

当归四逆汤治疗肝细胞癌作用机制的网络药理学分析

刘泽宇, 万宇翔, 黄金昶*

(北京中医药大学 第三附属医院, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 通过对当归四逆汤的网络药理学分析,探讨当归四逆汤治疗肝细胞癌的潜在抗肿瘤靶点及作用机制,为后续研究提供有针对性的指导。**方法:** 利用 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) 网站及 SwissTargetPrediction 网站建立当归四逆汤有效成分及靶点数据库,利用 Comparative Toxicogenomics Database (CTD), Therapeutic Target Database (TTD), Human Phenotype Ontology (HPO) 网站建立肝细胞癌相关靶点数据库,并与当归四逆汤靶点数据库相匹配。在匹配结果的基础上,应用 STRING 网站分析靶标之间的相互作用,并利用 The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) 网站进行基因本体论 (gene ontology, GO) 生物学过程分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析,运用 Cytoscape 3.6.0 软件进行网络分析。**结果:** 共发现当归四逆汤治疗肝细胞癌的 56 个可能的重要靶点,经 GO 富集分析得到 106 个细胞生物学过程,经 KEGG 富集分析得到 23 个相关通路,其中主要包括 TNF 信号通路, FoxO 信号通路, Toll 样受体信号通路, p53 信号通路, 磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路, 腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 信号通路, 两面神激酶 (JAK)/信号传导及转录激活因子 (STAT) 信号通路等。**结论:** 当归四逆汤对肝细胞癌的治疗作用可能是多靶点、多途径、多层次的。并且可以推测槲皮素和山柰酚可能是其中比较重要的 2 个有效成分, PI3K/Akt 信号通路和 MAPK 信号通路可能是本方发挥作用比较重要的两条信号通路。本研究不仅有助于更好地理解当归四逆汤抗肝细胞癌的作用机制,而且提供了利用网络药理学开发新的中医药候选药物的策略。

[关键词] 当归四逆汤; 肝细胞癌; 网络药理学

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0185-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200124

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190917.1732.004.html>

[网络出版时间] 2019-09-18 10:22

Network Pharmacology Study on Mechanism of Danggui Sinitang in Treating Hepatocellular Carcinoma

LIU Ze-yu, WAN Yu-xiang, HUANG Jin-chang*

(Third Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** This paper aims to explore the potential anti-neoplasm targets and mechanism of Danggui Sinitang on hepatocellular carcinoma by analyzing the prescription of Danggui Sinitang with the method of network pharmacology, in order to provide targeted guidance for further studies. **Method:** The Traditional Chinese Medicine System Platform (TCMSP) and SwissTargetPrediction database were adopted to establish the database of Danggui Sinitang's effective ingredients and targets. The Comparative Toxicogenomics Database (CTD), Therapeutic Target Database (TTD), and Human Phenotype Ontology (HPO) were used to build the hepatocellular carcinoma target database, which was then matched with Danggui Sinitang's target database. Based on the

[收稿日期] 20190617(017)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81573736);北京市自然科学基金面上项目(7172128);北京中医药大学研究生自主课题项目(2019-JYB-XS-245)

[第一作者] 刘泽宇,在读博士,从事中西医结合防治肿瘤研究, E-mail:13718560318@139.com

[通信作者] *黄金昶,博士生导师,主任医师,从事中西医结合防治肿瘤研究, E-mail:zryhhuang@163.com

matching results, STRING database was applied to analyze the interactions between the targets and the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) was utilized for the enrichment analysis on gene ontology (GO) biological process and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway. Then Cytoscape 3.6.0 software was used for networks analysis. **Result:** A total of 56 significant targets of Danggui Sinitang were found for treatment of hepatocellular carcinoma. The 106 cellular biological processes were obtained through GO biological process enrichment analysis and 23 related pathways were obtained by KEGG enrichment analysis, mainly including TNF signaling pathway, FoxO signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, p53 signaling pathway, phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K) /protein kinase B (Akt) signaling pathway, AMP activated protein kinase (AMPK) signaling pathway, Janus kinase (JAK) /signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling pathway, et al. **Conclusion:** The therapeutic effect of Danggui Sinitang on hepatocellular carcinoma may be multi-target, multi-channel and multi-level. It can be inferred that quercetin and kaempferol may be two important active components, and PI3K/Akt signaling pathway and MAPK signaling pathway may be two important signaling pathways. This study not only makes a contribution to a better understanding of the anti-hepatocellular carcinoma mechanism of Danggui Sinitang, but also proposes a strategy to develop new TCM candidates at a network pharmacology level.

