

基于网络药理学和分子对接研究丹参-赤芍药对治疗结直肠癌的作用机制

王方园¹, 王 栋¹, 孔宪斌², 时浩洋¹, 赵 爽¹, 杨玉莹¹, 孟静岩^{2*}

1. 天津中医药大学研究生院, 天津 301600

2. 天津中医药大学中医学院, 天津 301600

摘要: 目的 基于网络药理学和分子对接技术探究丹参-赤芍药对治疗结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 的作用机制, 并进一步运用体外细胞实验进行验证。方法 通过 TC MSP 数据库筛选出丹参-赤芍药对活性成分及其对应的靶点, 通过检索 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DrugBank 数据库检索获得 CRC 相关靶点, 将丹参-赤芍活性成分靶点与 CRC 靶点取交集, 采用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“药物-成分-疾病-靶点”网络, 运用 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络, 运用 R 语言进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析; 选取关键靶点及核心活性成分, 使用 AutoDock 软件进行分子对接。通过体外细胞实验验证网络药理学结果, 分别采用 MTT 及划痕实验检测丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞增殖及迁移能力的影响, 采用 qRT-PCR 及 Western blotting 检测丹参-赤芍药对对网络药理学核心靶点表达的影响。结果 网络药理学预测显示, 丹参-赤芍药对活性成分 206 个, 共有 352 个对应的靶基因, CRC 疾病相关靶点 9143 个, 得到交集靶点 283 个。通过 PPI 网络筛选得到丹参-赤芍药对治疗 CRC 的关键治疗靶点 3 个: 雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1)、黏着连接蛋白 β 1 (catenin β 1, CTNNB1) 和视网膜母细胞瘤基因 1 (retinoblastoma 1, RB1)。GO 功能和 KEGG 通路分析显示, 关键靶点涉及磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路、p53 信号通路、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)、细胞凋亡等。分子对接结果显示关键靶点与重要活性成分结合构象稳定, 筛选出丹参-赤芍药对治疗 CRC 的核心活性成分主要是黄芩苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷等。MTT 及划痕实验表明, 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞增殖和迁移能力具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$, 0.01); 丹参-赤芍药对显著抑制 ESR1 和 CTNNB1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$, 0.01), 显著上调 RB1 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$); 显著下调 ESR1、 β -catenin、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartate protease-3, Caspase-3) 和聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (poly-ADP-ribose polymerase, PARP) 蛋白表达水平 ($P < 0.05$, 0.01), 显著上调 RB1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$, 0.01)。结论 丹参-赤芍药对可能作用于 ESR1、CTNNB1 和 RB1 等靶点, 通过 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、p53 信号通路、HIF-1 信号通路等相关通路, 从而抑制 CRC 细胞的增殖和迁移能力。

关键词: 丹参-赤芍药对; 结直肠癌; 网络药理学; 分子对接; 雌激素受体 1; 黏着连接蛋白 β 1; 视网膜母细胞瘤基因 1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)18-5731-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.016

Mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair in treatment of colorectal cancer based on network pharmacology and molecular docking

WANG Fang-yuan¹, WANG Dong¹, KONG Xian-bin², SHI Hao-yang¹, ZHAO Shuang¹, YANG Yu-ying¹, MENG Jing-yan²

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China

2. College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301600, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of Danshen (*Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma*)-Chishao (*Paeoniae Radix Rubra*) drug pair in treatment of colorectal cancer (CRC), and further verified by *in vitro* cell experiments. **Methods** Active ingredients

收稿日期: 2022-07-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81973728); 天津市自然科学基金资助项目 (18JCZDJC36600)

作者简介: 王方园, 在读博士研究生, 研究方向为中医药抗肿瘤的基础研究。E-mail: 18132398088@163.com

*通信作者: 孟静岩, 博士生导师, 教授, 研究方向为中医药抗肿瘤的基础研究。E-mail: mengjy@163.com

of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair and corresponding targets were screened out through TCMS, targets related to CRC were obtained by GeneCards, OMIM, PharmGkb, TTD and DrugBank databases, CRC-related targets were obtained by searching GeneCards, OMIM, PharmGkb, TTD and DrugBank databases. Active ingredients targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair were intersected with CRC targets, Cytoscape 3.8.2 software was used to construct “drug-active ingredient-disease-target” network, STRING database was used to construct protein-protein interaction (PPI) network, R language was used for gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis; Key targets and core active components were selected, and AutoDock software was performed for molecular docking. The results of network pharmacology were verified by *in vitro* cell experiments. MTT and scratch experiments were used to detect the effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair on proliferation and migration of HCT116 cells. qRT-PCR and Western blotting were used to detect the effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair on network pharmacology core targets expression. **Results** Network pharmacology prediction showed 206 active ingredients of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair, with a total of 352 corresponding target and 9143 CRC-related targets, and 283 intersecting targets were obtained. Three key therapeutic targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair in treatment of CRC were identified by PPI network screening: estrogen receptor 1 (ESR1), catenin β 1 (CTNNB1) and retinoblastoma 1 (RB1). GO function and KEGG pathway analysis showed that key targets involved phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, p53 signaling pathway, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), apoptosis, etc. Molecular docking results showed that key targets and important active components were bound in a stable conformation. The core active components of *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair in treatment of CRC were mainly baicalin, paeoniflorin and benzoylpaeoniflorin. MTT and scratch experiments showed that *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair significantly inhibited the proliferation and migration of HCT116 cells ($P < 0.05, 0.01$), significantly inhibited mRNA expression levels of *ESR1* and *CTNNB1* ($P < 0.05, 0.01$), up-regulated *RB1* mRNA expression level ($P < 0.05$), down-regulated *ESR1*, β -catenin, cysteine-aspartate protease-3 (Caspase-3) and poly-ADP-ribose polymerase (PARP) protein expressions ($P < 0.05, 0.01$), up-regulated *RB1* protein expression level ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair may act on *ESR1*, *CTNNB1*, *RB1* and other targets, and inhibit the proliferation and migration of CRC cells through PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway, p53 signaling pathway, HIF-1 signaling pathway and other related pathways, thereby inhibiting the proliferation and migration ability of CRC cells.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix* et *Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* drug pair; colorectal cancer; network pharmacology; molecular docking; experimental verification; estrogen receptor 1; catenin β 1; retinoblastoma 1

