

基于网络药理学和实验验证分析黄芪-莪术-蚤休角药配伍抗结直肠癌的作用机制

梁研, 孙若岚, 刘夫艳, 刘甜甜, 关汉卿, 唐德才*

(南京中医药大学 中医学院·中西医结合学院, 江苏 南京 210023)

[摘要] 运用网络药理学和分子对接技术及动物实验探究黄芪-莪术-蚤休角药配伍治疗结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的潜在机制, 并以原位移植瘤裸鼠模型对核心靶点进行验证。在 TCMSP 等数据库检索黄芪-莪术-蚤休角药活性成分, 通过 PubChem、SwissTargetPrediction、TTD、DrugBank 数据库获得药物及疾病相关靶点并取交集靶点导入 STRING 数据库进行蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 在 DAVID 数据库进行基因功能注释 (Gene Ontology, GO) 和京都基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路富集分析。运用 AutoDock Vina 对角药活性成分与核心靶点进行分子对接和结合能力预测。构建原位移植瘤裸鼠模型, 验证黄芪-莪术-蚤休角药对裸鼠肿瘤生长、转移及肿瘤组织中核心靶点蛋白磷酸化的影响。网络药理学分析结果得到黄芪-莪术-蚤休角药中包括槲皮素 (quercetin)、姜黄素 (curcumin)、 β -蜕皮甾酮 (β -ecdysone) 等 9 个核心成分; 关键靶点涉及 AKT1 (protein kinase B)、MAPK3 (mitogen-activated protein kinase 3)、MAPK1 (mitogen-activated protein kinase 1)、EGFR (epidermal growth factor receptor) 等, 初步表明黄芪-莪术-蚤休角药可能通过 PI3K-AKT、MAPK 及其他信号通路来调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移和血管生成等生物学过程, 从而在 CRC 治疗中发挥作用。分子对接结果表明 9 个核心成分与靶蛋白 AKT1、MAPK3 均有强烈的结合能力。动物实验结果表明, 黄芪-莪术-蚤休角药能明显降低结肠癌裸鼠模型原位瘤的体积和肝转移灶数并显著降低 AKT1、MAPK3 的磷酸化, 其干预结肠癌的机制可能与激活 PI3K-AKT、MAPK 信号通路最为相关。该研究为黄芪-莪术-蚤休角药的临床应用于治疗 CRC 提供科学依据, 也为角药的现代化研究提供思路。

[关键词] 黄芪-莪术-蚤休角药; 结直肠癌; 网络药理学; 分子对接

Anti-colorectal cancer mechanism of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma based on network pharmacology and experimental verification

LIANG Yan, SUN Ruo-lan, LIU Fu-yan, LIU Tian-tian, GUAN Han-qing, TANG De-cai*

(School of Traditional Chinese Medicine and School of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] The present study explored the underlying mechanism of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma (AR-CR-PR) in the treatment of colorectal cancer (CRC) by network pharmacology and molecular docking and animal tests and verified the core targets based on the orthotopic transplantation model in nude mice. The active components of AR-CR-PR were retrieved from databases such as TCMSP. The targets of drugs and the disease were obtained from PubChem, SwissTargetPrediction, TTD, and DrugBank, and the intersection targets were imported into STRING for the analysis of the protein-protein interaction (PPI). Gene

[收稿日期] 2021-08-06

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81873021); 江苏省中医药科技发展专项 (2020ZX01); 江苏省研究生科研创新计划项目 (KYCX2111763)

[通信作者] * 唐德才, 教授, Tel: (025) 85811727, E-mail: talknow@njucm.edu.cn

[作者简介] 梁研, E-mail: 20190016@njucm.edu.cn

Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analyses were performed through DAVID. AutoDock Vina was used to perform molecular docking and binding ability prediction between the active components and the core targets. The effects of AR-CR-PR on tumor growth, metastasis, and phosphorylation of core target proteins in tumor tissues based on the orthotopic transplantation model in nude mice. As revealed by network pharmacology, AR-CR-PR contained nine core components, such as quercetin, curcumin, and β -ecdysone, and the key targets included protein kinase B (AKT1), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), MAPK1, and epithelial growth factor receptor (EGFR), which was indicated that the anti-CRC effect of AR-CR-PR was presumedly achieved by regulating tumor cell proliferation, apoptosis, migration, and angiogenesis through PI3K-AKT, MAPK and other signaling pathways. The results of molecular docking showed that the nine core components had strong binding abilities to AKT1 and MAPK3. The results *in vivo* showed that AR-CR-PR could reduce the volume of the orthotopic tumor, inhibit liver metastasis, and decrease the phosphorylation of AKT1 and MAPK3 in the CRC model. The mechanism of AR-CR-PR in the intervention of CRC may be related to the activation of PI3K-AKT and MAPK signaling pathway. This study provides a scientific basis for the clinical application of AR-CR-PR in the treatment of CRC and ideas for modern research on AR-CR-PR.

