

基于数据挖掘探究苦荞对胰腺癌的作用机制

常子惠,尼玛央宗,黄海皎,拉巴扎西,高小丽,田朋佳,尹中江*

(西藏自治区农牧科学院农业研究所,西藏 拉萨 850000)

摘要:基于数据挖掘及分子对接探讨以苦荞黄酮类化学物质为主的抗癌作用机制,采用中药系统药理学分析平台及文献查找挖掘苦荞抗胰腺癌的核心靶标和作用通路,通过GO分析和KEGG富集分析探讨其作用机制。结果表明,苦荞化学成分的作用靶点与胰腺癌的交集靶点有156个,苦荞成分槲皮素、山奈酚、大黄素、表儿茶素、芦丁等通过调控AKT1、TNF、TP53、IL6、VEGFA、IL1B、CASP3、EGFR等关键靶点,参与脂质和动脉硬化、乙型肝炎、人类巨细胞病毒感染、PI3K-Akt信号通路等,起到对胰腺癌的拮抗作用,且苦荞成分与各关键靶点均能够进行对接,且对接效果好。本研究预测苦荞对胰腺癌的拮抗作用可能是通过参与DNA与RNA之间转录过程抑制免疫信号通路中炎症因子与病毒感染的表达,促进癌细胞的凋亡,通过这种有效的靶向作用发挥抗肿瘤生物活性功能。

关键词:苦荞;胰腺癌;网络药理学;分子对接

中图分类号:R284.1

文献标志码:A

Exploring the Mechanism of Tartary *Fagopyrum tataricum* on Pancreatic Cancer Based on Data Mining

CHANG Zihui, Nimayangzong, HUANG Haijiao, Labazhaxi, GAO Xiaoli, TIAN Pengjia, YIN Zhongjiang*

(Institute of Agriculture, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tibet Lhasa 850000, China)

Abstract: To explore the anticancer mechanism of *Fagopyrum tataricum* flavonoids, based on data mining and molecular docking, the core targets and action pathways of *Fagopyrum tataricum* against pancreatic cancer were explored using the Traditional Chinese Medicine Systematic Pharmacology Platform (TCMSP) and literature search, and its action mechanism was explored by GO analysis and KEGG enrichment analysis. The results showed that there were 156 intersection targets between *Fagopyrum tataricum* chemical components and pancreatic cancer. *Fagopyrum tataricum* components, quercetin, kaempferol, rhodopsin, epicatechin, rutin, etc. involved in lipid and atherosclerosis, hepatitis B, human cytomegalovirus infection, PI3K-Akt signaling pathway to play an antagonistic role in pancreatic cancer, through the regulation of AKT1, TNF, TP53, IL6, VEGFA, IL1B, CASP3, EGFR and other key targets. Besides, *Fagopyrum tataricum* components and each key target can be docked, and the docking effect is good. This study predicts that the antagonistic effect of *Fagopyrum tataricum* on pancreatic cancer may be through participating in transcription process between DNA and RNA, inhibiting the expression of inflammatory factors and viral infection in the immune signaling pathway, promoting the apoptosis of cancer cells, and exerting anti-tumor bioactive functions through this effective targeting.

Key Words: *Fagopyrum tataricum*; pancreatic cancer; network pharmacology; molecular docking

苦荞麦 *Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn. 为1年生草本植物,隶属于蓼科(Polygonaceae)荞麦属(*Fagopyrum*),原产于中国西南地区高寒地带,现我

国西北、西南、东北、华北都有种植。苦荞是药食同源的小宗杂粮作物,富含黄酮类物质,其中芦丁含量占黄酮含量的80%~90%^[1],而黄酮类物质因其广泛的降糖、降压、抗氧化、抗炎、抗肿瘤等生物活性一直是研究的热点^[2],芦丁更是被广泛报道其抗肿瘤活性,具有广阔的抗肿瘤前景^[3]。胰腺癌(Pancreatic cancer, PC)作为消化系统中的恶性肿瘤之一,一经发现往往就已是晚期,只能采用化学疗法和放射疗法进行治疗,不仅完全治愈的可能不大,而且还有极大的副作用,因此,胰腺癌的早期筛

收稿日期:2023-07-10

基金项目:2022-2025 高产优质型农作物新品种选育(XZ202201ZY0013N)

