doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.19.006

# 基于网络药理学探讨华蟾素注射液治疗结直肠癌的作用机制*

徐玲艳[1],于天怡[2],石美智[1],陈君君[1],邢婷玉[1],徐晓红[1],刘　盈[1],韩永龙[1],张　凤[2],姜　波[1△]

(1. 上海交通大学附属第六人民医院,上海　201306;　2. 上海长征医院,上海　200003)

**摘要:目的**　基于网络药理学方法预测华蟾素注射液的有效活性成分,以及治疗结直肠癌的分子作用机制。**方法**　查阅并汇总国内外相关文献,查询PubChem数据库确定华蟾素注射液的活性成分,利用SwissTargetPrediction数据库检索活性成分靶点,运用GeneCards,TTD,DrugBank数据库查询结直肠癌的疾病靶点,利用Cytoscape 3.7.2软件绘制中药-活性成分-疾病靶点网络;应用String平台构建靶蛋白相互作用网络(PPI),并提取关键靶点,对关键靶点进行基因本体(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,对核心靶点与主要活性成分进行分子对接。培养人克隆结肠腺癌Caco-2细胞,利用液质联用高分辨质谱仪考察1.0%,0.3%,0.1%华蟾素注射液对结直肠癌细胞中靶点蛋白的调节作用。**结果**　华蟾素注射液的63个活性成分作用于25个结直肠癌的疾病靶点,信号转导及转录激活因子3(STAT3)、热激蛋白90α家族成员1(HSP90AA1)、表皮生长因子(EGFR)、激酶插入区域受体(KDR)、碳酸酐酶9(CA9)、Rho相关蛋白激酶1(ROCK1)、细胞间质上皮转换因子(c-MET)共7个关键靶基因参与结直肠癌的蛋白多糖、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗、非小细胞肺癌等信号通路。**结论**　华蟾素注射液通过多活性成分、多靶点、多通路治疗结直肠癌。

**关键词:**华蟾素注射液;结直肠癌;化学活性成分;网络药理学

**中图分类号:R965;R979.1**　　**文献标志码:A**　　**文章编号:1006-4931(2022)19-0026-10**

# Mechanism of Huachansu Injection in the Treatment of Colorectal Cancer Based on Network Pharmacology

*XU Lingyan[1], YU Tianyi[2], SHI Meizhi[1], CHEN Junjun[1], XING Tingyu[1], XU Xiaohong[1], LIU Ying[1], HAN Yonglong[1], ZHANG Feng[2], JIANG Bo[1]*

*(1. Shanghai Jiao Tong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai, China 201306; 2. Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai, China 200003)*

**Abstract: Objective**　To predict the effective active ingredients of Huachansu Injection and its molecular mechanism in the treatment of colorectal cancer (CRC) based on the network pharmacology. **Methods**　The active ingredients of Huachansu Injection were determined by the relevant studies at home and abroad and the PubChem database. The targets of active ingredients were searched by the SwissTargetPrediction database. The targets of CRC were searched by the GeneCards, TTD and DrugBank databases. The traditional Chinese medicine (TCM) - active ingredients - disease targets network was constructed by the Cytoscape 3.7.2 software. The protein - protein interaction (PPI) network was constructed and the key targets were extracted by the String platform. The gene ontology (GO) function analysis and the Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of the key targets were conducted. The molecular docking between the core targets and the main active ingredients was analyzed. The human colon adenocarcinoma Caco-2 cells were cultured, and the regulatory effects of 1.0%, 0.3% and 0.1% of Huachansu Injection on the target proteins in CRC cells were investigated by the liquid chromatography tandem mass spectrometry with high resolution. **Results**　A total of 63 active ingredients of Huachansu Injection acted on 25 CRC targets. Seven key target genes including signal transdution and activator of transcription 3 (STAT3), heat shock protein 90α family member 1 (HSP90AA1), epidermal growth factor receptor (EGFR), kinase insert domain containing receptor (KDR), carbonic anhydrase 9 (CA9), Rho-associated protein kinase 1 (ROCK1) and cellular - mesenchymal epithelial transition factor (c - MET) were involved in the signaling pathways of CRC such as proteoglycan, EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance and non - small cell lung cancer. **Conclusion**　Huachansu Injection treat CRC through multiple active ingredients, multiple targets and multiple pathways.

**Key words:** Huachansu Injection; colorectal cancer; chemical active ingredient; network pharmacology

结直肠癌为临床常见消化道肿瘤,发病率和死亡率均仅次于乳腺癌和肺癌,位居第3位[1]。外科手术是治疗结直肠癌的首选方案,但化学治疗(简称化疗)仍是晚期结直肠癌的主要治疗方式[2-3]。随着靶向治疗、免疫治疗的加入,晚期结直肠癌患者的生存率提升[4]。中药作为中国医药资源的宝库,在癌症的治疗中仍占有一席之地。中药制剂通过调节多个信号通路可直接发挥抗肿瘤作用,还对化疗引起的一系列不良反应有

*基金项目:上海市卫生健康委员会中医药传承和科技创新项目[ZYCC2019017];上海市浦东新区科技发展基金民生科研专项[PKJ2019-Y04];上海健康医学院附属医院2021年师资人才百人库项目[B3-0200-20-311008-02]。

第一作者:徐玲艳,女,硕士研究生,药师,研究方向为中药药理学,(电话)021-38297673(电子信箱)cjgfwp@163.com。

△通信作者:姜波,男,博士研究生,副主任药师,研究方向为药物分析与药物代谢,(电话)021-38297152(电子信箱)lucid1227@163.com。

缓减效果，能起到增效减毒的作用。华蟾素注射液（HCSI）是以蟾皮为主要原料提取精制而成的水溶性制剂，是第1个获得美国国立癌症研究所（NCI）资助进行临床研究的抗肿瘤中药注射液，广泛应用于原发性肝癌、胃癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌等多种中晚期肿瘤的治疗，特别是对含草酸铂方案化疗失败的晚期结直肠癌患者疗效显著[5]。目前，已从蟾皮中分离获得超过100个单体化合物，其化学成分主要有蟾蜍内酯（蟾毒配基类、蟾蜍毒素类）、蟾毒色胺类、多肽类、核苷类、氨基酸类等。华蟾素注射液中的水溶性生物碱及微量的脂溶性蟾毒内酯类毒性成分被认为是其主要的两类化学活性成分[6-7]。随着对华蟾素有效成分研究的不断深入，为探讨其药效作用机制，系统研究华蟾素注射液的化学活性成分非常必要，对于研究中药复方作用靶点、用药规律意义深远。本研究中采用网络药理学方法，综合分析药物-疾病-基因-靶点间的关系，剖析华蟾素注射液“多基因、多靶点”的作用特点[8-9]；利用网络药理学技术对筛选出的华蟾素注射液作用靶点进行聚类分析，从多个层面深入探讨其作用机制，全面分析其作用靶点、生物过程及信号通路；并使用计算机辅助软件对华蟾素注射液的主要活性成分与关键靶标蛋白进行模拟对接，以阐明其治疗结直肠癌复杂的作用机制，为华蟾素注射液治疗结直肠癌的深入研究提供参考。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试药与细胞

仪器：Orbitrap Fusion Lumos型液质联用高分辨质谱仪（美国Thermo公司）；UNIVERSAL 32R型台式冷冻离心机（德国Hettich公司）；ULT1786-3-V37型超低温冰箱（美国Revco公司）。

试药：华蟾素注射液（安徽华润金蟾药业股份有限公司，批号为190101-2）；DMEM高糖培养基、胎牛血清（FBS）、胰酶、青霉素/链霉素双抗溶液（美国Gibco公司）；乙腈（色谱纯，德国Merck公司）；其余试剂均为分析纯。

细胞：人克隆结肠腺癌细胞Caco-2细胞（中国科学院细胞库）。

### 1.2 数据库与软件

Canonical SMILES结构：PubChem网站（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）。

数据库：活性成分靶点数据库（SwissTargetPrediction，http://www.swisstargetprediction.ch/）；蛋白质数据库（UniProt，https://www.uniprot.org/）；蛋白质结构数据库（PDB，http://www.rcsb.org/）；基因信息数据库（GeneCards，https://www.genecards.org/）；疾病靶点数据库（TTD，http://db.idrblab.net/ttd/）；Drugbank数据库（https://go.drugbank.com/）；生物学信息注释数据库（DAVID 6.8，https://david.ncifcrf.gov/）。

软件：蛋白质-蛋白质相互作用分析平台（String，https://string-db.org/）；生物信息云平台（OmicShare，https://www.omicshare.com/）；网络分析及作图软件[可视化软件Cytoscape 3.7.2，Venny 2.1.0（https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html）]；ChemBioOffice 2014软件；分子对接相关软件（AutoDuck Tools，ChemBio 3D，PyMOL，MOE）。

