

基于整合药理学和实验验证探讨健脾除痰解毒方 干预肺癌的作用机制

詹雪¹,冯诗函¹,杨倩¹,
谭琪¹,夏琳涛¹,张佳艳¹,范宇翔²,王淑美^{1*}

¹重庆医科大学中医药学院 中医药防治代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆 400016;

²南京中医药大学第一临床医学院,南京 210023

摘要:基于整合药理学和实验验证探讨健脾除痰解毒方(Jianpi Chutan Jiedu Decoction, JCJD)干预肺癌的作用机制。采用中医药整合药理学研究平台(Integrative Pharmacology-based Research Platform of Traditional Chinese Medicine, TCMP) V2.0,检索并获取健脾除痰解毒方靶标及功能信息,以及肺癌疾病靶标及功能信息,借助中医关联网挖掘平台构建“疾病-方剂”关联网,并通过网络拓扑特征计算、自定义多维关联网可视化(方剂-中药材-核心靶标-通路-疾病)以及基因本体(GO)功能和依托 Reactome 数据库的 Pathway 信息进行富集分析,发现健脾除痰解毒方干预肺癌的关键网络靶标及其作用机制。最后通过动物实验进一步验证整合药理学结果。结果共获得健脾除痰解毒方干预肺癌的核心靶标 53 个;GO 富集分析得到生物过程有 20 种条目,细胞组分为 11 种条目,分子功能有 20 种条目;Reactome Pathway 富集分析得到 11 个条目,主要涉及呼吸电子传递、TP53 调节代谢基因、细胞内受体的 SUMO 化、白细胞介素(IL)-4 和 IL-13 通路等信号通路。动物实验结果显示与模型组比较,联合组肿瘤组织中乳酸含量明显下降($P < 0.05$),联合组可明显上调肿瘤组织中磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)蛋白平均光密度值($P < 0.05$),降低丙酮酸激酶 M2(PKM2)和己糖激酶 2(HK2)蛋白平均光密度值($P < 0.05$);与模型组比较,联合组可明显上调肿瘤组织中肿瘤抑制蛋白(P53)、PTEN mRNA 及蛋白表达($P < 0.01$, $P < 0.05$),降低肿瘤组织中 TP53 诱导的糖酵解与凋亡调控因子(TIGAR)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)、PKM2、HK2 mRNA 及蛋白表达($P < 0.01$)。综上,健脾除痰解毒方通过 TP53 调节代谢基因来下调葡萄糖代谢,从而抑制肺癌增殖。

关键词:整合药理学;实验验证;健脾除痰解毒方;肺癌;TP53;代谢

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)5-0868-14

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.5.016

Intervention mechanism of Jianpi Chutan Jiedu Decoction on lung cancer based on integrated pharmacology and experimental validation

ZHAN Xue¹, FENG Shi-han¹, YANG Qi¹,
TAN Qi¹, XIA Lin-tao¹, ZHANG Jia-yan¹, FAN Yu-xiang², WANG Shu-mei^{1*}

¹Chongqing Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine for Prevention and Cure of Metabolic Diseases, College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China;

²First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract: To explore the mechanism of Jianpi Chutan Jiedu Decoction (JCJD) on lung cancer based on integrated pharmacology and experimental verification. The integrated pharmacology based research platform of traditional Chinese medicine (TCMP) v2.0 was used to retrieve and obtain the target and function information of JCJD and lung cancer disease target and function information. The "disease prescription" association network was constructed with the help of the Chinese Medicine Association Network mining platform, and the network topology characteristics were calculated. The user-defined multidimen-

sional correlation network visualization (prescription-Chinese herbal medicine-core target-pathway-disease), gene ontology (GO) function and the path information based on the reactome database were enriched and analyzed, and the key network targets and mechanism of action of JCJD for lung cancer were found. Finally, the results of integrated pharmacology were further verified by animal experiments. A total of 53 core targets of JCJD for lung cancer were obtained; GO enrichment analysis revealed the presence of 20 items in biological processes, 11 items in cellular components, and 20 items in molecular functions; 11 items were obtained from the enrichment analysis of react pathway, mainly involving respiratory electron transport, TP53 regulates metabolic genes, SUMOylation of intracellular receptors, interleukin-4 and interleukin-13 pathways and other signaling pathways. The results of animal experiments showed that compared with the model group, the content of lactic acid in tumor tissue in the combined group was significantly decreased ($P < 0.05$). The combined group could significantly increase the average optical density of phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein in tumor tissue ($P < 0.05$), and reduce the average optical density of pyruvate kinase M2 (PKM2) and hexokinase 2 (HK2) protein ($P < 0.05$); Compared with the model group, the combined group could significantly increase the expression of tumor suppressor protein (P53), PTEN mRNA and protein in tumor tissues ($P < 0.01$, $P < 0.05$), and reduce the expression of TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR), glucose transporter 1 (GLUT1), PKM2, HK2 mRNA and protein in tumor tissues ($P < 0.01$). In conclusion, JCJD can down regulate glucose metabolism by regulating metabolic genes through TP53, thereby inhibiting the proliferation of lung cancer.

Key words: integrated pharmacology; experimental validation; Jianpi Chutan Jiedu Decoction; lung cancer; TP53; metabolism

肺癌作为全球癌症死亡的主要类型,手术、放疗和化疗是根除其最主要的手段,但大多数患者发现肿瘤时已处于晚期转移阶段,失去了手术机会^[1]。近年来,中医药在恶性肿瘤治疗中受到广泛关注,有研究发现^[2]中药复方在肺癌的治疗、化疗减毒、逆转化疗耐药等方面均显示出较好的疗效。

健脾除痰解毒方(Jianpi Chutan Jiedu Decoction, JCJD)为重庆医科大学附属第一医院中西医结合科李荣亨教授治疗肺癌的临床经验用方除痰解毒方加减而来^[3],健脾除痰解毒方由木香、砂仁、党参、白术、茯苓、陈皮、法半夏、三棱、莪术、威灵仙、仙鹤草、黄芪组成,方中木香、砂仁、党参、白术、茯苓、陈皮、法半夏健脾益气化痰,理气畅中^[4];三棱、莪术破血行气,消积止痛^[5];威灵仙、仙鹤草散癖积,解毒补虚^[6,7];黄芪补肺气,增强机体免疫力^[8]。全方既能解毒散积,又能健脾除痰,标本兼治。本课题组前期研究表明,除痰解毒方可抑制 H1975 细胞裸鼠移植瘤的生长,逆转肺癌对吉非替尼的耐药^[9]。且实验研究表明^[10],除痰解毒方适当加减变化具有抗 Lewis 肺癌和 A549 肺癌的作用,从而抑制肿瘤细胞增殖,促进其凋亡。然而,健脾除痰解毒方抗肺癌机制尚不清楚,因此,围绕肺癌的中医病因病机,对其进行理法方药的探究,在肺癌的防治上具有重要的价值。

