

基于网络药理学探讨桃莲绞复方增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用分子机制

罗雪菲¹, 王 伟^{3#}, 赵晓芳¹, 运晨霞², 冯秋瑜⁴, 骆 飞², 高宏君¹, 兰太进^{2*}

1. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁 530011

2. 广西中医药大学基础医学院, 广西 南宁 530200

3. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530012

4. 广西中医药大学瑶医药学院, 广西 南宁 530200

摘 要: **目的** 采用网络药理学方法, 探讨桃莲绞复方(Tao-lian-jiao Formula, TLF)增强全成分肿瘤细胞疫苗(Vaccine)抗结直肠癌作用的分子机制。**方法** 观察 TLF 和全成分肿瘤细胞疫苗单用及联合使用对结肠癌 CT26 荷瘤小鼠体质量和肿瘤质量的影响, HE 染色观察肿瘤组织病理变化。通过中药成分数据库(TCMSP、TCMID), PharmMapper 数据库和 OMIM 数据库分别收集 TLF 化学成分, 成分相关靶点和免疫相关靶点, 对 TLF 调控免疫相关的靶点和通路进行预测分析。通过实时荧光定量 PCR、Western blotting 对预测结果进行实验验证。**结果** 与模型组比较, TLF 组对肿瘤生长无显著抑制作用, 反而表现出促进肿瘤生长的趋势, 抑制率-20.1%; Vaccine 组对肿瘤生长亦无显著抑制作用($P>0.05$), 但有抑制趋势, 抑制率 19.1%; 当 TLF 联合 Vaccine (TLF+Vaccine) 则能显著抑制肿瘤生长($P<0.05$), 抑制率达 51.4%。通过中药成分数据库共收集到 TLF 所含的 57 个化学成分, 对应 570 个靶点, 同时收集到免疫相关的 168 个靶点, 比找到 TLF 免疫调节的潜在作用靶点 4 个, 分子互作后得到 24 个关键靶点, 信号通路(pathway)和基因本体论(Gene Ontology, GO)生物学过程富集分析结果提示干扰素 γ 受体 1(interferon gamma receptor 1, IFNGR1)及下游的 JAK1/JAK2-STAT1 可能是 TLF 发挥免疫调控的关键通路。验证实验结果显示, 与 Vaccine 组比较, TLF+Vaccine 组肿瘤组织中 IFNGR1、磷酸化酪氨酸蛋白激酶-1(phosphorylation of Janus kinase 1, p-JAK1)、磷酸化酪氨酸蛋白激酶-2(phosphorylation of Janus kinase 2, p-JAK2)、磷酸化信号转导和转录激活因子 1(signal transducer and activator of transcription 1, p-STAT1)表达显著降低($P<0.05$), 与预测结果一致。**结论** TLF 可增强 Vaccine 的抗结直肠癌作用, 具有作为一种有效的肿瘤免疫治疗佐剂的潜力, 其作用机制可能与下调 IFNGR1 表达, 抑制 JAK1/JAK2-STAT1 信号通路活性有关。

关键词: 桃莲绞复方(TLF); 结直肠癌; 网络药理学; 全成分肿瘤细胞疫苗; IFNGR1-JAK1/JAK2-STAT1 信号通路

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)02-0459-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.02.020

Molecular mechanism of Tao-lian-jiao Formula (TLF) to enhance anti-colorectal tumor activity of whole tumor cell vaccine based on network pharmacology

LUO Xue-fei¹, WANG Wei³, ZHAO Xiao-fang¹, YUN Chen-xia², FENG Qiu-yu⁴, LUO Fei², GAO Hong-jun¹, LAN Tai-jin²

1. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China

2. School of Basic Medical Science, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

3. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530012, China

4. College of Yao Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China

收稿日期: 2020-05-25

基金项目: 广西中医药民族医药传承创新专项课题(GZLC16-26); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA238024); 广西区教育厅中青年教师基础能力提升项目(2017KY0320)

作者简介: 罗雪菲, 女, 硕士, 主治医师, 主要从事免疫相关科研、临床和教学工作。E-mail: fayluo@163.com。

*通信作者: 兰太进, 男, 副教授, 研究方向为中药免疫药理及中药产品开发研究。E-mail: lanbo130406@gmail.com。

#并列第一作者: 王 伟, 男, 副主任医师。E-mail: wangweizx@163.com。

Abstract: Objective To explore the molecular mechanism of Tao-lian-jiao Formula (TLF, 桃莲绞复方) in enhancing anti-colorectal tumor activity of whole tumor cell vaccine by using network pharmacology. **Methods** To observe the effects of TLF and whole tumor cell vaccine alone or in combination on the body weight and tumor weight of CT26-bearing mice, and the pathological changes of tumor tissues were detected by H&E staining. The chemical ingredients of TLF, ingredients related targets and immune related targets were collected from traditional Chinese medicine (TCM) databases (TCMSP, TCMID), PharmMapper database and OMIM database, respectively. The targets and pathways related with TLF for regulating immunity were predicted and analyzed. The predicted results were verified by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blotting. **Results** Compared with model group, TLF group had no significant inhibitory effect on tumor growth ($P > 0.05$), while showed a tendency to promote tumor growth, with an inhibition rate of -20.1%; Whole tumor cell vaccine group (Vaccine group) also had no significant inhibitory effect on tumor growth ($P > 0.05$), but there was a inhibition rate of 19.1%; And the combination of TLF and whole tumor cell vaccine (TLF + Vaccine group) could significantly inhibit tumor growth ($P < 0.05$), and the inhibition rate was 51.4%. Through the public databases, 57 ingredients of TLF which corresponding to 570 targets and 168 immune related targets were collected. After comparison, four potential targets of TLF regulating immunity were found, and 24 key targets were obtained after PPI interaction. Pathway signaling and GO biological processes enrichment analysis suggested that interferon gamma receptor 1 (IFNGR1) and its downstream JAK1/JAK2-STAT1 may be the key pathways for TLF to regulate immunity. Verification experiment results showed that the expressions of IFNGR1, phosphorylation of Janus kinase 1 (p-JAK1), phosphorylation of Janus kinase 2 (p-JAK2) and signal transducer and activator of transcription 1 (p-STAT1) in tumor tissue of TLF + Vaccine group were significantly lower than that of vaccine group ($P < 0.05$), which was consistent with the predicted results. **Conclusions** TLF can enhance the anti-colorectal tumor activity of whole tumor cell vaccine, and has the potential to be an effective adjuvant for tumor immunotherapy. Its mechanism may be related to down-regulating the expression of IFNGR1 and inhibiting the activity of JAK1/JAK2-STAT1 signaling pathway.

