◆肿瘤研究◆

基于网络药理学与分子对接及实验验证探讨苦杏仁-桔梗药对治疗肺癌的作用机制

刘远财[1]，周夏成[1]，陈卓[2]，杨佳颖[1]，张爱琴[2]

1. 浙江中医药大学第二临床医学院，浙江 杭州 310053；2. 浙江省肿瘤医院，浙江 杭州 310022

［摘要］**目的：**运用网络药理学方法及分子对接初步预测苦杏仁-桔梗药对治疗肺癌的主要靶点及其作用机制，再通过体外实验验证部分关键靶点及其通路。**方法：**通过中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）、SwissTargetPrediction、GeneCard数据库获取活性成分和靶点，利用UniProt数据库将靶点标准化，通过在线veny2.1绘制韦恩图。运用STRING数据库绘制靶点的PPI网络图，使用Cytoscape3.8.2软件建立“药物-成分-靶点”“核心蛋白-蛋白”网络关系图，利用Matescape数据库进行GO和KEGG通路富集分析。通过PyMOL、AutoDockTool 1.5.6软件进行分子对接。用不同浓度的小鼠含药血清培养Lewis肺癌细胞，CCK8检测细胞活性，流式细胞Annen V-FITC/PI标记法检测细胞凋亡率，实时荧光定量PCR技术、Western Blot检测Lewis肺癌细胞中SRC蛋白表达水平。**结果：**获得苦杏仁-桔梗有效活性成分23个，靶点为227个，关键靶点为SRC，KEGG富集程度较高的为PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路等。分子对接显示结合能良好。体外实验显示苦杏仁-桔梗药对可抑制Lewis肺癌细胞增殖，诱导其凋亡，并能下调SRC蛋白表达水平。**结论：**苦杏仁-桔梗药对能抑制SRC的表达，可能通过调控PD-1和PD-L1通路、Ras信号通路、PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路降低肿瘤细胞的侵袭、迁移、增殖、分化等能力，增强机体免疫力，从而治疗肺癌。

［关键词］肺癌；苦杏仁-桔梗；SRC；网络药理；体外实验

［中图分类号］R734.2 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）11-0146-10

DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.11.027

Exploring the Mechanism of Action of Armeniacae Semen Amarum-Platycodonis Radix in the Treatment of Lung Cancer Based on Network Pharmacology and Molecular Docking and Experimental Validation

LIU Yuancai, ZHOU Xiacheng, CHEN Zhuo, YANG Jiaying, ZHANG Aiqin

Abstract: Objective: To preliminarily predict the main targets and mechanisms of Armeniacae Semen Amarum-Platycodonis Radix in the treatment of lung cancer using network pharmacological methods and molecular docking, and then verify some key targets and pathways through in vitro experiments. **Methods:** Active ingredients and targets were obtained through the Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), SwissTargetPrediction and GeneCard databases. The targets were standardized using the UniProt database, and the Venn diagram was drawn through online veny2.1. Using STRING database to draw the target PPI network diagram, using Cytascape3.8.2

［收稿日期］2022-11-29
［修回日期］2023-03-23
［基金项目］浙江省中医药科技计划重点项目（2021ZZ008）
［作者简介］刘远财（1996-），男，规培医师，E-mail：1446113953@qq.com。
［通信作者］张爱琴（1969-），女，主任中医师，E-mail：zhanghaojianbb@163.com。

software to establish the "drug–component–target" and "core protein–protein" network relationship diagram，and using Matescape database to conduct GO and KEGG pathway enrichment analysis. Molecular docking is performed through PyMOL and AutoDockTool 1.5.6 software. Lewis lung cancer cell was cultured with different concentrations of mouse drug– containing serum. Cell activity was detected by CCK8，apoptosis rate was detected by flow cytometry using Annen V–FITC/PI labeling，and the expression level of SRC protein in Lewis lung cancer cell was detected by real–time fluorescence quantitative PCR and Western Blot. **Results**：A total of 23 effective active components were obtained from Armeniacae Semen Amarum– Platycodonis Radix，with 227 target. The key target was SRC，and the PI3K– Akt signaling pathway and MAPK signaling pathway with higher KEGG enrichment were found. Molecular docking showed good docking performance. In vitro experiments showed that the Armeniacae Semen Amarum–Platycodonis Radix drug pair could inhibit the proliferation of Lewis lung cancer cell，induce the apoptosis，and down–regulate the expression level of SRC protein. **Conclusion**：The Armeniacae Semen Amarum–Platycodonis Radix drug pair can inhibit the expression of SRC，possibly by regulating the PD–1 and PD–L1 pathways，Ras signaling pathway，PI3K–Akt signaling pathway，and MAPK signaling pathway to reduce the invasion，migration，proliferation，and differentiation of tumor cells，improve immunity，and thereby treat lung cancer.

Keywords：Lung cancer；Armeniacae Semen Amarum–Platycodonis Radix；SRC；Network pharmacology；In vitro experiments

肺癌是近30年来我国发生率增长最快的恶性肿瘤，全国肺癌发病率(粗率)为57.3/10万，死亡率为45.9/10万[1]。目前，肺癌的治疗手段包括手术、化疗、放疗以及生物靶向治疗等，虽然治疗手段获得长足的进步，然而肺癌患者依然存在预后较差及复发可能性大等问题。大量相关数据表明，中医药治疗可以显著提高患者对化疗药物的敏感性，增强肿瘤抑制作用，并显著改善癌症相关的疲劳、骨髓抑制和其他不良反应[2]。

沙参麦冬汤为国家级名老中医吴良村教授治疗肺癌的经验方，长期临床实践表明其疗效确切，但其作用机制却尚未被阐明[3]。苦杏仁–桔梗是沙参麦冬汤中的1组核心药对，具有宣肃肺气的作用。本研究试通过网络药理学方法，初步预测苦杏仁–桔梗治疗肺癌的关键靶点及其作用机制，并通过分子对接技术和体外实验验证探讨苦杏仁–桔梗治疗肺癌的作用机制，为中医药治疗肺癌提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 药物活性成分筛选 以“苦杏仁”“桔梗”为关键词在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)搜索。按口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18进行筛选。

