

基于中医药整合药理学平台、GEO 数据库芯片及分子对接探讨大黄抗肝癌的作用机制

王 玉¹, 杨 雪⁴, 靳晓杰¹, 杨飞霞¹, 王玉霞¹, 王 菲¹, 樊 秦¹, 张 建¹, 武晓玉¹, 夏鹏飞^{1,2,3}, 赵 磊^{1,2,3*}

1. 甘肃中医药大学药学院, 甘肃 兰州 730000

2. 甘肃中医药大学 甘肃省高校中藏药化学与质量研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000

3. 甘肃省道地药材质量标准化技术与推广工程实验室, 甘肃 兰州 730000

4. 北京中医药大学药学院, 北京 102488

摘要: 目的 采用 GEO 数据库、整合药理学平台 v2.0 和分子对接技术探讨大黄抗肝癌的活性成分及其分子机制。方法 利用中医药整合药理学平台 (TCMIP) 筛选中药大黄的活性成分, 借助 TCMIP 及 Swisstarget 在线数据库预测作用靶点; 从 GEO 数据库下载肝癌基因芯片数据库, 利用 GEO2R 分析肝癌组织与正常肝组织之间的差异表达基因。基于大黄潜在靶点与肝癌靶点的匹配结果筛选大黄抗肝癌的关键靶点, 并对关键靶点进行基因本体论 (GO) 功能、基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。通过构建蛋白互作网络 (PPI)、成分-靶点网络及中药-成分-靶点-通路网络, 分析并筛选大黄抗肝癌的主要成分和核心靶点。进一步采用 Schrodinger-Maestro 软件对核心靶点与主要活性成分进行分子对接, 以虚拟验证其结合能力并分析其结合模式。结果 筛选得到大黄抗肝癌活性成分 20 个, 作用靶点 86 个, 涉及 CDK1、AKR1C3、PTGS2、AR、CCNB1 等。GO 功能富集主要集中在细胞周期、有丝分裂、氧化还原过程、药物反应、类固醇代谢过程等。KEGG 通路富集主要涉及细胞周期、细胞衰老、补体系统、花生四烯酸代谢、胆汁代谢等, 且这些代谢通路与细胞凋亡、转移、炎症和免疫相关。分子对接结果显示 92.2% 的活性成分与 10 个核心靶蛋白均具有较好的结合力, 且结合形式多以氢键、疏水键、 π - π 键和阳离子- π 键为主。结论 大黄中的大黄酸、大黄素、大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷、丹叶大黄素等活性成分能够作用于 CDK1、CCNB1、CYP2C9、MMP9、PTGS2 等多个靶点, 通过调节与细胞凋亡、转移、炎症、免疫相关的信号通路进而发挥抗肝癌作用。

关键词: 整合药理学平台; GEO 数据库; 分子对接; 大黄; 肝癌; 成分-靶点-通路; 大黄酸、大黄素、大黄酚-8-O- β -D-葡萄糖苷、大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷、丹叶大黄素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)20-5207-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.13

Mechanism of anti-hepatoma of *Rhei Radix et Rhizoma* based on integrative pharmacology platform, GEO database chip and molecular docking

WANG Yu¹, YANG Xue⁴, JIN Xiao-jie¹, YANG Fei-xia¹, WANG Yu-xia¹, WANG fei¹, FAN Qin¹, ZHANG Jian¹, WU Xiao-yu¹, XIA Peng-fei^{1,2,3}, ZHAO Lei^{1,2,3}

1. School of Pharmacy, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

2. Key Laboratory of Chemistry and Quality for Traditional Chinese Medicines, College of Gansu Province, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China

3. Gansu Province Engineering Laboratory for TCM Standardization Technology and Popularization, Lanzhou 730000, China

4. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

Abstract: Objective To investigate the anti-hepatoma active components of *Rhei Radix et Rhizoma* and their molecular mechanisms through GEO database, integrative pharmacology platform and molecular docking technology. **Method** The active ingredients of *Rhei Radix et Rhizoma* were screened by TCMIP and the corresponding targets of these components were predicted through TCMIP and

收稿日期: 2020-07-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81660577); 青海省藏药药理学和安全性评价研究重点实验室开发课题 (2018-ZY-05); 甘肃省道地药材质量标准化技术与推广工程实验室开放基金项目 (ddyc-2016-04); 甘肃省中医药管理局科研项目 (G2K-2014-77)

作者简介: 王 玉 (1990—), 男, 在读博士, 从事中药药效物质基础与质量标准研究。Tel: 18298355915 E-mail: 704338647@qq.com

***通信作者** 赵 磊, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药效物质基础与质量标准研究。Tel: (0931)8762539 E-mail: zzyhx@gszy.edu.cn

Swisstarget databases. The hepatoma gene chip database was downloaded from GEO databases, and the differentially expressed genes between hepatocellular carcinoma (HCC) and normal liver tissue were analyzed by GEO2R. Based on the matching results of potential targets of *Rhei Radix* et *Rhizoma* and the targets of hepatoma, the key targets of *Rhei Radix* et *Rhizoma* against hepatoma were screened, and GO function enrichment and KEGG pathway enrichment analysis of the key targets were performed. Main components and core targets of *Rhei Radix* et *Rhizoma* against hepatoma were analyzed and screened by constructing PPI network, component-target network and traditional Chinese medicine-component-target-pathway network. Furthermore, the molecular docking between the core targets and the main active components was performed by Schrodinger-Maestro software to virtually verify their binding ability and analyze their binding mode.

Result A total of 20 anti-hepatoma active components of *Rhei Radix* et *Rhizoma* were collected and related 86 targets were obtained, including CDK1, AKR1C3, PTGS2, AR and CCNB1, etc. The results of GO functional enrichment mainly focused on the cell cycle, G₂/M transition of mitotic cell cycle, oxidation-reduction process, drug reactions and steroid metabolism processes, etc. The results of KEGG pathway enrichment mainly involved cell cycle, cell senescence, complement system, arachidonic acid metabolism and bile metabolism, and these metabolic pathways were related to cell apoptosis, metastasis, inflammation and immunity. The results of molecular docking showed that 92.2% of the active components had good binding ability with the 10 core proteins, and the main combination forms mainly were hydrogen bonds, hydrophobic bonds, π - π bonds and cation- π .

Conclusion The active components of *Rhei Radix* et *Rhizoma* including rhein, emodin, chrysophanol-8-O- β -D-glucopyranoside, chrysophanol-1-O- β -D-glucoside and rhapontigenin can act on multiple targets such as CDK1, CCNB1, CYP2C9, MMP9 and PTGS2, by regulating signaling pathways related to cell apoptosis, metastasis, inflammation and immunity to play an anti-hepatoma effect.

Key words: integrative pharmacology platform; GEO database; molecular docking; *Rhei Radix* et *Rhizoma*; hepatoma; component-target-pathway; rhein; emodin; chrysophanol-8-O- β -D-glucoside; chrysophanol-1-O- β -D-glucoside; rhapontigenin

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种全世界常见的恶性肿瘤, 其发病早期症状不明显, 晚期以肝脏肿大、肝区疼痛等症状为主, 由于其病情发展迅速, 死亡率高, 已成为我国恶性肿瘤死亡的第二大诱因^[1-2]。引起肝癌发生的主要因素包括慢性病毒性肝炎、肝硬化、脂肪性肝病、黄曲霉素暴露、吸烟、饮酒、遗传因素等^[3]。其治疗手段以放、化疗为主, 而多数西药存在一定的不良反应, 并且长期服用易出现耐药性, 影响患者的生存质量^[4-5]。因此, 探寻治疗肝癌的补充和替代药物势在必行^[6]。中医药应用于抗肿瘤如肝癌、胃癌、肺癌、直肠癌等的防治, 在控制患者病情发展、减少疾病复发、改善症状体征等方面有独特的优势^[7-10]。大黄为蓼科大黄属多年生高大草本植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 或药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎, 具有清热解毒、凉血祛瘀、泻下攻积等功效^[11], 临床上常用于治疗肝胆和胃肠道疾病。基于传统中医药对肝癌的辩证理论及治则治法, 大黄可用于治疗肝癌中辨证属热毒、瘀血壅结的情况。现代药理学研究表明大黄及其提取物通过诱导细胞凋亡、抑制人非小细胞肺癌细胞 A549 和人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖、抑制人乳腺癌细胞 MAD-MDB-231 迁移与侵袭、干扰细胞周期蛋白的表达等途径发挥抗肿瘤作用^[12-13]。以大黄为主的方剂也具有增强抗肿瘤药物疗效, 辅助

放、化疗增敏减毒, 抑制肿瘤生长、侵袭的作用, 如大黄蟅虫丸可显著抑制耐药肝癌细胞活力^[14]。然而大黄在抗肝癌方面的活性物质及其作用机制仍有待进一步深入探究。

