

基于网络药理学和实验验证探讨新疆紫草治疗黑色素瘤的分子机制

康莹莹, 包海燕, 李敏, 许芳, 阳莹, 陈玲, 蒲一萍, 钱乾, 李建光*
(新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**通过网络药理学及分子对接技术初步预测新疆紫草治疗黑色素瘤的活性成分、作用靶点及信号通路,通过体外实验验证可能的作用机制。**方法:**通过中药系统药理学数据库(TCMSP),成分靶点预测数据库(SwissTargetPrediction)以及查阅文献获取新疆紫草药理作用的活性成分及相关靶点;通过GeneCards,在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM),毒性与基因比较数据库(CTD)获取黑色素瘤相关靶点;使用STRING数据库构建活性成分与相关靶点的新疆紫草-黑色素瘤靶点蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图;利用Cytoscape 3.8.2软件对新疆紫草抗黑色素瘤网络节点进行筛选分析;使用DAVID 6.8数据库对交集靶点进行基因本体(GO)功能注释和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。选取新疆紫草中活性成分乙酰阿卡宁和靶点通过AutoDock vina 1.1.2软件进行分子对接验证;利用体外细胞实验验证药物抗黑色素瘤的作用。**结果:**预测显示,新疆紫草与黑色素瘤共同靶点271个,其中关键靶点23个,包括基质金属蛋白酶(MMP)-9,Janus激酶(JAK)2等;KEGG富集分析预测新疆紫草治疗黑色素瘤主要作用于JAK信号转导与转录激活蛋白(STAT),酪氨酸激酶受体(ErbB),血管内皮生长因子(VEGF)等信号通路;分子对接显示新疆紫草中活性成分乙酰阿卡宁与JAK2,STAT3,VEGF,MMP-9,上皮钙黏蛋白(E-cadherin)受体表现出良好的对接活性;体外蛋白免疫印迹与实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)结果表明,不同剂量的乙酰阿卡宁能抑制A375细胞JAK2,STAT3,VEGF,MMP-9,E-cadherin蛋白与基因的表达($P<0.05$)。**结论:**新疆紫草治疗黑色素瘤具有多靶点、多通路的特点,其发挥治疗作用机制可能与影响JAK2,STAT3,VEGF,MMP-9,E-cadherin等关键靶点蛋白的表达,进而抑制黑色素瘤细胞侵袭和转移能力有关。该研究为新疆紫草抗肿瘤提供了实验依据。

[关键词] 新疆紫草; 黑色素瘤; 网络药理学; 分析对接; 体外验证

[中图分类号] R285;R965;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)01-0204-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211514

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211028.1814.005.html>

[网络出版日期] 2021-10-29 11:07

Mechanism of *Arnebia euchroma* Against Melanoma: An Exploration Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

KANG Ying-ying, BAO Hai-yan, LI Min, XU Fang, YANG Ying, CHEN Ling, PU Yi-ping,
QIAN Qian, LI Jian-guang*
(College of Pharmacy of Xinjiang Medical University, Urumiqi 830011, China)

[Abstract] **Objective:** To preliminarily predict the active components, action targets, and signaling pathways of *Arnebia euchroma* in the treatment of melanoma based on network pharmacology and molecular docking, and to verify its possible mechanism of action in *in vitro* experiments. **Method:** The active components and related targets of *A. euchroma* were retrieved from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) SwissTargetPrediction and literature, and the targets

[收稿日期] 20210831(022)

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技支疆项目(2018E02069)

[第一作者] 康莹莹,在读硕士,从事天然药物抗肿瘤研究工作,E-mail:1535084377@qq.com

[通信作者] *李建光,博士,教授,博士生导师,从事天然药物资源的研发工作,E-mail:xjykd_xjg@163.com

related to melanoma from the GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), and Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Following the construction of the protein-protein interaction (PPI) network of active components and related targets of *A. euchroma* and melanoma-related targets using STRING, Cytoscape 3.8.2 was used for screening and analyzing the nodes in the network of *A. euchroma* against melanoma. The intersections were subjected to gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis using DAVID 6.8. Acetyl alkannin, the active component in *A. euchroma*, was docked to the target by AutoDock Vina 1.1.2. The *in vitro* experiments were then carried out to verify the anti-melanoma effect of *A. euchroma*. **Result:** A total of 271 common targets of *A. euchroma* and melanoma were harvested, among which 23 were key targets, including matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and Janus kinase 2 (JAK2). As revealed by KEGG enrichment analysis, *A. euchroma* mainly acted on Janus kinase/signal transduction and activator of transcription (JAK/STAT), tyrosine kinase receptor (ErbB), and vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathways to resist melanoma. According to molecular docking, acetyl alkannin exhibited a good docking activity with JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9, and E-cadherin receptors. The results of Western blot and Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) showed that acetyl alkannin at different doses inhibited the protein and gene expression of JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9, and E-cadherin in A375 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** *A. euchroma* alleviates melanoma via multiple targets and multiple pathways, and it may exert the therapeutic effects by affecting the expression of such key target proteins as JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9, and E-cadherin and inhibiting the invasion and metastasis of melanoma cells. This study has provided an experimental basis for the treatment of tumor with *A. euchroma*.

