

莲心季铵碱抗胰腺癌靶点筛选及药效评价： 网络药理学预测与动物实验验证



齐 飞¹, 陈 琦²

1. 浙江大学医学院附属第一医院实验动物中心 (杭州 310003)
2. 浙江大学医学院附属第一医院肝胆胰外科 (杭州 310003)

【摘要】目的 运用网络药理学方法预测莲心季铵碱治疗胰腺癌的核心作用靶点及信号通路。**方法** 通过 TC MSP、SwissTargetPrediction 数据库筛选莲心季铵碱的潜在作用靶点, GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库收集胰腺癌相关靶点, 经 Venny 2.1.0 获取二者交集; 通过 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 经 Cytoscape 3.10.4 软件可视化分析并筛选核心靶点; 采用 DAVID 数据库进行 GO 功能及 KEGG 信号通路富集分析; 开展分子对接实验验证结合亲和力、动物实验验证药物效果。**结果** 共筛选出莲心季铵碱潜在作用靶点 112 个、胰腺癌相关靶点 2 187 个, 获得交集靶点 37 个。PPI 网络分析显示, Jun 原癌基因 (JUN)、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚基 α (PIK3CA)、热休克蛋白 90 α (HSP90AA1)、雌激素受体 1 (ESR1)、酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC) 为核心靶点; GO 功能富集分析显示, 其主要参与细胞增殖调控、凋亡过程、炎症反应及血管生成等生物学过程; KEGG 信号通路分析表明, 交集靶点基因显著富集于磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (PI3K-AKT) 信号通路及其他肿瘤相关通路。分子对接结果显示, 莲心季铵碱与 ESR1 (-7.8 kcal/mol)、SRC (-8.2 kcal/mol) 及 HSP90AA1 (-8.7 kcal/mol) 均具有较强的结合亲和力。体内实验表明, 20 mg/kg 莲心季铵碱可显著抑制肿瘤生长, 抑瘤率达 34% ($P < 0.05$), 且未造成明显体重指数降低。**结论** 莲心季铵碱在体内可抑制胰腺癌异种移植瘤的生长, 其作用机制可能与调控 PI3K-AKT 等多个靶点及信号通路相关。

【关键词】 莲心季铵碱; 胰腺癌; 网络药理学; 作用靶点; 分子对接; 动物实验; GO 功能分析; KEGG 通路富集分析

【中图分类号】 R285.5

【文献标识码】 A

Target screening and efficacy evaluation of lotusine against pancreatic cancer: prediction based on network pharmacology and validation by animal experiments

QI Fei¹, CHEN Qi²

1. Laboratory of Animal Research Center, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

2. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China

Corresponding author: CHEN Qi, Email: chen_qi@zju.edu.cn

【Abstract】Objective To predict the core therapeutic targets and signaling pathways of lotusine in pancreatic cancer treatment using network pharmacology. **Methods** Potential

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202601003

通信作者: 陈琦, 博士, 副主任医师, Email: chen_qi@zju.edu.cn

targets of lotusine were retrieved from TCMSP and SwissTargetPrediction database. Pancreatic cancer-related targets were collected from GeneCards, OMIM, and DisGeNET databases. The intersection targets were identified using Venny 2.1.0. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed via the STRING database, and visualized and analyzed using Cytoscape 3.10.4 to screen core targets. Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed using the DAVID database. Molecular docking was conducted to validate the binding of lotusine to core targets. Molecular docking experiments were used to validate binding affinity, and animal experiments were conducted to verify the drug efficacy. **Results** A total of 112 potential targets of lotusine, 2,187 pancreatic cancer-related targets were identified, yielding 37 intersection targets. PPI network analysis showed that JUN, PIK3CA, HSP90AA1, ESR1, and SRC were core targets. GO functional enrichment analysis indicated involvement in regulation of cell proliferation, apoptotic process, inflammatory response, and angiogenesis. KEGG pathway analysis showed significant enrichment in PI3K-AKT signaling pathway and other cancer-related pathways. Molecular docking demonstrated strong binding affinities between lotusine and ESR1 (-7.8 kcal/mol), SRC (-8.2 kcal/mol) and HSP90AA1 (-8.7 kcal/mol). In vivo experiments showed that lotusine (20 mg/kg) significantly inhibited tumor growth by 34% ($P < 0.05$) without significant body weight loss. **Conclusion** Lotusine exhibited inhibitory activity against pancreatic cancer xenograft growth in vivo, potentially through modulation of multiple targets and pathways including PI3K-AKT.

【Keywords】 Lotusine; Pancreatic cancer; Network pharmacology; Therapeutic targets; Molecular docking; Animal experiment; GO functional enrichment analysis; KEGG pathway enrichment analysis

胰腺癌 (pancreatic cancer, PC) 作为一种起源于胰腺导管上皮及腺泡细胞的恶性肿瘤, 其发病率和病死率呈逐年上升趋势, 在所有癌症中其病死率排名第 4, 5 年总生存率仅为 12.5%^[1]。尽管随着诊疗技术的不断进步, 手术联合放化疗可使早期诊断的 PC 患者 5 年生存率提高至 43.9%。但由于 PC 早期症状隐匿且缺乏特异性临床表现, 约 80% 的患者在确诊时已处于局部进展期或伴有远处转移^[2]。对于晚期患者, 即使接受系统性化疗, 5 年生存率也仅为 3.1%~14.7%^[1]。目前, 美国国立综合癌症网络指南推荐局部进展或转移性 PC 治疗方案主要包括: 改良 FOLFIRINOX 方案 (5-氟尿嘧啶、亚叶酸钙、奥沙利铂和伊立替康) 或吉西他滨联合白蛋白紫杉醇方案^[3-5]。然而, 这些传统化疗方案疗效有限, 且易产生耐药性, 同时伴随骨髓抑制、消化道反应等严重不良反应, 显著降低患者生活质量。近年来兴起的靶向治疗和免疫治疗虽为 PC 治疗带来新希望, 但由于 PC 分子分型复杂、肿瘤微环境呈“冷肿瘤”特性、Kirsten 大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, KRAS) 突变率高等因素, 客观缓解率仍不理想^[6-7]。因此, 开发

