟基苯甲醛 3,4-Dihydroxybenzaldehyde	$[M+H]^+$	139.0397	139.0397	0.22	$C_7H_6O_3$

天然产物研究与开发

续表 1(Continued Tab. 1)

编号 No	t_R (min)	化合物 Compound	离子模式 Ion mode	质荷比 m/z 实测值 Measured value	质荷比 m/z 理论值 Theoretical value	误差 Error ($\times 10^{-6}$)	分子式 Formula
13	5.046	庚二酸 Pimelic acid	$[M-H]^-$	159.0656	159.0656	0.32	$C_7H_{12}O_4$
14	5.195	间苯二酚一乙酸酯 Resorcinol monoacetate	$[M-H]^-$	151.0393	151.0394	0.26	$C_8H_8O_3$
15	5.402	异阿魏酸 Isoferulic acid	$[M-H]^-$	193.0500	193.0499	-0.15	$C_{10}H_{10}O_4$
16	5.567	咖啡酸 Caffeic acid	$[M-H]^-$	179.0343	179.0344	0.61	$C_9H_8O_4$
17	6.194	苯甲酸 Benzoic acid	$[M-H]^-$	121.0288	121.0288	-0.16	$C_7H_6O_2$
18	7.949	4-对羟基苯乙酸 4-Hydroxyphenylacetic acid	$[M-H]^-$	151.0393	151.0394	0.26	$C_8H_8O_3$
19	8.233	4-香豆酸 4-Coumaric acid	$[M-H]^-$	163.0393	163.0394	0.43	$C_9H_8O_3$
20	8.271	*N*,*N*′-二苯胍 *N*,*N*′ -Diphenylguanidine	$[M+H]^+$	212.1190	212.1190	0.14	$C_{13}H_{13}N_3$
21	8.309	(+)-赭曲菌素 (+)-Mellein	$[M-H]^-$	177.0550	177.0551	0.39	$C_{10}H_{10}O_3$
22	9.287	6-丙基-2H-吡喃-2-酮 6-Propyl-2H-pyran-2-one	$[M-H]^-$	137.0601	137.0601	0.14	$C_8H_{10}O_2$
23	9.344	4-羟基苯甲醛 4-Hydroxybenzaldehyde	$[M+H]^+$	123.0448	123.0448	0.25	$C_7H_6O_2$
24	10.386	Inotilone	$[M+H]^+$	219.0659	219.0660	0.18	$C_{12}H_{10}O_4$
25	11.198	肉桂酸甲酯 Methyl cinnamate	$[M+H]^+$	163.0762	163.0761	-0.18	$C_{10}H_{10}O_2$
26	11.641	壬二酸 Azelaic acid	$[M-H]^-$	187.0969	187.0970	0.48	$C_9H_{16}O_4$
27	11.939	*DL*-4-羟基苯乳酸 *DL*-4-Hydroxyphenyllactic acid	$[M-H]^-$	181.0499	181.0500	0.66	$C_9H_{10}O_4$
28	12.426	芥子酸 Sinapinic acid	$[M+H]^+$	225.0766	225.0765	-0.27	$C_{11}H_{12}O_5$
29	15.203	(+)-印蒿酮 (+)-Davanone	$[M+H]^+$	237.1856	237.1856	-0.08	$C_{15}H_{24}O_2$
30	15.600	柠檬酸酯 2 Citroflex 2	$[M+H]^+$	277.1289	277.1289	0.11	$C_{12}H_{20}O_7$
31	15.697	Calebertin	$[M-H]^-$	219.0656	219.0656	0.01	$C_{12}H_{12}O_4$
32	15.699	2-甲基苯甲酸 2-Methylbenzoic acid	$[M-H]^-$	135.0444	135.0445	0.29	$C_8H_8O_2$
33	16.197	Graveolide	$[M+H]^+$	249.1493	249.1493	-0.04	$C_{15}H_{20}O_3$
34	16.239	过氧化麦角固醇 Ergosterol peroxide	$[M+H]^+$	429.3371	429.3372	0.23	$C_{28}H_{44}O_3$
35	16.702	白皮杉醇 Piceatannol	$[M-H]^-$	243.0656	243.0655	-0.12	$C_{14}H_{12}O_4$
36	16.808	Lignarenone-B	$[M+H]^+$	213.1282	213.1282	-0.19	$C_{15}H_{16}O$
37	17.422	Ulocladol	$[M+H]^+$	319.0819	319.0820	0.22	$C_{16}H_{14}O_7$
38	17.612	(15*Z*)-9,12,13-三羟基-15-十八碳烯酸 (15*Z*)-9,12,13-Trihydroxy-15-octadecenoic acid	$[M-H]^-$	329.2326	329.2326	0.06	$C_{18}H_{34}O_5$
39	19.717	莪术醌 Curcuquinone	$[M+H]^+$	233.1543	233.1543	0.00	$C_{15}H_{20}O_2$
40	19.720	Mooloolabene *E*	$[M+H]^+$	399.2905	399.2903	-0.50	$C_{26}H_{38}O_3$
41	19.746	染料木黄酮 Genistein	$[M-H]^-$	269.0448	269.0448	-0.04	$C_{15}H_{10}O_5$
42	22.365	异维甲酸 Isotretinoin	$[M+H]^+$	301.2169	301.2169	-0.17	$C_{20}H_{28}O_2$
43	26.965	水蓼二醛 Polygodial	$[M+H]^+$	235.1698	235.1699	0.30	$C_{15}H_{22}O_2$
44	28.976	α-亚麻酸 α-Linolenic acid	$[M+H]^+$	279.2327	279.2327	-0.29	$C_{18}H_{30}O_2$
45	30.154	十八碳烯酸 Octadecenoic acid	$[M+H]^+$	277.2169	277.2169	-0.29	$C_{18}H_{28}O_2$
46	30.156	9-羰基-10(E),12(E)-十八碳二烯酸 9-Oxo-10(*E*),12(*E*)-octadecadienoic acid	$[M+H]^+$	295.2275	295.2274	-0.27	$C_{18}H_{30}O_3$
47	30.358	6-羟基-8-喹啉羧酸 6-Hydroxy-8-quinolinecarboxylic acid	$[M+H]^+$	190.0506	190.0504	-0.79	$C_{10}H_7NO_3$
48	33.680	Grandilobatin A	$[M+H]^+$	353.2694	353.2693	-0.06	$C_{21}H_{36}O_4$
49	34.380	1-亚油酰甘油 1-Linoleoyl glycerol	$[M+H]^+$	355.2850	355.2848	-0.73	$C_{21}H_{38}O_4$
50	35.127	16-羟基十六酸 16-Hydroxyhexadecanoic acid	$[M-H]^-$	271.2271	271.2271	-0.07	$C_{16}H_{32}O_3$
51	35.928	α-桐酸 α-Eleostearic acid	$[M+H]^+$	279.2326	279.2326	0.18	$C_{18}H_{30}O_2$
52	36.479	Austroinulin	$[M+H]^+$	323.2588	323.2585	-0.78	$C_{20}H_{34}O_3$
53	37.784	甘油油酸酯 Monoolein	$[M+H]^+$	357.3007	357.3006	-0.20	$C_{21}H_{40}O_4$
54	41.532	亚麻酸乙酯 Linolenic acid ethyl ester	$[M+H]^+$	307.2639	307.2638	-0.19	$C_{20}H_{34}O_2$

