

基于网络药理和分子对接探究和枢消积丸干预肝癌的机制

陈相霖¹, 彭昭宣², 张玉蓉², 彭一宸¹, 汪静^{2*}

¹西南医科大学; ²西南医科大学附属中医医院, 泸州 646000

摘要: 基于网络药理-分子对接探析和枢消积丸干预肝癌的机制。从 TCMSp、SymMap、GeneCards、OMIM、DurgBank、TTD 和 PharmGKB 数据库内筛选出 15 味中药主要活性成分及治疗肝癌的作用靶点, 应用 STRING 平台构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络模型。采用 Cytoscape 软件绘制药物-成分-共有靶点网络和 Metascape 工具对共有靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 最后采用 AutoTools 软件进行分子对接验证。最终获取数据库中活性成分-疾病共同靶点 251 个; 共同靶点的拓扑分析筛选出 21 个核心关键基因, 度值靠前的 4 位关键基因是 JUN、MAPK3、MAPK1 和 TP53; 并通过分子对接证明, 药物有效成分与 4 个核心基因对接良好, 其中柚皮素和 MAPK3 结合能最高; GO 富集分析显示, 和枢消积丸调节药物的反应、氧化应激反应、核受体活性和转录因子活性等生物过程参与肝癌发生发展; KEGG 富集通路分析, 主要核心靶点与肝癌相关的信号通路主要涉及钙离子信号通路、PI3K-Akt 信号通路、P53 信号通路、TGF- β 信号通路、Wnt 信号通路和 MAPK 信号通路。通过分子对接与网络药理的探析, 发现和枢消积丸治疗肝癌疾病的作用机制涉及多成分、多靶点和多通路, 为临床应用和基础研究提供了科学依据。

关键词: 和枢消积丸; 网络药理学; 分子对接; 肝癌; 作用机制

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023) Suppl-0116-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.S.015

Intervention mechanism of Heshu Xiaoji pills on liver cancer based on network pharmacology and molecular docking

CHEN Xiang-lin¹, PENG Zhao-xuan²,
ZHANG Yu-rong², PENG Yi-chen¹, WANG Jing^{2*}

¹Southwest Medical University; ²Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

Abstract: To explore the mechanism of Heshu Xiaoji pills (HXP) intervention in liver cancer based on network pharmacology-molecular docking, fifteen major active ingredients of TCM and their targets for the treatment of liver cancer were first screened from TCMSp, SymMap, GeneCards, OMIM, DurgBank, TTD and PharmGKB databases, and then protein-protein interaction (PPI) network models were constructed by applying the STRING platform. Cytoscape software was used to map the drug-component-shared target network and Metascape tool to perform GO functional enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis on the shared targets, and then AutoTools software was used for molecular docking validation. Finally, 251 active ingredient-disease common targets were obtained from the database. Target intersection analysis screened 21 core key genes, and the top 4 key genes were JUN, MAPK3, MAPK1 and TP53. Molecular docking demonstrated that the active ingredients of the drug dovetailed well with four core genes, among which naringenin and MAPK3 had the highest binding energy. GO enrichment analysis showed that the biological processes such as the response to drug, oxidative stress, nuclear receptor activity and transcription factor activity were involved in the development of hepatocellular carcinoma. KEGG enrichment pathway analysis showed that the main core targets and hepatocellular carcinoma-related signaling pathways mainly involved the calcium signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, P53 signaling pathway, TGF- β signaling pathway, Wnt signaling pathway

收稿日期: 2023-11-24 接受日期: 2023-02-10

基金项目: 四川省中医药管理局中医药科研专项(川科计[2018]4号, 2020IC0142); 泸州市"酒城英才·科技创新团队"(泸组通[2021]162号); 泸州市政府-西南医科大学科技战略合作项目(2021LZXNYD-Z08); 四川省中医药管理局中医药科研专项(川中医药办发[2021]13号)

* 通信作者 Tel: 86-013882726162; E-mail: lywj68@126.com

and MAPK signaling pathway. Through the analysis of molecular docking and network pharmacology, it was found that the mechanism of action of HXP in treating liver cancer disease involves multiple components, multiple targets and multiple pathways, which provides a scientific basis for clinical application and basic research.

