

山豆根治疗白血病作用机制的网络药理学研究^Δ

付海荣^{1*}, 庞毅², 谭家华³, 李晶⁴, 邓雪松^{1#}(1.重庆三峡医药高等专科学校基础医学部, 重庆 404120; 2.重庆三峡医药高等专科学校抗肿瘤天然药物工程中心, 重庆 404120; 3.重庆三峡医药高等专科学校公共基础部, 重庆 404120; 4.重庆三峡中心医院中心实验室, 重庆 404120)

中图分类号 R285;R733.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)24-3392-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.24.14

摘要 目的:探讨山豆根治疗白血病的潜在作用机制。方法:运用中药系统药理学分析平台数据库检索山豆根活性成分及其对应靶点蛋白,借助UniProt、PubMed数据库查询活性成分靶点蛋白对应的基因名称,运用Cytoscape 3.6.0软件构建化合物-靶点网络。通过DisGeNET数据库查询与白血病相关的基因(即疾病靶点),借助OmicShare平台筛选山豆根活性成分靶点与白血病疾病靶点的交集基因,利用STRING数据库和Cytoscape 3.6.0软件构建其蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,并进行拓扑学分析;利用DAVID生物信息学数据库进行基因本体(GO)分析和KEGG通路富集分析。结果:共获得山豆根活性成分13个、靶点蛋白204个,节点度值排名靠前的化合物及靶点蛋白包括槲皮素、山柰素以及前列腺素内过氧化物合酶2(PTGS2)、蛋白质丝氨酸蛋白酶1(PRSS1)、钙调蛋白依赖的蛋白激酶(CAMKK2)等。山豆根活性成分靶点与白血病疾病靶点的交集基因共24个,包括IRF1、BCL2、CYPLA1、PIM1等。上述交集基因的PPI网络共包含节点24个、边142条,平均节点度值为6.5,平均介数为0.045。GO分析结果显示,上述交集基因的生物过程涉及缺乏配体的体外凋亡信号通路、凋亡过程的负调控、B细胞增殖的正调控等,分子功能主要包括蛋白质同源化活性、相同蛋白质的结合等,细胞组分主要包括胞外区、线粒体等。KEGG通路富集分析结果显示,上述交集基因主要与T细胞受体信号通路、Janus激酶/信号传导及转录激活因子(JAK/STAT)信号通路、人类嗜T淋巴细胞I型病毒(HTLV-I)感染等通路有关。结论:山豆根中的活性成分可能通过JAK/STAT信号通路、HTLV-I感染等通路作用于PTGS2、PRSS1、CAMKK2等靶点,进而发挥对白血病的治疗作用,呈现多成分、多靶点、多通路的特点。

关键词 山豆根;白血病;网络药理学;靶点;基因;通路

响较大,以致质量存在差异,这可能与地瓜藤药材的产地、采收时间和贮藏条件等因素有关。

综上所述,所建指纹图谱以及聚类分析、PCA分析、OPLS-DA分析可用于地瓜藤药材的鉴别和质量控制。

参考文献

[1] 贵州省药品监督管理局.贵州省中药材、民族药材质量标准[S].贵阳:贵州科技出版社,2003:153.

[2] 张文平,张晓平,刘娜,等.民族药地板藤的研究进展[J].中国现代中药,2016,18(4):531-534.

[3] 郭良君,谭兴起,郑巍,等.地瓜藤化学成分研究[J].中草药,2011,42(9):1709-1711.

[4] 徐蔚,王培,李尚真,等.地果根茎化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(2):270-272.

[5] 关永霞,杨小生,佟丽华,等.苗药地瓜藤化学成分的研究[J].中草药,2007,38(3):342-344.

[6] 田民义,刘婷婷,洪怡,等.地果化学成分及抗肿瘤活性研究[J].中药材,2018,41(9):2120-2123.

[7] 杨世波,王韦,张润芝,等.地板藤根的抗氧化和抑菌活性研究[J].云南民族大学学报(自然科学版),2013,22(4):

235-238.

[8] 杜银香,胡泽华.地枇杷抑菌物质提取及抑菌活性研究[J].北方园艺,2017,41(14):150-154.

[9] 张文平,张晓平,时瑞梓,等.民族药地板藤止血抗炎及镇痛作用研究[J].时珍国医国药,2017,28(12):2905-2906.

[10] 张文平,张晓平,马大龙,等.民族药地板藤不同萃取部位体外抗病毒实验研究[J].中国现代中药,2018,20(3):288-304.

[11] 汤秀梅,王京昆,刘波,等.民族药地板藤的质量标准研究[J].云南中医中药杂志,2009,30(11):47-48.

[12] 唐丽萍,房秀艳,蒋晖,等.云南习用药材地板藤的质量标准研究[J].云南中医学院学报,2007,30(4):13-16.

[13] 邹纯才,鄢海燕.中药指纹图谱及其数字化[M].合肥:安徽科学技术出版社,2008:99-100.

[14] 金高娃,章飞芳,薛兴亚,等.超高效液相色谱在复杂体系中中药分离分析中的应用[J].世界科学技术,2006,8(3):106-111.

[15] 钮松召,崔颖,卢菲,等.蒙药山川柳的HPLC指纹图谱建立、相似度评价和聚类分析[J].中国药房,2019,30(8):1091-1094.

