

山豆根抗鼻咽癌活性成分的筛选[△]

南俊伶^{1*},王超众¹,闫广利^{1#},吴芳芳²,宋志军²,王 硕²,周小雷²,缪剑华²,王喜军^{1,2}(1.黑龙江中医药大学国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心/教育部经典名方有效性评价及产业化开发工程研究中心,哈尔滨150040;2.广西壮族自治区药用植物园/西南濒危药材资源开发国家工程实验室,南宁 530023)

中图分类号 R917;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)11-1320-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.11.07



摘要 目的 筛选山豆根抗鼻咽癌的活性成分。方法 选择山豆根主要化学成分,并在Swiss Target Prediction数据库中预测其作用靶点,同时借助GeneCards数据库获取鼻咽癌相关靶点。将山豆根化学成分靶点与鼻咽癌相关靶点取交集后构建蛋白互作(PPI)网络,再利用Cytoscape 3.6.1软件对PPI网络进行分析,筛选山豆根抗鼻咽癌的潜在活性成分和核心靶点。利用分子对接技术评估山豆根潜在活性成分与核心靶点的结合能力,筛选可能的抗鼻咽癌活性成分。利用细胞增殖实验验证山豆根潜在活性成分的抗鼻咽癌活性。结果 共筛选出山豆根抗鼻咽癌潜在活性成分7个(越南槐醇、槲皮素、山豆根素、苦参酮、染料木素、山豆根色烯素、高丽槐素),核心靶点10个(SRC、PIK3CA、MAPK1、MAPK3、AKT1、MAPK8、MAP2K1、PTK2、EGFR、JAK3)。分子对接结果显示,上述山豆根潜在活性成分均具有一定抗鼻咽癌活性;进一步细胞增殖实验结果显示,越南槐醇、山豆根素、高丽槐素对人鼻咽癌CNE-1细胞均具有较好的抑制作用。结论 越南槐醇、山豆根素、高丽槐素可能是山豆根抗鼻咽癌的主要药效物质基础。**关键词** 山豆根;鼻咽癌;活性成分;越南槐醇;山豆根素;高丽槐素

Screening of active components of *Euchresta japonica* against nasopharyngeal carcinoma

NAN Junling¹, WANG Chaozhong¹, YAN Guangli¹, WU Fangfang², SONG Zhijun², WANG Shuo², ZHOU Xiaolei², MIAO Jianhua², WANG Xijun^{1,2} (1. Chinmedomics Research Center of National Administration of Traditional Chinese Medicine/Research Center for Effectiveness Evaluation and Industrialization Development Engineering of Classical Formula of the Ministry of Education, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Guangxi Botanical Garden of Medical Plants/Southwest National Engineering Laboratory for the Resources Development of Endangered Medicinal Materials, Nanning 530023, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To screen the active components of *Euchresta japonica* against nasopharyngeal carcinoma. **METHODS** Main chemical components of *E. japonica* were selected, and their target proteins were predicted in Swiss Target Prediction database. The target proteins of nasopharyngeal cancer were obtained with GeneCards database. Protein-protein interaction (PPI) network was established after the target of chemical components of *E. japonica* was intersected with the target of nasopharyngeal carcinoma; PPI network was analyzed by using Cytoscape 3.6.1 software, and the potential active components and key targets of *E. japonica* against nasopharyngeal carcinoma were screened. The molecular docking technology was used to evaluate binding ability of active component-key target; active components of *E. japonica* against nasopharyngeal carcinoma were screened. The anti-nasopharyngeal cancer effect of potential active components of *E. japonica* was verified by cell proliferation experiment. **RESULTS** Seven potential active components (tonkinensisol, quercetin, sophoranone, matrine, genistein, coumarin, maackiain) and 10 core targets (SRC, PIK3CA, MAPK1, MAPK3, AKT1, MAPK8, MAP2K1, PTK2, EGFR, JAK3) of *E. japonica* against nasopharyngeal carcinoma were screened. The molecular docking results showed that above potential active components all possessed certain anti-nasopharyngeal cancer effect. Cell proliferation activity test showed that tonkinensisol, sophoranone and maackiain had a very significant inhibitory activity on nasopharyngeal carcinoma cells CNE-1. **CONCLUSIONS** Tonkinensisol, sophoranone and maackiain might be the main active components of *E. japonica* against nasopharyngeal carcinoma. **KEYWORDS** *Euchresta japonica*; nasopharyngeal carcinoma; active components; tonkinensisol; sophoranone; maackiain

