

基于网络药理学探讨北豆根-白附子配伍治疗非小细胞肺癌的作用机制[△]

孙长河^{1*}, 杨国旺^{2#} (1. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科, 北京 100010)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)04-0385-07

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.04.001

摘 要 目的: 基于网络药理学方法探讨北豆根-白附子配伍治疗非小细胞肺癌的作用靶点及机制。方法: 运用中药系统药理学数据库与分析平台筛选北豆根及白附子有效成分, 运用 Swiss Target Prediction 平台及 PharmMapper 平台获取化合物靶点; 运用人类孟德尔遗传综合数据库 (online mendelian inheritance in man, OMIM) 筛选非小细胞肺癌的疾病基因网络, 进而构建药物-成分化合物-靶点-疾病的网络图, 并进行蛋白质网络互作、基因本体 (gene ontology, GO) 功能富集分析及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析等。结果: 选择生物利用度 $\geq 30\%$ 且类药性 ≥ 0.18 作为北豆根-白附子的有效成分筛选调条件, 共获得 13 种化合物, 对每种化合物的前 50 种潜在靶点蛋白基因进行分析, 获得 363 个人类基因靶点; 通过对药物-成分化合物-靶点-疾病的互作网络进行分析, 其中在非小细胞肺癌相关基因上的靶点为 101 个。GO 分析共包含 276 条富集结果, KEGG 数据库中 26 条通路与非小细胞肺癌相关, 显示北豆根-白附子配伍具有广谱抗肿瘤特性, 提示其可能在表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂耐药、血管生成、免疫逃逸、细胞凋亡和调节肿瘤碳代谢等方面发挥治疗非小细胞肺癌的作用。结论: 基于网络药理学方法分析北豆根-白附子配伍治疗非小细胞肺癌的潜在有效成分及潜在作用靶点, 可为后续进一步研究北豆根-白附子配伍的作用机制提供理论指导及预测。

关键词 北豆根; 白附子; 网络药理学; 非小细胞肺癌; 作用机制

Mechanism of Menisperm Rhizoma and Typhonii Rhizoma in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer Based on Network Pharmacology[△]

SUN Changhe¹, YANG Guowang² (1. College of Graduate Students, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Dept. of Oncology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the target and mechanism of Menisperm Rhizoma and Typhonii Rhizoma in the treatment of non-small cell lung cancer based on network pharmacology. **METHODS:** Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform were used to screen the effective components of Menisperm Rhizoma and Typhonii Rhizoma, Swiss Target Prediction and PharmMapper were used to obtain compound targets. Online mendelian inheritance in man (OMIM) database was used to screen disease gene network of non-small cell lung cancer, the network diagram of drug-component-target-disease was constructed, and protein network interaction, gene ontology (GO) function analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway analysis were carried out. **RESULTS:** The bioavailability $\geq 30\%$ and drug like ≥ 0.18 were selected as the screening conditions of effective components from menisperm rhizoma and typhonii rhizoma. A total of 13 compounds were obtained, and 363 human gene targets were obtained by analyzing the first 50 potential target protein genes of each compound. Through the analysis of the drug-component-target-disease interaction network, totally 101 targets on non-small cell lung cancer related genes were obtained. A total of 276 enrichment results were included in GO analysis, and 26 pathways in KEGG database were associated with non-small cell lung cancer. These results indicated that the combination of Menisperm Rhizoma and Typhonii Rhizoma has broad-spectrum anti-tumor properties, suggesting that they may play a role of treating with non-small cell lung cancer in the aspects of EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance, angiogenesis, immune escape, apoptosis and regulation of tumor carbon metabolism. **CONCLUSIONS:** Based on the method of network pharmacology, the potential active components and potential targets of Menisperm Rhizoma and Typhonii Rhizoma in the prevention and

[△] 基金项目: 国家重点研发计划项目 (No. 2018YFC1705101)