### 1.3 方法

活性成分-靶点网络构建：从文献中查阅目前华蟾素注射液已明确的主要化学成分，从PubChem数据库获得活性成分标准canonical SMILES结构式，导入SwissTargetPrediction数据库进行活性化合物靶点预测，默认选择“Homo sapiens”，输入化合物字符串SMILES，提交、预测、筛选与华蟾素注射液活性化合物相关的作用靶点。通过UniProt数据库检索，限定物种为“人”，将检索得到的所有靶点蛋白校正为其标准名称。在GeneCards数据库、TTD数据库、Drugbank数据库检索结直肠癌相关靶基因，将以上3个数据库获取的结直肠癌靶基因与华蟾素注射液靶基因输入Venny 2.1.0软件，取交集作为华蟾素注射液抗结直肠癌的关键靶点，将上述靶点及华蟾素注射液主要化学成分导入Cytoscape 3.7.2软件，构建中药-活性成分-疾病靶点网络。

华蟾素注射液抗结直肠癌靶蛋白互作网络（PPI）构建：将华蟾素注射液抗结直肠癌靶点导入String平台构建PPI，设置蛋白种类为“Homo sapiens”，自定义相互作用阈值“confidence = 0.97”，其他参数为默认值。将PPI导入Cytoscape 3.7.2软件，利用“Network Analysis”功能计算各网络节点的度值、介数、最短路径等拓扑参数，上述参数的值越大表明该节点在网络中的位置越重要。选取网络中3个拓扑参数均较大且在均值以上的靶点作为华蟾素注射液抗结直肠癌的关键靶点。

华蟾素注射液抗结直肠癌靶点的基因本体（GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析：将华蟾素注射液抗结直肠癌靶点输入OmicShare和DAVID 6.8平台，分别进行GO功能富集分析与KEGG通路富集分析，依据$P < 0.001$和$P < 0.05$筛选富集的生物功能及信号通路。

华蟾素注射液抗结直肠癌核心靶点的分子对接：在PDB数据库搜索华蟾素注射液抗结直肠癌核心靶点的蛋白晶体结构，借助PyMOL软体将核心靶蛋白与原配体分离，同时去除核心靶蛋白的水分子、磷酸根及多余的非活性配体。将核心化学成分的二维（2D）结构导

入ChemBio 3D软件后进行MM2能量最小化优化，以mol2格式保存。将核心靶蛋白、原配体、化合物三维（3D）结构统一导入MOE软件，利用“Site Finder”功能找出活性口袋，进行核心靶蛋白与目标化合物的分子对接。

细胞培养与华蟾素注射液测定：将Caco－2细胞培养在T75方瓶中，培养液为DMEM培养基、10% FBS、1%双抗溶液（100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素），置37 ℃、5%$CO_2$细胞培养箱中培养4～6 d传代，直到细胞数量足够，以1×$10^5$个/mL接种于6孔板。48 h后每孔中加入含华蟾素注射液的培养基2 mL，分为空白组及1.0%，0.3%，0.1%（*V*/*V*）华蟾素注射液组，每组设3个重复。培养48 h后弃去上清液，用冰冷磷酸盐缓冲液（PBS）清洗，加入100 μL十二烷基硫酸钠（SDS）溶液裂解细胞，提取蛋白，经还原烷基化、丙酮沉淀后酶解过夜。肽段除盐后加入10 μL 0.5%甲酸－5%乙腈溶液重悬，－80 ℃冰箱保存备用。取6 μL肽段样品，置Orbitrap Fusion Lumos型液质联用高分辨质谱仪分析。色谱条件：色谱柱为New Objective self－packed $C_{18}$ analytical PicoFrit column柱（40 cm×75 μm，9 μm）；流动相A为0.5%甲酸－2%乙腈溶液（*V*/*V*），流动相B为0.5%甲酸－80%乙腈溶液（*V*/*V*），梯度洗脱（0～60 min时5%B→50%B）；流速为300 nL/min。质谱条件：全扫描模式分辨率设置为120 000，质荷比（*m*/*z*）为350～1 500；数据非采集（DIA）模式扫描分辨率设置为30 000，AGC target设置为1×$e^6$，maximal IT设置为54 ms。DIA原始数据文件使用Spectronaut X软件进行搜库分析。

## 2 结果

### 2.1 活性成分

华蟾素注射液为蟾皮的水提取物，化学成分复杂，目前已从蟾皮中分离获得超过100个单体化合物，主要包括蟾蜍二烯羟酸内酯类、吲哚生物碱类、蟾蜍环酰胺类、小分子环肽类、核苷类等。根据文献[10－12]报道，将筛选得到的63个化合物依次输入PubChem数据库，获取相关化合物信息，详见表1。

**表1 华蟾素注射液中活性化合物信息**

**Tab. 1 Information of active compounds in Huachansu Injection**

| 序号 | 英文名称 | 中文名称 | canonical SMILES | CAS号 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | bufalin | 蟾毒灵 | CC12CCC(CC1CCC3C2CCC4(C3(CCC4C5=COC(=O)C=C5)O)C)O | 465－21－4 |
| 2 | cinobufagin | 华蟾毒配基 | CC(=O)OC1C(C2(CCC3C(C24C1O4)CCC5C3(CCC(C5)O)C)C)C6=COC(=O)C=C6 | 470－37－1 |
| 3 | desacetylcinobufagin | 去乙酰华蟾毒精 | CC12CCC(CC1CCC3C2CCC4(C35C(O5)C(C4C6=COC(=O)C=C6)O)C)O | 4026－95－3 |
| 4 | bufotalin | 蟾毒它灵 | CC(=O)OC1CC2(C3CCC4CC(CCC4(C3CCC2(C1C5=COC(=O)C=C5)C)C)O)O | 471－95－4 |
| 5 | cinobufotalin | 华蟾毒它灵 | CC(=O)OC1C(C2(CCC3C(C24C1O4)CCC5(C3(CCC(C5)O)C)O)C)C6=COC(=O)C=C6 | 1108－68－5 |
| 6 | gamabufotalin | 日蟾毒它灵 | CC12CCC(CC1CCC3C2C(CC4(C3(CCC4C5=COC(=O)C=C5)O)C)O)O | 465－11－2 |
| 7 | desacetylbufotalin | 去乙酰蟾毒它灵 | CC12CCC(CC1CCC3C2CCC4(C3(CC(C4C5=COC(=O)C=C5)O)O)C)O | 465－19－0 |
| 8 | desacetylcinobufotalin | 去乙酰华蟾毒它灵 | CC12CCC(CC1(CCC3C2CCC4(C35C(O5)C(C4C6=COC(=O)C=C6)O)C)O)O | 4099－30－3 |
| 9 | resibufogenin | 酯蟾毒配基 | CC12CCC(CC1CCC3C2CCC4(C35C(O5)CC4C6=COC(=O)C=C6)C)O | 465－39－4 |
| 10 | dehydrobufotenine | 脱氢蟾蜍色胺 | C[N+]1(CCC2=CNC3=C2C1=C(C=C3)O)C | 17232－69－8 |
| 11 | telocinobufagin | 远华蟾毒精 | CC12CCC(CC1(CCC3C2CCC4(C3(CCC4C5=COC(=O)C=C5)O)C)O)O | 472－26－4 |
| 12 | bufothionine | 蟾蜍噻吟 | C[N+]1(CCC2=CNC3=C2C1=C(C=C3)OS(=O)O)C | 475－39－8 |
| 13 | arenobufagin | 沙蟾毒精 | CC12CCC(CC1CCC3C2C(C(=O)C4(C3(CCC4C5=COC(=O)C=C5)O)C)O)O | 464－74－4 |
| 14 | bufarenogin | 异沙蟾蜍精 | CC12CCC(CC1CCC3C2C(=O)C(C4(C3(CCC4C5=COC(=O)C=C5)O)C)O)O | 17008－65－0 |
| 15 | marinobufagin | 南美蟾毒精 | CC12CCC(CC1(CCC3C2CCC4(C35C(O5)CC4C6=COC(=O)C=C6)C)O)O | 470－42－8 |
| 16 | bufotalinin | 蟾毒它里灵 | CC12CCC3C(C14C(O4)CC2C5=COC(=O)C=C5)CCC6(C3(CCC(C6)O)C=O)O | 562－21－0 |
| 17 | cinobufaginol | 华蟾毒精醇 | CC(=O)OC1C(C2(CCC3C(C24C1O4)CCC5C3(CCC(C5)O)CO)C)C6=COC(=O)C=C6 | 6691－83－4 |
| 18 | resibufaginol | 脂蟾毒精醇 | CC12CCC3C(C14C(O4)CC2C5=COC(=O)C=C5)CCC6C3(CCC(C6)O)CO | 20987－26－2 |
| 19 | desacetylcinobufaginol | 去乙酰华蟾毒精醇 | CC12CCC3C(C14C(O4)C(C2C5=COC(=O)C=C5)O)CCC6C3(CCC(C6)O)CO | 39844－95－6 |
| 20 | resibufagin | 脂蟾毒精 | CC12CCC3C(C14C(O4)CC2C5=COC(=O)C=C5)CCC6C3(CCC(C6)O)C=O | 20987－24－0 |
| 21 | bufotenine | 蟾蜍色胺 | CN(C)CCC1=CNC2=C1C=C(C=C2)O | 487－93－4 |
| 22 | bufoviridine | 蟾蜍绿啶 | CN(C)CCC1=CNC2=C1C=C(OS(O)(=O)=O)C=C2 | 16369－08－7 |
| 23 | Argentinogenin | 阿根廷蟾毒精 | CC12CCC(CC1CCC3C2=C(C(=O)C4(C3(CCC4C5=COC(=O)C=C5)O)C)O)O | 4236－48－0 |
| 24 | bufogargarizanine－C | 蟾蜍环酰胺C | OCC1NCC(O)CC(NC1=O)C(=O)OCC1NCC(O)CC(NC1=O)C(O)=O | 1052080－99－2 |
| 25 | bufogargarizanine－D | 蟾蜍环酰胺D | [H][C@]12C[C@]([H])(NC(=O)[C@H](C)NC1)C(=O)O2 | 1207384－68－6 |
| 26 | 19－oxo－bufalin | 19－氧代－蟾毒灵 | CC12CCC3C(C1(CCC2C4=COC(=O)C=C4)O)CCC5C3(CCC(C5)O)C=O | 366004－24－2 |