[Key words] Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma; colorectal cancer; network pharmacology; molecular docking

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20211103.702

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种常见的消化道恶性肿瘤,2020 年全球癌症统计数据表明,CRC 的发病率 (10.0%) 和病死率 (9.4%) 均高居世界前三位^[1]。CRC 患者早期无明显症状,发现时多属中晚期,其中约有 25% 的初诊患者出现肿瘤转移^[2]。中医药具有整体调节,辨证论治,标本兼治和匡扶正气等特色与优势,可通过多方面、多环节、多靶点的作用特点,起到增强机体免疫力、抗肿瘤转移复发的作用。黄芪-莪术-蚤休角药由黄芪、莪术、蚤休 (重楼) 组成,其中,黄芪与莪术相使,补气活血、祛邪扶正;黄芪与蚤休配伍,扶正解毒疗疮、正邪兼顾;莪术与蚤休异类相使,活血清热解毒、协同增效;三药复合相使配伍,益气调营、化痰消浊、解毒散邪。近年来,黄芪-莪术-蚤休配伍及其复方在治疗 CRC 方面取得了一定的疗效和进展^[3-5], 预实验结果显示黄芪-莪术-蚤休角药能够抑制结肠癌裸鼠模型的肿瘤生长,提示黄芪-莪术-蚤休配伍对 CRC 具有潜在的治疗作用,但其发挥抗肿瘤作用的主要活性成分和分子机制尚不清楚。网络药理学研究思路与中医药多成分、多靶点、系统调控的理念相一致,将其应用于中药研究具有独到的优势和广阔的前景^[6-7],因此,本研究通过网络药理学及分子对接技术筛选黄芪-莪术-蚤休角药干预 CRC 的核心活性成分及关键作用靶点,构建“成分-靶点-通路”网络,探讨黄芪-莪术-蚤休角药干预 CRC 的潜在机制,并应用动物模型验证核心靶点,为黄芪-莪术-蚤休角药临床应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 网络药理学预测黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的作用机制

1.1.1 黄芪-莪术-蚤休角药活性成分及对应靶点收集 以 ADME 属性值“口服利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ”“药物相似性 (drug likeness, DL) ≥ 0.18 ”在 TCMSp 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 筛选黄芪-莪术-蚤休角药活性成分,未出现在该数据库或不满足上述参数设定条件但通过查阅文献 (<https://www.cnki.net>) 报道有明确抗肿瘤活性的化学成分也纳入研究^[8-13],同时通过化学专业数据库 (<http://www.organchem.csdb.cn>) 及化源网数据库 (<https://www.chemsrc.com>) 补充活性成分。在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载分子结构式,将其导入 SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch>) 进行 ADME 筛选和靶点预测并上传至 UniProt 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org>) 标准化蛋白质靶点信息。

1.1.2 黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 作用靶点获取 以“colon cancer”“colorectal cancer”“CRC”等为关键词在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、TTD 数据库 (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjttd>)、DrugBank 数据库 (<https://go.drugbank.com>) 进行检索,收集、合并、去重后得到 CRC 相关疾病靶点,并导入 UniProt 蛋白质数据库标准化蛋白质靶点信息。将 1.1.1 项中黄芪-莪术-蚤休角药活性成分对应靶点与 CRC 相关疾病靶点

导入 Venny 2.1.0 取交集,交集靶点即为黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 作用靶点。

1.1.3 “药物-成分-靶点”网络构建与分析 将黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 作用靶点蛋白导入 STRING 平台 (<https://www.string-db.org/>) 构建其靶点蛋白互作 (PPI) 网络,运用 Cytoscape 对 PPI 网络进行拓扑学分析得关键靶点。为进一步明确黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 核心活性成分,将黄芪-莪术-蚤休角药全部活性成分及上述关键靶点导入 Cytoscape,构建“药物-成分-靶点”网络并进行相关拓扑学分析。

1.1.4 GO 功能与 KEGG 通路 在 DAVID 数据库 (<https://david.abcc.ncifcrf.gov/>) 中导入关键靶点蛋白,设置物种为“homo sapiens”、 $P < 0.05$ 为筛选条件,进行基因功能注释 (GO) 和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析,以 P 对富集的通路和 GO 功能排序,选取前 20 位用 R 语言包“bubble plot”进行可视化。并构建黄芪-莪术-蚤休角药核心活性成分、CRC 关键靶点及其关联的前 20 条信号通路网络,运用 Cytoscape 分析,筛选出潜在核心靶点进行分子对接预测。

1.2 分子对接技术预测黄芪-莪术-蚤休角药核心成分与靶点结合能力

通过 RSCB PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 下载目的靶点蛋白 3D 结构,利用 PyMOL 软件 (www.pymol.org) 对蛋白质进行去水等操作,利用 AutoDockTools 1.5.6 软件对靶点蛋白受体和配体小分子进行加氢等常规处理,以原配体为中心设置 Grid Box,后应用 AutoDockVina 进行分子对接。选取与靶蛋白对接结合能最高的成分,采用 PyMOL 软件对结果进行可视化。

1.3 HCT116 裸鼠模型验证黄芪-莪术-蚤休角药干预 CRC 作用机制

1.3.1 动物模型的建立与分组 近交系雄性 BALB/c nude 裸鼠 35 只,体质量 (20 ± 2) g,由上海灵畅生物科技有限公司提供,许可证号 SCXK(沪)2018-0003,饲养于南京中医药大学实验动物中心。首先建立皮下异位瘤模型:裸鼠 3 只,将对数生长期的 HCT116 细胞制成悬液,接种于裸鼠腋下,待皮下瘤生长至体积约 100 mm^3 后处死裸鼠。然后建立原位移植瘤模型:剥离皮下肿瘤,浸入含双抗的生理盐水中,取肿瘤细胞生长旺盛的鱼肉状组织剪碎

成约 1 mm^3 瘤块备用。裸鼠称重,1%戊巴比妥钠麻醉,左下腹切口,露出盲结肠部,轻拖出至皮下,取 1 块瘤块用医用组织黏合剂黏合至此。空气中待风干 10 s 左右,纳肠入腹,缝合。待裸鼠清醒后置于 SPF 级动物房进行常规饲养。32 只裸鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组、5-fluorouracil (5-Fu) 组、黄芪-莪术-蚤休给药组。其中,假手术组除未附着瘤块外,手术操作与其他组一致,术后不用抗生素。

