

基于网络药理学研究蟾毒灵治疗卵巢癌的作用机制

王淞, 杨春娇, 温真鹏, 邹丹, 宋金城, 韩秋月, 郑新宇, 张晔(中国医科大学附属第一医院肿瘤研究所一室, 辽宁 沈阳 110000)

摘要: **目的** 以网络药理学为基础, 研究中药蟾毒灵治疗卵巢癌的作用机制。**方法** 通过使用 PubChem 获取蟾毒灵(Bufalin)的 3D 化学结构, 联合 PharmMapper 数据库获得蟾毒灵的药物靶点, 同时使用 CTD 及 STITCH 数据库对靶点进行补充; 从 GeneCards 数据库收集卵巢癌靶基因, 最后获得药物-疾病交集基因; 利用 STRING 数据库构建蛋白互作网络, 借助 Cytoscape 将其可视化得到蟾毒灵-卵巢癌-靶点蛋白调控网络, 计算节点度值, 筛选关键基因; 借助 R 软件及相关软件包进行靶基因 GO 功能注释及 KEGG 信号通路富集分析, 绘制靶点-通路图, 并利用体外实验验证。**结果** 筛选出蟾毒灵对应靶点 352 个, 卵巢癌疾病靶点 7 946 个, 交集靶点 107 个; GO 功能富集分析显示蟾毒灵可能与 51 种生物学过程相关; KEGG 富集得到细胞凋亡、MAPK 信号通路、乙型肝炎信号通路等 141 条通路。体外实验结果显示, 蟾毒灵对卵巢癌细胞的增殖具有抑制作用, 并且抑制 MAPK 信号通路关键蛋白磷酸化。**结论** 蟾毒灵对卵巢癌的治疗作用可能涉及多靶点、多过程; 体外实验证明蟾毒灵能够抑制卵巢癌细胞增殖, 并且对 MAPK 信号通路具有抑制作用。

关键词: 蟾毒灵; 卵巢癌; 网络药理学; 生物信息学; MAPK 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)05-0667-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.011

Study on the Mechanism of Bufalin in the Treatment of Ovarian Cancer Based on Network Pharmacology

WANG Song, YANG Chunjiao, WEN Zhenpen, ZOU Dan, SONG Jincheng, HAN Qiuyue, ZHENG Xinyu, ZHANG Ye (The First Department of Cancer Research Institute, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110000 Liaoning, China)

Abstract: **Objective** To study the mechanism of bufalin in the treatment of ovarian cancer on the basis of network pharmacology. **Methods** By using PubChem, PharmMapper database, CTD and STITCH database, we obtained the 3D chemical structure of bufalin and the drug target of bufalin. Target genes in ovarian cancer were collected from the GeneCards database, and drug-disease intersection genes were obtained. Subsequently, we used STRING database to construct a protein interaction network, visualized it with Cytoscape to obtain a bufalin-ovarian cancer-target protein regulatory network, calculated node degree, and screened key genes. GO function annotation and KEGG signal pathway enrichment analysis were further investigated by R software and related software package. The target-pathway diagram was drawn. Finally, the results were verified by *in vitro* experiments. **Results** 352 corresponding targets of bufalin, 7 946 targets of ovarian cancer and 107 targets of intersection were screened. GO functional enrichment analysis showed that bufalin might be related to 51 biological processes, and there were 141 pathways (apoptosis, MAPK signaling pathway, hepatitis B signaling pathway, etc.) in KEGG enrichment. The results of *in vitro* experiments showed that bufalin has an inhibitory effect on the proliferation of ovarian cancer cells. It also inhibits the phosphorylation of key proteins in the MAPK signaling pathway. **Conclusion** The therapeutic effect of bufalin on ovarian cancer may involve multiple targets and multiple processes. Experiments have shown that bufalin

收稿日期: 2020-12-22

作者简介: 王淞, 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤学。Email: songwang0225@163.com。通信作者: 张晔, 女, 教授, 研究方向: 肿瘤学。Email: zhangyecmu@163.com

基金项目: 国家自然科学基金项目(82073244); 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC200267)。

can inhibit the proliferation of ovarian cancer cells and has an inhibitory effect on the MAPK signaling pathway.

Keywords: Bufalin; ovarian cancer; network pharmacology; bioinformatics; MAPK signaling pathway

卵巢癌是第二常见的妇科恶性肿瘤,也是最常见的妇科恶性肿瘤死亡原因,且发病率仍在逐年增长^[1-2]。其治疗手段以手术和化疗为主,但化疗不良反应明显,患者难以耐受,甚至超过80%的患者化疗后出现耐药并复发^[3-4]。中药具有多靶点、多通路的特点,并且毒副作用明显低于传统化疗药物,这使其在肿瘤治疗方面前景广阔,并成为近年来的研究热点^[5],为卵巢癌的治疗开辟了一条新的道路。

蟾毒灵取自于中华大蟾蜍耳后腺,是我国的传统中药,分子式为 $C_{24}H_{34}O_4$,相对分子质量为386.5,具有镇痛、解热、增加心肌收缩力等作用^[6-7]。研究^[8-11]显示,蟾毒灵对肺癌、乳腺癌、肝癌等多种肿瘤均具有强大的抗癌作用。然而蟾毒灵对卵巢癌的作用机制研究较少,因此本研究拟通过网络药理学及生物信息学方法对该机制进行进一步的探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人卵巢癌 SKOV3 细胞株,购于美国模式培养物集存库(ATCC)。

