

## 基于网络药理学的半夏泻心汤对治疗胃癌的作用机制

钟 婵<sup>1</sup>, 张 涛<sup>2</sup>, 黄李冰雪<sup>1</sup>, 徐文华<sup>1</sup>, 陈远能<sup>2\*</sup>

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000; 2. 广西中医药大学附属瑞康医院消化内科, 广西 南宁 530000)

**摘要:** 目的 应用网络药理学方法探讨半夏泻心汤对治疗胃癌的作用机制。方法 借助中药系统药理学分析平台收集半夏泻心汤全方7味中药的化合物及有效靶点, 运用 Cytoscape 软件构建化合物-靶点网络; 集合 Comparative Toxicogenomics Database (CTD)、GeneCards、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 三库数据筛选的疾病靶点, 与中药的有效成分进行维恩 (Venny) 分析, 确定交集靶点的靶向关系; 从 String 数据库构建靶点蛋白互作 (PPI) 网络; 利用 DAVID 数据库进行基因功能 GO 分析和 KEGG 通路富集分析。结果 获得 164 个活性化合物, 药物靶点 143 个, 疾病靶点 911 个, 交集靶点 84 个。PPI 网络涉及 84 个蛋白质节点, 关键靶点包括 JUN、TP53、MAPK1、MAPK14、MAPK3、VEGFA、IL6、ESR1、PTGS2、TNF。GO 功能分析主要与 RNA 聚合酶 II 启动子、缺氧诱导过程、药物级联反应、细胞转录的调控相关。KEGG 通路 20 条, 主要涉及癌症信号通路、肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ ) 信号通路、低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF-1) 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、FoxO (Forkhead box O) 信号通路等。结论 本研究初步预判半夏泻心汤可能通过靶向作用关键蛋白和重要通路达到防治胃癌的效用, 有望对中药复方防治胃癌提供新的证据和研究思路。

**关键词:** 半夏泻心汤; 网络药理学; 靶点; 胃癌

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)09-2496-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.09.047

半夏泻心汤出自东汉著名医学家张仲景所撰《伤寒论》, 由半夏、黄芩、黄连、炙甘草、干姜、人参、大枣七味药组成, 方中重用半夏和胃降逆止呕, 为全方之君药; 黄芩、黄连苦寒泄热; 干姜、半夏辛温散寒, 寒热并用, 辛开苦降; 更佐人参、大枣、炙甘草补益脾胃, 共达调和中焦脾胃升降之功; 本方为少阳误下成痞所设, 是辛开苦降、寒温并用、攻补兼施、调和脾胃的代表方剂<sup>[1]</sup>。因其配伍精当, 效专力宏, 故后世广泛应用于各种消化系统疾病的治疗。胃癌 (gastric cancer) 系指源于胃黏膜上皮细胞的恶性肿瘤, 以胃腺癌居多, 居全球恶性肿瘤发病率、死亡率前列。胃癌起病隐匿, 其发病是多基因、多因素、多步骤参与的复杂病理过程。诸多研究证实半夏泻心汤不仅抑制胃癌细胞的增殖、促进胃癌细胞凋亡, 还能治疗胃癌前病变、缓解化疗胃肠道反应的疗效<sup>[2-4]</sup>。由于胃癌涉及多基因的突变, 不能通过干预单一靶点而奏效, 而中药复方具有多成分、多靶点、多途径的特性, 遵从“君、臣、佐、使”的配伍原则。因此开展中药复方防治胃癌的研究显得尤为重要。由于网络药理学的兴起, 使近年来现代生物医学研究的发展飞跃, 且在分子生物学水平中引领潮流。如

今从单靶点、单药物研究模式进展为多靶点、多成分体系。网络药理学是基于“疾病-基因-靶点-药物”的相互作用网络, 善于多向, 侧重整体, 全方位识别内外刺激信号的应答, 使研发的新药的有效成分能增加靶向疾病作用的机会, 进而到达抑制肿瘤的作用。本研究通过网络药理学技术, 分析半夏泻心汤对治疗胃癌的作用机制, 深入开展半夏泻心汤防治胃癌必将为中医现代化提供坚实的证据和实验支持。

### 1 材料与方法

1.1 半夏泻心汤化合物的收集 在中药系统药理学分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology TCM-SP) 平台 (<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>) 搜索半夏泻心汤7味全方的所有化合物, 共取得 1 058 个化合物, 包括大枣 133 个、人参 190 个、干姜 148 个、黄连 48 个、黄芩 143 个、半夏 116 个、甘草 280 个, 为该中药方的活性成分奠定基础。

1.2 半夏泻心汤活性成分的筛选 根据筛选阈值口服利用度 (Oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$  和类药性 (drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ , 从半夏泻心汤7味全方中的 1 058

收稿日期: 2019-01-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81360531); 广西一流学科建设重点项目 (2018XK081)

作者简介: 钟婵 (1993—), 女, 硕士生, 从事消化系统疾病诊治研究。Tel: 15970119638, E-mail: 762099518@qq.com

\* 通信作者: 陈远能 (1964—), 男, 教授, 从事消化系统疾病诊治研究。Tel: 13768118639, E-mail: cyn60668@aliyun.com

网络出版日期: 2019-10-24

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/KCMS/detail/31.1368.R.20191024.1316.006.html>

个化合物中筛选出 211 个候选化合物, 说明这些候选化合物具有较高的活性成分。

1.3 化合物-靶点网络的构建及拓扑学性质分析 将收集的中药化合物和靶点通过 Cytoscape 3.4.0 软件 (<http://www.cytoscape.org/>) 构建化合物-靶点网络。在该网络中筛选自由度 (degree centrality, DC) 较高的节点和相应的介数 (closeness centrality, CC) 进行拓扑分析, 以明确关键的化合物或者靶点。

1.4 交集靶点的获取 结合 Comparative Toxicogenomics Database (CTD)、GeneCards、Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) 3 个数据库建立的疾病靶点, 应用 Venny2.1.0 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 软件获取中药有效成分与疾病的交集靶点, 以探究半夏泻心汤的有效成分对胃癌靶点的靶向作用。