1.3.2 药物制备及分组给药 黄芪为蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根;莪术为温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 的干燥根茎;蚤休为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的干燥根茎。上述药材饮片均购自江苏省中医院中药房,由南京中医药大学药学院陆兔林教授鉴定。称取黄芪 60 g、莪术 30 g、重楼 45 g,10 倍量超纯水浸泡 0.5 h,加热回流提取 1 h,重复 2 次,同步回收挥发油,合并 2 次滤液,旋蒸浓缩,最终加入挥发油,制得生药量浓度约为 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的水煎液,4 °C 保存备用。注射用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu, Solarbio 公司,批号 709D021)。

术后第 3 天开始给药,假手术组和模型组分别灌胃生理盐水 $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$,每日 1 次;黄芪-莪术-蚤休给药组剂量的确定根据“人和动物按体表面积折算的等效剂量比值表”折算而来,按临床等效剂量 $5.85 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给予黄芪-莪术-蚤休合煎液灌胃,每日 1 次;5-Fu 组 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射,每 2 d 给药 1 次,共给药 3 周。

1.3.3 抑瘤率的计算 在给药结束后第 2 天颈椎脱臼处死裸鼠,完整剥离原位瘤,游标卡尺测量肿瘤长径 (a)、短径 (b),计算各组肿瘤体积及抑瘤率。肿瘤体积 = $ab^2/2$;抑瘤率 = $(1 - \text{给药组平均瘤重} / \text{模型组平均瘤重}) \times 100\%$ 。

1.3.4 Western blot 法检测核心靶蛋白的表达 选取各组裸鼠肿瘤组织(假手术组为原位移植瘤相对应位置的盲结肠组织),Western blot 法检测其 AKT1、MAPK3 蛋白及其磷酸化表达。提取蛋白后 BCA 法测定蛋白浓度;SDS-PAGE 电泳分离蛋白后转移至 PVDF 膜,3% BSA 室温封闭,加入一抗,蛋白激酶 B (AKT1,批号 10176-2-AP)、磷酸化的蛋白激酶 B (p-AKT1,批号 28731-1-AP)、丝裂原活化蛋白激酶 1/2 (ERK1/2,批号 16443-1-AP)、磷酸化的

丝裂原活化蛋白激酶 1/2(p-ERK1/2,批号 28733-1-AP),4 ℃ 孵育过夜。加入羊抗兔二抗 [HRP-conjugated affinipure goat anti-rabbit IgG(H+L),批号 SA00001-2],室温孵育 2 h。使用化学发光法进行显色及 Quantity One 分析软件对曝光条带的灰度值进行测定。

1.3.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 统计软件对实验数据进行分析处理,数据均采用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,双侧 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪-莪术-蚤休角药活性成分及对应靶点

通过 TCMS 数据库 ADME(OB \geq 30%、DL \geq

0.18)筛选以及合并其他数据库、药典和文献补充,得到黄芪-莪术-蚤休角药中黄芪活性成分 25 个、莪术活性成分 19 个、重楼活性成分 18 个,见表 1。对比文献研究发现本研究的筛选条件能够更全面地将黄芪-莪术-蚤休角药的抗肿瘤活性成分涵盖在内。通过 PubChem 数据库获得成分结构式导入到 SwissTargetPrediction 数据库进行 ADME 筛选和靶点预测补充 TCMS 靶点数据并去重;UniProt 蛋白质数据库标准化蛋白质靶点信息后确定了黄芪-莪术-蚤休角药对应靶点共计 573 个。

2.2 “药物-成分-靶点”筛选与网络构建

通过 GeneCards、TTD 和 DrugBank 数据库中搜

表 1 黄芪-莪术-蚤休角药活性成分信息

Table 1 Information of active components of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma

药材	No.	化学成分	OB/%	DL	PubChem CID
黄芪	HQ1	kumatakenin	50.83	0.29	5318869
	HQ2	isorhamnetin	49.60	0.31	5281654
	HQ3	3,9-di- <i>O</i> -methylnissolin	53.74	0.48	15689655
	HQ4	7- <i>O</i> -methylisomucronulatol	74.69	0.30	15689652
	HQ5	methylnissolin	64.26	0.42	14077830
	HQ6	formononetin	69.67	0.21	5280378
	HQ7	calycosin	47.75	0.24	5280448
	HQ8	kaempferol	41.88	0.24	5280863
	HQ9	quercetin	46.43	0.28	5280343
	HQ10	astragaloside I	46.79	0.11	51346122
	HQ11	neoastragaloside I ¹⁾	-	-	131637750
	HQ12	astragaloside II	46.06	0.13	13996693
	HQ13	astragaloside III	31.83	0.10	441905
	HQ14	astragaloside IV	22.50	0.15	13943297
	HQ15	ononin	11.52	0.78	442813
	HQ16	calycosin-7-glucoside	41.60	0.18	5318267
	HQ17	soyasaponin I	2.06	0.05	122097
	HQ18	isomucronulatol-7,2'-di- <i>O</i> -glucosiole	49.28	0.62	125142
	HQ19	isoastragaloside I ¹⁾	-	-	60148697
	HQ20	isoastragaloside II ¹⁾	-	-	60148655
	HQ21	isoastragaloside IV ¹⁾	-	-	102393334
	HQ22	5-methyl-7-methoxyisoflavone ¹⁾	-	-	2734290
	HQ23	astragalus polysaccharide ¹⁾	-	-	2782115
	HQ24	isorhamnetin 3-gentiobioside ¹⁾	-	-	5488387
莪术	HQEZ	hederagenin	36.91	0.75	73299
	HQEZ	hederagenin	36.91	0.75	73299
	EZ1	furanodiene	43.17	0.10	636458
	EZ2	isocurcumenol	97.67	0.13	10399139
	EZ3	aerugidiol	38.70	0.12	11776892

