

• 方药研究 •

基于复杂网络的中医方剂治疗肺癌核心药物及其干预靶点分析*

乔 阳¹, 刘 震¹, 郭利平^{1△}, 李 博¹, 任 明²

(1. 天津中医药大学, 天津 300193; 2. 天津中医药大学附属保康医院, 天津 300193)

摘要: **目的** 探讨中药方剂治疗肺癌的核心药物以及对其作用机制和效应靶点预测。**方法** 通过复杂网络的方法基于近 20 年文献首先筛选中药方剂中治疗肺癌的主药,再通过中药网络药理学数据库以及 TCGA 肿瘤全基因组数据库,通过数据挖掘方法探讨预测主药治疗肺癌的机制及关键靶点,并通过大数据高通量全基因组信息观察调节关键靶点对肺癌患者生存期的影响。**结果** 黄芪是肺癌治疗中医方药中的核心主药,不仅使用率最高并且与其他药物的配伍最多,能有效干预磷脂酶 D1(phospholipase D1, PLD1)基因靶点,而 PLD1 作为特异性基因在肺癌尤其是小细胞肺癌中呈现高表达,调节 PLD1 的表达可有效提高小细胞肺癌患者的生存率。**结论** 黄芪是肺癌治疗方药中的核心主药,其机制可能是干预 PLD1 起作用。

关键词: 肺癌; 复杂网络; 黄芪; 磷脂酶 D1(PLD1)

中图分类号: R273; R734.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2019)01-0077-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2019.01.017

A Preliminary Study on the Core Drugs and Intervention Targets of Traditional Chinese Medicine Prescription for Lung Cancer Based on Complex Network

QIAO Yang¹, LIU Zhen¹, GUO Liping¹, LI Bo¹, REN Ming²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Baokang Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

ABSTRACT: **Objective** To explore the core herbs of traditional Chinese medicine prescriptions in the treatment of lung cancer and to predict their action mechanism and effect targets. **Methods** Based on the literature of the past twenty years, we first screened the main drugs for lung cancer in Chinese herbal prescriptions, and then explored the mechanism and key targets of the main drugs for lung cancer treatment by data mining through Chinese herbal network pharmacology database and TCGA tumor genome database, and then observed and adjusted the key points by large data and high throughput genome-wide information. **Results** Astragalus membranaceus is the core of Chinese medicine in the treatment of lung cancer, not only with the highest utilization rate but also with the most compatibility with other drugs, it can effectively interfere with PLD1 gene target, and PLD1 as a specific gene in lung cancer, especially in small cell lung cancer shows high expression, regulating PLD1. **Conclusion** Astragalus membranaceus is the core drug in the treatment of lung cancer, and its effective mechanism may be through the intervention of PLD1.

KEY WORDS: lung cancer; complex network; Astragalus membranaceus; PLD1 gene target

在过去几十年中,肺癌一直是世界各个地区癌症死亡的主要原因,根据国家癌症中心于 2018 年 2 月发布的数据显示,肺癌是全国恶性肿瘤发病率以

及恶性肿瘤导致死亡人数最高的肿瘤,同时根据 2019 年最新发布的美国癌症统计报告及预测模型显示,肺癌发病人数是所有新发病例人数第二高的肿

收稿日期: 2019-01-16

* 基金项目: 国家中医药管理局行业专项(201107006);天津市滨海新区卫计委重点项目(2016BWKZ001);天津市教委科研计划项目(2017KJ152);天津市科技计划项目(15ZXLCZY00020)

第一作者简介: 乔阳(1989-),女,在读博士研究生,主要从事中医老年病的研究。

△通信作者: 郭利平,Email:lpgtjn@163.com.cn

瘤,其死亡人数将比因患乳腺癌、前列腺癌、大肠癌以及白血病的死亡人数相加总和更高^[1]。尽管新的血液疗法和细胞免疫疗法有一定进展,但主要的治疗方案依旧局限于手术切除以及放化疗(ALA 2015),同时并没有观察到肺癌患者的预后获得明显的改善。

中医疗法常用来改善西医疗法对肺癌患者的副作用,特别是那些接受联合化疗和放疗的非小细胞肺癌(NSCLC)的患者。据报道,中医治疗肺癌的机制可能是通过调节肺癌患者的免疫功能,增强 T 细胞迁移活动,抑制肿瘤细胞的增殖和促进肿瘤细胞凋亡等途径^[2-4]。

