

基于网络药理学及实验验证探究苗药虎掌草不同溶剂提取物抗前列腺癌活性及其作用机制

黄丽荣¹, 余佳^{2,3}, 李娇^{2,3}, 程莎^{2,3}, 骆衡^{2,3*}

¹贵州理工学院食品药品制造工程学院, 贵阳 550003; ²贵州医科大学药用植物功效与利用国家重点实验室; ³贵州省天然产物研究中心, 贵阳 550014

摘要: 运用网络药理学预测结合实验验证研究苗药虎掌草不同溶剂提取物的抗前列腺癌活性及其作用机制。分别以水、75%乙醇和乙酸乙酯提取虎掌草获得粗提物, 通过 MTT 法体外检测 3 种溶剂提取物对前列腺癌细胞 PC3 增殖的影响, 流式细胞术检测其对细胞凋亡的影响, 评价提取物对 PC3 细胞的抑制作用; 采用 GC-MS 分析乙酸乙酯提取物的化学成分; 运用网络药理学分析虎掌草的活性成分及抗前列腺癌作用靶点, 构建 PPI 网络, 拓扑分析筛选核心靶点, 通过 GO 生物功能富集和 KEGG 通路富集分析构建虎掌草抗前列腺癌的信号通路, 预测潜在作用机制; 利用 RT-PCR 检测虎掌草提取物对预测的 TNF 信号通路相关基因转录水平表达的影响, 验证预测靶点, 进一步分析作用机制。细胞实验表明, 3 种溶剂提取物对 PC3 细胞均具有较强的抑制增殖作用, 且能显著诱导细胞凋亡 ($P < 0.01$); GC-MS 和网络药理学结果表明白桦脂酸和虎掌草皂苷 D 为提取物的主要药效成分, 检索得到与抗前列腺癌相关的靶点 89 个, 进一步筛选得到核心靶点 15 个, 涉及 ALB、JUN、HSP90AA1 等靶点; GO 功能富集涉及 142 个生物过程、28 个细胞组成和 41 个分子功能, KEGG 通路富集分析交集靶点主要涉及 TNF、TRP、NF- κ B、癌症通路等。RT-PCR 靶点验证实验表明 3 种溶剂提取物均能显著影响 TNF 信号通路关键基因的表达, 证明了网络药理学预测机制的可靠性。本研究揭示了虎掌草水、75%乙醇和乙酸乙酯提取物具有较强的抗前列腺癌活性, 白桦脂酸和虎掌草皂苷 D 为主要药效成分, 其作用机制可能与调控 TNF、TRP、NF- κ B、癌症通路等有关。

关键词: 虎掌草提取物; 抗前列腺癌; 作用机制; 网络药理学; 实验验证

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Anti-prostate cancer activity and mechanism of different solvent extracts of *Anemones Rivularis Radix* based on network pharmacology and experimental validation

HUANG Li-rong¹, YU Jia^{2,3}, LI Jiao^{2,3}, CHENG Sha^{2,3}, LUO Heng^{2,3*}

¹College of Food and Pharmaceutical Engineering, Guizhou Institute of Technology, Guiyang 550003, China;

²State Key Laboratory for Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University;

Abstract: The anti-prostate cancer activity and mechanism of different solvent extracts from *Anemones Rivularis Radix* (ARR) were studied by network pharmacology and experimental validation. ARR was extracted with water, 75% ethanol, and ethyl acetate to obtain the crude extracts. The effects of three extracts on the proliferation and apoptosis of prostate cancer cells PC3 were analyzed by MTT and flow cytometry *in vitro*, respectively. Chemicals of ethyl acetate crude extracts were analyzed by GC-MS. The active constituents and anti-prostate cancer targets of ARR were analyzed by network pharmacology. PPI network was constructed, and core targets were screened by topological analysis. The anti-prostate cancer signaling pathway of extracts was analyzed by GO and KEGG enrichment analysis. Based on the above results, the mechanism of action was predicted. The expression of genes in extract-treated PC3 cells at the transcriptional level related to the TNF signaling pathway was assayed through RT-PCR, which further verified the predicted targets and mechanism. Results showed three extracts had strong inhibitory effect on PC3 cells proliferation, and induced apoptosis ($P < 0.01$) significantly. Compounds betulinic acid and huzhangoside D were the main active ingredients of ARR against prostate cancer based on GC-MS and network pharmacology. A total of 89 targets related to anti-prostate cancer were obtained, and 15 core targets were selected further, including JUN, BCL2L1 and HSP90AA1. GO functional enrichment showed there were 142 biological processes, 28 cell compositions, and 41 molecular functions involved. The intersection targets mainly involved TNF, TRP, NF- κ B, and cancer pathway abased on KEGG analysis. Results of RT-PCR showed the expression of key genes in the TNF signaling pathway were affected by three extracts significantly, which was consistent with the results predicted by the network pharmacology. This study revealed three extracts of ARR had strong inhibitory activity against prostate cancer, and betulinic acid and huzhangoside D were the main active compounds. The mechanism of action may be related to the regulation of TNF, TRP, NF- κ B and cancer pathways.

Key words: extracts of *Anemones Rivularis Radix*; anti-prostate cancer; mechanism; network pharmacology; experimental validation

前列腺癌是全球最常见的恶性肿瘤之一，位居我国男性泌尿生殖系统恶性肿瘤发病率第一位，对于中老年男性，其发病率随着年龄增长而提高，威胁着男性的生殖功能及生命安全^[1,2]。前列腺癌早期缺乏特异的临床症状，发生较隐匿，当出现明显的症状时，疾病多发展至中晚期。目前临床上对于前列腺癌的主要治疗手段为手术治疗和药物治疗。手术去势可很大程度上切断雄激素来源，但并不彻底，易复发，往往只适用于早期患者。药物治疗的原则是抑制雄激素的生成，或为阻断雄激素受体功能的拮抗剂，但副作用较大，预

后较差^[3]。因此，寻找高效且副作用小的前列腺癌药物成为临床亟待解决的问题。

苗药虎掌草（*Anemones Rivularis Radix*, ARR），又名溪畔银莲花、白花虎掌草、见风青、土黄芩，是毛茛科银莲花属植物草玉梅（*Anemones Rivularis Buch.-Ham.*）的全草或根。虎掌草主要分布于甘肃、青海、云南、贵州、四川等地，在贵州黔东南地区分布广泛，是贵州常用民族药^[4]。在《中草药与临床》《苗族常用植物药》记载虎掌草水煎用于治疗咽喉肿痛、疟疾，风湿疼痛，胃痛，跌打损伤，慢性支气管炎等疾病，表明其有抗炎、活血、消肿等功效^[5]。《云南中草药》记载用虎掌草治疗癌症^[6]。研究发现虎掌草 70%乙醇提取物能够显著抑制肿瘤细胞 HepG2、K562、A549 及 PC3 的增殖，动物体内研究表明提取物可增强动物免疫力，提升小鼠血清中的肿瘤坏死因子和白介素 2 水平^[7]；虎掌草 95%乙醇提取物能够抑制 HT29、Hep3B、DLD-1 肿瘤细胞的生长，其作用机制与抑制丙酮酸脱氢酶激酶活性有关^[8]。化学成分研究表明，虎掌草含有五环三萜及其皂苷、内酯、甾体、多酚类等成分^[9]，其中对三萜及其皂苷的研究报道较多，以常春藤皂苷及齐墩果烷型皂苷为主，且主要分布于虎掌草乙醇或甲醇提取部位^[10]。目前，关于虎掌草水、乙酸乙酯提取部位的化学成分及其抗前列腺癌活性研究鲜有报道，虎掌草的药用价值值得深入研究与开发。