1.2 药物–疾病靶点收集 在GeneCard数据库中获取肺癌靶点，由于获得相关靶点过多且有部分靶点与肺癌关联分数低，所以通过Excel筛选关联度中位数的方式[4]，筛选4次后获得最适关联度为13.17，之后通过关联度≥13.17对所得靶点进行筛选，并通过Uniprot数据库进行标准化。在SwissTargetPrediction数据库中预测其靶点和Uniprot号，通过在线veny2.1绘制肺癌、苦杏仁–桔梗交集靶点的韦恩图。

1.3 构建“药物–疾病”相互作用(PPI)网络 将活性成分、靶点录入Cytoscape3.8.2中进行可视化分析，并将靶点上传STRING数据库，绘制PPI网络图，置信度设定为大于0.9，将结果导入Cytoscape3.8.2进行核心靶点的筛选。

1.4 GO富集分析、KEGG通路分析 将共同作用靶点录入Metascape数据库中，对其进行GO生物过程(BP)、细胞组分(CC)、分子功能(MF)富集分析和KEGG通路富集分析，并根据*P*值由小到大分别筛选出部分条目，利用微生信平台绘制GO富集分析

条状图和KEGG通路分析气泡图。

1.5 分子对接 为了进一步确定各成分对肺癌关键靶点的作用，根据连接度值筛选出中药关键活性成分，PPI网络图筛选出核心靶点。利用PyMOL、AutoDockTool 1.5.6软件对关键活性成分与核心靶点进行对接。关键活性成分的结构文件(mol2格式)及核心靶点的蛋白质晶体结构(pdb格式)分别从PubChem和RSCB PDB数据库下载获取。

1.6 实验验证

1.6.1 材料 动物：SPF级雄性SD大鼠20只，6～8周龄，体质量(250±20)g，购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司，大鼠已通过浙江鹰旸医药研发中心实验动物伦理委会审查，伦理学批号：ZJET-20220314-01。细胞株：小鼠Lewis细胞株购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司，批号iCell-m027。药物：苦杏仁、桔梗各10 g，均购自寿仙谷，其中苦杏仁选用含苦杏仁苷≥2.4%[5]、成熟、饱满、肥厚、味苦者[6]；桔梗选用身干、条粗均匀、体质坚实、色白、味苦者[7]。试剂：DME高糖培养基(gibco，批号2130493)、胎牛血清(四季青，批号21110705)、Trypsin 0.25%(1×) Solution(TransGen Biotech，批号Q30323)、PBS磷酸盐缓冲液(pH 7.2～7.4)(TRANSGEN BIOTECH，批号O21023)、Cell Counting Kit-8(CCK8试剂盒)(碧云天，批号112921220216)、RIPA裂解液(碧云天，批号090121211229)、PMSF(碧云天，批号20220212)、SYBR Green qPCR试剂盒(翌生，批号H0108041)、逆转录试剂盒(康为世纪，批号36320)、蛋白酶抑制剂(康为世纪，批号50321)、异丙醇(麦克林，批号C12833389)、BCA蛋白定量试剂盒(Solarbio，批号20220218)、预染蛋白marker(Solarbio，批号326G022)、甲醇(永大，批号20220222)、30% acylamide (Biosharp，批号H108KA8405)、1.5M Tris pH 8.8(Biosharp，批号22011373)、1.0M Tris pH 6.8 Biosharp(Biosharp，批号21230507)、BSA(BioFRoxx，批号EZ7980B203)、10% APS(BBI Life Sciences，批号H616BA1001)、PVDF膜(millipore，批号R1NB74016)、SRC Antibody(Abcam，稀释比1∶1 000，批号GR5170787-24)、β-actin Antibody(Affinity，稀释比1∶10 000，批号12w2944)。仪器：低温高速离心机、细胞培养箱、低温高速离心机(Thermo)；酶标仪(MD)；流式细胞仪(安捷伦)；普通PCR(Eppendorf)；mRNA定量仪(Thermo Scientific)；实时荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司)；电泳仪、电泳槽、转膜仪(天能)；化学发光仪(勤翔)。

1.6.2 方法 ①水煎剂的制备：苦杏仁10 g、桔梗10 g，按照传统法煎煮2次，合并药液。②含药血清的制备：SD大鼠，雄性，20只，按体质量随机分为对照组、给药组。给药组大鼠每天早晚灌胃2次，按人鼠体表面积法换算法确定给药剂量(300 mg/kg)[8]，连续5 d；对照组给予等量0.9%氯化钠溶液，给药5 d。末次给药1 h后，麻醉大鼠，心脏取血，静置2～3 h，吸取上清液，3 000 r/min(离心半径10 cm)，离心15 min，吸取上清液，同组血清混合，56 ℃水浴灭活30 min，0.22 μm滤孔滤膜过滤，-80 ℃保存备用。③细胞培养与分组：小鼠Lewis肺癌细胞培养于胎牛血清、DME高糖培养基中，于细胞培养箱内培养，取对数生长期细胞悬液用于实验。将细胞分成8组处理(对照组：未经含药血清处理细胞；空白血清对照组：10%空白血清处理细胞；药对组：设置药对含药血清剂量1%、2%、4%、6%、8%、10%)，给药后接种于96孔板内，培养相应时间后，每孔加入10 μL CCK-8溶液，在培养箱内孵育。④CCK8检测细胞活性：用酶标仪测定450 nm处的吸光度值(A值)，计算细胞活性，细胞活性=(实验组A值-空白调零A值)/(对照组A值-空白调零A值)×100%。每组细胞平行测定5个复孔。⑤细胞凋亡实验：取对数生长期细胞种植于6 well cell culture plate，接种密度为每孔1.2×10^{6}个细胞，培养24 h后。分3组(A. 对照组：未经含药血清处理细胞；B. 空白血清对照组：空白血清处理细胞；C. 药对组：10%含药血清处理细胞)，处理48 h后收集细胞，预冷PBS洗涤2次，调整细胞浓度为1×10^{6}个/mL。加入500 μL结合缓冲液，离心弃上清，再加入100 μL结合缓冲液混匀后，分别加入5 μL Annexin V-FITC与10 μL PI，充分混匀；室温避光反应15 min。最后加入结合缓冲液400 μL，1 h内流式细胞仪检测细胞凋亡率。实验重复3次。⑥实时荧光定量PCR技术检测Lewis细胞SRC表达：将细胞培养至1×10^{7}个细胞时，运用10%含药血清处理细胞干预48 h，用细胞刮刀将瓶底细胞轻轻刮下，运用Trizol法提取总RNA，计算浓度后用逆转录试剂盒进

