

基于网络药理学和细胞实验探究莲子心生物碱防治 非小细胞肺癌的分子机制

程艳, 隆会芝, 罗红宇, 周子薇, 蒋斌元, 高利臣*
(南华大学附属长沙市中心医院, 药学院, 长沙 410000)

[摘要] 目的:基于网络药理学探究莲子心生物碱(NAPs)防治非小细胞肺癌(NSCLC)的潜在分子机制。方法:通过搜索中药系统药理数据库及分析平台(TCMSP),中药分子机制的生物信息学分析工具(BATMAN-TCM)数据库获取NAPs主要活性成分,结合靶点预测平台 Swiss Target Prediction 预测分析其主要靶点。通过 GeneCards,人类孟德尔遗传数据库(OMIM), DrugBank 数据库获取 NSCLC 主要靶点。提交二者交集靶点至 STRING 平台构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络,通过 DAVID 平台并对其进行基因本体(GO)和京都基因和基因百科全书(KEGG)分析。利用 Cytoscape 3.7.1 软件生成 NAPs-交集靶点-通路”网络。此外,选择异莲心碱处理肺癌细胞 A549,用倒置荧光显微镜观察细胞形态变化,细胞增殖与活性检测试剂盒-8(CCK-8)法检测异莲心碱对 A549 活力的影响,并用蛋白免疫印迹法(Western blot)验证预测靶点分子蛋白变化。结果:NAPs 中治疗 NSCLC 主要成分有莲明碱、莲心碱和异莲心碱(ISO)等;主要涉及通路包括磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT), Ras 相关蛋白 1(Rap1),受体酪氨酸激酶家族(ErbB)和缺氧诱导因子-1(HIF-1)通路,其功能主要为结合三磷酸腺苷(ATP)及调节蛋白激酶活性;主要靶点包括蛋白激酶 B-1(AKT1),磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚基 α 基因(PIK3CA),周期蛋白依赖激酶 2(CDK2),丝裂原活化蛋白激酶-1(MAPK1),表皮生长因子受体(EGFR),三磷酸腺苷结合盒基因-1(ABCB1),雷帕霉素靶蛋白(mTOR),酪氨酸激酶(Src),Janus 蛋白酪氨酸激酶(JAK1)和 G1/S-特异性周期蛋白-D₁(CCND1)等;体外细胞试验也证实,ISO 能以浓度和时间依赖下调磷酸化蛋白激酶 B(p-AKT)和磷酸化雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)的表达,抑制肺癌细胞 A549 生长。结论:NAPs 可以通过多成分、多靶点及多通路防治 NSCLC,其最主要通过 PI3K-AKT 通路抑制非小细胞肺癌。

[关键词] 莲子心生物碱(NAPs); 网络药理学; 非小细胞肺癌(NSCLC); 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K-AKT) 通路

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)13-0164-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210912

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210507.1710.001.html>

[网络出版日期] 2021-5-8 12:32

Molecular Mechanism of Nelumbinis Plumula Alkaloids in Prevention and Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: an Analysis Based on Network Pharmacology and Cell Experiment

CHENG Yan, LONG Hui-zhi, LUO Hong-yu, ZHOU Zi-wei, JIANG Bin-yuan, GAO Li-chen*
(Changsha Central Hospital, School of Pharmaceutical Science, University of South China, Changsha 410000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential molecular mechanism of Nelumbinis Plumula alkaloids (NAPs) in the prevention and treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) based on network

[收稿日期] 20210323(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81802952);湖南省科技重点研发计划项目(2016SK2066);湖南省中医药科研计划项目(201940);湖南省卫生健康委科研计划项目(20201904);长沙市科技计划项目(kq1801144);长沙市中心医院科研项目(YNKY201901);湖南省高层次卫生人才“225”工程项目

