

# 基于网络药理学联合分子对接对逍遥散干预原发性肝癌的作用机制研究

商志浩<sup>1</sup>, 潘成镇<sup>1</sup>, 马月辉<sup>1</sup>, 谢卓容<sup>1</sup>, 韦紫怡<sup>1</sup>, 罗伟生<sup>1</sup>, 彭岳<sup>1</sup>, 岑妍慧<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>广西中医药大学; <sup>2</sup>广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530000

**摘要:**为探索逍遥散干预原发性肝癌(HCC)的作用机制。运用网络药理学的方法,通过中药系统药理学技术平台(TCMSP)网站检索逍遥散的主要活性成分及对应的作用靶点,再利用 GEO 数据库筛选并分析原发性肝癌的差异基因,采用 Cytoscape3.7.2 软件构建活性成分-靶点网络图,利用 Biso Genet 插件分析筛选得出 PPI 蛋白互作网络和 PPI 网络的关键节点,然后运用生物信息学的方法对关键靶点进行基因功能分析和通路富集分析。最后使用分子对接技术对化合物核心成分与关键靶点进行对接验证。通过分析得到逍遥散作用于 HCC 的交集基因 27 个,GO 富集显示逍遥散的生物功能主要涉及无机物质细胞反应、趋化因子活动、细胞周期性蛋白依赖复合物等方面;KEGG 通路富集显示逍遥散影响的通路主要有细胞衰老信号通路、甾类激素生物合成信号通路、p53 信号通路等。分子对接结果显示逍遥散核心成分与 HCC 关键靶点亲和力良好。综上逍遥散改善 HCC 存在多成分、多靶点和多重药理作用,为进一步研究治疗 HCC 提供了线索。

**关键词:**网络药理学;基因芯片;分子对接;原发性肝癌;逍遥散;作用机制

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)8-1302-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.8.005

## Study on the mechanism of Xiaoyaosan in the treatment of primary liver cancer based on network pharmacology and molecular docking

SHANG Zhi-hao<sup>1</sup>, PAN Cheng-zhen<sup>1</sup>, MA Yue-hui<sup>1</sup>,  
XIE Zhuo-rong<sup>1</sup>, WEI Zi-yi<sup>1</sup>, LUO Wei-sheng<sup>1</sup>, PENG Yue<sup>1</sup>, CEN Yan-hui<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Guangxi University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China

**Abstract:** To explore the mechanism of intervention of Xiaoyaosan in primary hepatocellular carcinoma (HCC). Using the method of network pharmacology, pharmacology by traditional Chinese medicine (TCM) system technology platform (TCMSP) website retrieval Xiaoyaosan of main active components and the corresponding targets. Using GEO database selection and analysis of the differences of primary liver cancer gene, Cytoscape3.7.2 software was used to construct the active ingredient-target network diagram. Using Biso Genet plug-in analysis filter PPI protein interactions and PPI network of key nodes, then using bioinformatics methods on key targets for gene function analysis and pathway enrichment analysis. Finally, molecular docking technology was used to verify the docking between the core components of the compound and the key targets. Through analysis, 27 intersection genes of Xiaoyaosan acting on HCC were obtained, and GO enrichment showed that the biological functions of Xiaoyaosan were mainly related to the cellular reactions of inorganic substances, chemokine activities, and cyclin-dependent complexes of cells. The pathways enriched by KEGG pathway showed the influence of xiaoyao powder mainly included cell senescence signaling pathway, steroid hormone biosynthesis signaling pathway and p53 signaling pathway. Molecular docking results showed that the core components of Xiaoyaosan had good affinity with the key targets of HCC. In summary, Xiaoyaosan improves the existence of multiple components, multiple targets and multiple pharmacological effects in HCC, pro-

收稿日期:2020-03-04 接受日期:2020-07-02

基金项目:国家自然科学基金(81960761, 8166150270);广西自然科学基金面上项目(2020GXNSFAA259011);广西一流学科建设开放课题(2019XK137)

\*通信作者 Tel:86-771-18377105667; E-mail:szh928494065@163.com

viding clues for further research on the treatment of HCC.

**Key words:** network pharmacology; gene chip; molecular docking; primary liver cancer; Xiaoyaosan; action mechanism

原发性肝癌(HCC)是临床常见的消化系统恶性肿瘤,有流行广、起病缓慢、出现症状后疾病进展迅速、侵袭性强、病死率高<sup>[1]</sup>的特点。据统计,肝癌死亡率在恶性肿瘤城市死亡率中居于第二位,仅次于肺癌;农村居于第二位,仅次于胃癌。目前我国每年约有11万人死于肝癌,并且我国的肝癌发病率是全球最高,肝癌发病人数占全球的50%以上<sup>[2]</sup>,对我国人民的身体健康造成严重威胁。肝癌可发生于任何年龄,其中以35~55岁最多,男女之比约为1:1~4:1。早期切除是疗效较好的治疗方法之一,但大多数肝癌患者确诊时已属晚期,多数已错过手术时机,所能采用的现代综合治疗方法常被限制在放化疗和免疫治疗上,而放化疗对本病的治疗毒副反应大,适应证少,疗效往往难以令人满意。目前,中西医结合治疗是本病的主要治疗手段之一。

逍遥散,中医方剂名。出自《太平惠民和剂局方》卷九。逍遥散为和解剂,具有疏肝解郁,养血健脾之功效,主治肝郁血虚脾弱证。目前,医疗工作者做了一定的关于逍遥散治疗原发性肝癌及其并发症的临床研究,如Xiong等<sup>[3]</sup>选取了72例原发性肝癌患者,将其分成三组分别使用西药化疗加苦参注射液、西药单纯化疗、西药化疗加逍遥散加减进行治疗,结果用西药化疗加逍遥散治疗组相较于其他对照组取得了较好疗效,根据病人的各方面数据也显示逍遥散具有改善原发性肝癌患者的肝功能、生活质量、外周血白细胞等作用。但是由于逍遥散成分复杂多样,其治疗原发性肝癌的作用机制目前尚未有明确研究报道。

网络药理学是近年来新兴的一门学科,融合了系统生物学、多向药理学、计算生物学、网络分析等多学科的技术和内容,将生物学网络与药物作用网络整合,探究疾病及药物的相互作用机理,与复杂疾病的治疗理念相吻合<sup>[4]</sup>,已被广泛用于中药潜在活性成分和作用靶点的预测及中药作用机制的阐述。本研究基于网络药理学手段,结合文献调研、数据挖掘、统计推断、生物信息学等方法,构建逍遥散与原发性肝癌相互作用的药物与生物分子复杂关系网络,发掘药物作用靶点及药物与内源性蛋白及生物通路的作用关系,从而合理预测和科学推断有效物质成分的作用靶点及其调控的生物学过程和机

