

• 药理 •

基于网络药理学的清热化湿方治疗胃癌的药理机制研究

黄李冰雪¹ 张涛² 钟婵¹ 徐文华¹ 李昊宇¹ 陈远能^{2*}

(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, 广西 南宁 530000)

摘要 目的: 基于网络药理学技术探讨清热化湿方治疗胃癌的分子作用机制。方法: 采用中药系统药理学分析平台(TCMSP)对清热化湿方中可能的活性成分和靶点进行筛选和预测,并构建化合物-靶点网络;检索CTD数据库、GeneCards数据库及OMIM数据库获取胃癌相关靶点,构建疾病-靶点相互作用网络并进行拓扑学分析;筛选药物靶点和疾病靶点相互作用的有效靶点,利用DAVID对有效作用靶点进行GO分析及KEGG的相关通路富集分析。结果:根据 $OB \geq 30\%$ 及 $DL \geq 0.18$ 筛选出118个活性成分及116个可能蛋白靶点。应用Venn图获得54个清热化湿方有效作用靶点。GO分析得到374条富集结果,根据 $P < 0.01$ 选择靠前的富集结果;利用KEGG数据库对相关通路富集,筛选靠前的20条信号通路。结论:本研究结果验证了清热化湿方多成分、多靶点、多途径的整体调节特点,预测了清热化湿方治疗胃癌的可能作用机制,为后期实验研究提供了理论依据。

关键词 网络药理学;清热化湿方;胃癌;靶点

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1001-4454(2019)10-2375-10

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2019.10.034

Pharmacological Mechanism of Qingre Huashi Decoction in Treatment of Gastric Cancer Based on Network Pharmacology

HUANG Li-bing-xue¹ ZHANG Tao² ZHONG Chan¹ XU Wen-hua¹ LI Hao-yu¹ CHEN Yuan-neng²

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China; 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, China)

Abstract Objective: To explore the molecular mechanism of Qingre huashi decoction in the treatment of gastric cancer based on network pharmacology. Methods: Traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform(TCMSP) was used to screen and predict the possible active components and targets in Qingre huashi decoction and the compound-target network was constructed. CTD database, GeneCards database and OMIM database were searched to obtain gastric cancer-related targets, the disease-target interaction network was constructed and carried on topology analysis. The effective targets of drug-disease interaction were screened, the effective targets were analyzed by DAVID for gene ontology(GO) and KEGG related pathway enrichment analysis. Results: According to $OB \geq 30\%$ and $DL \geq 0.18$, 118 active components and 116 possible protein targets were screened. Venn map was used to obtain 54 effective targets of Qingre huashi decoction. GO analysis showed that there were 374 enrichment results, the former enrichment results were selected according to $P < 0.01$. The KEGG database was used to enrich the related pathways and to screen the top 20 signaling pathways. Conclusion: The results of this study verify the multi-component, multi-target and multi-pathway regulation characteristics of Qingre huashi decoction, predicte the possible mechanism of Qingre huashi decoction in treating gastric cancer, and provide a theoretical basis for the later experimental study.

Key words Network pharmacology; Qingre huashi decoction; Gastric cancer; Target

胃癌(Gastric cancer, GC)是最常见的消化道恶性肿瘤之一,是世界第三大癌症死亡原因⁽¹⁾。初发时多表现为上腹部不适,且无固定规律,进食后也难以缓解,不容易引起患者的重视,多数确诊时已为晚期。目前胃癌的治疗以外科手术和化疗为主,而中医药治疗因其毒副作用小、能提高患者生存质量的优势逐渐被发掘。胃癌属中医“积聚”范畴,认为“胃癌”究其病机本质而言属于“本虚标实”⁽²⁾:本虚

是以脾虚为本,标实是以湿、痰、瘀、毒、滞、食为主。相关研究认为胃癌的形成是在素体脾胃虚弱的基础上,饮食生冷、感受湿热寒邪、日久郁积引起气血运行不畅,脾胃运化呆滞,而成气滞、血瘀、食停、湿阻等。

清热化湿方为经典方“藿朴夏苓汤”加黄连、栀子化裁而成。藿朴夏苓汤出自《医原》,能宣通气机,燥湿利水,主治湿热病邪在气分而湿偏重者。方

收稿日期:2018-12-06

基金项目:国家自然科学基金(81360531);广西一流学科建设重点项目(2018XK81)

(作者简介:黄李冰雪(1992-)女,在读硕士研究生,专业方向:消化系统疾病诊治;Tel:15678839056, E-mail:794034801@qq.com, cnki.net)

*通讯作者:陈远能, Tel: 13768118639, E-mail: cyn60668@aliyun.com.

中淡豆豉、藿香芳化宣透以疏表湿,使阳不内郁;豆蔻芳香化湿;厚朴、半夏燥湿运脾,使脾能运化水湿,不为湿邪所困;杏仁开泄肺气于上,使肺气宣降,则水道自调;茯苓、猪苓、泽泻、薏苡仁淡渗利湿于下,使水道畅通,则湿有去路;佐以清热解毒之黄连、栀子,利湿又清热。全方开上、畅中、渗下,宣化表里之湿邪。清热化湿类方药对胃癌有一定的疗效,但该方治疗胃癌的物质基础及分子机制尚不明确,本研究借助网络药理学的方法来揭示清热化湿方治疗胃癌的药理机制,对指导临床用药具有重要意义。

网络药理学是集化学信息学、生物信息学、网络生物学和传统药理学于一体的综合性研究方法^[3],可从系统、整体的角度揭示中药方剂的生物活性成分及作用机制,反映中药多成分-多靶点作用关系,这与中医的整体观念和辨证论治理论一致。本研究基于网络药理学对清热化湿方的化合物、靶点蛋白及胃癌的靶点进行系统、全面的预测,构建多层次网络并分析其关联性,旨在为其用于临床治疗胃癌提供更多理论依据。

