

基于网络药理学的白屈菜抗肿瘤分子机制研究

章 亮¹, 陈泽慧¹, 陈韩英¹, 王晓琴¹, 张 波^{1,2*}

1. 石河子大学药学院, 新疆 石河子 832002

2. 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002

摘要: **目的** 白屈菜临床用于肿瘤治疗, 具有良好的疗效, 且毒副作用小。运用网络药理学方法筛选白屈菜有效部位和主要活性成分, 构建活性化合物-靶点网络, 对其抗肿瘤作用的分子机制进行科学阐释。**方法** 采用 ADME 计算方法筛选白屈菜活性成分, 通过文献挖掘、多个数据库联用检索收集白屈菜活性成分与潜在靶点, 并利用 SysDT 模型对化合物靶点进行筛选。利用 Cytoscape 软件构建化合物-靶点网络并进行网络拓扑学分析, 通过生物学信息注释数据库 (DAVID) 分析靶点基因功能及信号通路。**结果** 生物碱是白屈菜抗肿瘤主要活性成分, 通过 ADME 方法筛选出 21 种生物碱类成分, 相关靶点 168 个, 肿瘤相关通路 60 条, 整合相关通路绘制了白屈菜抗肿瘤通路。根据网络拓扑学分析结果以及成分修正结果推测, 白屈菜红碱、小檗碱和血根碱为白屈菜主要活性成分, 作用于 PTGS2、SCN5A、F10、NCOA2、CHRM3、AR、TP53、CASP1/3/9、DRD1、MAPT、MAPK1 和 BLM 等关键靶点。**结论** 白屈菜主要通过诱导细胞凋亡和抑制细胞增殖、转移和侵袭等多表型干预的网络模式产生作用, 从而发挥抗肿瘤活性, 且具有一定的中枢镇痛作用。

关键词: 网络药理学; 白屈菜; 生物碱; 抗肿瘤; 分子机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)03-0646-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.021

Study on antitumor molecular mechanism of *Chelidonium majus* based on network pharmacology

ZHANG Liang¹, CHEN Ze-hui¹, CHEN Han-ying¹, WANG Xiao-qin¹, ZHANG Bo^{1,2}

1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, Shihezi 832002, China

Abstract: Objective *Chelidonium majus* is applied to tumor therapy with good clinical effect and weak adverse effect. To explain the molecular mechanism of antitumor effect scientifically, the network pharmacology method was used to screen effective parts and major active components of *C. majus* and to construct the active compounds-targets network. **Methods** ADME calculation method was used to filtrate the active components of *C. majus*, and then the targets of the main active ingredients were collected by literature mining and multiple databases, and the targets of the compound were screened using the SysDT model. Besides, the compounds-targets network was constructed by Cytoscape software and network topology analysis was carried out. Biological information annotation databases (DAVID) was used to analyze the molecular function and biological pathway of the action targets. **Results** Alkaloids were the major active components of *C. majus*, 21 alkaloid components were screened out by ADME calculation method with 168 related targets, and 60 closely cancer-related pathways. Those pathways were integrated, with which a comprehensive *C. majus* antitumor pathway was constructed. According to the results of network topology analysis and ingredient correction results, it was speculated that chelerythrine, berberine and sanguinarine were the main active ingredients in *C. majus*, acting on the targets of PTGS2, SCN5A, F10, NCOA2, CHRM3, AR, TP5, CASP1/3/9, DRD1, MAPT, MAPK1, BLM, etc. **Conclusion** The antitumor activities of *C. majus* were mainly by inducing cell apoptosis and inhibiting cell proliferation, metastasis and invasion as phenotype intervention mode in network, thereby to exert antitumor activities and a certain central analgesic effect.

Key words: network pharmacology; *Chelidonium majus* L.; alkaloid; antitumor; molecular mechanism

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81460566, U1603122)

作者简介: 章 亮 (1994—), 男, 硕士, 从事系统药理学与分子药理学研究。Tel: 15739720925 E-mail: 1094368275@qq.com

*通信作者 张 波 (1978—), 男, 研究生导师, 教授, 从事系统药理学与中药药理学研究。Tel: (0993)2057670 E-mail: bozhang_lzu@126.com

中医具有以整体观和辨证论治为特色的理论体系和几千年的临床实践经验,在肿瘤疾病防治中具有其自身的特色和优势。中医理论认为肿瘤的发生、发展受到六淫邪气、情志饮食等体内、外诸多因素的影响,正气亏虚是肿瘤的发病基础。正虚邪实,脏腑失调,“风、寒、暑、湿、燥、火”六淫不正之气循经入脏,血遇热则凝,津液遇火灼为痰,渐成气滞血瘀,或蕴湿化热成痰,或化热积毒,瘀毒内结,日久而成积块,遂结成肿瘤。“虚、湿、痰、瘀、毒”对恶性肿瘤的发生起到了“因”的作用,但在肿瘤发展过程中也往往以“证”的现象出现。因此肿瘤治疗多以活血化瘀、扶正培本、软坚散结、清热解毒、利湿逐水为主^[1-2]。

白屈菜 *Chelidonium majus* L. 为罂粟科植物白屈菜全草,味苦,性凉,有毒,归肺、心、肾经;有镇痛、止咳、消肿、利尿、解毒之功效;治胃肠疼痛、痛经、黄疸、疥癣疮肿、蛇虫咬伤,外用消肿^[3]。白屈菜具有很强的抗肿瘤活性,临床用于治疗多种肿瘤,如食道癌、胃癌、肝胆肿瘤、直肠癌和各种中晚期肿瘤腹转移等^[4]。其主要活性成分为生物碱类化合物,包括白屈菜碱、白屈菜红碱、小檗碱、血根碱、原阿片碱以及黄连碱等。中成药复方白屈菜碱注射液用于治疗癌性疼痛,其主要成分是白屈菜碱、汉防己全碱和延胡索全碱。Ukrain 为临床使用的抗肿瘤药物,其主要成分是白屈菜生物碱类化合物,包括白屈菜碱、普洛托品、血根碱、白屈菜红碱^[5],可以治疗乳腺癌、胰腺癌、直肠癌、结肠直肠癌等多种癌症,并且不良反应较传统抗肿瘤药物少。

中药是中医传统理论的载体,是中医治疗疾病的物质基础,可作用于肿瘤发生、发展的多个环节,具有多靶点、多环节、多效应的特点,符合肿瘤多因素、多环节致病的机制。其在抑制、杀伤肿瘤细胞及改善症状与体征等方面发挥重要作用,同时具有不良反应低、能提高机体免疫力、不易产生耐药性等特点^[6-7]。但正是因为中药所具有的多成分、多靶点协同作用的特点,使得中药药效物质基础和作用机制不明确,很难从整体到组织器官、细胞和分子水平进行全面系统地研究^[8]。网络药理学是建立在疾病-基因-药物的多层次网络基础上,用于从整体上预测药物靶点、提高药物发现效率的新兴学科^[9],是在网络生物学与多向药理学的基础上提出的药物设计的新思想,打破传统的“1个药物,1个靶点,1种疾病”理念,是新药研发的策略之一。网络药

