

本文引用:龙书可,方玲子,林菲娟,邓燕桃,姜倩倩. 基于网络药理学结合分子对接探讨中药枸骨叶抗肿瘤的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(3): 431-438.

基于网络药理学结合分子对接探讨中药 枸骨叶抗肿瘤的作用机制

龙书可¹, 方玲子¹, 林菲娟¹, 邓燕桃¹, 姜倩倩^{1,2*}

(1. 深圳市第二人民医院药学部, 广东 深圳 518000; 2. 深圳市老年研究所, 广东 深圳 518000)

[摘要] **目的** 从网络视角出发, 探讨枸骨叶抗肿瘤的可能作用机制, 为其临床使用提供依据。 **方法** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、中医百科全书数据库(ETCM)及查阅相关文献, 获取枸骨叶的有效成分及潜在靶点。利用人类基因组注释数据库(GeneCards)结果对比, 获得枸骨叶与肿瘤重合的潜在靶点基因, 并通过 Cytoscape 3.6.0 软件构建枸骨叶的“候选成分-作用靶点”网络。利用 String 数据库和 Cytoscape 3.6.0 软件构建药物抗肿瘤的蛋白质相互作用(PPI)网络; 并通过分子对接验证和筛选潜在的核心化合物, 利用 DAVID 生物信息资源数据库对核心靶点进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。 **结果** 共筛选出枸骨叶抗肿瘤的作用的靶点 137 个, 对应 13 种有效成分。关键靶点涉及 TP53、MAPK1、STAT3 等。主要通过调控肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K/AKT)信号通路、肿瘤抑制因子 P53 信号通路、T 细胞受体信号通路等发挥抗癌作用。涉及的癌种包括前列腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌等。分子对接结果显示, 长梗冬青苷与 MAPK1 能稳定地结合并通过蛋白氨基酸 Gly32、Glu33、Gly34、Tyr36 等发生相互作用。 **结论** 枸骨叶抗肿瘤作用的主要机制涉及槲皮素、熊果酸、长梗冬青苷、芒柄花黄素为代表的多成分, 以 TP53、MAPK1 及 STAT3 为代表的多靶点, 以及细胞增殖、细胞凋亡、信号传导为代表的多通路。

[关键词] 枸骨叶; 抗肿瘤; 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R273

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.03.021

Investigation the Mechanism of Anti-cancer Potential of Gouguye (Ilicis Cornutae Folium) Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

LONG Shuke¹, FANG Lingzi¹, LING Feijuan¹, DENG Yantao¹, JIANG Qianqian^{1,2*}

(1. Department of Pharmacy of Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518000, China;

2. Shenzhen Institute of Gerontology, Shenzhen, Guangdong 518000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the anti-cancer potential of Gouguye (Ilicis Cornutae Folium) from a network perspective, so as to provide a theoretical basis for its clinical use. **Methods** The effective components and potential targets of Gouguye (Ilicis Cornutae Folium) were obtained through the traditional Chinese medicine (TCM) systems pharmacology database (TCMSP), the encyclopedia of TCM (ETCM) and refer to relevant literatures. By comparing the results of human genome database (GeneCards), the overlapping genes of Gouguye (Ilicis Cornutae Folium) and cancer were collected. The "candidate active components-targets" network of Gouguye (Ilicis Cornutae Folium) was built with Cytoscape 3.6.0 software. The anti-tumor protein interaction (PPI) network was constructed using the STRING database and Cytoscape 3.6.0 software. Through molecular docking verification and screening of potential core compounds. The gene ontology (GO) classification enrichment analysis and the kyoto encyclopedia

[收稿日期] 2020-12-14

[基金项目] 广东省自然科学基金项目(2018A030313373); 深圳市科技计划项目(JCYJ20170306171157738)。

[作者简介] 龙书可, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向: 中药药理学研究。

[通讯作者] * 姜倩倩, 女, 博士, E-mail: jq105@163.com。

of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis for the targets were carried out in DAVID database. **Results** Total 137 anti-tumor targets of Gouguye (*Ilicis Cornutae Folium*) were screened out, corresponding to 13 active components. Key targets involved TP53, MAPK1, STAT3, etc. It mainly plays an anti-cancer role by regulating tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, hypoxia induced-factor-1 (HIF-1) signaling pathway, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/AKT) signaling pathway, tumor suppressor factor P53 signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, etc. The cancers involved prostate cancer, pancreatic cancer, non-small cell lung cancer, etc. Molecular docking results showed that pedunculoside and MAPK1 could bind stably and interact with each other through protein amino acids such as Gly32, Glu33, Gly34 and Tyr36. **Conclusion** The main mechanism of Gouguye (*Ilicis Cornutae Folium*) in treating cancer is involved to multiple compounds represented by quercetin, ursolic acid, pedunculoside and formononetin, and multiple targets represented by TP53, MAPK1 and STAT3, and multiple signaling pathways represented by cell proliferation, apoptosis and signal transduction.

