

基于 CTL 模型检测的胃腺癌核心路径形式化验证^{*}

王亚鹏, 雷丽晖

(陕西师范大学计算机科学学院, 陕西 西安 710119)

摘要:胃腺癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,死亡率居消化道各类癌症之首。其发生发展是多步骤、多因素参与的复杂过程,涉及到多种蛋白分子的改变以及信号通路的异常,但其确切发病机制目前尚不清楚,研究其发病机理,探索有效治疗方法一直是医学研究最重要的课题之一。因此,对胃腺癌信号转导网络的研究有助于阐明其发病机制。目前,在胃腺癌的发生发展过程中由于基因的改变而导致细胞功能的变化,以及癌细胞环境因子通过作用于其受体和信号转导通路而影响其他正常细胞的功能。胃腺癌的信号转导网络非常复杂,通过对胃腺癌信号转导网络离散值模型的分析 and 验证,说明靶向胃腺癌信号通路或蛋白治疗的优越性。应用符号模型检测技术自动分析靶向信号通路或蛋白是如何影响胃腺癌细胞命运,了解胃腺癌的发生发展机理,从中找到潜在靶点,为治疗胃腺癌提供建议,使研制新的抗癌药物成为可能。

关键词:模型检测; NuSMV; 细胞信号通路; 胃腺癌

中图分类号: TP301.6

文献标志码: A

doi: 10.3969/j.issn.1007-130X.2018.12.025

Formal verification of gastric adenocarcinoma core pathway based on CTL model checking

WANG Ya-peng, LEI Li-hui

(School of Computer Science, Shaanxi Normal University, Xi'an 710119, China)

Abstract: Gastric adenocarcinoma is the most common malignancy in the digestive system, and its mortality ranks first among all types of cancers in the digestive tract. Its occurrence and development is a complex multi-step and multi-factor process which involves various protein molecules' change and abnormal signal pathways. However, its exact pathogenesis is still not clear. Studying its pathogenesis and exploring effective treatment methods have always been one of the most important topics in medical research. The study of gastric adenocarcinoma signal transduction networks therefore helps to elucidate its pathogenesis. At present, in the process of the development of gastric adenocarcinoma, there are some genetic changes that lead to changes in cell functions, and cancer cell environmental factors affect the function of cancer cells by acting on its receptors and signal transduction pathways. The signal transduction network of gastric adenocarcinoma is very complicated. We analyze and validate the discrete model of gastric adenocarcinoma signal transduction network to illustrate the superiority of targeting signaling pathways or protein therapeutics in gastric adenocarcinoma signal transduction networks. We use model detection technique to automatically analyze how targeting signaling pathways and key proteins affect the fate of gastric adenocarcinoma cells, helping understand the mechanism of occurrence and development of gastric adenocarcinoma, find potential targets for the treatment of gastric adenocarcinoma and provide advice on the development of new anti-cancer drugs.

^{*} 收稿日期:2018-06-05;修回日期:2018-08-15

基金项目:国家自然科学基金(F020504, A011404);中央高校基本科研业务费专项资金(GK201603086)

通信地址:710119 陕西省西安市长安区陕西师范大学计算机科学学院

Address: School of Computer Science, Shaanxi Normal University, Chang'an District, Xi'an 710119, Shaanxi, P. R. China

Key words: model checking; NuSMV; cell signaling pathway; gastric adenocarcinoma

1 引言

胃癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,而胃腺癌是胃癌中最常见的组织学类型。胃腺癌可发生于任何年龄段,其发病率和死亡率随着年龄的增长而呈上升趋势。在我国胃腺癌死亡率占有胃癌的 14%,居各类癌死亡率的第一位。近年来,随着科技的发展,癌细胞基因表达的异常水平与胃腺癌细胞发生发展和转移的相关性研究有很大进展,已经了解到在肿瘤发生过程中出现了一些基因改变以及由此而产生的信号转导通路的变化。

细胞内的信号分子并不是独立存在的,多数信号分子参与多条信号通路,因此不同信号通路之间会发生交叉调控。各条信号通路通过细胞内或细胞间信号分子相互作用在生物体内组成一个高度有序且复杂的网络,共同调控生物体的生理过程。研究人员通过分析癌细胞中基因表达的异常水平,来判断其与胃腺癌细胞的发生、发展与转移的相关性。明确胃腺癌发生发展和转移过程中关键蛋白和关键信号通路的过度表达或者抑制状态,有助于胃腺癌的早期诊断和治疗。