续表1

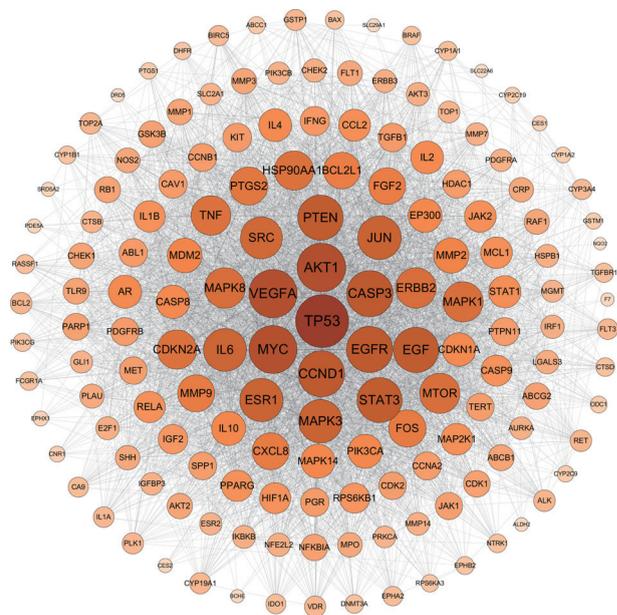
药材	No.	化学成分	OB/%	DL	PubChem CID
	EZ4	epicurzerenone	57.05	0.11	5317062
	EZ5	curcumenol	87.82	0.13	167812
	EZ6	curcumol	103.55	0.13	14240392
	EZ7	gweicurculactone	42.92	0.14	130117
	EZ8	germacron	32.50	0.07	6436348
	EZ9	humulene epoxide II	34.37	0.10	10704181
	EZ10	curcumin ²⁾	-	-	969516
	EZ11	demethoxycurcumin	4.89	0.33	5469424
	EZ12	bisdemethoxycurcumin	77.38	0.26	5315472
	EZ13	(+)-delta-cadinene	17.95	0.08	441005
	EZ14	turmerone	32.98	0.06	14367556
	EZ15	curdione	7.00	0.08	6441391
	EZ16	neocurdione ²⁾	-	-	24836956
	EZ17	(-)-beta-elemene	25.63	0.06	6918391
	EZ18	gamma-elemene	23.79	0.06	12309452
重楼	CL1	L-alanine ³⁾	-	-	5950
	CL2	L-asparagine ³⁾	-	-	6267
	CL3	diosgenin ³⁾	-	-	99474
	CL4	pennogenin ³⁾	-	-	12314056
	CL5	trillin ³⁾	-	-	11827970
	CL6	beta-ecdysone ³⁾	-	-	5459840
	CL7	gamma-aminobutyric acid ³⁾	-	-	119
	CL8	polyphyllin I ³⁾	-	-	11018329
	CL9	polyphyllin II ³⁾	-	-	46200821
	CL10	polyphyllin B ³⁾	-	-	328441
	CL11	dioscin ³⁾	-	-	119245
	CL12	polyphyllin VI ³⁾	-	-	10417550
	CL13	paris saponin VII ³⁾	-	-	176233
	CL14	polyphyllin VII ³⁾	-	-	71307572
	CL15	paris saponin H ³⁾	-	-	101615586
	CL16	polyphyllin F ³⁾	-	-	71664512
	CL17	progenin III ³⁾	-	-	11061578
	CL18	polyphyllin C ³⁾	-	-	44429637

注: ¹⁾文献及其他数据库补充^[8-9]; ²⁾文献补充^[9-10]; ³⁾文献及其他数据库补充^[11-13]。

索、合并去重后获得 CRC 疾病靶点 611 个。利用在线软件 Venny 2.1.0 将 CRC 疾病靶点与 2.1 项中黄芪-莪术-蚤休角药对应靶点取交集,得到黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 作用靶点 157 个,导入 STRING 平台得蛋白相互作用关系 (PPI),并绘制蛋白相互作用网络,见图 1。其中网络平均节点度值为 50.3, Cytoscape 以 degree ≥ 75 分析得到前 30 的蛋白靶点,包括 TP53 (tumor suppressor p53)、AKT1、VEGFA (vascular endothelial growth factor A)、EGFR

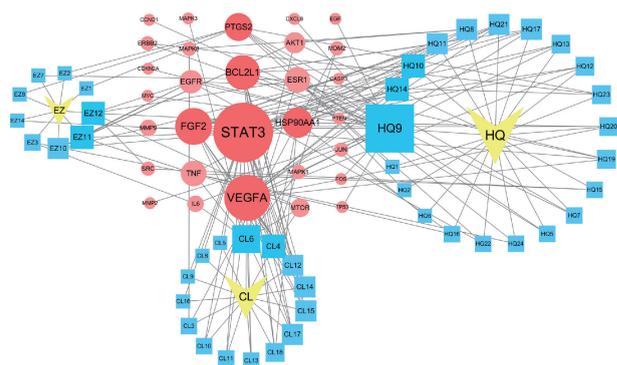
(epidermal growth factor receptor)、PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10)、CASP3 (caspase-3)、CCND1 (G1 cyclin D1)、MYC (myc proto-oncogene protein)、MAPK1、MAPK3 等,可能为黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的关键靶点。关键靶点与黄芪-莪术-蚤休角药活性成分作用关系见图 2。根据 degree ≥ 5 ,排序在前的活性成分有黄芪中的 HQ9 quercetin (槲皮素)、HQ10 astragaloside I (黄芪皂苷 I)、HQ14

astragaloside IV (黄芪甲苷), 莪术中的 EZ10 curcumin(姜黄素)、EZ11 demethoxycurcumin(去甲氧基姜黄素)、EZ12 bisdemethoxycurcumin(双去甲氧基姜黄素), 重楼中的 CL6 β -ecdysone(β -蜕皮甾酮)、CL4 pennogenin(偏诺皂苷元)、CL12 polyphyllin VI(重楼皂苷 VI) 等, 这些成分可能是黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 的核心活性成分。



