

中图分类号: R932; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)15-0033-10  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.15.008



# 基于UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS的扶正抗癌Ⅱ方药效物质基础及其干预结肠癌作用机制的网络药理学研究\*

周敏华<sup>1</sup>, 金 军<sup>1△</sup>, 王红刚<sup>2</sup>, 蔡大可<sup>3</sup>, 黄晓霞<sup>1</sup>, 刘喜娟<sup>1</sup>, 余靖华<sup>4</sup>

(1. 广东省中西医结合医院, 广东 佛山 528200; 2. 广东药科大学, 广东 广州 510006; 3. 广东省第二中医院·广东省中医药工程技术研究院, 广东 广州 510095; 4. 广东省佛山市南海区人民医院, 广东 佛山 528200)

**摘要:**目的 探讨扶正抗癌Ⅱ方(FZKAⅡ方)干预结肠癌的药效物质基础及作用机制。方法 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨串联质谱(UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS)法检测得到FZKAⅡ方水提液的质谱总离子流图,通过自建数据库、对照品的裂解规律、特征碎片离子、文献报道和Compound Discover 3.2软件的分析对化合物进行鉴定。通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库和Swiss ADME平台筛选FZKAⅡ方的化学成分,Swiss TargetPrediction,PharmMapper数据库收集成分靶点,DisGeNET, GeneCards, OMIM数据库收集疾病靶点;利用String 11.5数据库筛选FZKAⅡ方干预结肠癌的关键靶点;利用Omicshare平台进行GO富集分析和KEGG通路富集分析,预测其潜在的作用机制。采用AutoDock Vina v4.2.6软件对核心成分与关键靶点进行分子对接,并利用PyMOL 2.4.1软件对分子对接结果进行可视化。结果 鉴定出FZKAⅡ方化学成分128个,其干预结肠癌的主要活性成分有槲皮素、芹菜素、木犀草素、山柰酚、染料木素,核心靶点有SRC、糖原合成酶激酶3B(GSK3B)、细胞色素P450 1B1(CYP1B1)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)、蛋白酪氨酸激酶2(PTK2),其作用机制可能与癌症通路,癌症中的MicroRNAs、蛋白聚糖,人类巨细胞病毒感染等信号通路有关。分子对接结果显示,核心成分和关键靶点的结合活性均小于-7 kcal/mol。结论 FZKAⅡ方通过多成分、多途径、多靶点治疗结肠癌,该方法为指导临床用药提供了理论依据。

**关键词:**扶正抗癌Ⅱ方;结肠癌;药效物质;作用机制;超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨串联质谱法;网络药理学

## Pharmacological Material Basis of Fuzheng Kang'ai Formula II and Its Mechanism in the Prevention of Colon Cancer Based on UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS and Network Pharmacology

ZHOU Minhua<sup>1</sup>, JIN Jun<sup>1</sup>, WANG Honggang<sup>2</sup>, CAI Dake<sup>3</sup>, HUANG Xiaoxia<sup>1</sup>, LIU Xijuan<sup>1</sup>, YU Jinghua<sup>4</sup>

(1. Guangdong Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Foshan, Guangdong, China 528200; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006; 3. Guangdong Provincial Second Hospital of Traditional Chinese Medicine · Guangdong Provincial Engineering Technology Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong, China 510095; 4. Nanhai District People's Hospital of Foshan, Foshan, Guangdong, China 528200)

**Abstract: Objective** To investigate the pharmacological material basis and mechanism of Fuzheng Kang'ai Formula II (FZKA II) in the prevention of colon cancer. **Methods** The total ion flow chromatogram of FZKA II water extract was detected by the ultra-high performance liquid chromatography quadrupole-electrostatic field orbitrap high-resolution tandem mass spectrometry (UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS). The chemical components of FZKA II were identified through a self-built database, the fragmentation pattern of the reference substance, characteristic fragment ions, literature reports, and analysis by Compound Discover 3.2 software. The chemical components of FZKA II were screened through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) database and the Swiss ADME platform. The component targets were obtained through the Swiss TargetPrediction and PharmaMapper databases, while the disease targets were obtained through the DisGeNET, GeneCards, and OMIM databases. The key targets for FZKA II in the prevention of colon cancer were screened through the String 11.5 database. GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were conducted by the Omicshare platform to predict its potential mechanism. AutoDock Vina v4.2.6 software was used to perform molecular docking between key components and targets, and PyMOL 2.4.1 software was used for visualization of molecular docking. **Results** A total of 128 chemical components of FZKA II were identified. The main active components of FZKA II for the prevention of colon cancer were quercetin, apigenin, luteolin, kaempferol and genistein, and the key targets were SRC and glycogen synthase kinase 3B (GSK3B), cytochrome P450 1B1 (CYP1B1), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and protein tyrosine kinase 2 (PTK2), and their mechanism might be related to

\*基金项目:广东省中医药局科研项目[20202033];广东省财政厅基础与应用基础研究方向项目[2018A0303130160];广东省佛山市“十四五”中医重点专科项目[佛卫函[2020]15号];广东省佛山市“十四五”医学重点专科建设项目[佛卫函[2021]107号]。

第一作者:周敏华,女,硕士,主任中药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)zhouminhua7964@163.com。

△通信作者:金军,女,大学本科,主任中医师,研究方向为肿瘤内科学,(电子信箱)jinjun.nhzyy@163.com。

cancer pathways, pathways of MicroRNAs and proteoglycans in cancer, human cytomegalovirus infection, etc. The results of molecular docking showed that the binding activity of key components and key targets was lower than  $-7$  kcal/mol. **Conclusion** FZKA II treats colon cancer through multiple components, pathways, and targets, which provides a scientific theoretical basis for guiding clinical medication.

**Key words:** Fuzheng Kang'ai Formula II; colon cancer; pharmacological material basis; mechanism; UHPLC - Q - Orbitrap MS / MS; network pharmacology

结肠癌每年造成全球80万人过早死亡<sup>[1]</sup>。中医认为,结肠癌属“癥瘕”范畴,是由于正气亏虚、瘀、毒等在体内郁结而成。已有研究发现,植物中的化学物质等会干扰结肠癌的发生与发展<sup>[2]</sup>。广东省佛山市南海区名中医金军教授以扶正培本结合消痞散结为治法,自拟扶正抗癌II方(FZKA II方)治疗结肠癌,由党参、五爪金龙、白术、茯苓、薏苡仁、法半夏、浙贝母、陈皮、青皮、制仙茅、杜衡、山海螺、菝葜等组方,能有效预防肿瘤的发生与发展,改善癌因性疲乏症状<sup>[3]</sup>。本研究中采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨串联质谱(UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS)法检测得到FZKA II方水提液化学成分,并采用网络药理学对复方化学成分进行靶点预测及在线数据库收集疾病靶点,以探讨FZKA II方干预结肠癌的作用机制。现报道如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 仪器与试剂

