

基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨 蚕梅方治疗结直肠癌的作用机制

周亚秋¹,周红光^{1,2*}

¹南京中医药大学第一临床医学院肿瘤研究所,南京 210046;

²南京中医药大学附属医院,南京 210009

摘要:基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨蚕梅方(Canmei Decoction, CMF)治疗结直肠癌潜在的作用机制。通过 TCMSp 数据库、化学成分数据库、文献挖掘等方法收集 CMF 的活性成分,经 ADME 筛选获得候选靶点,利用 UniProt 数据库查询靶点蛋白对应的人类基因;通过 GeneCards、OMIM 数据库收集有关结直肠癌的靶点,抽取交集网络获得候选基因。利用 STRING 数据库构建交集靶点蛋白相互作用网络(PPI),选出关键靶点基因。将共同靶基因进行 GO 功能富集与 KEGG 通路分析。使用分子对接技术对化合物核心成分与关键靶点进行对接验证,并对核心化学成分进行实验验证。体外实验验证:采用 MTT、Annexin V-FITC/PI 双染法和 Western blot 法行体外实验验证不同浓度槲皮素对 HCT116 细胞的抑制率和凋亡相关蛋白表达水平的影响。实验得到 CMF 所含化合物对应靶点 166 个、结直肠癌对应靶点 1 028 个,两者交集的关键靶点 79 个。关键靶点 GO 富集条目中生物过程相关的条目 1 609 条,细胞组成相关的条目 41 条,分子功能相关的条目 123 条;关键靶点的 KEGG 富集通路涉及癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、IL-17 信号通路、细胞转录、细胞凋亡等。分子对接结果显示 CMF 核心成分与结直肠癌关键靶点亲和力良好。细胞实验结果显示,不同浓度的槲皮素干预 HCT116 细胞后可显著抑制细胞增殖和促进细胞凋亡,降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,增加促凋亡蛋白 BAX 表达。综上所述表明,CMF 防治结直肠癌的潜在作用机制可能与调控免疫炎症反应、细胞自噬、细胞增殖及凋亡等过程有关,具有多靶点、多途径、多系统的机制特点。

关键词:蚕梅方;结直肠癌;网络药理学;作用机制;槲皮素

中图分类号:R961.1

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)10-1784-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.10.017

Mechanism of Canmei Decoction in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and molecular docking

ZHOU Ya-qiu¹, ZHOU Hong-guang^{1,2*}

¹Cancer Institute, the First Clinical College of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

²Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210009, China

Abstract: To explore the potential mechanism of Canmei Decoction (CMF) in the treatment of colorectal cancer based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification. The active components of CMF were collected by TCMSp database, chemical composition database, literature mining and other methods, and candidate targets were obtained through ADME screening, and the human genes corresponding to the target proteins were queried by UniProt database; targets related to colorectal cancer were collected through GeneCards and OMIM databases, and candidate genes were obtained by extracting the intersection network. Using STRING database, the protein-protein interaction network (PPI) of intersection target was constructed, and the key target genes were selected. The common target genes were enriched by GO function and analyzed by KEGG pathway. Molecular docking technology was used to verify the docking between the core components of the compound and the key targets, and the core chemical components were experimentally verified. In vitro validation: MTT, Annexin V-FITC/PI double staining and Western blot were used to verify the inhibitory rate of different concentrations of quercetin on

收稿日期:2022-05-06

接受日期:2022-07-28

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81973737);吴勉华全国名老中医药专家传承工作室(2022-75)

* 通信作者 E-mail:zhouhongguang2288@163.com

HCT116 cells and the expression levels of apoptosis-related proteins. Experiments obtained 166 corresponding targets for compounds contained in CMF, 1 028 corresponding targets for colorectal cancer, and 79 key targets for the intersection of the two. There were 1 609 items related to biological process, 41 items related to cell composition and 123 items related to molecular function in the key target GO enrichment items. KEGG enrichment pathways of key targets involve cancer pathway, PI3K-Akt signaling pathway, IL-17 signaling pathway, cell transcription, apoptosis and so on. Molecular docking results showed that the core components of CMF had a good affinity with the key targets of colorectal cancer. The results of cell experiments showed that quercetin with different concentrations could significantly inhibit cell proliferation and promote cell apoptosis, reduce the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 and increase the expression of pro-apoptotic protein BAX. In conclusion, the potential mechanism of CMF in the prevention and treatment of colorectal cancer may be related to the regulation of immune inflammatory response, autophagy, cell proliferation and apoptosis, and has the characteristics of multi-target, multi-path and multi-system mechanism.

