

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.04.012

# 基于网络药理学和实验验证探讨芪术抗癌方治疗结直肠癌的作用机制

孙若岚<sup>1</sup>, 梁研<sup>1</sup>, 赵凡<sup>1</sup>, 朱诗娇<sup>2</sup>, 万林鹭<sup>1</sup>, 王旭<sup>1</sup>, 殷启航<sup>1</sup>, 尹刚<sup>1</sup>, 唐德才<sup>✉</sup>

1. 南京中医药大学中医学院, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210023; 2. 南京中医药大学药学院



**[摘要]** **目的** 探讨芪术抗癌方治疗结直肠癌的潜在分子机制。**方法** 应用网络药理学对芪术抗癌方中活性成分和治疗结直肠癌的作用靶点进行分析, 对芪术抗癌方治疗结直肠癌的关键靶点进行基因功能注释 (GO) 和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析。运用分子对接预测核心活性成分与关键靶点的结合活性。通过建立结肠癌原位移植瘤模型小鼠验证网络药理学研究得出的芪术抗癌方干预结直肠癌的关键靶点。48 只小鼠随机分为假手术组, 模型组, 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 组, 芪术抗癌方低、中、高剂量组, 每组 8 只。除假手术组外, 其余各组进行结肠癌原位移植瘤造模。造模后隔天开始 5-Fu 组给予 5-Fu 30 mg/kg, 每 3 天 1 次, 腹腔注射; 芪术抗癌方低、中、高剂量组分别给予芪术抗癌方 2.925、5.85、11.7 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组和模型组每天以 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 共 21 天。比较各组原位瘤质量及肿瘤肝转移灶数目, HE 染色观察结肠肿瘤组织的病理变化, Western blot 法检测结肠肿瘤组织中非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (PTPN1)、黏着斑蛋白 (vinculin)、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$ 、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的蛋白表达。**结果** 网络药理学筛选得到芪术抗癌方干预结直肠癌的核心活性成分前六位为槲皮素、山柰酚、芹菜素、木犀草素、黄芩苷元、熊果酸, 其作用靶点有 212 个, 排列前 3 位的环加氧酶 1 (PTGS1)、环加氧酶 2 (PTGS2)、非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (PTPN1), 可能是芪术抗癌方治疗结直肠癌的关键靶点。这些关键靶点主要在磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路、黏着斑和黏附连接中显著富集。分子对接结果显示, 除 PTGS1 与槲皮素、山柰酚、芹菜素的结合活性较好外 (结合能  $\geq -7.0$  kcal/mol), PTGS1 与木犀草素、黄芩苷元、熊果酸, PTGS2、PTPN1 与 6 个核心活性成分均有强烈的结合活性 (结合能  $< -7.0$  kcal/mol)。实验验证结果显示, 与假手术组比较, 模型组小鼠结肠肿瘤组织 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  蛋白表达显著升高, E-cadherin 表达显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 芪术抗癌方高、中剂量组原位瘤质量降低, 肝转移结节数减少 ( $P < 0.05$ ), 芪术抗癌方各剂量组及 5-Fu 组 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$ 、E-cadherin 表达水平呈现不同程度的回调, 芪术抗癌方各剂量组各指标改变呈一定的剂量依赖 ( $P < 0.05$ )。HE 染色观察到模型组肿瘤细胞核多呈分裂象, 芪术抗癌方各剂量组存在不同程度的肿瘤细胞核碎裂, 中、高剂量组更多。**结论** 芪术抗癌方能够抑制结直肠癌原位瘤生长和肝转移, 其作用机制可能是通过 PTPN1 调节了肿瘤细胞-细胞间和肿瘤细胞-细胞外基质间的黏附。

**[关键词]** 结直肠癌; 芪术抗癌方; 细胞黏附; 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1; 网络药理学; 分子对接

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化道恶性肿瘤之一, 全球发病率和死亡率均高居前三位<sup>[1]</sup>。患者早期无明显症状, 发现时多属中晚

期, 且转移复发是结直肠癌患者死亡的主要原因之一<sup>[2-3]</sup>。芪术抗癌方是课题组治疗结直肠癌的基础方, 具有补气活血、清热解毒、化痰散结的功效, 以此方加味治疗肿瘤, 可改善临床症状, 减少肿瘤复发, 收效良好<sup>[4-5]</sup>。

网络药理学综合研究药物、靶点和疾病之间的相互关系, 将“药物-成分-靶点-疾病”网络可视

**基金项目:** 江苏省中医药科技发展专项 (2020ZX01); 国家自然科学基金 (82274116, 82074035); 江苏省研究生科研创新计划 (KYCX23\_2189)

✉ 通讯作者: talknow@njucm.edu.cn

化,该方法为“药物-疾病”的效应关系提供了清晰的视角<sup>[6]</sup>。分子对接主要研究分子间相互作用,已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术。本研究应用网络药理学结合分子对接技术,构建成分-靶点-疾病作用网络,验证芪术抗癌方核心活性成分与关键靶点间的结合活性,同时通过动物模型验证芪术抗癌方治疗结直肠癌的作用靶点,为明确其有效成分及作用机制提供实验依据,也为临床治疗结直肠癌的中药研究与开发提供新思路。本研究中动物实验方案通过南京中医药大学实验动物中心伦理委员会审批,批件号:202012A016。

## 1 材料与方法

### 1.1 网络药理学分析芪术抗癌方治疗结直肠癌的作用机制

1.1.1 数据库与软件 中药系统药理分析平台(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)、化学专业数据库(<http://www.organchem.csdb.cn>)、化源网数据库(<https://www.chemsrc.com>)、PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)、Swiss Target Prediction数据库(<http://www.swiss-target-prediction.ch>)、Uniprot蛋白质数据库(<https://www.uniprot.org>)、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>)、STRING平台(<https://www.string-db.org/>)、David数据库(<https://david.abcc.ncifcrf.gov/>)、RSCB PDB数据库(<http://www.rcsb.org>)；Cytoscape 3.7.2 软件、RStudio 1.3 软件、PyMOL 1.7.2.1 软件、AutoDockTools 1.5.6 软件。

