

基于生物信息学方法分析仙茅-淫羊藿治疗脑胶质瘤的机制

王琴 申丽桃 张海伟^(通讯作者)

(临夏州人民医院)

【摘要】目的: 生物信息学方法分析仙茅-淫羊藿治疗脑胶质瘤的机制。方法: TCMSP、SwissTarget、pubchem数据平台检索仙茅、淫羊藿的成分和靶点, genecards、OMIM等数据库检索脑胶质瘤的靶点。将核心靶点导入Cytoscape构建药物-脑胶质瘤疾病靶点网络图。STRING构建靶蛋白互作网络。DAVID数据平台对核心靶点进行GO及KEGG富集分析。结果 共获得药物有效成分靶点580个, 脑胶质瘤靶点634个; 获得药物疾病交集靶点45个。PPI蛋白网络有45个节点。KEGG富集分析发现药物治疗脑胶质瘤的机制主要集中在脑胶质瘤通路、黑色素瘤通路、Tp53信号通路等肿瘤信号通路, 也有乙型肝炎通路、ErbB 信号通路、黏着斑等非肿瘤通路发挥作用; GO 功能分析涉及肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、迁移、血管内皮的生长及肿瘤的代谢等。结论 仙茅-淫羊藿药对中的黄酮类化合物槲皮素、山奈酚、木犀草素是其治疗脑胶质瘤的主要成分, 可能通过作用PARG、NOS2、EGFR、MAPK14、KDR、TERT、AKT1等核心靶点及脑胶质瘤通路、黑色素瘤通路、Tp53信号通路等信号通路发挥作用。

【关键词】仙茅-淫羊藿; 脑胶质瘤; 网络药理学

Analysis of the mechanism of glioma treatment based on bioinformatics methods

Wang Qin Shen Litao Zhang Haiwei^(corresponding author)

(Linxia State People's Hospital)

[Abstract] Objective: To analyze the mechanism of hair-Epimedium in glioma. Methods: TCMSP, SwissTarget and pubchem data platforms searched the components and targets of Cena, and Epimedium, and genecards and OMIM. The core targets were introduced into Cytoscape to construct a drug-glioma disease target network map. STRING Construct the target-protein interaction network. GO and KEGG enrichment analysis of core targets. Results A total of 580 targets of active drug components and 634 glioma targets were obtained, and 45 intersection targets were obtained. The PPI protein network has 45 nodes. KEGG enrichment analysis found that the mechanism of drug treatment for glioma mainly includes tumor signal pathways such as glioma pathway, melanoma pathway, Tp 53 signaling pathway, as well as hepatitis B pathway, ErbB signaling pathway, and focal adhesion pathway; The GO function analysis involves the proliferation, differentiation, apoptosis, migration, growth of vascular endothelium and metabolism of tumor. Conclusion Quercetin, kaempferol, and luteolin are the main components of glioma treatment, which may act through the core targets such as PARG, NOS 2, EGFR, MAPK14, KDR, TERT, AKT 1, glioma pathway, melanoma pathway, and Tp 53 signaling pathway.

[Key words] fairy grass-Epimedium; glioma; network pharmacology

脑胶质瘤是最常见的原发性脑肿瘤,占中枢神经系统的50%~60%。研究显示,脑胶质瘤发病率为6.47/10万,且逐年呈增长趋势^[1]。虽然现在研究发现脑胶质瘤的发生涉及一系列复杂的信号转导过程,造成癌基因、抑癌基因的失控,对脑胶质瘤的发生起到重要作用,但具体的发病机制仍然不明。研究显示,虽然替莫唑胺的应用使脑胶质瘤的生存率显著提升,但临床研究显示五年生存率仍然低于3%^[2]。中医药在治疗脑胶质瘤方面具有显著的优势,诸多医家将仙茅-淫羊藿药在治疗脑胶质瘤中广泛应用,但由于中药的多靶点、多途径的作用特点,需要进一步探讨其作用的具体靶点及途径。

