

基于网络药理学的清肺合剂抗肺癌作用机制研究

盛孔胜^{1,2}, 朱俊峰², 孔思思², 胡晓平², 李清林², 黄萍^{1,3*} (1.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 2.浙江省肿瘤医院药剂科, 杭州 310022; 3.浙江省人民医院药剂科, 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310010)

摘要: 目的 采用网络药理学方法阐明清肺合剂“多成分-多靶点-多途径”的作用理念,为进一步研究清肺合剂抗肺癌的药效物质基础和作用机制提供理论依据。方法 通过检索 TCMSP 数据库,结合口服生物利用度($OB \geq 30\%$)、小肠上皮细胞渗透性($Caco-2 \geq -0.4$)和类药性分析($DL \geq 0.18$)参数,筛选清肺合剂的活性成分;通过 TCMSP、STITCH、Swiss 数据库预测活性成分的靶点;通过 TCMSP、TTD、PharmGKB 数据库筛选出肺癌疾病相关基因;利用 Cytoscape 软件构建“活性成分-靶点-疾病”网络图;运用 String 数据库进行蛋白相互作用分析,建立 PPI 网络图;运用 DAVID 数据库进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析。结果 经筛选后得到清肺合剂的 108 个活性成分,对应 357 个靶点。挖掘得到肺癌靶点 412 个,其中成分-疾病交互靶点 38 个,参与细胞增殖和凋亡、血管生成、有丝分裂等生物过程,涉及多种肿瘤通路、焦点黏附通路、血管内皮生长因子信号通路、p53 信号通路、ErbB 信号通路。结论 清肺合剂通过多成分、多靶点、多通路调控细胞的分化、增殖、凋亡,调节血管生成,调控有丝分裂和减数分裂以及调节炎症反应从而发挥抗肺癌作用。

关键词: 清肺合剂; 网络药理学; 肺癌; 血管生成; 细胞凋亡

中图分类号: R966 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)08-0926-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.08.006

引用本文: 盛孔胜, 朱俊峰, 孔思思, 等. 基于网络药理学的清肺合剂抗肺癌作用机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 926-934.

Study on the Mechanisms of Qingfei Mixture in Lung Cancer Treatment Based on Network Pharmacology

SHENG Kongsheng^{1,2}, ZHU Junfeng², KONG Sisi², HU Xiaoping², LI Qinglin², HUANG Ping^{1,3*} (1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Pharmacy Department, Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China; 3.Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To elucidate the multicomponent-multitarget-multipathway nature of Qingfei mixture using network pharmacology strategy and to provide a theoretical basis for further study on the pharmacodynamic basis and action mechanisms of Qingfei mixture against lung cancer. **METHODS** The active components with oral bioavailability($\geq 30\%$), Caco-2 cell permeability(≥ -0.4) and drug-like analysis(≥ 0.18) in Qingfei mixture were screened by searching TCMSP database. TCMSP, STITCH and Swiss databases were used to predict the targets of active components; the lung cancer disease-related genes were screened by TCMSP, TTD, and PharmGKB databases; the “active component-target-disease” network was constructed using Cytoscape software; the protein interaction analysis was performed using String database and a PPI network was established; DAVID database was used for GO function annotation and KEGG pathway enrichment analysis. **RESULTS** After screening, 108 active components of Qingfei mixture were obtained and 357 corresponding targets were collected. The 412 lung cancer targets were obtained, including 38 component-disease interaction targets, which were involved in cell proliferation and apoptosis, angiogenesis, mitosis and other biological processes, and involved in multiple cancer pathways, focal adhesion pathway, vascular endothelial growth factor signaling pathway, p53 signaling pathway, ErbB signaling pathway. **CONCLUSION** Qingfei mixture can exert anti-lung cancer effects through the regulation of cell differentiation, proliferation, apoptosis, angiogenesis, mitosis and meiosis, and inflammatory response.

KEYWORDS: Qingfei mixture; network pharmacology; lung cancer; angiogenesis; apoptosis

原发性支气管肺癌(以下简称“肺癌”)是最常见的肺部原发性恶性肿瘤,绝大多数肺癌起源于支气管黏膜上皮。肺癌的发病率居肿瘤的首位,《中国癌症控制策略研究报告》发布警示:“肺癌

基金项目: 浙江省中医药重点研究项目(2018ZZ006, 2020ZZ003); 浙江自然科学基金/省药学会联合基金(LYY19H280001); 浙江省 151 人才第二层次培养项目(黄萍); 浙江省卫生创新人才培养项目(黄萍)

作者简介: 盛孔胜, 男, 硕士 Tel: 15700067400 E-mail: shengkongsheng@163.com *通信作者: 黄萍, 女, 博士, 主任药师, 硕士 Tel: (0571)88122438 E-mail: huangping1841@zjcc.org.cn

是我国第一大癌症”^[1]。中医认为本病的病机多因风寒暑湿燥火等外因侵袭肺脏，日久不散，瘀毒化热，可致肿瘤。同时与患者的体质较弱、先天性缺陷、吸烟、七情太过和不及有关。中医药治疗肺癌可以扶正抗癌，有利于稳定瘤灶，改善免疫功能，提高生活质量，并且对于化疗药物可起到增效减毒的作用。随着现代医学对中医药的研究越来越深入，中医药在临床上取得的疗效也越来越显著。

清肺合剂也称中肺合剂，是浙江省肿瘤医院依据中晚期肺癌经验方开发的医院制剂，由白花蛇舌草、浙贝母、夏枯草、半枝莲、白茅根、仙鹤草、重楼、防己、龙葵、天龙 10 味中药组方而成，以清热化痰解毒、软坚散结消肿为主，又伍以活血、止血补虚之品，使肺中痰热得以清化，肿块得以消散，痰中之血得止，肺虚得固。目前清肺合剂主要用于晚期肺癌的治疗，早、中期肺癌的辅助治疗以及肺癌、肺炎、放射性肺炎引起的咳嗽多痰、胸痛、咳血等症的治疗，临床疗效获肯定^[2-4]。

本研究采用网络药理学方法，探讨清肺合剂治疗肺癌的药效物质基础及作用机制，阐明其“多成分-多靶点-多途径”的系统作用机制，为进一步研究清肺合剂抗肺癌作用机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络数据库和分析软件

