

“枳实-白芍”药对治疗肝癌的网络药理学研究及分子靶点探讨

刘璇¹, 田婷婷¹, 鲁杰¹, 李沛远¹, 杨旭¹, 彭羽¹,
冯飞雪¹, 张飞¹, 王镜辉², 唐东昕^{1,2}, 杨柱¹, 罗莉³, 龙奉玺^{1*}

¹贵州中医药大学, 贵阳, 550025; ² 贵州中医药大学第一附属医院, 贵阳 550001; ³ 贵阳贵航医院, 贵阳 550000

摘要:探讨枳实-白芍发挥治疗肝癌的作用机制。利用网络药理学,从中药系统药理学分析平台筛选枳实-白芍活性成分及相关靶点蛋白;通过基因疾病关联数据库 Genecard、OMIM 数据库检索肝癌靶点,利用网络药理学分析平台及相关数据库对关键作用的节点进行生物功能和代谢通路分析,构建中药-疾病靶标蛋白相互作用网络图;最后在 The Human Protein Atlas 中寻找关键蛋白在癌组织与正常组织中的表达情况以及进行生存分析。结果筛选得出,枳实-白芍共有 35 个活性成分和 65 个共有靶点,GO 分析结果涉及核受体功能、细胞外间隙、凋亡过程的负调控、染色质结合、RNA 聚合酶 II 启动子转录正调控和负调控等过程,KEGG 结果显示与乙型肝炎、PI3-AKT、TNF 等信号通路相关,PPI 网络筛选出 65 个核心基因,关联度排名前三位分别是 IL6、VEGFA、EGFR,三者的高低表达与肝癌患者五年生存率都有相关性。综上所述,枳实-白芍中的活性成分芍药苷、新橙皮苷、川橙皮素等通过癌症途径、PI3-AKT、TNF 等信号通路对 IL6、VEGFA、EGFR 等相关靶点发挥转录正调控、核功能受体、凋亡途径等作用,为进一步实验研究提供了理论基础。

关键词:网络药理学;枳实;白芍;肝癌;作用机制

中图分类号:R273

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)Suppl-0046-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.S.008

Study on the network pharmacology and molecular target of "Zhishi-Baishao" in the treatment of liver cancer

LIU Xuan¹, TIAN Ting-ting¹, LU Jie¹, LI Pei-yuan¹, YANG Xu¹, PENG Yu¹,
FENG Feixue¹, ZHANG Fei¹, WANG Jing-hui², TANG Dong-xin^{1,2}, YANG Zhu¹, LUO Li³, LONG Feng-xi^{1*}

¹Guizhou University of traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

²The First Affiliated Hospital of Guizhou University of traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;

³Guiyang Guihang Hospital, Guiyang 550000, China

Abstract: To explore the mechanism of Fructus Aurantii Immaturus and Radix Paeoniae Alba in the treatment of liver cancer. Using network pharmacology, the active components and related target proteins of Fructus Aurantii Immaturus and Radix Paeoniae Alba were screened from the pharmacology analysis platform of traditional Chinese medicine system; the target of liver cancer was retrieved from GeneCards and OMIM databases, and the biological functions and metabolic pathways of key nodes were analyzed by using the network pharmacology analysis platform and related databases to build the interaction between traditional Chinese medicine and disease target proteins. Finally, the expression of key proteins in the human protein atlas was found in cancer and normal tissues, and survival analysis was carried out. The results showed that there were 35 active components and 65 common targets in Fructus Aurantii Immaturus and Radix Paeoniae Alba. The results of go analysis involved nuclear receptor function, extracellular space, negative regulation of apoptosis process, chromatin binding, positive regulation and negative regulation of RNA polymerase II promoter transcription. KEGG results showed that it was related to hepatitis B, PI3-

收稿日期:2020-02-07 接受日期:2020-05-15

基金项目:国家自然科学基金地区科学基金(81660833);国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2019YFC1712500);贵州中医药大学大学生创新创业训练计划(贵中医大创学字[2018]15号);贵州省研究生工作站计划(教育厅)([2014]018);贵州省科技厅(黔科合人才[2016]4032号);贵州省组织部(黔人办发[2018]3号);贵州省教育厅(黔教研合 GZS 字[2016]08);贵阳市科技局贵州中医药大学第一附属医院大健康科技合作项目(筑科合同[2019]9-2)

* 通信作者 Tel:86-018085176993; E-mail:39854265@qq.com

AKT, TNF and other signal pathways. Sixty-five core genes were screened by PPI network, IL6, VEGFA and EGFR were the top three in the correlation degree, and their high and low expression was correlated with the five-year survival rate of patients with liver cancer. In conclusion, paeoniflorin, neohesperidin and chuanhesperidin, the active components in Fructus Aurantii Immaturus, play the role of positive transcription regulation, nuclear function receptor and apoptosis pathway on IL6, VEGFA, EGFR and other related targets through cancer pathway, PI3-AKT, TNF and other signal pathways, providing a theoretical basis for further empirical research.

Key words: network pharmacology; Fructus Aurantii Immaturus; Radix Paeoniae Alba; liver cancer; mechanism.

原发性肝癌是我国最常见的肿瘤之一,据中国最新癌症数据统计,肝癌发病率位居恶性肿瘤第4位,死亡率位居第3位^[1]。肝癌早期起病隐匿,发现时常已发展为中晚期,对人类健康造成了严重威胁。中医理论认为,由于气机的疏泄不畅,阴阳失调,脏腑失约派生郁热邪毒,痰湿内生,气血亏虚发为肝癌。治疗上标本兼顾,多以行气化痰为标,补虚养阴为本。

白芍其味苦、酸,微寒,归肝脾经,具有养血敛阴、平肝止痛的功效。枳实具有行气消积化痰的功效,是张仲景《伤寒论》中四逆散的基本药对。有研究发现四逆散可以抑制 HepG2 肝癌裸鼠移植瘤的生长速度,其作用机制可能是通过调节 P53 的表达促进细胞凋亡^[2]。枳实与芍药组成经方枳实芍药散,作用于前列腺素内环氧合酶 2、肿瘤坏死因子、乙酰胆碱受体、多巴胺受体、5-羟色胺受体、视黄酸受体 α 等靶点,参与抗炎、神经递质调节、抗肿瘤等生物过程和信号通路,对肿瘤疾病具有良好的抑制作用^[3]。枳实特征有效成分是柚皮苷、新橙皮苷等二氢黄酮化合物,它们具有抗炎、抗溃疡、抗菌、抗病毒、抗癌、抗氧化、抗微生物、解毒,并能抑制毛细血管脆性和护肝等作用^[4-6]。研究发现白芍的特征性成分芍药苷、芍药内酯苷对急性肝损伤有治疗作用,通过增加 SOD、GSH-Px 的活性抑制自由基的产生,提高抗氧化酶活性,明显改善肝功能^[7]。本研究利用网络药理学的方法,探索枳实与白芍主要物质基础、核心靶点、疾病之间的相互作用关系,为进一步阐明枳实与白芍治疗肝癌的药理机制提供新的方法与思路。