* 硕士研究生。研究方向: 中西医结合临床方向。E-mail: 2579159653@qq.com

通信作者: 主任医师, 教授。研究方向: 中西医结合肿瘤方向。E-mail: guowangyang@sina.com

KEYWORDS Menispermii rhizoma; Typhonii rhizoma; Network pharmacology; Non-small cell lung cancer; Mechanism

表 1 北豆根、白附子中筛选的潜在有效成分及其 PubChem 主要信息

Tab 1 Potential active components and its PubChem information in menisperm rhizoma and typhonii rhizoma

分子 ID	分子名称	PubChem CID/SID	Canonical SMILES
MOL001494	mandenol	5282184	CCCCC=C=C=CCCCCCCC(=O)OCC
MOL000358	beta-sitosterol	222284	CCC(CCC(C)C)CCCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)O)C)C(C)C
MOL000359	sitosterol	12303645	CCC(CCC(C)C)CCCC2C1(CCC3C2CC=C4C3(CCC(C4)O)C)C(C)C
MOL012922	l-SPD	6917970	COC1=C(C=C2C3CC4=C(CN3CCCC2=C1)C(=C(C=C4)O)OC)O
MOL005944	matrine	91466	C1CC2C3CCCN4C3C(CCC4)CN2C(=O)C1
MOL012904	dauricumine	11741544	CN1CCC23C1(CC(C24C(C(=CC4=O)OC)O)C)C(=C(C(=O)C3)OC)OC
MOL009149	cheilanthifoline	5117621	COC1=C(C(C=C2C3CC4=C(CN3CCCC2=C1)C5=C(C(C=C4)OC)O)O
MOL012909	acutuminine	9977155	CN1CCC23C1(CC(C24CC(=CC4=O)OC)C)C(=C(C(=O)C3)OC)OC
MOL012910	bianfugecine	126021	COC1=CC2=C(C(C=C1)C3=NC=CC4=CC(=CC(=C43)C2=O)OC
MOL012918	dauriporphinoline	68232932	COC1=CC2=C(C(C=C1)C3=NC=CC4=C3C(=C(C(=C4OC)OC)O)C2=O
MOL012921	stepharine	98455	COC1=C(C2=C3C(CC24C=CC(=O)C=C4)NCCC3=C1)OC
MOL012920	sinomenine	5459308	CN1CCC23CC(=O)C(=CC2C1CC4=C3C(=C(C=C4)OC)O)OC
MOL012915	dauriline	无	无

导入 PharmMapper 平台预测靶点信息。对于两处获得的靶点,每种化合物取可能性最高的前 50 个蛋白靶点合并,共获得 668 个靶点。

2.3 疾病靶点预测结果

通过 OMIM 数据库检索 NSCLC 词条,将获取的前 50 个基因纳入 HYRD 数据库的 PPI 网络,共获取了 1 167 个相关蛋白靶点。表明 NSCLC 相关病因及影响因素众多,相关机制

复杂。

2.4 网络图构建与分析结果

使用 Cytoscape 3.6.1 软件,将“2.3”项中 PPI 网络作为背景网络,筛选其中与药物化合物的共同靶点,共获得 101 个共同靶点,构建“药物-成分化合物-靶点-疾病”网络,见图 1。可见,共有 12 个化合物存在疾病相关基因的靶点,其中 dauriporphinoline 的靶点数最多,为 18 个。