中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)；国家人口与健康科学数据共享平台(NSDSP)数据库(<http://cowork.cintcm.com/engine/search?channelid=58730>)；TTD 数据库(<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd/>)；PharmGKB 数据库(<http://www.pharmGKB.org>)；Genecards 数据库(<http://www.genecards.org/>)；STITCH 数据库(<http://stitch.embl.de/>)；Swiss 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)；String 数据库(<https://string-db.org/>)；DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)；Cytoscape 软件及其相关插件；OmicShare 在线软件(<http://www.omicshare.com/>)。

1.2 清肺合剂活性成分收集与筛选

本研究主要依托西北农林科技大学生命科学院创建的 TCMSP 对清肺合剂的化学成分进行查询汇总，同时参考了 NSDSP 以及中国药典。ADME 模块是 TCMSP 数据库和分析平台的一个核心部

分，其中生物口服利用度(OB)指示 1 个分子在口服药物开发中是否有较好的药物吸收度和合适的药物分配，一般认为 $OB>30\%$ 的分子具有较好的口服生物利用度；类药性(drug-likeness, DL)指示 1 个分子是否包含一些特定的功能集团或者具有与大多数药物相同或相似的物理特征，一般认为 $DL>0.18$ 的分子具有较好的类药性；小肠上皮细胞渗透性(Caco-2)指示一个分子在小肠是否有较好的吸收，一般认为 $Caco-2>-0.4$ 的分子具有较好的小肠上皮细胞渗透性^[5]。通过 TCMSP 数据库中的 ADME 模块，设置参数 $OB\geq 30\%$ 、 $Caco-2\geq -0.4$ 、 $DL\geq 0.18$ 进行活性成分筛选。一些重要的化学成分，例如中国药典中出现的重楼药材的质控检测指标重楼皂苷 I、II、IV，虽然未通过 ADME 筛选也纳入其中。

1.3 靶标基因收集及网络构建

主要依据 TCMSP 数据库收集化学成分的对应该靶点，其次通过 STITCH、Swiss 数据库应用三维分子相似性方法预测化学成分的潜在靶点作为补充。同时，通过 TCMSP、TTD、PharmGKB 数据库收集肺癌疾病相关靶基因，并进行合并、去重。使用 Cytoscape 3.6 软件构建“中药-成分-靶标-疾病”网络图，筛选出成分靶点与疾病靶点的交互靶点。再利用 Centiscape 插件分析网络拓扑性质的度(Degree)，度越高说明化合物或靶点在网络中的连接越多，指示其在疾病治疗中发挥重要的作用。

1.4 蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)分析

运用 String 数据库对交互靶点进行 PPI 分析，将得到的数据导入 Cytoscape 进行可视化，并利用 Centiscape 插件分析清肺合剂治疗肺癌的关键靶点。

1.5 GO 功能注释和 KEGG 通路分析

使用 DAVID 数据库对交互靶点进行 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析，并使用 Omicshare 对结果进行可视化。

2 结果

2.1 清肺合剂活性成分收集与筛选

基于 TCMSP 数据库共得到 385 种化学成分，其中浙贝母 20 种，基于 NSDSP 数据库补充了 44 种化学成分，此外收入药典中重楼的检测成分 3 种，以及其他常见化学成分 12 种。进一步以 $OB\geq 30\%$ 、 $Caco-2\geq -0.4$ 、 $DL\geq 0.18$ 为标准，筛选得到总计 108 个活性成分用于后续“中药-成分-靶点-疾病”分析，见表 1。

表 1 清肺合剂主要活性成分

Tab. 1 Main active components of Qingfei mixture

编号	中药名称	活性成分
1	浙贝母	Pelargonidin, Beta-sitosterol, Peimisine, Zhebeiresinol, Ziebeimine, Chaksine, Verticinone, Isoverticine, Sipeimine
2	白花蛇舌草	2,3-dimethoxy-6-methyanthraquinone, Poriferasterol, (4aS,6aR,6aS,6bR,8aR,10R,12aR,14bS)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid, 2-methoxy-3-methyl-9,10-anthraquinone, Stigmasterol, Beta-sitosterol, Quercetin, Ursolic acid, Oleanolic acid, P-coumaric acid, Caffeic acid
3	龙葵	40957-99-1, Beta-carotene, Sitosterol, Diosgenin, Solanocapsine, CLR, Quercetin
4	半枝莲	(2R)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)chroman-4-one, 5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavanone, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavanone, 5-hydroxy-7,8-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromone, 7-hydroxy-5,8-dimethoxy-2-phenyl-chromone, Chrysin-5-methylether, 9,19-cyclolanost-24-en-3-ol, Campesterol, CLR, Beta-sitosterol, Rivularin, Sitosteryl acetate, Stigmasta-5,22-dien-3-ol-acetate, Stigmasterol, Wogonin, Dinatin, 24-Ethylcholest-4-en-3-one, Baicalein, 6-Hydroxynaringenin, Salvigenin, Sitosterol, Eriodictyol, Daucosterol, Luteolin, Moslosooflavone, Quercetin, Apigenin, Scutellarin, Scutellarein
5	白茅根	Luteolinidin, 6-Methoxyflavone, Beta-sitosterol, Bifendate, Stigmasterol
6	仙鹤草	Kaempferol, (+)-Catechin, Luteolin, Quercetin
7	夏枯草	Beta-sitosterol, Kaempferol, Spinasterol, Stigmasterol, Delphinidin, Luteolin, Poriferasterol monoglucoside, Stigmast-7-enol, Morin, Quercetin, Ursolic acid, Oleanolic acid
8	防己	N-Methylflindersine, Tetraneurin A, Hesperetin, Beta-sitosterol, Tetrandrine, (+)-Limonene
9	天龙	Cernuine, Ugonin A, Ugonin B, Ugonin C, Ugonin D, Ugonin J, Ugonin K, Ugonin L, Ugonstilbene B, Chrysotricine, Ugonin E, Ugonin G, Ugonin H, (-)-Nicotine
10	重楼	Dioscin, Polyphyllin C, Polyphyllin E, Polyphyllin F, Polyphyllin G, Polyphyllin H, Polyphyllin I, Polyphyllin II, Polyphyllin VI