本研究通过体外研究虎掌草水、75%乙醇及乙酸乙酯提取部位的抗前列腺癌活性，利用气相色谱-质谱联用仪（GC-MS）分析提取物成分，并结合网络药理学预测虎掌草抗前列腺癌的物质基础、核心靶点及其抗前列腺癌的作用机制，利用 RT-PCR 检测预测信号通路相关基因的表达。旨在为深入研究虎掌草的抗前列腺癌活性成分及作用机制奠定基础，充分挖掘民族药的利用价值，为治疗恶性肿瘤提供参考。

1 材料与方法

1.1 药材

药材采集于贵州省黔南地区都匀市，经贵阳中医学院杨昌煜教授鉴定为毛茛科银莲花属植物草玉梅 *Anemones Rivularis Buch.-Ham.* 的根，植物样本（No. 2020091405）保存于黔南民族医学高等专科学校实验室。

1.2 主要仪器

ELx808 型酶标仪（美国 BIOTEK 公司）；FACSCanto II 型流式细胞仪（美国 Becton Dickinson）；StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems 公司）；HP6890/5975C GC-MS 联用仪（美国安捷伦公司）。

1.3 主要试剂与材料

75%乙醇（批号：PM12553，上海创赛科学仪器有限公司）；乙酸乙酯（分析纯，批号：10009418，国药集团化学试剂有限公司）；DMEM 培养基（批号：SH30022.01）、0.25%胰酶（批号：SH30236.01）均购自美国 HyClone 公司；二甲基亚砜（DMSO，批号：D8370-100）、青链霉素（批号：SV30010）、碘化丙啶（PI，批号：IP5030）、磷酸盐缓冲液（PBS，批号：P1003）、4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液（HEPES，批号：P1020）均购自北京索莱宝科技有限公司；Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒（批号：C1062M）、Taq DNA 聚合酶（批号：R011）均购自美国 Becton Dickinson 公司；胎牛血清（批号：11011-8611，杭州四季青生物工程材料有限公司）；噻唑蓝（MTT，批号：M2003，美国 Sigma 公司）；Trizol（批号：15596-018，美国 Thermo Fisher Scientific 公司）；PrimeScript RT-PCR Kit（批号：RR055A，大连 TaKaRa 公司）；引物（上海生工生物股份有限公司）；所用的其他试剂均为分析纯。

ZB-5MSI 5% Phenyl-95%Dimethylpolysiloxane 弹性石英毛细管柱（30 m×0.25 mm×0.25 μm，美国安捷伦公司）

1.4 数据库与分析软件

中药系统药理学分析平台（TCMSP，<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>）；PubChem 数据库（<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>）；ChEMBL 数据库（<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>）；Swiss Target Prediction 数据库（<http://swisstargetprediction.ch/>）；Pharmmapper 数据库（<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>）；Gene Card 数据库（<https://www.genecards.org/>）；CTD 数据库（<http://ctdbase.org/>）；OMIM 数据库（<https://www.omim.org/>）；Venny 2.1（<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>）；STRING 数据库（<https://string-db.org/>）；DAVID 数据库（<https://david.ncifcrf.gov/>）；Cytoscape3.8.0 可视化软件；R 软件等。

1.5 细胞株

人前列腺癌 PC3 细胞株来源于贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室。

1.6 虎掌草不同溶剂提取物的制备

将干燥的虎掌草粉碎，分别制备水、75%乙醇和乙酸乙酯提取物（E1、E2、E3）。具体操作方法为：按照料液比 1：10 分别以上述溶剂提取虎掌草 3 次，第一次为 3 h，第二、三次为 1.5 h，提取温度为 80 °C，合并 3 次滤液，旋转蒸发器浓缩得到浸膏，真空低温干燥即得到不同溶剂提取物。

1.7 虎掌草提取物对 PC3 细胞的影响

1.7.1 供试样品的制备

采取两步稀释法制备供试样品，第一步用 DMSO 进行溶解，第二步用无血清 DMEM 培养基稀释至所需浓度，确保 DMSO 含量不超过总体积的 1%。

1.7.2 细胞培养

PC3 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 °C，5% CO₂ 恒温培养箱培养，待细胞生长达至对数生长期后用 0.25%胰蛋白酶消化、传代。待细胞传代至 3 代进行实验。

1.7.3 细胞增殖抑制实验

将 PC3 细胞以 1×10^4 个/mL 密度接种到 96 孔培养板中，每个孔 190 μ L，于 37 °C，含 5% CO₂ 恒温饱和培养箱中培养过夜后进行分组：实验组加 10 μ L 不同浓度（终浓度分别为 5、10、20、40、80 μ g/L）的 3 种提取物，对照组（control, Con）加 10 μ L 与对应提取物同比例稀释的 DMSO，每组平行设置 3 个复孔。继续培养 24、48 和 72 h 后，用倒置荧光显微镜观察细胞状态。细胞培养结束，1 000 r/min 离心 10 min，吸取并弃掉培养液，每孔加入 100 μ L 无血清 DMEM 培养基与 5 mg/mL MTT 按体积分数 9：1 比例混合的混合液，继续培养 4 h。终止培养后，1 500 r/min 离心 8 min，小心移除上层液体，每孔分别加入 150 μ L DMSO，摇床低速震荡 10 min 使结晶物完全溶解，在酶标仪上测定 490 nm 波长下各孔的光密度值（OD），并按照公式（1）计算细胞增殖抑制率（R）。

$$R = (1 - OD_{\text{实验}} / OD_{\text{对照}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.7.4 细胞凋亡实验

细胞以 2×10^5 个/mL 接种于 6 孔细胞培养板，每孔 2 mL，待细胞完全贴壁后实验组分别加入 3 种不同溶剂提取物 100 μ L，使其终浓度为 20 μ g/L，对照组加入与提取物含同比例稀释的 DMSO，各组分别设置 3 个复孔。培养 72 h 后，收集细胞，1 000 r/min 离心 8 min，弃去上清培养液，用 3 mL 预冷 PBS 洗三次，至培养基颜色消失，加入 1 \times binding buffer（10 mmol/L HEPES 缓冲液，pH 7.4，140 mmol/L NaCl，2.5 mmol/L CaCl₂）悬浮细胞，使细胞浓度为 $(1 \sim 5) \times 10^6$ 个/mL。取 100 μ L 细胞悬液到 1.5 mL EP 管，避光加 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI（50 μ g/mL）染液，混匀，于室温避光孵育 15 min，然后加入 400 μ L binding buffer，轻轻混匀，1 h 内用流式细胞仪检测细胞的凋亡率。

