

· 数据挖掘 ·

## 基于网络药理学探讨抵当汤治疗膀胱癌的作用机制

沈扬, 芦倩, 张东健, 汤井源, 朱辰, 朱清毅, 卢子杰, 袁琳\*  
(南京中医药大学附属医院, 江苏省中医院, 南京 210000)

**[摘要]** 目的:探讨抵当汤治疗膀胱癌的作用靶点及可能作用机制。方法:基于多个中药与疾病数据库,运用网络药理学筛选潜在作用靶点,分析潜在靶点的生物学功能,构建“中药-靶点-通路-疾病”关系网络。并运用生物信息学方法在人群、基因数据库,探讨核心靶点的在组织中差异表达,人群中的分布以及与预后的相关性。采用体外实验验证抵当汤的作用功能,并检测抵当汤对候选靶点的作用机制。结果:本研究共筛选出21个核心靶点,16条通路,构建了抵当汤治疗膀胱癌的作用网络。检测出6个靶点:钙黏蛋白1(CDH1),环磷腺苷结合蛋白1(CREB1),菌落刺激因子2(CSF2),AP-1转录因子(JUN),基质金属蛋白酶2(MMP2)和前列腺素-内过氧化物合成酶(PTGS2)在膀胱癌组织中均存在差异表达( $P<0.05$ ),其中JUN与MMP2在人群中存在差异分布( $P<0.05$ )。同时,JUN的表达水平与膀胱癌患者的预后相关( $P<0.05$ )。细胞实验发现抵当汤可抑制膀胱癌细胞的增殖,同时可降低候选靶点JUN的表达( $P<0.01$ )。结论:抵当汤治疗膀胱癌存在多靶点、多通路的特点。其中已初步证实抵当汤可影响靶点JUN的表达并抑制膀胱癌的增殖,为进一步机制研究奠定良好基础。

**[关键词]** 抵当汤;膀胱癌;网络药理学;靶点

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)14-0200-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20201423

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200506.1135.002.html>

**[网络出版日期]** 2020-5-6 14:49

## Mechanism of Didangtang in Treatment of Bladder Cancer Based on Network Pharmacology

SHEN Yang, LU Qian, ZHANG Dong-jian, TANG Jing-yuan, ZHU Chen, ZHU Qing-yi,  
LU Zi-jie, YUAN Lin\*

(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of Chinese  
Medicine, Nanjing 210000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the targets and possible mechanism of Didangtang in the treatment of bladder cancer. **Method:** Based on multiple traditional Chinese medicine and disease databases, the network pharmacology was used to screen potential targets, analyze the biological functions of potential targets, and construct a network of "Chinese medicine-target-path-disease". Bioinformatics analysis was applied in population and gene databases, in order to explore the differential expressions of core targets in tissues, distribution in the population and the correlation with prognosis. The *in vitro* experiment was used to verify the biological function of Didangtang. The underlying mechanism of Didangtang on the candidate target was detected. **Result:** A total of 21 core target genes and 16 highly enriched pathways were screened out. A functional network of Didangtang was constructed systematically. At the same time, six targets, namely cadherin 1 (CDH1), CAMP responsive element binding protein 1 (CREB1), colony stimulating factor 2

**[收稿日期]** 20191129(002)

**[基金项目]** 江苏省中医药科技发展计划项目(YB201920);南京市科技计划项目(201605009);江苏省中医院创新发展基金项目(Y2019CX11)

**[第一作者]** 沈扬,在读硕士,从事中西医结合泌尿系肿瘤研究,E-mail:dryang9483@126.com

**[通信作者]** \*袁琳,博士,副教授,博士生导师,从事中西医结合泌尿系肿瘤研究,Tel:025-86617141,E-mail:yuanlin47@163.com

(CSF2), AP-1 transcription factor (JUN), matrix metalloproteinase 2 (MMP2), and prostaglandin-endoperoxide synthase (PTGS2), were differentially expressed in bladder cancer tissues ( $P < 0.05$ ). Furthermore, JUN and MMP2 were also differentially distributed in population ( $P < 0.05$ ). At the same time, the expression level of JUN was correlated with the prognosis of patients with bladder cancer ( $P < 0.05$ ). The *in vitro* experiment revealed that Didangtang inhibited the proliferation of bladder cancer cells and decreased the expression of candidate target JUN ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Didangtang has the characteristics of multiple targets and multiple pathways in treatment of bladder cancer. It is initially confirmed that Didangtang can affect the expression of target JUN and inhibit the proliferation of bladder cancer, which lays a good foundation for further studies on mechanism.