[**Key words**] Danggui Sinitang; hepatocellular carcinoma; network pharmacology

在世界范围内,肝癌是男性癌症死亡的第二大原因^[1]。原发性肝癌在我国恶性肿瘤发病率中居第 4 位^[2],每年约 38.3 万人死于原发性肝癌,占全球原发性肝癌死亡人数的 51%,5 年生存率不到 5%^[3]。肝细胞癌是最常见的原发性肝癌的病理类型之一,可以占到 70%^[4]。目前外科手术仍然是肝癌治疗的首选方法,但是由于肝癌患者大多会合并有肝硬化,或者在确诊时已经达到中晚期,所以能获得手术切除机会的患者仅占大约 20%~30%^[5]。而其他的治疗方法诸如介入、放化疗等等,虽然有一定的效果,但是作用有限。著名中西医结合肿瘤专家黄金昶教授在临床中经常使用当归四逆汤治疗肝细胞癌。当归四逆汤出自《伤寒论》,黄教授认为治疗肝癌应当养阴血、助肝阳、补脾气,本方中当归、白芍可养肝血,桂枝舒肝气通血脉,细辛补肝阳,方中暗含的桂枝汤又可温补脾胃,全方正合肝癌之病机。有研究表明本方中的当归、甘草组合在古代治疗肝癌的方剂中出现频率最高^[6],并且已有研究将其用于癌症相关症状的治疗^[7]。

网络药理学是基于网络观点从系统水平分析药物作用机制、发现先导化合物或新适应症、识别新药靶点等的一种新的药物研究策略^[8],其与中药整体调控机体的理念相吻合。目前有诸多研究运用网络药理学进行中药单味药或复方的作用机制研究,并取得了丰富的研究成果^[9-10]。因此,本研究将网络药理学研究思路与中药当归四逆汤相结合来阐释其治疗肝细胞癌的药效活性成分及可能的分子机制,

旨在为后续的实验研究提供一定的基础。

1 资料与方法

1.1 成分数据库的建立 药物成分及靶标数据来源于 Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform 网站^[11] (TCMSP, <http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)。在 TCMSP 网站中查询可以得到当归四逆汤中药物(当归、白芍、桂枝、甘草、细辛、川木通、大枣)的有效成分信息及其药理学信息,其中包括口服生物利用度 (oral bioavailability, OB), 药物相似性 (drug-likeness, DL) 以及药物作用靶点等。

1.2 有效成分筛选 将 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 作为筛选有效成分的标准。

1.3 靶标寻找 在 TCMSP 网站中找出药物有效成分的对应靶标,并利用 SwissTargetPrediction 网站^[12] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 补充药物有效成分的作用靶点信息。

1.4 疾病靶标数据库的建立 在 Therapeutic Target Database^[13] (TTD, <https://db.idrblab.org/ttd/>), Comparative Toxicogenomics Database^[14] (CTD, <http://ctdbase.org/>), Human Phenotype Ontology^[15] (HPO, <http://human-phenotype-ontology.github.io/>) 3 个数据库中检索肝细胞癌相关靶点并进行整合,从而构建肝细胞癌相关靶点数据库。

1.5 靶标匹配及网络构建 将筛选后的有效成分所对应的靶标与疾病相关靶标进行匹配,匹配所得靶标在 STRING^[16] 数据库 (<https://string-db.org/>)

中建立蛋白质相互作用(PPI)网络图。同时,运用 Cytoscape 3.6.0^[17] (<http://www.cytoscape.org/>) 软件进行药物、成分、靶标、通路之间的网络拓扑分析。

1.6 功能富集分析与通路分析 为了说明中药化合物对应的预测靶点在基因功能和通路中的作用,采用 Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery v6.8 数据库^[18] (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov/>) 对 PPI 网络中的蛋白质进行基因本体论(gene ontology, GO)生物学功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)^[19] 通路富集分析。

2 结果

2.1 当归四逆汤有效成分 通过在 TCMSp 数据库内检索,获得全方中的药物成分共 914 个,将 914 个成分根据 $OB \geq 30\%$, $DL \geq 0.18$ 的标准进行筛选后共得到 139 个有效成分(表 1)。将 139 个有效成分与中药构建中药-成分(Herbs-Compounds, H-C)网络(图 1),并对网络进行拓扑分析,根据“中介中心性”(betweenness)降序排列,前 4 位的有效成分分别是 槲木酸(mairin, MOL000211), 山柰酚(kaempferol, MOL000422), 槲皮素(querctetin, MOL000098), 谷甾醇(sitosterol, MOL000359)。