[第一作者] 程艳,在读硕士,从事肿瘤药理学研究,E-mail:shiyihechengyan@163.com

[通信作者] *高利臣,博士,副主任药师,硕士生导师,从事抗肿瘤药理研究,Tel:0731-85667812,E-mail:89206346@qq.com

pharmacology and cell experiment. **Method:** The main active components of NAPs were obtained by searching Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM), and their main targets were predicted and analyzed by employing Swiss Target Prediction. The main target genes of NSCLC were retrieved from GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and DrugBank databases. The resulting common targets were imported into STRING platform for constructing the protein-protein interaction (PPI) network, followed by gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis based on Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID). The NAPs-common target -pathway network was constructed by Cytoscape 3.7.1. After NSCLC cell line A549 was treated with isoliensinine, the cell morphology was observed under an inverted fluorescence microscope. The effect of isoliensinine on A549 vitality was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) assay and the target protein changes were verified by Western blot. **Result:** The main active components for NAPs against NSCLC were lysicamine, liensinine, and isoliensinine. The phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B (PI3K-AKT), RAS-related protein 1 (Rap1), epidermal growth factor family of receptor tyrosine kinases (ErbBs), and hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) pathways were mainly involved for binding adenosine triphosphate (ATP) and regulating protein kinase activity. The main targets included protein kinase B-1 (AKT1), alpha catalytic subunit of phosphoinositol-3-kinase (PIK3CA), cyclin-dependent kinase 2 (CDK2), mitogen-activated protein kinase-1 (MAPK1), epidermal growth factor receptor (EGFR), adenosine triphosphate-binding cassette B1 (ABCB1), mammalian target of rapamycin (mTOR), tyrosine kinase (Src), Janus kinase 1 (JAK1), and G1-phase-specific gene cyclin-D₁ (CCND1). The *in vitro* cell experiment also revealed that isoliensinine down-regulated the expression of phosphorylated AKT (p-AKT) and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in a concentration- and time-dependent manner and inhibited the growth of A549 cells. **Conclusion:** NAPs exert the preventive and therapeutic effects against NSCLC through multiple components, multiple targets, and multiple pathways, especially the PI3K-AKT pathway.

[Key words] Nelumbinis Plumula alkaloids (NAPs); network pharmacology; non-small cell lung cancer (NSCLC); phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) pathway

肺癌也称原发性支气管癌,世界卫生组织定义为起源于上皮细胞的恶性肿瘤^[1]。据2018年国际癌症机构统计数据,肺癌的发病率和病死率仍旧是人类第一^[2]。根据组织病变分类,肺癌可分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(NSCLC),其中NSCLC最为常见,约占肺癌总发病率的85%^[1]。NSCLC治疗手段多样,中药治疗近年来在临床防治中获得显著成效^[3]。

莲子心食药两用,来源于睡莲科植物莲,化学成分丰富,包括生物碱、黄酮、挥发油等,药理活性广泛,可以保护心血管、保护中枢神经系统、抗肿瘤、抗炎、抗氧化等,文献报道其生物碱主要发挥抗肿瘤作用^[4-5]。已有结合网络药理学探讨莲子心降低高血压及莲子心生物碱(NAPs)安神作用分子机制的报道^[6-7],但并未见关于NAPs抗肿瘤活性的网络药理学研究。

本研究通过运用网络药理学方法,以NAPs为

物质基础,防治NSCLC为研究目标,综合考虑NAPs化合物、靶点及疾病三者之间的关联,通过细胞和分子实验证实异莲心碱防治NSCLC药理活性及部分预测靶点的表达变化,明晰了NAPs防治NSCLC的分子机制。

1 材料

异莲心碱(北京索莱宝科技有限公司,批号SI8200),溶于二甲基亚砜(DMSO,美国MP公司,批号Y190601)配置成40 mmol·L⁻¹母液备用;高糖培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗(以色列BI公司,批号分别为01-052-1ACS, 04-001-1ACS, 03-031-1B)配置成含胎牛血清10%,青、链霉素双抗(青霉素1万U·mL⁻¹,链霉素1万mg·L⁻¹)的高糖培养基分装备用;胰蛋白酶(以色列BI公司,批号03-050-1ACS)分装成20 mL备用;聚丙烯酰胺电泳凝胶试剂盒(碧云天生物技术公司,批号010220200205);ECL超敏发光试剂盒(美国

Advansta公司,批号180728-03);细胞增殖活性检测试剂盒-8(CCK-8)试剂盒(上海翊圣投资有限公司,批号40203ES76);兔抗蛋白激酶B(AKT),磷酸化(p)-AKT,雷帕霉素靶蛋白(mTOR),p-mTOR,鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH),抗兔-免疫球蛋白(Ig)G,抗鼠-IgG(美国CST公司,批号分别为4685S,13038S,2983T,2974S,51332S,7074S,7076S);蛋白上样Marker(美国Thermo公司,货号26616和26619);蛋白上样5×Buffer,蛋白酶抑制剂PMSF,蛋白裂解液(碧云天公司,批号分别为11202020201203,112520201222,P0013B)。

TGL-16C型普通高速离心机(上海安亭科学仪器有限公司);DZKW-4型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器);HVA-85型高压灭菌锅(日本Hirayama公司);DP63PC型全自动化立式真空干燥箱(日本雅马拓公司);01-Dec-15型酶标仪,Thermo Forma 3111型CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);5418R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);Center 90FV型U系列纯化水机(美国艾科浦国际有限公司);SW-CJ-IFD型超净工作台(美国Airtech公司);IX51型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);DM 1L型LED倒置显微镜(德国Leica公司);165-3301型垂直电泳仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 NAPs靶点筛选 以“LIAN ZI XIN”为关键词搜索线上数据库中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp.com/index.php>),BATMAN-TCM(<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>),找到NAPs类主要成分。再以“莲子心成分”“Nelumbinis Plumula”“lotus seed”和“*Nelumbo nucifera* Gaertn”为关键词搜索万方、中国知网及PubMed数据库,补充中药平台未曾记录成分^[5,8-11]。用PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)标准化主要成分,用其简化分子线性输入规范(SMILES)号在SwissTargetPrediction预测主要成分靶点,然后导入Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)数据库进行靶点蛋白校准。

