

[文章编号] 1671-587X(2024)01-0208-13

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240125

基于黄芩汤治疗结直肠癌作用机制的网络药理学和 分子对接分析

陈霁莹¹, 姜靖雯¹, 张 慧²

(1. 广州中医药大学附属海南中医院, 海南 海口 570100; 2. 海南省中医院肿瘤科,
海南 海口 570100)

[摘要] **目的:** 通过网络药理学和分子对接技术分析黄芩汤治疗结直肠癌(CRC)的潜在作用靶点, 阐明其相关分子机制。**方法:** 基于中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)构建黄芩汤活性成分和作用靶点数据集, 通过GeneCards、人类在线孟德尔遗传(OMIM)、药物遗传学和药物基因组学知识库(PharmGKB)等数据库构建CRC疾病相关靶点数据集。利用R软件、Cytoscape软件和STRING数据库构建药物-疾病靶点交集、黄芩汤中药复方调控网络和蛋白-蛋白互作(PPI)网络。利用R软件和Metascape平台进行基因本体论(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集分析。采用AutoDock和PyMol软件进行分子对接验证, 评估配受体结合情况。**结果:** 筛选黄芩汤有效活性成分136个, 黄芩汤治疗CRC的潜在靶点242个, 核心靶点18个, 基于信号通路分析获得CRC密切相关核心关键靶点5个, 分别为蛋白激酶B1(AKT1)、丝裂原活化蛋白激酶3(MAPK3)、原癌基因FOS、肿瘤蛋白P53(TP53)和原癌基因MYC。GO功能富集分析, 主要参与多种细胞应激反应的生物过程。KEGG信号通路富集分析, 潜在靶点在癌症通路高度富集; 进一步对CRC核心靶点进行KEGG信号通路富集分析, 主要涉及内分泌抵抗、细胞凋亡和表皮生长因子受体-酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI)抵抗等通路。分子对接验证, 黄芩汤活性成分槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮和柚皮素与AKT1、MAPK3、FOS、TP53及MYC均对接稳定, 其中槲皮素与AKT1结合性最好。**结论:** 黄芩汤活性成分可多靶点和多通路治疗CRC, 核心配受体槲皮素和AKT1可能通过调控磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路影响细胞增殖、分化和凋亡进程, 发挥治疗CRC作用。

[关键词] 黄芩汤; 网络药理学; 分子对接; 结直肠肿瘤; 槲皮素

[中图分类号] R285.5; R735.3 **[文献标志码]** A

Network pharmacology and molecular docking analysis based on mechanism of Huangqin Tang in treatment of colorectal cancer

CHEN Aiyang¹, JIANG Jinwen¹, ZHANG Hui²

(1. Affiliated Hainan Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine,
Haikou 570100, China; 2. Department of Oncology, Hainan Traditional Chinese Medicine Hospital,
Haikou 570100, China)

[收稿日期] 2023-02-11

[基金项目] 海南省科技厅自然科学基金高层次人才项目(822RC847)

[作者简介] 陈霁莹(1996-), 女, 海南省三亚市人, 在读硕士研究生, 主要从事中医药治疗肿瘤方面的研究。

[通信作者] 姜靖雯, 主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: 174676785@qq.com)

ABSTRACT Objective: To analyze the potential therapeutic targets of Huangqin Tang in treatment of colorectal cancer (CRC) by network pharmacology and molecular docking techniques, and to clarify the related molecular mechanism. **Methods:** The active component and target dataset for Huangqin Tang were constructed based on the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP); the CRC-disease related target dataset was built by Databases such as GeneCards, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), and pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base (PharmGKB). Drug-disease target intersect, Huangqin Tang herbal formula network, and protein-protein interaction (PPI) networks were built by R software, Cytoscape software, and STRING Database; Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were conducted by R software and Metascape platform; molecular docking validation was performed with AutoDock and PyMOL software to assess the ligand-receptor binding. **Results:** A total of 136 effective active components of Huangqin Tang were screened, and 242 potential targets were identified for treatment of CRC, including 18 core targets. Five core key targets closely related to CRC, identified through signaling pathway analysis, were protein kinase B1 (AKT1), mitogen-activated protein kinase 3 (MAPK3), proto-oncogene FOS, tumor protein p53 (TP53), and proto-oncogene MYC. The GO functional enrichment analysis results mainly involved various biological processes related to cellular stress responses. The KEGG signaling pathway enrichment analysis results showed that potential targets were highly enriched in the cancer pathway; further analysis on CRC core targets via KEGG signaling pathway revealed involvement primarily in pathways related to endocrine resistance, apoptosis, and epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) resistance. The molecular docking results showed that the active components of Huangqin Tang, including quercetin, kaempferol, baicalein, 7-methoxy-2-methyl isoflavone, and naringenin, were stably docked with AKT1, MAPK3, FOS, TP53, and MYC, and quercetin exhibited the best binding with AKT1. **Conclusion:** The active components of Huangqin Tang can treat CRC through multi-target and multi-pathway. The core ligand quercetin and AKT1 may exert the therapeutic effect in CRC by regulating the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/AKT and mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways to influence the cell proliferation, differentiation, and apoptosis processes.

KEYWORDS Huangqin Tang; Network pharmacology; Molecular docking; Colorectal neoplasm; Quercetin

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是消化系统最常见的恶性肿瘤, 据统计, 2020年CRC在全球癌症发病率中位列第3位, 国内发病率也呈逐年上升趋势, 且发病年龄渐趋年轻化^[1-4]。目前CRC的治疗方法主要包括手术、放化疗和靶向药物等, 但患者术后胃肠神经功能紊乱、放化疗后消化道反应和皮肤神经感觉异常等不良反应的出现, 对患者治疗耐受性有一定程度的影响, 降低了CRC患者的临床疗效和生存质量。现代临床研究^[5]表明: 中医药治疗在结肠癌治疗全程均可进行干预, 与放化疗药物有效结合, 在增效减毒、控制转移和复发、提高患者的生活质量、延长患者总生存期和肿瘤康复等方面具有良好效果。

中医学理论^[6-7]认为: 结肠癌的病因病机主要为六淫外侵, 或饮食不节, 或七情内伤, 加之正气

不足, 脾虚失运, 或先天脾肾不足, 毒邪踞之, 蕴结于大肠, 肠道传导失职, 凝聚成积。黄芩汤出自《伤寒论辨·太阳病脉证并治》“太阳与少阳合病, 自下利者, 与黄芩汤”, 全方由黄芩、白芍、大枣和甘草4味中药配伍而成, 主治湿热下痢诸症, 被奉为治痢之祖方, 是临床肠癌治疗的常用方剂。方中黄芩“主诸热”, 为全方主药, 取其清热泻火解毒之功; 白芍酸苦敛阴和营止痛, 与黄芩相伍, 既泄肠中毒热, 又敛营止痛, 酸苦相施; 大枣、甘草与芍药合用可保津益气和中, 缓急止痛。现代药理研究^[8-10]显示: 黄芩汤有抗炎、抑菌、调整肠道菌群、抗肿瘤和化疗药物减毒增效的作用。但目前黄芩汤治疗CRC的分子靶点和作用机制仍未明确。

