

本文引用:凌绵聪,樊伟,熊婷,王天磊,潘嘉欣,莫燕丽,刘建浩. 清金保肺汤联合针灸辅助治疗非小细胞肺癌的临床及网络药理学研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(4): 590-598.

清金保肺汤联合针灸辅助治疗非小细胞肺癌的临床及网络药理学研究

凌绵聪, 樊伟, 熊婷, 王天磊, 潘嘉欣, 莫燕丽, 刘建浩*
(三亚市中医院, 海南 三亚 572000)

〔摘要〕 **目的** 探讨清金保肺汤联合针灸辅助治疗非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)的临床效果,并借助网络药理学方法建立清金保肺汤多成分-多靶点-多通路的中药复方调控网络与关系网络,结合小鼠实验验证其对于 NSCLC 的作用机制。**方法** 选取三亚市中医院 2019 年 1 月至 2020 年 12 月收治的 NSCLC 患者 80 例作为研究对象,分为对照组 40 例(常规治疗)与观察组 40 例(在对照组基础上应用清金保肺汤联合针灸治疗),治疗 1 个月后观察两组治疗效果及评估两组不良反应,监测淋巴细胞亚群百分比及绝对计数的变化情况。通过 GEO 数据库筛选肺癌肿瘤样本与正常样本的差异基因;运用中药系统药理学数据库搜索清金保肺汤药物有效活性成分以及药物作用靶点,运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建成分-靶点基因网络和蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络;利用 R 语言进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)代谢通路富集分析、基因本体论(GO)富集分析。采用 NSCLC 细胞株 A549 右腋下接种建立 NSCLC 荷瘤模型,蛋白质免疫印迹法对网络药理学筛选的关键作用靶点进行验证。**结果** 观察组有效率显著高于对照组($P<0.05$),不良反应率显著低于对照组($P<0.05$),CD3⁺T、CD4⁺T 细胞的绝对计数显著上升($P<0.05$),B 细胞的绝对计数显著下降($P<0.05$)。网络药理分析共筛选得到 35 个靶点基因、59 个有效活性成分;PPI 网络及拓扑网络分析显示,丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、EGFR-酪氨酸激酶抑制剂、核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等可能是清金保肺汤治疗 NSCLC 的重要靶点。KEGG 通路富集分析显示,清金保肺汤治疗 NSCLC 主要与酪氨酸激酶受体信号通路、白细胞介素 17、MAPK 等多条信号通路有关。动物实验结果证实,给药后清金保肺汤低、高剂量组小鼠肿瘤组织中 NF- κ B 和 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白表达水平平均降低($P<0.01$),Bcl-2 相关 X 蛋白表达水平升高($P<0.01$),验证了网络药理学结果。**结论** 本研究基于网络药理学并结合小鼠体内实验,初步探究了清金保肺汤治疗肺癌的基因靶向作用以及通路蛋白等信息,为进一步深入研究清金保肺汤对于肺癌的治疗机制奠定了理论基础。

〔关键词〕 肺癌;清金保肺汤;作用机制;临床效果;网络药理学;信号通路;小鼠

〔中图分类号〕 R285

〔文献标志码〕 B

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.04.012

Clinical and network pharmacology study of Qingjin Baofei Decoction combined with acupuncture in the adjuvant treatment of non-small cell lung cancer

LING Miancong, FAN Wei, XIONG Ting, WANG Tianlei, PAN Jiaxin, MO Yanli, LIU Jianhao*
(Sanya Hospital of Traditional Chinese Medicine, Sanya, Hainan, 572000 China)

〔Abstract〕 Objective To investigate the clinical effect of Qingjin Baofei Decoction combined with acupuncture in the adjuvant treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC). By means of network pharmacology, the regulation network and relationship

