基于网络药理学、分子对接与分子动力学模拟 探讨华蟾酥毒基对翼状胬肉成纤维细胞的 影响作用

韩欢欢*,华 耘,司 超,孙秀红,刘佳琳,陈冬梅,郭盛鸿,赵新荣#

石河子大学第一附属医院眼科, 新疆 石河子

收稿日期: 2025年5月4日; 录用日期: 2025年5月26日; 发布日期: 2025年6月6日

摘要

目的:运用网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和细胞实验预测华蟾酥毒基(Cinobufagin)对人翼状 胬肉成纤维(Human Pterygium Fibroblasts, HPF)细胞影响作用及其可能作用靶点。方法:运用Swiss Target Prediction、GeneCards和OMIM等数据库筛选翼状胬肉(Pterygium)与华蟾酥毒基的相关靶点, 绘制交集靶点韦恩图,STRING数据库构建蛋白相互作用网络图,运用GO与KEGG富集分析药物一疾病关 键靶点的功能与通路,分子对接验证华蟾酥毒基与关键靶点相互结合能力,分子动力学模拟再次分析华 蟾酥毒基与关键靶点的结构稳定性和相互作用;通过细胞培养,运用CCK-8法、RT-qPCR实验研究华蟾 酥毒基对HPF细胞增殖、凋亡因子作用及关键靶点的影响。结果:检索获取华蟾酥毒基与翼状胬肉共同 靶点36个;核心靶点涉及mTOR和MDM2;富集分析显示华蟾酥毒基主要作用在PI3K/AKT通路;分子对 接发现其与mTOR、MDM2结合强烈;分子动力学模拟进一步确认其结构稳定性及相互作用。CCK8实验 表明华蟾酥毒基抑制HPF细胞活力,RT-qPCR实验结果显示,华蟾酥毒基可干预相关靶点的mRNA表达。 结论:通过网络药理学、分子对接、分子动力学模拟和RT-qPCR共同验证了华蟾酥毒基可抑制HPF细胞 增殖及凋亡相关因子的表达;其作用机制可能与mTOR、MDM2等靶点有关。

关键词

网络药理学,分子动力学模拟,华蟾酥毒基,翼状胬肉,成纤维细胞

^{*}第一作者。

[#]通讯作者。

文章引用: 韩欢欢, 华耘, 司超, 孙秀红, 刘佳琳, 陈冬梅, 郭盛鸿, 赵新荣. 基于网络药理学、分子对接与分子动力 学模拟探讨华蟾酥毒基对翼状胬肉成纤维细胞的影响作用[J]. 眼科学, 2025, 14(2): 74-87. DOI: 10.12677/hjo.2025.142011

Exploring the Effects of Cinobufagin on Human Pterygium Fibroblasts Using Network Pharmacology, Molecular Docking, and Molecular Dynamics Simulations

Huanhuan Han^{*}, Yun Hua, Chao Si, Xiuhong Sun, Jialin Liu, Dongmei Chen, Shenghong Guo, Xinrong Zhao[#]

Ophthalmology Department of The First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi Xinjiang

Received: May 4th, 2025; accepted: May 26th, 2025; published: Jun. 6th, 2025

Abstract

Objective: This study aims to predict the effects of cinobufagin on human ptervgium fibroblasts (HPF) and identify its potential targets using network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics simulations, and cellular experiments. Methods: We utilized databases such as Swiss Target Prediction, GeneCards, and OMIM to screen for targets associated with ptervgium and cinobufagin. A Venn diagram was created to illustrate the intersecting targets, and the STRING database was employed to construct a protein-protein interaction network. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses were conducted to explore the functions and pathways of key drug-disease targets. Molecular docking was performed to assess the binding affinity of cinobufagin to these key targets, while molecular dynamics simulations were used to further analyze the structural stability and interactions of cinobufagin with the identified targets. Additionally, cell culture and reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) experiments were carried out to investigate the effects of cinobufagin on HPF cell proliferation, apoptotic factors, and key targets. Results: A total of 36 common targets for cinobufagin and pterygium were identified, with core targets including mTOR and MDM2. Enrichment analysis indicated that cinobufagin primarily acts on the PI3K/AKT signaling pathway. Molecular docking studies demonstrated strong binding affinity of cinobufagin to mTOR and MDM2. Molecular dynamics simulations further confirmed the structural stability and interactions of cinobufagin with these targets. Results from the RT-gPCR experiments suggested that cinobufagin could modulate the mRNA expression of related targets. Conclusion: The combined approaches of network pharmacology, molecular docking, molecular dynamics simulations, and RT-gPCR provide evidence that cinobufagin can inhibit HPF cell proliferation and the expression of apoptosis-related factors. Its mechanism of action may be associated with targets such as mTOR and MDM2.