1.8 GC-MS 分析提取物化学成分

由于 E1、E2 在低沸点有机溶剂中溶解性较差，因此，本研究只分析了 E3 的化学成分。取 E3 5.0 g，置于 10 mL 量瓶中，加入乙酸乙酯定容，室温下超声处理 1 h（功率 250 W，频率 50 Hz），冷却，用乙酸乙酯补足定容，摇匀，0.22 μ m 过滤膜过滤，取滤液进行 GC-MS 检测。气质条件：采用 ZB-5MSI 5% Phenyl-95% Dimethylpolysiloxane（30 m \times 0.25 mm \times 0.25

μm) 弹性石英毛细管柱作为色谱柱, 柱温 45 °C (保留 2 min), 以 5 °C/min 升温至 300 °C, 保持 2 min; 汽化室温度 250 °C; 载气为高纯 He (99.999%); 柱前压 7.62 psi, 载气流量 1.0 mL/min; 分流比 40 : 1, 溶剂延迟时间 3.0 min, 离子源为 EI 源; 离子源温度 230 °C; 四极杆温度 150 °C; 电子能量 70 eV; 发射电流 34.6 μA; 倍增器电压 1 326 V; 接口温度 280 °C; 质量范围 20~450 amu。对总离子流图中的各峰经质谱计算机数据系统检索及核对 Nist2008 和 Wiley275 标准质谱图, 分析其化学成分。

1.9 基于网络药理学的作用机制预测

1.9.1 药物成分与前列腺癌相关靶点的筛选

根据 GC-MS 分析的化学成分, 结合文献检索得到虎掌草的化学成分, 将其导入 TCMSP, 根据药物代谢动力学 (吸收、分布、代谢、排泄) 性质以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药指数 (drug like index, DL) ≥ 0.18 为标准, 筛选虎掌草的活性成分。利用 PubChem 数据库获得活性成分的 SMILES 式和 sdf 文件, 将其导入 ChEMBL、Swiss Target Prediction 和 Phrammapper 数据库进行活性成分的靶点预测。通过 GeenCard、CTD 和 OMIM 数据库共同检索前列腺癌相关靶点。利用 Venny 2.1 绘制成分靶点和前列腺癌靶点的韦恩图, 获取虎掌草活性成分和前列腺癌的交集靶点。

1.9.2 蛋白-蛋白互作网络的构建与核心靶点分析

为进一步明确虎掌草活性成分靶点与前列腺癌靶点之间的相互作用关系, 将虎掌草与前列腺癌的交集靶点导入 STRING 数据库, 设置蛋白种类为“Homo sapiens”, 以互作综合得分 (interaction score) ≥ 0.9 作为筛选条件, 建立药物靶蛋白-疾病靶蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI), 绘制网络图。利用 Cytoscape3.8.0 软件进行可视化处理, 通过 CytoHubba 插件以连接度值 (degree) ≥ 2 倍中位数为条件进行拓扑分析, 筛选得到核心靶点。

1.9.3 GO 和 KEGG 富集分析

为说明药物的靶点在基因功能中的作用, 将交集靶点导入 DAVID 数据库, 设定物种为“Homo sapiens”进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 结果以 $P \leq 0.05$ 临界值进行筛选, 并运用 R 软件将分析结果进行可视化处理。

1.10 RT-PCR 验证 TNF 信号通路相关基因 mRNA 的表达

实验分组及细胞处理方法如“1.7.4”。收集细胞后按 Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 超微量分光光度计测定 RNA 的含量和纯度。取 1 μg 总 RNA 按照第一链 cDNA 合成试剂盒说明合成 cDNA, 并以此为模板进行 RT-PCR 扩增, 以 β -actin 作为内参, RT-PCR 反应所用

引物序列如表 1 所示。扩增程序：95 °C 预变性 2 min，94 °C 变性 30 s，58 °C 复性 1 min，72 °C 延伸 50 s，32 个循环后，72 °C 总延伸 10 min。反应完毕后，PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，运用数码凝胶成像扫描拍照并分析条带。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因	序列 (5'→3')
Gene	Sequence (5'→3')
JUN	F: TCCAAGTGCCGAAAAAGGAAG
	R: CGAGTTTCTGAGCTTTCAAGGT
Caspase-3	F: GAAATTGTGGAATTGATGCGTGA
	R: CTACAACGATCCCCTCTGAAAAA
c-myc	F: TCCTGGCAAAAGGTCAGAGT
	R: GTTGTGTGTTTCGCCTCTTGA
BCL2L1	F: GACTGAATCGGAGATGGAGACC
	R: GCAGTTCAAACCTCGTCGCCT
TNF- α	F: CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG
	R: GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
β -actin	F: GCCAACACAGTGCTGTCT
	R: AGGAGCAATGATCTTGATCTT

1.11 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对所有数据进行统计学分析，结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 虎掌草不同溶剂提取物对 PC3 细胞的影响

2.1.1 虎掌草不同溶剂提取物抑制 PC3 细胞生长

E1、E2、E3 不同浓度、不同处理时间对 PC3 细胞增殖的抑制作用结果见图 1。结果表明：3 种提取物对 PC3 细胞的增殖均有抑制作用，抑制活性随着处理时间延长而增强，且随着处理浓度的增加而增强，即活性呈时间依赖性和剂量依赖性；相同浓度及时间处理下，E1 对 PC3 细胞的抑制活性高于其他两种提取物。倒置荧光显微镜观察 3 种提取物 20 $\mu\text{g/L}$ 处理细胞 48 h 后对细胞形态的影响，结果见图 2。结果显示 PC3 细胞经提取物处理后，均呈现细胞数量明显减少，出现凋亡小体，细胞分布不均匀，胞质皱缩，细胞碎片增加，易相互结成簇等细胞凋亡现象。以上结果表明虎掌草 3 种提取物能够显著抑制 PC3 细胞的生长。