〔收稿日期〕 2021-11-09

〔基金项目〕 海南省卫生健康行业科研项目(19A200155)。

〔第一作者〕 凌绵聪,男,硕士研究生,主治医师,研究方向:针药结合治疗内科相关疾病。

〔通信作者〕 *刘建浩,男,博士,主任医师, E-mail: liujianhao168@163.com。

network of Qingjin Baofei Decoction with multi-component, multi-target and multi-pathway were established, and its mechanism of action on NSCLC was studied in vivo in mice. **Methods** 80 NSCLC patients admitted to Sanya Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2019 to December 2020 were selected as the research objects, and they were divided into control group 40 cases (routine treatment) and observation group 40 cases (on the basis of control group, Qingjin Baofei Decoction combined with acupuncture treatment was applied). After one month of treatment, the therapeutic effect and adverse reactions of the two groups were observed, and the percentage and absolute count of lymphocyte subsets were monitored. GEO database was used to screen the differential genes between lung cancer samples and normal samples. The traditional Chinese medicine systems pharmacology (TCMSP) were used to search the active ingredients and drug targets of Qingjin Baofei Decoction. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct the component-target gene network and protein-protein interaction (PPI) network. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) metabolic pathway enrichment analysis and Gene Ontology (GO) enrichment analysis were performed using R language. NSCLC line A549 was inoculated under the right axilla to establish a tumor bearing model. The key targets screened by network pharmacology were verified by Western blot. **Results** The effective rate of observation group was significantly higher than that of control group ($P<0.05$), and the adverse reaction rate was significantly lower than that of control group ($P<0.05$). The absolute count of CD3⁺T, CD4⁺T cells were significantly increased ($P<0.05$), but the absolute count of B cells was significantly decreased ($P<0.05$). A total of 35 target genes and 59 active ingredients were screened by network pharmacology analysis. PPI network and topological network analysis showed that mitogen-activated protein kinase (MAPK), EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and nuclear factor- κ B (NF- κ B) may be important targets of Qingjin Baofei Decoction in the treatment of NSCLC. KEGG pathway enrichment analysis showed that the treatment of NSCLC by Qingjin Baofei Decoction was mainly related to tyrosine kinase receptor signaling pathway, interleukin 17, MAPK and other signaling pathways. Animal experimental results confirmed that, after administration, the expression levels of NF- κ B and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in tumor tissues of mice in Qingjin Baofei Decoction low-dose and high-dose groups decreased ($P<0.01$), the expression level of Bcl-2 related X protein increased ($P<0.01$), which verified the results of network pharmacology. **Conclusion** Based on network pharmacology and in vivo experiment in mice, this study preliminarily explores the gene targeting effect and pathway protein of Qingjin Baofei Decoction in the treatment of lung cancer, which lays a theoretical foundation for further verifying the therapeutic mechanism of Qingjin Baofei Decoction for lung cancer.

[**Keywords**] lung cancer; Qingjin Baofei Decoction; mechanism of action; clinical effect; network pharmacology; signaling pathway; mice

现今,肺癌的发病率与死亡率一直呈上升态势,是增长速度最快、威胁人类健康和生命安全的常见恶性肿瘤之一,分为小细胞肺癌和非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)两个亚型^[1]。有资料显示,约75%的肺癌患者确诊时已处于晚期^[2],且约85%为NSCLC^[3]。目前,西医治疗肺癌仍然以化疗为主,会产生恶心呕吐、脱发等不良反应,同时,患者需承受肿瘤复发、转移带来的焦虑等负面心理,影响治疗效果以及癌症预后,故传统疗法越来越被临床所采用^[4-5]。

清金保肺汤记载于《万氏家抄方》,具有滋阴清热、宣散肺气、止咳平喘等作用。本院多用于治疗肺炎、肺癌、肺结核等肺部疾病,疗效佳且无不良反应,患者容易接受,但治疗机制尚不明确。针灸疗法是

中医药特有的一种非药物治疗手段,在呼吸道疾病中的疗效较为突出,可以减轻放疗、化疗对人体产生的不良反应,提高患者的生活质量。针灸治疗肺癌的具体机制包括增加免疫功能、发挥抗炎作用、抑制肿瘤转移及生长等方面,针药联合也是目前中医临床治疗的常见方法^[6]。

网络药理学可揭示疾病-靶蛋白-药物之间的紧密联系,对于深入研究多途径、多靶点、多成分的中药复方提供了借鉴和思路,有效解决了中医药复方研究的困难^[7-8]。因此,本文针对NSCLC,对比观察清金保肺汤联合针灸辅助治疗的临床效果,同时借助网络药理学的方法探讨清金保肺汤对肺癌的作用机制并进行实验验证,为中医药治疗肺癌提供新思路,也为清金保肺汤的临床应用提供了一定依

据,同时有利于针灸疗法这一中医药特有的非药物治疗手段的推广使用。

1 资料与方法

1.1 临床分析

1.1.1 一般资料 80 例研究对象均为 2019 年 1 月至 2020 年 12 月于三亚市中医院肿瘤科住院的意识清晰、未经过放化疗、无糖尿病史及免疫系统疾病、生存预期>6 个月的 NSCLC 患者,排除妊娠期或哺乳期妇女和患有血液系统疾病、严重心肝肾功能不全及精神疾病者。应用随机数字表法将患者分为对照组(40 例,常规治疗)和观察组(40 例,在对照组基础上应用清金保肺汤联合针灸治疗),两组患者性别、年龄、体质量一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$)(见表 1),本实验通过三亚市中医院伦理委员会批准(伦理号:ZYLL201901023)。

表 1 两组一般资料比较($\bar{x}\pm s$, $n=40$)

组别	年龄/(岁, $\bar{x}\pm s$)	性别/(男/女, 例)	体质量/(kg, $\bar{x}\pm s$)
对照组	47.53±6.19	27/13	66.93±5.67
观察组	45.37±4.96	25/15	63.12±9.44
P 值	0.0890	0.6392	0.0316
t_{χ^2} 值	1.7222	0.2198	2.1882

1.1.2 治疗方法 (1)对照组对症应用常规化疗治疗,静脉滴注顺铂(75 mg/m²)。 (2)观察组在对照组基础上应用清金保肺汤联合针灸治疗。清金保肺汤组方:麦冬(去心)6 g,桔梗 9 g,天冬(去心)9 g,黄芩 9 g,荆芥 9 g,知母 9 g,杏仁 6 g,天花粉 12 g,玄参 12 g,牛蒡子 9 g,五味子 4 g。文火煎熬 40 min,水煎液 500 mL,早晚服用,1 剂/d。针灸:选取患者压痛点和天泉穴、风门穴、肺俞穴、尺泽穴、膏肓穴、心俞穴、中府穴进行针灸,每次留针 30 min,1 次/d。观察两组治疗 1 个月后的治疗效果。

