

· 胆道疾病 ·

DOI: 10.12449/JCH251221

基于网络药理学探讨柴胡皂苷e联合吉非替尼治疗胆管癌的作用机制

李 珊^a, 赵方言^b, 程新月^c, 刘湘花^a, 杨 艺^a, 闵远骞^c, 李天星^a, 禄保平^d

河南中医药大学 a. 医学院, b. 第三临床医学院, c. 第二临床医学院, d. 肝病研究所, 郑州 460046

通信作者: 禄保平, lbpteam@163.com (ORCID: 0000-0002-3707-2185)

摘要: **目的** 通过网络药理学和细胞实验探讨柴胡皂苷e联合吉非替尼抗胆管癌的药理作用和分子机制。**方法** 通过SwissTargetPrediction数据库获得柴胡皂苷a、b1、c、d、e、f、g、h的药物作用靶点;通过GeneCards数据库获得胆管癌的靶点;取交集靶点导入STRING数据库构建蛋白质-蛋白质互作网络;利用WEB-based GENE SET ANALYSIS TOOLKIT数据库进行GO和KEGG通路富集分析并构建靶点-通路网络,利用Pathview R包标注关键通路涵盖的靶点;利用Cytoscape 3.7.2构建药物-疾病-靶点网络并筛选药效较强的化合物与关键靶点分子对接;人胆管癌RBE细胞随机分为对照组、柴胡皂苷e组、吉非替尼组、柴胡皂苷e和吉非替尼联用组,MTT、EdU、划痕实验、荧光探针法及微量法检测细胞增殖、迁移及活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)生成;Western Blotting检测PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT蛋白表达。半数抑制浓度(IC₅₀)采用Logistic回归计算,计量资料多组间比较采用单因素方差分析和重复测量资料方差分析,进一步两两比较采用Tukey检验,单独效应比较采用LSD-t检验。**结果** 获得柴胡皂苷靶点34个,胆管癌靶点1815个,交集靶点12个,拓扑分析后显示,柴胡皂苷e和c抗胆管癌作用较强,STAT3、IL-2和PPP2CA为关键靶点,柴胡皂苷e、c分别与STAT3、IL-2、PPP2CA相应氨基酸位点形成氢键对接。GO富集分析得到生物过程条目13个,细胞组条目16个,分子功能条目13个;KEGG通路分析得到9条通路,PI3K-AKT和耐EGFR酪氨酸激酶抑制剂为关键信号通路,涵盖了STAT3、IL-2和PPP2CA等多个靶点;柴胡皂苷e和吉非替尼作用于人胆管癌RBE细胞24h的IC₅₀分别为16.89 μmol/L和27.49 μmol/L;与对照组相比,柴胡皂苷e作用24h可显著降低人胆管癌RBE细胞的增殖率(53.46% ± 6.42% vs 100.00% ± 6.00%, $P < 0.0001$)和迁移率(12.06% ± 1.76% vs 16.01% ± 1.89%, $P < 0.05$),诱导ROS和MDA产生增多(P 值均 < 0.05),下调p-AKT蛋白表达($P < 0.05$),且与吉非替尼联用效果更显著(P 值均 < 0.05)。**结论** 本研究显示柴胡皂苷e和吉非替尼通过抑制PI3K-AKT信号通路发挥抗胆管癌作用,为柴胡皂苷类药物的深入研究和临床应用提供一定的理论支持和科学依据。

关键词: 柴胡皂苷; 吉非替尼; 胆管肿瘤; 药理学**基金项目:** 河南省高等学校青年骨干教师培养计划(2021GGJS084); 河南省高等学校重点科研项目(21B310003); 河南省中医药科学研究专项课题(2023ZY2110)

Mechanism of action of saikosaponin e combined with gefitinib in treatment of cholangiocarcinoma: A study based on network pharmacology

LI Shan^a, ZHAO Fangyan^b, CHENG Xinyue^c, LIU Xianghua^a, YANG Yi^a, MIN Yuanqian^c, LI Tianxing^a, LU Baoping^d

a. School of Medicine, b. The Third Clinical Medical College, c. The Second Clinical Medical College, d. Institute of Hepatology, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 460046, China

Corresponding author: LU Baoping, lbpteam@163.com (ORCID: 0000-0002-3707-2185)

Abstract: Objective To investigate the pharmacological effect and molecular mechanism of saikosaponin e combined with gefitinib in the treatment of cholangiocarcinoma based on network pharmacology and cell experiment. **Methods** SwissTargetPrediction was used to obtain the drug action targets of saikosaponin a, b1, c, d, e, f, g, and h, and GeneCards was used to obtain the

targets of cholangiocarcinoma. The intersecting targets of these two groups of targets were imported into STRING to construct a protein-protein interaction network. WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit was used to perform gene ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis and construct a target-pathway network, and Pathview R package was used to label the targets covered by the key pathways. Cytoscape 3.7.2 was used to construct a drug-disease-target network, and molecular docking was performed between effective compounds and key targets. Human cholangiocarcinoma RBE cells were randomly divided into control group, saikosaponin e group, gefitinib group, and saikosaponin e+gefitinib group. MTT assay, EdU, scratch assay, and the fluorescence probe method were used to measure the proliferation and migration of RBE cells and the production of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA), and Western blotting was used to measure the protein expression levels of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), phosphorylated PI3K (p-PI3K), protein kinase B (AKT), and phosphorylated AKT (p-AKT). Logistic regression was used to calculate half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}); A one-way analysis of variance and repeated measures analysis of variance were used for comparison of continuous data between multiple groups, and the Tukey test was used for further comparison between two groups; the least significant difference *t*-test was used for comparison of simple effect. **Results** A total of 34 saikosaponin targets and 1 815 cholangiocarcinoma targets were obtained, resulting in 12 intersecting targets. The topological analysis showed that saikosaponins e and c had a stronger efficacy against cholangiocarcinoma, with the key targets of STAT3, IL-2, and PPP2CA, and saikosaponin e and c could respectively dock with the corresponding amino acid sites of STAT3, IL-2, and PPP2CA by forming hydrogen bonds. The GO functional enrichment analysis obtained 13 biological processes, 16 cellular components, and 13 molecular functions, and the KEGG pathway enrichment analysis obtained 9 pathways, among which PI3K-AKT and EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance were the key signaling pathways, covering multiple targets including STAT3, IL-2, and PPP2CA. Saikosaponin e and gefitinib had an IC_{50} of 16.89 $\mu\text{mol/L}$ and 27.49 $\mu\text{mol/L}$, respectively, on human cholangiocarcinoma RBE cells at 24 hours of treatment, and compared with the control group, saikosaponin e treatment for 24 hours significantly reduced the proliferation rate ($53.46\% \pm 6.42\%$ vs $100.00\% \pm 6.00\%$, $P < 0.000 1$) and migration rate ($12.06\% \pm 1.76\%$ vs $16.01\% \pm 1.89\%$, $P < 0.05$) of human cholangiocarcinoma RBE cells, increased the production of ROS and MDA (both $P < 0.05$), and downregulated the protein expression of p-AKT ($P < 0.05$), while its combination with gefitinib had a significantly greater effect (all $P < 0.05$). **Conclusion** This study shows that saikosaponin e and gefitinib exert a therapeutic effect on cholangiocarcinoma by inhibiting the PI3K-AKT signaling pathway, which provides theoretical support and a scientific basis for further research and clinical application of saikosaponins.