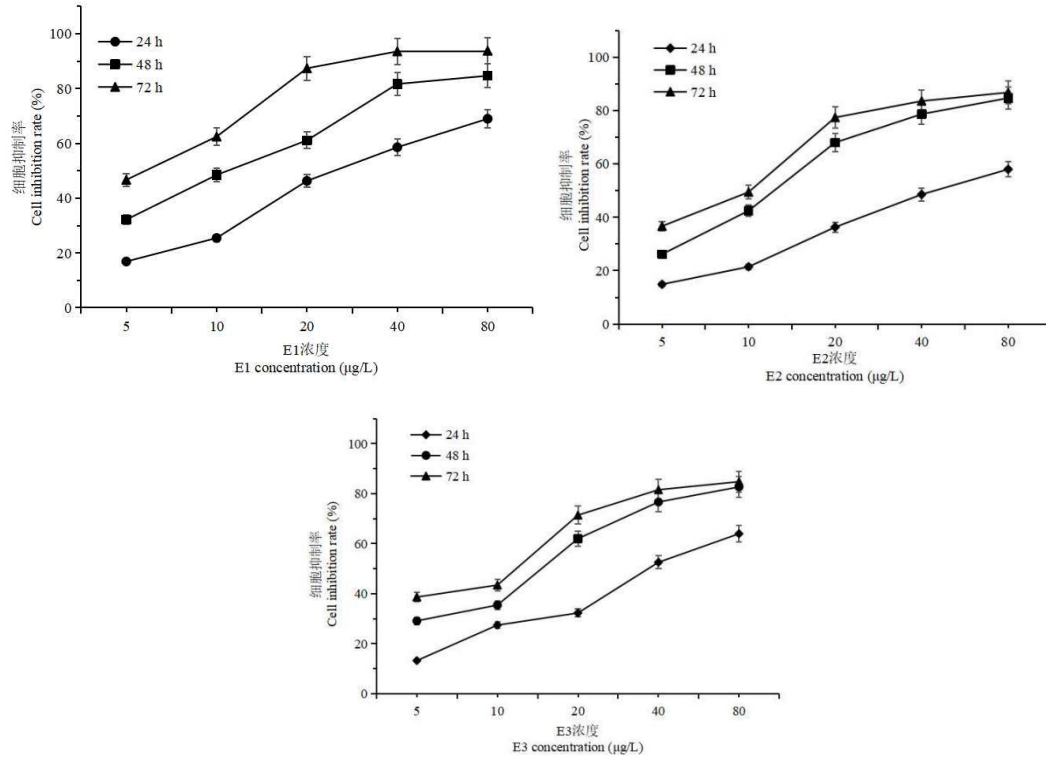


图 1 虎掌草不同溶剂提取物对 PC3 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 The effect of different solvent extracts of ARR on proliferation of PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

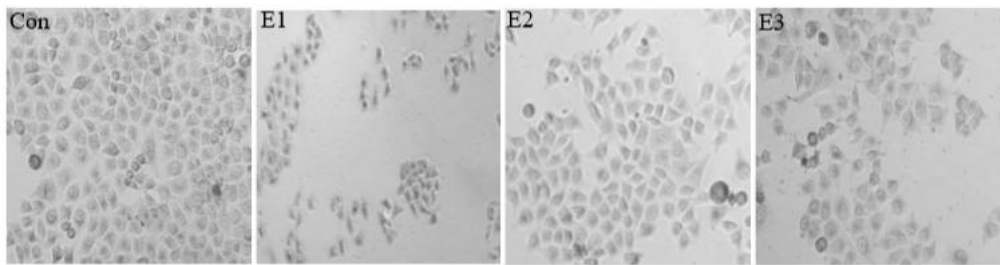
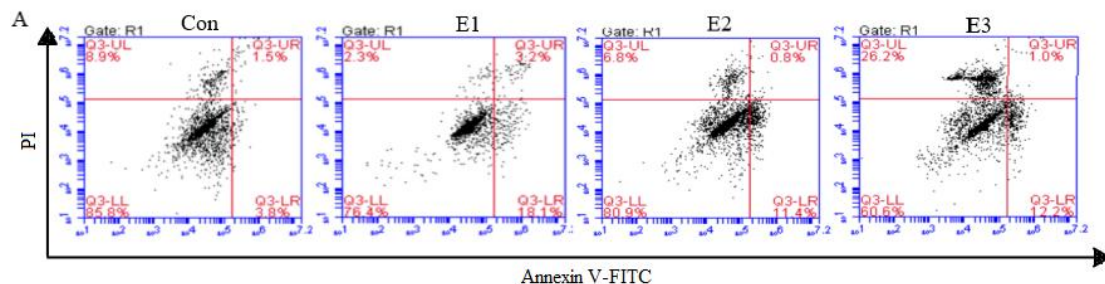


图 2 倒置荧光显微镜观察 PC3 细胞经虎掌草提取物处理后数量和形态学变化 (200×)

Fig. 2 The number and morphological changes of cells treated with extracts of ARR under inverted fluorescence microscope (200×)

2.1.2 虎掌草不同溶剂提取物诱导 PC3 细胞凋亡

PC3 细胞经 20 µg/L 虎掌草 3 种提取物处理 72 h 后, 运用流式细胞仪检测结果见图 3。结果表明 3 种提取物均能显著诱导 PC3 细胞凋亡 (见图 3A), 细胞凋亡率分析显示 E2 诱导细胞凋亡率高于其他两种提取物 (见图 3B)。



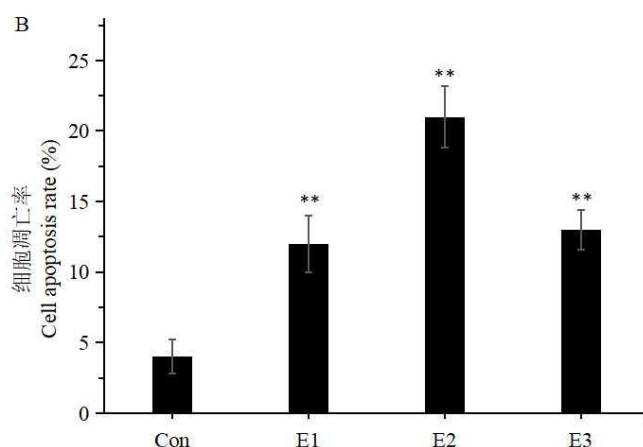


图3 虎掌草不同溶剂提取物对 PC3 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of different solvent extracts of ARR on apoptosis of PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注: 与对照组比较, $**P < 0.01$; Note: Compared with control group, $**P < 0.01$.

2.2 虎掌草乙酸乙酯提取物的化学成分

经 GC-MS 检测确定了 E3 的 23 种成分, 如表 2 所示。其中油酸 (17.599%)、棕榈酸 (17.144%) 及白桦脂酸 (9.54%) 为主要成分。此外, E3 含大量皂苷, 苷元均为齐墩果酸的 3-OH 与不同的糖结合而成, 其中糖的连接次序未定。

表 2 虎掌草乙酸乙酯提取物的化学成分

Table 2 Chemical composition in ethyl acetate extracts from ARR

编号 No.	t_R (min)	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound	分子量 Molecular weight
1	10.06	1.406	2,3-二氢-3,5-二羟基-6-甲基-4(H)-吡喃-4-酮 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one	144
2	12.26	7.033	4-(N-亚硝基-N-甲基氨基)-丁酸 4-(N-Nitroso-N-methylamino)-butyric acid	146
3	18.45	0.218	高香草酸 Homovanilic acid	182
4	19.70	1.121	松柏醇 4-(1E)-3-Hydroxy-1-propenyl-2-methoxyphenol	180
5	20.43	0.374	对羟基肉桂酸 <i>p</i> -Coumaric acid	164
6	21.18	0.159	丁香酚 Eugenol	164
7	21.49	0.511	十五烷酸 Pentadecanoic acid	242
8	22.49	17.144	棕榈酸 Palmitic acid	256
9	22.85	0.24	棕榈酸乙酯 Ethyl palmitate	284
10	24.56	6.873	亚油酸 Linoleic acid	280