1.1.3 观察指标 临床疗效评定包括治疗效果评估、不良反应评估和免疫功能评估。(1)治疗效果评估:以随访 1 个月内肿瘤病灶缩小程度作为评判指标。进展(progress degree, PD):肿瘤病灶未缩小或面积扩大表示恶化;无变化(no change, NC):肿瘤病灶发生缩小但缩小未超过 50%表示稳定;部分缓解(part relief, PR):肿瘤病灶缩小超过 50%,随访 1 个月内未发生复发情况表示部分缓解;完全缓解

(complete relief, CR):肿瘤病灶完全消失,随访 1 个月内未发生复发情况表示完全缓解。(2)不良反应评估:主要观察患者恶心、呕吐、白细胞降低的发生情况。(3)免疫功能评估:选用四色淋巴细胞亚群分析试剂盒(美国 BD 公司),使用 FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司),检测外周血中淋巴细胞亚群 CD3⁺、CD4⁺细胞、自然杀伤(natural killer cell, NK)细胞、B 细胞百分比及绝对计数。

1.1.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 进行统计分析,计数资料采用“例(%)”表示,行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

1.2 网络药理学研究

1.2.1 正常样本与肺癌样本的差异基因筛选 在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),选定 GEO DataSets 通过搜索库肺癌相关的文章,并以“Entry type”下的“Series”“Top Organisms”下的“Homo sapiens”“Study type”下的“Expression profiling by array”为限定条件,以便筛选文章引用文章中的数据,下载获得同一篇文章的相关文件。利用 R 语言软件,以 logFCfilter=1 且 adjPfilter=0.05 为筛选条件,最终得到差异基因,并分别取出上调最显著的 20 个基因和下调最显著的 20 个基因制作差异热图及差异火山图。

1.2.2 清金保肺汤中药相关基因筛选 在中药系统药理数据库(traditional chinese medicine systems pharmacology, TCMSP, <https://tcmsp.com/tcmssp.php>)中根据口服生物利用度(OB>30%)和类药性(DL>0.18)筛选清金保肺汤组方中各味中药的活性化合物。

1.2.3 清金保肺汤有效成分的靶基因和肺癌差异交集基因 通过 Perl(<http://Strawberryp Perl.com/>)软件,用清金保肺汤有效成分的靶基因在肺癌的差异基因中进行筛选,以便得到有效成分与部分差异基因的对应关系。

1.2.4 中药复方调控网络的构建 借助 Cytoscape 3.7.2(the cytoscape consoritum, <http://cytoscape.org>)软件构建清金保肺汤与肺癌的“有效成分-靶点-疾病”交互网络。

1.2.5 交集基因的蛋白相互作用核心网络(protein-protein interactions, PPI)的构建 使用 Cytoscape 3.7.2

软件中的 Bisogenet 插件进行 PPI 网络绘制。结合 Cytoscape 3.7.2 软件中的 CytoNCA 插件对 PPI 网络进行网络拓扑结构分析,筛选标准为选择节点度值 (degree centrality) 大于 61, 构建一个子网络;接下来以介数中心度 (betweenness centrality) 大于 100 为筛选标准, 构建另一个子网络。

1.2.6 基因功能富集(GO)及通路富集分析(KEGG)

利用 R 软件,选择生物过程 (biological process)、细胞组分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function) 3 个模块进行基因功能富集分析;利用 R 软件对清金保肺汤与肺癌的交集基因做 KEGG 信号通路分析,同时利用 Cytoscape 3.7.2 将 KEGG 通路与其相关基因构建关系网络。

1.3 动物实验

1.3.1 实验材料 C57BL/6 小鼠,SPF 级,7 周龄,体质量 18~22 g,雄性。动物房饲养,温度 (23±2) °C,相对湿度 50%±10%,照明条件为 12 h 光照/12 h 暗循环,自由摄食饮水,所用小鼠实验前均适应性饲养 1 周。

NSCLC 细胞株 A549 (批号: C1002, 杭州亦博生物科技有限公司);注射用顺铂 (规格: 10 mg/支, 国药准字 H37021356, 齐鲁制药有限公司),使用时用无菌生理盐水配制成浓度为 0.4 mg·mL⁻¹ 的顺铂溶液;核因子-κB (nuclear factor kappa-B, NF-κB)、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl2-associated X, Bax)、肌动蛋白 (β-actin) 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔免疫球蛋白 G、增强型 RIPA 裂解液、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、广谱磷酸酶抑制剂混合物 (100×) (批号: BOS113213951、16D16B02、B031132BP51、AA-64132、BST14B25C15I27、14K16B06、025B1050、16L-21C83, 博士德生物工程有限公司);Tris-HCl 缓冲盐溶液 (TBST) (批号: 20201125, 北京索莱宝科技有限公司)。

