

Mechanism of Fuzheng Kangliu Tang on Tumour Based on Network Pharmacology and Molecular Docking

Jiangjin Niu Dan Xiong Mingguo Gao Zongming Xie*

Liuyang Traditional Chinese Medicine Hospital, Liuyang, Hunan, 430100, China

Abstract

Objective: Using network pharmacology and molecular docking techniques to predict the anti-tumor mechanism of Fuzheng Kangliu Tang. **Methods:** Screening the active ingredients and related targets of Fuzheng Kangliu Tang through databases such as TCMSP, GeneCards, OMIM, etc; Construct an active ingredient target network diagram using Cytoscape 3.7.2 software. Construct a protein-protein interaction (PPI) network diagram using the STRING database, perform GO functional enrichment analysis and KEGG signaling pathway enrichment analysis using the DAVID database, and perform molecular docking using Autodock 1.5.7 software. **Results:** A total of core components such as quercetin, isorhamnetin, luteolin, dihydroisoflavone, and schisandrin B were screened, as well as five core targets including AR, ESR1, MAPK1, PPARG, and PTGS2, which act on signaling pathways such as cancer pathways. The binding energies of molecular docking are all less than -5.0 kJ/mol. **Conclusion:** The various components of Fuzheng Kangliu Tang can exert synergistic therapeutic effects by regulating cancer pathways, prostate cancer pathways, and other signaling pathways through core targets. This study laid a theoretical foundation for the subsequent clinical application and mechanism of action research of Fuzheng Kangliu Tang.

Keywords

Fuzheng Kangliu Decoction; network pharmacology; molecular docking; anti-tumor; action mechanism

基于网络药理学和分子对接探讨扶正抗瘤汤抗肿瘤作用机制

牛江进 熊丹 高明果 谢宗明*

浏阳市中医医院, 中国·湖南浏阳 430100

摘要

目的:运用网络药理学和分子对接技术预测扶正抗瘤汤抗肿瘤的作用机制。**方法:**通过TCMSP、GeneCards、OMIM等数据库筛选扶正抗瘤汤的有效成分及其相关作用靶点;运用Cytoscape3.7.2软件构建活性成分-靶点网络图。通过STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图,运用DAVID数据库进行GO功能富集分析和KEGG信号通路富集分析,运用Autodock1.5.7软件进行分子对接。**结果:**共筛选到槲皮素、异鼠李素、木犀草素、二氢异黄酮、五味子乙素等核心成分,以及AR、ESR1、MAPK1、PPARG和PTGS2五个核心靶点,作用于癌症通路等信号通路。分子对接结合能均<-5.0kJ/mol。**结论:**扶正抗瘤汤各药物成分可通过核心靶点,调控癌症通路、前列腺癌通路等信号通路发挥协同治疗作用。本研究为扶正抗瘤汤后续临床应用及作用机制研究奠定了理论基础。

关键词

扶正抗瘤汤; 网络药理学; 分子对接; 抗肿瘤; 作用机制

1 引言

近年来,全球患恶性肿瘤人数急剧增长。世界癌症报告显示,2020年全球约有1900万新发癌症病例和1000万癌症死亡病例,中国新发癌症为457万例,癌症死亡病例

300万例,其发病率和死亡率位居全球首位^[1]。恶性肿瘤中晚期患者预后差,存活率低,已成为严重危害人类健康的常见慢性病。

中医认为肿瘤的病因在于内、外两方面,外因包括四时不正之气和饮食因素,内因包括情志因素和脏腑亏虚^[2]。尚静等^[3]认为肿瘤形成的根本原因是由于正气虚损,疾病本身属虚。杨世红等^[4]认为肿瘤的发生与脾胃功能失调有着极密切的关系,脾虚导致的正气不足以及其所产生的痰、瘀是形成肿瘤的原因。基于中医对肿瘤的辨证分析,正虚邪实是其主要病机,临床中药治疗也多从扶正祛邪入手。

