

网络出版时间:2025-11-24 13:46:28 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251202.1333.014

基于网络药理学、转录组学和实验验证探讨 苍耳亭抑制喉鳞状细胞癌细胞增殖的作用机制

马自创¹, 苏丹², 王春³, 吴娜⁴, 王海坤^{1,4}, 沈爱宗⁵

(¹ 安徽医科大学药学科学学院, 合肥 230032; ² 中国科学技术大学附属第一医院健康管理中心, 合肥 230001; ³ 安徽医科大学药学科学学院临床药理研究所, 合肥 230032; ⁴ 安徽医科大学附属亳州医院药学部, 亳州 236800; ⁵ 中国科学技术大学附属第一医院药学部, 合肥 230001)

摘要 目的 结合网络药理学与体外实验探讨苍耳亭抑制喉鳞状细胞癌(LSCC)细胞增殖的潜在作用机制。方法 通过PharmMapper等数据库检索苍耳亭的作用靶点,经由DisGeNET等数据库获取LSCC疾病对应靶点,取交集以确定苍耳亭与LSCC的交集靶点。基于交集靶点构建蛋白互作网络并筛选核心靶点;使用R软件对交集靶点进行基因本体论(GO)生物功能及京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;基于Cytoscape 3.8.0软件绘制“苍耳亭-靶点-通路”网络图。采用分子对接及转录组学对上述结果进行初步验证。CCK-8、平板克隆实验检测苍耳亭对TU177细胞增殖能力的影响,Western blot检测PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白的表达。结果 共获得苍耳亭与LSCC交集靶点159个;筛选出AKT1等7种核心靶点;GO富集分析共得2 455个条目;KEGG富集分析共得172条通路,如PI3K-Akt信号通路等。苍耳亭与LSCC核心靶点的分子对接活性良好。转录组学结果与网络药理学预测结果吻合度较高。CCK-8与平板克隆实验表明,1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的苍耳亭对TU177细胞的增殖具有抑制作用($P < 0.05$),且呈浓度依赖性。p-PI3K与p-Akt蛋白的表达随着苍耳亭浓度的升高而下降($P < 0.01$)。结论 苍耳亭可通过调节PI3K-Akt信号通路,发挥抑制LSCC细胞增殖的作用。

关键词 网络药理学;苍耳亭;喉鳞状细胞癌;分子对接;细胞实验;PI3K-Akt信号通路;转录组学;实验验证

中图分类号 R 285

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)12-2289-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.12.012

喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma, LSCC)是最常见的头颈部恶性肿瘤之一,也是继肺癌之后,第二大常见的呼吸道恶性肿瘤^[1]。由于咽喉独特的解剖结构及丰富的黏膜下淋巴组织,LSCC易发生局部浸润并向颈部淋巴结转移^[2]。LSCC早期症状不明显,多数患者晚期时才被诊断。手术对早期LSCC有效,但对晚期患者效果有限^[3]。目前,放化疗和免疫治疗仍是LSCC主要的治疗选择,但放化疗伴随显著的不良反应且易致肿瘤复发,免疫治疗费用高昂且易耐药。因此寻找高效、低毒、稳定的治疗方案至关重要。

苍耳亭是一种天然生物活性双环倍半萜内酯,从常用的传统中药苍耳中提取获得^[4]。研究^[5]表明,苍耳亭对肿瘤细胞具有抗增殖、抗血管生成和促

凋亡作用。苍耳亭可通过CHOP、ROX/XIAP、ROS/RBL1等信号通路,介导肿瘤细胞的增殖、迁移,凋亡与自噬^[6-8]。苍耳亭在多种肿瘤中表现出潜在的抗癌活性,有望成为治疗肿瘤的有效候选药物。然而,对于苍耳亭在LSCC中的作用及分子机制的研究仍较为有限。因此,该研究通过网络药理学、转录组分析及体外细胞实验,探讨苍耳亭抑制LSCC细胞增殖的潜在靶点和机制,以为后续研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人LSCC细胞TU177从安徽医科大学基础医学院获得;苍耳亭标准品(货号:JOT-12269,成都格利普生物科技有限公司);胎牛血清、RIPA裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物、结晶紫染色液(货号:C2035、P0013B、P1045、C0121,上海碧云天生物技术有限公司);RPMI-1640培养基、青链霉素双抗、CCK-8试剂盒、预制胶(货号:KGL1503-500、KGL2303-100、KGA9306-1000、KGC4709-1,江苏凯基生物技术有限公司);蛋白上样缓冲液(货

2025-08-16 接收

基金项目:安徽省临床医学研究转化专项(编号:2023042951070 20095);亳州市重点研发计划项目(编号:bzzc2022015)

作者简介:马自创,男,硕士研究生;

王海坤,男,副主任药师,硕士生导师,通信作者,E-mail:

Haikunwang1985@outlook.com

号:G2075-10ML,武汉赛维尔生物技术有限公司);PVDF膜(货号:IPVH00010,密理博中国有限公司);ECL化学发光试剂盒(货号:180-506,上海天能生命科学有限公司);兔抗PI3K、兔抗p-PI3K、兔抗Akt、兔抗p-Akt(货号:4257S、4228S、4691S、4060S,美国Cell Signaling Technology公司);鼠抗GAPDH(货号:60004-1-Ig,武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 网络药理学分析

1.2.1 苍耳亭作用靶点的筛选 基于PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)获取苍耳亭的分子结构式,并将其导入以下数据库:PharmMapper(<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper>)、Swiss Target Prediction(<https://www.swisstargetprediction.ch>)、BATMAN-TCM(<https://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm>)、SEA(<https://sea.bk-slab.org>)、SuperPred(<https://prediction.charite.de>)和TargetNet(<https://targetnet.scbdd.com>),以获取苍耳亭的作用靶点。基于UniProtKB数据库(<https://www.uniprot.org>),物种设置为“Homo sapiens”,将获得的苍耳亭作用靶点名称规范化,并去重。

1.2.2 LSCC疾病靶点的获取 以“laryngeal squamous cell carcinoma”为检索词,检索DisGeNET(<https://www.disgenet.org>)、GeneCards(<https://www.genecards.org>)、NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)、PharmGKB(<https://www.pharmgkb.org>)、OMIM(<https://omim.org>)数据库,获取LSCC疾病靶点。将合并去重后的疾病靶点与苍耳亭作用靶点取交集,获取交集靶点,以Venn图展示。

