

基于网络药理学与体外实验的甘草甜素治疗口腔鳞状细胞癌的机制研究



田中佳¹, 雷印涛¹, 李俊福¹, 王倩²

1. 山东第一医科大学第二附属医院口腔科 (山东泰安 271000)

2. 遵义医科大学口腔医学院, 贵州省普通高校口腔疾病研究特色重点实验室 (贵州遵义 563000)

【摘要】目的 整合网络药理学、分子对接与体外实验, 探讨甘草甜素治疗口腔鳞状细胞癌 (OSCC) 的潜在分子机制。**方法** 通过 PubChem、SwissTargetPrediction 及 TargetNet 数据库获取甘草甜素作用靶点, 运用 GeneCards 与 OMIM 数据库检索 OSCC 相关靶基因, 取交集获得候选治疗靶点。利用 STRING 数据库与 Cytoscape 软件构建蛋白质-蛋白质相互作用网络, 筛选枢纽靶点, 并通过 ClueGO 进行基因本体 (GO) 功能注释与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。基于 TISIDB 数据库开展生存分析, 筛选预后相关关键基因。采用 AutoDock Vina 进行分子对接验证。以人舌鳞状细胞癌 HSC-3 细胞为模型, 开展体外实验验证甘草甜素的抗肿瘤活性及其对信号通路的调控作用。**结果** 共获得甘草甜素与 OSCC 的共同靶点 37 个。蛋白质-蛋白质相互作用网络分析筛选出信号转导及转录激活因子 3 (STAT3)、转录因子 AP-1 (JUN)、基质金属蛋白酶 9 (MMP9)、雄激素受体 (AR)、B 细胞淋巴瘤-样蛋白 1 (BCL2L1)、白细胞介素-2 (IL2)、早老素 1 (PSEN1)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、细胞色素 P450 2D6 (CYP2D6) 及 Toll 样受体 9 (TLR9) 为核心靶点。功能富集分析表明, 候选靶点主要富集于血管平滑肌细胞增殖、Notch 信号调控及免疫应答调节等生物学过程, 以及 Notch 信号通路、神经活性配体-受体相互作用等信号通路。生存分析显示, *PSEN1* 与 *TLR9* 高表达组中位生存时间均显著低于低表达组 (*PSEN1*: 1.8 年 vs. 3.2 年, $P=0.004\ 620$; *TLR9*: 2.1 年 vs. 4.5 年, $P=0.000\ 483$), 提示二者高表达与患者不良预后显著相关。分子对接结果显示甘草甜素与 *PSEN1* 及 *TLR9* 均具有较好的结合亲和力。体外实验证实, 甘草甜素可抑制 HSC-3 细胞增殖, 并下调 Notch 信号通路关键蛋白的表达水平。**结论** 本研究从多层次初步阐明甘草甜素干预 OSCC 的潜在分子机制, 其抗肿瘤作用可能与调控 Notch 信号通路及免疫相关过程有关, 为进一步机制探索及临床转化研究提供了理论依据。

【关键词】 甘草甜素; 口腔鳞状细胞癌; 网络药理学; 分子对接; Notch 信号通路

【中图分类号】 R285

【文献标识码】 A

Mechanism study of glycyrrhizin in the treatment of oral squamous cell carcinoma based on network pharmacology and *in vitro* cell experiments

TIAN Zhongjia¹, LEI Yintao¹, LI Junfu¹, WANG Qian²

1. Department of Stomatology, Second Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Tai'an 271000, Shandong Province, China

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202512047

基金项目: 贵州省教育厅乡村振兴集成示范村建设项目 (黔教技 [2022] 37 号)

通信作者: 王倩, 博士, 副教授, Email: qianwang07@126.com

<https://yxqy.whuzhmedj.com>

2. School of Stomatology, Zunyi Medical University, Guizhou Provincial Key Laboratory of Oral Disease Research and Zunyi Key Laboratory of Oral Disease Research, Zunyi 563000, Guizhou Province, China

Corresponding author: WANG Qian, Email: qianwang07@126.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the potential molecular mechanisms of glycyrrhizin in the treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) by integrating network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* experiments. **Methods** Glycyrrhizin targets were obtained from PubChem, SwissTargetPrediction, and TargetNet databases. OSCC-associated genes were retrieved from GeneCards and OMIM databases, and overlapping targets were identified as candidate therapeutic targets. A protein-protein interaction network was constructed using the STRING database and Cytoscape software to screen hub targets. Gene ontology (GO) functional annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses were performed using ClueGO. Survival analysis was conducted based on the TISIDB database to identify prognosis-related key genes. Molecular docking validation was performed using AutoDock Vina. *In vitro* experiments were carried out in HSC-3 cells to validate the anti-tumor activity of glycyrrhizin and its regulatory effects on signaling pathways. **Results** A total of 37 common targets of glycyrrhizin and OSCC were identified. Protein-protein interaction network analysis identified STAT3, JUN, MMP9, AR, BCL2L1, IL2, PSEN1, MMP2, CYP2D6, and TLR9 as hub targets. Functional enrichment analysis revealed that candidate targets were mainly enriched in biological processes, including vascular smooth muscle cell proliferation, Notch signaling regulation, and immune response modulation, as well as signaling pathways such as the Notch signaling pathway and neuroactive ligand-receptor interaction. Survival analysis demonstrated that patients with high expression of *PSEN1* and *TLR9* had significantly shorter median survival times compared with low-expression groups (*PSEN1*: 1.8 vs. 3.2 years, $P=0.004\ 62$; *TLR9*: 2.1 vs. 4.5 years, $P=0.000\ 483$), suggesting that high expression of both genes was significantly associated with poor prognosis in patients. Molecular docking revealed favorable binding affinity between glycyrrhizin and both *PSEN1* and *TLR9*. *In vitro* experiments confirmed that glycyrrhizin inhibited HSC-3 cell proliferation and downregulated the expression of key proteins in the Notch signaling pathway. **Conclusion** This study preliminarily elucidates the potential molecular mechanism of glycyrrhizin in intervening in OSCC from multiple perspectives. Its anti-tumor effects may be associated with the regulation of the Notch signaling pathway and immune-related processes, providing a theoretical basis for further mechanism exploration and translational research.