2.2 靶标基因收集及网络构建

收录 TCMSP 数据库提供的化学成分对应靶点, 通过 STITCH、Swiss 数据库应用三维分子相似性方法预测化学成分的潜在靶点作为补充, 最终得到由 108 个化合物对应的 2 416 个靶点, 合并去重后共得 357 个不同靶点。通过 TCMSP、TTD、PharmGKB 数据库检索“Lung Cancer”收集肺癌疾病相关靶基因, 合并去重后共得到肺癌靶点 412 个。将化合物靶点与肺癌靶点取交集, 共得 38 个共有靶基因, 分别是 PTGS2、BCL2、TOP2A、PPARG、AKT1、VEGFA、MMP1、MAPK1、MMP9、MMP2、PRKCA、BIRC5、TOP1、EGFR、ERBB2、CHEK1、CDK2、MMP3、OPRM1、CDK4、MPO、CDKN2A、NFE2L2、PTEN、CXCL8、HSPB1、ERBB3、MDM2、XIAP、KDR、MET、NUF2、IL2、PECAM1、IL2RA、ALB、HGF、TEP1。构建“中药-活性成分-靶标-疾病”网络图(C-T network-1), 见图 1。C-T network-1 共有 449 个节点(92 个活性成分节点和 357 个靶标节点), 形成 2 416 个关系对, 化合物的平均节点度为 26.2, 靶标的平均节点度为 6.8。剔除非肺癌靶标建立“中药-活性成分-肺癌靶标”网络图二(C-T network-2), 见图 2。C-T network-2 共有 102 个节点(其中 64 个活性成分节点, 38 个靶标节点), 形成 362 个关系对, 化合物平均节点度为 5.6, 靶标

平均节点度为 9.52。

由网络关系图可见, 一些活性成分是多种药材的共有成分, 且能够与多个靶标形成关系对, 例如白花蛇舌草、龙葵、半枝莲、仙鹤草、夏枯草共有成分 Quercetin 能够同时作用于 154 个靶标, 其中包含肺癌靶标 26 个, 见表 2。综合 2 个网络, Degree1 和 Degree2 均在平均节点度 2 倍以上(Degree1 $\geq$ 52.4 和 Degree2 $\geq$ 11.2)的关键化合物为槲皮素(Quercetin)、芹菜素(Apigenin)、木犀草素(Luteolin)。

肺癌靶标能与多个活性成分形成关系对, 例如 PTGS2 连接到 53 个化合物, BCL2 连接到 29 个化合物, 见表 3。在肺癌靶点中, Degree 值较高的靶点多数与细胞的增殖、分化、凋亡相关, 如 BCL2、PPARG、AKT1、VEGFA、MAPK1、MMP2、PRKCA、BIRC5、EGFR、CDKN2A 等。其中 AKT1、VEGFA、PRKCA、KDR 与血管生成相关; TOP2A、CDK2、CDK4、XIAP、HGF 与调控有丝分裂和减数分裂相关; PRKCA、CXCL8、IL2、PECAM1、IL2RA 与炎症反应相关。其中与血管生成相关靶点和与调控有丝分裂和减数分裂相关靶点 degree 值均较靠前, 与炎症反应相关靶点 degree 值较靠后, 提示清肺合剂抗肺癌的机制可能与调控细胞的分化、增殖、凋亡, 调节血管生成, 调控有丝分裂和减数分裂以及调节炎症反应相关。

