

引用:毋奥淳,蔡小平,魏征,张俊萍,巨佳.基于整合药理学分子对接及实验验证探讨化瘀解毒方调控PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B信号通路治疗肺癌的作用机制[J].中医导报,2025,31(6):42-48.

# 基于整合药理学分子对接及实验验证探讨 化瘀解毒方调控PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B信号通路 治疗肺癌的作用机制\*

毋奥淳<sup>1</sup>,蔡小平<sup>2</sup>,魏 征<sup>2</sup>,张俊萍<sup>2</sup>,巨 佳<sup>1</sup>

(1.河南中医药大学第二临床医学院,河南 郑州 450000;

2.河南省中西医结合医院,河南 郑州 450000)

[摘要] 目的:采用网络药理学和分子对接技术预测化瘀解毒方治疗肺癌的潜在靶点和作用机制,并结合动物实验进行验证。方法:分别通过TCMIP数据库及GeneCards、OMIM、TTD数据库筛选化瘀解毒方的潜在作用靶点和肺癌相关疾病靶点,然后利用Venny 2.1可视化平台获得药物和疾病的交集靶标;通过String数据库和Cytoscape 3.7.2软件构建蛋白质-蛋白质互作网络并筛选关键靶点,构建“中药-成分-核心靶标”关联网络;利用DAVID数据库对关键交集靶标进行基因本体(GO)功能富集及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析;利用Autodock Vina软件对重要蛋白和分子进行分子对接验证;对各组小鼠瘤体质量进行分析;ELISA检测血清中IL-6、IFN- $\gamma$ 含量;HE染色观察肿瘤组织、肺脏、肝脏、肾脏病理形态;免疫组化法检测肿瘤组织中PPAR $\gamma$ 、VEGF、NF- $\kappa$ B、PCNA、Caspase-3表达。结果:化瘀解毒方治疗肺癌的主要活性成分包括豆甾醇、丁香皂苷、谷甾醇、棕榈酸等,涉及STAT3、PPARG、AKT1、NFKB1、IL6等靶点及metabolic pathways、PPAR signaling pathways、cAMP signaling pathway等信号通路。动物实验结果显示化瘀解毒方能够明显抑制肿瘤增长,下调大鼠血清中IL-6含量,上调IFN- $\gamma$ 含量,且无明显肝肾毒性。结论:化瘀解毒方能够增加PPAR $\gamma$ 、Caspase-3的表达,抑制VEGF、NF- $\kappa$ B、PCNA的表达,促进A549肺癌细胞发生凋亡,抑制肿瘤细胞增殖和血管生长,其作用机制可能与调控PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B信号通路有关。

[关键词] 肺癌;化瘀解毒方;网络药理学;PPAR $\gamma$ ;NF- $\kappa$ B;小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-951X(2025)06-0042-07

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.008

## Investigation of the Mechanism of Huayu Xietu Formula (化瘀解毒方) in Regulating PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B Signaling Pathway for Lung Cancer Based on Molecular Docking of Integrative Pharmacology and Experimental Validation

WU Aochun<sup>1</sup>, CAI Xiaoping<sup>2</sup>, WEI Zheng<sup>2</sup>, ZHANG Junping<sup>2</sup>, JU Jia<sup>1</sup>

(1.The Second Clinical Medical College of He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou He'nan 450000, China; 2.He'nan Provincial Hospital of Integrative Medicine, Zhengzhou He'nan 450000, China)

[Abstract] Objective: To predict the potential targets and mechanisms of action of Huayu Jiedu formula for the treatment of lung cancer with network pharmacology and molecular docking techniques, and to validate the findings through animal experiments. Methods: Potential action targets of the Huayu Jiedu formula and lung cancer-related disease targets were screened using the TCMIP database and GeneCards, OMIM, and TTD

\*基金项目:国家自然科学基金项目(82305349);河南省中医药科学研究专项课题(2024ZY2125);河南省中医管理局拔尖人才项目(2022ZYBJ27);国家中医药管理局第七批全国老中医药专家学术经验继承工作项目(国中医药人教函[2022]76号)  
通信作者:蔡小平,男,主任医师,研究方向为中医药防治恶性肿瘤

databases, respectively. The intersection targets between drugs and diseases were obtained with the Venny 2.1 visualization platform. The String database and Cytoscape 3.7.2 software were used to construct a protein-protein interaction network and screen for key targets, and the "Chinese medicine-component-core target" association network was constructed. The DAVID database was used to perform gene ontology (GO) functional enrichment and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis on key intersection targets. Autodock Vina software was used for molecular docking validation of important proteins and molecules. Tumor mass was analyzed in each group of mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum levels of IL-6 and IFN- $\gamma$ . The pathological morphology of tumor tissues, lungs, livers, and kidneys were observed with HE staining. The expression of PPAR $\gamma$ , VEGF, NF- $\kappa$ B, PCNA and Caspase-3 in tumor tissues were detected via immunohistochemistry. Results: The main active components of Huayu Jiedu formula for treating lung cancer include stigmasterol, eugenol, sitosterol, palmitic acid, etc. involving targets such as STAT3, PPARG, AKT1, NFKB1, IL6, and signaling pathways such as metabolic pathways, PPAR signaling pathways, and cAMP signaling pathway. Animal experiment results showed that the Huayu Jiedu formula could significantly inhibit tumor growth, downregulate IL-6 levels in rat serum, and upregulate IFN- $\gamma$  levels, with no significant hepatotoxicity or nephrotoxicity. Conclusion: Huayu Jiedu formula can increase the expression of PPAR $\gamma$  and Caspase-3, inhibit the expression of VEGF, NF- $\kappa$ B, and PCNA, promote apoptosis in A549 lung cancer cells, and inhibit tumor cell proliferation and vascular growth. Its mechanism of action may be related to the regulation of the PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway.

