

基于网络药理学、分子对接和细胞实验探讨 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的作用机制

蒙喜云¹, 韩利民¹, 周 勇², 罗 俊³, 鲁正学^{1*}

1. 重庆市长寿区人民医院, 重庆 401220

2. 泸州市龙马潭区人民医院, 四川 泸州 646400

3. 重庆市丰都县中医院, 重庆 408200

摘要: **目的** 通过网络药理学、分子对接和细胞实验探讨 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的作用机制。**方法** 运用 Pharmmapper、SEA、ChEMBL 数据库预测靶点, 运用 UniProt 数据库将靶点进行标准化处理, 以获取相应的药物靶点。利用 TTD、DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库获得结直肠癌的靶点。将药物及疾病的靶点导入韦恩图绘制软件获得 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的潜在靶点。使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“药物-靶点-疾病”网络。利用仙桃学术数据库对潜在治疗靶点进行基因本体 (GO) 功能富集分析以及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析。同时将潜在治疗靶点导入 STRING 数据库, 以进行蛋白质相互作用 (PPI) 网络的分析, 并使用 Cytoscape 3.7.1 软件中的 CytoNCA 插件进行拓扑分析筛选核心靶点。运用 AutoDock vina、PyMOL 等软件对 4'-去甲基表鬼臼毒素和核心靶点进行对接验证。利用结直肠癌模型细胞 HCT166 进行实验验证, 采用 CCK-8 法检测 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT166 细胞增殖的影响, 流式染色法检验 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT166 细胞凋亡的影响。通过 Western blotting 检测磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 通路的关键蛋白表达水平。**结果** 共获得了 270 个 4'-去甲基表鬼臼毒素的作用靶点基因和 3 877 个结直肠癌的作用靶点, 其中 4'-去甲基表鬼臼毒素与结直肠癌共同作用靶点为 75 个。通过 PPI 网络分析发现热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1 (HSP90AA1)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (PARP1) 等为核心靶点。富集结果显示 4'-去甲基表鬼臼毒素可能通过 PI3K/Akt 和低氧诱导因子-1 (HIF-1) 等信号通路发挥治疗结直肠癌的作用。分子对接的结果表明 4'-去甲基表鬼臼毒素和核心靶点具有显著的结合性, 对接结合能均低于 -7.0 kcal/mol。细胞实验表明, 与对照组比较, 4'-去甲基表鬼臼毒素抑制 HCT166 细胞的增殖并促进细胞凋亡 ($P < 0.001$); Western blotting 实验结果提示 4'-去甲基表鬼臼毒素抑制 HCT166 细胞中 p-Akt、p-PI3K 蛋白的表达 ($P < 0.001$)。**结论** 通过网络药理学、分子对接以及细胞实验探究发现 4'-去甲基表鬼臼毒素可能通过 HSP90AA1、ERBB2、PARP1 等靶点以及 PI3K/Akt 信号通路发挥治疗结直肠癌的作用, 为 4'-去甲基表鬼臼毒素的临床应用和结直肠癌治疗的研究提供依据。

关键词: 4'-去甲基表鬼臼毒素; 结直肠癌; 网络药理学; 分子对接; 热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1; 酪氨酸激酶受体 2; 多聚 ADP 核糖聚合酶 1; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 通路

中图分类号: R285; R286.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)11-2733-13

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.11.006

Mechanism of 4'-demethylepipodophyllotoxin in treatment of colorectal cancer based on network pharmacology, molecular docking, and cell experiments

MENG Xiyun¹, HAN Limin¹, ZHOU Yong², LUO Jun³, LU Zhengxue¹

1. Chongqing Changshou District People's Hospital, Chongqing 401220, China

2. Longma Tan District People's Hospital, Luzhou, Luzhou 646400, China

3. Fengdu County Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 408200, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of action of 4'-demethylepipodophyllotoxin in treatment of colorectal cancer through network pharmacology, molecular docking, and cellular experiments. **Methods** The targets were predicted using Pharmmapper, SEA,

收稿日期: 2025-09-01

基金项目: 重庆市长寿区科技计划项目 (CSKJ2024028)

作者简介: 蒙喜云, 男, 硕士研究生, 从事中药治疗肝胆胰腺相关疾病研究。E-mail: mingdey1@163.com

*通信作者: 鲁正学, 男, 从事小分子药物治疗肝胆胰腺相关疾病研究。E-mail: 3633702946@qq.com

and ChEMBL databases, and standardized using the UniProt database to obtain the corresponding drug target. The target genes for colorectal cancer were obtained from TTD, DisGeNET, GeneCards, and OMIM databases. The drug and disease target were imported into Venn diagram software to identify potential targets of 4'-demethylepipodophyllotoxin for colorectal cancer treatment. The "drug-target-disease" network was constructed using Cytoscape 3.7.1 software. GO functional enrichment analysis and KEGG pathway analysis were performed on potential therapeutic targets using the Xiantao Academic Database. The potential therapeutic targets were also imported into the STRING database for PPI network analysis, and core targets were screened through topological analysis using CytoNCA in Cytoscape 3.7.1 software. Molecular docking validation of 4'-demethylepipodophyllotoxin and core targets was conducted using AutoDock Vina and PyMOL software. Using the colorectal cancer model cell HCT166 for verification experiment, with the CCK-8 method to detect the effect of 4'-demethylepipodophyllotoxin on HCT166 cell proliferation and flow cytometry to examine the effect of 4'-demethylepipodophyllotoxin on HCT166 cell apoptosis. Western blotting was used to detect the expression levels of key proteins in the PI3K/Akt pathway. **Results** A total of 270 action target for 4'-demethylepipodophyllotoxin and 3 877 action target for colorectal cancer were obtained, with 75 common action target between 4'-demethylepipodophyllotoxin and colorectal cancer. PPI network analysis identified core target such as HSP90AA1, ERBB2, and PARP1. The enrichment results showed that 4'-demethylepipodophyllotoxin may play a therapeutic role in colorectal cancer through signaling pathways such as PI3K/Akt and HIF-1. Molecular docking results showed that 4'-demethylepipodophyllotoxin has significant binding affinity with core targets, with docking binding energies below -7.0 kcal/mol. Cellular experiments indicated that compared to the control group, 4'-demethylepipodophyllotoxin inhibited HCT166 cell proliferation and promoted apoptosis ($P < 0.001$), while Western blotting results suggested that 4'-demethylepipodophyllotoxin inhibited the expression of p-Akt and p-PI3K proteins in HCT166 cells ($P < 0.001$). **Conclusion** Through network pharmacology, molecular docking, and cellular experiments, it was found that 4'-demethylepipodophyllotoxin may exert therapeutic effects on colorectal cancer through target such as HSP90AA1, ERBB2, and PARP1, as well as the PI3K/Akt signaling pathway, providing a basis for the clinical application of 4'-demethylepipodophyllotoxin and research on colorectal cancer treatment.

