

基于网络药理学的小陷胸汤治疗大肠癌的机制研究

高世勇^{1,3}, 李婉秋^{1,3}, 王 帅^{1,3}, 石 佳^{1,3}, 谭慧心^{2*}

1. 哈尔滨商业大学 药物工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 哈尔滨医科大学附属第四医院 药学部, 黑龙江 哈尔滨 150001

3. 黑龙江省肿瘤预防与抗肿瘤药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要:目的 采用网络药理学探究小陷胸汤治疗大肠癌的作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库及分析平台(TCMSP), 对组成小陷胸汤的 3 个单味药半夏、瓜蒌和黄连分别进行活性成分的收集和筛选, 构建成分-靶点网络图, 同时采用 GeneCards 数据库获取大肠癌疾病靶点。应用 Cytoscape 软件, 采用蛋白互作的方式, 垂钓小陷胸汤治疗大肠癌的核心靶点, 并采用 ClueGo 对核心靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 和通路的富集分析。采用 PyRx 软件对核心成分及蛋白靶点进行分子对接, 对网络药理学研究结果进行验证。结果 筛选得到 32 个小陷胸汤治疗大肠癌的活性成分, 181 个对应的蛋白靶点及 9329 个大肠癌疾病靶点。通过靶点垂钓的方式, 得到 360 个小陷胸汤治疗大肠癌的核心靶点。GO 富集分析发现, 小陷胸汤治疗大肠癌在生物过程 (biological process, BP) 方面, 与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 依赖性组蛋白脱乙酰酶活性、消旋酶活性负调控、胆囊收缩素反应、调节脱氧核糖核酸酶活性等有关; 分子功能 (molecular function, MF) 方面, 与蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性调节、腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine-triphosphate, ATP) 结合、凋亡过程中半胱氨酸型内肽酶活性调节等有关; 在细胞组成 (cellular component, CC) 方面, 主要与纺锤体微管、组蛋白脱乙酰酶复合物、核小体、ESC/E (Z) 复合物有关。信号通路富集分析注释得到胃泌素信号、细胞周期、乙型肝炎感染、DNA 损伤反应 4 个相关通路。分子对接结果表明由小陷胸汤中筛选出的活性成分与对应的蛋白靶点具有良好的结合能力。结论 小陷胸汤通过调控胃泌素信号通路、细胞周期通路、乙型肝炎感染通路、DNA 损伤反应通路治疗大肠癌。

关键词: 小陷胸汤; 网络药理学; 大肠癌; 胃泌素信号通路; 细胞周期通路; 乙型肝炎感染通路; DNA 损伤反应通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)03-0773-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.03.017

Mechanism of Xiaoxianxiong Decoction on treating colorectal cancer based on network pharmacology

GAO Shi-yong^{1,3}, LI Wan-qiu^{1,3}, WANG Shuai^{1,3}, SHI Jia^{1,3}, TAN Hui-xin²

1. Drug Engineering and Technology Research Center, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Department of Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

3. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Tumor Prevention and Antitumor Drugs Research, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Xiaoxianxiong Decoction (小陷胸汤) on colorectal cancer by network pharmacology. **Methods** The active components of Banxia (*Pinelliae Rhizoma*), Gualou (*Trichosanthis Fructus*) and Huanglian (*Coptidis Rhizoma*) in Xiaoxianxiong Decoction were collected and screened by TCMSP, and component-target network was constructed, GeneCards database was used to obtain colorectal cancer disease targets. Cytoscape software was used to identify the targets of Xiaoxianxiong Decoction in the treatment of colorectal cancer, and ClueGo was used to perform gene ontology (GO) and pathway enrichment analysis. Components and protein targets were docked by PyRx software to verify the accuracy. **Results** Thirty-two active components of Xiaoxianxiong Decoction in the treatment of colorectal cancer, 181 corresponding protein targets and 9329

收稿日期: 2021-11-03

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (LH2021H002); 2021 年哈尔滨商业大学教师“创新”项目支持计划项目 (LH2021H002); 中央支持地方高校改革发展基金优秀青年人才项目 (2020YQ12); 黑龙江省卫生计生委科技计划 (2017-132); 黑龙江省教育厅面上项目 (12541571)

作者简介: 高世勇, 男, 教授, 博士 (后), 博士生导师, 从事中药抗肿瘤药理研究。E-mail: sygao2002@163.com

***通信作者:** 谭慧心, 女, 副主任药师, 从事中药抗肿瘤药理研究。E-mail: thxydsy@163.com

colorectal cancer disease targets were screened. By target fishing, 360 Hub targets of Xiaoxianxiong Decoction were obtained. GO enrichment analysis showed the biological process (BP) of Xiaoxianxiong Decoction in the treatment of colorectal cancer was related to NAD-dependent histone deacetylase activity, negative regulation of helioase activity, regulation of deoxyribonuclease activity, response to cholecystokinin, regulation of protein neddylation and so on. Molecular function (MF) was related to protein serine/threonine kinase activity, regulation of protein serine/threonine kinase activity, adenosine-triphosphate(ATP) binding, regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process and sequence-specific double-stranded DNA binding. Cellular component (CC) was related to spindle microtubule, histone deacetylase complex, nuclear nucleosome and ESC/E(Z) complex. The enrichment analysis of signal pathways showed that they were related with gastrin signaling pathway, cell cycle pathway, hepatitis B infection pathway and DNA damage response pathway. Molecular docking results showed that the active components screened from Xiaoxianxiong Decoction had good binding ability to the corresponding protein targets. **Conclusion** Xiaoxianxiong Decoction can treat colorectal cancer by regulating gastrin signaling pathway, cell cycle pathway, hepatitis B infection pathway and DNA damage response pathway.

