

基于网络药理学及实验验证探讨灵芝 抗胃癌的分子机制

钟佳倚^{1,2}, 陈海兵³, 叶大增¹, 邓正军¹, 邵佳佳¹, 韩家玮¹, 元君辉³, 邓念英^{1*}

(1. 温岭市妇幼保健院 药剂科, 浙江 台州 317500; 2. 浙江中医药大学 药学院, 浙江 杭州 310053;
3. 温岭市妇幼保健院 儿科, 浙江 台州 317500)

[摘要] 基于网络药理学、分子对接技术及细胞实验预测灵芝抗胃癌的分子机制。利用中药系统药理学分析平台 (traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) 收集灵芝的活性成分和作用靶点。通过 GeneCards 和 OMIM 数据库获取胃癌相关的靶点。筛选获得两者的共同靶标后, 利用 STRING 数据库进行构建蛋白互作网络, 并且利用 Bioconductor 平台和 R 语言进行基因本体 (Gene Ontology, GO) 生物进程及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析。同时应用 Cytoscape 软件构建“草药-疾病-成分-靶点”网络和“草药-疾病-成分-靶点-通路”网络。另外选取灵芝的关键活性成分 β -谷甾醇与蛋白互作网络前 15 个靶标进行分子对接。最后利用细胞实验进一步验证上述结果。该实验分别获取灵芝活性成分 14 个, 灵芝相关靶点 28 个, 并且收集灵芝与胃癌的共同靶点 25 个, 包括 caspase-3 (CASP3)、caspase-8 (CASP8)、caspase-9 (CASP9) 和 B-cell lymphoma-2 (BCL2) 等。KEGG 通路分析筛选了 72 条相关信号通路, 显示细胞凋亡和 p53 信号通路可能在灵芝抗胃癌的过程中起关键作用。分子对接结果表明 β -谷甾醇与蛋白互作网络前 15 个靶标对接良好。细胞实验表明 β -谷甾醇通过调控细胞凋亡和细胞周期, 有效抑制人胃癌细胞 AGS 增殖, 这可能与 p53 信号通路有部分关系。以上结果表明, 灵芝抗胃癌具有多成分、多靶点、多通路协同作用的特点, 为后续深入研究灵芝抗胃癌的复杂机制提供了理论依据。

[关键词] 灵芝; 胃癌; 网络药理学; 分子对接; β -谷甾醇; p53

Molecular mechanism of Ganoderma against gastric cancer based on network pharmacology and experimental test

ZHONG Jia-yi^{1,2}, CHEN Hai-bing³, YE Da-zeng¹, DENG Zheng-jun¹, SHAO Jia-jia¹, HAN Jia-wei¹,
YUAN Jun-hui³, DENG Nian-ying^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Wenling Women's and Children's Hospital, Taizhou 317500, China;
2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;
3. Department of Pediatric, Wenling Women's and Children's Hospital, Taizhou 317500, China)

[Abstract] This study aims to explore the molecular mechanism of Ganoderma against gastric cancer based on network pharmacology, molecular docking, and cell experiment. The active components and targets of Ganoderma were retrieved from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and gastric cancer-related targets from GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). The protein-protein interaction (PPI) network of the common targets was constructed with STRING, followed by Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the common genes based on Bioconductor and R language. The medicinal-disease-component-target network and medicinal-disease-component-target-pathway network were established by Cytoscape. Molecular docking was

[收稿日期] 2021-06-26

[基金项目] 温岭市科技计划项目 (2020S018005)

[通信作者] * 邓念英, E-mail: dny01@sina.com

[作者简介] 钟佳倚, E-mail: abc148137622@163.com

performed between β -sitosterol (the key component in Ganoderma) and the top 15 targets in the PPI network. Cell experiment was performed to verify the findings. A total of 14 active components and 28 targets of Ganoderma were retrieved, and the medicinal and the disease shared 25 targets, including caspase-3 (CASP3), caspase-8 (CASP8), caspase-9 (CASP9), and B-cell lymphoma-2 (BCL2). The common targets involved 72 signaling pathways and apoptosis and p53 signaling pathway may play a crucial role in the effect of Ganoderma against gastric cancer. β -sitosterol had strong binding activity to the top 15 targets in the PPI network. The *in vitro* cell experiment demonstrated that β -sitosterol inhibited gastric cancer AGS cell proliferation by inducing cell apoptosis and cell cycle arrest in the S phase, which might be related to the regulation of the p53 pathway. This study shows the multi-component, multi-target, and multi-pathway characteristics of Ganoderma against gastric cancer, which lays a scientific basis for further research on the molecular mechanism.

[Key words] Ganoderma; gastric cancer; network pharmacology; molecular docking; β -sitosterol; p53

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20210902.701

胃癌(gastric cancer)是世界范围内最常见的肿瘤之一,它的发病率、病死率分别处于第5位和第3位。根据 GLOBOCAN2018 显示,胃癌全球新发病例超过 100 万例,估计死亡人数 78.3 万例^[1]。在我国胃癌发病率、病死率分别位于我国恶性肿瘤第2位和第3位^[2]。胃癌发病原因尚不明确,细菌(幽门螺杆菌)、病毒(epstein-barr virus, EBV)以及特定基因的遗传突变(GSTM1-null 或 CDH1 基因)可能是造成胃癌的主要危险因素^[3]。除此之外,富含亚硝基的饮食、烟草、酒精、吸烟等生活方式因素也与胃癌的发生发展有关^[4]。目前,化疗是胃癌的基本治疗方法^[5],但疗效有限且副作用较大,因此迫切需要寻找治疗胃癌的安全有效的药物。

灵芝 *Ganoderma lucidum* 作为我国珍贵的传统药物,具有增强免疫力、延年益寿的功效^[6]。灵芝具有多种不同生物活性成分,包括多糖类、三萜类、甾醇类、酶、核苷酸和维生素等。灵芝具有广泛的药理作用,如抗肿瘤、免疫调节、抗氧化、抗糖尿病、化学预防、化疗和放疗防护、抗菌、抗病毒(包括抗 HIV)等^[7]。灵芝的抗肿瘤作用一直是国内外瞩目的研究课题,体内外试验研究表明,灵芝及其主要活性成分在治疗胃癌的发生和发展中发挥重要作用^[8-10]。此外,作者前期研究也发现,从去壁灵芝孢子粉中提取的灵芝多糖通过诱导胃癌细胞凋亡和影响自噬,从而发挥抗胃癌的作用^[11]。然而由于灵芝活性成分的多样性和结构的复杂性,难以获得灵芝抗胃癌的作用靶点和具体机制网络。

本研究拟首先通过中药网络药理学方法,预测灵芝抗胃癌的潜在成分、作用靶点和分子通路,接着利用分子对接技术和细胞实验进行进一步的验证,阐明灵芝抗胃癌的潜在机制,以期对灵芝抗胃癌的

