

· 数据挖掘 ·

# 黄芪-莪术药对基于网络药理学的抗大肠癌分子机制

刘夫艳, 唐德才\*, 谭喜莹

(南京中医药大学基础医学院, 南京 210046)

**[摘要]** **目的:**运用计算机网络药理学技术预测黄芪-莪术药对治疗大肠癌的作用靶点和信号通路,进一步分析其抗大肠癌物质基础和作用机制。**方法:**通过 Therapeutic Target Database (TTD), Drugbank 数据库收集大肠癌疾病作用靶点;从中药系统药理学分析平台 (TCMSP) 获得黄芪、莪术所含中药成分;运用 ChemMapper, PharmMapper 数据库预测所选中药成分作用的疾病靶点;采用 Cytoscape 软件建立“化合物-疾病靶点”网络模型;利用 ClueGO 插件对靶点进行基因功能 (GO) 分析和基于京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。**结果:**黄芪-莪术药对活性化合物-大肠癌疾病靶点网络包含 56 个化合物和 54 个靶点,关键靶点涉及 AMP 激活蛋白激酶  $\alpha_1$  (PRKAA1), 前列腺素内过氧化物合酶 1 (PTGS1), 环氧化酶 2 (PTGS2), 胸苷酸合成酶 (TYMS), 肝羧酯酶 1 (CES1), 血管内皮生长因子 B (VEGFB), 血管内皮生长因子 A (VEGFA), 谷胱甘肽 S-转移酶 P (GSTP1), 丝氨酸羟甲基转移酶 (glyA) 等;靶点的基因功能偏向于肽基酪氨酸的磷酸化, 调节细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 1 和 ERK2 信号串联, 内皮细胞凋亡过程的负调节等;重要的 KEGG 通路涉及癌症通路, Ras 信号通路, Rap1 信号通路, 磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路等。**结论:**黄芪-莪术药对通过抑制肿瘤细胞增殖分化、促进肿瘤细胞凋亡、抗肿瘤新生血管生成以及增强机体免疫的多表型干预的网络模式产生抗大肠癌活性,其作用信号通路与 Ras 信号通路, Rap1 信号通路, PI3K/Akt 信号通路最为相关。

**[关键词]** 网络药理学; 黄芪-莪术; 大肠癌; 分子机制

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)13-0176-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190827

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190102.1122.011.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-04 13:48

## Anti-colorectal Cancer Molecular Mechanism of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma Based on Network Pharmacology

LIU Fu-yan, TANG De-cai\*, TAN Xi-ying

(Basic Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

**[Abstract]** **Objective:** The network pharmacology method was used to predict targets and signaling pathways of the drug pair Astragali Radix and Curcumae Rhizoma in treating colorectal cancer, in order to analyze the effective material basis and action mechanism. **Method:** Disease targets for colorectal cancer were collected through Therapeutic Target Database (TTD) and Drugbank database. Components of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma were obtained from the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database, and the Analysis Platform (TCMSP). ChemMapper and PharmMapper database were used to predict the disease targets of effective components. The "compound-disease targets" network model was established by Cytoscape software. The function analysis of gene ontology (GO) and the enrichment analysis of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) were carried out with ClueGO plug-in. **Result:** The network contained 56 compounds and 54 targets. The crucial targets included 5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha1 (PRKAA1), prostaglandin

**[收稿日期]** 20180913(017)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (81573627, 81873021); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目 (KYCX18-1603)

**[第一作者]** 刘夫艳, 在读硕士, 从事中药配伍抗肿瘤的理论与实验研究, E-mail: liufuyan0824@163.com

**[通信作者]** \* 唐德才, 教授, 从事中药药性、配伍机制及临床应用的研究, E-mail: talknow@163.com

G/H synthase 1 (PTGS1), prostaglandin G/H synthase 2 (PTGS2), Thymidylate synthase (TYMS), Carboxylesterase 1 (CES1), vascular endothelial growth factor B (VEGFB), vascular endothelial growth factor A (VEGFA), glutathione S-transferase P (GSTP1), and serine hydroxymethyltransferase 1 (glyA). Function about target genes inclined to peptide-tyrosine phosphorylation, extracellular regulated protein kinase (ERK) 1 and ERK2 signal series, negative regulation of endothelial cell apoptosis process, et al. Important KEGG Pathways involved pathways in cancer, Ras signaling pathways, Rap1 signaling pathways, and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /Akt signaling pathways. **Conclusion:** The anti-colorectal cancer activities of Astragali Radix and Curcumae Rhizoma were mainly affected by inhibiting cell proliferation and differentiation, promoting tumor cell apoptosis, resisting tumor angiogenesis, and enhancing immunity as phenotype intervention mode in network. The active signaling pathway is most related to Ras signaling pathway, Rap1 signaling pathway and PI3K/Akt signaling pathway.

**[Key words]** network pharmacology; Astragali Radix and Curcumae Rhizoma; colorectal cancer; molecular mechanism

大肠癌包括结肠癌和直肠癌,是一种最常见的人类消化道恶性肿瘤。在全球范围看,大肠癌发病率高居第 3 位,每年大约 140 万人被诊断为大肠癌,超过 60 万人死于该病。全国肿瘤登记中心(NCCR)2018 年最新的肿瘤登记年报数据统计结果显示,我国城市恶性肿瘤的发病率和死亡率大肠癌分别位居第 2 和第 4 位<sup>[1-2]</sup>。中医药联合化疗是大肠癌综合治疗的重要手段之一。本课题组前期研究及系统评价发现,补气活血药对黄芪-莪术配伍联合奥沙利铂能抑制结肠癌原位移植瘤小鼠肿瘤的生长及降低肝转移的概率<sup>[3]</sup>,但由于中药具有多成分、多途径、多靶点协同作用的特点,使其作用机制难以明确。

黄芪豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根;莪术为姜科植物蓬莪术 *Curcuma phaeocaulis*, 广西莪术 *C. kwangsiensis* 或温郁金 *C. wenyujin* 的干燥根茎<sup>[4]</sup>。黄芪味甘性微温,长于补气升阳,善补脾、肺之气,为“补中益气之要药”,性虽温补,而能疏调血脉,通行经络;莪术辛散苦泄,温通行滞,既能破血散瘀,又能行气化积,是破血化瘀代表药。一般人认为凡有虚候的患者应慎用或忌用,张锡纯则认为莪术“性非猛烈而建功甚速……若与参、术、芪诸药并用,大能开胃进食,调血和血”“若论耗散气血,香附尤甚于三棱、莪术,若论消磨癥瘕,十倍香附亦不及三棱、莪术也”。说明莪术虽行气活血消积之力强,而耗散正气之弊反而不大,与黄芪合用,尤善于破积,其健运脾胃,黄芪得莪术流通之性,有瘀者消瘀,无瘀虚极者可行补药之滞,十全育真汤、健运汤即取此意<sup>[5]</sup>。国医大师朱良春教授亦指出:“黄芪能补五脏之虚,莪术善于行

