

基于网络药理学和生物信息学研究益气解毒方治疗鼻咽癌的分子机制

邹 攀^{1,2}, 程 博^{2,3}, 钟文良^{1,3}, 伍永慧^{2,3}, 罗晶婧^{2,3}, 范婧莹^{2,3}, 熊 雨^{1,2},
蔺 婷^{2,3}, 王贤文^{3,4}, 何迎春^{2,3*}

(1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中医药防治耳鼻喉咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208; 3. 中医药防治耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007)

摘要: **目的** 基于网络药理学和生物信息学研究益气解毒方治疗鼻咽癌的分子机制。**方法** TCMSP 数据库检索益气解毒方的化学活性成分和作用靶点, GEO 数据库获得 GPL6480 数据集及 GSE53819 表达谱, R 软件筛选鼻咽癌组织和非癌组织中异常表达的差异基因, Cytoscape 软件对靶基因进行分析并构建“活性成分-靶点”网络图, STRING 数据库构建可视化 PPI 网络, 对关键作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 采用 MTT 法验证益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞活性的影响, Western blot 法验证药物对靶蛋白表达的影响。**结果** 益气解毒方含有 131 个化合物, 2 424 种药物活性成分, 预测潜在作用靶点 239 个; 差异表达基因 2 078 个, 韦恩图得到 50 个共同靶点, 出现频次较高的为 VEGFA、JUN、IL1B、CCND1、ICAM1 等; GO、KEGG 分析结果显示, 关键靶点主要涉及细胞因子活性、受体配体活性等生物过程, 主要富集在 IL-17、TNF、NF- κ B 等信号通路; 细胞验证实验表明益气解毒方水提物对 CNE2 细胞活性具有抑制作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈剂量和时间依赖性; 还能降低细胞中 NF- κ B、CCND1、P21 蛋白表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 益气解毒方可能通过 TNF 和 NF- κ B 等信号通路来治疗鼻咽癌。

关键词: 益气解毒方; 鼻咽癌; 网络药理学; 生物信息学; NF- κ B

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2021-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.054

鼻咽癌是发生于鼻咽黏膜被覆上皮及小涎腺的恶性肿瘤^[1], 世界卫生组织报告显示 2018 年新增鼻咽癌病例近 13 万, 死亡病例达 7 万余例^[2], 流行病学研究^[3]表明其可能与 EB 病毒感染^[4]、遗传易感性^[5]、有害环境因素的暴露^[6]、特殊饮食习惯等因素有关。尽管鼻咽癌在我国南方地区为高发性疾病, 但包括局部调强放疗、化疗^[7]、分子靶向治疗^[8]、手术、免疫治疗^[9]等治疗方法并没有显著改善患者的预后。因此, 迫切需要寻求新的辅助治疗方法, 建立用于鼻咽癌生存风险预测的新生物标记或模型, 以期为患者提供更有效和个性化的治疗。

我国传统医学近年来成为综合癌症治疗的选择之一。正气亏虚、气虚染毒被认为是鼻咽癌发生的内因, 在鼻咽癌发生发展过程中, 气虚染毒既是始动环节, 也是贯穿

始终的基本病机, 遂其基本治法为“益气解毒”^[10]。益气解毒方是本课题组研究和应用了 20 多年的经验方, 由黄连、黄芪、党参、天花粉、茯苓、白花蛇舌草、甘草 7 味中药组成, 以补益正气的黄芪和清热解毒的黄连作为君药; 党参补益肺气; 白花蛇舌草清热解毒、散癌祛毒; 天花粉和茯苓相互配合, 健脾养阴, 充养其身, 全方补泻共用、气阴双补, 共奏益气解毒、平和抗毒之效, 其在临床应用多年并取得良好疗效^[11]。

中医机制很难用现代医学手段阐明, 基于此, 本研究将从网络药理学角度阐明益气解毒方与鼻咽癌相关的基因、蛋白质和代谢物、作用通路之间的复杂相互作用关系, 以揭示鼻咽癌发生和发展的潜在机制, 并试图阐述益气解毒方防治鼻咽癌的分子机制, 为促进人们对药物机制的新理

收稿日期: 2020-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874408, 81973914); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ40216, 2020JJ5419); 中医药防治耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室开放基金课题 (2018YZD04); 湖南中医药大学基础医学一流学科开放基金项目 (2018JCYX08)

作者简介: 邹 攀 (1990—), 女, 博士生, 研究方向为中西医结合防治耳鼻喉咽喉疾病和肿瘤。Tel: 18773879990, E-mail: 453498858@qq.com

