

基于网络药理学吴茱萸治疗结直肠癌作用机制探讨及实验验证

李若男, 陈 喜, 赵李娜, 李 晶, 徐志立*

辽宁中医药大学 药学院, 辽宁 大连 116600

摘 要: **目的** 采用网络药理学、分子对接及实验验证的方法, 探讨吴茱萸治疗结直肠癌的作用机制。**方法** 运用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库及查阅国内外相关文献收集吴茱萸活性成分, 通过GeneCards、OMIM、TTD数据库收集结直肠癌靶点, 将成分-疾病靶点取交集后进行基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。AutoDock vina对核心成分与核心靶点进行分子对接。通过细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法和流式细胞仪检测异鼠李素对SW480细胞增殖和凋亡的影响; 通过蛋白免疫印迹法(Western blotting法)检测细胞中肿瘤蛋白p53(TP53)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(AKT1)、血管内皮生长因子A(VEGFA)的蛋白表达情况。**结果** 吴茱萸30个活性成分对应174个靶点, 结直肠癌对应1 484个靶点, 二者取交集获得98个靶点, GO涉及细胞增殖、细胞凋亡等生物过程, KEGG富集为癌症通路、PI3K/AKT等信号通路, 分子对接结果显示异鼠李素与TP53、AKT₁和VEGFA亲和力良好。与对照组比较, 异鼠李素可抑制SW480细胞增殖, 促进细胞凋亡; 与对照组比较, 异鼠李素下调了AKT₁和VEGFA的蛋白表达水平($P<0.01$), 上调TP53的蛋白表达水平($P<0.01$)。**结论** 吴茱萸治疗结直肠癌可通过多成分、多靶点、多通路途径来发挥作用, 其中异鼠李素是主要活性成分。

关键词: 吴茱萸; 结直肠癌; 网络药理学; 异鼠李素; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2024)01-0038-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.005

Mechanism of *Evodia rutaecarpa* in treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and experimental verification

LI Ruonan, CHEN Xi, ZHAO Lina, LI Jing, XU Zhili

College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Evodia rutaecarpa* in treatment of colorectal cancer based on network pharmacology, molecular docking and experimental verification. **Methods** The active ingredients of *E. rutaecarpa* were collected by TCMSP and relevant domestic and foreign literature, targets to colorectal cancer were collected through GeneCards, OMIM and TTD databases. The component-disease intersection targets were analyzed through GO and KEGG analysis. AutoDock vina was used to molecular docking between the core components and the core targets. The effects of isorhamnetin on proliferation and apoptosis of SW480 cells by cell counting kit-8 (CCK-8) and flow cytometry. Western blotting was employed to determine the expression levels of TP53, AKT1 and VEGFA. **Results** The 30 active components of *E. rutaecarpa* corresponding to 174 targets, 1 484 corresponding targets for colorectal cancer, and 98 targets for the intersection of the two. GO involve biological processes such as cell proliferation, apoptosis and so on. KEGG enrichment pathways involve cancer pathway, PI3K-Akt signaling pathway. Molecular docking results showed that isorhamnetin had a good affinity with TP53, AKT1, VEGFA. Isorhamnetin can inhibit proliferation of SW480 cell and and promote apoptosis compared with the group. Compared with the control group, isorhamnetin down-regulated the expression of AKT₁ and VEGFA ($P<0.01$) and up-regulated the expression of TP53 ($P<0.01$). **Conclusion** *E. rutaecarpa* can play a role in treatment of colorectal cancer through multi-component, multi-target and multi-pathway pathways, and isorhamnetin is the main active ingredient.

Key words: *Evodia rutaecarpa*; colorectal cancer; network pharmacology; isorhamnetin; proliferation; apoptosis

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一,死亡率位居世界第3位,且发病率逐年上升^[1]。目前,结直肠

