

基于网络药理学六君子汤治疗胃癌的物质基础与作用机制研究

余平, 郑建红, 楼婷婷(浙江省立同德医院, 杭州 310012)

摘要: **目的** 探讨六君子汤治疗胃癌的药效物质基础与潜在的作用机制。**方法** 依托 TCMSP 和 TCM-MESH 数据库平台对六君子汤中的活性成分进行检索和筛选; 利用 SwissTargetPrediction, TTD, CTD, GeneCards 等数据库对六君子汤活性成分以及胃癌相关靶点进行预测和筛选, 进而构建活性成分-靶点网络图。对得到的靶点通过 STRING 进行蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络构建并筛选核心靶点, 进而通过 ONCOMINE 数据库分析核心靶点在胃癌中的表达。利用 DAVID 在线数据库对靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)和 KEGG 通路富集分析以探讨靶点的生物学意义。对于得到的活性成分, 作用于胃癌的靶点以及所富集的通路, 构建六君子汤成分-靶点-通路网络图。**结果** 从六君子汤中筛选得到 21 个活性有效成分和 43 个作用于胃癌的相关靶点。靶点的 PPI 网络分析得到 6 个核心靶点, 在 ONCOMINE 数据库的胃癌样本和正常样本中均存在显著的表达差异。对靶点的 GO 和 KEGG 通路富集分析结果显示这些靶点富集在生物过程的条目有 74 个, 细胞组分的有 9 个, 分子功能的有 15 个, 而富集的 KEGG 通路有 78 条, 涉及肿瘤、信号通路、病毒致癌、凋亡、癌症中的蛋白多糖等多种与胃癌密切相关的通路。六君子汤成分-靶点-通路网络图揭示了六君子汤中的药效物质和作用靶点, 以及靶点与疾病通路之间的互作关系。**结论** 本研究初步明确了六君子汤通过多成分-多靶点-多通路治疗胃癌的作用机制, 为深入研究六君子汤的药效物质基础和作用机制奠定基础。

关键词: 六君子汤; 胃癌; 活性成分; 靶点; 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)12-1508-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.12.012

引用本文: 余平, 郑建红, 楼婷婷. 基于网络药理学六君子汤治疗胃癌的物质基础与作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1508-1515.

Network Pharmacology-based Study on Material Basis and Mechanism of Liujunzi Decoction for Gastric Cancer Treatment

YU Ping, ZHENG Jianhong, LOU Tingting(Tongde Hospital of Zhejiang Province, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the material basis and underlying mechanism of Liujunzi decoction for gastric cancer(GC) treatment. **METHODS** Active chemical ingredients in Liujunzi decoction were searched based on the TCMSP and TCM-MESH database, the ingredients related and GC related targets were screened from the SwissTargetPrediction, TTD, CTD, GeneCards database. The protein-protein interaction(PPI) network of the targets were performed to search out the core targets, subsequently, the ONCOMINE database were applied to analysis the expression of these core targets in GC. After then, the DAVID online tool was used to perform the gene ontology and KEGG pathway analysis for the targets. For the obtained active ingredient, acting on the target of gastric cancer and the enriched pathway, ingredients-targets-pathways network of Liujunzi decoction was constructed. **RESULTS** The 21 active ingredients and 43 related targets for GC treatment were screened out from the Liujunzi decoction. PPI network analysis of the target obtained 6 core targets, and there were significant differences in expression between the gastric cancer samples and the normal samples in the ONCOMINE database. The GO and KEGG pathway enrichment analysis of the target showed that there were 74 entries in the biological process, 9 in the cellular component, 15 in the molecular function, and 78 in the enriched KEGG pathway. Involved tumors, signaling pathways, viral carcinogenesis, apoptosis, proteoglycans in cancer, and other pathways closely related to GC. Ingredients-targets-pathways network of Liujunzi decoction revealed the complex and closely interactions among the active ingredients, targets and pathways. **CONCLUSION** The result of the study preliminarily verified the mechanisms of Liujunzi decoction for GC through multi-ingredients, multi-target and multi-pathway interactions, and lay foundation for further studies on the material basis and mechanism of action. **KEYWORDS:** Liujunzi decoction; gastric cancer; active ingredients; targets; pathways

胃癌为常见的恶性消化道肿瘤, 2018 年全球新增病例超过 100 万例, 死亡人数估计约 78 万人, 占全球死亡率的 1/12, 使其在常见诊断癌症中位

列第五, 在癌症死亡率中位列第三^[1]。且胃癌的发病率存在着明显的区域差异, 东亚国家(中国、韩国、日本)的发病率明显高于北欧、北美以及非洲。

基金项目: 浙江省中医药科技计划项目(2017ZA025)

