

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2021.06.021

郭旭, 张东, 孙晓丽, 等. 基于网络药理学和分子对接探讨紫苏籽抗癌抗肿瘤的分子机制[J]. 粮油食品科技, 2021, 29(6): 219-230.

GUO X, ZHANG D, SUN X L, et al. Research on anti-cancer and anti-tumor molecular mechanism of perilla seed based on network pharmacology and molecular docking[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2021, 29(6): 219-230.

基于网络药理学和分子对接探讨 紫苏籽抗癌抗肿瘤的分子机制

郭旭^{1,2}, 张东², 孙晓丽¹, 田荣荣¹✉

(1. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100094;

2. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037)

摘要: 采用网络药理学和分子对接的方法对紫苏籽成分、靶点、通路与癌症肿瘤的治疗进行系统研究。借助 TCMSP、Genecards、Uniprot 数据库收集紫苏籽成分、靶点以及癌症和肿瘤的靶点, 使用 Cytoscape 软件构建紫苏籽成分、靶点与癌症肿瘤之间的网络图; 通过 STRING 数据库进行蛋白互作网络分析, 并借助 DAVID 平台进行 GO 功能和 KEGG 富集, 采用 Auto Dock 将紫苏籽的活性成分和抗癌抗肿瘤靶点进行分子对接。结果表明: 共筛选出紫苏籽抗癌抗肿瘤作用的靶点 72 个, 对应 17 种有效成分。KEGG 信号通路涉及的癌种包括膀胱癌、甲状腺癌、胰腺癌等。分子对接结果显示木犀草素和 TP53 对接活性最好。结论: 该研究通过构建紫苏籽成分—靶点—疾病网络, 挖掘紫苏籽抗癌抗肿瘤的关键靶点, 并模拟靶点蛋白和活性成分的分子对接, 为紫苏籽在临床应用及机制研究等方面提供了方向和思路。

关键词: 紫苏籽; 网络药理学; 分子对接; 抗癌; 抗肿瘤

中图分类号: TS201.4; R285 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2021)06-0219-12

Research on Anti-cancer and Anti-tumor Molecular Mechanism of Perilla Seed Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

GUO Xu^{1,2}, ZHANG Dong², SUN Xiao-li¹, TIAN Rong-rong¹✉

(1. Department of Biomedicine, Beijing City University, Beijing 100094, China;

2. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China)

Abstract: Network pharmacology and molecular docking methods are used to systematically study the components, targets, pathways and cancer treatment of perilla seeds. With the help of TCMSP, Genecards, and Uniprot databases, the components of perilla seeds, targets, and cancer and tumor targets are collected. Cytoscape software is used to construct a network diagram for the components of perilla seeds, targets, and cancer tumors. The protein is performed through the STRING database interaction network analysis, GO function and KEGG enrichment with the help of DAVID platform. Auto Dock is used to molecularly dock the active ingredients of perilla seeds with anti-cancer and anti-tumor targets. There are 72 targets in total for

收稿日期: 2021-05-02

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (21808004)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21808004)

作者简介: 郭旭, 女, 1997 年出生, 在读研究生, 研究方向为药食资源研究与开发。E-mail: 739825865@qq.com.

通讯作者: 田荣荣, 女, 1982 年出生, 博士, 副教授, 研究方向为药食同源食品的开发及质量控制。E-mail: 576407747@qq.com.

the anti-cancer and anti-tumor effects of perilla seeds screened, corresponding to 17 effective ingredients. The cancer types involved include bladder cancer, thyroid cancer, pancreatic cancer, etc., among which luteolin and TP53 have the best docking activity. This study builds a network of components-target-disease of perilla seeds, explores the key targets of perilla seeds' anti-cancer and anti-tumor effects, simulates the molecular docking of target proteins and active ingredients, and provides guidance to the clinical application and application of perilla seeds.

Key words: perilla seed; network pharmacology; molecular docking; anti-cancer; anti-tumor

近年来,癌症已成了威胁全世界人类的常见疾病,患病率和死亡率居高不下。在中国,每 10 分钟就有 55 人死于癌症;全球约有 50% 的胃癌、肝癌和食道癌病例来自中国^[1]。因此,制定新的癌症防治策略迫在眉睫。紫苏籽是为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* (L.) Britt. 的干燥成熟果实,始载于《名医别录》^[2],在药食同源的植物资源中有很高的地位,作为中药和功能性食品在全世界广泛使用。药典中记载,紫苏籽可降气化痰,止咳平喘,润肠通便,具有抗动脉粥样硬化^[3-4]、改善学习和记忆力^[5]、改善视觉功能^[6]、抗老年痴呆^[7-8]、抗菌抗炎^[9-10]、抗癌抗肿瘤^[11-14]的功效。

传统的药物研发一直遵循着一种药物—一个靶点—一种疾病的模式,无疑这种模式局限了研制药物的思路,实际上临床上许多疾病都是多基因多靶点的,治疗起来十分的复杂,这时网络药理学应运而生。网络药理学是以系统生物学和多学科药理学为基础,提供了一种“多靶点、多效应、复杂疾病”的新型网络模式^[15],中医药本身也遵循着整体观和辨证论治,这与网络药理学不谋而合,近年来,基于网络药理学对中药的研究越来越多,也取得了较好的成效^[16]。分子对接是应用计算机模拟配体和受体的结合,通过结合能的大小来判断二者结合的可能性,通过可视化软件判断结合方式和位置,预测药物和靶点蛋白相互作用的概率,现在多用于新药的研发,为繁多的实验节省时间^[17]。目前对于紫苏籽的研究多集中在功能性食品的开发上,对于其治疗疾病的作用机制和靶点的研究较少,本研究借助网络药理学和分子对接的方法,对紫苏籽发挥作用的靶点和通路进行预测,希望可以对未来紫苏籽进一步研究提供思路 and 方向。

1 材料与方法

1.1 紫苏籽的活性成分及靶点收集

通过查阅文献^[18-21]并且利用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)收集紫苏籽的活性成分,获得其口服生物利用度(oral bioavailability, OB)、类药性(drug-likeness, DL)和小肠上皮细胞渗透率(Caco-2 permeability)值及各活性成分对应靶点,汇集靶点,并通过 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org/>)将药物靶点的蛋白名称转换成 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)的基因名称。

1.2 癌症/肿瘤相关靶点的搜集

从人类基因数据库(Gene-Cards, <https://www.genecards.org/>)中收集与关键词“cancer”和“tumor”相关的靶点,使用 Venn 在线软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)将活性成分靶点—癌症和肿瘤相关靶点取交集,获得紫苏籽的潜在抗癌和抗肿瘤靶点。

1.3 活性成分—疾病靶点网络构建及可视化分析

将交集靶点导入 Cytoscape3.7.2 软件,建立药物—活性成分—靶点—疾病网络图。图中节点(node)代表紫苏籽、活性成分、靶点、疾病,边(edge)分别代表活性成分和靶点或靶点和疾病的交互作用。

1.4 蛋白互作网络(PPI网络)的构建

将筛选得到的潜在抗癌和抗肿瘤靶点导入 String(<https://string-db.org>, version 11.0)在线平台数据库,以研究靶蛋白相互作用,设置物种为“Homo sapiens”,构建蛋白质—蛋白质相互作用网络(PPI网络)。

