

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2025.02.0111

论著

利用网络药理学方法探究天山雪莲药效成分治疗骨肉瘤的分子作用机制

陈小雷¹, 孟繁琦^{1,2}, 李心乐^{1,2}, 张平^{1,2,3}

(1.天津医科大学基础医学院人体解剖学系, 天津 300070; 2.卫生部激素与发育重点实验室, 天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300134; 3.天津市脊柱脊髓重点实验室, 天津 300052)

摘要 目的: 探讨天山雪莲药效成分在骨肉瘤治疗中的潜在机制。方法: 利用传统中药系统药理学平台(TCMSP)筛选天山雪莲的药效成分和潜在靶点, 并通过 GEO 数据库分析骨肉瘤的差异表达基因。通过韦恩图识别天山雪莲治疗骨肉瘤的潜在靶点, 结合蛋白质相互作用(PPI)网络及拓扑学分析筛选核心靶点。随后进行分子对接分析, 并通过实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)和蛋白质免疫印迹法(WB), 验证重要药效成分对核心基因表达水平的影响。结果: 识别天山雪莲与骨肉瘤的共同靶点 67 个, 确定基质金属蛋白酶 2(MMP2)为其中的核心基因。分子对接分析显示, 槲皮素与 MMP2 蛋白具有较强的结合能力(结合能为 8.9 kcal/mol)。实验进一步证实槲皮素显著抑制 MMP2 mRNA 在骨肉瘤细胞系 U2OS(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=9.30$, $P=0.000\ 7$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=11.97$, $P=0.000\ 3$)及 HOS(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=13.09$, $P=0.000\ 2$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=21.77$, $P<0.000\ 1$)中的表达水平。此外, 槲皮素还显著下调了 MMP2 蛋白在 U2OS (7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=9.14$, $P=0.000\ 8$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=11.97$, $P=0.000\ 3$)及 HOS 细胞中的表达(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=20.55$, $P<0.000\ 1$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=41.88$, $P<0.000\ 1$)。结论: 天山雪莲的关键成分槲皮素可靶向抑制骨肉瘤细胞中 MMP2 的表达水平, 对骨肉瘤具有潜在的治疗价值。

关键词 天山雪莲; 槲皮素; 骨肉瘤; 基质金属蛋白酶 2; 网络药理学

中图分类号 [R932]

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2025)02-0111-09

Exploring the molecular mechanisms of *Saussureainvolucrata* therapeutic compounds in the treatment of osteosarcoma using network pharmacology

CHEN Xiaolei¹, MENG Fanqi^{1,2}, LI Xinle^{1,2}, ZHANG Ping^{1,2,3}

(1.Department of Anatomy, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2.Key Laboratory of Hormones and Development (Ministry of Health), Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Tianjin 300134, China; 3.Tianjin Key Laboratory of Spine and Spinal Cord, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To investigate the potential mechanisms of therapeutic compounds of *Saussureainvolucrata* (Kar.et Kir.) in the treatment of osteosarcoma. **Methods:** The therapeutic components and potential targets of *Saussureainvolucrata* were screened using the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) platform, and differentially expressed genes in osteosarcoma were analyzed using the GEO database. Potential targets of *Saussureainvolucrata* against for osteosarcoma treatment were identified through Venn diagram analysis, and key genes were screened through protein-protein interaction (PPI) network and topological analysis. Molecular docking analysis was subsequently conducted, and the effects of main therapeutic compounds on key gene expression levels were verified using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blotting (WB) assays. **Results:** A total of 67 common targets between *Saussureainvolucrata* and osteosarcoma were identified, with matrix metalloproteinase 2 (MMP2) recognized as a hub gene. Molecular docking analysis demonstrated a strong binding affinity between quercetin and the MMP2 protein (binding energy of 8.9 kcal/mol). Subsequent experimental results further confirmed that quercetin significantly inhibited the expression levels of MMP2 mRNA in osteosarcoma cell lines U2OS (7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=9.30$, $P=0.000\ 7$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=11.97$, $P=0.000\ 3$) and HOS (7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=13.09$, $P=0.000\ 2$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=21.77$, $P<0.000\ 1$). Furthermore, quercetin also significantly reduced protein expression levels of MMP2 in U2OS (7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=9.14$, $P=0.000\ 8$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=11.97$, $P=0.000\ 3$) and HOS cells (7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=20.55$, $P<0.000\ 1$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=41.88$, $P<0.000\ 1$). **Conclusion:** The key component of *Saussureainvolucrata*, quercetin, can targeted inhibit the expression level of MMP2 in osteosarcoma cells, which has potential therapeutic value for osteosarcoma.

Key words *Saussureainvolucrata*; quercetin; osteosarcoma; matrix metalloproteinase 2; network pharmacology

作者简介 陈小雷(1985-),男,硕士在读,研究方向:天山雪莲药效成分治疗骨肉瘤的分子作用机制研究;通信作者:张平, E-mail: pizhang@tmu.edu.cn。

骨肉瘤是最常见的原发性恶性骨肿瘤之一,多发于儿童和青少年,具有高度的侵袭性和高转移率,患者 5 年生存率低于 50%^[1-2]。尽管该病的治疗

策略不断优化,但患者的总体生存率仍未显著改善,尤其是对于转移性和复发性的骨肉瘤^[3-4]。因此,亟需深入探索骨肉瘤的分子机制和生物标志物,以开发新的治疗策略、改善患者预后。

近年来,传统中医药以其低毒性、多成分、多靶点等独特优势,在肿瘤治疗中显示出巨大潜力^[5-6]。传统中医理论将骨肉瘤的病因总结为“毒热内蕴”、“正虚邪入,搏结伤骨成瘤”,将其归于“痹症”或“骨痹”,常使用活血化瘀、清热解毒和扶正祛邪等方法进行治疗^[7]。天山雪莲(*Saussurea involucrata*, SI)是一种主要产自新疆天山地区的菊科植物,具有祛风胜湿、通经活血的功效,可有效针对痹症,用于风寒湿痹痛及类风湿性关节炎的治疗。研究证实,天山雪莲中的黄酮类化合物可通过丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和核因子 κ B(NF- κ B)等信号通路靶向关键蛋白,发挥对类风湿性关节炎的治疗作用^[8]。因此,天山雪莲在治疗骨肉瘤方面具有很大的潜力。

