

· 数据挖掘 ·

## 基于网络药理学探讨小柴胡汤抗肺癌作用机制

赵怡, 陈美琪, 郝书婷, 乔婷婷, 游嘉欢, 翟菲, 梁建坤, 项荣武\*  
(沈阳药科大学 医疗器械学院, 沈阳 110016)

**[摘要]** **目的:** 运用网络药理学方法构建小柴胡汤多成分-多靶点-多通路的相互作用网络, 探究其抗肺癌的作用机制。**方法:** 利用中药系统药理数据库和分析平台(TCMSP)中药分子机制综合数据库(TCMID)和文献获取小柴胡汤的有效活性成分; 运用 PharmMapper 的反向药效团匹配方法对潜在靶标进行预测, 利用自开发软件 TCMKD1.0 进行“肘点法”筛选优化, 通过检索药物靶标数据库(TTD), 人类孟德尔遗传数据库(OMIM), GeneCards 等数据库及查阅文献筛选出肺癌相关靶点; 进而构建化合物-靶点网络、蛋白互作(PPI)网络、靶点-通路网络; 通过 STRING 数据库进行靶点信息的注释; 通过 Cytoscape 3.6 软件构建小柴胡汤成分-靶点-通路网络。**结果:** 得到小柴胡汤中 162 个有效活性成分, 涉及 71 个抗肺癌靶点和 11 个相关通路; 拓扑网络分析后得到槲皮素(querceetin), 人参皂苷 Rh<sub>2</sub>(ginsenosideRh<sub>2</sub>), 芒柄花黄素(formononetin),  $\beta$ -谷甾醇( $\beta$ -sitosterol)等 96 个重要成分, 表皮生长因子受体(EGFR), 血管内皮生长因子(KDR), 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK1), 肝细胞生长因子(MET)等 28 个关键靶点, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer), 小细胞肺癌(small cell lung cancer), ErbB 信号通路(ErbB signaling pathway), VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway)等 61 条核心通路。**结论:** 研究结果表明小柴胡汤抗肺癌的活性成分可能是槲皮素, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub>, 6-姜烯酚, 芒柄花黄素,  $\beta$ -谷甾醇等, 其作用机制可能与 ErbB signaling pathway, MAPK signaling pathway, VEGF signaling pathway 等通路有关, 该研究为深入阐述小柴胡汤抗肺癌作用机制提供依据。

**[关键词]** 网络药理学; 小柴胡汤; 肺癌; 作用机制; 肘点法

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R287; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)09-0208-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200323

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20191017.1323.005.html>

**[网络出版时间]** 2019-10-17 15:00

### Mechanism of Anti-lung Cancer Effect of Xiao Chaihutang Based on Network Pharmacology

ZHAO Yi, CHEN Mei-qi, HAO Shu-ting, QIAO Ting-ting, YOU Jia-huan, ZHAI Fei,  
LIANG Jian-kun, XIANG Rong-wu\*

(College of Medical Equipment, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**[Abstract]** **Objective:** To predict the action targets of anti-lung cancer active ingredients of Xiao Chaihutang, in order to explore the "multi-components, multi-targets and multi-pathways" mechanism using network pharmacology. **Method:** The active ingredients of Xiao Chaihutang that obtained through Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), traditional Chinese medicine integrative database for herb molecular mechanism analysis (TCMID) and literature were used to predict the targets by the reversed pharmacophore matching method. To screen out optimization targets, we chose elbow point analysis by using self-developed software TCMKD1.0, and screened out lung cancer-related targets by searching databases,

**[收稿日期]** 20190616(004)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81773694); 辽宁省教育厅基本科研项目(2017LFW02); 辽宁省科学技术基金项目(20170540850); 辽宁省自然科学基金项目(20180550345); 沈阳药科大学大学生创新创业项目(201910163259)

**[第一作者]** 赵怡, 在读硕士, 从事药理学信息学研究, E-mail: y514229@outlook.com

**[通信作者]** \*项荣武, 硕士, 教授, 从事临床药理学、药理学信息学研究, E-mail: xrwlove@163.com

such as Therapeutic Target Database (TTD), Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and GeneCards, and reviewing literatures. Then components-target network, protein-protein interaction network and targets-pathways network were constructed. The pathway information was acquired with STRING. The Cytoscape 3.6 software was used to construct the ingredients-targets-pathways network of Xiao Chaihutang. **Result:** The 162 active components in Xiao Chaihutang were obtained, involving 71 anti-lung cancer targets and 11 related pathways. Through topological network analysis, 96 important components, such as quercetin, ginsenosideRh<sub>2</sub>, formononetin and  $\beta$ -sitosterol were obtained, 28 key targets, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), vascular endothelial growth factor (KDR), cysteine protease-3 (Caspase-3), mitogen-activated protein kinase1 (MAPK1), hepatocyte growth factor (MET) were received, and 61 core pathways, such as non-small cell lung cancer, small cell lung cancer, ErbB signaling pathway, VEGF signaling pathway were acquired. **Conclusion:** The result suggests that the active components of Xiao Chaihutang against lung cancer may include quercetin, ginsenoside Rh<sub>2</sub>, 6-shogaol, formononetin,  $\beta$ -sitosterol. And the mechanism may be related to ErbB signaling pathway, MAPK signaling pathway and VEGF signaling pathway. This research provides a scientific basis for further elucidation of the anti-lung cancer pharmacological mechanism of Xiao Chaihutang.

