

基于网络药理学与分子对接技术的汉黄芩素 抗肿瘤作用机制研究[※]

黄恺飞*

摘要 **目的:**利用网络药理学和分子对接方法研究汉黄芩素的抗肿瘤机制。**方法:**通过PubChem、Swiss Target Prediction、TCMSP、Gene Cards和TTD数据库进行检索,分别建立汉黄芩素和肿瘤的靶点数据集,利用STRING平台和Cytoscape 3.8.0软件筛选核心靶点并进行可视化展示,运用DAVID 6.8数据库对核心靶点进行GO和KEGG富集分析,利用AutoDockTools 1.5.6软件对汉黄芩素与核心靶点进行分子对接验证。**结果:**汉黄芩素治疗肿瘤的作用靶点有165个,其中核心靶点包括TP53、RELA、SRC、MAPK1、AKT1等,共19个;汉黄芩素通过作用于多个生物过程(如乙型肝炎、HIF-1信号通路、PI3K-Akt信号通路、催乳素信号通路、TNF信号通路等通路),涉及RNA聚合酶II启动子的转录上调、凋亡过程的抑制、转录激活以及内皮细胞增殖的促进等机制来发挥抗肿瘤作用。分子对接结果显示,汉黄芩素与RELA以及TP53等关键靶点有着较好的结合活性。**结论:**汉黄芩素通过多种靶点和信号通路(如NFκB和p53信号通路)发挥其抗肿瘤作用。

关键词 汉黄芩素;网络药理学;分子对接技术;抗肿瘤机制

汉黄芩素是中药黄芩中的一种黄酮类化合物,具有广泛的生物活性,如抗肿瘤、抗炎、抗氧化以及抗病毒等^[1]。其中,汉黄芩素的抗肿瘤生物活性及作用机制方面成为国内外的研究热点,但是目前未能系统地阐释汉黄芩素的抗肿瘤作用机制。

本研究通过网络药理学和分子对接技术对汉黄芩素的抗肿瘤作用机制进行全面而系统的解析,以期对抗肿瘤药物机制研究提供指导。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件 ①数据库:TCMSP(<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>)、PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)、Swiss Target Prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)、Therapeutic Target Database(<http://db.idrblab.net/ttd/>)、Gene Cards(<https://www.genecards.org/>)、Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)、STRING(<https://string-db.org/>)、DAVID 6.8([\[david.ncbi.nlm.nih.gov/\]\(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/\)\)和PDB\(<https://www.rcsb.org/>\);②软件:Cytoscape 3.8.0软件,AutoDockTools 1.5.6软件,PyMOL软件和在线韦恩图\(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>\)。](https://</p></div><div data-bbox=)

1.2 汉黄芩素与肿瘤靶点数据集构建 通过PubChem、Swiss Target Prediction、TCMSP和Gene Cards数据库分别检索汉黄芩素(Wogonin)对应的靶点,并利用Uniprot数据库将所得靶点名称转化为基因名称,取其并集构建汉黄芩素的靶点数据集;通过Therapeutic Target Database(TTD)和Gene Cards数据库分别检索肿瘤(Tumour)对应的靶点,取其并集构建肿瘤的靶点数据集。

1.3 汉黄芩素抗肿瘤核心靶点筛选 利用在线韦恩图获取汉黄芩素与肿瘤的交集靶点作为汉黄芩素抗肿瘤的潜在靶点,将潜在靶点导入STRING平台和Cytoscape 3.8.0,根据度、接近度和中介中心值筛选前30个靶点,提取其交集作为汉黄芩素的核心抗肿瘤靶点。

1.4 GO与KEGG富集分析 将核心靶点上传至DAVID 6.8分析平台,以校正 $P < 0.01$ 筛选汉黄芩素抗肿瘤作用的生物过程和信号通路,探讨其作用机制。

1.5 分子对接 从TCMSP数据库获取汉黄芩素的

※基金项目 厦门“十三五”海洋经济创新发展示范项目(No.16PFW008SF15)

*作者简介 黄恺飞,男,高级工程师,生物化工博士。主要从事分子药理、海洋药物研究。

•作者单位 厦门市南方海洋研究中心秘书处(福建 厦门 361008)

3D 结构文件(mol2 格式),在 PDB 数据库中找到核心靶蛋白的结构文件,并基于其共晶配体定位对接口袋;使用 AutoDock Tools 1.5.6 进行核心靶点与汉黄芩素的半柔性对接,采用半经验自由能算法评分。

