

基于网络药理学与Dijkstra模型的柴胡抗肝癌机制研究

王鹏¹,许文倩²,高晓霞^{3*},秦雪梅^{3*}

(1.南方医科大学药学院,广东广州510515;

2.山西师范大学食品科学学院,山西太原030031;

3.山西大学中医药现代研究中心,山西太原030006)

摘要:以柴胡为君药的复方逍遥散、四逆散与小柴胡汤等常用于临床肝癌治疗。前期研究发现,柴胡具有抗肝癌活性,且其低极性部位能显著抑制肝癌细胞的增殖,并促进细胞凋亡。然而,柴胡低极性部位治疗肝癌的物质基础与作用机制尚未得到系统和深入地研究。本研究采用液相色谱-质谱联用技术(Liquid Chromatography-mass Spectrometry, LC-MS)解析柴胡低极性部位化学成分,并结合网络药理学与最短路径算法(Dijkstra)传播模型解析柴胡低极性部位抗肝癌关键成分-靶点药效网络,最后通过分子对接验证柴胡低极性部位关键成分与靶点相互作用。结果显示,柴胡低极性部位共鉴定35个化学成分;通过网络药理学筛选“hithubs”靶点40个,主要涉及癌症通路、癌症中蛋白聚糖、卡波西肉瘤(Kaposi Sarcoma)相关疱疹病毒感染、磷脂酰肌醇-3激酶-蛋白激酶B通路(Phosphatidylinositol-3 Kinase-akt Protein Kinase b Pathway, PI3K-Akt)信号通路、化学致癌作用-受体激活等通路。进一步根据“hithubs”各靶点在核心通路中的数量筛选出3个最为关键的靶点包括表皮生长因子受体(Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR)、基质金属蛋白酶(Matrix Metalloproteinase, MMP)和信号转导与转录激活因子3(Matrix Metalloproteinase, STAT3)。Dijkstra传播模型结果显示柴胡低极性中柴胡多炔8(RB-8)、柴胡多炔4(RB-4)和柴胡皂苷元G为关键抗肝癌成分。分子对接显示柴胡皂苷元G与EGFR, RB-8, RB-4和柴胡皂苷元G与STAT3具有很强的亲和力。本文结果表明RB-8, RB-4和柴胡皂苷元G可能是柴胡低极性部位的主要活性成分群,通过阻断EGFR的表达,抑制Janus激酶2(Janus Kinase 2, JAK2)/STAT3通路,最终减缓肝癌的生长与转移。该研究为解释中医治疗肝癌的潜在机制提供了参考,为柴胡治疗肝癌临床用药及相关药物制剂开发提供科学依据。

关键词:柴胡;网络药理学;Dijkstra传播模型;肝癌;分子对接

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**0253-2395(2025)02-0265-13

Investigation of the Mechanism of *Bupleurum* Against Liver Cancer by Integrated Network Pharmacology and Dijkstra Model

WANG Peng¹, XU Wenqian², GAO Xiaoxia^{3*}, QIN Xuemei^{3*}

(1.School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2.School of Food Science, Shanxi Normal University, Taiyuan 030031, China;

3.Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

收稿日期:2024-08-31;**接受日期:**2024-12-30

基金项目:国家自然科学基金项目(32174099;82304457;82174099);山西省基础应用项目面上项目(20210302123432);名优晋药再开发山西省重点实验室项目(202104010910001);地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室项目(202105D121009);山西省中医药创新团队(zyytd2024020);山西省“1331工程”重点协同创新中心;山西省科技创新团队;化学生物学与分子工程教育部重点实验室;中国博士后科学基金(2022M721531)

作者简介:王鹏(1994-),男,湖北天门人,博士研究生,研究方向为中药药理学。E-mail:wp940420@smu.edu.cn

* **通信作者:**高晓霞(GAO Xiaoxia),E-mail:gaoxiaoxia@sxu.edu.cn;秦雪梅(QIN Xuemei),E-mail:qinxm@sxu.edu.cn

引文格式:王鹏,许文倩,高晓霞,等.基于网络药理学与Dijkstra模型的柴胡抗肝癌机制研究[J].山西大学学报(自然科学版),2025,48(2):265-277. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024172.

Abstract: Bupleurum is the primary medicine in traditional Chinese compound prescriptions such as Xiaoyaosan, Sinisan, and Xiaochaihu decoction, commonly used to treat liver cancer. Previous studies have demonstrated that Bupleurum possesses anti-liver cancer properties. Specifically, the low-polarity partition of *Bupleurum* (LPB) significantly inhibits liver cancer cell proliferation and promotes apoptosis. However, the material basis and mechanism of LPB in treating liver cancer have not been systematically studied. In this study, liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to analyze the chemical components of the LPB. Network pharmacology combined with Dijkstra model were used to investigate the key component-target network of LPB against liver cancer. Finally, the interaction between the components and targets of the LPB was verified by molecular docking. Our results identified 35 chemical components in the LPB; 40 "hithubs" targets were screened by network pharmacology, and mainly involving pathways such as pathways in cancer, proteoglycans in cancer, kaposi sarcoma-associated herpesvirus infection, PI3K-Akt signaling pathway, and chemical carcinogenesis-receptor activation and other pathways. Based on the number of "hithubs" targets in the core pathway, the three most critical targets including epidermal growth factor receptor (EGFR), matrix metalloproteinase (MMP) and matrix metalloproteinase (STAT3) were selected. The Dijkstra model results indicated that RB-8, RB-4, and saikogenin G are key anti-liver cancer components in LPB. Molecular docking showed a strong binding affinity between these components and targets. Our findings suggest that RB-8, RB-4 and saikogenin G are the main active components in the LPB, which can inhibit EGFR expression, block the JAK2/STAT3 pathway, thereby curb liver cancer growth and metastasis. This study offers insight into the potential mechanism of traditional Chinese medicine in the treatment of liver cancer, and provides a scientific foundation for the clinical application of Bupleurum and the development of related pharmaceutical preparations.

Key words: *Bupleurum*; network pharmacology; Dijkstra model; liver cancer; molecular docking

0 引言

肝癌是全球第六大常见恶性肿瘤,也是癌症相关死亡的第二大原因。英国癌症研究中心指出,至2035年,肝癌将成为增长速度最快的恶性肿瘤之一^[1]。预计到2025年,原发性肝癌将影响超过100万人。超过一半的肝癌病例和死亡发生在东亚地区,其中我国每年肝癌发病和死亡人数分别为46.6万和38.3万,这将带来巨大的社会负担和健康挑战^[2]。肝癌的发生与吸烟、饮酒和食物中的致癌物质有关,遗传与环境因素也在其发病过程中起重要作用^[3]。炎症反应,细胞周期异常和代谢网络异常可能是肝癌的主要致病机制^[4]。近几十年来,肝癌的治疗主要包括化疗、放疗和手术切除。然而,尽管肝癌治疗取得了一定进展,但许多药物未能为患者带来令人满意的效果,有效率低且毒副作用较大。此外,外科手术对于患者的疾病进程与肝脏功能要求较高,且具有较高的复发风险^[5]。中药由于其多成分、多环节、多靶点的效应优势,为肝癌治疗提供了一种替代方法,例如提高人体免疫力、减轻化疗的毒副作用、增强化疗敏感性以及延长患者生存期^[6]。因此,发展中医药作为肝癌的一种新治疗方法具有重要意义。

柴胡为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC. 或狭叶柴胡 *Bupleurum scorzonrifolium* Willd. 的干燥根。其味辛、苦,性微寒,归肝、胆、肺经,具有疏散退热、疏肝解郁、升举阳气等作用。中医临床研究发现,肝郁脾虚证是原发性肝癌患者中最常见证型,以柴胡为君药的逍遥散、四逆散与小柴胡汤等常用于肝癌治疗^[7]。现代药理学研究表明,柴胡具有显著的抗肝癌活性,其中,柴胡注射液能够对人肝癌 SMMC-7721 细胞发挥抑制和促凋亡的作用;而小柴胡汤的含药血清则能诱导人肝癌 HepG2 细胞发生凋亡和自噬。柴胡的有效成分,如柴胡皂苷 A、B2 和 D 等,均展现出抗肝癌的潜力,其机制包括激活转录因子 3(ATF3)以诱导铁死亡,以及通过调节 STK4/IRAK1/NF- κ B 通路发挥抗炎抗肿瘤的作用,同时抑制肿瘤血管生成的 VEGF/ERK/HIF-1 α 信号通路等^[8-10]。然而,柴胡其他有效成分如柴胡多炔、挥发油类等抗肝癌作用尚不清楚。课题组前期对柴胡不同极性部位对肝癌 SMMC-7721 细胞的影响及机制研究发现,柴胡低极性部位组和中极性部位组干预后能够抑制肝癌细胞的增殖,并促进其凋亡,肝癌细胞阻滞于 G1 期主要与 Npas2-CDC25A-CDK2-Cyclin E 复合物有关,阻滞于 G2 期主要与 CDC25B-CDK1-Cyclin B1 复合物