扶正抗瘤汤(FZKLD)我院临床经验方,由黄芪、盐菟丝子、人参、枸杞子等十三味中药组成。本方临床疗效显

【基金项目】湖南省自然科学基金(项目编号:2024JJ8223)。

【作者简介】牛江进(1987-),男,中国河南唐河人,硕士,主管中药师,从事中药学、中药药理研究。

【通讯作者】谢宗明(1974-),男,中国湖南浏阳人,硕士,主任中药师,从事中药鉴定与质量评价研究。

著, 但其具体作用机制尚不明确。本研究利用网络药理学和分子对接预测 FZKLD 的有效成分, 探讨药物—成分—靶点—疾病之间的相互作用关系, 为深入研究 FZKLD 治疗肿瘤的作用机制奠定基础。

2 资料与方法

2.1 FZKLD 活性成分与靶点筛选

通过 TCMSP 数据库检索 FZKLD 各药味成分, 以 OB $\geq 30\%$, DL ≥ 0.18 为筛选条件获得各药味成分, 并在数据库中检索其相关靶点。通过 Uniprot 数据库, 获得标准化基因名称。“重楼”从化学专业数据库中获取化学成分, 经 SwissTarget 数据库进行 ADME 筛选, 并预测各成分相关靶点。灵芝从 BATMAN-TCM 数据库中, 获取活性成分和相应靶点。汇总成分靶点, 去重后得到 FZKLD 的有效成分和作用靶点。

2.2 成分 - 疾病靶点网络构建

以“Tumour”为关键词, 在 GeneCards、OMIM 数据库中检索, 合并去重后得到肿瘤疾病靶点。通过 VENNY2.1 获取药物成分和疾病交集靶点, 即为 FZKLD 抗肿瘤的作用靶点, 保留交集靶点对应的活性成分, 即为 FZKLD 治疗肿瘤的活性成分。通过 Cytoscape3.7.2 软件构建 FZKLD 治疗肿瘤“成分 - 靶点网络图”。

2.3 PPI 网络构建及核心靶点筛选

将交集靶点导入 STRING 数据库, 得到靶点蛋白互作

网络图 (PPI), Cytoscape3.7.2 软件对 PPI 网络进行优化, 并筛选核心靶点。

GO 功能和 KEGG 通路富集分析 将核心靶点导入 DAVID 数据库, 物种为 “Homo sapiens”, 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 对 GO 功能和 KEGG 信号通路进行富集分析。选择 KEGG 排名靠前的信号通路, 将通路富集的靶点与成分一一对应, 运用 Cytoscape3.7.2 软件构建“药物—成分—靶点—信号通路—疾病”网络图。

2.4 关键核心靶点分子对接验证

从 TCMSP 数据库获取小分子的“mol2”格式文件; 靶蛋白结构从 RCSB PDB 数据库下载。运用 PyMOL 2.4.1 软件移除蛋白结构中的水分子、小分子配体, 再将其导入 AutoDockTools 1.5.7 软件对蛋白进行加氢、计算电荷并设置原子类型。通过 AutoDock Tools 1.5.7 设置对接盒子进行分子对接, 绘制分子对接结合能热图; 并运用 PyMOL 2.4.1 软件对结合位点进行可视化处理^[5]。

3 结果

3.1 FZKLD 成分及靶点筛选

筛选到 FZKLD 成分 260 个, 各药味共有成分 17 个, 见表 1。各药味独有成分以药物名称拼音首字母加数字进行编号, 如白花蛇舌草 2 个 (编号: BHSSC1-2); 半枝莲 21 个 (编号: BZL1~21)。活性成分对应靶点共 8101 个, 去重后共 1175 个, 为 FZKLD 活性成分潜在作用靶点。

