

基于温辛肝功效网络的活血化淤治法 抗肝癌作用机制解析

顾浩, 马莉, 袁斌, 张燕玲, 王耘*, 乔延江*
(北京中医药大学 中药信息工程研究中心, 北京 100102)

[摘要] 目的: 功效网络是揭示中药功效作用机制和功效间关系的复杂网络。利用功效-药性的关系, 构建温辛肝活血功效网络, 阐明活血治疗肝癌的原理。以温辛归肝经的活血药红花为例, 探讨功效网络在中药有效成分辨识及组合配伍中的应用。方法: 该文利用前期工作中, 活血功效的相关药性组合温辛肝为研究对象, 收集具有温辛肝药性中药的药理作用数据, 利用关联规则方法和卡方检验得到温辛肝活血关联度最高的药理作用组合。利用 DrugBank 数据库收录的药理靶点数据, 在蛋白质相互作用网络背景下, 根据“功效-药性-药理-靶点-蛋白相互作用”为主线, 构建温辛肝活血功效网络。结果: 活血一方面通过影响原癌基因、抑癌基因、细胞凋亡、抗炎直接治疗肝癌, 另一方面可以通过抗凝、抗黏、调节局部血循环, 防止癌细胞转移和增强组织对抗癌药敏感性, 从而间接治疗肝癌。基于活血网络靶点筛选的红花有效成分群中, 红花黄色素、槲皮素和木犀草素等已有文献证明具有抗肝癌作用, 说明了该文结果的可靠性以及功效网络的用途。结论: 功效网络是揭示中药治法作用机制的有效途径, 并能够在此基础上发现中药治疗特定疾病的关键有效成分。

[关键词] 活血; 功效网络; 肝癌

原发性肝癌(以下简称肝癌)多表现为胁下积块, 刺痛, 痛处不移, 拒按, 面色晦暗, 红丝赤缕, 青筋暴露, 舌色青紫、斑斑, 脉弦涩等血瘀表现。通过近十年中医药治疗肝癌的文献研究, 总结发现气滞血瘀证是肝癌最常见的证型, 瘀血贯穿于病程始终, 血瘀证多见于病理分型中的巨块型肝癌^[1]。实验研究也发现, 肝癌患者常伴有微循环障碍, 血液黏度增高及血液高凝状态, 故活血化瘀是临床治疗原发性肝癌的重要治疗方法^[2], 临床疗效确切^[3]。但是其作用机制至今仍不明确。

中药是通过多成分的药物复杂系统对人体疾病系统的作用而产生治疗效应的。中医药整体观和辨证论治的理念体现在中医药多成分、多靶点系统调控的思想, 与网络药理学研究思路存在一定的共性。中药功效网络是揭示中药功效作用机制和功效间关系的复杂网络^[4]。中药功效网络不仅可以解析中药功效的作用机制, 还可以在网络上辨识中药有效成分群。由于实验方法难以全面筛选中药多

成分的多靶点多途径作用机制, 因此利用信息学方法构建的功效网络, 反筛中药有效成分群具有快速全面的特点, 可以为中药的二次开发提供理论依据。因此, 本文尝试利用功效网络解释活血化瘀治疗肝癌的分子机制, 同时示范性的应用功效网络筛选中药抗肝癌的有效成分群。

但是在功效网络构建的思路, 按照预期的中药-化学成分-作用靶点构建功效网络^[5]思路, 在操作过程中存在着实际困难。首先, 很多中药化学成分的作用靶点不清楚; 其次, 通过统计的方法判断功效相关靶点缺乏理论依据。药性犹如中药“药理”, 功效表达中药药效。由于同一药效可以通过不同药性途径实现, 因此根据功效-药性相关关系构建活血功效网络, 更具有针对性和特异性。药性、药理都是对药物作用途径和作用特征的描述, 具有天然的联系。而且中药药理作用的研究成果丰富, 以药理作用为桥梁可以将具有药性分类特征的功效网络引入分子层面, 是沟通传统中医药理念与现代研究成果, 将分子生物学的研究成果融入到中药功效和药性的机制研究去。

因此, 本文以活血功效为例, 利用功效-药性相关关系构建功效网络, 以药性的药理作用特征为切入点, 从分子网络层面阐释活血法治疗肝癌的原理。红花作为典型的活血化瘀药, 其几种成分对肝癌的治疗作用已见报道^[6], 为系统发现红花抗肝癌的有效成分群, 本文利用活血网络中抗肝癌相关靶点, 筛选了红花中抗肝癌活性成分群, 通过文献验证结果基本可靠。从而证明功效网络不仅能够解析中医药治疗疾病的机制, 也为基于靶点组合的药物设计奠定基础, 为中

