

基于气相色谱-质谱和网络药理学探讨 蒙药嘎拉图呼和挥发油成分抗胃癌的作用机制

刘静¹, 王海生², 张金月², 王宇琦², 刘星月², 孟钰坤², 王芳¹, 李君¹, 张微¹, 马宇衡^{1*}

(1. 内蒙古医科大学药学院, 内蒙古呼和浩特 010059;
2. 内蒙古医科大学基础医学院, 内蒙古呼和浩特 010059)

【摘要】目的 通过提取蒙药嘎拉图呼和挥发油部位, 进行化学成分鉴定, 结合网络药理学分析探讨传统蒙药嘎拉图呼和抗胃癌潜在作用机制。方法 采用气相色谱-质谱(GC-MS)联用法定性分析嘎拉图呼和挥发油部位成分, 并结合 Pubchem 和 Swiss Target Prediction 数据库, 进行活性成分靶点的筛选; 在 Gene Cards、OMIM、Pharm Gkb、TTD、DrugBank 数据库中检索胃癌相关的靶点; 利用在线 Venn 将查到的靶点信息取交集; Cytoscape 3.9.0 软件构建成分-靶点-疾病网络图筛选关键成分; STRING 11.0 数据库构建蛋白互作网络筛选核心作用靶点, 利用 DAVID 数据库进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析; 利用 Discovery Studio 2019 进行核心靶点与相应小分子化合物之间分子对接。结果 通过 GC-MS 共鉴定出嘎拉图呼和挥发油部位中 56 种成分; 以 GC-MS 结果为基础, 通过化学成分靶点预测数据库搜索并获得 46 个活性成分, 150 个活性靶点; 化学成分靶点与胃癌相关靶点取交集, 获得 135 个潜在治疗基因; 进行 GO 功能富集与 KEGG 通路分析, 获得包括 G 蛋白偶联信号通路、乙酰胆碱受体信号通路等多条胃癌相关信号通路; PPI 蛋白互作筛选核心基因, 结果显示 VEGFA、KDR、PTGS2 和 MAPK14 为挥发油治疗胃癌的潜在作用靶点。结论 蒙药嘎拉图呼和挥发油中的 46 个有效成分可能通过调控 VEGFA、KDR、PTGS2 和 MAPK14 参与多条信号通路共同发挥抗胃癌作用。本研究为进一步探讨蒙药复方抗胃癌作用机制提供了数据依据。

【关键词】嘎拉图呼和; 胃癌; 气相色谱-质谱; 网络药理学; 分子对接

中图分类号: R96

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2023)04-0357-05

嘎拉图呼和是蒙医药经典复方, 由铁线莲、干姜、蛇床子、萆薢、诃子灰(煨)、光明盐 6 味药材组成, 收录于《四部医典》《中国医学百科全书·蒙医学》等蒙药典籍中^[1]。处方中铁线莲具有破穿肿瘤、助胃火、燥“协日乌素”、破痞调温之功效, 常用于蒙药复方中治疗寒痞、肿瘤等; 在诸种药典和歌诀中, 均有“佳品药王为诃子”的描述, 对诸病均有疗效, 故以诃子调理体素; 以萆薢、蛇床子、光明盐散寒健胃、调养胃火、祛巴达干赫依; 以干姜提升胃温、促进食欲。本方剂性温, 主治未消化、巴达干赫依性寒痞症, 胃痞初期。

胃癌是人类常见的胃肠道恶性肿瘤之一。据世界卫生组织 2020 年全球癌症统计报告数据, 我国胃癌新发病例占全球的 43.9%, 死亡病例占全球

的 48.6%, 其中超 80% 胃癌患者确诊时已是进展期或转移性胃癌, 而转移性胃癌患者 5 年生存率仅为 9.4%^[2]。《“健康中国 2030”规划纲要》^[3]中提出: 要力争将肿瘤患者的 5 年生存率提高 15%。蒙医药作为民族瑰宝, 药效确切、资源丰富, 具有巨大的开发潜力。课题组前期已对嘎拉图呼和醇提物这一药效部位进行了成分鉴定及抗胃癌作用研究。现代药理学研究表明, 处方中干姜、蛇床子、萆薢含有挥发油, 且在抗肿瘤、抗炎和抗氧化等方面具有良好作用^[4-5], 因此对处方中挥发油成分进行成分鉴定, 并分析其抗胃癌潜在作用机制, 对于从整体上全面分析蒙药复方嘎拉图呼和抗胃癌分子机制具有重要意义。