[Keywords] lung cancer; Huayu Jiedu formula; network pharmacology; PPAR $\gamma$ ;NF- $\kappa$ B; mouse

肺癌是世界上最常见的癌症之一,具有发病率和死亡率高的特点,在恶性肿瘤中占比相对较高,同时肺癌也是男性癌症相关死亡的主要原因,是女性癌症相关死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。目前治疗肺癌所应用的传统化疗药物都有相同的局限性,包括非特异性靶向、生物利用度低及产生耐药性,这限制了它们在肺癌治疗中的疗效。中药治疗肺癌安全性高,副作用低,同时具有多成分,多靶点的优势,对患者的生活质量也有一定提高,是当前肺癌治疗的热点。

吸烟是肺癌的主要危险因素,香烟烟雾的致炎和致突变作用可促进促癌免疫反应。研究<sup>[2]</sup>发现,支气管肺泡细胞暴露于相当于每天吸8支香烟的颗粒物中后,肺组织中有明显的炎症和细胞毒性反应。肺部感染、职业性粉尘暴露和特发性肺纤维(IPF)也是引起肺癌的关键因素。这些因素都会导致炎症发生,从而导致肺癌发病<sup>[3]</sup>。PPAR信号通路的调节是抑制癌变和肿瘤进展的潜在新策略。研究<sup>[4]</sup>显示,3种PPAR同种型在慢性低度炎症期间均具有抗炎作用。几个PPAR导向的过程与促肿瘤或抗肿瘤发生有关,配体激活的PPAR $\gamma$ 可促进癌细胞的终末分化、促进细胞周期停滞和细胞凋亡<sup>[5]</sup>。

化痰解毒方由全蝎、壁虎、三七、半枝莲、广木香、茯苓、黄芪组成。其中全蝎、壁虎活血解毒,为君药;辅以三七活血化痰、软坚散结;佐以半枝莲解毒抗癌;使以广木香理气和胃、疏畅气血;茯苓、黄芪益气扶正。诸药合用,可以化痰解毒、化痰散结、理气活血、扶正培本。该方是国家“十二五”重点专科医院内制剂,在临床上广泛应用于治疗肺癌、肝癌、胃癌等,疗效显著。本研究通过整合药理学分析化痰解毒方有效成分与肺癌靶点之间的联系,分子对接验证关键活性成分与靶点的亲结合度,再通过动物实验验证其是否可以通过调控 PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B通路治疗肺癌。

## 1 材料与方法

1.1 软件与数据库 整合药理学平台(TCMIP,<http://www.tcmip.cn/TCMIP/index.php/Home/Login/login.html>);Venny 2.1平台(<https://bioinfopcnbcsices/tools/venny/>);String平台(<https://string-db.org/>);Cytoscape3.7.2平台([https://cytoscape.org/release\\_notes\\_3\\_7\\_2.htm](https://cytoscape.org/release_notes_3_7_2.htm));GenCards数据库(<http://www.genecards.org/>);OMIM数据库(<https://omim.org/>);DAVID数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)。

1.2 动物及细胞 5周龄BALB/cNude雄性小鼠,30只,SPF级,体质量(18 $\pm$ 2)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2021-0006,动物质量合格证号:110011241102703576。本动物实验经河南省中医药研究院伦理委员会批准,伦理审查批件号:2023伦理YJS-012。A549细胞购于中科院。

1.3 仪器 脱水机(型号:JJ-12J)、包埋机(型号:JB-P5)及冻台(型号:JB-L5)均购自武汉俊杰电子有限公司;病理切片机(上海徕卡仪器有限公司,型号:RM2016);组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司,型号:KD-P);烤箱(上海慧泰仪器制造有限公司,型号:DHG-9140A);盖玻片(江苏世泰实验器材有限公司,型号:10212432C);微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司,型号:P70D20TL-P4);脱色摇床(型号:TSY-B)、涡旋混合器(型号:MX-F)及掌上离心机(型号:D1008E)均购自Servicebio公司;移液枪(Dragon公司,型号:KE0003087/KA00 56573);组化笔(Gene tech公司,型号:GT1001);显微镜(CIC公司,型号:XSP-C204);成像系统(日本尼康株式会社,型号:Nikon DS-U3)。

1.4 药物及试剂 化痰解毒方(全蝎3 g,壁虎3 g,三七3 g,半枝莲15 g,广木香6 g,茯苓15 g,黄芪30 g)购买自河南省中医院(批号:20240206,20240206,20240108,20240304,20240308,

20240306,20240308),经河南省中西医结合医院梁瑞峰副研究员鉴定为正品;顺铂(云南植物药业有限公司,批号:20230805);青-链霉素混合液(批号:GA2313026)、胎牛血清(批号:HO20240202)、胰蛋白酶消化液(批号:GA2312017)均购自塞维尔生物科技有限公司;无水乙醇(批号:100092683)、二甲苯(批号:41810023)、中性树胶(批号:10004160)均购自国药集团化学试剂有限公司;HE染液(批号:G1005)、分化液(批号:G1005-3)、返蓝液(批号:G1005-4)均购自索莱宝科技有限公司;柠檬酸(PH6.0)抗原修复液(批号:CR2501022)、PBS缓冲液(批号:202501018)、3%双氧水(批号:202501010)、BSA(批号:GC2401208)、苏木素染液(批号:CR2501008)、苏木素分化液(批号:CR2501010)、苏木素返蓝液(批号:CR2501010)、CD43—抗(批号:AC24100 812F)、HRP标记山羊抗兔二抗(批号:GP2401118)、HRP标记山羊抗小鼠二抗(批号:GP2401225)、组化试剂盒DAB显色剂(批号:CR24012028)均购自塞维尔生物科技有限公司。VEGFR2—抗(三鹰公司,批号:26415-1-AP);IL-6(批号:388298-001)、IFN- $\gamma$ (批号:RRDC2407002)均购自赛默飞生物制药有限公司。