[**Keywords**] Gouguye (*Ilicis Cornutae Folium*); anti-cancer; network pharmacology; molecular docking

近年来,肿瘤患者的新发病例越来越多,严重威胁人类的身体健康,我国癌症统计数据显示,全国癌症新发病例数为 380.4 万例,死亡病例 229.6 万例^[1]。随着化疗、靶向治疗及免疫治疗的应用,越来越多肿瘤患者从中获益,而中医药治疗作为我国肿瘤治疗的重要组成部分,采取辨病与辨证相结合的办法,可以配合肿瘤放化疗等治疗手段,有效减轻毒副作用,抑制瘤体的增大,减少不良反应的发生,利于改善患者对肿瘤治疗的耐受能力^[2]。

枸骨叶为冬青科植物枸骨 *Ilex cornuta Lindl.ex Paxt.* 的干燥叶,具有清热养阴、平肝益肾作用,用于肺癆咯血、骨蒸潮热、头晕目眩等症状^[3]。现代研究^[4-8]表明,枸骨叶具有降脂、抗炎、抗氧化和抗肿瘤等作用,其中主要化学成分长梗冬青苷、熊果酸、槲皮素等对多种恶性肿瘤均有较好的治疗作用。临床运用中,含枸骨叶的方剂“扶肺煎”治疗肺癌的药理作用已有相关报道^[9],但枸骨叶基础研究较少,其抗肿瘤的药用有效成分、靶点、通路和相关分子作用机制未见报道。网络药理学是结合系统生物学、计算机技术及生物信息学的新兴学科,能整体系统地分析“药物-靶点-通路-疾病”之间的相互关系,为中医药的现代化研究提供了新的研究思路。本研究利用网络药理学方法探索枸骨叶的主要化学成分、核心靶点以及与肿瘤之间的相互关系,为进一步阐明枸骨叶抗肿瘤的作用机制提供思路和理论基础^[10-11]。

1 材料与方法

1.1 数据库、分析平台及软件来源

中药系统药理学分析平台(TCMSP, <https://tcm-spw.com/tcm-spw.php>); 中医百科全书数据库(ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/>); 有机小分子生物活性数

据库(PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); Swiss TargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>); 人类基因数据库(GeneCards, <https://www.genecards.org/>); DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>); DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>); RCSB 蛋白数据库(<https://www.rcsb.org/>); STRING 数据库(<https://string-db.org/>); Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/>); 在线云平台 OmicShare 网站(<https://www.omicshare.com/>); 网络拓扑属性分析软件 Cytoscape 3.6.0; 分子对接软件 Autodock vina 1.1.2; PyMOL 2.3.2(<https://pymol.org/2/>); LigPlot 2.2(<https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/LigPlus/>)。

1.2 研究方法

1.2.1 枸骨叶活性成分检索与靶点预测 借助 TCMSP 数据库,以“枸骨叶”为关键词搜索活性成分,根据药物 ADME(吸收、分布、代谢及排泄)特性,选取生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 为筛选条件,并根据文献检索增加枸骨叶中有明确药理活性的主要成分,将检索所得各个主要成分于 TCMSP 数据库、ETCM 数据库中检索相关靶点,对于未找到靶点的化合物从 PubChem 数据库中查找并下载 2D 结构,导入 Swiss Target Prediction 在线数据库中进行靶点预测,Swiss Target Prediction 在线数据库广泛应用于中药作用机理和潜在治疗靶点的研究^[12]。剔除预测概率为“0”的靶点。将靶点名称输入到 STRING 数据库中统一为规范基因名。

1.2.2 疾病及相关基因信息数据库建立 从 GeneCard 数据库中以“cancer”为关键词搜集肿瘤的疾病作用靶点,在 DisGeNET 数据库中以“Malignant Neoplasms”为关键词搜索,得到的靶点合并去重后,将其导入

EXCEL 表格中进行标准化处理以便后续的分析。

1.2.3 蛋白互作 PPI 网络模块分析与关键靶点筛选 将枸骨叶化合物预测得到的靶点与肿瘤疾病靶点求交集,将共有靶点导入 STRING 数据库获取蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络,导入 Cytoscape 3.6.0 软件进行可视化分析,确认了 PPI 网络中的关键靶基因并进行分析。

1.2.4 分子对接 选择 PPI 网络中度值靠前的靶点蛋白,从 RCSB 蛋白数据库下载蛋白三维结构,从 PubChem 数据库下载化合物结构,将准备好的蛋白文件、配体文件、化合物文件以及脚本放入相应文件夹,利用 Autodock vina 1.1.2 进行半柔性对接。选取对接结合能量最低的构象用于对接结合模式分析,并使用 PyMOL2.3.2 和 LigPlot 2.2 进行作图。

