

基于网络药理学的多西他赛治疗绒毛膜癌的作用机制研究

金雪宁¹, 林 飞¹, 冯心怡¹, 李 岑², 崔树娜²

(1. 扬州大学医学院, 江苏 扬州, 225000; 2. 扬州大学附属医院 妇产科, 江苏 扬州, 225009)

摘 要: **目的** 基于网络药理学探讨多西他赛治疗绒毛膜癌的作用靶点及信号通路。**方法** 通过 Genecards 数据库收集多西他赛、绒毛膜癌的靶点。对绒毛膜癌疾病靶点以及多西他赛药物靶点进行映射,构建作用靶点的蛋白质互作(PPI)网络模型,筛选出排名前 10 的 Hub 基因。采用 Cytoscape 软件建立药物-疾病靶点的网络模型。利用 DAVID 数据库进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。**结果** 多西他赛、绒毛膜癌靶点分别为 953、1 137 个,多西他赛治疗绒毛膜癌的关键靶点包括 *TP53*、*AKT1*、*CASP8*、*STAT3* 等,涉及的主要 KEGG 通路富集分析确定信号通路包括癌症通路、细胞凋亡通路、Focal Adhesion 通路、p53 信号通路等。**结论** 多西他赛治疗绒毛膜癌是通过调节 *TP53*、*AKT1*、*STAT3* 等关键基因来调控癌症通路、细胞凋亡通路、p53 信号通路等信号通路实现的。

关键词: 多西他赛; 绒毛膜癌; 信号通路; 网络药理学; 机制; 作用靶点

中图分类号: R 737.3; R 453 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-2353(2022)01-018-04 **DOI:** 10.7619/jcmp.20213494

Mechanism of docetaxel in treatment of choriocarcinoma based on network pharmacology

JIN Xuening¹, LIN Fei¹, FENG Xinyi¹, LI Cen², CUI Shu'na²

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225000; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, the Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, 225009)

Abstract: Objective To explore the action target and signal pathway of docetaxel in treatment of choriocarcinoma based on network pharmacology. **Methods** The targets of docetaxel and choriocarcinoma were collected from Genecards database. The disease targets of choriocarcinoma and docetaxel drug targets were mapped, the protein-protein interaction (PPI) network model of target was constructed, and the top 10 hub genes were screened. The network model of drug-disease targets was established by Cytoscape software. DAVID database was used for gene ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signal pathway enrichment analysis. **Results** A total of 953 and 1 137 targets were found for docetaxel and choriocarcinoma respectively, the key targets of docetaxel in the treatment of choriocarcinoma included *TP53*, *AKT1*, *CASP8*, *STAT3* and etc. Determined signal paths found by KEGG pathway enrichment analysis involved cancer pathway, apoptosis pathway, Focal Adhesion pathway, p53 and other signaling pathways. **Conclusion** Docetaxel treating choriocarcinoma is achieved by regulating key genes such as *TP53*, *AKT1* and *STAT3* to regulate signaling pathways such as cancer pathway, apoptosis pathway and p53 pathway.

Key words: docetaxel; choriocarcinoma; signaling pathways; network pharmacology; mechanism; action targets

绒毛膜癌(CC)简称绒癌,属于高度恶性滋养 细胞肿瘤,有 50% 的妊娠 CC 发生在葡萄胎之后,

收稿日期: 2021-08-30

基金项目: 2020 年度江苏省中医药科技发展专项项目(2020ZX21); 2021 年江苏省研究生培养创新工程项目(SJCX21_1659); 江苏省大学生创新创业训练计划项目(202011117115Y)

