

基于营卫理论探讨桂枝-赤芍配伍重塑肿瘤血管微环境的网络药理学机制[△]

黄菁^{1,2*}, 汪宗清³, 李思泽⁴, 陈婷⁵, 沈红梅^{1#}(1. 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院中西医结合科, 昆明 650118; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210000; 3. 安宁市第一人民医院康复医学科, 云南安宁 650300; 4. 云南中医药大学第一临床医学院, 昆明 650032; 5. 昆明医科大学第三附属医院/云南省肿瘤医院核医学科, 昆明 650118)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2024)03-0265-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2024.03.003



摘要 目的: 采用网络药理学方法预测桂枝-赤芍配伍影响肿瘤血管生成的潜在靶点和通路, 从分子网络药理学水平探索该配伍重塑肿瘤血管微环境的网络药理学机制。方法: 采用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)检索桂枝、赤芍的化学成分和潜在靶点, 选择口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 作为化学成分筛选条件; 在 GeneCards 数据库中检索血管生成的靶点; 利用 Cytoscape 3.6.0 软件绘制桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络; 使用 STRING 11.0 在线软件构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络并挖掘核心靶点; 采用 David Bioinformatics Resources 数据库对该复方活性成分潜在的靶点网络中的蛋白进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。结果: 桂枝-赤芍配伍的 33 种有效成分作用于血管生成过程的 77 个靶点, PPI 网络的核心靶点包括蛋白激酶 B(Akt)1、JUN、白细胞介素 6、基质金属蛋白酶、血管内皮生长因子 A、一氧化氮合酶 2 和缺氧诱导因子-1 α 等多个蛋白。GO 功能富集分析提示, 该配伍的关键蛋白主要参与了 DNA 结合转录激活剂活性、血红素结合、抗氧化活性、核受体活性和转录因子活性等生物过程。KEGG 通路富集分析显示, 该配伍参与了缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路、肿瘤蛋白 53 信号通路、细胞凋亡信号通路、表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂耐药信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路和磷脂酰肌醇 3 激酶-Akt 信号通路等, 提示桂枝-赤芍配伍与肿瘤血管生成的关系最为密切。结论: 桂枝-赤芍配伍中的黄芩素、谷甾醇和鞣花酸等成分可能通过 HIF-1 信号通路、VEGF 信号通路影响肿瘤血管生成, 干预肿瘤的生物行为。

关键词 营卫; 桂枝; 赤芍; 配伍; 肿瘤血管微环境; 网络药理学

Network Pharmacological Mechanism of *Cinnamomi Ramulus-Radix Paeoniae Rubra* Compatibility in Remodeling Tumor Vascular Microenvironment Based on Theory of Nutritive Qi and Defensive Qi[△]

HUANG Jing^{1,2}, WANG Zongqing³, LI Size⁴, CHEN Ting⁵, SHEN Hongmei¹(1. Dept. of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650118, China; 2. The First School of Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210000, China; 3. Dept. of Rehabilitation, Anning the First People's Hospital, Yunnan Anning 650300, China; 4. The First School of Clinical Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650032, China; 5. Dept. of Nuclear Medicine, the Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University/Yunnan Cancer Hospital, Kunming 650118, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the predict the potential targets and pathways of *Cinnamomi Ramulus-Radix Paeoniae Rubra* compatibility affecting tumor angiogenesis by using network pharmacology, and to explore the network pharmacological mechanism of the compatible structure to remodel the tumor vascular microenvironment from the molecular network pharmacological level. **METHODS:** Chemical components and potential targets of *Cinnamomi*

[△] 基金项目: 国家自然科学基金地区基金资助项目(No. 81960426); 云南省教育厅科学研究基金项目(No. 2019J1290); 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项面上项目(No. 202001AY070001-245); 全国中医药创新骨干人才培养项目(No. 国中医药人教函[2019]128号); 2019年度云南省高层次卫生健康技术人才培养项目(No. H-2019077); 第七批全国老中医药专家学术经验继承项目(No. 国中医药人教函[2022]76号)