[**Key words**] network pharmacology; Xiao Chaihutang; lung cancer; mechanism; elbow point analysis

肺癌是危害人类健康最严重的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。肺癌在我国男性恶性肿瘤发病率中位居榜首,在女性恶性肿瘤发病率中位居第2位,且男女恶性肿瘤死亡率最高的均为肺癌。目前我国肺癌发病率和死亡率正以 26.9% 的速度逐年递增,预计到 2025 年肺癌患者可达 100 万,成为世界第一肺癌大国<sup>[2]</sup>。目前世界上肺癌的治疗仍以手术、放化疗、化学药物为主,其毒副作用明显,中医药注重整体调节,采用辨证治疗、中药联合化疗等方法,毒副作用较少,越来越受到人们的重视,特别是中药复方在临床上取得了较好的效果<sup>[3]</sup>。

小柴胡汤出自汉代张仲景《伤寒论》,由柴胡、黄芩、半夏、生姜、人参片、大枣、炙甘草 7 味药组成。北柴胡味辛苦而性微寒,既能透达少阳之邪从外而散,又能疏泄气机之郁滞,为君药;黄芩苦寒为臣,清泄少阳之热;半夏辛温有毒功善降逆,生姜辛微温既解半夏之毒又助半夏和胃止呕,人参、大枣、炙甘草味甘补中能鼓舞脾胃之气,以助少阳枢机之力,此五味俱为佐药;且炙甘草能调和诸药性,并为使药之用。小柴胡汤主治伤寒少阳证,为“少阳枢机之剂,和解表里之总方”。

2007 年英国 Dundee 大学 Andrew L. Hopkins 提出了网络药理学的概念,从整体的角度系统地探索药物与疾病间的关联性,构建“药物-靶点-疾病”网络,为药物研发提供新的策略<sup>[4-5]</sup>,为多成分、多靶点、多疾病的复杂中药作用机制系统研究提供了新的思路和视角<sup>[6]</sup>。樊耀华等<sup>[7]</sup>通过网络药理学系统地探讨了茵陈五苓散的候选成分所对应的靶点及

作用机制。吴晓霞等<sup>[8]</sup>基于网络药理学探讨了桂枝汤解热作用的相关通路,预测了桂枝汤入血成分中芍药苷代谢物 I,环磷酸腺苷可能与解热作用相关。ZENG 等<sup>[9]</sup>用网络药理学方法对阳和汤抗乳腺癌的作用机制进行了预测。这些研究都证明了网络药理学系统性、整体性的特点与中医药君臣佐使的整体协同作用理论相一致。

近年在临床研究中,乔荣跃等<sup>[10]</sup>发现小柴胡汤在治疗癌症方面有显著作用,唐婷婷等<sup>[11]</sup>发现小柴胡汤在肺癌治疗中,能够有效控制疾病进展。罗燕等<sup>[12]</sup>发现柴胡皂苷 D 对肿瘤细胞增殖和转移有较好的抑制作用。但针对小柴胡汤整体性抗肺癌的作用机制尚未报道,本文将应用网络药理学方法,整体性、系统性地分析小柴胡汤的有效成分,运用肘点分析法精准地筛选小柴胡汤抗肺癌作用的有效靶点,通过拓扑网络分析深入挖掘小柴胡汤抗肺癌作用的有效通路,全面深入阐述小柴胡汤抗肺癌的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 化学成分收集和筛选** 通过对 TCMS (http://lsp.nwu.edu.cn/) 和 TCMI (http://www.megabionet.org/tcmid/) 数据库中的小柴胡汤中药材有效成分的检索并根据口服生物利用度 (OB)  $\geq 30$  和类药性 (DL)  $\geq 0.18$  进行筛选,运用自开发软件 Traditional Chinese Medicine Knowledge Discovery Database (TCMKD1.0) 进行自动比对去重等分析,结合文献挖掘收集已报道的小柴胡汤抗癌的有效活性成分,构建小柴胡汤的化学成分数据库。