Key words: Tao-lian-jiao Formula (TLF); colorectal tumor; network pharmacology; whole tumor cell vaccine; IFNGR1-JAK1/JAK2-STAT1 pathway

全成分肿瘤细胞疫苗作为多价抗原, 因其丰富的肿瘤蛋白抗原而受到越来越多的关注。免疫系统可以针对全成分肿瘤细胞疫苗表达的多种肿瘤抗原同时产生免疫应答, 从而有效避免因肿瘤细胞异质性造成的部分肿瘤抗原丢失而引起的免疫治疗响应率低下问题^[1]。虽然全成分肿瘤细胞疫苗可以提供较好的肿瘤抗原来源, 但依然存在几乎所有免疫治疗均存在的共性问题, 即免疫原性较弱^[2]。佐剂是增强疫苗免疫原性的关键, 其赋予疫苗若干优势, 包括减少所需的抗原数量, 减少正常免疫反应所需的免疫次数, 以及诱导更快速、更广泛和更强的免疫反应^[3]。目前, 多种肿瘤免疫治疗佐剂在临床前期的动物实验研究中取得了较好的效果^[4]。基于该策略, 开发针对全成分肿瘤细胞疫苗的佐剂将为提高其免疫治疗效率和增强其抗肿瘤作用起到促进作用。

研究证实, 许多补益类中药如黄芪、人参、冬虫夏草等具有调节免疫功能, 在不同疫苗策略下能诱导机体产生细胞和体液免疫应答, 发挥着免疫佐剂活性, 可辅助增强抗肿瘤作用^[5-6]。随着对民族医药的发掘整理, 很多民族药被发现跟某些中药有着相同或相似的功效, 如壮药五指毛桃就俗称为“土黄芪”等。从民族药这个待开发的资源库中挖掘出

具有较好效果且作用机制明确的肿瘤免疫治疗佐剂值得深入探索和研究。

桃莲绞复方 (Tao-lian-jiao Formula, TLF) 源于广西壮族民间验方, 由五指毛桃、绞股蓝、旱墨莲、夏枯草 4 味壮药材组成, 其中五指毛桃、绞股蓝益气补血、健脾护胃为主药; 母药以旱莲草滋阴润燥、滋养龙路; 帮药夏枯草软坚散结以助主药之力。如此主母帮带配伍, 全方共奏提升正气, 调理“三道两路”之功, 可用于肿瘤患者免疫功能的提高。TLF 为壮族民间验方, 能否成为一种全成分肿瘤细胞疫苗佐剂尚待深入研究。为了科学探讨这个问题, 本研究采用动物实验并结合网络药理学方法, 探究 TLF 增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用的效果及其分子机制 (实验流程见图 1), 为其后续开发应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 TLF 增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌效果观察

1.1.1 材料与仪器

(1) 仪器: 7500 型实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems); Tanon-5200 型化学发光成像系统 (上海天能科技有限公司); PowerPac

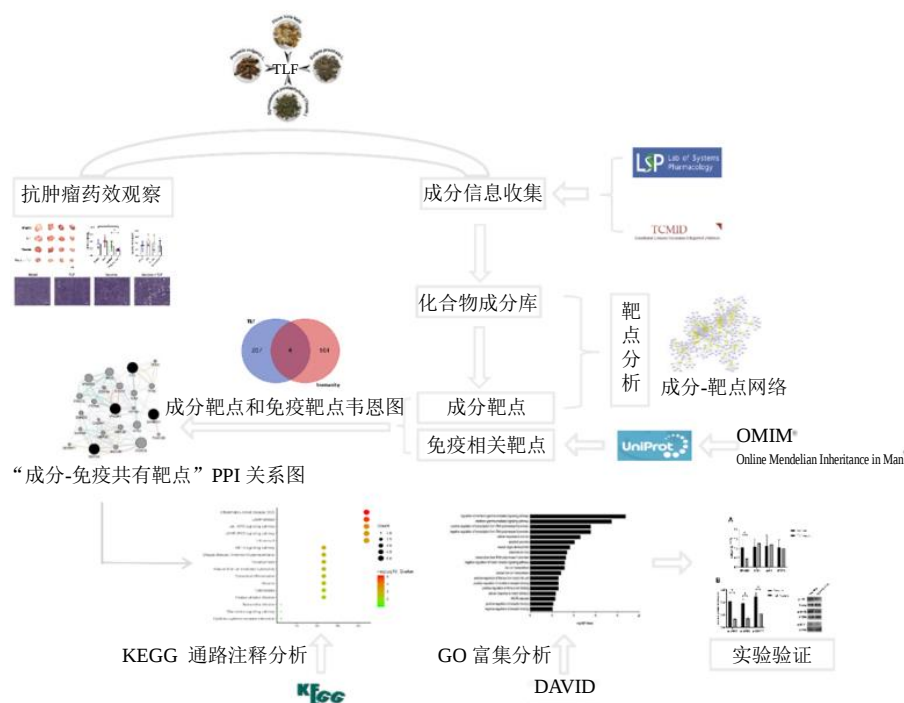


图 1 实验流程图

Fig. 1 Diagram of experiment

Universal 型通用电泳仪 (美国 Bio-Rad); SCQ-6201 型超声波清洗仪 (上海声彦超声波仪器有限公司); BSA224S 型分析天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); YRDC-0515 型低温恒温槽 (上海亚荣公司); DHG-9203A 型电热恒温干燥箱 (上海齐欣科学仪器有限公司); HWS-24 型水浴锅 (上海齐欣科学仪器有限公司); UPK-II-20L 型优普纯水制造机 (四川优普超纯科技有限公司); Centrifuge 5418 型台式离心机 (德国 Eppendorf); ST16R 型台式高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher)。

(2) 实验动物及细胞: BALB/c 雄性小鼠, SPF 级, 体质量 18~22 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(湘) 2019-0004; 小鼠 CT26 结肠癌细胞系, 购自南京凯基生物科技发展有限公司。所有动物实验遵循相关动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

