西黄丸抗弥漫大B细胞淋巴瘤的作用机制预测与验证Δ

黄茹意[1*]，李金宇[2]，林文琪[3]，江　鑫[2]，陈燕玲[1]，黄伟昆[1]，杨　琳[1#]（1.福建医科大学肿瘤临床医学院/福建省肿瘤医院药学部，福州　350011；2.福州大学化学学院，福州　350108；3.福建中医药大学药学院，福州　350122）

中图分类号　R965；R733.4　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2026）02-0161-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2026.02.05

摘　要　目的　探讨西黄丸抗弥漫大B细胞淋巴瘤（DLBCL）的作用机制。**方法**　基于TCMSP、GeneCards、DisGeNET等数据库筛选西黄丸活性成分及DLBCL相关疾病靶点；利用String数据库和Cytoscape软件，构建蛋白质-蛋白质相互作用网络以筛选核心成分与核心靶点，然后进行基因本体功能和京都基因与基因组数据库通路富集分析；利用GEPIA和PanCanSurvPlot数据库分析核心靶点的临床相关性；进一步对核心成分与核心靶点进行分子对接和分子动力学模拟验证，并采用分子力学泊松-玻尔兹曼表面积（MM-PBSA）算法计算结合自由能。采用CCK-8法、流式细胞术及Western blot法验证西黄丸对DLBCL的作用及相关分子机制。**结果**　网络药理学共筛选出108个西黄丸活性成分和410个西黄丸治疗DLBCL的潜在靶点，获得17 beta-estradiol（17β-雌二醇）、quercetin（槲皮素）等6个核心成分，肿瘤蛋白53（TP53）、酪氨酸蛋白激酶Src（SRC）等10个核心靶点。富集分析显示，西黄丸抗DLBCL主要涉及凋亡信号通路、磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）/蛋白激酶B（Akt）信号通路等。临床相关性分析显示，TP53、SRC在DLBCL样本中高表达，且与患者不良预后相关（$P<0.05$）。分子对接、分子动力学模拟及MM-PBSA结合自由能计算证实，SRC-槲皮素复合物具有更强而稳定的结合亲和力。体外实验结果显示，西黄丸可浓度依赖性抑制DLBCL细胞的增殖；与对照组比较，西黄丸中、高浓度组可显著诱导SU-DHL2和SU-DHL4细胞凋亡，显著降低SU-DHL4细胞中SRC蛋白、磷酸化PI3K（p-PI3K）/PI3K、p-Akt/Akt的表达（$P<0.05$）。**结论**　西黄丸可能通过调控SRC/PI3K/Akt信号通路抑制DLBCL细胞增殖并诱导其凋亡。

关键词　西黄丸；弥漫大B细胞淋巴瘤；网络药理学；分子对接；分子动力学模拟

Mechanism prediction and verification of Xihuang pill against diffuse large B-cell lymphoma

HUANG Ruyi[1], LI Jinyu[2], LIN Wenqi[3], JIANG Xin[2], CHEN Yanling[1], HUANG Weikun[1], YANG Lin[1]（1. Dept. of Pharmacy, Fujian Cancer Hospital/Clinical Oncology School of Fujian Medical University, Fuzhou 350011, China; 2. College of Chemistry, Fuzhou University, Fuzhou 350108, China; 3. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the mechanism of Xihuang pill (XHP) against diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). **METHODS** The active ingredients of XHP and potential therapeutic targets for DLBCL were identified using TCMSP, GeneCards and DisGeNET databases. Protein-protein interaction networks were constructed using the String database and Cytoscape software to screen core components and core targets. Gene ontology and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analyses were then performed. The clinical relevance of core targets was analyzed using the GEPIA and PanCanSurvPlot databases. Molecular docking and molecular dynamics (MD) simulation were conducted to verify the interactions between core components and core targets, and the binding free energy was calculated using the molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area (MM-PBSA) method. The effects of XHP on DLBCL and the related molecular mechanisms were validated using CCK-8 assay, flow cytometry and Western blot. **RESULTS** Network pharmacology analysis identified 108 active ingredients of XHP and 410 potential therapeutic targets for DLBCL. Six core components (e.g., 17 beta-estradiol, quercetin) and ten core targets [e.g., tumor protein 53 (TP53), proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src (SRC)] were obtained. Enrichment analysis indicated that the anti-DLBCL effects of XHP were primarily associated with the apoptotic signaling pathway, the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway and so on. Clinical correlation analysis revealed that TP53 and SRC expression were significantly up-regulated in DLBCL tissues and associated with poor patient prognosis ($P<0.05$). Molecular docking, MD simulations and MM-PBSA calculations confirmed that the SRC-quercetin complex had a stronger and more stable binding affinity. *In vitro* experiments

Δ **基金项目**　福建省卫健委科技计划项目（No.2022CXA027）；福建省科技创新联合资金项目（No.2025Y9690）；福建医科大学启航项目（No.2023QH1155）