Key words: Xiaoxianxiong Decoction; network pharmacology; colorectal cancer; gastrin signaling pathway; cell cycle pathway; hepatitis B infection pathway; DNA damage response pathway

大肠癌包括结肠癌和直肠癌。据统计, 2020 年全球大肠癌发病率在所有癌症中排名第 3, 死亡率排名第 2^[1]。小陷胸汤出自张仲景的《伤寒论》, 由黄连、半夏和瓜蒌组成^[2], 具有清热化痰、宽胸散结的功效^[3]。国内外多名学者发现小陷胸汤具有良好的抗肿瘤作用^[3-6], 对胰腺癌^[7]、肺癌^[8]和胃癌^[9]具有较好的疗效。丁芮等^[2]发现小陷胸汤可通过阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、增强机体免疫能力等途径发挥抗肿瘤作用。网络药理学^[10]的整体性、系统性的特点与中医药整体观、辨证论治的特点不谋而合, 为中医药的研究开辟了一条新道路, 为中西医研究之间的“对话”提供了一种新的“语言”。本研究通过网络药理学方法, 研究小陷胸汤治疗大肠癌的作用机制, 利用分子对接技术对筛选出的活性成分与治疗靶点的结合能力进行验证, 旨在揭示小陷胸汤治疗大肠癌的作用机制。

1 方法

1.1 小陷胸汤活性成分及靶点筛选

通过中药系统药理学数据库和分析平台 (TCMSP, <http://tcmsp.com>), 分别以“半夏”“瓜蒌”“黄连”为关键词, 以“口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ ”“药物相似性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ”为筛选条件, 获得活性成分和靶点信息^[11]。利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 进行蛋白名称和基因名称的转换^[12]。

1.2 小陷胸汤“活性成分-靶点”网络的构建

使用 Cytoscape 3.8.2 软件构建小陷胸汤“活性成分-靶点”网络图, 达到可视化的目的。

1.3 大肠癌疾病靶点获取

采用 GeneCards 数据库^[13], 以“colorectal cancer”为关键词, 筛选相关基因。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建及分析

运用 BisoGenet 插件, 获取小陷胸汤的药物靶点和大肠癌靶点的 PPI 信息, 并获取其共有靶点。以“度中心性 (degree centrality, DC)”“介度中心性 (betweenness centrality, BC)”“接近中心性 (closeness centrality, CC)”“特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)”“网络中心性 (network centrality, NC)”“局部边连通性 (local average connectivity, LAC)”为条件对共有靶点进行筛选^[14], 得到核心靶点。

1.5 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及通路富集分析

运用 ClueGo 进行生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF)、细胞组成 (cellular component, CC) 富集分析; 采用“Wiki Pathways”数据集进行通路富集分析。

1.6 分子对接

将小陷胸汤的活性成分输入到 PubChem 中, 下载 SDF 格式文件。将核心靶点与小陷胸汤对大肠癌作用的直接靶点垂钓, 获得关键靶点。在 PDB 数据库中查找关键靶点的晶体结构, 以分辨率低、有配体蛋白、单 Macromolecule 结构、Homo sapiens 为参考条件, 下载 PDB 格式。

将 SDF 格式的配体活性分子导入 Auto Dock Tools 中进行预处理。将 PDB 格式的关键蛋白导入

PyMol 中去除水分子和去除配体蛋白生成对接位点。将获取的蛋白导入 Auto Dock Tools, 在 Edit 中加氢、计算电荷、设置原子类型。

在 PyRx 中将处理好的配体活性分子导入 Ligands 中, 处理好的蛋白导入 Macromolecules 中, 运用 Vina Wizard 进行 Run Vina 计算分数, 得到蛋白与配体活性分子结合的能量数值表和蛋白与配体活性分子结合能力最佳的构象文件, 并采用 PyMol

对结果进行可视化。

2 结果

2.1 小陷胸汤活性成分的筛选

通过 TCMSP 数据库^[15]获得小陷胸汤化学成分 244 个, 以 $OB \geq 30\%$ 、 $DL \geq 0.18$ 为条件对化学成分进行筛选^[16], 最终得到 31 个化学成分及其对应的 181 个作用靶点。小陷胸汤化学成分见表 1, 对应靶点见表 2 (部分结果)。

表 1 小陷胸汤中的化学成分

Table 1 Active components in Xiaoxianxiong Decoction

序号	Mol ID	化学成分	OB/%	DL
1	MOL000098	quercetin	46.43	0.28
2	MOL000358	β -sitosterol	36.91	0.75
3	MOL000449	stigmaterol	43.83	0.76
4	MOL000519	coniferin	31.11	0.32
5	MOL000622	magnograndiolide	63.71	0.19
6	MOL000785	palmitine	64.60	0.65
7	MOL001454	berberine	36.86	0.78
8	MOL001458	coptisine	30.67	0.86
9	MOL001494	mandenol	42.00	0.19
10	MOL001755	24-ethylcholest-4-en-3-one	36.08	0.76
11	MOL002668	worenine	45.83	0.87
12	MOL002670	cavidine	35.64	0.81
13	MOL002714	baicalein	33.52	0.21
14	MOL002881	diosmetin	31.14	0.27
15	MOL002894	berberrubine	35.74	0.73
16	MOL002897	epiberberine	43.09	0.78
17	MOL002903	(R)-canadine	55.37	0.77
18	MOL002904	berlambine	36.68	0.82
19	MOL002907	corchoroside A _{qt}	104.95	0.78
20	MOL003578	cycloartenol	38.69	0.78
21	MOL004355	spinasterol	42.98	0.76
22	MOL005030	gondoic acid	30.70	0.20
23	MOL005530	hydroxygenkwanin	36.47	0.27
24	MOL006756	schottenol	37.42	0.75
25	MOL006936	10,13-eicosadienoic	39.99	0.20
26	MOL006957	(3S,6S)-3-(benzyl)-6-(4-hydroxybenzyl)piperazine-2,5-quinone	46.89	0.27
27	MOL006967	β -D-ribofuranoside, xanthine-9	44.72	0.21
28	MOL007165	10 α -cucurbita-5,24-diene-3 β -ol	44.02	0.74
29	MOL007171	5-dehydrokarounidiol	30.23	0.77
30	MOL007172	7-oxo-dihydrokaro-unidiol	36.85	0.75
31	MOL007179	linolenic acid ethyl ester	46.10	0.20

2.2 活性成分-靶点网络的构建

将 31 个小陷胸汤化学成分与 181 个潜在药物靶点, 通过 Cytoscape 3.8.2 软件构建小陷胸汤活性成分-靶点网络图^[17] (图 1), 其中三角形代表单味药, 六边形代表化学成分, 菱形代表药物靶点, 该

网络由 215 个节点、419 条边构成。

2.3 疾病靶点及治疗核心靶点的获取

以 “colorectal cancer” 作为关键词, 采用 GeneCards 数据库, 共获得大肠癌相关靶点 9329 个。将 181 个小陷胸汤作用靶点与 9329 大肠癌靶点进

表 2 小陷胸汤活性成分的作用靶点信息
Table 2 Target information of active components of Xiaoxianxiong Decoction