[Keywords] *Arnebia euchroma*; melanoma; network pharmacology; molecular docking; *in vitro* validation

黑色素瘤亦名恶性黑色素瘤,其发生与神经嵴黑色素细胞的异常过度增生密切相关^[1],其浸润与迁移能力强、扩散快、转移早、预后差,是最具侵略性的癌症之一^[2]。近年来,虽多种肿瘤的发病逐渐得到控制,但黑色素瘤的发病增长率仍以每年3%增长^[3]。95%的黑色素瘤患者在终末阶段因发生脑转移而死亡^[4-5],IV期的恶性黑色素瘤患者5年存活率仅不到10%^[6],恶性黑色素瘤已然成为威胁人类生命健康的一大主要肿瘤。目前的治疗方法多为常规的放射、化学药物、靶向药物以及免疫治疗药物,但存在明显的不良反应且易产生耐药等诸多问题^[7]。

新疆紫草 *Arnebia euchroma* 的干燥根作为药用,最初载于《神农本草经》,至今仍作为临床常用的中药之一。现代药理实验表明,新疆紫草具有抗肿瘤、抗炎、抗菌、抗氧化、抗病毒等多种活性^[8-12],其中发挥抗肿瘤作用的多为羟基萘醌类化合物^[13-15]。目前,针对新疆紫草的抗肿瘤作用的研究多集中在结肠癌^[16]、非小细胞肺癌^[17-18]、乳腺癌^[19]等,尽管新疆紫草对皮肤癌症具有潜在的治疗作用,但抗黑色素瘤的作用机制研究较少,具体靶点尚不明确。

课题组前期初步研究发现,新疆紫草中乙酰紫草素可抑制黑色素瘤 A375 细胞的增殖,促进其凋亡,但有待对新疆紫草抗黑色素瘤作用机制的靶点进行深入探讨,且缺乏系统的研究^[20]。网络药理学是通过整合多种生物数据库,采用系统性网络模型分析“中药成分-疾病-靶点-通路”之间相互作用关系的新兴交叉学科,并从分子生物学水平揭示药物的作用机制,是目前探索中药药理机制的综合有效的方法。本研究拟基于网络药理学与分子对接技术对新疆紫草治疗黑色素瘤可能的作用机制进行全面系统地解析,通过体外细胞实验验证有效成分乙酰阿卡宁对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭迁移能力的影响。侵袭迁移是恶性肿瘤发生、发展、难预后的一个重要特征,是治疗恶性黑色素瘤的关键。研究表明,Janus 激酶 2 (JAK2)/信号转导与转录激活蛋白 (STAT)3 信号通路与肿瘤的侵袭和迁移能力密切相关^[21]。基质金属蛋白酶家族基质金属蛋白酶 (MMPs) 是肿瘤侵袭迁移过程中最重要的调控分子之一。血管内皮生长因子 (VEGF) 是一种具有高度特异性,并可促进血管生成的因子,通过与血管内皮细胞上的受体结合发挥作用^[22],抑制 VEGF 表达能够减少新生血管的生成,从而抑制细胞增殖与侵

袭能力^[23]。本研究显示,新疆紫草中羟基萘醌类化合物乙酰阿卡宁主要作用于 JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9 等多个与肿瘤侵袭迁移相关的靶点,通过抑制 A375 细胞侵袭迁移能力,发挥治疗黑色素瘤的作用,为黑色素瘤临床药物的开发和临床应用提供依据。

1 方法

1.1 紫草活性成分与靶点预测 利用中药系统数据库及分析平台(TCMSP, <http://tcmssp.com/tcmssp.php>),检索紫草的所有化学成分,以口服生物利用度(OB)≥30%,类药性(DL)≥0.18为筛选条件,得到紫草的活性成分。借助 PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库和 SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)平台,预测各活性成分对应的潜在作用靶点。将筛选出的活性成分及作用靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件,构建“药物-活性成分-作用靶点”网络图。