网络药理学作为多数据、多学科融合的产物应运而生, 该模式立足于药物靶点预测、网络构建及功能分析等模块, 利用多层次和多结构网络来阐明中药有效成分及其分子机制^[15-16]。分子对接技术是以结构分子生物学和计算机辅助药物设计相结合的方式, 通过对受体活性位点进行空间结构互补并以结合能最小化寻找小分子化合物和靶蛋白之间最佳匹配模式的过程^[17]。基于此, 本研究拟从 GEO 数据库中获取有关肝癌组织与癌旁组织标本的基因芯片数据以筛选出差异表达基因, 并基于中医药整合药理学平台 (TCMIP) 筛选大黄活性成分及其作用靶点, 构建大黄抗肝癌的关键靶点蛋白互作网络 (PPI)、成分-靶点网络及中药-活性成分-关键靶点-主要通路网络, 对其关键靶点进行生物信息学分析。进一步采用分子对接技术对网络预测结果进行对接模拟验证与结合模式分析, 从而探究大黄抗肝癌的物质基础与其分子机制, 旨在为进一步大黄抗肝癌的实验研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 化学成分收集及活性成分的筛选

本研究采用 TCMIP v2.0 (<http://www.tcmip.cn/>)

TCMIP/index.php/Home/Login/login.html)对中药大黄成分进行检索。该数据库利用 Pipeline Pilot ADMET 收集模型计算化学成分的药动学参数(水溶性,血脑屏障渗透,CYP450 2D6 抑制,肝毒性,人体肠道吸收和血浆蛋白结合),即根据类药性的定量评估(QED)筛选各化学成分的药性。QED 值为 0~1, QED 值越大,其类药性越强,可分为 3 类:强(QED>0.67)、中(0.49≤QED≤0.67)、弱(QED<0.49)^[18]。本研究将 QED≥0.49 的成分作为大黄的活性成分。

1.2 活性成分靶标垂询

利用 MACCS 分子指纹系统,以化学成分的二维结构开展相似性检索,根据 Tanimoto 系数定义的相似度计量方法与 FDA 上市药物进行相似性评价,分值≥0.8 则为相似性药物,并提取药物作用靶标^[19]。同时,以“大黄”为关键词在 TCMIP v2.0 中检索成分靶标,收集相似性分值≥0.8 的所有靶标作为活性成分的潜在作用靶点。为全面收集活性成分的作用靶点,采用 SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>)对活性成分的潜在靶点进行反向预测。

1.3 肝癌基因数据芯片的选取及差异基因的筛选

以“hepatocellular carcinoma”为关键词从美国国立生物技术信息中心(NCBI)的 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>)样本中进行检索,并下载与肝癌相关的 GSE60502 基因表达谱,芯片平台为 GPL96 [HG-U133A]。共收集 36 个样本,其中肝细胞癌组织样本 18 例,癌旁组织样本 18 例。借助 GEO2R 的 R 语言程序对两组样本进行分析,并以 adj.P.Val<0.05,差异倍数|logFC|≥2 为显著性差异标准筛选肝癌的差异表达基因^[20]。

1.4 关键靶点的筛选及 PPI 网络的构建

将大黄成分靶点及肝癌差异基因通过韦恩分析获取大黄抗肝癌关键靶基因。并将核心靶基因通过 STRING 分析并构建蛋白相互作用网络,设置物种为“Homo sapiens”,互作阈值(confidence score)≥0.4,初步筛选关键靶点^[21]。蛋白质通过相互作用所形成的具有一定拓扑结构的互相关联的网络是生物体进行复杂生命活动的基础,本研究利用 MCODE 功能算法对 PPI 网络中联系紧密的功能模块进行分析,进一步明确关键靶点的生物学功能。

1.5 网络构建

采用 Cytoscape (version 3.7.1)构建关键靶点的 PPI 网络、成分-靶点网络及中药-活性成分-关键

靶点-主要通路网络,并通过 Network Analyzer 插件对网络的拓扑性质进行分析。PPI 网络中以大于介值(betweenness)、度值(degree)及节点紧密度(closeness)平均值的节点为核心靶点,并以节点度值的 2 倍中位数为卡值筛选活性成分-疾病网络中核心成分及靶点。

1.6 分子虚拟验证

PDB 数据库(www.rcsb.org)下载“1.5”项下成分-靶点网络中核心靶点蛋白晶体结构,并采用 Schrödinger 软件的 PrepWiz 模块对受体进行预处理。使用 Glide 的标准精度方法(SP)进行分子对接。将活性小分子结构用 LigPrep 进行处理,运用 MMFFs 力场得到相应的低能构象。Epik28 以 pH (7.0±2.0)为条件分配电离状态并进行对接计算。

1.7 关键靶基因在肝癌中的表达及对肝癌预后的影响

通过 Kaplan Meier-Plotter(<http://kmplot.com/analysis/>)分析核心表达基因对应肝癌患者的总生存期(OS)。根据肝癌患者差异基因的表达情况及中位值分为高表达和低表达 2 组,并计算危险比(HR)及其 95%置信区间和对应的 P 值,绘制生存曲线。

1.8 关键靶基因生物学功能及通路分析

通过 STRING 分析平台对大黄抗肝癌的关键靶基因进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。

2 结果

2.1 活性成分的筛选及候选靶点的预测

通过 TCMIP 数据库共检索到大黄化学成分 90 种,主要包括蒽醌类、蒽酮类、黄酮类、鞣质类等,其中 QED≥0.49 的活性成分共 20 种,见表 1。基于以上成分从 TCMIP 和 SwissTarget Prediction 共预测活性成分靶点 673 个。

2.2 差异基因及大黄抗肿瘤关键靶点的筛选

从 2 组样本中共筛选出差异基因 1 052 个。其中上调基因 485 个,下调基因 567 个。前 40 名差异基因的聚类及差异基因的表达分析见图 1。

2.3 关键靶点的筛选及蛋白互作网络分析

对大黄 20 种活性成分作用的 673 个潜在靶点和肝癌样本 1 052 个差异基因匹配,共获得 86 个关键靶点。基于 STRING 对大黄抗肝癌的 84 个靶蛋白进行蛋白互作分析,见图 2。该网络包括 83 个节点,488 条边,网络节点的平均连接度是 8.072。通过网络拓扑参数筛选出 AKR1C3、AR、CCNB1、CDK1、CYP1A1、

表 1 大黄中 20 个活性成分的基本信息

Table 1 Detailed information about 20 active components of *Rhei Radix et Rhizoma*

序号	化合物	QED	序号	化合物	QED
1	山柰酚	0.637	11	大黄酸	0.738
2	大黄素甲醚	0.841	12	5-乙酰基-7-羟基-2-甲基苯并吡喃酮	0.723
3	表儿茶素	0.514	13	5-羧基-7-羟基-2-甲基-苯并吡喃酮	0.744
4	大黄素	0.683	14	决明色原酮	0.837
5	大黄酚	0.758	15	7-羟基-2-(2-羟基)丙基-5-甲基-苯并吡喃酮	0.817
6	儿茶素	0.514	16	2-甲基-5-羧甲基-7-羟基苯并二氢吡喃酮	0.808
7	去氧大黄酚	0.742	17	2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮	0.806
8	芦荟大黄素	0.733	18	苯丁酮葡萄糖苷	0.576
9	大黄酚-8-O-β-D-吡喃葡萄糖苷	0.490	19	丹叶大黄素	0.740
10	大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖苷	0.490	20	大黄鞣质	0.539

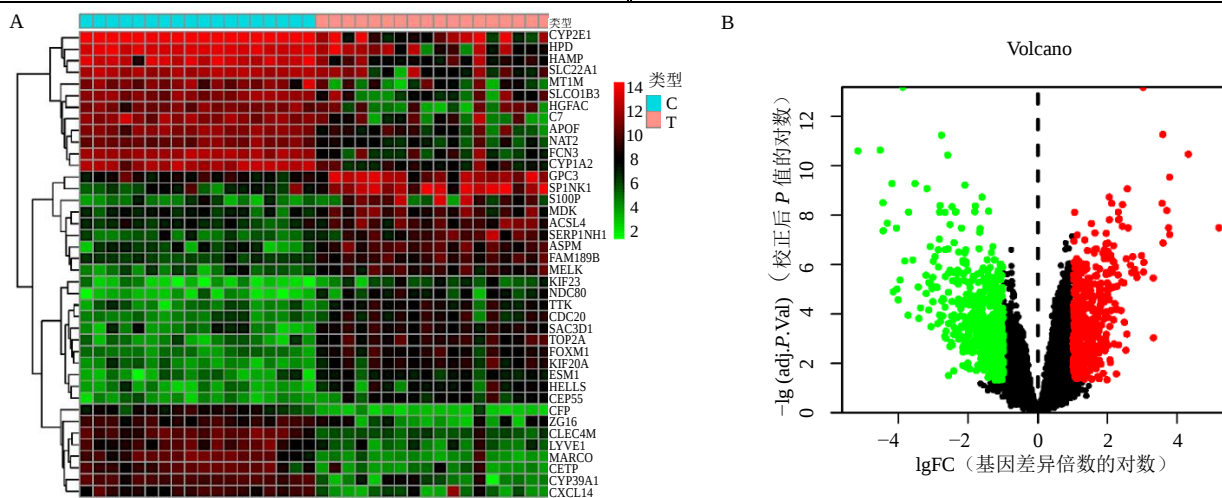


图 1 前 40 名差异基因的热图 (A) 与差异表达基因的火山图 (B)