**1.2 小柴胡汤的有效活性成分潜在靶点预测** 通过 TCM (<http://tcm.cmu.edu.tw/>) 和 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 两个数据库查找并导出化学成分的分子结构数据(\*.sdf 格式), 将 sdf 格式的分子结构数据分别导入 PharmMapper (<http://lilab.ecust.edu.cn/pharmmapper/>) 服务器; 通过对 Targetbank, BindingDB, Drugbank, PDTD 四大数据库进行快速检索获取药物靶点信息, 基于反向药效团匹配法的化学小分子潜在靶点和生物活性进行潜在靶点预测, 提高预测结果的可靠性<sup>[13]</sup>; 通过预测靶点的 Z'-score 值, 采用自开发软件 TCMKD1.0 对每个化合物的预测靶点集进行“肘点法”筛选优化分析, 得到有效活性成分的预测靶点库。利用 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 将预测靶点库中的靶点名称规范化。

**1.3 抗肺癌靶点的筛选** 通过收集美国 FDA 批准的抗肺癌药物靶点和检索 TTD, OMIM, GeneCards 数据库及文献中的抗肺癌靶点, 去重整理得到具有明确抗肺癌作用的已知靶点集。将已知靶点集和预测靶点库进行交集处理, 得到本课题研究的小柴胡汤抗肺癌靶点集合。

**1.4 抗肺癌靶点通路的注释分析** 利用生物分子功能注释系统 STRING (<https://string-db.org/>) 对已获取的小柴胡汤抗肺癌靶点集合进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 并用 R Version3.6.0 绘制高级气泡图。将小柴胡汤所对应的靶蛋白(基因)直接映射到通路上, 获得研究药物调控的主要通路。

**1.5 网络的构建与分析** 对于上述得到的小柴胡汤抗肺癌靶点集合和富集出的通路, 采用 Cytoscape 3.6.0 软件构建“活性成分-靶点-通路”网络, 实现小柴胡汤抗肺癌的多成分、多靶点、多通路作用机制的可视化研究和分析。

## 2 结果

**2.1 小柴胡汤活性成分-靶点结果分析** 通过对 TCMSp 和 TCMID 数据库的检索并筛选 ( $OB \geq 30$ ,  $DL \geq 0.18$ ), 最终收集到有效活性成分 217 个(其中柴胡 19 个, 黄芩 36 个, 半夏 13 个, 生姜 5 个, 人参 23 个, 大枣 29 个, 甘草 92 个), 去重后剩余 159 个。通过文献检索和团队前期研究, 纳入人参中具有显著抑制肿瘤细胞分裂功能的人参皂苷  $Rg_3$  ( $OB = 17.75$ ,  $DL = 0.22$ )<sup>[14-17]</sup> 和生姜中具有抑制细胞增殖、迁移和诱导肿瘤细胞凋亡作用的 6-姜酚 ( $OB = 35.64$ ,  $DL = 0.16$ ) 和 6-姜烯酚 ( $OB = 31.00$ ,  $DL = 0.14$ ) 等<sup>[18-19]</sup>。整合后本研究采用的最终有效活性

成分共计 162 个。

针对每个有效活性成分, 通过 PharmMapper 返回的 100 个预测靶点以  $Z'$ -score  $> 0$ <sup>[20]</sup> 进行初步筛选, 采用自开发软件 TCMKD 1.0, 根据“肘点法”进行筛选优化分析。以儿茶素为例, 如图 1 所示为儿茶素的肘点选择图, 横坐标为靶点的 Z'-score, 纵坐标为 Z'-score  $\geq$  该 Z'-score 的靶点的数量。最终得到肘点(图中三角形的红色点即为肘点), 将 Z'-score  $\geq$  肘点 Z'-score 的靶点作为该活性成分的预测靶点。通过 PharmMapper 预测和肘点法筛选优化, 合并去重后得到小柴胡汤作用的 454 个靶点。

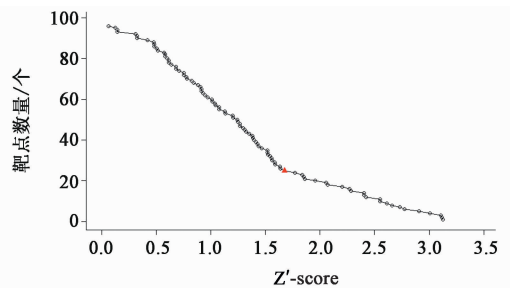


图 1 儿茶素靶点数量

Fig.1 Line chart of catechin target number

通过 TTD 数据库检索到抗肺癌相关靶点 29 个, 通过 OMIM 数据库检索到抗肺癌相关靶点 198 个, 通过 GeneCards 数据库检索到肺癌相关靶点 259 个, 通过查询 FDA 认证的有明确抗肺癌作用的靶点 17 个, 文献检索得到抗肺癌相关靶点 15 个, 合并去重后共得到 457 个肺癌靶点。

