

基于网络药理学和体外实验探究枸杞子的抗结直肠癌活性

樊娇秀¹, 胡敏¹, 曾俊^{1,2*}

¹重庆师范大学生命科学学院, 重庆

²动物生物学重庆市高校重点实验室, 重庆

收稿日期: 2023年6月30日; 录用日期: 2023年8月25日; 发布日期: 2023年9月1日

摘要

目的: 利用网络药理学预测和体外实验验证, 探讨枸杞子提取物的抗癌活性及作用机制。方法: 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获取枸杞子的活性成分以及对应的靶点; 通过TTD数据库、Gene Card数据库和DisGeNET数据库筛选结直肠癌的治疗靶点; 采用Venny2.1在线工具获取枸杞子与结直肠癌的共同靶点, 并用STRING数据库进行PPI (Protein-Protein Interaction)网络分析; 借助Metascape网站实现基因本体(GO)富集分析和KEGG通路富集分析; 采用溶剂法提取, 并采用真空冷冻法进行浓缩干燥; 利用MTT实验检测枸杞子的抗癌活性。结果: 获取枸杞子活性成分35个; 潜在的抗癌靶点121个, 其中基于PPI分析度值, 最有潜力的5个靶点分别是TP53、HSP90AA1、AKT1、MAPK1、RELA; KEGG富集显示枸杞子活性成分主要通过PI3K-Akt信号通路、HIF-1信号通路、松弛素信号通路等发挥作用; MTT实验表明黑枸杞和红枸杞粗提物均具有抗结直肠癌的活性。结论: 初步筛选并明确了枸杞子的活性成分及其抗癌活性, 为枸杞子的抗癌作用机制研究提供一定的参考。

关键词

枸杞子, 结直肠癌, 网络药理学, 细胞活力

Activity of *Lycii fructus* against Colorectal Cancer Based on Network Pharmacology and *in Vitro* Experiments

Jiaoxiu Fan¹, Min Hu¹, Jun Zeng^{1,2*}

¹College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing

²Animal Biology Key Laboratory of Chongqing Education Commission of China, Chongqing

*通讯作者。

文章引用: 樊娇秀, 胡敏, 曾俊. 基于网络药理学和体外实验探究枸杞子的抗结直肠癌活性[J]. 医学诊断, 2023, 13(3): 301-311. DOI: 10.12677/md.2023.133047

Abstract

Objective: To study the activity and the molecular mechanism of the active ingredients from *Lycii fructus* against colorectal cancer based on network pharmacology and *in vitro* experiments. **Methods:** The active components and corresponding targets of *Lycii fructus* were predicted by TCMSP; screening colorectal cancer related targets by TTD database, Gene Card database, and DisGeNET database; the common targets of *Lycii fructus* and colorectal cancer were obtained using Venny2.1 online tool, and PPI (Protein-Protein Interaction) networks analysis was conducted using STRING database; Gene Ontology (GO) enrichment and KEGG pathway enrichment were analyzed by Metascape website; MTT assay was used to examine the anticancer activity of the extract from *Lycii fructus* against colorectal cancer. **Results:** 35 active ingredients of *Lycii fructus* were predicted, with 121 potential anti-cancer targets identified. The 5 most promising targets based on PPI analysis were TP53, HSP90AA1, AKT1, MAPK1, and RELA. KEGG enrichment showed that the active ingredients from *Lycii fructus* mainly functioned via PI3K-Akt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, and relaxin signaling pathway. MTT assay was used to examine the effect of the extract from *Lycii fructus* on the colorectal cancer cell viability and its antioxidant activity. **Conclusion:** Based on the network pharmacology and *in vitro* experiments, the possible antitumor targets of the active ingredients from *Lycii fructus* were screened and their antitumor activity was verified *in vitro*, providing a reference for the further study of the anticancer mechanism of *Lycii fructus*.

Keywords

Lycii fructus, Colorectal Cancer, Network Pharmacology, Cell Viability

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

据统计, 2020 年全球有 1930 万新增癌症病例和近 1000 万癌症死亡[1]。其中, 结直肠癌是一种常见的恶性胃肠道肿瘤, 是全球第三大确诊癌症和第二大癌症死亡原因。近年来, 结直肠癌患者逐渐年轻化, 持续威胁着人民的生命健康[2]。目前常见的治疗结直肠癌的方法有手术切除、放疗、化疗和靶向治疗等, 其中化疗是临床上治疗结直肠癌的主要方式之一, 但随着化疗药物的使用, 结直肠癌细胞逐渐产生耐药性, 从而导致临床治疗效果不佳, 且化疗药物的毒副作用较大[3]。因此寻找新型、毒副作用小的抗癌药物迫在眉睫。

