

· 研究论文 ·

基于网络药理学的苦参碱抗肝癌作用及机制研究

王珂欣^{1,2}, 高丽^{1*}, 周玉枝¹, 张建琴¹, 秦雪梅¹, 杜冠华^{3*}

(山西大学 1. 中医药现代研究中心, 2. 化学化工学院, 山西 太原 030006;

3. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

摘要: 尽管多个研究表明苦参碱能抑制肝癌细胞增殖, 然而对其作用机制尚未进行系统研究。本研究首先考察苦参碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖和细胞迁移的作用, 在此基础上, 构建苦参碱抗肝癌靶点-功能相关蛋白相互作用网络, 进行拓扑分析和聚类分析, 预测苦参碱发挥抗肝癌作用的关键蛋白; 对其验证靶点进行通路富集分析, 预测苦参碱发挥抗肝癌作用的关键通路; 并采用 Western blot 对部分关键蛋白进行分析。细胞实验结果表明, 1、2 和 4 mg·mL⁻¹ 苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖, 0.5、1 和 2 mg·mL⁻¹ 苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞迁移。网络药理学结果表明, 苦参碱可能通过作用于乙酰肝素酶 (HPSE)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、Myc 原癌基因蛋白 (MYC) 和基质金属蛋白酶 2 (MMP2) 等关键验证靶点, 碳酸酐酶 1 (CA1)、再生基因 1A (REG1A)、羧酸酯酶 1 (CES1) 和乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 等关键预测靶点, 以及侵袭和迁移相关通路发挥抗肝癌作用。Western blot 结果显示苦参碱能显著下调 MMP2 表达, 上调 CASP3 表达。本文运用网络药理学阐释了苦参碱抗肝癌的作用靶点及通路, 为深入阐明苦参碱抗肝癌作用机制提供科学依据。

关键词: 网络药理学; 苦参碱; 肝癌; 作用机制

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 06-0888-09

Network pharmacology-based study of anti-hepatoma effects and mechanisms of matrine

WANG Ke-xin^{1,2}, GAO Li^{1*}, ZHOU Yu-zhi¹, ZHANG Jian-qin¹, QIN Xue-mei¹, DU Guan-hua^{3*}

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract: Although multiple studies have shown that matrine can inhibit the proliferation of hepatoma cells, its mechanism of action has not been systematically investigated. In this study, the effects of matrine on the proliferation and migration of human hepatoma SMMC-7721 cells were investigated. Based on this result, anti-hepatoma target-functionally related protein interaction network of matrine was constructed, and topological analysis and clustering analysis were performed to predict the crucial targets of matrine for the anti-hepatoma effects. Pathway enrichment analysis was performed on the validated targets to predict the crucial pathways of matrine. Parts of the crucial proteins were examined by Western blot. Cellular experiments showed that matrine at concentrations of 1, 2 and 4 mg·mL⁻¹ significantly inhibited the proliferation of SMMC-7721 cells,

收稿日期: 2017-01-17; 修回日期: 2017-03-03.

基金项目: 山西省研究生联合培养基地人才项目 (2016JD05); 山西大学引进人才事业发展经费 (226545008, 226545003); 山西省科技创新重点团队 (201605D131045-18); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004).

*通讯作者 Tel: 86-351-7018379, E-mail: gaoli87@sxu.edu.cn;

Tel: 86-10-63165184, E-mail: dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0075

and matrine at concentrations of 0.5, 1 and 2 mg·mL⁻¹ significantly inhibited the migration of SMMC-7721 cells. The results of network pharmacology suggest that matrine exerts its anti-hepatoma effects through acting on the key validated targets of heparanase (HPSE), caspase 3 (CASP3), Myc proto-oncogene protein (MYC), matrix metalloproteinases 2 (MMP2) and predicted targets of carbonic anhydrase 1 (CA1), lithostathine 1 alpha precursor (REG1A), carboxylesterases 1 (CES1) and acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2), and invasion and migration associated pathways. Western blot results suggest that matrine can down-regulate the expression of MMP2 and up-regulate the expression of CASP3. In this paper, we applied network pharmacology to explain the targets and pathways of matrine against hepatoma. The results provide a scientific basis for elucidation of the mechanisms of matrine against hepatoma.

Key words: network pharmacology; matrine; hepatoma; mechanism

肝癌是世界上流行最高的10种恶性肿瘤之一,死亡率在消化系统恶性肿瘤中位居第二,发病率有上升趋势,而我国每年新发病例占全球一半以上^[1-3]。现今肝癌的主要治疗手段是外科手术切除,但由于肝癌具有起病隐匿、高度恶性、潜伏期长、易转移和预后差等特点,单独化疗和其他局部治疗方法往往无法达到有效的治疗目的^[4,5]。

大量临床研究表明,中药能有效治疗肝癌^[6]、胃癌^[7]和乳腺癌^[8]等癌症,具有巨大的开发价值和应用前景。苦参碱(matrine, MT)是从豆科槐属植物苦参(*Sophora flavescens* Air)根中提取分离出来的主要生物碱,不仅在乳腺癌细胞(MCF-7)、胃癌细胞(SGC-7901和MKN45)、人胆囊癌细胞(GBC-SD)和骨肉瘤细胞(UMR-108)中表现出抗肿瘤作用,而且能显著抑制肝癌细胞的增殖^[9],其机制可能与诱导凋亡相关^[10]。但由于苦参碱抗肝癌作用机制复杂,尚未完全阐明,因此借助网络药理学的方法从系统生物学角度研究苦参碱抗肝癌机制具有重要意义。