1.1.2 芪术抗癌方活性成分及靶点收集 以“吸收、分布、代谢与排泄(ADME)”属性值的“口服生物利用度(OB)≥30%”“类药性(DL)≥0.18”为筛选条件,在中药系统药理分析平台筛选芪术抗癌方活性成分,未出现在该数据库或不满足上述参数设定条件但文献报道<sup>[7-11]</sup>有明确抗肿瘤活性的化学成分也纳入研究,同时通过化学专业数据库及化源网数据库补充活性成分。在PubChem数据库下载分子结构式,将其导入Swiss Target Prediction数据库进行ADME筛选和靶点预测并上传至Uniprot蛋白质数据库标准化蛋白质靶点信息。

1.1.3 芪术抗癌方治疗结直肠癌作用靶点获取与筛选 以“colorectal cancer”“CRC”“colon cancer”为关键词在GeneCards数据库、TTD数据库、Drug-

bank数据库进行检索,收集、合并、去重后得到结直肠癌相关疾病靶点,导入Uniprot蛋白质数据库标准化蛋白质靶点信息。将“1.1.2”中芪术抗癌方活性成分对应靶点与结直肠癌相关疾病靶点取交集,交集靶点即为芪术抗癌方干预结直肠癌作用靶点。

1.1.4 “药物-成分-靶点”网络构建 为明确芪术抗癌方干预结直肠癌主要活性成分,将芪术抗癌方的活性成分及交叉靶点导入Cytoscape 3.7.2,得到“药物-成分-靶点”网络图并进行拓扑学分析。网络图由“节点”表示的化合物和靶点以及由“边”表示的相互作用所构成。网络中每个节点的重要性通过Cytoscape插件Network Analyz的拓扑参数自由度和介数进行评估。节点的自由度和介数越大,表明该节点在网络中越重要。

1.1.5 基因功能注释(GO)和京都基因组百科全书(KEGG)通路分析 在David数据库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GO和KEGG通路富集分析,按P值由小到大对富集的通路和GO功能排序,应用RStudio 1.3软件进行可视化。

1.1.6 分子对接预测芪术抗癌方核心活性成分与关键靶点间结合活性 应用RSCB PDB数据库下载目的靶点蛋白3D结构,利用PyMOL 1.7.2.1软件对蛋白质进行去水等操作,通过PubChem数据库下载活性成分的SDF格式文件,将其转化为mol2格式文件,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AutoDock Vina进行分子对接<sup>[12]</sup>。以结合自由能的高低作为与化合物结合程度的评价标准,选取与靶蛋白对接结合能评分最高的成分。

### 1.2 动物实验验证

1.2.1 药物 芪术抗癌方组成:黄芪20 g,莪术10 g,重楼15 g,仙鹤草20 g,天冬15 g,半夏10 g。饮片均购自江苏省中医院中药房,经南京中医药大学的吴啟南教授鉴定,其中黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根,莪术为温郁金 *Curcuma wenyujin* YH Chen et C. Ling 的干燥根茎,重楼为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunanensis* (Franch.) Hand. -Mazz. 的干燥根茎,仙鹤草为龙芽草 *Agrimonia pilosa* Ledeb. 的干燥地上部分,天冬为 *Asparagus cochinchinensis* (Lour.) Merr. 的干燥块

根, 半夏为 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit. 的干燥块茎。注射用 5-氟尿嘧啶 (5-Fu, 北京索莱宝科技有限公司, 货号: A1209F024)。

1.2.2 细胞与动物 HCT116 人结肠癌细胞购于中国科学院细胞库。SPF 级 BALB/c-nud 雄性裸鼠 51 只, 4~6 周龄, 体质量 ( $20 \pm 2$ ) g, 购自上海灵畅生物科技有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2018-0003。于南京中医药大学实验动物中心 SPF 动物房中进行常规饲养。

1.2.3 主要试剂与仪器 胎牛血清 (货号: 10099141)、0.25% 胰蛋白酶 (货号: 25200114)、DMEM 培养基 (货号: 11965118), 美国 Gibco 公司; Histoacryl 医用组织胶水 (货号: 1050044), 德国 B. Braun 公司; 4% 多聚甲醛固定液 (货号: BL539A), 兰杰柯科技有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号: C0105M)、RIPA 裂解液 (货号: P0013B), 上海碧云天生物科技有限公司; 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1 (PTPN1) 抗体 (货号: NBP1-87191), 美国 Novus Biologicals 公司; 黏着斑蛋白 (vinculin) 抗体 (货号: 4650)、整合素亚单位  $\alpha v$  抗体 (货号: 4711)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 抗体 (货号: 3195), 美国 Cell Signaling Technology 公司; 整合素亚单位  $\beta 3$  抗体 (货号: Sc-7312), 美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; GAPDH 抗体 (货号: 10494-1-AP)、山羊抗鼠 IgG (H+L) (货号: SA00001-1)、山羊抗兔 IgG (H+L) (货号: SA00001-2), 武汉三鹰生物技术有限公司; ECL 发光液 (货号: 180-5001), 上海天能科技有限公司; BCA 蛋白试剂盒 (货号: 23227), 美国 Thermo Scientific 公司。

ME104 型电子天平, 梅特勒托利多 (上海) 有限公司; EG1150H 型组织包埋机, 德国 Leica 公司; Eclipse Ci-L 型正置白光拍照显微镜, 日本 Nikon 公司; Panoramic DESK/MIDI/250/1000 型全景切片扫描仪, 匈牙利 3DHISTECH 公司; Mini-Protean Tetra 型蛋白电泳仪及转膜仪, 美国 Bio Rad 公司; 5200 型化学发光成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.2.4 结肠癌原位移植瘤小鼠模型的建立及分组给药 参考文献 [13] 建立结肠癌原位移植瘤小鼠模型。48 只小鼠用随机数字表法分为假手术组, 模型组, 5-Fu 组, 芪术抗癌方低、中、高剂量组, 每组 8 只。除假手术组外, 其余各组进行结肠癌原位移植瘤造模。假手术组除未贴瘤块外均进行了相同手术步骤, 作为阴性对照。造模后隔天开始给

