基于网络药理学与细胞实验探讨至真方抗结直肠癌的作用机制*

韩惠杰[1]，李永静[2]，赵永波[3]，刘辉[1]，王松坡[1]

1. 上海市第一人民医院中医科，上海 200080；2. 上海中医药大学附属曙光医院传统中医科，上海 201203；
3. 上海市第一人民医院神经内科，上海 200080

摘要：目的：采用网络药理学、分子对接及细胞实验探讨至真方抗结直肠癌（colorectal cancer，CRC）的作用机制。方法：利用 TCMSP 数据库检索至真方的活性成分和作用靶点，GeneCards 数据库检索 CRC 靶点，并获取两者的交集靶点。通过 STRING 数据库构建蛋白质－蛋白质相互作用（protein－protein interaction，PPI）网络，根据拓扑分析筛选核心靶点。采用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药－活性成分－靶点－疾病”网络，根据拓扑分析筛选关键成分。借助 R 软件进行京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。采用 AutoDock 软件对关键成分和核心靶点进行分子对接验证。将 SW620 细胞分为对照组（CTR）、至真方低剂量组（ZZF－L，65 mg·L^{-1}）及至真方高剂量组（ZZF－H，440 mg·L^{-1}），干预 48 h。采用 RT－qPCR 法检测细胞蛋白激酶 B（protein kinase B，AKT1）、肿瘤蛋白 p53（tumor protein 53，TP53）基因表达水平；Western blot 法检测细胞磷脂酰肌醇 3－激酶（phosphatidylinositol－3－kinase，PI3K）、p－PI3K、AKT、p－AKT、p53 蛋白表达水平。结果：至真方活性成分 41 个，作用靶点 225 个。CRC 靶点 10 317 个，其与至真方的交集靶点 193 个。核心靶点包括 AKT1、TP53、IL－6 等，关键成分包括槲皮素、木犀草素等。KEGG 通路主要包括 PI3K/AKT 信号通路、p53 信号通路等。关键成分（槲皮素、木犀草素）与核心靶点（AKT、TP53）的结合能均小于 －5.0 kJ·mol^{-1}。与 CTR 组比较，ZZF－H 组细胞 *AKT1* mRNA、*TP53* mRNA 水平升高（$P<0.05$）。与 CTR 组比较，ZZF－H 组细胞 p－PI3K、p－AKT 蛋白表达水平降低，AKT、p53 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。结论：至真方可能通过槲皮素、木犀草素调控 PI3K/AKT、p53 信号通路，作用于 AKT、p53 等靶点，从而发挥抗 CRC 的作用。

关键词：结直肠癌；至真方；网络药理学；PI3K/AKT 信号通路；p53 信号通路；分子对接；细胞实验
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.09.314
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999（2025）09－1968－09

Action Mechanism of Zhizhen Formula Against Colorectal Cancer Based on Network Pharmacology and Cell Experiment

HAN Huijie[1]，LI Yongjing[2]，ZHAO Yongbo[3]，LIU Hui[1]，WANG Songpo[1]

1. Department of Traditional Chinese Medicine，The First People's Hospital of Shanghai，Shanghai China 200080；2. Department of Traditional Chinese Medicine，Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine，Shanghai China 201203；3. Department of Neurology，The First People's Hospital of Shanghai，Shanghai China 200080

Abstract：Objective：To investigate the mechanism of action of Zhizhen Formula against colorectal cancer（CRC）by network pharmacology，molecular docking and cell experiments. Methods：The active ingredients and targets of Zhizhen Formula were retrieved by TCMSP database，and CRC targets were retrieved by GeneCards database，and the intersection targets of the two were obtained. A protein－pro-

* **基金项目**：第五批全国中医临床优秀人才研修项目｛国中医药人教函〔2022〕1 号｝；上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划项目（张氏内科流派脾胃病传承创新团队）（2021LPTD－010）；上海申康医院发展中心临床三年行动计划资助项目（SHDC2020CR4049）

tein interaction (PPI) network was constructed through the STRING database, and the core targets were screened according to topological analysis. Cytoscape 3.7.2 software was used to construct a "traditional Chinese medicine – active ingredient – target – disease" network, and key components were screened according to topological analysis. Enrichment analysis of the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) was performed using R software. AutoDock software was used to verify the molecular docking of key components and core targets. SW620 cells were divided into control group (CTR) and Zhizhen Formula low – dose group (ZZF – L, 65 mg · L^{-1}) and Zhizhen Formula high – dose group (ZZF – H, 440 mg · L^{-1}), and the intervention was 48 h. RT – qPCR was used to detect the expression levels of protein kinase B (AKT1) and tumor protein p53 (TP53). Western blot was used to detect the expression levels of phosphatidylinositol – 3 – kinase (PI3K), p – PI3K, AKT, p – AKT and p53 proteins. Results: There were 41 active ingredients and 225 targets of Zhizhen Formula. There were 10,317 CRC targets, and 193 intersecting targets with Zhizhen Formula. The core targets include AKT1, TP53, IL – 6, etc., and the key components include quercetin, luteolin, etc. The KEGG pathway mainly includes PI3K/AKT signaling pathway, p53 signaling pathway, etc. The binding energy of the key components (quercetin and luteolin) and the core targets (AKT, TP53) was less than – 5.0 kJ · mol^{-1}. Compared with the CTR group, the levels of *AKT1* mRNA and *TP53* mRNA in the ZZF – H group were increased ($P < 0.05$). Compared with the CTR group, the expression levels of p – PI3K and p – AKT proteins in the ZZF – H group decreased, and the expression levels of AKT and p53 proteins increased ($P < 0.05$). Conclusion: Zhizhen Formula may regulate PI3K/AKT and p53 signaling pathways through quercetin and luteolin, and act on AKT, p53 and other targets, thereby exerting anti – CRC effects.