表 1 各药物共有成分表

CC*	MOL ID	来源	CC*	MOL ID	来源
A1	MOL000417	甘草、黄芪	A2	MOL000392	甘草、黄芪
A3	MOL000239	甘草、黄芪	A4	MOL000211	甘草、黄芪
A5	MOL000296	茯苓、黄芪	A6	MOL000006	半枝莲、女贞子
A7	MOL005190	半枝莲、女贞子	A8	MOL000359	半枝莲、甘草
A9	MOL000033	白术、黄芪	A10	MOL005438	山药、枸杞
A11	MOL005440	山药、菟丝子	B1	MOL000354	菟丝子、甘草、黄芪
C1	MOL000953	山药、菟丝子、半枝莲、枸杞	D1	MOL000422	人参、菟丝子、甘草、黄芪、女贞子
D2	MOL000449	人参、山药、半枝莲、枸杞、白花蛇舌草	E1	MOL000358	人参、白花蛇舌草、菟丝子、半枝莲、枸杞、女贞子
F1	MOL000098	白花蛇舌草、菟丝子、甘草、半枝莲、枸杞、黄芪、女贞子			

* 注: CC (common compounds) 为各药味共有成分。

3.2 成分 - 疾病靶点网络构建

GeneCards 检索结果选取 Relevance score ≥ 10 的靶点, 合并去重后得到 1011 个肿瘤疾病靶点。VENNY2.1 平台取药物成分和肿瘤疾病靶点交集, 得到 216 个靶点, 即为 FZKLD 作用于肿瘤的靶点。将交集靶点与活性成分一一对应, 构建“成分 - 交集靶点”网络图, 见图 1。分析网络拓扑属性, 以 Degree 值控制节点符号大小, 得到作用靶点数前 5 的化合物为 F1 (槲皮素)、B1 (异鼠李素)、A6 (木犀草素)、HQ10 (二氢异黄酮)、RS16 (五味子乙素)。

Degree 分别为 97、47、46、39 和 38, 可能是治疗肿瘤的关键成分, 作为分子对接配体。

3.3 PPI 网络构建及核心靶点筛选

STRING 数据库中, 设置物种为 “Homo sapiens”, 置信度 > 0.4 , 得到 PPI 互作网络, 共有 215 个节点, 7455 条边, 运用 cytoscape3.7.2 软件的“centiscape2.0”插件计算节点的紧密度、介度、连接度, 选择同时满足阈值 closeness undir > 0.0028 , betweenness undir > 147.06 , degree undir > 69.35 的节点, 即为核心靶点, 见图 2。Degree 排名