2 结果

2.1 汉黄芩素抗肿瘤核心靶点 数据库检索后获得 178 个汉黄芩素靶点和 10146 个肿瘤靶点;韦恩图结果显示两者共有靶点为 165 个(见图 1)。其中,蛋白质互作分析(PPI)筛选出 19 个核心靶点(见图 2),包括 TP53、RELA、SRC、MAPK1 等,节点大小代表度值高低。

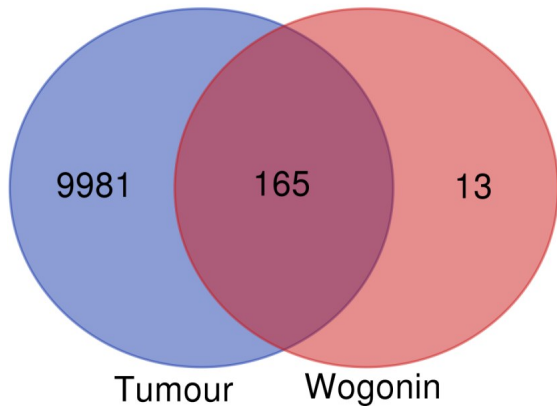


图 1 汉黄芩素和肿瘤靶点之间的韦恩图

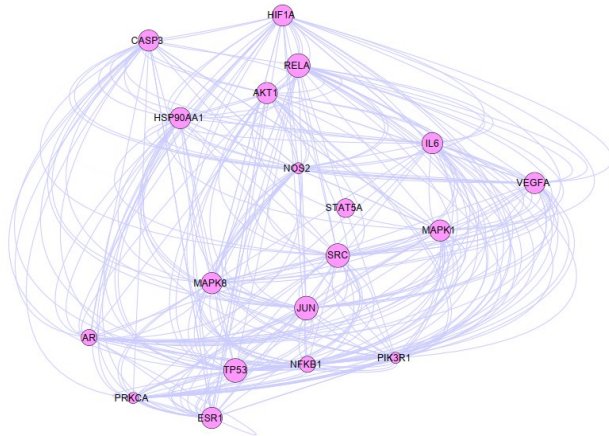


图 2 汉黄芩素抗肿瘤核心靶点的蛋白质互作分析

2.2 核心靶点 GO 和 KEGG 富集分析 基因本体分析(Gene Ontology analysis, GO)包括 3 个方面:生物过程(Biological process, BP)、细胞组分(Cellular component, CC)和分子功能(Molecular function, MF)。GO 富集分析结果显示,汉黄芩素抗肿瘤核心靶点生物过程包括 RNA 聚合酶 II 启动子转录上调、凋亡抑制、转录激活、内皮细胞增殖增强及细胞对脂多糖的

反应等;细胞组分显著富集在细胞质、细胞液和细胞核等部位;分子功能富集在蛋白质结合、转录因子结合、酶结合、特异性 DNA 结合、蛋白异二聚化、激酶活性和染色质结合等方面。见图 3。

KEGG 富集分析结果显示汉黄芩素抗肿瘤核心靶点显著富集的信号通路主要有癌症通路、乙型肝炎、HIF-1 信号通路、癌症中的蛋白多糖、PI3K-Akt 信号通路、催乳素信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、胰腺癌以及 ErbB 信号通路等。见图 4。