本文首先进行了嘎拉图呼和挥发油提取, 采用

收稿日期: 2022-04-21; 修回日期: 2023-08-02

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2023QN08050); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY23135); 内蒙古医科大学青年项目(YKD2022QN004); 2022 年度大学生创新创业培训计划项目(202210132071)

第一作者: 刘静(1990—), 女, 硕士, 助理研究员。研究方向: 中蒙药药效物质基础研究。E-mail: 867072815@qq.com

*通信作者: 马宇衡, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师。研究方向: 先导化合物发现及结构改造。E-mail: myhstar@126.com

气相色谱-质谱(GC-MS)联用技术对嘎拉图呼和挥发油成分进行定性分析,之后以此结果为基础,结合网络药理学和分子对接技术,对嘎拉图呼和挥发油抗胃癌的活性成分、作用关键靶点和通路进行预测,为后续研究提供数据依据与理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料及设备

气相色谱-质谱联用仪(安捷伦,型号:7890B-5977A);干姜(东营百佳益中药饮片有限公司,批号:20220302);荜茇(东营百佳益中药饮片有限公司,批号:20220509);蛇床子(东营百佳益中药饮片有限公司,批号:20220512)

1.2 实验方法

1.2.1 蒙药嘎拉图呼和挥发油提取方法 按比例精确称取嘎拉图呼和中干姜、蛇床子、荜茇3味药材110 g置于烧瓶中,加入8倍量水,浸泡10 h,加热保持微沸,提取5 h,当挥发油测定器中油量不再增加,停止加热,得到淡黄色透明油状液体,静置1 h后收集挥发油,备用。

1.2.2 GC-MS法分析挥发油成分 进样口温度250 °C,载气为高纯氮气(99.999%),20:1分流比,流速1 mL/min,1 μL进样量,柱温:40 °C(保持3 min),20 °C/min,升温至280 °C,保持20 min,接口温度280 °C,四级杆150 °C,离子源230 °C,70 eV,扫描范围为12~550 amu。生成质谱图,在计算机标准质谱图库(NIST14.L)中进行化学成分检索,并结合文献进行人工解析,鉴定挥发油中的化学成分,运用气相色谱面积归一化法确定各成分的相对含量。

1.2.3 嘎拉图呼和挥发油成分潜在作用靶点筛选

根据GC-MS成分鉴定结果,获得嘎拉图呼和挥发油化学成分信息,依据化合物的CAS号,在Pub Chem数据库中查询成分相对应的SMILES化学式。将获得的SMILES输入Swiss Target Prediction数据库,以“Probability”>0为标准筛选化合物对应的作用靶点,去重,将所筛选的活性成分靶点导入UniProt数据库,物种设置为“human”,将检索得到的靶点信息校正为UniProt ID,并得到靶点对应的基因名。

1.2.4 胃癌相关靶点基因筛选 在Gene Cards、OMIM、Pharm Gkb、TTD、DrugBank数据库以“gastric cancer”为关键词检索收集疾病相关的基因,并对二者收集的结果进行汇总,删除多余重复的基因即为

“胃癌”相关靶点基因。

1.2.5 嘎拉图呼和潜在活性成分-靶点-疾病网络的构建 将挥发油中的活性成分靶点同胃癌相关靶点取交集,筛选挥发油潜在调控胃癌的基因,绘制Venn图。采用Cytoscape 3.9.0软件,构建成分-靶点-疾病网络图,进一步明确胃癌靶点和挥发油中活性化学成分之间的对应关系。

1.2.6 蛋白相互作用(PPI)网络的构建 将挥发油活性成分和胃癌的共有靶点导入STRING 11.0数据库,将物种设置为“Homo sapiens”,将参数“minimum required interaction score”设置为0.55,构建蛋白互作用网络图。根据筛选结构使用Cytoscape软件的CytoNCA分别计算每个靶点的BC、DC、CC、EC、LAC和NC值,根据6组都大于中位值,配合R语言进行筛选,通过两次筛选最终获得核心靶点基因。