Key words: Canmei Decoction; colorectal cancer; network pharmacology; mechanism of action; quercetin

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)认为是男性第三大常见癌症,女性第二大常见癌症,也是全球第二大癌症死亡原因。结直肠癌的发病率和死亡率正在迅速上升,尤其是在低收入和中等收入国家,据估计,到2030年,结直肠癌的全球负担将增加60%,超过220万新病例和110万癌症死亡^[1]。传统的治疗方法有手术、药物、化疗等,但总体生存率并不理想。

中医药作为一种重要的抗肿瘤药物,已被临床研究证实。以往的研究表明,中医药结合化疗或放疗,可显著提高患者1~3年的生存率,减轻不良反应,改善生活质量,延长生存时间^[2],是治疗结直肠癌尤为重要的一种方法。古医籍中并无结直肠癌病名的确切记载,现多将其归为“锁肛痔”“肠风”“积聚”等范畴。《本草纲目》记载:“肠风下血,僵蚕炒去嘴足,乌梅肉焙各一两,为末,米糊丸梧子大。每服百丸,食前白汤下,一日三服。”其中僵蚕性平,味咸、辛,归肝、肺、胃经,祛风止惊、化痰散结;乌梅性平,味酸、涩,归肝、脾、肺、大肠经,敛肺、涩肠、祛腐。两药分走阴阳,酸收辛散,遂组方取名为蚕梅方(Canmei Decoction, CMF)^[3]。研究表明^[4], CMF提取物对AOM/DSS诱发小鼠腺瘤性肠息肉具有防治作用,能显著降低AOM/DSS小鼠腺瘤性息肉的发生率。

网络药理学是从系统、整体角度探索药物与机体相互作用的一门新学科^[5],为了探讨中药复方发挥药效的潜在活性成分和分子机制,该学科基于现代生物信息学研究方法,深层次解析了成分-成分、成分-靶点以及靶点-疾病网络之间的协同作用机制,反映了中药复方多成分、多靶点作用特点,体现了系统性和整体性的突出优势^[6,7]。已有学者采用网络药理学方法探讨CMF抗结直肠腺瘤(colorectal

adenoma, CRA)的潜在作用机制^[4],但尚没有采用网络药理学方法探讨CMF抗CRC作用机制的研究报道。本研究借助网络药理学研究方法,探讨其产生作用的信号通路,为CMF多成分、多靶点治疗的作用机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 筛选CMF的活性成分与靶标

一、通过化学成分数据库(<http://www.organchem.csdb.cn/scdb/default.asp>)、化学专业数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)及文献挖掘等方式,对僵蚕成分进行收集整理,建立僵蚕化学成分数据库。利用中药系统药理学数据库(TCM-SP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)筛选并获取候选活性成分。经ADME筛选后,依据可能性由大到小,选取Probability > 0.1的成分蛋白作为靶点。二、利用TCMSP预测的乌梅全部成分靶点,设定药物口服生物利用度(oral bioavailability, OB) ≥ 30%且药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18为筛选条件。在Uniprot(<http://www.uniprot.org/>)数据库中剔除非人源及未经验证的靶点基因,建立所有靶标的基因信息库,将汇总的靶标名去重导入信息库进一步标准化。

1.2 筛选结直肠癌的靶点

利用人类孟德尔遗传数据库OMIM(<https://omim.org/>)、人类基因数据库GeneCards(<https://www.genecards.org/>),以“colorectal cancer”为关键词,收集结直肠癌相关的人类疾病基因,根据score大于中位数对潜在靶点进行筛选,汇总后去除重复值,获得疾病靶点。

1.3 PPI数据采集与网络构建分析

在韦恩图绘制网站(<http://bioinformatics.psb.>

ugent. be/webtools/Venn/)上传疾病和药物靶点,取交集获得核心靶点。再将上述核心靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)构建蛋白互作网络(protein-protein interaction, PPI),筛选条件为 score > 0.7。借助 CytoScape3.7.2 软件及其内置工具计算此网络的拓扑参数,分析连接度(degree)、介度(betweenness)及紧密度(closeness)数据得到起核心作用的靶点。

1.4 GO 和 KEGG 富集分析

将核心靶点导入 Metascape(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)行 GO 和 KEGG 富集分析。筛选前十个具有显著性差异的 GO 和 KEGG 数据予可视化处理。构建“基因-通路”网络以进一步诠释 CMF 治疗结直肠癌的关键靶基因。

1.5 CMF 核心成分与关键靶基因的分子对接验证

在 PubChem 数据库寻找活性成分的 SDF 文件,利用 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org/>)获取 PPI 网络中中度值前 6 的靶点蛋白的蛋白结构。在 PyMOL 软件中对蛋白质结构去除水分子、加氢等处理,转换成 PDBQT 格式,然后在 AutoDockTools1.5.6 和 Vina 软件中完成分子对接,得到结合能(affinity)。利用 PyMOL 软件对结果进行可视化操作。

1.6 实验验证

1.6.1 实验细胞

人结肠癌细胞株 HCT-116 购自上海中乔新舟生物科技有限公司。细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液,置于 37℃、5% CO₂,饱和湿度的培养箱中培养。

1.6.2 主要试剂

槲皮素(货号:H-009, HPLC 纯度 ≥ 98%)购自瑞芬思公司; Annexin V-FITC/PI 试剂盒(KGA107)购自 keygen 公司; SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(货号:G2003)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:G2026)、超敏 ECL 化学发光试剂盒(货号:G2014)、蛋白 Marker(货号:26617)、兔源 Bax 抗体(货号:GB11690)、HRP 标记的羊抗兔 IgG(货号:GB23303)、鼠源 GAPDH 抗体(货号:GB12002)均购自 Servicebio 公司;鼠源 Bcl-2 抗体(AFFINITY 公司,货号:BF9103)。