制,力求更全面深入揭示逍遥散的药效物质基础和治理原发性肝癌的疗效机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 相关数据库

使用GEO数据库提取并分析得出HCC的差异基因;TCMSP数据库用于获取逍遥散中的有效成分及作用靶点;对应逍遥散与HCC的交集基因,综合BioGRID、BIND、MINT、HPRD、DIP、GRID数据库分析得出PPI蛋白互作网络;利用David数据库中的数据进行GO和KEGG富集分析;PDB数据库用于下载关键蛋白的3D结构。

### 1.2 基因芯片筛选

以“liver cancer normal”作为检索词,从GEO数据库筛选出同时含有肝癌组织和正常组织的人源基因芯片,并下载基因芯片的matrix文件,文件编号:GSE118916,以获取样本信息。

### 1.3 差异基因(DEGS)的筛选与处理

使用GEO2R在线分析工具,从基因芯片中筛选肝癌组织与正常组织的差异基因。并以adj. P. Val < 0.05, 2|log<sub>2</sub>(FC)| > 1为条件,从中筛选出肝癌组织中较正常组织显著上调、下调的差异基因,借助MEV4.9.0(Multi Experiment Viewer)绘制基因聚类热图及火山图。

### 1.4 逍遥散的活性成分及靶点挖掘

中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)是一个独特的中草药系统药理学平台,它能捕捉药物、靶标和疾病之间的关系,能够从整体层面研究药物靶标网络和疾病网络,揭示中药性质与作用机制<sup>[5-7]</sup>。从TCMSP在线平台(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)获取逍遥散(柴胡、当归、白芍、白术、茯苓、甘草)中各味中药的化学成分,根据口服生物利用度(OB)和类药性(DL)筛选出符合条件的候选活性成分及其对应靶点,将OB ≥ 30%, DL ≥ 0.18设为筛选条件<sup>[8]</sup>。借助美国国家生物技术信息中心数据库(NCBI)和Uniprot数据库,将物种限定为“人”,将靶点转换成对应的基因。

### 1.5 “中药化学成分-作用靶点”网络的构建和分析

将中药的预测靶点与HCC相关靶点取交集,所得交集靶点即为逍遥散作用于HCC的预测靶点。构建中药化学成分-作用靶点网络,通过Cytoscape3.7.2

软件中的“Network Analyzer”功能对中药化学成分-作用靶点网络进行分析,节点(node)代表逍遥散中所含药物化学成分与潜在作用靶点;边(edge)展现了中药活性成分和其作用靶点之间的联系,根据活性成分与靶点连接情况筛选出逍遥散作用于 HCC 的关键成分。

### 1.6 蛋白互作网络构建和关键靶点筛选

蛋白质相互作用网络绘制主要借助 Cytoscape3.7.2 软件中的 BisoGenet 插件,其中 BisoGenet 由 6 种蛋白质相互作用关系数据库构成的,包括 Biological General Repository for Interaction Datasets (BioGRID)、Biomolecular Interaction Network Database (BIND)、Molecular Interaction Database (MINT)、Human Protein Reference Database (HPRD)、Database of Interacting Proteins (DIP) 和 Biological General Repository for Interaction Datasets (GRID)。本研究将上述逍遥散的作用靶点和 HCC 相关的疾病靶点分别映射到蛋白质相互作用关系网络中,借助 BisoGenet 插件对 2 个蛋白质相互作用关系网络进行绘制,同时利用 cytoscape3.7.2 合并 2 个蛋白质相互作用关系网络,并对交集网络进行抽取,抽取获得的交集网络即为逍遥散治疗 HCC 的直接和间接靶点调控网络。

结合相关文献,并借助自由度、紧密度、特征向量中心性、中心中介性、网络中心性和局部边连通性等指标,采用网络拓扑分析插件 CytoNCA 进行进一步的蛋白互作网络拓扑结构分析,筛选出边数大于 250 的网络节点,即“Big hubs”;然后筛选网络中介数中心度大于 61 的节点,即为蛋白互作网络中的关键基因<sup>[9]</sup>。上述获得的相关成分及靶点则有可能是直接、间接调控这些节点,发挥治疗 HCC 的作用。

### 1.7 GO 基因功能富集分析

通过 R 语言中的“DOSE”、“clusterProfiler”、“enrichplot”R 包对交集基因进行 GO 功能富集分析,进一步阐释中药活性成分的靶点蛋白在基因功能中的作用。

### 1.8 KEGG 通路富集分析

通过 R 语言中的“clusterProfiler”、“org. Hs. eg.db”、“enrichplot”、“ggplot2”R 包对交集基因进行 KEGG 功能富集分析,进一步阐释中药活性成分的靶点蛋白在通路功能中的作用。

### 1.9 逍遥散核心成分与关键靶基因的分子对接验证

先用 ChemOffice 软件构建活性成分的 3D 结构

保存为 mol2 格式并使其能量最小化。从 PDB 数据 (<https://www.rcsb.org/>) 下载关键蛋白的 3D 结构 PDB 格式,运用 PyMOL 软件对蛋白质进行去水、加氢等操作,利用 AutoDock 软件将活性成分及靶蛋白格式转换为 pdbqt 格式,最后运行 Vina 进行对接。结合能小于 0 说明配体与受体可以自发结合,目前对于活性分子的靶点筛选尚无统一标准,这里通过对“药物—HCC”交集靶点与蛋白互作网络进行分析,筛选出两者共有且度值最高的两个蛋白分别与药物中与之作用的同样度值最高的两个分子进行分子对接验证。

## 2 结果

### 2.1 HCC 相关差异基因表达分析

通过对 GEO 芯片数据库的基因芯片进行挖掘分析,获取 HCC 患者肝组织与正常人肝组织的基因表达谱中明显影响和改变的基因共 580 个,其中上调基因 280 个,下调基因 413 个。差异基因热图见图 1,火山图见图 2。

### 2.2 化合物有效活性成分筛选

以  $OB \geq 30\%$ ,  $DL \geq 0.18$  为条件,对 TCMS 数据库进行检索,得到逍遥散中活性成分 2 241 个,其中来自柴胡的活性成分 347 个,来自当归的活性成分 65 个,来自白芍的活性成分 118 个,来自白术的活性成分 22 个,来自茯苓的活性成分 29 个,来自甘草的活性成分 1 660 个。

### 2.3 逍遥散有效活性成分—HCC 网络构建及分析结果

将 2 241 个靶点与 580 个 HCC 差异基因取交集,得到 27 个交集基因,对应逍遥散中 99 个候选活性成分,其中对应甘草化合物 77 个,柴胡活性成分 7 个,茯苓活性成分 4 个,白术活性成分 3 个,白芍活性成分 2 个,混合活性成分 6 个。逍遥散有效活性成分见表 1。借助软件 Cytoscape3.7.2 构建中药活性成分—靶点基因相互作用网络,网络中有 127 个节点(逍遥散活性成分节点 100 个,靶基因节点 27 个)和 183 条边,见图 3。图中度值最高的活性成分为槲皮素(querceetin),其次为山柰酚(kaempferol)、 $\beta$ -谷甾醇(beta-sitosterol)、豆甾醇(stigmasterol)、甘草查尔酮 A(licochalcone A)等。这些度值较高的活性成分可能是逍遥散治疗 HCC 的关键活性成分。