天然产物研究与开发

2.2 网络药理学预测结果

2.2.1 活性成分和疾病靶点筛选

通过 Swiss ADME 数据平台，对已鉴定的 54 个化学成分进行筛选，共筛出 19 个主要活性化合物（15、16、19、24、25、27、28、29、30、31、35、36、37、38、39、41、47、48、52）。采用 SwissTargetPrediction 数据平台对 19 活性化合物进行靶点预测，去除重复靶点后，得 534 个潜在靶点。通过 GeneCards 数据库，搜到 1 199 个非小细胞肺癌相关靶点（relevance score > 10）。将药物的有效成分靶点与疾病靶点相交，得到交集靶点 133 个。

2.2.2 核心靶点筛选及 PPI 网络分析

运用 String 数据库对交集靶点进行分析，构建了 133 个靶点的 PPI 网络，将数据导入软件 Cytoscape 3.8.0，利用 Analyze network 进行分析，包含 130 个节点和 830 条边。根据 3 个拓扑参数对 PPI 网络中所有节点进行分析，选取 BC 大于 0.018、CC 大于 0.490、和 DC 大于 25 的 15 个靶点作为核心靶点（见表 2）。

表 2 15 个核心靶点信息

Table 2 Information on 15 core targets

蛋白 Protein	基因 Gene	Uniprot ID Uniprot ID	DC	BC	CC
Heat shock protein HSP 90-alpha	*HSP90AA1*	P07900	53	0.156 003 37	0.600 000 00
Signal transducer and activator of transcription 3	*STAT3*	P40763	53	0.084 369 756	0.591 743 119
Axin1/beta-catenin	*CTNNB1*	P35222	48	0.082 238 069	0.586 363 636
Epidermal growth factor receptor erbB1	*EGFR*	P00533	47	0.072 701 046	0.581 081 081
Interleukin-6	*IL6*	P05231	44	0.098 009 214	0.556 034 483
Tyrosine-protein kinase SRC	*SRC*	P12931	43	0.057 476 919	0.563 318 777
Apoptosis regulator Bcl-2	*BCL2*	P10415	37	0.044 389 798	0.551 282 051
PI3-kinase p110-alpha subunit	*PIK3CA*	P42336	35	0.028 104 747	0.528 688 525
Estrogen receptor alpha	*ESR1*	P03372	34	0.105 080 468	0.563 318 777
Receptor protein-tyrosine kinase erbB-2	*ERBB2*	P04626	32	0.057 826 087	0.537 500 000
Caspase-3	*CASP3*	P42574	29	0.018 545 231	0.503 906 25
MAP kinase ERK2	*MAPK1*	P28482	29	0.020 466 435	0.511 904 762
Histone acetyltransferase p300	*EP300*	Q09472	28	0.024 567 138	0.501 945 525
Matrix metalloproteinase 9	*MMP9*	P14780	26	0.036 234 765	0.498 069 498
Toll-like receptor 4 (by homology)	*TLR4*	O00206	26	0.023 275 107	0.490 494 297