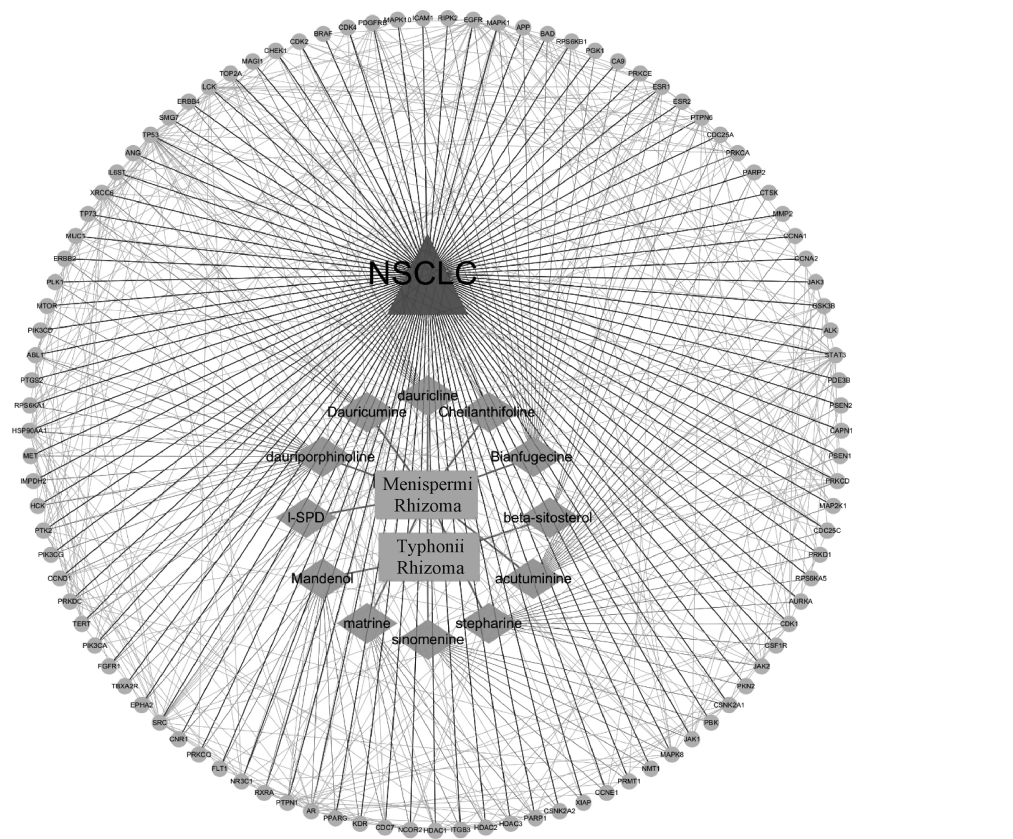


图 1 药物-成分化合物-靶点-疾病网络

Fig 1 Drug-component-target-disease network

2.5 PPI 网络构建结果

将药物与疾病共同靶点导入 STRING 平台(11.0 Version)(confidence 取 0.9,隐藏独立的节点),共获得 92 个节点,获得所示 PPI 网络,见图 2。