1.6.3 实验方法

1.6.3.1 MTT 检测细胞活性

将对数生长期 HCT116 细胞以每孔 1×10^4 /mL 个细胞接种于 96 孔板。待细胞贴壁后,每孔注入不

同浓度槲皮素 0、50、100、150 和 200 μmol/L 培养液 100 μL,每组设 3 个平行孔,培养 48 h 后,加入配制好的 MTT(5 mg/mL)试剂 20 μL/孔,在培养箱中继续孵育 4h,吸去培养上清液后加入 200 μL/孔 DM-SO,放置于摇床上低速避光振荡 10 min,使结晶物充分溶解。用酶标仪测定 490 nm 处每孔的 OD 值。按如下公式计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率 =

$$(OD_{\text{空白}} - OD_{\text{实验}}) / OD_{\text{空白}} \times 100\%$$

式中, $OD_{\text{空白}}$ 为空白组(含有细胞的培养基、MTT、不含药物)吸光度, $OD_{\text{实验}}$ 为实验组(含有细胞的培养基、MTT、不同浓度的药物)吸光度。

1.6.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡率

将对数生长期 HCT116 细胞以每孔 4×10^5 /mL 个细胞接种于六孔板,培养 24 h 后按照槲皮素四个浓度 0、50、100 和 200 μmol/L 加入培养液 100 μL/孔,继续培养 48 h,消化、重悬细胞。按照说明书,每管加入 500 μL 的 Binding Buffer 轻轻悬浮细胞,加 5 μL 的 Annexin V-FIT 混匀后,再加入 5 μL 的 PI 轻轻混匀,并在室温下避光孵育 5 ~ 15 min,最后分组使用流式细胞仪进行检测。

1.6.3.3 Western blot 法检测蛋白表达

将对数生长期 HCT116 细胞按“1.6.3.2”项方法处理后,加入 RIPA 裂解液提取总蛋白,利用 BCA 测试盒测定蛋白浓度,取等量蛋白用 10% SDS-PAGE 胶电泳后湿转到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次,然后加一抗 Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、GAPDH(1:2 000) 4℃ 孵育过夜,次日用 TBST 洗膜 3 次后加入二抗,4℃ 摇床上孵育 1 h 后再次洗膜 3 次,最后按 1:1 避光加入增强化学发光液(ECL)显影、定影,分析结果。

1.6.4 统计学方法

用 SPSS Statistics 26 软件进行数据分析,多组间数据比较采用单因素方差分析(单因素 ANOVA)。统计结果用均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 CMF 活性成分靶获取

通过对僵蚕成分的 2D 结构、CAS 号进行检索及筛选,符合条件的化合物有 3 个,乌梅符合条件的对应化合物有 8 个,为进一步检索各化合物对应靶点做准备。

2.2 CMF 化学成分对应靶点的筛选

在 TCMSP 数据库及 Swiss Target Prediction 数据库对符合筛选条件的各化学成分对应靶点进行检索,其中僵蚕对应的靶点有 227 个,乌梅对应的靶点有 239 个,共 466 个药物成分靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件,绘制 CMF 活性成分治疗结直肠癌的网络图(见图 1)。图中 466 条连线示意活性成分对共

有靶点的作用,黄色表示药物活性成分与疾病相关靶点的共有靶点,紫色表示活性化合物。根据该网络拓扑分析的数据,槲皮素、山奈酚在 CMF 治疗结直肠癌过程中发挥重要作用(见表 1)。

将上述各化合物对应靶点合并,去除重复值后得到 166 个靶点,为进一步研究 CMF 防治结直肠癌的潜在机制做准备。

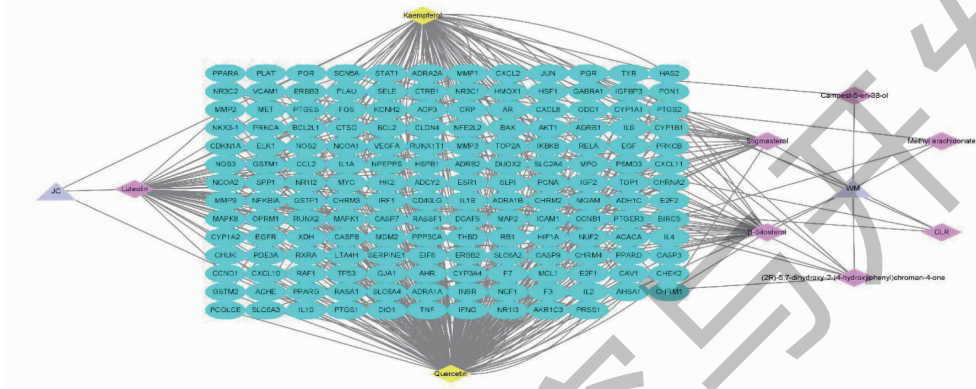


图 1 CMF 主要成分靶点网络

Fig. 1 Target network of main components of CMF

注:JC 表示僵蚕;WM 表示乌梅。Note:JC means Bombyx Batryticatus;WM means Fructus Mume.