*** 通信作者:** 何迎春 (1972—), 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治耳鼻喉咽喉疾病和肿瘤。E-mail: yingchunhe@aliyun.com

网络出版日期: 2021-07-07

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210707.1634.002.html>

解提供新的视角。

1 材料

1.1 细胞株 人鼻咽癌细胞 CNE2 (低分化), 购自北京北纳创联生物技术研究院, 本实验室传代培养。

1.2 药物 益气解毒方组方药材黄芪 30 g、茯苓 15 g、党参 15 g、天花粉 10 g、黄连 10 g、白花蛇舌草 10 g、甘草 6 g, 购自湖南中医药大学第一附属医院中药房, 水提物具体制备方法参考课题组前期研究^[12], 所有饮片均由湖南中医药大学中药鉴定教研室潘清平教授鉴定为正品, 密封保存于 -20 ℃ 下。注射用顺铂 (美国 Sigma 公司, 批号 P4394-25MG)。

1.3 试剂 RPMI 1640 培养基 (美国 Cytiva 公司, 批号 AF29546230); 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 42A0378K); 青霉素-链霉素双抗溶液 (美国 Sigma 公司, 批号 F4135、P3539); PBS 缓冲液 (武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号 WHO1111906XP); DMSO (德国 Biofroxx 公司, 批号 EZ6789B103); 兔抗 NF- κ B、Cyclin D1、P21 (批号 4370S、2978T、2947T), 鼠抗 β -actin (批号 2896T), 山羊抗兔、抗小鼠二抗 (批号 7076P4、7074P2) (美国 CST 公司)。

1.4 仪器 CO₂ 培养箱 (美国 Forma 公司); 电泳仪、电泳槽、转印槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); 高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); 恒温水浴箱 (美国 Pharmacia 公司); 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); ELX800 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); 双人单面净化工作台 (苏州净化设备有限公司); 冷柜、冰箱、超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher 公司); 涡旋振荡器 (美国 SBP 公司)。

2 方法

2.1 益气解毒方有效成分筛选及靶点预测 中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 是一个独特的中草药系统药理学平台, 包括化学物质、靶点和药物靶点网络, 涉及口服生物利用度 (oral bioavailability, OB)、类药性 (drug likeness, DL)、药物相似度、肠上皮通透性、血脑屏障、水溶性等天然化合物的药代动力学 (ADME) 特性^[13]。通过 TCMSP 数据库检索益气解毒方所含 7 味中药, 即“黄连”“黄芪”“天花粉”“白花蛇舌草”“茯苓”“党参”“甘草”, 以 OB $\geq$ 30%、DL $\geq$ 0.18 为条件筛选化学成分^[14]。

2.2 化学成分潜在作用靶点预测 通过 TCMSP 数据库, 通过相关靶点 (related targets) 搜索功能栏进行检索, 获得潜在药物靶标, 将潜在药物靶标导入 UniProtKB 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 中进行靶点基因名称校正, 得到官方名称 (剔除非人源靶点), 获得药物活性成分相关候选靶点。

2.3 益气解毒方“活性成分-靶点”网络构建 将益气解毒方药物活性成分、靶标导入 Cytoscape3.6.0 软件^[15]中,

应用 Network Analyzer (网络分析) 计算网络中节点参数, 构建“活性成分-靶点”网络以分析益气解毒方中重要成分和靶点。

2.4 GEO 数据库对鼻咽癌差异基因筛选 基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 是一个由基因表达数据、芯片和微阵列组成的公共功能基因组数据库, 以在 GEO DataSets 数据库中以“Nasopharyngeal carcinoma”为关键词, 输入类型为“Series”, 研究类型为“Expression profiling by array”, 研究对象为“*Homo sapiens*”, 筛选获得 GPL6480 数据集, 包含原发性鼻咽癌肿瘤样品 18 例, 非癌性鼻咽组织样品 18 例, 下载 GPL6480-9577.txt 及 GSE53819_series_matrix.txt.gz 两个文档。使用 R 软件 (版本 3.4.1, <http://www.r-project.org>) 的 Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>) 软件包进行数据处理和统计分析, 利用 Perl 语言将探针水平的表达数据转换为基因符号水平数据, R 语言 limma 软件包^[16]对鼻咽癌组织和非癌组织芯片数据的差异基因进行分析, 对差异表达基因进行筛选, 筛选条件设定为 logFC=1, Padj=0.05。

2.5 活性成分-鼻咽癌靶标网络构建 应用 R 语言软件 venny. R 插件绘制益气解毒方潜在药物靶标与鼻咽癌差异表达基因靶点韦恩图, Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点”网络, Network analyzer 功能进行网络特征分析, 网络中节点表示靶标或化合物, 边表示活性成分靶点与鼻咽癌靶标之间的相互作用关系, 识别益气解毒方中潜在的活性分子成分和靶点。