2.2.3 GO 分析及 KEGG 通路富集分析

通过 David 数据库进行富集分析得到 100 个 GO 条目（$P < 0.01$），其中包含 19 个分子功能（MF）条目、16 个细胞组成（CC）条目和 65 个生物过程（BP）条目。排名前 15 的 BP 条目见图 2A。KEGG 通路富集分析筛选到 85 条信号通路（$P < 0.01$），前 20 条通路见图 2B。

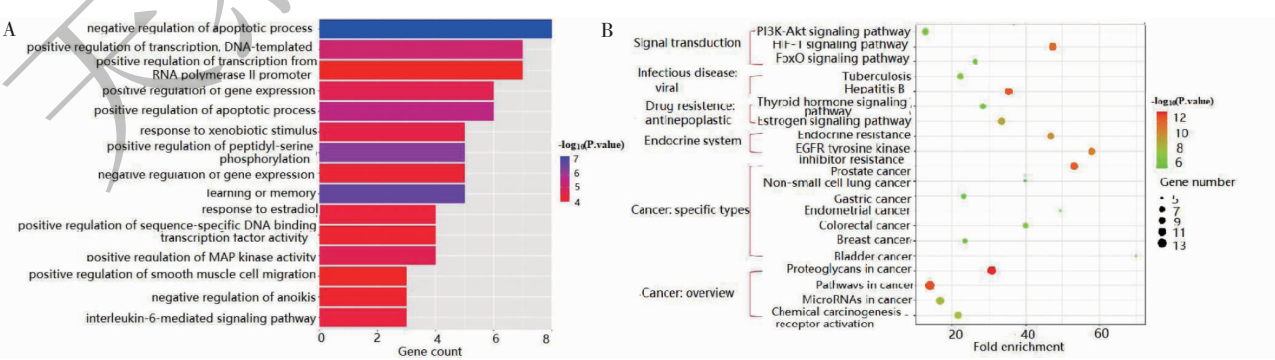

图 2 GO 富集分析（A）和 KEGG 通路分析（B）

Fig. 2 Analysis of GO enrichment (A) and KEGG pathway (B)

天然产物研究与开发

2.2.4　“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络

分析“桑树桑黄活性化合物-关键靶点-通路”网络分析结果如图 3 所示。19 个活性化合物成分通过 15 个靶点,在 20 条信号通路中发挥作用,说明桑树桑黄可通过多成分、多靶点、多通路抑制非小细胞肺癌的发生和发展。

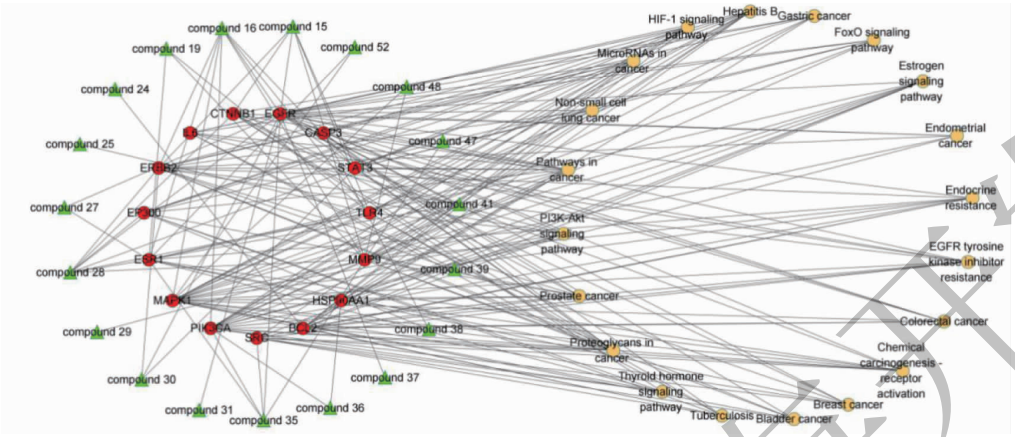

图 3　核心化合物-核心靶点-途径-图

Fig. 3　Core compound-core-target-pathway diagram

2.2.5　分子对接

将 19 个活性化合物与 15 个靶点蛋白进行分子对接,如图 4 和 5 所示。其关系值 Affinity(kcal/mol)值即代表两者的结合能力,结合能值越低,说明受体和配体结合越稳定。其中,ulocladol(**37**)和染料木黄酮(**41**)与多个核心靶点结合较好(见图 4)。化合物 **37** 和 **41** 分别与 PICK3A 的分子对接可视化图见图 5。