序号	Mol ID	化学成分	靶点
1	MOL002670	cavidine	RXRB
2	MOL002714	baicalein	FOSL1
3	MOL000358	β -sitosterol	MAP2
4	MOL000449	stigmaterol	ADRB1
5	MOL000519	coniferin	CCNA2
6	MOL006967	β -D-ribofuranoside, xanthine-9	MTAP
7	MOL007171	5-dehydrokaroundiol	NR3C1
8	MOL002881	diosmetin	NCOA1
9	MOL002668	worenine	CHEK1
10	MOL000098	quercetin	AKR1B1
11	MOL002903	(R)-canadine	CHRM2
12	MOL000622	magnograndiolide	GRIA2
13	MOL000785	palmatine	NOS2
14	MOL000785	palmatine	ESR1
15	MOL000785	palmatine	AR
16	MOL000785	palmatine	ESR2
17	MOL000785	palmatine	PRSS1
18	MOL000785	palmatine	F7
19	MOL002907	corchoroside A _{qt}	NR3C2
20	MOL002907	corchoroside A _{qt}	NCOA2

行蛋白互作, 并进一步筛选出二者的共同靶点, 采用 DC、BC、CC 等参数进行核心靶点筛选^[14], 共得到 360 核心靶点 (图 2)。

2.4 GO 功能富集分析

采用 ClueGo 插件, 对核心靶点进行 GO 功能富集分析。以“MF”“BP”“CC”数据集为背景数据, 构建富集分析图。

如图 3 所示, 与 MF 相关的有 5 条主要分子功能途径, 分别为蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性调节、腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine-triphosphate, ATP) 结合、凋亡过程中半胱氨酸型内肽酶活性调节、序列特异性双链 DNA 结合; 与 BP 相关的 5 条生物过程途径, 分别为烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD) 依赖性组蛋白脱乙酰酶活性、消旋酶活性负调控、胆囊收缩素反应、调节脱氧核糖核酸酶活性、蛋白类泛素化修饰的调控; 与 CC 相关的有 4 个细胞部位, 分别为纺锤体微管、组蛋白脱乙酰酶复合物、核小体、ESC/E (Z) 复合物。

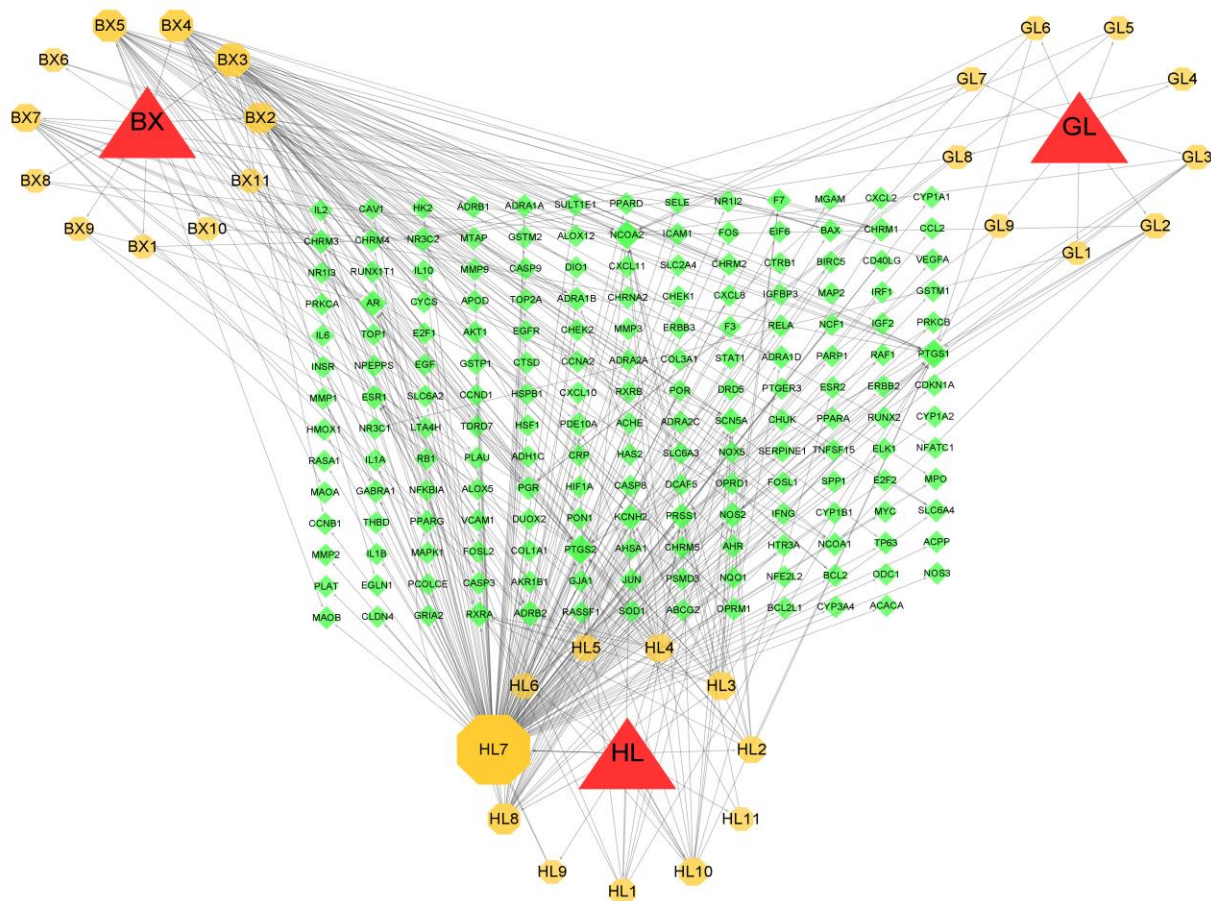
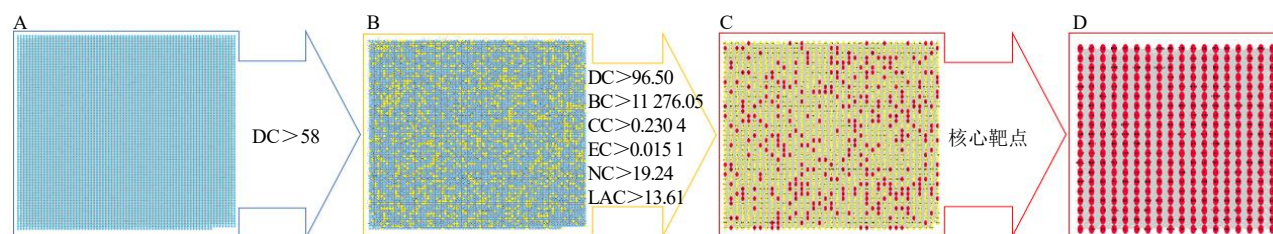