续表 1 华蟾素注射液中活性化合物信息

Continued Tab. 1 Information of active compounds in Huachansu Injection

| 序号 | 英文名称 | 中文名称 | canonical SMILES | CAS 号 |
|---|---|---|---|---|
| 27 | 3 - epi - bufalin | 3 - epi - 蟾毒灵 | CC12CCC(CC1CCC3C2CCC4(C3(CCC4C5 = COC( = O)C = C5)O)C)O | 465 - 20 - 3 |
| 28 | ψ - bufarenogin | ψ - 异沙蟾蜍精 | CC12CCC(CC1CCC3C2C( = O)C(C4(C3(CCC4C5 = COC( = O)C = C5)O)C)O)O | 17008 - 69 - 4 |
| 29 | 1β - hydroxycinobufagin | 1β - 羟基华蟾毒精 | CC( = O)O[C@H]1[C@H]2O[C@]22[C@@H]3CC[C@@H]4C[C@@H](O)C[C@@H](O)[C@]4(C)[C@H]3CC[C@]2(C)[C@H]1C1 = COC( = O)C = C1 | 850036 - 58 - 7 |
| 30 | 12β - hydroxycinobufagin | 12β - 羟基华蟾毒精 | [H]C1C[C@H](O)C[C@@]2([H])C([H])C([H])C3C(C([H])C(O)[C@]4(C)[C@H]([C@@H](CC(O) = O)[C@H]5O[C@@]345)C3 = COC( = O)C = C3)[C@@]12C | 39844 - 93 - 4 |
| 31 | 5β,12β - dihydroxycinobufagin | 5β,12β - 二羟基华蟾毒精 | [H]C1C[C@H](O)C[C@@]2([H])C([H])C([H])C3C(C([H])C(O)[C@]4(C)[C@H]([C@@H](CC(O) = O)[C@H]5O[C@@]345)C3 = COC( = O)C = C3)[C@@]12C | 1036970 - 13 - 4 |
| 32 | 3 - acetyl - gamabufotalin | 3 - 乙酰基 - 日蟾毒它灵 | CC( = O)OC1CCC2(C)C(CCC3C2C(O)CC2(C)C(CCC32O)C2 = COC( = O)C = C2)C1 | 10056 - 25 - 4 |
| 33 | 11α - hydroxymarinobufagin | 11α - 羟基南美蟾毒精 | CC12CC(O)C3C(CCC4(O)CC(O)CCC34C)C11OC1CC2C1 = COC( = O)C = C1 | 156054 - 83 - 0 |
| 34 | 19 - hydroxylbufalin | 19 - 羟基蟾毒灵 | CC12CCC(O)CC1CCC1C2CCC2(CO)C(CCC12O)C1 = COC( = O)C = C1 | 39844 - 86 - 5 |
| 35 | 19 - oxo - cinobufotalin | 19 - 氧代 - 华蟾毒它灵 | [H]C1CC(O)CC2(O)C([H])C([H])C3C(C([H])C([H])C4(C)C(C(OC(C) = O)C5OC345)C3 = COC( = O)C = C3)C12C = O | 24512 - 60 - 5 |
| 36 | 11α,19 - dihydroxymarinobufagin | 11α,19 - 二羟基南美蟾毒精 | CC12CCC(O)CC1(O)CCC1C2C(O)CC2(CO)C(CC3OC123)C1 = COC( = O)C = C1 | 156054 - 82 - 9 |
| 37 | 16 - desacetyl - 19 - oxocinobufotalin | 16 - 去乙酰基 - 19 - 氧代华蟾毒它灵 | CC12CCC3C(CCC4(O)CC(O)CCC34C = O)C11OC1C(O)C2C1 = COC( = O)C = C1 | 39844 - 88 - 7 |
| 38 | hellebrigenol | 嚏根草醇 | CC12CCC3C(C1(CCC2C4 = COC( = O)C = C4)O)CCC5(C3(CCC(C5)O)CO)O | 508 - 79 - 2 |
| 39 | hellebrigenin | 嚏根草配基 | CC12CCC3C(C1(CCC2C4 = COC( = O)C = C4)O)CCC5(C3(CCC(C5)O)C = O)O | 465 - 90 - 7 |
| 40 | 4,9 - anhydro - tetrodotoxin | 4,9 - 脱水河豚毒素 | C(C1(C2C3C4[NH + ] = C(NC35C(C1OC(C5O4)(O2)O)O)N)O)O | 13072 - 89 - 4 |
| 41 | serotonin | 血清素 | C1 = CC2 = C(C = C1O)C( = CN2)CCN | 50 - 67 - 9 |
| 42 | 5 - methoxy - tryptamine | 5 - 甲氧基 - 色胺 | COC1 = CC2 = C(C = C1)NC = C2CCN | 608 - 07 - 1 |
| 43 | bufotenidine | N - 三甲基 - 5 - 羟色胺 | C[N + ](C)(C)CCC1 = CNC2 = C1C = C(C = C2)[O - ] | 487 - 91 - 2 |
| 44 | pimeloylarginine | 庚二酰精氨酸 | C(CCC( = O)C(CCCN = C(N)N)(C( = O)O)N)CCC( = O)C(CCCN = C(N)N)(C( = O)O)N | |
| 45 | indole - 3 - acetic - acid | 吲哚 - 3 - 乙酸 | C1 = CC = C2C( = C1)C( = CN2)CC( = O)O | 87 - 51 - 4 |
| 46 | ethenzamide | 邻乙氧苯甲酸胺 | CCOC1 = CC = CC = C1C( = O)N | 938 - 73 - 8 |
| 47 | adalinine | 阿达林 | CCCCCC1(CCCC( = O)N1)CC( = O)C | 175669 - 30 - 4 |
| 48 | N,N - dibutyl - formamide | N,N - 二丁基二甲酰胺 | CCCCN(CCCC)C = O | 761 - 65 - 9 |
| 49 | linoleamide | 亚油酸酰胺 | CCCCCC = CCC = CCCCCCCCC( = O)N | 3999 - 01 - 7 |
| 50 | 7α - hydroxycholesterol | 7α - 羟基胆甾醇 | CC(C)CCC[C@@H](C)[C@H]1CC[C@H]2C3[C@H](O)C = C4C[C@@H](O)CC[C@]4(C)[C@H]3CC[C@]12C | 566 - 26 - 7 |
| 51 | oleic - acid | 十八烯酸 | CCCCCCCC/C = C\CCCCCCCC( = O)O | 112 - 80 - 1 |
| 52 | proline | 脯氨酸 | C1CC(NC1)C( = O)O | 147 - 85 - 3 |
| 53 | hypoxanthine | 次黄嘌呤 | C1 = NC2 = C(N1)C( = O)NC = N2 | 68 - 94 - 0 |
| 54 | xanthine | 黄嘌呤 | C1 = NC2 = C(N1)C( = O)NC( = O)N2 | 69 - 89 - 6 |
| 55 | adenine | 腺嘌呤 | C1 = NC2 = NC = NC( = C2N1)N | 73 - 24 - 5 |
| 56 | adenosine | 腺苷 | C1 = NC( = C2C( = N1)N(C = N2)C3C(C(C(O3)CO)O)O)N | 58 - 61 - 7 |
| 57 | thymidine | 胸苷 | CC1 = CN(C( = O)NC1 = O)C2CC(C(O2)CO)O | 50 - 89 - 5 |
| 58 | guanine | 鸟嘌呤 | C1 = NC2 = C(N1)C( = O)NC( = N2)N | 73 - 40 - 5 |
| 59 | guanosine | 鸟苷 | C1 = NC2 = C(N1C3C(C(C(O3)CO)O)O)N = C(NC2 = O)N | 118 - 00 - 3 |
| 60 | thymine | 胸腺嘧啶 | CC1 = CNC( = O)NC1 = O | 65 - 71 - 4 |
| 61 | riboflavin | 核黄素 | CC1 = CC2 = C(C = C1C)N(C3 = NC( = O)NC( = O)C3 = N2)CC(C(C(CO)O)O)O | 83 - 88 - 5 |
| 62 | cholesterol | 胆固醇 | CC(C)CCCC(C)C1CCC2C1(CCC3C2CC = C4C3(CCC(C4)O)C)C | 57 - 88 - 5 |
| 63 | uridine | 尿苷 | C1 = CN(C( = O)NC1 = O)C2C(C(C(O2)CO)O)O | 58 - 96 - 8 |