由于胃腺癌细胞信号网络的复杂性,生化反应中的许多参数都是未知的,因此传统的数学模型(如随机 Petri 网、常微分方程等)无法对其进行有效描述和分析。为了自动分析和验证复杂的胃腺癌信号转导网络,我们应用强大的模型检测^[1]技术验证模型(状态转移系统)是否满足时序逻辑公式中所表达的期望属性。通过模型检测来实现形式化验证,这是一种有限状态转换系统的自动化验证技术,已经成功应用于数字电路和硬件协议的验证。模型检测是确定给定模型是否满足命题时序逻辑中的期望属性/规范的过程。设 M 是一个状态转移图, S_0 是一组初始状态, φ 是时间逻辑的一个公式。模型检测问题是为了验证对于所有的初始状态 $s \in S_0$, 模型 M 满足属性 φ , 记为 $M, s \models \varphi$ 。模型检测算法详尽地搜索系统模型的状态空间以确定规范的真实性的。模型检测主要分为三个步骤:首先要给出系统的抽象模型和待验证模型的形式化表达;其次在验证工具上执行模型验证算法,以判定系统是否可以满足性质;最后给出结论,若系统不能满足性质,则给出反例。现有的模型检测主要包括计算树逻辑 CTL (Computation Tree

Logic)模型检测、线性时序逻辑 LTL (Linear Temporal Logic)模型检测和 μ 演算模型检测分支等。

本文将应用模型检测技术更好地了解胃腺癌细胞中的多条信号转导通路的相互作用,应用符号模型检测来研究胃腺癌细胞模型中的许多重要时序逻辑性质,这些性质已通过体内或者体外实验的验证。本文的目的是研究一些信号通路和蛋白的变化是如何影响细胞命运,从而鉴定出信号转导网络中的关键信号通路或关键蛋白,为治疗胃腺癌提供意见和建议。

2 信号转导通路

近年来对胃腺癌关键蛋白和信号转导通路的研究取得很大的进展, Suh 等^[2]发现叉头转录因子 P3 (FOX3) 影响了 Hippo 信号通路,他认为 FOX3 的低表达水平促进了癌细胞的发生发展,其与 Hippo 信号通路的核心激酶 Lats2 以及下游的转录辅助因子 YAP 的表达水平有一定的关联。Rosania 等^[3]发现 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 的表达水平降低与萎缩性胃炎 (AG) 和肠上皮化生 (IM) 在胃腺癌组织的出现显著相关。Tumanskiy 等^[4]发现胃腺癌的 P53 基因表达水平比正常值高出 2 倍,认为该基因的异常表达水平与胃腺癌细胞的侵袭能力有关。王秋红等^[5]发现 SAOSH1 与 p-ERK 在胃腺癌中的表达成显著负相关, SASH1 蛋白可能通过调控 ERK1/2 信号通路抑制胃腺癌的进展。王欣等^[6]认为 Smad1 能够抑制胃腺癌细胞的增殖和迁移,作用机制与 Akt 信号通路有关。

研究表明,在胃腺癌中 Ras/Raf/MEK/ERK、PI3k/Akt/mTOR、NF κ B、Wnt/ β -catenin、P53 等信号转导通路过度表达,因此可以通过了解胃腺癌发生发展的主要机制为治疗胃腺癌寻求潜在的分子靶点。我们的目标是明确胃腺癌信号转导通路中调节癌细胞周期进程的信号成分,了解胃腺癌的发生发展机理,从中找到潜在靶点为其治疗提供建议。图 1 所示为胃腺癌信号转导网络^[7],我们用符号 \rightarrow 表示激活,符号 $-$ 表示抑制作用。

Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK) 通路:近年来, MAPK 信号通路已经成为治疗癌症的重要靶点,主要功能是通过特异性级联磷酸化,将细胞外的信号通过生化反应传入到细胞内。研究表明 Ras、Raf、MAPK 以及其上游蛋白激酶 (ERKs 和 MEK-