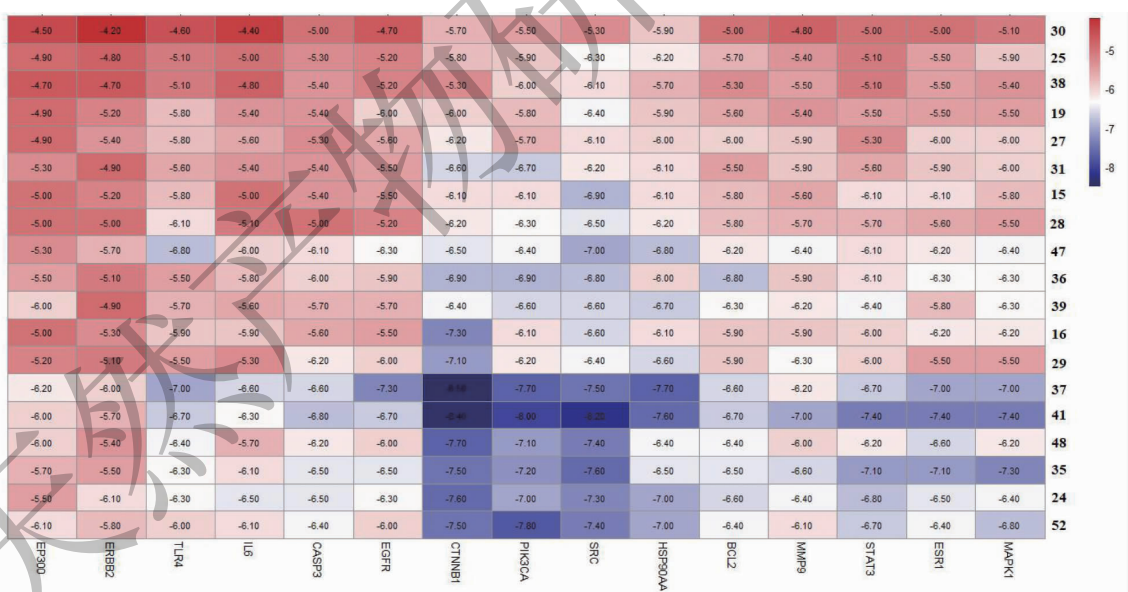

图 4　活性成分与核心靶点蛋白对接的热图

Fig. 4　Heat map of the docking between active ingredients and core target proteins

2.2.6　分子动力学模拟

根据分子对接结果,选取具有强烈结合活性且与非小细胞癌相关性评分较高的靶点 PIK3CA,对 Ulocladol 和染料木黄酮与 PIK3CA 进行 50 ns 的分子动力学模拟。均方根偏差(root mean square deviation,RMSD)、均方根波动(root mean square fluctuation,RMSF)和回旋半径(radius of gyration,Rg)等分子动力学模拟验证结果见图 6。RMSD 是一种描述蛋白质结构在模拟过程中稳定性的指标,从图 6A 和图6D可以看出,Ulocladol与PIK3CA的蛋白-配

天然产物研究与开发

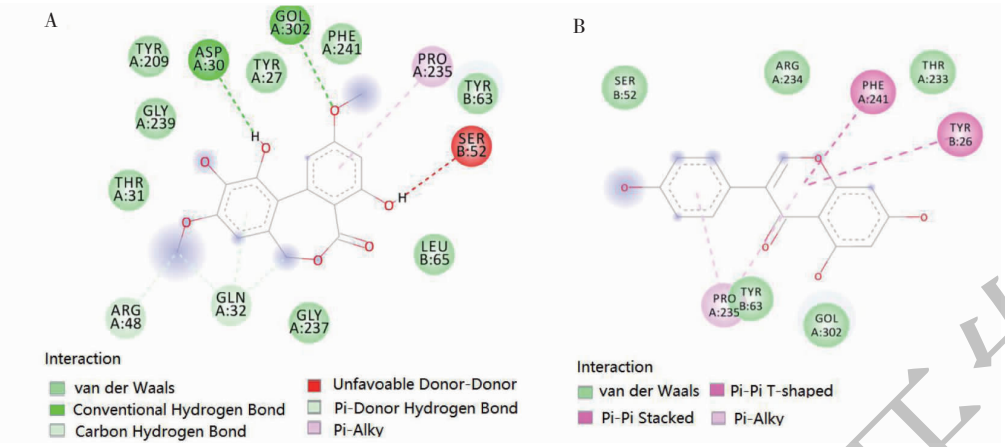

图 5 核心靶点与活性化合物分子对接的可视化

Fig. 5 Visualization of docking between core targets and active compound molecules

注:A:Ulocladol-PIK3CA;B:染料木黄酮-PIK3CA。Note:A:Ulocladol-PIK3CA;B:Genistein-PIK3CA.

