

基于网络药理学和实验验证探讨桦褐孔菌三萜抗宫颈癌 HeLa 细胞的作用机制

邵骏菁^{1a,1b}, 杨颖², 王传功^{1a,1b}, 张晓平^{2*} (1. 济宁医学院, a.基础医学院, b.药理学重点实验室, 山东 济宁 272067; 2. 山东中医药大学药学院, 济南 250355)

摘要: 目的 利用网络药理学和分子对接及体内验证实验探讨桦褐孔菌三萜成分抗宫颈癌 HeLa 细胞的潜在作用机制。方法 基于文献研究结合数据库筛选桦褐孔菌三萜的主要活性成分, 寻找活性成分以及 HeLa 细胞交集靶点, 进行 PPI 网络构建, GO 和 KEGG 富集分析, 分子对接进行验证。建立 HeLa 裸鼠模型, 桦褐孔菌三萜灌胃给药, 裸鼠处死后采用 Western blotting 检测指标。结果 经过筛选得到 15 个符合条件的活性成分的 274 个相关联靶点。与 2 046 个 HeLa 细胞相关靶点取交集, 获得 104 个桦褐孔菌三萜抗 HeLa 细胞的潜在靶点。通过“药物-成分-靶点-疾病”网络分析, PIK3CA、MAPK3、MDM2、AR、CCND1 可能是桦褐孔菌三萜纯化物抗 HeLa 细胞的潜在靶点。KEGG 富集分析结果显示, PI3K/Akt 信号通路、Ras 信号通路、MAPK 信号通路等多个信号通路可能是桦褐孔菌三萜抗 HeLa 细胞的潜在作用途径。分子对接结果显示, 核心成分与关键靶点均有较强的潜在结合能力。体内实验结果表明桦褐孔菌三萜可抑制模型小鼠肿瘤生长, 调节模型小鼠的免疫功能, 促进模型小鼠肿瘤凋亡, 抑制 PI3K 和 AKT 的磷酸化。结论 基于网络药理学、分子对接和体内验证方法, 证明了桦褐孔菌三萜通过多组分、多靶点发挥抗 HeLa 细胞的作用, 为桦褐孔菌的进一步研发及其抗肿瘤作用机制的探讨提供参考。

关键词: 桦褐孔菌三萜; HeLa 细胞; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt 通路; HeLa 裸鼠模型

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-7693(2024)03-0313-11

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20222585

引用本文: 邵骏菁, 杨颖, 王传功, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨桦褐孔菌三萜抗宫颈癌 HeLa 细胞的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(3): 313-323.

Study on the Mechanism of Triterpenoids from *Inonotus Obliquus* Against Gastric Cancer HeLa Cell Based on Network Pharmacology and Experimental Validation

SHAO Junjing^{1a,1b}, YANG Ying², WANG Chuangong^{1a,1b}, ZHANG Xiaoping^{2*} (1. Jining Medical University, a.College of Basic Medicine, b.Key Laboratory of Pharmacology, Jining 272067, China; 2.College of Pharmacy, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the potential mechanism of anti-HeLa cell of triterpenoids from *Inonotus obliquus* by network pharmacology, molecular docking and *in vivo* verification experiments. **METHODS** Based on literature research and database, the main active components of triterpenoids from *Inonotus obliquus* were screened, and the active components and HeLa cell intersection targets were found. PPI network was constructed, GO and KEGG enrichment analysis were carried out, and molecular docking was verified. HeLa cell nude mice model was established, and *Inonotus obliquus* triterpenoids were administered by gavage. The indexes were detected and detected by Western blotting after euthanizing nude mice. **RESULTS** After screening, 274 associated targets of 15 qualified active components were obtained. Intersecting with 2 046 HeLa cell-related targets, 104 potential anti-HeLa cell targets of *Inonotus obliquus* triterpenoids were obtained. Through the "drug-component-target-disease" network analysis, PIK3CA, MAPK3, MDM2, AR and CCND1 might be potential targets for anti-HeLa cell of triterpenoids purified from *Inonotus obliquus*. The results of KEGG enrichment analysis showed that multiple signal pathways such as PI3K/Akt signal pathway, Ras signal pathway and MAPK signal pathway might be the potential anti-HeLa cell pathway of triterpenoids in *Inonotus obliquus*. The results of molecular docking showed that the core components and key targets had strong potential binding ability. The *in vivo* test results showed that *Inonotus obliquus* triterpenoids could inhibit tumor growth, regulate immune function, promote tumor apoptosis and inhibit PI3K and AKT phosphorylation in model mice. **CONCLUSION** Based on the methods of network pharmacology, molecular docking and *in vivo* verification, it is proved that the triterpenoids of *Inonotus obliquus* play the role of anti-HeLa cell through multi-components and multi-targets, which lays a foundation for further research and development of

基金项目: 山东省重点研发计划项目 (2020CXGC010505, 2021CXGC010511)

作者简介: 邵骏菁, 女, 硕士 E-mail: shaojunjing1@163.com *通信作者: 张晓平, 女, 博士, 讲师 E-mail: xia_opingzhang@126.com

宫颈癌主要由人乳头瘤病毒 (human papilloma virus, HPV) 引起, 是一种严重危害女性健康的生殖系统恶性肿瘤^[1]。据统计, 宫颈癌的发病率和死亡率均居全球第 4 位, 且近年来呈年轻化的趋势^[2]。宫颈癌多采取手术为主、放化疗为辅的治疗方案, 但是据统计约有 30% 的患者在手术、放化疗后仍出现复发的情况, 且带来许多不良反应, 严重影响患者的生活质量^[3]。中医药在中国肿瘤患者的防治中发挥重要作用, 中药治疗具有多途径、多靶点、不良反应小、增强免疫等特点^[4-5]。中药除了能够直接作用于肿瘤细胞抑制其增殖分化, 还可作用于肿瘤的生存环境抑制其侵袭、转移及物质能量的供应等发挥直接的抗肿瘤作用, 还能辅助抗肿瘤药, 增强其药效, 减轻其不良反应等。

桦褐孔菌 (*Inonotus obliquus*) 为多孔菌科、褐卧孔菌属的药食两用真菌^[6-7]。虽然未被中国药典 2020 年版收录, 但是其在欧洲被用作预防和治疗疑难杂症如糖尿病和癌症等已有 600 多年的用药历史。长期的临床使用和动物实验研究表明, 桦褐孔菌具有良好的抗肿瘤、降血糖和降血脂等活性, 且尚未发现其明显的不良反应^[8]。作为桦褐孔菌的主要活性成分, 桦褐孔菌三萜类化合物 (triterpenoids of *Inonotus obliquus*, IO.T) 具有广泛的抗肿瘤作用, 对多种肿瘤具有抑制作用。邓丽颖等^[9]发现桦褐孔菌三萜对 A549、HeLa、MCF-7 及 4T1 肿瘤细胞均具有一定的抑制作用。金黎达等^[10]研究证明, IO.T 能够有效地诱导卵巢癌细胞 ES2、SKOV3 和肺癌细胞 A549、PC9 的细胞凋亡。白桦脂酸是桦褐孔菌三萜的主要活性成分, Wang 等^[11]发现紫杉醇联合白桦脂酸用药后, 表现出更强的抗肿瘤活性, 诱导更多细胞凋亡, 对细胞迁移的抑制作用也更强。笔者所在课题组前期对 IO.T 提取纯化工艺及体外抗肿瘤作用进行研究, 结果表明, 纯化后的 IO.T 能够有效抑制 HeLa 细胞的增殖、迁移, 且能够诱导 HeLa 细胞的晚期凋亡^[12]。但是其抗 HeLa 细胞的具体机制尚不清楚, 下一步仍须对其作用机制进行深入研究。

