

基于网络药理学探讨黄芩抗乳腺癌的作用机制

李勇杰^{1,2} 封芬^{1,2} 欧阳恩鸿^{1,2} 魏海谅¹

(1 邵阳学院 药学院 湖南邵阳 422000; 2 湘西南中药开发利用湖南省工程研究中心 湖南邵阳 422000)

摘要:目的: 基于网络药理学探讨黄芩抗乳腺癌的作用机制, 为深入了解中药的药理作用和作用机制提供新的方向。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 获取黄芩的主要活性成分及其作用靶点, 采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建黄芩-活性成分-靶点网络图; 通过 Genecards 数据库寻找与乳腺癌疾病相关的靶点信息; 利用 STRING 11.5 数据库进行蛋白质相互作用分析, 构建 PPI 网络并挖掘网络中潜在的蛋白质。使用 R 语言, 将黄芩治疗乳腺癌的相关靶点进行 GO/KEGG 富集分析。结果 黄芩的活性成分有 36 个, 对应靶点 111 个; 与乳腺癌疾病相关靶点取交集后总共获得交集靶点 106 个。黄芩治疗乳腺癌的靶点主要涉及细胞凋亡、细胞衰老、癌症、免疫、病毒相关等通路, 其生物学功能主要为对类固醇激素的反应、对内毒素的反应、对氧化应激的反应等。结论 本研究初步阐述了黄芩治疗乳腺癌的多成分多靶点多通路的作用机制, 为黄芩的临床应用提供理论基础。

关键词: 黄芩; 网络药理学; 乳腺癌; 作用靶点

乳腺癌是一种严重影响女性生活质量和寿命的恶性肿瘤, 其发病率位居全球女性恶性肿瘤首位。中药黄芩具有“主诸热黄疸, 肠癖泄痢, 逐水, 下血闭, 恶疮蚀火疡”的功效^[1]。然而, 目前黄芩抗乳腺癌的作用机制尚未完全阐明, 并且缺乏从细胞到分子水平系统地阐述其抗乳腺癌的作用机制。近年来, 随着生物信息的快速发展, 网络药理学被用来综合分析中药或中药复方中的有效活性成分, 并挖掘药物和疾病的共同作用靶点。因此, 本研究通过网络药理学方法研究中药黄芩治疗乳腺癌疾病多成分-多靶点的作用关系, 以分析靶点所涉及的生物学功能和信号通路, 为深入研究中药的药理作用和作用机制提供新的思路, 也有助于促进中药传承创新发现, 同时为临床试验提供理论基础。

1. 材料与方法

1.1 黄芩相关靶点筛选

通过中药系统药理学数据库与分析平台^[2] (TCMSP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>), 输入“黄芩”查询其活性成分, 以口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$, 且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为依据进行活性成分初步筛选以获得主要活性化合物及其对应的蛋白质靶点。筛选结束后, 把活性成分对应的蛋白质名称靶点上传至蛋白质相互作用数据库 (STRING 11.5, <https://cn.string-db.org/>), 统一转换成规范的基因名称。

1.2 乳腺癌相关靶点筛选

通过 Genecards 数据库 (<https://www.genecards.org>), 输入“breast cancer”寻找与乳腺癌疾病相关的靶点信息, 并下载这些数据。

1.3 黄芩—活性成分—靶点网络图的构建

将黄芩对应的活性成分和活性成分对应的靶点 EXCEL 表格数据进行整理, 并上传至 Cytoscape 3.7.2 软件进行网络图可视化。其中黄芩、活性成分、靶点分别用不同颜色和形状的节点表示, 节点之间的相互作用以边表示。

1.4 黄芩—乳腺癌相关靶点的 PPI 网络构建

利用 R 语言, 将黄芩的活性成分所对应的靶点与乳腺癌疾病相关靶点取交集, 并绘制韦恩图。接下来, 将交集靶点上传至 STRING 11.5 数据库, 进行蛋白互作 (PPI) 网络构建^[3]。选择以人为物种, 置信度 >0.4 , 并勾选隐藏游离蛋白选项, 得到黄芩治疗乳腺癌的潜在蛋白靶点相互作用网络图。根据自由度 (Dgree) 高低进行排名, 筛选出 Dgree 排名前 20 的核心蛋白, 用 R 语言绘制柱状图。统计分析和可视化均在 R 3.6.3 版本中进行, 用于可视化涉及的 R 包: ggplot2 包。