GeneGnome 成像系统 (基因有限公司);ImageJ 软件 (ImageJ2, 美国国立卫生研究院)。

清金保肺汤药液的制备:取清金保肺汤文火煎熬 40 min,制成生药浓度为 8、16 mg·mL⁻¹ 的药液,置于 4 °C 冰箱保存。

1.3.2 模型的制备、分组与给药 取非小细胞肺癌 A549 细胞株于 37 °C、5%CO₂ 培养箱内培养,待其

生长至对数生长期,用 0.25% 胰蛋白酶消化,离心 (1200 r/min, 10 min, 离心半径 8.359 6 cm),制成单细胞悬液 (细胞浓度为 1×10⁷/mL)。所有小鼠编号,随机分为正常组 10 只和造模组 40 只。造模组小鼠皮下接种单细胞悬液 0.2 mL,正常组小鼠皮下注射无菌生理盐水 0.2 mL。待皮下结节长径生长至 8 mm 左右,即成功建立非小细胞肺癌荷瘤模型,本研究中造模组所有小鼠均造模成功^[9-10]。

将造模成功的小鼠随机分为模型组、清金保肺汤低剂量组、清金保肺汤高剂量组和顺铂组,各 10 只。模型组和正常组均腹腔注射无菌生理盐水 5 mL·kg⁻¹,灌胃给予蒸馏水 5 mL·kg⁻¹;清金保肺汤低、高剂量组分别腹腔注射无菌生理盐水 5 mL·kg⁻¹,灌胃给予 8、16 mg·mL⁻¹ 清金保肺汤药液 5 mL·kg⁻¹;顺铂组腹腔注射 0.4 mg·mL⁻¹ 顺铂溶液 5 mL·kg⁻¹,灌胃给予蒸馏水 5 mL·kg⁻¹。均每天 1 次,连续 14 d。

1.3.3 标本采集与处理 末次给药次日,注射过量 1% 戊巴比妥钠处死小鼠,取出肿瘤组织 (正常组取正常组织) 称重,切成 3 mm×3 mm 左右碎块,-80 °C 冻存,备用。

1.3.4 Western blot 法检测小鼠肿瘤组织 NF-κB、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平^[11] 取“1.3.3”中备用组织,使用 T-PER 组织蛋白提取试剂提取蛋白,Bradford 法测定蛋白含量,SDS-PAGE 法分离 30 μg 蛋白,并转移到硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 NC 膜 1 h;TBST 洗膜后,用 NF-κB、Bcl-2、Bax、β-actin 一抗工作液室温震荡孵育 1 h;TBST 洗膜后,HRP 标记山羊抗兔灌胃 G 二抗室温孵育 1.5 h。GeneGnome 成像系统曝光,ImageJ 软件分析,所得灰度值即为蛋白相对表达量。

1.3.5 统计学分析 所有计量资料数据均以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。各组实验数据进行方差齐性检验,两组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床效果分析

观察组总有效率达 80%,显著高于对照组的 52.5% (*P* < 0.05)。同时,观察组呈现更少的不良反应,发生率仅为 52.5%,显著低于对照组的 90% (*P* < 0.05)。见表 2-3。对比两组治疗前淋巴细胞亚群百分比、绝

对计数,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后与对照组相比,观察组 CD3⁺T、CD4⁺T 细胞的绝对计数显著上升($P<0.05$),B 细胞的绝对计数显著下降($P<0.05$)。见图 1。

表 2 两组治疗效果的评估($n=40$,例)

组别	PD	NC	PR	CR	总有效率/%
对照组	19	10	11	0	52.5
观察组	8	13	16	3	80.0
P 值					0.032
χ^2 值					8.799

2.2 网络药理分析

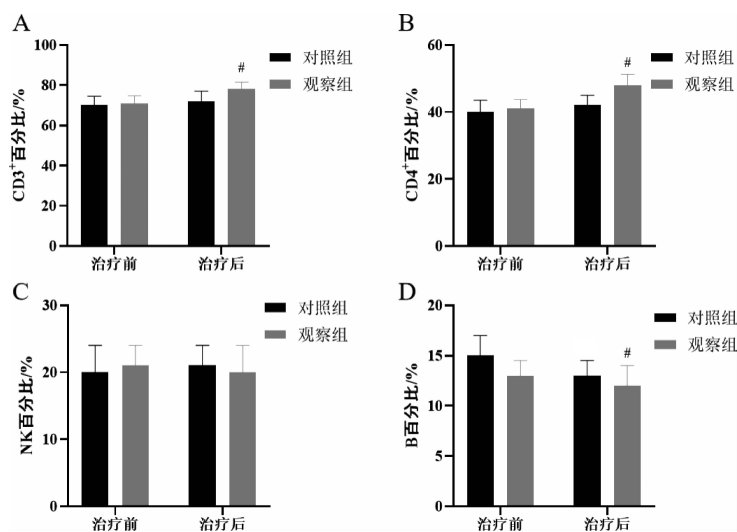
经过对数据处理,共得到正常样本 20 组、肿瘤样本 30 组,以 R 语言为平台,以 $\log FC=0.01$ 、 $P=0.05$ 为阈值对正常样品和肺癌样品进行差异分析,共得

表 3 两组不良反应发生情况($n=40$,例)

组别	恶心	呕吐	白细胞降低	总发生率/%
对照组	19	5	12	90.0
观察组	18	1	2	52.5
P 值				0.042
χ^2 值				6.327

到肺癌疾病差异基因 4212 个,其中对于正常组上调的差异基因共计有 2315 个,对于正常组下调的差异基因总共有 1897 个,并将其绘制差异热图(图 2A)和差异火山图(图 2B)。

