

- livery kinetics for active burst release with DNA toehold switches [J]. Am Chem Soc, 2019, 141 (51): 20354-20364.
- [5] DAI X M, MA J F, CHEN N N, et al. MSNs-based nanocomposite for biofilm imaging and NIR-activated chem/photothermal/photodynamic combination therapy [J]. ACS Appl Bio Mater, 2021, 4 (3): 2810-2820.
- [6] LIU X, YANG T, HAN Y, et al. In situ growth of CuSiO_2 -based multifunctional nanotherapeutic agents for combined photodynamic/photothermal cancer therapy [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2018, 10 (37): 31008-31018.
- [7] KIM J W, JO C S, LIM W G, et al. Programmed nano-particle-loaded nanoparticles for deep-penetrating 3D cancer therapy [J]. Adv Mater, 2018, 30 (29): e1707557.
- [8] MÖLLER K, BEIN T. Talented mesoporous silica nanoparticles [J]. Chem Mater, 2017, 29 (1): 371-388.
- [9] ZHANG P H, CHENG F F, ZHOU R, et al. DNA-hybrid-gated multifunctional mesoporous silica nanocarriers for dual-targeted and microRNA-responsive controlled drug delivery [J]. Angew Chem Int Ed, 2014, 53 (9): 2371-2375.
- [10] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. Lancet, 2017, 389 (10066): 299-311.
- [11] LIU M, XU S, WANG Y, et al. PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, sensitizes lung cancer cells to treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors [J]. Oncotarget, 2016, 7 (51): 84951-84964.
- [12] WUTTKE S, LISMONT M, ESCUDERO A, et al. Positioning metal-organic framework nanoparticles within the context of drug delivery—A comparison with mesoporous silica nanoparticles and dendrimers [J]. Biomaterials, 2017, 123: 172-183.

• 基础研究 •

基于网络药理学探讨西黄丸治疗肝癌的作用机制

吴锐悦 张丽允 冯文敏 黄月萍 刘亚茹 朱亚玲

【摘要】 目的 运用网络药理学和分子对接技术探讨西黄丸治疗肝癌的潜在作用机制。方法 利用 TCMSP、化学专业数据库及 SwissTargetPrediction 数据库获取西黄丸的活性成分及靶点；从 GeneCards、NCBI、DisGeNET 及 CTD 数据库收集肝癌相关靶点，并与活性成分靶点取交集；采用 STRING 平台和 Cytoscape 软件构建靶点相互作用网络，并借助 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析；利用 CB-Dock 分子对接工具将活性成分与关键靶点进行分子对接。结果 共筛选出 205 个活性成分和 324 个与肝癌治疗相关的潜在靶点，其中包括 AR、CYP19A1、ESR1 等 61 个关键靶点；GO 和 KEGG 富集分析发现关键靶点参与凋亡过程的负调控、蛋白质磷酸化、细胞增殖的正调控等生物过程，调控 HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路等 114 条信号通路。分子对接结果显示没药甾醇 I、洋椿苦素、白藜芦醇等活性成分与关键靶点之间均有较强的结合力。结论 西黄丸通过多成分、多靶点、多通路调控肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移与凋亡，从而抑制肝癌的发生和发展。

【关键词】 西黄丸；肝癌；网络药理学；分子对接

【中图分类号】 R285.5；R735.7 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2024)02-0118-05

肝癌是常见的恶性肿瘤之一，位居我国恶性肿瘤发病谱的第 4 位和死亡谱的第 2 位^[1]，虽然外科手术治疗、化疗和免疫治疗等技术有所改善，但肝癌复发率仍然很高，且多数肝癌患者被诊断时为中晚期，错过最佳治疗时机^[2]。西黄丸是中医药抗癌的经典方剂，由中药牛黄、麝香、乳香（醋制）和没药（醋制）组成。西黄丸具有清热解毒、消肿散

结的功效，可治疗乳岩、横痃、瘰疬、痰核、流注、肺癰、小肠癰等疾病^[3]。临床观察发现，西黄丸能改善晚期肝癌患者的生活质量和临床症状^[4]，但其作用机制尚不完全明确。本研究运用网络药理学和分子对接技术，挖掘西黄丸治疗肝癌的活性成分，预测其作用靶点及相关信号通路，探讨西黄丸治疗肝癌的潜在作用机制。

