

引用本文:刘亚琪,王逸骁,胡作为,等.基于网络药理学及分子对接技术探讨六味地黄丸治疗胃腺癌的作用机制研究[J].安徽医药,2021,25(6):1088-1094.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.06.007.

◇ 药学研究 ◇



## 基于网络药理学及分子对接技术探讨六味地黄丸治疗胃腺癌的作用机制研究

刘亚琪<sup>1</sup>,王逸骁<sup>2</sup>,胡作为<sup>3</sup>,郑承红<sup>3</sup>

作者单位:<sup>1</sup>武汉市中心医院中医科,湖北 武汉 430065;<sup>2</sup>襄阳市中医医院内科,湖北 襄阳 441000;

<sup>3</sup>湖北中医药大学中医临床医学院,湖北 武汉 430065

**摘要:** **目的** 探讨六味地黄丸治疗胃腺癌的有效成分及其靶点的作用机制。**方法** 本研究通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索六味地黄丸中所有有效成分信息以及相关靶点,并运用 Genecard、OMIM、TTD、Drugbank、DisGeNET 数据库检索胃腺癌相关靶点,将疾病靶点与药物靶点进行比对,得出六味地黄丸治疗胃腺癌的相关靶点。利用 Metascape 数据库,对获取的靶点进行基因本体(GO)富集和京都基因和基因组数据库(KEGG)富集分析,并将有效靶点、通路导入 Cytoscape 3.6.2 构建网络图进行分析,再使用 Autodock1.1.2 软件对核心化合物与关键靶点进行分子对接。**结果** 通过筛选,六味地黄丸共有 69 个有效成分和 156 个与疾病相关的靶点;JUN、MAPK1、IL-6、AKT1、MAPK8、VEGFA、MYC、ESR1、EGF、HSP90AA1、RELA、FOS、EGFR、CCND1、AR、MMP9、STAT1、IL1B、PPARG、PTGS2 是六味地黄丸抗胃腺癌的核心靶点。根据核心靶点筛选,发现六味地黄丸抗胃腺癌主要成分为槲皮素、山柰酚、薯蓣皂苷和四氢鸭脚木碱。将 156 个靶点通过 GO 富集发现其涉及细胞毒性、氧化应激、代谢、凋亡等多个方面,共得的 36 条通路,涉及肿瘤、代谢、免疫、信号转导、细胞凋亡等多个方面,其中肿瘤信号通路、晚期糖基化终末产物-糖基化终末产物受体(AGE-RAGE)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路是其发挥功能的主要通路。**结论** 六味地黄丸可通过多成分、多靶点、多通路治疗胃腺癌。槲皮素、山柰酚、薯蓣皂苷和四氢鸭脚木碱可能是其中比较重要的 4 个成分,肿瘤信号通路、AGE-RAGE 信号通路和 TNF 信号通路可能是本方发挥重要作用的 3 个通路。

**关键词:** 胃肿瘤; 槲皮素; 六味地黄丸; 网络药理学; 分子对接

### Network pharmacology and molecular docking on mechanism of *Liuwei Dihuang* pill in the treatment of gastric adenocarcinoma

LIU Yaqi<sup>1</sup>, WANG Yixiao<sup>2</sup>, HU Zuwei<sup>3</sup>, ZHENG Chenghong<sup>3</sup>

Author Affiliations:<sup>1</sup>Department of Traditional Chinese Medicine, Wuhan Central Hospital, Wuhan, Hubei 430065,

China;<sup>2</sup>Xiangyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xiangyang, Hubei 441000, China;

<sup>3</sup>Clinical Medical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the effective components and target mechanism of *Liuwei Dihuang* pill in the treatment of gastric adenocarcinoma. **Methods** This study used Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) to retrieve the information of all active ingredients and related targets in *Liuwei Dihuang* pill. Genecard, OMIM, TTD, Drugbank, DisGeNET database were used to retrieve the related targets of gastric adenocarcinoma. The disease targets with drug targets were compared, and the relevant targets of *Liuwei Dihuang* pill in the treatment of gastric adenocarcinoma were obtained. Metascape database was used to analyze Gene Ontology (GO) enrichment and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment, then the effective targets and pathways were imported into Cytoscape 3.6.2 to construct the network, the Autodock1.1.2 software was used to perform molecular docking between the core compound and the key target. **Results** There were 69 active components and 156 disease-related targets in *Liuwei Dihuang* pill. JUN, MAPK1, IL-6, AKT1, MAPK8, VEGFA, MYC, ESR1, EGF, HSP90AA1, RELA, FOS, EGFR, CCND1, AR, MMP9, STAT1, IL1B, PPARG, PTGS2 were the core targets of *Liuwei Dihuang* pill against gastric adenocarcinoma. According to the screening of core target, the main components of *Liuwei Dihuang* pill against gastric adenocarcinoma were quercetin, kaempferol, diosgenin and tetrahydrotetractylamine. The 156 targets were found to be involved in cell toxicity, metabolism, apoptosis, oxidative stress, etc by GO enrichment. The 36 pathway involved in the cancer, metabolism, immunity, signal transduction, apoptosis and others. The cancer signaling pathways, advanced glycation end product - receptor of AGE (AGE-RAGE) signal pathway, and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway were the main KEGG pathway. **Conclusions** *Liuwei Dihuang* pill can treat

gastric adenocarcinoma with multiple components, multiple targets and multiple pathways. In addition, quercetin, kaempferol, diosgenin and tetrachloridine may be the four important components, and cancer signaling pathway, AGE-RAGE signaling pathway and TNF signaling pathway may play an important role.

