

UPLC-Q-TOF-MS 结合网络药理学探讨南柴胡-赤芍药对抗肝癌作用机制研究

邹翔¹, 隋洋¹, 唐锡玉¹, 张茹², 舒淇¹, 宫甜¹, 吴双², 孙志伟¹,
李文兰^{1,2}, 曲中原^{2*}

(1. 哈尔滨商业大学 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076;
2. 哈尔滨商业大学 药学院 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

[摘要] 探究南柴胡-赤芍药对抗肝癌的药效物质基础和作用机制。采用 MTT 法和人肝癌 HepG2 细胞筛选南柴胡-赤芍药对体外抗肝癌的有效部位, 并采用 UPLC-Q-TOF-MS 分析有效部位的化学成分; 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 筛选出口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 的活性成分, 运用 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库查找和预测成分靶点; 采用 GeneCards 数据库和 DisGeNET 数据库获取肝癌的疾病靶点; 运用 Venny 2.1.0 取交集靶点, 并采用 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质互作网络 (PPI) 分析, 得到核心靶点; 采用 DAVID 数据库进行基因功能 GO 和 KEGG 通路富集分析; 采用 Western blot 法验证药对有效组分对人肝癌 HepG2 细胞富集关键通路相关蛋白表达的影响。结果表明, 与南柴胡-赤芍 30%、50%、70% 乙醇提取部位相比, 95% 乙醇提取后正丁醇萃取部位 (CSYZ) 抗肿瘤作用最为显著, UPLC-Q-TOF-MS 解析出 31 个化学成分, 其中 OB $\geq 30\%$ 的活性成分有 14 个; 获得成分和疾病的交集靶点 220 个, 根据 degree 中位数的 2 倍筛选获得核心靶点 35 个。GO 富集分析获得 215 个 $P < 0.05$ 的条目, 其中生物学过程条目 154 个, 细胞组分条目 22 个, 分子功能条目 39 个; KEGG 富集分析获得显著影响通路 95 条, 其中与南柴胡-赤芍药对抗肝癌密切相关的信号通路 (P 由小到大) 包括 PI3K/AKT 信号通路 (PI3K/AKT signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、ErbB 信号通路 (ErbB signaling pathway) 等。对涉及靶点最多的核心信号通路 PI3K/AKT 进行反推, 发现该通路涉及 15 个核心靶点和 8 种有效成分。验证实验结果表明, 南柴胡-赤芍药对有效组分可显著抑制 p-PI3K 和 p-AKT 的表达, 与网络药理学预测结果一致。综上, 南柴胡-赤芍抗肝癌的主要药效物质基础是柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷等 14 个成分, 并可通过调控 PI3K/AKT 通路发挥抗肝癌作用。

[关键词] 南柴胡; 赤芍; 肝癌; UPLC-Q-TOF-MS; 网络药理学; 实验验证

Mechanism of *Bupleurum scorzonerifolium* and *Paeonia lactiflora* herbal pair against liver cancer: an exploration based on UPLC-Q-TOF-MS combined with network pharmacology

ZOU Xiang¹, SUI Yang¹, TANG Xi-yu¹, ZHANG Ru², SHU Qi¹, GONG Tian¹, WU Shuang², SUN Zhi-wei¹,
LI Wen-lan^{1,2}, QU Zhong-yuan^{2*}

(1. Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. Pharmaceutical Engineering Technology Research Center, College of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

[收稿日期] 2021-11-07

[基金项目] 黑龙江省重点研发计划项目 (GZ20210110); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费项目 (2020-KYYWF-0071); 哈尔滨商业大学青年创新人才支持计划项目 (2020CX11); 哈尔滨商业大学研究生创新基金项目 (YJSCX2020-681HSD)

[通信作者] * 曲中原, 博士, 教授, 博士生导师, E-mail: qiuqiuqu@163.com

[作者简介] 邹翔, 博士, 研究员, 博士生导师, E-mail: zou8663202@163.com

[Abstract] This study aimed to decipher the pharmacodynamic material basis and mechanism of herbal pair *Bupleurum scorzonerifolium*-*Paeonia lactiflora* (BS-PL) against liver cancer based on UPLC-Q-TOF-MS and network pharmacology. MTT assay and human hepatocellular carcinoma HepG2 cells were used to screen the effective part of BS-PL, the active components of which were further analyzed and identified by UPLC-Q-TOF-MS. Next, we applied Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) to screen the active ingredients with $OB \geq 30\%$. Then TCMSP and SwissTargetPrediction were used to collect and predict component targets, followed by the search of liver cancer-related targets with GeneCards and DisGeNET. The intersection targets were obtained using Venny 2.1.0. Protein-protein interaction (PPI) network was constructed using STRING to uncover the core targets, which were subjected to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis based on DAVID. Finally, the effects of active ingredients on the expression of main proteins enriched in the key pathways of HepG2 cells were verified by Western blot. The results indicated that compared with 30%, 50%, and 70% ethanol extracts of BS-PL, the *n*-butanol extraction part (CSYZ) from 95% ethanol extract of BS-PL exhibited the best anti-tumor effect. UPLC-Q-TOF-MS revealed 31 ingredients, 14 of which showed $OB \geq 30\%$. A total of 220 intersection targets were obtained, from which 35 were selected as the key targets under the condition of two times the median of degree. Among the 215 items with $P < 0.05$ obtained through GO enrichment analysis, 154 were classified into biological processes, 22 into cell components and 39 into molecular functions. KEGG enrichment analysis revealed 95 significantly affected signaling pathways, and the ones (sorted in a descending order by P value) closely related to the anti-liver cancer effect of herbal pair were PI3K-AKT signaling pathway, TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, and ErbB signaling pathway. Finally, the PI3K/AKT signaling pathway involving the largest number of targets was extrapolated, and it was found that this pathway contained 15 core targets and 8 active components. Experimental verification showed that the effective components of BS-PL significantly inhibited the expression of p-PI3K and p-AKT, consistent with the prediction results of network pharmacology. In conclusion, the main pharmacodynamic substances of BS-PL against liver cancer are 14 components like saikosaponin a, saikosaponin d, and paeoniflorin, which exert the anti-liver cancer effect by regulating PI3K/AKT pathway.

