

文章编号 1006-8147(2019)01-0024-04

论 著

基于网络药理学预测当归贝母苦参丸治疗前列腺癌作用靶点及细胞内信号转导通路

胡 杨, 吴雄志

(天津医科大学肿瘤医院中医科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 天津市“肿瘤防治”重点实验室, 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心, 天津 300060)

摘要 目的: 通过网络药理学方法预测分析当归贝母苦参丸治疗前列腺癌的潜在机制。方法: 通过 TCMSPP 数据库检索中药的化学成分和作用靶点, 并于 UniProtKB 网络平台获取每种靶蛋白的基因名。借助 CTD 等数据库查询疾病靶点。在 STRING 数据库中构建蛋白-蛋白互作网络(PPI), 于 Cytoscape 中进行网络可视化分析。通过 DAVID 数据平台对关键靶蛋白进行分析。结果: 从 TCMSPP 数据库中筛选得到 26 个药物有效成分。PPI 网络包括 135 个药物疾病交集靶基因, 关键蛋白为 34 个。基因本体论(GO)分析这些靶基因涉及生物功能条目最多, 共 290 个。京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路主要涉及肿瘤信号通路等。结论: 当归贝母苦参丸治疗前列腺癌是多靶点、多通路协同作用的结果, 能够通过抑制细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制迁移以及抑制肿瘤血管生成等多方面发挥其抗肿瘤作用。

关键词 当归贝母苦参丸; 前列腺癌; 网络药理学; 富集分析; 信号通路

中图分类号 R96

文献标志码 A

Predicting the target and intracellular signal transduction pathway of angelica fritillariakushenpill in prostate cancer by a network pharmacology approach

HU Yang, WU Xiong-zhi

(Department of Traditional Chinese Medicine, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin 300060, China)

Abstract **Objective:** To predict and analyze the potential mechanism of angelica fritillariakushenpill in the treatment for prostate cancer by network pharmacology. **Methods:** The TCMSPP database was used to search for the chemical components and targets of traditional Chinese medicine, and the gene name of each target protein was obtained on the UniProtKB web platform. CTD and other databases were used to query disease targets. The protein-protein interaction (PPI) was constructed in the STRING database, and the network was visualized in Cytoscape. Key target proteins were analyzed by the DAVID data platform. **Results:** Twenty-six active pharmaceutical ingredients were screened from the TCMSPP database. The PPI network included 135 drug-disease target gene intersections, with 34 key proteins. Gene ontology (GO) analysis of these target genes involved the largest number of biological function items, a total of 290. The Kyoto encyclopedia of genes and Genomes (KEGG) pathway mainly involved tumor signaling pathways. **Conclusion:** Angelica fritillariakushenpill may have a multi-target and multi-pathway synergistic effect on the treatment of prostate cancer. It can enhance its anti-tumor effects by inhibiting cell proliferation, promoting apoptosis, inhibiting migration, and inhibiting tumor angiogenesis and so on.

Key words angelica fritillariakushenpill; prostate cancer; network pharmacology; enrichment analysis; signaling pathway

前列腺癌是男性疾病和死亡的主要原因, 每年约有 160 万男性被诊断出患有前列腺癌^[1]。在过去的几十年中, 已经提出了许多针对前列腺癌的治疗策略, 例如雄激素阻断治疗、手术和放疗等^[2]。然而, 由于传统疗法的不良反应以及高昂的费用使得一部分病人最终不得不中断治疗^[3]。中药复方能够增加肿瘤患者对化疗药物的敏感性、减少常规化疗的副作用, 提高生活质量^[4]。因此, 对于中药复方治疗

肿瘤的探索逐渐引起人们更多的关注。近年来关于当归贝母苦参丸治疗肿瘤的报道不断增多, 但其作用于前列腺癌的药理机制鲜有报道。此外, 由于中药复方涉及多成分多靶点的特征, 传统的研究方法很难系统的阐明其整体作用特点。网络药理学的出现为研究中药复方提供了新的方向^[5], 其通过系统的理念研究药物、靶点和疾病之间的关系, 以可视化方式展示药物靶点网络, 并从整体角度研究药物对生物网络的影响。本研究借助中药数据库, 疾病数据库等工具, 结合网络药理学研究方法, 对当归贝母苦参丸治疗前列腺癌的机制进行整体预测和

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81473441)