作者单位：华侨大学医学院，泉州 362021

通信作者：朱亚玲，Email: zhuyaling@hqu.edu.cn

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.02.032

1 材料与方法

1.1 西黄丸化合物及活性成分筛选

采用 TCMSP (<https://tcmsp-e.com/>) 及化学专业数据库 (www.organchem.csdb.cn), 检索西黄丸中牛黄、麝香、乳香、没药 4 味中药的所有化合物。通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库获取化合物的 SMILES 分子结构, 并导入 SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) 数据库预测化合物吸收度和类药性, 从中筛选胃肠吸收度 (gastrointestinal absorption) 为 “high”, 5 种类药性参数 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) 预测结果中有 3 个以上为 “yes” 的化合物, 作为活性成分。

1.2 活性成分靶点预测

将活性成分的 SMILES 分子结构导入 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 数据库中, 选择物种为 “homo sapiens”, 依据反向药效团匹配方法预测活性成分的靶点。

1.3 肝癌相关靶点的获取

在 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)、DisGeNET (<https://www.disgenet.org>) 及 CTD (<http://ctdbase.org>) 4 个数据库中, 以 “liver cancer” “hepatoma” “hepatic carcinoma” 为关键词进行检索, 筛选各数据库中肝癌相关靶点, 与西黄丸活性成分对应靶点取交集, 得到西黄丸治疗肝癌的潜在作用靶点。

1.4 靶点相互作用网络构建

利用 STRING 平台 (<https://cn.string-db.org/>), 构建西黄丸治疗肝癌潜在靶点相互作用网络 (PPI), 选择物种 “homo sapiens”, 置信度设置为 0.4。将靶点相互作用数据导入 Cytoscape 3.9.0 软件可视化, 借助 network analyzer 插件分析网络中各节点的度 (degree) 值、接近中心性和中介中心性等拓扑指标, 筛选 3 个参数值均大于平均值的节点作为关键靶点。

1.5 富集分析

将西黄丸治疗肝癌的潜在作用靶点上传至 DAVID 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 数据库, 以 $P < 0.01$ 为差异性富集临界值, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能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, 筛选 P 值排名

靠前的生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 和信号通路进行可视化。

1.6 中药-活性成分-关键靶点-通路网络的构建

在 Excel 表中构建 “中药-活性成分” “活性成分-关键靶点” “关键靶点-通路” 的对应关系, 并将其导入 Cytoscape 软件构建西黄丸治疗肝癌的 “中药-活性成分-关键靶点-通路” 网络, 利用 network analyzer 功能进行拓扑分析, 筛选 degree 排名前 5 的活性成分和关键靶点。

1.7 分子对接分析

从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库获取活性成分的 sdf 文件, 作为对接配体。利用 RCSB PDB (<http://www.rcsb.org>) 数据库下载关键靶点 3D 结构, 作为对接受体。将对接配体和对接受体文件上传至 CB-Dock (<http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/>) 分子对接工具进行分子对接, 以结合能判断受体与配体结合力强弱, 最后使用 PyMOL 软件进行可视化。

2 结果

2.1 西黄丸活性成分及靶点的筛选

运用 TCMSP 和化学专业数据库, 检索得到 385 个化合物, 根据化合物吸收度和类药性等参数筛选获得 205 个活性成分, 其中牛黄 18 个, 麝香 36 个, 乳香 72 个, 没药 79 个。经 SwissTargetPrediction 平台预测, 去重复后得到 873 个活性成分的作用靶点。

2.2 西黄丸治疗肝癌潜在作用靶点的获取

经 GeneCards、NCBI、DisGeNET 和 CTD 数据库筛选, 删除重复值后, 共收集得到肝癌相关靶点 1 783 个, 与西黄丸活性成分靶点取交集后, 得到 324 个共同靶点, 作为西黄丸治疗肝癌的潜在作用靶点。

2.3 PPI 网络构建与分析

借助 STRING 和 Cytoscape 软件构建西黄丸治疗肝癌潜在靶点 PPI 网络, 见图 1, 网络中包括 323 个节点和 6 628 条连线, 拓扑指标分析得到 degree 值、接近中心性和中介中心性均大于平均值 (分别为 41.041、0.496、0.003) 的节点有 AKT1、ALB、TNF 等 61 个, 将其作为西黄丸治疗肝癌的关键靶点。