[Key words] *Bupleurum scorzonerifolium*; *Paeonia lactiflora*; liver cancer; UPLC-Q-TOF-MS; network pharmacology; experimental verification

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220110.402

肝癌是严重威胁人类健康的最常见的恶性肿瘤之一,2020年高居全球癌症病死率第3位^[1-2]。我国每年肝癌发病和死亡人数分别为46.6万和38.3万,肝癌的五年生存率仅为12.1%,已成为我国恶性肿瘤的第二大死因^[3]。近几十年来,肝癌的治疗虽然取得了一定的进展,但其治疗效果仍难以让人满意。虽然外科治疗是肝癌患者获得长期生存最重要的手段,但是其对于肝癌患者所处的分期与肝脏功能要求较高,且受到远期疗效与复发风险的局限。肝癌的化学治疗有效率低,且毒副作用大^[4]。因此,继续探索与研发有效的肝癌治疗策略仍是首要问题。近年来,中医药已广泛应用于肝癌防治的各个阶段,因其多成分、多环节、多靶点的效应优势,在控制患者病情发展、提高癌症治疗效果、减轻毒副反应、减少复发、延长患者生存期、提高生存质量等方面具有显著的作用^[5-6]。

中医临床上肝郁脾虚证是原发性肝癌患者中最常见证型,治疗时常用逍遥散、四逆散等从调理肝脾

入手,方中柴胡-白芍是核心药对^[7]。柴胡疏肝解郁,平抑肝阳;白芍养血敛阴,柔肝缓急,两者配伍一疏一敛,使得肝气不郁,阴血又能固守,疏肝而不伤阴血,敛肝而不瘀滞气机。赤芍 *Paeonia lactiflora* 与白芍同基原,采收方法有所不同。最初在《神农本草经》中以芍药之名收载,到了南北朝时《本草经集注》始分赤芍、白芍2种。赤芍活血祛瘀、清肝泻火,与柴胡配伍常用于肝胆类肿瘤患者伴血热瘀滞者^[8]。南柴胡是中药柴胡基原之一,与北柴胡功效相同,但南柴胡效力较为柔和,更善升阳散邪,疏肝解郁。南柴胡与赤芍配伍,一入气分行气解郁,一入血分能凉血破瘀,共同发挥疏肝解郁、凉肝化瘀、活血行气止痛的功效^[9]。结合肝癌患者肝气郁结、血行不畅、气滞血瘀的病因病机,南柴胡与赤芍配伍治疗肝癌的效果优于北柴胡-白芍。由于南柴胡-赤芍药对活性物质复杂多样,该药对的抗肝癌药效物质基础、作用靶点和分子机制尚未研究阐明。近年来,网络药理学作为多数据、多学科融合的产物应运而

生,其构建的研究模式立足于药物靶点预测、网络构建及功能分析等模块,利用多层次和多结构网络来阐明中药有效成分及其分子机制,可对中药有效成分作用于疾病的机制进行预测,有效地降低了传统中药研究模式的盲目性,可阐明中药多成分、多靶点的复杂机制^[10-11]。

基于此,本研究首先采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术解析南柴胡-赤芍的抗肝癌有效部位的主要药效物质基础,通过网络药理学研究预测南柴胡-赤芍抗肝癌潜在有效成分的作用靶点及信号通路,进一步通过体外实验对预测结果进行验证,揭示南柴胡-赤芍药对抗肝癌的药效物质和作用机制,为中医药治疗肝癌临床用药及相关药物制剂开发提供科学依据。

1 材料

1.1 药材与细胞

南柴胡药材采自黑龙江省大庆市林甸县大山农村合作社栽培基地,经哈尔滨商业大学药学院曲中原教授鉴定为伞形科植物狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonifolium* 的干燥根,净制后切成 2~4 mm 饮片。赤芍饮片购自哈尔滨市人民同泰药店,经曲中原教授鉴定为毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* 根加工的饮片。

人肝癌细胞系 (HepG2) 由哈尔滨商业大学药学院提供。

1.2 药品与试剂

色谱甲醇、乙腈 (德国默克公司);甲酸 (美国 Fisher 公司);顺铂注射剂 (齐鲁制药有限公司,批号 9K0155B03);DMEM 和 RPMI 1640 培养基 (Meilunbio 公司,批号 MAO215-OCT-22F4);胎牛血清 (浙江天杭生物科技有限公司,批号 20040504);PMSF (大连美仑生物技术有限公司,批号 MAO152-Nov-12E);DMSO (天津富宇精细化工有限公司,批号 20200605);RIPA 细胞裂解液 (批号 20201111)、胰蛋白酶 Trypsin (批号 20200930)、BCA 试剂盒 (批号 20200623) 均购自碧云天生物技术有限公司;兔抗人 PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT 单克隆抗体以及鼠抗兔 IgG/HRP 均购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.3 仪器

CO-150 二氧化碳培养箱 (美国 NBS 公司);Olympus CKX41SF 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);iMark 酶标仪 [伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司];DYCZ-24DN 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司);液相色谱-G6500 系列四极杆飞行时间质谱联用仪 (美国 Agilent 公司);ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (美国 Waters 公司)。

1.4 数据库与软件

研究过程中所涉及到的数据库、软件及用途见表 1。

表 1 网络药理学所涉及数据库和软件

Table 1 Databases and softwares used in network pharmacology

No.	名称	网址	用途
1	Cytoscape 3. 2. 1	-	网络图的构建
2	PubChem	https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/	化合物成分信息搜集
3	TCMSP	http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php	成分信息查找
4	SwissTargetPrediction	http://www.swisstargetprediction.ch/	成分靶点预测
5	UniProt	http://www.uniprot.org/	筛选人源基因、校正标准基因名
6	GeneCards	http://www.genecards.org/	搜集疾病靶点
7	STRING	https://string-db.org/	构建蛋白质-蛋白质互作网络
8	DAVID	https://david.ncicrf.gov/	GO、KEGG 分析
9	OmicShare	https://www.omicshare.com/	可视化分析工具

2 方法

2.1 细胞培养

人肝癌细胞 HepG2 复苏后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2.2 南柴胡-赤芍抗肝癌有效部位筛选

2.2.1 不同提取部位的制备 分别采用 95%、70%、50%、30% 乙醇,以 1:10 的料液比,加热回流提取南柴胡-赤芍药材粉末 (40 目,1:1),提取液浓缩,得 4 个提取部位。采用水饱和正丁醇对 95% 提取部位进行萃取,获得正丁醇萃取部位 (CSYZ)。

2.2.2 MTT 法检测南柴胡-赤芍各提取部位对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 将对数生长期 HepG2 细胞配制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,并按每孔 100 μL 接种于 96 孔板中,置培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁后,分别按终浓度 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入每个提取部位或萃取部位药物(每孔 100 μL 药液),每个剂量设 6 个平行孔。同时设阳性对照组,给予终浓度为 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的顺铂含药培养液。加药培养 48 h 后弃去培养液,每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 100 μL ,继续培养 4 h 后,弃去上清液。每孔加入 150 μL DMSO,置于振荡器中避光振荡 10 min,使用酶标仪在 490 nm 检测吸光度,计算增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。实验重复 3 次,结果取平均值。

2.3 南柴胡-赤芍药对化学成分分析

2.3.1 溶液的制备 对照品溶液制备:取适量柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 和芍药苷对照品加甲醇溶解并定容至 5 mL 量瓶中,质量浓度分别为 0.38、0.24、3.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,用 0.22 μm 滤膜过滤,备用。

