

基于网络药理学和分子对接的半枝莲黄酮类成分 治疗肝细胞癌的机制研究*

刘小妹, 窦锦明

(潍坊市中医院 制剂科, 山东 潍坊 261041)

摘要: **目的** 网络药理学方法探究半枝莲黄酮类成分治疗肝细胞癌的作用机制及分子对接技术验证。**方法** 通过 TCMSP、SwissTargetPrediction、OMIM、BioGPS 等数据库筛选黄酮类成分、肝特异性靶点; 构建肝特异性靶点蛋白互作网络、筛选核心模块和基因; 进行肝特异性靶点生物通路富集分析; 将黄酮类成分和核心蛋白靶点在 SwissDock 平台进行分子对接。**结果** 黄酮类成分 36 个, 肝特异性靶点 135 个, 核心基因 4 个; 关键生物通路均与肝细胞癌的增殖抑制相关。黄酮成分与核心靶点有较强的结合活性。**结论** 半枝莲黄酮类成分抗肿瘤作用可能是通过多成分-多靶点阻滞肝癌细胞的有丝分裂 G1/S 细胞周期, 抑制肝细胞癌增殖。

关键词: 网络药理学; 分子对接; 半枝莲; 黄酮; 肝细胞癌; 增殖抑制

中图分类号: R285

Mechanism study on the treatment of hepatocellular carcinoma with flavonoids from Scutellaria barbata D. Don based on network pharmacology and molecular docking*

LIU Xiaomei, DOU Jinming

(Preparation Department, Weifang Traditional Chinese Medicine Hospital, Weifang, Shandong 261041, China)

Abstract: **[Objective]** To explore the mechanism of action and molecular docking technology validation of flavonoids from Scutellaria barbata D. Don in the treatment of hepatocellular carcinoma using network pharmacology methods. **[Methods]** Flavonoids and liver specific targets were screened through databases such as TCMSP, SwissTargetPrediction, OMIM, and BioGPS. A liver specific target protein interaction network was constructed, and core modules and genes were screened. Enrichment analysis of liver specific target biological pathways was conducted. Molecular docking of flavonoids and core protein targets was performed on the SwissDock platform. **[Results]** There were 36 flavonoid components, 135 liver specific targets, and 4 core genes. Key biological pathways are all associated with the proliferation inhibition of hepatocellular carcinoma. Flavonoids have strong binding activity with core targets. **[Conclusion]** The anti-tumor effect of flavonoids from Scutellaria barbata D. Don may be achieved by blocking the G1/S cell cycle of liver cancer cells through multiple components and targets, thereby inhibiting the proliferation of liver cancer cells.

Keywords: network pharmacology; molecular docking; Scutellaria barbata D. Don; flavonoids; hepatocellular carcinoma; proliferation inhibition

肝细胞癌是癌症死亡的第三大原因^[1]。我国发病率高和人口数量大, 已成为世界上肝细胞癌患者最多的国家^[2]。虽然肝细胞癌可以通过多种

途径治疗, 但治疗效果仍不理想。半枝莲为唇形科半枝莲 (Scutellaria barbata D. Don) 的干燥全草。具有清热解毒, 化瘀利尿功效。主要含有黄酮类、

收稿日期: 2024-03-27

* 基金项目: 山东省中医药科技项目 (2021M094); 潍坊市中医药科研项目 (2021-4-062、2022-3-001、2023-2-003)