[Key words] Didangtang; bladder cancer; network pharmacology; target gene

膀胱癌如今已成为泌尿系最常见肿瘤之一,全球每年新发膀胱癌约54.9万例,死亡约20万例<sup>[1]</sup>。在中国,每年膀胱癌新发病例数约8万例,死亡病例约3.29万例,居男性泌尿系统恶性肿瘤首位<sup>[2-3]</sup>。尽管手术是膀胱癌治疗主要措施,但多数患者在接受了手术、放疗、化疗、免疫治疗等的综合治疗后,但仍有50%~70%的患者术后可出现膀胱癌复发,其中10%~30%复发患者同时伴随病程进展,且复发与不良预后密切相关<sup>[4]</sup>。针对发病率逐年增加、诊疗手段有限、预后不良等困境,寻找有效的治疗手段,对膀胱癌的防治尤为重要。

抵当汤出自《伤寒论》,在既往报道中证实具有提高机体免疫功能、抑制肿瘤血管生长、诱导肿瘤细胞凋亡、逆转肿瘤细胞多药耐药性、细胞毒作用等作用<sup>[5-8]</sup>。同在临床运用中,针对膀胱癌也有显著疗效<sup>[9]</sup>。但笔者通过前期的文献检索,尚未发现抵当汤治疗膀胱癌相关分子机制的研究报道。网络药理学作为一门新兴的学科,对中药治疗肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤的作用机制提供了新的研究思路与方向<sup>[10-11]</sup>。因此,本文将结合网络药理学、生物信息学与细胞表型实验等方法,基于中医药与膀胱癌数据库,探索抵当汤治疗膀胱癌的作用靶点及可能作用机制,并通过体外实验进一步验证抵当汤的作用功能及靶点,以期为膀胱癌的治疗寻找新的作用靶点与理论依据,也为探讨抵当汤的作用机制提供新的研究思路。

## 1 资料与方法

**1.1 抵当汤作用膀胱癌靶点的筛选** 通过对多种中药数据库 Ctdbase<sup>[12]</sup>, Batman (<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>), TCMSP (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>), Coremine (<http://www.coremine.com/>)的共同挖掘,广泛确定了中药水蛭、大黄、桃仁、牛虻4个中药的作用靶点。同时,运用

网页工具 PolySearch2<sup>[13]</sup>, TTD<sup>[14]</sup>和 Drugbank (<https://www.drugbank.ca/>)寻找与膀胱癌相关的靶点。两者结果映射取交集,进一步确定抵当汤作用膀胱癌的靶点。

基于上述取得的靶点集,运用 String (<https://string-db.org/>), Cytoscape 软件进行拓扑关系网络构建,并对靶点集进行基因本体(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。同时,结合软件 Cytoscape 对靶点集进行相关性计算,确定靶点集中的核心靶点,作为后续研究的目标。

**1.2 中药-靶点-通路-疾病网络构建** 整合上述结果,运用 Cytoscape 软件,根据抵当汤的药味、核心作用靶点、作用通路和对应疾病构建彼此关系,相互间以 edge 相互连接,进而构建抵当汤-中药-靶点-通路-疾病作用网络。

**1.3 抵当汤作用膀胱癌的核心靶点分析** 运用生物信息学技术,通过对癌症基因组图谱(TCGA),基因表达数据集(GEO)数据库的挖掘,寻找并下载膀胱癌人群数据,选择包含癌与癌旁的数据用于组织验证;选择包含健康人与癌症患者的数据用于人群验证;运用 Xena (<http://xena.ucsc.edu/>)软件进行靶点的生存分析。同时运用 TCGA 膀胱癌数据库,基于 hallmark 基因集,采用基因富集分析(GSEA)研究差异表达的靶点所产生的不同基因集通路的影响,分析可能存在的作用机制。

## 1.4 细胞实验验证

**1.4.1 细胞** 实验细胞选取 J82 人膀胱癌细胞(由中国科学院上海生物化学及细胞生物研究所馈赠)。

**1.4.2 试剂与材料** trizol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 10296010); MEM 培养基、胎牛血清、青链霉素、丙酮酸钠、非必需氨基酸(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为 12-662F, 04-001-

1ACS, P1400, KGY0091, KGY0093); 细胞增殖毒性检测 (CCK-8) 试剂盒 (日本 Dojindo 公司, 批号 CK04-1); cDNA 逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司, 批号 RR036A-1); 引物序列由南京锐真生物技术公司合成设计, 设置  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 为内参,  $\beta$ -actin (191 bp): 上游 5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3', 下游 3'-ACATCTGCTGGAAGGTGGAC-5'; JUN (200 bp): 上游 5'-GCAGTTAGATGAGAGGGAGCA-3', 下游 3'-TCGGATCTGTGGACA TTGAA-5'。

**1.4.3 仪器** HERAcell 150i 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); Tecan Infinite M200 pro 多功能型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); TGem Plus 型全波长分光光度计 (中国 Tiangen 生物技术公司); ABI7500HT 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); ETC-811 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪 (中国东胜创新生物科技有限公司); Scepter 型细胞计数器 (美国 Millipore 公司)。

**1.4.4 药品准备** 抵当汤经原方记载换算比例水蛭-牛虻-大黄-桃仁 2:1:3:2, 取水蛭 30 g, 牛虻 15 g, 大黄 45 g, 桃仁 30 g。牛虻购自芄康中药有限公司, 其余药物均购自南京中医药大学附属医院, 经该院庞会明副主任中药师鉴定, 符合 2015 年版《中国药典》规定。将以上药物加 10 倍量清水浸泡 30 min, 煎煮 3 次, 反复过滤浓缩成 500 mL, 含生药 240 g·L<sup>-1</sup> 的母液, 低温保存。