将预测得到的小柴胡汤作用的靶点集与通过 TTD, OMIM, GeneCards, FDA 以及文献检索中收集的具有明确抗肺癌作用的已知靶点集进行比对分析。最终得出 Caspase-3, EGFR, ERBB4, IGF1R, IL2, KDR, MAP2K1, MAPK1, MET 等 71 个小柴胡汤抗肺癌有关的潜在作用靶点。

**2.2 小柴胡汤靶点-通路分析** 将预测出的 71 个靶点通过 STRING 软件进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 并以  $FDR < 0.05$  作为筛选条件。GO 富集分析包含 3 个部分, 细胞组分 (cellular component), 分子功能 (molecular function) 和生物过程 (biological process)。对每个部分, 按照 FDR 值由小到大排序, 选取前 15 条 GO 条目, 利用 R Version3.6.0 绘制高级气泡图, 见图 2~4。其中纵坐标为 GO 条目名称; 横坐标为富集因子, 其值为小柴胡汤中有抗肺癌作用的 71 个基因富集在该条 GO 条目上的个数与富集在该条 GO 条目上的总基因

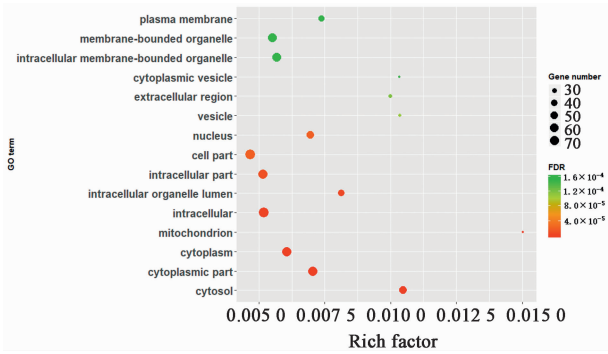


图 2 细胞组分富集的前 15 条条目  
Fig. 2 Top 15 cellular components

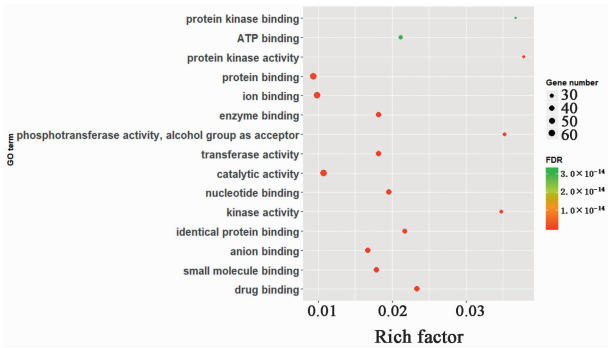


图 3 分子功能富集的前 15 条条目  
Fig. 3 Top 15 molecular functions

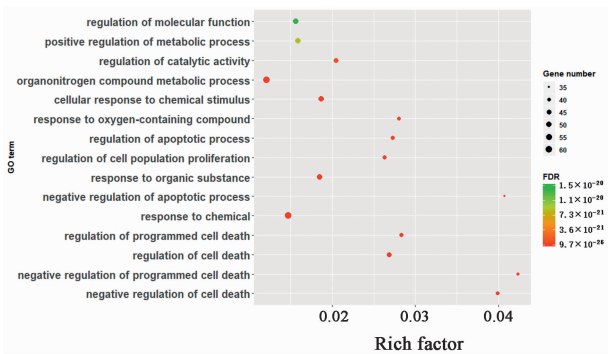


图 4 生物过程富集的前 15 条条目  
Fig. 4 Top 15 biological processes

个数的比值;气泡大小表示富集在该条 GO 条目上的基因个数,气泡越大,表示富集在该条 GO 条目上的基因个数越多;气泡颜色表示 FDR 值,气泡越红,表示该条目的 FDR 值越小。在细胞组分中 mitochondrion 的富集因子排列靠前;在分子功能中 kinase activity, phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor, protein kinase activity 和 protein kinase binding 的富集因子排名较高;在生物过程中 negative regulation of cell death, negative regulation of programmed cell death 和 negative regulation of apoptotic process 的富集因子排序较前。通过 KEGG

通路注释分析得到小柴胡汤抗肺癌作用预测靶点的通路,其中 71 个靶点参与的通路有 pathways in cancer, proteoglycans in cancer, prostate cancer, PI3K/Akt signaling pathway 等 149 条,图 5 为列举的前 15 条相关通路。通过查阅文献,149 条通路中和肺癌有关的通路有 11 条,见表 1。其中 Rich factor 表示小柴胡汤中有抗肺癌作用的 71 个基因在该条通路上的富集程度,rich factor 值越大,表示富集程度越高。