1 资料与方法

1.1 清热化湿方分子信息的收集及活性化合物的筛选 本研究采用中药系统药理学分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)(<http://lsp.nwu.edu.cn/>),以栀子、杏仁、藿香、黄连、茯苓、猪苓、半夏、淡豆豉、豆蔻、泽泻、厚朴、薏苡仁为关键词,检索清热化湿方中 12 味中药所有的化学成分。并按照推荐标准筛选化合物:口服生物利用度(Oral bioavailability,OB) ≥ 30% 和类药性(Drug-likeness,DL) ≥ 0.18,以此从 TCMSP 中筛选出具有较高活性且可能入血的成分。

1.2 清热化湿方化学成分靶点的预测和相互作用分析 通过 TCMSP 平台寻找与活性化合物相关的潜在靶点,将活性化合物与其对应靶点蛋白上传至 Cytoscape3.7.0 软件(<http://www.cytoscape.org/>)进行可视化处理,构建“化合物-靶点”网络。然后将化合物靶点导入 STRING10.5 数据库(<http://string-db.org>),以人类为研究对象,设置 medium confidence>0.900,获取蛋白互作信息,并导入 Cytoscape

软件进行可视化及网络拓扑学分析,最终绘制出蛋白相互作用网络(PPI)。根据拓扑分析中靶点连接度值(Degree)和介数中心性(Betweenness Centrality)的大小来评价清热化湿方中的关键化合物和靶点。

1.3 疾病靶点的确定 通过 CTD 数据库(Comparative Toxicogenomics Database)(<http://ctdbase.org>)、GeneCards 数据库(<https://www.GeneCards.org/>)及 OMIM 数据库(Online Mendelian Inheritance in Man)(<http://omim.org>),共搜集到与胃癌相关靶点 911 个。

1.4 清热化湿方对胃癌作用靶点的预测 利用 Venny 2.1(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)在线分析工具对清热化湿方化学成分作用靶点与胃癌相关靶点进行对比分析,以 Venn 图的形式展现药物靶点与疾病靶点存在 54 个交集靶点,并将交集靶点导入 STRING 数据库获取蛋白互作信息,将信息导入 Cytoscape 软件进行可视化及网络拓扑学分析,构建蛋白互作网络并筛选核心作用靶点。

1.5 清热化湿方对胃癌作用靶点的生物功能注释分析 将清热化湿方有效作用靶点上传至 David 6.8 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),以人类为研究对象,进行基因本体(gene ontology,GO)功能富集分析及可视化处理,包括生物过程(Biological Process, BP)、细胞成分(Cellular Component, CC)和分子功能(Molecular Function, MF)分析;同时进行基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,得到清热化湿方在胃癌中的主要作用通路,并通过 Omicshare 软件对富集分析结果进行可视化处理。

2 结果

2.1 活性化合物的筛选 通过检索 TCMSP 共收集到清热化湿方中化合物 843 个,其中包括茯苓 34 个,厚朴 139 个,栀子 98 个,半夏 116 个,黄连 48 个,藿香 94 个,泽泻 46 个,薏苡仁 38 个,猪苓 31 个,杏仁 113 个,淡豆豉 15 个,豆蔻 71 个。根据 OB ≥ 30%和 DL ≥ 0.18 为条件筛选出 133 个有效化合物,经去重共得到 118 个化合物,并将其作为候选化合物(表 1)。

表 1 清热化湿方 118 个候选化合物信息表

Mol ID	Molecule Name	OB/%	DL	来源
M001755	24-Ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76	半夏
M002670	cavidine	35.64	0.81	半夏
M002714	baicalein	33.52	0.21	半夏
M002776	baicalin	40.12	0.75	半夏

续表 1

Mol ID	Molecule Name	OB/%	DL	来源
M000358	<i>beta</i> -sitosterol	36.91	0.75	半夏
M000449	stigmasterol	43.83	0.76	半夏
M005030	gondoic acid	30.7	0.2	半夏
M000519	coniferin	31.11	0.32	半夏
M006936	10,13-eicosadienoic	39.99	0.2	半夏
M006937	12,13-epoxy-9-hydroxynonadeca-7,10-dienoic acid	42.15	0.24	半夏
M006957	(3 <i>S</i> ,6 <i>S</i>)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl)piperazine-2,5-quinone	46.89	0.27	半夏
M003578	cycloartenol	38.69	0.78	半夏
M006967	<i>beta</i> -D-Ribofuranoside, xanthine-9	44.72	0.21	半夏
M000273	(2 <i>R</i>)-2-[[3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4 <i>A</i> ,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid	30.93	0.81	茯苓
M000275	trametenolic acid	38.71	0.8	茯苓
M000276	7,9(11)-dehydropachymic acid	35.11	0.81	茯苓
M000279	cerevisterol	37.96	0.77	茯苓
M000280	(2 <i>R</i>)-2-[[3 <i>S</i> ,5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-3,16-dihydroxy-4 <i>A</i> ,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1 <i>H</i> -cyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropylhex-5-enoic acid	31.07	0.82	茯苓
M000282	ergosta-7,22 <i>E</i> -dien-3 <i>beta</i> -ol	43.51	0.72	茯苓
M000283	ergosterol peroxide	40.36	0.81	茯苓
M000285	(2 <i>R</i>)-2-[[5 <i>R</i> ,10 <i>S</i> ,13 <i>R</i> ,14 <i>R</i> ,16 <i>R</i> ,17 <i>R</i>)-16-hydroxy-3-keto-4 <i>A</i> ,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]-5-isopropylhex-5-enoic acid	38.26	0.82	茯苓
M000287	3 <i>beta</i> -Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid	38.7	0.81	茯苓
M000289	pachymic acid	33.63	0.81	茯苓
M000290	poricoic acid A	30.61	0.76	茯苓
M000291	poricoic acid B	30.52	0.75	茯苓
M000292	poricoic acid C	38.15	0.75	茯苓
M000296	hederagenin	36.91	0.75	茯苓
M000300	dehydroeburicoic acid	44.17	0.83	茯苓
M010921	estrone	53.56	0.32	杏仁
M010922	diisooctyl succinate	31.62	0.23	杏仁
M002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.2	杏仁
M002372	(6 <i>Z</i> ,10 <i>E</i> ,14 <i>E</i> ,18 <i>E</i>)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.55	0.42	杏仁
M000359	sitosterol	36.91	0.75	杏仁
M000953	CLR	37.87	0.68	杏仁
M000211	mairin	55.38	0.78	杏仁
M000492	(+)-catechin	54.83	0.24	杏仁
M002311	glycyrol	90.78	0.67	杏仁
M003410	ziziphin qt	66.95	0.62	杏仁
M004355	spinasterol	42.98	0.76	杏仁
M004841	licochalcone B	76.76	0.19	杏仁
M004903	liquiritin	65.69	0.74	杏仁
M004908	glabridin	53.25	0.47	杏仁
M005017	phaseol	78.77	0.58	杏仁
M007207	machiine	79.64	0.24	杏仁