[△] 基金项目:广西创新驱动发展专项(No.桂科AA18242040);广西科技基地和人才专项(No.桂科AD18126013);广西特色药用资源开发科技创新基地建设项目(No.桂科ZY21195044)

* 硕士研究生。研究方向:中药药效物质基础及新药开发。E-mail:1065913709@qq.com

通信作者:副研究员,硕士生导师。研究方向:中药药效物质基础及新药开发。E-mail:gancaosuan@163.com

山豆根为豆科植物越南槐 *Sophora tonkinensis* Gagnep. 的干燥根和根茎,又名广豆根,具有清热解毒、消肿利咽的功效,可用于治疗火毒蕴结、乳蛾喉痹、咽喉肿痛、齿龈肿痛、口舌生疮^[1]。现代药理学研究表明,山豆根具有抗肿瘤、抗病毒及增强免疫等药理作用^[2-3]。鼻

咽癌是发生于鼻咽黏膜被覆上皮及小涎腺的恶性肿瘤,是我国南方地区的高发性疾病^[1]。目前临床治疗鼻咽癌的常用方法是放疗、化疗等,但均具有副作用,因此,亟待开发治疗鼻咽癌的有效新药。相关研究发现,山豆根氯仿提取物对鼻咽癌细胞具有显著的抑制作用^[5]。基于此,本研究以山豆根为研究对象,利用网络药理学方法、分子对接技术及细胞增殖活性实验,筛选山豆根抗鼻咽癌的活性成分,以期抗鼻咽癌新药开发提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有 MCV-170AICL-PC 型二氧化碳培养箱(日本 Panasonic 公司)、BSC-1100-L II A2 型生物安全柜(北京东联哈尔滨仪器制造有限公司)、IX 71 型显微镜(日本 Olympus 公司)、XSE105 型分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)、FlexA-200 型酶标仪(杭州奥盛仪器有限公司)。

1.2 主要药品与试剂

槲皮素对照品(批号 201008,纯度 >98%)购于四川省维克奇生物科技有限公司;高丽槐素、染料木素对照品(批号分别为 RFS-M03003005008、RFS-R00111812016,纯度均大于 98%)购于成都瑞芬思生物科技有限公司;山豆根素对照品(批号 21S059-A2,纯度 95.8%)购于上海甄准生物科技有限公司;越南槐醇单体(纯度 >98%)为实验室自制;注射用顺铂(批号 H20023460)购于齐鲁制药有限公司;RPMI-1640 培养基购于美国 Hyclone 公司;青霉素-链霉素溶液购于上海碧云天生物技术有限公司;其余试剂为实验室常用规格,水为超纯水。