2.2 肺癌靶点筛选 以“non-small-cell lung carcinoma”“non-small cell lung cancer”及“NSCLC”为关键词,搜索在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <http://www.omim.org>),GeneCards数据库(<https://www.genecards.org>)中相应靶点,结合DrugBank(<https://www.drugbank.ca/>)数据库中NSCLC的临床一线西药作用靶点后,删除重复靶点

进而得到NSCLC相应靶点。

2.3 NAPs-NSCLC交集靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 为探明NAPs相关靶点与NSCLC靶点间的相互作用,利用线上网站Venny 2.1(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)将二者靶点取交集并绘制韦恩图。提交交集靶点至STRING 11.0数据库(<https://string-db.org>)构建PPI网络模型设定生物种类为“Homo sapiens”,并将最低相互作用评分设置为“highest confidence(0.900)”,其余设置均为默认值,得到PPI网络。将该网络提交至Cytoscape 3.7.1进行结构优化,通过Cytoscape 3.7.1中的MCODE插件对PPI网络进一步分析,得到核心蛋白质模块^[12]。PPI复杂网络一些密度较高的区域称为community或module。module内部的网络是PPI网络中连线密度较高子网,故而module被认为是具有生物学意义的集合,该集合具有两中含义,一是蛋白质复合体(protein complex),即多个蛋白质共同组成复合体后发挥生物学作用;二是功能模块(functional module),如位于同一通路的蛋白质,其相互作用更加密切^[13]。通过生物富集功能分析核心模块主要参与的生物学进程,并对其功能进行描述。

2.4 NAPs-NSCLC交集靶点功能与通路富集分析

DAVID平台(<https://david.ncifcrf.gov/tools.jsp>)拥有全面的注释功能且定期更新基因注释的数据资料。将NAPs治疗NSCLC的靶点录入DAVID平台,设置物种为“Homo Sapiens”,对其主要参与的生物学过程与代谢通路进行富集分析,保存数据结果。利用线上工具“微生信”(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对其进行可视化分析。

2.5 NAPs-交集靶点-通路网络图构建 通过Cytoscape 3.7.1构建NAPs-交集靶点-通路网络图,利用Cytoscape 3.7.1内置工具分析NAPs及相应靶点网络的拓扑异构学参数,常见包括连接度(degree),紧密度(closeness centrality)及介度(betweenness centrality)等,之后参照网络拓扑学参数筛选发挥药效的主要成分及核心靶点。

2.6 基础实验验证

2.6.1 形态学观察及CCK-8法检测细胞生长活力抑制情况 人肺腺癌A549细胞,用含10%胎牛血清和双抗(青霉素1万U·mL⁻¹,链霉素1万mg·L⁻¹)的高糖DMEM培养基,置于37℃,5%CO₂的恒温箱中培养。6孔板铺细胞5×10⁵个/孔,异莲心碱处理48h后,用倒置荧光显微镜观察拍照;96孔板铺细

胞8 000个/孔,不同剂量异莲心碱分别处理24,48 h后,CCK-8法检测异莲心碱对人肺腺癌A549细胞活力的抑制作用。

2.6.2 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测蛋白的表达 分别收集时间效应和剂量效应组的细胞,提取总蛋白,蛋白与1×上样Buffer按照4:1比例制备蛋白样品,上样后电泳,转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,用5%脱脂奶粉封闭1 h,一抗4℃孵育过夜。二抗孵育1.5 h,洗膜,显影。

表1 NAPs中发挥防治肺癌效应的主要活性成分及拓扑参数

Table 1 Main active components and topological parameters of Nelumbinis Plumula alkaloids