中药化学成分十分复杂, 临床应用主以各种经验医学用药规律为原则, 多药配伍来防治疾病, 此

特征使得中药现代化研究和开发利用难度大大提高。网络药理学由药理学、医学和统计学等多学科集成,通过系统和强大的数据库揭示药物治疗疾病分子机制的研究方法,通过构建“疾病-基因-蛋白-靶点-药物”网络,从整体上认识研究药物和疾病本质,与中药多成分、多靶点和整体性特点相呼应,是中医药现代化研究的有效方式^[1]。本研究通过网络药理学和分子对接技术探讨黄芩汤治疗CRC的可能生物活性成分和分子机制,为治疗CRC的中药研究和应用提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 黄芩汤有效成分和相关靶点筛选 利用中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)检索黄芩汤(黄芩、白芍、甘草和大枣)中药物化学成分,从中筛选口服利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 且类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 的有效成分,将所获得的活性成分靶点导入UniProt数据库,通过设定的条件对其进行基因注释。

1.2 CRC相关靶点筛选和黄芩汤潜在治疗靶点预测 以“colorectal cancer”为关键词在GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)、疗效药靶数据库(Therapeutic Target Database, TTD)(<https://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp>)、人类在线孟德尔遗传(Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM)数据库(<https://www.omim.org>)、DrugBank数据库(<https://go.drugbank.com/>)和药物遗传学和药物基因组学知识库(Pharmacogenetics and Pharmacogenomics Knowledge Base, PharmGKB)(<https://www.pharmgkb.org/>)数据库中检索、汇总和去重,获得CRC疾病相关靶点。将疾病靶点与黄芩汤活性成分靶点取交集,获得黄芩汤治疗CRC的作用靶点,以此作为疾病和药物的共同潜在靶点,并利用R 4.2.2软件Venn包绘制Venn图。

1.3 构建疾病-药物-化合物-靶点网络 利用Cytoscape 3.7.2软件绘制黄芩汤中药复方调控网络关系图,采用Network Analyzer插件进行分析,根据获取的介度(betweenness centrality, BC)、紧密度(closeness centrality, CC)和连接度等拓扑

参数的中位数对节点进行分析处理。

1.4 蛋白-蛋白互作(protein-protein interaction, PPI)网络构建和核心靶点筛选 为研究黄芩汤治疗CRC潜在作用靶点之间的相互关系,将筛选所得共同潜在靶点导入STRING数据库(<https://cn.string-db.org/>),物种来源设定为“Homo sapiens”,选择高置信度(置信度95%),构建靶点间相互作用的PPI网络。再导入Cytoscape 3.7.2软件进行网络拓扑分析,筛选PPI网络核心靶点。

1.5 CRC与黄芩汤交集靶点的基因本体论(Gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析 为了解黄芩汤治疗CRC所涉及的生物学功能及相关通路,将药物疾病共有靶点进行GO功能和KEGG信号通路富集分析。使用R 4.2.2软件,采用stringi数据包,安装clusterProfiler、enrichplot和ggplot2等函数包进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析,采用Metascape(<https://metascape.org/>)数据库对潜在靶点进行KEGG信号通路富集分析作为数据补充。得出黄芩汤治疗CRC的相关通路,采用R 4.2.2软件进行可视化处理。

1.6 成分靶点分子对接 为了进一步评估黄芩汤治疗CRC的活性成分和受体靶点的可靠性,对其进行分子对接,分析其结合情况。由PubChem数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载活性成分小分子蛋白的分子2D结构,采用ChemBio3D Ultra软件对小分子化合物进行结构优化和能量最小化,保存3D结构信息并通过AutoDockTools-1.5.7软件对小分子进行加氢和设置可旋转键等处理,作为分子对接的配体分子保存。在蛋白质数据库(Protein Data Bank, PDB)(<https://www.rcsb.org/>)下载生物来源为人的关键基因蛋白晶体结构,采用PyMOL软件去除靶蛋白水分子和原有配体,再通过AutoDockTools-1.5.7软件在蛋白受体上加氢和计算Gasteiger电荷等处理,设置活性口袋后保存,作为分子对接的蛋白质受体。最后,利用AutoDock软件将小分子配体与蛋白受体进行批量对接,通过PyMOL软件将最优对接复合物进行可视化处理。

2 结果

2.1 黄芩汤治疗CRC潜在靶点预测 根据OB $\geq 30\%$ 和DL ≥ 0.18 的标准在TCMSP数据库检索黄

芩汤活性成分, 共筛选出黄芩 36 个、白芍 13 个、大枣 29 个和甘草 92 个有效化合物, 剔除重复和缺少靶点基因的化合物, 并根据被证实的“Reviewed”和人类来源的“Human”为条件对其作用靶点在 UniProt 数据库进行注释校正, 最终得到 136 个有效成分和 247 个对应作用靶点。采用 GeneCards、TTD、OMIM、DrugBank 和 PharmGkb 数据库筛选 CRC 疾病相关靶点, 整合去重, 共得出 CRC 疾病相关靶点 17 045 个 (图 1A)。将药物和疾病靶点整合取交集, 得到黄芩汤治疗 CRC 的潜在靶点 242 个 (图 1B)。

2.2 构建黄芩汤-化合物-靶点网络 将黄芩汤活性成分与靶点通过 Cytoscape 3.7.2 软件绘制“黄芩汤-化合物-靶点”网络关系图 (图 2), 共获得 378 个节点和 2 085 条边。连线表示黄芩汤中不同药物有效活性成分与潜在疾病作用靶点之间的相互作用关系, 凹四边形代表潜在靶点, 蓝色节点代表大枣活性成分, 紫色节点代表黄芩活性成分, 黄色节点代表白芍活性成分, 红色节点代表甘草活性成分。成分-靶点间以“一对多”的相互作用关系为主, 体现中药多靶点干预治疗的特性。按 Degree 值筛选得到 20 个黄芩汤主要活性化合物 (表 1), 其中槲皮素潜在治疗疾病靶点最多, 有 136 个, 其次为山柰酚、汉黄芩素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮、柚皮素、黄芩素、甘草查尔酮 A、刺芒素、异鼠李素和美迪紫檀素。上述高连接度活性化合物可能在黄芩汤治疗 CRC 中发挥主要药理作用。

2.3 PPI 网络构建和核心靶点筛选 为研究黄芩汤治疗 CRC 潜在作用靶点的相互关系, 将所获得的 242 个黄芩汤治疗 CRC 的潜在靶点导入 STRING 数据库, 设置人源性物种来源, 默认其余参数设置, 构建 PPI 网络图 (图 3), 再将结果导入 Cytoscape3.7.2 软件进行分析, 根据基因的 BC、CC 和连接度中位值评分进行 2 次筛选, 最终得到 18 个节点, 157 条边 (图 4 和表 2)。其中按 Degree 值排名前 10 位的靶点为潜在核心作用靶点, 即上述靶点在网络分析中处于核心位置, 可能为黄芩汤治疗 CRC 的核心靶点。

2.4 GO 功能富集分析结果 利用 R 软件函数包对预测 242 个 CRC 潜在治疗靶点进行 GO 的生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cell component, CC) 富集分析, 采用 R 软件对结果进行可视化。BP 共