枸杞子(*Lycii fructus*)是茄科植物宁夏枸杞(*Lycium barbarum L.*)的干燥成熟果实, 收录在我国第一批“药食两用”的名单中, 其既可作为中药材, 具有多种药理作用, 如抗氧化、抗炎、抗癌等; 又可作为食品和保健品开发, 如泡水、泡酒等[4]。枸杞子的主要化学成分有多糖、类胡萝卜素、多酚等, 由于我国种植枸杞子地区的生态环境和气候条件存在差异, 故不同地理区域和不同品种的枸杞在大小、颜色、口感风味、功能成分含量以及营养品质等方面均存在显著差异[5]。近年来, 已有文献报道枸杞多糖的抗癌作用, 如马宗琴[6]通过磷酸化蛋白组学分析发现枸杞多糖通过增加非小细胞肺癌细胞凋亡蛋白的表达

来抑制肿瘤生长；枸杞多糖能够显著抑制乳腺癌细胞的增殖并诱导细胞 G0/G1 期的阻滞，还通过 xCT/GPX4 轴诱导乳腺癌细胞铁死亡[7]。枸杞多糖可通过抑制肝癌中 VEGF 的表达，降低血管通透性，从而抑制血管生成[8]。枸杞多糖联合 CXCL10 可以提高荷瘤小鼠免疫器官指数，提高 DC 细胞数量及其功能，促进 Th1 型细胞因子分泌及恢复 Th1/Th2 平衡，从而提高机体抗肿瘤免疫力[9]；还可与阿霉素联合应用可以增强抗肿瘤作用，改善肝癌小鼠免疫抑制状态[10]等，但对结直肠癌的抗癌作用鲜有报道。因此，本文先采用网络药理学方法分析枸杞子活性成分的抗癌靶点及其潜在的作用机制，并通过体外实验检测了枸杞子提取物的抗结直肠癌的活性，为进一步探讨枸杞子抗结直肠癌的分子机制提供一定的参考价值。

2. 材料与方法

2.1. 数据库

TCMSP 数据库(<http://tcmsp.com/tcmssp.php>)，Uniport 蛋白数据库(<https://www.uniprot.org/>)，TTD 数据库(<https://db.idrblab.net/ttd>)，DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)，GeneCard 数据库(<https://www.genecards.org/>)，VENNY2.1 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>)，STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)，Metascape 数据库(<https://metascape.org/gp/index.html>)，微生物信(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)。

2.2. 材料

黑枸杞和红枸杞均购自宁夏杞里香枸杞有限责任公司。结直肠癌细胞 HCT116 保存于重师医学院实验室。

2.3. 仪器与设备

粉碎机：Media；液晶超声波清洗器：昆山洁力美超声仪器有限公司；101 系列电热鼓风干燥箱：常州恩培仪器制造有限公司；PHS-3C 型 pH 计：上海仪电科学仪器股份有限公司；TG-19 高速离心机：四川蜀科仪器有限公司；旋转蒸发器 RE-52AA：上海亚荣生化仪器厂；电子天平：杭州万特衡器有限公司；冷冻干燥机：北京博医康实验仪器有限公司；酶标仪：美国 BioTek Instruments 公司；细胞培养箱：赛默飞；超净工作台：苏州安泰空气技术有限公司。

2.4. 网络药理学分析

2.4.1. 枸杞子活性成分筛选及靶点收集

以“枸杞子”为关键词输入到 TCMSP 数据库，按照口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 且类药性(DL) ≥ 0.18 的标准进行筛选，得到枸杞子的有效成分；再根据其活性成分收集对应的靶点信息，并利用 Uniport 蛋白数据库将靶点名称转换成对应的基因名称，删除非人源基因，得到枸杞子活性成分对应的基因名称。

2.4.2. 结直肠癌基因筛选

以“colorectal cancer”为关键词分别在 TTD 数据库、DisGeNET 数据库和 GeneCard 数据库中查找结直肠癌相关靶点，删除重复值得到结直肠癌的作用靶点信息。

2.4.3. 构建蛋白质 - 蛋白质相互作用网络 PPI

利用 VENNY2.1 对筛选得到的枸杞子和结直肠癌靶点取交集，并绘制 Venny 图。再利用 STRING 平台构建交集靶点蛋白质 - 蛋白质相互作用网络 PPI，设置物种为“Homo sapiens”，置信度大于 0.9，其

余为默认值,生成蛋白互作网络,再将其导入到 Cytoscape 3.9.1 软件中进行可视化,并进行拓扑分析得到关键靶点。

2.4.4. 富集分析

将获取得到的交集基因导入到 Metascape 数据库进行基因本体(GO)生物学功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)信号通路富集分析。GO 按照生物学过程(BP)、细胞组成(CC)以及分子功能(MF)三个方面来描述靶基因抗肿瘤的生物过程,KEGG 则分析靶基因的抗肿瘤通路。最后借助微生信平台分别绘制气泡图和柱状图。

2.4.5. 构建疾病 - 成分 - 靶点 - 通路网络图

运用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“疾病 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图,根据内置插件对拓扑参数分析,参数设置主要为度值,介度中心性和连接度中心性,根据分析结果得到核心成分。

