

· 数据挖掘 ·

基于网络药理学及体外实验验证探究丹参治疗膀胱癌的分子机制

白婕¹, 王伟峰², 毛广敏³, 张军¹, 杨波², 董昌盛^{3*}, 龚华^{2*}

(1. 上海中医药大学 研究生院, 上海 201203; 2. 上海健康医学院 附属周浦医院, 上海 201318;
3. 上海中医药大学 附属龙华医院, 上海 200032)

[摘要] 目的:基于网络药理学预测丹参治疗膀胱癌(BC)的潜在作用靶点及可能相关的信号通路,并通过体外细胞实验验证其潜在的分子机制。方法:应用中药系统药理数据库(TCMSP)筛选中药丹参活性成分;运用GeneCards和在线人类孟德尔遗传数据库(OMIM)获取BC疾病靶点;通过Venny 2.1工具整合丹参治疗BC的潜在靶点并绘制韦恩图;STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;DAVID数据库进行基因本体(GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析;细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测丹参酮Ⅱ_A(Tan II_A),隐丹参酮(CPT),木犀草素(LUT)分别以不同浓度(0、1、2、4、8、16、32 μmol·L⁻¹)对膀胱癌T24、5637细胞的增殖抑制活性;碘化吡啶(PI)染色法分析Tan II_A、CPT及LUT(0、4、8 μmol·L⁻¹)诱导5637细胞凋亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Tan II_A(0、4、8、16 μmol·L⁻¹)对关键靶点蛋白表达的调控。结果:筛选结果显示丹参65个活性成分,39个丹参-BC共同作用靶点,KEGG通路富集分析主要包含神经元-配体-受体的相互作用、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号传导途径、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂抗性、缺氧诱导因子(HIF)-1信号通路等。CCK-8结果表明,与空白组比较,Tan II_A、CPT及LUT均能明显抑制BC细胞T24和5637细胞的增殖($P<0.05$),且3个药物均对5637细胞的增殖抑制作用更为显著;同时在5637细胞系中,Tan II_A组的半抑制浓度(IC₅₀)明显低于CPT及LUT组($P<0.05$)。PI染色结果显示,与空白组比较,Tan II_A、CPT及LUT均能诱导5637细胞凋亡,诱导凋亡程度由高到低依次为Tan II_A、CPT、LUT($P<0.05$)。Western blot实验表明Tan II_A作用于5637细胞后能降低表皮生长因子受体(EGFR)、磷酸化磷脂酰肌醇3-激酶(p-PI3K),磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)蛋白表达水平,且呈浓度依赖性。结论:丹参治疗BC具有多成分、多靶点、多通路的特点,其作用机制可能与下调EGFR、p-PI3K、p-Akt蛋白的表达,进而抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡有关。

[关键词] 丹参;膀胱癌(BC);网络药理学;丹参酮Ⅱ_A;体外细胞实验

[中图分类号] R284.2;R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)15-0153-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220714 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220323.2038.003.html>

[网络出版日期] 2022-03-24 14:23

Molecular Mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* against Bladder Cancer: Based on Network Pharmacology and *In Vitro* Experiment

BAI Jie¹, WANG Weifeng², MAO Guangmin³, YANG Bo², ZHANG Jun¹,
DONG Changsheng^{3*}, GONG Hua^{2*}

(1. Graduate School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 201203, China;

[收稿日期] 2022-02-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774064);上海中医药大学杏林中青年人才培养体系—杏林青年学者项目(RC-2017-02-02);浦东新区卫生系统领先人才培养项目(PWR12021-10)

[第一作者] 白婕,在读硕士,从事膀胱癌中西医结合治疗的基础研究,E-mail:bj06140@163.com

[通信作者] *董昌盛,硕士,副研究员,硕士生导师,从事中医药防治恶性肿瘤及癌痛的理论、临床和基础研究工作,E-mail:dongchangsheng2010@163.com;

*龚华,博士,主任医师,硕士生导师,从事中西医结合治疗膀胱癌的理论、基础和临床研究,E-mail:drgonghua@126.com

2. Zhoupu Hospital Affiliated to Shanghai University of Medicine & Health Sciences, Shanghai 201318, China;
3. Longhua Hospital Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To predict the potential targets and possible related signaling pathways of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* against bladder cancer (BC) based on network pharmacology and verify the potential molecular mechanism through *in vitro* cell experiment. **Method:** Active components of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* were retrieved from Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and BC-related targets were searched from GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). Via Venny2.1, the potential targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* against BC were screened out and the Venn diagram was plotted. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING, followed by Gene Ontology (GO) term enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment with DAVID. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was employed to detect the inhibitory effect of tanshinone II_A (Tan II_A), cryptotanshinone (CPT), and luteolin (LUT) at different concentration (0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μmol·L⁻¹) on the proliferation of BC T24 and 5637 cells, propidium iodide (PI) staining to analyze the apoptosis of 5637 cells induced by Tan II_A, CPT, and LUT (0, 4, 8 μmol·L⁻¹), and Western blotting to detect the regulatory effect of Tan II_A (0, 4, 8, 16 μmol·L⁻¹) on the expression of key target proteins. **Result:** A total of 65 active components and 39 anti-BC targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* were screened out. The anti-BC targets were mainly involved in the KEGG pathways of neuron-ligand-receptor interaction, phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway, epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor resistance, and hypoxia inducible factor (HIF)-1 signaling pathway. As for the CCK-8 assay, compared with the blank group, Tan II_A, CPT, and LUT significantly inhibited the proliferation of T24 and 5637 cells, particularly the 5637 cells. The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of Tan II_A on 5637 cells was significantly lower than that of CPT and LUT. Moreover, compared with the blank group, Tan II_A, CPT, and LUT all induced the apoptosis of 5637 cells, and the effect followed the order of Tan II_A>CPT>LUT (*P*<0.05). Western blot showed that Tan II_A significantly reduced the expression of EGFR, p-PI3K, and p-Akt in 5637 cells in a concentration-dependent manner compared with the blank group (*P*<0.05). **Conclusion:** *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* exerts therapeutic effect on BC through multiple components, multiple targets, and multiple pathways. The mechanism is the likelihood that it down-regulates the expression of EGFR, p-PI3K, and p-Akt proteins, thus further inhibits cell proliferation, and induces apoptosis.