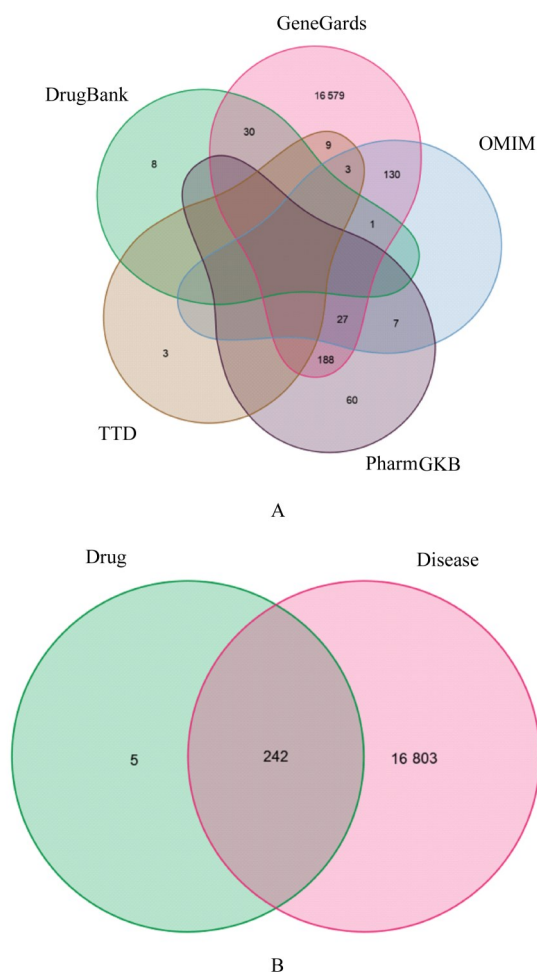


图 1 CRC 靶点 Venn 图(A)和黄芩汤靶点与 CRC 靶点 Venn 图(B)

Fig. 1 Venn diagram of CRC targets (A) and Venn diagram of Huangqin Tang targets and CRC targets (B)

富集 2 654 条, 主要与细胞对异生物应激反应、氧化应激反应和脂多糖反应等细胞调控有关联; CC 富集 147 条, 主要与膜筏、膜微区和细胞质膜微囊等有关联; MF 共富集 272 条, 主要与调控受体活性、配体转录因子激活和 DNA 及 RNA 相关转录因子结合等有关联。见图 5。

2.5 KEGG 信号通路富集分析结果 利用 R 软件 clusterProfiler 函数包的 enrichKEGG 函数和 Metascape 数据库 (人源) 对 242 个潜在靶点进行 KEGG 信号通路富集分析, 共富集到 183 条信号通路, 富集结果见图 6 和 7。黄芩汤与 CRC 交集潜在靶点通路富集主要涉及化学致癌因素-受体激活相关通路、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路、化学致癌-活性氧通路、

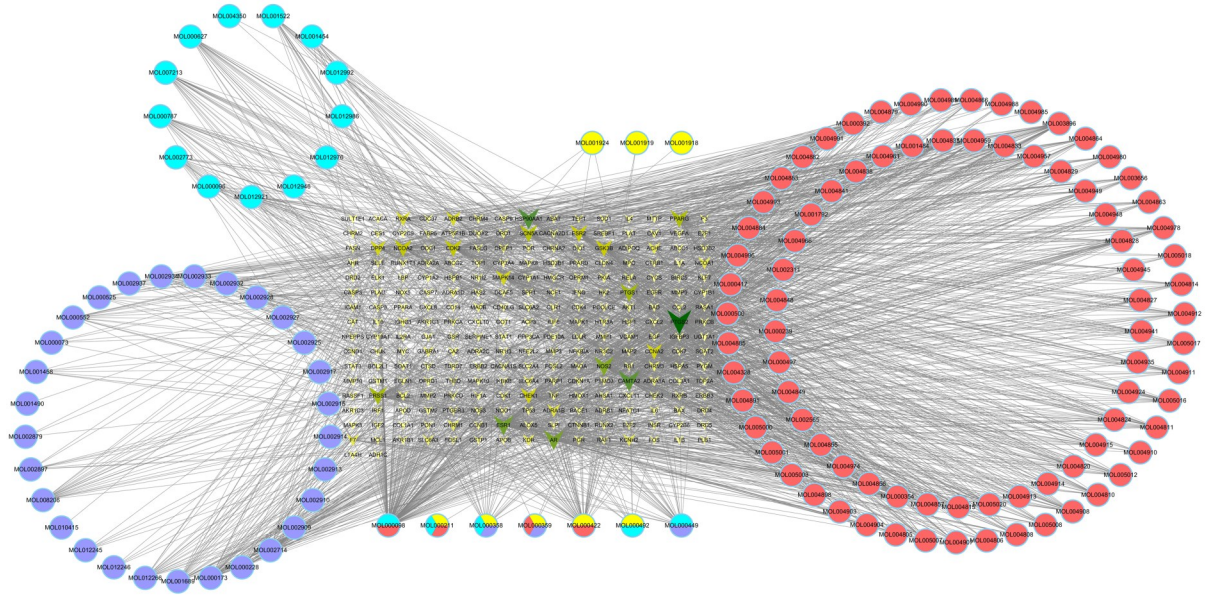


图2 黄芩汤-化合物-CRC靶点网络图

Fig. 2 Network diagram of Huangqin Tang-compounds-CRC target

表1 黄芩汤主要活性化合物

Tab. 1 Main active compounds of Huangqin Tang

Mol ID	Molecular name	OB(η /%)	DL	Herb	Degree
MOL000098	Quercetin	46.43	0.28	Dazao, Gancao	136
MOL000422	Kaempferol	41.88	0.24	Baishao, Gancao	53
MOL000173	Wogonin	30.68	0.23	Huangqin	39
MOL003896	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	42.56	0.20	Gancao	36
MOL004328	Naringenin	59.29	0.21	Gancao	35
MOL002714	Baicalein	33.52	0.21	Huangqin	33
MOL000497	Licochalcone A	40.79	0.29	Gancao	30
MOL000392	Formononetin	69.67	0.21	Gancao	30
MOL000354	Isorhamnetin	49.60	0.31	Gancao	28
MOL002565	Medicarpin	49.22	0.34	Gancao	27
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76	Dazao, Huangqin	27
MOL000358	Beta-sitosterol	36.91	0.75	Baishao, Dazao, Huangqin	27
MOL000500	Vestitol	74.66	0.21	Gancao	26
MOL004978	2-[(3R)-8,8-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyran[6,5-f]chromen-3-yl]-5-methoxyphenol	36.21	0.52	Gancao	26
MOL004891	Shinpterocarpin	80.30	0.73	Gancao	26
MOL004835	Glypallichalcone	61.60	0.19	Gancao	25
MOL005003	Licoagrocarpin	58.81	0.58	Gancao	24
MOL004974	3'-Methoxyglabridin	46.16	0.57	Gancao	24
MOL004957	HMO	38.37	0.21	Gancao	24
MOL002928	Oroxylin A	41.37	0.23	Huangqin	23

OB: Oral bioavailability; DL: Drug-likeness.