【Keywords】 Glycyrrhizin; Oral squamous cell carcinoma; Network pharmacology; Molecular docking; Notch signaling pathway

口腔鳞状细胞癌 (oral squamous cell carcinoma, OSCC) 是口腔最常见的恶性肿瘤, 占口腔癌的90%^[1]。流行病学数据显示, OSCC的发病率逐年上升, 从2018年的34 864例增至2020年的377 713例^[2-3]。目前, OSCC的治疗主要包括手术、放疗和化疗, 但这些方法仍面临化疗耐药、靶向药物匮乏及复发转移的风险^[4-5]。因此, 建立并落实患者的长期随访机制, 是改善预后、实现全程管理的基石。早期筛查和风险干预至关重要, 3年生存率可达92%^[6]。尽管现有治疗方法有一定效果, 但化疗耐药和缺乏有效靶

向药物仍是治疗瓶颈。甘草甜素作为一种天然化合物, 具有抗肿瘤和免疫调节作用, 可能有助于克服这些挑战, 成为潜在的干预策略。

中医药用于疾病防治具有悠久历史, 近年来亦被广泛作为肿瘤患者的补充与替代医学形式之一^[7]。甘草为常用中药材, 历代本草典籍及现代研究均提示其具有重要药用价值, 《神农本草经》^[8]将其列为上品。甘草甜素是从甘草中提取的重要活性成分, 属于五环三萜类化合物, 具有抗病毒、抗菌、保肝及升高血压等药理作用; 同时亦被报道具有祛痰、抗炎、抗糖尿病、抗肿

瘤、抗溃疡及免疫调节等生物学效应^[9]。研究表明,甘草甜素对不同类型的肿瘤细胞具有广泛活性,可诱导癌细胞的靶向凋亡和自噬、阻滞细胞周期、调节机体免疫等;还可作为抗癌药物递送系统中的载体材料。甘草甜素作为一种抗肿瘤药物,已被证明通过核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT)、Janus激酶/信号转导及转录激活因子 (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT) 等多种信号通路中发生作用^[10-12]。然而,关于甘草甜素干预OSCC的研究仍相对有限,其潜在抗肿瘤机制尚有待进一步系统阐明。

随着生物信息学、系统生物学和多元药理学快速发展,基于网络分析发现药物被认为是一种具有成本效益的药物开发的方法^[13]。中药网络药理学可对疾病相关靶点进行优先排序,预测草药化合物的靶点和药理作用,揭示药物-靶点-疾病共模块关联,并以高通量方式从草药配方中筛选协同多种化合物,解释草药配方的组合规则和网络调节的作用^[14]。分子对接是一种基于药物结构设计和筛选的重要方法,主要研究分子间的相互作用,预测配体与受体的结合方式和亲和力^[15-16]。基于上述背景,本研究结合网络药理学、分子对接与体外实验的方法对甘草甜素治疗OSCC的微观机制进行了预测和验证,以进一步推动甘草甜素的开发和运用,为探究甘草甜素治疗OSCC提供一定的证据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Heracell 150i 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); SpectraMax iD5 多功能酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳系统 (美国伯乐公司); 5849R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 主要药品与试剂

甘草甜素 (CAS 号: 1405-86-3, 纯度 $\geq$ 98%, 用二甲基亚砜溶解, 配制成储存液备用)、胎牛血清 (货号: S9030)、DMEM 高糖培养基 (货号: SH30022.01B)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液 (货号: T1300)、磷酸盐缓冲液 (1 $\times$ PBS,

货号: P1022)、高效 RIPA 组织/细胞裂解液 (货号: R0010)、CCK-8 检测试剂盒 (货号: CA1210)、HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (货号: SE20)、兔抗人 Notch1 多克隆抗体、兔抗人 JAG1 多克隆抗体、兔抗人 JAG2 多克隆抗体及小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (货号: K200057M) 均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.3 细胞

人舌癌细胞系 HSC-3 细胞由遵义医科大学基础医学院遗传实验室提供。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 甘草甜素及 OSCC 相应靶点信息的获取

通过 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载甘草甜素的 SDF 文件 (PubChemCID: 14982) 和标准的 SMILES 号; 并分别导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://new.swisstargetprediction.ch/>)^[17] 和 TargetNet 数据库 (<https://targetnet.scbdd.com/>), 所有参数均为默认值, 以 Prob > 0 作为筛选条件, 获得甘草甜素的相关靶点; 最终利用 UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 对检索出的靶点进行校正。

在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)^[18] 和人类孟德尔遗传在线数据库 (OMIM, <https://omim.org/>) 中输入关键词 “oral squamous cell carcinoma” 检索获得 OSCC 相关疾病基因和靶标, 排除重复数据后, 得到 OSCC 可能的靶标数据。使用 Venny 2.1 软件从甘草甜素的潜在靶标和 OSCC 的潜在靶标中获取交集靶标。

1.4.2 蛋白质-蛋白质相互作用网络构建

将获得的交集靶点导入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>)^[19], 物种设置为 “Homo sapiens”, 最小交互阈值选择为 “中等置信度 $\geq$ 0.7”, 其他参数保持默认设置, 获得蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 将结果导入 Cytoscape 3.9.0 软件中进行可视化, 并用 Cytoscape 软件中的 CytoHubba 插件选择了度值前 10% 的蛋白质作为潜在的关键靶点。

1.4.3 靶点的基因本体功能注释与京都基因与基因组百科全书通路富集分析

基因本体 (gene ontology, GO) 由生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function,

MF) 3个本体组成; GO可使用专用词汇表对多种生物体中的同源基因和蛋白质序列进行注释, 进而能够基于其共享的生物学来检索基因和蛋白质^[20]。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 是一个高度复杂的网络结构, 在描述代谢途径、基因信号网络和基因组信息的实际应用方面是一个非常全面的站点^[21]。本研究采用Cytoscape软件中的ClueGO插件对交集靶标进行GO功能注释和KEGG通路富集分析, 并将 $P < 0.05$ 作为筛选条件。

1.4.4 生存分析及核心基因表达

肿瘤-免疫系统相互作用数据库 (TISIDB, <http://cis.hku.hk/TISIDB/>) 是肿瘤与免疫系统相互作用的数据库, 包括来自癌症基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 的30种癌症类型的基因组学、转录组学和接受免疫治疗的患者的RNA测序数据集^[22]。肿瘤免疫评估资源 (TIMER) 2.0数据库 (<http://timer.comp-genomics.org/>) 具有肿瘤浸润免疫细胞的全面分析和可视化功能。通过TISIDB数据库可检测关键靶点的表达水平与OSCC患者生存预后的关系, 选取 $P < 0.05$ 的核心靶点并导出结果; 通过TIMER 2.0数据库探讨核心基因在癌症组织以及邻近正常组织之间的不同表达。