网络药理学是基于多学科理论从多角度对药

物干预疾病作用靶点及机制进行分析的新方法^[13]。本研究基于前期实验, 采用网络药理学和分子对接的方法, 筛选 IO.T 作用于 HeLa 细胞的潜在靶点和通路, 发掘其分子机制, 并通过体内实验进行验证, 为进一步研究 IO.T 抗肿瘤的作用机制及药物开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药物

桦褐孔菌三萜纯化物由本实验室经提取、纯化工艺优化后制备所得, 总三萜含量为 73.39%。

1.2 细胞

3~4 周龄 SPF 级 BALB/C 裸鼠, 雌性, 体重 15~18 g。IVC 系统饲养, 温度为 (25±2) °C, 湿度为 40%~60%, 通风良好。实验动物生产许可证号: SCXK(鲁)20190003。

宫颈癌细胞 HeLa 购自上海启达生物科技有限公司。

1.3 试剂

RPMI1640(SparkJade 公司, 批号: ATBGX); PBS(批号: 21036449)、DMSO(批号: EZ6789C150) 均购自 Biosharp 公司; MTT(BioFrox 公司, 批号: EZ6789C126); Trypsin-EDTA(Gibco 公司, 批号: 25200-056); 胎牛血清 (CLARK 公司, 批号: JC65977); IL-2 ELISA 试剂盒、IFN-γ ELISA 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号: CK-E20176、CK-E20140)。

1.4 仪器

HF90 CO₂ 恒温培养箱、HFsafe-1200TE 生物安全柜均购自上海力申科学仪器公司; EPOCH2T 酶标仪 (Bio Tek); Primaide 倒置显微镜 (日本 HITACHI 公司)。

1.5 方法

1.5.1 IO.T 库的构建 IO.T 是桦褐孔菌分离出的主要化学成分, 也是抗肿瘤的主要活性成分。利用中药系统药理学数据与分析平台 TCMSP 数据库^[14] ([http:// tcmsp.w.com/tcmsp.php](http://tcmsp.w.com/tcmsp.php)) 及文献检索查询 IO.T。在 TCMSP 数据库中设定口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) ≥ 30% 且类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 作为筛选条件^[15]; 同时查阅

相关文献补充部分未收录但已经报道的活性三萜类成分以构成 *IO.T* 库, 利用 ChemDraw 软件画出候选成分的结构式, 将其 “Sdf” 格式文件上传至 SwissADME 平台进行预测。首先, 肠胃吸收为 “High”, 说明化合物具有较好的 OB; 其次, 类药五原则 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) 中 ≥ 2 个结果为 “Yes”^[16]。同时满足以上 2 个条件的化合物可以纳入活性化合物范围中, 最终确定 *IO.T* 发挥抗宫颈癌 HeLa 细胞的活性成分。

1.5.2 *IO.T* 靶点库的构建 利用 Pubchem 数据库^[17] (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 SwissTarget Prediction 数据库^[18] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 逐个检索表中的化学成分。在 Pubchem 数据库中将 “activity” 设置为 “active”, “taxids” 设置为 “9606”, 在 SwissTarget Prediction 数据库中设置筛选条件为 “Homo spines”, Probability >0.10 。合并 2 个数据库筛选的结果并通过 UniProt(<http://www.uniprot.org/>) 将靶标转换为基因符号。去重, 整合得到 *IO.T* 靶点信息库。

1.5.3 HeLa 细胞靶点库的构建 以 “HeLa” “HeLa cancer” 为关键词, 在 Genecards database^[19] (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM database^[20] (<https://omim.org/>) 数据库检索宫颈癌 HeLa 细胞相关靶点, 整合 3 个数据库的检索结果并删除重复的基因靶点, 得到与 HeLa 细胞相关的靶点。

1.5.4 桦褐孔菌三萜 “活性成分-抗 HeLa 细胞潜在靶点” 网络构建与分析 利用 Venny 2.1 版平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 筛选出 *IO.T* 与 “HeLa 细胞” 的共同靶标。运用 Cytoscape 3.6.0 将活性成分与潜在作用靶点筛选结果导入, 构建 “活性成分-靶标” 关系网络, 在网络图中, “节点 (node)” 代表化合物和靶点, “边 (edge)” 代表 2 个节点之间的相互作用。

1.5.5 桦褐孔菌三萜 “活性成分-HeLa 细胞” 潜在靶点的蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 使用 String 平台^[21] (<https://www.string-db.org/>), 将潜在作用靶点导入后设置物种为 “Homo sapiens”, 设置 “minimum required interaction score” 为 “0.7” 并且隐藏游离的靶蛋白, 结果以 TSV 格式保存, 利用 Cytoscape 3.6.0 软件进行可视化分析, 获得 PPI 关系。

1.5.6 桦褐孔菌三萜 “活性成分-HeLa 细胞” 潜在作用靶点的基因本体 (gene ontology, GO) 富集分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 将活性成分与 HeLa 细胞的重叠靶点导入 Metascape 平台^[22] (<http://www.metascape.org/>) 进行 GO 功能富集分析, 探讨药物作用的生物学过程, 描述基因靶点的功能, 包括生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC)。同样对上述基因进行 KEGG 通路富集分析, 探讨药物作用的生物通路, 得到潜在靶点所富集的信号通路。GO 和 KEGG 富集分析条件均为 $P<0.05$ 。由在线可视化平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn>) 进行可视化分析。

1.5.7 桦褐孔菌三萜 “活性成分-靶点-通路” 网络构建 筛选 *IO.T* 靶点, 富集得到抗 HeLa 细胞的主要信号通路以及各通路对应的相关靶点, 导入 CytoScape 3.6.0 软件中构建 “活性成分-靶点-通路” 网络, 利用 Network Analyzer 功能进行网络拓扑学分析, 参数包括度值、介度等, 分析主要活性成分及核心靶点。

1.5.8 *IO.T* 与潜在靶点分子对接 从 PDB 数据库^[23] (<http://www.wwpdb.org/>) 中下载关键潜在靶点蛋白的 3D 结构并保存为 pdb 格式, 运用 PyMOL 软件去除水分子和配体蛋白, 运用 Chemdraw 3D 软件进行活性化合物配体的前处理。将前处理好的潜在靶点和活性化合物成分导入对接软件 AutoDock 中进行分子对接, 将结果保存为 pdbqt 格式, 使用 PyMOL 软件将对接得分较高且构象较稳定的化合物与靶点蛋白进行分子对接可视化分析^[24]。