供试品溶液制备:取南柴胡、赤芍粉末各 1 g,按照 2.2.1 项下 CSYZ 的制备方法制备得到浸膏,用甲醇复溶后定容至 25 mL 量瓶中,取 1 mL 再次用甲醇定容至 25 mL,用 0.22 μm 滤膜过滤,得 CSYZ 供试品。平行制备南柴胡、赤芍 95% 乙醇提取物的正丁醇萃取部位(CYZ 和 SYZ)。

2.3.2 色谱条件 ACQUITY UPLC HSS T3 色谱柱 (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μm);流动相 0.1% 甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~3 min, 20%~45% B; 3~15 min, 45%~80% B; 15~16 min, 80%~100% B; 16~18 min, 100%~5% B)。体积流量 0.3 mL \cdot min $^{-1}$,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$,进样量 5 μL 。

2.3.3 质谱条件 离子化模式为 Dual ESI 源电喷雾正、负离子模式,HPLC 流速 250~600 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$,鞘气温度 250 $^{\circ}\text{C}$,鞘气流速 11 L \cdot min $^{-1}$,喷嘴电压 45 psi (1 psi \approx 6.895 kPa),毛细管电压正、负离子模式下分别为 4 000、3 500 V,干燥气流速 5 L \cdot min $^{-1}$,干燥气温度 300 $^{\circ}\text{C}$,碰撞能量 35 V。

2.3.4 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷的定量分析 分别精密量取 5、10、100、250、500、1 000 μL 混合对照品储备液置于 25 mL 量瓶中,混合摇匀,0.22 μL 有机滤膜过滤至进样瓶,按 2.3.2、2.3.3 项下色谱及质谱条件,对 6 个浓度的混合对照品溶液进样

分析,进样量 5 μL 。提取 m/z 为 779.457 0、779.457 5、479.250 5 的离子峰,以浓度 (X) 为横坐标,峰面积的万分之一 (Y) 为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程和线性范围。

精密度试验:取 CSYZ 供试品溶液,按 2.3.2、2.3.3 项下色谱及质谱条件连续进样 6 次,计算 3 种对照品的峰面积及 RSD。

重复性试验:平行制备 CSYZ 供试品溶液 6 份,按 2.3.2、2.3.3 项下色谱及质谱条件分别进样分析,计算样品中的 3 种对照品的含量及 RSD。

稳定性试验:按 2.3.2、2.3.3 项下色谱及质谱条件分别在 0、2、4、8、12、24 h 对供试品溶液进样分析,计算 3 种对照品的峰面积及 RSD。

加样回收率试验:取南柴胡、赤芍粉末各 0.5 g,平行制备 6 份,按已知含量 1:1 加入相应的柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 和芍药苷对照品,按 2.3.1 项下方法制备供试品溶液,测定各成分的含量,计算 3 种成分的加样回收率。

2.4 南柴胡-赤芍抗肝癌作用机制研究

2.4.1 基于网络药理学的南柴胡-赤芍抗肝癌作用机制预测 通过 TCMSP 数据库^[12],筛选口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 的化合物作为南柴胡-赤芍的有效成分。采用 TCMSP 数据库查找成分靶点,同时采用 SwissTargetPrediction 数据库^[13] 预测成分靶点,将上述靶点进行合并去重。采用 GeneCards 数据库^[14] 和 DisGeNET 数据库^[15],以“liver cancer”为关键词进行检索,获取肝癌的疾病靶点,分别筛选出关联度评分 $\geq 10\%$ 和 score ≥ 0.2 的靶点作为研究对象。

将有效成分靶点和肝癌靶点,通过 Venny 2.1.0 网站 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 取交集,获得交集靶点。在 STRING 数据库^[16] 采用获得的交集靶点构建蛋白质-蛋白质互作 (PPI) 网络,并采用 Cytoscape 3.2.1 计算各节点的 degree,定义大于 2 倍 degree 中位数的靶点为核心靶点。核心靶点通过 DAVID 数据库^[17] 进行 KEGG 通路分析以及 GO 生物过程富集分析,采用 OmicShare 网站进行结果的可视化。同时,对涉及靶点数最多的核心信号通路、与之相关的核心靶点及靶点相关的活性成分构建“活性成分-靶点-通路”关联网。

2.4.2 Western blot 法检测 HepG2 细胞中 PI3K/AKT 通路主要蛋白的表达 将南柴胡-赤芍药对合

提的有效成分柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 和芍药苷按比例(2:1:140)配制有效组分溶液。实验设置 5 个组别,包括空白对照组、阳性对照组(顺铂,终浓度 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、南柴胡-赤芍药对有效组分处理组(终浓度分别为 100 、 200 、 $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。空白对照组给予等体积培养基。药物处理 48 h 后,离心收集细胞。加入一定体积的细胞裂解液(PMSF-细胞裂解液 1:99),冰浴裂解。离心收集蛋白,采用 BCA 蛋白质测定试剂盒测定蛋白浓度,95 °C 变性之后采取 SDS-PAGE(8%~12%)凝胶电泳。进一步将目的条带转至 NC 膜上(200 mA 恒流转膜约 1.5 h),并将膜放入含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液中封闭 2 h,一抗(兔抗 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 抗体)4 °C 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,显色。最终采用凝胶成像分析系统拍照,并采用 ImageJ 软件对条带进行分析。

2.4.3 统计学分析 实验均重复 3 次,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 IBM SPSS Statistics 21.0 软件对数据进行统计分析,多样本组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 LSD 多重比较分析法进行。显著水平 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 南柴胡-赤芍抗肝癌有效部位筛选

采用 MTT 法筛选南柴胡-赤芍抗肝癌有效部位,结果见表 2。通过生药量计算各组的 IC_{50} 可看出,95%乙醇部位的 IC_{50} 显著低于 70%、50%、30% 乙醇部位($P<0.05$)。通过干膏量计算,CSYZ 对人肝癌 HepG2 细胞的 IC_{50} 为 $(0.285\pm 0.016) \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,增殖抑制作用显著优于南柴胡-赤芍 95%乙醇提取部位 [$\text{IC}_{50} = (0.379\pm 0.010) \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$],故 CSYZ 为抗肿瘤活性部位。

表 2 不同提取部位对人肝癌 HepG2 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 2 Inhibitory effects of different extraction parts on the growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	IC_{50}
95%乙醇	2.504 ± 0.067
70%乙醇	$2.756\pm 0.027^{1)}$
50%乙醇	$3.041\pm 0.022^{2)}$
30%乙醇	$2.909\pm 0.029^{2)}$

注:与 95%乙醇部位相比¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ 。

3.2 南柴胡-赤芍有效部位化学成分分析

3.2.1 南柴胡-赤芍有效部位化学成分鉴定 通过质谱中准分子离子峰和二级碎片信息分析化合物的质谱裂解规律,对南柴胡-赤芍中化合物进行分析鉴定,共分析鉴定出 31 种化合物,其中 20 种成分在南柴胡单味药中存在,20 种成分在赤芍单味药中存在,二者共有成分 9 种。各供试品在正、负离子模式下的总离子流图见图 1,化合物详情见表 3。