作者简介:常子惠(1995-),女,研究实习员,硕士,主要从事农作物种质资源鉴定与评价、杂粮育种工作,E-mail:changzihui1995@163.com;*为通讯作者:尹中江(1971-),男,研究员,硕士,主要从事荞麦育种、栽培、农业信息及农业相关科研工作,E-mail:894649536@qq.com。

查和预防就显得十分重要。目前有不少与苦荞抗肿瘤相关的报道,夏翱文^[4]就报道过 miRNA-877-3p 介导苦荞黄酮抗胰腺癌的活性作用研究,可见苦荞对抗击胰腺癌有一定的效果。

利用网络药理学方法可以将药物潜在靶点与疾病靶点相互联系起来,从而揭示药物活性成分、疾病及相关信号通路之间的互作关系。分子对接以受体特性以及受体与药物分子之间相互作用方式为依据,通过计算机技术进行模拟对接,可以展现配体和受体分子在结合过程中的构象变化。由于在线的 TCMSP 数据库中未包括苦荞的化学成分信息,因此,利用文献检索方法确定苦荞化学成分,通过化合物 CAS 号在 TCMSP 数据库查询潜在的药物作用靶点,实施网络药理学分析与分子对接,预测苦荞对胰腺癌的作用机制。

结合西藏荞麦目前的研究及育种工作,根据国内研究发展趋势,立足自身条件,针对当前存在的许多基础薄弱环节、研究不足等问题,从当前不同需求出发,制订初、中、高级目标,解决制约产量稳定提升的问题,并选育出高黄酮含量的品种(系),以满足不同使用需求,加快符合西藏农业发展新需求,及时解决新问题。

1 资料与方法

1.1 数据库平台

本研究采用的数据库平台见表 1。

表 1 数据库平台

数据库平台	网址链接
TCMSP 中药系统药理学分析平台	http://tcmspw.com/tcmsp.pHp
Uniport	http://www.uniportcorp.com/
GeneCards	http://www.genecards.org/
STRING	http://string-db.org/
PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/
PDB 蛋白质晶体数据库	http://www.rcsb.org
CB-Dock 分子对接在线平台	http://clab.labshare.cn/cb-dock/pHp/blinddock.pHp

1.2 方法

1.2.1 检索化合物潜在的靶点与胰腺癌相关靶点

利用文献查找到苦荞化合物的成分信息,通过化合物的 CAS 号可在 TCMSP 中获得化合物的 MOLID、潜在的作用靶点及相关基因名^[5],再将得到的靶点与 Uniport 数据库比对进行 gene 名称标准

化。在 GeneCards 数据库可获得胰腺癌相关靶点的 gene 名称^[6],将化合物靶点和疾病相关靶点取交集分析,得到的交集靶点信息可分析苦荞对胰腺癌的拮抗机制。

1.2.2 靶标蛋白互相作用核心网络的构建

将所得的公共靶基因在 STRING 数据库进行 PPI 网络分析,隐藏游离靶点,蛋白互作分值设为 0.4,导出 TSV 格式文件,导入 Cytoscape 3.7.1 软件构建蛋白互作网络^[7]。

1.2.3 化合物-靶点-通路网络

利用 Cytoscape 3.7.1 软件对化合物、靶点、通路信息进行化合物-靶点-通路网络的构建。

1.2.4 靶点通路分析

运用 R 语言 ClusterProfiler 包对交集靶点进行 GO 功能富集分析,可获得交集靶点生物过程(Biological process, BP)、细胞组成(Cell composition, CC)、分子功能(Molecular function, MF)信息,以 $p < 0.05$ 加以筛选,绘制各类别排名前 10 的 GO 条目柱状图及 KEGG 前 20 条信号通路气泡图。

1.2.5 分子对接

使用 Cytoscape 3.7.1 软件对构建的蛋白互作网络和化合物-靶点-通路网络进行分析,根据蛋白互作网络分析结果选择 degree 值靠前的靶点蛋白和化合物-靶点-通路网络中 degree 值靠前的化合物为分子对接对象。分别从 PDB 数据库和 PubChem 数据库下载上述筛选出的靶点蛋白及关键化合物的蛋白质晶体结构和化合物结构文件,利用 CB-Dock 网络平台对靶点与化合物进行对接^[8]。