1.2 黑色素瘤疾病靶点的预测 利用 GeneCards(<https://www.genecards.org/>),在线人类孟德尔遗传病数据库(OMIM)(<http://omim.org/>)和 CTD(<http://ctdbase.org/>)数据库,以“Melanoma”为检索词条,对黑色素瘤的靶点进行检索和收集,获取疾病作用靶点。通过 Venny 2.1(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)在线工具绘制韦恩图,获得紫草与黑色素瘤的交集靶点。

1.3 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及核心靶点筛选 将 1.2 项中得到的交集靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)进行 PPI 分析,结果保存为 *tsv 格式文件并导入 Cytoscape 3.8.2 软件中,运用“Network Analyzer”的功能对 PPI 结果进行网络拓扑学分析,构建 PPI 网络,并通过 Cytoscape 3.8.2 软件筛选网络中的核心靶点。

1.4 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)生物富集分析 基于 DAVID 6.8(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库,以 $P < 0.05$ 为筛选条件,对交集靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。利用微生信在线平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)将 GO 和 KEGG 通路富集结果绘制成柱状图及气泡图。

1.5 主要活性成分-核心靶点的分子对接验证 根据筛选的活性成分和核心靶点,从有机小分子生物活性数据库(PubChem)数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载新疆紫草中乙酰阿卡宁的 2D 结构,保存为“SDF”格式,运用 Open Babel 软件

将其“SDF”格式转换为“MOL2”格式,即小分子配体。从 RCSB PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中保存 JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9, E-cadherin 靶点的 3D 结构“PDB”格式,运用 PyMOL 对蛋白质预处理,即蛋白受体;通过 AutoDock vina 1.1.2 验证化合物与靶蛋白之间的亲和力和结合模式,选取其中结合能最小的对接模型(结合能 < 0 , 可认为配体与受体蛋白能自发的结合,一般以结合能 $\leq -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ($1 \text{ kcal} \approx 4.186 \text{ kJ}$,下同)作为评分标准,筛选作用靶点蛋白),应用 PyMOL 软件绘制靶点蛋白受体和活性成分乙酰阿卡宁之间的结合模式图。

2 新疆紫草抗黑色素瘤的体外验证

2.1 细胞 人黑色素瘤 A375 细胞(中国典型培养物保藏中心,批号 20190715)。

2.2 药物及试剂 乙酰阿卡宁为课题组自制,经高效液相色谱法测定纯度 $> 98\%$; Prime Script RT Reagent Kit 反转录试剂盒, TB Green Premix Ex Taq II 荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 AL12354A, AL13557A); 高效 RIPA 组织/细胞裂解液(索莱宝科技有限公司,批号 R0010); 蛋白预染 Marker, BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific,批号分别为 10748010, 23227); SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒, 4×蛋白质上样缓冲液, 脱脂奶粉, ECL 化学发光试剂(索莱宝科技有限公司,批号分别为 P1200, P1016, D8340, SW2020); JAK2, STAT3, VEGF 抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab108596, ab68153, ab32152); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-2188R); DMED 高糖培养基, 胎牛血清, 0.25% 胰蛋白酶, 磷酸盐(PBS)缓冲液(以色列 BI 公司,批号分别为 20203012, 2021013, 20205026, 20211028), DMSO(美国 Sigma 公司,批号 WXBC7821V), 二抗辣根过氧化物酶标记山羊抗兔(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 20170226)。

2.3 仪器 371 型 CO₂ 细胞培养箱, FC 型全自动酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司); QuantStudio 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪, Nanodrop 2000/2000C 型分光光度计(美国 Thermo Fisher 科技公司); Br4i 型离心机(美国 Jouan 公司); AE31 型荧光倒置显微镜(中国麦克迪奥公司); SK-O180E 型摇床(SCILOGEX); GL-88B 型涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); PowerPac 型电泳仪(Bio-Rad); FluorChem E Alpha 型化学发光凝

胶成像系统(美国ProteinSimple公司)。

2.4 细胞培养及干预分组 将A375细胞复苏后,使用DMEM高糖培养基及10%胎牛血清,在37℃,5%CO₂恒温培养箱中培养,隔日胰蛋白酶消化传代,取对数生长期细胞用于实验。THP-1细胞随机分为空白组(不做处理)及低、中、高乙酰阿卡宁组(500,1 000,2 000 nmol·L⁻¹)干预48 h^[20]。