2.5. 细胞培养

2.5.1. 细胞复苏

提前配制 DMEM 完全培养基(含 10% FBS、青霉素和链霉素)。将储存在液氮罐中的 HCT116 细胞迅速放入已经提前加热至 37℃ 的水浴锅中,放入后快速摇动以缩短解冻时间。提前准备 10 mL 无菌离心管,将解冻后的细胞从冻存管中吸至无菌管中,1000 rpm 离心 5 min,在超净工作台取一个 60 mm² 的细胞培养皿,加入 3 mL DMEM 完全培养基备用;离心结束后丢弃上清液,加入 1 mL DMEM 完全培养基重悬细胞,并转移至 60 mm² 培养皿中,在超净工作台以十字架方式上下左右轻轻摇匀细胞,随后置于 5%,饱和湿度,37℃ 无菌细胞培养箱中培养。

2.5.2. 细胞传代

待 HCT116 细胞铺满细胞瓶底约为 80% 即可传代。用移液器将培养皿中的培养液去除干净后,用 PBS 清洗一次,加入 1 mL 的胰蛋白酶细胞消化液,轻轻晃动,将培养皿放入细胞培养箱消化 1~2 min,用显微镜观察细胞变圆后加入 1 mL DMEM 培养基终止消化。用移液器反复吹打成单细胞悬液,然后立即转移至提前备好的 10 mL 无菌离心管中,1000 rpm 离心 5 min。离心结束后弃上清液,加入 1 mL DMEM 完全培养基重悬细胞。向 100 mm² 细胞培养皿中加入 8 mL DMEM 完全培养基,取重悬好的细胞液的 1/3 或 1/2 加入到加入培养液的 100 mm² 培养皿中,在超净工作台以十字架方式上下左右轻轻摇匀细胞,随后置于 5%,饱和湿度,37℃ 无菌细胞培养箱中培养。

2.5.3. 细胞冻存

收集处于对数生长期状态良好的人结直肠癌细胞 HCT116,吸走培养皿中的上清培养液,从培养皿边缘轻轻地加入 2 mL PBS 缓冲液清洗细胞两次。加入 1 mL 胰蛋白酶细胞消化液后放回 37℃ 培养箱中消化 2 min,然后在光学显微镜下观察,若细胞变圆,加入 1 mL DMEM 完全培养基终止消化,然后用 1 mL 移液枪反复吹打培养皿壁上的细胞使其完全脱落,吹打下来的细胞悬液立即转移至 10 mL 离心管中,1000 rpm 离心 5 min。弃上层液体后,向离心管中加入专用细胞冻存液 3 mL 将细胞重悬,轻轻混匀后将重悬液体转移至已灭菌的细胞冻存管中,每管 1 mL。先放置于 4℃ 保存 30 min,再于 -20℃ 保存 2 h,然后转移至 -80℃ 冰箱中保存 24 h 后,再将冻存管转入液氮罐中长期保存。

2.6. 枸杞子粗提物提取

取 20 g 黑枸杞和红枸杞去蒂烘干,去除大部分水分,烘箱温度设置 50℃,烘干时间 8 h。黑枸杞和红枸杞烘干后利用研磨机研磨成粉,放入瓶内密封备用。将黑枸杞粉末和红枸杞粉末分别倒入两个锥形

瓶 A、B 内，加入 70% 酸化乙醇(料液比 1:25)，摇晃均匀，置于 37℃ 水浴锅内浸泡提取 2.5 h。浸泡提取后进行超声波提取，将锥形瓶转移至超声波清洗机中进行提取，提取条件：温度 30℃，功率 100 W，频率 120 Hz，超声时间 30 min。取提取液上清液进行离心，转速 3500 rpm 离心 15 min，弃去沉淀，将提取液倒入旋转蒸发仪烧瓶内，温度为 45℃、中速旋转，直至提取液不再蒸发出乙醇，视为浓缩完成。将浓缩液倒出，用少许一级水清理瓶壁，并与浓缩液合并。将浓缩液放入 -80℃ 冰箱冷冻 30 min，冷冻干燥机预制冷 30 min，冷冻干燥时间 36 h。干燥完成后，取出粉末，去氧保存。

2.7. MTT 法测定细胞活力

取浓度调整至 5×10^4 个/mL 的对数期 HCT116 细胞，每孔 100 uL 接种于 96 孔培养板，培养 24 h 直至细胞贴壁完全。分别用含有 0 mg/mL、1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、50 mg/mL、100 mg/mL 浓度的黑枸杞粗提物和红枸杞粗提物替换原有培养基，并设置空白对照孔，每个浓度做五个复孔。放入细胞培养箱中，培养条件为 37℃、5% CO₂、48 h。培养完成后，取出培养板，每孔加入 10 uL 5 mg/mL MTT，继续培养 4~6 h，吸走上清后每孔加入 150 uL DMSO，摇床震荡 10 min，在 490 nm 波长处测吸光度(OD)值，并计算相对细胞活力。存活率计算公式为(加药组 OD - 空白 OD)/(对照组 OD - 空白 OD)。