1.2 药物及试剂 蟾毒灵,美国 Sigma 公司,批号: B0261-10MG; 胎牛血清(批号: 04-001-1B)、RPMI-1640(批号: 01-100-1ACS)、PBS(批号: 02-024-1ACS),以色列 Bioind 公司; MTT,北京索莱宝科技公司,批号: 3D3H0511; p38MAPK 抗体、p-p38MAPK 抗体、ERK1/2 抗体、p-ERK1/2 抗体、 β -actin 抗体,美国 Cell Signaling Technology (CST) 公司,批号分别为: 9820、9210、4696、4370、3700; 青霉素/链霉素原液(批号: C0222)、胰酶细胞消化液(批号: C0201)、二甲基亚砜(DMSO,批号: ST038)、RIPA 裂解液(批号: P0013B)、PMSF(批号: ST506)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号: P0010)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(批号: P0012A)、SDS-PAGE5X 蛋白上样缓冲液(批号: P0015)、SDS-PAGE 电泳液(批号: P0014A)、BeyoECL Plus-超敏 ECL 化学发光试剂盒(批号: P0018),上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 主要仪器 DH4000AB 型电热恒温培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司; SW-CJ-2FD 型洁净工作台,上海苏州安泰空气技术有限公司; BX41 显微镜,日本 Olympus 公司; TanonEPS300 电泳仪,上海

天能科技有限公司; 水平摇床 ZXY-48,常州润华仪器; ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 网络药理学预测蟾毒灵治疗卵巢癌的潜在靶点、GO 功能富集分析及 KEGG 通路分析

1.4.1 蟾毒灵作用靶点的筛选与预测 通过使用有机小分子生物活性数据库(PubChem)(<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)^[12]获取蟾毒灵(Bufalin)的 3D 化学结构; 基于蟾毒灵 3D 化学结构,结合 PharmMapper 数据库(www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/)^[13]得到蟾毒灵的药物作用靶点; 同时使用毒性与基因比较数据库(CTD)(<http://ctdbase.org/>)^[14]及蛋白化合物作用网数据库(STITCH)(<http://stitch.embl.de/>)^[15]对靶点进行补充。

1.4.2 卵巢癌疾病靶点的获取 运用 GeneCards 数据库(www.genecards.org/)^[16]以“ovarian cancer”“Ovarian Carcinoma”为关键词进行检索,最终获得卵巢癌疾病靶点。

1.4.3 蟾毒灵治疗卵巢癌潜在靶点的获取 对“1.4.1”中蟾毒灵作用靶点及“1.4.2”中卵巢癌疾病靶点取交集,得到药物-疾病共同靶基因。

1.4.4 蛋白相互作用网络与靶点蛋白调控网络的构建 以“1.4.3”中获取的药物-疾病共同靶基因为基础,利用蛋白相互作用分析平台 STRING 在线数据库(<https://www.string-db.org/>)^[17],按照 Homo sapiens 为种属得到蛋白互作网络及相关文件。根据得到的文件,再利用 Cytoscape(3.8.0)软件^[18]进行网络可视化,运用 cytohubba 插件进行拓扑结构分析,计算每个节点的度值(Degree 值),得到蟾毒灵-卵巢癌-靶点蛋白调控网络。

1.4.5 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析 通过得到的药物-疾病共同靶基因结合运用 R 软件(4.0.3)、Bioconductor 生物信息软件包^[19]等,得到基因本体论 GO 功能富集分析^[20]及京都基因和基因组百科全书 KEGG 通路富集分析^[21]相关文件,绘制分析图并结合靶基因绘制出靶点-通路网络图。

1.5 细胞培养 将人卵巢癌 SKOV3 细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 μ g·mL⁻¹链霉素的 RPMI-1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C,含 5% CO₂ 的恒温孵箱中培养,当细胞贴壁生长至 80% ~

90%时开始消化传代,取传代至第 2~4 代且生长良好的细胞用于后续实验。

1.6 MTT 法测定细胞抑制率 取对数生长期的 SKOV3 细胞接种于 96 孔板,以 RPMI-1640 培养液调整至密度为 $1 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞混悬液,每孔 100 μL 。依据我们既往的研究及查阅资料,设置浓度为 0.1、1、10、50、100、200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,同时设立不加药物的空白对照组,每组设 5 个复孔。放入培养箱分别培养 24、48 h 后,每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 MTT 20 μL ;继续培养 4 h 后,每孔加入 150 μL DMSO,利用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔光密度(OD)值。抑制率(%)=(空白对照组 OD-加药组 OD)/空白对照组 OD $\times 100\%$ 。

1.7 Western Blot 法检测相关通路蛋白的表达 将对数期 SKOV3 细胞接种于 6 孔板,分别加入 100、200 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蟾毒灵干预细胞,并设立空白对照组。胰酶消化收集细胞,提取总蛋白,并用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定各组蛋白浓度;凝胶电泳后转移至 PVDF 膜,置于 5%脱脂奶粉中封闭 1 h;一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。1 $\times$ TBST 洗膜 10 min $\times 3$ 次,二抗孵育 1 h,洗膜,ECL 发光显色。 β -actin 作为上样参照量,利用 ImageJ 计算条带灰度值。

1.8 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学预测蟾毒灵治疗卵巢癌的作用靶点及 GO、KEGG 分析

2.1.1 蟾毒灵作用靶点的相关信息 分别从 Pharm Mapper、CTD、STITCH 在线数据库得到蟾毒灵潜在作用靶点,通过使用 Uniprot 数据库(sparql.uniprot.org/)^[22]对其进行靶点-基因名的转换,综合各数据库得到的靶点进行合并去重,最终得到 352 个药物作用靶点。