Keywords

Network Pharmacology, Molecular Dynamics Simulation, Cinobufagin, Pterygium, Fibroblasts

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc. This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0). http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

CC O Open Access

1. 引言

翼状胬肉(Pterygium)是一种以结膜纤维血管组织侵入角膜为特征的增殖性疾病,严重时可覆盖瞳孔 区,影响患者视力[1]。该病的总患病率为10.2%,且男性患病率高于女性(14.5%:13.6%)[2]。尽管手术治 疗广泛应用,但复发率较高。丝裂霉素-C(MMC)、糖皮质激素类药物、抗 VEGF 药物和免疫抑制剂等药 物在治疗中显示出一定疗效,但个体差异明显[3]-[6]。近年来,中医药在眼科疾病中的应用逐渐增多,其 显著的抗增殖作用和较小的不良反应使其在治疗中展现出良好的效果[7][8]。

蟾酥是由蟾蜍科动物中华大蟾蜍或黑框蟾蜍的耳后腺和皮肤腺体分泌物干燥而成,其中的华蟾酥毒 基(Cinobufagin)是蟾酥的主要抗肿瘤抗增殖的活性成分,能够抑制肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和自噬, 减少血管生成;现有研究表明,华蟾素注射液在治疗眼病方面已有报道,且取得了良好的临床疗效[2][9] [10]。翼状胬肉作为一种增殖性疾病,其病理机制复杂,关于华蟾酥毒基治疗翼状胬肉的机制尚不明确。 因此,探讨华蟾酥毒基在翼状胬肉病理进程中的潜在作用,不仅有助于揭示其分子机制,还可能为该疾 病的治疗提供新的药物靶点。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 药物与试剂

华蟾酥毒基(批号 HY-N0421,美国 MCE),培养基 DMEM/f12 (批号 C11330500BT,GIBCO),胎牛 血清(批号 c04001,上海达特希尔生物科技有限公司),青链霉素(批号 240004003)和胰蛋白酶(批号 240006010)购于北京索莱宝科技有限公司;CCK8 试剂盒(批号 13505202,米鼠);RNA 逆转录试剂盒(RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit)(批号 2964046,赛默飞);SYBR GREEN PCR MIX (批号 CW0957) 购自北京康为公司。

2.1.2. 细胞

收集石河子大学第一附属医院眼科在 2024-03-01/2024-04-30 手术切除的翼状胬肉组织 10 例。所有 患者均签署了知情同意书并自愿参加研究。本研究方案已经通过石河子大学第一附属医院科技伦理委员 会(KJ2024-179-02)批准,遵守《赫尔辛基宣言》。

2.1.3. 仪器

台式离心机(型号 TGL-16c,上海安亭科学仪器厂),冷冻离心机(型号 HSC-2015L,新芝),酶标仪(型 号 Cmax plus, Molecular 公司)、实时荧光定量 PCR 仪(型号 Light Cycler 480,美国罗氏公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 网络药理学、分子对接与分子动力学模拟

1. 华蟾酥毒基靶点与翼状胬肉疾病相关靶点预测

联合使用 Swiss Target Prediction、SEA、HERB、STITCH、SuperPred、Pharmmapper 中药成分靶点预测平台预测华蟾酥毒基的相关靶点。通过 Genecards 人类基因数据库、OMIM 数据库和 HERB 数据库获

取翼状胬肉疾病靶点进行进一步网络分析。使用 Origin 2023 学术版软件对华蟾酥毒基与翼状胬肉相关靶 点取交集。

2. 蛋白互作网络与"药物 - 靶点 - 疾病 - 信号通路"网络构建

使用 STRING 数据库对交集靶点进行蛋白质互作网络分析。使用 Cytoscape3.9.0 软件绘制 PPI 蛋白 互作网络图和"华蟾酥毒基 - 靶点 - 翼状胬肉 - 信号通路"网络图,显示出华蟾酥毒基与靶点、翼状胬 肉以及信号通路之间的复杂关系。根据 PPI 蛋白互作网络中的 Degree 值排序获取核心靶点。

3. GO 与 KEGG 富集分析

R4.2.2 软件以及微生信在线绘图平台被广泛应用于对中药与疾病交集靶点的基因本体论(GO)和京都 基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析中。通过这些分析,获取 GO 功能注释与 KEGG 信号通路,以富 集基因数为标准绘制 GO 和 KEGG 柱状分类图和气泡图。

