

基于网络药理学的半枝莲抗肿瘤活性成分及整合作用机制研究

杨 沙¹, 段灿灿², 晏仁义³, 张建永^{1*}

1. 遵义医学院药学院, 贵州 遵义 563000

2. 遵义医学院 基础药理教育部重点实验室暨特色民族药教育部国际合作联合实验室, 贵州 遵义 563000

3. 天津益倍元天然产物技术有限公司, 天津 300457

摘要: **目的** 利用网络药理学方法探索半枝莲抗肿瘤的活性成分和分子作用机制。**方法** 采用类药五原则筛选活性成分, 经分子对接获得半枝莲活性成分的靶蛋白并于 CTD 数据库中获得靶点相对应的疾病, 运用网络可视化软件, 构建分子-靶点-疾病相互作用网络; 同时进行蛋白质相互作用分析, 通过生物学信息注释库 (DAVID) 对靶点进行生物代谢通路分析。**结果** 半枝莲中有 72 个活性成分可与 14 个以上的肿瘤相关靶蛋白相互作用, 半枝莲临床生物碱 D、barbatellarine E、半枝莲碱 A 等在内的二萜类成分是半枝莲抗肿瘤的主要活性成分。网络分析显示, 半枝莲主要活性成分可作用于蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B)、碳酸酐酶 2 (CA2)、周期蛋白依赖性激酶 (CDK2)、视黄酸 α 受体 (RXRA) 等关键靶蛋白, 参与调控 VEGF 信号通路、Fc ϵ RI 信号通路以及 FoxO 信号通路。**结论** 半枝莲可通过抗炎、抑制肿瘤血管生成等过程发挥多靶点、多通路的协同抗肿瘤作用。

关键词: 半枝莲; 网络药理学; 抗肿瘤; 活性成分; 作用机制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3471-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.003

Active-component and integrative mechanism of *Scutellaria barbata* in treatment of cancer based on network pharmacology method

YANG Sha¹, DUAN Can-can², YAN Ren-yi³, ZHANG Jian-yong¹

1. School of Pharmacy, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

2. Key Laboratory Basic Pharmacology of Ministry of Education and Joint International Research Laboratory of Ethnomedicine of Ministry of Education, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

3. Tianjin Yibei Yuan Natural Products Technology Co., Ltd., Tianjin 300457, China

Abstract: **Objective** To explore the active compounds and integrative mechanism of *Scutellaria barbata* in treatment of cancer by using network pharmacology. **Methods** The active components were screened by five rules of durability. The target proteins of *S. barbata* were obtained by molecular docking. The main diseases related to *S. barbata* were obtained by Comparative Toxicogenomics Database (CTD). Then, the compound-target-disease interaction network was built using cytoscape 3.40. After protein-protein interaction analysis, Biological Information Annotation Databases (DAVID) was used to analyze the biological metabolic pathway of target proteins. **Results** A total of 72 compounds from *S. barbata* acted with more than 14 cancer-related targets, and diterpenoids including scutellinquinone D, barbatellarine E, and scutebarbatines A were the main active molecules of *S. barbata*. Network analysis showed that the active compounds of *S. barbata* can regulate VEGF signaling pathway, Fc epsilon RI signaling pathway, and FoxO signaling pathway through acting with the key targets protein, such as protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B), carbonic anhydrase 2 (CA2), cyclic protein dependent kinases 2 (CDK2), retinoic acid α receptor (RXRA) and so on. Finally, *S. barbata* regulated the process of inflammation and tumor angiogenesis for its anticancer effect. **Conclusion** *S. barbata* can show the multi-target and multi-pathway synergistic antitumor activity through anti-inflammation and inhibiting tumor angiogenesis. **Key words:** *Scutellaria barbata* D. Don; network pharmacology; antitumor; active component; action mechanism

恶性肿瘤作为全球较大的公共卫生问题之一, 成极大的威胁^[1]。目前尽管在预防和治疗方面取得了较好的进展, 但其仍是世界范围内导致死亡的主

收稿日期: 2017-11-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81560736, 81760746); 贵州省教育厅科技拔尖人才支持项目 (黔教合 KY 字 [2017] 078)

作者简介: 杨 沙, 硕士研究生。E-mail: 2459637593@qq.com

*通信作者 张建永, 硕士生导师, 主要从事中药质量评价与系统生物学研究。E-mail: zhangjianyong2006@126.com

要原因,因而对肿瘤疾病的治疗一直是医药学界研究的重点^[2]。大量临床研究表明,化学药物虽提高了多种恶性肿瘤的治愈率,但存在较强的毒副作用及耐药性等缺陷。中药治疗肿瘤具有较长的历史。目前其治疗恶性肿瘤包括清热解毒、扶正祛邪、活血化瘀、软坚散结、以毒攻毒等方法,具有多方位、多靶点及不易产生耐药性等优势,已经成为抗肿瘤新药研发的新方向^[3-4]。

半枝莲为唇形科黄芩属植物半枝莲 *Scutellaria barbata* D. Don 的干燥全草,始载于《药镜拾遗赋》。其性辛、苦、寒,具有清热解毒、消肿止痛等功效^[5],中医常用其单方或复方治疗各种肿瘤。据《中华肿瘤治疗大成》载,半枝莲主治原发性肝癌、胃癌等消化道肿瘤,肺癌及子宫颈癌等^[6]。现代药理学研究表明半枝莲具有很好的抗肿瘤活性,其主要通过抑制肿瘤增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成等途径发挥作用^[7-9]。目前,对于其抗肿瘤机制已经形成了初步的认识,然而半枝莲发挥抗肿瘤活性的活性成分和作用机制尚未完全明确。

网络药理学作为多学科融合形成的新兴产物,旨在通过各种数据库检索、高通量组学数据分析和计算机模拟等手段构建多层次网络,从而实现从系统水平研究药物与机体相互作用规律和机制等目的^[10]。网络药理学的出现为中药复杂体系的系统化研究提供了新思路^[11]。郑春松等^[12]从网络药理学角度揭示了白芍活性分子群可作用于 MAPK、JNK、PI3K-AKT 信号通路,发挥抑制炎症和骨破坏作用,从而达到治疗类风湿关节炎的药效。张潇等^[13]基于网络药理学研究了交泰丸抗抑郁作用的分子作用机制,发现了交泰丸 28 个活性成分,这些成分主要参与调控 MAPK、Wnt、ErbB 信号转导通路及该通路中的相关靶蛋白发挥抗抑郁作用。许律捷等^[14]采用网络药理学方法研究复方一枝蒿抗流感的作用机制,研究发现 IL-1、RAK3、RT、CLK1、HSD11B1 是复方一枝蒿抗流感的核心靶点,进一步通过作用于多条免疫相关通路,参与机体免疫调节进而发挥抗流感作用。综上可知,网络药理学相对于传统实验药理学方法,具有全面系统的特点。因此借助网络药理学挖掘半枝莲的主要活性成分及作用靶点,对于从系统水平阐述半枝莲的活性成分及作用机制具有重要意义,为深入开展半枝莲基础实验研究及指导临床合理用药提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 半枝莲化学成分收集

