

# 网络药理学合并分子对接术对三棱治疗白血病的潜在分子机制研究

孟 赞<sup>1</sup> 刘泽洪<sup>2</sup>

1. 乐山职业技术学院护理学院 四川乐山 614000

2. 重庆医药高等专科学校生理学教研室 重庆 401331

**摘要:** 目的 探讨三棱有效生物活性成分对白血病治疗潜在的机制研究。方法 采用中药药理学分析平台数据库系统获取三棱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对应的靶点蛋白基因名,采用 Cytoscape3.8.1 软件构化合物-靶点网络图。通过 DisGeNET 数据库查询与白血病相关的基因,借助 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 平台筛选三棱活性成分靶点与白血病疾病靶点的交集基因,利用 STRING 数据库构建其蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络;利用 STRING 和 DAVID 生物信息学 KEGG 通路富集分析和数据库进行基因本体(GO)分析。采用 Autodock 软件对三棱的有效活性成分与核心蛋白基因进行分子对接。结果 经筛选共获得具有开发药物的三棱活性成分5个、靶点蛋白658个。三棱活性成分靶点与白血病疾病靶点的交集基因共33个。GO分析结果显示,GO条目28个( $P < 0.01$ ),主要涉及细胞过程化学反应、细胞生物调节、细胞应激、氮化合物代谢过程、高分子代谢过程、信号传导、细胞凋亡。KEGG 通路富集分析显示,三棱有效成分主要影响的通路包括肿瘤坏死因子信号通路、小细胞肺癌、钙通道、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。三棱的有效活性成分与核心基因 PTGS2、SIRT1、JUN、IL4、MAPK14 有较强的结合能力。结论 三棱中的活性成分可能通过 IL-17 信号通路、甲状腺激素信号通路、MAPK、PI3K-Akt 信号通路作用于 PTGS2、SIRT1、JUN、IL4、MAPK14 等靶点作用于白血病,为进一步研究三棱治疗白血病的药理学及作用机制提供理论依据。

**关键词:** 网络药理学; 通路; 三棱; 白血病; 分子对接技术

白血病是造血系统的一种恶性疾病,其表现为乏力、出血、多汗、胸骨压痛、淋巴结肿大等症状<sup>[1]</sup>。在我国恶性肿瘤死亡率中白血病分别占第8位(女性)和第6位(男性)<sup>[2]</sup>,发病率更是位居儿童恶性肿瘤的首位,是造成儿童死亡的主要原因之一<sup>[3-4]</sup>。目前,临床上治疗白血病的方法主要化学药物治疗,但是,化疗药物的毒副作用以及耐药使患者生存质量和长期生存率下降,严重影响白血病疗效和预后。我国传统中药治疗肿瘤已有悠久的历史,中药材在减轻放化疗的毒副作用,延长生存期,提高生存质量以及防止术后肿瘤复发转移等方面具有重要的作用,目前,已有中药材应用于白血病的治疗<sup>[5]</sup>。因此,寻找高效、低毒的天然药物是治疗白血病的关键策略之一。三棱(Sparganii Rhizoma)是中药经典方剂常用药物,其药理作用是活血化瘀,有抗炎、抗血栓、镇痛、抗肿瘤等功效<sup>[6]</sup>。中药三棱莪术组方有利于减轻胃癌患者在化疗过程中的副作用,降低肿瘤相关标志物水平

的表达,能显著提高患者免疫功能<sup>[7]</sup>。热疗显著增强三棱提取物对结肠癌细胞的凋亡、迁移和侵袭作用<sup>[8]</sup>。大量文献报道,中药治疗白血病中,主要成分含中药三棱,但三棱有效成分对白血病细胞的研究尚未报到<sup>[9-10]</sup>。本研究利用网络药理学和生物信息学研究的优点,对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,为研究中医药现代化提供了新的思路<sup>[11-13]</sup>。本文对三棱成分治疗白血病的靶点和作用机制进行了研究,旨在为临床三棱治疗白血病提供理论依据,并下一步的实验研究提供思路。

## 一、资料与方法

### 1. 筛选三棱活性成分及靶点蛋白

首先使用中药系统药理学分析平台 TCMSp 数据库(<http://tcmspw.com/tcmsp.php>),以“三棱(Sanleng)”“Sparganii Rhizoma”为关键词查询三棱所含化学成分。根据 TCMSp 推荐,以口服利用度(OB)  $\geq 30\%$ 、类药性(DL)  $\geq 0.18$  为