[收稿日期] 2013-11-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373985, 81173568); 教育部新世纪优秀人才支持项目(NECT-11-0605); 国家科技支撑计划项目(2008BAI51B01); 北京中医药大学科研创新团队支持项目(2011-CXTD-11); 北京中医药大学校级课题(2013-JYBZZ-XS-410)

[通信作者] * 王耘, 教授, 博士生导师, Tel: (010) 84738620, E-mail: wangyun@bucm.edu.cn; * 乔延江, 教授, 博士生导师, Tel: (010) 84738620, E-mail: yjqiao@263.net

药成分组合的药物开发提供理论依据。

1 数据来源与方法

1.1 数据来源 功效-药性组合关系结果引用自课题前期工作发表的中药功效-药性组合相关关系研究一文^[7],结果显示活血功效最相关的药性组合是温-辛-肝,本文以温-辛-肝中药的活血功效为研究对象,缩小功效的含义和范围,为构建更有针对性的活血功效网络做准备。

药理作用相关靶点数据来源于 Drugbank 数据库,本文拟构建的蛋白质相互作用网络,背景数据来源于 Reactome 人类化学反应数据库和 HPRD 人类蛋白质相互作用关系数据库。肝癌相关基因编码的蛋白质数据由 GeneCards 数据库获得。Stitch 数据库中记载了化学成分与相关靶点之间的相互作用,结果主要来源于文献挖掘。中药红花的化学成分数据参考了《中药活性成分分析手册》一书^[8]。

1.2 药性组合-药理作用的数据挖掘 2010 年版药典记载的具有温-辛-肝药性的活血中药有 9 味,其相关的药理作用利用“中国期刊全文数据库”(CNKI)检索,收集 1980 年以来国内公开发表的有关这些中药药理研究的全部文献,并参考《中药学》^[9]、《临床中药学》^[10]对其药理信息进行补充。利用 SAS8.2(Statistics Analysis System)中的 Enterprise Miner 模块对温-辛-肝中药的药理作用进行关联规则分析,结果可以发现与温-辛-肝药性组合最相关的 2 个或 2 个以上药理作用。

1.3 活血功效网络构建方法 采用实体语法系统的形式化语言^[11],建立分子间关系模型,借鉴文献的定性推理方法^[12],可以根据活血药理作用相关靶点在蛋白-蛋白相互作用关系网络背景下,推导下游效应网络,即为活血功效分子网络。以活血法治疗肝癌的作用机制解析为目标,在活血功效网络中标记肝癌相关蛋白,通过网络传递,分析活血功效

网络与抗肝癌作用之间的内在关系。通过靶点功能分析,深入探讨活血化瘀法治疗血瘀型肝癌的作用机制。最后,应用活血网络中的肝癌相关靶点,筛选红花中可能与之相互作用的化学成分,即红花中潜在的抗肝癌相关活性成分。

2 结果与讨论

2.1 活血功效网络 本文药性组合-药理作用关联运算选择最小支持度 50% 作为阈值,本文选取关联度最大的规则作为网络构建的基础,见表 1。为评价药性组合与药理作用关系的可靠性,本文对温辛肝药性中药和非温辛肝药性中药与镇痛药理作用关系进行了卡方检验, $P < 0.05$, 具有统计学意义,说明与非温辛肝中药相比,镇痛确实与温辛肝中药关系更紧密。同理,对抗炎药理作用也进行了卡方检验。通过功效-药性-药理的相关性,以 DrugBank 数据库记载的药理作用相关靶点为基础,形成关系链,从而确定活血相关的功效靶点,见图 1。温-辛-肝药性组合的相关药理作用组合是镇痛和抗炎,即具有温-辛-肝药性特征的中药通常同时具有镇痛和抗炎的药理作用。活血与镇痛和抗炎密不可分,已得到大量药理实验的证明^[13]。确定活血相关靶点时,既与镇痛又与抗炎相关的靶点更能够体现温-辛-肝活血药的作用特征,因此选择两药理作用的交集靶点作为活血相关靶点,见图 1,靶点详细信息见表 2。