[16] 郭威,孙蓉,王亮,等.基于指纹图谱和OPLS-DA的越南和国产土茯苓差异性化合物探索[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(14):62-67.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81873571)
* 副教授,硕士。研究方向:抗肿瘤天然药物工程。E-mail:1026443774@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:抗肿瘤天然药物工程。E-mail:714259965@qq.com

(收稿日期:2019-06-29 修回日期:2019-11-06)

(编辑:陈宏)

Study on the Mechanism of *Sophora tonkinensis* in the Treatment of Leukemia Based on Network Pharmacology

FU Hairong¹, PANG Yi², TAN Jiahua³, LI Jing⁴, DENG Xuesong¹ (1. Dept. of Basic Medicine, Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2. Center for Natural Anti-tumor Medicine Engineering, Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 3. Dept. of Public Foundation, Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 4. Central Laboratory, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Chongqing 404120, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the potential mechanism of *Sophora tonkinensis* in the treatment of leukemia. METHODS: The active components and their target proteins of *S. tonkinensis* were searched by the analysis of traditional Chinese medicine system pharmacology platform, and UniProt database and PubMed database were used to query corresponding gene names of target proteins of active components. Cytoscape 3.6.0 software was used to construct compound-target network. The genes related to leukemia were searched by DisGeNET databases, and OmicShare platform was used to screen the intersection genes of the active component targets of *S. tonkinensis* and leukemia disease targets. STRING database and Cytoscape 3.6.0 software were used to construct PPI network, and topological analysis was performed. GO analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed by using DAVID bioinformatics database. RESULTS: There were 13 active components and 204 target proteins in *S. tonkinensis*. The components and targets with high node degree included quercetin, kaempferol, PTGS2, PRSS1, CAMKK2, etc. There were 24 intersection genes between the active component target and leukemia target, including *IRF1*, *BCL2*, *CYP11A1*, *PIM1*, etc. PPI network of the above intersection genes contained 24 nodes and 142 edges, with an average node degree of 6.5 and an average medium of 0.045. The results of GO analysis showed that the biological process of the above-mentioned genes involved in apoptosis signaling pathway *in vitro* without ligands, negative regulation of apoptosis process, positive regulation of B cell proliferation, etc. Molecule function mainly included that protein homology activity and binding of the same protein. Cell components mainly included extracellular region, mitochondria and so on. KEGG pathway enrichment showed that above-mentioned genes were mainly associated with T cell receptor signaling pathway, JAK/STAT signaling pathway, HTLV- I infection. CONCLUSIONS: Through JAK/STAT signaling pathway and HTLV- I infection pathway, the active components of *S. tonkinensis* may act on PTGS2, PRSS1, CAMKK2 and other targets, and then play a therapeutic role on leukemia, showing the characteristics of multi-component, multi-target and multi-channel.

KEYWORDS *Sophora tonkinensis*; Leukemia; Network pharmacology; Target; Gene; Pathway

白血病(Leukemia)是造血系统最常见的恶性肿瘤,发病率和病死率均较高,其主要症状为贫血、发热、出血、疲乏、胸骨压痛以及肝、脾、淋巴结肿大、神经系统炎症、骨骼及关节病变等^[1]。该病常见的病因包括病毒感染、化学因素、电离辐射、放射污染等,同时还与个体自身条件、遗传因素以及所处环境有关^[2]。研究表明,我国白血病发病率占各类型肿瘤的第6位^[3],且位居儿童恶性肿瘤的首位,已成为儿童死亡的主要原因之一^[4]。目前,临床上治疗白血病的方法主要包括造血干细胞移植、嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)免疫疗法、化学药治疗等^[5]。但由于上述治疗手段存在供体稀少或排斥反应明显、毒副作用大等潜在风险,严重影响了患者的疗效和预后^[6-7]。因此,寻找高效、低毒的药物是治愈白血病的关键。

中药具有药源广、毒性低、靶点多等特点,在白血病治疗领域具有一定的研究价值^[8]。祖国医学早在《黄帝内经》《金匱要略》等医籍中就有关于白血病临床表现及发病特点的记载,该症属中医学“虚劳”“热劳”“瘀积”

“血证”范畴^[9]。研究表明,多数医家对白血病辨证分型较为统一的观点为“本虚标实”,其中“本虚”主要以气阴、气血两虚为主,多由病程迁延、反复发作所致;而“标实”则包含“痰”“瘀”“毒”等3种,三者往往相互夹杂,尤其是痰凝、瘀血通常同时出现^[10]。

山豆根为豆科植物越南槐(*Sophora tonkinensis* Gagnep.)的干燥根及根茎,主产于我国广西西南部至西北部,具清热解毒、利咽消肿之功,常用于治疗咽炎、心律失常等症^[11]。山豆根的主要成分包括生物碱、黄酮、三萜、多糖类等化合物,其中生物碱(氧化苦参碱、苦参碱等)是山豆根的主要活性成分和药效物质基础^[12]。据报道,氧化苦参碱具有抗病毒、调节免疫、改善炎症、抗氧化等药理作用^[13-14];苦参碱可通过诱导细胞凋亡和直接损伤细胞膜而杀伤鼠淋巴细胞白血病L1210细胞^[15],还可提高人急性淋巴细胞性白血病MOLT-4细胞的早期凋亡率,使得Bcl-2编码基因表达下降^[16]。由此可见,山豆根及其活性成分具有一定的开发价值。