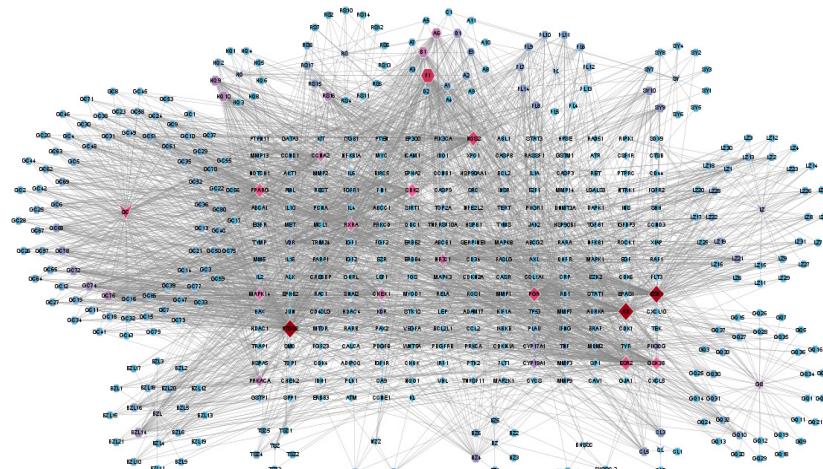


图 1 药物成分 – 交集靶点网络图

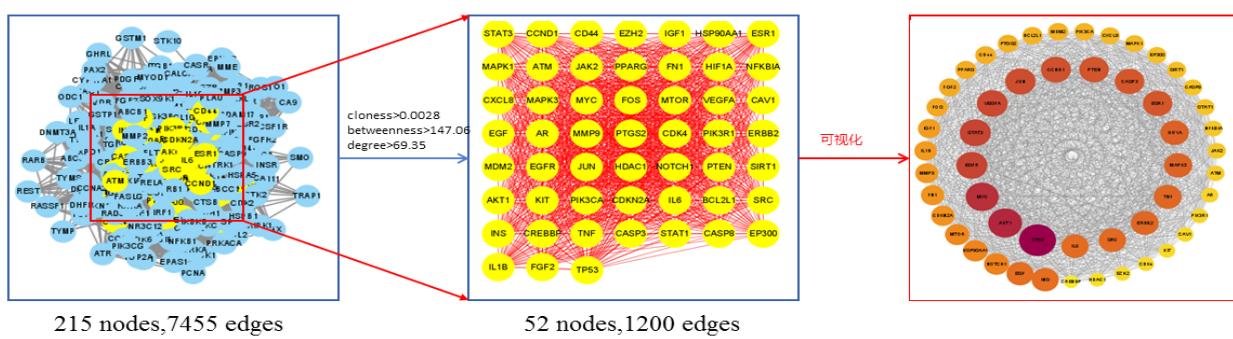


图 2 PPI 网络图及核心靶点筛选

靠前的靶点分别为 TP53、AKT1、MYC、STAT3、EGFR 等可能为 FZKLD 发挥抗肿瘤作用的关键靶点。

3.4 GO 功能与 KEGG 通路分析

通过 DAVID 数据库对核心靶点进行 GO 功能富集分析，共得到生物过程 (BP) 575 个，细胞组分 (CC) 53 个，分子功能 (MF) 109 个。选择 P 值前 10 的条目，如图 3 所示，

柱状图越高，则该功能上所富集的靶标蛋白越多，表明其可能在 FZKLD 治疗肿瘤的过程中发挥关键作用。生物过程主要涉及基因表达的正向调控、RNA 聚合酶 II 启动子的转录正调控、细胞增殖正向调节、凋亡过程负向调控等。细胞组分涉及大分子复合物、核原生质、细胞质、核染色质等。分子功能涉及酶结合、相同蛋白质结合、p53 蛋白结合等。

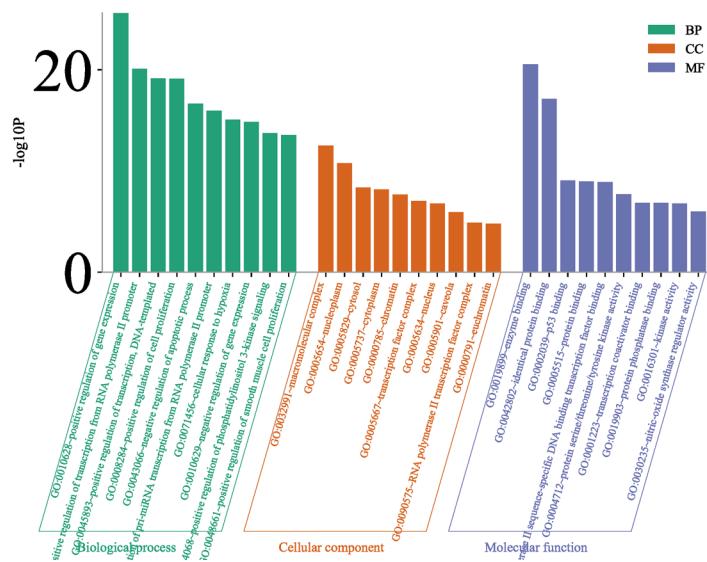


图 3 GO 功能富集分析图

KEGG 信号通路富集到 159 条信息, 选择 P 值前 20 的信号通路绘制气泡图, 结果见图 4。主要涉及癌症通路、前列腺癌通路、癌症相关蛋白聚糖等信号通路。将 P 值前 20 的信号通路中富集的靶点与活性成分对应, 构建“药物—成分—作用靶点—疾病—信号通路”网络, 见图 5。由图 5