仪器:UHPLC-Q-Orbitrap HRMS型液质联用系统(美国Thermo Fiser Scientific公司);Cubis型电子天平(德国Sartorius公司,精度为百万分之一);98-I-C型数显控温电热套(湖北泰维科技实业股份有限公司);KQ-300DE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司,功率为300 W,频率为40 kHz);N-1300型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)。

试剂:党参(批号为20211101),五爪金龙(批号为20211201),白术(批号为20220101),制仙茅(批号为20211201),法半夏(批号为202201228),茯苓(批号为20220101),杜衡(批号为20190601),山海螺(批号为20200701),菝葜(批号为20210601),浙贝母(批号为20220201),薏苡仁(批号为20220101),陈皮(批号为20211101),青皮(批号为C22103003),均购自佛山市中天中药饮片有限公司;松脂醇二葡萄糖苷对照品(批号为20011401),芦丁对照品(批号为21010803),齐墩果酸对照品(批号为21031204),绿原酸对照品(批号为21032502),辛弗林对照品(批号为0727-200004),均购自成都普菲德生物科技有限公司,含量大于98%;贝母素乙对照品(批号为10751-201110),党参炔苷对照品(批号为111732-201908),阿魏酸对照品(批号为110773-201915),茯苓酸对照品(批号为wkq210517054),白术内酯I对照品(批号为

wkq21050705),均购自四川维克奇生物科技有限公司,含量大于98%; $\beta$ -谷甾醇对照品(批号为0851-9601),紫丁香苷对照品(批号为111574-200603),均购自中国食品药品检定研究院,含量大于98%;乙腈(批号为21101121G118),甲酸(批号为C12851411),甲醇(批号为C15443672),均为质谱纯,购自上海麦克林生化科技有限公司。

### 1.2 色谱与质谱条件

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Acquity UPLC BEH Shield RP<sub>18</sub>柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m);流动相:0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(1~30 min时95%A→5%A,5%B→95%B);流速:0.3 mL/min;柱温:40  $^{\circ}$ C;进样量:2  $\mu$ L。

#### 1.2.2 质谱条件

离子源:可加热式电喷雾离子源(HESI);检测方式:正负离子切换模式;喷雾电压:3 500 V(正离子模式),3 200 V(负离子模式);辅助气加热温度:320  $^{\circ}$ C;离子传输管温度:320  $^{\circ}$ C;鞘气体积流速:35 arb;辅助气体积流速:15 arb;扫描模式:一级质谱[全扫描,质荷比( $m/z$ )100~1 500,质量分辨率为70 000],动态数据依赖性扫描(二级质谱)。

### 1.3 中药复方浸膏制备

取党参、五爪金龙、白术、制仙茅、法半夏、茯苓、杜衡、山海螺、菝葜、浙贝母、薏苡仁、陈皮、青皮等药材各适量,分别粉碎成粗粉,置圆底烧瓶中,加蒸馏水(浸过药面5 cm)浸泡30 min,煎煮2次,第1次煮沸后再用文火煎煮30 min,第2次煮沸后再用文火煎煮25 min,合并药液,旋转蒸发器减压浓缩至浸膏,待用。

### 1.4 溶液制备

取中药复方浸膏1 g,置25 mL容量瓶中,加适量80%乙醇使溶解,超声助溶,0.22  $\mu$ m微孔滤膜滤过,取续滤液,即得中药复方供试品溶液。分别取松脂醇二葡萄糖苷、芦丁、齐墩果酸、绿原酸、辛弗林、贝母素乙、茯苓酸、党参炔苷、苍术酮、白术内酯I、 $\beta$ -谷甾醇、阿魏酸、紫丁香苷对照品各1 mg,精密称定,分别置5 mL容量瓶中,加50%甲醇使溶解,配制成质量浓度为0.2 mg/mL的单一对照品贮备液;精密量取1 mL,加50%甲醇稀释成质量浓度为25  $\mu$ g/mL的混合对照品溶液。

### 1.5 网络药理学分析

成分靶点收集:将筛选出的化学成分的英文名称输入中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)进行检索,以口服生物利用度(OB)  $\geq 20\%$ 、类药性(DL)  $\geq 0.1$  为筛选条件,其中 TCMSP 数据库中未找到的化学成分,借助 Swiss ADME 平台(<http://www.swissadme.ch/>)进行筛选,以胃肠道吸收(GI absorption)的得分为“high”,DL至少通过2个“yes”进行筛选。筛选得到的活性成分逐个输入 Chemical Book 数据库(<https://www.chemical-book.com/ProductIndex.aspx>)或 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),记录化合物的 SMILES 号或下载化合物的结构,保存为 .sdf 文件。在 Swiss TargetPrediction 数据库(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)中输入化合物的 SMILES 号或打开 .sdf 文件,以“Homo sapiens”为限定条件预测成分的作用靶点,并使用 PharmMapper 数据库(<http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/>)补充成分靶点。

疾病靶点收集:以“Colon Cancer”为关键词,分别在 DisGeNET 数据库(<https://www.disgenet.org/>)、GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)中收集结肠癌的疾病靶点,删除重复靶点,保留与结肠癌相关的靶点。

关键靶点筛选:将成分靶点和疾病靶点合并筛选,保留共有靶点,即为 FZKA II 方干预结肠癌的关键靶点。

活性成分-关键靶点-通路网络构建:将关键靶点输入 String 11.5 数据库(<https://cn.string-db.org/>),以“Homo sapiens”为筛选条件,构建蛋白互作(PPI)网络,设定阈值“highestconfidence”  $> 0.9$ ,其余条件均为默认。使用 Cytoscape 3.9.1 软件构建活性成分-关键靶点-通路网络。

GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析:使用 Ensembl 数据库(<http://grch37.ensembl.org/index.html>)将 Gene name 转换为 Ensembl ID,使用基迪奥生物信息云平台(Omicshare, <https://www.omicshare.com/>)将关键靶点进行基因本体论 GO 富集分析和 KEGG 通路富集分析,前者包括 GO 生物过程分析(GO Biological Processes)、GO 分子功能分析(GO Molecular Functions)、GO 细胞组分分析(GO Cellular Components),分析条件均为默认参数,并对所得结果进行可视化。