2.1.2 卵巢癌的相关靶点信息 使用 GeneCards 数据库获取卵巢癌相关靶点,合并去重后得到 7 946 个相关靶点。

2.1.3 蟾毒灵治疗卵巢癌的潜在靶点 为进一步探讨蟾毒灵对卵巢癌的治疗作用,以 352 个药物相关靶点和 7 946 个疾病相关靶点为节点,结果得到 107 个交集基因(表 1)。

2.1.4 蟾毒灵治疗卵巢癌蛋白互作网络的构建及关键

表 1 蟾毒灵治疗卵巢癌的潜在作用基因

Table 1 Potential genes of bufalin in the treatment of ovarian cancer

序号	基因名称	序号	基因名称	序号	基因名称
1	ACR	37	S100A11	73	DUT
2	AKR1C4	38	S100B	74	EIF2AK3
3	ALK	39	SDHA	75	ENO1
4	ANXA3	40	SENP7	76	FAS
5	ARHGEF12	41	SPEN	77	FASLG
6	CCND1	42	STARD3	78	GRB2
7	CHAT	43	SULT2A1	79	GSTP1
8	CLIC4	44	TAB1	80	HNRNPH1
9	CLPP	45	THRB	81	HNRNPK
10	CUL5	46	UAP1	82	HSPA5
11	EIF2B1	47	USP14	83	JUN
12	ERBB2	48	USP19	84	KRT18
13	F13A1	49	VAV3	85	MAP2K7
14	F2	50	HSPB1	86	MAP3K3
15	FBP1	51	CYP3A4	87	MAPK8
16	FGA	52	IL1B	88	MMP1
17	GALM	53	MAPK1	89	MYC
18	HDAC6	54	MAPK3	90	NOS2
19	HMGB2	55	MMP9	91	PPA1
20	IGKC	56	CYCS	92	PSMA3
21	MAPK9	57	FOS	93	PTGS2
22	MB	58	RELA	94	PTK2
23	MMP14	59	BCL2	95	RHOA
24	MMP2	60	CASP3	96	ROCK1
25	MS4A1	61	ENDOG	97	RPLP0
26	MT-CYB	62	PARP1	98	RPSA
27	MYNN	63	TNF	99	SARNP
28	MYO6	64	ABCB1	100	SOS1
29	NAT1	65	ACTB	101	TARDBP
30	PAX6	66	ACTG1	102	TPT1
31	PEBP1	67	AKT1	103	VEGFA
32	PMP2	68	APAF1	104	GSK3B
33	PNLIPRP1	69	AR	105	CYP3A5
34	POLB	70	CASP9	106	TNFRSF10A
35	POLR2H	71	DDIT3	107	MYB
36	RPA1	72	DNAJB11		

靶基因的筛选 将得到的 107 个交集靶点导入 STRING 数据库,筛除游离靶点蛋白,生成共有 568 条边的蛋白互作网络图(图 1)。根据 PPI 网络,使用 Cytoscape 软件中 cytohubba 插件^[23]进行拓扑结构分析,计算每个节点的 Degree 值。节点颜色越深, Degree 值越大,说明其为关键靶基因的可能性越大。将靶点蛋白网络可视化(图 2),筛选出前 20 位关键基因,详见表 2。