在既往的研究中我们发现,中医药疗法可有效提高肺癌生存周期,对肺癌具有一定靶向效应和确切的疗效,许多肺系疾病经典方剂对肺癌的治疗有明显作用,如玉屏风散、四君子汤等。有研究表明,通过服用四君子汤可有效缓解肺癌症状,改善患者生活质量^[5]。治疗肺癌的中药方剂使用药物广泛博杂,然而其配伍规律以及核心药物尚不明确,同时既往对肺癌治疗方药的数据挖掘研究多从中医治疗“理法方药”的层面上分析药物和使用依据,缺乏从分子生物学层面上对肺癌治疗方药干预靶点的讨论。故本文拟基于近 20 年中医治疗肺癌的临床文献,通过复杂网络的方法筛选治疗肺癌的中药方剂中的核心药物,并结合中药网络药理学数据库提供模型进行核心药物干预靶点预测,最后利用 TCGA 肿瘤高通量基因组数据库验证关键干预靶点对肺癌患者生存期的影响。

1 材料与方法

1.1 数据采集

1.1.1 文献来源 文献检索采用计算机检索,限定语种为中文,检索数据库包括主要中文期刊文献数据库,包括中国知网(CNKI)、万方数据知识服务平台(WANFANG DATE)、维普中文期刊服务平台(VIP)等。检索策略使用主题词检索,其中疾病主题词包括“肺癌”“肺肿瘤”“小细胞肺癌”“非小细胞肺癌”“鳞癌”“肺腺癌”“肺大细胞癌”,治疗主题词限定为“中药”“中药方剂”,两部分主题词之间以“And”连接。检索年限均限定为 1997–2017 年近 20 年相关文献。

1.1.2 文献纳入标准 ①研究对象选择国内所有中药治疗肺癌的临床研究全文文献;②诊断标准为《2015 年肺癌诊疗指南》明确诊断为“肺癌”的患者;

③采用中药治疗为主,可合并其他常规肿瘤治疗方法;④方剂配伍属于《中医内科学》范畴,且效果确切;⑤明确给出方剂处方,中药选择包括草本、金石、羽翎、走兽等纲目。

1.1.3 文献排除标准 ①根据“孤证不立”的原则,排除样本数<10 的专家经验或个案报导文献;②综述、Meta 分析及机制研究等类型论文;③诊断不明确,或临床症状表现与“肺癌”诊断标准不符;④重复发表的文献,仅纳入一次;⑤会议论文或专家通信。

1.1.4 数据规范处理与挖掘 中药名称规范处理:本研究中,药物名称存在曾用名、通俗名、口语名等情况者均以《中华药典》^[6]为标准修订规范。

中药处方规范处理:双人执行纳排标准并进行处方提取,对于符合标准的潜在相关文献获取其全文,所有有争议的文献经双人讨论或请教第三人。

1.1.5 数据挖掘方法 数据库建立:采用 Microsoft Excel 建立“中药方剂治疗肺癌数据库”,建立数据库基本条目,包括:题目、第一作者、方剂名称、中药名称、性味、归经等内容。

关联分析:使用专业数据挖掘软件“IBM SPSS MODELER 18.0”版本进行关联分析,作为经典的关联规则算法之一,Apriori 算法中包含两则重要定义即支持度(Support)与置信度(confidence)。支持度与置信度分别反映此关联规则的有效性和确定性,就中药 A 与中药 B 的关联规则而言:支持度即为同时出现中药 A 和中药 B 的概率,用以描述中药间关联规则的频度,是对关联规则重要性的度量。置信度是使用中药 A 的基础上再使用中药 B 的概率,用以描述中药间关联规则的强度,是对关联规则准确性、可靠性的度量^[7]。在本研究中均选取置信度 ≥ 10 的中药配伍作为可信配伍。

1.1.6 复杂网络的构建 使用 Gephi 软件进行复杂网络分析,该软件使用主要包括 3 个步骤,即点与边的输入、拓扑构图、网络分析。

①点与边的输入:在本研究中,复杂网络的点即中药名称,边即通过 Apriori 算法计算所得中药—中药支持度;