Key words: colorectal cancer; Zhizhen Formula; network pharmacology; PI3K/AKT signaling pathway; p53 signaling pathway; molecular docking; cell experiments

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是临床最常见的消化道恶性肿瘤之一,具有高隐匿性,患者出现便血、腹痛等典型症状时,疾病已进展至中晚期或发生转移。据报道,发生转移的 CRC 患者 5 年生存率仅为 10%[1-2],且 CRC 病死率在恶性肿瘤中位居第二[3]。目前,CRC 的治疗以手术切除联合术前或术后放化疗、免疫治疗及靶向治疗等措施为主,但并未显著降低患者的高复发率和高病死率,且治疗相关不良反应常导致患者生活质量下降[4]。中医药治疗 CRC 通过增效减毒、改善临床症状及提升生活质量等方面展现出显著优势,已逐渐成为 CRC 综合治疗中不可或缺的辅助疗法[5]。

至真方系国医大师张镜人教授临床治疗大肠癌的经验方,由黄芪、女贞子、薏苡仁、石见穿、野葡萄藤、藤梨根、制香附组成,具有增效减毒的作用,临床疗效显著。《本草求真》谓黄芪为"补气诸药之最",功善补气健脾,可培补后天之本;《雷公炮制药性解》称女贞子"诚补阴之上剂也",擅长滋阴益肾,滋养先天之源;两药相合,先后天同补,共为君药。薏苡仁利水渗湿化浊,石见穿活血通络消癥,共为臣药;藤梨根清热解毒、除湿化浊,野葡萄藤清热解毒、理血通络,制香附气血同调,共为佐使药。全方补脾益肾、化浊解毒,共奏扶正祛邪之效。

网络药理学是一门融合了药理学、生物学、信息学等多学科知识的交叉学科。该学科运用数据库检索、高通量组学数据分析、计算机模拟等手段,旨在筛选中药复方中具有协同增效作用的化合物和靶点。通过构建及分析多层次的生物网络,网络药理学阐释了"药物 – 靶点 – 通路 – 疾病"之间相互作用的复杂性,充分体现了中医药多成分、多靶点、多途径的综合治疗特点。网络药理学的整体性、系统性研究特点与中医学的整体观念、辨证论治原则相契合,强调从"单一靶标"向"网络靶标"研究模式的转变[6]。这一方法为深入揭示中药及其活性成分的作用机制提供新的技术支持[7]。本研究利用网络药理学和分子对接技术预测至真方抗 CRC 的潜在靶点和信号通路,并通过细胞实验加以验证,以期为至真方抗 CRC 的基础和临床研究提供科学依据。

1　材料

1.1　细胞　人大肠癌 SW620 细胞株购自上海中国科学院细胞库,批号:B20527。

1.2　试剂　RPMI 1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号:11995065、10099141);CCK – 8 试剂盒(BBI Life Sciences 公司,批号:E606335 – 0500);RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013B);HyperScript Ⅲ RT SuperMix for qPCR with gDNA Remover(上海新贝生物科技有限公司,批号:RR036A);Power SYBR Green PCR (ThermoFisher Scientific 公司,批号:4367659);PVDF 膜(Millipore,货号:IPVH00010);BCA 蛋白测定试剂盒(Servicebio 公司,批号:P0010);PI3K 抗

体、p－PI3K 抗体、AKT 抗体、p－AKT 抗体、p53 抗体(ABclonal 公司,批号:R22768、4228、4691、4060S、PB0076);HRP 标记的山羊抗兔二抗(Cell Signaling Technology 公司,批号:111－035－003)。

1.3　仪器　QuantStudio™ 7 Flex 实时荧光定量 PCR 系统、细胞培养箱(ThermoFisher Scientific 公司);多功能粉碎机(合肥荣事达小家电有限公司);SENCO R50 旋转蒸发仪(上海申生科技有限公司);真空冷冻干燥机(美国 Labconco 公司);荧光定量 PCR 仪(上海新贝生物科技有限公司,型号:Q2000B)。

2　方法

2.1　网络药理学研究

2.1.1　数据库与软件　TCMSP 数据库(https://tcmsp－e.com/tcmsp.php),swissADME 数据库(http://www.swissadme.ch/),Swiss Target Prediction 数据库(http://www.swisstargetprediction.ch/),Uniprot 数据库(http://www.uniprot.org/),GeneCards 数据库(https://www.genecards.org/),STRING 数据库(https://string－db.org/),PDB 数据库(http://www.rcsb.org/),Cytoscape 3.7.2 软件(http://www.cytoscape.org/),Bioconductor 的 R 包(https://www.r－project.org/),AutoDock 软件(https://autodock.scripps.edu/)及 Pymol 软件(https://pymol.com/)。

2.1.2　至真方活性成分与作用靶点筛选　利用 TCMSP 数据库检索至真方(黄芪、女贞子、石见穿、藤梨根、香附、薏苡仁)的活性成分和作用靶点,以口服生物利用度(oral bioavailability,OB)≥30%、类药性(drug likeness,DL)≥0.18 为条件进行筛选。另外,查阅文献[8－9]获取至真方中野葡萄藤的活性成分,采用 swissADME 数据库进行筛选,并通过 Swiss Target Prediction 数据库获取作用靶点。最后,借助 Uniprot 数据库规范靶点名称,并去除重复靶点。