图 1 小陷胸汤活性成分-靶点网络图

Fig. 1 Active ingredient-target network of Xiaoxianxiong Decoction



A-小陷胸汤治疗大肠癌的共有靶点网络图 B-由 A 得到的重要靶点 PPI 网络图 (由 5692 个点、141 014 条边组成) C-由 B 获得的核心靶点 PPI 网络图 (由 1442 个点、62 887 条边组成) D-核心靶点 (由 360 个点、13 757 条边组成)

A-network map of common targets B-PPI network of significant proteins extracted from A (made of 5692 nodes and 141 014 edges) C-PPI network of Hub proteins extracted from B (made of 1422 nodes and 62 887 edges) D-Hub proteins (made of 360 nodes and 13 757 edges)

图 2 小陷胸汤治疗大肠癌核心靶点识别

Fig. 2 Identification of Hub protein in treatment of colorectal cancer by Xiaoxianxiong Decoction

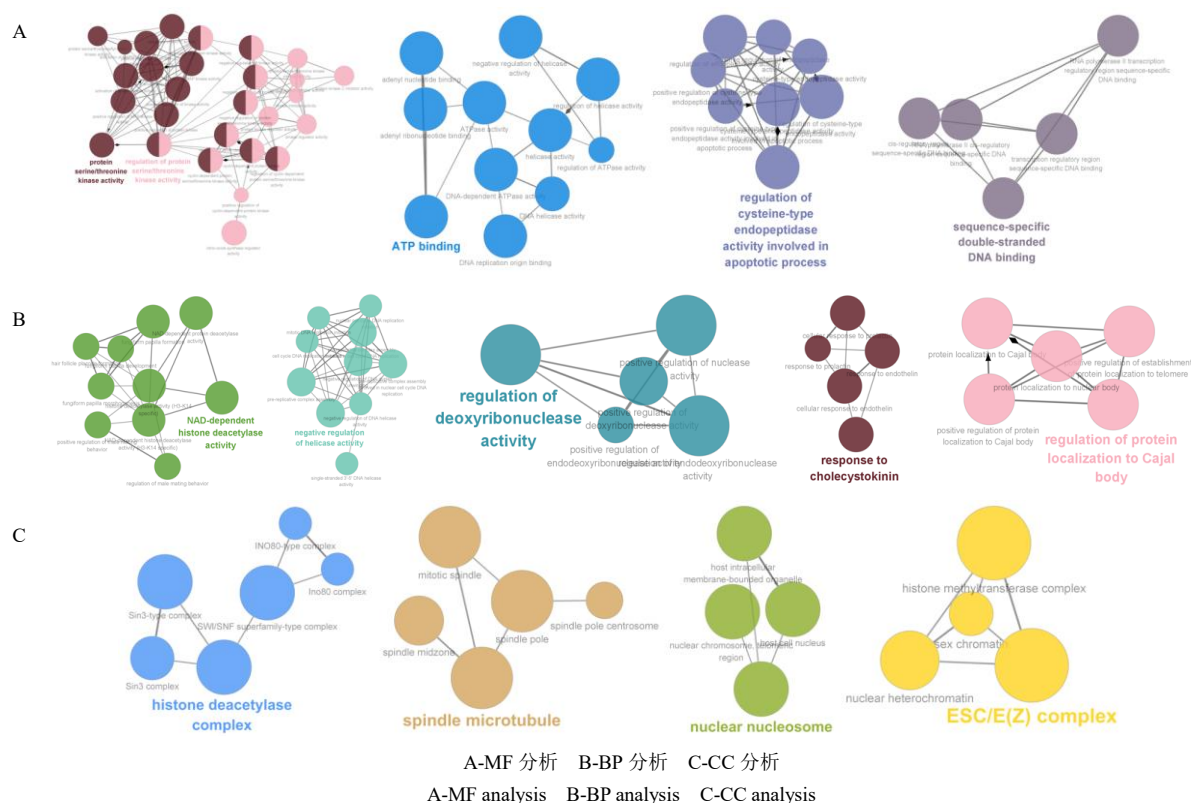


图 3 小陷胸汤治疗大肠癌的 Hub 靶点的 GO 分析重要通路图

Fig. 3 Important pathways diagram of Hub target of Xiaoxianxiong Decoction in the treatment of colorectal cancer by GO analysis

2.5 通路富集分析

如图 4 所示, Wiki Pathways 通路富集分析共得到 6 条主要通路, 分别为胃泌素信号通路、细胞周期通路、乙型肝炎感染通路、DNA 损伤反应通路、组蛋白修饰、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 信号通路。

2.6 配体活性成分与关键靶点的分子对接

在 PubChem 中查找 31 个配体活性分子的 SDF 格式文件, 共找到 28 个。小陷胸汤与大肠癌的直接作用靶点共 78 个, 将 78 个直接靶点与 360 个核心

靶点进行交互, 获得关键靶点 17 个, 其中 16 个可以与小陷胸汤的配体活性分子进行对接。

运用 PyRx 软件, 将 28 个配体活性分子与 16 个关键靶点进行分子对接。配体与受体结合能越低, 则结合的构象越稳定。以结合能数值作为数据, 运用 prism 软件绘制热图 (图 5), 共获得 476 个数据。结合能小于 -8 kJ/mol 的有 176 个, 占 36.97%; 结合能小于 -10.5 kJ/mol 的有 6 个, 占 1.26%; 结合能小于 -11 kJ/mol 的有 2 个, 占 0.42%。选取结合能力最好的 6 个组合进行可视化, 见图 6。6 个组合