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见的消化系统恶性肿瘤, 在最新统计的全球癌症发病率和死亡率排名中均位居前列^[1], 其高发病率和高死亡率严重威胁人们的生命健康。CRC 的发生、发展机制复杂, 其中涉及多种肿瘤相关基因及肿瘤相关信号通路的改变。

近年来, 中药以其多途径、多靶点的优势, 在辅助治疗 CRC 方面取得了良好的疗效。丹参-赤芍是临床上抑制恶性肿瘤发生发展常用的活血化瘀药对, 其中, 丹参是唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎, 《本草纲目》草部中记载其味苦, 性微寒, 无毒, 归心、肝经, 具有祛瘀生新、活血止痛的功效^[2]。赤芍是为毛茛科植物芍药 *Paeonia lactiflora* Pall. 或川赤芍 *P. veitchii* Lynch 的干燥根, 味苦, 性微寒, 归肝经, 具有清热凉血、活血祛瘀的功效^[3]。本研究基于网络药理学及分子对接技术筛选丹参-赤芍药对治疗 CRC 的相关靶点

和通路, 并将筛选后的活性成分与靶蛋白进行分子对接, 探讨丹参-赤芍药对是否能够多靶点、多途径抑制 CRC 的发生发展, 并运用体外细胞实验对相关靶点进行验证, 以期中医药防治 CRC 提供新思路。

1 材料

1.1 细胞

结直肠癌 HCT116 细胞购自 ATCC 细胞库。

1.2 药材

丹参 (批号 20190513)、赤芍 (批号 20190411) 均购自北京同仁堂股份有限公司, 经天津中医药大学孟静岩教授鉴定分别为唇形科植物丹参 *S. miltiorrhiza* Bge. 的干燥根和根茎、毛茛科植物芍药 *P. lactiflora* Pall. 的干燥根。

根据孟静岩教授多年临床经验, 丹参-赤芍药对以 1:1 配伍制成冻干粉, 将冻干粉溶解于无血清培养基, 配制成 2 mg/mL 的溶液 (以生药量计),

通过 0.22 μm 滤器灭菌, 将灭菌后的药液保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。本课题组前期利用 UPLC-Q-TOF/MS 技术对丹参-赤芍活性成分进行鉴定^[4], 筛选出 18 种丹参独有成分及 11 种赤芍的独有成分, 如丹参素、苯甲酰芍药苷、芍药苷等。

1.3 药品与试剂

MTT (批号 M8180)、高效 RIPA 裂解液 (批号 R0010)、PMSF (批号 P0100)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (批号 P1261) 购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒 (批号 19221ES50)、Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (批号 11141ES60)、Hieff UNICON Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix (批号 11184ES08) 购自上海翊圣生物科技有限公司; 雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) 抗体 (批号 WL00940)、 β -catenin (批号 WL0962a)、视网膜母细胞瘤基因 1 (retinoblastoma 1, RB1) 抗体 (批号 WL02216)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 WL04004)、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶 (poly-ADP-ribose polymerase, PARP) 抗体 (批号 WL01932) 购自沈阳万类生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗兔单克隆抗体 (批号 AS014)、 β -actin 抗体 (批号 AC026) 购自爱博泰克生物技术公司。

1.4 仪器

311 型 CO_2 细胞培养箱、MK3 型多功能读板机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 5418 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); E200 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); ChemiDoc MP 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 丹参-赤芍药对活性成分及靶点筛选 通过 TCMSP 数据库 (<https://tcmispw.com/tcmisp.php>) 检索丹参、赤芍的化学成分, 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为条件筛选化学成分及对应蛋白靶点, 并通过参考文献进行补充^[5]。使用 UniProt (<https://uniprot.org/>) 校正化学成分靶点基因名称, 使蛋白质靶点信息标准化^[6]。

2.1.2 CRC 相关基因查找及药物-疾病交集基因获取 通过 GeneCards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://omim.org/>)、PharmGkb (<http://www.pharmgkb.org/>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd>)、及 DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库, 以“colorectal cancer”为关键词进行疾病相关基因查找。将各数据库得到的疾病相关基因进行并集并删除重复基因, 使用 PERL 软件绘制 Venn 图, 对药物预测潜在靶点与疾病相关靶点取交集, 即获得丹参-赤芍药对治疗 CRC 的潜在靶点。

2.1.3 中药调控网络及蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络构建 将丹参-赤芍的主要活性成分与潜在靶点导入 Cytoscape 3.8.2 软件中, 绘制“中药-活性成分-潜在靶点”网络。将交集靶点输入到 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 物种设置为“Homo sapiens”, 最低相互作用阈值设为最高置信度 “highest confidence (0.9)”, 得到 PPI 网络, 再运用 Cytoscape 3.8.2 软件将 PPI 网络做可视化处理。使用插件 CytoNCA 提取网络中得分较高的节点, 以介数和自由度的中位数作为截点, 将截点之上的靶点视为关键靶点, 并进行后续研究。

2.1.4 基因本体 (gene ontology, GO) 功能及京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析 应用 R 软件中 Bioconductor 模块软件包 “org.Hs.eg.db” 运行完 entrez ID 转换。采用 R 软件中的 “colorspace” “stringi” “ggplot2” 和 “DOSE” “clusterProfiler” “enrichplot” 模块对关键靶基因进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析, 过滤条件为 $P > 0.05$, 输出气泡图, 分析富集结果。运行 “pathview” 模块绘制通路图^[7]。