目前中药成分数据库较多,其中中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)^[15]是一个综合中药平台,其中含 499 味中药以及与之对应的超过 2.9×10^4 个化学成分。本研究通过国内外文献检索和 TCMSP 数据库检索,收集半枝莲中的化学成分,利用 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Chemical Book (<http://www.chemicalbook.com/>) 等平台对其分子结构进行确证并采用 ChemBioDraw 软件绘制分子结构,结果统一保存为“sdf”格式文件。

1.2 活性成分的筛选及潜在靶点预测

传统中药多为口服制剂,在人体必然经过吸收、分布、代谢、排泄(ADME)过程才能与靶器官、靶组织结合发挥药效。而经验表明,符合里宾斯基(Lipinski)的类药五原则的先导药物因具有较好的 ADME 性质而成为潜在的口服药。PaDEL-Descriptor 是用于计算分子描述符及分子指纹的一款软件,可以计算 797 种描述符及 10 种分子指纹^[16]。半枝莲在临床为口服给药,因此,本研究采用 PaDEL-Descriptor 软件对化合物的分子描述符进行计算,对小分子化合物的类药性进行分析^[17],筛选出半枝莲中的潜在活性成分。

将活性成分的 sdf 格式文件导入 Phrammapper 数据库进行靶点匹配与预测^[18],提取对接分数较高的前 30 个靶点,进一步采用 Uniprot 数据库进行校正与转化操作,获取与活性成分作用的相关蛋白靶点(人源)。

1.3 半枝莲治疗疾病类型分析

在获得上述潜在作用靶点的基础上,将靶蛋白导入 CTD 数据库(<http://ctdbase.org/about/>)中进行疾病类型的分析,查询基因相关疾病,剔除不含疾病信息的靶点,并根据医学主题词表(MESH)的疾病分类对疾病数据进行归类统计。

1.4 网络构建和分析

整合“1.2”和“1.3”项结果,采用 Cytoscape 软件中的关联功能(Merge)将筛选出的活性成分、潜在靶点及疾病信息构建一个成分-靶点-疾病三元综合网络^[19]。进一步挖掘并提取出与肿瘤疾病相关的活性分子及靶点蛋白,进而生成成分-靶点网络图、靶点-疾病网络图、成分-靶点-肿瘤疾病网络图,并采用软件 Cytoscape 的插件 Network analysis 对网

络特征进行分析。

1.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建

将筛选得到的肿瘤靶点导入在线 STRING 10.0 软件 (<http://string-db.org/>)^[20], 获取蛋白质相互作用信息。该软件可自动对每一个蛋白质相互作用信息进行打分, 分值越高表明蛋白质的相互作用置信度越高。为保证数据的可靠性, 本研究选取打分值高于 0.7 的高置信度的数据, 构建由导入基因表所表达产物组成的 PPI 网络^[21], 并采用 Cytoscape 软件对网络进行可视化处理和分析。

1.6 生物通路分析

为说明半枝莲中活性成分的潜在作用靶点在基因功能和信号通路中的作用, 本研究将采用在线分析系统 DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) 对 PPI 网络中的关键靶蛋白进行 KEGG 通路分析, 并使用 Omicshare 在线分析平台 (<http://www.omicshare.com/tools/Home/Index/index.html>)

对富集分析结果进行可视化, 解析半枝莲中抗肿瘤活性成分显著影响的生物通路, 探讨半枝莲发挥抗肿瘤作用的可能机制。

2 结果

2.1 半枝莲中的活性成分及对应的潜在靶点信息

半枝莲所含化学成分结构类型有黄酮类、二萜类、挥发油类、甾体类等。按照类药五原则, 口服药物必须满足以下特点: ①氢键供体数目 (以 NH 和 OH 键数目之和计) 不大于 5; ②相对分子质量不大于 500; ③油水分配系数 ($\log P$) 不大于 5; ④氢键受体数目不大于 10; ⑤可旋转键的数量不超过 10 个。本研究通过 TCMSP 数据库和文献检索获得与半枝莲相关的化学成分有 217 个, 其中符合类药五原则的小分子有 150 个, 包括二萜类化合物 58 个, 黄酮类化合物 39 个, 挥发油类化合物 23 个, 甾体类化合物 10 个, 芳香醛、酮、酸化合物 16 个, 三萜类化合物 2 个, 以及其他类型化合物 2 个 (表 1)。

表 1 半枝莲的活性成分信息

Table 1 Detail information of active compounds in *S. barbata*

分类	编号	化合物名称	度	分类	编号	化合物名称	度
黄酮类	C1	5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	18	C29	5,7,8,2'-四甲氧基黄酮	12	二萜类
	C2	7,2'-二羟基-5,8-二甲氧基黄酮	14	C30	5,7,8,2',6'-5 甲氧基黄酮	17	
	C3	半枝莲种素	12	C31	7-羟基-5,8-二甲氧基黄酮-7-O-β-D-葡萄糖苷	10	
	C4	5-甲基醚-5,7-二羟基黄酮	13	C32	芹菜素-7-O-葡萄糖醛酸乙酯	15	
	C5	7-羟基-5,8-二甲氧基-2-苯基色原酮	15	C33	芹菜素	10	
	C6	5-羟基-7,8-二甲氧基-2-(4-甲氧基苯基)色原酮	18	C34	半枝莲素	15	
	C7	5,7,4'-三羟基-8-甲氧基黄烷酮	13	C35	野黄芩素	14	
	C8	5,7,4'-三羟基-6-甲氧基黄烷酮	14	C36	野黄芩苷	11	
	C9	苏齐黄酮	17	C37	5,4'-二羟基-6,7,3',5'-四甲氧基黄酮	10	
	C10	异红花素	13	C38	5,7-二羟基-8,2'-二甲氧基黄酮	15	
	C11	圣草素	14	C39	7-羟基-5,8-二甲氧基-3-苯基色原酮	12	
	C12	三裂鼠尾草素	12	C40	6-乙酰氧基半枝莲素 C	14	
	C13	黄芩苷	12	C41	scutebata P	16	
	C14	6-羟基柚皮素	13	C42	scutebata Q	15	
	C15	黄芩素	19	C43	scutebata E	19	
	C16	粗毛豚草素	14	C44	scutebata R	19	
	C17	柚皮素	13	C45	scutebata I	16	
	C18	甲基鼠李黄酮	15	C46	scutebata J	15	
	C19	次黄芩素	14	C47	scutebata K	16	
	C20	槲皮素	14	C48	scutebata L	13	
	C21	木犀草素	11	C49	scutebata N	16	
	C22	5,7-二羟基黄酮	10	C50	半枝莲素 B	17	
	C23	5,6,2'-三羟基-7,8-二甲氧基黄酮	15	C51	半枝莲素 C	17	
	C24	2',3',5,7-四羟基黄酮	4	C52	半枝莲素 D	18	
	C25	5,2'-二羟基-7,8-二甲氧基黄酮	14	C53	scuterulein D	12	
	C26	5,4'-二羟基-6,7,3'-三甲氧基黄酮	16	C54	scutebata E	15	
	C27	5,7,2'-三羟基黄酮	9	C55	scupolin I	16	
	C28	5,7,8,4'-四羟基黄酮	12	C56	半枝莲二萜 A	13	