可知, FZKLD 可能是通过各药物活性成分, 作用于 20 个主要信号通路和 52 个核心靶点发挥治疗肿瘤的作用。该网络中 Degree 值靠前的主要靶点为 PTGS2、AR、ESR1、PPARG、MAPK1 等; Degree 值分别为 135、129、128、77、31, 作为分子对接受体。

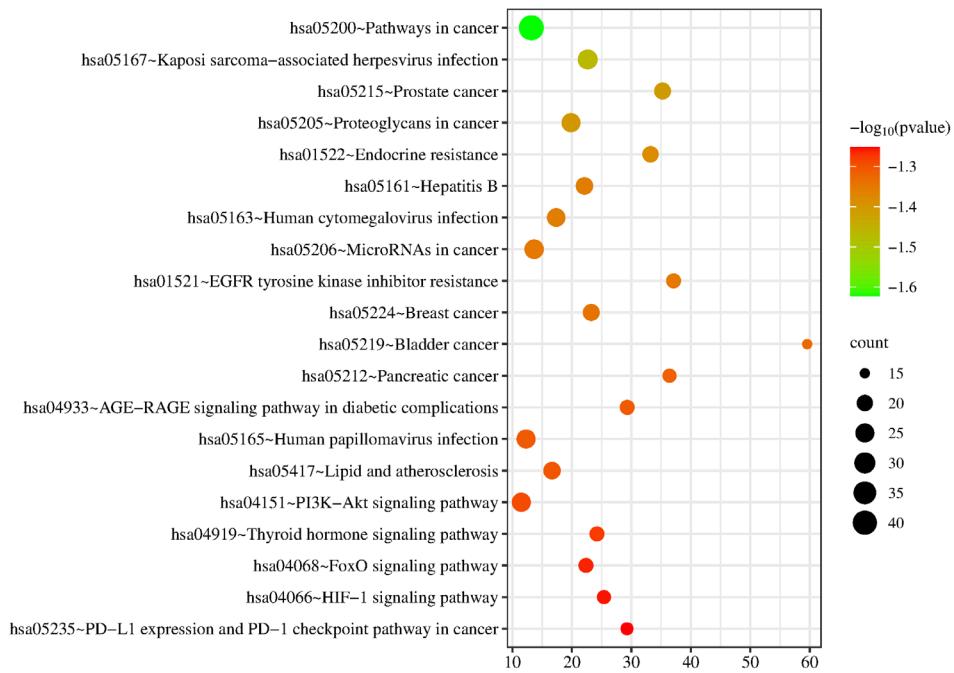


图 4 KEGG 信号通路富集气泡图

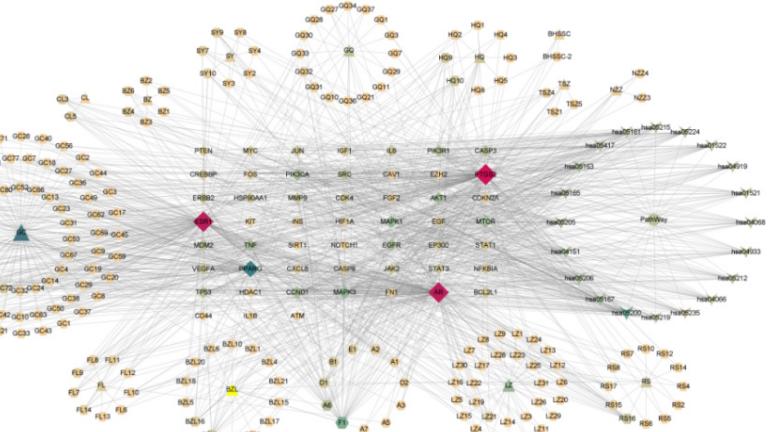


图 5 药物—成分—靶点—信号通路—疾病网络图

3.5 分子对接验证

各活性成分与靶点对接结合能在 $-22.93\sim-11.59\text{ kJ/mol}$ 之间, 均具有较好的结合活性。表明 FZKLD 的活性成分和肿瘤疾病靶点之间的关联性很强, 见表 2。利用 Pymol 软件对对接部位进行可视化处理, 部分对接结果见图 6。