1.材料和方法

1.1 检索药物活性成分

以OB>30%、DL>0.18为检索条件,以“仙茅、淫羊藿”为检索词,在TCMSP数据库中检索出中药的有效成分,并根据Pubchem数据库进行标准化处理。

1.2 检索药物有效成分靶点

向TCMSP数据库,输入仙茅、淫羊藿有效活性成分的MOL ID,检索其对应的作用靶点,同时也可经TCMSP数据库得到的有效化合物 Pubchem CID 输入 Pubchem,得到

Canonical SMILES 号，将获得的 SMILES 号输入 Swisstargetpredict 获得相关靶点，将所获得的靶点名称输入 Uniprot 数据库，进行规范化命名及去重。

1.3 检索脑胶质瘤靶点

以“Glioma”为检索词，在 OMIM、GeneCards 数据库检索疾病靶点，并将靶点输入 Uniprot 数据库。

1.4 构建仙茅-淫羊藿药对有效成分-脑胶质瘤靶点网络
将药物-疾病预测的靶点经 Cytoscape 3.8.0 构建仙茅-淫羊藿药对有效成分-疾病靶点网络图。

1.5 PPI 网络分析及核心靶点筛选

将药物-疾病交集蛋白靶点导入 String 数据库，构建出仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤的蛋白互作网络。将获得的 PPI 文件导入 Cytoscape 3.8.0 软件实现 PPI 的网络可视化，进行 PPI 网络的拓扑结构分析，寻找仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤核心基因。

1.6 仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤的 GO 与 KEGG 富集分析

将疾病-药物共同的靶点导入 Divad 平台，设置 $P < 0.05$ ，对仙茅-淫羊藿药治疗脑胶质瘤的靶点进行基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。

2 结果

2.1 仙茅-淫羊藿药对主要活性成分及潜在作用靶点

本研究检索到活性成分：仙茅 4 个、淫羊藿 19 个，作用靶点仙茅 114 个、淫羊藿共 555 个，去重后共获得靶点 580 个。Cytoscape 软件绘制药物-靶点图，其中以槲皮素 (quercetin) 的网络度最大，其次为山奈酚 (kaempferol)、木犀草素 (luteolin)，在预测的靶点中，前列腺素 H2 合酶 2 的网络度最大，其次为乙酰胆碱酯酶、核受体共激活剂 2 及雄激素受体、热休克蛋白 hsp90- α 、芳香酶，见图 1。

2.2 脑胶质瘤的潜在靶点

脑胶质瘤靶点在 OMIM 数据库获得 507 个、genecards 数据库获得 5079 个，以“score > 10”为条件，并去重后共获取疾病靶点 180 个。

2.3 疾病-药物靶点核心网络构建

将仙茅-淫羊藿药对活性成分潜在靶点和脑胶质瘤疾病靶点通过 venny 获得共同交集靶点 45 个。在 Cytoscape 软件绘制药物-疾病-靶点图，其中 71 个节点、214 条边，“degree”值槲皮素、木犀草素、山奈酚等排名前 3，degree 大于 10 的靶点分别是 PPARG、NOS2、EGFR，见图 2。

