肿瘤精准医学与转化研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.003767

基于网络药理学与16S rDNA测序的探究:中药通关藤对结肠炎相关结直肠癌小鼠模型的干预作用及机制研究

魏　颖,张　杰,孙佳鑫,刘　刚,苏丽娅
（内蒙古医科大学附属医院临床医学研究中心,呼和浩特　010050）

【摘　要】**目的:**研究中药通关藤对结肠炎相关结直肠癌(colitis-associatedcolon cancer,CAC)的干预及其活性作用机制。**方法:**运用高分辨质谱结合精确质量数数据库对通关藤化学成分进行鉴定,同时运用网络药理学方法,筛选当其的主要活性成分和治疗结直肠癌(colorectal cancer,CRC)的相关靶点,对其抗CRC作用机制进行研究。同时构建CAC小鼠模型,考察通关藤对CAC小鼠疾病活动指数(disease activity index,DAI)、体质量、结直肠形态以及血清TNF-α、IL-1β水平的影响。利用16S rDNA测序技术,揭示其对小鼠肠道微生物群落多样性的影响。**结果:**质谱鉴定出通关藤中50个成分,网络药理学匹配得到37个活性成分,检索出与CRC有关靶点313个。共得到958条GO条目和173条KEGG条目,与通关藤相关度较高主要包括炎症、氧化应激、癌症等相关通路。造模后各组小鼠分别出现了腹泻、便血、脱肛、消瘦等表现,各DSS循环后模型组DAI评分均升高,第一、二、三循环后通关藤组能降低造模后小鼠的DAI评分(P=0.007、P<0.001、P<0.001)。同时,与模型组相比,通关藤组小鼠结直肠长度增长,肠体肿胀减轻,上皮细胞结构相对完整,炎性细胞减少,杯状细胞增多,不典型增生减少,TNF-α、IL-6水平降低(P<0.001、P=0.002)。通关藤组小鼠的肠道微生物丰富度和多样性下降,通关藤组与模型组相比,Bacteroides的相对丰度降低,Muribaculaceae和Clostridia-UCG-014的相对丰度增加(P=0.002、P=0.009)。**结论:**通关藤具有干预CAC小鼠结直肠癌的作用,其作用机制可能与其调节炎癌相关作用通路及改变肠道微生物群多样性有关。

【关键词】通关藤;结肠炎相关结直肠癌;网络药理;肠道微生物;16S核糖体DNA
【中图分类号】R285　　【文献标志码】A

Intervention effect and mechanism of Chinese herbal medicine *Marsdenia tenacissima* on a mouse model of colitis-associated colorectal cancer: a study based on network pharmacology and 16S rDNA sequencing

Wei Ying, Zhang Jie, Sun Jiaxin, Liu Gang, Su Liya
(*Clinical Medical Research Center of The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical University*)

【**Abstract**】***Objective***: To investigate the intervention effect and active mechanism of traditional Chinese medicine *Marsdenia tenacissima* on colitis-associated colorectal cancer (CAC). ***Methods***: High-resolution mass spectrometry and a precise mass number database were used to identify the chemical components of *Marsdenia tenacissima*, and network pharmacology methods were used to obtain the main active components and targets of *Marsdenia tenacissima* in the treatment of colorectal cancer (CRC) and analyze its mechanism of action against CRC. A mouse model of CAC was established, and then *Marsdenia tenacissima* was analyzed in terms of its effect on disease activity index (DAI), body mass, colorectal morphology, and serum levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-1β (IL-1β) in CAC mice. Furthermore, 16S rDNA sequencing technique was used to assess the impact of *Marsdenia tenacissima* on the diversity of intestinal microbiota in mice. ***Results***: A total of 50 components were identified by mass spectrometry, and 37 active components were identified by network pharmacology. Furthermore, 313 targets related to CRC were identified. A total of 958 GO terms and 173 KEGG terms were obtained, among which inflammation, oxidative stress, and cancer pathways showed a relatively high degree of association with *Marsdenia tenacissima*. After modeling, the mice in each group had the manifestations such as diarrhea, bloody

作者介绍:魏　颖,Email:weimozhuo@163.com,
研究方向:中医药治疗重大疾病创新药物研究。
通信作者:苏丽娅,Email:suliya2307@hotmail.com。
基金项目:内蒙古自治区教育厅高校创新团队资助项目(编号:NMGIRT2225);内蒙古医科大学附属医院博士启动金资助项目(编号:2022NYFYBS012);内蒙古自治区"草原英才"工程青年创新人才资助资金资助项目(编号:060175)。
优先出版:https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250220.1656.005
(2025-02-21)

stool, prolapse of anus, and weight loss, and the model group had a significant increase in DAI score after each DSS cycle, while the *Marsdenia tenacissima* group had a significant reduction in DAI score of the model mice after the first, second, and third cycles (P=0.007, P<0.001, and P<0.001). In addition, compared with the model group, the *Marsdenia tenacissima* group had a significant increase in colorectal length, alleviation of intestinal swelling, a relatively intact structure of epithelial cells, a reduction in inflammatory cell infiltration, a significant increase in goblet cells, a reduction in atypical hyperplasia, and significant reductions in the levels of TNF-α and IL-6 in CAC mice (P<0.001 and 0.002). The *Marsdenia tenacissima* group had significant reductions in the abundance and diversity of intestinal microbiota, and compared with the model group, the *Marsdenia tenacissima* group had a significant reduction in the relative abundance of Bacteroides and significant increases in the relative abundances of Muribaculaceae and Clostridia-UCG-014 (P=0.002 and 0.009). ***Conclusion***: *Marsdenia tenacissima* exerts an intervention effect on colorectal cancer in CAC mice, possibly by regulating the pathways associated with inflammation and cancer and altering the diversity of intestinal microbiota.

【Key words】*Marsdenia tenacissima*; colitis-associated colon cancer; network pharmacology; intestinal microbiota; 16S ribosomal DNA

结直肠癌（colorectal cancer, CRC）是常见的消化道恶性肿瘤，其发病率已经位于癌症的第3位，死亡人数已经跃升至第2位[1]。其中，炎症相关性结直肠癌（colitis-associatedcolon cancer, CAC）约占CRC发病的5%[2]。CAC是由肠道内慢性炎症反复发作发展而来的，是炎症性肠病患者死亡的主要原因之一[3-5]。而慢性炎症是公认的致癌因素。中医药在治疗炎性疾病方面有独特优势，同时在抑制癌症术后复发、降低化疗药物的毒副作用以及提高生活质量延长生存时间方面都有较好的干预作用[6-7]。中药通关藤是萝藦科植物通关藤 *Marsdenia tenacissima*（Roxb.）Wight et Arn. 的干燥藤茎，其味苦，性微寒，民间常被用于治疗哮喘、咽炎、肺炎、风湿病[8]。其具有确切的抗肿瘤、抗炎、平喘、降压以及免疫调节等药理作用[9-12]。以其提取物作为原料的上市药物“消癌平”目前已被临床广泛用于治疗消化道癌与肺癌[13-15]。

近年来，网络药理学和16S rDNA测序技术助力中药研究。鉴于此，本研究将采用网理学预测和16S rDNA测序分析的方式，综合评价传统中药通关藤在干预CAC小鼠炎癌转化的过程中潜在药效作用机制。旨在为通关藤的临床使用提供借鉴，并为其进一步推广打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF级雄性C57BL/6小鼠30只，体质量25~30 g，8周龄，购自斯贝福生物技术有限公司，生产许可证号：SCXK（京）2019-0010，质量合格证号：No.110324241101560734。动物实验经内蒙古医科大学附属医院伦理委员会批准，伦理审查号：NO.WZ（2023067）。符合《涉及人的生物医学研究国际伦理准则》和《赫尔辛基宣言》要求。

1.1.2 药品与试剂 通关藤片（消癌平片）（国药准字Z20054951，批号220401）购自吉林京辉药业股份有限公司；偶氮甲烷（Azoxymethane, AOM，货号A5486，批号1003483802）购自美国Sigma-Aldrich公司；葡聚糖硫酸钠盐（Dextran sulfate sodium salt, DSS，货号160110，批号S7980）购自美国MP Biomedicals公司。甲醇、乙腈和甲酸均购自Fisher Scientific公司，质谱级。便隐血试纸购自上海优利医疗科技有限公司；大便隐血检测试纸条（批号2400458，上海源叶生物有限公司）；TNF-α ELISA试剂盒、IL-1β ELISA（批号H211221-008a）试剂盒，均购自北京欣博盛生物有限公司。