2.1.3　至真方抗 CRC 潜在靶点筛选　通过 GeneCards 数据库,以“Colorectal Cancer”为关键词,获取 CRC 的疾病靶点。

将至真方靶点和 CRC 靶点利用 R Studio 的 Venn Diagram 包映射出交集靶点,即至真方抗 CRC 的潜在靶点,并输出韦恩图。

2.1.4　至真方抗 CRC 核心靶点筛选　将交集靶点导入 STRING 数据库,构建蛋白质－蛋白质相互作用(protein－protein interaction,PPI)网络。利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 PPI 网络进行可视化处理,Network Analyzer 工具计算节点的度值(Degree)。将 Degree≥2 倍中位数度值的靶点作为至真方抗 CRC 的核心靶点[10]。

2.1.5　至真方抗 CRC 关键成分筛选　通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药－活性成分－靶点－疾病”网络,Network Analyzer 工具计算节点的 Degree,将 Degree≥2 倍中位数度值的活性成分作为至真方抗 CRC 的关键成分。

2.1.6　基因本体(Gene Ontology,GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)富集分析　借助 Bioconductor 中的 R 包 Clusterprofile 对交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,以 $P<0.05$ 为标准进行筛选,其结果以可视化的 barplot 条形图形式展示。

2.1.7　分子对接　将至真方关键成分与核心靶点进行分子对接验证,从 PDB 数据库获取蛋白质的三维结构,TCMSP 数据库获取配体分子的三维结构,使用 AutoDock 软件进行对接,每个组合对接 50 次,若结合能≤－4.0 kJ·mol^{-1}则视为有效结合[11]。最后,利用 Vina 软件与 Pymol 软件对分子对接结果进行可视化展示。

2.2　细胞实验研究

2.2.1　至真方醇提物制备　至真方中药饮片由上海市第一人民医院门诊部中药房采购于上海蔡同德药业有限公司,将黄芪、女贞子、薏苡仁、石见穿、野葡萄藤、藤梨根、制香附以 6∶3∶6∶6∶6∶6∶2 的比例混合,使用 95% 乙醇浸泡 20 min,回流提取 2 h,过滤出药液后使用旋转蒸发仪蒸干至浓稠,再用冻干机制成干粉,即得到至真方醇提物。使用时,将至真方醇提物粉末溶解于无菌二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO),并保证 DMSO 在终体系中含量小于 1‰。

2.2.2　CCK－8 法检测 SW620 细胞抑制率　SW620 细胞采用 RPMI－1640 培养基(含 10% 胎牛血清、100 U·mL^{-1}青霉素及 0.1 g·L^{-1}链霉素),在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度下培养。将处于对数生长期的 SW620 细胞接种于 96 孔板,孵育 12 h 后加入含有不同质量浓度至真方(100、200、400、600、800、1 000 mg·L^{-1})的完全培养基,培养 72 h 后弃

去原培养基，加入含有 10% CCK－8 溶液的新鲜培养基孵育 1 h，在 450 nm 波长下读取各孔光密度（optical density，OD）值，计算至真方对 SW620 细胞的生长抑制率、半数抑制浓度（half maximal inhibitory concentration，IC50）及非毒性浓度（IC10、IC20）。随后，将 SW620 细胞分为对照组（CTR）、至真方低剂量组（ZZF－L，65 mg·L^{-1}）及至真方高剂量组（ZZF－H，440 mg·L^{-1}），干预 48 h。

2.2.3　RT－qPCR 法检测 SW620 细胞 *AKT1*、*TP53* 基因表达水平　将各组 SW620 细胞接种于 6 孔板，弃去培养基，PBS 漂洗 2 次后加入适量 Trizol 裂解细胞，加入适量氯仿充分混匀后于冰上静置 10 min，4 ℃、12 000 r·min^{-1}离心 15 min，取上清并加入等量异丙醇充分混匀，静置 10 min 后，4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 15 min，弃上清，75% 乙醇漂洗后晾干，使用 ddH_2O 溶解。参照 HyperScript Ⅲ RT SuperMix for qPCR with gDNA Remover 说明书将 RNA 逆转录为 cDNA，使用 2 × S6 Universal SYBR qPCR Mix 进行 RT－qPCR 检测，采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法进行相对定量分析，至少重复 3 次实验，引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因名称	引物序列（5′－3′）
GAPDH	F：TGACAACTTTGGTATCGTGGAAGG
	R：AGGCAGGGATGATGTTCTGGAGAG
AKT1	F：TGGACTACCTGCACTCGGAGAA
	R：GTGCCGCAAAAGGTCTTCATGG
TP53	F：GGCCATCTACAAGCAGTCACAG
	R：GTCATCCAAATACTCCACACGC

2.2.4　Western blot 法检测 SW620 细胞 PI3K、p－PI3K、AKT、p－AKT、p53 蛋白表达水平　将各组 SW620 细胞接种于 6 孔板，RIPA 裂解液提取总蛋白，并用 BCA 法测定蛋白浓度。随后进行蛋白电泳分离，将蛋白质转移到 PVDF 膜上，5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h，TBST 清洗 3 次后，分别加入一抗（1∶1 000），置于 4 ℃冰箱孵育过夜；TBST 漂洗 3 次，加入相应二抗（1∶2 000）室温孵育 2 h，TBST 清洗 5 次后进行化学发光显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值，以 GAPDH 作为内参蛋白，计算目的蛋白的相对表达量，至少重复 3 次实验。