1.2.5 GO 功能富集和 KEGG 通路富集 将枸骨叶与肿瘤疾病的共有靶点映射到 STRING 数据库,进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集,从生物过程及信号通路角度分析枸骨叶治疗肿瘤可能的作用机制。

2 结果

2.1 枸骨叶活性成分与候选靶点

通过 TCMSP 数据库检索的枸骨叶化学成分 56 个,以 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的原则,筛选出枸骨叶活性化合物 10 个,结合文献查阅结果^[13-15],增加 4 个虽然 OB 、 DL 值较低,但含量较高并且有药理活性

的成分:齐墩果酸、羽扇豆醇、金丝桃苷、熊果酸纳入研究。最终得到 14 个活性成分。见表 1。

2.2 枸骨叶抗肿瘤作用靶点及主要成分预测

通过 TCMSP 数据平台、PubChem 数据库查找相关的化合物并进行靶点预测,对相同靶点去重剔除,最终得到枸骨叶潜在的靶点信息 259 个。

2.3 肿瘤相关靶点基因的获取

从 GeneCard 数据库中以“cancer”为关键词搜集肿瘤的疾病作用靶点,以 $score \geq 20$ 作为疾病靶点筛选的标准,得到 780 个靶点,在 DisGeNET 数据库中以“malignant neoplasms”为关键词搜索,以 $EI \geq 1$, $score \geq 0.1$ 作为筛选标准得到 955 个靶点,将搜集到的靶点合并去重后,共获得肿瘤靶点基因 1 529 个。将枸骨叶的靶基因与肿瘤相关基因进行映射,得到共同靶基因 137 个。

2.4 成分-靶点网络构建

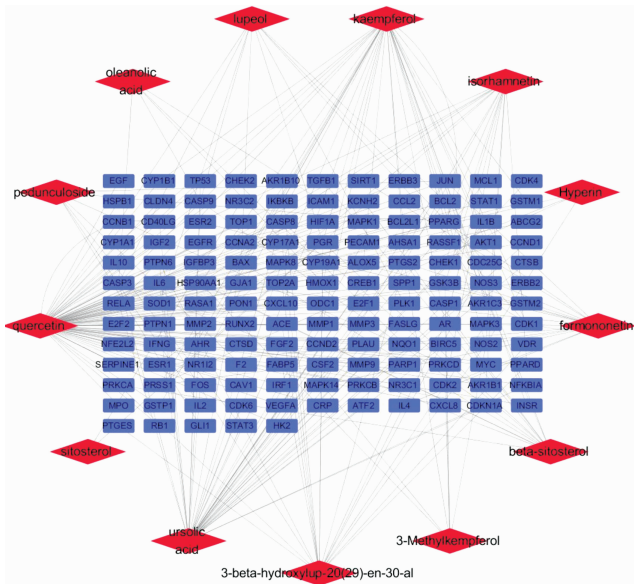
在 Cytoscape 3.6.0 软件中导入共同靶基因,剔除非作用于肿瘤疾病相关靶点的化合物构建成分-靶点网络。此网络共包括节点 150 个,其中 13 个节点为活性成分(并非所有活性成分均可作用于肿瘤相关靶点,剔除 1 个未作用于任何靶点的活性成分),共有 137 个节点为作用靶点,270 条作用连线。可见枸骨叶抗肿瘤具有多成分、多靶点的特点。见图 1。

2.5 核心靶点 PPI 网络的构建

将枸骨叶与肿瘤的靶基因导入 STRING 数据库,选择物种为“Homo sapiens”进行操作,最低相互作用阈值设为高等“high confidence=0.7”,构建 PPI

表 1 枸骨叶潜在活性成分的筛选信息

分子 ID	化合物	OB/%	DL
MOL001749	Bis[(2R)-2-ethylhexyl] benzene-1,2-dicarboxylate	43.59	0.35
MOL000354	异鼠李素 (isorhamnetin)	49.60	0.31
MOL000358	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75
MOL000392	芒柄花黄素 (formononetin)	69.67	0.21
MOL000422	山奈酚 (kaempferol)	41.88	0.24
MOL007245	3-甲基天冬氨酸 (3-Methylkempferol)	60.16	0.26
MOL007250	3-beta-hydroxylup-20(29)-en-30-al	44.34	0.79
MOL007252	长梗冬青苷 (pedunculoside)	43.79	0.71
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28
MOL000263	齐墩果酸 (oleanolic acid)	29.02	0.76
MOL000356	羽扇豆醇 (lupeol)	12.12	0.78
MOL004368	金丝桃苷 (Hyperin)	6.94	0.77
MOL000511	熊果酸 (ursolic acid)	16.77	0.75