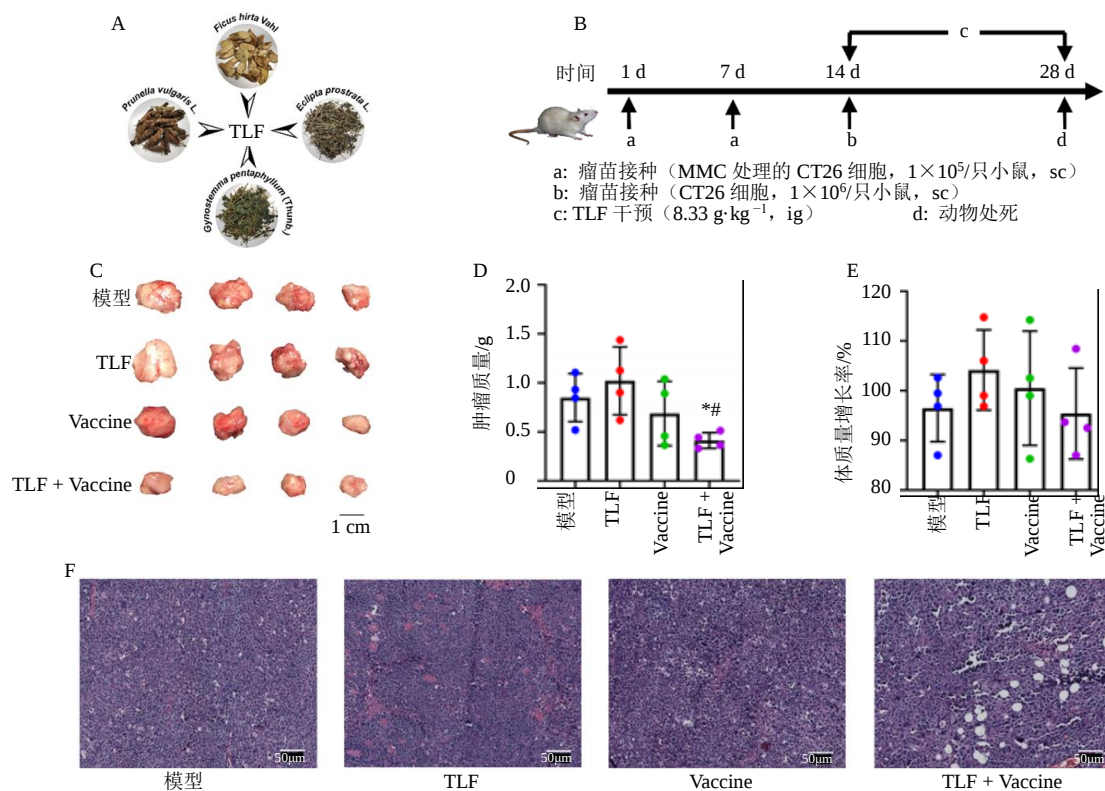
(3) 药物及试剂: 4 味药材均购自广西金秀药材市场, 由广西中医药大学中药鉴定教研室滕建北教授鉴定。五指毛桃经为桑科植物粗叶榕 *Ficus hirta* Vahl. 的干燥根, 墨旱莲为菊科植物鳢肠 *Eclipta prostrata* L. 的干燥地上部分, 绞股蓝为葫芦科植物绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 的干燥全草, 夏枯草为唇形科植物夏枯草 *Prunella*

vulgaris L. 的干燥果穗。丝裂霉素 C (MMC, 批号 A1400) 购自上海士锋生物科技有限公司; 总 RNA 试剂盒 (批号 EK0411)、Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (EK0411)、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版 (批号 EK0411) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; p-JAK1 Rabbit mAb (批号 74129)、p-STAT1 Rabbit mAb (批号 9167)、p-JAK2 Rabbit mAb (批号 3771)、 β -Actin Rabbit mAb (批号 4970)、Goat anti-rabbit IgG-HRP (批号 7074)、Signal Fire™ ECL Reagent (批号 6883) 购自美国 CST 公司; 其余试剂均为分析纯。

1.1.2 TLF 的制备及剂量设置 称取五指毛桃、墨旱莲、绞股蓝、夏枯草 (图 2-A) 适量, 加 10 倍量水, 室温浸泡 0.5 h, 武火煮沸后文火继续煎煮 1 h, 提取 3 次, 合并 3 次滤液, 得到 TLF 药液, 减压浓缩至每克浸膏生药量 2.0 g, 置 4 °C 冰箱保存待用。

TLF 临床每日给药剂量为 50 g 生药 (按成人体质量 60 kg 计算), 即 0.833 g 生药/kg。根据体表面积折算动物等效剂量^[7], 设定小鼠给药量为临床日用剂量 (0.833 g 生药/kg) 的 10 倍, 即 8.33 g 生药/kg。实验时用蒸馏水配制成所需浓度药液供动物 ig 给药, ig 容积为 20 mL/kg。

1.1.3 CT26 全成分肿瘤细胞疫苗的制备 取对数



sc-皮下注射 ig-灌胃 MMC-丝裂霉素 C 与模型组比较: * $P < 0.05$; 与 Vaccine 组比较: # $P < 0.05$

sc-subcutaneous injection ig-gavage MMC-mitomycin C * $P < 0.05$ vs model group; # $P < 0.05$ vs Vaccine group

图 2 TLF 药物组成 (A), 瘤苗接种、动物模型制备、给药处理过程 (B) 以及 TLF 对预防性接种全成分肿瘤细胞疫苗的荷瘤小鼠肿瘤大小 (C)、肿瘤质量 (D)、体质量增长率 (E) 和肿瘤组织病理改变 (F) 的影响

Fig. 2 TLF composition (A), whole tumor cell vaccine inoculation, animal model preparation, drug administration process (B), and TLF effect on tumor size (C), tumor weight (D), growth rate of body weight (E) and tumor histopathological changes (F) of tumor-bearing mice inoculated with whole tumor cell vaccine

生长期的 CT26 细胞, 加入 MMC 至质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, PBS 洗 3 遍, 计数后调整细胞浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。

1.1.4 荷瘤小鼠动物模型制备、给药处理及指标检测 将 16 只小鼠随机分为 4 组, 每组 4 只, 分别为模型组、TLF 组、全成分肿瘤细胞疫苗 (Vaccine) 组、TLF 联合全成分肿瘤细胞疫苗 (TLF + Vaccine) 组。将 MMC 处理的 CT26 细胞注射到不同组小鼠右前肢后方皮下 ($1 \times 10^5/\text{只}$), 进行全成分肿瘤细胞疫苗接种, 共接种 2 次, 2 次接种间隔 7 d。第 2 次全成分肿瘤细胞疫苗接种 7 d 后, 所有小鼠左前肢腋下均 sc 处于对数生长期的 CT26 细胞 ($1 \times 10^6/\text{只}$), 建立荷瘤小鼠模型。模型建立后, TLF 组和 TLF + Vaccine 组给予 TLF, 8.33 g 生药/kg, 连续 14 d。末次给药后 1 h, 称定小鼠体质量并通过公式计算体