[通信作者] 窦锦明, E-mail: doujinming83@163.com

术^[7]从分子空间结构角度对黄酮类成分与核心蛋白靶点进行验证, 以期为后续实验研究提供参考。

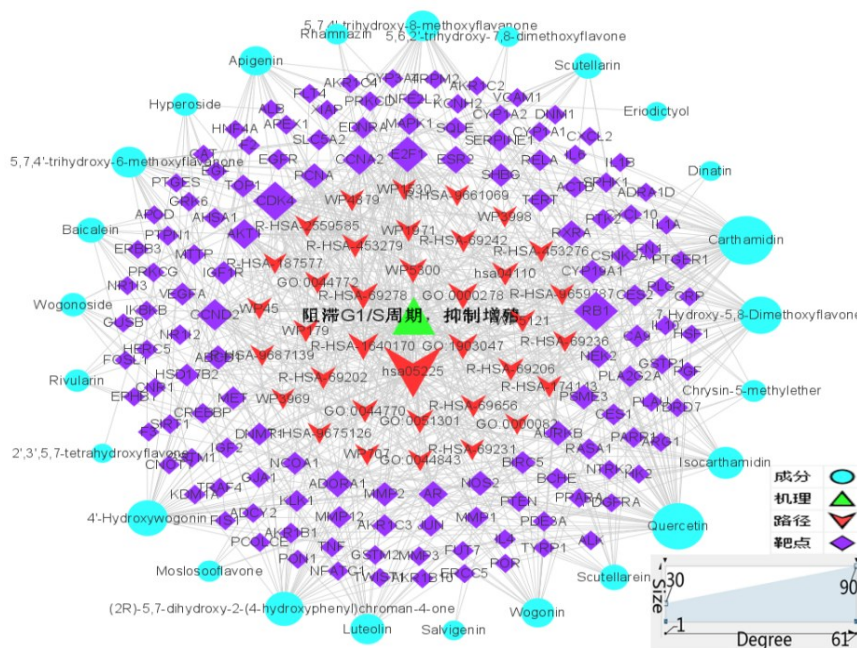


图 1 半枝莲黄酮类多成分-多靶点增殖抑制机制

1.3 构建蛋白-蛋白互作网络

将肝特异性靶点输入 STRING 数据库构建蛋白-蛋白作用网络, Cytoscape 软件可视化网络并进行拓扑学分析, Kmeans 法聚类分析, MCODE 法提取核心模块。

1.4 富集分析生物路径

将肝特异性靶点输入 Metascape 平台，从 GOBP、KEGG、Reactome、WikiPathways 数据库进行生物路径富集分析。

1.5 筛选核心基因

在蛋白互作网络中, 选用 Cytohubba 插件功能 MCC、MNC、Degree、EPC、Radiality、Closeness 算法, 获得 Hub 基因。Hub 基因、Cluster3 核心基因和 MCODE 核心基因取交集为核心基因。

1.6 分子对接

从 PDB 和 PubChem 数据库获取核心靶点蛋白质的结构和黄酮成分的 3D 结构，利用 PyMOL 和 OpenBabel 软件处理，通过 SwissDock 在线分子对接，热图显示最低结合能及 Chimera 可视化结合位点。

2 结果

2.1 筛选黄酮类成分

本研究通过 TCMSP 等数据库获得半枝莲黄酮类成分 36 个，分别为 7-Hydroxy-5, 8-Dimethoxyflavone、Isocarthamidin、(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one、5, 7, 4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone、5, 7, 4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone、Carthamidin、Baicalein、Baicalin、Chrysin-5-methylether、Dinatin、Eriodictyol、Luteolin、Moslosooflavone、Quercetin、Rhamnazin、Rivularin、Salvigenin、Scutellarein、Scutellarin、Scutevulin、Wogonin、2',3',5,7-tetrahydroxyflavone、5, 6, 2'-trihydroxy-7, 8-dimethoxyflavone、Apigenin、Hyperoside、5,7,2',3'-Tetrahydroxyflavone、5,7,2'-Trihydroxyflavone、Wogonoside、2',4'-Dihydroxy-2,3',6'-Trimethoxychalcone、4'-Hydroxywogonin、5,7,3',4',5-Pentamethoxyflavone、5-Hydroxy-7,4'-Dimethoxyflavone、5-Hydroxy-7,8,4'-Trimethoxyflavone、5-Hydroxy-7,3',4',5'-Tetramethoxyflavone、Alpinetin、Scullcapflavone。

2.2 筛选肝特异性靶点

从 SwissTargetPrediction 等数据库获得黄酮类成分预测靶点 533 个。从 OMIM 等数据库检索肝细胞癌的疾病预测靶点 12 004 个。成分预测靶点与疾病预测靶点取交集，半枝莲黄酮成分的潜在肝细胞癌作用靶点 328 个。从 BioGPS 等数据库肝脏作用靶点 7 474 个。将潜在肝细胞癌作用靶点与肝脏作用靶点取交集，得到半枝莲黄酮成分的肝特异性靶点 135 个（图 2）。