1 材料与方法

1.1 中药化学成分筛选

主要利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)搜索枳实和白芍的主要化学成分,根据口服生物利用度($OB \geq 30\%$)和类药性($DL \geq 0.18$)筛选具有生物学活性的化合物。

1.2 中药靶点筛选

以 TCMSP 为平台,将枳实、白芍药对中筛选出来的关键化合物进行检索,查出与之对应的蛋白靶点,利用蛋白质数据库(Uniprot)查询与靶点蛋白相对应的 ID 名称。

1.3 疾病靶点筛选

通过 GeneCards、OMIM 数据库检索与肝癌相关的靶基因,并与枳实-白芍药物靶点相互映射,得到枳实-白芍调控肝癌的靶基因,并绘制韦恩图。

1.4 “药物-成分-疾病靶点”网络构建与分析

本研究建了“成分-靶点”相互作用,将枳实、白芍靶点与肝癌靶点相互映射,筛选出共同的活性靶点,并运用 Cytoscape3.7.1 软件得到“枳实、白芍化合物-肝癌疾病靶点”网络图。在此网络中,化合物和靶点由节点(node)表示,2个节点之间的相互作用由互作线(edge)表示。

1.5 功能富集分析

为了分析枳实-白芍作用于肝癌的生物功能及信号通路传导过程,继而进一步阐明药物作用机制。将网络中的靶点置入 DAVID 数据库,进行 GO 富集和 KEGG 通路富集,并绘制 GO 富集柱状图与 KEGG 通路富集气泡图。

1.6 蛋白相互作用的构建

将获得的交集靶基因置入 STRING (<http://string-db.org>) 数据库,选择蛋白相互作用得分值 > 0.4 的数据,将得到的文本数据导入 Cytoscape3.7.1 中,构建中药-疾病靶标蛋白相互作用(PPI)网络图。

1.7 生存分析

为进一步验证枳实-白芍可以通过 IL6、VEGFA、ERGF 关键靶点发挥抗癌作用,分析三者肝癌组织中的表达情况,对 The Human Protein Atlas 数据库中对纳入的 365 例肝癌患者,提取生存时间、生存状态、FPKM 值进行生存分析。分别在 Tissue atlas 和 Pathology atlas 中提取正常组织与肝癌组织免疫组化检测中 IL6、VEGFA、ERGF 的表达情况,运用 Graphpad Prism 8 作生存曲线图。

2 结果

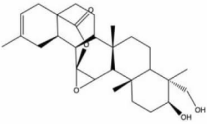
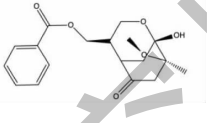
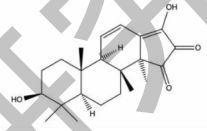
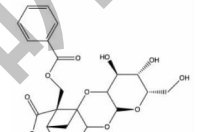
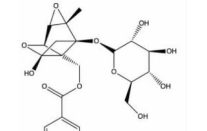
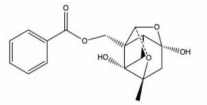
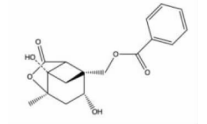
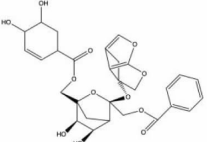
2.1 化学成分筛选结果

通过 TCMSP 数据库检索得到白芍成分 85 个, 枳实成分 65 个, 共 150 个化合物, 通过 OB 和 DL 筛选得到白芍的活性成分 13 个, 枳实的活性成分 22

个。具备人体对药物的吸收、分布、代谢及排泄全过程, 综合为 (ADME) 特性筛选出来药对中的 35 种活性成分具有较好的生物利用度^[8]。下表(表 1)为这些化合物的基本信息。

表 1 枳实-白芍药对含有的 35 个活性化合物的基本信息

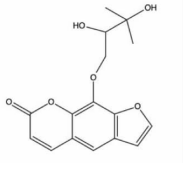
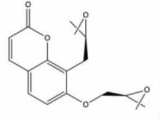
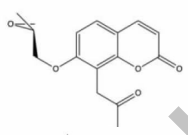
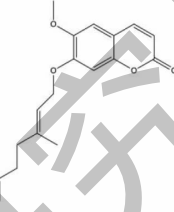
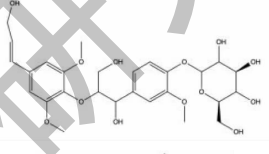
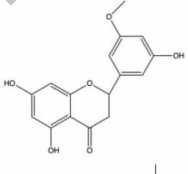
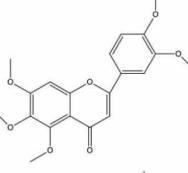
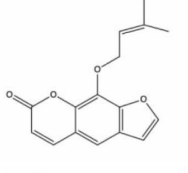
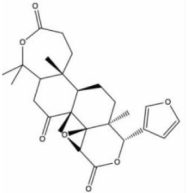
Table 1 Basic information of Fructus Aurantii Immaturus and Radix Paoniae Alba on 35 active compounds

代码 Code	化合物 Compound	结构式 Structural formula	生物利用度 OB (%)	类药性 DL	来源 Source
MOL001910	11 α , 12 α -Epoxy-3 β -23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28, 12 β -olide		64.77	0.38	白芍
MOL001918	Paeoniflorgenone		87.59	0.37	白芍
MOL001919	(3S, 5R, 8R, 9R, 10S, 14S)-3, 17-Dihydroxy-4, 4, 8, 10, 14-pentamethyl-2, 3, 5, 6, 7, 9-hexahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthrene-15, 16-dione		43.56	0.53	白芍
MOL001921	Lactiflorin		49.12	0.8	白芍
MOL001924	Paeoniflorin		53.87	0.79	白芍
MOL001925	Paeoniflorin _{qt}		68.18	0.4	白芍
MOL001928	Albiflorin _{qt}		66.64	0.33	白芍
MOL001930	Benzoyl paeoniflorin		31.27	0.75	白芍