1.5.9 验证性实验 用 PBS 清洗收集的对数生长期的 HeLa 细胞并调整细胞浓度为 $2 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$, 加入基质胶与细胞悬液 1:1 混匀, 冰上操作以避免基质胶凝固。用碘酊擦拭每只小鼠右腋下皮肤进行消毒并注射 0.1 mL 细胞悬液, 设定接种量约为每只 10^7 个细胞, 对照组小鼠在相同位置注射 0.1 mL 的 PBS, 整个实验操作均在无菌环境下进行。造模 1 周后测量裸小鼠肿瘤面积, 肿瘤面积在 $80 \sim 90 \text{ mm}^2$ 说明造模成功, 可进行后续的实验^[25-26]。将造模成功的裸小鼠随机分成模型组, *IO.T* 高、低剂量组, 顺铂组 (按照前期实验工艺优

化结果,对桦褐孔菌药材进行提取、纯化,制备桦褐孔菌三萜纯化物)。

IO.T 组 (高剂量: $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$; 低剂量: $15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、顺铂组 ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 均用 0.5% CMC-Na 的生理盐水配置,按体质量灌胃, $0.1\text{ mL}\cdot(10\text{ g})^{-1}$,模型组和对照组给予相应的不含药物的空白溶剂,每 3 d 灌胃 1 次,共 7 次。每 2 d 测量并记录 1 次裸小鼠肿瘤体积,第 20 天处死裸小鼠。

1.5.9.1 一般情况观察 观察裸小鼠在给药后有无异常反应、死亡等情况,每 2 d 测肿瘤体积(肿瘤体积= $a\times b^2/2$, a 表示长径, b 表示短径),并绘制体积变化曲线。

1.5.9.2 瘤重及抑瘤率 采血后脱颈椎处死裸小鼠,剥离肿瘤组织,记录瘤重并按公式计算抑瘤率(%)。

$$\text{抑瘤率} = \frac{\text{模型组瘤重} - \text{给药组瘤重}}{\text{给药组瘤重}} \times 100\%$$

1.5.9.3 对免疫器官的影响 裸小鼠处死后,称取脾脏和去瘤体质量,计算脾指数。

$$\text{脾指数} = \frac{\text{脾质量(g)}}{\text{体质量(100 g)}}$$

1.5.9.4 ELISA 法检测血清中白介素-2(interleukin 2, IL-2)、干扰素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 的含量 静置 4 h 并离心收集小鼠外周血 ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $1509.3\times\text{g}$, 15 min),吸取血清,使用 ELISA 试剂盒检测裸小鼠血清中 IL-2、IFN- γ 的含量。

1.5.9.5 病理学检查 用 4% 多聚甲醛固定剥离的肿瘤组织,进行脱水、浸蜡包埋、制片后,苏木素-伊红 (HE) 染色,切片扫描,进行病理学检查。

1.5.9.6 PI3K/AKT 通路蛋白质免疫印迹分析 采用 Western blotting 测定 *IO.T* 对 HeLa 裸鼠肿瘤组织中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达的影响。

1.5.10 统计学方法 采用 SPSS 23.0 进行统计分析,数据结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间均值两两比较采用 SNK 法,方差不齐则改用 Dunnett T3 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *IO.T* 的筛选

通过查阅文献收集到 *IO.T* 78 个^[27-28],经筛选得到符合条件的活性成分共 15 个,见表 1。从

TCMSP 数据库中检索到 3 个符合条件的活性成分: 栓菌酸 (Trametenolic acid)、白桦脂酸 (Betulinic acid)、羊毛甾醇 (Lanosterol); 通过 SwissADME 平台筛选,得到符合条件的活性成分 12 个: Inonotsulide A、Inonotsulide C 等。

表 1 桦褐孔菌三萜类活性化合物信息

Tab. 1 Information of triterpenoid active compounds of *Inonotus obliquus*

编号	化学成分
1	栓菌酸 Trametenolic acid
2	白桦脂酸 Betulinic acid
3	羊毛甾醇 Lanosterol
4	(20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-3 β ,25-二羟基羊毛甾-8-烯-20,24-内酯 Inonotsulide A
5	(20 <i>R</i> ,24 <i>S</i>)-3 β ,25-二羟基羊毛甾-7,9(11)-烯-20,24-内酯 Inonotsulide C
6	羊毛甾-8-烯-3 β ,22 <i>R</i> ,24 <i>R</i> -三醇 Inonotsutriol D
7	羊毛甾-8-烯-3 β ,21 <i>R</i> ,24 <i>S</i> -三醇 Inonotsutriol A
8	桦褐孔菌萜 A Inoterpene A
9	桦褐孔菌萜 B Inoterpene B
10	过氧化麦角甾醇 Ergosterol peroxide
11	(22 <i>E</i> ,24 <i>S</i>)-5 α ,8 α -epidioxy-24-methyl-cholesta-6,9(11),22-trien-3 β -ol <i>IO.T</i> 1
12	3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8,23-diene <i>IO.T</i> 2
13	3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8-ene <i>IO.T</i> 3
14	5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol <i>IO.T</i> 4
15	7 β -methoxylanostere-8,24-diene-3 β ,11 α ,22 <i>R</i> -triol <i>IO.T</i> 5

2.2 *IO.T* 靶点的预测

将各个 *IO.T* 分别导入 Pubchem 和 SwissTarget 数据库,合并后删除重复值共获得 274 个符合条件的基因靶点。

2.3 HeLa 细胞相关靶点获取结果

通过 GeneCard 数据库检索出 106 046 个靶点, OMIM 数据库检索出 900 个靶点,根据相关性打分筛选,合并 2 个数据库筛选结果并去除重复项共选取 2 046 个靶点,采用这些靶点组建了 HeLa 细胞相关靶点数据库。

2.4 桦褐孔菌三萜“活性成分-抗 HeLa 细胞潜在靶点”网络构建及网络拓扑学分析

利用 Venny 2.1 在线平台对 *IO.T* 靶点与 HeLa 细胞相关靶点取交集,得到 104 个 *IO.T* 抗 HeLa 细胞作用靶点基因,包括磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 γ (phosphatidylinositol- 4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit γ , PIK 3CA)、丝裂原活化蛋白激酶 3(mitogenactivated protein kinase 3, MAPK3)、mdm2 癌基因 (murine double minute

2)、编码 Raf 原癌基因丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (BRAF) 等, 见图 1。通过 Cytoscape 3.6.0 软件进行网络可视化分析, 构建桦褐孔菌三萜“活性成分-抗 HeLa 细胞潜在靶点”相互作用网络图。结果见图 2。