节点大小和颜色深浅表示度值 (degree), 节点越大、颜色越深代表度值越大 (图 2 同)。

图 1 黄芪-莪术-蚤休角药抗结肠癌作用靶点 PPI 网络
Fig. 1 PPI network of anti-colorectal cancer targets of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma



HQ. 黄芪; EZ. 莪术; CL. 重楼; 红色圆形表示蛋白靶点; 蓝色方形表示角药成分。

图 2 黄芪-莪术-蚤休角药成分-靶点相互作用网络
Fig. 2 Active component-key target interaction network of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma

2.3 GO 功能分析与 KEGG 通路分析

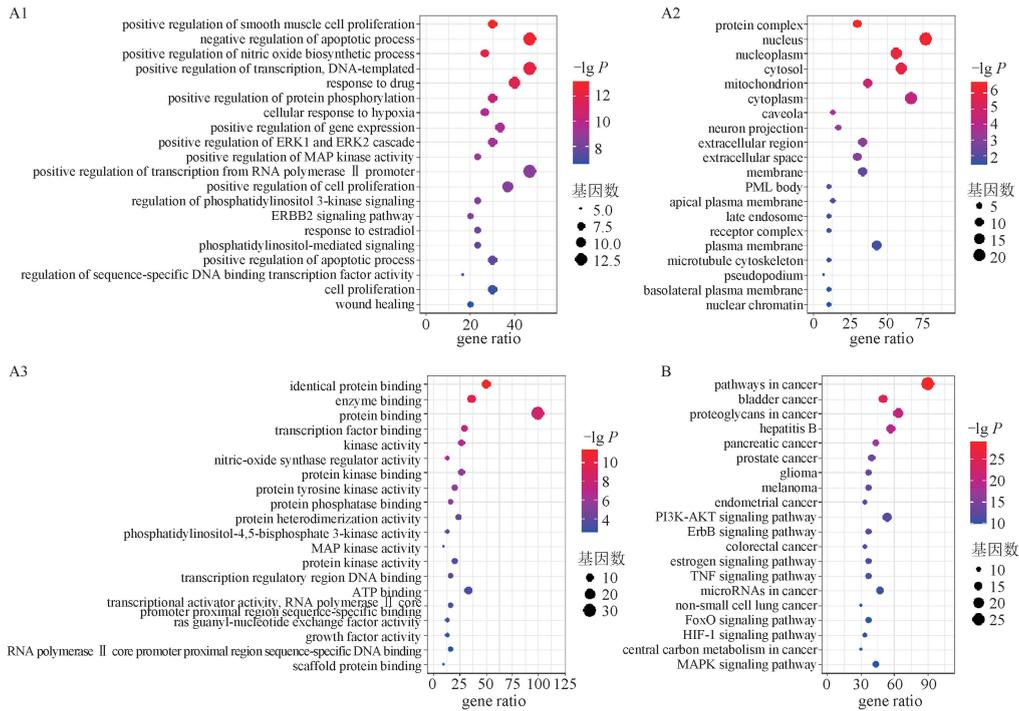
使用 DAVID 数据库对黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的前 30 个关键靶点进行 GO 功能分析和 KEGG 信号通路富集分析, 其中, GO 分析确定了 304 个生物过程 (biological process, BP)、28 个细胞成分 (cellular component, CC)、49 个分子功能 (molecular function, MF)。GO 分析结果中, BP 变化主要表现在对凋亡过程、转录过程、对药物的反应、平滑肌细胞增殖及蛋白质磷酸化的调控上; CC 变化在细胞核、核质、细胞质、蛋白质复合物部分; MF 变化主要集中在蛋白质结合和酶结合方面。KEGG 富集分析共获得 97 条通路, 依据 P 选取前 20 条信号通路进行可视化。结果中主要涉及的信号通路包括 MAPK、PI3K-AKT、ErbB、TNF、FoxO、HIF-1 信号通路及与膀胱癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌、非小细胞肺癌等肿瘤相关信号通路和生物学过程。以上提示黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 疾病的过程可能涉及多通路、多靶点和多生物学过程, 见图 3。

2.4 “成分-靶点-通路”网络构建

构建黄芪-莪术-蚤休角药核心活性成分、CRC 关键靶点及其关联的前 20 条信号通路网络, 见图 4。Cytoscape 分析有效成分及靶点的网络拓扑参数, 获得核心靶点为 AKT1、MAPK3 等; 主要通路为 pathways in cancer、PI3K-AKT、MAPK 信号通路等。

2.5 分子对接技术预测黄芪-莪术-蚤休角药核心成分与靶点结合能力

根据上述网络药理学分析得到黄芪-莪术-蚤休角药核心活性成分有槲皮素、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、 β -蜕皮甾酮、偏诺皂苷元、重楼皂苷 VI, 与核心靶点 AKT1 和 MAPK3 进行结合能预测。通常配体与受体结合能越低, 结合的构象越稳定。结合能小于 $-4.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 提示配体与受体有一定的结合活性, 小于 $-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 有较好的结合活性, 小于 $-7.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 有强烈的结合活性^[14]。9 种核心活性成分与 2 个核心靶蛋白对接, 结果发现除黄芪甲苷外, 其他 8 种活性成分均与 AKT1 和 MAPK3 有强烈的结合能力, 见表 2, 用 PyMOL 软件对黄芪-莪术-蚤休各药味中结合能最强的成分与靶点对接结果进行可视化, 见图 5。