1.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

采用 DAVID6.8 数据库(<https://david.ncifcrf>。

gov/), 对紫苏籽潜在抗癌和抗肿瘤靶点进行 GO 功能分析, 以了解靶点的生物学过程, KEGG 通路分析研究药物靶点主要信号通路, DAVID 平台列表与背景均设置为 “Homo sapiens”, GO 富集分析选择生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组成 (cellular component, CC) 3 个模块, 通路分析选择 KEGG。

1.6 成分-靶点分子对接

利用 Auto Dock 软件进行分子对接, Pymol 进行分子对接可视化分析。在紫苏籽抗癌抗肿瘤靶点的 PPI 网络图中选取核心靶点与紫苏籽活性成分进行分子对接, 借助 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 找出靶点蛋白的晶体结构, 靶点 AKT1 (PDB ID:6NPZ)、TP53 (PDB ID:3D06)、MAPK1 (PDB ID:4ZZN)。所有受体文件均做删除原配体、水分子及加氢加电荷处理, 配体分子为紫苏籽活性成分, 将整理好的靶点蛋白 3D 结构和对应化合物的结构导入 Auto Dock 进行分子对接。目前尚无明确的活性成分靶点选择的唯一标准, 一般认为结合能 <0 就有自发结合的可能, 结合能 >0 结合时可能需要外界力量促使其结合, 结合能越低结合的可能就越大^[22], 将所得结果使

用 Pymol 进行可视化处理, 得到核心靶点蛋白和对应化合物的相互作用关系图。

2 结果与分析

2.1 紫苏籽活性成分及靶点的筛选

口服利用度 (OB) 和类药性 (DL) 是药物活性成分筛选常用指标, 通过 TCMSP 数据库, 获得紫苏籽的化学成分 87 个, 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件进行筛选, 共筛选得紫苏籽的活性成分 17 种, 为脂肪酸及其油脂伴随物。利用中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP) 检索到紫苏籽主要活性成分的对应该靶点, 总计 883 个, 删除重复项, 共获得 288 个活性成分靶点。紫苏籽主要活性成分信息见表 1。

2.2 紫苏籽活性成分抗癌和抗肿瘤靶点收集

在 GeneCards 数据库中输入关键词 “cancer” 和 “tumor” 进行疾病靶点搜索, 以 $score \geq 20$ 进行筛选, 得到 1 646 个。利用 Venn 在线软件将紫苏籽活性成分对应的 107 个药物靶点 (删除未找到基因名称的靶点) 与癌症及肿瘤相关的 1 646 个疾病靶点取交集, 通过 Venn 图 (如图 1) 的形式得到 72 个紫苏籽潜在抗癌和抗肿瘤靶点 (见表 2)。

表 1 紫苏籽主要活性成分及其参数

Table 1 Main active ingredients and parameters of perilla seeds

MOLID	Ingretient	OB/%	Caco-2	DL
MOL012888	citrostadienol 枸橼固二烯醇	43.28	1.41	0.79
MOL012891	(2E,4E,6E)-icosa-2,4,6-trienoic acid (2E,4E,6E)-二十碳-2,4,6-三烯酸	41.64	1.23	0.20
MOL012893	(E)-(4-methylbenzylidene)-(4-phenyltriazol-1-yl)amine (E)-(4-甲基苄基-(4-苯基三唑-1-基)胺	57.87	1.04	0.19
MOL012896	Phthalic acid, butyl isohexyl ester 邻苯二甲酸,丁基异己酯	45.52	0.77	0.18
MOL000449	Stigmasterol 甾甾醇	43.83	1.44	0.76
MOL001439	arachidonic acid 花生四烯酸	45.57	1.20	0.20
MOL002773	beta-carotene β -胡萝卜素	37.18	2.25	0.58
MOL000358	beta-sitosterol β -谷甾醇	36.91	1.32	0.75
MOL004355	Spinasterol 菠菜甾醇	42.98	1.44	0.76
MOL005030	gondoic acid 巨头鲸鱼酸	30.70	1.20	0.20
MOL005043	campest-5-en-3beta-ol 菜油甾醇	37.58	1.32	0.71
MOL005481	2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene 2,6,10,14,18-五甲基二十碳-2,6,10,14,18-五烯	33.40	1.94	0.24
MOL000006	Luteolin 木犀草素	36.16	0.19	0.25
MOL007449	24-methylidenelophenol 24-亚甲基苯酚	44.19	1.41	0.75
MOL000953	CLR	37.87	1.43	0.68
MOL009653	Cycloeucaenol 环桉烯醇	39.73	1.42	0.79
MOL009681	Obtusifoliol 钝叶甾醇	42.55	1.47	0.76

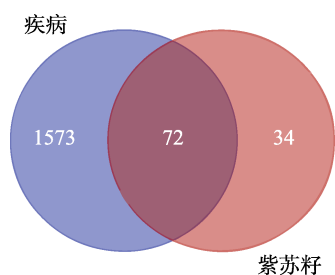


图 1 药物靶点与疾病靶点关系图

Fig.1 The relationship between drug targets and disease targets

2.3 紫苏籽活性成分-抗癌和抗肿瘤靶点网络构建

利用 Cytoscape 3.7.2 软件建立药物-活性成分-靶点-疾病的可视化网络图 (图 2), 共有 118 个节点、126 条边, 其中三角形蓝色节点代表紫苏籽, 11 个紫色圆形节点代表紫苏籽的活性成分, 72 个浅蓝色菱形节点代表癌症和肿瘤靶点, 粉色方形节点代表癌症和肿瘤, 126 条边代表节点之间的相互作用。节点的颜色和大小表示该靶点重

表 2 紫苏籽潜在抗癌和抗肿瘤靶点信息

Table 2 Information on potential anti-cancer and anti-tumor targets of perilla seeds

Number	GC id	Targets	Official full names
1	GC16P055390	MMP2	Matrix Metalloproteinase 2
2	GC16P055656	SLC6A2	Solute Carrier Family 6 Member 2
3	GC10P073909	PLAU	Plasminogen Activator, Urokinase
4	GC05P069167	CCNB1	Cyclin B1
5	GC17M030194	SLC6A4	Solute Carrier Family 6 Member 4
6	GC07P116672	MET	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
7	GC06P121436	GJA1	Gap Junction Protein Alpha 1
8	GC09P134317	RXRA	Retinoid X Receptor Alpha
9	GC17P078214	BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
10	GC07M095297	PON1	Paraoxonase 1
11	GC18M063123	BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator
12	GC02P201233	CASP8	Caspase 8
13	GC03P012287	PPARG	Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma
14	GC11P067583	GSTP1	Glutathione S-Transferase Pi 1
15	GC06P047305	TNF	Tumor Necrosis Factor
16	GC20M005114	PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
17	GC0XP123859	XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
18	GC01M186640	PTGS2	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 2
19	GC03P041236	CTNNB1	Catenin Beta 1
20	GC04M099336	ADH1C	Alcohol Dehydrogenase 1C (Class I), Gamma Polypeptide
21	GC11P069641	CCND1	Cyclin D1
22	GC12M057743	CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
23	GC10P113679	CASP7	Caspase 7
24	GC05P148825	ADRB2	Adrenoceptor Beta 2
25	GC06P043770	VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
26	GC19M041301	TGFB1	Transforming Growth Factor Beta 1
27	GC08P127735	MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
28	GC01M150707	MCL1	MCL1 Apoptosis Regulator, BCL2 Family Member
29	GC11M102810	MMP1	Matrix Metalloproteinase 1
30	GC07P022765	IL6	Interleukin 6
31	GC04M184627	CASP3	Caspase 3
32	GC04M148078	NR3C2	Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2
33	GC22P035380	HMOX1	Heme Oxygenase 1
34	GC01M206767	IL10	Interleukin 10
35	GC22M021754	MAPK1	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
36	GC07P106865	PIK3CG	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Gamma