本研究基于系统网络药理学分析,识别天山雪莲治疗骨肉瘤的潜在有效成分及靶点,并通过对蛋白质相互作用(PPI)网络的拓扑分析筛选出核心基因。然后利用分子对接探索天山雪莲有效成分与核心靶点的作用关系,并通过 qRT-PCR 和蛋白印迹法(WB)初步评估其抗肿瘤效果。

1 材料与方法

1.1 天山雪莲药效成分及作用靶点预测 利用 TCMSP(<https://old.tcmssp-e.com/index.php>)对天山雪莲的重要药效成分及其相关靶点进行预测^[10]。该平台通过药代动力学属性筛选口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和药物相似性(drug-likeness, DL)等参数,对中药的药效成分进行分析。本研究将筛选阈值设定为 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$ 。筛选出的关键成分进一步通过 Cytoscape 软件绘制成分与靶点的 PPI 网络,以直观展示天山雪莲在分子水平上的作用机制。

1.2 骨肉瘤临床样本的差异表达基因筛选 从 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)中获取序列号为 GSE12865 和 GSE14359 的骨肉瘤相关数据集及芯片信息^[11-12]。其中 GSE12865 基于 GPL-6244 平台(Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array),共包括 14 例样本,其中 12 例为骨肉瘤组织样本,2 例为正常成骨细胞;GSE14359 基于 GPL96 平台(Affymetrix Human Genome U133A Array),包括 20 例样本,18 例为骨肉瘤组织样本,2 例为正常成骨细胞。使用 GEO2R 在线工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>)进行差异基因表达分析,阈值设

定为 $P < 0.05$ 且 $|\log FCI| > 1.5$ 。

1.3 天山雪莲对骨肉瘤潜在靶点的鉴定 使用韦恩图将天山雪莲预测的靶点与上述差异表达分析中获得的骨肉瘤相关基因进行交集分析,以识别天山雪莲可能对骨肉瘤产生作用的潜在靶点。

1.4 基因本体(GO)和信号通路富集分析 使用 WebGestalt 生物信息学平台(<https://www.webgestalt.org/>)对潜在靶点进行了 GO 和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路的富集分析^[13]。GO 分析包括生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个方面,富集分析的显著性阈值设定为 $FDR \leq 0.05$ 。结果通过条形图和气泡图的形式进行可视化展示。

1.5 蛋白质相互作用(PPI)网络构建与核心靶点的识别 利用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)识别核心基因靶点的 PPI 关系,通过 Cytoscape 软件构建天山雪莲和骨肉瘤共同靶点的 PPI 网络^[14]。利用 MCODE 和网络分析插件对每个网络节点进行计算,包括 MCODE 得分、中介中心性、接近中心性和度数,其中 MCODE 分析参数设置 Degree Cutoff 为 2, Node Score Cutoff 为 0.2, K-core 为 2。随后,将 4 个指标筛选所得的基因集进行交集分析,以确定核心基因靶点。

1.6 核心靶点表达验证和预后分析 对于识别出的核心靶点,使用 Xena 分析平台(<https://xenabrowser.net/>)进行检索,获得 GDC TARGET-OS 骨肉瘤队列,共 527 例患者,其中包含 88 例骨肉瘤患者及样本信息,对核心靶点的临床表达水平进行分析,显著相关性的判定标准为 $P < 0.05$,验证核心靶点在骨肉瘤中的实际表达情况^[15]。

1.7 分子对接分析 从 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库和 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)中检索天山雪莲的核心药理成分和相关靶点的蛋白结构。首先通过 PyMOL(version 2.1.0)和 AutoDock Tools(version 1.5.6)对蛋白和配体结构进行预处理,以确保分子对接的准确性,然后使用 PyRx 软件(version 0.8)结合 AutoDock Vina 完成分子对接分析。

1.8 细胞培养和实验验证 骨肉瘤细胞系 U2OS 及 HOS 源于国家生物医学实验细胞资源库。将 U2OS 及 HOS 细胞系分别培养于 DMEM(Gibco, 11960077)及 MEM(Gibco, 11095080)培养基中,并补充 10% 的胎牛血清(Gibco, 16000-044)和 100 U/mL 的青霉素/链霉素(Gibco, 15140-122)。将培养箱(Thermo Scientific, 美国)的培养条件设置为 37℃、

5% CO₂。待细胞贴壁生长稳定,达到 80%融合度后,向 2 种细胞的培养板中分别添加浓度为 7.5 μmol/L 和 15 μmol/L 的槲皮素进行处理,同时设立空白对照组,不添加任何药物。药物处理 24 h 后收集细胞,采用 TRIzol 试剂(Thermo Fisher Scientific,美国)提取总 RNA。设计针对核心靶点的特异性引物,使用qRT-PCR 试剂盒(Takara,日本)对核心靶点的基因表达水平进行分析。用于 qRT-PCR 的基质金属蛋白酶(MMP)2 引物序列为:正向引物 5'-TACAGGATCATTGGCTACACACC-3',反向引物 5'-GGTCACATCGCTCCAGACT-3'。反应条件为:95℃ 预变性 3 min;35 个循环的 95℃ 20 s,56℃ 20 s;随后 72℃ 20 s,95℃ 15 s,60℃ 15 s,95℃ 20 min,最后 95℃ 15 s。进一步使用 RIPA 裂解液(碧云天,中国)提取总蛋白,检验蛋白浓度后用于 WB 实验,实验采用 MMP2 抗体(Abcam,ab92536)并以 β-actin 抗体(Proteintech,66009-1-Ig)作为内参蛋白,使用增强型化学发光(enhanced chemiluminescent,ECL)试剂盒显影并通过凝胶成像系统检测蛋白条带。

1.9 统计学处理 实验数据的统计分析通过

GraphPad Prism 6.0 软件进行。正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较使用 *One-Way Anova* 检验, $P<0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