表2 黄芩汤治疗CRC的潜在核心靶点

Tab. 2 Potential core targets of Huangqin Tang in treatment of CRC

Target	Target name	BC	CC	Degree
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3	393.235 814 3	0.670 886 076	27
AKT1	Protein kinase B1	176.409 101 2	0.609 195 402	21
HSP90AA1	Heat shock protein 90 alpha family class A member 1	207.695 211 6	0.595 505 618	21
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	147.378 085 6	0.616 279 070	20
FOS	FOS proto-oncogene	201.558 640 0	0.609 195 402	20
TP53	Tumor protein p53	173.513 651 2	0.576 086 957	19
ESR1	Estrogen receptor 1	107.373 380 9	0.588 888 889	17
MYC	MYC proto-oncogene	83.621 194 3	0.595 505 618	17
TNF	Tumor necrosis factor	139.960 208 6	0.557 894 737	17
MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14	90.592 859 5	0.588 888 889	16
RELA	Nuclear factor kappa-B p65 subunit	115.213 967 0	0.576 086 957	16
IL-6	Interleukin-6	128.678 836 9	0.552 083 333	16
CTNNB1	Catenin beta 1	112.855 398 0	0.569 892 473	16
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	66.109 788 1	0.582 417 582	15
CCND1	Cyclin D1	103.066 384 4	0.569 892 473	15
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	88.195 300 7	0.540 816 327	15
EGFR	Epidermal growth factor receptor	20.689 214 2	0.535 353 535	13
HIF1A	Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha	20.502 639 3	0.557 894 737	13

BC:Betweenness centrality; CC:Closeness centrality.

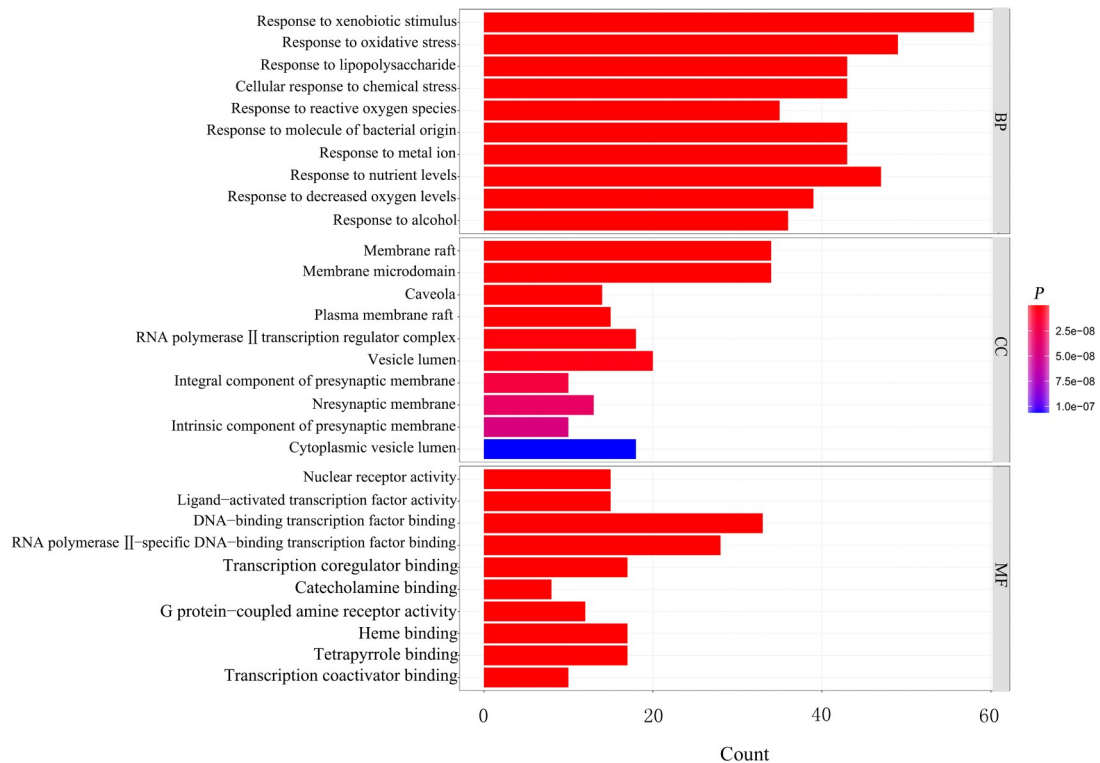


图5 黄芩汤治疗CRC潜在作用靶点GO功能富集分析图

Fig. 5 GO functional enrichment analysis diagram of potential targets of Huangqin Tang in treatment of CRC

自噬和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 等信号通路有关联 (图8)。将上述CRC通路相关基因与核心基因取交集结果显示: 黄芩汤可能通过调节蛋白激酶B1 (protein kinase B1, AKT1)、MAPK3、原癌基因FOS、肿瘤蛋白P53 (tumor protein P53, TP53)

和原癌基因MYC等核心关键靶点发挥治疗CRC的作用。将其通路可视化 (图9), 矩形框为基因/蛋白质节点, 其中黄色节点代表AKT1, 橙色节点代表MAPK3、FOS、TP53和MYC, 为黄芩汤对应作用的靶点蛋白。