作用机制提供方法和理论依据(图1)。

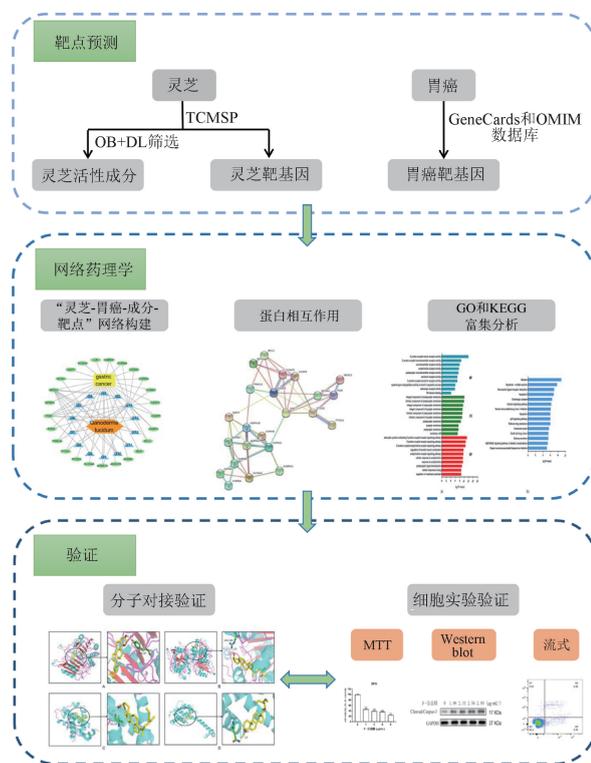


图1 工作流程图

Fig. 1 Overall flowchart of this study

1 资料与方法

1.1 数据库及分析软件

中药系统药理学数据库和分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform, TCMSP) (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>); UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>);

org/); OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>); Venny 2.1.0 数据库(<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>); STRING 数据库 (<https://string-db.org/>); Gene Ontology (GO) 数据库 (<http://www.geneontology.org/>); Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库 (<http://www.genome.jp/kegg/>); R cluster Profiler (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/clusterProfiler.html>); PubChem 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/>); Protein Data Bank (PDB) 数据库 (<https://www.pdb.org/>); R 语言 (R 3.6.3 for Windows); Cytoscape 3.7.2 软件; GraphPad Prism 6.0 软件; ChemBio3D 14.0.0.117 软件; PyMOL 1.6.x 软件; AutoDockTools 1.5.6 软件; AutoDock Vina 1.1.2 软件; ImageJ 1.41 软件。

1.2 灵芝活性成分和作用靶点的收集

利用 TCMSP^[12] 获取灵芝的活性成分和潜在作用靶点。以“灵芝”为检索词,设定口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 ^[13] 为筛选条件,收集符合条件的活性成分。根据筛选所得的灵芝活性成分获取所对应的靶标,利用 UniProt 数据库^[14],限定物种为“homo sapiens”,收集灵芝活性成分对应靶点的基因名。

1.3 胃癌潜在靶点的收集

利用 GeneCards 数据库(相关性评分 ≥ 1.0)^[15] 和 OMIM 数据库^[16],以“gastric cancer”作为检索词分别检索胃癌潜在靶点,合并去除重复基因后,最终收集与胃癌相关的靶点。

1.4 “草药-疾病-成分-靶点”网络的构建

利用 R 语言获取灵芝和胃癌的共同靶点,并通过 Venny 软件绘制韦恩图显示。利用 Cytoscape 软件构建“草药-疾病-成分-靶点”网络。

1.5 蛋白相互作用网络的构建

利用 STRING 数据库^[17] 构建靶标蛋白相互作用 (protein-protein interaction, PPI)。将 1.4 项获取的灵芝和胃癌的交集靶点导入 STRING 数据库,限定物种“homo sapiens”,并以置信度 ≥ 0.4 ,浅蓝色线代表从数据库中得来的蛋白间作用,紫色线代表经过实验验证的蛋白间作用。利用 GraphPad Prism 6.0 显示蛋白互作网络中前 15 蛋白的相邻数目。

1.6 通路和功能富集的分析

为进一步研究灵芝抗胃癌上的分子机制,利用 R clusterProfiler^[18] 对获得的靶标进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。根据 $P < 0.05$,筛选出排名前 10 的生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞成分 (cellular component, CC) 和排名前 15 的 KEGG 通路,并利用 GraphPad Prism 6.0 对结果进行可视化处理。随后将活性成分、靶点以及排名前 15 的 KEGG 通路等实验数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件,构建“草药-疾病-成分-靶点-通路”网络。

1.7 分子对接分析

为进一步地验证,选取灵芝的关键活性成分 β -谷甾醇与 PPI 网络中排名前 15 的靶标进行分子对接。利用 PubChem 数据库下载 β -谷甾醇的 2D 结构并保存为 SDF 格式文件。利用 ChemBio3D 软件修饰 β -谷甾醇的 SDF 格式文件并使其结构能量最小,保存为 mol 格式。从 PDB 数据库下载靶标的晶体结构,并运用 PyMOL 软件进行预处理,包括去除水分子、加氢等。随后利用 AutoDockTools 将 β -谷甾醇的 3D 结构和靶标晶体结构转换为 pdbqt 格式文件,利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接。通过结合能评价 β -谷甾醇和靶点的结合活性,最后运用 PyMOL 软件使对接文件可视化。

1.8 实验验证

1.8.1 药品 β -谷甾醇(批号 DOTN11S130277,纯度 $>98\%$),购自上海源叶生物科技有限公司。

1.8.2 细胞 人胃癌细胞系 AGS(批号 CL0031)购自湖北丰晖生物有限公司。

1.8.3 试剂 胎牛血清(批号 42F7180K, Gibco 公司); roswell park memorial institute (RPMI) medium 1640 培养液(批号 C11875500BT, Gibco 公司); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)(批号 M8180, Solarbio 公司); cleaved caspase-3(批号 9664P, CST 公司); cleaved poly ADP-ribose polymerase (cleaved PARP)(批号 5625S, CST 公司); p53(批号 2524T, CST 公司); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)(批号 60004-1-Ig, ProteinTech 公司); 二抗羊抗鼠 IgG(批号 074-1807, KPL 公司); 二抗羊抗兔 IgG(批号 074-1506, KPL 公司); bicinchoninic acid (BCA) 蛋白检测试剂盒(批号 122120210323, 上海碧云天

生物技术有限公司); emitter coupled logic (ECL) 化学发光试剂盒(批号 024B1098, 上海雅酶有限公司); PE annexin V apoptosis detection kit I 细胞凋亡试剂盒(批号 559763, 美国 BD 公司); 细胞周期检测试剂盒(批号 KGA511, 江苏凯基公司)。

1.8.4 仪器 ELx800 化学发光酶标仪(Bio-Tek 公司); DY CZ-24DN 型双垂直电泳仪(北京六一公司); DY CZ-40D 型转印电泳仪(北京六一公司); ClinxChemiScope 6000 型化学发光仪(上海勤翔有限公司); FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.8.5 MTT 细胞增殖实验 利用 MTT 法检测 β -谷甾醇对人胃癌 AGS 细胞系的增殖影响。将对数期生长的 AGS 细胞接种于 96 孔板中(4×10^3 个/孔), 每组 3 个复孔。细胞分别加入 0、1、3、6、9 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 β -谷甾醇, 分别处理 24 或 48 h 观察细胞形态。经 β -谷甾醇处理 24 或 48 h 后, 每孔加入 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液, 于细胞培养箱中继续孵化 4 h。小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 150 μL 的二甲基亚砜, 并在室温下避光低速振荡 10 min, 使结晶充分溶解。用酶标仪于 490 nm 测定各孔的吸光度(A), 以空白对照组的 A 为参照, 计算细胞相对活力。