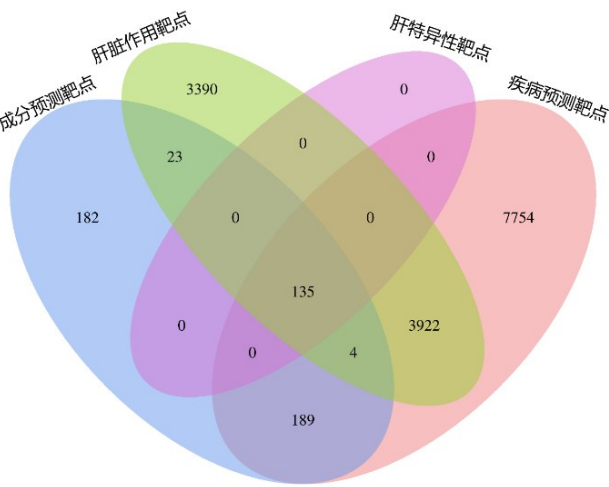


图 2 半枝莲黄酮成分筛选肝特异性靶点图

2.3 构建蛋白-蛋白互作网络

肝特异性靶点蛋白互作网络拓扑学分析结果：节点数：135，边数：1 488，平均节点度：22，平均局部聚类系数：0.639， $P<1.0e^{-16}$ （图 3）。

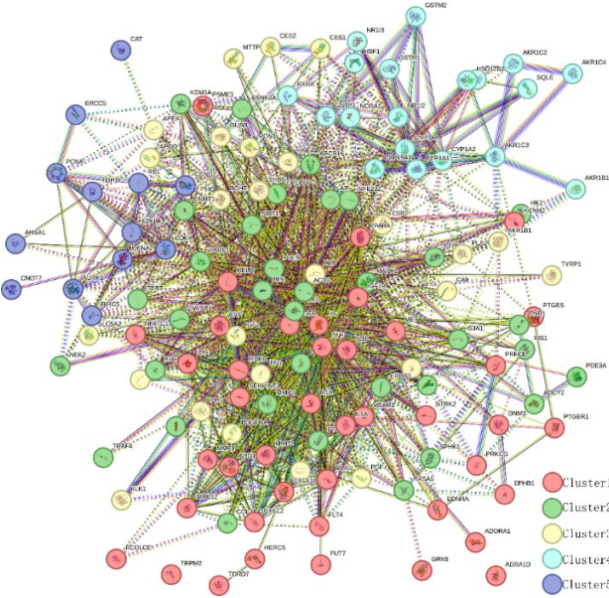


图 3 半枝莲黄酮成分肝特异性靶点蛋白互作网络及 Kmeans 聚类图

采用 Kmeans cluster 法聚类分析将整个肝脏特异性靶点蛋白互作网络分为 5 组 Cluster（图 3）。Cluster3 包含 ABCB1、ACTB、ADCY2、AKT1、AR、CNR1、COL18A1、CREBBP、CSNK2A1、DNMT1、EGF、ERBB3、FIS1、FOSL1、GJA1、HK2、JUN、KDM1A、MAPK1、MMP2、NEK2、NFE2L2、NOS2、PARP1、PDE3A、PTEN、PTK2、PTPN1、RASA1、SIRT1、SPHK1、TERT、TRAF4、TWIST1、XIAP，经 Metascape 分析这些基因的生物学通路主要是癌症发病、血管内皮生长、细胞增殖、生长因子反应、细胞周期调控。其中含 8 个 Hub 基因 AKT1、JUN、ACTB、PTEN、SIRT1、PARP1、EGF、MAPK1。因此，Cluster3 是半枝莲黄酮类成分肝脏特异性靶点蛋白互作网络的核心 Cluster。

采用 MCODE 法提取整个肝特异性靶点蛋白互作网络的核心模块 3 个（图 4），MCODE1、MCODE2、MCODE3 所含基因分别经 Metascape 分析，生物学通路主要与细胞凋亡、生长因子反应、细胞周期调控、程序性死亡相关。Cluster 3 所含 8 个 Hub 基因包含 MCODE1 中心基因 AKT1（边数：9）、JUN（边数：11）；包含 MCODE2 中心基

因 MAPK1（边数：13）；包含 MCODE3 中心基因 PARP1（边数：7）。因此，MCODE1、MCODE2、MCODE3 是半枝莲黄酮类成分肝脏特异性靶点蛋白互作网络 Cluster3 的核心模块。