注:红色菱形节点代表活性成分,蓝色方形节点代表作用靶点,线代表成分与靶点的关系

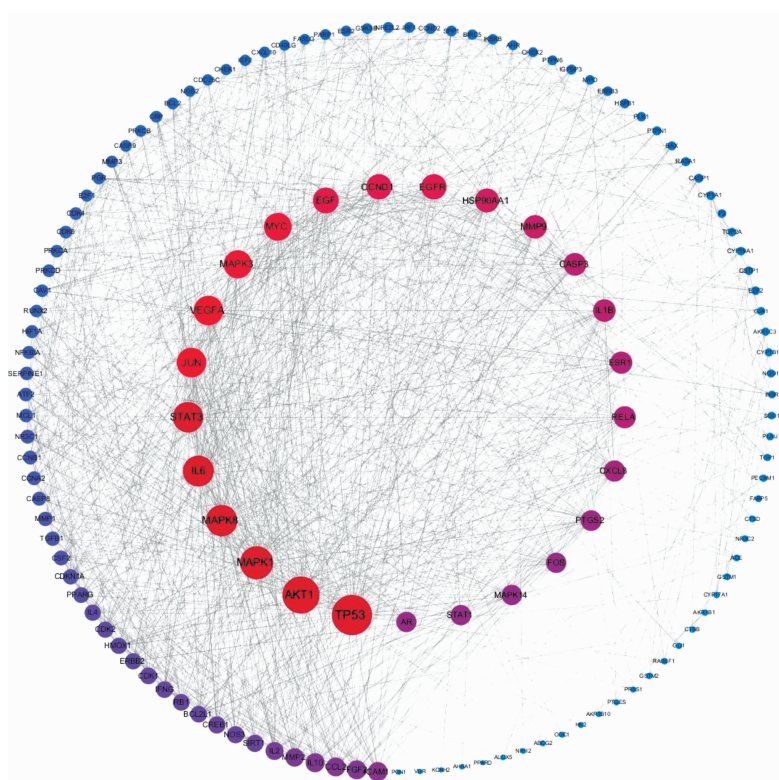
图 1 枸骨叶成分-靶点网络

网络,并利用 Cytoscape 3.6.0 软件对 PPI 网络进行拓扑结构分析,最终 116 个基因参与了关联网络的构建,包含了 993 个作用连线。见图 2。借助软件中 Network analyzer 插件,分析网络图的拓扑学参数,圆形节点的大小由其度值大小决定,度值越大,节点越大。网络拓扑学结构分析显示,全网平均度值为 17.12,筛选度值 ≥ 30 的核心靶点包括:TP53、MAPK1、

STAT3、IL6、MAPK8、VEGFA、MYC、MAPK3、CCND1、EGF、EGFR、P90AA1、ESR1、CASP3、CXCL8、STAT1、RELA、FOS、PTGS2,提示枸骨叶抗肿瘤作用可能与这些靶点显著相关。将这 19 个核心靶点导入 Metascape 数据库,获得靶点对应的蛋白功能。见表 2。表明枸骨叶抗肿瘤作用中有转录因子、酶和信号通路等相关蛋白质和信号通路的参与。

2.6 分子对接结果及分析

利用 AutoDock vina 1.1.2 软件,对 PPI 网络中中度值较大的 3 个靶蛋白(TP53、MAPK1、STAT3)与枸骨叶中预测靶点较多的 5 个成分进行分子对接。对接结果显示(表 3),分子与靶蛋白的最低结合能均小于 0,说明配体与受体均可以自发结合,其中长梗冬青苷与 P53、STAT3、MAPK1 蛋白的对接结合能均小于 $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,结合能分别为 -6.8 、 -6.7 、 $-8.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。将长梗冬青苷与 MAPK1 的对接结果利用 Pymol 软件绘图,由图可见,化合物的活性口袋中呈现出紧凑的结合模式。化合物和蛋白氨基酸 Gly32、Glu33、Gly34、Tyr36、Gly37、Lys54、Val39、Ser153、Leu156 形成强烈的疏水性相互作用;与氨基酸 Tyr113 形成键长为 3.12\AA 的氢键作用;与氨基酸 Asp111 形