量增长率, 异氟烷麻醉小鼠后迅速取出肿瘤组织称定质量, 然后将其分成 2 部分, 一部分经甲醛固定后进行 HE 染色用于病理学观察, 余下部分经液氮速冻后用于相关基因和蛋白分子表达情况的检测, 通过公式计算体质量增长率。造模及给药过程见图 2-B。

体质量增长率 = (给药后体质量 - 给药前体质量) / 给药前体质量

1.2 网络药理学分析

1.2.1 网络药理学相关数据库及软件 TCMID 数据库 (<http://www.megabionet.org/tcmid/>); PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>); TCMSP 数据库 (<http://tcmispw.com/tcmisp.php>); Pharmmapper 数据库 (<http://lilab-ecust.cn/pharmmapper/>); Pubmed 基因数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>); OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>); DAVID 数

数据库 (<https://david.ncicrf.gov/>); Cytoscape3.7.1 软件; Microsoft Excel 2010 软件。

1.2.2 TLF 化学成分的收集 将 TLF 的五指毛桃、绞股蓝、墨旱莲、夏枯草 4 味药材分别录入 TCMID 数据库和 TCMSP 数据库收集 TLF 的主要化学成分,以类药性 (drug-like, DL) 值 ≥ 0.17 为化学成分筛选标准。另外,“补骨脂素 (Psoralen)” DL 值为 0.10,因其含量较高,且作为药材五指毛桃含量测定成分,同时亦具有多种药理作用,故在筛选 TLF 化学成分时将其纳入分析。

1.2.3 TLF 组成成分-靶点关系网络的构建 将 TLF 所含化学成分 Smile 数据输入 PharmMapper 数据库进行数据挖掘,获得与 TLF 各成分直接相关的靶点,通过 Cytoscape 构建成分-靶点关系网络。

1.2.4 免疫相关靶点收集 以“Immunity”为关键词,在 OMIM 数据库 (<http://omim.org/>) 检索得到免疫相关靶点,通过 Cytoscape 构建免疫相关靶点网络。

1.2.5 TLF 与免疫共有靶点的筛查 对比 TLF 相关靶点与免疫相关靶点发现二者共有靶点,即是 TLF 增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用的可能靶点。

1.2.6 共有靶点 PPI 互作网络分析 将 TLF 和免疫共有靶点导入 Cytoscape,应用插件 GeneMANIA 进行共有靶点 PPI 互作网络分析。

1.2.7 共有靶点互作网络的信号通路 (Pathway) 和基因本体论 (Gene Ontology, GO) 生物学过程富集 通过 DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) 对 TLF 与免疫共有靶点互作网络进行 Pathway 和 GO 生物学过程富集分析。

1.3 实验验证

1.3.1 材料 实验用仪器和试剂见“1.1.1”项。

1.3.2 IFNGR1、JAK1、JAK2 和 STAT1 mRNA 表达水平的检测 各组肿瘤组织匀浆,采用总 RNA 提取试剂盒提取得到肿瘤匀浆组织总 RNA, Fast Quant cDNA 第一链合成试剂盒对总 RNA 进行反转录得到 cDNA,配制反应体系: $2 \times$ SuperReal PreMix Plus 10 μ L, β -actin/IFNGR1/JAK1/JAK2/STAT1 正向引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, β -actin/IFNGR1/JAK1/JAK2/STAT1 反向引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ L, cDNA 模板 1 μ L, $50 \times$ RO $\times$ Reference Dye 1 μ L, RNase-free ddH₂O 6.8 μ L。将反应体系置于荧光定量 PCR 仪中进行扩增,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 分析方法,每个标本重复 3 次, C_t 值取平均值, IFNGR1、JAK1、JAK2、STAT1 为目的基因, β -actin 为内参基因, Vaccine

组作为对照组, ΔC_t 值 = 目的基因 C_t 值 - 内参基因 C_t 值, $\Delta\Delta C_t$ 值 = TLF + Vaccine 组 ΔC_t 值 - Vaccine 组 ΔC_t 平均值。以 Vaccine 组目的基因表达量为 1, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 即为 TLF + Vaccine 组相对 Vaccine 组目的基因表达的倍数。所用引物见表 1。

表 1 RT-PCR 引物信息

Table 1 Primer sequences of real-time RT-PCR

引物	引物序列 (5'→3')
β -actin-F	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
β -actin-R	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
IFNGR1-F	GACTGATTCTGCACCAACATT
IFNGR1-R	TTTACCACAGAGAGCAAGGACT
JAK1-F	ACAGTGACACGGCTTGTGAA
JAK1-R	TGGCTTGGGAGAGAAGGATTTG
JAK2-F	GGTTCATTACAGCAGTTCAGTC
JAK2-R	GCAGGGTCTCCAGGTTTATG
STAT1-F	GCTGGGCGTCTATCCTGTGGT
STAT1-R	GCTCAGCTGGTCTGCGTTCA

1.3.3 p-JAK1、p-JAK2 和 p-STAT1 蛋白表达水平的检测 Western blotting 检测肿瘤组织中 p-JAK1、p-JAK2 和 p-STAT1 的表达。肿瘤样品在液氮中研磨,裂解缓冲液中溶解,辅以磷酸酶和蛋白酶抑制剂。用 BCA 蛋白检测试剂盒定量测定蛋白浓度。蛋白质样品 (30 μ g) 在 10% SDS-polyacrylamide 凝胶电泳分离,然后转移到 PVDF 膜。5%脱脂乳封闭膜 1 h, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,抗 p-JAK1 (1:500)、p-JAK2 (1:500) 和 p-STAT1 (1:500) 抗体。冲洗后,用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (1:500) 在室温下孵育 1 h,使用 Tanon-5200 型化学发光成像系统进行化学发光观察,拍照。

1.4 统计学分析

实验数据使用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA),组间的两两比较,方差齐性用 LSD 检验,方差不齐用 Tamhane's T2 检验,使用 GraphPad Prism 7.0 绘制统计结果图, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 TLF 增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用

