

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620101152465

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

鸦胆子抗癌及副作用分子机理的网络化研究

**Elucidation of the Molecular Mechanisms Underlying
Anticancer and Adverse Effects of Yadanzi (*Brucea Javanica*)
by Ingredient-Target Interaction Network Analysis**

张海平

指导教师姓名: 纪志梁 教授

专业名称: 遗传学

论文提交日期: 2013年05月 日

论文答辩时间: 2013年06月 日

学位授予日期: 2013年 月 日

答辩委员会主席:

评阅人:

2013年06月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(纪志梁 教授)课题(组)的研究成果,获得(纪志梁 教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(厦门大学生物信息学辅助虚拟药物开发)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目录

摘要	I
ABSTRACT	III
第一章 前言	1
1.1 中药研究概况	1
1.2 鸦胆子的传统运用以及现代研究和抗癌上的新运用	3
1.3 新研究手段研究及新药物设计理论对中药现代化的启发	4
1.3.1 计算机辅助药物设计	5
1.3.2 合理化药物设计	5
1.3.3 网络药学与中药研究	5
1.3 本论文研究的意义、思路和目的	6
第二章 材料与方法	8
2.1 研究流程	8
2.2 鸦胆子信息提取	9
2.2.1 鸦胆子化学结构与活性成分	9
2.2.2 鸦胆子的成分药理作用	12
2.3 通过反向对接方法来确定潜在蛋白靶点	13
2.3.1 靶点信息提取过程	13
2.4 对接比较分析	16
2.5 药效团分析	17
2.6 构建成分-靶点相互作用网络	18
第三章 结果与分析	19
3.1 鸦胆子成分治疗靶点及药理活性研究	19
3.1.1 部分被广泛研究报道的鸦胆子成分的研究介绍	19
3.1.2 基于成分 QSAR 特性的分类	21
3.2 预测的成分靶点相互作用和功能的多样性分析	23
3.2.1 功能多样性	23
3.2.2 成分靶点相互作用与相应药物靶点相互作用比较分析	28
3.3 药效团分析	34
3.4 鸦胆子组分-靶点相互作用网络解释非小细胞肺癌上的抗癌活性	38
3.4.1 非小细胞肺癌研目前究状况	38
3.4.2 网络化分析鸦胆子成分对非小细胞肺癌通路的影响	39
3.4.3 网络化多靶点药物的潜在优势	42
3.5 鸦胆子组分-靶点相互作用网络解释解释低血压严重副作用的发生	44
3.5.1 鸦胆子副作用介绍及导致低血压相关信号通路	44
3.5.2 鸦胆子成分作用于血管平滑肌收缩通路分析	48
3.5.3 鸦胆子成分作用于肾素-血管紧张素系统信号通路分析	48
3.5.3 鸦胆子成分作用于其它低血压相关信号通路以及鸦胆子在低血压	

潜在应用前景.....	49
第四章 展望	51
参考文献	52
附表	59
附录 1：攻读硕士期间参与的其它课题	83
附录 2：攻读硕士期间发表或在投文章	84
致 谢	85

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Table of Contents

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 General situation of traditional Chinese medicine	1
1.2 Traditional use of Brucea Javanica and modern research of its anticancer effect	3
1.3 Influence of new method and theories in drug research to the TCM modernization.....	4
1.3.1 Computer aided drug design	5
1.3.2 Rational drug design	5
1.3.3 Network pharmacology & TCM research.....	5
1.3 Meaningful and purpose of this research	6
Chapter 2 Materials and Methods	8
2.1 The waterflow of research.....	8
2.2 The information extraction of Brucea javanica	9
2.2.1 The chemical structure and active ingredients of Brucea javanica	9
2.2.2 Composition of pharmacological effects of Brucea javanica	12
2.3 Reverse docking method to identify potential protein targets.....	13
2.3.1 Process of target information extraction	13
2.4 The pharmacophore analysis	16
2.5 Comparative analysis of docking.....	17
2.6 Building ingredient-target interaction network.....	18
Chapter 3 Results and Discussions.....	19
3.1 Therapy targets and pharmacological activity of Brucea Javanica ingredients	19
3.1.1 Research progress of some widely studied and reported ingredients of Brucea Javanica	19
3.1.2 Ingredients classification based on QSAR properties.....	21
3.2 Functional Promiscuity of Ingredients and Targets and comparative analysis.....	23
3.2.1 Functional Promiscuity	23
3.2.2 Comparative docking analysis	28
3.3 Pharmacophore Analysis.....	34
3.4 Molecular Mechanisms Underlying Yadanzi's Anti-NSCLC Activity	38