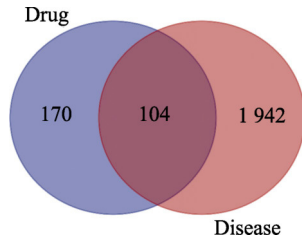


图 1 药物-疾病靶点 Venn 分析图

Fig. 1 Venn analysis diagram of drug-disease targets

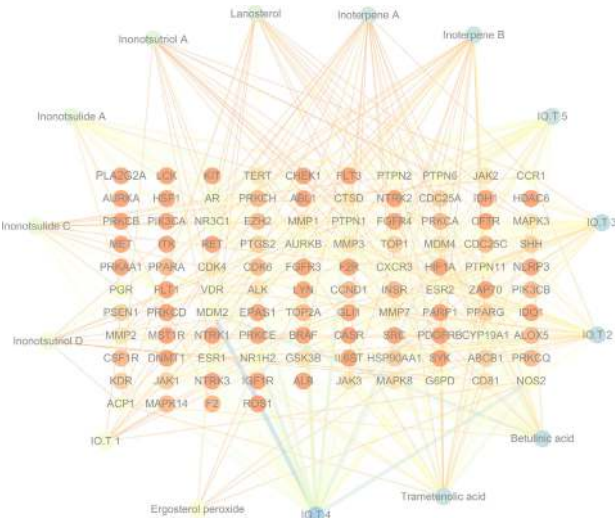


图 2 桦褐孔菌三萜“活性成分-抗 HeLa 细胞潜在靶点”相互作用网络图

Fig. 2 Network diagram of interaction between triterpenoids of *Inonotus obliquus* triterpene "active ingredient-potential anti-HeLa cell target"

2.5 桦褐孔菌三萜“活性成分-HeLa 细胞”潜在靶点 PPI 网络的构建

借助 String 平台输入潜在作用靶点, 获得包含 104 节点的 PPI 网络, 隐藏没有相互作用的节点, 通过 Cytoscape 3.6.0 软件进行网络可视化分析, 见图 3。圆形节点代表靶点, 度值越大, 节点越大; 连接评分越高, 边越粗。经过筛选得到靶标间相互作用网络共有 100 个节点, 502 条边。由节点大小可推测, HSP90AA1、PIK3CA、SRC、MAPK3 等可能是 IO.T 抗 HeLa 细胞的关键靶点。

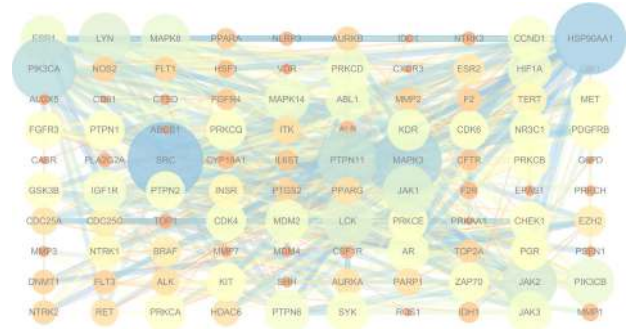


图 3 桦褐孔菌三萜“活性成分-HeLa 细胞”潜在靶点相互作用网络图

Fig. 3 Network diagram of interaction between potential targets of triterpenoids of *Inonotus obliquus* triterpene "active ingredient-HeLa cell"

2.6 桦褐孔菌三萜“活性成分-HeLa 细胞”潜在靶点 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将活性成分与 HeLa 细胞的重叠靶点导入 Metascape 平台进行 GO 功能分析, 富集到的生物学过程中 289 个与 BP 相关、66 个与 CC 相关、88 个与 MF 相关。根据评分从大到小排列, 各选取排名前 10 位结果绘制 GO 功能分析图, 见图 4。IO.T 抗 HeLa 细胞可能与蛋白质磷酸化、受体复合体、蛋白激酶活性等有关。

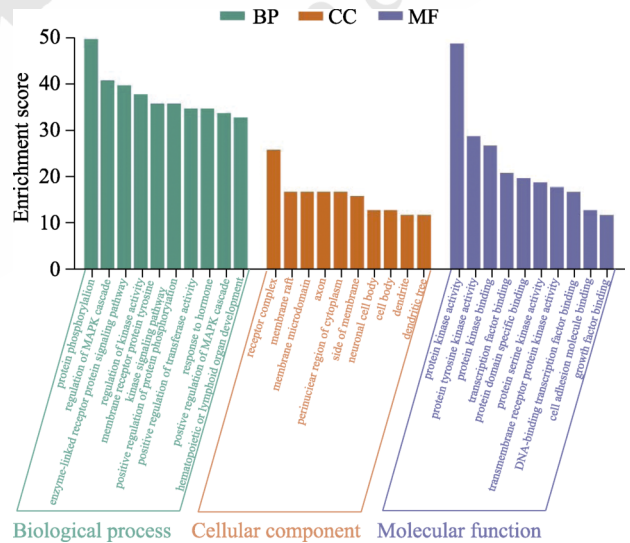


图 4 GO 功能分析 (前 10)

Fig. 4 GO function analysis(top 10)

对 104 个潜在作用靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共获得 149 条富集通路, 按照 P 值从小到大排列, 筛选出与肿瘤相关的 25 条主要通路, 见图 5。根据富集分析得出, IO.T 抗 HeLa 细胞的作用机制主要与 PI3K-AKT 信号通路、Ras 信号通路、EGFR 信号通路等密切相关。

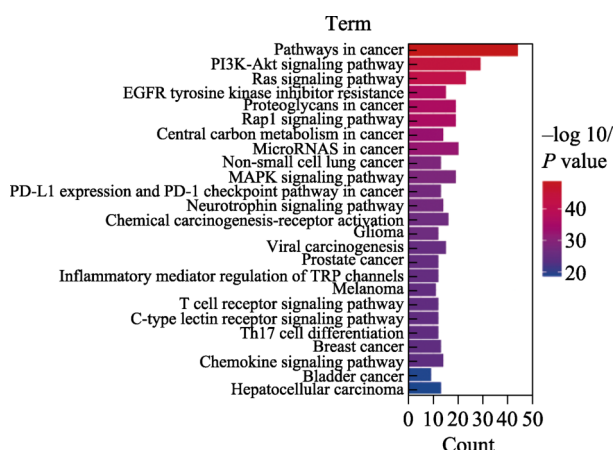


图5 KEGG 富集分析图(前 25)

Fig. 5 KEGG enrichment analysis chart(top 25)

2.7 桦褐孔菌三萜“活性成分-抗 HeLa 细胞潜在靶点-通路”网络的构建

根据 KEGG 通路富集分析结果选取 25 条相关性高的信号通路，同时与这些相关通路的靶点建立相互作用，将活性成分、通路靶点、信号通路通过 CytoScape 3.6.0 软件进行可视化分析，见图 6，左边为活性成分，中间为潜在靶点，右边为潜在通路，包括 146 个节点和 843 条边。拓扑学数据表明，5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol (*IO.T* 4)、3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8,23-diene(*IO.T* 2)、3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8-ene (*IO.T* 3)、栓菌酸、白桦脂酸可能是 *IO.T* 抗 HeLa 细胞的主要活性成分；PIK3CA、MAPK3、MDM2、AR、CCND1 可能是 *IO.T* 抗 HeLa 细胞的主要作用靶点。

