

基于网络药理学推测和分子生物学验证探讨半枝莲抗胰腺癌的活性成分及其作用机制

张红娜¹, 邹佳楠², 李 昆³, 翟真真^{4*}, 翟 静^{5*}

1. 河北经贸大学生物科学与工程学院, 河北 石家庄 050061

2. 复旦大学医学院, 上海 200433

3. 上海交通大学医学院, 上海 200025

4. 泰安市中心医院, 山东 泰安 271000

5. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)基础医学院, 山东省中药生物技术重点实验室, 山东 泰安 271000

摘要: **目的** 运用网络药理学预测和分子生物学验证探讨半枝莲抗胰腺癌的活性成分及其作用机制。**方法** 通过中医药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)筛选半枝莲的活性成分和相关潜在靶点;应用毒性与基因比较数据库(CTD)、治疗靶点数据库(TTD)、药物基因组学知识库(PharmGKB)建立胰腺肿瘤靶点数据库;基于半枝莲潜在靶点与胰腺肿瘤靶点的匹配结果,构建PPI网络,拓扑分析筛选核心靶点;基于核心靶点的GO功能富集分析和KEGG通路富集分析建立半枝莲抗胰腺癌的信号通路图;采用Western blotting验证半枝莲中核心成分木犀草素对胰腺癌细胞PANC-1中P53、Bax和Bcl-2关键靶点的调控作用。**结果** 共筛选出28种活性成分,包括槲皮素、木犀草素、汉黄芩素等;91个半枝莲作用靶点,经拓扑筛选获得24个核心靶点,涉及TP53、AKT1、JUN、VEGF等。GO功能富集分析显示,半枝莲作用靶点共涉及到73条生物学过程,KEGG通路富集筛选出18条信号通路参与胰腺癌的治疗,主要是通过NF- κ B、p53、PI3K-Akt和VEGF信号通路来调节肿瘤炎症微环境、细胞周期阻滞、促细胞凋亡以及抗血管生成。分子生物学实验发现半枝莲中木犀草素可调节p53信号通路中关键靶点促进胰腺癌细胞的凋亡,证明了本研究中网络药理学分析结果的可靠性。**结论** 初步证实了半枝莲具有多成分-多靶点-多途径协同作用的特点以及治疗胰腺肿瘤的潜在分子机制,为进一步探索其作用机制及临床应用奠定基础。

关键词: 网络药理学; 分子生物学; 半枝莲; 胰腺肿瘤; 分子机制; 槲皮素; 木犀草素; 汉黄芩素; TP53; AKT1; 凋亡过程的负正调节; 炎症反应; NF- κ B 信号通路; p53 信号通路; PI3K-Akt 信号通路; VEGF 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)12-3234-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.015

Active compounds and underlying mechanisms of *Scutellariae Barbatae Herba* against pancreatic cancer based on network pharmacology and molecular experimental validation

ZHANG Hong-na¹, ZOU Jia-nan², LI Kun³, ZHAI Zhen-zhen⁴, ZHAI Jing⁵

1. College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China

2. College of Medical Science, Fudan University, Shanghai 200433, China

3. College of Medical Science, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

4. Center Hospital of Tai'an City, Tai'an 271000, China

5. Shandong Key Laboratory of Biotechnology of Chinese Medicine, School of Basic Medicine, Shandong First Medical University and Shandong Academy of Medical Sciences, Tai'an 271000, China

收稿日期: 2019-11-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81903282); 山东省重点研发计划资助项目(2015GSF19023); 泰安市科技发展计划项目(2019NS188)

作者简介: 张红娜(1986—), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事中草药开发与利用研究。E-mail: zhang186982@126.com

*通信作者 翟真真, 女, 博士, 副主任技师, 主要从事药物筛选工作。E-mail: sdzzzhai@sina.com

翟 静, 女, 博士, 教授, 主要从事抗肿瘤药物开发。E-mail: tsmczhaijing@sina.com

Abstract: Objective To probe active components of *Scutellariae Barbatae Herba* (SBH) and its underlying complex mechanism in treating pancreatic cancer based on network pharmacology and molecular experimental validation. **Methods** Active compounds of SBH and potential targets of these compounds were screened via Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology (TCMSP) database. Then the pancreatic cancer target database was established by using Comparative Toxicogenomics Database (CTD), Therapeutic Target Database (TTD), and Pharmacogenomics Knowledgebase (PharmGKB). Based on the matching results between SBH potential targets and pancreatic cancer targets, a PPI network was structured and then the hub targets were screened by using topology analysis. Furthermore, DAVID bioinformatics was utilized for both Gene ontology (GO) functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis. At last, Western blotting was used to validate the regulating function of luteolin on P53, Bax and Bcl-2 targets of PANC-1 cells. **Results** A total of 28 active ingredients including quercetin, luteolin and wogonin were screened out, and 24 hub targets of 91 targets including TP53, AKT1, JUN and VEGF were obtained. The results of DAVID enrichment analysis indicated that 73 cellular biological processes and 18 pathways were found to participate in the treatment of pancreatic cancer, mainly involving in regulating inflammatory microenvironment, cell cycle arrest, pro-apoptosis and anti-angiogenesis through NF- κ B, p53, PI3K-AKT and VEGF signal pathways. Luteolin from SBH was validated to regulate key targets in the p53 signaling pathway to play a role in pro-apoptosis, which proved the reliability of results of network pharmacology. **Conclusion** This study confirmed the synergistic effect of multiple component-multiple target-multiple pathway of SBH on the treatment of pancreatic cancer, which offered a theory for its clinical application.

Key words: network pharmacology; molecular biology; *Scutellariae Barbatae Herba*; pancreatic cancer; molecular mechanism; quercetin; luteolin; wogonin; TP53; AKT1; positive and negative regulation of apoptotic process; inflammatory response; NF- κ B signaling pathway; p53 signaling pathway; PI3K-AKT signaling pathway; VEGF signaling pathway

胰腺肿瘤是消化系统的高度恶性肿瘤, 具有极高死亡率和预后差的特点。在过去的几十年中胰腺肿瘤的患者 5 年存活率总体上小于 3%, 预计到 2030 年将成为所有因恶性肿瘤死亡的第 2 大原因^[1]。在临床中大多采以手术方式并术后放化疗作为辅助手段来对胰腺肿瘤患者进行治疗, 或通过服用厄洛替尼靶向药物, 但胰腺对化疗并不十分敏感, 而靶向药物又存在一定的毒副作用, 这些治疗方法都不能达到较好的效果^[2]。我国学者刘鲁明团队研究表明, 应用中药半枝莲 *Scutellariae Barbatae Herba* 可显著缓解胰腺癌引起的腰腹胀痛和腹水等临床症状, 且具有提高免疫力, 降低肿瘤标记物 CA199 的表达, 减轻术后放化疗和靶向药物导致的毒副作用^[3-4]。

半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 在植物分类学中属于黄芩属的多年生草本植物, 具有清热解毒、消肿利尿等功效; 黄酮类和二萜类化合物是其发挥生物学功效的主要活性成分^[5-6]。大量临床研究证明, 半枝莲单方或组方可缓解多种肿瘤, 如胃癌、胰腺癌、结肠癌等消化道肿瘤, 以及肺癌和妇科肿瘤等^[5,7-9]。蔡芸芸等^[4]通过体内和体外研究表明, 半枝莲能够显著抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖和转移, 改变肿瘤基因 YAP、p-YAP 的表达、增加细胞的凋亡。但由于半枝莲含有成分复杂、作用靶点较多, 到目前为止半枝莲治疗胰腺肿瘤的关键活性成分及其潜在的分子作用机制尚不清楚。