1.8.6 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡率 利用流式细胞术检测 β -谷甾醇对人胃癌 AGS 细胞系细胞周期和凋亡的影响。将对数期生长的 AGS 细胞中接种于 96 孔板(4×10^3 个/孔), 经不同浓度的 β -谷甾醇处理 AGS 细胞系 24 h 后, 用胰酶消化后收集。进行细胞周期分析, 细胞经上述处理后, $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后, 加入 1 mL 的 PBS 清洗离心, 吸出上清液。接着加入 2 mL 的 75% 乙醇并于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。然后离心并去掉上清, PBS 重悬细胞 2 次。最后配制每管 500 μL 的 PI 和 RNaseA 混合液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光 30 min 后, 用流式细胞仪检测细胞周期。进行细胞凋亡的分析, 药物经上述处理后, 将细胞密度调至 1×10^5 个/L。接着每管加入 100 μL 的 binding buffer 重悬细胞后, 加入 5 μL 的 Annexin V-PE 和 5 μL 的 7-AAD 混匀后, 室温避光孵育 20 min。最后用 PBS 洗涤细胞, 加入 500 μL 的 PBS 重悬细胞后, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.8.7 Western blot 法检测蛋白含量 人胃癌 AGS 细胞经上述处理后, 加入蛋白裂解液, 于冰上裂解 30 min。利用 BCA 测定法测量总蛋白浓度。用

10% 或 12% 的 SDS-PAGE 凝胶分离 20 μg 的蛋白质, 并在冰上 100 V 下转移到 PVDF 膜上 2 h。将 PVDF 膜移至含 5% 脱脂奶粉中, 室温下将膜在脱色摇床上摇 1 h。从封闭液中取出膜, 置于杂交袋内, 分别加入以下特异性一抗: cleaved caspase-3 (1:1 000) 或 cleaved PARP (1:1 000) 或 p53 (1:1 000) 和 GAPDH (1:5 000)。4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜后, 用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 8 min。将膜在二抗山羊抗小鼠 IgG (1:2 000) 或二抗山羊抗兔 IgG (1:2 000) 在室温下孵育 1 h, 并用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 3 次, 每次 8 min。将 ECL 化学发光显影液滴加至 PVDF 膜上, 放入化学成像分析仪内曝光并拍照。采用 ImageJ 1.41 软件采集蛋白的灰度值并进行半定量分析。

1.8.8 统计学分析 采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm \text{SE}$ 表示。采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 灵芝活性成分和作用靶点的收集

在 TCMSP 数据库共获得了 242 个灵芝有效成分。根据 $\text{OB} \geq 30\%$ 和 $\text{DL} \geq 0.18$ 的筛选标准, 共筛选了 14 种潜在的有效成分, 且均为萜类和甾醇(表 1)。为方便后续研究, 这些成分被编号为 G1~G14。接着, 在 TCMSP 数据库中获得了 55 个与灵芝相关的潜在靶点。利用 UniProt 数据库校正靶点基因名, 去除无效及重复值, 共得到 28 个作用靶点。

2.2 胃癌潜在靶点的收集

通过 GeneCards 数据库(相关性评分 ≥ 1.0) 和 OMMI 数据库中分别获得了 11 842、170 个胃癌的靶点。合并剔除重复值后, 共获得 11 862 个胃癌潜在靶点。

2.3 “草药-疾病-成分-靶点”网络的构建

将收集的 28 个灵芝潜在靶点与胃癌的 11 862 个潜在靶点相匹配, 运用 R3.6.3 软件运行 R 语言得到灵芝胃癌共同靶点数目 25 个, 同时利用 Venny 2.1 软件绘制 Venn 图(图 2)。

将灵芝的活性成分和与灵芝和胃癌的共同靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件, 构建“草药-疾病-成分-靶点”网络(图 3)。该网络有 41 个节点, 其中包括灵芝(橙色的六边形), 胃癌(黄色的圆矩形), 灵芝 14 个活性成分(蓝色的三角形), 25 个灵芝和胃癌

表 1 灵芝的 14 种活性成分及对应的靶点数目

Table 1 Fourteen active components of Ganoderma and the number of corresponding targets

No.	分子 ID	英文名称	中文名称	OB/%	DL	靶点数目
G1	MOL011129	methyl lucidenate F	赤芝酸甲酯 F	32.67	0.81	1
G2	MOL011137	ergosta-7,22-dienol	麦角甾 7,22-二烯醇	43.51	0.72	2
G3	MOL011140	5alpha-lanosta-7, 9 (11) 24-triene-15alpha,26-dihydroxy-3-one	5 α -羊毛甾 7,9(11), 24-三烯-15 α ,26-二羟基-3-酮	38.54	0.81	1
G4	MOL011159	ergosta-4,6,8(14),22-tetraene-3-one	麦角甾 4,6,8(14),22-四-3 烯酮	48.32	0.75	1
G5	MOL011168	ergosta-7,9(11),22-trien-3 β ,5 α ,6 α -triol	麦角甾 7,9(11),22-三烯-3 β ,5 α ,6 α -三醇	46.95	0.78	1
G6	MOL011171	ganoderal B	灵芝醛 B	42.56	0.81	2
G7	MOL011256	ganolucidic acid E	丹芝酸 E	32.85	0.82	1
G8	MOL011267	lucialdehyde B	赤芝醛 B	43.12	0.81	1
G9	MOL011270	lucidenic acid A	赤芝酸 A	30.34	0.79	1
G10	MOL011287	lucidone A	赤芝酮 A	37.22	0.64	2
G11	MOL011309	methyl lucidenate Q	赤芝酸甲酯 Q	30.19	0.81	1
G12	MOL000279	ergosta-7,22-diene-3beta,5alpha,6beta-triol	麦角甾 7,22-二烯-3 β ,5 α ,6 β -三醇	37.96	0.77	1
G13	MOL000282	ergosta-7,22E-dien-3beta-ol	麦角甾 7,22E-二烯-3 β -醇	43.51	0.72	1
G14	MOL000358	beta-sitosterol	β -谷甾醇	36.91	0.75	14

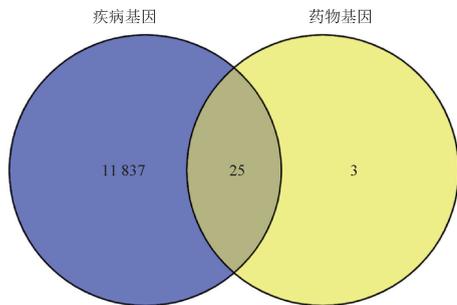


图 2 灵芝与胃癌共同靶点 Venn 图

Fig. 2 Venn diagram of Ganoderma targets and gastric cancer-related targets

的共同靶点节点(绿色的椭圆)和 68 条边。 β -谷甾醇是灵芝抗胃癌的最关键的活性成分,与 14 个靶点直接相关(表 1),如凋亡蛋白 caspase-3 (CASP3)、caspase-8 (CASP8)、caspase-9 (CASP9) 和 b-cell lymphoma-2 (BCL2),以及毒蕈碱受体 muscarinic acetylcholine receptor M1 (CHRM1)、CHRM2、CHRM3 和 CHRM4。

2.4 PPI 网络的构建

将灵芝与胃癌的 25 个共同靶标导入 STRING 数据库,限定物种“homo sapiens”,并以置信度 ≥ 0.4 进行过滤。PPI 网络有 23 个节点(隐藏 KCNH2 和 PON1 的离散节点)代表所有预测靶标(图 4)。边线 56 条,代表靶标之间的相互联系。其中综合数值评分 > 0.95 的相互作用蛋白为 CASP8-CASP3、BCL2-CASP8、CASP8-CASP9、CASP9-CASP3、BCL2-