1.3 细胞

人鼻咽癌细胞株 CNE-1 购于北纳创联生物科技有限公司(批号 20210426)。

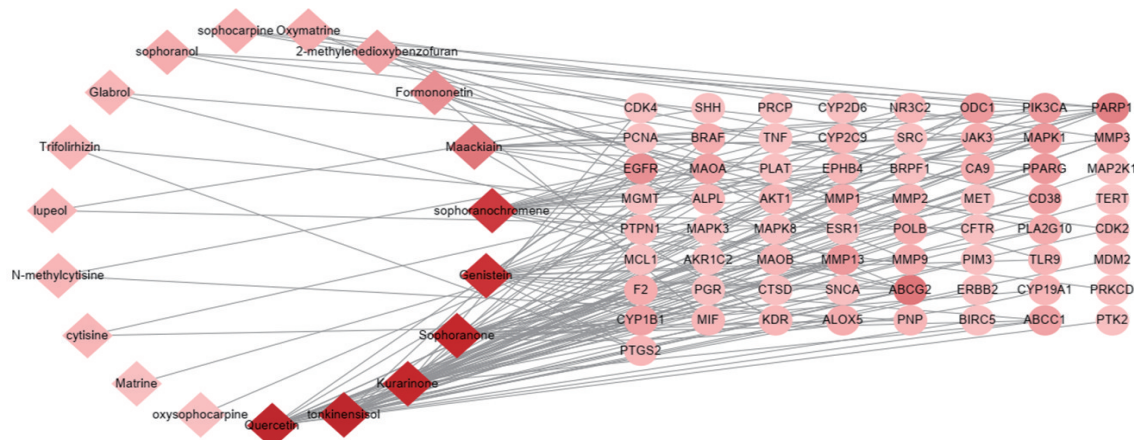
2 方法与结果

2.1 山豆根抗鼻咽癌潜在活性成分的筛选

检索文献[6-12],选择山豆根的主要化学成分(见表 1),然后在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中找到上述主要化学成分对应的 SMILES 号,再将 SMILES 号导入 Swiss Target Prediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中进行靶点的预测。借助 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)以“nasopharynx carcinoma(鼻咽癌)”为关键词获取与鼻咽癌相关的靶点。将上述化学成分的靶点与鼻咽癌相关靶点取交集,得到山豆根抗鼻咽癌的作用靶点及化学成分,再将两者导入 Cytoscape 3.6.1 软件中,构建山豆根抗鼻咽癌化学成分-靶点网络图。将山豆根抗鼻咽癌的作用靶点输入 String 数据库(<https://string-db.org/>)中构建蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络,再借助 Cytoscape 3.6.1 软件对网络进行分析^[13]。结果显示,从山豆根主要化学成分中共筛选到 189 个靶点,鼻咽癌疾病相关靶点共 1 028 个;两者取交集后发现,山豆根抗鼻咽癌的靶点共 65 个。构建的山豆根抗鼻咽癌化学成分-靶点网络见图 1,山豆根抗鼻咽癌的 PPI 网络见图 2。

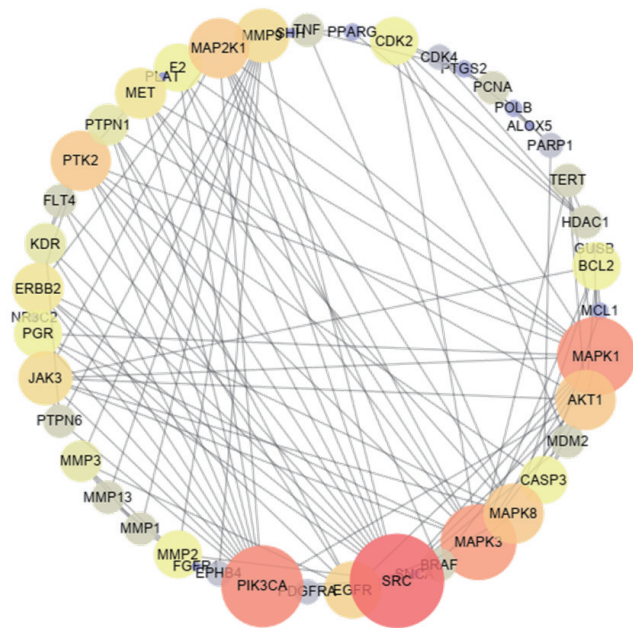
表 1 山豆根的主要化学成分

化学成分	参考文献
tonkinensisol(越南槐醇)	[6]
sophoranone(山豆根素)	[7]
genistein(染料木素)	[12]
maackiain(高丽槐素)	[6]
formononetin(芒柄花黄素)	[8]
2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran[2-(2,4-二羟基苯基)-5,6-亚甲二氧基苯并呋喃]	[7]
sophoranol(槐醇)	[9]
cytisine(金雀花碱)	[9]
trifolirhizin(三叶豆紫檀苷)	[8]
matrine(苦参碱)	[9]
quercetin(槲皮素)	[8]
kurarinone(苦参酮)	[8]
sophoradichromene(山豆根色烯素)	[8]
oxymatrine(氧化苦参碱)	[9]
sophocarpine(槐果碱)	[9]
N-methylcytisine(N-甲基金雀花碱)	[9]
glabrol(羽扇豆醇)	[10]
lupeol(羽扇豆醇)	[11]
oxysophocarpine(氧化槐果碱)	[9]



