

基于系统药理学方法筛选抗急性髓系白血病的中药活性分子

马晓茹¹, 周维维¹, 张闪闪¹, 王吉烨¹, 王永华¹, 张波^{1,2*}

(1. 石河子大学药学院, 新疆石河子 832002;

2. 省部共建新疆特种资源植物药教育部重点实验室, 新疆石河子 832002)

[摘要] 目的:筛选抗急性髓系白血病(AML)中药活性分子。方法:搜集治疗急白草药及化合物,通过系统药理学方法预测药物成药性质,潜在靶点以及潜在巯基消耗特性。选择口服生物利用度、类药性和巯基消耗活性较高的紫草素作为验证分子。构建潜在活性化合物-靶点、靶点-疾病网络,通过拓扑学特性筛选关键靶点及潜在活性分子。利用谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒及邻苯二甲醛(OPA)荧光法检测加入紫草素后还原型GSH含量变化。数字表达谱芯片检测紫草素 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理HL-60细胞48 h后基因表达。结果:在治疗AML的40味草药的4 024个化合物中,经过口服生物利用度(OB),类药性(drug-likeness, DL)及巯基消耗特性筛选获得72个分子,最后通过与AML相关靶点联系筛选出10个潜在活性化合物。实验验证紫草素消耗细胞及化学体系内GSH,预测靶点能够调控基因芯片的差异基因($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 48 h)。结论:本方法可用于研究中药的物质基础,有助于挖掘治疗AML中药活性分子,为抗AML药物研究提供借鉴。

[关键词] 系统药理学; 急性髓系白血病; 紫草素

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0196-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050196

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1503.028.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:03

Screening of Anti-acute Myelocytic Leukemia Ingredients in Traditional Chinese Medicine Based on Systematic Pharmacology Approach

MA Xiao-ru¹, ZHOU Wei-wei¹, ZHANG Shan-shan¹, WANG Ji-ye¹, WANG Yong-hua¹, ZHANG Bo^{1,2*}

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832002, China;

2. Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources, Ministry of Education, Shihezi 832002, China)

[Abstract] **Objective:** Present study aims to screen the active ingredients of traditional Chinese medicine for treatment of acute myelocytic leukemia. **Method:** Herbs and compounds for acute myelocytic leukemia (AML) were collected, and the systematic pharmacology approach was used to predict the nature of medicines, potential targets and potential thiol consumption characteristics. shikonin with higher oral Bioavailability (OB), drug-likeness (DL) and thiol consumption activities were selected as the verification molecule. The potential targets of screened compounds were predicted to build potential compound-target and potential target-disease networks. Key targets and potential active compounds were screened according to topological characteristics. Glutathione (GSH) content was detected by GSH detection kit and OPA fluorescence method after shikonin treatment. Digital gene expression profile sequencing analysis was used to verify the accuracy of the predicted targets after $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ shikonin treatment on HL-60 cells for 48 h. **Result:** After *in silico* screening, we identified 72 active compounds

[收稿日期] 20160418(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460566);石河子大学杰青项目(2013ZRKXJQ04);石河子大学对口支援高校名师“结对子”计划项目(SDJDZ201503)

[第一作者] 马晓茹, 硕士, 从事肿瘤药理学和系统药理学研究, Tel:15309932390, E-mail: mxiaoru@sina.cn

[通讯作者] *张波, 博士, 教授, 从事肿瘤药理学和系统药理学研究, Tel:0993-2057670, E-mail: bozhang_lzu@126.com

with appropriate OB, DL and thiol consumption characteristics among 4 024 compounds in 40 herbs for acute myelocytic leukemia. Then 10 potential active compounds were obtained which could act on AML related targets. The results verified that shikonin depleted GSH after shikonin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) treatment on HL-60 cells and chemical system. The predicted targets could regulate the expression of varied genes in gene chip ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h). **Conclusion:** According to the study, systematic pharmacology method and experimental verification were helpful to excavate the potential active ingredients for treatment of acute myelocytic leukemia.