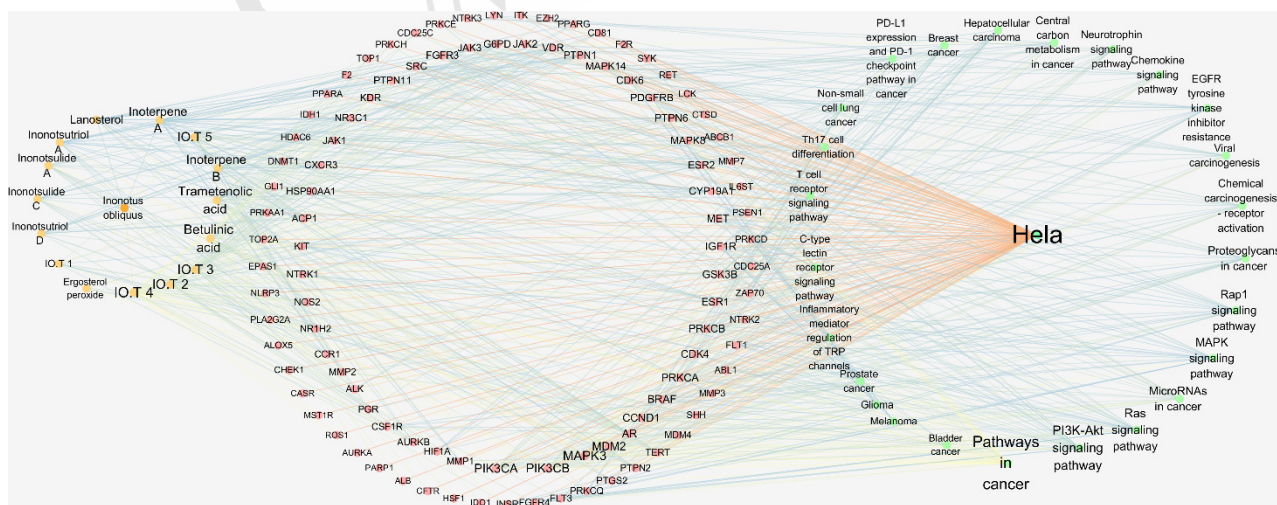


图6 “桦褐孔菌三萜-活性成分-潜在靶点-通路-疾病”网络

Fig. 6 "Inonotus obliquus triterpene-active component-potential target-pathway-disease" network

2.8 *IO.T* 与关键靶点的分子对接

根据“活性成分-潜在靶点-通路”网络中度值较大的 5 个作用靶点 PIK3CA、MAPK3、MDM2、AR、CCND1，分别以 5 个度值较大的活性成分 *IO.T* 4、*IO.T* 2、*IO.T* 3、栓菌酸、白桦脂酸为对象进行分子对接，结果见图 7。结果显示，各活性成分与潜在靶点的结合能均 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ cal} = 4.186 \text{ J}$)，具有强烈的结合活性。核心靶点蛋白质选择具有配体且结合力最强的化合物分析结合模式，具体对接过程见图 8。以上对接结果说明 *IO.T* 与 HeLa 细胞关键核心靶点有着良好的结合作用。

2.9 验证性结果

2.9.1 一般情况观察 给药后裸小鼠饮食量下降，顺铂组小鼠体质量下降并出现死亡情况，给药组小鼠体质量无明显下降且死亡情况。每 2 d 测量并记录小鼠的肿瘤体积，发现模型组裸小鼠肿瘤体积增长的速度明显快于给药组。最后 1 d 测量各组裸小鼠肿瘤体积进行比较，发现与模型组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)，见图 9。

2.9.2 瘤重及抑瘤率 采血后脱颈椎处死裸小鼠，剥离肿瘤组织，记录瘤重并计算抑瘤率。结果所示，*IO.T* 高、低剂量组与顺铂组裸小鼠瘤重明显低于模型组，且具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。在 *IO.T* 给药组中高剂量组的抑瘤效果更好，与顺铂组效果相近，结果说明 *IO.T* 对 HeLa 裸鼠具有一定的抑制肿瘤生长的作用，见表 2。

2.9.3 对免疫器官的影响 裸小鼠处死后，称取

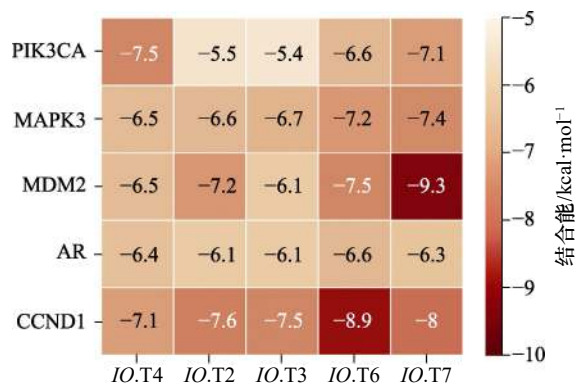


图 7 核心靶点分子对接热图
Fig. 7 Core target molecular docking heat map

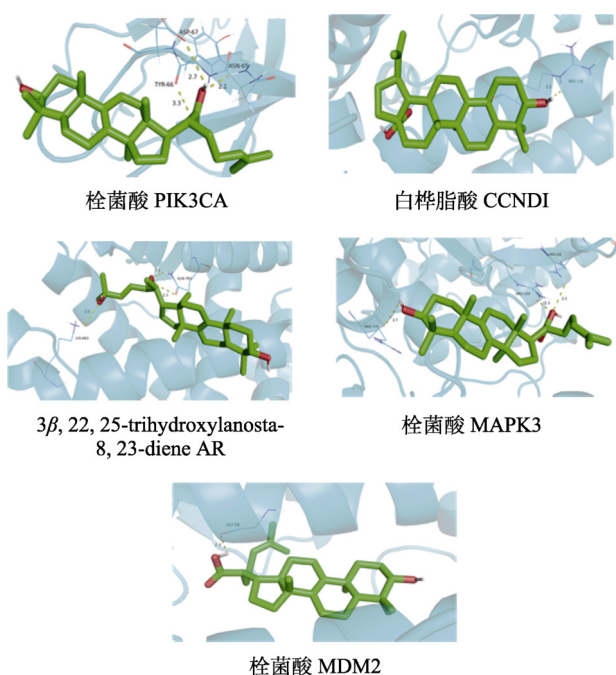


图 8 分子对接模型
Fig. 8 Molecular docking mode

脾脏和去瘤体质量，计算脾指数。模型组脾质量高于正常组脾质量且差异具有统计学意义，脾出

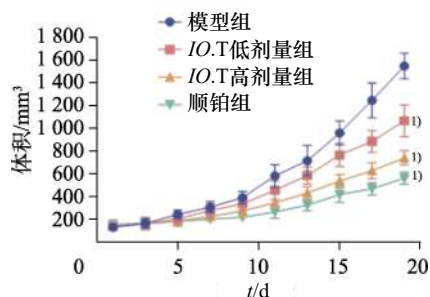


图 9 HeLa 裸鼠肿瘤生长曲线图
与模型组相比，¹⁾ $P<0.01$ 。
Fig. 9 Tumor growth curve of HeLa nude mice
Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$.

