

# 基于网络药理学探讨二至丸治疗肝细胞癌的作用机制

陈芝强<sup>1</sup>, 陈怡<sup>1</sup>, 麦喆钊<sup>1</sup>, 杨智华<sup>1</sup>, 钟崇<sup>2</sup>, 李菁<sup>3\*</sup>

- (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510405;
2. 广州中医药大学第一附属医院, 广州 510405;
3. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

**[摘要]** **目的:** 基于网络药理学方法, 探究二至丸治疗肝细胞癌(HCC)的可能作用机制。**方法:** 通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)以及文献查阅, 检索并收集二至丸成分——女贞子和墨旱莲的候选活性成分及其对应的靶标。利用 UniProt 数据库和人类基因组注释数据库(GeneCards)结果相比对, 获得二至丸与肝细胞癌重合的潜在靶标基因。使用 Cytoscape3.6.0 软件构建二至丸的“候选成分-作用靶标”网络。使用 omicshare 平台将药物靶蛋白和疾病靶点相映射, 并绘制 Venn 图。结合 String 数据库及 Cytoscape 软件中的 Generate style from statistics 工具, 构建蛋白质相互作用网络。通过 Systems Dock Web Site 网络服务器与二至丸的活性成分进行分子对接。利用 Database for Annotation, Visualization and Integration Discovery (DAVID) 生物信息资源数据库, 对二至丸的作用靶标进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析和 GO 分类富集分析。**结果:** 共从二至丸中筛选得到 21 个候选活性成分, 包括  $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol), 槲皮素(querceetin), 木犀草素(luteolin), 去甲蟛蜞菊内酯(demethylwedelolactone), 山柰酚(kaempferol)等, 和 151 个作用靶标, 包括肿瘤坏死因子(TNF), 血管内皮生长因子(VEGF), 氨基端激酶(c-JUN), 原癌基因(c-MYC), 基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等, 主要涉及乙型肝炎(Hepatitis B), TNF, 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt), 肿瘤抑制基因 p53, Toll 样受体家族(Toll-like receptor)等信号通路。**结论:** 该研究基于网络药理学的方法预测了二至丸治疗肝细胞癌的可能的作用机制, 为后续的深入研究提供了方向。

**[关键词]** 二至丸; 肝癌; 网络药理学; 靶标; 信号通路

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5; R287 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)03-0166-09

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20192126

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190716.1759.002.html>

**[网络出版时间]** 2019-07-17 14:15

## Mechanism of Erzhiwan on Hepatocellular Carcinoma Based on Network Pharmacology

CHEN Zhi-qiang<sup>1</sup>, CHEN Yi<sup>1</sup>, MAI Zhe-xing<sup>1</sup>, YANG Zhi-hua<sup>1</sup>, ZHONG Chong<sup>2</sup>, LI Jing<sup>3\*</sup>

- (1. The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;
3. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the possible mechanisms of Erzhiwan in the treatment of hepatocellular carcinoma (HCC) based on the network pharmacology. **Method:** The candidate active components and targets of Ligustri Lucidi Fructus and Ecliptae Herba were obtained through retrieval of the traditional Chinese medicine (TCM) systems pharmacology database (TCMSP) and literatures. Through Uniprot database and the human genome database (GeneCards), the overlapping genes of Erzhiwan and hepatocellular carcinoma were collected.

**[收稿日期]** 20190123(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81873303); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2018ZYX51)

**[第一作者]** 陈芝强, 在读硕士, 从事中西医结合肿瘤临床与基础研究, E-mail: 1120030466@qq.com

**[通信作者]** \* 李菁, 博士, 主治医师, 从事中西医结合防治肿瘤疾病研究, E-mail: lilee2711@sina.com

The "candidate active components-targets" network of Ligustri Lucidi Fructus and Ecliptae Herba was built with Cytoscape 3.6.0 software. Drug target proteins and disease targets were mapped, and Venn map was drawn by Omicshare database. Major targets interaction network was formed by using String database and "Generate style from statistics" tool in Cytoscape 3.6.0 software. Molecular docking with active components was carried out by Systems Dock Web Site. The Gene Ontology (GO) classification enrichment analysis and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis for the targets were carried out in DAVID database. **Result:** Totally 21 active components, including beta-sitosterol, quercetin, luteolin, demethylwedelolactone, kaempferol, and 151 targets, including tumor necrosis factor (TNF), vascular endothelial growth factor (VEGF), N-terminal kinase (JUN), proto-oncogene (c-MYC), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) of Erzhivan were collected. Erzhivan exerts its effects on HCC mainly by acting on signal pathways, including Hepatitis B, TNF, Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K/Akt), tumor suppressor gene p53 and Toll-like receptor. **Conclusion:** Based on the methodology of network pharmacology, this study preliminarily predicted the major targets and pathways of Erzhivan in the treatment of HCC, providing a direction for further studies.

[**Key words**] Erzhivan; hepatocellular carcinoma; network pharmacology; target; pathway

肝癌是指发生于肝实质细胞或肝内胆管上皮细胞的恶性肿瘤,其中肝细胞癌是最主要的病理类型,约占肝癌总数的 90%。我国为肝细胞癌的高发地区,每年新发病例约占全球病例的 55%<sup>[1]</sup>。因早期肝细胞癌症状不明显,确诊往往已属中晚期,难以进行根治性手术治疗,5 年生存率仅为 10% 左右<sup>[2]</sup>。