网络药理学是近年来提出的一种新思想,旨在数据库检索、高通量组学数据分析和计算机模拟等手段基础上,通过多层次网络构建及分析,从而实现药物作用机制预测等研究目的^[11,12]。本研究在本实验室前期构建的肝癌靶点库基础上,将苦参碱的靶点和肝癌靶点库进行映射,构建苦参碱抗肝癌靶点-功能相关蛋白相互作用网络,进行聚类分析和拓扑结构分析,预测其发挥作用的关键基因。此外,基于苦参碱验证的靶点,进行通路富集分析,为苦参碱抗肝癌机制的阐明提供科学依据。

材料与方法

药品与试剂 人肝癌SMMC-7721细胞由天津肿瘤医院吴雄志教授课题组惠赠,苦参碱(C₁₅H₂₄N₂O,批号JZ20160618,纯度98%以上)购自南京景竹生

物科技有限公司,5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)购自北京索莱宝科技有限公司,DMEM培养液、胎牛血清、胰酶、青链霉素、二甲基亚砜(DMSO)及BCA试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司,MTT购自Sigma公司,caspase 3抗体购自Cell Signaling Technology公司,MMP2和β-actin抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司,荧光素标记的山羊抗兔IgG二抗购自美国Gene公司。

仪器 Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(瑞士Tecan公司);电泳仪(BIO-RAD公司);Odyssey CLX 双色红外荧光扫描仪(美国Gene公司)。

细胞培养和处理 SMMC-7721细胞培养于DMEM培养液中(含10%胎牛血清、100 u·mL⁻¹青霉素及0.1 mg·mL⁻¹链霉素),在37℃、5% CO₂饱和湿度下,细胞生长对数期进行传代、备用。分别设置空白对照组、苦参碱实验组(0.5、1、2和4 mg·mL⁻¹)及阳性药5-FU组(10 μg·mL⁻¹),用药处理时间为48 h。

MTT法测定细胞增殖 将对数期细胞以5×10⁴个/孔接种于96孔板,培养24 h后,加入对应的含药培养液,每组设6个复孔。继续培养48 h后,于每孔换入含有MTT的培养基,于37℃孵育4 h后,弃去上清液,每孔加入DMSO溶液100 μL,溶解紫色结晶沉淀,振荡10 min,平行操作6次。用酶标仪在490 nm处测定其吸光度(OD)值,计算细胞存活率以及半数抑制浓度(IC₅₀)。

细胞划痕实验 SMMC-7721细胞悬液以5×10⁴个/孔接种于6孔板,100%汇合后,吸尽培养液,加入PBS液洗涤1次,沿孔板底部划一直线,用PBS洗去刮下的细胞,将含苦参碱0.5、1和2 mg·mL⁻¹的培养基加入6孔板,对照组加入含相同浓度DMSO的培养基,分别在培养12、24和36 h后,显微镜下随机取4个视野,使用NIS-Elements成像软件测量各时间点划痕两侧细胞间的距离,用以表示肿瘤细胞

的迁移能力^[13]。实验重复 3 次。

靶点收集 本实验室^[6]前期已从肝癌数据库 OncoDB.HCC^[14] (<http://oncodb.hcc.ibms.sinica.edu.tw>) 和 Liverome^[15] (<http://liverome.kobic.re.kr/index.php>) 中收集肝癌相关基因, 收集标准为: OncoDB.HCC 数据库实验验证的基因, 以及 Liverome 数据库出现频率 > 7 的基因。运用 HIT^[16]数据库 (<http://lifecenter.sgst.cn/hit/>) 查找苦参碱已验证靶点, 并用 ChemMapper^[17] (<http://lilab.ecust.edu.cn/chemmapper/>) 预测苦参碱的靶点, 将这些靶点与肝癌相关基因相映射, 得到苦参碱抗肝癌的靶点。

网络构建和分析 运用 String^[18] (<http://string-db.org/>) 数据库获得这些靶点功能相关的蛋白, 剔除重复的相互作用, 应用 Cytoscape^[19]构建蛋白-蛋白相互作用网络。应用 Markov Clustering (MCL) 算法^[20]对网络中蛋白进行聚类分析, 并应用 NetworkAnalyzer^[21]分析网络中平均最短距离 (average shortest path length) 和介数 (betweenness centrality) 等参数。

通路分析 针对苦参碱已验证的靶点, 应用功能富集软件 Funrich^[22]预测苦参碱发挥抗肝癌作用涉及的通路。

Western blot 实验 收集细胞, 加细胞裂解液 100 μL , 置冰上充分裂解 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集上清液, 并通过 BCA 试剂盒测定蛋白质浓度, 将等量的蛋白质加到每个泳道中, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 然后冰上 200 mA 转膜 120 min。5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床封闭 2 h, 加入一抗 MMP2 (1 : 500)、caspase 3 (1.5 : 1 000) 和 β -actin (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。除去一抗后, 加入荧光二抗 (1 : 15 000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次。Odyssey CLX 双色红外荧光扫描仪扫描, Image studio V 软件处理。

统计学方法 使用统计学软件 Prism GraphPad 5.0 进行统计分析, 实验结果采用 ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) 表示, 通过 t 检验比较组间差异。 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