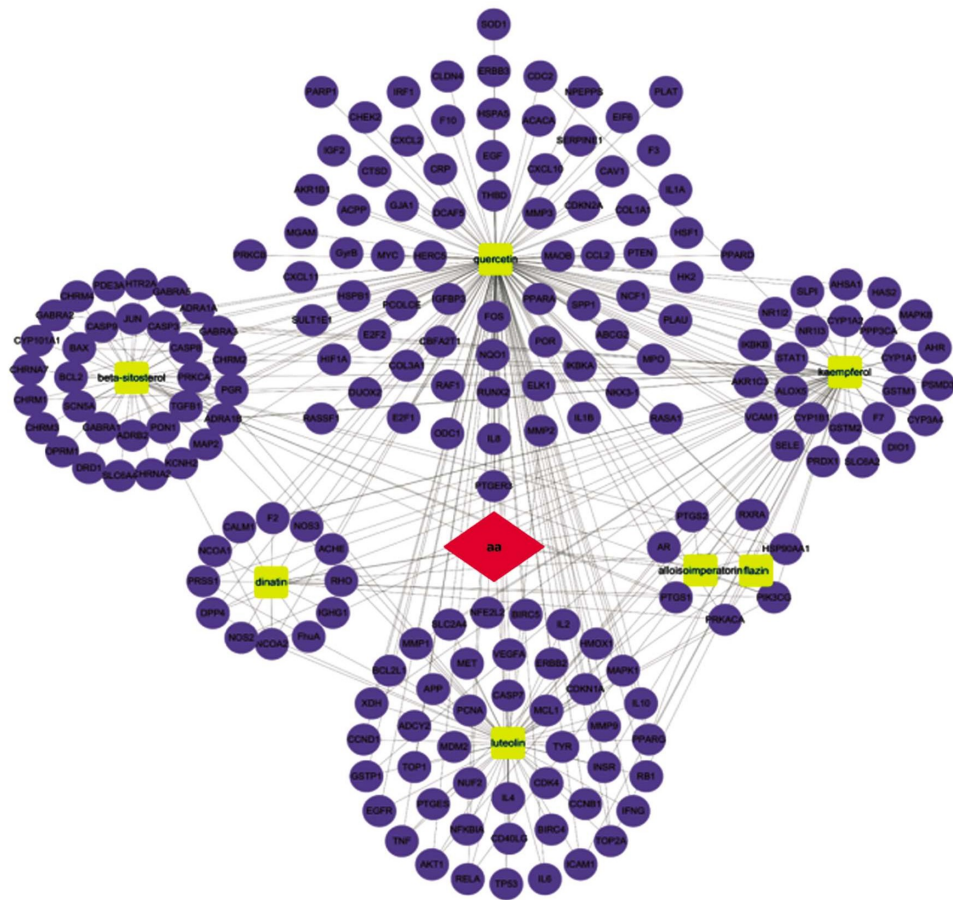
2.1 天山雪莲对骨肉瘤的潜在治疗靶点 通过系统网络药理学分析,鉴定出天山雪莲的 7 种关键药效成分:别异欧前胡素(alloisioimperatorin)、β-谷甾醇(beta-sitosterol)、高车前素(dinatin)、酒渣碱(flazin)、山奈酚(kaempferol)、木犀草素(luteolin)及槲皮素(querعتin),见表1,并确定了这 7 种药效成分对应的 388 个潜在治疗靶点(图 1)。

表 1 天山雪莲的 7 种药效成分

Tab.1 The seven therapeutic components of Saussurea involucrate

分子标识号	英文名称	中文名称	OB (%)	DL
MOL001939	alloisioimperatorin	别异欧前胡素	34.8	0.22
MOL000358	beta-sitosterol	β-谷甾醇	36.91	0.75
MOL001735	dinatin	高车前素	30.97	0.27
MOL009295	flazin	酒渣碱	94.28	0.39
MOL000422	kaempferol	山奈酚	41.88	0.24
MOL000006	luteolin	木犀草素	36.16	0.25
MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43	0.28

注:OB:口服生物利用度;DL:药物相似性



注:天山雪莲药效成分及靶点网络;红色代表天山雪莲(SI),黄色代表 7 种药效成分,紫色表示潜在治疗靶点

图 1 天山雪莲药效成分及潜在治疗靶点

Fig.1 The therapeutic components and potential targets of Saussurea involucrate

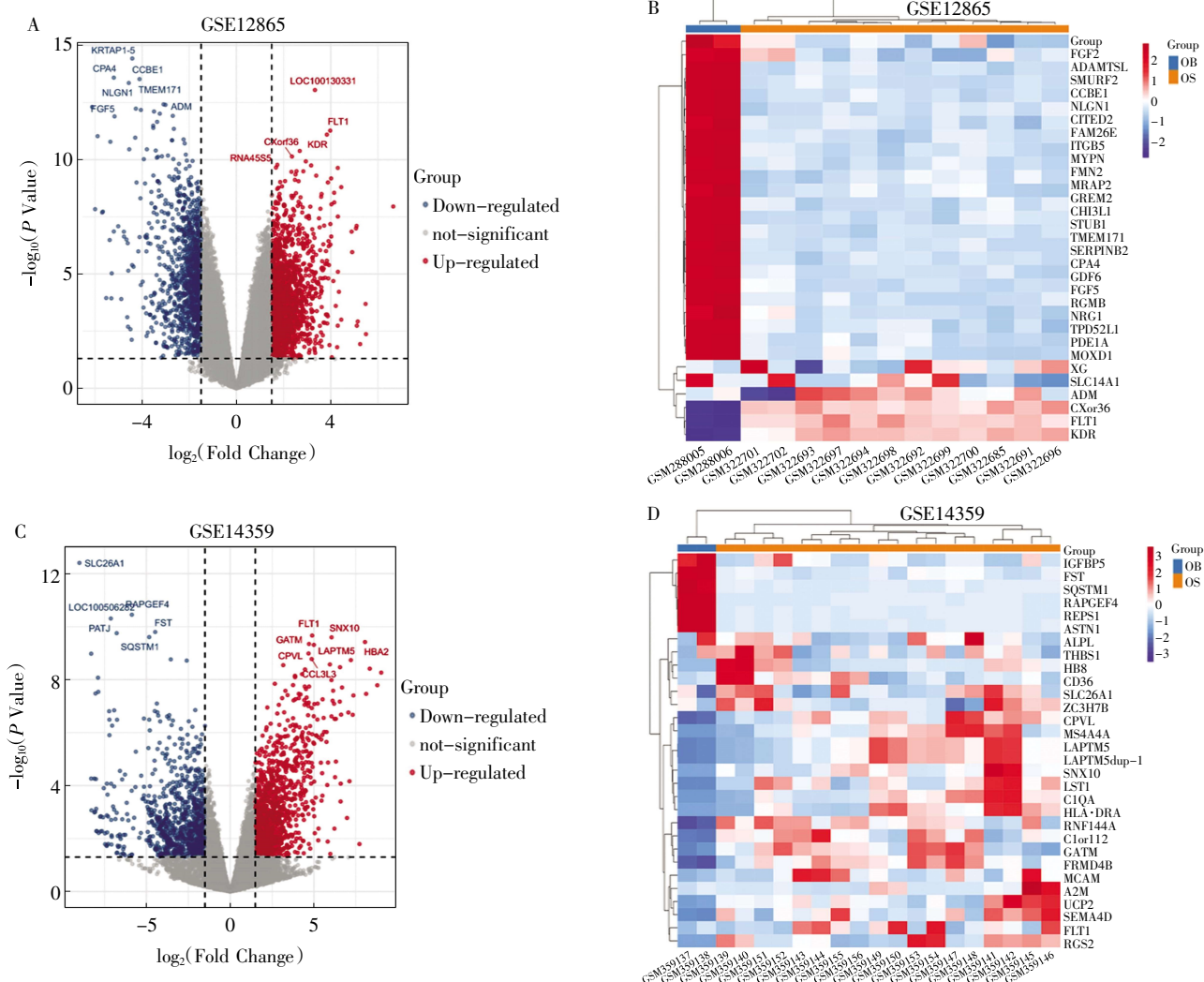
对 GSE12865 数据集的差异表达基因进行分析,共鉴定出 1 754 个与骨肉瘤相关的基因,其中上调的为 758 个,下调的为 996 个。分别绘制火山图及热图(图 2A、B)。对 GSE14359 数据集的分析识别出 1 912 个与骨肉瘤相关的基因,其中包含 1 103 个基因上调,809 个基因下调(图 2C、D)。合并两次差异表达基因的分析结果,共得到 3 148 个骨肉瘤的潜在靶标。通过韦恩图对骨肉瘤的潜在靶标及天山雪莲的预测靶点取交集,共得到 67 个共同靶点(图 3)。进一步构建天山雪莲-骨肉瘤共同靶点网络,其中的核心靶点为 MMP2、白细胞介素(IL)1 β 、肿瘤抑制蛋白 53(tumor protein p53, TP53)、丝氨酸蛋白酶抑制因子 1(serpin family e member 1, SERPINE1)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)等。