[Keywords] *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*; bladder cancer (BC); network pharmacology; tanshinone II_A (Tan II_A); molecular docking; *in vitro* cell experiment

膀胱癌(BC)于全球最常见的癌症中排名第10,2020年全球约有57.3万例新发病例和21.3万例死亡病例,男性的发病率和死亡率约是女性的4倍,BC在男性中是第6大最常见癌症^[1]。无痛性肉眼血尿是BC最常见的表现症状^[2],BC的治疗取决于进行经尿道膀胱肿瘤切除术(TURBT)时的病理程度^[3]。目前西医治疗非肌肉浸润性膀胱癌采取TURBT,其次是膀胱内化疗^[4];肌肉浸润性膀胱癌通常采用根治性膀胱切除术和新辅助化疗进行治疗^[5]。BC由于其进展快和复发率较高一直是临床治疗中面临的困难,同时临床对于BC复发的监测很大程度上依赖于

膀胱镜检查,这对于患者来说不仅是一笔昂贵的费用,而且还要承受检查带来的身体不适。

BC属于中医学“癃闭”“溺血”“血淋”等范畴。现代药理研究表明,丹参及其有效成分具有抑制肝癌、卵巢癌、肺癌等多种肿瘤生长的作用^[6-8]。有研究报道膀胱癌患者化疗辅助中药复方丹参饮治疗,可显著降低其胃肠道抑制的发生率并通过降低免疫指标CD3⁺、CD4⁺及自然杀伤细胞(NK)水平提高患者免疫功能^[9]。既往有研究对中药丹参的有效单体成分治疗BC的作用机制有部分阐述,如隐丹参酮(CPT)抑制β-连环蛋白的磷酸化以及N-钙黏蛋

白的表达,说明隐CPT可能是通过雷帕霉素靶体蛋白(mTOR)/ β -连环蛋白/N-钙黏蛋白轴抑制T24和J82膀胱癌细胞的侵袭性^[10]。丹参酮II_A(Tan II_A)上调3种膀胱癌细胞上皮标记物E-钙黏蛋白,下调间充质标记物N-钙黏蛋白和波形蛋白,同时抑制信号转换器和转录激活因子3(STAT3)的磷酸化,这表明Tan II_A可能通过抑制STAT3/CCL2信号通路来抑制BC细胞上的上皮细胞-间充质转化(EMT)^[11]。但目前关于丹参治疗BC的研究有限,且现阶段尚无运用网络药理学挖掘丹参对治疗BC作用机制的研究。为此,本研究通过网络药理学与体外细胞实验相结合的方法,深入挖掘丹参治疗BC的潜在作用靶点和可能的信号通路,以期拓展BC基础研究和临床治疗的思路。

1 材料

1.1 丹参活性成分筛选 选择“丹参”为检索词,在中药系统药理数据库(TCMSP)数据库中检索其包含的所有化学成分,设定检索条件:口服生物利用度(OB)和类药性指数(DL),要求二者同时满足OB \geq 30%和DL \geq 0.18,得到丹参的活性成分及其对应的靶点。运用UniProt数据库,输入靶点蛋白质名称于UniProKB检索工具框中,将其转化为基因ID。

1.2 成分-靶点网络构建与分析 将筛选出的丹参治疗BC的靶点及相对应的活性成分导入Cytoscape 3.7.1软件,绘制丹参活性成分-潜在靶点网络图,应用R Studio 3.6.1分析节点连接度筛选丹参治疗BC的主要活性成分。

1.3 BC差异表达基因的筛选 以“bladder cancer”为主题词检索GeneCards和OMIM数据库,合并两个数据库的结果,剔除重复的基因,获取BC差异表达基因,建立BC疾病靶点数据库。将丹参活性成分对应的靶点与BC疾病靶点进行交集,取得“丹参-BC”共同核心靶点,利用Venny 2.1.0工具绘制韦恩图,因此得到丹参治疗BC的潜在作用靶点。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 于STRING数据库中,导入获取的“丹参-BC”共同核心靶点,选择物种种类为“Homo sapiens”,构建PPI网络。然后,将置信度 >0.4 的数据导入Cytoscape 3.7.2软件中进行可视化分析,并筛选节点自由度值大于中位数2倍的核心靶点。