序号	中文名	英文名	连接度	介度	亲密度
C12	莲明碱	lysicamine	36	0.104 147 58	0.420 365 54
C2	莲心碱	liensinine	35	0.073 907 92	0.424 802 11
C3	异莲心碱	isoliensinine	34	0.061 288 40	0.422 572 18
C14	N-甲基紫堇定	N-methylcorydaldine	32	0.093 744 59	0.413 881 75
C11	鹅掌楸碱	liriodenine	32	0.095 983 79	0.416 020 67
C1	甲基莲心碱	neferine	30	0.045 255 32	0.413 881 75
C8	dl-杏黄甾碱	dl-armepavine	25	0.046 179 67	0.395 577 40
C13	莲心季安碱	lotusine	22	0.069 414 72	0.397 530 86
C7	亚美罂粟碱	armepavine	21	0.027 361 79	0.395 577 40
C9	荷叶碱	nuciferine	19	0.058 155 91	0.389 830 51
C6	S-N-甲基乌碱	S-N-methylisococlaurine	18	0.017 999 13	0.389 830 51
C10	前荷叶碱	pronuciferine	17	0.030 855 92	0.382 422 80
C15	甲集紫堇杷灵	O-methylcorypalline	15	0.015 201 20	0.358 574 61
C4	乌药碱	coclaurine	13	0.007 528 49	0.361 797 75
C5	去甲乌药碱	higenamine	7	0.000 577 55	0.316 306 48

3.2 NSCLC靶点获取 DrugBank数据库获得NSCLC靶点82个;GeneCards共提取4 762个,根据Score大小连卡两次中位数(6.155,14.41)获得1 190个相关靶点;OMIM数据库获得132个靶点。合并3个疾病数据库的靶点后删除重复值,共获得1 328个疾病靶点。

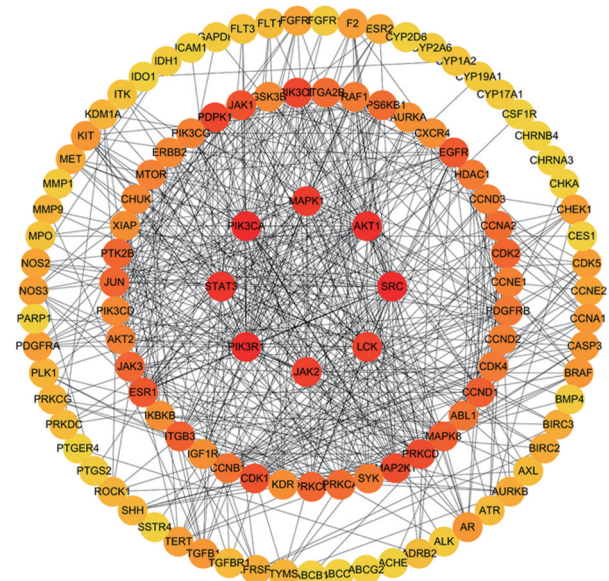
3.3 NAPs-NSCLC交集靶点PPI网络构建 将NAPs活性成分筛选所得靶点与NSCLC疾病靶点通过Venny 2.1取交集并绘制韦恩图,得到NAPs-NSCLC共同靶点127个。将交集靶点提交至STRING 11.0平台,得到交集靶点PPI网络,将该网络导入Cytoscape 3.7.1后结构优化得到图1。为更精确地分析判断NAPs治疗NSCLC的潜在作用机制,得到其PPI网络后,用Cytoscape 3.7.1中的MCODE插件,通过分子复合物检测算法对相互作

3 结果

3.1 NAPs靶点获取 广泛搜索线上数据库得知已报道NAPs约50余种。运用ADME筛选[口服生物利用度(OB)≥30%及类药性(DL)≥0.18],文献补充及PubChem校准后,初步筛选提取化合物15种,包括双苄基异喹啉化合物3种,单苄基异喹啉化合物5种,阿扑啡型化合物4种,其他3种,见表1。统一SwissTargetPrediction,TCMSP和BATMAN-TCM 3者的化合物预测靶点,删除重复值,共获得相应靶点414个。

用关系进行分析,进一步筛选获得其内在module,见图2。根据P值,分别保留PPI网络与module中3个最佳评分的生物学功能对其进行描述,见表2。

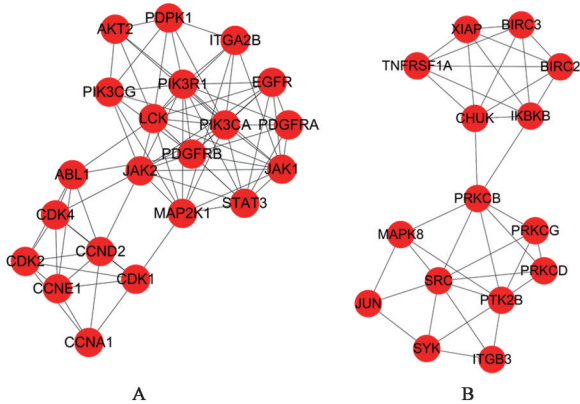
3.4 NAPs-NSCLC交集靶点功能与通路富集分析 应用DAVID线上平台对NAPs治疗NSCLC相应靶点进行基因本体(GO)和京都基因和基因百科全书(KEGG)富集分析,利用线上工具“微生信”对结果进行可视化分析。分析结果得,NAPs主要参与调节的信号通路包括磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT),FoxO,受体酪氨酸激酶家族(ErbB)和肿瘤中的碳代谢通路等,见图3。NAPs主要参与调节的生物学进程包括蛋白质的磷酸化(protein autophosphorylation),凋亡过程的负向调控(negative regulation of apoptotic process),肽基络氨酸磷酸化(peptidyl-tyrosine phosphorylation),细胞