药。5-Fu 组给予 5-Fu 30 mg/kg, 每 3 天 1 次, 腹腔注射; 芪术抗癌方低、中、高剂量组分别给予芪术抗癌方 2.925、5.85、11.7 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组和模型组以每天 0.1 ml/10 g 生理盐水灌胃, 均干预 21 天。芪术抗癌方灌胃剂量参考《药理实验方法学》<sup>[14]</sup> 中“人和动物按体表面积折算的等效剂量比值表”折算, 其中中剂量为临床等效剂量。40 只附着瘤块的造模小鼠 21 天后原位瘤增殖生长, 全部成功造模。

### 1.2.5 观察指标及方法

1) 肿瘤质量与肝转移灶数目: 末次给药后第 2 天, 称重后颈椎脱臼法处死小鼠, 观察并记录肝转移灶 (白色结节) 的数目, 取出完整的肿瘤组织用电子天平称重。

2) 结肠肿瘤组织病理形态: 采用 HE 染色法, 剥离肿瘤组织后, 4% 多聚甲醛溶液固定, 经脱水、包埋、切片等处理后常规 HE 染色, 于显微镜下观察。

3) Western blot 法检测结肠肿瘤组织 PTPN1、vinculin、E-cadherin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  蛋白表达: 采用随机数字表法每组选取 3 只小鼠, 称取各组小鼠肿瘤组织 (假手术组为原位移植瘤相对应位置的盲肠组织), 10 倍体积 RIPA 裂解液, 高速组织研磨仪中研磨, 样品离心后 ( $4^{\circ}\text{C}$ 、离心半径 10 cm、12 000 r/min 离心 10 min), 取上清液。BCA 法测定蛋白浓度, SDS-PAGE 电泳分离后移至 PVDF 膜, 3% BSA 室温封闭, 加入一抗  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜 (PTPN1、E-cadherin、vinculin 稀释 1: 1000, 整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  稀释 1: 500, GAPDH 稀释 1: 2000)。次日从  $4^{\circ}\text{C}$  取出, 室温平衡 1 h 后洗去一抗, 再用二抗 (山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 均稀释 1: 5000) 室温孵育 2 h。化学发光法显色, Quantity One 4.5.2 软件测定曝光条带灰度值, 以目的蛋白与内参 GAPDH 蛋白条带灰度值的比值为相对表达量。

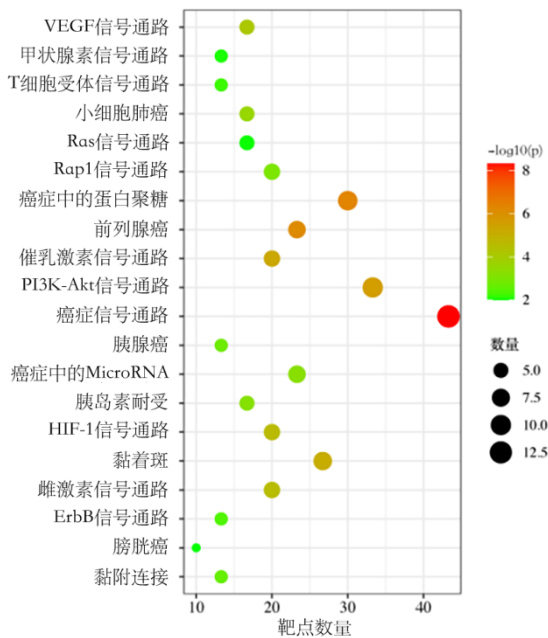
1.2.6 统计学方法 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析, 数据均符合正态分布、方差齐性, 以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著性差异法 (LSD) 检验。  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 网络药理学研究结果

2.1.1 芪术抗癌方活性成分及作用靶点筛选 运用中药系统药理分析平台数据库 ADME 筛选及文献补充, 得到芪术抗癌方活性成分共 105 个, 见附表





注: VEGF, 血管内皮生长因子; Ras, 大鼠肉瘤; Rap1, 大鼠肉瘤相关蛋白 1; PI3K-Akt, 磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶 B; MicroRNA, 微小核糖核酸; HIF-1, 缺氧诱导因子-1; ErbB, 酪氨酸激酶受体。

图2 芪术抗癌方治疗结直肠癌关键靶点的京都基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

Figure 2 Kyoto Encyclopedia of Genomes (KEGG) enrichment analysis of key targets of *Qizhu Kang'ai Formula* (芪术抗癌方) for colorectal cancer

皮素、山柰酚、芹菜素、木犀草素、黄芩苷元、熊果酸均有强烈的结合活性(结合能 $<-7.0$  kcal/mol), 见表1。因 PTGS1、PTGS2 的研究已相当广泛, 而 PTPN1 靶点在肿瘤研究报道相对少, 且此靶点在 KEGG 分析时在肿瘤黏附过程 (FA 和 AJ) 中被富集, PTPN1 在此过程中如何发挥作用值得研究。遂采用 PyMOL 1.7.2.1 软件对槲皮素、山柰酚、芹菜素、木犀草素、黄芩苷元、熊果酸与靶点 PTPN1 的

结果重点可视化, 可见槲皮素通过 GLN-266、ARG-221 和 TYR-46 在 PTPN1 的活性口袋以氢键相连, 山柰酚通过 ARG-221 在 PTPN1 的活性口袋与氢键结合, 芹菜素通过氢键连接 GLN-266、ARG-221、LYS-120、SER-216 结合在 PTPN1 的活性口袋, 木犀草素通过 GLN-266、LYS-116 和 ASP-181 在 PTPN1 的活性口袋以氢键相连, 黄芩苷元通过 PRO-180、ASP-181、ARG-221 和 LYS-116 在 PTPN1 的活性口袋与氢键结合, 熊果酸通过氢键连接 GLN-266 结合在 PTPN1 的活性口袋, 见图3。