气、破瘀、消积。莪术与黄芪同用,可奏益气化瘀之功,病变往往可以消弭于无形”,在临床上亦常用此配伍治疗肝脾肿大及肝癌,颇能改善病灶的血液循环和新陈代谢,以使癌症患者病情稳定,症状改善,甚至使其病情好转,延长生存期。

网络药理学是随着系统生物学和计算机技术的高速发展应运而生的,是一种基于网络观点从系统水平识别“药物-疾病-基因-靶点”的多分子药物协同作用机制的研究新策略<sup>[6-7]</sup>,与中医学从整体角度诊治疾病的理论和中药从整体水平调控机体治疗疾病的观点相吻合,逐渐被用来探索中药的分子作用机制。本研究从网络药理学的角度预测黄芪-莪术抗大肠癌的作用靶点和信号通路,进一步分析其抗大肠癌物质基础和作用机制。

## 1 方法

**1.1 大肠癌相关疾病靶点的收集** 在 TTD 疾病靶点筛选数据库 (<https://db.idrblab.org/ttd/>) 和 Drugbank 疾病靶点筛选数据库 (<https://www.drugbank.ca/>) 输入疾病名称“colorectal cancer”“colon cancer”“colorectal carcinoma”“carcinoma of large intestine”检索大肠癌的疾病作用靶点,并利用 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 获得靶点的 Uniprot ID,以便后续的分析。

**1.2 中药成分的收集** 利用中药系统药理学分析平台数据库 (TCMSP, <http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmssp.php>) 搜索黄芪和莪术的主要化学成分,进一步通过 PubMed 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) 中相关文献收集黄芪和莪术的化学成分,并利用 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 对其分子结构进行确证,并以

sdf 格式保存其 3D 结构,对于只有 2D 结构的成分以 mol2 的格式保存后导入 ChemBio3D 中转换为 SDF(. sdf) 格式保存,建立黄芪和莪术的化合物数据库。

**1.3 活性化合物的筛选** 中药多为口服制剂,在体内需经过吸收、分布、代谢、及排泄过程到达靶点器官、组织发挥作用,即药物动力学(ADME)过程。为了筛选潜在活性化合物,构建了包括口服生物利用度(OB),药物相似性(DL)在内的综合模型,对化合物的 ADME 性质进行预测。

**1.3.1 OB 评估** OB 是指药物经口服给药后被机体吸收进入血液循环的相对量和速率,是药物特性中最重要的药动学参数之一,是决定中药的化学成分是否具有药效活性的关键指标。OB 值由计算机预测模型 OBioavail1.1<sup>[8]</sup> 计算,该模型由 805 个已知 OB 值且结构不同的分子描述符,整合代谢和转运信息构建训练集,并通过 5 倍交叉验证以及独立外部验证来检验模型的可靠性。本研究以  $OB \geq 30\%$  建立阈值评估候选化合物,并且考虑使用最小数量的化合物尽可能多的获取信息。

**1.3.2 DL 评估** DL 是指化合物与已知药物的相似性,对化合物的 DL 进行准确评价有助于筛选出优秀化合物,提高药物候选物的命中率。本研究基于 Tanimoto 参数计算化合物的类药性指数。评估方法如公式(1)所示。

$$T(X, Y) = X \times Y / (|X|^2 + |Y|^2 - X \times Y) \quad (1)$$

X 是待预测化合物分子描述符指数,通过 Dragon 软件([http://www. taletе. mi. it/index. htm](http://www.taletе. mi. it/index. htm)) 计算;Y 表示 DrugBank 数据库中所有化合物的平均类药性指数(<http://www. drugbank. ca/>)。整个类药性指数的平均值是 0.18,  $DL \geq 0.18$  的化合物被认为与 Drugbank 数据库里已知药物具有一定的相似度,有较好的类药性。本研究基于样本量、数据的复杂性以及综合文献的考虑为尽可能多的筛选到有效化合物,将 DL 的 Tanimoto 参数确定为  $\geq 0.05$ 。

**1.4 预测化合物的靶点** 药物分子是通过与特定的分子靶点相结合,并调节其生物活性或转录水平,从而发挥药物的作用效果。为了阐明药物的作用机制,收集化合物作用靶点对研究化合物-靶点相互作用关系是必不可少的。相应靶点从以下 3 个方面获得,在 TCMSp 数据库以化合物名检索并整理其靶点; ChemMapper (<http://lilab. ecust. edu. cn/chemmapper/>) 数据库是根据 3D 结构的相似性预测化合物的作用靶标的服务器<sup>[9]</sup>,提交化合物相对应

的 SMILE 号,设置结构相似性阈值为 0.85,选择 DrugBank 生物活性数据库; PharmMapper (<http://lilab. ecust. edu. cn/pharmmapper/index. php>) 数据库是基于反向药效团匹配法的化学小分子潜在靶点和生物活性预测的服务器,通过对 Targetbank, Binding DB, Drugbank, PDTD 四大数据库进行快速检索获取药物靶点信息<sup>[10]</sup>,导入黄芪、莪术活性成分的三维化学结构数据,设置参数为不选择构象变化,选择人类数据库,设置最终产生 300 个蛋白构象。

**1.5 “化合物-靶点”网络的构建与分析** 网络是复杂生物系统的表现形式,为了阐明黄芪、莪术化合物的抗大肠癌活性机制,本研究构建了化合物-靶点相互作用的可视化网络。运用 Excel 表格筛选出黄芪、莪术化合物抗大肠癌的化合物-靶点信息,导入 Cytoscape 3.2.1 (<http://www. cytoscape. org/>) 得到“黄芪、莪术化合物-大肠癌疾病靶点”网络图。在网络中,化合物和靶点由节点(node)表示,2 个节点之间的相互作用由边(edge)表示。网络中每个节点的重要性通过拓扑参数自由度(Degree)和介数(Betweenness Centrality)进行评估。节点的自由度表示与节点相连的边的数量,度数越大,说明网络中与该节点直接相关的节点数越多,参与的生物功能越多,表明该节点在网络中越重要。节点的介数是指网络中所有最短路径中,经过节点的数量所占比例,反映了某节点在通过网络进项信息传输中的重要性。网络中介数越大,说明这个节点在网络中越重要。网络拓扑参数使用 Cytoscape 插件 Network Analyzer 进行分析获得。