1.2.3 蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络的构建及核心靶点的筛选 将交集靶点导入String平台(<https://www.string-db.org>),点选“Multiple proteins”,物种设为“Homo sapiens”,交互分数设为“ ≥ 0.9 ”,隐藏未连接节点,获得PPI网络对应的tsv文件。将tsv文件导入Cytoscape 3.8.0软件,运行CytoNCA插件分析Degree centrality(DC)、Closeness centrality(CC)、Betweenness centrality(BC)、Eigenvector centrality(EC)、Network centrality(NC)、Local average connectivity centrality(LAC)6个拓扑参数。对以上参数均大于各自均值的节点进行筛选,重复2次,获得核心靶点。

1.2.4 基因本体论(gene ontology, GO)生物功能及京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析 采用R

软件调用org.Hs.eg.db、enrichplot、clusterProfiler等程序包,首先将交集靶点名称统一为entrez ID,随后进行GO功能和KEGG通路富集分析。阈值设定如下: $P < 0.05$, Q (校正后的 P 值) < 0.05 。按 Q 值排序(由小到大),将GO富集分析各项前10位、KEGG富集分析前20位结果进行可视化。

1.2.5 “苍耳亭-靶点-通路”网络的建立 将苍耳亭、交集靶点、前20条KEGG通路信息导入Cytoscape 3.8.0软件,构建“苍耳亭-靶点-通路”网络。

1.2.6 分子对接验证 经由PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)获得核心靶点(“1.2.3”项)的3D结构,使用PyMol软件去除异质小分子和水分子后获得蛋白受体。经由PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)和Chem3D软件获得苍耳亭的3D结构,以最小自由能对结构进行优化后获得小分子配体。使用AutoDock Tools 1.5.6软件进行半柔性对接,对接盒子参数设定:Spacing(angstrom)为1.000,盒子应覆盖所有活性位点。使用AutoDock vina软件进行分子对接,结合能值与模型稳定性成反比。并将分子对接结果导入PyMol软件进行可视化。

1.3 细胞实验

1.3.1 细胞培养 TU177细胞用含有10%胎牛血清、1%青链霉素双抗的RPMI-1640培养基,于37℃、5%CO₂的培养箱中培养,待细胞生长密度至80%时,按照1:2或1:3比例传代。

1.3.2 CCK-8法检测细胞活力 将培养至对数生长期的TU177细胞以 4×10^3 个/孔接种于96孔板中,种板24 h后,弃去上清液,分别加入100 μL含不同浓度(0、1、2、4、8、12、16 μmol/L)苍耳亭药液的培养基,每组设6个复孔,于37℃培养箱中继续培养24、48 h,加入含10% CCK-8试剂的培养基100 μL,在37℃培养箱中孵育3 h,用酶标仪检测450 nm处各孔吸光度值。

1.3.3 平板克隆检测细胞增殖能力 将生长状态良好的TU177细胞以 1.5×10^3 个/孔均匀铺在6孔板中,培养1周后分别加入2 mL含不同浓度(0、1、2、4 μmol/L)苍耳亭药液的培养基,24 h后,弃去培养基,加入不含药液的培养基继续培养1周,在显微镜下观察细胞状态,待细胞克隆长至肉眼可见时,终止培养。吸弃培养基,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)漂洗2次,甲醇固定15 min后, PBS洗去甲醇,随后加入结晶紫染色15 min,吸弃结

晶紫,并用 PBS 清洗,晾干后拍照,计算细胞克隆数(超过 50 个细胞计为 1 个克隆)。

1.3.4 转录组分析 用含不同浓度苍耳亭(0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$)的培养基处理 TU177 细胞 24 h,每组 3 次重复。采集细胞后,委托北京百迈克生物科技有限公司进行 RNA 提取、建库及转录组测序。对获得的测序表达谱数据进行整理,使用 R 软件 limma 程序包,以 $|\text{Log}_2(\text{FC})| > 1$ 和调整后的 $P < 0.05$ 为筛选条件,筛选苍耳亭给药组和对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 苍耳亭)的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),并对 DEGs 进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析。

1.3.5 Western blot 检测 PI3K-Akt 信号通路蛋白表达水平 按“1.3.3”项中的给药方式处理细胞,给药 24 h 后收集细胞,加入适量 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,电泳后,转移至 PVDF 膜,3% BSA 室温封闭 1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt (1 : 1 000) 和 GAPDH (1 : 20 000) 一抗过夜,室温孵育山羊抗鼠、兔二抗 (1 : 2 000) 1 h, TBST 用于洗膜,最后使用 ECL 显影液显影,曝光所得蛋白条带使用 ImageJ 软件进行分析,以 GAPDH 为内参计算蛋白相对表达量。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism 9.5 软件对实验数据进行统计学分析,每个实验独立重复 3 次,统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 苍耳亭作用靶点筛选结果 各数据库获得的苍耳亭作用靶点数量如下: PharmMapper 153 个,

Swiss Target Prediction 80 个 (Probability > 0), BATMAN-TCM 40 个 (Score > 20), SEA 2 个 (MaxTc > 0.4), SuperPred 47 个 (Probability > 0.6), TargetNet 81 个 (Probability > 0)。基于 UniProtKB 数据库规范统一名称,去除重复值和非人类基因后,获得苍耳亭作用靶点 352 个。

2.1.2 苍耳亭治疗 LSCC 的交集靶点 按照“1.2.2”项检索方法,获得 LSCC 疾病靶点 2 910 个。将苍耳亭作用靶点和 LSCC 疾病靶点取交集,获得交集靶点 159 个,见图 1。

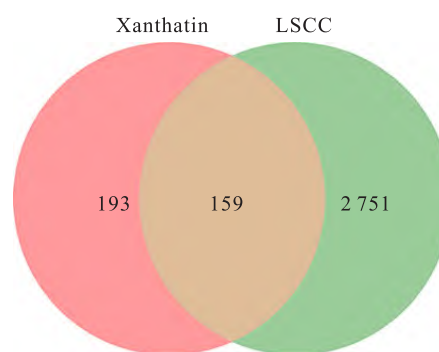


图1 苍耳亭与 LSCC 交集靶点的 Venn 图

Fig. 1 The venn diagram of intersection targets of Xanthatin and LSCC

2.1.3 PPI 网络的绘制及分析 PPI 网络共包含 271 条边和 125 个节点,按“1.2.3”项方法筛选 2 次后,获得核心靶点 7 个,分别为: AKT1、MAPK14、MAPK1、MAPK8、SRC、JUN、ESR1。它们的拓扑参数 (BC、CC、DC、EC、LAC、NC) 皆大于各自的第 2 次筛选均值 (7.25、0.56、7.00、0.18、3.33、4.40),流程见图 2。

2.1.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析结果 GO 功能富集共获取 2 455 个条目,其中生物过程 (bio-