1.2.7 GO功能和KEGG富集分析 将挥发油潜在治疗胃癌基因使用R语言进行id转换后,用R语言完成GO和KEGG分析,设定P value Filter<0.05,进行GO富集和KEGG通路富集分析。

1.2.8 核心靶点基因与相对应小分子化合物对接

检索核心靶点基因所对应的小分子化合物,并从Pub Chem中下载其2D结构,通过Chem Office进行3D转换。通过PDB和UniProt检索核心靶点基因所对应蛋白。利用Discovery Studio 2019将核心靶点蛋白与对应的小分子化合物进行分子对接,得到3D效果图及2D细节图,并计算两者之间的结合能。

2 结果

2.1 基于GC-MS技术的嘎拉图呼和挥发油成分鉴定

嘎拉图呼和挥发油经GC-MS分析后,获得总离子流图(见图1),通过NIST14.L数据库进行匹配分离,结合文献人工检索,共鉴定出56个化合物,占总峰面积的91.77%。其中,含量前十的成分有姜烯(12.61%)、d-柠檬烯(9.07%)、α-姜黄烯(8.33%)、β-双酚(7.90%)、(1R)-α-蒎烯(7.21%)、β-倍半水芹烯(5.49%)、石竹烯(4.73%)、8-庚烯(4.55%)、乙酸龙脑酯(4.26%)、(-)-蒎烯(3.97%)。

2.2 嘎拉图呼和挥发油成分潜在作用靶点筛选

以挥发油中鉴定出的56个化合物为基础,进行挥发油作用靶点预测,在TCMSP数据库中检索化合物的靶点信息,结果共有46个化合物查到作用靶点,去重后得到化合物相关作用靶点共150个。

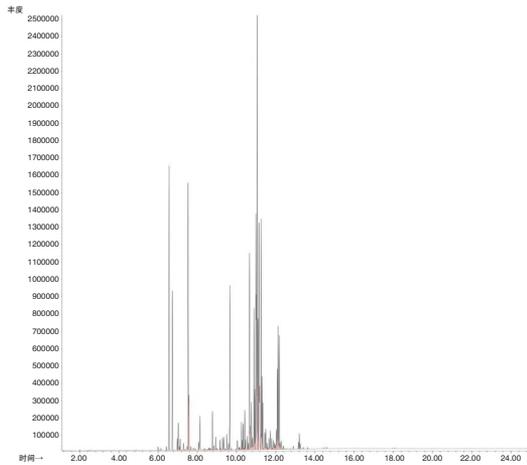


图1 嘎拉图呼和挥发油成分总离子流图

2.3 胃癌相关靶点基因筛选

在 GeneCards、OMIM、Pharmgkb、TTD、DrugBank 数据库中检索胃癌相关靶点,分别得到 11146、419、298、38、33 个靶点信息,整理去重后共得到相关疾病靶点 11313 个(见图 2 A)。

2.4 嘎拉图呼和潜在活性成分-靶点-疾病网络的构建

将挥发油化学成分的作用靶点与胃癌相关靶点取交集,共得到 135 个嘎拉图呼和治疗胃癌的潜在作用靶点(见图 2 B)。

采用 Cytoscape 3.9.0 软件,构建挥发油化学成分与胃癌疾病靶点之间的网络相互作用关系图(见图 2 C),图中共有 181 个节点、403 条边(共同靶点 135 个、化合物 46 个),挥发油化学成分与胃癌疾病靶点之间的连线表明两者之间存在靶向关系,说明 46 个挥发油活性化学成分与 135 个胃癌疾病靶点存在靶向关系。

2.5 蛋白相互作用(PPI)网络的构建

将交集靶点导入 STRING 在线工具,置信度设置为 0.55,构建挥发油化学成分治疗胃癌的 PPI 网络关系,涉及 117 个节点和 289 条边。导入 Cytoscape 3.9.0 软件,以 Cyto NCA 插件进行网络拓扑分析,计算节点的 betweenness、closeness、degree 值,以大于中位值为筛选条件,进行 2 次打分后,得到 4 个核心靶点分别为 VEGFA、PTGS2、KDR、MAPK14 (见图 2 D)。