理学基于“疾病-基因-靶点-药物”相互作用网络,系统综合地观察药物对疾病网络的干预与影响,其研究策略的整体性、系统性的特点与中医药整体观、辨证论治、组方配伍的原则,中药及其方剂的多成分、多途径、多靶点协同作用的原理殊途同归^[10]。本实验基于网络药理学研究方法,对白屈菜有效部位和活性成分进行筛选,研究其多成分-多靶点-多通路作用机制,以阐释其抗肿瘤活性的内涵。

1 材料与方法

1.1 化学成分库的构建

利用中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)和化学专业数据库(<http://chemdb.sgst.cn/scdb/default.asp>)搜索白屈菜主要化学成分,进一步通过 PubMed 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)中相关文献收集白屈菜化学成分,并利用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)对其分子结构进行确证,最后建立白屈菜化合物数据库。

1.2 活性化合物的筛选

中药多为口服制剂,在体内需经过吸收(absorption)、分布(distribution)、代谢(metabolism)及排泄(excretion)过程到达靶点器官、组织发挥作用,即 ADME 过程,也就是中药的药动学特性。为了筛选潜在活性化合物,构建了包括口服生物利用度(oral bioavailability, OB),药物相似性(drug-likeness, DL)和小肠上皮细胞渗透率(Caco-2 permeability)在内的综合模型,对化合物的 ADME 性质进行预测。

1.2.1 OB 评估 OB 是指药物经口服给药后药物被机体吸收进入全身血液循环的相对量和速率,是药物特性中最重要的药动学参数之一,是决定生物活性分子(即有药效作用的分子)类药性的关键指标^[11]。OB 值由计算机预测模型 OBioavail1.1^[12]计算,在该模型中,采用支持向量机为建模方法,该模型由 805 个已知 OB 值且结构不同的分子描述符,整合代谢(细胞色素 P4503A4)和转运(P 糖蛋白)信息构建训练集,并通过 5 倍交叉验证以及独立外部验证来检验模型的可靠性。考虑到生物碱的 OB 较低,本研究以 OB≥30%作为筛选条件。

1.2.2 DL 评估 DL 是指化合物与已知药物的相似性,可以作为该化合物与上市药物接近程度的 1 个指标^[11]。DL≥0.18(整个相似度的平均值)则认为该化合物与 Drugbank 数据库里药物具有一定的相似

性。本研究基于 Tanimoto 系数建模, 计算化合物的药物相似指数。药物相似度评估方法如公式 (1) 所示。

$$f(A, B) = A \times B / (|A|^2 + |B|^2 - A \times B) \quad (1)$$

A 是待预测化合物分子描述符指数, B 表示 DrugBank 数据库中所有化合物的平均类药性指数 (<http://www.drugbank.ca/>)

所有分子的描述符都通过 Dragon 软件 (<http://www.talete.mi.it/index.htm>) 计算。本研究选用 $DL \geq 0.18$ 的化合物作为候选化合物进一步研究。

1.2.3 Caco-2 细胞渗透率评估 对于口服药物的吸收主要是通过 Caco-2 细胞完成的, Caco-2 细胞渗透率决定了人体吸收药物的速度和程度, 并最终影响其生物利用度, 因此模拟 Caco-2 细胞对药物的转运是预测药物吸收的关键。在这项工作中, 应用 Caco-2 细胞渗透性预测模型 preCaco2^[13]来预测药物吸收。本研究中 Caco2 细胞渗透率的阈值设为 0.4。

最后, 将 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 和 Caco-2 细胞渗透率 ≥ 0.4 的化合物视为潜在活性化合物进行进一步分析。

1.3 化合物靶点筛选

药物分子是通过与特定的分子靶点相结合, 并调节其生物活性或转录水平, 从而发挥药物的作用效果。为了阐明药物的作用机制, 收集化合物作用靶点对研究化合物-靶点相互作用关系是必不可少的。相应靶点从以下 3 个方面获得: (1) 在 PubChem Compound (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中以化合物 CAS 号检索, 整理其靶点; (2) 在 TCMSP 数据库以化合物名检索并整理其靶点; (3) PubMed 数据库中基于文献挖掘作用靶点。此外, 利用 SysDT 药物-靶标预测模型^[14]对收集的靶点信息进一步筛选, 最终将获得的靶点进一步映射到 Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) 数据库归一化和标准化命名, 最终整合并建立化合物-靶点数据库。

1.4 网络构建与分析

网络是复杂生物系统的表现方式, 为了阐明白屈菜生物碱类化合物的抗肿瘤活性机制, 本研究构建了化合物-靶点相互作用的可视化网络, 若经预测化合物与靶点存在对应关系, 则在网络中化合物与靶点彼此连接。网络图利用 Cytoscape 3.1.1 构建。在网络中, 化合物和靶点由节点表示, 2 个节点之间的相互作用由边表示。网络中每个节点的重要性都通过拓扑参数度数^[15]和接近中心度^[16]进行评估。节点的度数是与节点相连边的数量, 度数越大, 说明网络中与该节点直接相关的节点数越多, 表明该节

点在网络中越重要。节点的接近中心度是节点中心度的度量, 反映网络中某一节点与其他节点之间的接近程度, 定义如下公式 (2) 所示。节点度数和接近中心度由 Cytoscape 插件 Network Analyzer 进行分析。

$$Cd(N_i) = \sum_{j=1}^n x_{ij} (i \neq j) / (n-1) \quad (2)$$

$Cd(N_i)$ 表示节点 i 的度中心度, $\sum_{j=1}^n x_{ij}$ 用于计算节点 i 与其他 $n-1$ 个节点 ($i \neq j$, 排除 i 与自身的联系) 之间的直接联系的数量

1.5 生物过程分析

生物学信息注释数据库 (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) 为大规模的基因或蛋白列表提供系统综合的生物功能注释信息, 能够找出最显著富集的生物学注释^[17]。使用 DAVID 数据库对筛选所得化合物靶点进行 GO (Gene Ontology) 生物学过程富集分析^[18], 并用 FDR 错误控制法 ($FDR < 0.05$) 对 P 值作检验校正, 最终设定阈值 $P < 0.05$, 筛选具有显著性差异的生物过程, 利用 Origin 8 软件绘图。

1.6 成分修正

整体网络的数据存在一定的冗余性, 即存在作用机制相同或相近的化合物, 因此本研究以抗肿瘤通路为背景进行成分修正, 即通过比较化合物所能作用的抗肿瘤通路, 选择涉及抗肿瘤通路多且能协同作用的化合物作为白屈菜抗肿瘤的代表性化合物。

首先根据化合物在化合物-靶点网络图中节点所处位置的重要性 (度数 > 30 和接近中心度 > 0.35) 筛选有效化合物, 并利用 DAVID 软件分析每个化合物作用的靶点群, 得到该化合物涉及的信号通路, 筛选出作用于肿瘤相关通路较多的化合物, 从而修正白屈菜抗肿瘤有效成分。

1.7 构建白屈菜抗肿瘤通路图

利用 KEGG Mapper 功能将选择的化合物作用靶点在其与肿瘤相关的作用通路上标注出来, 验证其通过多靶点、多途径协同抗肿瘤的机制。最终结合目前对癌症病理学的了解以及文献支持, 整合化合物作用靶点调节的关键通路, 构建 1 个综合的白屈菜抗肿瘤机制通路图。

