

· 数据挖掘 ·

龙葵甙体生物碱抗非小细胞肺癌网络药理学分析

刘良裕, 杨宇珂, 王建农*

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

[摘要] 目的:研究龙葵甙体生物碱抗非小细胞肺癌(NSCLC)的潜在作用靶点和通路,分析其抗NSCLC的可能作用机制。方法:查阅文献筛选出龙葵中具有抗NSCLC活性的甙体生物碱(SASN),通过SwissTargetPrediction, PharmMapper及GeneCards数据库分别获得SASN和NSCLC的全部靶点,利用Venny在线软件获取二者共同靶点,并运用Cytoscape软件构建“药物-成分-靶点-疾病”作用网络图,利用Metascape对共同靶点进行富集分析,进一步预测潜在通路。借助STRING数据库得到蛋白质-蛋白质相互作用网络(PPI),通过网络拓扑数据分析筛选出关键靶点,并通过蛋白免疫印迹法(Western blot)验证药物对关键靶点的影响。结果:经过筛选得到6个SASN,包括澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺、毛叶冬珊瑚碱、龙葵次碱和氮甲基澳洲茄碱,对SASN和NSCLC全部靶点取交集后得到SASN抗NSCLC的潜在作用靶点共有96个,京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析表明潜在靶点涉及的通路主要包括癌症通路、癌症蛋白聚糖通路和Forkhead box protein O (FoxO)通路等。PPI网络分析显示,蛋白激酶B1(Akt1),丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1),MAPK8,MAPK14,信号传导及转录激活蛋白3(STAT3)及原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC)等15个靶点可能是SASN抗NSCLC的关键作用靶点;同时,Western blot结果显示龙葵生物碱可以显著下调Akt1,STAT3和SRC 3个关键蛋白的表达。结论:该研究预测了SASN抗NSCLC的潜在作用靶点和信号通路,获得了SASN抗NSCLC的关键作用靶点,并从15个关键靶点中选取3个关键蛋白进行了验证,验证结果与靶点预测相一致,为后续深入研究龙葵甙体生物碱抗NSCLC作用机制提供了科学的指导。

[关键词] 龙葵; 甙体生物碱; 非小细胞肺癌; 作用机制; 网络药理学

[中图分类号] R285;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0178-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211418

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211014.1532.004.html>

[网络出版日期] 2021-10-14 18:52

Mechanism of Active Steroid Alkaloids from *Solanum nigrum* Against Non-small Cell Lung Cancer: Based on Network Pharmacology

LIU Liang-yu, YANG Yu-ke, WANG Jian-nong*

(Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the potential targets and pathways of steroid alkaloids from *Solanum nigrum* (SASN) in the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) and analyze the possible mechanism. **Method:** The active SASN against NSCLC were searched from literature. Then potential targets of SASN were screened through SwissTargetPrediction and PharmMapper, and those of NSCLC through GeneCards. Venny was employed to yield the common targets of the two, and Cytoscape to construct the 'medicinal-component-disease-target' network. Metascape was applied to enrich the Gene Ontology (GO) terms and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways of the common targets, and STRING was used to

[收稿日期] 20210809(002)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81872989)

[第一作者] 刘良裕,在读博士,从事中药药效物质基础与抗肿瘤机制研究,E-mail:liuliangyu93@126.com

[通信作者] *王建农,研究员,博士生导师,从事中药药效物质基础与抗肿瘤机制研究,Tel:010-62835620,E-mail:wangjiannong_med@163.com

generate the protein-protein interaction (PPI) network, followed by screening of key targets by Cytoscape. Finally, Western blot was used to verify the effects of the medicinal on key targets. **Result:** A total of 6 active SASN were screened out: solasonine, solamargine, solasodine, solanocapsine, solanidine, and N-methylsolasodine, which had 96 potential anti-NSCLC targets. These targets mainly involved the pathways in cancer, proteoglycans in cancer, and Forkhead box protein O (FoxO) pathway. PPI network analysis demonstrated 15 key anti-NSCLC targets of SASN, such as mitogen-activated protein kinase (MAPK) 1, MAPK8, MAPK14, protein kinase B (Akt1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), and proto-oncogene tyrosine protein kinase (SRC). Meanwhile, Western blot results showed that SASN could significantly down-regulate the expression of the key proteins Akt1, SRC, and STAT3. **Conclusion:** We predicted the potential targets and pathways of SASN against NSCLC and obtained 15 key targets, from which we selected three key proteins for validation. The validation results were consistent with the prediction results. This paper is expected to lay a scientific basis for the subsequent in-depth study of the mechanisms of SASN against NSCLC.