**Key words:** Stomach neoplasms; Quercetin; *Liuwei Dihuang* pill; Network pharmacology; Molecular docking

胃腺癌是最具侵袭性的恶性肿瘤之一,被认为是全球第五大常见癌症和第三大癌症死亡原因<sup>[1]</sup>,胃腺癌预后不佳,目前手术治疗仍是其主要治疗手段,虽然放疗、化疗、免疫治疗、靶向治疗改善了胃腺癌病人的预后,但晚期胃腺癌病人的中位生存期仍不超过12个月<sup>[2]</sup>,由于其治疗手段的局限性,且部分病人难以耐受手术及放化疗,西医治疗带来的副反应等一系列问题,越来越多的胃腺癌病人寻求中医治疗<sup>[3]</sup>。六味地黄丸是以“三补三泻”为特征的滋阴补肾的名方,胃腺癌病人由于手术耗气伤阴或肿瘤在体内长期消耗,或各种治疗引起正气亏损,阴血不足,最终导致胃阴不足,机体虚弱,无以耐受治疗及肿瘤的消耗。肾之气阴是一身元阴元阳的根本,滋阴补肾,从先天之本养后天消耗之气阴,培本固元,可对胃腺癌病人起到积极的效果。临床研究显示,六味地黄丸可抑制多种肿瘤细胞的活性,且可改善晚期胃癌病人生存质量,延长其生存期<sup>[4-5]</sup>。

网络药理学是一种基于系统生物学的理论,对选取的特点信号节点(Nodes)进行的多靶点药物分子设计及分析的新学科<sup>[6]</sup>。目前多数网络药理学研究的是单药或对药成分,很少有针对性对中药复方的研究,因此,本研究采用网络药理学研究方法,对六味地黄丸抗胃腺癌的主要有效成分、靶点及通路进行系统阐述,以期后续实验及临床用药提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药物化学成分的构建** 依托中药系统药理学分析平台(TCMSP)(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)<sup>[7]</sup>检索六味地黄丸中(熟地黄、牡丹皮、泽泻、山茱萸、山药、茯苓)所有化学成分信息,其中熟地黄有关的化学成分76个,丹皮有关的化学成分55个,泽泻有关的化学成分46个,山茱萸有关的化学成分226个,山药有关的化学成分71个,茯苓有关的化学成分34个。

**1.2 口服利用度(OB)和类药性(DL)筛选** 药物化学成分筛选选择OB≥30%,DL≥0.18作为有效成分的筛选条件,通过条件筛选,共有69个化学成分符合条件,其中熟地黄2个,牡丹皮11个,泽泻10个,山茱萸20个,山药16个,茯苓15个,其中相同的化合物有5个,故共有69个有效成分。

**1.3 药物靶点及疾病靶点的建立** 通过TCMSP平

台寻找69个有效成分对应的靶点。并在Genecard(<https://www.genecards.org/>)、OMIM(<https://omim.org/>)<sup>[8]</sup>、TTD(<http://db.idrblab.net/ttd/>)<sup>[9]</sup>、Drugbank(<https://www.drugbank.com/>)<sup>[10]</sup>、DisGeNET(<https://www.disgenet.org/>)<sup>[11]</sup>数据库中检索胃腺癌相关靶点并进行整合,从而构建胃腺癌相关靶点集合。

**1.4 药物靶点及疾病靶点的匹配** 将筛选后的药物有效成分所对应的靶点与疾病相关靶点进行匹配,匹配所得靶点在STRING数据库<sup>[12]</sup>(<https://string-db.org/>)中建立蛋白质相互作用(PPI)网络图。同时运用Cytoscape3.6.2<sup>[13]</sup>(<http://www.cytoscape.org/>)进行药物成分、靶点之间的网络拓扑分析。

**1.5 功能富集分析与通路分析** 为了说明中药有效成分对应的预测靶点在基因功能和通路中的作用,依托生物学信息注释数据库Metascape<sup>[14]</sup>(<http://metascape.org>),以 $P<0.01$ 作为具有统计学差异的筛选条件,对获取的靶点进行基因本体(GO)富集和京都基因和基因组数据库(KEGG)通路注释分析。并将药物疾病靶点及KEGG通路导入Cytoscape3.6.2软件中进行分析。

**1.6 分子对接** 通过pubchem网站(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)检索获取核心化合物的3D结构,采用AutoDock vina1.1.2软件对PPI网络中 degree 前5的靶点蛋白与其原配体及核心化合物进行分子对接。通过对接分数值(docking score)对成分与靶点之间的结合活性进行评价。

**1.7 统计学方法** OB(口服生物利用度)使用TCMSP内部软件OBioavail 1.1计算,OB≥30%是确定生物活性分子作为治疗药物的指标。DL(类药性)用于评估预期化合物的“类药”程度,化合物的“类药”水平为0.18,这是传统中草药中“类药”化合物的选择标准<sup>[15]</sup>。KEGG及GO富集过程中的 $P$ 值是基于超几何分布计算的,以 $P<0.01$ 作为差异有统计学意义的筛选条件<sup>[16]</sup>。分子对接AutoDock软件评价受体和配体之间的匹配情况,结合能≤-5.0 kcal/mol为分子与靶点结合性较好<sup>[17]</sup>。

