

DOI: 10.16305/j.1007-1334.2025.z20240604001

肉豆蔻活性成分去氢二异丁香酚调控 MDM2/p53 信号通路抗结直肠癌的药效及机制

艾方彬, 高瑞阳, 王子怡, 刘东徽, 张蓓蓓, 岳 备, 王峥涛, 窦 薇
上海中医药大学中药研究所(上海 201203)

【摘要】 目的 探讨去氢二异丁香酚(DDIE)抑制结直肠癌的作用和机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)和SwissTargetPrediction数据库预测DDIE的靶点,利用人类基因(GeneCards)和在线人类孟德尔遗传(OMIM)数据库收集结直肠癌疾病靶点,将药物与疾病交集靶点导入String数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,运用Cytoscape 3.9.1软件内置插件计算节点拓扑参数值并筛选核心靶点,采用Metascape数据库进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)和基因本体(GO)富集分析。并采用体内外实验对富集到的核心靶点和关键通路进行验证。采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测DDIE对小鼠结直肠癌细胞CT26、人结直肠癌细胞HCT116、人结肠上皮细胞NCM460细胞活力的影响;划痕实验检测DDIE对HCT116细胞迁移能力的影响;Hoechst染色实验、流式细胞术检测DDIE对CT26和HCT116细胞凋亡的影响。Western blot法检测DDIE对CT26、HCT116细胞中促凋亡蛋白B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的表达。利用SPF级雄性Balb/c小鼠构建CT26结直肠癌皮下移植瘤模型,24只小鼠分为模型组、伊立替康(CPT11)组(60 mg/kg,腹腔注射)、DDIE低剂量(25 mg/kg,灌胃)组、DDIE高剂量组(50 mg/kg,灌胃),记录小鼠体重、肿瘤大小,苏木精-伊红(HE)染色法观察各组小鼠肿瘤组织病理学变化情况,Western blot法检测DDIE对结直肠癌细胞和肿瘤组织中肿瘤蛋白p53(p53)和双微体同源基因2(MDM2)蛋白表达的影响。**结果** 网络药理学分析结果显示,DDIE抗结直肠癌作用与p53信号通路相关。CCK-8结果显示DDIE可抑制结直肠癌CT26、HCT116细胞活力,其 IC_{50} 分别为53.56 μ mol/L、63.36 μ mol/L,而对正常上皮细胞NCM460的活力影响较小,其 $IC_{50}>100$ μ mol/L。划痕实验结果显示,10 μ mol/L、20 μ mol/L DDIE呈剂量依赖性抑制HCT116细胞迁移能力($P<0.001$)。Hoechst染色实验和流式细胞术结果显示,50 μ mol/L DDIE能明显增加CT26和HCT116细胞凋亡率($P<0.05, P<0.001$);Western blot结果显示,25 μ mol/L和50 μ mol/L DDIE能明显增加HCT116细胞中促凋亡蛋白Bax、Caspase-3的表达水平($P<0.05, P<0.01, P<0.001$),以及CT26细胞中Bax的表达水平($P<0.05, P<0.01$)。动物实验结果显示,DDIE能明显抑制小鼠肿瘤质量和肿瘤体积($P<0.05, P<0.001$)。Western blot结果显示,DDIE能明显降低CT26、HCT116细胞中MDM2蛋白表达水平($P<0.05, P<0.01$)、增加p53蛋白表达水平($P<0.01, P<0.001$),并能明显降低小鼠肿瘤组织MDM2蛋白表达水平($P<0.05$)、增加p53蛋白表达水平($P<0.01$)。**结论** DDIE具有抗结直肠癌作用,其机制与上调p53蛋白表达及抑制肿瘤细胞增殖和迁移、促进肿瘤细胞凋亡相关。

【关键词】 结直肠癌;去氢二异丁香酚;肉豆蔻;抗肿瘤;网络药理学;小鼠模型;中药研究

Pharmacodynamic mechanism of Myristicae Semen's active ingredient dehydrodiisoeugenol regulating MDM2/p53 signaling pathway against colorectal cancer

AI Fangbin, GAO Ruiyang, WANG Ziyi, LIU Donghui, ZHANG Beibei, YUE Bei, WANG Zhengtao, DOU Wei

Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274329, 82304991);上海市青年科技英才扬帆计划项目(23YF1442500)

[作者简介] 艾方彬,女,硕士研究生,主要从事中药药理学研究工作

[通信作者] 窦薇,研究员,硕士研究生导师;E-mail: douwei@shutcm.edu.cn。王峥涛,教授,博士研究生导师;E-mail: ztwang@shutcm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of dehydrodiisoeugenol (DDIE) in inhibiting colorectal cancer.