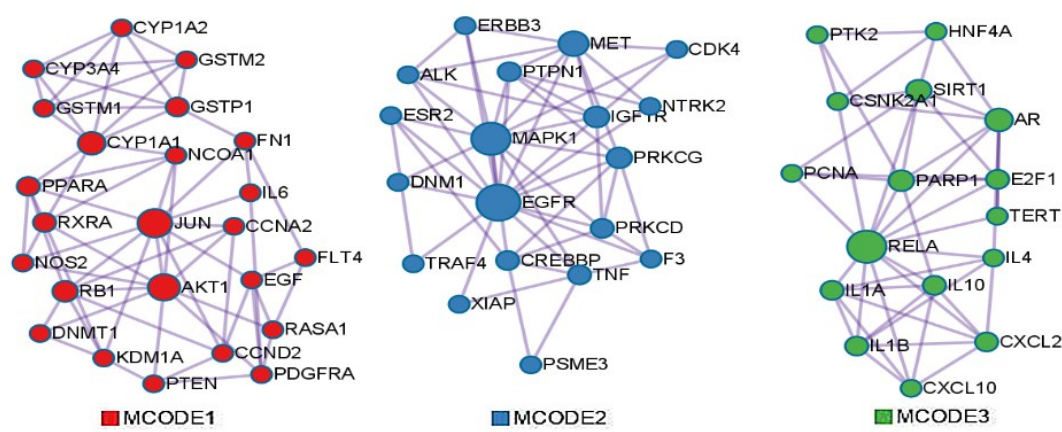


图 4 半枝莲黄酮成分肝特异性靶点蛋白互作网络 MCODE 核心模块

2.4 富集分析生物路径

从 Metascape 平台富集得肝特异性靶点生物路径均与肝细胞癌的增殖抑制相关（图 5），主要影响 cell cycle、mitotic cell cycle、cell division、cell cycle G1/S phase transition、G1/S transition of mitotic

cell cycle、oncogene induced senescence、APC/C-mediated degradation of cell cycle proteins、sphingolipid metabolism in senescence、DNA damage response，通过抑制各种 mRNA 和蛋白质的合成，进而影响 DNA 的复制，抑制肝细胞癌增殖。

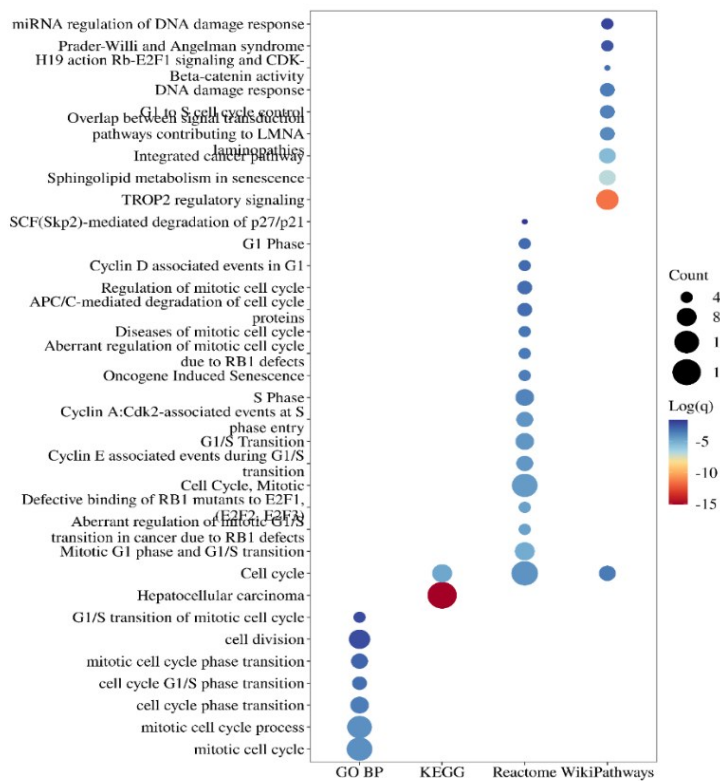


图 5 半枝莲黄酮成分肝特异性靶点生物路径富集分析图

2.5 筛选核心基因

运用 CytosHubba 插件，选用 MCC、MNC、Degree、EPC、Radiality、Closeness 算法，获得 Hub 基因 10 个 AKT1、JUN、ACTB、PTEN、SIRT1、PARP1、TNF、EGFR、EGF、MAPK1。

Cluster 3 基因、MCODE1/2/3 中心基因及 Hub 基因取交集（图 6），AKT1、JUN、MAPK1、PARP1 构成了半枝莲黄酮类成分肝特异性靶点蛋白互作网络的核心基因。