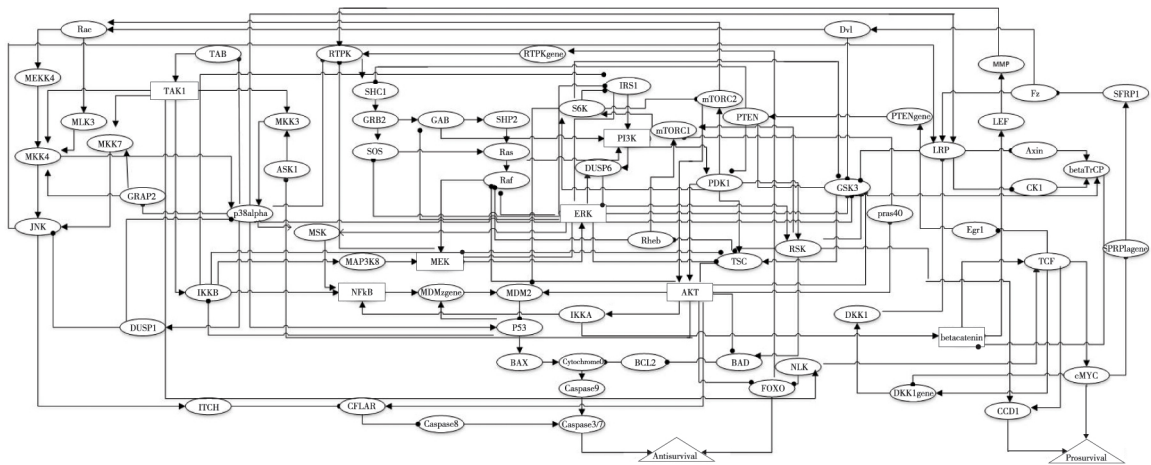


Figure 1 Signal transduction pathway of gastric adenocarcinoma(Rectangle represents high expression of proteins in cancer cells,and triangle represents proliferation and apoptosis of cancer cells)

图1 胃腺癌信号转导通路(方框代表癌细胞内高表达蛋白,三角形为癌细胞增殖和凋亡)

1)在胃癌组织中的表达明显增加,也说明了此通路在胃癌的发生发展中起到重要作用^[8]。

PI3k/Akt/mTOR 通路:PI3k/Akt/mTOR 信号通路作为细胞内重要信号转导通路之一,通过影响其下游多种分子的活化状态,在生物体内发挥着促进细胞增殖和抑制细胞凋亡的关键作用,它的过度表达与多种肿瘤的发生和发展密切相关。由于PI3K 通路在调节细胞的各种功能中起着非常重要的作用,已经成为抗癌药物研究的一个重要靶点。目前代表性药物是 LY294002,它是一种 PI3K 的抑制剂,研究发现它能够抑制抗凋亡分子 Bad 蛋白的磷酸化,与抗 Fas 抗体 CH-11 合用可使胃癌细胞系 MEK-45 凋亡^[9]。

核因子 κ B NF κ B(Nuclear Factor κ B) 通路:NF κ B 作为重要的调控因子,参与细胞增殖、细胞凋亡等过程的调节。研究发现,现在多种人类癌症细胞株中 NF κ B 呈过度表达状态,NF κ B 通过调控多种靶基因(如 COX-2、MMPS、Bcl-2、Ras、c-myc 等,这些基因都含有与 NF κ B 结合的位点)的表达,从而促进肿瘤的发生发展及转移。NF κ B 也是抗癌药物研究的一个重要靶点,因为其在促进癌细胞生长和抑制细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用。研究发现,NF κ B 在胃癌组织中的表达明显高于周边正常组织^[10]。

肿瘤抑制剂基因 P53:肿瘤抑制剂基因在维持基因组的完整性以及调节细胞增殖和凋亡的过程中起着非常重要的作用,因此肿瘤抑制剂基因的功能失活是肿瘤发生的一个直接原因。在胃癌发生发展的过程中主要涉及的肿瘤抑制剂是 P53,因此 P53 功能的失活能够促进癌细胞的生成和血管生

成并抑制癌细胞凋亡。

3 胃腺癌离散值模型

胃腺癌信号通路的作用机制非常复杂,涉及大量的基因突变、信号转导通路和蛋白的表达异常。我们应用胃腺癌信号转导网络的离散值模型定性研究信号转导通路异常或者蛋白突变导致过度表达情况下对胃腺癌发生发展的影响,从而可以根据胃腺癌发病机理找到治疗胃腺癌潜在的靶点。

在离散值建模中,每个节点表示参与信号转导网络生化反应的信号转导通路或者关键蛋白。在本文构建的离散值模型中,每个节点有两个离散值(每个节点也可以同时有 N 个值,分别代表不同的状态):0 表示信号转导通路或者蛋白受到抑制作用,1 表示信号转导通路或者蛋白过度表达作用。而节点的状态更新是依赖于其相邻节点状态的变化(状态更新),由离散状态转移函数描述。我们的工作类似于文献[11,12],胃腺癌信号转导网络模型是相对封闭的,通路中的各个蛋白可能受到其他蛋白的促进或者抑制作用。我们假设所有的反应都是同步发生的,即每个蛋白质(节点)的状态同时被更新。

在模型中,从时间 t 到 $t+1$ 每个蛋白节点的状态是通过传递函数由其父节点决定,由激活子 A_i 和抑制子 B_j 共同作用于节点, X_i 的离散状态传递函数为:

$$X_n(t+1) = \begin{cases} 1, & \text{if } \sum_i a_i(t) - \sum_j b_j(t) \geq 1 \\ 0, & \text{if } \sum_i a_i(t) - \sum_j b_j(t) < 1 \end{cases}$$

