

基于网络药理学的九香虫水煎液抗肝癌成分及可能机制分析*

杨 莎^{1**} 赵 帅¹ 田 莹² 蔡仁莲^{1,2} 陈绪美¹ 郭建军^{1***}

(1. 贵州大学昆虫研究所, 贵州山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025;

2. 遵义医科大学, 组织学与胚胎学教研室, 遵义 563000)

摘 要 【目的】运用网络药理学探究九香虫 *Aspongopus chinensis* 水煎液治疗肝癌的成分及可能作用机制。【方法】在前期测定的九香虫水煎液成分基础上, 运用 Pubchem、SwissTargetPrediction 等数据库收集排名前 50 的化合物及其可能靶点, GeneCards、Drugbank、DisGeNET 等数据库获取肝癌治疗的可能靶点, Cytoscape 3.9.0 构建药物-成分-靶点-疾病网络与成分-靶点-通路网络, STRING、cytoHubba 等构建 PPI 网络, Metascape 进行 KEGG 与 GO 富集分析, 得到治疗的关键通路, 进而得到关键成分和靶点。【结果】九香虫水煎液可能通过腺苷等 15 种成分, 作用于 EGFR、MAPK1、CCND1 等 13 个靶点, 调控 20 条癌症相关通路发挥其对肝癌的重要治疗作用。【结论】九香虫水煎液可能通过多成分、多靶点、多通路发挥治疗肝癌的作用。

关键词 九香虫; 水煎液; 肝癌; 网络药理学; 作用机制

Network pharmacology analysis of the components and mechanism of *Aspongopus chinensis* decoction against hepatocellular carcinoma

YANG Sha^{1**} ZHAO Shuai¹ TIAN Ying² CAI Ren-Lian^{1,2}
CHEN Xu-Mei¹ GUO Jian-Jun^{1***}

(1. Institute of Entomology, Guizhou University, Guizhou Provincial Key Laboratory for Agricultural Pest Management of the Mountainous Region, Guiyang 550025, China;

2. Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China)

Abstract [Aim] To investigate possible components and mechanisms of *Aspongopus chinensis* decoction against hepatocellular carcinoma using network pharmacology. [Methods] After determining the components of *A. chinensis* decoction, databases (Pubchem and SwissTargetPrediction) were used to collect the top 50 components and their possible targets. The GeneCards, Drugbank, and DisGeNET databases were used to identify possible targets for hepatocellular carcinoma treatment. Cytoscape 3.9.0 was used to construct a drug-component-target-disease and component-target-pathway network, and the STRING and cytoHubba databases were used to build a PPI network. Finally, the Metascape database was used to conduct KEGG and GO enrichment analyses to obtain the key pathways, components and targets for treatment. [Results] The 15 components (Adenosine, etc.) of *A. chinensis* decoction may regulate 20 cancer-related pathways through 13 targets (EGFR, MAPK1, CCND1, etc.). This could potentially have a therapeutic effect on hepatocellular carcinoma. [Conclusion] *A. chinensis* decoction may cure hepatocellular carcinoma through multiple components, targets, and pathways.

Key words *Aspongopus chinensis*; decoction; hepatocellular carcinoma; network pharmacology; mechanism of action

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (82160743)

**第一作者 First author, E-mail: 1308232672@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: jjguo@gzu.edu.cn

收稿日期 Received: 2022-08-09; 接受日期 Accepted: 2023-02-03

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一, 据统计, 2020 年全球肝癌发病率与死亡率分别为第 6 位与第 3 位 (Cao *et al.*, 2021; 曹毛毛和陈万青, 2021)。同年中国肝癌的发病率与死亡率约为全球平均水平的 2 倍, 成为我国恶性肿瘤的第二大死因 (刘宗超等, 2021)。肝细胞癌 (Hepatocellular carcinoma, HCC, 以下简称肝癌; 后文肝癌仅指 HCC) 是肝癌中最典型的种类, 占比高达 85%-90% (陈敏山等, 2021; 南月敏等, 2021), 严重威胁人类生命健康。目前肝癌的治疗方法主要有肝移植、手术切除、放化疗等, 但具有转移继而复发的风险, 效果欠佳 (宗静静等, 2021)。中医认为肝癌多由正气亏虚、气郁血瘀所致, 治疗关键在于补虚理气, 活血祛瘀 (程海波, 2014)。故在西医的基础上辅以中医治疗, 发挥中医固本培元、调和机体的优势, 不仅能减少西医治疗的副作用, 还能限制肿瘤细胞的转移与复发, 显著提高治疗效果 (Xi and Minuk, 2018)。

九香虫 *Aspongopus chinensis* Dallas, 1851 隶属于昆虫纲 Insecta 半翅目 Hemiptera 兜蝽科 Dinidoridae (彩万志等, 2001), 是一种药食两用的昆虫, 具有理气止痛、温中助阳的功效 (王祥初, 2003)。研究表明, 九香虫具有抗菌、抗凝血等作用, 同时其含药血清、血淋巴及多种有机溶剂提取物等对结肠癌、胃癌、乳腺癌、肝癌等肿瘤具有抑制作用 (李莎等, 2020)。在传统中药复方中, 九香虫惯用兑水煎煮, 水煎液为常见给药方式 (刘庆芳, 2002)。本课题组前期研究发现九香虫水煎液可显著抑制肝癌 HepG2 细胞体外增殖, 诱导细胞自噬与凋亡, 但九香虫水煎液成分复杂, 其对肝癌发挥作用的成分和机制尚不明确 (杨莎等, 2022)。

自 Hopkins (2007) 提出网络药理学后便快速运用于中医药领域的研究, 主要通过构建“药物-成分-靶点-疾病”网络, 探索各节点间的互作关系 (陈健和陈启龙, 2021), 从而解析药物对疾病的作用机理。本研究通过网络药理学手段, 挖掘九香虫水煎液主要的活性成分及其对肝癌作用的可能机制, 以期明确九香虫水煎液对肝癌的分子机制与临床应用奠定理论基础, 进一步

挖掘九香虫在现代医学中的价值。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

数据库 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>): 开放的化学数据库, 可以根据化合物名称、CAS 号、分子式检索化合物的结构、性质以及生物活性等信息 (Kim *et al.*, 2023); KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>): 其下的 KEGG COMPOUND 是生物小分子、生物聚合物和其他化学物质的集合; SwissTargetPrediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>): 在网站中输入某一生物活性分子的 2D 或 3D 结构, 可以预测其潜在的作用靶标 (Daina *et al.*, 2019); Uniport (<https://www.uniprot.org/>): 内容丰富且注释准确的蛋白质序列知识库, 使用国际委员会定义的官方命名法, 便于蛋白质名称的标准化 (Bairoch *et al.*, 2005); GeneCards (<https://www.genecards.org/>); Drugbank (<https://www.drugbank.com/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 三大数据库收录了大量人类疾病相关的基因; STRING (<https://cn.string-db.org/>): 探索蛋白质相互作用的数据库 (Szkarczyk *et al.*, 2019); Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>): 支持基因富集分析与蛋白质-蛋白质互作的数据库 (Zhou *et al.*, 2019); Cytoscape 3.9.0 软件可以绘制网络图并借助其插件 cytoHubba (Chin *et al.*, 2014) 对网络中的节点进行排名, 筛选出核心节点。