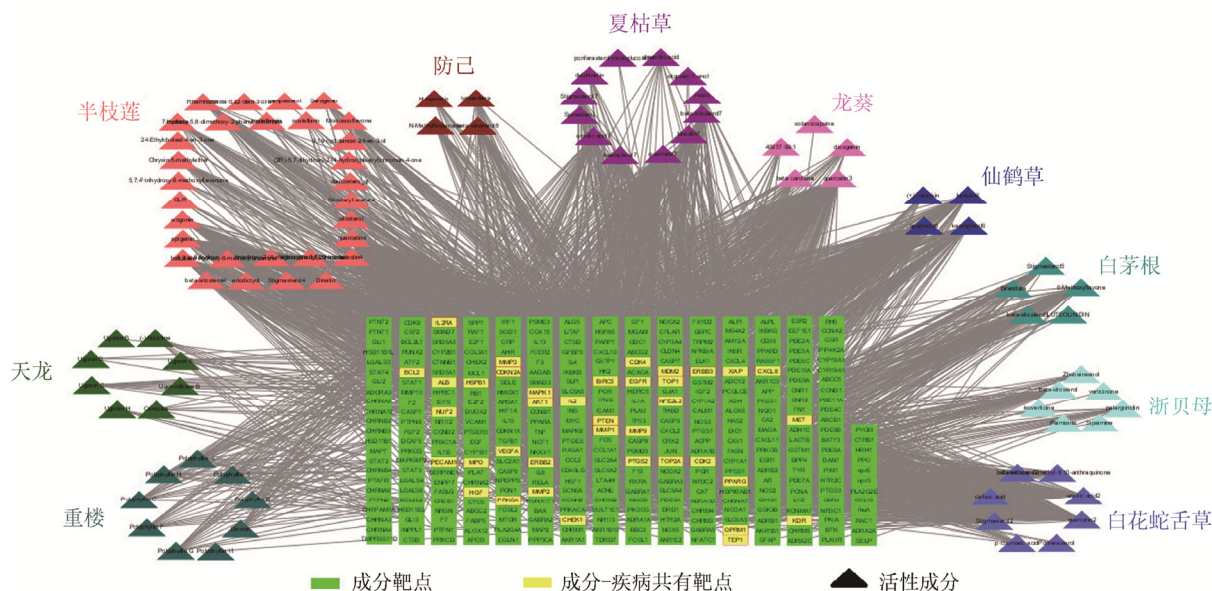


图1 中药-活性成分-靶标-疾病网络图1

Fig. 1 Herbal-compound-target-disease network-1

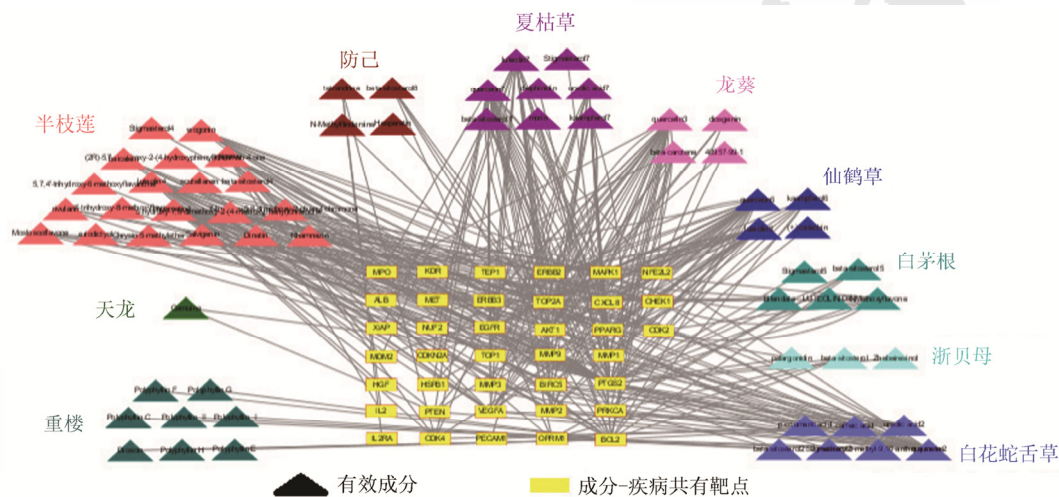


图2 中药-活性成分-靶标-疾病网络图2

Fig. 2 Herbal-compound-target-disease network-2

表2 活性成分 Degree 值

Tab. 2 Degree value of the active components

活性成分	来源	Degree1	Degree2	百分比/%
Quercetin	白花蛇舌草、龙葵、半枝莲、仙鹤草、夏枯草	154	26	17
Apigenin	半枝莲	80	13	16
Kaempferol	仙鹤草、夏枯草	63	8	13
Luteolin	半枝莲、仙鹤草、夏枯草	57	18	32
Ursolic acid	白花蛇舌草、夏枯草	55	10	18
6-methoxyflavone	白茅根	45	7	16
Wogonin	半枝莲	44	11	25
Beta-sitosterol	浙贝母、白花蛇舌草、半枝莲、白茅根、夏枯草、防己	38	4	11
Baicalin	半枝莲	37	6	16
Stigmasterol	白花蛇舌草、半枝莲、白茅根、夏枯草	31	1	3
2-methoxy-3-metHyl-9, 10-anthraquinone	白花蛇舌草	31	2	6
7-hydroxy-5, 8-dimethoxy-2-phenyl-chromone	半枝莲	26	5	19
5-hydroxy-7, 8-dimethoxy-2-(4-methoxyphenyl)chromone	半枝莲	26	4	15
Moslossooflavone	半枝莲	25	5	20
Rhamnazin	半枝莲	23	6	26
Beta-carotene	龙葵	22	7	32

表 3 肺癌疾病靶点 Degree 值

Tab. 3 Degree values of lung cancer disease target

靶点	Degree	靶点	Degree
PTGS2	53	OPRM1	7
BCL2	29	CDKN2A	6
TOP2A	27	CXCL8	6
PPARG	22	MPO	6
AKT1	16	NFE2L2	6
VEGFA	15	PTEN	6
MAPK1	14	ERBB3	5
MMP1	14	HSPB1	5
MMP9	13	MDM2	4
MMP2	11	XIAP	4
PRKCA	11	KDR	3
BIRC5	10	MET	3
TOP1	9	NUF2	3
CDK2	8	IL2	2
CHEK1	8	PECAM1	2
EGFR	8	ALB	1
ERBB2	8	HGF	1
CDK4	7	IL2RA	1
MMP3	7	TEP1	1

2.3 PPI 分析

利用 String 数据库对 38 个交互靶点进行 PPI 分析,将得到的数据导入 Cytoscape 软件进行可视化,见图 3。38 个靶点共形成 147 条互作关系(置信度 ≥ 0.7),利用 Centiscape 插件进行分析得到基因 Degree 值排名,见表 4。排名靠前的关键基因均与细胞存活、生长、分化和血管生成相关。例如 degree 值最为靠前的 4 个靶点 AKT1、VEGFA、EGFR、MAPK1 均参与调节细胞的存活、生长、分化,AKT1 和 VEGFA 均参与血管生成,VEGFA 是在血管生成和内皮细胞生长中具有活性的生长因子。EGFR 影响各种表皮和上皮组织的生长。而调控有丝分裂和减数分裂以及调节炎症反应相关基因在 PPI 网络中处于较周边区域,这与 C-T network-2 中肺癌靶点 Degree 值所显示的含义一致。因此,清肺合剂抗肺癌的作用机制可能主要与调控组织血管生成相关,其次与调控有丝分裂和减数分裂以及参与调节炎症反应相关。

2.4 GO 功能注释和 KEGG 通路富集分析

通过 GO 功能注释分析发现,交互靶点在“生物过程”中,主要富集于细胞增殖和凋亡的调节,有丝分裂细胞周期的调节,见图 4。在“细胞组成”中,主要是影响胞外间质、胞内细胞器内腔、囊泡内腔、核腔,见图 5。在“分子功能”中,主要富集于蛋白质、蛋白激酶活性,核苷、核苷酸结合,见图 6。KEGG 通路富集分析结果显示,交互靶点富集于多种肿瘤通路。除此之外,焦点黏附

(Focal adhesion)、血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)、ErbB 信号通路(ErbB signaling pathway)通路也是清肺合剂发挥药效的重要通路,见图 7。