表 1 CMF 关键药效分子及拓扑参数(前 5 位)

Table 1 Key pharmacophones and topological parameters of CMF (top 5)

名称 Name	介度 Betweenness	紧密度 Closeness	连接度 Degree
槲皮素 Quercetin	0.740 417 7	0.671 755 73	256
山奈酚 Kaempferol	0.154 539 11	0.423 076 92	102
木犀草素 Luteolin	0.153 544 53	0.419 047 62	51
β -谷甾醇 β -Sitosterol	0.098 212 32	0.379 310 34	28
豆甾醇 Stigmasterol	0.102 489 76	0.372 881 36	24

2.3 结直肠癌对应靶点

分别在 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库以“colorectal cancer”为关键词检索,得到 650、498 个靶点,汇总并去除重复值,共获得 1 028 个疾病靶点。应用韦恩图取交集,得到 79 个共同靶点(见图 2)。

2.4 活性成分靶点-疾病蛋白相互作用网络构建

借助 String 数据库结合 Cytoscape 3.7.2 软件构建中药成分靶点-疾病蛋白 PPI 网络(79 个节点,1 465 条边),设置 score >0.7,得到 CMF 治疗结直肠

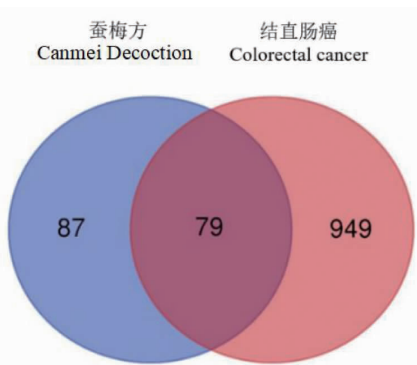


图 2 成分靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of component target-disease target

癌靶点蛋白互作网络(见图 3)。图中蛋白用节点表示,节点颜色和大小随 degree 值的大小改变,蛋白

间的相互联系用连线表示,边的粗细随 Combine score 值的大小改变。结果表明:肿瘤抑制基因 P53

(TP53)、RAC- α 丝氨酸/苏氨酸-蛋白激酶 (AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶 8 (MAPK8)、丝裂原活化蛋白

激酶 1 (MAPK1)、转录因子 AP-1 (JUN)、白细胞介素-6 (IL6) 靶点蛋白度值排名靠前,为关键靶点。

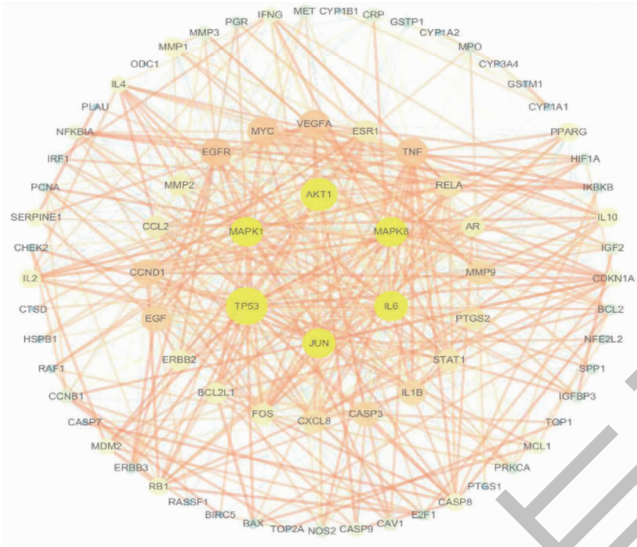


图 3 CMF-结直肠癌靶点 PPI 网络图

Fig. 3 PPI network of CMF-colorectal cancer targets

2.5 关键靶点的 GO 富集结果

GO 富集分析分为 3 类: 分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP) 和细胞组分 (cellular components, CC)。利用 Metascape 平台对 CMF 治疗结直肠癌的潜在靶点进行 GO 分析,显示共有 1 773 个结果富集,其中 BP 相关的条目最多,有 520 条,主要涉及有凋亡信号通路、细胞对化学应激的反应、细胞死亡的正调控、炎症反应、上皮细胞增殖、对脂多糖的反应、活性氧代谢过程等

方面,CC 相关的条目有 41 条,主要涉及细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物、细胞器外膜、囊泡腔、RNA 聚合酶 II 转录调节复合物等方面,MF 相关的条目有 123 条,主要涉及有激酶结合、转录因子结合、泛素样蛋白连接酶结合、细胞因子受体结合、蛋白激酶活性等方面。将基因 GO 本体条目按 P 值进行排序,分别选取 BP、CC 和 MF 的前 10 绘制柱状图 (见图 4)。