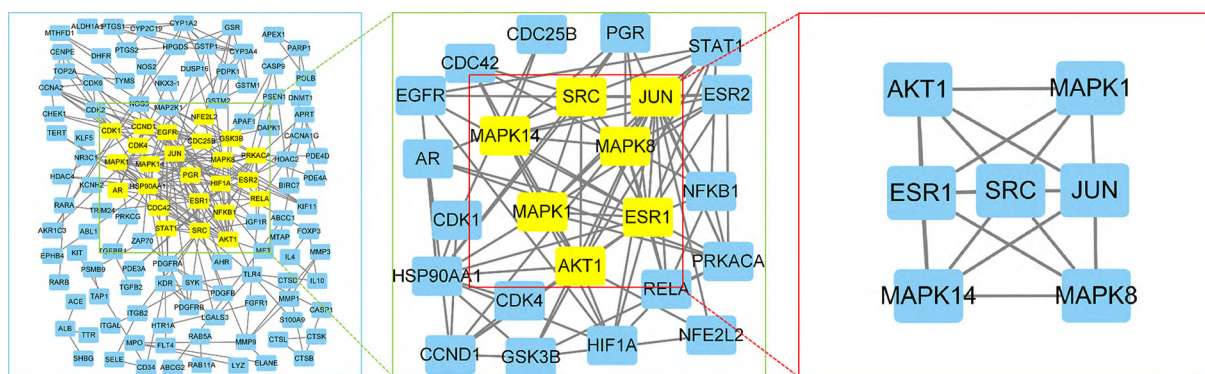


图2 苍耳亭抗 LSCC 的 PPI 网络核心靶点筛选

Fig. 2 Core targets of Xanthatin against LSCC screened by PPI network

logical processes, BP) 2 201 个, 细胞组分 (cell composition, CC) 71 个, 分子功能 (molecular functions, MF) 183 个。BP 主要涉及细菌源分子反应 (response to molecule of bacterial origin)、外源刺激反应 (response to xenobiotic stimulus) 等; CC 主要涉及囊腔 (vesicle lumen)、分泌颗粒管腔 (secretory granule lumen) 等; MF 主要涉及蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity)、核受体活性 (nuclear receptor activity) 等, 见图 3。KEGG 通路共富集到 172 个条目, 见

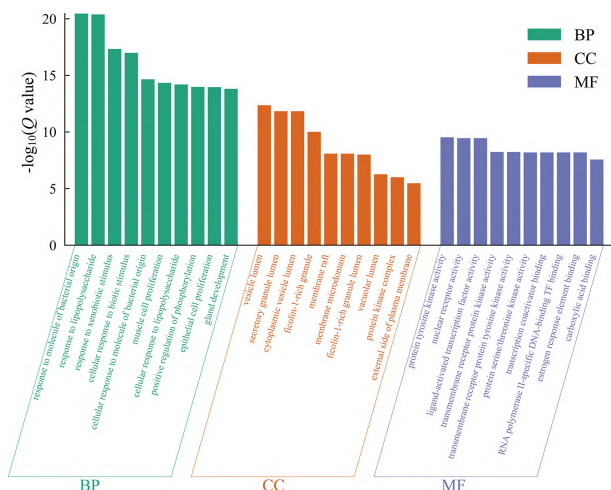


图 3 GO 功能富集分析直方图

Fig. 3 GO functional enrichment analysis histogram

图 4。排名靠前且和 LSCC 相关的通路主要包括 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、癌症相关通路 (prostate cancer、pancreatic cancer、proteoglycans in cancer) 等。

2.1.5 “药物-靶点-通路”网络的构建 “药物-靶点-通路”网络见图 5, 该网络包括 595 条边和 181 个节点, 即苍耳亭、159 个靶点与 20 条通路之间产生了 595 种直接或间接联系。网络中各节点之间联系密切, 药物、靶点和通路之间可能存在潜在的相互作用关系, 表明中药单体苍耳亭可通过多靶点、多通路作用于 LSCC。

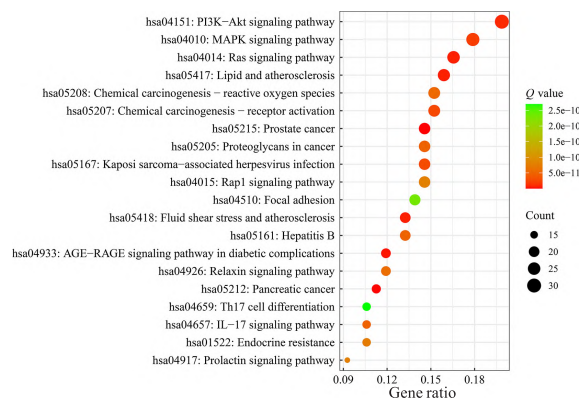


图 4 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis bubble diagram

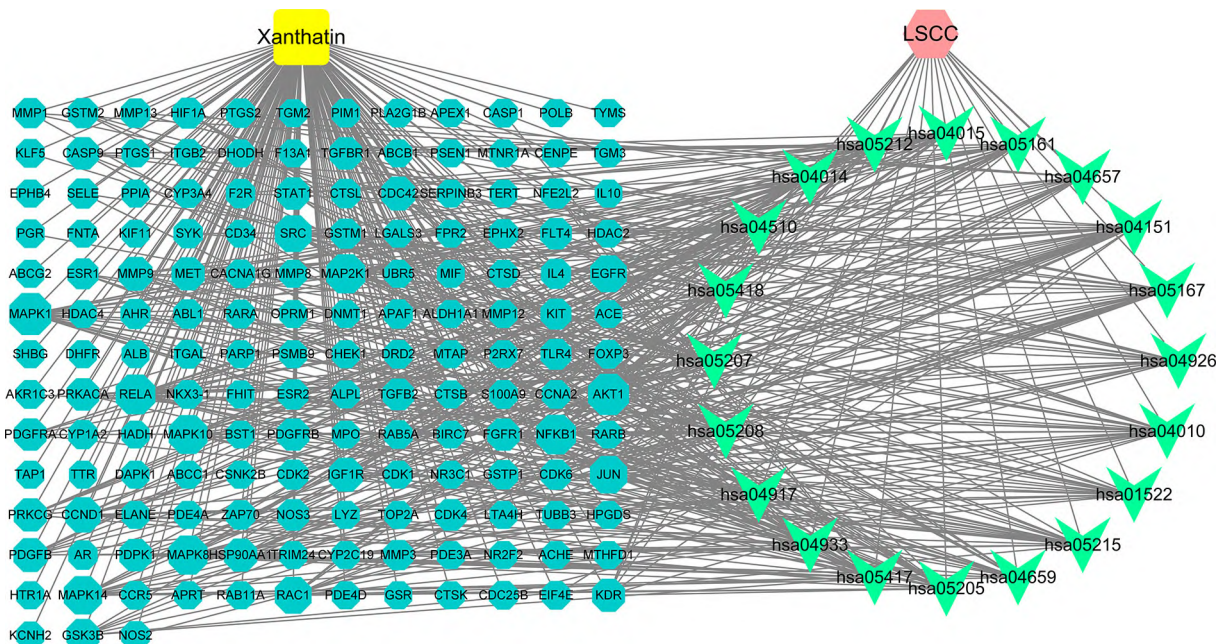


图 5 “苍耳亭-靶点-通路”网络图

Fig. 5 “Xanthatin-Target-Pathway” network

Yellow square represents Xanthatin; Pink hexagon represents the disease; Green V-shape represents the pathway; Cyan octagon represents the target; The size of the target node is positively correlated with its importance in the network.

