

基于加权基因共表达网络分析和分子对接分析荔枝核干预结肠腺癌的黄酮类成分及靶点

严炯艺, 冯茵怡, 卢卓, 奉建芳*, 罗伟生, 黎芳, 梁健钦*

广西中医药大学, 广西 南宁 530200

摘要: **目的** 探讨荔枝核干预结肠腺癌(COAD)进展和转移的黄酮类成分和作用靶点。**方法** 通过 DRAR-CPI 和 SWISS 数据库检索荔枝核中 19 个黄酮类化合物的潜在作用靶点。从 TCGA 数据库下载 COAD 基因表达数据和临床特征数据, 采用加权基因共表达网络分析(WGCNA)法建立 COAD 的基因共表达网络和识别共表达模块, 以共表达模块和潜在作用靶点中共同靶点作为化合物干预 COAD 的作用靶点。通过 String 数据库进行蛋白互作网络分析、KEGG 和 GO 分析。通过 cytoHubba 插件提取 Hub 基因作为 COAD 潜在生物标志物, 通过 Cytoscape 建立成分、靶点、通路的互作网络。HPA 数据库验证潜在生物标志物的表达, 通过分子对接技术虚拟筛选与潜在生物标志物作用的化合物。**结果** 经 WGCNA 分析得到 18 个共表达模块, 其中 7 个模块与生存时间、肿瘤分期等临床特征相关, turquoise 模块与 COAD 进展转移相关。荔枝核中 19 个黄酮类化合物作用于 380 个潜在作用靶点, 选择与 turquoise 模块重复的 34 个靶点作为作用靶点, GO 分析结果显示作用靶点富在 304 个 GO 条目, 其中生物过程 229 条、细胞组成 31 条、分子功能 44 条; KEGG 分析结果显示作用靶点富集在癌症通路、细胞周期、孕酮介导的卵母癌症途径、细胞衰老、p53 信号通路等 40 条通路。CytoHubba 筛选得到 CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB 基因作为 COAD 进展转移相关的潜在生物标志物。HPA 数据库免疫组化结果显示, 与癌旁组织相比, COAD 组织中 CDC25C、AURKB、CCNB2 蛋白表达升高($P < 0.05$), 与 TCGA 数据集中基因表达量一致。通过分子对接初步筛选得到柚皮芸香苷、原花青素 A2、根皮苷、表儿茶素可通过氢键等与 CDC25A、CDC25C、AURKB 结合较好。**结论** CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB 可作为 COAD 进展和转移密切相关的潜在生物标志物。荔枝核黄酮类化合物干预 COAD 进展和转移的机制可能与黄酮类化合物调控细胞分裂、细胞周期 G2/M 期转变等生物过程进而调节癌症途径、p53 信号通路等信号通路有关, 其中柚皮芸香苷、原花青素 A2、根皮苷、表儿茶素、芦丁可能是 CDC25A、CDC25C、AURKB 的潜在抑制剂。

关键词: 结肠腺癌; 荔枝核; 黄酮类化合物; WGCNA; 柚皮芸香苷; 原花青素 A2; 根皮苷; 表儿茶素; 芦丁

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)22-5768-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.22.014

Screening of flavonoids in *Litchi Semen* and its targets of intervention in colonic adenocarcinoma by weighted gene co-expression network analysis and molecular docking

YAN Jiong-yi, FENG Yin-yi, LU Zhuo, FENG Jian-fang, LUO Wei-sheng, LI Fang, LIANG Jian-qin

Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China

Abstract: **Objective** To screen the flavonoid constituents and targets of *Litchi Semen* in the intervention of progression and metastasis of colon adenocarcinoma (COAD). **Methods** Through DRAR-CPI and SWISS database, potential targets of 19 flavonoids in *Litchi Semen* were searched. COAD gene expression data and clinical characteristic data from TCGA database were downloaded. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was used to establish the gene co-expression network and identify the co-expression module of COAD. The common targets of co-expression module and potential targets were used as the compound to interfere with the drug target of COAD. Protein interaction network analysis, KEGG and GO analysis were performed by String database. The Hub gene was extracted as potential biomarkers of COAD by the cytoHubba, and the interaction network of

收稿日期: 2020-04-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81960872); 广西创新驱动发展专项(桂科 AA17202035、桂科 AA17202031); 中药药剂学(中药学) 2020 年一流学科项目(05020046); 中药学广西一流学科(桂教科研[2018]12 号)

作者简介: 严炯艺(1995—), 女, 在读研究生, 研究方向为中药新药开发。Tel: 18207746340 E-mail: 1151055951@qq.com