网络药理学突破了传统的“一种药物,一个靶点”理

念,借助网络分析、生物信息技术等手段,对传统中药成分的潜在靶点、药理作用进行多基因、多靶点、多途径的系统研究,可系统地、整体地探究中医药的药理机制,为中医药现代化研究提供了新的思路^[17]。网络药理学与中药研究的结合,有助于辨识活性成分、预测作用靶点、阐明作用机制和途径,并为挖掘新的活性化合物奠定了基础^[18]。鉴于此,本研究采用网络药理学的方法对山豆根用于治疗白血病的可能作用机制进行了系统探讨,以期为白血病的药物治疗提供参考。

1 资料与方法

1.1 山豆根活性成分及靶点蛋白的筛选

运用中药系统药理学分析平台数据库(TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>),以“Shan Dou Gen”“*Sophora tonkinensis* Gagnep.”等为关键词查询山豆根所含化学成分。根据TCMSP推荐,以口服利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18(其中,OB是客观评价药物分子口服生物利用度的重要指标,DL是评价药物分子成药性高低的指标)^[19]作为筛选条件,对山豆根活性成分及其对应靶点蛋白进行筛选。

1.2 化合物-靶点网络的构建

首先通过UniProt数据库(<http://www.uniprot.org/>)、PubMed数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)查询活性成分靶点蛋白对应的基因名称,再利用Cytoscape 3.6.0软件构建山豆根化合物-靶点网络,并进行可视化展示和拓扑学分析。以节点表示活性成分和靶点蛋白,节点之间以边相连;节点度值表示与某节点相连边的数量,其值越大,表明该节点在网络中越重要(下同)。

1.3 交集基因蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络的构建

为进一步了解山豆根靶点蛋白和白血病靶点在蛋白水平上的相互作用机制,先以“Leukemia”为关键词,通过DisGeNET数据库(<http://www.disgenet.org/>)查询与白血病相关的基因(即疾病靶点);再将山豆根靶点蛋白对应基因和白血病靶点基因上传至OmicShare平台(<http://www.omocshare.com>),选择“韦恩图”,获得山豆根活性成分靶点与白血病靶点的交集基因。将上述交集基因导入STRING数据库(<http://string-db.org/>)中,构建山豆根与白血病的PPI网络,并以节点度值为指标,使用Cytoscape 3.6.0软件进行可视化展示和拓扑学分析。

1.4 交集基因的通路分析

将“1.3”项下所得交集基因导入DAVID生物信息学数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)中,进行基因本体(GO)分析和KEGG通路富集分析。在此过程中,限定物种为“Homo sapiens(人)”,标识符(Identifier)设置为“Official gene symbol(官方名称)”,以P值反映生物功能

的显著性及通路的富集程度($P < 0.05$,表示该富集结果具有显著性;P值越小,则其显著性越高)。将P值由小到大排序前20位的富集结果导入OmicShare在线作图平台(<http://www.omicshare.com/tools/index.php/>)中进行可视化展示。

2 结果

2.1 山豆根活性成分的筛选结果

通过TCMSP共检索到山豆根化学成分79个;以OB≥30%和DL≥0.18为标准,共筛选出活性成分21个,其基本信息见表1(表中,两个“槐醇”的分子构象不同,故其TCMSP编号以及OB、DL均不同)。

表1 山豆根活性成分基本信息

Tab 1 Basic information of active compounds in *S. tonkinensis*

TCMSP编号	化学成分(英文名称)	分子量	OB, %	DL
MOL001484	高丽槐素(Inermine)	284.28	75.18	0.54
MOL000354	异鼠李素(Isorhamnetin)	316.28	49.60	0.31
MOL003627	槐果碱(Sophocarpine)	246.39	64.26	0.25
MOL003629	黄豆苷元-4,7-二葡萄糖(Daidzein-4,7-diglucoside)	578.57	47.27	0.67
MOL003633	羟基那可丁(Oxynarotine)	431.48	56.74	0.60
MOL003644	醉茄素(Withaferine)	470.66	33.14	0.73
MOL003647	槐树素(Sophojaponicin)	446.44	41.51	0.79
MOL003648	山槐素(Inermin)	284.28	65.83	0.54
MOL003651	大豆皂苷 be (4aR, 6aR, 6aS, 6bR, 8aR, 9S, 10S, 12aR, 14bS-10-hydroxy-2, 2, 4a, 6a, 6b, 9, 12a-heptamethyl-9-methylol-3, 5, 6, 6a, 7, 8, 8a, 10, 11, 12, 13, 14b-dodecahydro-1H-picen-4-one)	456.78	37.64	0.75
MOL003656	黄羽扇豆魏特酮(Lupiwighteone)	338.38	51.64	0.37
MOL003663	槐醇(Sophoranol)	264.41	67.32	0.28
MOL003669	大豆皂苷 C(Subprogenin C)	470.76	36.18	0.74
MOL003673	5,7,4'-三羟基-6-异戊烯基异黄酮(Wighteone)	338.38	42.81	0.36
MOL003675	臭豆碱(3,4,5,6-tetrahydrospartein-2-one)	244.37	71.26	0.24
MOL003676	槐胺碱(Sophoramine)	244.37	42.16	0.25
MOL003677	槐醇(Sophoranol)	262.44	62.77	0.28
MOL003680	槐定碱(Sophoridine)	248.41	60.07	0.25
MOL005944	苦参碱(Matrine)	248.41	63.77	0.25
MOL000392	芒柄花黄素(Formononetin)	268.28	69.67	0.21
MOL000422	山柰素(Kaempferol)	286.25	41.88	0.24
MOL000098	槲皮素(Quercetin)	302.25	46.43	0.28