Key words: Heshu Xiaoji pills; network pharmacology; molecular docking; liver cancer; mechanism of action

原发性肝癌(以下简称“肝癌”)是世界上第六大常见恶性肿瘤,在肿瘤相关死亡率位居第三,其中肝细胞癌占 75% ~ 85%^[1]。据估计,到 2025 年将有 100 万例新的肝癌病例^[2]。如今,手术、介入、化疗、放疗、免疫和靶向治疗等手段为肝癌患者带来福音,但肝癌复发率在肿瘤死亡率中位居第四位,且肝癌患者五年相对生存率仅 18%,具有高复发与高死亡率的特点^[3,4]。多方式、多靶点的肝癌治疗要求应运而生。

诸多证据表明,中医药作为辅助抗癌治疗的重要手段,具有多靶点、多途径、多成分、低毒性和高活性的特点^[5]。网络药理学可以基于多学科系统生物学和多项式药理学,以多维形式探索药物干预疾病的分子机制,可以为药物成分与疾病靶点之间的复杂相互作用提供生物网络构建和网络可视化分析^[6]。和枢消积丸(Heshu Xiaoji pills, HXP)是由柴胡、黄芩、黄芪、茜草等 15 味中草药组成。前期研究表明,该方对肝癌细胞增殖和迁移具有抑制作用。然而, HXP 作用于肝癌中的药理机制仍未阐明。本研究从公开的在线数据库中获取相关靶点信息,通过构建 PPI 网络、GO 功能富集和途径富集分析以及分子对接,从系统和分子水平上研究 HXP 抗肝癌的生物活性成分,并预测分子网络机制,以期为临床和基础实验提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 筛选活性成分和靶标

在中药系统药理分析平台 TCMSP 数据库(<https://old.tcm-sp-e.com/t>)和 SymMap 数据库(<http://www.symmap.org/>)中筛选了 HXP 主要药物成分。TCMSP 数据库内以口服生物利用度(oral bio-availability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 作为阈值筛选备用中药化合物。通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将化合物潜在靶点进行筛选,获取 HXP 有效成分的基因导入 Cytoscape 3.8.2 软件(<https://cytoscape.org/>)获取“化合物-靶点”网络图。

1.2 核心基因提取

GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>) DurgBank

数据库(<https://go.drugbank.com/>)、TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)和 PharmGKB 数据库(<https://www.pharmgkb.org/>)用于寻找肝癌的潜在相关靶点。合并了从五个数据库下载的相关目标,删除重复数据以获取潜在目标。此外,采用 Venny 软件(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制出韦恩图,明确疾病靶点与中药成分靶点的共有靶点。

1.3 成分-靶点-疾病网络建设

在 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)下载韦恩图重叠目标数据,将参数设置为所需的最小相互作用分数:0.9,构建蛋白质-蛋白质(protein-protein interaction, PPI)网络关系。随后导入 Cytoscape 3.8.2 软件,采用 2 倍中位数法提取核心基因,整合度值(node degree distribution)、介数中心性(betweenness centrality, BC)和接近中心性(closeness centrality, CC)等拓扑属性参数,对 PPI 数据进行可视化分析。

1.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape 数据库(<http://metascape.org/>)进行 GO 和 KEGG 富集分析,当 $P < 0.05$ 时,富集项被认为具有统计学意义。前 20 个生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)、细胞组分(cellular component, CC)和 KEGG 途径使用生物信息学工具(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)做可视化分析。

1.5 分子对接

将 HXP 有效成分和核心靶点基因分别导入 RCSB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)、PubChem 数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载蛋白质受体对应的 3D 结构。利用 Maestro、PyMol 和 ChemBioDraw Ultra 软件对上述蛋白质受体和配体进行处理,并进行分子对接过程以获得它们之间的亲和力。使用 AutoDock Vina 1.5.6 软件进行对接模拟和可视化。