1.1.3 仪器设备 BSA2202S型电子天平，德国赛多利斯公司；BSA224S-CW分析型天平，德国赛多利斯公司；TDL-5-A型低速台式离心机，上海安亭科学仪器厂；ABS PLUS型酶标仪，美国Mo-lecular Devices公司；3KL5型台式高速冷冻离心机，德国sigma公司；ULTS1490型-80 ℃冰箱，赛默飞世尔仪器有限公司。Q-TOF高分辨质谱仪，美国沃特世公司。

1.2 方法

1.2.1 精确质量数据库通关藤化学成分鉴定

1.2.1.1 样品前处理方法 准确称量方剂样品，用80%甲醇超声提取30 min，配置成10 mg/mL溶液14 000 r/min离心10 min取上清，待测。

1.2.1.2 色谱和质谱条件 色谱：UPLC HSS T3色谱柱（100×2.1 mm, 1.8 μm）。流动相：0.1%甲酸水（A）-0.1%甲酸乙腈（B），梯度洗脱，（0~1.5 min, 0%~0%；1.5~70 min, 0%~100%；70~72 min, 100%~100%）；流速0.25 mL/min；柱温度为40 ℃；进样量为10 μL，紫外检测波长210~400 nm全波长扫描。

质谱：电喷雾离子源（electric spray ion source, ESI）；正负离子扫描；细管电压正离子3.0 kV，负离子2.0 kV；锥孔气和脱溶剂气流量分别设置为50 L/H和800 L/H；源温度和脱溶温度分别设定为正离子120 ℃和500 ℃负离子120 ℃和350 ℃；锥孔电压正离子40 V负离子20 V；扫描范围m/z 50~

1 500。

1.2.2 网络药理学

1.2.2.1 通关藤的活性成分及作用靶点筛选 采用质谱分析通关藤化学成分，通过TCMSP、SYMMAP和TCMIP数据库辅助筛选，其中TCMSP基于口服生物利用度≥30%和类药性≥0.18选取活性成分。利用Swiss Target Prediction和Pharm Mapper获取活性成分对应的蛋白靶点，经UniProt数据库统一命名后，剔除无对应基因的靶点。将筛选结果整合后导入Cytoscape 3.9.1构建网络图，并使用Cytohubba插件识别核心活性成分。

1.2.2.2 CRC潜在靶点的获取 在OMIM（https://omim.org/）、Gene Cards（https://www.genecards.org）、TTD（http://db.idrblab.net/ttd）、DisGeNE（https://www.disgenet.org/）、Drugbank（https://www.drugbank.com/）等数据库以“Colorectal cancer”为关键词检索，将得到的基因进行整合。

1.2.2.3 筛选共同靶点 将药物与疾病获得的相关靶点输入Venny 2.0.1（https://bioinfogp.cnb.csic.es /tools/venny/index.html）平台，绘制Venn图，获得共同靶点。

1.2.2.4 蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络的构建 将共同靶点数据上传至STRING数据库（https://string-db.org/），物种选择设置为“Homo sapiens”，“minimum required interaction score”设为0.90，将获得数据导入Cytoscape，获得PPI网络图。并通过Cytohubba插件，基于最大集团中心性（maximal clique centrality，MCC）算法进行拓扑分析，获得核心作用蛋白靶点。

1.2.2.5 基因本体（gene ontology，GO）功能和京都基因与基因组百科全书（Kyoto encyclopedia of genes and genomes，KEGG）通路富集分析 通过DAVID数据库对靶点进行GO富集和KEGG通路分析，检验水准α=0.05。依托于生物信息学云平台（http://www.bioinformatics.com.cn/）绘制结果图。

1.2.2.6 分子对接 通过TCMSP数据库及PubChem数据库得到小分子mol2格式文件，通过PDB数据库（https://www.rcsb.org/）下载大分子靶蛋白的3D结构，运用PyMOL软件对蛋白质进行去水、加氢等操作，保存为pdb格式，再经过AutoDock Tools 1.5.6软件和Autodock Vina 1.1.2软件进行分子对接，通过两者结合能来评价其结合活性，并利用PyMol软件进行作图分析。

1.2.3 通关藤治疗CAC小鼠药效作用研究

1.2.3.1 实验药物的制备 通关藤根据人和动物间体表面积折算的等效剂量关系计算小鼠给药剂量为1.35 g/（kg·d）。将通关藤片粉碎后过200目筛，精密称取药粉3.0 g，将其溶解于20 mL饮用水中，超声溶解，功率350 W，提取3 min，现用现配，灌胃前充分摇匀。

1.2.3.2 动物饲养与分组 30只SPF级C57BL/6小鼠饲养于内蒙古医科大学实验动物中心[许可证号：SYXK（蒙）2015-0001]，室温22 ℃，湿度50%，SPF级，通风环境良好，12 h光照。适应性饲养7 d后，依据体质量通过随机数字表法分为正常对照组、模型、通关藤组，每组各10只。

1.2.3.3 动物模型的建立与干预处理 实验开始时，各组小鼠均于腹腔注射12.5 mg/kg的AOM，7 d后饲喂2.5% DSS饮用水，连续7 d，第3~4周给予常规饮用水，此为1个循环。3个循环结束后恢复常规饮用水[16]。各组小鼠从第7天开始中药干预处理，通关藤每日每只灌胃200 μL。

1.2.3.4 疾病活动指数（disease activity index，DAI）的评估与生存率统计 实验过程中对小鼠一般情况进行记录，包括小鼠精神状态、活动度、饮食情况、毛发色泽、脱肛现象等。每2日记录1次小鼠体质量、便血情况、大便性状，根据评分标准计算DAI分值[17]，评分标准见表1。DAI分值=（体质量下降率分+便血分+大便性状分）/3。

表1 DAI评分标准

体质量下降（%）	大便性状	大便隐血/肉眼血便	计分
0	正常	正常	0
1~	松散	隐血阳性	1
>5~			2
>10~	稀便	肉眼便血	3
>15			4

注：大便性状中，正常大便：成型大便；松散大便：不黏附于肛门的糊状、半成型大便；稀便：可黏附于肛门的稀水样大便

1.2.3.5 小鼠血清TNF-α、IL-1β水平测定 实验结束后，对小鼠进行心脏取血，将全血室温下静置30 min，离心机4 000 r/min，离心10 min，而后取血清根据试剂盒说明书进行水平测定，每个指标需要100 μL血清。

1.2.3.6 结直肠长度、瘤体数目测量 实验结束时，取小鼠结直肠组织沿肠系膜纵切至盲肠处，用预冷的PBS冲洗掉肠内容物，迅速测量结直肠长度，计数肿瘤数目。

1.2.3.7 HE染色 本研究选取肛门上3 cm处的直肠部位固定于10%福尔马林中，石蜡包埋，用切片机切成4 μm的蜡片，浸泡于二甲苯中脱蜡，用苏木精-伊红染色，脱水封片后，在光学显微镜下观察组织的病理学改变。

1.2.4 肠道微生物多样性研究

1.2.4.1 样品采集、预处理 给药结束后，采用无菌管收集各组小鼠新鲜粪便，-80 ℃冻存。

1.2.4.2 16SV4扩增子测序 该部分由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.3 统计学方法

数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析，数据结果以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，组间数据采用单因素方差分析。数据图利用GraphPad Prism 8软件绘制。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 基于精确质量数数据库通关藤化学成分鉴定

在通关藤中，通过Unifi系统与清华大学药物平台通关藤自建数据库的匹配鉴定，数据库经过对其精确质量数、二级碎片等数据进行比对，共匹配出50个化合物，主要包含C21甾体苷类成分，表2所示。