网络药理学以“疾病-基因-靶点-药物”为研究网络, 从整体的观点揭示药物对疾病的干预以及药物对人体复杂的作用机制^[10]。该方法的系统性正好与中医药治疗的整体性、协同性相契合^[11-12]。Wu 等^[13]应用网络药理学预测了补肾健脾汤中 3 种核心活性成分通过调控与凋亡密切相关的蛋白 p53、CASP3 和 Bcl-xL/BAD, 促使肝癌癌细胞的凋亡, 从而延长肝癌患者的生存期。Zhang 等^[14]基于网络药理学研究了芍药治疗溃疡性结肠炎的作用机制, 发现其活性成分与溃疡性结肠炎相关的 70 个靶点作用, 主要是通过 TNF 信号通路来减轻炎症反应对肠道的刺激。本研究旨在通过网络药理学筛选出半枝莲治疗胰腺肿瘤的主要活性成分、作用的核心靶点以及潜在复杂的网络关系, 为揭示半枝莲作用机制提供科学的参考, 为开发抗胰腺癌药物提供可靠的理论基础。

1 方法

1.1 活性成分的筛选

借助 TCMSP 平台 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 以“*Scutellaria barbata* D. Don”(半枝莲) 关键词进行查询。然后参数标准设置为生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 类药性 (DL) ≥ 0.18 , Caco-2 渗透性 > 0 , 氢键供体数 (Hdon) < 5 , 氢键受体数 (Hacc) < 10 , 相对分子质量 (MW) < 500 , 进行半枝莲的活性成分筛选。

1.2 靶点的筛选

1.2.1 半枝莲活性成分的靶点预测 由于药物活性成分通过与靶点相互作用来发挥其生物功能,因此本研究通过 TCMSP 数据库搜索半枝莲活性成分可能作用的靶点,然后利用 Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) 数据库进行标准化匹配。

1.2.2 胰腺肿瘤靶点的筛选 通过在治疗靶点数据库 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、比较毒性基因组学数据库 CTD (<http://ctdbase.org/>)、药物基因组学和生物信息学数据库 PharmGKB (<https://www.pharmgkb.org/>) 3 大疾病数据库中输入“Pancreatic Cancer”获得相关的非重复靶点。

1.2.3 胰腺肿瘤相关的药物活性成分靶点 将疾病相关靶点与药物活性成分相关靶点取交集,最终获得胰腺肿瘤疾病相关的药物活性成分靶点,用于后续分析。

1.3 蛋白-蛋白互作 (PPI) 网络和成分-靶点 (Compounds-Targets, C-T) 网络的构建

1.3.1 PPI 网络 依托 String 数据库 (<https://string-db.org/>) 分析胰腺癌相关的药物活性成分靶点,构建靶点蛋白间的互做网络关系,并对 PPI 网络图通过拓扑分析进一步了解核心靶点,网络拓扑分析过程见材料方法“1.4”项。

1.3.2 C-T 网络 应用 Cytoscape 3.7.2 软件将核心靶点与药物活性成分进行关联,构建核心靶点与药物活性成分的关系网络图,进而分析关键的药物活性成分。

1.4 网络拓扑分析

将材料方法“1.3”项构建的 PPI 网络分析结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件,根据 3 个主要参数“度”、“度介中心度”和“接近中心度”分析网络拓扑结构,筛选出核心靶点网络。首先根据节点“度”的数值分布,选定最大节点下对应的数值,设定“度”阈值为 34。“度介中心度”与“接近中心度”的阈值为对应节点“度”的数值。因此,第 1 次筛选阈值设定为度 ≥ 34 、度介中心度 $\geq 0.004\ 225$ 、接近中心度 $\geq 0.616\ 438$ 。将第 1 次筛选获得的网络图进行第 2 次筛选,阈值设定为度 ≥ 44 、度介中心度 $\geq 0.005\ 837$ 、接近中心度 $\geq 0.833\ 333$,最终获得核心靶点。

1.5 GO 和 KEGG 富集分析

借助于 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对疾病相关的药物活性成分靶点进行 GO 与

KEGG 富集分析。对前 25 个 GO 结果进行归类展示。KEGG 富集分析获得的信号通路结果根据富集倍数 (FDR) ≤ 0.01 标准筛选并排序,对前 18 个与癌症相关的信号通路进行作图展示。FDR 数值越高说明该信号通路中各种靶点与相关药物成分的药理作用关系越密切。为了探索半枝莲的药物成分对抗胰腺肿瘤的系统性的作用机制,将 T-P 网络、C-T 网络以及 GO 生物学功能进行整合,综合构建抗胰腺肿瘤的关键通路网络。

1.6 分子生物学验证

1.6.1 材料 通过中国科学院上海细胞库购买 PANC-1 细胞;木犀草素购自上海原业生物科技有限公司 (质量分数 $\geq 98\%$);二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司,美国) 用来溶解木犀草素,得到 100 mmol/L 的原液,4 °C 保存。为确保对细胞无影响,在细胞培养基中加入 DMSO 时最终体积分数需 $< 0.1\%$ 。

1.6.2 CCK-8 比色法检测细胞活力 细胞实验共分为 4 组。首先在 96 孔板中加入 1×10^5 个/mL 密度的 PANC-1 细胞培养液,100 μL /孔,24 h 后更换不同浓度的木犀草素培养液 (50、100、150 $\mu\text{mol/L}$),对照组为等量培养液,并设置空白组。每组设置 5 个重复,放置培养箱中分别培养 24 h 和 48 h。每个处理时间截止前 2 h,每孔添加 10 μL cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂 [吉满生物科技 (上海) 有限公司],再培养 2 h,用酶标仪测定各孔 450 nm 处的吸光度 (A) 值,根据公式计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.6.3 PI/Annexin V 检测细胞凋亡率 将对数生长期的 PANC-1 细胞消化离心洗涤后用培养基重悬,将细胞密度调整至 1×10^5 个/mL,2 mL/孔,培养箱中培养过夜。细胞贴壁后更换不同浓度的木犀草素培养液 (50、100、150 $\mu\text{mol/L}$),培养 48 h。取出培养板后消化洗涤收集细胞,根据凋亡试剂盒说明书,每孔加入 500 μL 缓冲液重悬细胞,再加入 PI 和 Annexin 各 5 μL ,避光孵育 15 min,最后流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.6.4 p53 信号通路中关键蛋白的检测 Western blotting 方法用于检测关键蛋白。4 个组的细胞总蛋白提取后,其蛋白浓度用 BCA 试剂盒检测 (北京中杉金桥生物有限公司)。SDS-PAGE (10%) 电泳后将印迹转到硝化纤维素膜上。用一抗在 4 °C 条件下封闭过夜,然后洗涤,用二抗在室温封闭孵育 2 h。

最后发光显影进行采集图像并分析灰度值。其中一抗为抗 P53 抗体、抗 Bax 抗体和抗 Bcl-2 (美国 Abcam 公司), 二抗为羊抗兔 IgG [吉满生物科技(上海)有限公司], β -actin 作为内参。

1.7 统计学分析

用 One-way analysis of variance (ANOVA) 法进行统计分析 (SPSS 15.0), 分别用 $P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 分别表示结果的统计学意义。