2.5 Real-time PCR分析 按照试剂盒说明步骤进行TRIzol法提取A375细胞的总RNA,定量,反转录和PCR反应。以GAPDH作为内参基因,计算2^{-ΔΔC_t}值。引物由上海生工生物有限公司合成,见表1。

表1 PCR引物序列

Table 1 Primer sequence of PCR

引物	序列(5'-3')	长度/bp
JAK2	上游 TCAGAGAAGAAGACAGGAAGACAG	236
	下游 TTGAGAATCCAGAGCACTTAGAGG	
STAT3	上游 AGAAGGACATCAGCGTAAGAC	151
	下游 GGATAGAGATAGACCAGTGGAGAC	
VEGF	上游 ATCGAGTACATCTCAAGCCAT	132
	下游 GTGAGGTTTGATCCGCATAATC	
MMP-9	上游 CAGTACCGAGAGAAAGCCTATT	111
	下游 CAGGATGTCATAGGTCACGTAG	
E-cadherin	上游 ATTTTCCCTCGACCCGAT	208
	下游 TCCCAGGCGTAGACCAAGA	

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)分析 采用Western blot检测乙酰阿卡宁对A375细胞JAK2, STAT3, VEGF蛋白表达的影响。每组A375细胞样本(空白组及高、中、低乙酰阿卡宁剂量组)用含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液中裂解,收集蛋白上清液,按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白含量。制备SDS-PAGE凝胶,缓缓加入冰上溶解的蛋白样品,恒压80 V,30 min后,恒压120 V,90 min电泳分离蛋白;300 mA转印70 min至PVDF膜上;5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,4℃一抗孵育过夜,TBST洗膜3次,二抗孵育1 h,再TBST洗膜3次,用ECL发光试剂显色,于凝胶成像系统检测目的蛋白条带,采用Image J对蛋白条带进行定量分析。

2.7 统计学方法 采用SPSS 19.0统计学软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较,方差齐时采用t检验,方差不齐时采用Games-Howell法。单因素方差分析用于多组之间均数比较, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 紫草活性成分和潜在作用靶点预测结果 通过TCMSP数据库检索,得到紫草51种化合物,设置ADME标准(OB>30%和DL>0.18)后,共筛选出紫草12种活性化合物,见表2。通过PudChem数据库和SwissTargetPrediction平台,对活性成分进行靶点预测,去除重复值后,共获得紫草潜在作用靶点365个。

表2 紫草活性成分筛选

Table 2 Screening results of active ingredients from *Arnebia euchroma*

序号	分子ID	活性成分	OB/%	DL
1	MOL007736	丹酚酸B	60.48	0.39
2	MOL007735	脱-O-甲基碘化叶黄素	30.12	0.20
3	MOL007734	5-[(E)-5-(3-呋喃)-2-甲基丙烯-2-苯基]-2,3-甲氧基对苯醌	61.8	0.24
4	MOL007728	紫草酸A	75.08	0.38
5	MOL007722	紫草素	64.79	0.20
6	MOL007716	乙酰阿卡宁	62.39	0.27
7	MOL007715	异戊酰紫草素	54.64	0.29
8	MOL007714	甲氧基乙酰紫草素	73.09	0.29
9	MOL002883	油酸乙酯	32.40	0.19
10	MOL002372	角鲨烯	33.55	0.42
11	MOL001494	亚油酸乙酯	42.00	0.19
12	MOL000359	β-谷甾醇	36.91	0.75

3.2 “药物-活性成分-作用靶点”网络图构建 将新疆紫草的12种活性成分和其潜在作用靶点导入Cytoscape 3.8.2软件中,构建“药物-活性成分-作用靶点”网络图。网络拓扑学分析结果显示,新疆紫草中度值较高的活性成分有乙酰阿卡宁,[(1R)-1-(5,8-二羟基-1,4-二氧基-2-萘基)-4-甲基-戊-3-烯基]丙酸酯,5-[(E)-5-(3-呋喃基)-2-甲基戊-2-烯基]-2,3-二甲氧基对苯醌等,这些活性成分可能为紫草对黑色素瘤发挥疗效的主要活性成分。

3.3 药物-疾病交集靶点获取 汇总GeneCards, OMIM和CTD疾病数据库中有关黑色素瘤的靶点,去除重复项,得疾病相关靶点4 147个。将紫草活性成分的潜在作用靶点与黑色素瘤疾病靶点输入Venny 2.1.0在线工具绘制韦恩图,取其交集后获得疾病-药物共同靶点271个。

3.4 PPI网络分析及关键靶点获取 通过STRING数据库对交集靶点进行PPI分析。共涉及271个节点和2 926条边。利用Cytoscape 3.8.2软件和

NetworkAnalyzer工具分析网络中节点的度值,构建PPI蛋白互作网络图。其中度值(Degree)越大,节点越大,节点颜色越深。运用CytoNCA插件和拓扑学参数,计算出度值,中介中心性(BC),紧密中心性