Fig. 1 Heat map of top 40 differential genes (A) and volcano map (B) of differentially expressed genes

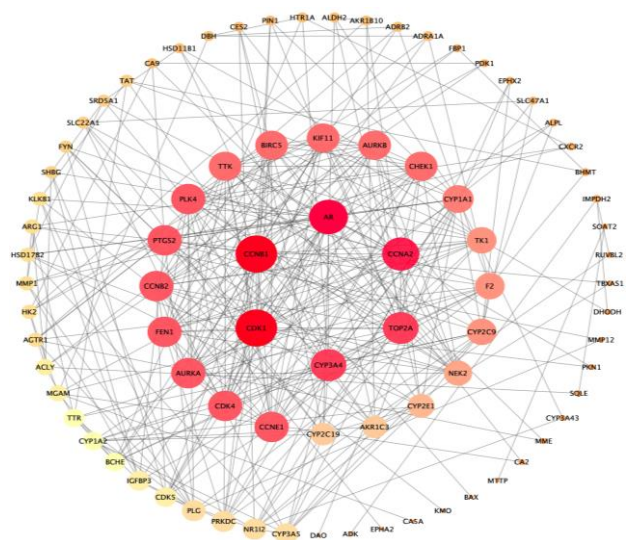


图 2 大黄抗肝癌关键靶点 PPI 网络

Fig. 2 Protein-protein interaction network of *Rhei Radix et Rhizoma* against hepatoma

CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4、F2、IGFBP3、PLG、PLK4、PRKDC、PTGS2 共 14 个重要靶点蛋白。

为进一步阐明 PPI 网络生物作用,通过 MCODE 功能对 PPI 网络进行模块分析,识别到网络中 K-core 值 > 2 的模块有 3 个,其中包括 17-核、10-核及 3-核子模块,见图 3。这 3 个子模块代表功能密切相关的靶蛋白通过相互作用而完成特定的分子功能,如 MCODE 1 主要参与细胞分裂, G₂/M 期过渡有丝分裂、细胞周期、蛋白质磷酸化等生物过程, MCODE 2 主要涉及异源代谢过程和环氧酶 P450 途径,而 MCODE 3 主要参与糖皮质激素反应。

2.4 成分-靶点网络的构建

成分-靶点网络见图 4,共包括 106 个节点、353 条边、20 个化合物节点和 86 个靶点节点,平均连接度是 6.660。根据网络中的拓扑学性质筛选到 11 个核心靶点 (CDK1、AURKB、CCNB1、CYP2C9、

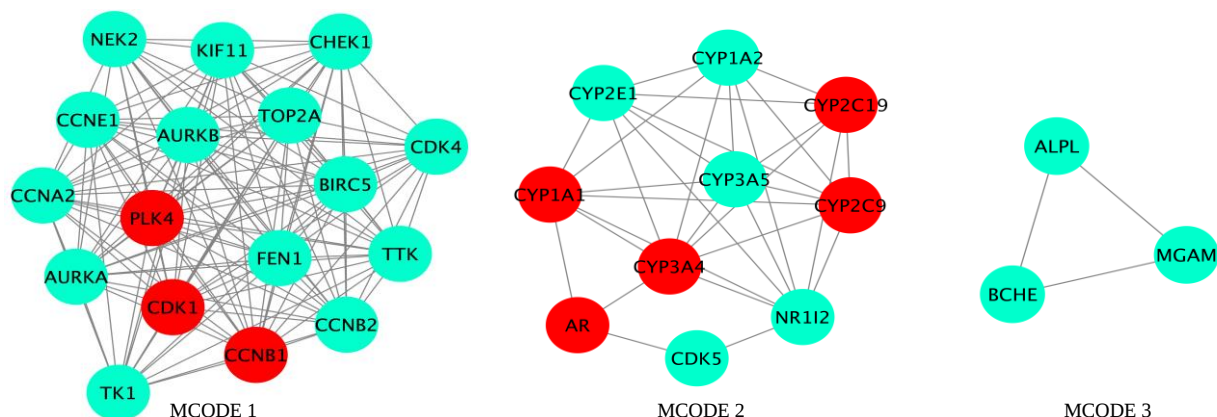
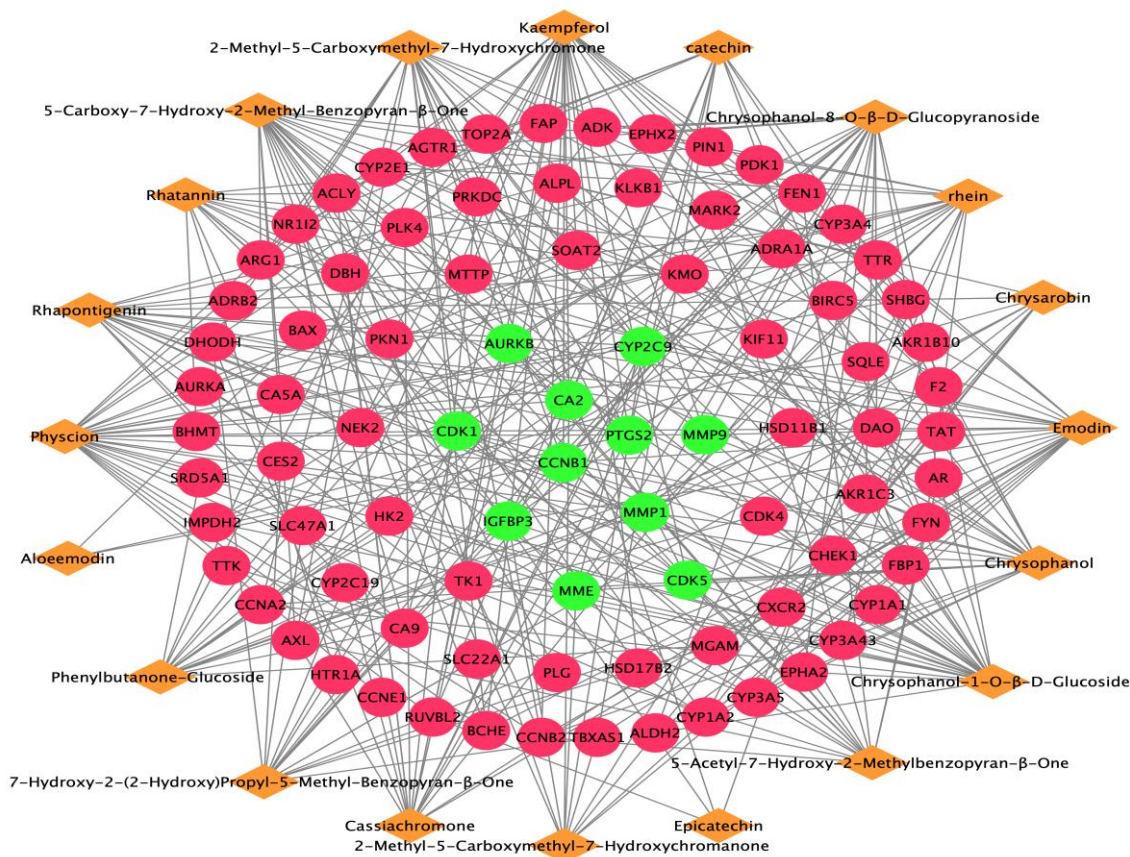


图 3 蛋白互作网络中识别的主要功能模块

Fig.3 Three functional modules of recognition in PPI network



菱形代表 20 种活性成分，圆形代表 86 个关键靶点

Diamond represents 20 active ingredients, circle represents 86 key targets

图 4 大黄抗肝癌的成分-靶点网络

Fig. 4 Compound-target network of *Rhei Radix et Rhizoma* against hepatoma

CA2、PTGS2、MME、MMP9、CDK5、MMP1、IGFBP3) 和 18 个关键成分 (蒽醌类大黄酸、大黄素、大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、去氧大黄酚、大黄酚-1-O-β-D-葡萄糖糖苷、大黄酚-8-O-β-D-吡喃葡萄糖糖苷、黄酮类山柰酚、二苯乙烯类丹叶大黄素、苯丁酮类苯丁酮葡萄糖苷、鞣质类鼠李没食子苷、色原酮类决明色酮、5-羧基-7-羟基-2-甲基-苯并吡喃酮、

2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮、7-羟基-2-(2-羟基)丙基-5-甲基-苯并吡喃酮、5-乙酰基-7-羟基-2-甲基苯并吡喃酮、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基苯并二氢吡喃酮)。此外，由该网络分析可知每个化合物与多个靶点相互作用，而每个靶点又与不同成分相互作用，故大黄在抗肝癌过程中充分体现了中药多成分与多靶点协同作用的整体性、关联性特点。