续表 2

Number	GC id	Targets	Official full names
37	GC12P068808	MDM2	MDM2 Proto-Oncogene
38	GC07P055019	EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
39	GC04M122451	IL2	Interleukin 2
40	GC17P039687	ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
41	GC12M068064	IFNG	Interferon Gamma
42	GC05P132673	IL4	Interleukin 4
43	GC17M040388	TOP2A	DNA Topoisomerase II Alpha
44	GC19P010270	ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1
45	GC07P116524	CAV1	Caveolin 1
46	GC20M031664	BCL2L1	BCL2 Like 1
47	GC02P024492	NCOA1	Nuclear Receptor Coactivator 1
48	GC11M065653	RELA	RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit
49	GC13P048303	RB1	RB Transcriptional Corepressor 1
50	GC11M100943	PGR	Progesterone Receptor
51	GC11P089177	TYR	Tyrosinase
52	GC17M007661	TP53	Tumor Protein P53
53	GC19M007112	INSR	Insulin Receptor
54	GC01M015491	CASP9	Caspase 9
55	GC06P047460	CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
56	GC08M070109	NCOA2	Nuclear Receptor Coactivator 2
57	GC14M104769	AKT1	AKT Serine/Threonine Kinase 1
58	GC14M035401	NFKBIA	NFKB Inhibitor Alpha
59	GC09P122370	PTGS1	Prostaglandin-Endoperoxide Synthase 1
60	GC01M094530	F3	Coagulation Factor III, Tissue Factor
61	GC01M058780	JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
62	GC0XP067544	AR	Androgen Receptor
63	GC19P048954	BAX	BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator
64	GC17P066302	PRKCA	Protein Kinase C Alpha
65	GC0XP136649	CD40LG	CD40 Ligand
66	GC07M099759	CYP3A4	Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4
67	GC03M038549	SCN5A	Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 5
68	GC21M025880	APP	Amyloid Beta Precursor Protein
69	GC05M001392	SLC6A3	Solute Carrier Family 6 Member 3
70	GC07P144938	PRSS1	Serine Protease 1
71	GC20P046008	MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
72	GC20P041028	TOP1	DNA Topoisomerase I

要性, 节点越大颜色越深说明该节点越重要。该网络中化合物的平均度值为 2.14, 由高到低依次为木犀草素 (degree=43)、 β -胡萝卜素 (degree=21)、豆甾醇 (degree=18)、 β -谷甾醇 (degree=17)、邻苯二甲酸丁基异己酯 (degree=9)、(E)-(4-甲基亚苄基-(4-苯基三唑-1-基)胺 (degree=6)、巨头鲸鱼酸 (degree=3)、24-亚甲基苯酚 (degree=3)、钝叶甾醇 (degree=3)、枸橼固二烯醇 (degree=3)。由图可知, 木犀草素作用于 MET、ADCY2、NUF2、

PTGES、CD40LG、INSR、SLC2A4、XIAP、GSTP1、TOP2A、IL4、IFNG、TYR 等 41 个靶点; β -胡萝卜素作用于 MMP10、GJA1、F3、CASP7、MYC、CTNNB1、CAV1、CYP1A2、CYP3A4、HMOX1、MMP1、CASP8 等 19 个靶点; β -谷甾醇作用于 MAP2、PON1、TGFB1、PRKCA、BAX、OPRM1、SLC6A4、CHRNA2、GABRA5、PDE3A、CHRM4、GABRA2 等 15 个靶点; 豆甾醇作用于 CHRNA7、GABRA1、ADRA1B、GABRA3、HTR2A、ADRB1、

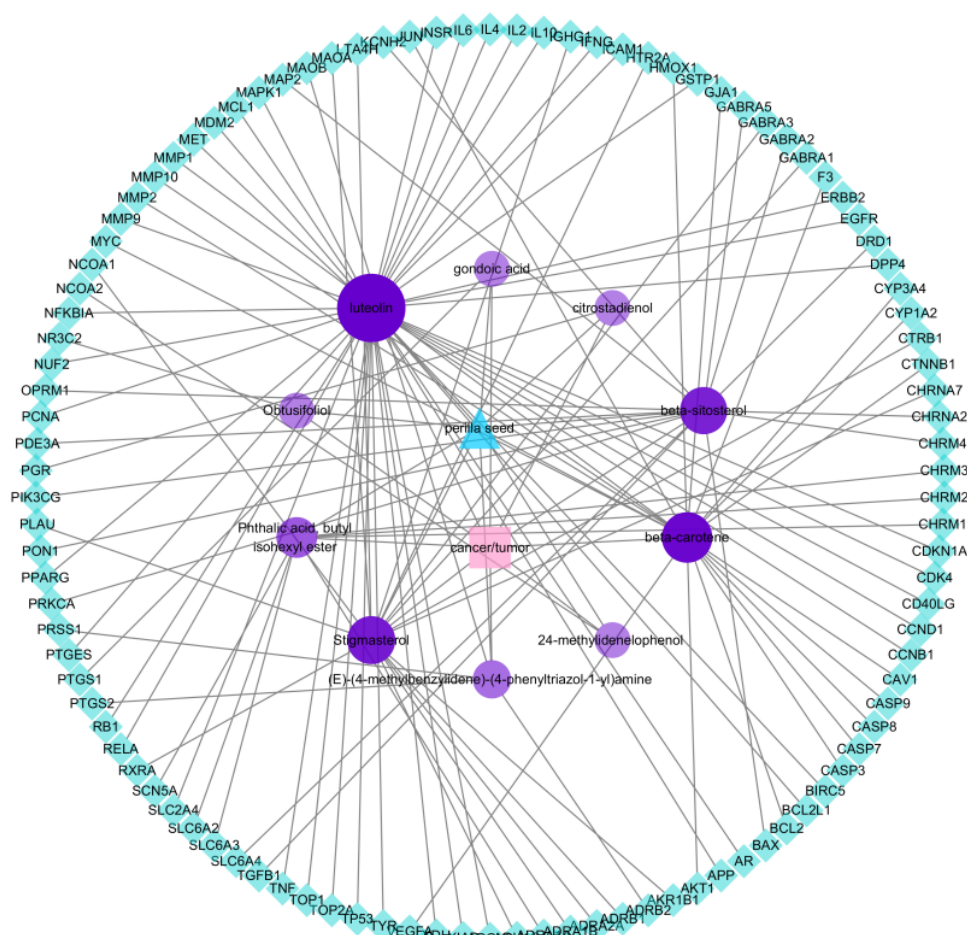


图 2 紫苏籽活性成分-抗癌和抗肿瘤靶点网络

Fig.2 Perilla seed active ingredients-anti-cancer and anti-tumor target network

CTRB1、MAOA、LTA4H 等 16 个靶点。靶点最多的成分是木犀草素。

2.4 蛋白质相互作用网络构建

应用 STRING 在线平台对紫苏籽的 72 个潜在抗癌和抗肿瘤靶点进行 PPI 蛋白互作网络分析，设置物种为“Homo sapiens”（人类），将蛋白相互作用评分置信度设置为 0.900，隐藏离散的靶点，获得 PPI 网络图（如图 3）。该网络中包含 72 个节点，241 条边，平均节点度为 6.69。根据节点度值大小，关键靶点依次有肿瘤抑制蛋白 p53（TP53）、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（AKT1）、丝裂原激活的蛋白激酶 1（MAPK1）、禽肉瘤病毒 17 的转化基因（JUN）、肿瘤坏死因子（TNF）、转录因子 p65（RELA）、白介素 6（IL6）、血管内皮生长因子 A（VEGFA）、Myc 原癌基因蛋白（MYC）、G1/S-特异性周期蛋白-D1（CCND1）、半胱天冬酶 3（CASP3）、人连环蛋白 β 1（CTNNB1）、视网膜母细胞瘤蛋白 1 多克

