中图分类号:R932;R285.5　　文献标志码:A　　文章编号:1006－4931(2025)23－0046－12
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.23.011

蟾毒它灵抗骨肉瘤作用机制的网络药理学和体外试验研究*

孟晶晶,丁启轩,胡玉洁,徐玲艳,张婧娴,张湘奇,陈君君,韩永龙△

(上海交通大学医学院附属第六人民医院,上海　200233)

摘要:目的　探讨蟾毒它灵诱导自噬抗骨肉瘤的作用机制。**方法**　采用细胞计数试剂盒(CCK－8)法筛选15种华蟾素注射液体外抗骨肉瘤的活性成分,采用流式细胞术和免疫印迹(Western blot)法检测其对143B和SAOS2细胞凋亡的影响,并构建类器官模型验证其抑制作用。通过GeneCards,DisGeNET,Comparative Toxicogenomics Database,Pharmmapper,SEA等数据库预测骨肉瘤相关靶点,通过SwissTargetPrediction等数据库预测蟾毒它灵的作用靶点,采用Venny 2.1.0软件获取共有靶点,采用String数据库和CytoScape 3.10.1软件构建蛋白－蛋白互作(PPI)网络,并进行基因本体论(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。采用AutoDock Tools 1.5.7软件对蟾毒它灵和自噬关键靶点进行分子对接验证,选用3－methyladenine(3－MA)作为自噬抑制剂,通过Western blot法、CCK－8法和流式细胞术验证蟾毒它灵调控自噬对细胞增殖和凋亡的影响。**结果**　蟾毒它灵是华蟾素注射液中抗骨肉瘤细胞增殖能力最强的活性成分,可诱导143B和SAOS2细胞凋亡,上调Bax表达,下调B细胞淋巴瘤2(Bcl－2)表达,且能显著抑制类器官生长,并引起部分凋亡。网络药理学分析结果显示,筛选出蟾毒它灵抗骨肉瘤的潜在靶点88个,蟾毒它灵抗骨肉瘤的作用机制可能与自噬、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶等有关。分子对接结果显示,蟾毒它灵与自噬靶点LC3B和P62结合稳定。体外试验结果显示,蟾毒它灵可上调LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ蛋白表达,下调P62蛋白表达,诱导骨肉瘤细胞自噬。加入3－MA后,蟾毒它灵对LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ和P62蛋白的调控作用被逆转,细胞增殖能力增强,凋亡水平降低。**结论**　蟾毒它灵可能通过诱导自噬发挥抗骨肉瘤作用,为基于自噬调控的骨肉瘤靶向治疗提供了理论依据。

关键词:蟾毒它灵;骨肉瘤;网络药理学;体外试验;自噬;LC3B蛋白;P62蛋白

Mechanism of Bufotalin Against Osteosarcoma Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Experiment

MENG Jingjing, DING Qixuan, HU Yujie, XU Lingyan, ZHANG Jingxian, ZHANG Xiangqi, CHEN Junjun, HAN Yonglong

(Shanghai Sixth People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, China　200233)

Abstract: Objective　To investigate the mechanism of bufotalin－induced autophagy in osteosarcoma. **Methods**　Fifteen active ingredients of Huachansu Injection against osteosarcoma *in vitro* were screened by the cell counting kit (CCK－8) method. Flow cytometry and Western blot were used to detect their effects on apoptosis of 143B and SAOS2 cells, and organoid models were constructed to verify their inhibitory effects. Osteosarcoma－related targets were predicted through databases such as GeneCards, DisGeNET, Comparative Toxicogenomics Database, Pharmmapper, and SEA. The action targets of bufotalin were predicted through the SwissTarget Prediction database. Common targets were obtained by the Venny 2.1.0 software, and the protein－protein interaction (PPI) network was constructed by the String database and CytoScape 3.10.1 software. Gene Ontology (GO) functional analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed. AutoDock Tools 1.5.7 software was used to perform molecular docking validation of bufotalin and key autophagy targets. 3－Methyladenine (3－MA) was selected as an autophagy inhibitor, and Western blot, CCK－8, and flow cytometry were used to verify the effect of bufotalin on regulating autophagy and cell proliferation and apoptosis. **Results**　Bufotalin was the most potent active ingredient in Huachansu Injection against the proliferation of osteosarcoma cells, it induced apoptosis in 143B and SAOS2 cells, upregulated Bax expression, downregulated B－cell lymphoma 2 (Bcl－2) expression, and significantly inhibited organoid growth, and induced partial apoptosis. The results of network pharmacology analysis showed that 88 potential targets of bufotalin against osteosarcoma were screened, the mechanism of bufotalin against osteosarcoma maight be related to autophagy, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase, etc. The molecular docking results showed that the binding of bufotalin to autophagy targets LC3B and P62 was stable. The results of the *in vitro* experiment showed that bufotalin could upregulate the expression of LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ proteins, downregulate the expression of P62 protein, and induce autophagy in osteosarcoma cells. After adding 3－MA, the regulatory effect of bufotalin on LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ and P62 proteins was reversed, and the proliferation ability of cells increased while the apoptosis level reduced. **Conclusion**　Bufotalin may exert anti－osteosarcoma

*基金项目:国家自然科学基金[82474124];上海市儿童基金会课题[X－5693(LG)]。

第一作者:孟晶晶,女,硕士研究生,研究方向为中药抗肿瘤药理学,(电子信箱)17857699303@163.com。

△通信作者:韩永龙,男,博士研究生,主任药师,研究方向为中药抗肿瘤药理学、药代动力学,(电子信箱)yonglongh@sjtu.edu.cn。

effect by inducing autophagy, it provides a theoretical basis for autophagy - regulated osteosarcoma targeted therapy.
Key words: bufotalin; osteosarcoma; network pharmacology; *in vitro* experiment; autophagy; LC3B protein; P62 protein

骨肉瘤为常见原发性恶性骨肿瘤，多发于青少年和60岁以上老年人群[1]。治疗骨肉瘤主要采用手术联合化学治疗（简称化疗）的综合方案，目前临床一线化疗方案多采用阿霉素、顺铂和甲氨蝶呤联用方案[2]，但其具有显著的心脏毒性、肾功能损伤等不良反应及严重耐药性[3]。近年来，中医药以其多生物活性成分、多靶点、多通路协同作用的治疗优势被广泛关注，深入研究中药抗骨肉瘤的作用机制将为抗骨肉瘤新药和新靶点的研发提供理论依据。目前已从华蟾素注射液（HCSI）中鉴定出蟾蜍二烯内酯、吲哚生物碱、肽类等100余种化合物。其中，蟾蜍二烯内酯类化合物蟾毒它灵、蟾毒灵、华蟾素毒基等被认为是HCSI主要的抗肿瘤活性成分[4-7]。有研究发现，蟾毒它灵具有抗肿瘤细胞增殖、迁移等作用，可通过调控细胞凋亡、铁死亡等途径，显著抑制非小细胞肺癌[8]、成骨细胞瘤[9]、三阴性乳腺癌[10]等肿瘤的生长，但蟾毒它灵抗骨肉瘤的作用机制、主要靶点和通路目前尚不清楚。本研究中采用细胞计数试剂盒（CCK-8）法从HCSI含有的15种蟾蜍二烯内酯类化合物中筛选出抗骨肉瘤细胞增殖能力最强的蟾毒它灵，并结合网络药理学与体外试验探讨了蟾毒它灵诱导骨肉瘤细胞自噬的作用机制，为抗骨肉瘤的药物研发和基于自噬调控的骨肉瘤治疗策略提供参考。

1 仪器、试药与细胞株

1.1 仪器

BB 150型37 ℃细胞培养箱、NanoDrop2000型超微量分光光度计（美国Thermo公司）；CytoFLEX型流式细胞仪（美国Bechman Coulter公司）；Epoch型多功能酶标仪（美国BioTek公司）；5245R型低温高速离心机（德国Eppendorf公司）；BX53型普通光学显微镜、CKX53型倒置荧光显微镜（日本Olympus公司）；ImageQuant LAS 4000型显影仪（美国GE Healthcare公司）。