2 结果

2.1 活性成分

从 TCMSP 数据库中共获得 94 个与半枝莲相关的化学成分。根据 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 、 $Caco-2 > 0$ 、 $Hdon < 5$ 、 $Hacc < 10$ 、 $MW < 500$ 的参数标准, 最终筛选出 28 个活性成分 (表 1)。

2.2 靶点的筛选

28 个半枝莲活性成分根据化学结构相似性筛

表 1 半枝莲 28 个活性成分信息

Table 1 Twenty-eight active compounds of SBH

分子 ID	活性成分	OB/%	DL	Caco-2	Hdon	Hacc	MW	类别
MOL000098	槲皮素 (quercetin)	46.43	0.28	0.05	5	7	302.25	黄酮类
MOL000006	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25	0.19	4	6	286.25	黄酮类
MOL000173	汉黄芩素 (wogonin)	30.68	0.23	0.79	2	5	284.28	黄酮类
MOL001735	毛地黄黄酮 (dinatin)	30.97	0.27	0.48	3	6	300.28	黄酮类
MOL002714	黄芩素 (baicalein)	33.52	0.21	0.63	3	5	270.25	黄酮类
MOL008206	芥苳黄酮 (moslosooflavone)	44.09	0.25	1.01	1	5	298.31	黄酮类
MOL002719	6-羟基柚皮素 (6-hydroxynaringenin)	33.23	0.24	0.27	4	6	288.27	黄酮类
MOL002915	鼠尾草素 (salvigenin)	49.07	0.33	0.86	1	6	328.34	黄酮类
MOL000351	鼠李素 (rhamnazin)	47.14	0.34	0.53	3	7	330.31	黄酮类
MOL012245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮 (5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone)	36.63	0.27	0.43	3	6	302.30	黄酮类
MOL012246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮 (5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone)	74.24	0.26	0.37	3	6	302.30	黄酮类
MOL012248	5-羟基-7,8-二甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)色原酮 (5-hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl) chromone)	65.82	0.33	0.85	1	6	328.34	黄酮类
MOL012250	7-羟基-5,8-二甲氧基-2-苯基色原酮 (7-hydroxy-5,8-dimethoxy-2-phenyl-chromone)	43.72	0.25	0.96	1	5	298.31	黄酮类
MOL001040	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one	42.36	0.21	0.38	3	5	272.27	黄酮类
MOL012252	环阿廷醇 (9,19-cyclolanost-24-en-3-ol)	38.69	0.78	1.45	1	1	426.80	甾醇类
MOL012254	菜子甾醇 (campesterol)	37.58	0.71	1.34	1	1	400.76	甾醇类
MOL000358	β -谷甾醇 (beta-sitosterol)	36.91	0.75	1.32	1	1	414.79	甾醇类
MOL001973	谷甾醇乙酸 (sitosteryl acetate)	40.39	0.85	1.39	0	2	456.83	甾醇类
MOL012269	5,22-二烯-3-豆甾醇乙酯 (stigmasta-5,22-dien-3-ol-acetate)	46.44	0.86	1.41	0	2	454.81	甾醇类
MOL012270	豆甾烷-3,5,22-三烯 (stigmastan-3,5,22-triene)	45.03	0.71	1.90	0	0	394.75	甾醇类
MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76	1.44	1	1	412.77	甾醇类
MOL000359	谷甾醇 (sitosterol)	36.91	0.75	1.32	1	1	414.79	甾醇类
MOL005869	胡萝卜苷 (daucosterol)	36.91	0.75	1.32	1	1	414.79	甾醇类
MOL001755	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76	1.46	0	1	412.77	甾醇类
MOL012266	半枝莲素 (rivularin)	37.94	0.37	0.65	2	7	344.34	二萜类
MOL012251	白杨素-5-甲醚 (chrysin-5-methylether)	37.27	0.20	0.91	1	4	268.28	芳香醚类
MOL005190	圣草酚 (eriodictyol)	71.79	0.24	0.17	4	6	288.27	挥发油类
MOL000953	CLR	37.87	0.68	1.43	1	1	386.73	未知

选其靶点, 获得 225 个活性成分相关靶点。在 CTD、TTD、PharmGKB 3 个数据库中分别获得 264、71、18 个与胰腺肿瘤相关的疾病靶基因, 然后通过数据库整合的方法, 去除重复靶点后获得与胰腺肿瘤的相关靶点共 329 个。将药物活性成分靶点与疾病靶点结果取交集, 最终获得 91 个胰腺肿瘤相关的药物活性成分靶点用于后续分析 (图 1)。

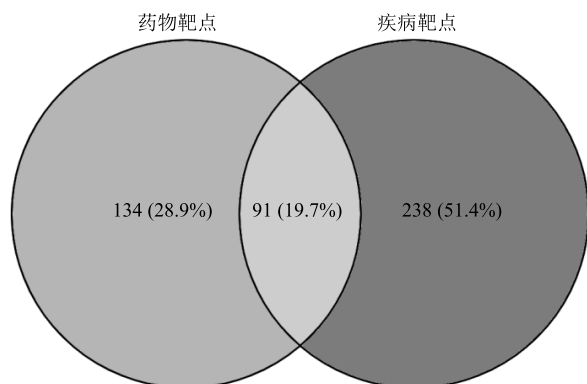


图 1 胰腺癌靶点和半枝莲靶点的韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of pancreatic cancer targets and SBH targets

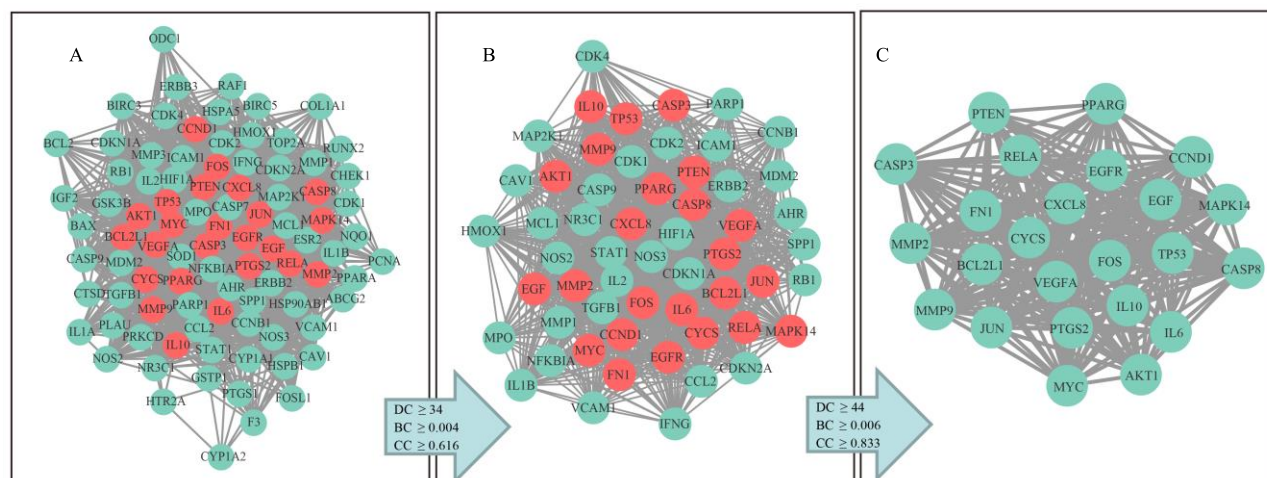


图 2 PPI 网络图的拓扑筛选过程

Fig. 2 Process of topological screening for PPI network

点越大说明该靶点连接的边越多在网络中作用越关键, 如 TP53、AKT1、JUN、MYC、CASP3、VEGFA 和 EGFR 等。

2.4 C-T 网络

为进一步分析半枝莲中发挥抗胰腺肿瘤的关键活性成分, 应用 Cytoscape 3.7.2 软件将 24 个核心靶点与 28 个半枝莲活性成分进行关联, 构建了核心靶点-活性成分网络 (C-T 网络, 图 4)。C-T 网络结果显示 24 个核心靶点共连接了 17 个活性成分, 主要有槲皮素 (MOL000098, 与 21 个核心靶点相关),