1.5 构建半夏泻心汤靶点蛋白相互作用 (PPI) 网络 将获得的交集靶基因导入 String10.0 软件 (<http://string-db.org>),

选取置信度高于 0.9 的数据, 再将文本数据导入 Cytoscape 中进行节点大小和颜色的调整, 完整构建半夏泻心汤的作用靶点 PPI 网络, 从而知晓哪些关键蛋白在网络中起调控作用。

1.6 基因本体 (gene ontology, GO) 功能与 KEGG 通路富集分析 采用 David v 6.7 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 对交集靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, 通过 Omicshare 云平台 (<http://www.omicshare.com/>) 从 KEGG 通路富集分析中筛选出 Top20 相关信号通路。以阐明半夏泻心汤的化学成分对胃癌靶点具有一定的生物功能, 以及在相关信号通路中的起调控作用。

## 2 结果

2.1 活性化合物的筛选 根据 TCMSP 平台中 OB 和 DL 的界定值和去重处理, 本研究共纳入 164 个活性化合物(表 1)。

表 1 半夏泻心汤中含有的 164 个活性化合物基本信息

分子 ID	名称	口服利用度 /%	类药性	来源中药
M12921	硬脂碱	31.55	0.33	大枣
M12946	酸枣仁皂苷 I	32.69	0.62	大枣
M12976	香豆雌酚	32.49	0.34	大枣
M12981	daechuine S7	44.82	0.83	大枣
M12986	jujubasaponin V	36.99	0.63	大枣
M12992	mauritime D	89.13	0.45	大枣
M1454	小檗碱	36.86	0.78	大枣
M1522	乌药碱	42.35	0.24	大枣
M211	mairin	55.38	0.78	大枣
M449	豆甾醇	43.83	0.76	大枣
M358	$\beta$ -谷甾醇	36.91	0.75	大枣
M4350	黄次苷丙	36.12	0.76	大枣
M492	(+) -儿茶素	54.83	0.24	大枣
M627	千金藤啶碱	33.11	0.54	大枣
M7213	荷叶碱	34.43	0.40	大枣
M2773	$\beta$ -胡萝卜素	37.18	0.58	大枣
M96	(-) -儿茶素	49.68	0.24	大枣
M3648	山槐素	65.83	0.54	人参
M422	山柰酚	41.88	0.24	人参
M5308	aposiopolamine	66.65	0.22	人参
M5317	脱氧三尖杉酯碱	39.27	0.81	人参
M5318	石竹胺	40.45	0.20	人参
M5320	花生四烯酸	45.57	0.20	人参
M5321	frutinone A	65.90	0.34	人参
M5344	人参皂苷-Rh2	36.32	0.56	人参
M5348	人参皂苷-Rh4	31.11	0.78	人参
M5356	girinimbin	61.22	0.31	人参
M5376	人参二醇	33.09	0.79	人参
M5384	苏齐内酯	57.52	0.56	人参
M5399	alexandrin	36.91	0.75	人参
M787	富马碱	59.26	0.83	人参
M2464	1-monolinolein	37.18	0.30	干姜
M2501	[[ (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	62.52	0.31	干姜
M2514	sexangularetin	62.86	0.30	干姜
M359	谷甾醇	36.91	0.75	干姜

续表 1

分子 ID	名 称	口服利用率/%	类药性	来源中药
M2894	小檗红碱	35.74	0.73	黄连
M2903	(R)-四氢小檗碱	55.37	0.77	黄连
M2904	berlambine	36.68	0.82	黄连
M2907	山茱萸苷 A	104.95	0.78	黄连
M622	magnograndiolide	63.71	0.19	黄连
M785	palmatine	64.60	0.65	黄连
M2668	甲基黄连碱	45.83	0.87	黄连
M1689	刺槐素	34.97	0.24	黄芩
M173	汉黄芩素	30.68	0.23	黄芩
M228	(2R)-7-羟基-5-甲氧基-2-黄酮-4-one	55.23	0.20	黄芩
M2714	黄芩素	33.52	0.21	黄芩
M2909	5,7,2,5-四羟基-8,6-二甲氧基黄酮	33.82	0.45	黄芩
M2910	红花素	41.15	0.24	黄芩
M2913	二氢黄芩素	40.04	0.21	黄芩
M2914	黄烷酮	41.35	0.24	黄芩
M2915	salvigenin	49.07	0.33	黄芩
M2917	5,2',6'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮	45.05	0.33	黄芩
M2925	5,7,2',6'-四羟基黄酮	37.01	0.24	黄芩
M2927	黄芩黄酮 II	69.51	0.44	黄芩
M2928	木蝴蝶素 A	41.37	0.23	黄芩
M2932	榄核莲黄酮	76.26	0.29	黄芩
M2933	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄酮	36.56	0.27	黄芩
M2934	黄芩新素	104.34	0.44	黄芩
M2937	dihydrooroxylin	66.06	0.23	黄芩
M525	去甲汉黄芩素	39.40	0.21	黄芩
M552	5,2'-二羟基-6,7,8-三甲氧基黄酮	31.71	0.35	黄芩
M73	表儿茶素	48.96	0.24	黄芩
M1458	黄连碱	30.67	0.86	黄芩
M1490	双[(2S)-2-乙基己基]苯-1,2-二羧酸盐	43.59	0.35	黄芩
M2879	邻苯二甲酸二异辛酯	43.59	0.39	黄芩
M2897	表小檗碱	43.09	0.78	黄芩
M8206	麝香草黄酮	44.09	0.25	黄芩
M10415	11,13-二十碳二烯酸,甲酯	39.28	0.23	黄芩
M12245	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮	36.63	0.27	黄芩
M12246	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮	74.24	0.26	黄芩
M12266	rivularin	37.94	0.37	黄芩
M1755	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76	半夏
M2670	cavidine	35.64	0.81	半夏
M2776	黄芩苷	40.12	0.75	半夏
M5030	巨头鲸鱼酸	30.70	0.20	半夏
M519	松柏苷	31.11	0.32	半夏
M6936	10,13-二十碳二烯酸	39.99	0.20	半夏
M6957	(3S,6S)-3-(苄基)-6-(4-羟基苄基)哌嗪-2,5-酮	46.89	0.27	半夏
M3578	cycloartenol	38.69	0.78	半夏
M6967	$\beta$ -D-呋喃糖苷,黄嘌呤-9	44.72	0.21	半夏
M1484	inermine	75.18	0.54	甘草
M1792	食脂素	32.76	0.18	甘草
M2311	甘草酚	90.78	0.67	甘草
M239	jaranol	50.83	0.29	甘草
M2565	美迪紫檀素	49.22	0.34	甘草
M354	异鼠李素	49.60	0.31	甘草
M3656	lupiwighteone	51.64	0.37	甘草
M3896	7-甲氧基-2-甲基异黄酮	42.56	0.20	甘草
M392	芒柄花素	69.67	0.21	甘草
M417	毛蕊异黄酮	47.75	0.24	甘草