2.1.6 分子对接结果 结合能越小,对接越稳定,苍耳亭与核心靶点的分子对接结合能均 < -5 kJ/mol,大多数 < -7 kJ/mol,表明所有组合结合活性良好,见表1。对接结果表明,苍耳亭与 LSCC 的核心靶点之间具有很强的关联性,因此,这些靶点可能是苍耳亭治疗 LSCC 的主要作用靶点。

表1 苍耳亭与核心靶点的分子对接结合能

Tab.1 Molecular docking binding energy of Xanthatin and core target

Ligands	Receptors	PDB ID	Binding energy (kJ/mol)
Xanthatin	AKT1	4GV1	-7.4
	MAPK14	6SP9	-7.8
	MAPK1	4FUX	-6.8
	MAPK8	8R5E	-7.7
	SRC	7NG7	-8.7
	JUN	5T01	-7.5
	ESR1	6VJD	-7.7

对结合能 < -7 kJ/mol 的组合进行可视化,同时标出氢键,见图6。苍耳亭可分别与 AKT1 的活性位点 ASP-274 形成氢键;与 MAPK14 的活性位点 ASP-112 形成氢键;与 MAPK8 的活性位点 LYS-55、ASN-156 形成氢键;与 SRC 的活性位点 ASP-407 形成氢键;与 JUN 的活性位点 ARG-207 形成氢键;与 ESR1 的活性位点 GLU-353 形成氢键。

2.2 细胞实验

2.2.1 CCK-8 实验结果 用不同浓度的苍耳亭(0、1、2、4、8、12、16 $\mu\text{mol/L}$) 处理 TU177 细胞 24、48 h 后,结果显示,苍耳亭可抑制 TU177 细胞的活力,且呈现浓度依赖性,见图7。24、48 h 的半数抑制浓度分别为 3.52、1.42 $\mu\text{mol/L}$,因此,本研究选择 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的苍耳亭处理 24 h 作为后续实验的干预条件。

2.2.2 平板克隆实验结果 用不同浓度的苍耳亭

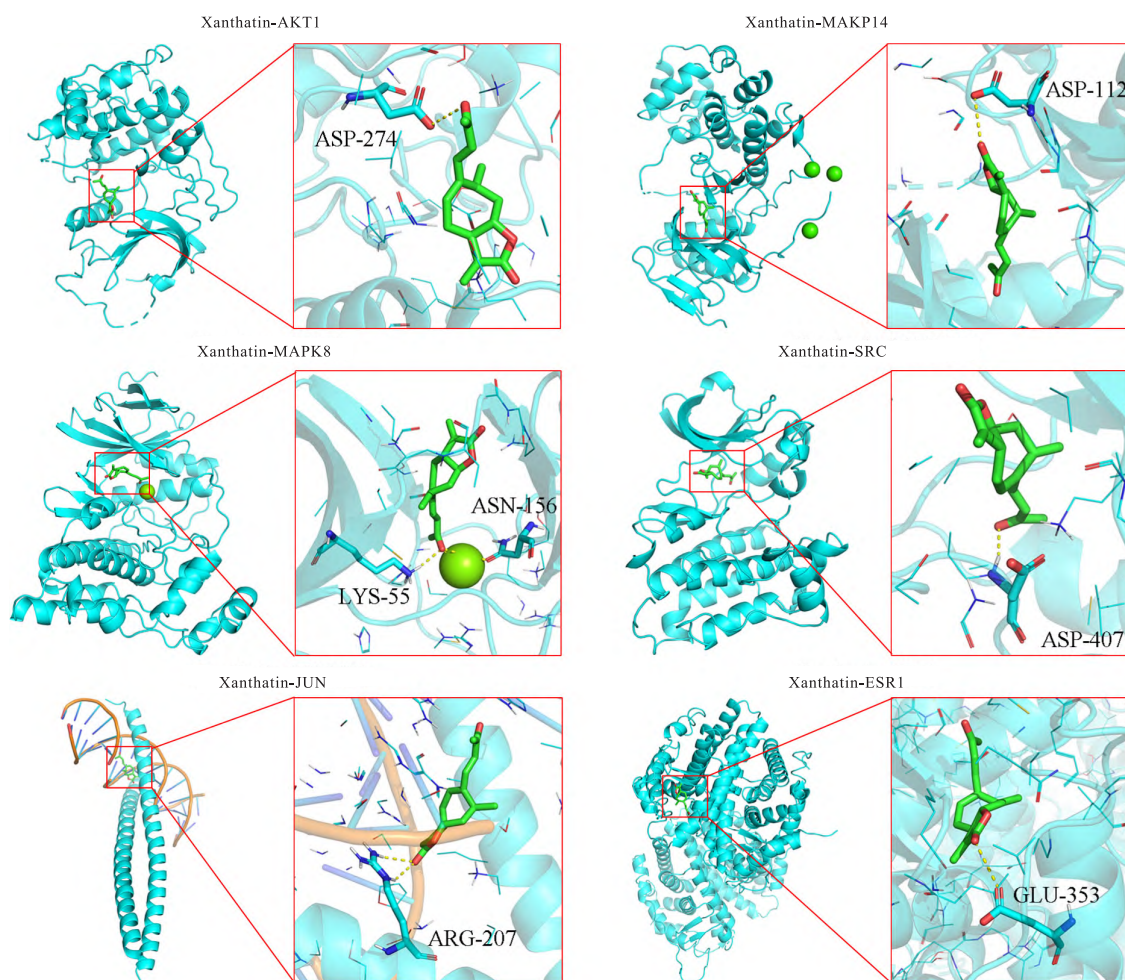


图6 苍耳亭与核心靶点分子对接构象

Fig.6 The conformation of Xanthatin docking with core target molecules

Green is Xanthatin; Cyan-blue is core target active site; Yellow dotted line is hydrogen bonding.