续表 1

分类	编号	化合物名称	度	分类	编号	化合物名称	度
二萜类	C57	半枝莲二萜 B	11		C104	β -谷甾醇	14
	C58	半枝莲二萜 C	15		C105	胆固醇	15
	C59	半枝莲二萜 D	12		C106	环阿屯醇	14
	C60	半枝莲二萜 E	11		C107	胡萝卜苷	17
	C61	半枝莲二萜 F	12	芳香醛、酮、 酸类	C108	6-羟基香豆素	19
	C62	半枝莲二萜 G	13		C109	对甲氧基桂皮酸	15
	C63	半枝莲二萜 H	19		C110	绿原酸	16
	C64	半枝莲二萜 I	17		C111	对羟基甲醛	1
	C65	半枝莲内酯 A	15		C112	对羟基苄基丙酮	11
	C66	scuterivalactones C2	16		C113	对香豆酸	14
	C67	barbatellarine E	20		C114	对羟基苯乙酮	1
	C68	半枝莲素 A	19		C115	原儿茶酸	15
	C69	scutellin A	13		C116	3,4-二羟基苯甲酸	15
	C70	scuterulein A	15		C117	香草酸	14
	C71	deacetylscuterulein C	15		C118	异香草酸	9
	C72	7-烟酰氧基半枝莲生物碱 H	19		C119	苯甲酸	13
	C73	半枝莲碱 M	16	挥发油类	C120	肉桂酸	9
	C74	半枝莲碱 N	15		C121	2,4-二羟基苯甲酸	16
	C75	半枝莲临泉生物碱 D	22		C122	大黄素甲醚	17
	C76	半枝莲碱 G	17		C123	2-羟基-3-甲基蒽醌	17
	C77	半枝莲碱 H	16		C124	里哪醇	13
	C78	半枝莲碱 I	13		C125	百里香酚	9
	C79	半枝莲碱 O	16		C126	香荆芥酚	9
	C80	半枝莲碱 X	18		C127	1,1,6-三甲基-1,2-二氢萘	13
	C81	半枝莲碱 Y	15		C128	乙酰百里香酚	14
	C82	半枝莲碱 Z	15		C129	β -榄香烯	11
	C83	半枝莲河南生物碱 C	18		C130	α -雪松烯	11
	C84	半枝莲河南生物碱 D	18		C131	石竹烯	12
	C85	半枝莲河南生物碱 H	15		C132	香叶基丙酮	17
	C86	6-(2-羧基-3-甲基丁酰氧基)半枝莲 河南生物碱 A	14		C133	α -愈创木烯	13
	C87	scutebates M	17		C134	β -紫罗兰酮	16
	C88	scutebabatas B	15		C135	β -没药烯	8
	C89	barbatellarines D	19		C136	δ -杜松烯	13
	C90	半枝莲临泉生物碱 C	17		C137	月桂酸	14
	C91	半枝莲碱 A	19		C138	α -雪松醇	14
甾醇类	C92	半枝莲碱 B	14		C139	α -杜松烷醇	13
	C93	半枝莲碱 C	14		C140	邻苯二甲酸二丁酯	13
	C94	半枝莲碱 F	17		C141	乐斯本	17
	C95	半枝莲碱 D	13		C142	棕榈酸	15
	C96	半枝莲河南生物碱 A	16		C143	亚油酸甲酯	12
	C97	7-乙酰氧基半枝莲碱 H	7		C144	叶绿醇	11
	C98	5,22-二烯-3-豆甾醇乙酯	14		C145	亚油酸	10
	C99	菜油甾醇	14		C146	鲨烯	15
	C100	谷甾醇乙酸酯	17	三萜类	C147	齐墩果酸	14
	C101	β -扶桑甾醇氧化物	14		C148	熊果酸	17
	C102	豆甾醇	13	其他类	C149	staphylionoside	13
	C103	谷甾醇	14		C150	金色酰胺醇酯	15

进一步通过 PharmMapper 平台反向分子对接实验, 得到上述活性分子的潜在作用靶点。本研究选取每个成分得分最高 (Fit score) 的前 30 个靶点蛋白, 经 Uniprot 进行校正, 剔除重复后共预测出半枝莲潜在影响的靶点蛋白共计 267 个。

2.2 药物-靶点-疾病相互作用网络构建与分析

经过筛选发现, 半枝莲的潜在作用疾病共 15 种, 包含细菌感染 (bacterial infection)、癌症 (cancer)、消化系统疾病 (digestive system disease)、泌尿系统疾病 (urogenital disease)、呼吸道疾病 (respiratory tract disease)、皮肤病 (skin disease)、口腔疾病 (mouth disease)、血液系统疾病 (blood disease)、代谢性疾病 (metabolic disease)、免疫系统疾病 (immune system disease)、心血管疾病 (cardiovascular disease)、内分泌系统疾病 (endocrine system disease)、神经系统疾病 (nervous system disease)、耳鼻喉疾病 (ear-nose-throat disease)、肌肉骨骼疾病 (musculoskeletal disease)。将半枝莲活性成分-作用靶点-疾病之间的相互作用采用 cytoscape 3.4.0 构建网络图 (图 1), 其中不同颜色的节点分别代表半枝莲中的活性成分、作用靶点以及对应的疾病类型, 边代表活性成分和作用靶点以及靶点和疾病间的相互作用关系。在网络中, 一个节点的度 (degree) 表示和节点相连的路径的条数, 度越大, 意味着该节点在整个网络中发挥较为重要的作用, 点的大小代表了度值的多少, 反映了成分、靶点及疾病的重要性。通过网络分析, 150 个活性成分的 267 个潜在靶点对应到 15 种疾病上, 表明半枝莲中不同的活性成分可作用于相同的靶点, 也可作用于不同的靶点, 这体现了其多成分、多靶点的作用特点。在网络中除部分靶点无对应的疾病信息外, 每一个靶点至少与一种疾病相关, 其中肿瘤的作用靶点较多 (度为 134), 而消化系统疾病、泌尿系统疾病、代谢性疾病等关联的作用靶点次之 (度依次为 105、90、54), 表明半枝莲在肿瘤治疗方面具有潜在优势, 从疾病类型看, 半枝莲可作用于肝癌、肺癌、胃癌、鼻咽癌、前列腺癌等不同类型的肿瘤。另外对肝硬化、肝炎、胆结石等消化系统疾病, 肾炎、肾功能衰竭等泌尿系统疾病及代谢性疾病糖尿病均具有潜在应用价值。而现代临床实践证明半枝莲单方及其复方均可用于上述疾病的治疗, 在一定程度上证明本研究策略的可行性。

