

基于网络药理学探讨山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的作用机制[△]

关鼎鲲^{1,2*}, 杨国旺^{2#} (1. 北京中医药大学研究生院, 北京 100029; 2. 首都医科大学附属北京中医医院肿瘤科, 北京 100010)

中图分类号 R932;R96 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)06-0641-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.06.001

摘要 目的: 基于网络药理学研究方法, 探讨山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的作用机制。方法: 通过中药系统药理学数据库与分析平台检索山慈菇和皂角刺的药物活性成分, 收集其作用靶点, 通过 Uniprot 数据库将收集的靶点进行“蛋白-基因名”转换; 对于肺癌疾病的靶点, 通过人类孟德尔遗传综合数据库、GeneCards 数据库筛选与肺癌相关的基因靶点; 将靶点与疾病靶点利用 Draw Venn Diagram 网站绘制 VENN 图获得交集靶点后, 利用 String 数据库、Metascape 在线数据库进行富集分析, 最终采用 Cytoscape 3.7.2 将所得结果可视化, 呈现所筛选的核心靶点及蛋白质-蛋白质相互作用网络。结果: 山慈菇-皂角刺药对共获得活性成分 10 种, 潜在作用靶点 202 个; 作用于肺癌的可能靶点 141 个, 筛选出核心靶点 20 个; 经过基因本体功能富集分析, 涉及生物过程 851 个; 经过京都基因与基因组百科全书通路富集分析, 涉及信号通路 110 个, 其中主要通路中 IL-17 通路、MAPK 信号通路以及 VEGF 通路是在肺癌发生发展过程中常被探讨的通路。结论: 山慈菇-皂角刺药对通过多靶点多通路干预肺癌治疗, 其潜在机制可能与抑制肿瘤分裂生长、抑制肿瘤附近血管生成以及控制肿瘤转移等相关。

关键词 网络药理学; 肺癌; 山慈菇-皂角刺药对; 作用机制

Mechanisms of Drug Pair of Cremastrae Pseudobulbus Pleiones Pseudobulbus and Gleditsiae Spina in the Treatment of Lung Cancer Based on Network Pharmacology[△]

GUAN Dingkun^{1,2}, YANG Guowang² (1. Postgraduate Academy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. Dept. of Oncology, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100010, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the possible mechanism of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in treatment of lung cancer based on network pharmacology. **METHODS:** The active ingredients and targets of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina were inquired through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database and then the targets were converted into gene ID through Uniprot database. The lung cancer related targets were inquired from online mendelian inheritance in man and Genecards database. Venn Diagram was drawn to obtain the intersection of targets and disease targets by Draw Venn Diagram, and String data and Metascape online database were used for enrichment analysis. The results were visualized by Cytoscape 3.7.2, showing the screened core targets and protein-protein interaction networks. **RESULTS:** A total 10 active ingredients and 202 potential targets were obtained. There were 141 possible targets for lung cancer, and 20 core targets were screened. After gene ontology functional enrichment analysis, 851 biological processes were involved. After enrichment analysis of the Kyoto Gene and Genome Encyclopedia pathways, 110 signaling pathways were involved, among which the IL-17 pathway, MAPK signaling pathway and VEGF pathway were the main pathways that were frequently explored in the development of lung cancer. **CONCLUSIONS:** The potential mechanism of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in intervention for lung cancer treatment through multi-target and multi-pathway may be related to the inhibition of tumor division and growth, inhibition of angiogenesis near the tumor and control of tumor metastasis.