图中节点颜色深浅代表度值大小,颜色越深,重要性越大

图1 NAPs与NSCLC交集靶点PPI网络

Fig. 1 PPI network diagram of intersection targets between Nelumbinis Plumula alkaloids and NSCLC



A. score值8.3; B. score值5.4

图2 PPI网络中的module

Fig. 2 Module diagram in PPI network

表2 交集靶点PPI核心网络主要功能描述

Table 2 Main functions of PPI core network

基因功能条目	分子功能	$-\lg P$
GO:0005524	ATP binding	31.485 44
GO:0004672	protein kinase activity	31.421 87
GO:0016301	kinase activity	23.656 2

迁移 (cell migration) 和增殖 (cell proliferation) 的调控等。参与调节 NSCLC 的分子功能包括 ATP 结合 (ATP binding), 蛋白激酶活性 (protein kinase activity), 激酶活性 (kinase activity), 蛋白酪氨酸激酶活性 (protein tyrosine kinase activity) 等, 具体 GO 分析结果见图 4。

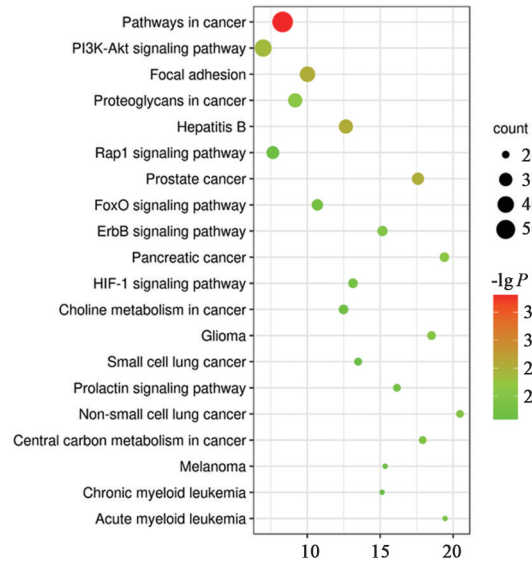


图3 NAPs防治NSCLC靶点KEGG气泡

Fig. 3 Targets KEGG bubble chart of Nelumbinis Plumula alkaloids for prevention and treatment of NSCLC

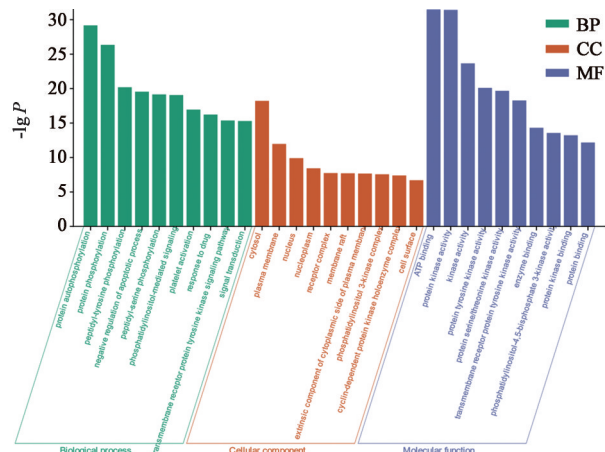


图4 NAPs防治NSCLC靶点GO富集分析

Fig. 4 Targets GO enrichment analysis of Nelumbinis Plumula alkaloids for prevention and treatment of NSCLC

3.5 NAPs-交集靶点-通路网络图构建 基于文献搜索和线上数据库筛选得到化合物靶点及其相应信号通路。将编辑好的化合物靶点信号通路文件导入 Cytoscape 3.7.1 构建网络通路图, 见图 5。运用 Cytoscape 3.7.1 网络分析功能得到 NAPs 治疗 NSCLC 的网络拓扑学参数, 筛选核心成分和核心靶点。Cytoscape 3.7.1 网络分析表明, 化合物相关参数排名前 3 的分别是莲明碱, 度值 36, 介度 0.104 1, 紧密度 0.420 4; 莲心碱, 度值 35, 介度 0.073 9, 紧密度 0.424 8; 异莲心碱, 度值 34, 介度 0.061 3, 紧密度 0.422 6。具体参数值可见表 1。通过分析靶点相关参数得, 与 NAPs 防治 NSCLC 联系最为紧密的前 10 位靶点分别是 AKT1, PIK3CA, 周期蛋白依赖