整合药理学数据和计算平台,是以中医药大数据为支撑,采用人工智能、数据挖掘、网络科学等学科的方法和技术,形成智能化和网络化的功能模块,

可构建中药方剂与疾病之间互作关联,明确中药方剂药效物质及其干预疾病的相关分子机制。

本研究拟在整合药理学基础上,通过构建 Lewis 肺癌小鼠移植瘤的体内模型,对健脾除痰解毒方干预肺癌进行分子机制研究。以期为肺癌的临床治疗提供有效的中医药干预证据。

1 材料与方法

1.1 肺癌相关基因及其功能挖掘

TCMIP V2.0 平台依托疾病-“基因相关性数据库(DisGeNET)”“人类表型本体数据库(HPO)”“Drugbank 数据库”“治疗靶标数据库(TTD)”等资源。本研究根据“肺癌(Lung Cancer)”构建肺癌的疾病靶标数据库。

1.2 健脾除痰解毒方候选靶标谱及其功能挖掘

本研究利用 TCMIP V 2.0 分析工具中中药(含方剂)靶标预测及功能分析模块,选择“木香”“砂仁”“党参”“白术”等 12 味方剂的组成药材,选择相似性分数(similar score) > 0.8 的药物候选靶标谱作为健脾除痰解毒方的作用靶标。

本平台通过化学成分二维结构相似性搜索,即采用 MACCS 分子指纹特征提取方法和 Tanimoto 系数定义的相似度计算方法,针对中药化学成分(可根据成药性等级进行筛选)和 FDA 上市药物进行相似性打分,从而获取高可信度的中药(含方剂)候选靶标谱。

1.3 病-方关联网络挖掘

进入“中医药关联网络挖掘”模块,基于目标疾

病(肺癌)基因和方剂(健脾除痰解毒方)候选靶标之间的相互作用信息,构建“疾病-方剂”关联网络,并通过网络拓扑特征计算和富集分析,发现健脾除痰解毒方干预肺癌的关键网络靶标及其作用机制。

1.4 实验验证

1.4.1 实验细胞及动物

细胞:Lewis 肺癌细胞(LLC)(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CL-0140)。

动物:健康雌雄各半 C57BL/6J 小鼠 60 只,体重(20 ± 2)g,购于重庆医科大学动物实验中心,许可证号 SYXK(渝)2022-0010,实验操作通过重庆医科大学伦理委员会批准(审批编号:IACUC-CQ-MU-2023-0076)。

1.4.2 实验试剂及仪器

胎牛血清(VivaCell,批号:C04001-500),乳酸含量测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:A019-2-1),BCA 蛋白浓度测定试剂盒增强型、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为:P0010、090120201015),RNA 提取试剂盒(艾科瑞生物,批号:AG21017),磷酸酯酶与张力蛋白同源物(PTEN)抗体、己糖激酶 2(HK2)抗体、TP53 诱导的糖酵解与凋亡调控因子(TIGAR)抗体、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)抗体(美国 Abcam 公司,批号分别为:ab267787、ab209847、ab189164、ab115730),丙酮酸激酶 M2(PKM2)抗体(美国 CST 公司,批号:4053)。

光学显微镜(日本 Olympus 公司);电泳仪、荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Odyssey Fc 双色红外成像系统(美国 LI-COR 公司);Synergy HTX 全自动酶标仪(美国 BioTek 公司)。

1.4.3 药物制备

健脾除痰解毒方由木香、砂仁、白术各 15 g,陈皮、法半夏各 10 g,党参、茯苓、三棱、莪术、威灵仙、仙鹤草、黄芪各 30 g 组成,药物购于重庆医科大学附属第一医院中药房,重庆医科大学何先元教授鉴定为正品,煎煮药物浓缩至含生药量 2 g/mL。

注射用顺铂(云南植物药业有限公司,批号:H53021679,使用前用生理盐水配成 0.25 mg/mL)

1.4.4 造模分组与给药

取对数生长期 Lewis 肺癌细胞,调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,于 C57BL/6J 小鼠右侧腋窝皮下注射 0.2 mL Lewis 单细胞悬液^[11]。接种 7 d 左右,以小鼠皮下肿瘤生长至最大直径为 0.5 cm 左右时,

为造模成功。

将 60 只造模成功的 C57BL/6J 小鼠按照随机数字表法分为模型组(MO 组)、顺铂组(DDP 组)、健脾除痰解毒方低剂量组(JCJD-L 组)、中剂量组(JCJD-M 组)、高剂量组(JCJD-H 组)、健脾除痰解毒方联合顺铂组(TO 组),每组 10 只,于造模第 8 d 开始干预。

给药剂量参照《药理实验方法学》折算,实验小鼠药物用量(g/kg) = 临床总药物用量(g)/60 kg × 9.01(小鼠与人的等效剂量比值),每剂生药含量为 275 g,换算出 JCJD 低、中、高剂量组分别按 10.32、20.65、41.3 g/kg 煎剂灌胃,连续灌胃 14 d,1 次/d;DDP 组小鼠给予腹腔注射顺铂(0.2 mL),2 次/周,共 4 次;TO 组小鼠给予 JCJD(41.3 g/kg)连续灌胃 14 d,1 次/d,同时腹腔注射顺铂(0.2 mL),2 次/周,共 4 次;MO 组给予等体积双蒸水灌胃,连续灌胃 14 d,1 次/d;上述均连续干预 14 d 后,戊巴比妥钠麻醉处死小鼠,并剥离肿瘤组织进行相关检验。

1.4.5 瘤块组织中乳酸水平检测

称取相应肿瘤组织,按重量(g):体积(mL) = 1:9 的比例,加入 9 倍体积的冷双蒸水,冰水浴匀浆,制成 10% 的匀浆液(取出部分 3 500 r/min 离心 10 min,取上清测定蛋白浓度),再置于沸水浴中煮 10 min,取出混匀抽提 1 min,3 500 r/min 离心 10 min,取 10% 匀浆上清液用生理盐水稀释成不同浓度,按试剂盒说明书进行实验。

1.4.6 免疫组化法(IHC)检测

处死小鼠后,完全剥离 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织,将肿瘤组织在室温下用 4% 多聚甲醛固定 24 h,常规脱水、包埋、制备厚度为 4 μm 的石蜡切片用于 IHC 测定。

1.4.7 实时荧光定量 PCR 检测

将每组 50 mg 肿瘤组织进行处理后,提取总 RNA,检测各组 RNA 浓度及纯度。后进行反转录操作。内参选用 GAPDH,进行 PCR 扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的 mRNA 表达量。引物序列由湖南艾方生物科技有限公司合成(见表 1)。

1.4.8 免疫印迹法(Western blot)法检测

提取各组小鼠 40 mg 肿瘤组织蛋白,配胶后经电泳分离,将蛋白转于 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉摇床上封闭 2 h,加入一抗,4 °C 孵育 16 h, TBST 洗涤 3 次,5 min/次,加二抗,室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次,5 min/次, ECL 超敏发光试剂盒显影, Image J 软