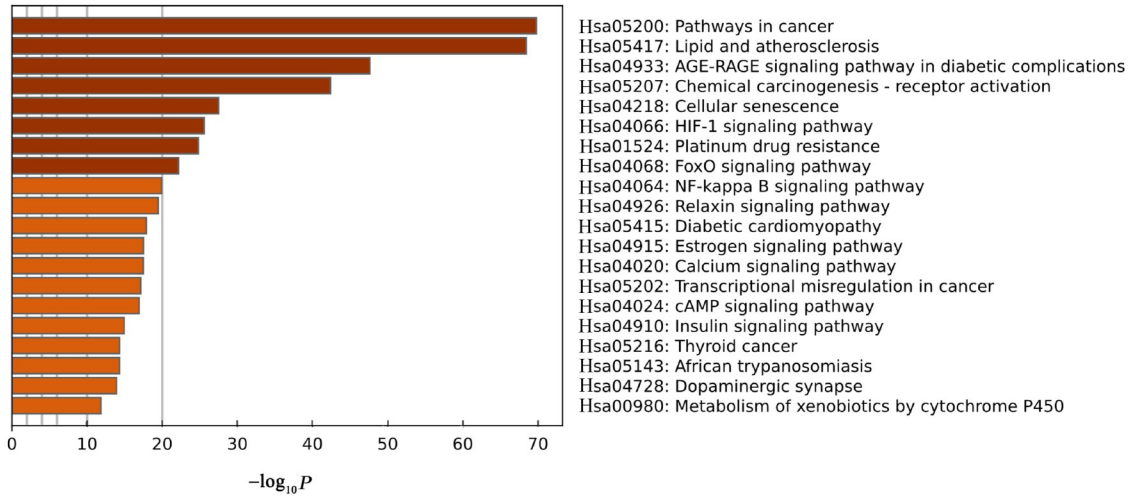


图6 KEGG 信号通路富集分析图

Fig. 6 KEGG signaling pathway enrichment analysis diagram

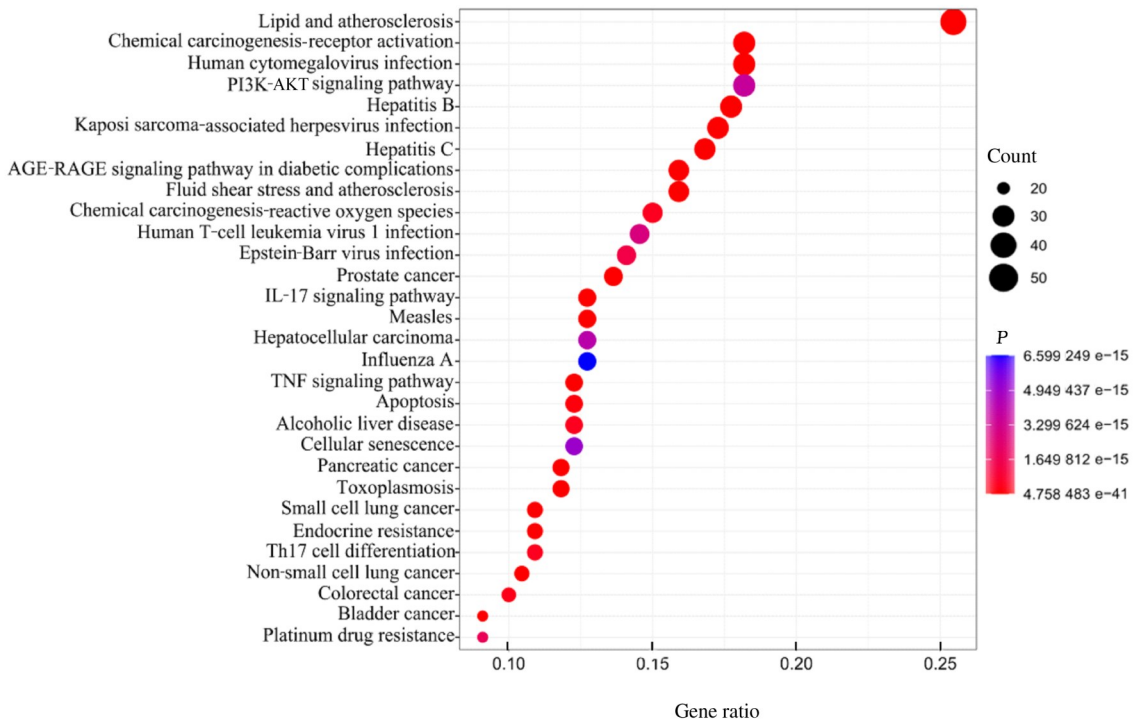


图7 KEGG 信号通路富集分析气泡图

Fig. 7 Bubble diagram of KEGG signaling pathway enrichment analysis

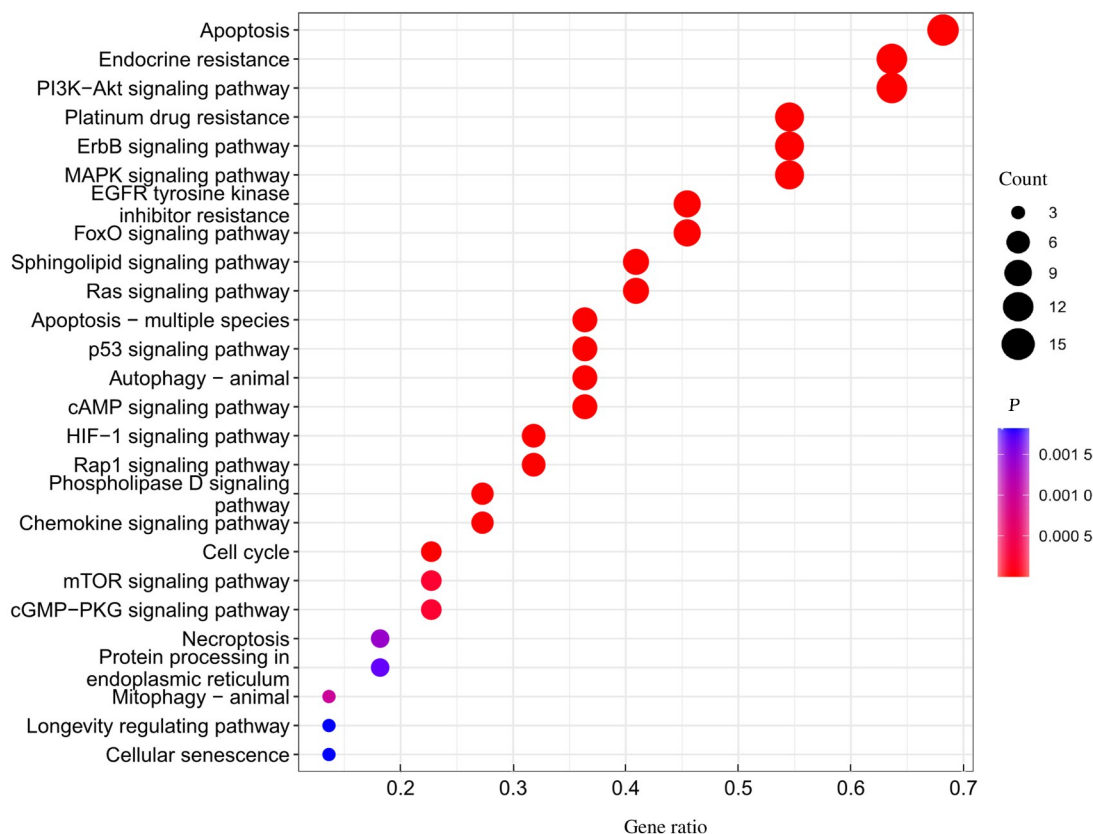


图8 CRC相关通路基因气泡图

Fig. 8 Bubble diagram of CRC related pathway genes

2.6 分子对接验证 根据KEGG信号通路富集分析中所得CRC相关基因,与前述所得10个核心靶点基因取交集,得出黄芩汤治疗CRC的5个核心靶点AKT1、MAPK3、FOS、TP53和MYC。选取黄芩汤有效成分排序前5位的化合物,即槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮和柚皮素作为小分子配体,利用AutoDock软件进行两两对接验证,配受体结合能越低,提示结合活性越高且结合构象越稳定,结果显示: CRC核心靶点与黄芩汤主要活性成分分子对接结合能均为负值,表明黄芩汤活性成分对于CRC关键受体有良好的结合活性,可能在治疗CRC过程中发挥重要作用(表3)。其中AKT1与槲皮素对接效果最好,通过PyMOL软件对其进行可视化(图10)。槲皮素与各靶点结合能均小于 $-5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$,与各靶点均有较好的结合活性,且连接度值最高,可能是黄芩汤治疗CRC的关键化合物。