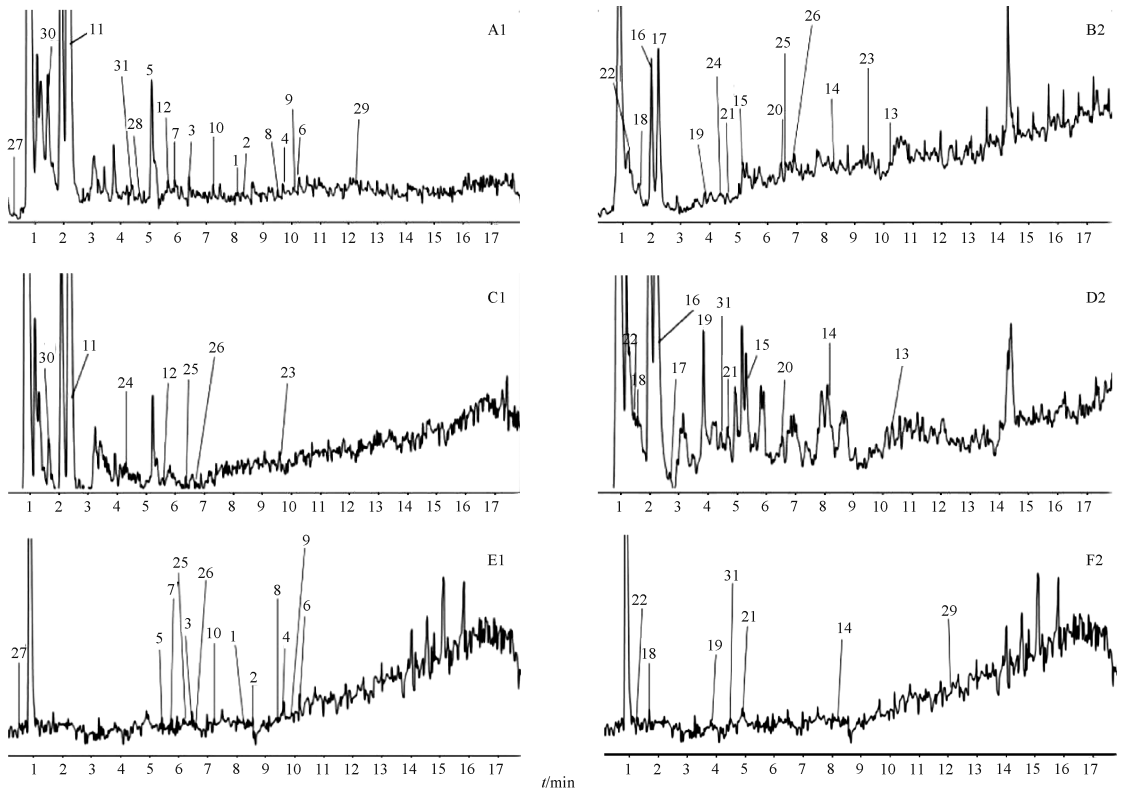
3.2.2 柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷的定量分析
柴胡皂苷 a 的回归方程为 $Y=10.086X+25.336$, $r=0.9993$,表明柴胡皂苷 a 在 $0.076\sim 15.200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈良好的线性关系;柴胡皂苷 d 的回归方程为 $Y=14.655X+14.363$, $r=0.9998$,表明柴胡皂苷 d 在 $0.048\sim 9.600 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈良好的线性关系;芍药苷的回归方程为 $Y=43.226X-337.96$, $r=0.9995$,表明芍药苷在 $0.600\sim 120.000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 呈良好的线性关系。

精密度试验结果显示柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.74%、0.95%、0.85%,表明仪器精密度良好。重复性试验结果显示,柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及芍药苷含量的 RSD 分别为 0.61%、1.1%、1.0%,表明该方法重复性良好。稳定性试验结果显示柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及芍药苷峰面积的 RSD 分别为 0.85%、0.64%、0.88%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。加样回收率试验结果显示柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及芍药苷的平均加样回收率分别为 97.42%、95.60%、96.50%,RSD 分别为 3.1%、3.2%、3.1%,表明测定结果准确。

负离子模式下扫描范围 m/z 450~9 500,剔除响应值较高的 377.093 7、683.228 1、1 033.988 1、160.842 1 的非目标 m/z ,得到总离子流图,见图 2。柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及芍药苷的离子峰 m/z 分别为 779.457 0、779.457 5、479.154 2,结合保留时间确定目标峰查看峰面积。柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷在 CSYZ 中的质量分数分别为 (0.092 ± 0.006) 、 (0.054 ± 0.004) 、 $(7.066\pm 0.158) \text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,比例为 2:1:140。

3.3 基于网络药理学的南柴胡-赤芍抗肝癌作用机制研究

3.3.1 南柴胡-赤芍抗肝癌作用机制预测 将有效部位解析鉴定出来的化学成分通过 TCMSP 数据库



1. 负离子模式; 2. 正离子模式; A、B. CSYZ(南柴胡-赤芍药对正丁醇萃取部位); C、D. SYZ(南柴胡 95%乙醇提取物的正丁醇萃取部位); E、F. CYZ(赤芍 95%乙醇提取物的正丁醇萃取部位)。

图1 CSYZ、SYZ和CYZ正、负离子基峰色谱图

Fig. 1 Chromatograms of base peaks of CSYZ, SYZ, and CYZ in positive and negative modes

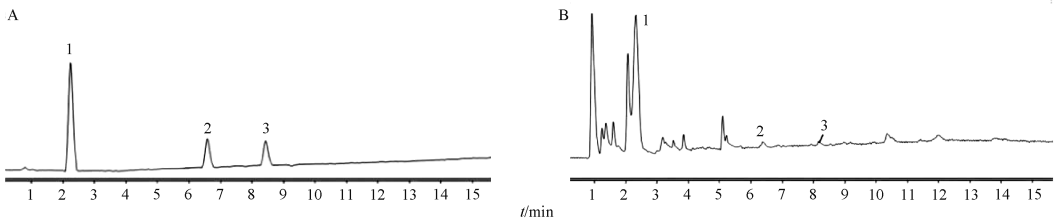
表3 南柴胡-赤芍 UPLC-Q-TOF-MS/MS 化学成分分析

Table 3 Analysis of chemical composition of *Bupleurum scorzonrifolium-Paeonia lactiflora* by UPLC-Q-TOF-MS/MS