隆抗体（RB1）、半胱氨酸蛋白酶 8（CASP8）、细胞周期素依赖性激酶抑制因子 1A（CDKN1A）、表皮生长因子（EGFR）这些靶蛋白在 PPI 网络中具有重要地位，与其他多个靶点相连，可能与紫苏籽发挥抗癌和抗肿瘤作用关系密切。

2.5 GO 功能富集分析

将紫苏籽 72 个潜在抗癌和抗肿瘤靶点进行 GO 富集分析（见图 4），获得 607 条生物学过程条目，其中 $P < 0.05$ 的生物学过程有 330 条，富集的前 30 个生物学功能依次为对药物的反应（23 个靶点）、凋亡过程的负调控（22 个靶点）、从 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控（27 个靶点）、对雌二醇的反应（12 个靶点）、肝再生（8 个靶点）、在没有配体的情况下的外在凋亡信号通路（8 个靶点）、一氧化氮生物合成过程的正调控（8 个靶点）、积极调控细胞增殖（16 个靶点）、基因表达的正调控（13 个靶点）、对有毒物质的反应（9 个靶点）、酶结合（24 个靶点）、相同的蛋白质结合

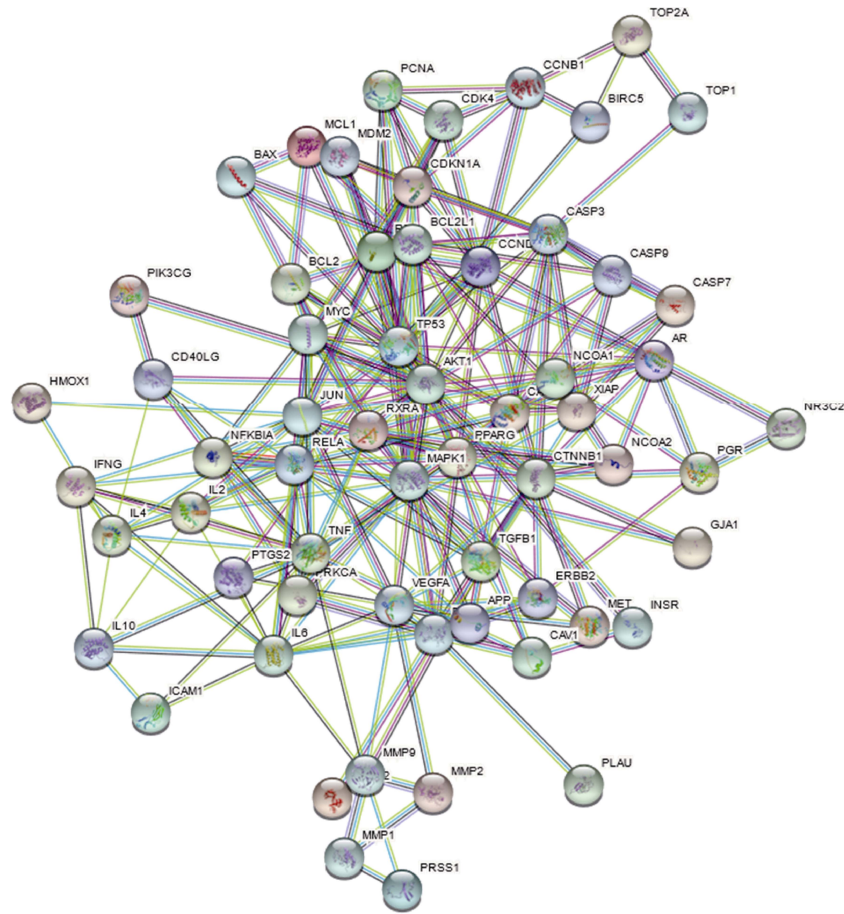


图 3 紫苏籽潜在抗癌和抗肿瘤靶点的 PPI 网络

Fig.3 PPI Network of potential anti-cancer and anti-tumor targets of perilla seed

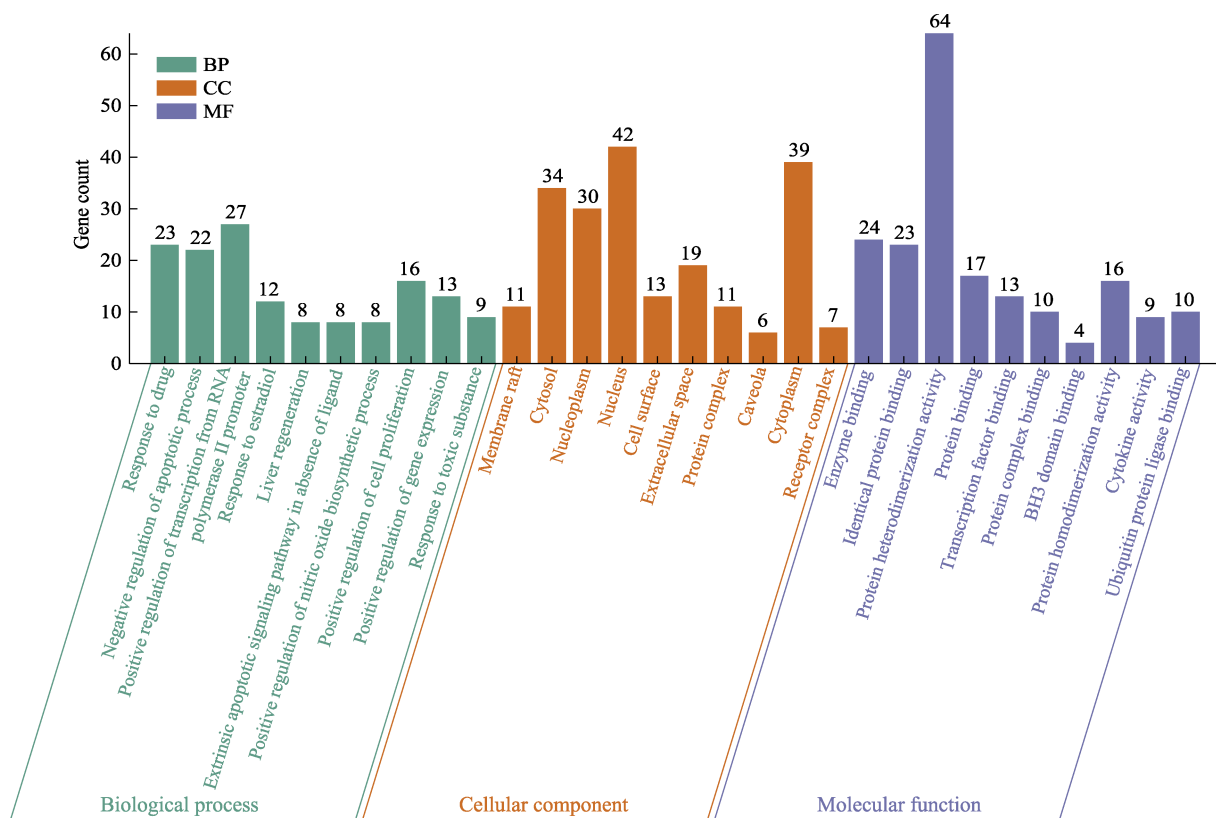


图 4 紫苏籽潜在抗癌和抗肿瘤靶点 GO 功能富集结果柱形图

Fig.4 Bar graph of GO enrichment results of potential anti-cancer and anti-tumor targets of perilla seed