1.2 实验方法

1.2.1 九香虫水煎液成分筛选 本课题组前期通过 GC-MS 检测九香虫水煎液的主要成分, 使用 ChromaTOF 软件对质谱数据进行处理, 根据质谱图和保留时间定性分析出 455 种物质, 同时根据峰面积归一化法得出各成分相对含量 (Kind *et al.*, 2009; 田莹等, 2020)。在此基础上, 设置与 Pubchem、KEGG 数据库匹配相似度 ≥ 700 , 峰面积从小到大排列, 筛选出相对含量较高的

50 种化合物。

1.2.2 九香虫水煎液化合物靶点筛选 在数据库 Pubchem 中依次输入 50 种化合物的 CAS 号并下载其 2D 结构的 .sdf 格式，将其导入 SwissTargetPrediction 中，保留 Probability>0 的靶点，Uniport 数据库标准化靶点，对所有化合物的靶点求并集并去重 (Bairoch *et al.*, 2005; Daina *et al.*, 2019)。

1.2.3 肝癌靶点的筛选 以“Hepatocellular Carcinoma”为关键词，分别在 GeneCards、Drugbank 和 DisGeNET 3 个数据库中搜索肝癌靶点，其中在 GeneCards 与 DisGeNET 数据中分别以 Relevance score 与 score 值中位数的偶数倍为筛选条件，Uniport 数据标准化靶点，对 3 个数据库的肝癌靶点求并集并去重 (刘欢等, 2023)。

1.2.4 九香虫水煎液治疗肝癌潜在靶点筛选及网络构建 将九香虫水煎液成分靶点与肝癌靶点作交集即九香虫水煎液作用于肝癌的潜在靶点，并运用 Cytoscape 3.9.0 软件建立九香虫-成分-靶点-疾病网络图。

1.2.5 PPI 的构建及关键靶点的筛选 将得到的交集靶点导入 STRING 数据库,设置中等置信

度 (0.400)，分析蛋白质之间的互作关系 (PPI)，借助 cytoHubba 插件，设置 degree 值，筛选出关键靶点 (Chin *et al.*, 2014; Szklarczyk *et al.*, 2019)。

1.2.6 KEGG 通路富集及 GO 富集分析 将关键靶点导入数据库 Metascape，进行 KEGG 通路富集和分子功能 (Molecular function, MF)、生物途径 (Biological process, BP) 和细胞成分 (Cellular component, CC) 3 种 GO 富集分析 ($P<0.01$)，并作出 KEGG 通路分析的柱状图与 GO 富集分析气泡图 (Zhou *et al.*, 2019)。

1.2.7 “成分-靶点-通路”网络构建 通过 1.2.6 KEGG 通路富集得到的前 20 条通路结果及对应的核心靶点，进一步筛选出水煎液的核心成分，借助 Cytoscape 3.9.0 软件，构建“成分-靶点-通路”网络图。

2 结果与分析

2.1 九香虫水煎液成分筛选

筛选出排名前 50 的九香虫水煎液成分结果如表 1 所示，其中氨基酸及其衍生物 15 种、羧酸类 9 种、核苷类 10 种、糖类 6 种、醇类 2 种、

表 1 九香虫水煎液排名前 50 的成分
Table 1 The top 50 components of *Aspongopus chinensis* decoction

序号 No.	CAS 号 CAS no.	化合物名称 Components	相似度 Similarity	峰面积 Peak area	代号 Code
1	72-18-4	缬氨酸 Valine	913	80 891 728	—
2	492-27-3	4-氧代-1H-喹啉-2-羧酸 4-Oxo-1H-quinoline-2-carboxylic acid	896	62 047 847	SJY34
3	71-00-1	组氨酸 Histidine	789	35 682 142	—
4	3226-65-1	蛋氨酸亚砷 Methionine sulfoxide	942	34 820 818	SJY33
5	141-43-5	乙醇 Ethanolamine	773	33 587 965	—
6	70-26-8	鸟氨酸 Ornithine	905	30 766 974	SJY32
7	63-91-2	苯丙氨酸 Phenylalanine	944	30 045 123	SJY31
8	73-22-3	色氨酸 Tryptophan	893	25 373 095	SJY30
9	99-20-7	海藻糖 Trehalose	763	25 346 985	SJY28
10	660-88-8	5-氨基戊酸 5-Aminovaleric acid	892	23 008 546	SJY27
11	110-60-1	腐胺 Putrescine	944	22 345 305	SJY29
12	372-75-8	瓜氨酸 Citrulline	877	18 470 534	SJY26
13	66-22-8	尿嘧啶 Uracil	914	18 110 504	—
14	73-24-5	腺嘌呤 Adenine	930	17 663 817	SJY25

续表 1 (Table 1 continued)

序号 No.	CAS 号 CAS no.	化合物名称 Components	相似度 Similarity	峰面积 Peak area	代号 Code
15	99-50-3	3,4-二羟基苯甲 3,4-Dihydroxybenzoic acid	823	17 116 436	SJY24
16	34363-28-5	D-(甘油 1-磷酸) D-(glycerol 1-phosphate)	707	16 931 314	—
17	50-99-7	葡萄糖 Glucose	817	16 640 413	SJY23
18	107-95-9	β -丙氨酸 1 Beta-Alanine 1	935	15 434 587	—
19	58-96-8	尿苷 Uridine	931	14 923 502	SJY22
20	110-17-8	富马酸 Fumaric acid	923	13 907 138	SJY21
21	87-99-0	木糖醇 Xylitol	948	13 821 691	SJY20
22	58-61-7	腺苷 Adenosine	913	11 792 985	SJY19
23	1957-10-3	棕榈酸 Palmitic acid	947	11 737 737	SJY18
24	56-86-0	谷氨酸 Glutamic acid	835	11 532 620	—
25	69-79-4	麦芽糖 Maltose	709	10 895 533	SJY17
26	110-15-6	琥珀酸 Succinic acid	895	8 708 958	—
27	56-45-1	丝氨酸 Serine	814	7 766 723	—
28	24259-59-4	核糖 Ribose	902	7 479 440	SJY16
29	68-94-0	次黄嘌呤 Hypoxanthine	916	7 089 109	—
30	675-20-7	5-氨基戊酸乳酸 5-Aminovaleric acid lactam	916	6 510 760	SJY15
31	541-59-3	马来酰亚 Maleimide	899	6 407 138	—
32	6000-40-4	D-甘油酸 D-Glyceric acid	932	6 305 974	—
33	69-89-6	黄嘌呤 Xanthine	905	6 068 876	SJY14
34	58-63-9	肌苷 Inosine	941	6 010 241	SJY13
35	501-52-0	氢化肉桂酸 Hydrocinnamic acid	957	5 818 552	SJY12
36	90-80-2	葡萄糖酸内酯 Gluconic lactone	833	5 816 638	SJY11
37	107-95-9	β -丙氨酸 2 Beta-Alanine 2	928	5 786 629	—
38	1957-11-4	硬脂酸 Stearic acid	950	5 633 980	SJY10
39	14122-18-0	3,6-脱水-D-半乳糖 3,6-Anhydro-D-galactose	887	5 587 176	SJY9
40	7306-96-9	苏糖酸 Threonic acid	918	5 291 328	—
41	87-81-0	塔格糖 Tagatose	905	5 272 200	SJY8
42	118-00-3	鸟苷 Guanosine	900	4 590 241	SJY7
43	65-71-4	胸腺嘧啶 Thymine	887	4 173 480	SJY6
44	60-18-4	酪氨酸 Tyrosine	823	4 012 274	SJY5
45	3068-00-6	丁三醇 2-Deoxyerythritol	702	2 982 785	SJY4
46	87-89-8	肌醇 Myo-inositol	873	2 677 775	SJY3
47	73-40-5	鸟嘌呤 Guanine	907	2 666 135	SJY2
48	672-15-1	L-高丝氨酸 L-homoserine	755	2 626 999	—
49	56-40-6	甘氨酸 Glycine	941	2 342 924	—
50	5949-29-1	柠檬酸 Citric acid	923	2 154 370	SJY1