结果

1 苦参碱抑制 SMMC-7721 细胞增殖

0.5、1、2 和 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苦参碱作用 SMMC-7721 细胞 48 h 后, 能浓度依赖性抑制细胞增殖。其中 1、2 和 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖, 抑制率分别为 40.87%、67.81% 和 74.80%。10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5-FU 对 SMMC-7721 细胞抑制率为

60.93%, 与 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苦参碱作用相当。根据 Logitc 方法计算得知, 苦参碱对 SMMC-7721 细胞的半数抑制浓度为 $1.30 \pm 0.48 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 苦参碱抑制 SMMC-7721 细胞迁移

划痕实验结果显示, 与对照组相比, 0.5、1 和 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 苦参碱作用 12、24 和 36 h 均能显著性抑制 SMMC-7721 细胞迁移, 且随着作用时间的延长, 细胞迁移能力逐渐下降, 呈明显的效应-时间依赖关系 (图 1)。

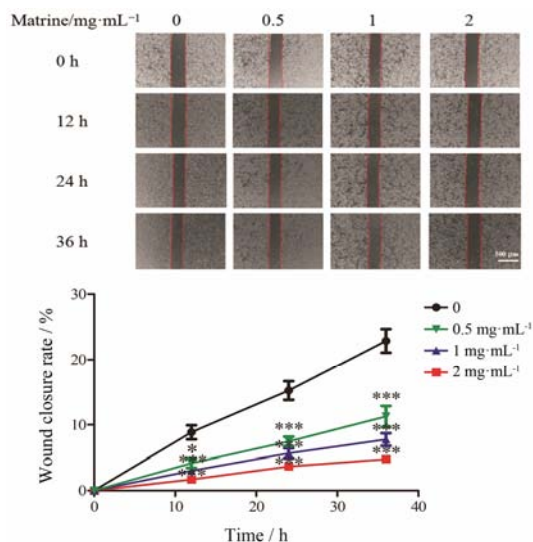


Figure 1 Wound-healing assays show representative effects of matrine on SMMC-7721 cells migration at 12, 24 and 36 h. $n = 3$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control group

3 苦参碱抗肝癌靶点网络构建

本实验室前期构建的肝癌靶点库共收集到 567 个肝癌相关基因^[6]。通过 HIT 数据库检索到 11 个苦参碱验证靶点, 和肝癌基因映射后得到 7 个, 分别是乙酰肝素酶 (HPSE)、半胱氨酸蛋白酶 3 (CASP3)、Myc 原癌基因蛋白 (MYC)、基质金属蛋白酶 2 (MMP2)、黏附分子 (CD44)、雄激素受体 (AR) 和细胞间黏附因子-1 (ICAM-1); 应用 ChemMapper 数据库获得苦参碱预测靶点, 和肝癌基因映射后得到 25 个预测靶点。应用 String 数据库收集与苦参碱 32 个靶点功能相关的蛋白, 得到蛋白-蛋白相互作用数据, 剔除重复的相互作用, 构建苦参碱抗肝癌靶点网络 (图 2)。结果显示, 与苦参碱 32 个靶点相互作用的蛋白有 264 个, 通过 1032 条边相互作用与关联。

4 苦参碱抗肝癌靶点-功能相关蛋白网络拓扑参数分析

分析蛋白质相互作用网络的拓扑特性, 不仅有助于研究未知蛋白质的生物学功能, 也为进一步研

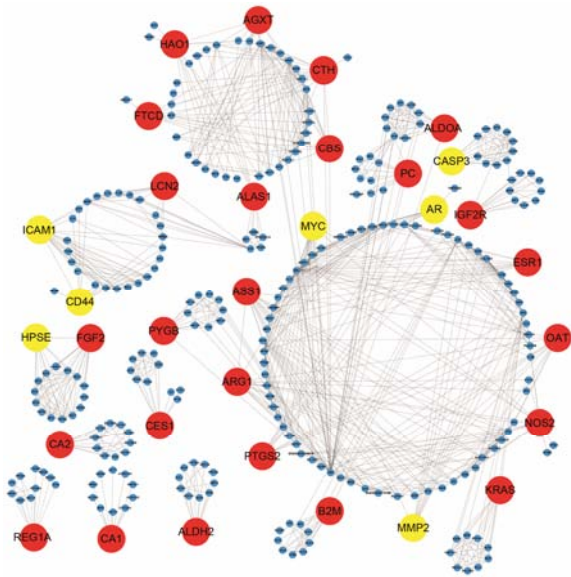


Figure 2 Targets of matrine-interacted proteins network. The red nodes represent predicted targets, and the yellow nodes represent validated targets

究蛋白质之间如何通过相互作用来完成生命活动提供理论依据^[23]。蛋白质节点最短路径长度和介数作为衡量节点中心度的方法,常用于分析网络中的关键节点^[24]。最短路径长度越小,介数值越大说明蛋白越重要。如果两个蛋白之间的最短路径长度太长,则这两个蛋白质之间有作用通路的可能性很小^[23]。应用 NetworkAnalyzer 得到 32 个靶点的最短路径长度和介数如表 1 所示,在验证靶点中,HPSE、CASP3、MYC 和 MMP2 为关键靶点;在预测靶点中,碳酸酐酶 1 (CA1)、再生基因 1A (REG1A)、羧酸酯酶 1 (CES1) 和乙醛脱氢酶 2 (ALDH2) 为关键靶点。

