Journal of Animal Biology, Summer 2024; 16(4):159-176

Research Article

The Study of a Network Pharmacology of Signaling Pathways and Target Genes of Berberine Substance in the Treatment of Ovarian Cancer Using Bioinformatics Analysis

Sanaz Panahi -Alanagh, Yasaman Khamineh, Mahmood Talkhabi*

Department of Animal Sciences and Marine Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 2 April 2024 Accepted: 2 May 2024

DOI: 10.60833/ascij.2024.1106105

Abstract

Ovarian cancer is one of the fatal diseases in women, which is difficult to diagnose early. Therefore, there is an urgent need for chemical agents that can help control the development of ovarian cancer. Berberine, as a chemical substance, has many antioxidant and medicinal properties, and the anti-cancer role of this substance is under research. This study aims to analyze berberine target genes in ovarian cancer and to identify berberine signaling pathways using network pharmacology. In this study, the dataset GSE36668 was taken from the GEO database. Differentially expressed genes (DEGs) were analyzed by GEO2R with adj $p < 0.05$ and $|\log FC| \geq 2$. Berberine-related targets were collected from SwissTargetPrediction and Pharm Mapper databases. The protein-protein interaction (PPI) network of berberine common targets and DEGs was drawn based on the data in the String database and using Cytoscape software. Common genes in berberine and ovarian cancer were used to investigate biological (BP), molecular (MF), and cellular pathways. The 10 hub genes selected in this study included ESR1, STAT1, CDK1, RXRA, PIK3CA, PGR, CCNB1, CHEK1, PIK3R1, and PIK3CG. It was also found that berberine target genes can play a role in cancer signaling pathways, chemical carcinogenesis, fluid shear stress and atherosclerosis, progesterone-mediated oocyte maturation, and PPAR signaling pathway. Based on these findings, berberine can affect the expression of genes that are effective in ovarian cancer and their protein products, and by affecting the biological pathways involved in this disease, it is a suitable solution for the treatment of ovarian cancer.

Keywords: Ovarian cancer, Berberine, Network pharmacology, DEGs, Protein-protein interaction network.

مقاله پژوهشی

مطالعه فارماکولوژی شبکه‌ای از مسیرهای سیگنال‌دهی و ژن‌های هدف ماده بربرین در درمان سرطان تخمدان با استفاده از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی

ساناز پناهی الانق، یاسمن خمینه، محمود تلخابی*

گروه علوم جانوری و زیست شناسی دریا، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات: m_talkhabi@sbu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۷

DOI: 10.60833/ascij.2024.1106105

چکیده

سرطان تخمدان یکی از بیماری‌های کشنده در زنان می‌باشد که تشخیص زودهنگام آن مشکل است. بنابراین، نیاز فوری به عوامل شیمیایی وجود دارد که می‌تواند در کنترل توسعه سرطان تخمدان کمک کند. بربرین، به عنوان یک ماده شیمیایی، دارای خواص آنتی اکسیدانی و دارویی متعددی است و نقش ضد سرطانی این ماده تحت پژوهش قرار دارد. هدف این مطالعه تجزیه و تحلیل ژن‌های هدف بربرین در سرطان تخمدان و شناخت مسیرهای سیگنال‌دهی بربرین با استفاده از فارماکولوژی شبکه است. در این مطالعه، مجموعه داده GSE36668 از پایگاه داده GEO گرفته شد. ژن‌های دارای بیان افتراقی(DEGs)، توسط GEO2R با adj $P < ۰/۰۵$ و $|\log FC| \geq ۲$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اهداف مرتبط با بربرین از پایگاه‌های داده SwissTargetPrediction و Pharm Mapper جمع‌آوری شدند. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI) اهداف مشترک بربرین و DEGs، بر اساس داده‌های موجود در پایگاه داده String و با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شد. ژن‌های مشترک در بربرین و سرطان تخمدان، در بررسی مسیرهای زیستی (BP) و مولکولی (MF) و سلولی استفاده شدند. ۱۰ ژن هاب انتخابی در این مطالعه شامل ESR1، STAT1، CDK1، RXRA، PIK3CA، PGR، CCNB1، CHEK1، PIK3R1 و PIK3CG بودند. همچنین مشخص شد ژن‌های هدف بربرین می‌توانند در مسیرهای سیگنال‌دهی سرطان، سرطان زایی شیمیایی، تنش برشی سیال و آترواسکلروز، بلوغ تخمک با واسطه پروژسترون و مسیر سیگنالینگ PPAR، نقش داشته باشند. بر اساس این یافته‌ها بربرین می‌تواند بر بیان ژن‌های موثر در سرطان تخمدان و محصولات پروتئینی آن‌ها اثر داشته و با اثر بر مسیرهای زیستی دخیل در این بیماری، راهکار مناسبی برای درمان سرطان تخمدان باشد.

کلمات کلیدی: سرطان تخمدان، بربرین، فارماکولوژی شبکه، DEGs، شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین.

مقدمه

سرطان تخمدان یک نوع سرطان از نوع کارسینوم است که در تخمدان‌ها شروع می‌شود. سرطان تخمدان هشتمین تومور شایع در اروپا و تومور زنان با بالاترین مرگ و میر است (۳۰). سرطان تخمدان یک بیماری منفرد نبوده و می‌تواند به حداقل پنج زیرگروه بافت‌شناسی مختلف تقسیم شود که دارای عوامل خطر، سلول‌های منشأ، ترکیبات مولکولی، ویژگی‌های بالینی و درمان‌های مختلف هستند. این عارضه که یک مشکل جهانی می‌باشد، معمولاً در مراحل پایانی تشخیص داده می‌شود و تاکنون هیچ استراتژی

غربالگری موثری برای آن وجود ندارد (۳۵). درمان-های استانداردی که برای سرطان تخمدان به تازگی تشخیص داده شده‌اند، شامل جراحی کاهش سلولی و شیمی‌درمانی مبتنی بر پلاتین است. از نظر زیست شناسی کارسینوم تخمدان با تومورهای متاستازکننده از طریق گسترش لنفاوی متفاوت است؛ زیرا سلول-های سرطانی تخمدان عمدتاً در حفره صفاقی منتشر می‌شوند و فقط به صورت سطحی تهاجمی هستند (۱۹). از آنجایی که تومورها به سرعت تکثیر می-شوند، اندام‌های احشایی را فشرده می‌کنند و فقط به طور موقت حساس به شیمی‌درمانی می‌باشند، این نوع سرطان یک بیماری بسیار کشنده است و نرخ درمان آن تنها ۳۰ درصد است پس بنابراین نیازمند روش‌های درمانی نوین می‌باشد (۲۲). مطالعات آزمایشگاهی بسیاری نشان داده‌اند که بربرین می‌تواند یک داروی ضد سرطان بالقوه باشد. در میان چندین متابولیت ثانویه گیاهی، آلکالوئیدها دارای خواص دارویی متنوعی هستند (۲۵). بربرین یک آلکالوئید کواترنری ایزوکینولین است که از بسیاری از انواع گیاهان دارویی مانند زردچوبه هندی یا گیاه خوک طلایی (*Hydrastis canadensis*)، *Berberis aristatatis japatisca*، *Berberis aristatiscan*، *Phellondenndron chinense Schneid* و گیاه فلودندرون چوب پنبه (*Phellodendron amurense*) جدا شده است. بربرین دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و خواص دارویی متعدد است (۷). مطالعات آزمایشگاهی با استفاده از رده‌های سلولی سرطانی نشان داده‌اند که بربرین از تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند و آپوپتوز را در انواع رده‌های سلول سرطانی القا می‌کند و باعث توسعه بیشتر مشتقات خود برای پیشگیری و درمان سرطان مبتنی بر دارو می‌گردد (۱۰, ۱۱, ۲۶, ۲۷). جستجو برای داروهای جدیدی که باعث جلوگیری از پیشرفت تومورهای مقاوم به درمان می‌شوند، برای توسعه داروهای ضدسرطان، بسیار مهم است (۳۱). چندین مکانیسم که توسط آن بربرین از تکثیر رده‌های مختلف سلولی سرطانی جلوگیری می‌کند، گزارش شده است. مطالعات نشان داده‌اند که بربرین با کاهش بیان ژن MMP16، سبب مهار تکثیر و مهاجرت سلول‌های سرطانی تخمدان می‌شود (۲٤). همچنین این ماده می‌تواند به طور قابل توجهی سطح فعال‌کننده پلاسمینوژن نوع اوروکیناز و بیان ژن MMP-9 را در سلول‌های کبدی مهار کند، از تخریب ماتریکس خارج سلولی تومور، جلوگیری کند و در نتیجه از تهاجم و مهاجرت سلول‌های تومور جلوگیری به عمل آورد (٤۸). علاوه بر آن در میان مکانیسم‌های عمل بربرین، مرگ سلول‌های سرطانی با فعال شدن آپوپتوز یکی از مهم‌ترین مشخصه‌ها می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده است که بربرین اثرات ضدتوموری علیه سرطان ریه، سرطان دهانه رحم، سرطان کبد، لوسمی و سایر بدخیمی‌ها دارد (۳, ۱٤, ۲۳, ۳۳). با این‌حال، چگونگی عمل و مکانیسم‌های مولکولی ماده بربرین در مواجهه با سرطان تخمدان، به طور کامل شناخته نشده‌اند و نیازمند تحقیق بیشتر می‌باشد. بیوانفورماتیک با ایجاد بستری مناسب برای شناسایی بیومارکرهای غیرتهاجمی برای تشخیص سرطان و طراحی روش‌های درمانی شخص‌محور به کمک زیست‌شناسان آمده است. همچنین با کمک بیوانفورماتیک درک بیولوژی سرطان از طریق سیستم‌های هوشمند فراهم شده است (۳۷). فارماکولوژی شبکه یک رشته به سرعت در حال توسعه است که علم شبکه و فارماکولوژی را برای مطالعه تعاملات پیچیده بین داروها، ژن‌ها و بیماری‌ها ترکیب می‌کند (۵۰). یکی از اهداف فارماکولوژی شبکه ساخت و تجزیه و تحلیل شبکه‌های دارو-ژن-بیماری شناسایی اهداف دارویی جدید می‌باشد، تا به