1.2 试药

15种HCSI单体活性成分（相关信息见表1），购自宝鸡市辰光生物科技有限公司，加二甲基亚砜（DMSO）制成浓度为640 μmol/L的溶液；Dulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM，美国Gibco公司，货号为C11995500）；胎牛血清（FBS，上海百赛生物技术股份有限公司，货号为2318150）；0.25%胰蛋白酶（Trypsin-EDTA，批号为20240606），无血清细胞冻存液（批号为20230523），青霉素/链霉素溶液（批号为20230319），水解磷酸酶抑制剂混合物（批号为20220411），通用型抗体稀释液和快速转膜液（批号为20230331），快速转膜液（20X，批号为20240820），均购自苏州新赛美生物科技有限公司；四溴双酚S（TBS）粉末（货号为G0001），十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）Running buffer粉末（货号为G2081），吐温-20，磷酸盐缓冲液（PBS，货号为G4202），蛋白酶抑制剂混合物，均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；CCK-8试剂盒（货号为C0042），BCA蛋白浓度测定试剂盒（增强型，货号为P0010），均购自上海碧云天生物技术有限公司；RIPA裂解缓冲液（北京索莱宝科技有限公司，货号为R0010）；三色预染蛋白Marker（货号为WJ103），一步法PAGE凝胶快速制备试剂盒（货号为PG212），1×无蛋白快速封闭液（货号为PS108P），Omni-增强化学发光（ECL）超灵敏化学发光检测试剂盒（飞克级，货号为SQ201），均购自上海雅酶生物医药科技有限公司；APC Annexin V/7-AAD凋亡检测试剂盒（美国Biolegend公司，货号为640930）；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH，批号为P60037），LC3B（批号为T55992），P62（批号为T55546），均购自上海艾比玛特医药科技有限公司；Bax（批号为A19684），B细胞淋巴瘤2（Bcl-2，批号为A19693），均购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；胱天蛋白酶3（CASP3，批号为22170-1），重组兔二抗（批号为RGAR001），重组鼠二抗（批号为RGAM001），均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

表1 HCSI活性成分相关信息

Tab. 1 Information of active ingredients in Huachansu Injection

CAS号	中文名	英文名	相对分子质量	纯度(%)
465-39-4	酯蟾毒配基	resibufogenin	384.510	≥98
4236-48-0	阿根廷配基	argentinogenin	414.491	≥98
465-21-4	蟾毒灵	bufalin	386.520	≥98
465-90-7	喽根草配基	hellebrigenin	416.507	≥98
471-95-4	蟾毒它灵	bufotalin	444.560	≥98
464-74-4	沙蟾蜍精	arenobufagin	416.507	≥98
1108-68-5	华蟾素	cinobufotalin	458.544	≥98
20987-24-0	酯蟾毒精	resibufagin	398.492	≥98
4099-30-3	去乙酰华蟾毒它灵	desacetylcinobufotalin	416.507	≥98
470-31-1	华蟾酥毒基	cinobufagin	442.545	≥98
465-11-2	和蟾蜍他灵	gamabufotalin	402.524	≥98
508-79-2	喽根草醇	hellebrigenol	418.523	≥98
470-42-8	南美蟾毒精	marinobufagin	400.508	≥98
4026-95-3	去乙酰华蟾毒精	desacetylcinobufagin	400.508	≥98
472-26-4	远华蟾毒精	telocinobufagin	402.524	≥98

1.3 细胞株

人骨肉瘤细胞U2OS和MG-63购自中国科学院上

海细胞库；人骨肉瘤细胞143B购自中国科学院北京细胞库；人骨肉瘤细胞SAOS2购自武汉普诺赛生命科技有限公司。上述细胞均使用含10%FBS和1%青霉素/链霉素溶液的DMEM培养基，在37 ℃、5%CO_2培养箱中连续培养。

2 方法与结果

2.1 华蟾素注射液活性成分筛选及其抗骨内瘤活性验证

2.1.1 方法

骨肉瘤类器官模型建立：本研究中的骨肉瘤患者临床样本（临床试验注册号：ChiCTR2400088450）来源于上海交通大学医学院附属第六人民医院肿瘤内科胡海燕主任团队。将收集到的骨肉瘤患者的肿瘤组织从4 ℃保存液中取出，用类器官基础培养基冲洗组织至上清液澄清后，用外科剪刀将组织切成小块，收集至15 mL离心管中，加入10 mL肿瘤组织消化液，37 ℃消化30 min，用FBS终止消化，100 μm滤网过滤，收集滤液，离心（温度为4 ℃，离心力为250 *g*）3 min，弃上清液，若细胞沉淀为红色，弃上清液后加2 mL红细胞裂解液重悬沉淀，在室温下裂解红细胞3 min，然后再离心（温度为4 ℃，离心力为250 *g*）3 min，弃上清液后加适量类器官基础培养基重悬沉淀，离心（温度为4 ℃，离心力为250 *g*）3 min，弃上清液，取少量悬液进行细胞计数，然后按浓度加入预制好的水凝胶基质材料与类器官完全培养基混合物，接种至低吸附细胞培养板中，置37 ℃、5%CO_2培养箱中培养。

CCK－8法检测细胞活力：将状态良好的人骨肉瘤细胞U2OS，SAOS2，MG－63，143B消化和离心后进行细胞计数，按细胞密度8×10^3个/孔接种于96孔板中，将配制好的细胞悬液按每孔100 μL加入孔板底部，待细胞贴壁后加药处理。设置空白组（加入不含细胞的完全培养基0 nmol/L）、对照组（加入含细胞的完全培养基）和加药组（使终浓度分别为40,80,160,320,640 nmol/L），置37 ℃、5%CO_2恒温培养箱中培养24 h。给药24 h后弃上清液，每孔加100 μL含10% CCK－8的无血清培养基，置培养箱中避光孵育1 h。采用多功能酶标仪检测450 nm波长处的吸光度（*OD*），计算细胞活力和半数抑制浓度（IC_{50}）。细胞活力（%）=（$OD_{加药组}-OD_{空白组}$）/（$OD_{对照组}-OD_{空白组}$）×100%。

流式细胞术检测细胞凋亡率：将状态良好的人骨肉瘤细胞SAOS2和143B以5×10^5个/孔接种于6孔板中，待细胞贴壁后，对照组加入2%低浓度培养基，加药组加入蟾毒它灵20，40，80 nmol/L，置恒温培养箱中培养24 h，收集上清液、洗涤细胞的PBS和胰酶消化的细胞悬液，低速离心（转速为1 000 r/min）5 min，PBS洗涤2次，细胞沉淀用100 μL Annexin V binding buffer、5 μL APC Annexin V、5 μL 7－AAD活力染色液混匀，25 ℃避光孵育15 min，每组补加400 μL Annexin V binding buffer，吹打混匀，置冰上，采用流式细胞仪上样，计算细胞凋亡率，采用Flowjo 10.4.0软件分析数据。

药物敏感性试验：取骨肉瘤类器官，使用类器官消化液，于37 ℃孵育10 min，使其消化成细胞簇或细胞团块，经基础培养基洗涤2次获得细胞沉淀后，用水凝胶基质和完全培养基的混合物重悬类器官沉淀，接种于96孔板细胞培养板中。设立对照组（加入正常类器官培养基）和加药组（加入含有不同浓度蟾毒它灵的类器官培养基，使终浓度分别为20，40，80 nmol/L），每隔3 d更换含特定浓度蟾毒它灵的类器官培养基。给药7 d后，置显微镜下观察，记录类器官的生长状态，采用CCK－8试剂盒测定类器官的细胞活力。

类器官活死染色：按上述步骤将类器官接种于96孔板中培养，设立对照组（加入正常类器官培养基）和加药组（加入含药物的类器官培养基，使终浓度为80 nmol/L），培养7 d。配制染色液，Calcein－AM探针和PI探针按1∶1 000比例加入培养基中，每孔加入100 μL染色液。培养箱中染色30 min，置荧光显微镜下观察。

2.1.2 统计学处理

采用GraphPad Prism 9.4.0软件统计和分析数据。实验结果均平行3次，计量资料以$\overline{X}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析（One－way ANOVA）。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2.1.3 实验结果

活性成分筛选：本课题组前期通过液相色谱串联质谱（LC－MS/MS）检测发现，HCSI主要含蟾蜍二烯内酯类成分[11]。故本研究中对HCSI含有的15种蟾蜍二烯内酯类成分进行活性筛选，采用CCK－8法对比酯蟾毒配基、阿根廷配基、蟾毒灵、嚏根草配基、蟾毒它灵、沙蟾蜍精、华蟾素、酯蟾毒精、去乙酰华蟾毒它灵、华蟾酥毒基、和蟾蜍他灵、嚏根草醇、南美蟾毒精、去乙酰华蟾毒精、远华蟾毒精处理人骨肉瘤细胞143B，SAOS2，U2OS，MG－63 24 h后，对细胞增殖水平的影响。结果沙蟾蜍精、蟾毒灵、蟾毒它灵等活性成分对4种骨肉瘤细胞均有一定杀伤作用，而其余活性成分多仅对其中1～2种骨肉瘤细胞有杀伤作用。详见图1。计算15种活性成分作用于4种人骨肉瘤细胞的IC_{50}，其中蟾毒它灵对人骨肉瘤细胞增殖的抑制效果最显著。详见表2。由于143B细胞较其他3种人骨肉瘤细胞具有高致瘤性和高转移性，且蟾毒它灵抑制143B和SAOS2细胞的增殖作用明显优于U2OS和MG－63细胞。因此，后续研究中选择蟾毒它灵为主要活性成分，研究其对143B和SAOS2细胞的作用。蟾毒它灵作用于143B和SAOS2细胞24 h