作者简介 胡杨(1993-), 女, 硕士在读, 研究方向: 抗癌中草药临床及基础研究; 通信作者: 吴雄志, E-mail: wuxiongzi@163.com。

分析,进一步阐明该复方可能的药理作用。

1 材料与方法

1.1 当归贝母苦参丸活性成分及靶点筛选 本研究通过 TCMSp 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmspsearch.php>) 查询该复方的活性成分,其中当归 125 种,浙贝母 17 种,苦参 113 种。由于生物实验耗时且成本高的缺点,利用计算机模拟工具鉴定药物的毒药物动力学 (absorption, distribution, metabolism and excretion, ADME) 性质现已成为药物研究中重要方法之一。在本研究中,口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 的化合物被选择用于后续研究。随后从 TCMSp 数据库中获取每种活性成分的靶蛋白,通过 UniProtKB 网络平台 (<http://www.uniprot.org>) 获取每种靶蛋白的基因名。

1.2 前列腺癌疾病靶点的获取 本研究主要通过数据库检索以及文献查询的方式确定前列腺癌靶点,前者包括 CTD (<http://ctdbase.org/>) 数据库与 TTD (<https://db.idrblab.org/ttd/>) 数据库,后者主要通过 Pubmed、万方、知网等文献检索网站中查询。在 CTD 数据库中选择相关分数为 50 分以上的靶点共 908 个,在 TTD 数据库中选择 74 个靶点,在中英文文献查询中选取 412 个靶点,剔除重复项后共获取 1 203 个靶点。

1.3 药物成分-靶点网络构建与分析 为了阐明当归贝母苦参丸复方本身的药物作用机制,本研究首先通过 Cytoscape 3.2.1 (<http://www.cytoscape.org/>) 网络分析软件构建该复方的成分-靶点网络图。将前期整理好的当归、浙贝母、苦参的化学成分以及所对应的靶点以 Excel 表格形式导入 Cytoscape 中,并对所得网络中的每个节点及每个节点间的相互作用关系进行分析。Cytoscape 是分子交互网络数据大规模集成的通用开放码源软件。分子和分子相互作用的动态状态被视为节点和边的属性,其核心功能是使网络布局和数据属性过度到可视显示属性的映射^[6]。

1.4 交集靶点 PPI 网络构建与分析 为了阐明靶点蛋白在生物网络系统水平的作用,在获取当归贝母苦参丸作用靶点和前列腺癌的疾病靶点后,取二者的交集靶点,导入 STRING 10.5 (<https://string-db.org/>) 在线数据平台,构建 PPI 网络,并进一步通过 Cytoscape 软件进行可视化处理。STRING 是一种包含已知和预测蛋白相互作用的数据库,对每一个蛋白相互作用都会进行分值评估,所评估分值越高说明蛋白之间相互作用的置信度越高^[7]。通过输入交集靶点的基因名称,选择物种为人类,选取评分 ≥ 0.9 的蛋白相互作用关系,导入 Cytoscape 进行分析。

1.5 基因本体论 (GO) 分析与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 为了更好地说明药物与疾病交集靶点在基因功能和信号通路中的作用,我们采用 DAVID 6.7 数据平台 (<https://david.ncicrf.gov/>) 对 PPI 网络中的蛋白进行 GO 富集分析与 KEGG 富集分析。DAVID 生物信息学数据库能够通过一些常用的统计学方法如超几何分布定量 (P 值) 等评估蛋白质生物学功能的显著性,旨在系统地大型基因/蛋白质列表中提取生物学含义^[8]。

2 结果

2.1 当归贝母苦参丸成分-靶点网络分析 通过 TCMSp 数据库中筛选出的当归贝母苦参丸中有效成分共有 255 个,经过 OB 值和 DL 值评估后得到 27 个有效成分,其中苦参中得到 20 个,浙贝母中 5 个,当归中 2 个,剔除一个重复项后最终得到 26 个有效成分,表 1 列出了度值大于中位数的有效成分信息。将 26 个有效成分以及其对应的 246 个靶点导入 Cytoscape 中进行可视化处理。如图 1 所示,该成分-靶点网络中共包括 272 节点和 544 条边。橙色圆形节点代表药物成分的 Mlo ID,蓝色菱形节点代表靶点。边代表节点之间的相互作用,每个节点的度值代表网络中与节点相连的边的数目,节点的尺寸与它们的度值成正比。随后通过评估网络集中度以及网络异构性对该成分靶点网络进行分析,其集中度和异构性分别为 0.543 和 2.691,说明该成分-靶点网络空间更偏向于一些成分和靶点。通过度值筛选出网络中关联度较高的节点。其中度值较高的成分节点有槲皮素 (MOL000098),木犀草素 (MOL000006),芒柄花黄素 (MOL000392) 等,意味着这些成分作用靶点多且相互作用较强。其中度值较高的靶点包括前列腺素 G/H 合成酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2)、热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP 90)、雄激素受体 (androgen receptor, AR) 等,均与前列腺肿瘤的发生发展密切相关。