Key words: Saikosaponins; Gefitinib; Bile Duct Neoplasms; Pharmacology

Research funding: Training Program for Young Scholars in Universities of Henan Province (2021GGJS084); Important Scientific Research Project of Universities in Henan Province (21B310003); Special Scientific Research Project of Chinese Medicine in Henan Province (2023ZY2110)

胆管癌是一种起源于胆管上皮细胞的恶性肿瘤,约占消化道恶性肿瘤的3%^[1]。近年来,其发病率在全球逐年升高,特别是亚洲国家^[2]。胆管癌起病隐匿、进展迅速、预后极差,对人类健康构成严重威胁^[3]。虽然手术切除是治疗该病的主要方法,但超过80%的患者发现时已是中晚期,失去手术机会^[4-5]。仅15%的患者存在手术机会,但术后极易复发,5年生存率只有20%~30%^[6]。晚期胆管癌患者以内科治疗为主,但癌组织对放化疗均不敏感,给患者造成沉重的心理和经济负担^[7-8]。因此,积极寻找抗胆管癌的有效药物和治疗方法对于提高患者生存率、改善预后具有重要的意义。

中药源自天然药材,毒副作用较小,在提高机体免

疫功能、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤侵袭转移、逆转肿瘤多药耐药等方面彰显独特的优势。中药柴胡具有解表退热、疏肝解郁、升举阳气的功效,治疗慢性肝胆疾病已有数千年的应用^[9]。柴胡的主要药效成分为柴胡皂苷,具有抗炎、保肝、抗病毒、抗肿瘤等作用^[10]。研究发现,柴胡皂苷在防治原发性肝癌方面疗效显著^[11],但在防治胆管癌方面研究甚少,药理作用和分子机制有待探索。网络药理学的兴起为针对疾病相关的分子网络寻找药物靶标指明了方向,是中药研发的主要预测手段^[12]。本研究即应用网络药理学预测8种柴胡皂苷治疗胆管癌的潜在靶点及作用机制,鉴于表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)与胆管癌的化

疗敏感性密切相关,吉非替尼是第一代选择性EGFR酪氨酸激酶抑制剂,通过阻断EGFR表达发挥抗癌效应,本研究进一步利用细胞模型验证柴胡皂苷联合吉非替尼治疗胆管癌的作用,为寻找胆管癌的有效防治策略奠定基础。

1 材料与方法

1.1 柴胡皂苷和胆管癌的靶点收集 在PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)输入“Saikosaponin”检索,选择“COMPOUND BEST MATCH”推荐的柴胡皂苷a、b1、c、d、e、f、g、h的2D结构“sdf”格式文件下载保存。在SwissTargetPrediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)依次上传“sdf”格式文件,物种选择“Homo species”,检索相关的基因靶点,汇总并删除重复后得到柴胡皂苷的药物靶点。在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)以“Cholangiocarcinoma”为关键词检索胆管癌相关的疾病靶点,并利用Venny 2.1在线工具(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)获得柴胡皂苷靶点与胆管癌靶点的交集,构建潜在靶点韦恩图。

1.2 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将获得的交集靶点提交至STRING数据库(<https://string-db.org/>),物种选择“Homo species”,最小互相作用阈值设定为“Medium confidence (>0.400)”,得到PPI网络后导入Cytoscape 3.7.2软件,利用MCODE插件绘制优化PPI网络图,并进行网络拓扑学分析。

1.3 GO和KEGG通路富集分析 将交集靶点输入WEB-based GENE SeT AnaLysis Toolkit数据库(<http://webgestalt.org/>)进行GO和KEGG通路富集分析,物种选择“Homo species”,设置筛选条件为“FDR (false discovery rate)≤0.05”,GO富集包括对生物过程、细胞组分、分子功能的分析;KEGG通路富集则分析可能涉及的信号通路并导入Cytoscape 3.7.2软件形成靶点-通路网络图,通过网络拓扑学筛选关键信号通路,使用Pathview R包重新渲染、整合富集的信息,并将信号通路中的靶点标注颜色。

1.4 药物-疾病-靶点网络构建 将柴胡皂苷a、b1、c、d、e、f、g、h治疗胆管癌的潜在靶点及上述获得的交集靶点导入Cytoscape 3.7.2软件,构建药物-疾病-靶点网络图,通过Cytoscape 3.7.2软件中内置的NetworkAnalyzer进行网络拓扑学分析,根据节点度值(degree)和介数中心性

(betweenness centrality)数值筛选8种柴胡皂苷中药效较强化合物及关键靶点。

1.5 分子对接模型构建 根据药物-疾病-靶点网络图,选取柴胡皂苷a、b1、c、d、e、f、g、h中节点度值及介数中心性最高的化合物与节点度值及介数中心性最高的靶蛋白进行分子对接,等级越高说明其在网络拓扑关系中的作用越重要。从PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载化合物的2D结构保存;从UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)获得靶蛋白的“PDB Entry”后,进入RCSB PDB PRO数据库(<https://www.rcsb.org/>)下载晶体结构保存,通过Pymol软件去除溶剂分子与配体后,使用Autodock Vina 1.1.2进行化合物与靶蛋白的分子对接,取打分最高的结果导入Pymol软件分析作图。

1.6 实验材料 人胆管癌RBE细胞株由中山大学病原生物学教研室馈赠,柴胡皂苷e购自上海麦克林生化科技股份有限公司(批号:C14911966),吉非替尼购自上海源叶生物科技有限公司(批号:S02HS193575),胎牛血清(FBS)购自上海达特希尔生物科技有限公司(批号:2408213),1640培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司(批号:WH1024Z082),二甲基亚砜(DMSO)和四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北京索莱宝科技有限公司(批号:8140035和1107S057),5-乙炔基-2-脱氧尿苷(EdU)细胞增殖检测试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司(批号:MA0424-Mar-23H),活性氧(ROS)检测试剂盒和BCA蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司(批号:112420201215和090419191224),丙二醛(MDA)检测试剂盒购自武汉亚科因生物技术有限公司(批号:ATYE19021),磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(AKT)和磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(批号:00123653、00127621和10017731);p-PI3K和p-AKT抗体购自美国Cell Signaling Technology公司(批号:2和27);HRP-IgG(H+L)抗体购自成都正能生物技术有限公司(批号:LL0310)。

1.7 柴胡皂苷e和吉非替尼的配制 取5 mg柴胡皂苷e粉末溶于21.787 mL 1640培养基中,用超声配合加速溶解,制成终浓度为300 μmol/L的母液。取178.76 mg吉非替尼粉末溶于2 mL DMSO中,用超声配合加速溶解,制成终浓度为200 mmol/L的母液。将两种药物的母液过滤、分装,置于-20℃冰箱中保存备用,使用时用1640培养基稀释成不同的目标浓度。

1.8 MTT检测细胞增殖 人胆管癌RBE细胞按照 6×10^3 /孔的密度接种到96孔板中,用含10% FBS的1640培养基培养至细胞贴壁,采用Excel随机数生成工具进行随机分组,分为对照组、柴胡皂苷e组、吉非替尼组、柴胡皂苷e和吉非替尼联用组,每组设3个复孔,采用3次独立性实验进行重复,药物作用12 h、24 h、48 h,每孔添加20 μ L 5 mg/mL的MTT再培养4 h,弃上清液后加入200 μ L DMSO,水平摇动器上充分震荡10 min使晶体完全溶解,置于酶标仪上检测光密度(optical density, OD)490 nm值,按照细胞活力(%)=(OD490 nm实验-OD490 nm空白)/(OD490 nm对照-OD490 nm空白) \times 100%,分析各组细胞的增殖能力。

1.9 EdU检测细胞增殖 人胆管癌RBE细胞接种于12孔板培养至贴壁,除对照组外,其余3组吉非替尼或/和柴胡皂苷e作用24 h后,加入含EdU的1640完全培养基1 mL/孔,使EdU终浓度为10 μ mol/L,37 $^{\circ}$ C孵育2 h,弃培养基并加入固定液1 mL/孔,室温孵育20 min,洗涤细胞后加入通透液1 mL/孔,室温孵育12 min,再次洗涤细胞并加入Click反应液500 μ L/孔,室温避光孵育30 min并洗涤细胞,荧光显微镜下观察增殖细胞的绿色荧光并拍照。每孔再加入1 mL $1 \times$ Hoechst 33342染核,室温避光反应10 min并洗涤细胞,荧光显微镜下观察细胞核的蓝色荧光并拍照。采用Photoshop软件对同视野下的细胞染色与核染色图片叠合处理,采用Image J软件分析细胞增殖状况。