高效低毒、机制新颖的天然来源候选药物, 已成为破解 PC 治疗困境的迫切需求。

中药在肿瘤防治领域具有悠久的历史 and 独特的优势。天然生物碱类化合物因其多靶点协同抗肿瘤、毒性低、患者耐受性好等特点, 已成为新型抗肿瘤药物研发的重要方向^[8]。莲子心 (Nelumbinis Plumula) 为睡莲科植物莲 (Nelumbo nucifera Gaertn.) 的成熟种子中的干燥幼叶及胚根, 是传统的清热解毒中药。现代药理学研究表明, 莲子心中主要含有莲心碱 (liensinine)、异莲心碱 (isoliensinine)、甲基莲心碱 (neferine) 和莲心季铵碱 (lotusine) 等双苄基异喹啉类生物碱。其中, 莲心季铵碱 (lotusine, CAS 号: 6871-67-6) 分子式为 $C_{19}H_{24}NO_3$ (常以季铵阳离子形式存在), 相对分子质量为 314.4, 是莲子心的主要活性成分之一。传统中医药理论认为莲子心性味苦寒, 归心、肺、肾经, 具有清心去热、固精止血、安神强心的功效^[9]。现代药理学研究进一步揭示了莲心季铵碱在心血管系统^[10]、神经系统^[11]、皮肤保护^[12]及肝脏代谢^[13]等方面的多种生物活性。

近年来, 莲子心中的生物碱类成分在抗肿

瘤领域展现出良好的应用前景。研究表明, 甲基莲心碱可通过调控磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin, PI3K/AKT/mTOR) 信号通路, 抑制肝癌细胞增殖, 并诱导细胞凋亡^[14]。莲心碱可通过调节 AMP 依赖的蛋白激酶/缺氧诱导因子-1 α (AMP-activated protein kinase/hypoxia-inducible factor-1 α , AMPK/HIF-1 α) 轴重编程肿瘤免疫微环境, 增强免疫治疗效果^[15]。莲心季铵碱可通过抑制表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)/AKT/细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路, 抑制非小细胞肺癌细胞增殖、诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于 G0/G1 期^[16]。此外, 网络药理学研究表明莲心季铵碱具有多靶点、多通路的药理作用特点^[17]。然而, 目前关于莲心季铵碱抗 PC 作用的研究尚未见报道。基于上述研究背景, 本研究拟采用网络药理学方法预测莲心季铵碱治疗 PC 的潜在作用靶点及信号通路, 并通过分子对接和动物实验进行验证, 旨在为其作为抗 PC 候选药物的研发提供理论依据和实验支撑。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Heracell Vios 160i CR 细胞培养箱 (美国 ThermoFisher scientific 公司); DMi1 和 DM IL LED 倒置显微镜 (德国 Leica 公司); 血球计数板 (北京索莱宝科技有限公司); 5804/5804R 高速台式离心机 (美国 Eppendorf 公司); Heraguard ECO 超净工作台 (美国 ThermoFisher scientific 公司)。

1.2 主要药品与试剂

莲心季铵碱 (货号: B28264-50mg) 购自上海源叶生物科技有限公司; 称取 50 mg 该药物, 溶于适量生理盐水中, 定容至 2.5 mL, 配制浓度为 20 mg/mL 的储存液, 分装后于 -20 °C 避光保存; 给药前, 将储存液置于室温解冻, 涡旋混匀后使用。

Gibco Advanced RPMI-1640 细胞培养 (货号: 12633020)、胎牛血清 (货号: A5669401) 和胰酶 (货号: 15050057) 均购自美国 ThermoFisher scientific 公司; 青霉素-链霉素 (杭州 Genom Bio 公司, 货号: GNM15140-1); PBS (北京索莱宝科技有限公司, 货号: P1003)。

1.3 动物及细胞

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠, 6~8 周龄, 购自杭州医科院, 动物生产许可证号: SCXK (浙) 2024-0037。小鼠饲养于浙江大学医学院附属第一医院实验动物中心, 饲养环境保持恒温 (25 °C)、恒湿 (55% \pm 5%), 并采用昼夜明暗交替的光照周期, 小鼠可自由饮水与进食。本实验经浙江大学医学院附属第一医院实验动物伦理委员会批准 (伦理批件号: 2025-262), 所有动物实验操作均遵循实验动物 3R 原则。

小鼠 PC 细胞系 KPC 源自 Kras^{G12D/+} Trp53R^{172H/+} Pdx1-Cre 小鼠模型的自发性肿瘤组织, 经分离提纯后冻存于 -18 °C 备用^[18]。

1.4 网络药理学预测

1.4.1 莲心季铵碱潜在作用靶点筛选

通过 SwissTargetPrediction 数据库 (<https://www.swisstargetprediction.ch/>) 输入莲心季铵碱的英文名称 “lotusine” 及 SMILES 结构 (C[N+](CCC=CC(=C(C=C2[C@H]1CC3=CC=C(C=C3)O)OC)O)C), 设置物种为 “Homo sapiens”, 筛选置信度 ≥ 0.1 的潜在靶点。同时结合中药系统药理学分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSAP) 数据库 (<https://tcmsp.com/tcmsp.php>) 中莲心相关生物碱的靶点信息进行补充, 去除重复靶点后得到莲心季铵碱的潜在作用靶点集合。