癌的治疗方法主要包括手术、放疗、化疗等,已取得良好疗效,但仍存在化疗药物的毒副作用大、肿瘤

收稿日期: 2023-07-17

第一作者: 李若男(1997—),女,硕士研究生,主要研究方向为中药消化药理。E-mail: 1445331160@qq.com

*通信作者: 徐志立(1972—),博士,副教授,硕士生导师,主要研究方向为中药消化药理。E-mail: xu_zhili@126.com

细胞耐药等问题,故研发新型的结直肠癌治疗药物仍为临床研究热点^[2]。

结直肠癌属中医学“肠覃”“肠积”“积聚”“脏毒”“肠癖”范畴,中医认为恶性肿瘤是由身体阴阳失衡引起的,“邪气”强于“正气”发生癌变。传承千年的中医药文化,底蕴丰富,中医药治疗结直肠癌显示出巨大的优势。吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.、石虎 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang 或疏毛吴茱萸 *E. rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode) Huang 的干燥近成熟果实,多项研究证明,其具有镇痛、抗炎、抗菌、抗氧化、抗肿瘤等作用^[3-5]。异鼠李素为吴茱萸的抗肿瘤活性成分,研究发现异鼠李素可以抑制人肺癌细胞、肝癌细胞的增殖^[6-9],但对结直肠癌的报道较少,且机制不明,仍需进一步研究。

网络药理学可构建多基因、多靶点、多通路相互作用网络,已广泛用于中药作用与作用机制的研究^[10-11]。分子对接主要研究分子间相互作用,并预测结合模式,已成为计算机辅助药物研究领域的一项重要技术^[12-13]。网络药理学在阐明中药药效及作用机制方面具有整体的优势。研究表明,吴茱萸对结直肠癌有疗效^[14],但其潜在的靶点和相关机制尚未见系统报道。因此,本研究采用网络药理学结合实验的方法,探讨吴茱萸治疗结直肠癌的潜在靶点和分子机制,为吴茱萸的深入研究提供理论依据。

1 材料

1.1 实验细胞

人结直肠癌 SW480 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品、试剂与仪器

异鼠李素(批号:SI8280,质量分数 $\geq 98\%$,北京索莱宝科技有限公司);CCK-8检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0038);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(批号:21B042)、兔源丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1(AKT1)抗体(批号:WL01652)、兔源肿瘤蛋白 p53(TP53)抗体(批号:WL01919)、兔源血管内皮生长因子 A(VEGFA)抗体(批号:WL00009b)、兔源 β -actin 抗体(批号:WL01372)、HRP 标记的羊抗兔二抗(批号:L3012-2)均购自万类公司;Ti-S 型荧光倒置显微镜(日本尼康公司);MR-96A 酶标仪(深圳迈瑞公司);NU-4750E 型 CO₂ 培养箱(NUAIRE 公司);TG16-WS 台式高速离心机(湖南湘仪仪器公司);DIV-86L386 超低温冰箱(海尔公司)。

2 方法

2.1 吴茱萸治疗结直肠癌的网络药理学分析及分子对接

2.1.1 吴茱萸活性成分及相关靶点筛选 在 TCMSP 数据库(<https://tcmssp-e.com/>)设置“吴茱萸”为关键词检索吴茱萸的化学成分,同时选择口服生物利用度(OB)和类药性(DL)作为参数,设置 OB $\geq 30\%$ 、DL ≥ 0.18 ,筛选活性成分以及作用的靶蛋白,并在 Uniprot 数据库(<https://www.uniprot.org>)中设定物种来源“Homo Sapiens”,将靶蛋白校正为基因名称。

2.1.2 结直肠癌疾病相关靶点筛选 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org>) 和 TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)数据库,以“colorectal cancer”为关键词,获得结直肠癌疾病相关的靶点列表,删除重复值后,通过韦恩图得到吴茱萸活性成分与疾病的交集靶点。

2.1.3 吴茱萸-活性成分-结直肠癌靶点相互作用网络图绘制 利用 Cytoscape 软件 (Version 3.8.2, <http://www.cytoscape.org>) 绘制“吴茱萸-活性成分-结直肠癌靶点”网络关系图,并使用插件“CytoNCA”,根据拓扑参数:连接度(degree)值的中位数对网络的节点进行分析。

2.1.4 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析 将“2.1.2”项获得的交集靶点导入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>),设定“Homo sapiens”物种来源,构建 PPI 网络,筛选条件为 score > 0.7 ,通过 Cytoscape 3.8.2 软件进行网络拓扑分析,寻找核心靶点。

2.1.5 基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 将核心靶点导入 DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析,获取核心靶点的生物学信息,并分析吴茱萸治疗结直肠癌的可能作用机制。

2.1.6 分子对接验证 通过 PubChem 数据库下载核心成分二维结构的 SDF 格式文件并将其转换为 mol 格式,再通过 PDB 数据库下载核心靶点结构保存为 PDB 格式。运用 AutoDock Tools 工具对下载的靶蛋白受体和配体小分子进行去水、加氢,利用 PyMOL 软件对结果进行可视化处理。