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度 Product length(bp)
P53	F:5'-GGCAGACTTTTCGCCACAG-3' R:5'-GATGATGGTAAGGATAGGTCCG-3'	130
TIGAR	F:5'-ACTTTCCTCCATCACTCCCA-3' R:5'-CTTCTCAGTCACTCCGTCA-3'	127
GLUT1	F:5'-GTATCCTGTTGCCCTTCTGC-3' R:5'-GACCCTCTTCTTTCATCTCC-3'	108
PKM2	F:5'-CCACTTGCAATTATTTGAGGAA-3' R:5'-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3'	146
HK2	F:5'-CAAAGTGACAGTGGGTGTGG-3' R:5'-GCCAGGTCTTCACTGTCTC-3'	179
PTEN	F:5'-ATCCTTCCAAGCAAAGCATC-3' R:5'-CTGAGACATCAAGCCCGTTC-3'	215
GAPDH	F:5'-AAATTCAACGGCACAGTCAA-3' R:5'-TAGACTCCACGACATACTCAGCA-3'	133

件统计分析蛋白相对表达量。

1.4.9 统计学分析

采用 SPSS 24.0 统计学软件分析, Graphpad Prism 8.0 软件整理生成统计图, 计量资料结果符合正态分布的以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 健脾除痰解毒方活性化合物分析

健脾除痰解毒方一共包括 12 味药, 每个药包括

化学成分 (chemical component)、成药性权重 (drug-likeness weight)、成药性等级 (druglikeness grading), 得到该方一共 519 个化合物, 针对中药所含的化学成分, 根据化学成分详情页面中提供成药性权重数值, 这个指标可以作为评价成分成药性的依据, 一般成药性权重在 0.67 以上是成药性比较好的成分, 也就是所谓的活性化合物, 并且成药性权重在 0.67 以上的成分其成药性等级也为 good, 更能佐证其为活性化合物。因此, 基于上述依据, 最终共得到 43 个活性化合物 (见表 2)。

表2 健脾除痰解毒方活性化合物

Table 2 Effective ingredients of JCJD

化学成分 Chemical component	成药性权重 Druglikeness weight
冬青醇 Ilicol	0.726
榄香醇 Elemol	0.722
木香醇 Costol	0.703
Germacra-1 (10), 4, 11 (13)-trien-12-ol	0.69
Colartin	0.673
2-(2-甲氧基苯氧基) 苯酚 2-(2-Methoxyphenoxy) phenol	0.856
丁香醛 Syringaldehyde	0.716
1,5-二异丁基-3,3-二甲基[3,1,0]环己酮	0.707
1,5-Di-isobutyl-3,3-dimethyl[3,1,0]cyclohexadione	0.707
茅苍术醇 Hinesol	0.671
脱氢鞣酸甲酯 Dehydroabietic acid methyl ester	0.677
三甲基芹素 Trimethylapigenin	0.895
5-去甲基辛烯汀 5-Demethylsinensetin	0.88

续表 2 (Continued Tab. 2)

化学成分 Chemical component	成药性权重 Druglikeness weight
黄芩黄酮 I Skullcapflavone I	0.823
桔皮素 Tangeretin	0.772
3- <i>O</i> -反式阿魏基奎宁酸 3- <i>O</i> - <i>Trans</i> ferulylquinic acid	0.718
川陈皮素 Nobiletin	0.699
5-羟基-7,8,4'-三甲氧基黄酮 5-Hydroxy-7,8,4'-trimethoxyflavanone	0.687
6-姜烯酚 Shogaol	0.854
双(4-羟基苄基)醚 Bis(4-hydroxybenzyl) ether	0.849
伪麻黄碱 <i>D</i> -pseudoephedrine	0.706
麻黄素 Ephedrine	0.706
山姜素 Alpinetin	0.911
乔松素 Pinoembrin	0.823
Curcarabranol A	0.816
(1 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-1-Methyl-7-[2-(2-methyl-1,3-dioxolan-2-yl)ethyl]-4-propan-2-ylidenebicyclo[4.1.0]heptan-3-ol	0.807
(4 <i>aR</i> ,5 <i>R</i> ,5 <i>aS</i> ,6 <i>aR</i>)-6 <i>a</i> -Hydroxy-3,5 <i>a</i> -dimethyl-5-(3-oxobutyl)-4,4 <i>a</i> ,5,6-tetrahydrocyclopropa[<i>f</i>][1]benzofuran-2-one	0.784
3-乙基-3-羟基-5 α -雄甾烷-17-酮 3-Ethyl-3-hydroxy-5 α -androstane-17-one	0.782
姜黄醇酮 Curcolone	0.765
二氢桔烯酮 Dihydrocurcumenone	0.765
4-[(1 <i>S</i> ,6 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-4-(2-Hydroxypropan-2-yl)-1-methyl-7-bicyclo[4.1.0]hept-3-enyl]butan-2-one	0.759
桔烯内酯 A Curcumenolactone A	0.719
莪术酮 Curzerenone	0.717
莪术醇 Zedoarol	0.715
环氧氧桔烯醇 Oxycurcumenol epoxide	0.713
莪术双环烯酮 Curcumenone	0.703
2-Methyl-6-[(1 <i>S</i>)-4-methylcyclohex-3-en-1-yl]hepta-2,6-dien-1-ol	0.687
芳姜黄酮 Ar-turmerone	0.684
异绒白乳菇醛 Isovelleral	0.684
5-左烯甲醇 5-Azulenemethanol	0.674
氯苯酚 A Clemaphenol A	0.872
仙鹤草内酯 Agrimonolide	0.842
华良姜素 Kumatakenin	0.904
美迪紫檀素 Medicarpin	0.865

2.2 健脾除痰解毒方治疗肺癌的核心靶标网络分析

健脾除痰解毒方治疗肺癌的作用核心靶标有 53 个。利用 TCMIP2.0 中网络调控机制挖掘功能构建核心网络靶标图,分别计算网络中所有的节点连接度(degree)、节点紧密度(closeness)和节点介度

(betweenness),选取上述三个特征值均大于网络中所有节点相应特征值中位数的节点进行排序,获得前 20 位的核心靶标。分别为 MMP1、MMP9、JUN、ESR1、NCOA1、NR3C1、ATP5C1、COX5A、COX5B、COX6B1、COX6C、COX7C、CYC1、UQCRC1、NFKB1、HSP90AA1、NCOA2、AR、FOS、MMP14(见表 3、图 1)。

表3 健脾除痰解毒方干预肺癌核心靶标
Table 3 The core target of JCJD in the intervention of lung cancer

靶标 Node	节点连接度 Degree	节点紧密度 Closeness	节点介度 Betweenness
MMP1	7	0.147	60.260
MMP9	7	0.147	60.260
JUN	14	0.161	316.194
ESR1	10	0.155	52.054
NCOA1	9	0.152	47.201
NR3C1	11	0.158	117.434
ATP5C1	15	0.149	30.262
COX5A	15	0.149	20.700
COX5B	14	0.16	256.742
COX6B1	14	0.15	64.738
COX6C	13	0.158	195.403
COX7C	14	0.149	10.782
CYC1	16	0.15	51.045
UQCRC1	16	0.15	51.045
NFKB1	10	0.155	63.792
HSP90AA1	10	0.156	152.988
NCOA2	7	0.149	16.270
AR	9	0.165	277.579
FOS	7	0.162	210.204
MMP14	5	0.134	0.750