2.3 PPI 网络和核心靶点分析

为了更好地理解半枝莲对胰腺肿瘤的作用机制, 运用 String 数据库构建了 91 个靶点的 PPI 网络, 由 91 个节点和 1 855 条边组成。随后根据 3 个拓扑参数 (度、度介中心度、接近中心度) 对 PPI 网络中所有节点进行分析, 选取大于中位值的靶点作为核心靶点, 构建半枝莲抗胰腺肿瘤的核心枢纽节点。将 91 个节点和 1 855 条边组成的 PPI 网络导入 Cytoscape 软件绘制互作网络图 (图 2-A), 经第 1 次筛选初步得到 1 个 56 个节点和 565 条边的互作网络图 (图 2-B), 经第 2 次筛选获得由 24 个节点和 273 条边的核心互作网络 (图 2-C)。24 个核心靶点分别为 CASP3、PTEN、PPARG、MMP2、FN1、RELA、MMP9、BCL2L1、CYCS、CXCL8、EGFR、JUN、VEGFA、FOS、EGF、CCND1、PTGS2、IL10、TP53、MAPK14、MYC、AKT1、IL6、CASP8, 详细信息见表 2。

将 24 个核心靶点与 67 个其他靶点进一步构建 PPI 网络分析, 并按节点大小降序排序 (图 3)。节

木犀草素 (MOL000006, 与 16 个核心靶点相关), 汉黄芩素 (MOL000173, 与 10 个核心靶点相关), 黄芩素 (MOL002714, 与 9 个核心靶点相关), β -谷甾醇 (MOL000358, 与 3 个核心靶点相关), 芥苳黄酮 (MOL008206) 和 7-羟基-5,8-二甲氧基-2-苯基色原酮 (MOL012250) (分别与 2 个核心靶点相关), 其他成分分别与 1 个核心靶点有关。这些关键活性成分主要为黄酮类和甾醇类。

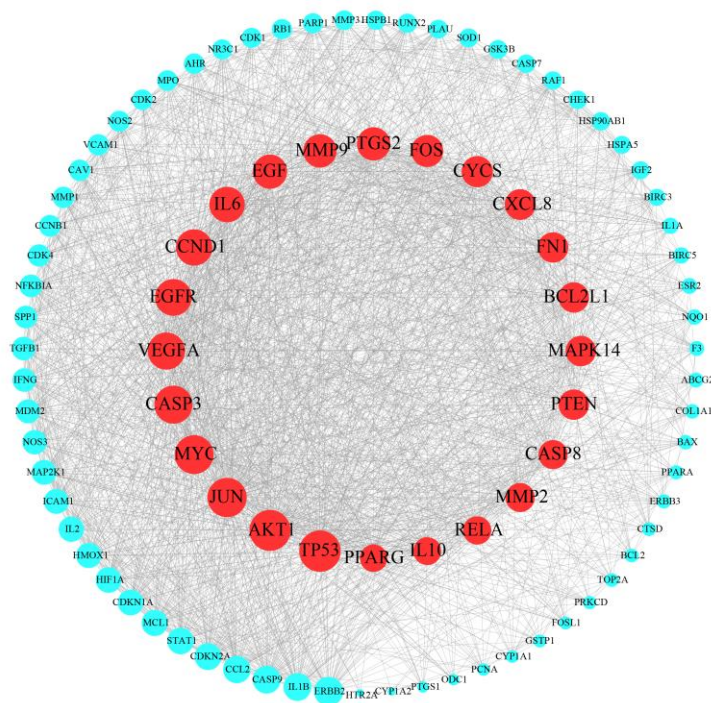
2.5 GO 功能富集

GO 功能富集获得 526 条生物学过程, 按照

表 2 24 个核心靶点的信息

Table 2 Information on 24 hub targets

Uniprot ID	基因名称	蛋白名称	度
P04637	TP53	cellular tumor antigen p53	55
P31749	AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	55
P15692	VEGFA	vascular endothelial growth factor A	55
P42574	CASP3	caspase-3	54
P05412	JUN	transcription factor AP-1	54
P05231	IL6	interleukin-6	52
P01106	MYC	mycproto-oncogene protein	52
P01133	EGF	pro-epidermal growth factor	51
P00533	EGFR	epidermal growth factor receptor	50
P01100	FOS	proto-oncogene c-Fos	50
P14780	MMP9	matrix metalloproteinase-9	50
P35354	PTGS2	prostaglandin G/H synthase 2	50
P24385	CCND1	G1/S-specific cyclin-D1	49
P10145	CXCL8	interleukin-8 (IL-8)	48
P22301	IL10	interleukin-10 (IL-10)	47
Q16539	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	47
P08253	MMP2	72 kDa type IV collagenase	46
P99999	CYCS	cytochrome c	45
Q07817	BCL2L1	bcl-2-like protein 1	44
Q14790	CASP8	caspase-8	44
Q04206	RELA	transcription factor p65	44
P60484	PTEN	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase PTEN	44
P02751	FN1	fibronectin	44
P37231	PPARG	peroxisome proliferator-activated receptor gamma	44



红色圆圈代表 24 个核心靶点，蓝色圆圈代表 67 个其他靶点。圆圈的大小与网络图中靶点的度成正比
24 big hub targets: red color; the other 67 targets: blue color. The size of the node is in direct proportion to the degree of each target

图 3 91 个靶点的 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of 91 targets

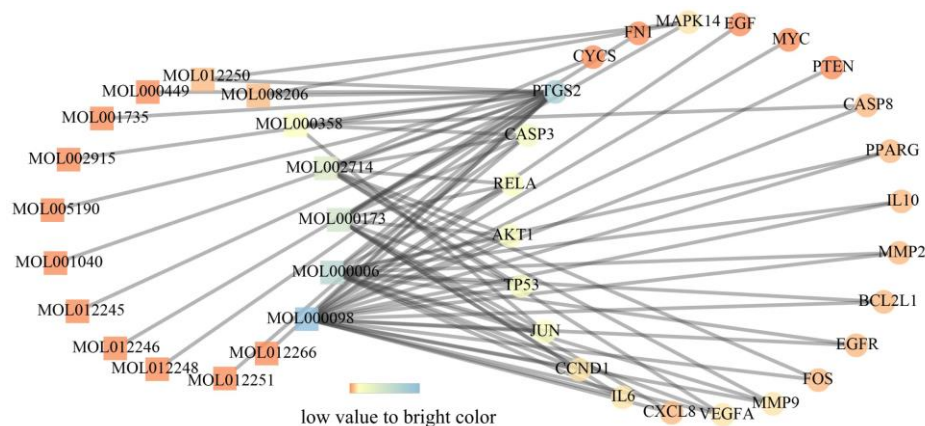


图 4 C-T 网络

Fig. 4 C-T network

FDR ≤ 0.01 进行筛选后获得 73 条生物学过程, 并对前 25 条显著的生物学功能做图展示, 归类后主要涉及到细胞凋亡、细胞周期、炎症反应和细胞增殖 4 个方面 (图 5)。