2.2 异鼠李素对人结直肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡及相关蛋白表达的影响

2.2.1 细胞培养 RPMI 1640 培养基中加入 10% 胎牛血清、100 U $\cdot$ mL⁻¹ 青霉素和 0.1 mg $\cdot$ mL⁻¹ 链霉素,将 SW480 细胞以 5×10^6 个 $\cdot$ mL⁻¹ 接种于 T25 培养

瓶中,于37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下常规培养,实验均在细胞对数生长期进行。

2.2.2 CCK-8法检测细胞增殖能力 SW480细胞以 5×10^3 个·mL⁻¹的密度接种于96孔细胞培养板,每组6个复孔,空白组不含细胞只加培养基,对照组及给药组分别加入培养基稀释的不同浓度(0、3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000 μmol·L⁻¹)异鼠李素100 μL培养24 h,而后避光加入10 μL CCK-8溶液,2 h后用酶标仪在450 nm处测定吸光度(*A*)值,计算细胞增殖率。

$$\text{增殖率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将SW480细胞密度调整为 1×10^6 个·mL⁻¹接种于6孔板中,培养箱内培养24 h后进行给药干预,分为对照组(细胞加培养基)及低、中、高浓度(25、50、100 μmol·L⁻¹)异鼠李素组,给药24 h后按照说明书,每管加入500 μL的Binding Buffer轻轻悬浮细胞,加入5 μL的PI轻轻混匀,再加5 μL的Annexin V-FITC混匀避光室温反应15 min后,用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

2.2.4 Western blotting法检测核心蛋白的表达 将SW480细胞密度调整为 1×10^6 个·mL⁻¹接种于6孔板中,加入异鼠李素,分组及加药同“2.2.3”项,作用24 h后,蛋白裂解液低温裂解,15 000 r·min⁻¹离心15 min取上清,进行蛋白定量;SDS-PAGE电泳后转移至PVDF膜,用含5%脱脂奶粉的PBST溶液封闭2 h,分别加入1:500稀释的VEGFA、AKT₁、TP53、β-actin一抗,4℃孵育过夜;将膜与1:800稀释的山羊抗兔IgG二抗室温下孵育2 h,ECL发光剂曝光,显影,用Image J 6.0软件分析蛋白表达水平。

2.2.5 统计学方法 采用GraphPad Prism8软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学及分子对接结果

3.1.1 吴茱萸活性成分及对应靶点的获取 通过TCMSP数据库检索吴茱萸的活性成分,筛选获得活性成分30个,见表1。收集活性成分对应的靶点,剔除重复值后共获得174个靶点。

表1 吴茱萸活性成分

Table 1 Active components of *Evodia rutaecarpa*

MOLID	化合物	OB/%	DL
MOL003958	吴茱萸胺(evodiamine)	86.02	0.64
MOL004018	吴茱萸酰胺甲(goshuyuamide I)	83.19	0.39
MOL004014	吴茱萸碱(evodiamide)	73.77	0.28
MOL003963	羟基吴茱萸碱(hydroxyevodiamine)	72.11	0.71
MOL004019	吴茱萸酰胺乙(goshuyuamide II)	69.11	0.43
MOL003942	吴茱萸苦素(rutaevine)	66.05	0.58
MOL004021	gravacridoneshlorine	63.73	0.54
MOL004025	<i>N</i> -(2-methylaminobenzoyl)tryptamine	56.96	0.26
MOL004017	石杉碱乙(fordimine)	55.11	0.26
MOL000354	异鼠李素(isorhamnetin)	49.60	0.31
MOL003974	吴茱萸新碱(evocarpine)	48.66	0.36
MOL003950	1-methyl-2-[(<i>Z</i>)-undec-6-enyl]-4-quinolone	48.48	0.27
MOL003947	1-methyl-2-[(<i>Z</i>)-pentadec-10-enyl]-4-quinolone	48.45	0.46
MOL003972	1-methyl-2-nonyl-4-quinolone	48.42	0.20
MOL003964	1-methyl-2-undecyl-4-quinolone	47.59	0.27
MOL004004	6-OH-木犀草素(6-OH-Luteolin)	46.93	0.28
MOL000098	槲皮素(querctin)	46.43	0.28
MOL003975	icosa-11, 14, 17-trienoic acid methyl ester	44.81	0.23
MOL003957	1-methyl-2-pentadecyl-4-quinolone	44.52	0.46
MOL013352	黄柏酮(obacunone)	43.29	0.77
MOL003956	二氢吴茱萸次碱(dihydorutaecarpine)	42.27	0.60
MOL003943	rutalinidine	40.89	0.22
MOL002662	吴茱萸次碱(rutaecarpine)	40.30	0.60
MOL003994	24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol	38.00	0.75
MOL000358	β-谷甾醇(β-sitosterol)	36.91	0.75
MOL000359	谷甾醇(sitosterol)	36.91	0.75
MOL001454	小檗碱(berberine)	36.86	0.78
MOL004020	棉花素(gossypetin)	35.00	0.31
MOL004002	5α- <i>O</i> -(3'-Methylamino-3'-phenylpropionyl)nicotaxine	30.86	0.49