续表 1

Mol ID	Molecule Name	OB/%	DL	来源
M012922	1-SPD	87.35	0.54	杏仁
M001323	sitosterol <i>alpha</i> 1	43.28	0.78	薏苡仁
M001494	mandenol	42	0.19	薏苡仁
M002882	[(2 <i>R</i>)-2,3-dihydroxypropyl][(Z)-octadec-9-enoate	34.13	0.3	薏苡仁
M008118	coixenolide	32.4	0.43	薏苡仁
M008121	2-Monoolein	34.23	0.29	薏苡仁
M000224	(4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-1,7-bis(3,4-dihydroxyphenyl)hepta-4,6-dien-3-one	33.06	0.31	豆蔻
M000228	(2 <i>R</i>)-7-hydroxy-5-methoxy-2-phenylchroman-4-one	55.23	0.2	豆蔻
M000230	pinocembrin	57.56	0.2	豆蔻
M000235	1,7-diphenyl-3,5-dihydroxy-1-heptene	49.01	0.18	豆蔻
M000238	1,7-diphenyl-5-hydroxy-6-hepten-3-one	32.65	0.18	豆蔻
M000239	jaranol	50.83	0.29	豆蔻
M000242	7- <i>O</i> -Methyletheriodietyl	56.56	0.27	豆蔻
M000243	alpinolide peroxide	87.67	0.19	豆蔻
M000258	dehydrodiisoeugenol	56.84	0.29	豆蔻
M000260	5-[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-7-methoxy-3-methyl-5-[(<i>E</i>)-prop-1-enyl]-2,3-dihydrobenzofuran-2-yl]-1,3-benzodioxole	65.55	0.4	豆蔻
M000006	luteolin	36.16	0.25	豆蔻
M000098	quercetin	46.43	0.28	豆蔻
M011691	6'- <i>O</i> -malonylglycitin	30.4	0.81	淡豆豉
M008400	glycitein	50.48	0.24	淡豆豉
M001454	berberine	36.86	0.78	黄连
M013352	obacunone	43.29	0.77	黄连
M002894	berberrubine	35.74	0.73	黄连
M002897	epiberberine	43.09	0.78	黄连
M002903	(<i>R</i>)-Canadine	55.37	0.77	黄连
M002904	berlambine	36.68	0.82	黄连
M002907	corchoroside A qt	104.95	0.78	黄连
M000622	magnograndiolide	63.71	0.19	黄连
M000762	palmidin A	35.36	0.65	黄连
M000785	palmatine	64.6	0.65	黄连
M001458	coptisine	30.67	0.86	黄连
M002668	worenine	45.83	0.87	黄连
M008647	moupinamide	86.71	0.26	黄连
M000830	alisol B	34.47	0.82	泽泻
M000831	alisol B monoacetate	35.58	0.81	泽泻
M000832	alisol B 2,3-acetate	32.52	0.82	泽泻
M000849	16β-methoxyalisol B monoacetate	32.43	0.77	泽泻
M000853	alisol B	36.76	0.82	泽泻
M000854	alisol C	32.7	0.82	泽泻
M000856	alisol C monoacetate	33.06	0.83	泽泻
M002464	1-Monolinolein	37.18	0.3	泽泻
M000862	[(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i>)-1-[(2 <i>R</i>)-3,3-dimethyloxiran-2-yl]-3-[(5 <i>R</i> ,8 <i>S</i> ,9 <i>S</i> ,10 <i>S</i> ,11 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[<i>a</i>]phenanthren-17-yl]butyl]acetate	35.58	0.81	泽泻
M000796	(22 <i>e</i> ,24 <i>r</i>)-ergosta-6- <i>en</i> -3 <i>beta</i> ,5 <i>alpha</i> ,6 <i>beta</i> -triol	30.2	0.76	猪苓
M000797	(22 <i>e</i> ,24 <i>r</i>)-ergosta-7,22- <i>dien</i> -3-one	44.88	0.72	猪苓