3 讨论

CRC是消化系统常见肿瘤,其发生发展过程

是多因素和多基因交互作用的结果,“炎-癌转化”是主要发病机制之一,原癌基因和(或)抑癌基因突变、肠道菌群失调和组织炎性微环境等因素长期影响可诱导肠道慢性炎症反应,肠道组织出现“炎症-不典型增生-癌”样改变,最终发展为CRC^[12-13]。临床研究^[14-15]证实:黄芩汤在炎症性肠病,尤其是溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)治疗方面疗效明显。研究^[10]证实:黄芩汤水提物PHY906有抗肿瘤、抗炎和减轻化疗不良反应的作用。黄芩汤可抑制肠癌小鼠肿瘤组织中Notch和Wnt信号通路,进而抑制细胞恶性增殖,预防炎症性肠病的恶性转化^[16]。张旖晴等^[17]在观察黄芩汤治疗小鼠结肠炎相关结肠癌的研究中发现:黄芩汤治疗组较肿瘤诱导组小鼠肿瘤负荷和肿瘤体积明显减小。迟宏罡等^[18]研究显示:黄芩汤处理后CRC SW620细胞中促凋亡相关蛋白表达上调,抗凋亡相关蛋白及因子表达下调。宋振民等^[19]观察黄芩汤联合化疗治疗84例CRC患者结果显示:黄芩汤联合化疗组患者临床疗效明显高于对照组。由此可见,黄芩汤可用于治疗CRC,其机制有可能与抗

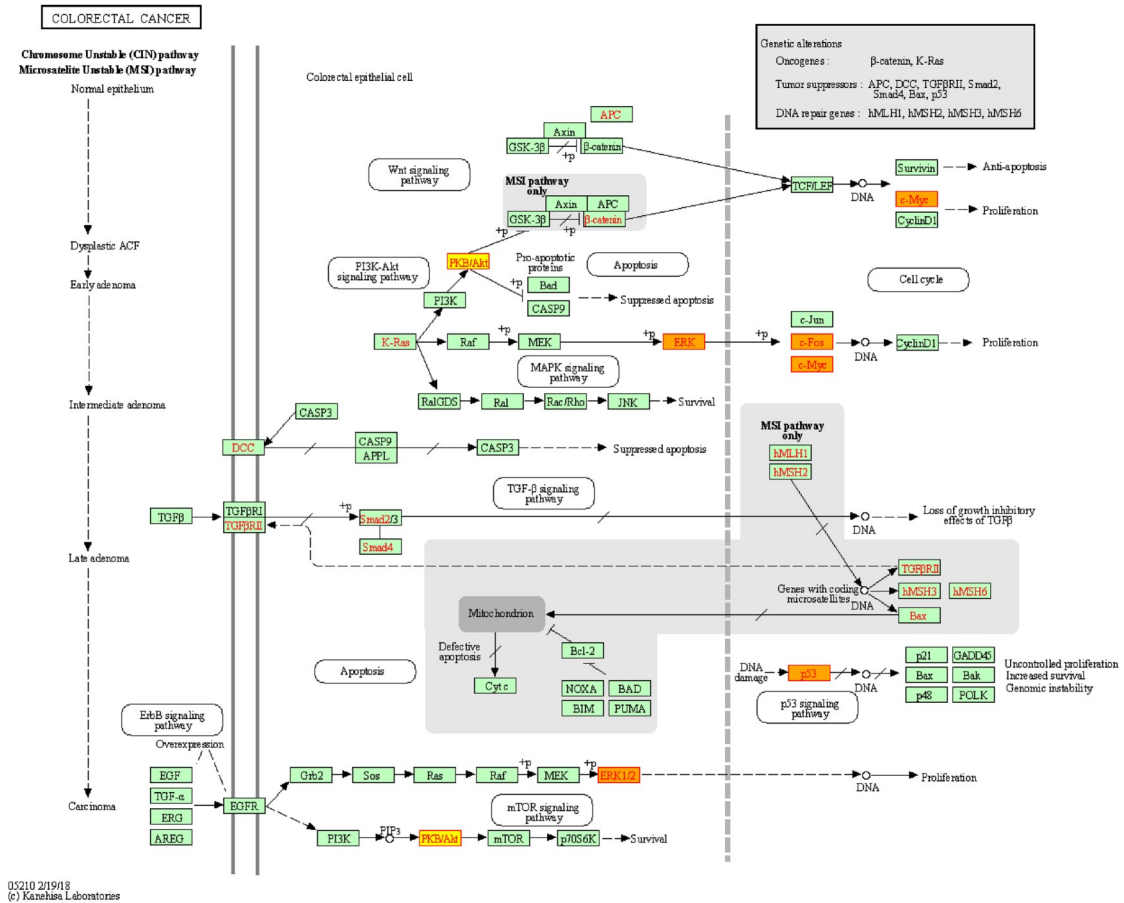


图9 黄芩汤治疗CRC核心关键靶点通路图

Fig. 9 Core key target pathway diagram of Huangqin Tang in treatment of CRC

炎机制有关, 但目前其分子机制尚未完全明确。

本研究共筛选出5种黄酮类核心化合物, 具有免疫激活、抗炎、抗肿瘤、抗氧化和抗耐药等生物活性, 主要通过抗炎、抗自由基、直接抑制癌细胞生长和抗致癌因子发挥抗肿瘤作用^[20]; 分子对接结果显示: 5种黄酮类化合物与核心关键靶点均对接良好。槲皮素以浓度依赖性方式抑制结肠癌SW480细胞增殖, 诱导其凋亡, 阻滞细胞周期于G₂和M期, 明显降低细胞黏附能力, 从而产生抗癌活性^[21]。YANG等^[22]研究表明: 槲皮素呈浓度依赖性抑制结肠癌HT-29细胞活性, 并通过调节AKT/组成型光形态发生因子9信号复合体亚基6 (constitutive photomorphogenesis 9 signalosome subunit 6, CSN6) /MYC信号轴诱导细胞凋亡。相关研究^[23]表明: 槲皮素通过上调凋亡基因, 下调抗凋亡基因, 促进大鼠CRC细胞凋亡。还可通过抑制炎症结肠癌小鼠白细胞介素6 (interleukin-6, IL-6) /信号转导及转录激活因子3 (signal

transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路活性, 降低炎症因子水平, 进而抑制细胞恶性增殖^[24]。有效成分山柰酚可通过诱导细胞周期阻滞和上调P53蛋白表达及磷酸化使B细胞淋巴瘤2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白家族中促凋亡因子Bcl-2相关X蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 表达水平升高, 抗凋亡因子Bcl-2表达水平降低, 促进细胞凋亡发生, 抑制结肠癌SW480细胞增殖^[25]。山柰酚可通过调节血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) /血管内皮细胞生长因子受体2 (vascular endothelial growth factor receptor-2, VEGFR-2) 及其下游PI3K/AKT、丝裂原活化的细胞外信号调节酶 (mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase, MEK) /细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号通路对VEGF诱导生成的血管内皮细胞产生抑制作用, 抑制血管生成^[26]。研究^[27]表明: 汉黄芩素

表3 CRC核心关键靶点与黄芩汤主要活性成分分子对接结合能

Tab. 3 Molecular docking binding energy of CRC core key targets and main active ingredients of Huangqin Tang