编号 No.	t_R (min)	相对含量 Relative content (%)	化合物 Compound	分子量 Molecular weight
11	24.61	17.599	油酸 Oleic acid	282
12	24.83	1.815	硬脂酸 Stearic acid	284
13	28.67	0.55	甘油棕榈酸酯 Glycerol palmitate	330
14	30.55	9.54	白桦脂酸 Betulinic acid	456
15	30.87	0.281	1-亚油酸甘油酯 1-Monolinolein	354
16	32.58	0.197	角鲨烯 Squalene	410
17	37.63	1.163	甾醇-5-烯醇 Sterol-5-enol	400
18	38.02	6.872	豆固醇 Soysterol	412
19	38.73	6.913	γ -谷甾醇 γ -Sitosterol	414
20	39.46	0.398	豆甾-7-烯-3-醇 Soyster-7-en-3-ol	414
21	39.73	0.552	环桉树醇 Cycloeucaenol	426
22	40.17	1.907	维生素 E Vitamin E	430
23	40.60	0.857	豆甾-4-烯-3-酮 Stigmast-4-en-3-one	412

2.3 基于网络药理学的抗前列腺癌作用机制预测

2.3.1 药物成分与前列腺癌相关靶点筛选

结合虎掌草 E3 成分分析结果与相关文献报道^[8-10], 通过 TCMSP 筛选确定了虎掌草的活性成分为白桦脂酸和虎掌草皂苷 D。通过数据库筛选共获得上述两个化合物的作用靶点 110 个, 前列腺癌相关靶点 12 653 个, 将活性成分靶点与前列腺癌相关靶点取交集并绘制韦恩图, 最终获得虎掌草治疗前列腺癌的潜在靶点 89 个 (见图 4)。

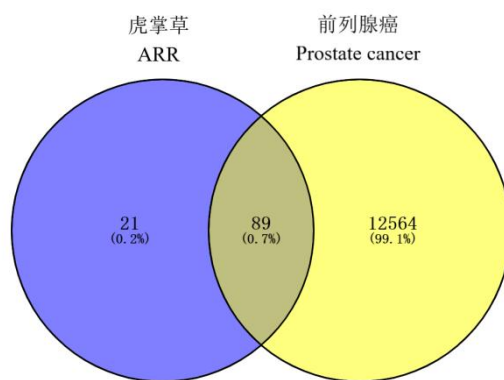


图 4 虎掌草活性成分与前列腺癌靶点的韦恩图

Fig. 4 Venn diagram of targets of active ingredients of ARR and prostate cancer targets

2.3.2 PPI 网络与核心靶点

为进一步探讨虎掌草活性成分抗前列腺癌活性的作用机制, 将交集靶点导入 STRING 数据库, 获得靶点间相互作用关系, 得到包含 78 个节点, 239 条边, 平均节点 5.37 的 PPI

网络（见图 5）。利用 CytoHubba 对蛋白互作网络进行拓扑分析，得到 degree 排名前 15 的核心靶点，分别是：ALB、JUN、HSP90AA1、PTGS2、BCL2L1、AR、PSEN1、MAPK8、KDR、CCNA2、BMP2、PARP1、PRKCD、CDC25C、TOP2A。其中 ALB（degree = 35）、JUN（degree = 29）和 HSP90AA1（degree = 25）在蛋白互作网络中有较高的度值，表明其在网络中可能发挥较重要的作用。

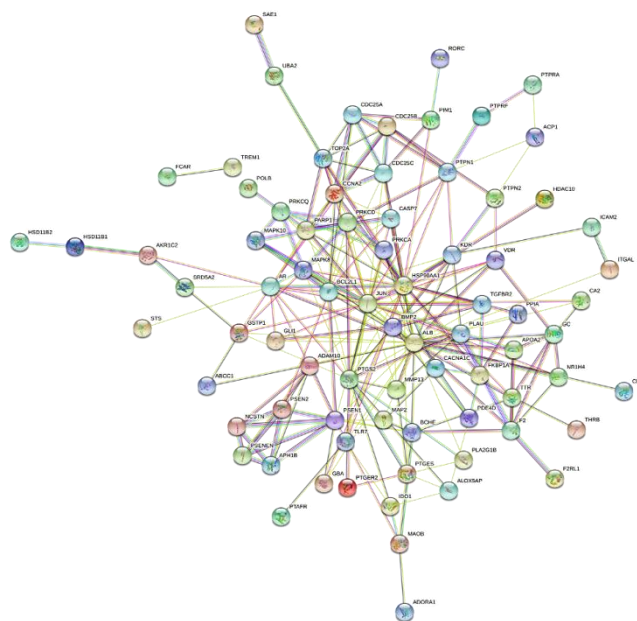


图 5 交集靶点的 PPI 网络

Fig. 5 PPI network of intersection targets

2.3.3 GO 和 KEGG 富集分析

通过 GO 富集分析中，发现交集靶点共涉及 142 个生物过程、28 个细胞组成和 41 个分子功能。以 $P < 0.05$ 和基因数目为条件筛选 GO 前 20 条目进行条形图绘制（见图 6）。结果表明交集靶点在生物过程中主要参与对药物的反应、凋亡过程的正向调节、炎症反应、Notch 信号传导途径、肿瘤坏死因子介导的信号传导途径的负向调节等过程；细胞组成主要分布于细胞膜、细胞质基质、内质网等；分子功能主要涉及蛋白质异构化活性、酶结合、药物结合等。

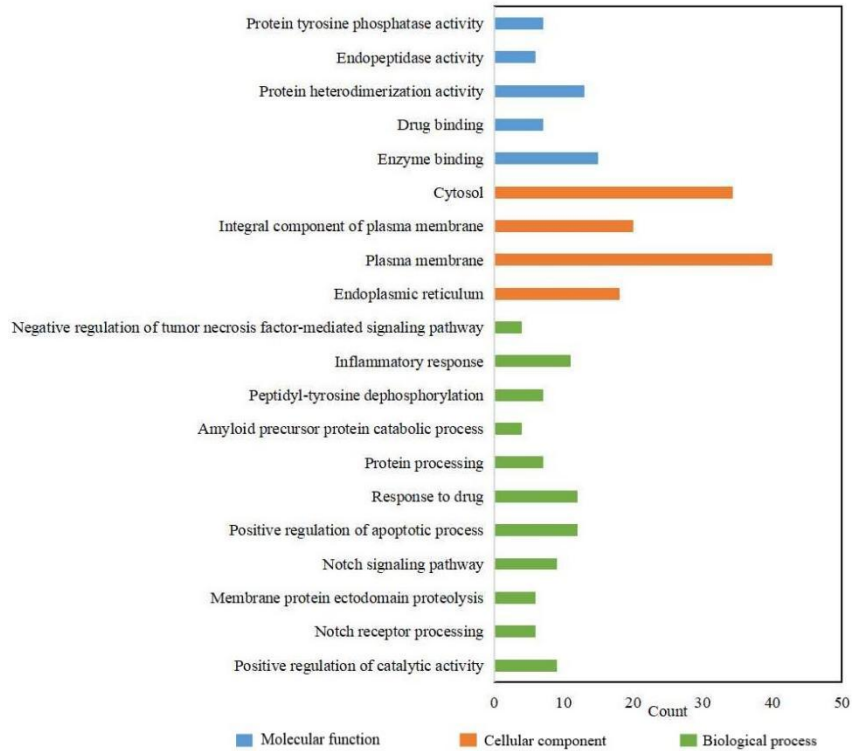


图6 虎掌草提取物抗前列腺癌作用靶点的GO生物功能富集分析

Fig. 6 GO enrichment analysis of targets for extracts of ARR against prostate cancer