1.5 生物信息学基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 于DAVID数据库中,导入丹参有效活性成分及丹参-BC共同核心靶点,进行GO富集分析以及KEGG通路富集分析,规

定 $P<0.01$ 为筛选条件。GO注释中包含生物过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF),探析丹参活性成分及核心靶点可能作用与BC后参与的生物学功能;KEGG分析筛选丹参活性成分及核心靶点可能作用与BC的信号通路。

1.6 验证实验

1.6.1 药物与试剂 人膀胱癌T24和5637细胞(上海富衡生物有限公司,货号分别为FH0171和FH0422)。

Tan II_A、CPT及木犀草素(LUT)(阿拉丁试剂上海有限公司,批号分别为T109794、C101973、L107328,纯度 \geq 99%)均以40 mmol·L⁻¹作为母液浓度溶解于二甲基亚砜(DMSO)(美国Sigma-Aldrich公司,货号D2650)中,储存于-80℃。

1640培养基和青/链霉素(美国Gibco公司,货号分别为8120207、2145468);胎牛血清(美国ExCell Bio公司,货号111348);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)、细胞凋亡、BCA蛋白定量、SDS-PAGE凝胶试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号分别为C0039、C1065M、ZJ101、PG112)。 β -肌动蛋白(β -actin)、磷酸化(p)-磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、p-蛋白激酶B(Akt)及表皮生长因子受体(EGFR)(phospho T308)(美国Abcam公司,货号分别为ab8226、ab32089、ab38449、ab52894)。

1.6.2 仪器 CO₂细胞培养箱(美国Thermo公司);infinite F200型多功能酶标仪(瑞士TECAN公司);5418型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);DMI3000B型倒置荧光显微镜(德国Leica公司);DxFLEX型流式细胞仪系统(苏州贝克曼库尔特);GelDoc XR型电泳/转膜仪及凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.6.3 CCK-8法检测T24、5637细胞增殖 于1640培养基(含10%胎牛血清、1%青/链霉素)中培养T24、5637细胞,以 1×10^5 个/孔接种96孔板,37℃培养过夜,每孔分别加入1、2、4、8、16、32 μ mol·L⁻¹的Tan II_A、CPT及LUT 100 μ L作用细胞24 h(给予药物刺激称为实验孔,不予药物处理称为溶剂孔,细胞及药物均不加称为空白孔)。药物刺激24 h之后,于每孔中均加入CCK-8溶液10 μ L,培养箱孵育1~2 h,在酶标仪450 nm处测定吸光度A,分别计算Tan II_A、CPT及LUT对T24、5637细胞的抑制率。

1.6.4 碘化吡啶(PI)染色法检测5637细胞凋亡 观察5637细胞的生长状态,及至对数生长期时,以 4×10^5 个/孔接种于6孔板中。细胞分为正常组和

Tan II A、CPT及LUT给药组(4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),药物刺激24 h后,收集所有细胞,按照细胞凋亡试剂盒指示进行PI染色,37 $^{\circ}\text{C}$ 、避光孵育25 min,运用流式细胞仪上机检测。

1.6.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测EGFR、p-PI3K及p-Akt蛋白表达 5637细胞经Tan II A(0、4、8、16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理,RIPA裂解液(含1%蛋白酶及1%磷酸酶抑制剂)裂解细胞释放蛋白,BCA试剂盒检测蛋白浓度,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热10 min使蛋白样品变性,配备10% SDS-PAGE凝胶加入蛋白样品,于80~120 V恒压电泳,300 mA恒流转膜,37 $^{\circ}\text{C}$ 下5%脱脂牛奶封闭1 h,加入EGFR、p-PI3K、p-Akt和 β -actin一抗(1:1 000),于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日TBST摇洗3次后加入二抗(1:5 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1 h,再用TBST摇洗3次,ECL发光显影。以 β -actin为内参,蛋白条带的处理分析运用Image J软件。

1.7 统计学处理 数据的统计分析运用SPSS 24.0

软件,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 丹参治疗BC的有效成分及活性成分-靶点网络构建 由TCMSP数据筛选到丹参活性成分65个,对应42个作用靶点,其中有4个活性成分没有对应的作用靶点,剔除这4个没有对应靶点的有效成分,见表1。将剩余61个丹参成分和42个潜在靶点导入于Cytoscape 3.7.1中,导入剩余61个丹参成分和42个潜在靶点,构建活性成分-靶点网络图,其中丹参活性成分用外圈绿色圆点表示,潜在作用靶点用内圈蓝色圆点表示,见增强出版附加材料。R Studio 3.6.1分析结果,将活性成分对应的潜在靶点根据其度值大小由高到低排列。在度值排名前十的活性成分中,考虑到购买难易程度以及现阶段相关研究报道的多少,选取Tan II A、CPT及LUT进行后续细胞实验,见表1。

表1 丹参活性成分的基本信息

Table 1 Basic information of active ingredients of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*