5 苦参碱抗肝癌靶点-功能相关蛋白网络聚类分析

蛋白相互作用网络是广泛存在的一类复杂生物网络,其网络拓扑特征与功能模块密切相关。聚类是对复杂网络进行分析和处理的一种重要计算方法^[25]。本研究基于随机的无监督聚类算法,应用 Cytoscape

Table 1 32 targets of matrine with predicted score, average shortest path length and betweenness centrality

Gene/protein	Description	Score	Average shortest path length	Betweenness centrality
CA1	Carbonic anhydrase 1	0.17	1.0	1.000
REG1A	Lithostathine 1 alpha precursor	0.02	1.0	0.704
CES1	Carboxylesterases 1	0.07	1.0	0.478
ALDH2	Acetaldehyde dehydrogenase 2	0.13	1.0	0.437
CA2	carbonic anhydrase II	0.11	1.0	0.267
FGF2	Fibroblast growth factor 2	0.13	1.1	0.386
HPSE	Heparanase	1.00	1.3	0.004
IGF2R	Insulin like growth factor II receptor	0.03	1.7	0.337
CASP3	Caspase 3	1.00	1.9	0.044
NOS2	Nitric oxide synthase 2	0.15	3.0	0.073
MYC	Myc proto-oncogene protein	1.00	3.1	0.083
CTH	Cystathionase gamma-lyase	0.00	3.1	0.049
CBS	Cystathionine beta-synthase	0.00	3.1	0.010
ARG1	Arginase 1	0.06	3.4	0.031
ASS1	Argininosuccinate synthase 1	0.02	3.4	0.059
OAT	Ornithine aminotransferase	0.00	3.4	0.010
ALDOA	Aldolase A	0.13	3.4	0.001
PYGB	Brain glycogen phosphorylase	0.00	3.5	0.008
ALAS1	Aminolevulinate delta synthase 1	0.00	3.5	0.278
MMP2	Matrix metalloproteinases 2	1.00	3.7	0.001
AGXT	Alanine glyoxylate aminotransferase	0.00	3.7	0.039
PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2 precursor	0.13	3.8	0.010
FTCD	Formimino transferase cyclodeaminase	0.00	3.8	0.010
ESR1	Estrogen receptor 1	0.02	3.8	0.002
AR	Androgen receptor	1.00	3.8	0.013
PC	Pyruvate carboxylase	0.06	4.3	0.029
B2M	Beta 2 microglobulin	0.03	4.6	0.027
KRAS	GTPase KRas	0.01	4.6	0.005
HAO1	Hydroxyacid oxidase (glycolate oxidase) 1	0.13	4.7	0.027
LCN2	Neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor	0.13	5.1	0.003
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	1.00	5.8	0.087
CD44	CD44 antigen precursor	1.00	5.9	0.015

中的 ClusterMaker 插件进行 MCL 聚类, 聚类所得的子网络如图 3 所示。结果显示, 验证靶点 AR 和预测靶点雌激素受体 1 (ESR1) 聚为一类, 验证靶点 HPSE 和预测靶点成纤维细胞生长因子 2 (FGF2) 聚为一类, 预测靶点鸟氨酸转氨酶 (OAT) 和精氨酸琥珀酸合酶 1 (ASS1) 聚为一类, 预测靶点丙氨酸乙醛酸氨基转移酶 (AGXT) 和羟乙酸氧化酶 (HAO1) 聚为一类, 预测靶点胱硫醚 β -合酶 (CBS) 和胱硫醚- γ -裂解酶 (CTH) 聚为一类。

6 苦参碱已验证靶点的通路分析

将苦参碱已验证的 7 个靶点输入 Funrich 进行通路富集, 如图 4 所示, 根据 P 值进行排序, 在前 8 条信号通路中 4 条通路均与迁移和侵袭相关, 分别是新生黏附连接的 E-钙粘蛋白信号 (E-cadherin signaling in the nascent adherens junction)、E-钙粘蛋白黏附连接的稳固和扩展 (stabilization and expansion of the E-cadherin adherens junction)、N-钙粘蛋白信号过程 (N-cadherin signaling events) 和整合素连接激酶信号 (integrin-linked kinase signaling)。4 条信号通路涉及 5 个靶点, 分别是 AR、MMP-2、MYC、ICAM1 和 CASP3。