## 2.2 抗结直肠癌作用靶点及主要成分预测

通过 SwissTargetPrediction 数据库预测共得到华蟾素注射液化合物靶点 978 个，从数据库中获取结直肠癌疾病靶点共 10 495 个。其中，TTD 数据库 19 个，Drugbank

数据库 48 个，GeneCards 数据库 10 428 个。将华蟾素注射液活性成分靶点与结直肠癌疾病靶点导入 Venny 2. 1 软件，去重后得到 25 个共有靶点，详见图 1。利用 Cytoscape 3. 7. 2 可视化软件绘制华蟾素注射液治疗结直肠癌的中药 - 活性成分 - 疾病靶点网络图，每个参与互作的活性成分节点用一个圆圈表示，圆圈面积越大、颜色越深表示其度值越大，详见图 2。筛选化合物度值大于 5 的节点，按度值大小对华蟾素注射液的活性成分进行排序，共筛选出 26 种核心活性成分，详见表 2。

### 2. 3 抗结直肠癌靶蛋白 PPI

用筛选出的 25 个蛋白在 String 数据库中考察蛋白相互作用时，发现有 8 个孤立蛋白。将 String 得到的蛋白

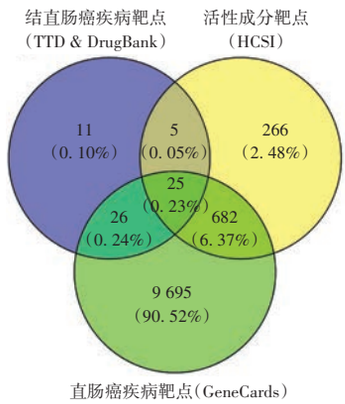



**图 1 华蟾素注射液活性成分靶点与结直肠癌疾病靶点的维恩图**

**Fig. 1 Venn diagram of targets of active ingredients of Huachansu Injection and targets of CRC**

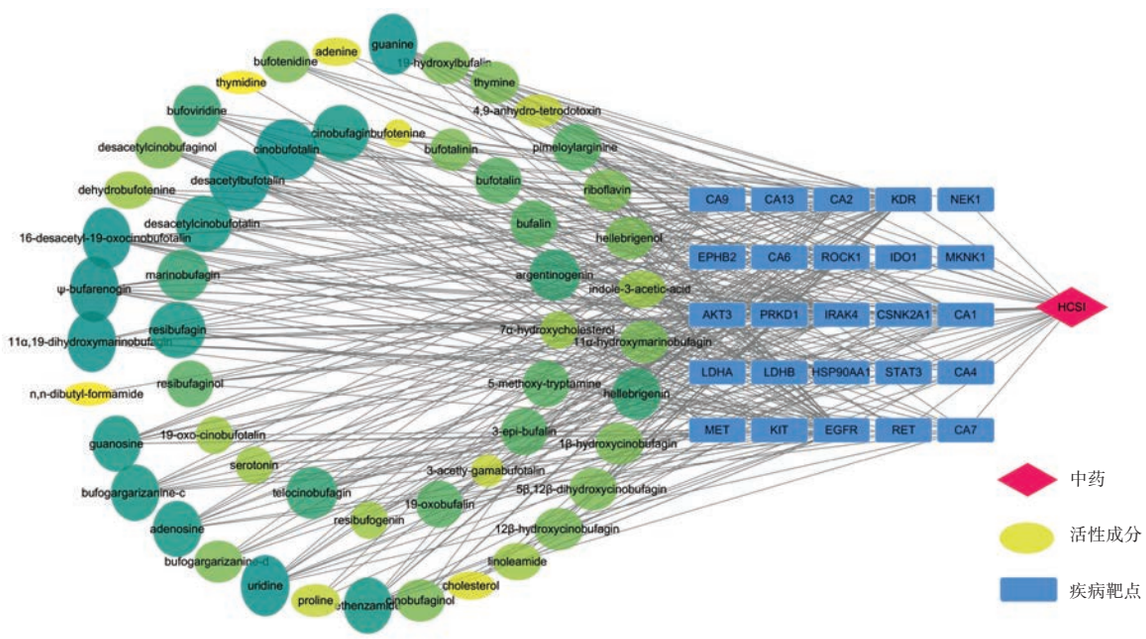



**图 2 华蟾素注射液抗结直肠癌的中药 - 活性成分 - 疾病靶点网络**

**Fig. 2 TCM - active ingredients - disease targets network of Huachansu Injection against CRC**

**表 2 华蟾素注射液核心活性成分拓扑学性质**

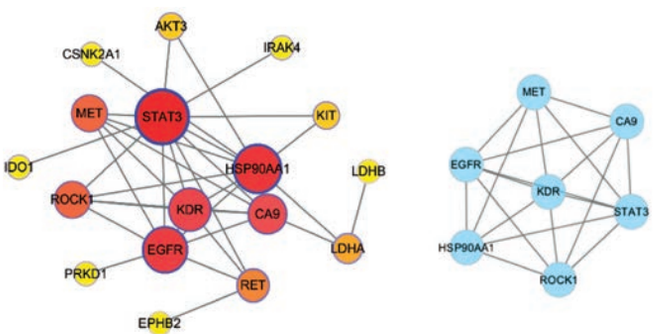
**Tab. 2 Topological properties of the core active ingredients of Huachansu Injection**

| 核心活性成分 | 度值 | 介数 | 核心活性成分 | 度值 | 介数 |
|---|---|---|---|---|---|
| ψ - bufarenogin | 10 | $1.409\times10^{-2}$ | guanosine | 8 | $1.562\times10^{-2}$ |
| cinobufotalin | 9 | $1.393\times10^{-2}$ | telocinobufagin | 7 | $6.944\times10^{-3}$ |
| desacetylbufotalin | 9 | $1.352\times10^{-2}$ | marinobufagin | 7 | $5.957\times10^{-3}$ |
| uridine | 9 | $9.267\times10^{-3}$ | argentinogenin | 7 | $7.068\times10^{-3}$ |
| guanine | 9 | $1.291\times10^{-2}$ | hellebrigenin | 7 | $7.668\times10^{-3}$ |
| 11α, 19 - dihydroxymarinobufagin | 9 | $1.261\times10^{-2}$ | bufoviridine | 7 | $8.942\times10^{-3}$ |
| 16 - desacetyl - 19 - oxocinobufotalin | 9 | $1.261\times10^{-2}$ | 5 - methoxy - tryptamine | 6 | $4.972\times10^{-3}$ |
| cinobufagin | 8 | $1.263\times10^{-2}$ | bufalin | 6 | $5.124\times10^{-3}$ |
| desacetylcinobufotalin | 8 | $1.107\times10^{-2}$ | bufotalin | 6 | $4.809\times10^{-3}$ |
| resibufagin | 8 | $1.003\times10^{-2}$ | resibufaginol | 6 | $3.931\times10^{-3}$ |
| bufogargarizanine - C | 8 | $1.239\times10^{-2}$ | 19 - oxo - bufalin | 6 | $5.220\times10^{-3}$ |
| ethenzamide | 8 | $8.214\times10^{-3}$ | 3 - epi - bufalin | 6 | $5.124\times10^{-3}$ |
| adenosine | 8 | $1.058\times10^{-2}$ | pimeloylarginine | 6 | $6.610\times10^{-3}$ |