在细胞凋亡方面, 主要涉及细胞色素 C 导致的 Caspase 家族活性的变化、细胞凋亡中线粒体的改变、响应 DNA 损伤的内在凋亡信号通路、缺乏配体的外源性凋亡信号通路的负调控、缺乏配体的外源性凋亡信号通路和凋亡过程的正负调节。细胞周

期调节方面的生物学过程包括: 有丝分裂细胞周期的 G1/S 过渡、细胞周期阻滞。在细胞增殖方面, 主要生物学过程有成纤维细胞增殖和平滑肌细胞增殖的正调节、血管生成过程、细胞增殖的正调控与负调控等。在与炎症相关方面, 主要生物学过程有对 IL-1 的细胞反应、对细胞因子的反应、炎症反应。基于以上 4 个主要方面可以看出, 半枝莲对胰腺肿瘤的抗癌作用可能是一个复杂的多途径协同作用的结果。

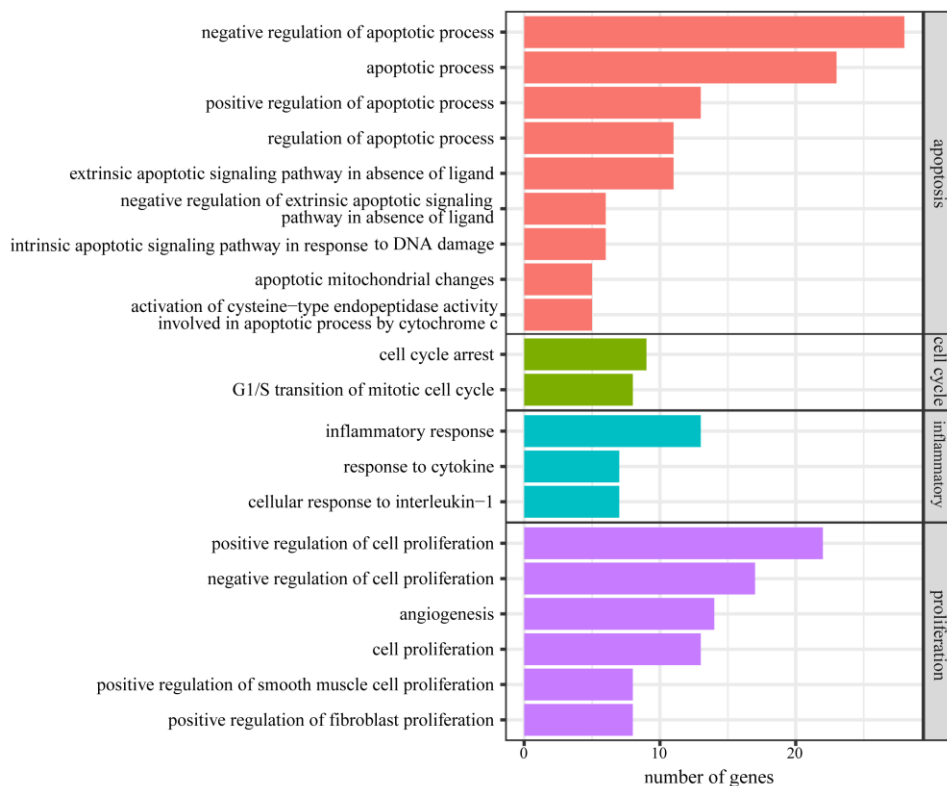


图 5 91 个靶点的 GO 生物功能富集分析

Fig. 5 GO biological process analysis of 91 targets

2.6 KEGG 通路富集

为了揭示半枝莲对胰腺肿瘤潜在的抗癌作用机制, KEGG 通路富集主要针对筛选出的 91 个靶点进行分析, 按照 $FDR \leq 0.01$ 筛选共获得 58 条 KEGG 信号通路, 前 18 条与癌症相关的信号通路包括: p53、细胞凋亡、TNF、VEGF、T 细胞受体、NF- κ B、

细胞周期、PI3K-Akt 等 (图 6)。

2.7 半枝莲治疗胰腺肿瘤的整合通路

考虑到半枝莲在胰腺癌治疗中的复杂机制, 通过整合 T-P 网络中关键的信号通路, 构建系统的“半枝莲-胰腺肿瘤网络”关系 (图 7), 主要分析了 4 条信号通路的网络关系及功能。可以看出, “半枝莲-

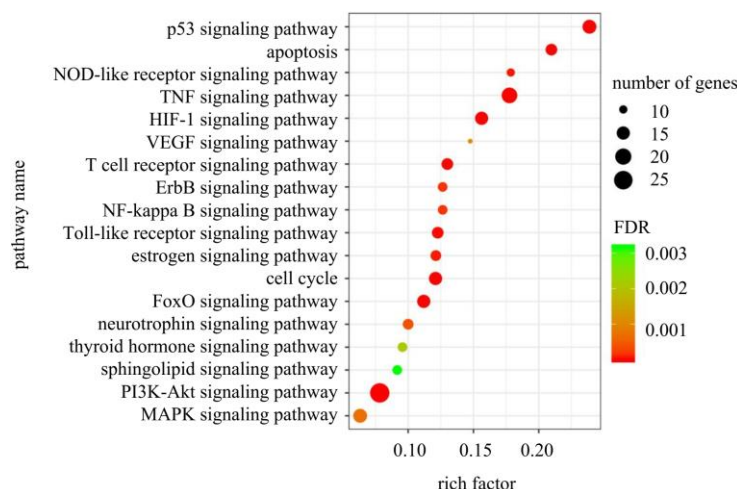
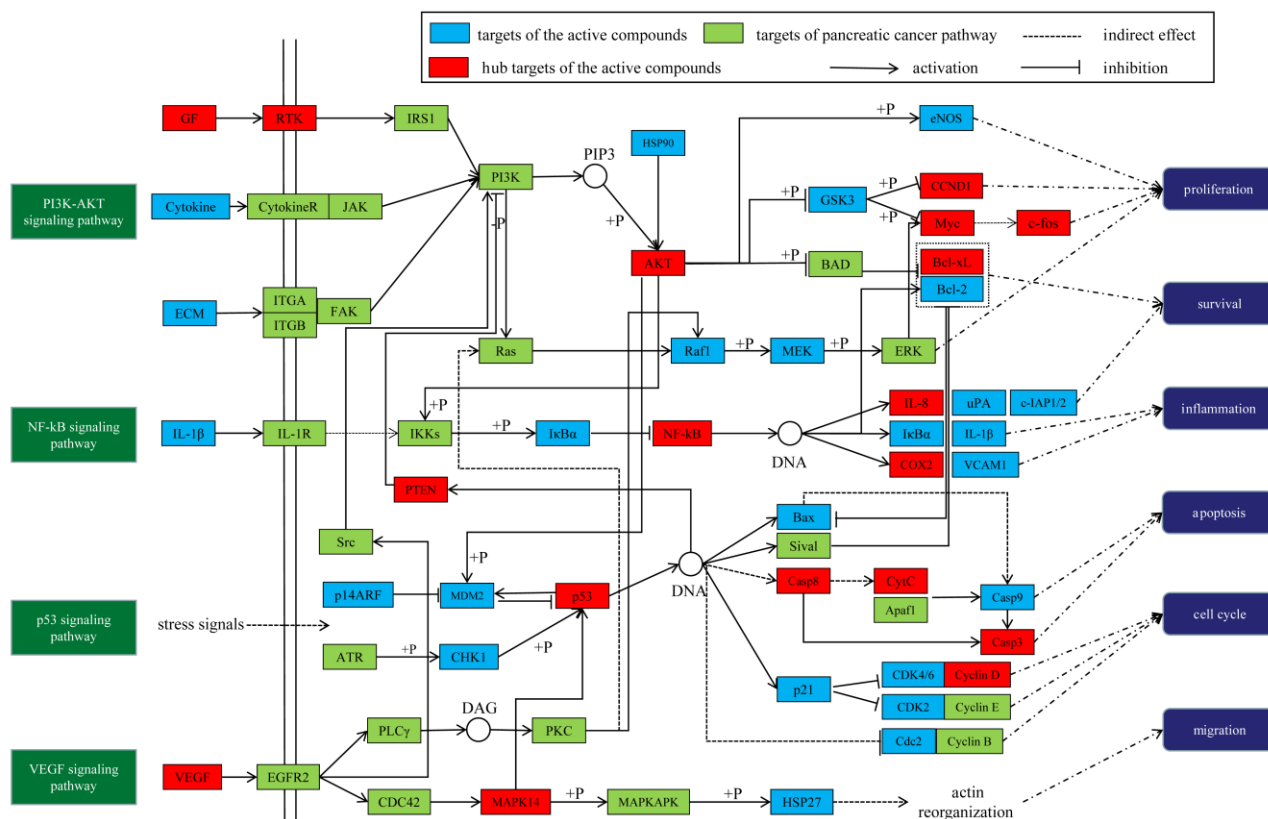


