

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2020.11.1236

· 论 著 ·

基于网络药理学的清胰化积方治疗胰腺癌的作用机制研究

解 婧, 程健珊, 朱晓燕, 刘鲁明, 宋利斌, 孟志强*

复旦大学附属肿瘤医院中西医结合科, 上海 200032

【摘要】 目的 通过网络药理学研究预测清胰化积方主要成分作用的靶点, 探讨其治疗胰腺癌的作用机制。**方法** 采用中药分子机制的生物信息学分析工具 (BATMAN-TCM) 数据库查找清胰化积方中的主要有效单体及其靶基因。建立裸小鼠胰腺癌移植瘤模型, 并分为清胰化积方治疗组与对照组, 对裸小鼠肿瘤组织进行基因测序, 筛选胰腺癌差异表达基因。经 Venn 分析筛选靶基因并对靶基因进行京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析, 构建清胰化积方功能成分治疗胰腺癌的调控机制网络图。输入 STRING 数据库获得蛋白质-蛋白质互作网络图, 利用基因表达谱数据动态分析 (GEPIA) 评估关键基因与胰腺癌预后的关系。**结果** 共获得清胰化积方潜在的 149 个有效成分, 预测成分作用靶标共 963 个。对清胰化积方治疗组与对照组裸小鼠胰腺癌肿瘤组织进行基因测序, 得到 6 039 个差异表达基因。经 Venn 分析, 筛选出 248 个共靶标靶基因。KEGG 通路富集分析发现清胰化积方治疗胰腺癌的作用机制可能与 MAPK、FoxO、cAMP、cGMP-PKG 等信号通路有关。与对照组相比, 清胰化积方治疗组裸小鼠 MAP2K1 (MEK1)、MAPK3 (ERK)、MAP2K3 (MKK3) 和 MAPK13 (p38) 表达水平下降。GEPIA 结果显示, MAP2K1 (MEK1)、MAPK3 (ERK)、MAP2K3 (MKK3) 和 MAPK13 (p38) 高表达时胰腺癌预后差。**结论** 清胰化积方治疗胰腺癌的作用机制与 MAPK 信号通路有关, MAP2K1 (MEK1)、MAPK3 (ERK)、MAP2K3 (MKK3) 和 MAPK13 (p38) 可作为清胰化积方治疗胰腺癌的潜在预后因子。

【关键词】 网络药理学; 胰腺肿瘤; 清胰化积方; MAPK 信号通路**【中图分类号】** R 735.9**【文献标志码】** A**【文章编号】** 0258-879X(2020)11-1236-10

Network pharmacology-based mechanism study of *Qingyi Huaji* recipe in treating pancreatic cancer

XIE Jing, CHENG Jian-shan, ZHU Xiao-yan, LIU Lu-ming, SONG Li-bin, MENG Zhi-qiang*

Department of Integrated Chinese and Western Medicine, Fudan University Shanghai Cancer Center, Shanghai 200032, China

【Abstract】 Objective To predict the target of the main components of *Qingyi Huaji* recipe (*QYHJ*) through network pharmacology investigations, and to explore its mechanism in treating pancreatic cancer. **Methods** The Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM) database was used to identify the major effective components of *QYHJ* and their target genes. The xenograft model of pancreatic cancer was established in nude mice, and they were divided into *QYHJ*-treated group and control group. The tumor tissues of nude mice were sequenced to screen the differentially expressed genes. The target genes were screened by Venn analysis, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses were performed to identify the related pathways; then the regulatory mechanism network of *QYHJ* in treating pancreatic cancer was constructed. The protein-protein interaction network was obtained from the STRING database, and Gene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA) was used to evaluate the relationship between the key genes and the prognosis of pancreatic cancer. **Results** A total of 149 potential active components and 963 predicted targets were obtained. Gene sequencing of pancreatic cancer tissues of nude mice (*QYHJ*-treated group vs control group) showed 6 039 differentially expressed genes. Venn analysis showed 248 potential targets and KEGG pathway enrichment analyses found that the mechanism of *QYHJ* in treating pancreatic cancer might involve mitogen-activated protein kinase (MAPK), forkhead box O (FoxO), cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase or protein kinase G (cGMP-PKG) and other signaling pathways. Compared with

【收稿日期】 2019-09-30**【接受日期】** 2020-03-24**【基金项目】** 国家自然科学基金 (81403248), 2019 年度希思科-丽珠中医药肿瘤研究基金 (Y-L2019-06)。Supported by National Natural Science Foundation of China (81403248) and 2019 CSCO-Livzon Traditional Chinese Medicine Cancer Research Fund (Y-L2019-06)。**【作者简介】** 解 婧, 博士, 副主任医师。E-mail: isable624@163.com

*通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-64175590, E-mail: meng@shca.org.cn

the control group, the *QYHJ*-treated group showed suppressed MAP2K1 (MEK1), MAPK3 (ERK), MAP2K3 (MKK3), and MAPK13 (p38) expressions. GEPIA results showed that the high expression levels of MAP2K1 (MEK1), MAPK3 (ERK), MAP2K3 (MKK3) and MAPK13 (p38) were related to the poor prognosis of pancreatic cancer patients. **Conclusion** The mechanism of *QYHJ* in treating pancreatic cancer may be related to MAPK signaling pathways. MAP2K1 (MEK1), MAPK3 (ERK), MAP2K3 (MKK3) and MAPK13 (p38) may be potential prognostic factors of *QYHJ* for treating pancreatic cancer.