2 结果

2.1 HXP 主要活性化合物和靶点的筛选

通过挖掘 TCMSP 平台为主和 SymMap 数据库

为辅助分析 HXP 中的活性成分(见表 1)。去除重复靶点后,最终收集 15 味中药作用靶点基因 258 个,

利用 Cytoscape 软件构建主要成分-靶点相互作用网络(见图 1)。

表 1 和枢消积丸活性成分筛选结果

Table 1 Screening results of the active ingredients in HXP

中药名称 Drug name	剂量 Dose(g)	成分数量 Quantity of ingredients
柴胡 Bupleuri Radix	6	17
黄芩 Scutellariae Radix	4.5	36
黄芪 Astragali Radix	5	20
甘草 Glycyrrhizae Radix	1.5	92
连翘 Forsythiae Fructus	5	23
白术 Atractylodis Macrocephatae Rhizoma	3	7
白芍 Paeoniae Radix Alba	5	13
茜草 Radix Rubiae	5	19
麦芽 Hordei Fructus Germinatus	1	18
肉桂 Cinnamomi Cortex	0.5	0
海螵蛸 Sepiae Endoconcha	1	0
鳖甲 Trionycis Carapax	2	1
鸡内金 Galli Gigeriae Endothelium Corneum	1	0
冰片 Borneolum Syntheticum	0.05	3
薄荷脑 Metholum	0.05	10

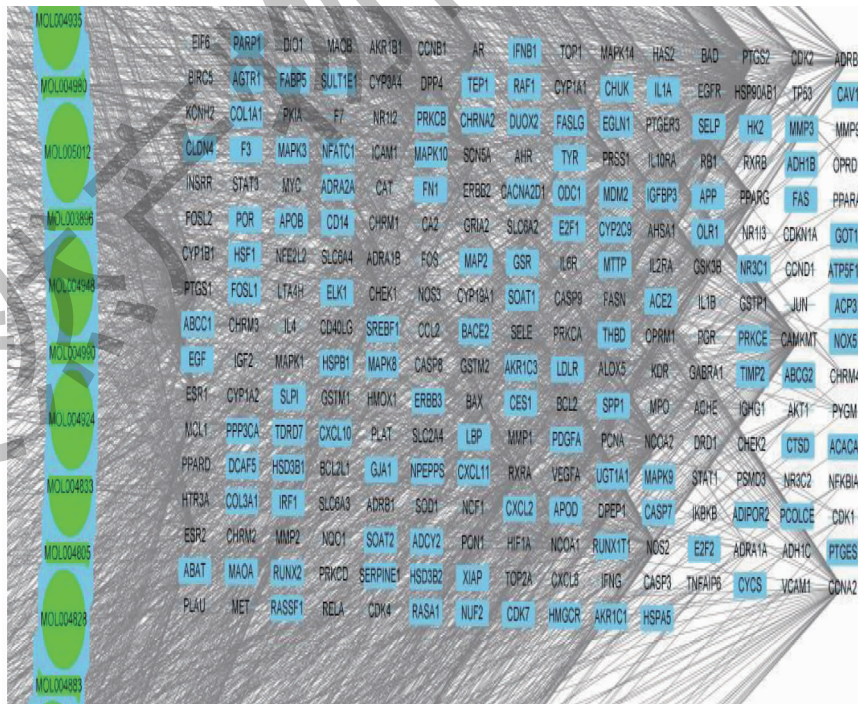


图 1 和枢消积丸的成分-靶点相互作用网络图

Fig. 1 Diagram of the component-target interaction network of HXP

2.2 HXP 与肝癌共有靶点的选择

GeneCards、OMIM、DurgBank、TTD 和 PharmGKB 数据库中检索“liver cancer”“hepatic carcinoma”“hepatoma”“hepatocellular carcinoma”及“primary

carcinoma of the liver”,获取 13 998 个肝癌相关靶基因(见图 2)。将 258 个药物成分靶点和 13 998 个疾病靶点引入 Venn 4.0.2 软件绘制韦恩图,最终获得交集靶点 251 个(见图 3)。