表2 通关藤主要化学成分列表

序号	化合物名称	分子式	精确相对分子质量（Da）	实际相对分子质量（m/z）
1	11-O-异丁酰基-12-O-乙酰基通关藤苷元B-3-O-茯苓二糖基	$C_{41}H_{64}O_{14}$	780.429 6	803.420 3
2	11α-O-（2-Methylbutyryl）-12β-O-acetyltenacigenin B	$C_{28}H_{42}O_{7}$	490.293 1	491.299 1
3	11α-O-Tigloyl-12β-O-acetyltenacigenin B	$C_{28}H_{40}O_{7}$	488.277 4	489.286 0
4	D-(+)-纤维四糖	$C_{24}H_{42}O_{21}$	666.221 9	665.213 0
5	Marsdenoside A	$C_{45}H_{70}O_{14}$	834.476 6	857.468 3
6	Marsdenoside B	$C_{45}H_{68}O_{14}$	832.460 9	855.452 4
7	Marsdenoside C	$C_{47}H_{68}O_{14}$	856.460 9	857.460 0
8	Marsdenoside D	$C_{40}H_{64}O_{13}$	752.434 7	775.425 4
9	Marsdenoside E	$C_{40}H_{62}O_{14}$	766.414 0	789.406 4
10	Marsdenoside F	$C_{39}H_{60}O_{14}$	752.398 3	775.385 9
11	Marsdenoside G	$C_{40}H_{62}O_{13}$	750.419 0	773.406 6
12	Marsdenoside H	$C_{48}H_{76}O_{19}$	956.498 1	979.489 1
13	Marsdenoside I	$C_{35}H_{56}O_{12}$	668.377 2	667.368 3
14	Marsdenoside K	$C_{50}H_{72}O_{19}$	976.466 8	977.471 4
15	Marstenacigenin B	$C_{35}H_{44}O_{8}$	592.303 6	591.300 8
16	Marstenacisside A1	$C_{48}H_{76}O_{19}$	956.498 1	955.490 8
17	Marstenacisside A2	$C_{48}H_{74}O_{19}$	954.482 4	953.476 8
18	Marstenacisside A4	$C_{51}H_{80}O_{20}$	1 012.524 3	1 011.516 9
19	Marstenacisside A6	$C_{51}H_{78}O_{19}$	994.513 7	993.509 4
20	Marstenacisside A7	$C_{53}H_{78}O_{19}$	1 018.513 7	1 017.491 7
21	Marstenacisside B1	$C_{59}H_{86}O_{25}$	1 194.545 8	1 193.541 3
22	Marstenacisside B2	$C_{54}H_{86}O_{24}$	1 118.550 9	1 141.541 4
23	Marstenacisside B3	$C_{54}H_{84}O_{24}$	1 116.535 3	1 139.525 4
24	Marstenacisside B6	$C_{59}H_{88}O_{24}$	1 180.566 6	1 181.578 4
25	Marstenacisside B7	$C_{59}H_{86}O_{24}$	1 178.550 9	1 179.561 2
26	Marstenacisside B8	$C_{59}H_{88}O_{24}$	1 180.566 6	1 179.546 1
27	Marstenacisside C	$C_{54}H_{92}O_{26}$	1 156.587 7	1 155.581 1
28	Tenacigenoside A	$C_{35}H_{56}O_{12}$	668.377 2	667.368 6
29	白桦脂酸	$C_{30}H_{46}O_{3}$	454.344 7	453.337 7
30	半乳糖醇	$C_{6}H_{14}O_{6}$	182.079 0	181.071 7
31	大叶牛奶菜苷乙	$C_{49}H_{76}O_{17}$	936.508 3	959.494 2
32	苦绳苷元	$C_{28}H_{40}O_{7}$	488.277 4	511.266 6
33	绿原酸	$C_{16}H_{18}O_{9}$	354.095 1	377.084 1
34	通关苷元	$C_{26}H_{40}O_{6}$	448.282 5	471.270 8
35	通关藤苷A	$C_{48}H_{74}O_{19}$	954.482 4	955.488 1
36	通关藤苷C	$C_{53}H_{76}O_{19}$	1 016.498 1	1 017.505 7
37	通关藤苷F	$C_{35}H_{56}O_{12}$	668.377 2	691.366 6
38	通关藤苷M	$C_{44}H_{74}O_{17}$	874.492 6	873.485 6
39	通关藤苷G	$C_{42}H_{64}O_{14}$	792.429 6	815.420 1
40	通关藤苷H	$C_{42}H_{66}O_{14}$	794.445 3	817.435 6
41	通关藤苷I	$C_{44}H_{62}O_{14}$	814.414 0	815.419 6
42	通关藤苷元B	$C_{21}H_{32}O_{5}$	364.225 0	365.232 7
43	通关藤新苷C	$C_{42}H_{66}O_{14}$	794.445 3	793.437 8
44	通关藤皂苷B	$C_{51}H_{78}O_{19}$	994.513 7	1 017.506 1
45	通关藤皂苷D	$C_{51}H_{80}O_{19}$	996.529 4	1 019.522 4
46	通关藤皂苷E	$C_{53}H_{78}O_{19}$	1 018.513 7	1 017.491 4
47	通光藤苷元丙	$C_{21}H_{34}O_{6}$	382.235 5	383.243 1
48	通光藤苷元乙	$C_{21}H_{32}O_{5}$	364.225 0	387.213 9
49	西索苷元	$C_{21}H_{34}O_{5}$	366.240 6	389.232 0
50	香豆酸	$C_{9}H_{8}O_{2}$	148.052 4	147.045 4

2.2 活性成分、靶点及CRC靶点的筛选

通关藤成分分析得到50个活性成分，经TCMSP、SYMMAP、TCMIP、Pharm Mapper等数据库匹配到37个，筛选出541个靶点。利用Cytoscape构建通关藤活性成分-靶点网络图（图1A），包含581个节点（37个活性成分和541个靶点）及10 008条边。网络分析显示，前10位高度连接（度值>289）的活性成分主要作用于390个靶点。经OMIM、GeneCards数据库比对，筛选出13 685个CRC相关靶点，与通关藤核心靶点交集得313个（图1B）。

2.3 通关藤治疗CRC潜在靶点的PPI网络

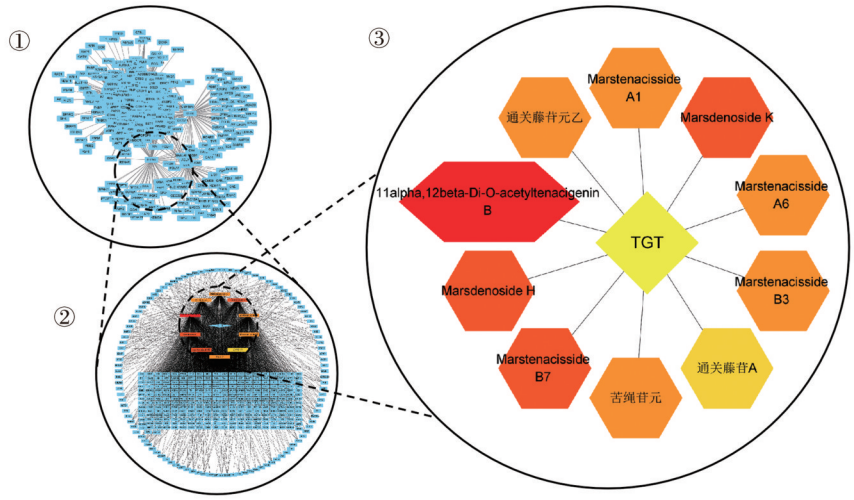
通过STRING数据库对313个交集靶点进行PPI网络分析（物种为“Homo sapiens”，置信度>0.4），构建了通关藤-CRC靶点PPI网络（图1C）。网络显示313个靶标间存在3 685项相互作用，平均局部聚类系数为0.45，PPI富集P值<1.0×10^{-16}。利用Cytoscape及Cytohubba插件的MCC算法，筛选出前20个核心靶点（暖色表示重要性更大），包括ALB、AKT1、EGFR、SRC、HSP90AA1等，这些与通关藤治疗CRC的作用机制密切相关（图1C②③）。

2.4 通关藤干预CRC的GO功能和KEGG通路富集分析

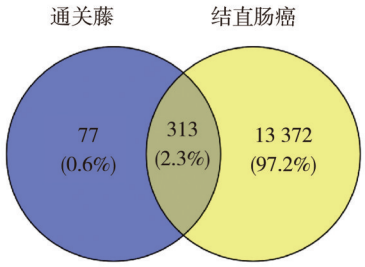
通过DAVID数据库对通关藤治疗CRC的313个靶点蛋白进行GO功能和KEGG通路富集分析，筛选条件为P<0.05。共获得958条GO条目，包括684条BP、79条CC和195条MF，前10名条目如图2A所示。KEGG通路富集分析得到173条通路，与通关藤高度相关的前20条通路涉及炎症、氧化应激和癌症等，见图2B。