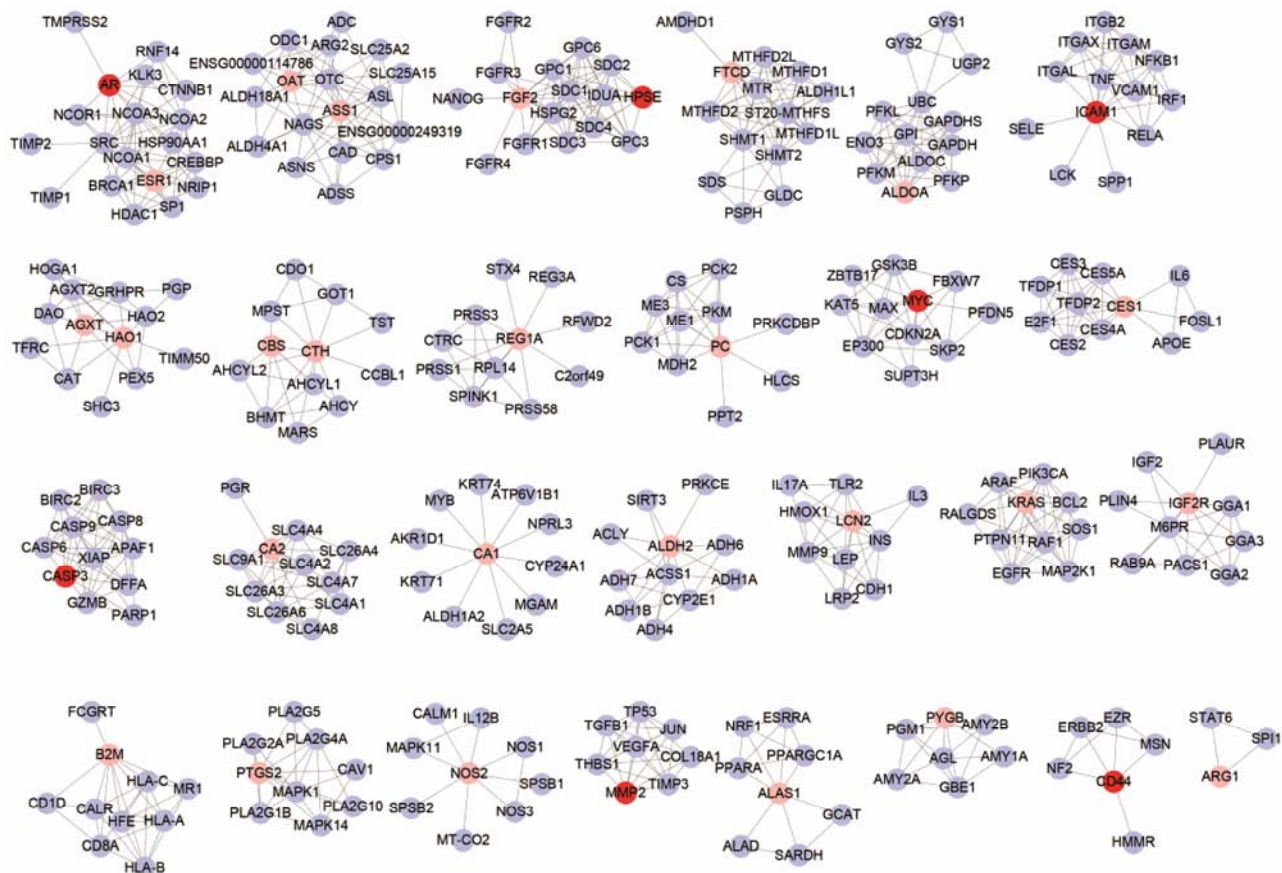


Figure 3 Clusters of interacted proteins of matrine using Markov Clustering (MCL) algorithm. The red nodes represent validated targets, and pink nodes represent predicted targets

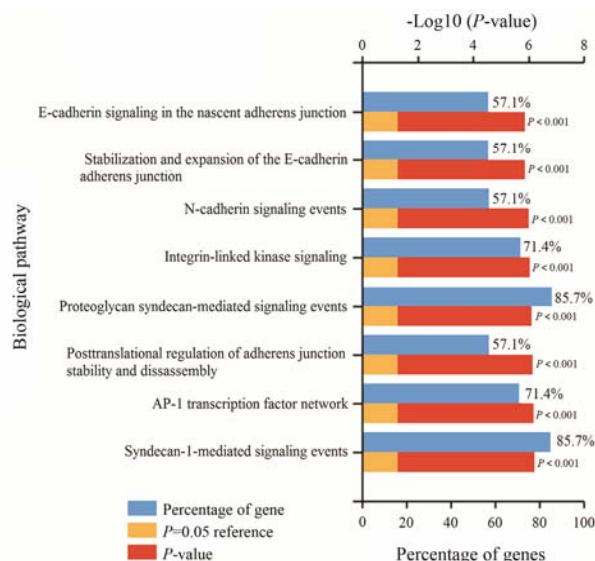


Figure 4 Pathway analysis of the validated targets of matrine

7 CASP3 和 MMP2 蛋白表达测定

根据以上研究进一步选取部分关键靶点进行 Western blot 实验验证, 如图 5 所示, 与对照组相比, 0.5、1 和 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 苦参碱能不同程度上调 CASP3 蛋白的表达, 且抑制 MMP2 蛋白的表达。

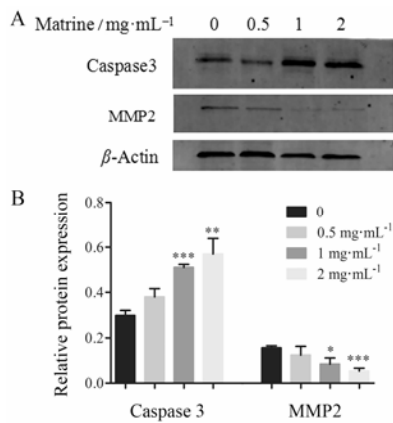


Figure 5 The protein expressions of caspase 3 and MMP2 were determined by Western blot analysis (A). Histogram analysis for the expression levels of caspase 3 and MMP2 (B). β -Actin was used as loading control. $n=4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