注:菱形表示山豆根抗鼻咽癌化学成分,圆形表示鼻咽癌相关靶蛋白;节点颜色越深表示其在网络中越重要

图 1 山豆根抗鼻咽癌化学成分-靶点网络图



注:图中节点越大表示其在网络中越重要

图2 山豆根抗鼻咽癌的PPI网络图

对山豆根抗鼻咽癌化学成分-靶点网络分析发现,整个网络的平均Degree值为3.5,网络中大于平均Degree值的化学成分分别为越南槐醇、槲皮素、山豆根素、苦参酮、染料木素、山豆根色烯素、高丽槐素。由此推测,这几种成分可能是山豆根抗鼻咽癌的潜在活性成分。

由图2可知,图中Degree值排名前10位的靶点分别是SRC、PIK3CA、MAPK1、MAPK3、AKT1、MAPK8、MAP2K1、PTK2、EGFR、JAK3。由此推测,这些靶点可能是山豆根抗鼻咽癌的核心靶点。

2.2 山豆根抗鼻咽癌核心靶点与潜在活性成分的分子对接测试

采用半柔性对接方式,将“2.1”项下筛选的山豆根抗鼻咽癌核心靶点与潜在活性成分进行分子对接测试,并计算活性成分与核心靶点间的结合能,评估其结合活

性,结果见表2(表中,1 kcal=4.184 kJ)。在PubChem数据库下载山豆根活性成分的3D结构,在PDB蛋白质数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载核心靶点的结构,并对活性成分进行去除水分子以及加氢处理,借助DockThor平台(<https://dockthor.lncc.br/v2/>)进行在线分子对接,采用Pymol软件将结合能力较好的对接结果进行可视化处理,结果见图3。

表2 山豆根抗鼻咽癌核心靶点与潜在活性成分的分子对接测试结果

核心靶点	活性成分	分子对接结合能/(kcal/mol)	核心靶点	活性成分	分子对接结合能/(kcal/mol)	
EGFR	染料木素	-7.121	PIK3CA	高丽槐素	-7.360	
	苦参酮	-8.131		山豆根色烯素	-7.998	
	槲皮素	-6.901		越南槐醇	-8.271	
	山豆根色烯素	-8.561		苦参酮	-7.069	
	高丽槐素	-8.284		AKT1	越南槐醇	-8.061
	山豆根素	-8.307		槲皮素	-7.473	
MAPK1	山豆根色烯素	-7.981	MAPK8	苦参酮	-7.839	
	越南槐醇	-8.005	MAPK3	越南槐醇	-7.562	
	苦参酮	-7.069	SRC	槲皮素	-8.393	
	JAK3	高丽槐素	-7.567	PTK2	槲皮素	-7.467
MAP2K1	越南槐醇	-7.865				

一般认为配体与受体结合的构象稳定时,发生作用的可能性越大;并且当结合能<-7.0 kcal/mol时,两者具有较好的结合活性,且结合能越低,对接效果越好^[14]。由表1可知,山豆根核心靶点与其对应的潜在活性成分的结合能均低于-7.0 kcal/mol,表明这些成分均具有一定的抗鼻咽癌活性。

2.3 山豆根潜在活性成分对鼻咽癌细胞增殖活性的影响

2.3.1 细胞培养 将人鼻咽癌CNE-1细胞复苏,接种于培养瓶中,使用含10%胎牛血清、1%双抗的RPMI1640培养基在37℃、5%CO₂的细胞培养箱中培养,隔夜换液,并观察细胞的生长状况,当细胞处于对数生长期时,进行细胞增殖实验。