通信作者: 崔树娜, E-mail: sncui@yzu.edu.cn; 李岑, E-mail: licen86@163.com

其余的发生在自然流产和人工流产、正常足月妊娠或早产以及异位妊娠之后^[1-2]。目前常用的化疗药物有甲氨蝶呤、环磷酰胺等,但这些化疗药物毒副作用大。多西他赛与紫杉醇都属于紫杉醇类药物,但多西他赛抗肿瘤活性更高,抗癌谱更广,其机制是加强微管蛋白聚合作用和抑制微管解聚作用,导致形成稳定的非功能性微管束,因而破坏肿瘤细胞的有丝分裂^[3],在临床中被广泛应用于治疗难治性卵巢癌等^[4-7]。作者的前期体外实验^[8]证实多西他赛能抑制 CC 细胞的增殖,诱导细胞凋亡并明显抑制其侵袭能力。研究^[9]报道多西他赛能降低对常规化疗药物不敏感的 CC 患者血清人绒毛膜促性腺激素(HCG)水平,但多西他赛治疗 CC 的作用机制还缺乏深入研究。网络药理学融合了系统生物学、多向药理学和计算机信息学等多门学科,建立“药物-成分-基因-靶点-通路-疾病”的多层次网络关系,探索天然药物与复杂疾病的相互关系^[10-11]。本研究基于前期实验研究和临床文献结果,采用网络药理学手段探索多西他赛治疗 CC 的潜在作用机制,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 多西他赛、CC 的靶点收集

在 Genecards 数据库(<https://www.genecards.org/>)中分别以“Docetaxol”“choriocarcinoma”为关键词检索靶点,并将其导入 Excel 表格中进行标准化处理,进行统计分析。

1.2 关键靶点筛选

将多西他赛所对应的靶点基因和 CC 相关的靶点基因进行映射,获得两者的共同基因,即多西他赛治疗 CC 的作用靶点。

1.3 蛋白质互作(PPI)网络构建

将筛选出的基因输入 String 11.0 数据库,将蛋白种类设置为人类(homo sapiens),“minimum required interaction score”参数设置为“highest confidence(0.900)”,其余参数保持初始默认设置,导出 PPI 数据文件,建立蛋白与蛋白之间的网络。将结果导入 Cytoscape 软件,对结果进行可视化。

1.4 Hub 基因筛选

通过 Cytoscape 软件的 Cytohubba 插件中的 MCC 算法,计算并筛选排名前 10 位的多西他赛治疗 CC 的 Hub 基因。

1.5 基因本体论(GO)富集和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集

将共同基因输入 DAVID 6.7 数据库(<http://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析,研究多西他赛治疗 CC 的关键靶点的生物功能以及参与的信号通路,以 $P < 0.05$ 和错误发现率(FDR) < 0.05 作为筛选条件,筛选具有显著差异的生物过程和靶点通路。

2 结果

2.1 靶点蛋白 PPI 网络的构建

在 Genecards 数据库分别以“Docetaxol”和“choriocarcinoma”为关键词检索靶点,分别获得 953 和 1 137 个靶点,将 1 137 个疾病靶点与 953 个药物靶点输入 Venny2.1 软件绘制韦恩图,筛选出 294 个共同靶点,见图 1。将共同靶点在 String 11.0 平台分析的数据导入 Cytoscape3.6.1 软件,构建 PPI 网络模型。以 Combined_score > 0.9 为筛选条件绘制 PPI 网络图,其中节点为靶点蛋白,边为各蛋白间互作关系,节点连接边数越多代表其在网络中作用越重要,见图 2。通过 Cytoscape 软件插件 Cytohubba 计算排名前 10 位的 Hub 基因,其中 TP53、AKT1、CASP8、STAT3 等多西他赛治疗 CC 的关键基因。见图 3。

2.2 GO 功能和 KEGG 富集分析

将 294 个预测靶点导入 DAVID 数据库中进行 GO 富集分析和 KEGG 通路分析。GO 富集分析中,参与的生物过程有 409 个,主要包括调控细胞增殖(细胞增殖调节)、细胞凋亡(细胞凋亡负调控、细胞死亡的调控、程序性细胞死亡的调控)、信号传导(信号传导的正调控)、调节分子代谢(大分子代谢及合成过程的正调控、有机物质的反应等)。KEGG 通路富集分析确定了 28 条相关信号通路,主要涉及癌症通路、细胞凋亡通路、Focal Adhesion 通路和 p53、ErbB、MAPK 等信号通路。见图 4、图 5。

3 讨论

CC 属于恶性滋养细胞癌,是由滋养层滋养细胞增殖引起的恶性转化,导致这种转化的分子机制尚未确定。CC 可继发于葡萄胎妊娠,也可继发于非葡萄胎妊娠,病情发展迅速,病死率高,主要通过血行播散,转移早且易扩散,肺是 CC 最易转移的部位,其次为阴道、盆腔等,转移部位皆有局