2.1.5 潜在活性成分与核心靶蛋白的分子对接 将药物活性成分与关键靶点进行分子对接, 首先通过 PubChem 数据库 (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得化合物的 3D 结构, 并利用 Open Babel 2.3.2 软件将获得的 SDF 文件转化为 PDB 格式。从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/pdb>) 获得关键靶点的 3D 结构 PDB 格式, 分子图形系统 PyMOL 2.5.1 去除水分子和小分子配体。靶蛋白与化合物均使用 AutoDockTools 1.5.6 转化为 PDBQT 格式。利用 AutoDock Vina 1.1.2 软件 Discovery Studio (DS, V2016) 进行对接, 对结果进行分析处理, 分子对接构象的结合能越低, 则结合构象越稳定, 反映受体分子与配体之间结合的可能性越大。故对接结果只保留每对分子对接的结合能绝对值最高者。

2.2 体外实验验证

2.2.1 MTT 实验 收集处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中, 细胞贴壁后加入不同质量浓度 (125、250、500、1000、2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的丹参-赤芍溶液, 同时设调零孔 (不接种细胞不含药物) 和对照孔 (接种细胞不含药物), 置于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中培养 48 h 后, 每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL), 轻晃混匀, 于 37°C 、5% CO_2 的培养箱中孵育 4 h 后, 弃去上清液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 轻晃混匀, 采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞抑制率。

$$\text{细胞抑制率} = [(A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}}) - (A_{\text{给药}} - A_{\text{调零}})] / (A_{\text{对照}} - A_{\text{调零}})$$

2.2.2 划痕实验 将处于对数生长期的 HCT116 细胞以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后, 用 10 μL 的枪头在孔内划线, 用 PBS 缓冲液沿孔壁轻轻冲洗孔底 2 次, 吸净细胞残渣, 每孔加入 2 mL 不同质量浓度 (100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的丹参-赤芍溶液后, 置于 5% CO_2 、 37°C 培养箱中培养 48 h, 对照组加入不含药物的培养基。培养 0、48 h 后, 于倒置显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 软件计算划痕面积。

2.2.3 qRT-PCR 检测 *ESR1*、黏着连接蛋白 $\beta 1$ (catenin beta 1, *CTNNB1*) 和 *RBI* mRNA 表达 按“2.2.2”项下方法处理细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物 (5'-3')
<i>ESR1</i>	F: CGCCTCTAACCTCGGGCTG R: AGTAGGGCCATCCCAGATGC
<i>CTNNB1</i>	F: CTGAGGAGCAGCTTCAGTCC R: GGCCATGTCCAACCTCCATCA
<i>RBI</i>	F: GACTTCTACTCGAACACGAATGC R: GTGTCCACCAAGGTCCTGAG
β -actin	F: AGCGAGCATCCCCAAAGTT R: GGGCACGAAGGCTCATCATT

2.2.4 Western blotting 检测 *ESR1*、 β -catenin、*RBI*、Caspase-3 和 PARP 蛋白表达 按“2.2.2”项下方法处理细胞, 收集各组细胞, 加入适量 RIPA 裂解液, 于冰上裂解, 提取细胞总蛋白, 于 100°C 水中加热 5~10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 封闭 2 h, 分别加入相应一抗 (1:1000),

室温孵育 1 h, 4°C 过夜孵育; 洗膜后, 加入二抗 (1:8000), 室温孵育 1 h; 洗膜后加入 ECL 发光液显色, 放置于凝胶成像系统运行程序显影成像, 应用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.2.5 数据统计 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 实验重复 3 次, 运用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。数据符合正态分布的采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 方差齐的结果用 LSD 检验方法进行组间的比较, 方差不齐或不服从正态分布的用 Dunnett's T_3 检验。

3 结果

3.1 丹参-赤芍药对活性成分及靶点的筛选

通过在 TCMSP 数据库中查找到丹参-赤芍的活性成分并按照筛选条件进行筛选, 得到活性成分 206 个, 药物作用靶基因 352 个。

3.2 CRC 相关靶点筛选和药物-疾病交集靶点获取

将 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DurgBank 数据库检索的 CRC 相关靶点结果合并, 去除重复数据, 筛选得到 CRC 相关靶点 9143 个, 见图 1。将丹参-赤芍药对的潜在靶点与 CRC 相关靶点取交集映射, 利用 Perl 软件绘制韦恩图, 共得到 283 个交集靶点, 见图 2。

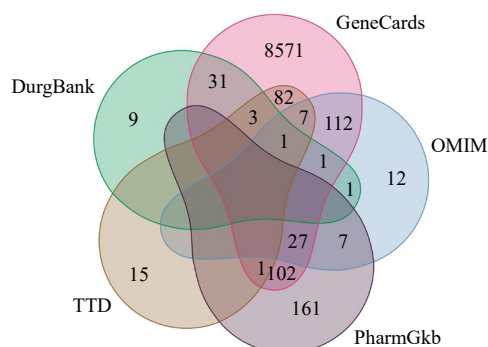


图 1 CRC 相关靶点

Fig. 1 CRC related targets

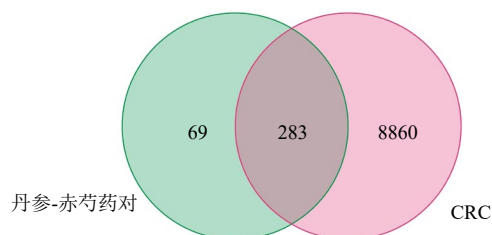


图 2 丹参-赤芍药对与 CRC 靶点的 Venn 图

Fig. 2 Venn of targets of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* and CRC

图 4 PPI 网络

Fig. 4 PPI network

使用插件 CytoNCA 提取网络中得分较高的节点,以介数和自由度的中位数作为截点,根据条件选择排名前 11 的靶点为 ESR1、CTNNB1、RB1、特化蛋白 1 (specialized protein 1, SP1)、原癌基因 SRC、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JUN)、信号传导与转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF1A)、周期依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、细胞周期素 D1 (cyclin D1, CCND1), 取排名前 3 的靶点即 ESR1、CTNNB1、RB1 作为关键靶点 (图 5), 进行后续研究。