有关,凋亡主要与Npas2-CDC25A靶点以及激活线粒体凋亡途径相关^[11]。然而,柴胡低极性部位成分复杂,课题组前期发现其含有多种新型多炔类成分,这些成分具有抗抑郁生物活性,也可能具有抗肝癌作用。因此,本研究采用LC-MS结合网络药理学的方法,鉴定柴胡低极性部位治疗肝癌的关键成分与靶点,并解析相关通路。

网络药理学能够在细胞和分子水平上深入理解药物在疾病治疗中的作用机制,并系统分析药物、疾病和靶点之间的相互作用,从而探索其复杂的生物学过程和信号通路^[12]。目前,许多学者开发了多种网络药理学新方法,在中药抗癌的研究中取得了新进展,包括网络高通量研究策略^[13]、基于靶点预测的药物-靶标预测算法(Drug Target Prediction Algorithm, drugCIPHER)方法^[14]、进化动力学的多尺度模型^[15]、机器学习算法^[16]与Dijkstra传播模型^[17]等等。其中,Dijkstra传播模型是通过成分-靶点-蛋白互作网络计算药物靶点与药物调控疾病基因的最短距离,并保留节点数小于或等于3的最短路径。该模型能反映中药药效的传播模式,并将复杂的成分-靶点网络简化以提取关键子网络,在靶标发现和成分筛选等方面广泛应用^[18]。因此,构建基于网络药理学的柴胡低极性部位治疗肝癌传播模式,将有助于更全面地揭示柴胡低极性部位治疗肝癌的物质基础与作用机制。

基于此,本研究首先采用UPLC-Q-TOF-MS技术解析柴胡低极性部位化学成分,进一步通过网络药理学结合Dijkstra传播模型,预测柴胡低极性部位抗肝癌关键成分、作用靶点及信号通路,最终通过分子对接解析关键成分与靶点的相互作用,揭示柴胡低极性部位抗肝癌的药效物质和作用机制,为中医药治疗肝癌临床应用及相关药物制剂开发提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药材

柴胡由山西省华阳药业有限公司提供,经鉴定为伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.,习称“北柴胡”。

1.2 药品与试剂

分析纯甲醇、石油醚与乙腈(天津四方化工有限公司,中国),质谱纯甲醇与乙腈(Thermo fisher公司,美国),色谱纯甲酸(Thermo fisher公司,美国),二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO,天津富宇精细化工有限公司,中国)。

1.3 仪器

赛默飞U3000超高效液相色谱(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC, Thermo fisher公司,美国),赛默飞Q ExactiveTM Orbitrap质谱(Mass Spectrometry, MS, Thermo fisher公司,美国),KQ-300E型超声波清洗仪(昆山市超声仪器有限公司,中国),Sartorius BSA124S分析天平(Sartorius公司,美国),Neofuge 13R高速冷冻离心机(上海力申科学仪器有限公司,中国),Milli-Q Integral Water Purification System纯水仪(Millipore公司,美国),HH-4数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司,中国)。

1.4 数据库与软件

建立柴胡化学成分数据库:通过文献数据库(Web of Science, <https://www.isiknowledge.com>; Pubmed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>; CNKI, <http://www.cnki.net>)和中药成分数据库(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>; TCMID, <http://47.100.169.139/tcmid>),收集并整理柴胡化合物及其结构信息,建立柴胡化学成分数据库。

成分靶点数据库:SwissTargetPrediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)和PharmMapper (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)。此外,从文献数据库Web of Science, Pubmed和CNKI中收集成分靶点。

以“liver cancer”“hepatocellular carcinoma”“intrahepatic cholangiocarcinoma”为检索词,在各个靶点数据库检索:DisGenet (<https://www.disgenet.org/>)、Genecards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://omim.org/>)和TTD (<http://ttd.org/>)。结合这些数据并删除重复值后,通过UniProt (<https://www.uniprot.org/>),将目标基因标准化为“Homo sapiens”的物种。

1.5 柴胡低极性部位制备

参照实验室前期方法,取适量柴胡药材,混匀后加入8倍量体积分数95%乙醇,加热回流2次(每次2h),合并回流液,过滤,回收乙醇至无醇味,然后加入等体积的石油醚超声萃取(30 min/次),至萃取液近乎无色。合并石油醚提取液,浓缩至浸膏,于真空干燥箱(60℃)中干燥,即得柴胡低极性部位。

供试液的制备:称取柴胡低极性部位样品100 mg,加入体积分数95%甲醇5 mL,涡旋1 min,超声提取20 min,高速离心(13 000 r/min)15 min,取其上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤后进样分析。

1.6 色谱、质谱条件与成分分析策略

色谱条件:超高效液相色谱条件色谱柱为Waters HSS T3液相色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),流动相为质量分数0.1%甲酸水溶液(A)和甲醇(B),柱温为40℃,流速为0.20 mL/min,进样量为5 μL。梯度条件:0 min~1 min, 10%~10%B; 1 min~2 min, 10%~60%B; 2 min~9 min, 60%~60%B; 9 min~11 min, 60%~70%B; 11 min~25 min, 70%~98%B; 25 min~26 min, 98%~10%B; 26 min~30 min, 10%B。

质谱条件:ESI离子源于正、负离子两种模式下采集数据,数据采集范围为50~1 500 m/z ,离子喷雾电压为3.5 kV(+)和2.5 kV(-);去簇电压和入口电压为70 V和10 V;碰撞气雾化气、辅助加热气和气帘气分别为50、50和35 kPa;去溶剂温度为320℃。采用数据依赖性采集(Data-Dependent Acquisition, DDA)方法,强度阈值为5 000选取强度最高的15个离子进行质谱检测。

分析策略:Compound Discoverer 3.1(CD)软件分析,利用Chemspider、mzVault、mzCloud等在线数据库对逍遥散质谱数据进行非靶向搜索,得到由样品名称、保留时间、分子式、质荷比以及对应的离子强度组成的数据集。

综合分析建立的本地化学成分数据库和Compound Discoverer 3.1计算结果。通过Xcalibur 3.2软件(美国Thermo公司)提取一级质谱与二级质谱信息,结合诊断离子、碎片离子、文献数据及数据库进一步鉴定柴胡低极性部位化

学成分。

1.7 蛋白-蛋白相互作用网络构建

柴胡低极性部位成分靶标和肝癌疾病靶标用于构建蛋白交互网络图。两种蛋白的相互作用网络由Cytoscape软件构建,从柴胡低极性部位成分靶标和肝癌疾病靶标的交叉点间获得网络。网络属性值是通过CytoNCA插件获得的,degree大于所有degree中位数两倍的节点被认为是“Hithub”关键节点,用于后续通路富集分析。

1.8 GO和KEGG通路富集分析

使用DAVID 6.7数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>),对KEGG通路和GO通路进行富集分析。KEGG生物途径富集分析选择的途径 P 值 ≤ 0.05 , Benjamin value ≤ 0.05 ,对前15名KEGG通路进行可视化分析。GO富集分析包括细胞成分、分子功能和生物过程三个方面。利用生物信息学平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>),进行了可视化分析,以制作气泡图和直方图。