4. 关键靶点的分子对接验证

从 PubChem 数据库下载筛选出的核心化合物的 SDF 格式结构文件;通过蛋白质结构数据库 PDB 获取 药物 - 疾病交集靶点的三维结构。将靶点蛋白及药物活性成分导入 AutoDock Tools 1.5.7,利用 Auto Dock Vina 1.2.0 软件进行分子的半柔性对接,获得有效活性成分与核心靶点对接结合自由能以及对接结果。

5. 分子动力学模拟

使用 Gromacs2022.4 软件对 MDM2 和 MTOR 蛋白与华蟾酥毒基各自的复合物进行分子动力学模拟 (MD)。选择 Amber14sb 为蛋白力场,选择 Gaff2 为配体力场,选用 TIP4P 水模型对蛋白质配体体系添加 溶剂并建立周期性边界为 1.2 nm 的水盒子,粒子网格(PME)方法被用于计算长程静电相互作用,使用蒙 特卡罗离子放置法引入适当数量钠离子和氯离子以中和整个系统的电荷。在系统能量最小化和平衡后,在没有任何约束的情况下以步长为 2 fs 的时间进行 100 ns 的分子动力学模拟,同时每 10 ps 对结构坐标 进行一次保存,利用 MM/GBSA 方法计算蛋白质与配体之间的平均结合自由能。

2.2.2. 细胞实验

1. 细胞培养

首先将手术切除的翼状胬肉组织在无菌条件下用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗, 将翼状胬肉组织切成小块,在含有 10%胎牛血清的 DMEM/F12 完全培养基中,培养皿转移至设定条件为 37℃、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中进行培养。在培养过程中,需每 2~3 天更换一次新鲜的培养基。当细胞 繁殖至合适密度时,用 0.25%的胰蛋白酶消化细胞进行传代,后续的实验操作采用第 3~5 代的 HPF 细胞。

2. 细胞鉴定

将 HPF 细胞接种于 12 孔板中, HPF 细胞密度达到 80%左右时,弃培养基且 PBS 浸洗后用 4%多聚 甲醛室温固定细胞、0.5%曲拉通 X-100 室温通透、封闭 1 h 后加入 5% BSA 稀释的山羊抗兔抗体(1:200)、 5% BSA 稀释的山羊抗兔抗体(1:200),4℃培养过夜。第二天加入用 5% BSA 稀释的 Alexa Fluor 488 标记 山羊抗鼠 IgG 二抗(1:200),避光孵育 1 h。再加入 DAPI (DAPI Staining Solution)避光孵育 10 min。最后 PBS 浸洗,调试荧光显微镜发射波长为 488 nm 时,观察蛋白的表达情况。

3. CCK8 法检测 HPF 细胞增殖情况

以 5 × 10³ 个/孔的密度将 HPF 细胞接种于 96 孔板,设置 3 个复孔。贴壁过夜,向 96 孔中加入不同 华蟾酥毒基浓度(0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μmol·L⁻¹)培养基。华蟾酥毒基处理 HPF 细胞 0 h、24 h、48 h 和 72 h 后吸除培养基,向培养孔中加入含 10% CCK8 反应液的培养基,孵育 1.5 h 后使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度。使用 GraphPad 7.0 软件计算细胞活力并筛选细胞活力为 50%的药物浓度(半数抑制浓 度)。依据半数抑制率计算高、中、低浓度组,同时设对照组(不含华蟾酥毒基)。 4. 实时荧光定量 PCR 检测各组 HPF 细胞 PCNA、m-TOR、MDM2、bax 以及 bcl-2 mRNA 表达 各组 HPF 细胞经相应浓度华蟾酥毒基处理 48 h 后按照 RNA 提取试剂盒 DNase 反转录试剂盒说明书 提取细胞总 RNA、反转录为 cDNA;按照荧光定量试剂盒说明书进行实时荧光定量 PCR 反应。使用 2-ΔΔCT 法计算目标基因的相对表达量。引物序列见表 1。

Table 1. Primer sequences 表 1. 引物序列

目的基因名称	上下游引物序列
<i>β</i> -a	ctin
For: 5'-3' AACCGCGAGAAGATGACCCAG	Rev: 5'-3' GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA
PC	NA
For: 5'-3' CGAGCACTGCCCAACAACAC	Rev: 5'-3' TGGCGGGAGGTAGACTGACC
mT	OR
For: 5'-3' ATGCTTGGAACCGGACCTG	Rev: 5'-3' TCTTGACTCATCTCTCGGAGTT
МГ	DM2
For: 5'-3' GGCAGGGGAGAGTGATACAGA	Rev: 5'-3' CAGCGGTAGGTGTCGAAGC
В	ax
For: 5'-3' CGAACTGGACAGTAACATGGAGG	Rev: 5'-3' CAGTTTGCTGGCAAAGTAGAAA
Во	:1-2
For: 5'-3' GACTTCGCCGAGATGTCCAG	Rev: 5'-3' GAACTCAAAGAAGGCCACAATCG