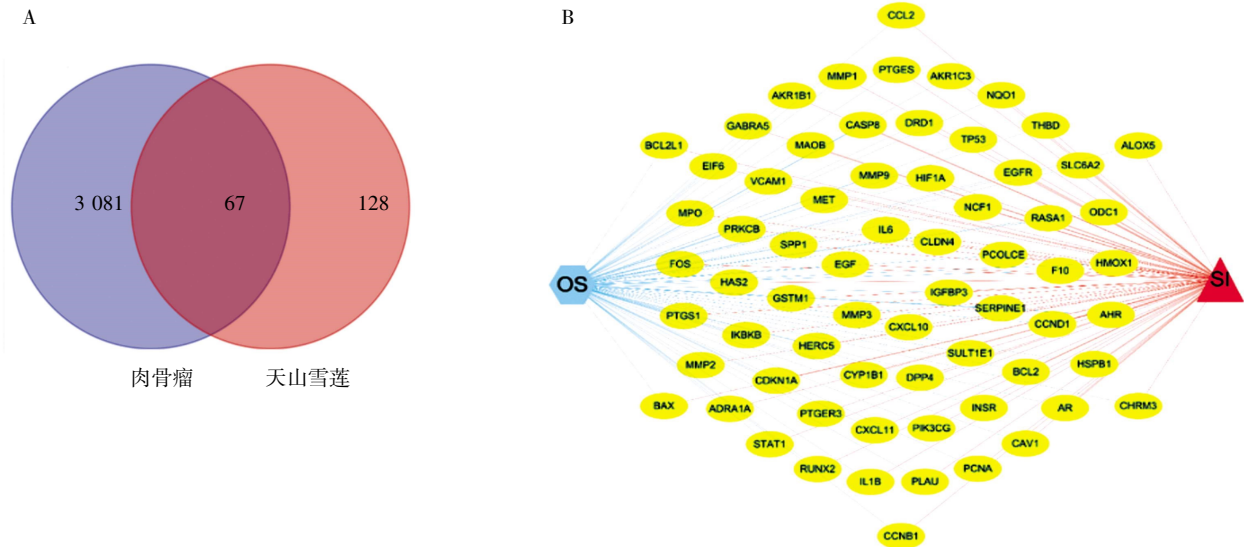
2.2 GO 和 KEGG 信号通路富集分析 GO 分析结

果显示,天山雪莲对骨肉瘤的潜在治疗靶点主要涉及的生物学过程包括刺激反应、生物调控、代谢过程、多细胞生物体过程和细胞通讯等;在细胞组分方面,这些基因主要定位于膜、细胞核、蛋白质复合物、细胞质和细胞外空间等;此外,这些靶基因涉及的分子功能主要与蛋白质结合、离子结合和酶调节活性等功能密切相关($FDR \leq 0.05$),见图 4A。

KEGG 信号通路富集分析表明,这些共享靶基因参与了多种关键的生物学通路,包括肿瘤通路、流体剪切应力与动脉粥样硬化、晚期糖基化终末产物/晚期糖基化终末产物受体(AGE-RAGE)信号通路、p53 信号通路、脂质与动脉粥样硬化以及其他肿瘤相关的信号通路($FDR \leq 0.05$),见图 4B。