(23 个靶点)、蛋白质结合 (64 个靶点)、蛋白质异二聚活性 (17 个靶点)、转录因子结合 (13 个靶点)、蛋白质复合物结合 (10 个靶点)、BH3 域结合 (4 个靶点)、蛋白质均二聚活性 (16 个靶点)、细胞因子活性 (9 个靶点)、泛素蛋白连接酶结合 (10 个靶点)、膜筏 (11 个靶点)、胞质溶胶 (34 个靶点)、核质 (30 个靶点)、核 (42 个靶点)、细胞表面 (13 个靶点)、细胞外空间 (19 个靶点)、蛋白质复合物 (11 个靶点)、小窝 (6 个靶点)、细胞质 (39 个靶点)、受体复合体 (7 个靶点)。

2.6 KEGG 信号通路分析

对紫苏籽 72 个潜在抗癌和抗肿瘤靶点进行 KEGG 通路注释分析, 获得 108 条信号通路条目, 其中 $P < 0.05$ 的通路有 102 条, 富集的前 20 条通路分析结果见表 3, 包括膀胱癌 (Bladder cancer)、甲状腺癌 (Thyroid cancer)、胰腺癌 (Pancreatic cancer)、子宫内膜癌 (Endometrial cancer)、前列腺癌 (Prostate cancer)、小细胞肺

癌 (Small cell lung cancer)、大肠癌 (Colorectal cancer)、胃癌 (Gastric cancer)、乳腺癌 (Breast cancer) 等通路, KEGG 富集分析可视化图见图 5, 其中 Rich Factor (富集因子) 数值越大代表富集程度越大; P value 经过多重校验的 P 值, 用绿色-红色表示, 颜色越红代表 P 值越小, 说明富集越明显。

$$\text{富集因子} = \frac{\text{该信号通路下的差异表达基因数}}{\text{位于该信号通路下的所有注释基因数}}$$

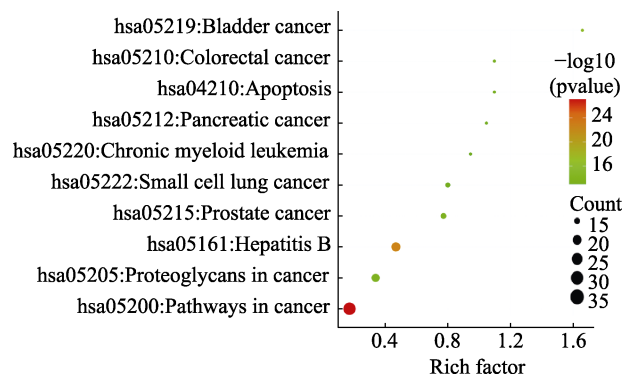


图 5 KEGG 富集分析可视化图

Fig.5 Visualization of KEGG enrichment analysis

表 3 紫苏籽抗癌和抗肿瘤靶点的 KEGG 通路富集

Table 3 Enrichment of KEGG pathway for anti-cancer and anti-tumor targets of perilla seeds

Term	Count	P-Value	Genes
hsa05200:Pathways in cancer	37	8.36E-28	RB1, CDKN1A, GSTP1, XIAP, PTGS2, RELA, EGFR, PIK3CG, CASP9, CASP8, RXRA, CCND1, MYC, CASP3, ERBB2, AKT1, MAPK1, JUN, TGFB1, MMP1, MMP2, PRKCA, MMP9, VEGFA, NFKBIA, AR, IL6, CDK4, BCL2, MDM2, BAX, BIRC5, CTNNB1, PPARG, MET, TP53, BCL2L1
hsa05161:Hepatitis B	24	1.11E-22	RB1, CDKN1A, JUN, TGFB1, PCNA, PRKCA, TNF, MMP9, PIK3CG, RELA, CASP9, NFKBIA, IL6, CASP8, CCND1, CDK4, MYC, CASP3, BCL2, BAX, BIRC5, AKT1, MAPK1, TP53
hsa05219:Bladder cancer	14	2.92E-17	RB1, CDKN1A, MMP1, MMP2, MMP9, EGFR, VEGFA, CCND1, CDK4, MYC, ERBB2, MDM2, MAPK1, TP53
hsa05205:Proteoglycans in cancer	21	1.3E-15	CDKN1A, TGFB1, MMP2, CAV1, PRKCA, TNF, MMP9, EGFR, PIK3CG, VEGFA, CCND1, PLAUI, MYC, CASP3, ERBB2, MDM2, AKT1, MAPK1, CTNNB1, MET, TP53
hsa05215:Prostate cancer	16	2.39E-15	RB1, CDKN1A, EGFR, PIK3CG, RELA, CASP9, NFKBIA, AR, CCND1, ERBB2, MDM2, BCL2, AKT1, MAPK1, CTNNB1, TP53
hsa05210:Colorectal cancer	14	1.2E-14	JUN, TGFB1, PIK3CG, CASP9, CCND1, MYC, CASP3, BCL2, BAX, BIRC5, AKT1, MAPK1, CTNNB1, TP53
hsa04210:Apoptosis	14	1.2E-14	XIAP, TNF, PIK3CG, RELA, CASP9, NFKBIA, CASP7, CASP8, CASP3, BCL2, BAX, AKT1, TP53, BCL2L1
hsa05212:Pancreatic cancer	14	2.32E-14	RB1, TGFB1, EGFR, PIK3CG, RELA, VEGFA, CASP9, CCND1, CDK4, ERBB2, AKT1, MAPK1, TP53, BCL2L1
hsa05222:Small cell lung cancer	15	3.69E-14	RB1, XIAP, PTGS2, PIK3CG, RELA, CASP9, NFKBIA, RXRA, CCND1, CDK4, MYC, BCL2, AKT1, TP53, BCL2L1
hsa05220:Chronic myeloid leukemia	14	9.51E-14	RB1, CDKN1A, TGFB1, PIK3CG, RELA, NFKBIA, CCND1, CDK4, MYC, MDM2, AKT1, MAPK1, TP53, BCL2L1
hsa05166:HTLV-I infection	21	1.3E-13	RB1, CDKN1A, JUN, TGFB1, PCNA, XIAP, TNF, IL2, PIK3CG, RELA, ICAM1, NFKBIA, IL6, CCND1, CDK4, MYC, BAX, AKT1, CTNNB1, TP53, BCL2L1
hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	23	4.52E-13	CDKN1A, INSR, PRKCA, EGFR, IL2, PIK3CG, RELA, VEGFA, CASP9, IL4, IL6, RXRA, CCND1, CDK4, MYC, MDM2, BCL2, AKT1, MAPK1, MET, TP53, MCL1, BCL2L1