作者简介: 余平, 男, 副主任中医师

Tel: (0571)89972243

E-mail: yuping1103@sina.com

在我国,流行病学调查显示胃癌每年的新发病例约 40 万例,约占全球总发病率的 40%,在中国癌症发病率和死亡率中位居前列,且胃癌早期比例低(10%),进展期病例为主要诊治对象,新发胃癌患者呈现年轻化趋势,成为危害我国居民身体健康和生活质量的重大疾病^[2-3]。除了手术治疗外,中医药联合化疗也是胃癌综合治疗的重要手段之一^[4]。六君子汤出自《医学正传》,由人参、白术、茯苓、炙甘草、半夏、陈皮等 6 种中药煎熬而成,主治脾胃气虚兼有痰湿之证,可以健运脾胃、理气导滞、恢复胃肠功能,因而六君子汤及其加减方在治疗胃肠功能疾病方面有着广泛的应用^[5-6]。胃癌的发生发展与脾胃亏虚密切相关,故健脾益胃为王道之法,六君子汤为健脾益胃常用方,对胃癌的治疗临床效果显著,能有效提高治疗效果和患者的生存率,还可改善胃癌术后患者胃肠功能障碍和化疗所致的不良反应^[7-9]。

与六君子汤治疗胃癌丰富的临床研究相反的是,六君子汤治疗胃癌的机制研究整体仍处于尚浅的层面,中药复方的复杂成分也是制约系统研究六君子汤的药效成分和作用机制的关键因素。网络药理学作为中药研究的前沿科学,着眼于药物、靶点与疾病间相互作用的整体性和系统性,将药物-靶点网络与生物信息网络相结合,与中医学从整体观念、辨证论治的角度去诊治疾病相契合^[10]。因此,本研究采用网络药理学的方法,探讨六君子汤治疗胃癌的潜在药效成分和分子机制,为进一步研究六君子汤治疗胃癌的作用机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 六君子汤活性成分的筛选

依托中药综合数据库(TCMID, <http://183.129.215.33/tcmid/search/>)明确六君子汤所含的六味中药材为人参(*Panax Ginseng* C. A. Mey.), 白术(*Atractylodes Macrocephala* Koidz.), 茯苓(*Poria Cocos*(Schw.) Wolf.), 炙甘草(*Radix Glycyrrhizae Preparata*), 半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.), 陈皮(*Citrus reticulata* Blanco)。随后通过 TCMSP 数据库(<http://ibts.hkbu.edu.hk/LSP/tcmsp.php>)和 TCM-MESH 数据库(<http://mesh.tcm.microbioinformatics.org/>)对六君子汤中中药成分相关的化学成分进行搜索,并根据药动学参数中的口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%,类药性

(drug-likeness, DL)≥0.18 及药物半衰期(drug half-life, HL)≥8 为筛选条件对六君子汤中的化学成分进行筛选,最终得到符合条件的候选活性成分^[11-12]。

1.2 靶点的预测筛选与成分-靶点网络构建

对于筛选得到的活性成分,基于 TCMSP 数据库中的化合物关联靶点将六君子汤中的活性成分逐一配对潜在靶点。此外,利用 SwissTarget Prediction8 数据库对活性成分相关靶点进行预测。利用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)对靶点命名进行规范化处理,选择的物种为“Homo sapiens”,得到官方名称。综合以上数据库所得靶点即为候选活性成分相关靶点。同时,利用 TTD(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>), CTD(<http://ctdbase.org/>), GeneCards(<https://www.genecards.org/>)数据库对胃癌相关靶点进行检索筛选,得到胃癌相关候选靶点。将候选活性成分相关靶点与胃癌相关候选靶点取交集,重合的靶点即为六君子汤活性成分作用于胃癌的相关靶点。将六君子汤的活性成分与对应靶点信息导入 Cytoscape 软件,构建六君子汤活性成分-靶点网络图,图中的一个节点代表一个成分或靶点,成分与靶点间的关联用边来表示,同时还利用 Cytoscape 软件中的 Network analyzer 功能对网络中的拓扑属性进行分析。

1.3 靶点蛋白互作网络构建及关键靶点的筛选

利用 STRING(<https://string-db.org/cgi/input.pl>)在线数据库可以对靶点的蛋白与蛋白之间相互作用(protein protein interaction, PPI)进行分析。将靶点信息导入 STRING 数据库,物种选择为“Homo sapiens”,每对蛋白相互作用综合得分>0.4 作为筛选条件得到靶点的 PPI 信息。将 PPI 信息导入 Cytoscape 软件,使得靶点的 PPI 网络图可视化,并利用 Cytoscape 软件中的 Network analyzer 功能对网络中的拓扑属性进行分析,通过拓扑参数度(degree)和接近中心性(closeness centrality) 2 个主要的网络拓扑参数对 PPI 网络图中的关键核心靶点进行筛选。此外,还利用 Cytoscape 软件中 MCODE 分析工具对 PPI 网络图中可能存在的互作关系显著的模块进行筛选。

1.4 关键靶点的表达分析

对于筛选得到的核心靶点,通过 ONCOMINE 4.5(<https://www.oncomine.org/resource/main.html>)在线数据库探索这些核心靶点在胃癌样本和正常

样本中的表达差异。ONCOMINE 为肿瘤领域的重要样本数据库, 包含几十种肿瘤的相关基因信息, 数据采集于 700 多个数据库的 86 000 多个样本, 对于给定的基因可以在多个数据库中分析其表达信息。

1.5 靶点基因本体论(gene ontology, GO)和通路富集分析

通过 DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=WS.html>)在线基因功能注释数据库对六君子汤活性成分作用于胃癌的相关靶点进行 GO 与 KEGG 通路富集分析。以 $P<0.05$ 为筛选标准, 得到这些靶点富集的 GO 和 KEGG 通路条目, 可以为探索这些靶点的生物学功能尤其是在癌症中所扮演的角色提供参考信息。