2.2 当归四逆汤作用靶点 根据 TCMSp 数据库中的有效成分靶点信息,并结合 SwissTargetPrediction 在线靶标垂钓,共收集到当归四逆汤中有效成分的相关作用靶点共 365 个。另一方面,在 TTD, CTD, HPO 3 个数据库中检索肝细胞癌相关靶点后进行整合,共获得 248 个疾病相关靶点。将药物相关靶点与疾病相关靶点进行比对,可以得到 56 个当归四逆汤抗肝细胞癌的可能作用靶点。

在 STRING 数据库中构建上述 56 个靶点的蛋白质相互作用网络(PPI)(图 2)。此网络中共包含 56 个节点,543 条边。对 PPI 进行拓扑特征分析,选取在“度中心性”(degree),“中介中心性”(betweenness),“接近中心性”(closeness)3 个参数上均大于中位数的点作为核心靶点,连续进行 2 次筛选后,得到 7 个重要核心靶点,具体包括白细胞介素(IL)-6 (degree = 38), 表皮生长因子(EGF, degree = 34), 氨基端激酶(JUN, degree = 40), 肿瘤坏死因子(TNF, degree = 36), PIK3CA (degree = 34), 雌激素受体 1 (ESR1, degree = 38), TP53 (degree = 43)。基于 7 个重要核心靶点,根据相关有效成分,进一步构建有效成分-靶点(Compounds-Targets, C-

T)网络(图 3)。

2.3 GO 和 KEGG 通路富集分析 通过运用 DAVID v6.8 对 56 个靶点进行富集分析,以 $P < 0.01$ 为筛选标准,获得 GO 生物学过程条目 106 条,并选取相关 KEGG 通路 23 条进行分析。

2.3.1 GOBP 富集分析 根据 P 值将 106 个 GO 生物学过程条目进行升序排列后可以发现,当归四逆汤抗肝细胞癌的作用靶点涉及大量不同类型的生物学过程。前 25 个条目主要涉及细胞增殖、细胞存活与凋亡、炎症反应、血管生成等方面(图 4)。基于以上几个主要方面,可以推测当归四逆汤的抗肝细胞癌作用可能是一个复杂的多途径协同作用的结果。

2.3.2 KEGG 通路富集分析 为了进一步揭示当归四逆汤抗肝细胞癌的潜在作用机制,通过对 56 个靶点进行 KEGG 通路富集分析,依据 $P < 0.01$ 及肿瘤相关信号通路进行筛选获得 23 条相关通路(表 2),如 hsa04668: TNF 信号通路, hsa04068: FoxO 信号通路, hsa04620: Toll 样受体信号通路等。利用这 23 条通路,构建了靶标——通路(targets-pathways, T-P)网络(图 5)。从 KEGG 通路富集分析的结果中可以发现,许多信号通路中均有磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路的参与,比如 hsa04668: TNF 信号通路, hsa04620: Toll 样受体信号通路, hsa04012: ErbB 信号通路, hsa04630: JAK/STAT 信号通路等。