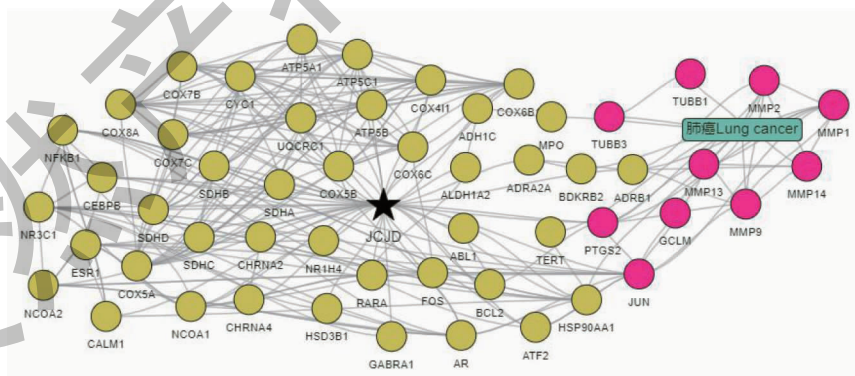


图1 健脾除痰解毒方干预肺癌核心靶标网络

Fig. 1 The core target network of JCJD intervention for lung cancer

2.3 核心靶标生物功能注释和通路富集

对筛选的核心靶标进行 GO 富集分析及 Reactome Pathway 富集分析。其中 GO 富集中得到生物过程(biological process, BP)为 20 种, 细胞组分(cell component, CC)为 11 种, 分子功能(molecular func-

tion, MF)为 20 种。

图2及表4显示,健脾除痰解毒方干预肺癌主要通过影响细胞对激素刺激的反应、线粒体电子传递, 细胞色素 C 转氨、肌肉拉伸反应、以 DNA 为模板的转录、电子传递链、质子跨膜运输、细胞对活性氧

的反应、RNA 聚合酶 II 对转录的正调控、细胞对镉离子的反应、以 DNA 为模板的转录正调控、转录调控、DNA 模板、RNA 聚合酶 II 对转录的负调控、细胞因子介导的信号通路、Fc-ε 受体信号通路、RNA 聚合酶 II 的转录、RNA 聚合酶 II 启动子的转录起始、凋亡过程的正调控、中性粒细胞脱颗粒、以 DNA 为模板的转录负调控、凋亡过程的负调控等生物过程发挥作用(见图 2、表 4)。

图 3 及表 5 显示,健脾除痰解毒方干预肺癌主要通过影响呼吸电子传递、雌激素依赖性基因表达、TP53 调节代谢基因、细胞内受体的 SUMO 化、白细胞介素(IL)-4 和 IL-13 信号通路、核受体转录途径、类固醇激素受体(SHR)的 HSP90 伴侣循环、生物钟、白色脂肪细胞分化的转录调控、衰老相关分泌表型(SASP)、中性粒细胞脱颗粒等信号发挥作用(见图 3、表 5)。

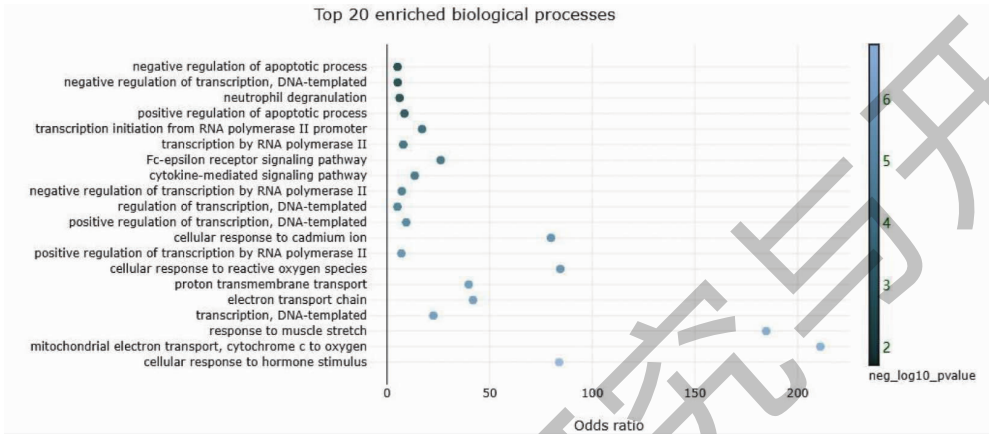


图 2 GO 功能富集分析

Fig. 2 GO function enrichment analysis

表 4 GO 功能分析

Table 4 GO function analysis

生物过程 BP description	靶基因 Target gene	目标数 Target count	P 值 P value
细胞对激素刺激的反应 Cellular response to hormone stimulus	NCOA2、NCOA1、JUN、FOS	4	1.29E-07
线粒体电子传递, 细胞色素 C 转氧 Mitochondrial electron transport, cytochrome C to oxygen	COX5A、COX5B、COX7C	3	3.17E-07
肌肉拉伸反应 Response to muscle stretch	NFKB1、JUN、FOS	3	4.88E-07
以 DNA 为模板的转录 Transcription, DNA-templated	NR3C1、NCOA1、JUN、AR、ESR1	5	2.02E-06
电子传递链 Electron transport chain	COX6B1、COX5A、COX6C、COX7C	4	2.14E-06
质子跨膜运输 Proton transmembrane transport	COX6B1、COX5A、COX6C、COX7C	4	2.63E-06
细胞对活性氧的反应 Cellular response to reactive oxygen species	MMP9、JUN、FOS	3	5.63E-06
RNA 聚合酶 II 对转录的正调控 Positive regulation of transcription by RNA polymerase II	NCOA2、NR3C1、NCOA1、FOS、 ESR1、JUN、AR、NFKB1	8	6.28E-06
细胞对镉离子的反应 Cellular response to cadmium ion	MMP9、JUN、FOS	3	6.68E-06
以 DNA 为模板的转录正调控 Positive regulation of transcription, DNA-templated	NCOA1、FOS、ESR1、JUN、AR、NFKB1	6	2.53E-05
以 DNA 为模板的转录调控 Regulation of transcription, DNA-templated	NCOA2、NR3C1、NCOA1、FOS、 ESR1、JUN、AR、NFKB1	8	6.59E-05

续表 4(Continued Tab. 4)