[Key words] network pharmacology; pancreatic neoplasms; *Qingyi Huaji* recipe; MAPK signaling pathway

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(11): 1236-1245]

胰腺癌是具有高致死率的恶性肿瘤, 5 年生存率不到 5%^[1]。胰腺癌是全球主要的致死性癌症之一^[2], 其侵袭性表型、治疗耐受和缺乏早期诊断方法导致其预后不良。手术切除是目前胰腺癌早期治疗的首选方法, 但超过 80% 的患者被诊断为晚期且无法手术。对于存在远处转移疾病的患者, 尽管已努力探寻新的治疗策略, 但近年来总体生存率并未显著提高^[3]。中草药具有安全、有效及低成本等优势, 受到研究者越来越多的关注, 如何运用中医药疗法提高胰腺癌患者的生存率是现阶段关注的重点。以清胰化积方为主的中西医综合疗法在治疗晚期胰腺癌的生存方面取得了很好的效果。沈晔华等^[4]研究发现清胰化积方可明显提高晚期胰腺癌患者 1 年、3 年和 5 年的生存率, 并延长患者中位生存期。清胰化积方以清热解毒、理气化湿为原则, 在中晚期胰腺癌的治疗中可稳定瘤灶、延长生存期, 其机制主要表现在下调免疫抑制因子、改善免疫抑制状态、抑制肿瘤相关成纤维细胞、改善肿瘤微环境、下调转移相关基因、降低 S 期细胞比例进而抑制肿瘤细胞增殖、调节 Notch 信号通路抑制蛋白表达等^[5]。

目前多向药理学、计算生物学等多学科都已步入大数据时代, 网络药理学作为一种研究药物、疾病、靶点之间相互关系的网络分析方法, 从网络构建的角度分析、预测和证实药物成分的物质基础, 有利于理解药物作用网络的作用机制^[6-8]。本研究运用网络药理学的分析方法, 获取清胰化积方主要成分对治疗胰腺癌的作用靶点, 建立基因调控网络, 分析其治疗胰腺癌的作用机制并通过动物实验加以验证。

1 材料和方法

1.1 实验细胞、动物与主要试剂 人胰腺癌 SW1990 细胞系购于中国科学院上海细胞所。SPF

级的 BALB/c 裸小鼠由上海斯莱克实验动物有限公司提供[动物生产许可证编号: SCXK(沪)2012-0002; 动物合格证编号: 2015000520204], 5~8 周龄, 体质量 18~20 g, 饲养于上海中医药大学重点动物实验室。动物自由摄取常规饲料(由上海中医药大学动物研究中心供应)。清胰化积方由药蛇六谷、白花蛇舌草、半枝莲、灵芝、薏苡仁、豆蔻和绞股蓝组成, 实验用清胰化积方采用中药免煎颗粒剂(江阴天江药业有限公司生产, 批号: 05112006), 加水配制成含生药 0.9、1.8、3.6 g/mL 的药液, 置 4℃ 冰箱备用。胰蛋白酶、FBS、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司, 青霉素-链霉素溶液、PBS 购自上海索莱宝生物科技有限公司, Qiagen 7410 购自德国凯杰公司, Prime Script™ RT reagent Kit 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 裸小鼠移植瘤模型的建立及处理

1.2.1 裸小鼠移植瘤模型的建立 人胰腺癌 SW1990 细胞用含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素、1% 羟乙基哌嗪乙磺酸(hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid, HEPES)的 DMEM 培养液培养, 使用 0.25% 的胰蛋白酶进行消化, 按 1:3 的比例传代。取处于对数生长期的 SW1990 细胞制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$, 在无菌条件下用 1 mL 注射器将细胞接种于裸小鼠右前肢腋下皮下, 每只裸小鼠接种量为 0.2 mL。

1.2.2 分组和给药 造模次日将裸小鼠随机分成 4 组, 即生理盐水对照组和清胰化积方低、中、高剂量组, 每组 8 只。按《中药药理实验方法学》^[9]附录 3 《人和动物间接体表面积折算的等效剂量比率表》计算, 低、中、高剂量组中小鼠清胰化积方用量分别为 18、36、72 g/kg, 予以浓缩含生药分别为 0.9、1.8、3.6 g/mL 的药液每日灌胃给药 0.2 mL, 对照组小鼠予生理盐水每日灌胃 0.2 mL。隔日测量移植瘤

大小。给药 10 d 后处死小鼠,取出移植瘤,观察后备用。

1.2.3 基因检测和分析 提取样品总 RNA 并使用 DNase 消化 DNA 后,使用 Illumina HiSeq X Ten (美国 Illumina 公司)平台进行测序,产生 150 bp 的双端数据。将测序所产生的 raw reads 进行质量过滤后产生 clean reads 数据,使用 DESeq (2012) R package^[10] 的 estimateSizeFactors 函数对数据进行标准化后,再使用 nbinomTest 函数计算差异表达基因的 *P* 值和差异倍数 (fold change, FC),并绘制火山图及热图。

1.3 网络药理学分析

1.3.1 清胰化积方有效成分收集与筛选 使用 BATMAN-TCM (Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine, <http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>) 数据库,以各类清胰化积方有效成分为关键词,设置“药物-靶点”相似性模型阈值 Score cutoff ≥ 30 、 $P \leq 0.05$,检索筛选活性成分及对应的潜在靶点。运用 Cytoscape 软件构建各类药物成分及其对应靶点网络关系图。

1.3.2 清胰化积方靶基因信号通路分析 根据收集到的活性成分相对应靶基因及胰腺癌相关靶基因,运用 Venn 平台 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 构建韦恩图 (Venn diagram) 并进行对比分析及重合匹配。利用 STRING (<https://string-db.org>) 数据库平台,获取蛋白相互作用关系并构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图,用 Cytoscape 绘制作图。通过 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 信号通路分析功能,预测清胰化积方靶基因富集的信号通路。

1.3.3 腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 通路基因表达水平与预后的关系分析 通过基因表达谱数据动态分析 (Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA; <http://gepia.cancer-pku.cn/index.html>) 平台^[11],对比分析胰腺癌组织和癌旁组织 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路关键基因的转录水平,分析该通路基因与胰腺癌预后的关系。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计

学分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多组间差异的比较,对于有统计学意义的数据采用 Dunnett 法进行两两比较。检验水准 (α) 为 0.05。采用 R 4.0 软件制作主成分分析 (principal component analysis, PCA) 图、MA 图 (M versus A plot) 和聚类热图。

2 结果

2.1 清胰化积方活性成分有效作用靶点筛选 使用 BATMAN-TCM 数据库输入清胰化积方中的 7 种药材,共得到有效成分 149 个,对应的靶基因 963 个。其中白花蛇舌草共 7 个有效成分,对应 234 个靶基因;半枝莲共 12 个有效成分,对应 55 个靶基因;薏苡仁共 3 个有效成分,对应 78 个靶基因;灵芝共 34 个有效成分,对应 539 个靶基因;绞股蓝共 83 个有效成分,对应 117 个靶基因;豆蔻共 10 个有效成分,对应 468 个靶基因。动物实验基因测序结果表明,清胰化积方高剂量组裸小鼠移植瘤组织中共发现 6 039 个与生理盐水对照组的差异表达基因 ($P < 0.05$, $|FC| > 1.2$)。将清胰化积方高剂量组与生理盐水对照组的组间差异表达基因,以及网络药理学分析得到的清胰化积方潜在作用靶点基因与胰腺癌重叠基因进行 Venn 分析,得到 248 个共靶标靶基因。