(0、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) 处理 TU177 细胞 24 h。结果表明,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 的苍耳亭比较,1 $\mu\text{mol/L}$ 的苍耳亭对 TU177 细胞克隆形成能力无影响,2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的苍耳亭不同程度的抑制了 TU177 细胞的克隆形成能力($P < 0.01$ 、 $P < 0.001$),且呈浓度依赖性,见图 8。提示苍耳亭能够抑制 TU177 细胞的增殖。

2.2.3 转录组分析结果 按照“1.3.4”方法,苍耳

亭 1 $\mu\text{mol/L}$ vs 对照组筛选得到 3 个 DEGs,其中上调基因 2 个,下调基因 1 个;苍耳亭 2 $\mu\text{mol/L}$ vs 对照组筛选得到 85 个 DEGs,其中上调基因 36 个,下调基因 49 个;苍耳亭 4 $\mu\text{mol/L}$ vs 对照组筛选得到 342 个 DEGs,其中上调基因 150 个,下调基因 192 个,见图 9A–9C。由此可见,随着苍耳亭给药浓度的增加,DEGs 的数量明显增加。

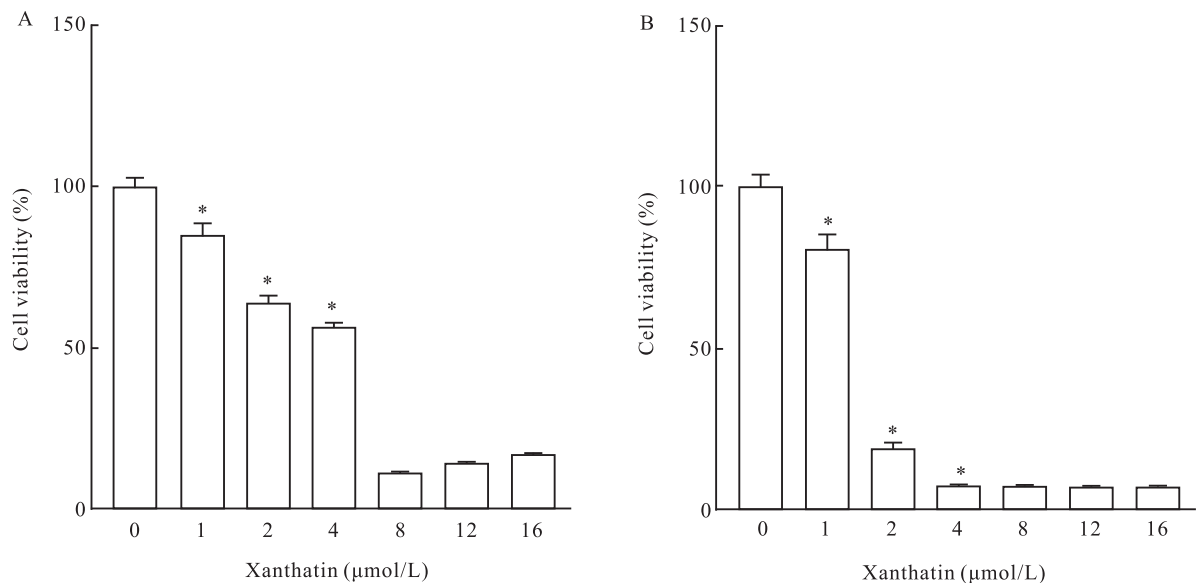


图 7 CCK-8 检测苍耳亭对 TU177 细胞的细胞毒性

Fig. 7 The cytotoxicity of Xanthatin on TU177 cells was detected by CCK-8

A: The cell viability of TU177 cells treated with Xanthatin for 24 h; B: The cell viability of TU177 cells treated with Xanthatin for 48 h; * $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Xanthatin.

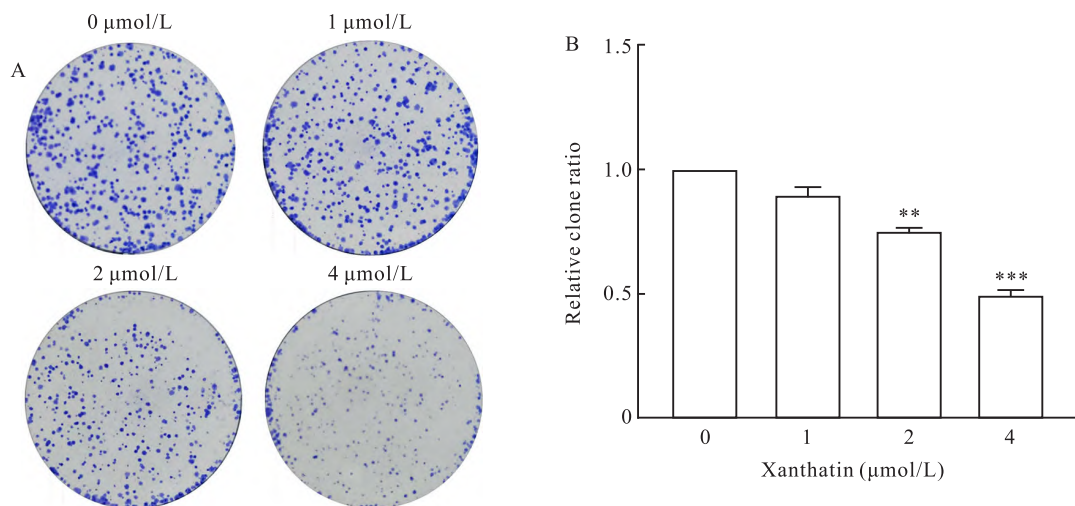


图 8 平板克隆实验检测苍耳亭对 TU177 细胞增殖能力的影响

Fig. 8 The effects of Xanthatin on the proliferation of TU177 cells were investigated by plate cloning

A: Plate clone results $\times 100$; B: Quantitative analysis of plate clone number; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Xanthatin.