2.5 分子对接验证

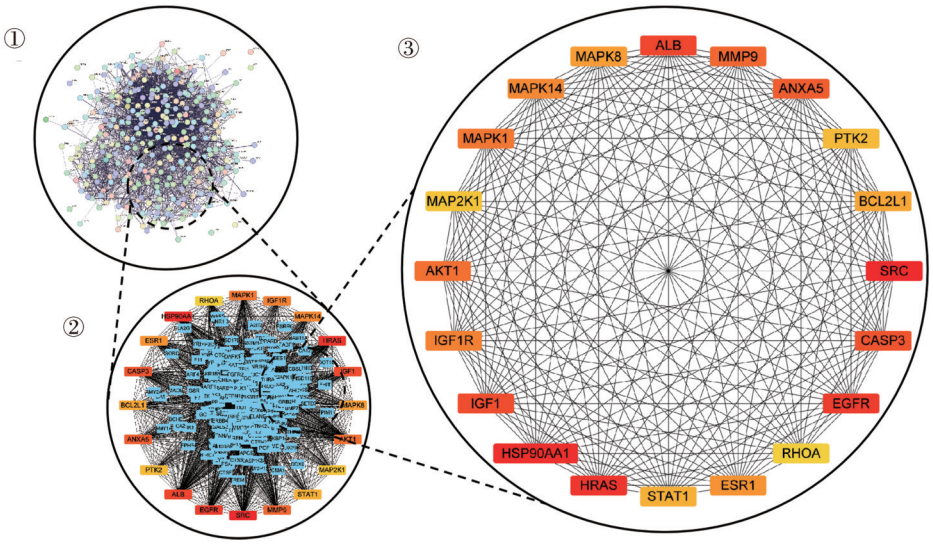
利用AutoDock Tools 1.5.6对PPI网络中筛选的关键靶点蛋白与度值最高的3个主要活性成分进行了分子对接。结合能计算结果显示，所有对接的活性成分与靶点蛋白的结合能均小于-7.0 kJ/mol，表明它们具有很强的对接活性，见表3。其中，结合能最低的6对结果已通过PyMOL进行了可视化展示，见图3。



A. 活性成分、靶点筛选

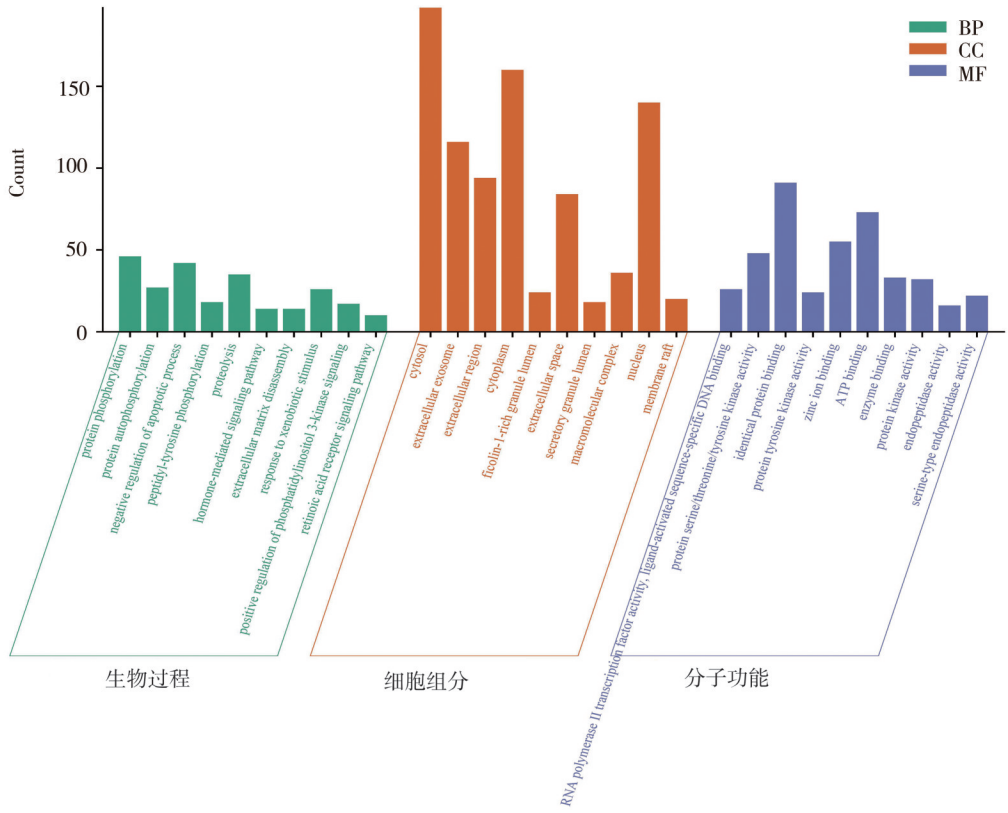


B. 通关藤-结直肠癌韦恩图

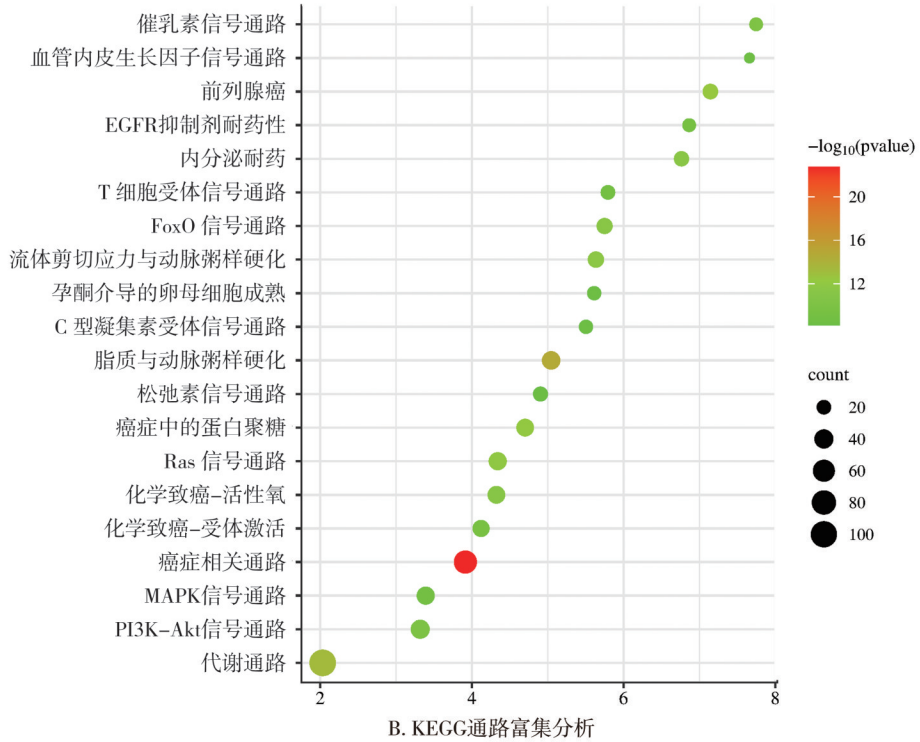


C. PPI网络图

图1 通关藤网络药理学



A. GO功能富集分析



B. KEGG通路富集分析

图2　通关藤治疗CRC富集分析

2.6　通关藤改善小鼠生CAC

计算各组小鼠的疾病活动指数（disease activity index，DAI），发现造模小鼠在第4天出现粪便潜血阳性，第5天出现腹泻或血便。模型组小鼠造模后活动度降低，毛色失去光泽，体质量显著下降，并出现便溏、便血、脱肛等症状，DAI明显升高，模型建立成功[18]。通关藤治疗组小鼠的这些症状得到缓解，体质量上升（给药1周后P=0.003）（图4A）。在3个造模循环中，通关藤组小鼠的DAI分值较模型组明显降低（P=

表3　主要活性成分与相应关键靶点分子对接结果

蛋白简称	Uniport ID	化合物	结合能（kJ/mol）
SCR1	P12931	11α12β-Di-O-acetyltenacigenin-B	-14.3
		Marsdenoside-H	-13.5
		Marstenacisside-B7	-16.8
HSP90AA1	P07900	11α12β-Di-O-acetyltenacigenin-B	-14.2
		Marsdenoside-H	-12.4
		Marstenacisside-B7	-15.2
EGFR	P00533	11α12β-Di-O-acetyltenacigenin-B	-12.7
		Marsdenoside-H	-12.8
		Marstenacisside-B7	-13.9
CASP3	P42574	11α12β-Di-O-acetyltenacigenin-B	-11.3
		Marsdenoside-H	-11.8
		Marstenacisside-B7	-11.9
AKT1	P31749	11α12β-Di-O-acetyltenacigenin-B	-13.9
		Marsdenoside-H	-13.9
		Marstenacisside-B7	-14.8
PTK2	Q05397	11α12β-Di-O-acetyltenacigenin-B	-13.1
		Marsdenoside-H	-12.8
		Marstenacisside-B7	-13.7