2.3 PPI 网络拓扑学分析及核心靶点的识别 利用 STRING 数据库构建了包含 65 个节点和 531 条边的 PPI 网络,并通过 Cytoscape 进行可视化(图 4A)。

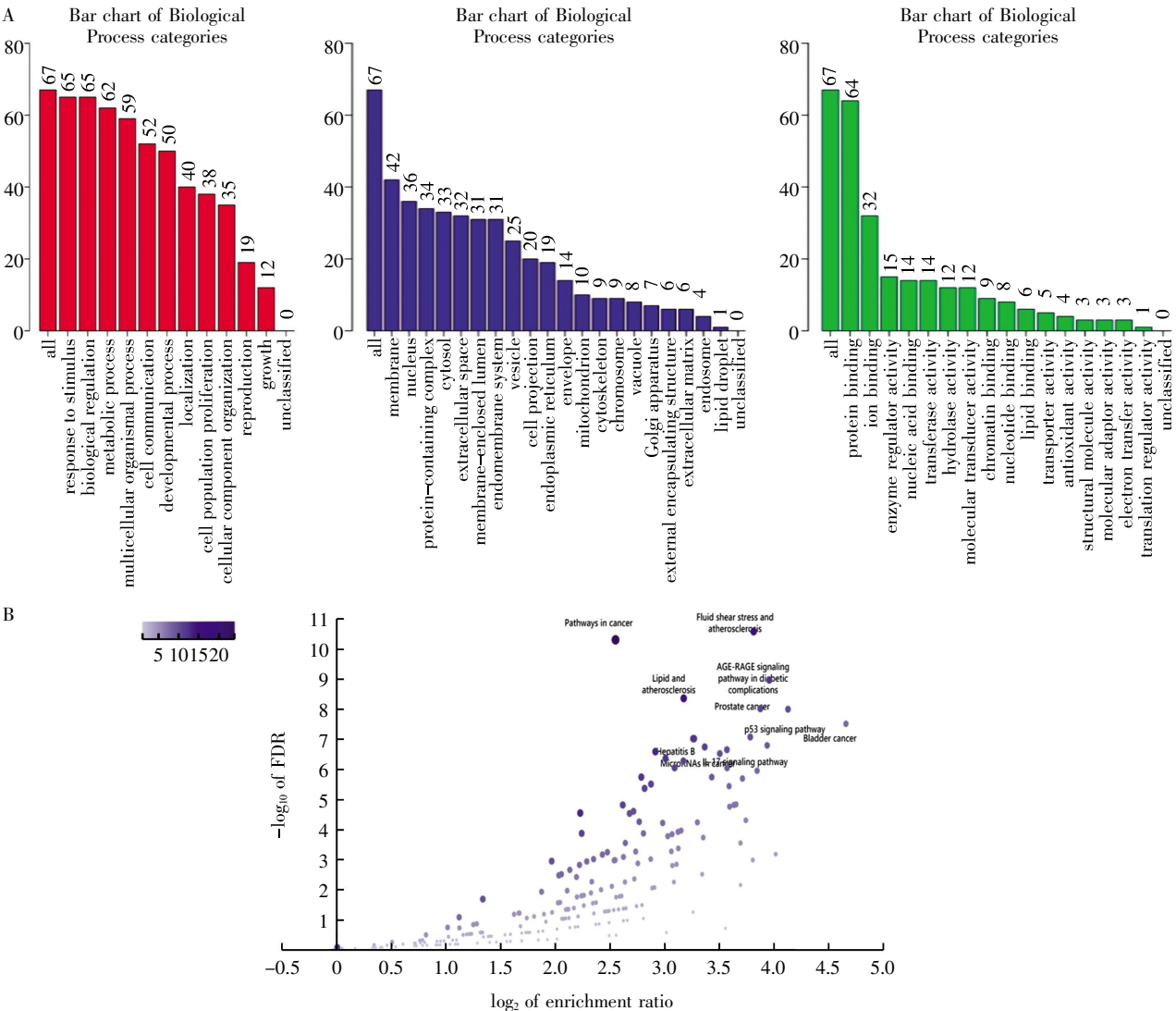




注:通过韦恩图获得 67 个天山雪莲治疗骨肉瘤的潜在靶点;SI:天山雪莲;OS:骨肉瘤

图 3 天山雪莲对骨肉瘤的潜在治疗靶点

Fig.3 Potential therapeutic targets of *Saussurea involucre* for osteosarcoma



注:A:GO 分析结果;B:KEGG 通路分析结果

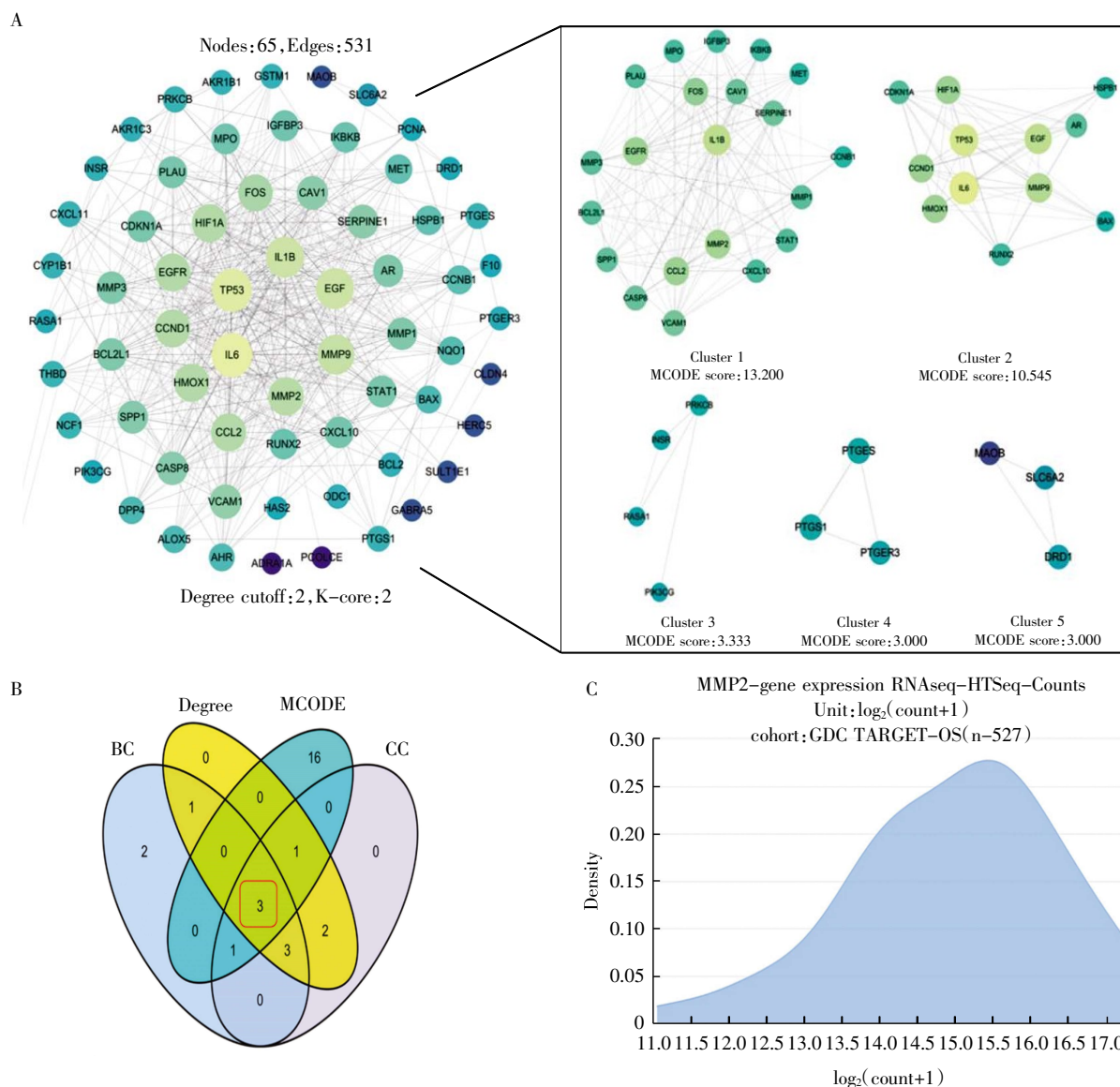
图 4 天山雪莲-骨肉瘤共同靶点的 GO 和 KEGG 分析结果

Fig.4 GO and KEGG analysis results of shared target genes between *Saussurea involucre* and osteosarcoma