续表 3

Term	Count	P-Value	Genes
hsa05145:Toxoplasmosis	15	1.49E-12	IL10, TGFB1, XIAP, TNF, RELA, CASP9, NFKBIA, CASP8, CD40LG, IFNG, CASP3, BCL2, AKT1, MAPK1, BCL2L1
hsa05223:Non-small cell lung cancer	12	3.36E-12	RB1, CASP9, RXRA, CCND1, CDK4, ERBB2, MAPK1, AKT1, PRKCA, TP53, EGFR, PIK3CG
hsa04066:HIF-1 signaling pathway	14	4.53E-12	CDKN1A, INSR, PRKCA, EGFR, PIK3CG, RELA, VEGFA, IL6, IFNG, ERBB2, BCL2, AKT1, HMOX1, MAPK1
hsa04668:TNF signaling pathway	14	1.88E-11	JUN, PTGS2, TNF, MMP9, PIK3CG, RELA, ICAM1, NFKBIA, CASP7, IL6, CASP8, CASP3, AKT1, MAPK1
hsa04660:T cell receptor signaling pathway	13	1.41E-10	IL10, JUN, TNF, IL2, PIK3CG, RELA, IL4, NFKBIA, CD40LG, IFNG, CDK4, AKT1, MAPK1
hsa05142:Chagas disease (American trypanosomiasis)	13	2.25E-10	IL10, JUN, TGFB1, TNF, IL2, PIK3CG, RELA, NFKBIA, IL6, CASP8, IFNG, AKT1, MAPK1
hsa05214:Glioma	11	4.5E-10	RB1, CDKN1A, CCND1, CDK4, MDM2, MAPK1, AKT1, PRKCA, TP53, EGFR, PIK3CG
hsa04919:Thyroid hormone signaling pathway	13	7.39E-10	NCOA1, NCOA2, PRKCA, PIK3CG, CASP9, RXRA, CCND1, MYC, MDM2, AKT1, MAPK1, CTNNB1, TP53

2.7 分子对接结果

由表 4 可知,三个靶蛋白与紫苏籽的三种活性成分木犀草素、豆甾醇和 β -胡萝卜素的结合能均小于 -5 KJ/mol, 以上靶点和活性成分均可自发结合且结合的可能性较高。分子对接的结果还要参考结合常数 K_i 和氢键个数来判断最终结合的

概率,一般来说,结合常数 K_i 越小越好,氢键个数越多越好。因此对接活性最好的是木犀草素和 TP53, 二者的对接模型见图 6。

3 讨论与结论

紫苏籽是我国宝贵的药食同源资源之一,其中含有花生四烯酸、木犀草素、 β -谷甾醇、豆甾

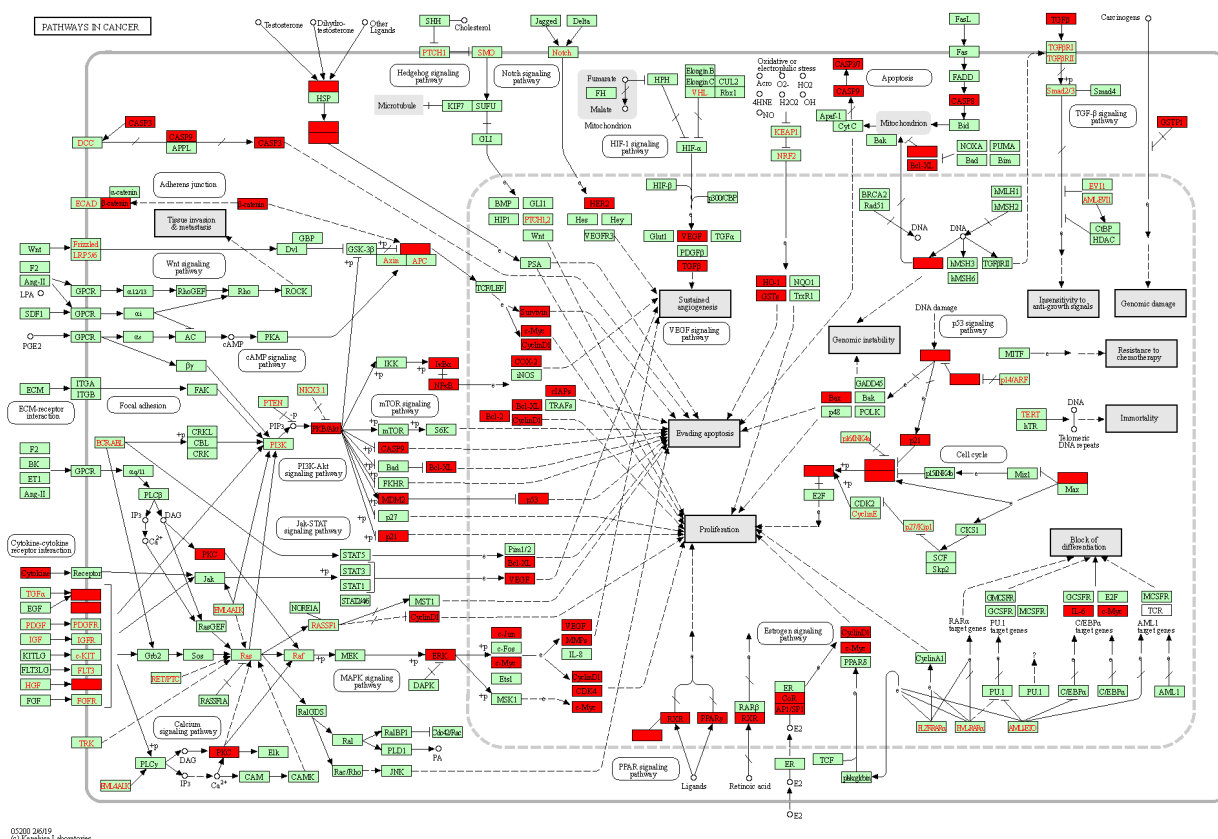


图 6 紫苏籽抗癌的有效靶点在癌症通路中的富集分析

Fig.6 Enrichment analysis of effective anti-cancer targets of perilla seeds in cancer pathways

注:红色为紫苏籽抗癌的核心靶点;绿色为除核心靶点以外的预测靶点。

Note: Red is the core target of perilla seed anti-cancer; green is the predicted target except the core target.