2.2 药物疾病交集靶点的 PPI 网络分析 通过前期数据挖掘与分子对接,将获得的药物与疾病交集靶点输入 STRING 数据库进行分析后,取评分 ≥ 0.9 的蛋白互作关系数据导入 Cytoscape 进行进一步分析。如图 2 所示,该 PPI 网络共有 135 个节点,节点之前的相互作用关系多达 3 066 种。通过 CytoHubba 插件中的 Degree、MCC、EPC 等算法对网络中的每个节点进行分析,取每种算法排名前 10 的靶点综合后得到 34 个关键基因 (图 3)。进一步通过 STRING 进行关键靶点的蛋白关系分析,其中度值最高的为

TP53,其次为 JUN 和 PTGS2 等。所有的关键基因都在前列腺癌的发生发展过程中扮演重要角色。

表 1 有效成分基本信息(度>14)

Tab 1 Basic information of active ingredients (Degree>14)

MOL ID	成分名称	OB 值/%	DL 值
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
MOL000006	木犀草素	36.16	0.25
MOL000392	芒柄花黄素	69.67	0.21
MOL000358	β -谷甾醇	36.91	0.75
MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76
MOL003542	8-异戊烯基-山奈酚	38.04	0.39
MOL000456	菜豆素	78.2	0.73
MOL003673	5,7,4'-三羟基-6-异戊烯基异黄酮	42.8	0.36
MOL003648	山槐素	75.18	0.54
MOL006596	大豆抗毒素	97.27	0.76
MOL001484	高丽槐素	75.18	0.54

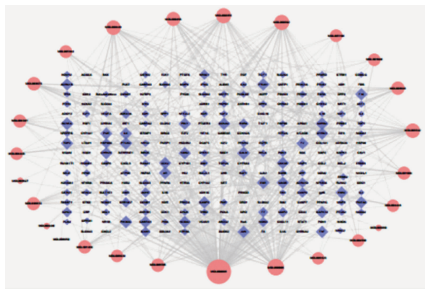


图 1 成分-靶点网络图

Fig 1 Component-target network

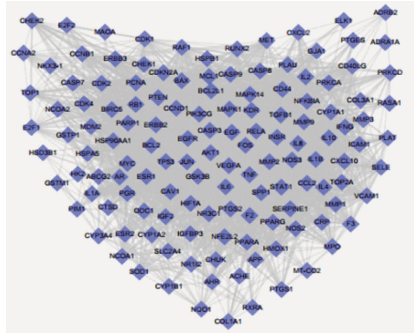


图 2 交集靶点网络互作图

Fig 2 PPI Network of intersection targets

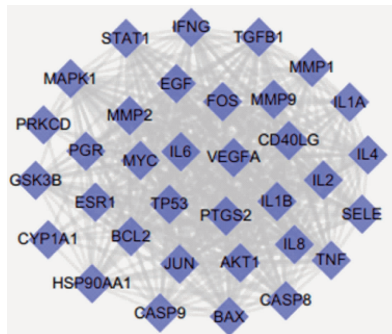


图 3 关键靶点网络互作图

Fig 3 PPI Network of key targets

2.3 当归贝母苦参丸治疗前列腺癌的机制分析 通过 DAVID 数据分析平台对以上 PPI 网络中的 135 个药物疾病交集靶点进行 GO 富集分析以及 KEGG 富集分析,研究当归贝母苦参丸治疗前列腺癌的可