2.2 化合物-靶点网络的分析结果

山豆根化合物-靶点网络见图1(图中,三角形表示山豆根活性成分,矩形表示靶点蛋白对应的基因)。由图1可见,该网络共包括217个节点和788条边,其中活性成分节点13个[表1中的醉茄素、槐树素、大豆皂苷be、槐醇(MOL003663、MOL003677)、大豆皂苷C、臭豆碱、槐胺碱等8个活性成分没有对应靶点]、靶点蛋白节点204个。该网络中,每个化合物平均与5.67个靶点相互作用,每个靶点平均与2.99个化合物相互作用。拓扑学分析结果显示,节点度值排序前5位的化合物分别为槲皮素、山柰素、芒柄花黄素、异鼠李素、黄羽扇豆魏特酮,分别能与154、63、39、37、21个靶点蛋白发生作用;节点度值排序前5位的靶点蛋白分别为前列腺素内过氧化

物合酶2(PGSG2)、蛋白质丝氨酸蛋白酶1(PRSS1)、钙调蛋白依赖的蛋白激酶2(CAMKK2)、热休克蛋白90α家族B类成员1(HSP90AB1)、PTGS1,分别与9、8、8、8、6个化合物发生作用。

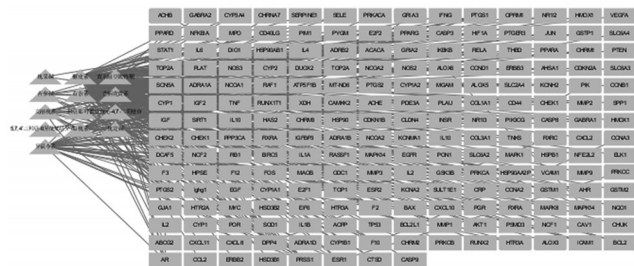


图1 山豆根化合物-靶点网络

Fig 1 Compound-target network diagram of *S. tonkinensis*

2.3 山豆根与白血病的交集基因

通过UniProt和PubMed数据库查询到山豆根活性成分靶点蛋白对应基因168个(排除非人类的靶点基因),在DisGeNET数据库中获得白血病相关基因1916个。通过韦恩图(见图2)可知,山豆根活性成分靶点和白血病疾病靶点的交集基因共有24个,分别为 *IRF1*、*BCL2*、*CYP1A1*、*PIM1*、*MPO*、*ACHE*、*GSK3B*、*STAT1*、*IL10*、*PIK3CG*、*PLAT*、*SOD1*、*IL2*、*IFNG*、*IL4*、*TOP2A*、*ICAM1*、*RB1*、*ODC1*、*F3*、*CDKN2A*、*JUN*、*CYP1B1*、*TOP1*。

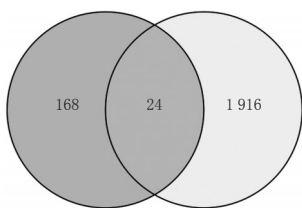


图2 山豆根活性成分靶点与白血病疾病靶点交集基因的韦恩图

Fig 2 Wayne map of intersection genes of active compounds related targets of *S. tonkinensis* and leukemia related targets

2.4 山豆根与白血病PPI网络的分析结果

将上述筛选出的24个交集基因导入STRING进行PPI分析,其可视化图谱见图3。由图3可见,该网络共包含节点24个、边142条,平均节点度值为6.5,平均介数为0.045。

2.5 交集基因通路的分析结果

将上述交集基因导入DAVID生物信息学数据库中进行GO分析,共得到GO条目29个($P < 0.05$),其中生物过程18个、分子功能7个、细胞组分4个,主要涉及缺乏配体的体外凋亡信号通路、蛋白质同源化活性等,且主要集中在胞外区,详见表2~表4。

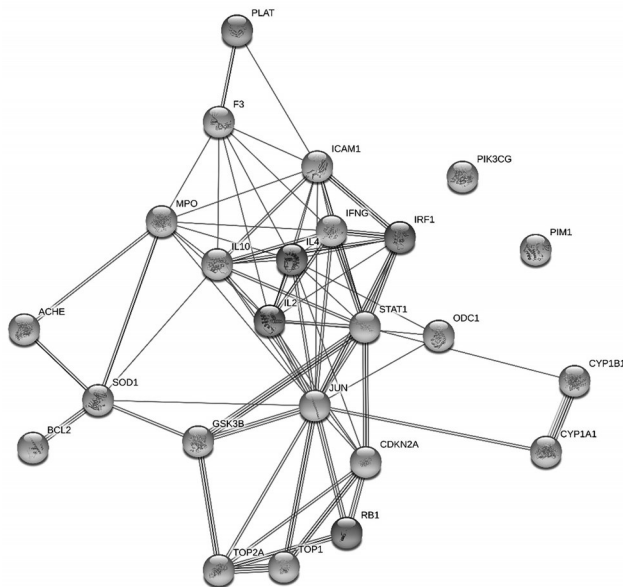


图3 山豆根与白血病的PPI网络

Fig 3 PPI network of *S. tonkinensis* and leukemia

表2 交集基因的GO分析结果(生物过程)