[**Key words**] systematic pharmacology; acute promyelocytic leukemia; shikonin

急性髓系白血病 (acute myelocytic leukemia, AML) 是一种血液系统恶性肿瘤, 其主要生物学特征为造血细胞的增殖失控、分化成熟受阻、正常凋亡程序失控等。美国每年约有 18 000 人被诊断为 AML 患者, 且 AML 致死率极高。尽管效果不佳, 易产生多药耐药性, 且复发率高, 7 + 3 疗法 (连续静脉注射阿糖胞苷 7 d, 静脉注射蒽环霉素 3 d) 仍然是目前普遍使用的治疗手段^[1]。该疗法于 1970 年由美国癌症和白血病研究组 B 开发。近 40 年来, AML 的治疗手段没有较大进展。

作为新药研发的重要资源, 天然产物具有不可估量的价值, 大量来自天然产物的化合物已被批准开展临床实验并上市^[2]。临床研究发现中药方剂对 AML 具有良好的治疗效果, 如紫金锭、益气养阴方、益气健脾补肾汤、龙胆泻肝汤、犀角地黄汤和青黄散等^[3]。由于中药是多组分、多靶点及其组分间协同作用的复杂体系, 使其深入研究呈现巨大困难。使用传统的“湿”实验测定中药成分的生物活性具有耗时长, 处理成本高和试验条件苛刻等缺点。因此, “干”实验是名副其实的首选方法。

系统药理学是多学科交叉的产物, 已被成功应用于中医药学的各方面研究中^[4]。LI 等^[5]使用系统药理学的方法发现补肺益肾汤具有预防慢性阻塞性肺炎、心室肥大的疗效, 通过抑制炎症细胞因子和肥大刺激因子表达, 影响胶原沉积发挥疗效。LI 等^[6]使用系统药理学的方法筛选治疗心血管疾病的中草药活性分子, 并开发出对心血管有效的新草药组合“丹山红”, 使用大鼠心肌梗死模型验证其效果, 高剂量组 [射血分数 (41.7 ± 3.64)%, 缩短分数 (23.23 ± 0.82)%] 的作用与福辛普利阳性药组 [射血分数 (45.47 ± 2.04)%, 缩短分数 (23.18 ± 1.20)%] 十分接近。

本文以方剂中抗急性白血病常用草药为研究对象, 利用系统药理学方法筛选潜在活性分子, 构建潜在活性化合物-靶点、靶点-疾病网络, 通过拓扑学特性筛选关键靶点及潜在活性分子, 结合实验验证。

以期发现具有抗 AML 的分子, 并为后续研究提供借鉴。

1 材料

人早幼粒白血病细胞 HL-60 细胞株购自于中国科学院上海细胞库, 在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养于含 16% 胎牛血清的 IMDM 培养基中, 含青霉素 ($100 \text{ kU} \cdot \text{L}^{-1}$) 和链霉素 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 取对数生长期细胞用于实验。

紫草素 (纯度 $\geq 98\%$, 美国 Sigma 公司, 批号 SLBL29930); 还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 邻苯二甲醛 (OPA) (上海生工生物工程股份有限公司, 批号分别为 MC0118B5013J, HJ01053BJ)。GSH/GSSG 比率测定试剂盒 (美国 BioVision 公司, 批号 1G220604)。细胞培养采用 IMDM 培养基 (美国 Gibco 公司, 批号 1774694) 和胎牛血清 (以色列 Biological Industries 公司, 批号 1525734)。

Forma 型 CO_2 细胞培养箱, 3001 型多功能酶标仪 (美国 Thermo 公司); Centrifuge 5430R, 5424 型低温离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

2 方法

2.1 构建治疗急性白血病的常用草药及其分子数据库构建 为了获得治疗急性白血病的草药, 笔者通过 CNKI 和 PubMed 数据库, 搜索关键词草药/herbal medicine 和急性白血病/Acute leukemia, 挖掘治疗白血病的常用 40 味草药, 构建草药数据库, 并通过文献阅读及数据库挖掘, 搜寻抗急性白血病草药所包含的化合物。从数据库中获得化合物, 进一步通过文献阅读验证化合物的准确性, 并删除重复分子。所有的化合物结构从 PubChem 数据库中获得, 被保存为 mol2 格式。使用 E-dragon (<http://www.vcclab.org/lab/edragon/>) 在线免费软件计算 1 556 个分子描述符, 为下一步口服生物利用度的预测提供输入数据。

2.2 口服生物利用度预测 口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) 是指药物经口服给药后药物被机体吸收进入全身血液循环的相对量和速率^[7]。