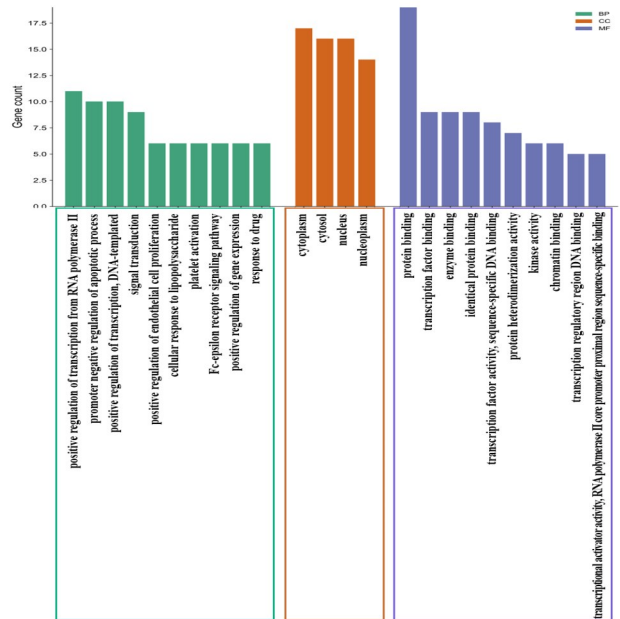


图 3 汉黄芩素抗肿瘤核心靶点 GO 富集分析

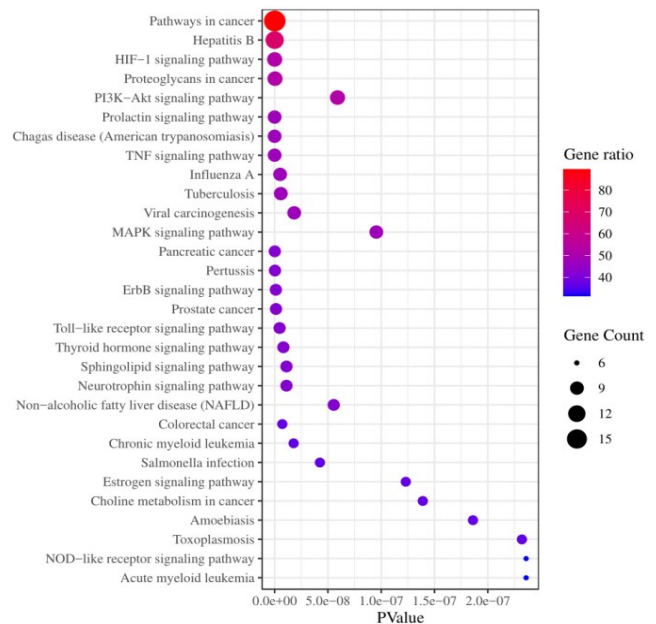


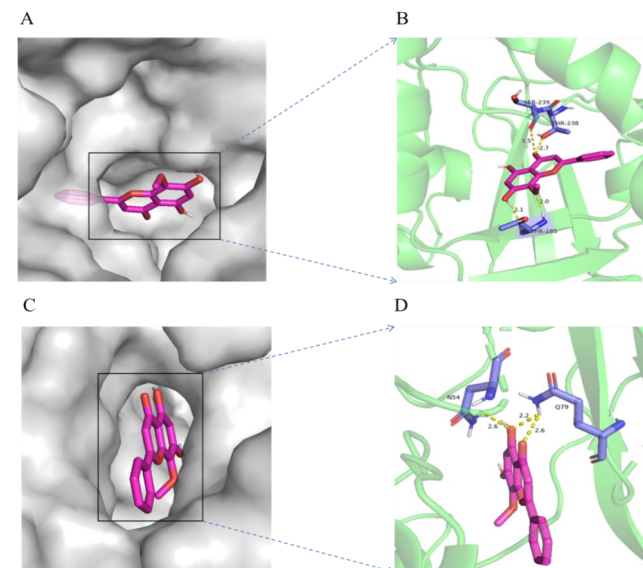
图 4 汉黄芩素抗肿瘤核心靶点 KEGG 富集分析

2.3 分子对接 分子对接结果(见表1)显示,所有核心靶蛋白的对接结合能都小于-4.25 kcal/mol,表明汉黄芩素与其均存在结合活性;根据活性物质与蛋白质间结合能越小则结合越牢固的原理^[2],筛选得到RELA(4ejn)和TP53(3s7b)两个最佳靶点,并通过PyMOL软件可视化展示其对接位点(见图5)。分子对接虚拟技术发现,汉黄芩素均稳定地位于对接口袋内。汉黄芩素通过氢键与TP53蛋白的SER-239、THR-238、THR-185三个氨基酸相互作用(图5A、图5B);同时,汉黄芩素与RELA蛋白的N54、Q79两个氨基酸形成氢键结合(图5C、图5D)。

表1 汉黄芩素与核心靶蛋白分子对接结果

对接的靶蛋白	结合能 (kcal/mol)	对接的靶蛋白	结合能 (kcal/mol)
AKT1(5a14)	-8.4	NFKB1(3vn2)	-7.3
AR(2ax6)	-6.4	NOS2(3qtf)	-8.7
CASP3(2h42)	-8.6	PIK3R1(3h0a)	-8.7
ESR1(1x7r)	-8.2	PRKCA(2vwz)	-8.4
HIF1A(5ikq)	-7.6	RELA(4ejn)	-9.4
HSP90AA1(3vhe)	-8.8	SRC(4mxo)	-7.9
IL6(3lxl)	-8.7	STAT5A(1wdy)	-6.8
JUN(3dkf)	-8.4	TP53(3s7b)	-9.3
MAPK1(5k4i)	-7.9	VEGFA(3vhe)	-7.8
MAPK8(3c7q)	-8.1		