1.4.2 PC 相关靶点收集

在人类基因 (GeneCards) 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、在线人类孟德尔遗传 (Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM) 数据库 (<https://omim.org/>)、DisGeNET 数据库 (<https://www.disgenet.org/>) 中分别以 “pancreatic cancer” “pancreatic carcinoma” 为关键词检索 PC 的相关靶点, 合并 3 个数据库的结果, 去除重复靶点后获得 PC 相关靶点集合。

1.4.3 交集靶点筛选与蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

利用 Venny 2.1.0 在线工具 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) 对莲心季铵碱潜在作用靶点和 PC 相关靶点进行交集分析, 得到两者的共同靶点, 即莲心季铵碱治疗 PC 的潜在作用靶点。将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 设置物种为 “Homo sapiens”, 置信

度得分 > 0.7, 隐藏孤立节点, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction networks, PPI) 网络。将 PPI 网络数据导出为 TSV 格式, 导入 Cytoscape 3.10.4 软件进行可视化分析, 通过度 (degree) 值筛选核心靶点 (degree 值 ≥ 5.52)。

1.4.4 GO 功能与 KEGG 通路富集分析

将交集靶点上传至 DAVID (The Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>), 设置物种为 “Homo sapiens”, 选择 “GO biological process” (生物学过程, BP)、“GO cellular component” (细胞组分, CC) 和 “GO molecular function” (分子功能, MF) 进行 GO 功能富集分析, 选择 “KEGG Pathway” 进行信号通路富集分析, 以 $P < 0.05$ 为筛选标准, 获取显著富集的功能条目和信号通路。

1.4.5 分子对接验证

莲心季铵碱的三维构象取自 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), 核心靶点蛋白的晶体结构则源于蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB, <https://www.rcsb.org>)。借助 AutoDock Tools 1.5.7 完成受体分子的质子化处理后, 将配体与受体同时导入, 设定对接盒子以包络蛋白活性口袋; 分子对接运算由 AutoDock Vina 执行, 依据结合亲和力及氢键相互作用数目筛选最优构象, 最终通过 PyMOL Anaconda 3 实现结果解析与图形呈现^[19]。

1.5 动物实验

1.5.1 模型构建及分组给药

将小鼠 PC 细胞 KPC 细胞系于 RPMI-1640 完全培养基、混合 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素, 培养于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中。取处于对数生长期的 KPC 细胞, 胰酶消化后调整细胞密度至 5×10^6 个 /mL, 用 PBS 重悬, 制成细胞悬液。另取 5 只 C57BL/6J 雄性小鼠作为正常组, 仅皮下接种 0.1 mL PBS 作为假手术对照。向 10 只 C57BL/6J 雄性小鼠右前肢腋下皮下接种 0.1 mL 细胞悬液, 待小鼠接种部位出现肿瘤结节且直径大于 5 mm 时, 即 PC 荷瘤小鼠模型构建成功^[20]。待移植瘤体积生长至 100~150 mm³ 时, 采用随机数字表法将建模成功的荷瘤小鼠随机分为 2 组: 对照组 (给予生理盐水) 和莲心季铵碱组 (20 mg/kg)^[21], 每组 5 只。每次给药 100 μ L, ip, qd, 连续给药 9 d; 正常组同步给予同体积生理盐水。

1.5.2 观察各组小鼠不同时间点肿瘤体积

利用游标卡尺测定给药前 (记为第 0 天) 及给药期间每 2 d 每只小鼠的肿瘤长径 (a) 与短径 (b), 计算肿瘤组织体积 ($1/2 \times a \times b^2$)。

1.5.3 计算各组小鼠抑瘤率

末次给药后 24 h, 麻醉后处死各组小鼠, 称量体重, 迅速剥离完整瘤体, 称取肿瘤重量, 并按公式计算抑瘤率 [(对照组瘤重-给药组瘤重) / 对照组瘤重 $\times 100\%$]。

1.5.4 统计学分析

通过 GraphPad Prism 9.0.0 软件进行处理分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 莲心季铵碱潜在作用靶点与 PC 相关靶点筛选

通过 SwissTargetPrediction 和 TCMSP 数据库筛选, 共获得莲心季铵碱潜在作用靶点 112 个。在 GeneCards、OMIM、DisGeNET 数据库中检索并合并 PC 相关靶点, 共得到 2 187 个。利用 Venny 2.1.0 进行交集分析, 最终获得 37 个莲心季铵碱治疗 PC 的潜在作用靶点 (图 1)。

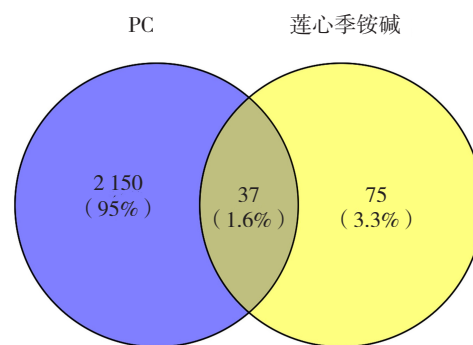


图1 莲心季铵碱与PC韦恩图
Figure 1. Venn diagram of lotusine and PC

2.2 PPI网络分析与核心靶点筛选

将 37 个交集靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络, 共包含 37 个节点和 69 条边, 平均节点度为 3.73。通过 Cytoscape 3.10.4 软件分析, 根据 degree 值筛选出核心靶点 12 个, 分别为雌激素受体 2 (estrogen receptor 2, ESR2, degree=6)、核糖体蛋白 S6 激酶 B1 (ribosomal protein S6 kinase B1, RPS6KB1, degree=6)、丝