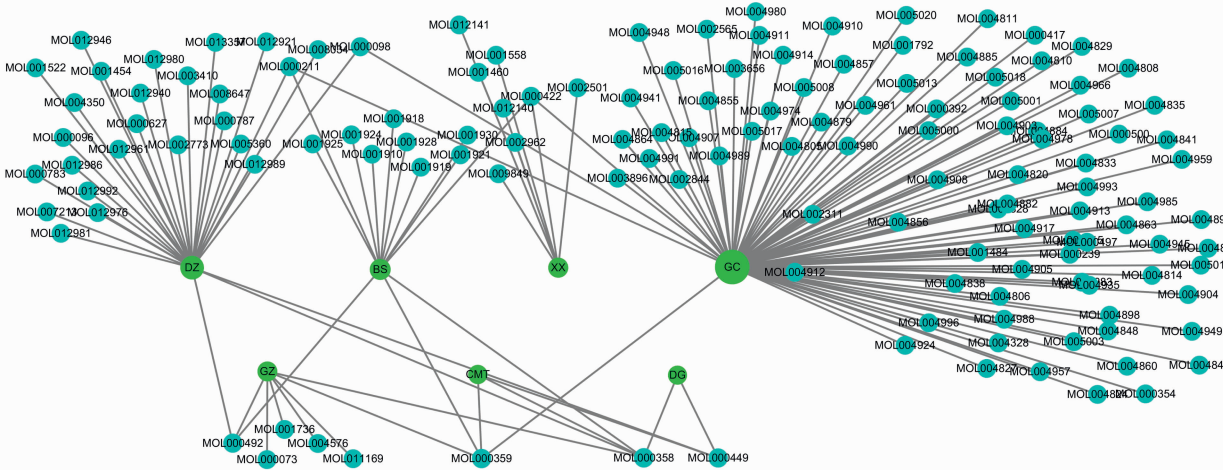
3 讨论

本研究运用网络药理学方法对当归四逆汤的抗肝细胞癌作用进行研究,从全方七味药相关的 914 个成分中筛选获取了 139 个有效成分,通过对 H-C 网络进行拓扑分析可以发现,槲木酸(mairin, MOL000211), 山柰酚(kaempferol, MOL000422), 槲皮素(querctetin, MOL000098), 谷甾醇(sitosterol, MOL000359)可能是本方发挥重要作用的重要成分。山柰酚属于黄酮类的化合物,有研究表明其能够通过 PI3K/Akt 和端粒酶通路诱导肿瘤细胞凋亡^[20]; 槲皮素可诱导人肝癌细胞株 Hep3B, Huh7 的凋亡^[21], 并且有体内实验证明槲皮素能够抑制裸鼠肝癌术后肿瘤的复发,其机制可能与上调 E-cadherin 的表达,下调 p65 蛋白和 MMP-2 有关^[22]; 槲木酸对人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞增殖具有明显的抑制作用,其可能通过影响肿瘤干细胞周期及诱导肿瘤干细胞凋亡而发挥作用^[23]; 谷甾醇对多种肿瘤细胞均有抑制作用,如通过 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导细胞自噬作

表 1 当归四逆汤中 139 个有效成分

Table 1 139 active ingredients from Danggui Sinitang

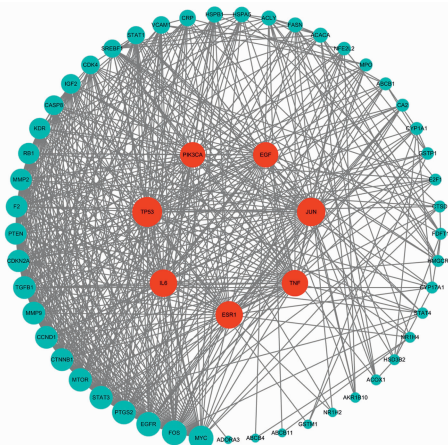
成分 ID	成分名称	成分 ID	成分名称
MOL000073	ent-epicatechin	MOL003410	ziziphijn_qt
MOL000096	(-)-catechin	MOL003656	lupiwighteone
MOL000098	quercetin	MOL003896	7-methoxy-2-methyl isoflavone
MOL000211	mairin	MOL004328	naringenin
MOL000239	jaranol	MOL004350	ruvoside_qt
MOL000354	isorhamnetin	MOL004576	taxifolin
MOL000358	beta-sitosterol	MOL004805	(2S)-2-[4-hydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl) phenyl]-8, 8-dimethyl-2, 3-dihydropyrano [2, 3-f] chromen-4-one
MOL000359	sitosterol	MOL004806	euchrenone
MOL000392	formononetin	MOL004808	glyasperin B
MOL000417	calycosin	MOL004810	glyasperin F
MOL000422	kaempferol	MOL004811	glyasperin C
MOL000449	stigmaterol	MOL004814	isotrifoliol
MOL000492	(+)-catechin	MOL004815	(E)-1-(2, 4-dihydroxyphenyl)-3-(2, 2-dimethylchromen-6-yl) prop-2-en-1-one
MOL000497	licochalcone a	MOL004820	kanzonols W
MOL000500	vestitol	MOL004824	(2S)-6-(2, 4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2, 3-dihydrofuro [3, 2-g] chromen-7-one
MOL000627	stepholidine	MOL004827	semilicoisoflavone B
MOL000783	protoporphyrin	MOL004828	glepidotin A
MOL000787	fumarine	MOL004829	glepidotin B
MOL001454	berberine	MOL004833	phaseolinisoflavan
MOL001460	cryptopin	MOL004835	glypallichalcone
MOL001484	inermine	MOL004838	8-(6-hydroxy-2-benzofuranyl)-2, 2-dimethyl-5-chromenol
MOL001522	(S)-coclaurine	MOL004841	licochalcone B
MOL001558	sesamin	MOL004848	licochalcone G
MOL001736	(-)-taxifolin	MOL004849	3-(2,4-dihydroxyphenyl)-8-(1,1-dimethylprop-2-enyl)-7-hydroxy-5-methoxy-coumarin
MOL001792	DFV	MOL004855	licoricone
MOL001910	11 alpha, 12alpha-epoxy-3beta-23-dihydroxy-30-norolean-20-en-28, 12beta-olide	MOL004856	gancaonin A
MOL001918	paeoniflorgenone	MOL004857	gancaonin B
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	MOL004860	licorice glycoside E
MOL001921	lactiflorin	MOL004863	3-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-8-(3-methylbut-2-enyl) chromone
MOL001924	paeoniflorin	MOL004864	5, 7-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-8-(3-methylbut-2-enyl) chromone
MOL001925	paeoniflorin_qt	MOL004866	2-(3, 4-dihydroxyphenyl)-5, 7-dihydroxy-6-(3-methylbut-2-enyl) chromone
MOL001928	albiflorin_qt	MOL012992	mauritime D
MOL001930	benzoyl paeoniflorin	MOL013357	(3S, 6R, 8S, 9S, 10R, 13R, 14S, 17R)-17-[(1R, 4R)-4-ethyl-1, 5-dimethylhexyl]-10, 13-dimethyl-2, 3, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a] phenanthrene-3, 6-diol
MOL002311	glycyrol		
MOL002501	[(1S)-3-((E)-but-2-enyl)-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R, 3R)-3-((E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl)-2, 2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate		
MOL002565	medicarpin		
MOL002773	beta-carotene		
MOL002844	pinocembrin		
MOL002962	(3S)-7-hydroxy-3-(2, 3, 4-trimethoxyphenyl) chroman-4-one		