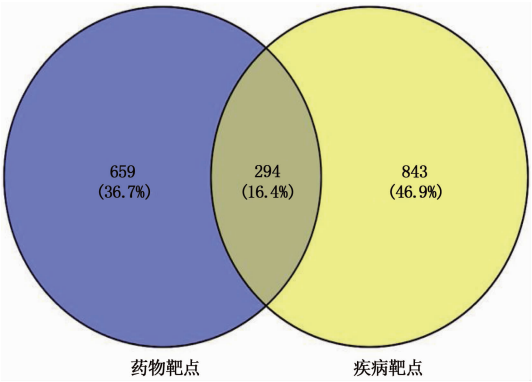


图 1 药物和疾病靶点韦恩图

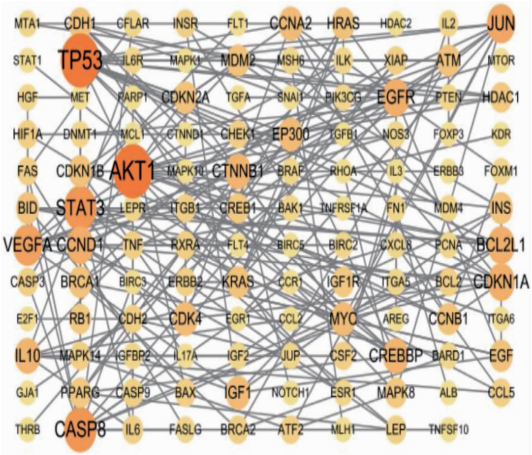


图 2 交集靶点相互作用网络关系

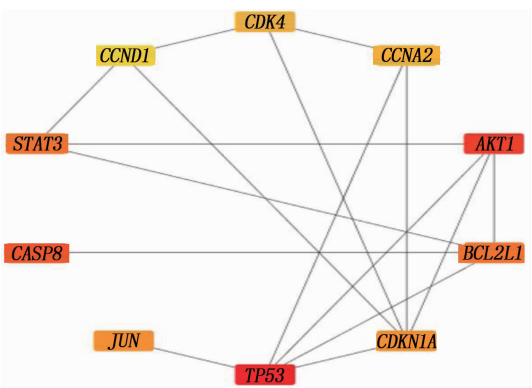


图 3 通过 MCC 算法计算排名前 10 位的多西他赛治疗 CC 的 hub 基因

部出血灶^[1, 12]。

多西他赛也称多西紫杉醇,是紫杉醇类化学药物的衍生物,临床应用广泛,常被用于治疗难治性卵巢癌等,但其应用于 CC 方面的研究较少^[4-6]。作者前期实验研究发现,多西他赛可以抑制 CC 细胞增殖的能力,并能诱导 CC 细胞凋亡,其作用浓度与时间呈正相关,并能明显抑制 CC 细胞体外侵袭的能力^[8]。对高度化疗耐药的 CC 细胞,每周使用单剂多西他赛可快速降低 HCG 水平(超过 95%),且对人体毒性最小,但其

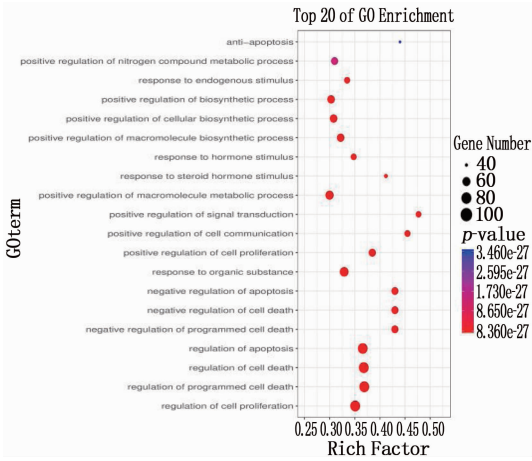
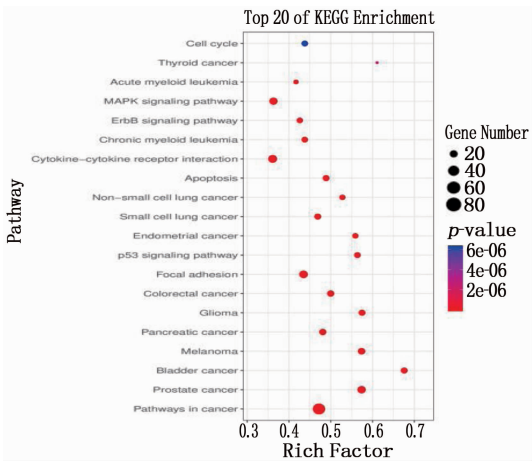