裂原活化蛋白激酶 14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14, degree=6)、Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2, degree=6)、雄激素受体 (androgen receptor, AR, degree=7)、孕激素受体 (progesterone receptor, PGR, degree=7)、mTOR (degree=8)、Jun 原癌基因 (Jun proto-oncogene, JUN, degree=10)、磷脂酰肌醇-4,5-

二磷酸 3- 激酶催化亚基 α (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha, PIK3CA, degree=10)、热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (heat shock protein 90 alpha family class A member 1, HSP90AA1, degree=13)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1, degree=15)、酪氨酸蛋白激酶 Src (SRC proto-oncogene, SRC, degree=15) (图 2)。

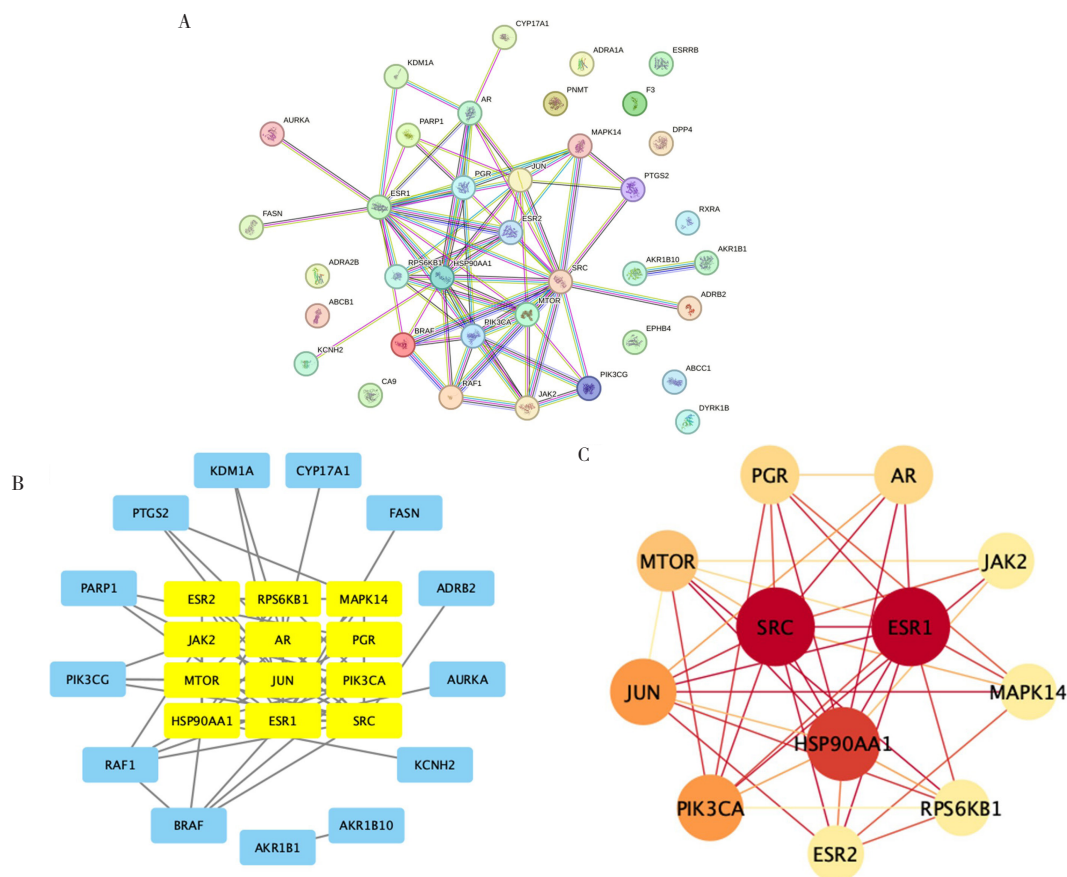


图2 莲心季铵碱与PC的PPI网络互动图

Figure 2. PPI network interaction diagram of lotusine and PC

注: A. 交集靶点PPI网络图; B. MCOD (molecular complex detection) 聚类模块图; C. 拓扑分析核心靶点网络图。

2.3 GO功能富集分析

GO 功能富集分析结果显示, 37 个交集靶点共富集到 148 个显著差异的 BP 条目、23 个 CC 条目和 82 个 MF 条目 ($P < 0.05$)。其中, BP 条目主要集中在“RNA 聚合酶 II 转录”“信号转导”“DNA 转录”“凋亡”等; CC 条目主要富集在“细胞质膜”“细胞质”“细胞核”“线粒体”等; MF 条目主要包括“蛋白结合”“ATP 结合”“酶结合”等 (表 1 和图 3A)。

2.4 KEGG通路富集分析

KEGG 信号通路富集分析共得到 89 条显著富集的通路 ($P < 0.05$), 主要涉及肿瘤相关信

号通路, 包括: 磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B (phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B, PI3K-AKT) 信号通路、内分泌耐药、催乳素信号通路及乳腺癌相关通路, 提示交集靶点基因可能通过激素受体信号、生长因子受体信号及免疫检查点通路参与肿瘤发生发展及治疗耐药。其中, PI3K-AKT 信号通路富集基因数有 8 个, 提示其可能是莲心季铵碱治疗 PC 的核心通路 (表 2 和图 3B)。