讨论

苦参碱是复方苦参注射液的主要成分, 近年来相关研究表明苦参碱在抑制肝癌细胞增殖、诱导细胞分化和凋亡等方面具有重要作用。Wu 等^[26]研究表明苦参碱能抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖, 且能通过下调凋亡抑制基因 livin 和 survivin 的表达, 从而诱导细胞凋亡。Zhang 等^[27]研究表明苦参碱可剂量依赖性诱导人肝癌 HepG2 细胞自噬。Wang 等^[28]研究表明苦参碱能明显抑制人肝癌 BEL-7402 细胞增殖, 且能上调 BEL-7402 细胞自噬相关蛋白表达水平。Ma 等^[29]证实了苦参碱对鼠肝癌 H22 细胞的抗肿瘤作用, 并且提出抑制细胞增殖和诱导凋亡可能是其发挥作用的机制。综上可知, 苦参碱有明确的抗肝癌作用, 然而苦参碱抗肝癌细胞侵袭与转移等方面的研究鲜见文献报道, 且苦参碱抗肝癌机制尚未进行系统、深入的研究。

在本研究中, 细胞实验结果证实苦参碱能显著性抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖, 并发现苦参碱能显著抑制 SMMC-7721 细胞迁移。在此结果基础上, 收集苦参碱抗肝癌已验证靶点和预测靶点, 综合考虑蛋白之间的相互作用与关联, 通过构建蛋白相互作用网络并进行网络分析, 预测苦参碱发挥抗肝癌作用的关键靶点。此外, 通过对苦参碱已验证的抗肝癌靶点进行通路富集, 得到其发挥抗肝癌作用相关的通路。通过构建苦参碱靶点-功能相关蛋白网络, 并进行最短路径和介数计算, 发现 HPSE、CASP3、MYC 和 MMP2 为苦参碱关键验证靶点, CA1、REG1A、CES1 和 ALDH2 为苦参碱关键预测靶点。HPSE 是

一种糖苷内切酶, 能特异性水解位于细胞表面、细胞外基质及基底膜的硫酸乙酰肝素, 促进肿瘤浸润、转移和血管生成^[30]。Chen 等^[31]研究表明 HPSE 在人肝癌细胞系 BEL-7402 和 HCCLM3 中均高表达, 表明 HPSE 不但参与肝癌细胞的侵袭转移过程, 也可能与肝癌细胞黏附有关。另外, 有些验证和预测的靶点虽然没有直接证据证明其能抑制肝癌的侵袭与转移, 但在其他癌症上也表现出了抑制侵袭与转移的作用, 为本研究结果提供了间接证据。如 Yu 等^[32]研究发现 RNA 干扰 REG1A 基因后可降低人膀胱癌 EJ 细胞侵袭能力。

近年来, 中医药防治肝癌的作用机制研究主要有防治癌前病变, 抑制肝癌细胞生长、增殖, 诱导分化凋亡, 抑制肝癌侵袭与转移, 增强细胞免疫^[33]。本研究通路富集分析结果提示, 苦参碱发挥抗肝癌作用机制可能与抑制肝癌细胞侵袭与转移相关。这与苦参碱可剂量依赖性抑制肝癌细胞迁移实验结果相一致。肿瘤转移, 是指癌细胞扩散到身体中其他器官的能力, 是一个非常复杂和多步骤的过程, 是所有与癌症相关死亡最常见的原因^[34, 35]。肿瘤侵袭和转移步骤包括黏附、降解和移动。上皮间质转化 (transformation of epithelial mesenchymal, EMT) 已被认为是引发癌症侵袭和转移的关键过程, 其中癌细胞通过上皮特异性表型 (即 E-钙粘蛋白和细胞角蛋白) 的丧失和间充质特异性标记物的获得 (即 N-钙粘蛋白和波形蛋白), 使细胞-细胞黏附分解^[36, 37]。同时, 为了降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 并增加运动性, 由侵袭性细胞分泌的蛋白水解酶的量升高, 例如 MMP2 和 MMP9^[38, 39]。

应用 Reactome 分析苦参碱发挥抑制侵袭与转移通路 5 个相关靶点的相互作用, 发现这些靶点在功能上相互关联 (图 6)。MYC 在互作中处于连接地位, AR 的表达可以调节 MYC, 同样 MYC 的表达也调节 MMP2 和 ICAM-1, 这与 MYC 是一种恶性组织维持基因是密切相关的^[40]。有研究表明 MYC 是决定细胞生长过程的开关, 在细胞由正常转向肿瘤性生长过程中起重要促进作用^[41]。Wu 等^[42]发现 MYC 蛋白过表达可促使肝癌细胞增殖, 使其具有更强的侵袭力, 与肝癌的发生、发展密切相关。而 AR 广泛参与体内多种生长发育和代谢过程, 有实验证实 AR 通过调控 β_1 -整合素-AKT 信号通路促进肝癌细胞的黏附, 抑制迁移^[43]。Carver 等^[44]利用肝细胞 AR 条件敲除鼠研究表明, AR 可促进肝癌的发生, 但抑制肝癌转

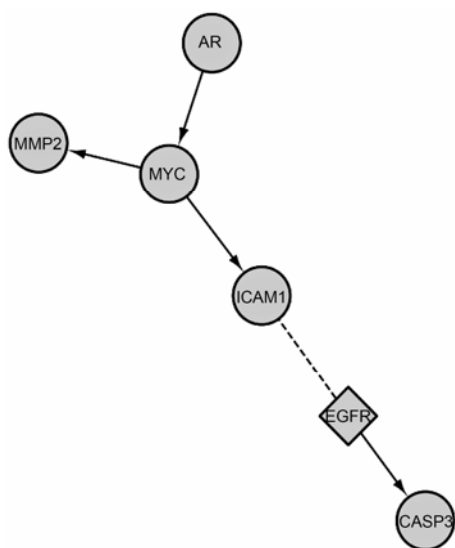


Figure 6 Functional relationships between the 5 targets of matrine. →, expression regulates; ---, predicted. The circular nodes represent validated targets, and the square nodes represent predicted targets