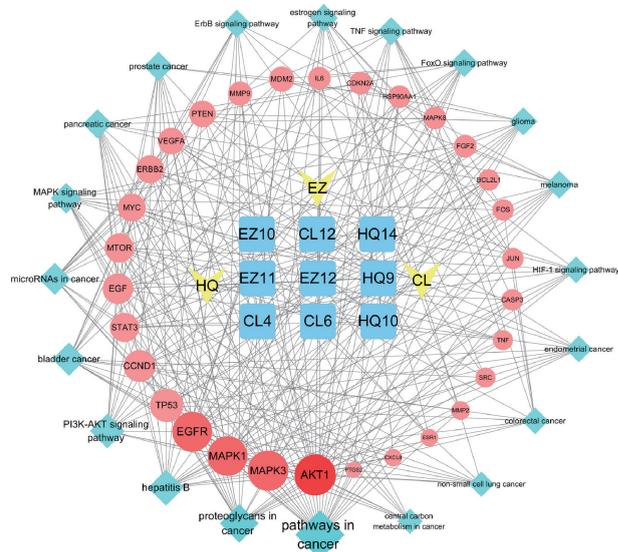
A. GO 分析; 1. 生物过程; 2. 细胞组分; 3. 分子功能; B. KEGG 通路富集分析; 气泡越大, 表示富集越显著; 颜色由蓝转红, 表示 P 越小。
图 3 黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的 GO 和 KEGG 富集分析

Fig. 3 GO and KEGG enrichment analyses of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma in the treatment of CRC

表 2 黄芪-莪术-蚤休角药活性成分与核心靶点结合能预测

Table 2 Prediction of binding ability of active components to core targets of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma

来源	化合物	kcal · mol ⁻¹	
		AKT1	MAPK3
黄芪	槲皮素	-8.8	-9.2
	黄芪皂苷 I	-7.9	-8.6
	黄芪甲苷	>-4.25	>-4.25
莪术	姜黄素	-8.7	-9.8
	去甲氧基姜黄素	-9.1	-9.0
	双去甲氧基姜黄素	-8.6	-9.8
蚤休(重楼)	β -蜕皮甾酮	-11.5	-10.7
	偏诺皂苷元	-9.4	-8.4
	重楼皂苷 VI	-8.3	-5.3



青色菱形表示信号通路; 节点越大, 颜色越深代表 degree 越大。
图 4 黄芪-莪术-蚤休角药“成分-靶点-通路”网络
Fig. 4 "Core component-key target-main pathway" network of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma

2.6 体内实验研究黄芪-莪术-蚤休角药对结肠癌的干预作用

2.6.1 黄芪-莪术-蚤休角药对结肠癌生长及肝转移的影响

黄芪-莪术-蚤休角药对结肠癌裸鼠的肿瘤生长及肝转移有一定抑制作用。实验结果显示, 与模型组相比, 黄芪-莪术-蚤休和 5-Fu 给药能够明

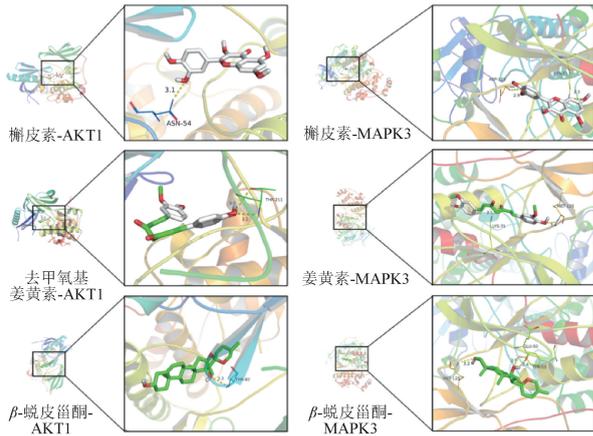
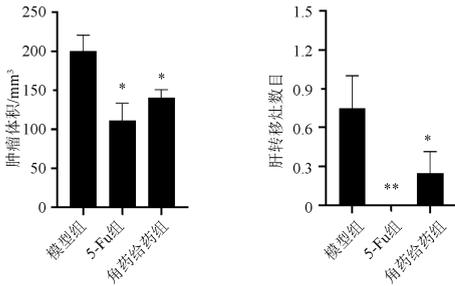


图5 黄芪-莪术-蚤休角药活性成分与核心靶点分子对接模式

Fig. 5 Molecular docking diagram of active components of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma with core targets

显减小裸鼠模型的原位瘤体积,并显著减少肝组织转移灶数目,见图6。



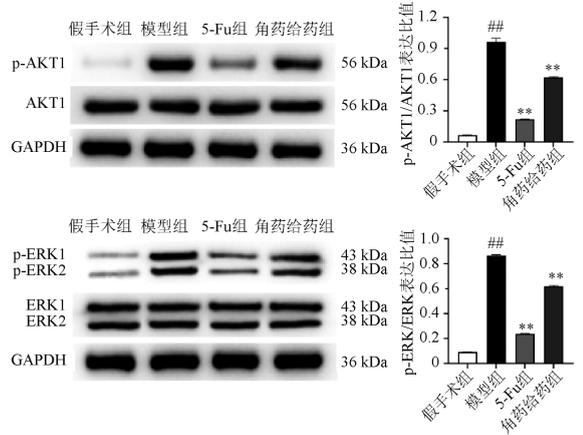
与模型组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (图7同)。