***通信作者** 奉建芳, 研究员。E-mail: fengjianfang@vip.163.com

梁健钦, 研究员。Tel: 15977775577 E-mail: 80004622@qq.com

components, targets and pathways was established by the Cytoscape. The expressions of potential biomarkers were verified by HPA database, and the compounds were docked with the potential biomarkers. **Results** A total of 18 co-expression modules were identified with seven of them were correlated with clinical features, such as survival time and tumor stage. Turquoise module was related to the development and transfer of COAD. 19 flavonoids in *Litchi Semen* acted on 380 potential targets. 34 targets repeated with turquoise module were selected as targets. GO analysis showed that the target points were enriched in 304 GO items, including 229 biological processes, 31 cell composition and 44 molecular functions; KEGG analysis showed that target points were enriched in cancer pathways, cell cycle, and progesterone-mediated 40 pathways including oocyte cancer pathway, cell senescence, and p53 signaling pathway. The genes of CDC25A, CDC25C, CCNB2 and AURKB were screened by cytoHubba as potential biomarkers which related to the progress and transfer of COAD. Compared with para-cancerous tissues, immunohistochemistry results obtained from HPA database showed that the protein expressions of CDC25C, AURKB and CCNB2 in COAD were increased significantly ($P < 0.05$), which were consistent with gene expression in TCGA data set. Narirutin, procyanidin A2, phloridzin and ent-epicatechin which were well combined to CDC25A, CDC25C and AURKB through hydrogen bond were screened. **Conclusion** CDC25A, CDC25C, CCNB2 and AURKB were the potential biomarkers closely related to the progression and metastasis of COAD. The mechanism of intervention of flavonoids in *Litchi Semen* on the progression and metastasis of COAD may be related to the regulation of biological processes, such as cell division, G2/M phase transformation of cell cycle, and the regulation of cancer pathway, p53 signaling pathway and other signaling pathways. Narirutin, procyanidin A2, phloridzin, ent-epicatechin and rutin could be treated as potential inhibitors of CDC25A, CDC25C and AURKB.

Key words: colonic adenocarcinoma; *Litchi Semen*; flavonoids; WGCNA; narirutin; procyanidin A2; phloridzin; ent-epicatechin; rutin

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是发病率和死亡率较高的消化道常见恶性肿瘤^[1]。多数 CRC 患者在发现或诊断时已发展至 CRC 中、晚期, 预后较差。结肠腺癌 (colonic adenocarcinoma, COAD) 是 CRC 中最常见的病理分型之一, 约占 95%^[2]。临床主要采取手术、化疗、放疗、生物靶向制剂治疗 COAD, 其中化疗、放疗会引起明显的不良反应。中医药结合其他手段治疗 COAD, 可延缓肿瘤发展, 减少癌症的复发和转移, 减少不良反应, 提高患者生存质量和生存时间。深入挖掘 COAD 生物标志物和抗 COAD 的天然化合物, 对 COAD 临床诊断、治疗水平的提高及药物的发现具有重要意义。

荔枝核是无患子科植物荔枝 *Litchi chinensis* Sonn. 的干燥成熟种子, 味甘、苦、涩, 性温, 属肝、肾经, 属软坚散结中药, 具有清热解毒、行气散结、祛寒止痛之功, 常用于治疗寒疝腹痛、睾丸肿痛等^[3]。研究表明, 荔枝核及其提取物具有抗肿瘤 (包括前列腺癌、肝癌、肺癌、乳腺癌和大肠癌等) 作用^[4-5]。荔枝核总黄酮具有良好的抗肝纤维化、抗炎、保肝、抗病毒、抗肿瘤作用^[6-9]。但其抗 CRC 的作用靶点和机制未见报道。

癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据库是癌症研究领域规模最大、数量最多的公共资源库, 可提供数千个肿瘤样本的体细胞突变、基因表达、基因甲基化数据。加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network

analysis, WGCNA) 基于无尺度网络将基因按照表达模式进行分类, 将高度相关的基因聚类归为一个模块, 可用于探索与复杂疾病相关的基因网络特征, 相比于常规的聚类方法, 具有更高的可信度^[10-11]。WGCNA 可有效整合基因表达和临床信息数据, 识别功能途径和候选生物标记物, 广泛应用于疾病标记物或基因靶点筛选。

本研究通过 WGCNA 分析 TCGA 中 COAD 数据, 挖掘与 COAD 发展转移相关的潜在生物标志物和荔枝核中黄酮类化合物抗 COAD 的作用靶点, 为后期更准确地开展荔枝核黄酮类化合物治疗 COAD 的实验研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 荔枝核黄酮类化学成分、潜在作用靶点和干预的疾病分析

选用课题组前期从荔枝核中分离鉴定以及文献检索得到的黄酮类化合物进行分析^[12]。通过 DRAR-CPI 服务器反向分子对接法 (参数设置: Z' -score < -1.0 、probability > 0.06) 和 SWISS 数据库检索法得到靶点, 靶点均通过 UniProt 数据库矫正为官方名称, 去除重复靶点后, 作为潜在作用靶点。将潜在作用靶点导入 String 数据库 ([https://string-db.org/Version 10.5](https://string-db.org/Version%2010.5)) 构建互作网络并进行 KEGG 分析, 取前 10 条通路导入 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 检索与通路相关的疾病, 每条通路选择关联度排名前 3 的疾病作

为荔枝核黄酮类化合物可干预的疾病。

1.2 TCGA 数据下载和预处理

在 TCGA 数据库 (<https://portal.gdc.cancer.gov/>) 中下载基因表达数据和相应的 JORN 格式的临床特征数据。参数设置：组织类型为结肠、亚型为 TCGA-COAD (结肠腺癌)、数据类型为转录数据、表达类型为基因表达量、Workflow 类型为 HTSeq-Counts。用 R 语言处理数据，删除无临床特征信息或临床特征信息不全的样本，以 $P < 0.05$ 、 $|\log FC| > 1$ 为标准筛选差异表达基因，建立差异表达基因矩阵。

1.3 WGCNA 分析

通过 R 包“WGCNA”对 COAD 差异表达基因进行分析，构建权重基因共表达模块，分析各模块与临床信息的相关性。先构建样本聚类树，剔除离群样本构建基因间相关矩阵，选择合适的软阈值 β ，运用动态剪切树法确定基因模块，设置每一个模块基因不少于 30 个，并根据模块特征向量 ME 将聚类树上相似的模块合并，绘制层次聚类树状图，并将模块与表型数据结合，计算各模块的 ME 与临床信息的皮尔森相关系数及其 P 值，通过皮尔森相关系数判断不同模块与各个临床信息间的关系，相关系数较高的多个模块中包含的基因靶点与黄酮类化合物作用靶点进行比对，选取共同靶点最多的模块作为黄酮类化合物干预 COAD 的目标模块，其共同靶点为黄酮类化合物干预 COAD 的作用靶点。