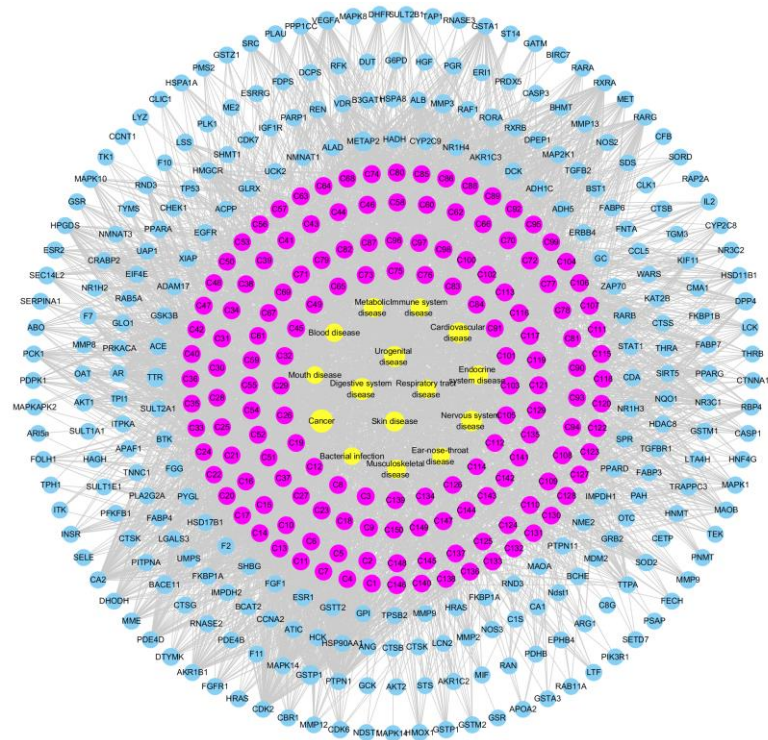
2.3 半枝莲活性成分-抗肿瘤靶点网络构建与分析

本研究拆解并提取成分-作用靶点-疾病网络图中与肿瘤相关的活性成分及靶蛋白, 构建成成分-靶点互作关系, 以成分-靶点网络表示 (图 2)。该网络总共包括 285 个节点 (150 个化合物节点和 135 个靶点节点)。进一步分析发现半枝莲有 96 个活性分子可与 14 个及以上的靶蛋白相互作用, 其中度较高的活性分子多数为二萜类化合物, 其次为黄酮类化合物, 如临泉半枝莲生物碱 D (scutellinquinine D, 度=22)、barbatellarine E (度=20)、半枝莲二萜 H (scutellones H, 度=19)、半枝莲碱 A (scutebarbatines A, 度=19), 5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮 (5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, 度=18) 以及黄芩素 (baicalein, 度=19)。亦有文献报道半枝莲的活性成分二萜类和黄酮类化合物具有较强的抗肿瘤活性^[22]。如黄酮类化合物汉黄芩素 (wogonin) 可通过作用于缺氧诱导因子 1 α (HIF-1 α) 蛋白, 抑制肿瘤血管生成^[23], 诱导肿瘤细胞凋亡^[24]; 黄芩素 (baicalein) 能抑制肿瘤细胞的增殖、转移以及与肺癌相关的炎症^[25]。二萜类成分半枝莲碱 A (scutebarbatines A) 能抑制 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺细胞的激活, 通过免疫调节抑制肿瘤生长^[26]; 半枝莲碱 B (scutebarbatines B) 能将细胞阻断于 G₁ 期, 影响细胞的正常分裂; Scutellones 能破坏肺癌细胞微丝蛋白聚集功能, 还可影响肿瘤细胞的迁移^[27]。进一步验证了结果的准确性。

此外, 对成分-靶点网络中 135 个靶蛋白节点的网络特征 (表 2) 分析发现, 有 60 个靶蛋白可与 10 个以上的活性分子存在较强的相互作用。这些靶点包括与癌细胞的侵袭和转移密切相关的蛋白酪氨酸磷酸酶 1B (PTP1B)、碳酸酐酶 2 (CA2) 等关键酶^[28-30], 肿瘤增殖和分化相关的周期蛋白依赖性激酶 (CDK2), 视黄酸 α 受体 (RXRA) 等靶蛋白^[31-32], 诱导肿瘤细胞的凋亡相关的丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14) 以及参与肿瘤血管生成的热休克蛋白 HSP90- α (HSP90AA1)、基质金属蛋白酶-12 (MMP12) 等蛋白。其中, 靶蛋白 PTP1B (度=88)、CA2 (度=75)、CDK2 (度=73)、HSP90AA1 (度=78) 拥有较多的相互作用配体, 介数 (betweenness) 也相对较高, 表明了上述靶点在网络中的重要性。

2.4 半枝莲活性成分-抗肿瘤靶点-肿瘤疾病生物网络的构建及分析

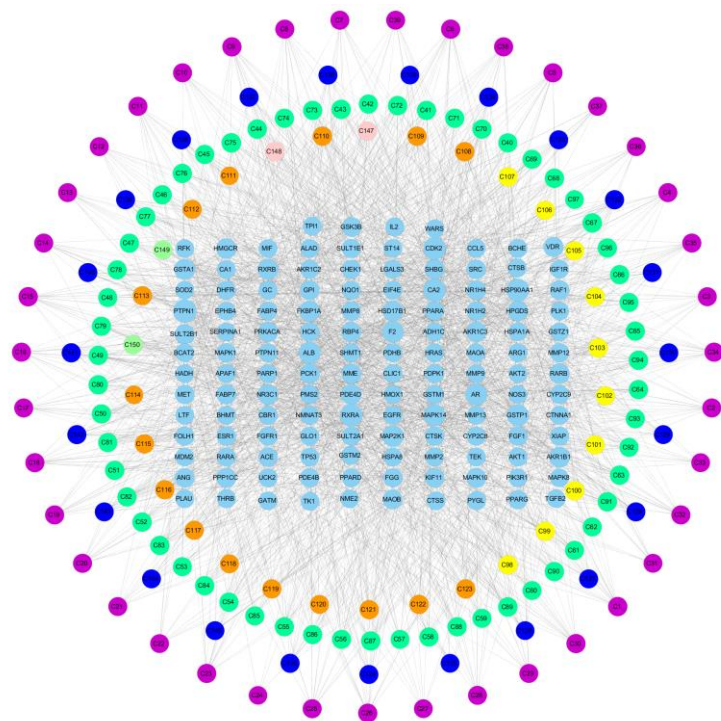
为进一步探究半枝莲治疗不同类型肿瘤的分子



红色代表成分 浅蓝色代表靶点 黄色代表疾病
red color represents active components light blue color represents targets yellow color represents disease

图 1 半枝莲活性成分-作用靶点-疾病网络图

Fig. 1 Active compound-target-disease network of *S. barbata*



紫色为黄酮类成分 绿色为二萜类成分 黄色为甾醇类 橘黄色为芳香醛、酮、酸类 深蓝色为挥发油 粉色为三萜类 浅绿色为其他类 浅蓝色为肿瘤相关靶点
purple color represents flavonoids green represents diterpenoids yellow represents sterol orange represents aromatic aldehyde aromatic ketone and aromatic acid
dark blue represents the volatile oil pink represents triterpenoids light green represents the others light blue represents the target related to tumor