1.6 六君子汤活性成分-靶点-通路网络构建

将六君子汤中的活性成分, 相关靶点, 靶点所富集的主要 KEGG 通路信息导入 Cytoscape 软件, 构建六君子汤活性成分-靶点-通路网络图, 将六君子汤中的有效成分与作用于胃癌的靶点相关联, 同时映射到相关通路中, 可以通过成分-靶点-通路网络图探讨六君子汤治疗胃癌的作用机制。

2 结果

2.1 六君子汤活性成分的筛选

利用 TCMSP 和 TCM-MESH 数据库对六君子汤中的 6 种单味中药所含的化学成分进行搜索, 初步得到的化学成分为人参含 190 个, 白术含 55 个, 茯苓含 34 个, 炙甘草含 11 个, 半夏含 116 个, 陈皮含 63 个。进一步利用 ADME 参数 $OB\geq 30\%$, $DL\geq 0.18$ 及 $HL\geq 8$ 为条件筛选得到共 21 个候选活性有效成分, 其中人参含 7 个: inermin, kaempferol, frutinone A, ginsenoside rh2, girinimbin, suchilactone, fumarine; 白术含 1 个: 8 β -ethoxy atractylenolide III; 茯苓含 3 个: pachymic acid, poricoic acid A, poricoic acid B; 炙甘草含 3 个: liquiritigenin, isoliquiritigenin, liquiritin; 半夏含 3 个: baicalein, baicalin, coniferin; 陈皮含 4 个: naringenin, hesperetine, citromitin, nobiletin。六君子汤中 21 个活性成分的相关信息见表 1。

2.2 六君子汤活性成分治疗胃癌相关靶点的筛选

从 TCMSP 和 SwissTargetPrediction 数据库共匹配预测得到 291 个成分相关靶点, 从 TTD、CTD、GeneCards 数据库共筛选得到 150 个胃癌相关靶点。将 291 个成分相关靶点与 150 个疾病相关靶

点进行韦恩图绘制后得到 43 个重合的靶点, 即为六君子汤活性成分作用于胃癌的相关靶点, 靶点的相关信息见表 2。

表 1 六君子汤活性成分的筛选

Tab. 1 Active ingredients in Liujunzi decoction

序号	成分	OB/%	DL	HL
人 参				
RS01	inermin	65.83	0.54	11.73
RS02	kaempferol	41.88	0.24	14.74
RS03	frutinone A	65.90	0.34	19.10
RS04	ginsenoside rh2	36.32	0.56	11.08
RS05	girinimbin	61.22	0.31	8.17
RS06	suchilactone	57.52	0.56	9.03
RS07	fumarine	59.26	0.83	23.46
白 术				
BZ01	8 β -ethoxy atractylenolide III	35.95	0.21	8.34
茯 苓				
FL01	pachymic acid	33.63	0.81	9.27
FL02	poricoic acid A	30.61	0.76	8.26
FL03	poricoic acid B	30.52	0.75	8.67
炙甘草				
ZGC01	liquiritigenin	32.76	0.18	17.89
ZGC02	isoliquiritigenin	85.32	0.15	17.66
ZGC03	liquiritin	65.69	0.74	17.96
半 夏				
BX01	baicalein	33.52	0.21	16.25
BX02	baicalin	40.12	0.75	17.36
BX03	coniferin	31.11	0.32	28.10
陈 皮				
CP01	naringenin	59.29	0.21	16.98
CP02	hesperetine	47.74	0.27	16.51
CP03	citromitin	86.90	0.51	15.62
CP04	nobiletin	61.67	0.52	16.20

2.3 六君子汤活性成分-靶点网络分析

对于从六君子汤中筛选得到的活性成分和作用于胃癌相关靶点, 利用 Cytoscape 软件构建了成分-靶点网络图, 见图 1。三角形代表活性成分, 共有 21 个, 圆形表示相关靶点, 共 43 个。人参中含 7 个活性成分, 作用于网络图中的 37 个靶点; 白术含 1 个活性成分, 作用于网络图中的 1 个靶点; 茯苓中含 3 个活性成分, 作用于网络图中的 4 个靶点; 炙甘草中含 3 个活性成分, 作用于网络图中的 14 个靶点; 半夏中含 3 个活性成分, 作用于网络图中的 18 个靶点; 陈皮中含 4 个活性成分, 作用于网络图中的 29 个靶点。网络图中, 活性成分中 degree 最高的为人参中的 kaempferol(degree=16), 其次是半夏中的 baicalein(degree=15), 陈皮中的 nobiletin(degree=12), 炙甘草中的 isoliquiritigenin(degree=10)。而与活性

成分关联较多的靶点有 PTGS2(degree=17), HSP90 (degree=12), BAX(degree=5), ABCG2(degree=5), TOP2(degree=5), CASP3(degree=4)。由六君子汤活性成分-靶点网络图可看出, 单个成分可同时作用于多个靶点, 相应的, 一个靶点也可同时与多个成分相关联, 具有多成分、多靶点的特征。