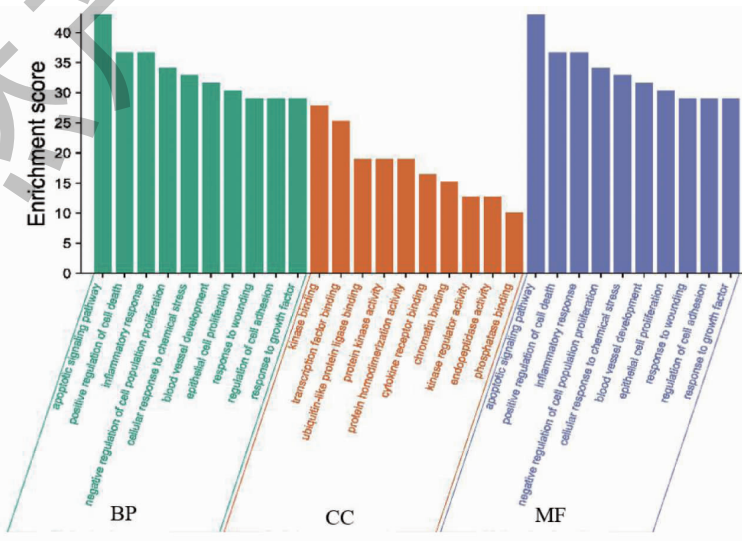


图 4 CMF 治疗 CRC 的 GO 功能富集分析

Fig. 4 GO functional enrichment analysis of CMF in the treatment of CRC

2.6 KEGG 通路富集结果

为了获取 CMF 治疗结直肠癌的潜在靶点主要富集的信号通路,利用 Metascape 平台对进行 KEGG 通路富集分析,以 $P < 0.01$ 作检验校正,筛选出富集最为显著的前 20 位的信号通路(见图 5)。可见

靶点富集得到的主要信号通路包括:癌症的途径、膀胱癌、IL-17 信号通路、丙型肝炎、PI3K-Akt 信号通路、流体剪切应力和动脉粥样硬化、铂类耐药、HIF-1 信号通路、癌症中的转录失调、p53 信号通路等途径。

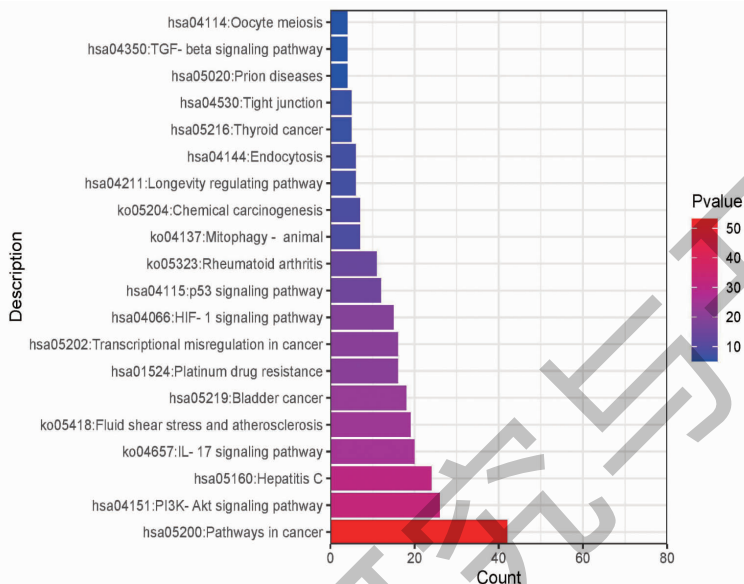


图 5 CMF 治疗 CRC 的 KEGG 信号通路

Fig. 5 KEGG signaling pathway of CMF in the treatment of CRC

2.7 “活性成分-靶点”分子对接

将“2.2”项下得到的核心活性成分山奈酚、槲皮素与关键靶点 TP53、AKT1、MAPK8、MAPK1、JUN、IL6 进行分子对接和结合能力预测。自由结合能越小,则表示受体与配体之间的亲和力越大(见表 2)。并用 PyMOL 软件进行可视化处理(见图 6、7)。结果显示,各活性成分与蛋白对接的结合自由能均小于 -6 kJ/mol,表明各活性成分与各蛋白均有较高的亲和力,其中 MAPK8 与山奈酚亲和力最

高,TP53 与槲皮素亲和力最高。

2.8 槲皮素对结肠癌 HCT-116 细胞增殖的影响

MTT 实验表明,槲皮素对结肠癌 HCT-116 细胞的抑制率与空白组比较显著增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),说明槲皮素能有效抑制结肠癌 HCT-116 细胞的增殖,且呈剂量依赖关系(见表 3)。因高浓度组抑制率相近,故本研究后续实验分别采用 0、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 作为槲皮素的低、中、高剂量进行体外细胞研究。

表 2 活性成分-靶点结合能

Table 2 Binding energy of active ingredients-targets

靶点名称 Target name	PDB ID	有效活性成分 Active ingredient	结合能 Binding energy (kJ/mol)
TP53	7BWN	槲皮素 Quercetin	-8.9
AKT1	3QKL	山奈酚 Kaempferol	-8.1
MAPK8	4L7F	山奈酚 Kaempferol	-9.2
MAPK1	4FV5	槲皮素 Quercetin	-7.5
JUN	5T01	槲皮素 Quercetin	-8.5
IL6	4J4L	槲皮素 Quercetin	-7.4