2.6 GO 功能富集与 KEGG 通路分析

将挥发油化学成分抗胃癌的潜在作用靶点导入 Bioconductor 生物信息软件包,进行 GO 功能富集、KEGG 信号通路富集分析,同时绘制柱状图及气泡图。GO 功能富集共有 1213 条分析结果,其中包

括了生物学过程(BP)1043 条,细胞组成(CC)36 条,分子功能(MF)134 条。按照 *P* 值的大小,将筛选出的前 10 名绘制柱状图(见图 2 E)。可以推测挥发油治疗胃癌的 BP 主要涉及脂肪酸类激素分泌代谢、类固醇激素分泌代谢等;CC 结果显示挥发油主要作用于细胞膜等部位;MF 主要涉及核受体活性、配体-激活等。

进行 KEGG 信号通路富集分析,结果显示,潜在作用靶点共参与 39 条信号通路,根据 *P* 值大小排序,将前 30 名信号通路绘制气泡图(见图 2 F)。根据气泡图可知,挥发油治疗胃癌可能通过 G 蛋白偶

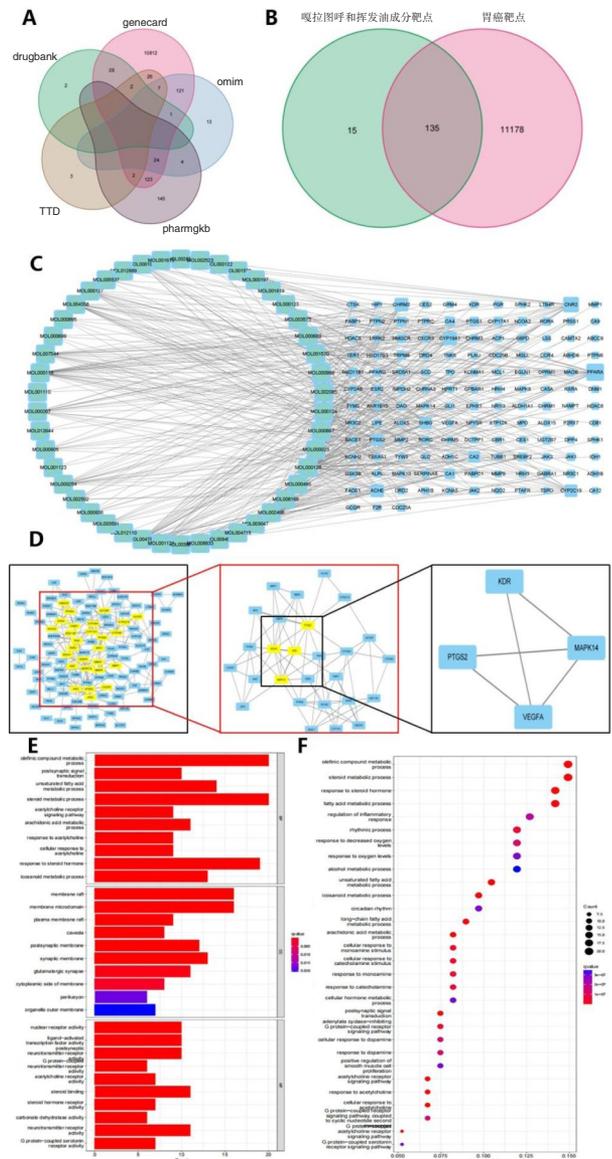


图2 嘎拉图呼和挥发油抗胃癌网络药理学分析

A: 胃癌疾病靶点韦恩图;B: 嘎拉图呼和挥发油成分与胃癌交集靶点的韦恩图;C: 嘎拉图呼和挥发油有效成分-胃癌疾病靶点相互作用网络图;D: 嘎拉图呼和挥发油治疗胃癌的核心靶点图;E: GO 功能富集分析;F: KEGG 通路富集分析