2.5 莲心季铵碱与核心靶点的分子对接

结合能为负值时提示配体-受体相互作用可自发进行, 当该数值低于 -5 kcal/mol 时, 提示二者间存在显著亲和力, 且能量越低结

合越稳固。分子对接数据显示，莲心季铵碱与 ESR1、SRC 及 HSP90AA1 的结合能分别为 -7.8、-8.2、-8.7 kcal/mol，均远低于自发结合阈值，表明该生物碱与上述关键靶间存在强效结合作用（图 4）。

表1 莲心季铵碱治疗PC靶点GO功能富集分析Top10条目

Table 1. Top 10 GO functional enrichment analysis of lotusine for PC

类别	条目名称	基因数	P
MF	蛋白质结合	35	5.53×10^{-4}
CC	细胞质	25	1.08×10^{-6}
CC	细胞质膜	22	7.04×10^{-5}
CC	细胞核	21	1.23×10^{-3}
CC	细胞核质	19	4.59×10^{-5}
CC	细胞质	18	1.49×10^{-2}
MF	蛋白质结合	16	2.42×10^{-7}
MF	ATP结合	15	3.07×10^{-7}
BP	RNA聚合酶II转录	13	9.29×10^{-7}
MF	酶结合	12	5.14×10^{-11}

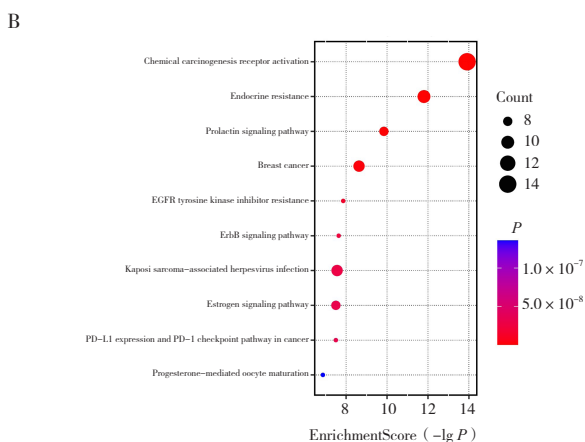
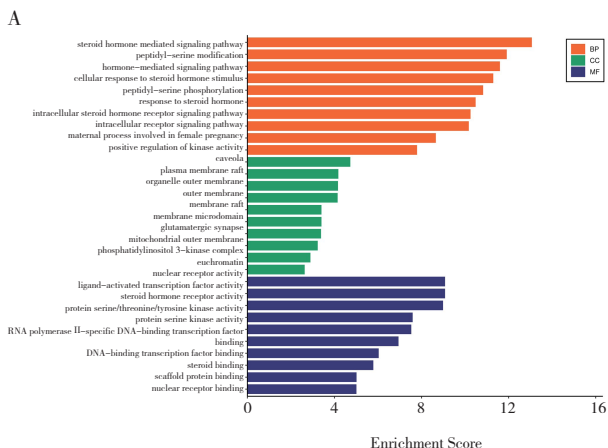


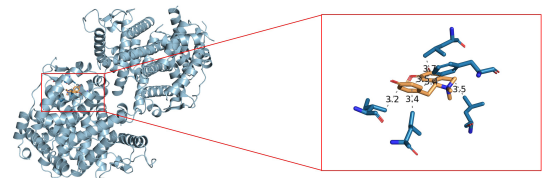
图3 GO功能与KEGG通路富集分析
Figure 3. Enrichment analysis of GO functional enrichment analysis and KEGG pathway

注：A. GO功能富集分析；B. KEGG信号通路富集分析。

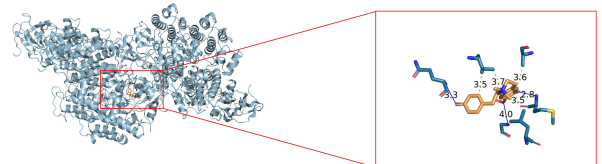
表2 莲心季铵碱治疗PC靶点KEGG通路富集分析 Top10 条目

Table 2. Top 10 KEGG pathway enrichment analysis of lotusine for PC

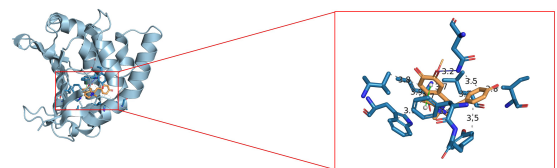
通路名称	基因数	P	通路ID
化学致癌作用-受体激活	14	6.68×10^{-13}	hsa05207
癌症通路	13	4.81×10^{-7}	hsa05200
内分泌抵抗	10	1.09×10^{-10}	hsa01522
乳腺癌	9	7.30×10^{-7}	hsa04066
卡波西肉瘤相关疱疹病毒感染	9	8.39×10^{-8}	mmu05167
催乳素信号通路	8	4.65×10^{-4}	hsa04917
雌激素信号通路	8	1.99×10^{-5}	map01522
癌症中的蛋白聚糖	8	1.25×10^{-5}	hsa05205
激素信号传导	8	9.74×10^{-7}	hsa04081
PI3K-AKT信号通路	8	9.18×10^{-9}	hsa04151



莲心季铵碱-ESR1



莲心季铵碱-SRC



莲心季铵碱-HSP90AA1

图4 莲心季铵碱与靶点对接模式图
Figure 4. Schematic diagram of the docking mode between lotusine base and target