其中, a_i 和 b_j 分别是节点 X_n 的激活子 A_i 和抑制子 B_j 的值,“0”代表抑制状态,“1”代表过度表达状态。例如,IKKB 被 TAK1 激活,但同时被 P53 抑制,即在某个时刻 t ,若 $TAK1=1, P53=0$,则下一个时刻 $IKKB(t+1)=1$ (过度表达状态);若 $TAK1=0, P53=1$,则下一个时刻 $IKKB(t+1)=0$ (抑制状态)。

在模型中,一些节点只受到抑制剂的调控,若在时刻 t ,节点 $X_n(t)$ 的所有抑制子和为 0,则在下一个时刻 $X_n(t+1)=1$,但是若至少一种抑制剂是过度表达状态,则 $X_n(t+1)=0$ 。

只有抑制子的节点状态(更新)传递函数为:

$$X_n(t+1) = \begin{cases} 0, & \text{if } \sum_j b_j \geq 1 \\ 1, & \text{if } \sum_j b_j = 0 \end{cases}$$

在模型中,一些节点只受到激活子调控。若在时刻 t ,节点 $X_n(t)$ 的所有激活子和为 0,则在下一个时刻 $X_n(t+1)=0$,但是若至少一种激活子是过度表达状态,则 $X_n(t+1)=1$ 。

只有激活子的节点状态(更新)传递函数为:

$$X_n(t+1) = \begin{cases} 0, & \text{if } \sum_i a_i \geq 1 \\ 1, & \text{if } \sum_i a_i = 0 \end{cases}$$

图 1 所示的胃腺癌信号转导网络,由 77 个节点组成,其中包含两个输出节点。可能的状态数为 $2^{77} \approx 1.5 \times 10^{23}$ 。传统的随机模拟^[13,14]、布尔网络^[15]、随机微分方程^[16]不能有效模拟大型网络,我们采用符号化模型检测的方法来分析此模型。在模型中信号转导通路之间交叉调控,我们的目的是识别和发现一些信号通路和关键蛋白,分析调控血管生成和细胞增殖的旁分泌信号通路,找到治疗胃腺癌潜在的靶点。

4 模型检测

4.1 模型检测简介

模型检测是一种有效的自动化验证技术,用于分析软件和硬件的正确性,主要工作流程如下:

- (1) 抽象出系统的数学模型;
- (2) 形式化描述期望的性质,得到形式化表达;
- (3) 通过模型检测算法来验证系统是否满足该性质,并给出一个布尔结果:系统满足性质(正确)或者系统违背性质(错误并给出反例)。

我们用 Kripke 结构表示模型检测系统中有限

状态转移系统,Kripke 结构 M 用四元组表示: $M = (S, S_0, R, L)$, 其中, S 是可数且非空的状态集合, S_0 表示初始状态, R 表示状态迁移函数, L 表示状态的函数。给定一个 Kripke 结构(模型) M 和一个时态逻辑公式 φ , 模型检测器会自动、详尽地搜索状态空间来验证模型 M 是否满足逻辑公式 φ 。

4.2 计算树时序逻辑

计算树时序逻辑 CTL^[1,17] 是一种离散、分支时间逻辑,是一种在模型检测中应用较多的时序逻辑。在模型检测中,CTL 是一种描述能力非常强的时序逻辑,它用来描述计算树的属性,计算树的根对应于初始状态,树上的其他节点对应于可能的状态转换(路径)序列。CTL 公式由路径量词和时态算子组成。路径量词分为两种:全称路径量词 A ,表示“在网络中的所有路径”;存在路径量词 E ,表示“在网络中存在某条路径”,它们用于描述计算树时序逻辑中的分支结构。时态算子描述了计算树中一条路径上所有的属性。CTL 分为以下五种基本的时态算子: X 时态算子表示属性在路径的下一个状态为真; G 时态算子表示属性在路径的每个状态上都为真; F 时态算子表示属性在路径的未来某一个状态上为真; U 时态算子表示在路径的某一个状态上它的第二个属性为真并且在这个状态之前的所有状态上其第一个属性都为真; R 时态算子是 U 算子的逻辑对偶。CTL 公式可以分为状态公式 φ 和路径公式 ϕ :

$\varphi ::= \alpha \mid \neg \varphi \mid \varphi_1 \vee \varphi_2 \mid A\phi \mid E\phi, \alpha \in AP$, AP 为原子命题集合。

$\phi ::= X\varphi \mid F\varphi \mid \varphi_1 \cup \varphi_2 \mid G\varphi$ 。

CTL 逻辑公式在模型上的解释如下:

$M, s \models p$ for $p \in AP$ 当且仅当 $p \in L(s)$ 。

$M, s \models \neg p$ for $p \in AP$ 当且仅当 $M, s \not\models p$ 。

$M, s \models \varphi_1 \vee \varphi_2$ 当且仅当 $M, s \models \varphi_1$ or $M, s \models \varphi_2$ 。