联信号通路、乙酰胆碱受体信号通路等多条生物学信号通路,调节烯烃、类固醇、脂肪酸等的代谢过程。

2.7 分子对接

通过 PDB 数据库,查找 4 个核心靶点基因 VEGFA、PTGS2、KDR、MAPK14 的 pdb 形式,同时在 Pubchem 中查找 mol 2 结构,利用 Discovery Studio 2019 得到受体与配体对接 3D 效果图及 2D 细节图,见图 3A-J,计算两者之间的结合能大小(见表 1)。

表 1 核心靶点与活性成分结合能

核心靶点	活性成分 中文名称	活性成分 英文名称	结合能 (/kcal·mol ⁻¹)
VEGFA	丁香酚	Eugenol	-9.3
PTGS2	橙花醛	Citral	-9.4
	香叶醇	Geraniol	-10.1
	(Z)-柠檬醛	Neral	-9.6
	芳樟醇	Linalool	-9.0
KDR	香茅醇	beta-Citronellol	-9.9
	丁香酚	Eugenol	-10.2
MAPK14	乙酸香叶酯	Neryl Acetate	-9.1
	乙酸香叶酯	Neryl Acetate	-9.4

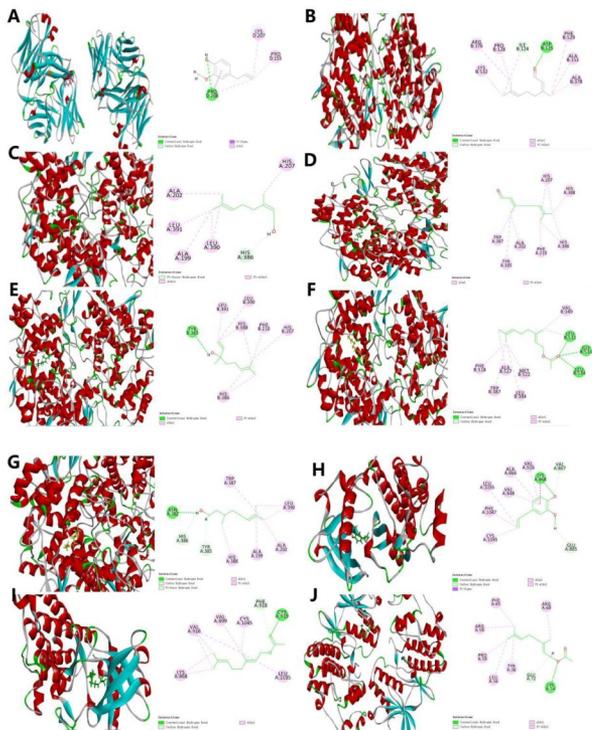


图 3 分子对接结果可视化分析图

A: VEGFA-Eugenol; B:PTGS2-Citral; C:PTGS2-Geraniol; D:PTGS2-Neral; E:PTGS2-Linalool; F:PTGS2-Neryl Acetate; G:PTGS2-beta-Citronellol; H:KDR-Eugenol; I:KDR-Neryl Acetate; J:MAPK14-Neryl Acetate

3 讨论

本研究首次采用 GC-MS 对蒙药复方嘎拉图呼和的挥发油进行成分鉴定,共鉴定分析出 56 种化学成分。以 GC-MS 结果为基础,在 TCMSP 数据库中检索化合物的靶点信息,共有 46 个化合物查到作用靶点,去重后得到化合物相关作用靶点共 150 个。通过与胃癌相关靶点取交集,共获得 135 个挥发油潜在治疗胃癌的基因靶点。进行 GO 功能富集与 KEGG 通路分析,获取包括 G 蛋白偶联信号通路、乙酰胆碱受体信号通路等在内的多条胃癌相关信号通路。通过 PPI 蛋白相互作用筛选核心基因,结果显示 VEGFA、KDR、PTGS2 和 MAPK14 为挥发油治疗胃癌的核心靶点基因。