西北农林科技大学王永华教授实验室建立口服生物利用度计算机预测模型 OBioavail. 1, 在该模型中, 采用支持向量机为建模方法, 该模型由 805 个已知 OB 值且结构不同的分子的分子描述符, 整合代谢 (细胞色素 P4503A4) 和转运 (P 糖蛋白) 信息构建训练集, 并通过五倍交叉验证以及独立外部验证来检验模型的可靠性。结果表明, 支持向量机方法的训练集的相关系数 $r^2 = 0.80$, 标准估计误差为 0.31。测试集的相关系数 $Q^2 = 0.72$, SEP = 0.22。由于肠道和肝脏的初步萃取率和吸收率分别为 43%, 44%。本文应用该模型预抗急性白血病草药中的化合物的 OB 值, 并筛选出 OB $\geq 60\%$ 的化合物, 这些化合物具有较高的生物利用度。

2.3 类药性评估 类药性 (drug-likeness, DL) 是指化合物与已知药物的相似性。可以作为该化合物与上市药物接近程度的一个指标^[7]。在本研究中, 药物的 DL 通过 Tanimoto 系数计算得到, 定义如下:

$$f(A, B) = \frac{A \cdot B}{|A|^2 + |B|^2 - A \cdot B}$$

其中 A 代表新化合物, B 代表数据库 Drugbank 中基于 Dragon 软件计算得到描述符的所有 6 511 个化合物分子的平均类药性指数 (<http://www.drugbank.ca/>)。DL ≥ 0.18 (整个相似度的平均值) 则认为该化合物具有类药性。

2.4 巯基消耗特性评估 As₂O₃ 和萸环类抗生素等药物改变氧化还原态与抑制白血病细胞生长有关^[8], 而这些药物的化学结构特征在助氧化、促活性氧产生方面并不具有一致性, 即药物可能通过氧化以外的方式来消耗细胞内的还原力, 进而改变氧化还原态水平, 例如消耗巯醇蛋白与 GSH, 改变白血病细胞恶性表型^[5], 即巯基可能作为一个化学靶点参与白血病的治疗。为提高药物的靶向性, 本研究将巯基消耗特性作为筛选标准。QSAR 软件 (OECD QSAR 工具箱 DPRA Cysteine peptide, 3.2.0 版本, 2013, <http://www.qsartoolbox.org/>) 筛选具有巯基消耗特性的活性分子。DPRA Cysteine peptide 的原理为使用已被实验验证消耗半胱氨酸的 112 个化合物, 从中提取 32 个具有消耗巯基的特征结构构建训练集, 与待测化合物比对, 若一致则认定具有消耗巯基的性质^[9]。

2.5 草药特征映射 草药特征映射方法是可视化草药中活性成分的理化特征, 从而直观得到其与药理学活性关系的方法^[10], 使用主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA), 将多维数据降维处理。

QSAR3.2.0 版本计算与药物相关的物理化学特征相关的参数, 包括相对分子质量、分子环数、辛醇-水分配系数、氢键供体/受体、可旋转键数、亲水因子和拓扑极性表面积。从 dragbank 数据库中搜集到 19 种已被 FDA 批准的治疗白血病的小分子药物, 将此化合物与经虚拟筛选 (OB, DL 和巯基消耗活性筛选) 得到的草药分子使用 PCA 法共同投射到空间上, 比较其药理活性的异同。

2.6 靶点预测 本文利用王永华教授实验室建立的计算机预测药物靶点方法^[7], 该模型整合了大规模的化学、基因组和药物数据, 采用了比较常用的机器学习建模方法支持向量机和随机森林, 建立模型的数据来自 Drugbank 数据库。该方法对预测已知结合关系 (平均敏感度为 72%) 和已知非结合关系 (平均特异性为 82%) 表现都很好。验证的平均准确率为 77.5%, 受试物测试曲线的曲线下面积为 85.2%。将筛选出的潜在活性化合物, 根据该方法预测其所关联的靶点。

2.7 潜在活性化合物-靶点, 靶点-疾病网络构建与分析 为了阐明潜在活性化合物-靶点和靶点-疾病相关关系。笔者构建了潜在活性化合物-靶点网络和靶点-疾病的可视化网络。若经预测化合物与靶点存在对应关系, 则在网络中化合物与靶点相连接。与靶点相关的疾病信息从 CTD, KEGG, PharmGKB 和 TTD 数据库中获得。所有的网络图利用 Cytoscape 3.1.1 创建。疾病根据医学主题词分类 (<https://www.nlm.nih.gov/>)。在筛选体系内, 紫草素被预测有优良的 OB, DL 和巯基消耗特性, 与白血病靶点作用联系密切, 且诱导白血病细胞凋亡和分化, 所以选择紫草素作为实验化合物, 进一步验证预测靶点的准确性。