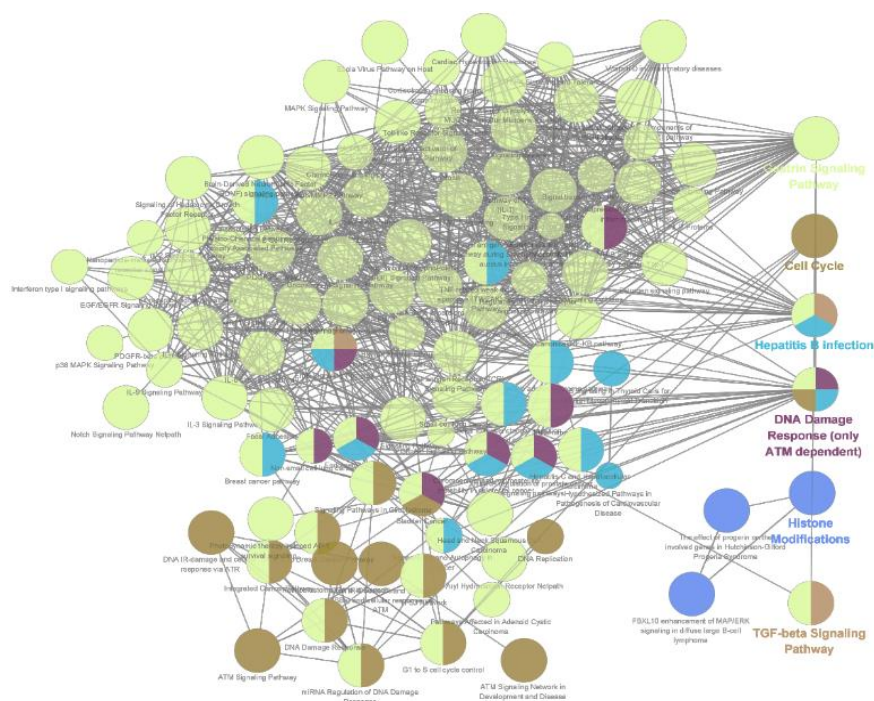


图 4 小陷胸汤治疗大肠癌的通路富集分析重要通路图

Fig. 4 Important pathways diagram of pathway enrichment analysis in treatment of colorectal cancer by Xiaoxianxiong Decoction

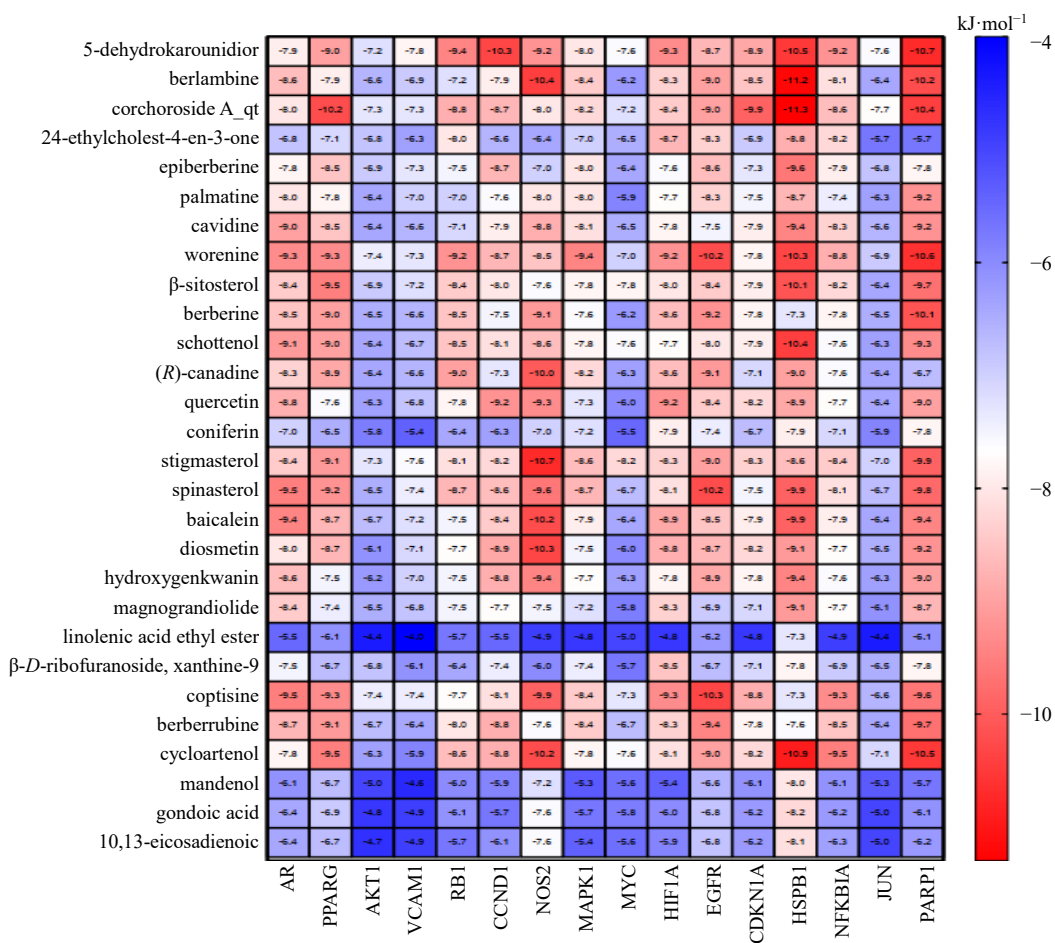
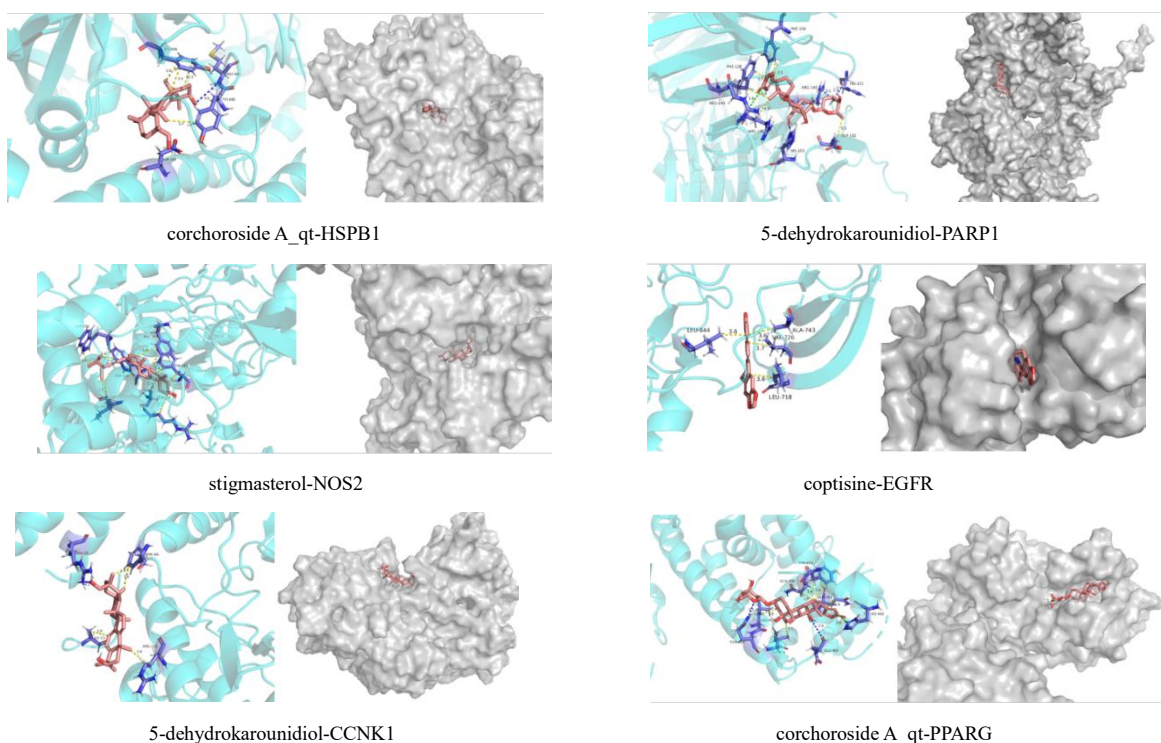