Key words: 4'-demethylepipodophyllotoxin; colorectal cancer; network pharmacology; molecular docking; HSP90AA1; ERBB2; PARP1; PI3K/AKT signaling pathway

结直肠癌是消化系统常见恶性肿瘤,有较高发病率和死亡率。在全球范围内,其发病率排名第3位(9.6%),死亡率排名第2位(9.3%)^[1]。近年来中国结直肠癌发病率持续攀升,有统计数据显示其在恶性肿瘤中发病率高居第2位、死亡率位列第4位,同时有统计数据显示,结直肠癌的5年生存率为60%~70%^[2-3],且因其早期症状不明显,60%~70%患者确诊时已进展至肿瘤细胞扩散的中晚期,这与肠镜筛查普及率不足30%密切相关^[4]。多数结直肠癌被认为起源于干细胞或类干细胞,其自我更新和耐药性等能力是由于遗传和表观遗传改变的积累引起^[5-8]。目前临床治疗策略包括手术、放疗、化疗以及生物制剂和免疫疗法等新兴疗法^[9-10],但现有的治疗方法效果仍不理想,尽管可以延长患者的生存时间,但仍有相当一部分患者在治疗后复发或转移,导致生存期缩短。此外,部分患者在接受治疗后会出现严重的不良反应,影响生活质量。开发新型抗结直肠癌药物成为当务之急,旨在改善患者的预后和生活质量。

4'-去甲基表鬼臼毒素是从鬼臼、八角莲等传统

药用植物中分离得到的重要木脂素类化合物。4'-去甲基表鬼臼毒素是表鬼臼毒素类的代谢中间体之一,该化合物因其在结构上去除了4'-位的甲基而得名,具有独特的生物学性质。4'-去甲基表鬼臼毒素通过靶向拓扑异构酶 II (Topo II) 并诱导 DNA 损伤,具有广泛的抗肿瘤活性,表明其具有作为抗癌药物开发的潜力^[11-12]。有研究表明,4'-去甲基表鬼臼毒素芳香酰胺类以及酯类衍生物对人肺腺癌细胞 A549、人肝肿瘤细胞株 HepG2 等均有一定的抑制活性作用^[13-14]。目前提出 4'-去甲基表鬼臼毒素对结直肠癌有抗癌效果的研究较少,考虑其药物毒性以及临床上出现的不良反应,验证可能的靶点以及作用通路,为后续 4'-去甲基表鬼臼毒素衍生物抗结直肠癌的开发应用提供了新的思路。

网络药理学作为一种新兴的研究方法,能从分子水平上研究药物的基因、蛋白以及与疾病的相关性,从而揭示其潜在的治疗机制^[15]。本研究通过网络药理学、分子对接技术以及细胞实验深入探讨了 4'-去甲基表鬼臼毒素在治疗结直肠癌中的作用机制,旨在为后续实验研究及临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 HCT 116 细胞购于碧云天生物技术有限公司(货号 C6309)。

1.1.2 药物与试剂 4'-去甲基表鬼臼毒素购于 MCE 中国(批号 HY-17435, 质量分数 99.76%); 杜尔贝科改良 Eagle 培养基培养基(批号 C11330500BT)购自赛默飞世尔科技公司; 高敏 CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒(CCK-8, 批号 KGA9306-1000)购自江苏凯基生物; Annexin V-EGFP/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(批号 KGA1101-100)购自江苏凯基生物; 二喹啉甲酸(BCA)蛋白试剂盒(批号 PC0020)购自中国索莱宝; 高效 RIPA 裂解液(批号 R0010)购自中国索莱宝, 内参 GAPDH (GAPDH, 批号 AF1186)购自碧云天生物技术有限公司; 蛋白激酶 B (Akt, 批号 R23411)、磷酸化 Akt (Ser473) (p-Akt, 批号 R381555)、磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K, 批号 R22768)、磷酸化 PI3K (Tyr467/Tyr199) (p-PI3K, 批号 341468)均购自成都正能生物技术有限公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) (SA00001-1、SA00001-2, Proteintech)购自武汉三鹰生物技术有限公司; 特超敏 ECL 化学发光底物(批号 BL520B)购自中国白鲨。

1.1.3 设备与仪器 CO₂ 细胞培养箱(赛默飞世尔科技公司); IX71 荧光倒置显微镜(日本 Olympus); TDL-40B 台式低速离心机(江苏万丰船用设备制造有限公司); 台式高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司); 电泳仪(美国 Bio-Rad)。

1.2 网络药理学与分子对接

1.2.1 4'-去甲基表鬼臼毒素靶点收集 从 PharmMapper (<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)、SEA (<https://sea.bkslab.org/>)、ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>) 数据库中检索“4'-demethylepipodophyllotoxin”筛选药物对应的靶点。在 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 中执行标准化处理, 以获取相应的药物靶点基因。

1.2.2 结直肠癌相关靶点筛选 在 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org>)、GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、TTD 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNET 数据库 (<https://disgenet.com>) 检索“colorectal cancer”去重后获得结直肠癌相关靶点。

1.2.3 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的潜在

作用靶点筛选 将获得的 4'-去甲基表鬼臼毒素靶点基因和与结直肠癌相关的靶点基因导入仙桃学术 (<https://www.xiantaozi.com>), 以绘制韦恩图。通过靶点交集, 从中筛选出 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的潜在作用靶点。

1.2.4 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络 将 4'-去甲基表鬼臼毒素、结直肠癌、4'-去甲基表鬼臼毒素对结直肠癌的潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 构建“药物-成分-靶点-疾病”网络。Network Analyzer 计算的靶点和药物的拓扑参数, 在该网络中, 节点表示药物、靶点或疾病, 节点之间的边则表示它们之间的相互作用。节点的 degree 值由与之相连的边的数量决定, degree 值越高, 说明该节点在网络中的重要性越大。

1.2.5 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络图并筛选核心靶点 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 是用于预测蛋白质间相互作用的重要工具。将 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的潜在作用靶点导入该数据库, 并设定最小相互作用阈值为 ≥ 0.4 , 同时选择人类作为物种, 从而构建 PPI 网络。将生成的 PPI 网络结果以 TSV 格式导出, 并利用 Cytoscape 3.7.1 软件进行可视化分析。核心靶标筛选采用度中心性 (degree)、中介中心性 (betweenness)、接近中心性 (closeness)、网络中心性 (network)、特征向量中心性 (eigenvector) 的中位数作为截断值。选取 5 项指标前 6 位排名的交集作为核心靶点。

1.2.6 基因本体 (GO) 功能富集分析和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析 使用 R 版本 3.6.3 及其相关软件包 (包括 clusterProfiler、org.hs.egg.db 和 ggplot2) 进行 GO 分析和 KEGG 通路分析。运用 Benjamini-Hochberg (BH) 方法对 P 值进行调整后, 设定 $P < 0.05$ 为具有统计学意义的阈值。GO 功能富集分析的内容涵盖生物过程 (BP)、细胞组分 (CC) 以及分子功能 (MF)。

1.2.7 TCGA 数据集验证核心基因差异表达 利用国家基因表达综合数据中心 (National Center for Gene Expression Comprehensive dataset, NCBI) 数据库, 选取结直肠癌测序的 TCGA-COADREAD 数据集 (202208) 中的 698 个样本进行辅助验证, 分析核心靶基因在数据集中是否差异表达, 进一步证实关键基因的重要性。

1.2.8 ROC 曲线分析核心基因的临床诊断价值 核心基因的 ROC 曲线分析对于评估其在临床研究中

的诊断价值至关重要。ROC 曲线帮助研究人员确定基因在区分患者组（疾病组）和对照组（健康组）之间的有效性。在 TCGA-COADREAD 数据集（202208）下载 6 个核心基因的表达谱并导入仙桃学术 ROC 计算部分。使用“pROC”包评估核心目标诊断的预测能力。ROC 的曲线下面积（AUC）被计算以评估预测模型的准确性；更高的 AUC 表示相应基因的更大准确性和临床诊断价值。

1.2.9 药物与核心靶点的分子对接 为了研究药物与靶点之间的关联，本研究使用 AutoDockVina 软件对 4'-去甲基表鬼臼毒素与治疗结直肠癌的核心靶点进行分子对接分析。核心靶点的三维结构来源于蛋白质数据库（PDB，<https://www.rcsb.org/>）并以 mol2 格式下载。使用 AutoDock 软件通过去除水、添加极性氢、计算加斯泰伊格电荷和调整网格盒大小来对蛋白质的结构进行预处理。氢原子、加斯泰格电荷和可旋转键被分配到配体上，运行分子对接并计算结合能。结合分数越低，结合效果越好，结合能 < -4.25 kcal/mol（1 cal = 4.2 J）表明配体与靶标之间存在结合活性；结合能 < -5.0 kcal/mol 表明具有良好的结合活性；结合能 < -7.0 kcal/mol 表明具有较强的对接活性^[6]，最后使用 Pymol 程序可可视化分子对接结合图。