1.4 GO、KEGG 富集分析

将黄酮类化合物干预 COAD 的作用靶点导入 String 数据库分析靶点相互作用，并进行 GO 和 KEGG 分析。

1.5 网络可视化分析

利用 Cytoscape 软件对网络进行可视化分析，根据 Degree 值对节点排序。

1.6 Hub 基因筛选及其相对表达量分析

运行 cytoHubba 插件筛选 Hub 基因，作为 COAD 潜在生物标志物，并利用 GEPIA (<http://gepia.cancer-pku.cn/>) 分析潜在生物标志物在 COAD 组织、癌旁组织的基因相对表达量。

1.7 免疫组化验证蛋白表达

通过 HPA 数据库 (<http://www.proteinatlas.org>) 分析潜在生物标志物在 COAD 组织与癌旁组织的蛋白质表达水平。输入关键基因的基因名，选择“issue”或“pathology”检索该基因在正常组织或肿

瘤组织中的典型图谱，根据蛋白质在组织中的染色强度和染色细胞的百分比，比较正常组织和肿瘤组织中蛋白表达的差异，最后截取具有代表性的免疫染色图像。

1.8 分子对接

从 RCSB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载 CDC25A (PDB ID: 1C25)、AURKB (PDB ID: 2VGO)、CDC25C (PDB ID: 3OP3)，利用 Discovery Studio 2016 中 Receptor-Ligand Interactions 模块下 Prepare Protein 对大分子受体进行前处理 (包括扣除原配体、去水加氢、施加力场等)。从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载化合物结构的 mol 格式文件，点击 Receptor-Ligand Interactions 模块下 Prepare Ligand 准备对接用小分子配体。利用 Libdock 将化合物对接到受体的抑制活性位点中。每个化合物取 Libdockscore 排名前 3 的姿势用 Calculate Binding Energies 计算结合能。

2 结果

2.1 荔枝核黄酮类化合物、潜在作用靶点和干预的疾病

由表 1 所示，共收集到 19 个黄酮类化合物，分别为槲皮素、芦丁、乔松素、黄豆黄素、矢车菊苷、表儿茶素、原花青素 A2、柚皮素、柚皮芸香苷、根皮苷、原花青素 A1、柚皮苷、川皮苷、根皮素、芒柄花黄素、原花青素 B4、原花青素、山柰素、山柰酚。如图 1 所示，这些化合物的作用靶点有 380 个，组成有 378 个节点、4 532 条边的网络。KEGG 富集分析结果显示，化合物的潜在作用靶点主要富集在癌症途径、代谢途径、PI3K-Akt 信号通路、前列腺癌等 193 条通路，可干预 CRC、胶质瘤、冠心病、脂肪肝等多种疾病。在预测荔枝核黄酮类化合物干预的疾病的结果中，CRC 节点度最大，提示荔枝核黄酮类化合物有极大可能对 CRC 具有治疗效果，且有文献报道荔枝核黄酮类化合物对结肠癌细胞具有显著抑制作用^[6]。因此，本研究选择 CRC 的一个典型病理分型 COAD 作为荔枝核黄酮类化合物抗肿瘤的研究对象。

2.2 COAD 的差异表达基因

为进一步研究荔枝核中黄酮类化合物治疗 CRC 的作用制剂，本研究从 TCGA 中下载并最终筛选出 38 例癌旁组织、367 例 COAD 组织的基因表达原始数据。如图 2 所示，共得到 5 392 个差异表达基因，其中上调 2 815 个 (右侧)、下调 2 577 个 (左侧)。

表 1 化合物与 CDC25A、AURKB、CDC25C 的对接结合能
Table 1 Docking binding energy of compounds with CDC25A, AURKB and CDC25C

化合物	化学式	CAS 号	CDC25A 结合能/ (kJ·mol ⁻¹)	AURKB 结合能/ (kJ·mol ⁻¹)	CDC25C 结合能/ (kJ·mol ⁻¹)
柚皮芸香苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	14259-46-2	—	-395.809 1	-247.141 7
柚皮苷	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	10236-47-2	—	-356.185 6	-225.111 3
原花青素 A2	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	41743-41-3	—	-383.494 3	—
原花青素	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₃	4852-22-6	—	—	—
芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	153-18-4	—	—	-283.435 3
原花青素 B4	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	29106-51-2	—	—	—
原花青素 A1	C ₃₀ H ₂₄ O ₁₂	12798-56-0	—	—	—
矢车菊苷	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	7084-24-4	—	-337.865 8	-174.521 1
根皮苷	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	60-81-1	-189.695 7	-346.985 4	-196.279 5
表儿茶素	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	35323-91-2	-131.148 5	-204.387 3	-179.289 2
山柰酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	520-18-3	—	-162.339 9	-123.183 7
根皮素	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	60-82-2	-120.162 4	-178.478 5	-155.881 7
柚皮素	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	480-41-1	—	-164.327 7	—
山柰素	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	491-54-3	—	-188.647 1	—
槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	117-39-5	—	-216.933 8	-156.079 0
芒柄花黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	485-72-3	—	-134.188 3	-79.116 9
乔松素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	480-39-7	—	-151.419 1	-90.185 3
川皮苷	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	478-01-3	—	-195.465 6	-113.516 0
黄豆黄素	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	40957-83-3	—	-179.843 9	-107.115 3
reversine*	C ₂₁ H ₂₇ N ₇ O	656820-32-5	—	-176.350 9	—