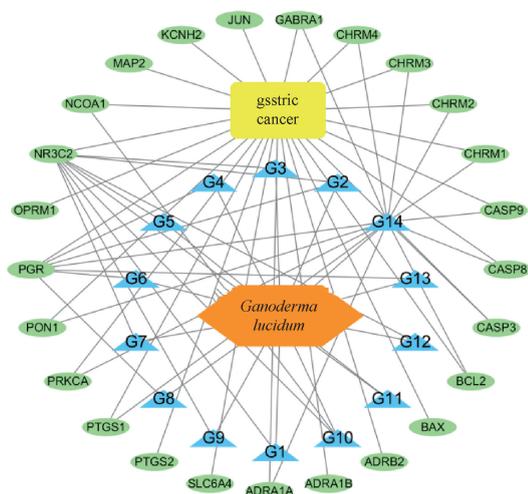


图 3 灵芝“草药-成分-疾病-靶标”网络

Fig. 3 "Medicinal-disease-component-target" network of Ganoderma

BAX、nuclear receptor coactivator (NCOA1)-progesterone receptor (PGR),这些蛋白间的相互作用在网络中具有重要地位。利用 GraphPad Prism 可视化网络中排名前 15 的邻接靶标数目,并绘制柱状图(图 5)。结果显示 CASP3、v-jun (JUN)、adrenoceptor alpha 1B (ADRA1B)和 CHRM1 是核心靶标,其相邻目标的数量分别为 9、9、7、7。

2.5 GO 和 KEGG 通路富集分析

为深入研究灵芝抗胃癌的作用机制,本研究利用 Bioconductor 平台对灵芝和胃癌 25 个共同靶标进行 GO 富集和 KEGG 通路分析。实验结果共得到

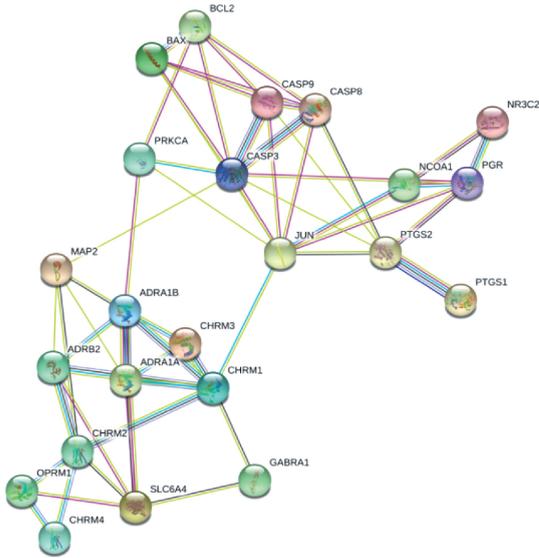


图4 灵芝抗胃癌潜在靶标相互作用网络
Fig. 4 Interaction networks of anti-gastric cancer targets in Ganoderma

蛋白连接酶结合 (GO:0031625, $n = 4$)、肿瘤坏死因子受体超家族结合 (GO:0032813, $n = 2$) 和抗氧化剂活性 (GO:0016209, $n = 2$)。在细胞成分中,灵芝对细胞膜的影响较大。根据 $P < 0.05$,筛选出排名前10的GO富集条目,并利用 GraphPad Prism 进行可视化(图6)。

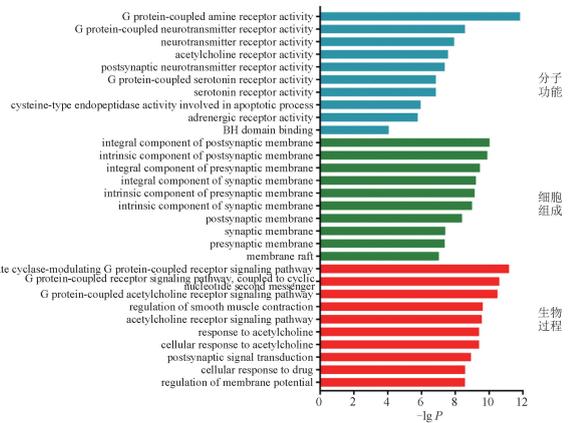


图6 灵芝与胃癌交集靶标排名前10的GO富集条目
Fig. 6 Top 10 gene ontology terms of the common targets of Ganoderma and gastric cancer

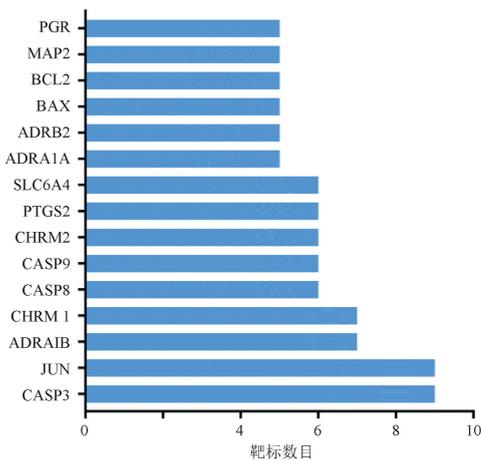


图5 排名前15的邻接靶标数目
Fig. 5 Histogram of the top 15 adjacent target numbers

547个GO富集条目,其中包括466个生物学过程条目,31个分子功能和50个细胞成分条目。在生物学过程方面,灵芝抗胃癌主要涉及腺苷酸环化酶调节G蛋白偶联受体信号通路 (GO:0007188, $n = 9$)、对雌二醇的反应 (GO:0032355, $n = 6$)、细胞对药物的反应 (GO:0035690, $n = 9$)、外生凋亡信号通路 (GO:0097191, $n = 5$)、凋亡线粒体变化 (GO:0008637, $n = 4$)。分子功能富集主要涉及G蛋白偶联受体活性 (GO:0008227, $n = 7$)、参与凋亡过程的半胱氨酸型内肽酶活性 (GO:0097153, $n = 3$)、泛素

通过KEGG通路分析,共富集到72条信号通路。灵芝抗胃癌主要涉及细胞凋亡通路 (hsa04215, $n = 5$), p53信号通路 (hsa04115, $n = 5$), 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路 (hsa04370, $n = 3$), PI3K-AKT信号通路 (hsa04151, $n = 5$)。根据 $P < 0.05$,筛选出排名前15的通路,并利用 GraphPad Prism 进行可视化(图7)。

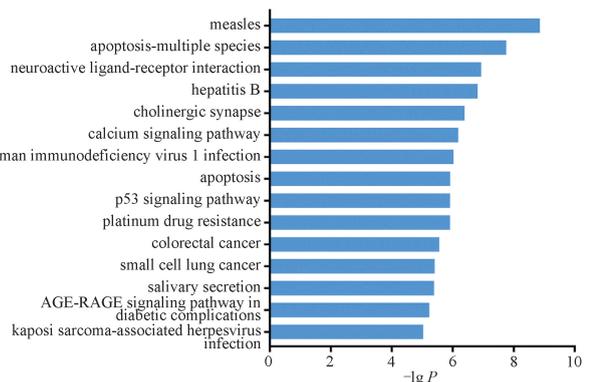


图7 灵芝与胃癌交集靶标排名前15的KEGG通路
Fig. 7 Top 15 KEGG pathways of the common targets of Ganoderma and gastric cancer

最后将灵芝的有效成分、灵芝和胃癌的共同靶标和排名前 15 的 KEGG 信号通路等数据结果导入 Cytoscape 软件,构建“草药-疾病-成分-靶点-通路”网络(图 8)。该网络有 56 个节点,其中包括灵芝(紫色八边形),胃癌(红色矩形),灵芝 14 个活性成分(橙色三角形),25 个灵芝与胃癌的共同靶标(黄色椭圆形),排名前 15 信号通路(绿色 V 形)和 68 条边。从图中可以看出 β -谷甾醇作用多靶点,是灵芝抗胃癌的核心成分。该网络图直观地体现灵芝通过多成分、多靶点和多通路拮抗胃癌的作用机制。