3.4.1 Current research condition of Non small cell lung cancer.....	38
3.4.2 Network analysis of Brucea Javanica ingredients effects in non-small cell lung cancer pathway.....	39
3.4.3 The potential advantages of multi-targets multi-drugs network	42
3.5 Molecular Mechanisms of Yadanzi-Induced Severe Hypotension.....	44
3.5.1 Side effects of Yadanzi and pathway related with Yadanzi-Induced Severe Hypotension	44
3.5.2 Analysis of Yadanzi ingredients acting on vascular smooth muscle contraction pathway	48
3.5.3 Analysis of Yadanzi ingredients acting on the renin-angiotensin system pathway	48
3.5.4 Other hypotension associated pathway Yadanzi acting on and perspective of Yadanzi application.....	49
Chapter 4 Perspectives	51
Reference.....	52
Annexed Table	59
Addendum 1: Other Task During the Master's Degree	83
Addendum 2: Published or Submitted Paper During the Master's Degree	84
Acknowledgements	85

摘要

鸦胆子作为一种常见的中草药，长期用于有效治疗疟疾，寄生虫和腐蚀赘疣等疾病。近年来，鸦胆子被发现具有广谱抑制癌细胞生长的作用，因而受到广泛关注。其中，鸦胆子油性提取物油酸和亚油酸具有明显抗癌效果，在国内作为抗癌药剂已生产上市。最近研究表明，鸦胆子多种水溶性成分也具有抗癌细胞生长的作用；部分成分进入了抗癌细胞试验或临床初期试验。然而，与其它中草药一样，鸦胆子抗癌活性的潜在机制尚未被阐述清晰。因此，对鸦胆子的抗癌分子机制的深入研究，将有助于鸦胆子在临床治疗上的理性开发。

在本次研究中，我们引入了一种新的计算机辅助策略，以探索鸦胆子疗效机制尤其是其分子网络化抗癌作用。通过反向对接技术扫描整个人类蛋白结构空腔，以获得部分水溶性鸦胆子活性成分的潜在靶点，并通过药效团分析和柔性对接进一步验证成分靶点相互作用。在 13 个鸦胆子水溶性成分的反向对接结果中，一共发现了 902 个的潜在靶点，其中 54 个是已知的癌症相关靶点。通过与相应的药物与靶点结合力比较后，发现所有预测的 7,119 个成分靶相互作用中，2,100 个相互作用（约占 29.5%）有相近或者更好的结合力。另外，通过药效团分析发现 71.1% 的靶点成分组（靶点对应的所有成分组合）中成分与相应靶点药物有三个或三个以上共同的结构特征。

进一步以非小细胞肺癌（NSCLC）为例的网络分析，显示出鸦胆子抗癌活性可能是通过不同层次的成分靶点交叉互相作用实现的。同时作用于 MAPK 信号通路和抗凋亡过程的磷酸化通路中多个关键蛋白可能是鸦胆子有效和持续抑制阻断 NSCLC 扩增和发展的主要原因。鸦胆子作用多个靶点蛋白很可能引起叠加或协同效应的产生，同时也可能避免了以往药物针对单个靶点蛋白所遇到的基因多态性导致的抗药性问题。此外，我们发现鸦胆子可能通过至少三条通路引起严重的低血压：（a）调节血管平滑肌收缩；（b）干扰肾素血管紧张素系统；（c）醛固酮调节的 K⁺重吸收通路（aldosterone-regulated sodium re-absorption）。这

揭示鸦胆子及其成分有可能是一种潜在的长效抗高血压药物。

总之,我们的成分靶点相互作用网络分析提供了一种研究系统药理学和毒理学经济有效的方法。这种研究方法从系统全面的角度理解鸦胆子治疗作用及机制,是一种新的研究手段。相似的运用,在某种程度上将会加速中药现代化的步伐。