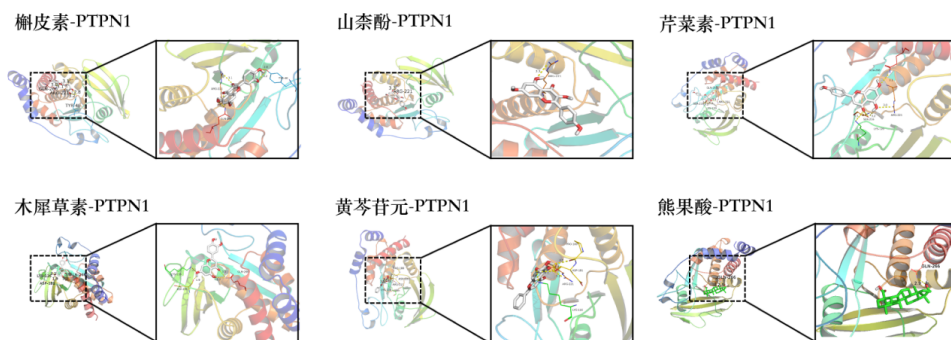
表1 芪术抗癌方核心活性成分与关键靶点结合能预测

Table 1 Prediction of binding energy between core active ingredients and key targets of *Qizhu Kang'ai Formula* (芪术抗癌方)

| 核心活性成分 | PTGS1 | PTGS2 | PTPN1 |
|--------|-------|-------|-------|
| 槲皮素    | -6.9  | -8.2  | -7.5  |
| 山柰酚    | -6.8  | -7.8  | -7.4  |
| 芹菜素    | -7.0  | -8.3  | -7.2  |
| 木犀草素   | -7.2  | -8.3  | -7.4  |
| 黄芩苷元   | -7.3  | -8.7  | -7.9  |
| 熊果酸    | -7.9  | -7.8  | -8.9  |

## 2.2 实验验证结果

2.2.1 各组小鼠结肠肿瘤组织病理情况 假手术组以原位移植瘤对应位置的肠组织做阴性对照。图4示, HE 染色观察, 假手术组肠黏膜层上皮完整, 细胞形态正常, 肠腺数量丰富, 排列紧密。模型组肿瘤细胞排列不规则, 细胞核异型, 多见核分裂象 (黑色箭头)。芪术抗癌方低剂量组肿瘤细胞排列紧密、不规则、多成簇, 出现小范围的肿瘤细胞核破碎、裂解 (红色箭头); 芪术抗癌方中剂量组出现多处的肿瘤细胞核碎裂, 胞质嗜酸性增强 (红色箭头); 芪术抗癌方高剂量组肿瘤细胞排列较稀疏,



注: PTPN1, 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1。

图3 芪术抗癌方治疗结直肠癌核心活性成分与关键靶点 PTPN1 的对接结果

Figure 3 The docking results of the core active ingredients to the key target PTPN1 of *Qizhu Kang'ai Formula* (芪术抗癌方) for colorectal cancer

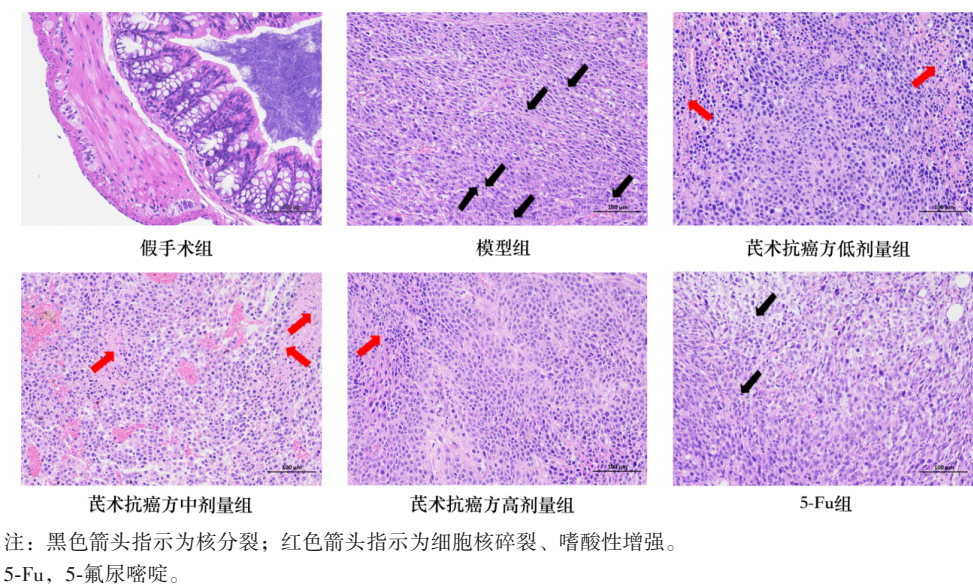


图 4 各组小鼠结肠肿瘤组织病理改变 (HE 染色, ×200)  
Figure 4 Pathological changes of colon tumor tissue in mice in each group (HE staining, ×200)

出现细胞核固缩深染、碎裂 (红色箭头), 芪术抗癌方各剂量组出现不同程度的片状坏死; 5-Fu 组肿瘤细胞排列较稀疏, 存在核分裂象 (黑色箭头)。

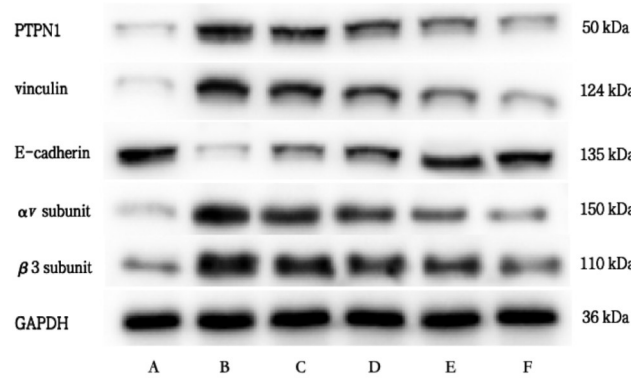
2.2.2 各组小鼠原位瘤质量与肝转移结节数比较 假手术组小鼠未出现肿瘤生长及肝转移现象。表 2 示, 与模型组比较, 芪术抗癌方各剂量组及 5-Fu 组原位瘤质量均降低, 芪术抗癌方中、高剂量组及 5-Fu 组肝转移结节数减少 ( $P<0.05$ ); 与芪术抗癌方低剂量组比较, 芪术抗癌方中、高剂量组肝转移结节数减少 ( $P<0.05$ ); 与芪术抗癌方各剂量组比较, 5-Fu 组原位瘤质量均降低, 肝转移结节数均减少 ( $P<0.05$ ), 且芪术抗癌方各剂量组原位瘤质量比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