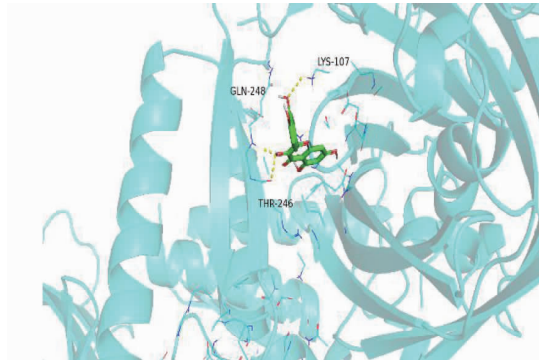


图6 槲皮素与 TP53 蛋白对接图

Fig. 6 The molecular docking diagram of quercetin with P53 protein

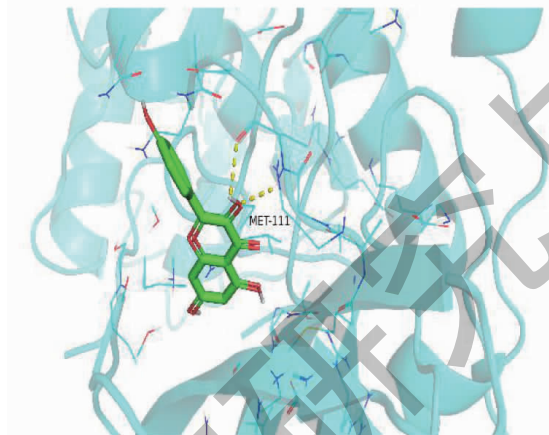


图7 山奈酚与 MAPK8 蛋白对接图

Fig. 7 The molecular docking diagram of kaempferol with MAPK8 protein

表3 不同浓度槲皮素对 HCT116 增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 3 Inhibition of different concentrations of quercetin on proliferation of HCT116($\bar{x} \pm s, n = 3$)

槲皮素 Quercetin($\mu\text{mol/L}$)	OD 值 Optical density value	抑制率 Inhibition rate(%)
空白组 Control	0.45 ± 0.03	0
50	$0.25 \pm 0.05^{**}$	46
100	$0.15 \pm 0.07^{**}$	67
150	$0.11 \pm 0.00^{**}$	75
200	$0.11 \pm 0.01^{**}$	76

注:与空白组比较, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control, ** $P < 0.01$.

2.9 槲皮素对结肠癌 HCT-116 细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC/PI 双染法结果显示,各浓度槲皮素均可诱导 HCT116 细胞凋亡,与空白组比较均有显著差异($P < 0.01$),由图 8 可知,随着槲皮素浓度的增加,其诱导凋亡的作用逐渐增强,尤其表现在总调及晚调比例,并且呈剂量赖关系。

2.10 槲皮素对结肠癌 HCT-116 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2、BAX 的影响

Western blot 结果显示(见图 9),随着槲皮素浓度的增加,Bcl-2 的蛋白质水平明显减少,BAX 的蛋白质水平显著增加,各浓度与空白组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。

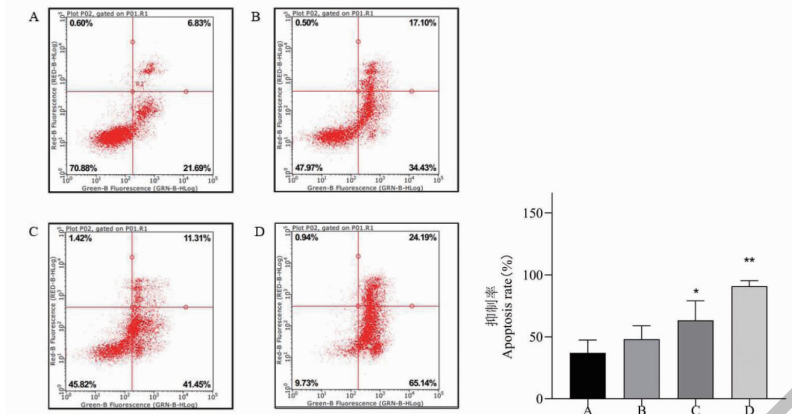


图 8 不同浓度槲皮素对 HCT116 凋亡的抑制 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Inhibition of different concentrations of quercetin on apoptosis of HCT116 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:A:空白组;B:槲皮素 50 μmol/L;C:槲皮素 100 μmol/L;D:槲皮素 200 μmol/L。与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,下同。Note:A: Control;B: Quercetin 50 μmol/L;C: Quercetin 100 μmol/L;D: Quercetin 200 μmol/L. Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