二至丸出自于《扶寿精方》,包含女贞子和墨旱莲两味中药,具有补益肝肾,滋阴养血之功效,现被广泛应用于肝损伤、肝硬化、肝癌等肝脏疾病的治疗。赵益等<sup>[3]</sup>研究发现,二至丸水溶液对于肝癌细胞 BEL-7402 有良好的抑制作用;张玉仁等<sup>[4]</sup>证实了二至丸在对荷瘤小鼠发挥肿瘤抑制作用的同时能使荷瘤小鼠体内的肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 升高;许多研究结果亦提供了女贞子以及墨旱莲有效成分抗肿瘤疗效的证据<sup>[5-7]</sup>。与此同时,本文作者在临床上使用墨旱莲-女贞子药对治疗肝细胞癌时,发现其能有效地改善患者生活质量和减少患者痛苦。此外,肝硬化被认为是肝细胞癌(HCC)发生的主要危险因素之一,我国肝癌患者大多伴有肝硬化。相关病理学研究表明,进展期 HCC 是在肝硬化的病理基础上,经过肝硬化再生结节、低级别退变结节、高级别退变结节、重度不典型增生色素痣(DN)恶变、小肝癌等多个阶段演变而来的。因此,治疗肝硬化,延缓其进展过程,对于治疗 HCC 亦有着重要的意义<sup>[8-9]</sup>。现代药理学研究结果表明,二至丸具有抗氧化应激,抗炎,抑制肝星状细胞增殖和促进肝星状细胞凋亡等作用,有确切的保肝护肝疗效,能有效抗肝纤维化,对于肝硬化有显著的预防和治疗作用<sup>[10-11]</sup>。因此,二至丸可能是通过抗肿瘤以及抗肝

硬化两方面起到治疗肝细胞癌的作用。然而,目前对于二至丸的研究大多为单一方面的体外实验或动物实验,具有很大的局限性,难以获得其在体内作用机制的整体网络。

二至丸化学成分复杂,治疗肝细胞癌具有多成分、多靶点的优点,但是目前大多研究仅停留于药物对个体和个别分子的影响,二至丸治疗肝细胞癌的有效活性成分及作用机制尚不明确。而对于两种药物的药理学研究仍处于“单基因-单靶点”阶段,对于其整体性研究相对较少,而且仍未有任何关于二至丸的网络药理学研究。本研究基于网络药理学的思路和方法,获取二至丸主要活性成分,筛选出核心靶标和主要涉及通路,建立“成分-靶标-通路-疾病”网络,探究二至丸治疗肝细胞癌的可能的作用机制。

## 1 资料与方法

**1.1 药物活性成分和对应靶标的获取** 在中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP<sup>[12]</sup>, version 2.3, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)分别以“女贞子”“墨旱莲”为关键词,检索获得其化学成分。考虑到中药中并非所有成分都可以作为药物被人体吸收,结合现有文献<sup>[13-14]</sup>及平台推荐,在检索结果中限定条件为口服生物利用度(OB)  $\geq 30\%$  和类药性(DL)  $\geq 0.18$  进行筛选,获得 2 种药物中复合筛选条件的化学成分信息,并以其作为二至丸的候选活性成分。同时在平台中获得各成分所对应的候选靶标。

**1.2 活性成分预测靶标所对应基因的获取** 通过 Uniport 数据库(<https://www.uniprot.org/>)检索二至丸活性成分所对应候选靶标的蛋白名称,限定

物种为“human(人)”,获取候选靶标相对应的基因名和对应的 UNIPROTKB。

**1.3 肝细胞癌相关靶标基因的获取** 在人类基因组注释数据库 (Genecards) 数据库 (<https://www.genecards.org/>) 中以“hepatocellular carcinoma”或“hcc”或“hepatocellular carcinomas”或“liver cancer”或“hepatoma”或“hepatic cancer”或“hepatic carcinoma”为关键词检索与肝细胞癌相关靶标基因。将所得的相关靶标基因和二至丸主要活性成分所对应的候选靶标基因录入 Excel 表格,通过 Excel 中的“SUMIF”函数,对二至丸主要活性成分的候选靶标基因与肝细胞癌相关靶标基因进行对比,筛选出其中的共同靶标基因,作为二至丸治疗肝细胞癌的潜在作用靶标。

**1.4 成分-作用靶标网络构建与分析** 将未能作用于肝细胞癌相关靶标的活性成分剔除,再将剩余的活性成分与治疗肝细胞癌的潜在作用靶标导入 Cytoscape3.6.0 软件,构建其成分-作用靶标网络。

**1.5 核心靶标相互作用网络构建与分析** 将二至丸治疗肝细胞癌潜在靶标基因导入 String 网络数据库 (<https://string-db.org/>),限定物种为“Homo sapiens”,检索获得靶标蛋白相互作用关系,保存 TSV 格式文件。将 TSV 文件导入 Cytoscape 3.6.0 软件中,并用 NetworkAnalyzer 工具进行网络分析,获得 Degree 值(连接度)。通过 Cytoscape 3.6.0 软件展示蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络,导出 PNG 格式文件为蛋白相互作用网络图。

**1.6 分子对接** 分子对接通过电脑模拟,并计算相关化学物理参数,预测配体与受体的结合亲和性和构象。System Dock Web Site 能实现分子对接,并评估配子-受体的结合潜力。基于所得的蛋白相互作用网络,筛选 Degree 值排名前 5 名的靶标,将其导入 System Dock Web Site 服务器 (<http://systemsdock.unit.oist.jp/iddp/home/index>) 中,与二至丸的主要活性成分进行对接,基于对结果所显示 Docking 评分的分析,评估二至丸的主要活性成分与核心靶标之间的结合潜力。

**1.7 生物学过程与通路分析** 将“女贞子”和“墨旱莲”的作用靶标基因的 UNIPROTKB 导入 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>),形成一个基因列表,对该列表进行 Gene Ontology (GO) 分类富集分析和 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 通路富集分析,保存结果。选取满足 KDR 值(即 Q 值)少于 0.05 的通路,并根据 KDR 值升序

排序,选取前 20 条通路,使用 OmicShare 网站 (<http://www.omicshare.com/>) 绘制高级气泡图。

**1.8 成分-靶标-通路网络构建** 对富集基因数最多的 20 条 KEGG 通路进行分析,并结合文献检索,筛选出可能与治疗肝细胞癌相关的通路,找出二至丸治疗肝细胞癌富集在这些通路上的靶标,并与药物相应的候选活性成分相匹配。结合上述三者,利用 Cytoscape 3.6.0 构建“成分-靶标-通路”网络关系。