续表 1

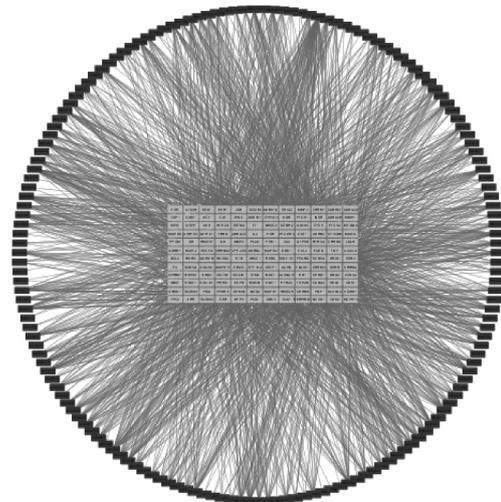
分子 ID	名称	口服利用率/%	类药性	来源中药
M4328	柚苷	59.29	0.21	甘草
M4806	euchrenone	30.29	0.57	甘草
M4808	glyasperin B	65.22	0.44	甘草
M4810	glyasperin F	75.84	0.54	甘草
M4811	glyasperin C	45.56	0.40	甘草
M4814	isotrifoliol	31.94	0.42	甘草
M4815	(E)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3-(2,2-dimethylchromen-6-yl)prop-2-en-1-one	39.62	0.35	甘草
M4820	kanzonols W	50.48	0.52	甘草
M4824	(2S)-6-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-4-methoxy-2,3-dihydrofuro[3,2-g]chromen-7-one	60.25	0.63	甘草
M4827	semilicoisoflavone B	48.78	0.55	甘草
M4828	glepidotin A	44.72	0.35	甘草
M4829	glepidotin B	64.46	0.34	甘草
M4833	菜豆异黄酮	32.01	0.45	甘草
M4835	刺果甘草查尔酮	61.60	0.19	甘草
M4838	8-(6-羟基-2-苯并呋喃)-2,2-二甲基-5-色原烯醇	58.44	0.38	甘草
M4841	甘草查尔酮 B	76.76	0.19	甘草
M4848	甘草查尔酮 G	49.25	0.32	甘草
M4849	3-(2,4-二羟基苯基)-8-(1,1-二甲酯-2-烯基)-7-羟基-5-甲氧基-香豆素	59.62	0.43	甘草
M4855	甘草利酮	63.58	0.47	甘草
M4856	gancaonin A	51.08	0.40	甘草
M4857	gancaonin B	48.79	0.45	甘草
M4863	3-(3,4-二羟基苯基)-5,7-二羟基-8-(3-甲基丁烯-2-烯基)色酮	66.37	0.41	甘草
M4864	5,7-二羟基-3-(4-甲氧基苯基)-8-(3-甲基丁烯-2-烯基)色酮	30.49	0.41	甘草
M4866	2-(3,4-二羟基苯基)-5,7-二羟基-6-(3-甲基丁烯-2-烯基)色酮	44.15	0.41	甘草
M4879	glycyrin	52.61	0.47	甘草
M4882	甘草香豆酮	33.21	0.36	甘草
M4883	菜豆异黄酮	41.61	0.42	甘草
M4884	菜豆异黄酮 B	38.93	0.55	甘草
M4885	菜豆异黄酮酮	52.47	0.54	甘草
M4891	shinpterocarpin	80.30	0.73	甘草
M4898	(E)-3-[3,4-二羟基-5-(3-甲基丁烯-2-烯基)苯基]-1-(2,4-二羟基苯基)prop-2-en-1-one	46.27	0.31	甘草
M4903	甘草苷	65.69	0.74	甘草
M4904	甘草吡喃香豆酮	80.36	0.65	甘草
M4907	glyzaglabrin	61.07	0.35	甘草
M4908	光甘草定	53.25	0.47	甘草
M4910	光甘草宁	52.90	0.31	甘草
M4911	光甘草素	46.27	0.44	甘草
M4912	光甘草酮	52.51	0.50	甘草
M4913	1,3-dihydroxy-9-methoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	48.14	0.43	甘草
M4914	1,3-dihydroxy-8,9-dimethoxy-6-benzofurano[3,2-c]chromenone	62.90	0.53	甘草
M4915	eurycarpin A	43.28	0.37	甘草
M4924	(-)-medicocarpin	40.99	0.95	甘草
M4935	sigmoidin-B	34.88	0.41	甘草
M4941	(2R)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)苯并二氢吡喃-4-one	71.12	0.18	甘草
M4945	(2S)-7-羟基-2-(4-羟基苯基)-8-(3-甲基丁烯-2-烯基)苯并二氢吡喃-4-one	36.57	0.32	甘草
M4948	异甘草酚	44.70	0.84	甘草
M4949	异甘草黄酮醇	45.17	0.42	甘草
M4957	HMO	38.37	0.21	甘草
M4959	1-methoxyphaseollidin	69.98	0.64	甘草
M4961	槲皮素 Der	46.45	0.33	甘草
M4966	3'-hydroxy-4'-O-methylglabridin	43.71	0.57	甘草
M497	甘草查尔酮 A	40.79	0.29	甘草
M4974	3'-methoxyglabridin	46.16	0.57	甘草