2.6 益气解毒方治疗鼻咽癌的 PPI 网络构建与关键靶点筛选 将益气解毒方药物作用靶标和差异表达基因进行蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 关系网络图构建, 采用 cytoscape 中的 BisoGenet 插件绘制其与鼻咽癌相关靶点的共同靶点 PPI 互作网络, 抽取交集网络, 即得益气解毒方治疗鼻咽癌的直接和间接靶点调控网络。通过网络拓扑分析插件 CytoNCA 进一步分析网络中核心靶点, 依次通过分析度中心性 (degree centrality, DC)、介度中心性 (betweenness centrality, BC) 对 PPI 网络进行拓扑属性分析, 筛选 PPI 网络中 degree、betweenness 均超过所有节点中位数的节点, 以节点传递信息量与传递效率^[17], 作为后续研究的“关键靶标”^[18]。为了探索差异表达基因的功能关联, 本研究还应用 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 构建 PPI 网络, 将蛋白种类设置为“*Homo sapiens*”, 将最高的置信度 (0.4) 作为最小的所需交互得分, 其他参数保持默认设置, 将 PPI 网络可视化。

2.7 基因本体论 (GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析及网络构建 应用 R 语言软件中 clusterProfilerGO 软件包及 Perl 语言中的 id2symbol 插件, 对活性成分与鼻咽癌的共同靶点进行 GO 分析 (<http://www.geneontology.org>), 其主要用于描述基因产物的功能, 含有大量的基因注释术语, 包括细胞成分 (CC)、分子功能 (MF)、生物过程 (BP)^[19]; 再应用 R 语言中的

clusterProfilerKEGG 软件包进行 KEGG 通路富集分析用于识别功能和代谢途径,根据富集因子值分析核心通路富集程度以探索差异表达基因的生物学功能^[20],探究益气解毒方治疗鼻咽癌的可能生物功能及信号通路机制。

2.8 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期鼻咽癌 CNE-2 细胞,以 4×10^4 /mL 密度接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,待细胞贴壁后弃原培养基,分为对照组(空白培养基)、益气解毒方组(2.0、1.0、0.5、0.25 g/L 益气解毒方提取物)、顺铂组(4.0 mg/L 顺铂),每孔加入 200 μ L 含相应药物的培养基,设 6 个复孔,培养 24、36、48 h 后弃原培养液,每孔加入 50 μ g/mL MTT 溶液 100 μ L,继续孵育 4 h 后于酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度值,实验重复 3 次。

2.9 Western blot 法检测蛋白表达 取对数生长期 CNE-2 细胞,计数后取 5×10^5 个细胞接种至 T25 培养瓶中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,分为对照组(空白培养基)、益气解毒方组(0.5、1.0 g/L 益气解毒方提取物)、顺铂组(4 μ mol/L 顺铂),加入相应药物干预 36 h,参考文献^[21]报道的方法进行蛋白定量、电泳、转膜、扫膜,并分析信号值,检测 NF- κ B、Cyclin D1、P21 蛋白表达,实验重复 3 次。

2.10 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理,计量资料数据均服从正态分布,以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,单因素设计和多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

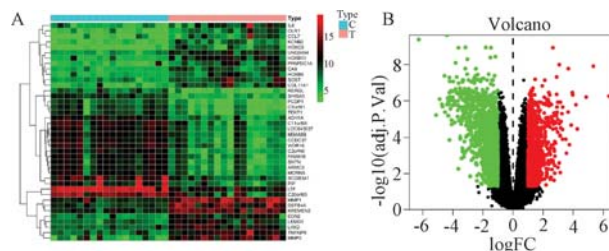
3 结果

3.1 有效成分筛选及 ADME 分析 采用 TCMSP 数据库,经 OB、DL 等 ADME 参数筛选得到有效成分黄连 11 种,黄芪 13 种,党参 17 种,白花蛇舌草 3 种,茯苓 6 种,天花粉 2 种,甘草 106 种,共计 131 种(对各药物无效成分进行剔除)。通过相关靶点搜索功能栏获得潜在药物靶点 2 417 个,其中黄连 287 个,黄芪 300 个,党参 214 个,白花蛇舌草 71 个,茯苓 30 个,天花粉 5 个,甘草 1 510 个。

3.2 潜在作用靶点预测 通过 TCMSP 数据库收集 131 种有效成分的 2 417 个药物靶点,打开 UniprotKB 数据库进行修正得到官方基因名。将活性成分、相关靶点蛋白名、官方基因名 3 列数据统计于 Excel 表格中,删除重复项,得到 2 082 条对应关系,将官方基因名单独列出去后,得到潜在作用靶点 239 个。

3.3 鼻咽癌相关疾病靶点 分析 GEO 芯片数据库中 GPL6480 数据集,包含原发性鼻咽癌肿瘤样品 18 例,非癌性鼻咽组织样品 18 例。通过 R 语言 limma 软件包共鉴定出 2 078 个差异表达基因,其中 864 个(41.58%)上调,1 214 个(58.42%)下调,差异表达基因见图 1,图 1A 共列出 40 个变化最为明显的基因,可能与鼻咽癌致病密切相关。