3. 结果

3.1. 网络药理学预测结果

3.1.1. 枸杞子活性成分筛选

在 TCMSP 数据库中以“枸杞子”为关键词进行检索，基于口服生物利用度 $OB \geq 30\%$ 且化合物类药性 $DL \geq 0.18$ 的标准，筛选到 35 个活性成分(见表 1)。

Table 1. Main active ingredients of *Lycii fructus*

表 1. 枸杞子主要活性成分

Mol ID	成分	OB (%)	DL
MOL001323	Sitosterol alpha1	43.28	0.78
MOL003578	Cycloartenol	38.69	0.78
MOL001494	Mandenol	42	0.19
MOL001495	Ethyl linolenate	46.1	0.2
MOL001979	LAN	42.12	0.75
MOL000449	Stigmasterol	43.83	0.76
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75
MOL005406	atropine	45.97	0.19
MOL005438	campesterol	37.58	0.71
MOL006209	cyanin	47.42	0.76
MOL007449	24-methylidenelophenol	44.19	0.75
MOL008173	daucosterol_qt	36.91	0.75
MOL008400	glycitein	50.48	0.24
MOL010234	delta-Carotene	31.8	0.55
MOL000953	CLR	37.87	0.68

Continued

MOL009604	14b-pregnane	34.78	0.34
MOL009618	24-ethylcholesta-5,22-dienol	43.83	0.76
MOL009620	24-methyl-31-norlanost-9(11)-enol	38	0.75
MOL009621	24-methylenelanost-8-enol	42.37	0.77
MOL009622	Fucosterol	43.78	0.76
MOL009633	31-norlanost-9(11)-enol	38.35	0.72
MOL009634	31-norlanosterol	42.2	0.73
MOL009635	4,24-methyllophenol	37.83	0.75
MOL009639	Lophenol	38.13	0.71
MOL009640	4alpha,14alpha,24-trimethylcholesta-8,24-dienol	38.91	0.76
MOL009641	4alpha,24-dimethylcholesta-7,24-dienol	42.65	0.75
MOL009642	4alpha-methyl-24-ethylcholesta-7,24-dienol	42.3	0.78
MOL009644	6-Fluoroindole-7-Dehydrocholesterol	43.73	0.72
MOL009646	7-O-Methyluteolin-6-C-beta-glucoside_qt	40.77	0.3
MOL009650	Atropine	42.16	0.19
MOL009656	(E,E)-1-ethyl octadeca-3,13-dienoate	42	0.19
MOL009665	Physcion-8-O-beta-D-gentiobioside	43.9	0.62
MOL009677	lanost-8-en-3beta-ol	34.23	0.74
MOL009678	lanost-8-enol	34.23	0.74
MOL009681	Obtusifoliol	42.55	0.76

3.1.2. 核心靶点筛选

对活性成分进行靶点预测，共得到 202 个作用靶点，以此构建“枸杞子活性成分-靶点”网络图，包含 234 个节点，389 条边，其中槲皮素、 β -谷甾醇和豆甾醇等成分作用的靶点较多，分别为 148、36 和 30 个。

在 TTD 数据库中以“colorectal cancer”为关键词得到 93 个靶点；在 DisGeNET 数据库中以“colorectal cancer”为关键词，筛选条件为 Score ≥ 0.3 ，得到 702 个靶点；在 GeneCard 数据库中以“colorectal cancer”为关键词，筛选条件为 Relevance score ≥ 10 ，得到 1533 个靶点。对所获得的靶点进行合并去重后得到 2073 个靶点。

为进一步明确枸杞子和结直肠癌的共同靶点，对获取的枸杞子的 202 个靶点和结直肠癌的 2073 个靶点交集，得到 121 个可能与枸杞子抗结直肠癌作用相关的靶点。运用 String 数据库构建了 121 个靶点的 PPI 网络，将数据导入 Cytoscape 3.9.1 软件，进行网络分析，包含 121 个节点，511 条边。根据 CytoNCA 进行拓扑分析，得到 10 个核心靶点分别为 TP53、HSP90AA1、AKT1、MAPK1、RELA、ESR1、TNF、FOS、MYC、MAPK14，见表 2。

3.1.3. GO 分析及 KEGG 通路富集分析结果

利用 Metascape 数据库对相关靶点进行生物过程、细胞组分和分子功能 3 个方面的 GO 分析，根据校正后的 P 值分别选择排名前 10 的条目绘制柱状图，如图 1。