—: 无对接 pose; *: AURKB 抑制剂

—: No docking pose; *: AURKB inhibitor

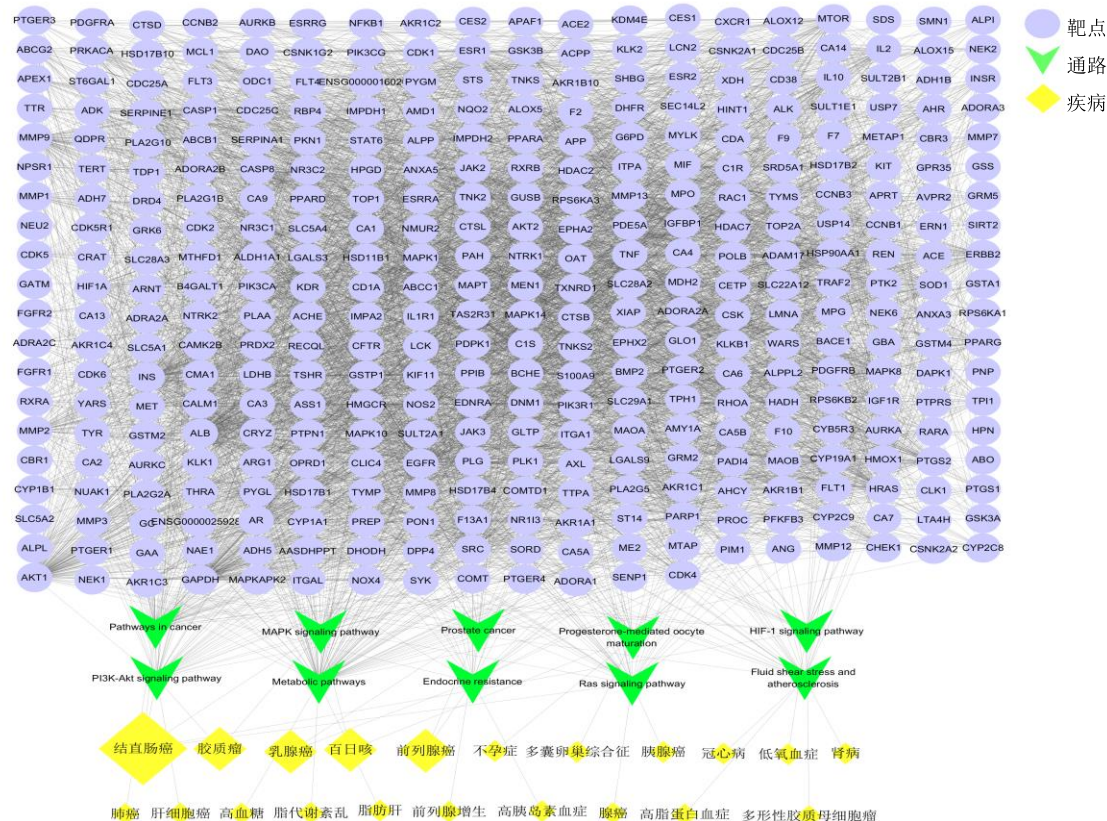


图 1 荔枝核黄酮类化合物的“靶点-通路-疾病”网络图

Fig. 1 “Target-pathway-disease” network of flavonoids in *Litchi Semen*

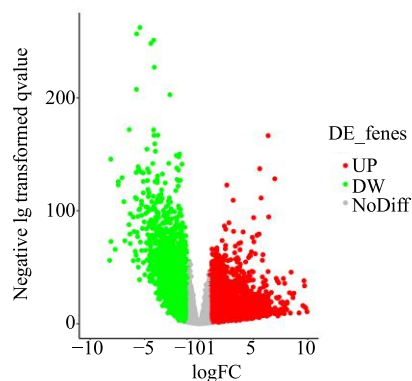


图 2 COAD 差异表达基因火山图

Fig. 2 Volcano map of COAD differential expression gene

2.3 基因模块选择和化合物作用靶点的确定

根据基因差异表达数据和临床特征数据使用 R 语言中 WGCNA 包绘制样本树状图, 如图 3 所示。选择性别、生存状态、生存时间、年龄、TNM 分期、N 分期 (淋巴转移情况)、T 分期共 7 个临床特征进行相关性分析。为符合无尺度网络, 设软阈值 $\beta=5$, 通过层次聚类 and 基于最小模块至少 30 个基因的动态分支切割, 识别出 20 个模块。然后, 基于模块特征基因之间的相似性以 0.75 为阈值, 20 个模块合并为 18 个模块, 如图 4 所示。计算模块与临床数据的相关性, 绘制热图, 如图 5 所示, 青绿色 (turquoise)、粉红色 (pink)、棕色 (brown)、蓝色 (blue)、深蓝色 (midnightblue)、黑色 (black)、紫色 (purple) 模块与性别、生存状态、生存时间、淋巴转移情况、肿瘤分期等临床特征相关性较高 (相关性 ≥ 0.16), 表明它们在 COAD 的肿瘤发生中起着重要作用。将以上 7 个