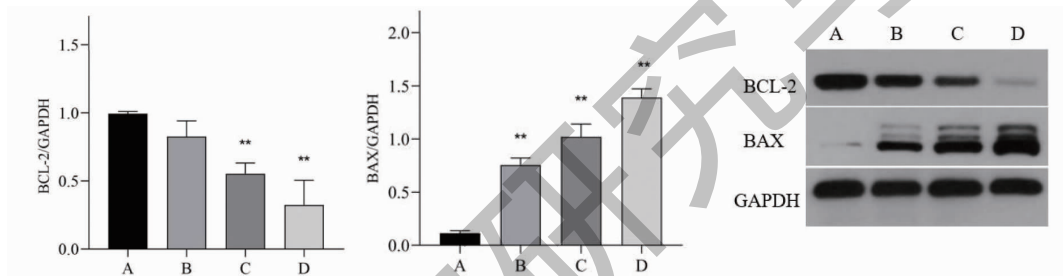


图 9 不同浓度槲皮素对 HCT116 凋亡蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of different concentrations of quercetin on apoptosis protein of HCT116 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

本研究基于网络药理学、分子对接及实验验证,对 CMF 治疗结直肠癌的潜在作用机制进行了系统分析,构建僵蚕、乌梅活性成分-结直肠癌靶点网络,预测潜在作用靶点及信号通路,通过拓扑数据分析发现槲皮素、山奈酚可能在 CMF 治疗结直肠癌过程中发挥至关重要的作用。

研究表明,槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、抗肿瘤和免疫抑制等药理学活性^[8],可以促进细胞凋亡和自噬,以及抑制血管生成和炎症来抑制结直肠癌的进展^[9]。通过抑制 MAPK/Erk、PI3K/Akt 和 NF-κB 等信号通路诱导细胞凋亡^[10,11]。天然黄酮醇山奈酚,具有抗菌、抗炎、抗氧化、抗肿瘤等多种药理学活性,并正在应用于癌症化疗。上述已有的研究结果与预测结果基本一致,提示 CMF 主要有效成分对防治结直肠癌具有确切治疗作用。

PPI 蛋白互作网络分析结果得出,CMF 防治结直肠癌的潜在靶基因有: TP53、AKT1、MAPK8、

MAPK1、JUN、IL6。TP53 是一种肿瘤抑制蛋白,通过促进细胞凋亡和 DNA 修复来严格调节细胞生长。研究表明,突变的 TP53 会导致结直肠癌患者癌细胞异常增殖和肿瘤进展^[12]。AKT1 (即 AKT) 是 PI3K/AKT 信号通路中的核心靶标,参与肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡、代谢、肿瘤耐药和免疫逃逸^[13]。MAPK1、MAPK8 均是 MAP 激酶家族的成员。MAP 激酶作为多种生化信号的整合点,参与多种细胞过程,如分化、增殖、转录调控等。实验证明,miR-422a 通过靶向 MAPK1 和 AKT1 抑制结肠癌细胞增殖^[14]。c-jun 是 JUN 基因的一种蛋白,结直肠癌患者表现出对 c-Jun 的易感性,且与生存率密切相关^[15]。IL-6 是急性期炎症反应中的关键细胞因子,参与包括癌症在内的多种慢性炎症疾病的发病机制。IL-6 家族细胞因子已被确定为检测癌症的生物标志物^[16]。综上所述,CMF 的有效成分靶点与大肠癌的疾病靶点相互作用,充分发挥中药治疗结直肠癌多成分、多靶点的独特优势。

GO 功能及 KEGG 通路富集分析发现, CMF 参与细胞增殖、细胞周期、凋亡、信号转导、氧化应激、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性的调节等生物过程; 癌症通路、IL-17 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、HIF-1 信号通路等通路富集的基因数量最多, 表明这些通路可能在 CMF 治疗结直肠癌的作用机制中发挥重要作用。

细胞因子是癌症生长和侵袭的重要炎症介质。IL-17 是 Th17 细胞产生的主要细胞因子, 可诱导嗜中性粒细胞和巨噬细胞产生炎症细胞因子和趋化因子, 参与包括宿主防御、组织修复、炎症性疾病的发病机制和癌症的进展等多种过程, 在人类恶性肿瘤中起关键作用^[17,18]。在肠道中, IL-17 信号通过增强具有 Apc 突变的肠细胞的增殖和存活来促进腺瘤形成, 损害肠道屏障功能, 激活肿瘤内 IL-17 反应, 促进肿瘤生长^[19]。此外, IL-17 诱导的细胞因子和趋化因子粒细胞动员抑制细胞, 其促进血管生成和抑制抗肿瘤免疫^[20-22]。PI3K/AKT/mTOR 这一经典的自噬信号通路, 参与了肿瘤细胞的生长、增殖、生存、凋亡、代谢以及肿瘤耐药和肿瘤免疫逃逸^[23]。该信号通路的活化是癌症发生的标志^[24-26]。在晚期乳腺癌、胃癌和结直肠癌等实体癌症中常见 PI3K 信号通路激活突变, 该突变率增加可达 30% ~ 60%^[27,28]。CMF 有效成分可通过调控多条通路, 影响结直肠癌的发生发展, 这为临床治疗提供了新的思路。