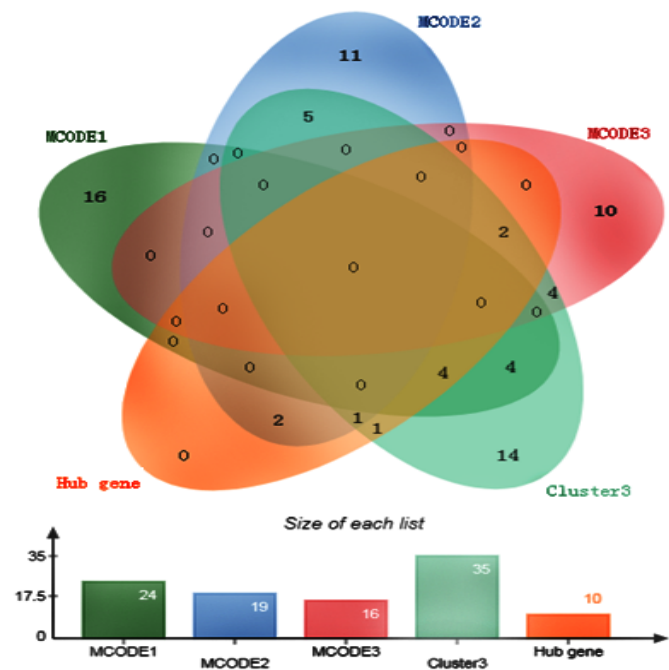


图 6 Hub 基因、MCODE 核心网络和 Kmeans 聚类三者关系分析

2.6 分子对接

分子对接是预测分子与蛋白结合模式和亲和力的一种方法。结合能量为负值，结合能小说明两者发生构象稳定作用的可能性越大，结合能

<-7 kcal/mol 时表示结合活性较强。分子对接试验结果显示（图 7、图 8），半枝莲黄酮类化合物与核心靶点有很强的结合活性。

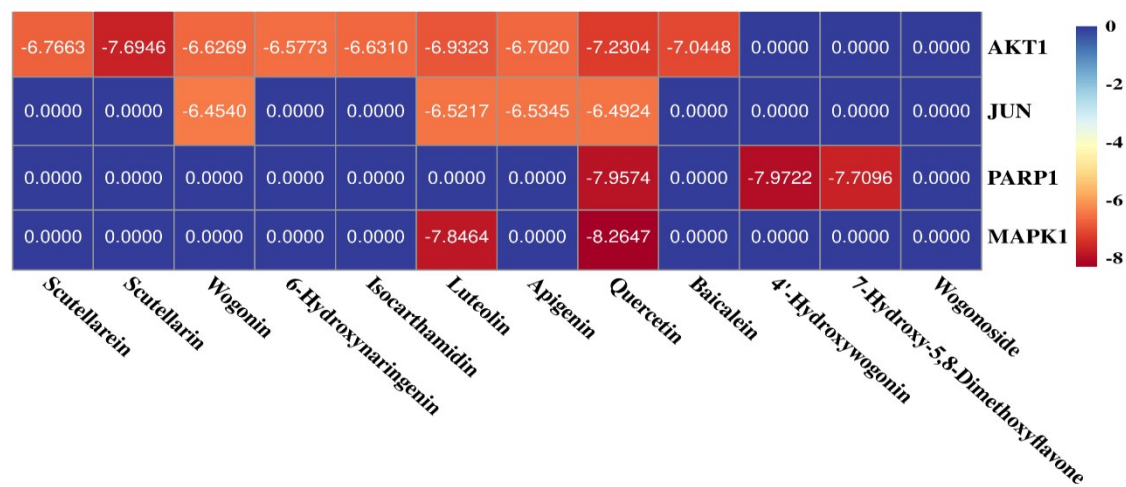


图 7 半枝莲黄酮成分与核心靶点结合能热图

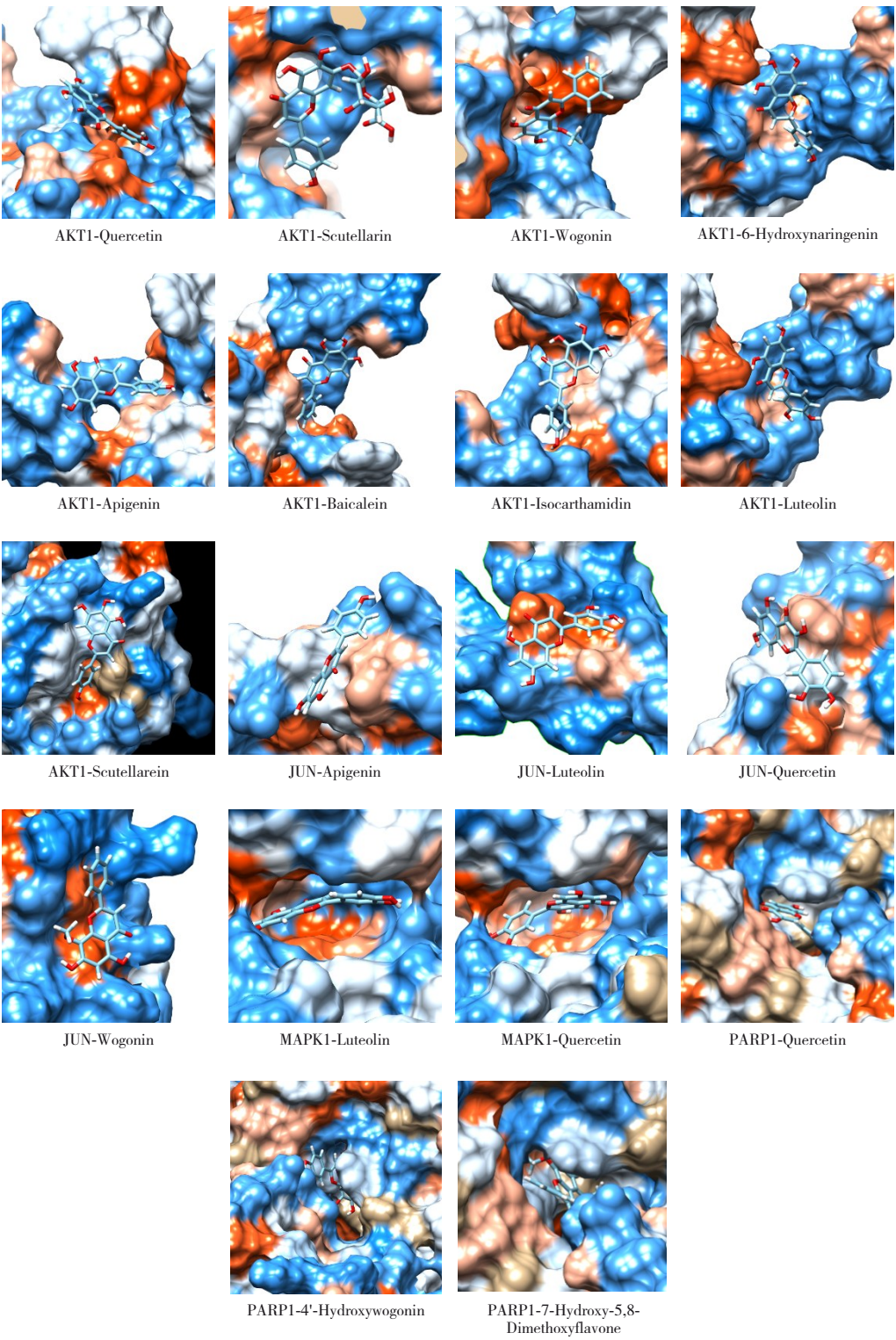


图 8 半枝莲黄酮成分与核心靶点结合位点

3 讨论

本研究对半枝莲的抗肿瘤黄酮类化学成分筛选、靶点预测、路径富集、分子对接验证，半枝莲的抗肿瘤黄酮类成分为 Scutellarein、

Scutellarin、Wogonin、6-Hydroxynaringenin、Isocarhamidin、Luteolin、Apigenin、Quercetin、Baicalein、Hyperoside、4'-Hydroxywogonin、7-Hydroxy-5,8-Dimethoxyflavone、Wogonoside。相关文献报道，半枝莲抗肿瘤黄酮类