| 表 2 各组小鼠原位瘤质量和肝转移结节数比较                                                                                                       |    |                                 |                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---------------------------------|---------------------------------|
| Table 2 Comparison of the mass of in situ tumors and the number of liver metastases in mice in each group ( $\bar{x}\pm s$ ) |    |                                 |                                 |
| 组别                                                                                                                           | 鼠数 | 原位瘤质量/g                         | 肝转移结节数/个                        |
| 假手术组                                                                                                                         | 8  | —                               | —                               |
| 模型组                                                                                                                          | 8  | 0.436±0.016                     | 4.333±0.509                     |
| 芪术抗癌方低剂量组                                                                                                                    | 8  | 0.358±0.004 <sup>a)</sup>       | 3.000±0.003                     |
| 芪术抗癌方中剂量组                                                                                                                    | 8  | 0.309±0.004 <sup>a)</sup>       | 2.333±0.192 <sup>a)b)</sup>     |
| 芪术抗癌方高剂量组                                                                                                                    | 8  | 0.286±0.003 <sup>a)</sup>       | 1.333±0.192 <sup>a)b)</sup>     |
| 5-Fu 组                                                                                                                       | 8  | 0.214±0.009 <sup>a)b)c)d)</sup> | 0.333±0.192 <sup>a)b)c)d)</sup> |

注: 5-Fu, 5-氟尿嘧啶。  
a) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; b) 与芪术抗癌方低剂量组比较,  $P<0.05$ ; c) 与芪术抗癌方中剂量组比较,  $P<0.05$ ; d) 与芪术抗癌方高剂量组比较,  $P<0.05$ 。

2.2.3 各组小鼠结肠肿瘤组织 PTPN1 及其相关黏附途径的蛋白表达比较 图 5、表 3 示, 与假手术

组比较, 模型组小鼠结肠肿瘤组织 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  蛋白表达显著升高, E-cadherin 表达显著降低 ( $P<0.05$ ); 与模型组比较, 芪术抗癌方各剂量组及 5-Fu 组 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  和 E-cadherin 表达水平呈现不同程度的回调, 且芪术抗癌方各剂量组各指标改变呈一定的剂量依赖 ( $P<0.05$ ); 与芪术抗癌方各剂量组比较, 5-Fu 组 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  和 E-cadherin 表达回调程度更明显 ( $P<0.05$ )。



注: A, 假手术组; B, 模型组; C, 芪术抗癌方低剂量组; D, 芪术抗癌方中剂量组; E, 芪术抗癌方高剂量组; F, 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 组; PTPN1, 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶 1; vinculin, 黏着斑蛋白; E-cadherin, E-钙黏蛋白;  $\alpha v$  subunit, 整合素亚单位  $\alpha v$ ;  $\beta 3$  subunit, 整合素亚单位  $\beta 3$ 。

图 5 各组小鼠结肠肿瘤组织 PTPN1、vinculin、E-cadherin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  的蛋白电泳图  
Figure 5 Protein electrophoresis of PTPN1, vinculin, E-cadherin, integrin subunit  $\alpha v$ , and integrin subunit  $\beta 3$  in colon tumor tissues of mice in each group

表3 各组小鼠结肠肿瘤组织中PTPN1、vinculin、E-cadherin、整合素亚单位 $\alpha v$ 、整合素亚单位 $\beta 3$ 蛋白表达比较

| Table 3 Comparison of protein expression of PTPN1, vinculin, E-cadherin, integrin subunit $\alpha v$ , and integrin subunit $\beta 3$ in colon tumor tissues of mice in each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$ ) |    |                                    |                                    |                                    |                                    |                                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 组别                                                                                                                                                                                                            | 鼠数 | PTPN1                              | vinculin                           | E-cadherin                         | 整合素亚单位 $\alpha v$                  | 整合素亚单位 $\beta 3$                   |
| 假手术组                                                                                                                                                                                                          | 3  | 0.042±0.001                        | 0.054±0.001                        | 0.515±0.006                        | 0.037±0.001                        | 0.112±0.002                        |
| 模型组                                                                                                                                                                                                           | 3  | 0.650±0.005 <sup>a)</sup>          | 0.494±0.002 <sup>a)</sup>          | 0.082±0.001 <sup>a)</sup>          | 0.395±0.003 <sup>a)</sup>          | 0.530±0.003 <sup>a)</sup>          |
| 芪术抗癌方低剂量组                                                                                                                                                                                                     | 3  | 0.372±0.004 <sup>b)</sup>          | 0.403±0.001 <sup>b)</sup>          | 0.146±0.002 <sup>b)</sup>          | 0.286±0.001 <sup>b)</sup>          | 0.448±0.004 <sup>b)</sup>          |
| 芪术抗癌方中剂量组                                                                                                                                                                                                     | 3  | 0.239±0.002 <sup>b) c)</sup>       | 0.385±0.002 <sup>b) c)</sup>       | 0.248±0.001 <sup>b) c)</sup>       | 0.241±0.001 <sup>b) c)</sup>       | 0.396±0.002 <sup>b) c)</sup>       |
| 芪术抗癌方高剂量组                                                                                                                                                                                                     | 3  | 0.171±0.004 <sup>b) c) d)</sup>    | 0.224±0.004 <sup>b) c) d)</sup>    | 0.323±0.002 <sup>b) c) d)</sup>    | 0.188±0.003 <sup>b) c) d)</sup>    | 0.299±0.006 <sup>b) c) d)</sup>    |
| 5-Fu 组                                                                                                                                                                                                        | 3  | 0.093±0.001 <sup>b) c) d) e)</sup> | 0.117±0.002 <sup>b) c) d) e)</sup> | 0.374±0.002 <sup>b) c) d) e)</sup> | 0.133±0.001 <sup>b) c) d) e)</sup> | 0.191±0.003 <sup>b) c) d) e)</sup> |