3.1.2 疾病相关的靶点及与药物活性成分交集靶点的获取 通过 GeneCards、OMIM 和 TTD 数据库汇总并去除重复值,共获得结直肠癌相关靶点 1 484 个,应用 Venn 2.1.0 绘制韦恩图,取活性成分靶点与疾病靶点的交集,得到吴茱萸活性成分与结直肠癌的交集靶点 98 个,见图 1。

3.1.3 吴茱萸-活性成分-结直肠癌靶点网络的构建 采用 Cytoscape 3.8.2 软件构建吴茱萸-活性成分-结直肠癌靶点网络关系图,依据度中心值、接近中心性(closeness centrality)、中介中心性(betweenness centrality)大于等于其中位数,平均最短路径长度(average shortest path length)小于等于其中位数的规则筛选核心成分,共获得 192 个节点,539 条边。连线代表节点间相互关系,连接的节

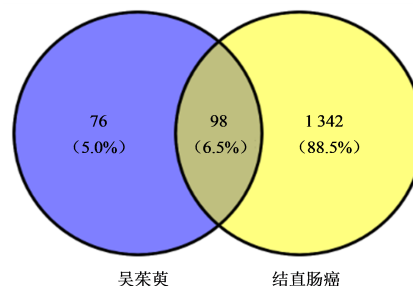


图1 成分靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of component target-disease target

点越密集,说明受该成分调控的靶点越多,结果显示异鼠李素(MOL000354)度值最大,可能是吴茱萸治疗结直肠癌的主要活性成分,并以此成分进行后续细胞实验验证,网络图见图2。

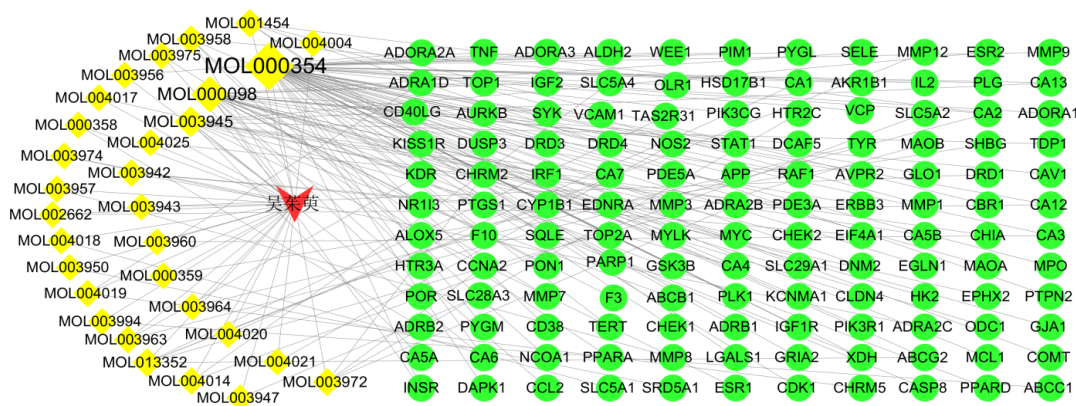


图2 吴茱萸-活性成分-结直肠癌靶点网络

Fig. 2 *E. rutaecarpa*-active components-CRC target network

3.1.4 PPI 网络分析 将交集靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件构建 PPI 网络,图中蛋白用节点表示,节点颜色和大小随度值的大小而改变,度值越大,节点越大且颜色越深,结果表明 TP53、AKT1、VEGFA 靶点蛋白度值排名靠前,为核心靶点,见图 3。

3.1.5 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 吴茱萸主要通过核、胞液和细胞质等细胞组分参与基因表达的正调控、细胞对氧化水平的应答、凋亡过程的调控等生物学过程,发挥蛋白质结合、DNA 结合、转录因子活性等分子功能,见图 4。使用微生信平台进行 KEGG 通路富集分析,设定 $P < 0.01$ 为阈值,按序选取前 20 条通路,主要富集在癌症通路、PI3K-AKT 和 Hepatitis B 等信号通路,见图 5。