酶2(CDK2),丝裂原活化蛋白激酶-1(MAPK1),表皮生长因子受体(EGFR),三磷酸腺苷结合盒基因-1(ABCB1),雷帕霉素靶蛋白(mTOR),酪氨酸激酶(SRC),Janus蛋白酪氨酸激酶(JAK1)和G₁/S-特异性周期蛋白D₁(CCND₁)。见表3。

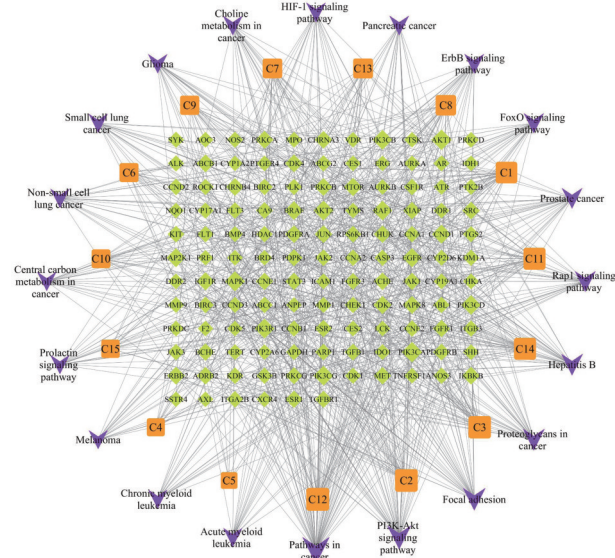


图5 NAPs防治NSCLC靶点通路

Fig. 5 Target pathway network of Nelumbinis Plumula alkaloids in prevention and treatment of NSCLC

表3 NAPs防治NSCLC主要靶点及其网络节点参数
Table 3 Main targets and network node parameters of Nelumbinis Plumula alkaloids for prevention and treatment of NSCLC

靶点名称	度值	介度	亲密度
AKT1	24	0.034 058 14	0.461 318 05
PIK3CA	24	0.025 058 4	0.463 976 95
CDK2	13	0.024 572 92	0.458 689 46
MAPK1	22	0.024 360 72	0.436 314 36
EGFR	18	0.022 229 18	0.431 635 39
ABCB1	12	0.018 488 75	0.418 181 82
MTOR	14	0.015 800 35	0.438 692 1
SRC	11	0.014 795 07	0.431 635 39
JAK1	9	0.014 541 56	0.427 055 7
CCND1	17	0.013 253 58	0.427 055 7
MAPK8	12	0.011 10 93	0.427 055 7
PIK3R1	21	0.010 578 72	0.413 881 75
PIK3CG	21	0.010 578 72	0.413 881 75
PIK3CB	21	0.010 578 72	0.413 881 75
RAF1	20	0.010 181 84	0.411 764 71

3.6 实验验证 选择NAPs中的异莲心碱处理NSCLC细胞A549,实验结果证实异莲心碱对肺癌细胞有很大的毒性作用。

3.6.1 异莲心碱对A549的生长活性的影响 用异莲心碱处理6孔板(5×10⁵个/孔)细胞后用细胞成像仪观察形态学变化,结果表明,异莲心碱可以抑制A549的生长,促进A549的死亡;用96孔板(8000个/孔)处理A549,CCK-8结果表明,随着加药剂量的增加以及处理时间的延长,A549的活性的呈浓度和剂量依赖下调。见表4。

表4 异莲心碱对A549细胞生长活力的影响(̄x±s,n=6)
Table 4 Effect of isoliensinine on growth activity of A549 cells (̄x±s,n=6)