与模型组比较, TLF + Vaccine 组能显著抑制肿瘤生长 ($P < 0.05$, 图 2-C、D), 肿瘤抑制率达 51.4%, 而 TLF 组和 Vaccine 组对肿瘤生长均无显著抑制作用 ($P > 0.05$, 图 2-C、D), 肿瘤抑制率分别为 -20.1% 和 19.1%。从肿瘤抑制率结果可以看出,单独采用 TLF

不仅不能抑制肿瘤生长,反而有促进生长的趋势;而单独采用全成分肿瘤细胞疫苗虽然具有抑制肿瘤生长的趋势,但作用不强。体质量增长率指标显示,各组小鼠体质量增长无显著差异 ($P>0.05$, 图 2-E)。上述结果表明,TLF 可增强全成分肿瘤细胞疫苗的抗结直肠癌作用,其作用机制可能与免疫调节相关。

石蜡切片染色结果(图 2-F)显示,模型组和 TLF 组肿瘤细胞排列致密,未见细胞变形,形态呈球形,体积不等,弥散,染色深。Vaccine 组部分肿瘤细胞体积缩小,细胞核染色较浅,观察到有坏死细胞,肿瘤细胞生长受到一定的抑制。TLF+Vaccine 组肿瘤细胞坏死大、核碎裂、核固缩,说明细胞生长受到严重抑制。石蜡切片染色的病理观察结果与肿瘤质量比较结果一致。

2.2 网络药理学分析

2.2.1 TLF 免疫调节靶点预测结果 从 TCMSP、TCMID 数据库中收集到 TLF 所含主要化学成分 57 个(表 2),其中五指毛桃 15 个、墨旱莲 16 个、夏枯草 13 个、绞股蓝 13 个、墨旱莲与五指毛桃共有成分 2 个,墨旱莲与夏枯草共有成分 2 个,绞股蓝与夏枯草共有成分 1 个,3 味药材共有化学成分 1 个(图 3-A);从 PharmMapper 数据库中收集到 50 个成分对应靶点 570 个(图 3-B);通过 OMIM 数据库收集到 168 个与免疫相关靶点(图 3-C);将收集到的 TLF 相关靶点与免疫相关靶点进行比对,筛选出 4 个 TLF 发挥免疫调节作用的潜在作用靶点(图 3-D)。

2.2.2 Pathway 和 GO 生物学过程富集分析结果 使用 Cytoscape 插件 GeneMANIA 对共有靶点进行

表 2 TLF 中四味药材所含化学成分信息

Table 2 Detailed information of ingredients among four herbal medicines in TLF

编号	成分	DL 值	药材
1	panaxadiol	DL0.79	<i>Eclipta prostrata</i> L.
2	luteolin-7-O-glucoside	DL0.78	<i>E. prostrata</i> L.
3	hyperoside	DL0.77	<i>Prunella vulgaris</i> L.
4	ginsenoside rb1	DL0.77	<i>Gynostemma pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
5	urs-12-en-3beta-ol	DL0.76	<i>P. vulgaris</i> L.
6	methyl betulinate	DL0.76	<i>P. vulgaris</i> L.
7	beta-amyrin	DL0.76	<i>P. vulgaris</i> L.
8	alpha-spinasterol	DL0.76	<i>P. vulgaris</i> L.
9	stigmasterol	DL0.76	<i>E. prostrata</i> L.
10	oleanolic acid	DL0.76	<i>E. prostrata</i> L.
11	beta-amyrin	DL0.76	<i>E. prostrata</i> L.
12	alpha-amyrin	DL0.76	<i>E. prostrata</i> L.
13	ursolic acid	DL0.75	<i>E. prostrata</i> L.
14	beta-sitosterol	DL0.75	<i>E. prostrata</i> L.
15	ursolic acid	DL0.75	<i>P. vulgaris</i> L.
16	beta-sitosterol	DL0.75	<i>Ficus hirta</i> Vahl
17	gypsogenin	DL0.75	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
18	astragaln	DL0.74	<i>F. hirta</i> Vahl
19	quercitrin	DL0.74	<i>E. prostrata</i> L.
20	echinocystic acid	DL0.74	<i>E. prostrata</i> L.
21	14alpha-methyl-5alpha-ergosta-9(11)-en-3beta-ol	DL0.73	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
22	methyl maslinate	DL0.72	<i>P. vulgaris</i> L.
23	vitexin	DL0.71	<i>F. hirta</i> Vahl
24	cyclobuxine-d	DL0.70	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
25	rutin	DL0.68	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
26	rutin	DL0.68	<i>P. vulgaris</i> L.