[Keywords] *Solanum nigrum*; steroid alkaloid; non-small cell lung cancer; mechanism; network pharmacology

在所有恶性肿瘤中,肺癌的死亡率高居首位,世界卫生组织最新发布的报告显示,肺癌导致的死亡达到全球癌症死亡总数的18.0%^[1]。在肺癌病理学分类中,非小细胞肺癌(NSCLC)是最常见的类型,占肺癌发生率的85%^[2]。尽管分子生物学的快速发展促成了多种靶向药物的临床应用,但NSCLC患者的总中位生存期仅增加1.5个月,5年生存率低于17%^[3],临床治疗仍存在诸多挑战。因此,寻找治疗NSCLC的新靶点、新机制或潜在治疗NSCLC的新化合物,对开发新NSCLC治疗药物或辅助治疗方式具有重大临床意义。

中药具备多成分、多靶点、多途径等优势与特点,可弥补西医疗疗的不足,在降低肺癌复发转移、减轻治疗毒副作用,提高患者生存质量及生存期方面发挥着积极作用。中药龙葵(*Solanum nigrum*)为茄科茄属植物龙葵或少花龙葵的干燥全草,具有清热解毒、消肿散结的功效。龙葵最早记载于《药性论》,而在《新修本草》《本草图经》《本草纲目》及《植物名实图考》等经典古籍中均详细记载了龙葵治疗各种疮痍肿毒的论述^[4],表明龙葵在古代已被广泛应用于恶性肿瘤的治疗。现代药理研究表明,龙葵生物碱是其抗肿瘤的主要活性成分,且对NSCLC疗效显著^[5]。CHEN等^[6]研究发现澳洲边茄碱可以显著抑制人非小细胞肺癌的生长,可能是通过下调蛋白激酶B(Akt),前列腺素E受体蛋白4(EP4)和DNA甲基转移酶1(DNMT1)表达,促进EP4和细胞外调节蛋白激酶1/2(ERK1/2)的磷酸化实现。黄文斯等^[7]发现澳洲茄碱可以抑制肺癌细胞H446的增

殖,同时可上调凋亡调节蛋白(Bax)和半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)。目前为止,龙葵生物碱抗NSCLC的药理机制研究较少且集中于对增殖和凋亡机制的研究,尚待进一步挖掘。此外,课题组前期研究发现,中药白英甾体生物碱可以凝集肿瘤细胞脂筏胆固醇调控外泌体发挥显著的抗NSCLC作用^[8],由于龙葵与白英同科同属,化学成分与白英相似,故推断其极可能与白英具有相似的药效和作用机制,而在此之前,并未有人单独对龙葵中的甾体生物碱这一类成分进行抗NSCLC预测或机制研究。基于上述背景,本文对龙葵中6种具有抗NSCLC活性的甾体生物碱(SASN)进行网络药理学研究,旨在发现SASN抗NSCLC的潜在靶点,为进一步深入研究SASN抗NSCLC的物质基础和药理机制提供明确思路和方向。研究框架见图1。

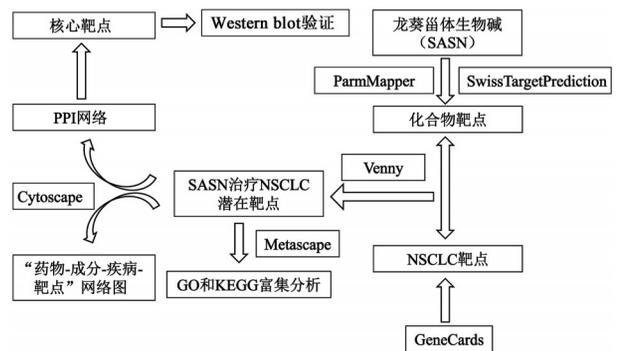


图1 龙葵中甾体生物碱网络药理学分析框架

Fig. 1 Flowchart of network pharmacological analysis of SASN

1 方法

1.1 化合物收集与靶点预测 查阅文献并经过筛

选后收集得到6种抗NSCLC活性甙体生物碱^[9],将此6种生物碱输入PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得上述成分的canonical SMILES结构。将获得的SMILES结构输入SwissTargetPrediction数据库^[10](<http://www.swisstargetprediction.ch/>),该网站预测基于2D和3D相似性,与包含3 000多种蛋白质和370 000种已知活性物质的数据库结合而成,可以预测生物活性小分子化合物最可能的大分子靶标。默认选择Homo sapiens,通过预测得到各化合物潜在作用靶点。通过UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/uniprot/>),限定物种为人,将所获得的靶点蛋白校正为其官方基因名称,并将重复基因删除。

PharmMapper^[11]是一个旨在使用药效团作图法为给定的探针小分子识别潜在候选靶标的在线分析平台,包含了TargetBank, BindingDB, DrugBank以及potential drug target database等所收录的所有药物靶点,能够自动筛选药物的最佳构象,并且匹配药效团。将上述6种成分的SDF格式文件导入PharmMapper数据库,Submit Job进行靶点预测,依次选择参数Generate Conformers-Yes, Maximum Generated Conformations-300, Select Targets Set-Human Protein Targets Only(v2010, 2241), Number of Reserved Matched Targets-300,得到相应化合物靶点后,按标准化拟合得分(Normalized Fit Score)>0.5筛选出与该6种化合物匹配度较高的潜在靶点,按上述相同步骤校正后删除重复基因。将2次所得靶点合并,去重,得到化合物的最终潜在靶点。