成分能激活多条生物学通路进而抑制肝癌细胞增殖并促进凋亡。Scutellarein (野黄芩素) 诱导 FAS/FASL 信号通路, 进而激活 Hep3B 肝癌细胞的外源性凋亡和阻滞 G2/M 细胞周期^[8]。Scutellarin (野黄芩苷) 通过下调 JAK2/STAT3 通路抑制肝癌细胞增殖和侵袭^[9]。Wogonin (汉黄芩素) 通过激活 Hippo 信号传导诱导肝癌细胞周期阻滞和凋亡^[10]。Luteolin (木犀草素) 直接作用于肿瘤细胞, 抑制其生长, 诱导细胞凋亡并减少肿瘤组织血管生成^[11]。Apigenin (芹菜素) 通过下调 YAP, 调节肝细胞癌细胞的迁移、侵袭和自噬^[12]。Quercetin (槲皮素) 通过调节自噬和巨噬细胞极化抑制肝癌^[13]。Baicalein (黄芩素) 通过调节 HDAC10 促进黄芩素对肝细胞癌细胞的治疗作用^[14]。Hyperoside (金丝桃苷) 抑制人 BMP-7 依赖性 PI3K/AKT 通路活性, 进而抑制肝癌细胞增殖^[15]。Wogonoside (汉黄芩苷) 通过调节 Bax/Bcl-2 通路活性诱导 Bel-7402 肝细胞癌凋亡^[16]。