3.4 “活性成分-靶点”网络构建 应用 R 语言软件 venny. R 插件将 2 078 个差异表达基因与 Uniprot 数据库获



注: A 为热图, B 为火山图。红点表示表达上调基因,绿点表示表达下调基因。

图 1 癌与癌旁组织差异表达基因

得的 239 个益气解毒方的潜在作用靶点绘制韦恩图,共筛选出 50 个共同靶点,见图 2。通过 Cytoscape 软件构建“药物活性成分-鼻咽癌靶标”调控网络,节点表示靶标或化合物,边表示活性成分靶点与鼻咽癌靶标之间的相互作用,再通过 Cytoscape 软件构建“药物-成分-靶点”网络,Network analyzer 功能进行网络特征分析,见图 3。

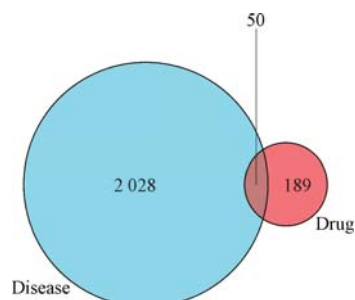
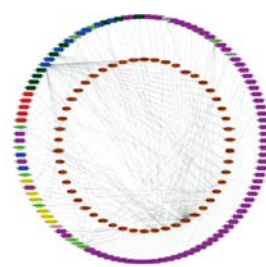


图 2 益气解毒方活性成分靶点与鼻咽癌疾病靶点韦恩图



注: 黄连为蓝色, 黄芪为黄色, 天花粉为粉色, 党参为深绿色, 茯苓为大红色, 甘草为紫色, 白花蛇舌草为灰色。淡绿色为共同有效成分, 内圈棕色圆点表示筛选出的靶点基因。

图 3 益气解毒方活性成分-鼻咽癌靶点基因互作网络

3.5 PPI 网络构建与关键靶点筛选 采用 Cytoscape 软件的 BisoGenet 工具包绘制益气解毒方入血活性成分的靶点 PPI 网络图,发现直接或间接相关靶点 1 872 个,靶点间相互关系 40 157 个,再以 CytoNCA 工具包抽取上述 PPI 网络图的交集,设定 DC 值 > 61 、BC 值 > 600 进行网络拓扑属性筛选,发现关键蛋白 404 个,筛选出 TOP 基因 54 个,见图 4。应用 STRING 数据平台输入韦恩图获得的共同靶点名称,选择“high confidence: 0.4”模式下构建的 PPI 互作网络,见图 5,节点表示蛋白,边表示功能相关性。应用

count. R 插件统计出现频次前 30 的蛋白靶点, 发现较高者有 VEGFA、JUN、IL1B、CCND1、ICAM1 等, 可能作为益

气解毒方治疗鼻咽癌的潜在靶点, 见图 6。

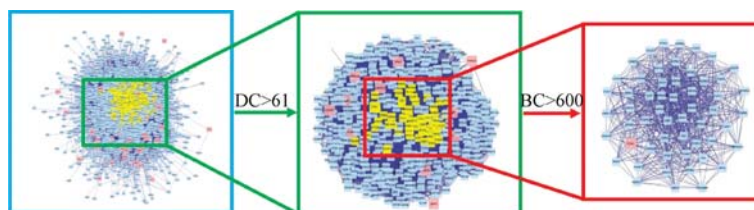
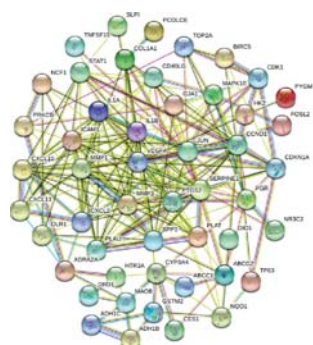


图 4 益气解毒方关键节点的目标筛选策略



注: 红色线条表示蛋白融合证据, 绿色线条表示临近证据, 蓝色线条表示共存证据, 黑色线条表示共表达证据。

图 5 益气解毒方共同靶点互作网络 (PPI)

3.6 生物功能 (GO) 分析 通过 R 语言软件 “clusterProfiler” 软件包将 50 个共同作用靶点进行 GO 功能分析, 按照生物学分类为分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP)、细胞组成 (cellular component, CC)。由图 7 可知, 差异表达基因的