Methods DDIE targets were predicted through the Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and the SwissTargetPrediction database. Disease targets for colorectal cancer were gathered from the GeneCards and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) databases. The intersection of drug and disease targets was analyzed using the String

database to assess protein-protein interactions (PPI). The Cytoscape 3.9.1 software plug-in was employed to evaluate node topology parameters and identify core targets. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) and Gene Ontology (GO) enrichment analyses were conducted through Metascape database. The enriched core targets and key pathways were validated through *in vivo* and *in vitro* experiments. The impact of DDIE on the viability of mouse colorectal cancer cells (CT26), human colorectal cancer cells (HCT116), and human colorectal epithelial cells (NCM460) was assessed using a cell counting kit (CCK-8). The migration of HCT116 cells was evaluated through a scratch assay, while the apoptosis of CT26 and HCT116 cells was analyzed via Hoechst staining and flow cytometry. Additionally, Western blot was performed to measure the expression levels of pro-apoptotic proteins [B lymphoblastoma-2-associated X protein (Bax) and Caspase-3] in CT26 and HCT116 cells. A subcutaneous transplantation tumor model of CT26 colon cancer was established using 24 SPF-grade male Balb/c mice, which were divided into 4 groups: a model group, an irinotecan (CPT11) group (60 mg/kg, intraperitoneal injection), a low-dose DDIE group (25 mg/kg, gavage), and a high-dose DDIE group (50 mg/kg, gavage). Body mass and tumor size were recorded. The histopathological changes of tumor tissues were monitored using hematoxylin-eosin (HE) staining. Western blot was used to detect the effect of DDIE on the expression of tumor protein p53 (p53) and murine double minute2 (MDM2) in tumor tissues. **Results** The network pharmacological analysis results indicated that the anti-colon cancer effect of DDIE were associated with the p53 signaling pathway. CCK-8 results revealed that DDIE could inhibit the viability of CT26 and HCT116 colon cancer cells, with IC_{50} values of 53.56 $\mu\text{mol/L}$ and 63.36 $\mu\text{mol/L}$, respectively, had little effect on the viability of normal epithelial cells NCM460 with $IC_{50}>100 \mu\text{mol/L}$. Scratch assay results demonstrated that 10 $\mu\text{mol/L}$ and 20 $\mu\text{mol/L}$ DDIE significantly inhibited the migration of HCT116 cells in a dose-dependent manner ($P<0.001$). Hoechst staining assays and flow cytometry results revealed that 50 $\mu\text{mol/L}$ DDIE significantly increased the apoptosis rates of CT26 and HCT116 cells ($P<0.05$, $P<0.001$). Western blot results analysis indicated that DDIE significantly enhanced the expression levels of pro-apoptotic proteins Bax and Caspase-3 in HCT116 cells ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), as well as Bax expression level in CT26 cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Animal experiment result demonstrated that DDIE significantly reduced tumor mass and tumor volume of mice ($P<0.05$, $P<0.001$). Western blot results indicated that DDIE significantly decreased the protein expression levels of MDM2 in CT26 and HCT116 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), while increased p53 expression ($P<0.01$, $P<0.001$); DDIE significantly decreased MDM2 expression level and increased p53 expression level in tumor tissues ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** DDIE has an anti-colorectal cancer effect, and its mechanism is related to up-regulation of p53 protein expression, inhibition of tumor cell proliferation and migration, and promotion of tumor cell apoptosis.

Keywords: colorectal cancer; dehydrodiisoeugenol; Myristicaceae Semen; anti-tumour; network pharmacology; mouse model; traditional Chinese medicine research

结直肠癌(colorectal cancer, CA)是全球第三大常见癌症,也是第四大致死原因,其导致的死亡人数占全球癌症死亡总人数的9.2%^[1-2],对人类健康构成严重威胁。尽管广泛的筛查措施在早期发现和切除癌前腺瘤方面取得了显著成效,但仍有大量患者在确诊时已处于晚期或转移期,这些患者的5年和10年生存率分别为65%和58%^[3]。此外,男性CA的患病率和病死率比女性高25%^[4]。近10年来,全球CA病死率每年下降约2%,但50岁以下人群的病死率每年上升1.2%,50~54岁人群的病死率每年上升0.6%,凸显出患者年龄呈现年轻化的趋势。尽管在发达国家中,这一挑战已呈现出稳定下降的趋势,然而在全球范围内,CA的治疗仍面临重大挑战。

CA的病因尚未被完全阐明,现有研究认为其与环境、饮食习惯、遗传等因素相关,例如高龄、家族的消化道癌症史、长期慢性炎症、不良的饮食和生活方式及肥胖等均可能增加患CA的风险。目前,CA的治疗遵循个体化治疗原则,根据患者的年龄、身体状况、肿瘤分期等因素制定最合理的治疗方案,以获得最佳疗效并提高治愈率。CA的治疗手段包括手术、放射治疗(放疗)、化学疗法(化疗)、分子靶向治疗和免疫治疗等,为患者提供全面的治疗方案。