5. 统计学方法 采用 GraphPad Prism 9.0.0 统计软件进行分析, 计量资料以平均数 ± 标准差(x±s)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 方差不齐采用非参数检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 中药成分相关靶点、疾病相关靶点与中药疾病交集靶点获取

使用 Swiss Target Prediction、SEA、HERB、STITCH、SuperPred、Pharmmapper 数据库共获得华蟾酥毒 基中潜在活性成分相关靶点 278 个。使用 Genecards 数据库 OMIM 数据库和 HERB 数据库共得到翼状胬肉 相关靶点 616 个。经过交集分析,最终确定了 36 个与华蟾酥毒基和疾病翼状胬肉共有的靶点,如图 1 所示。





3.2. 蛋白互作网络构建与分析

使用 String 蛋白互作分析平台构建 PPI 蛋白互作网络,把 Organism 设置为 Homo sapiens,且 minimum required interaction score 设置为 0.400 大小,由此可以得到 PPI 蛋白互作网络文件如下图 2。最终得到华 蟾酥毒基治疗翼状胬肉可能涉及的 5 个核心靶点,分别为 AKT1、MTOR、BCL2、PIK3CA 和 MDM2。 各靶点的 degree 值、Closeness centrality 值以及 Betweenness centrality 值详见表 2。



 Figure 2. Key targets of cinobufagin in the treatment of pterygium

 图 2. 华蟾酥毒基治疗翼状胬肉的关键靶点

Table 2. Information related to the involved targets

 表 2. 涉及靶点相关信息

靶点	Degree	Closeness centrality	Betweenness centrality
AKT1	29	0.853659	0.109187
MTOR	28	0.813953	0.051011
BCL2	28	0.833333	0.084158
PIK3CA	28	0.813953	0.092162
MDM2	26	0.777778	0.024157
STAT3	24	0.744681	0.017257
MYC	23	0.714286	0.009657
IGF1R	23	0.729167	0.026688
MAPK1	22	0.714286	0.033546
KDR	22	0.714286	0.011483

在 Cytoscape 软件中,将筛选出的靶点作为网络节点,并根据它们之间的相互作用关系绘制连接线,最终形成了如图 3 所示的"华蟾酥毒基 - 靶点 - 翼状胬肉 - 信号通路"网络图。



Figure 3. "Cinobufagin-Target-Pterygium-Signaling Pathway" network 图 3. "华蟾酥毒基 - 靶点 - 翼状胬肉 - 信号通路"网络

3.3. 药物 - 疾病关键靶点的功能与通路的分析

按照-logP (value)大小与富集基因数多少的顺序从 GO 分析共富集到与交集靶点相关 Biological process (BP)、Cellular component (CC)和 Molecular function 中选择前十个条目绘制 GO 气泡图,如图 4。发 现 BP 与上皮细胞增殖(epithelial cell proliferation)相关性最高; CC 与膜的外源成分(extrinsic component of membrane)相关性最高; MF 与蛋白酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity)和蛋白丝氨酸激酶活性 (protein serine kinase activity)高度相关。



图 4. GO 气泡图

KEGG 分析共富集到与交集靶点取前 30 个相关信号通路绘制 KEGG 柱状分类图,如下图 5。结果显示,华蟾酥毒基治疗翼状胬肉所涉及的最核心的信号通路为 PI3K/AKT signaling pathway 信号通路。



Figure 5. KEGG bar classification chart 图 5. KEGG 柱状分类图

3.4. 分子对接

将华蟾酥毒基与翼状胬肉核心靶点蛋白:AKT1、BCL2、EGFR、IGF1R、KDR、MAPK1、MDM2、MTOR、MYC、PIK3CA和 STAT3 依次分别进行分子对接,结果见表 3。

 Table 3. Molecular docking results of cinobufagin with key targets

 表 3. 华蟾酥毒基与关键靶点对接结果

靶点	MTOR	IGF1R	MAPK1	BCL2	MDM2	STAT3	KDR	PIK3CA	AKT1	MYC
结合能/(kcal mol ⁻¹)	-9.5	-9.1	-9.0	-8.7	-8.3	-8.3	-7.8	-7.6	-6.8	-6.6



Figure 6. Binding mode of cinobufagin with the core target protein 图 6. 华蟾酥毒基与核心靶点蛋白的结合模式