## 2 结果

**2.1 二至丸候选活性成分与候选靶标** 共收集到女贞子化学成分 119 个,墨旱莲化学成分 48 个。以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$  作为限定条件,筛选出候选活性成分 21 个,其中女贞子 13 个,墨旱莲 10 个,重复 2 个。同时在平台获取二至丸候选活性成分的靶标,共 211 个。见表 1。

表 1 二至丸活性成分

Table 1 Active components in Erzhiwan

| No. | 药物  | 英文名称   | OB/%   | DL   |
|-----|-----|--|--------|------|
| 1   | 女贞子 | beta-sitosterol                                      | 36.91  | 0.75 |
| 2   | 女贞子 | kaempferol   | 41.88  | 0.24 |
| 3   | 女贞子 | taxifolin  | 57.84  | 0.27 |
| 4   | 女贞子 | lucidumoside D                                       | 48.87  | 0.71 |
| 5   | 女贞子 | lucidumoside D_qt                                    | 54.41  | 0.47 |
| 6   | 女贞子 | luteolin   | 36.16  | 0.25 |
| 7   | 女贞子 | eriodictyol  | 71.79  | 0.24 |
| 8   | 女贞子 | syringaresinol diglucoside_qt                        | 83.12  | 0.8  |
| 9   | 女贞子 | lucidusculine  | 30.11  | 0.75 |
| 10  | 女贞子 | olitoriside  | 65.45  | 0.23 |
| 11  | 女贞子 | olitoriside_qt                                       | 103.23 | 0.78 |
| 12  | 女贞子 | (20S)-24-ene-3 $\beta$ ,20-diol-3-acetate            | 40.23  | 0.82 |
| 13  | 女贞子 | quercetin  | 46.43  | 0.28 |
| 14  | 墨旱莲 | linarin  | 39.84  | 0.71 |
| 15  | 墨旱莲 | acacetin   | 34.97  | 0.24 |
| 16  | 墨旱莲 | butin  | 69.94  | 0.21 |
| 17  | 墨旱莲 | 3'-O-methylroborol                                   | 57.41  | 0.27 |
| 18  | 墨旱莲 | pratensein   | 39.06  | 0.28 |
| 19  | 墨旱莲 | demethylwedelolactone                                | 72.13  | 0.43 |
| 20  | 墨旱莲 | wedelolactone  | 49.6   | 0.48 |
| 21  | 墨旱莲 | luteolin   | 36.16  | 0.25 |
| 22  | 墨旱莲 | quercetin  | 46.43  | 0.28 |
| 23  | 墨旱莲 | 1,3,8,9-tetrahydroxybenzofurano [3,2-c]chromen-6-one | 33.94  | 0.43 |

**2.2 候选靶标预测** 在 Uniprot 数据库中输入蛋白

靶标, 获得 211 个候选靶标的相应基因。将所得的靶标基因与 GeneCards 数据库中搜索得到的肝细胞

癌相关基因作进行对比, 筛选出可能与肝细胞癌有关的作用靶标 151 个, 见表 2。

表 2 二至丸潜在作用靶标信息

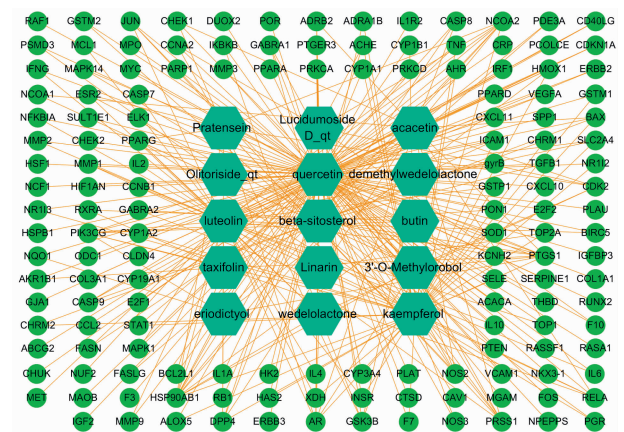
Table 2 Information of candidate targets of Erzhiwan