2.4 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对 324 个靶点进行富集分

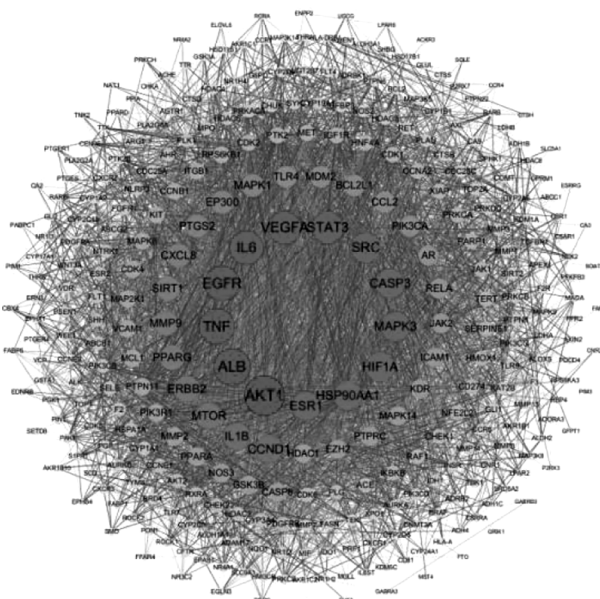
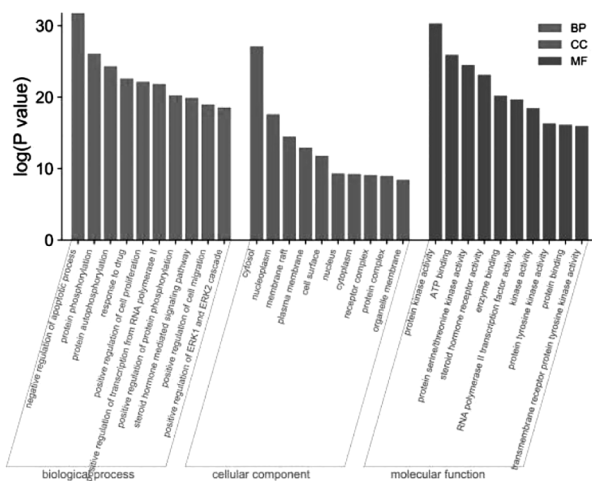


图 1 西黄丸治疗肝癌潜在靶点的 PPI 网络图



注：BP 为生物过程；CC 为细胞组分；MF 为分子功能。

图 2 西黄丸治疗肝癌的 GO 富集分析

析，GO 功能富集得到 620 个条目 ($P < 0.01$)，其中包括 458 个 BP、54 个 CC 和 108 个 MF，排名前 10 位的富集结果见图 2。结果显示，西黄丸治疗肝癌的靶点主要参与凋亡过程的负调控、蛋白质磷酸化、细胞增殖的正调控等生物过程；细胞组分为胞浆、核质、膜筏等；分子功能涉及蛋白激酶活性、ATP 结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等。KEGG 通路富集分析得到 114 条信号通路 ($P < 0.01$)，主要包括 HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、FoxO 信号通路、VEGF 信号通路等，排名前 20 的信号通路见图 3。