Tab 2 GO analysis results of intersection genes (biological processes)

GO编号	GO功能注释(英文名称)	基因数	P
GO0097192	缺乏配体的体外凋亡信号通路(Extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand)	4	0.000 01
GO0043066	凋亡过程的负调控(Negative regulation of apoptotic process)	7	0.000 02
GO0030890	B细胞增殖的正调控(Positive regulation of B cell proliferation)	3	0.001 28
GO0042542	过氧化氢反应(Response to hydrogen peroxide)	4	0.000 04
GO0034097	细胞因子反应(Response to cytokine)	4	0.000 04
GO0045348	主要组织相容性复合体(MHC) II生物合成过程的正调控(Positive regulation of MHC class II biosynthetic process)	3	0.000 04
GO0043524	神经元凋亡过程的负调控(Negative regulation of neuron apoptotic process)	3	0.013 92
GO0048304	同型转变为IgG同型抗原的正调控(Positive regulation of isotype switching to IgG isotypes)	3	0.000 04
GO0006955	免疫反应(Immune response)	4	0.019 09
GO0045893	转录的正调控(Positive regulation of transcription, DNA-templated)	7	0.000 05
GO0008285	细胞增殖的负调控(Negative regulation of cell proliferation)	6	0.000 16
GO0007050	细胞周期阻滞(Cell cycle arrest)	4	0.000 90
GO0007265	Ras蛋白信号转导(Ras protein signal transduction)	3	0.004 09
GO0045892	转录的负调控(Negative regulation of transcription, DNA-templated)	5	0.004 35
GO0042832	原生动物的防御反应(Defense response to protozoan)	3	0.000 30
GO0051726	细胞周期的调节(Egulation of cell cycle)	3	0.012 36
GO0016925	蛋白质的SUMO化修饰(Protein sumoylation)	3	0.011 06
GO0055114	氧化还原过程(Oxidation-reduction process)	4	0.045 73

KEGG通路富集分析共筛选出46条信号通路($P < 0.05$),主要涉及T细胞受体信号通路、Janus激酶/信号传导及转录激活因子(JAK/STAT)信号通路、人类嗜T淋巴细胞I型病毒(HTLV-I)感染等,详见图4(图中数字为P值)。

3 讨论

山豆根收载于2015年版《中国药典》(一部)中,为豆科植物越南槐(*S. tonkinensis* Gagnep.)的干燥根及根茎^[20]。该药为常用中药材,味苦,性寒,具有清火、解毒、

表3 交集基因的GO分析结果(分子功能)

Tab 3 GO analysis results of intersection genes (molecular function)

GO编号	GO功能注释(英文名称)	基因数	P
GO0042803	蛋白质同源化活性(Protein homodimerization activity)	7	0.000 34
GO0042802	相同蛋白质的结合(Identical protein binding)	5	0.017 36
GO0005125	细胞因子活性(Cytokine activity)	4	0.001 69
GO0008083	生长因子活性(Growth factor activity)	3	0.020 29
GO0003677	DNA结合(DNA binding)	7	0.021 69
GO0020037	血红素结合(Heme binding)	3	0.014 79
GO0003682	染色质绑定(Chromatin binding)	4	0.015 48

表4 交集基因的GO分析结果(细胞组分)

Tab 4 GO analysis results of intersection genes (cell components)

GO编号	GO功能注释(英文名称)	基因数	P
GO0005576	胞外区(Extracellular region)	7	0.012 78
GO0005739	线粒体(Mitochondrion)	7	0.005 41
GO0000228	细胞核染色质(Nuclear chromosome)	3	0.002 01
GO0005634	细胞核(Nucleus)	13	0.198 03

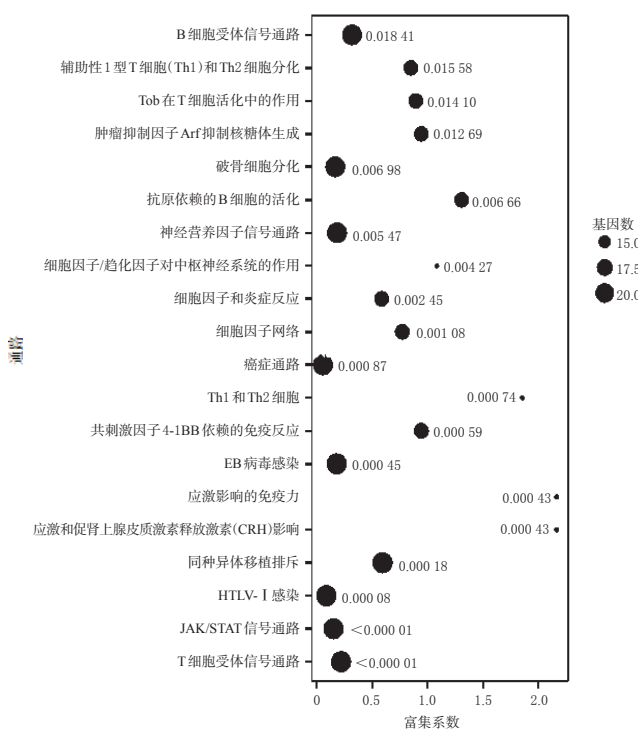


图4 交集基因的KEGG通路富集分析结果(前20位)