图6 黄芪-莪术-蚤休角药对结直肠癌模型裸鼠肿瘤生长及肝转移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma on tumor growth and liver metastasis in mice with colorectal cancer ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

2.6.2 黄芪-莪术-蚤休角药对结肠癌裸鼠模型肿瘤组织 AKT1、MAPK3 蛋白表达的影响 Western blot 法对黄芪-莪术-蚤休角药抗 CRC 核心靶点蛋白进行验证,其中 MAPK3 编码 ERK1 (extracellular-regulated kinase 1) 蛋白。结果显示,与假手术组相比,模型组 AKT1、ERK1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2) 的磷酸化程度显著升高 ($P < 0.01$);与模型组相比,黄芪-莪术-蚤休给药组和 5-Fu 组的

p-AKT1/AKT1 和 p-ERK/ERK 比值显著降低 ($P < 0.01$),见图7。



与假手术组相比## $P < 0.01$ 。

图7 黄芪-莪术-蚤休角药对结直肠癌裸鼠模型肿瘤组织 AKT1、MAPK3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma-Paridis Rhizoma on the expression of AKT1 and MAPK3 of tumor tissues in mice with colorectal cancer ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3 讨论

角药配伍源自《黄帝内经》“一君二臣,奇之制也”,是在中医药理论指导下,根据中药的性味、功效等将3味中药联合进行系统配伍。本研究中黄芪-莪术-蚤休角药复合相使配伍,其中黄芪扶固正气、托毒生肌,现代药理研究证实黄芪具有抗肿瘤活性,可增强机体免疫力^[15];莪术行气破血、消积止痛,有明确的抗炎、抗肿瘤活性^[16];蚤休(重楼)清热解毒,有抗肿瘤、抗炎镇痛等活性^[17]。三药合用共达益气调营、化痰消浊、解毒散邪之效用,针对肿瘤发生、发展过程中的“虚、瘀、毒”基本病理因素,达到遏制肿瘤生长及转移的目的。为了进一步明确黄芪-莪术-蚤休角药发挥抗肿瘤作用的主要活性成分和分子机制,本研究进行了网络药理学分析、分子对接预测及体内实验验证,以期为黄芪-莪术-蚤休角药临床应用提供理论依据。

本研究通过网络药理学分析得到黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的核心活性成分包括槲皮素、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、β-蜕皮甾酮、偏诺皂苷元、重楼皂苷 VI。有研究表明槲皮素可通过多种机制对多种肿瘤发挥

作用,在防癌抗癌方面抑制多种酶参与的细胞增殖、信号传导途径^[18];以黄芪甲苷为代表的黄芪皂苷类成分是黄芪发挥抗肿瘤活性关键成分之一,可不同程度地抑制 MAPK 的磷酸化达到抑制肿瘤的增殖、转移目的^[19-20]。姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素是莪术中已被广泛研究的具有重要抗肿瘤活性的天然多酚类化合物,可通过调节 MAPK/PI3K 等多种信号通路来抑制 CRC 进展^[21-22]。重楼中的核心活性成分 β -蜕皮甾酮和偏诺皂苷元在抗肿瘤研究方面还较少^[23-24],而对重楼皂苷 VI 为代表的重楼皂苷类成分的研究较广泛,有研究表明其可通过下调 MAPK 等信号通路在体外和体内发挥抗炎、抗肿瘤活性,且对各种类型的恶性肿瘤均有作用^[25-26]。由此可见,以槲皮素、黄芪皂苷类、姜黄素类、重楼皂苷类为代表的有效成分在黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 中发挥重要作用,提示黄芪-莪术-蚤休角药可能基于其主要药效团达到治疗 CRC 目的。

GO 和 KEGG 富集分析结果显示大量的癌症相关 GO 功能和 KEGG 信号通路出现显著富集,如 PI3K-AKT 信号通路、MAPK 信号通路、ErbB 信号通路等,反映了 CRC 发生、发展过程中的分子功能、生物学过程和信号通路逐渐紊乱失调,生长及增殖等信号通路呈现异常活跃状态。其中,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联反应是调节多种细胞过程的关键信号通路,包括增殖、分化、凋亡和应激反应,细胞外信号调节激酶(ERK-MAPK)是细胞增殖的重要途径之一,ERK-MAPK 的过度表达和激活在结直肠癌的进展中起着重要作用^[27-28]。网络药理学分析发现的黄芪-莪术-蚤休角药核心活性成分槲皮素、黄芪皂苷类、姜黄素类、重楼皂苷类等已有报道其能够降低 ERK-MAPK 的磷酸化^[18-22,25-26],提示黄芪-莪术-蚤休角药激活 MAPK 信号通路可能与其抗肿瘤活性有关。

通过构建“成分-靶点-通路”网络,筛选出黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的核心靶蛋白 AKT1 和 MAPK3,采用分子对接技术将黄芪-莪术-蚤休角药中的核心活性成分槲皮素、黄芪皂苷 I、黄芪甲苷、姜黄素、去甲氧基姜黄素、双去甲氧基姜黄素、 β -蜕皮甾酮、偏诺皂苷元、重楼皂苷 VI 与 2 个核心靶蛋白进行结合能预测,结果显示,除黄芪中的黄芪甲苷外其余 8 种核心活性成分与靶蛋白 AKT1、MAPK3 均