1.10 划痕实验检测细胞迁移 人胆管癌RBE细胞接种于12孔板培养至贴壁,用移液管尖端手工刮拭细胞单层,形成一个创口,PBS洗涤3次后,对照组采用无血清培养基培养,其余3组采用含吉非替尼或/和柴胡皂苷e的无血清培养基培养。分别于划痕0 h、24 h、48 h对划痕区拍照。采用Photoshop软件测量划痕宽度,按照迁移率(%)=(原划痕宽度-现划痕宽度)/原划痕宽度 \times 100%,分析各组细胞的迁移能力。

1.11 检测细胞ROS和MDA含量 根据ROS检测试剂盒说明书,细胞接种于24孔板,按照预先分组加入吉非替尼或/和柴胡皂苷e作用24 h,以不加药物的细胞为阴性对照,以加入ROS诱导剂刺激30 min的细胞为阳性对照,各组细胞弃培养基后,加入50 μ L、10 μ mol/L的DCFH-DA探针孵育20 min,弃上清并清洗3次后,采用荧光显微镜拍摄各组细胞的荧光,利用Image J软件进行荧光分析。依照MDA检测试剂盒说明书,分别将4组细胞收集并加入0.5 mL细胞裂解液冰浴裂解10 min,于

4 $^{\circ}$ C、13 000 $\times g$ 离心10 min后,取上清100 μ L与300 μ L Reaction Mix混匀后即测定管,100 μ L去离子水与300 μ L Reaction Mix混匀为空白管,测定管和空白管于95 $^{\circ}$ C水浴30 min,置冰浴中冷却后,于25 $^{\circ}$ C、10 000 $\times g$ 离心10 min,吸取200 μ L上清至96孔板测定OD532 nm和OD600 nm值,按照MDA (nmol/ 10^4) = 0.025 8 \times (OD532 nm测定-OD600 nm测定) - 0.025 8 \times (OD532 nm空白-OD600 nm空白),计算各组细胞的MDA含量。

1.12 Western Blotting分析 提取4组细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度后,与loading buffer混合煮沸变性,变性蛋白行10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,蛋白转于PVDF膜上,采用5%脱脂奶粉封闭2 h,漂洗5次后,于4 $^{\circ}$ C分别孵育p-PI3K(1:1 000)、p-AKT(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、AKT(1:1 000)、GAPDH(1:20 000)一抗过夜,漂洗5次后,再室温孵育HRP-IgG H+L二抗(1:5 000)1 h,漂洗5次后,采用ECL化学发光法曝光成像,Image J软件进行灰度分析。

1.13 统计学方法 采用SPSS 22.0对数据进行分析,应用GraphPad Prism 10.1.2对结果进行作图。正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,半数抑制浓度(IC₅₀)采用Logistic回归计算,多组间比较采用单因素方差分析和重复测量资料方差分析,进一步两两比较采用Tukey检验,单独效应比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPI网络图 获得34个柴胡皂苷的潜在靶点和1 815个胆管癌的潜在靶点,得到两者的交集靶点12个(附录1和2a)。将12个交集靶点导入STRING数据库后生成“string_interactions.tsv”文件,将文件导入Cytoscape 3.7.2软件,除去3个无关联靶点后生成PPI网络图。图中共有9个节点、21条边,节点中信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)度值最高,说明其在网络拓扑中的生物功能最重要,STAT3与其余靶点形成边相连,其与B细胞淋巴瘤2样蛋白1(B cell lymphoma 2 like 1, BCL2L1)、IL-2、RAR相关孤儿受体C(RAR-related orphan receptor C, RORC)、间质上皮细胞转化因子(mesenchymal to epithelial transition factor, MET)之间的边较粗,说明相互联系较密切(附录2b和2c)。

2.2 GO富集分析 获得499个条目,校正 $P < 0.05$ 后筛选出42个条目,包括生物过程13个,主要涉及刺激反应、生物调节、细胞通讯、新陈代谢过程等(图1a),尤其是对

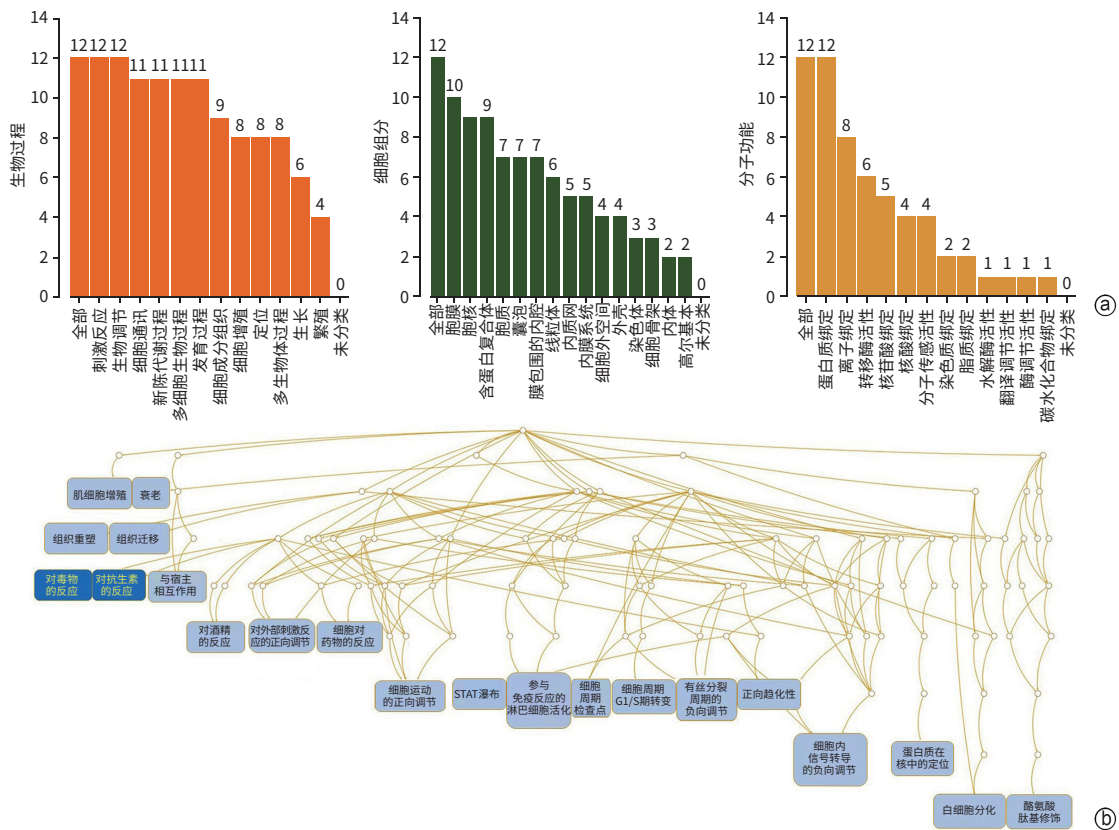
毒物的反应和对抗生素的反应(图1b);细胞组分16个,主要涉及胞膜、胞核、含蛋白复合体、胞质等(图1a);分子功能13个,主要涉及蛋白质绑定、离子绑定、转移酶活性和核苷酸绑定等(图1a)。

2.3 KEGG通路富集分析 获得79条通路,校正 $P < 0.05$ 后筛选出9条通路,主要涉及PI3K-AKT信号通路、耐EGFR酪氨酸激酶抑制剂、癌症蛋白多糖、癌症信号通路等(图2a)。结合靶点-通路网络分析可知PI3K-AKT和耐EGFR酪氨酸激酶抑制剂是柴胡皂苷治疗胆管癌所涉及的关键信号通路(图2b)。PI3K-AKT信号通路涵盖了7个靶点,分别是IL-2、激酶插入域受体(kinase insert domain receptor, KDR)、MET、蛋白磷酸酶2催化亚基 α (protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha, PPP2CA)、蛋白激酶C α (protein kinase C alpha, PRKCA)、BCL2L1和鼠双微体2(murine double minute 2, MDM2)(附录3a);耐EGFR酪氨酸激酶抑制剂涵盖了5个靶点,分别是MET、KDR、STAT3、PRKCA和BCL2L1(附录3b)。