## 2 结果

**2.1 六味地黄丸有效成分** 通过在TCMSP数据库内检索,获得全方中的药物化学成分共508个,将508个化学成分根据OB≥30%,DL≥0.18的标准进行筛选后共得到69个有效成分,见表1。

表1 六味地黄丸有效成分列表

| 中药 | 编号        | 化学成分                                                                                                                                                                     | 口服<br>利用<br>度/% | 类药<br>性 | 中药  | 编号        | 化学成分                                                             | 口服<br>利用<br>度/% | 类药<br>性 |
|----|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|-----|-----------|------------------------------------------------------------------|-----------------|---------|
| 熟地 | MOL000359 | sitosterol                                                                                                                                                               | 36.91           | 0.75    | 山药  | MOL005438 | campesterol                                                      | 37.58           | 0.71    |
|    | MOL000449 | Stigmasterol                                                                                                                                                             | 43.83           | 0.76    |     | MOL005435 | 24-Methylcholest-5-en-3 $\beta$ -O-glucopyranoside <sub>qt</sub> | 37.58           | 0.72    |
| 丹皮 | MOL001925 | paeoniflorin <sub>qt</sub>                                                                                                                                               | 68.18           | 0.40    |     | MOL000449 | Stigmasterol                                                     | 43.83           | 0.76    |
|    | MOL000211 | Mairin                                                                                                                                                                   | 55.38           | 0.78    |     | MOL005440 | Isofucosterol                                                    | 43.78           | 0.76    |
|    | MOL000359 | sitosterol                                                                                                                                                               | 36.91           | 0.75    |     | MOL005465 | AIDS180907                                                       | 45.33           | 0.77    |
|    | MOL000422 | kaempferol                                                                                                                                                               | 41.88           | 0.24    |     | MOL000546 | diosgenin                                                        | 80.88           | 0.81    |
|    | MOL000492 | (+)-catechin                                                                                                                                                             | 54.83           | 0.24    |     | MOL005458 | Dioscoreside C <sub>qt</sub>                                     | 36.38           | 0.87    |
|    | MOL007003 | benzoyl paeoniflorin                                                                                                                                                     | 31.14           | 0.54    | 山茱萸 | MOL001494 | Mandenol                                                         | 42              | 0.19    |
|    | MOL007369 | 4-O-methylpaeoniflorin <sub>qt</sub>                                                                                                                                     | 67.24           | 0.43    |     | MOL001495 | Ethyl linolenate                                                 | 46.1            | 0.20    |
|    | MOL007374 | 5-[[5-(4-methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid                                                                                                                | 43.44           | 0.30    |     | MOL001771 | poriferast-5-en-3 $\beta$ -ol                                    | 36.91           | 0.75    |
|    | MOL007382 | mudanpioside-h <sub>qt</sub> 2                                                                                                                                           | 42.36           | 0.37    |     | MOL002879 | Diop                                                             | 43.59           | 0.39    |
|    | MOL007384 | paeonidanin <sub>qt</sub>                                                                                                                                                | 65.31           | 0.35    |     | MOL002883 | Ethyl oleate (NF)                                                | 32.4            | 0.19    |
| 茯苓 | MOL000098 | quercetin                                                                                                                                                                | 46.43           | 0.28    |     | MOL003137 | Leucanthoside                                                    | 32.12           | 0.78    |
|    | MOL000273 | (2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-6-methylhept-5-enoic acid   | 30.93           | 0.81    |     | MOL000358 | beta-sitosterol                                                  | 36.91           | 0.75    |
|    | MOL000275 | trametenolic acid                                                                                                                                                        | 38.71           | 0.80    |     | MOL000359 | sitosterol                                                       | 36.91           | 0.75    |
|    | MOL000276 | 7,9(11)-dehydropachymic acid                                                                                                                                             | 35.11           | 0.81    |     | MOL000449 | Stigmasterol                                                     | 43.83           | 0.76    |
|    | MOL000279 | Cerevisterol                                                                                                                                                             | 37.96           | 0.77    |     | MOL005360 | malkangunin                                                      | 57.71           | 0.63    |
|    | MOL000280 | (2R)-2-[(3S,5R,10S,13R,14R,16R,17R)-3,16-dihydroxy-4,4,10,13,14-pentamethyl-2,3,5,6,12,15,16,17-octahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropylhex-5-enoic acid | 31.07           | 0.82    |     | MOL005481 | 2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene               | 33.4            | 0.24    |
|    | MOL000282 | ergosta-7,22E-dien-3 $\beta$ -ol                                                                                                                                         | 43.51           | 0.72    |     | MOL005486 | 3,4-Dehydrolycopen-16-al                                         | 46.64           | 0.49    |
|    | MOL000283 | Ergosterol peroxide                                                                                                                                                      | 40.36           | 0.81    |     | MOL005489 | 3,6-Digalloylglucose                                             | 31.42           | 0.66    |
|    | MOL000285 | (2R)-2-[(5R,10S,13R,14R,16R,17R)-16-hydroxy-3-keto-4,4,10,13,14-pentamethyl-1,2,5,6,12,15,16,17-octahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]-5-isopropylhex-5-enoic acid     | 38.26           | 0.82    |     | MOL005503 | Cornudentanone                                                   | 39.66           | 0.33    |
|    | MOL000287 | 3 $\beta$ -Hydroxy-24-methylene-8-lanostene-21-oic acid                                                                                                                  | 38.7            | 0.81    |     | MOL005530 | Hydroxygenkwanin                                                 | 36.47           | 0.27    |
|    | MOL000289 | pachymic acid                                                                                                                                                            | 33.63           | 0.81    |     | MOL005531 | Telocinobufagin                                                  | 69.99           | 0.79    |
|    | MOL000290 | Poricoic acid A                                                                                                                                                          | 30.61           | 0.76    |     | MOL008457 | Tetrahydroalstonine                                              | 32.42           | 0.81    |
|    | MOL000291 | Poricoic acid B                                                                                                                                                          | 30.52           | 0.75    |     | MOL000554 | gallic acid-3-O-(6'-O-galloyl)-glucoside                         | 30.25           | 0.67    |
|    | MOL000292 | poricoic acid C                                                                                                                                                          | 38.15           | 0.75    |     | MOL005552 | gemin D                                                          | 68.83           | 0.56    |
|    | MOL000296 | hederagenin                                                                                                                                                              | 36.91           | 0.75    |     | MOL005557 | lanosta-8,24-dien-3-ol,3-acetate                                 | 44.3            | 0.82    |
|    | MOL000300 | dehydroeburicoic acid                                                                                                                                                    | 44.17           | 0.83    | 泽泻  | MOL000359 | sitosterol                                                       | 36.91           | 0.75    |
|    | MOL001559 | piperlonguminine                                                                                                                                                         | 30.71           | 0.18    |     | MOL000830 | Alisol B                                                         | 34.47           | 0.82    |