本次对接结合能均小于-5 kcal·mol⁻¹,说明 AKT1、BCL2、EGFR、IGF1R、KDR、MAPK1、MDM2、 MTOR、MYC、PIK3CA 和 STAT3 蛋白与华蟾酥毒基之间均具有较好结合。其中 MDM2 与 mTOR 的结 合能低于-8.3 kcal·mol⁻¹,说明 MDM2 与 mTOR 与华蟾酥毒基之间均具有很强的结合作用,华蟾酥毒基 是很有可能对 mTOR 和 MDM2 的结构功能与生物活性产生影响。使用 PyMOL2.3.0 软件对这两组分子对 接结果进行可视化,详细对接情况如图 6 所示。

3.5. 分子动力学模拟

华蟾酥毒基及其靶点进行了 MD 模拟验证。RMSD 曲线显示, MDM2 和 MTOR 组在 10 ns 和 40 ns 后分别达到稳定状态, 波动小于 1 nm, 表明与华蟾酥毒基形成的复合物稳定性良好。RMSF 曲线进一步 确认, 华蟾酥毒基对 MDM2 和 MTOR 蛋白氨基酸残基稳定性影响甚微。回转半径 Rg 结果显示, MDM2 和 MTOR 与华蟾酥毒基复合物的 Rg 值分别稳定在 1.3 nm 和 2.7 nm 左右, 全程稳定。氢键分析显示, MDM2 与华蟾酥毒基间氢键数量少, 而 MTOR 与华蟾酥毒基间氢键数量稳定在 1~2 个, 形成更稳定结 合。SASA 曲线表明, 两者与华蟾酥毒基复合物的 SASA 值分别稳定在 60 nm²~70 nm² 和 280 nm²~300 nm², 全程波动小。再次验证了复合物的稳定性, 见图 7。



Figure 7. Interaction of cinobufagin with mTOR and MDM2 complexes 图 7. 华蟾酥毒基与 mTOR 和 MDM2 复合体的相互作用

自由能分布图(FEL)显示, MDM2 和 MTOR 蛋白与华蟾酥毒基复合物均形成单一最小能量团簇,表明复合物稳定性好,见图 8(A)。平均结合自由能分别为-30.29 和-26.81 kcal·mol⁻¹,验证了强烈结合,见

图 8(B)。MDM2 中 ILE-99、TYR-67、ILE-61 与华蟾酥毒基结合紧密,MTOR 中 GLN-2200 亦贡献显著, 见图 8(C)。氨基酸残基能量贡献与分子对接结果一致,结合位置稳定。分子动力学模拟五个时刻构象对 比显示,华蟾酥毒基与 MDM2 和 MTOR 蛋白结合位置无大变化,复合物稳定性高,见图 8(D)。



注: MDM2 (左)和 MTOR (右)。

Figure 8. A: Free energy distribution plot of the protein-cinobufagin complex. B: Average binding free energy of the protein with cinobufagin. The terms VDWAALS, EEL, EGB, ESURF, GGAS, GSOLV, and TOTAL represent van der Waals forces, electrostatic energy, polar solvation energy, non-polar solvation energy, molecular mechanics energy, solvation energy, and average binding free energy, respectively. C: Energy contributions of amino acid residues in the protein that are involved in cinobufagin binding. D: Comparison of molecular dynamics simulation results with the structure of cinobufagin at five time points. The molecular structures depicted in red, green, blue, yellow, and orange correspond to the cinobufagin small molecule structures at 0, 25, 50, 75, and 100 ns, respectively

图 8. A: 蛋白与华蟾酥毒基的复合物的自由能分布图。B: 蛋白与华蟾酥毒基的平均结合自由能。VDWAALS、EEL、 EGB、ESURF、GGAS、GSOLV、TOTAL分别代表范德华力、静电能、极性溶剂化能、非极性溶剂化能、分子力学 项、溶剂化能项和平均结合自由能。C: 蛋白中参与华蟾酥毒基结合的氨基酸残基能量贡献。D: 分子动力学模拟结 果与华蟾酥毒基五个时刻的结构对比图中红绿蓝黄橙分子结构分别对应 0, 25, 50, 75, 100 ns 五个时刻的华蟾酥毒基 小分子结构

3.6. HPF 细胞的培养、鉴定

在组织碎块培养的第3至第5天,长梭形细胞开始从组织块的边缘迁出。到第3代时,细胞呈现出 形态一致的长梭形。通过免疫荧光染色分析,细胞显示出波形蛋白的阳性表达(见图9(A)),而广谱细胞角 蛋白则为阴性表达(见图9(B))。结合组织来源、细胞形态观察结果以及免疫荧光染色结果,确认本研究中 培养的细胞为 HPF 细胞。