KEYWORDS Network pharmacology; Lung cancer; Drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina; Mechanism of action

[△] 基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81774039)

* 硕士研究生。研究方向: 中西医结合肿瘤学。E-mail: 20180931920@bucm.edu.cn。

通信作者: 主任医师, 教授。研究方向: 中西医结合肿瘤。E-mail: guowang_yang@163.com

首都医科大学附属北京中医医院杨国旺主任总结个人临床上对于肺癌的治疗经验处方,从中提炼出一对化痰散结、解毒化痰的药对——山慈菇、皂角刺,其在肺癌的治疗过程中能够发挥控制肿瘤的作用。山慈菇味甘、微辛,性凉,归肝、脾经,功擅清热解毒、化痰散结,临床上多用以抗肿瘤,如肺癌、胃癌和肝癌等,并常以复方的形式使用^[1-2]。皂角刺味辛,性温,归肝、胃经,功擅消肿托毒、排脓、杀虫,现代研究结果表明,其成分可有效抑制多种肿瘤^[1,3]。中医认为,肺癌的4个基本病机为“虚、瘀、痰、毒”^[4]。皂角刺有消肿解毒之功,山慈菇有解毒化痰散结之力,二者相须配伍,可以增强解毒化痰的效果^[5-6]。现代临床药物研究结果表明,山慈菇、皂角刺均有抗肺癌的作用,然而对二者抗肺癌的靶点尚不清晰,本研究意在探讨二者配伍治疗肺癌的相关靶点及通路^[7-8]。网络药理学从系统生物学角度出发,观察药物对病理网络的干预和影响,其对组合药物研究有极大帮助^[9],如已有研究探讨了左金丸对反流性食管炎的治疗^[10]、葶苈大枣泻肺汤对于肺癌的治疗^[11]等。因此,本研究借助网络药理学的研究方法,通过在数据库中挖掘山慈菇-皂角刺药对的化学成分、作用靶标及利用该药对与肺癌交集靶点富集相关信号通路,阐述二者配伍的治疗效果。

1 资料与方法

1.1 山慈菇、皂角刺成分筛选

以“山慈菇”“皂角刺”为关键词在中药系统药理学数据库与分析平台(traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform,TCMSP)(<https://tcmspw.com/tcmsp.php>)搜索二者成分。以口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30%和类药性(drug likeness,DL)≥0.18作为活性化合物的筛选条件^[12]。

1.2 药物相关靶点的获得

在TCMSP数据库中收集相关靶点信息,并将收集到的山慈菇、皂角刺蛋白靶点信息通过Uniprot数据库(<https://sparql.uniprot.org/>)进行蛋白与基因名称的转换,剔除重复值。

1.3 肺癌疾病靶点的获得

在人类孟德尔遗传综合数据库(online mendelian inheritance in man,OMIM)数据库(<https://omim.org/>)和GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)中以“lung cancer”作为关键词进行搜索,并下载相关疾病基因,进行归纳整理。

1.4 “药物-成分-靶点-疾病”网络模型构建和分析

将得到的药物主要活性成分、对应基因靶点与疾病基因靶点交集录入Cytoscape 3.7.2中进行网络构建,以不同节点形状区分药物、成分、基因靶点及疾病,连线作为具有相关关系的表示。

1.5 核心靶点富集分析

将上述得到的基因靶点录入Metascape数据库(<http://metascape.org>)中,对其进行基因本体(gene ontology,GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)通路富集分析。

2 结果

2.1 山慈菇、皂角刺有效活性成分

在TCMSP筛选出山慈菇潜在有效活性成分3种,皂角刺潜

在有效活性成分12种,其成分见表1—2。二者相同有效活性成分2种,为“beta-sitosterol”(β-谷甾醇)、“Stigmasterol”(豆甾醇)。

表1 山慈菇的潜在有效活性成分
Tab 1 Potentially effective active ingredients of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus

MOL ID	化合物成分	OB/%	DL
MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75
MOL000449	Stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76
MOL007991	2-methoxy-9,10-dihydrophenanthrene-4,5-diol(2-甲氧基-9,10-二氢菲-4,5-二醇)	44.97	0.18

表2 皂角刺的潜在有效活性成分
Tab 2 Potentially effective active ingredients of gleditsiae spina