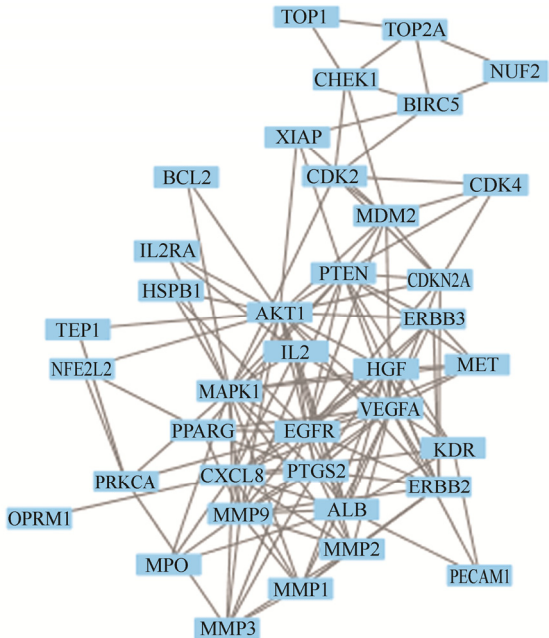


图 3 蛋白-蛋白相互作用网络图

Fig. 3 Protein-protein interaction network

表 4 蛋白互作网络 Degree 值排名

Tab. 4 Degree ranking of protein interaction network

基因名	Degree	基因名	Degree
AKT1	20	KDR	6
VEGFA	19	CDK2	6
EGFR	18	PPARG	6
MAPK1	17	BIRC5	5
CXCL8	15	CHEK1	5
PTEN	14	PRKCA	5
MMP9	14	CDK4	4
HGF	12	TOP2A	4
PTGS2	12	XIAP	4
ALB	11	MPO	4
ERBB2	11	IL2RA	3
MDM2	9	PECAM1	3
MMP2	9	HSPB1	3
CDKN2	8	NFE2L2	3
MMP1	8	TOP1	2
IL2	7	NUF2	2
ERBB3	7	BCL2	2
MMP3	7	TEP1	2
MET	6	OPRM	1

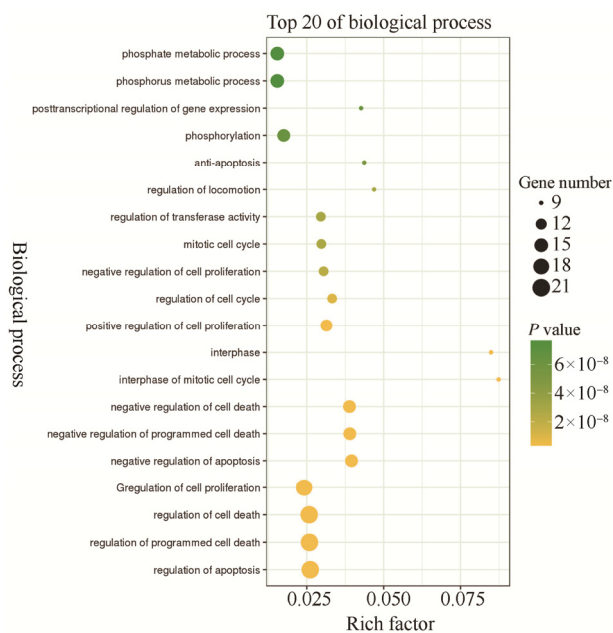


图 4 GO 富集分析 Top20 “生物过程” 气泡图
Fig. 4 Bubble chart of the top 20 GO(biological process) terms

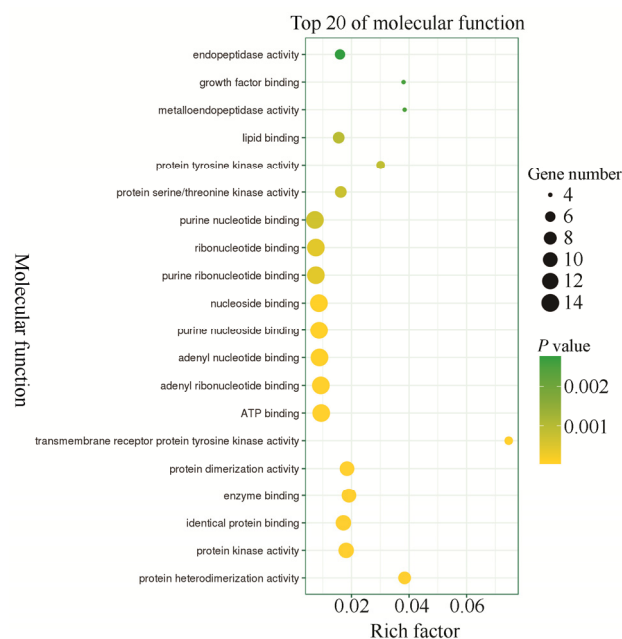


图 6 GO 富集分析 Top20 “分子功能” 气泡图
Fig. 6 Bubble chart of the top 20 GO(molecular function) terms

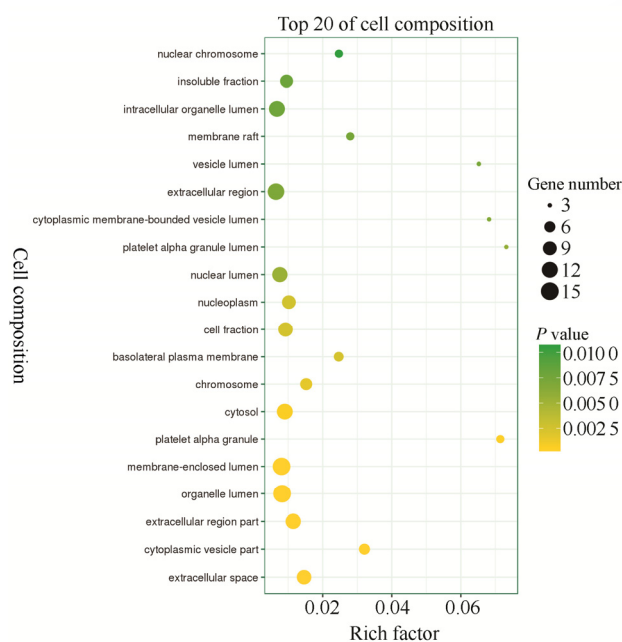


图 5 GO 富集分析 Top20 “细胞组成” 气泡图
Fig. 5 Bubble chart of the top 20 GO(cell composition) terms