制多种肿瘤增殖的药理活性而广受关注,其已被证实可抑制包括肺癌、胃癌、乳腺癌、肝癌、卵巢癌、直肠癌在内的多种癌细胞株的生长与增殖^[3-4]。本研究应用Cytoscape 3.8.0软件对165个汉黄芩素抗肿瘤的可能作用靶点进行PPI网络拓扑分析,得到TP53、RELA、SRC、MAPK1、AKT1等19个核心靶点,结果提示这19个靶点蛋白可能对汉黄芩素抗肿瘤发挥了关键作用。TP53是多种肿瘤发生、发展过程中最常见的突变基因,控制着细胞的增殖、周期、凋亡以及炎症^[5],在所有恶性肿瘤中,有50%以上会出现该基因突变。RELA是NF- κ B的一个亚基,负责激活特定的基因转录^[6],主要通过启动和调节多种肿瘤相关基因的转录从而调控细胞的增殖、分化、凋亡及转移,其不同位点的磷酸化可影响肿瘤的发生、发展,如Ser276磷酸化促进头颈部鳞癌的恶性表型;Thr-505磷酸化对肝癌有抑制作用;而Ser536磷酸化既可促进也可抑制肿瘤^[7]。作为一种非受体酪氨酸蛋白激酶,SRC蛋白是各种信号途径的中心枢纽,与MAPK、PI3K-Akt、STAT3等多条信号通路相互关联,在多种肿瘤细胞中高度活化和/或过量表达,促进肿瘤的发生和发展。综上所述,肿瘤的发生、发展涉及多种基因交互作用,汉黄芩素可能是通过调节上述靶基因的表达,通过影响肿瘤细胞增殖、分化、凋亡及自噬等过程,从而发挥抗肿瘤的作用。



图A、B为汉黄芩素与靶蛋白RELA(4ejn)分子对接模式图;图C、D为汉黄芩素与靶蛋白TP53(3s7b)分子对接模式图

图5 汉黄芩素与部分核心靶点分子对接模式图

3 讨论

3.1 汉黄芩素抗肿瘤核心靶点 汉黄芩素因具有抑

3.2 汉黄芩素抗肿瘤作用关键信号通路 根据KEGG富集分析结果,核心靶点所参与的信号通路主要有癌症通路、乙型肝炎、HIF-1信号通路、PI3K-Akt信号通路、TNF信号通路和MAPK信号通路。HIF-1是由 α 和 β 两个亚基组成的异二聚体蛋白,其中HIF-1 α 是应答缺氧应激的关键因子,可调控细胞对缺氧产生一系列代偿反应,维持细胞内氧平衡,在机体的生理和病理过程中具有重要作用^[8]。而低氧环境对于肿瘤细胞的凋亡与增殖发挥重要作用,一方面,低氧可以促进细胞凋亡;另一方面,经过低氧环境的细胞仍可存活,进一步促进肿瘤细胞向恶性转化^[9]。研究发现,PI3K/Akt信号通路参与了低氧条件下对于一般肿瘤细胞的血管生成、增殖、侵袭、转移及凋亡的调控^[10],通过抑制该通路可使HIF-1下游靶基因无法发挥生物效应,进而抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡^[11]。mTOR作为PI3K/Akt信号通路的下游底物,可以通过影响翻译调节因子4E-BP1和p70S6k的磷酸化状态来调控肿瘤细胞增殖和转移^[12]。MAPK信号通路在肿瘤侵袭和转移中起中介和信号放大作用,其

促有丝分裂和抗凋亡的效应对恶性肿瘤细胞的生长和肿瘤患者的预后具有十分重要的意义^[13]。MAPK家族包括细胞外信号调节激酶(ERK), c-Jun氨基末端激酶(JNK), p38 MAPK激酶^[14]。其中, ERK的激活与细胞增殖相关, JNK则与细胞应激和凋亡相关, p38 MAPK激酶与炎症反应有关, 这些因子的激活可抑制肿瘤细胞的增殖与分化^[15]。肿瘤坏死因子(TNF)是一种以诱导肿瘤细胞凋亡为特征的信号分子^[7], 可与细胞膜表面的特异性受体结合, 促进细胞生长、分化、凋亡及诱发炎症等, 此外, TNF- α 通过诱导凋亡蛋白表达, 引起Caspase级联反应, 诱导肿瘤细胞凋亡。而且, TNF与其受体结合后可激活其他蛋白激酶, 如NF- κ B和JNK信号通路^[16-17]。以上研究表明PI3K-Akt、TNF和MAPK等信号通路之间存在明显的交互联系, 汉黄芩素可能是通过综合影响多条信号通路而发挥抗肿瘤作用。