2.2 清胰化积方靶基因 KEGG 通路分析 将 248 个靶基因输入 DAVID 数据库进行 KEGG 通路分析,结果显示 248 个靶基因主要富集于信号转导、氨基酸代谢和碳水化合物代谢等通路。信号转导通路主要包括 MAPK、AMPK、叉头框转录因子 O 亚型 (forkhead box O, FoxO)、cAMP、环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP)-蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG)、钙、缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)、erb-b2 受体酪氨酸激酶 (erb-b2 receptor tyrosine kinase, ErbB)、TNF、磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 通路 (图 1)。

2.3 清胰化积方低剂量组和高剂量组差异表达基因分析

2.3.1 各组裸小鼠肿瘤生长曲线 裸小鼠皮下种植造模 1 d 后,随机分为对照组及清胰化积方低、中、高剂量组,每组 8 只。随着时间延长,肿瘤逐

渐增大, 与对照组相比, 清胰化积方低、中、高剂量组裸小鼠肿瘤生长明显受到抑制且呈剂量依赖性, 治疗 10 d 时各剂量组肿瘤相对增长率均低于对照组 (P 均 <0.01 , 图 2)。

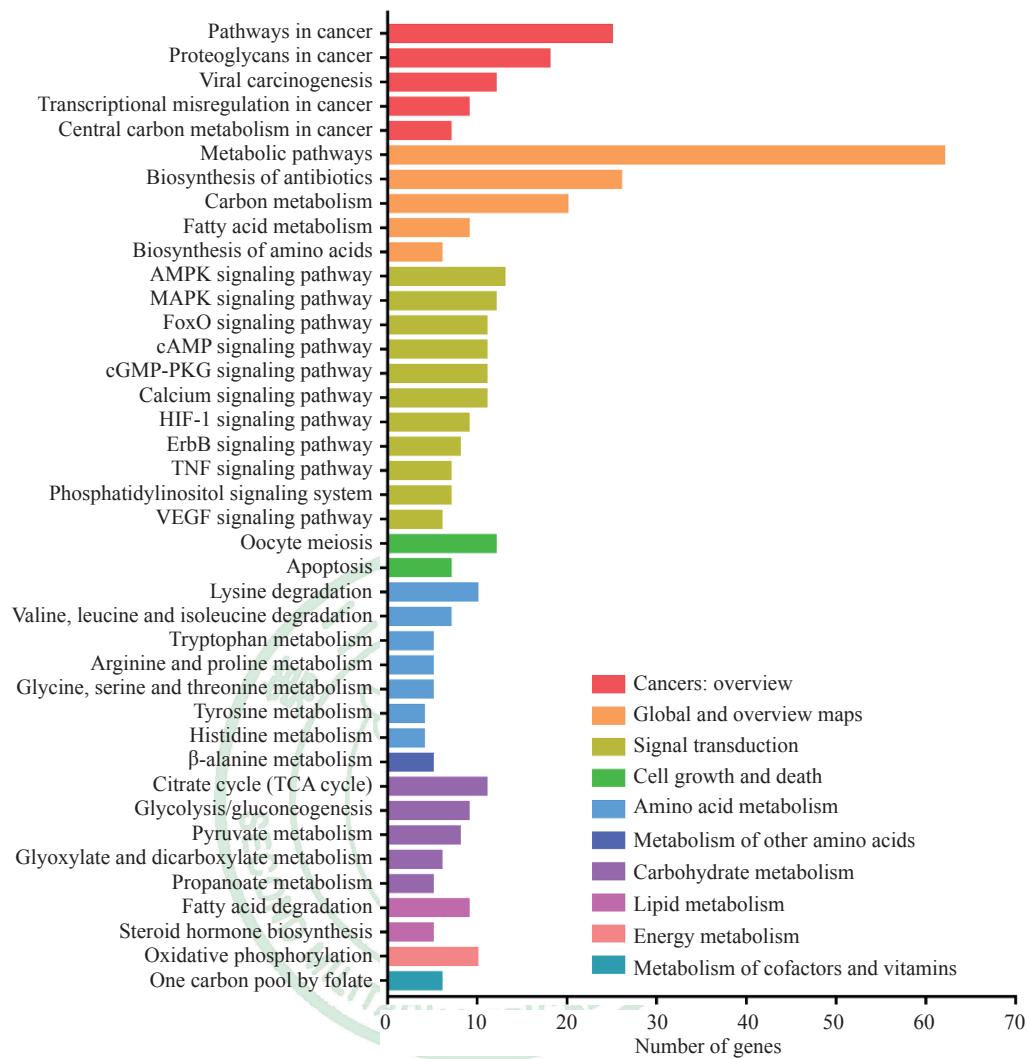


图 1 清胰化积方靶基因 KEGG 通路分析

Fig 1 KEGG pathway analysis of target genes of Qingyi Huaji recipe

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; FoxO: Forkhead box O; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; cGMP: Cyclic guanosine monophosphate; PKG: Protein kinase G; HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1; ErbB: Erb-b2 receptor tyrosine kinase; TNF: Tumor necrosis factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor; TCA: Tricarboxylic acid

2.3.2 清胰化积方低剂量组和高剂量组差异表达基因筛选 设定差异表达基因筛选条件: $P<0.05$, $|\log_2FC|>0.26$ 。结果显示, 与对照组相比, 清胰化积方低剂量组的差异表达基因共 2 376 个, 其中上调 1 655 个, 下调 721 个; 清胰化积方高剂量组的差异表达基因共 6 039 个, 其中上调 1 442 个, 下调 1 592 个。Venn 分析结果表明, 清胰化积方低剂量组与高剂量组的重叠基因共 1 894 个。采用 R 语言绘制 PCA 图对清胰化积方对照组、低剂量组和

高剂量组进行分析, 发现低剂量组和高剂量组主成分性质类似。通过 R 语言对低剂量组和高剂量组得到的差异表达基因进行 MA 分析, 并采用聚类热图对差异表达基因进行可视化分析, 展现差异表达基因的表达分布, 结果见图 3。

2.3.3 清胰化积方低剂量组和高剂量组差异表达基因富集分析 对清胰化积方低剂量组和高剂量组的差异表达基因进行 KEGG 分析, 其中清胰化积方低剂量组中的差异表达基因主要富集于 MAPK、