* 副主任医师。研究方向: 中西医结合防治恶性肿瘤及并发症。E-mail: hj_3698@163.com

通信作者: 主任医师, 硕士生导师。研究方向: 中西医结合防治恶性肿瘤。E-mail: Lilyydfz@126.com

Ramulus and *Radix Paeoniae Rubra* were retrieved based on the traditional Chinese medicines systems pharmacology platform (TCMSP). Oral bioavailability $\geq 30\%$ and drug-like properties ≥ 0.18 were selected as chemical composition screening conditions. The target of angiogenesis was searched in GeneCards database. Cytoscape 3.6.0 software was used to draw the network diagram of *Cinnamomi Ramulus-Radix Paeoniae Rubra*-compound-targets-angiogenesis. STRING 11.0 online software was used to construct the protein-protein Interaction (PPI) network and mine the core targets. Gene ontology (GO) function enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed for proteins in the potential target network of the compound active component by using David Bioinformatics Resources database. RESULTS: Totally 33 active components of *Cinnamomi Ramulus-Radix Paeoniae Rubra* were used in 77 targets of angiogenesis. Core targets of PPI network included protein kinase B (Akt) 1, JUN, interleukin 6, matrix metalloproteinases, vascular endothelial growth factor A, nitric oxide synthase 2, and hypoxia-inducible factor-1 α . GO functional enrichment analysis suggested that the key proteins of compatibility were mainly biological processes such as DNA-binding transcriptional activator activity, heme-binding activity, antioxidant activity, nuclear receptor activity and transcription factor activity. KEGG pathway enrichment analysis showed that the compatibility was involved in hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway, p53 signaling pathway, apoptosis signaling pathway, epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor resistance signaling pathway, vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, and phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway, suggesting that *Cinnamomi Ramulus-Radix Paeoniae Rubra* compatibility was most closely related to tumor angiogenesis. CONCLUSIONS: Components such as baicalein, sitosterol and ellagic acid in *Cinnamomi Ramulus-Radix Paeoniae Rubra* compatibility may affect tumor angiogenesis and intervene in the biological behavior of tumors through the HIF-1 signaling pathway and VEGF signaling pathway.

KEYWORDS Theory of nutritive Qi and defensive Qi; *Cinnamomi Ramulus*; *Radix Paeoniae Rubra*; Compatibility; Tumor vascular microenvironment; Network pharmacology

肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)为肿瘤的迅速生长提供营养和氧气,是肿瘤侵袭、转移的土壤,而瘤体内新生的血管是供应肿瘤营养和氧气的通道,肿瘤血管生成是该过程的关键。因此,研究 TME 中新生血管对于治疗肿瘤有至关重要的意义。现代医学的肿瘤血管生成与中医学的瘀血形成均为有形的病理产物,此为活血化瘀法治疗肿瘤的依据之一。中医认为,营卫二气化生充沛且保持“营行脉中、卫行脉外”的有序、和谐状态是人体营卫、气血、阴阳动态平衡的基础,营卫生化乏源、营卫循行不和是发病的重要因素。阳化气不足、阴成形过盛的病理状态可导致体内瘀血形成。这是从阴阳和卫气营血角度论治瘀血成瘤的依据。同时,瘀血成积所致癥瘕往往伴有瘀久化热之象。桂枝-赤芍这一临床常用配伍体现了营卫同调、气血并治、寒温并用的特点,契合了贯穿在肿瘤发生、发展过程中普遍存在的阴阳不调、营卫不和、气血同病、寒热错杂的基本病机。因此,从“营卫理论-肿瘤瘀血成积-桂枝赤芍配伍”关系链出发,本研究把桂枝-赤芍配伍的作用靶点定位于“血管内外”,探讨其干预肿瘤血管生成的可能性。

1 资料与方法

1.1 化学成分筛选

基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>),检索桂枝和赤芍的所有化学成分。从样品量、数据的复杂性以及综合文献考虑,选择口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 、类药性(DL) ≥ 0.18 作为候选化合物的筛选条件。

1.2 中药成分靶点获取

基于 TCMSP 数据库,检索桂枝和赤芍的所有靶点。

1.3 血管生成靶点获取

在 GeneCards 数据库以“Angiogenesis”为检索词进行检索,获取全部靶点。

1.4 构建桂枝-赤芍配伍的药物化合物靶点和血管生成靶点的交集靶点

在“<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>”网站构建桂枝-赤芍配伍的药物化合物靶点和血管生成靶点的交集靶点。

1.5 构建桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络

分析桂枝-赤芍配伍对应的化合物靶点及血管生成对应的靶点,通过 Cytoscape 3.6.0 软件绘制桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络。

1.6 构建桂枝-赤芍配伍的化合物-血管生成的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络

使用 STRING 11.0 在线软件(<https://string-db.org/>)构建桂枝-赤芍配伍的化合物-血管生成的 PPI 网络。

1.7 基因本体(GO)功能富集分析与京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析

使用“The R Project for Statistical Computing”(R)对调控网络中的靶点进行 GO 功能富集分析,获取这些靶点的主要功能。基于 KEGG 使用“R”对桂枝-赤芍配伍的化合物-血管生成网络中的节点进行富集,预测桂枝-赤芍配伍重塑 TME 中血管生成的可能通路。

2 结果

2.1 桂枝-赤芍配伍的化学成分筛选

通过 TCMSP 数据库,过滤后得到桂枝 7 个化学成分,赤

芍 29 个化学成分,去重后该配伍合计 33 个化学成分。其中来源于赤芍的芍药酮、芍药苷、芍药内酯苷、新芍药苷、楝叶吴萸素 B,来源于桂枝的紫杉素和桂枝及赤芍共有的儿茶素等化学成分的 OB 和 DL 均居前列。