Table 2. Key target network node parameters
表 2. 关键靶点网络节点参数

靶点	度值	介度中心性	接近中心性
TP53	38	1839.7869	0.5116279
HSP90AA1	35	1380.5483	0.52380955
AKT1	30	916.9795	0.49327356
MAPK1	29	759.0952	0.5045872
RELA	26	513.2753	0.4888889
ESR1	25	603.83466	0.4845815
TNF	23	893.4888	0.46413502
FOS	22	593.25616	0.48672566
MYC	22	303.99597	0.47826087
MAPK14	20	287.47958	0.4680851

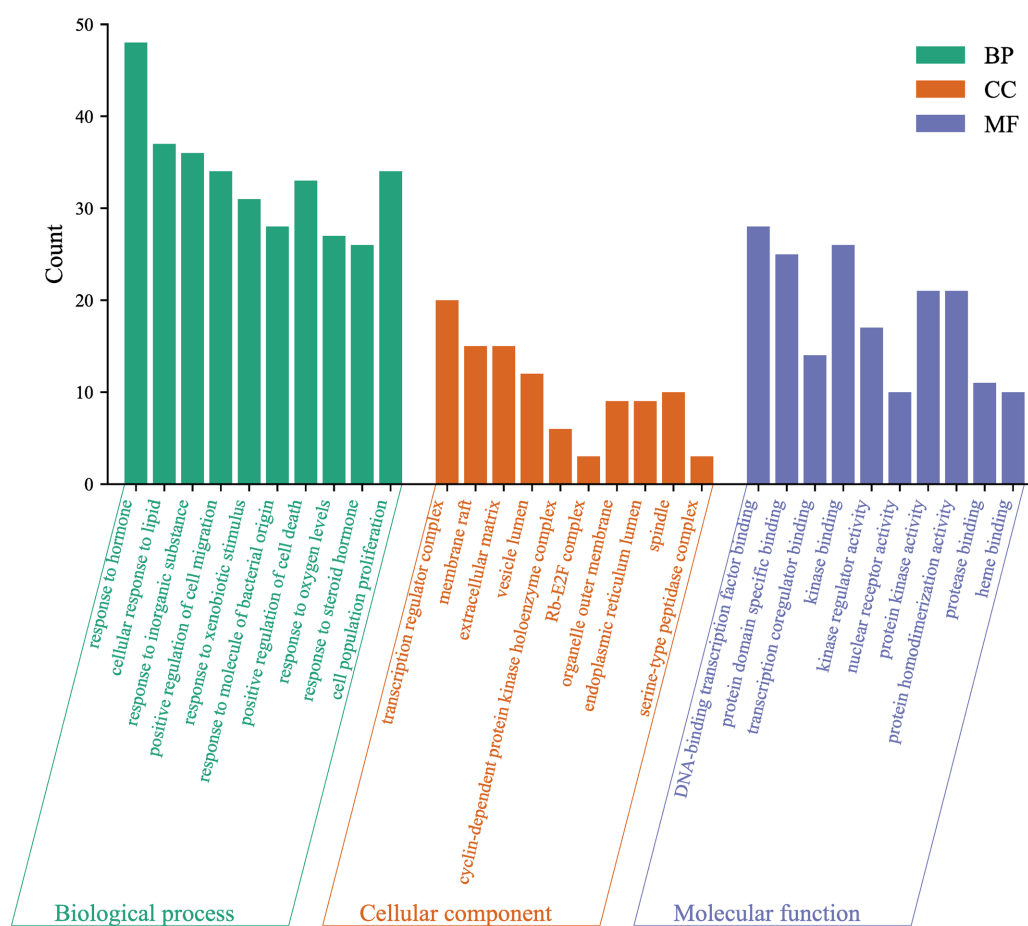


Figure 1. GO analysis of target points for the treatment of colorectal cancer with *Lycii fructus*

图 1. 枸杞子治疗结直肠癌靶点 GO 分析

对筛选出的 10 个核心靶点进行 KEGG 通路富集分析, 筛选出排名靠前的 20 条通路($P < 0.05$) (如图 2)。由图可知, 主要涉及癌症通路、PI3K-Akt 信号通路、HIF-1 信号通路、松弛素信号通路等。

