

# Network Pharmacological Research on the Mechanism of Shenfu Injection in Improving Immune Function of Tumor Patients

Tujia Chen<sup>1</sup> Ziyuan Zhou<sup>2\*</sup> Jun Meng<sup>2</sup>

1. Shenzhen University Medical School of Pharmaceutical Sciences, Shenzhen, Guangdong, 518060, China

2. National Cancer Center/National Cancer Clinical Medical Research Center/Shenzhen Hospital of Cancer Hospital of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen, Guangdong, 518116, China

## Abstract

Shenfu injection is composed of the effective components of red ginseng and aconite, which has the pharmacological effect of improving the immune state of the body. The research method of network pharmacology was used to predict the mechanism of Shenfu Injection to improve the immune function of tumor patients mainly through multiple pathways and multiple signal pathways acting on multiple targets.

## Keywords

Shenfu injection; immunity; network pharmacology

## 参附注射液改善肿瘤患者免疫功能作用机制的网络药理学研究

陈土佳<sup>1</sup> 周子原<sup>2\*</sup> 孟珺<sup>2</sup>

1. 深圳大学医学部药学院, 中国·广东 深圳 518060

2. 国家癌症中心/国家肿瘤临床医学研究中心/中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院深圳医院, 中国·广东 深圳 518116

## 摘要

参附注射液由红参和附子的有效成分组成, 具有改善机体免疫状态的药理作用。应用网络药理学研究方法预测了参附注射液主要通过多途径、多种信号通路作用于多靶点来改善肿瘤患者免疫功能的机制。

## 关键词

参附注射液; 免疫功能; 网络药理学

## 1 介绍

参附注射液是利用现代制剂技术对传统方剂参附汤进行的改进, 是由红参、附子提取物制成的中药注射剂。参附

**【基金项目】** 广东医学科学基金(项目编号: A2021413); 广东基础与应用基础基金(项目编号: 2019A1515110489); 国家自然科学基金(项目编号: 22107045); 深圳医院面上项目(项目编号: E010221005); 深圳科创委的项目 Shenzhen Science and Technology Innovation Committee(JC YJ20180508152213145)。

**【作者简介】** 陈土佳(1998-), 男, 中国广东化州人, 在读硕士, 从事医院药学和药理学研究。

**【通讯作者】** 周子原(1989-), 男, 中国河南许昌人, 博士, 从事临床药学研究。

注射液能够增强肿瘤患者的免疫功能, 减低化疗药物所导致的毒副作用并加强疗效<sup>[1]</sup>。参附注射液可以促进骨髓干细胞分化增殖, 促使多功能造血干细胞分化发育为 B 淋巴细胞而调节体液免疫功能, 明显调节晚期肿瘤患者的免疫球蛋白水平, 在肿瘤患者治疗中发挥积极作用<sup>[2]</sup>。参附注射液参与抗肿瘤的主要作用机制包括升高 CD3、CD4、CD4/CD8 比值, 从而提高机体免疫功能, 这对于改善患者的生存质量, 提高患者的生存率有深远意义<sup>[3-5]</sup>。

本研究基于网络药理学探讨参附注射液改善肿瘤患者机体免疫功能的分子机制。借助 TCMSPT 数据库检索参附注射液的活性成分, 基于 SwissTargetPrediction 数据库检索活性成分作用的生物靶标。肿瘤免疫调节相关的蛋白靶点在 DisGeNET 数据库中获得。两个数据库中的重叠靶点是参附注射液改善肿瘤患者机体免疫功能的有效作用靶点。在 STRING 数据库中构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络图,

找到其中关键的作用靶点。利用 R 语言对重叠靶点作 GO 注释和 KEGG 富集分析, 探索其中的生物信号通路。本研究共获得 4 个红参有效成分, 21 个附子有效成分, 742 个成分靶点, 337 个肿瘤免疫靶点, 68 个重叠靶点。GO 分子功能富集条目主要与丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸蛋白激酶、DNA 结合转录因子结合、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白丝氨酸激酶活性相关。KEGG 富集分析则包含癌症中的蛋白聚糖通路、HIF-1 信号通路、乙型肝炎通路、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药通路、PD-L1 在癌症中的表达和 PD-1 检查点通路等生物过程。

## 2 资料与方法

### 2.1 数据采集

#### 2.1.1 参附注射液成分以及相关靶点筛

通过中医药系统药理学平台 (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 寻找红参和附子的化学成分以及成分作用的相关靶点。基于 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 检索其中化学成分作用的相关靶点。利用 SwissTargetPrediction 数据库检索靶点时所需要用到的 SMILES IDs 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 ChemDraw20 软件中获得。汇集两个数据库收集到的所有靶点, 删除重复值, 保留唯一的蛋白靶点名称。筛选结束后, 对蛋白靶点信息进行标准化, 利用 Uniprot 数据库将蛋白靶点名称转换为 Uniprot ID, 删除没找相应 Uniprot ID 的蛋白靶点名称。