2.2 桂枝-赤芍配伍的成分靶点获取

基于 TCMSIP,分别检索桂枝、赤芍的靶点,得到桂枝对应 105 个靶点,赤芍对应 158 个靶点,共 263 个靶点。

2.3 血管生成靶点获取

在 GeneCards 数据库检索到血管生成相关靶点 4 625 个,其中相关度>16 的前 10 个靶点依次为血管内皮生长因子 A (VEGFA)、TEK 受体酪氨酸激酶 (TIE2)、激酶插入结构域受体 (KDR)、Fms 相关受体酪氨酸激酶 1 (FLT1)、成纤维细胞生长因子 2 (FGF2)、缺氧诱导因子 1 α (HIF1A)、血管生成素 1 (ANGPT1)、血管生成素 2 (ANGPT2)、黏附 G 蛋白偶联受体 B1 (ADGRB1) 和血小板反应蛋白 1 (THBS1)。

2.4 构建桂枝-赤芍配伍的药物成分靶点和血管生成靶点的交集

在“http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/”网站以桂枝-赤芍药物化合物对应的 263 个靶点和血管生成相关的 4 625 个靶点取交集,获得 77 个共享靶点,其中 VEGFA、HIF1A、蛋白激酶 B (Akt) 1、基质金属蛋白酶 (MMP) 9 和 β 2-肾上腺素能受体等 5 个共享靶点与血管生成的关联度均>16。

2.5 构建桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络

利用桂枝、赤芍的化合物靶点以及血管生成的靶点,通过 Cytoscape 3.6.0 软件绘制桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络,见图 1。图 1 中,外环表示桂枝-赤芍配伍结构的 16 种有效成分,来源于赤芍的有效成分主要包括 MOL001924 (芍药苷, paeoniflorin)、MOL001921 (芍药新苷, lactiflorin)、MOL002714 (黄芩素, baicalein)、MOL000449 (豆甾醇, stigmasterol) 和 MOL001002 (鞣花酸, ellagic acid) 等 9 种,来源于桂枝的有效成分包括 MOL004576 (二氢槲皮素, taxifolin) 和 MOL011169 (过氧麦角甾醇, peroxyergosterol) 等 4 种,桂枝和赤芍共有的 3 种有效成分为 MOL000358 (β -谷甾醇, beta-sitosterol)、MOL000492 [儿茶素, (+)-catechin] 和 MOL000359

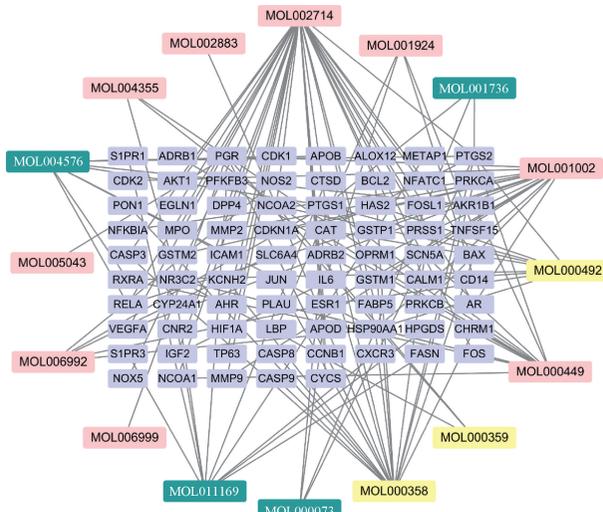


图 1 桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络

(谷甾醇, sitosterol)。上述植物甾醇、芍药苷均具有抗炎作用;儿茶素具有降低毛细血管通透性、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒等多种作用。圆环内的长方形表示桂枝-赤芍和血管生成共享的 77 个靶点;背景线条表示药物有效成分与血管生成共有靶点间的关联程度;该网络显示,桂枝-赤芍配伍的 16 种有效成分作用于血管生成的 77 个靶点,其中黄芩素、 β -谷甾醇、鞣花酸、过氧麦角甾醇和豆甾醇等成分与共享靶点的相关度较高。

2.6 构建桂枝-赤芍配伍-血管生成的 PPI 网络

使用 STRING 11.0 在线软件构建桂枝-赤芍配伍-血管生成的 PPI 网络,得到 77 个节点,611 条边,平均节点度为 15.9,平均局部聚类系数为 0.637。设置置信度为 0.70,去除离散节点后输出 PPI 关系图,见图 2。经对 PPI 节点和联边信息使用 R 运算分析后,挖掘到该调控网络的前 30 个核心靶点,见图 3。