2.6 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

2.6.1 GO 功能富集分析:使用 R 4.0.2 软件,将数据提交至 Bioconductor 数据库,取 $P < 0.05$,对预测获得的所有药物靶基因进行 GO 分析,并按照参与该功能基因的数量和显著性(P

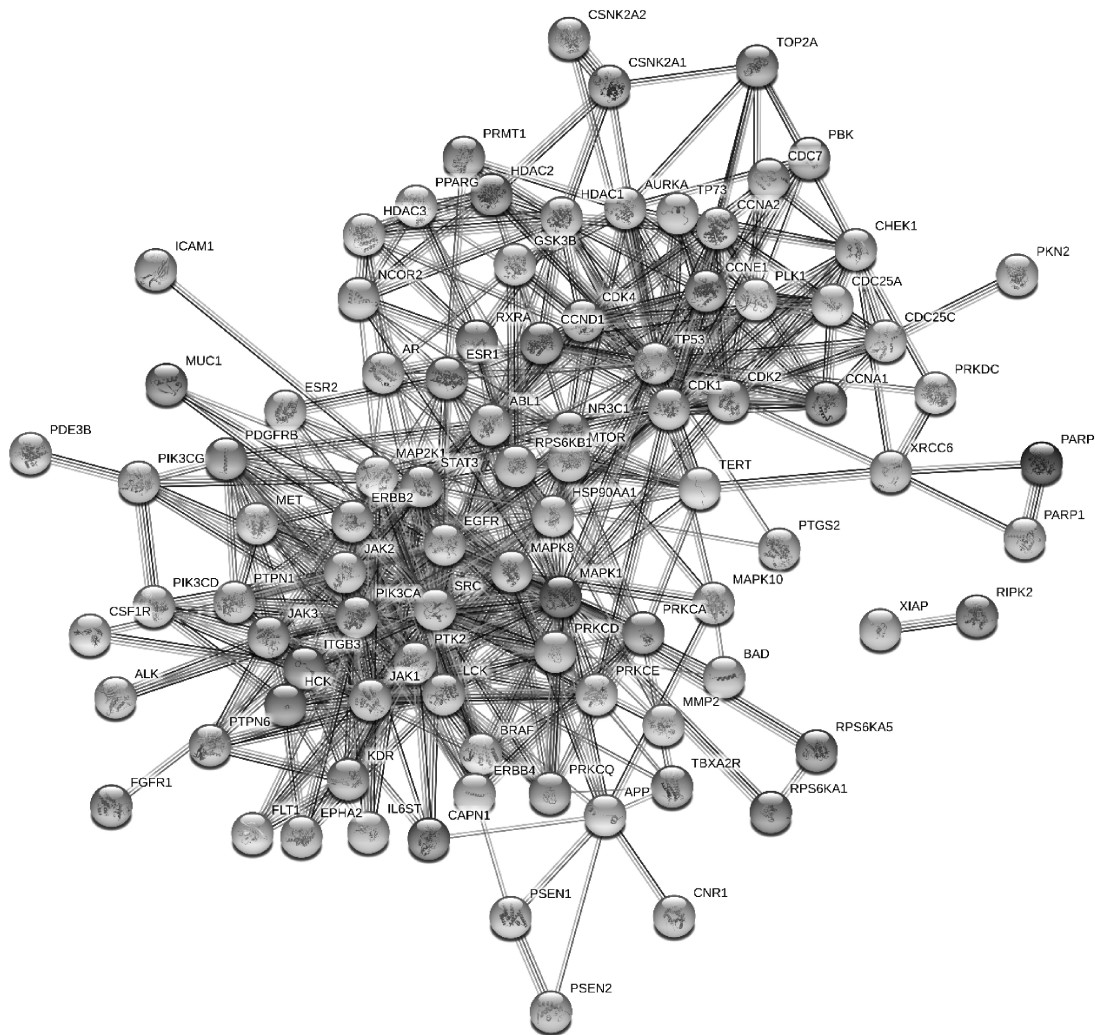


图2 “药物-疾病靶点”的 PPI 网络
Fig 2 PPI network of “drug-disease target”

值)进行排序,共查询到 276 条目,GO 活性前 30 条结果见图 3,GO 数目前 30 条结果见图 4。其中,富集到活性最高的是蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity),主要涉及 ALK、ERBB2 及 EGFR 等 54 个基因;富集到基因数量最多的是丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (protein serine/threonine kinase activity),主要涉及 GSK3B、EGFR 及 SYK 等 89 个基因。以上 2 种 GO 均与细胞生长、增殖和分化相关。

2.6.2 KEGG 通路富集分析:使用 R 4.0.2 软件,将数据提交至 Bioconductor 数据库进行 KEGG 通路富集分析,并按照参与该功能基因的数量和显著性 (P 值)进行排序,结果见图 5。其中 NSCLC 关键通路有 26 个基因参与,分别是 STAT3、ALK、JAK3、PRKCA、BRAF、AKT1、MAPK1、MAP2K1、PIK3CA、ERBB2、EGFR、BAD、MET、PIK3CD、CDK4、TP53、PIK3CB、PIK3R1、RAF1、RXRA、PDPK1、MAPK3、PRKCG、PRKCB、RARB 及 RXRG。靶点基因在该通路上的覆盖情况见图 6。其中, P53、RXR 受体以及 PI3K 的可能性最高, P53 基因的表达激活 P53 信号通路癌细胞凋亡; RAR、RXR 受体参与了包括细胞生长、分化、代谢和胚胎发育等许多重要生理过程的调节,在