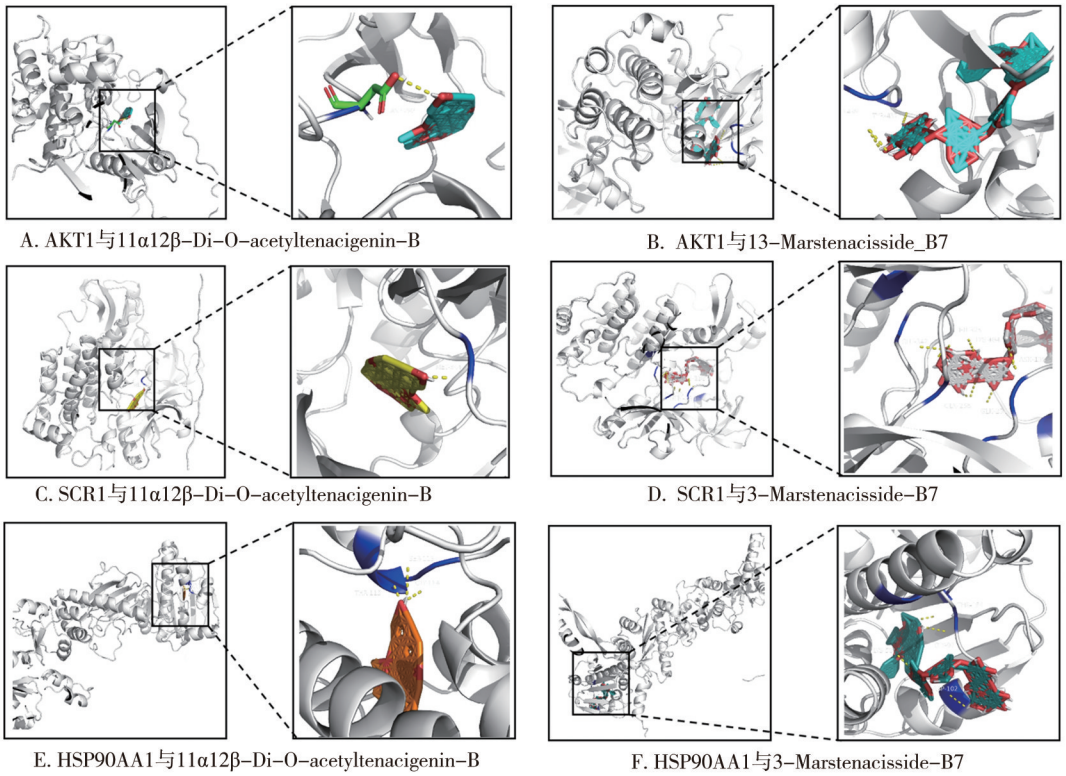


图3　主要活性成分与相应关键靶点分子对接图

0.007、P<0.001、P<0.001），且随时间推移，其DAI分值逐渐减小，见表4。实验过程中，模型组小鼠在第2轮饲喂DSS后开始出现死亡，实验结束时存活率为60%；而通关藤组小鼠则在第3轮出现死亡，存活，率高达80%，表明通关藤治疗能明显延长CAC模型小鼠的生存时间。

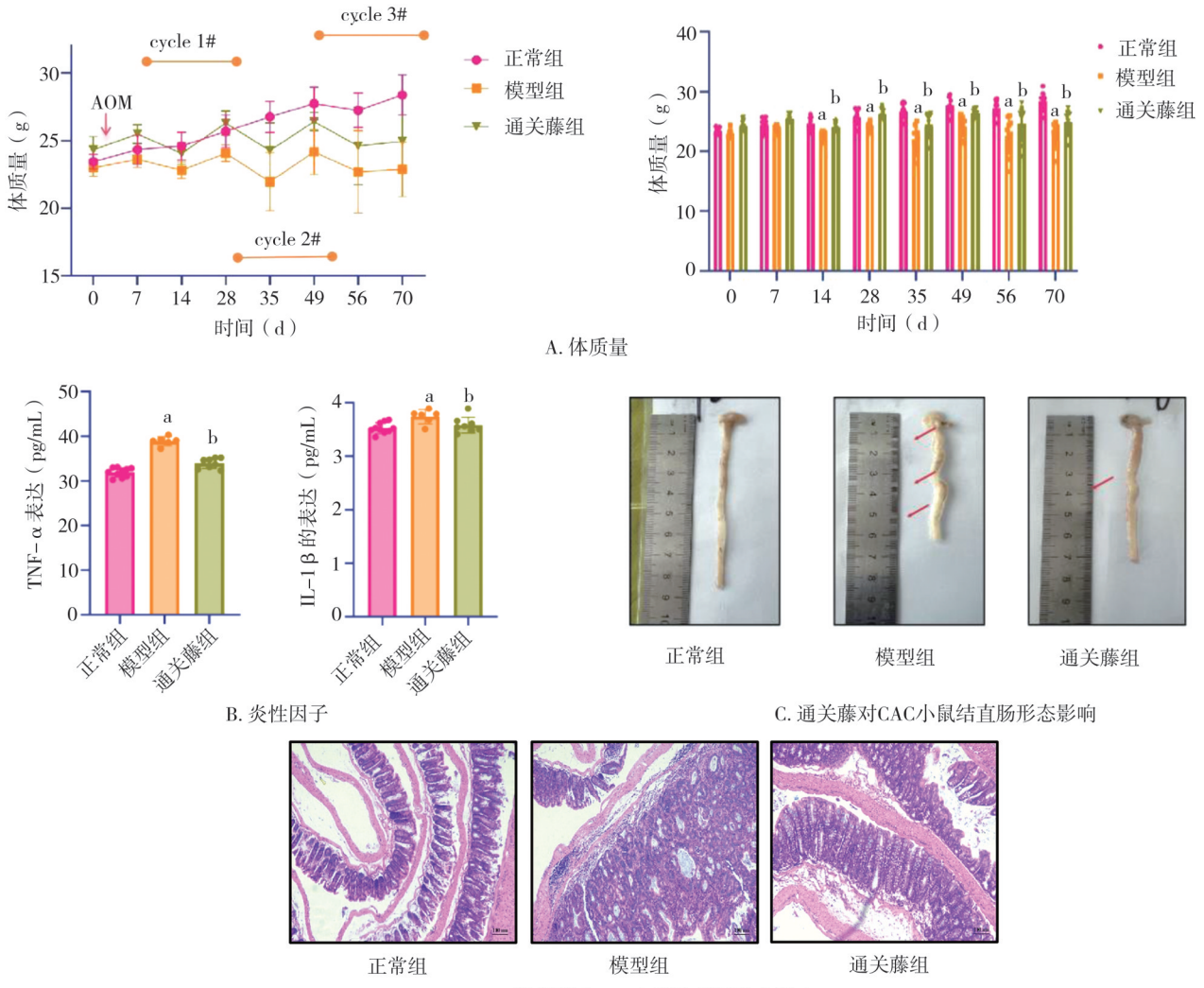
2.7　通关藤对CAC小鼠结直肠的影响

实验结果显示，如图4C，与正常组相比，模型组小鼠的结直肠长度明显缩短（P=0.002），并伴有明显的肠体肿胀、肿瘤和肠道内出血，模型建立成功[18]。而在接受通关藤治疗后，小鼠的结直肠长度较模型组有所增加，且成瘤数量明显

表 4　通关藤对 CAC 小鼠炎性反应相关性肠癌 DAI 评分的影响（$\bar{x} \pm s$）

分组	n	循环 1	循环 2	循环 3
正常组	10	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组	6	2.40 ± 0.58[a]	3.00 ± 0.42[a]	3.11 ± 0.17[a]
通关藤组	8	1.77 ± 0.16[b]	1.38 ± 0.42[b]	1.96 ± 0.68[b]

注：a，与正常组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01



注：a，与正常组比较，P<0.01；b，与模型组比较，P<0.01

图 4　通关藤对 CAC 小鼠相关体征影响（n=3）

减少（P=0.003 6）。通过 HE 染色观察（图 4D），模型组小鼠的结直肠肠黏膜上皮细胞表现出缺损，固有层隐窝变形、萎缩，甚至消失，同时出现大量炎性细胞浸润、杯状细胞减少以及腺体不典型增生，模型建立成功[18]。而通关藤组小鼠则表现出相对完整的上皮细胞结构，炎性细胞明显减少，杯状细胞增多，不典型增生也有所减少。此外，血清炎性因子水平测定进一步证实（图 4B），通关藤能够明显降低模型组小鼠中明显升高的 TNF-α 和 IL-1β 水平（P<0.01），从而有助于改善 CAC 小鼠的炎性状态。这些结果共同表明，通关藤在治疗 CAC 小鼠模型中具有积极的抗炎和抗肿瘤作用。