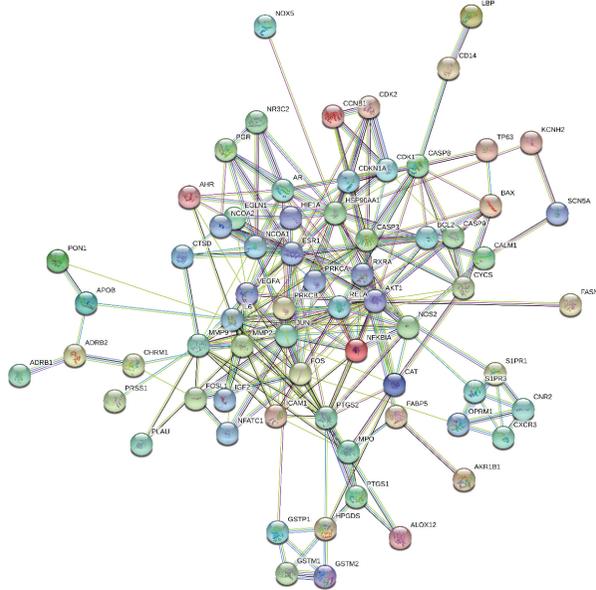


图 2 桂枝-赤芍配伍-血管生成的 PPI 网络

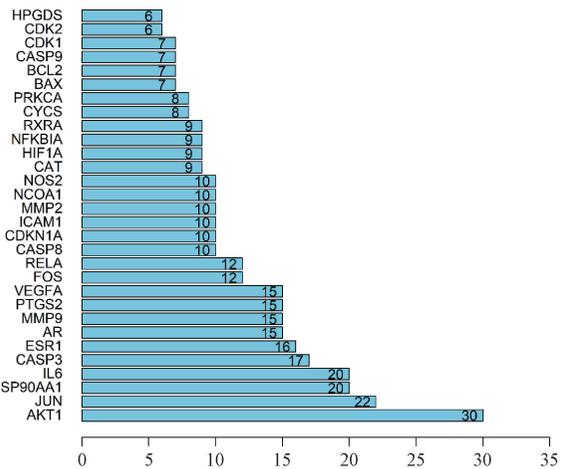


图 3 桂枝-赤芍配伍结构-血管生成的 PPI 网络核心靶点

2.7 GO 功能富集分析

GO 功能富集分析结果显示,调控网络中的核心靶点主要参与泛素样蛋白连接酶结合、酰胺结合和 DNA 结合转录激活

剂活性、RNA 聚合酶 II 特异性、内肽酶活性、血红素结合、过氧化物酶活性、氧化还原酶活性、抗氧化活性、核激素受体结合、RNA 聚合酶 II 转录因子结合、激素受体结合、激酶调节活性、硫化物结合、组蛋白激酶活性、核受体活性和转录因子活性等生物过程,提示桂枝-赤芍配伍结构广泛参与了包括机体代谢、免疫、炎症和凋亡在内的多靶点作用和过程,见图 4—5。

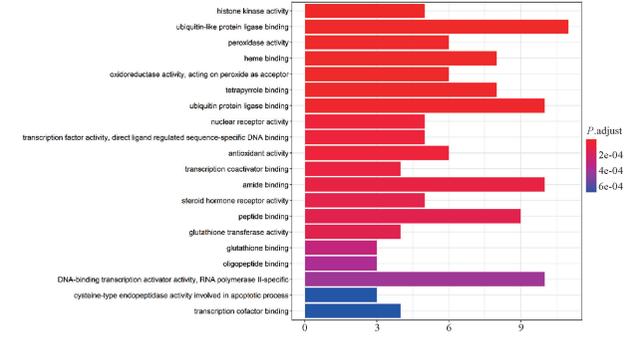


图 4 GO 功能富集分析柱状图

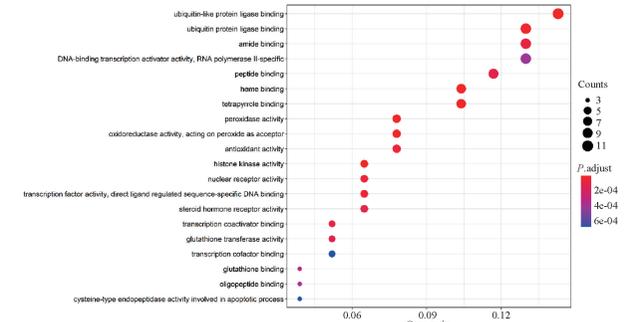


图 5 GO 功能富集分析气泡图

2.8 KEGG 通路富集分析

KEGG 使用“R”对桂枝-赤芍配伍化合物-血管生成网络中的节点进行富集,结果显示,富集到 33 条通路,主要集中在铂耐药、HIF-1 通路、p53 通路、细胞凋亡、内分泌抵抗、凋亡通路、Toll 样受体通路、表皮生长因子受体(EGFR)酪氨酸激酶抑制剂耐药、细胞衰老、血管内皮生长因子(VEGF)通路、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)-Akt 通路、环磷酸腺苷通路、丝裂原激活的蛋白激酶(MAPK)通路、破骨细胞分化、FOXO 通路和人类表皮生长因子受体 2 通路等,见图 6—7。