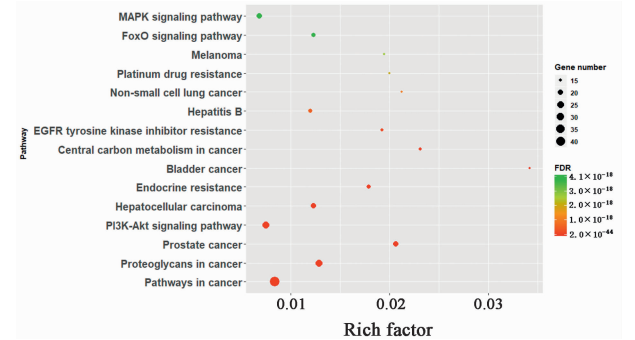


图 5 通过 KEGG 分析得到的小柴胡汤抗肺癌作用预测靶点通路  
Fig. 5 Enriched KEGG pathways of potential targets of Xiao Chaihutang

表 1 与肺癌有关的 11 条通路

Table 1 11 pathways associated with lung cancer

通路名称	富集因子	富集基因数	FDR
非小细胞肺癌	0.212 121 212	14	$1.09 \times 10^{-18}$
EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药性	0.192 307 692	15	$2.12 \times 10^{-19}$
ErbB 信号通路	0.156 626 506	13	$4.33 \times 10^{-16}$
VEGF 信号通路	0.152 542 373	9	$2.39 \times 10^{-11}$
小细胞肺癌	0.141 304 348	13	$1.23 \times 10^{-15}$
p53 信号通路	0.088 235 294	6	$1.13 \times 10^{-6}$
MAPK 信号通路	0.068 259 386	20	$4.06 \times 10^{-18}$
mTOR 信号通路	0.067 567 568	10	$1.96 \times 10^{-9}$
JAK/STAT 信号通路	0.056 25	9	$5.72 \times 10^{-8}$
Toll 样受体信号通路	0.049 019 608	5	$1.10 \times 10^{-4}$
TGF- $\beta$ 信号通路	0.036 144 578	3	$7.2 \times 10^{-3}$

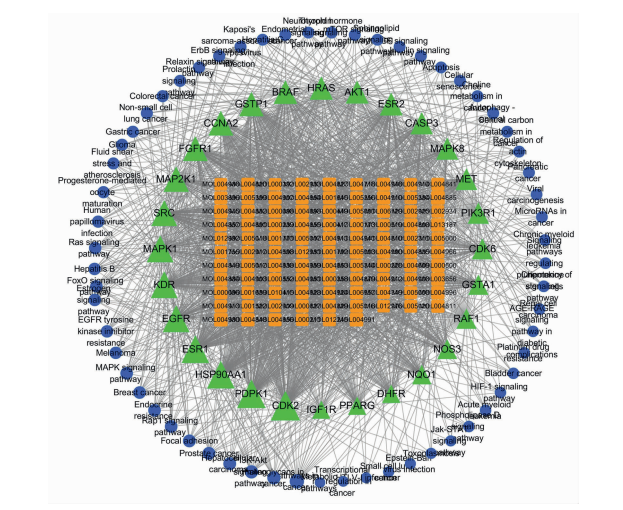
2.3 小柴胡汤活性成分-靶点-通路网络构建 利用 Cytoscape version3. 6. 0 软件构建小柴胡汤活性成分-靶点-通路网络模型,并进行拓扑网络分析。度值是网络中的重要参数,其含义为节点在网络中的边的个数。已有研究表明细胞的调控机制接近于无尺度网络,在无尺度网络下,相对较少的中心节点具有很高的度值,如果删除这些中心节点,整个网络将

无法正常运转<sup>[21]</sup>。以度值大于平均值为筛选条件,得到槲皮素,人参皂苷 Rh<sub>2</sub>, 芒柄花黄素,β-谷甾醇等 96 个重要成分, EGFR ( ERBB1, HER1 ), KDR ( VEGFR-2 ), Caspase-3, MAPK1 ( ERK2 ), MET ( 肝细胞生长因子, HFG ) 等 28 个关键靶点, non-small cell lung cancer, small cell lung cancer, ErbB signaling pathway, VEGF signaling pathway 等 61 条核心通路, 见图 6。其中节点为化合物( 橙色 ), 靶标( 绿色 ) 和通路( 蓝色 ), 边为化合物-靶标对, 靶标-相互作用靶标对和靶标-通路对。节点的大小与度值成正比, 度值越大, 节点越大。小柴胡汤中的有效活性成分广泛作用于肿瘤、炎症、免疫等相关通路, 体现了小柴胡汤多成分-多靶点-多通路的相互协调、整体相互作用达到抗癌效果的协同机制特点。这也与癌症属于复杂性疾病的理论相一致<sup>[22]</sup>。