关键词: 抗癌; 中草药; 网络药学

厦门大学博硕士论文摘要库

ABSTRACT

Yadanzi (*Brucea Javanica* or Java Brucea Fruit) has been effectively used in thousand years of traditional Chinese medicine (TCM) practice for treating malarial and parasite infections, and has raised substantial interests for its therapeutic effects on variety of cancers recently. However, like many other TCM herbs, the underlying mechanisms of Yadanzi's antitumoractivities haven't been fully illuminated. In this study, we constructed the ingredient-target interaction networks associated with Yadanzi's anticancer and toxicological effects based on experimentally implicated and *in-silico* predicted putative targets of thirteen Yadanzi's active ingredients. The putative targets were predicted by reversely docking each ingredient against human structural proteome and further validated by literature surveillance, comparative docking analysis and pharmacophore analysis. Overall, 902 putative protein targets of Yadanzi were identified, which include 54 primary therapeutic targets for countermining various cancers. Of total 7,119 predicted ingredient-target interactions, 2,100 (or about 29.5%) were estimated to have comparative or better binding affinity than their corresponding drug-target interactions. Moreover, additional pharmacophore analysis further validated that average about 71.1% ingredient-target interactions have common structural features between drugs and ingredients. Further network analysis, using non-small cell lung cancer (NSCLC) as an example, suggests that Yadanzi's anticanceractivities maybe partly produced by different levels of ingredient-target interactions. The simultaneously functional manipulation of multiple proteins in the MAPK signalling pathway and the phosphorylation process of anti-apoptosis may largely answer for the efficient and consistent blockage of the NSCLC cell proliferation and development, which is likely to be realized in an add-on or synergistic manner and despite of potential drug resistance induced by genetic

variation of any single protein target. Besides, it was found that Yadanzi likely induced serious hypotension in three routes of, but not limited to, (a) regulation of vascular smooth muscle contraction,(b) disturbance of renin-angiotensin system, and (c) aldosterone-regulated sodium re-absorption. This inspires us Yadanzi and its ingredients may serve as a potential antihypertensive agent for long-term treatment. In summary, our ingredient-target interaction network analysis provides an efficient however economic solution for system pharmacology and toxicology. Especially, it opens a window to spy upon the molecular secret of herbs' power in a way that recognized by nowadays medicine theory. This strategy may be extended for mechanistic study and novel drug discovery of other medicinal herbs.

keywords: Anticancer ; Herb medicine; Network Pharmacology

第一章 前言

中草药（一般也包括动物药和矿物药，应以植物药居多故称中草药）是各种中草药中医预防治疗疾病所使用的独特药物，也是中医区别于其它医学的重要标志。中国是中草药的发源地，根据《药用植物辞典》记载，目前中国大约有 12,000 种药用植物，仅具有抗癌效力的就有 300 余味，本文研究的鸦胆子就是一种常用抗肿瘤抗疟疾中草药。这些中药文化资源遗产是其它国家所不具备的，可以说在中草药中药资源上我们占据垄断优势。古代中医药学家对中草药和中医药学的深入探索、研究和总结，使得中草药得到了中国乃至亚洲广泛的认同与应用。

1.1 中药研究概况

中药在中国有很悠久的实践历史，并且在医药领域逐渐积累了丰富的医药知识，并由此形成了系统的中医药理论知识，对很多疑难杂症进行了各种初步研究和大胆尝试。它帮助了许多病人从各种不同的病理情况下恢复健康。以肿瘤为例，在古代的医疗文献中，早有关于癌症的病因、病名以及治疗方法，例如乳岩（即乳腺癌）、舌岩（即舌癌）、噎膈（即食道癌）、症瘕积聚（各种腹部肿瘤或转移癌）、恶疮（即皮肤癌）、癭瘤（即淋巴癌或转移癌）、鼓胀（癌症并发腹水）、癃闭（尿路肿瘤）等等。其相关的抗癌方剂包括西黄丸，阿魏化痞膏，阳和汤，蝎蚣排毒汤，消癌祛噎含化散，热敷散，麝香川芎抗癌散，华蟾泽漆散，复方斑蝥汤等等至今仍然广泛使用的辅助抗癌方剂。有治疗癌症效果的中草药更是繁多，记录有 300 余位大概分为 6 类：温经消积药、扶正补虚药、除痰散结药、活血化淤药、以毒攻毒药、清热解毒药。例如其中的牛黄，射干，山豆根，七叶一枝花白花蛇草，半枝莲，蟾衣，蟾酥，鸦胆子，败酱草等在中医及民间广泛认可，具有较大研究价值。

然而到了近代，西方医药技术得益于其机理清晰，与中药的运用相比占据了很大优势。而中药由于缺乏大量的现代医药理论的支持，极大的阻碍了中药世界

范围的运用。中药西药传统研究方法的不同，很大程度代表了在人类认知世界的历史进程中，形成的两种不同思维方式：一种是西方人惯用的对象性思维方式，一种是东方的非对象性的思维方式。而这两种思维并不是完全对立的，在某种程度上可以相互补充，最近中药研究手段的现代化，以及西药研究理论逐渐提出多靶点治疗，联合治疗，都体现了两种思维各有优势和价值。现代医学、生物学、信息科学理论和国内外天然药物的发展成果都可与中医药研究紧密结合，通过多技术、多学科融合，形成更加科学有效的中医药理论体系。