代号栏中的编号对应有作用靶点的成分，—代表无对应作用靶点的成分。

The number in the code column is the component with an effective target, and — represents the component without corresponding target.

脂类 2 种、胺类 2 种、生物碱 1 种、醌类 1 种及酯类 1 种。棕榈酸可以抑制肝癌细胞增值和诱导其凋亡 (Nagata *et al.*, 2015); 3, 4-二羟基苯甲酸可以诱导肝癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞凋亡 (Yin *et al.*, 2009); 核苷类及其类似物 (如核苷、嘌呤和嘧啶) 在抗肿瘤市场占有重要的份额, 其通过干扰核酸代谢, 阻碍肿瘤细胞的增殖, 实现抗肿瘤作用, 值得重点关注 (刘洋等, 2012; 蔡曦等, 2021)。

2.2 九香虫水煎液化合物靶点

通过数据库 SwissTargetPrediction 保留 Probability>0 的靶点, 求并集去重, 得到 394 个九香虫水煎液化合物靶点。

2.3 肝癌靶点筛选

从 GeneCards (Relevance score ≥ 8.697)、Drugbank 及 DisGeNET (score ≥ 0.04) 3 个数据库分别得到 1 163、30 和 922 个肝癌靶点, 求并集去重得到 1 197 个肝癌靶点。

2.4 九香虫水煎液治疗肝癌潜在靶点筛选及网络构建

水煎液和肝癌靶点交集的韦恩图 (图 1) 表明, 九香虫水煎液化合物与肝癌的交集靶点为 100 个, 即九香虫水煎液可能通过 100 个靶点作用于肝癌。

通过交集靶点得出 34 种可能作用于肝癌的水煎液成分。在得到水煎液中 34 种成分与 100 个潜在靶点基础上, 构建得到九香虫-成分-靶点-疾病网络 (图 2)。结果表明, 该网络由 336 个节点和 335 条边组成, 菱形代表交集靶点, 方形代表水煎液成分。对成分度值 (degree) 进行分析, 腺苷 (SJY19, degree = 24)、棕榈酸 (SJY18, degree = 22)、鸟苷 (SJY7, degree = 20) 等位于前列, 且每种成分均连接 2 个及以上靶点, 说明九香虫水煎液通过“多成分、多靶点”发挥对肝癌的抑制作用。

2.5 PPI 网络的构建及关键靶点筛选

通过向 STRING 平台导入成分-肝癌交集靶

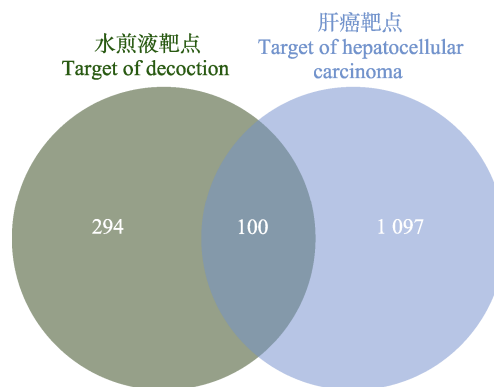


图 1 水煎液和肝癌靶点交集的韦恩图

Fig. 1 Vene diagram of intersection targets of *Aspongopus chinensis* decoction and hepatocellular carcinoma

绿色部分代表水煎液化合物的靶点,
蓝色部分代表肝癌靶点。

The green part represents the targets of the decoction compounds, and the blue part represents the targets of hepatocellular carcinoma.

点, 构建靶点蛋白之间的相互作用关系。通过 Cytoscape 3.9.0 构建 PPI 网络, 具有 99 个节点和 1 043 条边, 并使用 cytoHubba 插件, 设置 degree ≥ 36 得到 14 个核心靶点蛋白, 如图 3 所示, 依次为 GAPDH (磷酸甘油醛脱氢酶)、VEGFA (血管内皮生长因子 A)、EGFR (表皮生长因子受体)、ALB (血清白蛋白)、STAT3 (信号转导与转录激活因子)、SRC (原癌基因酪氨酸蛋白激酶)、ESR1 (雌激素受体)、CCND1 (G1/S-特异性周期蛋白-D1)、HSP90AA1 (热休克蛋白)、MMP9 (基质金属蛋白酶 9)、PPARG (过氧化物酶体增殖物激活受体)、MAPK1 (丝裂原活化蛋白激酶 1)、BCL2L1 (Bcl-2 样蛋白 1) 和 FGF2 (成纤维细胞生长因子 2)。综上, 这些基因可能在九香虫水煎液抗肝癌过程中扮演着重要的角色。

2.6 KEGG 通路富集与 GO 富集分析

通过 Metascape 平台, 对 14 个关键靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共得到 88 条通路, 提取 logP 值最小的 20 条通路绘制 KEGG 富集分析柱状图 (图 4)。其中, 包括癌症通路、癌症中的蛋白多糖、癌症的 MicroRNAs 等癌症相关通路, EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抗性、雌激素信号通路、胰腺癌、膀胱癌、前列腺癌及乳腺癌等特