图 6 KEGG 通路图

Fig. 6 KEGG pathway network



红色节点代表核心靶点, 蓝色节点代表其他靶点, 绿色节点代表通路中存在的靶点

Big hub targets: red color, the other targets: blue color, and the targets in the pathway: green color

图 7 半枝莲抑制胰腺癌的关键信号通路

Fig. 7 Key pathways of SBH for anti-pancreatic cancer

胰腺肿瘤网络”网络图中共包含有 18 个半枝莲作用的核心靶点,可分为 2 个代表治疗模块:肿瘤模块:PI3K-AKT、p53 和 VEGF 信号通路,炎症相关模块涉及到 NF- κ B 信号通路。从结果中可以看出,p53、PI3K、AKT 3 个蛋白在抗肿瘤模块中处于焦点,NF- κ B 是炎症模块的焦点,这些蛋白也是木犀草素作用的核心靶点。

2.8 木犀草素对 PANC-1 细胞活力的影响

为了验证系统药理学筛选的抗胰腺肿瘤相关靶点的可靠性,以木犀草素作为核心活性成分代表,进行体外实验验证。结果发现不同浓度的木犀草素处理 PANC-1 细胞后,与对照组比较,细胞存活率逐渐降低,并呈时间和浓度依赖性(图 8)。

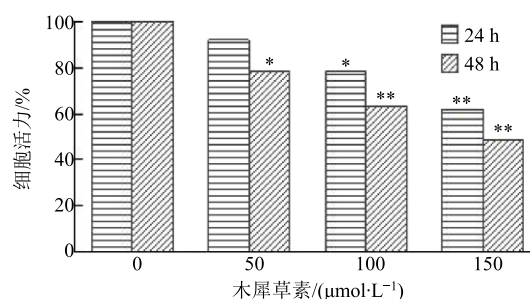
2.9 木犀草素对 PANC-1 细胞凋亡的影响

不同浓度的木犀草素处理后的 PANC-1 细胞,用 PI/AnnexinV 双染标记再进行流式细胞仪检测。

结果见图 9,细胞的凋亡率从 18.5%升高至 67.2%,对照组凋亡率仅为 8.8%。

2.10 木犀草素对 p53 信号通路中凋亡蛋白的调控

PANC-1 细胞在不同浓度木犀草素处理后其促凋亡蛋白 p53 和 Bax 表达均显著上升,凋亡抑制蛋



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 9 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as figure 9

图 8 木犀草素对 PANC-1 细胞活力的影响

Fig. 8 Effect of luteolin on viability of PANC-1 cells

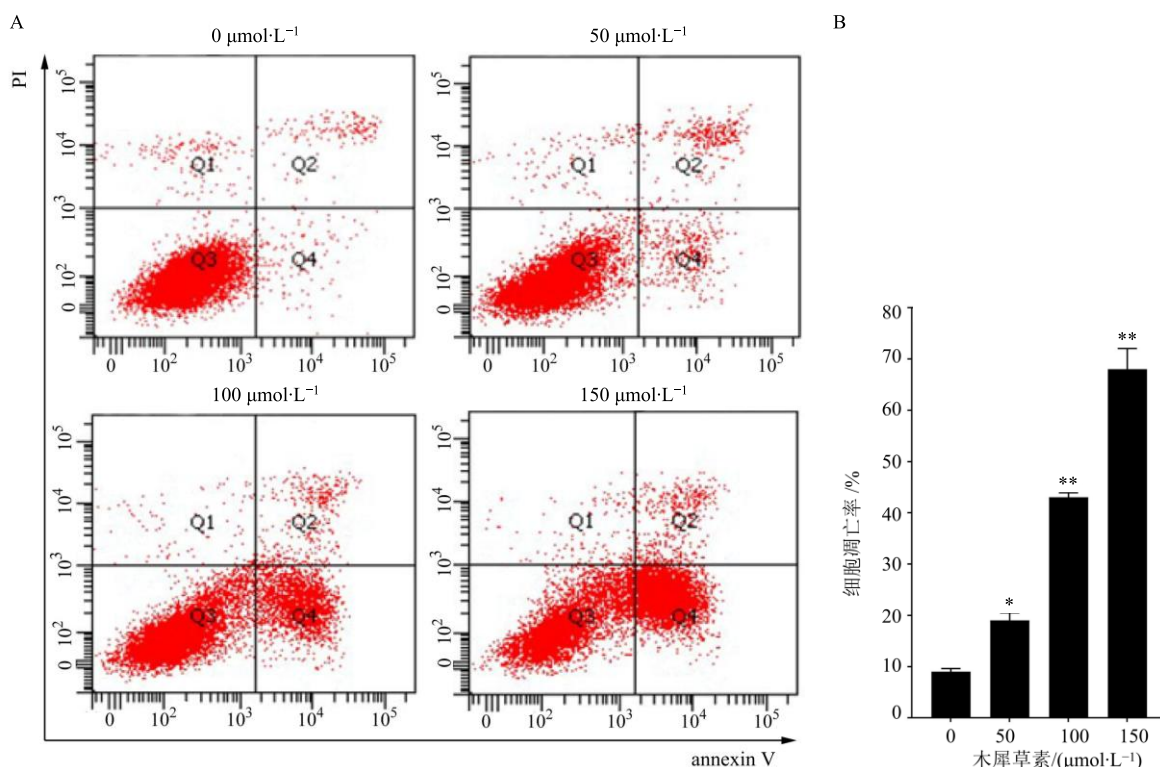


图 9 木犀草素对 PANC-1 细胞凋亡的影响

Fig. 9 Effect of luteolin on apoptosis of PANC-1 cells

白 Bcl-2 的表达则降低(图 10)。细胞实验结果证实了系统药理学筛选的半枝莲活性成分治疗胰腺肿瘤相关靶点的正确性。

3 讨论

半枝莲作为单方或复方都对胰腺癌患者的症状有明显的缓解作用,具有潜在的抗胰腺癌功能,但

关于作用机制尚不清楚^[3-4]。而网络药理学的发展使研究者从“一药一靶点”的传统观念转向“药物-靶点网络”模式^[15]。因此本研究应用网络药理学方法来探讨半枝莲治疗胰腺癌的潜在分子机制。