### 1.6 分子对接

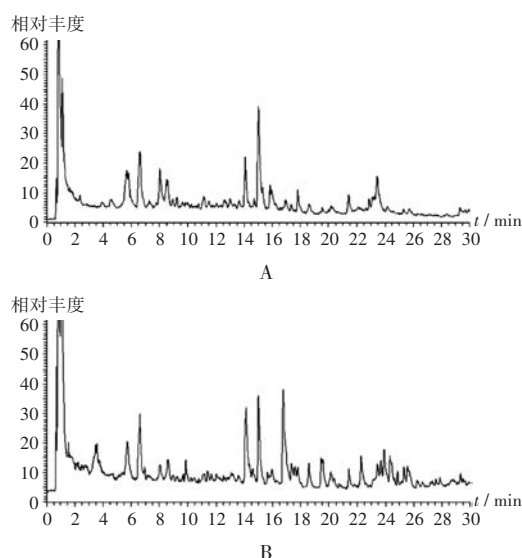
为进一步分析 FZKA II 方成分与靶点结合的强度,使用 AutoDock Vina v4.2.6 软件对 FZKA II 方的成分和靶点分别进行分子对接,以受体和配体的结合能小于  $-7 \text{ kcal/mol}$  为结合作用较好,结合能数值越低,产生相互作用所需的能量就越低<sup>[4]</sup>。在 PubChem 数据库

(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中下载化合物的结构,PDB 数据库(<http://www.rcsb.org/>)中下载靶点的三维(3D)结构;使用 Discovery Studio 4.5 Client 删除蛋白质靶点的水分子、配体、离子等,保存为 .pdb 文件;使用 AutoDock Vina v4.2.6 软件对化合物和靶点进行对接,在蛋白质分子上设置中心,并设置 X, Y, Z 的参数(设置为 126)以确保蛋白质被完全覆盖,为寻找配体分子的最低能量构象以模仿自然体系中的分子稳定构象,进行能量优化,优化次数设置为 100<sup>[5]</sup>,并进行柔性对接;使用 PyMOL 2.4.1 软件对对接结果进行可视化。

## 2 结果

### 2.1 FZKA II 方化学成分分析

UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS 正负离子切换模式下检测,得到 FZKA II 方水提液质谱总离子流图(图1);通过自建数据库、对照品的裂解规律、特征碎片离子、Compound Discover 3.2 软件的分析、文献[6-20]对化学成分进行鉴定,共鉴定出 128 个成分,其中黄酮类 35 个,萜类 17 个,苯丙素类 17 个,木脂素类 6 个,酚类 9 个,生物碱 14 个,有机酸 11 个,氨基酸 6 个,挥发油 1 个,炔类 3 个,甾体类 1 个,其他 8 个。结合网络药理学分析结果,与关键靶点关联性较强的 29 个成分见表 1。



A. 负离子模式 B. 正离子模式  
图1 FZKA II 方水提液质谱总离子流图  
A. Negative ion mode B. Positive ion mode

Fig. 1 TIC chromatogram of FZKA II water extract

### 2.2 网络药理学分析

成分靶点与疾病靶点确定:使用 Swiss TargetPrediction 数据库及 PharmMapper 数据库对 128 个化学成分进行靶点预测,剔除未预测到靶点的 29 个化学成分;其余 99 个成分共收集到成分靶点 271 个,去除重复靶点 143 个,最终得到 128 个成分靶点。使用 DisGeNET 数据库、

表1 FZKA II方水提液中化学成分鉴别结果  
Tab. 1 Identification results of chemical components in FZKA II water extract

序号	成分名称	化学式	保留时间 (min)	离子化方式	一级离子碎片	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	二级离子碎片	来源	成分类型
1	腺苷	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	1.22	$[M+H]^+$	268.103 82	-0.785	136.061 68	党参、青皮、白术、茯苓	生物碱
2	咖啡酸	$C_9H_8O_4$	3.48	$[M-H]^-$	179.055 18	1.367	87.007 20, 71.012 31, 59.012 34	白术、薏苡仁	苯丙素类
3	原儿茶酸	$C_7H_6O_4$	4.44	$[M-H]^-$	153.018 22	-0.099	109.028 12	党参	酚类
4	3-羟基-4-甲氧基肉桂酸	$C_{10}H_{10}O_4$	4.96	$[M+H]^+$	195.065 23	0.229	177.053 73, 163.038 80, 149.059 56, 135.044 04, 117.033 65, 89.060 04, 72.937 63	青皮	苯丙素类
5	4-羟基苯甲酸	$C_7H_6O_3$	6.01	$[M-H]^-$	137.023 13	-1.319	93.033 29	党参、陈皮	酚类
6	异樱花素	$C_{16}H_{14}O_5$	9.35	$[M+H]^+$	287.091 31	-0.314	269.128 08, 251.117 95, 209.107 09, 105.070 40	青皮	黄酮类
7	伞形花内酯	$C_9H_6O_3$	9.74	$[M+H]^+$	163.038 97	-0.004	148.973 77, 135.043 93, 103.054 50, 89.039 02	白术、五爪金龙	苯丙素类
8	柚皮素	$C_{15}H_{12}O_5$	10.97	$[M+H]^+$	273.075 68	-0.256	171.028 76, 153.018 20, 147.043 95, 119.049 39, 91.054 63, 67.018 62	青皮、陈皮	黄酮类
9	东莨菪内酯	$C_{10}H_8O_4$	10.99	$[M+H]^+$	193.049 68	0.145	175.038 85, 161.059 62, 133.064 79	五爪金龙	苯丙素类
10	阿魏酸*	$C_{10}H_{10}O_4$	11.24	$[M+H]^+$	195.065 38	0.998	177.090 91, 163.075 59, 149.059 66, 145.028 61, 135.080 29, 117.070 200, 89.060 01	青皮、白术	苯丙素类
11	3-咖啡酰山柰酚-7-O-芸香糖苷	$C_{27}H_{30}O_{15}$	11.48	$[M+H]^+$	595.166 32	0.964	577.392 88, 559.150 02, 541.132 93, 523.127 01	青皮	黄酮类
12	环巴胺	$C_{27}H_{41}NO_2$	13.85	$[M+H]^+$	412.321 23	0.543	411.200 900, 396.289 64	浙贝母	生物碱
13	山柰酚	$C_{15}H_{10}O_6$	13.88	$[M+H]^+$	287.055 05	0.035	259.059 72, 231.065 40, 213.054 84, 181.049 58, 165.054 75, 153.018 23, 123.044 24	五爪金龙	黄酮类
14	染料木素	$C_{15}H_{10}O_5$	15.18	$[M+H]^+$	271.060 03	-0.070	271.060 00	五爪金龙	黄酮类
15	圣草酚	$C_{15}H_{12}O_6$	15.21	$[M+H]^+$	289.070 74	0.261	243.065 23, 215.070 21, 169.064 80, 149.023 33	菝葜	黄酮类
16	橙皮素	$C_{16}H_{14}O_6$	15.43	$[M+H]^+$	303.086 52	0.678	285.075 04, 177.054 64, 171.028 72, 153.018 22, 117.033 84, 89.038 97, 67.018 54	青皮	黄酮类
17	野漆树苷	$C_{27}H_{30}O_{14}$	15.48	$[M+H]^+$	579.171 51	1.171	433.112 92, 271.059 88, 153.018 11, 85.028 97	青皮	黄酮类
18	芦丁*	$C_{27}H_{30}O_{16}$	15.58	$[M-H]^-$	609.147 92		300.027 92	党参	黄酮类
19	槲皮素	$C_{15}H_{11}O_7$	15.84	$[M+H]^+$	303.049 96	0.031	303.049 80	五爪金龙	黄酮类
20	鼠李素	$C_{16}H_{12}O_7$	16.44	$[M+H]^+$	317.065 67	0.091	302.042 11, 274.046 75	五爪金龙	黄酮类
21	苦鬼白毒素	$C_{22}H_{22}O_8$	17.82	$[M+H]^+$	415.138 76	0.038	415.137 27, 135.044 07	浙贝母	木脂素类
22	木犀草素	$C_{15}H_{10}O_6$	18.74	$[M+H]^+$	287.054 93	-0.085	269.080 96, 241.048 97, 213.054 72, 171.028 79, 153.018 19, 135.044 13	五爪金龙	黄酮类
23	芹菜素	$C_{15}H_{10}O_5$	20.31	$[M-H]^-$	269.045 65	1.200	225.054 67	五爪金龙	黄酮类
24	5-脱甲基诺比letin 3',4'-五甲氧基黄酮	$C_{20}H_{20}O_8$	21.68	$[M+H]^+$	389.122 74	-0.910	374.099 73, 359.075 87, 341.065 28, 331.082 24, 316.057 13, 215.018 39, 197.008 1	青皮	黄酮类
25	亚麻酸	$C_{18}H_{30}O_2$	22.23	$[M+H]^+$	279.093 02		251.069 93, 233.059 71	法半夏	有机酸
26	lancomaside C	$C_{38}H_{62}O_{27}$	22.68	$[M-H]^-$	1 219.576 90		647.377 08, 585.377 32, 407.333 95, 113.022 94	党参	三萜皂苷类