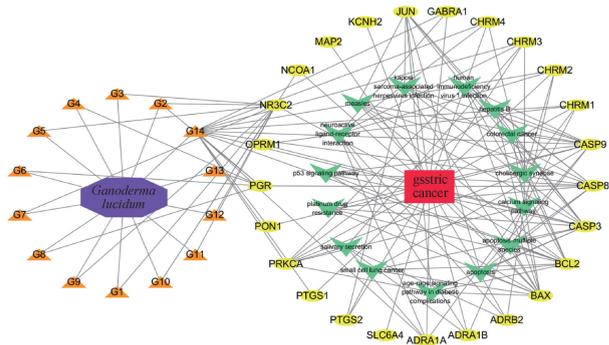


图 8 灵芝“草药-成分-疾病-靶标-通路”网络
Fig. 8 "Medicinal-disease-component-target-pathway" network of Ganoderma

2.6 分子对接分析

利用 AutoDock Vina 软件,将 β -谷甾醇与 PPI 网络中排名前 15 名除 ADRA1B(PDB 数据库中未找到 ADRA1B 的晶体结构)外的靶点进行分子对接,通过结合能评价成分和靶点的结合活性。结合能高于 $4.52 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明分子与靶点之间有一定的结合活性,而结合能高于 $7.00 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明分子与靶点有很好的结合活性^[19]。分子对接结果显示,所有的结合能都大于 $4.52 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,表明 β -谷甾醇与这些靶点对接良好(表 2)。利用 PyMOL 软件对 β -谷甾醇与 CASPE3(PDB ID:3GJR)、CASPE9(PDB ID:2AR9)、BAX(PDB ID:4BD6)、BCL2(PDB ID:5WHI)的分子对接结果进行可视化分析(图 9)。 β -谷甾醇与 CASPE3 的氨基酸残基 TYR-197 通过氢键相互作用。在 β -谷甾醇和 CASPE9 的氨基酸残基 AGR-386 之间观察到 1 个氢键。在 BCL2 活性部位的关键残基上, β -谷甾醇与 VAL-20 形成氢键。 β -谷甾醇与 BAX 的氨基酸残基 GLN-28 通过氢键相互

作用。

表 2 β -谷甾醇与 PPI 网络中排名前 15 的靶点结合能
Table 2 Binding energy of β -sitosterol and the 15 top targets in the PPI network

靶点	PDB ID	结合能	基本结合能
		$/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$	$/\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
CASPASE3	3GJR	-7.50	-7.20
JUN	1JNM	-6.40	-5.26
CHRM1	5CXV	-8.60	-7.26
CASPASE8	4PRZ	-6.00	-5.86
CASPASE9	2AR9	-8.00	-7.51
CHRM2	5YC8	-8.00	-6.82
PTGS2	5F1A	-10.00	-8.07
SLC6A4	5I6Z	-7.21	-7.21
ADRA1A	4IYE	-5.80	-4.85
ADRB2	2R4S	-6.90	-6.10
BAX	4BD6	-7.60	-6.55
BCL2	5WHI	-7.50	-5.94
MAP2	2HAK	-6.60	-5.51
PGR	1A28	-7.10	-6.42

2.7 β -谷甾醇抑制人胃癌 AGS 细胞的增殖

本实验利用 MTT 法检测不同浓度的 β -谷甾醇作用 AGS 24 或 48 h 对增殖的影响(图 10)。与空白对照组相比, β -谷甾醇能显著抑制人胃癌 AGS 细胞的增殖,并呈时间和剂量依赖性。特别是 β -谷甾醇($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)处理 24 h 的人胃癌 AGS 细胞增殖下降明显($P < 0.001$)。24、48 h 的 IC_{50} 分别为 (2.64 ± 0.35) 、 $(1.96 \pm 0.56) \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.8 β -谷甾醇诱导人胃癌 AGS 细胞 S 期阻滞

本研究利用流式细胞术检测不同浓度的 β -谷甾醇作用 AGS 细胞 24 h 对细胞周期的影响(图 11)。与未处理的细胞相比, β -谷甾醇组高浓度组(2.56 、 $2.88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的细胞在 S 期的显著积累($P < 0.05$),表明 β -谷甾醇阻滞人胃癌 AGS 细胞在 S 期。除此之外, β -谷甾醇还显著减少了 G_0/G_1 期的细胞积累。

2.9 β -谷甾醇诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡并激活 p53 通道

本研究利用流式细胞术检测不同浓度的 β -谷甾醇作用 AGS 细胞 24 h 对细胞凋亡率的影响(图 12)。各个 β -谷甾醇组 AGS 细胞总凋亡率呈剂量依赖性上升($P < 0.05$),表明 β -谷甾醇诱导了人胃癌 AGS 细胞凋亡。利用蛋白质印迹法进一步检测 β -谷甾醇对 AGS 凋亡的影响。caspase-3 和 PARP 是细胞凋

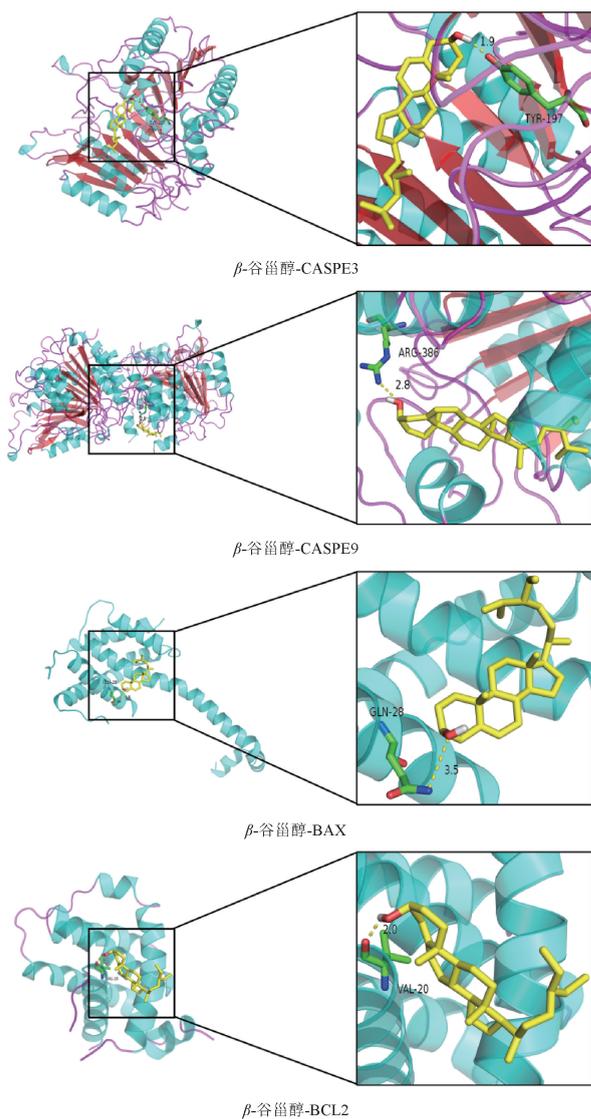
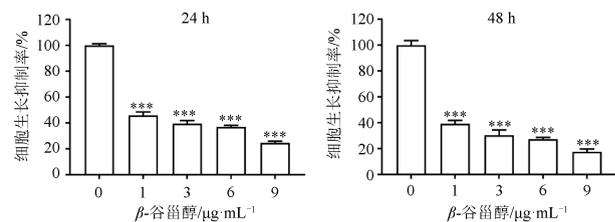