## 1.5 整合药理学分析与分子对接

1.5.1 药物活性成分靶点及肺癌靶点的获取 利用TCMIP平台,检索化痰解毒方中的三七、茯苓、半枝莲等成分,获得药物的活性成分,从而筛选出每味中药有效化合物活性成分的潜在靶点。通过文献和数据库搜集全蝎有效成分,将成分输入pubchem获得smile号,再使用Swiss target predicted预测其靶点。在文献中搜集壁虎的有效成分,将成分输入PubMed搜索其2D化学结构,设置化学成分结构相似性评分阈值为0.8的高阈值,将化学结构输入TCMIP平台获得壁虎有效靶点。通过Gene Cards、OMIN数据库,以“Lung Cancer”为关键词检索,得到疾病靶点并进行去重,将肺癌疾病靶点与化痰解毒方各中药活性成分靶点导入到Venny.10.1网站,制作韦恩图,取交集得到化痰解毒方治疗肺癌的潜在作用靶点。

1.5.2 蛋白互作(PPI)网络构建 将潜在靶点导入String数据库进行PPI网络构建,设置最低要求的交互分数为最高置信度(highest\_confidence) $\geq 0.9$ 进行筛选,同时设置隐藏网络中已断开的节点,最后制得核心靶点PPI互作网络图,并将其导入CytoScape3.7.2中进一步分析。

1.5.3 KEGG通路富集分析和GO生物过程富集分析 将化痰解毒方治疗肺癌潜在作用靶点的Gene Symbol导入DAVID数据库,进行KEGG通路富集分析和GO生物过程富集分析并保存结果。根据富集基因数量降序排序,选取富集基因数最多的前25条,使用微生信网站绘制气泡图。

1.5.4 构建“中药-成分-核心靶标”关联网络 将中药材、中药成分、核心靶标进行关联,对不同的节点进行筛选,将中医药多维关联网络可视化,以便后续筛选活性成分和靶标进行分子对接。

1.5.5 分子对接验证 对化痰解毒方治疗肺癌的核心成分与核心靶蛋白进行分子对接验证,结果以热图分析呈现。

## 1.6 动物实验验证

1.6.1 肺癌模型制备及分组 小鼠适应性喂养1周后,每只小鼠上肢右侧腋下接种0.2 mL A549细胞(浓度为 $1 \times 10^7$ 个/mL),

待瘤体平均体积达 $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ 时视为造模成功。造模成功后,将小鼠随机分为5组:对照组、顺铂组、化痰解毒方低剂量组、化痰解毒方中剂量组及化痰解毒方高剂量组,每组6只。

1.6.2 动物给药及取材 依据临床等效剂量换算,对照组予生理盐水灌胃( $3.5 \text{ mg/kg}$ );顺铂组予顺铂( $3.5 \text{ mg/kg}$ )腹腔注射,3次/周;化痰解毒方低、中、高剂量组分别予 $5.69 \text{ g/kg}$ 、 $11.38 \text{ g/kg}$ 、 $22.76 \text{ g/kg}$ 化痰解毒水煎液灌胃,1次/d,连续3周。给药结束,小鼠禁食禁水12 h后取材,眼球取血后静置2 h后离心提取血清,取出瘤体、肝脏和肾脏。

1.6.3 小鼠瘤体质量 干预治疗结束后取出各组小鼠瘤体进行称重并绘制柱状图。

1.6.4 ELISA检测血清中IL-6、IFN- $\gamma$ 含量 采用眼球取血法取血,将提取好的血清样本按照ELISA试剂盒说明进行IL-6、IFN- $\gamma$ 水平检测。

1.6.5 HE染色观察肿瘤组织、肝组织及肾组织形态 将取出的组织放入4%多聚甲醛进行固定,48 h后进行脱水石蜡包埋,依次进行苏木红染色和伊红染色,最后脱水封片,光学显微镜下观察各个组织形态学变化。

1.6.6 免疫组化法检测肿瘤组织中PPAR $\gamma$ 、VEGF、NF- $\kappa$ B、PCNA、Caspase-3蛋白表达 将切片蒸馏水洗3次,每次5 min,再置于盛满柠檬酸抗原修复缓冲液的修复盒中,于微波炉内进行抗原修复,冷却后将玻片使用PBS洗涤3次,每次5 min。切片放入3%双氧水溶液中,室温避光孵育25 min,将玻片置于PBS中洗涤3次,每次5 min。滴加3%BSA均匀覆盖组织,室温封闭30 min。轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加一抗,平放于湿盒内4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。玻片置于PBS洗涤3次,每次5 min,加入二抗室温孵育50 min。PBS洗涤3次,每次5 min。滴加DAB显色液,显微镜下控制显色时间,阳性为棕黄色,冲洗切片终止显色。苏木素复染3 min左右,显微镜镜检进行图像采集分析。

1.7 统计学方法 使用GraphPad Prism医学统计软件进行分析,组间差异性分析比较采用单因素方差分析。统计分析后使用GraphPad Prism10.1.2软件进行作图。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 化痰解毒方药物靶点与肺癌靶点 利用TCMIP数据库检测去重后得到化痰解毒方有效靶点745个,肺癌通过Gene Cards、OMIN数据库检索去重得到5 231个靶点。将肺癌疾病靶点与化痰解毒方各中药活性成分靶点导入到Venny.10.1网站,制作韦恩图,取交集得到292个化痰解毒方治疗肺癌的潜在作用靶点。(见图1)

