

基于网络药理学与分子对接探讨西黄丸治疗肝细胞癌的作用

机制

吕晓雯¹ 王振常^{2*} 汪佳丽¹

1. 广西中医药大学附属国际壮医医院 广西南宁 530201

2. 广西中医药大学基础医学院 广西南宁 530222

摘要: [目的] 使用网络药理学和分子对接技术, 探讨西黄丸治疗 HCC 的作用机制。[方法] 运用 TCMSp、BATMAN-TCM、Gene Card 数据库获得西黄丸与 HCC 交集靶点; 利用 Cytoscape 构建“活性成分-作用靶点”可视化网络; 使用 String 数据库将交集靶点进行 PPI 蛋白互作网络分析; 通过 David 数据库对预测的靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析; 应用 PyMOL、AutoDockTools 进行分子对接验证。[结果] ①筛选得到西黄丸 67 个活性成分和 410 个相关靶点(已修正去除重复及无靶点对应数据后得出), 其主要成分包括 Quercetin、Epiandrosterone、Alpha-Estradiol、Muscone 等; 同样筛选得到 HCC 疾病靶点 10541 个, 两者靶点取交集后得到 288 个西黄丸治疗 HCC 的预测靶点; ② PPI 蛋白互作网络筛选出 AKT1、INS、TP53、IL6 等核心靶点; ③ GO 富集分析共获得 1287 条结果(其中 BP 975 条; CC 93 条; MF 219 条), KEGG 富集分析获得 198 条结果; 西黄丸治疗 HCC 主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等, 可能通过影响肝癌细胞有氧糖酵解发挥治疗作用。④分子对接验证关键活性成分和核心靶点中结合能均 $< -5\text{KJ/mol}$, 证明两者能够稳定对接。[结论] 西黄丸中槲皮素、表雄酮、 α -雌二醇、麝香酮等活性成分可能通过干预 HCC 细胞有氧糖酵解来发挥治疗作用。

关键词: 西黄丸; 肝细胞癌; 网络药理学; 分子对接

肝细胞癌(HCC)是原发性肝癌中的一种。其目前的主要治疗方法包括外科手术、消融治疗、放射治疗、化学治疗、靶向治疗和免疫治疗等^[1]。近年来, 随着对中医药的深入研究, 越来越多的中药成分和复方在实验室及临床研究中显示出对 HCC 治疗的潜在价值。中医病名中未有肝细胞癌病名记载, 但可归属于“肝积”“肝癌”等范畴^[2]。西黄丸, 又称犀黄丸, 18 世纪首载于清代名医王洪绪的《外科证治全生集》, 由牛黄、麝香、乳香、没药组成, 具有消坚化结、解毒散痈、消肿止痛等功效^[3]。文献证实其可以延长术后和晚期癌症患者的生存期, 但作用机制尚不明确^[4]。本研究利用网络药理学和分子对接技术, 阐明西黄丸对 HCC 的作用机制, 为后续研究提供了更多的理论参考。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 西黄丸活性成分及作用靶点

运用 TCMSp 数据库分别对西黄丸中的成分“牛黄”“乳香”“没药”进行检索。运用 BATMAN-TCM 数据库对“麝香”进行检索, 获得上述药物活性成分并查找其对应靶点。使用 Uniprot 数据库获得西黄丸药物基因集。

1.1.2 HCC 靶点

以“Hepatocellular Carcinoma”为搜索词, 从 Gene Cards 数据库中搜索 HCC 靶点, 得到疾病基因集。将西黄丸基因集与 HCC 基因集利用 Venny 2.1 取交集基因, 并绘制韦恩图展示。

1.2 方法

1.2.1 构建“活性成分-作用靶点”可视化网络

将西黄丸药味名称、每味中药相应的活性化合物、交

集基因导入 Cytoscape 软件，绘制“活性成分-作用靶点”可视化网络。

1.2.2 构建蛋白互作 (PPI) 网络

将 1.1.2 得到的交集基因导入 String 数据库，生物类别设置为“Homo sapiens”得到疾病与药物交集基因的 PPI 网络并导出相关数据。将数据导入 Cytoscape 3.10.0 软件，使用 CytoNCA 插件，基于中心度 (Degree Centrality, DC) 筛选出核心靶点信息，并对其可视化展示。

1.2.3 基因富集分析

利用 DAVID 数据库 (step1)，选择 Shortcut to DAVID Tools 中 Functional Annotation (step2)，进入 Upload Gene List (step3)，将上述所得交集基因导入其中，并选择 OFFICIAL_GENE_SYMBOL (step4)；Homo sapiens (step4a)；Gene List (step5)；Submit List (step6)。随后进行 GO 与 KEGG 富集分析，其中 GO 分析包括 3 部分，分别为：生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)，分别导出数据后；均选取 pvalue 值在前 20 个条目使用微生信进行可视化展示。