②拓扑构图:拓扑构图为可视化工作最重要的内容之一,本研究选择的构图模式为 Fruchterman Reingold 模式,即“重力离心”构图模式,将连接密度

大的节点置于图形中央,节点的位置随重要程度逐渐由内向外离散;

③网络分析:通过复杂网络分析法筛选出其中重要的节点,故选择度(Degree)与中介性(Betweenness centrality)两指标作为衡量节点重要程度的量化参考,其中度为某个节点连接的边的总数目,该参数的意义在于衡量某个节点与其他节点直接联系的能力,度高的节点称为度中心,代表其位于整个网络的直观核心位置,中介性反映了节点在网络拓扑结构中所处位置的枢纽程度,将具备高中介中心性的节点称为中介中心,通过中介节点在网络中的枢纽特性,可提高节点之间的连接效率,提升网络的连接特性。

1.2 网络药理学机制及关键干预靶点预测 核心药物的网络药理学效应以及关键干预靶点预测模型来源于中药方剂网络药理学数据库(BATMAN:<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>),该数据库是第一个专门为研究中药分子机制而设计的在线生物信息学分析工具,该数据库可预测每一种中药成分的潜在靶点,然后对这些目标进行功能分析,包括基因本体(GO)、KEGG 途径和 omim/ttd 疾病浓缩分析。这些功能旨在促进对中医“多成分、多目标、多途径”组合治疗机制的理解,为今后的实验验证提供线索。此外,数据库还支持用户同时输入多味中药(如成方或自拟方),通常用于同时分析一个方剂可能的多个作用靶点,帮助理解分子和系统层次的药物组合原理^[8]。

1.3 TCGA 肿瘤全基因组数据库 肿瘤基因组图谱(TCGA)计划由美国 National Cancer Institute(NCI)和 National Human Genome Research Institute(NHGRI)于 2006 年联合启动的项目,目前共计研究 36 种癌症类型。其数据来源于癌症病人自愿捐赠肿瘤组织及正常组织样本,由人类癌症生物标本核心资源库承担癌症组织标本和正常组织标本的采集、处理和分配工作,通过高通量测序中心(GSC)分析与各癌症或者亚型相关的基因突变、扩增或者缺失,包括 mRNA 数据、microRNA 数据、Mutation 表现突变数据以及由蛋白芯片测序所得约 200 种常见癌症相关蛋白表达等数据^[9]。

2 结果

2.1 检索结果 检索流程如图 1 所示,根据文献检索策略及纳排标准,最终纳入符合标准文献共计 244

篇,经过人工阅读提取,共提取肺癌相关中药方剂 306 则。

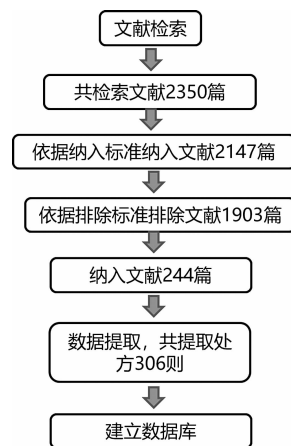


图1 检索流程

2.2 肺癌治疗中药方剂网络 通过复杂网络构建肺癌治疗中药方剂网络(见图2),从图中可以看出,黄芪、麦冬、北沙参、白术等药物为治疗肺癌中药方剂中较重要的药物。其中,黄芪位于整个模型的核心位置,不仅使用概率最高,也是和其他药物配伍使用最多的药物。通过量化网络节点中心程度的 Degree 值和 betweenness centrality 值我们也发现,黄芪数值远高于其他药物,这表明在肺癌的中药方剂配伍中不仅可以作为君药统领诸药,还可作为臣药配合其他药物更好发挥作用。

2.3 黄芪的干预靶点预测 通过中药方剂网络药理学数据库预测模型分析,利用主成分分析法,结合黄芪的化学成分,我们发现黄芪的提取物能有效干预 PLD1 靶点。如图 3 所示,经过 GO 分析和 KEGG 注释,发现 PLD1 作为许多细胞分化途径的重要步骤,对包括信号转导、膜运输和有丝分裂都起干预作用,并可作为囊泡内的膜运输核。其主要作用机制是通过刺激磷脂酰肌醇二磷酸和磷脂酰肌醇 3,4,5-三磷酸,磷酸激酶活化的 C- α ,通过将 ADP-核糖基化因子 arf-1 (-1)、以及由 GTP-结合蛋白的 Rho、Cdc42 和 Rac-1。