1.4.5 分子对接

从PubChem数据库下载甘草甜素2D结构的SDF文件, 通过Chem3D软件进行优化结构后保存; 通过蛋白质结构数据库 (PDB, <https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶点的蛋白结构, 随后, 在PyMOL软件中去除蛋白质的原始配体和水分子, 并以PDB格式存储; 运用AutoDockTools添加氢原子、计算蛋白质的电荷数和检测对接位点; 并在AutoDockTools中将目标蛋白和关键化合物的格式都转换为pdbqt格式后进行分子对接^[23]; AutoDock Vina用于计算分子对接的亲和力^[24]; 最后将关键化合物和靶蛋白的构象通过Pymol软件进行可视化。当对接结合能得分 < -5.0 kcal/mol时代表化合物与其相应靶标之间具有良好的结合作用^[25]。

1.5 实验验证

1.5.1 细胞培养与分组

HSC-3细胞培养于含10%胎牛血清及1%青霉素-链霉素双抗的DMEM高糖培养基中, 置于

37℃、含5% CO₂的饱和湿度培养箱内常规培养。将细胞分为空白对照组和甘草甜素药物干预组。参考既往体外研究中甘草甜素的常用处理浓度范围, 本研究选取低、中、高3个浓度梯度 (10、20、40 μmol/L), 以评估其对HSC-3细胞增殖的剂量依赖性影响^[26]。

1.5.2 CCK8法测定细胞活力

将HSC-3细胞以每孔 5×10^3 个接种于96孔板, 每条件设5个复孔, 于37℃、5% CO₂饱和湿度培养箱内培养。待细胞贴壁后, 加入甘草甜素处理, 分别于0、12、24、48、72、96 h加入CCK-8试剂, 以酶标仪测定450 nm波长处光密度 (OD) 值, 计算细胞存活率 [% , $(OD_{\text{药物}} - OD_{\text{空白}}) / (OD_{\text{对照}} - OD_{\text{空白}}) \times 100\%$]。空白孔仅含培养基和CCK-8试剂, 不含细胞。每处理条件设3个复孔, 独立重复实验3次 (每次均重新铺板并配制药物), 以确保统计学独立性。

1.5.3 Western Blot检测Notch通路中的蛋白表达

取对数生长期HSC-3细胞, 经0.25%胰蛋白酶 (含EDTA) 消化后以含血清完全培养基终止消化, 离心 ($1\,000 \times g$) 5 min收集细胞并重悬。将细胞接种于6孔板, 培养24 h贴壁后, 分别以甘草甜素 (10、20、40 μmol/L) 处理, 以0 μmol/L为对照组。处理结束后, 预冷PBS洗涤细胞2次, 加入细胞裂解液冰上裂解, 收集总蛋白, 离心 ($1\,200 \times g$) 5 min取上清, BCA法测定蛋白浓度。取等量蛋白行SDS-PAGE电泳, 转移至PVDF膜, 封闭后加入一抗 (Notch1、JAG1、JAG2, 稀释比例1:1 000; GAPDH, 稀释比例1:5 000), 4℃孵育过夜。TBST洗膜3次, 加HRP标记二抗 (稀释比例1:5 000) 室温孵育1~2 h, 洗膜后ECL显色成像。条带灰度值以ImageJ软件定量, 目标蛋白相对表达量以目标蛋白/GAPDH比值表示, 并归一化至对照组。实验独立重复3次, 每次均源于独立培养与处理的细胞样本。

1.6 统计学分析

采用SPSS 29.0软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 两组间比较采用独立样本 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 时间与处理因素的交互效应采用双因素方差分析。所有检验均为双侧, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 甘草甜素及 OSCC 相关靶点筛选

通过 SwissTargetPrediction 数据库进行靶点预测后，获得相关靶点 34 个；将甘草甜素的标准 SMILES 号输入 TargetNet 数据库后得到相关靶点 14 个，然后用 UniProt 蛋白质数据库进行标准化处理，删除重复项后得到相关靶点 45 个。

从 Gene Cards 数据库中获得了 5 076 个疾病靶点，OMIM 数据库中获得 428 个疾病靶点，排除重复数据后，共获得 5 431 个疾病目标。将筛选所得的甘草甜素靶点与 OSCC 靶点取交集并绘制 Venny 图，共得到甘草甜素-OSCC 交集靶点 37 个（图 1），并在 Cytoscape 中制作药物-靶点-疾病图（图 2）。

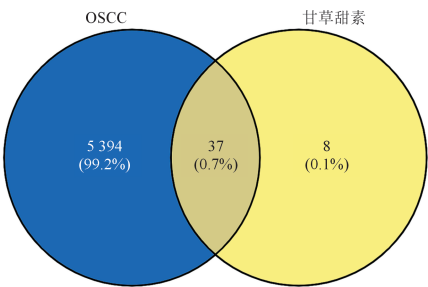


图 1 甘草甜素-OSCC 靶点韦恩图

Figure 1. Venn diagram of glycyrrhizin-OSCC targets

2.2 PPI 网络构建与关键靶点分析结果

将筛选获得的 37 个交集靶点上传至 STRING 数据库，以获取靶蛋白间的相互作用网络信息。该 PPI 网络共包含 37 个节点和 71 条边，平均节点度为 3.84，其中节点代表单个蛋白质编码基因位点所产生的所有蛋白质，边代表蛋白质之间的关