Fig 4 KEGG pathway analysis results of intersection genes (Top 20)

消肿、止痛等功效,可用于治疗心律失常、黄疸、咽喉炎等疾病^[1, 21-22]。近年国内外研究表明,山豆根具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、保护心血管系统、增强免疫力、抗炎、抗溃疡等多种活性^[23]。药理研究证明,山豆根生物碱具有抗菌、消炎、平喘、抗癌和保肝等活性^[24];部分黄酮类化合物具有抗肿瘤、抗心脑血管疾病、抗炎镇痛、免疫调节、降血糖、抗氧化、抗衰老、抗辐射等作用^[25];同时,山豆根的总糖含量为54.37%,且具有抗氧化、增强

免疫力的活性^[26]。

本研究通过TCMSP共检索到山豆根活性成分21个,其中有对应靶点的成分13个。由山豆根化合物-靶点网络可见,上述13个活性成分作用于204个靶点,充分体现了中药治疗疾病多成分、多靶点的特点。张良等^[27]研究证明,复方山豆根注射液对B16黑色素瘤和Lewis肝癌荷瘤小鼠肿瘤细胞的生长均具有抑制作用,并可延长小鼠的生存期。姚仲青等^[28]研究发现,山豆根总生物碱对S180、H22、ESC肿瘤细胞具有一定的抑制作用,但抑瘤率偏低。该网络中,节点度值排序前5位的化合物依次为槲皮素、山柰素、芒柄花黄素、异鼠李素、黄羽扇豆魏特酮,其中槲皮素的相关研究较多。槲皮素能全面地作用于肿瘤的启动、促进和发展等3个阶段,兼有抗促癌、抗致癌和诱导分化的作用,对白血病细胞、乳腺癌细胞等均有一定的抑制作用^[29];同时,该化合物还可促进宫颈癌HeLa细胞的凋亡、抑制人乳腺癌T47D细胞的增殖^[30-31]。Wu XY等^[32]实验发现,芒柄花黄素作为成纤维细胞生长因子受体2(FGFR2)抑制剂,可阻断乳腺癌裸鼠体内FGFR2介导的磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路,降低肿瘤细胞活性。杜倩倩等^[33]研究发现,异鼠李素可协同索拉非尼抑制c-Raf/丝裂原激活蛋白激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路,促进肿瘤细胞凋亡并抑制其增殖。而其余几种化合物与肿瘤相关性的报道不多,可作为学者后续研究的重点之一。该网络中排序前5位的靶蛋白分别为PTGS2、PRSS1、CAMKK2、HSP90AB1、PTGS1。Tan C等^[34]研究发现,PTGS2可激活核因子κB(NF-κB)信号通路并减轻放疗后的DNA损伤。有研究表明,PRSS1低表达可阻碍ERK信号通路激活,抑制胃癌MGC803细胞的增殖^[35]。CAMKK2存在于大鼠、小鼠及人类的受钙离子调控的蛋白激酶(66~68 kDa)中,研究证实其具有非常重要的生物学功能(如细胞增殖调控等),是潜在的药物干预靶点^[36]。王明慧等^[37]研究表明,HSP90AB1在非小细胞肺癌细胞中呈高表达,并且与肺腺癌患者预后不良有关。Chen WY等^[38]发现,PTGS1编码基因的启动子可与转录辅助激活因子ZBTB46结合,使得后者表达下调,从而增加PTGS1抑制剂的敏感性,最终降低机体肿瘤恶性程度。鉴于上述靶蛋白在肿瘤方面的活性,笔者认为其可能成为山豆根治疗白血病等肿瘤的相关靶点。

从韦恩图可知,山豆根与白血病的交集基因共24个,提示山豆根对白血病的治疗具有多靶点协同作用的特点。由PPI图可见,该网络共包含节点24个、边142条,提示这些交集基因编码蛋白之间相互作用紧密。GO分析结果显示,疾病靶点主要针对生物过程,如缺乏配体的体外凋亡信号通路、凋亡过程的负调控、B细胞增