续表 1 (Continued Tab. 1)

代码 Code	化合物 Compound	结构式 Structural formula	生物利用度 OB(%)	类药性 DL	来源 Source
MOL000211	Mairin		55.38	0.78	白芍
MOL000358	β -Sitosterol		36.91	0.75	白芍
MOL000359	Sitosterol		36.91	0.75	白芍
MOL000422	Kaempferol		41.88	0.24	白芍
MOL000492	(+)-Catechin		54.83	0.24	白芍
MOL013276	Poncirin		36.55	0.74	枳实
MOL013277	Isosinensetin		51.15	0.44	枳实
MOL013279	5,7,4'-Trimethylpigenin		39.83	0.3	枳实
MOL013428	Isosakuranetin-7-rutinoside		41.24	0.72	枳实
MOL013430	Prangenin		43.6	0.29	枳实

续表 1 (Continued Tab. 1)

代码 Code	化合物 Compound	结构式 Structural formula	生物利用度 OB(%)	类药性 DL	来源 Source
MOL013433	Prangenin hydrate		72.63	0.29	枳实
MOL013435	Poncimarin		63.62	0.35	枳实
MOL013436	Isoponcimarin		63.28	0.31	枳实
MOL013437	6-Methoxy aurapten		31.24	0.3	枳实
MOL013440	Citrusin B		40.8	0.71	枳实
MOL001798	Neohesperidin_qt		71.17	0.27	枳实
MOL001803	Sinensetin		50.56	0.45	枳实
MOL001941	Ammidin		34.55	0.22	枳实
MOL013352	Obacunone		43.29	0.77	枳实

续表 1 (Continued Tab. 1)

代码 Code	化合物 Compound	结构式 Structural formula	生物利用度 OB(%)	类药性 DL	来源 Source
MOL002914	Eriodyctiol (flavanone)		41.35	0.24	枳实
MOL004328	Naringenin		59.29	0.21	枳实
MOL005100	5,7-Dihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) chroman-4-one		47.74	0.27	枳实
MOL005828	Nobiletin		61.67	0.52	枳实
MOL005849	Didymin		38.55	0.24	枳实
MOL000006	Luteolin		36.16	0.25	枳实
MOL007879	Tetramethoxyluteolin		43.68	0.37	枳实
MOL009053	4-[(2S,3R)-5-[(E)-3-Hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol		50.76	0.39	枳实

2.2 化合物的疾病靶点数据库构建

以上 35 个化合物通过 TCMSP 获得的靶点,进一步在 Uniprot 数据库中查询出 76 个与人类相关的潜在靶点,再依据 GeneCards 数据库、OMIM 数据库挖掘得到肝癌相关基因 6 393 个,最后将白芍-枳实活性成分与肝癌相关基因映射,共得到 65 个共同基因,并将其确定为白芍-枳实抗肝癌的靶基因。其中属于白芍的 47 个,枳实的有 35 个,白芍-枳实两者间共同靶点 17 个。表明白芍与枳实两药均具多成

分、多靶点有抗癌的基因,且合用可增强抗癌的疗效,如图 1 所示。

2.3 枳实-白芍与肝癌靶点相互作用网络

运用 Cytoscape3. 7. 1 构建“枳实、白芍成分-肝癌疾病靶点”网络图并进行分析。依据 GeneCard、OMIM 数据库获得的 6 328 个肝癌基因,去除与肝癌靶点无关的化合物,最后得到 21 个与疾病密切相关的活性成分,将此作为枳实-白芍的主要抗癌活性成分,并与其潜在靶点共同构建其相互作用网络图。

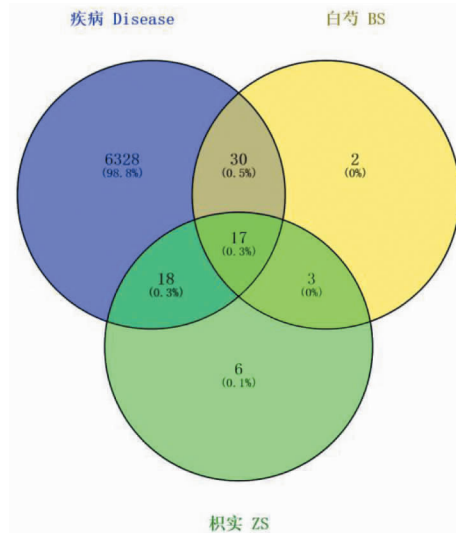


图1 中药-疾病靶标

Fig. 1 Traditional Chinese medicine-disease target

该网络包含 88 个节点(Nodes)和 245 条交互线(Edges),其中黄色三角形代表化合物,绿色圆形代表靶点蛋白,交互线代表相互关系(图 2)。通过此网络验证了枳实、白芍药对治疗肝癌是通过多成分、多靶

点、整合调节的方式发挥作用的。主要包括 IL6、Caspase 3、ESR1、MAPK8 等靶基因,这些靶基因在肝癌的发展中都呈高表达状态,可以通过不同的生物过程诱导细胞凋亡或者抑制细胞增殖^[9]。

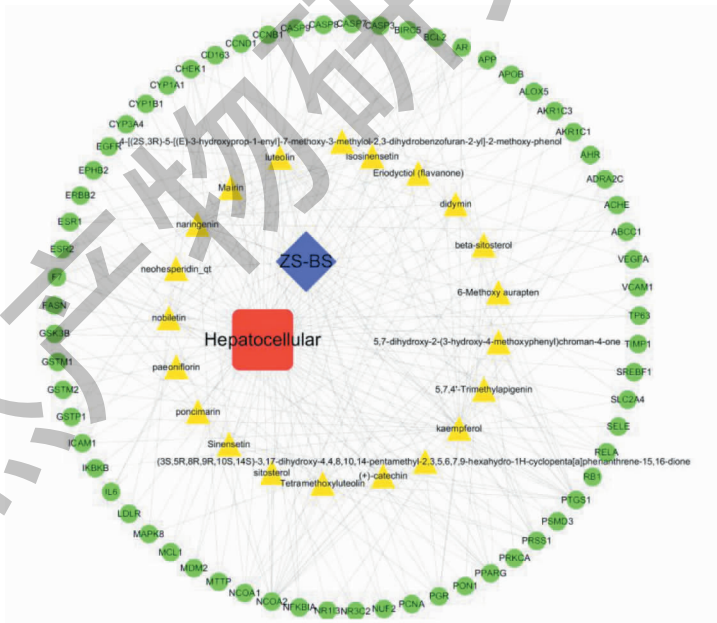


图2 中药-成分-疾病-靶标调控网络

Fig. 2 TCM component disease target regulatory network

2.4 GO 功能富集分析

利用 DAVID 平台进行 GO 功能富集分析,选择 Gene_Ontology 下的 GOTERM_BP_DIRECT、GOTERM_CC_DIRECT 和 GOTERM_MF_DIRECT,共富集得到 128 个结果。根据 $P < 0.01$ 共筛选出 32 个