#### 2.1.2 药效学预测

在药效学研究中, 吸收、分布、代谢、排泄是识别特定药物的关键指标。因此, 与此相关的口服生物利用度 (Oral Bioavailability, OB) 和类药性 (Drug Likeness, DL) 被用来预测参附注射液潜在的生物活性成分。基于对现有化合物的认识, 分别设置  $OB \geq 30\%$  和  $DL \geq 0.18$ 。

#### 2.1.3 肿瘤免疫相关靶点的筛选

以“Tumor Immunity”为关键词, 选择“Homo Sapiens”物种, 挖掘 DisGeNet 数据库中与肿瘤免疫相关的潜在靶点。

#### 2.1.4 绘制韦恩图

将化合物潜在作用靶点和肿瘤免疫相关靶点上传到 Venny2.1.0 网站, 重叠部分将是参附注射液活性成分发挥治疗作用的有效靶点, 这些靶点与肿瘤免疫功能密切相关。

#### 2.1.5 参附注射液 - 肿瘤免疫靶点蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI)

网络构建 STRING 数据库收集了大量已知蛋白 - 蛋白相互作用的结果, 将得到的重叠靶点上传至 STRING 数据库, 选择“Homo sapiens”物种, 把最低要求的互动分数设置为最高置信度 (0.900)。

### 2.2 网络图的构建以及核心靶点的筛选

网络分析有助于解释中药、化合物、疾病、基因之间

的关系。本研究中, 使用 Cytoscape3.9.0 软件构建了四个网络图: ①参附注射液中活性成分与其作用靶点的网络图, ②参附注射液活性成分所作用的靶点之间的蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI) 网络图, ③参附注射液改善肿瘤患者机体免疫的潜在靶点蛋白 - 蛋白相互作用 (PPI) 网络图, ④使用 Cytoscape 软件中 cytoHubba 插件的 Degree、MNC、MCC 算法分别筛选前出 10 个基因, 再取三者的交集得到核心靶点。

### 2.3 基因功能注释和生物信号通路富集分析

使用 R 语言软件 clusterProfiler 数据包进行基因本体 (GO) 富集分析及精度基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 筛选出前 20 个最具有显著性统计学意义的生物过程和通路, 所有结果在统计学上都有显著性差异 ( $p < 0.05$ )。

## 3 结果与分析

### 3.1 参附注射液 - 靶点网络图

设定 OB 和 DL 参数值后, 共获取红参活性成分 4 个、附子活性成分 21 个、成分对应靶点共 742 个。活性成分包括人参皂苷 Rh2、石防风素、多跟乌头碱、水黄芪素、脱氧乌头碱、 $\beta$ - 谷甾醇等, 见表 1。药物成分 - 靶点关系 (图 1 (A))。三角形代表药物活性成分, 圆形代表药物作用靶点, 颜色的深浅代表自由度大小。

### 3.2 肿瘤免疫相关靶点

总共在 DisGeNet 数据库获得 337 个靶点。

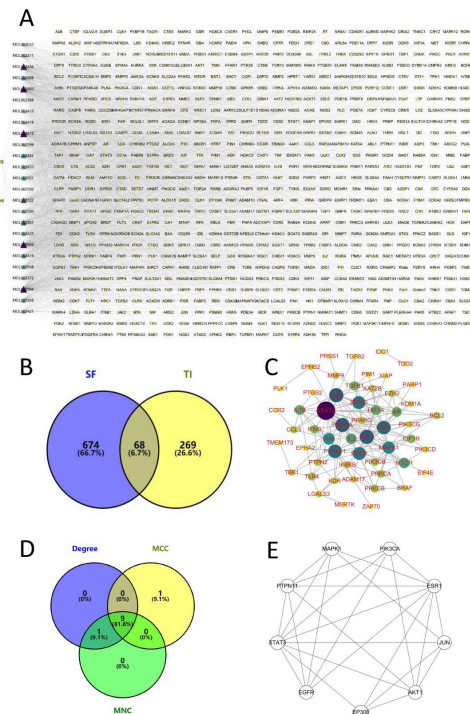


图 1 参附注射液与肿瘤免疫有相互作用的靶点的蛋白网络交互图

图1中，(A)成分-靶点关系图。三角形代表药物活性成分，圆形代表药物作用靶点，形状大小代表自由度。(B)构建的PPI网络图；(C) Cytoscape (3.9.0)成分-靶点关系图。三角形代表药物活性成分，圆形代表药物作用靶点，形状大小代表自由度。(D)使用Degree、MNC、MCC算法得到的前10个基因；(E)核心基因PPI网络图。