图 5 结合能的热图分析

Fig. 5 Thermal diagram analysis of binding affinity



图左为配体与靶点结合方式：黄线为疏水键，蓝线为氢键，绿线为盐桥 图右为配体分子与靶点结合位置
Left picture shows the binding mode of ligand and target: yellow line is hydrophobic bond, blue line is hydrogen bond, green line is salt bridge right picture shows the binding position of ligand molecule and target

图 6 小陷胸汤活性分子与关键靶点分子对接可视化

Fig. 6 Visualization of docking between active molecules of Xiaoxianxiong Decoction and key target molecules

分别为 corchoroside A_{qt} 与热休克蛋白 β 1 (heat shock protein β 1, HSPB1)、5-dehydrokarounidiol 与多聚 ADP 核糖聚合酶 1 (poly ADP-ribose polymerase 1, PARP1)、stigmasterol 与诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, NOS2)、coptisine 与表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、5-dehydrokarounidiol 与 G₁/S 特异性细胞周期蛋白-D1 (G₁/S-specific cyclin-D1, CCNK1)、corchoroside A_{qt} 与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator activated receptor γ , PPARG)。

3 讨论

小陷胸汤出自于汉·张仲景的《伤寒论》，由黄连、半夏、瓜蒌 3 味中药组成^[1]，研究发现小陷胸汤对多种肿瘤具有较好的作用^[2]，临床可用于治疗癌症^[3-5]。本研究通过 TCSMP 数据库，分别获取半夏、瓜蒌和黄连的化学成分，并以 OB 和 DL 为筛选条件，得到 31 个化学成分及相应的 181 个小陷胸汤作用靶点。采用 GeneCards 数据库，获得大肠癌靶点 9329 个。进一步对小陷胸汤作用靶点和大

肠癌靶点进行 PPI 及关键靶点垂钓，得到小陷胸汤治疗大肠癌的重要靶点，通过“DC”“BC”“CC”“EC”“NC”“LEC”为条件进行筛选，最终得到核心靶点 360 个。对核心靶点进行 GO 功能富集分析，注释小陷胸汤对大肠癌 BP、MF 及 CC 的影响；进一步对小陷胸汤治疗大肠癌的核心靶点进行通路富集分析，并结合分子对接技术，进行计算化学验证，揭示小陷胸汤治疗大肠癌的作用机制。

通过 MF 分析，小陷胸汤治疗大肠癌与其调控蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性、ATP 结合有关。蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶能够调控蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 的功能。丝氨酸/苏氨酸激酶参与协同刺激信号的启动，这类激酶一般在信号转导的中下游发挥作用^[18]。通过抑制 Akt 信号通路，抑制大肠癌内皮细胞的增殖、迁移、侵袭及管道形成能力，从而达到抑制大肠癌的作用^[19]。由此发现，小陷胸汤可通过改变蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性，使蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶的功能发生改变，通过调控 Akt 信号通路作用，影响大肠癌内皮细胞的迁移、侵袭能力，从而达到抑制大肠癌细胞增殖

的作用。ATP 是生物活动所需能量的直接来源,抑制 ATP 产生,可使癌细胞增殖所需的能量供应不足,从而达到抑制癌细胞增殖的作用^[20]。本研究发现小陷胸汤可影响大肠癌 ATP 结合的功能,通过调控大肠癌 ATP 达到治疗大肠癌的作用。

BP 分析发现,NAD 依赖性组蛋白脱乙酰酶能够控制 NAD 依赖性组蛋白去乙酰化酶的活性,而抑制组蛋白去乙酰化酶活性可以诱导癌细胞凋亡和自噬^[21]。本研究表明小陷胸汤能够通过抑制 NAD 依赖性组蛋白脱乙酰酶活性,发挥诱导大肠癌细胞凋亡和自噬,从而达到抑制大肠癌细胞增殖的作用。

CC 分析发现小陷胸汤主要影响大肠癌的纺锤体微管和组蛋白脱乙酰酶复合物 2 个部位。纺锤体微管是放射状微管,在细胞分裂过程中的染色体运动中起重要作用。干扰微管可以调控微管的功能、破坏微管的动态平衡、阻断癌细胞纺锤体的形成、阻止有丝分裂的进程,起到抗肿瘤作用^[22]。本研究发现,小陷胸汤能够影响微管的形成,推测小陷胸汤通过抑制纺锤体微管的形成,造成与细胞有丝分裂进程有关的细胞成分缺失,导致阻断细胞分裂过程从而影响细胞周期,达到抗肿瘤作用。组蛋白脱乙酰酶复合物是一类蛋白酶,对染色体的结构修饰和基因表达调控发挥着重要的作用,抑制组蛋白脱乙酰酶复合物可以逆转多种癌细胞中的布罗莫结构域(bromodomain, BRM)沉默,来抑制透明细胞肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)的肿瘤进展^[23]。本研究发现,小陷胸汤能够调控组蛋白脱乙酰酶复合物,推测小陷胸汤通过抑制组蛋白脱乙酰酶复合物的活性使大肠癌细胞内成分发生变化,逆转 BRM 沉默来抑制大肠癌的生长,起到抑制大肠癌细胞增殖的作用。

通路富集分析发现小陷胸汤通过调控胃泌素信号通路、细胞周期通路、DNA 损伤反应通路等影响大肠癌。胃泌素是一种重要的胃肠激素,主要由 G 细胞分泌。通过阻断胃泌素与受体结合,可以阻止胃泌素抑制细胞凋亡作用,转变为促进细胞凋亡作用^[24-26]。通过下调胃泌素含量,降低肿瘤干细胞标志物的表达,而阻止肿瘤的发展^[27]。胃泌素可增强癌细胞的运动能力^[26],促进癌细胞的迁移和侵袭能力^[28-29]。本研究表明小陷胸汤通过调控胃泌素通路促进细胞凋亡、抑制细胞侵袭和迁移、抑制肿瘤细胞的发展,从而抑制大肠癌细胞增殖。细胞周期是指细胞从一次分裂完成到下一次分裂结束的整个过