图 2 半枝莲活性成分-肿瘤相关靶点网络图

Fig. 2 Active compounds-tumor targets network of *S. barbata*

表 2 半枝莲化学成分的潜在靶点信息

Table 2 Information of potential targets from components of *S. barbata*

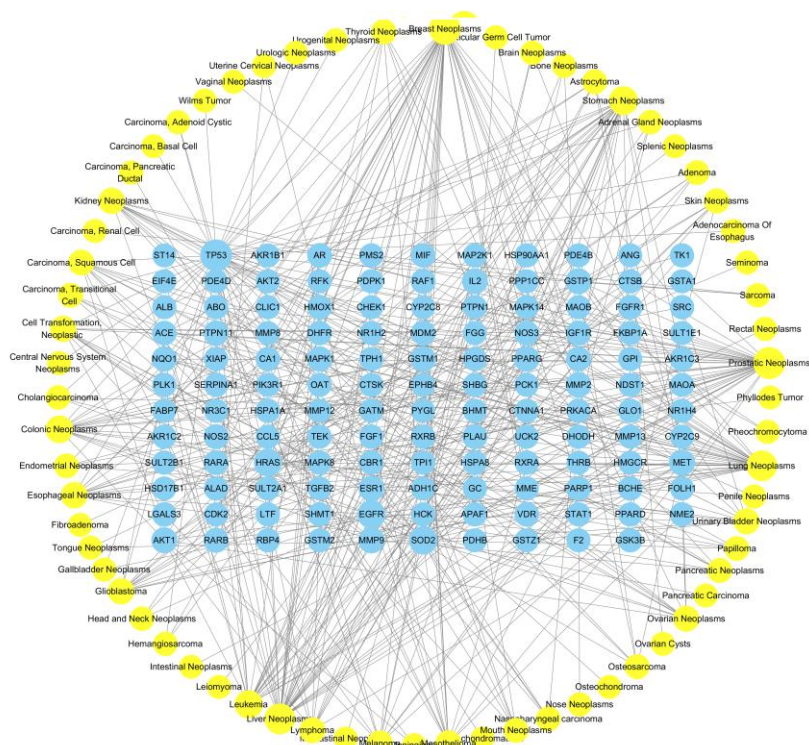
Uniprot ID	基因靶点	度	介数	UniprotID	基因靶点	度	介数
P18031	PTP1B	88	0.132	P02753	RBP4	24	0.004
P07900	HSP90AA1	78	0.060	P08473	MME	23	0.009
P00918	CA2	75	0.055	Q96RI1	NR1H4	22	0.003
P24941	CDK2	73	0.067	P04049	RAF1	21	0.002
P19793	RXRA	71	0.034	P27338	MAOB	21	0.003
P02768	ALB	61	0.029	P06744	GPI	20	0.006
P09211	GSTP1	60	0.053	P49841	GSK3B	19	0.007
Q16539	MAPK14	60	0.043	P08581	MET	19	0.002
P10275	AR	60	0.031	P03950	ANG	18	0.003
P00734	F2	54	0.040	P52732	KIF11	17	0.004
Q02750	MAP2K1	54	0.019	P03372	ESR1	15	0.003
P08263	GSTA1	45	0.020	Q07343	PDE4B	15	0.003
P28702	RXRB	43	0.011	P12821	ACE	15	0.003
P15121	AKR1B1	41	0.025	P39900	MMP12	14	0.002
P62942	FKBP1A	41	0.016	P05230	FGF1	14	0.002
Q08499	PDE4D	38	0.015	O15530	PDPK1	14	0.002
P04150	NR3C1	37	0.007	P12931	SRC	14	0.004
P04035	HMGCR	36	0.013	Q07869	PPARA	14	0.003
P10826	RARB	34	0.009	P22894	MMP8	13	0.003
P14061	HSD17B1	33	0.009	P11362	FGFR1	12	0.002
O60760	HPGDS	33	0.021	P49888	SULT1E1	12	0.004
P42330	AKR1C3	33	0.008	P55055	NR1H2	12	0.001
P17612	PRKACA	31	0.011	P98170	XIAP	12	0.002
P11473	VDR	29	0.005	P11712	CYP2C9	12	0.003
P35558	PCK1	28	0.028	P37231	PPARG	12	0.001
O00204	SULT2B1	27	0.007	P28482	MAPK1	12	0.001
P53779	MAPK10	26	0.009	P08631	HCK	11	0.001
P36873	PPP1CC	26	0.004	P43235	CTSK	11	0.002
P04278	SHBG	25	0.004	Q04609	FOLH1	11	0.002
O15540	FABP7	24	0.003	P10632	CYP2C8	11	0.001

作用机制，通过对靶点-疾病（不同类型肿瘤）网络（图 3）进行网络分析，挖掘出半枝莲活性成分显著影响的肿瘤疾病类型（度排列前 5），进而构建成分-靶点-肿瘤疾病生物网络。研究发现，与其他类型的肿瘤疾病相比，半枝莲对前列腺癌（度=41）、乳腺癌（度=40）、肝癌（度=35）、肺癌（度=34）、胃癌（度=26）的治疗具有显著的优势，这也与半枝莲功能主治的现代药理学研究相吻合。将上述疾病对应成分及靶点信息导入 Cytoscape 软件，生成成分-靶点-肿瘤网络图（图 4）。结果发现，半枝莲对

于不同类型的肿瘤疾病的治疗即有共同的分子作用群及靶点群，又各有偏重。

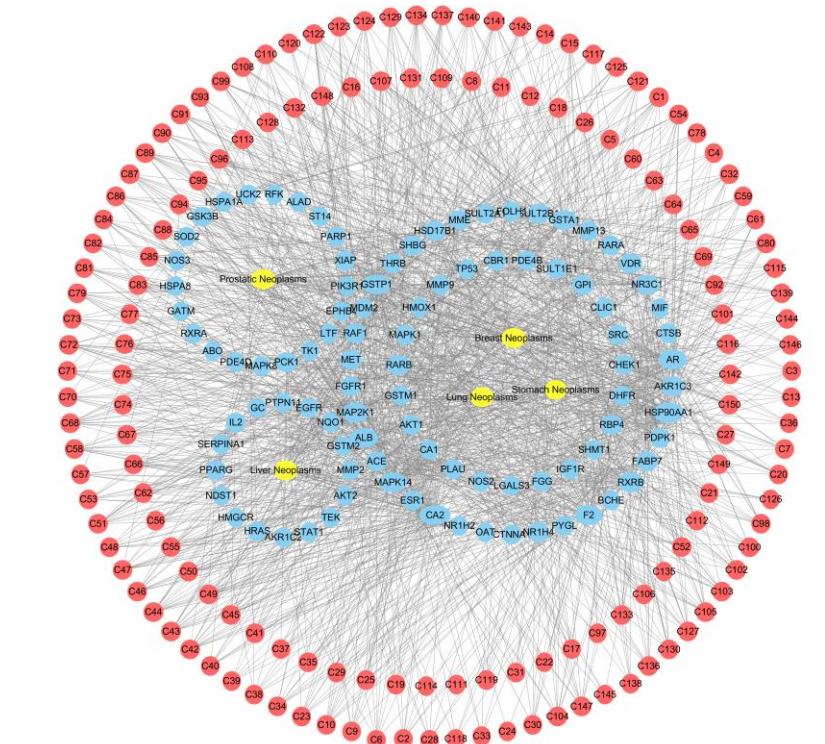
2.5 半枝莲肿瘤相关靶点 PPI 网络的构建和分析

为进一步探讨半枝莲发挥抗肿瘤活性作用机制，本研究基于 PPI 关系，构建了半枝莲潜在靶点的 PPI 网络（图 5）。PPI 网络包含 118 个节点和 476 条相互作用关系，利用 Cytoscape 软件对网络拓扑学特征进行分析，发现其中中介中心度（betweenness centrality）和度大于均值（度=8.068，中介中心度=0.016 5）的关键节点有 38 个，占总节点数的 32.2%。