殖的正调控、过氧化氢反应、细胞因子反应、MHC II 类生物合成过程的正调控等。KEGG 通路富集分析发现,山豆根与白血病最相关的通路包括 T 细胞受体信号通路、JAK/STAT 信号通路、HTLV- I 感染等。其中,HTLV- I 感染通路涉及的靶点基因有 *PIK3CG*、*ICAM1*、*CDKN2A*、*JUN*、*GSK3B*、*RB1*、*IL2*; 癌症通路涉及的靶点基因有 *PIK3CG*、*CDKN2A*、*JUN*、*GSK3B*、*BCL2*、*RB1*、*STAT1*; EB 病毒感染通路涉及的靶点基因有 *PIK3CG*、*ICAM1*、*JUN*、*BCL2*、*RB1*。研究表明, *c-JUN* 是原癌基因,是激活蛋白 1(AP-1)复合物中活性最强的转录因子,活化后的 *c-JUN* 可参与调节细胞增殖、存活、凋亡等多个过程^[39]。Chen KC 等^[40]研究发现,磷脂酶 A2 可通过 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化 c-Jun 蛋白来调节 Fas/FasL 的表达,从而诱导人慢性髓原白血病细胞株 K562 细胞凋亡。王应天等^[41]研究显示,内皮细胞黏附因子 1(ICAM-1)在乳腺癌、肝癌、结直肠癌组织中的表达明显高于癌旁组织和正常组织,且高表达的 ICAM-1 与淋巴转移相关。Bcl-2 是在调节细胞凋亡和阻滞细胞周期中发挥重要作用的抗凋亡蛋白。有研究表明, *BCL2* 基因-938C>A 启动子多态性可显著影响多种癌症细胞中该基因的启动子活性及 Bcl-2 蛋白的表达^[2]。Nava-Rodríguez MP 等^[42]研究发现,慢性淋巴细胞白血病患者存在单等位基因 *RB1*、*DLEU* 等基因缺失。由上述研究可知,与白血病通路相关的基因包括 *c-JUN*、*ICAM1*、*BCL2*、*RB1*,其可能是山豆根活性成分发挥白细胞治疗作用的靶点。此外,本研究挖掘出的 *PIK3CG*、*CDKN2A* 等其他基因,也可作为后续研究的对象之一。

综上所述,本研究通过网络药理学的方法探讨了山豆根的活性成分、作用靶点和其对白血病的潜在作用机制,发现除已有报道的成分外,还有一些有潜在治疗作用的化合物以及靶点,可作为后续研究的重点之一,可为山豆根治疗白血病及后期的新药研发提供参考。

参考文献

- [1] 陶燕芳. KAT2A、CDK4/CDK6 重要基因在儿童急性白血病中的作用机制研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.
- [2] 黄体龙, 李曾丽, 桑宝华, 等. BCL2-938C>A 基因多态性与儿童急性淋巴细胞白血病危险度的相关性研究[J]. 重庆医学, 2019, 48(11): 1836-1839.
- [3] 第四届全国难治性白血病研讨会关于难治性急性白血病诊断标准的商讨纪要[J]. 白血病·淋巴瘤, 2004, 13(2): 70.
- [4] 李泮霖, 苏薇薇. 网络药理学在中药研究中的最新应用进展[J]. 中草药, 2016, 47(16): 2938-2942.
- [5] 张利强, 陈振萍, 郑杰. 国产甲磺酸伊马替尼治疗儿童慢性髓系白血病慢性期的早期疗效和安全性分析[J]. 首都医科大学学报, 2019, 40(2): 174-178.
- [6] 李建勇, 夏奕, 徐卫. 慢性淋巴细胞白血病治疗进展[J]. 山东大学学报(医学版), 2019, 57(7): 10-19.
- [7] ERTL HC, ZAIA J, ROSENBERG SA, et al. Considerations for the clinical application of chimeric antigen receptor T cells: observations from a recombinant DNA advisory committee symposium held June 15, 2010[J]. *Cancer Res*, 2011, 71(9): 3175-3181.
- [8] 杨茜, 杜青, 吴娟丽, 等. 中药治疗白血病的研究进展[J]. 新疆中医药, 2019, 37(3): 86-89.
- [9] 韩延忠, 周永峰, 桑秀秀, 等. 氧化苦参碱对 H₂O₂ 诱导 L02 细胞损伤的抑制作用及其机制的研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(7): 1302-1307.
- [10] 邹恒伟. 山豆根的研究进展与趋向[J]. 广西农学报, 2014, 29(3): 43-47, 52.
- [11] KAJIMOTO S, TAKANASHI N, KAIMOTO T, et al. Sophorane, extracted from a traditional Chinese medicine Shandougen, induces apoptosis in human leukemia U937 cells via formation of reactive oxygen species and opening of mitochondrial permeability transition pores[J]. *Int J Cancer*, 2002, 9(6): 879-890.
- [12] 潘其明, 黄日镇, 潘英明, 等. 山豆根的化学成分研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 96-100.
- [13] TAKEDA T, TSUBAKI M, SAKAMOTO K, et al. Mangiferin, a novel nuclear factor kappa B-inducing kinase inhibitor, suppresses metastasis and tumor growth in a mouse metastatic melanoma model[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016. DOI: 10.1016/j.taap.2016.07.005.
- [14] LIU Y, HUANG H, LIN J, et al. Suppressive effects of genomic imprinted gene PEG10 on hydrogen peroxide-induced apoptosis in L02 cells[J]. *J Huazhong Univ Sci Tech Med Sci*, 2009, 29(6): 705-709.
- [15] 张春雷, 周小梅, 吕琪, 等. 苦参碱诱导淋巴细胞白血病 L1210 细胞凋亡的实验研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 47(16): 2930-2936.
- [16] 孙文洪, 何金花, 韩泽平, 等. Has-miR-204 反义核酸提高 MOLT-4 细胞对苦参碱的敏感性研究[J]. 安徽医药, 2014, 18(3): 437-440.
- [17] BHOWMICK D, BHAR K, MALLICK SK, et al. Paraphenylenediamine induces apoptotic death of melanoma cells and reduces melanoma tumour growth in mice[J]. *Biochem Res Int*, 2016. DOI: 10.1155/2016/3137010.
- [18] AZIKE CG, CHARPENTIER PA, LUI EM. Stimulation and suppression of innate immune function by American ginseng polysaccharides: biological relevance and identification of bioactives[J]. *Pharm Res*, 2015, 32(3): 876-897.
- [19] 宗阳, 董宏利, 陈婷, 等. 基于网络药理学黄芩-黄连药对治疗 2 型糖尿病作用机制探讨[J]. 中草药, 2019, 50(4): 888-894.