NSCLC 细胞中表达失调^[12]; RAF 靶点通过 MAPK 信号通路调控细胞增殖; PI3K 通过磷酸化 PIP2 产生 PIP3 激活 Akt, PI3-Akt 信号通路调控细胞凋亡^[13-14]。

除目标 NSCLC 通路外,亦观察到北豆根-白附子参与多条关键通路与 NSCLC 相关,如细胞凋亡 (Apoptosis)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药 (EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance)、ErbB 信号通路 (ErbB signaling pathway)、血管内皮生长因子信号通路 (VEGF signaling pathway)、PD-L1 在肿瘤中的表达与 PD-1 检查点通路 (PD-L1 expression and PD-1 checkpoint pathway in cancer)、癌症中的蛋白多糖 (Proteoglycans in cancer) 以及癌症的中心碳代谢 (Central carbon metabolism in cancer) 等。

3 讨论

本研究通过网络药理学方法初步探讨了北豆根-白附子配伍治疗 NSCLC 的分子机制。NSCLC 的发生发展是复杂的过程,涉及多系统、多种基因及蛋白机制的病理改变。北豆根-白附子配伍在治疗 NSCLC 的机制方面表现为多种成分-多通路-多靶点的特点,通过网络药理学方式研究预测的 13 种化合物,