1.9 Dijkstra模型传播系数计算

本研究采用的Dijkstra模型,基于成分-靶点-蛋白互作网络,检测柴胡低极性部位成分与其调控基因的最短距离,并保留不超过3个节点的路径。初始节点被认为是成分的直接靶点,终端节点被认为是调控的代谢基因。将第一或中间节点定义为繁殖模式,当节点数小于3时,意味着成分靶点与肝癌代谢基因直接相关,这是最理想的结果。当节点数等于3时,表示成分靶点通过其他中间基因与代谢基因相关。中间基因越多,成分靶点与代谢基因相关的方式就越多,也更容易影响代谢基因。终端节点定义为通过增殖模式到达的效应蛋白。具有更多繁殖模式和更多效应蛋白的靶标通常具有更好的干预效果。我们计算每个成分传播模式数量。

将成分靶点网络定义为图形 $G(H, L)$, H 和 L 分别代表节点和边。给定一个随机初始节点 u , $c_{u,x}$ 是从节点 u 到节点 x 的边的权重。 H 分为两组 P 和 Q , P 中的节点到 u 的距离已经确定, Q 中包含的节点到 u 的距离尚未确定。距离 Q 中从初始节点 u 到节点 x 定义为从 u 到 Q

中节点 x 不经过 Q 中其他节点的最短路径长度。算法的思路如下:

(1)开始时, $P = \{u\}$, $Q = H - \{u\}$ 。对于 Q 中的所有节点 x , 如果存在从 u 到 x 的路径, 则 $d_{u,x} = c_{u,x}$, 否则 $d_{u,x} = \infty$ 。

(2)对于 Q 中的所有节点 x , 找到 $d_{u,x}$ 最小的节点 t , 即:

$$d_{u,t} = \min \{ [d_{u,x}] | x \in Q \},$$

$d_{u,t}$ 是从靶标 U 到关键肝癌代谢基因节点 t 的最短距离。节点 t 也是 Q 中所有节点中离 u 最近的节点, 从 Q 中删除节点 t , 并将其合并到 P 中。

(3)更新 $d_{u,x}$ 对于 Q 中与 t 相邻的节点 x , 使用以下公式

$$d_{u,x} = \min \{ [d_{u,t}], [d_{u,t}] + [c_{t,x}] \}。$$

(4)继续上述步骤, 直到 Q 为空集。

(5)在计算 $d_{u,x}$ 以路径小于或等于 3 个节点为最短距离 DMIN, 在具有 3 个节点的路径中, 第 1 个节点和第 2 个节点代表传播模式, 第 3 个节点代表药物调控的代谢基因。

1.10 分子对接

EGFR、MMP 和 STAT3 靶点蛋白 PDB 文件是从蛋白质数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 下载。RB-8、RB-4 与柴胡皂苷元 G 的 mol2 文件从 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 网站下载或者 Chemdraw 17.1 软件绘制。分子对接采用 SYBYL2.1.1 药物设计学工具, 运用软件删去靶蛋白的原配体和分子, 补充非完整的氨基酸残基, 加氢加电荷, 以原活性配体为原型分子, 创建对接口袋, 以成分作为配体进行分子对接并打分 (Total score), 分值越高, 表示化合物与受体的结合力可能越强。

2 实验结果

2.1 基于 LC-MS 的柴胡低极性部位化学成分分析

通过总结课题组前期工作、文献调研 Web of Science、Pubmed、CNKI 和网络在线数据库 TCMSP、TCMID, 我们建立柴胡本地化学成分库。该化学成分库包含了各化合物名称、分子式、结构式和精确分子量, 部分化合物通过 Massbank (<http://massbank.eu/>) 和 Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库收集质谱碎片离子信息。最终, 本地化学成分库的

包含 335 个化合物。在化学成分鉴定过程中, 手动提取本地化学成分库中成分的一级质谱与二级质谱信息, 并与数据库中的质谱信息进行比对, 最终鉴定化学成分。柴胡低极性部位在正、负离子模式下的总离子流图见图 1, 共分析鉴定出 35 种化合物, 化合物详情见表 1。

2.2 基于“hithub”的柴胡低极性部位抗肝癌靶点分析

通过对柴胡低极性部位的 35 个成分进行 TCMSP、SwissTargetPrediction、Pharmmapper 和 PubMed 数据库分析, 去除重复后, 我们获得了 502 个成分靶点。同时, 通过 DisGene、GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库, 获得 6 673 个肝癌相关靶点。如图 2 所示, 这两个网络分别由 502 个节点与 6 461 条边, 以及 6 673 节点与 258 269 条边组成。结合这两个网络, 获得了柴胡低极性部位抗肝癌靶点 303 个, 并构建了包括 303 个节点与 3 633 条边的网络。将 degree 大于所有 degree 中位数两倍的节点作为“hithub”关键节点。最终我们获得了 35 个关键靶点, 并构建了柴胡低极性部位抗肝癌“hithubs”靶点网络包括 35 个点与 490 条边。

2.3 柴胡低极性部位抗肝癌靶点富集分析及核心靶点筛选

为了探讨柴胡低极性部位治疗肝癌的机制, 我们采用 DAVID 数据库对柴胡低极性部位抗肝癌的 35 个核心靶点进行 KEGG 与 GO 富集分析, 如气泡图所示 (图 3)。柴胡低极性部位治疗肝癌涉及许多与癌症相关的信号通路, 包括癌症通路、癌症中蛋白聚糖、Kaposi sarcoma 相关疱疹病毒感染、PI3K-Akt 信号通路、化学致癌作用-受体激活、前列腺癌、催乳素信号通路、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、内分泌抵抗、人巨细胞病毒感染、FoxO 信号通路、膀胱癌、C 型凝集素受体信号通路与 Th17 细胞分化。GO 富集分析包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF) 三个模块 (图 4), 结果显示柴胡低极性部位与肝癌相互作用在生物过程模块主要涉及 RNA 聚合酶 II 对转录的正调控、信号转导、基因表达的正向调控、DNA 模板

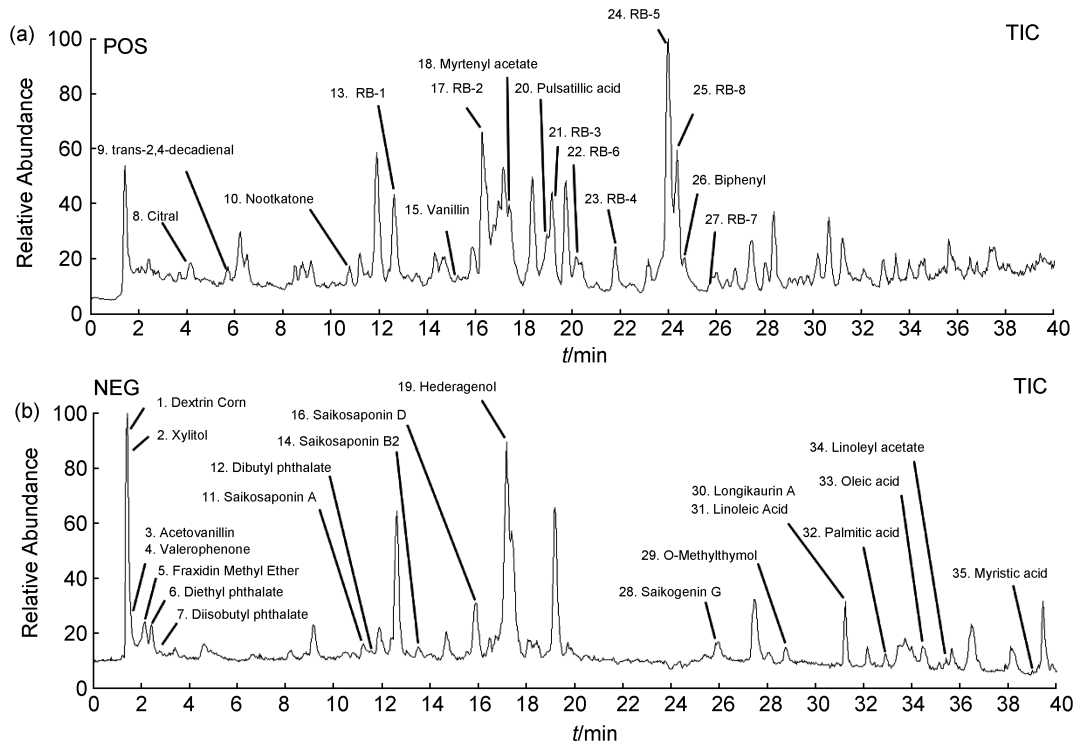


图 1 柴胡低极性部位正(a)和负离子(b)的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms (TIC) of positive (a) and negative (b) ions in low-polarity partition of *Bupleurum* (LPB)