2.5 预后价值分析

对成分-靶点网络中的 11 个核心靶点进行归属,发现 6 个核心基因 CDK1、AURKB、CCNB1、MMP12、CDK5、MMP1 被上调,而 5 个核心基因 IGFBP3、CYP2C9、CA2、PTGS2、MME 被下调。通过在线工具 Kaplan Meier-Plotter 对其中 9 个核心表达基因的预后价值进行评价,见图 5。结果表明差异表达最显著的 6 个上调基因 CDK1、AURKB、CCNB1、MMP12、CDK5、MMP1 的高表达组 OS 显著低于低表达组,而差异表达最显著的 3 个下调基因 CYP2C9、CA2、MME 的低表达组 OS 显著低于高表达组。

2.6 分子对接验证

分子对接是从几何匹配和能量稳定的角度识别配体和受体最佳结合模式的过程,通常对接分值 ≤ -20.9 kJ/mol 表明有较好的结合活性^[22],因此,本

研究以此为标准,对“2.4”项中关键成分与核心靶蛋白进行分子对接验证,结果以热图分析呈现,见图 6。由图可知,对接分值 ≤ -20.9 kJ/mol 的成分占 92.2%,其中分值在 $(-29.3 \sim -37.6)$ kJ/mol 的成分占 38.3%, ≤ -37.6 kJ/mol 的成分占 5.0%。

选取对接分值较高的 10 组活性成分与靶蛋白进行结合模式分析,见图 7。其中蒽醌类的大黄素、大黄酸、大黄酚-8-*O*- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄酚-1-*O*- β -D-葡萄糖苷分别与蛋白 CCNB1、CA2、AURKB、CDK5 结合密切。推测是蒽醌类化合物易与蛋白形成氢键、疏水作用、 π - π 堆积作用,如 9、10 号位的羰基氧与 Ala 157、Thr 200、Cys 83 形成氢键,侧链上的羟基作为氢键给体与周围的残基形成氢键,化合物周围的疏水性残基使化合物与蛋白的结合更稳定。此外,大黄酸与残基 His 94 易形成 π - π 堆积作用。色原酮类成分 7-羟基-2-(2-