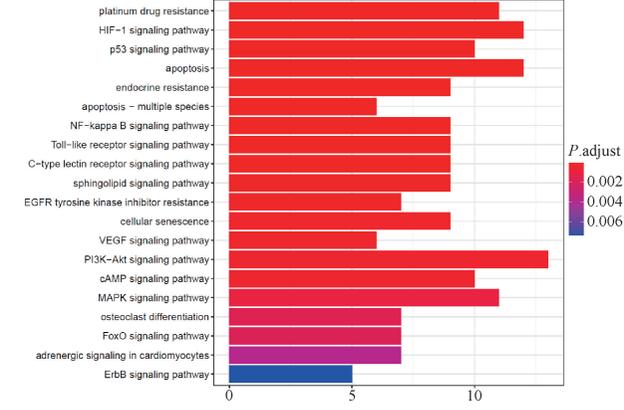


图 6 KEGG 富集通路柱状图

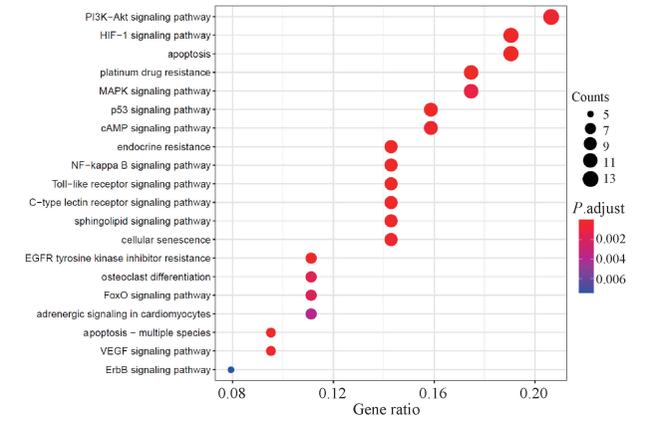


图 7 KEGG 富集通路气泡图

3 讨论

3.1 卫气营血与瘀血形成

阴阳二气是人的体用之基,“阳化气、阴成形”是阴阳二气功能的高度概括。阴阳动态平衡一旦打破,则为害成疾。瘀血作为肿瘤的常见病理产物,与“阳不化气、阴血成积”密切相关,如《灵枢·口问》曰:“邪之所在,皆为不足”。唐容川的《血证论》中记载,“瘀血在经络脏腑之间,则结为癥瘕,瘕者或聚或散,气为血滞,则聚而成形”。可见,肿瘤形成关乎气血,位于经络、脏腑之间,与瘀血有共同特征。此是从卫气营血角度论治肿瘤的依据。临床常见肿瘤患者表现出“面色黧黑”“肌肤甲错”“痛有定处”“舌青紫兼见瘀点瘀斑”“舌下脉络迂曲”和“脉涩”等证候,均提示体内瘀血内结。此是中医运用活血化瘀法治疗肿瘤的依据。研究发现,肿瘤患者普遍存在微循环障碍、血液黏滞状态、血小板聚集及 TME 诱导新生血管管壁的高通透性和功能异常等特点,这均是利于肿瘤细胞停滞继发种植转移、肿瘤细胞穿透管壁导致血行播散的原因。研究结果显示,活血化瘀法可通过促进肿瘤血管正常化、改善肿瘤局部缺氧来实现 TME 正常化,从而治疗肿瘤^[1]。

营卫二气来源于水谷精微,赖脾之运化、肺之输布得以各尽其能。营气濡养周身,卫气温养脏腑、护卫肌表,一阴一阳循环往复、出入循环。“营行脉中、卫行脉外”的有序、和谐状态是人体营卫、气血、阴阳动态平衡的基础。营卫之气化生不足,或循行逆乱、阻滞,或不循常道,或留滞不行,或溢出脉外,或寒邪侵扰等,均可致瘀血成积。《濒湖脉诀》中记载,“脉不自行,随气而至”,说明气虚则血滞成瘀。《血证论》中记载,“气结则血凝”;《寿世保元》中记载,“盖气者,血之帅也,气行则血行,气止则血止,……气寒则血凝,气有一息之运,则血有一息之不行”,可见病理状态下的营卫二气皆可致瘀。而瘀血成积所致癥瘕往往伴有瘀久化热之象。《金匱要略》中记载,“病者如热状,烦满,口干燥而渴,其脉反无热,此阴伏,是瘀血也”。《灵枢·营卫生会》中记载,“清者为营,浊者为卫,营在脉中,卫在脉外。营周不休,……阴阳相贯”。言明营卫来源于命门真气、中焦谷气和肺中清气,其中营气出于中焦,赖气之推动上输于肺,运行于十二经脉;卫气出于下焦,始于足少阴经,上行注肺出精明,复下行注肾经。卫气“昼行于阳”

“夜行于阴”的循行路线,与营气构成既能“偕行”又能“独行”,并可“大会”的“若即若离”关系。营卫二气通过出入于经脉内外,沟通表里之间,而协调脏腑气机。营卫二气贵在流通、和谐,若二者循行失常、逆乱或阻滞不通,则累及经络、脏腑及气血津液,导致瘀血。《伤寒论·辨脉法》中记载,“荣卫不通,血凝不流”。