续表1 FZKA II方水提液中化学成分鉴别结果

Continued Tab.1 Identification results of chemical components in FZKA II water extract

序号	成分名称	化学式	保留时间 (min)	离子化方式	一级离子碎片	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	二级离子碎片	来源	成分类型
27	tetradeca - 4, 12 - di - ene - 8, 10 - diyne - 1, 6, 7 - triol 党参炔醇	$C_{14}H_{18}O_3$	22.69	$[M+H]^+$	235.13258	-1.237	217.15833, 199.14783	党参	炔类
28	foetidissimoside A	$C_{32}H_{52}O_{22}$	23.22	$[M-H]^-$	1057.52405		647.38086, 585.38525, 407.33194, 113.02314	党参	三萜皂苷类
29	atractylenolide III 白术内酯III	$C_{15}H_{20}O_3$	23.79	$[M+H]^+$	249.14832	-0.807	231.13786, 203.12720, 163.07526, 119.08571, 105.07018, 91.05461	白术、党参	倍半萜类

注:\*指由对照品指认。

Note:\* refers to the identification by the reference substance.

GeneCard数据库、OMIM数据库共收集到疾病靶点933个, 去除重复靶点138个, 最终得到疾病靶点795个。

关键靶点确定: 取128个成分靶点和795个疾病靶点相互映射, 通过绘制维恩图, 获得FZKA II方干预结肠癌的关键靶点33个。详见图2。

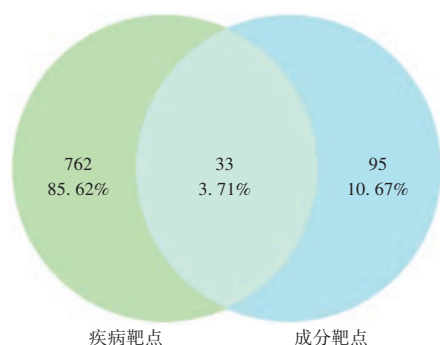


图2 FZKA II方治疗结肠癌的关键靶点维恩图

Fig.2 Venn diagram of the key targets of FZKA II in the treatment of colon cancer

PPI网络构建: 利用Cytoscape 3.9.1平台对String 11.5数据库分析结果进行可视化, 连线越紧密、颜色越深说明靶点在网络中越重要, 排名前10的靶点分别为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1(AKT1)、雌激素受体1(ESR1)、SRC表皮生长因子受体(EGFR)、前列腺素内过氧化物酶2(PTGS2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、激酶插入域受体(KDR)、胰岛素样生长因子受体1R(IGF1R)、CCNB1, 提示上述靶点可能是FZKA II方治疗结肠癌的核心靶点, 见图3。

关键靶点的GO富集分析和KEGG通路富集分析: 使用Omicshare平台对33个关键靶点进行GO富集分析与KEGG通路富集分析, 并对前20条富集分析结果进行可视化。由图4A可知, 生物过程主要涉及生物质量的调节(GO:0065008)、压力反应的调节(GO:0080134)、对程序性细胞死亡的调节(GO:0043067)等; 分子功能主要涉及离子结合(GO:0043167)、催化活性(GO:

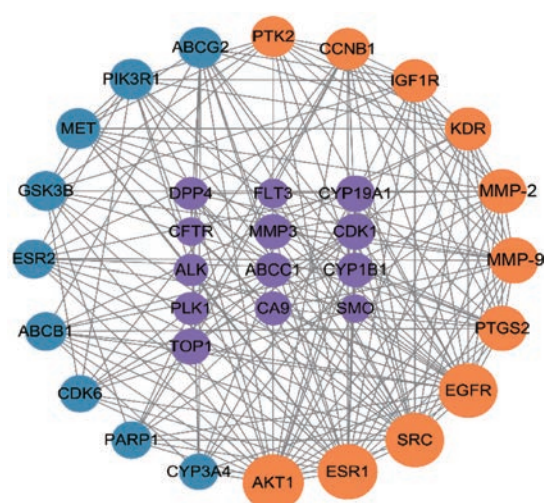


图3 FZKA II方治疗结肠癌关键靶点的PPI网络

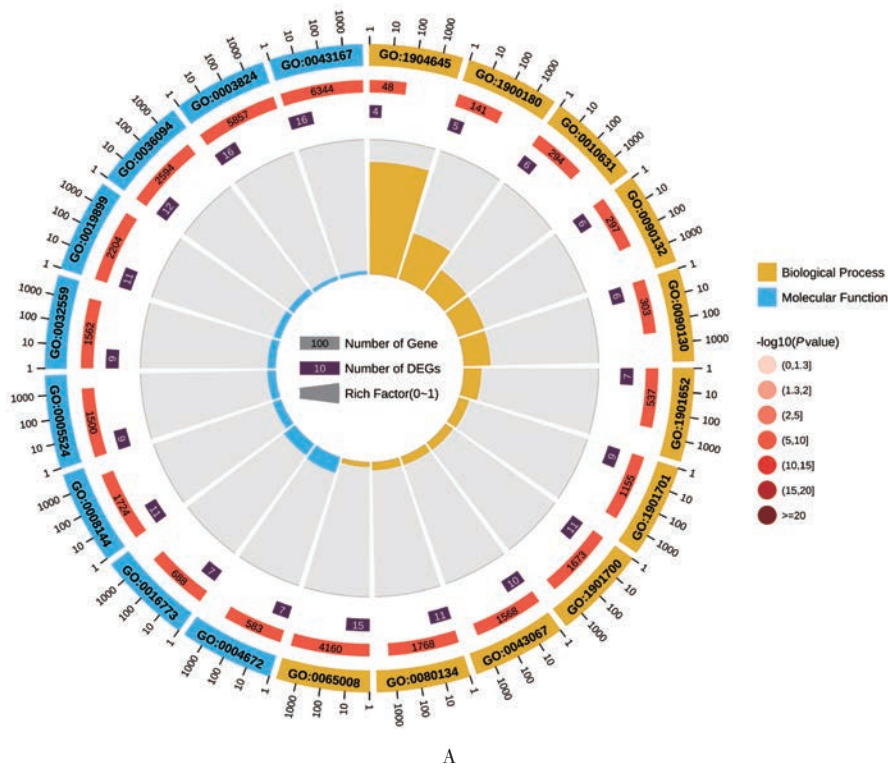
Fig.3 PPI network of key targets of FZKA II in the treatment of colon cancer

0003824)、小分子结合(GO:0036094)等; 由图4B可知, 细胞组成主要涉及质膜区、质膜部分、膜部件等; 由图4C可知, FZKA II方治疗结肠癌的通路主要有癌症通路、人类巨细胞病毒感染、癌症中的MicroRNAs、癌症中的蛋白聚糖、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等。

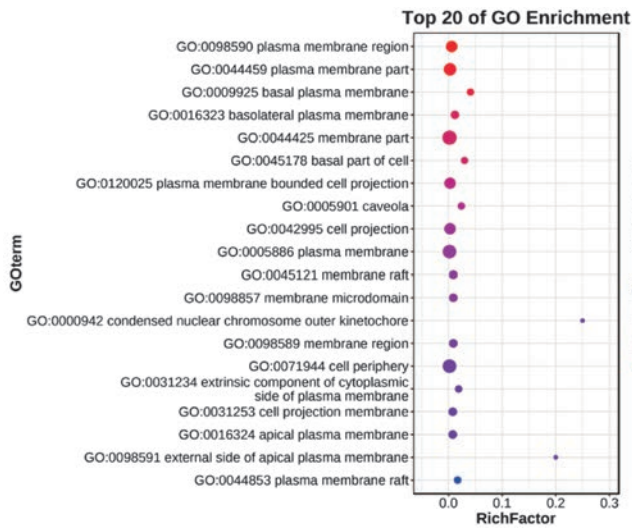
活性成分-关键靶点-通路网络构建: 将PPI网络筛选出的关键靶点与成分靶点相关联, 剔除与关键靶点无相互作用的成分, 最终得到22个活性成分与33个关键靶点相关, 选择前20个成分并结合前20条通路, 构建活性成分-关键靶点-通路网络(图5)。结果显示, 癌症通路富集8个靶点, 癌症中的MicroRNAs富集6个靶点, 癌症中的蛋白聚糖富集5个靶点; 其中, 与成分、通路关联性较强的前5个靶点为糖原合酶激酶3B(GSK3B)、SRC、MMP-9、蛋白酪氨酸激酶2(PTK2)、细胞色素P4501B1(CYP1B1)。

### 2.3 分子对接结果

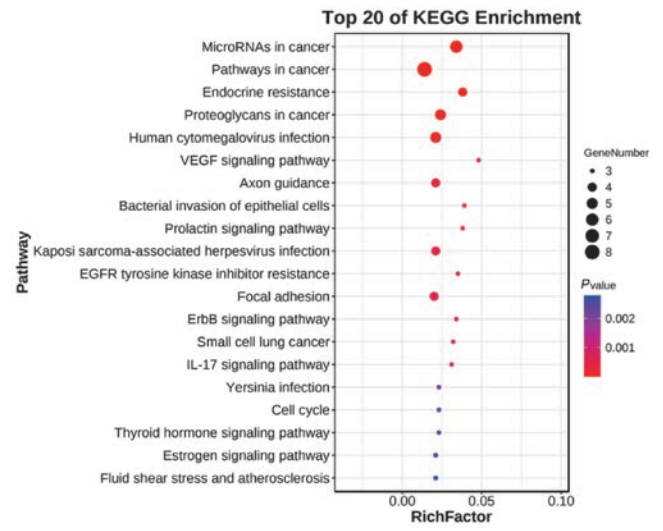
槲皮素、芹菜素、木犀草素、山柰酚、染料木素和关



A



B



C

A. 生物过程与分子功能 B. 细胞组成 C. KEGG 通路富集分析

图4 FZKA II 方治疗结肠癌的关键靶点的GO富集分析与KEGG通路富集分析

A. Biological processes and molecular functions B. Cell composition C. KEGG pathway enrichment analysis

Fig. 4 GO enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis of key targets of FZKA II in the treatment of colon cancer

键靶点的关联性较强,故选取以上5个核心成分分别与关键靶点进行对接。由图6可知,结合能小于 $-7 \text{ kcal/mol}$ 的有20种(83.33%),位于 $-7 \sim -5 \text{ kcal/mol}$ 的有4种(16.67%)。小于 $-5 \text{ kcal/mol}$ 的表示结合活性良好<sup>[21]</sup>,占100%。选取结合活性强的成分和靶点对接结果进行可视化,结果显示,FZKA II方的活性成分治疗结肠癌具有较好的活性。详见图7。

### 3 讨论

FZKA II 方中,党参、五爪金龙、白术、制仙茅共为君

药,健脾益气,温肾壮阳,共同补益先后天之本,扶助正气;茯苓、薏苡仁、法半夏、浙贝母、杜衡、山海螺和菝葜共为臣药,利湿导滞,清利肠中湿热,消痞散结;陈皮、青皮共为佐药,理气破气,补而不滞,抗邪与扶正兼顾。