行 RNA 的反转录。引物序列如下：Mouse SRC(F：GAACCCGAGAGGGACCTTC，R：GAGGCAG TAGGCACCTTTTGT)。按照荧光定量 PCR 试剂盒配制反应体系，反应条件：95 ℃，10 min 变性；95 ℃，15 s；60 ℃，60 s；40 次循环。运用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法定量分析数据，分析溶解曲线，并计算 mRNA 的表达比率。⑦Western Blot 法检测 Lewis 细胞 SRC 蛋白的表达：称取 100 mg 肺组织，加入 1 mL 冷 Lysis Buffer 裂解，匀浆，细胞弃上清，采用 PBS 洗涤 2 次后，收细胞 1 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 5 min，加入 600 μL 的 RIPA 裂解液(含 PMSF 和蛋白酶抑制剂)，冰上裂解 30 min，12 000 g，4 ℃离心 5 min，取上清，BCA 试剂盒测浓度。加入 Loading buffer(含 β-巯基乙醇)(Loading Buffer：β-巯基乙醇=50：3)(体积比为 Loading buffer：样品=1：4)，沸水煮 5 min 变性后，放-20 ℃保存待用。5% SDS-PAGE 凝胶电泳，200 mA 恒流 120 min 转膜，5%脱脂奶粉室温封闭 1.5～2 h，分别加入一抗 SRC(1：1 000)，4 ℃孵育过夜，TBST 洗 10 min×3 次，二抗室温孵育 2 h，TBST 洗 10 min×3 次，ECL 化学发光仪显影。

1.7　统计学方法　采用 SPSS16.0 统计软件进行数据分析，多组间计量资料若符合正态分布且符合方差齐性检验，用 One-way-ANOVA 单因素方差分析，进一步组间两两比较采用 Turkey 检验；若符合正态分布但方差不齐，则采用 Dunnett's *T*3 检验或独立样本 *t* 检验；若不符合正态分布，则采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。显著性水平 α=0.05。所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　研究结果

2.1　药物活性成分筛选　见表 1。苦杏仁获得有效成分 18 个，桔梗获得有效成分 7 个，MOL004355 菠菜甾醇(Spinasterol)是桔梗和苦杏仁中共有的活性成分。

2.2　药物-疾病靶点收集　见图 1。经筛选、标准化后获得肺癌靶点 1 221 个。获得苦杏仁靶点 636 个，获得桔梗靶点 343 个。采用在线韦恩图获得共同靶点 227 个。

2.3　构建 PPI 网络　见图 2～4。“药物-疾病”相互作用网络图中共包括 252 个节点(2 个药物、23 个化合物和 227 个靶点)和 938 条边。在 PPI 网络图中，共有 227 个节点，1 263 条边，通过 Cytoscape 3.8.2 进行 PPI 网络拓扑学分析，根据节点的 degree 大小筛选出前 20 个核心基因(degree>29)，其中 SRC 是

表 1　苦杏仁-桔梗活性成分

序号	药物	Mol ID	Molecule Name	OB(%)	DL
1	苦杏仁	MOL010921	Estrone	53.56	0.32
2	苦杏仁	MOL010922	Diisooctyl succinate	31.62	0.23
3	苦杏仁	MOL002211	11,14-eicosadienoic acid	39.99	0.20
4	苦杏仁	MOL002372	(6Z,10E,14E,18E)-2,6,10,15,19,23-hexamethyltetracosa-2,6,10,14,18,22-hexaene	33.55	0.42
5	苦杏仁	MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75
6	苦杏仁	MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
7	苦杏仁	MOL005030	Gondoic acid	30.70	0.20
8	苦杏仁	MOL000953	CLR	37.87	0.68
9	苦杏仁	MOL000211	Mairin	55.38	0.78
10	苦杏仁	MOL000492	(+)-Catechin	54.83	0.24
11	苦杏仁	MOL002311	Glycyrol	90.78	0.67
12	苦杏仁	MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76
13	苦杏仁	MOL004841	Licochalcone B	76.76	0.19
14	苦杏仁	MOL004903	Liquiritin	65.69	0.74
15	苦杏仁	MOL004908	Glabridin	53.25	0.47
16	苦杏仁	MOL005017	Phaseol	78.77	0.58
17	苦杏仁	MOL007207	Machiline	79.64	0.24
18	苦杏仁	MOL012922	l-SPD	87.35	0.54
19	桔梗	MOL004580	cis-Dihydroquercetin	66.44	0.27
20	桔梗	MOL005996	2-*O*-methyl-3-*O*-β-*D*-glucopyranosylplatycogenate A	45.15	0.25
21	桔梗	MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76
22	桔梗	MOL006070	Robinin	39.84	0.71
23	桔梗	MOL006026	Dimethyl 2-*O*-methyl-3-*O*-a-*D*-glucopyranosyl platycogenate A	39.21	0.25
24	桔梗	MOL000006	Luteolin	36.16	0.25
25	桔梗	MOL001689	Acacetin	34.97	0.24

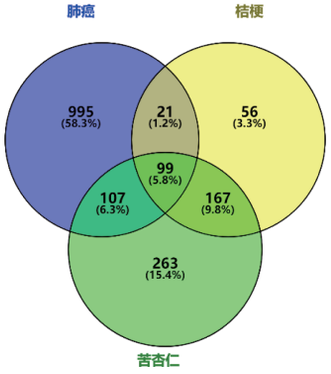


图 1　药物-疾病韦恩图

连接度最高的靶点，MOL001689（Acacetin）、MOL000006（Luteolin）、MOL004841（Licochalcone B）、MOL002311（Glycyrol）、MOL004908（Glabridin）这5个活性成分与肺癌的共同基因最多，均大于≥50个。