互作结果导入 Cytoscape 3.7.2 软件进行可视化分析，按度值大于 5 排列主要靶点，筛选出华蟾素注射液治疗结直肠癌的主要疾病靶点 7 个。由图 3 可知，每个参与互作的蛋白节点用一个圆圈表示，圆圈面积越大代表其度值越大，相互作用连线越粗代表其介数越大，圆圈周线越粗代表其路径越短。PPI 中共有 17 个节点、34 条相互作用连线，平均度值为 2.72，平均介数为 $4.89 \times 10^{-2}$，平均最短路径为 $3.43 \times 10^{-1}$，经节点的度值、介数、最短路径 3 个拓扑参数筛选，在网络中较大的 7 个核心靶点分别为信号转导及转录激活因子 3（STAT3）、热激蛋白 90α 家族成员 1（HSP90AA1）、表皮生长因子（EGFR）、激酶插入区域受体（KDR）、碳酸酐酶 9（CA9）、Rho 相关蛋白激酶 1（ROCK1）、细胞间质上皮转换因子（c－MET），详见表 3。

## 2.4 抗结直肠癌靶点的 GO 功能富集分析

利用 DAVID 数据库对关键靶点进行 GO 功能富集分析，依据 $P < 0.001$ 筛选出 GO 条目 262 个，其中生物过程（BP）223 个，分子功能（MF）24 个，细胞组成（CC）15 个。利用 OmicShare 云平台对 7 个关键靶点进行 GO 功能富集分析，结果显示，BP 主要涉及发育过程、生物过程的调节、代谢过程、刺激反应等，MF 和 CC 主要涉及结合过程、催化活性、信号转导活性、分子功能调节、细胞膜等。详见图 4 和图 5。




A　　B

A. 17 个靶点蛋白　B. 7 个靶点蛋白

**图 3　华蟾素注射液作用靶点的 PPI**

A. Seventeen target proteins　B. Seven target proteins

**Fig. 3　PPI network of target of Huachansu Injection**

**表 3　华蟾素注射液抗结直肠癌核心靶点及其拓扑参数**

**Tab. 3　Core targets and their topological parameters of Huachansu Injection against CRC**

| 靶点 | 靶点蛋白 | 度值 | 介数 | 最短路径 |
|---|---|---|---|---|
| STAT3 | signal transduction and activator of transcription 3 | 11 | $3.81 \times 10^{-1}$ | $7.27 \times 10^{-1}$ |
| HSP90AA1 | heat shock protein 90α family member 1 | 9 | $2.89 \times 10^{-1}$ | $6.67 \times 10^{-1}$ |
| EGFR | epidermal growth factor receptor | 8 | $1.68 \times 10^{-1}$ | $6.40 \times 10^{-1}$ |
| KDR | kinase insert domain containing receptor | 7 | $4.31 \times 10^{-2}$ | $6.15 \times 10^{-1}$ |
| CA9 | carbonic anhydrase 9 | 6 | $8.52 \times 10^{-2}$ | $5.71 \times 10^{-1}$ |
| ROCK1 | Rho－associated protein kinase 1 | 5 | $3.34 \times 10^{-3}$ | $5.52 \times 10^{-1}$ |
| c－MET | cellular－mesenchymal epithelial transition factor | 5 | $3.64 \times 10^{-3}$ | $5.52 \times 10^{-1}$ |

## 2.5 抗结直肠癌靶点的 KEGG 通路富集分析

依据 $P < 0.05$ 筛选 7 个关键靶点的 KEGG 通路，主要有癌症途径（pathways in cancer）、氮代谢（nitrogen metabolism）、癌症中的蛋白多糖（proteoglycans in cancer）、Rap1 信号通路（Rap1 signaling pathway）、磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）－Akt 信号通路（PI3K－Akt signaling pathway）、癌症的中心碳代谢（central carbon metabolism in cancer）、黏着斑（focal adhesion）、大鼠肉瘤病毒（Ras）信号通路（Ras signaling pathway）、缺氧诱导因子－1（HIF－1）信号通路（HIF－1 signaling pathway）、麻疹（measles）等 29 条，详见表 4。由图 6 可知，目标靶基因涉及代谢、细胞过

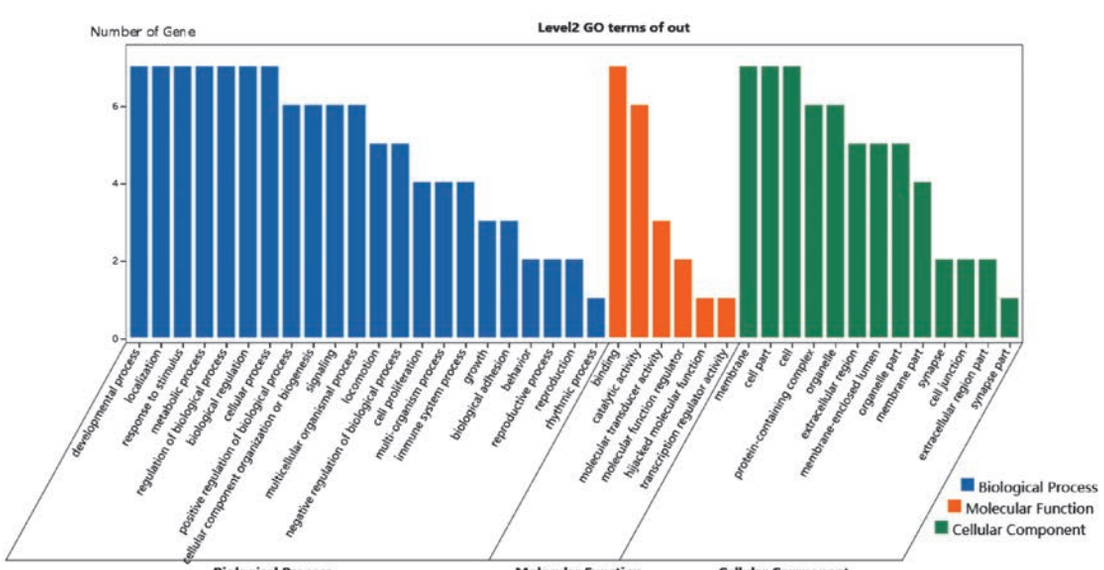



**图 4　华蟾素注射液抗结直肠癌靶点的 GO 功能富集分析二级分类柱状图**

**Fig. 4　Histogram of the second classification of GO function enrichment analysis of targets of Huachansu Injection against CRC**