درک مکانیسم‌های عمل دارو و پیش‌بینی اثربخشی و اثرات جانبی دارو کمک کند. فارماکولوژی شبکه بر این اصل استوار است که داروها به صورت مجزا عمل نمی‌کنند، بلکه با اهداف و مسیرهای متعدد در بدن تعامل دارند. با مطالعه این فعل و انفعالات، فارماکولوژی شبکه می‌تواند درک جامع‌تری از عملکرد دارو ارائه دهد و فرصت‌های درمانی جدید را شناسایی کند (۴۹). همچنین برای درک مکانیسم‌های اثر دارو با مطالعه برهمکنش‌های بین داروها و ژن‌ها، روش تجزیه و تحلیل فارماکولوژی شبکه‌ای می‌تواند مسیرهای کلیدی را که در عملکرد دارو دخیل می‌باشند شناسایی کند. سپس از این اطلاعات می‌توان برای تولید داروهای جدیدی که مؤثرتر می‌باشد و عوارض جانبی کمتری دارند، استفاده کرد (۲۱). هدف از این مطالعه تجزیه و تحلیل ژن‌های هدف سرطان تخمدان و مسیرهای سیگنال‌دهی بربرین با استفاده از فارماکولوژی شبکه است می‌باشد. شناسایی ژن‌های هدف و مسیرهای سیگنالی مرتبط با بربرین در سرطان تخمدان می‌تواند پیامدهای مهمی برای توسعه درمان‌های جدید و پیشگیری از این بیماری کشنده داشته باشد.

مواد و روش‌ها

روش کار: در این مطالعه از پایگاه‌های داده مختلف، تجزیه و تحلیل‌های گوناگون و ابزارهای بیوانفورماتیکی متفاوتی استفاده شده است (شکل ۱).

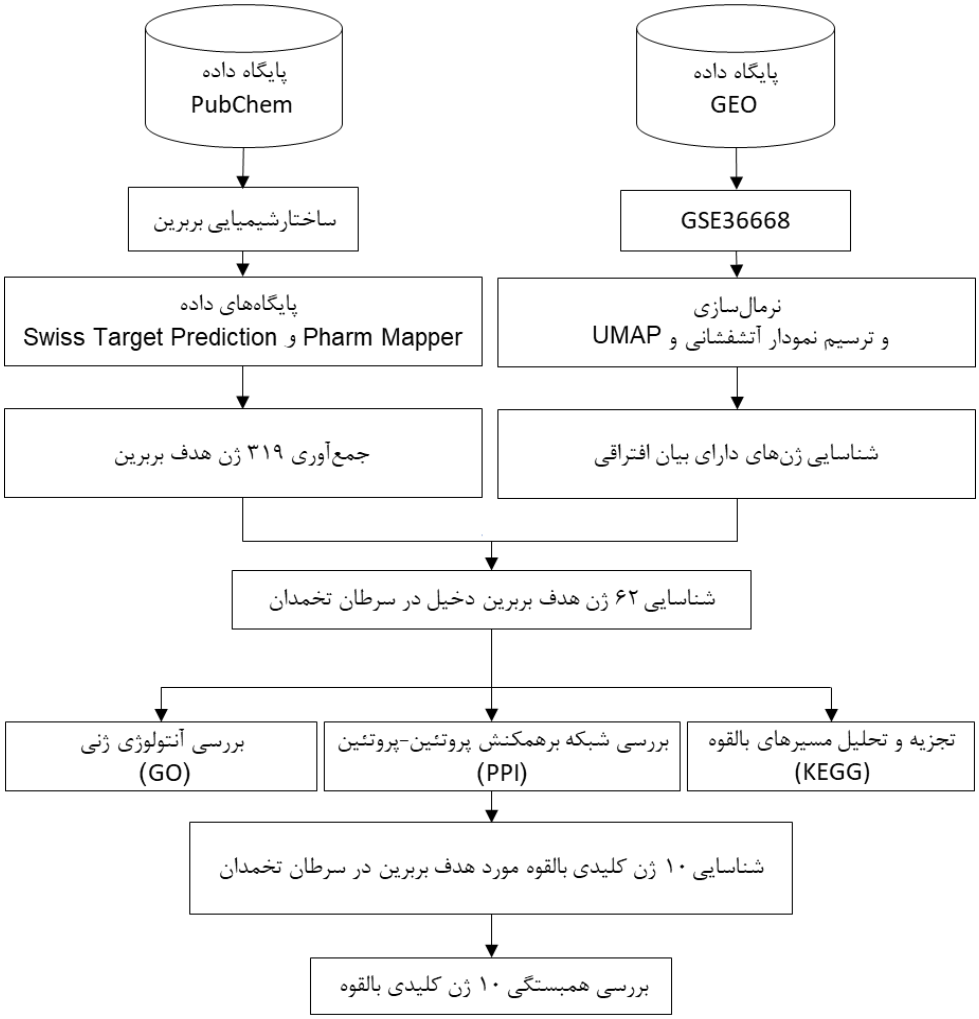
شناسایی اهداف ژنی بربرین: اهداف ژنی مرتبط با بربرین از پایگاه‌های داده SwissTargetPrediction (http://www.swisstargetprediction.ch/) و Pharm Mapper (http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/) جمع‌آوری شدند (۹, ۱۷). ساختار شیمیایی ذخیره شده به عنوان فایل های "sdf" از PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/) جمع‌آوری شد (۱۷).

شناسایی ژن‌های هدف بالقوه در سرطان تخمدان: ژن‌های هدف مرتبط با سرطان تخمدان از پایگاه داده GEO (/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) گرفته شد. کلید واژه به عنوان "سرطان تخمدان" و گونه به Homo sapiens تنظیم شد. مجموعه داده GSE36668 شامل چهار نمونه بافت سرطان تخمدان و چهار نمونه سالم از پلتفرم GPL570 (آرایه ژنوم انسانی U133 Plus 2.0) انتخاب شد. ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEGs) توسط GEO2R با ۰/۰۵ *adj Pvalue* < و 2 ≤ |logFC| مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (۸).

ساخت شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین (PPI): به منظور اشتراک‌گیری بین اهداف ژنی بربرین و ژن‌های دارای بیان افتراقی در سرطان تخمدان، از نرم‌افزار آنلاین Venn Bioinformatics & Evolutionary Genomics (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtoo ls/Venn/) استفاده شد و نمودار ون ترسیم گردید (۱۳). سپس شبکه PPI برای این اهداف ژنی مشترک در پایگاه داده STRING (https://string-db.org) ساخته شد. تجزیه و تحلیل ۱۰ ژن هاب در شبکه PPI، از طریق افزونه CytoHubba در CytoScape (نسخه ۳.۱۰.۱) انجام گرفت (۳۸, ۳۹). نمودار حرارتی برای اهداف ژنی مشترک بربرین و سرطان تخمدان ترسیم گردید. همچنین نمودار همبستگی برای ۱۰ ژن هاب نیز رسم شد.

تجزیه و تحلیل آنتولوژی ژنی و مسیرهای بالقوه: بخش‌های آنتولوژی ژنی (Gene Ontology; GO) و پایگاه کیوتو از ژن‌ها و ژنوم‌ها (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; KEGG) از پایگاه داده آنلاین EnrichR (https://maayanlab.cloud/Enrichr/)، به ترتیب جهت بررسی فرآیندهای زیستی (Biological

process; BP) و سلولی (Cellular Component; CC) و عملکردهای مولکولی (Mollecular Function; MF) و نیز آشکارسازی مسیرهای زیستی بالقوه استفاده گردید (۲۰). از ابزار آنلاین SRplot (https://www.bioinformatics.com.cn/) برای تجسم داده‌ها استفاده شد (۴۰). ساختارهای شبکه برای شناسایی گره‌های کلیدی (مانند اهداف دارویی یا ژن‌های بیماری) و مسیرهایی که نقش مهمی در سیستم دارند، تجزیه و تحلیل شدند. این تجزیه و تحلیل به درک مکانیسم‌های اثر ماده و پاتوفیزیولوژی بیماری کمک می‌کند.