**1.4.5 CCK-8 法检测 J82 细胞活性** 用完全培养液 (混合 MEM 培养基, 胎牛血清, 青链霉素, 丙酮酸钠及非必需氨基酸) 与生药母液配置为含生药 (0, 1, 3, 6, 12, 24, 36, 48 g·L<sup>-1</sup>) 的培养液。将细胞制悬接种于 96 孔板中, 每组设 5 个复孔, 运用细胞计数器计算细胞浓度, 保证每孔约 3 000 个细胞的混合药物培养液 100  $\mu$ L, 同时设置 3 个空白孔只加入培养液。将细胞板放于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中分别培养 24, 48 h, 吸净孔内上清, 向每孔加入 CCK-8 10  $\mu$ L 检测试剂混合 MEM 培养基 100  $\mu$ L, 测定每个孔的吸光度  $A$ 。细胞增殖率 =  $(A_{\text{加药组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{正常组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

**1.4.6 Real-time PCR 检测相关 mRNA 表达** 确定最佳药物浓度和时间后, 设置空白组与加药组培养细胞, 设 3 个复孔。采用 trizol 试剂提取各组细胞总 RNA, 分光光度计测定总 RNA 浓度。运用 cDNA 逆转录试剂盒于冰上配置 10  $\mu$ L 总体系, 反应条件:

37  $^{\circ}$ C 15 min, 85  $^{\circ}$ C 5 s, 最后 4  $^{\circ}$ C 5 min。经逆转录反应合成 cDNA, 进行 PCR 反应, 反应条件: 第一步预变性 (95  $^{\circ}$ C 30 s), 第二、三步循环 40 次 (95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s); 第四步添加溶解曲线 (95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 95  $^{\circ}$ C 5 s)。最后, 以 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 相对定量法处理实验数据。

**1.4.7 数据处理** 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析, 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析检验,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果与分析

**2.1 抵当汤作用膀胱癌相关靶点的检索** 通过对多个中药数据库的挖掘, 共寻找到 1 176 个作用靶点。其中 Batman 数据库中设置 cut-off 值  $> 30$ ,  $P < 0.05$  后保留靶点 272 个; TCMSP 数据库中通过对设置药物活性成分的口服利用度 (OB)  $\geq 30\%$ , 类药性 (DL)  $\geq 0.18$  阈值, 共确定 309 个作用靶点; 在 CTDbase 数据库中设置  $P < 0.01$  后共保留 145 个靶点; 对 Coremine 数据库的挖掘中共发现 744 个作用靶点。为体现中药的多靶点特性, 对四个数据库取交集共保留 1 176 个靶点。同时, 运用 PolySearch2 软件进行文本检索与膀胱癌相关作用靶点, 共 150 个符合条件; 在 TTD 数据库中, 共检索到 21 个相关靶点, DrugBank 中有 100 个靶点已有报道, 确定膀胱癌相关靶点共计 150 个。进而确定抵当汤作用在膀胱癌上的 68 个靶点, 见图 1。

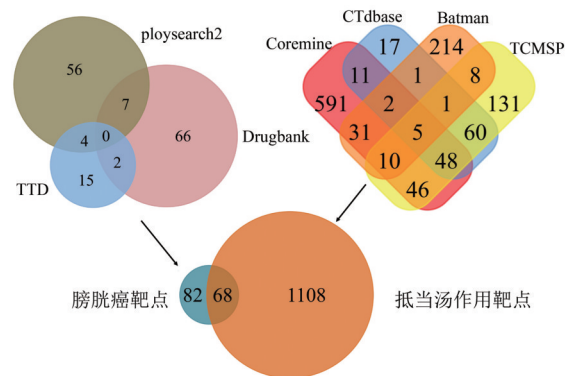
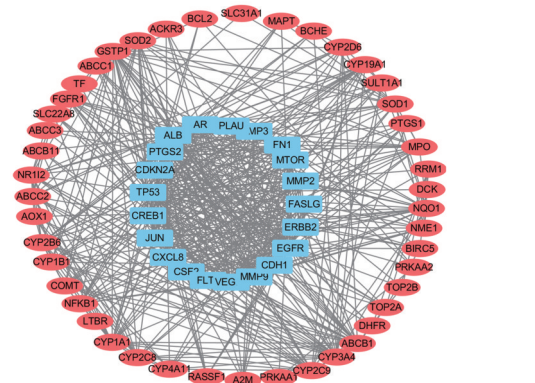


图 1 抵当汤作用膀胱癌的靶点筛选

Fig. 1 Screening results of target screening for bladder cancer

为进一步筛选靶点集中的核心靶点, 运用 Cytoscape 软件, 对靶点集进行计算, 具体设置如下: Degree Cutoff  $> 2$ , Node Score  $> 0.2$ , K-Core  $> 10$ 。获取到 21 个核心靶点 (MTOR, AR, MMP9, CSF2, ALB, FN1, FASLG, JUN, CREB1, CXCL8, ERBB2, CDH1, EGFR, TP53, CDKN2A, PTGS2, MMP2, FLT1, VEGFA, MMP3, PLAU), 见图 2。