1.3 体外实验验证

1.3.1 细胞培养 将收集的细胞用含 10% 胎牛血清的完全培养基重悬，使用流式细胞仪进行细胞计数。在 96 孔细胞培养板中，每孔接种 100 μ L 细胞悬液。接种完成后，将培养板置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中预培养约 12 h，使细胞充分贴壁。

1.3.2 CCK-8 实验验证 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞增殖的影响 实验设置空白对照组（完全培养基）及不同浓度（1.562 5、3.125 0、6.250 0、12.500 0、25.000 0、50.000 0、100.000 0、200.000 0 μ mol/L）4'-去甲基表鬼臼毒素的实验组，各组设置 6 个副孔，配制好的药物或培养基每孔加入 100 μ L，在实验组孔周边按每孔 100 μ L 加入 PBS 防止边缘效应。将加药后的 96 孔板放于培养箱中各培养 24、48 h，吸弃原液。每孔按照 CCK-8 试剂与培养基比例 1：10 加入 100 μ L 稀释后的 CCK-8 试剂与细胞接触，在培养箱中避光培养 1.5 h 后，CCK-8 试剂可在细胞内被代谢为紫色产物，其吸光度（A）值与检测细胞的数量呈正比，用酶标仪检测在 450 nm 波长时实

验组的 A 值，并计算增殖率。公式如下：

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.3.3 AnnexinV/PI 流式染色法验证 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞凋亡的影响 收集细胞状态良好的 HCT116 细胞制备 2×10^5 个/mL 的细胞悬液，使用 6 孔板加入培养基 2 mL/孔及制备的单细胞悬液。将铺板细胞放于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 48 h，吸取各实验组上清培养基于 EP 管中，孔中细胞用不含 EDTA 的胰酶消化并用上清培养基终止消化收集细胞。用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次收集细胞 1×10^5 个，加入 500 μ L Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液。每孔加入 5 μ L AnnexinV-FITC 混匀后，再加入 5 μ L Propidium Iodide，混匀后室温避光反应 10 min，进行流式细胞仪的观察和检测。

1.3.4 Western blotting 实验验证 通路关键蛋白 HCT116 细胞在 T25 细胞培养瓶中培养，用含有 1% PMSF 和 1% 磷酸转移酶抑制剂的 $1 \times$ RIPA 裂解缓冲液裂解细胞。蛋白浓度采用 BCA 试剂盒检测。随后，蛋白质（25 μ g）通过加热变性后用 10% SDS-PAGE 电泳，转移到聚偏二氟乙烯膜。用 5% 脱脂牛奶在 37 $^{\circ}$ C 下密封 1 h，Akt、p-Akt、PI3K、p-PI3K 一抗均以 1：1 000 比例稀释，GAPDH 一抗以 1：5 000 比例稀释，将转移后的膜条带按相对分子质量大小分别置于以上一抗中并在 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。孵育后，将膜条带与 HRP 结合的二抗在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1.5 h。使用特超敏 ECL 化学发光底物试剂检测特异性条带，并使用 Image J 软件计算特异性条带，进行蛋白质定量分析。

1.3.5 统计学方法 实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件统计分析和作图。数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。两组间比较采用 *t* 检验，多组数据的比较采用单因素方差检验（one-way ANOVA）进行统计分析。

2 结果

2.1 收集 4'-去甲基表鬼臼毒素潜在靶点

使用 PharmMapper、SEA、ChEMBL 数据库确定 4'-去甲基表鬼臼毒素的药理靶点，见图 1。使用 Uniprot 数据库确定了 270 个潜在靶点。

2.2 收集结直肠癌潜在作用靶点

利用 TTD、DisGeNET、GeneCards、OMIM 数据库筛选到与结直肠癌相关靶点，分别得到 100、11、3 806、200 个结直肠癌作用靶点，去除重复项后，最终获得了 3 877 个潜在的与结直肠癌相关的作用靶点，见图 2。

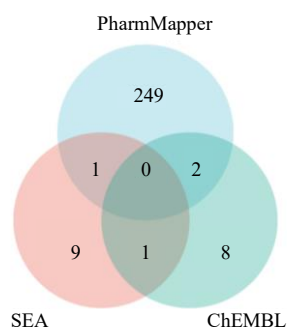


图 1 药物靶点数据库预测 4'-去甲基表鬼臼毒素靶点

Fig. 1 Drug target database predicts targets of 4'-demethylepipodophyllotoxin

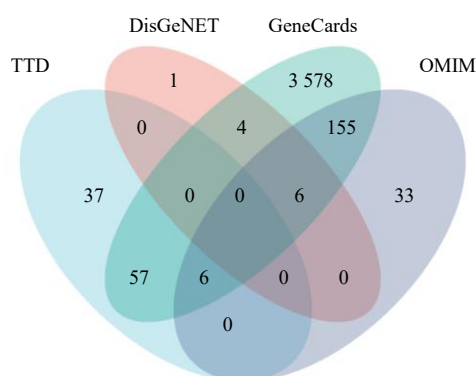


图 2 疾病靶点数据库预测结直肠癌靶点

Fig. 2 Disease target database predicts targets for colorectal cancer

2.3 4'-去甲基表鬼臼毒素与结直肠癌共同作用靶点的筛选

对筛选出的 4'-去甲基表鬼臼毒素相关靶点与结直肠癌的作用靶点进行交集分析, 绘制韦恩图, 得到的结果提示 4'-去甲基表鬼臼毒素与结直肠癌之间存在 75 个共同作用靶点, 见图 3。

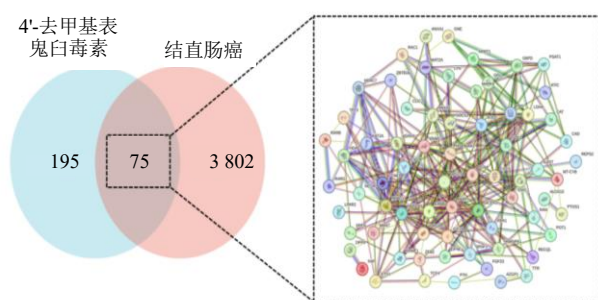


图 3 4'-去甲基表鬼臼毒素与结直肠癌作用靶点的韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of the action targets of 4'-demethylepipodophyllotoxin and colorectal cancer

2.4 “药物 - 靶点 - 疾病”网络的构建分析

将 4'-去甲基表鬼臼毒素、结直肠癌以及 4'-去甲基表鬼臼毒素在治疗结直肠癌的潜在作用靶点导入 Cytoscape 3.7.1 软件, 以构建“药物 - 靶点 - 疾病”网络。最终形成的网络包含 77 个节点和 151 条边, 如图 4 所示。

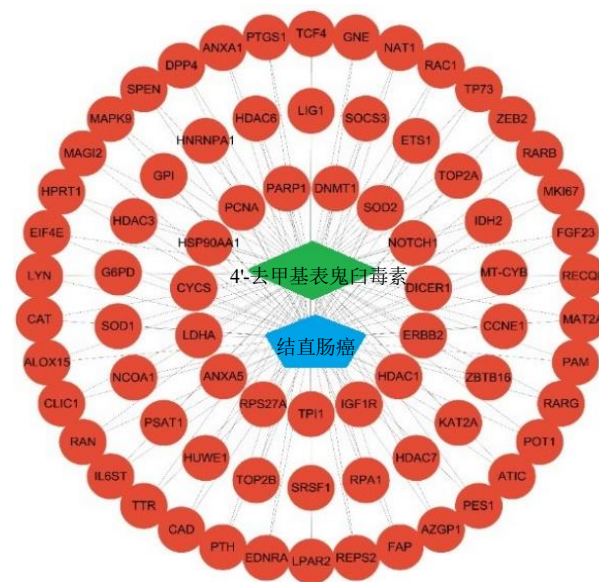


图 4 “药物 - 靶点 - 疾病”网络图

Fig. 4 Network diagram of “drug -target -disease”