شکل ۱- روش کار، پایگاه‌های داده و آنالیزهای انجام شده در مطالعه

Fig 1. Flowchart, databases and analyzes performed in the study

نتایج

استخراج ژن‌های هدف بربرین در سرطان تخمدان: در این مطالعه، ۱۱۲ ژن هدف بربرین از پایگاه داده Swiss Target Prediction (احتمال اطمینان > ۰) و ۲۲۰ ژن هدف از پایگاه داده PharmMapper به دست آمد. پس از ادغام لیست‌ها و حذف موارد تکراری، ۳۱۹ ژن هدف منحصر به فرد به عنوان اهداف بربرین باقی ماندند (جدول ۱). تعداد ژن‌های دارای بیان افتراقی (DEGs) جمع‌آوری شده از مجموعه داده GSE36668 مرتبط با سرطان تخمدان، پس از نرمال‌سازی ۵۸۸۹ مورد بود. در نمودار

جعبه‌ای، پس از نرمال‌سازی تمام نمونه‌های سالم و سرطانی در یک ردیف قرار گرفتند، همچنین در نمودارهای آتشفشانی و (UMAP) Uniform Manifold Approximation and Projection نمونه‌های سالم و سرطان تخمدان به خوبی از یکدیگر جدا شدند (شکل A-۲). در مجموع، ۶۲ هدف مشترک با استفاده از نمودار ون برای هر دو لیست ژنی به دست آمد (شکل B-۲، جدول ۱).در بررسی ارتباط ژن‌های مورد هدف بربرین در سرطان تخمدان نشان داده شد که ژن‌های دارای بیان افتراقی معنادار در نمودار حرارتی به خوبی جدا شده‌اند، مبتنی بر اینکه ژن‌های هدف مورد مطالعه دارای اختلاف بیان در نمونه‌های نرمال و سرطانی بوده‌اند (شکل C-۲).

تجزیه و تحلیل شبکه PPI: شبکه PPI با آستانه اطمینان بالا ۰/۷ برای ۶۲ ژن مشترک بربرین با سرطان تخمدان، شامل ۵۹ گره و ۱۹۲ یال، با میانگین درجه گره ٦، قطر شبکه ۳ و تعداد متوسط ۱۸.۰۷۲ همسایه برای ژن‌های مشترک بود و همچنین شبکه PPIبرای ۳۱۹ ژن هدف بربرین شامل ۲۵۱ گره و ۲۲٦۸ یال بود (شکل A-B-۳). در شبکه PPI مشخص است که ژن ESR1 و STAT1 در مرکز شبکه دارای بیشترین درجه اتصال گره می‌باشند. ESR1 دارای ۲۵ و STAT1 دارای ۲۰ برهمکنش غیرجهت‌دار با اهداف مشترک بربرین و سرطان تخمدان می‌باشد.

شناسایی ژن‌های هاب هدف بربرین در سرطان تخمدان: ژن‌های هاب توسط افزونه CytoHubba با فیلتر درجه بیان محاسبه شدند. نتایج شامل ۱۰ ژن هاب به ترتیب ESR1، STAT1، CDK1، RXRA، PIK3CA، PGR، CCNB1، CHEK1، PIK3R1 و PIK3CG می‌باشند (شکل C-۳). درجه اتصال ۱۰ ژن هاب که بیشترین درجه اتصال را داشته‌اند؛ در جدول ۲ آورده شده است. در ادامه بررسی همبستگی این ژن‌های هدف بالقوه بربرین در سرطان تخمدان با بررسی الگوهای هم‌بیان یا هم‌رویداد انجام شد و سپس نمودار همبستگی برای ژن‌های فیلتر شده پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از GraphPad Prism نسخه ۱۰ ترسیم شد (شکل D-۳). این نمودار نشان داد که ژن‌های ESR1، STAT1، CDK1، RXRA، CCNB1 و CHEK1 باهم الگوی هم‌بیانی مثبت و با ژن‌های PIK3CA، PGR، PIK3R1 و PIK3CG الگوی همبستگی منفی داشتند؛ در حالی که ژن‌های PIK3CA، PGR، PIK3R1 و PIK3CG با یکدیگر الگوی همبستگی مثبت داشتند.

تحلیل آنتولوژی ژنی (GO): لیست ژن‌های مشترک بیانی جداسازی شده در مراحل قبلی وارد پایگاه داده Enrichr جهت تحلیل GO شدند و بعد از مقایسه با لیست‌های ژنی طبقه‌بندی شده در این پایگاه‌های داده به بررسی GO آن‌ها در سه بخش اصلی BP، CC و MF پرداخته شد، که علاوه بر این پایگاه داده، از برخی نرم‌افزارها و پایگاه داده‌های دیگر در راستای بررسی GO نیز استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی لیست ژن‌های مشترک در این فراتحلیل بیانگر نقش زیستی ژن‌ها مشترک بربرین با سرطان تخمدان با فرایندهای مرتبط با رونویسی مانند آغاز رونویسی از پروموتور RNA پلیمرازII، شروع رونویسی الگوی DNA و همچنین مسیرهای سیگنال‌دهی گیرنده داخل سلولی، تنظیم مثبت سیگنال‌دهی فسفاتیدیلونیسیتول-۳-کیناز و فسفریلاسیون پروتئین مرتبط بودند. با انجام فرایند انتولوژی و مشاهده نتایج حاصل از آن در بعد سلولی نتایج حاصله بررسی لیست ژن‌های مشترک، بیانگر نقش سلولی ژن‌ها در ارتباط با فرایندهای مربوط به گروه کمپلکس انتقال فسفر، کلک‌های غشایی پلاسمایی، کمپلکس فسفاتید یلونیسیتول-۳-کیناز، گرانول‌های ماست‌سل، میکروتوبول‌های دوکی و کمپلکس پروتئین-کیناز

بودند. نتایج بعد مولکولی نیز نشان داد، ژن‌های هدف در ارتباط با فرایندهای مربوط به فعالیت‌های انتقالی مانند فعالیت گیرنده‌های هسته‌ای، فعالیت فاکتور رونویسی فعال شده با لیگاند، فعالیت پروتئین سرین-ترئونین کیناز، فعالیت هورمون استروئیدی و فرایندهای چسبندگی اتصال کربوکسیلیک اسید، اتصال اسید آلی، اتصال مونوکربوکسیلیک اسید، اتصال کواکتیواتور رونویسی و اتصال رونویسی می‌باشند (شکل ٤).

بررسی مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط با بربرین در سرطان تخمدان: بررسی مسیرهای سیگنال‌دهی در مسیر KEGG و نتایج حاصل از لیست ژن‌های مشترک در فراتحلیل نشان می‌دهد که نقش ٦٢ ژن هدف مشترک به دست آمده، در فرایندهای مربوط به مسیر سیگنال‌دهی سرطان و همچنین سرطان زایی شیمیایی، تنش برشی سیال و آترواسکلروز، بلوغ تخمک با واسطه پروژسترون و مسیر سیگنالینگ PPAR می‌باشد، که دارای درصد معنی‌داری بالاتری نسبت به بقیه بودند (جدول ۳).

جدول ۱- ژن‌های هدف بربرین و ژن‌های هدف بربرین دخیل در سرطان تخمدان

Table 1. Berberine target genes and berberine target genes involved in ovarian cancer