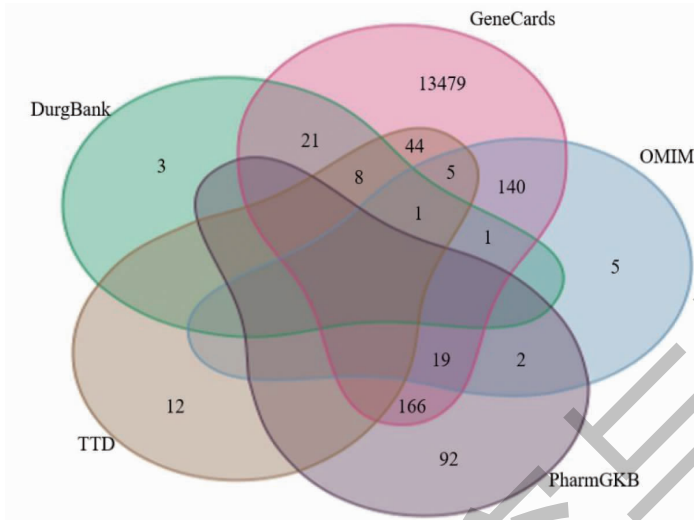


图 2 肝癌疾病靶点筛选图

Fig. 2 Target screening map for liver cancer

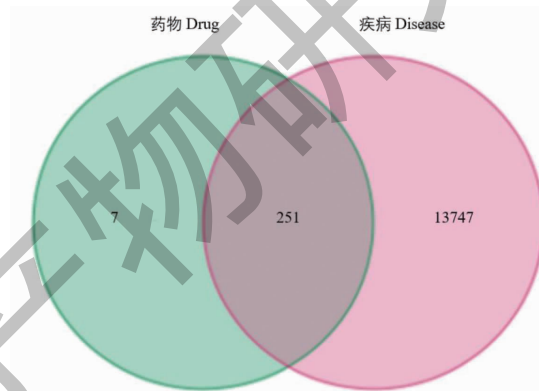


图 3 药物主要成分-疾病靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of major drug components-disease targets

2.3 PPI 网络建设和核心基因筛选

HXP 和 HCC 的交集靶点输入 String 数据库,设定物种为 Homo sapiens,获得蛋白与蛋白之间相互作用关系(PPI 网络)。随后利用 Cytoscape 插件 cytnca 进行网络拓扑,第二次筛选后结果稳定在 21 个中心节点和 140 条边。最后获取 MYC、HIF1A、FOS、CDKN1A、JUN、TP53、RB1、STAT3、MAPK3、MAPK1、MAPK14、AKT1、EGFR、PPARA、NR3C1、CCND1、MAPK8、ESR1、STAT1、NFKBIA 和 RELA 在内的 21 关键核心靶点(见图 4)。得分最高前 4 位分别为 JUN、MAPK3、MAPK1 和 TP53。

2.4 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析

根据 32 个关键核心靶点 GO 功能富集分析显示,多个生物功能参与调节肝癌进程,主要富集于 BP-对药物的反应、对氧化应激的反应等;CC-膜筏、膜微区等;MF-核受体活性、转录因子活性等(见图 5)。KEGG 分析表明,核心基因主要参与钙离子信号通路、PI3K-Akt 信号通路、P53 信号通路、TGF- β 信号通路、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路等重叠基因,可能是 HXP 治疗肝细胞癌的潜在药理机制(见图 6 和图 7)。