PI3K-Akt、FoxO、Rap1、AMPK 等信号通路, 胰腺化积方高剂量组中的差异表达基因主要富集于

MAPK、PI3K-Akt、Rap1、Ras 和 mTOR 等信号通路。两组共同的差异表达基因信号通路见表 1。

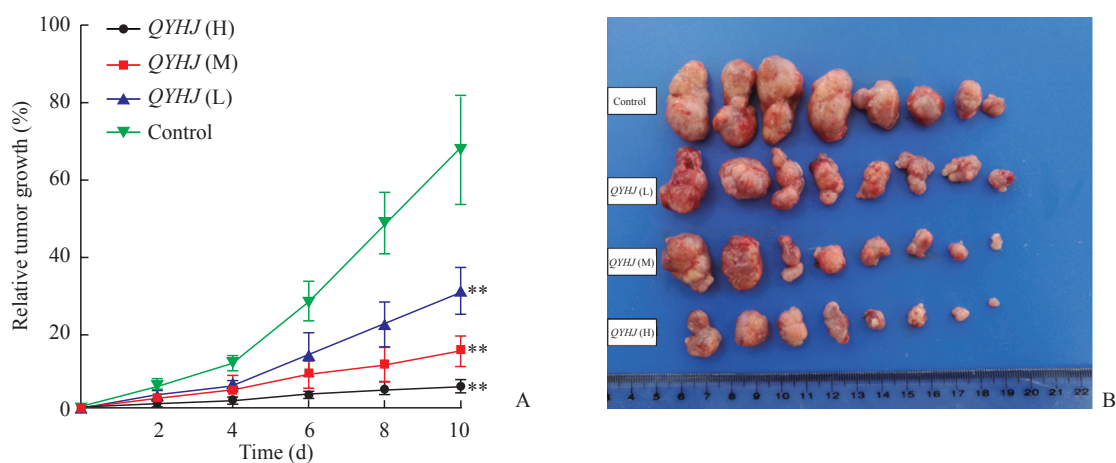


图 2 清胰化积方对小鼠移植瘤生长的影响

Fig 2 Effects of *QYHJ* on growth of xenograft tumor in mice

A: Tumor growth rate. Day 0: The day of tumor injection. Day 10: The last day of intervention. B: Tumor specimens dissected after 10 days of intervention on Day 11. *QYHJ*: *Qingyi Huaji* recipe; H: High-dose; M: Medium-dose; L: Low-dose. ** $P < 0.01$ vs control group. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

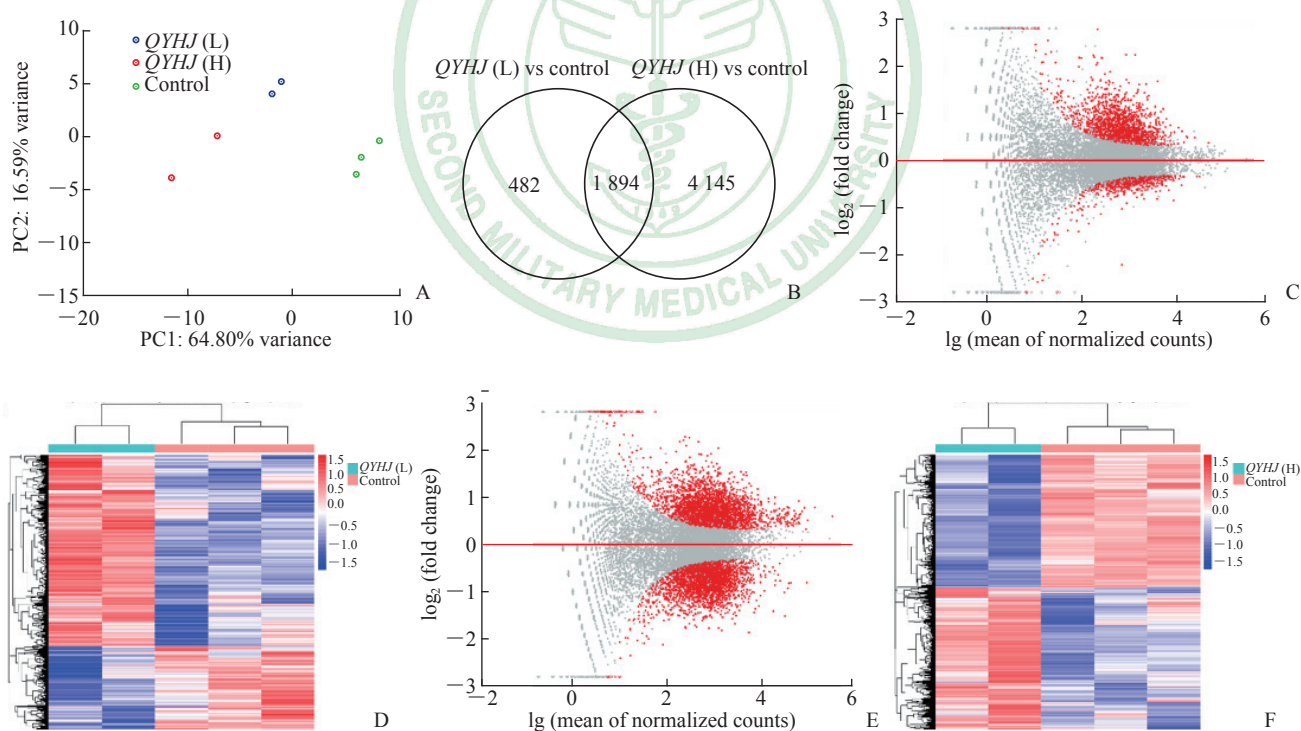


图 3 清胰化积方低剂量组和高剂量组差异表达基因的筛选

Fig 3 Screening differentially expressed genes of *QYHJ* (L) and *QYHJ* (H) groups

A: PCA chart of the control group, *QYHJ* (L) group and *QYHJ* (H) group; B: Venn diagram of differentially expressed genes between *QYHJ* (L) group and *QYHJ* (H) group; C: MA chart of *QYHJ* (L) group; D: Heat map of *QYHJ* (L) group; E: MA chart of *QYHJ* (H) group; F: Heat map of *QYHJ* (H) group. *QYHJ*: *Qingyi Huaji* recipe; H: High-dose; L: Low-dose; PCA: Principal component analysis; PC: Principal component; MA: M-versus-A plot