序号	MOL ID	成分名称	MW	OB%	DL	度值
1	007049	4-methylenemiltirone(4-亚甲丹参新酮)	266.36	34.35	0.23	20
2	007154	tanshinone II _A (丹参酮II _A)	294.37	49.89	0.40	19
3	001601	1,2,5,6-tetrahydrotanshinone(四氢丹参酮)	280.34	38.75	0.36	19
4	007145	salviolone(鼠尾草酚酮)	268.38	31.72	0.24	18
5	007041	2-isopropyl-8-methylphenanthrene-3,4-dione(2-异丙基-8-甲基菲-3-4-二酮)	264.34	40.86	0.23	18
6	007088	cryptotanshinone(隐丹参酮)	296.39	52.34	0.4	18
7	007108	isocryptotanshinone(异隐丹参酮)	296.39	54.98	0.39	17
8	007098	deoxyneocryptotanshinone(去羟新隐丹参酮)	298.41	49.4	0.29	16
9	000006	luteolin(木犀草素)	286.25	36.16	0.25	16
10	007061	methylenetanshinquinone(次甲丹参醌)	278.32	37.07	0.36	15
11	007069	przewaquinone C(紫丹参素C)	296.34	55.74	0.40	15
12	007100	dihydrotanshinolactone(二氢丹参内酯)	266.31	38.68	0.32	15
13	007122	miltirone(丹参新酮)	282.41	38.76	0.25	15
14	002651	dehydrotanshinone II _A (去氢丹参酮II _A)	292.35	43.76	0.40	14
15	007094	danshenspiroketallactone(丹参螺缩酮内酯)	282.36	50.43	0.31	14
16	007119	miltionone I(丹参醌I)	312.39	49.68	0.32	14
17	007101	dihydrotanshinone I(二氢丹参酮I)	278.32	45.04	0.36	14
18	007036	5,6-dihydroxy-7-isopropyl-1,1-dimethyl-2,3-dihydrophenanthren-4-one	298.41	33.77	0.29	13
19	007105	epidanshenspiroketallactone(表丹参螺缩酮内酯)	284.38	68.27	0.31	13
20	007127	1-methyl-8,9-dihydro-7H-naphtho 2-[5,6-g]benzofuran-6,10,11-trione	280.29	34.72	0.37	13
21	007124	neocryptotanshinone II(新隐丹参酮II)	270.35	39.46	0.23	13
22	007093	dan-shexinkum d(丹参新醌d)	336.41	38.88	0.55	12
23	007125	neocryptotanshinone(新隐丹参酮)	314.41	52.49	0.32	12

续表 1

序号	MOL ID	成分名称	MW	OB%	DL	度值
24	007111	isotanshinone II (异丹参酮 II)	294.37	49.92	0.40	12
25	002222	sugiol(柳杉酚)	300.48	36.11	0.28	11
26	007059	3- β -hydroxymethylenetanshiquinone(3-羟基亚甲基丹参醌)	294.32	32.16	0.41	11
27	007155	(6S)-6-(hydroxymethyl)-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	310.37	65.26	0.45	11
28	007156	tanshinone VI(丹参酮 VI)	296.34	45.64	0.30	11
29	007045	3 α -hydroxytanshinone II _A (3 α -羟基丹参酮 II _A)	310.37	44.93	0.44	10
30	007079	tanshinaldehyde(丹参醛 II)	308.35	52.47	0.45	10
31	007082	danshenol A(丹参醇 A)	336.41	56.97	0.52	9
32	007143	salvilenone I(鼠尾酮 I)	270.4	32.43	0.23	8
33	007130	prolithospermic acid(原紫草酸)	314.31	64.37	0.31	8
34	007107	C09092	286.5	36.07	0.25	8
35	007064	przewalskin B(紫丹参萜 B)	330.46	110.32	0.44	8
36	007068	przewaquinone B(紫丹参素 B)	292.3	62.24	0.41	8
37	007120	miltionone II(丹参醌新酮 II)	312.39	71.03	0.44	7
38	007058	formyltanshinone(醛基丹参酮)	290.28	73.44	0.42	7
39	007150	(6S)-6-hydroxy-1-methyl-6-methylol-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-quinone	312.34	75.39	0.46	7
40	007151	tanshindiol B(丹参二醇 B)	312.34	42.67	0.45	7
41	007081	danshenol B(丹参醇 B)	354.48	57.95	0.56	7
42	007070	(6S,7R)-6,7-dihydroxy-1,6-dimethyl-8,9-dihydro-7H-naphtho[8,7-g]benzofuran-10,11-dione	312.34	41.31	0.45	7
43	007071	przewaquinone F(紫丹参素 F)	312.34	40.31	0.46	7
44	007152	przewaquinone E(紫丹参素 E)	312.34	42.85	0.45	6
45	007050	3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-7-(3-hydroxypropyl)-7-methoxy-3,5-benzofurancarboxaldehyde	356.4	62.78	0.40	6
46	007085	salvilenone(鼠尾酮)	292.4	30.38	0.38	6
47	007132	(2R)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-[(Z)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acryloyl]oxy-propionic acid	360.34	109.38	0.35	5
48	001659	poriferasterol	412.77	43.83	0.76	5
49	001771	poriferast-5-en-3 β -ol	414.79	36.91	0.75	5
50	007048	(E)-3-[2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7(F)-hydroxy-benzofuran-4-yl]acrylic acid	312.29	48.24	0.31	5
51	007115	manool(泪柏醇)	304.57	45.04	0.20	4
52	007063	przewalskin A(紫丹参萜 A)	398.49	37.11	0.65	4
53	007121	miltipolone(丹参环庚三烯酚酮)	300.43	36.56	0.37	3
54	007077	sclareol(香紫苏醇)	308.56	43.67	0.21	3
55	000569	digallate	322.24	61.85	0.26	2
56	006824	α -amyrin(α -香树素)	426.8	39.51	0.76	2
57	007141	salvianolic acid G(丹酚酸 G)	340.3	45.56	0.61	2
58	007142	salvianolic acid J(丹酚酸 J)	538.49	43.38	0.72	2
59	007123	miltirone II(丹参新酮 II)	272.32	44.95	0.24	2
60	001942	isoimperatorin(异欧前胡素)	270.3	45.46	0.23	1
61	002776	baicalin(黄芩苷)	446.39	40.12	0.75	1
62	007051	6-O-syringyl-8-O-acetyl-7-shanzhiside methyl ester 6-(6-O-丁香基-8-O-乙酰基山柽苷甲酯)	628.64	46.69	0.71	0
63	007118	microstegiol(小盖鼠尾草酚)	298.46	39.61	0.28	0
64	007140	(Z)-3-[2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl (AA)-3,4-dihydroxy-phenyl]acrylic acid	314.31	88.54	0.26	0
65	007149	NSC 122421	300.48	34.49	0.28	0