蓝色 .21 个核心靶点;红色 .47 个非核心靶点

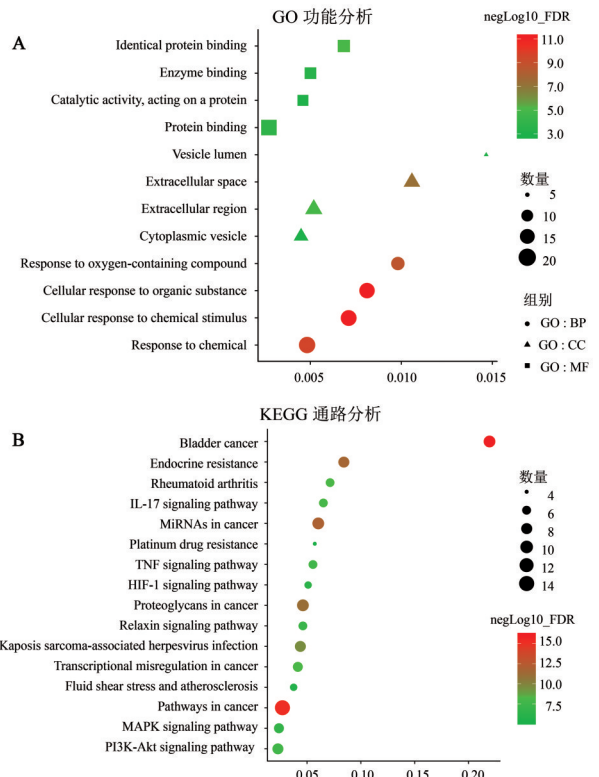
图 2 核心靶点相互关系网络构建

Fig. 2 Correlation network construction of core targets

2.2 核心靶点 KEGG 及 GO 分析与网络图构建  
 将上述靶点集导入 String 软件进行通路富集分析以及错误发现率(FDR)校正,并对所得结果进行排序,取 FDR 最低的前 12 个 GO 功能富集,其中 4 个分子功能版块(酶结合、特定蛋白结合、接触反应活性、蛋白结合),4 个细胞组成版块(细胞质囊泡、胞外空间、胞外区、囊泡腔),4 个生物过程版块(细胞对化学刺激的反应、化学品反应、药物反应、含氧化合物反应)以及 16 个通路(膀胱癌通路,癌症途径,癌症微小 RNA,内分泌抗性,癌症中的蛋白多糖,Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒感染,类风湿性关节炎,癌症中的转录失调,IL-17 信号通路,PI3K/Akt 信号通路,TNF 信号通路,松弛素信号通路,MAPK 信号通路,HIF-1 信号通路,流体剪切应力和动脉粥样硬化,铂类耐药)。根据 GO 分析结果分析,可见靶点主要分布在细胞外环境,可与有关蛋白结合或参与细胞抵抗外界刺激的过程。见图 3。

此外,KEGG 通路分析中除包含有常见的肿瘤相关通路、免疫炎症相关通路及代谢相关通路有富集外。还发现在治疗相关通路中有明显的富集,例如内分泌耐性、铂耐药性等。整合上述结果,运用 Cytoscape 软件构建“方剂-中药-靶点-通路-疾病”作用网络,直观地呈现出 4 味中药,21 个核心作用靶点,16 个高富集通路和膀胱癌间的关联,进而对相互间的作用关系进行可视化观察,见图 4。

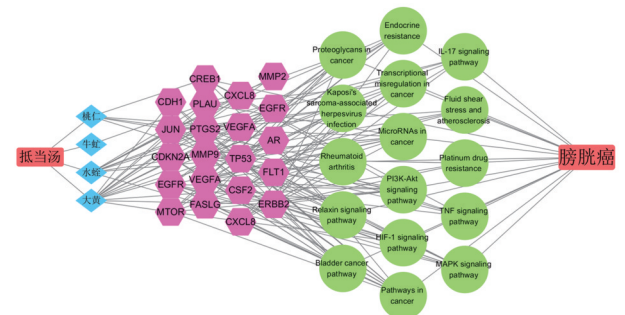
2.3 核心靶点的数据分析 运用生物信息学技术,下载 TCGA 膀胱癌人群数据库,以及 GEO 中膀胱癌相关数据。提取 TCGA 中 19 对以及 GSE13507 中膀胱癌组织(BT)与膀胱癌旁组织(BS)组织数据,发现 21 个核心靶点中有 6 个靶点存在差异,CDH1, CREB1, CSF2, JUN, MMP2 和 PTGS2,



A. 核心靶点 GO 功能分析;B. 核心靶点 KEGG 通路分析

图 3 核心靶点 KEGG 及 GO 分析

Fig. 3 KEGG and GO analysis of targets



六边形 . 核心作用靶点;圆形 . 作用通路;四边形 . 4 味中药;长方形 . 方剂“抵当汤”与疾病“膀胱癌”

图 4 抵当汤作用网络构建

Fig. 4 Didangtang network construction

见表 1。为进一步验证 6 个靶点在人群中表达差异性,提取 GSE13507 与 GSE38264 的健康人群与膀胱癌患者数据,检测得出只有 JUN, MMP2 在膀胱癌患者中存在显著低表达( $P < 0.01$ ),见表 2。同时运用 Xena 工具发现仅 JUN 的表达差异对患者的预后存在关联( $P < 0.05$ ),JUN 低表达的患者生存总体生存率优于高表达的患者,见图 5。

基于 TCGA 数据库中膀胱癌样本数据,取 JUN 中位数表达分组, JUN 高表达 ( $n=202$ ) 和 JUN 低表达 ( $n=205$ ),进行 GSEA 分析,其中 FDR 设置 0.25,