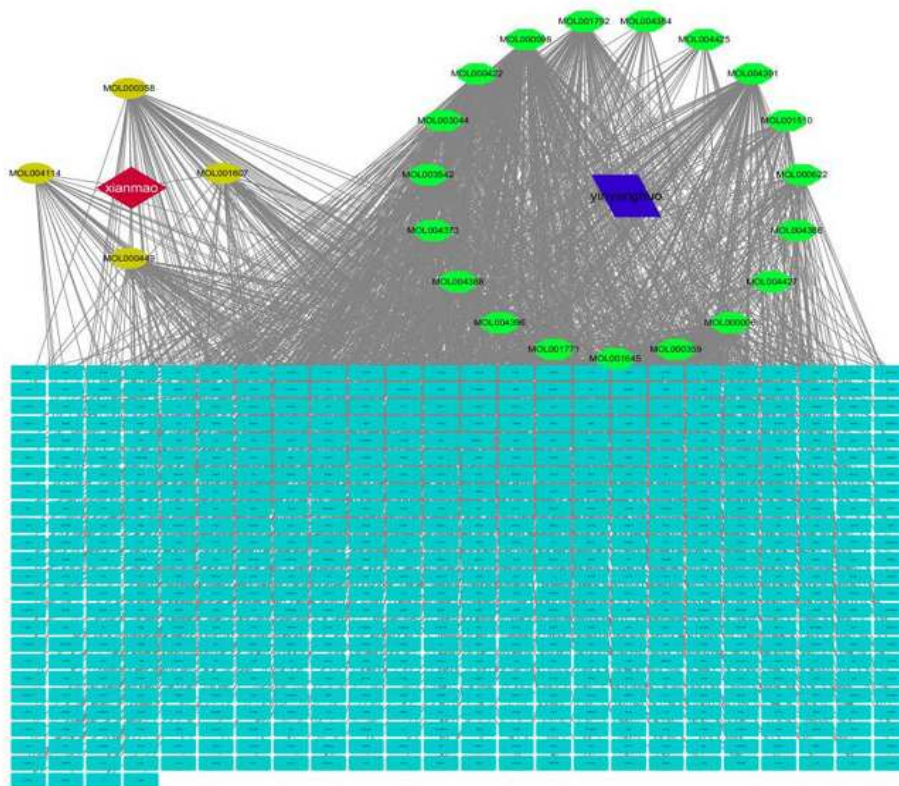


图 1 仙茅-淫羊藿药对活性成分-靶点网络图

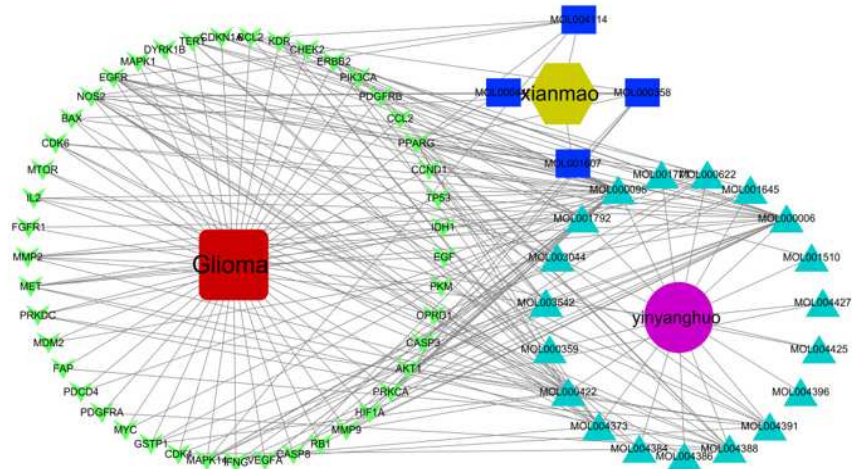


图 2 核心药物成分-疾病靶点网络图

2.3 药物-疾病共同蛋白 PPI 分析

将仙茅-淫羊藿药对活性成分与脑胶质瘤的交集靶点导入 String 平台, 构建蛋白互作网络, 结果节点共 45 个、506 条边, 节点中 degree > 23 的蛋白包括 TP53、MYC、AKT1、CASP3、CCND1 等。见图 3。

2.4 GO 与 KEGG 富集分析

使用 Divad 数据库对仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤的 45 个交集靶点进行 GO、KEGG 分析。GO 分析发现相关生

物学过程 (BP) 有 76 条, 主要涉及肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、迁移等调控及血管内皮的生长、肿瘤的代谢信号转导等; 相关分子功能 (MF) 有 23 条, 涉及肿瘤的蛋白酶活性、细胞核合成、能量转运、酪氨酸激酶、血管内皮等调控; 结果见图 4。KEGG 富集通路分析发现, 排名前 20 的通路主要包括脑胶质瘤通路、黑素瘤通路、Tp53 信号通路等肿瘤信号通路, 其他包括乙型肝炎通路、ErbB 信号通路、黏着斑等非肿瘤通路, 结果见图 5。