绿色代表中药(拼音首字母缩写),蓝色代表有效成分

图 1 当归四逆汤 H-C 网络

Fig. 1 Herbs-compounds network of Danggui Sinitang



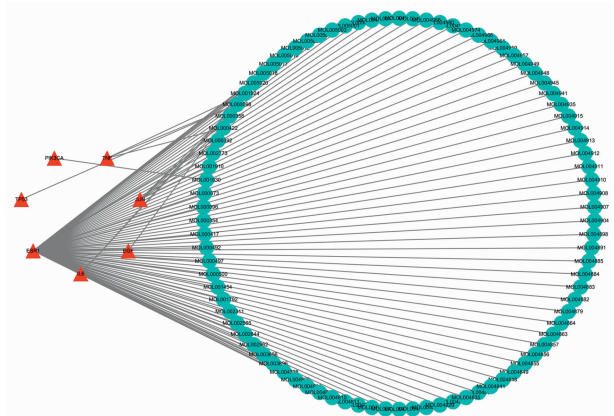
红色圆圈. 7 个核心靶点, 蓝色圆圈. 其他靶点, 圆圈越大表示 degree 越大

图 2 当归四逆汤中 56 个靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of 56 targets in Danggui Sinitang

用,从而抑制胃癌细胞增殖并促进其凋亡^[24],通过调控 p53 通路影响细胞凋亡进而对胰腺癌细胞发挥显著的抑制作用^[25]。

将有效成分的作用靶点与肝细胞癌相关靶点匹配,可以得到 56 个可能的作用靶点,之后进行网络拓扑分析得到 7 个重要核心靶点。C-T 网络中共包含 90 个有效成分,根据 degree 排序可发现其中槲皮素 (quercetin, MOL000098) 与 IL-6, EGF, JUN, TNF, TP53 这 5 个靶点均相关,芍药苷 (paeoniflorin, MOL001924) 与 IL-6, TNF 相关,山柰酚 (kaempferol, MOL000422) 与 JUN, TNF 相关, (+)-儿茶素 [(+)-catechin, MOL000492] 与 JUN, ESR1 相关,苯甲酰芍药苷 (benzoyl paeoniflorin, MOL001930) 与