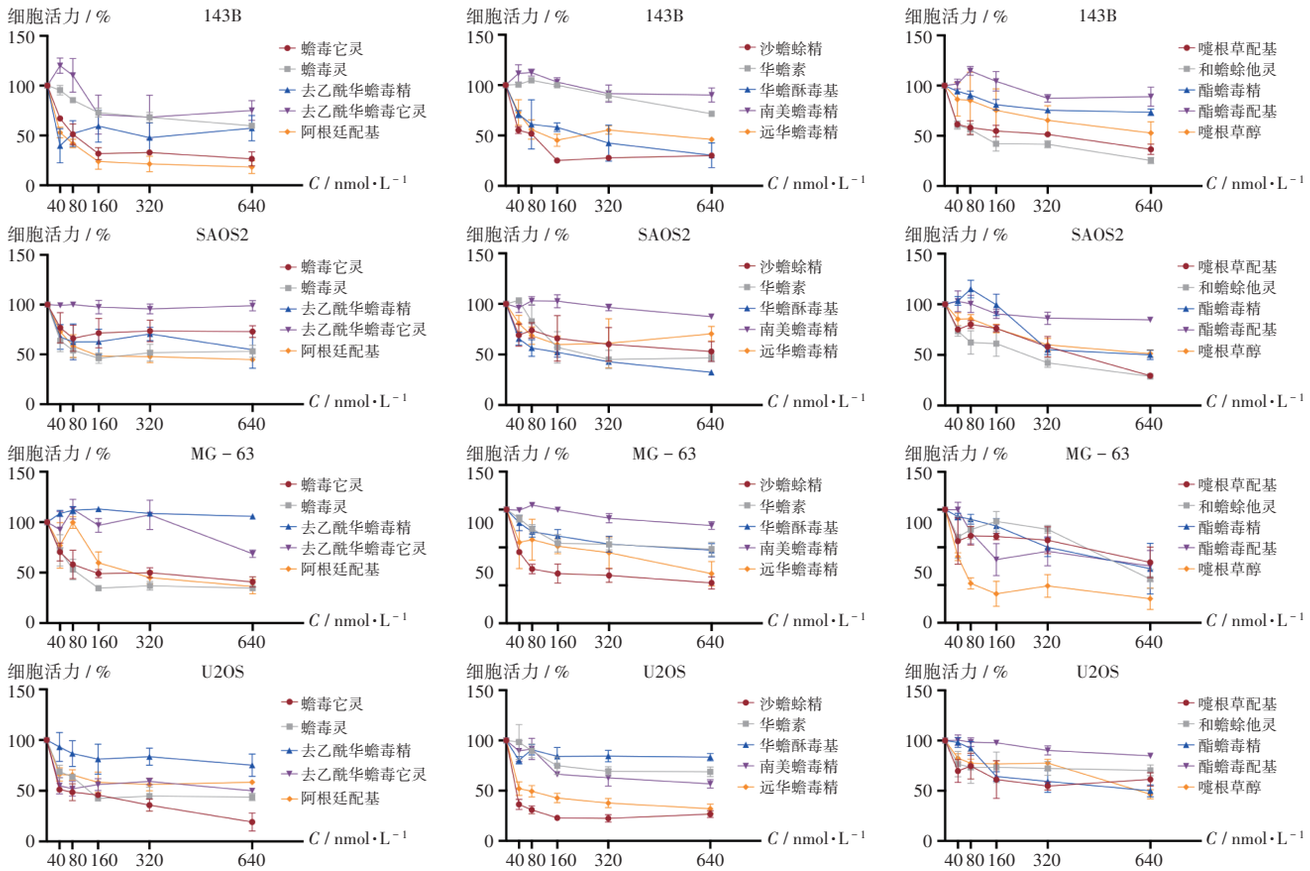


图 1　15 种 HCSI 活性成分作用于 4 种人骨肉瘤细胞的细胞活力

Fig. 1　Cytotoxicity of 15 active ingredients in Huachansu Injection acting on four types of human osteosarcoma cells

表 2　15 种 HCSI 活性成分作用于 4 种人骨肉瘤细胞的半数抑制浓度（nmol / L）

Tab. 2　IC_{50} of 15 active ingredients in Huachansu Injection acting on four types of human osteosarcoma cells（nmol / L）

活性成分	人骨肉瘤细胞			
	143B	SAOS2	MG－63	U2OS
蟾毒灵	987.6	455.8	119.8	204.0
蟾毒它灵	88.0	75.0	261.7	113.0
华蟾酥毒基	191.4	156.5	638.4	1 120.0
华蟾素	972.3	347.4	NA	1 825.0
沙蟾蜍精	55.0	260.0	720.0	579.8
去乙酰华蟾毒它灵	1 265.0	NA	NA	NA
酯蟾毒配基	1 843.0	NA	NA	2 657.0
嘧根草配基	218.3	362.8	NA	2 054.0
酯蟾毒精	3 114.0	534.1	3 987.0	649.2
嘧根草醇	642.4	465.8	NA	908.7
和蟾蜍他灵	104.4	204.7	3 792.0	NA
南美蟾毒精	1 775.0	1 258.0	2 758.0	759.7
远华蟾毒精	NA	NA	4 217.0	NA
阿根廷配基	43.8	247.5	311.0	2 998.0
去乙酰华蟾毒精	68.1	NA	NA	NA

注：NA 指无可用数据。

Note: NA refers to no available data.

后的 IC_{50} 分别为 88.0，75.0 nmol / L。后续实验选择细胞存活率高于 50% 的药物浓度（20，40，80 nmol / L）干预人骨肉瘤细胞。

促进人骨肉瘤细胞凋亡作用：流式 APC Annexin V / 7－AAD 双染色结果显示，浓度为 20，40，80 nmol / L 的蟾毒它灵可显著诱导 143B 和 SAOS2 细胞凋亡，且呈浓度依赖性，其中在浓度为 80 nmol / L 蟾毒它灵的作用下，143B 细胞最大凋亡率达 39.90%，SAOS2 细胞最大凋亡率达 22.15%。详见图 2 A。此外，蟾毒它灵可显著抑制抗凋亡蛋白 Bcl－2 的表达，促进促凋亡蛋白 Bax 的表达，并增加剪切 CASP3（cle－CASP3）/ CASP3 的表达，进一步证实了其体外促进人骨肉瘤细胞凋亡的作用。详见图 2 B。

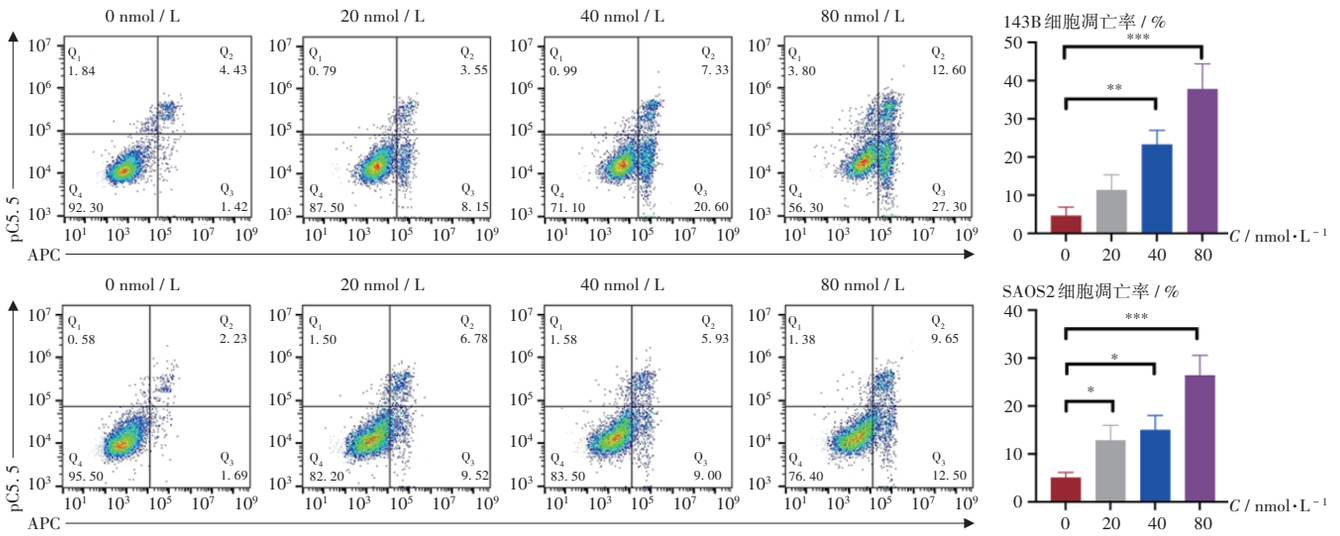
对骨肉瘤类器官生长的抑制作用：类器官是在体外由干细胞驱动形成的多细胞三维结构，具有近生理性、可模拟器官发育和形成、可长期传代培养，来源广泛、建模时间较短等特点，是研究和治疗癌症的优越体外模型[12－13]。本研究中通过构建骨肉瘤类器官模型进行的药效验证结果显示，加入蟾毒它灵后，骨肉瘤类器官增殖能力被抑制，详见图 3 A；不予蟾毒它灵（0 nmol / L）的骨肉瘤类器官生长迅速，而蟾毒它灵给药后的类器