移。MMP2 是基质金属蛋白酶系列 MMPs 家族中的重要一员, 研究证实, MMP2 在肝癌、结肠癌、乳腺癌和肺癌等肿瘤患者中均呈现过表达, 并且 MMP2 的高表达可以明显促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[45,46]。Chen 等^[47]研究发现在原发性肝癌细胞中降低 Rock2 可引起 MMP2 表达下降, 进而抑制肝癌细胞的侵袭与转移。ICAM-1 是一种跨膜糖蛋白, 主要在细胞膜表面的粘蛋白和血管内皮表面表达, 其作用于细胞与细胞之间, 具有抑制细胞迁移的作用^[48]。从 Reactome 分析结果可以看出 ICAM-1 通过和 EGFR 相互作用, 从而间接激活凋亡相关蛋白 CASP3^[49]。而 CASP3 表达缺失可使正常的细胞凋亡途径受阻, 导致肿瘤的发生、发展以及进一步恶化^[50]。总之, 苦参碱可能通过影响这 5 个靶点及其相互作用, 从而抑制肝癌细胞侵袭与转移。

在这 5 个细胞侵袭与转移相关靶点中, MMP2、CASP3 和 MYC 为苦参碱作用的关键靶点。应用 Western blot 检测 MMP2 和 CASP3 蛋白表达水平, 发现 0.5、1 和 2 mg·mL⁻¹ 苦参碱均能不同程度调节 MMP2、CASP3 蛋白的表达。本研究利用网络药理学的方法预测了苦参碱发挥抗肝癌作用可能的作用靶点及通路, 并选取关键靶点进行了蛋白水平的实验验证; 将细胞实验与网络药理学相结合, 从系统角度初步揭示了苦参碱治疗肝癌的作用机制, 为苦参碱抗肝癌机制的阐明奠定基础, 同时也为其他网络药理学工作的开展提供借鉴。

References

- [1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66: 7–30.
- [2] Ashtari S, Pourhoseingholi MA, Sharifian A, et al. Hepatocellular carcinoma in Asia: prevention strategy and planning [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7: 1708–1717.
- [3] Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Parkin DM, et al. Global burden of cancer in 2008: asystematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions [J]. *Lancet*, 2012, 380: 1840–1850.
- [4] Simard EP, Ward EM, Siegel R, et al. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62: 118–128.
- [5] Yong KL, Kim SU, Kim DY, et al. Prognostic value of α -fetoprotein and des- γ -carboxy prothrombin responses in patients with hepatocellular carcinoma treated with transarterial chemoembolization [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 5.
- [6] Gao L, Wang XD, Niu YY, et al. Molecular targets of Chinese herbs: a clinical study of hepatoma based on network pharmacology [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 24944.
- [7] Gao L, Hao J, Niu YY, et al. Network pharmacology dissection of multiscale mechanisms of herbal medicines in stage IV gastric adenocarcinoma treatment [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95: e4389.
- [8] Lee YM, Chen TL, Shih YRV, et al. Adjunctive traditional Chinese medicine therapy improves survival in patients with advanced breast cancer: a population-based study [J]. *Cancer*, 2014, 120: 1338–1344.
- [9] Sun M, Cao H, Sun L, et al. Antitumor activities of kushen: literature review [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 373219.
- [10] Wang W, You RL, Qin WJ, et al. Anti-tumor activities of active ingredients in Compound Kushen Injection [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36: 676–679.
- [11] Levinson AD. Cancer therapy reform [J]. *Science*, 2010, 328: 137.
- [12] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11: 110–120.
- [13] Guo M, Ding GB, Yang P, et al. Migration suppression of small cell lung cancer by polysaccharides from *Nostoc commune* Vaucher [J]. *J Agr Food Chem*, 2016, 64: 6277–6285.
- [14] Su WH, Chao CC, Yeh SH, et al. OncoDB.HCC: an integrated oncogenomic database of hepatocellular carcinoma revealed aberrant cancer target genes and loci [J]. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: D727–D731.
- [15] Lee L, Wang K, Li G, et al. Liverome: a curated database of