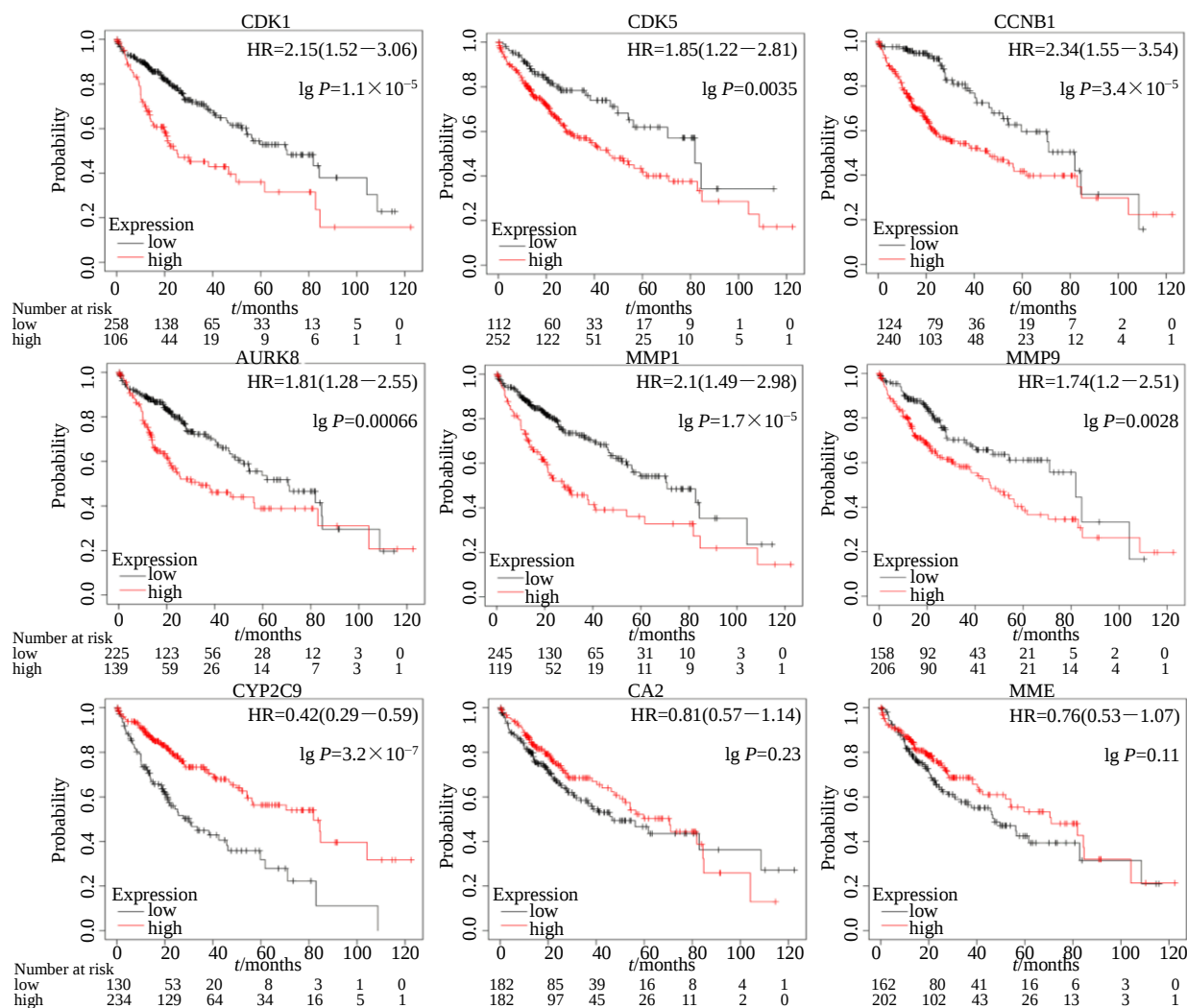


图 5 9 个核心表达基因在肝癌中的预后价值

Fig. 5 Prognosis of nine core expressed genes in hepatoma

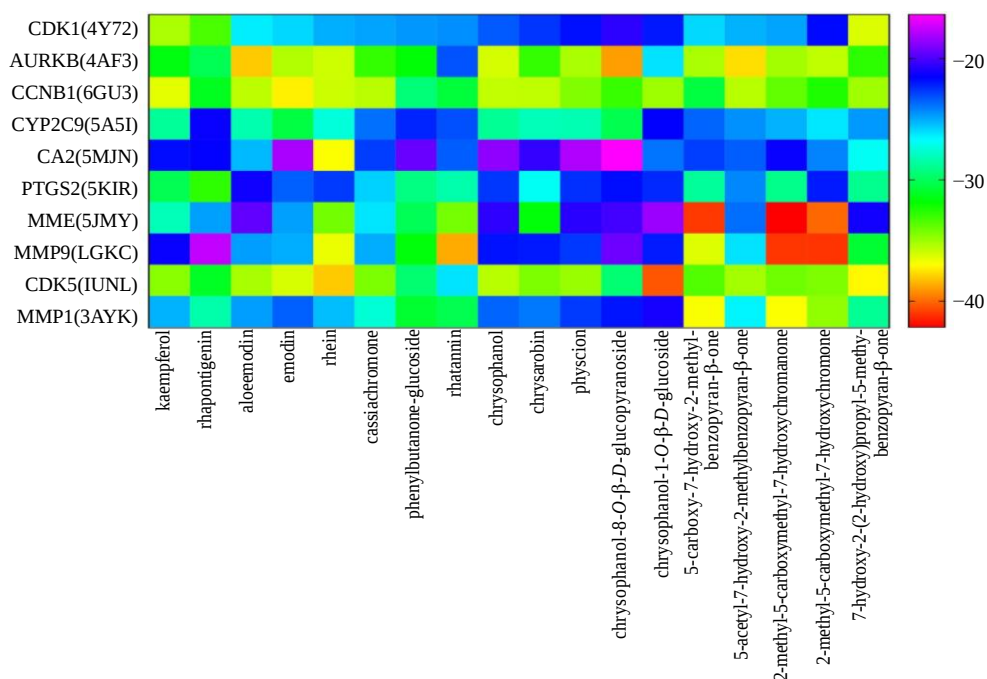


图 6 分子对接分数的热图分析

Fig. 6 Heat maps of molecular docking scores

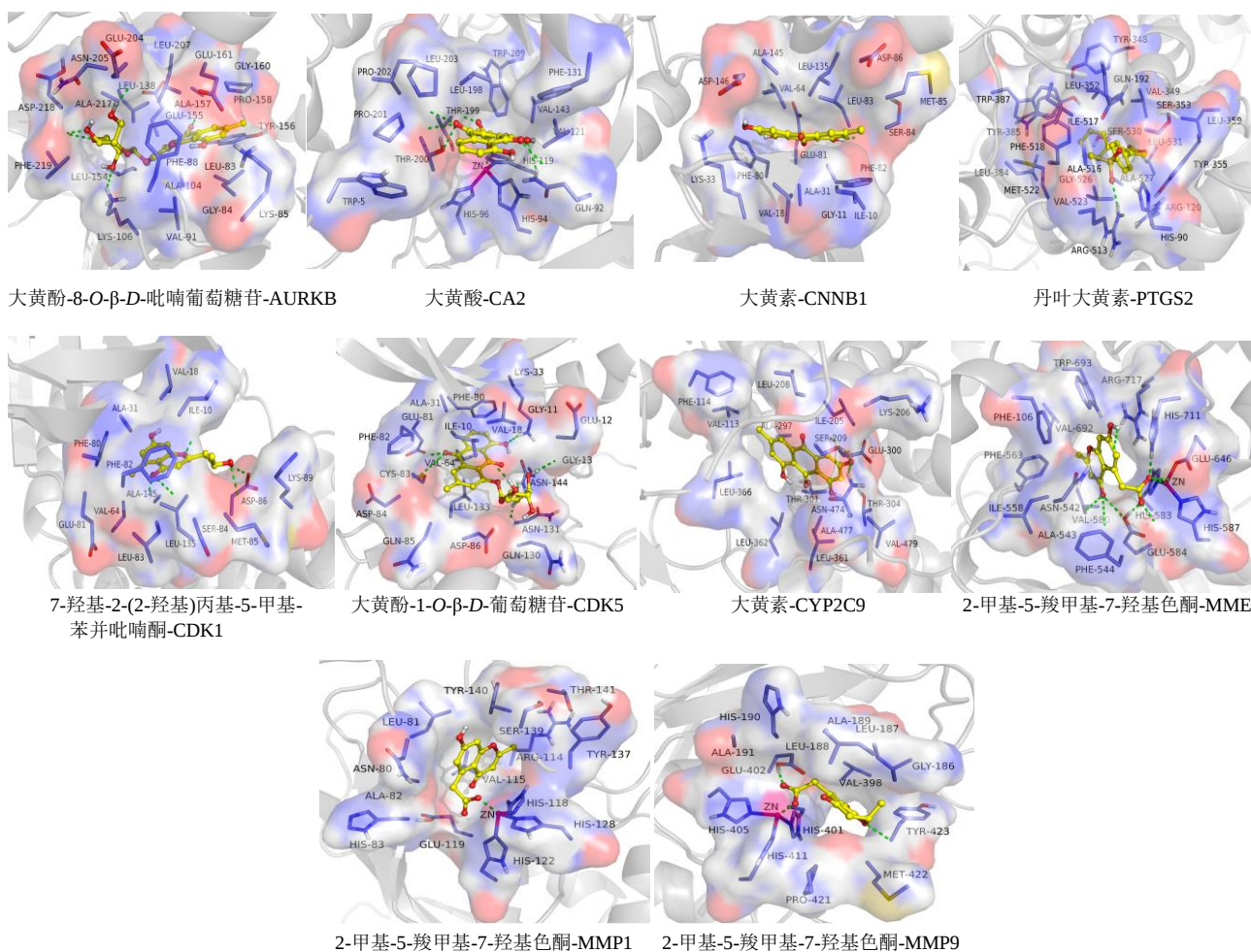


图 7 代表性成分和活性蛋白相互作用分析

Fig. 7 Interaction analysis between represent compounds and active proteins

羟基)丙基-5-甲基-苯并吡喃酮、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮则分别与蛋白 CDK1、MME、MMP1、MMP9 具有良好的亲和性,可能是色原酮类结构与蛋白形成氢键、疏水作用、 π - π (阳离子- π) 堆积作用,如羰基氧与残基 Ala 543、Leu 83 形成氢键,苯环则与 Arg 717 产生 π - π (阳离子- π) 堆积作用,侧链的羟基及羰基与氨基酸残基形成氢键。丹叶大黄素与 PTGS2 的 Ala 516、Leu 359 残基构成疏水作用,磺酰基中的氧与残基 Arg 513 形成氢键,结构中的苯环与残基 Arg 120 发生阳离子- π 相互作用。

2.7 GO 功能富集和 KEGG 通路分析

对 86 个关键靶蛋白进行 GO 富集分析,共富集到 23 条 ($FDR < 0.01$),见图 8。大黄抗肝癌靶点的生物过程 (biological process, BP) 条目 11 个,主要涉及氧化还原过程 (GO: 0055114)、药物反应 (GO: 0042493)、类固醇代谢过程 (GO: 0008202)、异源代谢过程 (GO: 0006805)、有丝分裂细胞周期的 G2/M 转换 (GO: 0000086)、药物代谢过程 (GO: 0017144)、环氧酶 P450 途径 (GO: 0019373)、单萜类代谢过程 (GO: 0016098)、外源药物分解代谢过程 (GO: 0042738)、杂环代谢过程 (GO: 0046483)、药物分解代谢过程 (GO: 0042737)。分子功能 (molecular function, MF) 共 10 条,主要包括 ATP 结合 (GO: 0005524)、氧化还原酶活性 (GO: 0016491)、酶结合 (GO: 0019899)、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性 (GO: 0004674)、血红素结合 (GO:

0020037)、单加氧酶活性 (GO: 0004497)、铁离子结合 (GO: 0005506)、氧化还原酶活性 (GO: 0016705)、氧结合 (GO: 0019825) 等。细胞组成 (cell composition, CC) 条目主要有胞质溶胶 (GO: 0005829) 和细胞器膜 (GO: 0031090)。

为进一步阐明关键靶蛋白参与的信号通路,根据 $FDR < 0.05$ 筛选出 37 条,见图 9,主要包括代谢通路 (hsa01100)、类固醇激素的生物合成 (hsa00140)、细胞周期 (hsa04110)、p53 信号通路 (hsa04115)、细胞衰老 (hsa04218)、花生四烯酸代谢 (hsa00590)、细胞色素 P450 代谢异种生物 (hsa00980)、药物代谢-细胞色素 P450 (hsa00982)、卵母细胞减数分裂 (hsa04114)、神经活性配体-受体相互作用 (hsa04080)、亚油酸代谢 (hsa00591)、孕激素介导的卵母细胞成熟 (hsa04914)、乙型肝炎 (hsa05161)、胆汁分泌 (hsa04976)、补体和凝血级联 (hsa04610)、类固醇生物合成 (hsa00100) 等。

3 讨论

大黄作为我国传统中药之一,诸家本草均提到其可下瘀血,凡瘀血滞留之症皆可用。因此,大黄可用于治疗肝癌辨证属热毒、瘀血壅结的情况。现代药理学研究也证实大黄具有潜在的抗肝癌作用,但其物质基础和作用机制仍有待探究。本研究基于中医药整合药理学平台、GEO 基因芯片分析及分子对接技术系统地探究大黄抗肝癌的潜在分子机制,进一步构建大黄抗肿瘤的中药-成分-靶点-通路网络模型 (图 10),从而揭示了大黄抗肝癌的物质基础和作用机制。

对大黄抗肝癌 PPI 网络的拓扑参数分析发现,AKR1C3、AR、CCNB1、CDK1、CYP1A1、CYP2C19、CYP2C9、CYP3A4、F2、IGFBP3、PLG、PLK4、PRKDC、PTGS2 共 14 个靶蛋白是该网络重要靶点。CDK1 是调节细胞周期的主要蛋白激酶,其表达活性的改变直接影响细胞周期 G₂/M 期的变迁^[23],与肿瘤的发生发展、转移存在密切关系。CCNB1,即细胞周期蛋白 B1 属于细胞周期蛋白 (Cyclin) 家族中的成员,对启动和促进有丝分裂进程至关重要。CCNB1 是调控细胞分裂由 G₂ 期向 M 期转化的一种蛋白复合体,能够促进细胞的分裂和增殖。研究发现 CCNB1 在肝癌组织高表达,且其表达水平与肝癌患者不良预后有关^[24]。Zhang 等^[25]研究发现干扰 CCNB1 可以诱导 p53 再活化,调节凋亡相关蛋白,降低胰腺癌细胞增殖能力,减少肝癌细胞 S 期比例,