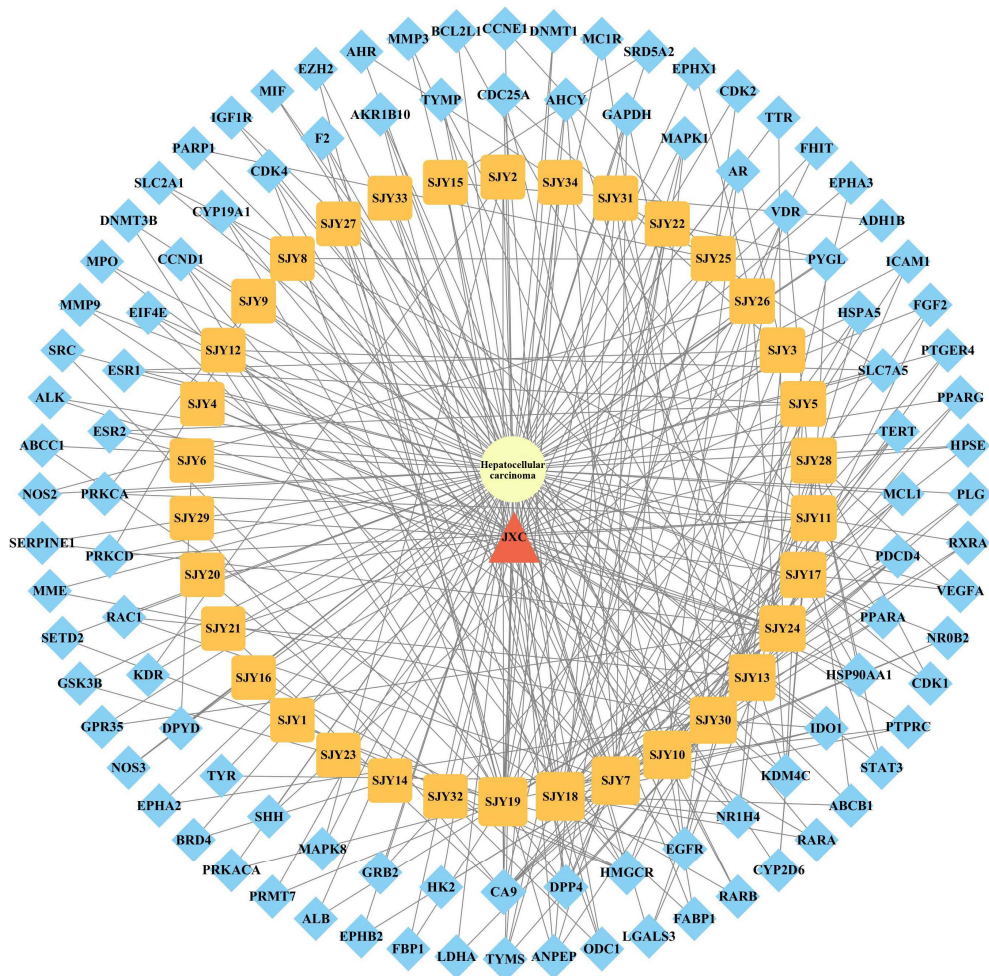


图 2 九香虫-成分-靶标-肝癌网络图

Fig. 2 Network diagram of *Aspongopus chinensis*-component-target-hepatocellular carcinoma

JXC 代表九香虫, SJY 编号对应成分见表 1。图 6 同。

JXC stands for *Aspongopus chinensis*, SJY codes and corresponding components see Table 1 in detail. The same for Fig. 6.

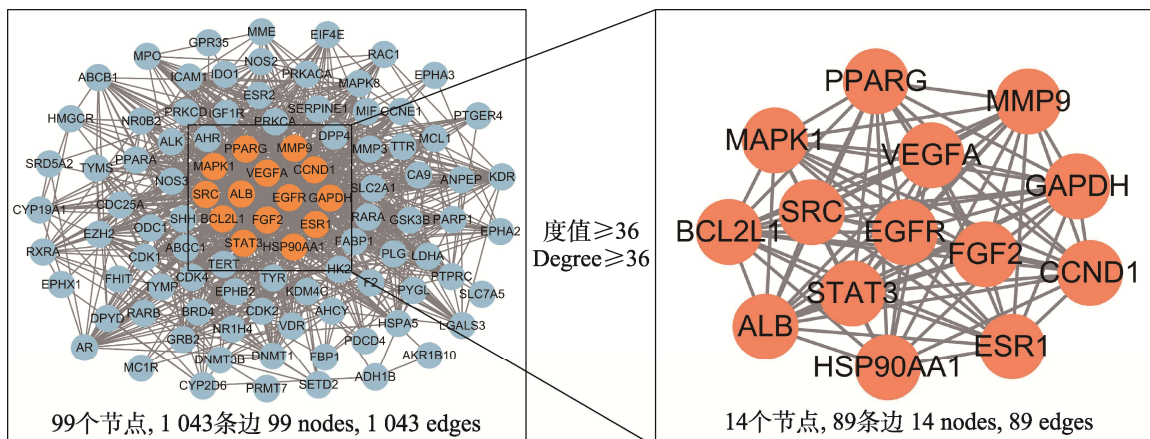


图 3 蛋白互作网络

Fig. 3 Protein-protein interaction network

图中字母为蛋白质缩写。The letters in the picture are protein abbreviations.