1.2 非小细胞肺癌相关靶点获取 GeneCards^[12](<https://www.genecards.org/>)作为一个综合性在线数据库,整合了约150个网络来源的以基因为中心的数据,该数据可以提供所有有关注释和预测人类基因的全面信息。因此,本研究于GeneCards数据库中输入关键词“Non-Small Cell Lung Cancer”搜索与NSCLC相关的基因,按Relavance Score \geq 20筛选出与人类NSCLC相关度较高的靶点。

1.3 龙葵甙体生物碱抗NSCLC潜在靶点提取及可视化网络构建 将上述得到的化合物潜在靶点和疾病相关靶点分别导入Venny 2.1.0(<https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>)在线工具,取二者交集,得到二者共有靶点,即为龙葵6种甙体生物碱抗NSCLC的全部潜在靶点。利用Cytoscape 3.7.2构建可视化网络,得到“药物-成分-疾病-靶点”网络图。

1.4 核心靶点筛选及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析 为进一步探究潜在靶蛋白间的相互作用,将上述所得“化合物-疾病”共有靶点输入相互作用数据库平台STRING 11.0(<https://string-db.org/>),构建PPI网络,物种设置为“Homo sapiens”,最低相互作用评分设置为“highest confidence(0.900)”,隐去游离的节点,其余参数保持默认设置,得到龙葵甙体生物碱抗NSCLC的蛋白相互作用网络。利用Cytoscape 3.7.2软件对PPI网络进行拓扑分析,并按“degree”大小进行排序。degree值越大,表明与该节点相连的边越多,在维持网络整体结构上可能占据重要地位,从而筛选出PPI网络中关键靶蛋白。

1.5 潜在靶点的基因本位(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析 Metascape^[13](<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)集成了40多个生物信息数据库,整合了GO, KEGG, UniProt和DrugBank等多个权威的数据资源,包含了生物通路富集分析,蛋白质相互作用网络结构分析以及丰富的基因注释功能,可快速获得全面的数据分析。将上述所得“化合物-疾病”共有靶点输入该平台,对潜在靶标进行GO和KEGG分析。GO分析包括分子功能(MF),生物过程(BP)和细胞组成(CC)3个部分,可诠释靶点的抗肿瘤生物过程;KEGG分析用于研究靶点涉及的主要信号通路。筛选排名靠前的生物过程和信号通路,进一步讨论分析潜在靶点可能的抗肿瘤机制。

2 关键蛋白验证

2.1 材料和试剂 龙葵生物碱、澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺,均为实验室自制得到,其中澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺已利用核磁共振波谱法鉴定,并利用高效液相法测定纯度均达90%以上。

人肺腺癌细胞A549(美国ATCC,批号CCL-185)。

磷酸盐缓冲液(PBS), RPMI-1640培养基,完全MEM培养基,青、链霉素混合液,胰蛋白酶-乙二胺四乙酸消化液(江苏凯基生物技术有限公司,货号分别为KGB5001, KGM31800, KGM41500, KGY002, KGY001);胎牛血清(美国Gibco公司,批号10100-147);二甲基亚砜,人纤维连接蛋白(美国Sigma公司,批号分别为D2650, L4544);全蛋白抽提试剂盒,BCA蛋白含量检测试剂盒,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒,预染蛋白分子量,5 \times SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,Tris-甘氨酸蛋白电泳缓冲液,蛋白免疫印迹法

(Western blot)检测试剂盒及显影定影试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号分别为KGP250, KGA902, KGP113, KGP441, KGP101, KGP103X, KGP1201, KGP116); Akt1,原癌基因酪氨酸蛋白激酶(SRC)和信号传导及转录激活蛋白(STAT)抗体(美国Thermo Fisher公司,批号分别为17-9715-42, AHO0051, MA5-15659); 96孔板(Corning Incorporated公司,批号3599);细胞培养瓶(Falcon公司,批号353014)。

2.2 Western blot检测A549相关蛋白表达情况

取生长对数期的A549细胞,消化、计数,配制细胞悬液,均匀的接种于6孔板中,待细胞贴壁后,分别用不同浓度的龙葵生物碱,以及澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺各 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理细胞,其中龙葵生物碱处理组分为低、中、高剂量3组(低剂量龙葵生物碱 $20\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;中剂量龙葵生物碱 $50\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;高剂量龙葵生物碱 $100\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),同时设置空白组。24 h后,加入裂解液,冰上静置裂解30 min,收集样品,置于1.5 mL离心管中,于 $4\ ^\circ\text{C}$, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下离心10 min(离心半径12 cm),收集上清液。参考文献[14],将各样品总蛋白浓度调整为相同浓度, $100\ ^\circ\text{C}$ 沸水中煮10 min,放于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 备用。参考文献[12]步骤,进行制胶,加样, $80\ \text{V}$ 条件下电泳30 min,再把电压提高至120 V,当目的条带进入凝