2.4　GO富集分析及KEGG通路分析　见图5～6。

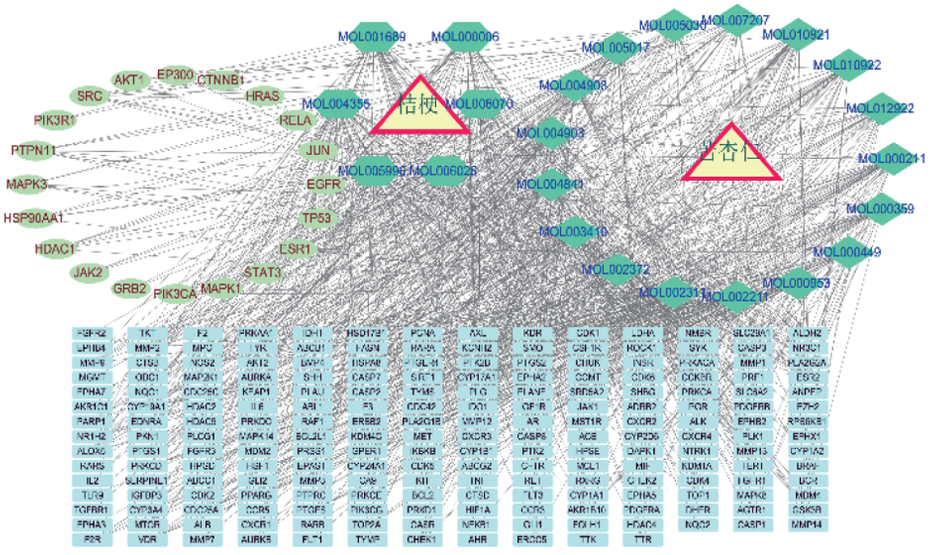


图2　药物成分-靶点图

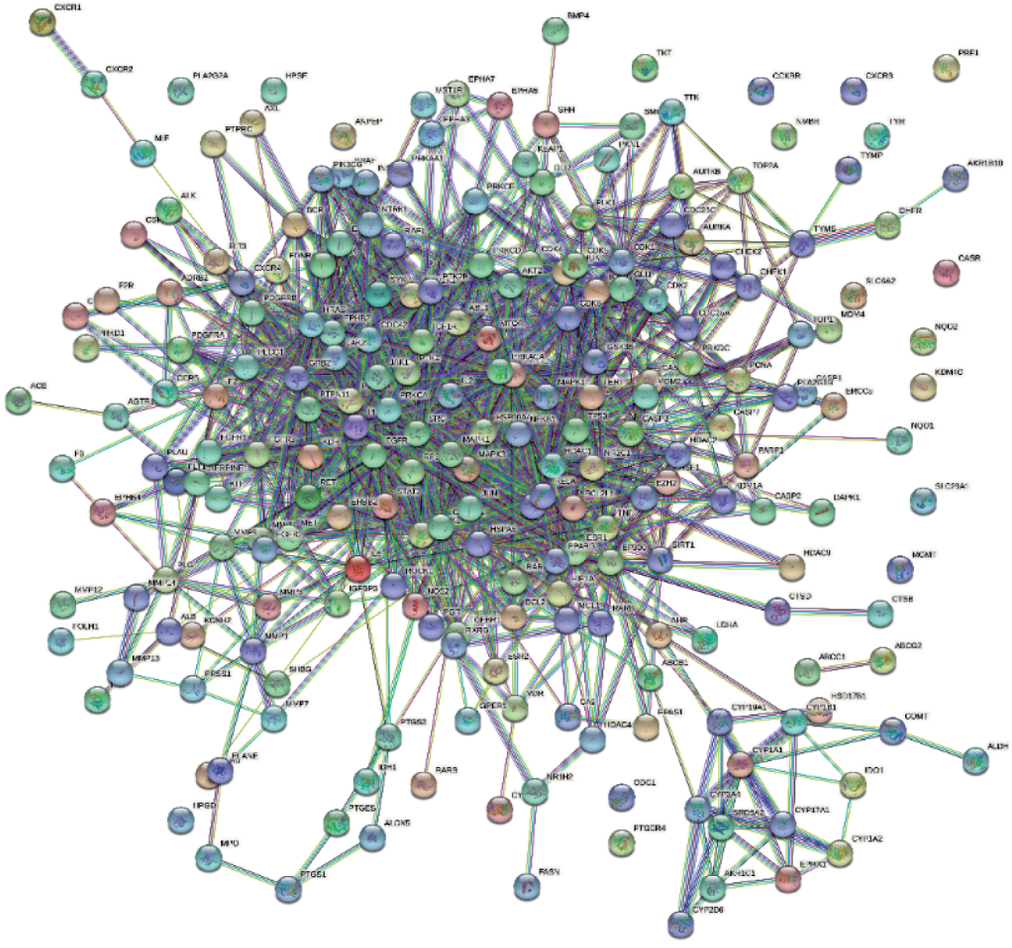


图3　PPI网络图

GO富集条目共获得398个GO条目，BP、CC和MF中富集的前10个GO条目；KEGG通路共获得179条，其中富集程度较高的为PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路等，前30条富集明显的通路。

2.5　分子对接结果　见表2、图7。关键活性成分与部分核心靶点结合能，这5个活性成分与靶点的对接结合能大部分低于-2.5 kcal/mol，说明结合活性良好，可能是潜在的肺癌抑制靶点。