表 1 核心靶点在组织中的差异性表达( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Differential expressions of targets in tissues( $\bar{x}\pm s$ )

数据库	n	组织	PTGS2	MMP2	CSF2	JUN	CREB1	CDH1
TCGA	19	癌旁	12.10±1.66 <sup>2)</sup>	13.81±1.19 <sup>1)</sup>	1.29±1.31 <sup>1)</sup>	13.96±1.22 <sup>2)</sup>	9.92±0.28 <sup>2)</sup>	10.32±4.36 <sup>1)</sup>
		癌	10.19±1.89	13.15±1.05	3.86±2.62	12.69±1.05	9.77±0.33	13.04±1.96
GSE13507	51	癌旁	10.26±1.69 <sup>2)</sup>	7.94±0.51 <sup>2)</sup>	7.28±0.20 <sup>2)</sup>	8.81±0.96 <sup>2)</sup>	8.66±0.39 <sup>2)</sup>	7.76±0.30 <sup>2)</sup>
		癌	9.27±1.50	7.52±0.40	7.63±0.90	8.19±0.64	8.40±0.49	7.91±0.40

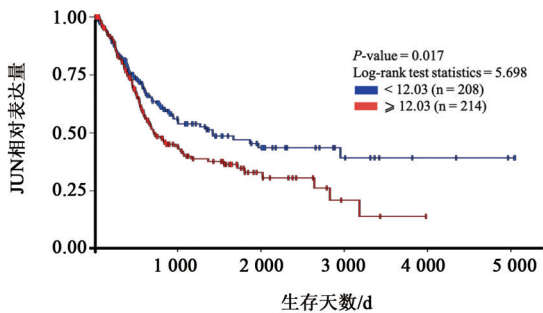
注:与癌组织相比<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01。

表 2 核心靶点在人群中的差异表达( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Differential expression of targets in population ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

数据库	人群	MMP2	JUN
GSE38264	健康	1.25±0.55 <sup>1)</sup>	0.80±1.35 <sup>1)</sup>
	膀胱癌	0.56±0.26	0.41±0.01
GSE13507	健康	8.03±0.53 <sup>1)</sup>	9.04±1.17 <sup>1)</sup>
	膀胱癌	7.49±0.42	8.17±0.80

注:与膀胱癌人群相比<sup>1)</sup>P<0.01。



基于 JUN 表达中位数分组,蓝线表示 JUN 相对低表达,红线表示 JUN 相对高表达

图 5 靶点 JUN 与膀胱癌预后的关系

Fig. 5 Relationship between JUN and prognosis of bladder cancer

P 值设置 0.01,共获得 4 个富集。其中当 JUN 高表达时,DNA 修复,细胞周期 G<sub>2</sub>/M 期和 Myc 通路功能集有显著富集,当 JUN 低表达时转化生长因子-β (TGF-β)功能集有显著富集,见图 6。

**2.4 膀胱癌细胞 J82 实验验证** 通过 CCK-8 实验检测药物 20% 细胞抑制值(IC<sub>20</sub>)发现,抵当汤干预后 J82 细胞增殖情况受到抑制,且呈现浓度依赖性。观察比较 24, 48 h 不同干预时长下细胞 80% 存活率发现,抵当汤在以 3 g·L<sup>-1</sup> 以下浓度处理 24 h,对 J82 细胞的增殖有一定抑制作用。PCR 检测结果也进一步显示,正常组中 JUN 的相对表达量为(0.36±0.02),采用 3 g·L<sup>-1</sup> 药物干预 J82 细胞 24 h, JUN 的相对表达量显著减少(0.19±0.02, P<0.01)。见表 3。

### 3 讨论

膀胱癌是泌尿系最常见恶性肿瘤<sup>[15]</sup>,现有的手术及放化疗方式不能有效抑制膀胱癌的复发及不良预后。传统医药作为膀胱癌治疗的重要手段,对膀胱癌患者有确切临床疗效。因此进一步阐明膀胱癌的发病机制,探究中医药治疗膀胱癌的作用机制,寻找膀胱癌的有效治疗靶点是十分重要的。

《伤寒论》中记载:“以热在下焦……小便自利者,下血乃愈。所以然者,以太阳随经,瘀热在里故也,抵当汤主之。”认为太阳膀胱经蓄血,当为下焦瘀热之故,可施“通应用”之法,选用抵当汤,方中水蛭破瘀消癥祛毒,大黄荡涤邪热、导瘀下行,桃仁破血行血,牛虻逐瘀通经,组成简单但逐瘀效果明显,同时笔者通过后期的体外细胞实验也进一步证实抵当汤对膀胱癌细胞的增殖具有抑制作用。据此运用网络药理学以及生物信息学的分析,通过对抵当汤组成水蛭、大黄、桃仁和牛虻进行靶点分析,构建了药物、疾病与靶点的作用网络,发现抵当汤治疗膀胱癌的多个潜在靶点以及可能通路。