GO 富集结果。其中主要包括核受体功能、细胞质功能、RNA 聚合酶 II 启动子转录正调控、细胞外间隙、凋亡过程的负调控、染色质结合等。具体如图 3 所示。

2.5 KEGG 信号通路分析

通过 DAVID 数据库将枳实-白芍 73 个靶基因在 KEGG 信号通路中富集,根据 $P < 0.01$, $FDR < 0.01$ 筛选出 13 条与肝癌密切相关的信号通路。包括:乙型肝炎、前列腺癌、癌症途径、PI3-AKT 信号通路、TNF 信号通路、甲状腺激素信号通路等。由此推测,枳实-白芍可能主要通过调节以上关键基因,影响此类信号通路发挥抗肝癌的作用,靶基因与通路的关系如下(见图 4)。

2.6 PPI 网络的构建与分析

将枳实-白芍药对可能与肝癌相关的 65 个基因导入 STRING 数据库中,构建枳实-白芍 PPI 网络(图 5),PPI 网络包含 65 个靶蛋白节点,510 条交互线。根据 Cobine score 排名前 30 的节点作出关键蛋白质节点条形图(图 6),其中度值较大的有 IL-6 (degree = 43)、VEGFA (degree = 38)、EGFR (degree = 37) 等,它们与其他蛋白相互作用强,在该网络中发挥了关键作用。如下图(图 6)所示。

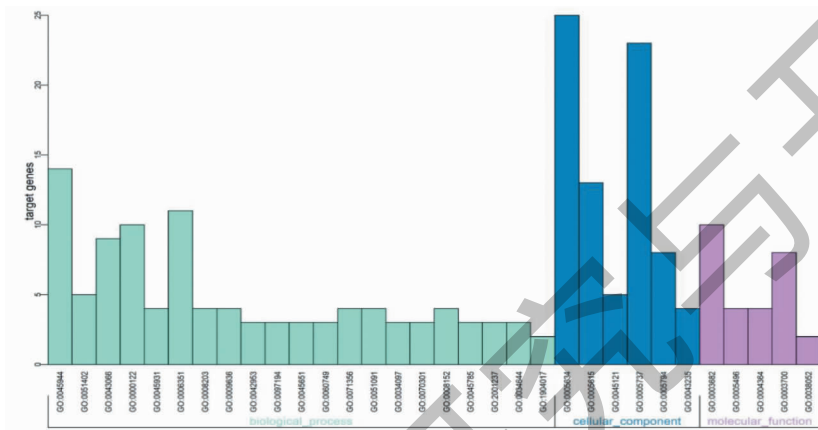


图 3 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis

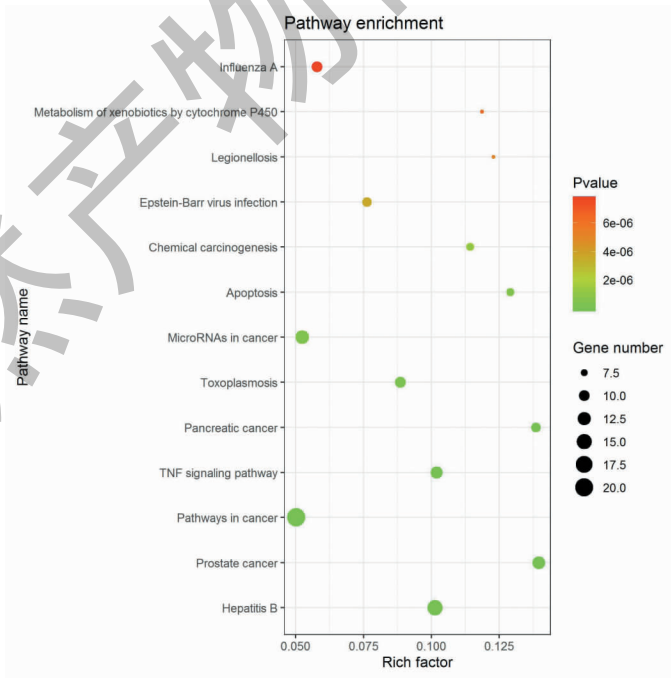


图 4 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 4 Bubble chart of enrichment analysis of KEGG pathway

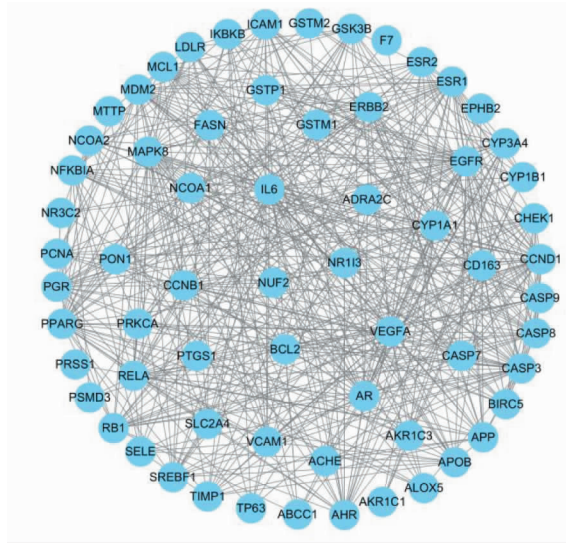


图 5 中药-疾病靶标蛋白相互作用网络

Fig. 5 Interaction network of traditional Chinese medicine and disease target protein