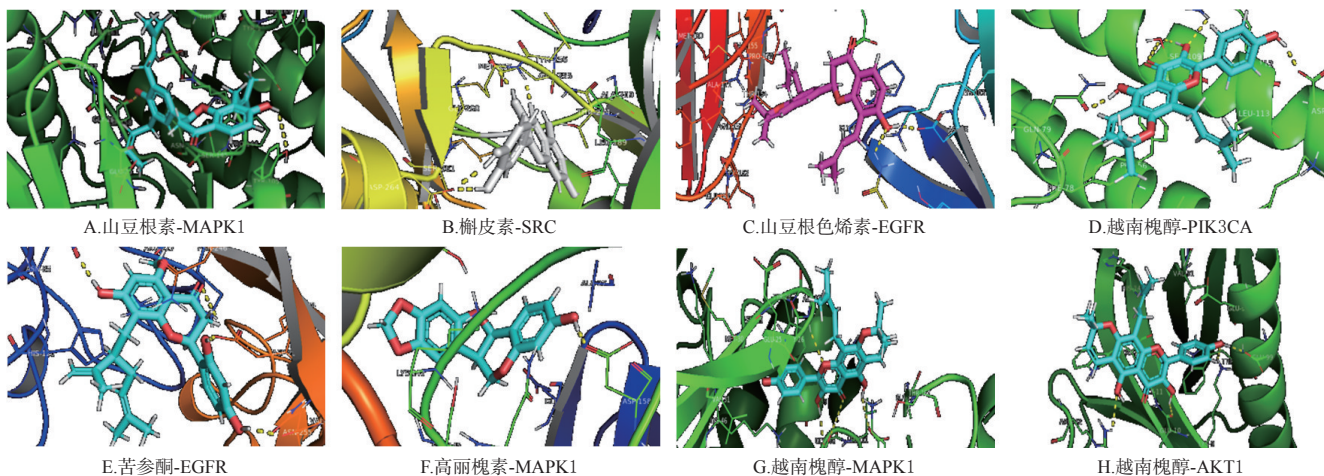


图3 山豆根抗鼻咽癌潜在活性成分与关键靶蛋白的分子对接可视化图

2.3.2 细胞增殖活性的检测 参考文献[15]方法,取对数生长期的细胞制成密度为 $2 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,接种于96孔板中,每孔接种100 μL 。实验分为顺铂组(阳性对照)、高丽槐素组、越南槐醇组、槲皮素组、山豆根素组,各组给药浓度均为100 $\mu\text{mol/L}$ (根据预实验结果设置)。另设不加药物只加细胞的空白组、不加细胞和药物的调零组,每组设6个复孔。各组细胞置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱中培养至贴壁后,加入相应药物,每孔100 μL ;继续培养24、48、72 h后,分别向每孔加入5 mg/mL MTT溶液20 μL ,培养4 h后,弃去上清液;每孔加入150 μL 二甲基亚砜,采用酶标仪于510 nm波长处检测各孔吸光度值(A),并计算细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率 $= [1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{调零组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零组}})] \times 100\%$ 。

结果显示,给药24 h时,顺铂、越南槐醇及山豆根素对人鼻咽癌CNE-1细胞的抑制效果较好,细胞增殖抑制率均大于80%,而高丽槐素、槲皮素的抑制作用相对较弱。给药48、72 h时,山豆根各活性成分的抑制作用均有所提高,且抑制作用由大到小依次为越南槐醇>山豆根素>高丽槐素>槲皮素。结果见表3。

表3 山豆根活性成分对人鼻咽癌CNE-1细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n=6, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h
顺铂组	87.66 \pm 0.67	98.53 \pm 1.61	100.19 \pm 0.28
越南槐醇组	81.59 \pm 2.16	94.51 \pm 0.76	97.93 \pm 0.49
山豆根素组	83.20 \pm 2.40	85.28 \pm 5.78	91.74 \pm 3.93
高丽槐素组	21.39 \pm 2.69	68.70 \pm 1.62	84.00 \pm 2.35
槲皮素组	10.80 \pm 1.64	45.84 \pm 2.08	64.97 \pm 1.96