生物过程 BP description	靶基因 Target gene	目标数 Target count	P 值 P value
RNA 聚合酶 II 对转录的负调控 Negative regulation of transcription by RNA polymerase II	NCOA2、NR3C1、ESR1、JUN、AR、NFKB1	6	1.11E-04
细胞因子介导的信号通路 Cytokine-mediated signaling pathway	MMP9、HSP90AA1、MMP1、FOS	4	1.84E-04
Fc-ε 受体信号通路 Fc-epsilon receptor signaling pathway	NFKB1、JUN、FOS	3	1.92E-04
RNA 聚合酶 II 的转录 Transcription by RNA polymerase II	NFKB1、NR3C1、FOS、JUN、ESR1	5	3.06E-04
RNA 聚合酶 II 启动子的转录起始 Transcription initiation from RNA polymerase II promoter	NR3C1、AR、ESR1	3	6.69E-04
凋亡过程的正调控 Positive regulation of apoptotic process	NCOA1、JUN、MMP9	3	6.69E-04
中性粒细胞脱颗粒 Neutrophil degranulation	HSP90AA1、MMP9、NFKB1	3	1.20E-02
以 DNA 为模板的转录负调控 Negative regulation of transcription, DNA-templated	NCOA2、NFKB1、JUN	3	1.86E-02
凋亡过程的负调控 Negative regulation of apoptotic process	NFKB1、JUN、MMP9	3	1.94E-02

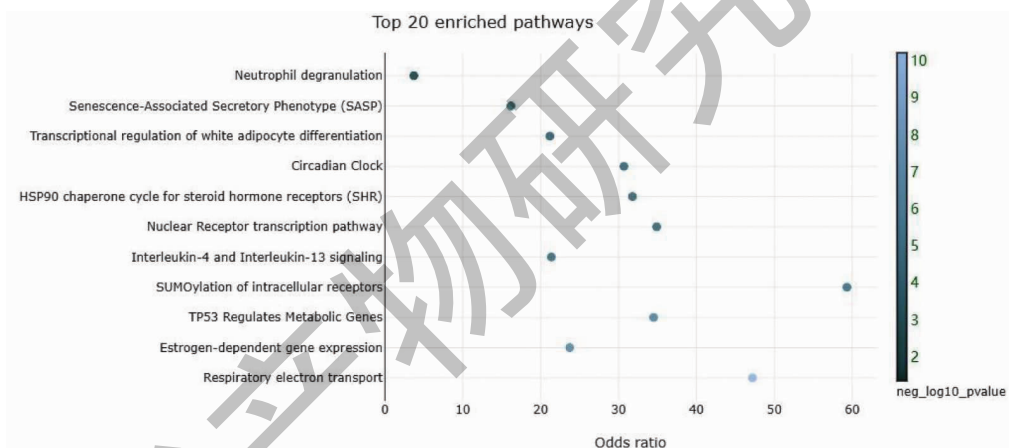


图 3 Reactome Pathway 富集分析

Fig. 3 Reactome pathway enrichment analysis

表 5 Reactome Pathway 分析

Table 5 Reactome pathway analysis

信号通路 Reactome description	靶基因 Target gene	目标数 Target count	P 值 P value
呼吸电子传递 Respiratory electron transport	COX5A、COX5B、CYC1、COX6B1、COX7C、COX6C、UQCRC1	7	5.98E-11
雌激素依赖性基因表达 Estrogen-dependent gene expression	NCOA2、NCOA1、FOS、ESR1、JUN、HSP90AA1	6	1.12E-07
TP53 调节代谢基因 TP53 regulates Metabolic Genes	COX6C、COX6B1、COX5A、COX5B、COX7C	5	2.38E-07
细胞内受体的 SUMO 化 SUMOylation of intracellular receptors	NR3C1、AR、ESR1	3	1.59E-05
IL-4 和 IL-13 信号通路 Interleukin-4 and interleukin-13 signaling	MMP9、HSP90AA1、MMP1、FOS	4	3.02E-05

续表 5 (Continued Tab. 5)

信号通路 Reactome description	靶基因 Target gene	目标数 Target count	P 值 P value
核受体转录途径 Nuclear receptor transcription pathway	NR3C1、AR、ESR1	3	7.96E-05
类固醇激素受体 (SHR) 的 HSP90 伴侣循环 HSP90 chaperone cycle for steroid hormone receptors (SHR)	HSP90AA1、NR3C1、AR	3	1.05E-04
生物钟 Circadian Clock	NCOA2、NR3C1、NCOA1	3	1.17E-04
白色脂肪细胞分化的转录调控 Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation	NCOA2、NFKB1、NCOA1	3	3.52E-04
衰老相关分泌表型 Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP)	NFKB1、JUN、FOS	3	7.75E-04
中性粒细胞脱颗粒 Neutrophil degranulation	HSP90AA1、MMP9、NFKB1	3	4.41E-02

2.4 健脾除痰解毒方治疗肺癌的“方剂-中药材-核心靶标-通路-疾病”多维网络分析

基于健脾除痰解毒方药靶与肺癌靶标的 PPI 网络信息,构建了健脾除痰解毒方干预肺癌的“方剂-中药材-核心靶标-通路-疾病”多维网络图(见图 4)。

由图 4 可知,干预作用主要作用于 7 条通路的

19 个核心靶标。基于上述多方面挖掘,本课题组选择 TP53 调节代谢基因进行基础实验验证健脾除痰解毒方是否可以与整合药理学相结合通过多途径、多层次、多环节干预肺癌,从而体现健脾除痰解毒方在肺癌治疗中的优势。

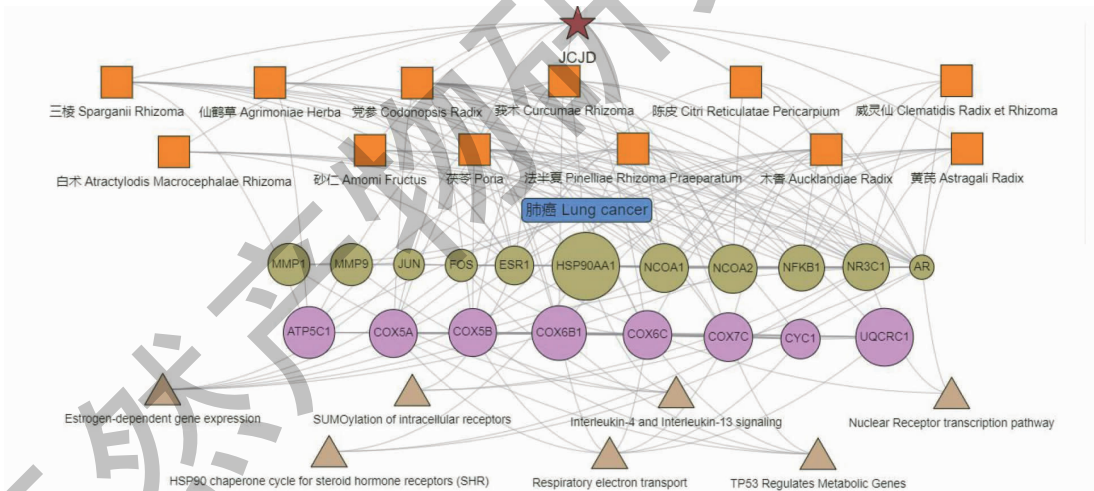


图 4 健脾除痰解毒方干预肺癌的“方剂-中药材-核心靶标-通路-疾病”多维网络关系图

Fig. 4 The multi-dimensional network relationship diagram of "prescription-Chinese herbal medicine-core target-pathway-disease" for Jcjd in preventing lung cancer