图 4 多西他赛潜在靶点的富集分析(生物过程)



原点由小到大代表分值逐渐升高,靶点富集数目多,通路显著性逐渐增强;颜色由蓝变红代表 P 值逐渐减小。

图 5 多西他赛潜在靶点的 KEGG 通路注释图

作用机制有待进一步深入研究。

本研究结果发现,多西他赛可靶向 *P53*、*AKT1*、*STAT3*、*VEGFA* 等 294 个基因,参与细胞凋亡与增殖的调控、分子合成与代谢的调控等主要生物过程。抑癌基因 *TP53* 编码 p53 肿瘤蛋白,其能调节细胞周期和避免细胞癌变发生。任何导致 *TP53* 失活的突变都会引起其抑癌功能的丧失而导致癌症发生^[13]。研究^[14]发现女性 *TP53* 突变携带者罹患 CC 的风险更高,且易产生化疗耐药,因此靶向调控 p53 对于多西他赛治疗 CC 具有重要的临床价值。蛋白激酶 B1(*AKT1*)是 AKT 的一个亚型,是生存信号通路 PI3K/AKT 的关键分子,与肿瘤细胞的生长、增殖、促进细胞侵袭和转移以及促进血管形成密切相关。研究^[15]发现,在 CC 细胞系中,逆转 *AKT1* 表达可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路及靶向负调控 *VEGFA* 表达,最终抑制 CC 细胞增殖、迁移和侵袭。信号转导

与转录激活因子3 (STAT3) 是一类具有信号转导及转录调控双重功能的蛋白质家族, 激活后与DNA 分子结合发挥作用^[16]。多项研究^[17-18]证实 STAT3 是参与恶性细胞转化的信号转导介质, IL-6/STAT3 通路与 CC 细胞增殖密切相关, 阻断 STAT3 信号通路能够抑制 CC 细胞的增殖, 并诱导 CC 细胞凋亡。

研究^[19-20]表明, p53 信号通路与肿瘤发展及预后密切相关, 其可以激活多条信号通路, 阻碍细胞周期, 诱导细胞凋亡, 促进细胞衰老以及 DNA 修复过程, 最终抑制肿瘤生长。研究^[21]发现 p53 和 p21CIP1 是 p53 信号通路中重要的靶基因, 在 CC JEG-3 细胞中, 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 p21CIP1 表达被激活后, 使 G₂ 细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1 表达显著降低, 同时 p53 丝氨酸磷酸化水平增加, p53 信号通路激活后使细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 进而激活 DNA 损伤反应通路, 抑制细胞增殖。

本研究借助网络药理学方法对多西他赛和 CC 进行靶标挖掘和通路分析, 得到 294 个共同靶向基因和 CC 多条信号通路, 包括 TP53、AKT1、STAT3、VEGAF 等基因以及细胞凋亡通路、p53 通路等信号通路, 证明了多西他赛可能通过调节多个靶基因、调控蛋白表达和信号传导通路而发挥对 CC 的治疗作用, 初步揭示了多西他赛治疗 CC 的作用机制, 为后续临床研究提供了新思路。

参考文献

[1] SAVAGE J, ADAMS E, VERAS E, *et al.* Choriocarcinoma in women: analysis of a case series with genotyping[J]. *Am J Surg Pathol*, 2017, 41(12): 1593 – 1606.

[2] ZHANG X, YAN K, CHEN J, *et al.* Using short tandem repeat analysis for choriocarcinoma diagnosis: a case series[J]. *Diagn Pathol*, 2019, 14(1): 93.