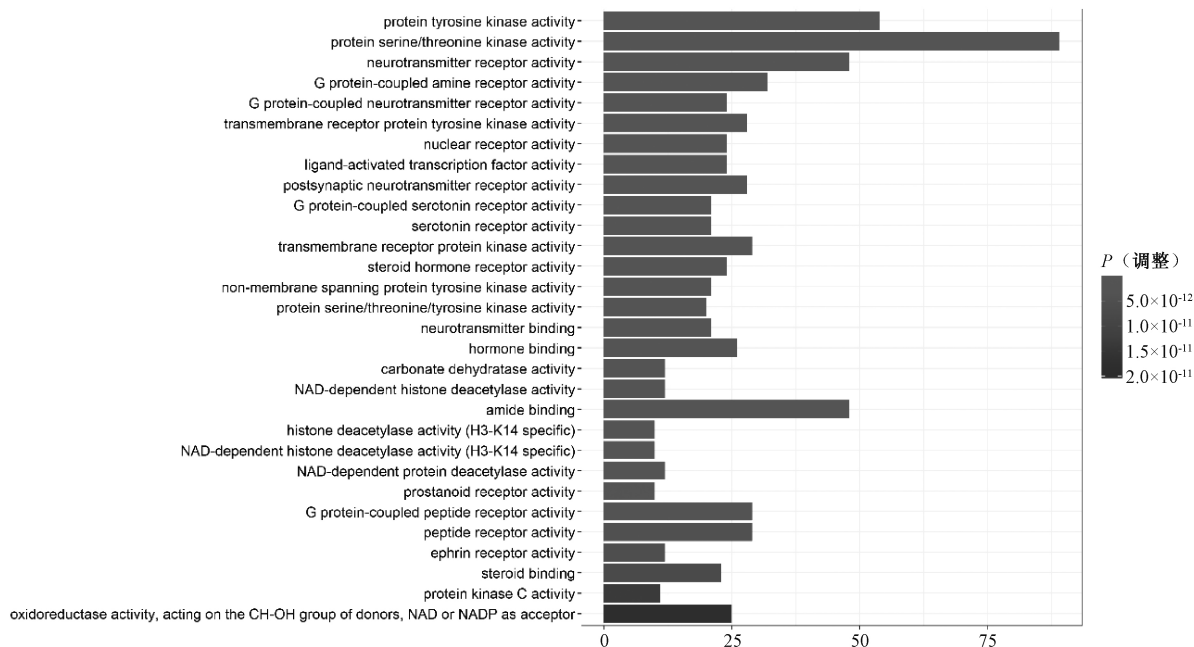


图 3 北豆根-白附子预测靶点 GO 功能富集分析活性

Fig 3 GO function analysis of prediction target of menispermis rhizoma and typhonii rhizoma

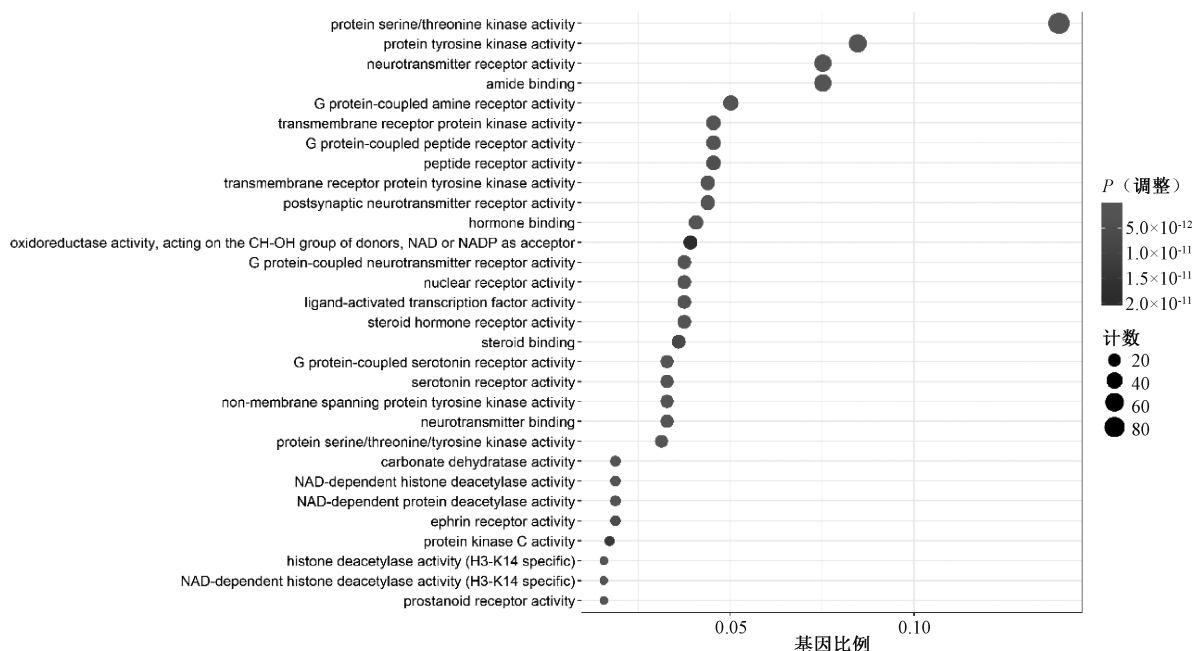


图 4 北豆根-白附子预测靶点 GO 功能富集数目

Fig 4 Number of GO function analysis of prediction target of menispermis rhizoma and typhonii rhizoma

通过单独或共同靶点作用于人体,其中 12 种化合物作用于 NSCLC 相关靶点。既往研究结果发现,苦参碱可上调肺癌 A549 细胞中自噬的特异性标志物 LC3-II 蛋白表达水平,诱导 A549 细胞自噬^[15-16]。青藤碱可抑制肺癌 HCC827、H460 和 H1975 细胞增殖,同时可观察到增殖标志物磷酸化组蛋白 H3 S10(p-H3 Ser10)表达的下调^[17];并可通过抑制 miR-21 的表达从而上调 TIMP-1、TIMP-2 和反转录富含半胱氨酸蛋白 (RECK) 的表达,并下调基质金属蛋白酶 (MMP) 和基质金属蛋