2.2 药物-疾病共同靶点的筛选 检索疾病数据库 GeneCards、OMIM 获取 BC 相关靶点,然后将 2 个数据库中检索到的靶点合并,去除重复靶点后,共获得 BC 疾病靶点 9 344 个。通过丹参活性成分靶点和

BC 疾病靶点交集得到二者的共同核心靶点 39 个,见表 2;利用 Venny 2.1.0 工具绘制韦恩图,见增强出版附加材料。

2.3 PPI 网络构建及拓扑分析 于 STRING

表 2 39 个核心靶点信息

Table 2 39 core target information

序号	中文名称	靶点简称	英文名称
1	表皮生长因子受体	EGFR	epidermal growth factor receptor
2	雌激素受体 1	ESR1	estrogen receptor 1
3	白细胞介素-6	IL-6	interleukin 6
4	核受体亚家族 3 群 C 成员 1	NR3C1	nuclear receptor subfamily 3 group c member 1
5	雄激素受体	AR	androgen receptor
6	血管内皮生长因子 A	VEGFA	vascular endothelial growth factor A
7	过氧化物酶体激活受体 gamma	PPARG	peroxisome proliferator activated receptor gamma
8	孕激素受体	PGR	progesterone receptor
9	细胞色素 P450 家族 3 亚家族 A 成员 4	CYP3A4	cytochrome P450 family 3 subfamily a member 4
10	糖原合成酶 3β	GSK3B	glycogen synthase kinase 3 beta
11	核受体辅酶 1	NCOA1	nuclear receptor coactivator 1
12	RB 转录核心抑制因子 1	RB1	RB transcriptional corepressor 1
13	淀粉样 β 前体蛋白	APP	amyloid beta precursor protein
14	核受体辅酶 2	NCOA2	nuclear receptor coactivator 2
15	乙酰胆碱酯酶 (Cartwright 血型)	ACHE	acetylcholinesterase (cartwright blood group)
16	雌激素受体 2	ESR2	estrogen receptor 2
17	胆碱能受体尼古丁-2 亚基	CHRNA2	cholinergic receptor nicotinic alpha 2 subunit
18	谷胱甘肽 S-转移酶 Pi 1	GSTP1	glutathione s-transferase Pi 1
19	胆碱能受体 M1	CHRM1	cholinergic receptor muscarinic 1
20	多巴胺受体 D2	DRD2	dopamine receptor D2
21	脂肪酸合成酶	FASN	fatty acid synthase
22	核受体亚家族 3 组 C 成员 2	NR3C2	nuclear receptor subfamily 3 group c member 2
23	醛基酮还原酶家族 1 成员 B10	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1 member B10
24	检查点激酶 1	CHEK1	checkpoint kinase 1
25	胆碱能受体 M2	CHRM2	cholinergic receptor muscarinic 2
26	胱天蛋白酶-7	CASP7	Caspase-7
27	胆碱能受体 M3	CHRM3	cholinergic receptor muscarinic 3
28	胆碱能受体 M5	CHRM5	cholinergic receptor muscarinic 5
29	5-羟色胺受体 3A	HTR3A	5-hydroxytryptamine receptor 3A
30	γ-氨基丁酸 A 型受体亚单位 α1	GABRA1	gamma-aminobutyric acid type a receptor subunit alpha 1
31	前列腺素-内过氧化物合成酶 1	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1
32	胆碱能受体 M4	CHRM4	cholinergic receptor muscarinic 4
33	肿瘤蛋白 p63	TP63	tumor protein p63
34	Bcl-2 凋亡调节器	BCL2	Bcl2 apoptosis regulator
35	内皮素转换酶 1	ECE1	endothelin converting enzyme 1
36	转录因子 7	F7	transcription factor 7
37	丝氨酸蛋白酶 1	PRSS1	serine protease 1
38	肾上腺素受体 α1A	ADRA1A	adrenoceptor alpha 1A
39	降钙素受体	CALCR	calcitonin receptor