| No. | 靶标      | Uniprotkb | No. | 靶标       | Uniprotkb | No. | 靶标     | Uniprotkb |
|-----|---------|-----------|-----|----------|-----------|-----|--------|-----------|
| 1   | ABCG2   | Q9UNQ0    | 37  | CXCL11   | O14625    | 73  | IL-1A  | P01583    |
| 2   | ACACA   | Q13085    | 38  | CYP19A1  | P11511    | 74  | IL-1R2 | P27930    |
| 3   | ACHE    | P22303    | 39  | CYP1A1   | P04798    | 75  | IL-2   | P60568    |
| 4   | ADRA1B  | P35368    | 40  | CYP1A2   | P05177    | 76  | IL-4   | P05112    |
| 5   | ADRB2   | P07550    | 41  | CYP1B1   | Q16678    | 77  | INSR   | P06213    |
| 6   | AHR     | P35869    | 42  | CYP3A4   | P08684    | 78  | IRF1   | P10914    |
| 7   | AKR1B1  | P15121    | 43  | DPP4     | P27487    | 79  | JUN    | P05412    |
| 8   | AKR1C3  | P42330    | 44  | DUOX2    | Q9NRD8    | 80  | KCNH2  | Q12809    |
| 9   | ALOX5   | P09917    | 45  | E2F1     | Q01094    | 81  | MAOB   | P27338    |
| 10  | APOB    | P04114    | 46  | E2F2     | Q14209    | 82  | MAP2   | P11137    |
| 11  | APP     | P05067    | 47  | ELK1     | P19419    | 83  | MAPK14 | Q16539    |
| 12  | AR      | P10275    | 48  | ERBB2    | P04626    | 84  | MCL1   | Q07820    |
| 13  | Bax     | Q07812    | 49  | ERBB3    | P21860    | 85  | MDM2   | Q00987    |
| 14  | BCL-2L1 | Q07817    | 50  | ESR2     | Q92731    | 86  | MET    | P08581    |
| 15  | BIRC5   | O15392    | 51  | F10      | P00742    | 87  | MGAM   | O43451    |
| 16  | CA2     | P00918    | 52  | F3       | P13726    | 88  | MMP-1  | P03956    |
| 17  | CASP7   | P55210    | 53  | F7       | P08709    | 89  | MMP-2  | P08253    |
| 18  | CASP8   | Q14790    | 54  | FASLG    | P48023    | 90  | MMP-3  | P08254    |
| 19  | CASP9   | P55211    | 55  | FASN     | P49327    | 91  | MMP-9  | P14780    |
| 20  | CAV1    | Q03135    | 56  | GJA1     | P17302    | 92  | MPO    | P05164    |
| 21  | CCL2    | P13500    | 57  | GSK3B    | P49841    | 93  | MTTP   | P55157    |
| 22  | CCNA2   | P20248    | 58  | GSTM1    | P09488    | 94  | MYC    | P01106    |
| 23  | CCNB1   | P14635    | 59  | GSTM2    | P28161    | 95  | NCOA1  | Q15788    |
| 24  | CD40LG  | P29965    | 60  | GSTP1    | P09211    | 96  | NCOA2  | Q15596    |
| 25  | CDK2    | P24941    | 61  | HIF1AN   | Q9NWT6    | 97  | NFE2L2 | Q16236    |
| 26  | CDK4    | P11802    | 62  | HK2      | P52789    | 98  | NFKBIA | P25963    |
| 27  | CDKN1A  | P38936    | 63  | HMOX1    | P09601    | 99  | NKX3-1 | Q99801    |
| 28  | CHEK1   | O14757    | 64  | HSF1     | Q00613    | 100 | NOS2   | P35228    |
| 29  | CHEK2   | O96017    | 65  | HSP90AB1 | P08238    | 101 | XDH    | P47989    |
| 30  | CHUK    | O15111    | 66  | HSPB1    | P04792    | 102 | NOS3   | P29474    |
| 31  | CLDN4   | O14493    | 67  | ICAM1    | P05362    | 103 | NQO1   | P15559    |
| 32  | COL1A1  | P02452    | 68  | IFNG     | P01579    | 104 | NR1I2  | O75469    |
| 33  | COL3A1  | P02461    | 69  | IGF2     | P01344    | 105 | NR1I3  | Q14994    |
| 34  | CRP     | P02741    | 70  | IGFBP3   | P17936    | 106 | NR3C2  | P08235    |
| 35  | CTSD    | P07339    | 71  | IKBKB    | O14920    | 107 | NUF2   | Q9BZD4    |
| 36  | CXCL10  | P02778    | 72  | IL-10    | P22301    | 108 | ODC1   | P11926    |

续表 2

| No. | 靶标     | Uniprotkb | No. | 靶标       | Uniprotkb | No. | 靶标      | Uniprotkb |
|-----|--------|-----------|-----|----------|-----------|-----|---------|-----------|
| 109 | OPRM1  | P35372    | 124 | PSMD3    | O43242    | 138 | SLC6A2  | P23975    |
| 110 | PARP1  | P09874    | 125 | PTEN     | P60484    | 139 | SLC6A4  | P31645    |
| 111 | PCNA   | P12004    | 126 | PTGES    | O14684    | 140 | SLPI    | P03973    |
| 112 | PGR    | P06401    | 127 | PTGS1    | P23219    | 141 | SOD1    | P00441    |
| 113 | PLAT   | P00750    | 128 | RAF1     | P04049    | 142 | SPP1    | P10451    |
| 114 | PLAU   | P00749    | 129 | RASA1    | P20936    | 143 | STAT1   | P42224    |
| 115 | PONI   | P27169    | 130 | RASSF1   | Q9NS23    | 144 | SULT1E1 | P49888    |
| 116 | POR    | P16435    | 131 | RB1      | P06400    | 145 | TGFB1   | P01137    |
| 117 | PPARA  | Q07869    | 132 | RELA     | Q04206    | 146 | THBD    | P07204    |
| 118 | PPARD  | Q03181    | 133 | RUNX2    | Q13950    | 147 | TNF     | P01375    |
| 119 | PPARG  | P37231    | 134 | RXRA     | P19793    | 148 | TOP1    | P11387    |
| 120 | PPP3CA | Q08209    | 135 | SELE     | P16581    | 149 | TOP2A   | P11388    |
| 121 | PRKCA  | P17252    | 136 | SERPINE1 | P05121    | 150 | VCAM1   | P19320    |
| 122 | PRKCD  | Q05655    | 137 | SLC2A4   | P14672    | 151 | VEGFA   | P15692    |
| 123 | PRSSI  | P07477    |     |          |           |     |         |           |

**2.3 成分-靶标网络构建** 在 Cytoscape 软件中导入二至丸的活性成分和与肝癌细胞癌相关的作用靶标,构建成分-靶标网络(图 1)。此网络共包括节点 166 个,其中 15 个节点为活性成分(并非所有活性成分均可作用于肝癌细胞癌相关靶标,剔除 6 个未作用于任何靶标的活性成分),151 个节点为作用靶标,边 317 条。蓝色六边形节点代表活性成分,绿色圆形节点代表作用靶标,而边则代表成分与靶标的关系。不同的靶标可对应相同的活性成分,同一靶标也可与不同的活性成分相对应,可见二至丸治疗肝癌细胞癌具有多成分、多靶标的特点。