2.6 莲心季铵碱对小鼠胰腺肿瘤生长的影响
造模成功并给药干预 9 d 后，对照组移植瘤体积 $(930.03 \pm 203.96) \text{ mm}^3$ 及重量 $(0.88 \pm 0.26) \text{ g}$ 显著高于给药组 $(599.75 \pm 59.62 \text{ mm}^3, 0.58 \pm 0.11 \text{ g}, P < 0.05)$ ，给药组抑瘤率达 34%，且给药组体重与正常组比较差异无统计学意义（图 5）。

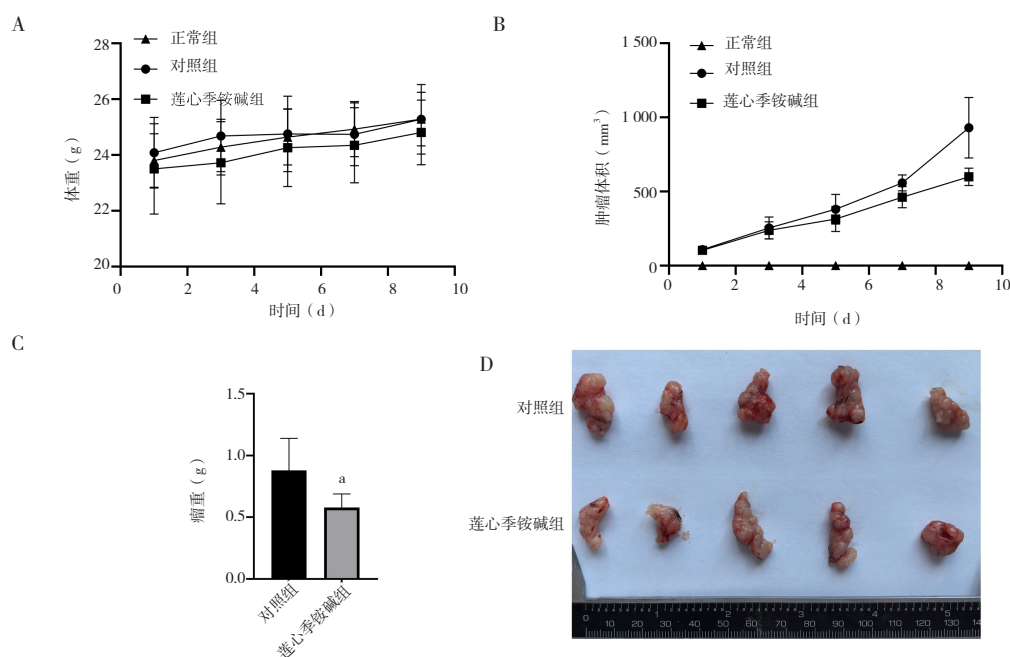


图5 莲心季铵碱对C57BL/6J小鼠PC移植瘤生长的影响 ($n=5$)

Figure 5. Effects of lotusine on the growth of PC xenografts in C57BL/6J mice ($n=5$)

注: A. 体重曲线; B. 肿瘤体积变化曲线; C. 终末瘤重; D. 皮下瘤体的代表性图片; 与对照组比较, $^*P<0.05$ 。

3 讨论

PC 的发生发展是一个涉及多基因、多信号通路异常激活的复杂生物学过程, 包括细胞增殖失控、凋亡受阻、炎症反应异常、血管生成过度等多个关键环节^[22-23]。传统单一靶点的抗肿瘤药物往往难以有效抑制 PC 的恶性进展。网络药理学作为一种新兴的研究方法, 强调从系统生物学和网络生物学的角度阐释中药多成分、多靶点、多通路协同作用的特点, 为揭示中药活性成分治疗复杂疾病的分子机制提供了新思路^[24-25]。本研究通过整合网络药理学预测、分子对接验证和动物实验评价, 系统阐明了莲心季铵碱抗 PC 的潜在分子机制。

3.1 核心靶点的生物学意义

本研究通过构建莲心季铵碱-PC 交集靶点的 PPI 网络, 筛选出 12 个高 degree 值的核心靶点, 包括 SRC、ESR1、HSP90AA1、PIK3CA、mTOR、JUN 等。这些核心靶点在 PC 的发生发展中发挥关键作用。SRC 作为非受体酪氨酸激酶家族的重要成员, 可通过激活 EGFR/PI3K 和黏着斑激酶/MAPK 等多条信号通路促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移^[26]。HSP90AA1 作为热休克蛋白 90 家族成员, 可通过分子伴侣功能稳定突变型 KRAS、

SRC 及雌激素受体 α 等致癌蛋白, 保障其正确折叠并逃避泛素-蛋白酶体降解途径^[27]。ESR1 和 ESR2 等雌激素受体在 PC 中异常表达, 可通过调控细胞周期蛋白 D1、MYC 原癌基因等增殖相关基因的转录促进肿瘤进展^[28]。PIK3CA、mTOR 与 RPS6KB1 构成经典的 PI3K-AKT-mTOR-S6K 生长信号轴, 是调控蛋白质合成、细胞周期进程和代谢重编程的核心通路^[29]。MAPK14 与 JUN 构成应激-转录调控模块, 可将细胞外炎症或缺氧信号转化为促进肿瘤细胞侵袭和上皮-间质转化的基因表达程序^[30]。JAK2-STAT3 信号通路则通过维持白细胞介素-6、血管内皮生长因子等促炎因子和血管生成因子的表达, 促进肿瘤微环境的形成和维持^[31]。莲心季铵碱可能通过同时作用于上述多个核心靶点, 从多个层面协同抑制 PC 的恶性生物学行为。