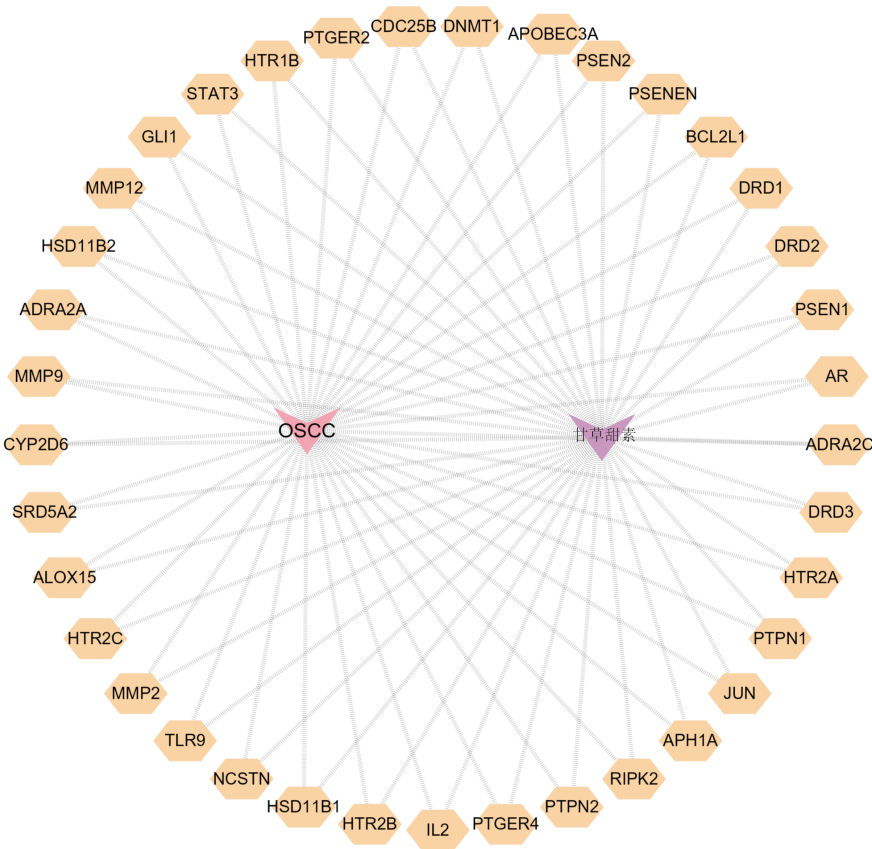


图 2 甘草甜素-靶点-OSCC 示意图

Figure 2. Schematic diagram of glycyrrhizin-target-OSCC

注：HTR. 5-羟色胺受体；PTGER. 前列腺素E₂受体；CDC25B. 细胞分裂周期蛋白 25B；DNMT1. DNA 甲基转移酶 1；APOBEC3A. 载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化多肽样蛋白 3A；PSEN. 早老素；PSENEN. 早老素增强子γ-分泌酶亚基；BCL2L1. B 细胞淋巴瘤-样蛋白 1；DRD. 多巴胺受体 D；AR. 雄激素受体；ADRA2. α₂-肾上腺素能受体；PTPN. 蛋白酪氨酸磷酸酶（非受体型）；JUN. 转录因子 AP-1；APH1A. 前咽缺陷蛋白 1 同源物 A / γ-分泌酶亚基 APH-1A；RIPK2. 受体相互作用丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 2；IL2. 白细胞介素-2；HSD11B1. 11β-羟基类固醇脱氢酶 1 型；NCSTN. 呆蛋白/尼卡斯因；TLR9. Toll 样受体 9；MMP. 基质金属蛋白酶；ALOX15. 花生四烯酸 15-脂氧合酶/15-脂氧合酶-1；SRD5A2. 类固醇 5α 还原酶 2 型；CYP2D6. 细胞色素 P450 2D6；HSD11B2. 11β-羟基类固醇脱氢酶 2 型；GLI1. 神经胶质瘤相关癌基因同源物 1/GLI 家族锌指蛋白 1。

联关系 (图3)。进一步将网络数据导入 Cytoscape 软件, 运用 CytoHubba 插件识别出排名前 10 的关键靶点 (图4)。

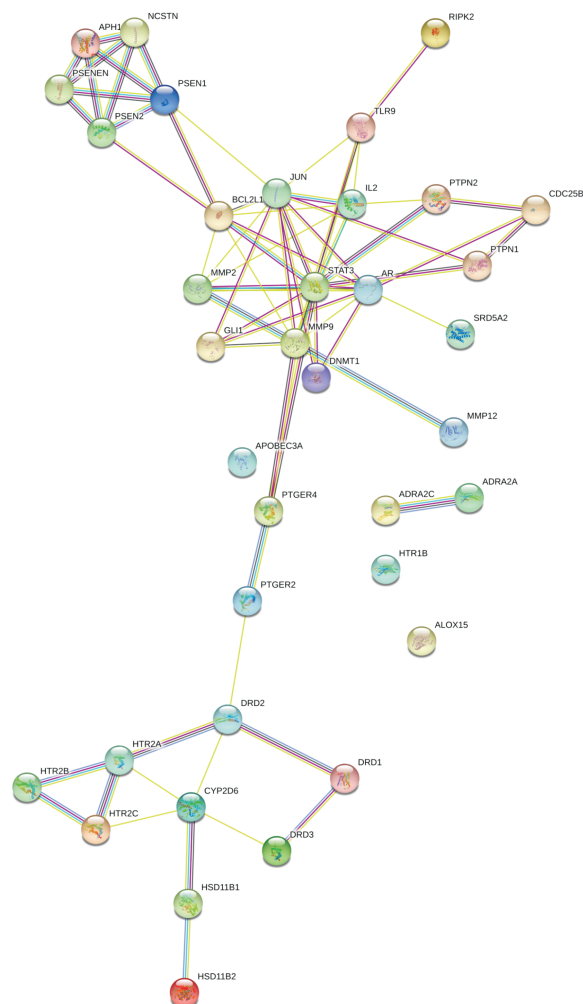


图3 甘草甜素治疗 OSCC 的靶点 PPI 网络

Figure 3. Targeted PPI network of glycyrrhizin for OSCC

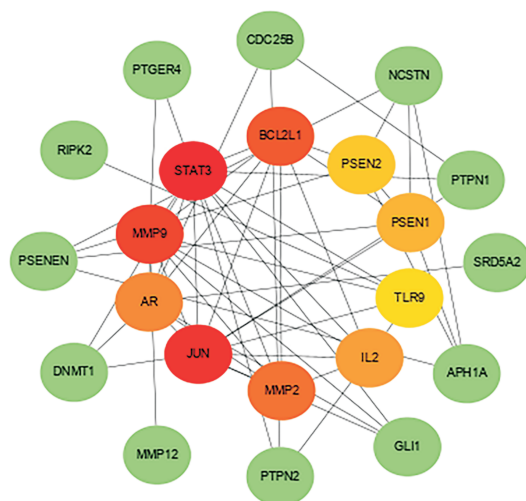


图4 甘草甜素治疗 OSCC 的关键靶点

Figure 4. Key targets of glycyrrhizin for OSCC

2.3 GO 功能注释与 KEGG 通路富集分析结果

GO 富集结果显示, 相关靶点主要涉及血管平滑肌细胞增殖、表皮生长因子受体信号通路调控、胺类运输调节、Notch 受体加工/处理、配体依赖性 Notch 信号过程及 T 细胞活化参与免疫反应等生物学过程 (图5)。KEGG 通路富集分析提示, 显著富集通路主要集中在神经活性配体-受体相互作用、Notch 信号通路、神经营养因子信号通路、类固醇激素生物合成以及麻疹、前列腺癌等相关条目 (图6)。在 ClueGO 网络图中, 每个圆形节点代表 1 个显著富集的通路; 同色节点表示功能相近并归属于同一聚类; 同一聚类中 P 值越小代表富集显著性越强, 并以加粗大写字体标注该聚类中显著性最高 (P 值最小) 的代表性条目。