官生长被剂量依赖性抑制，浓度为 80 nmol / L时的抑制作用最强，详见图 3 B；随后，对类器官进行活死染色，与 0 nmol / L 比较，加药处理后的类器官中橙色和红色荧光明显增多（图 3 C），表明类器官中凋亡细胞的比例显著增加，蟾毒它灵可引起部分类器官凋亡。可见，蟾毒它灵可抑制骨肉瘤类器官的生长，并引起其凋亡，具有良好的抗骨肉瘤活性。

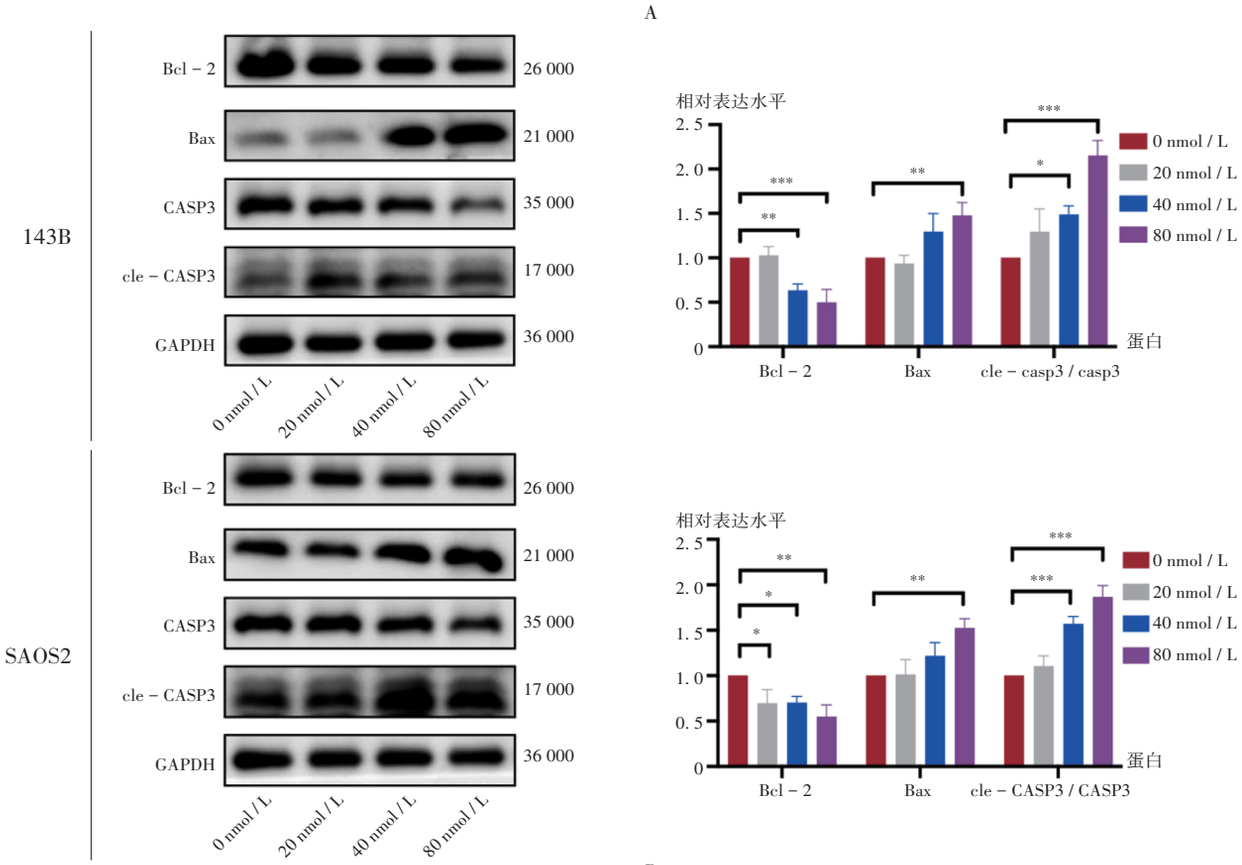
2.2 蟾毒它灵抗骨肉瘤作用机制的网络药理学研究

2.2.1 方法

骨肉瘤靶点预测：在 GeneCards 数据库（https: //



A



B

注：与 0 nmol / L蟾毒它灵比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。图 3 和图 9 同。

A. 对 143B 和 SAOS2 细胞凋亡率的影响　B. 对 143B 和 SAOS2 细胞凋亡蛋白的影响

图 2　蟾毒它灵浓度对 143B 和 SAOS2 细胞的促凋亡作用

Note: Compared with those treated with 0 nmol / L bufotalin, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ (for Fig. 2 - 3 and Fig. 9).

A. Effect of bufotalin on apoptosis rate of 143B and SAOS2 cells　B. Effect of bufotalin on apoptotic proteins of 143B and SAOS2 cells

Fig. 2　Effects of bufotalin concentration on promoting the apoptosis of 143B and SAOS2 cells

www. genecards. org)、DisGeNET 数据库(https: // disgenet. com /)、Comparative Toxicogenomics Database 数据库(https: // ctdbase. org /)中检索关键词“Osteosarcoma”，整理汇总后得到骨肉瘤的潜在靶点。

蟾毒它灵靶点预测：通过 PubChem 数据库(https: // pubchem. ncbi. nlm. nih. gov /)获得蟾毒它灵的 sdf 结构文件。将文件导入 SwissTargetPrediction 数据库(https: // www. swisstargetprediction. ch)、Pharmmapper 数据库(https: // www. lilab - ecust. cn / pharmmapper /)、SEA 数据库(https: // sea. bkslab. org /)，前 2 个数据库分别根据“probability > 0”“Norm Fit > 0. 6”筛选潜在靶点。

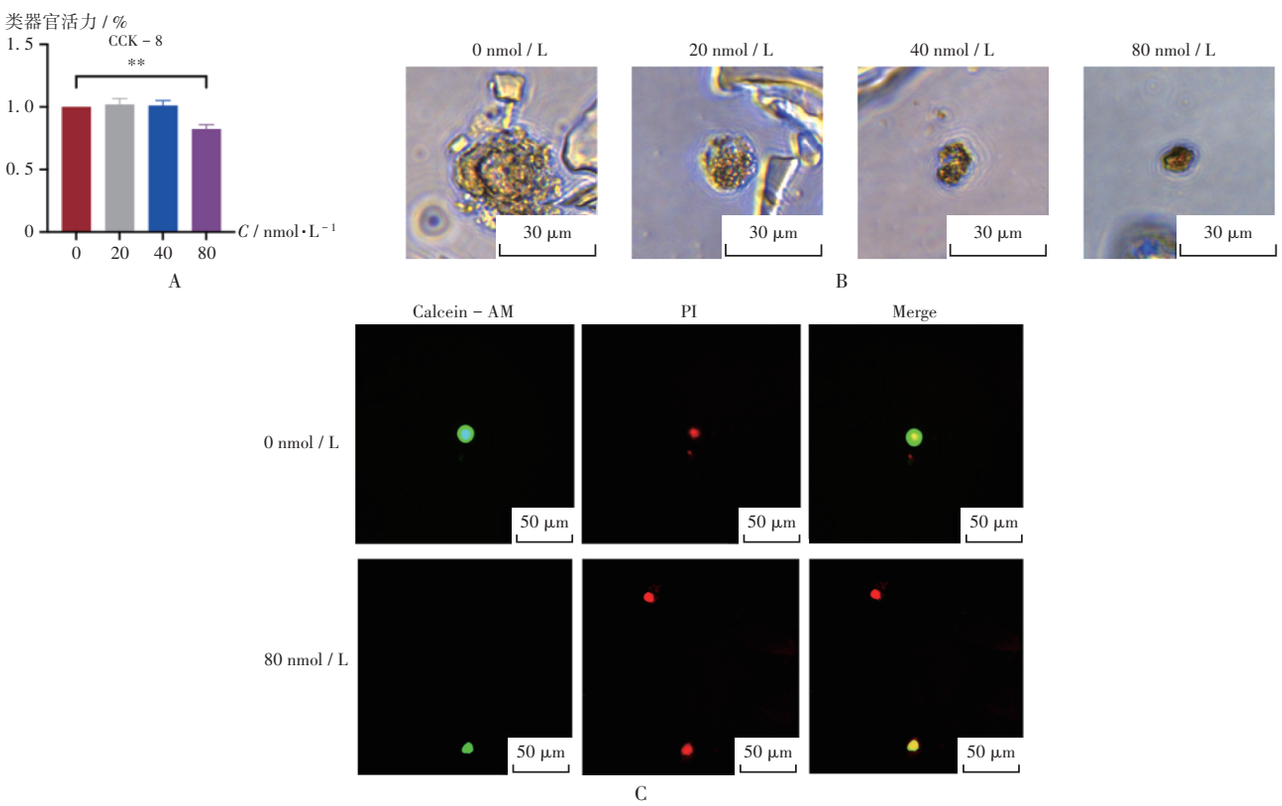
骨肉瘤 - 蟾毒它灵共有靶点预测：采用 Venny 2. 1. 0 软件对骨肉瘤和蟾毒它灵的靶点取交集，得到蟾毒它灵治疗骨肉瘤的潜在靶点。将共有靶点导入 String 数据库(https: // cn. string - db. org /)，筛选标准为“combined score > 0. 7”，构建蛋白 - 蛋白互作(PPI)网络。将 PPI 网络导入 CytoScape 3. 10. 1 软件，构建可视化靶点网络图，采用 CytoNCA 进行拓扑分析，以度(degree)值为参考标准，绘制 PPI 网络图，筛选关键靶点。