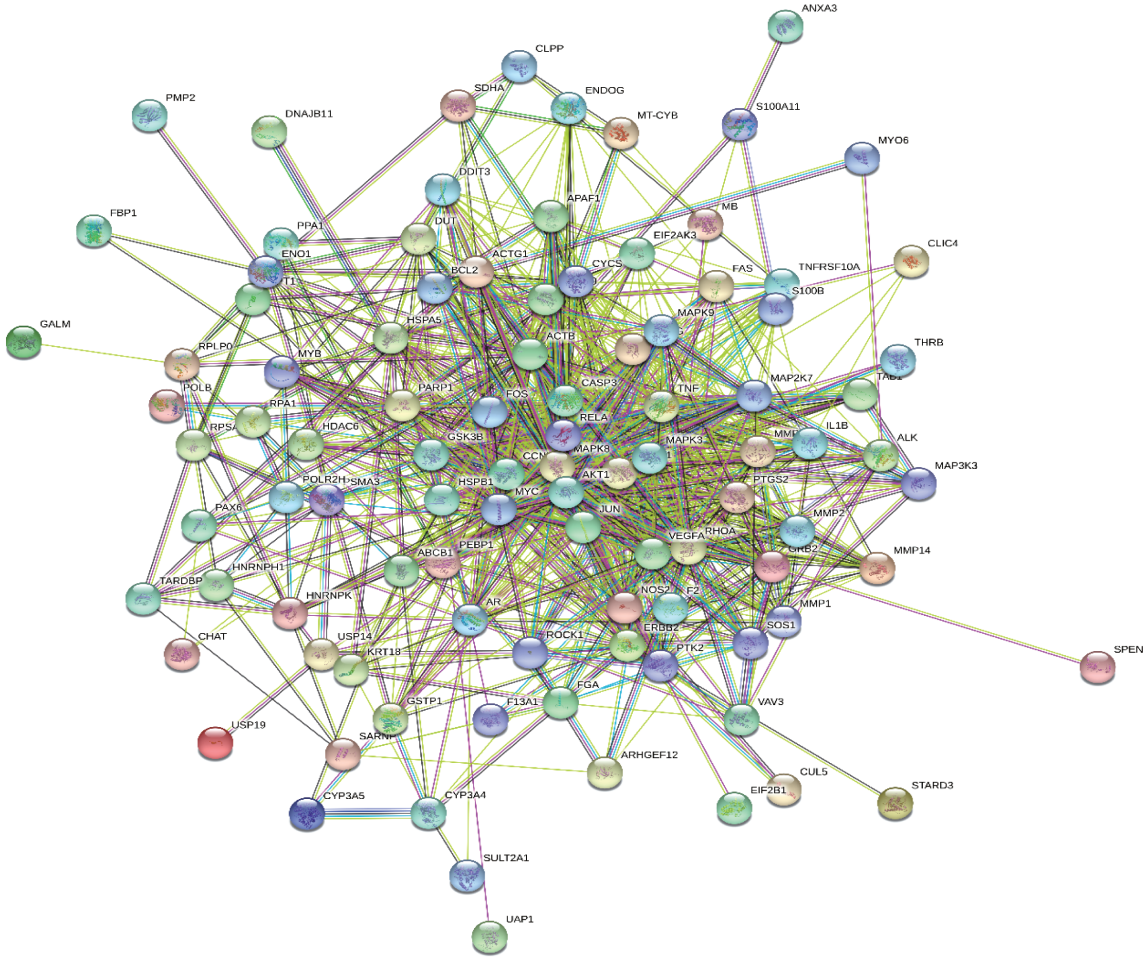


图 1 蟾毒灵治疗卵巢癌的蛋白互作网络
Figure 1 Protein interaction network of bufalin in the treatment of ovarian cancer

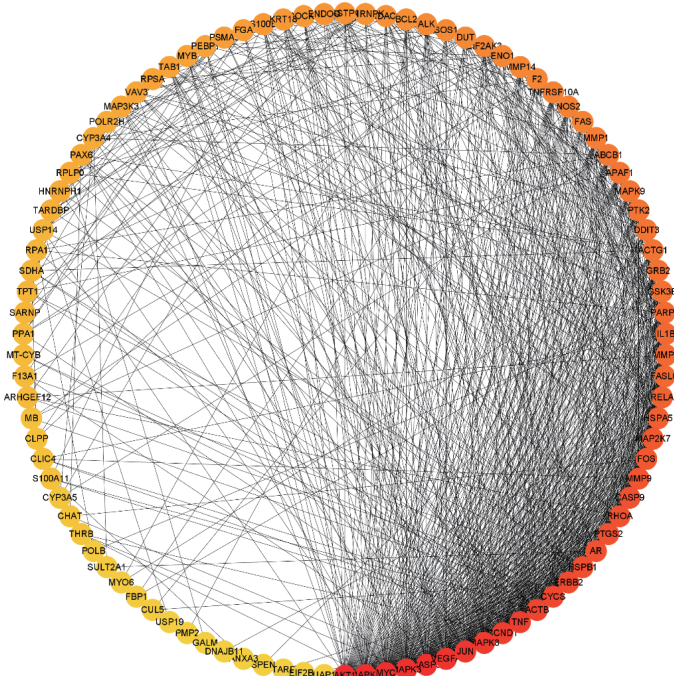
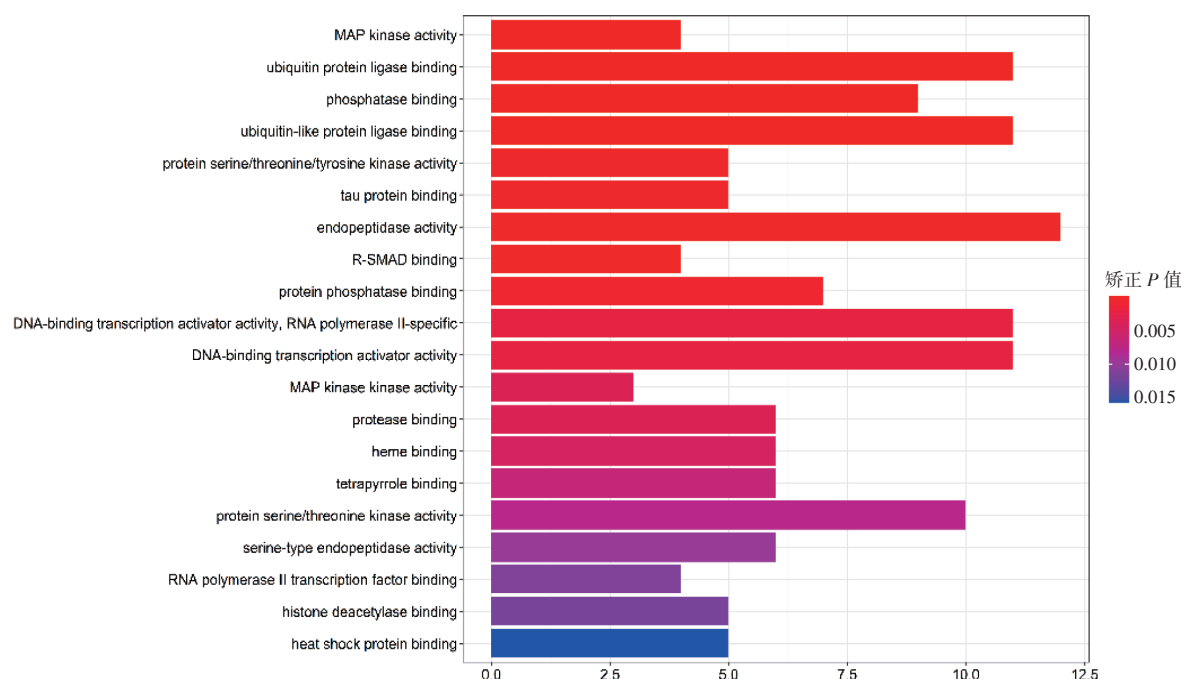