2.4 药物-疾病-靶点网络图 对药物-疾病-靶点网络拓扑学分析可知,图中共有21个节点,包括疾病1个,化合

物8个,靶点12个;共有40条边(图3a)。在8个柴胡皂苷中,e的度值和介数中心性最高,能与6个靶点相连,其次是c,能与4个靶点相连,说明柴胡皂苷e和c可能具有较强的抗胆管癌作用(图3c和3d)。在12个靶点中,STAT3和IL-2度值最高,其次是PPP2CA,说明这3个靶点在网络拓扑中介导的生物功能最重要,可能是柴胡皂苷治疗胆管癌的关键靶点(图3b)。

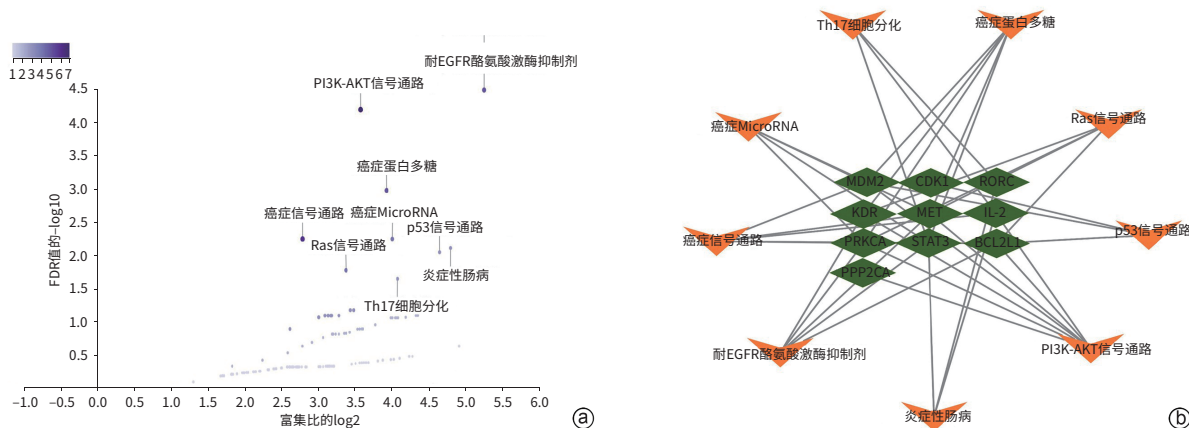
2.5 分子对接模型 依据药物-疾病-靶点网络拓扑学分析,选取柴胡皂苷e、c与STAT3、IL-2、PPP2CA分子对接,并分析氢键形成和对接的结合能。通常认为多个氢键之间协同作用能增加配体和分子之间结合的稳定性,一般结合能 < 0 kJ/mol,配体与分子可自行结合,结合能 < -29.29 kJ/mol,配体和分子之间亲和力较高,有较好的结合作用。柴胡皂苷e、c与STAT3、IL-2、PPP2CA对接结果如下:柴胡皂苷e与STAT3的Leu66、Leu67、Ile77、Arg343形成4个氢键,长度分别为2.5Å、2.6Å、2.9Å、2.5Å,与Arg70形成2个氢键,长度分别为2.1Å、2.5Å,与His71形成2个氢键,长度分别为2.4Å、2.5Å,结合能为-34.32 kJ/mol(图4a和4g);与IL-2的Asn26形成2个氢键,长度分别为



注:a,GO富集分析;b,生物过程的有向无环图,蓝色越深代表生物过程越重要。

图1 GO富集分析

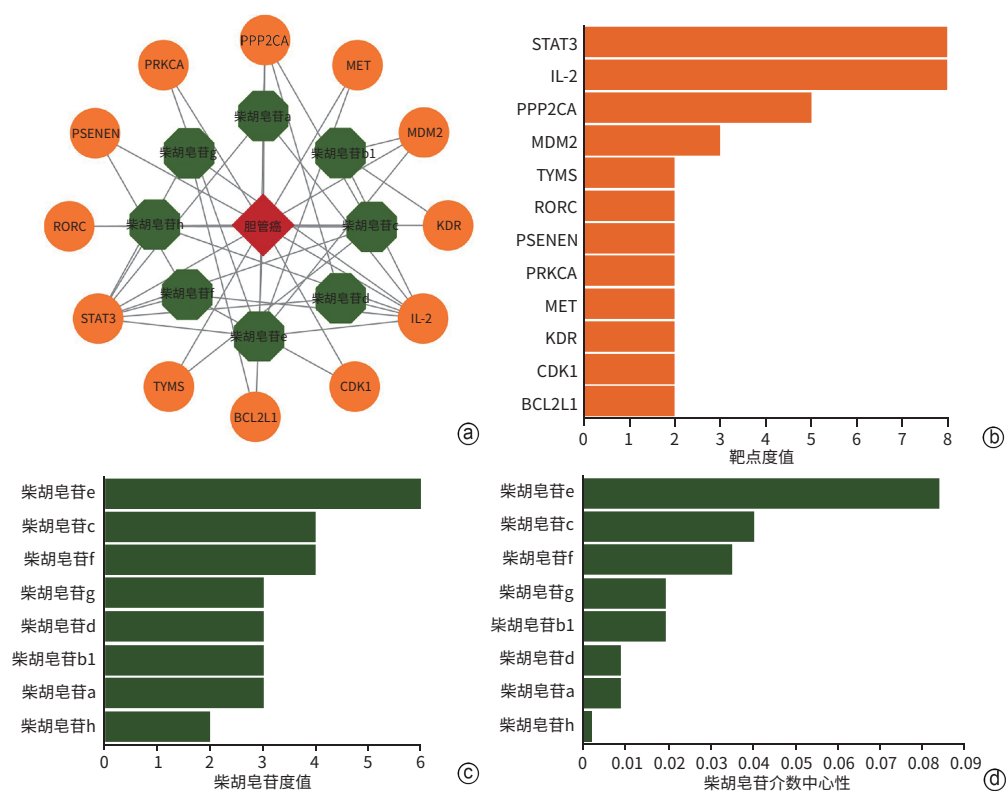
Figure 1 Analysis of GO enrichment



注:a,KEGG 富集通路火山图;b,靶点-通路网络图。

图2 KEGG通路富集分析

Figure 2 Analysis of KEGG pathway enrichment



注:a,药物-疾病-靶点网络图;b,靶点度值,度值越高说明靶点介导的生物功能越重要;c,柴胡皂苷度值,度值越高说明化合物介导的药效作用越重要;d,柴胡皂苷介数中心性,其值越大说明节点治疗该疾病的核心度越高,在网络拓扑中的药效作用越强。

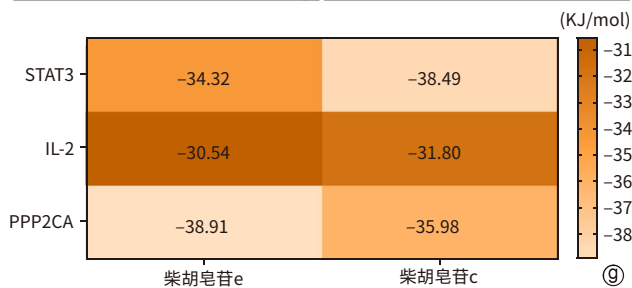
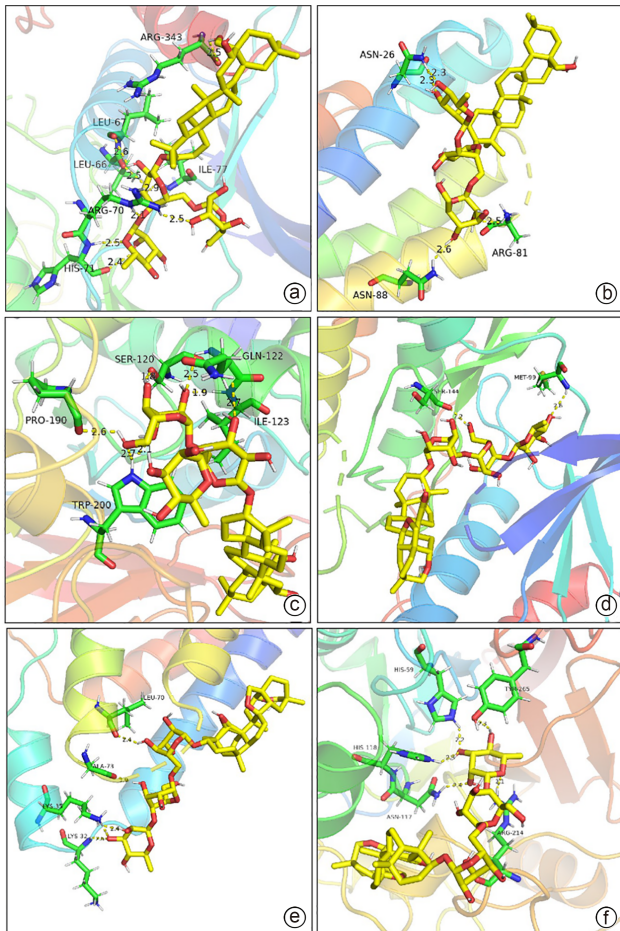
图3 药物-疾病-靶点网络图