Target	Uniprot-ID	PDB-ID	Ligand	TCMSP-ID	Binding energy (kcal·mol ⁻¹)
AKT1	P31749	7NH5	Quercetin	MOL000098	-10.4
AKT1	P31749	7NH5	Kaempferol	MOL000422	-9.2
AKT1	P31749	7NH5	Wogonin	MOL000173	-9.6
AKT1	P31749	7NH5	Naringenin	MOL004328	-9.5
AKT1	P31749	7NH5	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	MOL003896	-9.5
MAPK3	P27361	4QTB	Quercetin	MOL000098	-9.3
MAPK3	P27361	4QTB	Kaempferol	MOL000422	-9.0
MAPK3	P27361	4QTB	Wogonin	MOL000173	-9.2
MAPK3	P27361	4QTB	Naringenin	MOL004328	-9.4
MAPK3	P27361	4QTB	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	MOL003896	-9.6
FOS	P01100	1A02	Quercetin	MOL000098	-8.2
FOS	P01100	1A02	Kaempferol	MOL000422	-8.0
FOS	P01100	1A02	Wogonin	MOL000173	-7.7
FOS	P01100	1A02	Naringenin	MOL004328	-7.8
FOS	P01100	1A02	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	MOL003896	-7.2
TP53	P04637	7BWN	Quercetin	MOL000098	-8.9
TP53	P04637	7BWN	Kaempferol	MOL000422	-8.4
TP53	P04637	7BWN	Wogonin	MOL000173	-8.8
TP53	P04637	7BWN	Naringenin	MOL004328	-8.4
TP53	P04637	7BWN	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	MOL003896	-8.1
MYC	P01106	1A93	Quercetin	MOL000098	-5.3
MYC	P01106	1A93	Kaempferol	MOL000422	-5.2
MYC	P01106	1A93	Wogonin	MOL000173	-5.1
MYC	P01106	1A93	Naringenin	MOL004328	-5.0
MYC	P01106	1A93	7-Methoxy-2-methyl isoflavone	MOL003896	-4.9

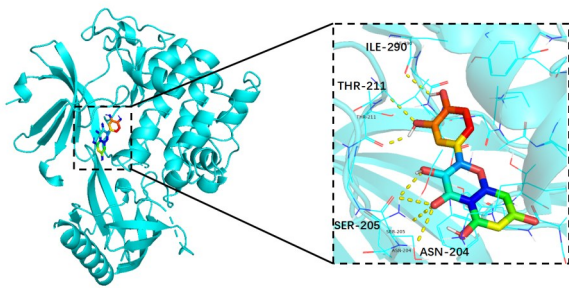


图10 AKT1与槲皮素分子对接模型

Fig. 10 Molecular docking model of AKT1 and quercetin

可调节凋亡因子 Bax 和 Bcl-2 表达水平, 诱导结肠癌 HT-29 和 SW620 细胞凋亡, 抑制作用呈浓度和时间依赖性, 且部分高浓度给药细胞株中抑制作用优于 5-氟尿嘧啶组, 还可通过促进 E-钙黏蛋白和抑制波形蛋白及 Snail 蛋白表达进而抑制上皮-间质转

化, 降低肿瘤细胞侵袭和迁移能力。李彦萍等^[28]研究发现: 汉黄芩素可通过抑制 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin) 信号通路诱导 CRC SW480 细胞凋亡。目前尚未见 7-甲氧基-2-甲基异黄酮抗肿瘤活性的研究报道, 但与其与核心关键靶点对接活性良好, 可作为后续进一步研究的理论基础。柚皮素可能通过调控 Notch1 信号通路抑制 CRC 细胞增殖分裂和侵袭, 促进细胞凋亡^[29], 在联合化疗药物治疗 CRC 方面也有良好的抗细胞增殖和迁移作用^[30]。

本研究采用多个数据库联合筛选得到 10 个核心靶点, 进一步利用 KEGG 信号通路富集分析, 最终得到 5 个黄芩汤治疗 CRC 的核心关键靶点 AKT1、MAPK3、FOS、TP53 和 MYC, 结合分子对接结果分析, AKT1 是最核心的靶点。AKT1 编码丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 在 CRC 组织中高表达^[31], 参与调节细胞增殖、生长和凋亡等

过程。研究^[32]表明：敲除 AKT1 可使 CRC 细胞增殖能力明显下降，还可逆转 CRC 细胞上皮-间质转化状态。MAPK3 是 MAPK 信号转导途径的重要组成部分，CRC 组织中 MAPK3 表达水平降低，且与 CRC 患者预后生存有关联^[33-34]。抑癌基因 TP53 主要通过诱导细胞凋亡发挥“细胞监查”作用^[35]。原癌基因 MYC 主要通过编码核内 DNA 结合蛋白参与调控细胞周期和细胞分裂，在 CRC 组织中过表达，可使癌细胞从 G₀ 和 G₁ 期进入 S 期，促进癌细胞增殖^[36]。本研究 GO 功能富集分析和 KEGG 信号通路富集分析结果显示：黄芩汤抗 CRC 可能通过癌症通路、化学致癌因素-受体激活信号通路、PI3K/AKT 信号通路、IL-17 信号通路、TNF 信号通路和细胞凋亡信号通路等，参与多种细胞应激反应，调节核受体活性、配体激活转录因子活性、DNA 结合转录因子活性和 RNA 聚合酶 II 转录调控等功能。

对癌症通路展开分析，得到与 CRC 相关通路涉及 22 个基因，对其进行 KEGG 信号通路富集分析结果显示：CRC 相关通路与内分泌抵抗、细胞凋亡、铂类药物耐药、EGFR-TKI 抵抗、PI3K/AKT 信号通路、细胞自噬和 MAPK 信号通路有关联，黄芩汤可能通过改善细胞耐药、诱导细胞凋亡和自噬等生物学功能发挥抗 CRC 作用。本研究分子对接结果显示：核心关键靶点与核心化合物槲皮素、山柰酚、汉黄芩素、7-甲氧基-2-甲基异黄酮和柚皮素均对接良好，表明黄芩汤主要活性成分对于 CRC 各关键受体有良好的结合活性，可能在治疗 CRC 中发挥重要作用，其中槲皮素与 AKT1 结合能最低，二者结合最稳固，推测槲皮素与 AKT1 受体结合后，通过 PI3K/AKT 信号通路间接调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路，进而发挥抗 CRC 作用。

PI3K/AKT 信号通路与肿瘤细胞增殖、分化、凋亡、侵袭和迁移等生物学过程有密切关联。研究^[37]证实：抑制 PI3K/AKT 通路可使结肠癌 HT-29 细胞出现细胞周期阻滞，抑制其生长增殖，促进其凋亡。PI3K/AKT 通路活化可促进基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 表达，进而使 CRC 细胞发生侵袭和迁移^[38]。mTOR 是 PI3K/AKT 信号通路的下游蛋白靶点，主要与抗细胞凋亡、促进癌细胞迁移和耐药有关^[39]。

本研究采用网络药理学和分子对接方法，初步探讨了黄芩汤治疗 CRC 可能的潜在活性成分和作用机制，通过对接结果推测槲皮素和 7-甲氧基-2-甲基异黄酮可能是其发挥抗 CRC 作用的关键化合物，活性成分槲皮素与 AKT1 结合可能通过 PI3K/AKT 和 mTOR 信号通路影响细胞增殖分化和细胞凋亡进程，发挥治疗 CRC 作用，体现了中药多靶点和多通路的特点。本研究结果为临床应用黄芩汤治疗 CRC 提供了理论依据。