2.5 实验结果

2.5.1 对肿瘤组织中乳酸水平的影响

与 MO 组相比,JCJD-H 组和 TO 组肿瘤组织中乳酸含量明显下降 ($P < 0.05$) (见表 6)。

2.5.2 对肿瘤组织中 PTEN、PKM2、HK2 蛋白表达的影响

与 MO 组相比,JCJD-M 组、JCJD-H 组肿瘤组织

中 PTEN 蛋白平均光密度值增加 ($P < 0.05$), TO 组可明显上调肿瘤组织中 PTEN 蛋白平均光密度值 ($P < 0.05$); TO 组肿瘤组织中 PKM2 蛋白平均光密度值降低 ($P < 0.05$), JCJD-M 组、JCJD-H 组肿瘤组织中 HK2 蛋白平均光密度值降低 ($P < 0.05$), TO 组可明显降低肿瘤组织中 HK2 蛋白平均光密度值 ($P < 0.05$) (见图 5~7、表 7)。

表 6 健脾除痰解毒方对肿瘤组织乳酸水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 6 Effect of JCJD on lactic acid level in tumor tissues($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	乳酸 Lactic acid(mmol/gprot)
MO	-	5.56 ± 0.98
DDP	0.002 5	4.04 ± 0.71
JCJD-L	10.32	3.30 ± 0.55
JCJD-M	20.65	3.09 ± 0.52
JCJD-H	41.3	2.58 ± 0.56*
TO	0.002 5 + 41.3	2.18 ± 0.44*

注:与 MO 组相比,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$,下同。

Note:Compared with MO group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,the same below.

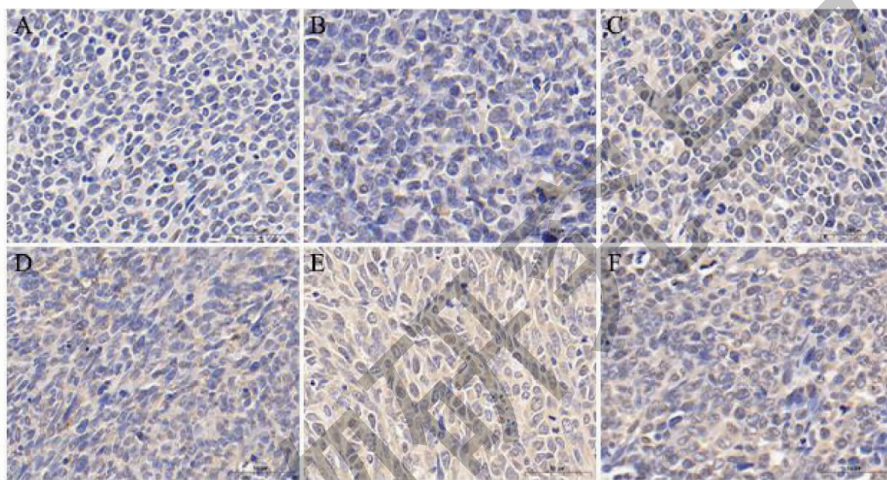


图 5 健脾除痰解毒方对肿瘤组织 PTEN 表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 5 Effect of JCJD on PTEN expression in tumor tissues (Immunohistochemistry, × 400)

注:A:MO组;B:DDP组;C:JCJD-L组;D:JCJD-M组;E:JCJD-H组;F:TO组,下同。Note:A:MO group;B:DDP group;C:JCJD-L group;D:JCJD-M group;E:JCJD-H group;F:TO group,the same below.

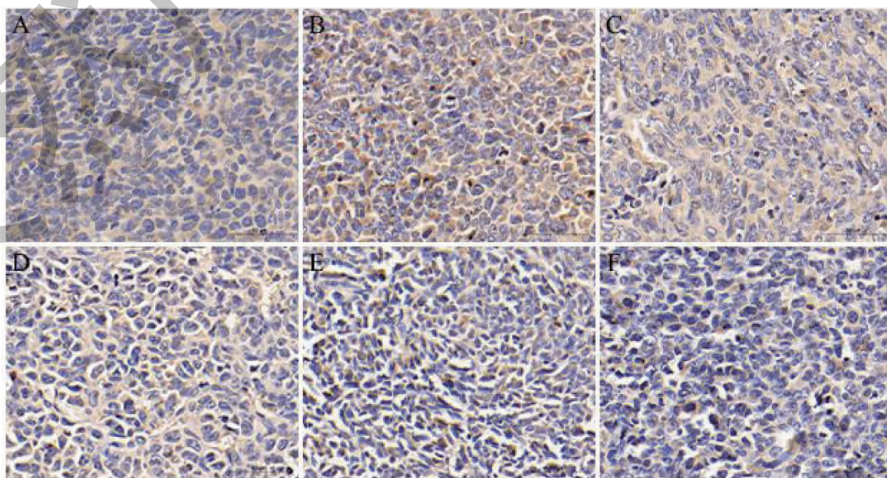


图 6 健脾除痰解毒方对肿瘤组织 PKM2 表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 6 Effect of JCJD on PKM2 expression in tumor tissues (Immunohistochemistry, × 400)

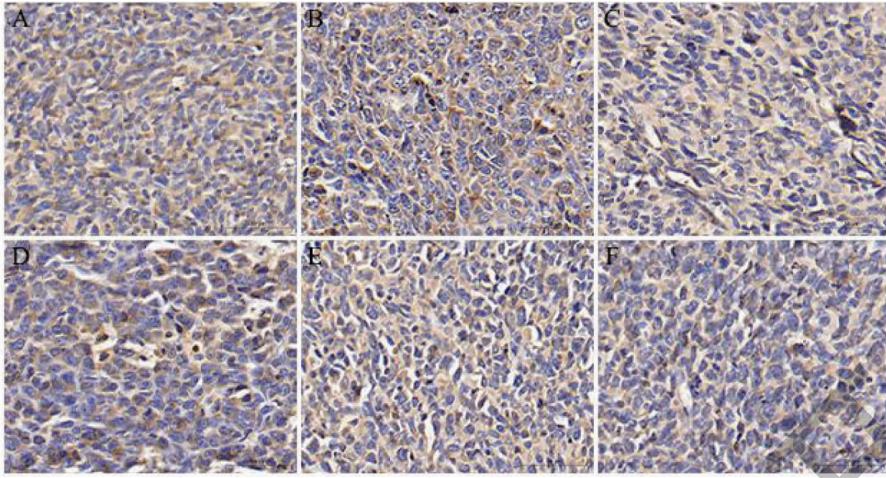


图7 健脾除痰解毒方对肿瘤组织 HK2 表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 7 Effect of JCJD on HK2 expression in tumor tissues (Immunohistochemistry, × 400)