通过构建药物活性成分-核心靶点(C-T)网络,发现了 8 个关键活性成分,属于黄酮类或是甾醇化

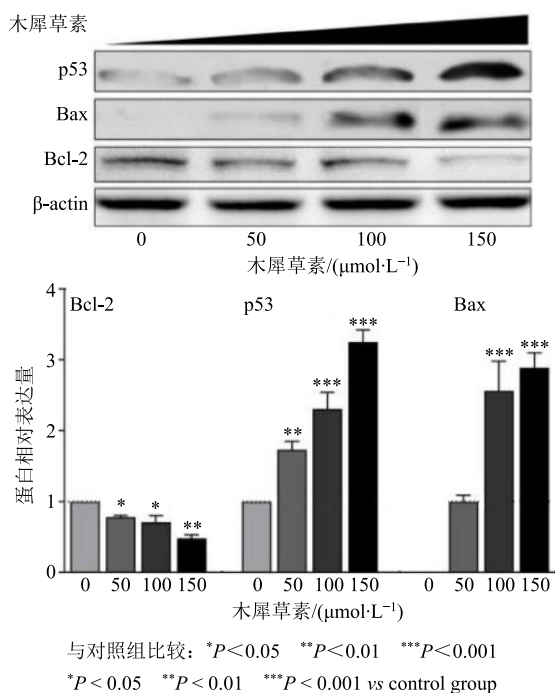


图 10 Western blotting 结果
 Fig. 10 Western blotting analysis

合物。有研究证明, 黄酮类物质, 比如槲皮素和木犀草素, 能通过调控蛋白表达引起胰腺癌细胞的周期阻滞, 促进其凋亡, 起到减缓症状和治疗作用^[16]。以往的体外研究证明, 抗氧化剂 *N*-乙酰-*L* 半胱氨酸 (NAC) 联合汉黄芩素可以抑制 ROS 导致的自噬进而增强其促胰腺癌细胞死亡作用^[17]; β -谷甾醇能够通过有效抑制胰腺肿瘤细胞系的生长, 呈现较强的抗癌活性^[18]; 黄芩素能抑制 BxPC-3 和 PANC-1 胰腺癌细胞的增殖和迁移, 通过凋亡和自噬信号途径诱导胰腺癌细胞死亡^[19]。由此可见, 这些活性成分是半枝莲对胰腺肿瘤具有抗癌作用的主要物质基础, 也说明半枝莲是通过多种化合物作用于多靶点和多通路共同实现抗癌作用。

通过靶点功能富集分析, 推测半枝莲治疗胰腺肿瘤的机制可能与细胞增殖、凋亡、细胞周期和炎症反应 4 个生物学过程有关。靶点通路富集分析可见 18 条与癌症相关的信号通路, 主要包括 p53、细胞凋亡、TNF、HIF-1、VEGF、T receptor、NF- κ B、细胞周期、PI3K-AKT 等信号通路。其中, p53 富集倍数最高, 说明该信号通路中各种靶点与半枝莲成分的药理作用关系最为密切。整合分析药物靶点与信号通路之后发现“半枝莲-胰腺肿瘤网络”关系中可分为 2 个治疗模块: 肿瘤相关模块和炎症相关模块。半枝莲治疗中与肿瘤相关的模块包括,

PI3K-AKT、p53 和 VEGF 信号通路。NF- κ B 则与炎症密切相关。

在肿瘤的发生发展过程中凋亡抑制、过度增殖以及侵袭都起着至关重要的作用^[20]。p53 是到目前为止被发现的最重要的肿瘤抑制因子之一^[20-21], 在本研究中介导了 2 条信号通路。其中一条是在胰腺肿瘤形成中研究较为透彻的 p53 (p14ARF-MDM2-p53-p21/P) 信号通路, 与细胞周期阻滞有关^[22]。已有研究证实, DNA 损伤后, 激活的 p14 会与 MDM2 直接结合, 引起 p53 的表达水平增加, 激活下游 p21, 造成肿瘤细胞的 G1 期停滞^[21]。

另一条是 Bcl-2/BAX/Casp-3 信号通路。Bcl-2 和 Bcl-xL 为抑制凋亡蛋白, Bax 为促凋亡蛋白^[23-24]。细胞中 Bax/Bcl-2 蛋白比例的增加会激活线粒体通路中的 Caspase-9 和 Caspase-3, 从而触发 caspase 级联反应引起细胞凋亡^[25]。在本研究系统药理学中发现半枝莲中作用于 p53、Bcl-2 家族、Caspase-9 和 Caspase-3 的活性成分有槲皮素、木犀草素、 β -谷甾醇、汉黄芩素、黄芩素。其中槲皮素、木犀草素不仅可以作用于 BAX 蛋白, 还能与 Bcl-2 和 Bcl-xL 蛋白作用, 发挥双向作用调控凋亡。这提示半枝莲成分可通过启动凋亡信号, 阻断细胞周期, 阻断肿瘤组织的生长^[26]。

肿瘤发展的特征之一就是细胞的非正常增殖。细胞中很多生长因子可通过直接或间接方式作用于 PI3K-Akt 通路, 对细胞增殖起促进作用^[27-28]。这条信号通路中涉及到多种调控蛋白, 比如激活 PI3K 和 Akt 蛋白可使得下游抗凋亡蛋白, 比如 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达增强。有研究表明, PI3K 信号通路的抑制与 PTEN 的表达相关^[17]。上述这些蛋白大多为本研究中半枝莲的核心作用靶点, 可见半枝莲对细胞增殖的调节可通过抑制 PI3K-Akt 的表达水平发挥作用。例如, 黄酮类物质槲皮素和木犀草素等可以通过抑制 Akt 的表达来影响下游靶点, 从而实现对细胞增殖的抑制。

缺氧是肿瘤微环境的基本特征之一, 可间接激活促血管生成因子 VEGF 的表达, 进而激活一系列的下游信号分子, 如 PLC- γ 、PKC、MAPK、PI3K 等, 最终发挥生物学效应^[29-31]。已有文献报道^[32], 抑制 VEGF 信号通路中蛋白激酶活化可抑制细胞增殖和迁移。半枝莲中黄酮类成分可能通过控制 VEGF 的表达水平, 影响该通路下游因子, 通过抑制血管生成, 起到抗癌功效。

肿瘤发展过程中炎症起促进作用, 炎症反应又会被肿瘤微环境进一步刺激^[33]。在炎症反应中 NF- κ B 至关重要, 不仅可以进入细胞核, 可刺激下游炎症因子的增加, 如 IL-1 β 、COX2、IL-8 等^[34]。研究表明, 在正常组织中 COX2 很少有过度表达, 但可被 LPS 等因素诱导大量产生^[35]。而槲皮素、木犀草素可通过 NF- κ B 信号通路直接作用, 抑制 COX2 的表达, 有效地影响炎症反应^[36], 这与本研究预测结果一致。因此, 半枝莲药物成分通过靶向肿瘤-炎症微环境中的关键信号通路来控制肿瘤的发展。