续表 1

分子 ID	名 称	口服利用率 / %	类药性	来源中药
M4978	2-[[ (3 <i>R</i> )-8- <i>β</i> -dimethyl-3- <i>β</i> -dihydro-2 <i>H</i> -pyrano [6,5- <i>f</i> ]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	36.21	0.52	甘草
M4980	香豆素 A	39.71	0.33	甘草
M4985	icos-5-enoic acid	30.70	0.20	甘草
M4988	kanzonol F	32.47	0.89	甘草
M4989	6-prenylated eriodictyol	39.22	0.41	甘草
M4990	7-2',4'-三羟基-5-甲氧基-3-芳基香豆素	83.71	0.27	甘草
M4991	7-乙酰氧基-2-methylisoflavone	38.92	0.26	甘草
M4993	8-prenylated eriodictyol	53.79	0.40	甘草
M4996	反二十碳烯酸	30.70	0.20	甘草
M500	vestitol	74.66	0.21	甘草
M5000	gancaonin G	60.44	0.39	甘草
M5001	gancaonin H	50.10	0.78	甘草
M5003	licoagrocarpin	58.81	0.58	甘草
M5007	glyasperins M	72.67	0.59	甘草
M5008	glycyrrhiza flavonol A	41.28	0.60	甘草
M5012	licoagroisoflavone	57.28	0.49	甘草
M5016	芳香膜菊素	49.95	0.30	甘草
M5017	phaseol	78.77	0.58	甘草
M5018	xambioona	54.85	0.87	甘草
M5020	dehydroglyasperins C	53.82	0.37	甘草
M98	槲皮素	46.43	0.28	甘草

2.2 半夏泻心化合物-靶点调控网络 由 309 个节点 (164 个化合物节点和 145 个靶点节点) 和 2 156 条边构建的化合物-靶点网络 (图 1)。在该网络中, 蓝色节点表示化合物分子, 黄色节点表示药物靶点, 每条边代表化合物与靶点之间的靶向作用关系。网络中和节点相连的边数代表一个节点的度值 (Degree)。根据 Degree 值较高的节点及对应的介数值进行拓扑学性质分析, 连接条数最多和集中较密集的化合物和靶点在该网络中起主导作用, 即最核心的化合物或者靶点 (表 2)。分析数据表明, 每个化合物的平均靶点数目为 13 个, 每个靶点平均与 15 个化合物相互作用, 由此说明半夏泻心汤具有多成分、多靶点的作用, 同时也符合中药复方的特性。从化合物来看, 有 60% 的化合物的作用靶点  $\geq 15$  个, 其中有 39 个化合物的靶点  $\geq 20$  个。甘草中的槲皮素 (M98) 的作用靶点数最高, 能与 70 个靶点蛋白发生相互作用; 人参中的山柰酚 (M422), 含有靶点蛋白 38 个; 大枣中的 Stepholidine (M627) 和黄连中的 (R)-四氢小檗碱 (M2903) 都与 27 个靶点蛋白发生相互作用。其次半夏中的 Cavidine (M2670) 和黄芩中的汉黄芩素 (M173) 皆作用于 26 个靶点蛋白。从靶点角度来看, 连接度最高的为前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin G/H synthase 2, PTGS2), 靶向 137 个化合物。紧邻的是钙调蛋白 2 (Calmodulin 2, CALM2) 靶向 100 个化合物。而凝血因子 VII (Coagulation factor VII, F7) 靶向 97 个化合物。

2.3 中药有效成分与疾病靶点的 Venny 分析 从 CTD、Genecards、OMIM 3 个数据库筛选出的 911 个胃癌相关靶点, 与半夏泻心汤的 143 个作用靶点取交集, 获得 84 个交



注: 正四边形表示化合物分子, 平行四边形表示药物靶点, 节点的大小与节点的度呈正比例关系。

图 1 半夏泻心汤化合物-靶点调控网络

集靶点 (图 2)。

2.4 半夏泻心汤靶点 PPI 网络的构建与分析 运用 String 数据库和 Cytoscape 软件共同建立了半夏泻心汤靶点 PPI 网络 (图 3)。该网络涉及 84 个蛋白质节点和 192 条连线。用节点的大小和颜色表示 Degree 值的大小, 节点越大对应的 Degree 值越大, 颜色由红变蓝对应的 Degree 值越大。用边的粗细表示 Combine score 值的大小, 边越粗 Combine score 值越大。根据 Degree  $\geq 10$  的节点制作出前 10 个关键蛋白质节点的条形图 (图 4), 其中关键节点包括 JUN、TP53、MAPK1、MAPK14、MAPK3、VEGFA、IL6、ESR1、

表2 化合物-靶点网络的关键节点及其拓扑学性质

名称	类别	介数	度值
前列腺素内过氧化物合酶 2	靶点	0.610 778 44	137
钙调蛋白 2	靶点	0.456 035 77	100
凝血因子 VII	靶点	0.434 042 55	97
雄激素受体	靶点	0.478 873 24	93
雌激素受体	靶点	0.416 326 53	90
前列腺素内过氧化物合酶 1	靶点	0.505 785 12	89
一氧化氮合成酶	靶点	0.422 068 97	86
胰蛋白酶-1	靶点	0.444 121 92	76
钠通道蛋 5 亚基	靶点	0.456 035 77	76
核受体共激活因子 2	靶点	0.450 662 74	74
槲皮素 ( M98)	化合物	0.484 177 22	70
过氧化物酶体增殖激活受体	靶点	0.429 172 51	68
细胞周期蛋白依赖性激酶 2	靶点	0.378 244 75	66
雌激素受体 β	靶点	0.367 346 94	60
糖原合成酶激酶-3β	靶点	0.369 119 42	59
丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Chk1	靶点	0.364 719 90	55
β <sub>2</sub> 肾上腺素能受体	靶点	0.427 972 03	54
细胞周期素 A2	靶点	0.361 275 09	54
二肽基肽酶 4	靶点	0.414 073 07	53
视黄酸受体 RXR-α	靶点	0.423 236 51	51
丝裂原活化蛋白激酶 14	靶点	0.360 424 03	49
肝素辅助因子 2	靶点	0.391 805 38	40
山柰酚 ( M422)	化合物	0.442 196 53	38
stepholidine ( M627)	化合物	0.414 634 15	27
( R) -canadine ( M2903)	化合物	0.413 513 51	27
α-1D 肾上腺素能受体	靶点	0.348 916 76	26
毒蕈碱乙酰胆碱受体 M1	靶点	0.369 119 42	26
乙酰胆碱酯酶	靶点	0.384 905 66	26
cavidine ( M2670)	化合物	0.412 398 92	26
汉黄芩素 ( M173)	化合物	0.416 893 73	26