3.1.6 分子对接 利用 Autodock 软件,将异鼠李素与 AKT1、TP53 和 VEGFA 进行分子对接验证,并用 PyMol 对结果进行可视化,见图 6。自由结合能量越小,两者结合的构象越稳定,故两者之间发生

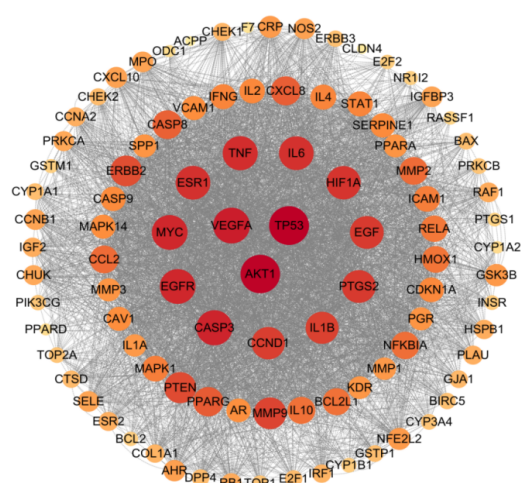


图3 吴茱萸治疗结直肠癌靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of targets of *E. rutaecarpa* in treating CRC

作用的可能性越好^[12-13],结果显示,异鼠李素与 AKT1、TP53 和 VEGFA 结合能均 $< -20.93 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