(CC)平均值,分别是16.00,95.658 88,0.481 327 22,其中均大于三者2倍均值的靶点共23个,见表3。这些靶点在PPI中起着关键作用,是新疆紫草活性成分治疗黑色素瘤的核心靶点。

表3 新疆紫草治疗黑色素瘤的核心靶点

Table 3 Core targets of *Arnebia euchroma* for melanoma

序号	基因名	靶点名	度值	中介中心性	紧密中心性
1	Akt1	Akt serine/threonine kinase 1	139	9 575.658	0.670 025 17
2	SRC	tyrosine-protein kinase SRC	108	4 799.075	0.621 495 3
3	MAPK1	mitogen-activated protein kinase 1	105	4 134.733	0.612 903 24
4	EGFR	epidermal growth factor receptor	104	3 331.852	0.610 091 75
5	CASP3	Caspase 3	99	2 948.767	0.597 752 8
6	HSP90AA1	heat shock protein HSP 90-alpha	88	2 617.105 5	0.579 520 7
7	MTOR	serine/threonine-protein kinase mTOR	87	2 219.722 2	0.577 006 5
8	ESR1	estrogen receptor	82	2 022.994 3	0.574 514 03
9	MAPK8	mitogen-activated protein kinase 8	77	1 449.854 1	0.564 755 86
10	PTGS2	prostaglandin-endoperoxide synthase 2	72	2 388.468 3	0.565 957 4
11	MAPK14	mitogen-activated protein kinase 14	70	1 769.645 4	0.558 823 5
12	PIK3CA	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	66	1 308.492 6	0.547 325 1
13	ERBB2	Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2	66	810.632 26	0.553 014 6
14	AR	androgen receptor	63	1 621.090 6	0.551 867 25
15	MMP-9	matrix metalloproteinase 9	61	1 986.728 5	0.540 650 4
16	MDM2	MDM2 proto-oncogene	56	486.371 34	0.528 827
17	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma	56	2 018.203 4	0.539 553 76
18	KDR	kinase insert domain receptor	55	771.524 6	0.539 553 76
19	HSP90AB1	heat shock protein 90 alpha family class B member 1	51	404.713 44	0.516 504 9
20	PRKACA	protein kinase CAMP-activated catalytic subunit alpha	50	2 586.620 8	0.514 506 76
21	JAK2	Janus kinase 2	50	474.350 46	0.519 531 25
22	HDAC1	histone deacetylase 1	49	810.362 2	0.518 518 5
23	NOS3	nitric oxide synthase 3	48	1 036.195 9	0.535 211 27

3.5 GO及KEGG通路富集分析 利用DAVID 6.8对271个紫草与黑色素瘤共同靶点进行生物富集分析,得到GO功能富集条目832条,其中,生物过程585条、细胞组成80条和分子功能167条。根据GO富集结果,对P排名前10的条目应用微生信平台绘图。根据DAVID筛得到KEGG通路117条,根据P排序绘制排名前20的KEGG气泡图。其中Y轴代表通路名称,X轴代表基因所占百分比,气泡面积代表通路富集基因数,气泡面积越大信号通路的显著性就越高,气泡颜色代表P的大小。可预测紫草对黑色素瘤的治疗作用主要分布在癌症通路,JAK/STAT信号通路,ErbB信号通路,VEGF信号通路,以及黑色素瘤等信号通路。

3.6 分子对接验证 结果显示,乙酰阿卡宁与

JAK2,STAT3,VEGF,MMP-9,E-cadherin靶点蛋白的结合能分别为-8.5,-7.7,-7.0,-9.6,-7.7 kcal·mol⁻¹,均≤-7.0 kcal·mol⁻¹,表现出较强的结合活性,结果见表4;乙酰阿卡宁与JAK2,STAT3,VEGF,MMP-9,E-cadherin 5个靶点蛋白可自发结合,借助氢键等分子间作用力产生较稳定构象。

表4 乙酰阿卡宁抗黑色素瘤关键靶点结合能预测

Table 4 Prediction of binding energy of key anti-melanoma targets of acetyl arkanin

靶点名称	PDB ID	结合能/kcal·mol ⁻¹
JAK2	6VGL	-8.5
STAT3	6TLC	-7.7
VEGF	1WQ9	-7.0
MMP-9	1L6J	-9.6
E-cadherin	4ZT1	-7.7

3.7 乙酰阿卡宁对 A375 细胞 JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9, E-cadherin 基因表达水平的影响
Real-time PCR 结果显示,与空白组(A375 细胞)相比,经过不同浓度乙酰阿卡宁干预的 A375 细胞

中 E-cadherin mRNA 的表达水平显著升高 ($P < 0.01$), JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9 mRNA 的表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 各 mRNA 表达水平与乙酰阿卡宁剂量均呈浓度依赖性, 见表 5。