靶点预测和通路富集发现, 槲皮素( 柴胡、大枣、甘草 )、汉黄芩素( 黄芩 )、异鼠李素( 柴胡、甘草 )、柚皮素( 甘草 ) 均作用于 ErbB 信号通路。刘涛等<sup>[24]</sup> 研究表明槲皮素能够抑制人小细胞肺癌 H446 细胞的增殖并促进其凋亡; 屈中玉等<sup>[25]</sup> 研究发现汉黄芩素通过抑制 MMP-2, APN 和 EGFR/TPK 的活性, 激活 Caspase-3 的活性, 最终对肺癌 A549 细胞的转移和凋亡产生重要作用; 朱玲等<sup>[26]</sup> 研究表明异鼠李素能抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的生长增殖, 从而诱导细胞凋亡, 达到抗癌的目的; YANG 等<sup>[27]</sup> 研究表明, 柚皮素可通过降低 EGFR 膜受体水平和阻断 EGFR 磷酸化改善言行刺激所致的气道黏液高分泌状态, 对慢性阻塞性肺病有治疗作用; 杨莉等<sup>[28]</sup> 研究发现柚皮素能够抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的增殖并诱导其凋亡。小柴胡汤中的槲皮素、汉黄芩素、异鼠李素、柚皮素通过抑制 ErbB 信号通路转导, 进而抑制肺癌细胞增殖。

VEGF 是已知作用最强的促血管形成因子之一, 在肺癌组织中均有高表达。靶向阻断 VEGF 信号转导通路能够有效抑制肿瘤血管生成, 从而抑制肿瘤的生长和转移。通过靶点预测和通路富集发现, KDR ( VEGF-2 ) 在网络中的度值最大, 且人参中的人参皂苷 Rh<sub>2</sub>, 大枣中的儿茶素作用于 VEGF 通路上。崔艳茹等<sup>[29]</sup> 研究表明人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 可降低 Lewis 肺癌小鼠瘤组织中 VEGF 蛋白的表达; 朱宝和等<sup>[30]</sup> 研究发现儿茶素中的 EGCG 可以直接抑制 VEGF 诱导的血管生成, 从而抑制肿瘤的新生血管化和肿瘤生长。因此可以推断, 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 和儿茶素可能通过抑制肿瘤组织 VEGF 蛋白表达, 抑制肿瘤细胞释放 VEGF, 从而抑制肿瘤血管生成。

p53 是一种抑癌基因, 其介导的细胞信号转导途径在细胞正常生命周期中有着重要作用。靶点预测和通路富集结果显示生姜中 6-姜酚和 6-姜烯酚作用于 p53 信号通路。相关研究发现 6-姜酚和 6-姜烯酚在多种肿瘤细胞中通过抑制细胞增殖、迁移和侵袭或通过诱导凋亡来发挥抗肿瘤活性<sup>[18-19]</sup>。6-姜烯酚通过调控基质金属蛋白酶-9 ( MMP-9 ) 和人基质金属蛋白酶组织抑制因子-1 ( TIMP-1 ) 而激发尿激酶型纤溶酶原的活性, 从而抑制癌细胞的转移。同时通过氧化应激介导 Caspase 依赖途径, 显著诱导低分化和 p53 突变的癌细胞株( 耐药基因 MDR-1 和 Bcl-2 高表达 ) 凋亡, 先诱导 ROS 产生, 耗竭细胞内谷胱甘肽 ( GSH ), 降低线粒体膜电位, 然后激活 Caspase-3/Caspase-7, 降解 DNA, 诱导细胞凋亡。



橙色. 活性成分; 绿色. 靶点; 蓝色. 通路

图 6 小柴胡汤关键成分-关键靶点-关键通路网络

Fig. 6 Important component-important target-important pathway network of Xiao Chaihutang

### 3 讨论

本研究采用“反向药效团匹配方法”对靶点进行预测和筛选, 利用 FDA, TTD, OMIM, GeneCards 等数据库及文献检索, 发现小柴胡汤中 71 个抗肺癌的相关靶点, 并对靶点进行 GO 富集分析和 KEGG 通路注释分析, 借助网络药理学方法对小柴胡汤抗肺癌的作用机制进行探讨, 阐述其多成分、多靶点、多通路的协同作用机制。