表 1 清胰化积方低剂量组和高剂量组共同的差异表达基因信号通路

Tab 1 Signaling pathways of common differentially expressed genes in QYHJ (L) and QYHJ (H) groups			
ID	Term	ListHits (QYHJ[L] vs control)	ListHits (QYHJ[H] vs control)
hsa04152	AMPK signaling pathway	27	57
hsa04371	Apelin signaling pathway	21	51
hsa04020	Calcium signaling pathway	13	41
hsa04024	cAMP signaling pathway	27	52
hsa04022	cGMP-PKG signaling pathway	23	49
hsa04012	ErbB signaling pathway	13	35
hsa04068	FoxO signaling pathway	30	56
hsa04340	Hedgehog signaling pathway	2	15
hsa04066	HIF-1 signaling pathway	17	39
hsa04390	Hippo signaling pathway	23	54
hsa04392	Hippo signaling pathway-multiple species	7	10
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	16	37
hsa04010	MAPK signaling pathway	49	106
hsa04150	mTOR signaling pathway	25	62
hsa04064	NF-κB signaling pathway	16	36
hsa04330	Notch signaling pathway	12	24
hsa04070	Phosphatidylinositol signaling system	19	51
hsa04072	Phospholipase D signaling pathway	14	48
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	40	99
hsa04015	Rap1 signaling pathway	29	71
hsa04014	Ras signaling pathway	25	65
hsa04071	Sphingolipid signaling pathway	23	59
hsa04350	TGF-β signaling pathway	14	30
hsa04668	TNF signaling pathway	21	45
hsa04370	VEGF signaling pathway	11	32
hsa04310	Wnt signaling pathway	17	50

QYHJ: Qingyi Huaji recipe; L: Low-dose; H: High-dose; AMPK: Adenosine monophosphate-activated protein kinase; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; cGMP: Cyclic guanosine monophosphate; PKG: Protein kinase G; ErbB: Erb-b2 receptor tyrosine kinase; FoxO: Forkhead box O; HIF-1: Hypoxia-inducible factor 1; Jak: Janus kinase; STAT: Signal transducer and activator of transcription; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; mTOR: Mammalian target of rapamycin; NF-κB: Nuclear factor κB; PI3K: Phosphoinositide 3 kinase; Akt: Protein kinase B; TGF-β: Transforming growth factor β; TNF: Tumor necrosis factor; VEGF: Vascular endothelial growth factor

2.3.4 MAPK 信号通路中差异表达基因的 PPI 分析 清胰化积方低剂量组富集到 MAPK 通路的差异表达基因有 49 个, 清胰化积方高剂量组富集到 MAPK 通路的差异表达基因有 106 个, 输入 STRING 数据库获得其 PPI 网络模式图 (图 4)。

2.3.5 MAPK 信号通路中关键基因的筛选和验证 清胰化积方高剂量组中有 15 个关键基因 (Degree>40), 分别为 *AKT1*、*CDC42*、*HRAS*、*KRAS*、*MAP2K1*、*MAP2K3*、*MAP3K1*、*MAPK11*、*MAPK12*、*MAPK13*、*MAPK3*、*MAPK8*、*MYC*、*NRAS* 和 *TP53*, 其中有 7 个基因 (*AKT1*、*KRAS*、

MAP3K1、*MAPK12*、*MAPK8*、*MYC* 和 *NRAS*) 与 Venn 分析重叠基因一致。利用 GEPIA 对上述关键基因进行验证, 结果表明 ERK1/2 通路中的关键基因 MAP2K1 (MEK1) 和 MAPK3 (ERK) 在胰腺癌中呈高表达, p38 MAPK 信号通路中的关键基因 MAP2K3 (MKK3) 和 MAPK13 (p38) 在胰腺癌中也呈高表达趋势 (图 5)。生存分析结果显示, 胰腺癌中 MAP2K1 (MEK1)、MAPK3 (ERK)、MAP2K3 (MKK3) 和 MAPK13 (p38) 高表达时患者存在预后较差的趋势, 故它们可作为清胰化积方治疗胰腺癌的潜在预后因子 (图 6)。