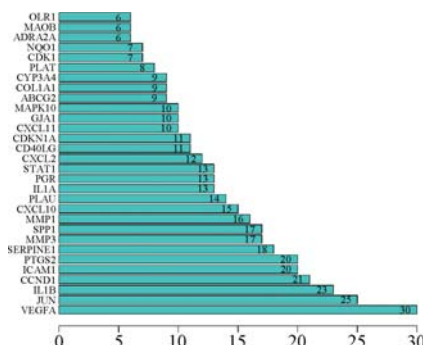


图 6 益气解毒方共同蛋白靶点出现频次

BP 主要集中在脂多糖反应、细菌起源分子反应、活性氧代谢过程、上皮细胞发育; MF 主要集中在细胞因子活性、细胞因子受体结合、受体配体活性、信号转导受体激活剂、趋化因子受体结合、肿瘤坏死因子受体结合等; CC 主要集中在细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、线粒体外膜、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物、细胞器外膜部分。

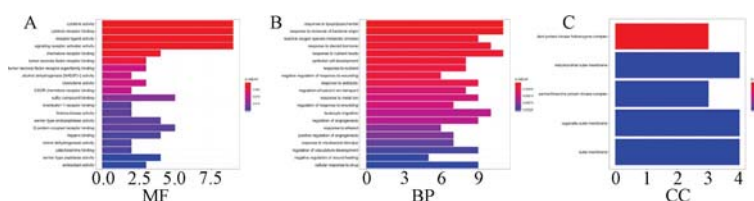


图 7 益气解毒方共同作用靶点 GO 功能分析柱状图

3.7 治疗鼻咽癌核心通路筛选 采用 R 语言软件进行 KEGG 富集分析, 根据 $FDR < 0.01$ 筛选了 20 条途径, 见图 8A, 基于 TNF 信号通路的潜在靶点见图 8B (红色节点代表潜在靶点或与潜在靶点相关的酶及化合物), KEGG 与基因之间的关系网络图见图 8C, 表明益气解毒方治疗鼻咽癌的机制是通过作用于多条信号通路、靶点、途径来实现的。排除广泛通路后, 表 1 中列出了富集靶点数目 ≥ 5 的信号通路, 可知差异表达基因主要富集于 IL-17、肿瘤坏死因子、NF- κ B、Toll 样受体信号通路中。

3.8 益气解毒方对 CNE2 细胞活性的影响 与对照组比较, 不同质量浓度益气解毒方水提物处理 CNE2 细胞 24、36、48 h 后, 细胞活性均受到抑制 ($P < 0.05$), 并呈剂量和时间依赖性, 见图 9。

3.9 益气解毒方对 CNE2 细胞 NF- κ B、Cyclin D1、P21 蛋白表达的影响 根据 Cytoscape 软件分析可知, Cyclin D1 (CCND1 基因的编码产物)、P21 (CDKN1A 基因编码的蛋白) 是益气解毒方共同蛋白靶点, NF- κ B 是益气解毒方治疗鼻咽癌核心通路之一。如图 10 所示, 与对照组比较, 各剂量益气解毒方组 NF- κ B、Cyclin D1、P21 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 讨论

鼻咽癌的病理类型大部分为低分化和未分化, 高度恶性且易转移, 目前尚无用于临床的特异性分子标记物, 因此, 有必要阐明与肿瘤预后和侵袭性独立相关的分子机制。随着高通量测序技术和微阵列技术的迅猛发展, 与鼻咽癌紧密相关的差异表达基因图谱分析越来越多, 为挖掘预防

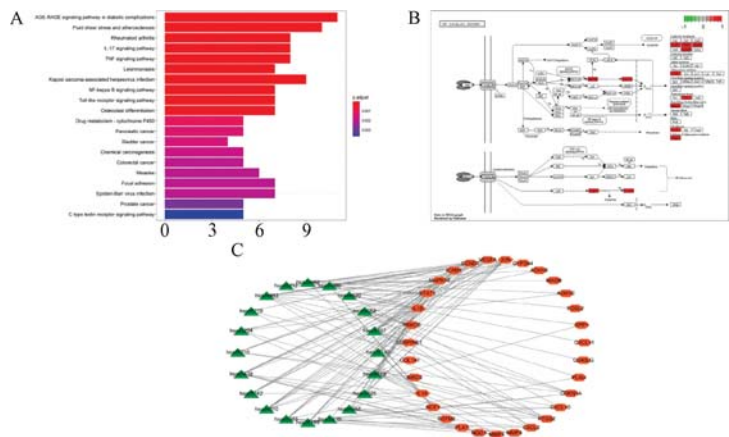
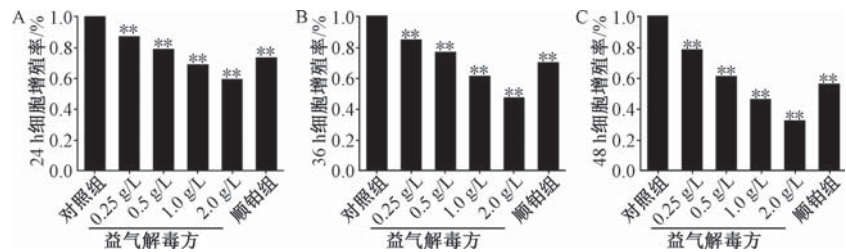