4 讨论与结论

癌症是世界范围内的主要公共卫生问题, 也是导致病人死亡的主要原因。当前, 中医药在治疗癌症方面具有独特优势而被广泛应用。在中国, 中医药已被用于治疗超过

70% 的癌症患者^[6]。

基于中医对肿瘤的辩证分析, 正虚邪实是其主要病机, 本研究所用复方正是基于“扶正祛邪”的治则而开发, 方中黄芪、人参、女贞子为君药。黄芪能补以中气, 温养脾胃, 凡中气不振, 脾土虚弱, 清气下陷者最宜。女贞子禀天地主阴之气, 滋肾养肝, 更入白参大补元气, 元气旺盛, 精血得生。黄芪、人参、女贞子健脾补肾, 相得益彰。菟丝子、枸杞子、茯苓、白术、山药、灵芝共为臣药, 共凑健脾益肾功效; 佐以白花蛇舌草、重楼、半枝莲清热解毒散结; 诸味以甘草调和为使药。

表 2 分子对接结合能

	结合能 / (kJ/mol)				
	AR	ESR1	MAPK1	PPARG	PTGS2
槲皮素	-22.05	-13.97	-19.66	-15.77	-20.13
异鼠李素	-17.49	-22.18	-16.82	-14.60	-19.92
木犀草素	-22.43	-16.78	-20.75	-20.04	-20.79
二氢异黄酮	-21.21	-18.87	-22.93	-17.87	-19.79
五味子乙素	-13.60	-17.99	-11.59	-15.98	-15.44

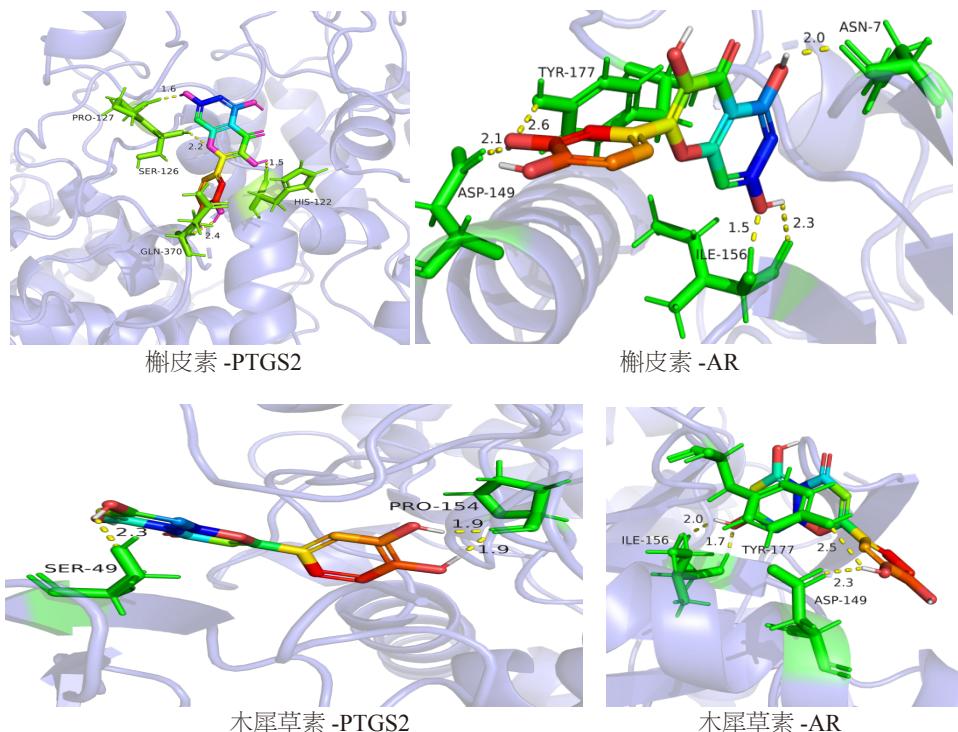


图 6 对接部位可视化图

本研究通过网络药理学和分子对接预测 FZKLD 治疗肿瘤的成分、靶点和作用机制。通过分析槲皮素、异鼠李素、木犀草素、二氢异黄酮、五味子素乙素可能是 FZKLD 治疗肿瘤的关键活性成分。且均为各药物共有成分，表明复方各药物之间存在协同治疗作用，黄芪、人参、女贞子在复方中起主要作用，与本方方解相符。