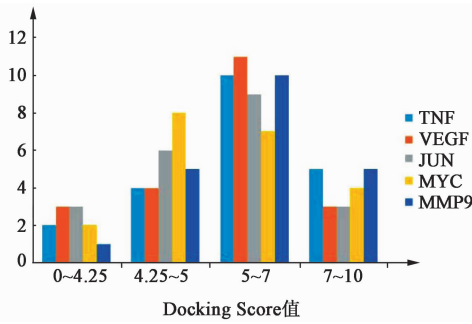


图 3 分子对接

Fig. 3 Diagram of molecular docking

数据库对二至丸活性成分对应的潜在靶标进行 GO 和 KEGG 分析。筛选 KDR 值(Q 值) < 0.05 的通路 与生物过程,其中 KDR 值越小的通路,与二至丸治 疗肝细胞癌关系越为密切。GO 富集分析包括细胞 组分(CC),分子功能(MF),生物过程(BP)3 个部分。GO 分析结果显示,仅有 14 个细胞组分(CC)符 合筛选条件,其中富集比例较高,KDR 值较小的在 CC 分析(图 4)中为 extracellular space, cytosol, nucleoplasm, membrane raft 等;MF 分析(图 5)中为 enzyme binding, protein binding, identical protein binding, protein homodimerization activity 等;BP 分析 (图 6)中为 response to drug, negative regulation of apoptotic process, response to lipopolysaccharide, response to estradiol 等。KEGG 通路富集分析发现 (图 7)二至丸治疗肝细胞癌的靶标主要与乙型肝炎 (Hepatitis B), TNF, 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt), 肿瘤抑制基因 p53, Toll 样受体家族等 通路关系较为密切。

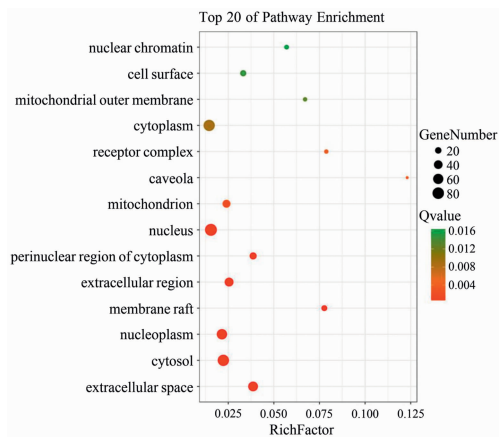


图 4 二至丸活性成分对应靶标的 CC 分析

Fig. 4 CC analysis on candidate targets from active components of Erzhawan

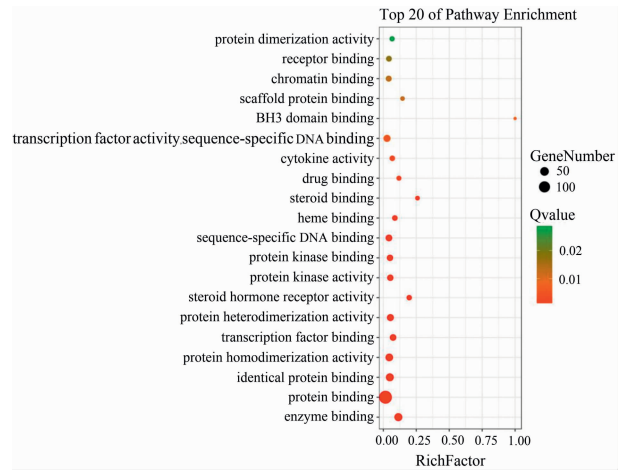


图 5 二至丸活性成分对应靶标的 MF 分析

Fig. 5 MF analysis on candidate targets from active components of Erzhawan

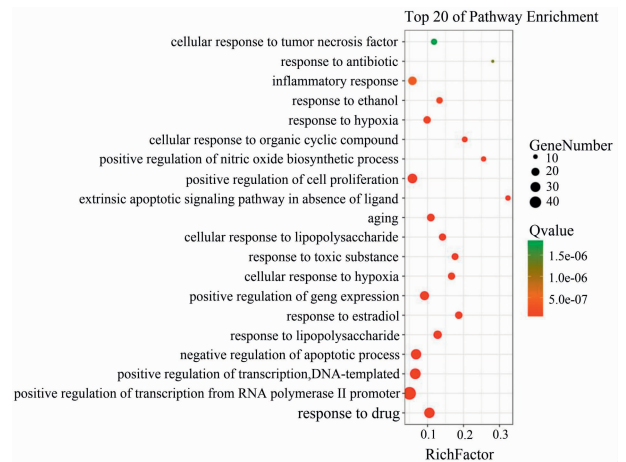


图 6 二至丸活性成分对应靶标的 BP 分析

Fig. 6 BP analysis on candidate targets from active components of Erzhawan

2.7 成分-靶标-通路网络构建 通过文献检索与 阅读,在排名前 20 的 KEGG 通路中筛选出可能与肝 细胞癌相关的通路,并将其与二至丸的活性成分、作 用靶标三者结合,构建成分-靶标-通路多维网络图 (图 8)。其中黄色矩形节点代表药物,蓝色三角形 节点代表与肝细胞癌相关的活性成分,紫色圆形节 点代表潜在靶标,绿色六边形节点代表与肝细胞癌 相关通路。分析网络图可知,二至丸治疗肝细胞癌 涉及的活性成分共 12 个,包括 beta-sitosterol, quercetin, luteolin, demethylwedelolactone, butin 等。 上述活性成分主要作用于 TNF, VEGF, JUN, MYC, MMP-9 等靶标,涉及 Hepatitis B, TNF, PI3K/Akt, p53, Toll-like receptor 等信号通路。

### 3 讨论

二至丸被誉为“清上补下第一方”,方中墨旱莲

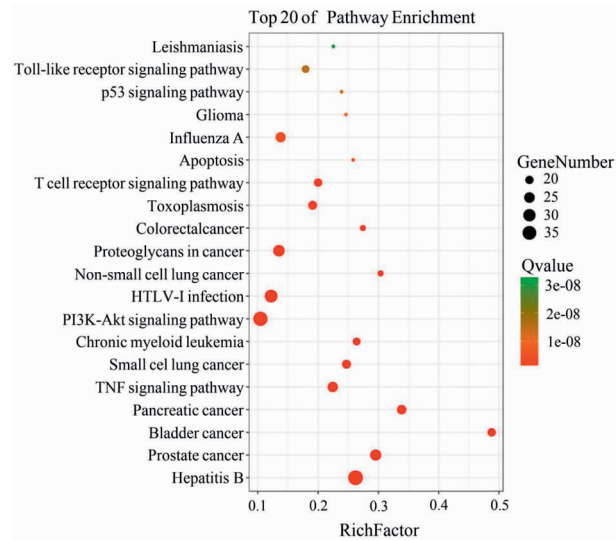


图 7 二至丸活性成分对应靶标的 KEGG 通路富集分析  
Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of candidate targets from active components of Erzhiwan