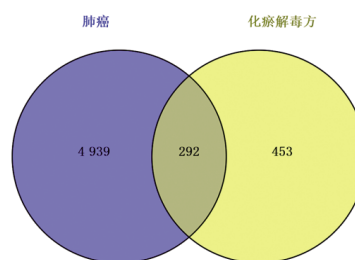


图1 化痰解毒方与肺癌的交集靶点

2.2 蛋白互作网络图 将潜在靶点导入String数据库进行PPI网络构建,设置最低要求的交互分数为最高置信度(High-

est\_confidence)  $\geq 0.9$  进行筛选,同时设置隐藏网络中已断开的节点,最后制得PPI互作网络图,并将其导入CytoScape3.7.2中进一步分析,其中颜色及圆圈的大小与degree值呈正相关,颜色越红,圆圈越大degree值越高。排名前10的靶标有STAT3、PPARG、AKT1、NFKB1、IL6等,推测这些靶点在化痰解毒方治疗肺癌中有重要意义。(见表1、图2)

表1 化痰解毒方治疗肺癌的前10位核心靶标

靶标	度值	紧密值	中介值
STAT3	41	0.123	0.076 060 460
PPARG	38	0.121	0.075 745 138
AKT1	35	0.121	0.081 082 674
HSP90AA1	33	0.122	0.095 815 726
IL-6	33	0.121	0.042 934 774
INS	32	0.121	0.063 046 837
ESR1	31	0.121	0.038 623 143
IL-1B	30	0.121	0.045 368 310
TNF	30	0.120	0.036 611 799
NFKB1	29	0.120	0.034 331 717

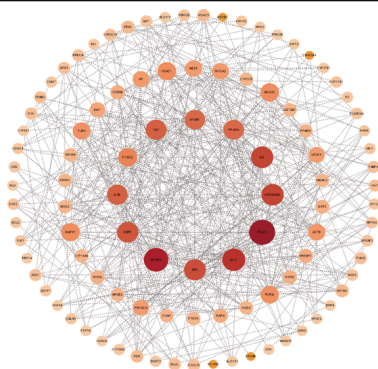


图2 靶点蛋白相互作用(PPI)网络图

2.3 KEGG通路富集分析和GO生物过程富集分析 将化痰解毒方治疗肺癌的潜在靶点上传至DAVID数据库,获得KEGG富集通路154条。为了更精准了解化痰解毒方治疗肺癌可能的作用机制,选择KEGG前25条通路绘制相应气泡图,可知潜在靶点富集的信号通路主要有metabolic pathway(代谢途径)、PPAR signaling pathway(PPAR信号通路)、cAMP signaling pathway(cAMP信号通路)等。(见图3)通过GO生物过程富集分析,生物过程(biological process, BP)主要包括RNA聚合酶II对转录的正向调节、信号转导等,细胞成分(cellular component, CC)主要包括组蛋白去乙酰化酶复合物、特定颗粒腔、氮质颗粒腔等,分子功能(molecular function, MF)主要包括蛋白质结合、金属离子结合等。(见图4)

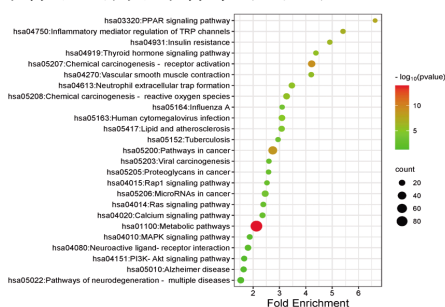


图3 KEGG 通路富集分析

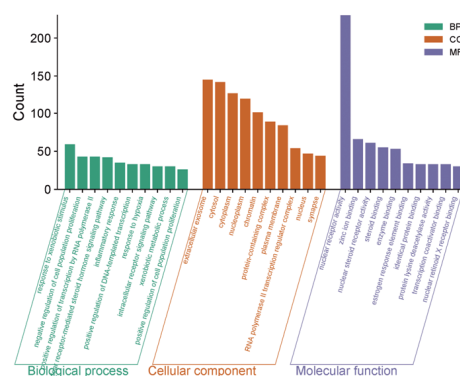


图4 GO 生物过程富集分析

2.4 “中药-成分-核心靶标”关联网络 以化痰解毒方药物靶标和肺癌靶标的蛋白互作网络信息为基础,构建化痰解毒方治疗肺癌的“中药-成分-核心靶标”多维网络。(见图5)由图可知,化痰解毒方7味药物中的重要活性成分有豆甾醇(stigmasterol)、丁香皂苷(syringin)、谷甾醇(sitosterol)、棕榈酸(cetylic acid)等。