“活性成分-靶点”分子对接结果显示 CMF 的核心活性成分槲皮素与山奈酚与关键靶点展现出较好的亲和力, 且结合位点构象稳定, 有较强的结合能力, 也进一步验证了本研究网络药理学的预测。

基于上述研究结果, 选择主要活性成分槲皮素作为后续细胞实验, 深入探讨其潜在的机制。实验结果显示, 不同浓度的槲皮素干预 HCT116 细胞后可显著抑制细胞增殖和促进细胞凋亡, 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达、增加促凋亡蛋白 BAX 表达。差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

从系统生物学角度对 CMF 防治结直肠癌潜在机制进行预测结果的分析, 符合中医运用复方中药多靶点、多途径、多系统, 整体调理机体、防治疾病的特点, 且有助于揭示中药复方科学内涵和指导中药新药研发。中药在肿瘤的预防和治疗方面有着广阔的前景, 但是网络药理学研究方法存在一定的局限性, 后期仍需开展多维度实验作进一步验证。

参考文献

- 1 Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality[J]. *Gut*, 2017, 66:683-691.
- 2 Xiang YN, Guo ZM, Zhu PF, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science[J]. *Cancer Med*, 2019, 8:1958-1975.
- 3 Fu XL, Sheng WL, Wang YC, et al. Based on data mining and analysis to explore medication rules of herb-pairs by traditional Chinese medicine treating for colorectal polyps[J]. *Liaoning J Tradit Chin Med* (辽宁中医杂志), 2018, 45:5-8.
- 4 Zhang HY, Ma XW, E QK, et al. Preventive and therapeutic effects of Canmei Prescription extracts on AOM/DSS induced adenomatous polyp in mice[J]. *Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med* (上海中医药大学学报), 2018, 32:55-59.
- 5 Chen HB, Zhou HG, Li wt, et al. Network pharmacology: a new perspective of mechanism research of traditional Chinese medicine formula[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2019, 34:2873-2876.
- 6 Jiang HH, Tang K, Zhang HW, et al. Study on mechanisms of *Schisandra sphenanthera* for treating hepatic injury based on network pharmacology[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2020, 32:759-768.
- 7 Li S, Zhang B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: theory, methodology and application[J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11:110-120.
- 8 Ulusoy HG, Sanlier N. A minireview of quercetin: from its metabolism to possible mechanisms of its biological activities[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60:3290-3303.
- 9 Darband SG, Kaviani M, Yousefi B, et al. Quercetin: a functional dietary flavonoid with potential chemo-preventive properties in colorectal cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233:6544-6560.
- 10 Zhang X, Zhang S, Yin Q, et al. Quercetin induces human colon cancer cells apoptosis by inhibiting the nuclear factor-kappa B pathway[J]. *Pharmacogn Mag*, 2015, 11:404-409.
- 11 Xavier CPR, Lima CF, Preto A, et al. Luteolin, quercetin and ursolic acid are potent inhibitors of proliferation and inducers of apoptosis in both KRAS and BRAF mutated human colorectal cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 281:162-170.
- 12 Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer[J]. *Cancers*, 2018, 10:154.
- 13 Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review[J]. *Ann Med*, 2014, 46:372-383.

- 14 Wei WT, Nian XX, Wang SY, et al. miR-422a inhibits cell proliferation in colorectal cancer by targeting AKT1 and MAPK1 [J]. *Cancer Cell Int*, 2017, 17:91.
- 15 Chen DK, Luo QX, Yu XH, et al. Correlation between rs4646999 polymorphism of c-jun gene promoter and prognosis of colorectal cancer [J]. *J Pract Med (实用医学杂志)*, 2017, 33:3518-3523.
- 16 Unver N, Mcallister F. IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 41:10-17.
- 17 Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. *Nature*, 2006, 441:431-436.
- 18 Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117:1175-1183.
- 19 Wang K, Kim MK, Di Caro G, et al. Interleukin-17 receptor signaling in transformed enterocytes promotes early colorectal tumorigenesis [J]. *Immunity*, 2014, 41:1052-1063.
- 20 Jin C, Lagoudas GK, Zhao C, et al. Commensal microbiota promote lung cancer development via gammadelta T cells [J]. *Cell*, 2019, 176:998-1013.
- 21 Coffelt SB, Kersten K, Doornebal CW, et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis [J]. *Nature*, 2015, 522:345-348.
- 22 Chung AS, Wu X, Zhuang G, et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy [J]. *Nat Med*, 2013, 19:1114-1123.
- 23 Martini M, De Santis MC, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. *Ann Med*, 2014, 46:372-383.
- 24 Gu Y, Wang Q, Guo K, et al. TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through WNT/ β -catenin and MAPK signalling [J]. *J Pathol*, 2016, 239:60-71.
- 25 Wei L, Wang X, Lv L, et al. The emerging role of noncoding RNAs in colorectal cancer chemoresistance [J]. *Cell Oncol*, 2019, 42:757-768.
- 26 Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296:1655-1657.
- 27 Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, et al. The PI3K pathway in human disease [J]. *Cell*, 2017, 170:605-635.
- 28 Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer [J]. *Front Oncol*, 2014, 4:64.