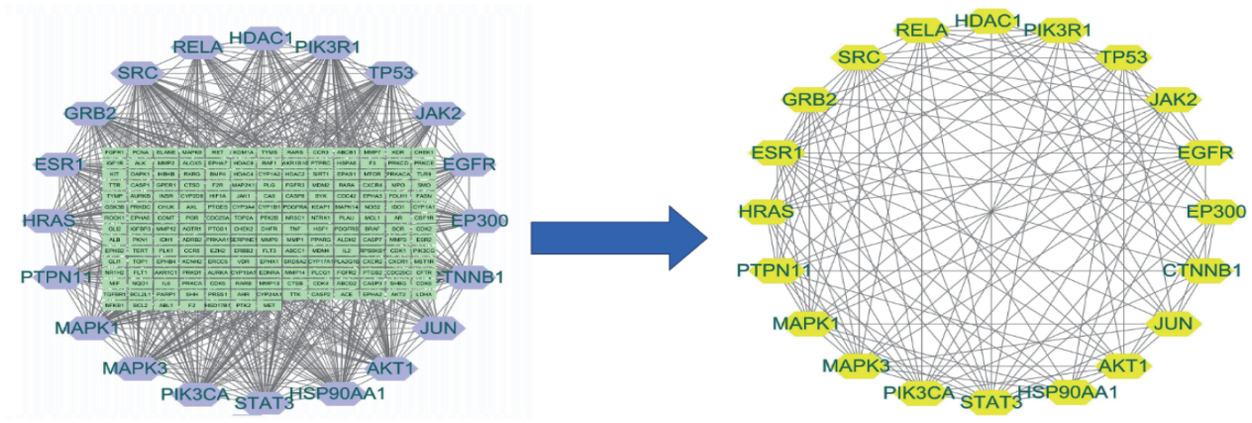


图4　PPI核心靶点筛选

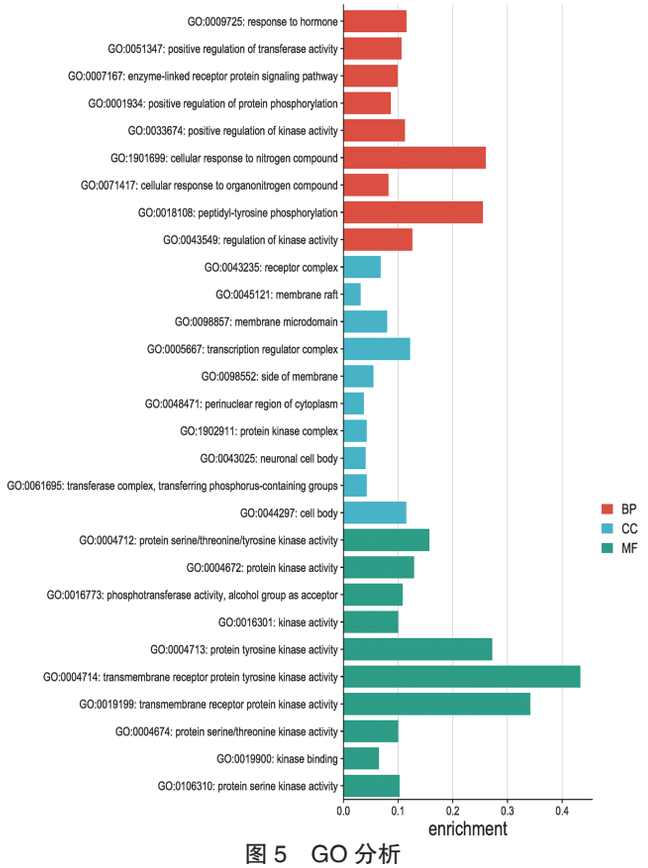


图5　GO分析



图6　KEGG通路分析

表2　关键活性成分与部分核心靶点结合能　kcal/mol

活性成分	PIK3R1	SRC	TP53	HRAS	MAPK3	活性成分	PIK3R1	SRC	TP53	HRAS	MAPK3
MOL004908	-6.38	-8.68	-5.89	-5.83	-6.20	MOL001689	-4.65	-7.37	-6.25	-5.23	-4.62
MOL004841	-3.68	-6.36	-4.54	-4.34	-4.26	MOL000006	-4.61	-5.68	-5.87	-4.29	-4.31
MOL002311	-6.09	-5.76	-5.38	-5.15	-4.79						

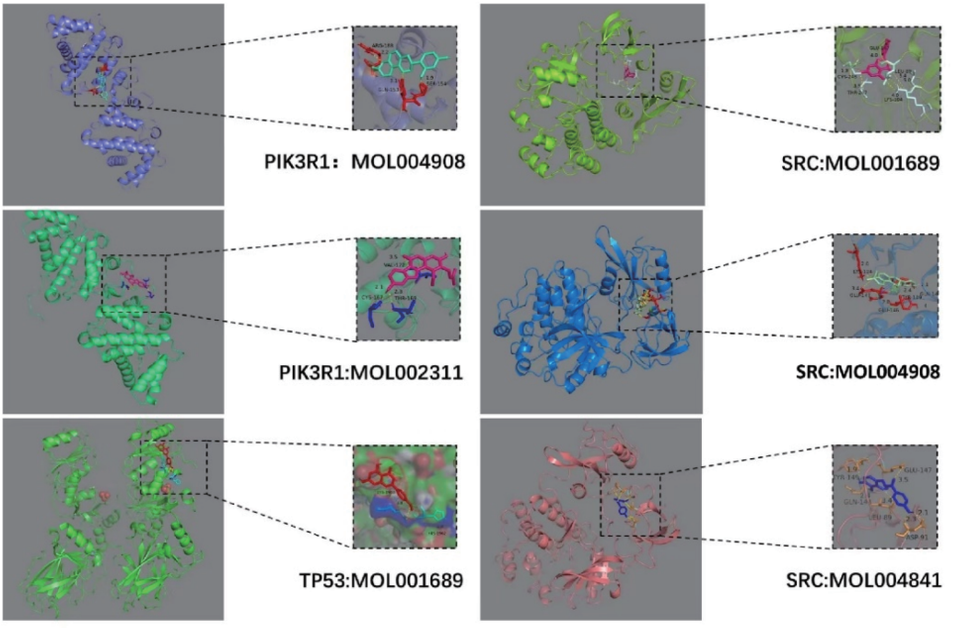
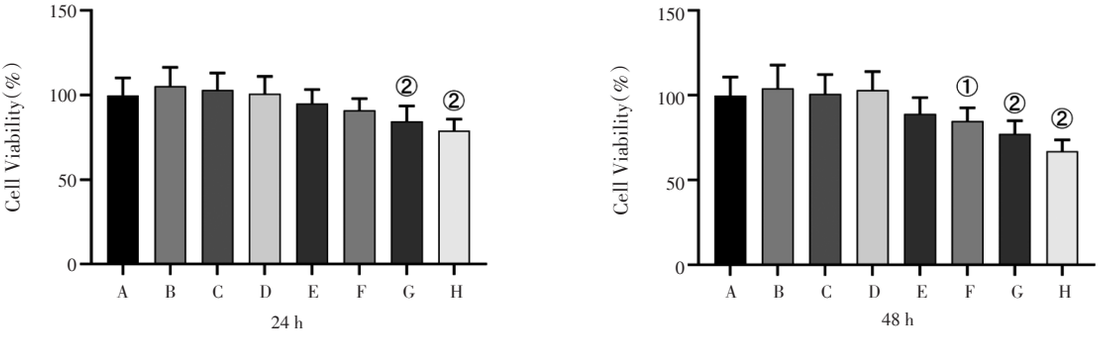