2 结果

2.1 白屈菜化学成分筛选

通过已有文献报道^[3,19-20], 白屈菜主要成分为生物碱类化合物, 亦是其主要活性成分。基于文献和数据库挖掘, 总共收集到 44 种生物碱类化合物。为

了筛选潜在的活性化合物,对其 ADME 性质进行评价,最终以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 和 $Caco-2 \geq 0.4$ 作为化合物筛选条件。共筛选得到 21 个药动学特征良好的化合物作为潜在活性化合物,占有 44 种化合物的 47.73%, 化合物基本信息见表 1。对于这 21

种化合物,其中多数已被实验证明具有抗肿瘤、镇痛、抗菌、抗炎等多种药理活性^[19]。

2.2 化合物靶点筛选

通过 PubChem Compound、TCMSP 数据库检索,基于 PubMed 数据库的文献挖掘收集 21 个潜在

表 1 白屈菜中筛选的 21 个候选化合物信息

Table 1 Information of 21 candidate compounds in *C. majus*

分子 ID	化合物	OB	DL	Caco-2	度数	接近中心度
MOL001454	小檗碱 (berberine)	36.86	0.78	1.24	73	0.471 3
MOL001455	氢化小檗碱 (canadine)	53.83	0.77	1.01	49	0.420 9
MOL002666	白屈菜红碱 (chelerythrine)	34.18	0.78	1.39	86	0.480 9
MOL001481	白屈菜碱 (chelidone)	48.32	0.86	0.67	22	0.375 7
MOL001482	白屈菜黄碱 (chelilutine)	53.55	0.87	1.13	3	0.298 6
MOL001458	黄连碱 (coptisine)	30.67	0.86	1.21	8	0.354 5
MOL001460	隐品碱 (cryptopin)	78.74	0.72	0.79	11	0.306 3
MOL004197	紫堇定 (corydine)	37.16	0.55	1.29	14	0.362 7
MOL001461	二氢白屈菜红碱 (dihydrochelerythrine)	32.73	0.81	1.13	15	0.364 1
MOL001462	二氢白屈菜玉红碱 (dihydrochelirubine)	55.29	0.86	1.11	7	0.302 4
MOL001463	二氢血根碱 (dihydrosanguinarine)	59.31	0.86	1.00	13	0.361 3
MOL000787	蓝堇碱 (fumarine)	59.26	0.83	0.56	13	0.341 7
MOL001466	高白屈菜碱 (homochelidone)	36.84	0.84	0.82	10	0.305 3
MOL001467	异紫堇定碱 (isocorydine)	55.63	0.55	0.94	45	0.413 5
MOL001469	甲氧基白屈菜碱 (methoxychelidone)	32.21	0.84	0.68	4	0.299 5
MOL000729	氧化血根碱 (oxysanguinarine)	46.97	0.87	1.08	3	0.298 6
MOL001473	丽春花碱 (rheadine)	63.51	0.83	0.87	6	0.301 4
MOL001474	血根碱 (sanguinarine)	37.81	0.86	1.26	37	0.399 5
MOL000217	金黄紫堇碱 (scoulerine)	32.28	0.54	0.89	29	0.386 5
MOL004230	刺罂粟碱 (stylopine)	48.25	0.85	0.93	7	0.302 4
MOL002668	甲基黄连碱 (worenine)	45.83	0.87	1.22	5	0.350 6

活性化合物的相关靶点,共收集到 442 个蛋白靶点,利用 SysDT 药物-靶标预测模型进行筛选,得到蛋白靶点 224 个。再将获得的靶点进一步映射到 Uniprot 数据库归一化和标准化命名,最终得到 168 个与肿瘤密切相关靶点,见表 2。

2.3 化合物-靶点网络构建与分析

运用 Cytoscape 3.1.1 软件构建白屈菜活性化合物-靶点网络,如图 1 所示(浅色节点为潜在活性化合物,深色节点为分子靶点)。图中共 189 个节点(21 个潜在化合物和 168 个潜在靶点)和 460 条边。节点的大小由其度数大小决定,度数越大,节点越大。每个活性成分可作用于多个靶点,网络拓扑学结构分析显示,化合物的平均度数为 4.842,说明白屈菜生物碱抗肿瘤作用的多靶点属性,其中度数较大(度数 > 30)的化合物为白屈菜红碱、小檗碱、氢化小

檗碱、异紫堇定碱和血根碱。化合物拓扑学参数见表 1。同时,许多靶点也与多种化合物相关,这可能表明白屈菜在发挥药效过程中不同化合物具有协同作用,其中 PTGS2、SCN5A、F10、NCOA2、CHRM3 和 AR9 的度数较大(度数 > 9)。每个节点的相对位置由其接近中心度决定,接近中心度越大,越接近所有其他节点。其中白屈菜红碱、小檗碱、氢化小檗碱、异紫堇定碱和血根碱位于网络的中心(接近中心度 > 0.35)。蛋白靶点中接近中心度较高的有 TP53、CASP3、CASP9、DRD1、MAPT、MAPK1、CASP1 和 BLM。