**1.6 生物过程分析** 使用 Cytoscape 插件 ClueGO 对筛选所得潜在靶点基因进行 GO 生物学过程基因功能分析和 KEGG 靶点通路富集分析,最终设定阈值  $P \leq 0.05$ ,筛选具有显著性差异的生物过程和可靠靶点通路。

## 2 结果

**2.1 大肠癌疾病靶点的收集** 基于 TTD, Drugbank 数据库挖掘并删除重复靶点,共收集到大肠癌疾病作用靶点 119 个,得到的靶点信息进行基因名和 Uniprot ID 的标准化。

**2.2 黄芪、莪术中药成分的收集** TCMSp 数据库检索(截止到 2018 年 7 月)得到黄芪成分 87 个,莪术成分 81 个,将每个成分的化学信息进行选择性下载,包括分子编号,英文名称,OB 值,DL 值,建立该药对的化学成分信息数据库。

**2.3 活性化合物的筛选** 以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.05$

为筛选条件对 168 个成分(含有 3 个共同成分)进行筛选,共得到黄芪 32 个,莪术 34 个,共 66 个(含有 2 个共同成分)具有良好的 ADME 性质的化合物作为潜在活性化合物,结果见表 1。对筛选后的化合物进行分析,发现黄芪筛选后得到的成分主要是皂苷类、黄酮类、氨基酸等,皂苷类和黄酮类成分是黄芪药效作用的主要活性成分且含量较高,历版《中国药典》也将黄芪甲苷和毛蕊异黄酮葡萄糖苷作为控制黄芪药材及其制剂质量的指标性成分。皂苷类成分黄芪甲苷(astragaloside I)、黄芪皂苷 II, III(astragaloside II, astragaloside III)对脑、肝、肺、心肌、肾脏均有保护作用,此外在抗肿瘤、抗炎抗病毒,改善贫血和心血管系统疾病方面也有一定效果;槲皮素(querletin),异鼠李素(isorhamnetin),芒柄花素(formononetin),毛蕊异黄酮(calycosin)等黄酮类成分,在调控免疫系统、抗氧化、抗细胞凋亡等方面均有较好的作用<sup>[11-12]</sup>。此外还筛选得到咖啡酸(caffeate acid),和阿魏酸(ferulic acid)等微量的酚酸类成分。莪术筛选后得到的成分主要为挥发油成分,另外也包含一些非挥发性成分,涵盖了文献报道过的大部分莪术常见活性成分<sup>[13]</sup>。挥发性成分包括莪术醇(curcumol),异莪术烯醇(isocurcumenol),呋喃二烯(furanodiene), $\beta$ -蒎烯(beta-pinene)和双氢莪术二酮[(1R,10R)-epoxy-1,10-dihydrocurdione]等;非挥发性成分有姜黄素(turmerone),双去甲氧基姜黄素(bisdemethoxycurcumin),桉树酚(cineole),石竹素[(-)-epoxycaryophyllene]等。莪术醇是临床药物莪术油的主要成分;莪术醇、莪术二酮、姜黄素已被文献报道对多种恶性肿瘤细胞的生长具有良好的抑制作用,同时还具有抗炎、镇痛、抗病毒的作用<sup>[14-15]</sup>。可见本研究的筛选条件可以很全面地将黄芪-莪术药对的抗肿瘤活性成分囊括其中。

**2.4 化合物的疾病靶点数据库构建** 通过 1.4 项的 3 种方式预测 66 个成分(含有 2 个共同成分)的所有潜在靶点,将化合物对应的靶点数据和 2.1 项得到的大肠癌疾病靶点数据导入 Excel 表格中,映射得到黄芪-莪术成分治疗大肠癌的疾病靶点,构建化合物治疗疾病的靶点数据库。剔除掉与大肠癌疾病靶点不匹配的成分和与黄芪-莪术成分不相关的疾病靶点,最终得到 56 个成分(含有 1 个共同成分)与 54 个疾病靶点相互作用的疾病靶点数据库。

**2.5 “化合物-靶点”网络的构建与分析** 运用

表 1 黄芪-莪术药对筛选的 66 个候选化合物信息

Table 1 Information of 66 candidate compounds in Astragali Radix and Curcumaе Rhizoma

分子 ID	化合物	OB/%	DL
MOL000033	(3S, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-10, 13-dimethyl-17-[(2R, 5S)-5-propan-2-yl]octan-2-yl]-2, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	36.23	0.78
MOL000098	querletin	46.43	0.28
MOL000131	EIC	41.90	0.14
MOL000211	mairin	55.38	0.78
MOL000239	jaranol	50.83	0.29
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
MOL000354	isorhamnetin	49.60	0.31
MOL000371	3,9-di-O-methylmissolin	53.74	0.48
MOL000374	5'-hydroxyiso-muronulatol-2',5'-di-O-glucoside	41.72	0.69
MOL000378	7-O-methylisomucronulatol	74.69	0.30
MOL000379	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- $\beta$ -D-glucoside	36.74	0.92
MOL000380	(6aR, 11aR)-9, 10-dimethoxy-6a, 11a-dihydro-6H-benzofurano[3,2-e]chromen-3-ol	64.26	0.42
MOL000381	13-hydroxy-9,11-octadecadienoic acid	35.60	0.17
MOL000387	bifendate	31.10	0.67
MOL000389	FERULIC ACID (CIS)	54.97	0.06
MOL000392	formononetin	69.67	0.21
MOL000398	isoflavanone	109.99	0.30
MOL000401	astragalosideI	46.79	0.11
MOL000403	astragalosideII	46.06	0.13
MOL000405	astragalosideIII	31.83	0.10
MOL000414	caffeate	54.98	0.05
MOL000417	calycosin	47.75	0.24
MOL000422	kaempferol	41.89	0.24
MOL000432	linolenic acid	45.01	0.15
MOL000433	FA	68.96	0.71
MOL000434	acetylastragaloside I	43.54	0.09
MOL000435	acetylastragaloside I <sub>qt</sub>	30.75	0.17
MOL000436	(Z)-1-(2, 4-dihydroxyphenyl)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-en-1-one	87.51	0.15
MOL000438	(3R)-3-(2-hydroxy-3, 4-dimethoxyphenyl)chroman-7-ol	67.67	0.26
MOL000439	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	49.28	0.62
MOL000442	1,7-dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	39.05	0.48
MOL005928	isoferulic acid	50.83	0.06
MOL000915	(1S, 10S), (4S, 5S)-germacrone-1(10), 4-diepoide	30.48	0.18
MOL000941	zingiberenol	31.43	0.07