注:圆形节点代表靶点,度值越大,节点越大

图 2 枸骨叶与肿瘤靶基因相互作用网络

表2 构骨叶抗肿瘤核心靶点及功能

序号	核心靶点	功能
1	TP53	转录因子/免疫球蛋白折叠;转运蛋白/转运通道
2	MAPK1	酶/(酶蛋白/转移酶,激酶/CMGC Ser/Thr 蛋白激酶);RAS 通路相关蛋白
3	STAT3	转录因子/免疫球蛋白折叠
4	IL6	细胞因子/炎症与感染相关蛋白
5	MAPK8	酶/(酶蛋白/转移酶,激酶/CMGC Ser/Thr 蛋白激酶);RAS 通路相关蛋白
6	VEGFA	RAS 通路相关蛋白
7	MYC	转录因子/基本域
8	MAPK3	酶/(酶蛋白/转移酶,激酶/CMGC Ser/Thr 蛋白激酶);RAS 通路相关蛋白
9	CCND1	细胞周期相关蛋白
10	EGF	RAS 通路相关蛋白
11	EGFR	酶/(酶蛋白/转移酶,激酶/Tyr 蛋白激酶);RAS 通路相关蛋白
12	HSP90AA1	参与信号转导、蛋白质折叠、蛋白质降解和形态进化
13	ESR1	核受体; 转录因子/锌配位的 DNA 结合域
14	CASP3	酶/(酶蛋白/水解酶,肽酶/半胱氨酸型肽酶)
15	CXCL8	细胞周期与转录相关蛋白
16	STAT1	转录因子/免疫球蛋白折叠
17	RELA	RAS 通路相关蛋白;转录因子/免疫球蛋白折叠
18	FOS	转录因子/基本域
19	PTGS2	酶/酶蛋白/氧化还原酶

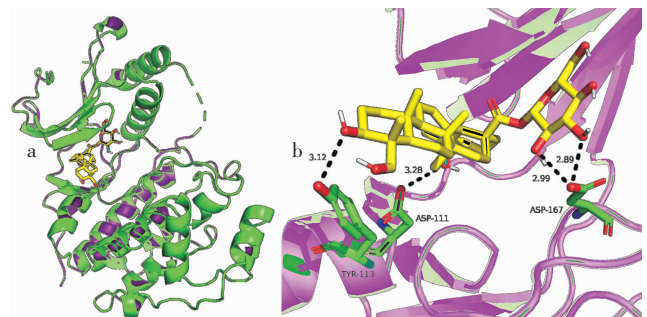
成键长为 3.28\AA 的氢键作用;与氨基酸 Asp167 形成键长为 2.99\AA 和 2.89\AA 的氢键作用,这些相互作用使得蛋白与化合物形成稳定的复合物。见图 3。

表3 构骨叶抗肿瘤关键靶点与主要化合物的分子对接

关键靶点	主要化合物	结合能/($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$)
TP53	芒柄花黄素	-6.5
	山奈酚	-6.6
	长梗冬青苷	-6.8
	槲皮素	-6.6
	熊果酸	-7.0
MAPK1	芒柄花黄素	-7.7
	山奈酚	-8.0
	长梗冬青苷	-8.6
	槲皮素	-8.0
	熊果酸	-8.1
STAT3	芒柄花黄素	-5.8
	山奈酚	-6.1
	长梗冬青苷	-6.7
	槲皮素	-6.2
	熊果酸	-7.0

2.7 潜在靶点生物学功能分析

为了阐明构骨叶抗肿瘤作用的分子机制,利用 DAVID 数据库对其活性成分对应的潜在靶点进行了 GO 和 KEGG 分析,GO 功能注释是通过生物过



注:a.整体示意图;b.3D 局部示意图。绿色为蛋白分子;黄色为配体;红色为氢键结合位点;虚线为氢键

图3 蛋白 MAPK1 与化合物长梗冬青苷对接的相互作用示意图

程、分子功能和细胞组分对基因进行注释和分类。设定统计标准 $P < 0.05$,共富集到 638 条生物过程,对 P 值作检验校正,选取生物过程、分子功能及细胞组分排名前 15 的基因分别做条形图,由图 4 可知,生物过程排名靠前的有 DNA 转录调控、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控、凋亡过程的负调控等;分子功能主要富集在酶结合区、蛋白结合、蛋白激酶结合、转录因子结合,主要涉及蛋白和转录因子活性;细胞组分分析中靠前的是胞液、胞外间隙、核质、细胞核等,主要集中在胞液和细胞核上,反映了肿瘤发病涉及体内多个生物过程的异常,同时表明构骨叶可能是通过调节这些生物过程发挥其抗肿瘤

作用。

KEGG 通路分析得到枸骨叶抗肿瘤相关通路,分析排名前 30 条信号通路并作气泡图,得知枸骨叶主要富集在 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、p53 信号通路、T 细胞受体信号通路等。这些生物过程与肿瘤的发生发展密切相关。见图 5。