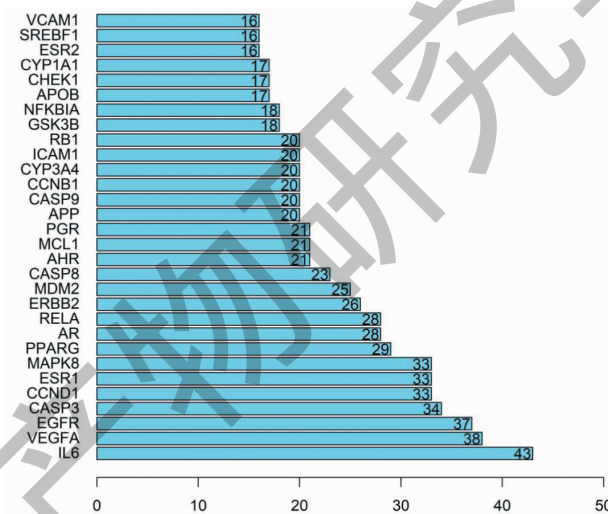


图 6 PPI 网络的关键蛋白节点条图

Fig. 6 Key protein node bar graph of PPI network

2.7 生存分析

2.7.1 IL6、VEGFA、EGFR 在正常肝组织及肝癌组织中的表达

在 The Cancer Genome Atlas 数据库内分别搜索 IL6、VEGFA、ERGF, 得到三者分别在正常肝组织与肝癌组织中的表达情况: 左为正常组织; 右为肝癌组织。研究各纳入 365 例患者, 免疫组化结果显示 IL6 主要在细胞核中表达, 在正常肝组织中表达较低, 在肝癌部分组织中显著升高, 呈弱阳性表达, 见图 7 (图片来源: The Human Protein Atlas)。VEGFA 在肝癌组织中呈阳性表达, 肝癌组织内的 VEGFA 表

达明显高于正常组织细胞, 见图 8 (图片来源: The Human Protein Atlas)。EGFR 在肝癌组织呈强阳性表达, 在正常组织中呈低表达, 见图 8 (图片来源: The Human Protein Atlas)。

2.7.2 IL6、VEGFA、EGFR 高低表达情况下肝癌患者的生存曲线

IL6 高表达肝癌患者五年存活率为 42%, IL6 低表达五年存活率为 51%, 提示 IL6 低表达生存率时间长, 预后更佳。两组整体生存曲线分布比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (见图 10)。

VEGFA 高表达肝癌患者五年存活率为 37%,

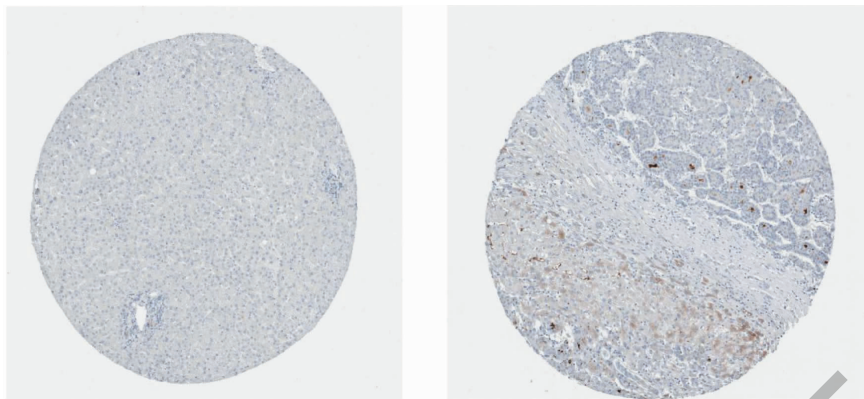


图 7 IL6 在正常肝组织及肝癌组织中的蛋白表达情况

Fig. 7 Protein expression of IL6 in normal liver tissue and liver cancer tissue

注:左(正常肝组织);右(肝癌组织),下同。Note:Left (normal);Right (tumor), the same below.