2.5 GO 及 KEGG 富集分析

将 75 个靶点导入仙桃学术数据库进行 GO 富集分析, $P < 0.05$ 的 GO 条目被视为显著富集的。根据功能注释, 绘制了排名前 10 位的气泡图, 见图 5。在 BP 分析中, 共识别出 715 个条目, 主要包括对金属离子的反应、对类固醇激素的反应、细胞对氧化应激的反应等; CC 分析中共获得了 40 个条目, 主要包括转录调控因子复合体、神经元胞体、染色体区域等; MF 分析中, 获得了 76 个条目, 主要有组蛋白去乙酰化酶结合、DNA 结合转录因子结合、转录辅阻遏物结合等。通过 KEGG 分析识别出了 27 条通路, 并筛选出排名前 20 位的通路绘制气泡图, 主要富集的通路包括磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/Akt 信号通路、病毒致癌作用和脂质与动脉粥样硬化等, 其中与结直肠癌相关通路有 PI3K/Akt 和低氧诱导因子-1 (HIF-1) 信号通路等, 见图 6。

2.6 PPI 网络分析及筛选关键靶点基因

利用 STRING 数据库构建的 PPI 网络分析结果显示, 该网络包含 70 个节点和 318 条边。通过

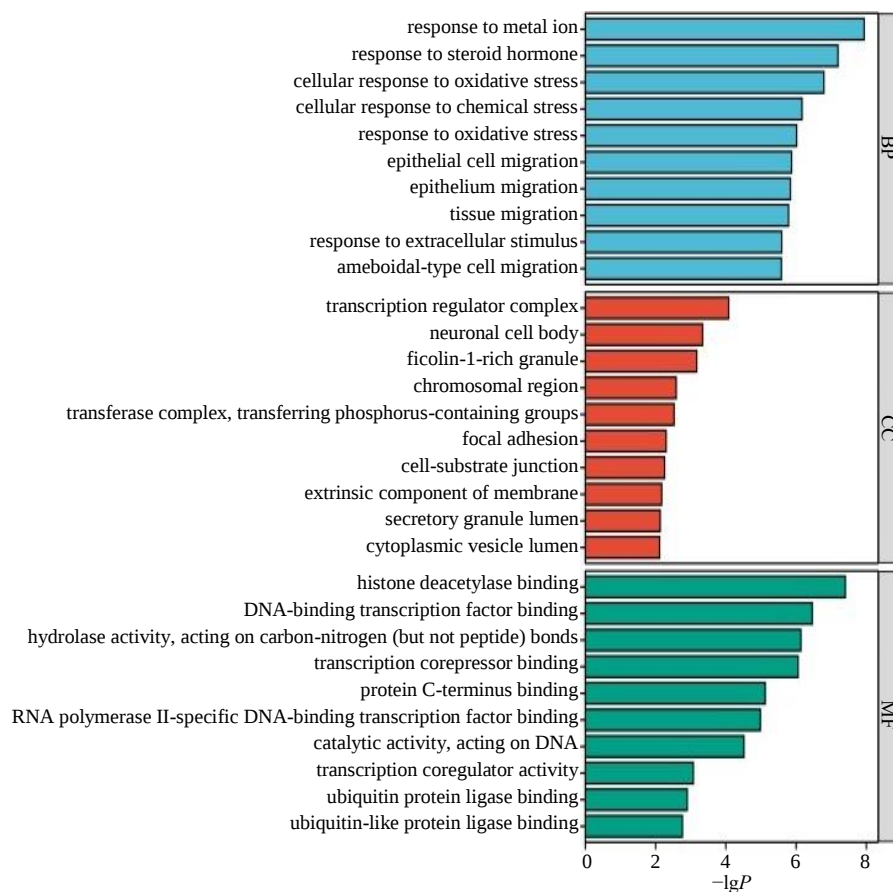


图 5 GO 功能分析

Fig. 5 GO function analysis

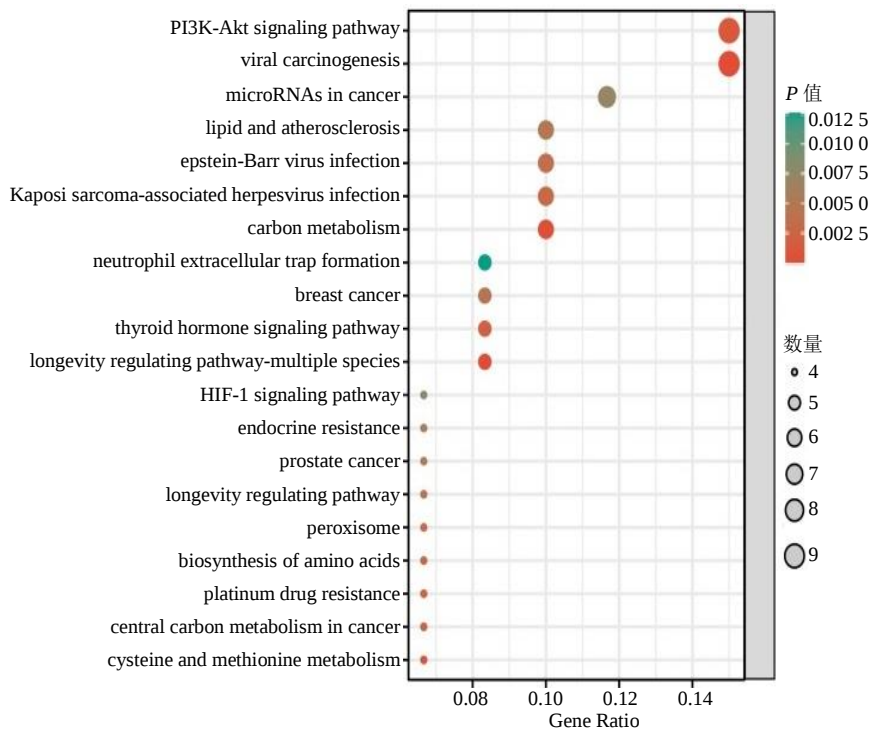


图 6 KEGG 通路分析

Fig. 6 KEGG channel analysis

Cytoscape 3.7.1 软件对网络进行可视化展示, 见图 7。在核心靶点中选取了在 Degree、Betweenness、Closeness、Network、Eigenvector 排名前 6 位的交集靶点, 包括热休克蛋白 90 α 家族 A 类成员 1

(HSP90AA1)、酪氨酸激酶受体 2 (ERBB2)、多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (PARP1)、组蛋白脱乙酰基酶 1 (HDAC1)、DNA 甲基转移酶 1 (DNMT1)、跨膜受体蛋白 Notch-1 (NOTCH1), 见表 1。