胶2/3时,停止电泳。转膜,10%的脱脂奶粉常温下摇床封闭2 h。封闭后的膜孵育一抗,过夜,清洗后用5%脱脂奶粉封闭液稀释二抗,室温摇床振荡反应2 h,洗膜,显影。

3 结果

3.1 龙葵甾体生物碱的基本信息及靶点信息

查阅文献并经过筛选得到6个具有抗NSCLC活性的龙葵甾体生物碱,分别是澳洲茄碱、澳洲茄边碱、澳洲茄胺、毛叶冬珊瑚碱、龙葵次碱、氮甲基澳洲茄碱,化合物的基本信息见表1,结构见图2。通过PharmMapper预测得到化合物靶点共1 496个,按Normalized Fit Score >0.5 筛选得到977个,去重后共257个;通过SwissTargetPrediction预测得到化合物靶点共94个,去重后共62个。将以上2种方式所得靶点合并,去重,共得到306个化合物潜在靶点。

表1 龙葵抗肿瘤活性甾体生物碱基本信息

Table 1 Information of active steroidal alkaloids from *Solanum nigrum*

Mol ID	PubChem CID	化合物名称	分子式
MOL006853	119247	solasonine	$\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{NO}_{16}$
MOL007353	73611	solamargine	$\text{C}_{45}\text{H}_{73}\text{NO}_{15}$
MOL007351	442985	solasodine	$\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}_2$
MOL007356	73419	solanocapsine	$\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{N}_2\text{O}_2$
MOL004448	65727	solanidine	$\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{NO}$
-	21573751	N-methylsolasodine	$\text{C}_{28}\text{H}_{45}\text{NO}_2$

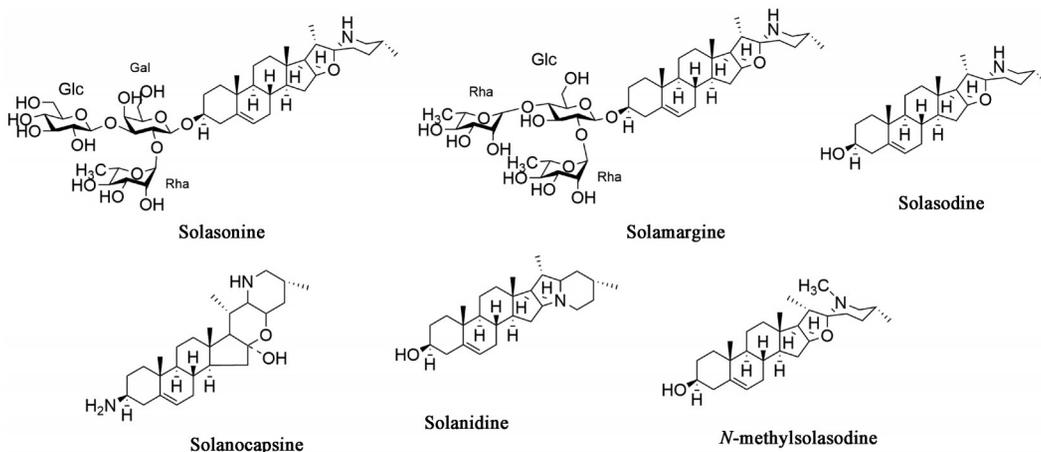


图2 龙葵抗肿瘤活性甾体生物碱结构

Fig. 2 Structures of active steroid alkaloids of *Solanum nigrum*

3.2 非小细胞肺癌相关靶点

通过GeneCards数据库得到非小细胞肺癌靶点共4 910个,按Relevance Score ≥ 20 筛选后得到1 210个与人类NSCLC相关度较高的靶点。

3.3 龙葵甾体生物碱抗NSCLC潜在靶点及可视化网络构建

通过Venny在线分析工具,将化合物靶

点与疾病靶点输入后得到二者共同靶点共96个,为龙葵甾体生物碱抗NSCLC的潜在靶点。

借助Cytoscape软件,输入药物、成分、疾病及96个潜在靶点,用不同形状的“节点”表示药物、成分、靶点及疾病,用“边”表示成分与靶点间关系,构建可视化网络图。

3.4 核心靶点筛选及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析 中心性是生物网络中任意节点在整个网络中心的程度,度是节点在网络中心性的指标,节点度值越大,这个节点的中心性越高。借助Cytoscape软件对PPI网络进行拓扑属性分析,绘制PPI网络图。

由STRING得到的PPI数据中,节点平均度值为7.83,平均中间中心性(BC)为 2.32×10^{-2} ,平均接近中心性(CC)为0.39,将度值、中间中心性、接近中心性均大于平均值的靶点取交集,筛选出PPI网络中15个核心靶点:丝裂原活化蛋白激酶1(MAPK1), MAPK8, MAPK14, Akt1, 鼠双微体2(MDM2), 信号传导及转录激活蛋白3(STAT3), 90 kDa热休克蛋白 α A1(HSP90AA1), 淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶(LCK), 磷酸肌醇依赖性蛋白激酶1(PDK1), SRC, 酪氨酸蛋白激酶JAK3, 雌激素受体1(ESR1), 维甲酸X受体 α (RXRA), 连环蛋白 α -1(CTNNA1), 基质金属蛋白酶-2(MMP-2), 提示这些靶点可能是龙葵甙体生物碱治疗NSCLC的关键靶点。