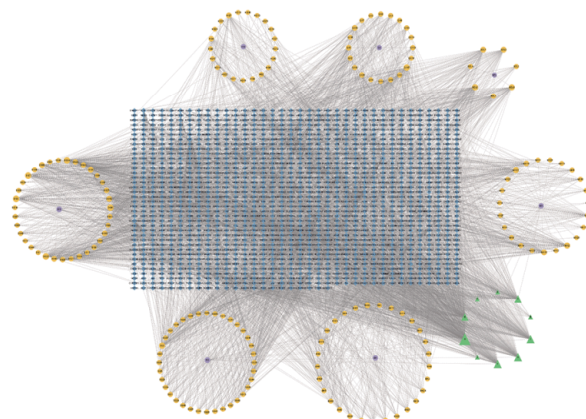


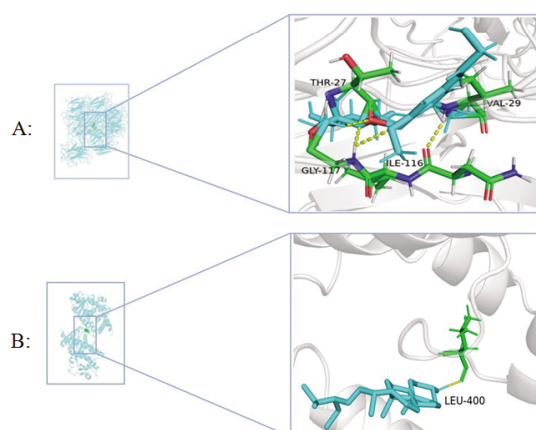
图5 中药-成分-核心靶标”关联网络

2.5 分子对接结果 豆甾醇(stigmasterol)、丁香皂苷(syringin)是经过Cytoscape 3.7.2筛选出的degree值排名较高的活性成分。degree值排名越高表明该活性成分可能是治疗疾病的关键成分。查阅文献豆甾醇和丁香皂苷对于肺癌有较好的治疗作用,所以选择豆甾醇、丁香皂苷作为分子对接的配体小分子。选择核心靶标的前4位蛋白作为受体大分子进行分子对接,结果表明,豆甾醇和丁香皂苷与STAT3、PPARG、AKT1、IL6的结合状况良好,结合能信息见表2。并使用PyMol软件,分别选择自结合能最佳的结果进行可视化。(见图6)

表2 分子对接结合能信息

序号	化合物	靶点	结合能/(kcal/mol)
1	豆甾醇	STAT3	-7.66
		PPARG	-9.64
		AKT1	-6.69
		IL-6	-8.83
2	丁香皂苷	STAT3	-7.35
		PPARG	-9.00
		AKT1	-6.04
		IL-6	-9.55

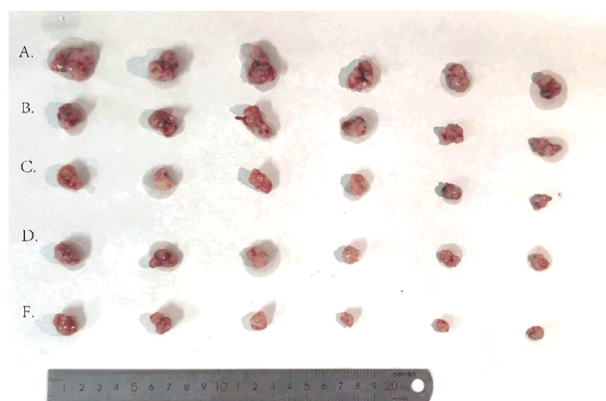




注:A.豆腐醇与PPAR $\gamma$ 对接结果;B.丁香皂苷与IL-6对接结果。

图6 分子对接可视化图

2.6 小鼠瘤体质量 结果显示,各组之间瘤体体积存在差异。与对照组比较,各组瘤体质量均不同程度下降( $P<0.05$ );质量大小排序为顺铂组<化癥解毒方高剂量组<化癥解毒方中剂量组<化癥解毒方低剂量组<对照组。(见图7~8)



注:A.对照组;B.化癥解毒方低剂量组;C.化癥解毒方中剂量组;D.化癥解毒方高剂量组;E.顺铂组。

图7 各组瘤体大小图片

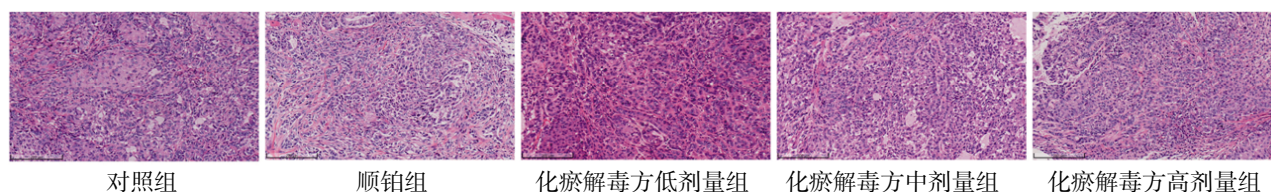


图10 各组小鼠肿瘤病理状态 (HE,×100)

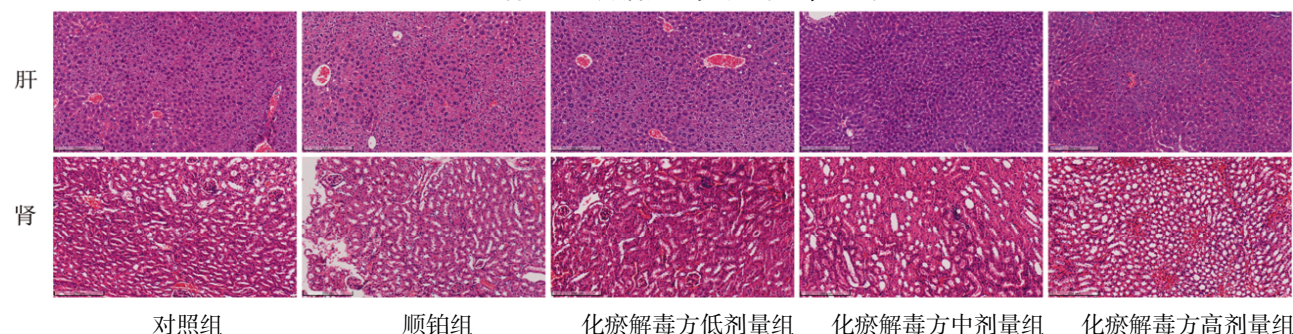
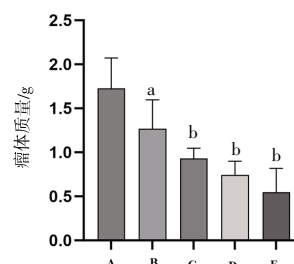


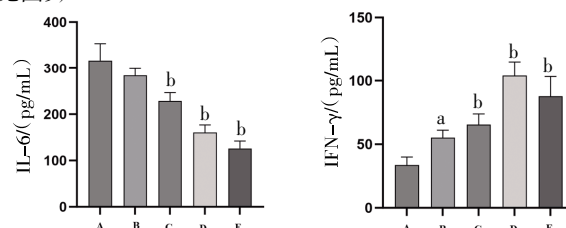
图11 各组小鼠肝脏、肾脏病理状态 (HE,×100)