图 8 益气解毒方治疗鼻咽癌的信号通路

表 1 KEGG 富集靶点数目≥5 的信号通路

编号	通路名称	计数	P 值	基因名
hsa04657	IL-17 信号通路	8	6.59×10^{-8}	PTGS2/JUN/MMP1/MAPK10/MMP3/IL1B/CXCL2/CXCL10
hsa04668	TNF 信号通路	8	2.60×10^{-7}	PTGS2/JUN/ICAM1/MAPK10/MMP3/IL1B/CXCL2/CXCL10
hsa04064	NF-κB 信号通路	7	2.34×10^{-6}	PTGS2/PLAU/ICAM1/CD40LG/IL1B/PRKCB/CXCL2
hsa04620	Toll 样受体信号通路	7	2.34×10^{-6}	JUN/MAPK10/STAT1/IL1B/CXCL11/CXCL10/SPP1
hsa04062	趋化因子信号通路	6	0.000 836 970	NCF1/STAT1/PRKCB/CXCL11/CXCL2/CXCL10
hsa04010	MAPK 信号通路	6	0.007 619 391	JUN/VEGFA/MAPK10/IL1B/PRKCB/IL1A
hsa04625	C 型凝集素受体信号通路	5	0.000 360 367	PTGS2/JUN/MAPK10/STAT1/IL1B
hsa04066	HIF-1 信号通路	5	0.000 447 729	VEGFA/CDKN1A/PRKCB/SERPINE1/HK2
hsa04926	松弛素信号通路	5	0.000 964 991	JUN/VEGFA/MMP1/MAPK10/COL1A1
hsa04921	催产素信号通路	5	0.002 120 811	PTGS2/JUN/CCND1/CDKN1A/PRKCB

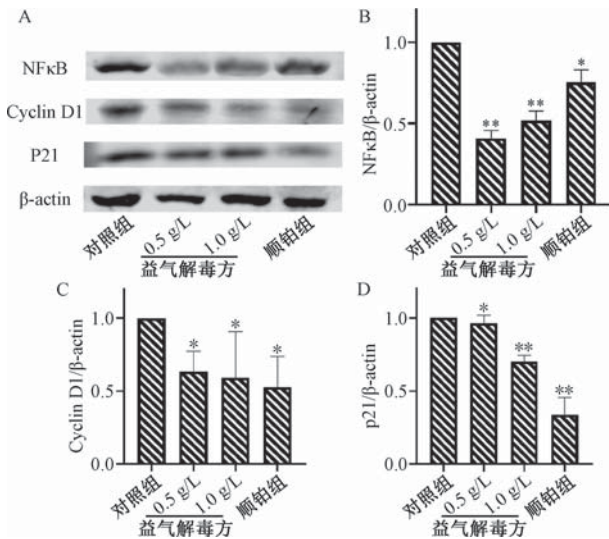


注：与对照组比较，** $P < 0.01$ 。

图 9 益气解毒方对 CNE2 细胞增殖的抑制作用

和治疗鼻咽癌的潜在诊疗靶标提供新方法。本研究从 GEO 提取基因表达数据集，随后进行了 PPI 网络分析、GO 分析、KEGG 途径富集分析，以预测鼻咽癌进展的分子机制。本研究共发现差异表达基因 2 078 个，并筛选出 VEGFA、JUN、IL1B、CCND1、ICAM1 在内的差异表达中心基因。血管内皮生长因子（VEGF）是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，刺激肿瘤血管生成并驱动肿瘤的进展^[22]；IL-1B 在原发肿瘤中的表达已被确定为预测乳腺癌患者^[23]发生骨转移风险增加的潜在生物标志物；CCND1 即 Cyclin D1，全称 G1/S-特异性周期蛋白-D1，其过表达导致有丝分裂异常绕过关键细胞检查点致细胞快速生长并最终促进肿瘤生长^[24]；ICAM-1 即细胞间黏附分子-1，是介导黏附反应重要的一个黏附分子，在控制肿瘤恶化和转移以及调节机体免疫反应中起重要作用^[25]。这些中心基因提示鼻咽癌的发生可能涉及肿瘤微环境的发生引起局部组织炎