MOL ID	化合物成分	OB/%	DL
MOL000359	sitosterol(谷甾醇)	36.91	0.75
MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75
MOL006358	Stigmast-4-ene-3,6-dione(豆甾-4-烯-3,6-二酮)	39.12	0.79
MOL002914	Eriodictiol(flavanone)(黄烷酮)	41.35	0.24
MOL000422	kaempferol(山奈酚)	41.88	0.24
MOL000449	Stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76
MOL000098	quercetin(槲皮素)	46.43	0.28
MOL000073	ent-Epicatechin(+)-表儿茶素	48.96	0.24
MOL013296	Fustin(黄酮素)	50.91	0.24
MOL013179	fisetin(漆黄素)	52.60	0.24
MOL001736	(-)-taxifolin(花旗松素)	60.51	0.27

2.2 相关靶点收集

在OMIM数据库中获得相关基因靶点503个, GeneCards数据库中获得相关靶点22 399个。对GeneCards数据库获得的靶点以“Relevance score”>13.84为筛选条件,获得相关靶点1 856个。将上述2个数据库获得基因靶点合并,并剔除重复项,共获得肺癌疾病相关靶点2 232个。通过在线绘制Venn图网站Draw Venn Diagram(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)获得药物基因靶点与肺癌疾病基因靶点的Venn图,获得交集靶点141个,见图1。

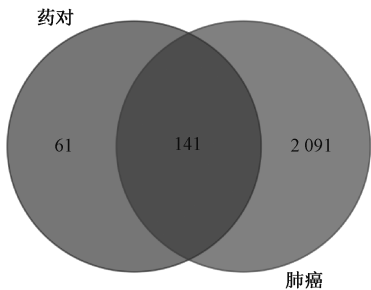


图1 山慈菇-皂角刺药对的疾病靶点 VENN 图
Fig 1 VENN diagram of disease targets of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina

2.3 核心靶点筛选及靶蛋白相互作用网络

将收集到的交集靶点通过String数据库(<https://string-db.org/>)绘制肺癌与药物交集靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein Interaction, PPI),见图2。将数据导入Cytoscape 3.7.2,对PPI节点的数据进行分析,图中节点面积越大代表其度值越大。以Degree(DG)>74(二倍中位数)为筛选条件筛选出核心基因靶点20个,对这20个核心基因靶点制

作蛋白相互作用网络,见图 3。上述 20 个靶点可作为山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的关键基因靶点。