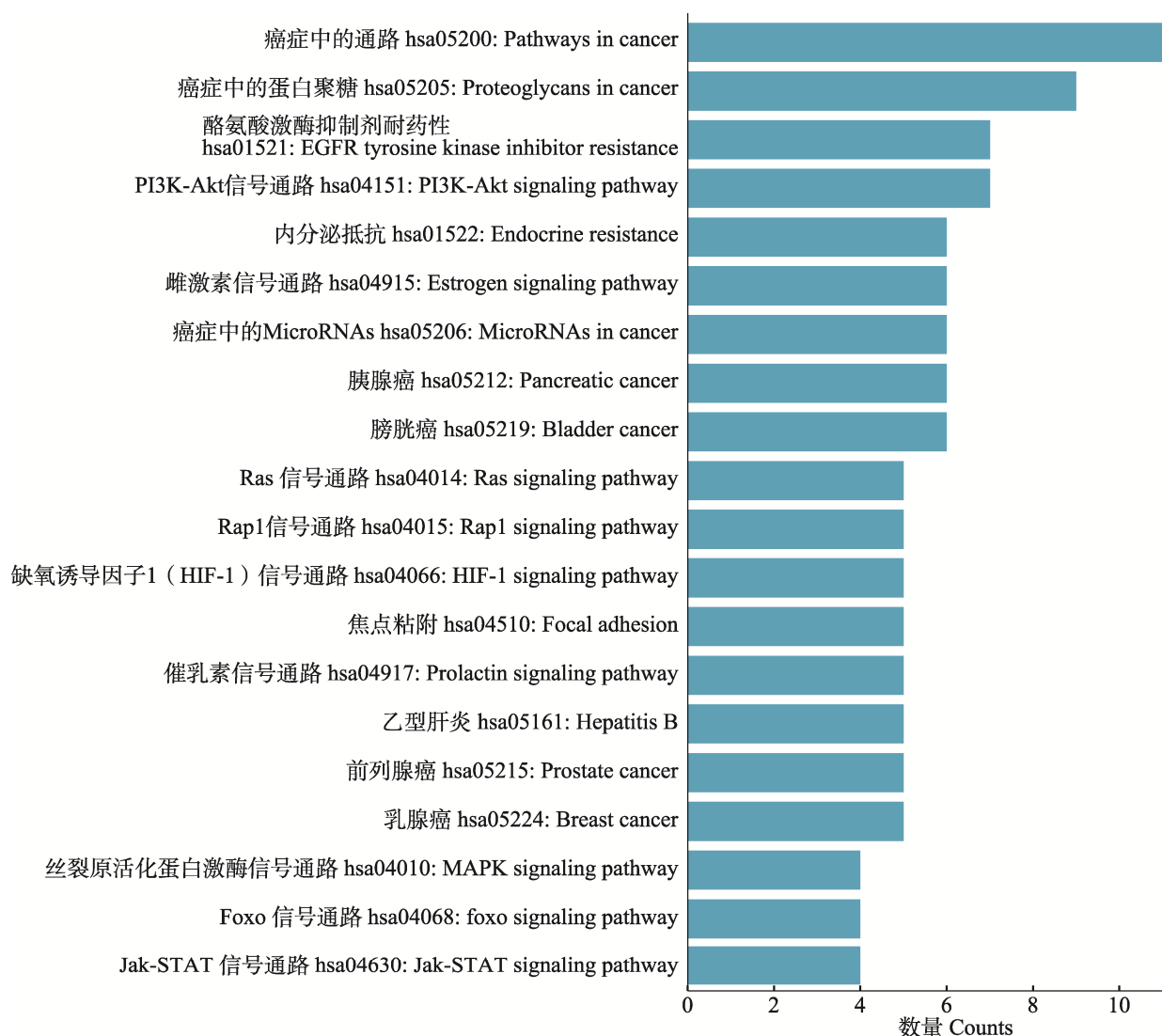


图4 KEGG 通路富集分析柱状图
Fig. 4 Histogram of KEGG pathway enrichment analysis

定癌症通路及 Rap1 信号、焦点粘附等免疫系统通路。GO 富集分析总计获得 26 条结果, 其中分子功能 (MF) 6 条, 包括钙调素结合蛋白激酶、蛋白质结构域特异性结合和蛋白质同源二聚体活性等; 生物途径 (BP) 15 条, 主要涉及正调控蛋白磷酸化、上皮细胞增殖和负调控细胞分化等; 细胞成分 (CC) 5 条, 分别为囊泡腔、核膜、细胞质核周区域、晚期胞内体和转录调控因子复合物 (图 5)。

2.7 “成分-靶点-通路”网络构建

在 2.6 得到了 20 条 KEGG 重要通路, 及其相对应的核心靶点和作用其靶点的重要成分, 构

建了“成分-靶点-通路”网络图 (图 6), 包括 46 个节点 (15 个成分、13 个核心靶点及 20 条通路) 和 146 条边, 其中橙色代表通路, 蓝色代表靶点, 绿色代表成分。对网络图度值分析后发现, 腺苷 (SJY19, degree=5)、海藻糖 (SJY28, degree=4)、鸟苷 (SJY7, degree=4) 调控的核心靶点相对较多, 具有较重要的作用; EGFR (degree=24)、MAPK1 (degree=22)、CCND1 (degree=16)、VEGFA (degree=14)、STAT3 (degree=12) 是相对重要的核心靶点, 均涉及到多种成分和重要通路, 侧面反映了“多成分、多途径”的影响; 癌症的途径、癌症中的蛋白多糖、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂抗性分别涉及到 11

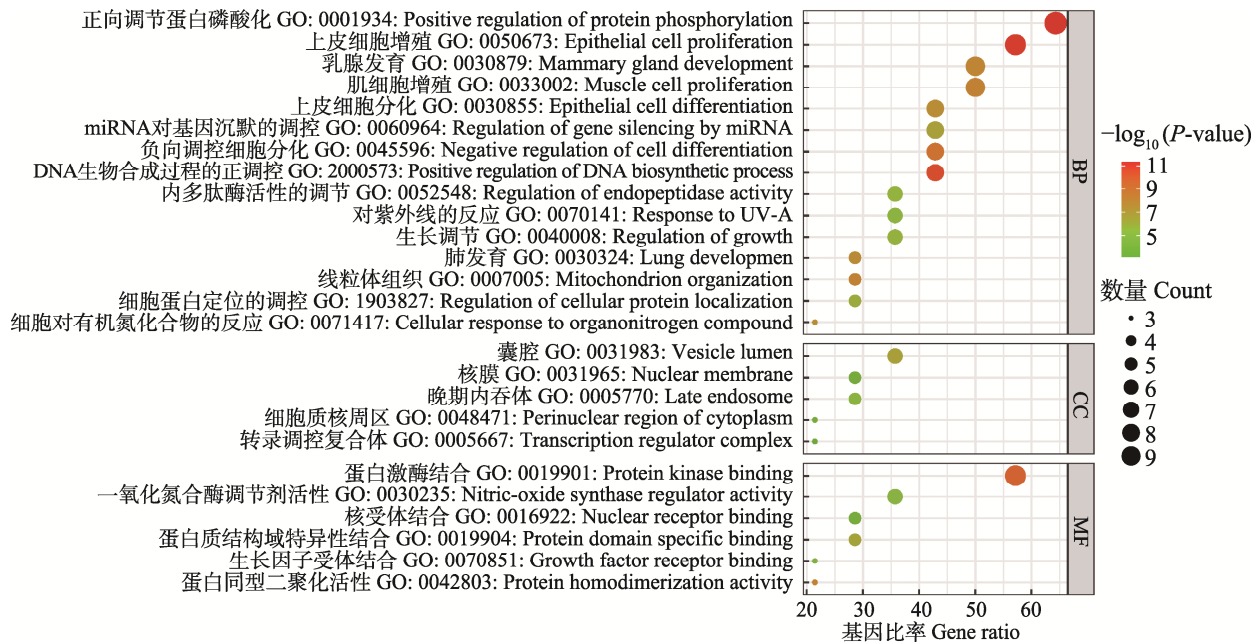


图5 GO 富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble diagram of GO enrichment analysis