表 2 药物对 HeLa 裸鼠瘤质量及抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Effect of drug on tumor weight and tumor inhibition rate in HeLa nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	—	1.325±0.31	—
IO.T低剂量组	15	0.738±0.09 ¹⁾	44.35
IO.T高剂量组	75	0.519±0.11 ²⁾	60.77
顺铂组	5	0.475±0.07 ²⁾	65.48

注：与模型组相比，¹⁾ $P<0.05$ ，²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

现异常增大的情况，标志着造模成功，脾脏从正免疫调节转变为负免疫调节，促进了 HeLa 裸鼠肿瘤的生长^[29]。IO.T 给药组脾质量明显低于模型组 ($P<0.01$)，但高于正常组，说明 IO.T 可以抑制小鼠脾脏的负免疫调节，促进正免疫调节，抑制 HeLa 裸鼠肿瘤的生长，见表 3。

表 3 药物对 HeLa 裸鼠脾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 3 Effect of drug on spleen index of HeLa nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	脾脏指数/g·(100 g) ⁻¹
正常组	—	0.390±0.03 ¹⁾
模型组	—	0.767±0.06
IO.T低剂量组	15	0.468±0.05 ¹⁾
IO.T高剂量组	75	0.417±0.02 ¹⁾
顺铂组	5	0.339±0.02 ¹⁾

注：与模型组相比，¹⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.01$.

2.9.4 ELISA 法检测血清中 IL-2、IFN-γ 的含量 IL-2、IFN-γ 作为免疫调节因子，能有效增强宿主免疫原性，提高宿主抗肿瘤的能力^[30-31]。模型组 IL-2 和 IFN-γ 的含量低于正常组，但差异无统计学意义；IO.T 各剂量组裸小鼠 IL-2 和 IFN-γ 的含量均高于模型组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$)，见表 4。表明 IO.T 可以通过免疫调节作用，促进免疫相关因子的释放，抑制 HeLa 细胞的生长。

2.9.5 病理学检查 用 4% 多聚甲醛固定剥离的肿瘤组织，脱水、浸蜡包埋、制片后，进行苏木素-伊红 (HE) 染色，切片扫描，进行病理学检查。结果表明，模型组肿瘤细胞大小不一、排列紧密、界限模糊并且生长旺盛；各药物组肿瘤组织出现坏死区域，肿瘤细胞表现出核固缩、核染色加深等类似凋亡的特征，见图 10。说明 IO.T 可促进 HeLa 细胞的坏死。

表 4 药物对 HeLa 裸鼠血清中 IL-2、IFN- γ 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Effect of drug on serum IL-2, IFN- γ contents of HeLa nude mice($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	IL-2/pg·mL ⁻¹	IFN- γ /pg·mL ⁻¹
正常组		339.79 $\pm$ 17.98	280.76 $\pm$ 30.13
模型组	—	304.50 $\pm$ 19.49	229.64 $\pm$ 25.93
IO.T低剂量组	15	366.83 $\pm$ 16.16 ¹⁾	294.11 $\pm$ 18.05 ¹⁾
IO.T高剂量组	75	401.33 $\pm$ 37.01 ²⁾	339.64 $\pm$ 29.28 ³⁾
顺铂组	5	337.79 $\pm$ 27.62	234.38 $\pm$ 10.82

注: 与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$ 。

Note: Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.001$.

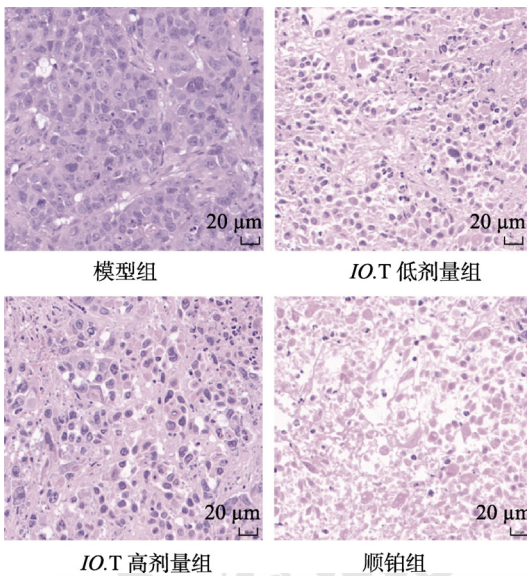


图 10 HeLa 裸鼠肿瘤组织病理切片 (HE 染色)

Fig. 10 Pathological sections of tumor tissue of HeLa nude mice(HE staining)

2.9.6 PI3K/AKT 通路蛋白质免疫印迹分析 根据对相关活性通路与活性靶点的预测结果, 选取相关度最高的 PI3K/AKT 信号通路进行验证。采用 Western blotting 测定 IO.T 对 HeLa 裸鼠肿瘤组织中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达的影响。IO.T 和顺铂给药后 PI3K、AKT 的表达与模型组没有显著性差异, 但能够显著抑制 PI3K 和 AKT 的磷酸化, 见图 11。以上结果说明 IO.T 能够抑制 PI3K、AKT 的活化, 从而抑制 PI3K/AKT 信号通路, 达到抑制 HeLa 细胞增殖的目的。

3 讨论

现代研究发现, 桦褐孔菌在抗肿瘤、抗氧化、治疗糖尿病、防治高血压、增强免疫等方面具有显著作用。近年来, 有大量研究发现 IO.T 具

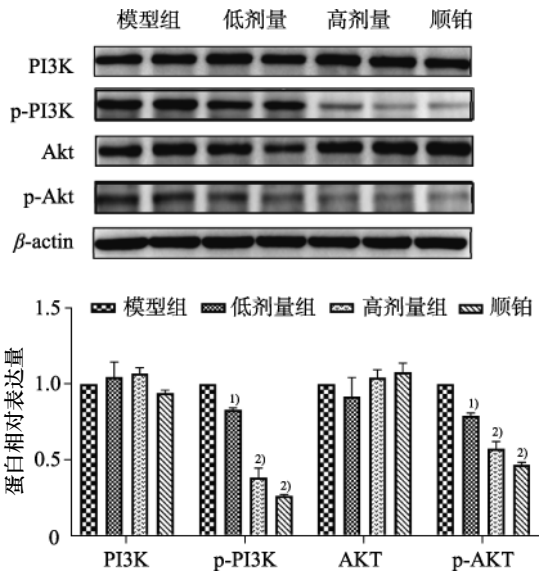


图 11 桦褐孔菌三萜类化合物对肿瘤组织中 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 蛋白表达的影响

与模型组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 11 Effect of *Inonotus obliquus* triterpene on protein expression of PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT in tumor tissues

Compared with model group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

有显著的抗肿瘤活性^[32-33]。笔者所在课题组前期体外抗 HeLa 细胞的实验也表明, 纯化后的 IO.T 能够有效抑制 HeLa 细胞的增殖、迁移, 且诱导 HeLa 细胞的晚期凋亡, 但是其抗 HeLa 细胞的具体机制尚不清楚^[12]。因此本研究基于网络药理学和分子对接技术筛选了 IO.T 抗 HeLa 细胞的主要活性成分及潜在靶点, 探讨其可能的作用机制。