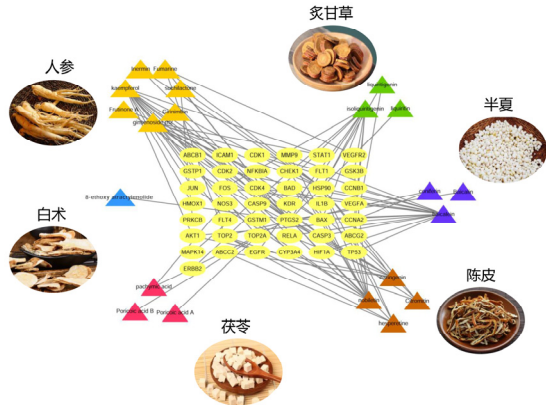


图1 六君子汤有效成分-靶点网络图

Fig. 1 Ingredients-related targets network of Liujunzi decoction

2.4 靶点 PPI 网络分析及关键靶点筛选

靶点的 PPI 网络见图 2, PPI 图中含有 41 个靶蛋白(2 个靶蛋白未参与蛋白互作)和 403 条互作边, 表明靶点之间互作关系密切。利用拓扑参数 degree 算法筛选出 degree>30 的靶点有 TP53(degree=37, closeness centrality=0.930), JUN(degree=33, closeness centrality=0.851),

AKT1(degree=32, closeness centrality=0.833), CASP3(degree=31, closeness centrality=0.816), EGFR(degree=31, closeness centrality=0.816), VEGFA(degree=31, closeness centrality=0.816), 表明 TP53, JUN, AKT1, CASP3, EGFR, VEGFA 这 6 个靶点为六君子汤作用于胃癌相关靶点 PPI 网络中的核心靶点, 在网络中占据重要地位。此外, 通过 Cytoscape 软件中的 MCODE 分析工具从 PPI 网络图中筛选出了 2 个显著模块。第 1 个模块中含有 22 个靶蛋白和 210 条蛋白互作边, MCODE 得分为 20; 第 2 个模块含有 7 个靶蛋白和 13 条互作边, MCODE 得分为 4.33。

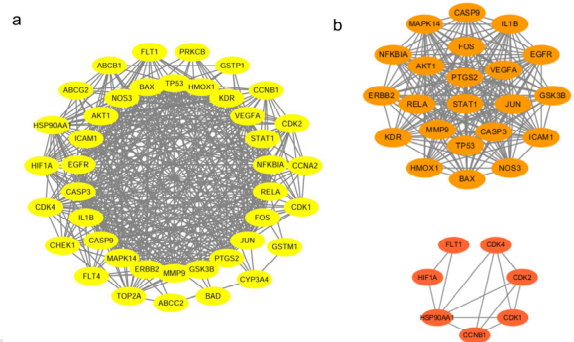


图2 六君子汤相关靶点蛋白互作网络图

a-六君子汤相关靶点 PPI 网络图; b-PPI 网络图中显著性模块的筛选。

Fig. 2 Protein-protein interaction network of Liujunzi decoction

a-PPI network of Liujunzi decoction; b-PPI modules originated from the PPI network with the most significant interactions.

表 2 六君子汤治疗胃癌活性成分靶点信息

Tab. 2 Information of potential targets from active ingredients of Liujunzi decoction

序号	基因	蛋白名称	序号	基因	蛋白名称
1	TOP2	DNA topoisomerase 2	23	CCNA2	Cyclin-A2
2	EGFR	Epidermal growth factor receptor	24	CASP3	caspase-3
3	ERBB2	Receptor tyrosine-protein kinase erbB-2	25	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
4	VEGFR2	Vascular endothelial growth factor receptor 2	26	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
5	HSP90	Heat shock protein HSP 90	27	GSK3B	Glycogen synthase kinase-3 beta
6	TP53	Cellular tumor antigen p53	28	FOS	Proto-oncogene c-Fos
7	JUN	Transcription factor AP-1	29	ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
8	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2	30	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
9	HMOX1	Heme oxygenase 1	31	TOP2A	DNA topoisomerase 2-alpha
10	GSTP1	Glutathione S-transferase P	32	ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2
11	IL1B	Interleukin-1 beta	33	CHEK1	Serine/threonine-protein kinase Chk1
12	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	34	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
13	PRKCB	Protein kinase C beta type	35	ABCC2	Canalicular multispecific organic anion transporter 1
14	CCNB1	G2/mitotic-specific cyclin-B1	36	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
15	CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	37	ABCB1	Multidrug resistance protein 1
16	BAX	Apoptosis regulator BAX	38	CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
17	NFKB1A	NF-kappa-B inhibitor alpha	39	FLT1	Vascular endothelial growth factor receptor 1
18	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	40	FLT4	Vascular endothelial growth factor receptor 3
19	BAD	Bcl2-associated agonist of cell death	41	GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1
20	KDR	Vascular endothelial growth factor receptor 5	42	NOS3	Nitric-oxide synthase, endothelial
21	RELA	Transcription factor p65	43	AKT1	Proline-rich AKT1 substrate 1
22	CASP9	caspase-9	-	-	-

2.5 核心靶基因在胃癌中的表达分析

靶点中的 6 个核心靶点 TP53, JUN, AKT1, CASP3, EGFR, VEGFA 的表达见图 3, 从 ONCOMINE 选取的数据库包含正常样本和胃癌样本。由图可看出, 6 个靶基因在正常样本和胃癌样本中的表达存在显著性差异($P < 0.05$), 表明这些核心靶点与胃癌的发生发展存在一定的联系。