＊ **第一作者**　主管药师，硕士。研究方向：肿瘤药理学。E-mail：1203281018@qq.com

\# **通信作者**　主任药师，硕士生导师。研究方向：临床药学。E-mail：LinYang@fjzlhospital.com

demonstrated that XHP concentration-dependently inhibited the proliferation of DLBCL cells; compared with control group, XHP medium- and high-dose groups could significantly induce the apoptosis of SU-DHL2 and SU-DHL4 cells, and significantly down-regulated the expressions of SRC protein, phosphorylated (p)-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt in SU-DHL4 cells ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** XHP may inhibit the proliferation and induce the apoptosis of DLBCL cells by regulating the SRC/PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS Xihuang pill; diffuse large B-cell lymphoma; network pharmacology; molecular docking; molecular dynamics simulation

弥漫大B细胞淋巴瘤(diffuse large B-cell lymphoma,DLBCL)是最常见的侵袭性非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma,NHL)亚型,占所有NHL病例的30%～40%[1]。多数DLBCL患者在接受标准一线治疗后预后可显著改善[2]。然而,仍有30%～40%的患者进展为难治/复发性DLBCL,其中90%的难治/复发性DLBCL患者对常规挽救性化疗及自体干细胞移植反应不佳[3－4]。因此,研发新型DLBCL治疗方案已成为当前临床的迫切需求之一。

近年来研究表明,中医药在淋巴瘤治疗领域展现出独特优势[5]。西黄丸始载于清代《外科证治全生集》,为王洪绪祖传方,由牛黄、麝香、乳香、没药4味中药组成[6]。2020年版《中国药典》(一部)记载,西黄丸具有清热解毒、活血化瘀、行气止痛之功效[7]。现代药理学证实,西黄丸可通过诱导细胞凋亡与焦亡、抑制增殖与迁移、抗血管生成及调节肿瘤微环境与免疫等多途径发挥抗肿瘤作用[8－10]。临床研究显示,西黄丸作为辅助治疗可改善肿瘤患者的生存质量并延长生存期,有助于逆转化疗耐药、减轻毒副作用[11－12]。在淋巴瘤治疗中,西黄丸联合一线治疗方案可显著提升NHL患者的4年总生存率,改善中医证候,提高疾病控制率与远期生存率[13－14]。然而,目前关于西黄丸抗淋巴瘤尤其是DLBCL的作用机制仍缺乏深入研究。

近年来,网络药理学已成为中医药研究的前沿和热点之一,该技术通过构建“多成分-多靶点-多通路”的交互网络,完美契合中药整体调节的独特性[15]。分子动力学模拟是一种计算模拟方法,用于研究各种配体和受体的分子运动与相互作用,以评估配体-受体复合物的稳定性和灵活性[16]。本研究拟整合网络药理学和分子动力学模拟来探索西黄丸中的活性成分和作用机制,并对预测结果进行体外实验验证,以期为该药的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究的主要仪器包括3111型CO_2细胞培养箱、Multiskan SkyHigh型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),CKX41型光学倒置显微镜、C6型流式细胞仪(美国BD公司),165-8001型蛋白电泳仪、Chemi-Doc型超高灵敏度化学发光成像系统(美国Bio-Rad公司)等。

1.2 主要药物与试剂

西黄丸(50 mg/丸,批号2404004)购自山东宏济堂制药集团股份有限公司;RPMI 1640培养基(批号L220KJ)购自上海源培生物科技股份有限公司;CCK-8细胞增殖与活性检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(批号分别为ABK0011C、TA-005)均购自厦门泰京生物技术有限公司;Annexin Ⅴ-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号C1052)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;RIPA裂解液、BCA试剂盒、预染蛋白标准品(批号分别为PC101、ZJ101、WJ101)均购自上海雅酶生物医药科技有限公司;ECL发光液(批号HY-K2005)购自美国MedChemExpress公司;兔抗磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)抗体、兔抗酪氨酸蛋白激酶Src(proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src,SRC)抗体(批号分别为db15064、db15017)均购自杭州戴格生物技术有限公司;兔抗磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K,p-PI3K)抗体(批号AB138364)购自英国Abcam公司;兔抗蛋白激酶B(protein kinase B,Akt)抗体、兔抗p-Akt抗体(批号分别为9272S、4060T)均购自美国CST公司;兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(批号A19056)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 细胞株

人DLBCL SU-DHL2、SU-DHL4细胞株均由福建省肿瘤医院病理科馈赠。

2 方法与结果

2.1 网络药理学分析

2.1.1 西黄丸活性成分及相关靶点预测

在TCMSP平台、BATMAN-TCM数据库分别检索西黄丸组成药物(牛黄、麝香、乳香、没药)的化学成分,以口服生物利用度≥30%和类药性≥0.18为条件筛选其活性成分及其靶点[17]。通过SwissTargetPrediction数据库筛选成分靶点,所获靶点均通过UniProt数据库进行靶点信息比对和标准化,再进行合并去重处理。最终获得108个西黄丸活性成分及1 476个活性成分相关靶点。