### 2.4 逍遥散治疗 HCC 的蛋白相互作用网络构建与关键靶点筛选

#### 2.4.1 PPI 蛋白互作网络构建

通过蛋白相互作用网络的构建,本研究发



图1 HCC 差异基因热图

Fig. 1 The thermogram of HCC differential gene

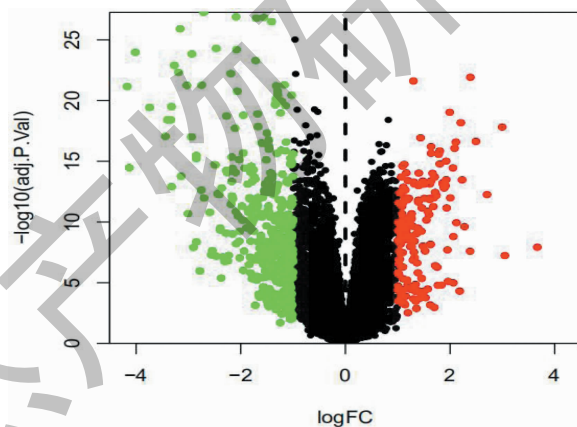


图2 HCC 差异基因火山图

Fig. 2 Volcano map of HCC differential genes

逍遥散可以与 1 375 个靶点产生直接或间接作用,而这些靶点与靶点之间的相互联系多达 24 942 种。本研究利用蛋白质相互作用网络,进一步深入分析逍遥散影响 HCC 发生、发展中的靶点,绘制蛋白质相互作用靶点网络,为网络分析和机制的探讨提供了可能。

#### 2.4.2 PPI 蛋白互作网络关键靶点筛选

本研究使用 Bisogenet 插件,以  $DC \geq 61$ ,  $BC \geq 250$  为条件,对逍遥散调控 HCC 的蛋白相互作用网

络节点进行拓扑结构分析及关键靶点筛选,旨在寻找网络中关键节点,并在网络中获得更多节点的传递信息和更高的节点信息传递效率,充分发挥其在网络中重要的作用。通过网络拓扑分析,本研究共发现关键节点 50 个,见表 2,筛选策略示意图见图 4。

#### 2.5 GO 功能分析结果

27 个逍遥散—HCC 交集基因影响了 271 个生物学过程,选取 P 值排名 20 的功能信息,图 5~7。

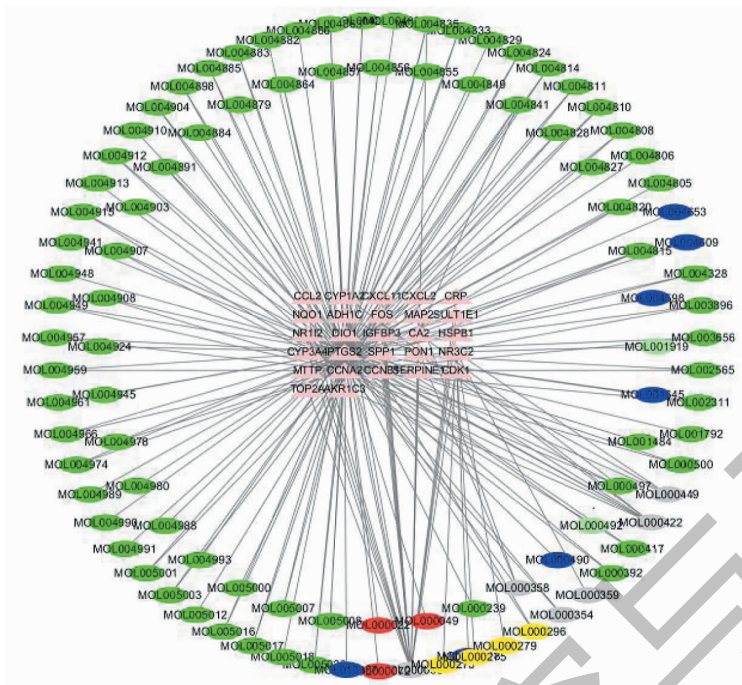


图3 逍遥散有效活性成分—靶点网络

Fig. 3 Xiaoyaosan compound-target network

注:绿色椭圆:甘草活性成分;绿色椭圆:白芍活性成分;蓝色椭圆:柴胡活性成分;红色椭圆:白术活性成分;灰色椭圆:逍遥散复合物活性成分;黄色椭圆:茯苓活性成分;粉色三角:靶基因。Note: Green ellipse: Gancao compound; Light green ellipse: Baishao compound; Blue ellipse: Chaihu compound; Red ellipse: Baizhu compound; Gray ellipse: Xiaoyaosan complex compound; Yellow ellipse: Fuling compound; Pink Triangle: Target gene.

表1 逍遥散干预 HCC 的有效分子成分

Table 1 The effective molecular components of Xiaoyaosan in the intervention of HCC

Mol	Drug	Mol	Drug
MOL005016	Gancao	MOL004835	Gancao
MOL004913	Gancao	MOL005020	Gancao
MOL004653	Chaihu	MOL004898	Gancao
MOL013187	Chaihu	MOL004814	Gancao
MOL000296	Fuling	MOL000449	multiDrug
MOL004915	Gancao	MOL000275	Fuling
MOL004949	Gancao	MOL004810	Gancao
MOL004838	Gancao	MOL004959	Gancao
MOL004912	Gancao	MOL004990	Gancao
MOL000098	multiDrug	MOL005003	Gancao
MOL004829	Gancao	MOL000279	Fuling
MOL000359	multiDrug	MOL004948	Gancao
MOL004941	Gancao	MOL004966	Gancao
MOL005012	Gancao	MOL000492	Baishao
MOL002311	Gancao	MOL000049	Baizhu
MOL004808	Gancao	MOL004827	Gancao
MOL004904	Gancao	MOL004855	Gancao

续表 1 (Continued Tab. 1)