肿瘤新生血管的生成是肿瘤发生发展过程中的一个关键因素。现代药理学研究发现血管内皮生长因子 A (VEGFA)在许多肿瘤细胞中表达上调,刺激血管内皮细胞的增殖和迁移,促进肿瘤血管生成^[6]。因此,抑制肿瘤新生血管的形成逐渐成为众多的科研工作者研发抗癌药物的新方向,多靶点酪氨酸激酶抑制剂-索拉非尼和血管内皮生长因子(VEGF)/血管内皮生长因子受体(VEGFR)单抗-阿西替尼等^[7]已经应用于胃癌治疗,临床结果显示其可有效抑制胃癌肿瘤血管新生,进一步抑制肿瘤的转移^[8]。KDR 作为 VEGF 受体家族中的重要一员,可促进肿瘤血管新生,介导内皮细胞的增殖、迁移,抗内皮细胞凋亡,引起血管通透性升高^[9]。肿瘤细胞分泌的 VEGFA,不仅可以通过旁分泌的方式作用于血管内皮细胞,同时也可通过自分泌的途径,与肿瘤表面的 KDR 相结合,促进肿瘤细胞的生长、转移。因此蒙药嘎拉图呼和挥发油作用于 VEGF-KDR 受体途径可能存在双重功效,除可以直接抑制血管新生外,还可抑制肿瘤细胞的生长与转移^[10,11]。

环氧酶-2 (PTGS 2 又名 Cox 2)为细胞诱导型酶,在炎症反应中表达迅速上调,参与肿瘤生长,血管生成以及浸润等行为,在胃癌、肺癌等多种肿瘤细胞中过表达^[12]。PTGS 2 可催化生成前列腺素 E 2(PGE 2),PGE 2 作为不饱和脂肪酸类激素,在肿瘤的发生发展中起着很重要的角色,如:促进血管生成,抗细胞凋亡,逃避免疫监视、促进肿瘤转移,减少细胞因子的产生和 NK 细胞活性等。此外,PTGS 2 可以导致 DNA 氧化,诱发突变^[13],故蒙药嘎拉图呼和挥发油可能通过抑制 PTGS 2-PGE 2 途径,从而发挥抗胃癌作用。(下转第 377 页)

- [5]张鲁,宋丽,范廷廷,等.影响腹膜透析患者残余肾功能的多因素分析[J].中国地方病防治杂志,2019,34(1):104-106
- [6]Li SY,Chuang CL,Lin CC,et al.Peritoneal-membrane characteristics and hypervolemia management in peritoneal dialysis: a randomized control trial[J].Membranes (Basel),2021,11(10):768
- [7]Htay H,Cho Y,Pascoe EM,et al.Predictors of residual renal function decline in peritoneal dialysis patients: The balANZ Trial[J].Perit Dial Int,2017,37(3):283-289
- [8]Kang T,Hu Y,Huang X,et al.Serum uric acid level and all-cause and cardiovascular mortality in peritoneal dialysis patients: a systematic review and dose-response meta-analysis of cohort studies[J].PLoS One,2022,17(2):e0264340
- [9]Cheetham MS,Cho Y,Krishnasamy R,et al.Incremental versus standard (Full-Dose) peritoneal dialysis[J].Kidney Int Rep,2021,7(2):165-176
- [10]Chen CH,Teitelbaum I.Peritoneal dialysis adequacy: a paradigm shift[J].Kidney Res Clin Pract,2022,41(2):150-155
- [11]杨丽,龚妮容,蒋建平.难治性腹透相关腹膜炎的致病菌及预后危险因素[J].实用医学杂志,2019,35(21):3300-3303
- [12]Qin A,Liu X,Yin X,et al.Normalized protein catabolic rate is a superior nutritional marker associated with dialysis adequacy in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients[J].Front Med,2020,7:e603725
- [13]Liu S,Qiu P,Luo L,et al.Serum C-reactive protein to albumin ratio and mortality associated with peritoneal dialysis[J].Ren Fail,2020,42(1):600-606
- [14]赫琪,刘佳谊,刘洋,等.老年2型糖尿病患者糖脂代谢,血尿酸水平与脂肪肝的关系[J].内蒙古医科大学学报,2021,43(6):5-7
- [15]Liu X,Dai C.Advances in understanding and management of residual renal function in patients with chronic kidney disease[J].Kidney Diseases,2017,2(4):187-196