图9 β -谷甾醇与受体的分子的相互作用
Fig. 9 Interaction of β -sitosterol with targets



与空白对照组 ($0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (图 11~12 同)。

图 10 MTT 法检测 β -谷甾醇不同浓度和作用时间对 AGS 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n=3$)

Fig. 10 Effect of the concentration and action duration of β -sitosterol on viability of AGS cells (MTT) ($\bar{x} \pm \text{SE}$, $n=3$)

亡途径中的核心执行蛋白,因此对这些蛋白的表达进行检测。 β -谷甾醇呈剂量依赖性提高了 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 的蛋白表达 ($P < 0.05$),表明 β -谷甾醇可能通过 caspase-3 和 PARP 诱导了人胃癌 AGS 细胞凋亡。根据 KEGG 通路结果, p53 通道在灵芝抗胃癌中起到非常重要的作用。基于以上原因,本研究猜测 β -谷甾醇诱导人胃癌 AGS 细胞凋亡可能与 p53 通道有一定的关系,因此对 p53 蛋白的表达进行了检测。 β -谷甾醇呈剂量依赖性提高了 p53 的表达 ($P < 0.05$),表明 p53 通路可能参与细胞凋亡过程。

3 讨论

众多的研究表明,三萜和甾醇是灵芝抗肿瘤的主要活性成分^[20-21]。麦角甾 4,6,8(14),22-四-3 烯酮(G4)能诱导人肝癌 HepG2 细胞 G_2/M 期阻滞,并诱导肝癌细胞凋亡^[22]。灵芝酸 E(G7)和赤芝酸 A(G9)对人肝癌 HepG2 和 P-388 细胞具有显著的细胞毒性^[23]。赤芝醛 B(G8)对小鼠肺癌 LLC 细胞株,和小鼠肉瘤 Meth-A 和 s-180 等细胞株表现出较强的抑制作用^[24]。 β -谷甾醇(G14)被发现能通过多种细胞信号途径抑制多种癌症的发生和发展,如乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、肺癌、胃癌和卵巢癌^[25]。 β -谷甾醇(G14)通过诱导人胃癌 SGC-7901 凋亡从而抑制细胞生长^[26],并且通过介导 AMPK/PTEN/Hsp90 等途径在体内体外抑制人胃癌 AGS 细胞的生长^[27]。本研究利用 TCMS 数据库,以 OB 和 DL 参数筛选了灵芝抗胃癌的 14 种活性成分,其中三萜和甾醇是关键活性成分。本研究还发现, β -谷甾醇通过作用于多个靶点而发挥抗胃癌的作用。基于以上原因,本研究选择 β -谷甾醇用于后续的细胞实验,研究其潜在机制。综上所述,灵芝通过多种活性成分共同发挥拮抗胃癌的作用,体现了中药多成分协同作用的特征。

本研究共收集到了 25 个灵芝与胃癌的共同靶标,其中 CASP3、JUN、ADRA1B、CHRM1、CASP8 和 CASP9 为核心预测靶点。细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种方式,而 caspase 蛋白家族与其密切相关。CASP3、CASP8 和 CASP9 是细胞凋亡过程中的关键调节因子^[28-29],在诱导胃癌细胞凋亡发挥重要作用^[30]。JUN 蛋白是转录因子激活蛋白 1(AP-1)家族的成员^[31],JUN 过度表达诱发胃癌的癌变^[32]。SHIBATA W 等^[33]发现 c-Jun NH2 端激酶(JNK)能

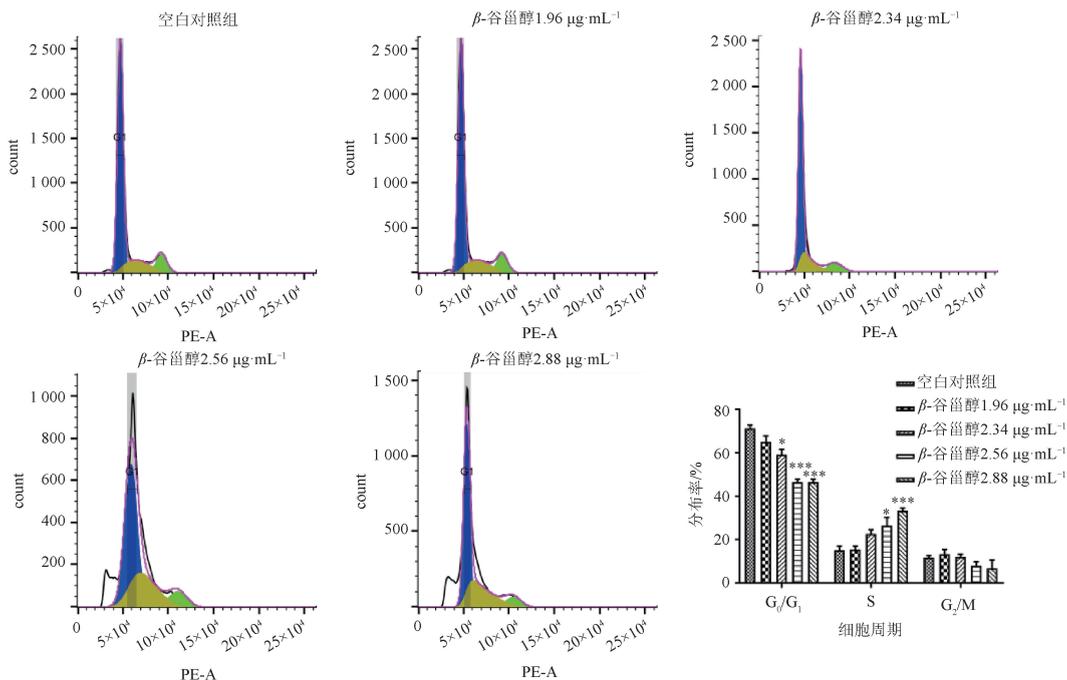


图 11 β -谷甾醇对 AGS 细胞周期的影响($\bar{x}\pm SE, n=3$)

Fig. 11 Effects of β -sitosterol on cell cycle progression in AGS cells($\bar{x}\pm SE, n=3$)

影响胃癌的发展。ADRA1B 是肾上腺素受体 $\alpha 1$ (ADRA1) 家族的成员^[34], 是一个与癌症密切相关的基因, 在胃癌的发生和发展中起到关键作用^[35]。胆碱能毒蕈碱 1 (CHRM1) 受体可直接或间接地抑制胰腺肿瘤的发生和发展^[36]。综上所述, 这些靶点是灵芝对抗胃癌的重要靶点, 体现了中药多靶点协同作用的特点。

本研究 KEGG 通路分析表明, 灵芝通过多种信号发挥抗胃癌的作用, 包括凋亡信号通路、p53 信号通路、VEGF 信号通路和 PI3K-AKT 信号通路。已经有相关文献报道这些通路通过调控人胃癌细胞的增殖、凋亡、侵袭、转移和血管生成等多个肿瘤发展过程, 来抑制胃癌的发生和发展^[37-39]。在这些信号通路中, 细胞凋亡无疑是最重要的信号通路, 诱导癌细胞凋亡正成为治疗胃癌的一个研究热点^[37, 40-41]。血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路被认为是血管生成过程中的重要分子, 而血管的异常生成与肿瘤生长和转移有关^[42]。抑制肿瘤血管生成有望成为治疗癌症的新方法, 抑制肿瘤血管生成的药物联合化疗已经作为晚期胃癌的一线治疗^[43]。PI3K-AKT 信号通路是细胞正常发展过程的重要信号通路之一, 其异常激活可涉及多种癌细胞的生物学过程, 如细