注:A.对照组;B.化癥解毒方低剂量组;C.化癥解毒方中剂量组;D.化癥解毒方高剂量组;E.顺铂组。与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

图8 各组瘤体质量比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

2.7 ELISA检测血清中IL-6、IFN- $\gamma$ 水平 化癥解毒方低剂量组小鼠血清IL-6与对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),其余各组小鼠血清IL-6均低于对照组,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。各组IL-6表达量比较:对照组/化癥解毒方低剂量组>化癥解毒方中剂量组>化癥解毒方高剂量组>顺铂组( $P<0.05$ );与对照组比较,各组IFN- $\gamma$ 增高,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),各组间比较:对照组<化癥解毒方低剂量组<化癥解毒方中剂量组<化癥解毒方高剂量组<顺铂组( $P<0.05$ )。(见图9)



注:A.对照组;B.化癥解毒方低剂量组;C.化癥解毒方中剂量组;D.化癥解毒方高剂量组;E.顺铂组。与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ ,<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

图9 各组小鼠血清 IL-6、IFN- $\gamma$  水平比较 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

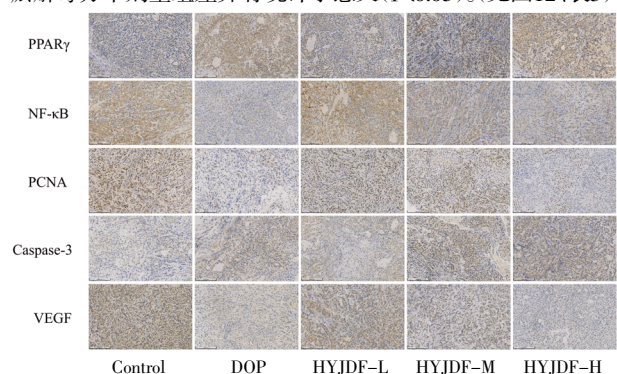
2.8 HE染色观察肿瘤组织、肝脏、肾脏病理学

2.8.1 肿瘤组织 各组肿瘤组织肿瘤细胞均有分布。其中对照组、化癥解毒方低剂量组及顺铂组中细胞不规则形态较多,

细胞核出现增大、分裂变形现象,呈条索状结构分布;化瘀解毒方中剂量组、化瘀解毒方高剂量组细胞形态趋向圆形,核分裂变形现象较少,细胞间隙较小。(见图10)

2.8.2 肝肾组织 各组肝肾组织无明显损伤。(见图11)

2.9 免疫组化法检测肿瘤组织中PPAR $\gamma$ 、VEGF、NF- $\kappa$ B、PCNA、Caspase-3蛋白表达 经DAB染色后,显微镜下观察到的棕黄(褐)色颗粒为阳性表达区域,其中PPAR $\gamma$ 、NF- $\kappa$ B、Caspase-3表达阳性着色主要位于细胞膜和细胞质,而VEGF、PCNA多位于细胞核。使用软件Image-Pro Plus 6.0检测阳性区域的平均光密度值(average optical density, AOD)。结果显示,与对照组比较,各组小鼠PPAR $\gamma$ 蛋白表达量均增高,其中顺铂组、化瘀解毒方高剂量组与化瘀解毒方中剂量组差异有统计学意义( $P<0.05$ );与对照组比较,各组小鼠NF- $\kappa$ B蛋白表达量均降低,其中顺铂组、化瘀解毒方高剂量组与化瘀解毒方中剂量组差异有统计学意义( $P<0.05$ );与对照组比较,各组小鼠VEGF、PCNA均降低( $P<0.05$ );与对照组比较,各组小鼠Caspase-3蛋白均增高,其中顺铂组、化瘀解毒方高剂量组与化瘀解毒方中剂量组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。(见图12、表3)



注:Control为对照组,DOP为顺铂组,HYJDF-L为化瘀解毒方低剂量组,HYJDF-M为化瘀解毒方中剂量组,HYJDF-H为化瘀解毒方高剂量组。

图 12 各组小鼠肿瘤组织 PPAR $\gamma$ 、VEGF、NF- $\kappa$ B、PCNA 及 Caspase-3 蛋白表达 (IHC,  $\times 100$ )

表 3 各组小鼠肿瘤组织 PPAR $\gamma$ 、VEGF、NF- $\kappa$ B、PCNA 及 Caspase-3 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	PPAR $\gamma$	NF- $\kappa$ B	PCNA	Caspase-3	VEGF
对照组	6	0.32 $\pm$ 0.00	0.71 $\pm$ 0.08	0.61 $\pm$ 0.05	0.22 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.03
顺铂组	6	0.88 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.40 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.22 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.71 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
化瘀解毒方低剂量组	6	0.44 $\pm$ 0.09	0.62 $\pm$ 0.06	0.49 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.38 $\pm$ 0.05	0.62 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
化瘀解毒方中剂量组	6	0.75 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	0.54 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.36 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.55 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.49 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>
化瘀解毒方高剂量组	6	0.96 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	0.37 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>	0.88 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>	0.34 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.05$ 。

### 3 讨 论

肺癌发病机制主要为正气虚损、邪毒侵肺、痰瘀内聚<sup>[6]</sup>。《黄帝内经》云:“温气不行,凝血蕴里而不散,津液涩滞,著而不去,而积皆成矣。”<sup>[7]</sup>凝血成瘀,痰湿汇聚,形成肿瘤。《疡科心得集》中提到“癌瘤者,非阴阳正气所结肿,乃五脏瘀血、浊气痰滞而成”。《丹溪心法》载“有结块者,多属痰……痰挟瘀血,遂成窠囊”<sup>[8]</sup>。中医中“瘀”是一个主要的病机变化,瘀常常伴随着附加的病机因素。肺癌在形成和发展过程中都存在“瘀”的情况。瘀既是肺癌的致病因素,又是肺癌难以治愈的