(上接第360页)

丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)是四种p38 MAPK中的一种,调节细胞的生长、分化,参与应激反应、炎症反应等多种病理生理过程^[14]。ROS的产生能够激活MAPK14,而MAPK14激活后又可以促进ROS的生成,二者通过影响肿瘤细胞的凋亡与周期等生物学特性,在肿瘤的发生、发展中发挥着重要的作用^[15]。现代研究表明MAPK信号通路作为一种重要的生物信号传递途径,不仅能够在肿瘤发生、发展中发挥重要作用,还能够参与调控肿瘤的耐药性过程^[16]。

综上所述,本研究以GC-MS结果为基础,通过网络药理学和分子对接技术预测分析嘎拉图呼挥发油抗胃癌的关键靶点基因。结果显示挥发油可能通过调节VEGFA、KDR、PTGS2和MAPK14等核心靶点,协同调控VEGF-KDR受体途径、PTGS2-PGE2途径、MAPK信号通路等,共同发挥抗胃癌作用。本研究为阐明复方蒙药嘎拉图呼和多成分、多靶点、多通路发挥治疗疾病的作用提供了研究基础,为更好地进一步开发利用该蒙药复方提供了参考依据,奠定了良好的数据基础。

参考文献

- [1]中国医学百科全书编辑委员会.中国医学百科全书·蒙医学[M].上海:上海科学技术出版社,1992:218
- [2]李昌峰,黄河.胃癌肿瘤微环境靶向治疗的研究进展[J].武警医学,2022,33(7):640-644
- [3]中国国务院.“健康中国2030”规划纲要[EB/OL]中国政府网,2016-10-25
- [4]鞠赫,赵远红,梁煜,等.基于五行相克浅谈药对黄连-干姜应用性研究[J].辽宁中医药大学学报,2022,24(11):188-192
- [5]廖翠平,葛莎莎,阿拉坦朝鲁门,等.芫芩的研究进展及质量标志物的预测[J].中国中药杂志,2022,47(19):22-27
- [6]杨俊美,王彩霞,刁为英.Eya2及VEGFA在胃癌中的表达及与临床病理参数的关系及临床意义[J].微量元素与健康研究,2022,39(2):4-6
- [7]杨婷婷,李鹏运,郑志兵.VEGFR小分子抑制剂研究的新进展[J].军事医学,2021,45(5):390-396
- [8]Tang J,Zhu Y,Xie K,et al.Erratum to: the role of the AMOP domain in MUC4/Y-promoted tumour angiogenesis and metastasis in pancreatic cancer[J].J Exp Clin Cancer Res,2017,36(1):34
- [9]陈家川,胡宗强,陈刚,等.原发性肝癌中肿瘤相关巨噬细胞的作用和相关治疗应用[J].中国普外基础与临床杂志,2022,29(3):389-395
- [10]谢静怡,尹明明,刘永平,等.基于细胞焦亡探讨中草药抗肿瘤作用的研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2022,24(7):2521-2529
- [11]钟明.KDR-CAR修饰Jurkat细胞抗肺癌作用研究[D].广州:广东药科大学,2021
- [12]桂永燕,高社干.环氧合酶-2基因在食管上皮癌变中的表达及其临床意义的研究进展[J].实用癌症杂志,2020,35(4):693-694
- [13]刘莹,王真权,贺荔枝.基于网络药理学和分子对接分析白术-茯苓治疗克罗恩病的作用机制[J].中医临床研究,2023,15(14):1-9
- [14]杨羽晨,杨佩佩,黄碧莹,等.丝裂原活化蛋白激酶信号通路介导的自噬可调节破骨细胞的增殖分化和功能[J].中国组织工程研究,2021,25(26):4192-4197
- [15]杨甜,吴八路,江宏强,等.MAPK14与胃癌放疗抵抗机制实验研究[J].中华肿瘤防治杂志,2019,26(21):1599-1605
- [16]马瑞莲,王毅.MAPK信号通路在乳腺癌中的研究进展[J].内蒙古医科大学学报,2021,43(S1):162-165