笔者通过对核心靶点进行 KEGG 和 GO 分析,发现靶点不仅在免疫与炎症相关通路中有明显富集,同时在几个特殊的治疗相关通路中也有着显著富集,例如内分泌抵抗通路、铂耐药性通路。内分泌抵抗通路在乳腺癌的内分泌治疗中发挥重要的作用,此通路机制可引起乳腺癌对内分泌药物治疗的耐药性产生,影响乳腺癌的治疗进展。在膀胱癌患者中,性激素的表达与膀胱癌的预后有着密切联系<sup>[16]</sup>。有研究者认为膀胱癌是一种与内分泌密切相关的肿瘤<sup>[17]</sup>,内分泌治疗可能对膀胱癌的治疗起到辅助作用,因此抑制内分泌抵抗通路的活性,降低可能发生的内分泌治疗抗性,是提高内分泌治疗膀胱癌疗效的关键环节。另外,铂耐药性通路在膀胱癌的治疗中起到重要阻碍作用。铂类药物是膀胱癌临床治疗一线化疗药物,铂耐药性通路可减少机体对药物的吸收,减少药物的结合,从而降低膀胱癌铂类药物化疗的疗效<sup>[18]</sup>。如果能抑制铂耐药

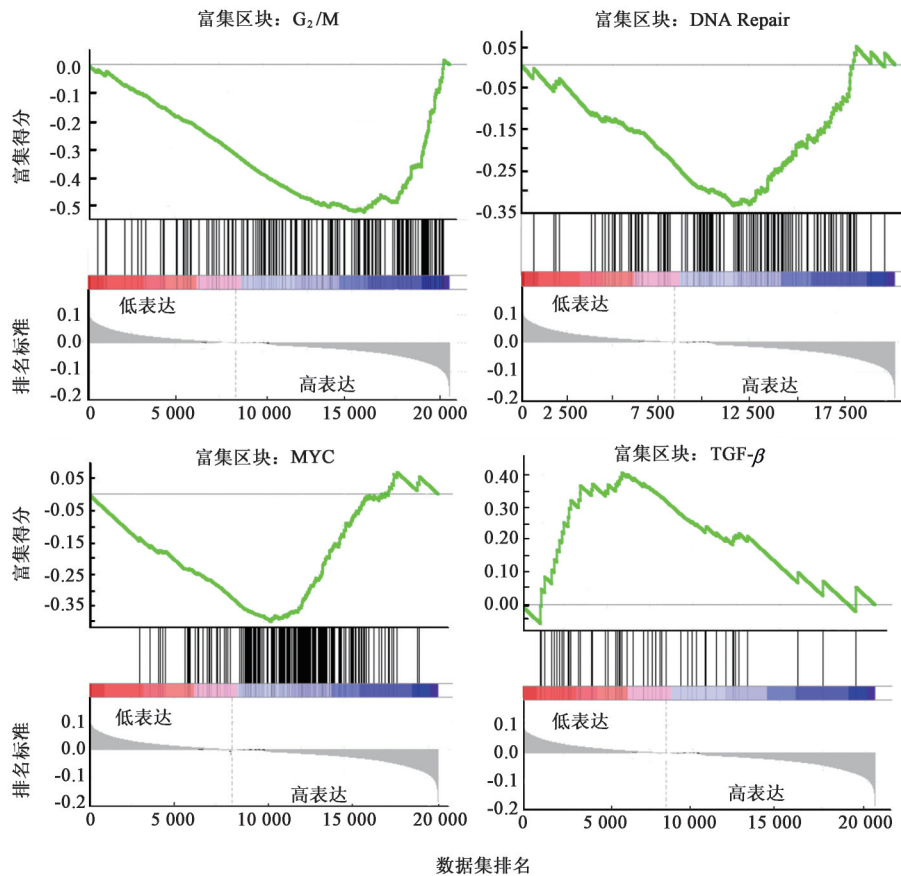


图6 基于TCGA中靶点JUN的GSEA分析

Fig. 6 GSEA analysis of JUN in TCGA bladder cancer dataset

表3 不同浓度抵当汤在不同时长下对J82膀胱癌细胞增殖率的影响

Table 3 Effect of different concentrations and time of Didangtang on J82 cells proliferation rate

组别	剂量/g·L <sup>-1</sup>	增殖率/%	
		24 h	48 h
正常	-	100.00	100.00
抵当汤	1	94.54	95.12
	3	89.06	93.18
	6	74.60	87.70
	12	66.34	46.21
	24	19.59	2.37
	36	10.98	1.68
	48	0.28	0.25

性通路的活性,进而可以提高铂类药物的化疗效能,对膀胱癌的治疗无疑是一大帮助。抵当汤的核心作用靶点中有4个靶点在铂耐药性通路中富集,分别是 ERBB2 (即 HER2), TP53, FASLG, CDKN2A。其中 ERBB2 是化疗耐药机制中的核心基因,在多种肿瘤的治疗中证实 ERBB2 的高表达可以抑制化疗药物引起的细胞凋亡效应<sup>[19-20]</sup>,在膀胱

癌中也有同样的报道<sup>[21]</sup>。此外 TP53 作为一个抑癌基因,广泛参与多种耐药过程,当 TP53 调节的通路受损会引起肿瘤细胞的获得性耐药<sup>[22]</sup>。由此可见,抵当汤的作用靶点与膀胱癌的治疗相关通路有密切联系,并可能通过对其核心靶点的调控进而影响膀胱癌的耐药与进展,但其具体的作用机制还有待进一步验证。