3.5 GO 功能富集分析

根据 R 语言程序设定条件进行 GO 功能富集分

析, 富集结果按照 P 值从小到大排序, 选取前 10 条 GO 条目输出气泡图。如图 6 所示, 丹参-赤芍药对主要影响药物反应、氧化应激响应等生物过程

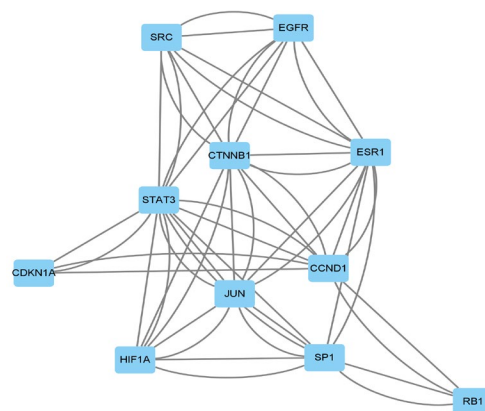


图 5 排名前 11 的靶点

Fig. 5 Targets of top 11

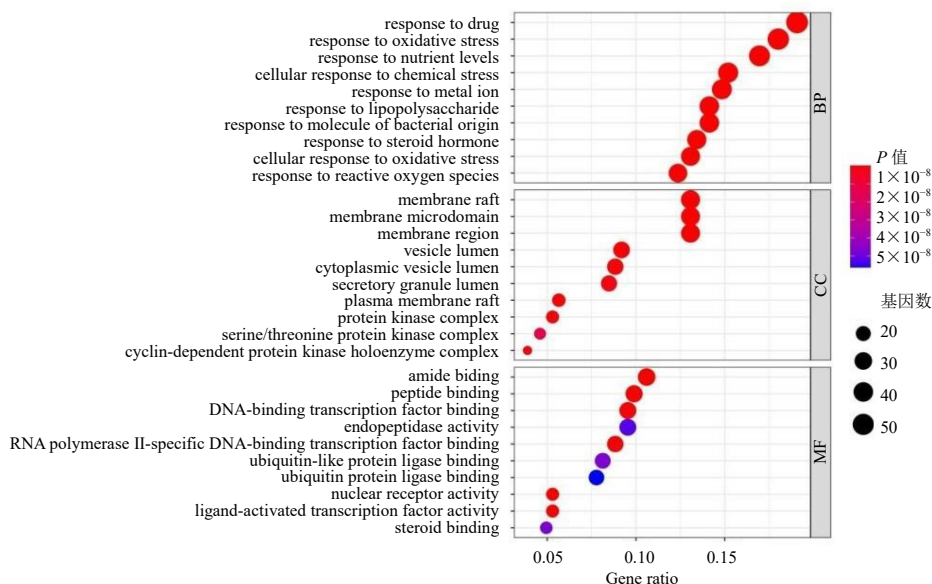


图 6 共同靶点 GO 功能富集分析

Fig. 6 GO function enrichment analysis of common targets

(biological process, BP), 影响膜筏、膜微域等细胞组分 (cellular components, CC), 参与酰胺结合、肽结合等分子功能 (molecular function, MF)。

3.6 KEGG 通路富集分析

分析药物与疾病共同靶点进行 KEGG 通路富集分析, 根据 P 值进行排序, 得到丹参-赤芍药对治疗 CRC 的相关通路 30 条, 见图 7。通过分析气泡图结果并结合肿瘤相关通路研究可知, 丹参-赤芍药对治疗 CRC 的潜在靶点主要集中在磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) - 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通

路、p53 信号通路、HIF-1 信号通路、细胞凋亡等信号通路上。

3.7 丹参-赤芍活性成分与关键靶点的对接

根据 PPI 分析结果, 选取度值排名前 3 的靶基因 (ESR1、CTNNB1 和 RB1) 所编码的靶蛋白 (ESR1、 β -catenin 和 RB1) 与丹参-赤芍药对的活性成分进行分子对接, 结果显示, 丹参-赤芍药对中活性成分黄芩苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、木犀草素、芍药苷、二没食子酸、异欧前胡素、异隐丹参酮、泪柏醇、鞣花酸等与关键靶点对接稳定 (表 2)。对结果进一步分析发现, 芍药内酯苷与 ESR1 结合能力较强, 分别在 LEU346、GLU353、ARG394