三角形. 核心靶点, 圆形. 有效成分

图 3 当归四逆汤 C-T 网络

Fig. 3 Compounds-targets network of Danggui Sinitang

PIK3CA 相关。由此可以推测以上 5 个成分为该网络中的核心成分,可通过 7 个重要核心靶点进而发挥抗肝细胞癌的作用。

进一步通过 GO 功能富集分析,可以发现当归四逆汤的作用涉及多个生物学过程,并且主要集中在抑制细胞异常增殖,促进肿瘤细胞凋亡等方面。这表明当归四逆汤可能主要通过抑制细胞异常增殖、促进肿瘤细胞凋亡而发挥抗肝细胞癌的作用。通过分析富集的 KEGG 通路可以发现, TNF 信号通路, FoxO 信号通路, Toll 样受体信号通路, p53 信号通路, PI3K/Akt 信号通路, AMPK 信号通路, ErbB 信号通路, MAPK 信号通路, JAK/STAT 信号通路, HIF-1 信号通路可能是本方发挥作用的主要信号通路。这其中的多个信号通路中都有 PI3K/Akt 信号通路与 MAPK 信号通路的参与,并且 PI3K/Akt 信号通路

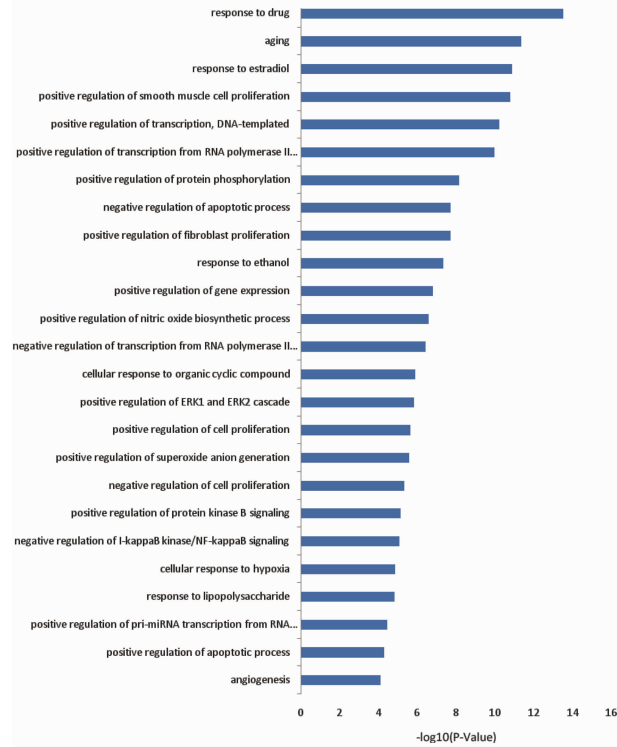


图 4 当归四逆汤 GO 富集分析

Fig. 4 GO enrichment analysis of Danggui Sinitang

和 MAPK 信号通路与细胞增殖和凋亡关系非常密切,因此可以推测这两个信号通路可能是当归四逆汤发挥作用最重要的通路。

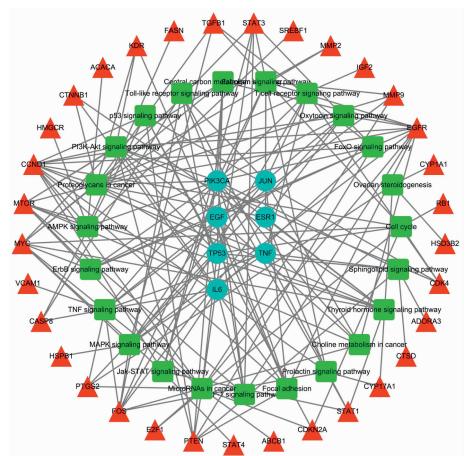
PI3K 是由调节亚基 p85 和催化亚基 p110 组成的异源性二聚体,当机体细胞内 PI3K 受到生长因子等刺激后,PI3K 活化后并聚集到细胞膜上,将其底物 3,4-二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 转化为 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3)^[26]。Akt 是 PI3K 下游分子,Akt 与 PIP3 相结合,使得 Thr308 和 Ser473 位点磷酸化而被激活,激活后 Akt 蛋白通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白,从而调控肿瘤细胞的增殖与凋亡等生物学过程^[27]。10 号染色体上缺失与张力蛋白同源的磷酸酶基因 (PTEN) 是 PI3K/Akt 通路的负调控因子,PTEN 通过促进 PIP3 在 D3 位去磷酸化生成 PIP2,从而对 PI3K 下游的 Akt/mTOR 信号通路进行负性调节,达到抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的目的^[28]。以上的结果表明,甘草、大枣中的槲皮素 (quercetin, MOL000098) 可能通过调节 PTEN 的表达,从而对 PI3K/Akt 通路进行负调控;同时,槲皮素还可能通过抑制 EGF 的表达水平以及与山柰酚一同抑制 Akt 的表达,从而实现对肿瘤的抑制。