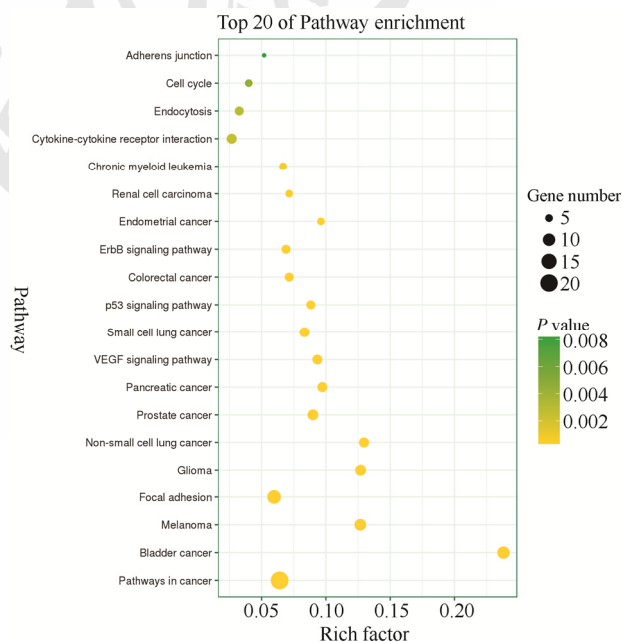


图 7 KEGG 富集分析 Top20 通路气泡图
Fig. 7 Bubble chart of the top 20 KEGG pathways

3 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一^[6], 其发病率及死亡率逐年增长^[7], 严重威胁人类生命健康。由于人口基数大、吸烟人数多、污染重, 我国肺癌发病率及死亡率均名列前茅。近年来, 随着对肺癌研究不断深入, 中药治疗肺癌的临床疗效获得了肯定。

清肺合剂由浙贝母、白花蛇舌草、重楼等 10 味中药组成, 主要用于治疗肺癌、肺炎、放射性肺炎引起的咳嗽多痰、胸痛、咳血等。清肺方出自《景岳全书》, 1973 年总结成中肺协定方, 1976 年开发为中肺合剂, 2002 年起对于清肺合剂的质量控制研究、药理药效研究、临床研究持续不断发展, 取得了一定进展^[8-16]。

中药尤其是复方中药的化学成分复杂, 能够

通过多靶点、多途径、系统性发挥药效。网络药理学基于“药物-活性成分-靶点-疾病”相互作用网络,系统综合地观察药物对疾病网络的干预与影响,可整体、系统地揭示中药对机体协同作用的物质基础和效应机制。本研究采用网络药理学方法挖掘清肺合剂抗肺癌的药效物质基础及作用机制,为其机制研究提供一定理论依据。

清肺合剂组方中药通过 ADME 分析筛选,得到 108 个性质较好的化合物。木犀草素(Luteolin)、槲皮素(Quercetin)、芹菜素(Apigenin)、山奈酚(Kaempferol)、熊果酸(ursolic acid)、沃戈宁(Wogonin)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、黄芩素(Baicalin)、鼠李糖苷(Rhamnagin)等化合物为清肺合剂的关键化合物,它们在 C-T network-1、C-T network-2 中 Degree 值均是最高,且是多味药材的共有物质,指示这些化合物在清肺合剂对肺癌的治疗中起着关键作用。已有文献报道,木犀草素、槲皮素、芹菜素、山奈酚、熊果酸、沃戈宁、黄芩素等化合物均可以抑制肺癌生长或诱导肺癌细胞凋亡。槲皮素可以通过靶向极化 B 激酶抑制肺癌生长,通过 NF- κ B 信号促进肺癌细胞凋亡,通过活化 mek-erk 通路抑制 A549 肺癌细胞生长和诱导凋亡,通过抑制 Snail 依赖的 Akt 激活和 Adam9 表达通路的激活抑制肺癌的转移等^[17-20]。芹菜素在 A549 人肺癌细胞系中,通过靶向 Akt 抑制细胞增殖、迁移和侵袭,通过影响瘦素/瘦素受体途径诱导肺腺癌细胞凋亡等^[21-22]。山奈酚通过上调人肺癌细胞中的 microRNA-340 抑制细胞增殖,同时促进细胞凋亡和自噬,通过激活 mek-mapk 介导 A549 肺癌细胞的生长抑制和凋亡等^[23-24]。木犀草素可以通过调节 microRNA-34a-5p 抑制肿瘤发生并诱导非小细胞肺癌细胞凋亡和 G2 期细胞周期阻滞等^[25-26]。沃戈宁通过调节 c-myc/skp2/fbw7 α 和 hdac1/hdac2 通路诱导细胞凋亡等^[27]。黄芩素通过抑制 Notch 信号通路抑制非小细胞肺癌细胞增殖、侵袭,通过抑制 12-脂氧合酶诱导人肺非小细胞癌 h460 细胞凋亡等^[28-29]。在“活性成分-靶点-疾病”网络的构建中,发现清肺合剂抗肺癌的重要靶点多数与细胞的增殖、凋亡相关。GO 分析的“生物过程”模块,靶点主要富集于细胞增殖和凋亡的调节、有丝分裂细胞周期的调节,指示清肺合剂抗肺癌的作用与调节细胞的增殖和凋亡密切相关。此外,发现清肺合剂抗肺癌还和血管生成密

切相关。例如 C-T network-1 和 C-T network-2 中最中心的靶点 AKT1、VEGFA、PRKCA、KDR 等均与血管生成、促内皮细胞生长相关。ALB 的主要功能是调节血液的胶体渗透压, MMP2 可以促进血管收缩等,指示清肺合剂抗肺癌的作用机制还可能与保护正常血管细胞、增强心血管功能、抑制肺癌向心血管系统转移且同时抑制肿瘤组织新生血管的生成有关。在清肺合剂的关键化合物中,木犀草素能够抑制缺氧诱导的上皮间充质转化,减少 Lewis 肺癌小鼠模型中由癌症引起的骨骼肌和心肌萎缩^[30-31]。熊果酸和阿司匹林联合药物可以通过调节 EMT 和 EGFR 介导的信号通路阻断癌细胞黏附、侵袭和向血管内皮细胞迁移^[32]。芹菜素可以抑制人肺癌细胞血管内皮生长因子的表达和血管生成^[33]。以上研究结果指示清肺合剂可能通过保护正常血管内皮细胞的增殖、存活、生长、分化,同时通过抑制肺癌细胞血管内皮生长因子的表达破坏癌区供血从而发挥抗肺癌作用。此外, β -谷甾醇为浙贝母、白花蛇舌草、半枝莲、白茅根、夏枯草、防己共有成分, Degree1 为 38, Degree2 为 4,其肺癌靶标为 PTGS2、OPRM1、BCL2、PRKCA。 β -谷甾醇抗肺癌的研究尚未有报道,也鲜有其抗肿瘤的相关研究,但已有研究报道它是潜在的抗肿瘤活性物质^[34]。鼠李糖苷是半枝莲的成分, Degree1 为 23, Degree2 为 6,其肺癌靶标为 PPARG、PTGS2、MAPK1、CDK2、TOP2A、CHEK1,同样未见鼠李糖苷抗肿瘤相关报道。指示可以对清肺合剂中的这 2 种关键成分进行抗肺癌相关研究。