转录的正调控和细胞群增殖的正向调节等;细胞成分模块主要涉及细胞质、nucleus、胞质溶胶、核质和含蛋白复合物等;同时,分子功能模块主要涉及蛋白结合、ATP结合、相同的蛋白质结合、酶结合和RNA聚合酶II特异性DNA结合转录因子结合等。

为了进一步分析柴胡低极性部位抗肝癌核心靶点,我们根据各靶点所涉及的KEGG与GO通路数量进行排名(图5)。结果表明,EGFR、MMP和STAT3参与了大多数的通路,这可能是柴胡低极性部位抗肝癌的核心靶点。

2.4 基于Dijkstra算法筛选柴胡低极性部位抗肝癌核心药效成分群

我们分析计算柴胡低极性部位的每个成分的传播模式。根据计算结果,排名前三的成分分别是RB-8、RB-4和柴胡皂苷元G,这三个成分可能是柴胡低极性部位抗肝癌最关键的成分。RB-8和RB-4是本课题组前期分离鉴定的多炔类化合物,具有抗抑郁活性并能抑制单胺类神经递质再摄取的活性^[19],但是其在肝癌癌症方面的作用尚未报道。现阶段尚无报道柴胡

皂苷元G的生物活性,仅有关于柴胡皂苷元G的网络药理预测显示其有抗抑郁活性。因此,这三个成分作为柴胡低极性部位抗癌最关键的成分,需要进一步的分子对接验证。

2.5 柴胡低极性部位抗肝癌药效成分群与靶点分子对接

柴胡低极性部位的代表性活性成分主要为RB-8、RB-4和柴胡皂苷元G,同时EGFR、MMP和STAT3是柴胡低极性部位抗肝癌的核心靶点。将3种核心成分与3种靶点的结合姿势、相互作用与每次相互作用的结合能进行分析(图7,表2)。分子对接的评分标准是0到5分,一般认为综合打分在4以上表示有较好地结合。结果表明,每种候选药物通过可见的氢键和强静电相互作用与其蛋白质靶标结合。此外,每个靶点的疏水口袋被3种候选药物成功占据。对于结合能进行比较分析发现,RB-8、RB-4与柴胡皂苷元G与EGFR具有-4.58、-5.44与-8.12 kcal/mol的结合能(对接打分>4),表明这些各成分与EGFR结合高度稳定。RB-8、RB-4与MMP2具有-0.17与-0.22 kcal/mol的弱结合能,柴胡皂苷元G与

表1 柴胡低极性部位UPLC-MS/MS化学成分分析

Table 1 Analysis of chemical composition of LBR by UPLC- MS/MS

No.	Time /min	Name	Fomula	IonType	Cal.m/z	Mea.m/z	Error/ ($\mu\text{g/g}$)	MS/MS
1	1.39	糊精	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_{16}$	[M-H]	503.161 7	503.162 3	2.943	341.109 5, 179.055 6, 89.023 5
2	1.42	木糖醇	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$	[M-H]	151.061 1	151.060 6	3.104	151.060 56, 101.023 5, 89.023 4
3	1.81	乙酰香兰素	$\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$	[M-H]	193.050 6	193.050 1	2.638	193.05, 178.026 7, 134.036 6
4	1.81	苯戊酮	$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}$	[M-H]	161.097 1	161.096 6	2.984	131.096 6, 83.049 3, 79.956 5
5	2.08	白蜡树素	$\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_5$	[M-H]	235.061 1	235.061 1	3.695	235.061 1, 163.075 9, 78.958 1
6	2.37	邻苯二甲酸二乙酯	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$	[M-H]	221.081 9	221.081 8	3.833	221.081 8, 177.091 7
7	2.79	邻苯二甲酸二异丁酯	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	[M-H]	277.144 5	277.144 2	2.520	277.144 2, 233.154 5, 165.127 9
8	4.29	柠檬醛	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	[M+H]	153.127 5	153.127 5	0.414	153.127 5, 135.116 9, 81.070 4
9	5.58	反,反-2,4-癸二烯醛	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$	[M+H]	153.127 5	153.127 5	0.850	153.127 5, 135.117 0, 93.070 3
10	10.74	努特卡酮	$\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$	[M+H]	219.174 3	219.174 4	0.388	219.174 4, 177.127 5, 121.065 0
11	11.22	柴胡皂苷 A	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$	[M-H]	779.458 7	779.459 1	1.750	779.459 1, 617.406 3
12	11.68	邻苯二甲酸二丁酯	$\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$	[M-H]	277.144 5	277.144 4	2.168	277.144 4, 233.154 6, 165.127 9
13	12.74	RB-1	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}$	[M+H]	215.143	215.143 2	0.511	215.143 2, 159.080 6, 107.086 0
14	13.49	柴胡皂苷 B2	$\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{18}$	[M-H]	779.458 7	779.459	1.274	779.459
15	15.19	香草醛	$\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$	[M+H]	153.054 7	153.054 8	0.892	153.054 7, 125.059 9, 111.044 4
16	15.86	柴胡皂苷D	$\text{C}_{42}\text{H}_{68}\text{O}_{13}$	[M-H]	779.458 7	779.458 9	1.030	779.459 1, 617.406 5
17	16.28	RB-2	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}$	[M+H]	215.143	215.143 2	0.778	215.143 2, 159.080 6, 107.049 5
18	17.45	6,6-二甲基双环庚-2-烯-2-乙酸甲酯	$\text{C}_{12}\text{H}_{18}\text{O}_2$	[M+H]	195.137 9	195.138	-0.036	195.138 0, 149.132 6, 125.059 9
19	17.5	常春藤皂苷元	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	[M-H]	471.347 9	471.348 4	3.555	471.348 4
20	18.97	白头翁酸	$\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_4$	[M+H]	471.346 8	471.348 4	2.778	471.348 4, 453.327 0, 187.148
21	19.43	RB-3	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}$	[M+H]	243.174 3	243.174 4	0.031	243.174 4, 159.080 6, 107.070 1
22	20.3	RB-6	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2$	[M+H]	257.153 1	257.152 2	-3.828	257.152 2, 159.080 6, 91.054 7
23	21.83	RB-4	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}$	[M+H]	243.174 3	243.174 5	0.527	243.174 5, 159.080 6, 107.049 5
24	23.99	RB-5	$\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}$	[M+H]	215.143	215.143 2	0.618	215.143 2, 159.080 6, 107.049 5
25	24.35	RB-8	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{O}$	[M+H]	243.174 3	243.174 5	0.613	243.174 5, 159.080 6, 107.049 5
26	24.71	联苯	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}$	[M+H]	154.077 7	154.077 9	1.120	154.077 9, 128.062 5, 113.964 1
27	25.54	RB-7	$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_2$	[M+H]	257.153 1	257.152 4	-3.360	257.152 4, 159.080 6, 91.055 1
28	26.19	柴胡皂苷元 G	$\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_4$	[M-H]	471.347 9	471.348 3	3.255	471.348 3
29	28.74	2-异丙基-5-甲基茴香醚	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}$	[M-H]	163.112 8	163.112 3	3.190	163.112 2, 119.049 5, 91.018 1
30	31.27	Longikaurin A	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_5$	[M-H]	347.186 3	347.186 7	3.154	347.186 6, 329.176 2
31	31.27	亚油酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$	[M-H]	279.232 6	279.233 3	5.310	279.233 2
32	32.92	棕榈酸	$\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	[M-H]	255.232 9	255.233	4.014	255.233
33	34.46	油酸	$\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$	[M-H]	281.248 6	281.248 8	4.092	281.248 8
34	35.47	亚油基乙酸酯	$\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{O}_2$	[M-H]	307.264 2	307.264 5	3.575	307.264 5, 83.049 2
35	38.99	肉豆蔻酸	$\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$	[M-H]	227.201 6	227.201 5	3.761	227.201 5, 130.982 8