本研究对半枝莲黄酮类成分肝特异性靶点蛋白互作网络、筛选核心基因及生物通路分析, 可能的抗肿瘤核心靶点为 AKT1、JUN、PARP1、MAPK1。查阅相关文献, 半枝莲黄酮类成分抗肿瘤核心靶点能够抑制肝癌细胞增殖并促进凋亡。扶正解毒消积方靶向激活 AKT/CyclinD1/p21/p27 通路活性, 抑制肝癌细胞增殖^[17]。JUN 参与调控肝癌细胞增殖、迁移、凋亡等多种功能^[18]。PARP1 通过阻断 ALC1 向 DSB 位点的募集来抑制 DNA 损伤位点核小体的清除, 从而抑制 RPA2 和 RAD51 的募集, 促进肝细胞癌凋亡^[19]。人参皂苷 Rh2 可通过激活 MAPK 通路来抑制肝癌 Hep G2 细胞的迁移^[20]。

分子对接显示黄酮类成分和核心靶点间的结合稳定, 并预测结合模式。相关研究显示 AKT1 能与野黄芩等多种黄酮相互作用抑制肿瘤。野黄芩苷直接与 AKT1/2 蛋白结合, 并抑制 AKT1/2 的活性, 抑制食管鳞状细胞增生^[21]。汉黄芩素抑制细胞中 Akt 活性且降低 Ser 473 残基的磷酸化, 激活 Bax 和 Bcl-2 相关内在凋亡途径, 促进骨髓瘤细胞凋亡^[22]。木犀草素通过 PI3K/AKT 途径抑制 MMP-2, 9 表达, 进而在体内、外抑制人黑色素瘤细胞增殖和诱导细胞凋亡^[23]。芹菜素通过磷脂酰肌醇激酶-3/Akt 依赖性途径介导 HER2/neu 过表达乳腺癌细胞中 HER2/neu 的蛋白酶体降解, 进而诱导细胞凋亡^[24]。槲皮素通过 Akt1 相关的

CXCL12/CXCR4 途径抑制前列腺癌的增殖^[25]。黄芩素以剂量相关的方式下调 LncRNA, 进而激活 PI3K/Akt 途径介导的宫颈癌凋亡作用^[26]。相关研究显示 JUN 能与木犀草素等多种黄酮相互作用抑制肿瘤。木犀草素增强 HL-60 白血病细胞中组蛋白 H3 乙酰化和 c-Jun 活化来刺激 Fas/FasL 介导的细胞凋亡^[27]。芹菜素通过 JUN 通路诱导细胞周期 G2/M 阻滞来抑制不同癌症细胞系的增殖^[28]。相关研究显示 PARP1 能与槲皮素等多种黄酮相互作用抑制肿瘤生长。槲皮素激活了 PARP-1 促凋亡信号, 诱导人白血病 HL-60 细胞 G0/G1 期阻滞和细胞凋亡^[29]。

综上所述, 半枝莲黄酮类成分抗肿瘤作用可能是通过多成分-多靶点相互作用, 阻滞肝癌细胞的有丝分裂 G1/S 细胞周期, 抑制肝细胞癌增殖。

参 考 文 献

- [1] 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(3): 209-249.
- [2] 赵庆江, 田大广. 肝细胞癌临床诊疗的研究进展[J]. 中国社区医师, 2023, 39(11): 11-13, 21.
- [3] 汪茂林. 半枝莲化学成分及其抗肿瘤作用机制初探[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [4] 金顺琪, 张露蓉. 半枝莲药理效应及临床应用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(8): 194-198.
- [5] 刘新杨, 商亚珍. 半枝莲提取黄酮类化合物药理学研究进展[J]. 承德医学院学报, 2021, 38(5): 421-426.
- [6] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021, 16(4): 527-532.
- [7] 任洁, 魏静. 分子对接技术在中药研究中的应用[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(1): 123-125.
- [8] SANG EUN H, SEONG MIN K, JEONG LH, et al. Scutellarein induces fas-mediated extrinsic apoptosis and G2/M cell cycle arrest in Hep3B hepatocellular carcinoma cells[J]. Nutrients, 2019, 11(2): 263.
- [9] LIU K, TIAN T, ZHENG Y, et al. Scutellarin inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of JAK2/STAT3 pathway[J]. J Cellular Molecular Medi, 2019, 23(4): 3040-3044.
- [10] WU KY, TENG M, ZHOU W, et al. Wogonin induces cell cycle arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by activating hippo signaling[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2022, 22(8): 1551-1560.
- [11] HAN YQ, XIAO YF, YU L, et al. Advances in the mechanism of luteolin against hepatocellular carcinoma based on bioinformatics and network pharmacology[J]. J Cancer, 2023, 14(6): 966-980.
- [12] ZENG J, XIE H, ZHANG ZL, et al. Apigenin regulates the