通过 MCODE 插件进行分析,共识别出网络中显著的 5 个核心子网络或簇(clsuter),分别由 21 个节点和 132 条边、12 个节点和 58 条边、4 个节点和 5 条边、3 个节点和 3 条边及 3 个节点和 3 条边组成(图 5)。从 MCODE 值最高的簇 1(cluster 1)中,结合中介中心性(betweenness centrality,BC)、接近中心性(closeness centrality,CC)及度值(degree)等中心性指标排名前 10 的基因,最终确定 IL1 β 、MMP2 和 EGFR 为该网络的核心靶点(表 2,图 6A)。为进一步验证这些核心靶点在临床中的相关性,对 IL1 β 、MMP2 和 EGFR 在 GDC TARGET-OS 骨肉瘤患者队列中的表达水平进行检验。结果表明,MMP2 在骨肉瘤临床患者中呈现出显著的高表达趋势。

2.4 槲皮素与 MMP2 蛋白分子对接分析及实验验证 检索 TCMSP 系统药理学分析结果发现,MMP2 为槲皮素的潜在靶点,故通过分子对接分析进一步预测槲皮素与 MMP2 蛋白的结合效能。从 PDB 数据库获取 MMP2 的蛋白结构进行对接,结果显示,槲皮素在 MMP2 的活性位点表现出较强的亲和力,结合能为 8.9 kcal/mol(图 6)。分析显示,配体与蛋白质中的关键氨基酸残基 LEU-82、LEU-137、ILE-141、ALA-83 及 GLY-80 结合成氢键,并与 HIS-120、VAL-117 发生了疏水作用。

在分子对接分析的基础上,进一步通过 qRT-PCR 和 WB 评估槲皮素对 MMP2 基因转录和蛋白翻译的影响。qRT-PCR 实验结果显示,槲皮素剂量



注:A:PPI网络及5个核心子网络;B:PPI网络的3个核心靶点:IL1 β 、MMP2和EGFR;C:GDC TARGET-OS骨肉瘤样本中MMP2的显著高表达趋势

图 5 天山雪莲-骨肉瘤共同靶点的 PPI 网络及核心靶点

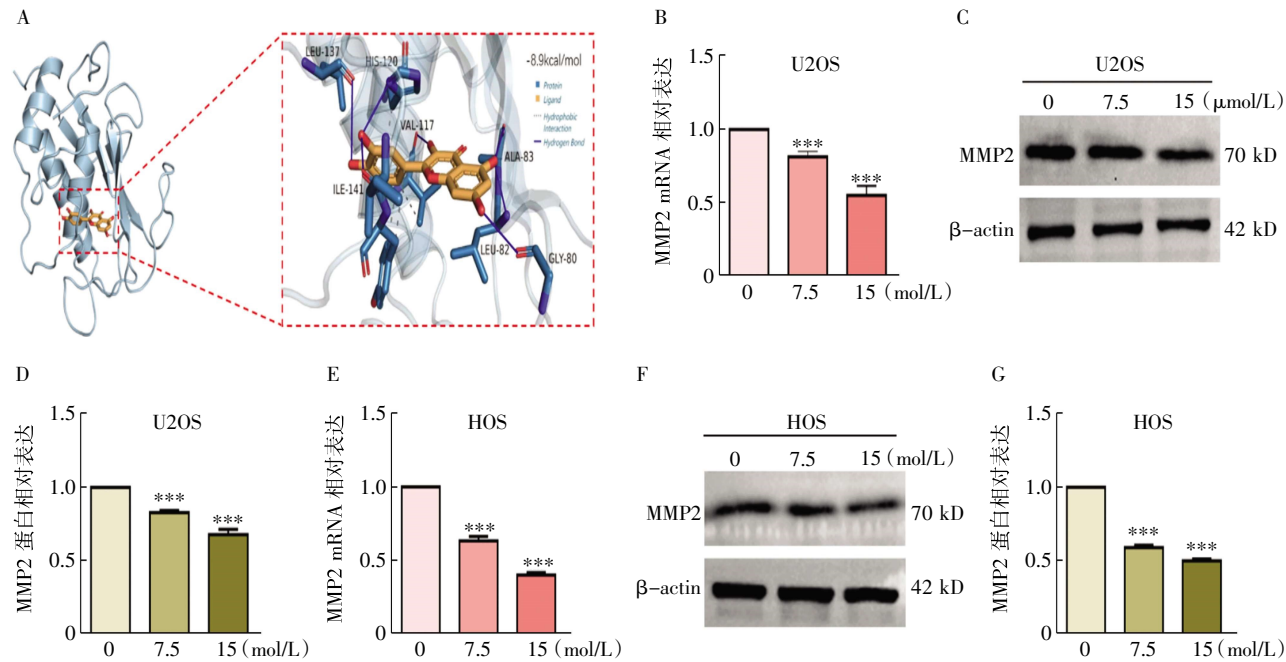
Fig.5 PPI network and hub genes of key targets between *Saussureainvolucrata* and osteosarcoma

依赖性地抑制 U2OS 细胞中 MMP2 mRNA 的表达水平(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=9.30$, $P=0.000\ 7$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=11.97$, $P=0.000\ 3$)及 HOS 细胞中 MMP2 mRNA 的表达水平(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=13.09$, $P=0.000\ 2$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=21.77$, $P<0.000\ 1$)。WB 分析结果进一步证实,槲皮