MAPK 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,c-Jun 氨基

表 2 当归四逆汤 23 条相关通路

Table 2 Totally 23 relative pathways of Danggui Sinitang

通路	P
hsa05205: proteoglycans in cancer	2.16 × 10 ⁻¹⁰
hsa04668: TNF signaling pathway	1.36 × 10 ⁻⁶
hsa05206: microRNAs in cancer	9.51 × 10 ⁻⁶
hsa04917: prolactin signaling pathway	1.66 × 10 ⁻⁵
hsa04919: thyroid hormone signaling pathway	2.58 × 10 ⁻⁵
hsa04110: cell cycle	4.45 × 10 ⁻⁵
hsa04068: FoxO signaling pathway	7.30 × 10 ⁻⁵
hsa04915: estrogen signaling pathway	1.10 × 10 ⁻⁴
hsa05230: central carbon metabolism in cancer	1.30 × 10 ⁻⁴
hsa04620: Toll-like receptor signaling pathway	1.61 × 10 ⁻⁴
hsa04115: p53 signaling pathway	1.61 × 10 ⁻⁴
hsa04151: PI3K/Akt signaling pathway	2.82 × 10 ⁻⁴
hsa04152: AMPK signaling pathway	3.46 × 10 ⁻⁴
hsa04012: ErbB signaling pathway	5.49 × 10 ⁻⁴
hsa04010: MAPK signaling pathway	7.35 × 10 ⁻⁴
hsa04630: JAK/STAT signaling pathway	8.67 × 10 ⁻⁴
hsa04066: HIF-1 signaling pathway	9.45 × 10 ⁻⁴
hsa04510: focal adhesion	0.001 018 274
hsa05231: choline metabolism in cancer	0.001 082 908
hsa04071: sphingolipid signaling pathway	0.002 329 523
hsa04913: ovarian steroidogenesis	0.006 449 629
hsa04921: oxytocin signaling pathway	0.007 525 445
hsa04660: T cell receptor signaling pathway	0.008 320 994



圆形. 核心靶点, 三角形. 其他靶点, 方形. KEGG 通路

图 5 当归四逆汤 T-P 网络

Fig. 5 Targets-pathways network of Danggui Sinitang

末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 是 MAPK 家族的成员, JNK 可通过 MKK4, MKK7 被激活, 活化

的 JNK 与转录因子 c-Jun, p53, Elk-1, ATK2 等结合, 并使其被激活而增强转录活性, 进而在细胞中发挥调节增殖、分化、凋亡等方面的作用^[29]。以上的结果表明, 白芍、细辛、甘草中的山柰酚(kaempferol, MOL000422)和甘草中的美迪紫檀素(medicarpin, MOL002565)可能分别调控 JNK1 和 JNK3, 从而抑制癌细胞的增殖与促进其凋亡。同时, 山柰酚(kaempferol, MOL000422), β -谷甾醇(beta-sitosterol, MOL000358)等可能调控 c-Jun, 槲皮素(quercetin, MOL000098)可能调控 c-Jun 与 p53, 他们共同调节 MAPK 信号通路, 进而发挥对肿瘤细胞的抑制作用。

此外, 其他通路同样也发挥着重要作用, 例如 JAK/STAT 信号通路中的 STAT3 可能被甘草中的甘草查尔酮 A(licochalcone A, MOL000497)下调, 从而抑制细胞的生长等。

以上分析了当归四逆汤治疗肝细胞癌的有效成分及作用靶点、信号通路。可以看出, 当归四逆汤中的诸多有效成分参与调控了多条相关通路, 从而形成其多靶点、多通路、多途径协同作用网络, 并且可以推测槲皮素和山柰酚可能是其中比较重要的 2 个有效成分, PI3K/Akt 信号通路和 MAPK 信号通路可能是本方发挥作用比较重要的两条信号通路。根据上述结果及分析可以认为, 当归四逆汤正是通过该网络作用于多个相关靶点, 直接或间接发挥其抗肝细胞癌的作用。当然, 由于目前对槲皮素与山柰酚的研究以及 PI3K/Akt 信号通路和 MAPK 信号通路的研究相对较多, 因此本研究中根据在线数据分析得出的结果不可避免地会产生一定的偏倚, 一些更加重要的成分或者信号通路或许未能显示。并且, 由于本研究是根据网络数据库中现有的研究数据进行的理论推测, 其中可能会有假阴性或者假阳性的结论。这些都有待于进一步的实验验证。