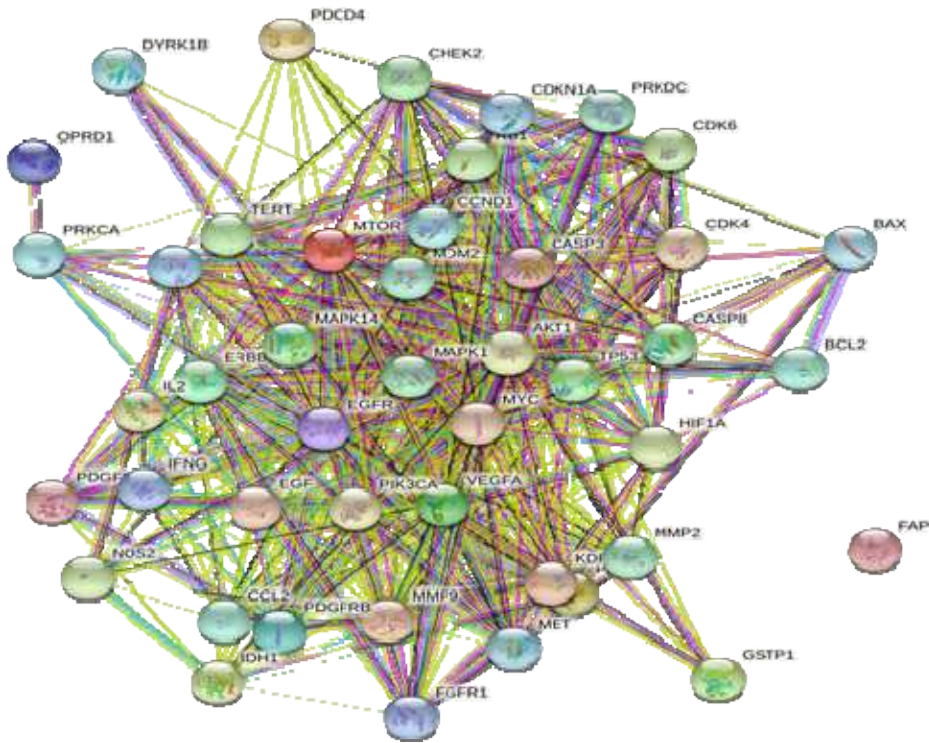


图 3 药物与疾病交集靶点 PPI 分析结果图

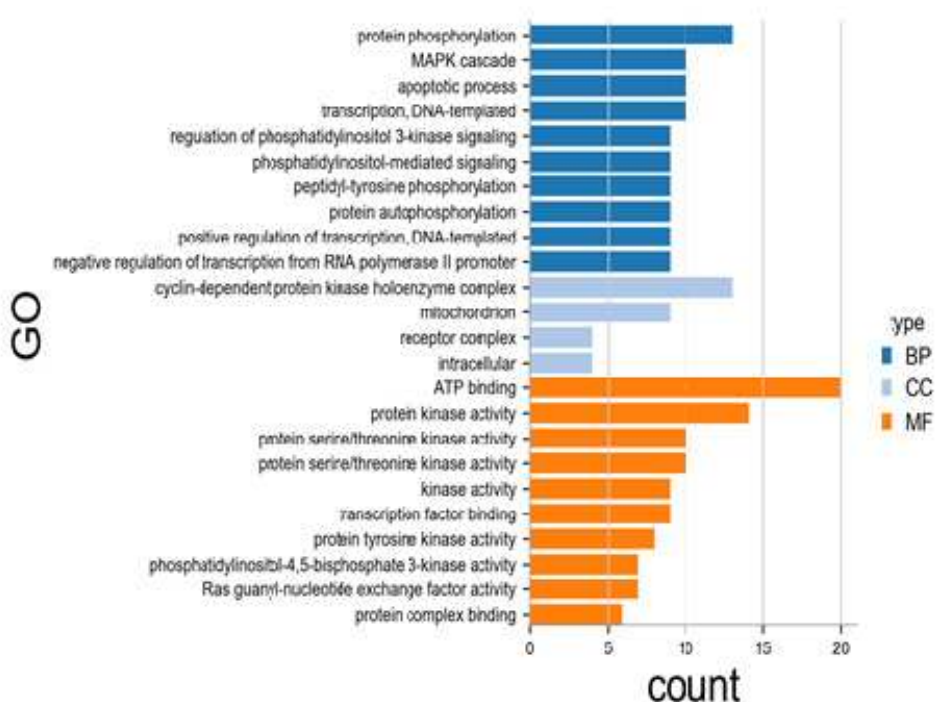


图 4 GO 富集分析结果

注：BP：生物学过程、MF：分子功能、CC：细胞组分

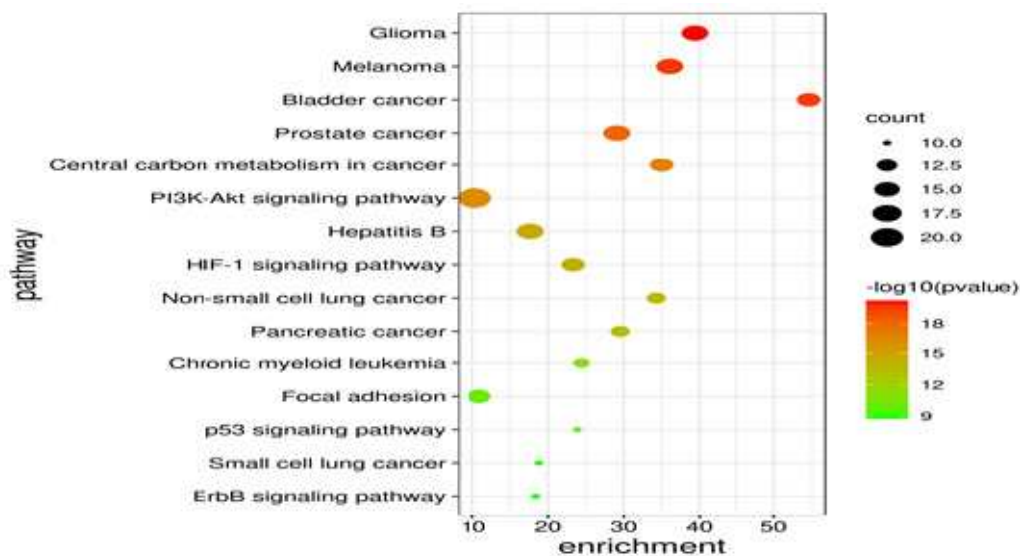


图 5 KEGG 富集功能通路气泡图

3 讨论

仙茅和淫羊藿都具有温补肾阳、补肾填髓、驱风除湿的作用，在临床广泛用于治疗脑胶质。研究显示^[3]，淫羊藿具有抑制端粒酶活性、调节机体免疫功能；仙茅则具有升高被抑制的 T 淋巴细胞数目、抑制糖代谢途径作用。本研究表明，仙茅-淫羊藿药对的有效活性化合物主要集中在黄酮类化合

物，如槲皮素、谷甾醇、木犀草素等。研究显示^[4-5]，槲皮素可减少高糖培养下海马神经元的凋亡；淫羊藿苷则通过增加细胞裂解物中 Caspase-3 活性而促进脑胶质瘤凋亡；此外，黄酮类化合物^[6]具有抑制颅脑肿瘤的生长和增殖，且途径不依赖于抗氧化途径，而木犀草素通过抑制 Bcl-2、Bax 的表达对脑胶质瘤具有改善作用。