基因本体论(GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析：将关键靶点输入 DAVID 数据库(https: // david. ncifcrf. gov / home. jsp)，进行 GO 功能与 KEGG 通路富集分析。根据“$P_{value} \leqslant 0.001$”“错误发现率($FDR$) ≤ 0. 05”筛选前 10 条分子功能(MF)、细胞组分(CC)和生物学过程(BP)的结果，在微生物信息学分析和可视化云平台(http: // www. bioinformatics. com. cn /)进行可视化；筛选前 20 条 KEGG 通路进行桑基气泡图可视化。

分子对接：从 PubChem 数据库下载蟾毒它灵的二维结构，导入 ChemBio3D 17. 0 软件进行能量最小化优化，保存为 mol2 格式。从 PDB 蛋白数据库(https: // www. rcsb. org)下载靶点的三维晶体结构，采用 PyMOL 3. 0. 3 软件去除水分子和残留配体，导入 Autodock Tools 1. 5. 7 软件，将处理后的文件保存为 pdbqt 格式，并对靶点与蟾毒它灵进行分子对接，确定对接口袋，并计算结合能。采用 PyMOL 3. 0. 3 软件对对接结果进行可视化。

2. 2. 2 实验结果

靶点预测与 PPI 网络构建：通过 GeneCards，DisGeNET，Comparative Toxicogenomics Database 等数据库搜索骨肉瘤的潜在靶点，整理，汇总，得到 2 860 个潜在靶点。通过 SwissTargetPrediction，Pharmmapper，SEA 等数据库预测蟾毒它灵的潜在作用靶点，整理，汇总，得到 191 个



A. 对骨肉瘤类器官增殖的抑制作用 B. 对骨肉瘤类器官生长的抑制作用(× 200) C. 蟾毒它灵作用后骨肉瘤类器官的活死染色(× 100)

图 3 蟾毒它灵浓度对骨肉瘤类器官的影响

A. Inhibitory effect of bufotalin on the proliferation of osteosarcoma organoids B. Inhibitory effect of bufotalin on the growth of osteosarcoma organoids (× 200) C. Live and dead staining of osteosarcoma organoids after bufotalin treatment (× 100)

Fig. 3 Effects of bufotalin concentration on the osteosarcoma organoids

潜在靶点。采用 Venny 2.1.0 软件取两者的交集，最终得到 88 个蟾毒它灵抗骨肉瘤的共有靶点。详见图 4。将共有靶点导入 String 数据库，采用 Cytoscape 3.10.1 软件进行拓扑分析，并构建 PPI 网络图，根据 CytoNCA 计算得到蛋白的 degree 值。参与互作的蛋白皆用椭圆表示，椭圆颜色越深代表蛋白的 degree 值越大，蛋白节点根据 degree 值大小由内至外排列。详见图 5。

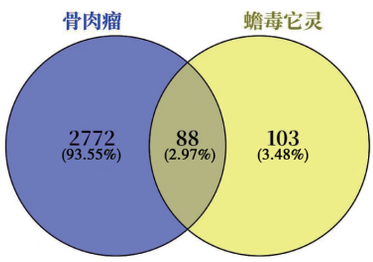


图 4　蟾毒它灵－骨肉瘤共有靶点维恩图

Fig. 4　Venny diagram of bufotalin − osteosarcoma common targets

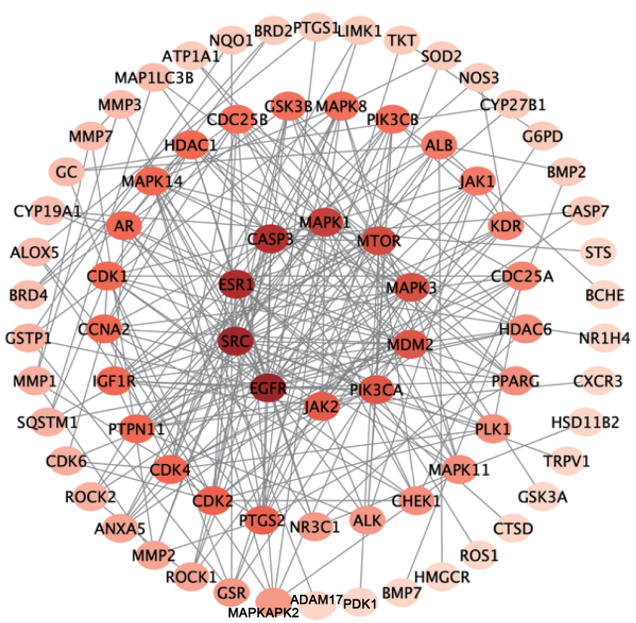


图 5　共有靶点 PPI 网络

Fig. 5　PPI network of common targets

GO 功能与 KEGG 通路富集分析：采用 DAVID 数据库对 77 个关键靶点进行分析后，根据“$P_{value} \leqslant 0.001$”“$FDR \leqslant 0.05$”筛选出 85 条 GO 功能，其中包括 48 条 BP、21 条 MF、16 条 CC，分别选取 P 值排名前 10 的 BP，MF，CC 进行可视化，其中 BP 主要涉及蛋白质磷酸化、表皮生长因子受体（EGFR）信号通路、凋亡过程调控等，MF 主要涉及丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶活性、蛋白激酶活性等，CC 主要涉及胞质、细胞核、核浆、受体复合物等。详见图 6。KEGG 通路分析共富集到 115 条相关通路，根据“$P_{value} \leqslant 0.001$”“$FDR \leqslant 0.05$”筛选出 103 条信号通路，将 P 值排名前 7 的 KEGG 通路进行桑基图可视化发现，蟾毒它灵抗骨肉瘤的作用机制可能与自噬、血管内皮