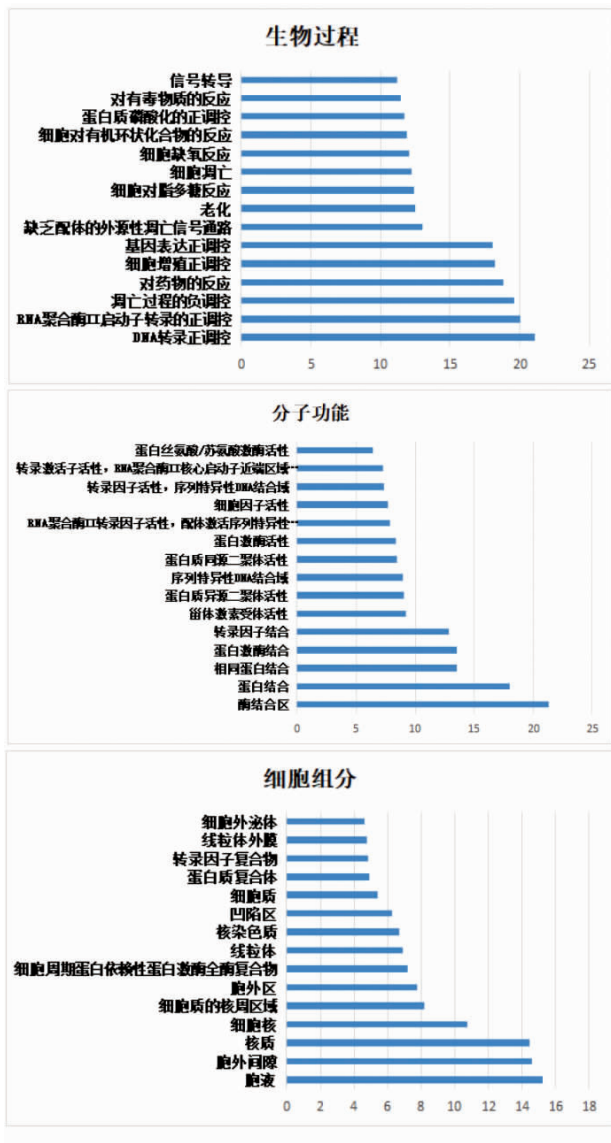


图 4 枸骨叶潜在靶点的 GO 分析

3 讨论

3.1 肿瘤发生、发展的分子机制研究

遗传和表观遗传的改变使得细胞逃避控制其存活和迁移的机制不断增殖,导致癌症的产生^[16]。Hanahan 等^[17]根据现代肿瘤发生发展机制,提出了肿瘤(hallmarks)学说,包括维持增殖信号、逃避生长抑制、避免免疫破坏、增强无限复制、癌性促炎反应、激活侵

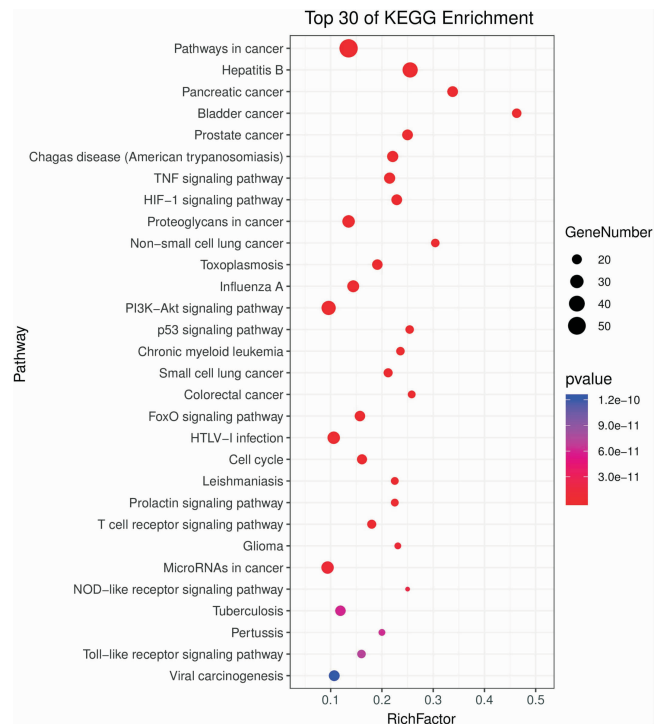


图 5 枸骨叶潜在靶点的 KEGG 通路富集

袭转移、诱导血管生成、基因组不稳定与突变、细胞死亡抵抗、细胞能量代谢失衡等。其中 MAPK、PI3K/Akt、mTOR、EGFR 等促进细胞周期,推动细胞增殖,TP53、NF2、LKB1 上皮极性蛋白可以逃逸抑癌蛋白 RB 的生长抑制,此外,癌细胞还通过突变、促炎反应、诱导血管生成等制造免疫抑制肿瘤微环境进行增殖、向周边浸润、转移逃避免疫破坏。

3.2 枸骨叶抗肿瘤的主要活性成分与关键靶点探讨

本研究得到的枸骨叶治疗肿瘤的成分靶点网络图显示槲皮素、山奈酚、异鼠李素、芒柄花黄素、长梗冬青苷等 14 种化合物的连接度与介度较高,可作用于多个肿瘤靶点,提示这些成分可能是枸骨叶治疗肿瘤的重要成分。王梓萱等^[18]研究槲皮素能通过诱导 P53 非依赖性的 G2/M 细胞周期阻滞和细胞凋亡,从而实现对肿瘤细胞增殖的抑制作用。现代研究^[19]表明,槲皮素可以调节与癌症相关的多种 miRNAs,包括 let-7、miR-21、miR-146a 和 miR-155,从而抑制癌症的发生和发展。张磊等^[20]发现山奈酚能诱导三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)MDA-MB-231 细胞中乳腺癌耐药蛋白的表达并下调抗肿瘤药物对 MDA-MB-231 细胞的杀伤作用,还有研究^[21-22]表明山奈酚可诱导 G1 期以下细