本研究中通过高分辨质谱技术分析FZKA II方的成分,共鉴定出化学成分128个,其中黄酮类占比最大(27.34%),表明黄酮可能是FZKA II方的主要活性成分。另有文献报道,类黄酮的摄入可能通过抗过氧化、抗氧化和抗炎作用而降低结直肠癌的发病率和复发风

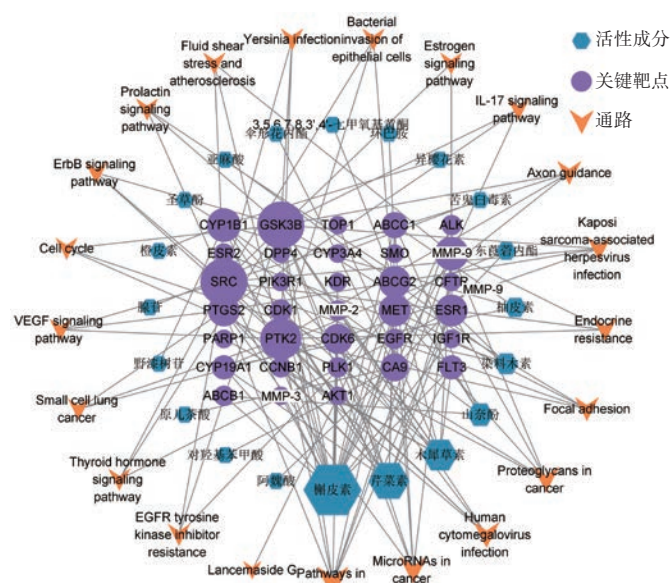


图5 FZKA II方治疗结肠癌的活性成分-关键靶点-通路网络  
Fig. 5 Active ingredients - key targets - pathway network of FZKA II in the treatment of colon cancer

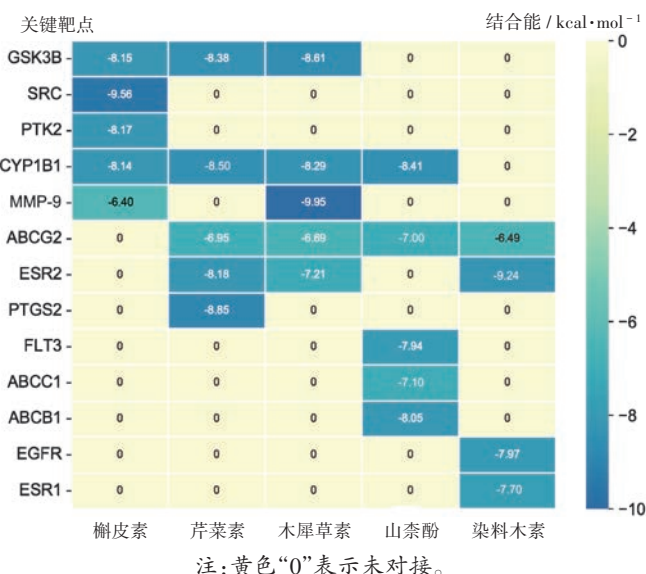
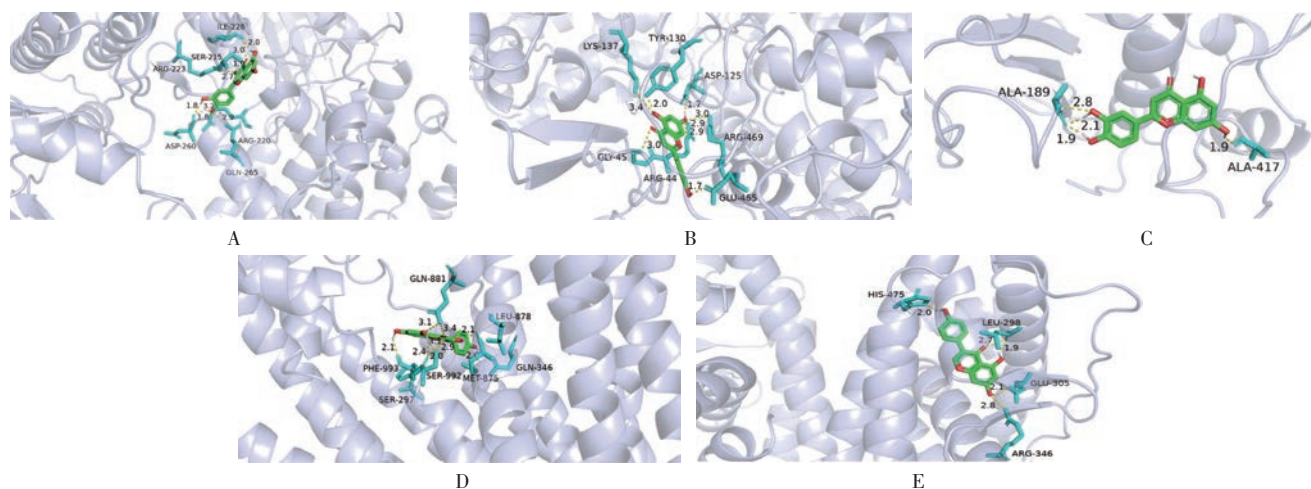


图6 FZKA II方治疗结肠癌的核心成分与关键靶点对接结果  
Note: Yellow "0" refers to no molecular docking.  
Fig. 6 Molecular docking results of key components and targets of FZKA II in the treatment of colon cancer



A. 槲皮素和糖原合酶激酶3B(GSK3B)对接 B. 芹菜素和PTGS2对接 C. 木犀草素和MMP-9对接 D. 山柰酚和多药耐药性蛋白1(ABCB1)对接 E. 染料木素和雌激素受体2(ESR2)对接  
注:绿色为化合物,荧光蓝为氨基酸残基,黄色虚线为氢键。

图7 FZKA II方治疗结肠癌的核心成分与关键靶点对接结果的可视化

A. Molecular docking of quercetin and GSK3B B. Molecular docking of apigenin and PTGS2 C. Molecular docking of luteolin and MMP-9  
D. Molecular docking of kaempferol and ABCB1 E. Molecular docking of genistein and ESR2

Note: Green refers to chemical components, fluorescent blue refers to amino acid residues, and yellow dashed lines refer to hydrogen bonds.