图 2 蟾毒灵治疗卵巢癌的靶点蛋白调控网络
Figure 2 Protein regulatory network of bufalin in the treatment of ovarian cancer

表 2 蟾毒灵治疗卵巢癌的互依关键基因及度值(前 20 位)
Table 2 Key genes and degree value (top 20) of bufalin in the treatment of ovarian cancer

序号	基因名称	度值(Degree 值)	序号	基因名称	度值(Degree 值)
1	AKT1	54	11	ACTB	44
2	MAPK1	51	12	CYCS	41
3	MYC	51	13	ERBB2	40
4	CASP3	50	14	HSPB1	35
5	MAPK3	50	15	AR	34
6	VEGFA	48	16	CASP9	34
7	JUN	47	17	PTGS2	34
8	MAPK8	46	18	RHOA	34
9	CCND1	45	19	MMP9	33
10	TNF	45	20	FOS	32

2.1.5 蟾毒灵治疗卵巢癌作用靶点功能富集分析
利用 R 软件对蟾毒灵治疗卵巢癌作用靶基因进行 GO 功能分析, 共筛选出 51 个符合标准的结果, 按照 *P* 值明显程度对前 20 位结果绘制功能富集条形图 (图 3), 条形长度代表富集基因数目。



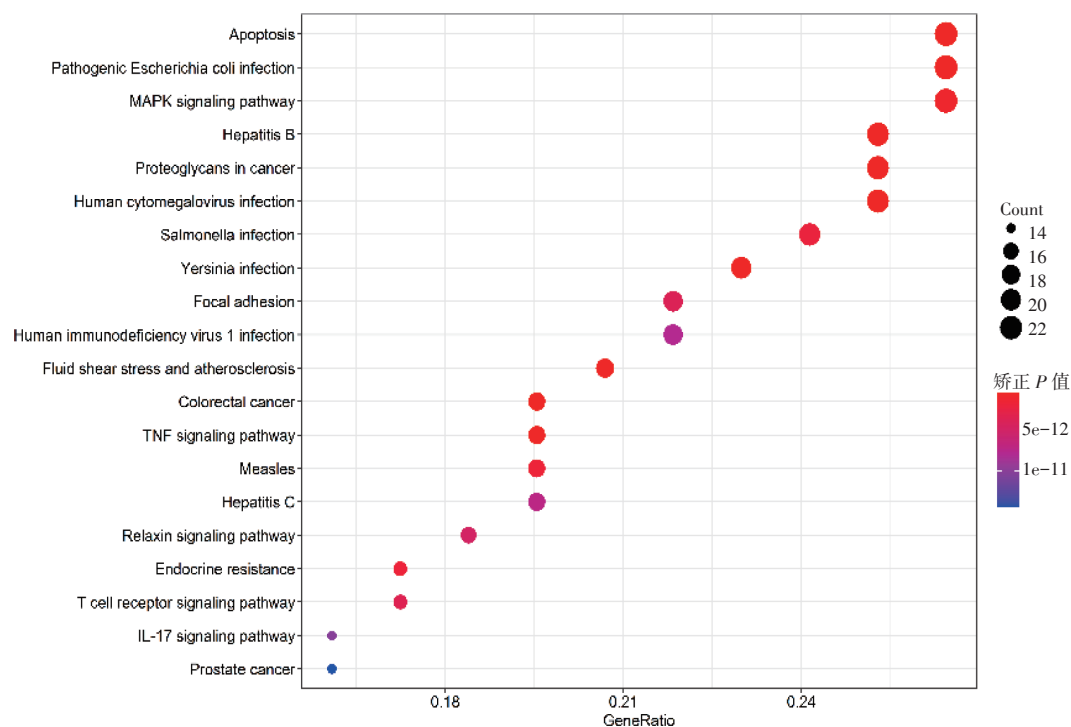
注：横坐标为所富集基因数目，纵坐标为 GO 注释

图 3 蟾毒灵治疗卵巢癌的 GO 功能富集分析

Figure 3 GO enrichment analysis of bufalin in the treatment of ovarian cancer

2.1.6 蟾毒灵治疗卵巢癌作用靶点通路富集分析 利用 R 软件对蟾毒灵治疗卵巢癌作用靶基因进行 KEGG 通路富集分析，共筛选出 141 个符合标准的结果。按照靶基因富集程度对前 20 位结果绘制通路富