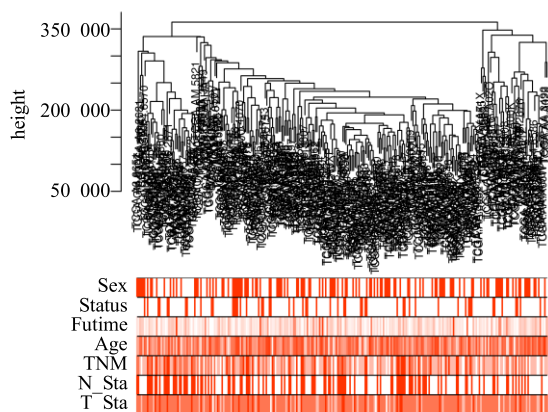


图 3 COAD 样本聚类结果及对应的样本临床信息

Fig. 3 COAD samples clustering results and corresponding clinical information

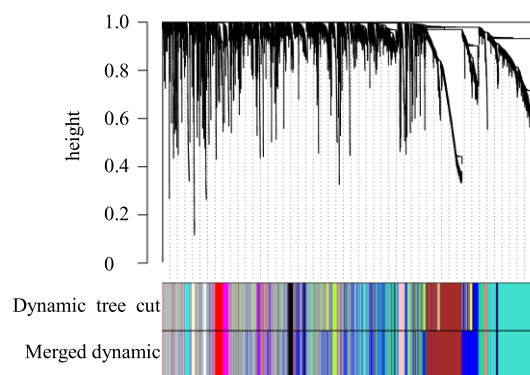


图 4 COAD 差异表达基因聚类树状图

Fig. 4 Dendrogram of COAD differential expression gene cluster

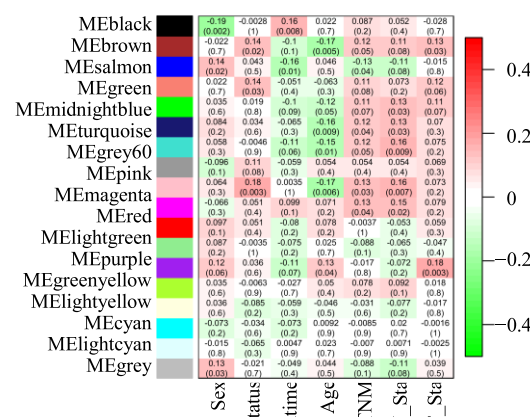


图 5 基因模块与临床表征相关性热图

Fig. 5 Thermogram of correlation between gene module and clinical characterization

模块的靶点分别与化合物作用靶点对比, 黄酮类化合物干预 COAD 的作用靶点主要集中在青绿色模块, 该模块与患者年龄呈负相关, 与 TNM 和 N 分期呈正相关, 提示青绿色模块中靶点与 COAD 进展和淋巴转移有关。

2.4 抗 COAD 作用靶点的富集分析

将 34 个黄酮类化合物干预 COAD 的作用靶点导入 String 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析。GO 分析结果如图 6 所示, 作用靶点富集在细胞分裂、细胞周期 G₂/M 期转变、刺激反应、转移酶活性等 229 个生物学过程, 催化活性、阴离子结合、小分子结合、蛋白激酶活性等 44 个分子功能, 细胞质、胞浆、细胞内细胞器等 31 个细胞组成。KEGG 富集分析结果显示, 作用靶点富集在癌症通路、细胞周期、孕酮介导的卵母癌症途径、细胞衰老、p53 信号通路等 40 条通路, 前 10 条通路见图 7。