注: PTPN1, 非受体型蛋白酪氨酸磷酸酶1; vinculin, 黏着斑蛋白; E-cadherin, E-钙黏蛋白; 5-Fu, 5-氟尿嘧啶。

a) 与假手术组比较,  $P<0.05$ ; b) 与模型组比较,  $P<0.05$ ; c) 与芪术抗癌方低剂量组比较,  $P<0.05$ ; d) 与芪术抗癌方中剂量组比较,  $P<0.05$ ; e) 与芪术抗癌方高剂量组比较,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

中医古籍中有“肠覃”“脏毒”“锁肛痔”等类似结直肠癌症状的记载, 对其病机的认识多以“虚、瘀、毒”为主, 治宜扶正祛邪。芪术抗癌方中黄芪补气健脾, 莪术破气散瘀消癥, 重楼清火热解毒, 仙鹤草补虚疗损, 天冬滋阴润燥降火, 半夏燥湿化痰, 三补三泻配伍, 有“补泻并施、气阴同补、散敛相济、瘀毒共除”之效。课题组前期研究<sup>[15]</sup>发现, 芪术抗癌方联合 5-Fu 能够促进 CT26 细胞凋亡, 发挥抑制原位移植瘤生长作用。但芪术抗癌方化学成分复杂, 明确其有效成分及分子机制更有利于其临床应用。

本研究网络药理学分析结果显示, 芪术抗癌方干预结直肠癌的核心活性成分包括槲皮素、山柰酚、木犀草素、芹菜素、黄芩苷元、熊果酸。现代研究表明, 槲皮素通过转录因子 EB 的溶酶体激活和活性氧依赖性诱导癌细胞铁死亡, 抑制癌细胞的增殖<sup>[16]</sup>; 山柰酚通过谷氨酰胺转氨酶 2 (TGM2) 介导的蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (Akt/mTOR) 信号通路诱导胰腺癌细胞活性氧依赖性凋亡<sup>[17]</sup>; 木犀草素和芹菜素抑制诱导型程序性死亡受体 1 (PD-L1) 表达, 以提高鼠类肉瘤病毒癌基因 (KRAS) 突变型肺癌的抗肿瘤免疫<sup>[18]</sup>; 黄芩苷元通过减少糖酵解和抑制缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 逆转线粒体功能障碍, 增强化疗药物对乳腺癌细胞的敏感性<sup>[19]</sup>; 熊果酸通过溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 的依赖性铁死亡增强索拉非尼的抗肿瘤作用<sup>[20]</sup>。上述研究提示这些成分或许是芪术抗癌方发挥抗结直肠癌作用的主要活性成分。网络药理学分析得到的关键靶点 PTGS1、PTGS2、PTPN1 等与肿瘤密切相关<sup>[21-22]</sup>。随后利用分子对接分析芪

术抗癌方中 6 个核心活性成分与关键靶点 PTGS1、PTGS2、PTPN1, 结果显示核心活性成分与关键靶点间均有较强的结合活性。生物信息学分析这些关键靶点主要在 PI3K-Akt 信号通路、FA 和 AJ 中显著富集。而相关研究显示, PTPN1 是 FA 及 AJ 黏附途径的串扰中枢<sup>[23]</sup>。所以, 本研究着重观察与 PTPN1 及其相关的肿瘤细胞黏附途径的蛋白, 探讨芪术抗癌方能否通过调控 PTPN1 影响细胞黏附, 从而达到抑制结直肠癌进展的目的。

细胞黏附是指单个细胞黏附于另一个细胞或其他一些无生命体表面的行为, 是肿瘤转移过程的关键环节之一。同源黏附, 指同型肿瘤细胞间侧面形成的 AJ; 异源黏附, 指肿瘤细胞与血管内皮、细胞外基质间形成的 FA。AJ 和 FA 分别由跨膜蛋白钙黏蛋白和整合素介导, 其胞内结构域与相关黏附蛋白、肌动蛋白形成复合物, 胞外结构域则与相应的同源型结构域或细胞外基质连接。原位组织瘤中, 同源黏附减弱有利于肿瘤细胞从原发灶脱落, 异源黏附增强有利于肿瘤细胞黏附继发部位的基质, 导致肿瘤的恶性进展<sup>[24]</sup>。有研究报道, 强细胞-细胞外基质间黏附和弱细胞-细胞间黏附整体组合驱动细胞的迁移运动<sup>[25]</sup>。

PTPN1 参与多种信号转导, 可作为肿瘤抑制因子或肿瘤启动子参与调节多种恶性肿瘤的进展, 被认为是癌症的潜在治疗靶点<sup>[26-29]</sup>。PTPN1 可通过影响细胞的物理附着、细胞黏附相关因子的表达, 参与 AJ 和 FA 的形成<sup>[23]</sup>。Vinculin 与 PTPN1 在异常细胞黏附调节中密切相关, 是在 AJ 及 FA 中富集的肌动结合蛋白, 在细胞黏附及迁移的维持和调节中起关键作用<sup>[30]</sup>; 当其被募集到同异源黏附连接处时, 会发生剧烈的形状转变, 从紧凑的构象转变为高度伸长的形式, 在机械张力和/或酪氨酸磷酸化作用

下,使 E-cadherin 或整联蛋白家族与肌动蛋白细胞骨架发生不同程度的结合,使细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质间产生相互作用<sup>[31-34]</sup>。本研究借助结肠癌原位移植瘤模型小鼠进行验证,结果显示,芪术抗癌方各剂量组原位瘤质量无明显差异,芪术抗癌方低剂量组肝转移结节数目较模型组无差异,而芪术抗癌方中、高剂量组肝转移结节数减少,芪术抗癌方中、高剂量组间无差异,提示芪术抗癌方中、高剂量减少肝转移结节数目效果优于低剂量。模型组小鼠肿瘤组织中 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  蛋白表达较假手术组相应位置的结肠组织显著升高, E-cadherin 表达显著降低。芪术抗癌方各剂量组 PTPN1、vinculin、整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  的高表达显著降低, E-cadherin 的表达水平升高,且各指标改变呈一定的剂量依赖。结果提示,芪术抗癌方升高了原位肿瘤中 E-cadherin 的表达,增强了细胞-细胞黏附,减少了肿瘤细胞的脱落可能,同时降低了肿瘤组织的整合素亚单位  $\alpha v$ 、整合素亚单位  $\beta 3$  表达,减少了细胞与细胞外基质间的黏附能力,或因此抑制了肿瘤细胞的迁移能力,以高剂量效果更佳。