2.1.2　DLBCL疾病相关靶点的收集与西黄丸治疗DLBCL潜在靶点的获取

使用GeneCards数据库、OMIM数据库和DisGeNET数据库，以“diffuse large B-cell lymphoma”为检索词，限定物种为“homo sapiens”，得到DLBCL疾病相关靶点，合并所有靶点并去重后最终得到2 059个与DLBCL相关的疾病靶点。将所获西黄丸活性成分相关靶点与DLBCL疾病相关靶点上传至Venny 2.1.0平台取交集，最终获得410个西黄丸治疗DLBCL的潜在靶点。

2.1.3　“西黄丸-活性成分-靶点-DLBCL”网络构建及分析

将“2.1.2”项下获得的410个交集靶点导入Cytoscape 3.9.1软件构建“西黄丸-活性成分-靶点-DLBCL”网络图。借助Network Analyzer插件进行拓扑分析，结果显示，该网络图包含500个节点、1 839条边。根据度值大小排序选取前6个成分作为西黄丸的核心成分，分别为17 beta-estradiol（17β-雌二醇）、quercetin（槲皮素）、5-cis-cyclopentadecen-L-one（5-顺-环十五烷-L-酮）、*P*-menth-4-en-3-one（5-甲基-2-丙-2-基环己-2-烯-1-酮）、androst-4-ene-3，17-dione（雄烯二酮）、testosterone（睾酮），度值分别为114、108、95、95、94、93。

2.1.4　蛋白质-蛋白质相互作用网络构建及分析

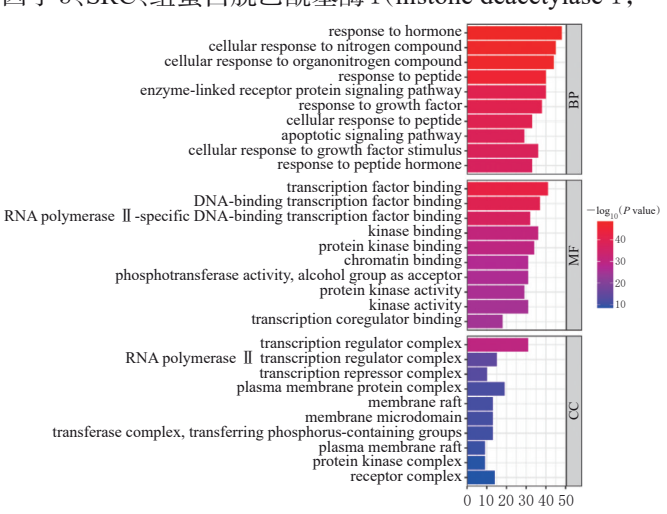
进一步将410个交集靶点导入String数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络，设置物种为“homo sapiens”，阈值设置为“highest confidence（>0.9）”。将PPI网络导入Cytoscape 3.9.1软件进行可视化和分析。根据度值大小排序选取前10个靶点作为核心靶点，包括：肿瘤蛋白53（tumor protein 53，TP53）、Akt、E1A结合蛋白300、信号转导和转录激活因子3、SRC、组蛋白脱乙酰基酶1（histone deacetylase 1，HDAC1）、雌激素受体1、连环蛋白β1（catenin beta 1，CTNNB1）、肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）、JUN原癌基因。

2.1.5　潜在靶点生物功能富集分析

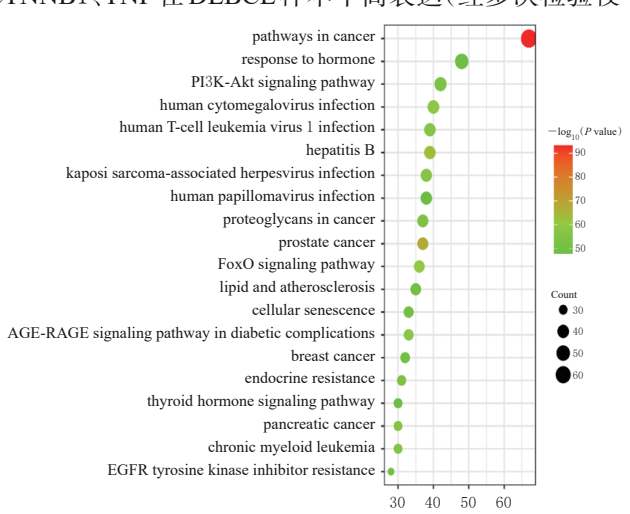
将PPI网络中按度值大小排序前100个靶点导入Metascape数据库进行基因本体（gene ontology，GO）功能和京都基因与基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）通路富集分析，物种设置为“homo sapiens”，设定$P<0.01$。结果显示，共富集到1 763个生物过程（biological process，BP）条目、141个分子功能（molecular function，MF）条目、68个细胞成分（cellular component，CC）条目以及193条KEGG通路。分别将GO功能富集结果排序前10位的条目和KEGG通路富集结果排序前20位的通路导入微生信网站，生成GO功能BP、CC、MF条目的三合一柱状图（图1A）和KEGG通路的气泡图（图1B）。结果显示，GO功能富集主要与apoptotic signaling pathway（凋亡信号通路）、transcription factor binding（转录因子结合）、transcription regulator complex（转录调节因子复合物）等有关；KEGG通路富集分析主要涉及pathways in cancer（癌症信号通路）、PI3K-Akt signaling pathway（PI3K/Akt信号通路）、FoxO signaling pathway（叉头框蛋白O信号通路）等。