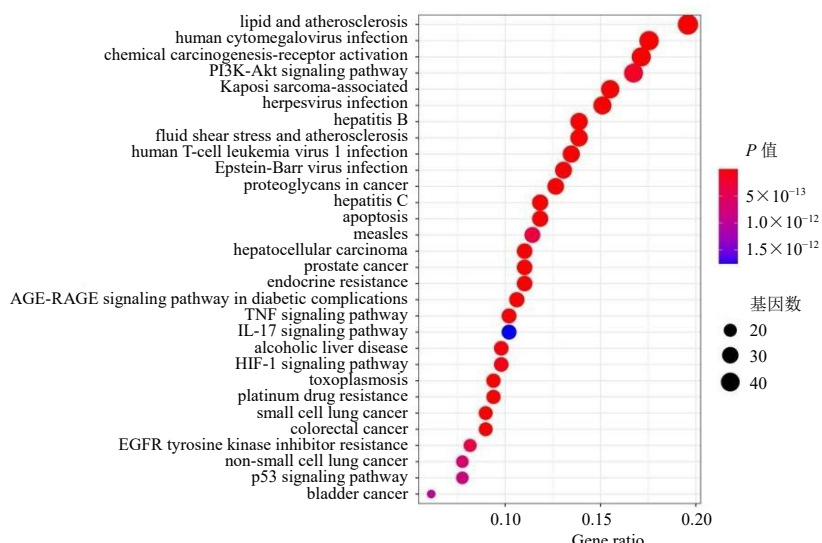


图 7 共同靶点 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of common targets

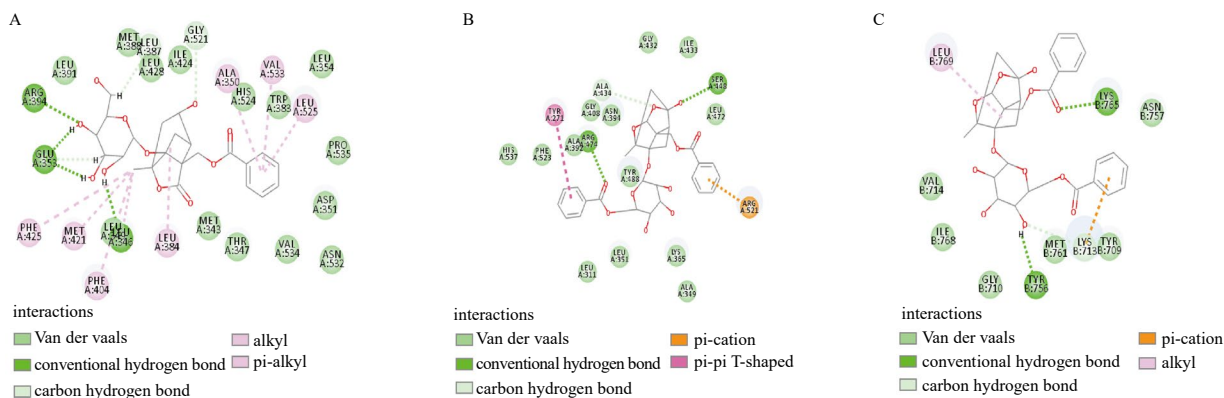
表 2 活性成分与 ESR1、 β -catenin 和 RB1 的对接结合能

Table 2 Docking binding energy of active ingredients with ESR1, β -catenin and RB1

化合物	CAS 号	化学式	结合能/(kJ·mol ⁻¹)		
			ESR1	β -catenin	RB1
黄芩苷	21967-41-9	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁	-59.839 7	-36.287 8	-31.935 1
芍药内酯苷	39011-90-0	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-67.481 0	-35.980 9	-27.285 5
苯甲酰芍药苷	38642-49-8	C ₃₀ H ₃₂ O ₁₂	-43.502 0	-37.983 9	-36.384 6
木犀草素	491-70-3	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	-43.917 8	-31.121 4	-28.384 9
芍药苷	23180-57-6	C ₂₃ H ₂₈ O ₁₁	-57.785 0	-36.094 9	-34.370 7
二没食子酸	536-08-3	C ₁₄ H ₁₀ O ₉	-41.632 7	-30.167 2	-30.135 8
异欧前胡素	482-45-1	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	-40.261 3	-26.367 9	-24.423 8
异隐丹参酮	22550-15-8	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	-38.606 6	-30.239 8	-20.804 0
泪柏醇	596-85-0	C ₂₀ H ₃₄ O	-38.050 1	-29.017 5	-24.494 1
鞣花酸	476-66-4	C ₁₄ H ₆ O ₈	-41.694 3	-28.035 6	-20.353 2

形成 H 键，结合能为-67.481 kJ/mol；苯甲酰芍药苷与 β -catenin 结合能力较强，分别在 SER448、ARG474 形成 H 键，结合能为-37.983 9 kJ/mol；

苯甲酰芍药苷与 RB1 结合能力较强，分别在 LYS765、TYR756 形成 H 键，结合能为-36.384 6 kJ/mol（图 8）。



A-芍药内酯苷与 ESR1 对接；B-苯甲酰芍药苷与 β -catenin 对接；C-苯甲酰芍药苷与 RB1 对接

A-docking of albiflorin to ESR1; B-docking of benzoylpaeoniflorin to EGFR; C-docking of benzoylpaeoniflorin to RB1

图 8 丹参-赤芍核心活性成分与关键靶点的对接

Fig. 8 Docking of core active ingredients of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* to key targets

3.8 丹参-赤芍药对抑制 HCT116 细胞增殖

如表 3 所示, 不同质量浓度的丹参-赤芍药对 HCT116 细胞均有一定的抑制作用, 且呈剂量相关性。运用 SPSS 25.0 统计软件计算出药物作用于 HCT116 细胞 48 h 的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 为 $459.303 \mu\text{g/mL}$ 。根据 IC_{50} 值和本课题组前期实验, 给药质量浓度选择在 $459.303 \mu\text{g/mL}$ 以下。选择 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 的丹参-赤芍药对进行后续实验。

3.9 丹参-赤芍药对抑制 HCT116 细胞迁移

如图 9 所示, 与对照组比较, 各给药组细胞迁

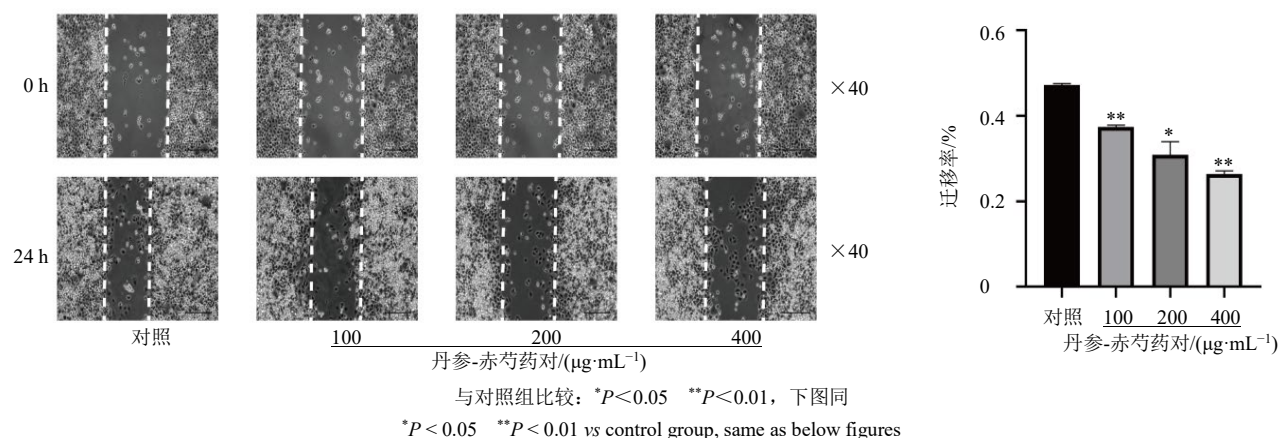


图 9 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* on migration of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