续表1 六味地黄丸有效成分列表

|           |                         |       |      |           |                                                                                                                                                                                              |       |      |
|-----------|-------------------------|-------|------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|------|
| MOL005463 | Methylcimicifugoside_qt | 31.69 | 0.24 | MOL000831 | Alisol B monoacetate                                                                                                                                                                         | 35.58 | 0.81 |
| MOL001736 | (-)-taxifolin           | 60.51 | 0.27 | MOL000832 | alisol, b, 23-acetate                                                                                                                                                                        | 32.52 | 0.82 |
| MOL005429 | hancinol                | 64.01 | 0.37 | MOL000849 | 16 $\beta$ -methoxyalisol B monoacetate                                                                                                                                                      | 32.43 | 0.77 |
| MOL000322 | Kadsurenone             | 54.72 | 0.38 | MOL000853 | alisol B                                                                                                                                                                                     | 36.76 | 0.82 |
| MOL000310 | Denudatin B             | 61.47 | 0.38 | MOL000854 | alisol C                                                                                                                                                                                     | 32.7  | 0.82 |
| MOL005430 | hancinone C             | 59.05 | 0.39 | MOL000856 | alisol C monoacetate                                                                                                                                                                         | 33.06 | 0.83 |
| MOL005461 | Doradexanthin           | 38.16 | 0.54 | MOL002464 | 1-Monolinolein                                                                                                                                                                               | 37.18 | 0.30 |
| MOL000953 | CLR                     | 37.87 | 0.68 | MOL000862 | [(1S,3R)-1-[(2R)-3,3-di-methyloxiran-2-yl]-3-[(5R,8S,9S,10S,11S,14R)-11-hydroxy-4,4,8,10,14-pentamethyl-3-oxo-1,2,5,6,7,9,11,12,15,16-decahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-yl]butyl] acetate | 35.58 | 0.81 |

**2.2 六味地黄丸作用靶点** 根据TCMSP数据库中的有效成分靶点信息,共收集到六味地黄丸中有效成分的相关作用靶点共506个,其中丹皮214个、茯苓23个、山药122个、山茱萸108个、熟地30个和泽泻9个。从Genecard、OMIM、TTD、Drugbank、DisGeNET等数据库中检索胃腺癌相关靶点后,共获得6198个疾病相关靶点。将药物相关靶点与疾病相关靶点进行对比分析,取交集可以得到156个六味地黄丸抗胃腺癌的可能作用靶点。

**2.3 PPI网络的构建** 在STRING数据库中构建上述156个靶点的蛋白质相互作用网络(PPI)。由于单独孤立的蛋白与其他蛋白无相互作用,均不在蛋白互作网络中体现,故此网络中共包含147个节点,1048条边。节点大小及颜色由degree的大小表示,节点越大对应的degree越大,颜色由红色到蓝色,对应的degree越大(图1)。对PPI进行拓扑特征分析,选取在“度值”(degree)、“中介中心性”(betweenness)、“接近中心性”(closeness)3个参数均大于中位数的点作为核心靶点,连续进行3次筛选后,得到20个重要核心靶点,具体包括JUN(degree=48, closeness=0.857), MAPK1(degree=52, closeness=0.837), IL-6(degree=52, closeness=0.800), AKT1(degree=64, closeness=0.783), MAPK8(degree=53, closeness=0.783), VEGFA(degree=43, closeness=0.766), MYC(degree=40, closeness=0.735), ESR1(degree=33, closeness=0.692), EGF(degree=39, closeness=0.692), HSP90AA1(degree=42, closeness=0.679), RELA(degree=34, closeness=0.679), FOS(degree=29, closeness=0.667), EGFR(degree=35, closeness=0.667), CCND1(degree=37, closeness=0.667), AR(degree=29, closeness=0.667), MMP9(degree=35, closeness=0.667), STAT1(degree=29, closeness=