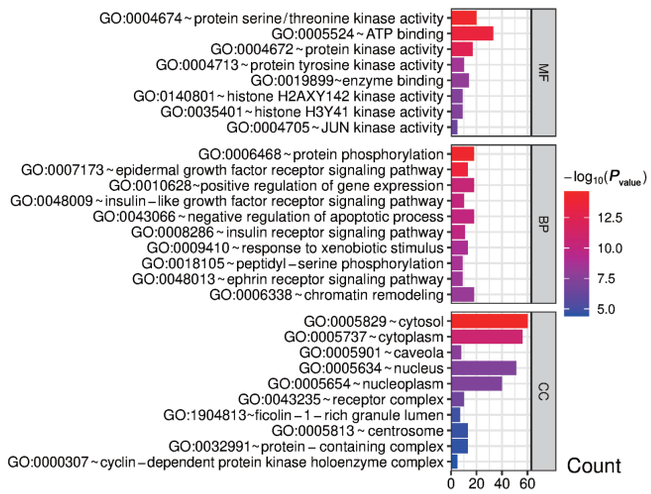


图 6　GO 功能分析柱状图

Fig. 6　Bar chart of GO functions analysis

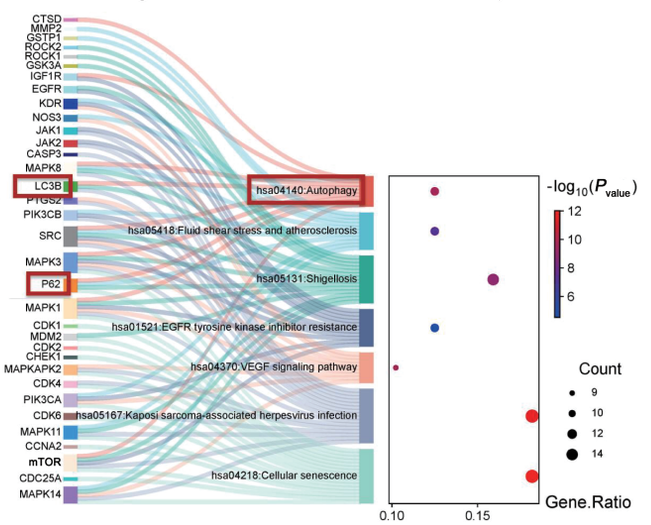


图 7　KEGG 通路富集分析桑基图

Fig. 7　Sankey plot of KEGG pathways enrichment analysis

生长因子（VEGF）信号通路、EGFR 酪氨酸激酶等有关。详见图 7。

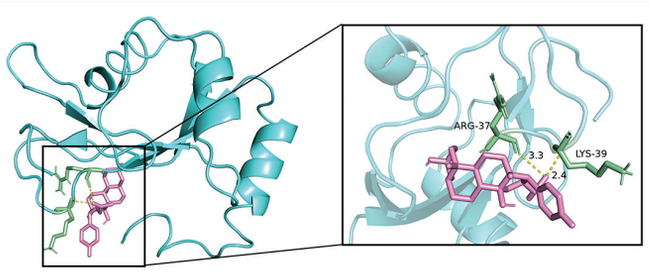
分子对接：KEGG 通路富集分析结果显示，蟾毒它灵发挥抗骨肉瘤作用可能与自噬密切相关。研究表明，自噬作为一种应激调控防御机制，在肿瘤的增殖、侵袭、转移、凋亡中发挥重要作用[14]。利用分子对接对网络药理学富集到的自噬靶点进行筛选，选取蟾毒它灵与 KEGG 通路富集到的 9 个自噬靶点进行分子对接，以评估蟾毒它灵与关键靶点的结合能力。结合能越低，配体与核心靶蛋白的结合效率越高，则相互作用越稳定。结果蟾毒它灵与自噬靶点的结合能均低于 −4 kcal / mol。其中，蟾毒它灵与 LC3B 和 P62 的结合能分别为 −8.709，−7.315 kcal / mol，高于其他靶点的结合能，提示蟾毒它灵与 LC3B 和 P62 结合稳定。详见表 3。采用 PyMOL 3.0.3 软件可视化蟾毒它灵与 LC3B 和 P62 的相互作用，蓝色部分表示目标蛋白 LC3B 和 P62，粉色部分代表

蟾毒它灵，黄色虚线表示配体和受体间氢键的相互作用，绿色部分表示与氢键相连的氨基酸残基。结果见图 8，表明蟾毒它灵可能通过与自噬蛋白 LC3B 和 P62 结合而诱导骨肉瘤细胞自噬。

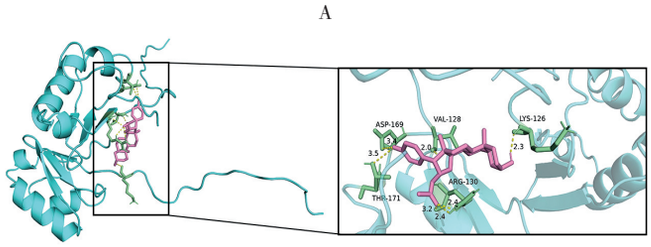
表 3　蟾毒它灵与 9 个自噬靶点的分子对接结合能（kcal / mol）

Tab. 3　The binding energy of bufotalin for molecular docking with nine autophagic targets（kcal / mol）

分子	CID	自噬靶点	结合能
蟾毒它灵	12302120	LC3B	－8.709
蟾毒它灵	12302120	P62	－7.315
蟾毒它灵	12302120	CTSD	－7.021
蟾毒它灵	12302120	MTOR	－6.932
蟾毒它灵	12302120	IGF1R	－5.985
蟾毒它灵	12302120	MAPK1	－5.484
蟾毒它灵	12302120	SRC	－4.912
蟾毒它灵	12302120	MAPK3	－4.867
蟾毒它灵	12302120	MAPK8	－4.638



A



B

A. 蟾毒它灵和 LC3B　B. 蟾毒它灵和 P62

图 8　分子对接可视化热图

A. Bufotalin and LC3B　B. Bufotalin and P62

Fig. 8　Visualization heatmap of molecular docking

2.3　蟾毒它灵诱导骨肉瘤细胞自噬发挥抗骨肉瘤作用验证

2.3.1　方法

免疫印迹（Western blot）法检测蛋白表达水平：按 2.1.1 流式细胞术检测细胞凋亡率项下方法处理细胞，配制 RIPA 裂解工作液进行裂解，6 孔板中每孔加 150 μL 裂解液，冰上裂解 10 min，用刮板收集细胞裂解液，离心（温度为 4 ℃，转速为 14 000 r / min）30 min，配制 BCA 工作液，进行蛋白定量，37 ℃温箱中放置 30 min。采用分光光度计测定 570 nm 波长处的 *OD* 值，计算得到蛋白浓度，补齐裂解液，并加入 5 × Loading buffer 调平蛋白样品浓度，95 ℃加热变性 10 min，配制 SDS－PAGE 凝胶，电泳分离蛋白，并转移至聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上封闭 20～30 min，随后一抗孵育过夜，室温二抗孵育 1 h。按 1∶1 的比例配制超敏显影液，将膜放入显影液中浸泡数秒，进行曝光显影，检测 LC3 Ⅱ / LC3 Ⅰ 和 P62 的蛋白表达水平。

抗骨肉瘤作用验证：3－methyladenine（3－MA）是一种经典自噬抑制剂，主要通过干扰自噬体的形成来抑制细胞的自噬过程[15]。按 2.1.1 流式细胞术检测细胞凋亡率项下方法处理细胞，分别设为不加蟾毒它灵组（Ⅰ组，蟾毒它灵 0 nmol / L）、单加蟾毒它灵组（Ⅱ组，蟾毒它灵 80 nmol / L）、单加 3－MA 组（Ⅲ组，3－MA 100 nmol / L）、蟾毒它灵和 3－MA 联合作用组（Ⅳ组，蟾毒它灵 80 nmol / L＋3－MA 100 nmol / L），分别予相应药物，采用 CCK－8 法检测细胞活力，采用流式细胞术检测细胞凋亡率，采用 Western blot 法检测 LC3 Ⅱ / LC3 Ⅰ 和 P62 蛋白表达水平。

2.3.2　统计学处理

同 2.1.2 项下统计学处理方法。

2.3.3　实验结果

采用 Western blot 法检测 LC3B 和 P62 的蛋白表达水平，结果显示，蟾毒它灵作用后显著升高 143B 和 SAOS2 细胞中 LC3 Ⅱ / LC3 Ⅰ 的表达水平（$P < 0.05$），同时显著降低 P62 的表达水平（$P < 0.05$），表明蟾毒它灵能诱导骨肉瘤细胞自噬。详见图 9。

与 Ⅱ 组比较，Ⅳ 组 143B 和 SAOS2 细胞的 LC3 Ⅱ / LC3 Ⅰ 蛋白表达水平显著下调（$P < 0.05$），P62 蛋白表达水平显著上调（$P < 0.05$），表明蟾毒它灵对骨肉瘤细胞自噬蛋白的调控作用被 3－MA 逆转，详见图 10 A；骨肉瘤细胞活力均显著增强（$P < 0.01$），详见图 10 B；细胞凋亡率均显著降低（$P < 0.05$），详见图 10 C。可见，蟾毒它灵可通过诱导自噬抑制骨肉瘤细胞增殖，并促进其凋亡，可在体外发挥抗骨肉瘤作用。

3　讨论

骨肉瘤是一种高度侵袭性恶性肿瘤，发病率高，约有 20% 的患者确诊时已发生转移[16]。目前，临床治疗骨肉瘤使用的一线化疗方案通常伴随强烈的不良反应，且长期用药也会引起肿瘤耐药性，从而导致骨肉瘤患者的 5 年总生存率仍低于 70%，在过去几十年中并未显著提高[2,17－18]，故迫切需要寻找其他安全、有效的药物。本研究中基于 HCSI 活性成分的筛选结果，结合网络药理学和体外细胞及类器官试验验证发现，蟾毒它灵作为抗骨肉瘤活性最强的蟾蜍二烯内酯类成分，通过诱导细胞自噬发挥抗骨肉瘤作用，可能成为抗骨肉瘤的潜在候选药物。