续表 1

Mol ID	Molecule Name	OB/%	DL	来源
M000798	ergosta-7 22-diene-3β-ol	43.51	0.72	猪苓
M000801	5α,8α-epidioxy-(22e,24r)-ergosta-6 22-dien-3β-ol	44.39	0.82	猪苓
M011169	peroxyergosterol	44.39	0.82	猪苓
M000816	ergosta-7 22-dien-3-one	44.88	0.72	猪苓
M000817	ergosta-5,7 22-trien-3-ol	46.18	0.72	猪苓
M000820	polyporusterone E	45.71	0.85	猪苓
M000822	polyporusterone G	33.43	0.81	猪苓
M001406	crocetin	35.3	0.26	栀子
M001663	(4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	32.03	0.76	栀子
M001941	ammidin	34.55	0.22	栀子
M004561	sudan III	84.07	0.59	栀子
M000422	kaempferol	41.88	0.24	栀子
M001506	supraene	33.55	0.42	栀子
M001942	isoimperatorin	45.46	0.23	栀子
M002883	ethyl oleate(NF)	32.4	0.19	栀子
M003095	5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	51.96	0.41	栀子
M007245	3-Methylkempferol	60.16	0.26	栀子
M009038	GBGB	45.58	0.83	栀子
M002879	diop	43.59	0.39	藿香
M005573	genkwanin	37.13	0.24	藿香
M005884	patchoulan 1,12-diol	38.17	0.25	藿香
M005890	pachypodol	75.06	0.4	藿香
M005911	5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon	51.54	0.27	藿香
M005916	irisolidone	37.78	0.3	藿香
M005918	phenanthrone	38.7	0.33	藿香
M005921	quercetin 7-O-β-D-glucoside	49.57	0.27	藿香
M005922	acanthoside B	43.35	0.77	藿香
M005923	3,23-dihydroxy-12-oleanen-28-oic acid	30.86	0.86	藿香
M005970	eucalyptol	60.62	0.32	厚朴
M005980	nearohesperidin	57.44	0.27	厚朴

2.2 清热化湿方化合物-靶点网络的构建及相互作用分析 利用 Cytoscape3.7.0 软件将 118 个化合物与对应靶点构建化合物-靶点网络(图 1),并对化合物潜在的靶点进行拓扑学分析并构建蛋白互作网络 (protein-protein interaction network, PPI network) (图 2)。化合物-靶点网络中,总共包括 214 个节点(98 个化合物节点和 116 个靶点节点)和 602 条边。其中矩形节点代表化合物,三角形节点代表化合物对应的靶点,每条边表示化合物分子与靶点之间的相互作用关系。118 个化合物中有 13 个化合物在数据库中未找到相应靶点,未参与网络构建。PPI 网络包括 78 个节点,195 条边,其中节点表示靶点蛋白,节点的大小表示与 Degree 成正比,每条边表示靶点之间的相互作用关系,边宽度与 Combine score

值成正比。网络拓扑学分析,节点平均 Degree 为 5,大于平均 Degree 的节点有 28 个;节点平均介数中心性为 0.052865,大于平均介数中心性的节点有 18 个。根据网络节点的 Degree 和介数中心性大小筛选出核心节点进行分析,获得关键化合物(泽泻醇、小檗碱、山奈酚、木犀草素、β-谷甾醇、豆甾醇、黄芩素、羌花素、鱼藤酮)及靶点 (PTGS2、AR、PTGS1、NCOA2、PGR、NR3C2、PRSS1、CTPS1、CA2、CHRM1、ACTA1、CHRM3、ESR1、SCN5A),认为这些化合物及靶点起到了桥梁作用。

2.3 清热化湿方对胃癌作用靶点的预测及相互作用分析 将清热化湿方活性化合物对应的 116 个药物靶点与胃癌对应的 911 个疾病靶点进行匹配分析并以 Venn 图形式体现,得到 54 个交集靶点,将上述