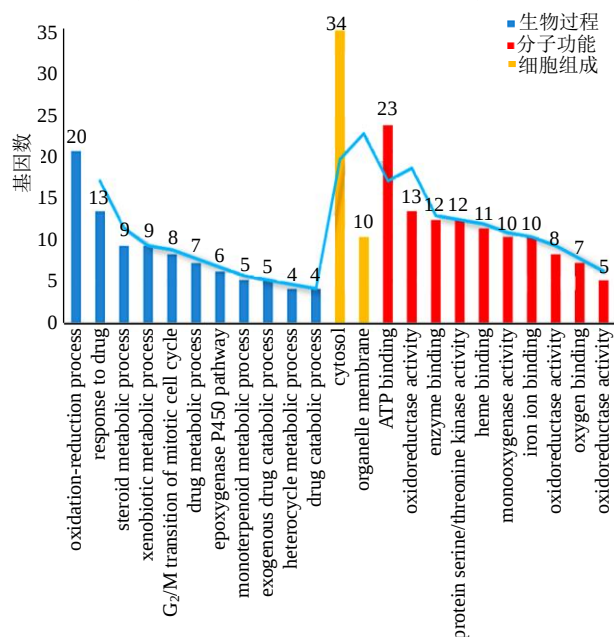


图 8 关键靶点的 GO 功能分析

Fig. 8 GO analysis of key targets

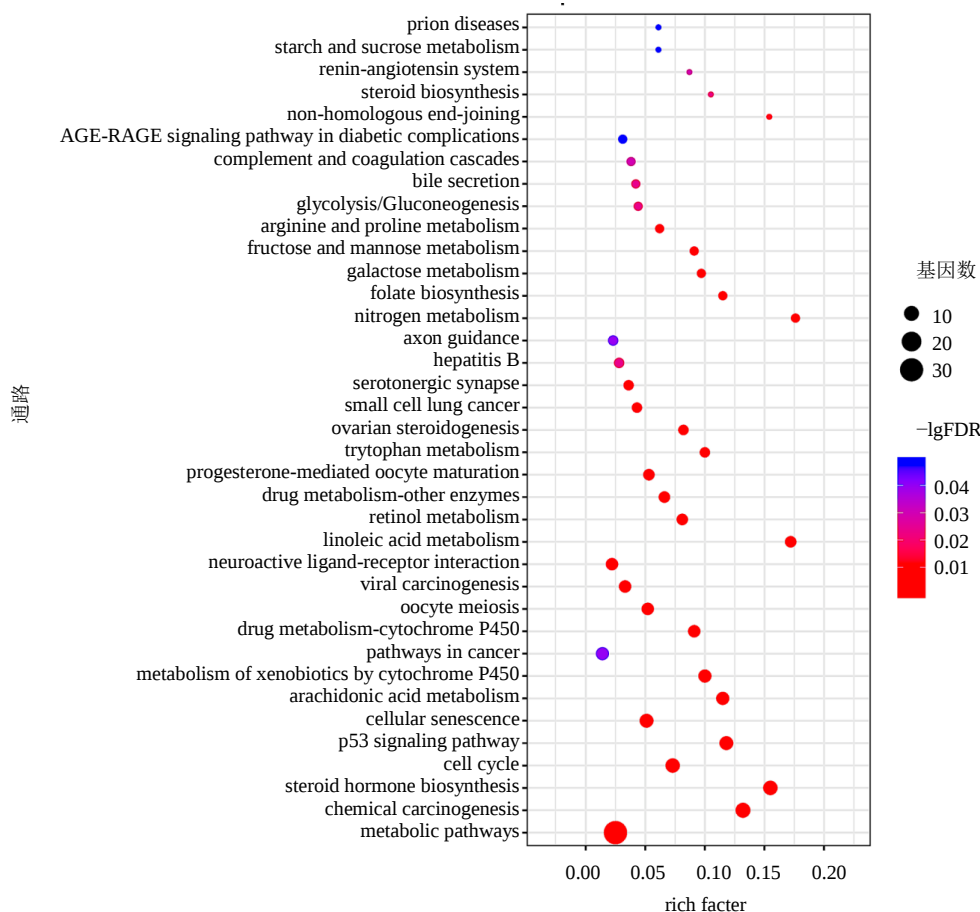


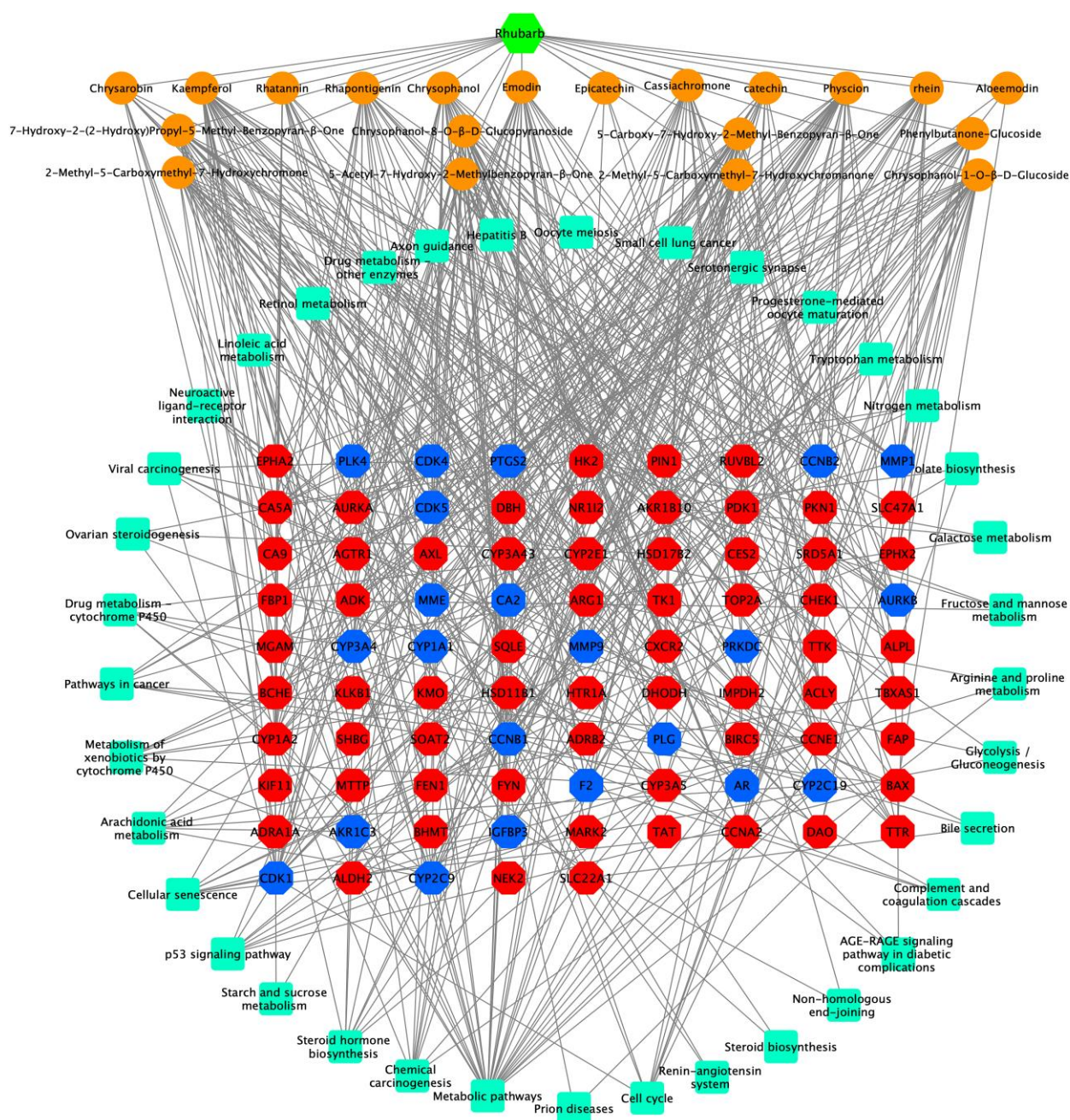
图 9 关键靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 9 KEGG analysis of potential targets

显著增强胰腺癌细胞的凋亡和衰老, 提高 G_0/G_1 期细胞比例。亦有研究证实 CCNB1 的异常表达可通过 p53 信号通路等影响肿瘤的生物效应^[26]。因此, CCNB1 可通过多种机制参与肝癌的发生、发展。AR 为雄激素受体, 主要以雄激素依赖的方式诱导下游靶基因转录^[27]。AR 介导的下游靶基因 (TGF- β 1、VEGF、CCRK 等) 的异常表达能影响 HCC 细胞的生长、增殖、血管形成^[28]。AKR1C3 基因是 AKR1 基因家族的一员, 在核受体通路中具有非常重要的作用, 可调控如雌激素受体 (ER)、AR 等与其相应的配体结合^[29]。由于 AKR1C3 是一种类固醇激素合成酶, 在与激素相关的癌细胞中, AKR1C3 均异常表达, 因此 AKR1C3 是一种潜在的前癌症生物标志物^[30]。CYP3A4 是细胞色素 P450 超家族的成员, 参与肝脏物质代谢过程^[31]。据统计, 临床 60% 药物都要经其代谢转化, 且许多药物也是其诱导剂或抑制剂^[32]。IGFBP3, 即胰岛素样生长因子结构蛋白-3, 主要由肝脏分泌, 具有抗肿瘤细胞增殖和组织分化的作用, 肝细胞受损会导致 IGFBP3

分泌降低, 是肝癌发生的一个重要信号因子^[33]。此外, 肝癌最常见的发病过程涉及慢性肝损伤。慢性炎症则引起多次肝细胞损伤而导致肝细胞再生性增殖, 致使肝纤维化、肝硬化等症。而炎症诱导的氧化应激关键酶 PTGS2 催化合成的前列腺素 (PG) 为肝损伤中的重要炎症介质, 具有抑制细胞凋亡、促进细胞增殖、抑制免疫监视、促进血管生成等作用, 且流行病学、体内外研究均表明 PTGS2 特异性抑制剂有抑制肝癌的作用^[34]。