2 结果与分析

2.1 苦荞的活性成分

以 1.2.1 方法搜集苦荞的活性成分,主要活性化合物为黄酮类物质,基本信息见表 2。

表 2 苦荞活性成分的基本信息

化学物质	CAS 号	分子 ID
芦丁	153-18-4	MOL000415
山奈酚	520-18-3	MOL000422
表儿茶素	490-46-0	MOL006505
槲皮素	117-39-5	MOL000098
山奈酚-3-O-芸香糖苷	17650-84-9	MOL002693
大黄素	518-82-1	MOL000472
胡萝卜苷	474-58-8	MOL001525
伞形花内酯	93-35-6	MOL002558

2.2 苦荞与胰腺癌的相关靶点

在TCMSP数据库对筛选的8个活性成分进行靶点预测,共得到319个靶点,去除重复值后共得到162个靶点。此外,在GeneCards数据库检索得到14 403个PC靶点。在Venny 2.1在线工具平台绘制162个苦荞靶点和14 403个PC靶点韦恩图,共得到156个共同靶点(图1)。

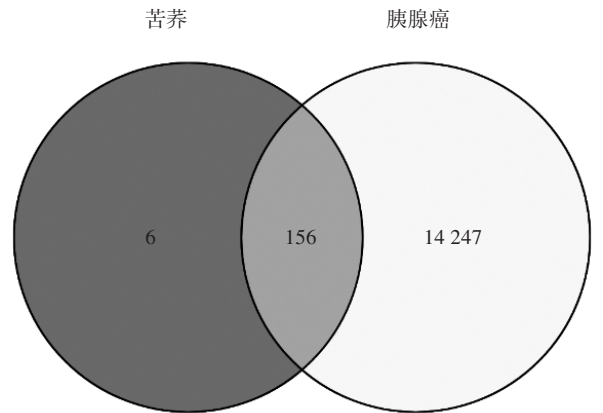


图1 苦荞与胰腺癌靶点韦恩图

2.3 靶标蛋白互相作用核心网络

将苦荞与PC的156个公共靶点导入STRING数据库进行PPI网络分析,获得化合物靶标蛋白互作核心网络数据。为了更直观表示蛋白互作核心网络关系,该数据用Cytoscape 3.7.1软件构建蛋白互作网络图(图2)。去除游离靶点后该网络共有153个节点,2 648条边,其中,节点大小、颜色深浅代表degree的大小。结果表明,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶AKT1(degree=104)、肿瘤坏死因子TNF(degree=100)、细胞肿瘤抗原p53(TP53, degree= 99)、白细胞介素-6(IL6, degree= 96)、血管内皮生长因子VEGFA(degree= 91)、白细胞介素-1(IL-1B, degree= 89)、胱天蛋白酶3(CASP3, degree= 87)、表皮生长因子受体EGFR(degree= 85)这8个靶点可能是苦荞活性物质与PC相互作用的关键靶点。

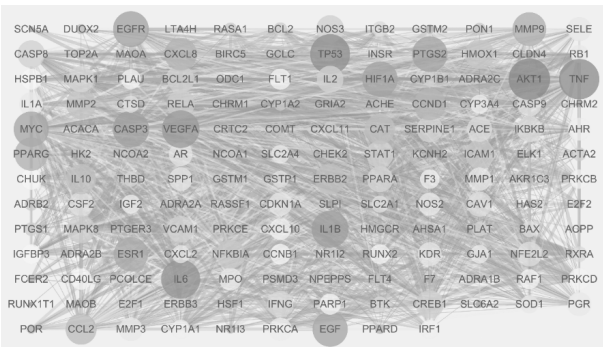


图2 苦荞与胰腺癌交集基因PPI网络

2.4 GO分析和KEGG通路分析

用1.2.4方法对苦荞与PC的156个交集靶点做GO和KEGG富集分析。GO富集分析结果发现,有1 685个生物过程(BP)、71个细胞组成(CC)、176个分子功能(MF)条目(图3)。156个靶点主要富集在脂多糖的响应、细菌源分子的响应、活性氧代谢过程、细胞对化学压力的反应等生物过程;在细胞组成方面,主要富集在膜筏、膜微域、膜区域、等离子膜筏等;在分子功能方面体现在DNA结合型转录因子的结合、RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子、核受体活性、配体激活的转录因子活性等。