胞聚集,并通过抑制内质网受体、Survivin 凋亡抑制基因和 ER α 从而导致细胞凋亡。朱琳等^[23]体外实验研究发现异鼠李素处理 A549 细胞后,流式细胞术及免疫细胞化学检测表明异鼠李素通过下调 bcl-2 基因和 PCNA 蛋白表达,上调抑癌基因 P53、bax 及 Caspase-3 基因等来抑制肿瘤细胞的生长、增殖及诱导细胞凋亡。在体动物实验也观察到,异鼠李素在体内也具有明显的抗肿瘤作用,可显著降低癌细胞增殖指数,诱导凋亡。李自全等^[24]研究发现芒柄花黄素可抑制 NSCLC 细胞增殖,加速细胞凋亡发生,可能通过下调 Cyclin E1 表达而影响细胞周期,并通过调控 Bcl-2 和 Bax 表达促使细胞凋亡发生。陈曦等^[25]发现长梗冬青苷可以抑制炎症相关癌症(colitis associated cancer, CAC)小鼠结肠 miR-29a 表达,上调 miR-29a 下游靶蛋白 TET3 的表达,同时抑制 STAT3 蛋白表达,可能是其干预 CAC 小鼠模型中结肠炎——癌病理发展的部分机制。还有研究^[26]表明长梗冬青苷可通过逆转由 miR-31-5p 和 miR-223-3p 过表达而引起的 Lats2 和 Apc 的下调,显著减轻 DSS/AOM 对小鼠肠道的损伤,从而预防 CAC。

PPI 网络分析结果发现,TP53、MAPK1、STAT3、IL6、MAPK8、VEGFA、MYC、MAPK3、CCND1、EGF、EGFR 等 19 个靶点是 PPI 网络的关键靶蛋白。主要涉及 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K/AKT 信号通路、p53 信号通路、T 细胞受体信号通路等,结合 KEGG 通路分析结果得出,主要富集的癌种为前列腺癌、胰腺癌、非小细胞肺癌、慢性骨髓白血病、神经胶质瘤等。TP53 是位于染色体 17 的短臂上的肿瘤抑制基因,通常调节细胞周期机制的活性。已观察到 P53 基因的突变在多种类型的人类癌症中具有高流行性,并且经常伴随点突变发生^[27]。Zawlik 等^[28]研究表明胶质母细胞瘤经常显示 TP53 通路的基因改变,在胶质母细胞瘤中,MDM2 SNP309 G 等位基因和 TP53 密码子 72 Pro/Pro 之间存在显著相关性。MAPK1、MAPK8、MAPK3 是 MAP 激酶家族的成员,又称为细胞外信号调节激酶,是多种生物化学信号的整合点,参与细胞增殖、分化、转录调控和发育等多种过程^[29]。Chen 等^[30]研究证明 MAPK1 是 miR-378 的直接靶点,MAPK1 的异位表达挽救了 miR-378

被抑制细胞的迁移和侵袭,从而显著降低了前列腺癌细胞生长。

本研究的分子对接结果提示,枸骨叶中的活性成分与 TP53、MAPK1、STAT3 有较好的亲和力,其化合物抗肿瘤的作用需要进一步的生物实验验证。

综上所述,基于对枸骨叶有效成分进行的靶点预测,并对潜在靶点进行了 PPI 研究,以及 GO 和 KEGG 富集分析,发现枸骨叶中对应核心靶点较多的成分有槲皮素、芒柄花黄素、长梗冬青苷、熊果酸等,这些成分可能是枸骨叶发挥抗肿瘤的潜在活性成分。我们推测,枸骨叶抗肿瘤作用是多化合物、多靶点、多途径的直接或间接协同作用的结果。本研究为将来的实验设计及进一步探索提供了依据,后续将通过药理学实验验证枸骨叶的抗肿瘤药理活性作用,并进行枸骨叶中多种化合物的协同作用等方面的相关研究。