2.6 靶点功能及通路注释分析

利用 DAVID 数据库对靶点进行了 GO 和 KEGG 分析, GO 包含 3 个子类, 分别为生物过程、细胞组分和分子功能, 富集在生物过程的条目有 74 个, 细胞组分的条目有 9 个, 分子功能所富集的条目有 15 个, 而富集的 KEGG 通路有 78 条。以 P 值作为富集程度显著性标准, 靶点所富集的 GO 3 个子类前 10 个条目和 KEGG 通路前 15 个通路见图 4。这些靶点所富集的生物过程有 response to muscle stretch, cellular response to hypoxia, positive regulation of VEGFR signaling pathway, positive regulation of angiogenesis, positive regulation of endothelial cell proliferation, apoptotic process, lipopolysaccharide-mediated signaling pathway, cell division, cell growth, cell proliferation 等涉及信号传导、细胞周期、血管生成、缺氧反应等。这些靶点还涉及到了细胞核、细胞质、胞浆、内质网、浓缩染色体等细胞组分。靶点相关的分子功能主要与 binding(ATP binding, chromatin

binding, cyclin binding, sequence-specific DNA binding, histone acetyltransferase binding) 和 activity(cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity, glutathione transferase activity, ATPase activity, NO synthase regulator activity, VEGFR) 相关。KEGG 通路分析显示这些靶点富集的通路有 pathways in cancer, TNF signaling pathway, VEGF signaling pathway, p53 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Viral carcinogenesis, Apoptosis, HIF-1 signaling pathway, proteoglycans in cancer 等涉及肿瘤、信号通路、病毒致癌、凋亡、癌症中的蛋白多糖等多种通路, 且这些通路都与癌症有着密切的联系。

2.7 六君子汤成分-靶点-通路网络构建及分析

对于分析得到的主要 KEGG 通路, 将通路条目、富集的靶点、靶点对应的活性成分信息导入 Cytoscape 软件即得到六君子汤成分-靶点-通路网络图, 见图 5。矩形代表 KEGG 通路, 圆形代表富集的靶点, 三角形代表六君子汤的活性成分。其中与胃癌直接相关的代谢通路 pathways in cancer 共有 21 个靶点参与其中, 包括核心靶点 TP53, JUN, AKT1, CASP3, EGFR, VEGFA, 还包括 BAD, BAX, CASP9 等靶蛋白; 而这些靶点与六君子汤中的 kaempferol, baicalein, naringenin, ginsenoside rh2, isoliquiritigenin, nobilentin 等成分相关联。而另外一条同样与肿瘤密

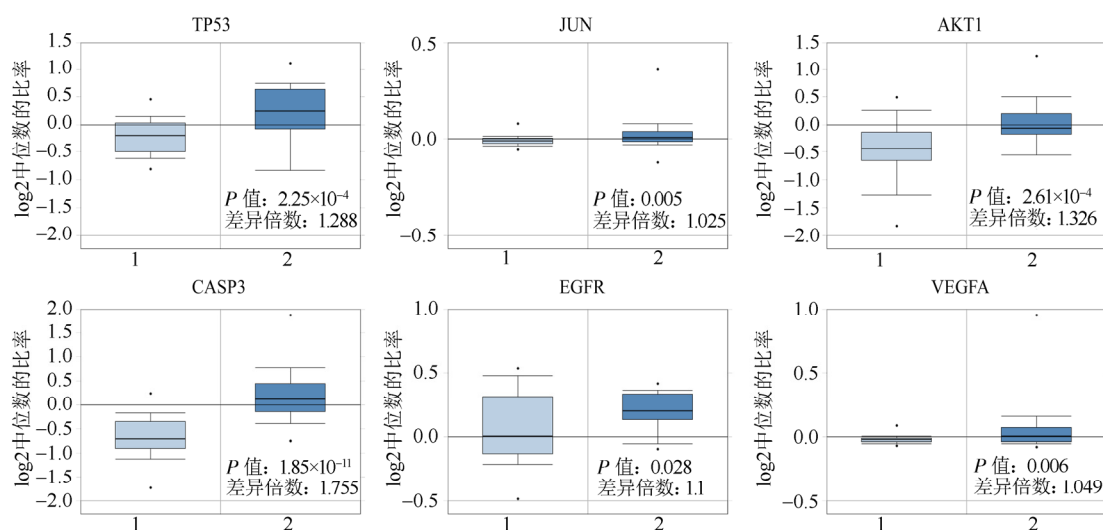


图3 核心靶基因 TP53, JUN, AKT1, CASP3, EGFR, VEGFA 在胃癌中的表达分析

1-正常样本; 2-胃癌样本。

Fig. 3 Expression analysis of core targets TP53, JUN, AKT1, CASP3, EGFR, VEGFA in gastric samples

1-normal samples; 2-gastric cancer samples.