表7 健脾除痰解毒方对肿瘤组织中 PTEN、PKM2、HK2 平均光密度值的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 7 Effect of JCJD on the average optical density of PTEN, PKM2 and HK2 in tumor tissues($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	PTEN	PKM2	HK2
MO	-	0.081 ± 0.005	0.220 ± 0.018	0.220 ± 0.013
DDP	0.002 5	0.117 ± 0.010	0.166 ± 0.012	0.165 ± 0.016
JCJD-L	10.32	0.121 ± 0.013	0.133 ± 0.013	0.157 ± 0.006
JCJD-M	20.65	0.135 ± 0.007*	0.119 ± 0.011	0.150 ± 0.006*
JCJD-H	41.3	0.160 ± 0.007*	0.109 ± 0.009	0.136 ± 0.006*
TO	0.002 5 + 41.3	0.165 ± 0.007*	0.076 ± 0.013*	0.124 ± 0.004*

2.5.3 对肿瘤组织中 P53、TIGAR、GLUT1、PKM2、HK2、PTEN mRNA 表达的影响

与 MO 组相比, JCJD-L 组、JCJD-M 组、JCJD-H 组 TIGAR、GLUT1、PKM2、HK2 mRNA 表达下降($P < 0.05, P < 0.01$), TO 组可明显下调 TIGAR、

GLUT1、PKM2、HK2 mRNA 表达($P < 0.01$); JCJD-L 组、JCJD-M 组、JCJD-H 组 P53、PTEN mRNA 表达上升($P < 0.05, P < 0.01$), TO 组可明显上调 P53、PTEN mRNA 表达($P < 0.01$)(见表 8)。

表8 健脾除痰解毒方对肿瘤组织中 P53、TIGAR、GLUT1、PKM2、HK2、PTEN mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 8 Effect of JCJD on the expression of P53, TIGAR, GLUT1, PKM2, HK2 and PTEN mRNA in tumor tissues($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	剂量 Dose(g/kg)	P53	TIGAR	GLUT1	PKM2	HK2	PTEN
MO	-	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
DDP	0.002 5	1.65 ± 0.46	0.91 ± 0.03	0.85 ± 0.04	0.82 ± 0.07	0.88 ± 0.04	2.26 ± 0.25
JCJD-L	10.32	2.80 ± 0.40*	0.82 ± 0.03*	0.84 ± 0.03*	0.59 ± 0.05*	0.76 ± 0.03*	3.59 ± 0.25*
JCJD-M	20.65	4.57 ± 0.41*	0.68 ± 0.02**	0.72 ± 0.02*	0.49 ± 0.05*	0.72 ± 0.04*	3.58 ± 0.23*
JCJD-H	41.3	5.61 ± 0.29*	0.57 ± 0.03**	0.56 ± 0.03*	0.38 ± 0.05*	0.69 ± 0.03*	5.20 ± 0.22**
TO	0.002 5 + 41.3	7.74 ± 0.21**	0.40 ± 0.02**	0.36 ± 0.01**	0.29 ± 0.04**	0.50 ± 0.02**	7.30 ± 0.18**

2.5.4 对肿瘤组织中 P53、TIGAR、GLUT1、PKM2、HK2、PTEN 蛋白表达的影响

与 MO 组相比, DDP 组、JCJD-L 组、JCJD-M 组

与 JCJD-H 组中 P53 蛋白表达上升($P < 0.05, P < 0.01$), TO 组可明显上调 P53 蛋白表达($P < 0.01$); JCJD-M 组、JCJD-H 组与 TO 组中 PTEN 蛋白表达上

升($P < 0.05$); JCJD-M 组、JCJD-H 组与 TO 组中 PKM2、HK2 蛋白表达下降($P < 0.05$, $P < 0.01$), DDP 组中 TIGAR 蛋白表达下降($P < 0.05$), JCJD-L

组、JCJD-M 组、JCJD-H 组与 TO 组可明显下调 TIGAR、GLUT1 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$) (见图 8)。

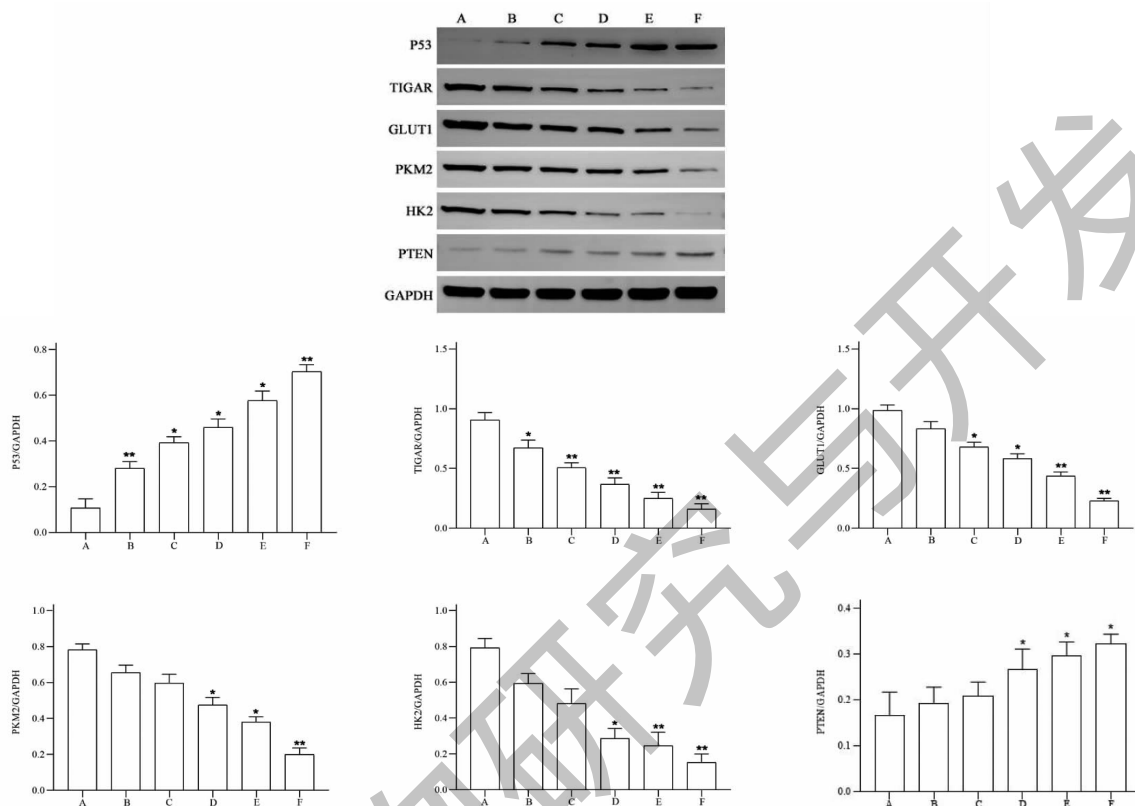


图 8 健脾除痰解毒方对肿瘤组织中 P53、TIGAR、GLUT1、PKM2、HK2、PTEN 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 8 Effect of JCJD on the expression of P53, TIGAR, GLUT1, PKM2, HK2 and PTEN proteins in tumor tissues($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