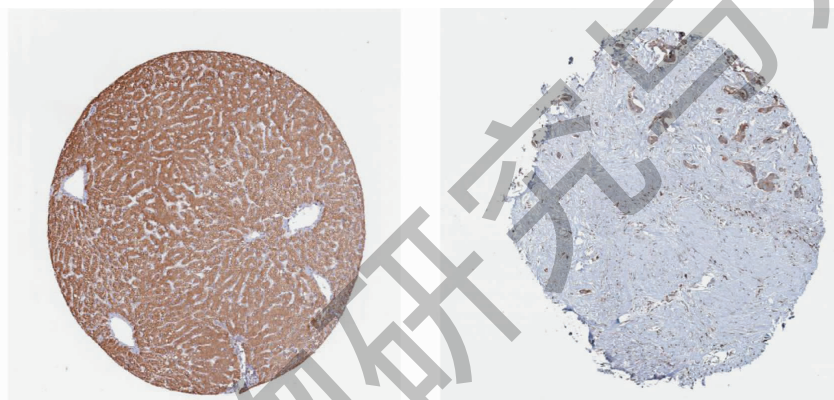


图 8 VEGFA 在正常肝组织及肝癌组织中的蛋白表达情况

Fig. 8 Expression of VEGFA in normal liver tissue and liver cancer tissue

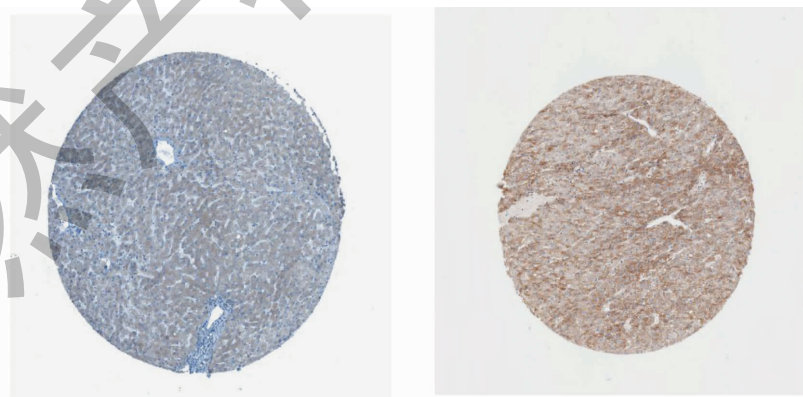


图 9 EGFR 在正常肝组织及肝癌组织中的蛋白表达情况

Fig. 9 Expression of EGFR in normal liver tissue and liver cancer tissue

VEGFA 低表达患者五年生存率为 54%。与 VEGFA 高表达相比,VEGFA 低表达的肝癌患者生存率时间长,预后更佳($P < 0.05$),见图 11。

EGFR 高表达肝癌患者五年存活率为 49% ,

EGFR 低表达概念患者五年存活率为 47% , $P > 0.05$,统计学无明显差异,见图 12。

3 讨论

本研究通过网络药理学方法初步筛选了枳实-

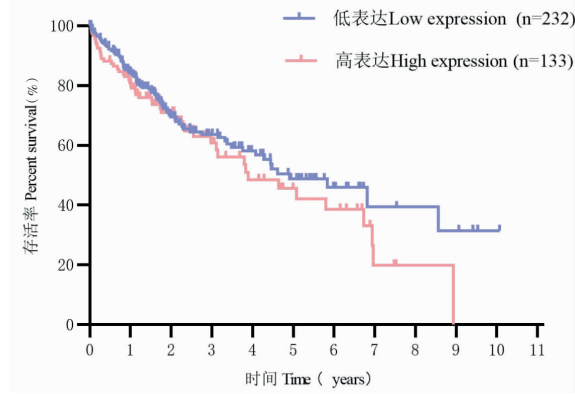


图 10 IL6 的生存曲线

Fig. 10 Survival of IL6

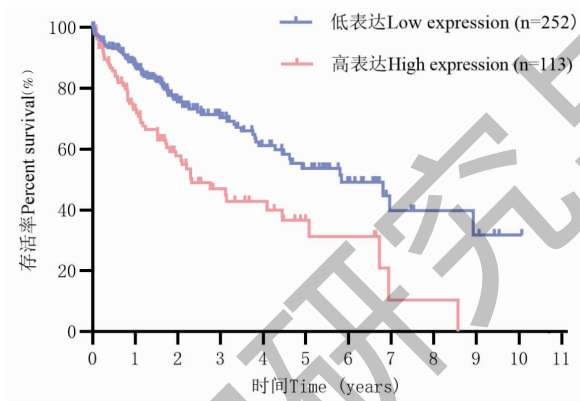


图 11 VEGFA 的生存曲线

Fig. 11 Survival of VEGFA

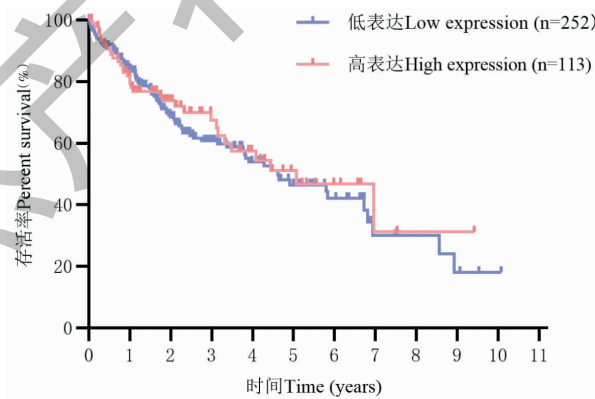


图 12 EGFR 的生存曲线

Fig. 12 Survival of EGFR

白芍药对治疗肝癌的活性成分,通过 TCMSP 数据库获得其成分靶点,通过 Genecard、OMIM 数据库获得疾病靶点,建立成分-靶点-疾病网络图,分析药物与疾病的生物过程、信号通路、蛋白互作以及生存分析,以可视化的形式将药物与疾病之间的关系系统

地呈现出来,通过枳实-白芍药对的生物靶点推测其效应机制,阐释其抗肿瘤作用机制,以探讨中医药在肿瘤疾病中的治疗规律。

在本次研究中,新橙皮苷、芍药苷、枸橼苦素等成分具有较高的活性。有研究表明芍药苷可以通过

调节 NF- κ B 信号通路、前列腺素 E2 受体信号通路、不依赖 P53 途径诱导细胞凋亡^[10-12]。芍药苷能够降低 MMP-9 和 ERK 的表达,增强 E-钙黏蛋白的表达来抑制肝癌细胞的增殖、侵袭转移和浸润^[13]。枳实的活性成分新橙皮苷具有抗肿瘤活性^[14],可以通过线粒体途径、死亡受体途径诱导细胞凋亡^[15],通过 TLR4 介导的炎症途径对肝脏具有保护作用^[16]。川陈皮素在体内外均有明显抗肿瘤活性,其作用机制可能与抑制体外微管蛋白聚合、诱导肿瘤细胞凋亡有关^[17]。有研究表明川陈皮素是通过活化凋亡蛋白酶 Caspase 3 可以诱导肝癌细胞凋亡发挥抗癌作用^[18]。通过联系潜在活性靶点的 GO 富集分析发现枳实-白芍与核受体功能、细胞质功能、RNA 聚合酶 II 启动子转录正调控、细胞外间隙、凋亡过程的负调控、染色质结合等过程关系密切;KEGG 富集结果显示乙型肝炎途径、前列腺癌途径、癌症途径、TNF 信号通路、PI3K-AKT 信号通路等是参与治疗的重要通路。中药可以作用于核受体调控蛋白和代谢酶表达、抗炎抗氧化等生物过程能够抑制肝癌的侵袭与迁移,发挥保肝作用。芍药苷对肝损伤、病毒性肝炎及肝纤维化有保护和治疗作用^[19],主要通过抑制炎症因子、抗氧化应激调节、抗凋亡等作用降低 AST、ALT 保护肝组织,通过控制乙型肝炎途径从而对肝癌的发生发展起着一定的预防治疗作用^[20,21]。另外,芍药苷可调节 PI3K/Akt、TGF- β /Smads、IRS/Akt/GSK3 β 、ROCK/NF- κ B、IL-13/STAT6、mTOR、NF- κ B 及 TLR 等信号通路等多个炎症相关信号通,抑制炎症因子 IL-13、NF- κ B、IL-6、IL-1 β 等产生,对肝脏具有保护作用。Zhao 等^[22]发现芍药苷可以通过抑制 NADPH 氧化酶合成从而发挥抗氧化作用,介导 PI3-AKT 信号通路诱导 GSH 合成,能够有效地抑制肝癌的发展。新橙皮苷属于黄酮类化合物,是枳实的主要成分,具有抗癌活性,其可能机制与癌症途径相关,可以抑制肿瘤细胞增长和促进细胞凋亡^[23]。乙型肝炎通路与肝癌联系最为紧密,现代医学认为,乙型肝炎病毒是肝癌发生的高危因素,慢性乙肝患者及合并肝硬化的患者,HCC 的发病率更高^[24,25]。PI3K-AKT 信号通路是生长因子调控细胞增殖和生存的重要因子之一,此通路的分子突变有很强的的致癌作用,被证实是肝癌细胞得以存活的首要通路之一^[26]。TNF (肿瘤坏死因子)是炎症反应中最早出现的炎症介质,主要参与调控炎症发生和细胞凋亡,可以直接杀伤、抑制肿瘤