2.8 细胞增殖实验 为确定紫草素对诱导 HL-60 细胞凋亡、分化的适宜浓度, 进行细胞增殖实验。调节 HL-60 细胞密度为 8×10^4 个/mL, 均匀接种于 96 孔板, 分别用终质量浓度为 25, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的紫草素处理细胞, 每组设置 6 个复孔, 培养 48 h 和 72 h 后加入质量浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 20 μL , 继续培养 4 h 后用平板离心机 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 小心弃去上清液, 再加 DMSO 150 μL 震荡 10 min, 酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度 $A^{[11]}$ 。按下式计算药物的体外生长抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药组}}}{A_{\text{空白组}}} \times 100\%$$

2.9 GSH 试剂盒, OPA 荧光法分别测定紫草素对

细胞及化学体系内 GSH 含量的影响 为验证 QSAR 预测的准确性,分别检测紫草素对化学体系和细胞内 GSH 含量的影响。细胞密度为 5×10^5 个/mL,加紫草素($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱孵育 2, 4, 8, 12, 24 h 后,收集细胞,按照谷胱甘肽测试试剂盒说明进行检测。

在 96 孔板内加入等量不同浓度的 GSH 溶液和紫草素溶液及磷酸缓冲液,室温反应 1 h 后,分别加入等量的质量分数为 0.1% 的 OPA 的甲醇溶液,暗处反应 15 min 后,酶标仪选定激发波长为 340 nm,发射波长为 420 nm,测定其荧光强度。

2.10 数字表达谱芯片检测紫草素调控差异基因 为比对预测靶点与数字表达谱芯片差异基因的联系,委托上海伯豪基因完成(合同号 BH14896)。HL-60 细胞分为空白对照组和紫草素组(48 h, $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。

2.11 数据统计 采用 SPSS 19.0 统计软件,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 治疗急性白血病草药的收集及其活性化合物的筛选 通过文献挖掘,发现常用治疗急性白血病的草药包括:白花蛇舌草、白茅根、白芍、白术、百部、板蓝根、半枝莲、败酱草、冰片、陈皮、赤芍、川芎、丹参、当归、党参、地骨皮、莪术、茯苓、甘草、枸杞子、虎杖、黄精、黄芪、黄芩、金银花、连翘、牡丹皮、麦冬、女贞子、人参、桑寄生、熟地黄、太子参、天花粉、五味子、玄参、薏苡仁、知母、栀子、紫草。通过文献阅读及 TC MSP 数据库,经过去重处理收集到 4 024 个化合物。使用方法 2.2 及 2.3 项,筛选出 $\text{OB} \geq 60\%$ 和 $\text{DL} \geq 0.18$ 的 743 化合物。再使用方法 2.4 筛选出具有巯基消耗特性的化合物,最终获得 72 个具有优良药代动力学性质的化合物,为下一步的工作提供基础。

3.2 草药特征映射 如图 1 所示,所有的描述符变量由 8 个主成分被压缩成 2 个主成分,共累计解释描述符数据变量的 85.5%。第一个主成分解释全部信息的 68.121%,第二个主成分总共解释总变量的 17.451%,且每个成分对第一个主成分贡献都是均等的。通过虚拟筛选获得的大部分草药分子之间,及与部分西药在空间中距离很近,具有类似的物理化学性质,提示他们可能具有类似的药理活性,即这些来自不同草药的重叠活性化合物的靶点特征就有可能是重合的。