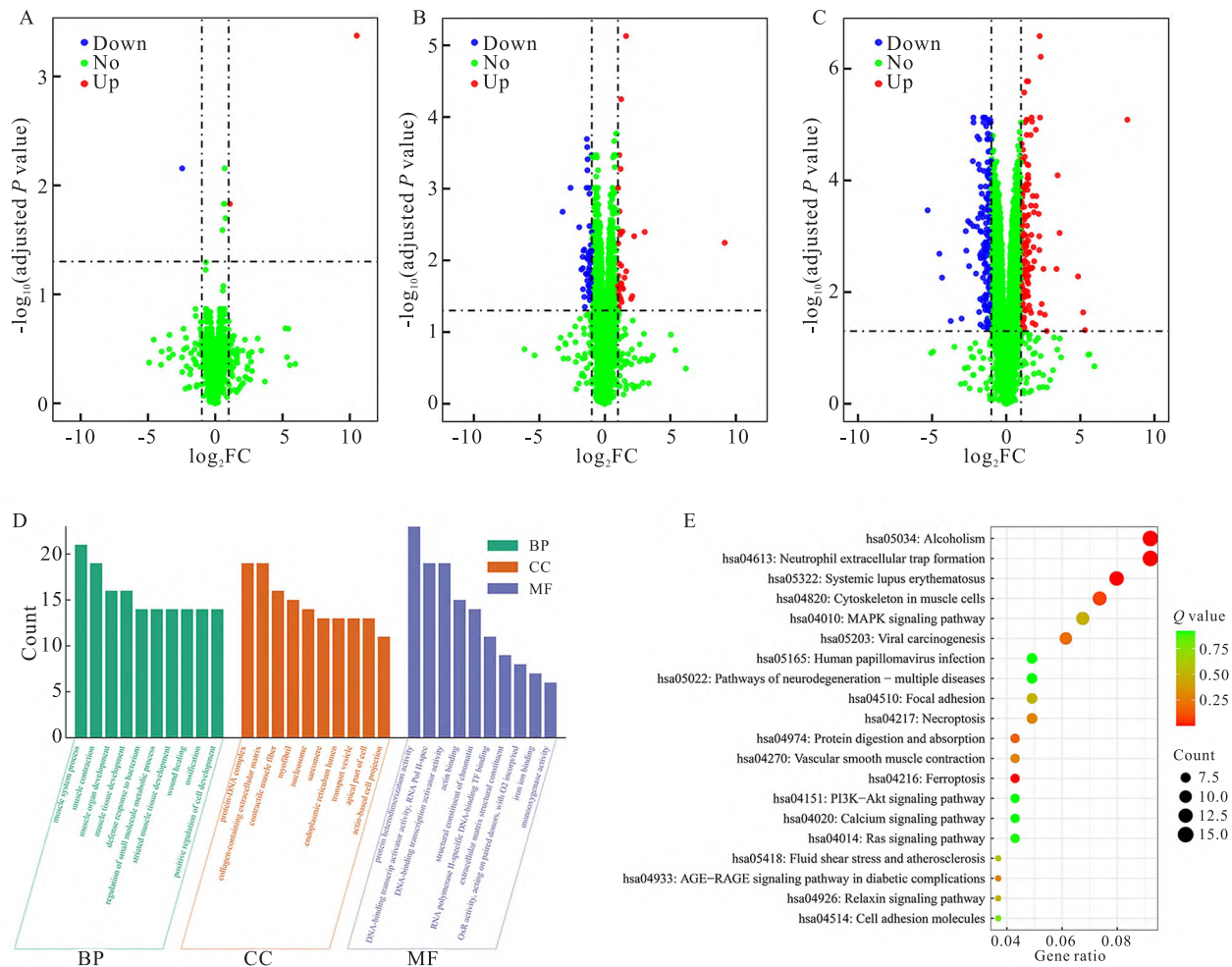


图9 苍耳亭抗 LSCC 的转录组分析

Fig.9 Transcriptome analysis of Xanthatin against LSCC

A: DEGs volcano map of Xanthatin 1 $\mu\text{mol/L}$ vs control group; B: DEGs volcano map of Xanthatin 2 $\mu\text{mol/L}$ vs control group; C: DEGs volcano map of Xanthatin 4 $\mu\text{mol/L}$ vs control group; D: GO functional enrichment analysis diagram of DEGs; E: KEGG pathway enrichment analysis diagram of DEGs.

选取苍耳亭 4 $\mu\text{mol/L}$ vs 对照组的 DEGs 进行富集分析,将 Count 值靠前的条目进行可视化。GO 功能富集结果见图 9D,与肿瘤相关的富集条目主要涉及小分子代谢过程的调节、DNA 结合转录激活、氧化还原酶活性等。KEGG 通路富集结果见图 9E, DEGs 主要富集于 MAPK 信号通路、病毒致癌作用、程序性凋亡、PI3K-Akt 等信号通路。将转录组富集分析获得的 KEGG 通路在上述网络药理学筛选出的 172 条通路对比,发现 149 条共同通路,吻合率为 86.6%,进一步证实了网络药理学预测结果的可靠性。在共同通路中,本研究选取与 LSCC 密切相关的 PI3K-Akt 信号通路进行后续的机制验证。

2.2.4 Western blot 实验结果 Western blot 分析结果表明,与 0 $\mu\text{mol/L}$ 的苍耳亭比较,2、4 $\mu\text{mol/L}$ 苍

耳亭处理后 p-PI3K 和 p-Akt 蛋白的表达下降 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),且呈现浓度依赖性。见图 10。因此,推测苍耳亭可能通过调控 PI3K-Akt 信号通路发挥抗 LSCC 的作用。

3 讨论

近年来,天然植物药逐渐成为抗肿瘤药物研发的重要资源之一。作为中医的常规治疗手段,中药因其多靶点作用、确切的疗效和较小的副作用而备受关注。苍耳子是菊科植物苍耳的干燥成熟带总苞的果实,是一味历史悠久的传统中药,具有抗炎镇痛、抗肿瘤、降血糖血脂、抑菌抗病毒等作用^[9],广泛用于鼻渊流涕、头痛风寒等疾病^[10]。苍耳亭是苍耳子中分离提取出的倍半萜内酯生物活性化合物,

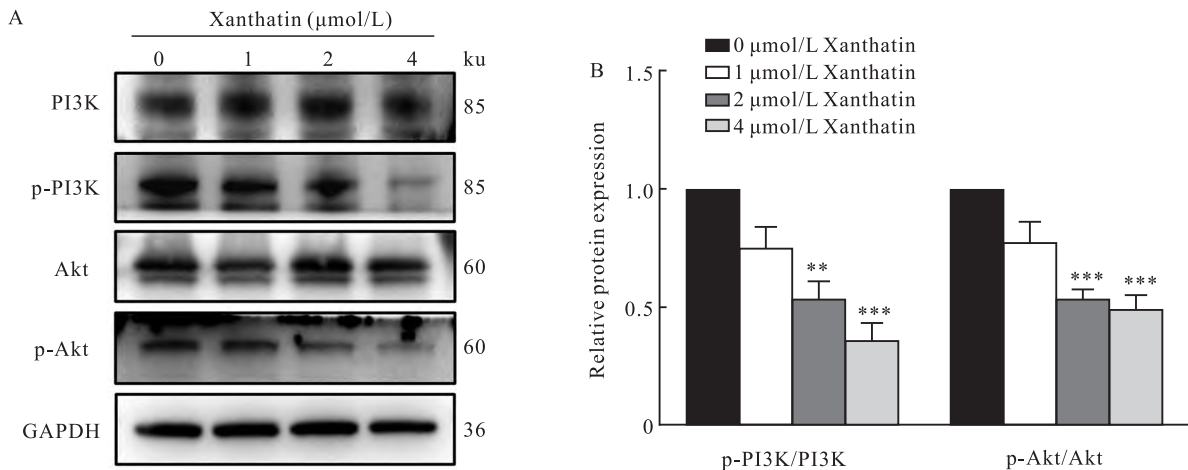


图 10 Western blot 检测苍耳亭对 TU177 细胞 PI3K-Akt 信号通路的影响

Fig. 10 The effects of Xanthatin on PI3K-Akt signaling pathway in TU177 cells was detected by Western blot analysis

A: Protein bands associated with the PI3K-Akt signaling pathway; B: Quantitative analysis of p-PI3K and p-Akt; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ Xanthatin.