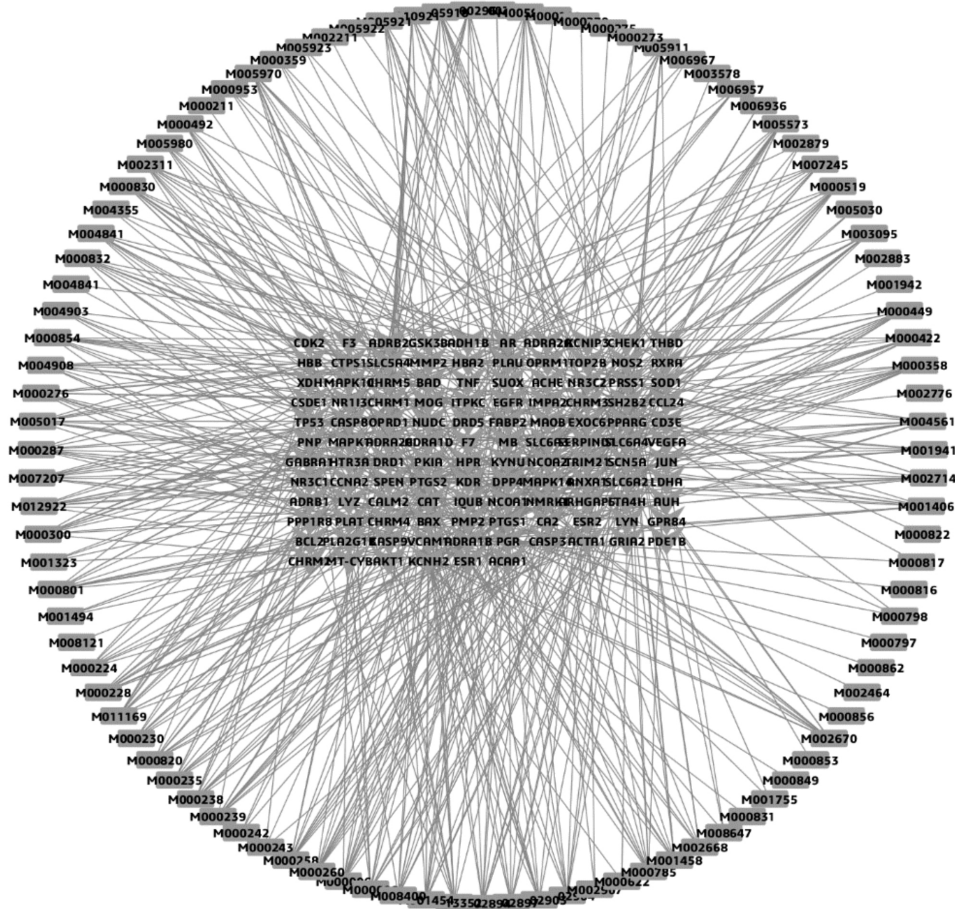


图 1 清热化湿方化合物-靶点相互作用网络

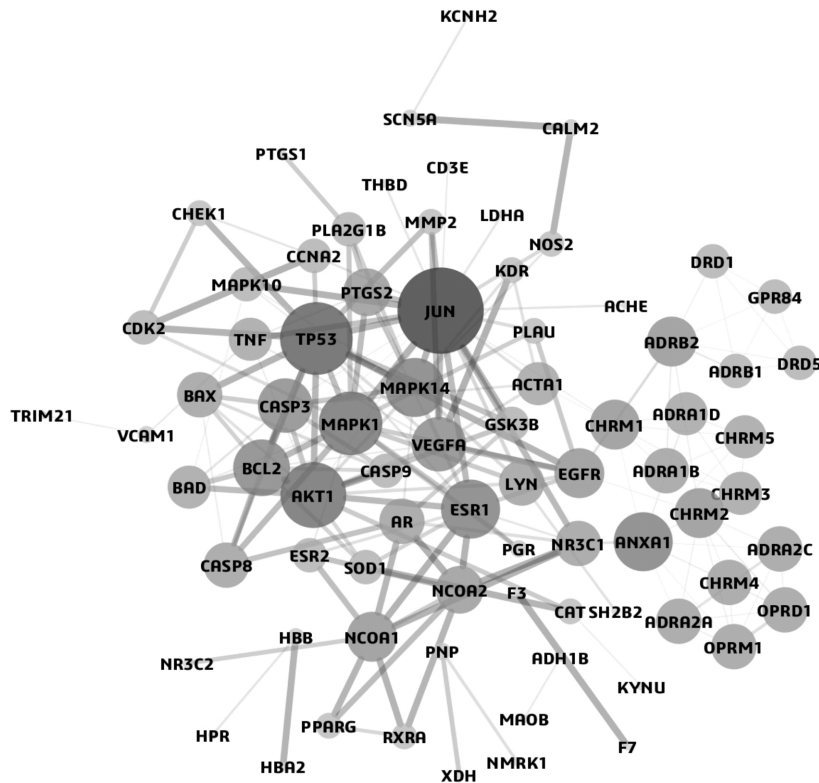


图 2 化合物潜在靶点蛋白互作网络图

信息进行可视化处理(图3)。54个交集靶点导入 STRING 数据库,设置置信度大于 0.900,剔除孤立的靶点蛋白,获取蛋白互作信息,并利用 Cytoscape 软件进行可视化及网络拓扑学分析得到清热化湿方对胃癌作用相关靶点蛋白互作网络(图4)。该网络由 43 个节点、110 边组成。网络拓扑学分析,节点平均 Degree 为 5.116279,大于平均 Degree 的节点有 13 个;节点平均介数中心性为 0.033875,大于平均介数中心性的节点有 12 个。根据网络节点的 Degree 和介数中心性筛选出 9 个核心作用靶点,分别是 JUN、TP53、AKT1、MAPK1、BCL2、MAPK14、ESR1、VEGFA、EGFR,认为这些核心作用靶点在网络中起到关键作用。

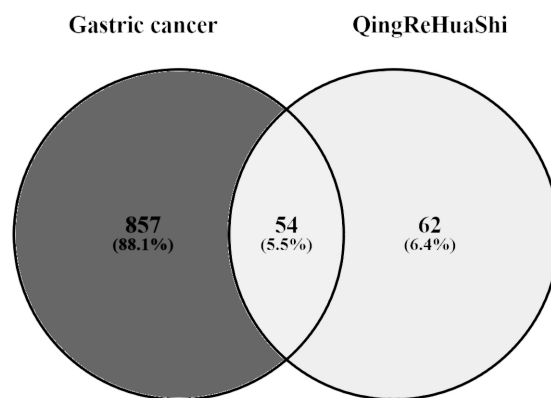


图3 清热化湿方有效成分靶点和胃癌相关靶点关系的 Venn 图

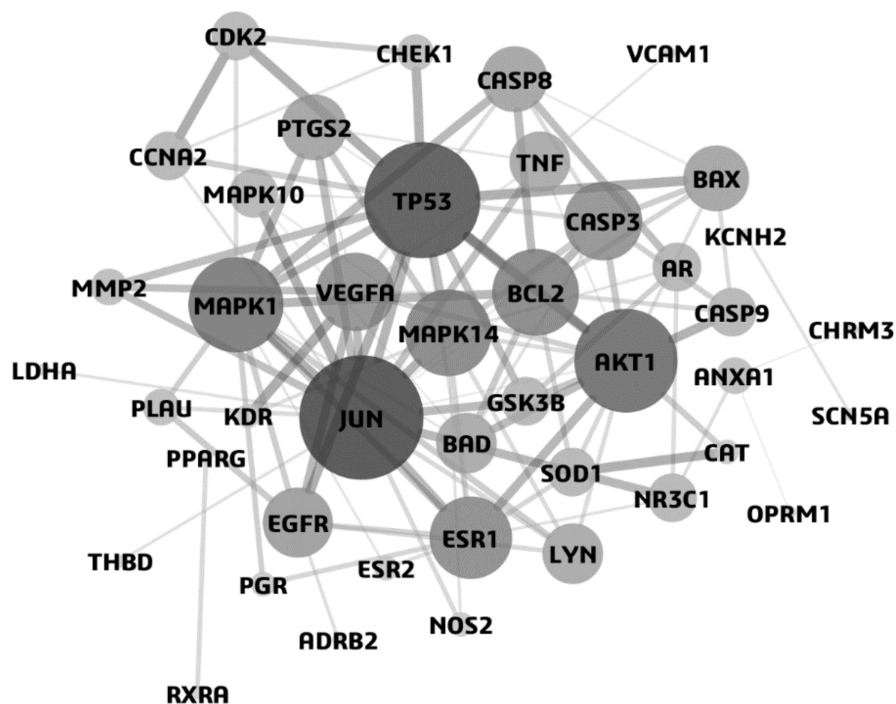


图4 清热化湿方对胃癌相关靶点蛋白互作网络图

2.4 GO 功能富集分析 利用 David 数据库对清热化湿方有效作用靶点进行 GO 功能富集分析得到 374 条富集结果,根据 Benjamini 校正法、 P value < 0.01 确定了 90 个 GO 条目:其中生物过程相关条目 60 个(图 5 列出靠前 20 条),主要涉及细胞缺氧反应、脂多糖介导的信号通路、细胞对血管内皮生长因子刺激的反应、RNA 聚合酶 II 启动子对转录的正调控、缺乏配体的外源性凋亡信号通路、凋亡过程中的负调控、一氧化氮生物合成过程的正调控等;细胞组成相关条目 9 个(图 6),主要涉及核、线粒体、胞浆、核质、蛋白质复合物、质膜、细胞表面等;分子功能相关条目 21 个(图 7 列出靠前 20 条),主要涉及酶结合、蛋白结合、类固醇激素受体活性、序列特异性