2.5 中药-活性成分-关键靶点-通路网络的构建与分析

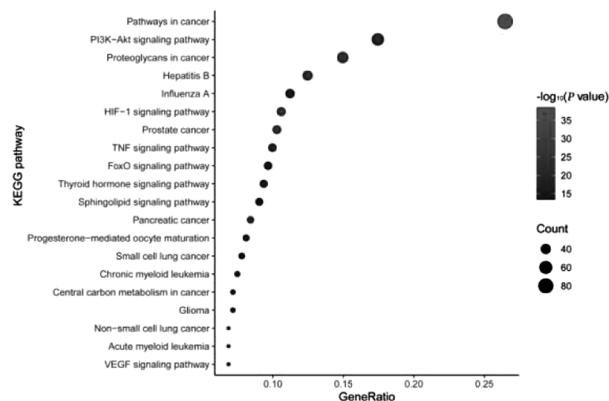


图 3 西黄丸治疗肝癌的 KEGG 通路富集分析

使用 Cytoscape 软件构建西黄丸治疗肝癌的“中药-活性成分-关键靶点-通路”网络，见图 4。该网络中包括 255 个节点，1 453 条连线，其中三角形节点为 4 味中药，圆形节点为 170 个活性成分，菱形节点为 61 个关键靶点，V 形节点为排名前 20 的信号通路，连线代表各节点之间的联络关系。根据 degree 值大小筛选出排名前 5 的活性成分有没药甾醇 I (guggulsterol-I)、洋椿苦素 (cedrelone)、白藜芦醇 (cis-resveratrol)、7 β -羟基孕甾-4-烯-3, 16-二酮 (7 β -hydroxypregn-4-ene-3, 16-dione)、桑色素 (morin) 等，排名前 5 的关键靶点包括 AR (degree = 117)、CYP19A1 (degree = 114)、ESR1 (degree = 77)、ESR2 (degree = 73)、MAPK3 (degree = 55)。

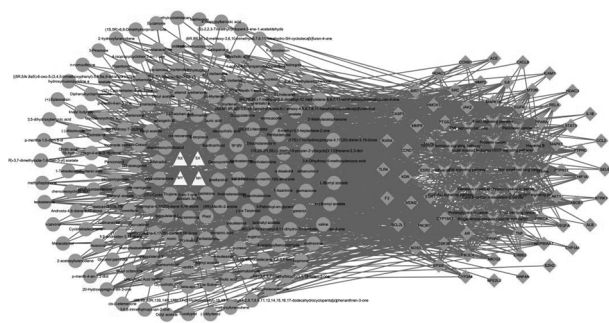


图 4 西黄丸治疗肝癌的中药-活性成分-关键靶点-通路网络

2.6 分子对接结果

一般认为配体和受体结合时，结合能越低其构象越稳定，相互作用的可能性越大。将“2.5”项下 degree 值排名前 5 的活性成分和关键靶点进行分子对接，结果见图 5，其中 AR 与 7 β -hydroxypregn-4-ene-3, 16-dione、CYP19A1 与 cedrelone、