是其主要的活性成分之一。现代药理学研究表明,苍耳亭可通过多种机制干预肿瘤的进展:抑制血管内皮生长因子及其相关信号因子^[11];抑制 STAT3 信号通路并增加活性氧的生成^[12];调节 Wnt/ β -catenin 信号通路,抑制 β -catenin 磷酸化^[13];通过抑制 mTOR 信号通路,影响肿瘤细胞的迁移与侵袭,同时调节能量代谢过程,从而发挥抗肿瘤作用^[14]等。结合现有证据,苍耳亭被认为是一种极具潜力的抗肿瘤活性药物。

由 PPI 网络可得, AKT1、MAPK14、MAPK8、SRC、JUN、ESR1 是苍耳亭治疗 LSCC 的核心靶点。AKT1 已被证明在 LSCC 中高度表达^[15], Zhu et al^[16]报道了骨形态发生蛋白通过激活 PI3K-Akt 信号通路促进 LSCC 中的血管生成以及 LSCC 细胞的转移; MAPK14、MAPK8 均是 MAPK 家族的成员, MAPK 信号通路中一些基因的表达,如 p38 β 、JNK2、ERK2 均与 LSCC 密切相关^[17]。Chan et al^[18]的研究阐述了 SRC 靶点能作为 PI3K-Akt/ β -catenin 级联反应枢纽,参与增强 LSCC 细胞迁移和生长过程。Almouhanna et al^[19]证实了 ESR1 相关通路参与头颈部鳞状细胞肿瘤的进展,该通路对 LSCC 的治疗可能存在一定的潜在价值。总的来说,这些靶点在 LSCC 的发展过程中发挥重要作用,调控着 LSCC 中的自噬、增殖、迁移、侵袭以及化疗耐药等关键生物过程^[20]。

KEGG 通路富集分析得到的通路包括 PI3K-Akt 通路、MAPK 信号通路以及癌症相关通路,这些通路均与 LSCC 相关。分子对接结果显示,苍耳亭与核心靶点的结合能大多数 < -7 kJ/mol,表明苍耳亭与这些靶点之间具有较强的结合力,并且分子构象稳定,初步佐证了苍耳亭能够通过多靶点发挥抗肿瘤效应。转录组分析结果进一步验证了网络药理学的预测。在细胞实验中,评估了苍耳亭对 TU177 细胞活力与增殖的影响,并对 PI3K-Akt 信号通路进行了验证,发现苍耳亭呈浓度依赖性的抑制了细胞活力与增殖,并显著降低了 PI3K、Akt 的磷酸化水平。这些结果表明,抑制 PI3K-Akt 信号通路可能是苍耳亭发挥抗 LSCC 的关键机制之一。

综上所述,苍耳亭可通过调节 PI3K-Akt 信号通路,影响 TU177 细胞的活力,发挥抑制 LSCC 细胞增殖的作用。本研究为苍耳亭在 LSCC 治疗中的应用提供了有力的支持,但相关机制的阐述仍不全面,未来的研究将重点关注苍耳亭作用的下游靶点,并结合其他生物信息学方法和体内动物实验,以更深入的揭示苍耳亭治疗 LSCC 的作用机制。

参考文献

- [1] 梁珠珠, 陈 澍, 孙倩玉, 等. TRPP2 通过 UPR/AFT6/EpCAM 信号通路调节口腔鳞状细胞癌的迁移和侵袭[J]. 安徽医科大学学报, 2024, 59(11): 2024-32, 2064. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.11.018.