Berberine target genes	TTHY, P62937, CAH2, ESR1, AK1C2, P11511, STS, APOA2, BMP2, NR1H2, RXRA, ADA17, CFAD, CHLE, ANDR, PIM1, P62508, BRAF1, NOS3, PDE4D, SHBG, P00390, SRC, P00517, CCNA2, MMP13, PRGR, NONE, ALBU, THRB, ANXA5, P11586, Q16539, P14061, DHSO, ALDR, P28845, P24941, Q06520, MCR, TYSY, Q62986, MMP12, HS90A, Q04828, P35968, P00326, P53041, PTN1, VTDB, DUS6, PDE3B, PDPK1, EGFR, AK1C3, CHK1, CASP7, PDE4B, FA10, PTN11, P11142, P49638, MET, XIAP, PH4H, Q08881, EPHB4, CTNA1, ADHX, P04179, MK10, KIF11, MMP8, PDK2, PTGD2, MMP3, NR1H3, P49841, CDK6, PDE5A, HDAC8, DPP4, PLGF, HYES, PYRD, P49137, P55263, P08263, O14965, Q13126, AOFB, AMPM2, NR1I2, FKB1A, P01343, PPARG, FGFR1, ERBB4, JAK3, LCK, O00204, ST1E1, RENI, CATG, NR1H4, S10A9, P14555, P78536, FABPH, NEP, Q14541, ACADM, P10827, Q16772, IGF1R, O43617, P10828, GCR, FABP6, TIE2, Q93088, HCK, FABP4, RARG, DPEP1, IL2, P20132, O43252, TGFR1, FAK1, GSTP1, A1AT, P16442, RARA, DYR, TGM3, RET4, TPH1, MP2K1, FPPS, RARB, SETD7, VDR, P36873, P22830, MMP2, P29373, P35520, ZAP70, BACE1, P00519, NGAL, CATS, CCL5, Q9HAN9, NSR, ELNE, CATK, HMDH, GSTM1, KPCT, LKHA4, FABP7, RXRB, KTHY, STAT1, DCK, HMOX1, CMA1, CP2C9, CP2C8, Q92831, GSTM2, Q9UBX1, Q96CA5, HINT1, P00492, TRYB2, FKB1B, RORA, G6P, P00480, P06730, FOLH1, OAT, Q9NPB1, CASP1, O14717, O15382, DUT, Q9BZX2, ADA33, FIBG, Q16836, CASP3, RAC1, Q96C86, APAF, GMPR1, RAB5A, RASH, PNMT, P50135, P10114, Q8TEK3, O76054, Q03518, Q9Y689, DAPK1, P35558, PPARD, Q969G6, CATB, EPCR, SIRT5, P35270, AMYP, Q9D4P0, GSTT2, FKBP3, MAOA, APP, EP300, PTGES, TLR9, TOP2A, GLO1, NFE2L2, ALOX5, PTGS1, IKBKG IKBKB, CHUK, EGFR, HSD17B3, STAT3, HSD11B1, AKT1, GSK3B, CA7, CA6, CA12, CA14, CA9, CA5A, ABCC1, CHEK1, PDK1, WEE1, TOP1, RAF1, BRAF, CA2, CA1, GCGR, MMP14, AURKB, SERPINE1, RPS6KB1, AURKA, CDK2 CCNA1 CCNA2, TYR, AGTR1, NOX4, BMP1, MMP13, ADAM17, CELA1, PREP, GRIK1, MMP8, CXCR2, ALPL, MELK, MPDH1, IMPDH2, CFD, SPHK2, SPHK1, MAP3K12, BCL2, THRA, THRB, CSF1R, ALOX5AP, NCOR2 HDAC3, SGK1, DPP4, DPP7, HSP90AB1, ADAM10, MMP3, CDK5R1, CDK5, KCNH2, HPGD, JAK1, JAK2, HDAC10, MMP16, MMP12, YWHAG, LIPC, LIPG, WDR5, HTR1A, MMP9, ANPEP, QPCT, CA13, CA5B, MMP7, GRIK2, ST3GAL3, FUT7, FUT4, F3 F7, GRM2, P2RY12, PSEN1 APH1B ,PTGS2, TNF
Berberine target genes involved in ovarian cancer	ESR1, STAT1, CDK1, RXRA, CCNB1, PGR, PIK3CA, CHEK1, PIK3R1, PIK3CG, KIT, NR1H4, PIK3CD, PPARD, RXRB, AURKB, HMOX1, INSR, NR1H3, XIAP, CDK9, ERBB4, GSTP1, HCK, KIF11, SCD, TYMS, ATR, DHFR, FABP4, LRRK2, NOS3, NR3C2, PRKACA, FABP6, MMP3, RARB, BMP2, DAPK1, GSTM1, MAOB, CYP27B1, RARG, RPS27, AGPAT2, CYP11B2, GRK2, GSTM2, OAT, SETD7, GABRB3 ,GRK5 ,HINT1 ,HTR3A ,MAP4K4 ,PTGES ,RORA ,SAE1, TBXAS1

جدول ۲- ۱۰ ژن هاب هدف بربرین در سرطان تخمدان با بیشترین درجه اتصال در شبکه PPI

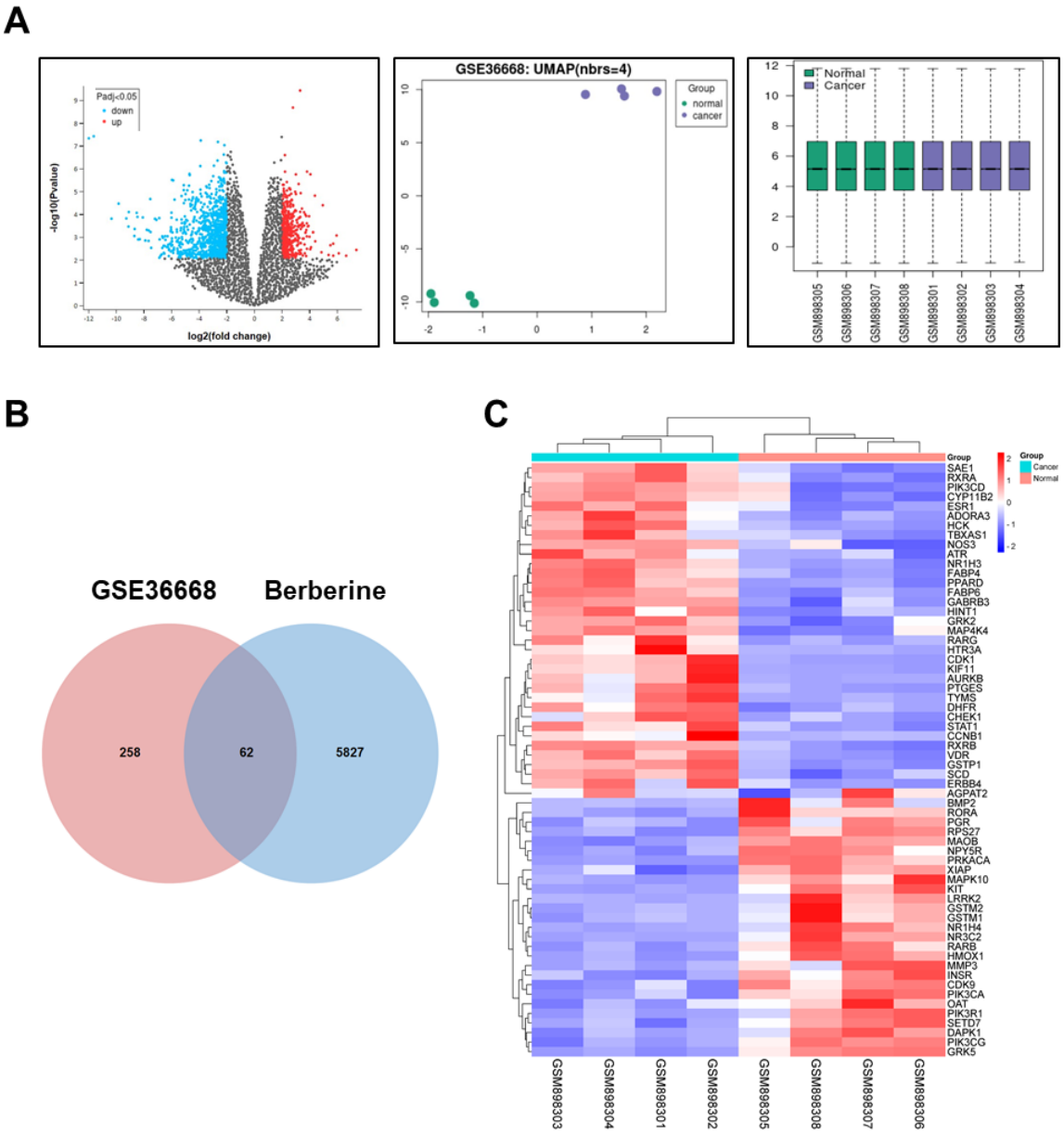
Table 2. 10 berberine target hub genes in ovarian cancer with the highest degree of connection in the PPI network

Gene symbol	Degree
ESR1	25
STAT1	20
CDK1	15
PIK3CA	13
RXRA	15
PGR	13
CCNB1	13
CHEK1	12
PIK3R1	11
PIK3CG	10

جدول ۳- ژن‌های هدف بالقوه بربرین که در مسیرهای مرتبط با سرطان تخمدان نقش دارند.