2.1.6　核心靶点的临床相关性分析

本研究进一步利用GEPIA数据库分析PPI网络获得的10个核心靶点在DLBCL样本和健康人全血细胞样本之间的表达差异。GEPIA数据库收集到47份DLBCL样本和337份健康人全血细胞样本的相关数据，采用方差分析比较各核心靶点在两组间表达水平的差异。如表1所示，核心靶点中的TP53、Akt、SRC、HDAC1、CTNNB1、TNF在DLBCL样本中高表达（经多次检验校



A. GO功能富集分析柱状图



B. KEGG通路富集分析气泡图

图1　西黄丸治疗DLBCL潜在靶点的GO功能和KEGG通路富集分析图

正后$P<0.01$)。为进一步探讨这些差异表达靶点的临床意义,本研究利用PanCanSurvPlot数据库评估其表达水平与DLBCL患者总生存期的相关性。结果(图2)显示,SRC的总生存期显著低于低表达患者(风险比=1.39,$P=0.028\ 8$),TP53高表达患者则相反(风险比=0.64,$P=0.002\ 5$),提示SRC高表达和TP53低表达是不良预后因素。

表1　核心靶点在DLBCL中的表达中位数比较

靶点	DLBCL样本(n=47)	全血细胞样本(n=337)	$\log_2$FC	校正P值
TP53	38.17	4.06	2.953	<0.01
Akt	41.11	19.98	1.005	<0.01
HDAC1	126.35	23.81	2.360	<0.01
SRC	11.34	1.89	2.094	<0.01
CTNNB1	48.05	14.02	1.707	<0.01
TNF	6.38	1.44	1.597	<0.01

FC:差异倍数。

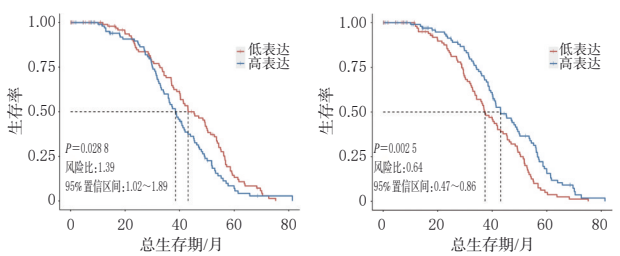
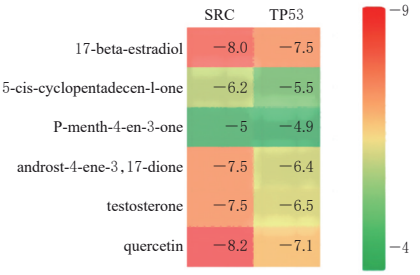


图2　SRC、TP53的表达水平与DLBCL患者总生存期的关系图

2.1.7　西黄丸核心成分与关键靶点的分子对接

根据上述结果,本研究最终选择TP53和SRC 2个关键靶点分别与西黄丸的核心成分进行分子对接。从PubChem数据库获取西黄丸核心成分的3D结构作为对接配体;从RCSB PDB数据库下载TP53(ID:6GGE)和SRC(ID:2SRC)的3D结构作为对接受体;在AutoDock Vina软件中进行核心成分与关键靶点对接,当结合能小于−5.0 kcal/mol时证明分子间显示出更强的亲和力[18]。核心成分与2个关键靶点的对接得分以热图形式展示,结果(图3)显示,17β-雌二醇、槲皮素与SRC的结合亲和力更高。



注:颜色深度代表分子对接的结合能得分(单位kcal/mol),得分越低,表明理论结合亲和力越强,颜色也越深。

图3　核心成分与关键靶点的分子对接结果热图

2.1.8　分子动力学模拟与结合自由能计算验证

为进一步验证17β-雌二醇、槲皮素与SRC的对接稳定性,本研究使用Amber 20.0软件进行了200 ns的分子动力学模拟,计算均方根偏差(root mean square deviation,RMSD)、均方根波动(root mean square fluctuation,RMSF)、回转半径(radius of gyration,Rg)并绘制相应的曲线。RMSD曲线结果(图4A)显示,SRC-槲皮素复合物的RMSD曲线处于较低水平且保持平稳,RMSD值波动均小于2 Å,而SRC-17β-雌二醇复合物的RMSD曲线波动稍大。RMSF曲线结果(图4B)显示,两个复合物的RMSF曲线整体趋势相似,但在一些残基区域(如200~250和300~400残基处),SRC-槲皮素复合物的波动幅度略大。Rg曲线结果(图4C)显示,两个复合物的Rg值相对稳定,均保持较为稳定的结构构型。