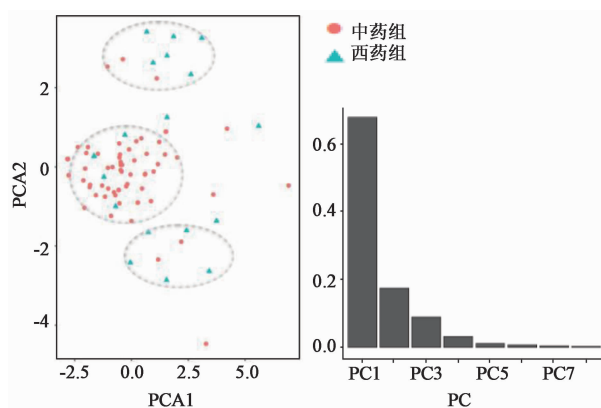


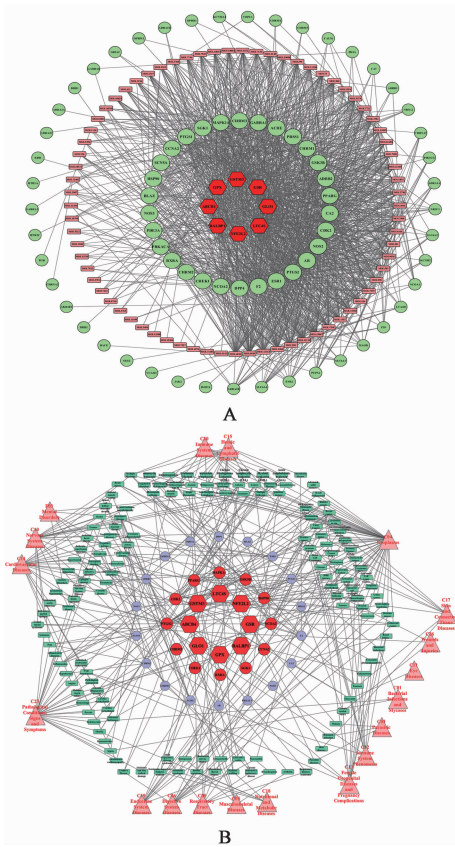
图 1 中药与西药活性分子物理化学性质主成分分析

Fig. 1 Principal components analysis of physical and chemical properties of active molecules in Chinese medicines and western medicines.

3.3 活性化合物-靶点网络构建 如图 2A 所示,红色矩形代表潜在活性化合物,最外圈的绿色圆形代表作用较少的靶点。内圈的绿色和红色靶点代表着有较多化合物作用的靶点。急性白血病的中医分型分为 5 种,分别为热毒炽盛型、瘀血停滞型、痰热内积型、气血两虚型和气阴两虚型。不同的草药分别对应不同的证,例如黄芩和当归对应痰热内积型,茯苓和甘草对应气血两虚型,麦冬和女贞子对应气阴两虚型。由于中医具有同病异治的特性,即治疗同一种疾病的不同草药所对应的靶点可能有重合的部分。故本研究搜集 40 种作用于不同证的草药,挖掘对急性白血病有效的分子。有趣的是笔者的化合物-靶点网络包括了 72 个化合物,83 个靶点,953 条边,即平均每个化合物对应 13.1 个靶点,平均每个靶点与 11.5 个化合物相关联,提示靶点作用的网络具有较高的集中性。

3.4 靶点-疾病网络构建 如图 2B 所示的靶点-疾病网络图中,高频靶点与白血病密切相关。例如 RXRA,作为全反式维甲酸的受体,能够调控肿瘤细胞增殖和分化,在白血病治疗方面发挥重要作用^[12]。有研究认为 HSP90 可以作为一个治疗白血病的靶点,与促进白细胞增殖、抑制凋亡的信号转导有关^[13]。PTGS2, CDK2 和 NOS2 均为已上市白血病药物的作用靶点^[14]。高频靶点中 AR, ESRI, MAPK14, ABCB4 及低频靶点中 JAK2, TOP2A 等靶点均显示和肿瘤疾病的治疗联系紧密。

3.5 紫草素对 HL-60 细胞增殖的抑制量效与时效关系 不同浓度紫草素作用 HL-60 细胞不同时间,紫草素可以抑制 HL-60 细胞增殖,呈浓度与时间依赖性,其 48, 72 h IC_{50} 分别 $150, 75 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 且



A. 潜在活性化合物-靶点网络; B. 靶点-疾病网络

图 2 系统药理学网络构建

Fig. 2 Systems pharmacology approach network

根据前期报道^[3], 选择紫草素质量浓度为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

表 1 紫草素对 HL-60 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of Shikonin on proliferation of HL-60 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$) %

组别	质量浓度 $/\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率	
		48 h	72 h
空白	0	-	-
紫草素	25	$10.65 \pm 1.82^{1)}$	$27.09 \pm 1.41^{2)}$
	50	$23.09 \pm 2.26^{2)}$	$35.02 \pm 2.05^{2)}$
	100	$39.02 \pm 3.78^{2)}$	$51.59 \pm 2.42^{2)}$
	200	$58.21 \pm 2.74^{2)}$	$67.21 \pm 2.75^{2)}$
	400	$74.66 \pm 1.98^{2)}$	$83.89 \pm 1.25^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3 同)。