能滋补肝肾,凉血止血;女贞子亦为平补肝肾之常用之品,《本草纲目》言其能“强阴,健腰膝,变白发,明目”。许多药理研究表明,二至丸及其中成药有确切显著的保肝护肝作用,被广泛运用于肝细胞癌的临床治疗,但目前其具体作用机制尚不明确<sup>[15]</sup>。因此,基于网络药理学的原理和方法,探究二至丸治疗肝细胞癌的作用机制,为其治疗肝细胞癌提供证据支持,有利于其临床上的进一步推广使用,并为更高层次的研究奠定基础。

本研究所收集的二至丸治疗肝细胞癌的主要活性成分包括  $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol),去甲萆薢内酯(demethylwedelolactone),山柰酚(kaempferol),槲皮素(quercetin),木犀草素(luteolin)等。 $\beta$ -谷甾醇是植物甾醇类成分之一。相关药理研究表明, $\beta$ -谷甾醇可促进 Bax 蛋白的表达,降低 Bcl-2 蛋白的表达以及活化 Bid,通过抑制肝癌 HepG2 细胞生长,

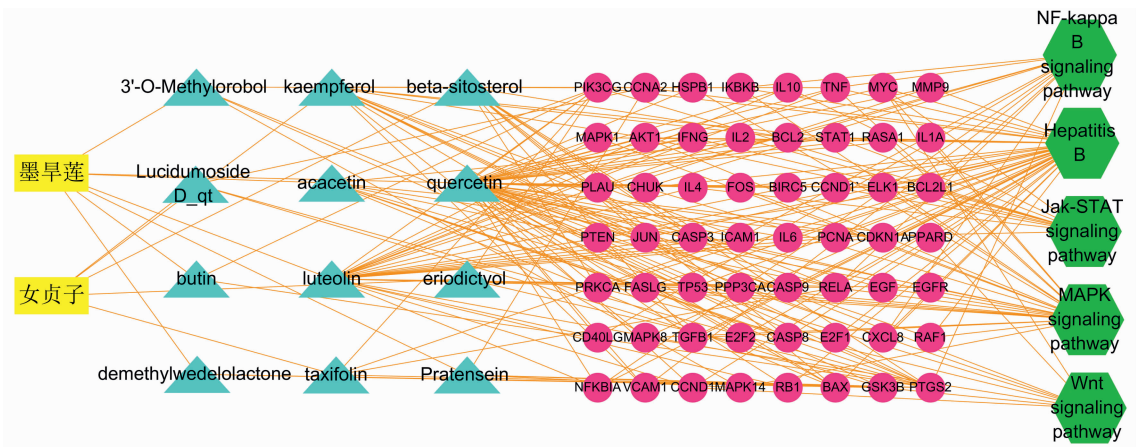


图 8 “成分-靶标-通路”网络关系  
Fig. 8 “Compound-target-pathway” network

发挥抗肝癌作用<sup>[16]</sup>。山柰酚对肝癌 Huh7 细胞与肝癌细胞 CBRH7919 生长有明显的抑制作用<sup>[17-18]</sup>。槲皮素不仅有较强的抗肝癌细胞作用,且能显著抑制缺氧诱导的人肝癌 HepG2 细胞的上皮间质转化,抑制肝癌的转移<sup>[19-21]</sup>。本研究中的“成分-靶标”网络、靶标相互作用网络体现了二至丸多成分、多靶标治疗肝细胞癌的特点,作用机制复杂多样。分子对接试验结果提示二至丸活性成分和关键靶标之间结合能力良好,提示本实验的数据与结果较为可靠,具有较高的参考价值。

同时发现,二至丸可能通过作用于 TNF, VEGF, c-JUN, c-MYC 和 MMP-9 等 5 个靶标发挥治疗肝细胞癌的作用。TNF 是由巨噬细胞分泌的一种小分子蛋白,分为 TNF- $\alpha$  和 TNF- $\beta$  类型,能直接杀伤肿瘤

细胞,并且通过促进正常细胞增殖和分化,保护周围正常的组织结构<sup>[22]</sup>。VEGF 是目前发现最强的促血管生长因子,肿瘤细胞通过分泌大量的血管内皮生长因子,为肿瘤的快速生长发展提供足够的氧气与营养物质,而大量脆弱紊乱的新生血管导致肿瘤极易发生血道转移。因此,抑制血管内皮生长因子的分泌和表达,有利于抑制肝细胞癌肿瘤的生长和转移<sup>[23]</sup>。c-JUN 是一种细胞转录因子相关蛋白,对细胞增殖有促进作用。有研究表明,肝细胞癌患者 c-JUN 的表达被促进,导致肝癌细胞增殖和免疫逃逸,促进肝癌发生发展<sup>[24-25]</sup>。c-MYC 是一种原癌基因,其产物磷酸化蛋白 p62c-MYC 能使肝细胞发生恶性转化。同时,c-MYC 还能诱导血管内皮生长因子表达,因此它在肿瘤的发生和进展过程中发挥重

要作用<sup>[26-27]</sup>。MMP-9 是锌依赖的肽链内切酶,参与胚胎发育、伤口愈合、肿瘤细胞侵袭和转移等过程。研究发现,MMP-9 通过降解 IV 型胶原蛋白,促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和转移,由此可知抑制 MMP-9 的表达可以抑制肝细胞癌的进一步发展,而 MMP-9 的表达情况亦可为评估肝细胞癌的严重程度以及预后提供依据<sup>[28-29]</sup>。