筛选条件, 化合物 OB、DL 值越高, 就越有可能被开发成临床药物<sup>[14]</sup>, 筛选三棱活性成分及其对应靶点蛋白, 进行下一步研究。

### 2. 构建化合物-靶点网络

采用 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, 利用 Cytoscape3.8.1 软件构建三棱化合物-靶点网络, 并进行分析。

### 3. 构建 PPI 网络

先“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, 再将三棱靶点蛋白对应基因和白血病靶点基因上传至 Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/>), 获得白血病靶点与三棱活性成分靶点交集的基因, 分析结果并做出韦恩图。将上述交集基因输入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/>) 中, 做出三棱与白血病的 PPI 网络图, 并导入 Cytoscape 3.8.1 进行分析。

### 4. 生物信息分析

将上一步骤所得交集基因导入 STRING 和 DAVID 数据

库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中, 进行 GO 和 KEGG 分析。在此过程中, 以 P 值反映生物功能的显著性和通路的富集程度 ( $P < 0.05$ , 表示结果有显著性差异)。

### 5. 分子对接

将三棱有效活性成分在 PubChem Substance 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 查询 3D 结构, ChemBioDraw 3D 模块中结构最小化。根据生物信息分析关键蛋白从 NCBI 获得的氨基酸序列在 SWISS-MODEL 服务器 (<https://swissmodel.expasy.org/>) 中建模。受体结构由 AutodockTools 1.5.6 21 修改, 导出为 pdbqt 格式由 AutoDock-Vina 1.1.2 执行对接, 输出分数显示为 kcal/mol。PyMOL 2.3.0 和 BIOVIA Discovery Studio 2016 被应用于结果处理和可视化。

## 二、结果

### 1. 筛选三棱活性成分

通过 TCMSP 共查阅到三棱化学成分 29 个; 以  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  为标准, 共 5 个有潜在药物开发的活性成分, 5 个有效成分分别对应 83 个相关靶点, 其基本信息详见表 1。

表 1 三棱主要活性成分

分子编号	分子名	化学名	分子量	OB%	DL
MOL001297	trans-gondoic acid	反式-11-二十碳烯酸	310.58	30.7	0.2
MOL000392	formononetin	芒柄花素	268.28	69.67	0.21
MOL000296	hederagenin	常春藤皂苷元	414.79	36.91	0.75
MOL000358	beta-sitosterol	$\beta$ -谷甾醇	414.79	36.91	0.75
MOL000449	Stigmasterol	豆甾醇	412.77	43.83	0.76

### 2. 化合物-靶点网络分析

该网络活性成分节点 83 个, 图 1 可见, 分别是反式-11-二十碳烯酸、芒柄花素、常春藤皂苷元、 $\beta$ -谷甾醇、豆甾醇, 数据表示这四种化合物中, 共计 140 个靶蛋白, 分别是反式-11-二十碳烯酸 (8)、芒柄花素 (39)、常春藤皂苷元 (32)、 $\beta$ -谷甾醇 (38)、豆甾醇 (24)。节点度值排序前 5 位的靶点蛋白分别为 NCCA2、PTGS2、NCOA2、GABRA2、HSP90。

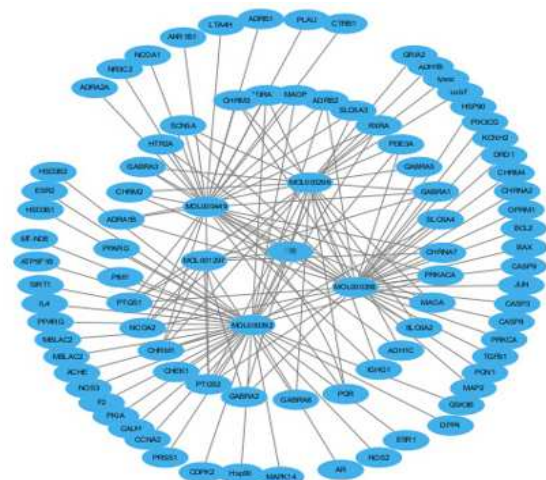


图 1 三棱有效成分网络靶点图

### 3. 白血病靶基因获取

从 GeneCards 和 DisGeNET 数据库中, 获取 2112 个白血病相关基因。通过 UniProt 数据库查询到三棱活性成分靶点蛋白对应基因 82 个, 通过图 2 可知, 三棱活性成分靶与白血病靶点的交集基因 33 个, 有 NOS2、BCL2、ADRA1A、PTGS2、ESR1、TGFB1、CCNA2、GSK3B、NR3C2、IL4、CASP9、NCOA2、SIRT1、CHRM3、PLAU、RXRA、DPP4、PON1、CHEK1、KCNH2、CASP8、PPARG、PIM1、MAPK14、ACHE、CASP3、PIK3CG、PTGS1、PRUN1、BAX、PAX1。