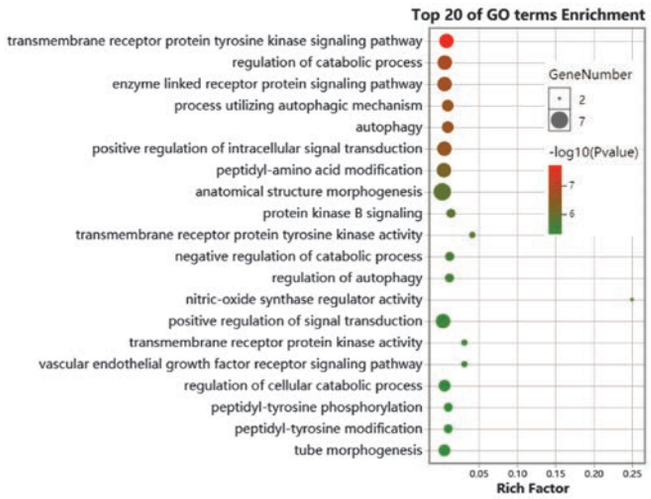



**图5　华蟾素注射液抗结直肠癌靶点的GO功能富集分析气泡图**

**Fig. 5　Bubble diagram of GO function enrichment analysis of targets of Huachansu Injection against CRC**

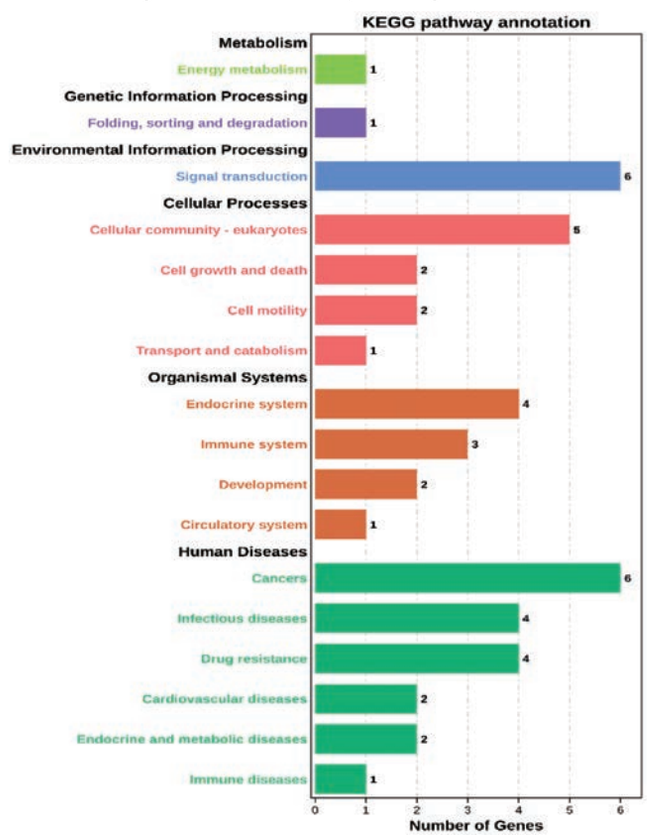



**图6　华蟾素注射液抗结直肠癌靶点的KEGG通路富集分析数目统计图**

**Fig. 6　Statistical chart of KEGG pathway enrichment number of targets of Huachansu Injection against CRC**

程、器官系统、疾病等。上述前20条信号通路的气泡图见图7，以富集因子（RF）、*P*值及调控通路上的基因个数衡量KEGG富集程度，其中气泡颜色代表*P*值的大小，RF代表富集程度的大小，气泡大小代表该通路中目标基因的多少。可见，*P*值偏小为癌症中的蛋白多糖、EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗、肿瘤中的microRNA、黏着斑、癌症途径、PI3K－Akt信号通路、Rap1信号通路、Ras信号通路、癌症的中心碳代谢、人巨细胞病毒感染、非小细胞肺癌（NSCL）、黑色素瘤、胰腺癌、幽门螺杆菌感染中的上皮细胞信号转导、黏合连接、丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）信号通路、前列腺癌、HIF－1信号通路、FoxO信号通路。通过使用预测目标靶蛋白在结直肠癌通路的富集分析发现，上述关键目标蛋白在结直肠癌的治疗中发挥重要作用，详见图8。

**表4　KEGG通路富集分析信号通路**

**Tab. 4　Signal pathways of KEGG pathway enrichment analysis**

| KEGG通路 | 中文名称 | 基因数 | 基因比例(%) | *P*值 |
|---|---|---|---|---|
| proteoglycans in cancer | 癌症中的蛋白多糖 | 5 | 71 | $1.76\times10^{-7}$ |
| pathways in cancer | 癌症途径 | 5 | 71 | $2.08\times10^{-5}$ |
| EGFR tyrosine kinase inhibitor resistance | EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗 | 4 | 57 | $2.74\times10^{-7}$ |
| microRNAs in cancer | 肿瘤中的microRNA | 4 | 57 | $4.89\times10^{-6}$ |
| focal adhesion | 黏着斑 | 4 | 57 | $1.23\times10^{-5}$ |
| PI3K－Akt signaling pathway | PI3K－Akt信号通路 | 4 | 57 | $1.15\times10^{-4}$ |
| Rap1 signaling pathway | Rap1信号通路 | 3 | 43 | $4.88\times10^{-4}$ |
| Ras signaling pathway | Ras信号通路 | 3 | 43 | $7.38\times10^{-4}$ |
| human cytomegalovirus infection | 人巨细胞病毒感染 | 3 | 43 | $1.46\times10^{-3}$ |
| central carbon metabolism in cancer | 癌症的中心碳代谢 | 2 | 29 | $1.32\times10^{-3}$ |
| non－small cell lung cancer | 非小细胞肺癌 | 2 | 29 | $1.52\times10^{-3}$ |

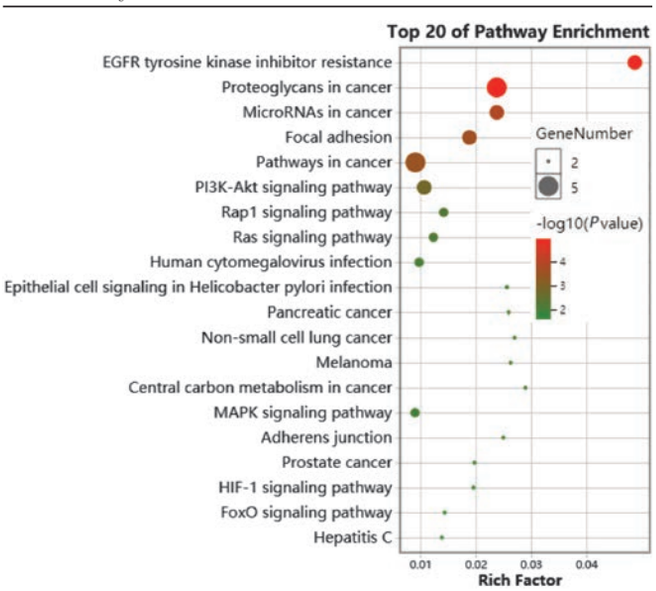



**图7　华蟾素注射液抗结直肠癌靶点的KEGG通路富集分析气泡图**

**Fig. 7　Bubble diagram of KEGG pathway enrichment analysis of targets of Huachansu Injection against CRC**

### 2.6　对结直肠癌细胞中靶点蛋白的调节作用

不同浓度的华蟾素注射液与Caco－2细胞共同培养后，采用Orbitrap Fusion Lumos型液质联用高分辨质谱仪相对定量Caco－2细胞中7种主要目标靶点蛋白。结果显示，1.0%（*V*/*V*）浓度的华蟾素注射液对STAT3，EFFR，HSP90AA1蛋白均有显著抑制作用（$P<0.05$）。详见图9。

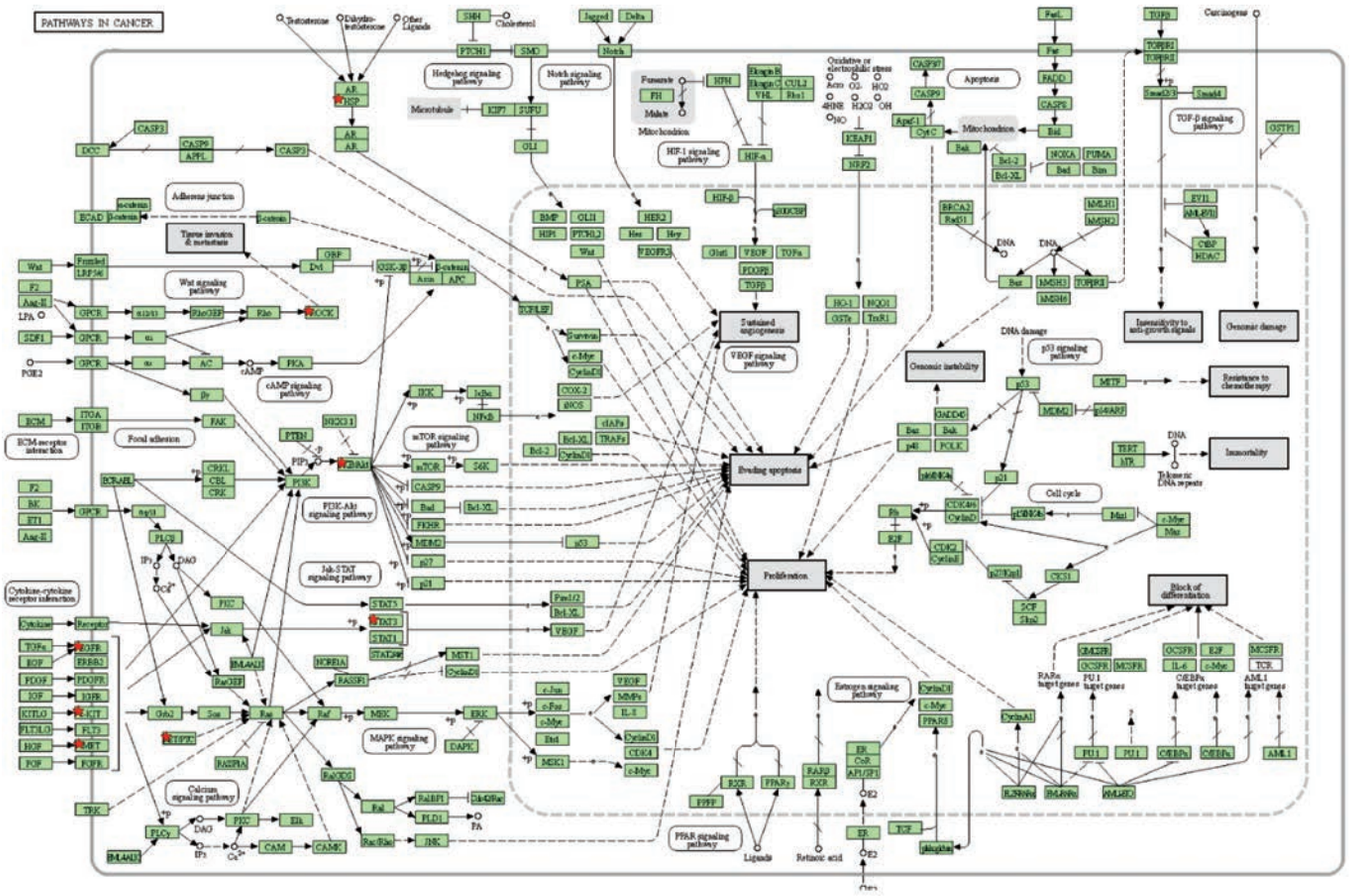
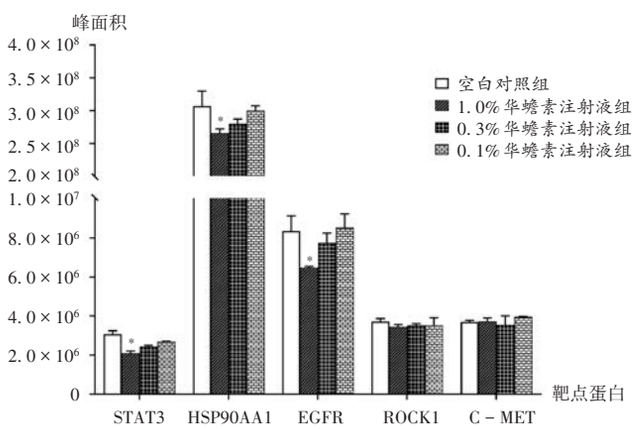