Figure 9. Identification results of human pterygium fibroblast cells 图 9. HPF 细胞的鉴定结果

3.7. 华蟾酥毒基对 HPF 细胞增殖的影响

与对照组相比,华蟾酥毒基在浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 μmol·L⁻¹时,作用 48 h 和 72 h 均能显 著抑制 HPF 细胞的增殖(P < 0.05)。然而,在作用 24 h 时,除 0.05 μmol·L⁻¹浓度外,其他浓度均表现出统 计学显著性差异(见图 10)。在后续实验中,将浓度分为低、中、高三个水平(分别为 0.1 μmol·L⁻¹、0.2 μmol·L⁻¹、 0.4 μmol·L⁻¹),作用时间设定为 48 h,并设立不含华蟾酥毒基的对照组。





3.8. 华蟾酥毒基对 PCNA、mTOR 和 MDM2 mRNA 表达的抑制作用及其对 HPF 细胞增殖的 影响

与对照组相比, 0.1 μmol·L⁻¹华蟾酥毒基处理组的 mTOR mRNA 表达差异无统计学意义(P > 0.05)。 然而,在 0.4 μmol·L⁻¹华蟾酥毒基处理组中,PCNA、mTOR、MDM2 和 BCI-2 mRNA 的表达显著下调, 同时 Bax mRNA 的表达显著上调(P < 0.05)。因此我们推测,华蟾酥毒基对细胞增殖的抑制作用可能与其 对 mTOR 和 MDM2 mRNA 表达的下调有关(见图 11)。



Figure 11. Cinobufagin downregulates the expression levels of PCNA, mTOR, MDM2, and Bcl-2 while upregulating the expression of Bax ($\bar{x} \pm s$, n = 3)

图 11. 华蟾酥毒基下调 PCNA、mTOR、MDM2、Bcl-2 并上调 Bax 的表达水平(x ± s, n = 3)

4. 讨论

翼状胬肉是一种常见的眼表疾病,通常发生在眼球的鼻侧。普遍认为,紫外线辐射、炎症反应以及 上皮 - 间质细胞转化等因素可能是其发病的主要原因[11][12]。目前,翼状胬肉的治疗通常采用翼状胬肉 切除术结合结膜瓣移植术。然而,该方法的复发率较高,并可能引发多种并发症。因此,开发新的、有效 的翼状胬肉治疗方法至关重要。在中医药领域治疗增殖性疾病方面具有独特的优势,常被单独或联合应 用于此类疾病的治疗。华蟾酥毒基是一种从蟾酥中提取的高活性单体成分,近年来的研究表明其在多种 增殖性疾病中具有显著的抗增殖作用。例如,在肝癌细胞中,华蟾酥毒基通过抑制 PI3K-AKT-mTOR 信 号通路来抑制细胞增殖[13],或通过抑制 AURKA-mTOR-eIF4E 轴发挥抗肿瘤作用[14]。在结直肠癌细胞 中,它不仅有效抑制细胞增殖[15],还抑制新生血管的形成[16]。此外,华蟾酥毒基在鼻咽癌中显著降低 了癌细胞的迁移、侵袭和转移能力[17],并在改善脂多糖诱导的急性肺损伤方面表现出潜力[18]。在眼科 的病例报道中,华蟾酥毒基能够抑制葡萄膜黑色素瘤细胞的活性并诱导其凋亡[19]。翼状胬肉作为一种具 有肿瘤样特征的增殖性疾病,其病理变化与肿瘤相似[20][21]。然而,目前尚无关于华蟾酥毒基在翼状胬 肉中的研究报道,其作用的关键成分和作用机制仍有待进一步阐明。

本研究通过实验首次验证了华蟾酥毒基对 HPF 细胞的生物学效应。首先,利用 CCK-8 细胞活性测定,确认了华蟾酥毒基对 HPF 细胞活力的显著抑制作用。通过 RT-qPCR 分析,作者观察到随着药物浓度的增加,PCNA 的 mRNA 含量呈下降趋势,Bcl-2 的 mRNA 含量表达呈下降趋势,而 Bax 的 mRNA 含