No.	t_R /min	离子模式	理论值	检测值	误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	二级碎片 m/z	鉴定	来源
1	8.205	$[M-H]^-$	779.458 7	779.455 8	3.74	$C_{42}H_{68}O_{13}$	779.455 8, 617.995 7	柴胡皂苷 b_1/b_2	南柴胡
2	8.419	$[M-H]^-$	779.458 7	779.457 5	1.56	$C_{42}H_{68}O_{13}$	779.457 5, 617.408 2	柴胡皂苷 d	南柴胡
3	6.550	$[M-H]^-$	779.458 7	779.457 0	2.20	$C_{42}H_{68}O_{13}$	779.457 0, 617.400 3	柴胡皂苷 a	南柴胡
4	9.825	$[M-H]^-$	911.501 0	911.499 6	1.51	$C_{47}H_{76}O_{17}$	911.499 6, 779.459 1, 617.410 1	柴胡皂苷 k	南柴胡
5	5.468	$[M+Cl]^-$	961.493 3	961.488 8	4.86	$C_{48}H_{78}O_{17}$	961.488 8, 925.514 7, 779.454 1	柴胡皂苷 c	南柴胡
6	10.302	$[M-H]^-$	821.469 3	821.467 9	1.68	$C_{44}H_{70}O_{14}$	821.467 9, 779.459 3, 617.401 0	3'-O-乙酰柴胡皂苷 d	南柴胡
7	5.686	$[M-H]^-$	623.161 8	623.161 2	0.89	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623.161 2, 477.102 3, 315.050 8, 285.076 2	水仙苷	南柴胡
8	9.695	$[M-H]^-$	941.511 5	941.510 3	1.31	$C_{48}H_{78}O_{18}$	941.510 3, 779.457 6, 617.406 6	柴胡皂苷 s/n	南柴胡
9	9.905	$[M-H]^-$	957.506 5	957.505 5	1.00	$C_{48}H_{78}O_{19}$	957.505 5, 779.456 9, 617.405 6	柴胡皂苷 q/p	南柴胡
10	7.222	$[M-H]^-$	927.532 3	927.493 3	2.79	$C_{48}H_{80}O_{17}$	927.493 3, 765.479 6, 619.417 5	柴胡皂苷 f	南柴胡
11	2.295	$[M-H]^-$	479.155 9	479.154 2	3.51	$C_{23}H_{28}O_{11}$	479.154 2, 449.332 2	芍药苷	赤芍
12	5.549	$[M-H]^-$	479.155 9	479.155 8	0.18	$C_{23}H_{28}O_{11}$	479.155 8, 449.474 2	芍药内酯苷	赤芍
13	10.259	$[M+H]^+$	209.044 4	209.045 1	-3.13	$C_{10}H_8O_5$	209.045 1, 194.092 1, 165.948 3	秦皮素	赤芍
14	8.138	$[M+H]^+$	415.393 4	415.389 9	8.55	$C_{20}H_{30}O$	415.389 9, 400.202 7, 385.164 6	谷甾醇	南柴胡、赤芍

续表3

No.	t_R /min	离子模式	理论值	检测值	误差/ $\times 10^{-6}$	分子式	二级碎片 m/z	鉴定	来源
15	5.101	$[M+Na]^+$	607.178 6	607.179 8	-2.06	$C_{30}H_{32}O_{12}$	607.179 8,485.140 9	苯甲酰芍药苷/ 苯甲酰芍药内酯苷	赤芍
16	2.246	$[M+H]^+$	463.159 9	463.161 8	-4.17	$C_{23}H_{26}O_{10}$	463.161 8,179.073 2,151.075 9, 105.062 3	芍药新苷	赤芍
17	2.403	$[M+H]^+$	633.181 4	633.186 5	-8.07	$C_{30}H_{32}O_{15}$	633.186 5,315.105 0,179.073 0	没食子酰芍药 苷/没食子酰芍药 内酯苷	赤芍
18	1.878	$[M+H]^+$	291.086 3	291.084 2	7.29	$C_{15}H_{14}O_6$	291.084 2,197.060 9,179.071 4, 134.037 5	儿茶素	南柴胡、赤芍
19	3.911	$[M+H]^+$	317.065 6	317.067 8	-6.39	$C_{16}H_{12}O_7$	317.067 8,286.005 4,271.022 8	异鼠李素	南柴胡、赤芍
20	6.484	$[M+H]^+$	167.070 3	167.070 2	0.43	$C_9H_{10}O_3$	167.070 2,121.064 5,106.042 0	丹皮酚	赤芍
21	4.938	$[M+H]^+$	303.049 9	303.049 9	0.10	$C_{15}H_{10}O_7$	303.049 9,241.106 2,212.005 7	槲皮素	南柴胡、赤芍
22	1.430	$[M+H]^+$	355.102 4	355.101 2	3.27	$C_{16}H_{18}O_9$	355.101 2,338.141 6,306.084 5, 277.766 6	绿原酸	南柴胡、赤芍
23	9.539	$[M-H]^-$	169.014 2	169.015 1	-5.02	$C_7H_6O_5$	169.015 1,125.098 1	没食子酸	赤芍
24	4.455	$[M-H]^-$	495.150 8	495.150 9	-0.20	$C_{23}H_{28}O_{12}$	495.150 9,137.024 1	氧化芍药苷	赤芍
25	6.498	$[M-H]^-$	515.119 5	515.119 5	0	$C_{25}H_{24}O_{12}$	515.119 5,353.084 8,191.055 7	异绿原酸	南柴胡、赤芍
26	6.576	$[M-H]^-$	477.103 8	477.104 3	-0.94	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477.104 3,271.023 5,243.032 0	异鼠李素-3- O - β - D-葡萄糖苷	南柴胡、赤芍
27	0.499	$[M-H]^-$	207.066 3	207.064 2	10.01	$C_{11}H_{12}O_4$	207.064 2,165.053 3,135.046 8	咖啡酸乙酯	南柴胡、赤芍
28	4.729	$[M+H]^+$	207.064 2	207.062 9	11.09	$C_{11}H_{10}O_4$	207.062 9,192.042 3,174.033 1	滨蒿内酯	赤芍
29	12.361	$[M+H]^+$	225.112 1	225.110 4	7.74	$C_{12}H_{16}O_4$	225.110 4,207.948 1,179.591 1, 109.101 2	3, 4-diethoxyphenylacetic acid	南柴胡
30	1.967	$[M-H]^-$	183.029 9	183.029 7	1.07	$C_8H_8O_5$	183.029 7,168.625 1,124.015 8,	没食子酸甲酯	赤芍
31	4.641	$[M+H]^+$	193.049 5	193.050 4	-4.50	$C_{10}H_8O_4$	193.050 4,135.046 7	东莨菪内酯	南柴胡、赤芍



A. 对照品;B. CSYZ(南柴胡-赤芍药对正丁醇萃取部位);1. 芍药苷;2. 柴胡皂苷 a;3. 柴胡皂苷 d。

图2 对照品及CSYZ总离子流图

Fig. 2 Total ion chromatograms of reference substance and CSYZ

查阅 OB, 筛选 $OB \geq 30\%$ 的成分作为南柴胡-赤芍药对的有效成分, 共筛选出 14 个化学成分, 其中 8 种成分归属于南柴胡, 10 种成分归属于赤芍, 二者共有成分 4 种, 信息见表 4。

通过 TCMSP 数据库查找 14 种成分的潜在靶点共 184 个, 采用 SwissTargetPrediction 数据库预测成分靶点共 241 个, 整合 2 个数据库结果, 去重后共获