在中药现代化研究上，近些年国内外取得了可喜进展，例如对中草药及中药方剂疗效进行了大量细胞实验和临床实验，很多中药有效成分被分离出来，例如紫杉醇，喜树碱，长春碱，青蒿素等中草药提取出来，并制成上市药物。在机制研究上，中草药以及其组成的中药方剂分子机制也正逐步为研究者重视，如有对黄连解毒汤的研究指出，黄连解毒汤是通过激活凋亡细胞 caspase-3, -8, 和 -9, 以及抑制癌症相关蛋白 Akt, 导致凋亡通路的激活，从而抑制结肠癌细胞的扩增^[1]。四物汤治疗乳腺癌的基因芯片研究显示能被雌激素上调的基因例如 GREB1, PGR 和 EGR3 也同样被四物汤上调^[2]。另外中药方剂成分间的协同作用也逐步为研究者重视，将成为中药研究的一个重要方向^[3]。生物芯片，核磁技术，计算机模拟等新技术也逐渐在研究中药中起着重要作用。这些实验研究促使中药进一步发展，为治疗多种复杂疾病包括癌症^[4]，心脏病^[5]，慢性肝炎^[6]，哮喘^[7]，糖尿病^[8]，等等的提供了资源和有效手段。中药治疗尤其与小分子化学药物治疗相结合，被证明是一种有效减少抗药性和副作用的手段^[9]。另外，中药对病人蛋白表达谱的影响的研究也较多。

当然这些实验方法还存在很大不足，大部分还是停留在治疗效果观察或成分提取分析这类基础研究，但是对于深入研究中药内在机理，以及成分之间协同作用分子机制等药物研究基本问题并没有得到根本解决。也难以全面了解中药对机体产生的疗效的作用机理，往往只注重药物作用的单个方面，局限于传统单一药物针对单一靶点的传统西药研究思维方式。基于当前研究思维和方法存在的这

些问题,可以推测出网络化全面研究药物作用机理将是未来中药机理研究的主要方向。

1.2 鸦胆子的传统运用以及现代研究和抗癌上的新运用

鸦胆子 (*Brucea javanica*) 是苦木科、常绿灌木或小乔木, 广布于福建、台湾、广东、海南、广西、贵州、云南等地。其果(果仁)、根和叶均可入药。中药鸦胆子 (*Fructus Bruceae*) 是指鸦胆子树 (*Fructus Bruceae* (L.) Merr.) 的成熟干燥果实。按《本草纲目拾遗》记载, 鸦胆子功效为清热, 解毒, 杀虫, 截疟, 腐蚀赘疣。传统以干龙眼肉包裹或装入胶囊包裹吞服, 亦可压去油制成丸剂、片剂服, 不宜入煎剂。鸦胆子的临床毒性反应发生率较高: 胃肠反应, 头昏, 乏力, 腹痛, 便血, 体温增高, 眼结膜充血, 四肢麻木或瘫痪, 昏迷, 抽搐等。鸦胆子的主要成分是鸦胆子苦素类, 包括鸦胆子苦素 A、B、C、D、E、F、G、H、I (Bruceine A、B、C、D、E、F、G、H、I)、鸦胆子苦内酯 (Bruceolide)、鸦胆子苦醇 (Brusatol) 等; 生物碱类, 如鸦胆子碱 (Brucamarine)、鸦胆宁 (Yatanine); 糖甙类, 如鸦胆灵 (Brucealin)、鸦胆子甙 (Yatanoside) 以及鸦胆子酚 (Brucenol)、鸦胆子酸 (Bruceolic acid) 和香草酸 (Vanillic acid)。鸦胆子仁含脂肪油, 内含油酸 (Oleic acid)、亚油酸 (Linoleic acid) 等。

作为一种有效安全的中草药, 在中国几千年来救助了大量病人免于寄生虫感染和疟疾的痛苦。最近, 它展示了在治疗癌症上的潜在价值^[10, 11]。商业上鸦胆子油胶囊和注射剂被批准生产用于治疗各种肺癌, 肝癌, 和结肠癌。主要鸦胆子油成分油酸和亚麻酸被认为是有效抗癌成分, 通过抑制拓扑异构酶 I 或异构酶 II^[10], ^[12, 13]。也有学者认为鸦胆子油通过上调凋亡蛋白 3 和凋亡蛋白 9, 同时抑制 NF-kappaB 和 COX-2 导致癌症细胞死亡。