Figure 3 Network diagram of drug-ingredient-target

2.3Å、2.3Å,与 Arg81、Asn88 形成 2 个氢键,长度分别为 2.5Å、2.6Å,结合能为 -30.54 kJ/mol(图 4b 和 4g);与 PPP2CA 的 Ser120、Ile123、Pro190 形成 3 个氢键,长度分别为 1.8Å、2.7Å、2.6Å,与 Gln122 形成 2 个氢键,长度分别为 2.5Å、1.9Å,与 Trp200 形成 2 个氢键,长度分别为 2.7Å、2.1Å,结合能为 -38.91 kJ/mol(图 4c 和 4g);以上说明柴胡

皂苷 e 与 STAT3、IL-2、PPP2CA 均能较好的结合。柴胡皂苷 c 与 STAT3 的 Met99、Ser144 形成 2 个氢键,长度分别为 2.6Å、2.2Å,结合能为 -38.49 kJ/mol(图 4d 和 4g);与 IL-2 的 Lys32、Lys35、Leu70、Ala73 形成 4 个氢键,长度分别为 2.5Å、2.4Å、2.4Å、1.9Å,结合能为 -31.80 kJ/mol(图 4e 和 4g);与 PPP2CA 的 His59、Asn117、His118、Arg214、

Tyr265形成5个氢键,长度分别为2.2Å、2.4Å、2.3Å、2.1Å、2.3Å,结合能为-35.98 kJ/mol(图4f和4g);以上说明柴胡皂苷c与STAT3、IL-2、PPP2CA均能较好的结合。



注:a、b和c,柴胡皂苷e与STAT3、IL-2和PPP2CA分子对接;d、e和f,柴胡皂苷c与STAT3、IL-2和PPP2CA分子对接;g,结合能评分图。

图4 分子对接模型

Figure 4 Molecular docking model

2.6 柴胡皂苷e和吉非替尼对胆管癌RBE细胞增殖迁移的影响 MTT结果显示,尽管柴胡皂苷e或吉非替尼作用时间、浓度分别对人胆管癌RBE细胞增殖率有影响(P 值均 <0.0001),但时间和浓度间有交互效应($P < 0.0001$),即不能保证每个时间点的不同浓度之间细胞增殖率均有差异。继而做了单独效应比较,在12 h、24 h

和48 h这些时间点,不同浓度的柴胡皂苷e或吉非替尼作用后细胞增殖率均减少(P 值均 <0.0001 ,表1、2),作用24 h的 IC_{50} 分别为16.89 $\mu\text{mol/L}$ 和27.49 $\mu\text{mol/L}$ (图5a和5b)。因此,后续实验中柴胡皂苷e和吉非替尼联合用药的浓度分别选取接近 IC_{50} 的16 $\mu\text{mol/L}$ 和25 $\mu\text{mol/L}$ 。联合用药结果显示,吉非替尼和柴胡皂苷e均能抑制细胞生长,减少细胞增殖,且两者联合作用最明显(两者联用分别与柴胡皂苷e和吉非替尼比较, P 值分别为0.0101、0.0328)(图5c和5d)。划痕实验结果显示,尽管不同时间和不同组别分别影响人胆管癌RBE细胞的迁移(P 值均 <0.0001),但时间和组别间有交互效应($P < 0.0001$),因此做了单独效应比较,结果显示吉非替尼或柴胡皂苷e,或两者联用,作用24 h和48 h,均能减少细胞迁移(图5e)。

表1 柴胡皂苷e对胆管癌RBE细胞增殖率的影响

Table 1 Effect of saikosaponin e on the proliferation rate of RBE cells

浓度	12 h细胞增殖率(%)	24 h细胞增殖率(%)	48 h细胞增殖率(%)
0 $\mu\text{mol/L}$	100.00 \pm 2.71	100.00 \pm 1.74	100.00 \pm 2.30
2 $\mu\text{mol/L}$	93.21 \pm 1.41 ¹⁾	84.19 \pm 4.69 ¹⁾	77.78 \pm 2.57 ¹⁾
4 $\mu\text{mol/L}$	81.70 \pm 1.32 ¹⁾	74.70 \pm 4.37 ¹⁾	68.81 \pm 2.42 ¹⁾
8 $\mu\text{mol/L}$	76.51 \pm 2.07 ¹⁾	67.30 \pm 3.92 ¹⁾	61.26 \pm 2.68 ¹⁾
16 $\mu\text{mol/L}$	73.69 \pm 4.14 ¹⁾	52.96 \pm 4.11 ¹⁾	43.39 \pm 2.16 ¹⁾
32 $\mu\text{mol/L}$	65.00 \pm 1.17 ¹⁾	35.29 \pm 3.32 ¹⁾	13.44 \pm 1.78 ¹⁾

注:时间&浓度: $F=98.50$, $P < 0.0001$;时间: $F=807.33$, $P < 0.0001$;浓度: $F=1176.30$, $P < 0.0001$ 。与同一时间的0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,1) $P < 0.0001$ 。