3.3 汉黄芩素与抗肿瘤核心靶点的分子对接 分子对接研究显示, 汉黄芩素与TP53、RELA、PIK3R1、IL6、HSP90AA1、NOS2、CASP3、JUN以及MAPK8等靶点也有较好的结合活性(见表1)。其中, 靶点TP53, RELA与化合物汉黄芩素的结合活性最佳(见表1和图5), TP53和RELA可能是汉黄芩素发挥抗肿瘤活性的重要作用靶点。有研究报道, 汉黄芩素能够对p53的核转位功能产生影响, 通过凋亡或自噬通路诱导细胞死亡^[18]; 汉黄芩素可以抑制RELA蛋白的磷酸化并且抑制肝癌细胞的增殖和侵袭^[13], 表明汉黄芩素可能通过TP53和RELA信号通路来影响肿瘤的发展进程。然而, 过去的研究只能有限地显示TP53和RELA在汉黄芩素抗肿瘤中的作用, 而本研究显示汉黄芩素可与TP53和RELA蛋白直接结合, 发挥抗肿瘤作用。

综上所述, 本研究通过网络药理学和分子对接技术系统阐释了汉黄芩素抗肿瘤的作用机制, 对抗肿瘤药物机制研究有一定的指导意义。但是, 考虑到该研究是基于公共数据库完成, 因此, 其具体的作用机制还需要通过实验进一步验证。

参考文献

- [1]任晓东, 符伟, 张晓芸, 等. 天然产物汉黄芩素的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(9): 777-784.
[2]刘兴兴, 郭怡鲲, 艾奇, 等. 基于网络药理学和分子对接技术分析六

味地黄丸治疗骨质疏松症的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(9): 1593-1602.

[3]种楠, 李勤, 冯艳红, 等. 汉黄芩素的抗肿瘤研究进展[J]. 临床误诊误治, 2019, 32(11): 112-116.

[4]陈旭, 郑玉, 彭泉, 等. 汉黄芩素经PTEN/PI3K/AKT信号通路对乳腺癌细胞增殖的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 363-368.

[5]COLE A J, ZHU Y, DWIGHT T, et al. Comprehensive analyses of somatic TP53 mutation in tumors with variable mutant allele frequency [J]. Sci Data, 2007, 4(9): 170120.

[6]李丽, 陈玉婷, 曾希. RelA/p65的磷酸化调节及其与肿瘤的关系[J]. 中南医学科学杂志, 2018, 46(2): 110-114.

[7]XIE W, HUANG X, CHEN R, et al. Esomeprazole alleviates the damage to stress ulcer in rats through not only its antisecretory effect but its antioxidant effect by inactivating the p38 MAPK and NF- κ B signaling pathways[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13(8): 2969-2984.

[8]KASUNO K, TAKABUCHI S, FUKUDA K, et al. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling [J]. J Biol Chem, 2004, 279(4): 2550-2558.

[9]SCHMID T, JIE Z, BRÜNE B. HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia [J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(4): 423-431.

[10]夏曙, 于世英. PI3K/Akt信号转导通路在恶性肿瘤中的研究进展[J]. 肿瘤, 2006, 26(6): 576-578.

[11]杨梦思, 周娜, 王志钢, 等. 转录因子HIF-1 α 及其信号通路在疾病发生中的作用研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(8): 8-13.

[12]GONG J, ZHOU S, YANG S. Vanillic acid suppresses HIF-1 α expression via inhibition of mTOR/p70S6K/4E-BP1 and Raf/MEK/ERK pathways in human colon cancer HCT116 cells [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(3): 465.

[13]LIU X, TIAN S, LIU M, et al. Wogonin inhibits the proliferation and invasion, and induces the apoptosis of HepG2 and Bel7402 HCC cells through NF- κ B/Bcl-2, EGFR and EGFR downstream ERK/AKT signaling [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4): 1250-1256.

[14]吴向华, 陆云飞. MAPK信号转导通路与乳腺癌关系的研究进展[J]. 广东医学, 2010, 31(4): 526-528.

[15]WOO J S, CHOO G S, YOO E S, et al. Apigenin induces apoptosis by regulating Akt and MAPK pathways in human melanoma cell A375SM [J]. Mol Med Rep, 2020, 22(6): 4877-4889.

[16]徐洁, 姚红兵. TNF- α 信号传导通路的研究现状[J]. 泸州医学院学报, 2007, 30(2): 156-158.

[17]古翠萍, 张沂平. TNF- α 抗肿瘤作用机制新进展[J]. 中国肿瘤, 2007, 16(2): 102-105.

[18]王浩甲. 汉黄芩素调控P53核转位干预结肠癌的作用机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.

(收稿日期: 2023-10-11)

(本文编辑: 金冠羽)