表 1 功效-药性-药理关联结果

Table 1 The relationship of herbal function-property-pharmacology

功效/药性	支持度	总数	计数	药性组合/药理作用
活血	25	36	9	温辛肝
温辛肝	75	8	6	镇痛-抗炎

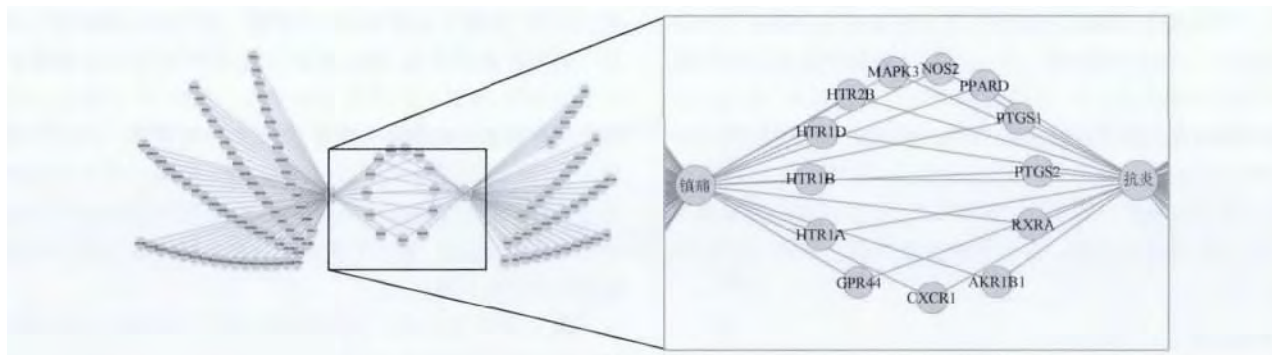


图 1 镇痛抗炎药理作用交集靶点

Fig. 1 Target intersection of analgesic and anti-inflammatory

利用实体语法推理规则,以活血靶点为初始节点,推断下游相关的蛋白,从而构建活血功效网络,由于整个网络过于复杂,在正文中只展示局部网络,包括两步蛋白相互作用

的关系,见图 2。

2.2 活血与肝癌的关系 本文以肝癌相关蛋白为目标,搜索活血功效网络对疾病相关蛋白的影响,在图中标记,见图

表 2 镇痛抗炎交集靶点

Table 2 Common targets for anti-inflammatory and analgesic

交集靶点	简称	全称
P08908	HTR1A	5-hydroxytryptamine 1A receptor
P15121	AKR1B1	aldose reductase
P19793	RXRA	retinoic acid receptor RXR-alpha
P23219	PTGS1	prostaglandin G/H synthase 1
P25024	CXCR1	high affinity interleukin-8 receptor A
P27361	MAPK3	mitogen-activated protein kinase 3
P28221	HTR1D	5-hydroxytryptamine 1D receptor
P28222	HTR1B	5-hydroxytryptamine 1B receptor
P35228	NOS2	nitric oxide synthase, inducible
P35354	PTGS2	prostaglandin G/H synthase 2
P41595	HTR2B	5-hydroxytryptamine 2B receptor
Q03181	PPARδ	peroxisome proliferator-activated receptor delta
Q9Y5Y4	GPR44	putative G-protein coupled receptor 44

2. 图中红色靶点为活血功效,其余所有节点都为活血相关蛋白。活血相关蛋白中,粉色点代表活血靶点,深绿色点代表既是活血靶点又是肝癌相关蛋白的节点,浅绿的点为肝癌相关蛋白。从功效网络标记可见,活血功效是通过特定蛋白影响肝癌的分子机制。图 2 中活血和肝癌相关蛋白的详细分类和关系见表 3。活血靶点和活血相关蛋白中都有肝癌相关蛋白,活血靶点本身就是肝癌相关蛋白的在表 3 中“关系”栏用“直接”关系表示,活血靶点通过蛋白相互作用影响到肝癌相关蛋白的在表 3 中“关系”栏用“间接”关系表示。

结果表明,活血可以通过直接作用和间接作用的方式抗肝癌。直接抗癌作用就是直接抑制细胞增殖、作用于原癌基因和抑癌基因、促进细胞凋亡,直接抗肿瘤。例如,图 2 中标明的活血功效网络中的抑癌基因 TP53 和趋化因子受体 CXCR4 都是细胞增殖的关键分子^[14],与肝癌的发生发展密切相关,这也阐明了活血法抗癌的原理。而许多实验都证明一