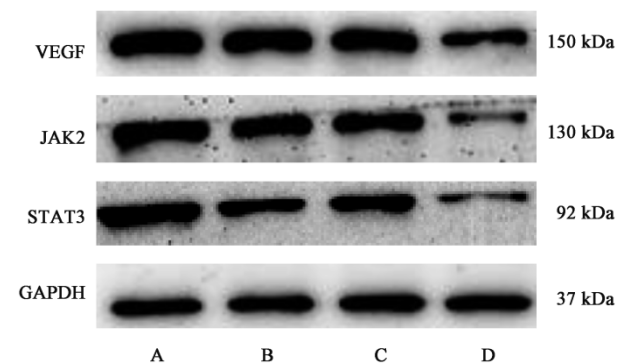
表 5 乙酰阿卡宁对 A375 细胞, JAK2, STAT3, VEGF, MMP-9 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effects of acetylakanin on mRNA expression levels of JAK2, STAT3, VEGF and MMP-9 in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/nmol·L ⁻¹	VEGF	JAK2	MMP-9	STAT3	E-cadherin
空白		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
乙酰阿卡宁	500	0.54±0.02	0.70±0.01	0.82±0.15	0.77±0.02	0.82±0.03
	1 000	0.47±0.10	0.66±0.03	0.62±0.15	0.52±0.04	1.28±0.17
	2 000	0.41±0.01	0.54±0.01	0.50±0.05	0.45±0.01	4.30±0.15

3.8 乙酰阿卡宁对 A375 细胞 JAK2, STAT3, VEGF 蛋白表达水平的影响 与空白组(A375 细胞)相比, 经过不同浓度乙酰阿卡宁干预的 A375 细胞中 JAK2, STAT3, VEGF 蛋白的表达水平均明显降低 ($P < 0.01$), 均呈浓度依赖性, 见图 1, 表 6。

分进行筛选, 结果表明, 羟基萘醌类成分治疗恶性黑色素瘤的主要活性成分。本研究选取课题组已从新疆紫草中分离得到的羟基萘醌类单体化合物乙酰阿卡宁, 对网络药理学富集得到的 MMP-9, JAK2, STAT3, VEGF 等靶点及通路进行实验验证。



A. 空白组; B. 乙酰阿卡宁低剂量组 (500 nmol·L⁻¹); C. 乙酰阿卡宁中剂量组 (1 000 nmol·L⁻¹); D. 乙酰阿卡宁高剂量组 (2 000 nmol·L⁻¹)

图 1 各组细胞 STAT3, JAK2, VEGF 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoretic of STAT3, JAK2 and VEGF in each group of cells

表 6 乙酰阿卡宁对 A375 细胞, JAK2, STAT3, VEGF 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effects of acetyl arkanin on the expression levels of JAK2, STAT3 and VEGF in A375 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量 /nmol·L ⁻¹	JAK2	STAT3	VEGF
空白		1.00	1.00	1.00
乙酰阿卡宁	500	0.74±0.09	0.6±0.05	0.97±0.08
	1 000	0.67±0.01	0.65±0.12	0.78±0.07
	2 000	0.35±0.1	0.23±0.06	0.52±0.12

4 讨论

本研究通过网络药理学对新疆紫草的活性成

JAK 蛋白家族属于非跨膜型的酪氨酸激酶, 在细胞内, JAK1-3 和 TYK2 4 个组成成员功能不同^[24]。STAT 是细胞内重要的信号转导及转录激活因子, 由 STAT(1-4), STAT5a, STAT5b 和 STAT6 等 7 个成员组成^[25]。JAKs 活化后能激活 STATs, 共同构成多条信号通路, 如 JAK1/STAT6, JAK2/STAT3 和 JAK2/STAT5 等。JAK/STAT 信号通路被上游细胞因子刺激后, 通过调节下游靶基因, 参与细胞增殖、分化、侵袭转移、血管新生等生理过程, 进而调控肿瘤发生、发展^[26]。其中, JAK2/STAT3 信号通路在肿瘤细胞的侵袭迁移过程承担重要作用。XU 等^[27]发现 JAK2 在癌组织中表达上调, 并且与淋巴结转移相关。上调 JAK2 的表达会促进肿瘤细胞增殖、转移和侵袭能力, 下调 JAK2 的表达则作用相反。LIN 等^[28]发现, STAT3 通过上调 miR-92a 的活性, 从而靶向并下调 RECK 的表达, 促进了肺癌细胞的侵袭性。研究报道, STAT3 可参与调控血管基底膜降解与清除、血管上皮细胞增殖与迁移以及新生血管与血管网重建等 3 个血管生成的关键步骤^[29]。