除了油酸和亚麻酸, 13 个鸦胆子水溶性提取成分被分离和纯化, 其中大部分属于苦木内酯。其中一些成分如鸦胆丁, 鸦胆子苦素 D, 和鸦胆子苦醇在多种

癌症细胞系中显示了突出的抗癌效果（表 1）。鸦胆子是有效抗多种骨髓瘤和恶性血液病的有效试剂，它进行过治疗乳腺癌和恶性黑素瘤的二期临床试验^[14, 15]。鸦胆苦醇能够增强化疗效果，和促进 HL-60 细胞系分化^[16]。这些工作在一定程度上填补了以现代医学方式理解鸦胆子药学活性的缺口；然而，它在配体靶点层次的作用方式仍然不清楚。因此，在这篇文章中我们主要以鸦胆子治疗非小细胞肺癌机理为例，引入了新的计算机辅助方法去阐明可能的鸦胆子抗癌活性的分子层次作用机制。

1.3 新研究手段研究及新药物设计理论对中药现代化的启发

新药物研究手段如计算机辅助药物设计，核磁共振及生物芯片，为研究中药全面深入研究提供了新的机遇和可能。如本实验用到的反向对接，能够快速的预测大量潜在药物靶点，而这用传统方法是很难做到的。另外，新的药物理论如网络药理学系统生物学也逐渐被广泛认可，这些新理论在很大程度上支持了中药多成分多靶点的科学性。不过，传统的合理化药物设计也就有很多值得中药理论借鉴学习，在中药内在分子机理研究上，确定药物作用靶点仍然具有重要意义，是网络化分析药物作用机理的基石。中药的作用大多数以组方出现，即使像鸦胆子一类的单方药也是以多成分的形式发挥作用。多成分往往作用于多靶点，这与以往西药的单药物针对单靶点理论相左，但却与近年来提出的网络药理学、系统生物学等观点有共通之处，部分支持了中药的科学性。事实上，中药多组分往往疗效往往能高于其中某个单一组分，产生出加成或协同作用^[3]。而这些加成或协同作用正好与近些年出现的网络药理学和系统生物学理论相符。该理论与以往经典的合理化药物设计不同，认为阻断单个通路或节点往往由于生物的代偿作用往往难以完全治愈复杂疾病，例如癌症、高血压、糖尿病等。

1.3.1 计算机辅助药物设计

随着计算机技术的发展,逐渐在生物领域起着越来越重要的作用,并由此诞生了生物信息学,旨在借助计算机相关技术、软件研究生物问题,其中一个代表就是计算机辅助药物设计,因此也诞生了许多生物及药物研究强大的软件,本实验中用到的 INVDOCK, MOE 等在很大程度上使得本次鸦胆子机理探究变得可能。另外数据的分析处理也借用了 PERL 程序,相关生物数据库等计算机为基础的工具。计算机辅助药物研究特点是可以高通量、低成本,随着计算方法的不断改进,将模拟出与实际情况越来越接近的结果,极大辅助实验研究。

1.3.2 合理化药物设计

现代新药开发和研究的步骤一般为首先是寻找、确定和制备药物筛选靶。药物靶点是指药物在体内的作用结合位点,包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子。合理化药物设计(Rational Drug Design)可以依据生命科学研究中所揭示的包括酶、受体、离子通道、核酸等潜在的药物作用靶位,或其内源性配体以及天然底物的化学结构特征来设计药物分子,用于发现高选择性作用于该靶点的新药。这类新药一般是单药物针对单个靶点,认为药物针对靶点特异性越高也有效力,以减小 Off-target 带来的副作用。然而有效药物并不是高效作用于多个靶点,例如: aspirin 和 metformin 而是部分作用于多个靶点^[17]。以这种指导思想进行药物设计被逐渐证明并非有效,近十几年新药开发速度下降,将其逐渐被网络药理学思想取代。

1.3.3 网络药理学与中药研究

单个药物针对单靶点治疗单一疾病逐渐成为近几十年来的主流,然而实际上系统生物学显示这个理论不适合涉及多个靶点多通路的复杂疾病,例如癌症,高血压^[18]。传统的中医药就是通过系统或者网络药理学来达到治疗效果的典型代表。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

廈門大學博碩士論文摘要庫