3.2 关键信号通路的作用机制

KEGG 通路富集分析结果显示, 莲心季铵碱治疗 PC 的潜在靶点显著富集于 PI3K-AKT 信号通路、化学致癌-受体激活通路、内分泌耐药通路、雌激素信号通路等多条肿瘤相关通路。其中, PI3K-AKT 信号通路是最核心的调控枢纽。该通路在约 60% 的 PC 中异常激活, 可通过促进细胞周期进程、抑制细胞凋亡、增强蛋白质合成和糖

酵解代谢等多种机制驱动肿瘤进展^[32]。化学致癌-受体激活通路整合了外源致癌物和突变信号,可上调芳烃受体核转位蛋白(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)、细胞色素 P450 1A1 (cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1, CYP1A1)等转录因子和代谢酶的表达,启动 DNA 损伤修复和原癌基因表达程序^[33]。内分泌耐药和雌激素信号通路的富集提示莲心季铵碱可能通过调控激素受体信号影响 PC 细胞的增殖和存活^[34]。蛋白聚糖在肿瘤中的作用通路则提示莲心季铵碱可能通过调节肿瘤微环境中的细胞外基质成分影响肿瘤细胞的侵袭和转移能力^[35]。这些通路的协同调控构成了莲心季铵碱抗 PC 的多层次、多维度作用网络。

3.3 动物实验的验证

体内实验结果进一步证实了莲心季铵碱的抗 PC 活性。在连续 9 d 的给药周期内, 20 mg/kg 剂量的莲心季铵碱可显著抑制 C57BL/6J 小鼠 PC 移植瘤的生长, 抑瘤率达 34%, 且未引起小鼠体重明显下降, 显示出良好的安全性。这一结果与网络药理学预测的“多靶点-快速阻断 PI3K/MAPK 信号”机制相吻合^[36]。值得注意的是, 本研究中莲心季铵碱的抑瘤率虽低于临床一线药物吉西他滨单药治疗(文献报道约 50%~60%)^[37], 但考虑到莲心季铵碱为天然来源化合物、给药周期较短且未观察到明显毒性反应, 其作为 PC 辅助治疗药物或与其他化疗药物联合应用具有潜在的临床应用价值。

3.4 研究局限性与展望

本研究存在一定的局限性。首先, 动物实验样本量相对较小(每组 5 只), 虽符合初步探索性研究的设计要求, 但可能限制统计效力及结果的普适性。其次, 本研究仅通过网络药理学预测、分子对接及短期皮下移植瘤模型进行初步验证, 缺乏原位 PC 模型、转移模型及肿瘤免疫微环境的相关数据。此外, 核心靶点(SRC、ESR1、HSP90AA1 等)的因果关系尚未通过基因敲除/敲入等实验手段进行确证, 莲心季铵碱的药代动力学特征和长期毒性也有待进一步研究。未来研究拟扩大样本量至 8~10 只以上, 延长给药周期至 4~6 周并同步开展药代动力学/药效学分析; 借助 KPC 基因工程小鼠原位模型、CRISPR-Cas9 基因编辑技术、患者来源类器官疾病模型和患者来源

异种移植瘤模型平台系统验证关键靶点; 进一步设计“莲心季铵碱+吉西他滨”“莲心季铵碱+抗 PD-1 抗体”等联合治疗方案, 以析因设计和 Bliss 模型评估协同指数, 并探索 ESR1/ESR2 表达水平作为预测莲心季铵碱疗效的生物标志物, 为精准临床试验提供依据。

3.5 结论

本研究通过网络药理学分析初步揭示, 莲心季铵碱可能通过作用于 SRC、ESR1、HSP90AA1 等核心靶点, 调控 PI3K-AKT 等关键信号通路, 从抑制细胞增殖、促进凋亡、减轻炎症反应、抑制血管生成等多个方面发挥治疗 PC 的作用。该结果为后续莲心季铵碱的抗 PC 实验研究提供了理论基础和研究方向。

参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023[J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(1): 17-48. DOI: 10.3322/caac.21763.
- 2 Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of pancreatic cancer: global trends, etiology and risk factors[J]. *World J Oncol*, 2019, 10(1): 10-27. DOI: 10.14740/wjon1166.
- 3 Conroy T, Desseigne F, Ychou M, et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(19): 1817-1825. DOI: 10.1056/NEJMoa1011923.
- 4 Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, et al. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(18): 1691-1703. DOI: 10.1056/NEJMoa1304369.
- 5 Tempero MA, Malafa MP, Al-Hawary M, et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(8): 1028-1061. DOI: 10.6004/jnccn.2017.0131.
- 6 Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2015, 12(6): 319-334. DOI: 10.1038/nrclinonc.2015.53.
- 7 Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(4): 687-692. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1860.
- 8 Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019[J]. *J Nat Prod*, 2020, 83(3): 770-803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
- 9 中国药典 2025 年版. 一部[S]. 2025: 294.
- 10 Zhan Q, Zhao J, Liu L, et al. Integrated network pharmacology and molecular docking analyses of the mechanisms underlying the antihypertensive effects of lotusine[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 945: 175622. DOI: 10.1016/j.ejphar.2023.175622.
- 11 Liu QQ, Mi J, Du YY, et al. Lotusine ameliorates propionic acid-induced autism spectrum disorder-like behavior in mice by activating D1 dopamine receptor in medial prefrontal cortex[J].