续表 1

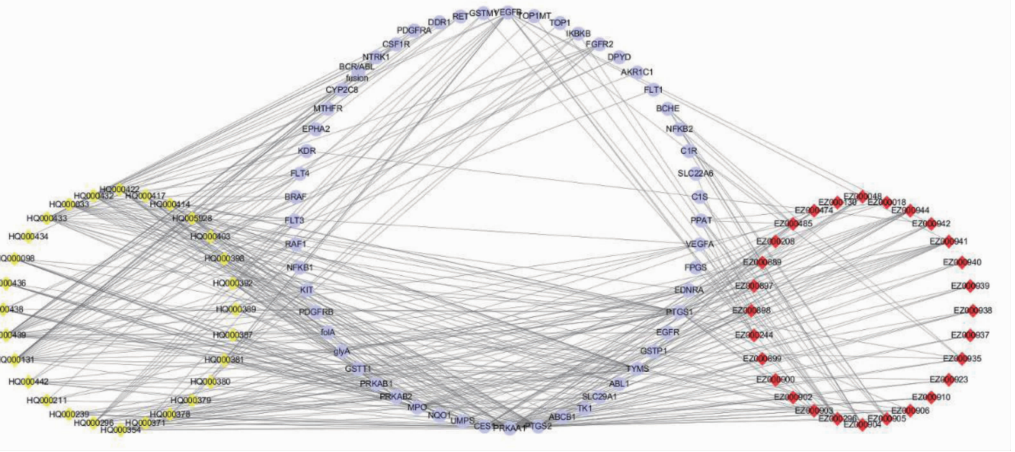
分子 ID	化合物	OB/%	DL
MOL000942	(1 <i>R</i> , 4 <i>S</i> , 4 <i>aR</i> , 8 <i>aR</i> )-4-isopropyl-1, 6-dimethyl-3, 4, 4 <i>a</i> , 7, 8, 8 <i>a</i> -hexahydro-2H-naphthalen-1-ol	31.67	0.09
MOL000910	germacron	32.50	0.07
MOL000894	turmerone	32.98	0.06
MOL000898	(1 <i>S</i> , 6 <i>R</i> , 7 <i>R</i> )-4-isopropylidene-1-methyl-7-(3-oxobutyl)norcaran-3-one	34.17	0.11
MOL000939	(1 <i>S</i> , 3 <i>E</i> , 7 <i>E</i> , 11 <i>S</i> )-1,5,5,8-tetramethyl-12-oxabicyclo[9.1.0]dodeca-3,7-diene	34.37	0.10
MOL000474	(-)-epoxycaryophyllene	35.94	0.13
MOL000913	tricyclene	36.11	0.07
MOL000891	(1 <i>R</i> , 10 <i>R</i> )-epoxy-1,10-dihydrocurdione	36.73	0.12
MOL000296	hederagenin	36.91	0.75
MOL000897	(3 <i>S</i> , 3 <i>aR</i> , 8 <i>aR</i> )-3, 8 <i>a</i> -dihydroxy-5-isopropylidene-3, 8-dimethyl-1, 2, 3 <i>a</i> , 4-tetrahydroazulen-6-one	38.70	0.12
MOL000944	(6 <i>R</i> )-2-methyl-6-(4-methylphenyl)hept-2-en-4-one	40.84	0.07
MOL000903	gweicurculactone	42.92	0.14
MOL000048	(5 <i>E</i> , 9 <i>Z</i> )-3, 6, 10-trimethyl-4, 7, 8, 11-tetrahydrocyclodeca[b]furan	43.17	0.10
MOL000905	beta-pinene	44.77	0.05
MOL000899	fulanodiene	45.11	0.10
MOL000485	TMH	46.25	0.05
MOL000906	wenjine	47.93	0.27
MOL000937	58870_FLUKA	49.01	0.10
MOL000938	calarene	51.55	0.11
MOL000935	hepanal	53.83	0.10
MOL000208	aromadendrene	55.74	0.10
MOL000900	(5 <i>R</i> , 6 <i>R</i> )-5-isopropenyl-3, 6-dimethyl-6-vinyl-5,7-dihydrobenzofuran-4-one	57.05	0.11
MOL000904	cineole	59.96	0.05
MOL000917	cineole	59.96	0.05
MOL000923	ACETIC ACID, BORNYL ESTER	67.15	0.08
MOL000130	CAM	67.17	0.05
MOL000940	bisdemethoxycurcumin	77.38	0.26
MOL000244	borneol	81.80	0.05
MOL000018	(+/-)-isoborneol	86.98	0.05
MOL000901	BRN 3094585	87.82	0.13
MOL000889	isocurcumenol	97.67	0.13
MOL000902	curcumol	103.55	0.13

其 54 个潜在靶点构建的相互作用网络图(图 1),该网络包含 110 个节点和 378 条边,其中菱形代表化合物,圆形代表靶点蛋白,边代表相互关系。54 个疾病靶点中 51 个潜在靶点都与至少 2 个化合物相互作用,56 个化合物中 53 个化合物都与 2 个及以上疾病靶点相互作用,充分体现了中药的多成分、多靶点相互作用的复杂网络关系,验证了黄芪、莪术药对治疗大肠癌是通过多途径、多环节、多靶标,整体协同的方式发挥作用的。经插件 Network Analyzer 对网络中所有节点的拓扑参数进行分析,选择平均自由度(Degree)和介数(Betweenness Centrality)均在平均值以上的靶点作为与黄芪、莪术治疗大肠癌的重要潜在靶点。最终筛选出 10 个满足条件的靶点蛋白,分别是 AMP 激活蛋白激酶  $\alpha_1$  (PRKAA1),前列腺素内过氧化物合酶 1 (PTGS1),环氧化酶 2 (PTGS2),胸苷酸合成酶 (TYMS),肝羧酯酶 1 (CES1),血管内皮生长因子 B (VEGFB),血管内皮生长因子 A (VEGFA),谷胱甘肽 S-转移酶 P (GSTP1),丝氨酸羟甲基转移酶 (glyA)。此外,在网络中与潜在靶点作用较多的化合物是亚油酸 (isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole, linoleic acid),叶酸 (folic acid),亚麻酸 (linolenic acid),姜烯酚 (zingiberenol),常春藤皂苷元 (hederagenin),3,9-去甲美迪紫檀素 (3,9-di-O-methylnissolin),芒柄花素 (formononetin), $\alpha$ -蒎烯 (alpha-pinene),莪术双环烯酮 (curcumenone)。