浅蓝色代表靶点 黄色代表疾病
light blue color represents targets yellow color represents disease

图 3 靶点-肿瘤疾病网络图
Fig. 3 Target-tumor disease network



浅蓝色代表靶点 黄色代表疾病 红色代表成分
light blue color represents targets yellow color represents disease red color represents compounds

图 4 半枝莲活性成分-抗肿瘤靶点-肿瘤疾病生物网络
Fig. 4 Active compounds-cancer targets-tumor disease of *S. barbata*

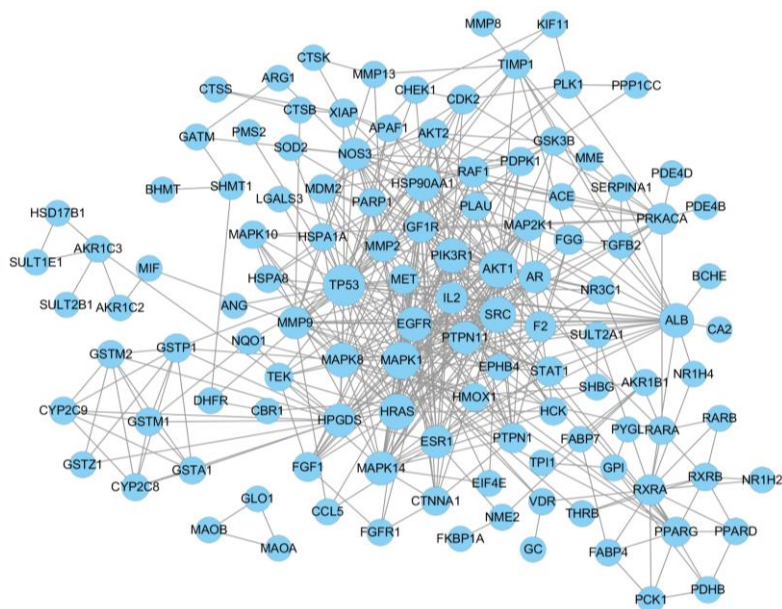


图 5 蛋白质-蛋白质相互作用网络图
Fig. 5 PPI network

这些关键节点包括 TP53、AKT1、MAPK1、MMP9、HRAS、SRC、HSP90AA1 等靶蛋白，其中度值最高的为肿瘤抑制蛋白 p53 (TP53)，能与 41 个蛋白发生相互作用，提示该靶蛋白在整个网络中发挥较为重要的作用。

2.6 生物通路富集分析

PPI 网络中 38 个关键靶蛋白的 KEGG 通路富集分析结果如图 6 所示，本研究通过 Rich factor、P 值富集到通路上的基因个数来衡量 KEGG 富集程度。其中 Rich factor 指差异表达的基因中位于该通路条目的基因数目与所有注释基因中位于该通路条目的目的基因总数的比值。Rich factor 越大，表示富集的程度越大。研究的关键靶蛋白主要富集于 VEGF 信号通路、FcεRI 信号通路 (Fc epsilon RI signaling pathway) 以及 FoxO 信号通路。此外，分析发现半枝莲亦调控了常见的肿瘤经典通路如 MAPK、PI3K-Akt 等通路，进一步表明半枝莲的多成分、多通路整合作用，除了经典的抗肿瘤通路外，还展现出其抗肿瘤独特的作用方式。

3 讨论

中医认为热毒蕴结是恶性肿瘤发生的重要病因和病理之一，热邪久留体内，血遇热则凝，津液遇火灼为痰，热与痰、瘀等蕴结形成热毒，热毒阻塞于经络脏腑，就可形成肿瘤。《皇帝内经素问·至真要大论》中记载“治热以寒、热者寒之”，对于

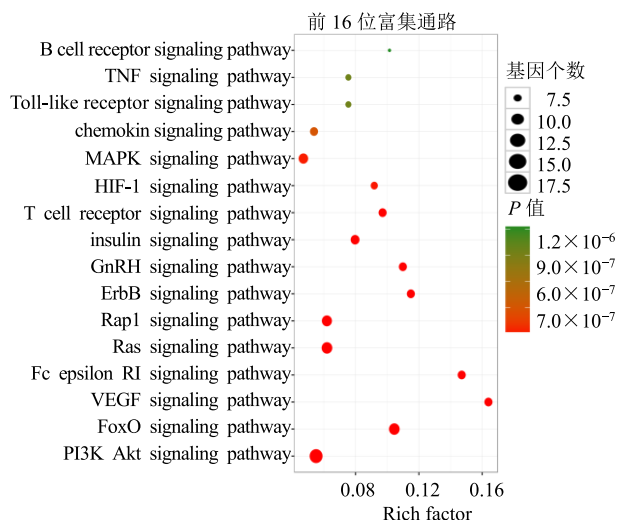


图 6 通路分析气泡图
Fig. 6 Bubble plot of pathway analysis

肿瘤的治疗要用寒冷药物达到清热解毒的目的。因此采用清热解毒药治疗恶性肿瘤是中医治疗肿瘤的主要法则之一^[33]。

半枝莲作为一种广泛应用于临床的清热解毒类中药，被应用于多种癌症的辅助治疗^[34]。本研究采用网络药理学的方法挖掘半枝莲抗肿瘤的活性成分及作用靶点，通过构建成分-靶点-疾病网络获得半枝莲发挥抗肿瘤活性的活性成分及靶点，并对成分与靶蛋白间的相互作用关系采用成分-靶点网络进行可视化，同时进行蛋白相互作用网络，靶点