量则显著上升。这些数据表明,华蟾酥毒基能够有效抑制 PCNA 和 Bcl-2 的表达。PCNA 作为细胞增殖 的标志物,其表达的剂量依赖性下调可能暗示细胞生长途径受到抑制; Bcl-2 的持续降低则表明凋亡过程 被促进,细胞存活信号受到抑制; 而促凋亡基因 Bax 的显著上调进一步表明凋亡途径被强烈激活,增强 了 Bax 的促凋亡作用。以上细胞实验结果表明,华蟾酥毒基能够有效抑制 HPF 细胞的增殖,且使凋亡基 因表达升高,抗凋亡基因表达下降。这一发现为华蟾酥毒基在翼状胬肉治疗中的潜在应用提供了新的视 角。

结合网络药理学,明确华蟾酥毒基抑制翼状胬肉中的核心靶点,本研究利用 TCMSP 数据库进行了 潜在作用靶点的 PPI 网络分析,最终确定了五个关键靶点:AKT1、mTOR、BCL2、PIK3CA 和 MDM2, 这些核心靶点可能是华蟾酥毒基治疗翼状胬肉的重要治疗靶点。这些核心靶点与翼状胬肉的增殖、凋亡 和迁移等过程密切相关。其中,mTOR 作为华蟾酥毒基抗翼状胬肉的最重要靶点之一,它与翼状胬肉的 发生和发展密切相关,并能够调控 HPF 细胞的增殖和纤维化[12]。MDM2 作为一种 E3 连接酶,其在翼 状胬肉中的水平显著高于正常结膜[20]。MDM2 能够泛素化 p53 蛋白,导致其被蛋白酶体降解,从而维 持 p53 蛋白在较低水平[21]。MDM2 和 mTOR 都是细胞增殖的重要调节因子,值得注意的是,它们在肿 瘤及其他增殖性疾病中也被广泛研究。通过 KEGG 富集分析,确定了 PI3K/Akt 信号通路及其下游潜在靶 点的相关性最为显著。分子对接结果显示,华蟾酥毒基能够与 mTOR 和 MDM2 紧密结合。RT-qPCR 结 果分析,华蟾酥毒基干预 HPF 细胞后,mTOR 和 MDM2 的 mRNA 含量表达则显著上升。这与分子对接 和分子动力学模拟结果相符。表明显示出该方法在药物靶向预测方面的巨大潜力。然而,本研究在深入 机制探索方面存在一定的局限性。我们计划在未来的研究中,通过更精细的实验设计和更深入的机制分 析,来弥补当前的不足,以期在翼状胬肉药物研发领域取得更具突破性的进展。

综上所述,本研究首次通过体外实验验证了华蟾酥毒基对 HPF 细胞的生物学效应及其相关靶点。研究结果表明,华蟾酥毒基能够抑制 HPF 细胞的增殖,上调 Bax 基因表达,并下调 Bcl-2、mTOR 和 MDM2 的基因表达,从而抑制翼状胬肉的生长。通过网络药理学筛选,进一步确认了其相关靶点,并利用分子动力学模拟验证了华蟾酥毒基与 mTOR 和 MDM2 复合物之间的高结合亲和性和结构稳定性。这些研究发现为翼状胬肉的药物治疗提供了重要的参考和借鉴。

基金项目

国家自然科学基金(82060171); 2024年石河子大学第一附属医院院级课题(LC2023020)。

参考文献

- Zaidi, S.B.H. and Ali Khan, W. (2021) Is Pterygium Morphology Related to Loss of Corneal Endothelial Cells? A Cross-Sectional Study. *Clinical Ophthalmology*, 15, 1259-1266. <u>https://doi.org/10.2147/opth.s296531</u>
- [2] Liu, L., Wu, J., Geng, J., Yuan, Z. and Huang, D. (2013) Geographical Prevalence and Risk Factors for Pterygium: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BMJ Open*, 3, e003787. <u>https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003787</u>
- [3] Rokohl, A.C., Heindl, L.M. and Cursiefen, C. (2021) Pterygium: Pathogenese, Diagnose und Therapie. Der Ophthalmologe, 118, 749-763. <u>https://doi.org/10.1007/s00347-021-01366-9</u>
- [4] Martins, T.G., Costa, A.L., Alves, M.R., *et al.* (2016) Mitomycin C in Pterygium Treatment. *International Journal of Ophthalmology*, **9**, 465-468.
- [5] Wang, G., Dong, N., Wang, Y., Li, J., Dong, F., Jeyalatha, V., et al. (2018) Epithelial Dysplasia in Pterygium Postoperative Granuloma. *Experimental Eye Research*, 175, 199-206. <u>https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.08.014</u>
- [6] Zada, M., Pattamatta, U. and White, A. (2018) Modulation of Fibroblasts in Conjunctival Wound Healing. *Ophthalmology*, 125, 179-192. <u>https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2017.08.028</u>
- [7] Baheran, S.S., Alany, R.G., Schwikkard, S., Muen, W., Salman, L.N., Freestone, N., et al. (2023) Pharmacological