3.2 瘀血形成与肿瘤血管微环境

《素问·举痛论》中记载,“血气稽留不得行,故宿昔而成积矣”。可见,“瘀”是肿瘤发生、发展的重要病因病机。《金匱要略》中列出“鳖甲煎丸”“大黄蛰虫丸”“桂枝茯苓丸”和“当归芍药散”等方剂寒热并用、攻补兼施,从益气活血、活血化瘀和血水同治等角度治疗瘀血成积之证。TME具有的乏氧、高乳酸浓度、低pH、高组织间隙液压及高固体压力等特点,为肿瘤的发生、发展、侵袭和转移提供了物质基础和有利条件^[1]。其中肿瘤血管生成是TME的特点之一,瘤体中新血管表现出分布规律紊乱、排列不齐、分支迂曲、管腔不规则或无管腔等特点,与肿瘤的中医病机“血气稽留、瘀血成积”有共同之处^[2]。

通过构建桂枝-赤芍配伍-化合物-靶点-血管生成网络发现,桂枝和赤芍配伍共有的有效成分如植物甾醇、芍药苷、儿茶素可作用于肿瘤局部慢性炎症微环境和通透性升高的肿瘤新生血管。桂枝-赤芍配伍与血管生成PPI网络的核心靶点包括Akt1、JUN、白细胞介素(IL)-6、CASP3、MMP、VEGFA、一氧化氮合酶2(NOS2)、HIF1A等。Akt1基因作为已知的癌基因,其激活依赖于PI3K途径,并被认为是该途径中的关键节点。JUN基因是一种蛋白质编码基因,涉及人类恶性肿瘤易位和缺失的染色体区域,参与大肠癌细胞USP28激活的KRAS介导的转录激活。IL-6主要产生于急慢性炎症部位,分泌入血后与IL-6的受体结合诱导炎症反应,与肿瘤炎症微环境密切相关。CASP3参与细胞凋亡、坏死和炎症的信号传导途径。MMP是降解细胞外基质最重要的酶类,通过降解肿瘤细胞外基质促进肿瘤细胞转移,也调节肿瘤细胞生长信号,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤组织的慢性持续炎症反应,通过提高转化生长因子-β(TGF-β)及其下游信号分子的溶解性及活性促进血管生成,与脂肪细胞相互作用影响肿瘤进展,与TME的稳态密切相关^[3]。VEGFA属于血小板衍生生长因子(PDGF)/VEGF家族,可以诱导内皮细胞增殖,促进细胞迁移,决定着生理和病理性血管生成,抑制细胞凋亡并诱导血管通透,正向调控肿瘤新生血管与肿瘤进展。细胞黏附分子属于跨膜蛋白,在细胞增殖、分化和凋亡中发挥作用。NOS2参与VEGF信号传导。HIF1A编码转录因子HIF-1的α亚基,HIF-1通过激活多基因转录调节细胞和组织缺氧,参与血管生成和细胞凋亡。上述核心基因在肿瘤炎症微环境和血管微环境中发挥着促进炎症持续状态和诱导血管生成的作用。

KEGG富集结果显示桂枝-赤芍配伍结构参与了包括肿瘤化疗铂类药物耐药、缺氧转录、肿瘤发生、肿瘤靶向EGFR耐药、肿瘤炎症环境和血管生成等多个信号转导和生物学过程,其中与肿瘤血管生成的关系最为密切,与目前公认的血管

生成领域主要的分子信号通路如PI3K-Akt通路、MAPK通路、黏着斑激酶通路、Wnt/Frizzled signal通路和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路一致^[4]。已知在VEGF家族中,VEGFA与肿瘤血管生成最为密切。Flk-1/KDR(VEGFR2)是VEGF最主要结合的受体,能诱导内皮细胞向肿瘤迁移,并介导肿瘤血管生成。PI3K-Akt通路参与血管生成进程的机制是通过影响下游多种效应蛋白分子的活化状态,在细胞内发挥抑制凋亡、促进增殖的关键作用。FOXO转录因子是PI3K-Akt通路的效应器。PI3K-Akt通路通过Akt介导的磷酸化作用阻止FOXO进入细胞核,抑制FOXO转录因子发挥作用。研究发现,转录因子FOXO1参与了血管生成、内皮细胞分裂与代谢过程。敲除FOXO1可导致血管生成失控,强制表达FOXO1则血管生长速度减缓。而FOXO1常常在肿瘤组织中失活,导致血管生成失控。研究发现,FOXO1通过抑制原癌基因MYC,抑制内皮细胞分化生长,有望成为癌症治疗的靶点^[5]。