HCSI 具有解毒、抗炎、消肿、止痛功效，可用作肝

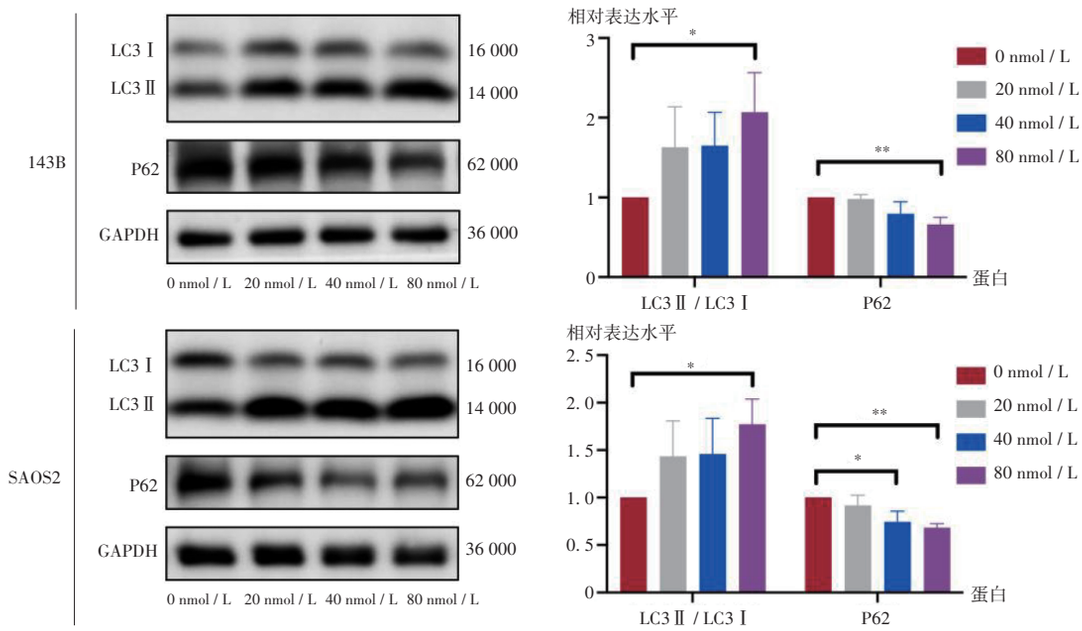


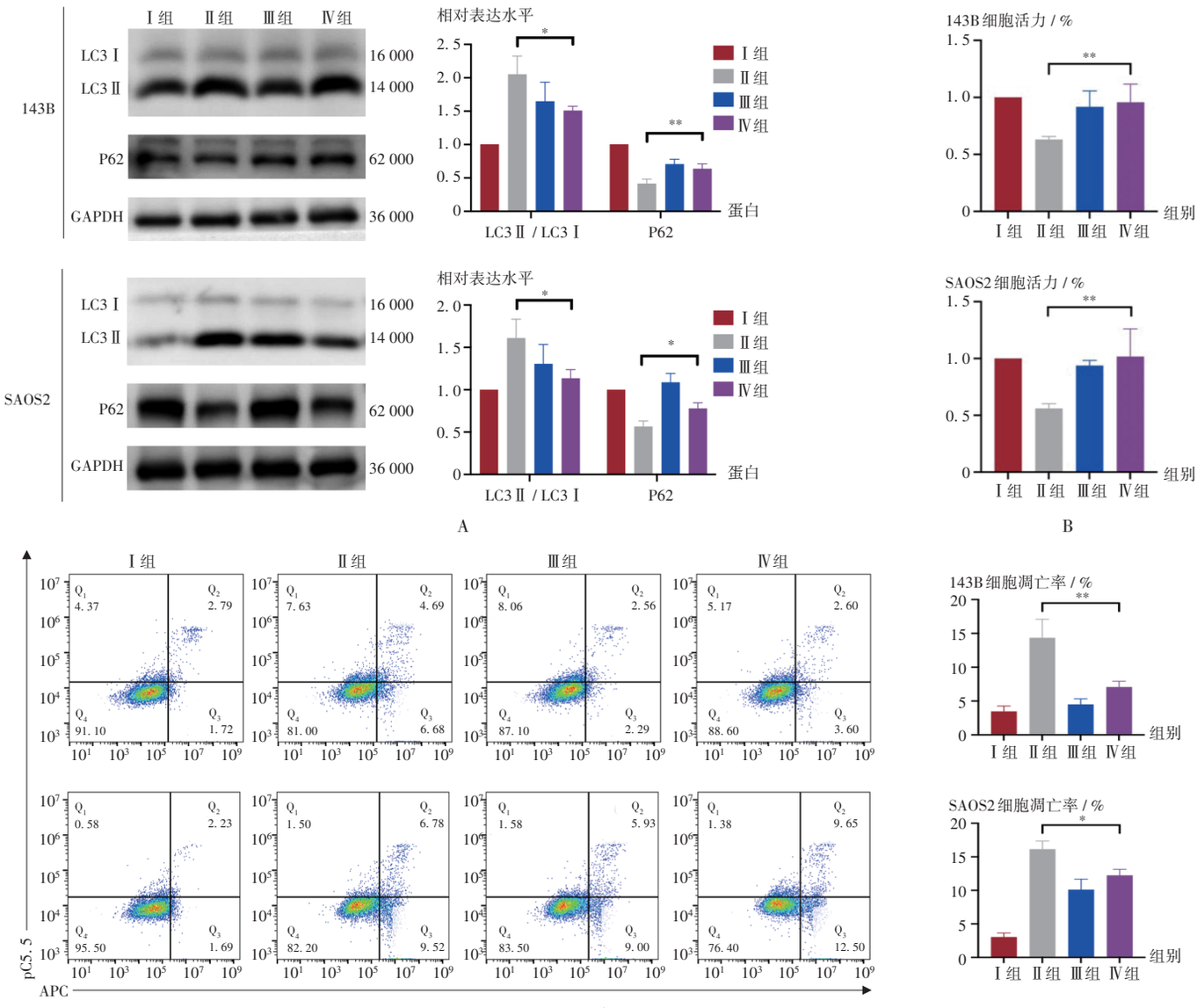
图9 蟾毒它灵浓度对143B和SAOS2细胞自噬相关蛋白表达水平的影响

Fig. 9 Effects of bufotalin concentrations on autophagy - related protein expression levels in 143B and SAOS2 cells

癌、胃癌、肺癌等恶性肿瘤的辅助治疗，因其成分复杂，已有许多研究针对其主要活性成分进行了深入研究。MA等[19]研究发现，蟾毒它灵可通过激活ROS激酶/c-Jun氨基端蛋白激酶/p-38（ROS/JNK/p-38）信号通路诱导U2OS细胞自噬。LEE等[20]聚焦于蟾毒灵的研究发现，蟾毒灵可通过内质网应激和线粒体相关信号通路诱导U2OS细胞凋亡。本研究在课题组前期对HCSI成分检测的基础上，对其中15种蟾蜍二烯内酯类主要活性成分进行骨肉瘤细胞毒性测定，筛选得到活性最强的成分蟾毒它灵。据报道，蟾毒它灵可抑制三阴性乳腺癌、成骨细胞瘤、胶质母细胞瘤[21]、肝细胞癌[22]、非小细胞肺癌、恶性黑色素瘤[23]、食管鳞状细胞癌[24]等肿瘤的生长，但对骨肉瘤的作用缺乏研究。通过流式细胞仪检测细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达水平，均提示蟾毒它灵在体外具有显著的抗骨肉瘤作用。类器官作为一种具有前景的新型临床前模型，在癌症研究和临床治疗中展现出了巨大的价值[25]。如ZHANG等[26]利用骨肉瘤类器官模型验证DNA依赖性蛋白激酶催化亚基（PRKDC）抑制剂与阿霉素协同作用对骨肉瘤耐药的逆转作用。本研究中提取源于人骨肉瘤患者的组织成功构建类器官模型，结果显示，蟾毒它灵可显著抑制骨肉瘤类器官的生长，提示蟾毒它灵具有较强的体内抗骨肉瘤活性。

为深入探讨蟾毒它灵抗骨肉瘤的具体作用机制，本研究中借助网络药理学寻找蟾毒它灵抗骨肉瘤的潜在靶点。KEGG通路富集分析结果显示，蟾毒它灵抗骨肉瘤作用与自噬通路、VEGF信号通路、EGFR酪氨酸激酶等有关。自噬是一种细胞的程序性死亡方式，肿瘤早期，激活自噬可清除错误折叠的蛋白质，抑制肿瘤细胞的恶性增殖[27-28]。中药及其单体通过调控自噬治疗骨肉瘤一直是近几年的研究热点。研究发现，原薯蓣皂苷[29]、槲皮素[30]等中药单体均可靶向自噬发挥抗骨肉瘤作用。LC3B是自噬过程的核心调控蛋白，是自噬体形成的标志性分子，分为LC3 Ⅰ和LC3 Ⅱ 2种形式，且LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ与自噬水平呈正相关[31]；P62作为自噬底物，通过自噬溶酶体有效降解，与自噬水平呈负相关[32]。有研究显示，HCSI的活性成分蟾毒它灵可通过增加MAP1A/1B和LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ诱导骨肉瘤细胞自噬和凋亡[33]。本研究结果显示，蟾毒它灵干预后143B和SAOS2细胞中的LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ蛋白表达水平升高，P62蛋白表达水平降低，表明骨肉瘤细胞中自噬通路被激活，蟾毒它灵可能通过调控LC3B和P62诱导骨肉瘤细胞发生自噬。细胞自噬与凋亡都是细胞的程序性死亡方式，两者可同时发生，共同引起细胞死亡，而自噬也可作为上游通路诱导细胞凋亡，引起自噬细胞的死亡[34]。为探讨蟾毒它灵是否通过自噬对骨肉瘤细胞的增殖和凋亡产生影响，在蟾毒它灵干预的基础上，加入自噬抑制剂3-MA，结果显示，蟾毒它灵对LC3 Ⅱ/LC3 Ⅰ和P62蛋白表达的调控作用均被逆转。且加入3-MA后减弱了蟾毒它灵对143B和SAOS2细胞增殖的抑制，以及对细胞凋亡的诱导作用，进一步验证蟾毒它灵可通过诱导骨肉瘤细胞自噬而发挥抗骨肉瘤作用。