研究表明，槲皮素具有抗炎、抗氧化、抗癌等多种功效，对多种类型的癌症具有抑制作用，包括乳腺癌、肺癌、鼻咽癌、肾癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌和卵巢癌等。槲皮素下调细胞周期蛋白 D1/Cdk4 和 E/Cdk2，上调 p21，从而诱导 G1 期细胞周期停滞^[7]，抑制肿瘤细胞增殖。上皮-间充质转化 (EMT) 在癌细胞的迁移、侵袭过程中起重要作用，槲皮素可通过抑制 EMT，进而抑制前列腺癌细胞的迁移，侵袭能力^[8]，发挥抗肿瘤作用。

异鼠李素为槲皮素的甲基化代谢产物，具有与槲皮素类似的功效，对多种癌症具有治疗效果，可调控癌细胞的凋亡与自噬、抑制癌细胞的侵袭和迁移、增强化疗药物的敏感性^[9]，在癌症的治疗中发挥重要作用。

五味子乙素为联苯环辛烯木脂素，具有抗炎，免疫调节，抗肿瘤等多种临床功效。可作用于 Wnt/β-catenin 信号通路，抑制人膀胱癌细胞 T-24 细胞的增殖，迁移和侵袭^[10]。研究显示，五味子乙素可抑制多种肿瘤细胞 P-gp 的表达和活性，阻止药物从细胞内泵出细胞外，增加药物敏感性^[11]。

GO 功能富集分析表明 FZKLD 可能通过调控基因表达，细胞增殖和凋亡等生物过程发挥抗肿瘤作用。KEGG 富集分析结果显示，共有 43 个基因富集于癌症通路，为 FZKLD 主要作用通路。分子对接结果表明，PTGS2、AR、PPARG、ESR1、MAPK1 为 FZKLD 发挥抗肿瘤作用的核心靶点。

PTGS2 由炎症因子、肿瘤促进因子、生长因子和其他应激因子诱导，参与肿瘤发生、炎症反应、血管生成和许多其他生物学过程^[12]。研究表明 PTGS2 激活可产生前列腺素 E2，作用于多种信号途径，促进细胞增殖分化或抑制细胞凋亡，加速肿瘤的发生发展^[13]。AR 参与细胞的增殖和分化，研究发现 AR 在多种肿瘤中异常表达，并可调节肿瘤细胞的增殖、凋亡、迁移、侵袭和分化，对肿瘤的发生，发展

及预后造成影响^[14]。PPARG 是过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的编码基因, 对许多细胞因子如肿瘤坏死因子- α , IL-6 和 IL-8 的形成发挥调控作用, 可抑制肿瘤细胞增殖, 促进细胞凋亡, 抑制肿瘤血管形成, 是多种癌症潜在治疗靶点^[15]。ESR1 与肿瘤的增殖密切相关, 在肝癌细胞等多种癌症细胞中, ESR1 的表达下调^[16]。ESR1 的突变会导致乳腺癌患者内分泌治疗耐药, ESR1 突变体的抑制剂可以诱导肿瘤消退^[17]。MAPK1 与肿瘤的增殖、细胞凋亡和血管生成密切相关。抑制 MAPK1/2 信号通路, 可下调 Bcl-2 蛋白、上调 Bcl-2 相关 X (Bax) 蛋白, 降低肿瘤细胞侵袭能力, 促进肿瘤细胞凋亡^[18]。KEGG 富集分析结果表明, 上述五个核心靶点在癌症通路、前列腺癌通路、内分泌耐药、微小 RNA 等通路均有富集, 其可能通过上述通路发挥综合调控作用。