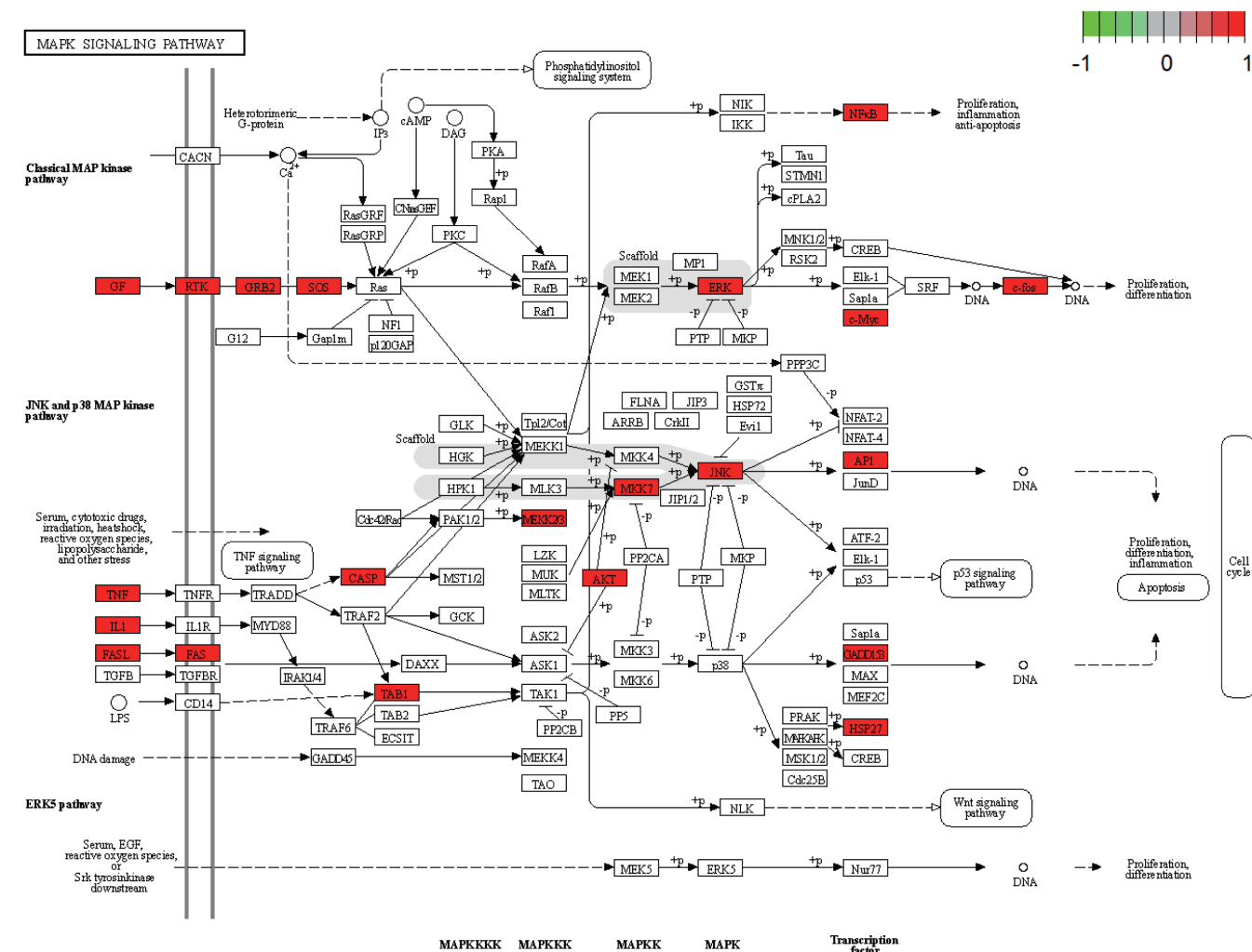
集气泡图，结果见图 4。根据 KEGG 富集结果结合关键靶点及 GO 富集我们认为，MAPK 信号通路与蟾毒灵治疗卵巢癌密切相关。运用 R 软件对 MAPK 信号通路进行分析并绘制靶点-通路网络图，具体见图 5。



注：横坐标为富集基因数占总基因数的比例，纵坐标为富集通路

图 4 蟾毒灵治疗卵巢癌的 KEGG 通路分析

Figure 4 KEGG pathway analysis of bufalin in the treatment of ovarian cancer



Data on KEGG graph
Rendered by Pathview

注：红色部分为潜在作用靶基因

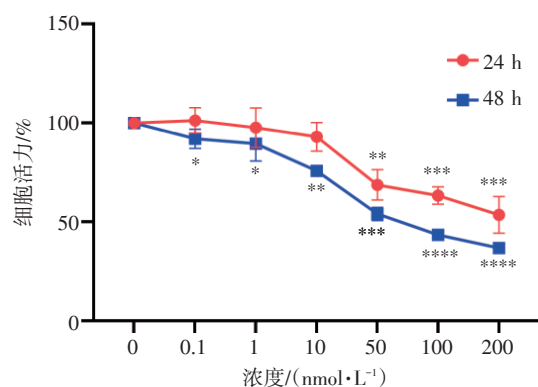
图5 MAPK 信号通路图

Figure 5 MAPK signaling pathway diagram

2.2 蟾毒灵对 SKOV3 细胞增殖能力及 MAPK 信号通路的影响

2.2.1 蟾毒灵对 SKOV3 细胞增殖的抑制作用 结果见图 6。与空白对照组比, 药物干预 24、48 h 后, 部分浓度的蟾毒灵对 SKOV3 细胞的增殖有明显抑制作用, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$), 且随着药物浓度增加, 对细胞的抑制作用增强, 呈现剂量依赖性。24 h IC_{50} 为 211.054 nmol (95% $CI=147.299 \sim 356.793$ nmol), 48 h IC_{50} 为 70.215 nmol (95% $CI=46.167 \sim 115.153$ nmol)。

2.2.2 蟾毒灵对 SKOV3 细胞中 p38MAPK、p-p38MAPK、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达的影响 ERK1/2 与 p38MAPK 均为 MAPK 信号通路关键蛋白, 并在通路中发挥重要作用, 结果见图 7。结果显示, 与空白对照组比较, 经过不同浓度蟾毒灵处理后的人 SKOV3 细胞中, p-ERK1/2 及 p-p38MAPK 蛋白表达均出现