- liver cancer-related gene signatures with self-contained context information [J]. *BMC Genomics*, 2011, 12 Suppl 3: S3.
- [16] Ye H, Ye L, Kang H, et al. HIT: linking herbal active ingredients to targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: D1055–D1059.
- [17] Gong J, Cai C, Liu X, et al. ChemMapper: a versatile web server for exploring pharmacology and chemical structure association based on molecular 3D similarity method [J]. *Bioinformatics*, 2013, 29: 1827–1829.
- [18] Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, et al. STRING 8-a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: D412–D416.
- [19] Lopes CT, Franz M, Kazi F, et al. Cytoscape web: an interactive web-based network browser [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26: 2347–2348.
- [20] Mei CL, Jiang H, Jenness J. Markov Clustering (MCL) based thread grouping and thread selection [C] // Southeastcon'09. Atlanta: IEEE, 2009: 404–409.
- [21] de Jong H, Geiselmann J, Hernandez C, et al. Genetic network analyzer: qualitative simulation of genetic regulatory networks [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 336–344.
- [22] Pathan M, Keerthikumar S, Ang CS, et al. FunRich: an open access standalone functional enrichment and interaction network analysis tool [J]. *Proteomics*, 2015, 15: 2597–2601.
- [23] Estrada E. Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast [J]. *Proteomics*, 2006, 6: 35–40.
- [24] Anitha P, Anbarasu A, Ramaiah S. Gene network analysis reveals the association of important functional partners involved in antibiotic resistance: a report on an important pathogenic bacterium *Staphylococcus aureus* [J]. *Gene*, 2016, 575: 253–263.
- [25] Dongen SMV. Graph Clustering by Flow Simulation [D]. Utrecht: University of Utrecht, 2000.
- [26] Wu H. Effects and Molecular Mechanisms of Matrine on Human Hepatocarcinoma SMMC-7721 Cells (苦参碱对人肝癌细胞 SMMC-7721 的影响及分子机制) [D]. Zhejiang University, 2009.
- [27] Zhang JQ, Li YM, Liu T, et al. Antitumor effect of matrine in human hepatoma G2 cells by inducing apoptosis and autophagy [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16: 4281–4290.
- [28] Wang XF. Effects of Matrine on The Expression of Genes Related to Hepatocellular Carcinoma BEL-7402 Cell Apoptosis and Autophagy (苦参碱对肝癌细胞 BEL-7402 凋亡和自噬相关基因表达的影响) [D]. Shanxi Medical University, 2014.
- [29] Ma L, Wen S, Zhan Y, et al. Anticancer effects of the Chinese medicine matrine on murine hepatocellular carcinoma cells [J]. *Planta Med*, 2008, 74: 245–251.
- [30] Zhang W, Chan H, Wei L, et al. Overexpression of heparanase in ovarian cancer and its clinical significance [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30: 2279–2287.
- [31] Chen XP, Luo JS, Tian Y, et al. Effect of heparanase on the adhesion and invasion ability of hepatoma carcinoma cells [J]. *Chin J Clin Oncol (中国肿瘤临床)*, 2014, 41: 1180–1184.
- [32] Yu Z, Geng J, Zheng JH, et al. RNA interference targeting regenerating islet-derived 1 alpha gene inhibits cell proliferation and decreases invasion of human bladder cancer cell line EJ *in vitro* [J]. *Chin J Exp Surg (中华实验外科杂志)*, 2012, 29: 1013–1016.
- [33] Jiang Z, Hua HQ. Progress on prevention and treatment of Chinese medicine to molecular mechanism of liver cancer [J]. *China J Chin Mater Med (中国中药杂志)*, 2009, 34: 1310–1313.
- [34] Spano D, Heck C, De Antonellis P, et al. Molecular networks that regulate cancer metastasis [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22: 234–249.
- [35] Hanibuchi M, Kim SJ, Fidler IJ, et al. The molecular biology of lung cancer brain metastasis: an overview of current comprehensions and future perspectives [J]. *J Med Invest*, 2014, 61: 241–253.
- [36] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15: 178–196.
- [37] Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells [J]. *Semin Cancer Biol*, 2012, 22: 194–207.
- [38] Chaki SP, Barhoumi R, Berginski ME, et al. Nck enables directional cell migration through the coordination of polarized membrane protrusion with adhesion dynamics [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126: 1637–1649.
- [39] Stroka KM, Jiang H, Chen SH, et al. Water permeation drives tumor cell migration in confined microenvironments [J]. *Cell*, 2014, 157: 611–623.
- [40] Ciribilli Y, Singh P, Spanel R, et al. Decoding c-Myc networks of cell cycle and apoptosis regulated genes in a transgenic mouse model of papillary lung adenocarcinomas [J]. *Oncotarget*, 2015, 6: 31569–31592.
- [41] Vora HH, Shah NG, Trivedi TI, et al. Expression of C-Myc mRNA in squamous cell carcinoma of the tongue [J]. *J Surg Oncol*, 2007, 95: 70–78.
- [42] Wu FX, Cao J, Zhao YN, et al. Expression of b-myb and

- c-myc in hepatocellular carcinoma and its clinical significance [J]. *Chin J Clin Oncol* (中国肿瘤临床), 2008, 35: 269–271.
- [43] Ma WL, Jeng LB, Lai HC, et al. Androgen receptor enhances cell adhesion and decreases cell migration *via* modulating β 1-integrin-AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2014, 351: 64–71.
- [44] Carver BS. Strategies for targeting the androgen receptor axis in prostate cancer [J]. *Drug Discov Today*, 2014, 19: 1493–1497.
- [45] Han T, Kang D, Ji D, et al. How does cancer cell metabolism affect tumor migration and invasion? [J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7: 395–403.
- [46] Rotte A, Martinka M, Li G. MMP2 expression is a prognostic marker for primary melanoma patients [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2012, 35: 207–216.
- [47] Chen LF, Liu TD, Du XH, et al. Effects of rock2 regulating MMP2 on invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res Prev Treat* (肿瘤防治研究), 2014, 41: 35–39.
- [48] Yang J, Gu Y, Huang X, et al. Dynamic changes of ICAM-1 expression in peripheral nervous system following sciatic nerve injury [J]. *Neurol Res*, 2011, 33: 75–83.
- [49] Cheng Q, Cao X, Yuan F, et al. Knockdown of WWP1 inhibits growth and induces apoptosis in hepatoma carcinoma cells through the activation of caspase3 and p53 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 448: 248–254.
- [50] Zhang YX. Expression of Livin and its relationship with caspase-3 in hepatocellular carcinoma (Livin 与 caspase-3 在原发性肝癌中的表达及意义) [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2010.