续表 2

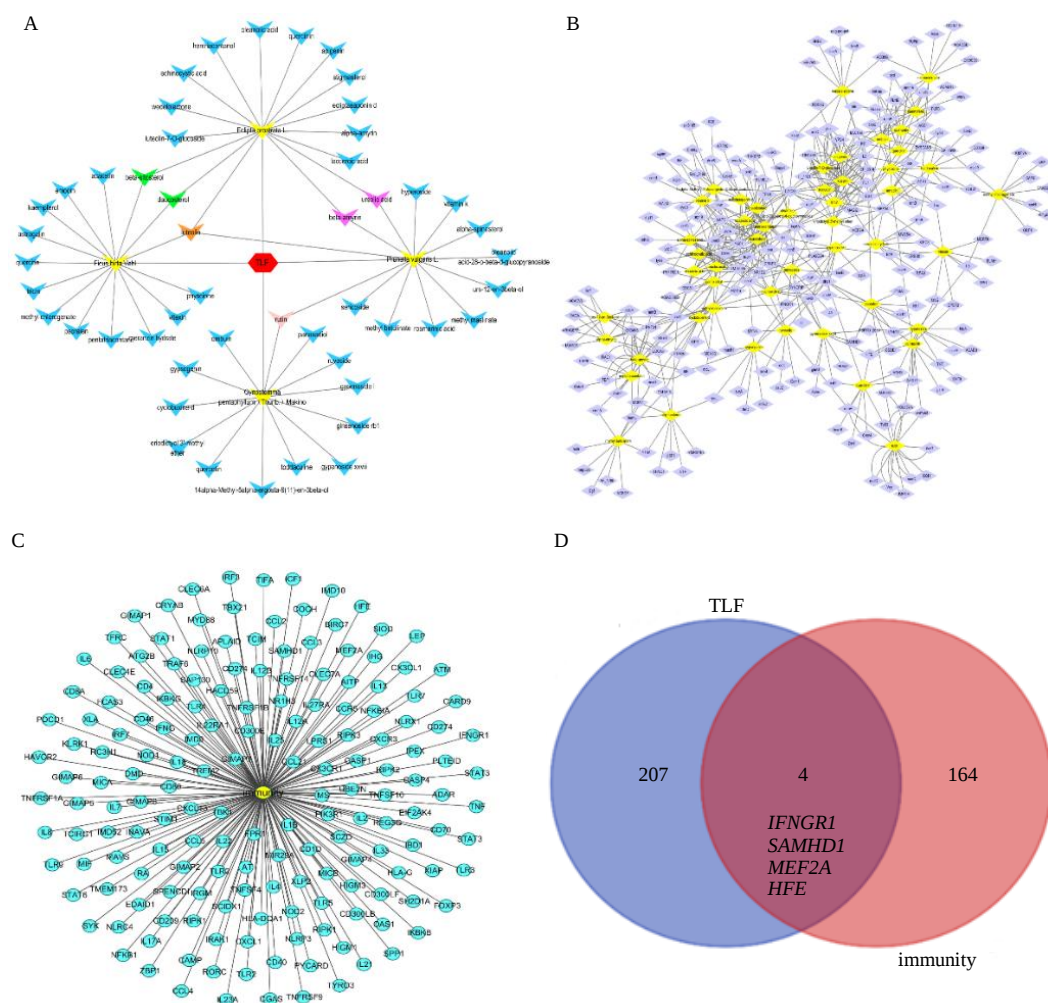
编号	成分	DL 值	药材
27	vitamin k	DL0.66	<i>P. vulgaris</i> L.
28	daucosterol	DL0.63	<i>E. prostrata</i> L.
29	daucosterol	DL0.63	<i>F. hirta</i> Vahl
30	ruvoside	DL0.63	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
31	lacceroic acid	DL0.49	<i>E. prostrata</i> L.
32	wedelolactone	DL0.48	<i>E. prostrata</i> L.
33	hentriacontanol	DL0.46	<i>E. prostrata</i> L.
34	pentatriacontane	DL0.42	<i>F. hirta</i> Vahl
35	oleanolic acid-28-O-beta-D-glucopyranoside	DL0.41	<i>P. vulgaris</i> L.
36	methyl chlorogenate	DL0.36	<i>F. hirta</i> Vahl
37	sericoside	DL0.35	<i>P. vulgaris</i> L.
38	rosmarinic acid	DL0.35	<i>P. vulgaris</i> L.
39	tricin	DL0.34	<i>F. hirta</i> Vahl
40	ecliptasaponin d	DL0.34	<i>E. prostrata</i> L.
41	ombuin	DL0.34	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
42	quercetin	DL0.28	<i>F. hirta</i> Vahl
43	quercetin	DL0.28	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
44	physcione	DL0.27	<i>F. hirta</i> Vahl
45	eriodictyol 3'-methyl ether	DL0.27	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
46	luteolin	DL0.25	<i>E. prostrata</i> L.
47	luteolin	DL0.25	<i>F. hirta</i> Vahl
48	luteolin	DL0.25	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
49	gypenoside xxviii	DL0.25	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
50	kaempferol	DL0.24	<i>F. hirta</i> Vahl
51	emodin	DL0.24	<i>F. hirta</i> Vahl
52	acacetin	DL0.24	<i>F. hirta</i> Vahl
53	gypenoside l	DL0.22	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
54	apigenin	DL0.21	<i>E. prostrata</i> L.
55	meranzin hydrate	DL0.17	<i>F. hirta</i> Vahl
56	toddaculine	DL0.17	<i>G. pentaphyllum</i> (Thunb.) Makino
57	psoralen	DL0.10	<i>F. hirta</i> Vahl

互相作用分析, 构建包含 24 个靶点的互作网络(图 4-A)。通过 DAVID 数据库, 对互作网络进行 Pathway 信号通路富集, 预测得到 16 条通路(图 4-B), 其中前 3 条分别为 inflammatory bowel disease (IBD)、leishmaniasis、JAK-STAT signaling pathway。GO 生物学过程富集, 预测得到 19 个生物学过程(图 4-C), 其中前 3 个分别为 regulation of interferon-gamma-mediated signaling pathway、interferon-gamma-mediated signaling pathway、positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter。分析

结果提示, TLF 可能通过 IFNGR1-JAK1/JAK2-STAT1 信号通路发挥免疫调节作用, 从而增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结肠直肠癌作用。

2.3 实验验证结果

根据网络药理学的预测结果, 对 IFNGR1、JAK1、JAK2、STAT1 的 mRNA 表达水平进行了检测。PCR 结果显示, 与 Vaccine 组比较, TLF+Vaccine 组的 IFNGR1 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$, 图 5-A); 两组 JAK1、JAK2 和 STAT1 mRNA 表达水平不具有显著性差异(图 5-A)。



A-药材-化学成分网络图，图中黄色圆形节点为药材（4 味），蓝色六边形节点表示成分（50 个），其中绿色部分表示墨旱莲与五指毛桃共有成分，紫色部分表示墨旱莲与夏枯草共有成分，粉色部分表示绞股蓝与夏枯草共有成分，黄色部分表示墨旱莲、五指毛桃与夏枯草共有成分 B-成分-靶点网络图，图中黄色菱形节点表示成分（50 个），蓝色菱形节点表示成分对应的靶点（570 个） C-免疫相关靶点网络图，图中蓝色节点表示免疫相关靶点（168 个） D-成分相关靶点（蓝色圆圈）与免疫相关靶点（红色圆圈）的韦恩图，共有靶点 4 个

A-Herbs-ingredients network, the yellow circle nodes represent herbs (4), and the blue hexagon nodes are ingredients (50). Among these ingredients, the green parts are the common ingredients of *Eclipta prostrata* L. and *Ficus hirta* Vahl, the purple parts are the common ingredients of *Eclipta prostrata* L. and *Prunella vulgaris* L., the pink parts are the common ingredients of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino and *Prunella vulgaris* L., and the yellow parts are the common ingredients of *Eclipta prostrata* L., *Ficus hirta* Vahl and *Prunella vulgaris* L. B-Ingredients-targets network, the yellow diamond nodes represent ingredients (50), and the blue diamond nodes (570) represent targets corresponded to the ingredients C-Immunity-targets network, the blue node represents immunity related targets (168) D-Venn diagram of ingredient-target (blue circle) and immunity-targets (red circle), with four common targets