MMPs 是参与血管基底膜降解与清除过程的关键蛋白, 其主要生理功能为降解并清除细胞外基质。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族成员之一, 是一种蛋白水解酶, 其活性高低与 Zn²⁺ 及 Ca²⁺ 有关, 可降解细胞外基质, 促进新血管生成, 调节细胞间、细胞与基质间的粘附作用, 增强肿瘤的浸润、转移能力。以往大量研究表明, MMP-9 可在膀胱癌、前列腺癌、

结肠癌、甲状腺癌及肺癌等肿瘤组织中表达^[30]。STAT3激活MMPs的表达,促进癌细胞清除细胞外基质,一旦细胞外基质被清除,细胞将上调与细胞运动相关蛋白的表达来完成迁移。研究发现,STAT3调控的肌动蛋白结合蛋白(fascin)被上调后,增强细胞发生迁移、侵袭和转移的能力^[31]。MMPs亦可在降解肿瘤基膜和肿瘤间质的过程中诱导VEGF的产生,MMP-9和VEGF在恶性肿瘤的侵袭和转移中均扮演重要角色^[32]。

VEGF是一类特异性细胞因子,主要由肿瘤细胞和骨髓原始细胞分泌,可促进内皮细胞的增殖并增加血管的通透性。VEGF家族包括VEGFA-E,PIGF1-2共7种糖蛋白,以及3种酪氨酸蛋白激酶受体(VEGR1-3)。VEGF特异性的与VEGFR结合后,促进血管内皮细胞的增殖、诱导新生血管的生成、调节血管的通透性,是肿瘤向周边组织浸润的病理学基础^[33]。VEGF还可反向促进MMPs的合成和分泌,加速肿瘤细胞增殖、侵袭和转移的能力。异常激活的STAT3亦可上调VEGF的表达^[34]。

本研究通过分子对接验证结果显示,新疆紫草中有效成分-羟基萘醌类化合物乙酰阿卡宁与JAK2,STAT3,VEGF,MMP-9,E-cadherin等靶蛋白的结合活性较强,说明乙酰阿卡宁可较为稳定的与上述受体结合。体外细胞验证实验结果表明,不同剂量的乙酰阿卡宁可通过抑制人黑色素瘤A375细胞的侵袭迁移能力,发挥抗黑色素瘤作用。该结论丰富了新疆紫草治疗恶性黑色素瘤的机制研究,为临床应用提供实验证据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GABRISOVA V, KUCEROVA L, KUCEROVA L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells[J]. *Neoplasma*, 2016, 63(4): 510-517.
- [2] 金兰, 康晓静. 黑色素瘤靶向治疗的耐药机制及其治疗策略[J]. *国际肿瘤学杂志*, 2018, 45(7): 444-448.
- [3] TRIPP M K, WATSON M, BALK S J, et al. State of the science on prevention and screening to reduce melanoma incidence and mortality: the time is now[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 460-480.
- [4] HONG A M, WALDSTEIN C, SHIVALINGAM B, et al. Management of melanoma brain metastases: evidence-based clinical practice guidelines by cancer council Australia[J]. *Eur J Cancer*, 2020, 142: 10-17.
- [5] HARSHITA M, MISHRA P K, ADAM E, et al.

Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology [J]. *J Cancer Res Clin*, 2018, 144: 2283-2302.

- [6] MARIANA A, MARCELA B M. Combining immunotherapy with oncogene-targeted therapy: a new road for melanoma treatment [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 46.
- [7] 林千里, 张文俊, 汪汇, 等. 皮肤黑色素瘤流行病学及防治研究进展[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(3): 28-32.
- [8] SHA L Y, LYU Z Q, LIU Y J, et al. Shikonin inhibits the Warburg effect, cell proliferation, invasion and migration by downregulating PFKFB2 expression in lung cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2021, doi: 10.3892/mmr.2021.12199.
- [9] WANG J C, CHEN Z J, FENG X J, et al. Shikonin ameliorates injury and inflammatory response of LPS-stimulated WI-38 cells via modulating the miR-489-3p/MAP2K1 axis [J]. *Environ Toxicol*, 2021, doi: 10.1002/tox.23298.
- [10] HUANG X Y, FU H L, TANG H Q, et al. Optimization extraction of shikonin using ultrasound-assisted response surface methodology and antibacterial studies [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 1208617.
- [11] ZHONG J J, WANG Z F, XIE Q, et al. Shikonin ameliorates D-galactose-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice via the MAPK and nuclear factor- κ B signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 83: 106491.
- [12] MA C L, HU Y M, TOWNSEND J A, et al. Ebselen, disulfiram, carmofur, PX-12, tideglusib, and shikonin are non-specific promiscuous SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. *bioRxiv*, 2020, doi: 10.1101/2020.09.15.299164.
- [13] LIU Y K, KANG X, NIU G, et al. Shikonin induces apoptosis and pro-survival autophagy in human melanoma A375 cells via ROS-mediated ER stress and p38 pathways [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47: 626-635.
- [14] KRESCHMER N, DEUTSCH A, DURCHSCHEIN C, et al. Comparative gene expression analysis in WM164 melanoma cells revealed that beta-beta-dimethylacryl shikonin leads to ROS generation, loss of mitochondrial membrane potential, and autophagy induction [J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 2823-2839.
- [15] CUI J Q, ZHOU X B, HUANG J, et al. Selective antitumor effect of shikonin derived DMAKO-20 on