本研究共筛选出 15 个 IO.T, 包括栓菌酸、白桦脂酸、羊毛甾醇、Inonotsulide A、Inonotsulide C、Inonotsutriol D、Inonotsutriol A、Inoterpene A、Inoterpene B、Ergosterol peroxide、(22E,24S)-5 α ,8 α -epidioxy-24-methyl-cholesta-6,9(11),22-trien-3 β -ol(IO.T 1)、3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8,23-diene(IO.T 2)、3 β ,22,25-trihydroxylanosta-8-ene(IO.T 3)、5,8-epidioxyergosta-6,22-dien-3 β -ol(IO.T4)、7 β -methoxyllanostere-8,24-diene-3 β ,11 α ,22R-triol(IO.T5)。据文献报道, 栓菌酸能够上调蛋白主要为 HSP90-AA4P、MYB、SERPINE1, 下调蛋白为 Rho C、SERPINA1、PIK3R4, 与 PI3K/AKT 信号通路、细胞转移和自噬相关, 能有效抑制 HepG2/2.215 细胞增殖和诱导自噬活性, 有望成为治疗肝癌的候选药物^[34]。Wang 等^[35]发现栓菌酸能够下调 p-PIK3CA、p-AKT、p-mTOR、Bcl-2、pro-caspase-9 和 pro-caspase-3 蛋白表达, 上调 p-

PIK3CA/PIK3CA、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR 比值,抑制线粒体介导的凋亡。Kim 等^[32]发现从桦褐孔菌中分离出的栓菌酸对 AGS、MCF-7 和 PC3 3 种肿瘤细胞具有明显的抗增殖活性。Xu 等^[36]发现在 HeLa 细胞中,白桦脂酸处理后 *Bcl-2* 基因表达下调,*Bax* 基因表达上调,通过触发内质网途径和活性氧介导的线粒体途径诱导 HeLa 细胞凋亡。Garcês 等^[37]对白桦脂酸在人宫颈腺癌(HeLa)、人宫颈转移表皮样癌(ME-180)和人乳腺癌(MCF-7)细胞系中的抗肿瘤活性进行了评价,发现其在 MCF-7 和 HeLa 细胞中具有较高的活性,并通过诱导细胞凋亡发挥作用,可作为女性癌症治疗的潜在替代方案。Baek 等^[38]从桦褐孔菌中分离并鉴定出包括栓菌酸、Inonotsutriol A 在内的 8 种三萜类化合物,均对人肺癌细胞系(A549、H1264、H1299 和 Calu-6)具有一定的抑制性,并促进其凋亡。因此,本研究利用网络药理学对 *IO.T* 进行了相关活性预测,其中栓菌酸、白桦脂酸、 $3\beta,22,25$ -trihydroxy lanosta-8,23-diene、 $3\beta,22,25$ -trihydroxy lanosta-8-ene、 $5,8$ -epidioxy-ergosta-6,22-dien- 3β -ol 在网络中度值较大,可能为 *IO.T* 抗 HeLa 细胞的主要活性成分。

根据 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,进一步表明 *IO.T* 抗 HeLa 细胞作用可能与癌症通路、PI3K/AKT 信号通路、Ras 信号通路、癌症小分子核糖核酸、MAPK 信号通路等有关。其中 PI3K/AKT 信号通路显著性最高,PI3K/AKT 通路在多种人类癌症中经常被激活,被认为是一个很有前途的治疗靶点。它们在恶性肿瘤中的作用是激活上游癌蛋白(包括受体酪氨酸激酶和 RAS),以及 PI3K/AKT 通路负调控因子(如 PTEN、TSC1/2、LKB1 和 PIP3)的缺失引起的^[39]。PI3K/AKT/mTOR 轴参与肿瘤转化的可能机制包括刺激增殖、存活、代谢重编程和侵袭/转移,以及抑制自噬和衰老^[40]。另有研究表明,PI3K/AKT 通路具有调节 T 细胞的发育、功能和稳定性,调节免疫的作用^[41]。此外在“活性成分-潜在靶点-通路”网络,PIK3CA、MAPK3、MDM2、AR、CCND1 为度值较大的 5 个潜在靶点,表明 *IO.T* 抗 HeLa 细胞可能与 PIK3CA、MAPK3、MDM2、AR、CCND1 靶点密切相关。其中度值最大的 PIK3CA 属于 PI3K 基因家族的成员,PIK3CA 基因突变经常在人类实体癌中观察到,PIK3CA 突变编码可能会激

活下游 PI3K/AKT 信号通路^[42]。分子对接结果显示,*IO.T* 中度值较大的 5 个度值较大的活性成分 *IO.T* 4、*IO.T* 2、*IO.T* 3、栓菌酸、白桦脂酸与 5 个关键作用靶点 PIK3CA、MAPK3、MDM2、AR、CCND1 结合能均 $\leq -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,具有强烈的结合活性,表明 *IO.T* 与潜在靶点分子生物亲和力高,药效活性较好。

在体内实验验证中,首先建立 HeLa 裸鼠肿瘤模型,观察小鼠的一般情况,记录小鼠肿瘤生长曲线。处死小鼠后,称取瘤重,*IO.T* 高、低剂量组和顺铂组能够显著抑制小鼠瘤重,增加抑瘤率,*IO.T* 低剂量组、*IO.T* 高剂量组和顺铂组的抑瘤率分别为 44.35%, 60.77%, 65.48%。计算脾指数,发现 *IO.T* 给药后能抑制肿瘤小鼠的脾异常增大,抑制肿瘤小鼠脾脏的负免疫调节。酶联吸附试验中,发现 *IO.T* 给药后可显著上调小鼠血清中免疫因子 IL-2、IFN- γ 。剥离的肿瘤组织进行病理学检查,发现给药后肿瘤组织出现坏死区域,肿瘤细胞出现核固缩、核染色加深等类似凋亡的特征。选取显著性最高的 PI3K/AKT 信号通路,对肿瘤组织进行 Western blotting 检测,发现给药后对 PI3K、AKT 蛋白的表达没有显著性影响,而对磷酸化的 PI3K 和 AKT 具有显著性抑制作用。以上实验结果表明,*IO.T* 可通过抑制 PI3K/AKT 通路的活化,抑制肿瘤细胞的增殖,促进肿瘤细胞的凋亡,调节宿主免疫功能,从而抑制 HeLa 裸鼠肿瘤组织的生长。这一结果也与网络药理学预测结果相一致。

综上所述,本研究系统阐述了 *IO.T* 能通过多靶点-多途径共同作用达到抗 HeLa 细胞的物质基础和作用机制,并通过体内实验进行了验证,为桦褐孔菌的进一步研发及其抗肿瘤作用机制的探讨提供参考。

REFERENCES

- [1] ROSALIK K, TARNEY C, HAN J. Human papilloma virus vaccination[J]. *Viruses*, 2021, 13(6): 1091.
- [2] XIA X, LI D, CHENG L, et al. Research progress of the quality of life in patients with cervical cancer[J]. *Shanghai Nurs*(上海护理), 2021, 21(2): 45-49.
- [3] CHENG K Y, HAO M. Metformin inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition via PKM2 relative-mTOR/p70s6k signaling pathway in cervical carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(12): 2000.
- [4] ZANG M T, ZHANG J, YANG Y L, et al. Analysis of current