0.667), IL1B(degree=35, closeness=0.655), PPARG(degree=25, closeness=0.655), PTGS2(degree=32, closeness=0.655)。基于20个重要核心靶点,根据相关有效成分,进一步构建药物有效成分-核心靶点网络,通过Cytoscape网络图分析可以发现:丹皮通过quercetin(MOL000098)、kaempferol(MOL000422)、5-[[5-(4-Methoxyphenyl)-2-furyl]methylene]barbituric acid(MOL007374)作用于20个核心靶点发挥作用,山药通过diosgenin(MOL000546)、AIDS180907(MOL005465)、(-)-taxifolin(MOL001736)、Kadsurenone(MOL000322)、Stigmasterol(MOL000449)对PTGS2、RELA、VEGFA、AKT1、ESR1、HSP90AA1、AR核心靶点发挥作用,山茱萸通过Tetrahydroalstonine(MOL008457)、beta-sitosterol(MOL000358)、Hydroxygenkwanin(MOL005530)、Mandenol(MOL001494)、Cornudentanone(MOL005503)、2,6,10,14,18-pentamethylcosa-2,6,10,14,18-pentaene(MOL005481)对AR、HSP90AA1、PPAGR、PTGS2、JUN等核心靶点发挥作用,茯苓和熟地分别通过hederagenin(MOL000296)及Stigmasterol(MOL000449)对PTGS2发挥作用。这些药物有效成分及靶点的相互作用,体现了六味地黄丸多成分多靶点抗胃腺癌的作用关系。见图2。

**2.4 GO富集分析** 将六味地黄丸活性成分预测出的156个作用靶点通过Metascape生物分子功能注释系统进行GO富集分析,包括GO BP生物过程分析(biological process)、GO MF分子功能(molecular function)分析和GO CC细胞组分分析(cellular component)。在其中每项排名前10的条目,见表2。

其中GO BP中response to inorganic substance, response to toxic substance, cytokine-mediated signaling pathway靶点富集较集中;GO MF中protein ki-



nase binding, transcription factor binding, protein domain specific binding 靶点相对集中富集;在 GO CC 中与 membrane raft, transcription factor complex, perinuclear region of cytoplasm 相关性最大。

**2.5 KEGG 通路富集分析** 为了进一步揭示六味地黄丸抗胃腺癌的潜在作用机制,通过对 156 个候选靶点进行 KEGG 通路富集分析,依据  $P < 0.01$  进行筛选共获得 36 条相关通路,涉及肿瘤、代谢、免疫、信号转导、细胞凋亡等多个方面,将 36 个通路根据  $P$  值由小到大进行排序。排在前 5 位的依次是 hsa05200: Pathways in cancer 信号通路、hsa04933: 晚期糖基化终末产物-糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) in diabetic complications 信号通路、hsa04668: 肿瘤坏死因子 (TNF) 信号通路、hsa04066:

缺氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路、hsa01524: Platinum drug resistance 信号通路,将获得的靶点及前 20 项信号通路导入 Cytoscape 3.6.2 进行分析,构建靶点-通路网络,根据 degree 排序,发现 KEGG 通路富集前 5 位的依次是肿瘤信号通路 (hsa05200, degree=49)、AGE-RAGE 信号通路 (hsa04933, degree=27)、TNF 信号通路 (hsa04668, degree=22)、HIF-1 信号通路 (hsa04066, degree=20)、铂耐药信号通路 (hsa01524, degree=16),提示六味地黄丸可能通过这些通路发挥作用。

**2.6 分子对接** 将 PPI 网络中排名前 5 的靶点蛋白分别与槲皮素 (Quercetin)、山柰酚 (Kaempferol)、薯蓣皂苷 (Diosgenin) 和四氢鸭脚木碱 (Tetrahydroalstonine) 进行分子对接验证,以对接分数来评价核心成