参考文献

- [1] 曹毛毛,陈万青.中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J].中国肿瘤临床,2019,46(3):145-149.
- [2] 余婷,杨柱,龙奉玺,等.基于网络药理学探讨黄精-百合药对抗癌作用的机制[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(5):168-177.
- [3] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].北京:中国医药科技出版社,2015:250
- [4] 左文健,梅文莉,曾艳波,等.枸骨的化学成分和药理活性研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(27):16560-16562.
- [5] 周思祥,姚志容,李军,等.枸骨叶的化学成分研究[J].中草药,2012,43(3):444-447.
- [6] 黎敏,杨武斌,米本中,等.槲皮素抗癌作用机制相关研究报道[J].中药药理与临床,2018,34(2):129-132,24.
- [7] 陈姝瑾,王淳,刘春英.熊果酸对肺癌细胞 A549 自噬相关蛋白的影响[J].中华中医药学刊,2020,38(6):86-90,268.
- [8] 陈曦,程博,宋宁,等.长梗冬青苷对 CAC 模型小鼠结肠 miR-29a/TET3 及 STAT3 的作用[J].中药药理与临床,2019,35(5):39-42.
- [9] 许继平,裘维焰,应树华,等.扶肺煎对原发性肺癌抗转移的临床研究[J].中国中医药信息杂志,2000,7(8):40-41.
- [10] 黄钰凯,梁明坤,吴发胜,等.基于网络药理学的左金丸治疗胃癌作用机制研究[J].湖南中医药大学学报,2020,40(6):709-716.
- [11] 李亚梅,彭壮,徐佳,等.夏枯草抗乳腺癌成分-靶点-通路的网络药理学研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):1021-1027.
- [12] GFELLER D, GROSDIDIER A, WIRTH M, et al. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive

- small molecules [J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42 (Web Server issue): W32–W38.
- [13] 何丹,杜冰翌,杨鑫瑶,等.冬青属常用药用植物的药理作用及临床应用研究进展[J].*中国实验方剂学杂志*,2020,26(16):218–227.
- [14] 蔡伟.HPLC法测定构骨叶中金丝桃苷的含量[J].*北方药学*,2016,13(1):3.
- [15] 施之琪,王洛临,曾文雪,等.HPLC同时测定构骨叶中熊果酸和齐墩果酸的含量[J].*江西中医学院学报*,2013,25(1):58–60.
- [16] 洪梓德,莫志贤.中药抗肿瘤机制中的11种信号通路[J].*中国实验方剂学杂志*,2018,24(21):205–218.
- [17] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. *Cell*, 2011,144(5): 646–674.
- [18] 王梓萱,周静,唐玥,等.槲皮素诱导肿瘤细胞P53非依赖的G₂/M周期阻滞和凋亡[J].*中国药理学与毒理学杂志*,2018,32(10):790–796.
- [19] KIM D H, KHAN H, ULLAH H, et al. MicroRNA targeting by quercetin in cancer treatment and chemoprotection[J]. *Pharmacological Research*, 2019, 147: 104346.
- [20] 张磊,林晓萌,曹哲丽,等.山奈酚诱导三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231中乳腺癌耐药蛋白的表达并下调抗肿瘤药物对MDA-MB-231细胞的杀伤作用[J].*科学技术与工程*,2019,19(20):91–96.
- [21] 张敬,史晓宇,孟玮,等.山奈酚通过下调ERR α 抑制非小细胞肺癌A549细胞的侵袭和迁移[J].*中国肿瘤生物治疗杂志*,2018,25(12):1230–1236.
- [22] CHUWA A H, SONE K, ODA K, et al. Kaempferol, a natural dietary flavonoid, suppresses 17 β -estradiol-induced survivin expression and causes apoptotic cell death in endometrial cancer[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(5): 6195–6201.
- [23] 朱玲,王正荣,周黎明,等.异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨[J].*航天医学与医学工程*,2005,18(5):381–383.
- [24] 李自全,孟祥娇.芒柄花素对人非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡的影响及相关机制探讨[J].*中国实验方剂学杂志*,2016,22(20):138–142.
- [25] 陈曦,程博,宋宁,等.长梗冬青苷对CAC模型小鼠结肠miR-29a/TET3及STAT3的作用[J].*中药药理与临床*,2019,35(5):39–42.
- [26] CHEN G, FENG Y, LI X Z, et al. Post-transcriptional gene regulation in colitis associated cancer[J]. *Frontiers in Genetics*, 2019, 10: 585.
- [27] 邹柯涵,徐敏,罗书笛,等.CK、Ki67、Gly-3及P53在肝细胞癌组织中的表达[J].*湖南中医药大学学报*,2017,37(3):326–328.
- [28] ZAWLIK I, KITA D, VACCARELLA S, et al. Common polymorphisms in the MDM2 and TP53 genes and the relationship between TP53 mutations and patient outcomes in glioblastomas[J]. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 2009, 19(2): 188–194.
- [29] 柴冬亚,袁佳琪,周轶平.MAPK信号通路影响肿瘤多药耐药的研究进展[J].*中国新药杂志*,2019,28(8):948–953.
- [30] CHEN Q G, ZHOU W, HAN T, et al. MiR-378 suppresses prostate cancer cell growth through downregulation of MAPK1 in vitro and in vivo[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(2): 2095–2103.

(本文编辑 匡静之 周旦)