DNA 结合、蛋白酶结合、一氧化氮合酶调节活性、受体信号蛋白酪氨酸激酶活性、半胱氨酸型内肽酶活性与细胞凋亡的关系、转录因子结合等。

2.5 KEGG 通路富集分析 利用 David 数据库对

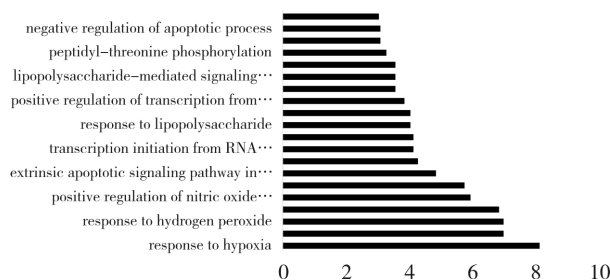


图5 清热化湿方对胃癌作用核心靶点的 20 个生物学过程分析

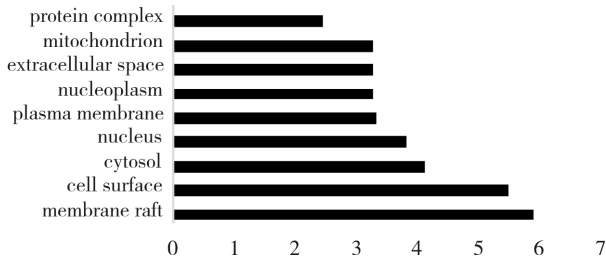


图 6 清热化湿方对胃癌作用核心靶点的 9 个细胞组成分析

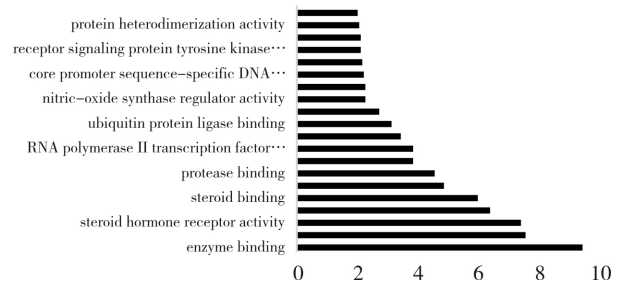


图 7 清热化湿方对胃癌作用核心靶点的 20 个分子功能分析

清热化湿方有效作用靶点进行 KEGG 通路富集分析,共富集出 91 个结果,根据 Benjamini 校正法、 P value <0.01 ,对 P value 排序后取前 20 条进行分析,并利用 Omicshare 软件对富集分析结果进行可视化处理(图 8)。KEGG 富集最显著的 20 条通路主要涉及癌症(Pathways in cancer)、结肠直肠癌(Colorectal cancer)、乙型肝炎(Hepatitis B)、前列腺癌(prostate cancer)、细胞程序性死亡(Apoptosis)、结核病

(Tuberculosis)、肿瘤中的蛋白多糖(Proteoglycans in cancer)、TNF 信号通路(TNF signaling pathway)、VEGF 信号通路(VEGF signaling pathway)、胰腺癌(Pancreatic cancer)等。大多数基因显著富集在了 Pathways in cancer、TNF signaling pathway 和 VEGF signaling pathway 通路上。