笔者通过“中药-化合物-靶点-疾病”网络图找到了 38 个清肺合剂中与抗肺癌相关的重要靶点,大致可分为 4 类。第一类与细胞的增殖、分化、凋亡相关: BCL2、PPARG、AKT1、VEGFA、MAPK1、MMP2、PRKCA、BIRC5、EGFR、CDKN2A、MDM2、XIAP、MET 等。第二类与血管生成相关: AKT1、VEGFA、PRKCA、KDR 等。第三类与调控有丝分裂和减数分裂相关: TOP2A、CDK2、CDK4、XIAP、HGF 等。第四类与炎症反应相关: PRKCA、CXCL8、IL2、PECAM1、IL2RA 等。结合 2 个网络的 Degree 值以及 PPI 分析发现,关键靶点主要参与细胞的增殖、分化、凋亡和血管生成。在 PPI 分析中, Degree 值最高的几个靶点(AKT1、VEGFA、EGFR、ALB)均与血管功能

密切相关, 指示清肺合剂的抗肺癌作用除了与细胞的增殖、分化、凋亡相关外, 还与血管生成密切相关。清肺合剂通过调控血管功能抑制肺癌的作用有待进一步研究。

在 KEGG 通路分析中, 血管内皮生长因子信号通路(VEGF signaling pathway)也处于很显著的位置。此外焦点黏附(Focal adhesion)、p53 信号通路(p53 signaling pathway)、ErbB 信号通路(ErbB signaling pathway)等也是高度富集的信号通路, 指示这些通路可能在清肺合剂抗肺癌中起着重要作用。黏着斑激酶抑制在小细胞肺癌的治疗中有较好的潜力^[35], 焦点黏附信号通路在肺癌化疗耐药中有着重要作用^[36], 防己通过血管内皮生长因子信号通路抑制肺癌生长并诱导细胞凋亡^[37], 肺癌 p53 信号通路被抑制会加速肿瘤进展^[38], Hoque 等^[39]确定了非小细胞肺癌 ErbB 通路改变的模式, 且发现其与抗表皮生长因子受体治疗(anti-EGFR therapies)相关。以上研究结果指示可以针对这些信号通路进行清肺合剂抗肺癌机制的相关研究。

综上所述, 本研究采用网络药理学方法初步分析了清肺合剂治疗肺癌的药效物质基础和潜在的作用机制。通过对“活性成分-靶点-疾病”网络进行分析, 发现木犀草素、槲皮素、芹菜素、山奈酚、熊果酸、沃戈宁、 β -谷甾醇、黄芩素、鼠李糖苷等是清肺合剂抗肺癌的关键成分; AKT1、VEGFA、EGFR、ALB、BCL2 等是清肺合剂抗肺癌的关键靶点。进一步进行基因功能注释和通路富集分析, 揭示清肺合剂可以通过多靶点、多途径破坏肿瘤血管, 促进肺癌细胞凋亡, 抑制增殖、转移, 调控有丝分裂和减数分裂, 参与调控炎症反应等发挥抗肺癌作用, 预测出的结果与基础实验研究大体一致。本研究结果可结合课题组前期对清肺合剂 HPLC 指纹图谱等分析, 进一步指导和完善清肺合剂的整体质量控制。但由于数据库和已有实验数据构成的网络模型并不能完全揭示药物在生物体内状况, 因此还需进一步对所得结果进行药效及机制验证^[40]。

REFERENCES

- [1] DONG Z W, QIAO Y L, LI L D, et al. Report of Chinese cancer control strategy [J]. China Cancer(中国肿瘤), 2002, 11(5): 250-260.
- [2] XU J, YANG Y. Traditional Chinese medicine in the Chinese health care system [J]. Heal Policy, 2009, 90(2/3): 133-139.
- [3] LI P, QI L W, LIU E H, et al. Analysis of Chinese herbal medicines with holistic approaches and integrated evaluation models [J]. Trac Trends Anal Chem, 2008, 27(1): 66-77.
- [4] TAN P, BAO W L, ZHU X R, et al. Treat on 100 cases of advanced non-small cell lung cancer by Zhongfei decoction [J]. Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med(浙江中西医结合杂志), 2005, 15(1): 12-13.
- [5] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [6] HOREWEG N, DE KONING H J. The importance of screening for lung cancer [J]. Expert Rev Respir Med, 2014, 8(5): 597-614.
- [7] KURT H, OZBAYER C, BAYRAMOGLU A, et al. Determination of the relationship between rs4986790 and rs4986791 variants of TLR4 gene and lung cancer [J]. Inflammation, 2016, 39(1): 166-171.
- [8] LIN N M, ZHANG R S, FANG L, et al. Determination of fangchinoline and tetrahydrone in Zhongfei mixture by HPLC [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2008, 43(20): 1593-1595.
- [9] 陈凌亚, 周晓芳, 翁琳, 等. 薄层色谱法鉴别中肺合剂的主要成分 [J]. 医药导报, 2005, 24(10): 945-946.
- [10] ZHANG H C, LIN N M, HAN J M, et al. The effects of Zhongfei mixture on proliferation and apoptosis in tumor cells from the mice bearing lewis lung carcinoma [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28(1): 155-158.
- [11] HE F G, LIN N M, HAN J M, et al. The effects of Zhongfei mixture on angiogenesis in tumor tissue from the mice bearing lewis lung carcinoma [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28(2): 355-358.
- [12] LIN N M, ZHANG H C, XU H Y. Anti-metastasis effect and mechanism of Zhongfei mixture in the mice bearing lewis lung carcinoma [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2010, 45(22): 1729-1733.
- [13] SUN Y, ZHANG A Q, MA S L, et al. The effect of ZhongFeiHeJi regulate the TGF- β 1, IL-6 and IL-1 expression in peripheral blood of rats with radioactive injury of lungs [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28(3): 571-573.
- [14] SUN Y, ZHANG A Q, ZHANG Y J, et al. The effect of ZhongFeiHeJi regulate the expression of MMP-9/TIMP-1 in lung tissue of rats with radioactive injury of lungs [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2009, 27(11): 2394-2395.
- [15] 张爱琴, 张永军, 马胜林, 等. 中肺合剂对放射性肺损伤大鼠肺羟脯氨酸的影响 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2008, 18(5): 288-289.
- [16] ZHOU X F, LIN N M, XU L, et al. The effects of Zhongfei mixture on the expression of survivin and caspase-3 in tumor tissues from the mice bearing lewis lung carcinoma [J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊), 2010, 28(4): 768-770, 898.
- [17] ZHU X Y, MA P J, PENG D, et al. Quercetin suppresses lung cancer growth by targeting Aurora B kinase [J]. Cancer Med, 2016, 5(11): 3156-3165.
- [18] YOUNG H, JEONG J C, JEONG Y S, et al. Quercetin potentiates apoptosis by inhibiting nuclear factor-kappaB signaling in H460 lung cancer cells [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36(6): 944-951.
- [19] NGUYEN T T, TRAN E, NGUYEN T H, et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells [J].