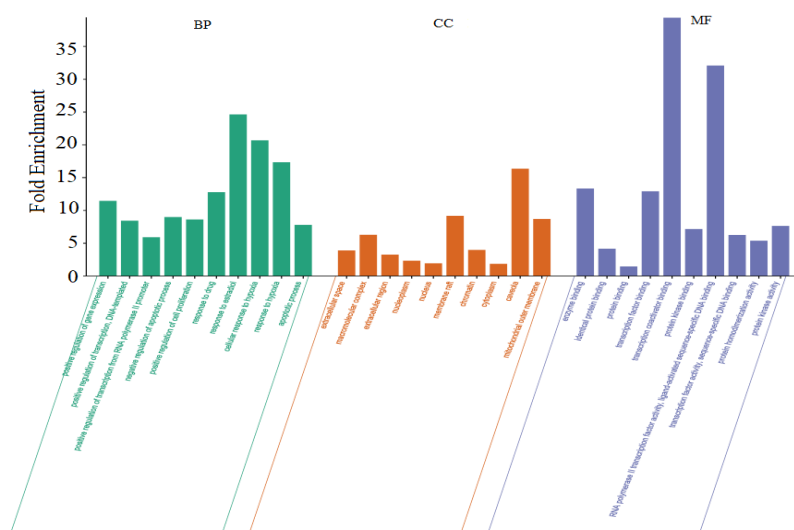


图4 GO功能富集分析
Fig. 4 GO function enrichment analysis

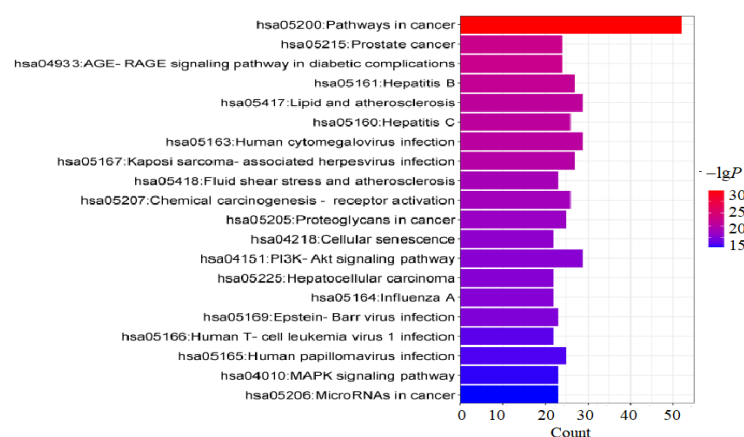


图5 KEGG通路富集分析
Fig. 5 KEGG pathway enrichment analysis

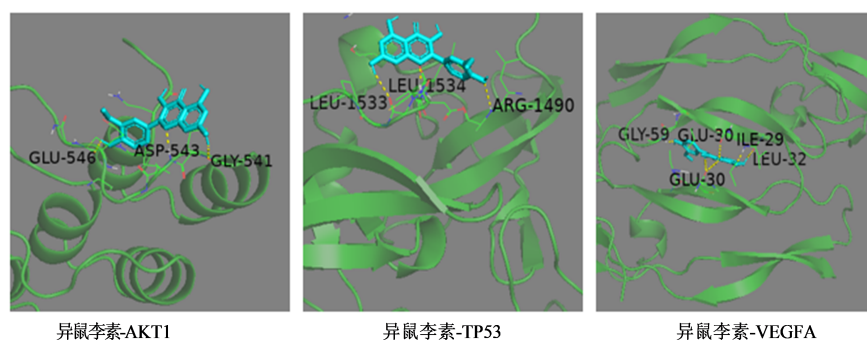


图6 核心成分与核心靶点的分子对接示意图
Fig. 6 Molecular docking diagram of core components and core targets

($-5.0 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$), 见表2。

3.2 异鼠李素对SW480细胞的影响

3.2.1 异鼠李素对SW480细胞存活率的影响 与对照组比较,异鼠李素抑制了SW480细胞的增殖,

差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图7。异鼠李素 $3.125 \sim 12.500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 对SW480细胞增殖抑制效果不明显,故本实验后续分别采用25、50、 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为异鼠李素的低、中、高浓

表2 核心成分与核心靶点的结合能

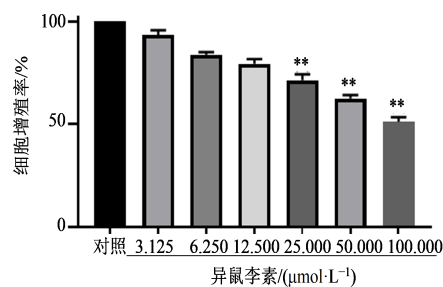
Table 2 Binding energy of core component and core target

核心靶点	PDB ID	核心成分	结合能/(kJ·mol ⁻¹)
TP53	6MXY	异鼠李素	-30.200
AKT1	5AAR	异鼠李素	-23.263
VEGFA	6ZFL	异鼠李素	-27.196

度进行体外细胞研究。

3.2.2 异鼠李素对 SW480 细胞凋亡的影响
Annexin V-FITC/PI 双染法结果显示,随着异鼠李素浓度的增加,其诱导 SW480 细胞凋亡的作用逐渐增强,与对照组比较差异具有统计学意义($P < 0.01$),见图8。

3.2.3 异鼠李素对 SW480 细胞 VEGFA、AKT1、TP53 蛋白表达的影响 Western blotting 结果显示,随着异鼠李素浓度的增加,AKT1、VEGFA 的蛋白

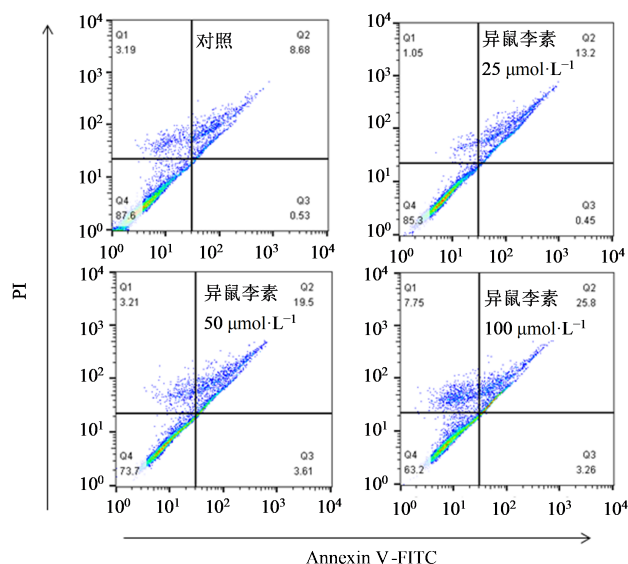


与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图7 异鼠李素对 SW480 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)Fig. 7 Effect of isorhamnetin on cell survival rate of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

表达水平下调, TP53 的蛋白表达水平上调, 各异鼠李素浓度组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 见图9。