$M, s \models \varphi_1 \wedge \varphi_2$ 当且仅当 $M, s \models \varphi_1$ and $M, s \models \varphi_2$ 。

$M, s \models AX\varphi$ 当且仅当对任一后继状态 $s_i, s_{i-1} \rightarrow s_i$ 且满足 $M, s \models \varphi$ 。 AX 表示:“任一后继状态”。

$M, s \models EX\varphi$ 当且仅当存在状态 $s_i, s_{i-1} \rightarrow s_i$ 且满足 $M, s \models \varphi$ 。 EX 表示:“存在下一个状态”。

$M, s \models AG\varphi$ 当且仅当对任一路径 $s_1 \rightarrow s_2 \rightarrow s_3 \rightarrow \dots, s_1 = s$, 并且满足在该路径上任一状态 $s_i, M, s_i \models \varphi$ 。表示从 s 开始的任何一条执行路径,该路

径上的任何一个状态都满足 φ 。

$M, s \models EG\varphi$ 当且仅当对任一路径 $s_1 \rightarrow s_2 \rightarrow s_3 \rightarrow \dots, s_1 = s$, 并且满足在该路径上任一状态 $s_i, M, s_i \models \varphi$ 。表示从 s 开始至少存在一条执行路径, 该路径上的任何一个状态都满足 φ 。

$M, s \models AF\varphi$ 当且仅当对任一路径 $s_1 \rightarrow s_2 \rightarrow s_3 \rightarrow \dots, s_1 = s$, 并且在该路径上存在某个状态 $s_i, M, s_i \models \varphi$ 。表示从 s 开始的任何一条执行路径, 该路径上至少存在一个状态都满足 φ 。

$M, s \models EF\varphi$ 当且仅当对任一路径 $s_1 \rightarrow s_2 \rightarrow s_3 \rightarrow \dots, s_1 = s$, 并且在该路径上存在某个状态 $s_i, M, s_i \models \varphi$ 。表示从 s 开始至少存在一条执行路径, 该路径上的至少存在一个状态都满足 φ 。

如图 2 所示, 我们用同步程序来研究胃腺癌核心信号转导网络并验证感兴趣的性质。计算建模和形式化验证可以帮助更好地了解癌细胞中多种信号转导通路的相互作用。在本文中, 我们应用符号模型检测器 NuSMV 来研究胃腺癌细胞模型中的许多重要的时序逻辑性质, 这些性质已经通过体外或体内实验得到了验证, 我们还提出了几个可以通过未来实验进行测试的属性。

下面给出胃腺癌核心信号通路网络模型的一部分 NuSMV 代码作为说明, 如图 2 所示。在 NuSMV 模型检测器中, 关键字 VAR 用于声明变量; ASSIGN 用于定义模型的初始状态 (init) 和状态转换 (next)。CTL 属性的验证使用“SPEC”语句进行编码。

```
MODULE main
VAR
  Rac: {0,1}; Dvl: {0,1}; mTORC2: {0,1};
  TAK1: {0,1}; GRAP2: {0,1}; MLK3: {0,1}; MKK4: {0,1};
  Antisurvival: boolean; Prosurvival: boolean;
ASSIGN
  init(Rac) := 0; init(Dvl) := 0; init(mTORC2) := 0;
  init(TAK1) := 0; init(GRAP2) := 0; init(MLK3) := 0; init(MKK4) := 0;
  init(Antisurvival) := FALSE; init(Prosurvival) := FALSE;
next(Rac) :=
  case
  Dvl + mTORC2 >= 1 : 1;
  Dvl + mTORC2 = 0 : 0;
esac;
next(MLK3) :=
  case
  Rac >= 1 : 1;
  Rac = 0 : 0;
esac;
next(MKK4) :=
  case
  Rac + TAK1 + MLK3 + GRAP2 >= 1 : 1;
  Rac + TAK1 + MLK3 + GRAP2 = 0 : 0;
esac;
SPEC AG(Rac=1 -> AF(Prosurvival))
```

Figure 2 Synchronization procedure for gastric adenocarcinoma core signaling pathway

图 2 胃腺癌核心信号通路同步程序

5 形式化分析与验证

胃腺癌的发生发展涉及多种蛋白和信号转导通路的异常表达, 研究蛋白和信号通路的变化如何影响胃腺癌细胞的命运及发生发展意义重大。研究发现一些表达异常的基因可以作为新的潜在靶

点用于胃腺癌的治疗, 近年来针对各种基因的靶向治疗取得一定的疗效, 许多治疗胃腺癌的靶向药物陆续应用于临床。我们使用模型检测器中的同步方式对图 1 中的信号转导通路和蛋白进行分析与验证, 了解胃腺癌的发生发展机制。在胃腺癌信号通路的研究中, 我们期望在特定的条件下 (比如基因敲除、关键癌蛋白功能丧失、药物干预等) 预测癌细胞的发生发展, 鉴定出胃腺癌发生发展中起重要作用的关键蛋白和关键信号通路。