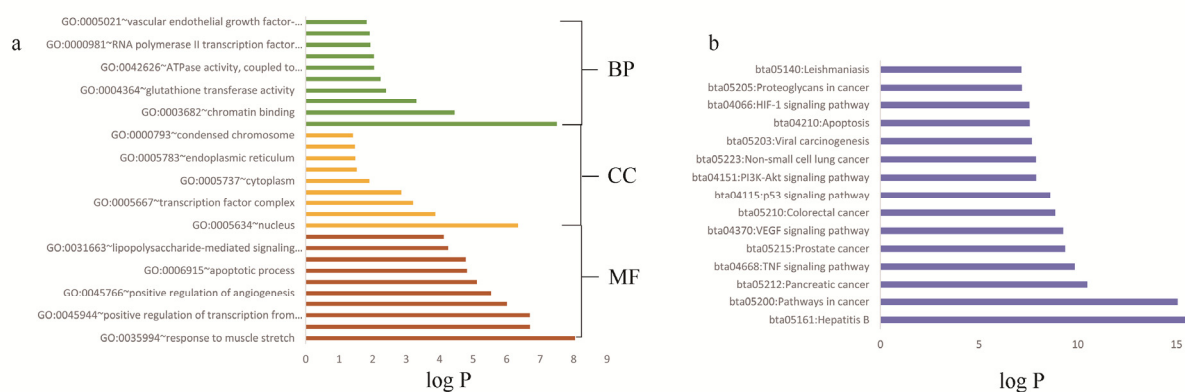


图4 靶点生物学功能及通路富集分析

a-基因本体论分析；b-KEGG 通路富集分析；BP-生物过程；CC-细胞组分；MF-分子功能。

Fig. 4 Functional and pathway enrichment analysis of the targets

a-gene ontology analysis; b-KEGG pathways; BP-biological process, CC-cellular component; MF-molecular function.

切相关的通路 p53 signaling pathway 有 9 个靶点参与其中，分别为 TP53, CASP3, CASP9, BAX, CCNB1, CDK1, CDK2, CDK4, CHEK1，同样有多个成分与这些靶点相关联。大多数复杂疾病如肿瘤的发生发展并非是由单一分子或代谢通路发生变异引起的，而是由机体内的多个分子发生

表达紊乱，通路发生失衡从而引起一系列生理反应所致的。六君子汤成分-靶点-通路图可看出，六君子汤中的活性成分调控多个靶点，而成分作用的靶点又分布于不同的代谢通路，具有多成分-多靶点-多通路的特征，相互联系、共同作用、多层调控从而发挥六君子汤对胃癌的治疗效果。

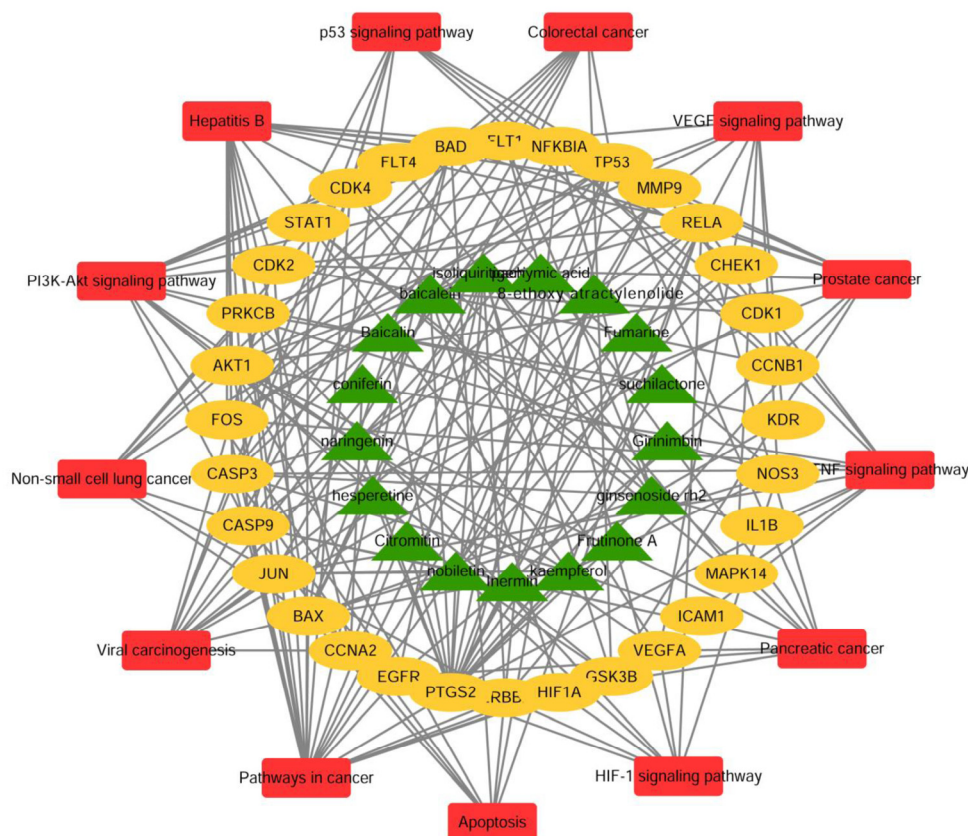


图5 六君子汤成分-靶点-通路网络图

Fig. 5 Ingredients-targets-pathways network of Liujunzi decoction

3 讨论

中医药治疗胃癌有着上千年的历史,胃癌在中医中属于“胃反”“积聚”“胃脘痛”“伏梁”“噎膈”等范畴。《灵枢·五变》云“肠胃之间,寒温不次,邪气稍至,蓄积留止,大聚乃起,由寒气在内所生也,气血虚弱,风邪搏于脏腑,寒多则气涩,气涩则生积聚也”^[13]。六君子汤为中医经典名方,也是益气健脾和胃的基础方剂。六君子汤中人参健脾补肺,益气生津,补虚固本,是为君药;白术苦温,燥湿健脾,是为臣药;茯苓甘淡,健脾祛湿为佐药,白术、茯苓相伍则健脾祛湿之功显著;炙甘草甘温,益气和胃;半夏化痰燥湿、补益脾气;陈皮芳香健脾醒胃,均为佐使良药,诸药调和,可行脾胃复健,气机调畅之功^[14]。