与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

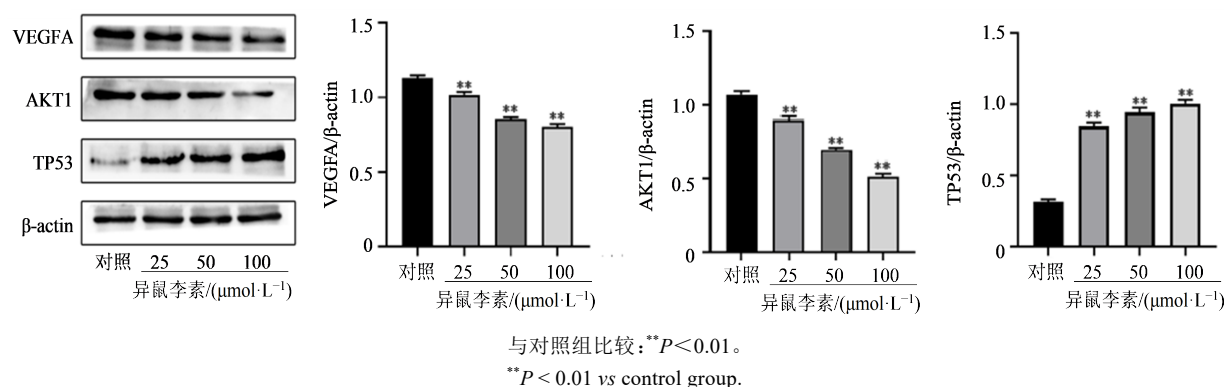
图8 异鼠李素对 SW480 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 8 Effects of isorhamnetin on apoptosis of SW480 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

本研究基于网络药理学构建吴茱萸-活性成分-结直肠癌靶点网络,从整体角度探讨吴茱萸治疗结直肠癌的机制。筛选出吴茱萸治疗结直肠癌的活性成分 30 个,靶点 98 个,表明吴茱萸治疗结直肠癌具有多组分-多靶点的特点。研究表明,异鼠李素具有抗炎、抗肿瘤和抗氧化等药理特性^[15],可以促进肿瘤细胞凋亡,还可以抑制血管生成,在胃癌、胰腺癌、胆囊癌、口腔磷癌中可抑制癌细胞增殖并诱导癌细胞凋亡^[6-9],上述研究结果与预测结果基本一

致,提示异鼠李素对结直肠癌具有治疗作用。

PPI 蛋白网络结果显示,吴茱萸治疗结直肠癌的核心靶基因有 TP53、AKT₁、VEGFA。TP53 是一种肿瘤抑制基因,基因突变后将失去抑制作用成为癌基因。研究表明,突变的 TP53 会促进结直肠癌患者肿瘤细胞的生长^[16],是细胞凋亡的关键基因。AKT₁(即 AKT)是 PI3K/AKT 信号通路中的核心靶点,参与肿瘤细胞的生长、增殖、凋亡及肿瘤耐药等^[17]。VEGFA 由内皮细胞及肿瘤等多种细胞分泌,是实体瘤生长过程中血管生成的关键调节因子,目

图 9 异鼠李素对 SW480 细胞核心蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 9 Effects of isorhamnetin on core protein expression of SW480 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

前,靶向 VEGFA 的治疗方法已经成为肿瘤学的创新性治疗方案。研究表明,VEGFA 促进肿瘤血管生成,在结直肠癌的治疗过程中至关重要^[18-19]。基于网络药理学分析的结果,通过 Western blotting 对核心蛋白进行验证,结果显示,与对照组比较,异鼠李素下调 AKT₁ 和 VEGFA 的表达水平,提示异鼠李素通过抑制 PI3K/AKT 信号通路和下调与血管生成相关的蛋白水平来抑制肿瘤细胞和肿瘤血管的生长,从而治疗结直肠癌;上调 TP53 的表达水平,提示异鼠李素在抑制 SW480 细胞凋亡过程中发挥重要作用。为探讨吴茱萸治疗结直肠癌的潜在作用机制,经 GO 和 KEGG 富集分析发现,这些潜在靶点参与细胞凋亡等过程,且与癌症通路、PI3K-AKT 等通路相关。分子对接结果显示,异鼠李素与 TP53、AKT₁ 和 VEGFA 结合力良好。基于此,通过体外实验进行验证,结果显示,异鼠李素通过抑制 SW480 细胞增殖,促进细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

本研究通过网络药理学探讨吴茱萸对结直肠癌的治疗作用及机制,发现吴茱萸可通过多成分-多靶点-多通路的途径治疗结直肠癌,并结合体外实验对筛选的主要成分和核心靶点进行细胞实验验证。但通过数据库筛选的有效成分会存在一定的误差,不能完全诠释药物的实际有效成分,故还需要通过超高效液相色谱-四级杆静电场轨道阱高分辨质谱联用分析吴茱萸的有效成分,以及结合后续的体内实验数据,为临床应用和科学研究提供更合理的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Rawla P, Sunkara T, Barsouk A. Epidemiology of

colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors [J]. *Prz Gastroenterol*, 2019, 14(2): 89-103.