得南柴胡-赤芍有效成分靶点 371 个。利用 GeneCards 数据库获取肝癌相关靶点 16 806 个, 按关联度评分 ≥ 10 筛选获得靶点基因 1 843 个; DisGeNET 数据库获得肝癌相关靶点 5 725 个, 按 $score \geq 0.2$ 筛选获得疾病靶点 599 个; 合并整理 2 个数据库共获得肝癌相关靶点 2 161 个。利用 Venny 2.1.0 在线平台获得南柴胡-赤芍有效成分靶点和肝

表4 南柴胡-赤芍的有效成分信息

Table 4 Information of effective components of *Bupleurum scorzonerifolium-Paeonia lactiflora*

No.	名称	英文名	分子式	OB/%	来源
1	柴胡皂苷 a	saikosaponin a	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	32.39	南柴胡
2	柴胡皂苷 d	saikosaponin d	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₃	34.39	南柴胡
3	3'-O-乙酰柴胡皂苷 d	3'-O-acetylsaikosaponin d	C ₄₄ H ₇₀ O ₁₄	48.60	南柴胡
4	芍药内酯苷	albiflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	30.25	赤芍
5	芍药苷	paeoniflorin	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	53.87	赤芍
6	谷甾醇	sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	36.91	南柴胡、赤芍
7	苯甲酰芍药苷	benzoyl paeoniflorin	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	31.14	赤芍
8	芍药新苷	lactiflorin	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₀	49.12	赤芍
9	儿茶素	catechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	54.83	南柴胡、赤芍
10	异鼠李素	isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	49.60	南柴胡、赤芍
11	槲皮素	quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	46.43	南柴胡、赤芍
12	没食子酸	gallic acid	C ₇ H ₆ O ₅	31.69	赤芍
13	咖啡酸乙酯	(E)-ethyl caffeate	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	103.85	南柴胡
14	滨蒿内酯	scoparone	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	74.75	赤芍

癌疾病的共同靶点,并将其作为有效成分与肝癌的相关靶点,最终获得交集靶点 220 个,见图 3。

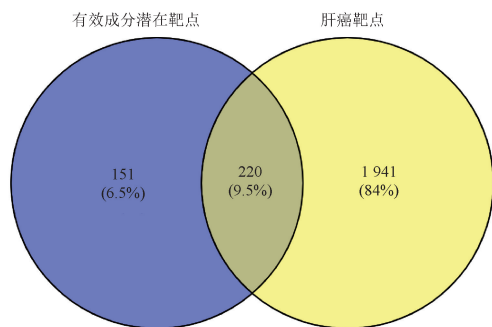


图3 南柴胡-赤芍有效成分与肝癌靶点韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of effective components of *Bupleurum scorzonerifolium-Paeonia lactiflora* with liver cancer-related targets

将交集靶点在 STRING 11.5 数据库构建 PPI 网络导出 TSV 文件,并通过 Cytosape 3.2.1 计算各靶点 degree。进一步将大于 2 倍 degree 的靶点定义为核心靶点,包括 GAPDH、TP53、AKT1、VEGFA、TNF、IL6 等 35 个核心靶点,核心靶点蛋白的相互作用关系见图 4。

采用 DAVID 数据库对南柴胡-赤芍药对抗肝癌的 35 个核心靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析。根据 $P < 0.05$ 共筛选获得了 215 个 GO 条目,其中生物学过程条目 154 个,细胞组分类目 22 个,分子功能条目 39 个。按照 P 从小到大排序,取前 10 个条目进行可视化分析,见图 5。结果表

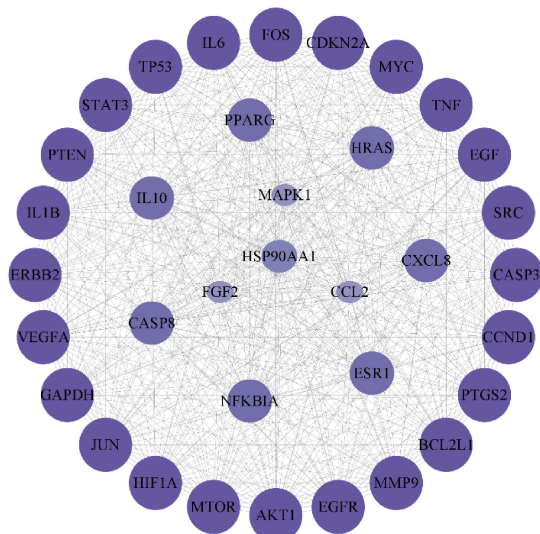


图4 核心靶点的蛋白相互作用关系

Fig. 4 Protein-protein interaction relationship of core targets

明,上述核心靶点参与的生物学过程主要有 RNA 聚合酶 II 启动子转录的正调控 (positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter)、转录正调控 (positive regulation of transcription, DNA-templated)、信号转导 (signal transduction)、凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process)、药物反应 (response to drug)、细胞增殖的负调控 (negative regulation of cell proliferation) 等。

KEGG 富集分析共获得 $P < 0.05$ 的通路 95 条,按 P 从小到大排序,取前 20 条通路进行可视化分析,见图 5。结果表明,与南柴胡-赤芍药对抗肝癌

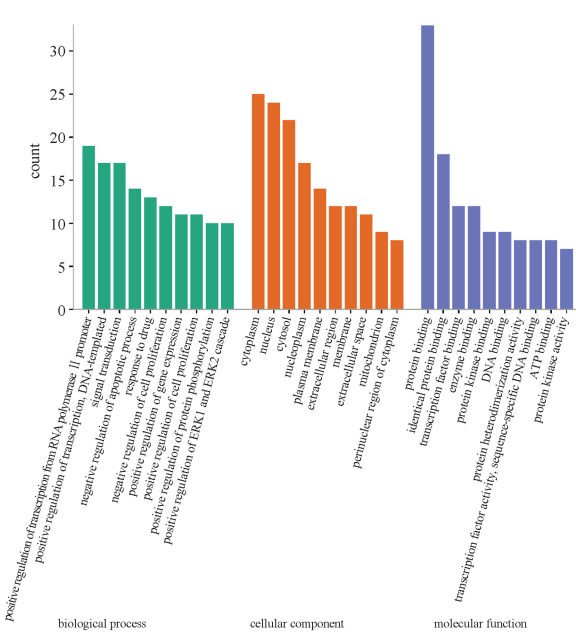
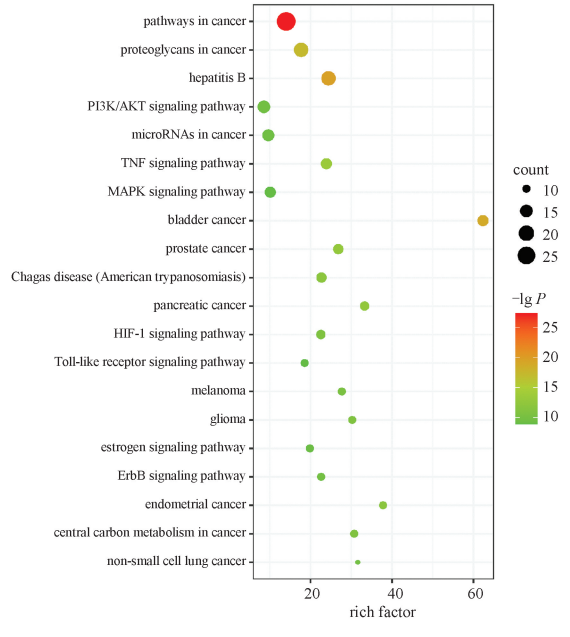