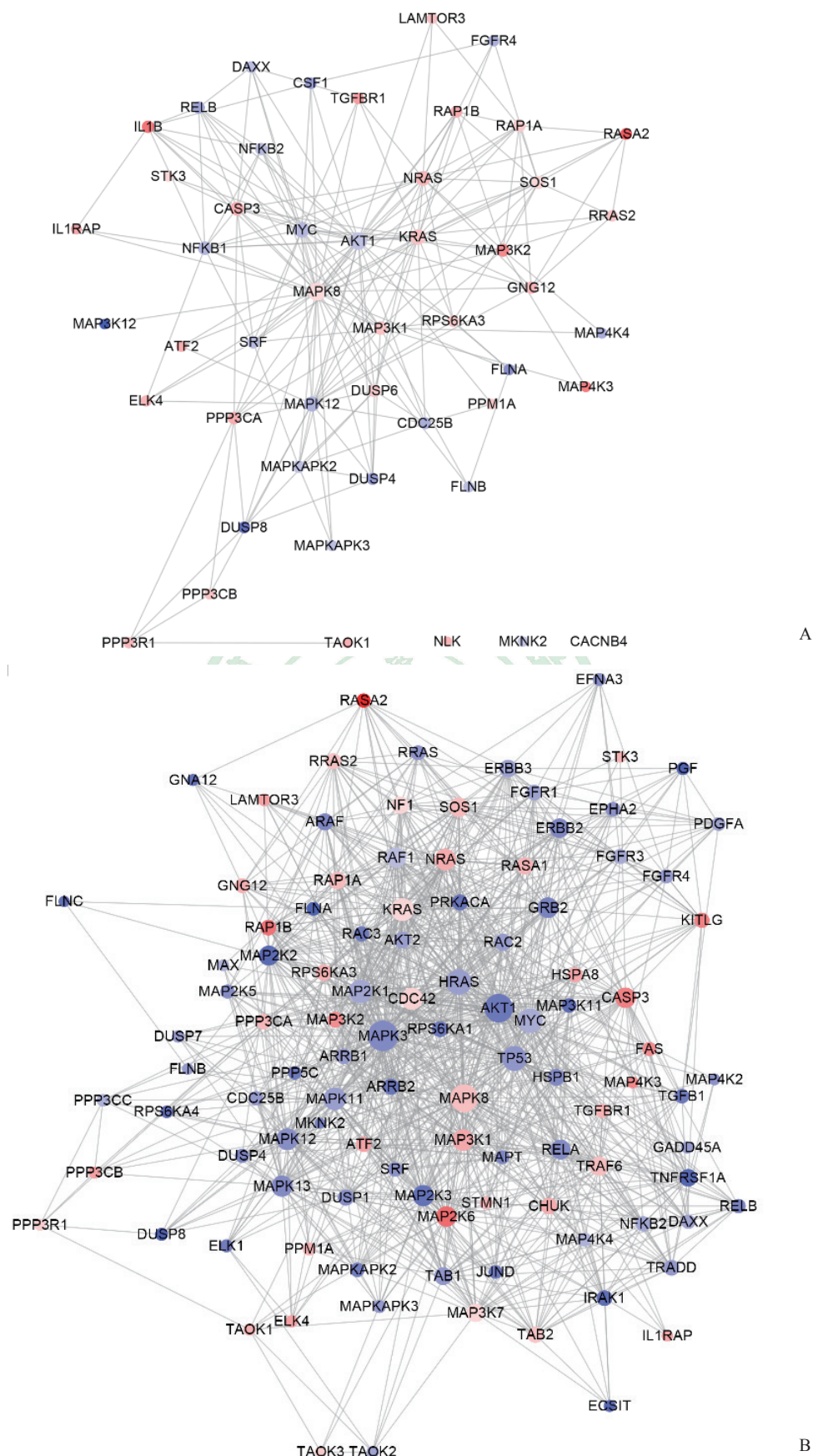


图 4 MAPK 信号通路相关差异表达基因的 PPI 分析

Fig 4 PPI analysis of differentially expressed genes related to MAPK signaling pathways

A: *Qingyi Huaji* recipe low-dose group; B: *Qingyi Huaji* recipe high-dose group. Blue represents downregulated genes, red represents upregulated genes, circles represent the size and degree. MAPK: Mitogen-activated protein kinase; PPI: Protein-protein interaction

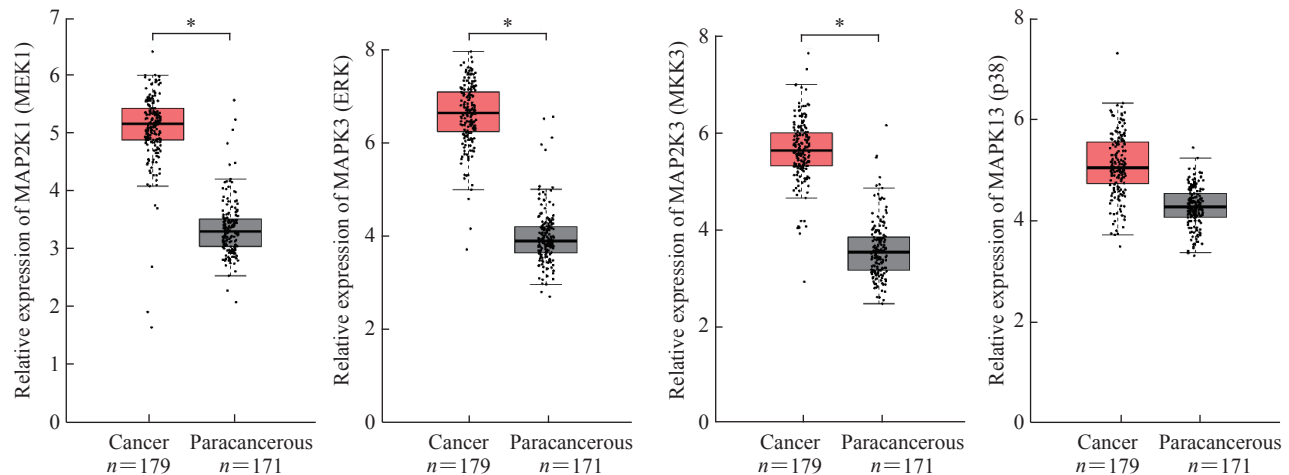


图 5 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路关键基因在胰腺癌和癌旁样本中的表达情况

Fig 5 Expression of key genes of ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways in pancreatic cancer and paracancerous samples

ERK: Extracellular-regulated protein kinase; p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; MAP2K1 (MEK1): Mitogen-activated protein kinase kinase 1; MAPK3 (ERK): Mitogen-activated protein kinase 3; MAP2K3 (MKK3): Mitogen-activated protein kinase kinase 3; MAPK13 (p38): Mitogen-activated protein kinase 13. * $P < 0.05$