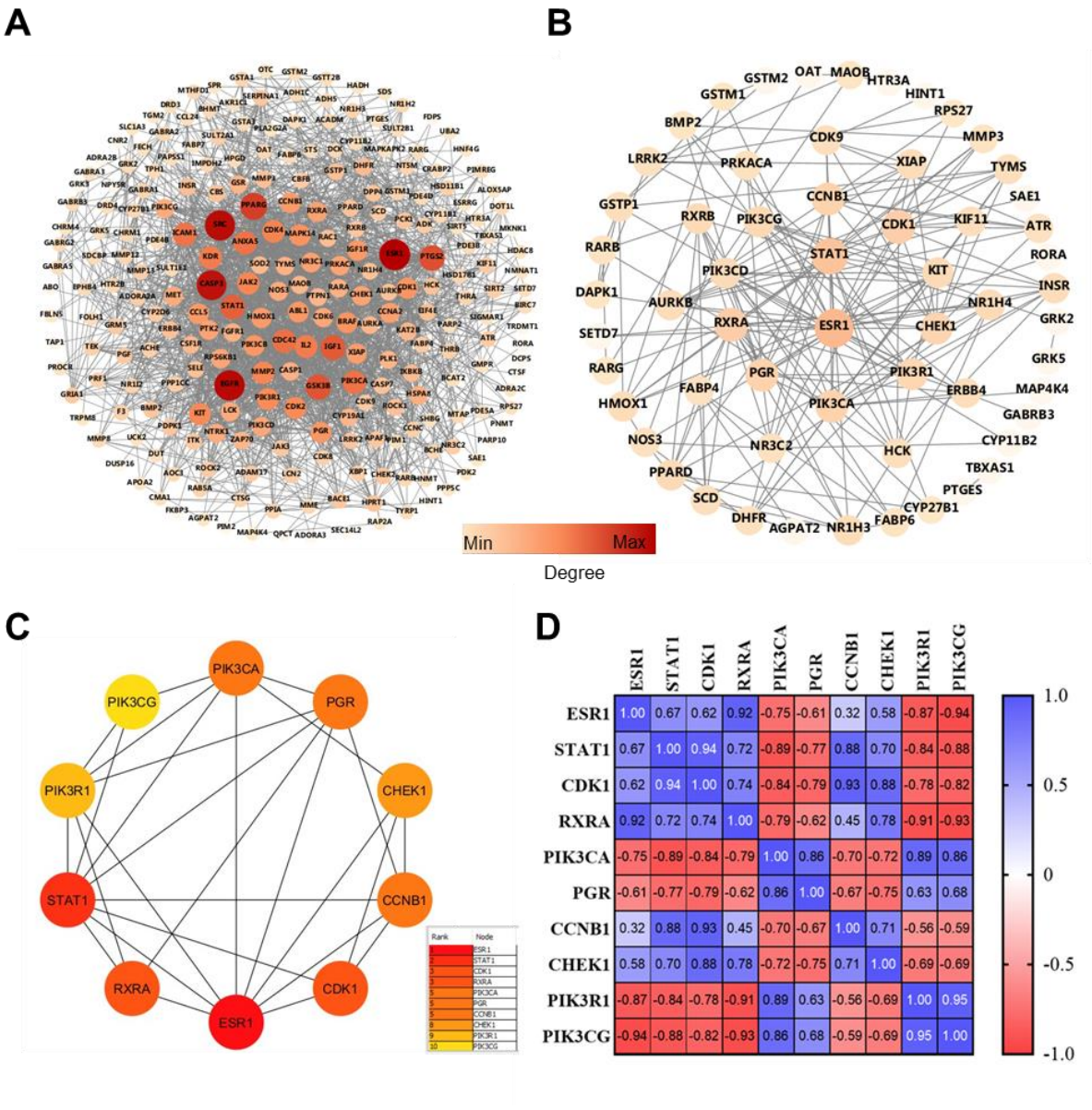
Table 3. Berberine potential target genes that are involved in pathways related to ovarian cancer

Pathways	Potential target genes involved in significant pathways	Combined score	Adjusted *p*
Pathways in cancer	PIK3CA, PIK3CD, MAPK10, PTGS2, KIT, GSTM2, GSTM1, DAPK1, STAT1, GSTP1, ESR1, RXRB, BMP2, RXRA, RARB, HMOX1, PRKACA, PPARD	575.53	2.564e-13
Chemical carcinogenesis	GSTM2, GSTM1, VDR, GSTP1, PIK3CD, XIAP, PIK3R1, ESR1, RXRA, PIK3CA, PGR, PRKACA	662.94	3.758e-11
Fluid shear stress and atherosclerosis	MAPK10, GSTM2, GSTM1, PIK3CA, NOS3, GSTP1, PIK3CD, HMOX1, PIK3R1	557.89	2.998e-8
Progesterone-mediated oocyte maturation	MAPK10, CCNB1, PIK3CA, CDK1, PIK3CD, PGR, PIK3R1, PRKACA	669.60	4.135e-8
PPAR signaling pathway	RXRB, RXRA, SCD, FABP4, NR1H3, FABP6, PPARD	741.18	1.235e-7



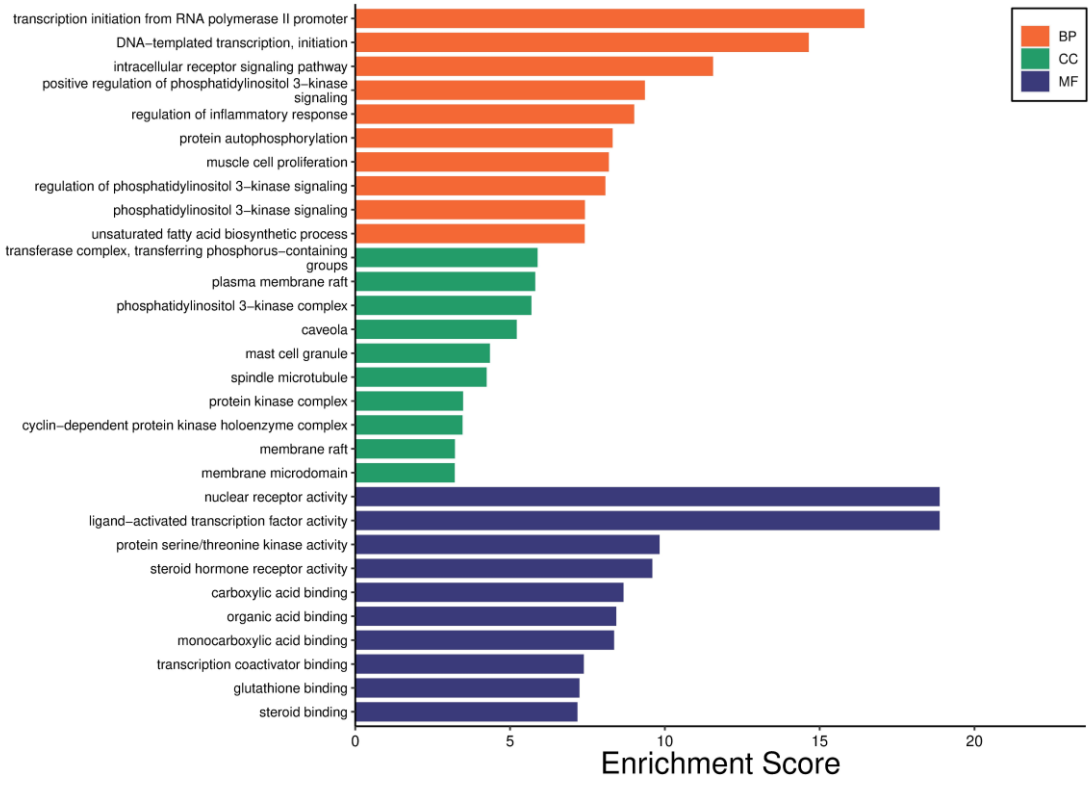
شکل ۲- A: نمودارهای آتشفشانی، UMAP و جعبه‌ای داده‌های بیانی نمونه‌های انتخاب شده از مطالعه‌ی GSE36668. B: نمودار ون ژن‌های مشترک بین اهداف بربرین و ژن‌های دارای بیان افتراقی در سرطان تخمدان. C: نمودار حرارتی ژن‌های موثر بربرین و سرطان تخمدان.

Figure 2. A: Volcano plot, UMAP plot and boxplots of expression data of selected samples from GSE36668 dataset. B: Venn diagram of shared genes between Berberine targets and differentially expressed genes in ovarian cancer. C: Heatmap of Berberine target genes and ovarian cancer.



شکل ۳- A: شبکه PPI مربوط به ۳۱۹ مورد ژن هدف بربرین. گره دایره‌ای نشان‌دهنده هر پروتئین است، هر چه اندازه گره بزرگتر باشد و رنگ آن تیره‌تر باشد مقدار درجه بالاتر است. B: شبکه PPI مربوط به ٦٢ ژن هدف بربرین در سرطان تخمدان. C: شبکه PPI ژن‌های هاب هدف بربرین در سرطان تخمدان. D: نمودار همبستگی برای ۱۰ ژن هاب مورد هدف بربرین در سرطان تخمدان.

Fig 3. A: PPI network related to 319 Berberian target genes. A circular node represents each protein, the larger the node size and the darker the color, the higher the degree value. B: PPI network of 62 Berberine target genes in ovarian cancer. C: PPI network of Berberine target genes in ovarian cancer. D: Correlation plot for 10 hub genes targeted by Berberine in ovarian cancer.



شکل ٤- بررسی آنتولوژی ژنی ژن‌های مشترک بربرین در سرطان تخمدان به ترتیب در سه بخش BP، CC و MF.

Fig 4. Gene ontology review of Berberine common genes in ovarian cancer, respectively, in three sections BP, CC and MF.