表皮生长因子受体 ( EGFR ) 是一个巨大的跨膜糖蛋白, 属于表皮生长因子受体 ( HER ) 家族, 该家族包括 HER1 ( ERBB1, EGFR ), HER2 ( ERBB2, NEU ), HER3 ( ERBB3 ) 及 HER4 ( ERBB4 ), 在亚裔非吸烟的肺腺癌患者中 EGFR 突变率超过 60%<sup>[23]</sup>。

mitogen-activated protein kinase (MAPK) 家族是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPK1 是 MAPK 家族中的一员, MAPK1 调控异常与肿瘤发生发展密切相关。另外, MAPK 与 VEGF 产生协同作用<sup>[31]</sup>。通过靶点预测和通路富集发现, 芒柄花黄素(甘草)、山柰酚(柴胡、人参、甘草)作用于 MAPK 信号通路。LIU 等<sup>[32]</sup>研究发现芒柄花黄素对癌细胞的调控作用涉及 MAPK 通路和 Akt 通路; 李爱明等<sup>[33]</sup>研究发现芒柄花黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞有增殖抑制和诱导凋亡作用; NGUYE 等<sup>[34]</sup>研究发现山柰酚通过激活 MEK/MAPK 通路抑制 A549 肺癌细胞生长, 并促使其凋亡。小柴胡汤通过芒柄花黄素、山柰酚等成分作用于 MAPK 通路来抑制肺癌细胞增殖。

TGF- $\beta$  生长因子家族在肿瘤的发生、发展和转移等方面起着重要的作用, 其可通过下调 COX-2 在 A549 人肺腺癌中的表达来抑制肺腺癌细胞的增殖<sup>[35]</sup>。靶点预测和通路富集发现, 存在于黄芩、半夏、人参、生姜、大枣中的  $\beta$ -谷甾醇作用于 TGF- $\beta$  信号通路。WANG 等<sup>[36]</sup>研究结果表明,  $\beta$ -谷甾醇可通过 TGF- $\beta$ /Smad2/3 途径诱导 A549 细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 细胞周期停滞, 进而抑制细胞增殖。

通过建立小柴胡汤活性成分-靶点-通路网络并进行网络拓扑分析发现, 小柴胡汤中的菠菜甾醇、豆甾醇、甘草宁、维斯体素等活性成分度值较高, 且作用于 EGFR, KDR, MAPK1 等关键靶点, 可为后续研究有抗肺癌作用的活性成分提供基础。

本研究通过网络药理学方法分析小柴胡汤抗肺癌的作用机制, 仍存在一些不足之处。首先, 小柴胡汤中各个成分的含量及其在体内的代谢途径并不明确, 会导致靶点预测不够准确; 其次, 在构建成分-靶点-通路网络中没有考虑成分-靶点-靶点、靶点-通路间作用关系的方向以及权重, 会影响网络构建的精确度; 最后, 得到的关键成分、靶点和通路还需要实验来进一步验证。

综上所述, 本研究通过 TCMSp, PharmMapper, TCMKD1.0, STRING, Cytoscape3.6.0 等分析预测小柴胡汤抗肺癌的靶点和通路, 并通过构建网络揭示其抗肺癌的调控机制。研究结果与现有的小柴胡汤中活性成分抗肺癌的药理作用研究一致。小柴胡汤中 7 味中药 96 个重要活性成分, 通过调控 28 个关键靶点, 作用于 61 条核心通路, 整体协同发挥抑制肿瘤生长、促使肺癌细胞凋亡的作用, 充分体现了中药多成分-多靶点-多通路的调控机制, 为进一步深入研究小柴胡汤抗肺癌的作用机制奠定了基础。

#### [参考文献]

- [1] MOKDAD A H, FOROUZANFAR M H, DAOUD F, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 387(10036): 2383-2401.
- [2] CHEN W, ZHENG R, ZENG H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Can Res*, 2015, 27(1): 2-12.
- [3] 白伟, 韩永波, 朱冬梅, 等. 中药治疗肺癌用药情况分析 [J]. *中医学报*, 2017, 32(3): 335-338.
- [4] HOPKINS A L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [5] 刘艾林, 杜冠华. 网络药理学: 药物发现的新思想 [J]. *药学报*, 2010, 45(12): 1472-1477.
- [6] 王永华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(7): 801-808.
- [7] 樊耀华, 欧海亚, 王汉裕, 等. 基于网络药理学的茵陈五苓散作用机制分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(11): 193-200.
- [8] 吴晓霞, 张立石, 高焕, 等. 基于网络药理学探讨桂枝汤解热作用机制及药效物质基础 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(15): 190-197.
- [9] ZENG L, YANG K. Exploring the pharmacological mechanism of Yanghe decoction on HER2-positive breast cancer by a network pharmacology approach [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 199(3): 68-85.
- [10] 乔荣跃, 廉滋鑫, 张永康. 和法之小柴胡汤在肿瘤治疗中的运用 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(4): 1426-1428.
- [11] 唐婷婷, 施贝德, 陈小会, 等. 小柴胡汤辅助化疗对晚期肺癌患者炎症因子与免疫功能的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(7): 1759-1761.
- [12] 罗燕, 蒋益兰, 李勇敏, 等. 柴胡皂苷 D 对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、周期及周期相关调控因子表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2019, 39(5): 572-576.
- [13] WANG X, SHEN Y, WANG S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [14] ZHANG Y, LIU Q, XING S, et al. Inhibiting effect of Endostar combined with ginsenoside Rg<sub>3</sub> on breast cancer tumor growth in tumor-bearing mice [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(2): 180-183.
- [15] HE B, GAO J, LUO X, et al. Ginsenoside Rg<sub>3</sub> inhibits