PTGS2、TNF。这进一步说明这些关键蛋白是该网络的核心，掌控着整个网络的重要节点。

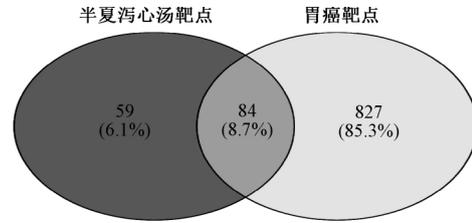


图2 中药有效成分与疾病的交集靶点

2.5 GO 富集与 KEGG 通路富集分析 将 84 个交集靶基因导入 DAVID 数据平台进行 GO 和 PATHWAY 富集分析 (图 5~7)。该富集分析过程中,共获取 213 个 GO 条目,生物过程占 143 个,分子功能占 41 个,细胞组成占 29 个。根据  $P < 0.01$ ,取排名前 10 的条目分别建立饼状图、折线图、条形图。其中生物过程涉及 RNA 聚合酶 II 启动子、药物级联反应、缺氧诱导、一氧化氮生物合成过程、DNA 结合转录因子活性的调控、DNA 模板、MAPK 信号激活、氧化还原过程、细胞转录的调控、基因表达的调控、毒性物质应答等方面;分子功能涉及酶结合、类固醇结合、药物结合、血红素结合、MAP 激酶活性、类固醇激素受体活性、蛋白质同源二聚体活性等方面;细胞组成涉及胞外间隙、线粒体、细胞膜表面、溶酶体等方面。采用 Omicshare 软件构建 PATHWAY 富集分析气泡图 (图 8),共筛选出 75 条通路,根据  $P < 0.01$ ,取排名前 20 的通路,主要涉及癌症信号通路、TNF-α 信号通路、HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路等,由此说明半夏泻心汤的化学成分可干预与这些通路来达到防治胃癌的效用。

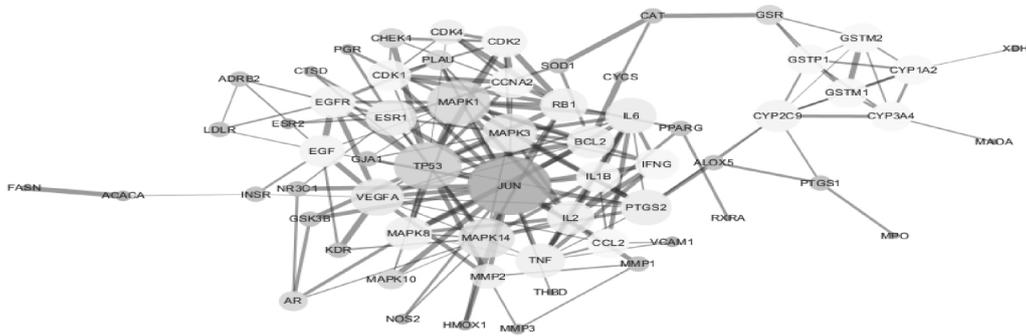


图3 半夏泻心汤靶点 PPI 网络

### 3 讨论

历代医家认为胃癌病机当责之于虚、郁、痰、瘀、毒,以痰瘀郁毒,阴伤气耗,虚实夹杂以及气郁为主要病机,与体质内虚、六淫邪毒、七情内、血瘀、痰结、湿聚、热毒等多种病理产物相互纠结,导致机体阴阳失调,脏腑、经络、气血功能障碍,日久引起病理产物聚结,留滞不去,聚而成癥而发生质的改变,伤、饮食失调、素有旧疾等因素相关;在正虚的基础上,气郁形成有形之肿块<sup>[5]</sup>。半夏泻心汤由半夏、黄芩、干姜、人参、黄连、大枣、炙甘草 7 味药组成,方中以辛温之半夏为君,散结除痞,又善降逆

止呕;臣以辛热之干姜以温中散寒,苦寒之黄芩、黄连以泄热开痞;又以人参、大枣甘温益气,以补脾虚,为佐药;使以甘草补脾和中而调诸药。全方寒热互用以和其阴阳,苦辛并进以调其升降,补泻兼施以顾其虚实。使寒去热清,升降复常。则痞满可除,呕利自愈<sup>[6]</sup>。

通过本研究 PPI 网络结果提示作用于胃癌细胞的关键靶点涉及 JUN、TP53、MAPK1、MAPK14、MAPK3、VEGFA、IL6、ESR1、PTGS2、TNF。c-JUN 是原癌基因(其蛋白为 JUN),是病毒癌蛋白 v-jun 的细胞同源物, JUN 是第一个被发现的致癌转录因子。c-JUN 对紫外线诱导的细