胞自噬、上皮-间质转化、细胞凋亡, 化疗抵抗和转移等^[44]。本实验的研究结果与上述文献报道一致。综上所述, 灵芝抗胃癌具有多成分、多靶点、多信号通路协同作用的特征, 体现了中药综合治疗的特点。

p53 具有广泛的生物学功能, 包括调节细胞周期、细胞凋亡、DNA 代谢、血管生成、细胞分化和免疫反应^[45]。其中 p53 诱导癌细胞凋亡这一功能已被广泛报道^[46-47]。p53 可参与外源性和内源性的凋亡途径^[48]。结合 KEGG 通路富集分析的结果, 本研究推测 β -谷甾醇诱导 AGS 细胞系凋亡可能与 p53 信号通路有关。细胞实验结果显示, β -谷甾醇呈剂量依赖性上调了 cleaved caspase-3、cleaved PARP 和 p53 的表达水平。因此, 作者推测 β -谷甾醇激活了 p53 通路, 并通过激活 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 最终诱导胃癌 AGS 细胞凋亡。然而, p53 诱导细胞凋亡的机制非常复杂, 尚未完全阐明。已有证据证明 p53 调节 Bcl-2 家族成员诱导癌细胞凋亡, 如 Bax、Noxa、PUMA 和 Bid^[49-51]。有研究表明对化疗药治疗后造成的 DNA 损伤, p53 通过 TNFR 超家族的 2 个促凋亡成员 CD95 (Fas/Apo) 1 和 Killer/DR5 介导依赖性诱导癌细胞凋亡^[52-53]。

本研究也存在一定局限性。首先, 公共数据库

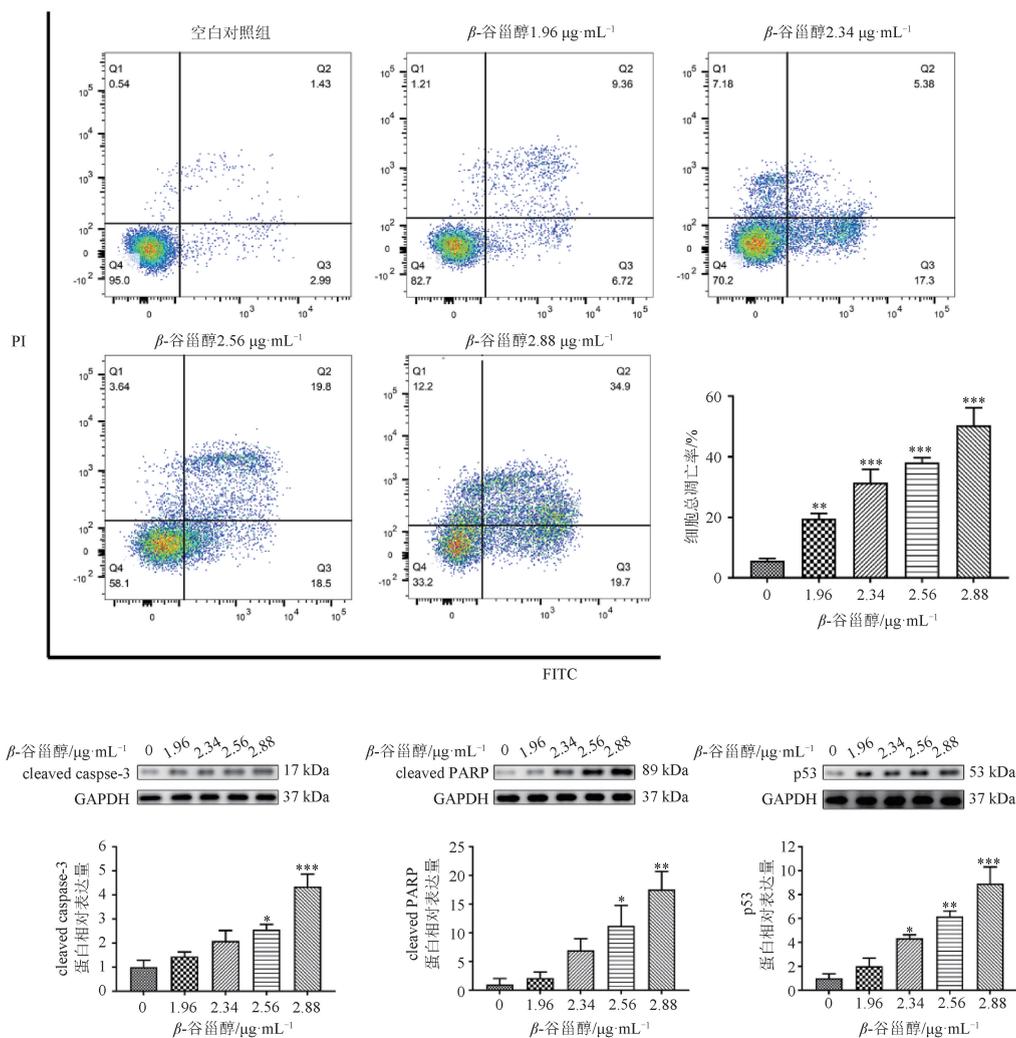


图 12 β -谷甾醇处理 AGS 细胞 24 h 对细胞凋亡率以及对 cleaved caspase-3、cleaved PARP 和 p53 蛋白水平的影响($\bar{x}\pm\text{SE}, n=3$)
Fig. 12 Effect of β -sitosterol on total apoptosis rate and levels of cleaved caspase-3, cleaved PARP, and p53 in AGS cells within 24 h ($\bar{x}\pm\text{SE}, n=3$)

是实时更新的,所以本研究结果只在一定程度上揭示灵芝抗胃癌的作用机制。其次,本研究只进行了体外实验,并仅使用了人胃癌 AGS 细胞系,以后需要多维度的进一步验证。未来的研究除了选择 p53 信号通路,还可选择其他信号通路(如 PI3K-AKT 信号通路)进行深入研究等。此外,虽然 β -谷甾醇是灵芝最主要的活性成分,但仍不能完全代表灵芝,以后仍需进一步的实验验证。总而言之,灵芝抗胃癌的机制仍应在体内和体外进一步深入研究。

本研究利用中药网络药理学、分子对接和体外实验,初步探讨了灵芝抗胃癌的潜在机制,其实验结果与现有文献内容一致。本研究结果表明,灵芝通过多成分、多靶点和多信号通道协同发挥抗胃癌的

作用,而 β -谷甾醇在此过程中发挥了重要作用。此外, β -谷甾醇通过调控细胞凋亡和细胞周期,有效抑制人胃癌细胞 AGS 增殖,可能与 p53 信号通道有关。本研究为今后治疗胃癌的实验和临床治疗提供了新的启示。

[参考文献]

- [1] 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.
- [2] 曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. 中国临床肿瘤杂志, 2019, 46(3): 145.
- [3] RAWLA P, BARSOUK A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention[J]. Prz Gastroenterol,