2.3　统计学方法　采用 SPSS 22.0 软件分析数据，GraphPad Prism 8.0 软件绘图。计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，符合正态分布的数据，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 t 检验；不符合正态分布的数据采用非参数检验。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　网络药理学研究结果

3.1.1　至真方活性成分与作用靶点　通过 TCMSP 数据库筛选出黄芪有效成分 16 个，对应靶点 431 个；女贞子有效成分 8 个，对应靶点 330 个；石见穿有效成分 2 个，对应靶点 180 个；藤梨根有效成分 6 个，对应靶点 219 个；香附有效成分 16 个，对应靶点 466 个；薏苡仁有效成分 6 个，对应靶点 44 个；通过文献检索筛选出野葡萄藤有效成分 7 个，对应靶点 298 个。汇总上述成分和靶点并删除重复后，最终获得至真方活性成分 41 个，作用靶点 225 个。

3.1.2　至真方抗 CRC 潜在靶点　通过 GeneCards 数据库获取 CRC 疾病靶点 10 317 个，其与至真方的交集靶点共 193 个，即为至真方抗 CRC 的潜在靶点，见图 1。

3.1.3　至真方抗 CRC 的核心靶点　通过 STRING 数据库构建交集靶点的 PPI 网络，包括 193 个节点和 3 548 条边，见图 2A，经拓扑分析得到中位数 Degree 为 36.8。至真方抗 CRC 的核心靶点 19 个，包括 AKT1（Degree：127）、TP53（Degree：115）、IL－6（Degree：115）、VEGFA（Degree：108）、TNF（Degree：102）、EGFR（Degree：100）、CASP3（Degree：99）、JUN（Degree：99）、MAPK1（Degree：99）、MYC（Degree：98）、EGF（Degree：96）、MAPK8（Degree：95）、PTGS2（Degree：93）、MMP9（Degree：90）、ESR1（Degree：87）、CXCL8（Degree：84）、CCND1（Degree：84）、FOS（Degree：83）、PTEN（Degree：80）。这 19 个核心靶点根据 Node degree distribution 值进行可视化处理，见图 2B。

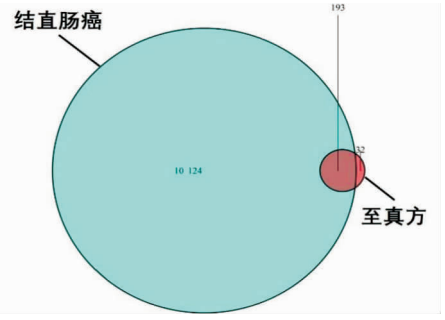
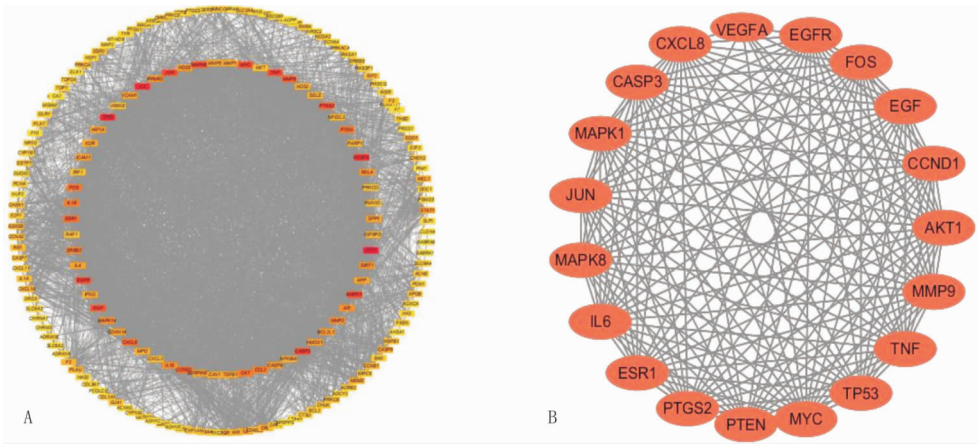


图 1　至真方与 CRC 交集靶点韦恩图

3.1.4　至真方抗 CRC 的关键成分　通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药－活性成分－靶点－疾病”网络，包括 7 个中药、41 个化学成分及 193 个交集靶点，见图 3。至真方抗 CRC 的关键成分包括槲皮素（Degree＝136）、木犀草素（Degree＝54）等。