Mol	Drug	Mol	Drug
MOL003896	Gancao	MOL001484	Gancao
MOL003656	Gancao	MOL004879	Gancao
MOL001792	Gancao	MOL004820	Gancao
MOL000072	Baizhu	MOL000239	Gancao
MOL004974	Gancao	MOL004598	Chaihu
MOL004957	Gancao	MOL004828	Gancao
MOL004991	Gancao	MOL004903	Gancao
MOL000417	Gancao	MOL004856	Gancao
MOL004811	Gancao	MOL000358	multiDrug
MOL004609	Chaihu	MOL000022	Baizhu
MOL004805	Gancao	MOL004924	Gancao
MOL004885	Gancao	MOL001919	Baishao
MOL004328	Gancao	MOL004884	Gancao
MOL004882	Gancao	MOL004864	Gancao
MOL005018	Gancao	MOL004908	Gancao
MOL000392	Gancao	MOL004988	Gancao
MOL000500	Gancao	MOL004841	Gancao
MOL004989	Gancao	MOL004980	Gancao
MOL004824	Gancao	MOL004891	Gancao
MOL004863	Gancao	MOL005007	Gancao
MOL000422	multiDrug	MOL000497	Gancao
MOL000354	multiDrug	MOL001645	Chaihu
MOL005001	Gancao	MOL004857	Gancao
MOL004883	Gancao	MOL004978	Gancao
MOL004866	Gancao	MOL004945	Gancao
MOL000273	Fuling	MOL004907	Gancao
MOL004806	Gancao	MOL005000	Gancao
MOL004848	Gancao	MOL000490	Chaihu
MOL004833	Gancao	MOL004993	Gancao
MOL004961	Gancao	MOL004718	Chaihu
MOL004910	Gancao	MOL005008	Gancao
MOL005017	Gancao	MOL004849	Gancao
MOL002565	Gancao	MOL004815	Gancao

表 2 PPI 蛋白互作网络关键靶点

Table 2 Key targets of PPI protein interaction network

Symbol	Uniprot ID	Protein names	Degree	Betweenness
TP53	PO4637	Cellular tumor antigen p53	299	1116.11
HSP90AB1	PO8238	Heat shock protein HSP 90-beta	176	356.71
HSP90AA1	PO7900	Heat shock protein HSP 90-alpha	225	521.22

续表 2(Continued Tab. 2)

Symbol	Uniprot ID	Protein names	Degree	Betweenness
VCP	P55072	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	189	421.96
TOP2A	P11388	DNA topoisomerase 2-alpha, EC 5.6.2.2	105	250.3
ITGA4	P13612	Integrin alpha-4	198	374.01
VCAM1	P12320	Vascular cell adhesion protein 1	147	294.17
ESR1	P03372	Estrogen receptor	238	548.52
HSPA8	P11142	Heat shock protein 70kDa	139	338.56
MDM2	Q00987	E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	139	271.78
HSPB1	P04792	Heat shock protein beta-1	415	388.4
HSPA5	P11021	Heat shock protein family A (Hsp70) member 5	150	441.95
FN1	P11276	Fibronectin	231	366.17
HSPA4	P34932	Heat shock 70 kDa protein 4	129	287.46
TUBB	P07437	Tubulin beta-1 chain	108	312.95
MCM2	P49736	DNA helicase, EC 3.6.4.12	249	643.38
NTRK1	P04629	High affinity nerve growth factor receptor	399	1035.64
APP	P12023	Amyloid-beta A4 protein (ABPP, APP)	270	449.21
HDAC2	Q92769	Histone deacetylase 2, HD2, EC 3.5.1.98	119	254.33
HNRNPU	Q00839	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	144	296.76
EEF1A1	P68104	Elongation factor 1-alpha 1, EF-1-alpha-1	134	366.58
EP300	Q09472	E1A binding protein p300	207	561.36
HDAC1	Q09106	Histone deacetylase 1	179	386.88
PARP1	P09874	Poly [ADP-ribose] polymerase, EC 2.4.2.30	131	369.66
NPM1	P06748	Nucleophosmin	203	558.14
PARK2	B8YGJ6	E3 ubiquitin-protein ligase parkin	142	268.31
YWHAZ	P63104	14-3-3 protein zeta/delta	224	570.79
CUL7	Q14999	Cullin-7, CUL-7	204	470.84
UBE2I	P63279	SUMO-conjugating enzyme UBC9, EC 2.3.2.	156	267.71
CREBBP	Q92793	CREB-binding protein	161	298.2
YWHAE	P62258	14-3-3 protein epsilon, 14-3-3E	132	253.65
XPO1	041980	Exportin-1, Exp1	238	311.61
EGFR	P00533	Receptor protein-tyrosine kinase	177	268.56
UBC	P63279	SUMO-conjugating enzyme UBC9, EC 2.3.2.	223	519.04
HDAC5	Q9UQL6	Histone deacetylase 5, HD5, EC 3.5.1.98	151	339.8
COP5	Q92905	COP9 signalosome complex subunit 5	209	582.6
SNW1	Q13573	SNW domain-containing protein 1	152	256.82
HDAC6	Q9UBN7	Histone deacetylase 6	104	302.98
CDK2	P24941	Cyclin-dependent kinase 2	265	550.3
BRCA1	P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein	181	449.25
HUWE1	Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1	137	274.38
MYC	P01108	Myc proto-oncogene protein	161	364.68
PRKDC	F7CL40	FAT domain-containing protein	114	263.11

续表 2(Continued Tab. 2)

Symbol	Uniprot ID	Protein names	Degree	Betweenness
CUL2	Q13617	Cullin-2 ,CUL-2	134	249.05
CUL3	Q13618	Cullin-3 ,CUL-3	282	848.13
CTNNB1	P35222	Catenin beta-1	136	327.95
CAND1	Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	176	297.83
CUL1	Q13616	Cullin-1 ,CUL-1	214	533.84
CDC5L	Q99459	Cell division cycle 5-like protein	158	266.87
CDK1	P11440	Cyclin-dependent kinase 1	281	354.28

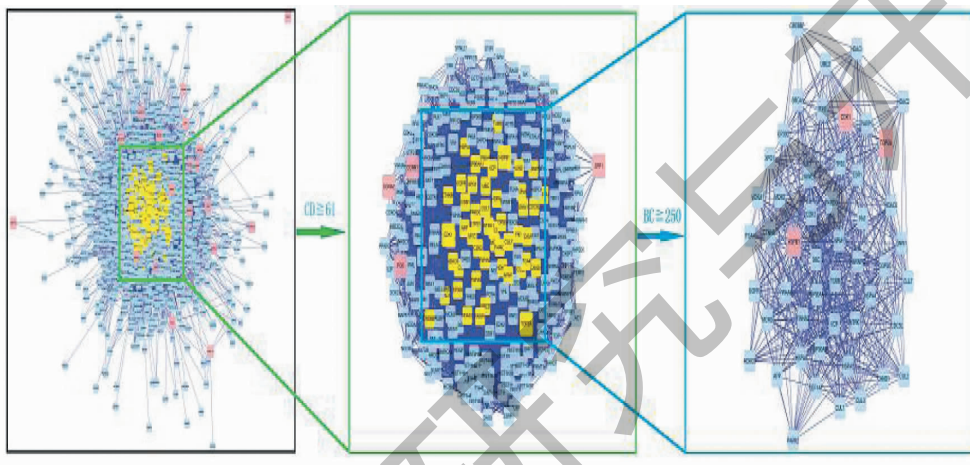


图 4 逍遥散干预 HCC 核心靶点筛选策略示意图

Fig. 4 Schematic diagram of Xiaoyaosan's selection strategy for interfering with HCC core targets