2.8　通关藤对小鼠肠道菌群的影响

2.8.1　通关藤对小鼠肠道微生物多样性的影响　对 15 份粪便样品测序，获得 177 万余条高质量序列，平均每个样品约 10.9 万条，共发现 5 030 个 ASVs。图 5 显示，Chao1 和 Shannon 指数曲线趋于稳定，表明测序数据可靠。通关藤组 Chao1 指数较其他组明显降低（P<0.01），提示通关藤可能通过降低肠道微生物多样性来治疗 CAC。

主坐标分析（PCoA）揭示样本间的主要差异，基于

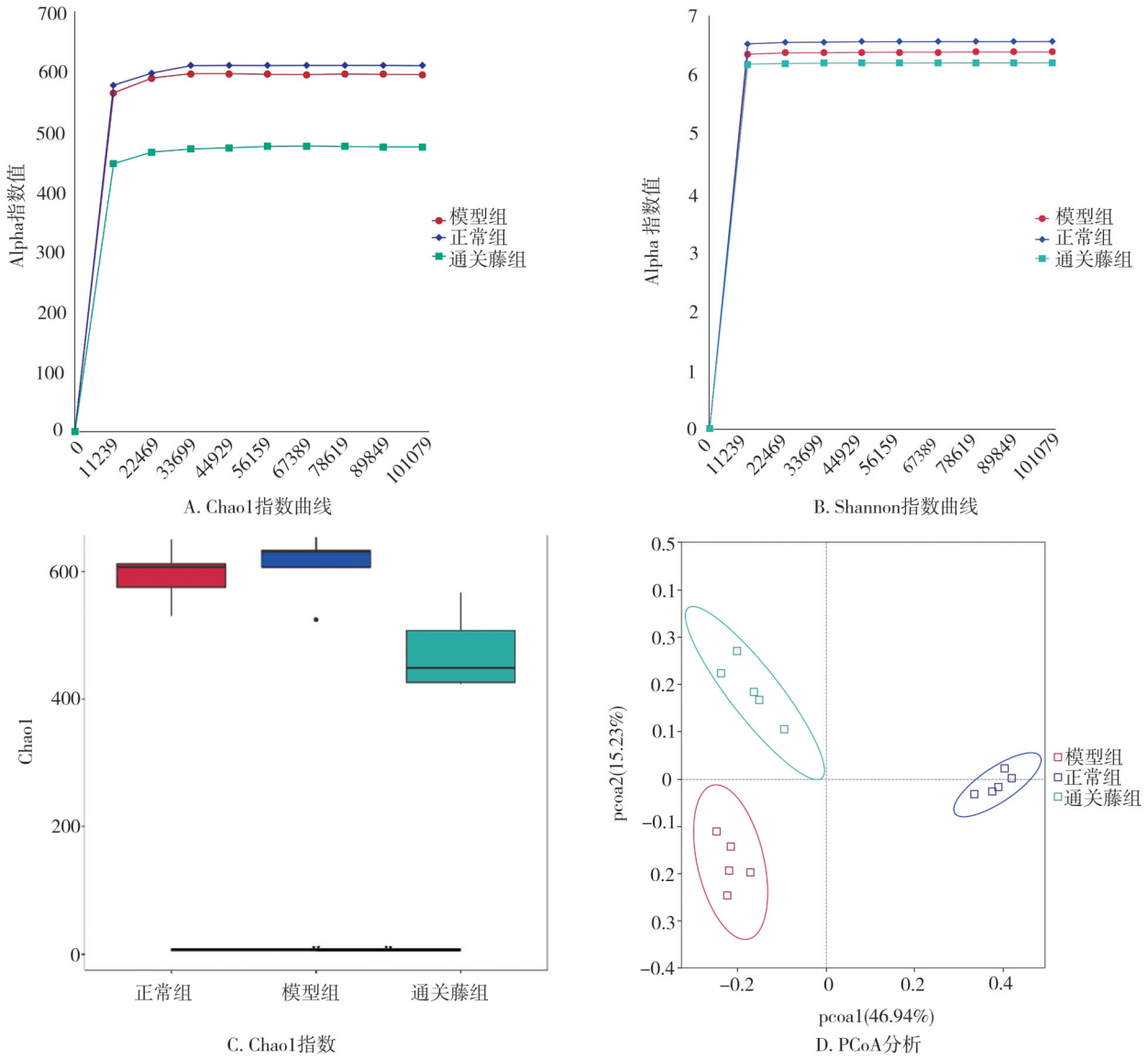
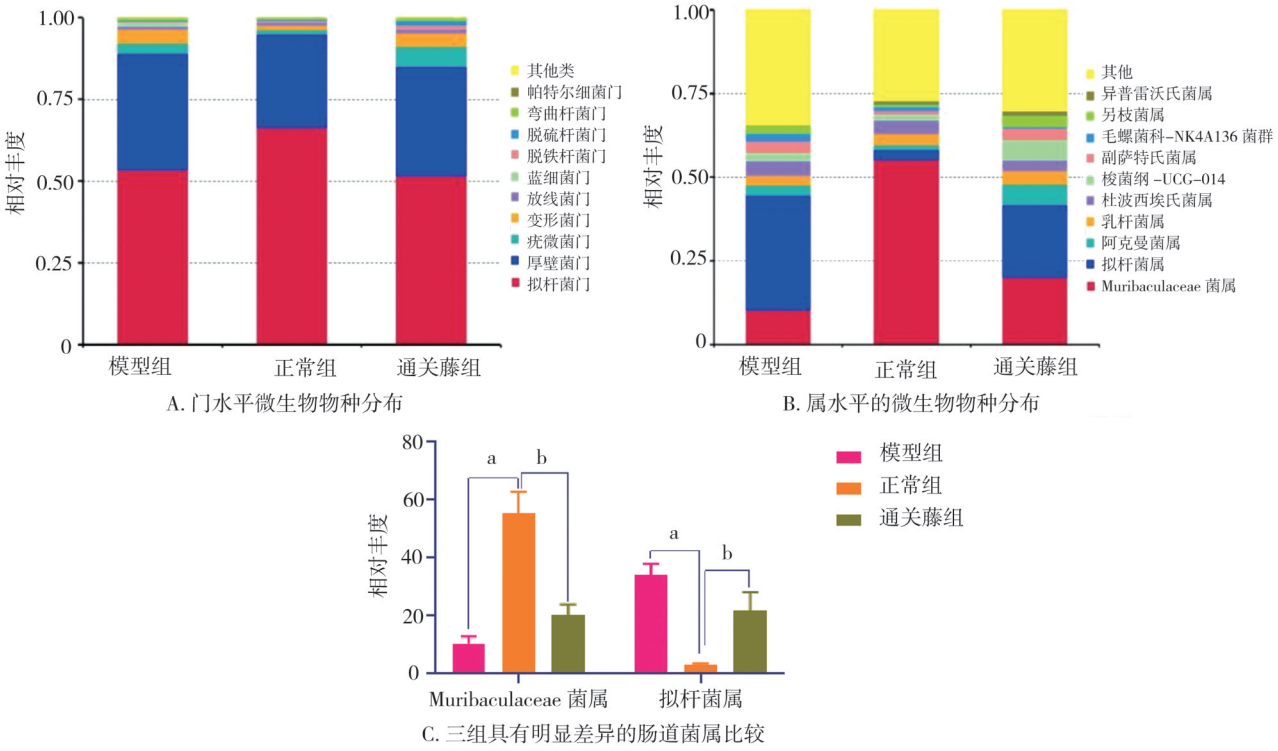


图5　各组小鼠组间的多样性分析（n=5）

Weighted 和 Unweighted unifrac 距离的分析显示，PC1 和 PC2 分别贡献了 15.23% 和 46.94% 的差异。通关藤组在 PCoA 图上更接近正常组，提示通关藤能调节 CAC 小鼠的肠道微生态。