交集靶点 KEGG 通路注释分析表明其涉及 34 条信号通路（见图 7），其中与癌症发生发展相关的通路主要有：癌症通路、TRP 通道的炎性介质调节、胰岛素抵抗、Notch 信号通路、GnRH 信号通路、cAMP 信号通路、TNF 信号通路、癌症中的 MicroRNAs、MAPK 信号通路、Ras 信号通路等。进一步表明虎掌草治疗前列腺癌的作用方式可能是通过多靶点，多通路共同发挥作用。

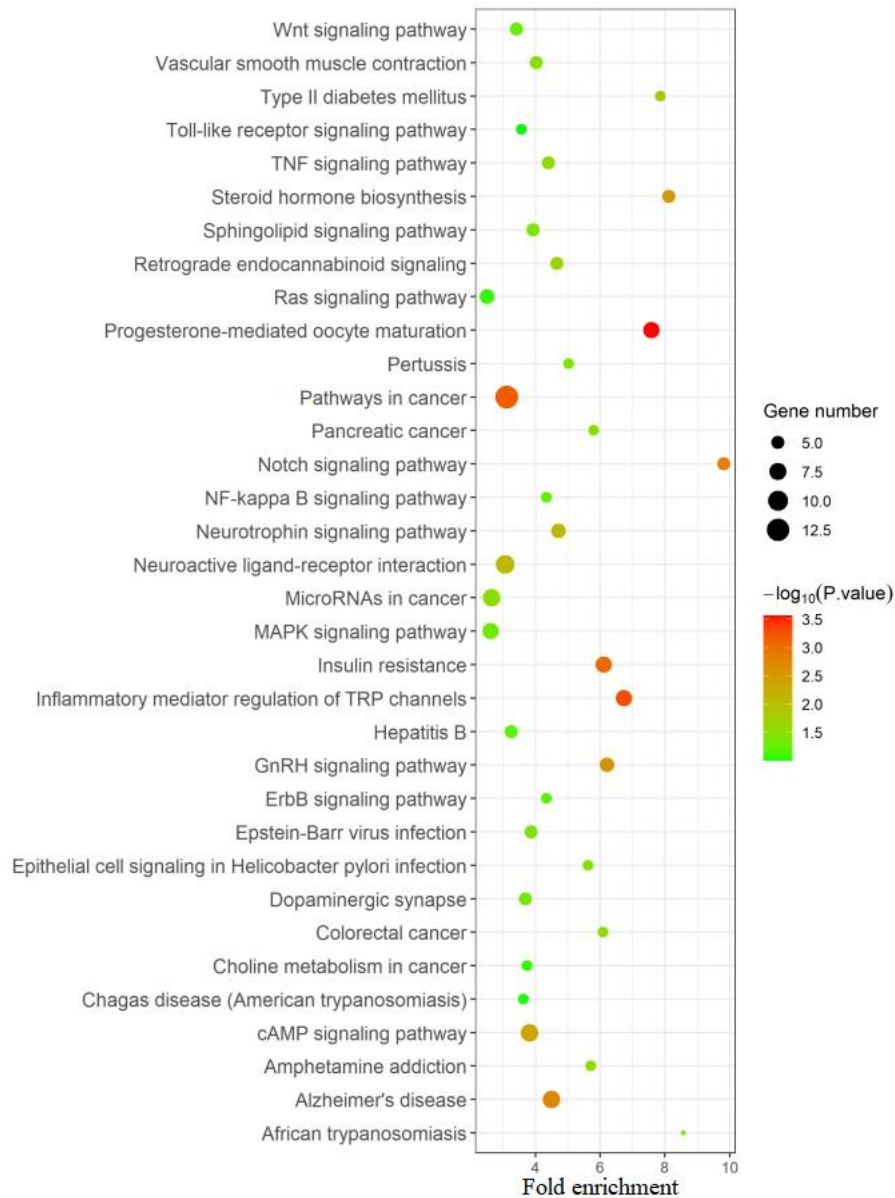


图 7 虎掌草提取物抗前列腺癌作用靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG enrichment analysis of targets for extracts of ARR against prostate cancer

2.4 虎掌草提取物对 TNF 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响

TNF 信号通路涉及的重要基因 JUN 和 BCL2L1 既是虎掌草抗前列腺癌的核心靶点，该通路又与 KEGG 通路注释分析涉及的其他信号通路：MAPK 信号通路、NF- κ B 信号通路、细胞凋亡通路及 Toll 样受体信号通路密切相关^[11-13]，提示 TNF 信号通路可能是虎掌草提取物发挥抗前列腺癌作用的重要通路。因此，选择 TNF 信号通路验证虎掌草提取物抗前列腺癌的作用机制。

RT-PCR 检测结果见图 8。结果显示不同浓度的 3 种提取物处理 PC3 细胞 48 h 后，实验组 Caspase-3 和 TNF- α 的 mRNA 表达水平显著高于对照组，而 BCL2L1 和 c-myc 的 mRNA

表达水平显著低于对照组，JUN 的表达水平略高于对照组；E2 对受试基因的 mRNA 表达水平的影响较 E1 和 E3 对该基因的表达水平的影响明显；E1 和 E3 对 BCL2L1 基因的表达水平随受试浓度的增加而增加，而 E2 对该基因的影响随浓度的升高而降低。其他受试基因的表达水平在 10 $\mu\text{g/L}$ 和 20 $\mu\text{g/L}$ 药物浓度处理下差异不显著。以上结果表明虎掌草提取物能够显著影响与 TNF 信号通路相关基因的 mRNA 表达水平。