2.4 PLD1 在肺癌中的干预作用 通过分析 TCGA 数据库我们发现,在 25 种肿瘤及亚型的横向对比中,PLD1 在 2 种肺癌亚型,包括 831 例小细胞肺癌(LU-AD)及 874 例肺鳞癌(LUSC)中均呈现高表达(见图 4),尤其是在小细胞肺癌中,PLD1 在肺鳞癌组织中的表达是健康肺组织的 2 倍以上。同时,根据来源于真

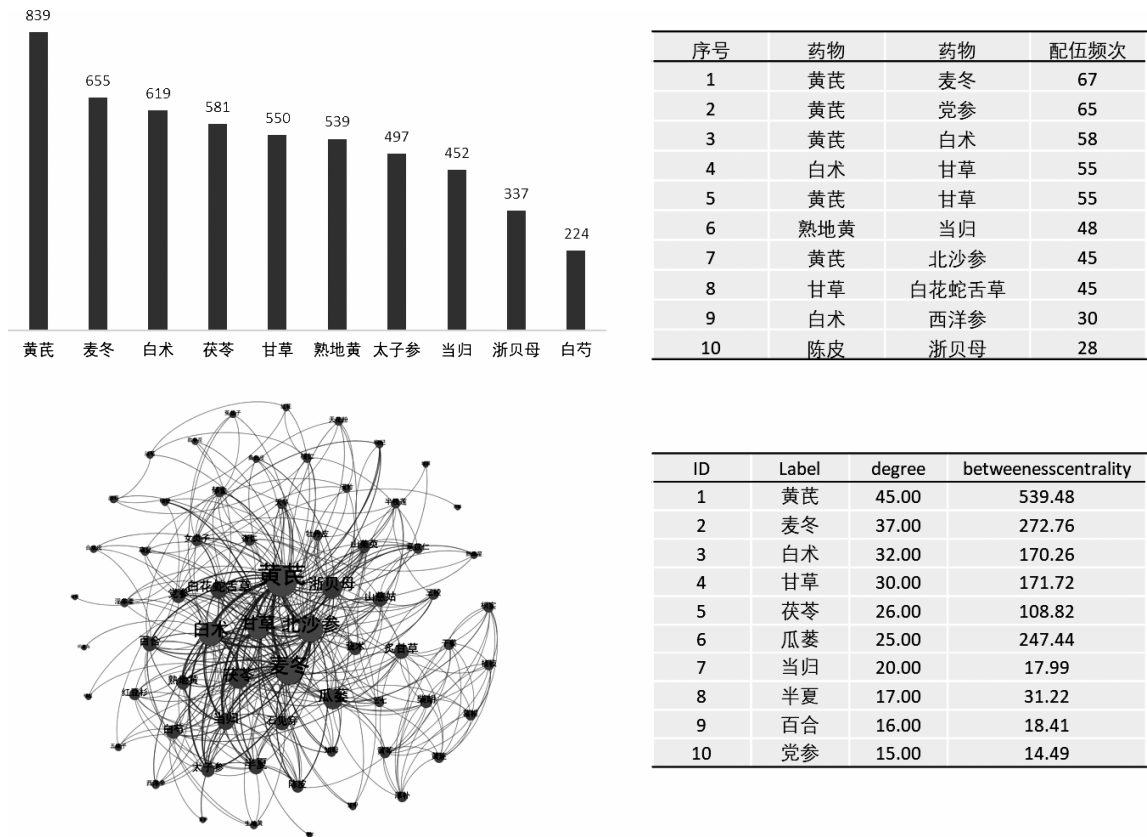


图 2 肺癌治疗中药方剂复杂网络模型及参数

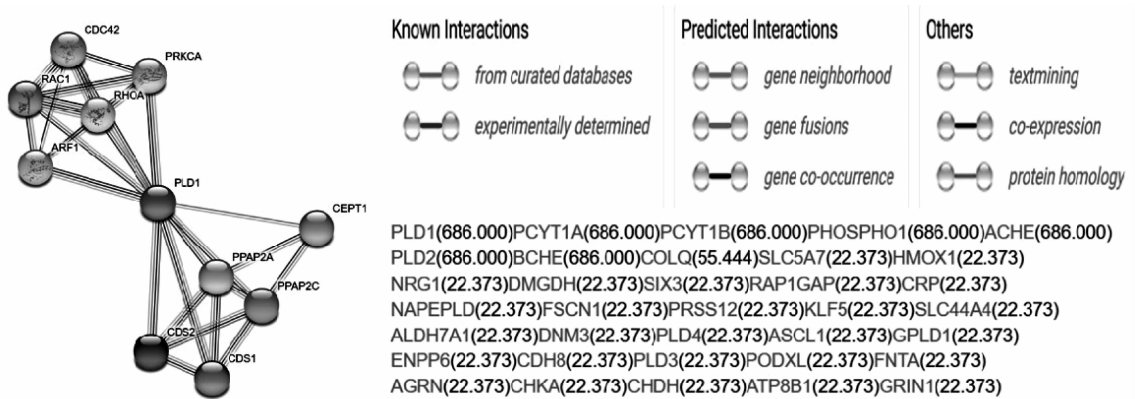


图 3 黄芪潜在干预靶点 PLD1 蛋白互作用机制

实世界临床病例的 482 例小细胞肺癌以及 477 例肺鳞癌的生存报告, 绘制全生存周期内的生存曲线, 结果显示, PLD1 高表达对于小细胞肺癌的生存周期具有重要影响且具备显著性差异 ($HR=1.6, P=0.002$), 即 PLD1 高表达人群在同一个时间节点内死亡几率是低表达人群的 1.6 倍, 但在肺鳞癌中我们并未观察到 PLD1 的表达量与生存周期存在明显相关性。研究结果提示, 降低 PLD1 的表达对于提高肺癌尤其是小细胞肺癌患者的生存率具有重要意义, 但对于肺鳞癌患者可能并无显著作用。

3 讨论

中医学理论认为“邪之所凑, 其气必虚”, 辨证肺癌, 多属气虚。黄芪性甘温, 归肺脾经, 有补气壮阳、固表敛汗之效, 为传统补气之要药。近年来, 有关黄芪在防治肿瘤领域中的研究更是得到了科研人员的热点关注。研究表明, 黄芪化学成分相对复杂, 主要包括有多糖、皂苷、黄酮等^[10]。黄芪多糖 (Astragalus polysaccharides, APS) 是其主要有效活性成分, 在体外对 Lewis 肺癌细胞有抑制转移作用^[11]。黄芪多糖不仅能诱发肿瘤细胞凋亡, 还可抑制 Th1 型细胞因子和