1.2.4 分子对接

按照中心度排列，选取靶点数目排名前 4 的活性成分和基因网络中心度排名前 4 的基因进行分子对接，并计算出结合能。从 TCMSMP 数据库中查询活性成分结构。从 PubChem® 数据库查询活性成分。将 1.2.2 中排名前 4 的核心靶点输入 Uniprot 数据库选取基因蛋白分子。使用 RCSB PDB 数据库及 PyMol 软件对蛋白分子进一步加工，运行 AutoDockTools 对活性成分和靶点蛋白对接，统计分子对接的结合能。使用 PyMol 软件对分子对接结果可视化展示。

2 结果

2.1 活性成分筛选

通过 TCMSMP 得到“牛黄”化合物 5 个，“乳香”化合物 8 个，“没药”化合物 45 个。通过 BATMAN-TCM 得到“麝香”化合物 30 个。共计获得 88 个活性成分。

2.2 西黄丸与 HCC 交集基因

上述 2.1 中通过 TCMSMP 中预测得到 5 个牛黄靶点、11 个乳香靶点、173 个没药靶点 (去除重复值后)，导入 Uniprot 后得到 373 个预测靶点对应基因。通过 BATMAN-TCM 中得到麝香的 726 个预测靶点基因。二者去除重复值最终得到 408 个预测靶点基因。从 GeneCards 中搜索 HCC 得到 10541 个疾病靶点基因，将西黄丸药效基因与 HCC 的疾病基因取交集，得到 288 个西黄丸治疗 HCC 的预测靶点，见图 1。

2.3 活性成分-作用靶点网络构建

在 Cytoscape 中构建“活性有效成分-交集靶点”网络可视化，如图 2。其中 NH 代表牛黄；RX 代表乳香；MY 代表没药；SX 代表麝香；A 代表牛黄和麝香中共有 Cholesterol-CLR (胆固醇)。利用 degree 值排序，排列靠前分别为 Quercetin (槲皮素)、Epiandrosterone (表雄酮)、Alpha-Estradiol (α -雌二醇)、Muscone (麝香酮)；证明上述为西黄丸治疗 HCC 的主要活性成分。

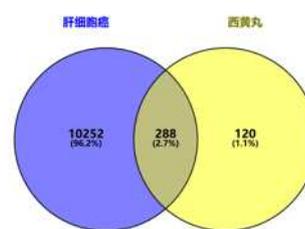


图 1 西黄丸药效基因与 HCC 治疗基因 Venny 图

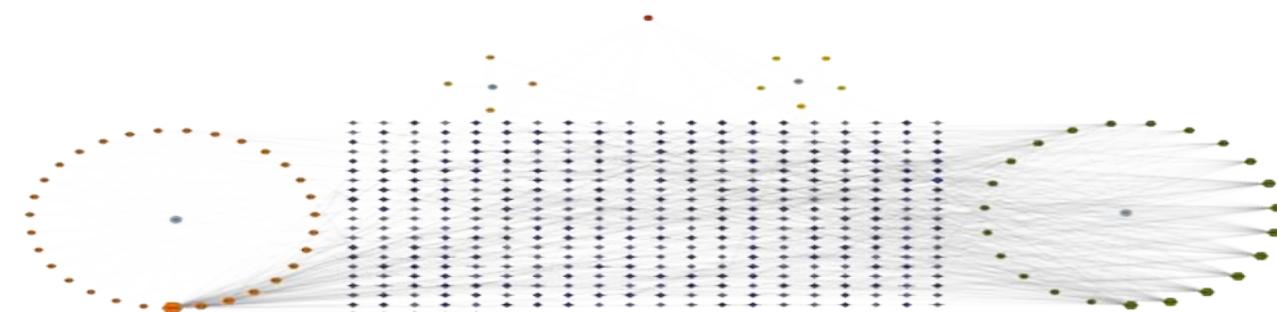


图 2 活性有效成分-交集靶点可视化

2.4 PPI 蛋白互作网络分析

将交集基因导入 String 数据库构建 PPI 蛋白互作文件后导入 Cytoscape 软件，进一步筛选核心蛋白，如图 3，图中图形大小依据中心度排列，中心度数值越大，则节点越大，说明该蛋白在网络中的连接程度越高，中心度值靠前的蛋白质为 AKT1、INS、TP53、IL6 等，这些中心度值较大的蛋白质在整个网络中起着关键的作用，为筛选出的核心蛋白，可能是西黄丸治疗 HCC 的关键靶点。