最后,根据分子力学泊松-玻尔兹曼表面积(molecular mechanics Poisson-Boltzmann surface area,MM-PBSA)计算蛋白质和分子之间的结合自由能。为探究不同类型键的各自贡献,本研究将两个复合物的结合能分解为4个能量分量:范德华能(ΔE_{vdW})、静电能(ΔE_{ele})、极性溶剂化能(ΔG_{GB})和非极性溶剂化自由能(ΔG_{SA})。结果(表2)显示,SRC-17β-雌二醇复合物和SRC-槲皮素复合物的总结合自由能(ΔG_{bind})分别为(−23.1±4.1)、(−29.3±3.0)kcal/mol,可见SRC与槲皮素的结合更强,SRC可能是西黄丸发挥药效最有希望的靶点。

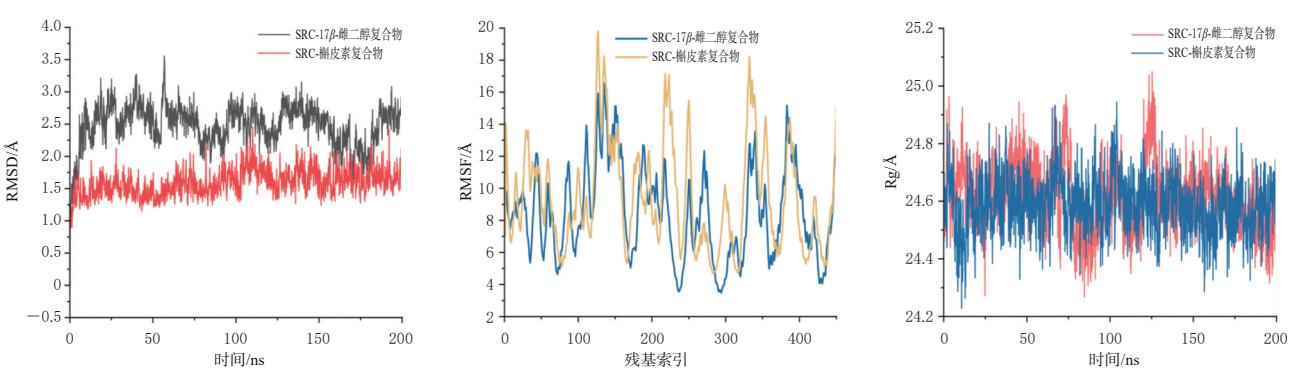


图4　17β-雌二醇、槲皮素与SRC对接复合物的相互作用曲线图

表2　MM-PBSA计算所得SRC对接复合物的结合自由能（$\bar{x}\pm s$，kcal/mol）

复合物	ΔE_{vdW}	ΔE_{ele}	ΔG_{GB}	ΔG_{SA}	ΔG_{bind}
SRC-17β-雌二醇复合物	−30.0±3.6	−9.9±3.6	20.6±3.0	−3.7±0.4	−23.1±4.1
SRC-槲皮素复合物	−35.0±4.3	−38.5±10.9	49.6±7.5	−5.5±0.2	−29.3±3.0

2.2　体外实验验证

2.2.1　西黄丸溶液制备

以RPMI 1640培养基将西黄丸配制成质量浓度为0.1 g/mL的混悬液，置于4 ℃无菌密封容器中预冷24 h以促进成分释放。随后，使用超声波振动2 h以促进溶解，并在4 ℃下继续孵育48 h。孵育结束后，将混合物以0.22 μm微孔滤膜过滤，收集滤液，即得西黄丸浸出液[19]。该浸出液分装后于−20 ℃下储存。实验前，使用RPMI 1640培养基将储存的西黄丸浸出液稀释至所需工作浓度。

2.2.2　西黄丸对SU-DHL2和SU-DHL4细胞增殖的影响

采用CCK-8法检测。将培养至对数生长期的SU-DHL2和SU-DHL4细胞，分别接种于96孔板（每孔1×10^4个细胞）中，每孔100 μL。参考相关文献[19]设置对照组、空白组、西黄丸不同浓度组（10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5 mg/mL），每组设置3个复孔，分别作用24、48 h测得光密度（optical density，OD）。细胞存活率（%）=（实验组OD−空白组OD）/（对照组OD−空白组OD）×100%。采用GraphPad Prism 10.0软件对数据进行统计分析和绘图，将细胞存活率对药物浓度的对数进行拟合，计算半数抑制浓度（IC_{50}）。满足正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差分析，进一步两两比较采用LSD-t检验；检验水准$\alpha=0.05$（统计方法后同）。