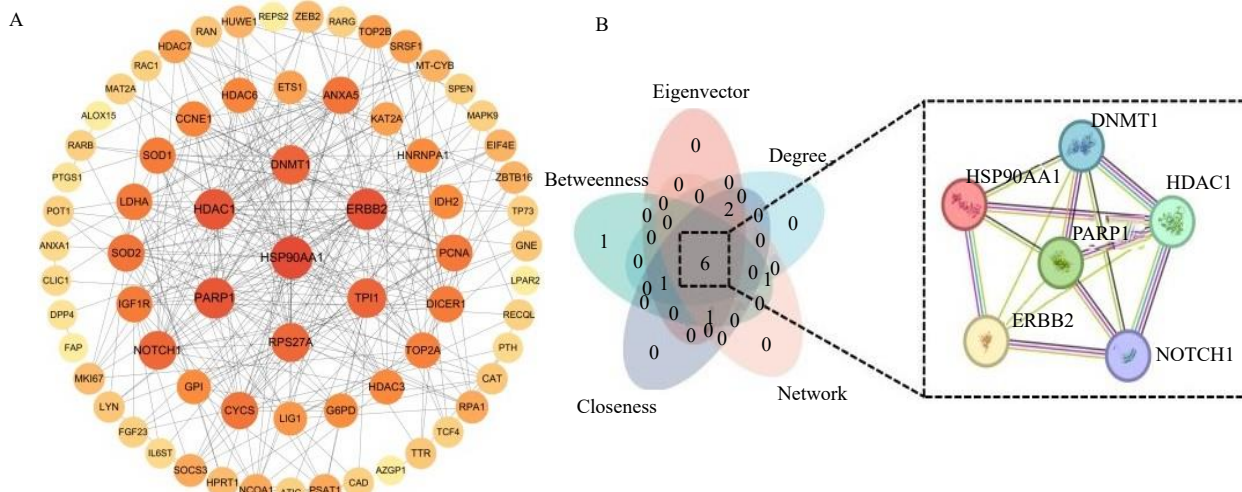


图 7 关键靶点基因的 PPI 网络 (A)、5 种算法交集靶基因 (B)

Fig. 7 PPI network of key target genes (A), intersection of five algorithms with the target gene (B)

表 1 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的关键靶点

Table 1 Key targets of 4'-demethylepipodophyllotoxin for colorectal cancer

Uniprot ID	靶点	Degree	Eigenvector	Betweenness	Closeness	Network
P07900	HSP90AA1	27	0.272	619.156	0.589	16.676
P04626	ERBB2	25	0.262	602.981	0.575	15.267
P09874	PARP1	24	0.272	286.787	0.560	15.339
Q13547	HDAC1	24	0.251	310.218	0.556	14.646
P26358	DNMT1	21	0.242	276.095	0.552	10.885
P46531	NOTCH1	20	0.223	278.216	0.534	11.286

2.7 TCGA 数据集验证核心基因差异表达

利用 TCGA-COADREAD 数据集 (202208) 中的 698 个样本进行辅助验证, 分析发现 6 个核心靶基因中 *HSP90AA1*、*ERBB2*、*PARP1*、*DNMT1*、*NOTCH1* 在数据集中差异表达, 具有统计学意义 ($P < 0.01$ 、 0.001), *HDAC1* 无差异, 进一步证实核心基因的重要性, 见图 8。

2.8 ROC 诊断曲线分析

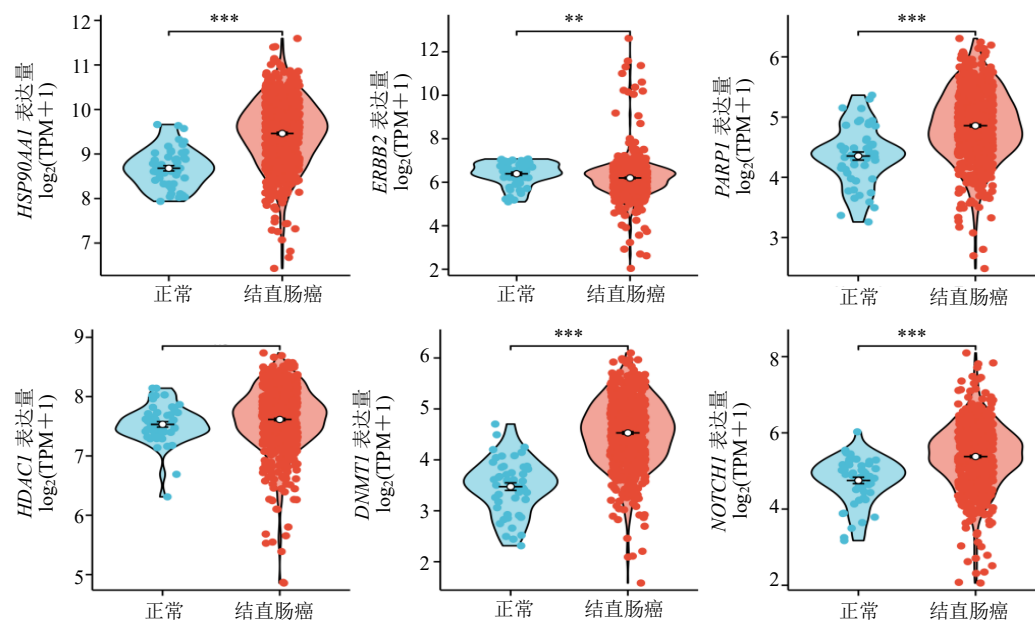
利用 TCGA-COADREAD 数据集 (202208) 中的 698 个样本进行辅助验证, 绘制核心靶基因的 ROC 曲线 (图 9), 以进一步验证核心基因的临床诊断价值。结果显示, 数据集中核心基因的 AUC 值均大于 0.5, 核心基因对于区分结直肠癌样本与正常对照样本具有一定的准确性和特异性。

2.9 4'-去甲基表鬼臼毒素与核心靶点的分子对接

将 6 个核心靶点与 4'-去甲基表鬼臼毒素进行分子对接分析, 以确定它们之间的相互作用关系。通常认为, 当结合能 < -5.0 kcal/mol 时, 表明该成分与核心靶点蛋白之间具有良好的结合能力; 而结合能 < -7.0 kcal/mol 则提示该物质与核心靶点蛋白之间具有显著的结合活性, 利用 Pymol 可视化, 结果见图 10。结果显示, 4'-去甲基表鬼臼毒素与核心靶点的结合能均 < -7.0 kcal/mol, 提示 4'-去甲基表鬼臼毒素与核心靶点之间具有显著的结合能力。

2.10 CCK-8 实验验证 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞增殖影响

本研究探讨了不同浓度 (1.5625、3.1250、6.2500、12.5000、25.0000、50.0000、100.0000、200.0000



与正常组比较: **P<0.01 ***P<0.001。

P < 0.01 *P < 0.001 vs normal group.

图 8 TCGA-COADREAD 数据集中 6 个关键基因差异表达分析

Fig. 8 Analysis of differential expression of 6 key genes in TCGA-COADREAD data set

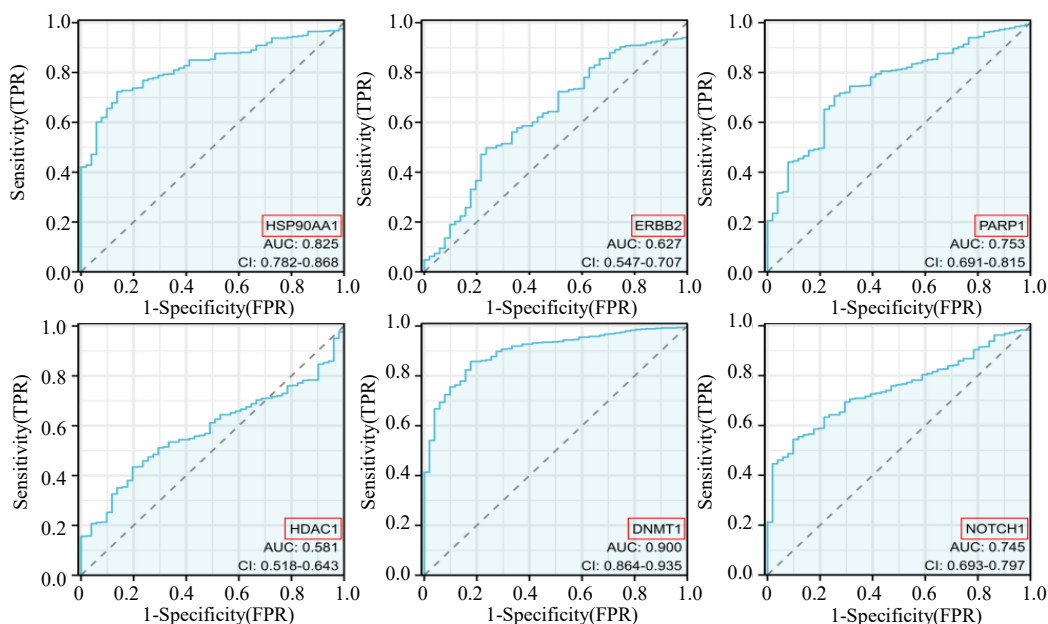


图 9 TCGA-COADREAD 数据集中 6 个核心基因 ROC 曲线分析

Fig. 9 ROC curve analysis of 6 core genes in TCGA-COADREAD data set

μmol/L) 4'-去甲基表鬼臼毒素处理 24、48 h 后对 HCT116 细胞增殖的影响。CCK-8 实验表明, 4'-去甲基表鬼臼毒素以浓度相关方式抑制结直肠癌细胞增殖, 见图 11。结果显示该药物 24 h 的 IC₅₀ 为 23.090 0 μmol/L, 48 h 的 IC₅₀ 为 14.240 0 μmol/L, 故选择 3.75、7.50、15.00 μmol/L 进行后续实验。