1.5 黄芩—乳腺癌相关靶点的 GO (Gene Ontology) 和 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 富集分析

使用 R 语言, 设置 $P < 0.01$, 将黄芩治疗乳腺癌的相关靶点进行 GO/KEGG 富集分析。按照 P 值大小分别筛选出排名前 10 的条目进行可视化分析, 包括了生物过程 (Biological Process, BP), 细胞组分 (Cellular Component, CC), 分子功能 (Molecular Function, MF) 和 KEGG。统计分析和可视化均在 R 3.6.3 版本中进行, 涉及的 R 包: clusterProfiler 包 (用于富集分析), ggplot2 包 (用于可视化)。

2. 结果

2.1 黄芩活性成分及作用靶点的获取

我们通过 TCMSP 数据库, 依据 $OB \geq 30\%$ 且 $DL \geq 0.18$ 初步筛选出黄芩的活性成分共有 36 种, 其分子 ID 包括 MOL001689、MOL000173、MOL000228、MOL002714、MOL002908、MOL002909、MOL002910、MOL002911、MOL002913、MOL002914、MOL002915、MOL002917、MOL002925、MOL002926、MOL002927、MOL002928、MOL002932、MOL002933、MOL002934、MOL002937、MOL000358、MOL000359、MOL000525、MOL000552、MOL000073、MOL000449、MOL001458、MOL001490、MOL001506、MOL002879、MOL002897、MOL008206、MOL010415、MOL012245、MOL012246、MOL012266。这些活性成分对应的靶点共有 111 个。

2.2 乳腺癌疾病靶点的获取

从 Genecards 数据库获得乳腺癌疾病相关靶点共 15606 个, 接下来, 将中药黄芩的活性成分对应靶点与乳腺癌疾病获得的靶点取交集, 总共获得 106 个靶点, 此交集靶点则为黄芩治疗乳腺癌的潜在作用靶点 (图 1A)。

2.3 中药黄芩—活性成分—靶点网络图的构建

接下来, 我们将黄芩和其活性成分对应的靶点数据进行整理, 发现有效活性成分为 32 个, 其对应靶点总共为 112 个 (删除重复值), 通过导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建黄芩—活性成分—靶点网络图 (图 1B)。

2.4 黄芩活性成分—乳腺癌疾病靶点 PPI 网络构建

为了进一步明确黄芩治疗乳腺癌的相关靶点间的相互作用, 我们利用图 1A 的韦恩图所获得的 106 个靶点上传至 STRING 11.5 数据库, 最后得到黄芩治疗乳腺癌的潜在靶点 PPI 网络图 (图 1C)。设置置信度 >0.4 , 去除 2 个没有蛋白相互作用的游离靶点, 得到关键蛋白总共 104 个。并按照自由度进行排名, 选取黄芩治疗乳腺癌相关靶点排名前 20 的关键

蛋白(图1D)。

2.5 黄芩活性成分—乳腺癌疾病靶点 GO/KEGG 富集分析

最后,我们利用 R 语言进行黄芩活性成分—乳腺癌疾病靶点 GO/KEGG 富集分析。GO 富集分析显示,黄芩治疗乳腺癌的生物学功能主要涉及到对类固醇激素的反应、对内毒素的反应、对氧化应激的反应、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合体、转录因子复合体、核转录因子复合体、核受体活性、类固醇激素受体活性、G 蛋白偶联受体活性等多个生物学功能(图 1E)。KEGG 富集分析显示,黄芩治疗乳腺癌的信号通路涉及到细胞凋亡、细胞衰老、癌症、免疫、病毒等通路,包括细胞凋亡、细胞衰老、铂类耐药、小细胞肺癌、结直肠癌、前列腺癌、蛋白多糖与癌症、P53 信号通路、雌激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、Th17 细胞分化、人类免疫缺陷病毒 1 型感染、乙型肝炎等多条通路相关(图 1F)。