[2] Blondy S, David V, Verdier M, et al. 5-Fluorouracil resistance mechanisms in colorectal cancer: From classical pathways to promising processes [J]. *Cancer Sci*, 2020, 111(9): 3142-3154.

[3] 中国药典[S]. 四部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.

[4] Matsuda H, Wu J X, Tanaka T, et al. Antinociceptive activities of 70% methanol extract of *Evodia fructus* (fruit of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and its alkaloidal components [J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(3): 243-248.

[5] 吕艳伟, 郭星娴, 周鹏, 等. 吴茱萸碱激活结肠癌细胞自噬抑制其增殖的研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(20): 4851-4856.

Lv Y W, Guo X X, Zhou P, et al. Evodiamine activates autophagy and inhibits the proliferation in colon cancer cell [J]. *Chin Tradit Herb Drug*, 2018, 49(20): 4851-4856.

[6] Manu K A, Shanmugam M K, Ramachandran L, et al. Isorhamnetin augments the anti-tumor effect of capecitabine through the negative regulation of NF-kappa B signaling cascade in gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2015, 363(1): 28-36.

[7] Wang J L, Quan Q H, Ji R F, et al. Isorhamnetin suppresses PANC-1 pancreatic cancer cell proliferation through S phase arrest [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 108: 925-933.

[8] Ruan Y, Hu K, Chen H. Autophagy inhibition enhances isorhamnetin induced mitochondria dependent apoptosis in nonsmall cell lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 5796-5806.

[9] Choi Y H. Isorhamnetin induces ROS-dependent cycle arrest at G₂/M phase and apoptosis in human

- hepatocarcinoma Hep3B cells [J]. Gen Physiol Biophys, 2019, 38(6): 473-484.
- [10] Yuan H D, Ma Q Q, Cui H Y, et al. How can synergism of traditional medicines benefit from network pharmacology? [J]. Molecules, 2017, 22(7): 1135.
- [11] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. «网络药理学评价方法指南»解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
- Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(14): 4119-4129.
- [12] Saikia S, Bordoloi M. Molecular docking: Challenges, advances and its use in drug discovery perspective [J]. Curr Drug Targets, 2019, 20(5): 501-521.
- [13] 汪祺, 李勇, 王亚丹, 等. 基于分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验综合考察何首乌中潜在肝毒性成分研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 635-640.
- Wang Q, Li Y, Wang Y D, et al. Investigation of potential hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* based on molecular docking and rat liver microsome inhibition test [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(4): 635-640.
- [14] 孔奕丹, 齐英, 崔娜, 等. 吴茱萸化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中医药信息, 2023, 40(5): 79-83, 89.
- Kong Y D, Qi Y, Cui N, et al. Research progress on modern chemical constituents and pharmacological effects of *Evodia rutaecarpa* [J]. Inf Tradit Chin Med, 2023, 40(5): 79-83, 89.
- [15] 肖颖, 余英才, 余雄英, 等. 异鼠李素和槲皮素抗氧化活性研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(5): 1118-1120.
- Xiao Y, Yu Yc, Yu X Y, et al. Study on the antioxidant activity of isorhamnetin and quercetin [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2012, 23(5): 1118-1120.
- [16] 左爱仁, 汪满红, 万春鹏, 等. 东方肉穗草异鼠李素诱导 HepG2 细胞凋亡研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(2): 427-428.
- Zuo A R, Wang M H, Wan C P, et al. Study on apoptosis of HepG2 cells induced by isorhamnetin from *Hedyotis orientalis* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2011, 22(2): 427-428.
- [17] Kanapathipillai M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer [J]. Cancers, 2018, 10(6): 154.
- [18] Martini M, de Santis M C, Braccini L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: An updated review [J]. Ann Med, 2014, 46(6): 372-383.
- [19] Unterleuthner D, Neuhold P, Schwarz K, et al. Cancer-associated fibroblast-derived WNT2 increases tumor angiogenesis in colon cancer [J]. Angiogenesis, 2020, 23(2): 159-177.

[责任编辑 刘东博]