- melanoma through CYP1B1 [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2020, doi: 10.2174/1568009620666201116112937.
- [16] HAN X, KANG K A, PIAO M J, et al. Shikonin exerts cytotoxic effects in human colon cancers by inducing apoptotic cell death via the endoplasmic reticulum and mitochondria-mediated pathways [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2019, 27: 41-47.
- [17] TANG J C, REN Y G, ZHAO J, et al. Shikonin enhances sensitization of gefitinib against wild-type EGFR non-small cell lung cancer via inhibition PKM2/STAT3/Cyclin D₁ signal pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 204: 71-77.
- [18] KIM H J, HWANG K E, PARK D S, et al. Shikonin-induced necroptosis is enhanced by the inhibition of autophagy in non-small cell lung cancer cells [J]. *J Transl Med*, 2017, 15: 123.
- [19] SHAHSAVARI Z, KARAMI-TEHRANI F, SALAMI S. Targeting cell necroptosis and apoptosis induced by shikonin via receptor interacting protein kinases in estrogen receptor positive breast cancer cell line, MCF-7 [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2018, 18: 245-254.
- [20] 钱乾, 许芳, 李敏, 等. 乙酰紫草素对黑色素瘤A375细胞增殖和凋亡作用研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2021, 44(6): 726-730.
- [21] ZHANG R, HAO J, GUO K W, et al. Germacrone inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 7643248.
- [22] BHATTACHARYA R J, YE X C, W R, et al. Intracrine VEGF signaling mediates the activity of pro-survival pathways in human colorectal cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 3014-3024.
- [23] WAN X F, ZHU Y L, ZHANG L J, et al. Gefitinib inhibits malignant melanoma cells through the VEGF/Akt signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17: 7351-7355.
- [24] LIU S L, SUI Y F, LIN M Z. MiR-375 is epigenetically downregulated due to promoter methylation and modulates multi-drug resistance in breast cancer cells via targeting YBX1 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol*, 2016, 20(15): 3223-3229.
- [25] DOI T, ISHIKAWA T, OKAYAMA T, et al. The JAK/STAT pathway is involved in the upregulation of PD-L1 expression in pancreatic cancer cell lines [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(3): 1545.
- [26] WANG X, CHEN L H, LIU J, et al. *In vivo* treatment of rat arterial adventitia with interleukin β induces intimal proliferation via the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(4): 3451-3458.
- [27] XU Y, JIN J, XU J, et al. JAK2 variations and functions in lung adenocarcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(6): 101042831771114.
- [28] LIN H Y, CHIANG C H, HUNG W C. STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(3): 731-738.
- [29] KALLURI, RAGHU. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(6): 422-433.
- [30] 彭挺生, 丘钜世, 吴惠茜, 等. CD44s、MMP-9、Ki-67的表达与骨肉瘤侵袭、转移、复发的关系 [J]. *癌症*, 2002, 21(7): 745-750.
- [31] TSUJITA Y, HORIGUCHI A, TASAKI S, et al. STAT3 inhibition by WP1066 suppresses the growth and invasiveness of bladder cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(4): 2197-2204.
- [32] 徐小艳, 徐宪伟, 王慧, 等. 肺腺癌中CD147、MMP-9和VEGF的表达及临床意义 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2017, 33(4): 384-387.
- [33] STEVENS M, OLYEAM S. Modulation of receptor tyrosine kinase activity through alternative splicing of ligands and receptors in the VEGF-A/VEGFR Axis [J]. *Cells*, 2019, doi: 10.3390/cells8040288.
- [34] CHAI E Z P, SHANMUGAM M K, ARFUSO F, et al. Targeting transcription factor STAT3 for cancer prevention and therapy [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2016, 162: 86-97.

[责任编辑 顾雪竹]