此外笔者通过对核心靶点的筛选,运用了多个数据样本数据,进行多维度的相互验证,发现了2个在人群以及组织中均存在明显差异表达的靶点 JUN, MMP2。MMP2 作为一种需要金属离子作为辅助的蛋白酶,并能通过帮助多种肿瘤细胞突破基底膜,进而引起转移<sup>[23-25]</sup>。例如在乳腺癌中, MMP2 的高表达会导致其骨转移的发生<sup>[26]</sup>。近年来大量研究也证实, MMP2 的表达与膀胱癌的进展有着密切联系。JIN 等<sup>[27]</sup>发现 MMP2 在膀胱癌转移细胞中呈现高表达,并能促进膀胱癌细胞的转移;此外, PENG 等<sup>[28]</sup>也证实通过诱导 MMP2 蛋白的自噬降解可抑制膀胱癌的侵袭。基于笔者前期的研究结果发现, MMP2 是中药大黄和水蛭的潜在靶点,并且在既往研究中已证实大黄素可显著抑制 MMP2 的

表达<sup>[29]</sup>,同时水蛭素也可以显著降低MMP2的表达<sup>[30-31]</sup>。由此笔者认为抵当汤中的水蛭素与大黄素可共同作用在MMP2靶点上,但具体作用机制还需进一步实验验证。

此外,另一个靶点JUN在本研究中发现不仅在人群与组织中有着显著差异表达,同时与膀胱癌的预后有着密切联系,此结果与HU等<sup>[32]</sup>的结果相一致。JUN是一个在多种癌症中具有差异表达且具有较强活性的转录因子<sup>[33-35]</sup>,但对肿瘤的生物功能还存在着争论。例如在乳腺癌中活化的JUN可影响肿瘤血管的生长,进而促进乳腺癌的转移<sup>[36]</sup>;但在MAHNER等<sup>[37]</sup>的研究中发现JUN表达的丧失与卵巢癌的进展相关。在本研究结果中,膀胱癌中JUN的表达显著低于正常组织,但从预后角度观察JUN低表达的膀胱癌患者却远优于高表达的患者。因此,JUN与膀胱癌的进展有着密切的联系,可作为膀胱癌进展及预后观察的一个因素,但其中的具体机制还有待进一步的探讨。同时,本研究还发现JUN是中药大黄、桃仁和水蛭的共同作用靶点,在既往研究中也证实大黄素可降低JUN的表达<sup>[38]</sup>、水蛭中的肝素衍生物可抑制JUN的转录<sup>[39]</sup>等。在细胞实验中发现抵当汤干预后膀胱癌细胞中的JUN表达明显受到抑制,与前期报道相一致。据此可证实,抵当汤对靶点JUN存在抑制作用。此外,通过GSEA对JUN的分析发现,笔者发现JUN的差异表达在膀胱癌中产生不同的调控机制。当JUN低表达时,TGF- $\beta$ 信号通路会有大量富集,而JUN高表达时,DNA修复,MYC以及细胞周期G<sub>2</sub>/M通路会有大量基因集富集。由此,笔者推测JUN的差异表达会通过以上4条通路影响膀胱癌的进展。

本研究发现抵当汤在膀胱癌治疗过程中可能通过影响多个靶点的表达与通路功能进而发挥作用,并针对其中的JUN靶点进行了初步的细胞实验验证,结果证实了抵当汤对膀胱癌的抑制作用以及对其核心靶点JUN的调控作用,为研究中医治疗膀胱癌的作用机制提供了前期理论依据和新思路。但本研究所得出的结果仍需在其他膀胱癌细胞株及动物模型上进一步验证,抵当汤对膀胱癌的具体调控机制还待深入探究,使研究结果更具说服力。

#### [参考文献]

[1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADA P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.

[3] PANG C, GUAN Y, LI H, et al. Urologic cancer in China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2016, 46(6):497-501.

[4] KAMAT A M, HAHN N M, EFSTATHIOU J A, et al. Bladder cancer[J]. Lancet, 2016, 388(10061): 2796-2810.

[5] 王学良,杨运高,王程. 抵当汤抑制肿瘤转移的实验研究[J]. 湖南中医杂志, 2004, 20(3):69-70.

[6] 曹科,潘艳芳,陈佩禅,等. 抵当汤对小鼠肿瘤转移及酪氨酸激酶受体信号传导系统EGFR的影响[J]. 中医药学刊, 2004, 22(11):2026-2027.

[7] 姜波,艾华. 抵当汤化痰方对荷瘤小鼠抑瘤作用及对T淋巴细胞亚群的影响[J]. 吉林中医药, 2008, 28(2):147-148.

[8] 杨运高,华何与,陈先明,等. 中药抵当汤对小鼠结肠癌脾移植肝转移模型肿瘤增殖细胞核抗原的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(3):579-581.

[9] 王庆才. 仲景方药与肿瘤临床[J]. 辽宁中医杂志, 2000, 27(8):344-346.

[10] 赵怡,陈美琪,郝书婷,等. 基于网络药理学的小柴胡汤抗肺癌作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi:org/10.13422/j.cnki.syfjx.20200323.