表1 参附注射液有效成分

成分 ID	成分名称	生物利用度	类药性
MOL002032	DNOP	40.58542	0.39974
MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracos-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.54594	0.42436
MOL000358	beta-sitosterol	36.91391	0.75123
MOL005344	ginsenoside rh2	36.31951	0.55868
MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99355	0.20044
MOL002388	Delphin_qt	57.7617	0.2786
MOL002392	Deltoin	46.69281	0.36837
MOL002393	Demethyldejavaine A		0.1819
MOL002394	Demethyldejavaine B	34.52073	0.18141
MOL002395	Deoxyandrographolide	56.3041	0.31451
MOL002397	karakoline	51.7309	0.73447
MOL002398	Karanjin	69.55687	0.33616
MOL002401	Neokadsuranic acid B	43.09829	0.85195
MOL002406	2,7-Dideacetyl-2,7-dibenzoyl-taxayunnanine F	39.42848	0.37822
MOL002410	benzoylnapelline	34.0565	0.52933
MOL002415	6-Demethyldejavoline	51.87164	0.65822
MOL002416	deoxyaconitine	30.95922	0.24469
MOL002419	(R)-Norcoclaurine	82.54295	0.20872
MOL002421	ignavine	84.07948	0.24798
MOL002422	isotalatizidine	50.82414	0.73291
MOL002423	jesaconitine	33.41258	0.19087
MOL002433	(3R,8S,9R,10R,13R,14S,17R)-3-hydroxy-4,4,9,13,14-pentamethyl-17-[(E,2R)-6-methyl-7-[(2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-[[ (2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxyhept-5-en-2-yl]-1,2,3,7,8,10,12,15,16,17-decahydr	41.52217	0.21712
MOL002434	Carnosifloside I_qt	38.15575	0.79654
MOL000359	sitosterol	36.91391	0.7512
MOL000538	hypaconitine	31.38846	0.26085

### 3.3 参附注射液改善肿瘤患者机体免疫的相关靶点

在 Venny 2.1.0 网站上得到了 68 个重叠靶点,见图 1(B)。参附注射液很可能是通过这些靶点改善肿瘤患者机体免疫功能。

### 3.4 蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络图构建

参附注射液可能通过与 68 个潜在蛋白靶点相互作用从而改善肿瘤患者机体免疫功能。把这些蛋白靶点上传至 STRING 数据库构建网络图,见图 1(C)。将网络图数据导入 Cytoscape3.9.0 软件进行可视化,见图 1(D)。自由度最高的前四个节点分别是 STAT3 (自由度=23), AKT1 (自由度=16), PIK3CA (自由度=16), JUN (自由度=16)。使用三种算法自由度 (Degree)、最大邻域分量(MNC)、最大团中心性 (MCC) 预测到九个核心靶点,分别是 STAT3、PIK3CA、JUN、AKT1、PTPN11、ESR1、

EGFR、EP300、MAPK1,见图 1(E)。这九个核心靶点之间的相互作用如图 1(E) 所示。

### 3.5 对 68 个潜在作用靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 富集分析

根据 P 值筛选出前二十个生物分子功能: 丝氨酸 / 苏氨酸 / 酪氨酸蛋白激酶 (GO: 0004712)、DNA 结合转录因子结合 (GO: 0140297)、RNA 聚合酶 II 特异性 DNA 结合转录因子结合 (GO: 0061629)、蛋白丝氨酸 / 苏氨酸激酶活性 (GO: 0004674)、整合素结合 (GO: 0005178) 等,见图 2(A)。根据 P 值筛选出前二十个相关生物信号通路: 癌症中的蛋白聚糖 (hsa05205)、HIF-1 信号通路 (hsa04066)、乙型肝炎 (hsa05161)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药 (hsa01521)、PD-L1 在癌症中的表达和 PD-1 检查点通路 (hsa05235) 等,见图 2(B)。