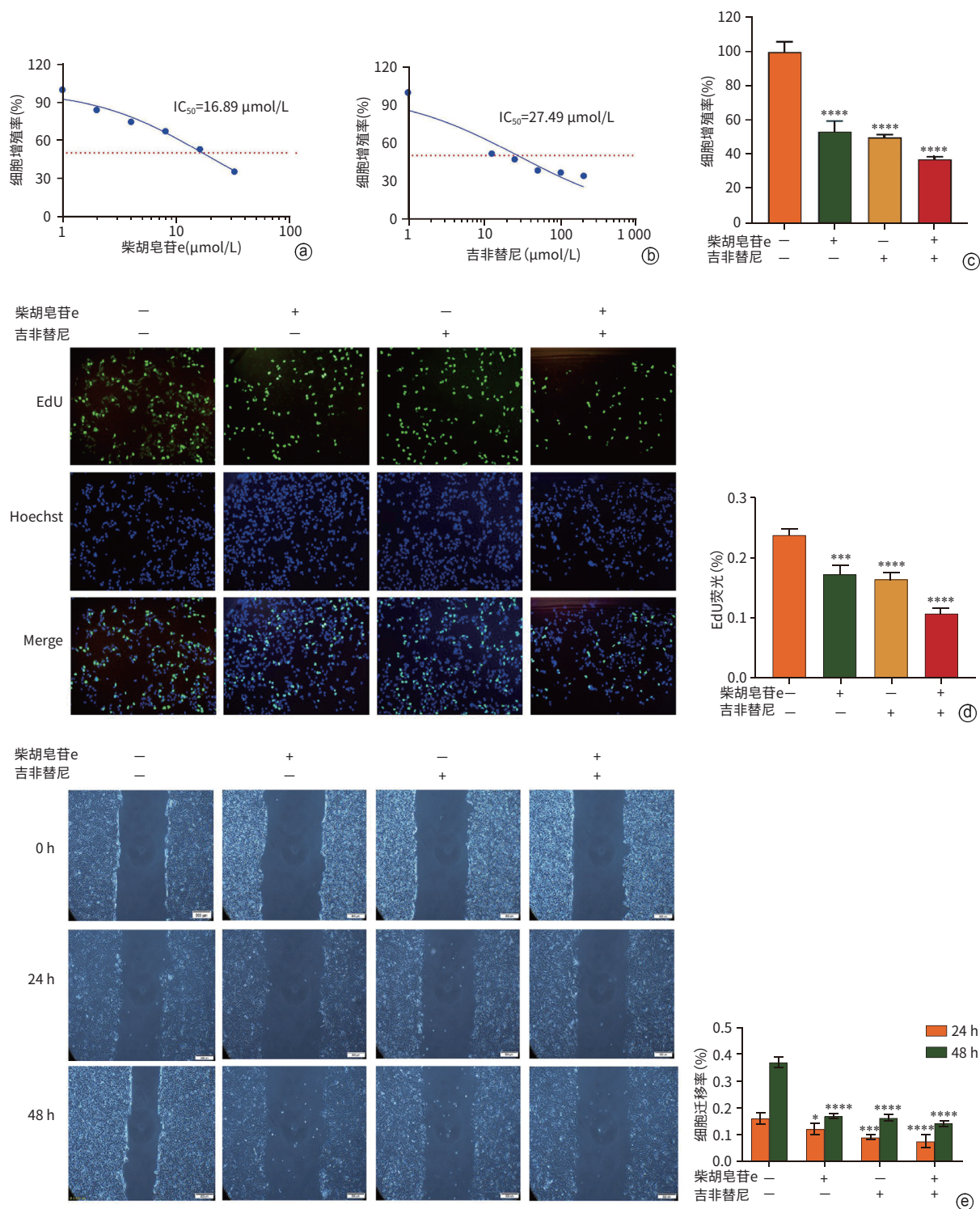
表2 吉非替尼对胆管癌RBE细胞增殖率的影响

Table 2 Effect of gefitinib on the proliferation rate of RBE cells

浓度	12 h细胞增殖率(%)	24 h细胞增殖率(%)	48 h细胞增殖率(%)
0 $\mu\text{mol/L}$	100.00 \pm 5.83	100.00 \pm 3.88	100.00 \pm 3.30
12.5 $\mu\text{mol/L}$	64.59 \pm 4.04 ¹⁾	51.50 \pm 3.94 ¹⁾	36.15 \pm 2.50 ¹⁾
25 $\mu\text{mol/L}$	60.18 \pm 2.56 ¹⁾	47.02 \pm 5.22 ¹⁾	31.30 \pm 2.27 ¹⁾
50 $\mu\text{mol/L}$	57.14 \pm 3.19 ¹⁾	38.26 \pm 4.89 ¹⁾	29.50 \pm 1.04 ¹⁾
100 $\mu\text{mol/L}$	53.59 \pm 8.28 ¹⁾	36.59 \pm 1.91 ¹⁾	23.59 \pm 2.60 ¹⁾
200 $\mu\text{mol/L}$	47.34 \pm 2.97 ¹⁾	33.98 \pm 2.89 ¹⁾	19.45 \pm 5.30 ¹⁾

注:时间&浓度: $F=16.87$, $P < 0.0001$;时间: $F=396.66$, $P < 0.0001$;浓度: $F=1423.68$, $P < 0.0001$ 。与同一时间的0 $\mu\text{mol/L}$ 比较,1) $P < 0.0001$ 。

2.7 柴胡皂苷e和吉非替尼对ROS和MDA生成及p-PI3K和p-AKT表达的影响 ROS和MDA检测结果显示,与对照组相比,柴胡皂苷e和吉非替尼均具有诱导人胆管癌RBE细胞产生ROS和MDA的作用,且两者联用对MDA的诱导作用更显著(P 值均 <0.05)(图6a和6b)。Western Blotting结果显示,与对照组相比,柴胡皂苷e处理的人胆管癌RBE细胞p-AKT蛋白表达下调;吉非替尼



注: a、b,柴胡皂苷e、吉非替尼分别作用24 h的IC₅₀;c、d,柴胡皂苷e和吉非替尼对胆管癌RBE细胞增殖的影响,图c中 $F=108.30, P<0.0001$,图d中 $F=72.71, P<0.0001$ (胞质为EdU染色,胞核为Hoechst染色,×10);e,柴胡皂苷e和吉非替尼对胆管癌RBE细胞迁移的影响(×10),时间&组别: $F=42.96, P<0.0001$,时间: $F=362.93, P<0.0001$,组别: $F=109.60, P<0.0001$ 。与对照组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$,**** $P<0.0001$ 。

图5 柴胡皂苷e和吉非替尼对胆管癌RBE细胞增殖迁移的影响

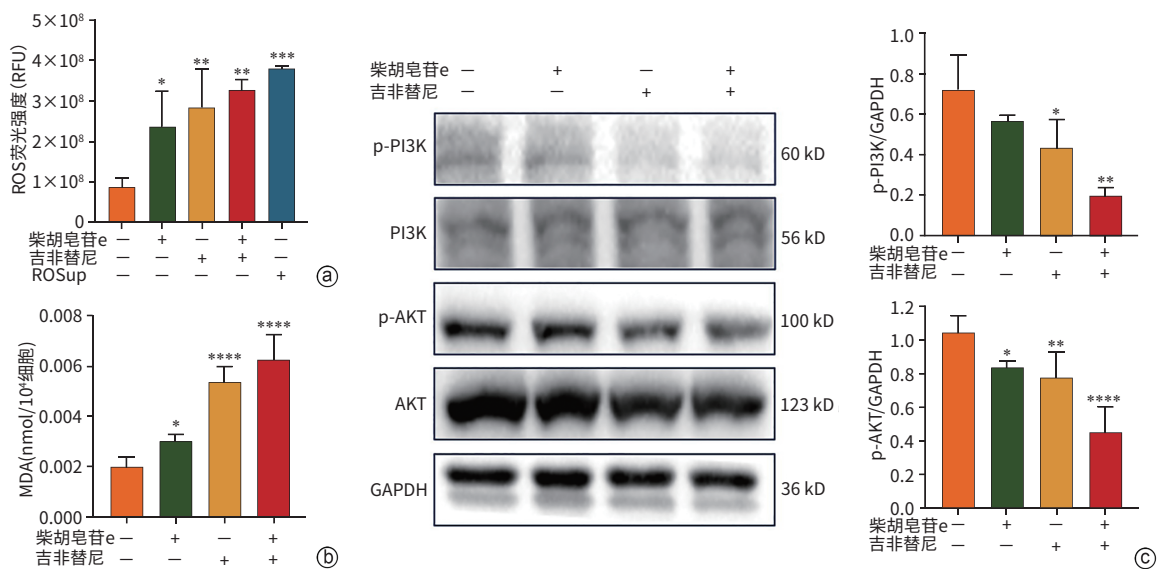
Figure 5 Effect of saikosaponin e and gefitinib on the proliferation and migration of RBE cells

处理的人胆管癌RBE细胞p-PI3K和p-AKT蛋白表达均下调(P 值均 <0.05);两者联用分别与柴胡皂苷e和吉非替尼比较,p-PI3K和p-AKT蛋白表达下调均更显著(P 值分别为0.016 1、0.041 4、0.000 6、0.003 4)(图6c)。

3 讨论

胆管癌因特殊的解剖位置及向周围组织、血管浸润的特性,其手术切除率低,放化疗效果欠佳,患者复发率高、生存期短、预后极差,使治疗难度加大^[13]。中医药历史悠久,传承数载,可以调节免疫功能,改善内环境,配合放化疗减毒增效,预防肿瘤的复发转移,在胆系肿瘤的研究和应用越来越多。中医认为胆管癌属“胁痛”“黄疸”“积聚”等病范畴,多因肝郁气滞,湿热壅阻,影响肝脏的疏泄和胆腑的通降功能,治疗上应注重疏肝利胆,清腑退黄,通利渗湿^[14]。中药柴胡入肝胆经,善疏肝、利胆、解郁。叶天士在《本草经解》中提到:“柴胡轻清,升达胆气……凡有结气,皆能散之也”。柴胡的主要药效成分为柴胡皂苷,根据化学结构的不同,分为a、b、c、d、e、f、g、h等^[15]。目前,柴胡皂苷a、b、d的抗肿瘤作用较为明确^[16]。Zhao等^[17]发现柴胡皂苷a可通过激活IL-12-STAT4通路诱导辅助性T细胞1型分化而抑制乳腺癌的生长;You等^[18]证实柴胡皂苷b2对小鼠肝癌移植瘤具有显著的抑制作用,与调控VEGF-ERK-HIF-1 α 通路有关;Lai等^[19]研究表明柴胡皂苷d可靶向MKK4-JNK信号通