体复合物在 33 nm 达到了平衡,稳定在 1.1 nm 左右,染料木黄酮与 PIK3CA 的蛋白-配体复合物在 6 nm 处达到平衡后波动较为平缓,稳定在 0.8 nm 左右。模拟过程中蛋白质各残基的 RMSF 值可以评估其在模拟过程中的波动情况。图 6B 和图 6E 结果显示,化合物**37**和PIK3CA体系RMSF值在0.1~0.88 左右,化合物 **41** 和 PIK3CA 体系 RMSF 值在 0.1~0.7 左右,两个体系在相近残基数量处(240、1 400、3 900 左右)具有相似较大波动,推测是化合物 **37** 和化合物 **41** 具有相似的苯环结构。其中残基 ASP 30 的 RMSF 值是 0.12 nm,将 MD 过程中化合物 **41** 和 PIK3CA 在结合自由能最低时候的结合方式可视化,表示氢键发挥限制 ASP 30 的效果(见图 7),且氢键距离为 0.22 nm。Rg 值的变化趋势可以更好地了解蛋白质-配体复合物的稳定性,由图 6C 和图 6F 可看出,在 5 ns 后,化合物 **41** 和 PIK3CA 体系 Rg 值达到 2.3 nm 并保持稳定,化合物 **37** 和 PIK3CA 体系在 32 ns 后,Rg 值达到 2.25 nm 并保持稳定,说明化合物 **37** 和 **41** 和 PIK3CA 的结合在模拟过程中结构紧凑。

2.3 SSBEE 抗 A549 细胞的活性

为了探讨 SSBEE 是否能够抑制非小细胞肺癌的生长,本研究将不同浓度的 SSBEE 与 A549 细胞共孵育 24 h 后,CCK-8 实验检测 SSBEE 是否具有抑制 A549 细胞增值的活性。如表 2 所示,SSBEEE 对肿瘤细胞 A549 具有一定抑制作用,且与浓度成正相关。SSBEE 对 A549 细胞的半数抑制浓度为 53.23±0.64 μg/mL(见表 3)。SSBEE 在浓度为 160 μg/mL 时抑制率为(81.26% ±0.81%),但低于 5-氟尿嘧啶(83.53% ±0.53%),两者间差异显著($P<0.05$)。

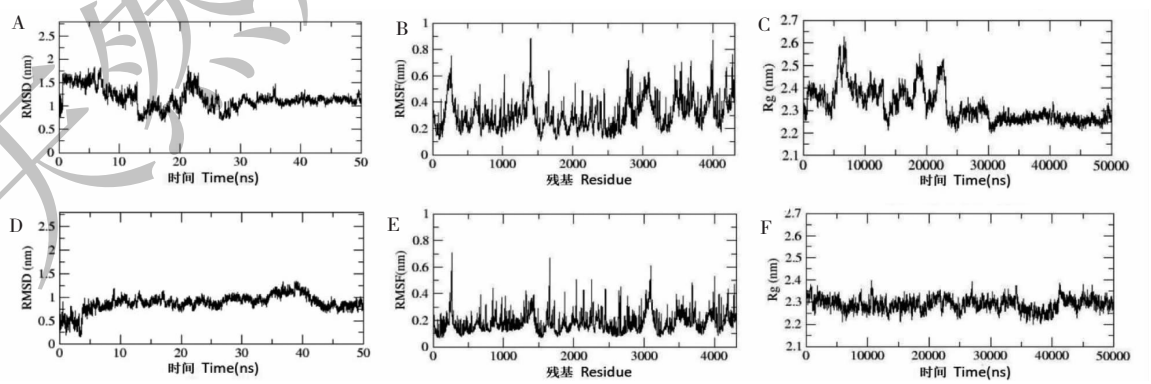

图 6 分子动力学模拟的 RMSD、RMSF 和 Rg 曲线

Fig. 6 RMSD, RMSF and Rg curve of molecular dynamics simulation

注:A:RMSD-Ulocladol-PIK3CA;B:RMSF-Ulocladol-PIK3CA;C:Rg-Ulocladol-PIK3CA;D:RMSD-染料木黄酮-PIK3CA;E:RMSF-染料木黄酮-PIK3CA;F:Rg-染料木黄酮-PIK3CA。Note:A:RMSD-Ulocladol-PIK3CA;B:RMSF-Ulocladol-PIK3CA;C:Rg-Ulocladol-PIK3CA;D:RMSD-Genistein-PIK3CA;E:RMSF-Genistein -PIK3CA;F:Rg-Genistein-PIK3CA.