بحث

میزان مرگ و میر مرتبط با سرطان تخمدان بالاترین رتبه را در میان سرطان‌های بدخیم زنانه دارد. با این حال، علت و رویدادهای مولکولی زمینه‌ای سرطان تخمدان مشخص نیست (۲۸). علی‌رغم پیشرفت در درمان جراحی و پزشکی، مرگ و میر کلی سرطان تخمدان تا حد زیادی در دهه‌های گذشته بدون تغییر باقی مانده است. کشنده بودن سرطان تخمدان عمدتاً به دلیل مشکلات در تشخیص آن در مراحل اولیه و عدم درمان مؤثر برای بیماران با وضعیت پیشرفته است (٤). بنابراین، درک عوامل و مکانیسم‌های پیشرفت سرطان تخمدان برای بهبود میزان بقا و پیشگیری ضروری است. اخیراً، بیوانفورماتیک به سرعت در حال توسعه است و به طور گسترده‌ای برای آشکار کردن تغییرات ژنتیکی عمومی در پیشرفت سرطان‌ها استفاده می‌شود. استفاده از این ابزارهای بیوانفورماتیکی امکان شناسایی اهداف برای تشخیص، درمان و پیش‌آگهی تومورها را فراهم می‌کند (۵۲). فارماکولوژی شبکه می‌تواند به پیش‌بینی شناسایی ژن‌های هدف و مسیرهای سیگنال‌دهی مرتبط بپردازد و در ادامه به انجام آزمایشات به صورت کلینیکی کمک کند (٤٧). در مطالعه‌ای مکانیسم دارویی OP-B که سرطان تخمدان را مهار می‌کند با ترکیبی از پیش‌بینی فارماکولوژی شبکه و اعتبارسنجی تجربی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه آن‌ها برای اولین بار نشان داد که OP-B می‌تواند به طور موثر تکثیر سلولی و مهاجرت را در سرطان تخمدان سرکوب کند و همچنین باعث آپوپتوز و توقف چرخه سلولی عمدتاً از طریق تنظیم مسیر سیگنال‌دهی STAT3 شود (۵۳). ده ژن هاب به دست آمده از نتایج حاصل از این مطالعه شامل ESR1،

STAT1، CDK1، RXRA، PIK3CA، PGR، CCNB1، CHEK1، PIK3R1 و PIK3CG می‌باشد. ESR1 مخفف گیرنده استروژن ۱ است که پروتئین گیرنده استروژن آلفا (ERα) را کد می کند. ERα یک گیرنده هورمونی هسته‌ای می‌باشد که نقش مهمی در میانجی‌گری اثرات استروژن در بافت‌های هدف دارد (٦). ESR1 به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل کرده و بیان ژن‌های دخیل در فرایندهای فیزیولوژیکی مختلف از جمله رشد، تمایز و توسعه سلولی را تنظیم می‌کند. جهش یا اختلال در تنظیم این ژن و محصول پروتئینی آن، ERα، با چندین بیماری از جمله سرطان سینه مرتبط است (۱۲). گیرنده استروژن، عملکردی در زیرگروه‌های انتخابی سرطان تخمدان دارد و نشان‌دهنده یک هدف بالقوه برای درمان است که با نتایج انتولوژی مولکولی و زیستی بدست آمده سازگاری دارد. اکثریت (بیش از ۸۰٪) کارسینوم‌های سروز درجه بالا، سروز درجه پایین و آندومتریوئید و بسیاری از تومورهای سلولی گرانولوزا ERα را بیان می‌کنند (۵). هدف بعدی مبدل سیگنال و فعال کننده رونویسی ۱ (STAT1) یک پروتئین مبدل است و به عنوان یک فاکتور رونویسی عمل می‌کند که با نتایج انتولوژی زیستی و سلولی مرتبط بدست آمده سازگاری دارد، اما نقش آن در سرطان تخمدان به طور کامل شناخته نشده است. عملاً، اثرات دو وجهی STAT1 بر تومورزایی در انواع مختلف سرطان وجود دارد (٥٤). شواهد موجود نشان می‌دهد که STAT1 دارای عملکردهای سرکوب‌کننده و ارتقا دهنده تومور است که در رگ‌زایی، تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم، آپوپتوز، مقاومت دارویی، ساقه و پاسخ‌های ایمنی عمدتاً از طریق تعامل و تنظیم ژن‌های هدف در سطوح مختلف نقش دارند (٢٤). CDK1 یکی از کینازهای وابسته به سیکلین (CDKs) خانواده‌ای از کینازهای سرین/ترئونین هستند که فعالیت آنها توسط مهارکننده‌های CDK (CKI) و سیکلین‌ها تنظیم می‌شود. به طور کلی، سیکلین‌ها و CKIها به ترتیب فعال سازی CDK را ترویج و مهار می‌کنند (٤٢). از آنجایی که سرطان معمولاً شامل اختلال در تنظیم چرخه سلولی می‌شود، سیکلین‌ها و CDKها با استفاده از مولکول‌های کوچک، پپتیدها، ایمونوتراپی و CKI در انواع تومورها مورد هدف قرار گرفته‌اند (٤٦). اگرچه بسیاری از مطالعات ارزیابی درمان‌های هدفمند CDK در سرطان تخمدان در مراحل اولیه بالینی هستند، شواهد قابل توجهی وجود دارد که هدف قرار دادن CDKها، به ویژه در ترکیب با داروهای سنتی مبتنی بر پلاتین، می تواند اثربخشی قابل توجهی در سرطان تخمدان داشته باشد. با این وجود، قبل از اینکه بتوان این عوامل را در انسان بررسی کرد، توسعه پیش بالینی اضافی مورد نیاز است، از جمله استفاده از مدل‌های تومور داخل بدن و مطالعات اضافی در مورد مکانیسم اثر آنها (۵۱). RXRA مخفف Retinoid X Receptor Alpha است که ژنی است که پروتئین آلفا گیرنده رتینوئید X را کد می‌کند. RXRA یک گیرنده هسته‌ای است که با سایر گیرنده‌های هسته‌ای، مانند گیرنده‌های اسید رتینوئیک (RARs) و گیرنده‌های فعال شده با تکثیر پراکسی زوم (PPARs) هترودایمر تشکیل می‌دهد. این هترودایمرها نقش اساسی در تنظیم بیان ژن در پاسخ به مولکول‌های سیگنال دهنده مختلف از جمله رتینوئیک اسید و اسیدهای چرب دارند همانطور که در تحلیل مسیرهای سیگنال‌دهی بدست آمده مشاهده شد (٤١). مولکول‌های سیگنال دهنده مختلف مانند اسید رتینوئیک می‌تواند تمایز را القا کند و از رشد سلول‌های سرطانی تخمدان جلوگیری کند و رتینوئیک اسید همچنین ممکن است بیان ژن مربوط به تکثیر سلولی و آپوپتوز در سلول‌های سرطان تخمدان را تنظیم کند اسیدهای چرب می توانند از طریق تغییرات متابولیسم اسیدهای