3.5 潜在靶点的GO及KEGG富集分析 为了进一步挖掘龙葵甙体生物碱抗NSCLC的潜在作用机制,通过Metascape平台对96个潜在靶点进行GO和KEGG富集分析。将富集到的GO结果按P值排序,潜在靶点涉及最显著的BP是激酶活性的正调控(positive regulation of kinase activity),而最主要的CC是受体复合物(receptor complex)和细胞膜脂质筏(membrane raft),其主要MF包括蛋白质激酶活性(protein kinase activity),蛋白质酪氨酸激酶活性(protein tyrosine kinase activity)和蛋白质激酶结合(protein kinase binding)。

将富集到的KEGG通路结果按P值排序,取前10位绘制气泡图。每张图左侧为排名前10的通路名称,气泡颜色由红到蓝代表P值从小到大,气泡越大代表参与该通路的基因数越大,横轴代表该通路基因所占总体输入基因的比值。排名前十的通路为pathways in cancer, proteoglycans in cancer, FoxO signaling pathway, Th17 cell differentiation, adherens junction, transcriptional misregulation in cancer, bladder cancer, leukocyte transendothelial migration, endocytosis, IL-17 signaling pathway。

3.6 关键蛋白表达 结果显示,质量浓度在 $20 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,与空白组相比,龙葵生物碱能够显著下调关键蛋白Akt1, SRC和STAT3蛋白表达($P <$

0.05),且呈剂量依赖性。此外,在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,澳洲茄碱、澳洲茄边碱和澳洲茄胺均可以不同程度地下调关键蛋白Akt1, SRC和STAT3蛋白表达,见图3。

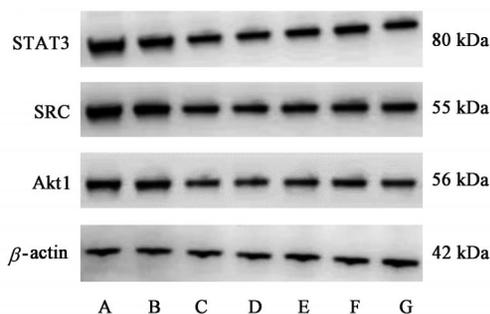


图3 Western blot验证龙葵甙体生物碱调控关键蛋白的表达
Fig. 3 Western blot results for regulation of key proteins expressions by SNSA

4 讨论

NSCLC是中医临床的常见病种^[15],中医认为NSCLC与热毒、痰饮密切相关,热毒内蕴、痰淤热毒互结损伤肺脏,日久而形成有形实邪,发而为瘤^[16],故临床上应用清热解毒中药治疗NSCLC的频率高达82.1%^[17]。龙葵作为一类清热解毒中药,在临床常被用于治疗包括肺癌在内的多种肿瘤。对于龙葵的抗肿瘤药理研究表明,龙葵生物碱是其抗肿瘤有效成分,石芳等^[18]研究表明澳洲茄碱可以抑制肺癌细胞侵袭,调节基质金属蛋白酶和其组织抑制剂表达。黄越燕等^[19]发现,龙葵生物碱对人肺癌A549细胞增殖具有显著的抑制作用,并可使A549细胞形态发生显著变化。金德忠等^[20]发现,澳洲茄碱对人肺癌A549及小鼠Lewis肺癌2种细胞株均有一定抑制作用,且细胞出现皱缩的垂死形态,即细胞凋亡或细胞坏死,表明澳洲边茄碱以诱导细胞凋亡或坏死的方式阻滞肺癌细胞增殖。然而,目前为止,龙葵生物碱抗肿瘤物质基础以及更深入、确切的作用机制尚待进一步挖掘。网络药理学作为一种集生物信息学、网络生物学和传统药理学等多学科于一体的综合性研究方法,基于药物与药物之间在结构、功效等方面的相似性,从系统层面揭示中药的生物活性成分及作用机制,在中药作用机制研究中显示出重要价值。本研究利用网络药理学方法,对龙葵甙体生物碱潜在的作用靶点进行预测,为后续的药理机制研究提供科学指导,对进一步阐明甙体生物碱抗NSCLC的靶点和作用机制具有重要意义。

当前,已有基于网络药理学的龙葵抗肺癌的靶

点和机制预测研究,耿其顺等通过网络药理学筛选出7个有效活性成分,51个相关作用靶点及10条信号通路,结果表明龙葵可能通过内皮生长因子受体(EGFR)等靶点及缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路和腺苷酸激活蛋白激酶(AMPK)信号通路对于肺癌有一定治疗和预防作用^[21]。刘燕玲等^[22]基于加权基因共表达网络分析探讨龙葵抗肺腺癌功能基因模块,共收集龙葵活性成分9个,筛选龙葵潜在抗癌靶点41个,其潜在调控通路包括癌症通路、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路等。尽管如此,与之前已有研究不同的是,本研究基于课题组对白英甾体生物碱确切的抗肿瘤机制研究,从而推广并聚焦于龙葵中结构明确且抗NSCLC活性明确的甾体类生物碱,而目前并未有单独对这类成分抗NSCLC网络药理学研究的报道。