综上所述, FZKLD 可能通过槲皮素、异鼠李素等活性成分, 作用于 PTGS2、AR、PPARG、ESR1、MAPK1 等核心靶点, 调控多条信号通路, 抑制肿瘤细胞增殖和血管生成、诱导细胞凋亡, 降低肿瘤细胞的侵袭能力, 提高肿瘤细胞对放疗、化疗药物的敏感性, 从而发挥抗肿瘤的药理作用。本研究为 FZKLD 的临床应用和深入的作用机制研究提供了有效的线索和理论依据。

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 May;71(3):209-249.
- [2] 周岱翰.论中医肿瘤学的治疗特色与疗效优势[J].中医肿瘤学杂志,2022,4(3):76-82.
- [3] 尚静,文赟,肖冲,等.从“扶正”论治化疗呕吐[J].云南中医中药杂志,2016,37(5):15-16.
- [4] 杨世红,曲强,杜雨锡.朴炳奎老师治疗肿瘤病思路探析[J].中国中医药现代远程教育,2015,13(12):35-36.
- [5] 牟艳芳,陈文璐,周冰,等.基于网络药理学与分子对接技术探讨川蛭通络胶囊干预微循环障碍的机制研究[J].中草药,2021, 52(24):7550-7560.
- [6] So T, Chan S, Lee V, et al. Chinese Medicine in Cancer Treatment-How is it Practiced in the East and the West[J]. Clin ONCOL-UK, 2019, 31:578-588.
- [7] Moon SK, Cho GO, Jung SY, et al. Quercetin exerts multiple inhibitory effects on vascular smooth muscle cells: role of ERK1/2, cell-cycle regulation, and matrix metalloproteinase-9[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003;301:1069-1078.
- [8] 贺毅,杨鑫,邹安庆,等.槲皮素通过G3BP1调控Wnt/ β -catenin信号通路对前列腺癌细胞迁移、侵袭及上皮-间充质转化的影响[J].现代泌尿外科杂志,2022,27(1):60-65+71.
- [9] Luo W, Liu Q, Jiang N, et al. Iisorhamnetin inhibited migration and invasion via suppression of Akt/ERK-mediated epithelial-to-mesenchymal transition in A549 human non-small-cell lung cancer cells[J]. Biosci Rep, 2019,39(9):BSR20190159.
- [10] 曲强,孙英杰,吴腾飞,等.五味子乙素抑制膀胱癌细胞增殖和侵袭转移及对Wnt/ β -catenin信号通路的调节作用[J].解剖科学进展,2023,29(3):257-259.
- [11] 沈华杰,万宗明.五味子乙素抗肿瘤作用研究进展[J].中成药, 2020,42(7):1847-1850.
- [12] Cai B, Qu X, Kan D. miR-26a-5p suppresses nasopharyngeal carcinoma progression by inhibiting PTGS2 expression[J]. Cell Cycle, 2022 Mar-Mar;21(6):618-629.
- [13] Kunzmann A T, Murray L J, et al. PTGS2 (Cyclooxygenase-2) expression and survival among colorectal cancer patients: a systematic review[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013,22(9):1490-1497.
- [14] 刘经纬,胡星,邹军荣,等.雄激素受体基因GGN重复序列与雄激素相关肿瘤关系研究进展[J].赣南医学院学报,2021,41(3):5.
- [15] 周盼.PPARG基因在人皮肤鳞状细胞癌Colo16细胞中功能的初步研究[D].北京:北京协和医学院,2018.
- [16] 韩潇文.ESR1和ACOX2在肝细胞癌中的表达及其意义[D].合肥:安徽医科大学,2021.
- [17] Udden SN. Targeting ESR1 mutation-induced transcriptional addiction in breast cancer with BET inhibition[J]. JCI Insight, 2022 Sep 8;7(17):e151851.
- [18] Li YY, Lin YK, et al. SCM-198 protects endometrial stromal cells from oxidative damage through Bax/Bcl-2 and ERK signaling pathways[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2019,51(6):580-587.