本研究结果表明,二至丸治疗 HCC 主要涉及 Hepatitis B, TNF, PI3K/Akt, p53, Toll-like receptor 等 5 条信号通路。

Hepatitis B 即乙型肝炎通路,现代医学认为,乙型肝炎病毒的感染是 HCC 发生的高危险因素。慢性乙型肝炎患者的 HCC 发病率为正常人的 5 ~ 15 倍,若同时合并肝硬化,则 HCC 的发病率更高<sup>[30-31]</sup>。许多临床研究结果表明,抗病毒治疗能改善 HCC 患者的预后和生存质量,提高肝细胞癌患者的术后生存率<sup>[32-33]</sup>。炎症伴随着肝癌的发生发展过程。TNF 是肿瘤微环境中最重要的炎性细胞因子之一,其中以 TNF- $\alpha$  最具代表性。目前,对于 TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 信号通路相关的研究较多。朱倩等<sup>[34]</sup>根据研究结果预测,TNF- $\alpha$  可能通过活化 NF- $\kappa$ B 信号通路而提高了肝癌细胞 VEGF, MMP-9 的表达,促进肝细胞癌 HCC 血管的生成,降解细胞外基质,进而促进肝癌细胞的侵袭能力。此外,TNF- $\alpha$  通过激活 NF- $\kappa$ B 信号通路,从而使肿瘤细胞中 VEGF 的表达上调,有利于肝癌新血管的生成,促进肝癌的进展<sup>[35-36]</sup>。PI3K/Akt 信号通路参与调节细胞生长、代谢、凋亡、转移等过程密切相关,在许多肿瘤细胞内异常表达,可借以对肝癌的预后和临床疗效做出判断。Akt 被 PI3K 激活后,会通过促进肿瘤细胞增殖,抑制细胞凋亡来促使肿瘤的发展。因此,目前许多对于肝癌发病机制和治疗的研究都以 PI3K/Akt 信号通路作为关键靶点之一。有研究发现通过抑制 PI3K/Akt 信号通路中 PDK1 的表达,可以抑制肝癌细胞迁移和侵袭<sup>[37-40]</sup>。p53 属于最早发现的抑癌基因之一,分为野生型和突变型。野生型 p53 能通过调控 DNA 复制的过程,维持细胞正常增殖和生长,抑制细胞恶性增殖;而突变型 p53 调节功能发生改变,具有了致癌作用,超过一半的肿瘤中发现突变的 p53 基因。许多研究结果表明,金丝桃苷,葫芦素 I, 奥沙利铂等药物或活性成分都是通过激活 p53 信号通路发挥抗肝癌的治疗作用<sup>[41-44]</sup>。Toll 样受体是一种天然的免疫识别受体,可同时存在于肿瘤细胞和免疫细胞表面,具有促进肿瘤细胞的增殖和增强机体

的抗肿瘤免疫能力的双重作用。Toll 样受体及其下游 NF- $\kappa$ B, MAPK 信号通路激活后,会产生不同炎症介质和细胞因子,通过改变肝癌组织的微环境,调控肝癌的发生发展<sup>[45-46]</sup>。

综上所述,本研究表明二至丸治疗肝细胞癌主要的活性成分可能为  $\beta$ -谷甾醇,去甲蟛蜞菊内酯,山柰酚,槲皮素,木犀草素(luteolin)等,这些活性成分通过作用于 TNF, VEGF, c-JUN, c-MYC 和 MMP-9 等靶标以及调节 Hepatitis B, TNF, PI3K/Akt, p53, Toll-like receptor 等通路,发挥治疗作用。

#### [参考文献]

- [1] 郑侠,陈晓锋. 肝细胞癌系统治疗研究进展[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2018, 4(3): 37-43.
- [2] 颜葱,涂晓璇,吴伟,等. 晚期肝癌综合治疗进展[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(21): 1100-1103.
- [3] 赵益,罗蓉,尚广彬,等. 二至汤含药血清对肿瘤细胞抑制作用的研究[J]. 新中医, 2013, 45(4): 156-159.
- [4] 张玉仁,郑翔翔,朱卫丰,等. 二至丸对阴虚荷瘤小鼠抑瘤作用的研究[J]. 江西中医药大学学报, 2007, 19(6): 58-59.
- [5] 周步高,刘端勇,左铮云. 二至丸防治肿瘤的免疫学视角分析[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(5): 1800-1802.
- [6] 刘先芳,梁敬钰,孙建博,等. 女贞子化学成分和药理活性研究进展[J]. 海峡药学, 2018, 30(1): 1-8.
- [7] 郑辉,王盟,朱玉云,等. 旱莲草水提物对荷 S180 实体瘤小鼠抗肿瘤作用[J]. 医药导报, 2008(12): 1438-1439.
- [8] 廖碧红,单鸿,王劲,等. 肝炎后肝硬化继发肝癌患者小肝癌病灶 320 排 CT 灌注成像 HAP/HPI/HPP 变化及其临床意义[J]. 山东医药, 2017, 57(40): 14-17.
- [9] 周冷潇,韩涛. 慢性乙型病毒性肝炎肝硬化发生肝细胞癌的危险因素分析[J]. 天津医科大学学报, 2017, 23(3): 214-216.
- [10] 胡冬梅,陈小玲,陆杨,等. 二至丸及其组成药味保肝药理作用研究进展[J]. 药学实践杂志, 2016, 34(4): 289-291, 296.
- [11] 李跃文,王博龙. 二至丸抗肝纤维化活性成分-靶点-通路的网络预测[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(11): 201-205.
- [12] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. J Chem, 2014, 6(1): 13.
- [13] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. IJMS, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [14] Walters J R F. New advances in the molecular and cellular biology of the small intestine[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2006, 18(2): 161-167.