结果（图5）显示，西黄丸在作用24、48 h时对两种细胞均表现出显著的细胞毒性效应，且呈现出浓度依赖性趋势。在48 h时，细胞毒性更为明显，因此选择该时间点计算IC_{50}。SU-DHL2和SU-DHL4两种细胞的48 h IC_{50}分别为2.06、2.83 mg/mL。基于此，后续实验SU-DHL2细胞选择1、2、4 mg/mL为西黄丸低、中、高浓度组，SU-DHL4细胞选择1.4、2.8、5.6 mg/mL为西黄丸低、中、高浓度组。

2.2.3　西黄丸对SU-DHL2和SU-DHL4细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测。将培养至对数生长期的SU-DHL2和SU-DHL4细胞分别以1×10^5个/mL接种于6孔板中，每孔加入2 mL培养液。设置对照组和西黄丸低、中、高浓度组，每组设置3个复孔。给药处理48 h后，收集细胞，使用磷酸盐缓冲液离心清洗细胞2次，收集沉淀。使用FITC和PI染料进行染色，在室温下避光孵育15 min，随后检测各组细胞的凋亡情况，并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率（%）=（早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数）/总细胞数×100%。

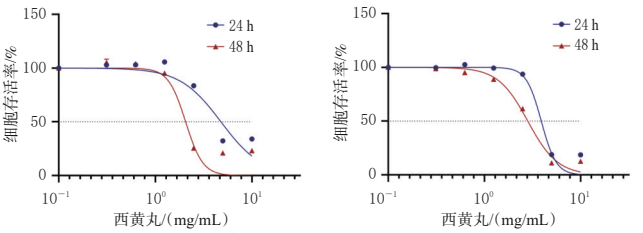


图5　不同浓度西黄丸对SU-DHL2和SU-DHL4细胞存活率的影响

结果（表3）显示，相较于对照组，西黄丸各浓度组SU-DHL2、SU-DHL4细胞的凋亡率均升高，其中，中、高浓度组差异有统计学意义（$P<0.05$），并有浓度依赖趋势，表明西黄丸能够显著诱导SU-DHL2和SU-DHL4细胞凋亡。

表3　各组SU-DHL2和SU-DHL4细胞的凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，$n=3$，%）

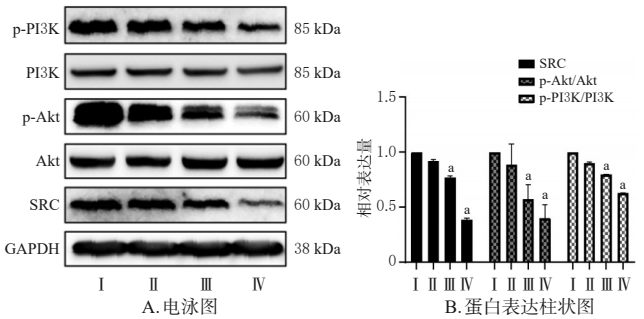
组别	SU-DHL2细胞	SU-DHL4细胞
对照组	5.547±0.760	4.730±0.156
西黄丸低浓度组	7.150±0.651	6.890±0.042
西黄丸中浓度组	21.025±1.351[a]	12.145±0.120[a]
西黄丸高浓度组	32.133±0.635[a]	48.967±2.479[a]

a：与对照组相比，$P<0.05$。

2.2.4　西黄丸对关键靶点SRC和PI3K/Akt信号通路相关蛋白的影响

采用Western blot法检测。根据“2.2.3”项下方法选择SU-DHL4细胞进行分组与给药。给药处理48 h后，收集细胞，使用预冷的磷酸盐缓冲液离心清洗细胞2次，RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白，BCA法测定蛋白浓度，加热变性。取变性蛋白样品，经10%十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行转膜，使用5%脱脂奶粉封闭，加入相应一抗（SRC、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、GAPDH稀释度均为1∶1 000），于4 ℃下孵育过夜；次日加入二抗（稀释度为1∶5 000），室温下孵育2 h，用TBST缓冲液洗涤3次后，用ECL发光液进行显影，最后使用Image J软件进行分析，计算目的蛋白与内参蛋白（GAPDH）灰度值比值以及磷酸化前后蛋白的灰度值比值。

结果（图6）显示，与对照组相比，西黄丸中、高浓度组SU-DHL4细胞中SRC蛋白、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt的表达均显著降低（$P<0.05$），表明西黄丸可能通过SRC/PI3K/Akt信号通路作用于DLBCL，这与网络药理学预测结果一致。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：西黄丸低浓度组；Ⅲ：西黄丸中浓度组；Ⅳ：西黄丸高浓度组。a：与对照组相比，$P<0.05$。

图6 西黄丸对SU-DHL4细胞SRC/PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达的影响

3 讨论

西黄丸作为一种中药方剂，具有清热解毒、活血化瘀、散结消肿等诸多功效，在中国古代被用于治疗疮痈、瘰疬和肿瘤等病症[20]。既往研究表明，西黄丸在多种实体瘤及淋巴瘤的辅助治疗中具有一定潜力，可改善患者生存质量、延长生存期，并可能逆转部分化疗耐药[11]。但其在DLBCL中的具体分子机制尚不清楚。