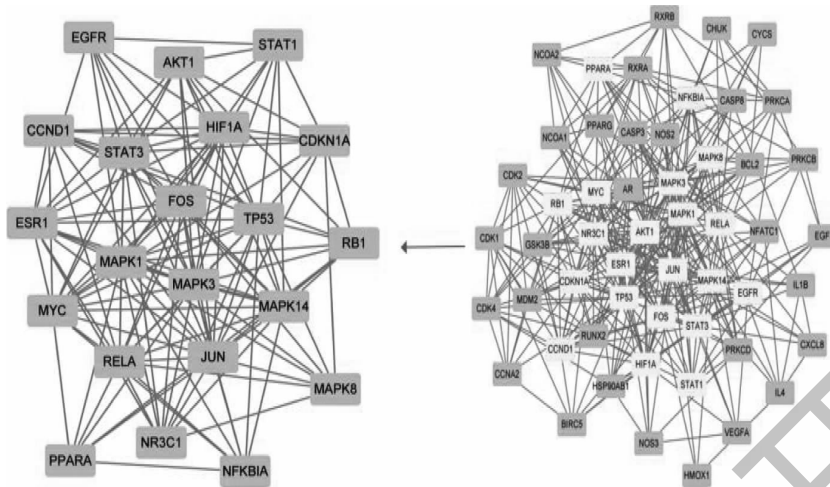


图 4 PPI 网络建设图

Fig. 4 Flow chart of PPI network

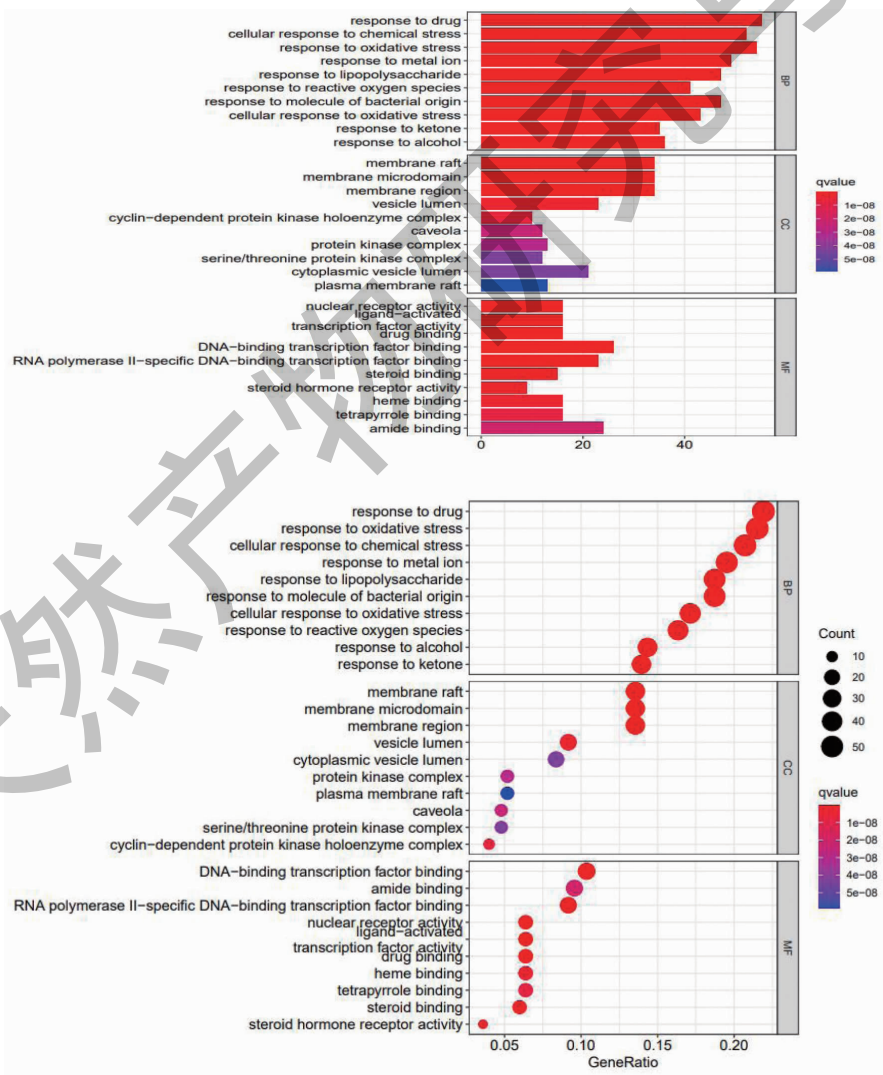


图 5 GO 功能富集分析

Fig. 5 GO functional enrichment analysis



图6 KEGG 功能富集分析

Fig. 6 KEGG functional enrichment analysis

2.5 HXP 和四大关键靶点分子对接

将 PPI 网络中中度值靠前的 4 个关键基因进行分子对接,即 JUN、MAPK3、TP53 和 MAPK1,对应 ID 分别为 1JNM、3FXW、6MY0 和 2DKZ。当结合能小于 0 kcal/mol 时,考虑两个分子的自发结合和相互

作用,结合能越低,分子构象越稳定^[7]。对接分析结果显示,所有化合物-靶标对均低于 0,表明每个候选核心靶标在自然条件下均可对接,其中柚皮素和 MAPK3 的结合能最高,为 -11.2 kcal/mol (见表 2)。