[11] 官扬,曾文雪,胡慧明,等. 基于网络药理学探讨甘草-枳壳活性成分抗乳腺癌作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, doi: org/10.13422/j.cnki.syfjx.20200125.

[12] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, et al. The comparative toxicogenomics database: update 2019[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D948-D954.

[13] LIU Y, LIANG Y, WISHART D. PolySearch2: a significantly improved text-mining system for discovering associations between human diseases, genes, drugs, metabolites, toxins and more [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43(W1):W535-W542.

[14] LI Y H, YU C Y, LI X X, et al. Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1):D1121-D1127.

[15] 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.

[16] MIYAMOTO H, YAO J L, CHAUX A, et al. Expression of androgen and oestrogen receptors and its prognostic significance in urothelial neoplasm of the

- urinary bladder[J]. *BJU Int*, 2012, 109(11): 1716-1726.
- [17] MIZUSHIMA T, TIRADOR K A, MIYAMOTO H. Androgen receptor activation: a prospective therapeutic target for bladder cancer? [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(3): 249-257.
- [18] MASSARI F, SANTONI M, CICCARESE C, et al. Emerging concepts on drug resistance in bladder cancer: Implications for future strategies[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 96(1): 81-90.
- [19] SHU T, LI Y, WU X, et al. Down-regulation of HECTD3 by HER2 inhibition makes serous ovarian cancer cells sensitive to platinum treatment [J]. *Cancer Lett*, 2017, 411(2): 65-73.
- [20] LEE Y, MA J, LYU H, et al. Role of erbB3 receptors in cancer therapeutic resistance [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(3): 190-198.
- [21] MOOSO B A, VINALL R L, MUDRYJ M, et al. The role of EGFR family inhibitors in muscle invasive bladder cancer: a review of clinical data and molecular evidence[J]. *J Urol*, 2015, 193(1): 19-29.
- [22] LIU J, ZHANG C, HU W, et al. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(2 Pt A): 197-203.
- [23] LI X, YANG Z, SONG W, et al. Overexpression of Bmi-1 contributes to the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by increasing the expression of matrix metalloproteinase (MMP) 2, MMP-9 and vascular endothelial growth factor via the PTEN/PI3K/Akt pathway[J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(3): 793-802.
- [24] CHEN J S, HUANG X H, WANG Q, et al. Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/Akt signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP) -2 and MMP-9 in liver cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(1): 10-19.
- [25] ROOMI M W, MONTERREY J C, KALINOVSKY T, et al. Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(5): 1323-1333.
- [26] MENDES O, KIM H T, LUNGU G, et al. MMP2 role in breast cancer brain metastasis development and its regulation by TIMP2 and ERK1/2 [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2007, 24(5): 341-351.
- [27] JIN H, YU Y, HU Y, et al. Divergent behaviors and underlying mechanisms of cell migration and invasion in non-metastatic T24 and its metastatic derivative T24T bladder cancer cell lines[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(1): 522-536.
- [28] PENG M, WANG J, ZHANG D, et al. PHLPP2 stabilization by p27 mediates its inhibition of bladder cancer invasion by promoting autophagic degradation of MMP2 protein[J]. *Oncogene*, 2018, 37(43): 5735-5748.
- [29] LU H F, LAI K C, HSU S C, et al. Involvement of matrix metalloproteinases on the inhibition of cells invasion and migration by emodin in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Neurochem Res*, 2009, 34(9): 1575-1583.
- [30] YU C, WANG W, JIN X. Hirudin Protects Ang II-induced myocardial fibroblasts fibrosis by inhibiting the extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24(9): 6264-6272.
- [31] 田晋帆, 葛长江, 吕树铮, 等. 重组水蛭素对载脂蛋白E基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的影响及机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(2): 198-203.
- [32] HU H M, LIU S, ZHANG Y, et al. Expression levels of transcription factors c-Fos and c-Jun and transmembrane protein HAB18G/CD147 in urothelial carcinoma of the bladder[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(5): 2991-3000.
- [33] VOGT P K. Jun, the oncoprotein [J]. *Oncogene*, 2001, 20(19): 2365-2377.
- [34] SHAULIAN E, KARIN M. AP-1 as a regulator of cell life and death[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(5): 131-136.
- [35] LI L, LI M, SUN C, et al. Altered hematopoietic cell gene expression precedes development of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia and identifies patients at risk [J]. *Cancer Cell*, 2011, 20(5): 591-605.
- [36] VLEUGEL M M, GREIJER A E, BOS R, et al. c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 2006, 37(6): 668-674.
- [37] MAHNER S, BAASCH C, SCHWARZ J, et al. C-Fos expression is a molecular predictor of progression and survival in epithelial ovarian carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99(8): 1269-1275.
- [38] TANG Q, ZHAO S, WU J, et al. Inhibition of integrin-linked kinase expression by emodin through crosstalk of AMPKalpha and ERK1/2 signaling and reciprocal interplay of Sp1 and c-Jun[J]. *Cell Signal*, 2015, 27(7): 1469-1477.
- [39] LI L, RUI X, LIU T, et al. Effect of heparin-derived oligosaccharide on vascular smooth muscle cell proliferation and the signal transduction mechanisms involved [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2012, 26(6): 479-488.

[责任编辑 张丰丰]