路,从而抑制胰腺癌细胞的生长并促进其凋亡。但是,柴胡皂苷c、e、f、g、h抗肿瘤方面的报道很少,尤其是对胆管癌的治疗作用还不明确,值得深入研究。PPI网络分析可知,柴胡皂苷抗胆管癌的关键靶点主要为STAT3、IL-2和PPP2CA。STAT3是STAT家族的重要成员,在肿瘤的形成进展中发挥重要作用^[20]。在胆管癌组织中,STAT3的异常激活与肿瘤的浸润、转移及不良预后密切相关,而STAT3沉默则可抑制胆管癌的转移和进展^[21]。IL-2是机体免疫应答网络中最重要的调节因子,能促进T细胞生长并诱导其杀伤效应,IL-2水平与肝癌进展呈负相关,其表达降低提示患者免疫功能低下^[22]。PPP2CA是蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)催化亚基的 α 亚型,其低表达与结肠直肠癌、胃癌等消化道肿瘤的进展恶化及不良预后相关^[23-24]。以上研究说明,STAT3、IL-2和PPP2CA在包括胆管癌在内的多种消化道肿瘤中扮演着重要角色,阻断STAT3^[20]或应用IL-2及其类似物^[25]的抗肿瘤疗法已取得良好的疗效。药物-疾病-靶点网络分析提示,相较于柴胡皂苷a、b1、d、f、g、h、e和c抗胆管癌的药效作用更强一些,这与不同柴胡皂苷化学结构上的微小差别有关。例如,a和e仅是C23的差异,a为CH₂OH,e为CH₂-H,但这能影响药物与底物结合的亲和力,导致生物活性和药效作用存在差异。分子对接中柴胡皂苷e和c均能与STAT3、IL-2和PPP2CA形成氢键对接,且对接结合能均 <-29.29 kJ/mol,



注:a、b,柴胡皂苷e和吉非替尼对ROS、MDA生成的影响,图a中 $F=10.36$, $P=0.001 4$,ROSup:ROS诱导剂,RFU:相对荧光单位;图b中 $F=57.43$, $P<0.000 1$;c,柴胡皂苷e和吉非替尼对p-PI3K和p-AKT表达的影响,p-PI3K分析 $F=11.56$, $P=0.002 8$,p-AKT分析 $F=21.2$, $P<0.000 1$ 。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.000 1$ 。

图6 柴胡皂苷e和吉非替尼对ROS和MDA生成及p-PI3K和p-AKT表达的影响

Figure 6 Effect of saikosaponin e and gefitinib on the production of ROS and MDA as well as the expression of p-PI3K and p-AKT

说明有较好的结合。但相较于柴胡皂苷c,柴胡皂苷e与STAT3和PPP2CA对接的氢键数目更多,多个氢键可增加结合的稳定性,提示柴胡皂苷e结合STAT3和PPP2CA的能力可能更强,这为实验论证和深入研发柴胡皂苷提供参考。

GO富集分析发现柴胡皂苷治疗胆管癌的靶点涉及刺激反应、生物调节、细胞通讯等生物过程,尤其是对毒物的反应和对抗生素的反应。研究表明,胆管癌的发生发展与胆结石、胆汁淤积、病毒和寄生虫感染及化学性致癌物等致炎因素长期刺激密切相关^[26],慢性炎症可使胆管微环境菌群改变,产生毒性代谢产物发挥直接或间接的致癌作用,其发病机制涉及错综复杂的细胞信号调控。KEGG通路富集分析提示,耐EGFR酪氨酸激酶抑制剂和PI3K-AKT为关键信号通路,这两条信号通路涵盖了包括STAT3、IL-2、PPP2CA在内的多个靶点,提示柴胡皂苷可能从多层次、多途径、多靶点发挥抗胆管癌功效。EGFR是广泛存在于人表皮细胞和基质细胞的一种具有酪氨酸激酶活性的膜表面受体,在胆管癌手术切除组织和人胆管癌细胞株中EGFR表达升高,其异常激活是癌组织对化疗不敏感的一大原因^[27]。EGFR酪氨酸激酶抑制剂能降低EGFR磷酸化,并增强胆管癌对吉西他滨等化疗药物的敏感性,这使得EGFR酪氨酸激酶抑制剂成为抗肿瘤药物研发的热点^[28]。众多化疗药物杀死癌细胞的重要策略之一是诱导ROS过量生成,破坏癌细胞的蛋白、脂质和DNA,促使癌细胞过氧化损伤^[29]。ROS和MDA作为氧化应激和脂质过氧化的重要指标,反映了药物的抗癌效应。本研究中EGFR酪氨酸激酶抑制剂吉非替尼和柴胡皂苷e均能通过诱导氧化应激发挥抗胆管癌细胞增殖迁移的作用。EGFR酪氨酸激酶抑制剂治疗多种肿瘤虽有效果,但在使用一段时间后会表现出耐药性,获得性耐药的部分原因与药物诱导EGFR下游的PI3K-AKT信号通路激活有关^[30]。双靶向PI3K和EGFR的联合治疗能以协同的方式增强疗效,已在消化道肿瘤的研究中彰显出显著的治疗效果^[31]。本研究中柴胡皂苷e抗胆管癌的作用也与抑制PI3K-AKT信号通路的激活有关,且柴胡皂苷e与吉非替尼联合用药的效果更明显,因而有望克服胆管癌的耐药性,具有良好的研究价值和开发前景。

综上,本研究发现柴胡皂苷e和吉非替尼可调控PI3K-AKT信号通路诱导胆管癌细胞氧化应激,并抑制胆管癌细胞的增殖迁移。然而,胆管癌的发病机制涉及错综复杂的信号通路交互网络,今后尚需结合系统的动

物实验和大量的临床样本明确柴胡皂苷e治疗胆管癌的更多靶点和机制,为后续开发柴胡皂苷类药物提供更可靠的实验支持。另外,胆管癌化疗耐药的瓶颈问题也亟待突破,柴胡皂苷e与吉非替尼联用在治疗胆管癌耐药株方面的药理作用也需深入探究,为胆管癌的有效治疗提供更充分的参考依据。

利益冲突声明: 本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明: 李珊负责课题设计及论文撰写与修改;赵方言、程新月负责数据的收集及分析;刘湘花、杨艺负责指导实验并修改论文;闵远骞、李天星负责网络药理学分析;禄保平负责审阅论文并最后定稿。



附录见二维码

参考文献:

- [1] MORIS D, PALTA M, KIM C, et al. Advances in the treatment of intrahepatic cholangiocarcinoma: An overview of the current and future therapeutic landscape for clinicians[J]. CA A Cancer J Clin, 2023, 73(2): 198-222. DOI: 10.3322/caac.21759.
- [2] QURASHI M, VITHAYATHIL M, KHAN SA. Epidemiology of cholangiocarcinoma[J]. Eur J Surg Oncol, 2025, 51(2): 107064. DOI: 10.1016/j.ejso.2023.107064.
- [3] BANALES JM, MARIN JJG, LAMARCA A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: The next horizon in mechanisms and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17(9): 557-588. DOI: 10.1038/s41575-020-0310-z.
- [4] SARCOGNATO S, SACCHI D, FASSAN M, et al. Cholangiocarcinoma[J]. Pathologica, 2021, 113(3): 158-169. DOI: 10.32074/1591-951x-252.
- [5] CHEN ZM, CHEN JH. Advances in precision diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2025, 30(2): 159-170. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2025.02.002. 陈祯美, 陈进宏. 胆管癌精准诊疗进展及前沿[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2025, 30(2): 159-170. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2025.02.002.
- [6] ELVEVI A, LAFFUSA A, SCARAVAGLIO M, et al. Clinical treatment of cholangiocarcinoma: An updated comprehensive review[J]. Ann Hepatol, 2022, 27(5): 100737. DOI: 10.1016/j.aohep.2022.100737.
- [7] LI YH, YU JF, ZHANG YJ, et al. Advances in targeted therapy of cholangiocarcinoma[J]. Ann Med, 2024, 56(1): 2310196. DOI: 10.1080/07853890.2024.2310196.
- [8] LIU Y, LIU LX. New advances in diagnosis and treatment of advanced cholangiocarcinoma[J]. Chin J Dig Surg, 2025, 24(7): 855-861. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20250606-00261. 刘尧, 刘连新. 晚期胆管癌诊断与治疗新进展[J]. 中华消化外科杂志, 2025, 24(7): 855-861. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20250606-