注: RB-1: (2Z, 8Z, 10E)-pentadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol; RB-2: (2Z, 8E, 10E)-pentadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol; RB-3: (2Z,8Z,10E)-heptadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol; RB-4: (2Z,8E,10E)-heptadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol; RB-5: (2E, 8E, 10E)-pentadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol; RB-6: (2Z,8E,10E)-pentadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-yl acetate; RB-7: (2E, 8E, 10E)-pentadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-yl acetate; RB-8: (2E,8E,10E)-heptadeca-2,8,10-trien-4,6-diyn-1-ol。

MMP2 未能结合(对接打分 <4),各成分与 MMP2 结合能力较弱。RB-8、RB-4 和柴胡皂苷元 G 与 STAT3 分别具有 -3.97 、 -3.97 和 -5.69 kcal/mol 的结合能(对接打分 >4),表明这些成分与 STAT3 结合高度稳定。

3 讨论与总结

肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,死亡率在消化系统恶性肿瘤中排名第二,发病率呈上升趋势^[2]。近年来,中医结合现代治疗方法在改善症状、促进疗效、减少毒副作用方面

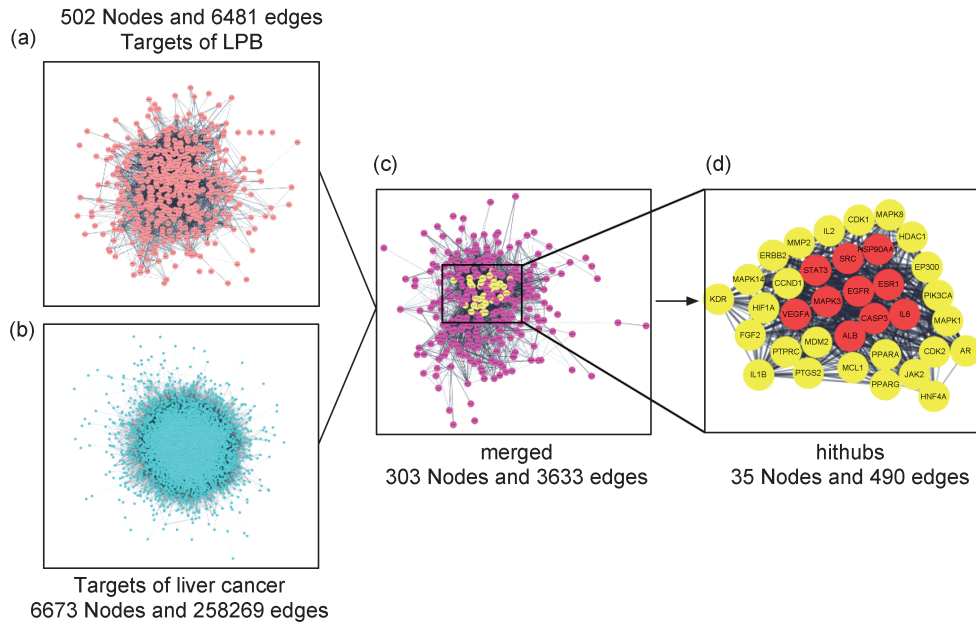


图2 LPB作用于肝癌核心靶点的筛选过程

(a) LPB 靶点网络; (b) 肝癌靶点网络; (c) LPB 抗肝癌靶点网络; (d) LPB 抗肝癌“hithubs”靶点网络

Fig. 2 The screening process of core targets of LPB acting on key nodes of liver cancer

(a) LPB target network; (b) liver cancer target network; (c) LPB anti-liver cancer target network and (d) LPB anti-liver cancer "hithubs" target network

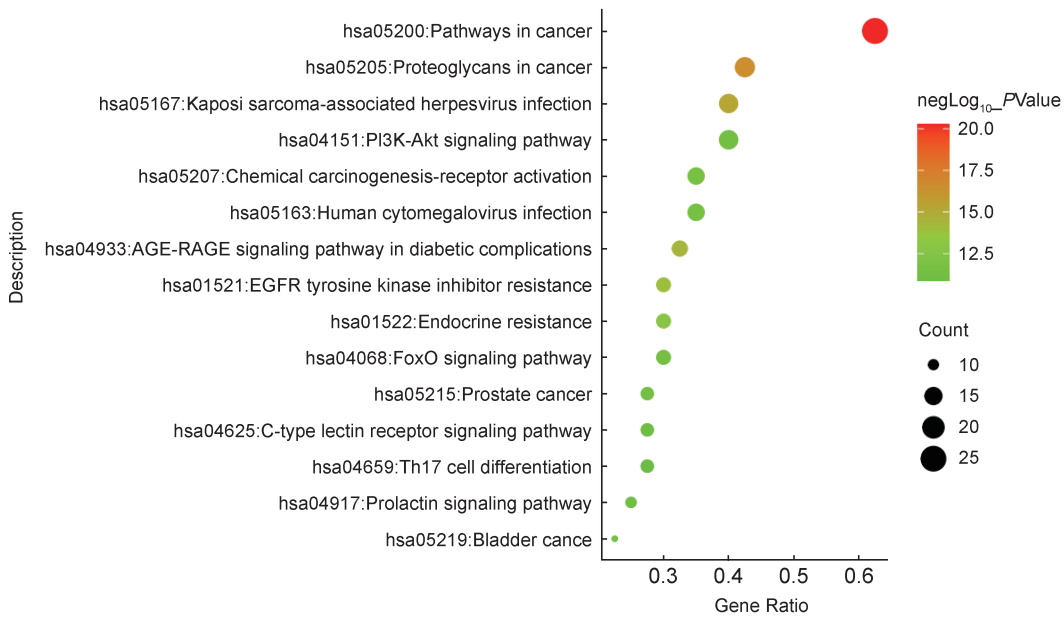


图3 核心靶点的KEGG富集分析气泡图

具有显著性(P值)的前15个通路,以气泡图显示,色标表示P值,点的大小代表每个通路基因数量。

Fig. 3 Bubble chart of KEGG enrichment analysis of core targets

Top 15 pathways with corresponding P-values, displayed in a dot plot. The color scales indicated p-values and the sizes of the dots represented the gene count of each term.

取得了长足的进步。柴胡归肝、胆经,具有疏肝解郁等功效。目前,临床上以柴胡为君药的中药方剂用于治疗肝癌,如逍遥散、四逆散与小柴胡汤等,在改善晚期肝癌患者的症状方

面发挥了更有利的作用^[7]。本课题组前期研究发现,柴胡具有抗肝癌活性,其低极性部位能抑制肝癌细胞的增殖,并促进其凋亡,其机制可能与甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢有关^[11]。然

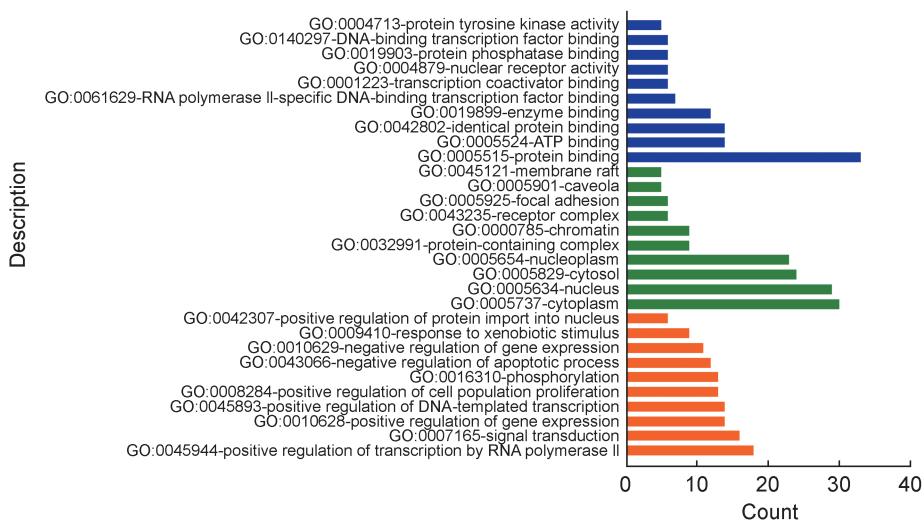


图4 核心靶点的GO富集分析
条带的长度和颜色用于表征靶标数量与相关生物过程。

Fig. 4 GO enrichment analysis

The length and color of the bands were used to characterize the number of targets involved into the related biological processes.