3.6 实验验证紫草素消耗 HL-60 细胞及化学体系内 GSH 紫草素 ($100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 HL-60 细胞后, GSH 含量在 12 h 后出现下降趋势, 提示紫草素消耗细胞内 GSH (图 3)。随着紫草素浓度的增加, 反应体系的荧光强度不断变小, 即 GSH 浓度浓度呈现量效性减少。紫草素 $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时的荧光强度即显著

下降。提示紫草素可以与 GSH 发生化学反应, 产生消耗 GSH 的显著效果 (图 4)。

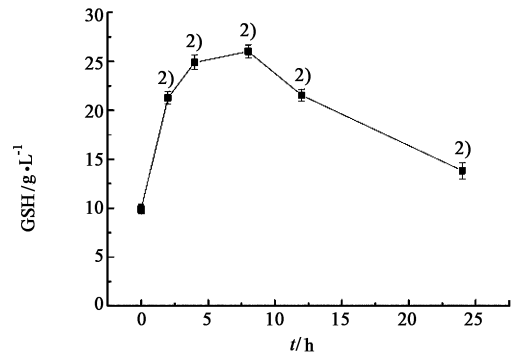


图 3 紫草素作用 HL-60 细胞不同时间对 GSH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of Shikonin on content of GSH in HL-60 cells at different time points ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

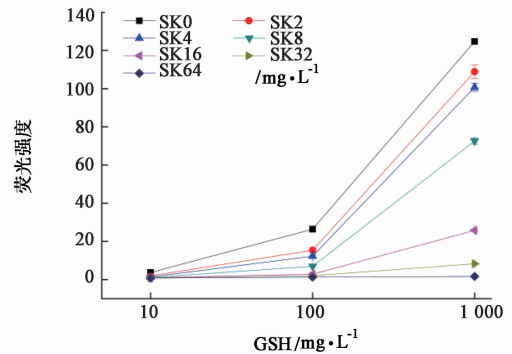


图 4 紫草素浓度对荧光强度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of Shikonin on fluorescence intensity ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.7 紫草素调节芯片差异基因与预测靶点蛋白质互作网络构建 通过 string 数据库预测芯片差异基因与预测靶点蛋白质互作关系, 建立预测靶点-差异

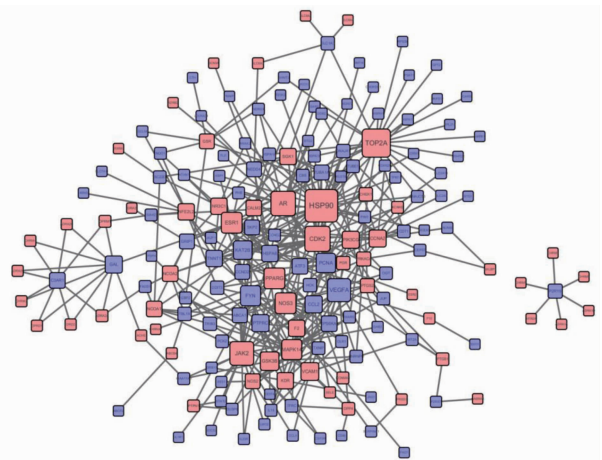


图 5 差异基因与预测靶点蛋白质互作网络

Fig. 5 Interaction network of differentially expressed genes and predicted target protein

基因之间的蛋白质互作网络 (protein-protein interaction network, PPI)。如图 5 所示,红色矩形代表预测靶点,蓝色矩形代表基因芯片差异基因,矩形面积越大则代表该节点具有较高的度。83 个预测靶点中,80 个靶点与数字表达谱芯片差异基因有联系,预测靶点在 PPI 网络中具有较高的度,在图中具有最高的度靶点的前 5 位,分别为 HSP90(31),TOP2A(25),CDK2(21),AR(20),JAK2(19),均为预测靶点且与白血病相关。部分预测靶点(红色矩形)在图中占据中心位置,提示预测靶点对芯片差异基因具有调控作用。此外,在基因芯片的差异基因中,VEGFA, FYN 和 PCNA 具有较高的度(18,14,13)。Song 等^[15]报道

VEGFA 蛋白在全反式维甲酸诱导的 HL-60 细胞分化的过程中扮演重要的角色。FYN 能够改变 HL-60 细胞微管蛋白聚集从而调控分化^[16]。PCNA 表达增多可以促进 AML 细胞的增殖^[17]。以上证据指出受到预测靶点影响较大的差异基因在急性白血病的进程中具有重要作用,预测靶点能够充分调节差异基因从而影响 AML 治疗。通过文献阅读及分析靶点在 PPI 网络中的地位,发现 RXRA, PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4, JAK2, TOP2A 和 NOS3 在白血病治疗中发挥作用,因此以这些靶点为“饵”,在 72 个化合物中寻找相关分子。表 2 展示与靶点联系较高的前 10 位化合物。