图 5 核心靶点的 GO 和 KEGG 富集分析
Fig. 5 GO and KEGG enrichment analysis of core targets



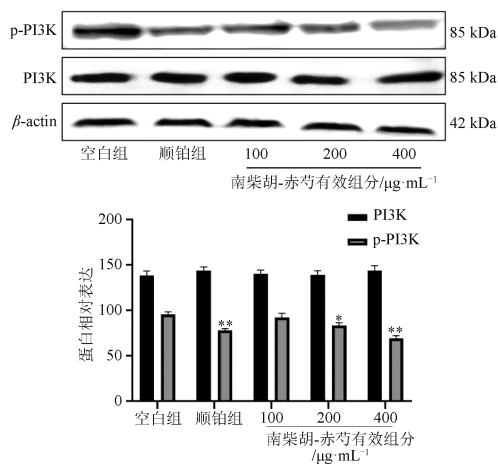
密切相关的信号通路包括 PI3K/AKT 信号通路 (PI3K/AKT signaling pathway)、TNF 信号通路 (TNF signaling pathway)、MAPK 信号通路 (MAPK signaling pathway)、HIF-1 信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、ErbB 信号通路 (ErbB signaling pathway) 等,其中 PI3K/AKT 信号通路为涉及靶点数最多的核心信号通路。构建“活性成分-靶基因-通路”网络,对 KEGG 富集分析进行反推,结果发现 PI3K/AKT 信号通路涉及 15 个核心靶点和 8 种有效成分,见图 6。

3.3.2 南柴胡-赤芍药对抗肝癌作用机制的验证 采用 Western blot 法测定南柴胡-赤芍药对有效组分 (100、200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 对人肝癌 HepG2 细胞中 AKT、p-AKT、PI3K、p-PI3K 蛋白表达的影响,结果见图 7、8。200、400 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药物处理后, HepG2 细胞中 p-PI3K、p-AKT 的表达量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 AKT 和 PI3K 蛋白表达量无显著变化,提示南柴胡-赤芍有效组分对肝癌的抑制作用与抑制 PI3K/AKT 通路的激活有关,与网络药理学预测结果一致。

图 6 “活性成分-靶基因-通路”网络
Fig. 6 "Active component-target gene-pathway" network

4 讨论

肝癌是全世界六大恶性肿瘤之一,严重影响人类的健康。据 2020 年全球癌症报告分析显示,肝癌发病率位居世界肿瘤发病率第 7 位,病死率占癌症总数的 8.3%^[18-19]。目前,外科手术切除是治疗肝癌的最佳手段,但是这种治疗手段局限于肝癌患者所处的分期与肝脏功能,具有复发的风险^[20]。因此,继续探索与研发有效的肝癌治疗策略迫在眉睫。随着我国传统中医药学的发展,中医药参与到癌症临床治疗的各个阶段^[21],其具有毒副作用小、减轻手术切除为患者带来的痛苦,提高临床治疗效果、延长癌症患者生存期、提高癌症患者生存质量等重要作用^[22]。南柴胡具有疏肝解郁、疏散退热、升举阳



与空白组相比 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ (图 8 同)。

图 7 南柴胡-赤芍有效组分对 HepG2 细胞中 PI3K 和 p-PI3K 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of effective components of *Bupleurum scorzonerifolium-Paeonia lactiflora* on PI3K and p-PI3K protein expression in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

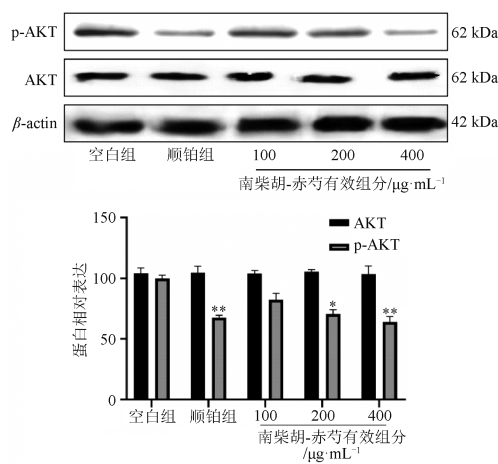


图 8 南柴胡-赤芍有效成分对 HepG2 细胞中 AKT 和 p-AKT 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of effective components of *Bupleurum scorzonerifolium-Paeonia lactiflora* on AKT and p-AKT protein expression in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

气的功效。赤芍具有清热凉血、散瘀止痛的功效,结合肝癌肝郁化火、气滞血瘀的病理病机,二者联用则能达到疏肝活血的效果^[23]。但是,南柴胡-赤芍药对治疗肝癌的药效物质基础及作用机制尚未阐明。因此,本研究通过考察南柴胡-赤芍药对抗 HepG2 细胞的最佳有效部位,利用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术进行化学成分鉴定,并通过网络药理学结合实验

验证的方法,阐明 CSYZ 治疗肝癌的药效物质基础及其作用机制。

本实验首先考察不同提取部位对人肝癌细胞 HepG2 的增殖抑制作用,最终确定 CSYZ 为南柴胡-赤芍药对的最佳抗肝癌有效部位。以 CSYZ 为研究对象,进一步运用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术对 CSYZ 的化学成分进行鉴定,并通过与单味药比较,共鉴定出 31 种化学成分,20 种成分源于南柴胡,20 种成分源于赤芍,9 种成分为南柴胡与赤芍的共有成分。网络药理学可以从多个角度考察药物对疾病的影响,能充分体现中药多成分、多靶点及系统调节的中医理论^[24-26]。因此,运用网络药理学方法筛选获得柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷在内的 14 个有效成分,并发现其主要作用于 GAPDH、TP53、AKT1、VEGFA、TNF、IL6 等 35 个核心靶点,且 PI3K/AKT 信号通路可能是南柴胡-赤芍药对抗肝癌的主要信号通路之一。结合“活性成分-靶基因-通路”网络溯源分析,最终发现 8 种活性成分(柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷、槲皮素、芍药内酯苷、芍药新苷、异鼠李素、没食子酸)与 PI3K/AKT 通路有关。相关研究发现,柴胡皂苷 a 能够通过线粒体途径和 ER 应激途径触发细胞凋亡并抑制 PI3K/AKT 信号传导对抗宫颈癌的发展^[27];柴胡皂苷 d 能够通过抑制 AKT 的磷酸化,进而减少 FOXO3a 蛋白磷酸化,激活 FOXO3a 的转录活性,从而导致前列腺癌 DU145 细胞阻滞在 G₁ 期,诱导细胞发生凋亡^[28];芍药苷能部分通过抑制 PI3K/AKT 信号传导来抑制胃癌 MGC-803 细胞的活力,并诱导细胞凋亡^[29];芍药苷还能调节 PI3K/AKT 信号通路抑制缺氧诱导因子 HIF-1 的表达,来预防缺氧诱导的乳腺癌上皮间质转化^[30]。此外,也有文献报道柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷对肝癌均具有良好的抗肿瘤作用^[31-34]。因此,综合前期研究及文献报道,优选柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷作为南柴胡-赤芍药对的活性药效组分,推测其主要通过 PI3K/AKT 途径发挥治疗肝癌的药效。