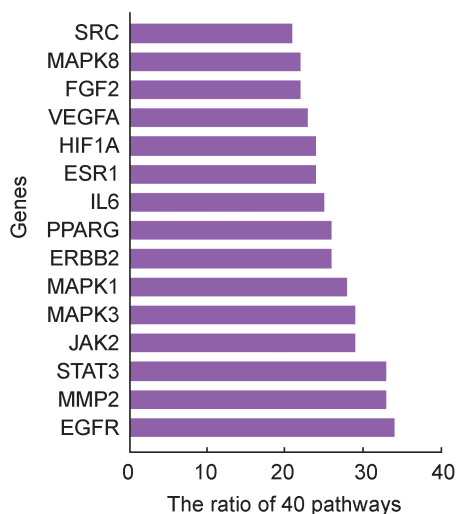


图5 GO富集分析中前30个通路和KEGG分析中前10个通路中关键靶点的数量

Fig. 5 The proportion of key targets in the top 10 pathways in KEGG and top 30 pathways GO enrichment analysis.

而,柴胡低极性部位抗肝癌的物质基础与作用机制仍然不清楚。在本研究中,我们采用LC-MS解析了柴胡低极性部位化学成分,并结合网络药理学与Dijkstra传播模型解析柴胡低极性部位抗肝癌关键成分-靶点药效网络,通过分子对接验证柴胡低极性部位关键成分与靶点相互作用。该方法阐述了柴胡低极性部位成分治疗肝癌的传播模式,并发现RB-8、RB-4和柴胡皂苷元G可能是柴胡低极性部位的主要活性成分群,通过阻断EGFR的表达,抑制JAK2/

STAT3通路以及抑制MMP表达,最终减缓肝癌的生长与转移。该研究为解释中医治疗肝癌的潜在机制提供了参考,为柴胡治疗肝癌临床用药及相关药物制剂开发提供科学依据。

Dijkstra算法是一种用于寻找图中最短路径的算法。该算法由计算机科学家艾兹赫尔·迪克斯特拉(Edsger W. Dijkstra)于1956年提出,其基本思路是通过不断选择当前已知的最短路径节点,逐步扩展到其他节点,直到找到目标节点的最短路径^[20]。近年来,Dijkstra算法作为一种经典的最短路径算法,在网络药理学领域中发挥了重要作用,为分析中药与生物网络之间的复杂关系提供了有效工具,促进了靶点识别、药物发现及网络交互分析等方面的研究。在中药网络药理学中,其作用往往不仅限于单一靶点,而是通过多成分与多靶点之间的相互作用,形成复杂的网络结构^[21]。Dijkstra算法可用于识别各成分通过生物网络作用于多个靶点的路径,从而揭示潜在的关键成分与靶点。同时,该算法还能够分析成分与蛋白质网络之间的关系,以帮助理解药物的作用机制。Dijkstra算法能够追踪成分药物从靶点出发,经过多个中介分子,到达其他靶点的路径,这对于多成分多靶点效应及其网络关系的研究具有重要意义^[22]。本研究从柴胡低极性部位抗肝癌的关键靶点出发,运用Dijkstra算法寻找与靶点相关的

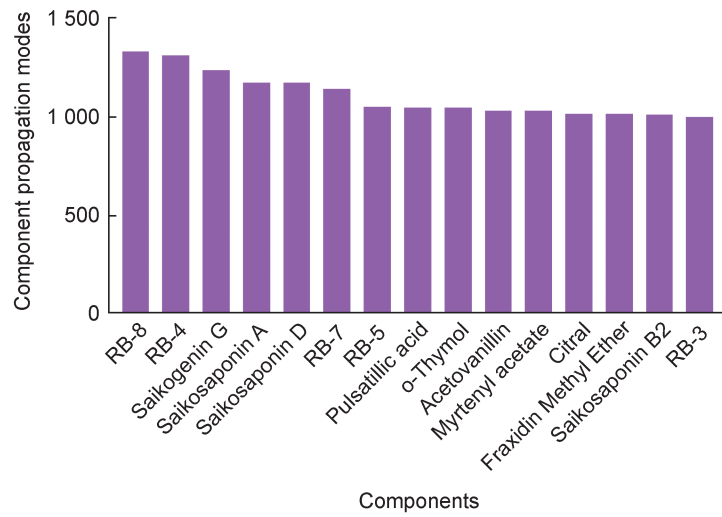


图6 LPB中每个成分的传播模式的值分布

Fig. 6 The value distribution of propagation mode of each component in LPB

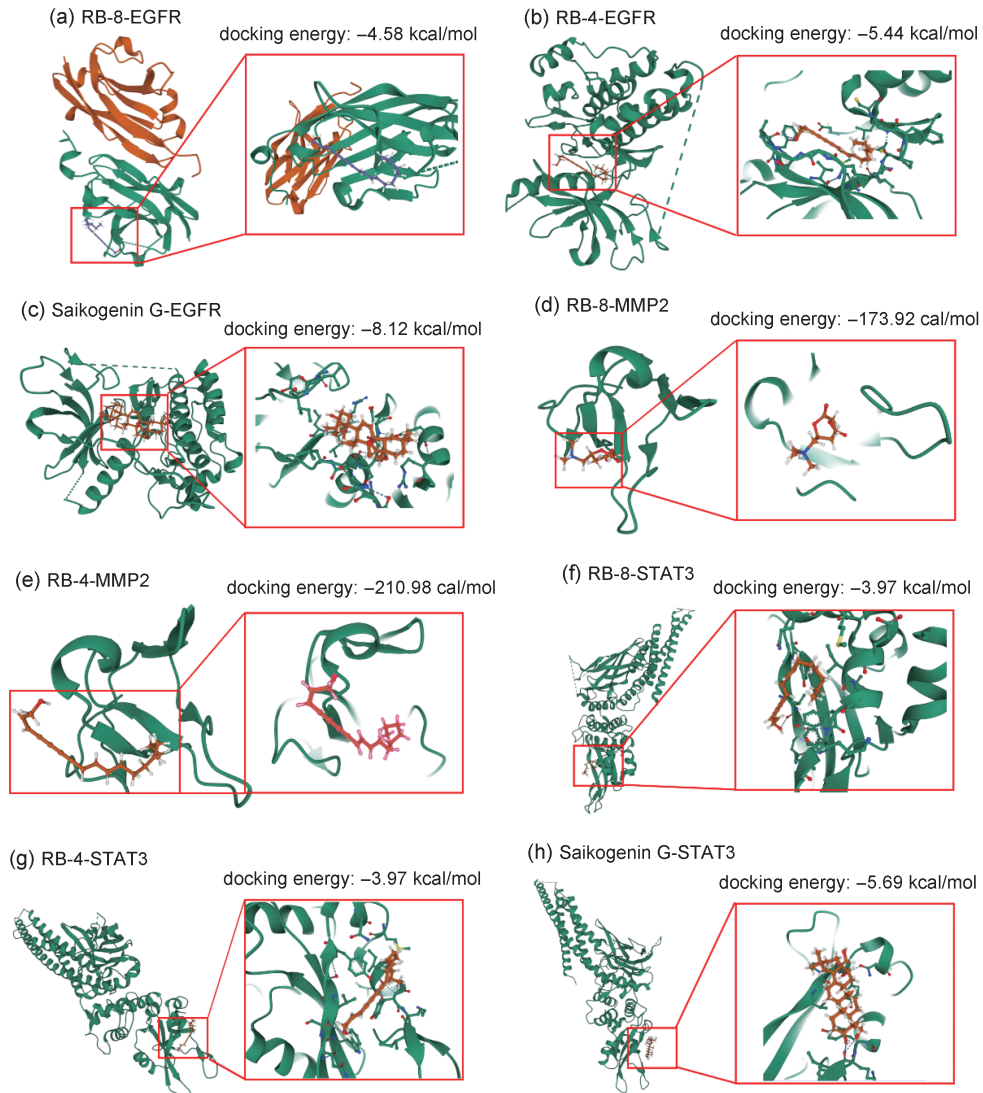


图7 柴胡低极性部位核心成分与靶点对接的二维模型及相互作用力

Fig. 7 2D model and the interaction forces of the core components and targets of the LBR