چرب می‌تواند بر رشد، تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی تخمدان تأثیر بگذارد (۵۵). PIK3CA مخفف Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase زیر واحد کاتالیزوری آلفا است. این ژنی است که زیر واحد کاتالیزوری p110α فسفاتیدیل ۳-کیناز (PI3K) را کد می‌کند. PIK3CA یک جزء حیاتی از مسیر PI3K است که در تنظیم فرایندهای سلولی مختلف از جمله رشد سلولی، تکثیر، بقا و متابولیسم نقش دارد (۴۴). جهش در ژن PIK3CA معمولا در انواع مختلف سرطان از جمله سرطان تخمدان یافت می‌شود. این جهش‌ها می‌توانند منجر به اختلال در تنظیم مسیر PI3K و در نتیجه رشد و بقای سلولی کنترل نشده شود. در سرطان تخمدان، جهش‌های PIK3CA با پیشرفت تومور، مقاومت در برابر درمان و پیش‌آگهی ضعیف مرتبط است. در سرطان تخمدان، جهش‌های PIK3CA با پیشرفت تومور، مقاومت در برابر شیمی‌درمانی و پیش‌آگهی ضعیف همراه است. هدف قرار دادن مسیر PI3K/AKT/mTOR، که اغلب به دلیل جهش‌های PIK3CA بی نظم است، به عنوان یک استراتژی درمانی بالقوه در درمان سرطان تخمدان ظاهر شده است (۲, ۱۸, ۴۵). PGR مخفف Progesterone Receptor است که پروتئینی است که توسط ژن PGR کدگذاری می‌شود. گیرنده‌های پروژسترون نقش مهمی در واسطه‌سازی اثرات پروژسترون، یک هورمون جنسی زنانه، در بافت‌های هدف دارند که با نتایج انتولوژی و مسیرهای سیگنال‌دهی بدست آمده سازگاری دارد (۱). در زمینه سرطان تخمدان، بیان گیرنده‌های پروژسترون می‌تواند بر رفتار تومور و پاسخ به درمان تأثیر بگذارد. تحقیقات نشان می‌دهد که گیرنده‌های پروژسترون ممکن است در برخی از سرطان‌های تخمدان، به‌ویژه در زیرگروه‌های خاصی مانند سرطان تخمدان آندومتریوئید وجود داشته باشد. وجود یا عدم وجود گیرنده‌های پروژسترون در سلول‌های سرطان تخمدان می‌تواند بر رشد، بقا و پاسخ آنها به درمان‌های هورمونی تأثیر بگذارد (۳۲). CCNB1، همچنین به عنوان Cyclin B1 شناخته می‌شود، پروتئینی است که در تنظیم چرخه سلولی نقش دارد. در زمینه سرطان تخمدان، CCNB1 نقش مهمی در ترویج تقسیم و تکثیر سلولی دارد. بیان نابجای CCNB1 در سرطان‌های مختلف از جمله سرطان تخمدان مشاهده شده است که می‌تواند به رشد و پیشرفت تومور کمک کند. مطالعات تحقیقاتی نشان داده‌اند که سطوح بالای بیان CCNB1 در سلول‌های سرطانی تخمدان با رفتار تهاجمی تومور، پیش‌آگهی ضعیف و مقاومت در برابر شیمی‌درمانی مرتبط است. مهار CCNB1 به عنوان یک استراتژی درمانی بالقوه برای هدف قرار دادن سلول‌های سرطان تخمدان و افزایش نتایج درمان پیشنهاد شده است (۱۵). CHEK1 که به نام Checkpoint Kinase 1 نیز شناخته می‌شود، پروتئینی است که در مسیر پاسخ آسیب DNA نقش دارد. در زمینه سرطان تخمدان، CHEK1 نقش مهمی در حفظ ثبات ژنومی و تنظیم پیشرفت چرخه سلولی در پاسخ به آسیب DNA ایفا می‌کند (۳۴). مطالعات تحقیقاتی نشان داده‌اند که بیان CHEK1 در برخی از سلول‌های سرطانی تخمدان افزایش یافته است و بیان بیش از حد آن با رشد تومور، بقا و مقاومت در برابر شیمی درمانی مرتبط است. مهار CHEK1 به عنوان یک استراتژی درمانی بالقوه برای حساس کردن سلول‌های سرطانی تخمدان به شیمی درمانی و افزایش نتایج درمان بررسی شده است (۱۶). PIK3R1 که به عنوان زیرواحد تنظیم کننده فسفوئینوزیتید-۳-کیناز نیز شناخته می‌شود، یک زیرواحد تنظیم کننده آنزیم فسفوئینوزیتید ۳-کیناز (PI3K) است. در سرطان تخمدان، تغییرات در مسیر PI3K، از جمله جهش یا اختلال در تنظیم PIK3R1، می‌تواند نقش مهمی در

توسعه و پیشرفت تومور داشته باشد (۴۳). PIK3CG، همچنین به عنوان گاما زیرواحد کاتالیزوری فسفاتیدیل ۴،۵-بیس فسفات ۳-کیناز شناخته می‌شود، ژنی است که زیر واحد کاتالیزوری p110γ فسفوئینوزیتید ۳-کیناز (PI3K) را کد می‌کند. PIK3CG در مسیر سیگنالینگ PI3K نقش دارد که نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای سلولی مختلف از جمله رشد، تکثیر و بقای سلول دارد (۳۶). مطالعات تحقیقاتی نشان داده‌اند که جهش یا تغییر در بیان PIK3R1 و PIK3CG می‌توانند منجر به فعال‌سازی نابجای مسیر PI3K در سلول‌های سرطان تخمدان شوند. این فعال‌سازی می‌تواند باعث رشد، بقا و تهاجم سلولی شود و به تهاجمی تومور و مقاومت در برابر درمان کمک کند (۲۹). نتایج حاصل از آنالیزهای انجام شده به وضوح نشان می‌دهد کـه چندین مسیر توسط بربرین در سرطان تخمدان تنظیم می‌شوند، ژن‌های مرتبط بـا سرطان تخمدان و فاکتورها و عوامل ایمنی‌شناسی مرتبط مختلف به طور مداوم و به شدت تنظیم مجدد شده‌اند. در تجزیه وتحلیل این مسیرها همچنین مشاهده شد که ژن‌های بدست آمده در رشد، تکثیر و بقای سلول، رگ‌زایی، تکثیر سلولی، مهاجرت، تهاجم، آپوپتوز، مقاومت دارویی و پاسخ‌های ایمنی درگیر می‌باشند. در مجموع، در این مطالعه حدود ۶۲ ژن توسط آنالیز دو گروه ژنی بدست آمد. بـا این حال، حدودا در تمام اهداف مشترک شواهد زیادی در مطالعات دیگر وجود داشت که نشان می‌داد آن‌ها در فرایند بیماری سرطان تخمدان از طریق فاکتورها و عوامل و مسیرهای مبتنی بر فرایندهای سلولی، مولکولی و زیستی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. درک نقش ژن‌های بدست آمده در سرطان تخمدان برای توسعه درمان‌های هدفمندی که می‌تواند نتایج بیمار را بهبود بخشد و بر مقاومت دارویی در این بیماری چالش برانگیز غلبه کند، بسیار مهم است.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان می‌دهد که بربرین با تاثیر روی رشد، تکثیر و بقای سلول، رگ‌زایی، مهاجرت، تهاجم، آپوپتوز، مقاومت دارویی و پاسخ‌های ایمنی می‌تواند در درمان سرطان تخمدان با هدف قرار دادن ژن‌های دخیل در سرطان تخمدان استفاده شود، با این حال برای درک کامل نحوه عملکرد آن به تأیید بیشتر به وسیله مطالعات بالینی نیاز است.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است و بدینوسیله از کلیه پرسنل مربوطه قدردانی می‌شود.

منابع

1. Akison L.K, Robker R.L.2012. The critical roles of progesterone receptor (PGR) in ovulation, oocyte developmental competence and oviductal transport in mammalian reproduction. *Reproduction in Domestic Animals,* 47 Suppl 4:288-96.

2. Campbell I.G, Russell S.E., Choong D.Y., Montgomery K.G., Ciavarella M.L., Hooi C.S. 2004. Mutation of the PIK3CA gene in ovarian and breast cancer. *Cancer research,* 64(21):7678-81.

3. Chu S.C, Yu C.C, Hsu L.S, Chen K-S, Su M.Y, Chen P.N. 2014. Berberine reverses epithelial-to-mesenchymal transition and inhibits metastasis and tumor-induced angiogenesis in human cervical cancer cells. *Molecular pharmacology,* 86(6):609-23.

4. Colombo N, Van Gorp T, Parma G, Amant F, Gatta G, Sessa C, Vergote I. 2006. Ovarian cancer. *Critical reviews in oncology/hematology,* 60(2):159-79.

5. Doherty J.A, Rossing M.A, Cushing-Haugen K.L, Chen C, Van Den Berg D.J, Wu A.H. 2010. ESR1/SYNE1 polymorphism and invasive epithelial ovarian cancer risk: an Ovarian Cancer Association Consortium study. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention,* 19(1):245-50.

6. Dustin D, Gu G, Fuqua SA. 2019. ESR1 mutations in breast cancer. *Cancer,* 125(21):3714-28.

7. Eissa L.A., Kenawy H.I., El-Karef A., Elsherbiny N.M., El-Mihi K.A. 2018. Antioxidant and anti-inflammatory activities of berberine attenuate hepatic fibrosis induced by thioacetamide injection in rats. *Chemico-biological interactions,* 294:91-100.

8. Elgaaen B.V., Olstad O.K., Sandvik L., Ødegaard E., Sauer T., Staff A..C, Gautvik K.M. 2012. ZNF385B and VEGFA are strongly differentially expressed in serous ovarian carcinomas and correlate with survival. *PLOS ONE,* 7(9):46317-46326

9. Gfeller D., Grosdidier A., Wirth M., Daina A., Michielin O., Zoete V. 2014. SwissTargetPrediction: a web server for target prediction of bioactive small molecules. *Nucleic acids research,* 42(W1):W32-W8.

10. Jahagirdar D, Gore CR, Patel H, Maria K, Tandon I, Sharma NK. 2018. Induction of apoptotic death and cell cycle arrest in HeLa cells by extracellular factors of breast cancer cells. A*sian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP,* 19(12):3307.

11. Jeong S.Y., Seol D.W. 2008. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB reports,* 41(1):11-22.

12. Jeselsohn R., Buchwalter G., De Angelis C., Brown M., Schiff R. 2015. ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer. *Nature reviews Clinical oncology,* 12(10):573-83.

13. Jia A., Xu L., Wang Y. 2021. Venn diagrams in bioinformatics. *Briefings in bioinformatics,* 22(5):bbab108.

14. Jie S., Li H., Tian Y., Guo D., Zhu J., Gao S., Jiang L. 2011. Berberine inhibits angiogenic potential of Hep G2 cell line through VEGF down□regulation in vitro. *Journal of gastroenterology and hepatology,* 26(1):179-85.