PI3K/AKT 通路与各种人类恶性肿瘤生物过程有关,对调节肿瘤细胞的葡萄糖代谢、增殖和凋亡具有重要意义,其中 AKT 还通过调节细胞周期来调节细胞增殖^[35]。根据 CSYZ 的含量测定结果,确定柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d 及芍药苷比例为 2:1:140。以此比例配制的有效组分经 Western blot 验证发现,可

显著抑制 PI3K/AKT 通路中 p-PI3K 及 p-AKT 的表达水平,说明南柴胡-赤芍药对有效组分可抑制 PI3K/AKT 信号通路的激活,进而抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖,这与网络药理学预测的结果相一致。

总之,南柴胡-赤芍药对抗肝癌最佳有效部位为 CSYZ,其抗肿瘤的有效成分包括柴胡皂苷 a、柴胡皂苷 d、芍药苷等在内的共 14 种化学成分,这些成分可通过调控 PI3K/AKT 而抑制肝癌细胞的增殖与生长,从而发挥其抗肝癌的作用,至于南柴胡-赤芍药对通过其他机制发挥抗肝癌疗效,还需进一步验证。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209.
- [2] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, et al. Cancer statistics for the year 2020; an overview [J]. *Int J Cancer*, 2021, 149(4): 778.
- [3] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China; a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783.
- [4] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188.
- [5] LI J J, LIANG Q, SUN G C. Traditional Chinese medicine for prevention and treatment of hepatocellular carcinoma: a focus on epithelial-mesenchymal transition [J]. *J Integr Med*, 2021, 19(6): 469.
- [6] 刘博佳,宁青,钟荣玲,等.羽扇豆醇对人肝癌细胞 HepG2 和 SK-HEP-1 侵袭、转移的影响及机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(24): 6028.
- [7] 毛伟娇,谢敏,董夏,等.中医药治疗肝郁脾虚型肝癌的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2021, 27(1): 131.
- [8] 富琦,张青.名老中医方药心得丛书:郁仁存常用抗肿瘤药对 [M].北京:科学出版社,2018.
- [9] 陈雁黎.胡希恕伤寒论方证辨证 [M].北京:中国中医药出版社,2018.
- [10] 王子怡,王鑫,张岱岩,等.中医药网络药理学:《指南》引领下的新时代发展 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1): 7.
- [11] 牛明,张斯琴,张博,等.《网络药理学评价方法指南》解读 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4119.
- [12] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [13] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(W1): W357.
- [14] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1.30.1.
- [15] PIÑERO J, SAÜCH J, SANZ F, et al. The DisGeNET cytoscape app: exploring and visualizing disease genomics data [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19: 2960.
- [16] SZKLARCZYK D, GABLE A L, NASTOU K C, et al. The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605.
- [17] HUANG DA W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44.
- [18] LI A, LEWISON G. Chinese cancer research in 2009—18 and the disease burden [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 5031.
- [19] 刘宗超,李哲轩,张阳,等.2020 全球癌症统计报告解读 [J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2021, 7(2): 1.
- [20] OMATA M, CHENG A L, KOKUDO N, et al. Asia-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatocellular carcinoma: a 2017 update [J]. *Hepatol Int*, 2017, 11(4): 317.
- [21] 林雨珠,肖志伟,黄学武,等.原发性肝癌中西医结合诊疗实践回眸 [J]. *中医肿瘤学杂志*, 2020, 2(1): 5.
- [22] 张宇,陈华国,赵超,等.中药有效成分抗肝癌作用机制研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(14): 3395.
- [23] 巫丹.柴胡与赤芍、醋柴胡与白芍配伍前后药效学比较 [J]. *亚太传统医药*, 2017, 13(1): 18.
- [24] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(2): 110.
- [25] LI N N, XIANG S Y, HUANG X X, et al. Network pharmacology-based exploration of therapeutic mechanism of Liu-Yu-Tang in atypical antipsychotic drug-induced metabolic syndrome [J]. *Comput Biol Med*, 2021, 134: 104452.
- [26] ZHENG J, XU W, LIU W, et al. Traditional Chinese medicine Bu-Shen-Jian-Pi-Fang attenuates glycolysis and immune escape in clear cell renal cell carcinoma: results based on network pharmacology [J]. *Biosci Rep*, 2021, 41(6): BSR20204421.
- [27] DU J, SONG D, CAO T, et al. Saikosaponin-A induces apoptosis of cervical cancer through mitochondria-and endoplasmic reticulum stress-dependent pathway *in vitro* and *in vivo*: involvement of PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 20(21): 2221.
- [28] 姚敏.柴胡皂苷 d 对人前列腺癌 DU145 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用及机制研究 [D].长春:吉林大学,2016.
- [29] ZHENG Y B, XIAO G C, TONG S L, et al. Paeoniflorin inhibits human gastric carcinoma cell proliferation through up-

- regulation of microRNA-124 and suppression of PI3K/Akt and STAT3 signaling[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(23): 7197.
- [30] ZHOU Z, WANG S, SONG C, et al. Paeoniflorin prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 2511.
- [31] CHEN C H, CHEN M F, HUANG S J, et al. Saikosaponin a induces apoptosis through mitochondria-dependent pathway in hepatic stellate cells[J]. *Am J Chin Med*, 2017, 45(2): 351.
- [32] 许严伟, 耿胜男, 王梦琪, 等. 柴胡皂苷 D 对阿霉素治疗小鼠肝癌的靶向导引作用[J]. *中草药*, 2021, 52(3): 778.
- [33] ZHANG C Y, JIANG Z M, MA X F, et al. Saikosaponin-d inhibits the hepatoma cells and enhances chemosensitivity through SENP5-dependent inhibition of Gli1 sumoylation under hypoxia [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 1039.
- [34] XIANG Y, ZHANG Q, WEI S, et al. Paeoniflorin: a monoterpene glycoside from plants of Paeoniaceae family with diverse anticancer activities[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2020, 72(4): 483.
- [35] 吴雨蒙, 王莹, 吴琪, 等. 二仙汤对过氧化氢诱导的成骨细胞蛋白组学及 PI3K 信号通路的影响[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(15): 3934.

[责任编辑 马超一]