- 2019, 14(1): 26.
- [4] KOBAYASHI J. Effect of diet and gut environment on the gastrointestinal formation of *N*-nitroso compounds: a review [J]. Nitric Oxide, 2018, 73: 66.
- [5] ILSON D H. Advances in the treatment of gastric cancer; 2019 [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2019, 35(6): 551.
- [6] AHMET U, ERDINC N, ONDER K, et al. *Ganoderma lucidum* (Reishi Mushroom) and cancer[J]. J BUON, 2016, 21(4): 792.
- [7] SANODIYA B S, THAKUR G S, BAGHEL R K, et al. *Ganoderma lucidum*: a potent pharmacological macrofungus[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2009, 10(8): 717.
- [8] JANG K J, HAN M H, LEE B H, et al. Induction of apoptosis by ethanol extracts of *Ganoderma lucidum* in human gastric carcinoma cells[J]. J Acupunct Meridian Stud, 2010, 3(1): 24.
- [9] MA J Q, LIU C M, CHEN Y Q, et al. Cellular and molecular mechanisms of the *Ganoderma applanatum* extracts induces apoptosis on SGC-7901 gastric cancer cells[J]. Cell Biochem Funct, 2011, 29(3): 175.
- [10] OLIVEIRA M, REIS F S, SOUSA D, et al. A methanolic extract of *Ganoderma lucidum* fruiting body inhibits the growth of a gastric cancer cell line and affects cellular autophagy and cell cycle[J]. Food Funct, 2014, 5(7): 1389.
- [11] ZHONG J Y, FANG L, CHEN R, et al. Polysaccharides from sporoderm-removed spores of *Ganoderma lucidum* induce apoptosis in human gastric cancer cells via disruption of autophagic flux[J]. Oncol Lett, 2021, 21(5): 425.
- [12] RU J L, LI P, WANG J A, et al. TCMSF: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. J Cheminform, 2014, 6: 13.
- [13] XU X, ZHANG W X, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(6): 6964.
- [14] UniProt Consortium. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021 [J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1): D480.
- [15] 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.
- [16] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCOTT A F, et al. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1): D1038.
- [17] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, 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.
- [18] YU G G, WANG L G, HAN Y Y, et al. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters [J]. OMICS, 2012, 16(5): 284.
- [19] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology [J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e83922.
- [20] SU H G, PENG X R, SHI Q Q, et al. Lanostane triterpenoids with anti-inflammatory activities from *Ganoderma lucidum* [J]. Phytochemistry, 2020, 173: 112256.
- [21] SHAO Y Y, QIAN L S, WU L F, et al. Structure identification and anti-cancer pharmacological prediction of triterpenes from *Ganoderma lucidum*[J]. Molecules, 2016, 21(5): 678.
- [22] ZHAO Y Y, SHEN X Y, CHAO X, et al. Ergosta-4,6,8(14), 22-tetraen-3-one induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1810(4): 384.
- [23] WU T S, SHI L S, KUO S C. Cytotoxicity of *Ganoderma lucidum* triterpenes[J]. J Nat Prod, 2001, 64(8): 1121.
- [24] GAO J J, MIN B S, AHN E M, et al. New triterpene aldehydes, lucialdehydes A-C, from *Ganoderma lucidum* and their cytotoxicity against murine and human tumor cells [J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(6): 837.
- [25] BIN S M S, AMEEN S S. Beta-sitosterol: a promising but orphan nutraceutical to fight against cancer[J]. Nutr Cancer, 2015, 67(8): 1214.
- [26] ZHAO Y H, CHANG S K C, QU G, et al. Beta-sitosterol inhibits cell growth and induces apoptosis in SGC-7901 human stomach cancer cells[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(12): 5211.
- [27] SHIN E J, CHOI H K, SUNG M J, et al. Anti-tumour effects of beta-sitosterol are mediated by AMPK/PTEH/HSP90 axis in AGS human gastric adenocarcinoma cells and xenograft mouse models[J]. Biochem Pharmacol, 2018, 152: 60.
- [28] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. Aging, 2016, 8(4): 603.
- [29] WONG R S Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2011, 30(1): 87.
- [30] WEI S C, PENG L, YANG J J, et al. Exosomal transfer of miR-15b-3p enhances tumorigenesis and malignant transformation through the DYNLT1/caspase-3/caspase-9 signaling pathway in gastric cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2020, 39(1): 32.
- [31] BOHMANN D, BOS T J, ADMON A, et al. Human protooncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1[J]. Science, 1987, 238: 1386.
- [32] ZHANG J, WONG C C, LEUNG K T, et al. FGF18-FGFR2 signaling triggers the activation of c-Jun-YAP1 axis to promote carcinogenesis in a subgroup of gastric cancer patients and indicates translational potential[J]. Oncogene, 2020, 39(43): 6647.

- [33] SHIBATA W, MAEDA S, HIKIBA Y, et al. c-Jun NH2-terminal kinase 1 is a critical regulator for the development of gastric cancer in mice[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(13): 5031.
- [34] DOCHERTY J R. Subtypes of functional alpha1-adrenoceptor [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(3): 405.
- [35] NODA H, MIYAJI Y, NAKANISHI A, et al. Frequent reduced expression of alpha-1B-adrenergic receptor caused by aberrant promoter methylation in gastric cancers[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(2): 383.
- [36] RENZ B W, TANAKA T, SUNAGAWA M, et al. Cholinergic signaling via muscarinic receptors directly and indirectly suppresses pancreatic tumorigenesis and cancer stemness [J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(11): 1458.
- [37] RONG L, LI Z D, LENG X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109726.
- [38] JI H S, ZHANG X Y. RPL38 regulates the proliferation and apoptosis of gastric cancer via miR-374b-5p/VEGF signal pathway[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 6131.
- [39] 裴俊文,魏丹丹,蒋立峰. 益气化瘀散结方对胃癌 SGC-7901 细胞 PI3K/Akt/Mtor 信号通路的影响 [J]. *世界中医药*, 2020, 15(18): 2686.
- [40] JEONG S, JO M J, YUN H K, et al. Cannabidiol promotes apoptosis via regulation of XIAP/Smac in gastric cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(11): 846.
- [41] LIANG J R, YANG H. Ginkgolic acid (GA) suppresses gastric cancer growth by inducing apoptosis and suppressing STAT3/JAK2 signaling regulated by ROS [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109585.
- [42] CARMELIET P, JAIN R K. Angiogenesis in cancer and other diseases[J]. *Nature*, 2000, 407(6801): 249.
- [43] OHTSU A, SHAH M A, VAN CUTSEM E, et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(30): 3968.
- [44] FATTAHI S, AMJADI-MOHEB F, TABARIPOUR R, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: epigenetics and beyond[J]. *Life Sci*, 2020, 262: 118513.
- [45] SUZUKI K, MATSUBARA H. Recent advances in p53 research and cancer treatment [J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011: 978312.
- [46] UMAMAHESWARI S, PRIYADARSHINEE S, KADIRVELU K, et al. Polystyrene microplastics induce apoptosis via ROS-mediated p53 signaling pathway in zebrafish [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345: 109550.
- [47] ZENG L, ZHANG F Y, ZHANG Z, et al. P53 inhibitor pifithrin- α inhibits ropivacaine-induced neuronal apoptosis via the mitochondrial apoptosis pathway [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2021, 35(8): e22822.
- [48] VOUSDEN K H. p53: death star [J]. *Cell*, 2000, 103(5): 691.
- [49] NAKANO K, VOUSDEN K H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53 [J]. *Mol Cell*, 2001, 7(3): 683.
- [50] ODA E, OHKI R, MURASAWA H, et al. Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis [J]. *Science*, 2000, 288(5468): 1053.
- [51] THORNBORROW E C, PATEL S, MASTROPIETRO A E, et al. A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine bax genes [J]. *Oncogene*, 2002, 21(7): 990.
- [52] MÜLLER M, WILDER S, BANNASCH D, et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs [J]. *J Exp Med*, 1998, 188(11): 2033.
- [53] WU G S, BURNS T F, MCDONALD E R, et al. KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene [J]. *Nat Genet*, 1997, 17(2): 141.

[责任编辑 陈玲]