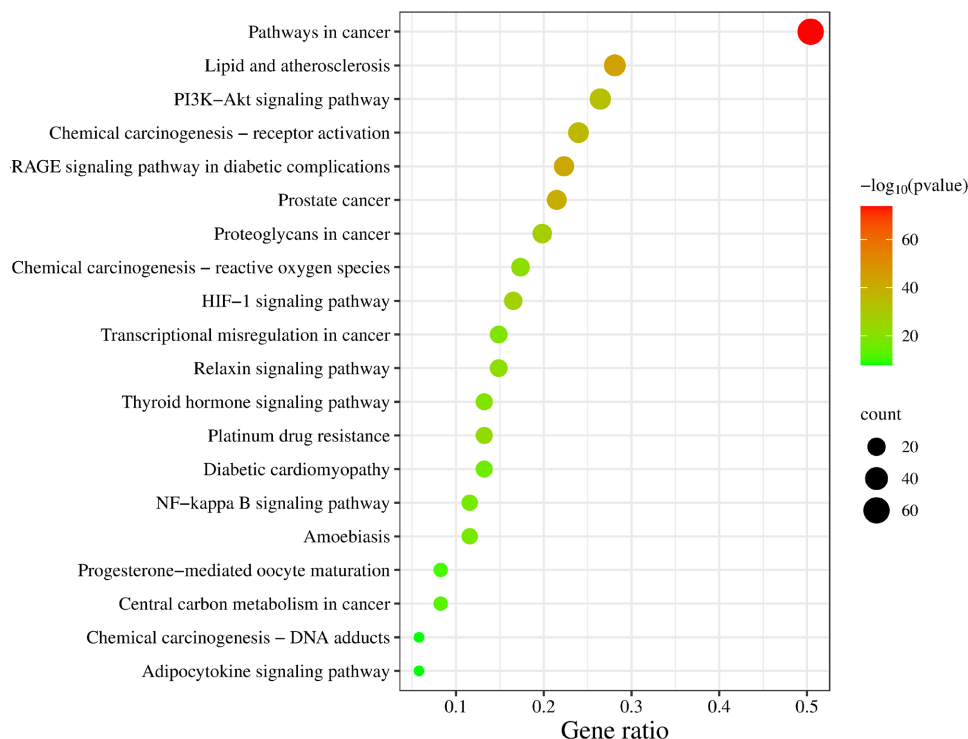


Figure 2. Analysis of KEGG pathway for the treatment of colorectal cancer with *Lycii fructus*
图 2. 枸杞子治疗结肠直肠癌靶点 KEGG 通路分析

3.1.4. “疾病 - 成分 - 靶点 - 通路” 网络图构建

根据 Cytoscape 3.9.1 软件构建“疾病 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图。如图 3 所示，35 个活性成分可通过 121 个靶点主要通过 20 条信号通路中发挥作用，说明枸杞子可能通过多成分、多靶点、多通路抑制结肠癌的发生和发展。其中度值最大的前 5 个活性成分包括槲皮素、β-谷甾醇、豆甾醇、阿托品和黄豆黄素，见表 3。

3.2. 体外实验验证结果

枸杞粗提取物对 HCT116 细胞活力的影响

为了验证网络药理学的筛选和预测结果，我们利用乙醇对枸杞子的活性成分进行提取，并采用冷冻真空的方法进行干燥，获取枸杞子的粗提取物。采用 MTT 法测定不同浓度黑枸杞和红枸杞粗提取物对结肠癌细胞 HCT116 活性的影响。如图 4 所示，两种枸杞提取物对 HCT116 细胞活力均有一定抑制作用，且黑枸杞提取物的抑癌效果优于红枸杞提取物。

Table 3. Network node parameters of main active ingredients in *Lycii fructus*

表 3. 枸杞子主要活性成分网络节点参数

成分	度值	介度中心性	接近中心性
槲皮素	148	27156.375	0.575
β-谷甾醇	36	6881.4004	0.39593115
豆甾醇	30	5780.076	0.38685015
阿托品	27	3230.6094	0.34468666
黄豆黄素	23	1881.4994	0.34752747

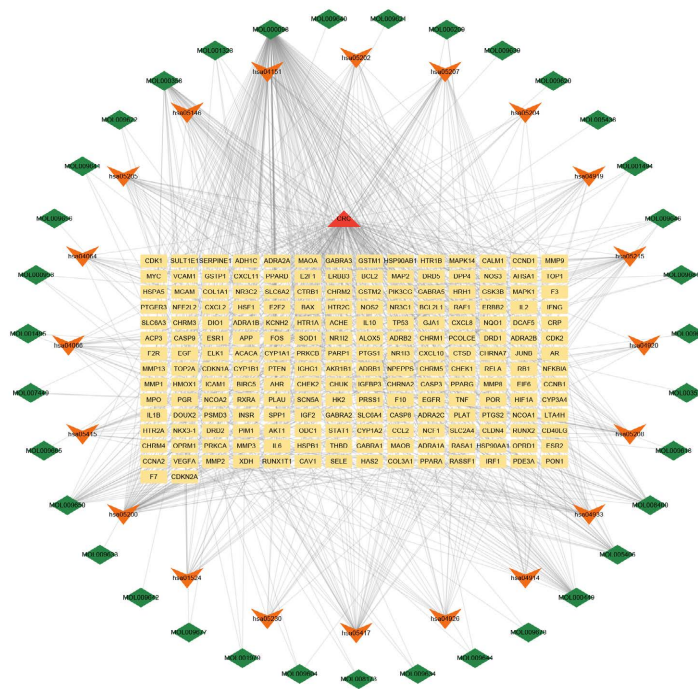


Figure 3. Network diagram of “disease-component-target-pathway”
图3. “疾病 - 成分 - 靶点 - 通路”网络图