素可显著下调 U2OS 细胞中 MMP2 的蛋白表达水平(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=9.14$, $P=0.000\ 8$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=11.97$, $P=0.000\ 3$)及 HOS 细胞中 MMP2 蛋白的表达水平(7.5 $\mu\text{mol/L}$: $t=20.55$, $P<0.000\ 1$; 15 $\mu\text{mol/L}$: $t=41.88$, $P<0.000\ 1$)。

表 2 PPI 网络拓扑学分析结果
Tab.2 Topological analysis results of the PPI network

基因符号	MCOD E 值	基因符号	中介中心性	基因符号	接近中心性	基因符号	度值
FOS	15	FOS	0.141	IL6	0.722	IL6	45
IGFBP3	15	IL6	0.113	TP53	0.707	TP53	43
PLAU	14.890	DRD1	0.104	IL1B	0.670	EGF	39
MMP3	14.386	TP53	0.086	EGF	0.670	IL1 β	39
SPP1	14.386	EGFR	0.078	MMP9	0.657	MMP9	37
MMP1	14.386	EGF	0.066	FOS	0.644	MMP2	34
SERPINE1	14.131	MMP2	0.051	EGFR	0.637	EGFR	33
VCAM1	14.000	IL1B	0.045	MMP2	0.637	HMOX1	33
BCL2L1	13.650	HMOX1	0.031	CCL2	0.631	CCND1	33
CAV1	13.000	SLC6A2	0.031	CCND1	0.631	CCL2	33
MPO	13.000						



注:A:分子对接分析结果显示,槲皮素与 MMP2 蛋白可能存在较强的亲和力,可在多个关键氨基酸残基位点发生相互作用;B:qRT-PCR 显示,槲皮素剂量依赖性地抑制 U2OS 细胞中 MMP2 mRNA 的表达;C、D:WB 结果证实槲皮素显著下调 U2OS 细胞中 MMP2 蛋白表达;E: qRT-PCR 结果表明槲皮素剂量依赖性地抑制 HOS 细胞中 MMP2 mRNA 的表达;F、G:WB 分析结果显示,槲皮素显著抑制 HOS 细胞中 MMP2 蛋白表达水平;MMP2:基质金属蛋白酶 2;*** $P<0.000\ 1$

图 6 槲皮素与 MMP2 蛋白分子对接分析及实验验证

Fig.6 Molecular docking analysis and experimental validation of Quercetin and MMP2 protein

3 讨论

骨肉瘤是原发性恶性骨肿瘤的常见类型,虽然整体上发病率较低,但极具侵袭性。临床中 10%~20% 的患者可出现转移,最常见的转移部位是肺

部^[16]。目前,保肢手术结合阿霉素、顺铂以及大剂量甲氨蝶呤的联合化疗方案是该病的首选^[17]。然而长期用药可能导致抗药性,降低了肿瘤细胞对药物的敏感程度,使该病的总体生存率在过去 40 年中未

有显著改善^[18]。尽管基因治疗和免疫疗法在骨肉瘤的治疗中展示出的良好前景,但由于该病复杂的基因异质性和免疫抑制性肿瘤微环境,这些疗法在临床上的广泛应用仍然面临极大挑战。近年来,研究证实传统中医药可通过调节 MAPK、Wnt/ β -catenin、酪氨酸激酶/转录因子 3 (tyrosine kinase/transcription factor 3, JAK/STAT3) 及 NF- κ B 等多条与肿瘤相关的重要信号通路,在不同类型的肿瘤中发挥“多成分、多靶点、多通路”的治疗优势,对骨肉瘤的治疗也有巨大的潜在价值^[7]。

天山雪莲是一种名贵的中药材,以其温润化燥、祛寒益气的独特药性闻名,具有显著的抗炎镇痛、抗疲劳和抗肿瘤等多种药理功效^[19]。本研究通过系统网络药理学方法,挖掘出天山雪莲的 7 种潜在药效成分:别异欧前胡素、 β -谷甾醇、高车前素、酒渣碱、山奈酚、木犀草素及槲皮素。此外,对天山雪莲及骨肉瘤的 67 个共同靶点进行 KEGG 信号通路富集分析,结果表明这些靶点与多个肿瘤相关的信号通路联系紧密,进一步支持了天山雪莲在抗骨肉瘤治疗中的潜在价值。在此基础上,结合分子对接分析、qRT-PCR 和 WB 实验,进一步证实了关键药效成分槲皮素对骨肉瘤细胞 MMP2 在转录和翻译水平上的显著抑制作用。

槲皮素作为一种具有多功能药效的黄酮类化合物,不仅在免疫保护、抗炎、抗病毒和抗衰老方面展示出显著的效果,同时还具备强大的抗肿瘤潜力^[20]。研究表明,槲皮素可在肿瘤细胞内作用于多个靶点,并通过抑制 MAPK 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 等肿瘤相关信号通路,增加活性氧簇水平,同时还可调节上皮-间质转化标志物及部分 MMP,从而有效抑制肿瘤细胞的迁移、侵袭及耐药性^[21]。此外,槲皮素还可通过对 miR-15a、let-7c、miR-197 等多种非编码 RNA 的调节,抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭,诱导其凋亡^[22]。基于这些多重机制,槲皮素在肿瘤预防和治疗中的应用前景广泛,本研究进一步揭示了其在骨肉瘤治疗领域的潜在价值,并初步确认 MMP2 为其重要的作用靶点。

MMP2 主要通过蛋白水解作用降解细胞外基质和基底膜中的明胶、IV 型胶原和 V 型胶原,其基因的过度表达或激活会导致细胞外基质和基底膜的降解,促进肿瘤细胞的浸润、侵袭及转移^[23]。此外, MMP2 还在细胞凋亡、增殖和血管生成中也发挥着关键作用,目前已被证实与黑色素瘤、肺癌、胃癌、乳腺癌及肾细胞癌等多种恶性肿瘤密切相关^[24]。在

黑色素瘤中, MMP2 的高表达与肿瘤的高侵袭性及加速进展紧密联系,通常预示着较差的预后,敲低 MMP2 可显著抑制肿瘤生长^[25]。而在乳腺癌中, MMP2 可通过金属蛋白酶组织抑制因子-2 (tissue inhibitor of metalloproteinases -2, TIMP -2)/MMP14/MMP2 通路,促进肿瘤细胞穿越血管内皮,增强了肿瘤的转移能力^[26]。