程。细胞周期通路的任何一个环节被阻断,都会造成细胞增殖的停滞。肿瘤抑制因子通过诱导细胞周期停滞发挥抗癌作用^[30]。通过影响细胞周期的 G₁ 和 G₂/M 期诱导细胞周期停滞可抑制大肠癌细胞的生长^[31-32],阻止癌细胞进行分裂,发挥治疗大肠癌的作用^[33-34]。本研究发现小陷胸汤能够调控细胞周期通路,推测小陷胸汤通过影响大肠癌的细胞周期,阻止细胞分裂进程和诱导细胞周期停滞,使大肠癌细胞不能正常分裂,从而抑制大肠癌细胞增殖,治疗大肠癌。DNA 损伤是 DNA 复制过程中 DNA 核苷酸序列的永久性改变,从而导致遗传特征的改变。增加 DNA 损伤可使癌细胞对辐射敏感,增加了辐射诱导的细胞凋亡^[35]。通过诱导 DNA 损伤,从而导致细胞毒作用、抑制癌细胞存活、诱导细胞死亡、引起细胞凋亡或过早衰老^[36-39]。本研究发现小陷胸汤能够调控 DNA 损伤通路,推测小陷胸汤通过使大肠癌细胞 DNA 损伤产生细胞毒作用、诱导细胞凋亡、增强大肠癌细胞对辐射敏感性等作用,从而抑制大肠癌细胞增殖,治疗大肠癌。

通路富集分析发现胃泌素信号通路、细胞周期通路、DNA 损伤通路具有诱导细胞凋亡、抑制细胞侵袭、阻止细胞分裂进程、诱导细胞周期停滞、产生细胞毒等作用,从而达到抑制癌细胞增殖的目的。进一步分析发现这 3 条通路都能够抑制细胞增殖,推测小陷胸汤通过抑制细胞增殖达到治疗大肠癌的作用。MF 和 BP 分析结果也显示小陷胸汤具有抑制大肠癌细胞增殖的潜质,进一步佐证了通路富集分析结果。

分子对接显示小陷胸汤的活性成分与靶点具有较好的结合能力,其中 HSPB1、PARP1、NOS2、EGFR、CCND1、PPARG 靶点与配体活性分子结合效果最好,结合能均小于 -10.0 kJ/mol 。HSPB1^[40]是热休克蛋白,NOS2^[41]是一种同工酶,抑制这 2 种蛋白的表达可以抑制 Akt 信号通路的表达,从而抑制大肠癌的增殖。PARP1 是 DNA 修复酶,它可以识别 DNA 结构损伤从而修复。PARP1 可以修复癌细胞中发生损伤的 DNA 片段,抑制 PARP1 的表达可以抑制癌细胞生长^[42]。EGFR^[43]是表皮生长因子受体,CCND1^[44]属于高度保守的细胞周期蛋白家族,抑制这 2 种蛋白的表达可以使大肠癌细胞生长停滞或诱导细胞凋亡,从而抑制大肠癌细胞的生长和增殖。PPARG 是配体调节的核激素受体,可以与特异 DNA 序列结合调控基因的转录。

PPARG 的表达可以抑制大肠癌的生长速率^[45]。因此,小陷胸汤通过抑制 Akt 信号通路、与特异 DNA 序列的结合、阻止损伤 DNA 片段修复、抑制细胞周期等途径,抑制大肠癌细胞增殖,从而达到治疗大肠癌的作用。分子对接的结果与 GO 富集分析、通路富集分析结果一致,验证了网络药理学分析结果的正确性。

综上所述,本研究采用网络药理学方法发现小陷胸汤治疗大肠癌的机制与抑制肿瘤细胞增殖、促进细胞凋亡、影响细胞周期、导致细胞 DNA 损伤、抑制肿瘤血管生成和诱导细胞自噬等方面有关,并通过分子对接模拟了小陷胸汤活性分子与靶点结合的情况,其治疗作用多途径、多靶点的特点与中医治疗理论辨证论治不谋而合^[46]。本研究为治疗大肠癌提供了新思路,为小陷胸汤治疗大肠癌的研究提供方向和参考依据,为小陷胸汤的新药研发提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 丁芮, 王翔, 周鹏, 等. 小陷胸汤中抗肿瘤作用有效成分及其机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 186-192.
- [3] 周蕾, 刘嘉湘. 刘嘉湘运用小陷胸汤治疗肿瘤相关症状举隅 [J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(3): 617-619.
- [4] 周佳静, 贾英杰. 贾英杰教授运用小陷胸汤合苇茎汤治疗肺癌并发恶性胸腔积液经验举隅 [J]. 西部中医药, 2012, 25(4): 31-33.
- [5] 郭麒, 喻嵘, 肖碧跃, 等. 国医大师熊继柏运用小陷胸汤合方治疗恶性肿瘤经验 [J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(3): 271-273.
- [6] Huang C, Wang X L, Qi F F, *et al.* Berberine inhibits epithelial-mesenchymal transition and promotes apoptosis of tumour-associated fibroblast-induced colonic epithelial cells through regulation of TGF- β signalling [J]. *J Cell Commun Signal*, 2020, 14(1): 53-66.
- [7] 王彬彬, 沈敏鹤, 吴良村. 吴良村应用小陷胸汤治疗胰腺癌经验 [J]. 中医杂志, 2018, 59(2): 108-110.
- [8] 姚鹏宇, 刘芳, 吕翠霞. 陶汉华教授基于“气血水并调”理论运用小陷胸汤合四君子汤加减治疗肺癌经验 [J]. 西部中医药, 2021, 34(1): 37-40.
- [9] 丁芮, 葛瑞瑞, 王恩宇, 等. 加味小陷胸汤水提物通过 Wnt5a/Ca²⁺/NFAT 信号通路抑制 TGF- β 1 介导的人胃癌 MGC-803 细胞上皮-间质转化及侵袭迁移 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(4): 37-46.
- [10] 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.
- [11] Ru J L, Li P, Wang J N, *et al.* TCMSP: A database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13.
- [12] 罗静初. UniProt 蛋白质数据库简介 [J]. 生物信息学, 2019, 17(3): 131-144.
- [13] Safran M, Chalifa-Caspi V, Shmueli O, *et al.* Human gene-centric databases at the Weizmann institute of science: GeneCards, UDB, CroW 21 and HORDE [J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(1): 142-146.
- [14] Zhang Y, Li Y, Mao X, *et al.* Thyroid hormone synthesis: A potential target of a Chinese herbal formula Haizao Yuhuo Decoction acting on iodine-deficient goiter [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 51699-51712.
- [15] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [16] 董音汝, 莫云秋, 郑景辉, 等. 基于网络药理学分析小陷胸汤治疗动脉粥样硬化的作用机制 [J]. 中国新药杂志, 2020, 29(3): 335-342.
- [17] 刘鑫馗, 吴嘉瑞, 张丹, 等. 基于网络药理学的生脉散作用机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(16): 219-226.
- [18] 赵传祥, 袁观斗, 陈谦, 等. 丝氨酸苏氨酸激酶受体相关蛋白在肿瘤发生发展中的作用研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2018(1): 171-175.
- [19] 肖高春, 郑勇斌, 童仕伦, 等. 抑制磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶和丝裂原细胞外信号调节激酶/细胞外信号调节激酶信号通路对结肠癌血管内皮细胞功能的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32(8): 1911-1914.
- [20] Hu X J, Zheng W M, Luo Y Y, *et al.* Arca subcrenata polypeptides inhibit human colorectal cancer HT-29 cells growth via suppression of IGF-1R/Akt/mTOR signaling and ATP production [J]. *Nutr Cancer*, 2020, 72(2): 260-272.
- [21] 徐春梅, 张子亦, 陈羲, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中国现代应用药理学, 2016, 33(4): 509-513.
- [22] Qi F, Zhou J, Liu M. Microtubule-interfering agents, spindle defects, and interkinetochore tension [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 26-30.
- [23] Fang R, Pan R, Wang X T, *et al.* Inactivation of BRM/SMARCA2 sensitizes clear cell renal cell carcinoma to histone deacetylase complex inhibitors [J]. *Pathol Res*