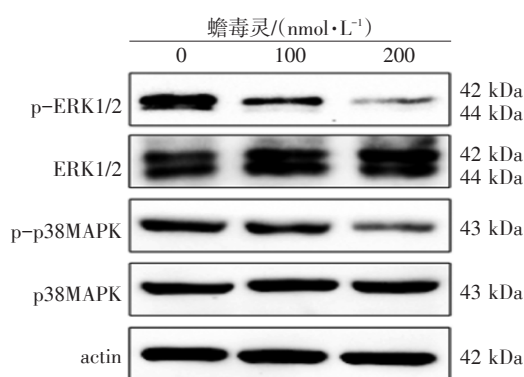


注：与空白对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

图6 蟾毒灵对 SKOV3 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 6 The inhibitory effect of bufalin on SKOV3 cell proliferation ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

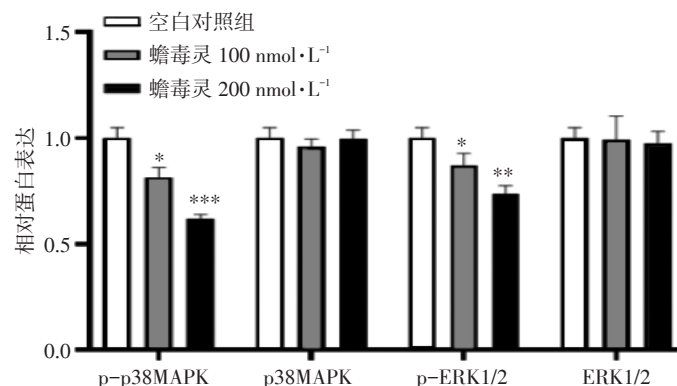
明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), ERK1/2 及 p38MAPK 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注：与空白对照组比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$

图 7 MAPK 信号通路蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 7 Protein expression of MAPK signaling pathway($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



3 讨论

卵巢癌属中医的“癥瘕”范畴，中医认为其形成机制与《黄帝内经》“阳化气，阴成形”理论有关。全球每年约有 15 万人死于卵巢癌^[24]，并且卵巢癌大多预后不佳^[25]。中药在改善预后、减少化疗产生的副作用、增强放化疗疗效等方面彰显出越来越明显的优势。蟾毒灵作为一种传统中药，是从蟾酥中分离出来的单体，《本草经典补遗》提及：蟾酥性毒质黏，能辟邪而开窍，可拔毒以消痈。基于我们之前的研究^[26-32]发现，蟾毒灵在多种肿瘤中均具有显著成效。

本研究利用网络药理学共筛选出 107 个蟾毒灵治疗卵巢癌的作用靶点，并通过 PPI 网络对作用靶点进行预测及筛选，结果显示 AKT1、MAPK1、MYC、CASP3、MAPK3 等可能为蟾毒灵治疗卵巢癌的关键靶点。GO 富集分析显示共涉及 MAP 激酶活性、泛素蛋白连接酶结合、磷酸酶结合等 51 种生物学功能。KEGG 富集分析共富集出细胞凋亡、MAPK 信号通路、乙型肝炎信号通路等 141 条通路，其中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路富集的基因数目较多且 P 值最为显著。结合功能富集结果及关键基因，我们认为 MAPK 信号通路可能与蟾毒灵治疗卵巢癌的机制密切相关。体外实验表明，蟾毒灵对于卵巢癌细胞的增殖具有抑制作用，并且可以通过抑制 ERK1/2 与 p38MAPK 蛋白磷酸化来调节 MAPK 信号通路。

MAPK 信号通路是人体内重要的通路^[33]，主要通过磷酸化关键蛋白靶点将细胞外信号和细胞内信号传递到细胞内的调节网络。丝裂原活化蛋白激酶是一种重要的信号元件，可将细胞外刺激转化为多种

细胞反应，其中 ERK1/2 与 p38MAPK 均为其重要亚族，被有丝分裂原激活时，其在多种肿瘤中被上调^[34-37]，尤其是 p38MAPK 在遗传毒性应激诱导的自噬与凋亡之间的相互作用中起着关键作用^[38]。

综上所述，本研究利用网络药理学、体外实验等方法对蟾毒灵治疗卵巢癌的靶点及其作用进行了阐述，为临床上应用蟾毒灵治疗卵巢癌提供了理论依据。但大部分靶点库都是基于现有靶点，仍有许多未知的潜在靶点。网络药理学的出现让我们找到了卵巢癌研究的新方向，有助于开发药物潜力，同时，蟾毒灵治疗卵巢癌的深入机制仍待我们进一步完善。

参考文献：

- [1] COOK S A, TINKER A V. PARP inhibitors and the evolving landscape of ovarian cancer management: a review[J]. BioDrugs, 2019, 33 (3): 255-273.
- [2] OTTEVANGER P B. Ovarian cancer stem cells more questions than answers [J]. Semin Cancer Biol, 2017, 44(6): 67-71.
- [3] CORRADO G, SALUTARI V, PALLUZZI E, et al. Optimizing treatment in recurrent epithelial ovarian cancer [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2017, 17(12): 1147-1158.
- [4] KIM J Y, CHO C H, SONG H S. Targeted therapy of ovarian cancer including immune check point inhibitor [J]. Korean J Intern Med, 2017, 32(5): 798-804.
- [5] 王碧云. 雷火灸配合化疗治疗上皮性卵巢癌的疗效观察 [J]. 上海针灸杂志, 2020, 39(11): 1409-1413.
- [6] WU S H, BAU D T, HSIAO Y T, et al. Bufalin induces apoptosis in vitro and has antitumor activity against human lung cancer xenografts in vivo [J]. Environ Toxicol, 2017, 32(4): 1305-1317.
- [7] ZHANG Y, DONG Y, MELKUS M W, et al. Role of P53-senescence induction in suppression of LNCaP prostate cancer growth by cardiotonic compound bufalin [J]. Mol Cancer Ther, 2018, 17