2.4 靶点生物学功能分析

为了阐明白屈菜抗肿瘤作用的分子机制,对其进行了 GO 生物过程富集分析。将 168 个潜在靶点映射到 DAVID 数据库中,进行生物学功能富集,

表 2 肿瘤密切相关蛋白靶点

Table 2 Target proteins closely related with tumor

Uniprot	基因	蛋白	Uniprot	基因	蛋白
P08183	ABCB1	multidrug resistance protein 1	P08069	IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
P00519	ABL1	tyrosine-protein kinase ABL1	O14920	IKBKB	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
P31749	AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	P60568	IL-2	interleukin-2
P31751	AKT2	RAC-beta serine/threonine-protein kinase	P07750	IL-4	interleukin-4
Q9Y243	AKT3	RAC-gamma serine/threonine-protein kinase	P05231	IL-6	interleukin-6
O14727	APAF1	apoptotic protease-activating factor 1	P06213	INSR	insulin receptor
P10275	AR	androgen receptor	P56199	ITGA1	integrin alpha-1
P27540	ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	P13612	ITGA4	integrin alpha-4
Q13315	ATM	serine-protein kinase ATM	O60674	JAK2	tyrosine-protein kinase JAK2
Q07812	BAX	apoptosis regulator BAX	P52333	JAK3	tyrosine-protein kinase JAK3
P10415	BCL2	apoptosis regulator Bcl-2	P05412	JUN	transcription factor AP-1
Q07817	BCL2L1	Bcl-2-like protein 1	Q12809	KCNH2	potassium voltage-gated channel subfamily H member 2
O43521	BCL2L11	Bcl-2-like protein 11	P35968	KDR	vascular endothelial growth factor receptor 2
O15392	BIRC5	baculoviral IAP repeat-containing protein 5	P10721	KIT	mast/stem cell growth factor receptor Kit
P54132	BLM	bloom syndrome protein	Q02750	MAP2K1	dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1
P38398	BRCA1	breast cancer type 1 susceptibility protein	P28482	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1
P00918	CA2	carbonic anhydrase 2	Q16539	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14
P29466	CASP1	caspase-1	P27361	MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3
Q92851	CASP10	caspase-10	P45983	MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8
P42574	CASP3	caspase-3	P45984	MAPK9	mitogen-activated protein kinase 9
P70343	CASP4	caspase-4	P10636	MAPT	microtubule-associated protein tau
P51878	CASP5	caspase-5	P49736	MCM2	DNA replication licensing factor MCM2
P55210	CASP7	caspase-7	O15151	MDM4	protein Mdm4
Q14790	CASP8	caspase-8	P08581	MET	hepatocyte growth factor receptor
P55211	CASP9	caspase-9	O75030	MITF	microphthalmia-associated transcription factor
P78396	CCNA1	cyclin-A1	P08253	MMP2	matrix metalloproteinase-2
P20248	CCNA2	cyclin-A2	P14780	MMP9	matrix metalloproteinase-9
P14635	CCNB1	G ₂ /mitotic-specific cyclin-B1	P42345	MTOR	serine/threonine-protein kinase mTOR
O95067	CCNB2	G ₂ /mitotic-specific cyclin-B2	P01106	MYC	myc proto-oncogene protein
P24385	CCND1	G ₁ /S-specific cyclin-D1	Q15788	NCOA1	nuclear receptor coactivator 1
P30279	CCND2	G ₁ /S-specific cyclin-D2	Q15596	NCOA2	nuclear receptor coactivator 2
P30281	CCND3	G ₁ /S-specific cyclin-D3	Q9Y6Q9	NCOA3	nuclear receptor coactivator 3
P24864	CCNE1	G ₁ /S-specific cyclin-E1	P19838	NFKB1	nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
O96020	CCNE2	G ₁ /S-specific cyclin-E2	P38936	CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
P51946	CCNH	cyclin-H	P46527	CDKN1B	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
P06493	CDK1	cyclin-dependent kinase 1	P49918	CDKN1C	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
P24941	CDK2	cyclin-dependent kinase 2	P49715	CEBPA	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
P11802	CDK4	cyclin-dependent kinase 4	O14757	CHEK1	serine/threonine-protein kinase Chk1
Q00534	CDK6	cyclin-dependent kinase 6	O96017	CHEK2	serine/threonine-protein kinase Chk2
P50613	CDK7	cyclin-dependent kinase 7	P11229	CHRM1	muscarinic acetylcholine receptor M1
Q92769	HDAC2	histone deacetylase 2	P20309	CHRM3	muscarinic acetylcholine receptor M3
Q16665	HIF1A	hypoxia-inducible factor 1-alpha			
Q2TB90	HKDC1	putative hexokinase HKDC1			
P07900	HSP90AA1	heat shock protein HSP 90-alpha			
P42858	HTT	huntingtin			
P47928	ID4	DNA-binding protein inhibitor ID-4			
P05019	IGF1	insulin-like growth factor I			

续表 2

Uniprot	基因	蛋白	Uniprot	基因	蛋白
P08485	CHRM4	muscarinic acetylcholine receptor M4	Q03181	PPARD	peroxisome proliferator-activated receptor delta
P08912	CHRM5	muscarinic acetylcholine receptor M5	P37231	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
O15111	CHUK	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha	Q13131	PRKAA1	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1
P02452	COL1A1	collagen alpha-1(I) chain	P17252	PRKCA	protein kinase C alpha type
Q92793	CREBBP	CREB-binding protein	O75365	PRL	protein tyrosine phosphatase type IVA 3
P07333	CSF1R	macrophage colony-stimulating factor 1 receptor	P43116	PTGER2	prostaglandin E2 receptor EP2 subtype
P35222	CTNNB1	catenin beta-1	P35354	PTGS2	prostaglandin G/H synthase 2
P10145	CXCL8	interleukin-8	Q05397	PTK2	focal adhesion kinase 1
P04839	CYBB	cytochrome b-245 heavy chain	P04049	RAF1	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
P53355	DAPK1	death-associated protein kinase 1	Q04206	RELA	transcription factor p65
P18901	DRD1	D(1A) dopamine receptor	P07949	RET	proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret
P05305	EDN1	endothelin-1	O75116	ROCK2	rho-associated protein kinase 2
P01133	EGF	pro-epidermal growth factor	P19793	RXRA	retinoic acid receptor RXR-alpha
P00533	EFFR	epidermal growth factor receptor	P28702	RXRB	retinoic acid receptor RXR-beta
Q09472	EP300	histone acetyltransferase p300	Q14524	SCN5A	sodium channel protein type 5 subunit alpha
Q99814	EPAS1	Endothelial PAS domain-containing protein 1	Q9NTG7	SIRT3	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3, mitochondrial
P03372	ESR1	estrogen receptor	P10451	SPP1	osteopontin
Q62986	ESR2	estrogen receptor beta	P40763	STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
P00742	F10	coagulation factor X	P42229	STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A
P00734	F2	prothrombin	Q9BYT3	STK33	serine/threonine-protein kinase 33
P08709	F7	coagulation factor VII	Q13043	STK4	serine/threonine-protein kinase 4
P25445	FAS	tumor necrosis factor receptor superfamily member 6	P43405	SYK	tyrosine-protein kinase SYK
P48023	FASLG	tumor necrosis factor ligand superfamily member 6	Q9NUW8	TDP1	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1
P11362	FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1	P01137	TGFB1	transforming growth factor beta-1
P21802	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	P36897	TGFB1	TGF-beta receptor type-1
P22607	FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3	O00206	TLR4	toll-like receptor 4
P22455	FGFR4	fibroblast growth factor receptor 4	P01375	TNF	tumor necrosis factor
P36888	FLT3	receptor-type tyrosine-protein kinase FLT3	P02751	FN1	fibronectin
P35916	FLT4	receptor-type tyrosine-protein kinase FLT4	P01100	FOS	proto-oncogene c-Fos
P25963	NFKBIA	NF-kappa-B inhibitor alpha	Q12778	FOXO1	forkhead box protein O1
P35228	NOS2	nitric oxide synthase, inducible	P11413	G6PD	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
P29474	NOS3	nitric oxide synthase, endothelial	P35557	GCK	glucokinase
Q06710	PAX8	paired box protein Pax-8	O94925	GLS	glutaminase kidney isoform, mitochondrial
P12004	PCNA	proliferating cell nuclear antigen	P49841	GSK3B	glycogen synthase kinase-3 beta
P16234	PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor alpha	O14763	TNFRSF10B	tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B
P09619	PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor beta	O95551	TOP2	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2
O15530	PDPK1	3-phosphoinositide-dependent protein	P11388	TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha
P53350	PLK1	serine/threonine-protein kinase PLK1	P04637	TP53	cellular tumor antigen p53 kinase 1
Q9UBT6	POLK	DNA polymerase kappa	O94782	USP1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1
			O75604	USP2	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 2
			P49767	VEGFC	vascular endothelial growth factor C