本研究不仅揭示了 MMP2 可能是天山雪莲治疗骨肉瘤的潜在核心靶点,还通过对 GDC TAR-GET-OS 骨肉瘤队列的深入分析,证实 MMP2 在骨肉瘤患者中的特异性高表达。这种高表达不仅与肿瘤的侵袭性和转移能力密切相关,还往往预示着较差的预后。而分子对接结果显示,槲皮素可与 MMP2 蛋白在多个关键位点,通过多种形式进行稳固结合,提示槲皮素对 MMP2 蛋白的潜在抑制能力。进一步通过 qRT-PCR 和 WB 实验证实,经不同浓度的槲皮素处理后, MMP2 的转录和翻译水平均显著下调,这可能通过槲皮素与 MMP2 蛋白的直接靶向结合以及 mTOR 和 MAPK 等信号通路的调控来实现,提示槲皮素可能通过多种机制的联合作用,减缓甚至抑制骨肉瘤的发展,这些发现进一步支持了槲皮素或天山雪莲作为骨肉瘤潜在治疗药物的应用前景。

综上所述,本研究通过网络药理学结合分子生物学实验验证,系统揭示了天山雪莲中的重要药效成分槲皮素在骨肉瘤治疗中的潜在价值,并初步确认 MMP2 为其关键作用靶点。研究分析表明,槲皮素可抑制 MMP2 的表达水平从而发挥药效。本研究不仅证实槲皮素是一种具有广泛应用前景的抗肿瘤药物,也为探索天山雪莲在骨肉瘤治疗中的药效成分基础及进一步临床转化应用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] MAO P, FENG Z, LIU Y, et al. The Role of ubiquitination in osteosarcoma development and therapies[J]. *Biomolecules*, 2024, 14 (7): 791.
- [2] REN S, ZHANG X, HU Y, et al. Blocking the Notch signal transduction pathway promotes tumor growth in osteosarcoma by affecting polarization of TAM to M2 phenotype[J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (17): 1057.
- [3] THANINDRATARN P, DEAN D C, NELSON S D, et al. Advances in immune checkpoint inhibitors for bone sarcoma therapy[J]. *J Bone Oncol*, 2019, 15: 100221.
- [4] SHIM T, CHILLAKURU Y, DARWISH C, et al. Head and neck osteosarcomas: analysis of treatment trends and survival outcomes in the United States (2004–2016)[J]. *Head Neck*, 2021, 43: 3294–3305.

- [5] RAMAKRISHNA K, KARUTURI P, SIAKABINGA Q, et al. Indole-3 Carbinol and diindolylmethane mitigated β -amyloid-induced neurotoxicity and acetylcholinesterase enzyme activity: in silico, *in vitro*, and network pharmacology study[J]. *Diseases*, 2024, 12(8): 184.
- [6] ZHANG C, LU M, LI C N, et al. Mechanism of inhibition of TLR4/NF κ B/NLRP3 inflammatory pathway against AD based on the network pharmacology of Erjing Pills[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(34): e39392.
- [7] LIUY, JIANG B, LI Y, et al. Effect of traditional Chinese medicine in osteosarcoma: cross-interference of signaling pathways and potential therapeutic targets[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(3): e36467.
- [8] SUNQ, MA L, ZHU X. Metabolomics-based exploration the response mechanisms of *Saussureainvolucrata* leaves under different levels of low temperature stress[J]. *BMC Genomics*, 2023, 24(1): 297.
- [9] CHEN J, WU X, YU R. Unraveling the Therapeutic mechanism of *saussureainvolucrata* against rheumatoid arthritis: a network pharmacology and molecular modeling-based investigation[J]. *Nutrients*, 2023, 15(19): 4294.
- [10] JINLONG R, PENG L, JINAN W, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminformatics*, 2014, 6: 13.
- [11] SADIKOVIC B, YOSHIMOTOM, CHILTON-MACNEILL S, et al. Identification of interactive networks of gene expression associated with osteosarcoma oncogenesis by integrated molecular profiling[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(11): 1962-1975.
- [12] FRISCHE-GUENTHER R, NOSKEA, UNGETHUM U, et al. De novo expression of EphA2 in osteosarcoma modulates activation of the mitogenic signalling pathway[J]. *Histopathology*, 2010, 57(6): 836-850.
- [13] ELIZARRARAS J M, LIAO Y, SHI Z, et al. WebGestalt 2024: faster gene set analysis and new support for metabolomics and multi-omics[J]. *Nucleic Acids Res*, 2024, 52(W1): W415-W421.
- [14] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13: 2498-2504.
- [15] CUI X, WANG H, WU X, et al. Increased expression of KPNA2 predicts unfavorable prognosis in ovarian cancer patients, possibly by targeting KIF4A signaling[J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14(1): 71.
- [16] MILLER B J, CRAMP, LYNCH C F, et al. Risk factors for metastatic disease at presentation with osteosarcoma: an analysis of the SEER database[J]. *J Bone Jt Surg*, 2013, 95: e89.
- [17] CHOU A J, GORLICK R. Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions[J]. *Expert Rev Anti-cancer Ther*, 2006, 6: 1075-1085.
- [18] KANSARA M, TENG M W, SMYTHMJ, et al. Translational biology of osteosarcoma[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14: 722-35.
- [19] GONG G, HUANGJ, YANGY, et al. *Saussureae involucratae* Herba (Snow Lotus): review of chemical compositions and pharmacological properties[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 10: 1549.
- [20] RATHER R A, BHAGAT M. Quercetin as an innovative therapeutic tool for cancer chemoprevention: molecular mechanisms and implications in human health[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(24): 9181-9192.
- [21] SRINIVASAN A, THANGAVELC, LIUY, et al. Quercetin regulates beta-catenin signaling and reduces the migration of triple negative breast cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2016, 55: 743-756.
- [22] WANG M, CHEN X, YU F, et al. The targeting of noncoding RNAs by quercetin in cancer prevention and therapy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022: 4330681.
- [23] VANDOOREN J, VANEN STEEN P E, OPDENAKKER G. Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(3): 222-272.
- [24] MUNIZ-BONGERS L R, MCCLAINCB, SAXENA M, et al. MMP2 and TLRs modulate immune responses in the tumor microenvironment[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(12): e144913.
- [25] HOFMANN U B, WESTPHAL J R, VAN MUIJEN G N, et al. Matrix metalloproteinases in human melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(3): 337-344.
- [26] KWON M J. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in breast cancer[J]. *Front Oncol*, 2023, 12: 1108695.

(2024-09-24 收稿)

欢 迎 踊 跃 投 稿