细胞的细胞因子,是一种并且对机体免疫功能的起到调节作用,促进 T 细胞及其他杀伤细胞对肿瘤细胞的杀伤^[27]。

通过分析 PPI 网络涉及的多个过程及对比 degree 值,发现 IL6、VEGFA、EGFR 三个是中心基因且与肝癌发展最密切,可能是枳实-白芍的关键基因。IL6 是一种促炎性因子,在炎症和肿瘤发生过程中发挥重要作用,它的高表达能够增强肿瘤的粘附性和侵袭能力从而促进肿瘤的发生和发展^[28],降低 IL6 的表达和分泌,能够有效地抑制肿瘤细胞生长,提高存活率^[29]。IL-6 可以通过调节 STAT3 信号通路参与肝癌细胞增殖、凋亡、转移、血管新生等多个过程,其作用机制主要是通过调节促凋亡基因的表达发挥抗癌效应的^[30]。VEGFA 是血管生长因子 VEGF 的亚型之一,对血管内皮细胞的影响最大,在肝癌组织中高表达,可以促进肿瘤组织建立丰富的毛细血管网,促进肿瘤细胞的增殖分化^[31]。枳实与白芍抗肝癌的潜在靶点 VEGF (血管内皮细胞生长因子)可以诱导肿瘤新生血管形成,具有促进肿瘤细胞迁移,抑制肿瘤细胞凋亡,在肝癌患者中呈高表达状态^[32]。白芍中成分之一没食子酸鞣质具有抗氧化作用,其抗肿瘤作用机制可能是抑制 VEGF 诱导的血管生成,有研究发现其可以抑制内皮细胞的增殖,并且通过抑制 VEGF 结合受体达到减少血管生成的作用^[33,34]。与肿瘤细胞的转移、浸润、预后差有关,该靶点下游的信号转导主要与 Ras/Raf/MEK/ERK-MAPK 和 PI3K/AKT/mTOR 通路关系密切^[35,36]。EGFR 是上皮生长因子(EGF)细胞增殖和细胞传导的受体,在肝癌细胞增殖和细胞侵袭过程中起着促进效应,且表达水平与肝癌细胞增殖和侵袭能力成正相关^[37],抑制 EGFR 信号通路可以抑制肝癌细胞增殖^[38]。由此推测枳实-白芍可能是通过多种组分与这些关键靶点直接或间接相互作用达到治疗肝癌的目的。

枳实-白芍药对治疗肝癌是一个多成分、多靶点、多通路相互作用的复杂网络关系,研究结果初步验证了枳实-白芍的基本药理学作用和相关抗肝癌治疗的重要节点。在 The Human Protein Atlas 中做进一步验证,IL6、VEGFA、EGFR 免疫组化图结果显示三者肝癌组织中的表达较正常组织都要高,说明 IL6、VEGFA、EGFR 的高表达与肝癌发生存在联系。根据生存曲线分析发现 IL6、VEGFA 的低表达的五年生存率均高于高表达($P < 0.05$),结果有

统计学意义。在 The Human Protein Atlas 数据库中的 365 例患者中 EGFR 的高表达生存曲线尚未得到验证,但是依旧可能相关,猜测可能是通过其他通路实现的,不排除是样本量太小或者是不影响生存率,但影响其他关乎生存质量的指标。EGFR 在肝癌中的表达作用尚不明确,需要后续开展实验验证说明。通过网络药理学前期分析,枳实-白芍可能通过调节这三个关键靶点发挥治疗作用,但是本文并未进行明确的实验验证,作者将进行后续研究以进行验证。

通过研究,枳实-芍药治疗肝癌涉及多个过程和靶点,我们初步分析,并为进一步深入探讨其作用机制奠定了良好的基础。但是,由于中药成分的复杂性,其药理学作用还需要通过实验进一步探讨。

参考文献

- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015. [J]. Can J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- Wang W, Elia, Gao JY. Effect of Sini powder on SIRT1 and p53 expression in HepG2 transplanted liver cancer nude mice[J]. Pharmacol Clin Tradit Chin Med(中药药理与临床), 2014, 30(3):16-18.
- Wang BL, Liu ZQ. Network pharmacology research on "composition target pathway" of Zhishi Shaoyao powder[J]. Chin Med Clin Pharm(中药新药与临床药理), 2018, 29:586-594.
- Li Z, Song R, Xu FG, et al. LC-MS/MS analysis of flavonoids metabolites in rats after infusing the extract of Fructus Aurantii Immaturus[J]. J China Med Univ(中国药科大学学报), 2010, 41:539-547.
- Yi Q, Xiong Y, Zhou B, et al. Isolation and identification of flavonoids in Fructus Aurantii[J]. Chin J Tradit Chin Med(中国中药杂志), 2015, 40:2352-2356.
- Ji Y, Chen JZ, Chen JM. Research progress of flavonoids in Fructus Aurantii[J]. Chin J Tradit Chin Med Inf(中国中医药信息杂志), 2010, 17(11):105-107.
- Ren M, Wu SX, Zhan SY, et al. Protective effect of total paeoniflorin and its main components paeoniflorin and paeoniflorin on carbon tetrachloride induced acute liver injury in mice[J]. Chin J Tradit Chin Med Phram(中华中医药学刊), 2020, 38(5):244-247.
- Li J, Zhao P, Li Y, et al. Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease[J]. Sci Rep, 2015, 5:15290.
- Zhu WH, Zhang W, Li Y, et al. Artesunate induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by increasing the production of reactive oxygen species [J]. Chin J Pathophysiol, 2018, 34(1):64-69.
- Wu JJ, Sun WY, Hu SS, et al. A standardized extract from *Paeonia lactiflora* and *Astragalus membranaceus* induces apoptosis and inhibits the proliferation, migration and invasion of human hepatoma cell lines [J]. Int J Oncol, 2013, 43:1643-1651.
- Hu S, Sun W, Wei W, et al. Involvement of the prostaglandin E receptor EP2 in paeoniflorin-induced human hepatoma cell apoptosis[J]. Anti-Cancer Drugs, 2013, 24:140-149.
- Lee SMY, Li MLY, Tse YC, et al. Paeoniae Radix, a Chinese herbal extract, inhibit hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway [J]. Life Sci, 2002, 71:2267-2277.
- Lu JT, He W, Song SS, et al. Paeoniflorin inhibited the tumor invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Bratisl Lek Listy, 2014, 115:427-433.
- Qian JZ, Wang BC. Research progress in the pharmacological action of hesperidin [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2010, 22:176-180.
- Ratana BP, Benjawan WT, Patompong KW, et al. Hesperidin from *Citrus* seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways [J]. Tumor Biol, 2016, 37(1):227-237.
- Xia XM, Fu JL, et al. Neohesperidin dihydrochalcone down-regulates Myd88-dependent and -independent signaling by inhibiting endotoxin-induced trafficking of TLR4 to lipid rafts [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 89:522-532.
- Zhao YY, Ying Y, Zhou LM. The inhibitory effect of chenpeisu on hepatoma cells [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2007, 22:149-151.
- Su MY, Niu JL, Li L, et al. Antitumor activity and mechanism of chuanchenpi *in vitro* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2011, 33:1479-1483.
- Xia XJ, Huang B. Research progress of paeoniflorin in the treatment of liver cancer and its mechanism [J]. Central South Pharm(中南药理学), 2018, 16:209-212.
- Zhang Y. Experimental research progress of protective effect of paeoniflorin on various types of liver injury [J]. Mod J Integr Chin West Med(现代中西医结合杂志), 2019, 28:681-684.
- Liu L, Zhao JL. Protective effect of paeoniflorin on LPS induced acute liver injury in mice [J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志), 2016, 32:433-436.
- Zhao Y, Zhou G, Wang J, et al. Paeoniflorin protects against ANIT-induced cholestasis by ameliorating oxidative stress in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 58:242-248.