此外, 在成分-靶点网络中还发现其它核心靶点受到多个活性成分的调节, 如 CDK5 参与与肿瘤发生发展相关的增殖、存活及上皮间充质转换等多个过程^[35]。研究表明 CDK5 在 HCC 中表达上调, 且引起肿瘤细胞增殖和凋亡异常, 该过程与细胞周期调节无关, 而与肿瘤的分化程度密切相关^[36]。AURK 是一类丝/苏氨酸激酶, 可通过干扰中心体、纺锤体、染色体的功能影响细胞的有丝分裂, 从而抑制肝癌细胞增殖^[37]。在多数肿瘤细胞中, AURK 家族蛋白都处于高表达状态, 有效抑制其表达对抑制肿瘤细



从上至下依次为大黄、20 种活性成分、重要通路及关键靶点

From top to bottom, it represents rhubarb, 20 active ingredients, important pathways and key targets

图 10 中药-成分-靶点-通路网络

Fig. 10 Herb-compound-target-pathway network

胞增殖和延长原发性肝癌患者生存时间意义重大，其有望成为原发性肝癌化学治疗的潜在靶点^[38]。MMP1 和 MMP9 为基质金属蛋白酶（MMPs）家族成员，能降解细胞外基质的内肽酶，参与血管生成过程中的细胞运动、基底膜降解和管腔形成，二者与原发性肝癌的侵袭和转移具有密切联系，已有研究证实 MMP9 是原发性肝癌浸润、转移和复发的肿瘤分子标记物^[39]。

大黄抗肝癌的成分-靶点网络中共筛选出 18 个关键成分，主要是蒽醌类、色原酮类、黄酮类、鞣质类、苯丁酮类化合物。已有研究通过体外实验证实大黄素甲醚、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸等蒽醌类化合物均对肝母细胞瘤 G2（HepG2）细胞有抑制作用^[40]。Kuo 等^[41]研究发现大黄酸可抑制 HepG2 细胞增殖，诱导其凋亡，阻滞 G₁ 期细胞分裂。潘智育等^[42]亦证实大黄酸可降低 HBx 蛋白表达水平和

细胞内钙离子浓度,抑制乙型肝炎病毒(HBV)复制、肝癌细胞的生长和 HBV 的分泌。亦有研究通过大鼠体内试验证实大黄素能抑制大鼠肝癌 CBRH-7919 细胞增殖,诱导肝癌细胞凋亡,且与时间、药物浓度呈正相关^[43]。此外,徐贤绸等^[44]在体内模型中观察到大黄素作用于胰腺癌肝转移细胞时,抑制了肝癌细胞的迁移和侵袭,作用机制可能是 MMP2 和 MMP9 的表达受到抑制。芦荟大黄素在不同阶段的细胞周期阻滞中发挥调节作用, Lin 等^[45]研究表明芦荟大黄素能使肝癌细胞 Hep3B 阻滞于 S 期,这与 Cyclin A 和 CDK2 以及激活线粒体死亡途径相关。研究发现富含山柰酚的食物可以降低肝癌的发病率,山柰酚能抑制癌症扩散和促进癌细胞凋亡^[46]。Wang 等^[47]研究发现黄酮类成分山柰酚能显著抑制 AKT 磷酸化并切割 HepG2 细胞中的 caspase-9、caspase-7、caspase-3 和 PARP。此外,网络中的其他活性成分如苯丁酮葡萄糖苷、大黄鞣质、决明色酮、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基苯并二氢吡喃酮、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮、7-羟基-2-(2-羟基)丙基-5-甲基-苯并吡喃酮、5-乙酰基-7-羟基-2-甲基苯并吡喃酮在抗肿瘤方面的研究较少。然而这些成分与 10 个核心靶蛋白的对接分值均 ≤ -20.9 kJ/mol,表明以上活性成分与多个核心靶点蛋白具有较好的结合能力,可能为大黄抗肝癌的潜在新活性成分,且这类成分的占比达 92.2%,该结果亦证实了构建的大黄抗肝癌成分-靶点网络模型的合理性。基于以上结果和分析可知,已有多项研究证实网络中所预测的蒽醌类、黄酮类化合物与核心靶点具有抗肝癌作用,且分子对接及代表性成分的结合模式分析亦表明网络中的活性成分与多个靶蛋白具有较好的空间结合能。

关键靶基因 GO 功能富集分析共得到 23 条生物学过程,其中上调基因的 GO 富集主要集中在有丝分裂、细胞周期、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、胆固醇代谢、药物代谢、细胞增殖、ATP 结合、酶结合等生物学过程,其中 FDR 最小值为有丝分裂和药物代谢过程。下调基因的 GO 富集主要包括单加氧酶活性、氧化还原反应、类固醇代谢、酶结合、环氧化酶 P450 途径、单萜类代谢过程药物应答、药物分解代谢过程、氧结合等生物学过程,其中 FDR 最小值是单加氧酶活性和类固醇代谢过程。

关键靶点基因 KEGG 通路富集分析结果表明,上调基因的通路富集主要涉及细胞周期、卵母细胞

减数分裂、孕激素介导的卵母细胞成熟、p53 信号通路、细胞衰老、乙型肝炎,这些通路主要参与细胞周期的调控。CCNBs 和 CDKs 是细胞周期调控网络的核心蛋白,且核心靶点 CDK1 和 CCNB1 共同参与细胞分裂过程。分子对接结果显示,CCNB1 与网络中的 18 个活性成分的对接分值均 ≤ -29.3 kJ/mol,CDK1 与网络中的 17 个活性成分对接分值均 ≤ -20.9 kJ/mol,提示大黄中的活性成分可能通过下调细胞周期通路中的 CDK1、CCNB1 的表达而发挥抗肝癌作用。下调基因的通路富集主要包括补体和凝血级联、类固醇激素的合成、视黄醛代谢、花生四烯酸代谢、药物代谢-细胞色素 P450、细胞色素 P450 的外源性物质代谢、胆汁代谢、亚油酸代谢。由下调基因的通路富集结果发现其主要与肝脏的化学物质代谢和免疫反应相关,其中补体和凝血级联通路在机体内补体系统主要介导免疫和炎症反应,且已有报道发现补体系统与肝癌具有一定相关性^[48]。细胞色素 P450 的外源性物质代谢、视黄醛代谢、药物代谢-细胞色素 P450 主要与机体内源或外源性化学物质的代谢有关,涉及的重要基因有 CYP2C9、CYP1A1、CYP1A2、CYP3A4 和 CYP3A5。另有研究证实花生四烯酸通路和肿瘤细胞的增殖、转移、分化和预后有关^[49],其涉及的主要基因有 CYP2C9、PTGS2、AKR1C3、CYP2C19、CYP2E1、EPHX2 和 TBXAS1。以上通路的共有基因 CYP2C9 和 PTGS2,也是成分-靶点网络中的关键基因,且分子对接结果发现大黄中的 18 个活性成分与这 2 个基因的对接分值均 ≤ -20.9 kJ/mol,提示大黄的主要活性成分可能通过上调肿瘤增殖转移、化学物质代谢和免疫反应相关通路中的 CYP2C9、PTGS2 的表达而产生抗肝癌作用。基于以上分析结果,本研究构建了大黄抗肝癌的中药-成分-靶点-通路网络信息模型,进而全面地从分子水平阐明大黄抗肝癌的物质基础和作用机制。此外,网络分析和分子对接结果亦表明,中药及其复方可以通过多成分、多靶点、多通路的形式协同作用,进而发挥系统治疗疾病的优势。

4 小结

本研究采用 GEO 数据库、中医药整合药理学平台 v2.0、多方法学交叉方案探讨了大黄潜在成药性小分子与肝癌特征性靶标之间的网络药理学关系,对代表性活性成分与关联靶标进行了分子对接及虚拟验证,较为全面地阐释了大黄抗肝癌的物质基础

与作用机理。研究结果显示大黄中的大黄酸、大黄素、大黄酚-8-O- β -D-吡喃葡萄糖苷、大黄酚-1-O- β -D-葡萄糖苷、丹叶大黄素、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基苯并二氢吡喃酮、2-甲基-5-羧甲基-7-羟基色酮、7-羟基-2-(2-羟基)丙基-5-甲基-苯并吡喃酮, 能够与 CDK1、AURKB、CCNB1、CYP2C9、CA2、PTGS2、MME、MMP9、CDK5 和 MMP1 共 10 个核心靶点蛋白通过氢键、疏水键、 π - π 键、阳离子- π 键等作用力结合, 进而调控细胞周期、细胞衰老、代谢通路、补体系统、花生四烯酸代谢、胆汁代谢等生物过程及与之相关的细胞凋亡、转移、炎症、免疫反应信号通路, 从而产生抗肝癌作用。此外, 中药-活性成分-关键靶点-主要信号通路网络模型充分体现了中医药通过多成分、多靶点、多途径调节机体以发挥整体治疗疾病的优势。可见, 大黄在治疗肝癌方面有着非常广阔的前景, 而基于 GEO 数据库、中医药整合药理学平台 v2.0 及分子对接技术的大黄抗肝癌机制研究也为中药抗肿瘤的研究提供了新思路。