注：A：交集靶点 PPI 网络图；B：核心靶点 PPI 网络图。

图 2　PPI 网络图

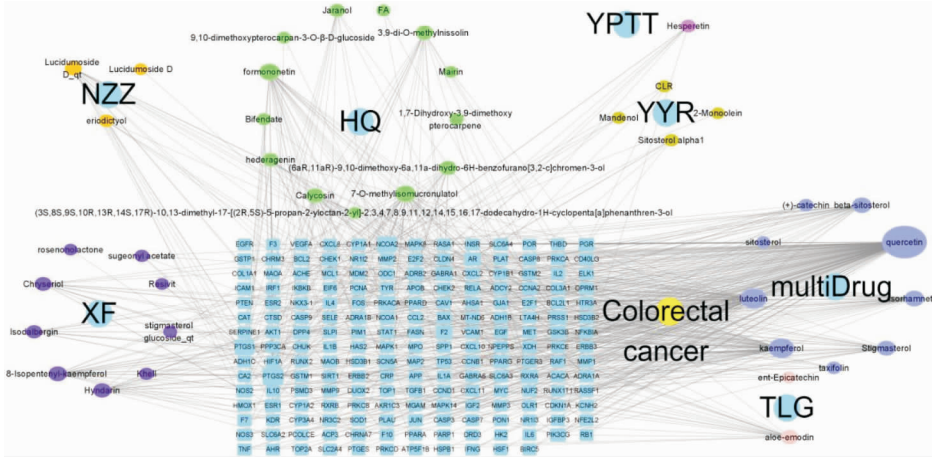


图 3　“中药－活性成分－靶点－疾病”网络图

3.1.5　GO 功能和 KEGG 通路富集结果　GO 分析得到 2 992 个条目，其中生物过程（biological process，BP）2 684 个、细胞组成（cellular component，CC）100 个、分子功能（molecular function，MF）208 个，主要包括细胞对化学应激的反应（cellular response to chemical stress）、周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合体（cyclin－dependent protein kinase holoenzyme complex）、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性（protein serine/threonine kinase activity）等，见图 4。

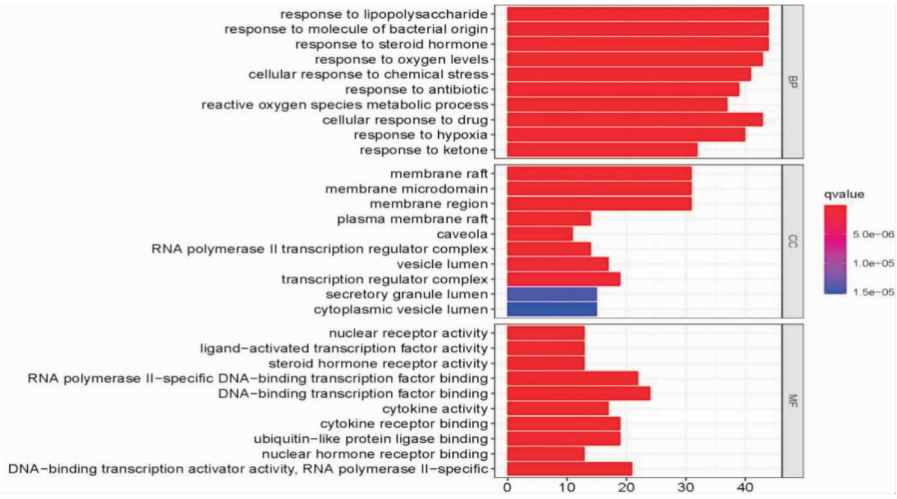


图 4　GO 功能富集条形图

KEGG 分析得到 187 条信号通路，主要涉及对细胞增殖、凋亡起调控作用的通路，如 PI3K/AKT 信号通路、p53 信号通路等，见图 5。

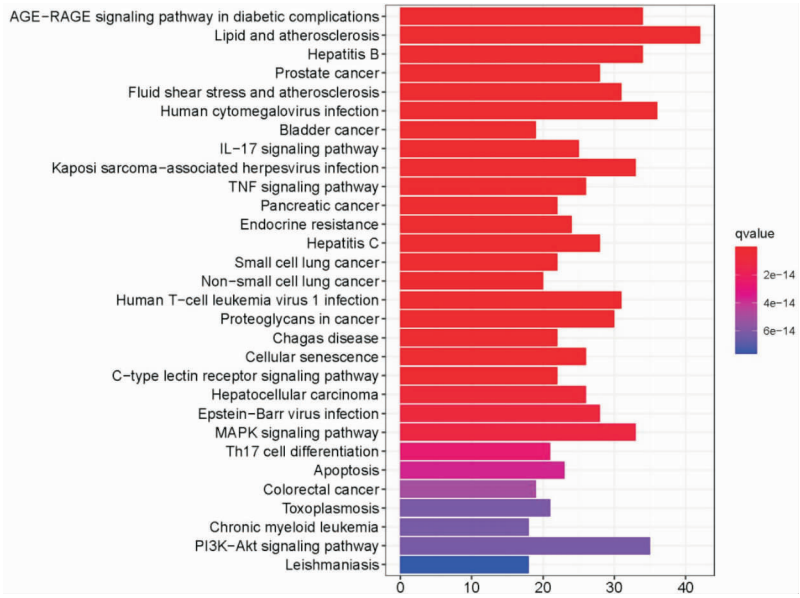
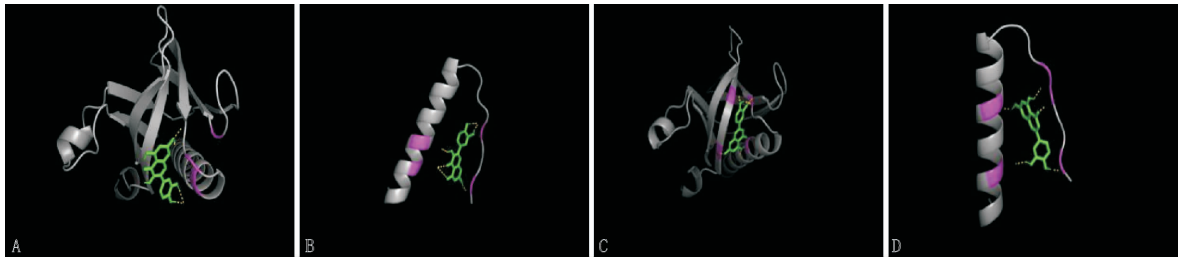