图 7　分子对接可视化

2.6　验证实验结果

2.6.1　细胞活力的检测　见图 8。与空白血清组比较，24 h 和 48 h 后，8%、10%含药血清组 Lewis 细胞的细胞活力显著降低（$P<0.01$）；48 h 后 6%、8%、10%含药血清组 Lewis 细胞的细胞活力显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），药物浓度和细胞活力呈反比。



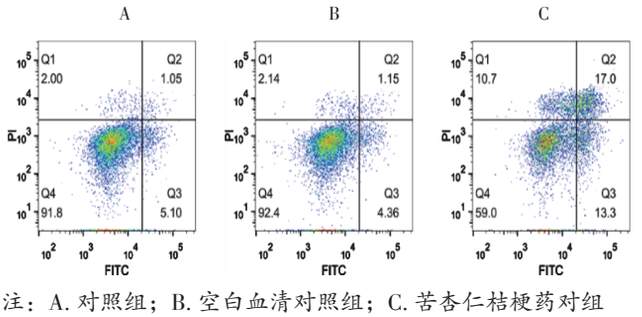
注：A. 对照组；B. 空白血清对照组；C.1%含药血清组；D.2%含药血清组；E.4%含药血清组；F.6%含药血清组；G.8%含药血清组；H.10%含药血清组。①与空白血清对照组比较，$P<0.05$；②与空白血清对照组比较，$P<0.01$

图 8　细胞活力

2.6.2　苦杏仁-桔梗对各组 Lewis 肺癌细胞凋亡结果　见图 9～10。与对照组比较，苦杏仁-桔梗药对组 Lewis 细胞的凋亡率显著升高（$P<0.01$）。

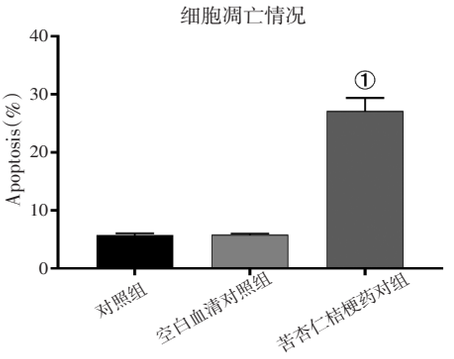
2.6.3　Lewis 细胞中 SRC mRNA 表达情况　见图 11。与对照组比较，苦杏仁-桔梗药对组 Lewis 细胞中 SRC 的表达水平显著降低（$P<0.01$）。

2.6.4　Lewis 细胞中 SRC 蛋白表达水平　见图 12～13。与对照组比较，苦杏仁-桔梗药对组 Lewis 细胞中 SRC 蛋白表达水平显著性降低（$P<0.01$）。



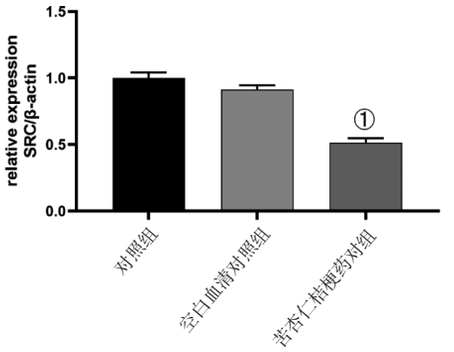
注：A. 对照组；B. 空白血清对照组；C. 苦杏仁桔梗药对组

图 9　流式细胞图



注：①与对照组比较，$P<0.01$

图 10　细胞凋亡柱状图



注：①与对照组比较，$P<0.01$

图 11　Lewis 细胞中 SRC mRNA 表达情况（$\bar{x}\pm s$，n=3）

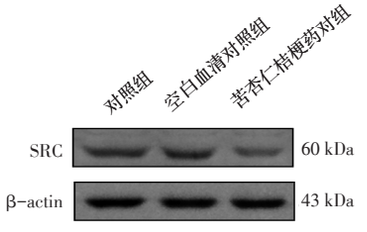
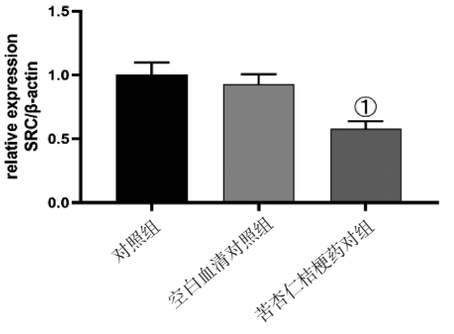


图 12　Lewis 细胞中 SRC 蛋白表达条带图



注：①与对照组比较，$P<0.01$

图 13　Lewis 细胞中 SRC 蛋白表达情况

3　讨论

肺癌是一个全身性疾病，而肺部肿瘤只是一个局部表现，其基本病机为本虚标实，气阴亏虚为本，痰瘀胶结为标。正气亏虚，邪毒乘虚而入，致使肺失宣肃，气机不畅，气滞血瘀，阻塞脉络，津液输布不利，壅结成痰，痰瘀胶结，日久形成肿块。朱丹溪《丹溪治法心要》提出了以“行气开痰为要”的积聚治疗大法。中医“益气化痰法”既可稳定瘤体、提高肺癌患者带瘤生存率，又可缓解肺癌相关症状、减轻化疗不良反应，有效改善患者生活质量，尤其是在化疗后延缓靶向治疗耐药、维持治疗及治疗肺癌等多个方面具有相当优势[9]。苦杏仁-桔梗是临床治疗肺癌的常用药对。其中苦杏仁性温，味苦，归肺、大肠经，擅肃降肺气而化痰，润燥止咳；桔梗性平，味苦、辛，长于开宣肺气而祛痰，尽梳理胸膈气机之能。二者相须为用，一宣一降，梳理气机。治痰先治气，气顺痰自清，故肺之宣降功能得复。因此，临床上治疗肺癌时，常配伍苦杏仁、桔梗宣降肺气。