研究结果显示,潜在靶点涉及的主要细胞成分之一是细胞膜脂质筏。脂质筏富含胆固醇,是外泌体形成的关键结构。肿瘤来源的外泌体(TDEs)是由肿瘤细胞膜分泌的微囊泡^[23],在形成肿瘤转移前微环境,诱导血管新生,增强肿瘤耐药性以及远端转移灶形成等方面发挥重要的信号传导作用^[24],干预TDEs形成可以阻断其在肿瘤进展中的重要功能。因此,干预细胞膜胆固醇,将破坏脂质筏结构,影响TDEs形成,从而干扰其信号传导,控制肿瘤进展。由于甾体糖苷生物碱与部分甾体皂苷性质相似,能与胆固醇按比例结合生成不溶性分子复合物,基于此背景,课题组前期研究已证明白英甾体糖苷生物碱可以凝集脂筏胆固醇调控TDEs生成及功能发挥显著抗NSCLC作用^[8]。由于龙葵与白英同属,化学成分与白英相似,故极可能具有与白英相似的药效和作用机制,这一推测也与本研究的GO分析结果一致,提示龙葵极有可能通过作用于肿瘤细胞膜脂筏,调控TDEs,发挥抗NSCLC作用,这一创新性机制值得进一步深入研究。

此外,潜在靶点涉及的最显著的生物进程是激酶活性的正调控,主要的分子功能与蛋白激酶的活性有关。蛋白激酶作为重要的信号传导分子之一,在细胞凋亡、周期调节、增殖、血管生成、分化、代谢等生理活动中具有重要作用^[25]。本研究筛选出15个关键靶点,分别是MAPK8, Akt1, MAPK1, MAPK14, MDM2, STAT3, HSP90AA1, LCK, PDPK1, SRC, JAK3, ESR1, RXRA, CTNNA1, MMP-2。研究结果提示,龙葵甾体生物碱可能通过影响上述关键靶点,调控蛋白激酶活性,从而进一

步影响细胞的生命活动,发挥抗NSCLC作用。基于该预测结果,本研究对STAT3, Akt1和SRC3个蛋白进行验证,在NSCLC中,STAT3, Akt1和SRC的表达均异常升高。其中, SRC的异常高表达是NSCLC患者转移的重要因素,研究表明, SRC的敲减可抑制小鼠NSCLC的转移^[26]。STAT3参与肿瘤发生发展的多个环节, STAT3的磷酸化可以促进肿瘤细胞上皮间质转化,从而促进肿瘤转移^[27]。Akt1在NSCLC细胞存在过表达和活化, Akt1能够通过磷酸化其下游的多种作用底物促进肿瘤细胞的侵袭、转移和血管生成等^[28]。实验结果表明,龙葵总生物碱和3个甾体生物碱均能够显著抑制A549细胞中3个蛋白的表达,提示可能是龙葵甾体生物碱抗NSCLC转移的主要靶点。

通过KEGG富集分析得到的排名前3的通路为癌症通路、癌症蛋白聚糖(FoxO)信号通路。癌症蛋白聚糖(PGs)已被证明是影响肿瘤进展的关键大分子,主要的PGs包括硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG),硫酸软骨素蛋白聚糖(CSPG)和透明质酸(HA)等。研究表明,在这些蛋白聚糖中, HSPG的Perlecan可以导致肿瘤增殖、侵袭^[29],此外还在肿瘤生长和血管生成中具有关键作用^[30]。而合成多糖syndecans和Perlecan均可调节细胞黏附和迁移^[31],介导上皮间质转化(EMT)^[32],促进血管生成^[33]。而FoxO家族的转录因子可调节基因在细胞生理事件中的表达,这些事件包括细胞凋亡,细胞周期控制,葡萄糖代谢等^[34-35]。该结果提示,龙葵甾体生物碱抗NSCLC作用机制可能主要通过癌症蛋白聚糖和FoxO信号通路实现,有待进一步研究证实。

5 总结

本研究以龙葵中具有抗NSCLC活性的甾体生物碱为研究对象,通过网络药理学方法预测了其抗NSCLC的潜在作用靶点及通路,初步提示了龙葵甾体生物碱可能是通过凝集细胞膜脂筏胆固醇调控外泌体生成和功能发挥治疗NSCLC的作用,并且可能主要通过癌症通路、癌症蛋白聚糖通路和FoxO信号通路影响肿瘤细胞的正常增殖和各项生命活动;同时,龙葵甾体生物碱能够显著下调STAT3, Akt1和SRC蛋白表达,推测可能是其抗NSCLC转移的重要靶点。本研究结果为后续深入研究龙葵抗NSCLC的物质基础和分子机制提供了明确的方向和科学的指导。