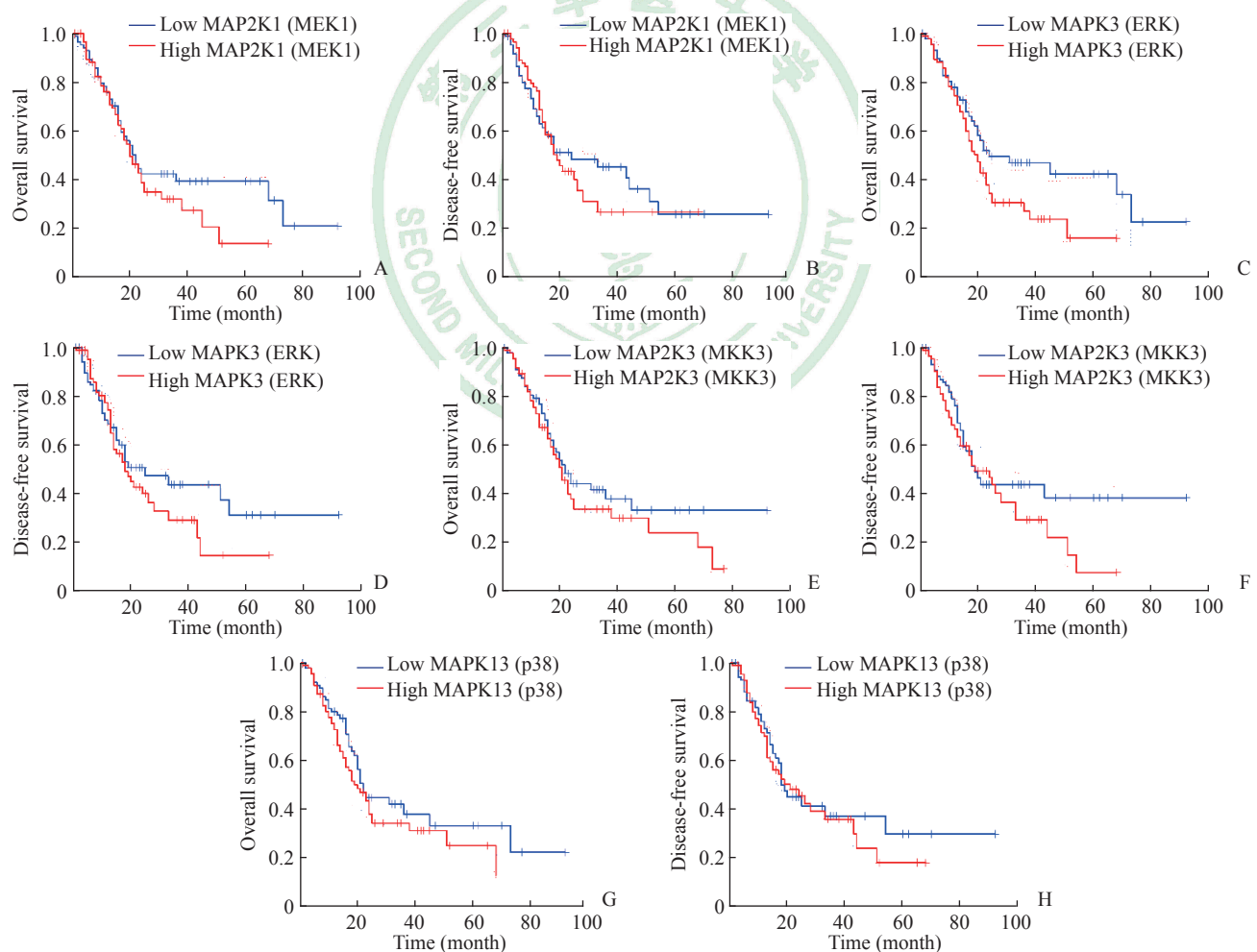


图 6 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路关键基因与胰腺癌患者预后的关系

Fig 6 Relationship between key genes of ERK1/2 and p38 MAPK signaling pathways and prognosis of pancreatic cancer patients

ERK: Extracellular regulated protein kinase; p38 MAPK: p38 mitogen-activated protein kinase; MAP2K1 (MEK1): Mitogen-activated protein kinase kinase 1; MAPK3 (ERK): Mitogen-activated protein kinase 3; MAP2K3 (MKK3): Mitogen-activated protein kinase kinase 3; MAPK13 (p38): Mitogen-activated protein kinase 13

3 讨 论

胰腺癌是消化系统中最常见的恶性肿瘤之一^[12],目前胰腺癌治疗方法以化学治疗为主,但大多数药物疗效较差、不良反应大^[13]。有研究发现,使用辅助化学治疗可改善胰腺癌患者的生活质量并延长生存时间,相比最佳支持治疗对晚期胰腺癌疗效更佳^[14]。中医辅助疗法不仅可以延长胰腺肿瘤患者生存时间,同时对生活质量的提高具有重要作用^[15]。中药及复方具有多成分、多靶点、多通路的作用特点,作用机制的研究尤为重要。网络药理学是一个基于“疾病-基因-目标-医学”概念的交互式网络,系统并科学地评价药物对疾病网络的干预和影响,以揭示药物对机体作用的机制。该策略的系统性与中医的整体观点及中药配方中的多成分、多途径和多目标的协同作用机制相符,特别适合中药的作用机制研究。

清胰化积方是在胰腺癌“湿热积累”的机制上提出的,是以“清热燥湿”为主要原则的治疗方法,已被用于胰腺癌患者的综合治疗^[16],临床和动物研究均显示清胰化积方治疗肝转移的晚期胰腺癌具有明显疗效^[17]。本研究选取BALB/c裸鼠皮下种植SW1990细胞诱导胰腺癌的动物模型,该模型模拟胰腺癌肿瘤发生、发展过程,并且符合胰腺癌肿瘤生长微环境,是研究胰腺肿瘤发病及相关药物作用机制的理想模型。本研究发现治疗组相比对照组肿瘤生长受到抑制,说明清胰化积方对胰腺癌的治疗有重要作用。

我们通过网络药理学研究发现,清胰化积方通过抑制MAPK通路治疗胰腺癌,MAP2K1(MEK1)、MAPK3(ERK)、MAP2K3(MKK3)和MAPK13(p38)可作为清胰化积方治疗胰腺癌的潜在预后因子。已有研究发现MAPK通路在癌症中表现出频繁的异常激活,并使肿瘤更易于侵袭和转移^[18-19]。抑制MAPK可以阻断胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力^[20]。Ras/Raf/MEK/ERK信号通路是调节细胞增殖、分化和存活过程的重要分子^[21]。有研究表明RAS/MEK/ERK通路的过度激活通过增强放射疗法诱导的双链DNA断裂的修复来促进肿瘤的放射抵抗,靶向MEK会损害DNA损伤修复途径,并使肿瘤细胞对放射和化学疗法敏感^[22]。MEK抑制剂会干扰同源重组和非同源性

末端修复途径,从而使胰腺癌细胞对电离辐射更加敏感^[23]。Awasthi等^[24]提出可以通过特异性抑制MEK1/2激酶活性来增强基于紫杉醇的化学治疗方案的效果。p38 MAPK是炎症的必需激酶,在高糖条件下的胰腺癌细胞和糖尿病伴随胰腺肿瘤的动物模型中,p38 MAPK磷酸化显著增加,使用p38 MAPK抑制剂可显著抑制胰腺癌细胞的增殖和侵袭,抑制肿瘤增长和转移,提高患有胰腺肿瘤的糖尿病小鼠的存活率^[25]。高糖可诱导过氧化氢的产生,并进一步通过激活ERK来调节转移相关因子尿激酶纤溶酶原激活剂的表达,从而促进胰腺癌细胞的侵袭^[26]。抑制ERK和p38 MAPK信号通路在抑制高血糖驱动的活性氧诱导的胰腺癌进展中起重要作用^[27]。因此,MAPK是胰腺癌治疗的关键信号通路。

综上所述,我们通过网络药理学研究结果表明,清胰化积方治疗胰腺癌的作用机制与MAPK信号通路有关,MAP2K1(MEK1)、MAPK3(ERK)、MAP2K3(MKK3)和MAPK13(p38)等可作为评价清胰化积方治疗胰腺癌疗效的潜在预后因子。清胰化积方治疗胰腺癌的具体作用机制仍需大量的体内外实验进行探究。