综上所述,芪术抗癌方可改善结肠癌模型小鼠的肿瘤病理变化,抑制原位瘤生长和肝转移,其中中、高剂量较低剂量效果更好,调节关键靶点 PTPN1 及其相关黏附途径的肿瘤细胞-细胞与肿瘤细胞-细胞外基质黏附途径相关蛋白的表达,高剂量调节作用更明显,初步证实芪术抗癌方可能通过影响肿瘤细胞的黏附过程从而达到干预结直肠癌进展的作用。本研究的不足之处在于,本研究虽然发现 PTPN1 可作为影响肿瘤细胞黏附的关键靶点,但实验结果无法直接体现 PTPN1 调节肿瘤细胞同源黏附与异源黏附串扰的中枢作用,其中是否还涉及其他生物过程,后续可通过体外实验,结合慢病毒转染等技术,深入研究 PTPN1 对肿瘤细胞黏附的作用机制。

## 参考文献

- [1]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, 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):209-249.
- [2]LEE RM, CARDONA K, RUSSELL MC. Historical perspective: two decades of progress in treating metastatic colorectal cancer [J]. J Surg Oncol, 2019, 119(5): 549-563.
- [3]CORSINI EM, MITCHELL KG, CORREA A, et al. Effect of primary colorectal cancer tumor location on survival after pulmonary metastasectomy [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2021, 162(1):296-305.
- [4]唐德才. 活血化瘀药在抗肿瘤及转移中的运用思考 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(1):1-4.
- [5]齐卓操,尹刚. 唐德才教授“补气活血法”辨治胃肠癌病经验 [J]. 中医研究, 2021, 34(9):71-73.
- [6]ZHANG R, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: review and assessment [J]. Front Pharmacol, 2019, 10:123. doi: 10.3389/fphar. 2019. 00123.
- [7]YIN G, CHENG X, TAO 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: 224-229. doi: 10.1016/j.jpba. 2017. 09. 015.
- [8]GU J, SUN R, WANG Q, et al. Standardized *Astragalus Mongholicus* Bunge-*Curcuma Aromatica* Salisb. Extract efficiently suppresses colon cancer progression through gut microbiota modification in CT26-bearing mice [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:714322. doi: 10.3389/fphar. 2021. 714322.
- [9]KIM SB, HWANG SH, SUH HW, et al. Phytochemical analysis of agrimonia pilosa ledeb, its antioxidant activity and aldose reductase inhibitory potential [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(2):379.
- [10]ZHU L, CHEN J, TAN J, et al. Flavonoids from agrimonia pilosa ledeb: free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures [J]. Molecules, 2017, 22(3):195.
- [11]GROCHOWSKI DM, SKALICKA-WOŹNIAK K, ORHAN IE, et al. A comprehensive review of agrimoniin [J]. Ann N Y Acad Sci, 2017, 1401(1):166-180.
- [12]TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2):455-461.
- [13]JACKSTADT R, SANSOM OJ. Mouse models of intestinal cancer [J]. J Pathol, 2016, 238(2):141-151.
- [14]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2001:1861.
- [15]杜相宇,唐德才. 芪术抗癌方及其联合 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):1090-1094.
- [16]WANG Z, MA J, LI X, et al. Quercetin induces p53-

- independent cancer cell death through lysosome activation by the transcription factor EB and reactive oxygen species-dependent ferroptosis[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(5):1133–1148.
- [17] WANG F, WANG L, QU C, et al. Kaempferol induces ROS-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells via TGM2-mediated Akt/mTOR signaling[J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1):396.
- [18] JIANG Z, WANG W, XU C, et al. Luteolin and its derivative apigenin suppress the inducible PD-L1 expression to improve anti-tumor immunity in KRAS-mutant lung cancer[J]. *Cancer Lett*, 2021, 515: 36–48. doi: 10.1016/j.canlet.2021.05.019.
- [19] CHEN Y, ZHANG J, ZHANG M, et al. Baicalein resensitizes tamoxifen-resistant breast cancer cells by reducing aerobic glycolysis and reversing mitochondrial dysfunction via inhibition of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  [J]. *Clin Transl Med*, 2021, 11(11):e577.
- [20] LI H, YU Y, LIU Y, et al. Ursolic acid enhances the antitumor effects of sorafenib associated with Mcl-1-related apoptosis and SLC7A11-dependent ferroptosis in human cancer[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106306. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106306.
- [21] HUBNER RA, MUIR KR, LIU JF, et al. Polymorphisms in PTGS1, PTGS2 and IL-10 do not influence colorectal adenoma recurrence in the context of a randomized aspirin intervention trial[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(9):2001–2004.
- [22] 詹琪, 曾智锐, 任长城, 等. 松油烯-4-醇抑制神经胶质瘤 U87 和 U251 细胞增殖、迁移与侵袭并促进其凋亡[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(7):1021–1028.
- [23] ZHANG C, ZHOU T, CHEN Z, et al. Coupling of integrin  $\alpha 5$  to annexin A2 by flow drives endothelial activation[J]. *Circ Res*, 2020, 127(8):1074–1090.
- [24] SERRELS A, CANEL M, BRUNTON VG, et al. Src/FAK-mediated regulation of E-cadherin as a mechanism for controlling collective cell movement: insights from in vivo imaging[J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(4):360–365.
- [25] WANG S, MATSUMOTO K, LISH SR, et al. Budding epithelial morphogenesis driven by cell-matrix versus cell-cell adhesion[J]. *Cell*, 2021, 184(14):3702–3716.
- [26] FELDHAMMER M, UETANI N, MIRANDA-SAAVEDRA D, et al. PTP1B: a simple enzyme for a complex world [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2013, 48(5):430–445.
- [27] SHARMA B, XIE L, YANG F, et al. Recent advance on PTP1B inhibitors and their biomedical applications [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 199: 112376. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112376.
- [28] WIEDE F, LU KH, DU X, et al. PTP1B is an intracellular checkpoint that limits T-cell and CAR T-cell antitumor immunity[J]. *Cancer Discov*, 2022, 12(3):752–773.
- [29] SUN F, YU M, YU J, et al. miR-338-3p functions as a tumor suppressor in gastric cancer by targeting PTP1B [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):522.
- [30] PENG X, CUFF LE, LAWTON CD, et al. Vinculin regulates cell-surface E-cadherin expression by binding to beta-catenin[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 4):567–577.
- [31] BAYS JL, DEMALI KA. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(16): 2999–3009.
- [32] KOIRALA R, PRIEST AV, YEN CF, et al. Inside-out regulation of E-cadherin conformation and adhesion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(30):e2104090118.
- [33] BERTOCCHI C, WANG Y, RAVASIO A, et al. Nanoscale architecture of cadherin-based cell adhesions [J]. *Nat Cell Biol*, 2017, 19(1):28–37.
- [34] BARCELONA-ESTAJE E, DALBY MJ, CANTINI M, et al. You talking to me? Cadherin and integrin cross-talk in biomaterial design[J]. *Adv Healthc Mater*, 2021, 10(6):e2002048.