通过 TCMSP 平台,得到 128 个活性成分(经过 $OB>30\%$, $DL>0.18\%$ 筛选得到),药物作用靶点 8322 个,经 OB 与 DL 筛选重复项后得 1845 个药物作用靶点。运用 Perl 软件对药物有效成分和相关靶点进行



注:与对照组相比, # $P<0.05$

图 1 两组患者治疗前后淋巴细胞亚群百分比的比较

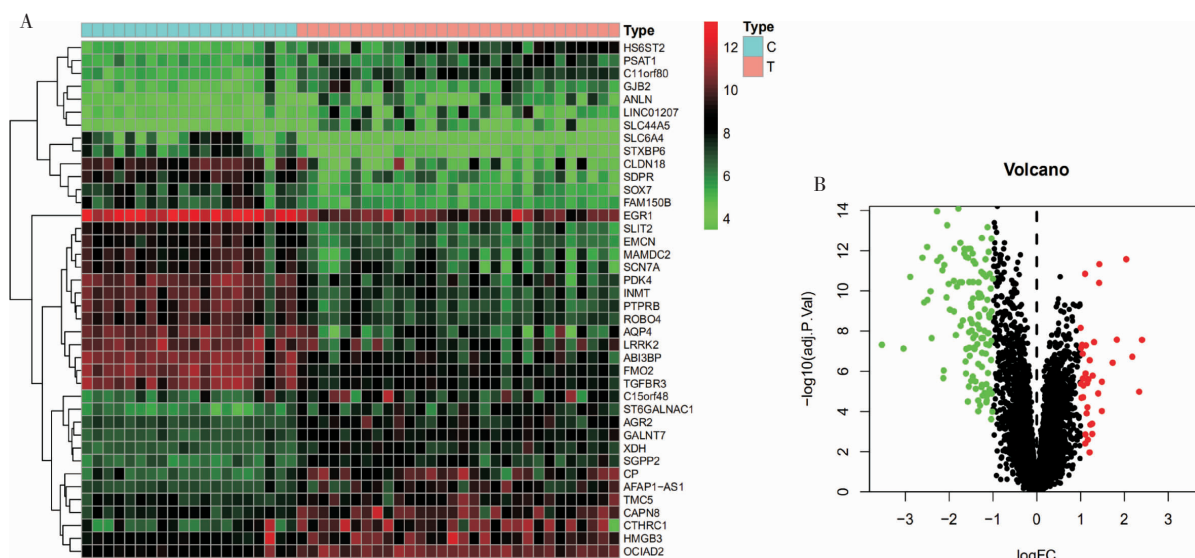


图 2 肺癌正常样本与肿瘤样本的差异热图(A)与火山图(B)

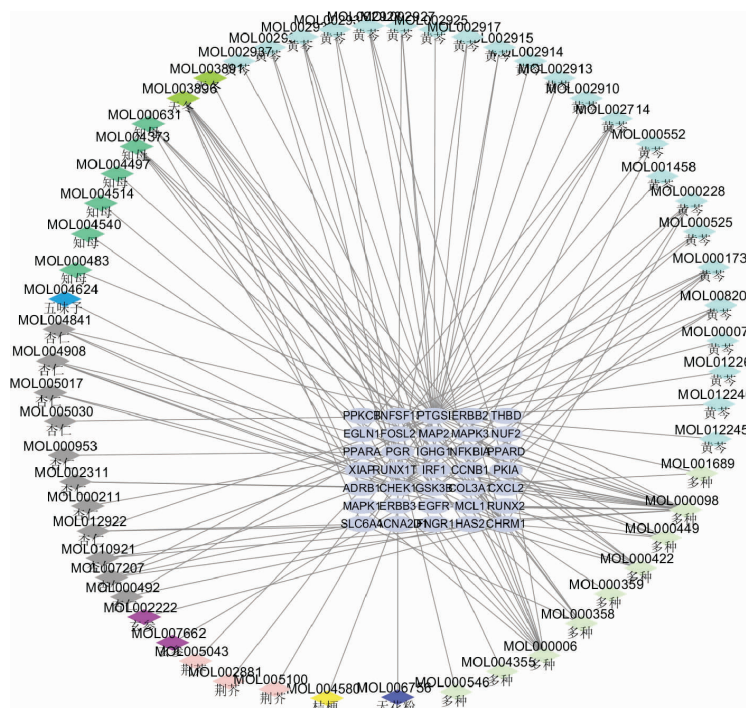


图 3 有效成分-靶点基因网络

整理,共筛选出 35 个靶点基因、59 个有效活性成分。

将药物有效成分与交集靶基因数据导入 Cytoscape 软件构建成分-靶点基因网络,即中药复方调控网络,如图 3 所示。药物分子中槲皮素(quercetin)(Degree=19)、木犀草素(luteolin)(Degree=11)、甲基原薯蓣皂苷元-qt(methylprotodioscin-qt)(Degree=8)、山柰酚(kaempferol)(Degree=6)度值(degree centrality, DC)较大,作用靶点较多,说明这几个活性成分在肺癌治疗过程中起着主要作用。交集基因中环加氧酶 1(prostaglandin endoperoxide synthase 1, PTGS1)(Degree=40)、检查点激酶 1(checkpoint kinase 1, CHEK1)(Degree=14)、毒蕈碱型胆碱能受体 1(cholinergic receptor muscarinic 1, CHRM1)(Degree=14)、孕激素受体(progesterone receptor, PGR)(Degree=14)、糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β)(Degree=11)度值较大,说明药物分子主要作用于这些靶点而对肺癌起到一定的治疗效果。