图表显示逍遥散活性成分主要富集在无机物质细胞反应、细胞激素代谢过程金属离子反应、类固醇分解过程、伯醇代谢过程等生物过程中,在分子功能方面,主要涉及趋化因子活动、氧化还原酶活性、趋化

因子受体结合等,细胞组成主要影响细胞周期蛋白复合物、蛋白激酶全酶复合物、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶复合物等。

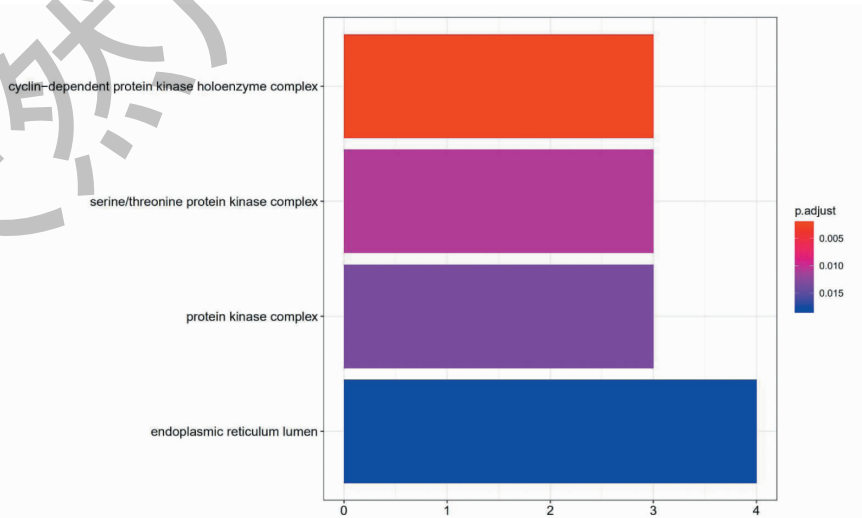


图 5 GO 富集功能分析柱状图(CC 富集结果)

Fig. 5 Histogram of GO enrichment function analysis(CC enrichment results)



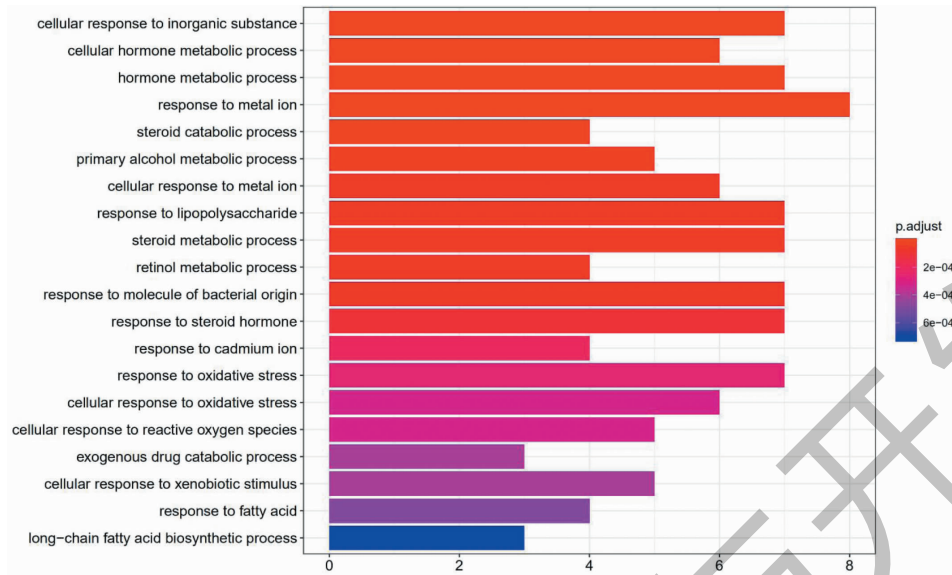


图6 GO 富集功能分析柱状图(BP 富集结果)

Fig. 6 Histogram of GO enrichment function analysis (BP enrichment results)

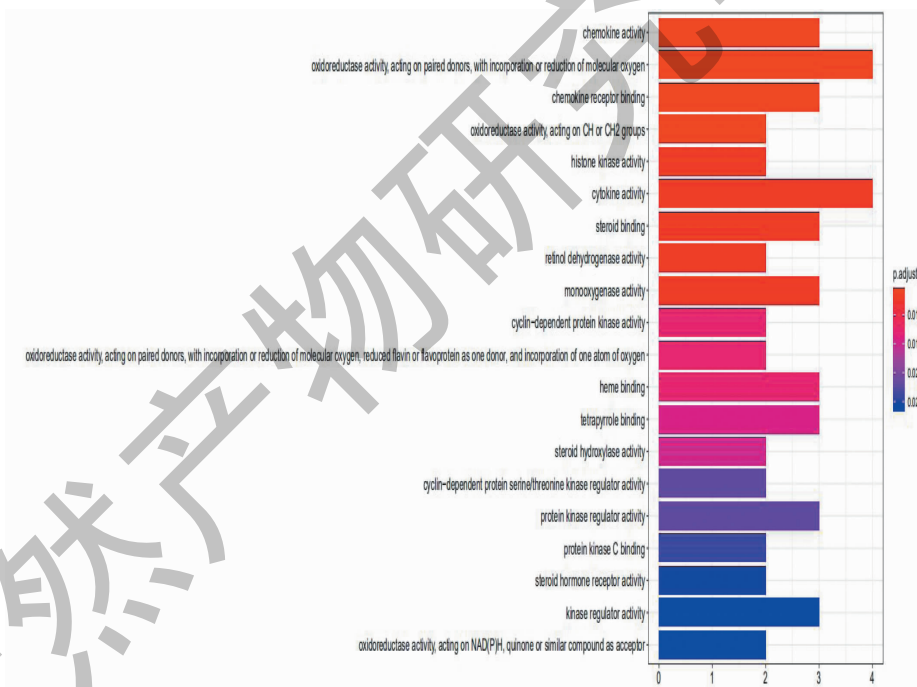


图7 GO 富集功能分析柱状图(MF 富集结果)

Fig. 7 Histogram of GO enrichment function analysis (MF enrichment results)

## 2.6 KEGG 富集通路分析结果

KEGG 通路富集分析发现,27 个交集靶点基因显著富集在 17 条通路上 ( $P < 0.05$ ,  $FDR < 0.01$ ), 见图 8, 其中最有意义的 10 条通路包括细胞衰老信号通路、甾类激素生物合成信号通路、p53 信号通路、化学性致癌信号通路、IL-17 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、视黄醇新陈代谢信号通路、药物代