- 00261.
- [9] WANG HQ, ZHOU QY, LI BQ, et al. Chemical compositions and pharmacological effects of Chinese thoroughwort: Review[J]. *Jilin J Chin Med*, 2024, 44(1): 96-100. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzy.2024.01.022.
王海强, 周千瑶, 李冰琪, 等. 柴胡化学成分及药理作用研究进展[J]. *吉林中医药*, 2024, 44(1): 96-100. DOI: 10.13463/j.cnki.jlzy.2024.01.022.
- [10] LI X, LI XY, HUANG NN, et al. A comprehensive review and perspectives on pharmacology and toxicology of saikosaponins[J]. *Phyto-medicine*, 2018, 50: 73-87. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.174.
- [11] QUE RY, LI Y. Advances in mechanisms of saikosaponins preventing and treating hepatocellular carcinoma[J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2014, 16(2): 128-131. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2014.02.044.
阙任焯, 李勇. 柴胡皂苷防治原发性肝癌机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(2): 128-131. DOI: 10.13194/j.issn.1673-842x.2014.02.044.
- [12] ZHANG P, ZHANG DF, ZHOU WA, et al. Network pharmacology: Towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine[J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25(1): bbad518. DOI: 10.1093/bib/bbad518.
- [13] ZHAO FY, LI S, WANG XQ, et al. Molecular mechanism of traditional Chinese medicine active components in regulating glucose metabolism against cholangiocarcinoma[J]. *J Clin Hepatol*, 2024, 40(8): 1704-1708. DOI: 10.12449/JCH240832.
赵方言, 李姗, 王祥麒, 等. 中药活性成分调控糖代谢抗胆管癌的分子机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2024, 40(8): 1704-1708. DOI: 10.12449/JCH240832.
- [14] BAI JZ, JIA LQ, CHEN DM, et al. Research progress on medication patterns and pharmacology of traditional Chinese medicine for treating cholangiocarcinoma based on syndrome differentiation[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(24): 8228-8240. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.028.
白金钊, 贾立群, 陈冬梅, 等. 中医辨证施治胆管癌用药规律及药理学研究进展[J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8228-8240. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.24.028.
- [15] ZHU YC, LAI Y. Pharmacological properties and derivatives of saikosaponins: A review of recent studies[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2023, 75(7): 898-909. DOI: 10.1093/jpp/rgad052.
- [16] XIAO X, GAO C. Saikosaponins targeting programmed cell death as anticancer agents: Mechanisms and future perspectives[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2024, 18: 3697-3714. DOI: 10.2147/DDDT.S470455.
- [17] ZHAO X, LIU JY, GE SS, et al. Saikosaponin a inhibits breast cancer by regulating Th1/Th2 balance[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 624. DOI: 10.3389/fphar.2019.00624.
- [18] YOU M, FU JM, LV XZ, 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: 136. DOI: 10.3892/or.2023.8573.
- [19] LAI MR, GE YQ, CHEN M, et al. Saikosaponin D inhibits proliferation and promotes apoptosis through activation of MKK4-JNK signaling pathway in pancreatic cancer cells[J]. *OncoTargets Ther*, 2020, 13: 9465-9479. DOI: 10.2147/ott.s263322.
- [20] YANG X, LI SD, LIU JK, et al. Current research status of traditional Chinese medicine in the prevention and treatment of hepatocellular carcinoma by regulating the JAK/STAT signaling pathway[J]. *J Clin Hepatol*, 2023, 39(11): 2718-2729. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.11.030.
杨星, 李淑娣, 刘江凯, 等. 中药调控Janus激酶/信号转导和转录激活因子(JAK/STAT)信号通路防治肝细胞癌的研究现状[J]. *临床肝胆病杂志*, 2023, 39(11): 2718-2729. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.11.030.
- [21] LIU WW, FAN LH, SHAO B, et al. STAT3 promotes migration and invasion of cholangiocarcinoma arising from choledochal cyst by transcriptionally inhibiting miR200c through the c-myc/MEK/ERK signaling pathway[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2023, 69(9): 136-142. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.9.20.
- [22] WANG YL, ZHANG H, LI G, et al. Study on lymphocyte subsets, interleukin 2, and natural killer cell activity in peripheral blood of patients with liver cancer[J]. *Chin J Lab Med*, 2004, 27(12): 844-845. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.2004.12.013.
王玉亮, 张珩, 李光, 等. 肝癌患者外周血淋巴细胞亚群、白细胞介素2和自然杀伤细胞活性的研究[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(12): 844-845. DOI: 10.3760/j.issn:1009-9158.2004.12.013.
- [23] HUANG TT, HE KX, MAO YY, et al. Genetic variants in PPP2CA are associated with gastric cancer risk in a Chinese population[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 11499. DOI: 10.1038/s41598-017-12040-z.
- [24] LV Y, ZHU YF, BAI G. Association between PPP2CA expression and colorectal cancer prognosis tumor marker prognostic study[J]. *Int J Surg*, 2018, 59: 80-89. DOI: 10.1016/j.ijsu.2018.09.020.
- [25] QIAN MX, LU JG, FENG J. Research progress on interleukin-2 and its analogues[J]. *Chin J Pharm*, 2020, 51(8): 947-955. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.08.001.
钱梦歆, 路建光, 冯军. 白介素-2及其类似物的研发进展[J]. *中国医药工业杂志*, 2020, 51(8): 947-955. DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2020.08.001.
- [26] CALIGIURI A, BECATTI M, PORRO N, et al. Oxidative stress and redox-dependent pathways in cholangiocarcinoma[J]. *Antioxidants*, 2024, 13(1): 28. DOI: 10.3390/antiox13010028.
- [27] BOONSRI B, YACQUB-USMAN K, THINTHARUA P, et al. Effect of combining EGFR tyrosine kinase inhibitors and cytotoxic agents on cholangiocarcinoma cells[J]. *Cancer Res Treat*, 2021, 53(2): 457-470. DOI: 10.4143/crt.2020.585.
- [28] KIDOIKHAMMOUAN S, LERT-ITTHIPORN W, DEENONPOE R, et al. Targeting EGFR activation to overcome gemcitabine resistance in cholangiocarcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2024, 44(12): 5393-5404. DOI: 10.21873/anticancer.17366.
- [29] PINTER M, PECK-RADOSAVLJEVIC M. Review article: Systemic treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 48(6): 598-609. DOI: 10.1111/apt.14913.
- [30] HE JY, HUANG ZR, HAN LZ, et al. Mechanisms and management of 3rd-generation EGFR-TKI resistance in advanced non-small cell lung cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2021, 59(5): 90. DOI: 10.3892/ijo.2021.5270.
- [31] PIPER AK, PENNEY C, HOLLIDAY J, et al. EGFR and PI3K signaling pathways as promising targets on circulating tumour cells from patients with metastatic gastric adenocarcinoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(10): 5565. DOI: 10.3390/ijms25105565.

收稿日期: 2025-06-06; 录用日期: 2025-07-22

本文编辑: 王亚南

引证本文: LI S, ZHAO FY, CHENG XY, et al. Mechanism of action of saikosaponin e combined with gefitinib in treatment of cholangiocarcinoma: A study based on network pharmacology [J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(12): 2586-2596.

李姗, 赵方言, 程新月, 等. 基于网络药理学探讨柴胡皂苷e联合吉非替尼治疗胆管癌的作用机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(12): 2586-2596.