一个重要原因<sup>[9]</sup>。汉·张仲景《伤寒杂病论》首次提出阴毒和阳毒,唐·孙思邈《备急千金要方》则提出风毒、丹毒、漆毒、食物毒、药毒等多种毒<sup>[10]</sup>。肺癌瘀毒是由于元气衰败,不能行血运津,复因情志、外感、饮食、劳倦等因素,形成顽痰、死血,痰血积久不去,化火成毒所致。瘀与癌毒往往相伴而生。瘀与癌毒之间具有同源互生的关系,形成癌毒的环境条件,同样也是促使血瘀形成的环境条件。在血瘀的状态下,癌毒更易形成。癌毒与血瘀等邪气共同作用癌瘤更易发生,癌毒和癌瘤的存在又可进一步加重血瘀的发展和变化。因而,肺内癌毒一旦形成,不仅阻隔经络气血,且掠夺水谷精微以自养,导致五脏六腑失却气血津液濡润,逐渐衰竭,而出现咳喘、痰中带血、胸闷胸痛、气短、消瘦乏力等症<sup>[11]</sup>。化瘀解毒方针对病因进行治疗,以活血化瘀、解毒攻毒的功效在临床上疗效显著。本研究通过应用网络药理学预测方法与分子对接,结合A549肺癌小鼠模型,初步揭示化瘀解毒方抗肺癌的作用机制。

本研究中网络药理学发现,豆甾醇、丁香皂苷、谷甾醇等为化瘀解毒方治疗肺癌的重要活性成分。SONG N等<sup>[12]</sup>的研究发现,豆甾醇可明显抑制NCI-H1975细胞的活力,但促进脂质沉积;同时,癌细胞能量代谢减少,可影响细胞增殖和集落形成;豆甾醇可通过靶向PPAR $\gamma$ 抑制癌细胞的活力和致癌性。丁香皂苷具有免疫调节<sup>[13]</sup>和抗肿瘤<sup>[14]</sup>作用。其作用机制主要与消除氧化自由基、增强抗氧化酶活性、抑制炎症信号通路激活和抑制炎症因子产生有关<sup>[15]</sup>。研究<sup>[16]</sup>表明丁香苷可以有效抑制实体瘤的生长。丁香皂苷也是许多药物的关键成分,如艾迪注射液,已被评估其在肿瘤存活率、肿瘤反应、生活质量和减少放疗副作用等方面具有有益影响<sup>[17]</sup>。

网络药理学结果显示STAT3、PPAR $\gamma$ 、MAPK1、NFKB1、AKT1等为化瘀解毒方治疗肺癌的核心靶点,PPAR信号通路是富集基因数和显著性均较高的通路。PPAR(过氧化物酶体增殖物激活受体)是核激素受体超家族的成员,具有3种同种类型:PPAR $\alpha$ 、PPAR $\beta/\delta$ 和PPAR $\gamma$ ,是配体激活的转录因子<sup>[18]</sup>。研究<sup>[19]</sup>表明,PPAR在肿瘤的发生发展过程中起关键作用。PPAR $\gamma$ 作为脂质代谢的关键调节因子,可以转录激活或抑制脂肪酸摄取、脂肪酸合成和胆固醇合成等癌细胞特定的代谢特征,以适应缺氧和营养贫乏的环境,从而影响癌细胞的生长、迁移和侵袭。同时PPAR- $\gamma$ 复杂的神经保护机制已被证明会影响这些癌症相关炎症反应的多个方面,包括抑制炎症、减少细胞凋亡和降低氧化应激水平等<sup>[20]</sup>。有研究<sup>[21]</sup>发现,当PPAR $\gamma$ 激活时能够抑制巨噬细胞和单核细胞产生炎症介质,如诱导型一氧化氮合酶、MMP-9、清道夫受体A、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 和IL-6等。NF- $\kappa$ B信号通路处于PPAR信号通路的下游,其编码I $\kappa$ B $\alpha$ 基因的启动子受PPAR控制<sup>[22]</sup>。PPAR $\gamma$ 对NF- $\kappa$ B的直接影响可能与其酶学性质有关。PPAR $\gamma$ 是E3泛素连接酶,能与E2UBCH3协同作用,引起Lys48 p65 NF- $\kappa$ B的泛素化,导致NF- $\kappa$ B亚基的蛋白水解降解。NF- $\kappa$ B降解的强度通过PPAR $\gamma$ 配体活化增加<sup>[23]</sup>。吡格列酮是一种PPAR激动剂<sup>[24]</sup>。KEITH R L等<sup>[25]</sup>研究了吡格列酮作为高危吸烟者及早期NSCLC患者肺癌的化学预防手段,结果显示吡格列酮治疗减少了癌细胞增殖。

实验结果显示,小鼠瘤体质量随着给药剂量的增加而明显减小。本研究通过IHC检测小鼠肿瘤组织中PPAR $\gamma$ 、VEGF、



NF- $\kappa$ B、PCNA及Caspase-3表达。结果表明,与对照组比较,各干预组PPAR $\gamma$ 表达均增加,且随着PPAR $\gamma$ 表达的增加,VEGF、NF- $\kappa$ B及PCNA表达下降,Caspase-3表达增加。ELISA结果表明化痰解毒方在小鼠体内能够提高免疫因子表达,降低炎症因子水平。HE染色结果及以上数据表明,化痰解毒方可能通过调节PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B信号促进肺癌细胞凋亡,抑制血管内皮生长因子和肺癌细胞增殖,从而发挥抗肿瘤的作用。