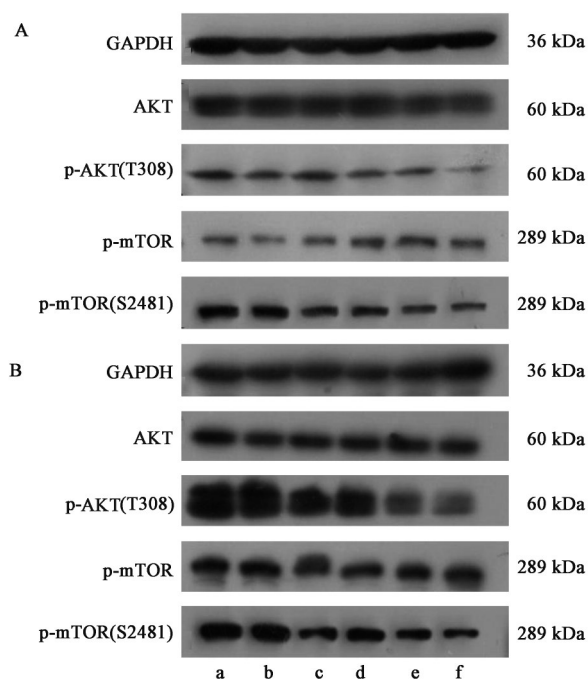
组别	处理 /μmol·L ⁻¹	24 h	48 h
空白		98.472 5±1.562 6	97.778 5±1.620 4
DMSO		93.803 8±3.775 8 ¹⁾	97.535±5.812 1
异莲心碱	1	86.015 5±4.521 4 ¹⁾	97.945 8±2.874 3
	2.5	88.311 4±6.175 3 ¹⁾	89.957 4±3.440 6 ¹⁾
	5	87.091 2±4.362 3 ¹⁾	83.871 0±3.475 4 ¹⁾
	10	84.294 3±5.519 3 ¹⁾	57.212 4±5.301 1 ¹⁾
	20	68.373 5±3.214 5 ¹⁾	35.149 1±2.600 3 ¹⁾
	40	36.424 3±4.615 3 ¹⁾	19.187 5±0.361 ¹⁾
	80	22.805 5±1.073 1 ¹⁾	18.578 8±0.233 3 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05。

3.6.2 异莲心碱下调p-AKT和p-mTOR的表达 异莲心碱对肺癌A549细胞预测靶点AKT和mTOR蛋白的影响 Western blot法检测结果表明,异莲心碱能以浓度和剂量依赖地下调p-AKT和p-mTOR的表达,结果见图7。

4 结论与展望

肺癌是人类最常见的恶性肿瘤。肺癌致病机制错综复杂,中医常见理论包括“扶正治癌”说、“癌毒”说、“络病”说及近期提出的“正虚伏毒”学说。结合中医理论,中药治疗存在以下优势,稳定肿瘤病灶、减轻患者症状、预防肿瘤复发、改善生活质量及延长生存期^[14]。莲子心成分广泛,药理活性复杂多样,包括生物碱、黄酮、甾醇及酯、挥发油和多糖等。不同成分作用各异,据报道多糖和生物碱可降低^[15-16],黄酮、生物碱、莲子心糖蛋白可抗氧化^[17-18],生物碱还具有保护肝肾的作用,如逆转博来霉素诱导的肺纤维化^[19],改善糖尿病肾病症状^[20]。此外,近期有部分研究报道了NAPs在癌症方面的活性^[21-23]。



A. 48 h 剂量效应; a~f. 0, 0.5, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; B. 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时间效应; a~f. 0, 1, 6, 12, 24, 48 h

图7 异莲心碱对A549中预测靶点的影响

Fig. 7 Effect of isoliensinine on predicted targets in A549

2007年,英国物理学家HOPKINS将“网络药理学”定义为一门运用网络药理学方法分析药物与疾病靶点之间“多成分、多靶点、多途径”协同作用的药理学分支科学。本研究综合考虑肺癌、网络药理学以及传统中药三者间的相互作用,得到NAPs主要活性化合物及其发挥防治功能的主要靶点。结果提示,NAPs中,发挥抗肺癌作用的成分主要有莲明碱,莲心碱,异莲心碱,N-甲基紫堇定,鹅掌楸碱和甲基莲心碱;作用靶点包括AKT1,PIK3CA,CDK2,MAPK1,EGFR,ABCB1,MTOR, SRC, JAK1和CCND1,通过与ATP结合,调节蛋白激酶活性,影响PI3K/Akt, FoxO, ErbB, Rap1和HIF-1等通路,进而参与蛋白质的磷酸化、细胞凋亡、迁移及增殖的调控。异莲心碱是NAPs的主要生物碱之一,其作用靶点包括SLC6A3, PIK3CA, mTOR, ABCB1, ALK1, DRD2, SLC47A1, CHRNA4, ACHE, 与NAPs的预测靶点大同小异。体外细胞实验证实,异莲心碱可以抑制A549的生长活性,下调预测靶点分子p-AKT(T308)和p-mTOR(S2481)蛋白的表达。

EGFR是NSCLC中最常见的驱动基因,在一项名为“PIONEER”的研究中,51.4%的晚期肺癌患者伴有EGFR敏感突变^[24]。PIK3CA在肺癌患者中也存在突变及过度扩增的现象。上游EGFR与

PIK3CA的突变往往导致AKT的突变及过度活化,促进肺癌进一步恶化^[25]。CDK2作为周期调控蛋白,其抑制剂的发展也是肿瘤防治的新方向^[26]。MAPK1在肺癌组织中的突变及过表达会促进其进一步的恶化^[27]。NAPs可以作用于上述分子,影响NSCLC的发生发展。