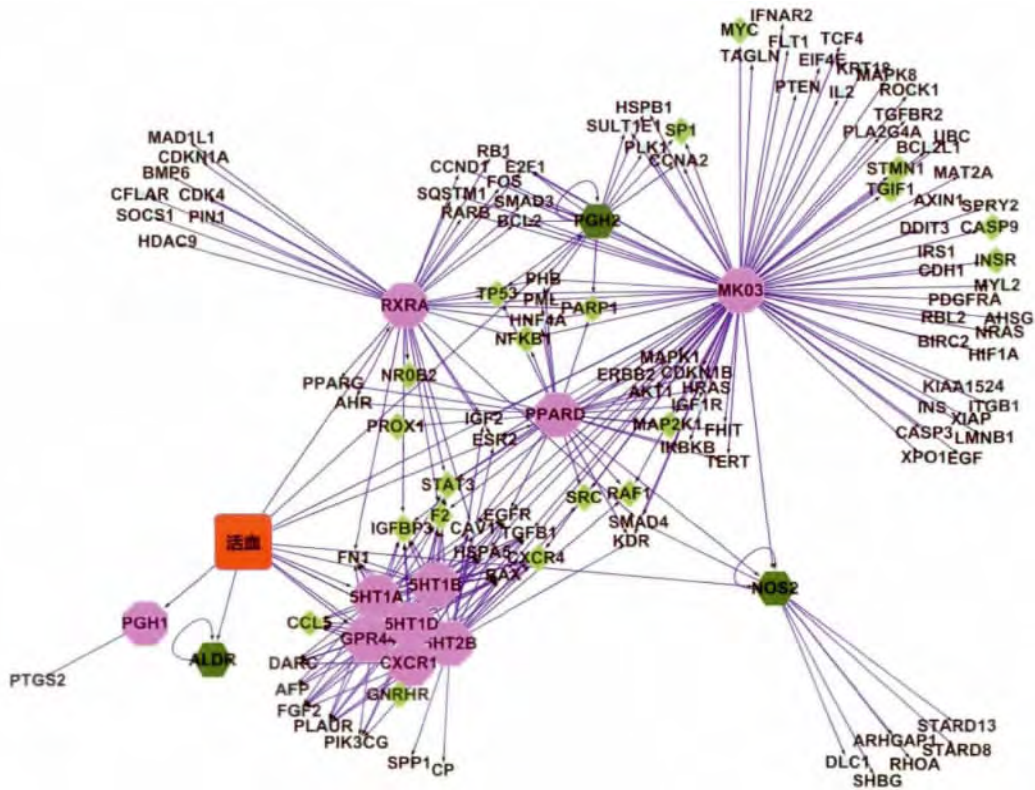


图 2 活血功效网络

Fig. 2 Functional network of invigorating blood circulation

些活血化瘀中药本身就有抗肿瘤作用如丹参、川芎、赤芍、莪术、郁金、乳香、三棱、红花、没药、全蝎、土鳖虫、当归、水蛙等对肿瘤都有直接抑制作用,这与活血功效网络的发现相一致。

间接抗癌作用,包括改善微循环和预防肝癌肿瘤转移等预防癌症发生发展的相关作用。肝癌常伴有血液黏度增高

及血液高凝状态,而活血功效网络中的过氧化物酶体增殖活性受体 (PPARδ) 等靶点就是与调节血脂密切相关^[15],另外活血相关蛋白凝血酶 F2 关系也到抗凝血,因此调节上述靶点都可达到缓解血液高黏和高凝的作用。肝癌患者血液中过多的纤维蛋白、血小板会造成高凝、高黏状态,他们能包裹原发灶脱落的癌细胞,形成瘤栓,使癌细胞易于躲避血液

表 3 活血功效对肝癌治疗的作用

Table 3 Targets interaction of promoting blood circulation and liver cancer

活血靶点	肝癌蛋白	关系
PTGS2	PTGS2	直接
NOS2	NOS2	直接
AKR1B1	AKR1B1	直接
GPR44	CXCR4	间接
GPR44	CCL5	间接
PPARD	PROX1	间接
PPARD	NR0B2	间接
PPARD	SRC	间接
5HT2B	F2	间接
5HT2B	GNRHR	间接
PGH2	TP53	间接
5HT1B	CXCR4	间接
5HT1B	CCL5	间接
5HT1D	CXCR4	间接
5HT1D	CCL5	间接
MK03	MAP2K1	间接
MK03	TP53	间接
MK03	TGIF1	间接
MK03	CASP9	间接
MK03	STAT3	间接
MK03	STMN1	间接
MK03	SRC	间接
MK03	SP1	间接
MK03	INSR	间接
MK03	RAF1	间接
MK03	MYC	间接
CXCR1	CXCR4	间接
CXCR1	CCL5	间接
RXRA	IGFBP3	间接
RXRA	NFKB1	间接
RXRA	PARP1	间接
5HT1A	CXCR4	间接
5HT1A	CCL5	间接