15. Kang E.Y., Weir A., Meagher N.S., Farrington K., Nelson G.S, Ghatage P. 2023. CCNE1 and survival of patients with tubo-ovarian high-grade serous carcinoma: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Cancer,* 129(5):697-713.

16. Kim M.K, James J, Annunziata C.M. 2015. Topotecan synergizes with CHEK1 (CHK1) inhibitor to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *BMc Cancer,* 15:196.

17. Kim S., Chen J., Cheng T., Gindulyte A., He J., He S., Li Q., Shoemaker B.A., Thiessen P. A., Yu B., Zaslavsky L., Zhang J., Bolton E.E. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research,* 51(D1), D1373–D1380.

18. Kolasa I.K., Rembiszewska A., Felisiak A, Ziolkowska-Seta I., Murawska M., Moes J. 2009. PIK3CA amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients. *Cancer biology & therapy,* 8(1):21-6.

19. Kubeček O., Laco J., Špaček J., Petera J., Kopecký J., Kubečková A., Filip S. 2017. The pathogenesis, diagnosis, and management of metastatic tumors to the ovary: a comprehensive review. *Clinical & experimental metastasis,* 34(5):295-307.

20. Kuleshov M.V., Jones M.R., Rouillard A.D., Fernandez N.F., Duan Q., Wang Z. 2016. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research,* 44(W1):W90-W7.

21. Lee A.Y., Park W., Kang T.W., Cha MH., Chun J.M. 2018. Network

Kinase Inhibitors: *Academic Press,* p. 97-127.

30. Natanzon Y., Goode E.L., Cunningham J.M. 2018. Epigenetics in ovarian cancer. Seminars in cancer biology; *Elsevier*.

31. Okubo S., Uto T., Goto A., Tanaka H., Nishioku T., Yamada K., Shoyama Y. 2017. Berberine induces apoptotic cell death via activation of caspase-3 and-8 in HL-60 human leukemia cells: nuclear localization and structure–activity relationships. *The American Journal of Chinese Medicine,* 45(07):1497-511.

32. Peluso J.J., Liu X., Saunders M.M., Claffey K.P., Phoenix K. 2008. Regulation of ovarian cancer cell viability and sensitivity to cisplatin by progesterone receptor membrane component-1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* 93(5):1592-9.

33. Qi H.W., Xin L.y., Xu X., Ji X.X., Fan L.H. 2014. Epithelial-to-mesenchymal transition markers to predict response of Berberine in suppressing lung cancer invasion and metastasis. *Journal of translational medicine,* 12:1-10.

34. Ranuncolo S.M., Polo J.M., Melnick A. 2008. BCL6 represses CHEK1 and suppresses DNA damage pathways in normal and malignant B-cells. *Blood cells, molecules, and diseases,* 41(1):95-9.

35. Rosenfield R.L. 2015. The polycystic ovary morphology-polycystic ovary syndrome spectrum. *Journal of pediatric and adolescent gynecology,* 28(6):412-9.

36. Semba S., Itoh N., Ito M., Youssef E.M., Harada M., Moriya T. 2002. Down-regulation of PIK3CG, a catalytic subunit of phosphatidylinositol 3-OH kinase, by CpG hypermethylation in human colorectal carcinoma. *Clin Cancer Research,* 8(12):3824-31.

37. Shameer K., Badgeley M.A.., Miotto R, Glicksberg B.S., Morgan J.W., Dudley J.T. 2017. Translational bioinformatics in the pharmacology-based prediction of active compounds and molecular targets in Yijin-Tang acting on hyperlipidaemia and atherosclerosis. *Journal of ethnopharmacology,* 221:151-9.

22. Lengyel E. 2010. Ovarian cancer development and metastasis. *The American journal of pathology,* 177(3):1053-64.

23. Li H., Guo L., Jie S., Liu W., Zhu J., Du W. 2008. Berberine inhibits SDF-1-induced AML cells and leukemic stem cells migration via regulation of SDF-1 level in bone marrow stromal cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy,* 62(9):573-8.

24. Li X., Wang F., Xu X., Zhang J., Xu G. 2021. The dual role of STAT1 in ovarian cancer: insight into molecular mechanisms and application potentials. *Frontiers in Cell and Developmental Biology,* 9:636595.

25. Liu D., Meng X., Luo H. 2019. A natural isoquinoline alkaloid with antitumor activity: studies of the biological activities of berberine. *Frontiers in pharmacology,* 10:437939.

26. Ma W., Zhu M., Zhang D., Yang L., Yang T., Li X., Zhang Y. 2017. Berberine inhibits the proliferation and migration of breast cancer ZR-75-30 cells by targeting Ephrin-B2. *Phytomedicine,* 25:45-51.

27. Matera R., Saif M.W. 2017. New therapeutic directions for advanced pancreatic cancer: cell cycle inhibitors, stromal modifiers and conjugated therapies. *Expert Opinion on Emerging Drugs,* 22(3):223-33.

28. Momenimovahed Z., Tiznobaik A., Taheri S., Salehiniya H. 2019. Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *International journal of women's health,* 287-99.

29. Naqi A., Ara S.A., Khan M.A., Ahmad J. 2022. Chapter 4 - An insight on PI3K/AKT/MTOR inhibitors in cancer: Opportunity and translational perspectives. In: Hassan MI, Noor S, editors. Protein

46. Wang Q, Bode AM, Zhang T. 2023. Targeting CDK1 in cancer: mechanisms and implications. *NPJ precision oncology,* 7(1):58.

47. Wang S., Gao J., Li Q., Ming W., Fu Y., Song L., Qin J. 2020. Study on the regulatory mechanism and experimental verification of icariin for the treatment of ovarian cancer based on network pharmacology. *Journal of ethnopharmacology,* 262:113189.

48. Wang X., Wang N., Li H., Liu M., Cao F., Yu X. 2016. Up-regulation of PAI-1 and down-regulation of uPA are involved in suppression of invasiveness and motility of hepatocellular carcinoma cells by a natural compound berberine. *International Journal of Molecular Sciences,* 17(4):577.

49. Wang Z, Wang Y-y. 2013. Modular pharmacology: deciphering the interacting structural organization of the targeted networks. *Drug discovery today,* 18(11-12):560-6.

50. Xin W., Zi-Yi W., Zheng J-H, Shao L. 2021. TCM network pharmacology: a new trend towards combining computational, experimental and clinical approaches. *Chinese journal of natural medicines,* 19(1):1-11.

51. Yang W., Cho H., Shin H-Y., Chung J-Y., Kang E.S., Lee E.j, Kim J.H. 2016. Accumulation of cytoplasmic Cdk1 is associated with cancer growth and survival rate in epithelial ovarian cancer. *Oncotarget,* 7(31):49481.

52. Yang X, Zhu S, Li L, Zhang L, Xian S, Wang Y, Cheng Y. 2018. Identification of differentially expressed genes and signaling pathways in ovarian cancer by integrated bioinformatics analysis. *OncoTargets and therapy,* 1457-74.

53. Yuan S., Xu Y., Yi T., Wang H. 2022. The anti-tumor effect of OP-B on ovarian cancer in vitro and in vivo, and its mechanism: An investigation using network era of real-time biomedical, health care and wellness data streams. *Briefings in bioinformatics,* 18(1):105-24.

38. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome research,* 13(11):2498-504.

39. Szklarczyk D., Franceschini A., Wyder S, Forslund K., Heller D., Huerta-Cepas J. 2015. STRING v10: protein–protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic acids research,* 43(D1):D447-D52.

40. Tang D., Chen M., Huang X., Zhang G., Zeng L., Zhang G. 2023. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. *PLoS One,* 18(11):e0294236.

41. Tontonoz P., Graves R.A., Budavari A.I., Erdjument-Bromage H., Lui M., Hu E. 1994. Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR7 and RXRa. *Nucleic acids research,* 22(25):5628-34.

42. Ubersax JA, Woodbury EL, Quang PN, Paraz M, Blethrow JD, Shah K, et al. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature,* 425(6960):859-64.

43. Vallejo-Díaz J., Chagoyen M., Olazabal-Morán M., González-García A., Carrera A.C. 2019. The Opposing Roles of PIK3R1/p85α and PIK3R2/p85β in Cancer. *Trends Cancer,* 5(4):233-44.

44. Vivanco I., Sawyers C.L. 2002. The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer,* 2(7):489-501.

45. Wang D., Li C, Zhang Y., Wang M., Jiang N., Xiang L. 2016. Combined inhibition of PI3K and PARP is effective in the treatment of ovarian cancer cells with wild-type PIK3CA genes. *Gynecol Oncol,* 142(3):548-56.

pharmacology-based analysis. *Journal of Ethnopharmacology,* 283:114706.

54. Zhang Y., Liu Z. 2017. STAT1 in cancer: friend or foe? *Discovery medicine,* 24(130):19-29.

55. Zheng S. 2001. The expression of RAR/RXR and RA sensitivity in primary ovarian tumor cells: *Temple University.*