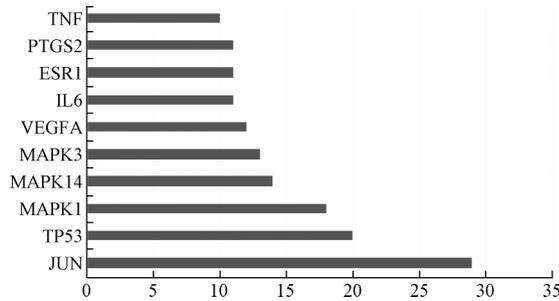


图4 PPI网络的关键蛋白节点

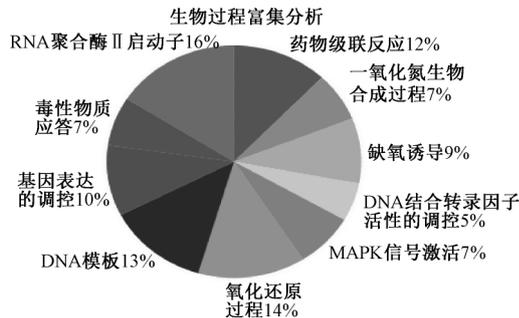


图5 生物过程富集分析

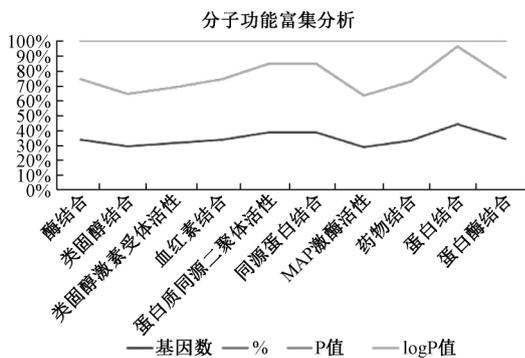


图6 分子功能富集分析

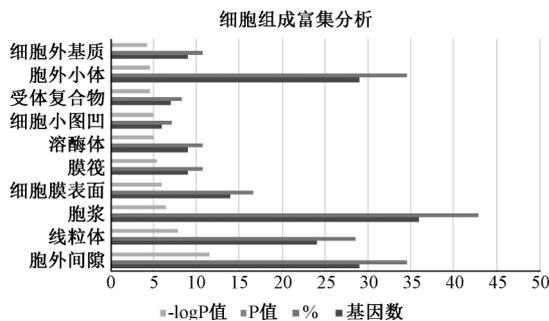


图7 细胞组成富集分析

胞凋亡有保护作用，并与 NF- $\kappa$ B 协同作用抑制了 TNF- $\alpha$  诱导的细胞凋亡<sup>[7]</sup>。肿瘤抑制基因 P53 (Tumor protein P53, TP53) 被称为“基因组的守护者”，是人类癌症中最常见的突变基因 (>50%)。当 DNA 发生持续损伤时，TP53 可以激活 DNA 修复蛋白，若无法修复，即可引发细胞凋亡 (即程序性细胞死亡)；TP53 还能将细胞周期保持在 DNA 损伤识别的 G1/S 调控点而停止生长，说明 TP53 在维持基

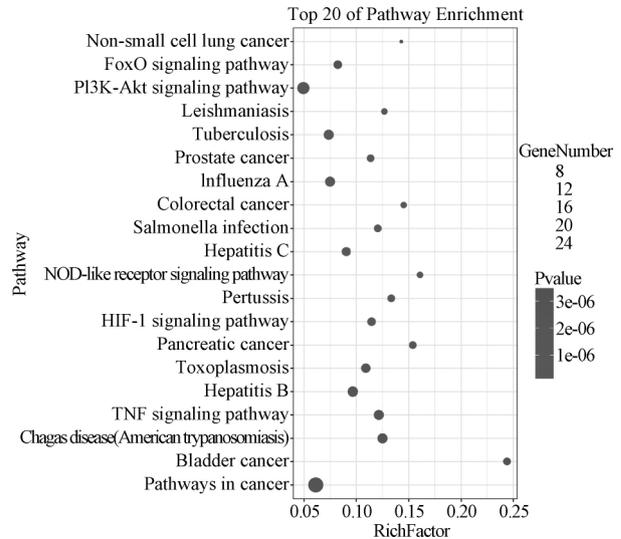


图8 Pathway 富集分析

因稳定和预防癌症形成方面起着重要的作用<sup>[8]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是一组能被不同的细胞外刺激，如细胞因子、神经递质、激素、细胞应激及细胞黏附等激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶，调节着细胞的生长、分化、对环境的应激适应、炎症反应等多种重要的细胞生理病理过程<sup>[8]</sup>。实验表明，MAPK14 和 MAPK3/1 通路具有控制恶性肿瘤的迁移和增殖<sup>[9]</sup>。前列腺素合成酶 (PTGS2) 的表达通常被称为环氧化酶 2 (COX2)，其表达受 MAPK3/1 的调节<sup>[9]</sup>。PTGS2 是前列腺素生物合成过程中的关键酶，与炎症和有丝分裂有关的前列腺素生物合成有关，与 PTGS2 相关的疾病涉及消化性溃疡疾病，PTGS2 的上调与细胞黏附增加、表型改变、抗凋亡和肿瘤血管生成有关<sup>[10]</sup>。在肿瘤细胞中，PTGS2 是前列腺素 E2 (PGE2) 产生的关键步骤，在调节细胞的运动、增殖和抗凋亡等方面起着重要的作用<sup>[11]</sup>。血管内皮生长因子 A (VEGFA) 被认为是参与肿瘤血管生成和肿瘤形成的最强有力的细胞因子，肿瘤血管生成通过调节氧气、营养物质和生长因子向肿瘤细胞的输送，在实体肿瘤的生长、侵袭和转移扩散中发挥至关重要的作用<sup>[12]</sup>。研究阐明 VEGFA 存在于不同的人胃癌细胞系上清液中，VEGFA 信号通路的激活促进了胃癌的生长和转移<sup>[13]</sup>。据报道，胃肿瘤及血液循环中 VEGF-A 水平与疾病程度、复发及生存密切相关<sup>[14]</sup>。雌激素受体 (Estrogen Receptor, ESR1) 是一种配体激活的转录因子，由激素结合、DNA 结合和转录激活有关的结构域组成，其控制许多细胞过程，包括生殖系统的生长、分化功能，骨骼的生长和维持以及心血管和神经系统的正常功能。研究发现 ESR1 具有调控细胞增殖、迁移和凋亡的作用<sup>[15]</sup>。白细胞介素 6 (Interleukin 6, IL-6) 是一种在炎症和 B 细胞成熟过程中起作用的细胞因子，胃癌组织中 M2 巨噬细胞的表达与 IL-6 的表达呈正相关<sup>[16]</sup>。肿瘤坏死因子 (Tumor Necrosis Factor, TNF) 是一种多功能的促炎细胞因子，属于 TNF 超家族。这种细胞因子参与调节广