肿瘤细胞长期处于缺氧的状态,缺氧与肿瘤细胞的发生、增殖、凋亡、自噬和代谢等均密切相关。而实体肿瘤内部缺氧的首要原因是氧利用增加和氧供给减少。HIF作为缺氧状态下产生的最重要的一类内源性转录因子,是引起缺氧反应的上游因子,HIF1A作为发挥其功能的单体,其表达水平与缺氧程度正相关。目前已知HIF1A可直接调控60多个靶基因,一方面,决定细胞凋亡与增殖,使肿瘤选择性地增殖适应于缺氧环境;其次,调控糖酵解关键酶,使肿瘤细胞适应缺氧环境;第三,直接促进血管生成,上调多种血管生成促进因子及其受体的表达;第四,促进TME中MMP家族的分泌,降解基质,改变细胞黏附和运动相关的受体,利于肿瘤细胞的扩散和侵袭;第五,促进环氧化酶2、核因子κB(NF-κB)等炎症因子的转录,与TME中的炎症网络发生交互作用,改变TME中细胞因子、趋化因子、生长因子的数量和功能,最终促进肿瘤细胞生长、增殖、血管生成而加速瘤体生长^[6]。

肿瘤局部的缺血缺氧也促进了血管生成促进因子如VEGF家族及其受体、FGF家族及其受体、血管生成素家族和受体、表皮生长因子(EGF)、PDGF、TGF-β和胰岛素样生长因子1等表达上调,加剧了血管生成的促进因子和抑制因子的失衡,并形成以血管生成促进因子为优势的TME,实现瘤体内皮细胞增殖、内皮干细胞迁移和侵入、血管成熟和退化^[7-8]。MMP可以通过提高TGF-β及其下游信号分子的溶解性及活性,促进血管生成,作用于肿瘤生长、凋亡、慢性炎症反应等多条通路改变TME^[9]。以活血化瘀为基础的中药被广泛用于治疗癥瘕积聚之证,通过发挥益气温阳、行气散瘀、温阳化瘀和破血逐瘀等功效,降低机体血小板黏附聚集和纤维蛋白含量,增加纤维蛋白溶解和肿瘤周围组织血供,改善肿瘤周围组织微循环及血液高凝状态,不但能直接阻断肿瘤血管生成,而且能通过改变TME的缺血、乏氧状态,调节肿瘤血管生成的促进因子和抑制因子的平衡,抑制肿瘤血管生成,抑制肿瘤的生长、转移^[10]。

3.3 桂枝-赤芍配伍结构重塑肿瘤血管微环境

桂枝-赤芍是临床上常用的具有温阳化(行)气、活血化瘀兼清瘀热、调和营卫阴阳功效的基本配伍。桂枝色赤,性温偏

热,味辛而甘,散寒解表、温通经脉、通阳化气。赤芍色赤亦,性微寒,味苦,清热凉血、散瘀止痛。《本草从新》中记载,“赤散邪,能行血中之滞”。桂枝与赤芍相伍,一入气分、一入血分,桂枝升降出入无处不到,发挥气的推动、温煦和气化作用,而消瘀血散凝滞;赤芍针对瘀血日久易凝滞化热,出现“口干、但欲漱口不欲咽、烦热不安、夜间发热”等瘀热同见症状而活血凉血。二者寒温并用,且皆色赤入血,《神农本草经百种录》中记载,“赤走血,凡血病凝结者无不治之”研究发现,多个以桂枝为君药的方剂具有改善内皮细胞分泌功能、调节凝血和纤溶系统、抑制血栓形成及改善高凝状态的功效^[11-12]。赤芍能改善血液流变状态、抑制血小板黏附、增加血小板内皮型一氧化氮合酶等蛋白表达水平^[13]。刘丽亚等^[14]通过对多个数据库进行文献检索,运用中医传承辅助软件对高纤维蛋白原血症患者的中医治法进行综合分析,发现赤芍的用药频次排序居第5位,配伍后以活血化瘀、生血化瘀治疗高纤维蛋白原血症。赤芍的活性成分对于多种呼吸道、消化道和妇科肿瘤细胞均具有广泛的抑制作用。赤芍总苷可通过上调 Caspase-3、Fas 和 Fas 配体表达水平,下调 B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2),降低 Bcl-2/Bcl-2 相关 X 蛋白比值,抑制血管生成而诱导黑色素瘤肿瘤细胞凋亡^[15]。研究发现,赤芍总苷具有抗血小板聚集、抗肿瘤等药理作用^[16]。肿瘤细胞本身可以激活血小板并诱导血小板聚集,血小板通过促进肿瘤上皮间质转化、血管生成、形成癌栓和免疫逃逸等生物学行为加快肿瘤进程。实验发现,通过竞争性结合血小板表面 C 型凝集素受体 2 可抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 转移^[17]。临床观察结果显示,降低血小板数量或抑制其功能均可以明显抑制肿瘤转移^[18]。综上,桂枝-赤芍配伍结构可通过发挥通阳活血、化瘀散邪的功效,促进肿瘤血管正常化,重塑 TME,从而抑制肿瘤生长。