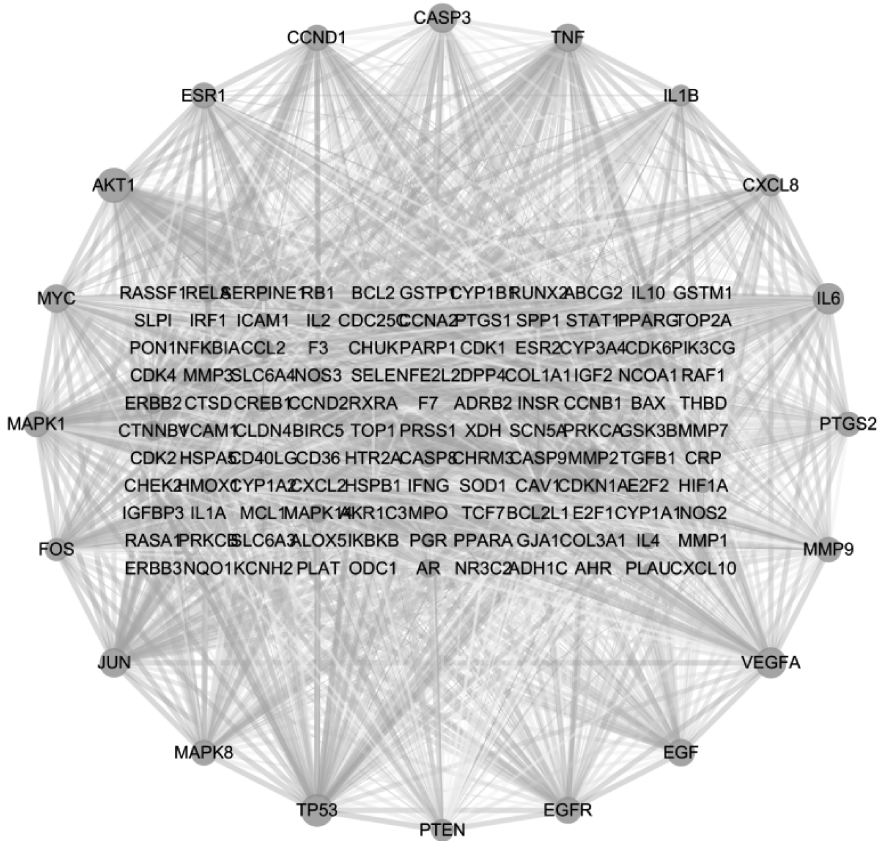


图 2 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的 PPI 图

Fig 2 PPI diagram of drug pair of crematulae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in the treatment of lung cancer

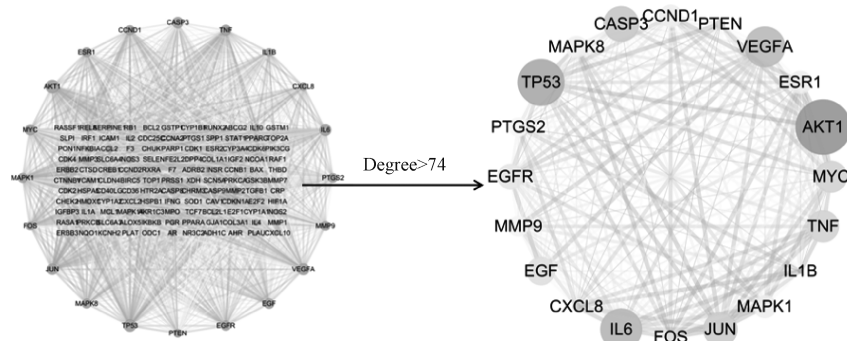


图 3 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的核心基因筛选图

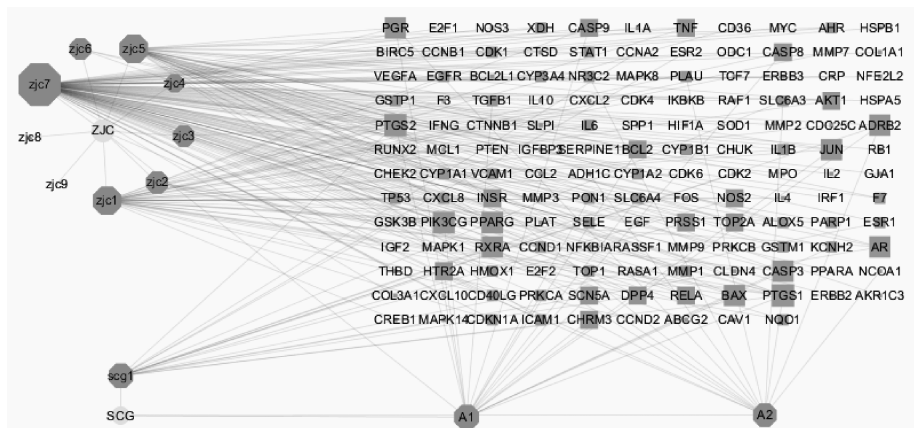
Fig 3 Core gene screening diagram of drug pair of crematulae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in the treatment of lung cancer

2.4 “药物-成分-靶点”网络模型

山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的“药物-成分-靶点”网络模型图见图 4。图中,圆形节点为皂角刺、山慈菇,正八边形靶点为皂角刺、山慈菇潜在有效活性成分,正八边形 A1、A2 靶点为皂角刺、山慈菇相同潜在活性成分,正方形节点为皂角刺、山慈菇潜在有效活性成分对应靶点与肺癌疾病靶点交集基因;模型中,图形的面积越大,表示其相关联成分及靶点更多,其度值越大,290 条边代表潜在活性成分与靶点存在的相互作用关系。