**图 8　华蟾素注射液作用的靶蛋白在结直肠癌通路的富集**

**Fig. 8　Enrichment of target proteins of Huachansu Injection in the CRC pathway**




注：与空白对照组比较，$^{*}P < 0.05$。

**图 9　华蟾素注射液对结直肠癌细胞中靶点蛋白的调节作用**

Note: Compared with those in the blank control group, $^{*}P < 0.05$.

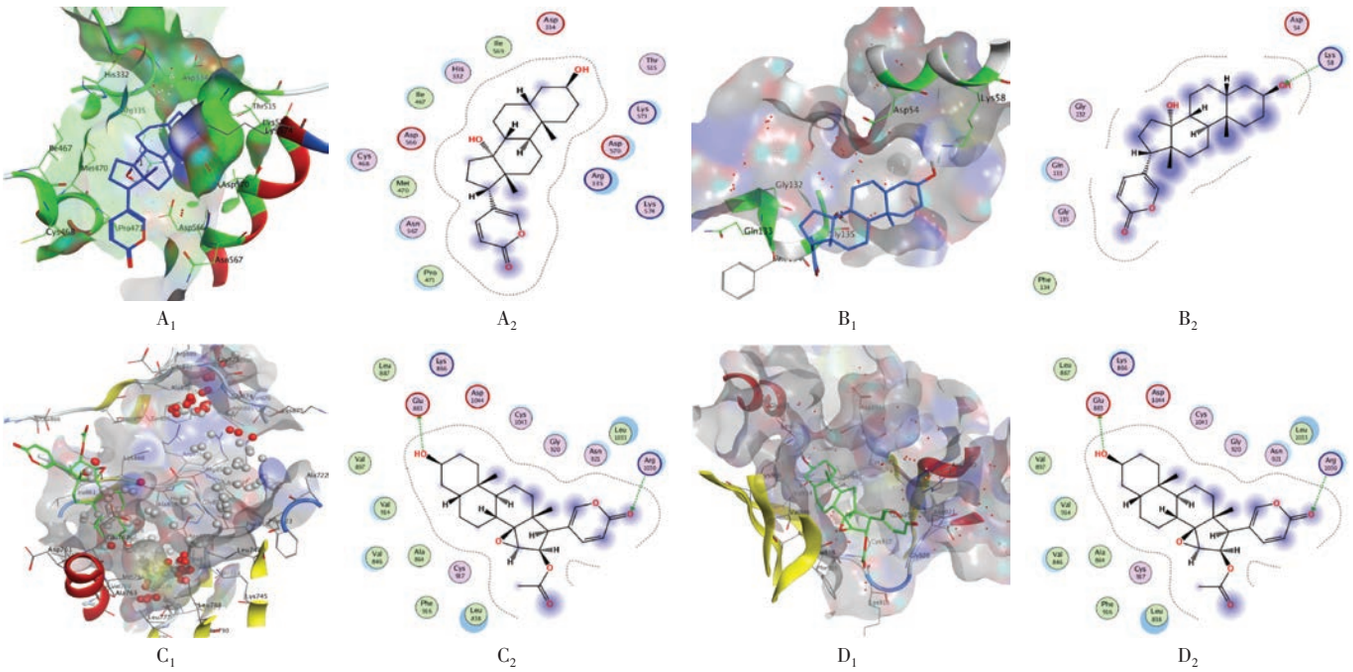
**Fig. 9　Regulation of Huachansu Injection on the target proteins in Caco－2 cells**

### 2.7　抗结直肠癌的核心靶点分子对接

筛选PPI中度值排名靠前的核心靶点蛋白，从PDB数据库中获得核心靶蛋白的蛋白配体复合物，利用AutoDuck Tools和PyMOL软件将蛋白除水、除配体，导入MOE软件，将核心靶蛋白与华蟾素注射液排名靠前且经Chem-Bio 3D结构优化的活性化合物进行分子对接，评价活性化合物与靶蛋白之间的结合活性，根据其结合能大小筛选出华蟾素注射液治疗结直肠癌的潜在核心化合物，分子对接结合能低于－5 kcal / mol为结合能力较好。模拟对接的最终GBVI / WSA打分及相互作用分析结果显示，Bufalin与STAT3（PDB ID为6NJS）的最佳结合能为－6.064 9 kcal / mol，Bufalin与HSP90AA1（PDB ID为1BYQ）的最佳结合能为－6.261 0 kcal / mol，Cinobufagin与EGFR（PDB ID为5UG9）的最佳结合能为－6.138 8 kcal / mol，Cinobufagin与KDR（PDB ID为1YWN）的最佳结合能为－6.807 5 kcal / mol。分子对接图见图10。

## 3　讨论

华蟾素注射液作为一种临床疗效确切的抗肿瘤中药注射液，在晚期结直肠癌的治疗中发挥着重要作用[13－14]，其化学成分复杂，主要是蟾毒配基类、蟾蜍毒素类、蟾毒色胺、核苷类、多肽类、氨基酸类等。明确其发挥药理作用的活性物质是一项繁杂的工作。WEI等[15]考察了华蟾素注射液中的蟾蜍二烯内酯类、生物碱类、核苷类、多肽类对肝癌细胞BEL－7402、胃癌细胞BGC－823的抗癌活性，结果显示，蟾蜍二烯内酯类具有最强的抗肿瘤活性，其次是多肽类，生物碱类几乎



$A_1$ $A_2$ $B_1$ $B_2$

$C_1$ $C_2$ $D_1$ $D_2$

$A_1$, $A_2$. Bufalin – STAT3 $B_1$, $B_2$. Bufalin – HSP90AA1 $C_1$, $C_2$. Cinobufagin – EGFR $D_1$, $D_2$. Cinobufagin – KDR

**图10 华蟾素注射液主要活性成分与核心靶点蛋白分子对接三维图和二维图**

$A_1$, $A_2$. Bufalin – STAT3 $B_1$, $B_2$. Bufalin – HSP90AA1 $C_1$, $C_2$. Cinobufagin – EGFR $D_1$, $D_2$. Cinobufagin – KDR

**Fig. 10 3D and 2D diagrams of molecular docking of main active ingredients of Huachansu Injection and key target proteins**

没有抗癌活性。KONG等[16]的研究显示，生物碱类成分蟾蜍噻吟通过抑制JAK2 / STAT3通路而诱导肝癌细胞自噬发挥华蟾素注射液抗肿瘤的作用。本研究中通过网络药理学方法，系统分析了华蟾素注射液治疗结直肠癌的中药 – 活性成分 – 疾病靶点网络结构关系，发现华蟾素注射液治疗结直肠癌是各类活性物质综合作用的结果，处于核心药理作用地位的化学活性物质为蟾蜍二烯内酯类，与文献[7]报道的结果一致。