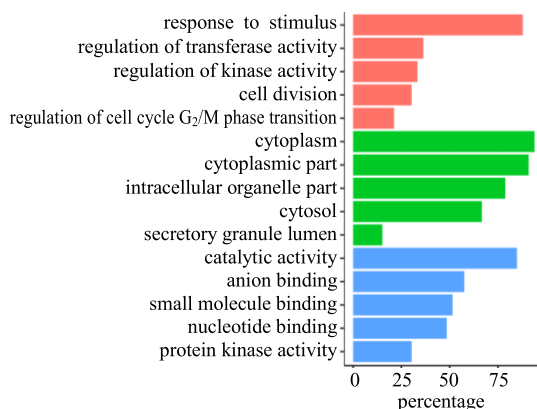


图 6 GO 富集条形图

Fig. 6 Bar chart of GO enrichment

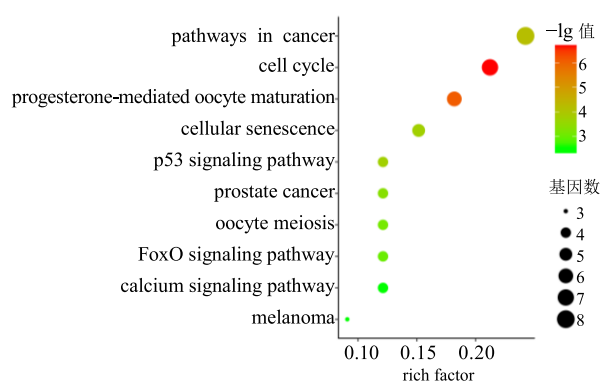


图 7 KEGG 富集气泡图

Fig. 7 Bubble chart of KEGG enrichment

2.5 化合物-抗 COAD 作用靶点-通路网络的构建

如图 8 所示，化合物节点中乔松素、槲皮素、原花青素类成分面积较大，说明它们与作用靶点联

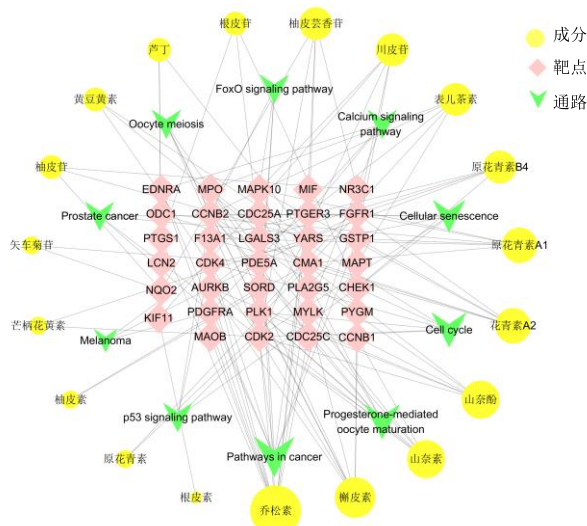


图 8 “成分-抗 COAD 作用靶点-通路”网络图

Fig. 8 “Compositions-anti COAD targets-pathways” network

系最多，指示为荔枝核干预 COAD 的主要活性成分。

2.6 潜在生物标志物 CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB 的筛选及基因表达

利用 cytoHubba 插件按 NMCC 算法在作用靶点中筛选出排名前 4 的 Hub 基因，分别为 CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB。如图 9 所示，与正常组织（癌旁组织）相比，COAD 组织中 CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB 基因的表达显著升高 ($P < 0.05$)。因此选择这 4 个蛋白作为潜在生物标志物。

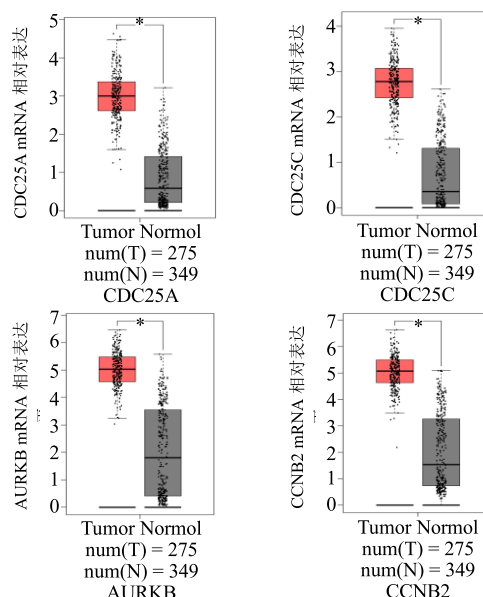


图 9 COAD 组织与正常组织基因表达量箱线图

Fig. 9 Box diagram of gene expressions in COAD tissues and normal tissues

2.7 免疫组织化学法验证 CDC25C、CCNB2、AURKB 蛋白的表达

除 HPA 数据库中未见 CDC25A 免疫组化结果外，其他 3 个蛋白的表达如图 10 所示，抗体 CAB003800 在正常结肠组织中 CDC25C 呈现低强度染色，而在 COAD 组织中呈现中等强度染色，染色细胞比例均大于 75%；抗体 CAB009575 在正常结肠组织中 CCNB2 呈现低强度染色，而在 COAD 组织中呈现中等强度染色，染色细胞比例均大于 75%；抗体 CAB005862 在正常结肠组织中 AURKB 呈低强度染色，染色细胞比例小于 25%，而在 COAD 组织中检测到 AURKB 呈高强度染色，染色细胞比例 25%~75%。与如图 9 中 CDC25C、CCNB2、AURKB 基因表达水平一致，提示 CDC25C、CCNB2、AURKB 可作为 COAD 潜在的生物标志物。

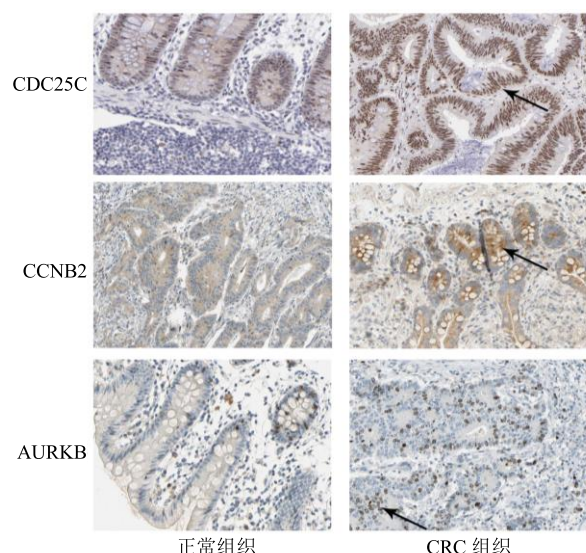


图 10 CRC 组织及正常组织的免疫组化图

Fig. 10 Immunohistochemistry diagram of CRC tissues and normal tissues

2.8 化合物与 CDC25A、CDC25C、AURKB 蛋白的对接模式

在 PDB 数据库中目前没有收录 CCNB2 的蛋白晶体结构, 故无法进行分子对接。其他 3 个蛋白与黄酮类化合物的对接结果如表 1 所示, CDC25A 与 3 个成分具有相互作用; AURKB 与 15 个成分具有相互作用, 与柚皮芸香苷、原花青素 A2、柚皮苷结合能力较强; CDC25C 与 13 个成分具有相互作用, 其中芦丁、柚皮芸香苷、柚皮苷与 CDC25C 结合能力较强。部分化合物与蛋白的相互作用见图 11。

3 讨论

传统研究中药作用机制的方法大多从研究单个或少数几个基因、通路或者中药中的单体成分入手, 具有一定的盲目性、局部性, 无法对疾病的发生发展机制进行全局探索, 难以从整体观揭示中药治疗疾病的多成分、多靶点、多通路的特点。COAD 发