- [20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:27-30.
- [21] 朱大诚,周军,何莲花,等.山豆根水提物对白血病CEM细胞生长抑制及其机制研究[J].时珍国医国药,2012,23(8):1931-1933.
- [22] 张涛.山豆根药理作用与临床应用研究近况[J].广西中医学院学报,2018,11(3):110-110,117.
- [23] RYU JK, KIM SJ, RAH SH, et al. Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer[J]. *Immunity*, 2016, 46(1):38-50.
- [24] 刘建军,黄亮,刘辉.葛根素对人骨肿瘤细胞株MG63的增殖抑制和诱导凋亡作用[J].中国现代应用药学,2016,33(3):300-304.
- [25] ROUDEN J, LASNE MC, BLANCHET J, et al. (-)-cytosine and derivatives: synthesis, reactivity, and applications [J]. *Chem Rev*, 2014, 114(4):712-778.
- [26] POUNY I, BATUT M, VENDIER L, et al. Cytosine-like alkaloids from *Ormosia hosia* Hemsl. & E. H. Wilson.[J]. *Phytochemistry*, 2014. DOI: 10.1016/j.phytochem.2014.07.022.
- [27] 张良,张万峰,王日芝,等.复方山豆根注射液对荷瘤小鼠B16、Lewis抑瘤作用的实验研究[J].中医药信息,2001,18(6):53.
- [28] 姚仲青,朱虹,王光凤.山豆根总生物碱抗肿瘤作用的初步研究[J].南京中医药大学学报,2015,21(7):253-254.
- [29] PIETTA PG. Flavonoids as antioxidants[J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(7):1035-1042.
- [30] WANG YJ, ZHANG W, LV QG, et al. The critical role of quercetin in autophagy and apoptosis in HeLa cells[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(1):925-929.
- [31] 牟成金,潘武,汪静.槲皮素调控EGFR/AKT/mTOR信号通路对人乳腺癌细胞株T47D增殖和凋亡的影响[J].临床和实验医学杂志,2019,18(14):1460-1464.
- [32] WU XY, XU H, WU ZF, et al. Formononetin, a novel FGFR2 inhibitor, potently inhibits angiogenesis and tumor growth in preclinical models[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(42):44563-44578.
- [33] 杜倩倩,黄璐璐,刘春霞,等.异鼠李素与索拉非尼联合对肾癌的抑制作用及作用机制[J].药学学报,2019,54(8):1424-1430.
- [34] TAN C, LIU L, LIU XY, et al. Activation of PTGS2/NF- κ B signaling pathway enhances radiation resistance of glioma [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(3):1175-1185.
- [35] 邱虎,余保平.血清肿瘤标志物在消化系统肿瘤诊断中的研究进展[J].医学综述,2017,23(1):72-75,81.
- [36] Marcelo KL, Means AR, York B. The Ca²⁺/calmodulin/CAMKK2 axis: nature's metabolic CaMshaft[J]. *Trend Endocrinol Metab*, 2016, 27(10):706-718.
- [37] 王明慧,冯林,李萍,等. HSP90AB1在非小细胞肺癌中高表达并且与肺腺癌患者预后不良有关[J].中国肺癌杂志,2016,19(2):64-69.
- [38] CHEN WY, ZENG TW, WEN YC, et al. Androgen deprivation-induced ZBTB46-PTGS1 signaling promotes neuroendocrine differentiation of prostate cancer[J]. *Cancer Letters*, 2018, 10(16):665-671.
- [39] CHEN S, LI F, CHAI H, et al. miR-502 inhibits cell proliferation and tumor growth in hepatocellular carcinoma through suppressing phosphoinositide 3-kinase catalytic subunit gamma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 464(2):500-505.
- [40] CHEN KC, CHIOU YL, CHANG LS. JNK1/c-Jun and p38 alpha MAPK/ATF-2 pathways are responsible for up-regulation of Fas/FasL in human chronic myloid leukemia K562 cells upon exposure to Taiwan cobra phospholipase A2[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(3):612-620.
- [41] 王应天,林洪生,樊慧婷,等. ICAM-1在肿瘤转移中的作用及研究进展[J].河北医药,2019,41(2):269-272.
- [42] NAVA-RODRÍGUEZ MP, DOMÍNGUEZ-CRUZ MD, AGUILAR-LÓPEZ LB, et al. Genomic instability in a chronic lymphocytic leukemia patient with mono-allelic deletion of the DLEU and RB1 genes[J]. *Mol Cytogenet*, 2019. DOI:10.1186/s13039-019-0417-5.

(收稿日期:2019-04-28 修回日期:2019-08-27)

(编辑:张元媛)

《中国药房》杂志——RCCSE中国核心学术期刊, 欢迎投稿、订阅