ESR1 与 cis-resveratrol、ESR2 与 morin、MAPK3 与 cedrelone 之间具有很强的结合力。

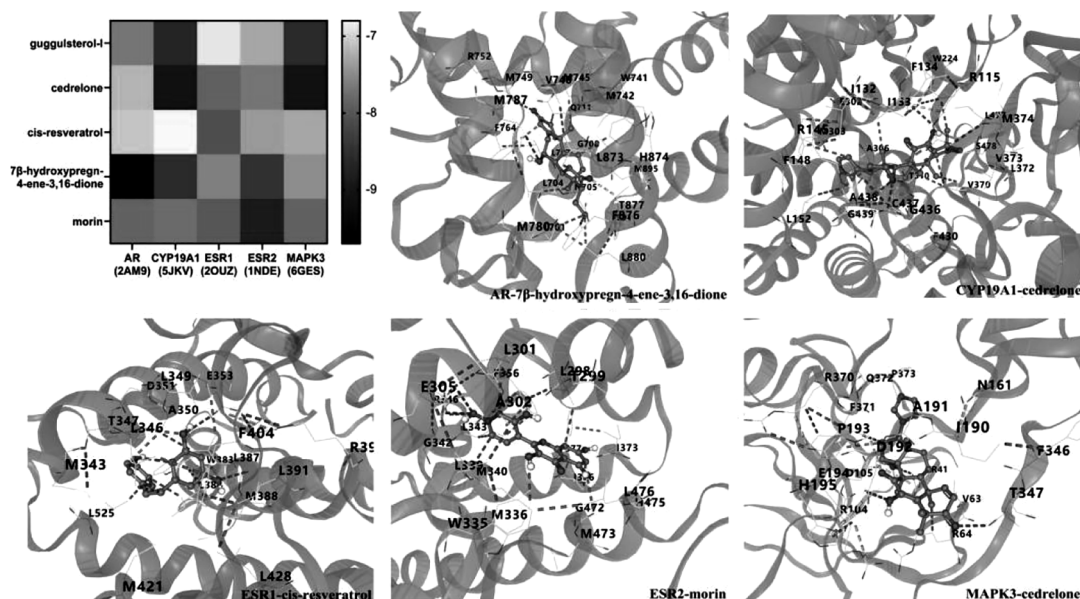


图 5 西黄丸治疗肝癌活性成分与关键靶点的分子对接结果

3 讨论

本研究通过网络药理学方筛选得到西黄丸活性成分 205 个，西黄丸治疗肝癌相关靶点 324 个，分析发现活性成分中没药甾醇 I、洋椿苦素、白藜芦醇、7β-羟基孕甾-4 烯-3, 16-二酮、桑色素等对应关键靶点数量最多，表明这些活性成分在西黄丸治疗肝癌的过程中发挥重要作用。有研究发现，洋椿苦素可通过上调肝癌组织中 PBLD 蛋白水平，激活 Ras 和 Rap1 信号通路，从而调控肝癌细胞的增殖和凋亡^[5]。白藜芦醇可以激活 p53 信号通路和抑制 PI3K/Akt 信号通路，抑制肝癌细胞增殖、侵袭和迁移，从而抑制肝癌的进展^[6]。黄酮类化合物桑色素可通过调控 PI3K/Akt 信号通路活化 GSK-3β 激酶，诱导肝癌细胞周期 G₁/S 期阻滞，促进肝癌细胞凋亡^[7-8]。此外，活性成分没药甾醇 I 和 7β-羟基孕甾-4 烯-3, 16-二酮在肝癌治疗中的作用尚未有报道，仍需大量实验进行探索验证。

GO 功能及 KEGG 通路富集分析显示，靶点主要参与凋亡过程的负调控、蛋白质磷酸化、细胞增殖的正调控等多个生物过程，调控的信号通路中 HIF-1 信号通路、VEGF 信号通路、TNF 信号通路等与肝癌细胞增殖、血管生成等过程密切相关，PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路在肝癌细胞周期、细胞凋亡等方面具有重要的调控作用，提示西黄丸治疗肝癌的潜在作用机制主要与细胞增殖、细胞周期、细胞凋亡等过程相关。

分子对接结果显示西黄丸活性成分与 AR、CYP19A1、ESR1、ESR2、MAPK3 等关键靶点均具有较强的结合力。有报道发现，原发性肝细胞癌组织中 AR 的表达水平显著增加，AR 可通过促进细胞周期进展、增加细胞氧化应激、抑制自然杀伤细胞的细胞毒性等作用，促进肝癌的发生^[9-10]。CYP19A1 编码细胞色素 P450 芳香化酶的高表达，可促进局部雌激素水平升高，进而激活 AREG 和 EGFR 介导的信号通路，参与肝细胞癌的发生和进展^[11]。ERα（由 ESR1 编码）和 ERβ（由 ESR2 编码）两个亚型的雌激素受体在肝癌、乳腺癌等各种癌症的发生和进展中发挥着重要作用。ERα 表达可使 YAP 信号通路失活，从而抑制细胞周期相关基因并抑制肝癌的进展^[12]。SERMs 通过抑制 ERβ 介导的 AKT 信号通路，抑制 TGF-α 诱导的肝癌细胞迁移^[13]。MAPK3 是 ERK/MAPK 通路中重要的信号转导分子，MAPK3 磷酸化后可调控参与细胞增殖和凋亡相关的核转录因子 c-fos、c-Jun，从而促进肝癌的发生、发展和转移^[14-15]。由此可见，关键靶点与肝癌细胞的增殖、侵袭、迁移与凋亡等密切相关，说明西黄丸活性成分可通过作用于关键靶点抑制肝癌的发生和发展。

综上所述，本研究通过整合在线数据库资源获取西黄丸活性成分与靶点，初步阐述了西黄丸多成分、多靶点、多途径治疗肝癌的作用机制，后续将通过实验深入研究西黄丸吸收入血成分中的抗癌组