将交集靶基因数据导入 Cytoscape 软件,借助 Bisogenet 插件制作 PPI 网络,得到 2484 个节点(图 4A),根据网络节点的拓扑特征值,利用度值与介度中心数(betweenness centrality, BC)计算进行拓扑分析,并以 DC>61 为筛选条件进行拓扑结构分析得到 471 个节点(图 4B),以 BC>600 为筛选条件进行拓扑结构分析得到核心网络,其中包含 84 个节点

(图 4C)。

探讨清金保肺汤对肺癌的治疗机制,以 $P<0.05$ 为条件对交集靶基因进行 GO 富集分析,共得到 314 个生物信息有关术语,其中生物过程相关术语 274 条、细胞组分相关术语 9 条、分子功能相关术语 31 条。选择 P 值较低的点进行可视化分析,其可视化分析所得柱状图如图 5 所示。

将交集靶基因以 $P<0.05$ 为筛选条件进行 KEGG 通路富集分析,得到 102 条 KEGG 信号通路,选择其中 P 值较小的 20 条信号通路进行可视化分析,主要信号通路为酪氨酸激酶受体信号通路(ErbB)、白细胞介素 17 信号通路(IL-17)、焦点粘连(Focal adhesion)、丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药等,其可视化分析柱状图如图 6A。并筛选出前 20 条通路用 Cytoscape 软件绘制 KEGG 关系网络(图 6B)。

2.3 各组小鼠肿瘤组织 NF- κ B、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较

与正常组相比,模型组小鼠肿瘤组织 NF- κ B、Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$),Bax、Bax/Bcl-2 蛋白表达水平降低($P<0.01$)。与模型组相比,清金保肺汤低、高剂量组及顺铂组小鼠肿瘤组织中 NF- κ B、Bcl-2 蛋白表达水平降低($P<0.01$);Bax、Bax/Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。与清金保肺汤低剂

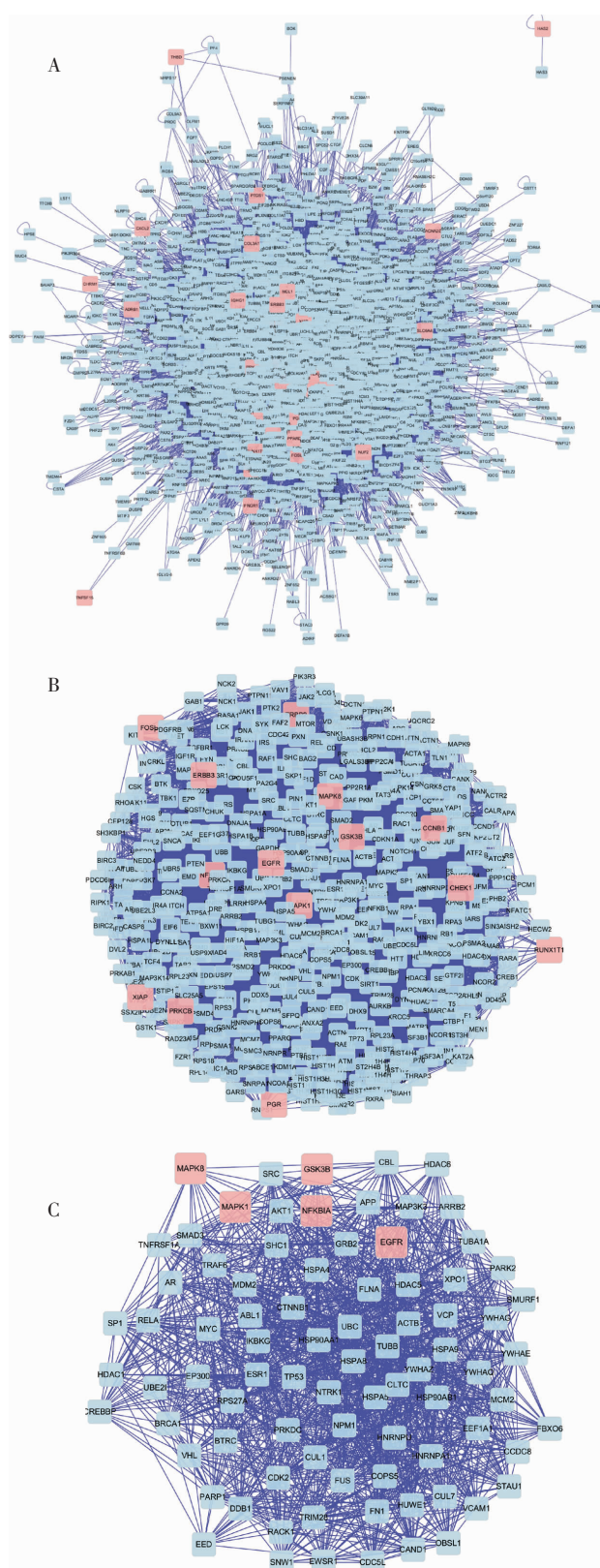
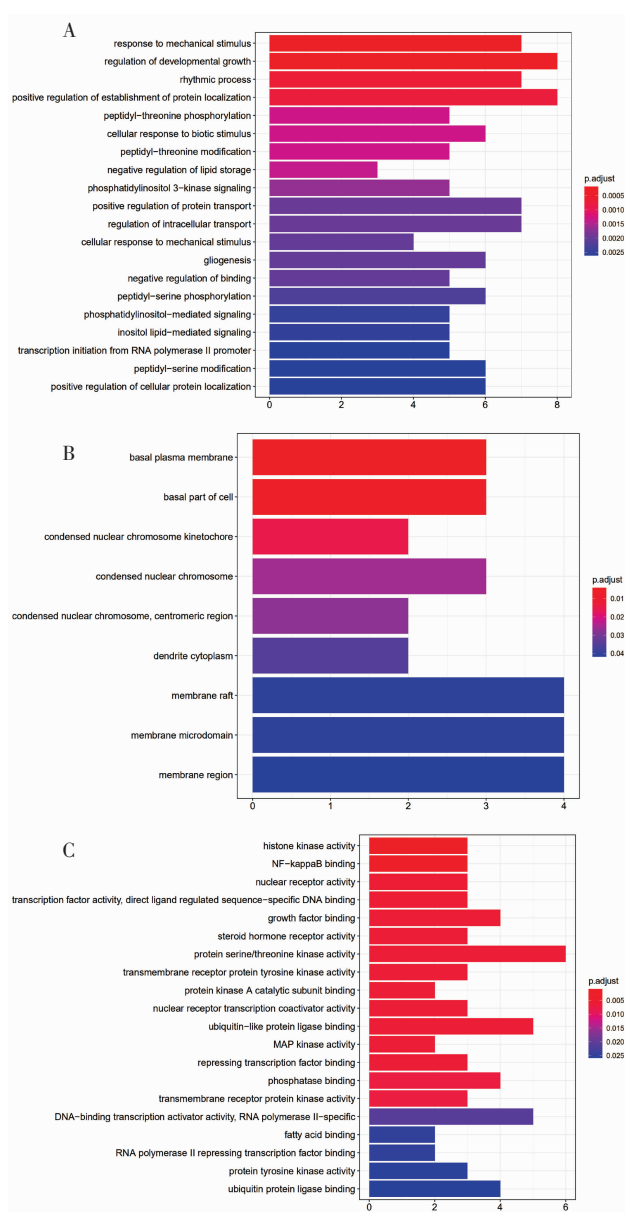