能机制。在 GO 分析过程中,根据错误发现率(false discovery rate,FDR)共确定了 350 个条目(FDR<0.05),其中生物功能所占比例最多,共 290 个。表 2 列出了交集靶基因排名前 10 的生物功能条目,主要涉及细胞增殖调控,细胞凋亡调控等方面。在通路富集分析中,共得到 60 条 KEGG 富集通路,其中 FDR 值<0.05 的共有 20 条。如图 4 所示,主要包括肿瘤信号通路、前列腺癌信号通路、P53 信号通路等。根据以上分析结果,将药物有效成分的作用靶点嵌入前列腺癌发生相关的经典信号通路中,如图 5 所示,有效成分所作用的靶点用红色字体标出,该复方能通过多种靶点发挥其抗肿瘤作用。

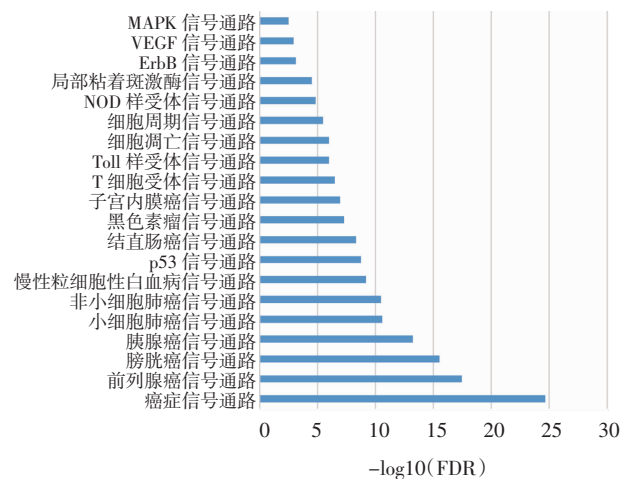


图 4 交集靶点京都基因与基因组百科全书通路富集分析结果

Fig 4 KEGG pathway enrichment analysis of intersection targets

表 2 交集靶点基因本体论生物功能分析结果

Tab 2 GO biological function analysis of intersection targets

GO ID	名称	FDR
0042127	细胞增殖调控	5.55×10^{-39}
0042981	细胞凋亡调控	4.43×10^{-36}
0043067	细胞程序性死亡调控	7.92×10^{-36}
0010941	细胞死亡调控	9.83×10^{-36}
0010033	对有机物的反应	9.18×10^{-31}
0043066	细胞凋亡负调控	2.37×10^{-28}
0043069	细胞程序性死亡负调控	4.14×10^{-28}
0060548	细胞死亡负调控	4.62×10^{-28}
0010604	高分子代谢过程的正调控	6.32×10^{-24}
0051726	细胞周期调控	4.02×10^{-22}