本研究中通过网络药理学方法深入研究了华蟾素注射液活性成分靶点，重点分析了关键靶点及其富集的生物过程、信号通路，发现华蟾素注射液治疗结直肠癌主要作用于STAT3，HSP90AA1，EGFR，KDR，CA9，ROCK1，c – MET等核心关键靶点，参与发育过程、生物过程的调节、代谢过程、刺激反应等生物过程。关键靶点富集的通路主要有癌症途径、氮代谢、癌症中的蛋白多糖、Rap1信号通路、PI3K – Akt信号通路、癌症的中心碳代谢、黏着斑、Ras信号通路、HIF – 1信号通路、麻疹等，其中癌症途径、信号通路的数量最多，如PI3K – Akt，Rap1，Ras信号通路等。华蟾素注射液通过STAT3的持续激活参与肿瘤细胞的增殖、分化、凋亡、癌变等过程，是该通路中的关键转录因子，也是目前结直肠癌治疗研究的热点[17 – 19]。c – Met二聚化和磷酸化，进而抑制激活PI3K / Akt，RAS / MAPK，STAT3 / JNK等信号通路，阻止肿瘤细胞的迁移、黏附、肿瘤血管生成、细胞外基质的降解等过程，实现治疗结直肠癌的目的[20 – 23]。蟾毒灵通过EGFR信号通路改善EGFR酪氨酸激酶抑制剂的抵抗，能改善临床肿瘤靶向药物的耐药问题，显著提高癌症的治疗效果[24 – 25]。

本研究中选取了蟾毒灵、华蟾毒配基与预测排名前4名的靶点蛋白进行分子对接，进一步验证预测的数据。结果显示，华蟾素注射液中的蟾毒灵对STAT3和HSP90AA1有较好的结合能力，而华蟾毒配基对EGFR和KDR有较好的结合能力。分子对接验证了4个目标靶点蛋白华蟾素注射液发挥抗肿瘤作用的地位和重要性，同时液质联用高分辨质谱测定结果也证实了华蟾素注射液对EGFR，STAT3，HSP90AA1的作用，但对c – MET，CA9，ROCK1，KDR有作用的活性成分还需进一步深入研究。

目前，华蟾素注射液药理活性成分筛选的依据主要依赖化学分离、液相色谱 – 四极杆飞行时间质谱串联质谱（LC – QTOF / MS）等体外方法研究的结果。蟾毒灵、华蟾毒配基和酯蟾毒配基是华蟾素注射液中含量较高的化合物，为2020年版《中国药典（一部）》中质量控制的标志性物质，是入血成分体内药代动力学研究最多的活性成分[26]。而其他类化学成分因受到仪器设备精确度、灵敏度等条件的限制，无法准确定量临床剂量下其体内活性成分的浓度，迄今鲜有华蟾素注射液多类活性成分入血定性、定量的综合研究，故本研究中的预测性研究仍使用文献已鉴定的体外化学活性成分。

综上所述，华蟾素注射液治疗结直肠癌具有多成

分、多靶点、多通路的优势，后续将对网络药理学的预测结果进行生物学实验验证，重点围绕华蟾素注射液对EGFR酪氨酸激酶抑制剂抵抗、结直肠癌模型PI3K－Akt信号通路、Rap1信号通路、Ras信号通路展开研究，检验预测结果的准确性和可靠度。本研究所得结论建立于数据库及网络药理学统计技术，可为进一步的实验研究奠定基础和提供理论依据。

**参考文献**

[1] SIEGEL RL, MILLER KD, FUCHS HE, et al. Cancer statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(1): 7－33.
[2] Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) Diagnosis and Treatment Guidelines for Colorectal Cancer Working Group. Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) diagnosis and treatment guidelines for colorectal cancer 2018 (English version)[J]. Chin J Cancer Res, 2019, 31(1): 117－134.
[3] DONG CX, DING YW, WENG SS, et al. Update in version 2021 of CSCO guidelines for colorectal cancer from version 2020[J]. Chin J Cancer Res, 2021, 33(3): 302－307.
[4] 米　迷，翁姗姗，陆德珉，等. 2021 年晚期结直肠癌治疗研究进展[J]. 实用肿瘤杂志，2022，37(1)：23－28.
[5] 钱鸣杰，眭振宇，唐　文，等. 3 种药物联合治疗晚期结直肠癌的疗效[J]. 重庆医学，2015，44(22)：3112－3114.
[6] 喻昌燕，孟令杰，姜　念，等. 蟾皮化学成分和药理活性的研究进展[J]. 中草药，2021，52(4)：1206－1220.
[7] 贾小晴，孙　萍. 华蟾素抗肿瘤成分及作用机制研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报，2017，19(3)：215－217.
[8] 高凤凤，裴艳玲，任　越，等. 基于网络药理学与分子对接技术研究黄精抗动脉粥样硬化的作用机制[J]. 药学学报，2020，55(11)：2642－2650.
[9] 季士亮，何丽萍，郭东凯，等. 基于网络药理学探寻银芩口服液治疗新型冠状病毒肺炎抑制机制的研究[J]. 医学新知，2020，30(5)：345－354.
[10] 吴　欢，唐卯星，陶欣怡，等. UPLC－ESI－QTOF / $MS^E$ 结合 UNIFI 快速分析华蟾素注射液化学成分[J]. 天然产物研究与开发，2020，32(3)：498－506.
[11] ZHAN X, WU H, WU H, et al. Metabolites from Bufo gargarizans (Cantor, 1842): A review of traditional uses, pharmacological activity, toxicity and quality control[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 246: 112178.
[12] ZHAO HY, WU X, WANG HJ, et al. Qualitative and quantitative analysis of cinobufacini injection using rapid separation liquid chromatography coupled with quadrupole－time－of－flight mass spectrometry and HPLC－photodiode array detection, a feasible strategy for the quality control of Chinese medicine injections[J]. J Sep Sci, 2013, 36(3): 492－502.
[13] MENG Z, GARRETT CR, SHEN Y, et al. Prospective randomised evaluation of traditional Chinese medicine combined with chemotherapy: a randomised phase Ⅱ study of wild toad extract plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinomas[J]. Br J Cancer, 2012, 107(3): 411－416.
[14] WANG J, CAI H, LIU QL, et al. Cinobufacini Inhibits Colon Cancer Invasion and Metastasis via Suppressing Wnt / β－Catenin Signaling Pathway and EMT[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(3): 703－718.
[15] WEI XL, SI N, ZHANG YF, et al. Evaluation of Bufadienolides as the Main Antitumor Components in Cinobufacin Injection for Liver and Gastric Cancer Therapy[J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0169141.
[16] KONG WS, SHEN FX, XIE RF, et al. Bufothionine induces autophagy in H22 hepatoma－bearing mice by inhibiting JAK2 / STAT3 pathway, a possible anti－cancer mechanism of cinobufacini[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 270: 113848.
[17] ZHU ZT, LI EZ, LIU YY, et al. Inhibition of Jak－STAT3 pathway enhances bufalin－induced apoptosis in colon cancer SW620 cells[J]. World J Surg Oncol, 2012, 10: 228.
[18] WU XY, TIAN F, SU MH, et al. BF211, a derivative of bufalin, enhances the cytocidal effects in multiple myeloma cells by inhibiting the IL－6 / JAK2 / STAT3 pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2018, 64: 24－32.
[19] 李菲菲，张祉薇，于宏杰，等. STAT3 在结直肠癌发生发展中的作用机制[J]. 中国细胞生物学学报，2021，43(1)：93－102.
[20] 陈婷婷，刘　伟，武　伟，等. c－Met 抑制剂联合氟尿嘧啶对结直肠癌细胞 SW620 增殖及凋亡的影响[J]. 山东医学高等专科学校学报，2021，43(1)：13－15.
[21] QI FH, WANG JJ, ZHAO L, et al. Cinobufacini inhibits epithelial－mesenchymal transition of human hepatocellular carcinoma cells through c－Met / ERK signaling pathway[J]. Biosci Trends, 2018, 12(3): 291－297.
[22] QIAN LQ, SU HY, WANG G, et al. Anti－tumor Activity of Bufalin by Inhibiting c－MET Mediated MEK / ERK and PI3K / AKT Signaling Pathways in Gallbladder Cancer[J]. J Cancer, 2020, 11(11): 3114－3123.
[23] SHENG X, ZHU PF, ZHAO Y, et al. Effect of PI3K / AKT / mTOR Signaling Pathway on Regulating and Controlling the Anti－Invasion and Metastasis of Hepatoma Cells by Bufalin[J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2021, 16(1): 54－65.
[24] CAO F, GONG YB, KANG XH, et al. Degradation of MCL－1 by bufalin reverses acquired resistance to osimertinib in EGFR－mutant lung cancer[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2019, 379: 114662.
[25] KANG XH, XU ZY, GONG YB, et al. Bufalin Reverses HGF－Induced Resistance to EGFR－TKIs in EGFR Mutant Lung Cancer Cells via Blockage of Met / PI3k / Akt Pathway and Induction of Apoptosis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 243859.
[26] ZHANG XJ, LIU T, ZHANG YD, et al. Elucidation of the Differences in Cinobufotalin's Pharmacokinetics Between Normal and Diethylnitrosamine－Injured Rats: The Role of P－Glycoprotein[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 521.

（收稿日期：2021－08－05；修回日期：2022－05－14）