KEGG富集分析结果得到198个通路,对其中前20条通路($p<0.05$)做可视化分析,结果显示,苦荞与PC的交集靶点主要富集在脂质和动脉硬化、乙型肝炎、人类巨细胞病毒感染、PI3K-Akt信号通路等(图4)。

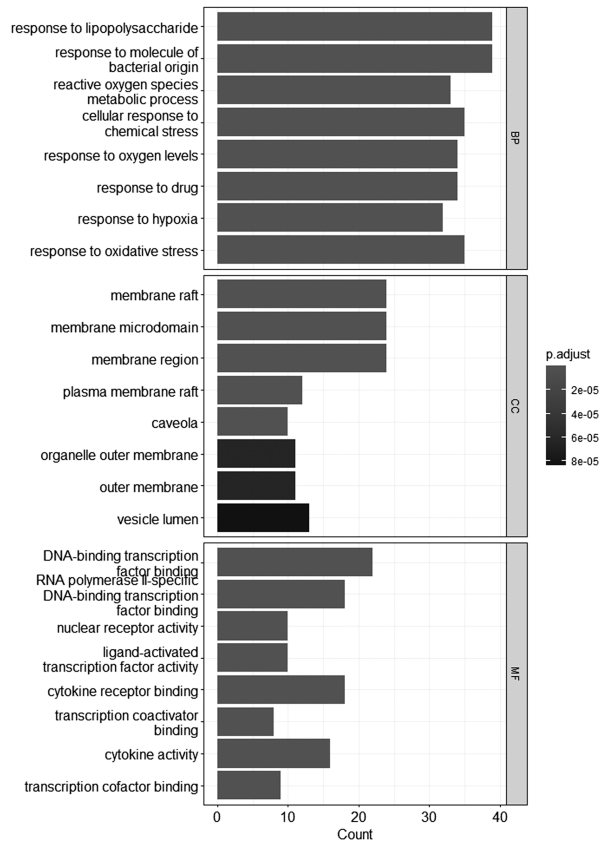


图3 GO功能富集

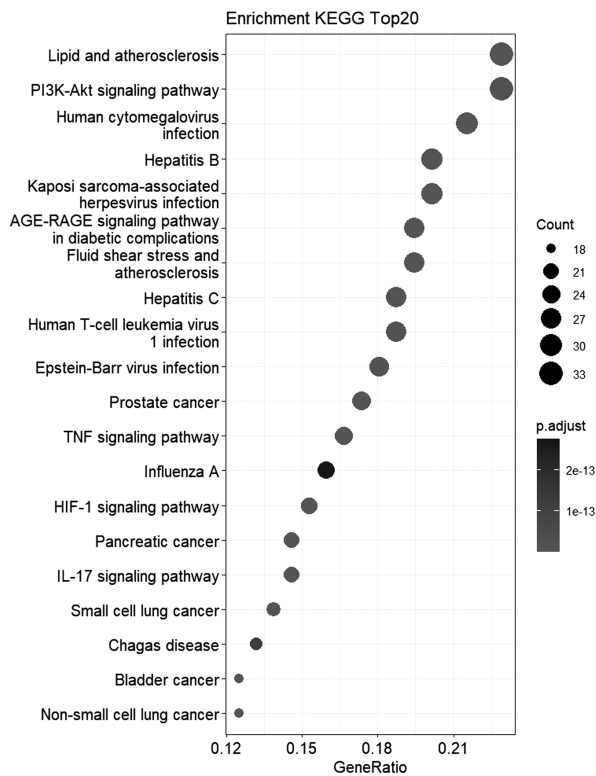


图4 KEGG通路

2.5 化合物-靶点-通路网络

156个公共靶点、苦荞8个化合物、KEGG前20条通路用Cytoscape软件进行Network Analyze分析,获得化合物-靶点-通路网络关系图。结果表明,共有184个节点,746条边(图5)。苦荞中MOL000098槲皮素(degree=119)、MOL000422山奈酚(degree=45)、MOL000472大黄素(degree=27)、MOL006505表儿茶素(degree=23)、MOL000415芦丁(degree=16)、MOL000558伞形花内酯(degree=9)等成分与交集靶点间有较高的关联度。