关联通路分析,从而为半枝莲多成分、多靶点、多途径的抗肿瘤整合作用机制提供参考。

本研究结果发现半枝莲作用的关键靶点包括 PTP1B、CDK2、HSP90AA1 等,其中 PTP1B 是一种经典的非跨膜性蛋白酪氨酸磷酸酶,其主要通过调节细胞内酪氨酸的磷酸化水平来调控细胞的生长、分化、代谢、迁移、基因转录及凋亡,在细胞增殖和信号传导的调节过程中起着重要作用。相关研究发现 PTP1B 在乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤组织和细胞中高表达,并有能促进肿瘤细胞转移的作用^[35-36]。已有研究发现从中药中分离得到的部分黄酮类成分和二萜类成分具有很好的 PTP1B 抑制活性^[37],然而关于半枝莲对靶蛋白 PTP1B 的调控还尚未见报道,需深入研究。CDK2 是 CDKs 家族成员之一,是细胞周期 G₁ 期和 S 期中重要的调控因子^[38]。越来越多的研究表明细胞周期调控异常与细胞癌变密切相关,在 90% 以上的人肿瘤中,CDKs 都有过度表达^[39],Marconett 等^[40]采用 PI 染色流式细胞仪研究发现半枝莲提取物可抑制肺癌 MCF7 细胞增殖,阻滞细胞周期于 G₁ 期,并可降低 cyclinD1、CDK2、CDK4 的表达,进一步验证了预测的正确性。HSP90AA1 编码的热休克蛋白 90 α 作为热休克蛋白家族中的重要一员,能维持多种致癌配体蛋白的构造稳定性及功能,在肿瘤细胞的分化和增殖、生存和移动、血管形成和转移中起作用。HSP90 已成为公认的抗癌治疗的靶蛋白^[41]。Fu 等^[42]研究发现半枝莲所含的木犀草素能降低 STAT3 的 Tyr⁷⁰⁵ 和 Ser⁷²⁷ 磷酸化进而诱导肿瘤细胞的凋亡与对靶蛋白 HSP90 的调控有关。Aalinkel 等^[43]研究发现半枝莲所含的槲皮素能降低 HSP90 的表达从而抑制前列腺癌细胞的生存和繁殖,由此可知正是半枝莲多成分组合作用于关键靶点发挥抗肿瘤活性。通过靶点-疾病网络分析,可以获得成分-靶点-疾病的关系,特别是不同类型肿瘤的关联靶点及成分,可在后期不同肿瘤研究中,选取合适的成分及靶点通路进行分析,更有效地揭示作用机制。

为进一步探讨半枝莲调节的生物通路,本研究对 PPI 网络中出现的蛋白进行 KEGG 通路富集分析,发现 PPI 网络的关键靶点主要富集于 3 个通路: VEGF 信号通路、Fc ϵ RI 信号通路和 FoxO 信号通路。恶性肿瘤的生长、转移、复发依赖于新生血管的形成观点已达共识,肿瘤血管生成的过程受多种生成因子调控,研究发现 VEGF 信号通路与肿瘤新生血

管有着密不可分的关系,其中 VEGF 家族及其受体是作用最强的正性调控因子之一,在肿瘤血管中呈高表达状态。张妮娜等^[44]采用 Matrigel 栓和原代人脐静脉内皮细胞建立血管生成模型发现半枝莲在体内外均能抑制肿瘤血管的生成,并且能显著抑制肿瘤细胞分泌 VEGF 蛋白表达,从实验角度证明半枝莲可通过调控 VEGF 信号通路影响血管内皮细胞增殖、生长、迁移及血管通透性的增加,抑制血管的生成进而发挥抑制肿瘤的生长和转移。FoxO 信号通路在细胞凋亡过程中发挥着非常重要的作用,参与多种肿瘤的发生和发展。FoxO 家族是 PI3K/Akt 信号通路下游的重要信号分子,可通过 Akt 磷酸化和去磷酸化调节其活性以及下游信号分子如细胞死亡调节因子(Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim)、Fas 配体和细胞周期蛋白依赖性激酶等转录作用,诱导细胞凋亡。已有较多的研究证明半枝莲能诱导多种肿瘤细胞的凋亡,可能与 FoxO 信号通路有关^[45-47]。静广平等^[47]研究发现半枝莲提取物(ESB)可通过调控 apoptosis 信号通路中多个基因如 Bcl-2、Bax、Caspase-3 从而降低舌鳞癌 SAS 细胞的增殖力。张梅等^[48]研究发现半枝莲可通过诱导细胞凋亡作用抑制人肺癌 A549 细胞的生长,其分子机制可能与下调 Survivin 表达水平和上调 Caspase-3 的表达水平有关。此外,本研究发现炎症相关通路 Fc ϵ RI 信号通路在半枝莲治疗恶性肿瘤的过程中可能发挥重要作用。近年来研究表明,恶性肿瘤的生长不仅受肿瘤细胞自身遗传学和生物学的调控,而且还受肿瘤微环境的影响,而炎症被认为是其中最重要的因素之一。在肿瘤炎症环境中,募集的炎症免疫细胞不仅通过表型的转换和修饰参与免疫抑制微环境的形成,而且通过输送炎症因子促进肿瘤的增殖和转移。半枝莲具有抗炎作用,有研究^[49]发现半枝莲提取物可以显著抑制 HT-29 人结肠癌细胞中由促炎因子 IL-6 介导的 STAT3 磷酸化水平和转录活性的升高,从而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。因此,推测半枝莲可通过调控 Fc ϵ RI 通路介导的信号转导,抑制肥大细胞和嗜碱性粒细胞释放炎性介质和细胞因子进而间接抑制肿瘤细胞的生长,具有潜在的研究价值。

综上所述,本研究应用网络药理学方法,对半枝莲多成分、多靶点、多途径的复杂网络关系进行研究,发现半枝莲抗肿瘤的主要活性成分为包括半枝莲甾体生物碱 D、barbatellarine E、半枝莲碱 A