现代药理学表明，苦杏仁-桔梗药对在肿瘤的生长、增殖、凋亡过程中发挥了重要作用[10-11]。为了研究苦杏仁-桔梗治疗肺癌的作用机制，本研究通过网络药理学方法进行研究，首先发现其治疗肺癌的主要成分可以分为黄酮类[甘草查尔酮 B(Licochalcone B)、刺槐素(Acacetin)、木犀草素(Luteolin)、甘草黄酮(Glabridin)]和非黄酮类化合物[甘草酚(Glycyrol)]。在肺癌发生发展过程中，由于肿瘤细胞具有生长迅速、无限增殖、迁移和侵袭能力强、刺激新血管生成等特性，故其预后不佳。研究表明，黄酮类化合物抗肿瘤的机制主要有：诱导肿瘤细胞凋亡、抗氧化、影响肿瘤细胞侵袭迁移、抑制肿瘤血管形成等[12]，细胞层面已证实，刺槐素可通过抑制 A549 细胞中 VEGF、MMP-9 蛋白表达，上调 E-cadherin 蛋白表达，而甘草黄酮可以抑制整合素/FAK/SRC 通路，从而达到抑制肺癌 A549 细胞的迁移、侵袭及血管生成的作用[13-14]。中药主要是通过调控凋亡相关因子及凋亡相关信号通路来诱导肺癌细胞凋亡[15]，研究表明，甘草查尔酮 B、木犀草素可以上调 Bax/Bcl-2 及 Caspase-3 的表达，通过介导线粒体途径来诱导细胞凋亡[16-17]；甘草酚可以与 TOPK 蛋白强结合并抑制其

激酶活性，从而导致凋亡信号通路的激活[18]。

其次，本研究进一步对227个靶点进行GO分析和KEGG信号通路分析，发现生物过程与蛋白质磷酸化、激酶活性的调节、酶联受体蛋白信号通路相关，KEGG信号通路主要涉及PD-1和PD-L1通路、Ras信号通路、PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路等。①PD-1和PD-L1通路：PD-1是T细胞活化时在T细胞上表达的关键共抑制受体之一，在与其配体（主要是PD-L1）结合后，PD-1被激活，抑制T细胞功能，包括活化、增殖和细胞因子产生，并最终导致活化T细胞死亡[19]。因此，PD-1信号传导通常被癌细胞劫持以逃避免疫监视[20]，而通过阻断PD-1/PD-L1轴来激发有效的抗肿瘤免疫应答，并且联合其他抗肿瘤方法，具有更优异的抗肿瘤效率和更高的反应率[21]。②Ras信号通路：RAS蛋白属于GTP酶家族，被认为是细胞增殖、细胞迁移、细胞凋亡和存活的调节因子，主要包括HRAS、KRAS、NRAS 3种亚型[22]，其中，KRAS致癌驱动突变见于15%～25%的NSCLC患者[23]。KRAS蛋白主要参与Ras-Raf-MEK-ERK和PI3K-AKT-mTOR两种信号通路，激活的RAS蛋白能够进一步激活它的效应蛋白Raf或PI3K，进而调控细胞周期、细胞增殖、分化和凋亡等生物学过程[24-25]。③PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路：PI3K-AKT和MAPK信号通路是参与调节肿瘤发生和发展的经典致癌信号通路[26]。PI3K是一种下游效应器，响应各种细胞外刺激而被激活，激活的PI3K能使AKT磷酸化，进而促进侵袭性癌症行为，如细胞增殖、侵袭、转移和血管生成，并通过调节几种下游效应物来防止程序性细胞死亡[27]；MAPK是调节多种细胞过程的关键信号通路，包括增殖、分化、细胞凋亡和应激反应[28]，研究表明，抑制PI3K-Akt和MAPK信号通路，可以抑制肺癌细胞的增殖、迁移、侵袭[29]。

同时，由靶点预测和网络分析结果可知，SRC处于靶点网络核心位置，故推测其为主要靶点，而实时荧光定量PCR技术检测和Western Blot法检测发现苦杏仁-桔梗药对能降低Lewis细胞中SRC蛋白表达水平。SRC是原癌基因，在细胞形态、运动、增殖和存活中起关键作用[30]。既往研究表明，SRC过表达见于约60%～80%的NSCLC患者[31]。在肿瘤细胞中，SRC激酶异常活化，会促进肿瘤细胞的生长和转移，因此靶向SRC激酶的药物逐渐成为研究热点[32-33]。当外部信号转导入细胞时，SRC激酶可以迅速被激活并使下游信号转导分子被磷酸化，通过复杂的信号传导过程最终影响细胞的黏附和侵袭能力[34]。在信号分子中，粘着斑激酶（FAK）是整合素介导的信号转导系统中胞内第1信号分子，磷酸化的FAK可通过活化FAK-RAS-MAPK和FAK-PI3K/AKT等胞内信号通路，从而影响细胞的增殖与生存。研究表明，抑制SRC的表达及活化可在一定程度上降低FAK、AKT和MAPK的磷酸化[35-36]。除整合素途径外，SRC还可以通过SH3结构域与PI3K的直接结合或通过介导PI3K的磷酸化从而激活PI3K，在促进PI3K活化方面发挥直接作用[37]。

本研究基于网络药理学对苦杏仁-桔梗治疗肺癌的活性成分、主要靶点、信号通路进行了分析，并进行了体外实验，发现苦杏仁-桔梗能抑制Lewis肺癌细胞中SRC的表达，可能通过调控PD-1和PD-L1通路、Ras信号通路、PI3K-Akt信号通路、MAPK信号通路，从而降低肿瘤细胞的侵袭、迁移、增殖、分化等能力，增强机体免疫力，进而达到治疗肺癌的目的。但本研究也存在一定局限性，需通过进一步实验研究进行验证。

［参考文献］

[1] 国家卫生健康委办公厅. 原发性肺癌诊疗指南（2022年版）[J]. 协和医学杂志，2022，13（4）：549-570.

[2] ZHANG Y，LOU Y，WANG J，et al. Research Status and Molecular Mechanism of the Traditional Chinese Medicine and Antitumor Therapy Combined Strategy Based on Tumor Microenvironment[J]. Frontiers in Immunology，2020，11：609705.