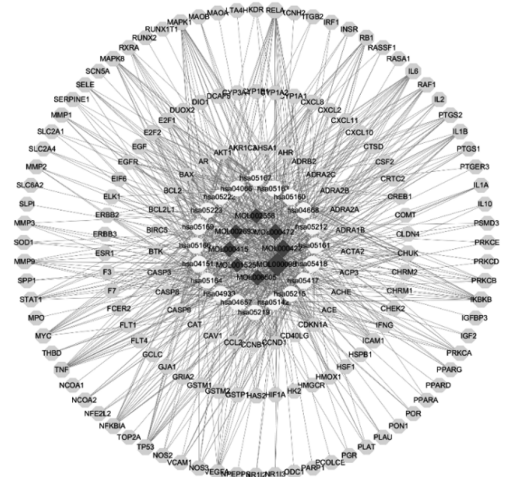


图5 化合物-靶点-通路网络

2.6 分子对接分析

选取2.3分析结果中的8个靶点蛋白(AKT1、TNF、TP53、IL6、VEGFA、IL1B、CASP3、EGFR)和2.5分析结果中的5个化合物(槲皮素、山奈酚、大黄素、表儿茶素、芦丁)进行分子对接。靶点与配体之间的结合用Vina分值评价,得分小于0说明蛋白和化合物可以结合,得分越低靶点与配体之间结合越容易。对接结果显示,苦荞化学成分与上述靶点蛋白都具有良好的结合作用(图6),效果最好的是芦丁与IL6之间的分子对接(图7)。

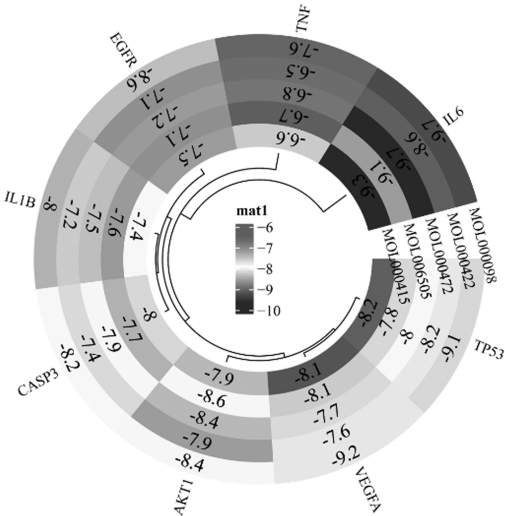


图6 核心靶点与化合物的对接数值

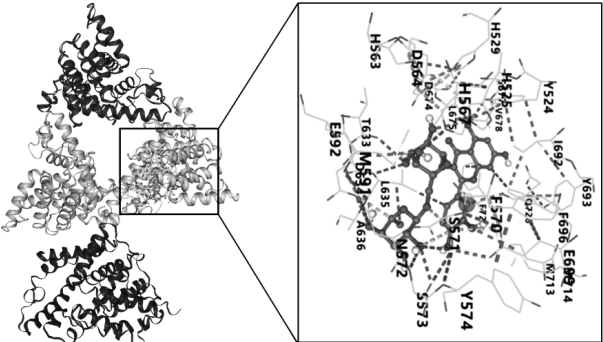


图7 芦丁与IL6分子对接示例

3 讨论

胰腺癌也称“万癌之王”,发现时多半已发展为晚期,病程进展快,治疗效果差,预后差,总的5年生存率仅5%~9%。胰腺癌在病理上具有普遍异质性,针对这一复杂疾病的精准诊疗手段目前仍不足,这是导致其预后不良的主要原因^[9]。因此,早期的疾病精准诊疗和日常预防就显得尤为重要。而苦荞中含有丰富的黄酮类成分,并且是天然芦丁的重要来源,在芦丁的多种活性功能中,其抗肿瘤