利益冲突声明：

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：

陈霁莹参与研究设计、论文撰写、数据收集、统计学分析和绘制图表，姜靖雯参与写作思路拟定、指导论文撰写和论文修改，张慧参与论文知识性内容审阅和论文修改。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, SAUER A G, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145-164.
- [2] 田传鑫, 赵磊. 结直肠癌及结直肠癌肝转移流行病学特点[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(13): 1033-1038.
- [3] 尹周一, 王梦圆, 游伟程, 等. 2022 年美国癌症统计报告解读及中美癌症流行情况对比[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2022, 8(2): 54-63.
- [4] SIEGEL R L, TORRE L A, SOERJOMATARAM I, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults[J]. Gut, 2019, 68(12): 2179-2185.
- [5] 杨宇飞. 中医药在结直肠癌治疗中的优势与展望[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(11): 1294-1297.
- [6] 刘强, 胡志敏. 胡志敏教授治疗大肠癌的经验[J]. 世界中西医结合杂志, 2009, 4(9): 616-617.
- [7] 郭晓东, 管艳. 周岱翰治疗大肠癌的中医临证思路[J]. 广州中医药大学学报, 2015, 32(2): 366-368.
- [8] 欧燕, 戴艺, 蒲俊勇. 黄芩汤在消化系统肿瘤化疗患者中的应用进展[J]. 医学综述, 2021, 27(9): 1802-1806.
- [9] 迟宏罡, 郑学宝, 赵兵, 等. 黄芩汤对葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠结肠黏膜 NF- κ B p65 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(2): 565-568.
- [10] XING S Q, WANG Y F, HU K W, et al. WGCNA reveals key gene modules regulated by the combined treatment of colon cancer with PHY906 and CPT11[J]. Biosci Rep, 2020, 40(9): BSR20200935.
- [11] 马伟, 孙嘉莹, 任伟超, 等. 网络药理学: 中医药研究开发的新技术[J]. 世界中医药, 2023, 18(3): 412-415.
- [12] MCDOWELL C, FAROOQ U, HASEEB M.

- Inflammatory bowel disease [M]. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2021:2-5.
- [13] 李培华, 蔺超, 何柳, 等. 炎症相关结直肠癌致病因素分析[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(24):4562-4567.
- [14] 阎玲. 黄芩汤加减联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎临床观察[J]. 四川中医, 2019, 37(5): 101-103.
- [15] 王会录, 王孝郎. 黄芩汤加味辅助美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎39例[J]. 现代中医药, 2019, 39(3): 56-58.
- [16] 迟宏罡, 张淑华, 于丰彦, 等. 黄芩汤对结肠炎相关结肠癌Notch/Wnt信号通路的影响[J]. 广东医科大学学报, 2018, 36(4): 375-380.
- [17] 张旖晴, 魏玮, 程遥, 等. 基于网络药理学研究黄芩汤对小鼠溃疡性结肠炎及相关癌症的保护作用[J]. 世界中医药, 2022, 17(16): 2287-2291, 2298.
- [18] 迟宏罡, 赵兵, 郑学宝, 等. 黄芩汤体外诱导人结肠癌SW620细胞凋亡及其对凋亡相关因子表达的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(1): 56-60.
- [19] 宋振民, 宋会群, 宋沛沛. 黄芩汤联合化疗治疗结肠癌临床研究[J]. 新中医, 2020, 52(17): 25-27.
- [20] 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.
- [21] 林增海, 陆军, 王凯松. 槲皮素抗结肠癌细胞SW480生长的作用机制研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2021, 18(5): 366-371.
- [22] YANG L, LIU Y Q, WANG M, et al. Quercetin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells via inhibition of the Akt-CSN₆-Myc signaling axis [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(5): 4559-4566.
- [23] TEZERJI S, NAZARI ROBATI F, ABDOLAZIMI H, et al. Quercetin's effects on colon cancer cells apoptosis and proliferation in a rat model of disease [J]. Clin Nutr ESPEN, 2022, 48: 441-445.
- [24] 蔡剑辉, 任约翰, 厉金雷, 等. 槲皮素调控白细胞介素-6/信号转导及转录激活蛋白3信号通路在结肠炎性相关结肠癌小鼠模型的机制研究[J]. 中国药物与临床, 2020, 20(6): 896-899.
- [25] 李暉, 杜秉娜, 张嵘, 等. 山柰酚对人结肠癌SW48细胞增殖的抑制作用[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(9): 727-730.
- [26] CHIN H K, HORNG C T, LIU Y S, et al. Kaempferol inhibits angiogenic ability by targeting VEGF receptor-2 and downregulating the PI3K/AKT, MEK and ERK pathways in VEGF-stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. Oncol Rep, 2018, 39(5): 2351-2357.
- [27] 毛海燕, 殷旭东, 乔大伟, 等. 汉黄芩素调控胆绿素还原酶A对结肠癌细胞的抑制作用[J]. 中成药, 2021, 43(8): 2181-2188.
- [28] 李彦萍, 龚焱婷, 王嘉馨, 等. 基于网络药理学的汉黄芩素抑制人结肠癌细胞SW480增殖机制研究 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(8): 1772-1778.
- [29] 黄敏, 吴传中, 郝传铮, 等. 柚皮素对结肠癌细胞侵袭能力及细胞中MMP-2、MMP-9表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(19): 4750-4752.
- [30] 周跃, 周燕红. 柚皮素联合5-FU对大肠癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2020, 34(5): 369-372, 394.
- [31] 许欣, 姚冬颖. 结肠癌中Girdin和Akt1蛋白的表达及临床意义[J]. 河北医药, 2016, 38(15): 2259-2261, 2266.
- [32] 阮善明, 周萌萌, 袁莉, 等. 解毒三根汤对结肠癌SW480细胞侵袭转移及AKT/GSK-3 β 信号通路的影响[J]. 中医杂志, 2019, 60(16): 1401-1406.
- [33] DING L, WANG L Y, SUI L M, et al. Claudin-7 indirectly regulates the integrin/FAK signaling pathway in human colon cancer tissue [J]. J Hum Genet, 2016, 61(8): 711-720.
- [34] HOLM M, SARASWAT M, JOENVÄÄRÄ S, et al. Colorectal cancer patients with different C-reactive protein levels and 5-year survival times can be differentiated with quantitative serum proteomics [J]. PLoS One, 2018, 13(4): e0195354.
- [35] LI H, ZHANG J L, TONG J H M, et al. Targeting the oncogenic p53 mutants in colorectal cancer and other solid tumors [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 5999.
- [36] 任辉, 姜涛, 边学海, 等. 癌基因C-myc在结肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(10): 1381-1383.
- [37] 唐剑, 贺菊乔, 杨怡玲, 等. PI3K/Akt信号通路对人结肠癌HT-29细胞增殖的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2018, 32(3): 218-221.
- [38] RYCHAHOU P G, MURILLO C A, EVERS B M. Targeted RNA interference of PI3K pathway components sensitizes colon cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) [J]. Surgery, 2005, 138(2): 391-397.
- [39] 周慧, 海广范, 张涛, 等. 癌症治疗中PI3K/AKT/mTOR通路及靶向抑制剂研究进展[J]. 中国药业, 2023, 32(5): 127-135.