2.5 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析

将上述研究中得到的 21 个核心基因靶点输入 Metascape 数据库进行 GO 功能富集分析、KEGG 通路富集分析,按照 $P < 0.01$ 进行筛选。GO 功能富集分析结果显示,生物分子功能方面,主要涉及一氧化氮酶活性调节、细胞因子受体结合和转录因子结合等,见图 5、表 3。KEGG 通路富集分析结果表明,涉及信号通路 14 条,主要为癌症通路、乙型肝炎通路、IL-17 信号通路、膀胱癌、乳腺癌、内分泌抵抗、丙型肝炎、小细胞肺癌、



scg1 为 MOL007991,zjc1 为 MOL013179,zjc2 为 MOL013296;zjc3 为 MOL013297;zjc4 为 MOL001736;zjc5 为 MOL002914;zjc6 为 MOL000359;zjc7 为 MOL000422;zjc8 为 MOL000073;zjc9 为 MOL000098;A1 为 MOL000358;A2 为 MOL000449
 scg1 indicates MOL007991, zjc1 indicates MOL013179, zjc2 indicates MOL013296; zjc3 indicates MOL013297; zjc4 indicates MOL001736; zjc5 indicates MOL002914; zjc6 indicates MOL000359; zjc7 indicates MOL000422; zjc8 indicates MOL000073; zjc9 indicates MOL000098; A1 indicates MOL000358; A2 indicates MOL000449

图 4 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的“药物-成分-靶点”网络模型图

Fig 4 Drug-component-target network of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in the treatment of lung cancer

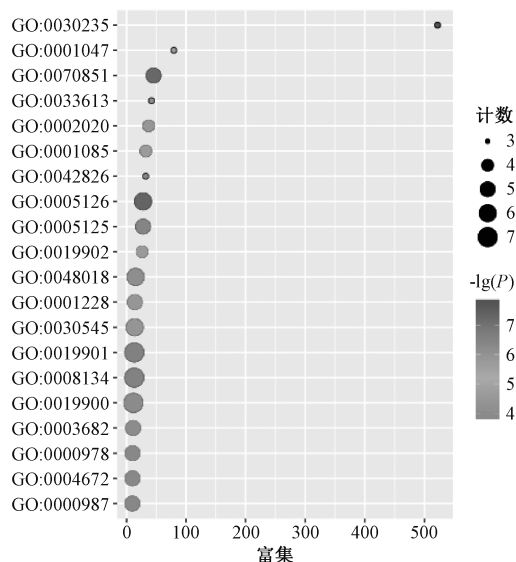


图 5 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的 GO 功能富集分析 (排序前 20 位)

Fig 5 GO function analysis of gene target of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in the treatment of lung cancer (Top 20)

VEGR 通路及 p53 通路等,见图 6、表 4。

3 讨论

研究结果显示,山慈菇-皂角刺药对的有效活性成分槲皮素 (MOL000098)、(+)-表儿茶素 (MOL000073)、黄颜木素 (MOL013296)、漆黄素 (MOL013179) 及花旗松素 (MOL001736) 的 OB 值排序居前 5 位,由此可以推测,上述成分可能在山慈菇-皂角刺药对治疗疾病中起主要作用。且由“药物-成分-靶点”图中可以看出,度值最高的为槲皮素,度值为 113,表明其与网络中其他靶点关联最强。以往研究结果

表 3 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的 GO 功能富集分析前 20 位名称

Tab 3 Top 20 GO function analysis of gene target of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleditsiae spina in the treatment of lung cancer