症和免疫反应，导致基因突变发生细胞异常分裂，最终导致肿瘤发生。益气解毒方是课题组田道法教授研发，经药监部门批准以“益气解毒颗粒”剂型作为医院制剂的抗鼻咽癌中药复方，在临床疗效确切。本实验在前期研究基础上，利用网络药理学和生物信息学研究益气解毒方治疗鼻咽癌的分子机制，GO 分析表明，益气解毒方治疗鼻咽癌的关键靶点主要涉及活性氧代谢过程、上皮细胞发育、细胞因子活性、受体配体活性、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物等生物过程。KEGG 通路分析表明，48 个共同靶点主要分布在 TNF、IL-17、NF-κB 等信号通路，NF-κB 通常起调节细胞生长和炎症作用^[26]，在许多肿瘤过程中，细胞生长和增殖都需要 NF-κB 信号传导^[27]，在鼻咽癌中 LMP1^[28]通过肿瘤坏死因子受体相关因子的结合激活 NF-κB^[29]；IL-17 细胞与其他免疫细胞相互作用改变肿瘤微环境^[30]，IL-



注：A 为蛋白条带图，B~D 分别为 NF-κB、Cyclin D1、P21 蛋白表达统计图。与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 10 益气解毒方对 CNE2 细胞 NFκB、Cyclin D1、P21 蛋白表达的抑制作用

17 还可通过 p38 丝裂原激活的蛋白激酶/NF-κB 信号通路促进鼻咽癌细胞的迁移和侵袭^[31]。这些通路主要在细胞凋亡、增殖、侵袭转移等方面发挥作用，预测益气解毒方可能通过调控多个复杂的生物过程来治疗鼻咽癌。

综上所述，本研究采用网络药理学和生物信息学初步挖掘、分析益气解毒方多靶点防治鼻咽癌可能的作用机制，获得了益气解毒方的作用靶点和有效成分，预测并验证了益气解毒方治疗鼻咽癌的分子机制，为进一步验证本课题组之前的实验研究及后续深层次的药效研究提供良好的基础。

参考文献：

- [1] Wei W I, Sham J S. Nasopharyngeal carcinoma[J]. *Lancet*, 2005, 365(9476): 2041-2054.
- [2] 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.
- [3] Chang E T, Adami H O. The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2006, 15(10): 1765-1777.
- [4] Raab-Traub N. Epstein-barr virus in the pathogenesis of NPC[J]. *Semin Cancer Biol*, 2002, 12(6): 431-441.
- [5] Dai W, Zheng H, Cheung A K L, et al. Genetic and epigenetic landscape of nasopharyngeal carcinoma[J]. *Chin Clin Oncol*, 2016, 5(2): 16.
- [6] Lee H M, Okuda K S, González F E, et al. Current perspectives on nasopharyngeal carcinoma[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1164: 11-34.
- [7] Paier F, Di Cataldo V, Zei G, et al. Role of chemotherapy in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Oncol Rev*, 2012, 6(1): e1.

- [8] Almobarak A A, Jebreel A B, Abu-Zaid A. Molecular targeted therapy in the management of recurrent and metastatic nasopharyngeal carcinoma: a comprehensive literature review[J]. *Cureus*, 2019, 11(3): e4210.
- [9] Chow J C, Ngan R K, Cheung K M, et al. Immunotherapeutic approaches in nasopharyngeal carcinoma[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2019, 19(11): 1165-1172.
- [10] 刘 湘. 益气解毒方对鼻咽癌宿主调节性 T 细胞的分化诱导效应机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2012.
- [11] 廖 雪. 益气解毒方抗鼻咽癌药效物质基础及作用机制研究[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2016.
- [12] 廖 雪, 蔺 婷, 罗晶婧, 等. 益气解毒方水提物对 RAW264.7 细胞免疫功能的影响[J]. *肿瘤基础与临床*, 2015, 28(6): 473-476.
- [13] Ru J L, Li P, Wang J A, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [14] Shi C, Qin G U, Shao J, et al. Chinese character operating system of traditional Chinese medicine and pharmacology (TCMP) [J]. *Medinfo Medinfo*, 1995, 8 (Pt 2): 1123-1126.
- [15] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. *Genome Res*, 2003, 13(11): 2498-2504.
- [16] Ritchie M E, Phipson B, Wu D I, et al. Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(7): e47.
- [17] 王海燕, 彭 伟, 李思毅, 等. 基于网络药理学的黄连解毒汤治疗脑胶质细胞瘤的分子机制预测[J]. *中医药导报*, 2019, 25(23): 20-27.
- [18] 刘志强, 王博龙. 基于网络药理学预测二妙丸“一方多效”的分子机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(18): 198-206.
- [19] Gene Ontology Consortium. The gene ontology (GO) project in 2006[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34 (Database issue): D322-D326.
- [20] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D457-D462.
- [21] 胡 晶, 戴 娜, 徐冰雁, 等. 益气解毒方通过 MAPK/ERK 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(6): 1221-1227.
- [22] Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer[J]. *Oncology*, 2005, 69(Suppl 3): 4-10.
- [23] Tulotta C, Ottewill P. The role of IL-1B in breast cancer bone metastasis [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2018, 25 (7): R421-R434.
- [24] Qie S, Diehl J A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(12): 1313-1326.
- [25] Manuel R, Enric E. Role of LFA-1 and ICAM-1 in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2017, 9(11): 153.