2.11 AnnexinV/PI 染色实验检测 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞凋亡影响

为了明确 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞抑制作用是否和药物能诱导 HCT116 细胞凋亡有关, 使用细胞凋亡检测试剂盒在流式细胞仪上对不同浓度作用的 HCT116 细胞进行检测, 如图 12 所

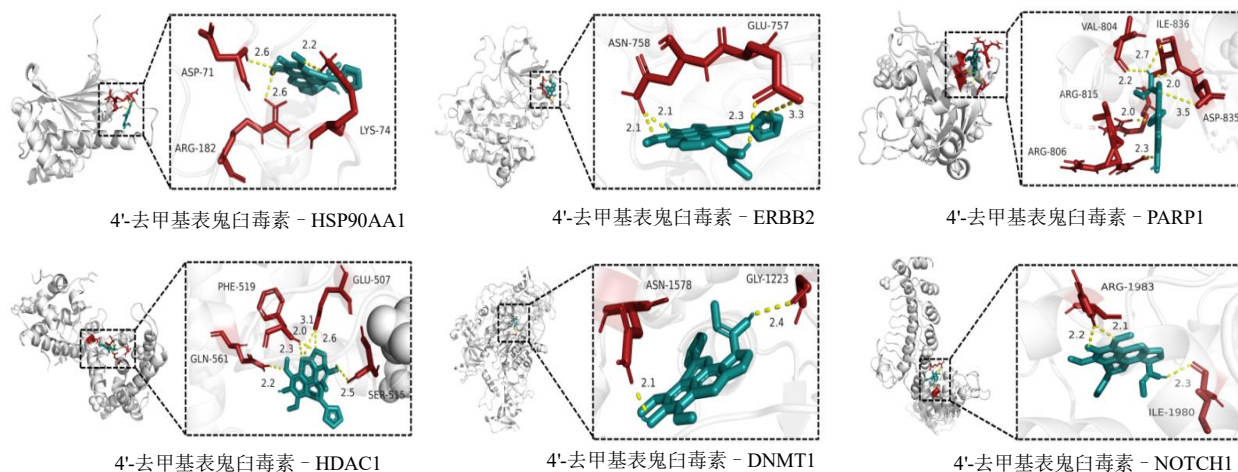
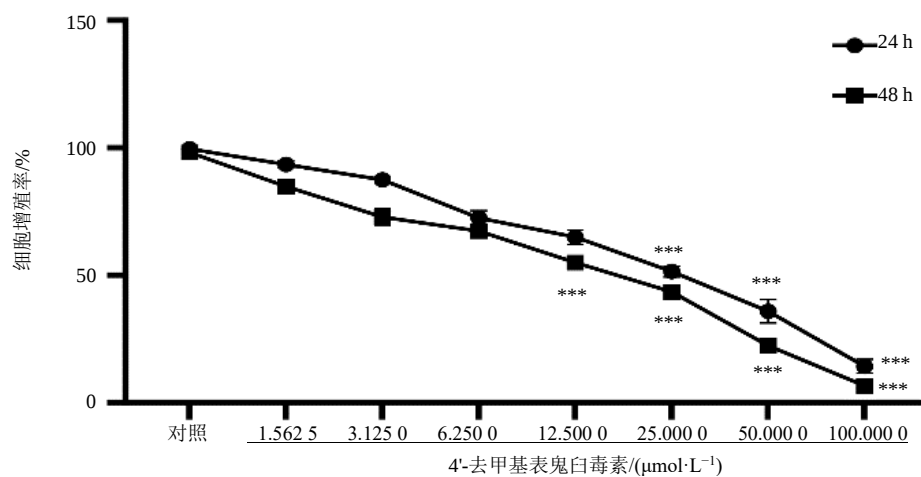


图 10 4'-去甲基表鬼臼毒素与核心靶点分子对接可视化图

Fig. 10 Visualized docking of 4'-demethylepipodophyllotoxin with core target molecules

与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。*** $P < 0.001$ vs control group.图 11 CCK-8 实验检测不同浓度 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Fig. 11 CCK-8 experiment detects the effect of different concentrations of 4'-demethylepipodophyllotoxin on the proliferation of HCT 116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

示,与对照组相比,4'-去甲基表鬼臼毒素浓度相关性增加 HCT116 细胞的凋亡率($P < 0.001$),实验结果表明 4'-去甲基表鬼臼毒素能通过诱导细胞凋亡进而参与结直肠癌发生发展。

2.12 Western blotting 实验验证 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞通路关键蛋白的影响

利用 Western blotting 方法检测 4'-去甲基表鬼臼毒素干预后对 HCT116 细胞的 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达。实验结果见图 13,分析发现在 4'-去甲基表鬼臼毒素干预后,PI3K/Akt 信号通路上的关键磷酸化蛋白 p-PI3K、p-Akt 表达显著下调($P < 0.001$)。

3 讨论

结直肠癌是全球范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一,其复杂的发病机制和多样的临床表现给患者的生存质量带来了极大的挑战^[17]。尽管目前已采取手术、放疗和化疗等多种治疗手段,但 these 方法在某些患者中效果有限,并常伴有明显的不良反应^[9-10]。4'-去甲基表鬼臼毒素是一种具有显著生物活性的天然产物,是当前抗肿瘤药物 VP-16 (依托泊苷)与 VM-26 (替尼泊苷)的母体结构之一,其能够与细胞 DNA 形成稳定复合物,抑制 DNA 拓扑异构酶 II 的功能,从而阻断肿瘤细胞的 DNA 复制与转录^[18]。本研究通过网络药理学预测、分子