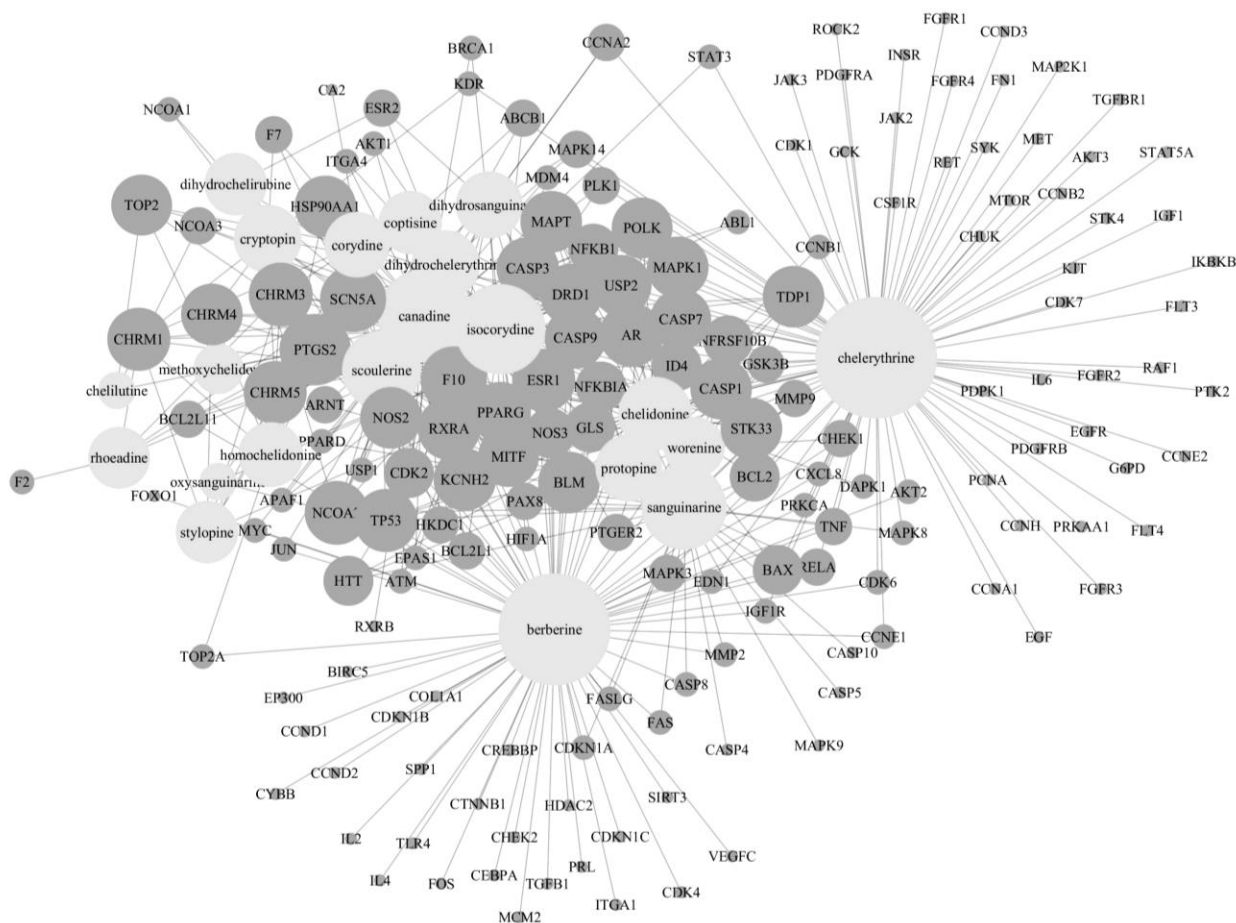


图 1 白屈菜化合物-靶点网络图

Fig. 1 Compounds-targets network of *C. majus*

以系统地分析其生物过程。共富集到 718 条生物过程, 其中 P 值 ≤ 0.05 的生物过程共有 598 条, 并用 FDR 错误控制法对 P 值作检验校正, 阈值为 $FDR < 0.05$ 。如图 2 所示, Y 轴表示功能富集排名前 30 的生物过程, X 轴表示 P 值的负对数。结果表明, 这些靶点与多种生物过程相关, 包括细胞增殖、细胞凋亡、细胞迁移、血管生成和细胞周期的调控; 以及转录、翻译、信号传导、炎症反应和免疫应激等生物过程, 这些生物过程于肿瘤的发生、发展密切相关^[21]。反映了肿瘤发病涉及体内多个生物过程的异常, 同时表明白屈菜生物碱可能是通过调节这些生物过程发挥其抗肿瘤作用。

2.5 成分修正结果

根据化合物所处化合物-靶点网络图中位置的重要性（度数和接近中心度）预测白屈菜红碱、小檗碱、氢化小檗碱、异紫堇定碱和血根碱为白屈菜抗肿瘤的主要成分，将 5 种化合物各自调控的靶点放入 DAVID 数据库进行 KEGG 代谢通路富集分析，

得到各自调控的与肿瘤相关通路(表3)。其中白屈菜红碱和小檗碱能调控的通路数最多;血根碱亦可调控大部分通路,且能和白屈菜红碱、小檗碱产生协同;氢化小檗碱和异紫堇定碱只能调控极少部分通路,且都在白屈菜红碱和小檗碱调控的通路内。根据以上结果,推测白屈菜中的主要有效成分为白屈菜红碱、小檗碱和血根碱。

2.6 白屈菜抗肿瘤通路图

将白屈菜红碱、小檗碱和血根碱作用靶点利用 KEGG Mapper 展示在与癌症最为相关的通路 pathway in cancer 中, 如图 3 所示, 其中蓝色方格为化合物作用靶点。白屈菜红碱、小檗碱和血根碱能够调控 pathway in cancer 通路网络中多个 (88) 节点, 作用于细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期、细胞转移以及免疫反应等多条信号通道。表明白屈菜生物碱类活性成分通过多靶点、多通路、多表型干预的网络模式产生作用。