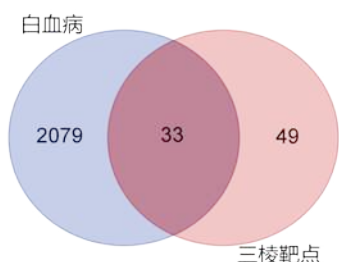


图 2 三棱活性成分靶点与白血病靶点交集基因

### 4. 靶蛋白相互作用 PPI 网络分析

把获得的 33 个三棱活性成分靶点和白血病疾病靶点的交集基因, 用 STRING 数据库构建 PPI 网络 (图 3)。该网络共包含节点 33 个、边 130 条, 平均节点度值为 7.8, 平均介 0.557。由图可知, PPI 网络图中的核心基因为 PPARG、SIRT1、RXRA、PTGS2、BCL2、CASP3、ESR1、JUN、IL4、MAPK14、TGFB1、NCCA2、PTGS1、NCOA2、GABRA2、HSP90。

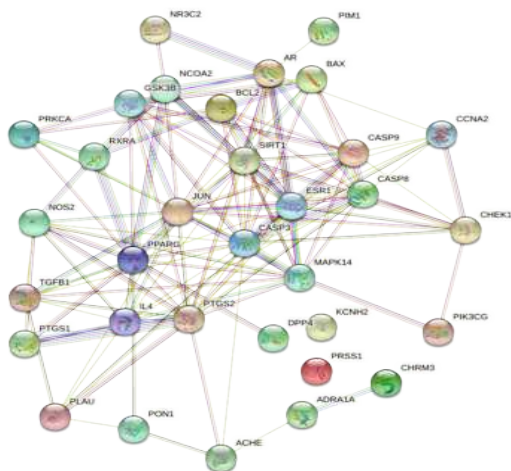


图 3 三棱与白血病的 PPI 网络

### 5. 交集基因 GO 功能分析

将上述交集到的基因导入 DAVID 和 STRING 数据库中进行 GO 分析, 共得到 GO 条目 P 值小于 0.01 有 658 个, 主要涉及细胞过程、化学反应、细胞应激、细胞生物调节、氮化合物代谢过程、信号传导、高分子代谢过程、细胞代谢过程的调节、有机物代谢过程、转录因子活性、细胞凋亡等, 详见图 4。

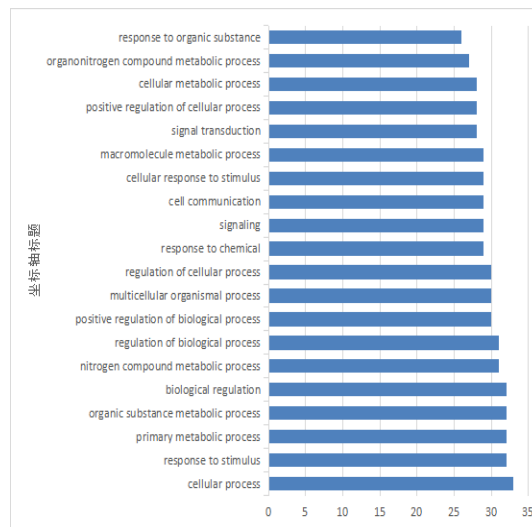


图 4 交集基因 GO 过程分析 (前 20)

### 6. 交集基因 KEGG 通路富集分析

将 33 个三棱活性成分靶点和白血病疾病靶点的交集基因, DAVID 和 STRING 生物信息学数据库中进行 KEGG 分析, 富集到 95 条通路 ( $P < 0.01$ )。按富集到基因数从多到少排序, 前 20 条通路详见表 2。KEGG 通路富集分析显示, 三棱化合物主要富集的通路包括癌症通路、癌症 MicroRNAs、结肠癌、IL-17 信号通路、凋亡、小细胞肺癌、甲状腺激素信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等, 根据富集基因分析可知, 三棱主要通过 PTGS2、SIRT1、JUN、IL4、MAPK14、TGFB1、PPARG、RXRA、BCL2、CASP3、ESR1 等相关基因发挥作用。