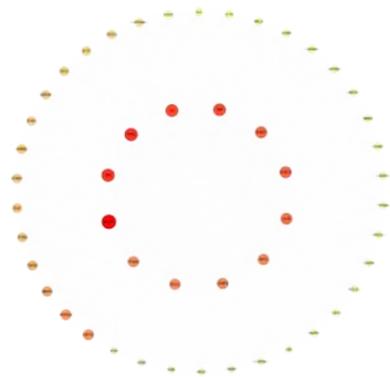


图 3 PPI 可视化

2.5 GO 与 KEGG 富集分析

使用 David 数据库对 288 个交集基因进行富集分析，GO 富集分析所得到的 GO 条目共 1287 条，其中生物过程 (BP) 条目共 975 条；细胞成分 (CC) 条目共 93 条；分子功能 (MF) 条目共 219 条；KEGG 通路富集分析共得到 198 条结果。根据 pvalue 值降序排列，选取数值最大的前 20 个条目运用微信工具以气泡图可视化，如图 4，图中气泡颜色越红，代表 pvalue 值可信度越高；气泡越大，代表该条目上富集的靶点数目越多。分析结果显示，西黄丸治疗 HCC 主要涉及 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等发挥治疗作用。

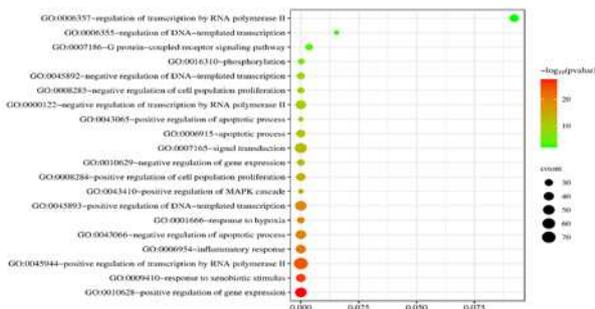


图 4 GO 富集分析 (BP)

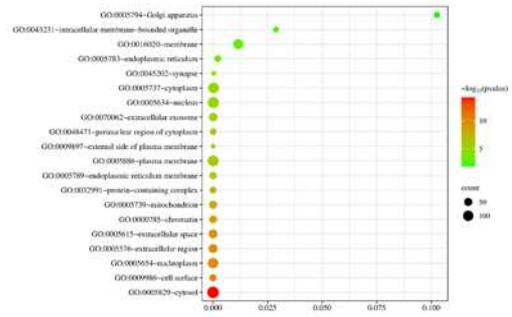


图 4 GO 富集分析 (CC)

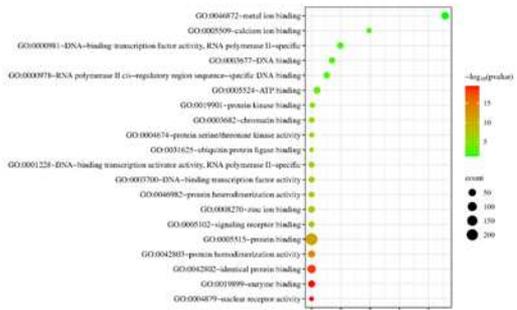


图 4 GO 富集分析 (MF)



图 4 KEGG 通路富集分析

2.6 分子对接

选取 2.3 中排名前四的关键活性成分和 2.4 中排名前四的关键靶点进行分子对接，对接信息见表 1。计算得出结合能均 < -5 KJ/mol，证明西黄丸关键活性成分可对关键靶点发挥调控作用，该研究的预测较为可靠。选取结合能最高的表雄酮 -INS、结合能最低的槲皮素 -AKT1 进行分子对接，如图 5、图 6。

表 1 活性成分与靶点对接的结合能

	Quercetin	Epiandrosterone	Alpha-Estradiol	Musccone
AKT1	-5.84	-7.65	-7.16	-6.47
INS	-7.93	-8.31	-7.22	-6.75
TP53	-6.66	-8.14	-7.53	-7.31
IL6	-6.16	-7.17	-6.69	-6.14