图4 清金保肺汤治疗肺癌相关靶点的PPI蛋白互作网络图(A)与拓扑网络图(B、C)

量组相比,清金保肺汤高剂量组 NF- κ B、Bcl-2 蛋白表达水平降低($P<0.01$);Bax、Bax/Bcl-2 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。以上结果表明,清金保肺汤可调节小鼠肿瘤组织中 NF- κ B、Bcl-2、Bax 的表达水平,对肺癌起到一定的治疗作用。见图 7。

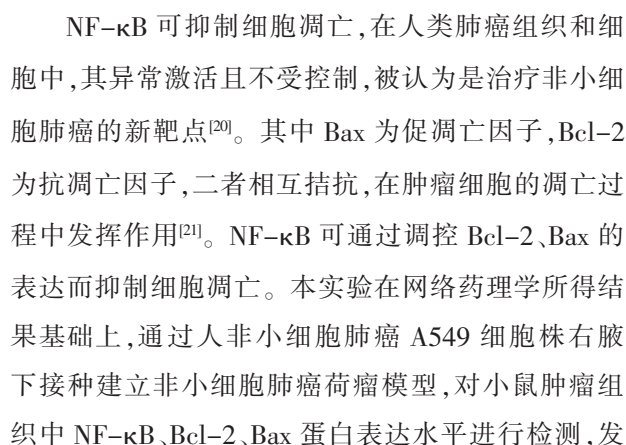


注:A.BP;B.CC;C.MF

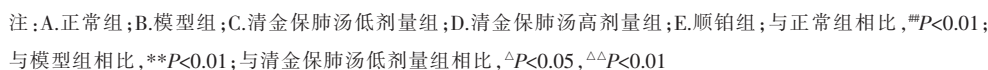
图5 GO 富集分析

3 讨论

本实验结合针灸及现代药理学探究临床效果的同时,运用网络药理学方法探究清金保肺汤对肺癌的作用机制,并结合小鼠体内实验,采用清金保肺汤对非小细胞肺癌荷瘤模型小鼠进行干预,对网络药理学所得结果进行验证,以期为临床应用中中医药治疗肺癌提供一定的思路与方向。TCMSP 平台筛选出槲皮素、木犀草素、山柰酚等活性成分对于肺癌治疗有较强的靶向作用。槲皮素能降低 MMP-9 mRNA、MMP-9 蛋白和转化生长因子- β 1 蛋白的表达而诱导肺癌肿瘤细胞株 A549 凋亡^[12-13]。木犀草素可促使 A549 肺癌细胞凋亡、阻碍 A549 肺癌细胞的侵袭^[14]。



通过 PPI 网络的构建以及拓扑分析得到清金保肺汤治疗肺癌的关键靶点。P53 肿瘤抑制因子(tu-

图 7 各组小鼠肺组织 NF- κ B、Bcl-2、Bax 蛋白表达结果

现清金保肺汤可通过抑制 NF- κ B 信号通路,调节细胞凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 的表达,进而促进肿瘤细胞的凋亡,这一结果与网络药理研究相佐证,为肺癌的中医药治疗提供了参考。