2.4 生存分析及核心基因的表达

基于 TISIDB 数据库对 TCGA-HNSC 队列 (包含口腔鳞癌亚型) 进行 Kaplan-Meier 生存分析,

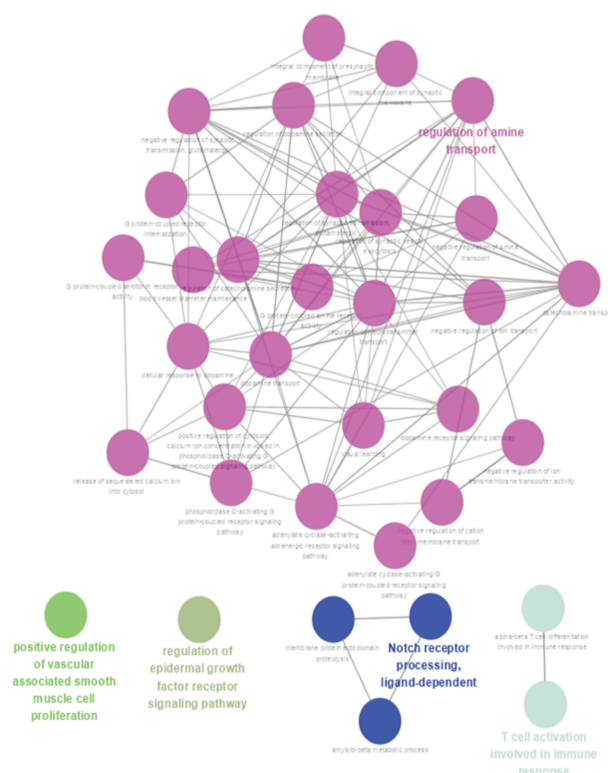


图5 甘草甜素治疗 OSCC 的有效靶点 GO 富集分析

Figure 5. GO enrichment analysis of targets for glycyrrhizin control of OSCC

注: 节点代表富集通路; 颜色表示功能聚类; 同一聚类中以加粗大写字体标注显著性最高 (P 最小) 的代表条目, 富集显著性阈值设定为 $P < 0.05$ 。

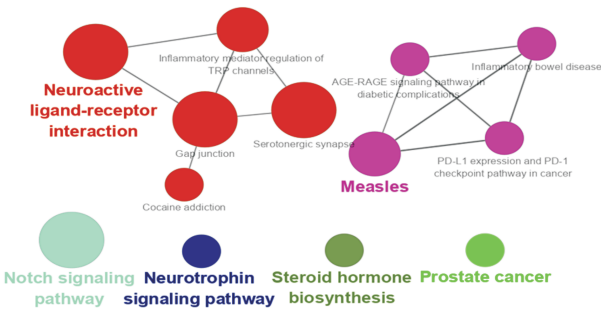


图6 甘草甜素治疗OSCC有效靶点的KEGG分析
Figure 6. KEGG analysis of targets for glycyrrhizin in treating OSCC

注：节点代表富集通路；颜色表示功能聚类；同一聚类中以加粗大写标注显著性最高（ P 最小）的代表条目，富集显著性阈值设定为 $P < 0.05$ 。

并按基因表达水平将患者分为高表达组与低表达组。结果显示，*PSEN1* 高表达组的总体生存显著差于低表达组（Log-rank $P = 0.004\ 620$ ）（表1、图7），提示 *PSEN1* 高表达与不良预后相关。相反，*TLR9* 高表达组的总体生存优于低表达组（Log-rank $P = 0.000\ 483$ ）（表1、图7），提示 *TLR9* 高表达可能与较好预后相关。

表1 *PSEN1* 和 *TLR9* 表达水平与 HNSC 患者预后的生存分析结果汇总

基因	分组	中位生存时间（年）	95%CI	Log-rank P
<i>PSEN1</i>	Low	3.2	(2.5, 4.0)	0.004 620
	High	1.8	(1.2, 2.3)	
<i>TLR9</i>	Low	4.5	(3.8, 5.2)	0.000 483
	High	2.1	(1.5, 2.7)	

TIMER 数据库分析进一步显示，*PSEN1* 与 *TLR9* 在 HNSC 肿瘤组织中的表达水平均显著高于邻近正常组织（表2、图8），提示二者可能参与 HNSC 的发生发展，并与患者预后相关。

2.5 分子对接分析

在鉴定出关键基因后，将关键基因表达影响 OSCC 患者生存的靶蛋白在 AutoDockTools 中进行分子对接；通过 Autodock Vina 计算出 *PSEN1*（PDB ID: 6iyc）、*TLR9*（PDB ID: 3wvf）和甘草甜素之间的结合能分别为 -7.9 kcal/mol 、 -7.7 kcal/mol ，如此说明甘草甜素与 OSCC 患者生存相关的中枢基因表达的靶蛋白之间具有良好的结合作用（图9、图10）。

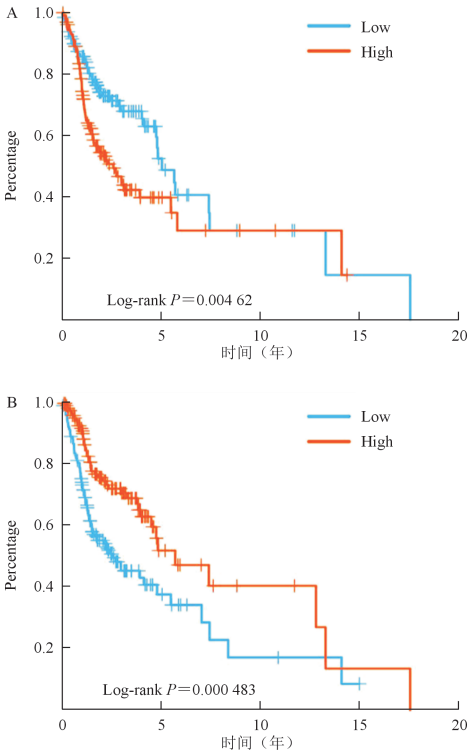


图7 *PSEN1* (A) 和 *TLR9* (B) 表达水平与 HNSC 患者预后的生存分析曲线

Figure 7. Survival analysis curves of the relationship between *PSEN1* (A) and *TLR9* (B) expression levels and prognosis in patients with HNSC

表2 *PSEN1*、*TLR9* 与癌症组织与邻近正常组织的表达结果分析

基因	样本类型	样本量	表达水平 ($\log_2\text{TPM}$, $\bar{x} \pm s$)	中位表达量 ($\log_2\text{TPM}$)	范围 ($\log_2\text{TPM}$)
<i>PSEN1</i>	肿瘤	520	2.0 ± 0.8	1.8	0.0~5.8
	正常	44	1.2 ± 0.6	1.0	0.0~3.0
<i>TLR9</i>	肿瘤	520	1.5 ± 0.7	1.3	0.0~5.2
	正常	44	0.8 ± 0.5	0.6	0.0~3.0