编号	条目名称
GO:0030235	nitric-oxide synthase regulator activity
GO:0005126	cytokine receptor binding
GO:0070851	growth factor receptor binding
GO:0019901	protein kinase binding
GO:0008134	transcription factor binding
GO:0005125	cytokine activity
GO:0019900	kinase binding
GO:0048018	receptor ligand activity
GO:0030545	receptor regulator activity
GO:0002020	protease binding
GO:0001085	RNA polymerase II transcription factor binding
GO:0001047	core promoter binding
GO:0019902	phosphatase binding
GO:0001228	DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific
GO:0033613	activating transcription factor binding
GO:0003682	chromatin binding
GO:0042826	histone deacetylase binding
GO:0000978	RNA polymerase II proximal promoter sequence-specific DNA binding
GO:0004672	protein kinase activity
GO:0000987	proximal promoter sequence-specific DNA binding

显示,槲皮素存在抑制肿瘤细胞增殖和诱导,能通过调控抑癌基因、原癌基因发挥抗肿瘤的作用^[13];漆黄素可以抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤^[14],可以调节由苯并(a)芘诱发的肺癌中的线粒体酶和凋亡信号^[15]。由此可见,山慈菇、皂角刺相须为用有一定的药理学基础。

从 PPI 图中可以看出,核心基因等度值较高的基因均为与肺癌发生发展存在密切关系的基因。AKT1 作为 AKT 的亚型^[16],与恶性肿瘤的发生发展密切相关;AKT1 作为一种癌基因参与了非小细胞肺癌的发生发展过程^[17]。TP53 基因作为

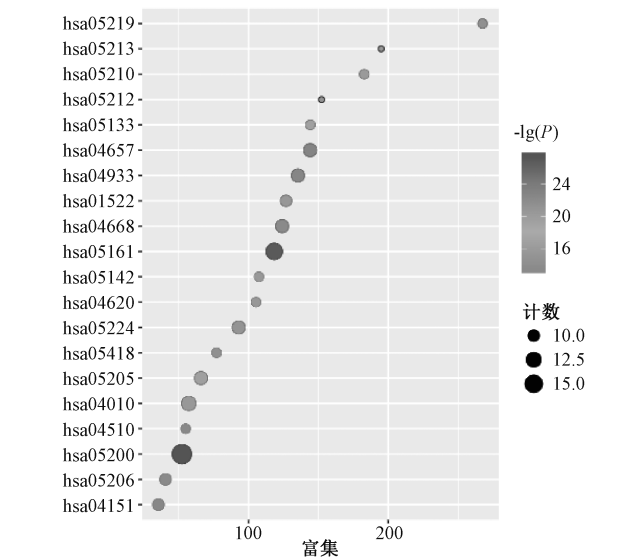


图6 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的 KEGG 通路富集分析(排序前 20 位)

Fig 6 KEGG function analysis of gene target of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleitdsiae spina in the treatment of lung cancer(Top 20)

表 4 山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的 KEGG 通路富集分析前 20 位名称

Tab 4 Top 20 KEGG function analysis of gene target of drug pair of cremastrae pseudobulbus pleiones pseudobulbus and gleitdsiae spina in the treatment of lung cancer

编号	条目名称
hsa05200	Pathways in cancer
hsa05161	Hepatitis B
hsa04657	IL-17 signaling pathway
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications
hsa04668	TNF signaling pathway
hsa05219	Bladder cancer
hsa05224	Breast cancer
hsa01522	Endocrine resistance
hsa04010	MAPK signaling pathway
hsa05210	Colorectal cancer
hsa05205	Proteoglycans in cancer
hsa05133	Pertussis
hsa05213	Endometrial cancer
hsa05142	Chagas disease (American trypanosomiasis)
hsa04620	Toll-like receptor signaling pathway
hsa05212	Pancreatic cancer
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis
hsa05206	MicroRNAs in cancer
hsa04510	Focal adhesion
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway

一种抑癌基因,在非小细胞肺癌中发现其突变^[18];JUN 作为即刻早期基因,其包含 c-JUN 等原癌基因,与多种细胞因子及生长因子的转变相关,在多种恶性肿瘤中呈高表达^[19]。VEGFR 基因作为血管内皮生长因子受体基因,与肺癌发展中血管生成关系密切,为多种肿瘤治疗药物作用靶点;VEGFA 主要通过 ERK、PI3K/Akt 通路诱导血管内皮细胞的增殖或存活,影响肿瘤的进展^[20]。山慈菇-皂角刺药对通过上述靶点对肺癌产生作用,可能通过抑制原癌基因的表达及控制肿瘤的增殖基因,

从而抑制肺癌的发生发展。

GO 功能富集分析与 KEGG 通路富集分析结果显示,山慈菇-皂角刺药对通过多种生物进程影响肿瘤的发生发展。MAPK 通路是肺癌发生发展的关键途径^[21]。高水平的 VEGF 以旁分泌的形式刺激肿瘤血管内皮细胞,诱导血管形成,促进肿瘤持续生长,提高血管通透性,促进肿瘤转移^[22]。目前,临床上多种靶向药物通过影响 EGFR 信号通路治疗肺癌。山慈菇-皂角刺药对也可能通过上述通路作用于肺癌,通过抑制肿瘤分裂生长、抑制肿瘤附近血管生成以及控制肿瘤转移等途径治疗肺癌。

本研究通过网络药理学方法探讨了山慈菇-皂角刺药对治疗肺癌的可能潜在作用机制,分析其作用于肺癌的核心靶点;山慈菇-皂角刺药对可提高肺癌的治疗效果;在中医临床上可以尝试作为常规药对使用,为今后的实验室研究及临床研究提供思路。其中,VEGF 等通路为本课题组的关注通路,待日后明确其机制。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2020 年版. 北京:中国医药科技出版社,2020:23.
- [2] 刘宇,韩雪,郝蕾,等. 张一昕教授治疗慢性肝病常用组药浅析[J]. 河北中医药学报,2018,33(4):61-64.
- [3] 黄南光. 复方皂刺汤联合化疗治疗晚期非小细胞肺癌临床疗效观察[D]. 南京中医药大学,2018.
- [4] 胡凤山. 郁仁存治疗非小细胞肺癌经验探析[J]. 中国中医药信息杂志,2010,17(11):89-90.
- [5] 邵晶,李湘奇. 乳腺癌合剂治疗乳腺癌样增生 62 例[J]. 中国民间疗法,2004(5):56-57.
- [6] 曾德宝,凌婉雯,宋鑫,等. 治疗肺癌脑转移[J]. 中医药临床杂志,2019,31(10):1826-1829.
- [7] 阮小丽,施大文. 山慈菇的抗肿瘤及抑菌作用[J]. 中药材,2009,32(12):1886-1888.
- [8] 刘伟杰,杜钢军,李佳恒,等. 皂角刺总黄酮对肺癌的防治作用及其机制研究[J]. 中草药,2013,44(20):2878-2883.
- [9] 李玮婕,毛霞,郭秋岩,等. 网络药理学研究策略在组合药物研究中的应用[J]. 转化医学电子杂志,2018,5(3):3-16.
- [10] 曹云,陈建新,符欣,等. 基于网络药理学探讨左金丸治疗反流性食管炎的作用机制[J]. 北京中医药,2020,39(9):975-979,1009.
- [11] 张漂,司富春,刘子提. 葶苈大枣泻肺汤治疗肺癌的网络药理学分析[J]. 中药药理与临床,2020,36(2):195-201.
- [12] Xu X, Zhang W, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci,2012,13(6):6964-6982.
- [13] 王刚,杜士明,杨光义,等. 槲皮素抗肿瘤的分子机制研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(4):322-324.
- [14] 陈锐娥,陈文荣,龙晓英. 非瑟酮抗肿瘤药理、药动学及新剂型研究进展[J]. 广东药科大学学报,2017,33(4):565-569.
- [15] Ravichandran N, Suresh G, Ramesh B, et al. Fisetin modulates mitochondrial enzymes and apoptotic signals in benzo (a) pyrene-induced lung cancer [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 390 (1-2): 225-234.

(下转第 649 页)