谢-细胞色素 P450 信号通路、代谢细胞色素 P450 的外源性物质信号通路、类风湿性关节炎信号通路, 提示逍遥散通过作用以上多条通路来发挥治疗 HCC 的作用。

## 2.7 逍遥散核心成分作用于 CYP1A2、PTGS2 和 CDK1 的分子对接验证

对“逍遥散有效成分—靶点”调控网络分析可

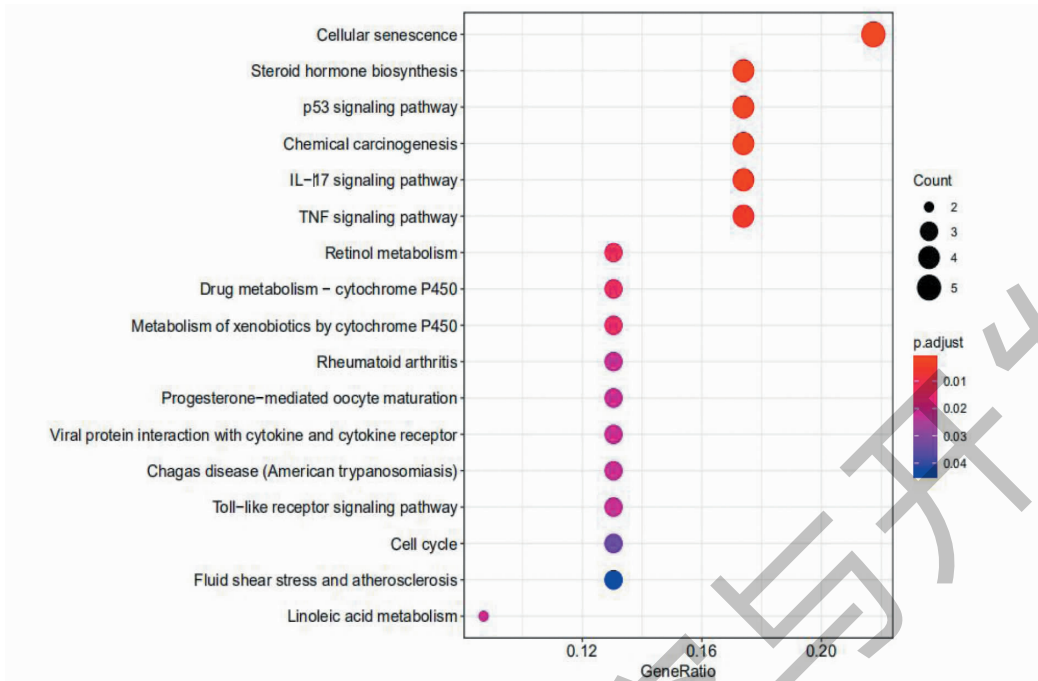


图 8 KEGG 富集通路气泡图

Fig. 8 Bubble diagram of KEGG enrichment pathway

注:圆点越大,富集基因数目越多;圆点颜色越红,P 值越小;逍遥散治疗 HCC 的关键靶点参与的通路信息。Note:The larger the dot, the greater the number of enriched genes. The redder the dot, the smaller the P value; Pathway information on the involvement of key targets of Xiaoyaosan in the treatment of HCC.

知,山奈酚、槲皮素与  $\beta$ -谷甾醇是逍遥散作用于 HCC 最为关键的核心成分, CYP1A2、PTGS2 和 CDK1 不仅作为疾病的靶点,也出现在最终所得的 PPI 蛋白互作网络之中且度值较高。一般认为配体与受体结合的构象稳定时能量越低,发生的作用可能性越大。分子对接结果显示槲皮素与 CYP1A2 和 PTGS2,  $\beta$ -谷甾醇与 PTGS2 和 CDK1, 山奈酚与 PTGS2 和 CYP1A2 的分子对接结合能均远远小于 0 kJ/mol, 由此表明二者之间具有较好的结

合活性,结果见表 3 和图 9 ~ 14。

### 3 讨论

网络药理学是通过分析大数据来进行药物研究的新模式。将网络药理学与传统的中医药有机结合,其整体性、系统性、动态性的特点与中医整体观念、辨证论治的理论相一致<sup>[10]</sup>。使用网络药理学方法研究中药复方的作用机制是当下药理学研究的一个热点<sup>[11]</sup>。逍遥散具有疏肝解郁,养血健脾,调和肝脾之功,是和解剂的代表方之一,临床中常用以治

表 3 逍遥散中部分核心活性成分与 CYP3A4、PTGS2 和 CDK1 的结合能

Table 3 Binding energy of some core compounds in Xiaoyaosan with CYP3A4, PTGS2 and CDK1

靶点名称 Target name	PDB ID Active ingredient	有效活性成分 Binding energy	结合能 Binding energy (kJ/mol)
PTGS2	5F19	槲皮素	-8.8
CYP1A2	2HI4	槲皮素	-9.7
PTGS2	5F19	$\beta$ -谷甾醇	-8.4
CDK1	4Y72	$\beta$ -谷甾醇	-9.8
PTGS2	5F19	山奈酚	-8.8
CYP1A2	2HI4	山奈酚	-10.0



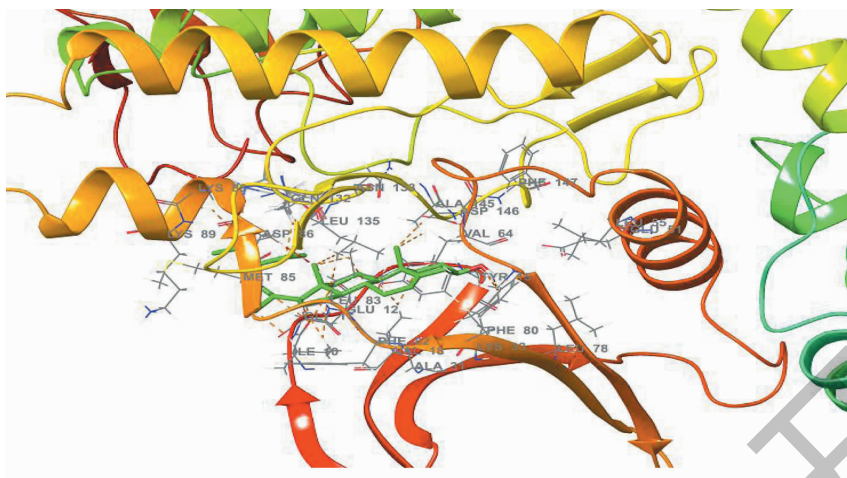
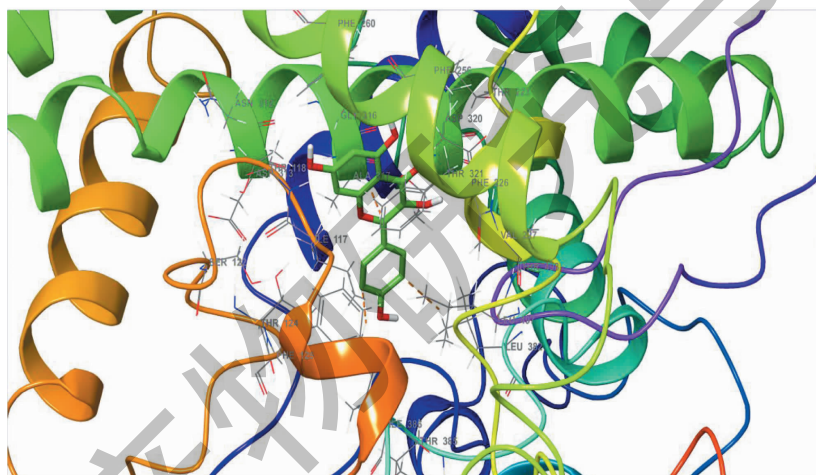
图 12  $\beta$ -谷甾醇-CDK1Fig. 12  $\beta$ -Sitosterol-CDK1