(<https://cn.string-db.org/>)数据库中,导入39个丹参-BC共同核心靶点,获取靶点蛋白-靶点蛋白之间的相互作用网络数据,再应用Cytoscape 3.7.1软件可视化PPI网络。筛选度值排名前30的核心靶点,其中EGFR排第一位。见增强出版附加材料。

2.4 GO和KEGG富集分析 于DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)在线数据库中,导入39个丹参-BC共同核心靶点,分别从BP、CC和MF3个方面进行功能富集分析,结果显示丹参治疗BC靶点的生物过程与细胞对类固醇激素、单胺类刺激以及儿茶酚胺刺激的反应等相关;细胞组分主要富集于突触前膜、突触后膜及其内在成分等;分子功能则与神经递质受体活动、咽后神经递质受体的活动、核受体活性、配体激活、转录因子激活、药物结合、类固醇结合、DNA结合型转录因子的激活、乙酰胆碱受体活性、G蛋白偶联胺类受体活性等密切相关。见增强出版附加材料。

利用DAVID数据库对潜在靶点进行KEGG通路分析,根据 $P < 0.05$ 进行筛选,并根据 P 值由高到低进行排序,选择前20个条目建立富集图。潜在靶点的通路主要涉及神经活性配体与受体的相互作用、雌激素信号传导途径、钙信号传导途径、PI3K/Akt信号传导途径、EGFR酪氨酸激酶抑制剂的抗性、内分泌抗性、HIF1信号通路等,并参与乳腺癌、前列腺癌、胃癌、膀胱癌和胰腺癌等多种肿瘤的发生与发展。见增强出版附加材料。

2.5 实验验证

2.5.1 Tan II_A、CPT及LUT对膀胱癌细胞T24、5637的增殖抑制活性 CCK-8结果显示,与空白组比较,Tan II_A、CPT及LUT能明显抑制T24、5637细胞的增殖($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在T24细胞系中,Tan II_A、CPT及LUT的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为5.898、6.973、10.26 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;在5637细胞系中,Tan II_A、CPT及LUT的IC₅₀值分别为3.42、4.627、10.17 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果提示,相较于T24细胞,Tan II_A、CPT及LUT对5637细胞的增殖抑制作用更强;同时在5637细胞中,Tan II_A的增殖抑制作用优于CPT及LUT。因此,后续凋亡及Western blot实验选择5637细胞系。见表3。

2.5.2 Tan II_A、CPT及LUT诱导膀胱癌细胞5637凋亡 结果显示,与空白组比较,经不同浓度(4、8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Tan II_A、CPT及LUT作用后,5637细胞凋亡率明显升高($P < 0.05$),5637细胞凋亡率由高到低依次为Tan II_A、CPT及LUT,因此后续Western

表3 Tan II_A、CPT及LUT对膀胱癌细胞T24、5637的增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Tan II_A, CPT and LUT on the proliferation of bladder cancer cells T24 and 5637 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

细胞	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率/%		
		Tan II _A	CPT	LUT
T24		100.00±2.08 ²⁾	100.00±0.20	100.00±2.09
	1	117.20±2.49 ²⁾	96.11±2.68	94.02±2.43 ¹⁾
	2	110.50±2.78 ²⁾	97.41±1.86	90.15±1.55 ²⁾
	4	86.93±1.57 ²⁾	89.34±1.75 ²⁾	73.52±4.06 ²⁾
	8	17.58±0.13 ²⁾	54.47±1.17 ²⁾	49.36±0.91 ²⁾
	16	8.43±0.31 ²⁾	27.30±0.47 ²⁾	45.63±0.93 ²⁾
	32	6.43±0.22 ²⁾	24.47±0.40 ²⁾	34.77±0.74 ²⁾
5637		100.00±3.93	100.00±2.03	100.00±1.35
	1	81.19±1.95 ²⁾	103.96±0.70	84.43±9.80 ²⁾
	2	76.66±1.01 ²⁾	89.98±2.53 ¹⁾	90.23±4.83 ¹⁾
	4	41.06±0.73 ²⁾	56.37±1.47 ²⁾	77.39±5.24 ²⁾
	8	17.44±1.37 ²⁾	21.30±0.89 ²⁾	58.25±2.01 ²⁾
	16	13.82±1.58 ²⁾	8.59±0.14 ²⁾	36.14±2.17 ²⁾
	32	6.87±0.23 ²⁾	4.29±0.62 ²⁾	18.91±0.55 ²⁾