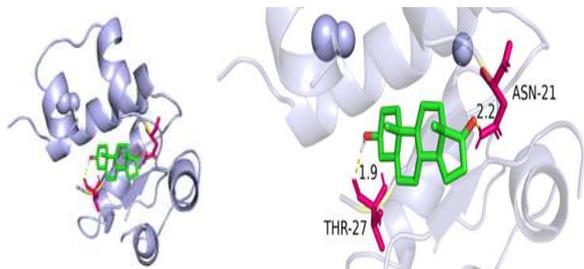


图 5 表雄酮和 INS 对接图

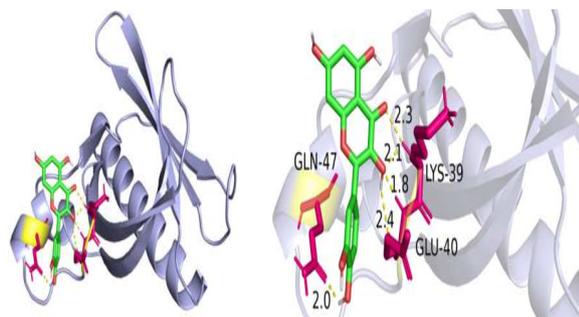


图 6 槲皮素和 AKT1 对接图

3 讨论

本研究从网络药理学的角度研究了西黄丸治疗 HCC 的部分作用机制。上述结果表明, 槲皮素、表雄酮、 α -雌二醇、麝香酮等可能是西黄丸治疗 HCC 的关键活性成分。槲皮素可以通过抑制肿瘤细胞生长、调节肝脏功能等方面对 HCC 进行治疗^[5]。脱氢表雄酮具有抑制肝癌细胞生长的明显作用^[6]。有学者认为, 雌二醇可能通过降低肝脏的炎症反应减缓 HCC 发展^[7]。麝香酮可诱导肝癌细胞自噬^[8]。构建 PPI 网络后, 分析得到 AKT1、INS、TP53、IL6 等可能为西黄丸治疗 HCC 的核心靶点。AKT1 在调节细胞生长和分裂和细胞凋亡抑制等多种过程中发挥着关键作用。INS 能够加速糖酵解。TP53 在多种肿瘤中起抑癌作用。在感染和组织损伤期间, IL-6 的快速生成有助于宿主防御。KEGG 通路富集结果显示西黄丸治疗 HCC 的信号通路主要有 PI3K-Akt 信号通路、AGE-RAGE 信号通路等。研究表明抑制 PI3K/Akt 可抑制肝细胞癌有氧糖酵解^[9]。AGEs-RAGE 也对糖酵解代谢存在关联^[10]。中药及复方可以靶向调控肝细胞癌有氧糖酵解, 抑制肝细胞癌发生发展^[11]。由此猜测西黄丸可能通过影响 HCC 细胞微环境, 干预 HCC 细胞有氧糖酵解等方式来治疗肝细胞癌。下一步可深入探索相关成分对 HCC 的治疗作用。

综上所述, 本研究对其作用机制进行了初步验证, 由于西黄丸对于肝细胞癌有氧糖酵解的影响尚不明确, 所以开展相关实验验证应是下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] 原发性肝癌诊疗指南(2024年版)[J]. 中国临床医学, 2024,31(02):277-334.
 - [2] 原发性肝癌中医诊疗指南[J]. 临床肝胆病杂志, 2024,40(05):919-927.
 - [3] 外科证治全生集[M]. (清)王维德撰. 人民卫生出版社, 2006.
 - [4] 胡凯文. 肿瘤绿色治疗学:Green therapy of cancer[M]. 北京:北京科学技术出版社, 2017:89.
 - [5] 高丽枫, 李秀丽, 张雪辉, 等. 槲皮素在肝细胞癌中的作用机制研究进展[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2021,37(06):65-70.
 - [6] 吕元, 邓春平, 黄冰, 等. 脱氢表雄酮调节 HepG2/GFP-HBx 细胞 p16 基因甲基化及其与细胞周期和凋亡的相关性[J]. 中国实验动物学报, 2009,17(03):180-185.
 - [7] 路欣. HSD17B4 促进肝癌细胞增殖及其机制的研究[D]. 河北医科大学, 2015.
 - [8] Qi W C, Li Z H, Yang C L, et al. Inhibitory mechanism of muscone in liver cancer involves the induction of apoptosis and autophagy. *Oncol Rep*, 2020,43(3):839-850.
 - [9] Hardie D G. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer[J]. *Diabetes*, 2013,62(7):2164-2172.
 - [10] Bucciarelli, L.G., et al. RAGE and modulation of ischemic injury in the diabetic myocardium. *Diabetes* 57, 1941-1951 (2008).
 - [11] 杨星, 李淑娣, 王振, 等. 中药对肝细胞癌有氧糖酵解影响研究进展[J/OL]. 中成药, 1-8[2024-08-04].
- 作者简介:**
吕晓雯(1994—), 女, 汉族, 广西中医药大学 2022 级硕士, 研究方向: 中西医结合临床脾胃肝病方向
通讯作者: 王振常(1972—), 男, 博士生导师, 主任医师。
基金项目:
广西中医药多学科交叉创新团队项目(GZKJ2311); 广西中医药重点学科中医肝胆病学学科项目(GZXK-Z-20-06); 王振常广西名中医工作室建设项目(GZY2024024); 广西中医药大学校级课题重点项目(2023ZD009)。