具有很强烈的结合活性,这与网络药理学分析结果相吻合。继而应用结肠癌原位移植瘤裸鼠模型验证黄芪-莪术-蚤休角药对结肠癌的干预作用,结果显示黄芪-莪术-蚤休角药能够抑制结肠癌的肿瘤生长和肝转移,同时显著降低了裸鼠模型肿瘤组织中 AKT1、MAPK3 的磷酸化表达,使 p-AKT1/AKT1、p-MAPK3/MAPK3 显著下调,提示黄芪-莪术-蚤休角药的核心活性成分可能通过以 PI3K-AKT、MAPK 信号通路为代表的多种途径发挥抗 CRC 的作用。本研究较系统地研究了黄芪-莪术-蚤休角药治疗 CRC 的作用机制,为后续基于“黄芪-莪术-蚤休”组方临床治疗 CRC 和角药开发提供思路。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209.
- [2] LEE R M, CARDONA K, RUSSELL M C. Historical perspective: two decades of progress in treating metastatic colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2019, 119(5): 549.
- [3] 杜相宇,唐德才. 莪术抗癌方及其联合 5-氟尿嘧啶对 CT26、WT 结肠癌原位移植瘤模型小鼠肿瘤组织中凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 中医杂志, 2020, 61(12): 1090.
- [4] SUN R L, GU J F, CHANG X W, et al. Metabonomics study on orthotopic transplantation mice model of colon cancer treated with *Astragalus membranaceus*-*Curcuma wenyujin* in different proportions via UPLC-Q-TOF/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 193: 113708.
- [5] 何兰,简小兰,蒋益兰,等. 健脾消癌方及拆方对结肠癌原位种植瘤裸鼠模型钙黏蛋白、波形蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(6): 1324.
- [6] 段海婧,龙晓宙,杜丽东,等. 中药防治肿瘤的网络药理学研究概况及存在的问题 [J]. 中药药理与临床, 2021, 37(3): 206.
- [7] 董培良,李慧,韩华. 中药网络药理学的应用与思考 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(17): 204.
- [8] 裴文茜,何凡,程春松,等. 中药黄芪质量评价方法的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(5): 620.
- [9] YIN G, CHENG X L, TAO W W, et al. Comparative analysis of multiple representative components in the herb pair *Astragali Radix-Curcumae Rhizoma* and its single herbs by UPLC-QQQ-MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 148: 224.
- [10] 袁玮,秦宇雯,陆兔林,等. 温郁金、温莪术、片姜黄饮片的炮制工艺沿革及现代研究 [J]. 中草药, 2018, 49(5): 1192.
- [11] 孟巍,杜娟,陈涛. 重楼的化学成分及其抗肿瘤机制 [J]. 生命的化学, 2020, 40(1): 70.
- [12] 杨远贵,张霁,张金渝,等. 重楼属植物化学成分及药理活性

- 研究进展[J]. 中草药,2016,47(18):3301.
- [13] 王跃虎,牛红梅,张兆云,等. 重楼属植物的药用价值及其化学物质基础[J]. 中国中药杂志,2015,40(5):833.
- [14] HSIN K Y, GHOSH S, KITANO H. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. PLoS ONE, 2013, 8(12): e83922.
- [15] AUYEUNG K K, HAN Q B, KO J K. *Astragalus membranaceus*: a review of its protection against inflammation and gastrointestinal cancers[J]. Am J Chin Med,2016,44(1):1.
- [16] 韦露秋,方刚. 莪术有效成分抗肿瘤的细胞分子调控机制研究[J]. 广西中医药大学学报,2019,22(3):71.
- [17] 张特,张亮,陆俊霏,等. 重楼皂苷 I 靶向 EGFR 影响人乳腺癌细胞增殖及凋亡的作用机制[J]. 中国中药杂志,2021, doi: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210824.704.
- [18] TANG S M, DENG X T, ZHOU J, et al. Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects[J]. Biomed Pharmacother,2020,121:109604.
- [19] 周芹. 黄芪甲苷抗凋亡作用机制的研究进展[J]. 中国现代应用药学,2017,34(5):783.
- [20] LI S S, SUN Y, HUANG J, et al. Anti-tumor effects and mechanisms of *Astragalus membranaceus* (AM) and its specific immunopotential: status and prospect[J]. J Ethnopharmacol, 2020,258:112797.
- [21] MIRZAEI H, MASOUDIFAR A, SAHEBKAR A, et al. MicroRNA: a novel target of curcumin in cancer therapy[J]. J Cell Physiol,2018,233(4):3004.
- [22] TOMEH A, HADIANAMREI R, ZHAO X B. A review of curcumin and its derivatives as anticancer agents[J]. Int J Mol Sci,2019,20(5):1033.
- [23] 赵立敏,王琦,张勇. β -蜕皮甾酮应用于心血管疾病的研究进展[J]. 世界中医药,2020,15(23):3599.
- [24] 晏秀祥,潘齐冬,孙浩云,等. 滇重楼民族民间应用及传统功效的物质基础研究[J]. 中国中药杂志,2021,46(24):6343.
- [25] TIAN Y, GONG G Y, MA L L, et al. Anti-cancer effects of polyphyllin I: an update in 5 years[J]. Chem Biol Interact, 2020,316:108936.
- [26] AHMAD B, REHMAN S U, AZIZULLAH A, et al. Molecular mechanisms of anticancer activities of polyphyllin VII[J]. Chem Biol Drug Des,2021,97(4):914.
- [27] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med,2020,19(3):1997.
- [28] MARMOL I, SANCHEZ-DE-DIEGO C, PRADILLA D A, et al. Colorectal carcinoma: a general overview and future perspectives in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci,2017,18(1):197.

[责任编辑 陈玲]