- [1] Liang Z Z, Chen S, Sun Q Y, et al. TRPP2 regulates the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma through the UPR/AFT6/EpCAM signaling pathway[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(11): 2024 – 32, 2064. doi:10.19405/j.cnki.issn1000 – 1492.2024.11.018.
- [2] Gao W, Zhang C, Li W, et al. Promoter methylation-regulated miR-145-5p inhibits laryngeal squamous cell carcinoma progression by targeting FSCN1[J]. *Mol Ther*, 2019, 27(2): 365 – 79. doi:10.1016/j.ymthe.2018.09.018.
- [3] 张森, 吴先莎, 潘建瑞, 等. 长链非编码 RNA OIP5-AS1 通过 miR-216a-5p/ZEB1 轴对喉鳞状细胞癌迁移和侵袭影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2024, 31(21): 1291 – 7. doi:10.16073/j.cnki.cjcp.2024.21.02.
- [3] Zhang S, Wu X S, Pan J R, et al. Effect of long-chain non-coding RNA OIP5-AS1 on the migration and invasion of laryngeal squamous cell carcinoma through miR-216a-5p/ZEB1 axis[J]. *Chin J Cancer Prev Treat*, 2024, 31(21): 1291 – 7. doi:10.16073/j.cnki.cjcp.2024.21.02.
- [4] Xu Y, Chen Z, Lu X, et al. Targeted inhibition of STAT3 (Tyr705) by xanthatin alleviates osteoarthritis progression through the NF- κ B signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116451. doi:10.1016/j.biopha.2024.116451.
- [5] Liu R, Shi D, Zhang J, et al. Xanthatin promotes apoptosis *via* inhibiting thioredoxin reductase and eliciting oxidative stress[J]. *Mol Pharm*, 2018, 15(8): 3285 – 96. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00338.
- [6] Ma Y Y, Di Z M, Cao Q, et al. Xanthatin induces glioma cell apoptosis and inhibits tumor growth *via* activating endoplasmic reticulum stress-dependent CHOP pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(3): 404 – 14. doi:10.1038/s41401 – 019 – 0318 – 5.
- [7] Geng Y D, Zhang L, Wang G Y, et al. Xanthatin mediates G2/M cell cycle arrest, autophagy and apoptosis *via* ROS/XIAP signaling in human colon cancer cells[J]. *Nat Prod Res*, 2020, 34(18): 2616 – 20. doi:10.1080/14786419.2018.1544976.
- [8] Geng Y, Liu P, Xie Y, et al. Xanthatin suppresses pancreatic cancer cell growth *via* the ROS/RBL1 signaling pathway: *in vitro* and *in vivo* insights[J]. *Phytomedicine*, 2023, 119: 155004. doi:10.1016/j.phymed.2023.155004.
- [9] 赵娅敏, 张敏, 张沛春, 等. 苍耳子的化学成分及其生物活性研究进展[J]. *西北民族大学学报(自然科学版)*, 2024, 45(3): 10 – 22, 73. doi:10.3969/j.issn.1009 – 2102.2024.03.003.
- [9] Zhao Y M, Zhang M, Zhang P C, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of fructus xanthii[J]. *J Northwest Univ Natl Nat Sci*, 2024, 45(3): 10 – 22, 73. doi:10.3969/j.issn.1009 – 2102.2024.03.003.
- [10] 唐小杭, 陈平, 朱娴丹, 等. 苍耳子水提液中苍术苷含量测定及其肝毒性研究[J]. *中成药*, 2024, 46(12): 4180 – 7. doi:10.3969/j.issn.1001 – 1528.2024.12.046.
- [10] Tang X H, Chen P, Zhu X D, et al. Determination of atractyloside content in xanthium strumarium aqueous extract and study on its hepatotoxicity[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2024, 46(12): 4180 – 7. doi:10.3969/j.issn.1001 – 1528.2024.12.046.
- [11] Shen M, Zhou X Z, Ye L, et al. Xanthatin inhibits corneal neovascularization by inhibiting the VEGFR2-mediated STAT3/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(2): 769 – 78. doi:10.3892/ijmm.2018.3646.
- [12] Lee Y J, Choi J, Yoon Y J, et al. 8-Epi-xanthatin induces the apoptosis of DU145 prostate carcinoma cells through signal transducer and activator of transcription 3 inhibition and reactive oxygen species generation[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(3): 1508 – 20. doi:10.1002/ptr.6918.
- [13] Li W D, Wu Y, Zhang L, et al. Characterization of xanthatin: anticancer properties and mechanisms of inhibited murine melanoma *in vitro* and *in vivo*[J]. *Phytomedicine*, 2013, 20(10): 865 – 73. doi:10.1016/j.phymed.2013.03.006.
- [14] Li L, Liu P, Xie Y, et al. Xanthatin inhibits human colon cancer cells progression *via* mTOR signaling mediated energy metabolism alteration[J]. *Drug Dev Res*, 2022, 83(1): 119 – 30. doi:10.1002/ddr.21850.
- [15] Sun E C, Dong S S, Li Z J, et al. Clinicopathological significance of AKT1 and PLK1 expression in oral squamous cell carcinoma[J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 7300593. doi:10.1155/2022/7300593.
- [16] Zhu Q, Zhang X, Lu F, et al. RUNX1-BMP2 promotes vasculogenic mimicry in laryngeal squamous cell carcinoma *via* activation of the PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 22(1): 227. doi:10.1186/s12964 – 024 – 01605 – x.
- [17] Cheng Y, Chen J, Shi Y, et al. MAPK signaling pathway in oral squamous cell carcinoma: biological function and targeted therapy[J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4625. doi:10.3390/cancers14194625.
- [18] Chan X Y, Chang K P, Yang C Y, et al. Upregulation of ENAH by a PI3K/AKT/ β -catenin cascade promotes oral cancer cell migration and growth *via* an ITGB5/Src axis[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 136. doi:10.1186/s11658 – 024 – 00651 – 0.
- [19] Almouhanna F, Hess J. An ESR1-related gene signature identifies head and neck squamous cell carcinoma with imputed susceptibility to endocrine therapy[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(2): 1244. doi:10.3390/ijms25021244.
- [20] Gao W, Guo H, Niu M, et al. circPARD3 drives malignant progression and chemoresistance of laryngeal squamous cell carcinoma by inhibiting autophagy through the PRKCI-Akt-mTOR pathway[J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 166. doi:10.1186/s12943 – 020 – 01279 – 2.

Investigating the mechanism of Xanthatin in inhibiting proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma cells based on network pharmacology, transcriptomics, and experimental validation

Ma Zichuang¹, Su Dan², Wang Chun³, Wu Na⁴, Wang Haikun^{1,4}, Shen Aizong⁵

(¹*School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032*; ²*Health Management Center, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001*;

³*Institute of Clinical Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032*;

⁴*Dept of Pharmacy, Bozhou Hospital of Anhui Medical University, Bozhou 236800*;

⁵*Dept of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001*)

Abstract *Objective* To investigate the potential mechanisms of Xanthatin in inhibiting the proliferation of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cells by integrating network pharmacology and *in vitro* experiments. *Methods* The targets of Xanthatin were identified using databases such as PharmMapper, while disease-related targets for LSCC were obtained from databases such as DisGeNET. The overlapping targets between Xanthatin and LSCC were determined by intersecting these datasets. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed based on the overlapping targets, and key targets were identified. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analyses of the overlapping targets were performed using R software. A "Xanthatin-target-pathway" network was visualized using Cytoscape 3.8.0 software. The preliminary validation of the aforementioned results was performed using molecular docking and transcriptomics. The effects of Xanthatin on the proliferation of TU177 cells were assessed using CCK-8 and colony formation assays. Additionally, Western blot analysis was employed to measure the expression levels of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt proteins. *Results* A total of 159 overlapping targets between Xanthatin and LSCC were identified, and seven key targets, including AKT1, were screened. GO enrichment analysis yielded 2 455 entries, and KEGG enrichment analysis identified 172 pathways, such as the PI3K-Akt signaling pathway. Xanthatin exhibited favorable binding activity with the core target proteins of LSCC in molecular docking experiments. The transcriptomics results showed high consistency with the predictions from network pharmacology. CCK-8 and colony formation assays demonstrated that Xanthatin at concentrations of 1, 2, and 4 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited the proliferation of TU177 cells in a dose-dependent manner. The expression levels of p-PI3K and p-Akt proteins decreased with increasing concentrations of Xanthatin. *Conclusion* Xanthatin may exert an inhibitory effect on the proliferation of LSCC cells by modulating the PI3K-Akt signaling pathway.

Key words network pharmacology; Xanthatin; laryngeal squamous cell carcinoma; molecular docking; cell experiments; PI3K-Akt signaling pathway; transcriptomics; experimental validation

Fund programs Clinical Medical Research Translational Project of Anhui Province (No. 202304295107020095); Key Research and Development Project of Bozhou (No. bzzc2022015)

Corresponding author Wang Haikun, E-mail: Haikunwang1985@outlook.com