[参 考 文 献]

- [1] FALASCA M, KIM M, CASARI I. Pancreatic cancer: current research and future directions[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1865: 123-132.
- [2] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69: 7-34.
- [3] ADAMSKA A, DOMENICHINI A, FALASCA M. Pancreatic ductal adenocarcinoma: current and evolving therapies[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18: 1338. doi: 10.3390/ijms18071338.
- [4] 沈晔华,刘鲁明,孟志强,陈震,林钧华,周振华,等.清胰化积方为主综合治疗晚期胰腺癌64例生存分析[J]. *中医杂志*, 2009, 50: 39-42.
- [5] 王凤娇,陈联誉,陈震,刘鲁明.概述清胰化积方抑制胰腺癌发生发展的现代研究机制[J]. *上海中医药杂志*, 2017, 51: 95-98.
- [6] GE Q, CHEN L, TANG M, ZHANG S, LIU L, GAO L, et al. Analysis of mulberry leaf components in the treatment of diabetes using network pharmacology[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 833: 50-62.
- [7] SHAWKY E. Prediction of potential cancer-related molecular targets of North African plants constituents using network pharmacology-based analysis[J/OL].

- J Ethnopharmacol, 2019, 238: 111826. doi: 10.1016/j.jep.2019.111826.
- [8] LIANG J W, WANG M Y, OLOUNFEH K M, ZHAO N, WANG S, MENG F H. Network pharmacology-based identification of potential targets of the flower of *Trollius chinensis* Bunge acting on anti-inflammatory effects[J/OL]. Sci Rep, 2019, 9: 8109. doi: 10.1038/s41598-019-44538-z.
- [9] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 附录3.
- [10] ANDERS S, HUBER W. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level—the DESeq package[Z/OL]. (2013-02-24)[2019-08-30]. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.359.7464&rep=rep1&type=pdf>.
- [11] TANG Z, LI C, KANG B, GAO G, LI C, ZHANG Z. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W98-W102.
- [12] SUN Q, ZHANG B, HU Q, QIN Y, XU W, LIU W, et al. The impact of cancer-associated fibroblasts on major hallmarks of pancreatic cancer[J]. Theranostics, 2018, 8: 5072-5087.
- [13] BRUNNER T B, KUNZ-SCHUGHART L A, GROSSE-GEHLING P, BAUMANN M. Cancer stem cells as a predictive factor in radiotherapy[J]. Semin Radiat Oncol, 2012, 22: 151-174.
- [14] ZHANG Y L, ZHANG X, MIAO X Z, YUAN Y Y, GAO J, LI X, et al. Coptisine suppresses proliferation and inhibits metastasis in human pancreatic cancer PANC-1 cells[J]. J Asian Nat Prod Res, 2020, 22: 452-463.
- [15] LI M, WANG M M, GUO X W, WU C Y, LI D R, ZHANG X, et al. Different survival benefits of chinese medicine for pancreatic cancer: how to choose?[J]. Chin J Integr Med, 2018, 24: 178-184.
- [16] WANG P, CHEN Z, MENG Z Q, LUO J M, LIN J H, ZHOU Z H, et al. Ski acts as therapeutic target of *Qingyihuaji* formula in the treatment of SW1990 pancreatic cancer[J]. Integr Cancer Ther, 2010, 9: 50-58.
- [17] YIN J H, SHI W D, ZHU X Y, CHEN Z, LIU L M. *Qingyihuaji* formula inhibits progress of liver metastases from advanced pancreatic cancer xenograft by targeting to decrease expression of Cyr61 and VEGF[J]. Integr Cancer Ther, 2012, 11: 37-47.
- [18] GU D N, JIANG M J, MEI Z, DAI J J, DAI C Y, FANG C, et al. microRNA-7 impairs autophagy-derived pools of glucose to suppress pancreatic cancer progression[J]. Cancer Lett, 2017, 400: 69-78.
- [19] LIU Y, TONG L, LUO Y, LI X, CHEN G, WANG Y. Resveratrol inhibits the proliferation and induces the apoptosis in ovarian cancer cells via inhibiting glycolysis and targeting AMPK/mTOR signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2018, 119: 6162-6172.
- [20] HU M, CHEN X, MA L, MA Y, LI Y, SONG H, et al. AMPK inhibition suppresses the malignant phenotype of pancreatic cancer cells in part by attenuating aerobic glycolysis[J]. J Cancer, 2019, 10: 1870-1878.
- [21] SAMATAR A A, POULIKAKOS P I. Targeting RAS-ERK signalling in cancer: promises and challenges[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13: 928-942.
- [22] TOULANY M, IIDA M, KEINATH S, IYI F F, MUECK K, FEHRENBACHER B, et al. Dual targeting of PI3K and MEK enhances the radiation response of K-RAS mutated non-small cell lung cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7: 43746-43761.
- [23] ESTRADA-BERNAL A, CHATTERJEE M, HAQUE S J, YANG L, MORGAN M A, KOTIAN S, et al. MEK inhibitor GSK1120212-mediated radiosensitization of pancreatic cancer cells involves inhibition of DNA double-strand break repair pathways[J]. Cell Cycle, 2015, 14: 3713-3724.
- [24] AWASTHI N, MONAHAN S, STEFANIAK A, SCHWARZ M A, SCHWARZ R E. Inhibition of the MEK/ERK pathway augments nab-paclitaxel-based chemotherapy effects in preclinical models of pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2017, 9: 5274-5286.
- [25] WANG L, BAI Y Y, YANG Y, HU F, WANG Y, YU Z, et al. Diabetes mellitus stimulates pancreatic cancer growth and epithelial-mesenchymal transition-mediated metastasis via a p38 MAPK pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7: 38539-38550.
- [26] LI W, MA Z, MA J, LI X, XU Q, DUAN W, et al. Hydrogen peroxide mediates hyperglycemia-induced invasive activity via ERK and p38 MAPK in human pancreatic cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6: 31119-31133.
- [27] CAO L, CHEN X, XIAO X, MA Q, LI W. Resveratrol inhibits hyperglycemia-driven ROS-induced invasion and migration of pancreatic cancer cells via suppression of the ERK and p38 MAPK signaling pathways[J]. Int J Oncol, 2016, 49: 735-743.

[本文编辑] 孙 岩