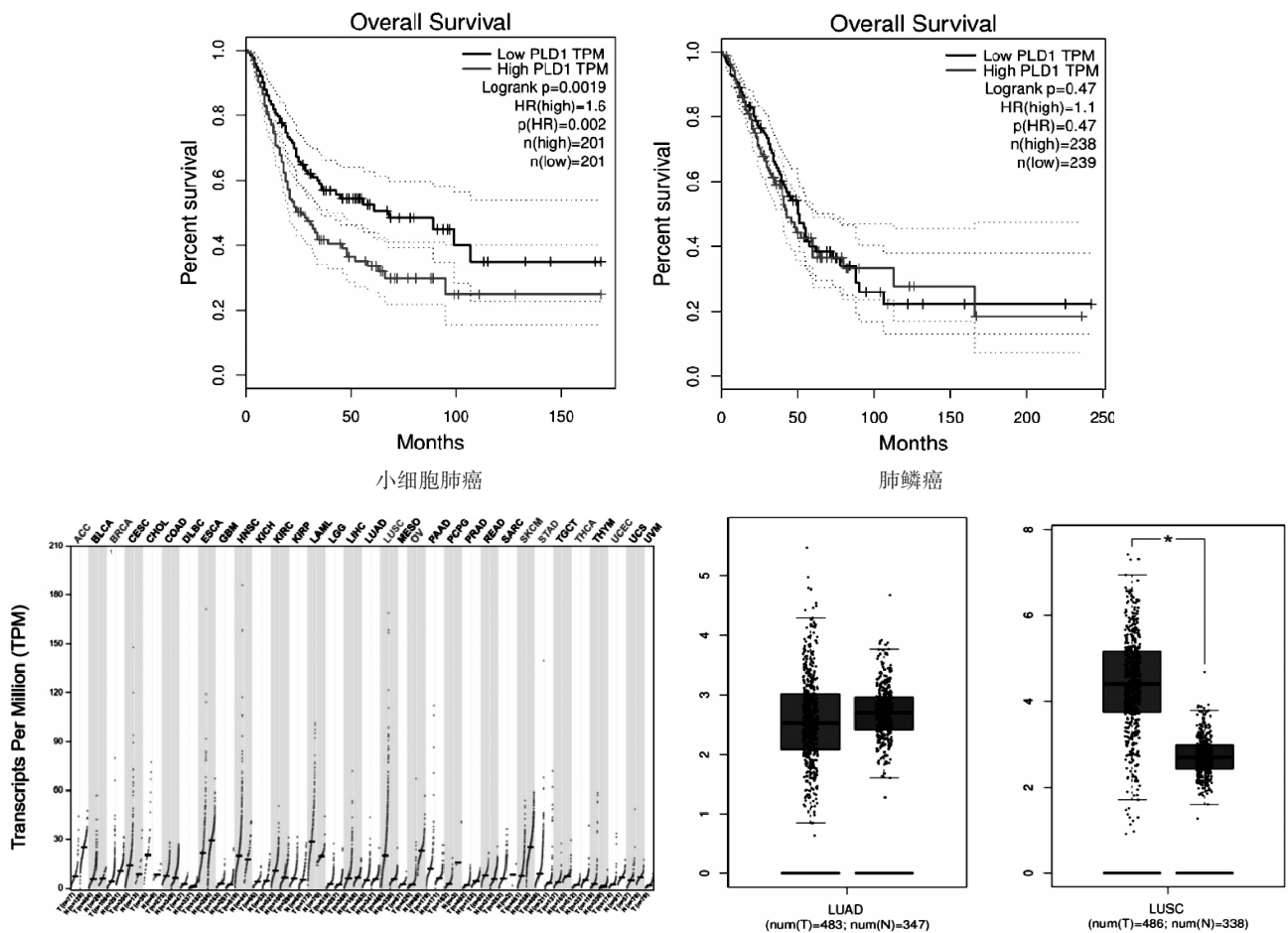


图 4 PLD1 在肺癌中的表达情况及对生存率的影响

转录因子的表达,起到调节 T 细胞亚群的作用^[12]。黄芪甲苷(astragaloside A)作为中药黄芪的最主要单体活性成分之一,能抑制 SPC-A-1 细胞增殖,增加细胞凋亡率^[13]。临床研究发现,黄芪口服液、黄芪注射液,可改善老年肺癌患者的免疫功能,提高生存质量,利于生存期的改善^[14-15]。以黄芪为君药的方剂如黄芪生脉饮、大黄芪汤对非小细胞型肺癌的治疗有良好的辅助作用^[16-17]。

磷脂酶 D(phospholipaseD, PLD)是调控机体磷脂代谢的重要酶类^[18],近年研究表明,在多种恶性肿瘤中,PLD 表达和活性增高,并可促进肿瘤的增生和浸润,PLD 对肿瘤细胞的生存、生长以及侵袭转移的促进作用主要是通过其酶解产物 PA 与信号通路靶分子的相互作用实现^[19]。哺乳类动物常见 PLD1 和 PLD2 2 种亚型^[20]。相关文献表明,在多种肿瘤组织中均发现 PLD1 活性异常升高,如胃癌、肝细胞癌等^[21-22]。

肺癌是比较常见的恶性肿瘤之一,我国肺癌发病率处于不断的攀升趋势并趋于年轻化^[23],肺癌的发生发展机制及其治疗的转归和预后是当前研究的热点之一。有关 PLD1 与肺癌尤其是小细胞肺癌的生存周期关系的相关报道并不多见。通过中药网络药理学数据库以及 TCGA 肿瘤全基因组数据库,通过数据挖掘方法探索预测中药黄芪能有效的干预 PLD1 这个关键靶点,并通过大数据高通量全基因组信息观察调节 PLD1 靶点对肺癌患者生存期的影响,为进一步的实验研究提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] CHEN S, FLOWER A, RITCHIE A, et al. Oral Chinese herbal medicine (CHM) as an adjuvant treatment during chemotherapy for non-small cell lung cancer: A systematic review [J]. Lung Cancer, 2009, 68(2): 137-145.
- [3] GAO J, MORGAN W A, ALBERTO S M, et al. The

- ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* and the active compounds induce cell cycle arrest and apoptosis including upregulation of p53 and Bax in human lung cancer cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 254(3):221-228.
- [4] KAO S J, SU J L, CHEN C K, et al. Osthole inhibits the invasive ability of human lung adenocarcinoma cells via suppression of NF- κ B-mediated matrix metalloproteinase-9 expression [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 261(1):105-115.
- [5] 刘丽荣, 徐凯. 中医药治疗晚期非小细胞肺癌研究现状[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(6):98-100.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:6-13.
- [7] 李澄, 谢雁鸣, 张寅, 等. 基于关联规则 Apriori 算法的真实世界复方苦参注射液治疗乳腺恶性肿瘤西药联合应用特征研究[J]. *中南药学*, 2017, 15(11):1513-1519.
- [8] LIU Z Y, GUO F, WANG Y, et al. BATMAN-TCM: a bioinformatics analysis tool for molecular mechanism of traditional Chinese medicine[J]. *Sci Rep*, 2016(6):21146.
- [9] Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. [J]. *Nature*, 2011, 474:609-615.
- [10] 邓晓霞, 李清宋, 陈中, 等. 黄芪抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *中药新药与临床药理*, 2016, 27(2):307-312.
- [11] 李杨, 杨玲玲, 白彦丽, 等. 黄芪多糖对气阴两虚 Lewis 肺癌荷瘤小鼠肿瘤生长、转移及细胞周期的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2018, 45(3):131-137.
- [12] 王美阁. 黄芪多糖对非小细胞肺癌患者免疫功能的影响[J]. *光明中医*, 2017, 32(3):335-337.
- [13] 杨晶源, 王立宏, 王利. 黄芪甲苷抗人肺癌 SPC-A-1 细胞增殖作用及其机制 [J]. *中成药*, 2016, 38 (8):1818-1820.
- [14] 戴彭辰, 刘一诚, 何成诗, 等. 黄芪口服液辅助化疗治疗老年肺癌的临床疗效及对免疫功能的影响[J]. *转化医学电子杂志*, 2016, 3(5):1-3.
- [15] 刘德志, 蓝朝廷. 黄芪注射液在老年肺癌患者辅助化疗中的作用[J]. *中国初级卫生保健*, 2017, 31(7):76-77.
- [16] 桂雪梅, 黄成亮, 范贤明, 等. 黄芪生脉饮用于非小细胞型肺癌辅助治疗的临床研究 [J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(2):100-104.
- [17] 熊绍权, 罗秋月, 李亚玲, 等. 大黄芪汤联合化疗抑制晚期非小细胞肺癌新增转移的回溯性临床研究[J]. *成都中医药大学学报*, 2018, 41(1):46-49.
- [18] 高雅, 曹函激, 胡天惠. 磷脂酶 D 在肿瘤发生中的作用机制研究进展[J]. *肿瘤防治研究*, 2013, 40(9):899-902.
- [19] 洪星辉, 黄金玲. Wnt/ β 连环素和 NF- κ B 信号通路对磷脂酶 D 的调控作用及其与肿瘤关系的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(5):779-783.
- [20] 高敏娜, 李昱. Wnt/ β -catenin 和 NF- κ B 信号通路对肿瘤血管生成中 VEGFs/VEGFRs 的调控作用 [J]. *生理科学进展*, 2013, 44(1):72-74.
- [21] ZHANG J W, BIAN Z H, ZHOU J L, et al. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation by targeting phospholipase D1 in human gastric carcinoma [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(9):680-688.
- [22] XIAO J J, SUN Q, BEI Y H, et al. Therapeutic inhibition of phospholipase D1 suppresses hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Sci*, 2016, 130(13):1125-1136.
- [23] 李丽华, 史健. 肿瘤微环境与肺癌相关性研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(6):501-504.