表 2 抗 AML 化合物的筛选结果

Table 2 Screening results of anti-AML compounds

潜在活性分子名称	OB/%	DL	巯基消耗活性	化合物所对应靶点
goshuyamide I	83.19	0.39	+	RXRA, PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4, NOS3
tecomin	65.41	0.13	++	RXRA, PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4, NOS3
<i>N</i> -(2,5-dimethoxyphenyl)-4-methoxybenzamide	60.7	0.18	+	RXRA, PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4
isoliquritigenin	85.32	0.15	++	PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4, JAK2
goshuyamide II	69.11	0.43	+	PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4, NOS3
przewaquinone B	62.24	0.41	++	RXRA, PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, MAPK14, ABCB4
(1 <i>R</i> , 5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> , 7 <i>R</i>)-3-allyl-6-(3, 4-dimethoxyphenyl)-1-methoxy-7-methylbicyclo-[3.2.1]oct-2-ene-4,8-dione	61.56	0.36	+++	PTGS2, CDK2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, ABCB4, ABCB4, NOS3
shikonin	64.79	0.2	+++	ESR1, AR, PTGS2, MAPK14, CDK2, ABCB4
perlolyrine	65.95	0.27	+++	RXRA, PTGS2, CDK2, ESR1, MAPK14, ABCB4
eupatoriopicrin	76.78	0.36	+++	PTGS2, HSP90, NOS2, AR, ESR1, ABCB4, NOS3

注: + 表示消耗巯基低活性, ++ 表示消耗巯基中活性, +++ 表示消耗巯基高活性。

4 讨论

据报道白血病患者还原型谷胱甘肽水平异常升高,而降低其含量可以逆转耐药状态,此外降低谷胱甘肽含量可以调节细胞内的氧化还原平衡促进细胞分化和凋亡^[18]。As₂O₃ 作为治疗急性早幼粒白血病的特效药,小剂量诱导分化,大剂量诱导凋亡。有研究推测含二巯基基团的蛋白质可能是 As₂O₃ 作用的主要靶分子从而发挥治疗白血病的疗效,并以得到实验证实^[19]。砷剂通过消耗细胞内的 GSH 含量,从而增加疗效,而使用 BSO 可以增加 As₂O₃ 对 K562/ADM 细胞凋亡的作用^[20]。故笔者认为在细胞内巯基修饰可作为一个重要的治疗条件,在本研究中,首次将巯基消耗作为筛选标准,获得对 AML 有效的化合物。

中药由于其复杂的物质基础,且具有多成分、多靶点和协同作用的特点,因此寻找中药活性成分及其潜在作用靶点存在困难。本研究通过使用计算机

预测化合物的 ADME 性质筛选出具有优良药代动力学性质的化合物。预测其靶点,通过表达谱芯片数据结合蛋白质互作网络验证确定该靶点在治疗 AML 中的作用,从而筛选出活性分子。其中部分筛选结果已有文献报道具有抗白血病的作用,为筛选方法可靠性提供依据。例如,异甘草素为一种分化诱导剂,通过调控细胞氧化还原态诱导 HL-60 细胞分化^[21]。泽兰苦素使 L-1210 白血病动物生存率增加 60%^[22]。肉桂酸诱导癌细胞细胞周期阻滞^[23]。茄曼陀罗对 K562 细胞具有较强的细胞毒性^[24]。紫草素可以诱导 HL-60 细胞凋亡和分化^[25]。对于 AML 细胞株 (HL-60, U937 和 NB4 细胞) 的细胞毒活性,紫草素为 100 nmol·L⁻¹, Przewaquinone B 为 100 ~ 800 nmol·L⁻¹, 拉帕醇为 3.184 μmol·L⁻¹, *N*-(2,5-dimethoxyphenyl)-4-methoxybenzamide 为 12.6 μmol·L⁻¹, 泽兰苦素为 19.8 μmol·L⁻¹, 异甘草素为 51.6 μmol·L⁻¹。

本方法可用于研究中药的物质基础,有助于挖掘治疗 AML 中药活性分子,本研究的意义主要在于构建一种系统性研究中药的方法,并为相关研究提供方法学的参考与借鉴。

[参考文献]

[1] Zeidner J F, Karp J E. Clinical activity of alvocidib (flavopiridol) in acute myeloid leukemia [J]. *Leuk Res*, 2015, 39(12):1312-1318.