本研究通过网络药理学分析筛选出西黄丸的6个核心成分和10个核心靶点。GO功能和KEGG通路富集分析表明，西黄丸抗DLBCL的治疗靶点显著富集于凋亡信号通路、癌症信号通路、PI3K/Akt信号通路等肿瘤相关通路，提示西黄丸可能通过多靶点、多通路协同发挥作用。进一步临床相关性分析显示，核心靶点中TP53、Akt、SRC、HDAC1、CTNNB1和TNF靶点在DLBCL样本中高表达，其中仅TP53和SRC与DLBCL患者的不良预后密切相关。值得注意的是，尽管两者均为核心靶点，但其在DLBCL发生发展中的作用机制有所不同。*TP53*是肿瘤抑制基因，其在DLBCL患者中的突变频率较高，并与肿瘤的起始、进展、治疗耐药以及整体生存期较差相关[21]。而SRC作为非受体酪氨酸激酶，更多参与上游信号转导，通过激活PI3K/Akt和丝裂原活化蛋白激酶/细胞外信号调节激酶促进肿瘤生长、迁移、侵袭、转移及化疗耐药[22]。同时，SRC的激活与B细胞淋巴瘤的早期表型和肿瘤生长也高度相关[23－25]，其下游PI3K/Akt信号通路在DLBCL的发生、进展及耐药中起关键调控作用[26]。因此，SRC可能作为更易于干预的信号节点，为药物作用提供明确的通路依据。本研究在后续验证阶段，优先选择信号传导路径较为明晰的SRC/PI3K/Akt信号通路进行深入探索。

为验证核心成分与关键靶点的相互作用，本研究进行了分子对接与分子动力学模拟。分子对接结果显示，6个核心成分与TP53、SRC均具有较好的结合潜能。其中，17β-雌二醇和槲皮素与SRC的对接得分更高。本研究对结合能较优的SRC-17β-雌二醇与SRC-槲皮素复合物进行了200 ns的分子动力学模拟。RMSD通常用于评估蛋白质相对于其原始结构的偏离程度，反映蛋白质配体和对接复合物的结构稳定性[27]。结果显示，相较于SRC-17β-雌二醇复合物，SRC-槲皮素复合物的RMSD曲线波动更小且更快达到平衡，表明其整体构型更为稳定；RMSF曲线分析提示，两者结合模式对蛋白质关键区域波动性影响存在差异；Rg曲线分析结果则表明，两个复合物在模拟过程中结构紧凑性保持良好。尤为重要的是，分子动力学模拟后的结合自由能分析考虑了模拟过程中观察到的分子的动态行为，在准确估计药物-蛋白质相互作用的强度方面发挥着至关重要的作用[28]。根据计算结果，SRC-槲皮素复合物的ΔG_{bind}低于SRC-17β-雌二醇复合物[(－29.3±3.0)kcal/mol vs.(－23.1±4.1 kcal/mol)]，表明槲皮素与SRC之间具有更强且更稳定的结合亲和力。上述计算模拟结果为后续优先选择SRC及其下游通路进行实验验证提供了重要理论依据。

基于“预测-验证”的研究思路，本研究体外实验证实，西黄丸可浓度依赖性地抑制DLBCL SU-DHL2和SU-DHL4细胞的增殖并诱导其凋亡；Western blot结果进一步显示，西黄丸能显著下调SU-DHL4细胞中SRC蛋白、p-PI3K/PI3K及p-Akt/Akt的表达。以上实验结果与网络药理学预测及分子动力学模拟结论相互印证，共同提示西黄丸可能通过抑制SRC/PI3K/Akt信号通路发挥抗DLBCL作用。

本研究仍存在一定局限性：实验仅在SU-DHL2和SU-DHL4两株细胞系中进行，缺乏原代细胞及动物实验数据支持。未来研究可进一步聚焦槲皮素等单体成分的药效，开展动物体内实验，并探索西黄丸与临床化疗药物的协同作用，从而为其在DLBCL治疗中的合理应用提供更充分的科学依据。

综上所述，本研究通过网络药理学、分子动力学模拟与体外实验验证，初步阐明西黄丸可能通过调控SRC/PI3K/Akt信号通路抑制DLBCL细胞增殖并诱导其凋亡。

参考文献

[1] BARRACLOUGH A, HAWKES E, SEHN L H, et al. Diffuse large B-cell lymphoma[J]. Hematol Oncol, 2024, 42(6): e3202.

[2] WANG L, LI L R, YOUNG K H. New agents and regimens for diffuse large B cell lymphoma[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 175.