综上所述，本研究中通过体外试验筛选出HCSI抗骨肉瘤活性最强的成分为蟾毒它灵，并在类器官水平



注：与Ⅱ组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$，$^{***}P < 0.001$。

A. 蟾毒它灵联用3 - MA对143B和SAOS2细胞自噬相关蛋白表达水平的影响　B. 3 - MA减弱蟾毒它灵对143B和SAOS2细胞增殖的抑制作用　C. 3 - MA减弱蟾毒它灵对143B和SAOS2细胞凋亡的诱导作用

图10　蟾毒它灵通过诱导自噬发挥抗骨肉瘤作用验证结果

Note: Compared with those in group Ⅱ, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

A. Effect of bufotalin combined with 3 - MA on the expression levels of autophagy - related proteins in 143B and SAOS2 cells　B. Effect of 3 - MA on reducing the inhibitory effect of bufotalin on the proliferation of 143B and SAOS2 cells　C. Effect of 3 - MA on reducing the bufotalin - induced apoptosis in 143B and SAOS2 cells

Fig. 10　Verification results of the anti - osteosarcoma effect of bufotalin by inducing autophagy

验证了其抗骨肉瘤活性；结合网络药理学、分子对接和实验验证发现，蟾毒它灵通过调控LC3B和P62诱导自噬，从而促进骨肉瘤细胞凋亡。但本研究中仅对自噬的关键靶点进行了验证，缺乏对上游调控机制的深入探索。未来可基于本研究中富集分析得到的靶点探寻自噬的关键上游蛋白，解析靶蛋白间的相互作用网络，建立上游靶点与自噬核心通路间的调控图谱，并在患者来源的类器官模型中进行机制验证，为骨肉瘤患者基于自噬调控的精准干预提供理论依据。

参考文献

[1] FRIED S, SUHRAWARDY A, REHMAN R, et al. Metastatic osteosarcoma involving the skin: A systematic review of patient demographics, clinical characteristics, and treatment outcomes[J]. Journal of the American Academy of Dermatology, 2023, 88(2): 470 - 471.

[2] TIAN HL, CAO JJ, LI BW, et al. Managing the immune micro-

environment of osteosarcoma: the outlook for osteosarcoma treatment[J]. Bone Res, 2023, 11(1): 11.

[3] YU L, ZHANG J, LI YF. Effects of microenvironment in osteosarcoma on chemoresistance and the promise of immunotherapy as an osteosarcoma therapeutic modality[J]. Front Immunol, 2022, 13: 871076.

[4] WANG ZX, QI FH, CUI YG, et al. An update on Chinese herbal medicines as adjuvant treatment of anticancer therapeutics[J]. Biosci Trends, 2018, 12(3): 220 - 239.

[5] CAO YF, YU L, DAI G, et al. Cinobufagin induces apoptosis of osteosarcoma cells through inactivation of Notch signaling[J]. Eur J Pharmacol, 2017, 794: 77 - 84.

[6] WU SC, FU BD, SHEN HQ, et al. Telocinobufagin enhances the Th1 immune response and protects against *Salmonella typhimurium* infection[J]. International Immunopharmacology, 2015, 25(2): 353 - 362.

[7] LI YY, CHEN Y, ZHAO C, et al. Arenobufagin modulation of PCSK9 - mediated cholesterol metabolism induces tumor - associated macrophages polarisation to inhibit hepatocellular carcinoma progression[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155532.

[8] ZHANG W, JIANG BP, LIU YX, et al. Bufotalin induces ferroptosis in non - small cell lung cancer cells by facilitating the ubiquitination and degradation of GPX4[J]. Free Radi Biol Med, 2022, 180: 75 - 84.

[9] ZHU YR, XU Y, FANG JF, et al. Bufotalin - induced apoptosis in osteoblastoma cells is associated with endoplasmic reticulum stress activation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014, 451(1): 112 - 118.

[10] PARK SJ, JUNG HJ. Bufotalin Suppresses Proliferation and Metastasis of Triple - Negative Breast Cancer Cells by Promoting Apoptosis and Inhibiting the STAT3 / EMT Axis[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2023, 28(19): 6783.

[11] 孟昭阳, 赵 娟, 朱琴芳, 等. 基于网络药理学和细胞实验探讨华蟾素注射液抗结直肠癌的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(17): 4755 - 4767.

[12] ZHOU ZZ, PANG Y, JI JY, et al. Harnessing 3D *in vitro* systems to model immune responses to solid tumours: a step towards improving and creating personalized immunotherapies[J]. Nat Rev Immunol, 2024, 24(1): 18 - 32.

[13] KIM W, GWON Y, PARK S, et al. Therapeutic strategies of three - dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration[J]. Bioactive Materials, 2023, 19: 50 - 74.

[14] 施亚敏, 周 政, 边 猛, 等. 重楼皂苷Ⅱ通过调控 ROS 和内质网应激促进骨肉瘤细胞自噬的研究[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(12): 2340 - 2346.

[15] 郭苏阳, 杨 波, 刘红丽, 等. 自噬抑制剂 3 - MA 联合 PI3K / mTOR 双重抑制剂 NVP - BEZ235 促进宫颈癌细胞凋亡的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2019, 41(6): 614 - 617.

[16] 杨均政, 陈楚仪, 肖 可, 等. 华蟾素注射液通过 TFR1 促进 U2OS 骨肉瘤细胞铁死亡的作用机制研究[J]. 时珍国医国药, 2024, 35(12): 2705 - 2711.

[17] GAZOULI I, KYRIAZOGLOU A, KOTSANTIS I, et al. Systematic Review of Recurrent Osteosarcoma Systemic Therapy[J]. Cancers, 2021, 13(8): 1757.

[18] TIPPETT VL, TATTERSALL L, AB LATIF NB, et al. The strategy and clinical relevance of *in vitro* models of MAP resistance in osteosarcoma: a systematic review[J]. Oncogene, 2023, 42(4): 259 - 277.

[19] MA K, ZHANG C, HUANG MY, et al. Cinobufagin induces autophagy - mediated cell death in human osteosarcoma U2OS cells through the ROS / JNK / p38 signaling pathway[J]. Oncology Reports, 2016, 36(1): 90 - 98.

[20] LEE CH, SHIH YL, LEE MH, et al. Bufalin Induces Apoptosis of Human Osteosarcoma U - 2 OS Cells through Endoplasmic Reticulum Stress, Caspase - and Mitochondria - Dependent Signaling Pathways[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2017, 22(3): 437.

[21] ZHU ZS, LIANG SW, HONG Y, et al. Bufotalin enhances apoptosis and TMZ chemosensitivity of glioblastoma cells by promoting mitochondrial dysfunction via AKT signaling pathway[J]. Aging(Albany NY), 2024, 16(10): 9264 - 9279.

[22] WANG D, ZHAO HJ, ZHAO Y, et al. Silencing LINC01547 induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis and metastasis inhibition via the ADAR1 / FAK and miR - 146b - 5p / RAC1 axes[J]. Apoptosis, 2025, 30(3 / 4): 936 - 954.

[23] PAN ZH, QU CJ, CHEN Y, et al. Bufotalin induces cell cycle arrest and cell apoptosis in human malignant melanoma A375 cells[J]. Oncol Rep, 2019, 41(4): 2409 - 2417.

[24] LIN SH, LV JH, PENG PL, et al. Bufadienolides induce p53 - mediated apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Oncol Let, 2018, 15(2): 1566 - 1572.

[25] 果月红, 周凡琦, 吴 熙, 等. 利用结直肠癌类器官模型评估化疗药物药效[J]. 基础医学与临床, 2025, 45(4): 456 - 464.

[26] ZHANG WC, LI W, YIN C, et al. PRKDC Induces Chemoresistance in Osteosarcoma by Recruiting GDE2 to Stabilize GNAS and Activate AKT[J]. Cancer Res, 2024, 84(17): 2873 - 2887.

[27] 陈兰芳, 肖 亮, 杨军平. 细胞自噬的分子机制及其功能[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(2): 157 - 163.

[28] 张新颖, 毛景东, 杨晓燕, 等. AMPK / mTOR 信号通路的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2019, 39(3): 109 - 116.

[29] HUANG CF, HSIEH YH, YANG SF, et al. Mitophagy Effects of Protodioscin on Human Osteosarcoma Cells by Inhibition