表 2 六味地黄丸活性成分预测出的 156 个作用靶点 GO 富集分析

| 项目      | 条目                                           | 靶点数 | $P$ 值                       | 项目      | 条目                                             | 靶点数 | $P$ 值                       |
|---------|----------------------------------------------|-----|-----------------------------|---------|------------------------------------------------|-----|-----------------------------|
| GO BP   |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
|         |                                              |     |                             | 0030424 | axon                                           | 17  | $4.375\ 17 \times 10^{-7}$  |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0010035 | response to inorganic substance              | 49  | $1.186\ 66 \times 10^{-41}$ | 0048471 | perinuclear region of cytoplasm                | 18  | $8.472\ 52 \times 10^{-7}$  |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0009636 | response to toxic substance                  | 46  | $4.342\ 61 \times 10^{-39}$ | 0045177 | apical part of cell                            | 13  | $1.437\ 8 \times 10^{-6}$   |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0071407 | cellular response to organic cyclic compound | 45  | $3.648\ 38 \times 10^{-37}$ | 0031012 | extracellular matrix                           | 15  | $1.776\ 77 \times 10^{-6}$  |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0019221 | cytokine-mediated signaling pathway          | 50  | $1.576\ 16 \times 10^{-35}$ | 0043209 | myelin sheath                                  | 5   | $1.597\ 37 \times 10^{-5}$  |
| GO:     |                                              |     |                             | GO MF   |                                                |     |                             |
| 0032496 | response to lipopolysaccharide               | 36  | $7.647\ 16 \times 10^{-34}$ | GO:     |                                                |     |                             |
| GO:     |                                              |     |                             | 0019901 | protein kinase binding                         | 30  | $2.196\ 5 \times 10^{-17}$  |
| 0009611 | response to wounding                         | 43  | $1.846\ 29 \times 10^{-30}$ | GO:     |                                                |     |                             |
| GO:     |                                              |     |                             | 0008134 | transcription factor binding                   | 30  | $3.193\ 01 \times 10^{-17}$ |
| 0009991 | response to extracellular stimulus           | 39  | $4.742\ 42 \times 10^{-30}$ | GO:     |                                                |     |                             |
| GO:     |                                              |     |                             | 0004879 | nuclear receptor activity                      | 12  | $1.473\ 33 \times 10^{-16}$ |
| 0070482 | response to oxygen levels                    | 34  | $1.704\ 51 \times 10^{-28}$ | GO:     |                                                |     |                             |
| GO:     |                                              |     |                             | 0019904 | protein domain specific binding                | 29  | $1.676\ 87 \times 10^{-15}$ |
| 0097190 | apoptotic signaling pathway                  | 39  | $5.337\ 03 \times 10^{-28}$ | GO:     |                                                |     |                             |
| GO:     |                                              |     |                             | 0046982 | protein heterodimerization activity            | 24  | $2.474\ 57 \times 10^{-14}$ |
| 0009410 | response to xenobiotic stimulus              | 30  | $2.016\ 04 \times 10^{-27}$ | GO:     |                                                |     |                             |
| GO CC   |                                              |     |                             | 0016491 | oxidoreductase activity                        | 26  | $2.735\ 9 \times 10^{-12}$  |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0045121 | membrane raft                                | 18  | $2.713\ 08 \times 10^{-12}$ | 0044389 | ubiquitin-like protein ligase binding          | 17  | $1.775\ 82 \times 10^{-11}$ |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0005667 | transcription factor complex                 | 17  | $2.500\ 84 \times 10^{-10}$ | 0001085 | RNA polymerase II transcription factor binding | 12  | $4.028\ 65 \times 10^{-10}$ |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 1902911 | protein kinase complex                       | 10  | $2.327\ 84 \times 10^{-9}$  | 0019207 | kinase regulator activity                      | 13  | $9.793\ 55 \times 10^{-10}$ |
| GO:     |                                              |     |                             | GO:     |                                                |     |                             |
| 0031983 | vesicle lumen                                | 14  | $4.655\ 62 \times 10^{-8}$  | 0016209 | antioxidant activity                           | 9   | $5.172\ 26 \times 10^{-9}$  |
| GO:     |                                              |     |                             |         |                                                |     |                             |
| 0005741 | mitochondrial outer membrane                 | 10  | $2.540\ 35 \times 10^{-7}$  |         |                                                |     |                             |

**表3** 靶点蛋白与六味地黄丸中4个核心成分及原配体的对接分数/(kcal/mol)

| 靶点蛋白  | 薯蓣皂苷  | 山柰酚  | 槲皮素  | 四氢鸭脚木碱 | 原配体  |
|-------|-------|------|------|--------|------|
| JUN   | -8.5  | -8.6 | -8.5 | -7.4   | -7.7 |
| MAPK1 | -10.2 | -8.1 | -8.0 | -8.1   | -9.7 |
| IL-6  | -7.4  | -6.8 | -6.8 | -6.8   | -6.9 |
| AKT1  | -8.8  | -8.0 | -8.2 | -8.4   | -8.7 |
| MAPK8 | -9.1  | -8.2 | -8.2 | -6.8   | -8.8 |

分与靶点之间的相互作用,若结合能 $<0$ ,表明配体分子均能和受体蛋白自发地结合,结合能 $<-5.0$  kcal/mol,表明其结合性好,结合能越小对接越好<sup>[18]</sup>。然后将5个靶点蛋白与其原配体进行对接,得到的对接分数作为参照,用于评价4个核心成分与靶点蛋白的对接结果,见表3。从结果可以看到,4个核心成分与靶点蛋白均能较好的对接,JUN与山柰酚的结合优于原配体,MAPK1、IL-6、AKT1、MAPK8与薯蓣皂苷结合优于原配体。