Fig. 7 Visualization of the molecular docking results between the key components and targets of FZKA II in the treatment of colon cancer

险;黄酮类化合物还可调节线粒体功能,平衡细菌菌群,促进癌细胞凋亡,通过干扰多种信号转导途径,抑制癌细胞的增殖、血管生成及癌细胞的转移,促进其凋亡等<sup>[22-23]</sup>。此外,通过网络药理学对128个化学成分预测的靶点与结肠癌疾病靶点绘制维恩图得到33个共同靶点,即为FZKA II方治疗结肠癌可能的关键靶点。通过与成分、通路相关联,发现槲皮素、芹菜素、木犀草素、山柰酚、染料木素和关键靶点的关联性较强,上述

成分均来源于五爪金龙,表明五爪金龙可能是治疗结肠癌的核心药材,与方剂组方特点一致。据报道,食用富含槲皮素的洋葱可降低胃癌、结肠癌、直肠癌的患病风险,尤与结肠癌的发病率呈正相关<sup>[24]</sup>。山柰酚在多种类型的癌细胞中发挥细胞毒作用,可诱导SW480人结肠腺癌细胞凋亡,具有潜在的抗癌作用<sup>[25-28]</sup>。终生摄入染料木素可降低由偶氮甲烷诱导的大鼠结肠癌病变的发生率和频率<sup>[29]</sup>。以上研究结果均表明,槲皮素、芹

菜素、木犀草素、山柰酚和染料木素等可能是FZKA II方治疗结肠癌的主要活性成分,为FZKA II方治疗结肠癌的作用物质基础研究提供了方向。

GSK3B, SRC, CYP1B1, MMP-9, PTK2与成分、通路关联性较强,表明其可能是FZKA II方干预结肠癌的核心靶点。有研究表明,抑制GSK3B的表达可进一步抑制肿瘤生长,同时还可诱导结肠癌细胞凋亡<sup>[30-31]</sup>。SRC基因编码一种与癌症相关的非受体酪氨酸激酶SRC家庭激酶(SFK),SFK在肿瘤的发展过程中通过影响肌动蛋白、Ras/细胞外调节蛋白激酶/丝裂原活化蛋白激酶(Ras/ERK/MAPK)途径,以及EGFR和血管内皮生长因子(VEGF)受体等在细胞黏附、侵袭、增殖、存活和血管生成中起关键作用<sup>[32]</sup>。MMP-9参与了蛋白激酶C通路的激活,其过表达与乳腺癌和结肠癌患者的生存率下降和癌细胞转移直接相关<sup>[33-34]</sup>。与正常组织相比,CYP1B1 mRNA分别在65%和60%的膀胱和结肠肿瘤中存在过表达现象,且在不同来源的人类结肠癌中检测到CYP1B1 mRNA的差异过表达,故CYP1B1被认为是潜在的肿瘤标志物和癌症治疗的确切靶点<sup>[35-39]</sup>。槲皮素与CYP1B1和GSK3B等同时靶向,且有报道指出,槲皮素的抗癌作用可能是通过其与多种受体的结合,尤其是与芳香烃受体(AhR)的结合。AhR是一种配体门控转录因子,参与调控CYP1家族的表达,CYP1B1作为CYP1的亚型,其过表达导致CYP1激活<sup>[35]</sup>,故推测槲皮素可能是干预结肠癌的主要因素之一。以上结果均表明,GSK3B, SRC, CYP1B1, MMP-9可能是FZKA II方治疗结肠癌的重要靶点。

GO富集分析和KEGG通路富集分析结果显示,FZKA II方治疗结肠癌与癌细胞中的MicroRNAs、蛋白聚糖、人类巨细胞病毒感染等相关。在恶性肿瘤中,蛋白聚糖可调节癌细胞的表型、耐药性及肿瘤间质中血管的生成,肿瘤间质的广泛重塑与蛋白聚糖表达和其结构变异显著相关<sup>[40]</sup>。蛋白聚糖在结肠癌中过度表达和分泌,通过与巨噬细胞表面的Toll样受体2(TLR2)和Toll样受体4(TLR4)结合而激活TLR2/4信号通路,释放炎症因子白细胞介素1R(IL-1R)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)<sup>[41-42]</sup>;TLR2/TLR4信号传导的启动促进了癌细胞的生长,下调了细胞凋亡,上调了肿瘤和基质细胞对生长因子和炎症相关细胞因子的合成<sup>[43-45]</sup>,表明蛋白聚糖活性具有促癌作用。有研究发现,人类巨细胞病毒感染与结肠癌发生风险显著相关<sup>[46]</sup>,结肠癌细胞系感染人类巨细胞病毒后表型显著改变,与结肠癌细胞增殖和迁移相关的Wnt信号通路在感染人类巨细胞病毒的细胞中显著上调<sup>[47]</sup>。MicroRNAs在肿瘤发生、发展、血管生成、转移及化学药物治疗耐药中显著相关,MicroRNAs谱的改

变与结肠癌的转化和癌细胞转移有关<sup>[48]</sup>。以上结果均表明,FZKA II方可能通过癌症通路,癌症中的MicroRNAs、蛋白聚糖,人类巨细胞病毒感染等信号通路发挥治疗结肠癌的作用。

综上所述,本研究中采用UHPLC-Q-Orbitrap MS/MS法鉴定出FZKA II方中128个化学成分,其中以黄酮类成分最多,提示黄酮类成分可能是FZKA II方治疗结肠癌的主要作用物质基础;采用网络药理学对128个化学成分进行分析,得到GSK3B, SRC, CYP1B1, MMP-9, PTK2 5个核心靶点,其可能通过癌症通路、癌症中MicroRNAs、癌症中的蛋白聚糖或人类巨细胞病毒感染等信号通路发挥治疗结肠癌的作用,但具体作用机制有待进一步验证。

### 参考文献

- [1] LANNAGAN TR, JACKSTADT R, LEEDHAM SJ, et al. Advances in colon cancer research: *in vitro* and animal models[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2021, 66: 50-56.
- [2] RAJAMANICKAM S, AGARWAL R. Natural products and colon cancer: current status and future prospects[J]. *Drug Dev Res*, 2008, 69(7): 460-471.
- [3] 余锡贺,陈健英,林卉,等.扶正抗癌II方联合自血穴注治疗晚期肺癌因性疲乏的临床观察[J]. *中外医学研究*, 2022, 20(12): 1-5.
- [4] HSIN KY, GHOSH S, KITANO H, et al. Combining machine learning systems and multiple docking simulation packages to improve docking prediction reliability for network pharmacology[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): 83922.
- [5] 朱冬宁,吴纯伟,陈驰,等.基于分子对接模拟预测复方脑脉通治疗缺血性脑卒中的物质基础[J]. *中药材*, 2017, 40(3): 673-679.
- [6] 龙丽,冯海兴,王灿茂,等.UFLC-Q-TOF-MS/MS结合指纹图谱定性评价菝葜(金剛藤)药材质量的研究[J]. *中医药信息*, 2021, 38(2): 16-23.
- [7] 钟艳梅,冯毅凡,郭姣.基于UPLC/Q-TOFMS技术的白术药材化学成分快速识别研究[J]. *质谱学报*, 2015, 36(1): 72-77.
- [8] 刘晓,孙戡平,秦昆明,等.基于UHPLC-Q-TOF-MS技术研究炮制对白术芍药散中化学成分的影响[J]. *中草药*, 2022, 53(13): 3920-3928.
- [9] 牛研,王书芳.LC-Q-TOF-MS和LC-IT-MS<sup>n</sup>分析当归芍药散中化学成分[J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [10] 黄海英,康俊丽,余亚辉,等.基于UPLC-Q-Orbitrap MS法分析补肺益肾方的化学成分[J]. *分析测试学报*, 2019, 38(1): 1-13.
- [11] 安太勇,陈晓虎,张梅,等.UPLC-Q-Exactive四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱联用快速分析川党参的化学成分[J]. *中草药*, 2018, 49(7): 1533-1542.
- [12] 王乃馨,王卫东,李超,等.杜衡挥发油的超声辅助提取及其GC/MS分析[J]. *粮油加工*, 2010(8): 9-12.