- (11): 2341–2352.
- [8] CAO F, GONG Y B, KANG X H, et al. Degradation of MCL-1 by bufalin reverses acquired resistance to osimertinib in EGFR-mutant lung cancer[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 379: 114662.
 - [9] FENG Y L, CHEN Y G, MENG Y B, et al. Bufalin suppresses migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells elicited by poly(I: C) therapy[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(5): e1426434.
 - [10] LIU T, JIA T, YUAN X, et al. Development of ocreotide-conjugated polymeric prodrug of bufalin for targeted delivery to somatostatin receptor 2 overexpressing breast cancer in vitro and in vivo[J]. *Int J Nanomedicine*, 2016, 11: 2235–2250.
 - [11] SUN X, NG T T H, SHAM K W Y, et al. Bufalin, a Traditional Chinese Medicine compound, prevents tumor formation in two murine models of colorectal cancer[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2019, 12(10): 653–666.
 - [12] KIM S. Getting the most out of PubChem for virtual screening [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2016, 11(9): 843–855.
 - [13] WANG X, SHEN Y, WANG S, et al. PharmMapper 2017 update: a web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(W1): W356–W360.
 - [14] DAVIS A P, GRONDIN C J, JOHNSON R J, et al. The comparative toxicogenomics database: update 2019[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D948–D954.
 - [15] SZKLARCZYK D, SANTOS A, VON MERING C, et al. STITCH 5: augmenting protein-chemical interaction networks with tissue and affinity data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D380–D384.
 - [16] STELZER G, DALAH I, STEIN T I, et al. In-silico human genomics with GeneCards[J]. *Hum Genomics*, 2011, 5(6): 709–717.
 - [17] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362–D368.
 - [18] DONCHEVA N T, MORRIS J H, GORODKIN J, et al. Cytoscape StringApp: network analysis and visualization of proteomics data [J]. *J Proteome Res*, 2019, 18(2): 623–632.
 - [19] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139–140.
 - [20] HUANG Q, WU L Y, WANG Y, et al. GOMA: functional enrichment analysis tool based on GO modules[J]. *Chin J Cancer*, 2013, 32(4): 195–204.
 - [21] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 27–30.
 - [22] UniProt: a worldwide hub of protein knowledge[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D506–D515.
 - [23] WANG W, LOU W, DING B, et al. A novel mRNA-miRNA-lncRNA competing endogenous RNA triple sub-network associated with prognosis of pancreatic cancer[J]. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11(9): 2610–2627.
 - [24] WEBB P M, JORDAN S J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2017, 41(5): 3–14.
 - [25] NATANZON Y, GOODE E L, CUNNINGHAM J M. Epigenetics in ovarian cancer[J]. *Semin Cancer Biol*, 2018, 51(8): 160–169.
 - [26] CHEN F, ZHU L, HU J, et al. Bufalin attenuates triple-negative breast cancer cell stemness by inhibiting the expression of SOX2/OCT4[J]. *Oncol Lett*, 2020, 20(5): 171.
 - [27] SONG J C, ZOU D, ZHAO X X, et al. Bufalin inhibits human diffuse large B-cell lymphoma tumorigenesis by inducing cell death through the Ca^{2+} /NFATC1/cMYC pathway[J]. *Carcinogenesis*, 2021, 42(2): 303–314.
 - [28] 张晔, 赵明芳, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵诱导人胃癌SGC7901细胞自噬与凋亡的研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(10): 2155–2157.
 - [29] 曲秀娟, 曲晶磊, 刘云鹏, 等. 抑制NF- κ B通路增强蟾蜍灵诱导的HL-60细胞凋亡[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(11): 2039–2042.
 - [30] 曲秀娟, 赵明芳, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵在诱导HL-60细胞凋亡时对SYK和CBL家族蛋白的影响[J]. *中国实验血液学杂志*, 2009, 17(1): 65–68.
 - [31] 肖家雯, 曲秀娟, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵联合ATRA诱导HL-60细胞分化并上调Syk表达[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(7): 1227–1229.
 - [32] 张晔, 田昕, 刘云鹏, 等. 蟾蜍灵对顺铂耐药胃癌SGC7901细胞增殖与凋亡的影响及其作用机制[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(4): 498–500, 514.
 - [33] LEE S, RAUCH J, KOLCH W. Targeting MAPK signaling in cancer: mechanisms of drug resistance and sensitivity[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1102.
 - [34] WAGNER E F, NEBREDÁ Á R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537–549.
 - [35] LU H, TRAN L, PARK Y, et al. Reciprocal regulation of DUSP9 and DUSP16 expression by HIF1 controls ERK and p38MAP kinase activity and mediates chemotherapy-induced breast cancer stem cell enrichment[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15): 4191–4202.
 - [36] SLATTERY M L, LUNDGREEN A, WOLFF R K. MAP kinase genes and colon and rectal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(12): 2398–2408.
 - [37] KIM S H, CHOO G S, YOO E S, et al. Silymarin induces inhibition of growth and apoptosis through modulation of the MAPK signaling pathway in AGS human gastric cancer cells[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(5): 1904–1914.
 - [38] SUI X, KONG N, YE L, et al. p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents[J]. *Cancer Lett*, 2014, 344(2): 174–179.

(编辑: 修春)