2.6 甘草甜素对 HSC-3 细胞增殖及活性的影响

CCK-8 法检测了不同浓度甘草甜素（0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ ）处理 24、48、72 及 96 h 后细胞的存活率。结果显示，与对照组（0 $\mu\text{mol/L}$ ）相比，甘草甜素处理组细胞存活率呈浓度依赖性和时间依赖性降低（图11）。在相同时间点下，随着甘草甜素浓度的升高，细胞存活率逐渐下降；在同一浓度下，随着处理时间的延长，细胞存活率亦呈下降趋势。具体而言，20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 处理组在 48 h 时细胞存活率显著低于对

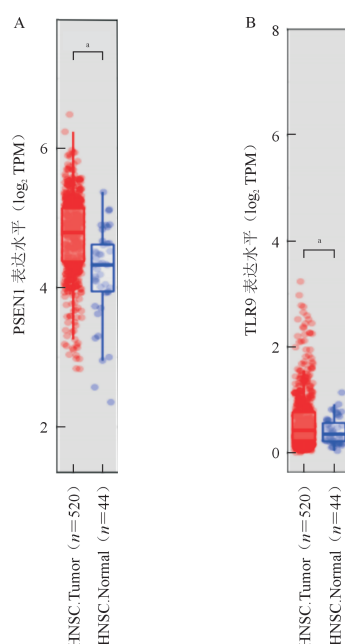


图8 *PSEN1* (A)、*TLR9* (B) 在癌症组织与邻近正常组织的表达差异比较

Figure 8. *PSEN1* (A), *TLR9* (B) and expression differences comparison of cancer tissue and adjacent normal tissue

注: ^a $P < 0.01$ 。

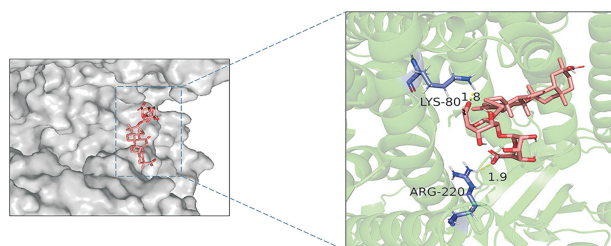


图9 甘草甜素与PSEN1的残基LYS-80、ARG-220对接模式图

Figure 9. Docking pattern of glycyrrhizin with residues LYS-80 and ARG-220 of PSEN1

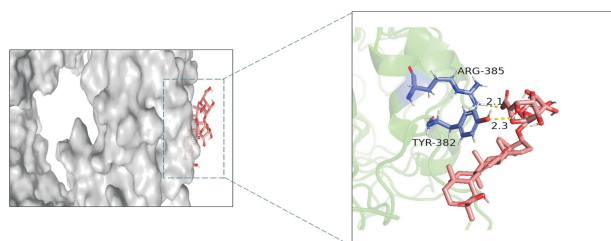


图10 甘草甜素与TLR9的残基ARG-385、TYR-382对接模式图

Figure 10. Docking pattern of glycyrrhizin with residues ARG-385 and TYR-382 of TLR9

照组 ($P < 0.01$), 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组在 72 h 时开始出现显著差异 ($P < 0.05$); 至 96 h 时, 各处理组细胞存活率均显著低于对照组 ($P < 0.01$)。

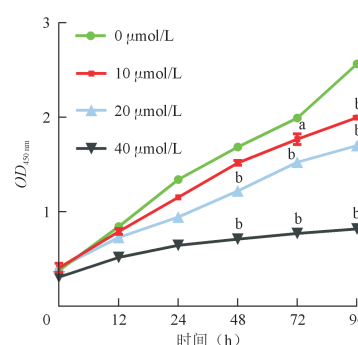


图11 甘草甜素对细胞存活率的影响 ($n = 3$)

Figure 11. Effect of glycyrrhizin on the cell survival rates ($n=3$)

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

2.7 甘草甜素对 Notch 信号通路蛋白的影响

Western Blot 检测了不同浓度 (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 甘草甜素处理 48 h 后 HSC-3 细胞中 Notch1、JAG1 及 JAG2 的蛋白表达水平。结果显示, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 相比, Notch1 蛋白表达在 20 $\mu\text{mol/L}$ 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 组中显著下调 ($P < 0.01$), 而在 10 $\mu\text{mol/L}$ 组中差异无统计学意义 ($P > 0.05$); JAG1 与 JAG2 蛋白表达在各浓度处理组中均显著降低 ($P < 0.01$)。上述结果表明, 甘草甜素可剂量依赖性地抑制 HSC-3 细胞中 Notch 信号通路关键蛋白的表达, 且对 JAG1 和 JAG2 的抑制效应较 Notch1 更为敏感。具体见图 12。

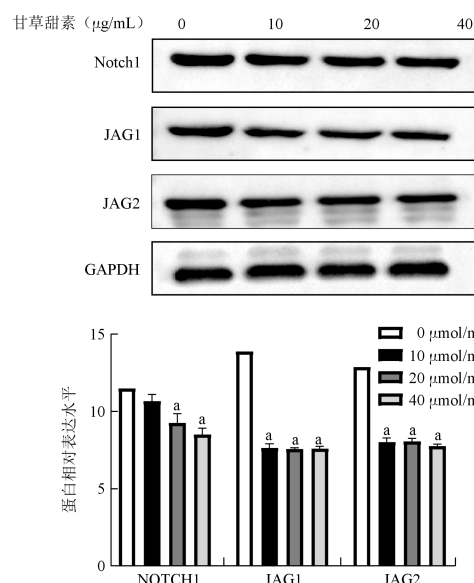


图12 甘草甜素对 Notch 信号通路蛋白的影响 ($n = 3$)

Figure 12. Effect of glycyrrhizin on Notch signaling pathway protein ($n=3$)

注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, ^a $P < 0.01$ 。

3 讨论

OSCC可累及舌、唇及口底等部位,具有高度侵袭性,且临床上常在中晚期方被确诊,从而导致其5年生存率较低,并显著影响患者外观与生活质量^[27]。近年来研究提示全球口腔癌发病率及死亡率呈上升趋势,疾病负担持续加重^[28]。因此,亟需进一步阐明OSCC的潜在致病机制并探索更为有效的治疗干预策略。甘草甜素作为甘草的主要活性成分之一,在多种肿瘤研究中表现出一定的抗肿瘤与化学预防潜力^[9]。既往研究亦报道甘草甜素可在特定应激条件下(如紫外线诱导的氧化损伤)对OSCC细胞产生保护作用,并可与抗坏血酸钠协同增强抗氧化效应^[29]。然而,甘草甜素在OSCC中可能发挥的抗肿瘤机制仍缺乏系统阐释。本研究结合网络药理学、分子对接与体外细胞实验,对其潜在作用靶点与关键通路进行了整合分析,旨在为甘草甜素相关基础研究与潜在转化应用提供线索,并为OSCC的防治策略提供参考。