剪切力及免疫监视,增加肿瘤转移的机率。故缓解血液高黏和高凝状态,成为治疗和预防肝癌的重要机制。

活血作用对局部血液循环的调节,使局部血流量增加,血液流速增加,血管痉挛解除,减轻代谢障碍,提高肿瘤局部的血供和血内含氧量,从而提高肿瘤组织对放射线和化疗药物的敏感性,也可以间接抗癌。实验^[16]和 meta 分析^[17]都表明,活血化痰中药联合肝动脉栓塞化疗更有助于抑制肝癌生长。

2.3 基于功效网络的红花抗肝癌有效成分群筛选 红花是温辛归肝经的活血药,符合活血网络的应用范围,因此本文选取红花作为应用对象。根据两步推断构建的活血功效网络中所有与肝癌相关的活血靶点为目标,通过 Stitch 数据库收集的红花化学成分与相关靶点的对应关系,筛选红花中与

肝癌相关的有效成分群,见表 4。

表 4 红花抗肝癌有效成分群筛选

Table 4 Screening of safflower active ingredient group for anti-hepatoma

成分	激活靶点	抑制靶点
红花黄色素	-	NFKB1
腺苷酸	-	CCL5
咖啡酸	-	PTGS2
棕榈酸	NFKB1 ,NOS2	INSR
月桂酸	NFKB1	
亚油酸	MYC	PTGS2 ,PPARD
木犀草素	-	PTGS2 ,NFKB1 ,STAT3 ,NOS2
肉豆蔻酸	GNRHR	-
槲皮素	TP53 ,CASP9	PARP1 ,PTGS2 ,MYC
芦丁	-	INSR
黄酮醇	-	PTGS2 ,AKR1B1 ,SRC ,NOS2

其中槲皮素抗肝癌的作用已见报道^[18],本研究结果发现槲皮素作用于肾上腺素 H 合成酶(PTG2)发挥抗炎作用,通过 MKO3 靶点作用于 TP53 和 CXCR4 而抑制肿瘤增殖,槲皮素不仅能抗肝癌,而且能够抑制炎症反应,因此对于肝癌的发生发展有治疗作用,与文献报道结果一致^[19]。有文献报道,木犀草素除可抗肝癌外,还可以增强机体对其他抗癌药物的敏感性,从而增强抗癌效果^[20],其原因在于它作用于一氧化氮合酶 NOS2,它是唯一能合成内皮源性舒张因子一氧化氮的限速酶,与血管扩张密切相关,通过调节局部血液循环增强机体对其他抗癌药物的敏感性,达到协同抗癌作用。亚油酸作用于 PPARD,与降血脂作用相关。总的来说,红花抗肝癌机制主要表现在抑制癌细胞增殖、抗炎、调节局部血液循环、降血脂等方面。

3 结论

本文通过活血功效网络的构建,初步阐明了活血治疗肝癌的原理,并说明了红花抗肝癌的主要作用机制,为基于靶点组合的分子复方开发奠定基础,为中药的组分复方设计提供理论支持。结果表明,功效网络不仅能够解释其治疗疾病的作用机制,还可以根据疾病相关靶点,从中医辨证的角度反向筛选相关中药有效成分群,揭示其多成分多靶点多途径的治疗机制。

[参考文献]

- [1] 施蓉,陈晓. 气滞血瘀型肝癌的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2012, 46(2):79.
- [2] 鞠立霞,陈哲,李柏. 活血化痰药治疗原发性肝癌作用机制研究进展[J]. 中医杂志, 2004, 45(4):310.
- [3] 彭正顺,饶荣生,倪慧文,等. 肝动脉灌注活血药治疗晚期肝癌疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(6):330.
- [4] 王耘,张燕玲,史新元,等. 中药功效网络的构建及应用[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2008, 10(5):105.