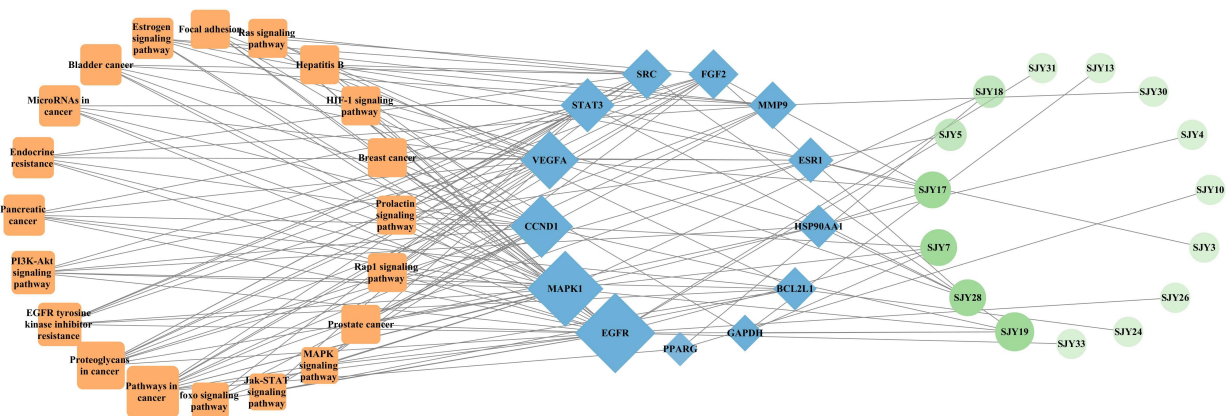


图6 成分-靶标-通路网络图

Fig. 6 Network diagram of component-target-pathway

个、9个和7个核心靶点，可能是水煎液治疗肝癌较重要的作用通路。

3 结论与讨论

九香虫为民间传统虫类中药，具有良好的抗癌活性，其多种提取物已被证实对多种肿瘤有较好的抑制活性（李莎等，2020）。九香虫水煎液作为一种汤剂，具有易吸收、见效快以及随症加减用量等特点（王旭兰等，1999），是传统中药复方常见的服用方式。

本研究运用网络药理学手段，分析九香虫水煎液对肝癌治疗过程中可能的作用机制。“成分-靶点-通路”网络表明，九香虫水煎液通过腺苷、鸟苷等15种成分，作用于EGFR、MAPK1、CCND1、VEGFA、STAT3等13个靶点，调控癌症的途径、癌症中的蛋白多糖、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抗性等20条通路发挥对肝癌的核心治疗作用。网络（图6）分析发现，15种成分中腺苷和鸟苷治疗肝癌的潜力最大。腺苷与鸟苷都属于核苷，鸟苷可以代谢生成腺苷，已证实腺苷的

衍生物 3'-脱氧腺苷对肺癌、肝癌、乳腺癌等具有良好的抑制作用(蔡曦等, 2021)。

在得到的 13 种关键靶点中, 表皮生长因子受体 EGFR 能够通过调节 CXCR4 或 CXCL12 的表达从而影响细胞的增殖、侵袭与转移(秦德芳等, 2022), 其突变或过度表达与肝癌的形成与侵袭密切相关, 同时通过抑制肝癌细胞凋亡引起肝癌细胞恶性增殖(Panvichian *et al.*, 2015), 提示其是良好的肝癌检测指标与治疗靶点(Fang *et al.*, 2107)。MAPK1 又名 ERK2, 是 MAPK 信号通路的一个关键激酶, 在细胞增殖中起重要作用(Si *et al.*, 2108)。在外界信号刺激下, MAPK1 发生磷酸化并作用于下游的细胞周期蛋白, 从而促进细胞从 G1 期进入 S 期(侯东泽等, 2017)。细胞周期调节蛋白 CCND1 可以调节细胞周期蛋白依赖性激酶并参与 G1 期向 S 期的细胞周期转化, 同时该通路对肝癌细胞的侵袭转移、肝癌干细胞的干性维持及化疗药物的耐药性形成等肿瘤学行为具有促进作用(Gennaro *et al.*, 2018)。Fatima 等(2017)发现 ESR1 可以调节 VEGFA 的表达, 从而影响脂肪血管的形成和调节炎症的程度。STAT3 可以通过调控缺氧、ROS、生长因子剥夺和一些靶向因子引发细胞自噬(You *et al.*, 2015)。SRC 是一种由原癌基因编码的小分子蛋白, 其磷酸化程度与肿瘤细胞的凋亡有关(李亚威等, 2022)。前期研究发现九香虫水煎液抑制肝癌细胞的增殖、调控肝癌细胞自噬和凋亡, 可能是通过调控上述关键靶点发挥了对肝癌的体外抑制作用。

KEGG 富集分析表明, 20 条重要通路主要分为癌症通路、特定类型癌症通路及免疫系统通路三大类。综合本研究内容, PI3K-Akt 信号通路、乙型肝炎通路、MAPK 信号通路及 Jak-STAT 信号通路可能在肝癌的调控中意义重大。研究表明, PI3K-Akt 信号通路是真核细胞中重要的信号转导通路之一, 其分子突变具有很强的致癌作用, 可调控细胞的增殖、迁移与凋亡从而影响肝癌细胞的生长(Follo *et al.*, 2015; 刘阳等, 2020)。据报道, 80%以上的原发性肝癌来源于肝硬化, 而乙型肝炎往往合并肝硬化, 成为原发性肝癌的

高危因素(孙莉莉和李春姬, 2021), 乙型肝炎通路与肝癌的发生密切相关。MAPK 信号通路在细胞生长、增殖、分化中扮演着重要的角色, 该通路在 50%-100%的肝癌中被激活, 其异常活化与肝癌的发生、发展及肿瘤血管形成等密切相关, 导致预后不良现象(Delire and Stärkel, 2015)。MAPK 信号通路可分为 ERK、JNK、p38MAPK 及 ERK 4 条亚通路, 其中 EPK 通路可促进肝癌细胞的迁移与侵袭, JNKs 和 p38MAPK 信号通路则主要调控肝癌细胞的自噬与凋亡(杨晓娟等, 2019)。JAK-STAT 信号通路具有调节细胞生长与分化的能力, 其组成性激活可提高肿瘤侵袭与转移的能力(王建强和黄缘, 2013)。

网络药理学分析发现, 九香虫水煎液通过多成分、多靶点、多通路共同发挥抗肝癌作用, 在肝癌治疗领域可能具有较大的潜力。课题组前期初步证明九香虫水煎液对肝癌细胞的抑制作用, 为进一步验证预测结果的可靠性, 探究九香虫水煎液抗肝癌的内在机制, 可对筛选到的关键活性成分进行体外验证, 检测腺苷、尿苷等单体对肝癌细胞增殖、自噬和凋亡的影响。同时, 运用 Western blot 检测水煎液关键活性成分对核心靶点的影响。然而, 本研究仍有一定的局限, 九香虫水煎液成分的多样性与癌症病理的复杂性使不同成分之间可能存在协同或拮抗作用, 抗肝癌的具体作用机理还有待进一步研究验证。

参考文献 (References)

- Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang HZ, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LSL, 2005. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Research*, 35(1): D154-D159.
- Cai WZ, Pang XF, Hua BZ, Liang GW, Song DL, 2001. *General Entomology* (2nd Edition). Beijing: China Agricultural University. 303-306. [彩万志, 庞雄飞, 花保祯, 梁广文, 宋敦伦, 2001. 普通昆虫学 (第 2 版). 北京: 中国农业大学出版社. 303-306.]
- Cai X, Shang C, Meng LR, 2021. Progress on anti-tumor pharmacological effects and mechanism of cordycepin. *Drug Evaluation Research*, 44(7): 1548-1554. [蔡曦, 尚超, 孟丽荣, 2021. 虫草素抗肿瘤药理作用及其机制的研究进展. 药物评价研究, 44(7): 1548-1554.]