本次研究药物-疾病交集靶点显示，degree 较高的靶点

为PPARG、NOS2、EGFR、MAPK14、KDR、TERT、AKT1等。研究证实^[7],磷酸肌醇3激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)、雷帕霉素的哺乳动物靶标(mTOR)、TP53、视网膜母细胞瘤(RB)是脑胶质瘤发生发展的主要途径;过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARG)不但与脑胶质瘤的发生及预后密切相关,而且还参与脂质和葡萄糖动态平衡的基因表及抑制炎性介质的产生而发挥抗炎作用。EGFR、AKT、mTOR等基因在脑胶质瘤患者中高表达,与疾病的发展及预后正相关^[8];丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)在低度恶性胶质瘤方面具有广泛的表达,具有减轻神经胶质瘤的耐药性和抗辐射性作用。研究显示,肝细胞生长因子受体(MET)在胶质母细胞瘤的增殖、存活、迁移、侵袭、血管生成中起关键作用。综上,推测上述靶点可能是仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤的核心靶点。研究发现^[9],MYC原癌基因蛋白(MCY)对缺乏功能性p53肿瘤抑制途径的细胞化疗具有促敏作用。丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通过调控转录、翻译、细胞骨架重排等多种生物学功能,在分化细胞减数分裂、有丝分裂和有丝分裂后功能的启动和调控中也起着重要作用。在脑胶质

瘤患者中,MAPK基因突变高达75%^[10]。综上可见,PPI核心蛋白TP53、MYC、AKT1、CCND1、MAPK1、MMP2等蛋白在中药仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤患者中具有重要作用。研究表明,细胞肿瘤(TP53)在多种肿瘤类型中起抑癌作用,具有诱导生长停滞或凋亡作用,而在脑胶质瘤发生中,TP53突变对胶质母细胞瘤发生起到重要作用。PI3K-Akt信号通路在多种因素的激活下,导致Akt基因被激活,通过磷酸化参与细胞的凋亡、蛋白质合成及细胞周期的底物来控制关键的细胞过程。有证据表明,脑胶质瘤通路的激活可激活下游的MAPK信号通路、ErbB信号通路、p53信号通路及mTOR信号通路,导致细胞周期阻滞、细胞衰老或凋亡,而TP53的突变或导致p53激活的通路中断,似乎是所有癌症的一个普遍特征。

综上所述,通过网络药理学分析发现,仙茅-淫羊藿药对治疗脑胶质瘤通过多通路、多靶点而发挥抗肿瘤作用。本研究通过对仙茅-淫羊藿药对治疗脑膜瘤的机制的分析,为今后进一步的实验研究提供研究基础。

参考文献:

- [1]丛明华,宋晨鑫,郑荣寿,等.2011年中国脑和神经系统肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2015,24(05):349-353.
- [2]Egger M, Davey SG, Schneider M, et al. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ*, 1997, 315(7109): 629-634.
- [3]何丽君,江金井,陈豪,等.淫羊藿药理作用和临床应用的研究进展[J].中医临床研究,2020,12(02):17-20.
- [4]闫斌,槲皮素、齐墩果酸和淫羊藿苷及其配伍对高糖培养SD大鼠海马神经元凋亡及p38MAPK、JNK信号通路影响的研究[D].北京协和医学院,2018.
- [5]施萌婧,臧运华,刘永吉,等.淫羊藿苷对TRAIL诱导胶质母细胞瘤细胞凋亡的影响及其分子机制[J].山东医药,2020,60(29):28-31.
- [6]李沂键.染料木素与异黄酮抑制PC-9肺癌和U87-MG脑胶质瘤细胞的生长和增殖[D].华中科技大学,2013.
- [7]Le Rhun E, Preusser M, Roth P, et al. Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treat Rev*. 2019.
- [8]刘翰屿.人表皮生长因子受体/AKT/mTOR通路在脑胶质瘤中表达及临床意义[J].临床军医杂志,2021,49(01):95-96+98.
- [9]Höglund A, Nilsson LM, Forshell LP, et al. Myc sensitizes p53-deficient cancer cells to the DNA-damaging effects of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine. *Blood*. 2009 Apr 30; 113(18): 4281-8.
- [10]Reinhardt A, Stichel D, Schrimpf D, et al. Anaplastic astrocytoma with piloid features, a novel molecular class of IDH wildtype glioma with recurrent MAPK pathway, CDKN2A/B and ATRX alterations. *Acta Neuropathol*. 2018 Aug; 136(2): 273-291.

作者简介:第一作者:王琴(1985-),女,本科学历,副主任医师,从事神经内科临床工作;

通讯作者:张海伟(1992-),男,研究生学历,主治医师,从事中西医结合防治肿瘤疾病工作。