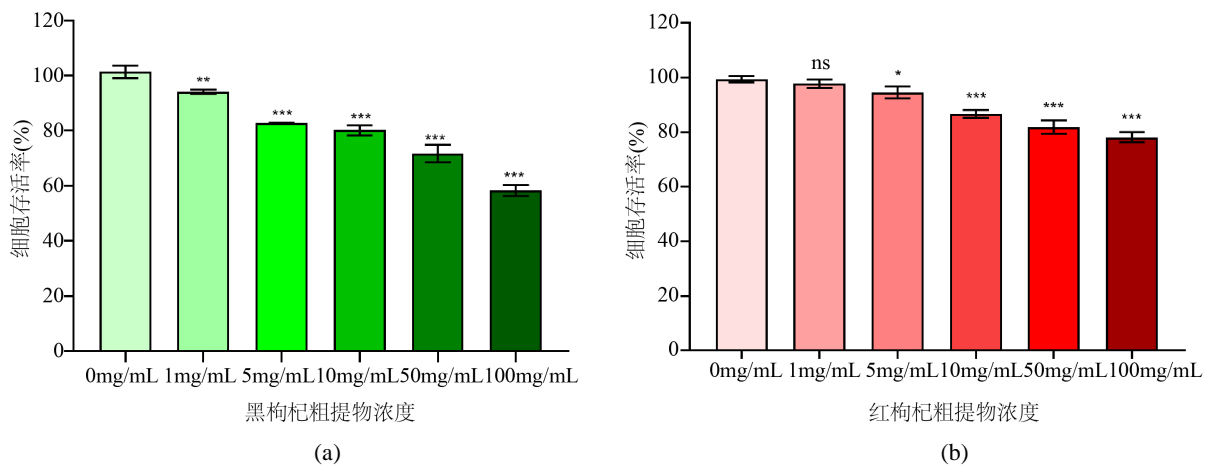


Figure 4. Effect of *Lycii fructus* crude extract on the viability of HCT116 cells
图4. 枸杞粗提物对 HCT116 细胞活力的影响

4. 讨论

网络药理学可以在分子水平方面分析化合物多靶点、多通路调控疾病的可能机制，提供药物 - 靶点 - 疾病之间的相互作用关系，为重要的药理研究提供了更多的方向[11]。本研究检索出枸杞子共 188 个化学成分，根据筛选得到 35 个主要活性成分，包括槲皮素、β-谷甾醇和豆甾醇等成分。其中，槲皮素是一种黄酮类化合物，已报道在包括结直肠癌等多种癌症中发挥作用[11]；β-谷甾醇是一种含量丰富的植物甾醇，具有抗炎、抗氧化以及抗肿瘤作用等[12]；豆甾醇是广泛存在于大豆、谷物等食物的不饱和甾醇，对皮肤癌、肝癌、胃癌等都有一定的抑制作用[13]。

通过网络药理预测, 35 个化合物可以通过 121 个潜在靶点与结直肠癌相关。根据拓扑分析可以得到 TP53、HSP90AA1、AKT1、MAPK1、RELA 等是枸杞子治疗结直肠癌关键的潜在靶点。如: TP53 主要通过抑制损伤细胞的分化, 调节细胞周期, 诱导细胞程序性死亡, 激活衰老, 与其他抑癌基因相互作用来发挥作用[14]; HSP90AA1 是 HSP90 家族的应激诱导成员, 在肿瘤发病过程中调节一系列原癌基因表达, 并能促进肿瘤的进展、侵袭和化疗耐药性[15] [16]; AKT1 在组织中分布广泛, 也是 PI3K/Akt 信号转导通路下游的主要作用靶点, 其通过磷酸化激活抑制下游的多种作用底物, 从而促进肿瘤细胞的生长、增殖和分化等[17]; MAPK1 即 ERK2, 是 ERK 信号通路的关键节点, 其通过磷酸化激活后由细胞质转位到细胞核, 从而来激活下游通路蛋白磷酸化引起细胞多种生物学功能的变化, 如细胞增殖凋亡、氧化应激等[18]; RELA 又名转录因子 p65, 是 NF- κ B 转录因子的一个重要组成部分, 是各种炎症反应、应激反应和细胞凋亡等重要生理和病理过程的关键分子[19]。

GO 分析表明, 枸杞子主要活性成分靶点主要通过 DNA 结合转录因子、蛋白特异性结构域、转录辅助调节因子、激酶等结合来发挥作用。从 KEGG 富集分析的通路来看, 枸杞子主要涉及癌症途径、脂质与动脉粥样硬化、糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路、前列腺癌、化学致癌 - 受体激活、PI3K-Akt 信号通路、癌症中的蛋白聚糖、HIF-1 信号通路、铂类药物耐药性等。