3 讨论与结论

肺癌的发病率、病死率在世界恶性肿瘤中皆居首位,其治疗依然为全球难题^[12]。中药复方在抗癌抑癌、增强免疫功能、调节肿瘤微环境等方面发挥着显著作用^[13,14],然而中药复方抗癌物质基础及潜在机制的研究仍具有挑战性。整合药理学是中药现代研究的创新方法之一,其从微观到宏观系统解析了中药与机体之间复杂的相互作用关系。本研究基于整合药理学模型,通过网络智能大数据计算挖掘技术提示健脾除痰解毒方干预肺癌的机制与 TP53 调节代谢基因相关,同时体内实验佐证整合药理学分析结果。

研究表明代谢改变是肿瘤发展必不可少的重要环节。与正常细胞不同,癌细胞通过糖酵解代谢葡萄糖,增强葡萄糖摄取和乳酸产生。有氧糖酵解增加导致的乳酸积累促进了肿瘤微环境内的酸中毒^[15]。细胞外空间中与低 pH 值相关的酸性环境

促进了肿瘤细胞的血管生成、侵袭性和转移,并为癌症患者带来更差的临床结果^[16]。这种现象被称为“Warburg 效应”,可使癌细胞在肿瘤生长、抗凋亡、转移和免疫逃逸方面具有很大优势^[17]。

TP53,又称 P53 基因,是人体内关键的“抑癌基因”。P53 正常情况下监控细胞的分裂,针对细胞的癌变,会辅助细胞的修复。当 P53 产生突变时,就会失去抑癌功能,甚至可能帮助肿瘤的产生,被认为是预后差、进展快的标志。研究发现,P53 功能障碍可能导致“Warburg 效应”。且 P53 也可以直接控制细胞的代谢特征,在抑制糖酵解方面发挥着较大的作用^[18]。在本研究中,发现健脾除痰解毒方可下调肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中乳酸水平,并通过 TCMIP V2.0 挖掘分析发现,健脾除痰解毒方可通过 TP53 调节代谢基因这条关键通路干预肺癌的生长。

PTEN 与 P53 在抑制肿瘤发生发展方面存在互补作用,PTEN 不仅表现出抑癌基因的特性,而且在

调节肿瘤细胞的生长发展、增殖凋亡等方面起着重要的作用。肿瘤代谢改变作为一个复杂的过程,代谢酶是其直接执行者,抑癌基因 P53 的改变可通过调控代谢过程中的关键酶,从而调控肿瘤代谢的改变^[19]。研究发现,目前在许多生长迅速的恶性肿瘤中都发现了 HK2、PKM2 的高表达,包括肺癌、肠癌等,且 HK2、PKM2 的改变与肿瘤患者的预后密切相关^[20,21]。大量证据表明, HK2、PKM2 通过“Warburg 效应”在肿瘤发展过程中发挥着重要作用,在多种肿瘤细胞中敲低 HK2、PKM2 可以减少葡萄糖的摄取、降低乳酸的产生,进而抑制肿瘤细胞增殖^[22]。且有研究表明, P53 通过转录抑制 GLUT1 和 GLUT4 并通过下调 TIGAR 表达抑制糖酵解^[23-25]。本研究结果显示,健脾除痰解毒方可上调肺癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 P53、PTEN mRNA 及蛋白表达,下调 GLUT1、TIGAR、HK2、PKM2 mRNA 及蛋白水平,表明健脾除痰解毒方可通过 TP53 调节葡萄糖代谢基因,从而抑制肺癌小鼠荷瘤生长转移。

本研究基于整合药理学和实验验证结果发现,健脾除痰解毒方通过 TP53 调节代谢基因来下调葡萄糖代谢,从而抑制肺癌增殖。总之,本研究强调了健脾除痰解毒方在肺癌中进行葡萄糖代谢重编程的潜在机制,为后续应用健脾除痰解毒方临床干预肺癌提供了新的策略。

参考文献

- Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70: 7-30.
- Jiang RY, Wang T, Lan QY, et al. Bufeixiaojiyin ameliorates the NLRP3 inflammation response and gut microbiota in mice with lung cancer accompanied with qi-yin deficiency [J]. *Cancer Cell Int*, 2022, 22: 121.
- Luo Y, Tong BJ, Zhao B, et al. Chutan Jiedu Decoction reverses of lung cancer to gefitinib by processing EMT [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2019, 35: 34-40.
- Kapelemera AM, Uang YS, Wang LH, et al. Pharmacokinetic herb-drug interactions of Xiang-Sha-Liu-Jun-Zi-Tang and pemetaxel in male sprague dawley rats and its influence on enzyme kinetics in human liver microsomes [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 858007.
- Ou KX, Liu J, Yu CH. Mechanism of herbal couple Sanleng-Ezhu against endometrial cancer based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2022, 38: 73-79.
- Zhou R. Application of state-target application of painful arthritis liver and kidney deficiency [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101: e31463.
- Dong N, Zhang X, Wu D, et al. Medication regularity of traditional Chinese medicine in the treatment of aplastic anemia based on data mining [J]. *Evid-based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 1605359.
- Zhao D, Chen X, Wang L, et al. Improvement influenza vaccine immune responses with traditional Chinese medicine and its active ingredients [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1111886.
- Luo Y, Wang SM, Tong BJ, et al. Effects of Chutan Jiedu Decoction combine with gefitinib on the expressions of twist and fibronectin in nude mouse xenografts models of H1975 human lung adenocarcinoma [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1319-1324.
- Wang SM, Shi ZR, Weng JL, et al. Comparison the therapeutic mechanism of Chutan Jiedu Decoction and Yiqi Chutan Decoction for the treatment of lung cancer based on network pharmacology [J]. *J Oncol Chin Med* (中医肿瘤学杂志), 2022, 4: 28-34.
- Liu X, Wu Z, Zuo S, et al. Establishment of orthotopic lewis lung cancer model in mouse [J]. *Chin J Lung Cancer*, 2010, 13: 42-47.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68: 394-424.
- Li Z. Traditional Chinese medicine and lung cancer from theory to practice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111381.
- Liu Y. Cellular senescence and cancer; focusing on traditional Chinese medicine and natural products [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53: e12894.
- Ganapathy-Kanniappan S. Molecular intricacies of aerobic glycolysis in cancer; current insights into the classic metabolic phenotype [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2018, 53: 667-682.
- Matsuura K. Metabolic regulation of apoptosis in cancer [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2016, 327: 43-87.
- Ganapathy-Kanniappan S. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12: 152.
- Schiliro C. Mechanisms of metabolic reprogramming in cancer cells supporting enhanced growth and proliferation [J]. *Cells*, 2021, 10: 1056.
- Tang M, Xu H, Huang H, et al. Metabolism-based molecular subtyping endows effective ketogenic therapy in p53-mutant colon cancer [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2022, 9: e2201992.
- Mazurek S. Pyruvate kinase type M2: a key regulator of the metabolic budget system in tumor cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2011, 43: 969-980.