本实验创新性地将针灸疗法应用于非小细胞肺癌的辅助治疗,通过网络药理学方法探究清金保肺汤对肺癌的作用机制,并结合小鼠体内实验验证网络药理学所得结果,为肺癌的临床治疗提供了新思路。

4 结论

清金保肺汤联合针灸组疗效明显高于对照组,清金保肺汤治疗肺癌的有效成分很可能是槲皮素、木犀草素、山柰酚等活性成分,这些成分通过 ErbB、IL-17 等通路作用于 TP53、MDM2、EGFR、MAPK1、MAPK8 等关键靶点,调控蛋白激酶活性与调节细胞对于机械刺激的反应等,从而发挥抑制肿瘤细胞生长、诱导肺癌组织细胞凋亡等作用,从而对肺癌起到一定的治疗作用。

参考文献

- [1] 程 艳,隆会芝,罗红宇,等. 基于网络药理学和细胞实验探究莲子心生物碱防治非小细胞肺癌的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(13):164-171.
- [2] 吴健彬,陈壮忠,钟丽霞,等. 健脾益气方联合化疗对肺脾气虚证晚期非小细胞肺癌患者疗效及生活质量的影响[J]. 广州中医药大学学报,2021,38(5):865-870.
- [3] 宋 勇,高健伟. 精准医学时代的晚期非小细胞肺癌内科治疗进展[J]. 医学研究生学报,2017,30(11):1121-1127.
- [4] 何 伟,佟雅婧,胡 勇. 从“伏毒入络”论中晚期肺癌病因病机[J]. 中国中医药信息杂志,2019,26(11):5-8.
- [5] CHEN W T, CHEN Y K, LIN S S, et al. Hyperforin suppresses tumor growth and NF- κ B-mediated anti-apoptotic and invasive potential of non-small cell lung cancer[J]. Anticancer Research, 2018, 38(4): 2161-2167.
- [6] 李东华,于 晶,李 睿,等. 温针灸对中晚期非小细胞肺癌化疗患者消化道反应及免疫功能的影响分析[J]. 中国医学创新,2020,17(4):142-146.
- [7] 赵 怡,陈美琪,郝书婷,等. 基于网络药理学探讨小柴胡汤抗肺癌作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(9):208-214.
- [8] 王哲义,孙悻泽,曲稔栋,等. 基于网络药理学的麻杏石甘汤治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)作用机制探讨[J]. 中草药,2020,51(8):1996-2003.
- [9] 郑 阳,宿 濛,陈 涛,等. 加味小陷胸汤基于核因子- κ B 信号通路对非小细胞肺癌荷瘤小鼠的影响实验研究[J]. 陕西中医,2021,42(1):23-28.
- [10] 王珊珊,谭光波. 补肺汤对慢性阻塞性肺疾病肺气肿大鼠血清 IFN- γ 、IL-4 表达水平影响研究[J]. 陕西中医,2019,40(11):1491-1494.
- [11] 孟祥龙,刘晓琴,宁晨旭,等. 生、熟地黄通过 AMPK 介导 NF- κ B/NLRP3 信号通路改善高脂饲料并链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的作用机制差异性研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(21):5627-5640.
- [12] 乔路敏,张培彤. 清热解毒法治疗肺癌辨析[J]. 中国肿瘤,2014,23(4):316-321.
- [13] 赵 欣,张 健. 槲皮素抑制肺癌肿瘤细胞的生长和转移的机制[J]. 中南大学学报(医学版),2015,40(6):592-597.
- [14] 徐统震,孙雪飞,任冬梅,等. 木犀草素抑制肺癌细胞 A549 的增殖及其联合化疗作用[J]. 山东大学学报(医学版),2012,50(7):50-54.
- [15] 张 敬,史晓宇,孟 玮,等. 山柰酚通过下调 ERR α 抑制非小细胞肺癌 A549 细胞的侵袭和迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2018,25(12):1230-1236.
- [16] 卢惠明,陈福春,刘 绚,等. 肺癌 P53 和 MDM2 蛋白表达及意义[J]. 数理医药学杂志,2002,15(3):214-215.
- [17] 王政江,王德霞,窦慧慧,等. P53、MDM-2 蛋白在肺癌中的表达及其与肺癌临床病理特征的关系研究[J]. 疑难病杂志,2017,16(10):1047-1049,1053,1081.
- [18] 李 萍,王北宁. p53 基因治疗肺癌及 p53 与 mdm2 基因相互调控的实验研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,1999,6(3):202.
- [19] 郭洪梅,赵 丹,曹 琳,等. 白花蛇舌草水提物通过抑制 MAPK 通路致肺癌细胞的凋亡[J]. 药学与临床研究,2019,27(1):5-9.
- [20] AI X H, MAO F, SHEN S P, et al. Bexarotene inhibits the viability of non-small cell lung cancer cells via slc10a2/PPAR γ /PTEN/mTOR signaling pathway[J]. BMC Cancer, 2018, 18(1):407.
- [21] 程婷婷,李 岩,陈贵元. 地参多糖对非小细胞肺癌 A549 细胞抗肿瘤作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(3):83-90.

(本文编辑 匡静之)