[3] 潘国凤，宋巧玲，吴良村. 新加沙参麦冬汤联合放疗治疗中晚期非小细胞肺癌30例临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志，2010，25（6）：951-954.

[4] 钱薇，褚明亮，刘杰民. 基于网络药理学和分子对接研究山慈菇对肺癌的作用机制[J]. 特产研究，2021，43（5）：53-62，74.

[5] 辛洁萍，王海丽，王敏，等. 炒苦杏仁炮制原理研究及对炒苦杏仁质量标准的思考[J]. 中华中医药杂志，2021，36（7）：4249-4252.

[6] 薛紫鲸，张丹，郭龙，等. 经典名方中苦杏仁的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（10）：207-214.

[7] 管仁伟，郭瑞齐，詹志来，等. 经典名方中桔梗的本草考证[J]. 中国实验方剂学杂志，2022，28（10）：82-91.

[8] 赵伟，孙国志. 不同种实验动物间用药量换算[J]. 畜牧兽医科技信息，2010（5）：52-53.

[9] 陈虹宇，王文萍，林晓彤，等. 益气除痰法中医药治疗非小细胞肺癌的研究进展[J]. 中医肿瘤学杂志，2021，3(1)：1-7.
[10] 史佳民，范理宏. 苦杏仁苷抗肿瘤机制的研究进展[J]. 生命的化学，2019，39(1)：147-152.
[11] 王思宇，王宇. 桔梗皂苷D在抗肿瘤作用机制中的研究进展[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2021，23(9)：3226-3234.
[12] 石元英，徐勤. 黄酮类化合物抗肿瘤作用机制的研究与靶向治疗策略[J]. 华夏医学，2017，30(2)：164-168.
[13] 闫庆韬，万斯傲，刘意等. 刺槐素对非小细胞肺癌A549细胞的抑制作用及其机制[J/OL]. 江苏大学学报(医学版)：1-13[2023-03-13]. https://doi.org/10.13312/j.issn.1671-7783.y220104.
[14] TSAI Y M, YANG C J, HSU Y L, et al. Glabridin inhibits migration, invasion, and angiogenesis of human non-small cell lung cancer A549 cells by inhibiting the FAK/rho signaling pathway[J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10(4): 341-349.
[15] 黄智超，李国峰，郎一帆，等. 中药诱导肺癌细胞凋亡机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2021，27(23)：226-236.
[16] 张芳红，朱公建，王晓敏，等. 甘草查尔酮B对人非小细胞肺癌A549细胞增殖和凋亡的影响[J]. 甘肃医药，2022，41(5)：385-388，422.
[17] 杨朋，钱军，陈文飞，等. 木犀草素对人非小细胞肺癌A549细胞凋亡及自噬的影响[J]. 中成药，2022，44(8)：2667-2671.
[18] LU S, YE L, YIN S, et al. Glycyrol exerts potent therapeutic effect on lung cancer via directly inactivating T-LAK cell-originated protein kinase[J]. Pharmacol Res, 2019, 147: 104366.
[19] AI L, XU A, XU J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond[J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2020, 1248: 33-59.
[20] CHEN D S, MELLMAN I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point[J]. Nature, 2017, 541(7637): 321-330.
[21] YI M, ZHENG X, NIU M, et al. Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions[J]. Molecular Cancer, 2022, 21(1): 28.
[22] CHEN K, ZHANG Y, QIAN L, et al. Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2021, 14(1): 116.
[23] WOOD K, HENSING T, MALIK R, et al. Prognostic and Predictive Value in KRAS in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review[J]. JAMA Oncology, 2016, 2(6): 805-812.
[24] SANTARPIA L, LIPPMAN S M, EL-NAGGAR A K. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy[J]. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012, 16(1): 103-119.
[25] LI L, ZHAO G D, SHI Z, et al. The Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathway and its role in the occurrence and development of HCC[J]. Oncology Letters, 2016, 12(5): 3045-3050.
[26] XIA P, XU X Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application[J]. American Journal of Cancer Research, 2015, 5(5): 1602-1609.
[27] IKSEN, POTHONGSRISIT S, PONGRAKHANANON V. Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products[J]. Molecules(Basel, Switzerland), 2021, 26(13): 4100.
[28] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 19(3): 1997-2007.
[29] JIANG M, ZHOU L Y, XU N, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibited lipopolysaccharide-induced non-small cell lung cancer cell proliferation, migration, and invasion by suppressing the PI3K/AKT/mTOR and ERK/MAPK signaling pathways[J]. Thoracic Cancer, 2019, 10(6): 1319-1333.
[30] ROSKOSKI R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 324(4): 1155-1164.
[31] MASAKI T, IGARASHI K, TOKUDA M, et al. pp60c-src activation in lung adenocarcinoma[J]. European Journal of Cancer, 2003, 39(10): 1447-1455.
[32] KELBER J A, RENO T, KAUSHAL S, et al. KRas induces a Src/PEAK1/ErbB2 kinase amplification loop that drives metastatic growth and therapy resistance in pancreatic cancer[J]. Cancer Research, 2012, 72(10): 2554-2564.
[33] KARACHALIOU N, CARDONA A F, BRACHT J W P, et al. Integrin-linked kinase (ILK) and src homology 2 domain-containing phosphatase 2 (SHP2): Novel targets in EGFR-mutation positive non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. EBioMedicine, 2019, 39: 207-214.
[34] LIN X, ZHANG J, CHEN L, et al. Tyrosine phosphorylation of Rab7 by Src kinase[J]. Cellular Signalling, 2017, 35: 84-94.
[35] GAYRARD C, BERNAUDIN C, DÉJARDIN T, et al. Src- and confinement-dependent FAK activation causes E-cadherin relaxation and β-catenin activity[J]. Journal of Cell Biology, 2018, 217(3): 1063-1077.
[36] 张鹤，赵晓宇，郑锐，等. Src酪氨酸激酶抑制剂对表皮生长因子诱导的肺腺癌细胞生长的作用及机制[J/OL]. 中国医科大学学报：1-5[2023-03-16]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1227.R.20230130.1457.004.html.
[37] GUARINO M. Src signaling in cancer invasion[J]. Journal of Cellular Physiology, 2010, 223(1): 14-26.

(责任编辑：吴凌，李海霞)