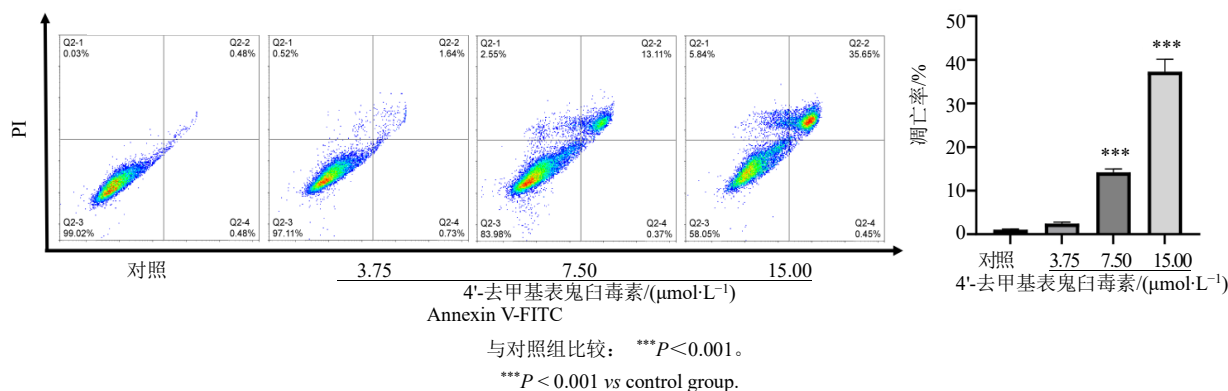
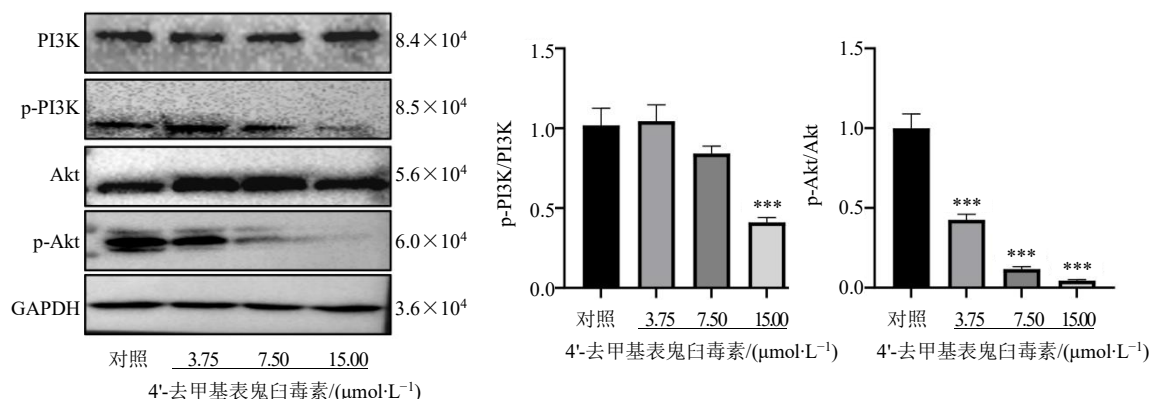


图 12 AnnexinV/PI 双染法检测 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 12 Effect of 4'-demethylepipodophyllotoxin on apoptosis of HCT 116 cells was detected by AnnexinV/PI double staining ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group.

图 13 Western blotting 实验检测 4'-去甲基表鬼臼毒素对 HCT116 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 13 Effects of 4'-demethylepipodophyllotoxin on PI3K/Akt signaling pathway-related proteins in HCT 116 cells detected by Western blotting experiment ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

对接验证以及细胞实验,系统揭示 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的多靶点、多通路协同机制,为中医药治疗结直肠癌提供分子层面的科学依据。

通过 PPI 网络拓扑分析,从 75 个潜在交集靶点中筛选出 6 个 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的核心靶点,包括 HSP90AA1、ERBB2、PARP1、HDAC1、DNMT1、NOTCH1。HSP90AA1 是一种高度保守的分子伴侣,已被认为是多种癌症(包括结直肠癌)发展的肿瘤促进因子^[19],HSP90AA1 作为 PI3K/Akt 通路的一个关键上游调控者和稳定器,其与 Akt 结合,防止其被泛素化降解,维持其蛋白稳定性和功能完整性^[20]。研究表明,HSP90AA1 会加速肿瘤进展、侵袭及化疗耐药性,提示 HSP90AA1 是一个极具潜力治疗结直肠癌的靶点^[21]。ERBB2 是

表皮生长因子受体家族的一员,ERBB2 的扩增导致 ERBB2 酪氨酸激酶受体的过度表达,从而引起信号传导异常和细胞迁移、生长、黏附和分化^[22]。ERBB2 与家族其他成员(如 EGFR/HER1、HER3)形成异源二聚体后,其胞内区的酪氨酸残基会发生自身磷酸化。磷酸化的酪氨酸位点可作为锚定位点,直接招募 PI3K 的 p85 调节亚基。这种招募导致 PI3K 的 p110 催化亚基被激活,从而直接启动 PI3K/Akt 信号级联反应,从而驱动肿瘤细胞的无限增殖、存活、侵袭和转移^[23]。ERBB2 在 5% 的转移性结直肠癌中过度表达,研究提示在晚期结直肠癌中靶向 ERBB2 治疗可能是有前景的探索方向^[24]。PARP1 是 PARP 家族成员之一,属于 DNA 损伤修复酶,主要参与 DNA 修复、转录调控等生物学过程^[25]。PARP1 的

过度激活会通过 AMPK/mTOR 轴,间接地对 PI3K/Akt 通路的功能产生负向抑制,PI3K/Akt 通路的异常激活被认为是导致 PARP 抑制剂耐药的一个重要机制^[26]。研究发现,抑制 PARP1 可诱导 DNA 损伤积累,促使肿瘤细胞凋亡,这为结直肠癌的治疗提供了新的靶点^[27]。HDAC1 属于组蛋白去乙酰化酶家族,在调控基因表达和维持染色质结构中发挥重要作用^[28]。HDAC1 是 PI3K/Akt 通路的核心放大器与协同驱动因子,激活的 HDAC1 通过沉默 PTEN 和直接去乙酰化通路组件,反过来强力增强 PI3K/Akt 通路的信号输出,从而调节细胞周期进程和增殖^[29]。已有研究表明,靶向 HDAC1 治疗可增强结直肠癌细胞对化疗药物的敏感性^[30]。DNMT1 是 DNA 甲基转移酶家族关键成员,主要负责维持 DNA 甲基化模式,在肿瘤的发生中起着调控作用^[31]。DNMT1 是 PI3K/Akt 通路的关键放大器与稳定器, DNMT1 通过甲基化沉默 *PTEN* 等基因,解除对 PI3K/Akt 通路的抑制,导致其进一步超活化,使得癌细胞获得持续的生存和增殖信号^[32]。NOTCH1 是 NOTCH 信号通路的核心受体,该通路参与细胞命运决定与增殖调控,其异常激活与结直肠癌的发生发展密切相关^[33]。NOTCH1 与 PI3K/Akt 通路之间存在密切的双向正反馈关系,活化的 NOTCH1 (其胞内段 NICD 进入细胞核) 可以通过转录依赖和非转录依赖的方式激活 PI3K/Akt 通路,从而更有效地诱导癌细胞死亡^[34]。靶向调控上述靶点可能是 4'-去甲基表鬼臼毒素治疗结直肠癌的关键策略之一。

GO 和 KEGG 富集分析结果显示,4'-去甲基表鬼臼毒素参与对氧化应激、转录调控因子复合体、结合组蛋白去乙酰化酶等 BP,并通过 PI3K/Akt 等信号通路治疗结直肠癌。PI3K/Akt 信号通路在结直肠癌发病进展中具有重要作用,PI3K/Akt 信号通路的异常激活与结直肠癌细胞的增殖、凋亡抑制及转移能力增强密切相关,被 PI3K 激活的 Akt 通过磷酸化下游靶点,调控细胞存活、自噬等的生理过程^[35-36]。有研究表明,刺五加苷通过调节肠道微生物群并抑制 PI3K/Akt 信号通路来抑制结直肠癌转移^[37]。与 VP-16/VM-26 通过抑制拓扑异构酶 II 发挥作用的经典机制不同^[18],本研究的结果表明,4'-去甲基表鬼臼毒素还能通过抑制 PI3K 及其下游信号分子的磷酸化,有效地干扰肿瘤细胞的信号传导,进一步抑制细胞增殖。这一机制差异提示 4'-去甲基表鬼臼毒素可能代表了一类作用模式全新的

先导化合物,尤其为克服由 TopoII 表达改变或突变所引发的耐药性问题提供了新的思路^[38-39]。本研究还揭示了 4'-去甲基表鬼臼毒素对细胞生物行为的影响,特别是在细胞凋亡方面。通过 AnnexinV/PI 染色实验发现 4'-去甲基表鬼臼毒素显著提高了 HCT116 细胞的凋亡率,表明该药物不仅能抑制细胞增殖,还能诱导细胞死亡,从而为其抗肿瘤活性提供了进一步证据,完善了对结直肠癌细胞在药物作用下生物反应的理解,为未来的抗癌策略提供了新的思路。