### Exploring the Mechanism of Action of *Qizhu Kang'ai Formula* (莼术抗癌方) for the Treatment of Colorectal Cancer based on Network Pharmacology and Experimental Validation

SUN Ruolan<sup>1</sup>, LIANG Yan<sup>1</sup>, ZHAO Fan<sup>1</sup>, ZHU Shijiao<sup>2</sup>, WAN Linlu<sup>1</sup>, WANG Xu<sup>1</sup>, YIN Qihang<sup>1</sup>, YIN Gang<sup>1</sup>, TANG Decai<sup>1</sup>

1. School of Chinese Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023; 2. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine

**ABSTRACT Objective** To explore the potential molecular mechanism of *Qizhu Kang'ai Formula* (莼术抗癌方, QZKAF) for the treatment of colorectal cancer (CRC). **Methods** Network pharmacology was used to analyze the active ingredients and targets of QZKAF for CRC, and analyze the key targets of QZKAF for the treatment of CRC by gene function annotation (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis. Molecular docking was applied to predict the binding activity of the core active ingredients to the key targets. A orthotopic trans-

plantation tumor mice model of CRC was established to validate the key targets of QZKAF for CRC obtained from network pharmacology analysis. Forty-eight mice were randomly divided into the sham operation group, the model group, the 5-fluorouracil (5-Fu) group, and the QZKAF low-, medium-, and high-dose groups, with 8 mice in each group. Except for the sham operation group, the remaining groups underwent colon cancer orthotopic transplantation tumor modeling. The 5-Fu group was given 30 mg/kg of 5-Fu by intraperitoneal injection once every 3 days on the alternate day after modeling, while the QZKAF low-, medium-, and high-dose groups were given 2.925, 5.85, and 11.7 g/(kg·d) of QZKAF by gastric gavage, respectively, and the sham-operation group and the model group were gavaged with 0.1 ml/10 g of normal saline every day, all for 21 days. The in situ tumors mass and the number of liver metastases were compared between the groups. The pathological changes of colon tumor tissues were observed by HE staining, and the protein expression of protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 1 (PTPN1), vinculin, integrin subunit  $\alpha v$ , integrin subunit  $\beta 3$ , and E-cadherin were detected in colon tumor tissues by Western blot. **Results** Network pharmacology screening yielded that the top six core active ingredients of QZKAF intervening in CRC were quercetin, kaempferol, apigenin, luteolin, baicalein and ursolic acid. There were 212 targets of action, and the ranked top three were prostaglandin endoperoxide synthase 1 (PTGS1), prostaglandin endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and PTPN1, which may be the key targets of QZKAF in the treatment of CRC. These key targets were significantly enriched mainly in phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway, focal adhesion and adhesion junction. Molecular docking results: except for PTGS1 with better binding activity to quercetin, kaempferol, and apigenin (binding energy  $\geq -7.0$  kcal/mol), PTGS1 showed strong binding activity to lignans, baicalein, ursolic acid, as well as PTGS2 and PTPN1 to the six core active ingredients (binding energy  $< -7.0$  kcal/mol). Experimental validation results: the protein expression of PTPN1, vinculin, integrin subunit  $\alpha v$ , integrin subunit  $\beta 3$  in the colon tumor tissues of mice in the model group significantly increased, and the expression of E-cadherin significantly decreased compared to those in the sham operation group ( $P < 0.05$ ). Compared to those in the model group, the mass of the in situ tumors was reduced, and the number of hepatic metastasis nodules decreased in the high- and medium-dose QZKAF groups ( $P < 0.05$ ); the expression levels of PTPN1, vinculin, integrin subunit  $\alpha v$ , integrin subunit  $\beta 3$  and E-cadherin in all QZKAF groups and 5-Fu group showed different degrees of retracement, and the changes of the indicators in all QZKAF groups showed a certain degree of dose-dependence ( $P < 0.05$ ). HE staining showed that the nuclei of tumor cells in the model group were mostly schizophranic, and there were different degrees of nuclear fragmentation of tumor cells in all QZKAF groups with more in the medium- and high-dose groups. **Conclusion** QZKAF could inhibit the growth of in situ tumors and liver metastasis of CRC. Its mechanism might be related to the regulation of tumor cell-cell and tumor cell-extracellular matrix adhesion by PTPN1.

**Keywords** colorectal cancer; *Qizhu Kang'ai Formula* (芪术抗癌方); cell adhesion; protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 1; network pharmacology; molecular docking

(收稿日期: 2023-03-23; 修回日期: 2023-12-09)

[编辑: 王利芬]