将前五个靶标基因结合最好的化合物进行分子对接展示,详见图3。其中山柰酚(kaempferol)与JUN结合最好,薯蓣皂苷(diosgenin)与MAPK1、IL-6、AKT1、MAPK8结合最优。图3A为kaempferol和JUN之间的结合模式,氨基酸残基Ser155、Asn156、Lys55与kaempferol配体小分子形成氢键相互作用,氨基酸残基Val158、Ala113、Met111、Asp112、Ile32、Ala53、Val40、Gly35、Leu168与kaempferol配体小分子形成疏水相互作用,图3B为diosgenin和MAPK1之间的结合模式,氨基酸残基Thr110、Glu109、Ile31、Gly32、Val39、Glu33、Gly34、Tyr36、Asp167、Asn154、Leu156、Ser153、Met108、Asp111、Lys114与diosgenin配体小分子形成疏水相互作用,图3C为diosgenin和IL-6之间的结合模式,氨基酸残基Asn63、Pro65、Glu93、Tyr97、Thr143、Leu147、Lys150与diosgenin配体小分子形成疏水相互作用,图3D为diosgenin和AKT1之间的结合模式,氨基酸残基Gly311与diosgenin配体小分子形成氢键相互作用,氨基酸残基Phe161、Tyr160、Gly162、Gly159、Val164、Asp292、Lys276、Leu295、Thr312与diosgenin配体小分子形成疏水相互作用,图3E为diosgenin和MAPK8之间的结合模式,氨基酸残基Lys153与diosgenin配体小分子形成氢键相互作用,氨基酸残基Asp169、Ser155、Asn114、Leu168、Ser34、Ile32、Gly33、Val40、Lys55、Gly35、Gln37、Ala36、Asp151与diosgenin配体小分子形成氢键相互作用。

### 3 讨论

六味地黄丸源于宋代医学家钱乙的《小儿药证直诀》,由熟地黄、丹皮、山药、山茱萸、泽泻、茯苓6

味药组成,是滋补肾阴的名方。近代研究表明,六味地黄丸具有防治胃癌的作用。如石金凤研究发现中、高剂量六味地黄丸联合5-氟尿嘧啶(5-Fu)可显著抑制胃癌细胞的生长,且可减轻5-Fu注射液对胃癌荷瘤鼠的毒副作用<sup>[5]</sup>。江良县通过临床研究发现<sup>[19]</sup>,六味地黄丸联合FOLFOX6方案可延长晚期胃癌病人的生存期,降低化疗毒副反应,提高化疗疗效。简咏梅等<sup>[4]</sup>报道六味地黄丸可显著降低胃癌相关炎症因子的表达而降低糖尿病小鼠胃癌的发生风险。但六味地黄丸治疗胃癌的作用机制及有效成分尚不明确。因此,本研究采用网络药理学方法探讨六味地黄丸抗胃腺癌的作用机制,从全方六味中药获得508个成分,按 $OB \geq 30\%$ , $DL \geq 0.18$ 筛选,共获取69个有效成分,将有效成分靶点与疾病相关靶点进行比对后,得到156个六味地黄丸抗胃腺癌的可能作用靶点。对其进行拓扑分析发现20个重要核心靶点,依次是JUN、MAPK1、IL-6、AKT1、MAPK8、VEGFA、MYC、ESR1、EGF、HSP90AA1、RELA、FOS、EGFR、CCND1、AR、MMP9、STAT1、IL1B、PPARG、PTGS2。在药物有效成分-靶点网络中对20个核心靶点再分析,根据degree降序可发现其中槲皮素(quercetin, MOL000098)与18个核心靶点相关,山柰酚(kaempferol, MOL000422)与9个核心靶点相关,薯蓣皂苷(diosgenin, MOL000546)与4个核心靶点有关,四氢鸭脚木碱(Tetrahydroalstonine, MOL008457)与4个核心靶点有关。推测槲皮素及山柰酚是六味地黄丸抗胃腺癌的主要成分,其次是薯蓣皂苷及四氢鸭脚木碱。

进一步通过GO功能富集分析,可以发现六味地黄丸的作用涉及多个生物学过程,并更可能通过细胞毒性、氧化应激、代谢及凋亡功能发挥其抗胃腺癌的作用。通过KEGG通路富集分析,我们共发现36条相关信号通路,其中Cancer信号通路、AGE-RAGE信号通路、TNF信号通路富集较集中,其次是HIF-1信号通路及Platinum drug resistance信号通路,推测这些通路可能是六味地黄丸发挥主要作用的主要信号通路。进一步通过有效成分-靶点-通路富集分析发现,槲皮素、山柰酚、薯蓣皂苷和四氢鸭脚木碱主要通过AGE-RAGE信号通路和TNF信号通路发挥作用。AGE-RAGE信号通路在胃癌的发生、发展和转移中发挥着重要作用<sup>[20]</sup>,研究表明,槲皮素能通过抑制RAGE基因的表达,提升细胞凋亡与自噬作用,增加肿瘤细胞的死亡率达到抗癌的功效<sup>[21-22]</sup>。TNF信号通路中的多个蛋白在胃癌细胞的增殖、生存等过程中起着重要作用,研究表明槲皮素和山柰酚均可通过调节TNF等凋亡基因的表达

抑制肿瘤的增殖<sup>[23-24]</sup>,薯蓣皂苷可通过上调 TNFR1/TNF- $\alpha$  的 mRNA 的表达显著抑制胃癌细胞 HGC-27 的增殖<sup>[25]</sup>。以上的结果表明,熟地、丹皮、山药、山茱萸、茯苓、泽泻可通过多个成分对胃腺癌多个靶点及多条通路作用,不局限于单一成分、单一靶点及单一通路。槲皮素、山柰酚、薯蓣皂苷及四氢鸭脚木碱可能是六味地黄丸的主要有效成分,可通过多个靶点对 Cancer 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、TNF 信号通路发挥作用。六味地黄丸的其他有效成分也参与调控了多个靶点及通路,体现了六味地黄丸多成分、多靶点、多通路协同作用抗胃腺癌的机制。根据以上结果,我们发现在铂耐药通路中同样有多个靶点富集,这与目前临床研究六味地黄丸联合化疗治疗晚期胃癌可抑制肿瘤生长,提高化疗疗效,改善病人生存质量不谋而合,值得今后根据有效成分、作用靶点及信号通路进一步研究。