【利益冲突】 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ORGANIZATION W H. Latest global cancer data: cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020 [EB/OL]. (2021-01-06) [2021-08-09]. <https://www.iarc.fr/faq/latest-global-cancer-data-2020-qa/>.
- [2] WINSTON W, TAN M D. Non-small cell lung cancer (NSCLC) [EB/OL]. (2021-07-15) [2021-08-09]. <https://emedicine.medscape.com/article/279960-overview>.
- [3] AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures 2015. Atlanta: American cancer society, 2015 [EB/OL]. (2015-12-26) [2021-08-09]. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@editorial/documents/document/acspc-044552.pdf>.
- [4] 李红念, 蒋启明, 梅全喜, 等. 龙葵的化学成分与药理作用研究进展[J]. 今日药学, 2011, 21(11): 713-715.
- [5] 梅全喜, 张志群, 林慧, 等. 龙葵治疗肿瘤的药理作用与临床应用研究进展: 中华名中医论坛暨发挥中西医优势防治肿瘤高峰论坛[C]//中华中医药学会, 广东省中医药学会. 全国毒性中药饮片学术研讨会论文集, 2011卷. 广东中山, 2011.
- [6] CHEN Y, TANG Q, XIAO Q, et al. Targeting EP4 downstream c-Jun through ERK 1/2-mediated reduction of DNMT 1 reveals novel mechanism of solamargine-inhibited growth of lung cancer cells[J]. J Cell Mol Med, 2017, 2(21): 222-233.
- [7] 黄文斯, 王颖, 朱海涛, 等. 澳洲茄碱诱导肺癌细胞株 H446 凋亡及其机制探讨[J]. 中国肺癌杂志, 2015, (7): 416-421.
- [8] 韩林. 白英生物碱对非小细胞肺癌的抑制作用及凝集脂筏胆固醇抑制血管新生的抗肿瘤机制研究[D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.
- [9] 周新兰. 中药龙葵抗癌活性成分研究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006.
- [10] DAINA A, MICHELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47 (W1) : W357-W364.
- [11] XIA W, YIHANG S, SHIWEI W, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [12] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [M]. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2016, doi: 10.1002/cpbi.5
- [13] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. Nat Commu, 2019, 10 (1523): 325-347.
- [14] HNASKO T S, HNASKO R M. The Western blot[J]. Methods Mol Biol, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-2742-5_9
- [15] 王永炎, 曹洪欣. 中国中医科学院中医优势病种研究 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2011: 256.
- [16] 张星星, 李泽庚. 肺癌中医病因病机探讨[J]. 中华中医药杂志, 2015, 2(10): 3447-3449.
- [17] 乔路敏, 张培彤. 清热解毒法治疗肺癌辨析[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(4): 316-321.
- [18] 石芳, 巫林, 王妍, 等. 龙葵提取物澳洲茄碱对肺癌细胞侵袭及 MMPs/TIMPs 表达的影响[J]. 肿瘤药学, 2018, 8(3): 337-341, 346.
- [19] 黄越燕, 朱琦峰, 周燕, 等. 龙葵生物碱体外抑制肿瘤细胞增殖作用的实验研究[J]. 亚太传统医药, 2012, 8(9): 31-33.
- [20] 陈来, 李姗姗, 金德忠, 等. 中药龙葵提取物澳洲茄碱对肺癌细胞抑制作用[J]. 时珍国医国药, 2015, 5(2): 333-334.
- [21] 耿其顺, 朱子家, 王文斌, 等. 基于网络药理学研究龙葵抗肺癌的生物作用机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 313(11): 182-185.
- [22] 刘燕玲, 吴美玲, 胡莹, 等. 基于加权基因共表达网络分析(WGCNA)探讨龙葵抗肺癌功能基因模及生物标记识别研究[J]. 中草药, 2019, 50(24): 6073-6083.
- [23] KADOTA T, YOSHIOKA Y, YU F, et al. Extracellular vesicles in lung cancer-from bench to bedside [J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 67: 39-47.
- [24] HOSHINO A, COSTA-SLIVA B, SHEN T L, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis[J]. Nature, 2015, 527(7578): 329-335.
- [25] KUMAR R, CHAUDHARY K, GUPTA S, et al. Cancer DR: cancer drug resistance database [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1445.
- [26] 王威. Src 和 GSTA1 在肺癌转移中的作用及机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [27] WANG W P, YING S, LU Q, et al. Gankyrin promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in NSCLC through forming a closed circle with IL-6/STAT3 and TGF- β /SMAD3 signaling pathway [J]. Oncotarget, 2016, 8(4): 5909.
- [28] TANNO S, TESTA J R, KOHGO Y. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor

- expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2001, 120(5-suppl-S1):A39-A40.
- [29] ADATIA R, ALBINI A, CARLONE S, et al. Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of anti-sense perlecan cDNA [J]. *Ann Oncol*, 1997, 8(12):1257-1261.
- [30] SHARMA B, HANDLER M, EICHSTETTER I, et al. Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(8):1599-1608.
- [31] COUCHMAN J R, CHEN L, WOODS A. Syndecans and cell adhesion [J]. *Int Rev Cytol*, 2001, 207: 113-150.
- [32] KATO M, SAUNDERS S, NGUYEN H, et al. Loss of cell surface syndecan-1 causes epithelia to transform into anchorage-independent mesenchyme-like cells[J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6(5):559.
- [33] MAEDA T, DESOUKY J, FRIEDL A. Syndecan-1 expression by stromal fibroblasts promotes breast carcinoma growth *in vivo* and stimulates tumor angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2005, 25:1408-1412.
- [34] BRUNET A, GREER E L. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression[J]. *Oncogene*, 2005, 24(50):7410.
- [35] ZHANG Y, GAN B, LIU D, et al. FoxO family members in cancer [J]. *Cancer Biolo Ther*, 2011, 12(4):253-259.

[责任编辑 顾雪竹]

·书讯·

俯卧位通气技术在ICU应用护理要点 ——评《中医护理学》

重症医学科(ICU)主要收治各类重症患者,通过使用最精密、最严密的临床监护方案、器械与分析手段来实现对重症患者的24 h全身所有脏器,功能的监控治疗以及护理。ICU科室的治疗与护理,以挽救患者性命及危重状态,转入到安全的生命状态作为最高准则。俯卧位通气技术是重症患者较为常用的辅助治疗,这种治疗对ICU科室医护人员的综合水平提出了较高的要求,一是要求护理人员充足,通常情况下,实施俯卧位通气技术最少需要4位医护人员同时在场进行。二是护理难度较大,从治疗前准备、治疗过程、治疗后护理到并发症护理阶段,都需要护士对患者监测情况进行仔细的监督,注意各类参数变化,并时刻注意患者的生命意识,护士要有连续奋战的精神,身体反应迅速。俯卧位通气技术在ICU应用护理要点集中在三个方面:一是让患者以及家属了解心理护理的重要性;二是结合监护参数,密切观察患者的生命体征、意识以及身体反应,治疗期间要及时调整患者的体位,关注患者情绪;三是要仔细做好管道护理与并发症护理,治疗完成后应当结合患者情况及时地给予耐受度评估,给予适当地镇静镇痛护理,尽可能使患者处于可忍受的状态,协助患者做一些有限的活动,避免并发症的发生。

中西医结合护理在ICU室的工作中不断的应用和发展。尤其是在新型冠状病毒疫情防控中,中西医结合治疗与护理,是抗击疫情成功的关键因素。在《新型冠状病毒肺炎中西医结合防治共识》中指出,对于重症与危重症患者的治疗,主张在临床对症治疗的基础上,积极地防治并发症,予以中医药综合治疗。关注重症医学的发展方向,中西医结合治疗与护理方式将会在重症医学领域内进入更加深层次的融合。

《中医护理学》由温茂兴,康凤河主编,化学工业出版社2018年3月出版的“十三五”规划教材。本书是在全面广泛的调查基础上,秉持教材编写的“三基”“五性”“三特点”的原则,汲取“十二五”教材编写经验与精华,反映当前护理学科的发展状况,参考和吸收了近年来国内相关教材中的先进内容和编写方法。全书总共分为十个章节,阴阳五行学说、藏象、经络、病因病机、诊法、辨证、养生与治则、药物疗法、针灸疗法以及中医护理。从章节分类不难看出,本书所涵盖的中医护理知识是循序渐进的,从中医基础概念介入,以诊法与辨证、养生与治则作为重要理论支撑,最后贯穿到中医用药与护理技能。从学习的角度来看,本书语言清晰,概念阐述精准,易于理解,知识点由浅入深,有利于形成循序渐进的中医理论思维。本书十分注重系统性和整体性,同时其特别安排的数字版资源,还对电子教案、教学素材进行了额外的补充,以进一步扩充知识面广度。基于护理专业实操的重要性,本书在第八章、第九章、第十章三个章节对相关护理方法进行了系统性、规范性的概括。例如对药物内服的要求,就分了15种情况。这种编写方式也充分体现了中医辨证的理论特点。本书中所介绍的中医护理方法,结合护理需要和实际工作,让本书知识与护理实操有效接轨。本书主要介绍的中医护理方法包括中药方剂与护理、针灸疗法与护理、推拿疗法与护理、刮痧疗法与护理、拔罐疗法与护理等,这些疗法所需要的环境和器械都很容易实现,便于操作,并且能够在基础日常护理中使用。

《中医护理学》是一本适用于护理专业学习的书籍,现代护理学的迅速发展对中医护理学产生了深刻的影响,不仅仅可以作为高等教育的护理教材,也可以作为各个科室护士的重要参考书籍。尤其对ICU科室的护士,可以很好地进行中医护理知识的学习,继而形成中西医护理意识,并在临床护理中规范性的应用,以进一步提升ICU护理水平。

(作者吴双双,陈敏,湖州师范学院附属第一医院,浙江 湖州 313000)