**2.6 生物过程分析** 为了阐明黄芪、莪术配伍治疗大肠癌作用的分子机制,利用 Cytoscape 插件 ClueGO 对 54 个潜在靶点进行了 GO 生物学过程基因功能分析和 KEGG 靶点通路富集分析。

**2.6.1 黄芪-莪术治疗大肠癌的潜在靶点 GO 基因功能分析** 共富集分析得到 50 条  $P \leq 0.05$  的生物过程,结果分为 3 部分,富集分析网络图(圈越大表示富集程度越高,颜色相近表示功能相近)、富集分析饼状图(各个基因功能组所占比例)、柱状图(相关基因在每条生物过程的百分比)。根据 Term  $P$  值越小,Term 可靠性越高,排名前 10 位的生物过程依次是肽基酪氨酸的磷酸化 (peptidyl-tyrosine phosphorylation),调节 ERK1 和 ERK2 信号串联 (regulation of ERK1 and ERK2 cascade),蛋白质自磷酸化 (protein autophosphorylation),ERK1 和 ERK2 信号串联的正向调节 (positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade),调节血管内皮生长因子信号通路 (vascular endothelial growth factor signaling

Cytoscape 3.2.1 构建“黄芪、莪术化合物-大肠癌疾病靶点”网络图并进行分析。根据 56 个化合物及



菱形节点为化合物,圆形节点为靶点蛋白;黄色表示黄芪化合物,红色表示莪术化合物

图 1 黄芪-莪术化合物大肠癌疾病靶点网络

Fig.1 Network of compounds of Astragali Radix and Curcuma Rhizoma disease targets for colorectal cancer

pathway), 调节磷脂酶活性 (regulation of phospholipase activity), 磷脂酰肌醇介导的信号传导 (phosphatidylinositol-mediated signaling), 乳腺的发育 (mammary gland development), 有毒物质的应答 (response to toxic substance), 肽基酪氨酸自磷酸化 (peptidyl-tyrosine autophosphorylation) (图 2, 表 2)。这些生物过程表明网络中大肠癌相关疾病靶点偏向于通过激活细胞转录因子、调结细胞生物信号传导、调控细胞生长因子、参与细胞能量代谢以及调节肿瘤新生血管的方式, 从而引起细胞的增殖和分化, 调节细胞生长周期和细胞生存活力, 促进新生血管形成, 促进大肠癌的发生发展和转移, 这与本课题组研究的黄芪-莪术通过促进肿瘤血管正常化以达到抑制肿瘤的活性, 提示该研究为课题组研究提供了理论基础。

**2.6.2 黄芪-莪术治疗大肠癌的潜在靶点 KEGG 通路富集分析** 共富集分析得到 43 条  $P \leq 0.05$  的信号通路, 结果亦展示为网络图、饼状图、柱状图 3 部分。按照  $P$  值判断其可靠性, 排名前 10 位的通路依次为癌症通路 (pathways in cancer), Ras 信号通路 (Ras signaling pathway), Rap1 信号通路 (Rap1 signaling pathway), PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway), 癌症的中心碳代谢通路 (central carbon metabolism in cancer), 前列腺癌 (prostate cancer)、血流剪切力和动脉粥样硬化通路 (fluid shear stress and atherosclerosis), 黏着斑 (focal adhesion), 细胞因子-细胞因子受体相互作用通路 (cytokine-cytokine receptor interaction), 急性骨髓性白血病通路 (acute myeloid leukemia) (图 3, 表 3)。表明黄芪-莪术抗大肠癌的作用可能与癌症途径,

Ras, PI3K/Akt, 中心碳代谢通路, 血液黏稠度, 黏着斑生成有关。

### 3 讨论

大肠癌是受遗传、环境和生活方式等共同影响的系统性疾病, 多种信号分子参与其发生发展过程, 调节环路复杂的相互作用和交叉干扰使人们难以对肿瘤细胞的胞内信号输出作出正确的认识和预测。由于肿瘤的高度复杂性, 一直以来沿用的针对单一分子靶点的高特异性化合物 (抗体) 的“一病一靶”治疗策略并没有取得满意的效果<sup>[16]</sup>。本研究运用系统网络药理学方法, 筛选出黄芪-莪术药对中活性化合物, 获取其作用靶点, 映射得到其抗大肠癌潜在靶点, 建立化合物-靶点网络图, 从系统水平上来研究药物与机体之间相互作用的本质和规律, 快速识别药物活性成分, 并确定其在机体分子层面的生物靶点, 推测药物的效应机制, 从而阐释药对抗大肠癌活性的物质基础和效应机制。

运用网络药理学的相关理念和技术, 最终预测得到黄芪-莪术药对抗大肠癌的 56 个化合物和 54 个作用靶点, 其活性成分多样性和作用靶点多样性在一定程度上解释了“异病同治, 同病异治”的物质基础。靶点 PRKAA1, PTGS<sub>1</sub>, PTGS<sub>2</sub>, TYMS, CES1, VEGFB, VEGFA, GSTP1, glyA 在网络的中心位置, 视为黄芪-莪术抗大肠癌的重要潜在靶点, 这些靶点涉及信号传导、细胞周期、代谢过程、免疫系统及肿瘤新生血管形成过程, 这些生物过程与大肠癌的发生发展及转移紧密相关, 也证实了黄芪-莪术的抗大肠癌作用。其中靶点 PRKAA1, 即 AMPK $\alpha_1$ , 是一种丝氨酸蛋白激酶, 作为“细胞能量监测器”, 能在细胞能量缺乏时中止细胞的扩增, 近几年的实验研究结