综上所述。本研究从网络药理学角度对六味地黄丸治疗胃腺癌的有效成分、核心靶点、作用通路进行了分析,并基于分子对接技术模拟其可能分子作用机制,为下一步实验研究六味地黄丸治疗胃腺癌提供了理论依据和线索。当然,由于本研究是基于现有数据库进行的理论推测,其中可能存在假阴性或者假阳性的结论。均有待于进一步的实验验证。

(本文图 1~3 见插图 6-3)

### 参考文献

- [1] GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER COLLABORATION, FITZMAURICE C, ALLEN C, et al. Global, regional, and national cancer incidence, mortality, years of life lost, years lived with disability, and disability-adjusted life-years for 32 cancer groups, 1990 to 2015: a systematic analysis for the global burden of disease study[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(4):524-548.
- [2] HARADA K, LOPEZ A, SHANBHAG N, et al. Recent advances in the management of gastric adenocarcinoma patients[J]. F1000 Res, 2018, 7:1.D0I: 10.12688/f1000research.15133.1.
- [3] 韩冬冬, 顾康生. 单药或联合方案二线治疗进展期胃癌研究进展[J]. 安徽医药, 2018, 22(12):2287-2290.
- [4] 简咏梅, 孙永宁. 六味地黄丸对 N-甲基-N-亚硝基脲(MNU)诱导 C57BL/KsJ-db/db 小鼠胃癌的保护作用及其机制研究[J]. 中华中医药学刊, 2015, 33(5):1136-1139.
- [5] 石金凤, 许丽萍, 王秀增, 等. 六味地黄丸联合 5-Fu 对抑制人胃癌裸鼠移植瘤的增效作用[J]. 中国医学工程, 2015, 23(9):1-2, 5.
- [6] 邢心睿, 吕狄亚, 柴逸峰, 等. 网络药理学在中药作用机制中的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2018, 36(2):97-102.
- [7] 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.
- [8] LUO P, TIAN L P, RUAN J, et al. Disease gene prediction by integrating PPI networks, clinical RNA-seq data and OMIM data[J]. IEEE/ACM transactions on computational biology and bioinformatics, 2019, 16(1):222-232.
- [9] LI YH, YU CY, LI XX, 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.
- [10] WISHART DS, FEUNANG YD, GUO AC, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018[J]. Nucleic Acids Res, 2018, 46(D1):D1074, D1082.
- [11] PIÑERO J, RAMÍREZ-ANGUITA JM, SAÜCH-PITARCH J, et al. The DisGeNET knowledge platform for disease genomics: 2019 update[J]. Nucleic Acids Res, 2020, 48(D1):D845, D855.
- [12] SZKLARCZYK D, MORRIS JH, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(D1):D362, D368.
- [13] SALAMON J, GOENAWAN IH, LYNN DJ. Analysis and visualization of dynamic networks using the DyNet app for cytoscape[J/OL]. Curr Protoc Bioinformatics, 2018, 63(1):e55. DOI: 10.1002/epbi.55.
- [14] ZHOU Y, ZHOU B, PACHE L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nature Communications, 2019, 10(1):1523.
- [15] LIU H, WANG J, ZHOU W, et al. Systems approaches and polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 146(3):773-793.
- [16] KANEHISA M, SATO Y, FURUMICHI M, et al. New approach for understanding genome variations in KEGG[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(D1):D590, D595.
- [17] LI H, LEUNG KS, WONG MH, et al. Improving autodock vina using random forest: the growing accuracy of binding affinity prediction by the effective exploitation of larger data sets[J]. Mol Inform, 2015, 34(2/3):115-126.
- [18] 庄莉, 翟国园, 姚卫峰, 等. 基于网络药理学的二至丸对肾脏保护作用的机制研究[J]. 药学报, 2019, 54(5):877-885.
- [19] 江良县, 喻潇藏. 六味地黄丸联合 FOLFOX6 方案治疗晚期胃癌的疗效观察[J]. 医学美学美容, 2014, 22(5):261-262.
- [20] 唐康. AGE/RAGE-HIF1 $\alpha$  信号持续激活在结肠癌细胞 EMT 中作用机制的初探[D]. 重庆:重庆医科大学, 2017.
- [21] 马纳, 李亚静, 范吉平. 槲皮素药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20(8):221-224.
- [22] 付丽娜, 刘维红, 徐爱军, 等. 槲皮素对人胃癌 MKN45 细胞的抑制作用研究[J]. 现代药物与临床, 2017, 32(6):983-986.
- [23] 曹林娟, 韩艳秋, 郝洪军, 等. 槲皮素和山柰酚逆转白血病细胞系 K562/A02 多药耐药性的机制及相关基因表达谱的研究[J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(11):830-836.
- [24] 周孟, 廖祥明, 王珊, 等. 槲皮素抑制人肝癌细胞 HepG2 的体外外活性研究[J]. 安徽医药, 2019, 23(11):2136-2141.
- [25] 袁志鹰, 罗林明, 陈乃宏, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 法分析百合芽化学成分及其薯蓣皂苷元抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(5):808-813, 831.

(收稿日期:2020-05-15, 修回日期:2020-06-14)