活性作用被广泛研究。已有研究报道芦丁能促进癌细胞的凋亡,从而抑制癌细胞的生长^[10]。此外,苦荞中的槲皮素、山奈酚、大黄素、表儿茶素等也具有多种生物活性。槲皮素被报道具有较强的抗氧化、抗炎和抗增殖性质,且与雷公藤甲素的配伍对肺癌和食管癌细胞均有抗癌增效作用,并均呈现出良好的量效关系,具有良好的抗肿瘤前景^[11];山奈酚具有抗癌、抗氧化、抗骨质疏松、降血糖、免疫调节、疾病预防、抗炎等活性,对预防心血管疾病和损伤组织保护等有良好的药理活性^[12];大黄素已被证明具有抗肿瘤作用,有研究表明大黄素主要通过促进细胞凋亡、抑制细胞增殖、抑制血管生成、抑制肿瘤转移等起到抑制胰腺癌的作用^[13];表儿茶素也具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化等活性,且槲皮素和表儿茶素联用对炎症相关性结肠癌、大肠腺癌等具有协同作用,可以起到良好的抑制效果^[14-15]。本研究采用网络药理学和分子对接方法对苦荞抑制胰腺癌的机制做了预测,得出苦荞活性成分对胰腺癌的抑制主要与其活性成分影响 AKT1、TNF、TP53、IL6、VEGFA、IL1B、CASP3、EGFR 等介质的表达有关。

通过分析交集靶点 PPI 网络发现,AKT1、TNF、TP53、IL6、VEGFA、IL1B、CASP3、EGFR 等关键靶点,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 AKT1 被确定在胰腺癌等多种肿瘤中发挥致癌基因作用^[16];TNF 为重要的炎症细胞因子,可以激活巨噬细胞、间质细胞及编码炎症相关细胞因子基因的启动子,诱发炎症反应^[17];其中 TP53 基因编码包含转录激活、DNA 结合和寡聚结构域的蛋白,该蛋白参与多种细胞应激反应,调节靶基因的表达,从而诱导细胞周期阻滞、凋亡、衰老、DNA 修复或代谢改变,并根据生理环境和细胞类型诱导生长停滞或凋亡^[18];IL-6 是一种功能广泛的多效性细胞因子,可调节多种细胞的生长与分化,具有调节免疫应答、急性期反应及造血功能,并在机体的抗感染免疫反应中起重要作用^[19];VEGFA 可促进新生血管形成和使血管通透性增加,具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用^[20];IL-1B 作为一个重要的炎症介质,能够参与多种细胞活动,包括细胞增殖、分化和凋亡,有研究报道 IL-1B 可以促进移植小鼠和人肿瘤的生长和转移,包括肉瘤、黑色素瘤、胰腺导管腺癌、骨髓瘤和乳腺癌。最重要的是,IL-1B 及其受体也已被证明是间质和上皮细胞原发性癌变和转移的重要驱动因

素。在胰腺癌模型中发现 IL-1B 是结缔组织增生反应的重要驱动因素。肿瘤产生的 IL-1B 激活了 TME 中的星状细胞,并诱导 TAM 介导的免疫抑制、Th17 侵袭和结缔组织增生。阻断 IL-1B 可增强抗 PD-1 免疫治疗的抗肿瘤活性。因此,在胰腺癌模型中,IL-1B 在结缔组织反应和免疫逃避的协调中是至关重要的^[21]。CASP3 为细胞凋亡途径中最为关键的酶类之一,是细胞凋亡检测的重要指标,参与执行细胞凋亡的 caspase 的激活^[22]。

本研究基于网络药理学及分子模拟对接的方法,以苦荞活性成分为研究对象,综合分析其干预胰腺癌的生物学途径及通路,并用反向分子对接进行验证,得出苦荞主要活性成分槲皮素、山奈酚、大黄素、表儿茶素、芦丁可能通过作用于 AKT1、TNF、TP53、IL6、VEGFA、IL1B、CASP3、EGFR 等靶点调控脂质和动脉硬化、乙型肝炎、人类巨细胞病毒感染、PI3K-Akt 信号通路,从而抑制促炎因子的释放以减轻机体炎症反应,同时调控细胞凋亡程序,抑制癌细胞扩散,从而起到对胰腺癌的防治作用。该机制主要呈现多分子、多靶点、多通路的特点,各成分间存在协同效应。

本研究结果仅是一种理论上的作用机制的探讨,且数据挖掘主要依靠网络数据库,主要对苦荞的黄酮类成分做了分析,其他化学成分是否也有活性未尝得知,预测结论可能有一定偏差,后续还需进一步验证苦荞活性成分对胰腺癌的作用机制。