泛的生物学过程,包括细胞增殖、分化、凋亡、脂质代谢和凝血,TNF与自身免疫性疾病、胰岛素抵抗和癌症等疾病相关<sup>[17]</sup>。由此说明半夏泻心汤的有效成分可与胃癌相关靶点相互作用,基于中药复方多成分、多靶点、多途径的优势,进一步发挥了防治胃癌的效用。根据KEGG通路分析提示胃癌相关通路涉及低氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1信号通路、TNF- $\alpha$ 信号通路等。HIF-1是对细胞低氧非常敏感的特异性转录因子,它是机体耐受低氧最重要的物质,可能与胃癌的发生有关<sup>[18]</sup>。在细胞水平上,低氧使细胞抑制氧化磷酸化水平,ATP的生成主要依赖加快糖酵解速度来实现,这样可降低细胞的氧消耗,为适应这种转变,细胞上调与糖酵解有关酶和葡萄糖转运蛋白的表达;在系统水平上,局部组织细胞低氧还可提高VEGF水平,VEGF作用在内皮细胞上,刺激新血管的形成,以维持局部氧的供应。实验表明,HIF-1 $\alpha$ 表达下调可显著抑制胃癌的恶性表型<sup>[19]</sup>,低氧诱导胃癌细胞失活,糖原合成酶激酶-3b(GSK-3b)可能通过负性调节HIF-1 $\alpha$ /VEGF信号通路而抑制胃癌血管生成和肿瘤生长<sup>[20]</sup>,胞核HIF-1 $\alpha$ 阳性与胃癌患者不良预后相关<sup>[19 21]</sup>。近期的研究还发现,TNF- $\alpha$ 所诱导的JNK途径和NF- $\kappa$ B途径具有协同性<sup>[7]</sup>,即如果抑制NF- $\kappa$ B途径则可以增强JNK的细胞凋亡反应,反之亦然。TNF- $\alpha$ 是主要的炎性细胞因子,其通过调节炎症,细胞增殖、分化、存活和死亡来维持内稳态。TNF既可诱导细胞死亡,也能促使细胞存活和促炎细胞因子的产生。TNF/TNFR1诱导至少两种细胞信号传导复合物,其中受体相关的质膜复合物(复合物I),激活NF- $\kappa$ B和MAPK以及转录和翻译;胞质复合物(复合体II),其作用是启动细胞死亡;TNFR1被刺激后,迅速募集TRADD(TNF receptor-associated death domain),TRAF2(TNF-receptor-associated factor 2),RIPK1(receptor-interacting protein)和细胞凋亡抑制剂cIAP1和cIAP2(Inhibitor of apoptosis)组装复合物I;RIPK1和复合物I的其它组分被cIAP快速泛素化;泛素(Ub)与RIPK1和复合物I组分的结合引起转化生长因子激酶1(TAK1)介导的IKK2,JNK,ERK和p38 $\alpha$ 的活化;复合物I的形成引起NF- $\kappa$ B和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的激活,其最终导致细胞因子和促生存蛋白如cFLIP[Fas-associated death domain-like interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme(FLICE)-like inhibitory protein]的产生,其是协调炎症反应所必需的;复合物I形成之后,TNF还启动基于RIPK1的胞质复合物的形成,即复合物II,复合物II通过激活caspase-8引发细胞凋亡,或通过RIPK3和MLKL,引起细胞坏死<sup>[22]</sup>。研究发现,TNF- $\alpha$ -238G/A多态性与亚洲人,特别是中国人患胃癌的风险增加有关<sup>[23]</sup>。PI3K(Phosphatidylinositol 3-kinases),是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,由调节亚基p85和催化亚基p110构成。PI3K通过两种方式激活,一种是与具有磷酸化酪氨酸残基的生长因子受体或连接蛋白相互作用,引起二聚体构象改变而被激活;另一种是通过Ras和p110直接结合导致PI3K活化,

活化的PI3K产生第二信使3,4,5-三磷酸磷脂肌醇PIP3,PIP3与细胞内含有PH结构域的信号蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)和磷酸肌醇依赖激酶(PDK1)结合,改变Akt的蛋白结构,使之移位到细胞膜,可使膜上的PDK21和PDK-2发生蛋白磷酸化,促使PDK1磷酸化的Ser308导致Akt活化。活化的Akt通过磷酸化作用激活或抑制其下游一系列底物如Bad(Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter)、Caspase9、NF- $\kappa$ B等改变,从而调节细胞的增殖、分化、凋亡以及迁移等。Rong Yan等发现LRIG1可激活EGFR/PI3K/Akt信号通路,诱导胃癌细胞凋亡。miR-4295上调EGFR、PI3K、Akt、p-PI3K和p-Akt的表达,提示miR-4295通过靶向节LRIG1(leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains 1)的表达,激活EGFR/PI3K/Akt信号通路,从而促进胃癌细胞增殖,诱导胃癌细胞凋亡<sup>[24]</sup>。FOXO转录因子家族成员包括FOXO1、FOXO3、FOXO4和FOXO6,FOXO<sup>[25]</sup>。FOXO在增殖、凋亡、分化、抗应激和代谢反应在内的多种细胞过程中起着至关重要的作用<sup>[25]</sup>。Yang等<sup>[26]</sup>,Su等<sup>[27]</sup>分别发现FOXO3和FOXO4的表达缺失与胃癌的生长和转移密切相关,可能成为胃癌治疗的潜在靶点。因此,推测半夏泻心汤活性成分可能靶向作用于上述信号通路中的关键因子从而达到治疗胃癌的目的。

综上所述,本研究通过网络药理学从系统层面来揭示半夏泻心汤治疗胃癌的药理作用机制。推测该方活性成分在缺氧诱导,细胞凋亡、周期、分化、增殖、迁移、侵袭和血管生成等环境下能发挥显著的药效。中药不以消除肿瘤为终极目的,更强调人瘤共存、改善症状的特点,但中药复方防治胃癌的客观证据及科学评价还有漫长的研究之路,由此,探讨半夏泻心汤防治胃癌的研究必将为中医药现代化提供坚实的证据和实验支持。