性质 1 $AF(\neg Antisurvival)$ 。

性质 2 $AF(Prosurvival)$ 。

性质 3 $AF(\neg Antisurvival \ \& \ Prosurvival)$ 。

性质 1 和性质 2 被验证为“True”, 表示胃腺癌细胞最终会达到“增殖”的状态, 而不一定要经历“凋亡”, 因为癌细胞的扩散是必然的。性质 3 被验证为“False”, 表明胃腺癌细胞最终不能到达一个没有凋亡而增殖活跃的状态。

性质 4 $AG\{(PI3K=1) \rightarrow EF(P53=0 \ \& \ Prosurvival)\}$ 。

性质 5 $AG\{(AKT=1) \rightarrow EF(P53=0 \ \& \ Prosurvival)\}$ 。

性质 6 $AG\{(betacatenin=1) \rightarrow EF(P53=0 \ \& \ Prosurvival)\}$ 。

性质 4~性质 6 被验证为“True”, 表明若蛋白 PI3K、Ras、AKT 变异或者过度表达, 其下游信号成分将在所有路径上被连续激活并抑制重要的肿瘤抑制剂 P53 的表达, 最终导致癌细胞的增殖。PI3K 通路在调节细胞的各种功能中起着重要的作用, 已经成为抗癌药物研究的一个重要靶点。当 AKT 过度表达后, 能够磷酸化抑癌基因 P21 以及促凋亡基因 Bad、Caspase-9 等, 从而阻止凋亡和促进上皮细胞的存活^[18]。betacatenin 作为一种多功能胞浆蛋白, 我国叶国刚等^[19]的研究显示, betacatenin 在进展期胃癌组织中的异常表达率比正常胃组织高, betacatenin 在正常胃组织和胃癌组织中的表达具有显著性差异。曾有报道^[20], 在胃癌患者中, 大约有 8%~26% 的患者有 betacatenin 基因突变, 该基因突变后产生不完整的 betacatenin, 由于其不能被降解, 遂进入细胞核内与 Tcf/Lef 结合, 形成异二聚体, 持续激活 c-myc 等靶基因, 使其进行非正常转录并过度表达, 从而导致肿瘤的发生。这些性质表明, 即使某些途径被某些单基因靶向疗法阻断, 不同信号传导途径之间的串扰也可能是胃腺癌细胞存活的原因。

性质 7 $AG\{(NF\kappa B=1)\rightarrow EF(P53=0 \ \& \ Prosurvival)\}$ 。

NF κ B 是抗癌药物研究的一个重要作用靶点,因为它在促进癌细胞生长以及抵抗凋亡的过程中起着非常重要的作用。胃腺癌组织中 NF κ B 的表达低分化显著高于高/中分化组织,表明 NF κ B 参与胃癌的生长和分化。性质 7 被验证为“True”,表明在对 NF κ B 的研究中发现它的过度表达可以促进细胞的增殖,抑制细胞的凋亡。苏晓娟等^[21]研究表明,NF κ B 的异常表达可能是胃癌形成的早期分子事件,其表达水平对评价胃癌的恶性程度及预后可能有一定的参考价值。

性质 8 $AG\{(P53=1\rightarrow AF(MDM2=1) \ \& \ (MDM2=1\rightarrow AF(P53=0)))\}$ 。

性质 8 被检测为“True”,表明 P53 的激活促进了 MDM2 的表达,形成 MDM2 的依赖负反馈调节机制^[22],P53 正向调节 MDM2 促进其表达,MDM2 负向调节 P53 抑制其表达^[23]。其调节过程为:P53 诱导激活 MDM2,MDM2 与 P53 结合后形成 P53-MDM2 复合物,将 P53 由细胞核转运到细胞浆中,降解 P53,从而阻止了依赖于 P53 的凋亡发生。

性质 9 $PI3K=1\rightarrow AG\{(NF\kappa B\geq 1\rightarrow AF(NF\kappa B=0)) \ \& \ (NF\kappa B=0\rightarrow AF(NF\kappa B\geq 1))\}$ 。

性质 9 被验证为“True”,表明有无外部刺激都会发生 NF κ B 的振荡。对于某些特定的信号通路实验研究发现,外部刺激可能诱发信号振荡,引起生物学家的关注^[24]。

性质 10 $(MEK=0 \ \& \ ERK=0) \mid (PI3K=0 \ \& \ AKT=0)\rightarrow AF(FOXO=1 \ \& \ Antisurvival)$ 。