综上所述, 本研究从系统网络的角度为探究当归四逆汤治疗肝细胞癌的原理提供了支持, 为下一步的实验研究奠定了基础, 其具体的作用机制还有待今后进一步研究与验证。

[参考文献]

[1] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2):87-108.
[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
[3] WALLACE M C, PREEN D, GARY P J, et al. The

evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: a global perspective [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 9(6):765-779.
[4] ALTEKRUSE S F, DEVESA S S, DICKIE L A, et al. Histological classification of liver and intrahepatic bile duct cancers in SEER registries[J]. J Registry Manag, 2011, 38(4):201-205.
[5] 李相成, 李长贤, 张嘉伟, 等. 多模式治疗肝细胞肝癌的共识与争议[J]. 中国实用外科杂志, 2018, 38(1):41-44.
[6] 张靖, 李红法, 樊威, 等. 抗肝癌中药古方用药规律统计及抗肝癌新药研发风险评估[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19):3870-3875.
[7] 杨树明, 幼明. 当归四逆汤治疗癌痛 50 例[J]. 实用中医药杂志, 1994(5):47.
[8] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11):682-690.
[9] 刘雨晴, 王爱帅, 蒋珊, 等. 基于网络药理学探讨夏枯草对非小细胞肺癌的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, doi:org/10.13422/j.cnki.syfjx.20192024.
[10] 余平, 郑建红, 楼婷婷. 基于网络药理学六君子汤治疗胃癌的物质基础与作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12):1508-1515.
[11] 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.
[12] GFELLER D, MICHIELIN O, ZOETE V. Shaping the interaction landscape of bioactive molecules [J]. Bioinformatics, 2013, 29(23):3073-3079.
[13] LI Y H, YU C Y, LI X X, et al. Therapeutic target database update 2018: enriched resource for facilitating bench-to-clinic research of targeted therapeutics [J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1):D1121-D1127.
[14] GRODIN C J, DAVIS A P, WIEGERS T C, et al. Accessing an expanded exposure science module at the comparative toxicogenomics database [J]. Environ Health Perspect, 2018, 126(1):014501.
[15] ROBINSON P N, MUNDLOS S. The human phenotype ontology[J]. Clin Genet, 2010, 77(6):525-534.
[16] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(Database issue):D362-D368.
[17] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. [J]. Genome Res,

- 2003,13(11):2498-2504.
- [18] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. [J]. Nature Protocols, 2009, 4(1):44-57.
- [19] WIXON J, KELL D. The Kyoto encyclopedia of genes and genomes-KEGG[J]. Yeast, 2000, 17(1):48-55.
- [20] KASHAFI E, MORADZADEH M, MOHAMADKHANI A, et al. Kaempferol increases apoptosis in human cervical cancer HeLa cells via PI3K/Akt and telomerase pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 573-577.
- [21] 陈兆勋, 高彦宇, 李冀. 不同浓度槲皮素对人肝癌细胞株 Hep3B、Huh7 细胞凋亡的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(12):1051-1053.
- [22] 陈鹏, 阳锡军, 李春满, 等. 槲皮素对裸鼠肝癌切除术后肿瘤复发的影响及机制[J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(11):25-28.
- [23] 陈飞宇, 李澎, 甘加宽, 等. 桦木酸对人肝癌 HepG2 肿瘤干细胞增殖的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(2):60-64.
- [24] 孙玉成, 刘晓巍, 片光哲. β -谷甾醇诱导人胃癌细胞自噬与凋亡的作用及机制研究[J]. 中国医师杂志, 2019, 21(6):866-871.
- [25] PATIL J R, JAYAPRAKASHA G K, MURTHY K N C, et al. Characterization of *Citrus aurantifolia* bioactive compounds and their inhibition of human pancreatic cancer cells through apoptosis [J]. Microchemical Journal, 2010, 94(2):108-117.
- [26] PENE F, CLAESSENS Y E, MULLER O, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma [J]. Oncogene, 2002, 21(43): 6587-6597.
- [27] HILL M M, HEMMINGS B A. Inhibition of protein kinase B/Akt implications for cancer therapy [J]. Pharmacol Ther, 2002, 93(2/3):243-251.
- [28] JIANG B H, LIU L Z. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis [J]. Adv Cancer Res, 2009, 102(1):19-65.
- [29] BORSELLO T, FORLONI G. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(18):1875-1886.

[责任编辑 张丰丰]