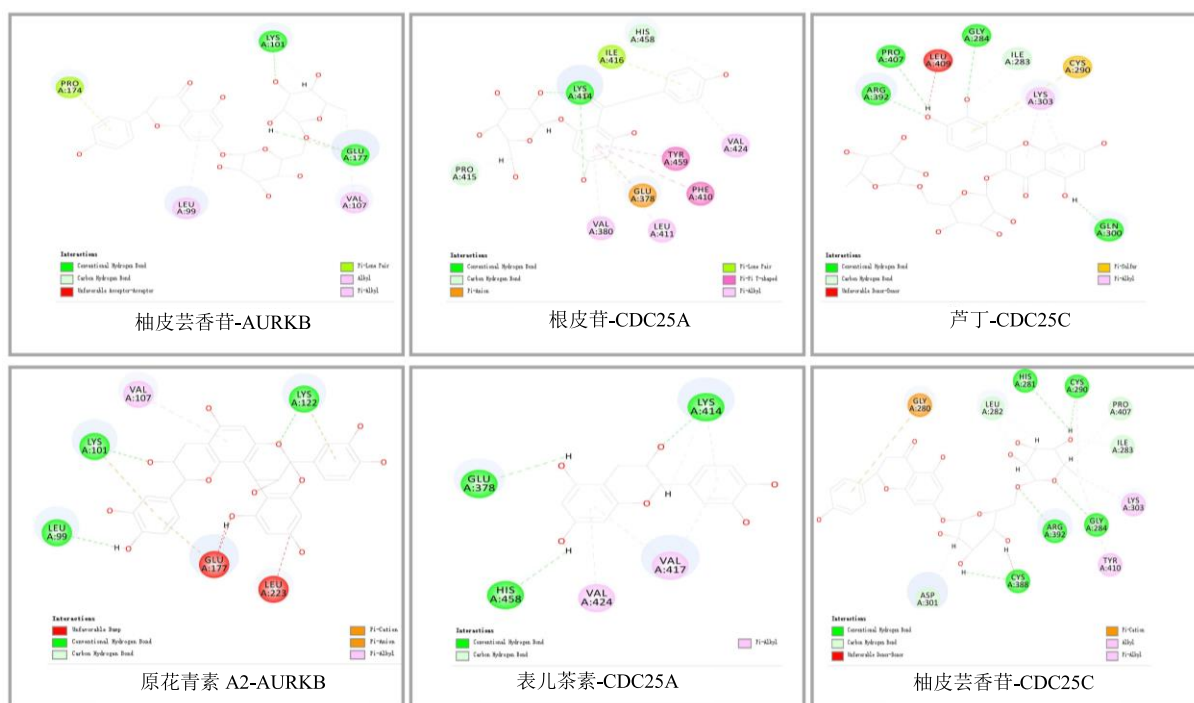


图 11 柚皮芸香苷、原花青素 A2、根皮苷、表儿茶素与 AURKB、CDC25A、CDC25C 的分子对接结果

Fig. 11 Molecular docking patterns of AURKB, CDC25A and CDC25C with narirutin, procyanidin A2, phloridzin, ent-epicatechin and rutin

病机制复杂, 患者预后差、死亡率高, 从众多基因中筛选可靠的生物标志物, 对 COAD 的诊断和治疗具有重要意义。本研究采用 WGCNA 联合网络药理学的方法, 构建无尺度网络, 将 COAD 差异基因分为 18 个模块, 从中挖掘得到 4 个与肿瘤分期和淋巴转移密切相关的生物标志物 (CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB)。细胞分裂周期因子 25 (CDC25)

是一种双特异性磷酸酶, 可以通过激活 CDK, 并调控应对 DNA 损伤, 使细胞周期运行^[13]。CDC25A、CDC25C 是 CDC25 其中两种亚型, 其异常表达将会导致细胞周期紊乱、失常, 从而导致肿瘤发生。研究表明, CDC25A、CDC25C 参与多种癌症的调控过程, CDC25C 在食管鳞状细胞癌组织中呈高表达且与患者预后不良有关^[14]; 在肺腺癌组织中

CDC25C 呈高表达状态, GASE 分析发现其主要富集在细胞周期、凋亡、DNA 损伤反应、有丝分裂 M-M/G₁ 期和 FA 介导的细胞死亡^[15]。CDC25A 具有原癌基因特性, 作为细胞周期 G₁/S 期和 G₂/M 期进程的重要调控因子, 其表达水平的增加会促进 G₁/S 期和 G₂/M 期检查点之间的转变, 导致细胞增殖, 促使癌症发生和转移, CDC25A 在宫颈癌、胃癌、下咽癌和 CRC 等一系列人类恶性肿瘤中均表现为高表达^[16-18]。CCNB2 是细胞周期蛋白 B 家族的一个成员, 在细胞周期调控中发挥重要作用。CCNB2 与 CRC 的肿瘤分期和肿瘤浸润程度显著相关, 肿瘤分期越晚, 浸润程度越深, CCNB2 蛋白表达越高^[19]。AURKB 即极光激酶 B, 其异常表达会使正常分裂的两个子细胞在有丝分裂期间的染色体分离阶段通过相互的细胞质桥梁, 形成异常的双核子细胞, 导致肿瘤的发生。