图 3 TLF 免疫调节靶点预测
Fig. 3 TLF immunomodulatory targets prediction

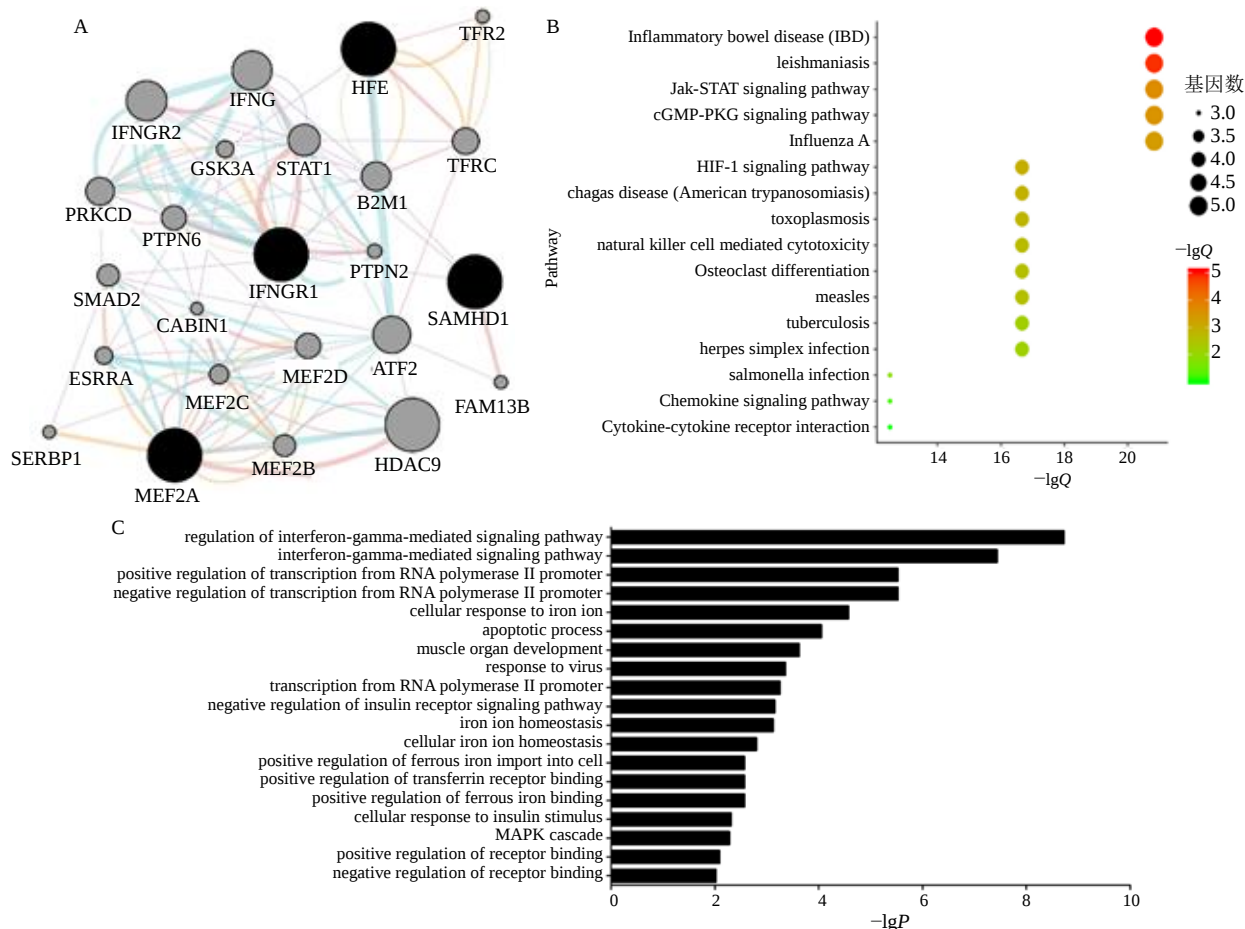
根据 PCR 实验结果，得到具有显著性变化的基因 *IFNGR1*，而 *IFNGR1* 可通过磷酸化 JAK1/JAK2-STAT1 信号通路发挥作用。因此，采用 Western blotting 方法对磷酸化蛋白 p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1 进行了检测。结果显示，与 Vaccine 组比较，TLF+Vaccine 组 p-JAK1、p-JAK2、p-STAT1

蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ ，图 5-B)。

实验验证结果与网络药理学预测结果一致。

3 讨论

本研究以 CT26 结肠癌荷瘤小鼠为模型，考察了 TLF 单用和联合全成分肿瘤细胞疫苗对肿瘤生长的影响。结果显示，TLF 单独使用无抗肿瘤作用，

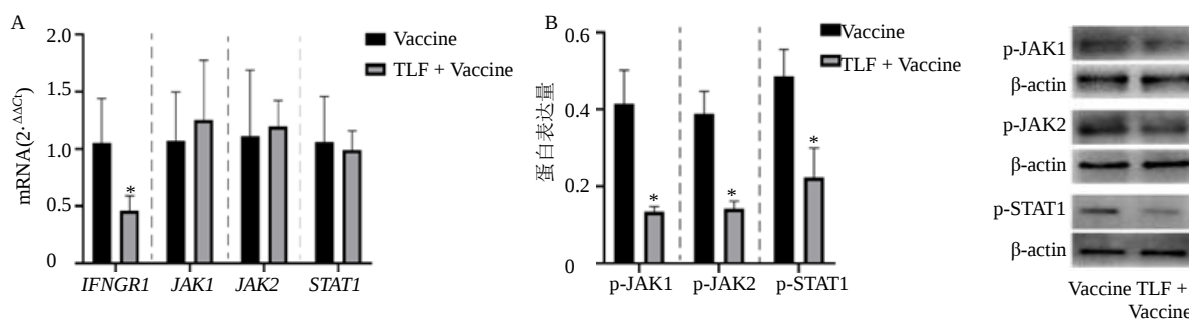


A-共有靶点 PPI 交互网络图，图中黑色节点为 TLF 与免疫共有靶点，灰色节点为与共有靶点的相关靶点 B-Pathway 信号通路与其 $-\lg Q$ 关系图 C-GO 生物学过程与其 $-\lg P$ 关系图

A-Protein-protein interaction (PPI) network within the common targets, the black nodes are common targets between ingredients-targets and immunity-targets, and the gray nodes are the targets related to the common targets B-The relationship between pathways and their $-\lg Q$ C-The relationship between of GO biological process and their $-\lg P$