分,为阐明西黄丸治疗肝癌的物质基础及新药的研
发提供线索和依据。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71 (3): 209-249.
- [2] GANESAN P, KULIK L M. Hepatocellular Carcinoma [J]. Clinics in Liver Disease, 2023, 27 (1): 85-102.
- [3] 王维德. 外科证治全生集 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 36.
- [4] 周云娣. 西黄丸辅助治疗晚期原发性肝癌效果观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2020, 13 (4): 73-75.
- [5] WU J S, NIU Q, YUAN J, et al. Novel compound cedrelone inhibits hepatocellular carcinoma progression via PBLD and Ras/Rap1 [J]. Exp Ther Med, 2019, 18 (6): 4209-4220.
- [6] ZHANG B C, YIN X N, SUI S G. Resveratrol inhibited the progression of human hepatocellular carcinoma by inducing autophagy via regulating p53 and the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B pathway [J]. Oncol Rep, 2018, 40 (5): 2758-2765.
- [7] JIANG Y, QIAN Y, HONG H, et al. Morin protects chicks with T-2 toxin poisoning by decreasing heterophil extracellular traps, oxidative stress and inflammatory response [J]. Br Poult Sci, 2023, 64 (5): 614-624.
- [8] SIVARAMAKRISHNAN V, DEVARAJ S N. Morin fosters apoptosis in experimental hepatocellular carcinogenesis model [J]. Chem Biol Interact, 2010, 183 (2): 284-292.
- [9] MONTGOMERY E J, XING E, CAMPBELL M J, et al. Constitutively active androgen receptor in hepatocellular carcinoma [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (22): 13768.
- [10] DAUKI A M, BLACHLY J S, KAUTTO E A, et al. Transcriptionally active androgen receptor splice variants promote hepatocellular carcinoma progression [J]. Cancer Res, 2020, 80 (3): 561-575.
- [11] COCCIADIFERRO L, MICELI V, GRANATA O M, et al. Merlin, the product of NF2 gene, is associated with aromatase expression and estrogen formation in human liver tissues and liver cancer cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017, 172: 222-230.
- [12] JEON Y, YOO J E, RHEE H, et al. YAP inactivation in estrogen receptor alpha-positive hepatocellular carcinoma with less aggressive behavior [J]. Exp Mol Med, 2021, 53 (6): 1055-1067.
- [13] MATSUSHIMA-NISHIWAKI R, YAMADA N, HATTORI Y, et al. SERMs (selective estrogen receptor modulator), acting as estrogen receptor β agonists in hepatocellular carcinoma cells, inhibit the transforming growth factor- α -induced migration via specific inhibition of AKT signaling pathway [J]. PLoS One, 2022, 17 (1): e0262485.
- [14] MOON H, RO S W. MAPK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. Cancers (Basel), 2021, 3 (12): 3026-3045.
- [15] HAO Y L, FANG H C, ZHAO H L, et al. The role of microRNA-1 targeting of MAPK3 in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats undergoing sevoflurane preconditioning via the PI3K/Akt pathway [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2018, 315 (3): 380-388.

• 基础研究 •

余甘露促进胃肠动力治疗食积大鼠作用机制的研究

何文慧 吴冬枝 刘楠楠 林凤飞

【摘要】 目的 探究余甘露治疗食积大鼠的作用机制。**方法** 随机将 20 只大鼠分成正常对照组、模型恢复组、阳性对照组和实验组,每组 5 只。采用猪油灌胃法构建食积大鼠模型,造模后给药 2 周,观察大鼠一般状态、体质量、进食量、胃残留率、肠推进率等变化。HE 染色法探究食积大鼠胃肠组织病理情况。ELISA 法检测各组大鼠血清中胃动素(MTL)、P 物质(SP)、胃促生长素(Ghrelin)、生长抑素(SS)和血管活性肠肽(VIP)含量变化。**结果** 造模后,与正常对照组相比,食积大鼠精神萎靡、进食量减少、胃残留率增加,小肠推进缓慢。给药后,阳性对照组和实验组的食积症状明显缓解,血清中 MTL、SP 和 Ghrelin 的含量明显增加,而 SS 和 VIP 含量明显降低。**结论** 余甘露治疗食积大鼠的作用机制可能与调节大鼠血清中 MTL、SP、Ghrelin、VIP 和 SS 的水平有关。

基金项目: 福州市科技计划项目(2020-WS-79)

作者单位: 福建省福州市第二医院骨科研究所,福州 350007

通信作者: 林凤飞, Email: 596558644@qq.com

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.02.033