苦荞作为药食同源作物,在食品方面形式多样,口味丰富,苦荞食品、饮品的开发十分广泛,药品开发只注重其单一提取物的运用,如生物类黄酮散、生物类黄酮软膏等产品,这显得苦荞药用产品的开发比较局限,未能使其药用价值完全发挥。因此,在利用苦荞进行产品开发时应注重其各成分间协同增效的相互作用,才能发挥其最大价值。目前西藏荞麦育种工作中苦荞麦的培育主要以总黄酮含量稳定>2%的品种(系)为主,在此标准下芦丁含量能达到总黄酮的 80%~90%,也为苦荞麦的开发利用提供了支持保障。该研究以文献分析为导向,旨在提升与促进西藏荞麦综合研究与实际工作。

参考文献:

- [1] 刘艳杰.苦荞总黄酮的纯化与芦丁水溶性粉体的研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2018.
- [2] 雷李涛,周永昌,蒲秀瑛.苦荞黄酮类化合物的制备及抗氧化及降糖作用研究[J].中国食品工业,2023(2):102-104,112.

- [3] 周 鹏, 吴建章, 仇佩虹, 等. 芦丁-硒配合物的合成及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志, 2007(24): 1905-1907.
- [4] 夏翱文. miRNA-877-3p 介导苦荞黄酮抗胰腺癌的活性作用研究[D]. 温州: 温州大学, 2021.
- [5] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Cheminformatics, 2014, 6(1): 13.
- [6] STELZER G. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. CurrProtoc Bioinformatics, 2016, 54: 1-30.
- [7] CHRISTIAN V M, JENSEN L J, BEREND S, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms[J]. Nucleic Acids Res (suppl-1): 143.
- [8] 常子惠, 何文佳, 多杰仁青, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨藏麻黄挥发性成分对支气管炎的作用机制[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(1): 133-143.
- [9] 姚钧天, 刘 亮, 郭津生. 胰腺癌的诊疗与精准治疗[J]. 西南医科大学学报, 2023, 46(2): 110-115.
- [10] 陈素贤, 谷泽慧, 马场斐, 等. 芦丁对人结肠癌 SW480 细胞凋亡的促进作用及其作用机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(2): 356-363.
- [11] 张月月, 王君明, 雷公藤. 甲素配伍槲皮素抗癌增效作用[J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(7): 1633-1636.
- [12] 雷晓青, 陈 鳌, 刘 毅, 等. 山萘酚药理作用的研究进展[J]. 微量元素与健康研究, 2017, 34(2): 61-62.
- [13] 倪 琰, 郭晓冬, 王静霞, 等. 大黄素治疗胰腺癌的机制[J]. 中医学报, 2022, 37(11): 2343-2349.
- [14] 张 磊, 罗 霄, 刘明靓, 等. 基于 miR-124-3p/IL-6 信号通路的槲皮素和表儿茶素协同调节炎症相关性结直肠癌研究[J]. 中草药, 2023, 54(5): 1471-1477.
- [15] 罗 霄. 槲皮素联合表儿茶素对炎症相关性大肠腺癌的干预作用及可能机制研究[D]. 宜昌: 三峡大学, 2022.
- [16] 汪俊州, 王义刚, 孙雅轩. miR-431-5p 通过调控 AKT1 抑制胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和促进凋亡研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(6): 716-721.
- [17] TAFT J, MARKSON M, LEGARDA D, et al. Human TBK1 deficiency leads to autoinflammation driven by TNF-induced cell death[J]. Cell, 2021, 184(17): 4447-4463.
- [18] SAKAMOTO Y, ISHIDA T, MASAKI A, et al. Clinical significance of TP53 mutations in adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. British journal of haematology, 2021: 571-584.
- [19] DICHTL S, LINDENTHAL L, ZEITLER L, et al. Lactate and IL6 define separable paths of inflammatory metabolic adaptation[J]. Science advances, 2021, 7(26): eabg3505.
- [20] JIANG M, FANG Y S, LI Y, et al. VEGF receptor 2 (KDR) protects airways from mucus metaplasia through a Sox9-dependent pathway[J]. Developmental Cell, 2021, 56(11): 1646-1660.
- [21] 陈伟涛. 抑制 IL1B 对舌癌细胞株功能的影响[D]. 福州: 福建医科大学, 2019.
- [22] MA X Y, ZHANG Y, WANG Z Y, et al. Ursolic Acid, a Natural Nutraceutical Agent, Targets Caspase3 and Alleviates Inflammation-Associated Downstream Signal Transduction.[J]. Molecular nutrition & food research, 2017, 61(12): 134-139.