TME 对肿瘤血管生成具有复杂的调控作用,肿瘤血管生成也能导致 TME 的变化,二者共同影响了肿瘤的生物行为。靶向肿瘤血管生成的治疗已被临床广泛应用数十年,虽然目前已有多种药物靶向于阻断血管生成过程,如同时阻断 VEGFR1 和 VEGFR2 通路的贝伐珠单抗,特异性抑制肿瘤内皮细胞增殖并诱导其凋亡的重组人血管内皮抑制素,抑制 VEGFR2、VEGFR3 和 PDGFR β 靶点的索拉非尼,覆盖 VEGFR、PDGFR 和 FGFR 等多靶点并抑制 c-Kit、Ret 和 c-Met 表达而影响肿瘤细胞增殖转移的安罗替尼,阻断 EGFR 通路的西妥昔单抗等。该类药物可单用或与化疗、放疗及免疫治疗联合应用治疗多种实体瘤,但其疗效也显示出局限性,如原发耐药、继发耐药、维持治疗的争议以及在总生存时间的改善方面未显示出优势等问题。这可能与 TME 的异质性、肿瘤炎症微环境促进血管生成、肿瘤血管急剧退化加重肿瘤局部缺氧、肿瘤组织内血管减少影响化疗药递送和其他促新生血管形成通路的激活等原因有关。

本研究基于《黄帝内经》“营行脉中、卫行脉外”理论,采用网络药理学方法,针对肿瘤血管微环境中异常血管生成与中医“血气稽留、瘀血成积”的病因病机的共同特征,预测具有通阳活血、化瘀散邪功效的桂枝-赤芍配伍作用于肿瘤血管微环境的潜在靶点和通路,从分子网络药理学水平探索该配伍重

塑肿瘤血管微环境的网络药理学机制,为后续实验研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 唐振豪,兰聪颖,林丽珠. 从肿瘤微环境正常化探讨活血化疗法及除痰散结法在肿瘤治疗中的机制[J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(7): 1091-1098.
- [2] HLUSHCHUK R, BARRÉ S, DJONOV V. Morphological aspects of tumor angiogenesis[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1464: 13-24.
- [3] 司海龙,张洁,马一鸣,等. 培元抗癌汤联合替加氟对肝癌肺转移肿瘤微环境中 MMP2、MMP9 及 CXCL1、CXCL2 调节的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2021, 48(4): 184-187, 后插 5.
- [4] 张京. 紫铆因抑制肿瘤血管新生的相关性质及机理研究[D]. 上海:华东师范大学, 2010.
- [5] 曲环,李芳. FoxO1 和 FoxO3a 在内皮细胞凋亡过程中的作用[J]. 广东医学, 2016, 37(21): 3162-3164.
- [6] WU C, LI X D, ZHANG D C, et al. IL-1 β -mediated up-regulation of WT1D via miR-144-3p and their synergistic effect with NF- κ B/COX-2/HIF-1 α pathway on cell proliferation in LUAD[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(6): 2493-2502.
- [7] SELIGER C, MEYER A L, RENNER K, et al. Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF- β 2[J]. *Cell Cycle*, 2016, 15(13): 1755-1766.
- [8] CUI J Y, GONG R, HU S Q, et al. Gambogic acid ameliorates diabetes-induced proliferative retinopathy through inhibition of the HIF-1 α /VEGF expression via targeting PI3K/AKT pathway[J]. *Life Sci*, 2018, 192: 293-303.
- [9] ZONNEVILLE J, SAFINA A, TRUSKINOVSKY A M, et al. TGF- β signaling promotes tumor vasculature by enhancing the pericyte-endothelium association[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 670.
- [10] TAO L, WANG S, ZHAO Y, et al. Pleiotropic effects of herbs characterized with blood-activating and stasis-resolving functions on angiogenesis[J]. *Chin J Integr Med*, 2016, 22(10): 795-800.
- [11] 毛德军,杨东,刘彦斌,黄芪桂枝五物汤对老年糖尿病合并髋部骨折术后患者血液高凝状态的影响[J]. 中医学报, 2018, 33(11): 2104-2108.
- [12] 周洁,吴群,王蕾,等. 桂枝茯苓加味保留灌肠联合超声药物导入治疗盆腔炎的疗效[J]. 北京医学, 2019, 41(9): 847-849.
- [13] 章丽,赵冰洁,袁嘉瑞,等. 牡丹皮、赤芍与白芍对急性血瘀模型大鼠活血功效的比较研究[J]. 中草药, 2016, 47(15): 2676-2683.
- [14] 刘丽亚,孟棵,王恒和. 中医药治疗高纤维蛋白原血症用药规律[J]. 河南中医, 2020, 39(9): 1415-1420.
- [15] 王亚珍,吕品田,王凤红,等. 赤芍总苷对人黑色素瘤细胞株凋亡诱导的作用机制[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(23): 4606-4608.
- [16] 胡延喜. 赤芍总苷在大鼠体内药代动力学和芍药苷与人血清白蛋白相互作用研究[D]. 沈阳:辽宁大学, 2018.
- [17] 李昱彤,孙瑶,赵丽虹,等. 皖南蝮蛇毒通过血小板抑制肿瘤转移的研究[J]. 皖南医学院学报, 2022, 41(3): 217-220.
- [18] 张思思,袁未. 老年肺癌手术患者凝血状态和血小板参数的变化及意义[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(2): 291-293.

(收稿日期:2022-06-07 修回日期:2023-08-03)