图 13 山奈酚-CYP1A2

Fig. 13 Kaempferol-CYP1A2

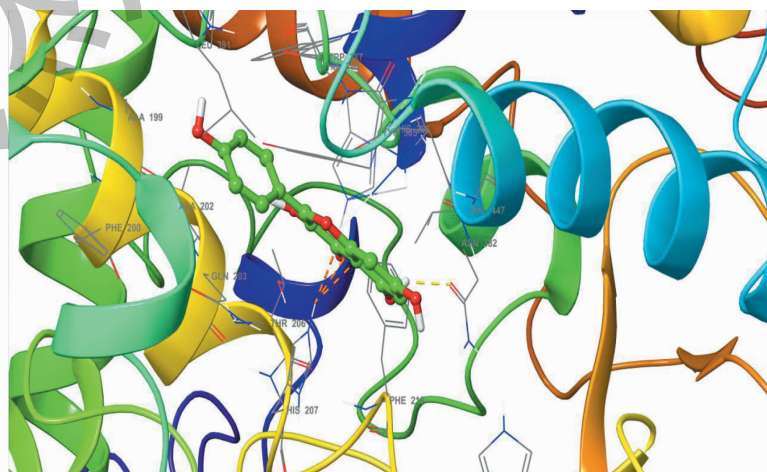


图 14 山奈酚-PTGS2

Fig. 14 Kaempferol-PTGS2

疗原发性肝癌。本研究借助网络药理学手段,初步挖掘、分析逍遥散在干预 HCC 中多成分、多靶点、多途径的治疗机制。

本研究分析了原发性肝癌与正常人相比其致癌的差异基因,得到明显影响和改变的基因共 580 个,其中上调基因 280 个,下调基因 413 个,并将此作为疾病干预的靶基因。接着系统分析了逍遥散 6 味中药(柴胡、白芍、甘草、白术、当归、茯苓)的有效成分,构建有效成分-靶点网络,分析化合物与靶点的相互作用关系。其中槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇、山柰酚等是有效成分-靶点网络中的关键。槲皮素是甘草中的有效成分, $\beta$ -谷甾醇是当归中的有效成分,山柰酚是甘草中的有效成分。已有研究表明,槲皮素具有良好的抑制细胞增殖,调控血管新生的作用,能够抑制体外培养的人脐静脉血管内皮细胞(EVC304)生长<sup>[12]</sup>;具有抗肿瘤,抑制 Eca109 细胞的迁移、侵袭及血管新生<sup>[13]</sup>,下调 VEGF<sup>[14]</sup>的作用;同时还可以降低毛细血管脆性、扩张冠状动脉、增加冠脉血流量等。 $\beta$ -谷甾醇主要是抑制血管新生,其通过调节 VEGF 的表达,对 H22 荷瘤小鼠具有一定的抑瘤作用<sup>[15]</sup>,还能够调节人肺癌 A549 细胞增殖及凋亡<sup>[16]</sup>。山柰酚是一种有抗炎、抗氧化作用的黄酮类化合物;具有明显的抗肿瘤作用,高摄入山柰酚可降低晚期大肠腺瘤的复发,体外实验表明山柰酚对小鼠黑色素瘤细胞 B16 具有增殖抑制作用<sup>[17]</sup>;还能通过抑制铜离子诱导低密度脂蛋白氧化,成为氧化低密度脂蛋白,能降低单核巨噬细胞表面 CD36 蛋白的表达,阻止该细胞对氧化低密度脂蛋白的摄取,有效预防动脉粥样硬化。除此之外,化合物中的多个成分具有抑制血管生长、减低细胞侵袭力、下调 VEGF 表达等抗肿瘤机制作用。

对逍遥散的靶点进行 PPI 映射并构建网络,对网络分析后发现了多个与多种复杂疾病紧密相关的关键靶点,如 TP53、HSP90AB1、HSP90AA1、VCP、TOP2A、ITGA4、VCAM1、ESR1、HSPA8、MDM2 等。研究将有效成分中的核心成分槲皮素、 $\beta$ -谷甾醇与关键靶基因进行了分子对接验证,证明了其具有良好的亲和力,进一步佐证了本次研究的科学性。为了说明作用靶点在基因功能和信号通路中的作用,本研究进行了 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。发现逍遥散能够调节细胞对无机物的反应、细胞激素代谢、细胞周期素依赖性蛋白激酶全酶复合物、趋化因子活性及受体结合、激素代谢等功能,大

多数基因富集到了与癌症有直接或间接关系的通路上,包括甾体激素生物合成通路、P53 信号通路、细胞衰老通路、化学致癌通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路、视黄醇代谢通路、药物代谢-细胞色素 p450 通路、孕酮介导的卵母细胞成熟通路等。已有研究表明 P53 信号通路能够调节细胞周期、活化凋亡信号转导,进而诱导细胞凋亡。其通路中的 p53 蛋白大量表达时,可以上调 Bcl-2 的表达水平、下调 Bax 的表达来共同完成细胞凋亡的调控<sup>[18]</sup>。Zhu 等<sup>[19]</sup>发现 TNF 信号通路激活时可提高了人肝癌细胞株 MHCC-97L 中的 VEGF 及 MMP9 的表达,使得癌细胞的侵袭能力得到增强。据此,可以推断逍遥散可能通过抑制该通路来达到延缓 HCC 发生发展的目的。IL-17 通路是一条与炎症反应相关的信号通路,近年来研究发现,IL-17 在抗肿瘤治疗中同样发挥着重要作用。当 IL-17 通路被激活时,荷瘤小鼠体内的 MHC I、MHC II 和 LFA-1 大量表达,同时促进了 IFN- $\gamma$ 、IL-12 的分泌、进而发挥 CTL 杀伤肿瘤细胞的作用<sup>[20]</sup>。