综上所述,化痰解毒方治疗肺癌具有多靶点、多通路以及副作用小的特点,但是本研究仍存在以下不足之处:(1)PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B信号通路在抗肺癌的治疗过程中涉及多种生物过程,所以靶向PPAR $\gamma$ /NF- $\kappa$ B信号通路的治疗法是否会产生副作用未可知,仍需进行进一步的机制研究来确保其安全性;(2)尚未从体外实验证明化痰解毒方对肺癌的影响;(3)本研究仅讨论了化痰解毒方治疗肺癌的单条信号通路,未涉及其他信号通路之间的相互作用。我们仍需进一步深入研究化痰解毒方治疗肺癌的活性成分、作用靶点及调控机制,为中药复方预防及辅助治疗肺癌提供科学依据。

# 参考文献

- [1] LI Y T, YAN B S, HE S M. Advances and challenges in the treatment of lung cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2023, 169: 115891.
- [2] HRUBÁ D. Clear relationship between smoking and lung cancer[J]. Cent Eur J Public Health, 2012, 20(1): 3-4.
- [3] O'CALLAGHAN D S, O'DONNELL D, O'CONNELL F, et al. The role of inflammation in the pathogenesis of non-small cell lung cancer[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(12): 2024-2036.
- [4] MICHALIK L, WAHLI W. PPARs mediate lipid signaling in inflammation and cancer[J]. PPAR Res, 2008, 2008: 134059.
- [5] 田雪.没食子酸引起非小细胞肺癌凋亡和生长抑制的实验研究[D].杭州:浙江中医药大学, 2023.
- [6] 赵亚茜,王琦,谌晓莉,等.中医药通过调节免疫治疗非小细胞肺癌的研究进展[J].云南中医中药杂志, 2023, 44(5): 116-121.
- [7] 岳露露,韩吉,许博,等.基于伏邪理论探讨胃癌前病变态靶辨治思路[J/OL].中医学报, 1-8[2024-09-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/41.1411.R.20240929.1335.042.html>.
- [8] 杜菲,陈明显,沈堂彪,等.朱丹溪“痰挟瘀血,遂成窠囊”学说的临证应用[J].浙江中医药大学学报, 2021, 45(6): 633-636, 640.
- [9] 张亚密,杨宁,曹迪,等.扶正化痰方联合化疗治疗中、晚期非小细胞肺癌气虚血瘀证的临床研究[J].河北中医, 2020, 42(12): 1820-1823.
- [10] 郁文越,朱佳,孙露露,等.基于浊毒理论探析原发性支气管肺癌病因病机及防治思路[J].河北中医, 2022, 44(11): 1765-1768, 1843.
- [11] 蔡小平,魏征.恶性肿瘤中医证治新理论:痰毒论[J].辽宁中医杂志, 2013, 40(3): 465-466.
- [12] SONG N, WANG J, LAI Z L, et al. Arisaema heterophyllum blume monomer stigmaterol targets PPAR $\gamma$  and inhibits the viability and tumorigenicity of lung adenocarcinoma cells NCI-H1975[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2022, 2022: 5377690.
- [13] SINGH V K, THAKUR D C, RAJAK N, et al. Immunomodulatory potential of bioactive glycoside syringin: A network pharmacology and molecular modeling approach[J]. J Biomol Struct Dyn, 2024, 42(8): 3906-3919.
- [14] NIU H S, LIU I M, CHENG J T, et al. Hypoglycemic effect of syringin from *Eleutherococcus senticosus* in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Planta Med, 2008, 74(2): 109-113.
- [15] DAI R, NIU M M, WANG N L, et al. Syringin alleviates ovalbumin-induced lung inflammation in BALB/c mice asthma model via NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Environ Toxicol, 2021, 36(3): 433-444.
- [16] QIAN Q Y, PAN J C, YANG J, et al. Syringin: A naturally occurring compound with medicinal properties[J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1435524.
- [17] YANG M, SHEN C, ZHU S J, et al. Chinese patent medicine Aidi injection for cancer care: An overview of systematic reviews and meta-analyses[J]. J Ethnopharmacol, 2022, 282: 114656.
- [18] LI Q, ZHANG H T, LIU X M. Didymine alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by activating the PPAR signaling pathway[J]. Yonsei Med J, 2022, 63(10): 956-965.
- [19] NING Z, GUO X, LIU X L, et al. USP22 regulates lipidome accumulation by stabilizing PPAR $\gamma$  in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 2187.
- [20] ZHAO L, ZHENG X L, LIU J F, et al. PPAR signaling pathway in the first trimester placenta from in vitro fertilization and embryo transfer[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109251.
- [21] CLARK R B. The role of PPARs in inflammation and immunity[J]. J Leukoc Biol, 2002, 71(3): 388-400.
- [22] BUROKER N E, BARBOZA J, HUANG J Y. The IkappaBalpha gene is a peroxisome proliferator-activated receptor cardiac target gene[J]. FEBS J, 2009, 276(12): 3247-3255.
- [23] HOU Y Z, MOREAU F, CHADEE K. PPAR $\gamma$  is an E3 ligase that induces the degradation of NF $\kappa$ B/p65[J]. Nat Commun, 2012, 3: 1300.
- [24] HOU Y, GAO J, XU H, et al. PPAR $\gamma$  E3 ubiquitin ligase regulates MUC1-C oncoprotein stability[J]. Oncogene, 2014, 33(49): 5619-5625.
- [25] KEITH R L, BLATCHFORD P J, MERRICK D T, et al. A randomized phase II trial of pioglitazone for lung cancer chemoprevention in high-risk current and former smokers[J]. Cancer Prev Res, 2019, 12(10): 721-730.

(收稿日期:2024-11-29 编辑:罗英姣)