### 三、讨论

中药三棱主要成分分为黄酮类、甾体类、挥发油类、有机酸类、苯丙素类、环二肽类及微量元素等, 主要的药理作用用于改善血液流变学、抗血栓、抗肿瘤、抗炎、镇痛、等作用。中药三棱提取物对结肠癌和胃癌细胞的凋亡、迁移和侵袭作用。证实了三棱有效成分有抗肿瘤的作用, 而有效成分对白血病细胞的研究尚未报到。

表 2 交集基因的 KEGG 通路富集分析结果 (前 20 位)

ID	通路名称	基因数	P 值
hsa05200	Pathways in cancer	17	0.00001
hsa05161	Hepatitis B	9	0.00001
hsa05167	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection	9	0.00001
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	8	0.00001
hsa05145	Toxoplasmosis	8	0.00001
hsa05152	Tuberculosis	8	0.00001
hsa05210	Colorectal cancer	7	0.00001
hsa04657	IL-17 signaling pathway	7	0.00001
hsa05222	Small cell lung cancer	7	0.00001
hsa04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	7	0.00001
hsa05206	MicroRNAs in cancer	7	0.00001
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	7	0.00001
hsa05140	Leishmaniasis	6	0.00001
hsa04919	Thyroid hormone signaling pathway	6	0.00001
hsa04210	Apoptosis	6	0.00001
hsa05164	Influenza A	6	0.00001
hsa05203	Viral carcinogenesis	6	0.00001
hsa05205	Proteoglycans in cancer	6	0.00001
hsa05165	Human papillomavirus infection	6	0.00001
hsa04215	Apoptosis - multiple species	5	0.00001

中药活性的往往通过多成分-多靶点-多通路发挥药理作用。本研究通过 TC MSP 共检索到三棱化学成分 29 个;以  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$  为标准,共 5 个有潜在药物开发的活性成分,5 个有效成分分别对应 83 个相关靶点。从数据库中获得白血病相关基因 2112 个和三棱活性成分靶点蛋白对应基因 83 个。通过韦恩图,三棱活性成分靶点和白血病疾病靶点的交集基因 33 个。PPI 网络展示靶基因蛋白之间的交互次数情况。以上结果提示三棱对白血病治疗有多靶点共同协同的特点。PPI 网络结果可见 NCOA2、PTGS2、ERBB2、CASP3、ESR1、HSP90,结合中国知网和 PUMED 数据,发现核心基因前列腺素 G/H 合成酶 2(PTGS2)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、胱天蛋白酶 3 (CASP3)、热休克蛋白 90 (HSP90)、核受体辅激活因子 2 (NCOA2) 在白血病中均有差异表达。以上的结果提示了三棱有效成分治疗白血病有一定的作用。

GO 分析显示,疾病靶点涉及细胞过程、化学反应、细胞应激、细胞生物调节、氮化合物代谢过程、信号传导、高分子代谢过程、细胞代谢过程的调节、有机物代谢过程、转录因子活性、细胞凋亡等。KEGG 通路富集分析,三棱化合

物主要富集的通路包括癌症通路、癌症 MicroRNAs、结肠癌、IL-17 信号通路、细胞凋亡、小细胞肺癌、甲状腺激素信号通路、MAPK 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。癌症通路中,靶点基因有 TGFB1、IL4、PPARG、BAX、CASP3、GSK3B、NOS2、CASP9、CASP8、PTGS2、JUN、PIM1、AR、BCL2、ESR1、PRKCA、RXRA; 癌症 MicroRNAs 有 SIRT1、CASP3、PTGS2、PLAU、PIM1、BCL2、PRKCA; 凋亡通路中有 BAX、CASP3、CASP9、CASP8、JUN、BCL2,三个通路中共有的基因 CASP3、BCL2。有研究表明注射用核糖核酸 II 上调 p53,调控 Bcl-2/Bax,激活 aspase-3 表达,促 KG1a 细胞凋亡<sup>[14]</sup>。白血病肿瘤患者中,IL-17 表达异常,IL-17 信号通路可以调控调控 Bcl-2/Bax,促进白血病细胞凋亡<sup>[15]</sup>。MAPK 抑制剂能够通过诱导细胞凋亡来治疗多种肿瘤。PI3K/AKT 信号通路异常活化与白血病多药耐药有密切相关,抑制 PI3K/AKT 通路可抑制肿瘤细胞增值、促进细胞凋亡<sup>[16]</sup>。激活甲状腺激素受体,提高 HIF1 $\alpha$  基因的表达,促进白血病的发展。青蒿琥酯通过抑制 AML 细胞中的 PI3K/AKT 通路活化,上调抑癌基因表达,导致促凋亡蛋白的表达,抑制肿瘤细胞增殖,促进 AML 细胞凋亡。热休克蛋白 90(HSP90)