综上所述,NAPs是一类具有极大肺癌防治潜力的化合物。但是,文中网络药理学相关数据主要来源于线上数据库,结果来源于大数据计算,还需更多的基础实验来验证相应分子变化。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 葛均波,徐永健. 内科学[M]. 8版. 北京:人民卫生出版社,2014:75.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [3] 程伟,陈新梅. 中药抗非小细胞肺癌作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(24):227-234.
- [4] 施继尧,王蒙,吴毅. 莲心心的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中医药导报,2018,24(21):105-108.
- [5] CHEN S X, LI J, WU J, et al. Plumula nelumbinis: a review of tradition-al uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and safety [J]. J Ethnopharmacol,2021,266:113429.
- [6] 占秋晓,李丹丹,刘璐,等. 基于网络药理学探究莲心治疗高血压的分子机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2020,18(7):1039-1045.
- [7] 蒋跃平,陈章义,莫芳,等. 基于网络药理学的莲心心中生物碱类成分发挥传统安神功效的药理机制研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(19):4225-4233.
- [8] PAUDEL K R, PANTH N. Phytochemical profile and biological activity of *Nelumbo nucifera*[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2015,2015:789124.
- [9] 张京梅,李鹏跃,王岚,等. 莲心心总生物碱的提取分离及药效学初步研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,15(6):26-28.
- [10] 赵秀玲,党亚丽. 莲心心化学成分及其提取、药理作用的研究进展[J]. 食品科学,2018,39(23):329-336.
- [11] LIN Z T, YANG R N, GUAN A, et al. Ultra-performance LC separation and quadrupole time-of-flight MS identification of major alkaloids in *Plumula nelumbinis* [J]. Phytochem Anal, 2014, 25 (6): 485-494.

- [12] 但文超,何庆勇,曲艺,等. 基于网络药理学的枳术丸调治血脂异常的分子机制研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2019,21(11):2396-2405.
- [13] VELLA D, MARINI S, VITALI F, et al. MTGO: PPI network analysis via topological and functional module identification[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):929-940.
- [14] 田建辉. “正虚伏毒”为肺癌发病的核心病机[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(12):10-14.
- [15] LIAO C H, LIN J Y. Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) plumule polysaccharide protects the spleen and liver from spontaneous inflammation in non-obese diabetic mice by modulating pro-/anti-inflammatory cytokine gene expression [J]. Food Chem, 2011, 129 (2) : 245-252.
- [16] 史霄燕,胡文淑. 甲基莲心碱对高脂血症患者及健康成人血小板聚集的影响[J]. 中国药理学通报, 1998 (3):237-239.
- [17] 李希珍. 莲子心化学成分及生物活性的研究[D]. 长春:吉林大学, 2016.
- [18] ZHAO X, SHEN J, CHANG K J, et al. Comparative analysis of antioxidant activity and functional components of the ethanol extract of lotus (*Nelumbo nucifera*) from various growing regions [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(26):6227-6235.
- [19] XIAO J H, ZHANG J H, CHEN H L, et al. Inhibitory effects of isoliensinine on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. Planta Med, 2005, 71 (3): 225-230.
- [20] 邓碧. 莲子心提取物对糖尿病大鼠肾脏保护作用及其机制研究[D]. 成都:成都医学院, 2015.
- [21] WANG gang, WANG ping, YAN Xiaojun, et al. Neferine hinders choriocarcinoma cell proliferation, migration and invasion through repression of long noncoding RNA-CHRF [J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):4089-4096.
- [22] ZHOU J, LI G, ZHENG Y, et al. A novel autophagy/mitophagy inhibitor liensinine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy through DNMI1-mediated mitochondrial fission [J]. Autophagy, 2015, 11 (8) : 1259-1279.
- [23] SHU G, ZHANG L, JIANG S, et al. Isoliensinine induces dephosphorylation of NF- κ B p65 subunit at Ser536 via a PP2A-dependent mechanism in hepatocellular carcinoma cells: roles of impairing PP2A/I2PP2A interaction [J]. Oncotarget, 2016, 7 (26):40285-40296.
- [24] LIU X, WANG P, ZHANG C, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) : a rising star in the era of precision medicine of lung cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(30):50209-50220.
- [25] TAN, A C. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3):511-518.
- [26] TADESSE S, ANSHABO A T, PORTMAN N, et al. Targeting CDK2 in cancer: challenges and opportunities for therapy [J]. Drug Discov Today, 2020, 25(2):406-413.
- [27] ZHANG Z Y, GAO X H, MA M Y, et al. CircRNA 101237 promotes NSCLC progression via the miRNA 490-3p/MAPK1 axis [J]. Sci Rep, 2020, 10(1):9024.

[责任编辑 顾雪竹]