- research situation of anti-tumor traditional Chinese medicine from the perspective of patents[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2021, 30(24): 2228-2233.
- [5] LUO Y J, YUE H M, HE H H. The role of traditional Chinese medicine in comprehensive anti-tumor therapy[J]. *J Southeast Univ Med Sci Ed(东南大学学报:医学版)*, 2016, 35(2): 289-291.
 - [6] DAI Y C, LI Y. Notes on the nomenclature of six important medicinal fungi in China[J]. *Mycosystema(菌物学报)*, 2011, 30(4): 515-518.
 - [7] YANG J Y, MENG L. Research progress on the general situation and pharmacological action of *Inonotus obliquus*[J]. *Edible Med Mushrooms(食药菌)*, 2021, 29(3): 202-207.
 - [8] WANG Y Q, GUO L P, LIU C M, et al. Isolation of potential α -glucosidase inhibitor from *Inonotus obliquus* by combining ultrafiltration-liquid chromatography and consecutive high-speed countercurrent chromatography[J]. *Anal Methods*, 2021, 13(7): 918-924.
 - [9] DENG L Y, YANG C Y, YAN Y H, et al. Synthesis of acylated triterpenes of *Inonotus obliquus* and their antitumor activities[J]. *J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药)*, 2018, 35(11): 868-873.
 - [10] JIN L D, OU W B, XU X Q. Preliminary study on tumor cell activity inhibition effect of triterpene from submerged fermentation of *Inonotus obliquus*[J]. *J Zhejiang Sci Tech Univ Soc Sci Ed(浙江理工大学学报:社会科学版)*, 2019, 36(1): 98-105.
 - [11] WANG R N, YANG M M, LI G Y, et al. Paclitaxel-betulinic acid hybrid nanosuspensions for enhanced anti-breast cancer activity[J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2019(174): 270-279.
 - [12] SHAO J J, YANG Y, MA D L, et al. Study on the purification technology of total triterpenoid extracts from *Inonotus obliquus* and their antitumor activity *in vitro*[J]. *China Pharm(中国药房)*, 2022, 33(18): 2198-2203.
 - [13] LI X X, JIN C, CHEN K, et al. Mechanism of *Callerya nitida* var. *hirsutissima* in treatment of breast cancer based on network pharmacology[J]. *Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报)*, 2022, 38(5): 767-775.
 - [14] NIU M, ZHANG S Q, ZHANG B, et al. Interpretation of network pharmacology evaluation method guidance[J]. *Chin Tradit Herb Drugs(中草药)*, 2021, 52(14): 4119-4129.
 - [15] WANG Z Y, WANG X, ZHANG D Y, et al. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Development in new era under guidance of network pharmacology evaluation method guidance[J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2022, 47(1): 7-17.
 - [16] HU B C, TIAN J X, ZHANG Y T, et al. Online prediction of compound's druggability[J]. *Chin J Med Chem(中国药物化学杂志)*, 2022, 32(2): 90-101.
 - [17] IM S, CHEN J, CHENG T J, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D1388-D1395.
 - [18] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357-W364.
 - [19] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016(54): 1.30. 1-1.30. 1.30. 33.
 - [20] SCOTT A F, AMBERGER J S. The genes of OMIM: A legacy of Victor McKusick[J]. *Am J Med Genet A*, 2021, 185(11): 3276-3283.
 - [21] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
 - [22] ZHOU Y Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
 - [23] BURLEY S K, BERMAN H M, KLEYWEGT G J, et al. Protein data bank (PDB): The single global macromolecular structure archive[J]. *Methods Mol Biol*, 2017(1607): 627-641.
 - [24] SEELIGER D, DE GROOT B L. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina[J]. *J Comput Aided Mol Des*, 2010, 24(5): 417-422.
 - [25] FANG Y H, MA C J, ZHANG C L, et al. miRNA-496 influences the malignant biological behaviors of cervical cancer HeLa cells and the growth of transplanted tumors in nude mice through mTOR[J]. *Chin J Cancer Biotherapy(中国肿瘤生物治疗杂志)*, 2021, 28(11): 1068-1074.
 - [26] 符婕, 王红. miR-34a 介导的阿魏酸对人宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(13): 2833-2835.
 - [27] 崔杰, 于新, 王立勋, 等. 桦褐孔菌化学成分和药理作用研究进展[J]. *河北中医药学报*, 2017, 32(3): 48-53.
 - [28] DUAN Y C, SUI D, WANG L, et al. Research progress on small molecule chemical components and pharmacological values of *Inonotus obliquus*[J]. *J Fungal Res(菌物研究)*, 2022, 20(3): 214-227.
 - [29] ZHOU Q, LIAN L F, WU L Z, et al. Antitumor effect and immune mechanism of *Sedum lineare* on tumor-bearing mice[J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)*, 2013, 29(6): 83-86.
 - [30] ZLOZA A, DHARMADHIKARI N D, HUELSMANN E J, et al. Low-dose interleukin-2 impairs host anti-tumor immunity and inhibits therapeutic responses in a mouse model of melanoma[J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2017, 66(1): 9-16.
 - [31] SONG Y L, ZHU Y Y, ZHOU Y, et al. IFN- γ and tumor immunity[J]. *J Mod Oncol(现代肿瘤医学)*, 2021, 29(1): 143-148.
 - [32] KIM J, YANG S C, HWANG A Y, et al. Composition of triterpenoids in *Inonotus obliquus* and their anti-proliferative activity on cancer cell lines[J]. *Molecules*, 2020, 25(18): 4066.
 - [33] ZHAO Y X, ZHENG W F. Deciphering the antitumoral potential of the bioactive metabolites from medicinal mushroom *Inonotus obliquus*[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(265): 113321.

- [34] SHI F F, FU Y H, WANG J Z, et al. Trametenolic acid B triggers HSP90AA4P and autophagy in HepG2/2.2. 15 cells by proteomic analysis[J]. *ACS Omega*, 2020, 5(22): 13042-13051.
- [35] WANG J Z, WANG A L, HE H B, et al. Trametenolic acid B protects against cerebral ischemia and reperfusion injury through modulation of microRNA-10a and PI3K/Akt/mTOR signaling pathways[J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2019(112): 108692.
- [36] XU T, PANG Q Y, ZHOU D, et al. Proteomic investigation into betulinic acid-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105768.
- [37] GARCÊS DE COUTO N M, WILLIG J B, RUARO T C, et al. Betulinic acid and brosimine B hybrid derivatives as potential agents against female cancers[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2020, 20(5): 622-633.
- [38] BAEK J, ROH H S, BAEK K H, et al. Bioactivity-based analysis and chemical characterization of cytotoxic constituents from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) that induce apoptosis in human lung adenocarcinoma cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018(224): 63-75.
- [39] AOKI M, FUJISHITA T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR axis[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017(407): 153-189.
- [40] XIE Y B, SHI X F, SHENG K, et al. PI3K/Akt signaling transduction pathway, erythropoiesis and glycolysis in hypoxia (review)[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(2): 783-791.
- [41] POMPURA S L, DOMINGUEZ-VILLAR M. The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function[J]. *J Leukoc Biol*, 2018. Doi: 10.1002/JLB.2MIR0817-349R.
- [42] CANAUD G, HAMMILL A M, ADAMS D, et al. A review of mechanisms of disease across PIK3CA-related disorders with vascular manifestations[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2021, 16(1): 306.
- 收稿日期: 2023-03-07
(本文责编: 陈怡心)