白酶胞外诱导剂 (EMMPRIN/CD147) 表达,从而逆转上皮间质转化,最终抑制肺癌 A549 和 H1299 细胞侵袭和迁移^[18]。青藤碱诱导凋亡的通路可能存在于 PI3K/Akt、ERK 通路之外^[19]。β-谷甾醇在体外以剂量依赖的方式抑制肺癌 A549、NCI-H460 细胞生长,可将 A549 细胞周期阻滞于 G2/M 期,并诱发细胞凋亡^[20]。

虽然已有北豆根-白附子配伍所含部分化合物的抗 NSCLC 机制研究,但仍有较多化合物的机制不甚明确,故本研究利用

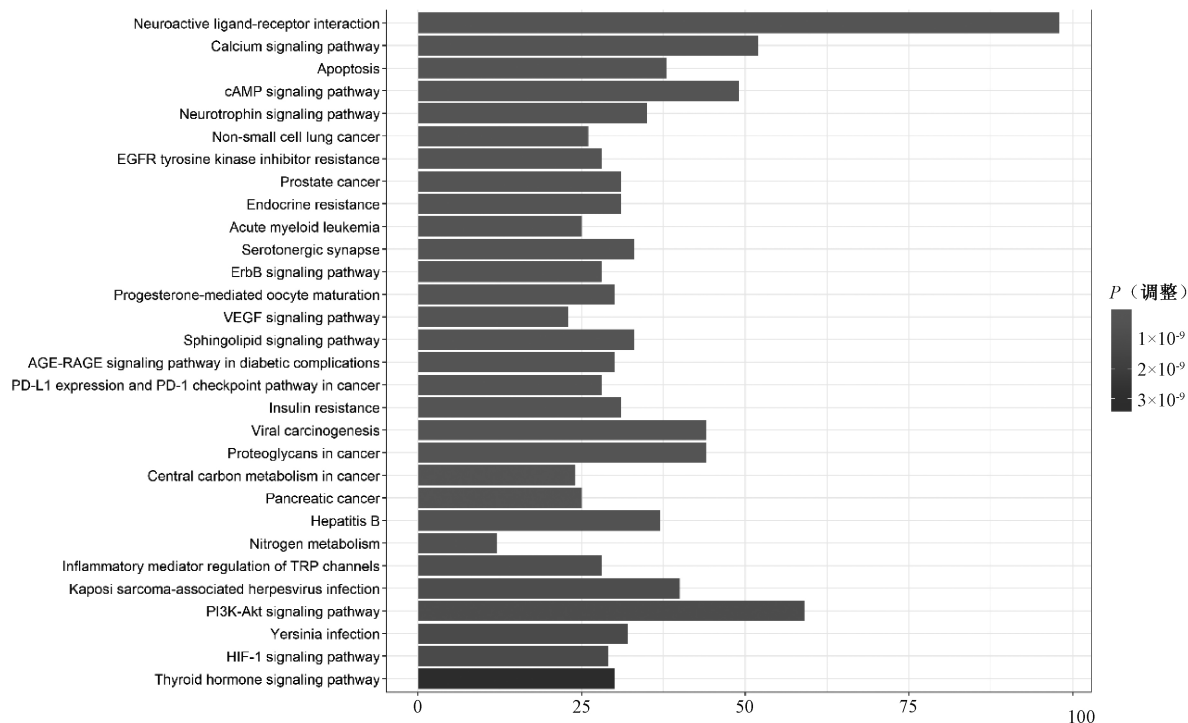


图 5 北豆根-白附子预测靶点 KEGG 通路富集分析

Fig 5 KEGG pathway analysis of prediction target of menisperm rhizoma and typhonii rhizoma