- Cao MM, Chen WQ, 2021. Interpretation on the global cancer statistics of GLOBOCAN 2020. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science*, 13(3): 63–69. [曹毛毛, 陈万青, 2021. GLOBOCAN 2020 全球癌症统计数据解读. 中国医学前沿杂志, 13(3): 63–69.]
- Cao W, Chen HD, Yu YW, Li N, Chen WQ, 2021. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020. *Chinese Medical Journal*, 134(7): 783–791.
- Chen J, Chen QL, 2021. Current situation and thinking of network pharmacology in the research of traditional Chinese medicine. *Academic Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, 35(5): 1–6, 13. [陈健, 陈启龙, 2021. 网络药理学在中医药研究中的现状及思考. 上海中医药大学学报, 35(5): 1–6, 13.]
- Chen MS, Xu L, Zhang YJ, Zhou ZG, Guo RP, Yuan YF, 2021. Suggestions on the nomenclature of liver cancer. *National Medical Journal of China*, 101(26): 2025–2028. [陈敏山, 徐立, 张耀军, 周仲国, 郭荣平, 元云飞, 2021. 关于规范肝癌命名的建议. 中华医学杂志, 101(26): 2025–2028.]
- Cheng HB, 2014. Discussion on the pathogenesis theory of cancer toxin. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 55(20): 1711–1715. [程海波, 2014. 癌毒病机理论探讨. 中医杂志, 55(20): 1711–1715.]
- Chin CH, Chen SH, Wu HH, Ho CW, Ko MT, Lin CY, 2014. CytoHubba: Identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. *BMC Systems Biology*, 8(4): S11.
- Daina A, Michielin O, Zoete V, 2019. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W357–W364.
- Delire B, Stärket P, 2015. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: Pathogenesis and therapeutic implications. *European Journal of Clinical Investigation*, 45(6): 609–623.
- Fang Y, Yang WJ, Cheng L, Meng FH, Zhang J, Zhong ZY, 2017. EGFR-targeted multifunctional polymersomal doxorubicin induces selective and potent suppression of orthotopic human liver cancer *in vivo*. *Acta Biomaterialia*, 64: 323–333.
- Fatima LA, Campello RS, Santos RS, Freitas HS, Frank AP, Machado UF, Clegg DJ, 2017. Estrogen receptor 1 (ESR1) regulates VEGFA in adipose tissue. *Scientific Reports*, 7(1): 16716.
- Follo MY, Manzoli L, Poli A, McCubrey JA, Cocco L, 2015. PLC and PI3K/Akt/mTOR signalling in disease and cancer. *Advances in Biological Regulation*, 57: 10–16.
- Gennaro VJ, Stanek TJ, Peck AR, Sun YG, Wang F, Qie S, Knudsen KE, Rui H, Butt T, Diehl JA, McMahon SB, 2018. Control of CCND1 ubiquitylation by the catalytic SAGA subunit USP22 is essential for cell cycle progression through G1 in cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(40): E9298–E9307.
- Hopkins AL, 2007. Network pharmacology. *Nature Biotechnology*, 25(10): 1110–1111.
- Hou DZ, Dai JS, Deng ZB, Yan DG, 2017. Overexpression of microRNA-490-5p targeting CDK1 suppresses proliferation and cell cycle progression of gastric cancer cells by inhibiting ERK signaling pathway. *Modern Oncology*, 25(16): 2565–2572. [侯东泽, 代劲松, 邓志波, 颜登高, 2017. MicroRNA-490-5p 靶向 CDK1 通过 ERK 信号通路参与胃癌细胞周期调控. 现代肿瘤医学, 25(16): 2565–2572.]
- Kanehisa M, Goto S, 2000. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 27–30.
- Kim S, Chen J, Cheng TJ, Gindulyte A, He J, He SQ, Li QL, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B, Zaslavsky L, Zhang J, Bolton EE, 2023. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Research*, 51(D1): D1373–D1380.
- Kind T, Wohlgemuth G, Lee DY, Lu Y, Palazoglu M, Shahbaz S, Fiehn O, 2009. FiehnLib: Mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 81(24): 10038–10048.
- Li S, Li L, Peng HB, Ma XJ, Huang LQ, Li J, 2020. Advances in studies on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Aspongopus chinensis*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 45(2): 303–311. [李莎, 李磊, 彭洪兵, 马晓晶, 黄璐琦, 李娟, 2020. 九香虫化学成分、药理作用及临床应用研究进展. 中国中药杂志, 45(2): 303–311.]
- Li YW, Xie L, Wang N, 2022. Effect of hirsutine on proliferation, apoptosis, metastasis and invasion of human cervical cancer Ca Ski cells. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 28(4): 109–115. [李亚威, 谢磊, 王娜, 2022. 毛钩藤碱对人工宫颈癌 ca ski 细胞增殖、凋亡、转移及侵袭的影响. 中国实验方剂学杂志, 28(4): 109–115.]
- Liu H, Liu X, Jin LJ, Liu SS, Wei YF, 2023. Mechanism of AiTongXiao granule in the treatment of hepatocellular carcinoma based on network pharmacology and transplanted liver cancer model. *Journal of Hainan Medical University*, 29(21): 1632–1641. [刘欢, 刘显, 金丽杰, 刘莎莎, 韦燕飞, 2023. 基于网络药理学和大鼠移植性肝癌模型探讨癌瘤消颗粒防治肝癌的分子作用机制. 海南医学院学报, 29(21): 1632–1641.]
- Liu QF, 2002. Modern clinical study and application of *Aspongopus chinensis*. *Journal of Henan University*, 21(4): 66–67. [刘庆芳, 2002. 九香虫现代临床研究与应用. 河南大学学报(医学科学版), 21(4): 66–67.]
- Liu Y, Li MH, Xing XH, 2012. Recent progress in research and development of nucleoside analogues as anticancer agents. *Chinese Journal of New Drugs*, 21(21): 2493–2498. [刘洋, 李明花, 邢向红, 2012. 核苷类抗肿瘤药物研究进展. 中国新药杂志, 21(21): 2493–2498.]
- Liu Y, Wei J, Xiao B, Zeng Q, 2020. Effect of hepatitis B X-interacting protein on proliferation and migration of hepatoma cells by regulating PI3K/Akt signaling pathway. *Chinese Journal of Immunology*, 36(7): 837–841. [刘阳, 魏俊, 肖贝, 曾琴, 2020. 乙肝病毒 X 蛋白结合蛋白可能通过 PI3K/Akt 信号通路