天然产物研究与开发

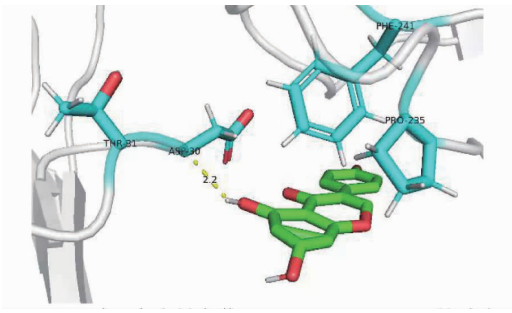

图 7　MD 过程中染料木黄酮(41)和 PIK3CA 的结合

Fig. 7　The combination of genistein (**41**) and PIK3CA during the MD process

表 3　SSBEE 对 A549 细胞的半数抑制浓度($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3　IC_{50} of SSBEE on A549 cell($\bar{x} \pm s, n = 3$)

样品 Sample	IC_{50}(μg/mL)
SSBEE	53.23 ± 0.64
Fluorouracil 5-氟尿嘧啶	44.14 ± 0.52

2.4　SSBEE 抑制 A549 细胞的机制研究

A549 细胞与不同浓度 SSBEE 共培养后,PIK3CA 基因编码的磷脂酰肌醇-3-激酶 p110α 催化亚基和 CTNNB1 编码的 β-catenin 蛋白的表达都显著下降(见图 8),呈浓度正相关关系且差异显著($P < 0.05$)。这些实验结果验证了网络药理学和分子对接技术在 SSBEE 防治非小细胞肺癌细胞 A549 相关靶点预测的正确性。

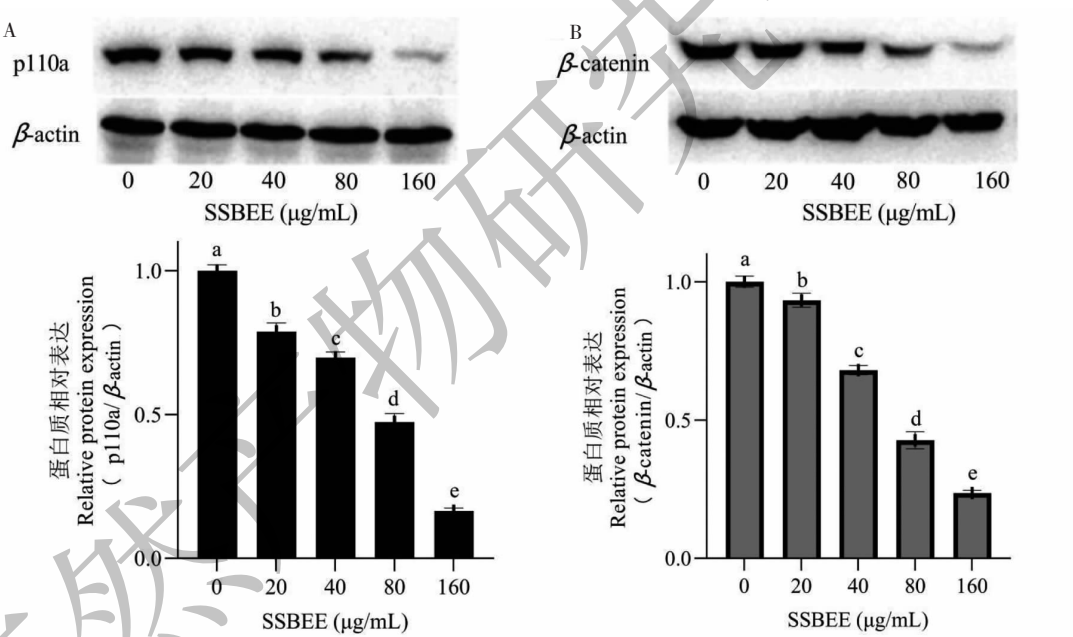

图 8　SSBEE 抑制 PI3KA 和 CTTNB1 的表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8　SBEE inhibits the expression of PI3KA and CTTNB1($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:不同字母代表差异显著($P < 0.05$)。Note:Different letters mean significant difference($P < 0.05$).

3　讨论与结论

本研究通过 UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap-MS 技术共鉴定出 SSBEE 中包含 54 个化合物,其中 19 个化合物的 GI 和 DL 较好,主要为多酚黄酮类(5 个酚酸、4 个多酚和 1 个黄酮)。通过网络药理学、分子对接和分子动力学预测了 SSBEE 防治 NSCLC 的可能作用靶点。体外细胞实验证明,SSBEE 抑制 A549 生长的 IC_{50} 值为 53.23 ± 0.64 μg/mL,且 SSBEE 可以通过抑制这些靶点如 PI3KA 和 CTTNB1 的表达而抑制非小细胞肺癌细胞 A549 的存活。

通过网络药理学预测,19 个化合物可以通过

天然产物研究与开发

133 个潜在靶点与 NSCLC 相关,且多个物质被报道具有抗 NSCLC 作用。如染料木黄酮(**41**)可通过 IMPDH2/AKT1 途径促进 A549 细胞的凋亡[11];此外其也可以通过 miR-27a 和 MET 信号抑制 A549 细胞的增殖[12]。Inotilone(**24**)可通过 ROS 介导的 PI3K/AKT/MAPK 信号通路抑制体内外的肺癌转移[13]。白皮杉醇(**35**)可增强吉西他滨在 A549 细胞中的抗肿瘤效能[14]。因此,桑树桑黄的这些成分可能在抗 NSCLC 中发挥重要作用。