注:分别与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表4、表5同)

blot实验选择Tan II_A进行干预,见表4。

表4 Tan II_A、CPT及LUT对5637细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

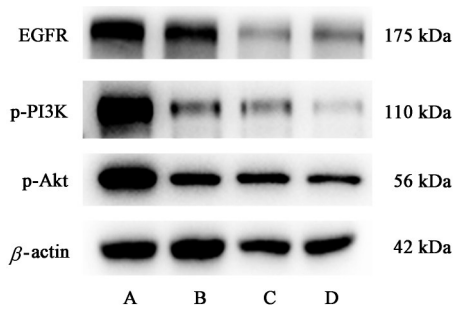
Table 4 Effect of Tan II_A, CPT and LUT on apoptosis of 5637 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%		
		Tan II _A	CPT	LUT
空白组		3.33±0.24	1.90±0.33	2.25±0.19
给药组	4	17.19±0.63 ²⁾	13.20±0.23 ²⁾	3.88±0.28 ²⁾
	8	28.96±2.32 ²⁾	14.74±0.49 ²⁾	10.41±0.26 ²⁾

2.5.3 Tan II_A对5637细胞EGFR、p-PI3K及p-Akt蛋白表达的影响 Western blot结果显示,随着Tan II_A给药浓度升高,与空白组比较,5637细胞中EGFR、p-PI3K及p-Akt相对表达水平降低,并且呈浓度依赖性,同时蛋白表达均存在统计学差异($P < 0.05$),见图1、表5。

3 讨论

膀胱癌是泌尿系较为常见的尿路上皮癌,目前西医治疗疗效显著,但医患双方仍面临着BC术后复发率高,生活质量低等问题。中医药作为我国传统医学,在膀胱癌辅助治疗方面也发挥着至关重要的作用。既往研究报道中药复方丹参饮及丹参有效单体成分不仅具有抑制膀胱肿瘤生长的作用,同



注: A. 空白组; B~D. 给药组(4, 8, 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

图1 Tan II_A对5637细胞EGFR、p-PI3K及p-Akt蛋白表达电泳
Fig. 1 Electrophoresis of Tan II_A on EGFR, p-PI3K and p-Akt protein expression in 5637 cells

表5 Tan II_A对5637细胞EGFR、p-PI3K及p-Akt蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Tan II_A on EGFR, p-PI3K and p-Akt protein expression in 5637 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	EGFR/ $\beta\text{-actin}$	p-PI3K/ $\beta\text{-actin}$	p-Akt/ $\beta\text{-actin}$
空白组		0.92±0.19	0.97±0.13	1.00±0.15
给药组	4	1.06±0.06	0.38±0.07 ²⁾	0.73±0.09
	8	0.47±0.11 ²⁾	0.28±0.10 ²⁾	0.76±0.17 ¹⁾
	16	0.58±0.02	0.13±0.03 ²⁾	0.48±0.26 ¹⁾

时还能改善化疗引起的胃肠道抑制作用^[9-11],但由于丹参所含成分众多,其抗膀胱癌的活性物质及作用机制未得到清晰地阐明。

本研究利用网络药理学,深入挖掘丹参治疗BC的有效成分、潜在靶点和作用机制,并结合体外细胞实验CCK-8检测增殖活性、碘化丙啶染色法检测凋亡以及Western blot检测关键蛋白表达情况进行验证。共筛选到丹参作用于BC的活性成分65个,潜在靶点42个。同时通过PPI网络筛选出EGFR度值排名第一的核心靶点。EGFR属于受体酪氨酸激酶(RTKs)的ErbB家族,EGFR及其配体在BC中表达显著上调,同时EGFR通路在BC中被激活,从而影响BC的分级、分期及预后^[12]。WANG等^[13]发现长链非编码RNA EGFR/AS1可以通过维持EGFR mRNA的稳定性从而促进EGFR基因的表达,进而促进BC的转移。ZOU等^[14]发现类泛素蛋白FAT10通过激活EGFR/Akt/HK2轴,正向调控BC细胞的增殖与进展。HUANG等^[15]发现BC细胞与血管内皮细胞相互作用,通过CXC趋化因子和CXCR2信号通路触发EGFR信号,进而促进BC的进展。

KEGG通路富集结果显示,丹参治疗BC的相关通路主要为雌激素信号传导途径、钙信号传导途

径、PI3K/Akt信号通路等;同时与乳腺癌、前列腺癌、胃癌、膀胱癌、胰腺癌等肿瘤发生发展密切相关。PI3K/Akt信号通路由PI3K及其下游分子Akt组成^[16]。Akt作为PI3K信号通路下游的主要分子,由Akt1、Akt2、Akt3 3个亚型组成^[17]。PI3K/Akt信号通路在许多肿瘤发生过程中被异常激活,同时也在肿瘤的发生发展过程中起着至关重要的作用;此外,PI3K/Akt通路还参与了调控癌细胞的生存、增殖、侵袭和迁移^[18-19]。YAN等^[20]发现黄芩素在体内外抑制MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞增殖,诱导细胞凋亡和自噬,并下调p-Akt、p-mTOR蛋白的表达,说明黄芩素可能是通过抑制PI3K/Akt通路抑制乳腺癌细胞生长。有研究报道,N-钙黏蛋白和磷酸化EGFR的表达与Akt的激活和侵袭性行为调节相关,N-钙黏蛋白和p-EGFR的抑制则会降p-Akt的激活^[21]。研究发现,MUC13过表达通过与EGFR相互作用并激活EGFR/PI3K/Akt信号通路,在体内外促进肝内胆管癌(iCCA)转移,同时,PI3K/Akt信号通路的激活有助于MUC13在iCCA细胞中的致癌作用^[22]。本实验发现Tan II_A可以下调EGFR、p-PI3K、p-Akt蛋白的表达,提示Tan II_A可能是通过抑制PI3K/Akt通路抑制膀胱癌细胞生长。