移率显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 其中丹参-赤芍高剂量组作用最佳。

3.10 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞 *ESR1*、*CTNNB1* 和 *RB1* mRNA 表达的影响

如图 10 所示, 与对照组比较, 丹参-赤芍药对各剂量组 *ESR1* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 丹参-赤芍药对高剂量组 *CTNNB1* mRNA 表

达水平显著降低 ($P < 0.01$), 丹参-赤芍药对中、高剂量组 *RB1* mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.11 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞 *ESR1*、 β -catenin 和 *RB1* 蛋白表达的影响

如图 11 所示, 与对照组比较, 丹参-赤芍药对各剂量组 *ESR1* 和 β -catenin 蛋白表达水平均显著降低, *RB1* 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.05, 0.01$)。

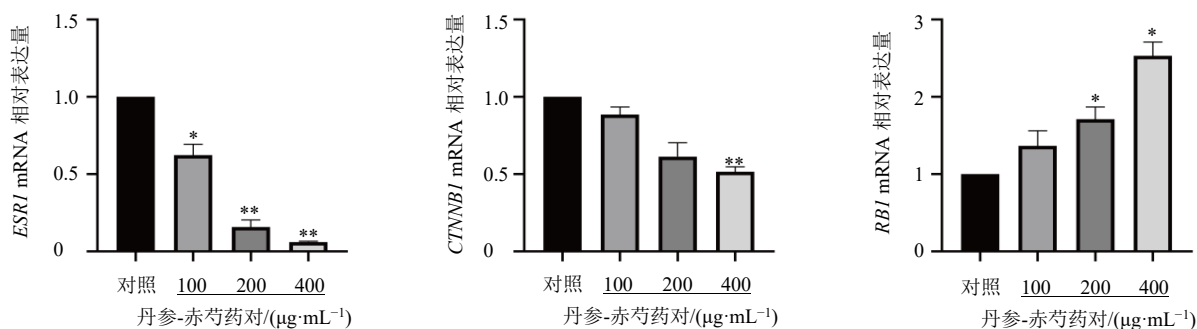


图 10 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞 *ESR1*、*CTNNB1* 和 *RB1* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* on *ESR1*, *CTNNB1* and *RB1* mRNA expressions in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.12 丹参-赤芍药对 HCT116 细胞凋亡蛋白表达的影响

如图 12 所示, 与对照组比较, 丹参-赤芍药对

高剂量组 Caspase-3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), 丹参-赤芍药对中、高剂量组 PARP 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

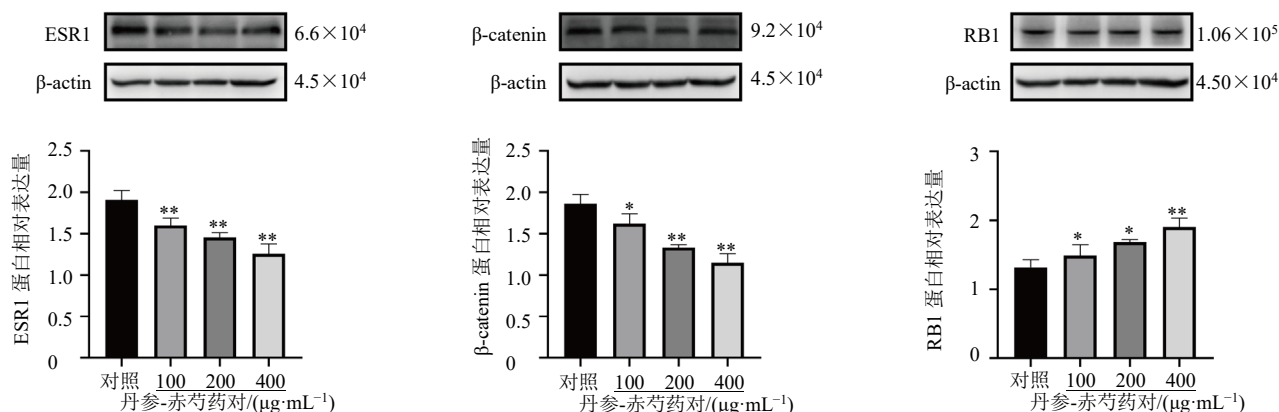


图 11 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞 ESR1、 β -catenin 和 RB1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* on ESR1, β -catenin and RB1 protein expressions in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

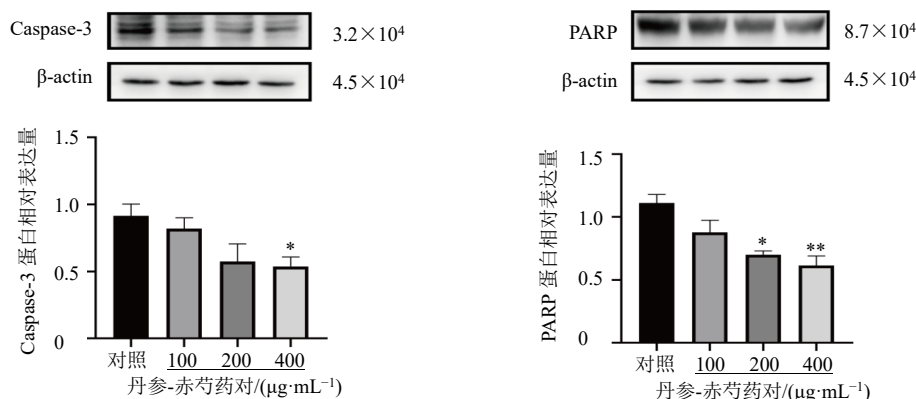


图 12 丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 12 Effect of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma-Paeoniae Radix Rubra* on apoptosis protein expressions in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