- Phytother Res, 2024, 38(2): 1089–1103. DOI: [10.1002/ptr.8098](https://doi.org/10.1002/ptr.8098).
- 12 Ryu TK, Roh E, Shin HS, et al. Inhibitory effect of lotusine on solar UV-induced matrix metalloproteinase-1 expression[J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(6): 773. DOI: [10.3390/plants11060773](https://doi.org/10.3390/plants11060773).
- 13 Xu J, Zhang X, Yan L, et al. Insight into lotusine and puerarin in repairing alcohol-induced metabolic disorder based on UPLC-MS/MS[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10385. DOI: [10.3390/ijms231810385](https://doi.org/10.3390/ijms231810385).
- 14 Liu Z, Zhang S, Wang T, et al. Neferine inhibits MDA-MB-231 cells growth and metastasis by regulating miR-374a/FGFR-2[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 309: 108716. DOI: [10.1016/j.cbi.2019.06.029](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.06.029).
- 15 Liu J, Zhang X, Fan X, et al. Liensinine reshapes the immune microenvironment and enhances immunotherapy by reprogramming metabolism through the AMPK-HIF-1alpha axis in hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2025, 44(1): 208. DOI: [10.1186/s13046-025-03477-6](https://doi.org/10.1186/s13046-025-03477-6).
- 16 Lan Y, Sun J, Xu J, et al. Anti-lung cancer activity of lotusine in non-small cell lung cancer HCC827 via reducing proliferation, oxidative stress, induction of apoptosis, and G0/G1 cell cycle arrest via suppressing EGFR-Akt-ERK signalling[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2025, 61(4): 450–458. DOI: [10.1007/s11626-025-01048-9](https://doi.org/10.1007/s11626-025-01048-9).
- 17 Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110–120. DOI: [10.1016/S1875-5364\(13\)60037-0](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60037-0).
- 18 Chen Q, Wang J, Zhang Q, et al. Tumour cell-derived debris and IgG synergistically promote metastasis of pancreatic cancer by inducing inflammation via tumour-associated macrophages[J]. *Br J Cancer*, 2019, 121(9): 786–795. DOI: [10.1038/s41416-019-0595-2](https://doi.org/10.1038/s41416-019-0595-2).
- 19 Meng XY, Zhang HX, Mezei M, et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery[J]. *Curr Comput Aided Drug Des*, 2011, 7(2): 146–157. DOI: [10.2174/157340911795677602](https://doi.org/10.2174/157340911795677602).
- 20 Wu C, Liu W, Hu X, et al. Targeting TNK2/ACK1 reverses the immunosuppressive tumor microenvironment and synergizes with immunotherapy in pancreatic cancer[J]. *Nat Commun*, 2025, 17(1): 512. DOI: [10.1038/s41467-025-67197-3](https://doi.org/10.1038/s41467-025-67197-3).
- 21 Wu Q, Song L, Yang Y, et al. Liensinine inhibits osteosarcoma growth by ROS-mediated suppression of the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9144644. DOI: [10.1155/2022/9144644](https://doi.org/10.1155/2022/9144644).
- 22 Ying H, Dey P, Yao W, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(4): 355–385. DOI: [10.1101/gad.275776.115](https://doi.org/10.1101/gad.275776.115).
- 23 Kleeff J, Korc M, Apte M, et al. Pancreatic cancer[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16022. DOI: [10.1038/nrdp.2016.22](https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22).
- 24 Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682–690. DOI: [10.1038/nchembio.118](https://doi.org/10.1038/nchembio.118).
- 25 Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13. DOI: [10.1186/1758-2946-6-13](https://doi.org/10.1186/1758-2946-6-13).
- 26 Zhang S, Yu D. Targeting Src family kinases in anti-cancer therapies: turning promise into triumph[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33(3): 122–128. DOI: [10.1016/j.tips.2011.11.002](https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.11.002).
- 27 Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, et al. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(8): 537–549. DOI: [10.1038/nrc2887](https://doi.org/10.1038/nrc2887).
- 28 Iwao K, Miyoshi Y, Ooka M, et al. Quantitative analysis of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNA expression in human pancreatic cancers by real-time polymerase chain reaction[J]. *Cancer Lett*, 2001, 170(1): 91–97. DOI: [10.1016/s0304-3835\(01\)00563-8](https://doi.org/10.1016/s0304-3835(01)00563-8).
- 29 Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. *Cell*, 2017, 170(4): 605–635. DOI: [10.1016/j.cell.2017.07.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029).
- 30 Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537–549. DOI: [10.1038/nrc2694](https://doi.org/10.1038/nrc2694).
- 31 Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 798–809. DOI: [10.1038/nrc2734](https://doi.org/10.1038/nrc2734).
- 32 Altomare DA, Tanno S, De Rienzo A, et al. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas[J]. *J Cell Biochem*, 2002, 87(4): 470–476. DOI: [10.1002/jcb.10287](https://doi.org/10.1002/jcb.10287).
- 33 Shimizu Y, Nakatsuru Y, Ichinose M, et al. Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(2): 779–782. DOI: [10.1073/pnas.97.2.779](https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.779).
- 34 Chang EC, Charn TH, Park SH, et al. Estrogen receptors alpha and beta as determinants of gene expression: influence of ligand, dose, and chromatin binding[J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(5): 1032–1043. DOI: [10.1210/me.2007-0356](https://doi.org/10.1210/me.2007-0356).
- 35 Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumor microenvironment and angiogenesis[J]. *J Cell Mol Med*, 2011, 15(5): 1013–1031. DOI: [10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x](https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x).
- 36 Lu JJ, Bao JL, Chen XP, et al. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 485042. DOI: [10.1155/2012/485042](https://doi.org/10.1155/2012/485042).
- 37 Burris HA 3rd, Moore M J, Andersen J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(6): 2403–2413. DOI: [10.1200/JCO.1997.15.6.2403](https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.6.2403).

收稿日期: 2026年01月02日 修回日期: 2026年03月04日
本文编辑: 马琳璐 钟巧妮