[3] 李佳元, 李天虹. 多西他赛 10 倍稀释法脱敏试验的临床应用[J]. *中华护理杂志*, 2008, 43(9): 849 – 850.

[4] 华金仁, 程慧明, 占戈兰, 等. 多西紫杉醇治疗卵巢癌的临床疗效及毒理研究[J]. *临床医药实践*, 2021, 30(5): 323 – 326.

[5] 彭涛. 六甲蜜胺联合多西他赛在铂耐药复发性上皮性卵巢癌化疗的临床观察[J]. *当代医学*, 2021, 27(15): 151 – 152.

[6] HU Y J, IP P P C, CHAN K K L, *et al.* Ovarian clear cell carcinoma with choriocarcinomatous differentiation[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2010, 29(6): 539 – 545.

[7] WASEDA Y, KOMAI Y, YANO A, *et al.* Pathological complete response and two-year disease-free survival in a primary

gastric choriocarcinoma patient with advanced liver metastases treated with germ cell tumor-based chemotherapy: a case report[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2012, 42(12): 1197 – 1201.

[8] 李岑. 紫杉醇对绒癌 JEG-3 细胞增殖、凋亡及侵袭能力的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2009.

[9] WINQUIST E, CAREY M. Activity of docetaxel in chemoresistant gestational choriocarcinoma[J]. *Gynecol Oncol*, 2000, 79(3): 523 – 524.

[10] 吉兰芳, 王梦梦, 崔树娜. 基于网络药理学方法的二至丸治疗肝肾阴虚型崩漏作用机制研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2020, 27(4): 78 – 86.

[11] 林飞, 黄丹, 陈婷婷, 等. 基于网络药理学的黄芪-鸡血藤配伍治疗白细胞减少症作用机制研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(6): 882 – 887.

[12] GASPARRI R, SEDDA G, BRAMBILLA D, *et al.* When a differential diagnosis is fundamental: choriocarcinoma mimicking lung carcinoma[J]. *J Clin Med*, 2019, 8(11): 2018.

[13] 胡才智, 胡春玲. 采用高通量测序技术检测肺癌致病突变及靶向药物突变位点[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(1): 105 – 112.

[14] 阎英, 张海波. 靶向 Akt1 小干扰 RNA 对人喉癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国当代医药*, 2011, 18(36): 7 – 9, 13.

[15] 谢迎春, 邓丹, 张玉梅, 等. miR-503-5p 靶向 VEGFA 基因通过 PI3K/AKT 信号通路调控人绒毛膜癌细胞增殖、迁移和侵袭[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(6): 655 – 660.

[16] 王秀兰, 程玲瑗, 王博, 等. 磷酸化信号转导与转录激活因子 3 蛋白在结直肠癌中表达及临床意义的 meta 分析[J]. *山西医药杂志*, 2018, 47(1): 24 – 27.

[17] PENG Z, ZHANG C, ZHOU W, *et al.* The STAT3/NFIL3 signaling axis-mediated chemotherapy resistance is reversed by Raddeanin A via inducing apoptosis in choriocarcinoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(7): 5370 – 5382.

[18] FITZGERALD J S, TSAREVA S A, POEHLMANN T G, *et al.* Leukemia inhibitory factor triggers activation of signal transducer and activator of transcription 3, proliferation, invasiveness, and altered protease expression in choriocarcinoma cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(11): 2284 – 2296.

[19] ZHENG W, LIU T, SUN R, *et al.* Daidzein induces choriocarcinoma cell apoptosis in a dose-dependent manner via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 6093 – 6099.

[20] 徐文达, 高平, 杨文君. p53 信号通路与肿瘤关系的研究进展[J]. *宁夏医科大学学报*, 2012, 34(9): 971 – 976.

[21] DRUKTEINIS J S, MEDRANO T, ABLORDEPPEY E A, *et al.* Benzo[a]Pyrene, but not 2, 3, 7, 8-TCDD, induces G2/M cell cycle arrest, p21CIP1 and p53 phosphorylation in human choriocarcinoma JEG-3 cells: a distinct signaling pathway[J]. *Placenta*, 2005, 26: S87 – S95.

(本文编辑: 梁琥)