- [26] DiDonato J A, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer[J]. *Immunolo Rev*, 2012, 246(1): 379-400.
- [27] Hoesel B, Schmid J A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer[J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 86.
- [28] Tsang C M, Lui V W Y, Bruce J P, et al. Translational genomics of nasopharyngeal cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 61: 84-100.
- [29] Yi M, Cai J, Li J J, et al. Rediscovery of NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma; How genetic defects of NF- κ B pathway interplay with EBV in driving oncogenesis? [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(8): 5537-5549.
- [30] Zou W P, Restifo N P. T_H17 cells in tumour immunity and immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(4): 248-256.
- [31] Zarogoulidis P, Katsikogianni F, Tsiouda T, et al. Interleukin-8 and interleukin-17 for cancer[J]. *Cancer Invest*, 2014, 32(5): 197-205.

基于网络药理学探究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的机制

孙健洪¹, 张若琛², 张颖利³, 解俊杰⁴, 石 妍^{5*}

(1. 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院药学部, 内蒙古 包头 014030; 2. 包头市第九中学, 内蒙古 包头 014000; 3. 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院医学整形外科, 内蒙古 包头 014030; 4. 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院党政办公室, 内蒙古 包头 014030; 5. 内蒙古科技大学包头医学院第一附属医院药剂科, 内蒙古 包头 014010)

摘要: **目的** 基于网络药理学研究附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的作用机制。**方法** SD 大鼠随机分为对照组、模型组、附子理中丸组, 其中模型组及附子理中丸组应用葡聚糖硫酸钠 (DSS) 自由饮用法造模, 对照组正常饮水, 在不同时间节点进行 DAI 评分; 末次给药采集标本 HE 染色进行病理形态观察; 检索附子理中丸的活性化合物成分信息, 对成分的靶点进行预测、分析, 结合半柔性分子对接方法验证靶点; 应用 Western blot 法对关键靶点进行验证。**结果** 与模型组对比较, 附子理中丸组评分降低 ($P<0.01$), 结肠组织溃疡愈合, 组织炎性细胞浸润减少。网络药理学筛选得到附子理中丸治疗溃疡性结肠炎靶点 76 个, 这些靶点参与核因子 $\kappa 1$ (NF- κ B1) 信号通路、T 细胞受体信号通路、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 信号通路等与溃疡性结肠炎密切相关的信号通路, 关键靶点有丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、NF- κ B1、TNF- α 、白介素-6 (IL-6)、NF- κ B3。验证实验表明附子理中丸可降低大鼠溃疡性结肠炎中 NF- κ B1、TNF- α 、IL-6、NF- κ B3 蛋白表达从而起到保护作用。**结论** 网络药理学分析揭示附子理中丸治疗溃疡性结肠炎的多途径、多靶点作用特点, 为后续的基础研究提供理论依据。

关键词: 附子理中丸; 溃疡性结肠炎; 网络药理学; 分子对接; NF- κ B

中图分类号: R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2027-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.055

溃疡性结肠炎是一种病因尚不确切的非特异性肠道疾病, 临床表现为腹痛、腹泻、里急后重及黏液脓血便等, 常呈连续慢性炎症反应状态, 发作与缓解交替, 迁延不愈, 根治困难, 给患者的生理和精神造成极大困扰。临床治疗常采用氨基水杨酸、糖皮质激素和免疫抑制剂等药物, 然而常规治疗难以有效缓解病情和防止复发, 还可能引起多种不良反应。因此, 探究溃疡性结肠炎的有效治疗方法已成为临床研究的热点^[1]。

附子理中丸由附子、干姜、白术、党参、甘草组成, 原方出自《阎氏小儿方论》, 后收录于《国家基本药物目录》, 具有温阳祛寒、益气健脾之功, 多用于脾胃虚寒所致脘腹冷痛、呃逆、肠易激综合征^[2], 对溃疡性结肠炎的疗效显著^[3-4], 作用机制与炎症密切相关。

网络药理学是融合了计算机技术、系统生物学、高通量筛选等技术, 研究“药物-靶点-疾病”之间复杂关系的交叉学科, 通过对中药多成分、多靶点、多通路、多功能

收稿日期: 2021-03-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81960734); 包头医学院科学研究基金项目 (BYJJ-QM-2018027)

作者简介: 孙健洪 (1983—), 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为中蒙药药理学。Tel: 15335510301, E-mail: 281180218@qq.com

***通信作者:** 石 妍, 女, 硕士, 主任药师, 研究方向为医院药学。E-mail: shiyan2005@126.com

网络出版日期: 2021-07-19

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210719.1003.004.html>