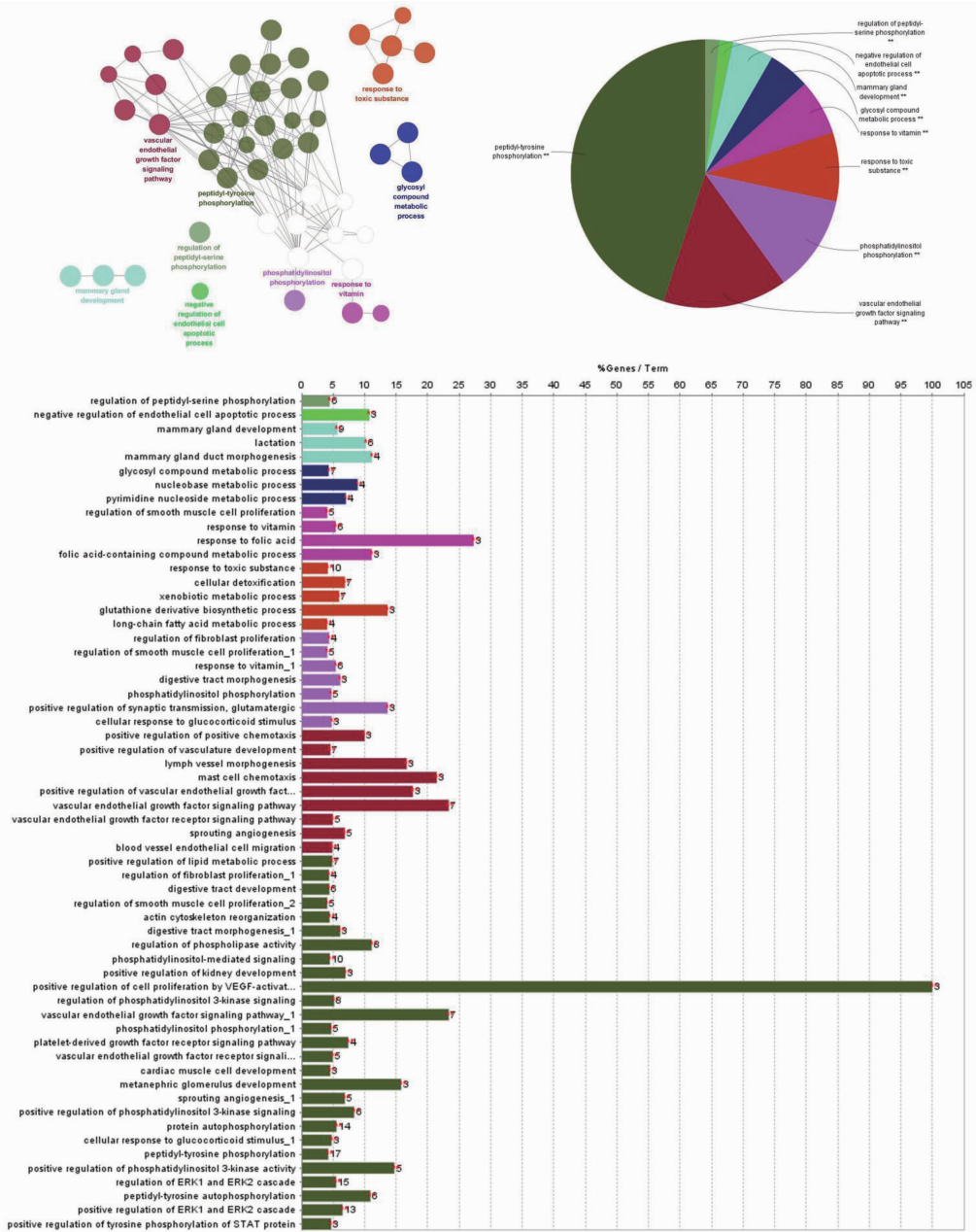


图 2 黄芪-莪术治疗大肠癌的潜在靶点 GO 基因功能分析

Fig. 2 GO analysis of potential targets for Astragali Radix and Curcumae Rhizoma in treating colorectal cancer

表 2 黄芪-莪术抗大肠癌潜在靶点生物学过程的 GO 分析

Table 2 GO analysis of potential targets for Astragali Radix and Curcumae Rhizoma in resisting colorectal cancer

ID	GO 生物学过程	P	基因数/个	占比/%
GO:0018108	peptidyl-tyrosine phosphorylation	$8.02 \times 10^{-16}$	17	4.23
GO:0070372	regulation of ERK1 and ERK2 cascade	$1.21 \times 10^{-15}$	15	5.47
GO:0046777	protein autophosphorylation	$1.07 \times 10^{-14}$	14	5.53
GO:0070374	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	$1.36 \times 10^{-14}$	13	6.50
GO:0038084	vascular endothelial growth factor signaling pathway	$2.36 \times 10^{-12}$	7	23.33
GO:0010517	regulation of phospholipase activity	$3.22 \times 10^{-11}$	8	11.11
GO:0048015	phosphatidylinositol-mediated signaling	$7.99 \times 10^{-10}$	10	4.48
GO:0030879	mammary gland development	$8.30 \times 10^{-10}$	9	5.63
GO:0009636	response to toxic substance	$1.63 \times 10^{-9}$	10	4.17
GO:0038083	peptidyl-tyrosine autophosphorylation	$1.23 \times 10^{-8}$	6	10.91