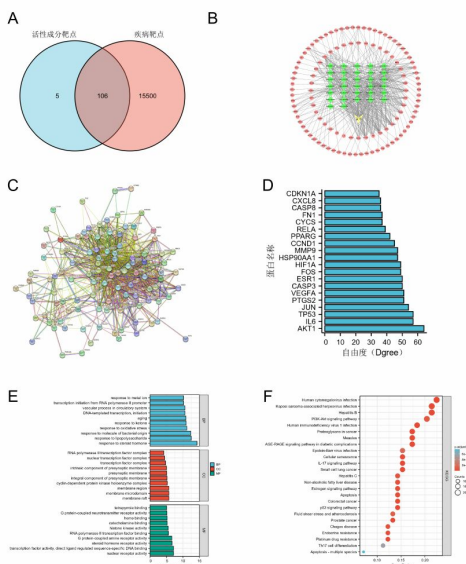


图 1A 黄芩活性成分和乳腺癌疾病交集靶点的韦恩图;1B 黄芩—活性成分—乳腺癌靶点网络图;1C 黄芩—乳腺癌交集靶点 PPI 网络图;1D 黄芩治疗乳腺癌的关键蛋白靶点;1E 黄芩治疗乳腺癌潜在靶点的 GO 富集分析;1F 黄芩治疗乳腺癌潜在靶点的 KEGG 富集分析。

3. 讨论

本研究通过网络药理学方法初步筛选出黄芩的主要活性成分主要有 36 种,包括了黄芩苷(MOL002714)、汉黄芩素(MOL000173)和刺槐素(MOL001689)等多种活性成分。有研究显示,在 MCF-7 乳腺癌细胞中,黄芩苷可以通过上调 miR-30a-5p 的表达,降低细胞的增殖、侵袭并增加细胞的凋亡^[4]。因此,黄芩可能通过这些活性成分来发挥抗乳腺癌的作用。

我们通过将黄芩活性成分对应的靶点和乳腺癌疾病相关靶点进行交集,总共获得 106 个黄芩治疗乳腺癌的靶点。并将 106 个靶点上传至 STRING 11.5 数据库,最后得到黄芩治疗乳腺癌的潜在靶点 PPI 网络图。按照自由度进行排名,选取黄芩治疗乳腺癌相关靶点排名前 20 的关键蛋白。有学者研究显示,通过回顾性分析 88 例乳腺癌病理资料,发现 AKT1 在绝大多数乳腺癌患者呈现高表达,并且与肿瘤大小、淋巴结转移密切相关^[5]。通过对黄芩治疗乳腺癌的交集靶点进行 GO 富集分析,对 BP 条目进行分析,主要涉及到对类固醇激素的反应、对内毒素的反应和对氧化应激的反应等生物学过程。类固醇激素尤其是雌激素和孕激素对乳腺癌的发生发展有着重要的作用,通过内分泌治疗可以治疗依赖性乳腺癌^[6]。KEGG 富集分析显示,黄芩治疗乳腺癌的信号通路涉及到细胞凋亡、细胞衰老、铂类耐药、癌症、P53 信号通路、雌激素信号通路、PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、Th17 细胞分化等多条通路。此结果提示,黄芩治疗乳腺癌可能和一些经典的癌症通路、细胞凋亡以及免疫调节等密切相关。

以上研究结果表明,黄芩治疗乳腺癌可能通过多成分多靶点来干预不同的生物学过程和信号通路。通过对蛋白网络中的核心蛋白进行干预,可为临床用黄芩治疗乳腺癌提供科学依据,也为发掘黄芩治疗乳腺癌的潜在作用机制提供了新的思路。

参考文献:

- [1]冯涛,宋佳敏,孙立丽,等.基于 CiteSpace 知识网络图谱的黄芩研究进展[J].中国现代应用药学,2022: 1-8.
 - [2]RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminform, 2014,6: 13.
 - [3]SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets[J]. Nucleic Acids Res, 2019,47(D1): D607-D613.
 - [4]金鑫,王杰,方晴,等.黄芩苷对乳腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响[J].中国临床药理学杂志,2021,37(18): 2437-2439.
 - [5]史圆圆,吴建农,路名芝,等. Akt1 和 ARK5 在乳腺癌中的表达及临床病理意义[J]. 诊断病理学杂志, 2021,28(03): 189-193.
 - [6]王宇,乔娟娟,张磊,等.类固醇激素在乳腺癌中的作用及对肿瘤干细胞的影响[J].实用肿瘤学杂志,2019,33(05): 466-470.
- 基金项目:邵阳市指导性科技计划项目(2020ZJ140)
作者简介:李勇杰,男,讲师,硕士,主要从事肿瘤药理学研究