中医认为 CRC 病位在大肠, 与脾胃密切相关。《灵枢·百病始生》提到: “肠胃之络伤, 则血溢于肠外, 肠外有寒, 汁沫与血相抟, 则并合凝聚不得散, 而积成矣。” 患者多因脾失健运, 血行不畅, 日久致瘀, 瘀血搏结肠道, 损伤肠络, 日久成痼而致癌肿, 常见腹痛拒按、舌质紫暗或有瘀斑、脉涩等临床表现, 故临床治疗 CRC 多加入丹参、赤芍等活血类中药^[8]。

本研究利用网络药理学, 深入挖掘丹参-赤芍治疗 CRC 的有效成分、潜在靶点和作用机制。共筛选到丹参-赤芍药对的活性成分 206 个, 丹参-赤芍药对治疗 CRC 的潜在靶点 283 个, 并通过 PPI 网络分析筛选出 ESR1、CTNNB1 及 RB1 为关键核心靶

点。其中, ESR1 是 CRC 发生、发展和转移中最重要的调节基因, 是诱导 CRC 的潜在机制^[9]。一项基于 GSCA 的遗传改变分析表明, *ESR1* 基因的突变可能是诱发 CRC 致癌的潜在机制, 并且与生物学进展与免疫反应有关^[10]。CTNNB1 基因编码蛋白 β -catenin 是 Wnt 信号传导的关键组成部分, 在 CRC 进展中起着至关重要的作用^[11-12]。 β -catenin 在正常结肠上皮组织中定位于细胞膜, 而在癌变过程中 β -catenin 从细胞膜游离, 在 CRC 癌组织中主要表达于细胞质和细胞核中。其在 CRC 癌组织中异常高表达与肿瘤的分化、侵袭、转移密切相关^[13]。研究显示, 槲皮素、木犀草素、芹菜素等中药单体通过 Wnt/ β -catenin 通路对 CRC 的不同阶段 (包括癌前病变、CRC 早期和晚期) 发挥抗肿瘤作用^[14]。 β -

catenin 可能是 CRC 患者的临床预后的重要生物标志物。RB1 是肿瘤抑制基因, RB1 表达水平与肿瘤的大小、淋巴结转移及临床预后密切相关, RB1 可以通过限制细胞周期进展从而抑制肿瘤的发展进程^[15]。有研究发现 RB1 在前列腺癌、乳腺癌、CRC、非小细胞肺癌等多种恶性肿瘤进展过程中失活^[15-18]。肿瘤细胞中的 RB1 缺失会诱导脂肪酸氧化并激活 JNK, 激活后的 JNK 通过刺激 IL-6 的产生, 进而促进 STAT3 介导的干细胞样行为和恶性进展。也有研究分析发现, RB1 是 CRC 发生晚期肝转移及腹膜转移的核心基因, 并且可能与肿瘤浸润淋巴细胞相关途径有关^[19]。本研究通过 MTT 及划痕实验验证了丹参-赤芍药对对 HCT116 细胞的增殖和迁移能力具有明显的抑制作用, 并且通过 qRT-PCR 及 Western blotting 实验分别在基因和蛋白水平验证了丹参-赤芍药对对网络药理学筛选出的核心基因 ESR1 及 CTNNB1 (编码蛋白 β -catenin) 的表达具有明显的抑制作用, 对 RB1 表达具有明显的促进作用。因此, 核心基因 ESR1、CTNNB1 及 RB1 有可能在丹参-赤芍药对抑制 CRC 发生发展过程中发挥了关键作用。

GO 功能富集分析发现丹参-赤芍药对对药物反应、氧化应激等 BP, 膜筏、膜微域等 CC, 酰胺结合、肽结合等 MF 产生影响, 并且 KEGG 通路富集分析得到丹参-赤芍药对主要通过 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、p53 信号通路、HIF-1 信号通路、细胞凋亡等信号通路抑制 CRC 的发生发展。其中 PI3K/Akt 是与肿瘤发生发展密切相关的信号通路, 在调控 CRC 细胞增殖、侵袭、细胞周期等行为上发挥重要的作用。研究表明, HER2 在 CRC 癌组织中的高表达水平与 PI3K/Akt 通路的激活有关, PI3K 可以驱动 HER2 的表达, 促进肿瘤干细胞增殖能力^[20]。杠柳次苷是一种潜在的抗癌化合物, 研究发现杠柳次苷可以通过靶向 PI3K/Akt 通路, 促进细胞凋亡来发挥抗 CRC 作用^[21]。TNF- α 是 CRC 中常见的促炎细胞因子, 可通过激活 JNK 信号通路调节 BaP 和 PhIP 诱导的 CRC 上皮细胞 DNA 损伤。TNF- α 诱导的 DNA 损伤又能被功能性 p53 抑制^[22]。CRC 中增强的糖酵解和磷酸戊糖途径与 HIF-1 α 表达增加有关, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) / PI3K/Akt 和 Wnt/ β -catenin 信号激活 HIF-1 α 诱导的代谢重编程, 从而在 CRC 治疗过程中促进机体对 5-氟尿嘧啶产生耐药性, 降低临床疗效^[23]。故 PI3K-

Akt 信号通路、TNF 信号通路、p53 信号通路、HIF-1 信号通路、细胞凋亡等信号通路与 CRC 的发生发展密切相关。

利用分子对接技术筛选出丹参-赤芍药对中有有效成分黄芩苷、芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷、木犀草素、芍药苷等与关键核心靶点对接能力较强, 这与本课题组前期进行的 UPLC-Q-TOF/MS 实验筛选出的药物有效成分相一致^[4]。其中, 黄芩苷介导了多种癌症相关信号通路的调节^[24], 其可以通过上调孕酮诱导的蜕膜蛋白 (decidual protein induced by progesterone, DEPP) 和激活 Ras/Raf/丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MEK) /细胞外调节蛋白激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 信号传导诱导 CRC 细胞的衰老^[25], 也可以通过减少 c-Myc 的表达来诱导 CRC 细胞凋亡并抑制肿瘤生长^[26]; 芍药内酯苷可通过核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) /环氧化酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 信号通路抑制溃疡性结肠炎大鼠发生炎症反应, 抑制结肠组织氧化反应, 减轻结肠组织病变, 从而阻断 CRC “炎-癌” 转化进程^[27]; 苯甲酰芍药苷、木犀草素、芍药苷等也具有很好的抗肿瘤活性作用^[28-30]。