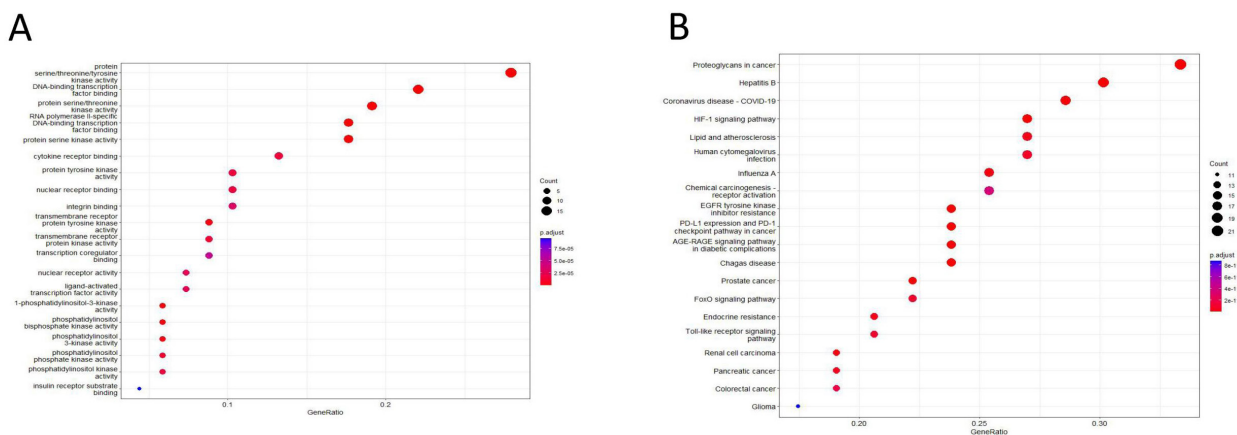


图2 参附注射液与肿瘤免疫共同作用靶点的 (A) GO 富集分析与 (B) KEGG 富集分析图

注：红色越深，P 值越小。

### 4 讨论

人体的免疫状态与肿瘤发展密切相关，因而提高机体的免疫功能及其活力是肿瘤防治的有效途径之一。中国中医药在肿瘤综合治疗方面发挥了重要作用。参附注射液对提高肿瘤患者的生存质量和机体免疫的调节有明显作用。本研究通过网络药理学的方法，检索得到参附注射液的主要有效成分，如人参皂苷 Rh2、石防风素、多根乌头碱、水黄皮素、脱氧乌头碱、β-谷甾醇等。其中，人参皂苷 Rh2 其具有显著的免疫调节活性。在肿瘤微环境导致的免疫抑制情况下，人参皂苷 Rh2 可提高 CD4<sup>+</sup>T、CD8<sup>+</sup>T 细胞比例，促进生产 TNF-α、INF-γ、IL-6 等正向免疫因子，提高机体免疫应答<sup>[6]</sup>。β-谷甾醇也可以增加 IL-12、IL-18 等细胞因子，提升自然杀伤细胞活性<sup>[7]</sup>。参附注射液可能通过关系较为紧密的 STAT3、PIK3CA、JUN、AKT1、PTPN11、ESR1、EGFR、EP300、MAPK1 等蛋白分子，达到改善肿瘤患者机体免疫功能。参附注射液能够抑制 STAT3 蛋白磷酸化而发挥调控作用，从而增强肺癌大鼠 T 淋巴细胞免疫功能<sup>[8]</sup>。PD-L1 在癌症中的表达和 PD-1 检查点通路对机体免疫功能有显著影响，其中 PD-1 和 PD-L1 是免疫治疗的关键靶点<sup>[9]</sup>。本研究应用网络药理学方法揭示了参附注射液改善肿瘤患者机体免疫功能的多成分、多靶点和多通路的协同作用的特

点，为进一步深入研究该药特有的药理作用以及改善肿瘤患者机体免疫功能的作用机制提供了重要的理论依据。

### 参考文献

- [1] 何朗. 参附注射液对非小细胞肺癌化疗患者血小板及机体免疫功能的影响 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(9).
- [2] 封文军. 参附注射液对晚期肿瘤患者免疫球蛋白及血液流变性的影响 [J]. 中国中医急症, 2002, 11(5).
- [3] 郭玉玉. 参附注射液在恶性肿瘤治疗中的临床研究进展 [J]. 医学信息: 医学与计算机应用, 2014, (22).
- [4] 张芹, 杨秀芹, 王军业. 参附注射液在恶性肿瘤治疗中的应用研究 [J]. 黑龙江医药, 2006(6):491-492.
- [5] 杨威英. 参附注射液在老年肿瘤晚期恶病质的应用 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(5):797.
- [6] 黄容容, 钱颖, 向明. 人参皂苷 Rh2 免疫调节作用研究进展 [J]. 中国免疫学杂志, 2019, 35(23):2936-2941.
- [7] 王莉. β-谷甾醇抗肿瘤作用研究 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2009, 36(9).
- [8] 翟占强. 基于 JAK/STAT 通路 EFhD2 蛋白对肺癌大鼠 T 淋巴细胞免疫功能的调节作用研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(14): 1672-1676+1681.
- [9] 卢哲, 张国军, 姚群峰. 基于 PD-1/PD-L1 靶点的肿瘤免疫治疗研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(5):926-930.