2.8.2　通关藤对小鼠微生物物种组成的影响　如图 6A，模型组与正常组相比，拟杆菌门（Bacteroidota）相对丰度下降 12.93%，而厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）和疣微菌门（Verrucomicrobiota）分别增加 6.95%、3.00% 和 1.84%。通关藤组较模型组，厚壁菌门（Firmicutes）、变形菌门（Proteobacteria）和疣微菌门（Verrucomicrobiota）和 Bacteroidota 相对丰度分别减少 2.04% 和 1.99%，而 Verrucomicrobiota 增加 3.03%。在属水平（图 6B），模型组 Muribaculaceae 相对丰度较正常组下降 44.95%，而拟杆菌属（Bacteroides）和 Parasutterella 分别增加 31.13% 和 2.32%。通关藤组处理后，Bacteroides、毛螺菌属 NK4A136（Lachnospiraceae- NK4A136-group）组和杜氏杆菌（Dubosiella）属相对丰度分别减少 12.46%、1.79% 和 1.25%，而 Muribaculaceae、Clostridia-UCG-014 和阿克曼氏菌属（Akkermansia）分别增加 9.71%、3.60% 和 3.04%。特别地，模型组 Muribaculaceae 相对丰度远低于正常组，而通关藤提高了这一菌属的相对丰度；相反，Bacteroides 在模型组中高于正常组，通关藤降低了其相对丰度（图 6C）。综上，通关藤组的细菌组成更接近于对照组，差异菌属可能是其疗效的关键因素。

LEfSe 分析（图 7）（LDA≥4、P<0.05）显示，正常组 Muribaculaceae 为优势菌属，模型组以 Bacteroides 和 Lachnospiraceae-NK4A136-group 为主，通关藤组则优势于 Clostridia-UCG-014、Parasutterella 和 Alistipes。Lefse 分析进一步指出，模型组优势菌群为 Parasutterella 和 Bacteroides，而通关藤组增加了 Muribaculaceae 和 Clostridia-UCG-014 的丰度，并降低了 Bacteroides 的丰度。这些变化可能与通关藤治疗 CAC 作用相关。

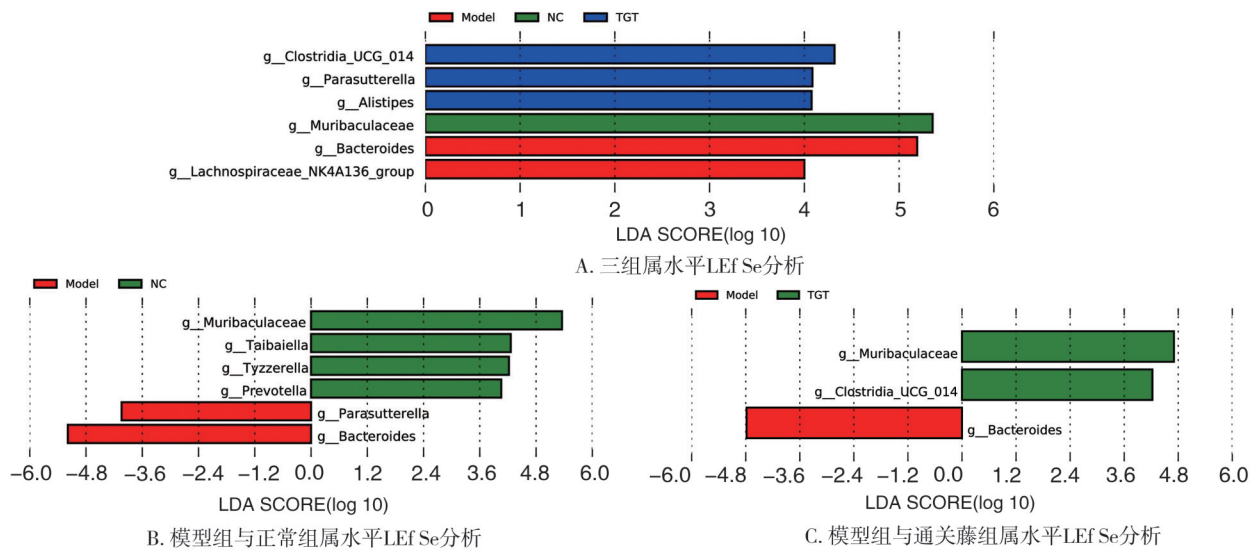


A. 门水平微生物物种分布　　B. 属水平的微生物物种分布

C. 三组具有明显差异的肠道菌属比较

注：a，与正常组比较，$P<0.01$，b，与模型组比较，$P<0.01$

图6　各组小鼠微生物物种分布（$n=5$）



A. 三组属水平LEf Se分析

B. 模型组与正常组属水平LEf Se分析　　C. 模型组与通关藤组属水平LEf Se分析

图7　LEf Se分析（$n=5$）

3　讨　论

通关藤传统药用历史悠久[19]，其化学成分主要包括孕甾烷衍生物等[20]，该类成分被认为是抗癌的主要活性成分[21]。网络药理学分析得到通关藤治疗CRC的313个潜在作用靶点，其中SRC、HSP90AA1、AKT1等基因的高表达与癌症进展紧密关联[22-25]。KEGG通路分析筛选出173条与通关藤抗CRC作用相关的通路，主要聚焦于癌症、代谢、PI3K-Akt、T细胞受体和VEGF等信号通路[26]。

本研究显示，通关藤能改善CAC小鼠的肠道症状，如便溏、便血、脱肛，减轻结直肠炎性病变，并抑

制肿瘤发展。同时，它能够通过降低TNF-α、IL-6等炎性因子，调节机体炎性水平。这一效果与肠道微生物群的改善直接相关[27]。Firmicutes和Bacteroidota为哺乳动物优势菌群，其比值（F/B）与肠道健康程度关联密切[28]。研究发现，模型组小鼠的F/B值升高，表明肠道菌群失衡。而通关藤组小鼠的F/B值回调，改善了肠道菌群紊乱。此外，通关藤组Verrucomicrobiota相对丰度增加，这类革兰氏阴性细菌存在于肠道粘膜内层，能分解多糖，产生短链脂肪酸，如丙酸和丁酸，对肠道健康和免疫系统有重要作用。它们有助于肠道葡萄糖稳态，并具抗炎特性，Akkermansia是其中的重要菌种。研究表明，Akkermansia能降低肠炎、肠癌风险。通关藤提高CAC小鼠Akkermansia丰度，与其缓解肠炎、肠癌症状相关。LEfSe分析显示，模型组Bacteroides和Lachnospiraceae-NK4A136-group丰度高于正常组，其中Bacteroides在CRC患者中丰度较高，是CRC的候选病原体[29-31]。Lachnospiraceae-NK4A136-group与肠道炎症正相关，并可能导致代谢紊乱、糖尿病和结肠癌[32]。通关藤能降低CAC小鼠中的Bacteroides和Lachnospiraceae-NK4A136-group的丰度，调节肠道菌群紊乱。此外，模型组Muribaculaceae丰度远低于正常组，该菌属对肠道能量代谢有益，被视为有益菌[33-34]。通关藤可缓解小鼠Muribaculaceae的降低，协同改善机体肠道菌群紊乱。

基于上述论断，研究证实通关藤具有抗CAC活性，其通过调节炎症、癌症信号通路以及改善肠道菌群紊乱来发挥其治疗效果。中药通关藤具有进一步开发成CRC辅助化疗药物的潜力，对于中西医结合辅助化疗具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, 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.

[2] Tan G, Huang CY, Chen JY, et al. HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 149.

[3] Wu HX, Wu ZC, Qiu YL, et al. Supplementing a specific synbiotic suppressed the incidence of AOM/DSS-induced colorectal cancer in mice[J]. iScience, 2023, 26(6): 106979.

[4] Qin ZY, Yuan XY, Liu J, et al. *Albuca bracteata* polysaccharides attenuate AOM/DSS induced colon tumorigenesis via regulating oxidative stress, inflammation and gut microbiota in mice[J]. Front Pharmacol, 2022, 13: 833077.

[5] Liu J, Shen W, Cheng H, et al. *Shenbai Jiedu Fang* inhibits AOM/DSS-induced colorectal adenoma formation and carcinogenesis in mice *via* miRNA-22-mediated regulation of the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway[J]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2022, 42(10): 1452-1461.

[6] Chen JF, Wu SW, Shi ZM, et al. Traditional Chinese medicine for colorectal cancer treatment: potential targets and mechanisms of action [J]. Chin Med, 2023, 18(1): 14.

[7] 庞 震，胡广域，翟嘉威，等. 基于北京38家三级医院病案首页的结直肠癌围手术期联合中医药治疗对住院费用影响的多因素分析[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2023(2)：502-508.

Pan Z, Hu GY, Zhai JW, et al. The Multivariate Analysis of Effects on the Treatment of Colorectal Cancer Surgery Combined with Traditional Chinese Medicine on Hospitalization Expenses Based on the First Page of Tertiary Hospital Medical Records[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2023(2): 502-508.