3.1 网络药理学预测OSCC潜在干预靶点的合理性

本研究通过网络药理学预测了甘草甜素干预OSCC的潜在靶点。经“药物-靶点-疾病”网络拓扑分析,共获得甘草甜素相关靶点45个、OSCC相关靶点5431个,交集候选靶点37个。经PPI网络拓扑分析,筛选出STAT3、JUN、MMP9、AR、BCL2L1、IL2、PSEN1、MMP2、CYP2D6与TLR9等潜在枢纽靶点。进一步基于TISIDB数据库进行生存分析,聚焦于患者生存结局相关的核心靶标PSEN1与TLR9,为后续机制研究提供了依据。

PSEN1是 γ -分泌酶复合物的核心组分,定位于内质网与质膜,参与Notch受体的跨膜剪切。Notch信号的经典激活依赖受体经配体结合后发生序列性蛋白水解:首先经ADAM家族蛋白酶在膜外区剪切,随后由 γ -分泌酶在跨膜区完成膜内剪切,释放Notch胞内结构域(Notch intracellular domain, NICD),后者入核后介导下游转录程序(如发状分裂增强子/HES相关YRPW基序等),调控肿瘤细胞增殖、迁移与凋亡等表型。大量研究表明,PSEN1在胃癌、结直肠癌、膀胱癌及肝癌等多种肿瘤中表达失调^[30-31];其在食管癌、

膀胱癌及头颈部鳞状细胞癌中的异常表达可加速肿瘤对放化疗的耐药^[32-33]。因此,PSEN1作为癌症生物标志物和治疗靶点具有潜在的临床价值。

TLR9属于Toll样受体家族,与多数定位于细胞膜的TLR不同,TLR9主要定位于内涵体/溶酶体,可识别病原体DNA并启动免疫炎症信号^[34]。在口腔癌研究中,TLR9表达与肿瘤分化程度及侵袭深度相关:高/中分化鳞状细胞癌中可见较高表达,低分化病例中表达相对较低^[35-36]。本研究通过生存分析发现TLR9高表达与HNSC患者不良预后显著相关,结合分子对接显示甘草甜素与TLR9具有较好结合亲和力,提示TLR9可能作为OSCC预后的候选分子标志物,其在甘草甜素抗肿瘤作用中的具体角色有待进一步验证。

3.2 Notch信号轴是甘草甜素干预OSCC的关键通路之一

富集分析显示,候选靶点主要富集于血管平滑肌细胞增殖、EGFR信号调控、Notch受体加工及配体依赖性Notch信号过程、T细胞活化等生物学过程,KEGG通路富集涉及Notch信号通路、神经活性配体-受体相互作用及神经营养因子信号通路等。综合网络拓扑学与功能富集结果,Notch信号通路被聚焦为甘草甜素干预OSCC的核心通路之一。

Notch通路在哺乳动物中包含4个受体(Notch1~4)及Jagged与 δ 样两大家族配体。既往研究表明,Notch信号参与调控肿瘤干细胞维持、增殖、血管生成与转移,被认为是HNSCC的潜在治疗靶点;Notch1可调控肿瘤细胞凋亡及耐药表型,且与口腔白斑恶变风险相关;JAG1/JAG2在HNSCC中表达升高,与不良预后及淋巴结转移相关^[37]。这些证据为本研究选取Notch1、JAG1与JAG2作为验证节点提供了合理依据。

3.3 甘草甜素体外抑制OSCC细胞增殖并下调Notch信号蛋白表达

为验证网络药理学预测结果,本研究进一步开展体外细胞实验。CCK-8结果显示,甘草甜素可显著抑制HSC-3细胞活力,且呈剂量与时间依赖性;Western Blot结果显示Notch1、JAG1与JAG2蛋白表达明显下调。上述结果表明,甘草甜素对OSCC细胞的抑制作用与Notch轴相关蛋白变化具有一致性,支持其可能通过抑制Notch信号通路发挥抗肿瘤效应。

综合 PPI 网络、富集分析及体外实验结果，Notch 信号通路可能是甘草甜素发挥抗 OSCC 作用的重要调控轴。值得注意的是，结合生存分析与网络拓扑学筛选，本研究将 *PSEN1* 与 *TLR9* 预测为潜在的核心靶点。*PSEN1* 是介导 Notch1 受体跨膜水解、释放具转录活性 NICD 的关键上游酶。因此，预测网络中 *PSEN1* 的枢纽地位从分子源头层面解释了本实验中 Notch 信号轴整体受抑的表型。*TLR9* 则可能在肿瘤微环境相关的免疫交叉调控中发挥协同作用。

本研究为甘草甜素干预 OSCC 的作用机制提供了初步实验依据与理论参考，但仍存在局限性：一方面，目前的体外验证仅局限于单一细胞系（HSC-3），未能全面反映 OSCC 的异质性；另一方面，计算模拟与网络预测的静态结果尚需动态机制实验的支撑。未来研究拟引入多株 OSCC 细胞系（如 CAL27、SCC-9 等）与动物在体模型，并结合靶点基因（如 *PSEN1* 的过表达/敲减技术）及直接结合实验，进一步明确甘草甜素调控该机制链条的具体靶向机制。