图 5　KEGG 通路富集条形图

3.1.6　分子对接　分子对接显示，关键成分（槲皮素、木犀草素）与核心靶点（AKT、TP53）的结合能均 < −5.0 kJ · mol^{-1}，表明两者具有较强的结合活性，见表 2、图 6。



注：A：槲皮素与 AKT；B：槲皮素与 TP53；C：木犀草素与 AKT；D：木犀草素与 TP53。

图 6　分子对接模式图

表 2　关键成分与核心靶点的结合能　（kJ · mol^{-1}）

关键成分	AKT	TP53
槲皮素	−6.02	−5.84
木犀草素	−6.21	−6.40

3.2　细胞实验研究结果

3.2.1　至真方对 SW620 细胞的生长抑制作用　CCK−8 检测显示，至真方对人大肠癌 SW620 细胞的生长有抑制作用，且在所选浓度范围内随至真方浓度的升高而增强。至真方对 SW620 细胞的 IC10、IC20、IC50 分别为 65.46 mg · L^{-1}、132.51 mg · L^{-1}、442.42 mg · L^{-1}，故确定至真方干预 SW620 细胞的低剂量为 65 mg · L^{-1}、高剂量为 440 mg · L^{-1}，见表 3。

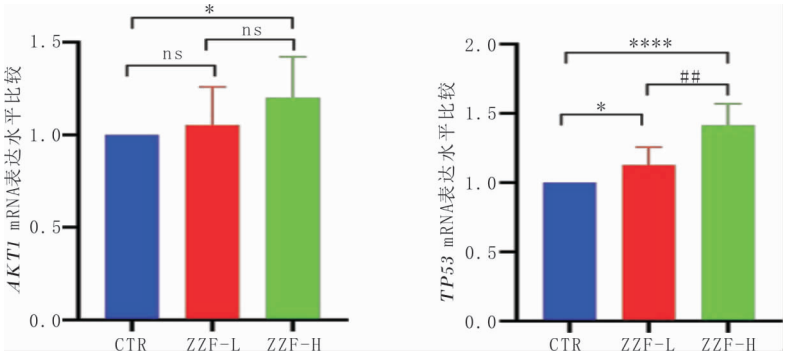
3.2.2　至真方对 SW620 细胞 *AKT1* mRNA、*TP53* mRNA 表达的影响　RT−qPCR 显示，与 CTR 组比较，ZZF−L 组细胞 *TP53* mRNA 水平升高，ZZF−H 组细胞 *AKT1* mRNA、*TP53* mRNA 水平升高（$P < 0.05$）。与 ZZF−L 组比较，ZZF−H 组细胞 *TP53* mRNA 水平升高（$P < 0.000\ 1$），见图 7。

表 3　不同质量浓度至真方对 SW620 细胞生长抑制率的影响　（$\bar{x} \pm s$）

质量浓度（ρ/mg · L^{-1}）	n	抑制率/%
1 000	3	71.87 ± 1.73
800	3	70.02 ± 1.98
600	3	60.73 ± 1.89
400	3	50.56 ± 1.69
200	3	30.54 ± 5.21
100	3	10.57 ± 5.76

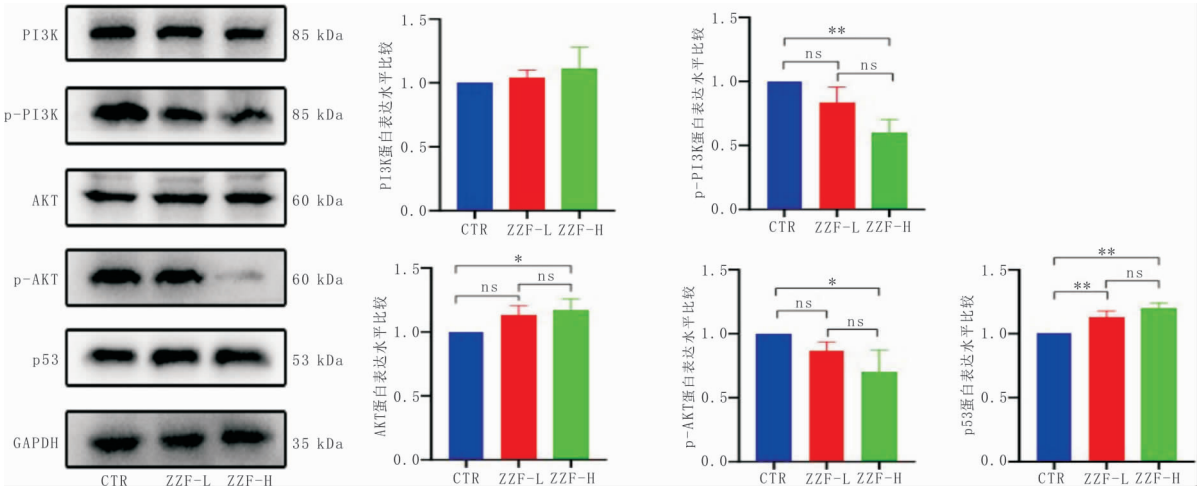
3.2.3　至真方对 SW620 细胞 PI3K、p−PI3K、AKT、p−AKT、p53 蛋白表达的影响　Western blot 显示，与 CTR 组比较，ZZF−L 组细胞 p53 蛋白表达