- [13] 王璐, 刘然, 邢爽, 等. 草乌与生半夏、法半夏配伍 UPLC/Q-TOF-MS 离子流图, OPLS-DA/PCS 及差异化合物对比研究[J]. 四川中医, 2020, 38(1): 58-62.
- [14] 康安, 郭锦瑞, 谢彤, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析茯苓中的化学成分[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(6): 561-565.
- [15] 刘梦诗, 杨得坡, 杨婉玲, 等. 基于 UHPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术分析四花青皮的成分[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(23): 2395-2400.
- [16] 余雄英, 任启生, 宋新荣. 山海螺挥发油的 GC-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(5): 87-88.
- [17] 李洁洪. 五爪金龙化学成分的研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2017.
- [18] 朱伟豪, 杜伟锋, 罗云云, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF-MS 液质联用技术分析薏苡仁中的脂肪酸及其酯类化学成分[J]. 中草药, 2020, 51(15): 3876-3883.
- [19] 崔明超, 张加余, 陈少军, 等. 浙贝母植株各部位中生物碱和黄酮的 LC-LTQ-Orbitrap MS<sup>n</sup> 分析[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2124-2130.
- [20] 王文通, 江汉美, 张智婧. HS-SPME-GC-MS 分析仙茅及酒仙茅的挥发性成分[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(13): 137-139.
- [21] 卜雕雕, 苏卓, 张丹, 等. 基于网络药理学左金丸治疗胃溃疡的机制[J]. 中成药, 2019, 41(6): 1264-1271.
- [22] FSHLARI K, HADDADI NS, HAJ-MIRZAIAN A, et al. Natural flavonoids for the prevention of colon cancer: A comprehensive review of preclinical and clinical studies [J]. Journal of Cellular Physiology, 2019, 234(12): 21519-21546.
- [23] RAVISHLANKAR D, RAJORA AK, GRECO F, et al. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(12): 2821-2831.
- [24] NOORI-DALOII MR, MOMENY M, YOUSEFI M, et al. Multifaceted preventive effects of single agent quercetin on a human prostate adenocarcinoma cell line (PC-3): Implications for nutritional transcriptomics and multi-target therapy [J]. Medical Oncology, 2011, 28(4): 1395-1404.
- [25] YOSHLIDA T, KONISHI M, HORINAKA M, et al. Kaempferol sensitizes colon cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 375(1): 129-133.
- [26] SHLARMA V, JOSEPH C, GHOSHL S, et al. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(9): 2544-2553.
- [27] BESTWICK CS, MILNE L, DUTHIE SJ. Kaempferol induced inhibition of HL-60 cell growth results from a heterogeneous response, dominated by cell cycle alterations [J]. Chem Biol Interact, 2007, 170(2): 76-85.
- [28] LEUNG HW, LIN CJ, HOUR MJ, et al. Kaempferol induces apoptosis in human lung non-small carcinoma cells accompanied by an induction of antioxidant enzymes [J]. Food Chem Toxicol, 2007, 45(10): 2005-2013.
- [29] ZHANG YK, LI Q, ZHOU D, et al. Genistein, a soya isoflavone, prevents azoxymethane-induced up-regulation of WNT/ $\beta$ -catenin signalling and reduces colon pre-neoplasia in rats [J]. Br J Nutr, 2013, 109(1): 33-42.
- [30] GHOSHL JC, ALTIERI DC. Activation of p53-dependent apoptosis by acute ablation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in colorectal cancer cells [J]. Clinical Cancer Research, 2005, 11(12): 4580-4588.
- [31] SHLAKOORI A, MAI W, MIYASHITA K, et al. Inhibition of GSK-3 $\beta$  activity attenuates proliferation of human colon cancer cells in rodents [J]. Cancer Science, 2007, 98(9): 1388-1393.
- [32] TURRO E, GREENE D, WIJGAERTS A, et al. A dominant gain-of-function mutation in universal tyrosine kinase SRC causes thrombocytopenia, myelofibrosis, bleeding, and bone pathologies [J]. Science Translational Medicine, 2016, 8(328): 328ra30.
- [33] KIM LC, SONG L, HAURA EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10): 587-595.
- [34] NIU J, GU X, TURTON J, et al. Integrin-mediated signalling of gelatinase B secretion in colon cancer cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 249(1): 287-291.
- [35] BJÖRKLUND M, KOIVUNEN E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1755(1): 37-69.
- [36] ANDROUSOPOULOS VP, SPYROU I, PLOUMIDIS A, et al. Expression Profile of CYP1A1 and CYP1B1 Enzymes in Colon and Bladder Tumors [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82487.
- [37] MCFADYEN MC, BREEMAN S, PAYNE S, et al. Immunohistochemical localization of cytochrome P450 CYP1B1 in breast cancer with monoclonal antibodies specific for CYP1B1 [J]. J Histochem Cytochem, 1999, 47(11): 1457-1464.
- [38] MCFADYEN MC, CRUICKSHANK ME, MILLER ID, et al. Cytochrome P450 CYP1B1 overexpression in primary and metastatic ovarian cancer [J]. Br J Cancer, 2001, 85(2): 242-246.
- [39] MCFADYEN MC, MELVIN WT, MURRAY GI. Cytochrome P450s: novel options for cancer therapeutics [J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(3): 363-371.
- [40] THEOCHARIS AD, KARAMANOS NK. Proteoglycans remodeling in cancer: Underlying molecular mechanisms [J]. Matrix Biol, 2019, 75-76: 220-259.
- [41] SCHAEFER L, BABELOVA A, KISS E, et al. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2005, 115(8): 2223-2233.
- [42] MORETH K, FREY H, HUBO M, et al. Biglycan-triggered TLR-2- and TLR-4-signaling exacerbates the pathophysiology of ischemic acute kidney injury [J]. Matrix Biol, 2014, 35: 143-151.