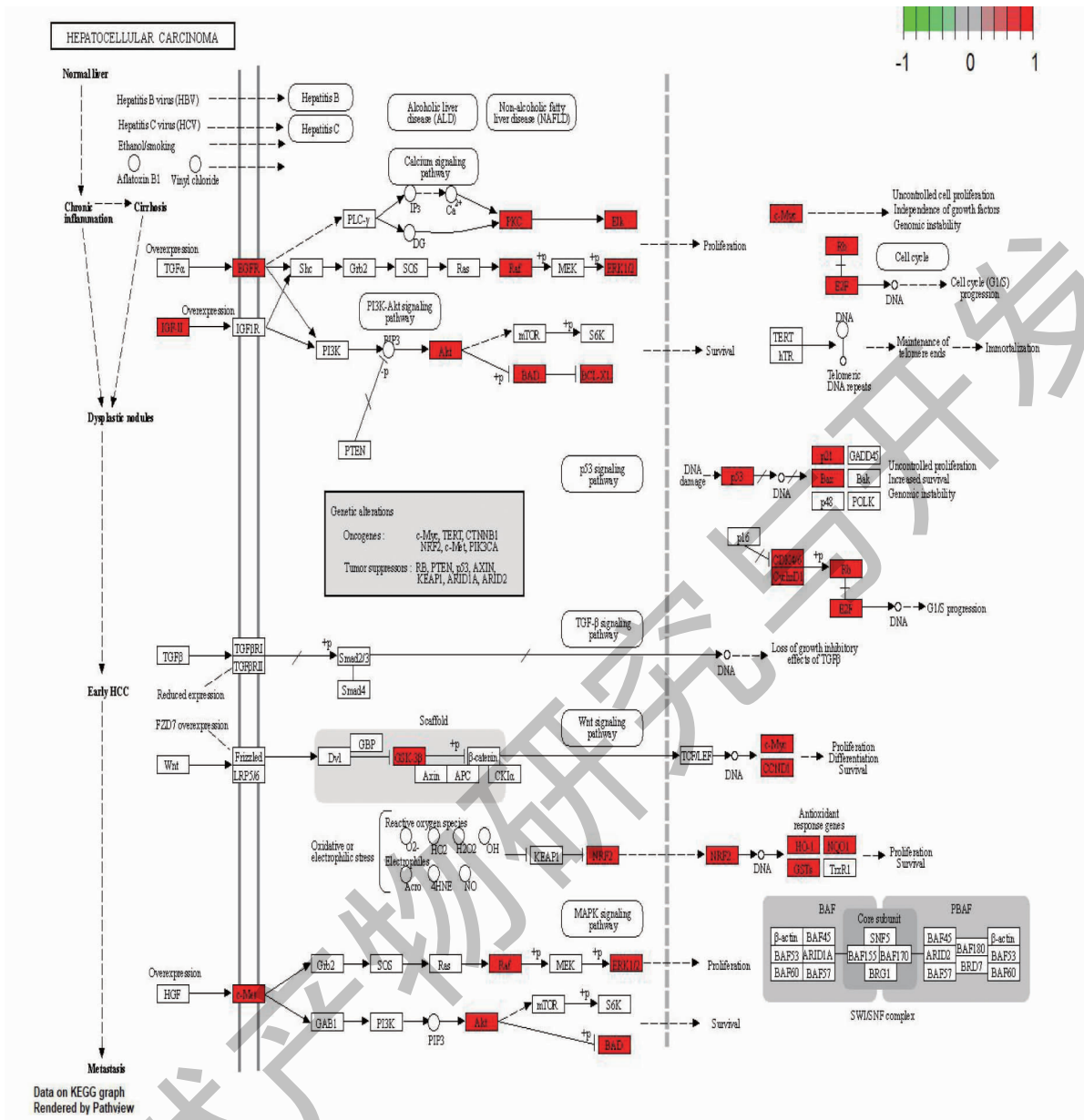


图 7 21 个核心基因在 KEGG 细胞通路中的位置图

Fig. 7 Location map of 21 core genes in the KEGG cellular pathway

表 2 药物活性成分与最终核心基因的结合能

Table 2 Binding energy of the active ingredient of the drug with the final core gene

活性成分 Active ingredient	核心靶点 Core target	结合能 Binding energy (kcal/mol)
刺槐素 Acacetin	TP53	-7.3
芦荟大黄素 Aloe-emodin	TP53	-7.1
黄芩素 Baicalein	TP53	-7.1
β -谷甾醇 β -Sitosterol	JUN	-7.2
芒柄花黄素 Formononetin	JUN	-7.9
木犀草素 Luteolin	JUN	-8.9