水平升高($P<0.05$)；与 CTR 组比较，ZZF－H 组细胞 p－PI3K、p－AKT 蛋白表达水平降低，AKT、p53 蛋白表达水平升高($P<0.05$)，见图 8。



注：$*P<0.05$，$****P<0.000\ 1$，$##P<0.01$，ns$P>0.05$。

图 7　各组 SW620 细胞 *AKT1* mRNA、*TP53* mRNA 表达水平比较



注：$*P<0.05$，$**P<0.01$，ns$P>0.05$。

图 8　各组 SW620 细胞 PI3K、p－PI3K、AKT、p－AKT、p53 蛋白表达水平比较

4　讨论

根据大肠癌的临床表现，可将其归属于中医“积聚”“肠积”“肠风”“肠覃”“锁肛痔”等范畴。《灵枢·百病始生》记载：“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。”国医大师张镜人教授认为，大肠癌的形成主要归因于两方面：一是正虚，多为脾肾亏虚，正气不足；二是邪实，多为痰瘀凝聚，癌毒内生。脾肾虚弱、正气亏损是发病之本，痰浊、瘀血、癌毒是发病之标；二者互为因果，由虚致积，因积益虚。因此，张镜人教授治疗 CRC 多从脾肾入手，其经验方“至真方”的临床疗效显著。

网络药理学研究表明，至真方可通过多成分、多靶点、多途径发挥抗 CRC 的作用，AKT1、TP53 可能是其核心靶点，槲皮素、木犀草素可能是其关键活性成分。AKT1 为 AKT 的同分异构体之一，是 PI3K/AKT 信号通路的重要下游靶点[12]，其被磷酸化激活后参与调控肿瘤细胞的增殖与凋亡，并增强 CRC 细胞的侵袭性[13]。*TP53* 是一种编码 p53 蛋白的抑癌基因，能够诱导细胞周期停滞、抑制细胞增殖并促进细胞凋亡，从而发挥抗肿瘤作用[14]。野生型 TP53 丧失抑癌功能，可诱导正常细胞向癌细胞转变，导致 CRC 发生[15]，且与野生型相比，*TP53* 基因突变的 CRC 患者预后较差[16]。槲皮素和木犀草素同属黄酮类化合物，具有抗氧化和抗肿瘤活性[17－18]。槲皮素可通过抑制 M2 型巨噬细胞极化和下调环状 RNA 表达，抑制 CRC 发生[19]。木犀草素可通过介导 MAPK 通路抑制细胞增殖，阻断细胞周期，诱导 DNA 损伤和细胞凋亡，从而抑制 CRC[20]。槲皮素和木犀草素联用不仅能降低 5－FU 在 CRC 临床治疗中的毒性，还能协同增强 5－FU 对 CRC 细胞的抗增殖和促

凋亡作用[21]。分子对接显示,槲皮素、木犀草素与 AKT、TP53 的结合能均小于 -4.0 kJ·mol^{-1},表明至真方的关键成分与核心靶点具有较强的亲和力,存在相互作用的可能性较大。

KEGG 分析显示,至真方可能通过调控 PI3K/AKT、p53 等信号通路发挥抗 CRC 的作用。研究显示,PI3K/AKT 信号通路可调节细胞增殖与凋亡[22-23]。山柰酚与 5-FU 联合应用可通过诱导细胞凋亡,抑制大肠癌细胞胸苷酸合成酶表达,产生协同抗癌效应,此效应可能与 p-AKT 活性降低及 PI3K/AKT 通路抑制有关[24]。p53 信号通路中相关蛋白表达上调可抑制血管生成,加速细胞凋亡,从而起到抗肿瘤作用[25]。研究发现,p53 可通过上调 Bax 表达抑制肿瘤细胞增殖[26]。Flavopereirine 能够增强 CRC 细胞中 p53 的表达及其磷酸化水平,通过上调 p53 诱导细胞周期停滞和细胞凋亡,从而显著抑制 HCT116 异种移植肿瘤的生长[27]。p-AKT 通过调节糖代谢,影响蛋白质合成,激活肿瘤细胞生长与增殖[28]。此外,PI3K/AKT 信号通路对 p53 表达具有关键调控作用,该通路通过影响 p53 蛋白分子伴侣 MDM2 的磷酸化,促进 p53 降解,从而调控肿瘤行为[29]。因此,至真方可能通过抑制 PI3K/AKT 信号通路,抑制 MDM2 激活,增加促凋亡蛋白 p53 表达,诱导细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

细胞实验显示,至真方可抑制 SW620 细胞增殖,且呈浓度依赖性。另外,至真方可上调 SW620 细胞 *AKT1* mRNA、*TP53* mRNA 表达水平,同时下调 PI3K、AKT 蛋白磷酸化水平,上调 p53 蛋白表达水平。综上,至真方可能通过调控 PI3K/AKT、p53 信号通路,抑制细胞增殖,从而发挥抗 CRC 的作用。在后续研究中,将继续探讨重要信号通路之间的协同或拮抗效应。

参考文献:

[1] LEE R M, CARDONA K, RUSSELL M C. Historical perspective: Two decades of progress in treating metastatic colorectal cancer[J]. J Surg Oncol, 2019, 119(5): 549-563.

[2] 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.

[3] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020 全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2021,7(2):1-13.