等在内的二萜类成分,其次为5-羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、黄芩素等黄酮类成分。这些组分既能通过直接调节肿瘤细胞分化、生长、增殖和凋亡,达到抑瘤效果;同时也能通过抗炎、抑制肿瘤血管生成等间接提高抗肿瘤的功。本研究为进一步深入探讨其作用机制奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] 吴菲, 林国桢, 张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势 [J]. 中国肿瘤, 2012, 21(2): 81-85.
- [2] 孙韬, 胡凯文. 恶性肿瘤的中成药治疗 [J]. 现代中医临床, 2007, 14(2): 44-47.
- [3] 张文娟, 王永华. 系统药理学原理、方法及在中医药中的应用 [J]. 世界中医药, 2015, 2(10): 280-286.
- [4] 黄越燕, 周吉芳, 徐佳颖. 有毒中药抗肿瘤作用的研究进展 [J]. 山东医药, 2017, 57(2): 108-112.
- [5] 田新宇, 范翠梅, 渠田田, 等. 半枝莲总黄酮中7种成分的含量测定及抗肿瘤活性 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(1): 53-59.
- [6] 潘敏求, 何日恒. 中华肿瘤治疗大成 [M]. 石家庄: 河北科学出版社, 1996.
- [7] 金贤兰. 半枝莲抗肿瘤药理与临床应用研究进展 [J]. 现代医药卫生, 2011, 27(14): 2154-2156.
- [8] 王红, 徐斯凡, 赵凤娟. 半枝莲抗肿瘤药理活性及机制研究进展 [J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2010, 19(4): 77-80.
- [9] 牛国晓, 李洁. 半枝莲抗肿瘤机制研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(2): 231-233.
- [10] Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application [J]. 中国天然药物, 2013, 11(12): 110-120.
- [11] 王永华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系 [J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 801-808.
- [12] 郑春松, 黄绥心, 叶蕪芝, 等. 从网络药理学角度研究白芍治疗类风湿关节炎的作用 [J]. 风湿病与关节炎, 2017, 5(6): 11-15.
- [13] 张潇, 高耀, 向欢, 等. 基于网络药理学的交泰丸治疗抑郁症作用机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(7): 1584-1590.
- [14] 许律捷, 姜雯, 庞晓丛. 复方一枝蒿抗流感有效成分的网络药理学研究 [J]. 药学学报, 2017, 52(5): 745-752.
- [15] 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.
- [16] Yap C W. PaDEL-descriptor: An open source software to calculate molecular descriptors and fingerprints [J]. J Comput Chem, 2011, 32(7): 1466-1474.
- [17] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. Adv Drug Deliv Rev, 2001, 46(1/2/3): 3-26.
- [18] Liu X, Ouyang S, Yu B, et al. PharmMapper server: A web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38: W609-W614.
- [19] Smoot M E, Ono K, Ruscheinski J, et al. Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization [J]. Bioinformatics, 2011, 27(3): 431-432.
- [20] Szklarczyk D, Franceschini A, Wyder S, et al. STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43: D447-D452.
- [21] 刘鑫馗, 吴嘉瑞, 张丹, 等. 基于网络药理学的参附汤作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 211-218.
- [22] Wang P, Geng X, Pi G, et al. Preparative separation of four individual flavonoids in *Scutellaria barbata* D. Don based on high selectivity polymeric adsorbents with different polarities [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(32): 3375-3381.
- [23] Song X, Yao J, Wang F, et al. Wogonin inhibits tumor angiogenesis via degradation of HIF-1 α protein [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 271(2): 144-155.
- [24] Tsai C F, Yeh W L, Huang S M, et al. Wogonin induces reactive oxygen species production and cell apoptosis in human glioma cancer cells [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(8): 9877-9892.
- [25] Gong W Y, Wu J F, Liu B J, et al. Flavonoid components in *Scutellaria baicalensis* inhibit nicotine-induced proliferation, metastasis and lung cancer-associated inflammation *in vitro* [J]. Int J Oncol, 2014, 44(5): 1561-1570.
- [26] Gong T, Wang C F, Yuan J R, et al. Inhibition of tumor growth and immunomodulatory effects of flavonoids and scutebarbatins of *Scutellaria barbata* D. Don in lewis-bearing C57BL/6 mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 630760.
- [27] 曲桂武. 安徽半枝莲中新克罗烷型二萜化合物的发现及抗肿瘤活性研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
- [28] Radhakrishnan V M, Kojs P, Young G, et al. pTyr421 cortactin is overexpressed in colon cancer and is dephosphorylated by curcumin: Involvement of non-receptor type 1 protein tyrosine phosphatase (PTPN1) [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e85796.
- [29] Eustace B K, Sakurai T, Stewart J K, et al. Functional

- proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 α in cancer cell invasiveness [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, 6(6): 507-514.
- [30] 姜亮, 韩金祥, 常晓天. 碳酸酐酶与肿瘤相关性研究进展 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2012, 19(18): 1433-1436.
- [31] VanArsdale T, Boshoff C, Arndt K T, *et al*. Molecular pathways: Targeting the cyclin D-CDK4/6 axis for cancer treatment [J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(13): 2905-2910.
- [32] Christensen L L, Tobiasen H, Holm A, *et al*. MiRNA-362-3p induces cell cycle arrest through targeting of E2F1, USF2 and PTPN1 and is associated with recurrence of colorectal cancer [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1): 67-78.
- [33] 陈培丰. 清热解毒法在恶性肿瘤治疗中的意义和作用机制 [J]. 浙江中医药大学学报, 2001, 25(5): 11-12.
- [34] 刘磊磊, 陈娟, 师彦平. 清热解毒中药抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2012, 43(6): 1203-1212.
- [35] 孔德姣, 石琨. 蛋白酪氨酸磷酸酶 1B 在肿瘤发生和发展中的作用 [J]. 肿瘤, 2011, 31(12): 1122-1126.
- [36] 汪进国, 吴佩, 武健, 等. PTP1B 基因对人胃癌细胞株的增殖和迁移能力的影响 [J]. 中国癌症杂志, 2015, 25(8): 579-587.
- [37] Cs J, Lf L, Yw G. Natural products possessing protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) inhibitory activity found in the last decades [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2012, 33(10): 1217-1245.
- [38] Veena M S, Wilken R, Zheng J Y, *et al*. P16 protein and gigaxonin are associated with the ubiquitination of NF κ B in Cisplatin-induced senescence of cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(50): 34921-34937.
- [39] 汪鑫, 任晓岚, 尤启冬, 等. 细胞周期蛋白依赖激酶小分子抑制剂的研究进展 [J]. 海峡药学, 2009, 21(6): 12-14.
- [40] Marconett C N, Morgenstern T J, San R A K, *et al*. A phytochemical extract from the *Scutellaria barbata* plant, disrupts proliferation of human breast and prostate cancer cells through distinct mechanisms dependent on the cancer cell phenotype [J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(4): 397-405.
- [41] 营巧玲, 李前文, 杜云翔. 热休克蛋白 90 α 在肿瘤、食管癌中的研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2015, 12(23): 1750-1752.
- [42] Fu J, Chen D, Zhao B, *et al*. Luteolin induces carcinoma cell apoptosis through binding Hsp90 to suppress constitutive activation of STAT3 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49194.
- [43] Aalinkeel R, Bindukumar B, Reynolds J L, *et al*. The dietary bioflavonoid, quercetin, selectively induces apoptosis of prostate cancer cells by down-regulating the expression of heat shock protein 90 [J]. *Prostate*, 2008, 68(16): 1773-1789.
- [44] 张妮娜, 卜平, 朱海杭, 等. 半枝莲抑制肿瘤血管生成的作用及其机制研究 [J]. 癌症, 2005, 21(12): 1459-1463.
- [45] 代志军, 刘小旭, 薛茜, 等. 半枝莲含药血清对小鼠肝癌细胞生长的抑制和诱导凋亡作用 [J]. 中药材, 2008, 31(4): 550-554.
- [46] 彭军, 林久茂, 魏丽慧, 等. 半枝莲提取物诱导结肠癌 HT-29 细胞凋亡的机制研究 [J]. 福建中医药大学学报, 2010, 20(6): 35-39.
- [47] 静广平, 焦晓辉, 王学勇. 半枝莲提取物抗人舌鳞癌 SAS 细胞增殖作用的研究 [J]. 口腔医学研究, 2009, 25(3): 249-253.
- [48] 张梅, 韩松洋, 葛园园, 等. 半枝莲提取物对人肺癌 A549 细胞的凋亡作用及其对凋亡相关基因表达的影响 [J]. 陕西中医, 2016, 37(6): 756-758.
- [49] Qi Q J, Qiong Y L, Hong W C, *et al*. *Scutellaria barbata* D. Don inhibits growth and induces apoptosis by suppressing IL-6-inducible STAT3 pathway activation in human colorectal cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(4): 1602-1608.