- 影响肝癌细胞的增殖和迁移. 中国免疫学杂志, 36(7): 837–841.]
- Liu ZC, Li ZX, Zhang Y, Zhou T, Zhang JY, You WC, Pan KF, Li WQ, 2021. Interpretation on the report of global cancer statistics 2020. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management (Electronic Version)*, 7(2): 1–14. [刘宗超, 李哲轩, 张阳, 周彤, 张婧莹, 游伟程, 潘凯枫, 李文庆, 2021. 2020 全球癌症统计报告解读. 肿瘤综合治疗电子杂志, 7(2): 1–14.]
- Nagata Y, Ishizaki I, Waki M, Ide Y, Hossen MA, Ohnishi K, Miyayama T, Setou M, 2015. Palmitic acid, verified by lipid profiling using secondary ion mass spectrometry, demonstrates anti-multiple myeloma activity. *Leukemia Research*, 39(6): 638–645.
- Nan YM, Gao YH, Wang RQ, Li WG, Zhao SX, Yang M, 2021. The consensus of secondary prevention for primary liver cancer (2021 version). *Journal of Practical Hepatology*, 24(2): 305–318. [南月敏, 高沿航, 王荣琦, 李文刚, 赵素贤, 杨明, 2021. 原发性肝癌二级预防共识(2021 年版). 实用肝脏病杂志, 24(2): 305–318.]
- Panvichian R, Tantiwettrueangdet A, Sornmayura P, Leelaudomlapi S, 2015. Missense mutations in exons 18–24 of EGFR in hepatocellular carcinoma tissues. *BioMed Research International*, 2015: 171845.
- Qin DF, Li L, Zhang ZS, Zhan HX, Huo YL, Zhao MQ, Ma D, Liu J, 2022. The effect of EGFR on the proliferation, invasion and migration of malignant peripheral nerve sheath tumor cells by regulating the CXCR4/CXCL12 signaling pathway. *Journal of Chongqing Medical University*, 47(2): 127–134. [秦德芳, 李丽, 张泽舜, 展洪星, 霍泳林, 赵敏清, 马丁, 刘军, 2022. EGFR 通过调控 CXCR4/CXCL12 信号通路对恶性外周神经鞘膜瘤细胞增殖、侵袭和迁移能力的影响. 重庆医科大学学报, 47(2): 127–134.]
- Si WG, Shen JY, Du CY, Chen DN, Gu XD, Li CG, Yao MY, Pan J, Cheng JC, Jiang DH, Xu L, Bao C, Fu PF, Fan WM, 2018. A miR-20a/MAPK1/C-Myc regulatory feedback loop regulates breast carcinogenesis and chemoresistance. *Cell Death Differ*, 25(2): 406–420.
- Sun LL, Li CJ, 2021. Analysis of risk factors of hepatitis B liver cirrhosis complicated with liver cancer. *World Journal of Complex Medicine*, 7(4): 118–121. [孙莉莉, 李春姬, 2021. 乙型肝炎肝硬化并发肝癌的危险因素分析. 世界复合医学, 7(4): 118–121.]
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV, 2019. STRING v11: Protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1): D607–D613.
- Tian Y, Tan J, Zhao S, Guo JJ, 2020. Main components and anti-proliferative activities of *Aspongopus chinensis* decoction on breast cancer cells. *Journal of Environmental Entomology*, 42(2): 299–305. [田莹, 檀军, 赵帅, 郭建军, 2020. 九香虫水煎液主要成分分析及对乳腺癌细胞增殖的抑制作用. 环境昆虫学报, 42(2): 299–305.]
- Wang JQ, Huang Y, 2013. Role of the JAK-STAT signal pathway in the development and progression of liver cancer. *World Chinese Journal of Digestology*, 21(21): 2051–2056. [王建强, 黄缘, 2013. JAK-STAT 信号通路在肝癌发生发展中作用的研究进展. 世界华人消化杂志, 21(21): 2051–2056.]
- Wang XC, 2003. Please drink *Aspongopus chinensis* wine to strengthen Yang. *Medicated Food Therapy*, 2003(8): 33–34. [王祥初, 2003. 壮阳请喝九香虫酒. 药膳食疗, 2003(8): 33–34.]
- Wang XL, Yu ZJ, Lin L, 1999. Attach importance to decocting and taking Chinese medicine decoction. *Bulletin of Medical Research*, 28(10): 4, 28. [王旭兰, 于正军, 林凌, 1999. 要重视中药汤剂的煎煮与服用. 医学研究通讯, 28(10): 4, 28.]
- Xi SY, Minuk GY, 2018. Role of traditional Chinese medicine in the management of patients with hepatocellular carcinoma. *World Journal of Hepatology*, 10(11): 799–806.
- Yang S, Cai RL, Chen XM, Zhao S, Tian Y, Guo JJ, 2022. Effect of *Aspongopus chinensis* decoction on the growth of hepatoma cells HepG2 in Vitro. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 41(3): 74–79. [杨莎, 蔡仁莲, 陈绪美, 赵帅, 田莹, 郭建军, 2022. 九香虫水煎液对肝癌 HepG2 细胞体外生长的影响. 山地农业生物学报, 41(3): 74–79.]
- Yang XJ, Zhu BL, Zhang Y, Lu LX, Hui L, Yu XH, Ren XL, 2019. Research progress of MAPK signaling pathway and HBV infection related hepatocellular carcinoma. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 28(11): 1303–1307. [杨晓娟, 朱博兰, 张裕, 卢利霞, 惠玲, 于晓辉, 任小龙, 2019. MAPK 信号通路 with HBV 感染相关性 HCC 的研究进展. 胃肠病学和肝病杂志, 28(11): 1303–1307.]
- Yin MC, Lin CC, Wu HC, Tsao SM, Hsu CK, 2009. Apoptotic effects of protocatechuic acid in human breast, lung, liver, cervix, and prostate cancer cells: potential mechanisms of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(14): 6468–6473.
- You LK, Wang ZG, Li HS, Shou JW, Jing Z, Xie JS, Sui XB, Pan HM, Han WD, 2015. The role of STAT3 in autophagy. *Autophagy*, 11(5): 729–739.
- Zhou YY, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, Benner C, Chanda SK, 2019. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications*, 10(1): 1523.
- Zong JJ, Qing X, Fan Z, Xu WJ, Zhang YW, 2021. Treatment of primary hepatocellular carcinoma. *Journal of Southeast University (Medical Science Edition)*, 40(4): 542–547. [宗静静, 卿鑫, 樊哲, 许文景, 张业伟, 2021. 原发性肝癌治疗进展. 东南大学学报(医学版), 40(4): 542–547.]