[4] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA A Cancer J Clinicians, 2020, 70(3): 145-164.

[5] XIANG Y N, GUO Z M, ZHU P F, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science[J]. Cancer Med, 2019, 8(5): 1958-1975.

[6] 于盼盼,杨忠杰,郭丽娜,等. 基于网络药理学苍耳子的物质基础和作用机制的分析[J]. 安徽医药,2020,24(2):234-237,425.

[7] 世界中医药学会联合会. 网络药理学评价方法指南[J]. 世界中医药,2021,16(4):527-532.

[8] 畅晓洁. 野葡萄藤抗结肠癌活性成分的研究[D]. 广州:华南理工大学,2012.

[9] WU M J, YEN J H, WANG L S, et al. Antioxidant activity of porcelainberry (Ampelopsis brevipedunculata (maxim.) trautv.)[J]. Am J Chin Med, 2004, 32(5): 681-693.

[10] 周佳林,李文杰,黄雪云,等. 基于网络药理学和数据挖掘探讨中药调控铁死亡干预肝硬化的用药规律研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2023,23(12):1433-1438,1445.

[11] 宗阳,丁美林,贾可可,等. 基于网络药理学和分子对接法探寻达原饮治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)活性化合物的研究[J]. 中草药,2020,51(4):836-844.

[12] BALASURIYA N, DAVEY N E, JOHNSON J L, et al. Phosphorylation-dependent substrate selectivity of protein kinase B (AKT1)[J]. J Biol Chem, 2020, 295(24): 8120-8134.

[13] CHEN B, DENG Y N, WANG X X, et al. miR-26a enhances colorectal cancer cell growth by targeting RREB1 deacetylation to activate AKT-mediated glycolysis[J]. Cancer Lett, 2021, 521: 1-13.

[14] LIEBL M C, HOFMANN T G. The role of p53 signaling in colorectal cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 13(9): 2125.

[15] JUN H H, KWACK K, LEE K H, et al. Association between TP53 genetic polymorphisms and the methylation and expression of miR-34a, 34b/c in colorectal cancer tissues[J]. Oncol Lett, 2019, 17(5): 4726-4734.

[16] OTTAIANO A, SANTORSOLA M, CIRCELLI L, et al. Hypertension, type 2 diabetes, obesity, and p53 mutations negatively correlate with metastatic colorectal cancer patients'

survival[J]. Front Med (Lausanne),2023,10:1091634.
[17] TANOMRAT R, NAKTUBTIM C, AIMVIJARN P, et al. N - acetylcysteine improves the inhibitory effect of Quercetin - rich onion extract on HT - 29 and HCT - 116 colorectal cancer migration and invasion through iNOS suppression [J]. Int J Med Sci,2023,20(9):1123 - 1134.
[18] JANG C H, MOON N, LEE J, et al. Luteolin synergistically enhances antitumor activity of oxaliplatin in colorectal carcinoma via AMPK inhibition[J]. Antioxidants (Basel), 2022,11(4):626.
[19] CHEN B, WU L, TANG X X, et al. Quercetin inhibits tumorigenesis of colorectal cancer through downregulation of hsa_circ_0006990 [J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 874696.
[20] 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.
[21] ERDOGAN M K, AGCA C A, ASKIN H. Quercetin and luteolin improve the anticancer effects of 5 - fluorouracil in human colorectal adenocarcinoma in vitro model: a mechanistic insight[J]. Nutr Cancer,2022,74(2):660 - 676.
[22] YANG H, LIU J X, SHANG H X, et al. Qingjie Fuzheng granules inhibit colorectal cancer cell growth by the PI3K/AKT and ERK pathways[J]. World J Gastrointest Oncol, 2019,11(5):377 - 392.
[23] XIE Y, LIU L. Analysis of correlation between HP infection and activation of PI3K/AKT pathway in mucosal tissues of gastric cancer and precancerous lesions[J]. Oncol Lett, 2018,16(5):5615 - 5620.
[24] LI Q Y, WEI L H, LIN S, et al. Synergistic effect of kaempferol and 5 - fluorouracil on the growth of colorectal cancer cells by regulating the PI3K/AKT signaling pathway [J]. Mol Med Rep,2019,20(1):728 - 734.
[25] 张笛,罗雅菲,徐凌云. 黄芩苷和黄芩素抗肿瘤作用研究新进展[J]. 中南药学,2020,18(4):613 - 620.
[26] JEFFRIES K A, KRUPENKO N I. Ceramide signaling and p53 pathways[J]. Adv Cancer Res,2018,140:191 - 215.
[27] LI J M, HUANG Y C, KUO Y H, et al. Flavopereirine suppresses the growth of colorectal cancer cells through P53 signaling dependence[J]. Cancers (Basel),2019,11(7): 1034.
[28] SONG M Q, BODE A M, DONG Z G, et al. AKT as a therapeutic target for cancer[J]. Cancer Res, 2019, 79(6): 1019 - 1031.
[29] ABRAHAM A G, O'NEILL E. PI3K/AKT - mediated regulation of p53 in cancer[J]. Biochem Soc Trans, 2014, 42 (4):798 - 803.

收稿日期:2025 - 03 - 10

作者简介:韩惠杰(1981 -),男,河北石家庄人,医学硕士,主治医师,研究方向:中西医结合防治肿瘤。
通信作者:王松坡(1971 -),男,医学博士,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合防治肿瘤。E - mail: 13386259791@163.com

编辑:刘凯歌