表2 柴胡低极性活性成分与靶点对接打分

Table 2 Dock scoring of the core components and targets of the LBR

No.	成分名	靶点名称	Total score
1	RB-4	EGFR	4
2	RB-8	EGFR	4
3	SaikogeninG	EGFR	5
4	RB-4	STAT3	4
5	RB-8	STAT3	4
6	SaikogeninG	STAT3	5
7	RB-4	MMP2	3
8	RB-8	MMP2	3
9	SaikogeninG	MMP2	—

关键成分,最终发现RB-8、RB-4和柴胡皂苷元G,这三个成分可能是柴胡低极性部位抗癌的最关键成分。然而,这些关键成分仅仅是预测的结果,后续的体内外药理学验证是非常必要的。

EGFR(表皮生长因子受体)是HER家族成员之一,其在许多恶性肿瘤如肝癌、肺癌和胃癌均有高表达^[23]。研究表明,EGFR可通过受体激活形成二聚体,使酪氨酸自磷酸化,进而激活细胞质部分的酪氨酸激酶。下游信号通路蛋白可以与EGFR上磷酸化的酪氨酸位点结合,引起细胞内不同的信号应答,从而导致一系列生物效应^[24]。下游信号通路主要包括JAK/STAT和RAS/RAF/MAPK等信号通路。大量研究结果显示STAT3在肿瘤中存在异常高表达,同时信号通路中STAT3的表达与肝癌的发生密切相关^[25]。既往研究表明,STAT1和STAT3在肝癌组织中的阳性表达率显著高于相应的癌旁组织,并且STAT3的高表达与HCC的分化程度和临床分期呈正相关^[26]。越来越多的证据表明,STAT3是JAK2/STAT3信号通路的关键调控基因^[27]。JAK2/STAT3信号通路的激活可以增加细胞中p-STAT3的蛋白含量,并影响肿瘤细胞的增殖和侵袭^[28]。此外,课题组前期研究发现柴胡低极性部位能作用于肝癌细胞周期G1期Npas2-CDC25A-CDK2-Cyclin E通路,与G2期CDC25B-CDK1-Cyclin B1通路。STAT3在细胞周期的调控中也扮演着重要的角色,STAT3可以通过调控细胞周期蛋白Cyclin E促进G1期向S期的过渡^[29]。STAT3可以通过直接结合到Cyclin B1

基因的启动子区域来促进Cyclin B1的转录。这种直接调控机制使得STAT3在细胞周期的G2/M期转变中发挥重要作用^[30]。因此,EGFR/AK2/STAT3信号通路在柴胡低极性部位调控细胞周期过程中发挥重要作用。我们的结果表明,柴胡低极性部位RB-8、RB-4和柴胡皂苷元G成分可以作用于EGFR/JAK2/STAT3,柴胡低极性部位治疗可能抑制EGFR的表达,从而阻断JAK2/STAT3通路发挥抗肝癌作用。

MMP是一类锌离子和钙离子依赖的蛋白酶家族,能够靶向并降解ECM中的多种蛋白。MMP是与肿瘤发生相关的最突出的蛋白酶家族,越来越多的研究报道了MMP家族与肝癌的关联^[31]。研究表明,MMP可以降解细胞外基质,加速肿瘤细胞进入血液或淋巴系统,从而促进肝癌细胞的侵袭和转移^[31]。MMP可以降解细胞外基质,加速肿瘤细胞进入血液或淋巴系统,从而促进肝癌细胞的侵袭和转移。课题组的前期研究表明,柴胡低极性部分可以降低MMP9的蛋白表达,降低肝癌细胞的迁移能力。此外,MMP在肿瘤微环境中调节细胞间的相互作用,影响肿瘤细胞的生长、存活和迁移。Juric等报道,MMP-9抑制剂可以增加CXCL10和其他T细胞相关刺激因子的表达,包括IL-12p70和IL18^[32]。此外,MMP在血管生成中起着重要作用。通过降解基质成分,MMP促进内皮细胞迁移和增殖,从而支持肿瘤的生长。某些MMP的表达水平与肿瘤的侵袭性和预后相关。例如,MMP-2和MMP-9在多种癌症中高表达,且与肿瘤的恶性程度和转移相关,被认为是肿瘤发生过程中潜在的生物标志物^[33]。我们的结果表明,柴胡低极性部位RB-8、RB-4成分可以作用于MMP靶点,柴胡低极性部位能抑制肝癌MMP表达,减缓肝癌的生长与转移。

综上所述,我们的研究为揭示柴胡低极性部位作为肝癌的有前途的治疗选择提供了科学基础。因此,网络药理学与Dijkstra传播模型解的整合揭示了柴胡低极性部位在肝癌中的多成分与多靶点药理机制。尽管我们使用分子对接分析来验证我们的结果,后续仍需要额外的体内和体外研究来验证当前发现的有效性。此

外,我们的研究有几个局限性。首先,需要额外的体内和体外研究来确认我们的发现。其次,需要一个更大的传统药物和靶基因数据库来提高网络药理学分析结果的准确性。第三,即使将网络药理学的结果与分子对接相结合,我们也无法完全理解柴胡低极性部位确切治疗机制。因此,多学科的整合对于了解柴胡低极性部位在肝癌中的作用机制是必要的。

肝癌是一种生长速度较快的致命疾病。面对疾病异质性、抗癌耐药性和缺乏治疗靶点,研究人员和临床医生需要更有效的治疗方案。本研究采用LCMS技术解析了柴胡低极性部位化学成分,并整合网络药理学与Dijkstra传播模型确定柴胡低极性部位抗肝癌的多成分与多靶点机制。进一步采用分子对接验证这些成分与靶点的相互作用。我们的结果表明RB-8、RB-4和柴胡皂苷元G可能是柴胡低极性部位的主要活性成分群,通过阻断EGFR的表达,抑制JAK2/STAT3通路以及抑制MMP表达,最终减缓肝癌的生长与转移。该研究为解释中医治疗肝癌的潜在机制提供了参考,为柴胡治疗肝癌临床用药及相关药物制剂开发提供科学依据。

参考文献:

- [1] CHEN J G, ZHU J, WANG G R, *et al.* Qidong: a Crucible for Studies on Liver Cancer Etiology and Prevention[J]. *Cancer Biol Med*, 2019, **16**(1): 24-37. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0394.
- [2] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM I, *et al.* Estimating the Global Cancer Incidence and Mortality in 2018: GLOBOCAN Sources and Methods[J]. *Int J Cancer*, 2019, **144**(8): 1941-1953. DOI:10.1002/ijc.31937.
- [3] CHAN L K, TSUI Y M, HO D W, *et al.* Cellular Heterogeneity and Plasticity in Liver Cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, **82**: 134-149. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.02.015.
- [4] SINGH A K, KUMAR R, PANDEY A K. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers[J]. *Curr Chem Genom Transl Med*, 2018, **12**: 9-26. DOI:10.2174/2213988501812010009.
- [5] SUI X B, XIE T. Combination of Chinese and Western Medicine to Prevent and Reverse Resistance of Cancer Cells to Anticancer Drugs[J]. *Chin J Integr Med*, 2020, **26**(4): 251-255. DOI:10.1007/s11655-019-3180-x.
- [6] WEI X J, WANG F, TAN P, *et al.* The Interactions between Traditional Chinese Medicine and Gut Microbiota in Cancers: Current Status and Future Perspectives[J]. *Pharmacol Res*, 2024, **203**: 107148. DOI: 10.1016/j.phrs.2024.107148.
- [7] 毛伟娇, 谢敏, 董夏, 等. 中医药治疗肝郁脾虚型肝癌的研究进展[J]. *中医药导报*, 2021, **27**(1): 131-133. DOI: 10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2021.01.031. MAO W J, XIE M, DONG X, *et al.* Research Progress of Chinese Medicine on Liver Cancer with Liver Depression and Spleen Deficiency Syndrome[J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, **27**(1): 131-133. DOI: 10.13862/j.cnki.cn43-1446/r.2021.01.031.
- [8] YOU M, FU J M, LV X Z, *et al.* Saikosaponin B2 Inhibits Tumor Angiogenesis in Liver Cancer via down-Regulation of VEGF/ERK/HIF-1 α Signaling[J]. *Oncol Rep*, 2023, **50**(1): 136. DOI:10.3892/or.2023.8573.
- [9] LEI C H, GAO Z H, LV X Z, *et al.* Saikosaponin-b2 Inhibits Primary Liver Cancer by Regulating the STK4/IRAK1/NF-KB Pathway[J]. *Biomedicines*, 2023, **11**(10): 2859. DOI:10.3390/biomedicines11102859.
- [10] LAN T, WANG W, ZENG X X, *et al.* Saikosaponin a Triggers Cell Ferroptosis in Hepatocellular Carcinoma by Inducing Endoplasmic Reticulum Stress-stimulated ATF3 Expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2023, **674**: 10-18. DOI:10.1016/j.bbrc.2023.06.086.
- [11] 王威宇, 陈一笑, 白帅东, 等. 柴胡不同极性部位对肝癌 SMMC-7721 细胞的影响及机制研究[J]. *中草药*, 2024, **55**(7): 2271-2282. WANG W Y, CHEN Y X, BAI S D, *et al.* Effect and Mechanism of Different Polarity Fractions of Bupleuri Radix on Hepatocellular Carcinoma SMMC-7721 Cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, **55**(7): 2271-2282.
- [12] WANG C, REN Q, CHEN X T, *et al.* System Pharmacology-based Strategy to Decode the Synergistic Mechanism of Zhi-Zhu Wan for Functional Dyspepsia [J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 841. DOI: 10.3389/fphar.2018.00841.
- [13] ZHENG J H, WU M, WANG H Y, *et al.* Network Pharmacology to Unveil the Biological Basis of Health-strengthening Herbal Medicine in Cancer Treatment[J]. *Cancers*, 2018, **10**(11): 461. DOI: 10.3390/cancers10110461.
- [14] ZHANG B, WANG X, LI Y, *et al.* Matrine Is Identified as a Novel Macropinocytosis Inducer by a Network Target Approach[J]. *Front Pharmacol*, 2018, **9**: 10. DOI: 10.3389/fphar.2018.00010.
- [15] GUO Y C, NIE Q, MACLEAN A L, *et al.* Multiscale Modeling of Inflammation-induced Tumorigenesis Re-

- veals Competing Oncogenic and Oncoprotective Roles for Inflammation[J]. *Cancer Res*, 2017, **77**(22): 6429–6441. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-17-1662.
- [16] GAO J, ZHANG K L, WANG Y, *et al.* A Machine Learning-driven Study Indicates Emodin Improves Cardiac Hypertrophy by Modulation of Mitochondrial SIRT3 Signaling[J]. *Pharmacol Res*, 2020, **155**: 104739. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104739.
- [17] WANG K X, CHEN Y P, LU A P, *et al.* A Metabolic Data-driven Systems Pharmacology Strategy for Decoding and Validating the Mechanism of Compound Kushen Injection Against HCC[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, **274**: 114043. DOI:10.1016/j.jep.2021.114043.
- [18] WANG K X, GAO Y, GONG W X, *et al.* A Novel Strategy for Decoding and Validating the Combination Principles of Huanglian Jiedu Decoction from Multi-scale Perspective[J]. *Front Pharmacol*, 2020, **11**: 567088. DOI:10.3389/fphar.2020.567088.
- [19] LIU J L, FANG Y, YANG L, *et al.* A Qualitative, and Quantitative Determination and Pharmacokinetic Study of Four Polyacetylenes from *Radix Bupleuri* by UPLC-PDA-MS[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2015, **111**: 257–265. DOI:10.1016/j.jpba.2015.04.002.
- [20] ZHANG Q L, WEN F F, SUN F, *et al.* Efficacy and Mechanism of Quercetin in the Treatment of Experimental Colitis Using Network Pharmacology Analysis [J]. *Molecules*, 2022, **28**(1): 146. DOI: 10.3390/molecules28010146.
- [21] SHOU X T, WANG Y M, ZHANG X S, *et al.* Network Pharmacology and Molecular Docking Analysis on Molecular Mechanism of Qingzi Zhitong Decoction in the Treatment of Ulcerative Colitis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 727608. DOI:10.3389/fphar.2022.727608.
- [22] YANG Y, YANG K, HAO T, *et al.* Prediction of Molecular Mechanisms for LianXia NingXin Formula: a Network Pharmacology Study[J]. *Front Physiol*, 2018, **9**: 489. DOI:10.3389/fphys.2018.00489.
- [23] LO H W, HSU S C, XIA W Y, *et al.* Epidermal Growth Factor Receptor Cooperates with Signal Transducer and Activator of Transcription 3 to Induce Epithelial-mesenchymal Transition in Cancer Cells via Up-regulation of TWIST Gene Expression[J]. *Cancer Res*, 2007, **67**(19): 9066–9076. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-0575.
- [24] UENO Y, SAKURAI H, TSUNODA S, *et al.* Heregulin-induced Activation of ErbB3 by EGFR Tyrosine Kinase Activity Promotes Tumor Growth and Metastasis in Melanoma Cells[J]. *Int J Cancer*, 2008, **123**(2): 340–347. DOI:10.1002/ijc.23465.
- [25] PEROUKIDES S, BRAVOU V, ALEXOPOULOS A, *et al.* Survivin Overexpression in HCC and Liver Cirrhosis Differentially Correlates with P-STAT3 and E-cadherin[J]. *Histol Histopathol*, 2010, **25**(3): 299–307. DOI:10.14670/HH-25.299.
- [26] CALVISI D F, LADU S, GORDEN A, *et al.* Ubiquitous Activation of Ras and Jak/Stat Pathways in Human HCC[J]. *Gastroenterology*, 2006, **130**(4): 1117–1128. DOI:10.1053/j.gastro.2006.01.006.
- [27] WENDT M K, BALANIS N, CARLIN C R, *et al.* STAT3 and Epithelial-mesenchymal Transitions in Carcinomas[J]. *JAKSTAT*, 2014, **3**(1): e28975. DOI: 10.4161/jkst.28975.
- [28] LIU J F, DENG W W, CHEN L, *et al.* Inhibition of JAK2/STAT3 Reduces Tumor-induced Angiogenesis and Myeloid-derived Suppressor Cells in Head and Neck Cancer[J]. *Mol Carcinog*, 2018, **57**(3): 429–439. DOI:10.1002/mc.22767.
- [29] BHARADWAJ U, LI M, CHEN C Y, *et al.* Mesothelin-induced Pancreatic Cancer Cell Proliferation Involves Alteration of Cyclin E via Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription Protein 3[J]. *Mol Cancer Res*, 2008, **6**(11): 1755–1765. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0095.
- [30] SUN J J, DU Y P, SONG Q L, *et al.* E2F Is Required for STAT3-mediated Upregulation of Cyclin B1 and Cdc2 Expressions and Contributes to G2-M Phase Transition[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2019, **51**(3): 313–322. DOI:10.1093/abbs/gmy174.
- [31] KIVISAARI A K, KALLAJOKI M, MIRTTI T, *et al.* Transformation-specific Matrix Metalloproteinases (MMP)-7 and MMP-13 Are Expressed by Tumour Cells in Epidermolysis Bullosa-associated Squamous Cell Carcinomas[J]. *Br J Dermatol*, 2008, **158**(4): 778–785. DOI:10.1111/j.1365-2133.2008.08466.x.
- [32] JURIC V, O'SULLIVAN C, STEFANUTTI E, *et al.* MMP-9 Inhibition Promotes Anti-tumor Immunity through Disruption of Biochemical and Physical Barriers to T-cell Trafficking to Tumors[J]. *PLoS One*, 2018, **13**(11): e0207255. DOI:10.1371/journal.pone.0207255.
- [33] LU L L, ZHANG Q, WU K L, *et al.* Hepatitis C Virus NS3 Protein Enhances Cancer Cell Invasion by Activating Matrix Metalloproteinase-9 and Cyclooxygenase-2 through ERK/P38/NF- κ B Signal Cascade[J]. *Cancer Lett*, 2015, **356**(2 Pt B): 470–478. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.09.027.