综上所述,本研究创新性的应用网络药理学和体外细胞实验初步揭示了丹参治疗BC具有多靶点-多通路的特点,同时,丹参有效成分Tan II_A、CPT及LUT均能抑制BC细胞的增殖,并诱导其凋亡。其中,Tan II_A抑制BC细胞生长的作用最为显著,同时降低EGFR、p-PI3K、p-Akt蛋白的表达,说明Tan II_A可能是通过抑制EGFR/PI3K/Akt信号通路诱导BC细胞凋亡,这一结论不仅拓展了BC治疗的研究思路,还丰富了丹参及其单体抗肿瘤的基础研究。然而,本研究还存在一些有待完善的地方,实验结果仍需在动物模型上进一步验证,丹参及其单体成分对BC的具体调控机制还有待深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, 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 (3): 209-249.
- [2] DAVIS R, JONES J S, BAROCAS D A, et al. Diagnosis, evaluation and follow-up of asymptomatic microhematuria (AMH) in adults: AUA guideline [J].

- J Urol, 2012, 188(6 Suppl):2473-2481.
- [3] SHARMA S, KSHEERSAGAR P, SHARMA P. Diagnosis and treatment of bladder cancer [J]. Am Fam Physician, 2009, 80(7):717-723.
- [4] BELLMUNT J, ORSOLA A, LEOW J J, et al. Bladder cancer: ESMO practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. Ann Oncol, 2014, 25 Suppl 3:40-48.
- [5] CHANG S S, BOCHNER B H, CHOU R, et al. Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO guideline [J]. J Urol, 2017, 198(3):552-559.
- [6] 袁慧鑫, 李秀惠. 丹参酮 II_A 影响肝细胞癌发生发展的作用机制 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2022, 32(1): 93-96.
- [7] 袁萍, 姜思琴, 聂亦然, 等. 丹参注射液通过干扰肿瘤细胞与血小板相互作用抑制 SKOV3 细胞体外增殖 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(23):59-65.
- [8] 楼招欢, 夏榕蔓, 李晓娟, 等. 丹参二萜醌活化 ERS 介导的凋亡通路抗肺癌作用机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24):4900-4907.
- [9] 蒋远斌, 王铀, 郭宇, 等. 丹参饮对化疗后气阴两虚型膀胱癌患者胃肠道抑制及免疫功能的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):191-195.
- [10] KIM C J, TERADO T, TAMBE Y, et al. Cryptotanshinone, a novel PDK 4 inhibitor, suppresses bladder cancer cell invasiveness via the mTOR/ β -catenin/N-cadherin axis [J]. Int J Oncol, 2021, 59(1):40.
- [11] HUANG S Y, CHANG S F, LIAO K F, et al. Tanshinone II_A inhibits epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer cells via modulation of STAT3-CCL2 signaling [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8):1616.
- [12] REBOUSSOU S, BERNARD-PIERROT I, DE REYNIÈS A, et al. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype [J]. Sci Transl Med, 2014, 6(244):244ra91.
- [13] WANG A, JIANG A, GAN X, et al. EGFR-AS1 promotes bladder cancer progression by upregulating EGFR [J]. Biomed Res Int, 2020, 2020:6665974.
- [14] ZOU Y, DU Y, CHENG C, et al. FAT10 promotes the progression of bladder cancer by upregulating HK2 through the EGFR/Akt pathway [J]. Exp Cell Res, 2021, 398(1):112401.
- [15] HUANG Z, ZHANG M, CHEN G, et al. Bladder cancer cells interact with vascular endothelial cells triggering EGFR signals to promote tumor progression [J]. Int J Oncol, 2019, 54(5):1555-1566.
- [16] JAFARI M, GHADAMI E, DADKHAH T, et al. PI3K/Akt signaling pathway: Erythropoiesis and beyond [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3):2373-2385.
- [17] YANG Q, JIANG W, HOU P. Emerging role of PI3K/Akt in tumor-related epigenetic regulation [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59:112-124.
- [18] XU F, NA L, LI Y, et al. Roles of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours [J]. Cell Biosci, 2020, 10(1):54.
- [19] 赵革, 张丹, 杨小会, 等. 丁香活性组分抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(5):1197-1204.
- [20] YAN W, MA X, ZHAO X, et al. Baicalein induces apoptosis and autophagy of breast cancer cells via inhibiting PI3K/Akt pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12:3961-3972.
- [21] WALLERAND H, CAI Y, WAINBERG Z A, et al. Phospho-Akt pathway activation and inhibition depends on N-cadherin or phospho-EGFR expression in invasive human bladder cancer cell lines [J]. Urol Oncol, 2010, 28(2):180-188.
- [22] TIEMIN P, FANZHENG M, PENG X, et al. MUC13 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression via EGFR/PI3K/Akt pathways [J]. J Hepatol, 2020, 72(4):761-773.

[责任编辑 顾雪竹]