在白血病中表达增高,抑制 HSP90 能促进白血病细胞发生凋亡。白血病细胞中核受体辅激活因子 2 (NCOA2) 表达增高,抑制 NCOA2 的表达可以通过细胞凋亡途径促进白血病细胞发生凋亡。由上述研究可知,与白血病通路相关的核心基因包括 PTGS2、SIRT1、JUN、IL4、MAPK14、TGFB1、PPARG、RXRA、BCL2、CASP3、ESR1,可能发挥三棱治疗白细胞靶点作用。

综上所述,本研究通过网络药理学的方法探讨了三棱的活性成分作用白血病的潜在机制,发现具有潜在治疗作用的化合物及其靶点,为后续研究提供参考。

#### 参考文献

[1] 苏慧敏,王羽,李宏伟. 询证护理应用于白血病化疗患者的临床效果[J]. 中国城乡企业卫生, 2021,239(9): 143-145.

[2] GONG D, LI W, HU L D, et al. Clinical features and prognosis of t (8; 21) AML patients in China: a multicenter retrospective study [J]. J Exp Hematol, 2017, 25(4):980-986.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 张石生,雷超,王洁等. 基于数据挖掘中药治疗急性髓系白血病用药规律分析[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022,24(11):73-76.

[6] 张磊,程健,余莹,等. 活血祛瘀药对三棱-莪术治疗胃癌的网络药理学作用机制研究[J]. 浙江中医药大学学报, 2020,44(08):773-782.

[7] 赵航,戴玮. 三棱莪术组方辅助治疗胃癌的临床效果研究[J]. 癌症进展, 2019,17(08):925-928.

[8] 王振兴,李水芹,赵梓亦,等. 三棱、莪术提取物联合热疗对结肠癌 SW620 细胞凋亡及迁移、侵袭能力的影响[J].

中国药房, 2018,29(24):3386-3391.

[9] 安娜,张古英,赵宜乐等. 基于数据挖掘的中医药治疗急性白血病化疗后骨髓抑制期的临床用药规律研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021,21(10):1250-1253+1257.

[10] 陈小舜. 罗秀素辨治慢性粒细胞白血病的经验[J]. 浙江中医志, 2000,9(06):237-237.

[11] 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药, 2021,16(4):527-532.

[12] 付海荣,庞毅,谭家华,等. 山豆根治疗白血病作用机制的网络药理学研究[J]. 中国药房, 2019,30(24):3392-3398.

[13] 朱章志,施岚尔,刘江涛,等. 基于网络药理学探索青蒿治疗人急性髓系白血病作用机制[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(1):1-4.

[14] 郭珮,冉建华,李静,等. 注射用核糖核酸 II 上调 P53 诱导人白血病细胞凋亡[J]. 中国药理学通报, 2016,32(12):1729-1734.

[15] Zhu F, McCaw L, Spaner D E, et al. Targeting the IL-17/IL-6 axis can alter growth of Chronic Lymphocytic Leukemia in vivo/in vitro [J]. Leukemia research, 2018, 6(6):28-38.

[16] Finney Olivia C, Brakke Hannah M, Rawlings-Rhea Stephanie, et al. CD19 CAR T cell product and disease attributes predict leukemia remission durability[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2019,129(5):2123-2132.

#### 基金项目:

基金 1, 重庆教委青年项目 (KJQN202202823); 基金 2, 乐山职业技术学院院级课题 (KY2022039)

#### 作者简介:

孟赞 (1989 年 2 月), 女, 四川乐山市, 讲师, 硕士研究生, 主要从事的基础医学研究。

#### 通讯作者:

刘泽洪 (1988 年 10 月), 男, 重庆市渝中区, 讲师, 硕士研究生, 主要从事基础医学研究。