- Pract*, 2020, 216(4): 152867.
- [24] 茆家定. MAPK 信号转导通路在胃泌素调节大肠癌生长中的作用及其分子机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2013.
- [25] 苏薇, 吴会超. 胃泌素及其受体拮抗剂对人胃癌细胞株 MKN45 中骨桥蛋白表达的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(20): 5005-5007.
- [26] 曾怡, 周建奖, 谢渊, 等. 沉默胃泌素基因抑制胃癌细胞的增殖、迁移和侵袭 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(9): 905-911.
- [27] Ferrand A, Sandrin M S, Shulkes A, *et al*. Expression of gastrin precursors by CD133-positive colorectal cancer cells is crucial for tumour growth [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(3): 477-488.
- [28] 刘骏, 周建奖, 赵艳, 等. 胃泌素促进胃癌细胞的迁移和侵袭 [J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(4): 730-733.
- [29] 丁健, 于皆平, 李丹, 等. 促胃液素对结肠癌细胞侵袭力的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 2005, 27(4): 213-215.
- [30] Li X L, Zhou J B, Chen Z R, *et al*. P53 mutations in colorectal cancer-molecular pathogenesis and pharmacological reactivation [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(1): 84-93.
- [31] Xiong Y, Xiong Y J, Liu D Y, *et al*. Retracted: Pancratistatin inhibits the growth of colorectal cancer cells by inducing apoptosis, autophagy, and G₂/M cell cycle arrest [J]. *Med Sci Monit*, 2021, 27: e932346.
- [32] Park Y L, Ha S Y, Park S Y, *et al*. Reversine induces cell cycle arrest and apoptosis via upregulation of the Fas and DR5 signaling pathways in human colorectal cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(5): 1875-1883.
- [33] Han C, Song Y, Lian C. MiR-769 inhibits colorectal cancer cell proliferation and invasion by targeting HEY1 [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 9232-9239.
- [34] Yue M, Li S Q, Yan G Q, *et al*. Paeoniflorin inhibits cell growth and induces cell cycle arrest through inhibition of FoxM1 in colorectal cancer cells [J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(2): 240-249.
- [35] Deorukhkar A, Ahuja N, Mercado A L, *et al*. Zerumbone increases oxidative stress in a thiol-dependent ROS-independent manner to increase DNA damage and sensitize colorectal cancer cells to radiation [J]. *Cancer Med*, 2015, 4(2): 278-292.
- [36] Chalouati H, Boutet E, Metais B, *et al*. DNA damage and oxidative stress induced at low doses by the fungicide hexachlorobenzene in human intestinal Caco-2 cells [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2015, 25(6): 448-458.
- [37] Fadlalla K, Watson A, Yehualaeshet T, *et al*. *Ruta graveolens* extract induces DNA damage pathways and blocks Akt activation to inhibit cancer cell proliferation and survival [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(1): 233-241.
- [38] Rudolf E, John S, Cervinka M. Irinotecan induces senescence and apoptosis in colonic cells *in vitro* [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 214(1): 1-8.
- [39] Rigatti M J, Verma R, Belinsky G S, *et al*. Pharmacological inhibition of Mdm2 triggers growth arrest and promotes DNA breakage in mouse colon tumors and human colon cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2012, 51(5): 363-378.
- [40] Cayado-Gutiérrez N, Moncalero V L, Rosales E M, *et al*. Downregulation of Hsp27 (HSPB1) in MCF-7 human breast cancer cells induces upregulation of PTEN [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2013, 18(2): 243-249.
- [41] Thomas D D, Wink D A. NOS2 as an emergent player in progression of cancer [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(17): 963-965.
- [42] 季鸣, 姚海平, 周洁, 等. 新型 PARP1/2 抑制剂 YHP-743 的抗肿瘤作用 [J]. 药学报, 2018, 53(6): 938-943.
- [43] Hu S M, Yao X H, Hao Y H, *et al*. 8-Gingerol regulates colorectal cancer cell proliferation and migration through the EGFR/STAT/ERK pathway [J]. *Int J Oncol*, 2020, 56(1): 390-397.
- [44] Guo F, Xue J. MicroRNA-628-5p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer through downregulating CCND1 expression levels [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1481-1490.
- [45] Sabatino L, Fucci A, Pancione M, *et al*. UHRF1 coordinates peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPARG) epigenetic silencing and mediates colorectal cancer progression [J]. *Oncogene*, 2012, 31(49): 5061-5072.
- [46] 张海涛, 辛鹏飞, 冯文俊, 等. 基于网络药理学分析五味消毒饮治疗关节假体周围感染的作用机制 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(36): 5843-5849.

[责任编辑 李亚楠]