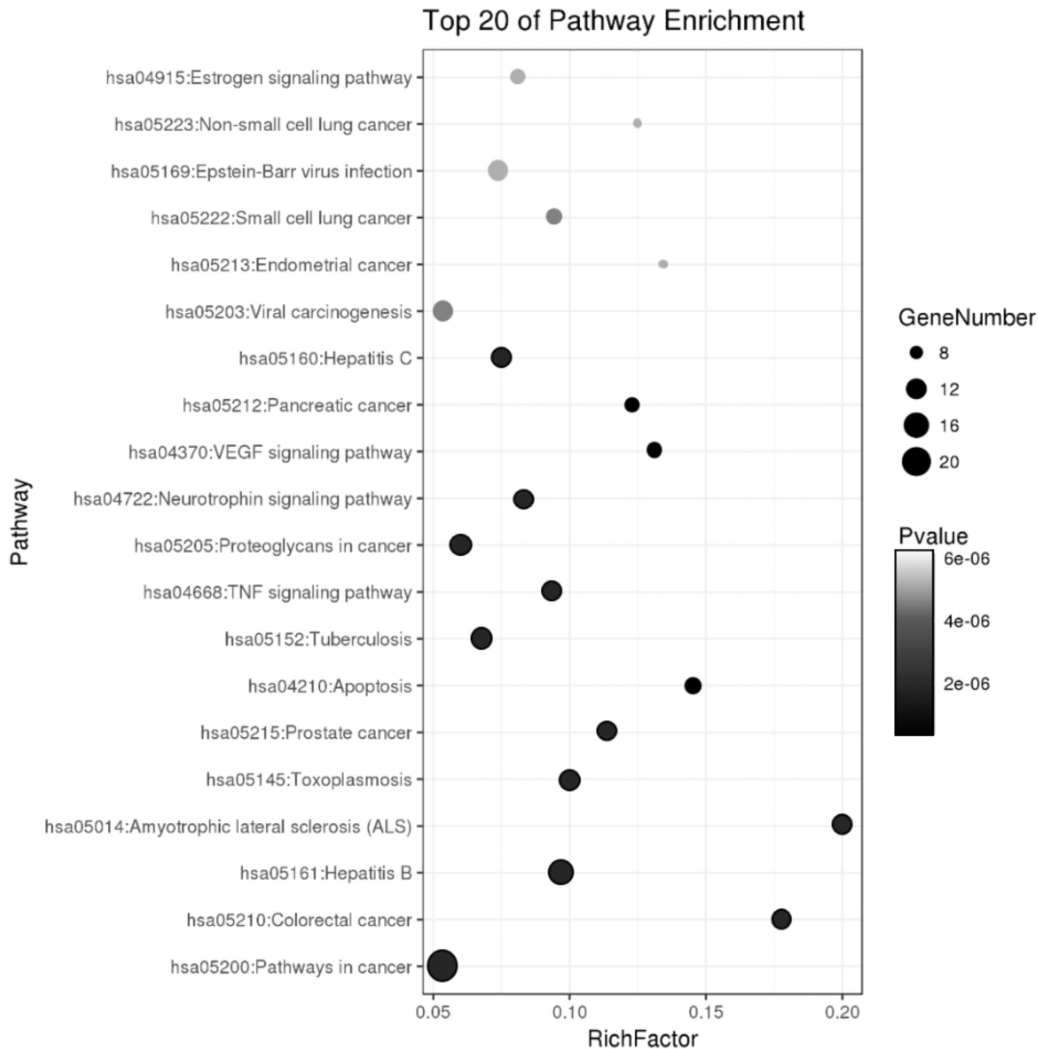


图 8 清热化湿方对胃癌作用核心靶点的 KEGG 机制分析

3 讨论

中医学认为胃癌的病机多为脾胃湿热、热毒血

瘀、气滞痰凝,导致脾胃运化失调、湿热壅盛、凝聚成块而诱发胃癌。临床上可将胃癌分为脾胃虚寒型、

肝胃不和型、痰毒内阻型、气血双亏型、胃热伤阴型、痰湿凝结型、脾肾阳虚、气阴两虚 8 类⁽⁴⁾，治疗之本为清热解暑、活血化痰、燥湿化痰。针对清热化湿方的现代药理研究表明⁽⁵⁾方中黄连、藿香等具有抗菌、抗病毒、助消化、解痉、镇痛、镇吐、调节胃肠蠕动以及抑制幽门螺杆菌等作用。本研究利用网络药理学技术，初步挖掘了清热化湿方的有效入血成分、对胃癌的核心作用靶点及可能涉及的通路，从靶点、信号通路的角度揭示清热化湿方对胃癌的疗效。

本研究系统地分析了清热化湿方中 12 味中药的有效成分，通过构建化合物-靶点图及拓扑学分析可知，泽泻醇、小檗碱、山奈酚、木犀草素、 β -谷甾醇、豆甾醇、黄芩素、荜花素、鱼藤酮等是该网络中的关键化合物。其中泽泻醇对人胃癌、结肠、卵巢细胞有抗增殖作用，可激活内源性途径诱导细胞凋亡⁽⁶⁾。小檗碱是天然的异喹啉类生物碱，具有抗炎、抗氧化、抗血管生成和抗肿瘤等多种生物学活性。相关报道⁽⁷⁾显示小檗碱可能通过下调 EGFR 蛋白的表达，使 MEK、ERK 磷酸化减少，从而抑制肿瘤细胞的侵袭和增殖。山奈酚是一种具有抗肿瘤、抗转移活性的黄酮类化合物，其可诱导 HeLa 宫颈癌细胞凋亡、降低细胞存活率、下调 PI3K/Akt 和 HTLV-I 信号通路、抑制上皮-间质转化(EMT)等⁽⁸⁾。木犀草素⁽⁹⁾是广泛存在于水果、蔬菜的一种天然黄酮，其在体内均能抑制细胞活力、诱导细胞周期阻滞、集落形成、增殖、迁移、侵袭和促进细胞凋亡；还参与调节胃癌细胞中的 PI3K、Akt、mTOR、ERK 等信号通路和 miRNAs 的表达。黄芩素⁽¹⁰⁾对人胃癌上皮 AGS 细胞具有杀伤作用，且能抑制幽门螺杆菌 VacA 基因的表达，干扰幽门螺杆菌对 AGS 细胞的粘附和侵袭能力，降低幽门螺杆菌诱导的 IL-8 的表达。鱼藤酮是一种具有多种药理活性的高氧合三萜类化合物，它参与了 LPS 介导的巨噬细胞中的抗炎作用，在转录和翻译水平上降低了促炎介质 NO、IL-6、IL-1 β 等的释放且无细胞毒性⁽¹¹⁾。

本研究对清热化湿方作用于胃癌有效靶点的 PPI 进行了网络拓扑分析，发现多个关键核心靶点，如 JUN、TP53、AKT1、MAPK1、BCL2、MAPK14、ESR1、VEGFA、EGFR。为了阐明清热化湿方如何通过这些靶点产生作用，本研究进一步做了 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析，发现清热化湿方能调节脂多糖介导的信号通路、凋亡负调控过程、细胞对血管内皮生长因子刺激反应、蛋白质磷酸化、RNA 调控等方面。KEGG 结果显示，清热化湿方的主要作用可能与 TNF signaling pathway、VEGF signa-