根据目前对肿瘤病理学的了解，整合白屈菜生

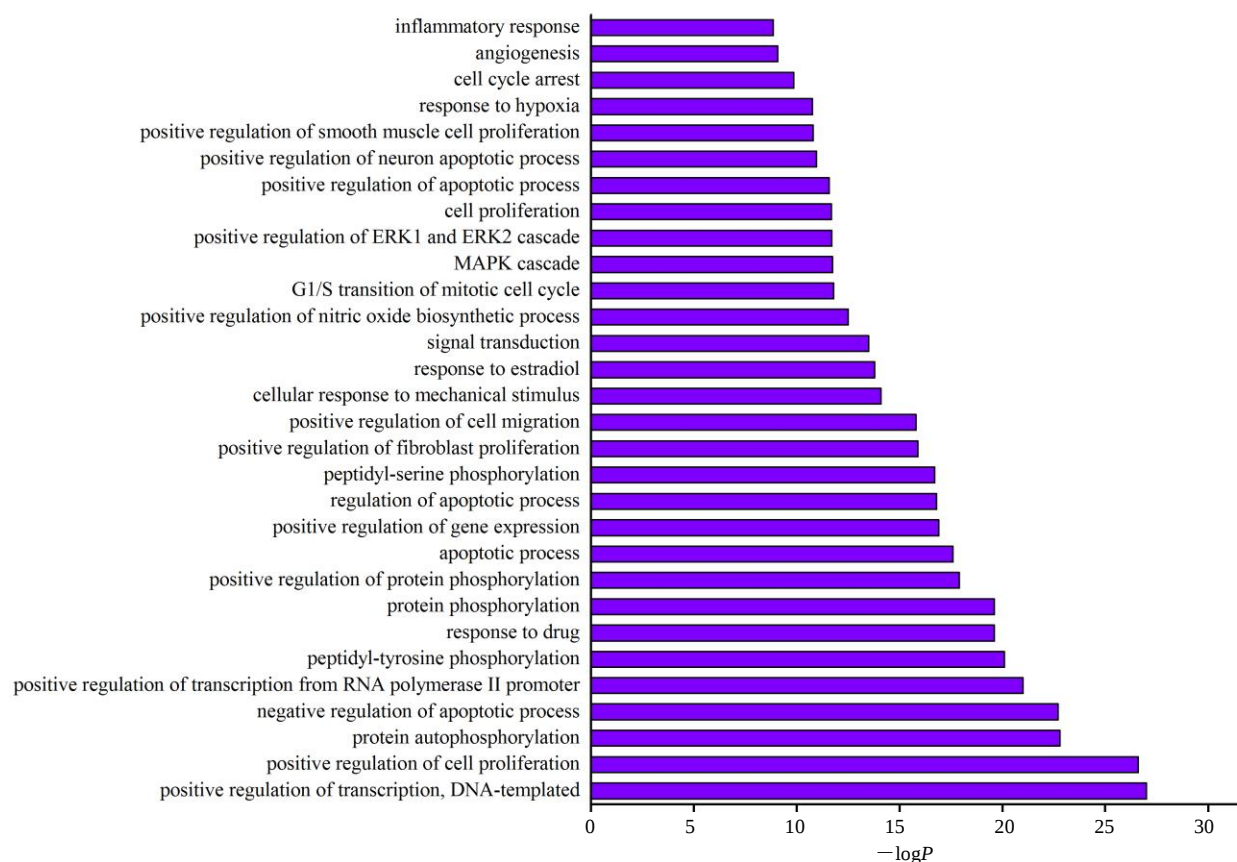


图 2 潜在靶点生物学过程的 GO 分析

Fig. 2 GO analysis of potential targets in biological processes

表 3 筛选得到化合物调控的肿瘤相关通路

Table 3 Tumor-related pathways controlled by screened compounds

通路类型	白屈菜红碱	小檗碱	氢化小檗碱	异紫堇定碱	血根碱
pathways in cancer	✓	✓	✓	✓	✓
PI3K-Akt signaling pathway	✓	✓	—	—	—
prostate cancer	✓	✓	—	—	✓
central carbon metabolism in cancer	✓	—	—	✓	—
FoxO signaling pathway	✓	✓	—	—	—
ras signaling pathway	✓	—	—	—	—
pancreatic cancer	✓	✓	—	—	✓
MAPK signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
HIF-1 signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
proteoglycans in cancer	✓	✓	—	—	✓
focal adhesion	✓	✓	—	—	—
rap1 signaling pathway	✓	—	—	—	—
glioma	✓	✓	—	—	—
acute myeloid leukemia	✓	✓	—	—	—
melanoma	✓	✓	—	—	—
progesterone-mediated oocyte maturation	✓	—	—	—	—
TNF signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
sphingolipid signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
small cell lung cancer	✓	✓	✓	✓	✓
non-small cell lung cancer	✓	✓	—	—	—
prolactin signaling pathway	✓	✓	—	—	✓

续表 3

通路类型	白屈菜红碱	小檗碱	氢化小檗碱	异紫堇定碱	血根碱
chronic myeloid leukemia	✓	✓	—	—	✓
viral carcinogenesis	✓	✓	—	—	✓
apoptosis	✓	✓	✓	✓	✓
colorectal cancer	✓	✓	—	—	✓
neurotrophin signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
p53 signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
cell cycle	—	✓	—	—	—
NOD-like receptor signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
T cell receptor signaling pathway	✓	✓	—	—	—
endometrial cancer	✓	✓	—	—	—
Toll-like receptor signaling pathway	✓	✓	—	—	✓
B cell receptor signaling pathway	✓	✓	—	—	—
ErbB signaling pathway	✓	✓	—	—	—
adipocytokine signaling pathway	✓	—	—	—	✓
osteoclast differentiation	✓	✓	—	—	✓
bladder cancer	✓	✓	—	—	✓
chemokine signaling pathway	✓	—	—	—	—
HTLV-I infection	✓	✓	—	—	—
VEGF signaling pathway	✓	✓	—	—	—
choline metabolism in cancer	✓	—	—	—	—
Fc epsilon RI signaling pathway	✓	—	—	—	—
microRNAs in cancer	✓	✓	—	✓	—
mTOR signaling pathway	✓	—	—	—	—
insulin signaling pathway	✓	—	—	—	—
thyroid hormone signaling pathway	✓	✓	✓	—	✓
regulation of actin cytoskeleton	✓	—	—	—	—
RIG-I-like receptor signaling pathway	✓	—	—	—	✓
cytokine-cytokine receptor interaction	✓	—	—	—	—
transcriptional misregulation in cancer	✓	✓	—	—	—
oocyte meiosis	✓	—	—	—	—
NF-kappa B signaling pathway	✓	✓	—	—	—
AMPK signaling pathway	✓	—	—	—	—
cAMP signaling pathway	✓	✓	—	—	—
estrogen signaling pathway	✓	✓	—	—	—
thyroid cancer	—	✓	✓	—	✓
Jak-STAT signaling pathway	—	✓	—	—	—
renal cell carcinoma	—	✓	—	—	—
Wnt signaling pathway	—	✓	—	—	—
natural killer cell mediated cytotoxicity	—	—	—	—	✓
总数	56	44	5	5	26

✓ 表示调控 —表示不调控

✓means regulate —means not regulate

物碱抗肿瘤相关通路, 本研究构建了 1 个综合的白屈菜抗肿瘤通路图。首先, 根据对肿瘤病理学认识与文献支持, 挑选 KEGG 通路分析中与肿瘤密切相关的途径, 包括 TGF- β 、PI3K-Akt、FOXO、MAPK、TNF、apoptosis、P53 和 Wnt 等信号通路。然后整合相关通路绘制了比较全面的白屈菜生物碱抗肿瘤

活性通路图, 如图 4 所示。

3 讨论

现代医学对肿瘤的药物治​​疗主要有化学治疗、免疫治疗等。传统的化学药物虽然疗效显著, 但是开发费用高昂, 且毒副作用大、易出现耐药性。鉴于肿瘤的高度复杂性, 一直以来沿用的针对单一分