图 4 Pathway 信号通路和 GO 生物学过程富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of pathway signaling and GO biological processes



A-*IFNGR1*、*JAK1*、*JAK2*、*STAT1* mRNA 表达水平的检测 B-p-JAK1、p-JAK2 和 p-STAT1 蛋白表达水平的检测，与 Vaccine 组比较：* $P < 0.05$ A-*IFNGR1*、*JAK1*、*JAK2* and *STAT1* mRNA expression levels among different groups B-p-JAK1, p-JAK2 and p-STAT1 protein expression levels among different groups, * $P < 0.05$ vs Vaccine group

图 5 实验验证

Fig. 5 Experimental verification

相反还有促进肿瘤生长的趋势；全成分肿瘤细胞疫苗虽然能一定程度上延迟模型小鼠的肿瘤生长，但作用强度较弱。而当 TLF 和全成分肿瘤细胞疫苗联合使用时，模型小鼠肿瘤生长受到了显著抑制。结果表明，TLF 可增强全成分肿瘤细胞疫苗的抗结直肠癌作用，有潜力作为一种有效的肿瘤免疫治疗佐剂。

为考察 TLF 作为佐剂的分子机制，本研究引入了网络药理学方法，并结合现代分子生物学技术，初步确定，TLF 可能是通过 IFNGR1-JAK1/JAK2-STAT1 信号通路发挥免疫调节作用，从而增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用。IFNGR1 是一种膜分子，为 IFN- γ 的受体，定位于 6 号染色体，几乎表达于所有细胞表面^[8]。JAK1 和 JAK2 均

为 JAK 家族成员，属酪氨酸激酶蛋白，对 II 型干扰素（IFN- γ ）传递信号起着重要作用^[9]。当 IFN- γ 与 IFNGR1 结合后，下游信号组件 JAK1 和 JAK2 相继发生磷酸化，继而导致 STAT1 活化形成复合物，诱导多种免疫分子的表达，如程序性死亡配体 1（programmed death ligand-1, PD-L1）^[10]。PD-L1 是 PD-1 免疫抑制检查点的配体，是肿瘤诱导免疫耐受的主要原因^[11]。在全成分肿瘤细胞疫苗激活免疫应答的情况下，TLF 能通过降低 IFNGR1 表达，抑制 JAK1/JAK2-STAT1 信号通路活性，减少免疫抑制检查点配体 PD-L1 的表达（图 6），从而促进细胞毒性 T 淋巴细胞（cytotoxic T cell, CTL）对肿瘤细胞的清除。

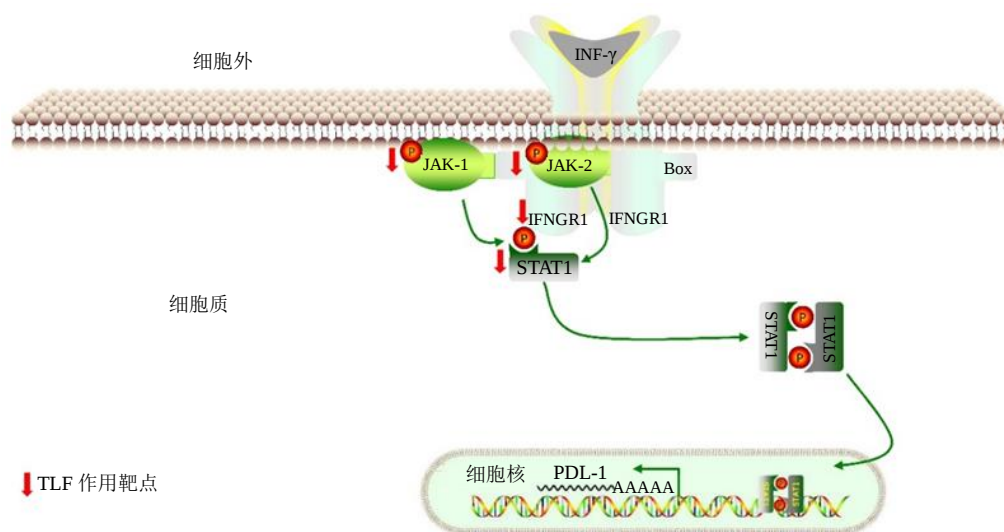


图 6 TLF 增强全成分肿瘤细胞疫苗抗结直肠癌作用的分子机制

Fig. 6 Molecular mechanism of TLF in enhancing anti-colorectal tumor activity of whole tumor cell vaccine

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Keenan B P, Jaffee E M. Whole cell vaccines: Past progress and future strategies [J]. *Semin Oncol*, 2012, 39(3): 276-286.
- [2] Tian H W, Shi G, Yang G Y, et al. Cellular immunotherapy using irradiated lung cancer cell vaccine co-expressing GM-CSF and IL-18 can induce significant antitumor effects [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 48.
- [3] Chang W T, Lai T H, Chyan Y J, et al. Specific medicinal plant polysaccharides effectively enhance the potency of a DC-based vaccine against mouse mammary tumor metastasis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0122374.
- [4] 钱颖, 钱晨, 白晓庆, 等. 免疫佐剂在肿瘤免疫疗法中的应用进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2020, 40(3): 96-103.
- [5] 朱喆, 蔡泓志, 李映波. 中草药提取物作为疫苗佐剂的

研究进展 [J]. *医学研究杂志*, 2018, 47(5): 7-10.

- [6] 芮冉, 焦佩娟, 张朝玉, 等. 提高机体抗肿瘤免疫中药的现代研究 [J]. *吉林中医药*, 2018, 38(3): 325-327.
- [7] Nair A B, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2): 27-31.
- [8] Castro F, Cardoso A P, Gonçalves R M, et al. Interferon-Gamma at the crossroads of tumor immune surveillance or evasion [J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 847.
- [9] Pencik J, Pham H T, Schmoeller J, et al. JAK-STAT signaling in cancer: From cytokines to non-coding genome [J]. *Cytokine*, 2016, 87: 26-36.
- [10] Garcia-Diaz A, Shin D S, Moreno B H, et al. Interferon receptor signaling pathways regulating PD-L1 and PD-L2 expression [J]. *Cell Rep*, 2019, 29(11): 3766.
- [11] Sunshine J, Taube J M. PD-1/PD-L1 inhibitors [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2015, 23: 32-38.

[责任编辑 王文倩]