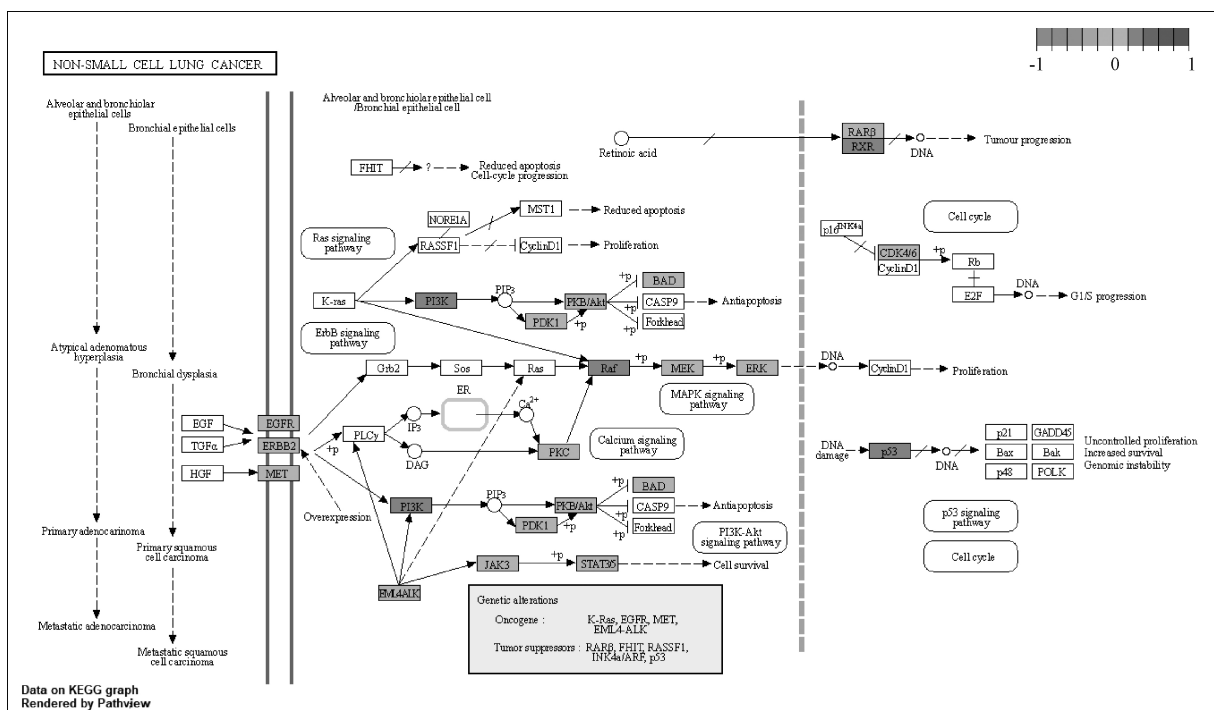


图 6 NSCLC 通路图及北豆根-白附子靶基因

Fig 6 NSCLC pathway map and target gene of menisperm rhizoma-typhonii rhizoma

GO 功能分析和 KEGG 富集分析探讨可能存在的抗肿瘤蛋白功能靶点及作用机制。在 KEGG 富集分析中,富集到多条肿瘤相关的通路,显示北豆根-白附子配伍的广谱抗肿瘤的特性,提示其可能在表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂耐药、血管生成、免疫逃逸、细胞凋亡和调节肿瘤碳代谢等方面发挥抗

NSCLC 的作用。也为北豆根-白附子配伍相关化合物抗肿瘤作用的进一步研究打下基础。

本研究运用网络药理学方法初步预测了北豆根-白附子配伍治疗 NSCLC 潜在有效成分的作用机制,可为相应研究提供

(下转第 394 页)