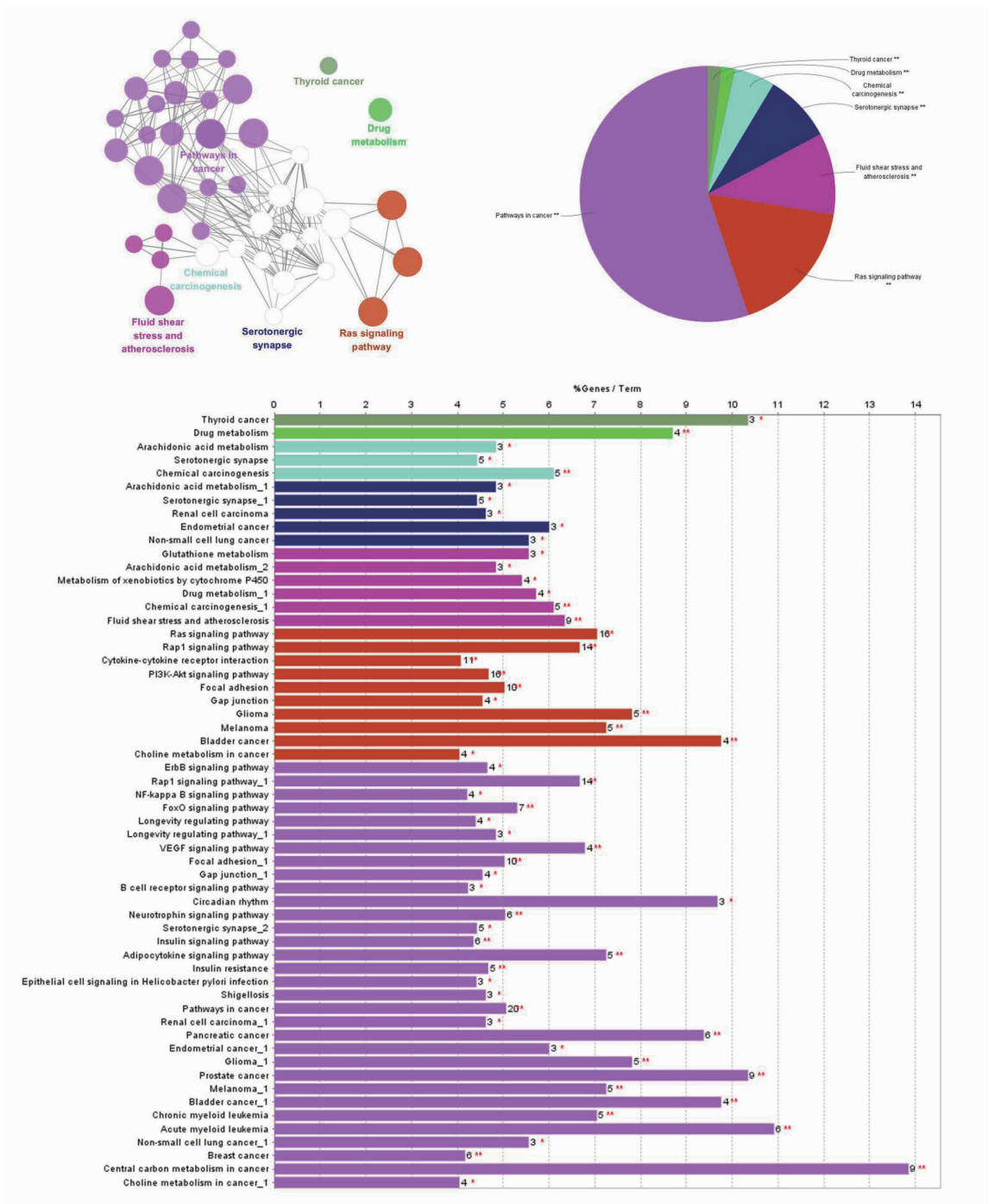


图 3 黄芪-莪术治疗大肠癌的潜在靶点 KEGG 通路富集分析

Fig3 KEGG pathway analysis of potential targets for Astragali Radix and Curcumae Rhizoma in treating colorectal cancer

果表明, 激活 AMPK $\alpha_1$  能够加速大肠癌细胞的糖酵解和能量代谢, 从而促进癌细胞凋亡<sup>[17]</sup>, AMPK 信号还被报道参加调节大肠癌局部缺血诱导的血管生长<sup>[18]</sup>, 并在人大肠癌细胞的转移过程中起重要的作用<sup>[19]</sup>, 通过核转录因子 (NF)- $\kappa$ B 信号通路调节大肠癌细胞的多药耐药性<sup>[20]</sup>。PTGS1 和 PTGS2 也就是环氧合酶 COX1 和 COX2, 是前列腺素合成的主要限速酶, 在炎症、癌症、心血管疾病中都发挥重要

作用<sup>[21]</sup>。COX1 参与细胞间信号传导, 对于维持生理学功能如保护胃黏膜和维持血管平衡具有重要的作用, 并与一些炎症反应相关。COX2 只有在炎症和促使有丝分裂的刺激下才会诱导性的表达, 参与 PGE<sub>2</sub> 的合成, PGE<sub>2</sub> 已经被研究证实在肿瘤细胞增殖, 侵袭, 血管生成, 免疫抑制等多方面发挥重要作用, COX2 作为 PGE<sub>2</sub> 合成途径中的关键酶, 已经在多种肿瘤细胞中都被检测到表达上调<sup>[22]</sup>。在大肠

表 3 黄芪-莪术抗大肠癌潜在靶点的重要通路

Table3 Significant pathway of potential targets for Astragali Radix and Curcumae Rhizoma in resisting colorectal cancer

ID	KEGG 信号通路	P	基因数 / 个	占比 / %
KEGG:05200	pathways in cancer	$5.80 \times 10^{-14}$	20	5.06
KEGG:04014	Ras signaling pathway	$2.44 \times 10^{-13}$	16	7.05
KEGG:04015	Rap1 signaling pathway	$2.23 \times 10^{-11}$	14	6.67
KEGG:04151	PI3K/Akt signaling pathway	$1.30 \times 10^{-10}$	16	4.68
KEGG:05230	central carbon metabolism in cancer	$1.92 \times 10^{-10}$	9	13.85
KEGG:05215	prostate cancer	$2.78 \times 10^{-9}$	9	10.34
KEGG:05418	fluid shear stress and atherosclerosis	$2.09 \times 10^{-7}$	9	6.34
KEGG:04510	focal adhesion	$3.58 \times 10^{-7}$	10	5.03
KEGG:04060	cytokine-cytokine receptor interaction	$7.04 \times 10^{-7}$	11	4.07
KEGG:05221	acute myeloid leukemia	$1.12 \times 10^{-6}$	6	10.91