- [5] 王耘,王刚,肖斌,等. 活血化瘀中药功效网络的构建方法[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2010, 12(5):764.
- [6] 梁颖,张晓莉,陶冀,等. 红花多糖对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的抑制作用[J]. 中医药学报, 2011, 39(5):32.
- [7] 顾浩,王耘,肖斌,等. 中药功效-药性组合关联关系研究[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(7):1568.
- [8] 常新全. 中药活性成分分析手册(上下)[M]. 北京:学苑出版社, 2002.
- [9] 颜正华. 中药学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2006.
- [10] 高学敏,钟麟生. 临床中药学[M]. 石家庄:河北科学技术出版社, 2005.
- [11] Wang Y. Entity grammar systems: a grammatical tool for studying the hierarchical structures of biological systems[J]. Bull Math Biol, 2004, 66(3):447.
- [12] Yan J. TCM grammar systems: an approach to aid the interpretation of the molecular interactions in Chinese herbal medicine[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1):77.
- [13] 张曦. 舒筋活血药抗炎、镇痛作用及急性毒性试验的实验研究[J]. 中医临床杂志, 2007, 19(6):558.
- [14] 王勃,李少林,张俊,等. CXCR4 在不同转移潜能肝癌细胞中的表达及意义[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(2):131.
- [15] 郭鸣雷,李锦军,李宏年,等. 过氧化物酶体增殖激活受体 γ (PPAR γ)在肝癌组织中的差异性表达[J]. 肿瘤, 2005, 25(5):413.
- [16] 施先艳,鲁德银,朱尤庆,等. 中药配合肝动脉栓塞化疗对肝癌生长的影响[J]. 中国医药学报, 2002, 17(4):228.
- [17] 孟茂斌,崔尧丽,官咏松,等. 中药配合肝动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌随机对照试验的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2008, 8(1):21.
- [18] 沈钦海,秦召敏,孙志军,等. 槲皮素抗肝癌作用[J]. 临床荟萃, 2009, 24(23):2034.
- [19] 李钢. 槲皮素对肝癌高转移细胞侵袭转移能力的影响及机制研究[D]. 昆明:昆明医科大学, 2012.
- [20] 王洪燕,全康,蒋燕灵,等. 木犀草素抗肿瘤细胞增殖及增敏抗肿瘤药物作用研究[J]. 浙江大学学报:医学版, 2010, 39(1):30.

Analysis on anti-hepatoma effect of medicine invigorating blood circulation and eliminating blood stasis based on warm-pungent-liver efficiency network

GU Hao, MA Li, YUAN Bin, ZHANG Yan-ling, WANG Yun*, QIAO Yan-jiang*

(Information Engineering Research Center for Traditional Chinese Medicines, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Objective: The efficiency network is a complicated network for revealing the efficient mechanism of traditional Chinese medicines (TCMs) and relations among efficiencies. The efficiency-property relations were used to establish a warm-pungent-liver efficiency network to explain the principle of treating hepatoma with medicines invigorating blood circulation and eliminating blood stasis. Safflower, a warm-pungent medicine distributing along the live meridian, was taken for example to discuss the efficiency network's application in the identification of active ingredients of TCMs and the combination. **Method:** In the early stage of this study, combined warm-pungent-liver medicines distributed along the liver meridian and invigorating blood circulation and eliminating blood stasis were taken as the study objects to collect the pharmacological effect data of warm-pungent-liver medicines and obtain the pharmacological effect combinations with the highest blood circulation-invigorating association by the association rules and the chi-square test. The pharmacological target data recorded in the DrugBank database is used to establish the warm-pungent-liver efficiency network according to the principle line of "efficiency-property-pharmacology-target-protein interaction" under the background of the protein interaction network. **Result:** The blood circulation-invigorating medicines could directly treat hepatoma by impacting protooncogene, cancer suppressor gene, cell apoptosis and anti-inflammation, and indirectly treat hepatoma by resisting coagulation and adhesion, regulating local blood circulation, preventing cancer cell metastasis and enhancing the tissues' sensitivity to the anticancer drugs. Among the active ingredients of safflower screened based on the blood circulation-invigorating network targets, carthamin yellow, quercetin and luteolin have been proved to have the anti-hepatoma effect in literatures, which indicated the reliability of this study's results and the purpose of the efficiency network. **Conclusion:** The efficiency network is an effective method for revealing the TCM's mechanism, and lays a foundation for discovering key active ingredients of TCMs for treating specific diseases.

[Key words] invigorate blood circulation; efficiency network; hepatoma

doi:10.4268/cjmm20141313

[责任编辑 张宁宁]

• 2421 •