- colorectal tumor growth through the down-regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(2): 437-445.
- [16] LI Y, YANG T, LI J, et al. Inhibition of multiple myeloma cell proliferation by ginsenoside Rg<sub>3</sub> via reduction in the secretion of IGF-1 [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2222-2230.
- [17] PARK E H, KIM Y J, YAMABE N, et al. Stereospecific anticancer effects of ginsenoside Rg<sub>3</sub> epimers isolated from heat-processed American ginseng on human gastric cancer cell[J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1): 22-27.
- [18] KIM M O, LEE M H, OI N, et al. [6]-shogaol inhibits growth and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells by directly regulating Akt1/2 [J]. *Carcinogenesis*, 2014, 35(3): 683-691.
- [19] LEE H S, SEO E Y, KANG N E, et al. [6]-Gingerol inhibits metastasis of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2008, 19(5): 313-319.
- [20] WANG X, PAN C, GONG J, et al. Enhancing the enrichment of pharmacophore-based target prediction for the polypharmacological profiles of drugs[J]. *J Chem Inf Model*, 2016, 56(6): 1175-1183.
- [21] BARABASI A L, OLTVAI Z N. Network biology: understanding the cells functional organization [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(2): 101-113.
- [22] ADRIENNE N, ARUSHI V, STEPHEN P, et al. Super enhancers in cancers, complex disease, and developmental disorders [J]. *Genes*, 2015, 6(4): 1183-1200.
- [23] SHI Y, JOSEPH S A, SUMITRA T, et al. A prospective, molecular epidemiology study of EGFR mutations in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology (PIONEER) [J]. *J Thorac Oncol*, 2014, 9(2): 154-162.
- [24] 刘涛, 张雅雅, 许英艺, 等. 槲皮素对人小细胞肺癌 H446 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(2): 169-174.
- [25] 屈中玉, 王文廉, 王启船, 等. 汉黄芩素对肺癌肿瘤细胞生长和转移抑制作用机制的研究 [J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(1): 81-85.
- [26] 朱玲, 王正荣, 周黎明, 等. 异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨 [J]. *航天医学与医学工程*, 2005(5): 381-383.
- [27] YANG J, LI Q, ZHOU X D, et al. Naringenin attenuates mucous hypersecretion by modulating reactive oxygen species production and inhibiting NF- $\kappa$ B activity via EGFR-PI3K-Akt/ERK MAPKinase signaling in human airway epithelial cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1/2): 29-40.
- [28] 杨莉, 安益国, 郑建忠. 柚皮素诱导肺腺癌 A549 细胞凋亡的研究 [J]. *中国现代医药杂志*, 2014, 16(10): 19-21.
- [29] 崔艳茹, 屈飞. 人参皂苷 Rh<sub>2</sub> 对荷 Lewis 肺癌小鼠抗肿瘤作用 [J]. *肿瘤药学*, 2011, 1(5): 422-425.
- [30] 朱宝和, 詹文华, 贺德, 等. EGCG 对肿瘤生物抑制机制影响的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2008, 15(20): 1552-1556.
- [31] TAKAHASHI O, KOMAKI R, SMITH P D, et al. Combined MEK and VEGFR inhibition in orthotopic human lung cancer models results in enhanced inhibition of tumor angiogenesis, growth, and metastasis [J]. *Clin Can Res*, 2012, 18(6): 1641-1654.
- [32] LIU Y, HE J, CHEN X, et al. The proapoptotic effect of formononetin in human osteosarcoma cells: involvement of inactivation of ERK and Akt pathways [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(3): 637-645.
- [33] 李爱明, 赵惠民, 揭俊卿. 芒柄花黄素对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及上皮间质转化的抑制作用 [J]. *临床肿瘤学杂志*, 2015, 20(6): 481-486.
- [34] NGUYEN T T, TRAN E, ONG C K, et al. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK [J]. *J Cell Physiol*, 2010, 197(1): 110-121.
- [35] KANG S, MIN A, IM S A, et al. TGF- $\beta$  suppresses COX-2 expression by tristetraproline-mediated RNA destabilization in A549 human lung cancer cells [J]. *Cancer Res Treat*, 2015, 47(1): 101-109.
- [36] WANG X, LI M, HU M, et al. BAMBI overexpression together with  $\beta$ -sitosterol ameliorates NSCLC via inhibiting autophagy and inactivating TGF- $\beta$ /Smad2/3 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(5): 3046-3054.

[责任编辑 张丰丰]