3 讨论

鼻咽癌的新发病例大部分来自东亚和东南亚地区,其中我国新发鼻咽癌病例占全世界的47.7%,主要分布在广东、广西、湖南、福建等省份^[6]。山豆根主产于广西、广东、四川、贵州等地^[7],对鼻咽癌具有一定的抑制作用,因此,筛选山豆根抗鼻咽癌的活性成分具有重要意义。

本研究利用网络药理学方法、分子对接技术,筛选出山豆根抗鼻咽癌的活性成分有越南槐醇、槲皮素、山豆根素、苦参酮、山豆根色烯素、染料木素、高丽槐素等;进一步考察其中结合能较低的越南槐醇、山豆根素、槲皮素、高丽槐素对人鼻咽癌CNE-1细胞的增殖抑制作用,结果显示,越南槐醇、山豆根素的体外抑制作用较强,接近阳性对照药顺铂。

黄乐等^[6]采用一测多评法对广西7个产地的山豆根成分含量进行测定,结果发现,山豆根中越南槐醇含量为0.08%~0.29%;韩国研究者制备了山豆根提取物,并测得其中三叶豆紫檀苷含量为4.76%、山豆根素含量为3.17%、高丽槐素含量为1.84%^[7];He等^[8]对来自广西、广

东、贵州、湖南、四川的17批山豆根的黄酮类成分进行含量测定,结果显示,山豆根中槲皮素含量为0.02%~0.06%。由此可知,本研究预测的几种潜在活性成分除槲皮素外,均在山豆根中含量较高。越南槐醇、山豆根素、高丽槐素在山豆根抗鼻咽癌化学成分-靶点网络中的Degree值均大于3.5,且与核心靶点的结合能较低;进一步细胞实验结果也表明,这3种成分对人鼻咽癌CNE-1细胞具有较好的抑制作用。由此推测,越南槐醇、山豆根素、高丽槐素可能是山豆根抗鼻咽癌的主要活性成分。槲皮素在山豆根中含量较低,且对人鼻咽癌CNE-1细胞的抑制较弱,可能不是山豆根抗鼻咽癌的主要活性成分。2-(2,4-二羟基苯基)-5,6-亚甲二氧基苯并呋喃在山豆根抗鼻咽癌化学成分-靶点网络中仅关联4个靶点,而且与核心靶点无关联,也可能不是山豆根抗鼻咽癌的主要活性成分。三叶豆紫檀苷在山豆根中含量较高,且有研究报道,三叶豆紫檀苷可在大鼠体内代谢为高丽槐素^[8],由此推测,三叶豆紫檀苷可能在体内转化为高丽槐素,进而发挥抗鼻咽癌作用。

综上所述,本研究初步确定越南槐醇、山豆根素、高丽槐素为山豆根抗鼻咽癌的主要药效物质基础,可为治疗鼻咽癌的新药开发提供参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:28-29.
- [2] 彭百承,黄健,李萍,等. 山豆根颗粒及其饮片抗肿瘤作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(23):190-193.
- [3] PAN Q M, LI Y H, HUA J, et al. Antiviral matrine-type alkaloids from the rhizomes of *Sophora tonkinensis*[J]. J Nat Prod, 2015, 78(7):1683-1688.
- [4] 陈晓钟,黄爽. 鼻咽癌的治疗进展[J]. 浙江医学,2021,43(2):129-133.
- [5] WANG S, SONG Z J, GONG X M, et al. Chloroform extract from *Sophora tonkinensis* Gagnep. inhibit proliferation, migration, invasion and promote apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by silencing the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 271:113879.
- [6] 黄乐,姚彩云,梁莹,等. 一测多评法测定山豆根中3个非生物碱成分含量[J]. 中国现代中药,2020,22(12):2015-2020.
- [7] JANG S M, BAE S H, CHOI W K, et al. Pharmacokinetic properties of trifolirhizin, (-)-maackiain, (-)-sophorane and 2-(2,4-dihydroxyphenyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran after intravenous and oral administration of *Sophora tonkinensis* extract in rats[J]. Xenobiotica, 2015, 45(12):1092-1104.

(下转第1329页)