- [15] 庄振杰,李佳容,黄慈辉,等.基于网络药理学的女贞子-黄芪药对的抗癌机制[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(12):195-202.
- [16] 张忠泉,邢煜君,胡国强,等. $\beta$ -谷甾醇诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡机制研究[J].中国中药杂志,2011,36(15):2145-2148.
- [17] 王铮华,梁统,李涛,等.山柰酚对人肝癌细胞 Huh7 生长及凋亡的影响[J].广东医学,2014,35(2):192-194.
- [18] 周瑶,杜标炎,谭宇蕙,等.山柰酚对大鼠肝癌细胞 CBRH7919 的增殖抑制及诱导凋亡作用[J].广州中医药大学学报,2010,27(3):250-253,317.
- [19] 张红萍,袁梅.槲皮素对肝癌细胞 Huh7 的杀伤活性研究[J].浙江实用医学,2018,23(1):1-4.
- [20] 李丝丝,彭琼,甘惠中,等.槲皮素在衣霉素诱导的内质网应激介导肝癌细胞上皮间质转化中的作用[J].胃肠病学和肝病杂志,2017,26(4):386-389.
- [21] 陈鹏,阳锡军,赵方,等.槲皮素对裸鼠肝癌切除术后肿瘤肺转移的影响[J].现代肿瘤医学,2018,26(3):344-346.
- [22] 冯馨锐,崔雨舒,何志涛,等.肿瘤坏死因子- $\alpha$  的生物学功能研究进展[J].吉林医药学院学报,2019,40(1):66-68.
- [23] 何万鹏,姚稼桐,王显魁,等.影响原发性肝细胞癌患者血管内皮生长因子表达水平的研究进展[J].实用医院临床杂志,2016,13(5):214-217.
- [24] 叶劲松,王志明. CD95、JNK1、JNK2 和 c-Jun 在肝细胞癌中的表达及意义[J].中国普通外科杂志,2010,19(10):1118-1122.
- [25] 杨跃武,叶志强,孔庆磊,等. c-Jun 蛋白在肝细胞癌中的表达及其意义[J].中华肝脏外科手术学电子杂志,2015,4(4):250-253.
- [26] 牛广旭,吴士茜,刘志权,等. MCM7、Rb、c-MYC 在肝细胞癌中的表达及其在基因通路中的作用[J].实用癌症杂志,2017,32(2):210-213.
- [27] 王加亮,顾春燕,钱铮,等. c-MYC 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及临床病理意义[J].南通大学学报:医学版,2016,36(5):432-435.
- [28] 曹自,孙保存,赵秀兰,等. Runx2 通过促进 MMP9 的表达增强肝细胞肝癌迁移侵袭能力[J].中国肿瘤临床,2017,44(9):424-428.
- [29] 杨建村. 基质金属蛋白酶-9、富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白检测在原发性肝癌严重程度和预后评估中的价值分析[J].世界华人消化杂志,2018,26(17):1036-1043.
- [30] 杨俊杰,鄢业鸿. 抗病毒治疗对乙肝相关性肝细胞癌术后预后的影响[J].广东医学,2018,39(4):587-592,596.
- [31] Gordon S C, Lamerato L E, Rupp L B, et al. Antiviral therapy for chronic hepatitis B virus infection and development of hepatocellular carcinoma in a US population[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014, 12(5):885-893.
- [32] 付广双,王国才,袁艺萌,等. 乙肝相关性原发性肝癌预后因素分析及抗病毒治疗预后观察[J].现代医学与健康研究电子杂志,2018,2(15):63-64.
- [33] 郭宝中. 抗病毒治疗对乙型肝炎相关原发性肝癌患者生活质量及预后的影响[J].中国现代药物应用,2016,10(7):188-189.
- [34] 朱倩,卢贵余,桂芬芳,等. TNF- $\alpha$  对肝癌细胞 NF- $\kappa$ B 信号通路活化的影响及临床意义[J].河北医药,2018,40(24):3700-3703.
- [35] YU H B, ZHANG H F, ZHANG X, et al. Resveratrol inhibits VEGF expression of human hepatocellular carcinoma cells through a NF-kappa B-mediated mechanism [J]. Hepatogastroenterology, 2010, 57(102/103):1241-1246.
- [36] 李井彬,柯善栋,胡少明. 黄连素通过 NF- $\kappa$ B 信号通路对 TNF- $\alpha$  诱导的 VEGF 表达的影响[J].华中科技大学学报:医学版,2014,43(4):386-390.
- [37] 软洋,姜浩,金星林. PI3K/Akt 转导通路与肝细胞癌生物学行为的关系[J].世界最新医学信息文摘,2017,17(86):29-31,33.
- [38] 曹煜姗,孙达权,夏庆,等. PI3K/Akt 通路在肝癌细胞迁移和侵袭中的作用[J].山东医药,2018,58(26):14-17.
- [39] 洪璇,张艳桥. JAK-STAT 信号传导通路在肿瘤中的研究进展[J].基础医学与临床,2011,31(4):463-466.
- [40] 杨欣,李亚辉,潘恩佳,等. 基于 PI3K/Akt 信号通路筛选附子-半夏抗肿瘤的活性成分及关键靶点[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(10):170-179.
- [41] 蒋参,熊慧生,巫植棵,等. 金丝桃苷介导 p53/Caspase 通路对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的调节作用[J].中国免疫学杂志,2018,34(12):1832-1836.
- [42] 陈明,王举涛,吴珍妮,等. 半枝莲总黄酮通过 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究[J].中国中药杂志,2017,42(7):1358-1364.
- [43] 高洁,丁淑琴,邓蓉,等. 奥沙利铂通过 p53 信号通路抑制肝细胞癌增殖的机制研究[J].蚌埠医学院学报,2018,43(8):984-988.
- [44] 吴思思,朱国念,倪银芸,等. 葫芦素 I (JSI-124) 通过 p53 信号通路诱导 HepG2 细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(1):33-38.
- [45] 刘幸,撒亚莲. Toll 样受体在肝癌中作用的研究进展[J].昆明医科大学学报,2016,37(7):121-125.
- [46] 徐恩君,刘亚婷,李涛. Toll 样受体信号转导与原发肝癌发生发展关系的研究进展[J].免疫学杂志,2015,31(8):727-732.

[责任编辑 张丰丰]