性质 10 被验证为“True”,表明通过磷酸化失活的促凋亡转录因子 FOXO 被联合的 MEK 和 ERK 或 PI3K 和 AKT 抑制相互协同作用激活,验证结果与文献^[7]实验结果一致。FOXO 被称为肿瘤抑制剂,激活的 FOXO 转录因子可能对胃腺癌、心血管疾病和癌症的治疗有重要意义。

性质 11 $AG\{((TAK1=0 \ \& \ PI3K=0) \mid (TAK1=0 \ \& \ AKT=0))\rightarrow AF(FOXO=1 \ \& \ Antisurvival)\}$ 。

性质 12 $AG\{((TAK1=0 \ \& \ PI3K=0) \mid (TAK1=0 \ \& \ AKT=0))\rightarrow AF(ERK=1)\}$ 。

性质 13 $NLK=1\rightarrow AF(FOXO=0 \ \& \ !Antisurvival)$ 。

性质 11 和性质 12 被验证为“True”,表明当 TAK1 和 PI3K 或者 TAK1 和 AKT 被联合抑制

后,FOXO 被激活并促进癌细胞凋亡,但是 TAK1 和 PI3K 或者 TAK1 和 AKT 的协同机制尚不清楚,验证结果与文献^[25]实验结果一致。验证结果表明,联合抑制 TAK1 和 PI3K 或者 TAK1 和 AKT 后,ERK 仍处于激活或者过度表达状态,这可能表明 MEK/ERK 不参与 TAK1 的下游抑制效应。性质 13 同样被验证为“True”,表明激酶 NLK(Nemo 激酶)是一种候选基因,可能潜在地作为 TAK1 和 PI3K/AKT 信号转导的串扰点,因为已有实验验证其作用于 TAK1 的下游^[26],并介导 FOXO 的抑制性磷酸化^[27]。

6 结束语

我们通过对胃腺癌信号转导网络的离散值模型研究信号通路或者蛋白的表达如何影响细胞的命运,与基于传统建模方法随机模拟^[13,14]、布尔网络^[15]、随机微分方程^[16]相比,应用形式化分析同步建模方法更具有灵活性。通过对一些时序逻辑公式的验证对信号通路进行形式化研究,可以让我们更清晰地了解胃腺癌发生发展机制,为靶向治疗提供意见。文中鉴定了几种关键蛋白,包括 PI3K、AKT、NF κ B、NLK、P53、TAK1、betacatenin 等蛋白激活或者过度表达如何影响细胞命运。同时也解释了单基因靶向治疗的缺陷,由于不同信号通路间存在串扰现象,即使抑制某些关键蛋白的表达,但也并不能阻止胃腺癌细胞的增殖分化。实验还证明了在胃腺癌细胞信号转导通路中同样存在 NF κ B 和 P53-MDM2 的振荡属性。在未来的工作中将继续探索更全面和更具有代表性的胃腺癌信号转导网络,全面了解胃腺癌信号转导网络及其串扰,有助于研究人员开发更有效的多靶标治疗药物。通过和最新研究成果结合进一步改进模型,更好地模拟真实的胃腺癌信号网络的动态变化。

参考文献:

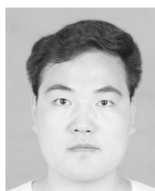
- [1] Clarke E M, Grumberg O, Peled D A. Model checking[M]. Cambridge: The MIT Press, 1999.
- [2] Suh J H, Won K Y, Kim G Y, et al. Expression of tumoral FOXP3 in gastric adenocarcinoma is associated with favorable clinicopathological variables and related with Hippo pathway[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2015, 8(11): 14608-14610.
- [3] Rosania R, Varbanova M, Wex T, et al. Regulation of apoptosis is impaired in atrophic gastritis associated with gastric cancer[J]. BMC Gastroenterology, 2017, 17(1): 84-91.
- [4] Tumanskiy V A, Khrystrnko T A. Comparative immunohis-