[3] CRUMP M, NEELAPU S S, FAROOQ U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study[J]. Blood,

2017,130(16):1800-1808.
[4] ZHANG J, GU Y, CHEN B A. Drug-resistance mechanism and new targeted drugs and treatments of relapse and refractory DLBCL[J]. Cancer Manag Res, 2023, 15: 245-255.
[5] ZHANG G F, QIN Y M, LIU S B, et al. Bibliometric analysis of research trends and topic areas in traditional Chinese medicine therapy for lymphoma[J]. Pharm Biol, 2024,62(1):13-21.
[6] 王洪绪.外科证治全生集[M].北京:人民卫生出版社,1989:36.
[7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[M].2020年版.北京:中国医药科技出版社,2020:876-877.
[8] GUO Q J, LIN J Y, LIU R, et al. Review on the applications and molecular mechanisms of Xihuang pill in tumor treatment[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015,2015:854307.
[9] CAO B, WANG S Y, LI R S, et al. Xihuang pill enhances anticancer effect of anlotinib by regulating gut microbiota composition and tumor angiogenesis pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2022,151:113081.
[10] CHEN C, YUAN S M, CHEN X H, et al. Xihuang pill induces pyroptosis and inhibits progression of breast cancer cells via activating the cAMP/PKA signalling pathway[J]. Am J Cancer Res, 2023,13(4):1347-1362.
[11] CHEN Z H, LI Z M, YANG S, et al. The prospect of Xihuang pill in the treatment of cancers[J]. Heliyon, 2023, 9(4):e15490.
[12] MAO D, FENG L, HUANG S Q, et al. Meta-analysis of Xihuang pill efficacy when combined with chemotherapy for treatment of breast cancer[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2019, 2019:3502460.
[13] 董旭辉.西黄丸联合CHOP方案治疗B细胞非霍奇金淋巴瘤临床疗效[J].中医药临床杂志,2018,30(8):1492-1494.
[14] 王钧.西黄丸联合CHOP方案治疗非霍奇金淋巴瘤的效果探析[J].当代医药论丛,2019,17(9):175-176.
[15] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. J Ethnopharmacol, 2023,309:116306.
[16] WU X D, XU L Y, LI E M, et al. Application of molecular dynamics simulation in biomedicine[J]. Chem Biol Drug Des, 2022,99(5):789-800.
[17] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014,6:13.
[18] WANG H, DU Y Y, JI J, et al. Utilizing network toxicology and molecular dynamics simulations to efficiently evaluate the neurotoxicity and underlying mechanisms of the endocrine-disrupting chemical triclosan[J]. Int J Mol Sci, 2025,26(19):9458.
[19] WANG Y, WANG W H, LIU K L, et al. The mechanism of Xihuang pills' intervention in the tumour immune microenvironment for the treatment of liver cancer based on the STAT3-PDL1 pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2024, 331:118278.
[20] 吴若霞,陈锦东,李松辉,等.西黄丸抗肿瘤作用机制的研究进展[J].湖南中医杂志,2021,37(12):190-192.
[21] EL HAMEED EBID O A, EZZ EL ARAB L R, SAAD A S, et al. Prognostic impact of MYD88 and TP53 mutations in diffuse large B Cell lymphoma[J]. Ann Hematol, 2023, 102(12):3477-3488.
[22] WANG P H, MA Y, RAO X H, et al. Kaempferol targets Src to exert its chemopreventive effects on mammary tumorigenesis via regulation of the PI3K/AKT pathway[J]. Phytomedicine, 2025,141:156701.
[23] PEIRÓ G, ORTIZ-MARTÍNEZ F, GALLARDO A, et al. Src, a potential target for overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast carcinoma[J]. Br J Cancer, 2014,111(4):689-695.
[24] LANTERMANS H C, MINDERMAN M, KUIL A, et al. Identification of the SRC-family tyrosine kinase HCK as a therapeutic target in mantle cell lymphoma[J]. Leukemia, 2021,35(3):881-886.
[25] ZHANG N N, ZHANG G, LIU N, et al. A novel orally available Syk/Src/Jak2 inhibitor, SKLB-850, showed potent anti-tumor activities in B cell lymphoma (BCL) models[J]. Oncotarget, 2017,8(67):111495-111507.
[26] CHEN J F, GE X W, ZHANG W, et al. PI3K/AKT inhibition reverses R-CHOP resistance by destabilizing SOX2 in diffuse large B cell lymphoma[J]. Theranostics, 2020, 10(7):3151-3163.
[27] SADAQAT M, QASIM M, TAHIR UL QAMAR M, et al. Advanced network pharmacology study reveals multi-pathway and multi-gene regulatory molecular mechanism of Bacopa monnieri in liver cancer based on data mining, molecular modeling, and microarray data analysis[J]. Comput Biol Med, 2023,161:107059.
[28] SULEMAN M, YOUSAFI Q, ALI J, et al. Bioinformatics analysis of the differences in the binding profile of the wild-type and mutants of the SARS-CoV-2 spike protein variants with the ACE2 receptor[J]. Comput Biol Med, 2021,138:104936.

(收稿日期:2025-09-08 修回日期:2025-12-15)
(编辑:舒安琴)