癌的预防与治疗临床观察研究中,选择性 COX2 抑制剂在大肠癌早期有很好的抗肿瘤作用,对淋巴结入侵也有效果<sup>[23]</sup>。TYMS 基因是最早引起人们关注的肿瘤化疗敏感基因<sup>[24]</sup>,其多态性与肿瘤化疗药物代谢密切相关,是 5-氟尿嘧啶(5-FU)发挥细胞毒性作用的目标酶,报道显示 TYMS 低水平的大肠癌患者应用 5-FU 的疗效更好。CES1 属于丝氨酸酯酶超家族,他们位于多种组织的内质网和胞质,参与许多药物、环境毒物和前致癌物的代谢激活或发挥解毒作用<sup>[25]</sup>。VEGF 信号通路参与血管新生整个过程,对骨、肺、肾脏、脑、肿瘤等全身各组织器官血管内皮细胞的增殖、迁移和趋化有十分明显的促进作用,病理状态下,缺氧、炎症及肿瘤生长刺激是促进 VEGF 合成的最主要的因素<sup>[26]</sup>。联系潜在靶点的 GO 基因分析和 KEGG 通路富集分析结果,说明黄芪-莪术药对通过抑制肿瘤细胞增殖分化,促进肿瘤细胞凋亡,抗肿瘤新生血管生成,增强机体免疫的多表型干预的网络模式产生抗大肠癌活性,其作用信号通路与 Ras 信号通路,Rap1 信号通路,PI3K/Akt 信号通路最为相关,这与现代药理的研究结果是相互验证的。WANG 等<sup>[27]</sup>细胞实验结果表明,黄芪的活性成分芒柄花素能够抑制结肠癌细胞 SWI116 和 HCT116 的增殖分化、侵袭转移,并在进一步的信号通路研究中发现芒柄花素可能通过抑制 PI3K/Akt 和 STAT3 信号通路发挥抗肿瘤作用。WANG 等<sup>[28]</sup>分别探讨了莪术活性成分莪术醇在体外细胞实验和体内动物实验对结肠癌细胞生长周期的阻断作用,研究结果表明莪术醇能够在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 阶

段阻断结肠癌细胞的生长周期,其作用机制与 Akt/GSK3β/cyclin D<sub>1</sub> 信号通路的失活有关。

本研究应用网络药理学方法对黄芪-莪术药对抗大肠癌的化学成分、作用靶点和作用机制进行了初步探索性研究,为进一步的实验验证研究奠定了良好的基础。但是,由于数据库信息不全面,化合物筛选的主观性,且只关注于药物的组成成分,忽略了其成分的含量、化合物之间的相互作用以及药物体内代谢过程等的影响,故研究预测的结果具有一定的片面性和局限性。

[参考文献]

[1] MspH L A T, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65 (2): 87-108.

[2] 陈万青, 孙可欣, 郑荣寿, 等. 2014 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2018, 27 (1): 1-14.

[3] 曹子丰, 唐德才, 时晓霞, 等. 黄芪、莪术配伍联合奥沙利铂对 CT26. WT 原位移植瘤小鼠中 CXCR3、CCR6 表达影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40 (6): 477-482.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 302-303.

[5] 吴相文. 张锡纯使用对药举隅 [J]. 河北中医, 2009, 31 (12): 1886-1888.

[6] Hopkins A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. Nat Chem Biol, 2008, 4 (11): 682-690.

[7] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. Chin J Nat Med, 2013, 11 (2): 110-120.

[8] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13 (12): 6964-6982.

[9] GONG J, CAI C, LIU X, et al. ChemMapper: a versatile web server for exploring pharmacology and chemical structure association based on molecular 3D similarity method [J]. Bioinformatics, 2013, 29 (14): 1827-1829.

[10] WANG X, SHEN Y, WANG S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database. [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45 (W1): 356-360.

[11] 高云峰, 高娜. 黄芪生理活性成分及其药理作用研究进展 [J]. 新农业, 2017 (1): 20-21.

- [12] 刘洋,杜婧,沈颜红. 10 种药用黄芪属植物化学成分及药理作用的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017,23(18):222-234.
- [13] 郭丽娟,张云,丛晓东,等. 温郁金主要成分含量测定及指纹图谱研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2011,18(4):101-103.
- [14] 王颖,郭兰萍,黄璐琦,等. 姜黄、莪术、郁金的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国药房,2013,24(35):3338-3341.
- [15] 张贵杰,黄克斌. 广西莪术化学成分和药理作用研究进展[J]. 广州化工,2015,43(11):24-26.
- [16] 肖智勇,周文霞,张永祥. 基于网络药理学的抗肿瘤药物发现策略[J]. 国际药学研究杂志,2014,41(1):1-6.
- [17] YU H, ZHANG H, DONG M, et al. Metabolic reprogramming and AMPK $\alpha_1$  pathway activation by caulerpin in colorectal cancer cells[J]. *Int J Oncol*, 2017,50(1):161-172.
- [18] Larsen A K, Gramont A D, Poindessous V, et al. Functions and clinical implications of autocrine VEGF signaling in colorectal cancer [J]. *Curr Colorectal Cancer Rep*,2013,9(3):270-277.
- [19] Park J J, Seo S M, Kim E J, et al. Berberine inhibits human colon cancer cell migration via AMP-activated protein kinase-mediated downregulation of integrin  $\beta_1$  signaling[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2012,426(4):461-467.
- [20] 王子元,王荟,刘坤,等. AMPK- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号转导通路在大肠癌多药耐药中的作用及白藜芦醇的干预机制[J]. 中华中医药杂志,2017,32(7):3266-3269.
- [21] Williams C S, Mann M, Dubois R N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development[J]. *Oncogene*,1999,18(55):7908-7916.
- [22] 张翹腾,王毅. COX2-PGE<sub>2</sub> 调节肿瘤的发生和发展机制研究进展[J]. 西南军医,2018,20(1):50-53.
- [23] Benelli R, Venè R, Ferrari N. Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (cyclooxygenase-2), a complex target for colorectal cancer prevention and therapy[J]. *Transl Res*,2018,doi: 10.1016/j.trsl.2018.01.003.
- [24] 王明,李兴德,朱中成. DPYD、TYMS 及 MTHFR 基因表达与直肠癌放疗敏感性关系[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(12):1697-1700.
- [25] 刘帅兵,缪丽燕. 羧酸酯酶 1 和 2 基因多态性在药物代谢中的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志,2015,24(3):206-210.
- [26] 向本旭,刘婷婷,孙芳玲,等. VEGF 相关信号通路在血管新生中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(12):81-86.
- [27] WANG A L, LI Y, ZHAO Q, et al. Formononetin inhibits colon carcinoma cell growth and invasion by microRNA149 mediated EphB3 downregulation and inhibition of PI3K/AKT and STAT3 signaling pathways [J]. *Mol Med Rep*,2018,17(6):7721-7729.
- [28] WANG J, LI X M, BAI Z, et al. Curcumin induces cell cycle arrest in colon cancer cells via reactive oxygen species and Akt/GSK3 $\beta$ /cyclin D<sub>1</sub> pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, doi: 10.1016/j.jep.2017.06.037.

[责任编辑 张丰丰]