ling pathway 等通路有关。TNF(tumour necrosis factor)是机体炎症和免疫的重要调节因子，包括 TNF- α 和 TNF- β 。TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞、抗原提呈 T 细胞分泌，TNF- β 主要由 T 淋巴细胞产生并分泌。大量研究表明⁽¹²⁾，TNF- α 参与胃癌的发生、胃癌细胞的增殖侵袭及转移、以及新生血管的生成等多个生物学过程。Essadik 等⁽¹³⁾研究认为 TNF- α 基因启动子甲基化存在单核苷酸多态性(SNP)，例如 238G/A、308G/A、857C/T、863 C/A 和 193 G/A 等。Xu⁽¹⁴⁾等发现 TNF- α -308 GA 和 AA 基因在胃癌家系中的频率高于非胃癌家系，表明 TNF- α -308 多态性与胃癌的发生密切相关。VEGF(vascular endothelial growth factor)具有肝素结合活性，对血管内皮细胞、促进血管形成、血管通透性和肿瘤细胞增殖具有重要作用，它被认为是维持肿瘤生长的关键因子⁽¹⁵⁾。Zhang 等⁽¹⁶⁾发现乳腺肿瘤的大小与 VEGF 在肿瘤组织中的表达呈正相关，研究⁽¹⁷⁾显示 VEGF 在肿瘤生长过程中可增加血管的通透性，Liu 等⁽¹⁸⁾研究发现胃癌组织中 VEGF mRNA 和蛋白的表达明显高于非癌组织。以上数据均表明 VEGF 参与了胃癌的发生、转移和侵袭。

综上所述，本研究利用网络药理学和生物信息学方法初步验证了清热化湿方治疗胃癌的药理作用机制，这为后续的深入探讨奠定了良好的基础。网络药理学为中医药研究提供了一种新的思维方式，它是利用网络和软件分析来预测中药作用机理，但由于数据库的局限性及缺少化合物含量、代谢方面的数据分析，无法全面的揭示中药的药理作用。因此需要更多的临床试验和动物试验来进一步验证其作用机理。

参 考 文 献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA: Cancer J Clin* 2018, 68(6): 394-424.
- [2] 戴辉煌, 王常松. 从本虚论治胃癌前病变经验浅析 [J]. *天津中医药大学学报* 2017, 36(4): 251-253.
- [3] Song W, Ni S, Fu Y. Uncovering the mechanism of Maxing Ganshi Decoction on asthma from a systematic perspective: A network pharmacology study [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17362.
- [4] 张玉, 杨亚平. 胃癌病理分型及与中医证型相关性的研究综述 [J]. *陕西中医药大学学报* 2017, 40(2): 98-101.
- [5] 李晓丽, 吴长军, 阴永辉, 等. 从“湿去热孤”论藿朴夏苓汤分消上下之应用 [J]. *辽宁中医杂志* 2018, 45(11):

- 2289-2291.
- [6] Wang J ,Li H ,Wang X ,*et al.* Alisol B-23-acetate ,a tetracyclic triterpenoid isolated from *Alisma orientale* ,induces apoptosis in human lung cancer cells via the mitochondrial pathway [J].*Biochem Biophys Res Commun* ,2018 ,505(4) : 1015-1021.
- [7] Kim S ,You D ,Jeong Y ,*et al.* Berberine down-regulates IL-8 expression through inhibition of the EGFR/MEK/ERK pathway in triple-negative breast cancer cells [J].*Phyto-medicine* ,2018 ,50: 43-49.
- [8] Imran M ,Rauf A ,Shah ZA ,*et al.* Chemo-preventive and therapeutic effect of the dietary flavonoid kaempferol: A comprehensive review [J].*Phytother Res* ,2019 ,33(2) : 263-275.
- [9] Pu Y ,Zhang T ,Wang J ,*et al.* Luteolin exerts an anticancer effect on gastric cancer cells through multiple signaling pathways and regulating miRNAs [J].*J Cancer* ,2018 ,9(20) : 3669-3675.
- [10] Chen ME ,Su CH ,Yang JS ,*et al.* Baicalin ,baicalein ,and lactobacillus rhamnosus JB3 Alleviated *Helicobacter pylori* infections *in vitro* and *in vivo* [J].*J Food Science* ,2018 ,83(12) : 3118-3125.
- [11] Gao Y ,Hou R ,Liu F ,*et al.* Obacunone causes sustained expression of MKP-1 thus inactivating p38 MAPK to suppress pro-inflammatory mediators through intracellular MIF [J].*J Cell Biochem* ,2018 ,119(1) : 837-849.
- [12] Wilkie KP. Modeling the Dichotomy of the Immune Response to Cancer: Cytotoxic Effects and Tumor-Promoting Inflammation [J].*Bull Math Biol* ,2017 ,79(6) : 1426-1448.
- [13] Essadik A ,Jouhadi H ,Rhouda T ,*et al.* Polymorphisms of Tumor Necrosis Factor Alpha in Moroccan Patients with Gastric Pathology: New Single-Nucleotide Polymorphisms in TNF- α (-193) (G/A) [J].*Mediators Inflammation* , 2015 ,2015: 143941.
- [14] Xu T ,Kong Z. Relationship Between Tumor Necrosis Factor- α rs361525 Polymorphism and Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis [J].*Front Physiol* ,2018 ,9: 469.
- [15] Oh SY ,Kwon HC ,Kim SH ,*et al.* The relationship of vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and clinical outcome in advanced gastric cancer patients treated with FOLFOX: VEGF polymorphism in gastric cancer [J].*BMC cancer* ,2013 ,13: 43.
- [16] Zhang Y ,Liu J ,Lin J ,*et al.* The transcription factor GATA1 and the histone methyltransferase SET7 interact to promote VEGF-mediated angiogenesis and tumor growth and predict clinical outcome of breast cancer [J].*Oncotarget* ,2016 ,7(9) : 9859-9875.
- [17] Finley SD. Effect of tumor microenvironment on tumor VEGF during anti-VEGF treatment: systems biology predictions [J].*J Natl Cancer Inst* ,2013 ,105(11) : 802-811.
- [18] Liu D ,Wang N ,Sun Y ,*et al.* Expression of VEGF with tumor incidence ,metastasis and prognosis in human gastric carcinoma [J].*Cancer Biomark* ,2018 ,22(4) : 693-700.