续表 2(Continued Tab. 2)

活性成分 Active ingredient	核心靶点 Core target	结合能 Binding energy(kcal/mol)
木犀草素 Luteolin	TP53	-7.4
	MAPK1	-8.9
汉黄芩素 Wogonin	JUN	-8.4
	TP53	-7.0
槲皮素 Quercetin	JUN	-8.8
	TP53	-7.1
柚皮素 Naringenin	MAPK1	-8.3
	MAPK3	-11.2
山奈酚 Kaempferol	JUN	-9.1
葛根素 Puerarin	JUN	-7.9

3 讨论与结论

尽管手术切除、介入治疗、射频消融、靶向和免疫治疗等治疗领域迅速发展,但由于肝癌的病理复杂性,肝癌仍是全球高死亡率的恶性肿瘤之一,全球医疗系统仍将肝癌治疗视为的巨大挑战^[8]。现今,大量天然草本植物经证实能在肝癌内起积极作用,因它们具有清除自由基,协同作用多目标靶点能力,还能参与调节多种治疗肝癌的潜在机制,包含诱导肿瘤细胞凋亡和自噬,抑制细胞增殖和干预细胞代谢等,对抑制肝癌的潜在治疗作用逐渐被认可^[9]。

本研究通过网络药理学发现 HXP 治疗肝癌的药物-疾病共有核心靶点 251 个,利用拓扑、聚类和通路分析构建了基于 HXP 和肝癌的网络,筛选获取关键靶点 21 个,其中 JUN、MAPK3、TP53 和 MAPK1 靶点的度值最靠前,随后分子对接显示 4 个靶点和 HXP 活性成分在自然情况下对接良好。研究显示,c-jun 蛋白形成同源二聚体或异二聚体构成,促进活化蛋白-1(AP-1)转录活性,刺激细胞增殖相关基因转录,是肝癌细胞核内重要癌蛋白^[10]。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是一组丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,其中 MAPK1 和 MAPK3 是 MAP 激酶信号转导途径的重要组成部分^[11]。有研究表明,TP53 作为公认的抑癌基因,在肝癌细胞 DNA 的损伤增多环境中诱导细胞凋亡,同时作用细胞周期蛋白的基因表达来调控细胞周期的 G₁ 停滞,是肝癌患者中最常见的突变基因^[12]。

根据生物过程和信号通路富集分析,21 个关键靶点基因作用于肝癌的钙离子信号通路、PI3K-Akt 信号通路、P53 信号通路、TGF- β 信号通路、Wnt 信

号通路和 MAPK 等信号通路。钙离子(Ca²⁺)不仅是机体内重要的第二信使,也参与细胞内信号转导通路。钙离子超负荷时可刺激的线粒体代谢可触发线粒体通透性转换孔(MPTP)的打开,同时增强蛋白激酶、磷脂酶、谷氨酰胺转移酶和核酸内切酶等的表达,诱导肝癌细胞凋亡。据文献报道,人肝癌 SMMC-7721 细胞内 Ca²⁺ 浓度,与 COX-2 的表达和 PGE2 的生成呈负相关,与诱导细胞凋亡能力正相关^[13]。磷脂酰乙醇 3'-激酶(PI3K-Akt)信号通路在癌症中被激活,参与肿瘤进展及调节抗癌治疗的耐药性,是重要的细胞内通路。通过归纳总结肝癌相关疾病发现,作为肿瘤细胞增殖和发展的关键调节剂的表皮生长因子受体(EGFR)通过配体结合和磷酸化活化信号级联,导致下游 PI3K-AKT 信号通路激活,直接磷酸化 mTOR,介导炎症通路,还参与肝癌细胞代谢、增殖和自噬过程^[14]。有学者证明,TP53 基因突变使肝癌细胞周期失调,P53 蛋白对细胞凋亡具有重要作用。p53 激活可以抑制 mTOR 信号通路蛋白表达,提示 p53 可能是 mTOR 信号通路上游的抑制剂^[15]。TGF- β 信号通路是参与存在于炎症和纤维化、肝硬化和肝癌的所有阶段的重要途径。阻断 TGF- β 途径的新药已进入临床评价,其中最先进的是 LY2157299,通过主要影响细胞迁移和侵袭能力,抑制肝癌细胞活性^[16]。Wnt 信号转导途径在肝癌内被异常激活,细胞核内未被磷酸化的活性 β -catenin 逐渐增多,参与调节肝癌细胞凋亡、周期运行和迁移侵袭等致癌的生理病理过程。许多研究证实天然草本植物能,阻断 Wnt 信号转导途径可达到治疗肝癌的目的^[17]。MAPK 信号通路是肝癌