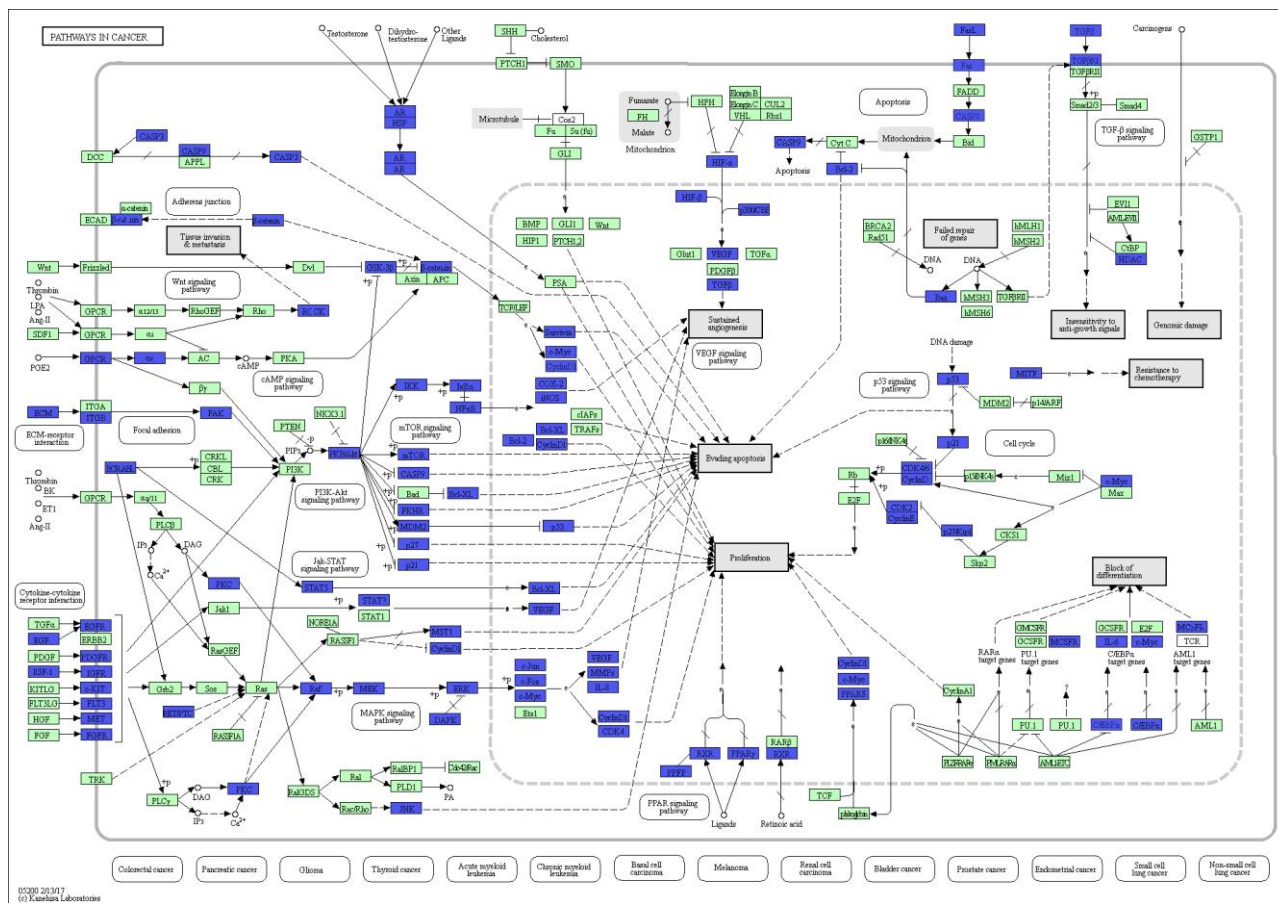


图3 白屈菜生物碱在癌症相关通路中的作用靶点

Fig. 3 Targets of *C. majus* alkaloids in tumor pathway

子靶点的高特异性化合物（抗体）的“一病一靶”治疗策略并没有取得满意的效果^[22]。本研究采用网络药理学方法,利用 ADME 性质筛选出具有良好药动学性质的化合物,并获取其作用靶点,建立化合物-靶点网络图,从系统水平上来研究药物与机体之间相互作用的本质和规律,快速识别药物活性分子,并确定其在机体分子层面的生物靶点,推测药物的效应机制,从而阐释药物抗肿瘤活性的物质基础和效应机制。

辨证施治是中医治病的基本方法，症状是辨证依据，辨证施治、对症下药，方能产生良好的疗效。传统中医认为，“虚、湿、痰、瘀、毒”既是肿瘤发生、发展的“因”，也往往以“证”的现象出现。因此，肿瘤治疗多以活血化瘀、扶正培本、软坚散结、清热解毒、利湿逐水为主。白屈菜味苦，性凉，具有化瘀、解毒、利尿、镇痛之功效。其寒凉之性可清热，化瘀之功效可避免气滞、血淤产生的热量积累而导致的体液变瘀湿和变稠形成痰，利尿之功效防止体液的积累，解毒之功效可祛瘀毒，并能缓解

肿瘤患者的癌性疼痛^[23]。因此,白屈菜既可对“症”治疗,亦可对“因”治疗,且毒副作用小,具有良好的应用前景。

通过 ADME 性质筛选, 最终获得 21 个潜在活性化合物, 对应靶点 168 个。其活性成分多样性和化合物靶点的多样性, 预示了中药疾病治疗的广泛性和药物毒副作用的根源, 并在一定程度上解释了“异病同治, 同病异治”的物质基础。根据化合物-靶点网路(图 1)预测并利用通路分析筛选有效成分, 最后推测白屈菜红碱、小檗碱为白屈菜抗肿瘤主要有效成分。以前的研究显示, 小檗碱可诱导肝癌细胞自噬和凋亡^[20]。白屈菜红碱可以通过多种途径诱导细胞凋亡, 并能抑制细胞增殖和阻断细胞周期^[24]。本研究结果与文献报道一致, 说明基于化合物-靶点网络预测和通路分析筛选的方法预测中药有效成分具有一定的可行性和科学性。