参考文献

- [1] Cameron D. Fifty years of Australian pediatric gastroenterology [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(Suppl 3): S75-S80.
- [2] Lopez P M, Villanueva A, Llovet J M. Systematic review: Evidence-based management of hepatocellular carcinoma: an updated analysis of randomized controlled trials [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010, 23(11): 1535-1547.
- [3] Rawla P, Sunkara T, Muralidharan P, et al. Update in global trends and aetiology of hepatocellular carcinoma [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*, 2018, 22(3): 141-150.
- [4] Cheng H J, Sun G D, Chen H, et al. Trends in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: Immune checkpoint blockade immunotherapy and related combination therapies [J]. *Am J Cancer Res*, 2019, 9(8): 1536-1545.
- [5] Yoon E L, Yeon J E, Lee H J, et al. Systemic cytotoxic chemotherapy of patients with advanced hepatocellular carcinoma in the era of sorafenib nonavailability [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2014, 48(3): 22-29.
- [6] Shi Z F, Song T B, Wan Y, et al. A systematic review and meta-analysis of traditional insect Chinese medicines combined chemotherapy for non-surgical hepatocellular carcinoma therapy [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 4355.
- [7] Wu Z L, Yang L N, He L, et al. Systematic elucidation of the potential mechanisms of core Chinese materia medicas in treating liver cancer based on network pharmacology [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020(8): 1-13.
- [8] Chen Y B, Zhang G J, Chen X P, et al. Jianpi bushen, a traditional Chinese medicine therapy, combined with chemotherapy for gastric cancer treatment: A meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 4924279.
- [9] Wang Q, Acharya N, Liu Z W, et al. Enhanced anticancer effects of *Scutellaria barbata* D. Don in combination with traditional Chinese medicine components on non-small cell lung cancer cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 217: 140-151.
- [10] El-Garawani I M, Elkhateeb W A, Zaghlol G M, et al. *Candelariella vitellina* extract triggers *in vitro* and *in vivo* cell death through induction of apoptosis: A novel anticancer agent [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 127: 110-119.
- [11] 王 玉, 杨 雪, 夏鹏飞, 等. 大黄的化学成分、药理作用研究进展及质量标志物的预测分析 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4821-4837.
- [12] Nho K J, Chun J M, Lee A Y, et al. Anti-metastatic effects of *Rheum Palmatum* L. extract in human MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 40(1): 30-38.
- [13] Lin C C, Lee M H, Lin J H, et al. Crude extract of *Rheum palmatum* L. Induces cell cycle arrest S phase and apoptosis through mitochondrial-dependent pathways in U-2 OS human osteosarcoma cells [J]. *Environ Toxicol*, 2016, 31(8): 957-969.
- [14] 张希琼. 大黄虻虫丸抗肝癌活性成分筛选及其药动力学研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [15] 崔如意, 许海玉. 基于 TCMIP V2.0 人参治疗心衰质量标志物研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(19): 4628-4633.
- [16] Wang Y L, Cui T, Li Y Z, et al. Prediction of quality markers of traditional Chinese medicines based on network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2019, 11(4): 349-356.
- [17] Ning K, Zhao X M, Poetsch A, et al. Computational molecular networks and network pharmacology [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 7573904.
- [18] Xu H Y, Zhang Y Q, Liu Z M, et al. ETCM: An encyclopaedia of traditional Chinese medicine [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D976-D982.
- [19] 彭修娟, 杨新杰, 许 刚, 等. 基于整合药理学探讨清肺排毒汤治疗新型冠状病毒肺炎的功效及作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(16): 6-13.
- [20] 郁 乐, 张轶雯, 辛文秀, 等. 基于 GEO 芯片数据的肝癌特征基因生物信息学及预后关联性分析 [J]. *中国现代应用药学*, 2019, 36(17): 2177-2182.
- [21] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: Protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D808-D815.
- [22] 宗 阳, 丁美林, 贾可可, 等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎

- (COVID-19) 活性化合物的研究 [J]. 中草药, 2020, 51(4): 836-844.
- [23] Bulavin D V, Amundson S A, Fornace A J. P38 and Chk1 kinases: Different conductors for the G(2)/M checkpoint symphony [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2002, 12(1): 92-97.
- [24] Yue C S, Ren Y Y, Ge H, *et al.* Comprehensive analysis of potential prognostic genes for the construction of a competing endogenous RNA regulatory network in hepatocellular carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 561-576.
- [25] Zhang H, Zhang X, Li X, *et al.* Effect of CCNB1 silencing on cell cycle, senescence, and apoptosis through the p53 signaling pathway in pancreatic cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 619-631.
- [26] Ni Z, Wang X T, Zhang T C, *et al.* Comprehensive analysis of differential expression profiles reveals potential biomarkers associated with the cell cycle and regulated by p53 in human small cell lung cancer [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 15(4): 3273-3282.
- [27] Kierszenbaum A L, Rivkin E, Tres L L, *et al.* The androgen receptor in spermatogenesis [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 103(3/4): 299-301.
- [28] Wilson B G, Roberts C W. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(7): 481-492.
- [29] Liu C F, Armstrong C M, Lou W, *et al.* Inhibition of AKR1C3 activation overcomes resistance to abiraterone in advanced prostate cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2017, 16(1): 35-44.
- [30] Penning T M, Steckelbroeck S, Bauman D R, *et al.* Aldo-keto reductase (AKR) 1C3: Role in prostate disease and the development of specific inhibitors [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2006, 248(1/2): 182-191.
- [31] Sasaki E, Yokoi T. Role of cytochrome P450-mediated metabolism and involvement of reactive metabolite formations on antiepileptic drug-induced liver injuries [J]. *J Toxicol Sci*, 2018, 43(2): 75-87.
- [32] Seripa D, Pilotto A, Panza F, *et al.* Pharmacogenetics of cytochrome P450 (CYP) in the elderly [J]. *Ageing Res Rev*, 2010, 9(4): 457-474.
- [33] Pivonello C, de Martino M C, Negri M, *et al.* The GH-IGF-SST system in hepatocellular carcinoma: Biological and molecular pathogenetic mechanisms and therapeutic targets [J]. *Infect Agents Cancer*, 2014, 9: 27.
- [34] Cui W, Yu C H, Hu K Q. *In vitro* and *in vivo* effects and mechanisms of celecoxib-induced growth inhibition of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(22): 8213-8221.
- [35] Malumbres M. Cyclin-dependent kinases [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(6): 122.
- [36] 董贾中, 杨玉秀, 白杨秋, 等. CDK5 在肝细胞癌中的异常表达 [J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(10): 1010-1015.
- [37] Xu Z W, Wang F M, Fan F X, *et al.* Quantitative proteomics reveals that the inhibition of Na(+)/K(+)-ATPase activity affects S-phase progression leading to a chromosome segregation disorder by attenuating the aurora A function in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(11): 4594-4602.
- [38] Bertolin G, Sizaire F, Herbomel G, *et al.* A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 12674.
- [39] Ogasawara S, Yano H, Momosaki S, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in cultured hepatocellular carcinoma (HCC) cells and surgically resected HCC tissues [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(6): 1043-1048.
- [40] 曾斐, 李晓飞, 黄玉珊, 等. 望江南蒽醌类成分的提取及抗肝癌活性研究 [J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(9): 2231-2235.
- [41] Kuo P L, Hsu Y L, Ng L T, *et al.* Rhein inhibits the growth and induces the apoptosis of Hep G2 cells [J]. *Planta Med*, 2004, 70(1): 12-16.
- [42] 潘智育, 李竞, 陈云龙, 等. 8-溴乙氧基大黄酸的合成及其对肝癌 HepG2.2.15 细胞乙型肝炎病毒抑制作用的研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8): 1175-1180.
- [43] 李密, 张海男, 林源, 等. 大黄素对大鼠肝癌细胞凋亡诱导因子及核酸内切酶 G mRNA 表达的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2009, 20(3): 193-196.
- [44] 徐贤绸, 温培楠, 王兆洪, 等. 大黄素治疗裸鼠胰腺癌肝转移瘤的实验研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2014, 24(3): 207-210.
- [45] Lin M L, Lu Y C, Su H L, *et al.* Destabilization of CARP mRNAs by Aloe-emodin contributes to caspase-8-mediated p53-independent apoptosis of human carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(4): 1176-1191.
- [46] Neuhouwer M L. Dietary flavonoids and cancer risk: Evidence from human population studies [J]. *Nutr Cancer*, 2004, 50(1): 1-7.
- [47] Wang J Q, Fang X Y, Ge L, *et al.* Antitumor, antioxidant and anti-inflammatory activities of kaempferol and its corresponding glycosides and the enzymatic preparation of kaempferol [J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197563.
- [48] Cheng P, Cheng Y, Su M X, *et al.* Bicluster and pathway enrichment analysis of HCV-induced cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3741-3745.
- [49] Ortea I, González-Fernández M J, Ramos-Bueno R P, *et al.* Proteomics study reveals that docosahexaenoic and arachidonic acids exert different *in vitro* anticancer activities in colorectal cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(24): 6003-6012.