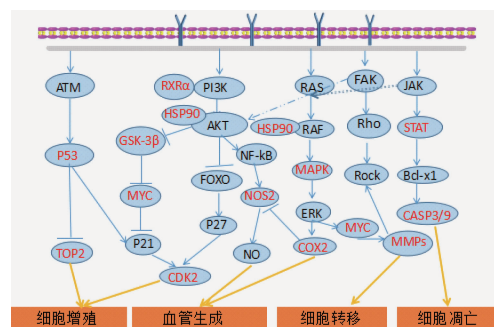


图 5 成分-靶点信号通路图

Fig 5 Component-target signaling pathway map

3 讨论

当归贝母苦参丸具有清热解毒,软坚散结功效,该复方中的有效成分如槲皮素、多种贝母皂苷、当归多糖等均具有一定的抗肿瘤作用^[9],关于当归贝母苦参丸治疗前列腺疾病早前已有许多文献记载^[10]。本研究发现该复方成分-靶点网络中的关键成分包括槲皮素和木犀草素等,其度值远远高于其他成分。槲皮素是一种广泛分布于植物界的抗氧化类黄酮物质,其有效的抗诱变和抗增殖作用已在动物体内和体外研究中得到证明^[11],例如,Sun等^[12]发现槲皮素与二甲双胍联用能够通过阻断磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)信号通路而起到协同抑制前列腺癌的作用。同样的,木犀草素作为一种具有生物活性的黄酮类物质,也具有抗炎、抗过敏和抗癌等多种生物学作用。在前列腺癌中,Zhou等^[13]发现木犀草素能够通过抑制E钙黏蛋白(E-cadherin)而抑制前列腺癌PC3细胞的侵袭能力。此外,该成分-靶点网络中的关键靶点主要有HSP90和PTGS2等。HSP90是一种重要的分子伴侣,抑制HSP90将使其效应蛋白无法维持自身的稳定结构以及正常功能,从而阻断前列腺癌信号通路中的多个靶点,有效的发挥其抗肿瘤作用^[14]。PTGS2(又称COX-2)水平在肿瘤的早期增生到发生转移的过程中不断上调,能够促进前列腺癌细胞增殖,抑制其凋亡,促进肿瘤血管生成等^[15-16]。因此,抑制PTGS2的表达在抑制前列腺癌的过程中具有重要作用。随后,笔者进一步筛选出当归贝母苦参丸治疗前列腺癌的关键基因。通过DAVID数据库提炼出当归贝母苦参丸治疗前列腺癌的主要功能,这些GO条目中所涉及的细胞凋亡的调控功能,细胞增殖的调控功能以及细胞周期的调控功能等在前列腺癌的发生发展中均具有重要作用。结合KEGG富集通路分析,在笔者绘制的信号通路图中可以看出,当归贝母苦参丸能够通过阻断PI3K信号传导途径抑制细胞的增殖,阻断丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路进而抑制肿瘤血管的生成。此外,其抗肿瘤机制还可以通过抑制基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)来抑制肿瘤的转移而实现。以上分析充分体现了中药复方当归贝母苦参丸治疗前列腺癌多靶点的网络模式,复方中具有多靶点的成分可以通过多种途径作用于疾病的各个方面,并且产生相互协同效应。通过网络药理学方法能够清晰的阐明每种成分的重要性,为日后研究更为有效的抗肿瘤药物提供了一定的理论基础。此

外,网络药理学作为一种新兴的研究方法仍存在一些不足之处,如根据DL值筛选出的草药成分可能与草药中的确切成分有所出入,预测目标的准确性或会受到预测工具的影响等。因此,在今后的研究工作中应对草药成分进行更加全面的分析,同时尽可能采用多种预测工具对预测结果进行综合分析,并通过实验对预测出的靶点进行验证。

参考文献:

- [1] Pernar C H, Ebot E M, Wilson K M, et al. The Epidemiology of Prostate Cancer[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2018, a030361
- [2] Cornford P, Bellmunt J, Bolla M, et al. EAU-ESTRO-SIOG guidelines on prostate cancer. part II: treatment of relapsing, metastatic, and Castration-Resistant prostate cancer[J]. Eur Urol, 2017,71(4):630
- [3] Sun S, Gong F, Liu P, et al. Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Gene, 2018,664:50
- [4] Liang W, Yew D T, Hon K L, et al. The indispensable value of clinical trials in the modernization of traditional Chinese medicine: 12 years' experience at CUHK and future perspectives[J]. Amer J Chin Med, 2014,42(3):587
- [5] Tang H Q, He S B, Zhang X Y, et al. A network pharmacology approach to uncover the pharmacological mechanism of XuanHuSuo powder on osteoarthritis[J]. Evidence-Based Compl Alternative Med, 2016,2016(2):3246946
- [6] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003,13(11):2498
- [7] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of Life[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(Database issue):D447
- [8] Huang D W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using David bioinformatics resources[J]. Nat Protoc, 2009,4(1):44
- [9] 闫德祺. 当归贝母苦参丸活性成分的抗癌作用及机制研究进展[J]. 中外医学研究, 2013,11(29):151
- [10] 孙桂云,潘利忠. 当归贝母苦参丸治疗前列腺病举隅[J]. 浙江中医杂志, 2007,42(2):87
- [11] Murakami A, Ashida H, Terao J. Multitargeted cancer prevention by quercetin[J]. Cancer Lett, 2008,269(2):315
- [12] Sun S, Gong F, Liu P, et al. Metformin combined with quercetin synergistically repressed prostate cancer cells via inhibition of VEGF/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Gene, 2018,664:50
- [13] Zhou Q, Yan B, Hu X W, et al. Luteolin inhibits invasion of prostate cancer PC3 cells through E-cadherin[J]. Mol Cancer Ther, 2009,8(6):1684
- [14] Solit D B, Scher H I, Rosen N. Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer[J]. Semin Oncol, 2003,30(5):709
- [15] Gallego G A, Prado S D, Fonseca P, et al. Cyclooxygenase-2(COX-2): a molecular target in prostate cancer[J]. Clin Transl Oncol, 2007, 9(11):694
- [16] Cheng I, Liu X, Plummer S J, et al. COX2 genetic variation, NSAIDs, and advanced prostate cancer risk[J]. Br J Cancer, 2007,97(4):557

(2018-05-09 收稿)