综上所述, 本研究基于网络药理学、分子对接技术及体外实验证明了丹参-赤芍药对能够通过多通路、多靶点在 CRC 治疗中发挥重要的作用, 为丹参-赤芍药对治疗 CRC 提供了客观依据。

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] 陈叶青, 李晓琳, 陈子睿, 等. 基于数据挖掘的结直肠癌中医证型与中药应用规律研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2022, 28(3): 412-416.
- [3] 韩荣春, 史素影, 童小慧, 等. 芍药在中国和日本的本草学比较 [J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 1109-1111.
- [4] Kong X B, Liu C X, Lu P, *et al.* Combination of UPLC-Q-TOF/MS and network pharmacology to reveal the mechanism of Qizhen Decoction in the treatment of colon cancer [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(22): 14341-14360.
- [5] Wei X, Zhou R P, Chen Y, *et al.* Systemic pharmacological verification of Baixianfeng Decoction regulating TNF-PI3K-Akt-NF- κ B pathway in treating rheumatoid arthritis

- [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 119: 105519.
- [6] 杨艳妮, 袁培培, 冯敖梓. 基于网络药理学和分子对接技术探讨巴戟天治疗类风湿性关节炎的作用机制 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1463-1470.
- [7] 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.
- [8] 徐钰莹, 杨宇飞. 杨宇飞教授阶段辨治晚期结直肠癌的中西医并重思路与经验总结 [J]. 世界中医药, 2021, 16(9): 1372-1379.
- [9] Pu W L, Qian F, Liu J, *et al*. Targeted bisulfite sequencing reveals DNA methylation changes in zinc finger family genes associated with KRAS mutated colorectal cancer [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 759813.
- [10] Song D L, Zhang D, Chen S S, *et al*. Identification and validation of prognosis-associated DNA repair gene signatures in colorectal cancer [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 6946.
- [11] Huang C T, Du R J, Jia X C, *et al*. CDK15 promotes colorectal cancer progression via phosphorylating PAK4 and regulating β -catenin/MEK-ERK signaling pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29(1): 14-27.
- [12] Zeng S, Chen L, Sun Q, *et al*. Scutellarin ameliorates colitis-associated colorectal cancer by suppressing Wnt/ β -catenin signaling cascade [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 906: 174253.
- [13] Matly A, Quinn J A, McMillan D C, *et al*. The relationship between β -catenin and patient survival in colorectal cancer systematic review and meta-analysis [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2021, 163: 103337.
- [14] Chang J R, Xavier H W, Chen D F, *et al*. Potential role of traditional Chinese medicines by Wnt/ β -catenin pathway compared with targeted small molecules in colorectal cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 690501.
- [15] Foggetti G, Li C, Cai H C, *et al*. Genetic determinants of EGFR-driven lung cancer growth and therapeutic response *in vivo* [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(7): 1736-1753.
- [16] Aggarwal R, Rydzewski N R, Zhang L, *et al*. Prognosis associated with luminal and basal subtypes of metastatic prostate cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2021, 7(11): 1644-1652.
- [17] Aftimos P, Oliveira M, Irrthum A, *et al*. Genomic and transcriptomic analyses of breast cancer primaries and matched metastases in AURORA, the breast international group (BIG) molecular screening initiative [J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(11): 2796-2811.
- [18] Han F Y, Hu M X, Zhang L J, *et al*. A-to-I RNA editing of BLCAP promotes cell proliferation by losing the inhibitory of Rb1 in colorectal cancer [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 417(2): 113209.
- [19] Jacob S, Jurinovic V, Lampert C, *et al*. The association of immunosurveillance and distant metastases in colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2021, 147(11): 3333-3341.
- [20] Mangiapane L R, Nicotra A, Turdo A, *et al*. PI3K-driven HER2 expression is a potential therapeutic target in colorectal cancer stem cells [J]. *Gut*, 2022, 71(1): 119-128.
- [21] Cheng Y, Wang G Y, Zhao L M, *et al*. Periplocymarin induced colorectal cancer cells apoptosis via impairing PI3K/AKT pathway [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 753598.
- [22] Alotaibi A G, Li J V, Gooderham N J. Tumour necrosis factor- α (TNF- α) enhances dietary carcinogen-induced DNA damage in colorectal cancer epithelial cells through activation of JNK signaling pathway [J]. *Toxicology*, 2021, 457: 152806.
- [23] Dong S H, Liang S, Cheng Z Q, *et al*. ROS/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signalings activate HIF-1 α -induced metabolic reprogramming to impart 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 15.
- [24] Singh S, Meena A, Luqman S. Baicalin mediated regulation of key signaling pathways in cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 164: 105387.
- [25] Wang Z, Ma L M, Su M Q, *et al*. Baicalin induces cellular senescence in human colon cancer cells via upregulation of DEPP and the activation of Ras/Raf/MEK/ERK signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 217.
- [26] Tao Y L, Zhan S B, Wang Y B, *et al*. Baicalin, the major component of traditional Chinese medicine *Scutellaria baicalensis* induces colon cancer cell apoptosis through inhibition of oncomiRNAs [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14477.
- [27] 黄梅, 颜景颖. 基于 NF- κ B/COX-2 信号通路探讨芍药内酯苷对溃疡性结肠炎模型大鼠的影响 [J]. 中医学报, 2022, 37(2): 365-370.
- [28] 钟万超. 赤芍水溶性成分及其生物活性的研究 [D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院, 2020.
- [29] Song Y L, Yu J, Li L L, *et al*. Luteolin impacts deoxyribonucleic acid repair by modulating the mitogen-activated protein kinase pathway in colorectal cancer [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10998-11011.
- [30] 司晓丽, 韩玉梅, 王家敏, 等. 芍药苷对结肠癌 SW480 细胞增殖、侵袭、迁移的影响 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2019, 28(2): 127-133.

[责任编辑 李亚楠]