内最常激活的细胞内途径之一。能通过磷酸化作用,激活下游信号分子调节重要细胞过程,干预肝癌细胞增殖、凋亡和侵袭等^[18]。

本研究在潜在活性成分筛选、靶点预测、富集通路及分子对接研究方法中对和枢消积丸的活性成分抗肝癌机制进行深入解析,多方位阐释了该方具有多成分、多靶点和多通路治疗肝癌疾病作用,为肝癌的治疗提供新思路 and 科学依据。

参考文献

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71:209-249.
- Llovet J, Kelley R, Villanueva A, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Dis Primers, 2021, 7:7.
- Llovet JM, De Baere T, Kulik L, et al. Locoregional therapies in the era of molecular and immune treatments for hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18:293-313.
- Reveron-Thornton RF, Teng MLP, Lee EY, et al. Global and regional long-term survival following resection for HCC in the recent decade: a meta-analysis of 110 studies[J]. Hepatol Commu, 2022, 6:1813-1826.
- Xiang Y, Guo Z, Zhu P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science[J]. Cancer Med, 2019, 8:1958-1975.
- Zhai Z, Tao X, Alami MM, et al. Network pharmacology and molecular docking combined to analyze the molecular and pharmacological mechanism of *Pinellia ternata* in the treatment of hypertension[J]. Curr Issues Mol Biol, 2021, 43:65-78.
- Stanzione F, Giangreco I, Cole JC. Use of molecular docking computational tools in drug discovery[J]. Prog Med Chem, 2021, 60:273-343.
- Grandhi MS, Kim AK, Ronnekleiv-Kelly SM, et al. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment[J]. Surg Oncol, 2016, 25:74-85.
- Rawat D, Shrivastava S, Naik RA, et al. An overview of natural plant products in the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2018, 18:1838-1859.
- Yang YW, Ye ZQ, Kong QL. Expression of c-Jun in hepatocellular carcinoma and its significance[J]. Chin J Hepat Surg: Electron(中华肝脏外科手术学电子杂志), 2015, 4:250-253.
- Couri T, Pillai A. Goals and targets for personalized therapy for HCC[J]. Hepatol Int, 2019, 13:125-137.
- Huang WL, Su XS, Li MN. Experimental study of P53 fusion protein on cancer cells[J]. J Clin Hepatol(临床肝胆病杂志), 2007, 23:201-203.
- Ren MD, Lu XL, He SX, et al. Effect of saikosaponins-d on COX-2 expression and intracellular calcium of human hepatoma carcinoma cell line SMMC-7721[J]. Chin J Mod Med(中国现代医学杂志), 2011, 21:3587-3590.
- Fang XY, He PL, Yao Z, et al. Inhibitory effects of *Panax notoginseng* saponins on H22 cells and its effects on PI3K-AKT-mTOR signaling pathway of H₂₂ tumor-bearing mice[J]. J Chin Med Mater(中药材), 2020, 43:1451-1455.
- Xu P, Shi HL, Jiao Y, et al. TP53BP2/ASPP2 inhibits autophagy of HepG2 cells by activating mTOR pathway in a p53-independent manner[J]. Chin J Cell Mol Immunol(细胞与分子免疫学杂志), 2019, 35:986-991.
- Neuzillet C, De Gramont A, Tijeras-Raballand A, et al. Perspectives of TGF- β inhibition in pancreatic and hepatocellular carcinomas[J]. Oncotarget, 2014, 5:78-94.
- Zhao YH, Zhang YF, Fan YF. Anti-hepatoma effect of active ingredients of Chinese medicine via Wnt/ β -catenin signaling pathway: a review[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2022, 4:1-8.
- Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, et al. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension[J]. Physiol Genomics, 2008, 33:278-291.