通过 PPI 网络分析,CTNNB1、EGFR、SRC、BCL2 和 PIK3CA 等靶点可能是防治 NSCLC 中的重要靶点。CTNNB1(钙黏蛋白相关蛋白)在细胞黏附和 Wnt 信号传导通路中具有重要作用。Song 等[15]研究显示,*CTNNB1* 是 NSCLC 中微小核糖核酸调控机制中的潜在靶基因。*PIK3CA* 是编码磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)P110α 催化亚单位的基因,其表达异常上调会使细胞过度增殖,并增加细胞侵袭和转移能力。Song 等[16]研究显示 *PIK3CA* 基因沉默 48h 后,A549 细胞侵袭和转移能力均显著降低,其在 NSCLC 中发挥着重要作用[17]。酪氨酸激酶 SRC 在许多癌症的进展中起着至关重要的作用,并参与了几个表皮生长因子受体(EGFR)介导的信号通路。Chang 等[18]发现 peruvoside 可通过降低多种与 SRC 相关的途径来抑制 NSCLC 的恶性程度。这些靶点主要与凋亡过程正负向调控、RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调控、对外来刺激的反应、MAP 激酶活性的正向调节、白细胞介素-6 介导的信号通路等多种生物过程有关。KEGG 富集分析前 20 条通路中,癌症相关通路占了 11 条,且 HIF-1、PI3K-Aktt 和 FoxO 等多条信号通路与 NSCLC 的发生、增殖和迁移等密切相关[19-21]。Hou 等报道 Salvianolic acid F 可通过 PI3K/AKT 信号通路抑制依赖 KRAS 的 A549 细胞生长[22]。黄芪总皂苷通过抑制 HIF-1α/VEGF 信号通路,可降低 A549 细胞的增殖、迁移能力,并诱导其凋亡[23]。顺铂诱导亲本 A549 细胞凋亡可能与抑制 PI3K/Akt/FOXO3a 信号通路,上调转录因子 FOXO3a 表达有关[24]。因此可以推测,桑树桑黄可能可以通过 HIF-1、PI3K-Aktt 和 FoxO 等多条信号通路防治 NSCLC。

分子对接结果显示,Ulocladol 和染料木黄酮与 CTNNB1、EGFR、SRC、BCL2 和 PIK3CA 等核心靶点结合得分均小于-6.5,提示化合物 Ulocladol 和染料木黄酮与以上核心靶点结合较好。uloclaol 通过氢键与 PIK3CA 靶蛋白 A 链 GlN32、ARG48、ASP30 和 GOL302 结合;染料木黄酮与 A 链 PHE241 和 B 链 TYR26 有 Pi-Pi Tshaped 相互作用。已有染料木黄酮与 PIK3CA 相互作用的文献报道[25],但 Ulocladol 与 PIK3CA 靶蛋白的相互作用还未见报道。同时通过 KEGG 富集分析得到的与 NSCLC 相关的 HIF-1 和 PI3K-Aktt 等信号通路多条通路涉及到以上基因。

通过 Ulocladol 和染料木黄酮与 PIK3CA 的分子动力学模拟(RMSD、RMSF 和 Rg)分析,说明 Ulocladol 和染料木黄酮与 PIK3CA 具有很强的结合稳定性。体外实验进一步验证了 SSBEE 可以抑制 A549 细胞中 *PIK3CA* 和 *CTNNB1* 基因蛋白的表达,提示 SSBEE 可能可以通过下调 *PIK3CA* 和 *CTNNB1* 等相关基因的表达发挥抗 NSCLC 的作用,同时也验证了本研究中网络药理筛选、分子对接结果、分子动力学与预测分子机制的准确性。

综上所述,本实验从 SSBEE 中检测到 54 个化合物,应用网络药理学方法,对桑树桑黄的多成分、多靶点与 NSCLC 之间复杂网络关系进行研究,初步探讨了桑树桑黄防治 NSCLC 的主要活性成分及其作用靶点和相关通路,同时结合分子对接技术、分子动力学和细胞实验验证了本研究中网络药理学分析结果的可靠性,为桑树桑黄防治 NSCLC 的潜在作用和机制研究奠定基础。

参考文献

1 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. Ca Cancer J Clin, 2018, 68: 394-424.

2 Tang H, Guo H, Cao F, et al. Characteristics of cancer epidemiology among 0-14 years old Chinese children, 2005-2015[J]. Chin General Pract(中国全科医学), 2022, 25: 984-989.

3 Chen ZH. Correlation analysis between pathological classification syndrome type of non-small cell lung TNM stage and TCM cancer[J]. Chin J Ethnomed Ethnopham(中国民族民间医药), 2022, 31: 88-91.