[8] 李双凤，黄家彦，韩 笑，等. 通关藤抗肿瘤主要成分及作用机制研究进展[J]. 药物评价研究，2023，46(1)：187-197.

Li SF, Huang JY, Han X, et al. Research progress in anti-tumor components and mechanism of *Marsdenia tenacissima*[J]. Drug Eval Res, 2023, 46(1): 187-197.

[9] Hu YJ, Wei LY, Zhao J, et al. Mechanism of *Marsdenia tenacissima* against ovarian cancer based on network pharmacology and experimental verification[J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2023, 48(8): 2222-2232.

[10] Moh SM, Kurisawa N, Suenaga K, et al. Allelopathic potential of *Marsdenia tenacissima* (roxb.) moon against four test plants and the biological activity of its allelopathic novel compound, 8-dehydroxy-11 β-*O*-acetyl-12 β- *O*-tigloyl-17 β-marsdenin[J]. Plants (Basel), 2023, 12(8): 1663.

[11] Song XQ, Tian LL, Ye T, et al. Pregnane steroids and steroid glycosides with multidrug resistance reversal activity from *Marsdenia tenacissima*[J]. Fitoterapia, 2023, 168: 105551.

[12] Yuan Y, Guo Y, Guo ZW, et al. *Marsdenia tenacissima* extract induces endoplasmic reticulum stress-associated immunogenic cell death in non-small cell lung cancer cells through targeting AXL[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 314: 116620.

[13] 杨玉晴，李春晓，郭 静. 中药注射剂联合化疗治疗中晚期食管癌有效性与安全性的网状Meta分析[J]. 中草药，2023，54(11)：3608-3621.

Yang YQ, Li CX, Guo J. Effectiveness and safety of traditional Chinese medicine injections combined with chemotherapy in treatment of middle and advanced esophageal cancer: a network Meta-analysis[J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(11): 3608-3621.

[14] 葛亚楠，刘兆喆，张冠中，等. 消癌平注射液治疗结直肠癌患者真实世界临床应用特征研究[J]. 肿瘤药学，2021，11(2)：207-

210，228.

Ge YN，Liu ZZ，Zhang GZ，et al. Study on clinical application characteristics of xiao'aiping injection in the real world of treatment in colorectal cancer[J]. J Mod Oncol，2021，11(2)：207-210，228.

[15] 刘殿龙，李经蕾，邸明一，等. 消癌平注射液联合TP方案治疗晚期非小细胞肺癌痰湿瘀阻证的疗效观察[J]. 中华全科医学，2023，21(3)：389-392，538.

Liu DL，Li JL，Di MY，et al. Clinical observation of Xiaoaiping Injection combined with TP regimen in the treatment of advanced non-small cell lung cancer with phlegm-damp-stasis syndrome[J]. Chin J Gen Pract，2023，21(3)：389-392，538.

[16] 葛兴森，甘 雨，陈 贺，等. 射干提取物对AOM/DSS诱导小鼠炎症相关性肠癌模型中MAPK及PI3K的影响[J]. 实用中医内科杂志，2023，37(1)：29-31，后插14.

Ge XS，Gan Y，Chen H，et al. Effects of Shegan extract on mapk and Pi3K in aom/dss mouse model of inflammatory associated colorectal cancer[J]. J Pract Tradit Chin Intern Med，2023，37(1)：29-31，后插14.

[17] Lu YL，Huang R，Ying JM，et al. RING finger 138 deregulation distorts NF-κB signaling and facilities colitis switch to aggressive malignancy[J]. Signal Transduct Target Ther，2022，7(1)：185.

[18] Parang B，Barrett CW，Williams CS. AOM/DSS model of colitis-associated cancer[J]. Methods Mol Biol，2016，1422：297-307.

[19] 于绍帅，陈明苍，李志雄，等. 通关藤的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2011，17(21)：279-283.

Yu SS，Chen MC，Li ZX，et al. Progress on chemical and pharmacological studies of *Marsdenia tenacissima*[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae，2011，17(21)：279-283.

[20] 颜 昱，李 军，宋月林，等. 利用HPLC-IT-TOF-MS表征通关藤化学轮廓[J]. 中草药，2018，49(21)：5051-5060.

Yan Y，Li J，Song YL，et al. Chemical profile characterization of *Marsdenia tenacissima* using HPLC-IT-TOF-MS[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2018，49(21)：5051-5060.

[21] 白 爽，李奕诺，徐 鑫，等. 通关藤化学成分及药理活性研究进展[J]. 解放军药学学报，2015，31(3)：260-264.

Bai S，Li YN，Xu X，et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of caulis *Clematidis*[J]. Pharm J Chin People's Liberation Army，2015，31(3)：260-264.

[22] Irby RB，Mao W，Coppola D，et al. Activating SRC mutation in a subset of advanced human colon cancers[J]. Nat Genet，1999，21(2)：187-190.

[23] Zhang HB，Yin XT，Zhang XY，et al. HSP90AB1 promotes the proliferation，migration，and glycolysis of head and neck squamous cell carcinoma[J]. Technol Cancer Res Treat，2022，21：15330338221118202.

[24] Wang HN，Deng GX，Ai ML，et al. Hsp90ab1 stabilizes LRP5 to promote epithelial-mesenchymal transition via activating of AKT and Wnt/β-catenin signaling pathways in gastric cancer progression[J]. Oncogene，2019，38(9)：1489-1507.

[25] Revathidevi S，Munirajan AK. Akt in cancer：mediator and more[J]. Semin Cancer Biol，2019，59：80-91.

[26] 金磊鑫，庞雯文，张春泽. 通关藤抗结直肠癌活性及作用机制研究进展[J]. 遵义医科大学学报，2023，9(12)：1217-1224.

Jin LX，Pang WW，Zhang CZ. Research progress on the anti-colorectal cancer activity and mechanism of *Marsdenia tenacissima*[J]. J Zunyi Med Univ，2023，9(12)：1217-1224.

[27] Cai J，Sun LL，Gonzalez FJ. Gut microbiota-derived bile acids in intestinal immunity，inflammation，and tumorigenesis[J]. Cell Host Microbe，2022，30(3)：289-300.

[28] 牧亚峰，向 楠，左新河，等. 白芍总苷对自身免疫性甲状腺炎大鼠肠黏膜屏障及肠道菌群的影响[J]. 中草药，2021，52(11)：3269-3277.

Mu YF，Xiang N，Zuo XH，et al. Effects of total glucosides of *Paeonia lactiflora* on intestinal mucosal barrier and intestinal flora in rats with autoimmune thyroiditis[J]. Chin Tradit Herb Drugs，2021，52(11)：3269-3277.

[29] 李俊达，贾杰只，陈 渝，等. 单宁酸/镁纳米复合物对Ⅲ度烫伤大鼠创面愈合的作用及其机制[J]. 中华烧伤与创面修复杂志，2025，41(8)：793-802.

Li JD，Jia JZ，Chen Y，et al. Effects and mechanism of tannic acid/magnesium nano complex on wound healing in rats with full-thickness scald[J]. Chin J Burns Wounds，2025，41(8)：793-802.

[30] Chattopadhyay I，Dhar R，Pethusamy K，et al. Exploring the role of gut microbiome in colon cancer[J]. Appl Biochem Biotechnol，2021，193(6)：1780-1799.

[31] Cheng YW，Ling ZX，Li LJ. The intestinal microbiota and colorectal cancer[J]. Front Immunol，2020，11：615056.

[32] Jia YJ，Li TY，Han P，et al. Effects of different courses of moxibustion treatment on intestinal flora and inflammation of a rat model of knee osteoarthritis[J]. J Integr Med，2022，20(2)：173-181.

[33] Lin HY，Ma XP，Yang XR，et al. Natural shikonin and acetylshikonin improve intestinal microbial and protein composition to alleviate colitis-associated colorectal cancer[J]. Int Immunopharmacol，2022，111：109097.

[34] Xie J，Tian SM，Liu J，et al. Combination therapy with indigo and indirubin for ulcerative colitis via reinforcing intestinal barrier function[J]. Oxid Med Cell Longev，2023，2023：2894695.

（收稿：2024-05-11；修回：2024-09-28；录用：2024-10-28）

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

魏 颖，张 杰，孙佳鑫，等. 基于网络药理学与16S rDNA测序的探究：中药通关藤对结肠炎相关结直肠癌小鼠模型的干预作用及机制研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(10)：1363-1374.