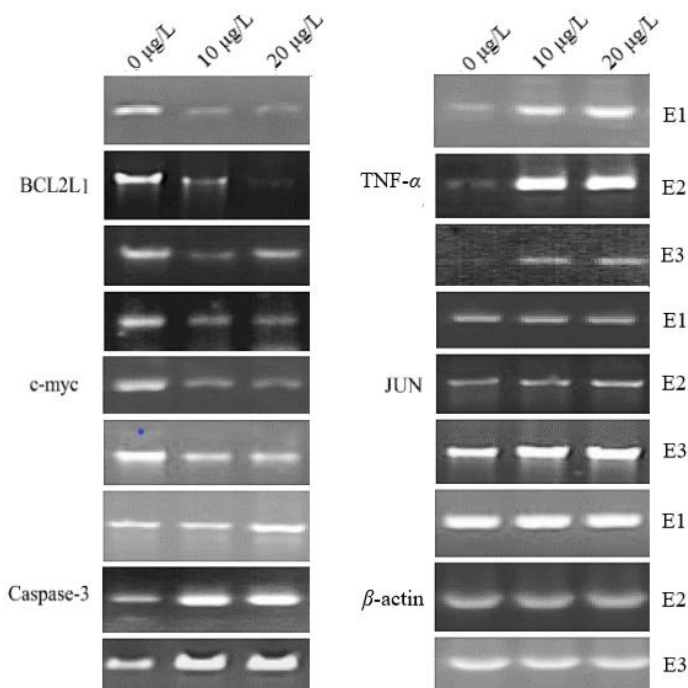


图 8 虎掌草不同溶剂提取物对 PC3 细胞 TNF 信号通路相关基因 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of different solvents extracts of ARR on the expression of the TNF pathway related genes at the mRNA level in PC3 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

本文研究了苗药虎掌草水、75%乙醇和乙酸乙酯提取物 (E1、E2、E3) 体外对前列腺癌细胞 PC3 的抑制作用。结果显示 3 种溶剂提取物能明显抑制 PC3 细胞的生长，且具有显著的时间和剂量依赖性，且各组提取物均能诱导 PC3 细胞凋亡，其中 E2 对 PC3 细胞诱导凋亡水平高于其他两组。虎掌草 3 种溶剂提取物的体内抗前列腺癌活性值得深入研究。

为探讨虎掌草提取物抗前列腺癌的物质基础，本研究运用 GC-MS 分析了 E3 的化学成分，结合文献检索成分，利用 TCMSP 筛选出白桦脂酸和虎掌草皂苷 D 为虎掌草的主要活性成分。大量研究表明白桦脂酸具有广谱抗肿瘤活性，包括黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、白血病等，已成为研发新药方面最具潜力的先导化合物之一^[14-15]。Shin 等研究表明白桦脂酸通过抑制缺氧诱导的前列腺癌 PC3 细胞的 STAT3 和 HIF-1 α 因子，发挥抗血管生成活性^[16]。白桦脂酸不溶于水，微溶于乙醇，易溶于乙酸乙酯，据此推测其为 E2

及 E3 抗前列腺癌的重要物质。研究表明 E3 的对羟基肉桂酸能显著抑制 PC3 细胞的增殖, $IC_{50} = 1.1 \pm 0.2 \text{ mmol/L}$, 进一步作用机制研究发现其可与 MAPK8 结合, 为 MAPK 抑制剂^[17]; 丁香酚处理 PC3 细胞 48 h, $IC_{50} = 89.44 \text{ } \mu\text{g/mL}$, 与 2-甲氧基雌二醇联用具有协同抑制 PC3 细胞增殖作用, 并通过 Bcl-2 依赖性途径诱导细胞凋亡^[18]; 棕榈酸通过抑制 PI3K/Akt 途径抑制 PC3 细胞的增殖^[19]。上述研究一方面表明这些物质可能为 E3 抗前列腺癌的重要物质; 另一方面本研究网络药理学预测的核心靶点 MAPK8、BCL2L1 其在上述研究中得到了证实, 证明了网络药理学预测的信号通路及靶点的可靠性。虎掌草皂苷 D 为齐墩果烷型皂苷, 该化合物发现至今已有 20 多年, 然而关于其药理药效学的研究甚少^[20]。研究发现该化合物能够下调促炎细胞因子 (TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6) 的表达, 并上调抗炎细胞因子 IL-10 的表达, 发挥治疗小鼠膝骨关节炎作用^[21]。另有研究表明虎掌草皂苷 A 具有抗肿瘤活性^[22], 该化合物结构与虎掌草皂苷 D 非常相似, 因此虎掌草皂苷 D 的抗肿瘤活性值得深入研究。本研究运用 GC-MS 检索分析的 E3 化学成分有限, 且未对 E1 和 E2 进行化学成分检测分析, 对虎掌草药效物质的分析不够全面, 可能使网络药理学预测的虎掌草抗前列腺癌作用机制不够完整。

KEGG 通路富集结果显示, 交集靶点主要富集于癌症通路、TRP 通道的炎性介质调节、Notch、胰岛素抵抗、TNF 信号通路等。TRP 通道与癌症疼痛相关, 多种炎症介质参与 TRP 通道的激活和致敏, 已成为治疗病理性疼痛的新靶点^[23]。Notch 信号通路可调节细胞的生长和转移, 影响细胞凋亡与周期, 在肿瘤细胞发生发展中起着重要作用。在前列腺癌中, Notch-1 的过表达能促进 PC3 细胞的迁移和侵袭, 反之能抑制 PC3 细胞的侵袭^[24]。胰岛素抵抗参与许多疾病的发病过程, 如糖尿病、高血压、动脉粥样硬化等, 近年来大量研究证明胰岛素抵抗与前列腺癌、食管癌、乳腺癌等癌症的发生发展密切相关, 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病、癌症之间存在协同关系^[25]。TNF- α 是一种促炎细胞因子, 参与多种恶性肿瘤的发生发展。研究表明, TNF- α 能通过抑制 GSK-3 β 活性的 AKT 信号通路和激活 NF- κ B 信号通路与 p38-MAPK 信号通路提高 Snail 的稳定性达到治疗前列腺癌的目的^[26]。KEGG 通路富集结果表明虎掌草抗前列腺癌的作用机制可能是通过作用于多信号通路、多机制协同发挥作用。

TNF 信号通路直接或间接参与 KEGG 通路富集中的其他信号通路, 并与细胞凋亡通路密切相关。验证的核心靶点 JUN、BCL2L1、Caspase-3、c-myc 以及 TNF- α 均是 TNF 信号通路相关的重要基因。Caspase-3 是肿瘤细胞凋亡启动子, 它的活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标准^[27]。c-myc 是可使细胞无限增殖的基因, 其表达的上调会促使细胞恶变, 导

致肿瘤的发生,反之,其表达的下调也是作为癌细胞凋亡的重要依据^[28]。Bcl-2 是细胞凋亡的重要调节因子,且与前列腺癌化疗耐药密切相关,其通过与 Bcl-2 家族成员 BAK1/BAX (促凋亡因子)结合抑制细胞凋亡^[29]。TNF- α 为前列腺癌细胞增殖和侵袭的重要指标,血清 TNF- α 高表达与前列腺癌患者 Gleason 评分升高呈正相关^[30]。虎掌草提取物能够显著影响上述基因在 mRNA 水平的表达,表明其抗前列腺癌作用机制与调控 TNF 信号通路密切相关。