#### 参考文献:

- [1] 李杰,贾壮壮.半夏泻心汤临床应用研究进展[J].湖南中医杂志,2018,34(2):185-188.
- [2] 张保国,刘庆芳.半夏泻心汤现代研究与临床应用[J].中成药,2011,33(2):318-321.
- [3] 张一,王瑞平.半夏泻心汤在胃癌防治中的现代应用[J].贵阳中医学院学报,2011,33(5):130-132.
- [4] 张艳,汪永锋,刘喜平,等.半夏泻心方及其拆方配伍药组对实验性大鼠胃癌前病变胃黏膜组织病理学影响[J].甘肃中医,2007(6):69-71.
- [5] 朱金霞,周思雨.浅析胃癌的中医药治疗[J].中医临床研究,2018,10(24):107-108.
- [6] 王惠英,曹圣荣.半夏泻心汤方证探微[J].实用中医内科杂志,2017,31(9):76-79.
- [7] Yang C W, Lee Y Z, Hsu H Y, et al. c-Jun-mediated anticancer mechanisms of tylophorine[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(6):1304-1314.
- [8] Surget S, Khoury M P, Bourdon J C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective[J]. *Onco Targets Ther*, 2013, (7):57-68.

- [9] Oyeniran C , Tanfin Z. MAPK14 cooperates with MAPK3/1 to regulate endothelin-1-mediated prostaglandin synthase 2 induction and survival in leiomyoma but not in normal myometrial cells [J]. *Biol Reprod* , 2011 , 84( 3) : 495-504.
- [10] Lucido M J , Orlando B J , Vecchio A J , et al. Crystal structure of aspirin-acetylated human cyclooxygenase-2: insight into the formation of products with reversed stereochemistry [J]. *Biochemistry* , 2016 , 55( 8) : 1226-1238.
- [11] Orlando B J , Malkowski M G. Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone [J]. *J Biol Chem* , 2016 , 291 ( 29) : 15069-15081.
- [12] Macedo F , Ladeira K , Longatto-Filho A , et al. Gastric Cancer and Angiogenesis: Is VEGF a Useful Biomarker to Assess Progression and Remission [J]. *J Gastric Cancer* , 2017 , 17( 1) : 1-10.
- [13] Chen S , Zhang X , Peng J , et al. VEGF promotes gastric cancer development by upregulating CRMP4 [J]. *Oncotarget* , 2016 , 7 ( 13) : 17074-17086.
- [14] Park D J , Thomas N J , Yoon C , et al. Vascular endothelial growth factor a inhibition in gastric cancer [J]. *Gastric Cancer* , 2015 , 18( 1) : 33-42.
- [15] Kim V , Strake L , Thangarajah F , et al. ESR1-promoter-methylation status in primary breast cancer and its corresponding metastases [J]. *Clin Exp Metastasis* , 2018 , 35( 7) : 707-712.
- [16] Fu X L , Duan W , Su C Y , et al. Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression [J]. *Cancer Immunol Immunother* , 2017 , 66( 12) : 1597-1608.
- [17] Jinesh G G , Chunduru S , Kamat A M. Smac mimetic enables the anticancer action of BCG-stimulated neutrophils through TNF-alpha but not through TRAIL and FasL [J]. *J Leukoc Biol* , 2012 , 92( 1) : 233-244.
- [18] Liu H L , Liu D , Ding G R , et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and Wnt/beta-catenin signaling pathways promote the invasion of hypoxic gastric cancer cells [J]. *Mol Med Rep* , 2015 , 12( 3) : 3365-3373.
- [19] Gan L , Meng J , Xu M , et al. Extracellular matrix protein 1 promotes cell metastasis and glucose metabolism by inducing integrin beta4/FAK/SOX2/HIF-1alpha signaling pathway in gastric cancer [J]. *Oncogene* , 2018 , 37( 6) : 744-755.
- [20] Ko Y S , Cho S J , Park J , et al. Hypoxic inactivation of glycogen synthase kinase-3beta promotes gastric tumor growth and angiogenesis by facilitating hypoxia-inducible factor-1 signaling [J]. *APMIS* , 2016 , 124( 9) : 748-756.
- [21] Zhang W J , Chen C , Zhou Z H , et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha Correlates with Tumor-Associated Macrophages Infiltration , Influences Survival of Gastric Cancer Patients [J]. *J Cancer* , 2017 , 8( 10) : 1818-1825.
- [22] Gnanaprakasam J N R , Estrada-Muniz E , Vega L. The anacardic 6-pentadecyl salicylic acid induces macrophage activation via the phosphorylation of ERK1/2 , JNK , P38 kinases and NF-kappaB [J]. *Int Immunopharmacol* , 2015 , 29 ( 2) : 808-817.
- [23] Zheng W , Zhang S , Zhang S , et al. The relationship between tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and gastric cancer risk: An updated meta-analysis [J]. *Biomed Rep* , 2017 , 7( 2) : 133-142.
- [24] Yan R , Li K , Yuan D W , et al. Downregulation of microRNA-4295 enhances cisplatin-induced gastric cancer cell apoptosis through the EGFR/PI3K/Akt signaling pathway by targeting LRIG1 [J]. *Int J Oncol* , 2018 , 53( 6) : 2566-2578.
- [25] Watroba M , Maslinska D , Maslinski S. Current overview of functions of FoxO proteins , with special regards to cellular homeostasis , cell response to stress , as well as inflammation and aging [J]. *Adv Med Sci* , 2012 , 57( 2) : 183-195.
- [26] Yang X B , Zhao J J , Huang C Y , et al. Decreased expression of the FOXO3a gene is associated with poor prognosis in primary gastric adenocarcinoma patients [J]. *PLoS One* , 2013 , 8 ( 10) : e78158.
- [27] Su L , Liu X , Chai N , et al. The transcription factor FOXO4 is down-regulated and inhibits tumor proliferation and metastasis in gastric cancer [J]. *BMC Cancer* , 2014 , 14( 1) : 378.