[2] Butler M S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials [J]. *Nat Prod Rep*, 2008, 25(3):475-516.

[3] 杨向东, 杨文华, 张佳, 等. 基于中医传承辅助系统分析杨文华教授治疗白血病的用药经验 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(14):340-343.

[4] 苑婕, 李晓杰, 陈超, 等. 基于网络药理学方法预测银杏叶治疗心脑血管类疾病的有效成分及其潜在靶点 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(11):208-212.

[5] LI J, ZHAO P, LI Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufeiyishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:15290.

[6] LI P, CHEN J, WANG J, et al. Systems pharmacology strategies for drug discovery and combination with applications to cardiovascular diseases [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1):93-107.

[7] 王永华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(7):801-808.

[8] CHOU W C, DANG C V. Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies [J]. *Curr Opin Hematol*, 2005, 12(1):1-6.

[9] Urbisch D, Honarvar N, Kolle S N, et al. Peptide reactivity associated with skin sensitization: the QSAR Toolbox and TIMES compared to the DPRA [J]. *Toxicol In Vitro*, 2016, doi: 10.1016/j.tiv. 2016.04.005.

[10] ZHOU W, WANG Y. A network-based analysis of the types of coronary artery disease from traditional Chinese medicine perspective: potential for therapeutics and drug discovery [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 151(1):66-77.

[11] 冉芳, 蒋江涛, 赵虹, 等. 紫草素通过氧化胁迫诱导 K562 细胞凋亡 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(13):221-224.

[12] Joost H A M, Arie B B, Femke S, et al. PML-RAR α /RXR Alters the epigenetic landscape in acute promyelocytic leukemia [J]. *Cancer Cell*, 2010, 17

(2):173-185.

[13] Pascale F, Denis G, Amélie D, et al. Significance of heat-shock protein (HSP) 90 expression in acute myeloid leukemia cells [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2008, 13(3):357-364.

[14] Giafis N, Katsoulidis E, Sassano A, et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the generation of arsenic trioxide-dependent cellular responses [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(13):6763-6771.

[15] SONG G, LI Y, ZHANG Z, et al. c-Myc but not Hif-1 α -dependent downregulation of VEGF influences the proliferation and differentiation of HL-60 cells induced by ATRA [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(6):2378-2384.

[16] Katagiri K, Katagiri T, Kajiyama K, et al. Tyrosine-phosphorylation of tubulin during monocytic differentiation of HL-60 cells [J]. *J Immunol*, 1993, 150(2):585-593.

[17] Nguyen L X, ZHU L, Lee Y, et al. Expression and role of the ErbB3 binding protein 1 in acute myelogenous leukemic cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2016, doi: 10.1158/1078-0432.

[18] Estrela J M, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy [J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2006, 43(2):143-181.

[19] 王婷, 张学美. 细胞内还原性谷胱甘肽水平与三氧化二砷治疗血液恶性肿瘤疗效的关系 [J]. *医学综述*, 2009, 15(23):3569-3571.

[20] 张景红, 冯汗青, 李红玉. 雄黄微生物提取液诱导 K562/ADM 细胞凋亡的作用机制研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(3):533-536.

[21] CHEN H, ZHANG B, YUAN X, et al. Isoliquiritigenin-induced effects on Nrf2 mediated antioxidant defence in the HL-60 cell monocytic differentiation [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37(11):1215-1224.

[22] Hladon B, Chodera A. Sesquiterpene lactones XVII. Cytostatic and pharmacological activity [J]. *Arch Immunol Ther Exp:Warsz*, 1975, 23(6):857-865.

[23] Sova M, Zizak Z, Stankovic J A, et al. Cinnamic acid derivatives induce cell cycle arrest in carcinoma cell lines [J]. *Med Chem*, 2013, 9(5):633-641.

[24] PAN Y, WANG X, HU X. Cytotoxic withanolides from the flowers of *Datura metel* [J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(7):1127-1132.

[25] ZHANG B, CHEN N, CHEN H, et al. The critical role of redox homeostasis in shikonin-induced HL-60 cell differentiation via unique modulation of the Nrf2/ARE pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012:781516.

[责任编辑 邹晓翠]