综上所述,虎掌草的水、75%乙醇和乙酸乙酯提取物均能显著抑制前列腺癌细胞 PC3 增殖,并能诱导其凋亡,网络药理学预测白桦脂酸和虎掌草皂苷 D 可能是其发挥药效的重要物质基础,其可能通过多靶点、多途径发挥抗前列腺癌活性。细胞验证实验证实了虎掌草不同溶剂提取物抗前列腺癌作用机制与调控 TNF 信号通路密切相关,初步验证了本研究中网络药理学预测的分子机制的可靠性。本研究对下一步开展虎掌草有效成分、药理药效研究及临床应用具有重要的意义,为进一步开发贵州民族药资源提供重要的理论依据和基础。

参考文献

- 1 Wasim S,Lee SY,Kim J.Complexities of prostate cancer[J].Int J Mol Sci,2022,23:14257.
- 2 Zhao Z,Wang YN,Ge Y,et al.Research progress in 2023 ASCO-GU prostate cancer[J].J Mod Urol(现代泌尿外科杂志),2023,6:536-540.
- 3 Guo ZR.Development of three anti-prostate cancer drugs[J].Acta Pharm Sin(药学学报),2022,57:1918-1924.
- 4 National Administration of Traditional Chinese Medicine "Chinese Materia Medica" editorial Committee.Chinese Materia Medica 3(中华本草 3)[M].Shanghai:Shanghai Science and Technology Press,1999:164.
- 5 Liu Y.Chinese Herbal Medicine and Clinics(中草药与临床)[M].Kunming:Yunnan Science and Technology Press,2007:147.
- 6 Revolutionary Committee of Yunnan Provincial Health Bureau.Yunnan Chinese Herbal Medicine(云南中草药)[M].Kunming:Yunnan People's Publishing House,1971:470-471.
- 7 Chung TW,Lee JH,Choi HJ,et al.*Anemone rivularis* inhibits pyruvate dehydrogenase kinase activity and tumor growth[J].J Ethnopharmacol,2017,203:47-54.
- 8 Wu DS,Liu J,Wei D,et al.Study on the anti-tumor activity and immunomodulatory effect of alcohol extraction of brook anemone[J].Yunnan J Tradit Chin Med Mater Med(云南中医中药杂志),2015,36:58-60.
- 9 Chau TAM,Nguyen MK,Phuong TT,et al.A new saponin and other constituents from *Anemone rivularis* Buch.-Ham[J].Biochem Syst Ecol,2012,44:270-274.
- 10 Liao X,Li BG,Wang MK.The chemical constituents from *Anemone rivularis*[J].Chem J Chin Univ(高等学校化学学报),2001,22:1338-1341.
- 11 Gil-araujo B,Toledo Lobo MV,Gutiérrez-almerón M,et al.Dual specificity phosphatase 1 expression inversely correlates with NF- κ B activity and expression in prostate cancer and promotes apoptosis through

- a p38 MAPK dependent mechanism[J].Mol Oncol,2014,8:27-38.
- 12 Rodríguez-berriguete G,Fraile B,Paniagua R,et al.Expression of NF- κ B-related proteins and their modulation during TNF- α -provoked apoptosis in prostate cancer cells[J].Prostate,2012,72:40-50.
 - 13 King EM,Holden NS,Gong W,et al.Inhibition of NF-kappaB-dependent transcription by MKP-1:transcriptional repression by glucocorticoids occurring via p38 MAPK[J].J Biol Chem,2009,284:26803-26815.
 - 14 Zhou YM,Lin LM,Xia BH.Review on preparation technology and pharmacological activity of betulinic acid[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2016,28:978-985.
 - 15 Zhao ZX,Li CF,Yang HW,et al.Advances in microbial transformation of pentacyclic triterpenes[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1415-1426.
 - 16 Shin J,Lee HJ,Jung DB,et al.Suppression of STAT3 and HIF-1 alpha mediates anti-angiogenic activity of betulinic acid in hypoxic PC-3 prostate cancer cells[J].PLoS One,2011,6:e21492.
 - 17 Stefani T,Romo-Mancillas A,Carrizales-Castillo JJJ,et al.Cytotoxic fractions from *Hechtia glomerata* extracts and p-coumaric acid as MAPK inhibitors[J].Molecules,2021,26:1096.
 - 18 Padhy I,Paul P,Sharma T,et al.Molecular mechanisms of action of eugenol in cancer:recent trends and advancement[J].Life(Basel),2022,12:1795.
 - 19 Zhu S,Jiao W,Xu Y,et al.Palmitic acid inhibits prostate cancer cell proliferation and metastasis by suppressing the PI3K/Akt pathway[J].Life Sci,2021,286:120046.
 - 20 Rattan R,Reddy SG,Dolma SK,et al.Triterpenoid saponins from *Clematis graveolens* and evaluation of their insecticidal activities[J].Nat Prod Commun,2015,10:1525-8.
 - 21 Zhang R J,Cai C C,Pang J,et al.Therapeutic effect of Huzhangoside D in rats with knee osteoarthritis induced by anterior cruciate ligament transection[J].Pharmacogn Mag,2021,17:112.
 - 22 Kwak CH,Lee JH,Kim EY,et al.Huzhangoside A suppresses tumor growth through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase activity[J].Cancers(Basel),2019,11:712.
 - 23 Duitama M,Moreno Y,Santander SP,et al.TRP channels as molecular targets to relieve cancer pain[J].Biomolecules,2021,12:1.
 - 24 Zhang L,Sha J,Yang G,et al.Activation of Notch pathway is linked with epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells[J].Cell Cycle,2017,16:999-1007.
 - 25 Chiefari E,Mirabelli M,La Vignera S,et al.Insulin resistance and cancer:In search for a causal link[J].Int J Mol Sci,2021,22:11137.
 - 26 Rodríguez-Berriguete G,Sánchez-Espiridión B,Cansino JR,et al.Clinical significance of both tumor and stromal expression of components of the IL-1 and TNF- α signaling pathways in prostate cancer[J].Cytokine,2013,64:555-563.
 - 27 Kaleem S,Siddiqui S,Siddiqui HH,et al.Eupalitin induces apoptosis in prostate carcinoma cells through ROS generation and increase of caspase-3 activity[J].Cell Biol Int,2016,40:196-203.
 - 28 Zhang J,Song N,Zang D,et al.c-Myc promotes tumor proliferation and anti-apoptosis by repressing p21 in rhabdomyosarcomas[J].Mol Med Rep,2017,16:4089-4094.
 - 29 Karnak D,Xu L.Chemosensitization of prostate cancer by modulating Bcl-2 family proteins[J].Curr Drug Targets,2010,11:699-707.
 - 30 Zhou J,Chen H,Wu Y,et al.Plasma IL-6 and TNF- α levels correlate significantly with grading changes in localized prostate cancer[J].Prostate,2022,82:531-539.

收稿日期: 2023-10-23 接受日期:

基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合基础[2023]YB241); 贵州省“百”层次创新型人才培养项目(黔科合平台人才-GCC[2022]034-1); 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2022]一般194); 贵州理工学院高

层次人才科研启动经费项目（XJGC20190659）

*通信作者 Tel: 13595032564; E-mail: luo_heng@gmc.edu.cn