表 4 紫苏籽活性成分与抗癌抗肿瘤潜在
作用靶点的分子对接结果

Table 4 Results of molecular docking between active
components of perilla seeds and potential
anti-cancer and anti-tumor targets

配体-受体	结合 常数 Ki	氢键 个数/个	结合能 (KJ/mol)
木犀草素 Luteolin-AKT1	17.43 mM	2	-10.04
木犀草素 Luteolin-MAPK1	1.75 mM	3	-15.73
木犀草素 Luteolin-TP53	0.99 mM	3	-17.15
豆甾醇 Stigmasterol-AKT1	7.12 mM	1	-12.26
豆甾醇 Stigmasterol-MAPK1	2.13 mM	2	-15.23
豆甾醇 Stigmasterol-TP53	0.18 mM	0	-21.42
β -胡萝卜素 Betacarotene-AKT1	0.99 mM	0	-17.15
β -胡萝卜素 Betacarotene-MAPK1	9.43 mM	0	-11.55
β -胡萝卜素 Betacarotene-TP53	0.05 mM	0	-24.48

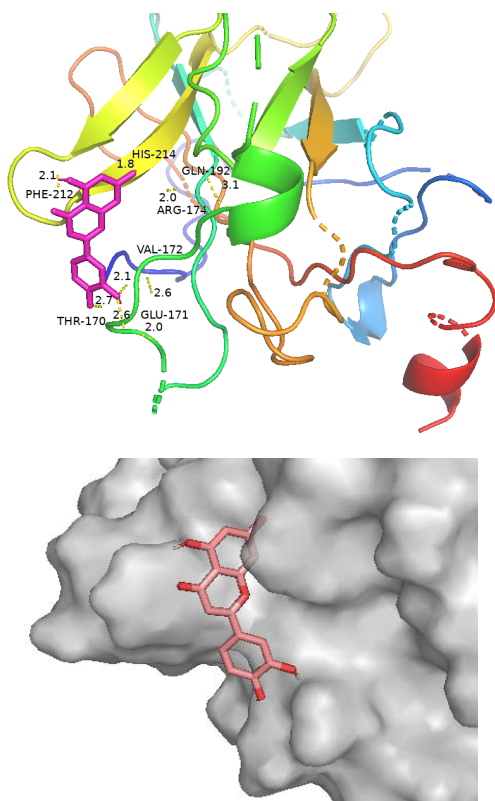


图 7 TP53 与木犀草素分子对接模型

Fig.7 Molecular docking model of TP53 and luteolin

醇、类胡萝卜素等多种丰富的活性成分，这些成分在人体中能够发挥多重作用，达到防病治病的效果。有关研究结果显示，从先天的遗传突变，

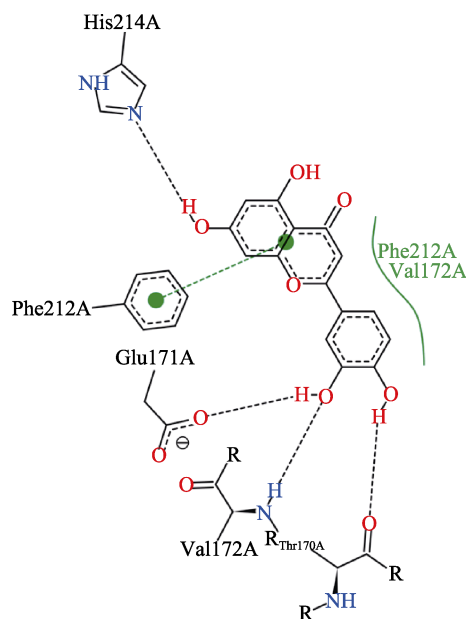


图 8 TP53 与木犀草素分子对接 2D 模式图

Fig.8 2D model diagram of TP53 and luteolin
target-molecular docking

激素影响到日常生活中的烟草，饮食，辐射等都是诱发癌症的因素之一^[23]。其中日常的饮食中摄入脂肪的含量和种类是与患癌风险有一定相关性的，这提示我们可以从饮食方面预防癌症，干预癌症的治疗。紫苏籽的提取物有一定的抗癌抗肿瘤作用，但是其主要活性成分和作用机制尚未得到验证。通过网络分析，获得紫苏籽 17 种主要活性成分，72 个抗癌抗肿瘤靶点，其中木犀草素、 β -谷甾醇、豆甾醇、类胡萝卜素与靶点、通路的关联度最高，在紫苏籽活性成分-抗癌抗肿瘤靶点网络中与众多疾病靶点互相连接，由此可知，这些成分是紫苏籽抗癌抗肿瘤的重要基础。通过 PPI 蛋白网络分析可视化我们可以看到与紫苏籽对癌症肿瘤发挥作用的关键靶点分别为：AKT1、TP53、MAPK1、JUN、TNF、RELA、IL6、VEGFA、CASP3、CTNNB1、CCND1、MYC 等，参考查阅文献可知，AKT1^[24-25]是与乳腺癌相关的靶点；TP53^[26]是与乳腺癌、肺癌、脑瘤和肾上腺皮质癌相关的靶点；MAPK1 是与宫颈癌^[27]、胃癌^[28]、胰腺癌^[29]等相关的靶点。

通过分子对接，我们发现木犀草素与 TP53 的对接活性最好，自发结合的可能性最大。紫苏籽中的木犀草素属于黄酮类物质，研究表明，黄酮类成分对高血压、炎症、过敏症、癌症等有一定的预防和治疗作用。其中的抗癌特性与细胞活

力下降、细胞周期停滞、细胞凋亡的诱导、转移和抑制肿瘤血管的生成有关^[30]。木犀草素能够抑制很多类型的癌细胞的增殖。例如,木犀草素能够阻滞人类胃癌和前列腺癌以及黑色素瘤细胞的 G1 期细胞周期;木犀草素诱导黑色素瘤细胞 G1 期阻滞与抑制 CDK2 活性有关等。Chian 等分别给予生理盐水、单纯顺铂、单纯木犀草素或顺铂+木犀草素联合治疗小鼠非小细胞肺癌,发现木犀草素能抑制无胸腺裸鼠皮下生长的非小细胞肺癌细胞系 A549 细胞的异种移植肿瘤的生长^[31];木犀草素可以结合和抑制 DNA 拓扑异构酶 I 和 II,这两种酶是修复受损 DNA 所必需的,并直接嵌入底物 DNA,导致 DNA 双链断裂。木犀草素的这一作用通过 p53 介导的 p21/waf1 表达诱导细胞周期停滞^[32],另外 Kang 等^[33]发现木犀草素可以增加 Nrf2 和 p53 之间的相互作用,增加了抗氧化酶和凋亡相关蛋白的表达,进而使得木犀草素有很好的抗结肠癌效果。文献中的信息与网络药理学 KEGG 信号通路分析所得的结果保持一致。

本研究采用网络药理学和分子对接的方法初步分析了紫苏籽对癌症和肿瘤的治疗作用,预测了紫苏籽抗癌抗肿瘤的潜在靶点以及相关的信号通路和生物过程,揭示了紫苏籽抗癌抗肿瘤是多成分、多靶点、多通路共同作用的结果。中药网络药理学是古代中医药和现代药物发展领域在网络、药理学、生物学以及计算机之间的跨学科领域的发展与融合,通过数据库中大量的数据整合与计算预测,通过网络可视化挖掘出紫苏籽的主要活性成分、抗癌抗肿瘤作用靶点和通路,为紫苏籽的抗癌抗肿瘤研究提供理论依据。本研究对紫苏籽抗癌抗肿瘤的作用机制及未来的实验验证提供了理论依据,以期对后期的药物开发和临床应用提供参考。

参考文献:

- [1] 《健康中国行动(2019-2030)》[J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(36): 5905.
《Healthy China Action (2019-2030)》[J]. Chinese Tissue Engineering Research, 2020, 24(36): 5905.
- [2] 蔡乾蓉, 吴卫, 郑有良, 等. 紫苏属籽粒含油率及其脂肪酸分析[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(8): 84-87.
CAI Q R, WU W, ZHENG Y L, et al. Seed oil content and fatty acid composition of perilla L.[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(8): 84-87.
- [3] CHANG H H, CHEN C S, LIN J Y. Dietary perilla oil inhibits proinflammatory cytokine production in the bronchoalveolar lavage fluid of ovalbumin-challenged mice[J]. Lipids, 2008, 43(6): 499-506.
- [4] KIM H, CHOI S, CHOI H. Suppression of hepatic fatty acid synthase by feeding α -linolenic acid rich perilla oil lowers plasma triacylglycerol level in rats[J]. The Journal of nutritional biochemistry, 2004, 15(8): 485-492.
- [5] LEE A Y, CHOI J M, LEE J, et al. Effects of vegetable oils with different fatty acid compositions on cognition and memory ability in A β 25-35-induced Alzheimer's disease mouse model[J]. Journal of medicinal food, 2016, 19(10): 912-921.
- [6] 蒋晖, 杨剑苏, 龙启豹. 紫苏籽油饮食控制治疗睑板腺功能障碍性干眼症[J]. 安徽医学, 2014, 35(9): 1235-1237.
JIANG H, YANG J S, LONG Q B. Effect of diet control by perilla seed oil on dry eye caused by meibomian gland dysfunction[J]. AnHui Medical Journal, 2014, 35(9): 1235-1237.
- [7] KAMALASHIRAN C, SRIYAKUL K, PATTARAARCHACHAI J, et al. Outcomes of perilla seed oil as an additional neuroprotective therapy in patients with mild to moderate dementia: a randomized control trial[J]. Current Alzheimer Research, 2019, 16(2): 146-155.
- [8] KAMALASHIRAN C, PATTARAARCHACHAI J, MUENGTAWEEPONGSA S. Feasibility and safety of perilla seed oil as an additional antioxidative therapy in patients with mild to moderate dementia[J]. Journal of Aging Research, 2018, 2018: 1-5.
- [9] THOMAS S S, CHA Y, KIM K. Perilla oil alleviates high-fat diet-induced inflammation in the colon of mice by suppressing nuclear factor-kappa b activation[J]. Journal of medicinal food, 2020, 23(8): 818-826.
- [10] QIU J, ZHANG X, LUO M, et al. Subinhibitory concentrations of perilla oil affect the expression of secreted virulence factor genes in Staphylococcus aureus[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e16160.
- [11] 高飞, 郑引索, 阮彩莲. 紫苏油治疗乳腺癌临床效果探究[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2015, 30(2): 79-80.
GAO F, ZHENG Y S, RUAN C L. Study on the clinical effect of perilla oil in treating breast cancer[J]. Journal of Jiujiang University(Natural Science Edition), 2015, 30(2): 79-80.
- [12] FUTAKUCHI M, CHENG J L, HIROSE M, et al. Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP)[J]. Cancer letters, 2002, 178(2): 131-139.
- [13] OKUNO M, TANAKA T, KOMAKI C, et al. Suppressive effect of low amounts of safflower and perilla oils on diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in male F344 rats[J]. 1998: 186-193.

- [14] NARISAWA T, TAKAHASHI M, KOTANAGI H, et al. Inhibitory effect of dietary perilla oil rich in the n-3 polyunsaturated fatty acid α -linolenic acid on colon carcinogenesis in rats[J]. Japanese journal of Cancer research, 1991, 82(10): 1089-1096.
 - [15] ZHANG G, LI Q, CHEN Q, et al. Network pharmacology: a new approach for chinese herbal medicine research[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013, 2013: 621423-621429.
 - [16] LI S, FAN T, JIA W, et al. Network pharmacology in traditional Chinese medicine[J]. Hindawi, 2014.
 - [17] THOMSEN R, CHRISTENSEN M H. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking[J]. Journal of medicinal chemistry, 2006, 49(11): 3315-3321.
 - [18] 张运晖, 赵瑛, 欧巧明. 紫苏籽化学成分及生物活性研究进展[J]. 甘肃农业科技, 2020(9): 63-71.
ZHANG Y H, ZHAO Y, OU Q M. Research progress on chemical constituents and biological activities of fructus perillae[J]. Gansu Agricultural Sciences and technology, 2020(9): 63-71.
 - [19] 时艺霖, 顾宪红, 毛薇, 等. 紫苏籽化学成分提取工艺条件及应用研究进展[J]. 家畜生态学报, 2015, 36(8): 79-85.
SHI Y L, GU X H, MAO W, et al. Research progress in the extraction technology condition and application of chemical substances in perilla frutescens seed. [J]. Acta Ecologiae Animalis Domastici, 2015, 36(8): 79-85.
 - [20] 许春芳, 董喆, 郑明明, 等. 不同产地的紫苏籽油活性成分检测与主成分分析[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(2): 275-282.
XU C F, DONG Z, ZHENG M M, et al. Active compound and principal component analysis of perilla seed oils from different production areas[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(2): 275-282.
 - [21] 张瑜, 戚欣, 白艺珍, 等. 紫苏籽油化学组成与检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(20): 7181-7188.
ZHANG Y, QI X, BAI Y Z, et al. Advances in chemical composition and related detection technologies of Perilla seed oil[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2020, 11(20): 7181-7188.
 - [22] HSIN K, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. PloS one, 2013, 8(12): e83922.
 - [23] ANAND P, KUNNUMAKARA A B, SUNDARAM C, et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes[J]. Pharmaceutical research, 2008, 25(9): 2097-2116.
 - [24] HENG J, GUO X, WU W, et al. Integrated analysis of promoter mutation, methylation and expression of AKT1 gene in Chinese breast cancer patients[J]. PloS one, 2017, 12(3): e174022.
 - [25] LÓPEZ-CORTÉZ OPEZ A, LEONE P E, FREIRE-PASPUEL B, et al. Mutational analysis of oncogenic AKT1 gene associated with breast cancer risk in the high altitude ecuadorian mestizo population[J]. BioMed research international, 2018, 2018: 1-10.
 - [26] OLIVIER M, HOLLSTEIN M, HAINAUT P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use[J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2010, 2(1): a1008.
 - [27] LI X, TUERGAN M, ABULIZI G. Expression of MAPK1 in cervical cancer and effect of MAPK1 gene silencing on epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis[J]. Asian Pacific journal of tropical medicine, 2015, 8(11): 937-943.
 - [28] FEI B, WU H. MiR-378 inhibits progression of human gastric cancer MGC-803 cells by targeting MAPK1 in vitro[J]. Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 2013, 20(12): 557-564.
 - [29] FURUKAWA T, KANAI N, SHIWAKU H O, et al. AURKA is one of the downstream targets of MAPK1/ERK2 in pancreatic cancer[J]. Oncogene, 2006, 25(35): 4831-4839.
 - [30] TUORKEY, MUO BA RAK J. Molecular targets of luteolin in cancer[J]. European Journal of Cancer Prevention, 2016, 25(1): 65-76.
 - [31] CHIAN S, TGAPA R, CHI Z, et al. Luteolin inhibits the Nrf2 signaling pathway and tumor growth in vivo[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 447(4): 602-608.
 - [32] HELTON E S, CHEN X. p53 modulation of the DNA damage response[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2010, 100(4): 883-896.
 - [33] KANG K A, PIAO M J, HYUN Y J, et al. Luteolin promotes apoptotic cell death via upregulation of Nrf2 expression by DNA demethylase and the interaction of Nrf2 with p53 in human colon cancer cells[J]. Experimental & molecular medicine, 2019, 51(4): 1-14. 
- 备注：本文的彩色图表可从本刊官网 (<http://lyspkj.ijournal.cn>)、中国知网、万方、维普、超星等数据库下载获取。