4 Liu K. Chemotherapy is used to improve the immune function and lung function of patients with lung cancer[J]. J Aerospace Med(航空航天医学杂志), 2023, 34: 34-37.

5 WU HS, Dai YC. Species clarification of the medicinal fungus Sanghuang[J]. Mycosystema(菌物学报), 2020, 39: 781-794.

6 Fu L Z, Lu N, Yan J, et al. Analyses and evaluation of nutrition, active component and antioxidant activities of fruiting

天然产物研究与开发

bodies of three species of *Sanghuangporus*[J]. Mycosystema (菌物学报),2021,40:2148-2158.

7 Fan Q,Wu MS,Zhang B H,et al. Main active components of *Phellinus linteus* and its domestic and international research progress[J]. China Fruit Veg(中国果菜),2022,42:50-55.

8 Wen Y,Wan YZ,Qiao CX,et al. Immunoregenerative effects of the bionically cultured Sanghuang mushrooms (*Inonotus sanghuagn*) on the immunodeficient mice[J]. J Ethnopharmacol,2019,245:112047.

9 Liu K,Xiao X,Wang J,et al. Polyphenolic composition and antioxidant, antiproliferative, and antimicrobial activities of mushroom Inonotus sanghuang[J]. LWT-Food Sci Technol, 2017,82:154-161.

10 Wang W,Song J,Lu N,et al. Sanghuangporus sanghuang extract inhibits the proliferation and invasion of lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Nutr Res Pract,2023,17:1070-1083.

11 Xu H,Ma H,Zha L,et al. Genistein promotes apoptosis of lung cancer cells through the IMPDH2/AKT1 pathway[J]. Am J Transl Res,2022,14:7040-7051.

12 Yang Y,Zang A,Jia Y,et al. Genistein inhibits A549 human lung cancer cell proliferation via miR-27a and MET signaling [J]. Oncol Lett,2016,12:2189-2193.

13 Chao W,Deng JS,Li PY,et al. Inotilone from Inonotus linteus suppresses lung cancer metastasis *in vitro* and *in vivo* through ROS-mediated PI3K/AKT/MAPK signaling pathways[J]. Sci Rep,2019,9:2344.

14 Xu B,Tao ZZ. Piceatannol enhances the antitumor efficacy of gemcitabine in human A549 non-small cell lung cancer cells [J]. Oncol Res,2015,22:213-217.

15 Song F,Xuan Z,Yang X,et al. Identification of key microRNAs and hub genes in non-small-cell lung cancer using integrative bioinformatics and functional analyses[J]. J Cell Biochem,2020,121:2690-2703.

16 Song Z H,Zhang JQ,Wang YS. Effect of PIK3CA gene on the invasion and migration of human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Progress of Anatomical Sciences(解剖科学进展),2018,24:293-295.

17 Chaft JE,Arcila ME,Paik PK,et al. Coexistence of PIK3CA and other oncogene mutations in lung adenocarcinoma-rationale for comprehensive mutation profiling[J]. Mol Cancer Ther,2012,11:485-491.

18 Lai Y,Chang H,Chen H,et al. Peruvoside is a novel Src inhibitor that suppresses NSCLC cell growth and motility by downregulating multiple Src-EGFR-related pathways[J]. Am J Cancer Res,2022,12:2576-2593.

19 Xiong F,Zhan Z,Tang YP,et al. The effect of PI3K/Akt signal transduction pathway in non-small cell lung cance[J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报),2010,26:1264-1267.

20 Zhong M. The effects and mechanism of SPIN1 in facilitating malignant progression and radiotherapy resistance of non-small cell lung cancer cells via regulating FOXO3a-FOXM1 pathway[D]. Nanchang:The First Clinical Medical College of Nanchang University(南昌大学第一临床医学院),2022.

21 Yang K,Zhang W,Zhong L,et al. Long non-coding RNA HIF1A-As2 and MYC form a double-positive feedback loop to promote cell proliferation and metastasis in KRAS-driven non-small cell lung cancer[J]. Cell Death Differ,2023,30:1533-1549.

22 Hou X,Zhou C,Liang Z,et al. Salvianolic acid F suppresses KRAS-dependent lung cancer cell growth t hrough the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Phytomedicine, 2023, 121:155093.

23 Chen J,Tian WP,Wei XB. Effects of total astragalosides on proliferation, migration, apoptosis and HIF-1α/VEGF signaling pathway protein expression of lung adenocarcinoma cells [J]. Shandong Medical Journal(山东医药),2023,63:11-14.

24 Zhou H,Xu M,Li B,et al. PI3K/Akt/FOXO3a a signaling pathway inducing protective autophagy resistance remodeling to DDP promotes acquired lung adenocarcinoma[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther(中国临床药理学与治疗学),2022,27:961-970.

25 Bocheńska K,Moskot M,Smolińska-Fijołek E,et al. Impact of isoflavone genistein on psoriasis in *in vivo* and *in vitro* investigations[J]. Sci Rep,2022,11:18297.

天然产物研究与开发