在细胞验证实验中, 进一步证实了木犀草素通过调节关键蛋白促进 PANC-1 细胞的凋亡从而对抗胰腺肿瘤。本研究发现木犀草素有效抑制了 PANC-1 细胞增殖, 呈剂量、时间依赖性; 处理 48 h 后, 细胞凋亡率增加; Western blotting 验证木犀草素可上调 PANC-1 细胞中 Bax、p53 蛋白表达, 减少 Bcl-2 因子的水平。证实了木犀草素作为半枝莲中关键药效成分之一, 可作用于 p53 信号通路中多个肿瘤调控因子发挥促凋亡功效, 同时也验证了本研究中系统网络药理学筛选结果和预测分子机制的可靠性和准确性。

综上所述, 通过网络药理学的方法, 预测了半枝莲的活性成分和作用靶点, 分析了其抗胰腺肿瘤的潜在分子机制。半枝莲对胰腺肿瘤的抗癌作用是多化合物、多靶点、多途径的直接或间接协同作用的结果。同时, 细胞实验验证了本研究中系统药理学分析结果的可靠性。在未来的研究中, 将进一步探索半枝莲中多种化合物的微协同作用, 以及这些化合物的作用与其代谢机制之间的关系。

参考文献

- [1] Neoptolemos J P, Kleeff J, Michl P, et al. Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives [J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2018, 15(6): 333-348.
- [2] Gillen S, Schuster T, Buschenfelde C M, et al. Preoperative/neoadjuvant therapy in pancreatic cancer: A systematic review and meta-analysis of response and resection percentages [J]. *PLoS Med*, 2010, 7(4): e1000267.
- [3] 沈 婕, 何胜利, 刘鲁明. 刘鲁明运用大剂量半枝莲治疗胰腺癌经验 [J]. *上海中医药杂志*, 2014, 48(11): 14-15.
- [4] 蔡芸芸, 高 嵩, 刘鲁明, 等. 半枝莲提取物通过 Hippo/YAP 通路抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、侵袭转移和成瘤能力的研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(7): 2947-2951.
- [5] 杨 沙, 段灿灿, 晏仁义, 等. 基于网络药理学的半枝莲抗肿瘤活性成分及整合作用机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(15): 3471-3482.
- [6] 朱慧贤, 譙凤英, 胡思源, 等. 半枝莲总黄酮胶囊治疗急性咽炎肺胃实热证的 II 期临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2017, 32(7): 1259-1263.
- [7] Lin J, Chen Y, Cai Q, et al. *Scutellaria Barbata* D. Don inhibits colorectal cancer growth via suppression of multiple signaling pathways [J]. *Integr Cancer Ther*, 2014, 13(3): 240-248.
- [8] Chen C, Kao C, Chiu M, et al. The anti-cancer effects and mechanisms of *Scutellaria barbata* D. Don on CL1-5 lung cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(65): 109340-109357.
- [9] Zhang L, Ren B, Zhang J, et al. Anti-tumor effect of *Scutellaria barbata* D. Don extracts on ovarian cancer and its phytochemicals characterisation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 206(12): 184-192.
- [10] 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.
- [11] 宋祯彦, 陈易璇, 余婧萍, 等. 钩藤散活性成分治疗阿尔茨海默病作用机制的网络药理学分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(24): 5854-5864.
- [12] 解 静, 高 杉, 李 琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略 [J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [13] Wu R, Li X Y, Wang W H, et al. Network pharmacology-based study on the mechanism of Bushen-Jianpi Decoction in liver cancer treatment [J]. *Evid Based Complementary Altern Med*, 2019, doi: 10.1155/2019/3242989.
- [14] Zhang Y, Li X, Xu X, et al. Mechanisms of *Paeonia lactiflora* in treatment of ulcerative colitis: A network pharmacological study [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 7574-7580.
- [15] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [16] 白永恒. 垂盆草提取物抗胰腺癌作用及对 Hedgehog 信号的影响 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [17] Li S J, Sun S J, Gao J, et al. Wogonin induces Beclin-1/PI3K and reactive oxygen species-mediated autophagy in human pancreatic cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(6): 5059-5067.
- [18] Cao Z Q, Wang X X, Lu L, et al. β -Sitosterol and

- gemcitabine exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activity by modulating apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition by deactivating Akt/GSK-3 β signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2019, doi: 10.3389/fphar.2018.01525.
- [19] 敖 鹏, 陈 晋, 边晓燕, 等. 黄芩素对人胰腺癌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中国药师, 2018, 21(7): 1154-1158.
- [20] Fesik S W. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery [J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(11): 876-85.
- [21] Mello S S, Attardi L D. Deciphering p53 signaling in tumor suppression [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 51: 65-72.
- [22] Azmi A S, Philip P A, Wang Z, *et al.* Reactivation of p53 by novel MDM2 inhibitors: Implications for pancreatic cancer therapy [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2010, 10(3): 319-331.
- [23] Timucin A C, Basaga H, Kutuk O. Selective targeting of antiapoptotic BCL-2 proteins in cancer [J]. *Med Res Rev* 2019, 39(1): 146-175.
- [24] Zhao A H, Zeng Q, Xie X Y, *et al.* MicroRNA-125b induces cancer cell apoptosis through suppression of Bcl-2 expression [J]. *J Genet Genomics*, 2012, 39(1): 29-35.
- [25] Xu W Y, Guo G F, Li J J, *et al.* Activation of Bcl-2-caspase-9 apoptosis pathway in the testis of asthmatic mice [J]. *PLoS One*, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0149353.
- [26] Hsua S L, Hsieh Y C, Hsieh W C, *et al.* Baicalein induces a dual growth arrest by modulating multiple cell cycle regulatory molecules [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, 425(3): 165-171.
- [27] Rimawi M F, Shetty P B, Weiss H L, *et al.* Epidermal growth factor receptor expression in breast cancer association with biologic phenotype and clinical outcomes [J]. *Cancer*, 2010, 116(5): 1234-1242.
- [28] Engelman J A, Luo J, Cantley L C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism [J]. *Nat Rev Genetics*, 2006, 7(8): 606-619.
- [29] Khorana A A, Ahrendt S A, Ryan C K, *et al.* Tissue factor expression, angiogenesis, and thrombosis in pancreatic cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(10): 2870-2875.
- [30] Liao D, Johnson R S. Hypoxia: A key regulator of angiogenesis in cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2007, 26(2): 281-290.
- [31] Kim D, Sung B, Kim J A, *et al.* HS-1793, a resveratrol analogue, downregulates the expression of hypoxia-induced HIF-1 and VEGF and inhibits tumor growth of human breast cancer cells in a nude mouse xenograft model [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(2): 715-723.
- [32] Galaria I I, Fegley A J, Nicholl S M, *et al.* Differential regulation of ERK1/2 and p38 (MAPK) by components of the Rho signaling pathway during sphingosine-1-phosphate-induced smooth muscle cell migration [J]. *J Surg Res*, 2004, 112(2): 173-179.
- [33] Mantovani A, Allavena P, Sica A, *et al.* Cancer-related inflammation [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 436-444.
- [34] Hoesel B, Schmid J A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer [J]. *Mol Cancer*, 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-86.
- [35] Zhang Q W, Jiang X R, He W G, *et al.* MCL plays an anti-inflammatory role in mycobacterium tuberculosis-induced immune response by inhibiting NF- κ B and NLRP3 inflammasome activation [J]. *Mediat Inflamm*, 2017, doi: 10.1155/2017/2432904.
- [36] Granado-Serrano A B, Martín M A, Bravo L, *et al.* Quercetin modulates NF- κ B and AP-1/JNK pathways to induce cell death in human hepatoma cells [J]. *Nutr Cancer*, 2010, 62(3): 390-401.