- 23 Satoru K, Yasuhiko T, et al. Antiproliferative active of Flavonoid on several cancer cell lines [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1999, 63:896-899.
- 24 Yang JJ, Yan YH. Effect of antiviral therapy on postoperative prognosis of hepatitis B-related HCC [J]. Guangdong Med J (广东医学), 2018, 39:587-592.
- 25 Gordon SC, Lamerato LE, Rupp LB, et al. Antiviral therapy for chronic hepatitis B virus infection and development of hepatocellular carcinoma in a US population [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014, 12:885-893.
- 26 Tao WW, Chen FY, Jiang YC, et al. Pekinenin D, an extract of *Euphorbia pekinensis*, induces apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells through PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Pharm Clin Tradit Chin Med (中药药理与临床), 2017, 33(6):50-54.
- 27 Laetitia K, Véronique D, Nathalie V, et al. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25:475-484.
- 28 Jonse SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer [J]. Nat Rev Immunol, 2018, 18:773-789.
- 29 Lanton T, Shriki A, Nechemia-Arbely Y, et al. Interleukin 6-dependent genomic instability heralds accelerated carcinogenesis following liver regeneration on a background of chronic hepatitis [J]. Hepatology, 2017, 65:1600-1611.
- 30 Sun C, Wu MJ, Jiang ZQ, et al. Mechanism of 2-hydroxy-3-methylanthraquinone, an effective component of *Hedyotis diffusa*, inducing apoptosis of hepatoma cells through IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. Chin J Tradit Chin Med Phram (中华中医药杂志), 2018, 33:5346-5350.
- 31 Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology [J]. Sci World J, 2014:919570.
- 32 Ru L. Expression and clinical significance of ncbp2 and VEGF in HCC [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University (郑州大学), 2019.
- 33 Lee SJ, Lee HM, JiS T, et al. 1, 2, 3, 4, 6-Penta-O-galloyl- β -D-glucose blocks endothelial cell growth and tube formation-through inhibition of VEGF binding to VEGF receptor [J]. Cancer Lett, 2004, 204(1):89-94.
- 34 Li YD, Diao Y, Wang LQ. Research progress of anti-tumor effect of *Paeonia* and its effective components [J]. Strait Pharm J (海峡药理学) 2009, 21(12):27-32
- 35 Dai H, Song D, Xu J, et al. Ammonia-induced Na, KATPase/ouabain-mediated EGF receptor transactivation, MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling and ROS formation cause astrocyte swelling [J]. Neurochem Int, 2013, 63:610-625.
- 36 Heo JS, Lee YJ, Han HJ. EGF stimulates proliferation of mouse embryonic stem cells; involvement of Ca^{2+} influx and p44/42 MAPKs [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(1):C123-C133.
- 37 Zhu RX, Yang DY, Situ WJ. Effect of EGFR abnormal expression on proliferation and invasion of hepatoma cells [J]. Heilongjiang Med (黑龙江医药), 2019, 32:924-926.
- 38 Dai HL, Jia GZ, Zhao Y, et al. Genistein inhibits SMMC 7721 cell proliferation through EGFR/ERK pathway [J]. Med J Liaoning (辽宁医学杂志), 2015, 36(1):1-3.

(上接第 137 页)

- 12 Sticher O. Quality of *Ginkgo* preparations [J]. Planta Med, 1993, 59(1):2-11.
- 13 Wang JH, Chen J, Wang MM, et al. Determination of 7 flavonol glycosides in *Ginkgo biloba* reference extract [J]. Chin J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40:4018-4021.
- 14 Yang Y, Zhou B, Zhao WJ. *Ginkgo biloba* leaves history: a model of research and development for Chinese materia medica/phytomedicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47:2579-2591.
- 15 Shao TT. Study progress on extraction and separation technology of *Ginkgo* flavonoids and terpene lcatones [J]. Mod Chin Med (中国现代中药), 2016, 18:396-400.
- 16 Zhang W, Li X, Lin BC. Preparation of high-purity flavonoids from *Ginkgo biloba* L. [J]. J Anhui Agr Sci (安徽农业科学), 2011, 39:764-765.
- 17 Zheng XW, Gao Q, Zhu GQ, et al. Preparation of high purity *Ginkgo* flavonol glycosides by acid/polar coupled modified macroporous resin column chromatography [J]. Chin J Pharm (中国医药工业杂志), 2018, 49:1283-1288.