- tochemical characteristic of expression levels of Ki-67, P53, caspase 3 in non-invasive and invasive intestinal-type gastric adenocarcinoma[J]. *PATHOLOGY*, 2016, 37(2):70-75.
- [5] Wang Qiu-hong, Du Gui-qing, Deng Gui-xia, et al. Expression and significance of SASH1 and p-ERK in gastric adenocarcinoma[J]. *Chinese Journal of Diagnostic Pathology*, 2017, 24(6):440-444. (in Chinese)
- [6] Wang Xin, Li Yi-jiong, Pang Chao, et al. Study on expression of Smad1 in gastric adenocarcinoma and its effect on migration ability of gastric cancer cells[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2017, 33(6):844-848. (in Chinese)
- [7] Flobak A, Baudot A, Remy E, et al. Discovery of drug synergies in gastric cancer cells predicted by logical modeling[J]. *Plos Computational Biology*, 2015, 11(8):e1004426.
- [8] Liang B, Wang S, Zhu X G, et al. Increased expression of mitogen-activated protein kinase and its upstream regulating signal in human gastric cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, 11(5):623-628.
- [9] Osaki M, Kase S, Adachi K, et al. Inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway enhances the sensitivity of Fas-mediated apoptosis in human gastric carcinoma cell line, MKN-45[J]. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 2004, 130(1):8-14.
- [10] Chang Chi-sen, Chen Wei-na, Lin Hui-hsuan, et al. Increased oxidative DNA damage, inducible nitric oxide synthase, nuclear factor κ B expression and enhanced antiapoptosis-related proteins in *Helicobacter pylori*-infected non-cardiac gastric adenocarcinoma[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, 10(15):2232-2240.
- [11] Mo W, Xu X, Xu L, et al. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis through the hedgehog signaling pathway in pancreatic cancer cell[J]. *Pancreatolgy*, 2011, 11(6):601-609.
- [12] Gong H, Zuliani P, Clarke E M. Model checking of a synchronous diabetescancer logical network[J]. *Current Bioinformatics*, 2013, 8(1):9-15.
- [13] Gong H, Zuliani P, Komuravelli A, et al. Analysis and verification of the HMGB1 signaling pathway[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(Suppl 7):1-13.
- [14] Gong H, Zuliani P, Komuravelli A, et al. Computational modeling and verification of signaling pathways in cancer[C] // *Proc of the 4th International Conference on Algebraic and Numeric Biology*, 2012:117-135.
- [15] Albert I, Thakar J, Li S, et al. Boolean network simulations for life scientists[J]. *Source Code for Biology and Medicine*, 2008, 3(1):16-23.
- [16] Gong H, Sengupta H, Linstedt A, et al. Simulated de novo assembly of golgi compartments by selective cargo capture during vesicle budding and targeted vesicle fusion[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 95(4):1674-1688.
- [17] Hafer T, Thomas W. Computation tree logic CTL* and path quantifiers in the monadic theory of the binary tree[C] // *Proc of the 14th International Colloquium on Automata, Languages and Programming*, 1987:269-279.
- [18] Blume J P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling[J]. *Nature*, 2001, 411(6835):355-365.
- [19] Ye Guo-gang, Li Qi-yun, Jiang kun. Expression of β -catenin and its significance in gastric adenocarcinoma[J]. *The Practical Journal of Cancer*, 2008, 23(4):356-359. (in Chinese)
- [20] Clements W M, Wang J, Samaik A, et al. β -catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer[J]. *Cancer Research*, 2002, 62(12):3503-3506.
- [21] Su Xiao-juan, Tang Zhi-feng, Li Qiang, et al. Expression and significance of RhoA and NFkB in human gastric carcinoma[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2011, 33(4):276-279. (in Chinese)
- [22] Bose I, Ghosh B. The P53 mdm-2 network: From oscillations to apoptosis[J]. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(5):991-997.
- [23] Ferredmma D A, Wu L, Levine A J. Functions of the MDM2 oncoprotein[J]. *Cellular & Molecular Life Sciences*, 1999, 55(1):96-107.
- [24] Gong H. Analysis of intercellular signal transduction in the tumor microenvironment[J]. *BMC Systems Biology* 2013, 7(3):1-12.
- [25] Shankar S, Chen Q, Srivastava R K. Inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways act synergistically to enhance antiangiogenic effects of EGCG through activation of FOXO transcription factor[J]. *Journal of Molecular Signaling*, 2008, 3(1):7.
- [26] Arthur J S C, Ley S C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2013, 13(9):679-692.
- [27] Kim S, Kim Y, Lee J, et al. Regulation of FOXO1 by TAK1-Nemo-like kinase pathway[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(11):8122-8129.

附中文参考文献:

- [5] 王秋红, 杜桂清, 邓桂霞, 等. SASH1 和 p-ERK 在胃腺癌中的表达及意义 [J]. *诊断病理学杂志*, 2017, 24(6):440-444.
- [6] 王欣, 李宜炯, 庞超, 等. Smad1 在胃腺癌组织中的表达及对胃腺癌细胞迁移能力的影响研究 [J]. *中国免疫学杂志*, 2017, 33(6):844-848.
- [19] 叶国刚, 李其云, 蒋鲲. β -连环蛋白在胃腺癌组织中的表达及意义[J]. *实用癌症杂志*, 2008, 23(4):356-359.
- [21] 苏晓娟, 唐志锋, 李强, 等. RhoA 和核因子 κ B 在胃癌中的表达及临床意义[J]. *中华肿瘤杂志*, 2011, 33(4):276-279.

作者简介:



王亚鹏 (1991-), 男, 河南商丘人, 硕士生, 研究方向为生物信息学和模型检测。
E-mail: 497664397@qq.com

WANG Ya-peng, born in 1991, MS candidate, his research interests include bioinformatics, and model checking.