Treatment Strategies of Pterygium: Drugs, Biologics, and Novel Natural Products. *Drug Discovery Today*, **28**, Article 103416. <u>https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103416</u>

- [8] 李月明, 李苑碧, 吴虎强, 等. 翼状胬肉术后配合中药治疗的研究进展[J]. 光明中医, 2021, 36(15): 2639-2641.
- [9] Dai, C., Zhang, R., An, P., Deng, Y., Rahman, K. and Zhang, H. (2023) Cinobufagin: A Promising Therapeutic Agent for Cancer. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 75, 1141-1153. <u>https://doi.org/10.1093/jpp/rgad059</u>
- [10] 赵俊生. 华蟾素注射液在眼科的应用[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(10): 2017-2018.
- [11] 赵新荣. mTOR/p70S6K 信号通路在翼状胬肉成纤维细胞增殖和转分化中的作用研究[D]: [博士学位论文]. 武汉: 华中科技大学, 2018.
- [12] Liu, W., Lin, T. and Gong, L. (2023) ZD6474 Attenuates Fibrosis and Inhibits Neovascularization in Human Pterygium by Suppressing AKT-mTOR Signaling Pathway. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, **39**, 128-138. <u>https://doi.org/10.1089/jop.2022.0127</u>
- [13] Xu, Z., Bao, J., Jin, X., Li, H., Fan, K., Wu, Z., et al. (2023) The Effects of Cinobufagin on Hepatocellular Carcinoma Cells Enhanced by MRT68921, an Autophagy Inhibitor. *The American Journal of Chinese Medicine*, 51, 1595-1611. <u>https://doi.org/10.1142/s0192415x23500726</u>
- [14] Jin, X., Wang, J., Zou, S., Xu, R., Cao, J., Zhang, Y., et al. (2020) Cinobufagin Triggers Defects in Spindle Formation and Cap-Dependent Translation in Liver Cancer Cells by Inhibiting the AURKA-mTOR-eIF4E Axis. The American Journal of Chinese Medicine, 48, 651-678. <u>https://doi.org/10.1142/s0192415x20500330</u>
- [15] Lu, X., Qiao, Y., Li, Y., Yang, B., Chen, M. and Xing, C. (2017) Preclinical Study of Cinobufagin as a Promising Anti-Colorectal Cancer Agent. Oncotarget, 8, 988-998. <u>https://doi.org/10.18632/oncotarget.13519</u>
- [16] Hirasaki, Y., Okabe, A., Fukuyo, M., Rahmutulla, B., Mano, Y., Seki, M., et al. (2022) Cinobufagin Inhibits Proliferation of Acute Myeloid Leukaemia Cells by Repressing C-Myc Pathway-Associated Genes. *Chemico-Biological Interactions*, 360, Article 109936. <u>https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109936</u>
- [17] Li, X., Chen, C., Dai, Y., Huang, C., Han, Q., Jing, L., et al. (2019) Cinobufagin Suppresses Colorectal Cancer Angiogenesis by Disrupting the Endothelial Mammalian Target of Rapamycin/Hypoxia-Inducible Factor 1α Axis. Cancer Science, 110, 1724-1734. <u>https://doi.org/10.1111/cas.13988</u>
- [18] Wang, C., Mei, X., Wu, Y., Yang, Y. and Zeng, Z. (2022) Cinobufagin Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Regulating Autophagy through Activation of the P53/mTOR Pathway. *Frontiers in Pharmacology*, 13, Article 994625. <u>https://doi.org/10.3389/fphar.2022.994625</u>
- [19] Zhang, L., Huang, X., Guo, T., Wang, H., Fan, H. and Fang, L. (2020) Study of Cinobufagin as a Promising Anticancer Agent in Uveal Melanoma through Intrinsic Apoptosis Pathway. *Frontiers in Oncology*, 10, Article 325. <u>https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00325</u>
- [20] Arish, M., Kordi-Tamandani, D.M., Sangterash, M.H. and Poyandeh, R. (2016) Assessment of Promoter Hypermethylation and Expression Profile of *P14^{ARF}* and *MDM2* Genes in Patients with Pterygium. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, **42**, e4-e7. https://doi.org/10.1097/icl.00000000000126
- [21] Cao, D., Ng, T.K., Yip, Y.W.Y., Young, A.L., Pang, C.P., Chu, W.K., et al. (2018) P53 Inhibition by MDM2 in Human Pterygium. Experimental Eye Research, 175, 142-147. <u>https://doi.org/10.1016/j.exer.2018.06.021</u>