现代药理学研究发现六君子汤可以缩小胃溃疡大鼠的溃疡面积,提高胃黏膜组织中表皮细胞生长因子、转化生长因子 α 含量^[15]。六君子汤能改善胃动素、生长抑素和胃泌素等胃肠激素水平,还可以通过扶植胃内正常菌群、改善胃内微生态环境,有效阻止幽门螺杆菌在胃内的定居或增殖^[16-17]。陈玉龙等^[18]研究还发现六君子汤能明显抑制肿瘤细胞的生长,且呈明显的剂量依赖性。为了阐明六君子汤治疗胃癌的作用机制,本研究通过网络药理学的方法构建了六君子汤作用于胃癌的成分-靶点-疾病网络图,揭示了六君子汤中的药效物质和作用靶点,以及靶点与疾病通路之间的互作关系,也阐明了六君子汤通过多成分-多靶点-多通路治疗胃癌的作用机制。

靶点 PPI 网络筛选出的核心靶点之一 TP53 为重要的抑癌基因,在维护基因稳定性防止基因突变,抑制血管生成,捕获和杀死肿瘤细胞方面发挥着重要的作用,故被称为基因的守护者^[19]。因而 TP53 的基因突变以及其介导的信号通路也与多种癌症密切相关。研究发现, p53 的表达水平随着疾病从正常胃黏膜到胃癌的进展而增加,且 TP53 的突变在胃癌中呈现较高频率^[20]。此外,幽门螺杆菌感染有关的致瘤性也与幽门螺杆菌通过 CagA 有效降解 p53 直接相关^[21]。TP53 可以调控胃癌细胞的凋亡、增殖和迁徙,而多种相关 miRNA, LncRNA 或基因因此也可以通过抑制或上调 TP53 的表达以及调控 p53 signaling pathway 而影响胃癌的病理进展。本研究中,发现六君子汤中的药效物质可以直接作用于 TP53 且参与了 p53 signaling

pathway,既明确了六君子汤治疗胃癌的潜在机制,也证明了六君子汤治疗胃癌的有效性。表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是表皮生长因子家族的受体,影响 EGFR 表达或活性的突变会导致癌症。临床研究表明 EGFR 在胃癌中的过表达可作为胃癌预后的有效标志物,而检测 EGFR 基因突变有助于预测对药物敏感性和提高疗效。而血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor A, VEGFA)是 VEGF 家族的成员,特异性作用于内皮细胞,具有多种生物学功能。本研究从六君子汤活性成分相关靶点筛选得到的核心靶蛋白 VEGFA 以及相关的 KEGG 通路 VEGF signaling pathway 都与胃癌有着密切的联系。VEGF signaling pathway 以及相关靶蛋白 VEGFA, VEGFR2 等可诱导肿瘤血管生成,增加血管通透性,促进肿瘤细胞迁移,抑制细胞凋亡,而针对 VEGFA 或 VEGFR2 等抗血管生成阻断剂的研究也是目前肿瘤治疗的新策略之一^[22]。在六君子汤活性成分作用于胃癌的相关靶点中,有多个凋亡蛋白参与其中,如 CASP3, CASP9, BAX 以及 BAD, KEGG 通路分析也表明 apoptosis 通路参与了六君子汤治疗胃癌的作用机制。细胞凋亡程序受阻不能正常进行细胞死亡清除是肿瘤发生的重要基础, CASP3, CASP9, BAX, BAD 等蛋白所参与调控的凋亡通路可直接调控肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤细胞的增殖增长^[23]。对临床患者的研究也发现胃癌组织中 CASP3 的表达与肿瘤的临床病理特征和预后有关^[24]。而六君子汤相关靶点 HSP90 的抑制剂 STA-9090 可上调胃癌细胞中 c-PARP, CASP3, CASP8, CASP9 的表达,显著抑制 AGS 和 N87 人胃癌细胞系的增殖,有效诱导 G2/M 细胞周期停滞和细胞凋亡^[25]。

综上所述,本研究运用网络药理学的方法,对六君子汤中的药效成分,作用的靶点以及作用机制进行研究。从六君子汤中筛选得到 21 个活性有效成分包括 kaempferol, baicalein, nobiletin, isoliquiritigenin 等,以及成分相关的 43 个作用于胃癌的相关靶点。靶点的 PPI 网络分析得到核心靶点有 TP53, JUN, AKT1, CASP3, EGFR, VEGFA。对靶点的 GO 和 KEGG 通路富集分析结果显示这些靶点富集在生物过程的条目有 74 个,细胞组分的有 9 个,分子功能的有 15 个,而富集的 KEGG 通路有 78 条,其中包括 pathways in cancer, VEGF

signaling pathway, p53 signaling pathway, viral carcinogenesis, apoptosis, proteoglycans in cancer 等涉及肿瘤、信号通路、病毒致癌、凋亡、癌症中的蛋白多糖等多种与胃癌密切相关的通路。通过建立六君子汤成分-靶点-通路之间的互作关系网络,揭示了六君子汤中的药效物质和作用靶点,也初步明确了六君子汤是通过多成分-多靶点-多通路发挥治疗胃癌的作用机制的。本研究为进一步研究六君子汤中的药理药效机制提供了初步探讨与预测,确切的药理药效机制仍需后续的实验研究验证。