- Carcinogenesis, 2004, 25(5): 647-659.
- [20] CHANG J H, LAI S L, CHEN W S, et al. Quercetin suppresses the metastatic ability of lung cancer through inhibiting Snail-dependent Akt activation and Snail-independent ADAM9 expression pathways [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(10): 1746-1758.
 - [21] ZHOU Z P, TANG M M, LIU Y, et al. Apigenin inhibits cell proliferation, migration, and invasion by targeting Akt in the A549 human lung cancer cell line [J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(4): 446-456.
 - [22] BRUNO A, SIENA L, GERBINO S, et al. Apigenin affects leptin/leptin receptor pathway and induces cell apoptosis in lung adenocarcinoma cell line [J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(13): 2042-2051.
 - [23] HAN X, LIU C F, GAO N, et al. Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells [J]. *Biomedecine Pharmacother*, 2018, 108: 809-816.
 - [24] NGUYEN T T, TRAN E, ONG C K, et al. Kaempferol-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells is mediated by activation of MEK-MAPK [J]. *J Cell Physiol*, 2003, 197(1): 110-121.
 - [25] JIANG Z Q, LI M H, QIN Y M, et al. Luteolin inhibits tumorigenesis and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via regulation of MicroRNA-34a-5p [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2): E447.
 - [26] CAI X T, YE T M, LIU C, et al. Luteolin induced G2 phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells [J]. *Toxicol Vitro*, 2011, 25(7): 1385-1391.
 - [27] CHEN X M, BAI Y, ZHONG Y J, et al. Wogonin has multiple anti-cancer effects by regulating c-Myc/SKP2/Fbw7a and HDAC1/HDAC2 pathways and inducing apoptosis in human lung adenocarcinoma cell line A549 [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79201. Doi:10.1371/journal.pone.0079201.
 - [28] SU G F, CHEN H, SUN X H. Baicalein suppresses non small cell lung cancer cell proliferation, invasion and Notch signaling pathway [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 22(1): 13-18.
 - [29] LEUNG H W, YANG W H, LAI M Y, et al. Inhibition of 12-lipoxygenase during baicalein-induced human lung nonsmall carcinoma H460 cell apoptosis [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(3): 403-411.
 - [30] RUAN J S, ZHANG L, YAN L G, et al. Inhibition of hypoxia-induced epithelial mesenchymal transition by luteolin in non-small cell lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(1): 232-238.
 - [31] CHEN T J, LI B, XU Y, et al. Luteolin reduces cancer-induced skeletal and cardiac muscle atrophy in a Lewis lung cancer mouse model [J]. *Oncol Rep*, 2018. Doi: 10.3892/or.2018.6453.
 - [32] TANG Q, LIU Y J, LI T, et al. A novel co-drug of aspirin and ursolic acid interrupts adhesion, invasion and migration of cancer cells to vascular endothelium via regulating EMT and EGFR-mediated signaling pathways: Multiple targets for cancer metastasis prevention and treatment [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 73114-73129.
 - [33] LIU L Z, FANG J, ZHOU Q, et al. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: Implication of chemoprevention of lung cancer [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(3): 635-643.
 - [34] BIN SAYEED M S, AMEEN S S. Beta-sitosterol: A promising but orphan nutraceutical to fight against cancer [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(8): 1214-1220.
 - [35] ABOUBAKAR NANA F, LECOCQ M, LADJEMI M Z, et al. Therapeutic potential of focal adhesion kinase inhibition in small cell lung cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2019, 18(1): 17-27.
 - [36] NAKANISHI T, MENJU T, NISHIKAWA S, et al. The synergistic role of ATP-dependent drug efflux pump and focal adhesion signaling pathways in vinorelbine resistance in lung cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(2): 408-419.
 - [37] CHEN Z, ZHAO L, ZHAO F, et al. Tetrandrine suppresses lung cancer growth and induces apoptosis, potentially via the VEGF/HIF-1 α /ICAM-1 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 7433-7437.
 - [38] HAO X L, HAN F, ZHANG N, et al. TC2N, a novel oncogene, accelerates tumor progression by suppressing p53 signaling pathway in lung cancer [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(7): 1235-1250.
 - [39] HOQUE M O, BRAIT M, ROSENBAUM E, et al. Genetic and epigenetic analysis of erbB signaling pathway genes in lung cancer [J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(12): 1887-1893.
 - [40] ZHOU W X, CHENG X R, ZHANG Y X. Network pharmacology-a new philosophy for understanding of drug action and discovery of new drugs [J]. *Chin J Pharm Toxicol*, 2012, 26(1): 4-9.

收稿日期: 2019-05-03
(本文责编: 李艳芳)