为了验证网络药理学的预测结果, 我们通过体外细胞实验, 初步明确了枸杞粗提物抗结肠癌的活性。MTT 结果显示, 黑枸杞和红枸杞的粗提物都具有一定的抗癌活性, 其中, 黑枸杞粗提物比红枸杞粗提物抗癌效果更好, 推测这与黑枸杞含有更多的抗氧化物质如花青素有关。在肿瘤细胞内, 一定水平的活性氧水平有利于肿瘤细胞的生长。推测: 黑枸杞中的花青素会清除胞内的活性氧, 从而抑制肿瘤细胞的生长。当然这个推测还有待进一步的验证。

在进行网络药理学分析时, 由于枸杞子的化学成分较多, 没有对所有成分进行全面分析; 此外, 在体外实验研究中, 仅分析了枸杞子粗提物对体外结直肠癌细胞活性的影响, 还有待进一步优化提纯, 进一步明确抗癌成分; 最后, 对于枸杞子抗癌的机制还有待进一步深入研究, 尤其是探究其抗癌功效与抗氧化的关联。

综上所述, 本研究基于网络药理学证明了枸杞子可通过多靶点、多通路联合调控结直肠癌, 并通过体外实验验证了枸杞子粗提物的抗癌活性, 为枸杞子抗结直肠癌的进一步机制研究提供了一定的理论参考。

参考文献

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., *et al.* (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **71**, 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- [2] 周子钧. Slit2/Robo1 信号通过 TGF- β /Smads 信号通路促进结肠直肠癌的转移机制研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广东药科大学, 2019.
- [3] 张晨晨, 薛宇, 陈丹妮, 等. 结直肠癌化疗及靶向治疗的研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2022, 25(5): 453-458.
- [4] 韩星, 李雪岩, 杨海洋, 等. 基于网络药理学方法研究枸杞子抗癌作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(5): 522-527, 545.
- [5] 周琪乐, 龚凌慧, 纪凤娣, 等. 红枸杞、黄枸杞和黑枸杞营养成分比较[J]. *中国酿造*, 2021, 40(10): 43-49.
- [6] 马宗琴. 枸杞多糖对人非小细胞肺癌细胞增殖影响及其磷酸化蛋白质组学分析[D]: [硕士学位论文]. 银川: 宁夏大学, 2022.
- [7] 张晴晴. 枸杞多糖诱导乳腺癌细胞铁死亡的作用机制研究[D]: [硕士学位论文]. 银川: 宁夏医科大学, 2022.
- [8] 张芙蓉. 枸杞多糖对肝癌细胞及其细胞内血管内皮生长因子的抑制作用[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西医科大学, 2011.

- [9] 胡妮. 枸杞多糖单用及联合 CXCL10 抗肝癌作用免疫机制研究[D]: [硕士学位论文]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [10] 邓向亮. 枸杞多糖增强阿霉素抗小鼠肝癌的作用研究[D]: [博士学位论文]. 广州: 广州中医药大学, 2015.
- [11] 王锦, 张海, 曲素欣. 基于网络药理学的三七治疗结直肠癌的分子作用机制研究[J]. 中医学报, 2022, 37(6): 1302-1310.
- [12] 左俊, 马少林. β -谷甾醇对增生性瘢痕成纤维细胞作用机制的网络药理学分析[J]. 中国组织工程研究, 2023, 28(2): 216-223.
- [13] 蒋玉菡, 胡磊, 吴敏瑞, 等. 基于网络药理学探讨豆甾醇抗胃癌的靶点与机制[J]. 武汉轻工大学学报, 2023, 42(1): 38-44.
- [14] 常远. KRAS、PIK3CA、APC、TP53 基因异常表达和结直肠癌患者临床特征的相关性研究[D]: [硕士学位论文]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [15] Zhang, M.N., Peng, Y.N., Yang, Z.W., *et al.* (2022) DAB2IP Down-Regulates HSP90AA1 to Inhibit the Malignant Biological Behaviors of Colorectal Cancer. *BMC Cancer*, **22**, Article No. 561. <https://doi.org/10.1186/s12885-022-09596-z>
- [16] Zuehlke, A.D., Beebe, K., Neckers, L. and Prince, T. (2015) Regulation and Function of the Human HSP90AA1 Gene. *Gene*, **570**, 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.018>
- [17] 许欣, 姚冬颖. 结直肠癌中 Girdin 和 Akt1 蛋白的表达及临床意义[J]. 河北医药, 2016, 38(15): 2259-2261, 2266.
- [18] 张倩楠, 贾琴琴, 杨婷婷, 等. MAPK1 基因沉默对肺癌 A549 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭能力的影响[J]. 宁夏医科大学学报, 2022, 44(4): 373-379.
- [19] 陈雪, 林瑞珠, 许建峰, 等. 基于 NF- κ B p65 信号通路探讨金汁修复受损的小鼠肠黏膜上皮细胞的机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(2): 171-176.