中医“证”的本质是细胞内基因诱生性表达的细胞因子,中医“证”的发病机制是细胞因子网络功能态紊乱。中药治疗疾病的基本作用机制是调节

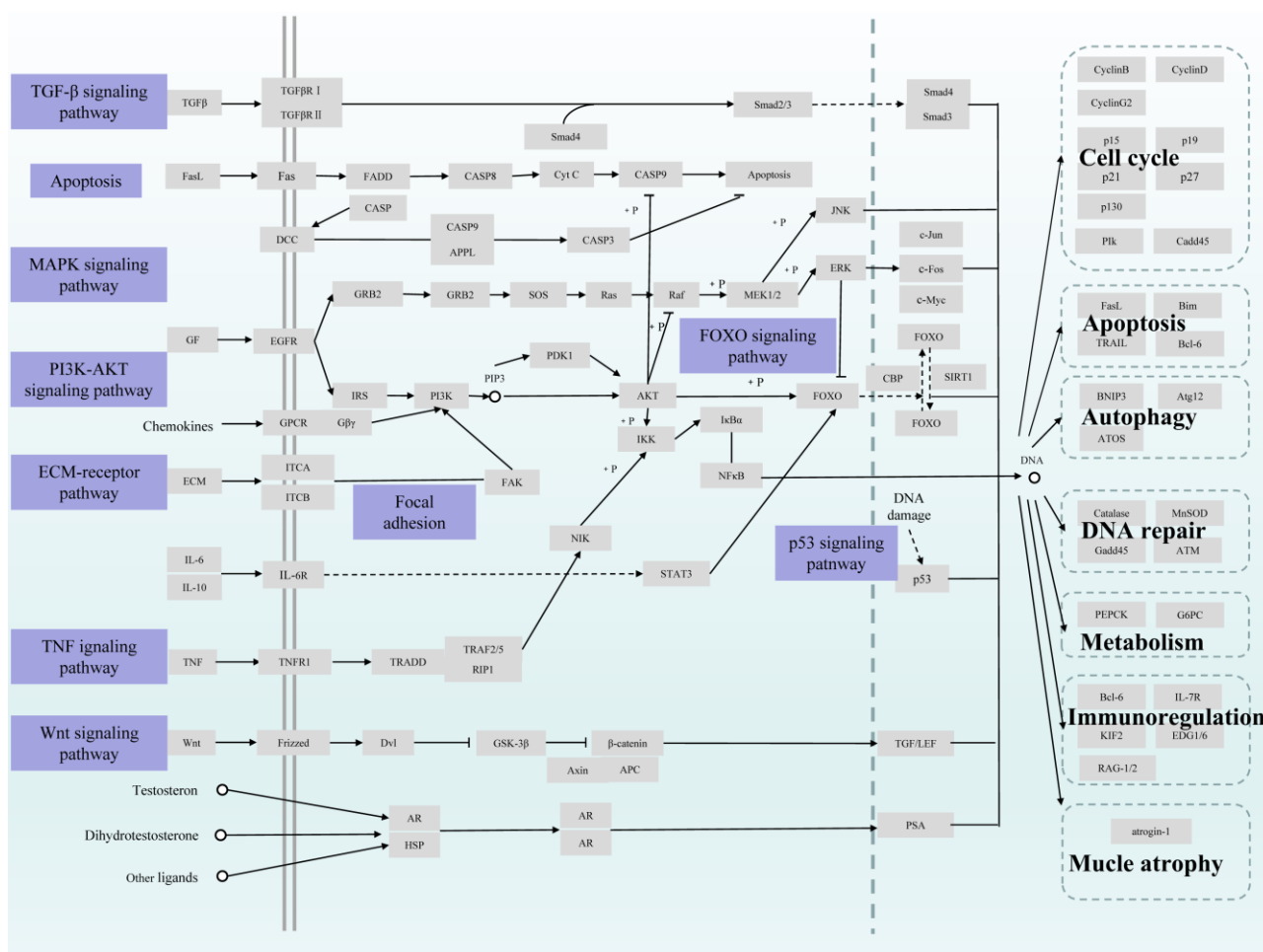


图 4 白屈菜生物碱抗肿瘤途径

Fig. 4 Antitumor pathway of *C. majus* alkaloids

细胞因子网络的功能态平衡,从而达到治疗中医的“证”和西医“病”的效果^[25]。预测靶点中 PTGS2、SCN5A、F10、NCOA2、CHRM3、AR、TP53、CASP1/3/9、DRD1、MAPT、MAPK1 和 BLM 在网络的中心位置,可能为白屈菜抗肿瘤网络中重要的调节因子。这些靶点涉及细胞过程、代谢过程、免疫系统以及调节生物体对应激的应答等生物过程,与肿瘤的发生、发展密切相关^[20];某些靶点与中枢神经系统相关,实验证明白屈菜生物碱提取物具有良好的镇痛抗炎作用^[22],说明白屈菜具有一定的中枢神经抑制作用。因此,白屈菜通过抑制肿瘤生长和迁移、增强机体免疫以及调节能量和体液代谢多表型干预的网络模式产生抗肿瘤活性,并对癌性疼痛具有一定的缓解作用。

本研究应用网络药理学方法对白屈菜抗肿瘤化学成分、作用靶点和作用机制进行了探索性研究。

研究结果初步验证了该药的基本药理学作用和相关机制,并为进一步深入探讨其作用机制奠定了良好基础。然而,由于数据库信息不全面,化合物筛选的主观性,且只关注于药物的组成成分,而忽略了其成分的含量、化合物之间的相互作用以及药物体内代谢过程等的影响,故研究预测的结果具有一定的片面性和局限性。

参考文献

- [1] 王庆才. 恶性肿瘤中医证因探析 [J]. 辽宁中医杂志, 1998, 25(3): 108-109.
- [2] 蔡小平, 魏 征. 恶性肿瘤中医证治新理论——瘀毒论 [J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(3): 465-466.
- [3] 韦祖巧, 邹 翔, 曲中原, 等. 白屈菜化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 中草药, 2009, 40(1): 38-40.
- [4] 邹 翔, 王雨蒙, 王嘉琪, 等. 白屈菜碱的药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(11): 1326-1330.

- [5] Habermehl D, Kammerer B, Handrick R, *et al.* Proapoptotic activity of Ukrain is based on *Chelidonium majus* L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway [J]. *BMC cancer*, 2006, doi: 10.1186/1471-2407-6-14.
- [6] 黄自丽, 黄修燕, 郑 起. 中药抗肿瘤作用及其作用机制研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(3): 386-389.
- [7] 张秀云, 周凤琴. 中药抗肿瘤研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(11): 142-144.
- [8] 刘志华, 孙晓波. 网络药理学: 中医药现代化的新机遇 [J]. 药学学报, 2012, 47(6): 696-703.
- [9] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展 [J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [10] 张彦琼, 李 梢. 网络药理学与中医药现代研究的若干进展 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(6): 883-892.
- [11] 马晓茹, 周维维, 张闪闪, 等. 基于系统药理学方法筛选抗急性髓系白血病的中药活性分子 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(5): 196-202.
- [12] Ru J, Li P, Wang J, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, doi: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [13] Li L T, Li Y, Wang Y H, *et al.* Prediction of human intestinal absorption based on molecular indices [J]. *J Mol Sci*, 2007, 23(4): 286-291.
- [14] Yu H, Chen J, Xu X, *et al.* A systematic prediction of multiple drug-target interactions from chemical, genomic, and pharmacological data [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37608.
- [15] Azuaje F J, Zhang L, Devaux Y, *et al.* Drug-target network in myocardial infarction reveals multiple side effects of unrelated drugs [J]. *Sci Rep*, 2011, doi: 10.1038/srep00052.
- [16] 戴维·诺克, 杨 松. 社会网络分析 [M]. 第 2 版. 上海: 上海人民出版社, 2012.
- [17] Dennis G, Sherman B T, Hosack D A, *et al.* DAVID: Database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(9): R60.
- [18] Ashburner M, Ball C A, Blake J A, *et al.* Gene Ontology: tool for the unification of biology [J]. *Nat Gene*, 2000, 25(1): 25-29.
- [19] 李纬博. 白屈菜生物活性化学成分的研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [20] Wang N, Feng Y, Zhu M, *et al.* Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: The cellular mechanism [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6): 1426-1436.
- [21] Douglas H, Robert A W. Hallmarks of cancer: The next generation [J]. *Cell*, 2011, 114(5): 646-674.
- [22] 肖智勇, 周文霞, 张永祥. 基于网络药理学的抗肿瘤药物发现策略 [J]. 国际药学研究杂志, 2014, 41(1): 1-5.
- [23] 何志敏, 佟继铭, 宫凤春. 白屈菜碱镇痛作用研究 [J]. 中草药, 2003, 34(9): 72-73.
- [24] 陈志宝, 李欣燃, 朱 淼, 等. 白屈菜红碱抗肿瘤机制研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(1): 9-12.
- [25] 申维玺, 刘玉梅. 细胞因子网络与中药的作用机理 [J]. 世界科学技术——中国现代化, 2000, 2(6): 24-27.