REFERENCES

- [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] 邹文斌, 李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. *中国实用内科杂志*, 2014
- [3] WANG P L, SUN Z, WANG W, et al. Conditional survival of patients with gastric cancer who undergo curative resection: A multi-institutional analysis in China [J]. *Cancer*, 2018, 124(5): 916-924.
- [4] LIU X P, LI H, ZHANG C, et al. Effect of Placenta Polypeptide Injection combined with chemotherapy on patients with advanced gastric cancer [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2018, 35(9): 1384-1387.
- [5] CHEN S W, TIAN X D. Liujunzi decoction for diabetic mild gastroparesis: a meta analysis [J]. *Chin J Clin Res(中国临床研究)*, 2014, 27(8): 913-918.
- [6] LV L, WANG F Y, MA X X, et al. Efficacy and safety of Xiangsha Liujunzi granules for functional dyspepsia: A multi-center randomized double-blind placebo-controlled clinical study [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(30): 5589-5601.
- [7] 邹晓东. 胃癌的中医辨治体会[J]. *光明中医*, 2015, 30(8): 1744-1746.
- [8] 林浩, 吴丹红, 杨爱莲. 六君子汤加味对改善晚期胃癌化疗患者生活质量的临床观察[J]. *海峡药学*, 2017, 29(6): 152-153.
- [9] ZHAO G, DENG J Z, ZHANG H. Curative effect of liujunzi decoction combined with chemotherapy in the treatment of advanced gastric cancer and its effect on the quality of life [J]. *Chin Community Dr(中国社区医师)*, 2016, 18(34): 123-124.
- [10] LIU X K, WU J R, LIN M J, et al. Mechanism of Si junzitang based on network pharmacology [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2017, 23(16): 194-202.
- [11] SHEN X, ZHAO Z Y, WANG H, et al. Elucidation of the anti-inflammatory mechanisms of *Bupleuri* and *Scutellariae* radix using system pharmacological analyses [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 3709874.
- [12] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [13] LIANG Y Q, SHEN K P, HU B. Research on traditional Chinese medicine pathogenesis and treatment of gastric cancer [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊)*, 2014, 32(3): 513-515.
- [14] ZHOU B, SHAN Z S, FANG M M, et al. Clinical observation on modified liujunzi decoction in combination with chemotherapy in treatment of 31 advanced non-small cell lung cancer patients [J]. *J Tradit Chin Med(中医杂志)*, 2015, 56(3): 219-222.
- [15] WANG C H, LIU M H, WANG P, et al. Impact of Liujunzi decoction on the EGF, TGF- α in gastric ulcer tissue rats [J]. *J Chang Univ Chin Med(长春中医药大学学报)*, 2015, 31(3): 448-450.
- [16] 张仲林, 臧志和, 钟玲, 等. 六君子汤对脾虚证大鼠胃肠激素影响的实验研究[J]. *中成药*, 2010, 32(4): 659-661.
- [17] 王平, 田维毅, 何光志, 等. 六君子汤对幽门螺杆菌感染小鼠胃内微生态环境的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(2): 379-380.
- [18] CHEN Y L, MIAO Y Y, LV C T. Comparative study on inhibitory effect of reinforcing spleen and stomach recipes on tumour growth [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志)*, 2010, 16(3): 112-115.
- [19] VOUSDEN K H. Activation of the p53 tumor suppressor protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1602(1): 47-59.
- [20] BUSUTTIL R A, ZAPPAROLI G V, HAUPT S, et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(23): 12016-12026.
- [21] WEI J X, NOTO J M, ZAIKA E, et al. Bacterial CagA protein induces degradation of p53 protein in a p14ARF-dependent manner [J]. *Gut*, 2015, 64(7): 1040-1048.
- [22] CROCIANI O, LASTRAIOLI E, BONI L, et al. HERG1 channels regulate VEGF-A secretion in human gastric cancer: clinicopathological correlations and therapeutical implications [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(6): 1502-1512.
- [23] REN L P, LI X J, JIN S J. Influence of sophoridine on proliferation and caspase-3/bcl-2/bax signaling pathway of human pancreatic cancer cell line capan-1 cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2017, 34(3): 325-328.
- [24] HUANG K H, FANG W L, LI A F, et al. Caspase-3, a key apoptotic protein, as a prognostic marker in gastric cancer after curative surgery [J]. *Int J Surg*, 2018(52): 258-263.
- [25] LEE H, SAINI N, PARRIS A B, et al. Ganetespib induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis in gastric cancer cells through targeting of receptor tyrosine kinase signaling [J]. *Int J Oncol*, 2017, 51(3): 967-974

收稿日期: 2018-11-20

(本文责编: 沈倩)