- migration, invasion, and autophagy of hepatocellular carcinoma cells by downregulating YAP[J]. *Neoplasma*, 2022, 69(2): 292-302.
- [13] WU RX, ZHOU T, XIONG JQ, et al. Quercetin, the ingredient of Xihuang pills, inhibits hepatocellular carcinoma by regulating autophagy and macrophage polarization[J]. *Front Biosci*, 2022, 27(12): 323.
- [14] QI JN, LI J, BIE BB, et al. MiR-3, 178 contributes to the therapeutic action of baicalein against hepatocellular carcinoma cells via modulating HDAC10[J]. *Phytother Res*, 2023, 37(1): 295-309.
- [15] WEI S, SUN Y, WANG L, et al. Hyperoside suppresses BMP-7-dependent PI3K/AKT pathway in human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(15): 1233.
- [16] LI YS, TU M, CHENG C, et al. Wogonoside induces apoptosis in Bel-7402, a hepatocellular carcinoma cell line, by regulating Bax/Bcl-2[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1831-1835.
- [17] YANG X, FENG Y, LIU Y, et al. Fuzheng Jiedu Xiaoji formulation inhibits hepatocellular carcinoma progression in patients by targeting the AKT/CyclinD1/p21/p27 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153575.
- [18] 范潇龙, 侯秋霞, 罗桃红, 等. Jun 转录因子家族与肝细胞癌的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(5): 49-52.
- [19] WANG C, TANG HY, GENG AK, et al. Rational combination therapy for hepatocellular carcinoma with PARP1 and DNA-PK inhibitors[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(42): 26356-26365.
- [20] 冯子强, 左国伟, 石庆强, 等. 人参皂苷 Rh2 抑制肝癌 HepG2 细胞迁移的实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2015, 31(1): 61-65.
- [21] LIU FF, ZU XY, XIE XM, et al. Scutellarin suppresses patient-derived xenograft tumor growth by directly targeting AKT in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Cancer Prev Res*, 2019, 12(12): 849-860.
- [22] ZHANG M, LIU LP, CHEN YL, et al. Wogonin induces apoptosis in RPMI 8226, a human myeloma cell line, by downregulating phospho-Akt and overexpressing Bax[J]. *Life Sci*, 2013, 92(1): 55-62.
- [23] YAO X, JIANG W, YU DH, et al. Luteolin inhibits proliferation and induces apoptosis of human melanoma cells *in vivo* and *in vitro* by suppressing MMP-2 and MMP-9 through the PI3K/AKT pathway[J]. *Food Funct*, 2019, 10(2): 703-712.
- [24] WAY TD, KAO MC, LIN JK. Apigenin induces apoptosis through proteasomal degradation of HER2/neu in HER2/neu-overexpressing breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(6): 4479-4489.
- [25] NING Y, WU YR, ZHOU Q, et al. The effect of quercetin in the yishen Tongluo Jiedu recipe on the development of prostate cancer through the Akt1-related CXCL12/CXCR4 pathway[J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2024, 27(6): 863-876.
- [26] YU XL, YANG YC, LI Y, et al. Baicalein inhibits cervical cancer progression via downregulating long noncoding RNA BDLNR and its downstream PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018, 94: 107-118.
- [27] WANG SW, CHEN YR, CHOW JM, et al. Stimulation of Fas/FasL-mediated apoptosis by luteolin through enhancement of histone H3 acetylation and c-Jun activation in HL-60 leukemia cells[J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(7): 866-877.
- [28] HNIT SST, YAO M, XIE CL, et al. Apigenin impedes cell cycle progression at G₂ phase in prostate cancer cells[J]. *Discov Oncol*, 2022, 13(1): 44.
- [29] CHANG JL, CHOW JM, CHANG JH, et al. Quercetin simultaneously induces G₀/G₁-phase arrest and caspase-mediated crosstalk between apoptosis and autophagy in human leukemia HL-60 cells[J]. *Environ Toxicol*, 2017, 32(7): 1857-1868.
- (张咏 编辑)