综上所述,本研究揭示了 4'-去甲基表鬼臼毒素通过调控 PI3K/Akt 信号通路,抑制结直肠癌细胞增殖并诱导其凋亡的潜力。这些发现为深入理解结直肠癌的分子机制提供了新的视角,并为 4'-去甲基表鬼臼毒素在临床应用中的开发奠定了基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(3):229-263.
- [2] Zhang L, Cao F, Zhang G Y, *et al.* Trends in and predictions of colorectal cancer incidence and mortality in China from 1990 to 2025 [J]. *Front Oncol*, 2019, 9: 98.
- [3] Xia C F, Dong X S, Li H, *et al.* Cancer statistics in China and United States, 2022: Profiles, trends, and determinants [J]. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590.
- [4] 张兴龙, 蔡林, 朱称心, 等. 内镜检查在结直肠癌防治中的应用及研究进展 [J]. *肿瘤学杂志*, 2024, 30(10): 825-832.
- [5] Dekker E, Tanis P J, Vleugels J L A, *et al.* Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [6] Hu P S, Xia Q S, Wu F, *et al.* NSPc1 promotes cancer stem cell self-renewal by repressing the synthesis of all-trans retinoic acid via targeting RDH16 in malignant glioma [J]. *Oncogene*, 2017, 36(33): 4706-4718.
- [7] Carnero A, Garcia-Mayea Y, Mir C, *et al.* The cancer stem-cell signaling network and resistance to therapy [J]. *Cancer Treat Rev*, 2016, 49: 25-36.
- [8] 黄楚月, 冷强, 周炳文, 等. 气液交互法构建患者来源的结直肠癌类器官模型及其在扶正类中药多糖活性评价中的应用 [J]. *中草药*, 2024, 55(20): 6964-6972.
- [9] Boland P M, Ma W W. Immunotherapy for colorectal

- cancer [J]. *Cancers*, 2017, 9(5): 50.
- [10] Ganesh K, Stadler Z K, Cercek A, *et al.* Immunotherapy in colorectal cancer: Rationale, challenges and potential [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(6): 361-375.
- [11] Yu X, Che Z P, Xu H. Recent Advances in the chemistry and biology of podophyllotoxins [J]. *Chemistry*, 2017, 23(19): 4467-4526.
- [12] Zhao W, Cong Y, Li H M, *et al.* Challenges and potential for improving the druggability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer chemotherapy [J]. *Nat Prod Rep*, 2021, 38(3): 470-488.
- [13] 孙亚飞, 姚利霞, 李湘, 等. 4'-去甲基表鬼臼毒素芳香酰胺类衍生物的设计、合成及其抗肿瘤活性 [J]. 中国药物化学杂志, 2018, 28(1): 1-7.
- [14] 李湘, 肖旭华, 姚利霞, 等. 4'-去甲基表鬼臼毒素酯类衍生物的合成及初步抗肿瘤活性 [J]. 中国医药工业杂志, 2017, 48(9): 1287-1292.
- [15] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. 中草药, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [16] 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.
- [17] Lee Y C, Lee Y L, Chuang J P, *et al.* Differences in survival between colon and rectal cancer from SEER data [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78709.
- [18] Pamidi C C, Derry W B, Gupta R S. Synthesis and biological activity of galactopyranoside derivatives of 4'-demethylepipodophyllotoxin showing VP-16 (etoposide)-like activity [J]. *Anticancer Drug Des*, 1991, 6(5): 481-493.
- [19] Gao C, Peng Y N, Wang H Z, *et al.* Inhibition of heat shock protein 90 as a novel platform for the treatment of cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, 25(8): 849-855.
- [20] Mo Y X, Jin A, Hong W Z, *et al.* Isowighteone attenuates vascular calcification by targeting HSP90AA1-mediated PI3K-Akt pathway and suppressing osteogenic gene expression [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2025, 13: 1636883.
- [21] Chu S H, Liu Y W, Zhang L, *et al.* Regulation of survival and chemoresistance by HSP90AA1 in ovarian cancer SKOV3 cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(1): 1-6.
- [22] Strickler J H, Yoshino T, Graham R P, *et al.* Diagnosis and treatment of ERBB2-positive metastatic colorectal cancer: A review [J]. *JAMA Oncol*, 2022, 8(5): 760-769.
- [23] Wei D, Rui B, Fan Q Q, *et al.* KIF11 promotes cell proliferation via ERBB2/PI3K/AKT signaling pathway in gallbladder cancer [J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(2): 514-526.
- [24] Venturini J, Massaro G, Lavacchi D, *et al.* The emerging HER2 landscape in colorectal cancer: The key to unveil the future treatment algorithm? [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2024, 204: 104515.
- [25] Petropoulos M, Karamichali A, Rossetti G G, *et al.* Transcription-replication conflicts underlie sensitivity to PARP inhibitors [J]. *Nature*, 2024, 628(8007): 433-441.
- [26] Xu X P, Liu Y, Gong Q, *et al.* PARP1 promotes EGFR-TKI drug-resistance via PI3K/AKT pathway in non-small-cell lung cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2024, 94(2): 209-221.
- [27] Manic G, Musella M, Corradi F, *et al.* Control of replication stress and mitosis in colorectal cancer stem cells through the interplay of PARP1, MRE11 and RAD51 [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(7): 2060-2082.
- [28] Schuettengruber B, Simboeck E, Khier H, *et al.* Autoregulation of mouse histone deacetylase 1 expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 23(19): 6993-7004.
- [29] Dong R X, Zhang X, Liu Y D, *et al.* Rutin alleviates EndMT by restoring autophagy through inhibiting HDAC1 via PI3K/AKT/mTOR pathway in diabetic kidney disease [J]. *Phytomedicine*, 2023, 112: 154700.
- [30] Deng J, Li Y K, Yin L L, *et al.* Histone lactylation enhances GCLC expression and thus promotes chemoresistance of colorectal cancer stem cells through inhibiting ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2025, 16(1): 193.
- [31] Kar S, Deb M, Sengupta D, *et al.* An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function [J]. *Epigenetics*, 2012, 7(9): 994-1007.
- [32] Liu Y F, Cheng H H, Cheng C C, *et al.* ZNF191 alters DNA methylation and activates the PI3K-AKT pathway in hepatoma cells via transcriptional regulation of DNMT1 [J]. *Cancer Med*, 2022, 11(5): 1269-1280.
- [33] Wang X R, Wen X D, Hu X H, *et al.* ALDH1A1 promotes colorectal cancer metastasis through activating the notch signaling pathway [J]. *Med Oncol*, 2025, 42(9): 403.
- [34] Peng X C, Zhou J R, Li B, *et al.* Notch1 and PI3K/Akt signaling blockers DAPT and LY294002 coordinately inhibit metastasis of gastric cancer through mutual enhancement [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85(2): 309-320.

- [35] Leiphrakpam P D, Are C. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway as a target for colorectal cancer treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3178.
- [36] Zhong J T, Ding S, Zhang X Y, *et al.* To investigate the occurrence and development of colorectal cancer based on the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Front Biosci*, 2023, 28(2): 37.
- [37] Wei J, Zheng Z M, Hou X X, *et al.* Echinacoside inhibits colorectal cancer metastasis via modulating the gut microbiota and suppressing the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A): 116866.
- [38] 倪宏伟. 结直肠癌耐药基因 P-gp、Topo-II 及 ERCC1 表达的临床意义 [D]. 大连: 大连医科大学, 2014.
- [39] 廉蕊, 刘少卿, 郑纪宁, 等. 多药耐药基因相关产物 P-gp 和 Topo-II 在结直肠癌中的表达及临床意义 [J]. *中国医学装备*, 2018, 15(3): 83-85.

[责任编辑 高源]