已有研究表明逍遥散能够抑制实体肿瘤的生长,并且对荷瘤造成的脾和胸腺指数具有一定的恢复作用<sup>[21]</sup>;通过引起细胞内钙离子变化,诱导肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡<sup>[22]</sup>;提高机体免疫功能和调节癌基因的表达<sup>[23]</sup>;抑制 MCF-7 的细胞生长,诱导细胞自噬性死亡等<sup>[24]</sup>。但对于其所影响的具体蛋白,具体信号通路的研究尚少,根据本次研究分析结果可以推断其影响与肝癌直接或间接相关的蛋白及通路对肝癌组织进行抑制,从而达到一定的治疗目的。

综上所述,本研究应用网络药理学方法,初步探究了逍遥散多成分、多靶点、多通路的复杂机制过程,对进一步理解药物-靶点相互作用机制提供了重要信息,为后续从逍遥散中提取有效药物成分治疗 HCC 提供了依据,也对未来论证中医药基础理论的科学性提供了参考。

#### 参考文献

- 1 Yang BH, Xia JL. Clinical diagnosis and staging criteria of primary liver cancer [J]. Chin J Hepatol (中华肝脏病杂志), 2001, 9:324-325.
- 2 Li XQ, Bao YC, et al. Clinical research of combined huachansu injection with chemotherapy on advanced non-small cell lung cancer [J]. J Mod Oncol (现代肿瘤医学), 2009, 17(1):60-61.
- 3 Xiong JL. Clinical observation on 24 cases of primary liver

- cancer treated by chemotherapy combined with Xiaoyaosan [J]. *Chin Med Herald*( 中医药导报 ),2011,17(2):18-20.
- 4 Liu ZH,Sun XB. Network pharmacology: new opportunity for the modernization of traditional Chinese medicine [J]. *Acta Pharm Sin*( 药学学报 ),2012,47:696-703.
  - 5 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(1):13.
  - 6 Yang YF, Yan L, Wang JH, et al. Systematic investigation of *Ginkgo biloba* leaves for treating cardio-cerebrovascular diseases in an animal model [J]. *ACS Chem Biol*,2017,12:1363-1372.
  - 7 Lu WD, Li L, Shen YJ, et al. Network pharmacology study of Xiaoxuming Decoction based on vasodilatory and vasoconstrictory related GPCR targets [J]. *China J Chin Mater Med* ( 中国中药杂志 ),2018,43:4698-4708.
  - 8 Ma Y, Wang WJ, Huang SJ, et al. Study on the mechanism of Danshen-Gegen in treating coronary heart disease based on network pharmacology [J]. *Nat Prod Res Dev*( 天然产物研究与开发 ),2019,37(2):1-21.
  - 9 Li G, Xu B, Liang XZ, et al. Study on the molecular mechanism of osteoporosis treated by Epimedium based on network pharmacology [J]. *Chin Pharmacol Bull* ( 中国药理学通报 ),2018,34:267-273.
  - 10 Li PL, Su WW. Recent progress in applying network pharmacology to research of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drug*( 中草药 ),2016,47:2938-2942.
  - 11 Cai TT, Pan HF, Wang Q, et al. Network pharmacology research of traditional Chinese medicine compound based on combined disease and syndromes [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* ( 中华中医药杂志 ),2016,31:4746-4748.
  - 12 Fu Y. Effect of quercetin on mitomycin inhibiting the growth of vascular endothelial cells [C]. Special Issue of the 10th National Academic Conference of Chinese Pharmacological Society( 中国药理学会第十次全国学术会议专刊 ),2009:220.
  - 13 Li CL, Liao YY, Cheng D, et al. Effects of quercetin on invasion and angiogenesis of human esophageal cancer Eca109 cells [J]. *Int J Dig Dis*( 国际消化病杂志 ),2017,37(2):104-108.
  - 14 Wei Y, Lu YL, Wang RR, et al. Effects of quercetin on proliferation of hypoxia induced hepatoma carcinoma cell HepG2 and expressions of HIF-1 $\alpha$ , VEGF [J]. *Med J Chin PAP*( 武警医学 ),2018,15(2):134-137.
  - 15 Lin MZ, Zhao Y, Cai EB, et al. Anti-tumor effect of  $\beta$ -sitosterol in H22 tumor-bearing mice [J]. *Chin J Public Health* ( 中国公共卫生 ),2017,331:1797-1800.
  - 16 Zhou L, Yu XC, Wang LQ, et al. Effects of  $\beta$ -sitosterol on proliferation and apoptosis of lung cancer cell line A549 [J]. *Int Lab Med*( 国际检验医学杂志 ),2016,37:865-867.
  - 17 Zhou Y, Tang Y, Du BY, et al. Inhibitory effect of kaempferol on proliferation of mouse melanoma cell B16 [J]. *Chin J Clin Ration Drug Use*( 临床合理用药杂志 ),2018,11(3):86-87.
  - 18 Gao S, Zhao XX, Lu ZM. Role of cell apoptosis regulated by P53 in treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Hepatol*( 临床肝胆病杂志 ),2017,33:1373-1376.
  - 19 Zhu Q, Lu GY, Gui FF, et al. Effects of TNF- $\alpha$  on activation of NF- $\kappa$ B signaling pathway in hepatocellular carcinoma in vitro and its clinical significance [J]. *Hebei Med J*( 河北医药 ),2018,40:3700-3703.
  - 20 Yang LJ, Zhao S, Zhang HP, et al. Antitumor effects of IL-17 *in vitro* and *in vivo* [J]. *Immunol J*( 免疫学杂志 ),2012,2:764-769.
  - 21 Song YT, Wang YJ, Zhou ZS, et al. Study on anti-tumor effect of Xiaoyaosan [J]. *J Changchun Univ Chin Med*( 长春中医药大学学报 ),2006(2):62-63.
  - 22 Wang K, yang M, Wang YY, et al Influence of Jiawei Xiaoyaosan on hepatoma cell apoptosis and calcium [J]. *Acta Univ Med Anhui*( 安徽医科大学学报 ),2019,54:272-276.
  - 23 Yao H, Zhang H, Yang Y. Experimental study on combination of Jiawei Xiaoyaosan and chemotherapeutic drugs against transplanted hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *J Pract Oncol*( 实用肿瘤学杂志 ),2006(6):532-533.
  - 24 LI R, Du N, Liu LP, et al. Effect of containing serum of Danzhi Xiaoyaosan on autophagy of human breast cancer cell line MCF-7 [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* ( 中国实验方剂学杂志 ),2016,22(3):86-88.