参考文献

- Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2015, 24(3): 491–508. DOI: [10.1016/j.soc.2015.03.006](#).
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394–424. DOI: [10.3322/caac.21492](#).
- Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209–249. DOI: [10.3322/caac.21660](#).
- DE felice F, DE vincentiis M, Valentini V, et al. Follow-up program in head and neck cancer[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2017, 113: 151–155. DOI: [10.1016/j.critrevonc.2017.03.012](#).
- Keam B, Machiels JP, Kim HR, et al. Pan-Asian adaptation of the EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for the diagnosis, treatment and follow-up of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck[J]. ESMO Open, 2021, 6(6): 100309. DOI: [10.1016/j.esmoop.2021.100309](#).
- Cheraghloou S, Schettino A, Zogg CK, et al. Changing prognosis of oral cancer: An analysis of survival and treatment between 1973 and 2014[J]. Laryngoscope, 2018, 128(12): 2762–2769. DOI: [10.1002/lary.27315](#).
- Xiang Y, Guo Z, Zhu P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science[J]. Cancer Med, 2019, 8(5): 1958–1975. DOI: [10.1002/cam4.2108](#).
- 清·孙星衍, 孙冯翼, 重辑. 神农本草经[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1963: 18.
- Roohbakhsh A, Iranshahy M, Iranshahi M. Glycyrrhetic acid and its derivatives: anti-cancer and cancer chemopreventive properties, mechanisms of action and structure– cytotoxic activity relationship[J]. Curr Med Chem, 2016, 23(5): 498–517. DOI: [10.2174/0929867323666160112122256](#).
- Khan R, REhman MU, Khan AQ, et al. Glycyrrhizic acid suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumorigenesis in Wistar rats: Alleviation of inflammatory, proliferation, angiogenic, and apoptotic markers[J]. Environ Toxicol, 2018, 33(12): 1272–1283. DOI: [10.1002/tox.22635](#).
- Sun ZP, Tan ZG, Peng C, et al. HK2 is associated with the Warburg effect and proliferation in liver cancer: Targets for effective therapy with glycyrrhizin[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 343. DOI: [10.3892/mmr.2021.11982](#).
- Wu X, Wang W, Chen Y, et al. Glycyrrhizin suppresses the growth of human NSCLC cell line HCC827 by downregulating HMGB1 level[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 6916797. DOI: [10.1155/2018/6916797](#).
- Zhang R, Zhu X, Bai H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 123. DOI: [10.3389/fphar.2019.00123](#).
- 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](#).
- Kataria R, Khatkar A. Molecular docking of natural phenolic compounds for the screening of urease inhibitors[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2019, 20(5): 410–421. DOI: [10.2174/1389201020666190409110948](#).
- Saikia S, Bordoloi M. Molecular docking: challenges, advances and its use in drug discovery perspective[J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(5): 501–521. DOI: [10.2174/1389450119666181022153016](#).
- Gfeller D, Grosdidier A, Wirth M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Web Server issue): W32–38. DOI: [10.1093/nar/gku293](#).
- Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54: 1.30.1–1.30.33. DOI: [10.1002/cpbi.530](#).
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1): D362–D368. DOI: [10.1093/nar/gkw937](#).
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium[J]. Nat Genet, 2000, 25(1): 25–29. DOI: [10.1038/75556](#).
- Wixon J, Kell D. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes—KEGG[J]. Yeast, 2000, 17(1): 48–55. DOI: [10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)17:1<48::AID-YEA2>3.0.CO;2-H](#).
- Ru B, Wong CN, Tong Y, et al. TISIDB: an integrated repository portal for tumor–immune system interactions[J]. Bioinformatics,

- 2019, 35(20): 4200–4202. DOI: [10.1093/bioinformatics/btz210](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz210).
- 23 Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility[J]. *J Comput Chem*, 2009, 30(16): 2785–2791. DOI: [10.1002/jcc.21256](https://doi.org/10.1002/jcc.21256).
- 24 Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading[J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455–461. DOI: [10.1002/jcc.21334](https://doi.org/10.1002/jcc.21334).
- 25 Li X, Xu X, Wang JN, et al. A system-level investigation into the mechanisms of Chinese traditional medicine: compound Danshen formula for cardiovascular disease treatment[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e43918. DOI: [10.1371/journal.pone.0043918](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043918).
- 26 He LH, Wang XR, Ma Q, et al. Glycyrrhizin inhibits the invasion and metastasis of breast cancer cells via upregulation of expressions of miR-200c and E-cadherin[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2020, 9: 1807. DOI: [10.4314/TJPR.V19I9.2](https://doi.org/10.4314/TJPR.V19I9.2).
- 27 Gigliotti J, Madathil S, Makhoul N. Delays in oral cavity cancer[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2019, 48(9): 1131–1137. DOI: [10.1016/j.ijom.2019.02.015](https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.02.015).
- 28 Ren ZH, Hu CY, He HR, et al. Global and regional burdens of oral cancer from 1990 to 2017: Results from the global burden of disease study[J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020, 40(2–3): 81–92. DOI: [10.1002/cac2.12009](https://doi.org/10.1002/cac2.12009).
- 29 Kato T, Hino S, Horie N, et al. Anti-UV activity of Kampo medicines and constituent plant extracts: re-evaluation with skin keratinocyte system[J]. *In Vivo*, 2014, 28(4): 571–578. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982224/>.
- 30 Cui X, Yang Y, Yan AH. MiR-654-3p constrains proliferation, invasion, and migration of sinonasal squamous cell carcinoma via CREB1/PSEN1 Regulatory Axis[J]. *Front Genet*, 2021, 12: 799933. DOI: [10.3389/fgene.2021.799933](https://doi.org/10.3389/fgene.2021.799933).
- 31 Li P, Lin X, Zhang JR, et al. The expression of presenilin 1 enhances carcinogenesis and metastasis in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(9): 10650–10662. DOI: [10.18632/oncotarget.7298](https://doi.org/10.18632/oncotarget.7298).
- 32 Meng F, Qian LT, LYU L, et al. miR-193a-3p regulation of chemoradiation resistance in oesophageal cancer cells via the PSEN1 gene[J]. *Gene*, 2016, 579(2): 139–145. DOI: [10.1016/j.gene.2015.12.060](https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.060).
- 33 Deng H, Lyu L, Li Y, et al. The miR-193a-3p regulated PSEN1 gene suppresses the multi-chemoresistance of bladder cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(3): 520–528. DOI: [10.1016/j.bbadis.2014.12.014](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.12.014).
- 34 Hasnat S, Hujanen R, Nwaru BI, et al. The prognostic value of toll-like receptors in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review and Meta-analysis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(19): 7255. DOI: [10.3390/ijms21197255](https://doi.org/10.3390/ijms21197255).
- 35 Min R, Zun Z, Siyi L, et al. Increased expression of Toll-like receptor-9 has close relation with tumour cell proliferation in oral squamous cell carcinoma[J]. *Arch Oral Biol*, 2011, 56(9): 877–884. DOI: [10.1016/j.archoralbio.2011.01.010](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.01.010).
- 36 Pisani LP, Estadella D, Ribeiro DA. The role of toll like receptors (TLRs) in oral carcinogenesis[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(10): 5389–5394. DOI: [10.21873/anticancer.11965](https://doi.org/10.21873/anticancer.11965).
- 37 Sun WY, Gaykalova DA, Ochs MF, et al. Activation of the NOTCH pathway in head and neck cancer[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(4): 1091–1104. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-13-1259](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1259).

收稿日期: 2025 年 12 月 12 日 修回日期: 2026 年 06 月 27 日
本文编辑: 钟巧妮 洗静怡