本研究显示, 乔松素、槲皮素、原花青素等黄酮类化合物可通过调控癌症通路、细胞周期发挥抗癌作用。同时, 分子对接结果显示, 柚皮芸香苷、柚皮苷等可与 CDC25A、CDC25C、AURKB 等潜在生物标志物作用靶点结合。乔松素具有抗癌作用, 能够显著地诱导 LNCaP 细胞凋亡和细胞 S 期、G₂/M 期周期阻滞^[20]。槲皮素具有亲脂性特点, 可以穿过细胞膜, 抑制癌细胞的迁移和侵袭能力, 从而阻止癌细胞转移, 在多种恶性肿瘤 (如肝癌、淋巴瘤、CRC 等) 中发挥显著抗癌作用^[21-22]。研究表明, 乔松素、槲皮素、原花青素等是荔枝核抗 COAD 的主要活性成分, 其中柚皮芸香苷、柚皮苷的作用靶点可能是 CDC25A、CDC25C、AURKB。

4 结论

本研究通过 WGCNA 分析发现, CDC25A、CDC25C、CCNB2、AURKB 在细胞周期进程中起重要作用, 它们可能协同促进细胞增殖与分裂, 其异常表达会导致 COAD 的发生、发展和转移, 可作为 COAD 诊断和治疗的生物标志物; 通过网络药理学、分子对接等策略预测, 与 CDC25A、CDC25C、AURKB 作用的黄酮类化合物主要是柚皮芸香苷、原花青素 A2、根皮苷、表儿茶素、芦丁, 可能是这些靶点的抑制剂。本研究初步揭示了荔枝核黄酮类成分抗 COAD 的多成分、多靶点、多通路的调控机制, 后期可开展实验进一步验证化合物活性及作用靶点。

参考文献

[1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics [J].

CA: Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

- [2] 陈 功, 万德森. 直肠癌术前新辅助治疗最新进展 [J]. 结直肠肛门外科, 2015, 21(1): 9-15.
- [3] 张 楠, 周志昆, 张凌云, 等. 荔枝核与龙眼核水提取物的体外抗肿瘤活性的比较与评估 [J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(3): 39-40.
- [4] 于培良, 赵立春, 廖夏云, 等. 荔枝核化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(15): 41-46.
- [5] 肖柳英, 张 丹, 冯昭明, 等. 荔枝核小鼠抗肿瘤作用研究 [J]. 中药材, 2004, 27(7): 517-518.
- [6] 卢 青, 成秋宸, 范丽雯. 荔枝核总黄酮对结肠癌细胞株 HT29 的抑制作用及相关机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(17): 172-176.
- [7] 常 明. 荔枝核总黄酮靶向 AKT/mTOR & NF-κB 双通路抑制前列腺癌细胞的生长和转移 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [8] Xu X Y, Xie H H, Hao J, et al. Eudesmane sesquiterpene glucosides from *lychee seed* and their cytotoxic activity [J]. *F J Agric Food Chem*, 2010, 5(73): 1123-1126.
- [9] Xu X Y, Xie H H, Hao J, et al. Flavonoid glycosides from the seeds of *Litchi chinensis* [J]. *Food Chem*, 2011, 59(4): 1205-1209.
- [10] Chen C T, Wang P P, Mo W J, et al. Expression profile analysis of prognostic long non-coding RNA in adult acute myeloid leukemia by weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) [J]. *J Cancer*, 2019, 10(19): 4707-4718.
- [11] Xue K, Yang J, Zhao Y, et al. Identification of susceptibility genes to allergic rhinitis by gene expression data sets [J]. *Clin Transl Sci*, 2019, 13(1): 169-178.
- [12] 刘 梦, 李志峰, 冯 宇, 等. 荔枝核化学成分的分离与鉴定 [J]. 中草药, 2019, 50(15): 3593-3597.
- [13] 唐艳萍, 曹 骥. CDC25A 与肿瘤的研究进展 [J]. 癌症进展, 2018, 16(15): 1815-1819.
- [14] 董 倩. CDC25C 在食管鳞癌中的表达与预后研究 [D]. 衡阳: 南华大学, 2019.
- [15] Xia Z, Ou-Yang W, Hu T, et al. Prognostic significance of CDC25C in lung adenocarcinoma: an analysis of TCGA data [J]. *Cancer genet*, 2019, 233/234: 67-74.
- [16] 赵 旻, 左泽华, 邱小萍, 等. CDC25A 和 CDC25B 基因在宫颈癌中的表达和临床意义 [J]. 肿瘤, 2008, 28(1): 44-47.
- [17] 阎庆辉, 赵 璞, 曹志峰, 等. 胃癌组织中 Cyclin E、p57 与 CDC25A 的表达及意义 [J]. 山东医药, 2008, 48(39): 62-63.
- [18] 杨春悦, 马桂琴, 李连贺, 等. 下咽癌中 CDC25A 基因的表达及临床意义 [J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(9): 649-650.
- [19] 辛 萱, 陈 军, 严钢莉, 等. CCNB2 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(26): 5127-5131.
- [20] Saad M A, Abdel Salam R M, Kenawy S A, et al. Pinocembrin attenuates hippocampal inflammation, oxidative perturbations and apoptosis in a rat model of global cerebral ischemia reperfusion [J]. *Pharmacol Rep*, 2015, 67(1): 115-122.
- [21] Pezzuto A, Piraino A, Mariotta S. Lung cancer and concurrent or sequential lymphoma: two case reports with hypersensitivity to bevacizumab and a review of the literature [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(2): 604-608.
- [22] 王惠丽, 陈柳青, 刘 艳, 等. 槲皮素联合 5-氟尿嘧啶对人结肠癌 Lo Vo 细胞凋亡、周期和迁移能力的影响 [J]. 广东医学, 2016, 37(20): 3023-3025.