在中医学理论中,CA被归类为“肠覃”“肠风脏毒”等疾病范畴。人体正气虚弱时,邪气易侵袭,导致大肠内“虚”“瘀”“毒”逐渐积聚形成肠覃^[5]。鉴于现代治疗手段的毒副作用及高昂成本,中药天然产物在癌症的预防和辅助治疗中的应用受到了越来越多的关注,展现出其独特的优势。中药复方主要通过“益气健脾”“清热解毒”“滋补肝肾”“补气养血”四个方面发挥治疗作用,如四君子汤、复方苦参注射液等^[6]。中药资源丰富且便于获取,然而中药复方成分复杂多样,各组分药效作用难以明确,限制了中药的进一步研究与发展。

肉豆蔻,作为一种传统中药材,其味辛、微苦,性温,归属于脾、胃、大肠经。肉豆蔻可温中涩肠、行气消食,适用于脾胃虚寒、久泻不止、脘腹胀痛、持续性腹泻等症状^[7]。肉豆蔻中的主要活性成分去氢二异丁香酚(dehydrodiisoeugenol, DDIE),是一种酚类新木脂素化合物,具有显著的抗肿瘤活性,尤其在多种恶性肿瘤的治疗中表现突出^[8-9]。然而,DDIE在治疗CA方面的具体作用及机制尚缺乏充分的研究数据支持。本研究通过体内外实验验证DDIE的抗肿瘤作用,并通过网络药理学探讨其治疗CA的分子机制,旨在为DDIE在CA治疗中的应用提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠 CA 细胞 CT26、人 CA 细胞 HCT116、人结肠上皮细胞 NCM460 均购自于中国科学院上海生命科学研究院细胞库。

1.1.2 实验动物 24 只 SPF 级雄性 Balb/c 小鼠, (22±2)g, 6~8 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限公司。动物生产许可证号: SCXK(沪)2022-0004; 动物使用许可证号: SYXK(沪)2020-0009。饲养于上海中医药大学实验动物中心, 饲养环境: 温度 20~24 °C、湿度 55%~65%、12 h/12 h 昼夜循环。实验遵循《实验动物管理条例》^[10] 及上海中医药大学动物伦理委员会审批的实验方案(伦理审批号: PZSHU9TCM210604006)。

1.1.3 药物与试剂 DDIE、细胞计数试剂盒(CCK-8)、洛斯维·帕克纪念研究所(RPMI-1640)培养基(批号分别为 2680-81-1、MA0218、PWL033), 大连美仑生物技术有限公司; 盐酸伊立替康(CPT11)、胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素溶液(批号分别为 136572-09-3、10099-141C、10378016), 美国 Gibco 公司; 异氟烷(批号: C002151204), 河北一品制药有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)抗体(批号: GR291713), 成都植标化纯生物技术有限公司; 胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体、B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体、双微体同源基因 2(MDM2)蛋白抗体、肿瘤蛋白 p53(p53)抗体、兔二抗(批号分别为 12375-1-AP、18985-1-AP、66511-1-Ig、60283-2-Ig、SA00001-2), 美国 Proteintech Group 公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号: 4970), 美国 Cell Signaling Technology 公司; 细胞凋亡检测试剂盒(批号: AD10), 东仁化学科技(上海)有限公司; 增强型化学发光(ECL)试剂盒、细胞凋亡(Hoechst)染色试剂盒(批号分别为 36208ES60、40744ES60), 上海翌圣生物科技股份有限公司; 二辛可酸(BCA)试剂盒、速溶型蛋白上样缓冲液(批号分别为 ZJ101、LT101S), 上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.1.4 主要仪器 病理切片机(型号: HI1220), 上海徕卡仪器有限公司; 电泳仪(型号: 1645050), 上海伯乐生命医学产品有限公司; 多功能酶标仪(型号: VLBLATGD2), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 2000 分光光度计(型号: 840-317500), 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 高速离心机(型号: 5721300011), 德国 Eppendorf 公司。

1.2 网络药理学分析

1.2.1 成分和靶点预测 通过化学结构绘图软件 Chem Draw 软件获得 DDIE 化学结构, 运用中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, [\[e.com/tcmsp.php/\]\(http://e.com/tcmsp.php/\)\)、SwissTargetPrediction 数据库\(<http://swisstargetprediction.ch/>\)进行成分靶点预测, 得到 DDIE 的靶点。在人类基因数据库\(Gene Cards, <https://www.genecards.org/>\)和在线人类孟德尔遗传数据库\(OMIM, <https://www.omim.org/>\)中以“colon cancer”“colorectal cancer”为关键词进行搜索, 获得疾病相关靶点。去除重复靶点后, 与 DDIE 预测所得靶点进行交集分析, 并导入数据处理网站 Venny2.1 在线工具\(<http://www.liuxiaoyuyuan.cn/>\)绘制 DDIE 治疗 CA 的潜在靶点韦恩图。](https://old.tcmsp-</p>
</div>
<div data-bbox=)

1.2.2 蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络及通路富集分析 将潜在靶点导入 String 数据库(<https://cn.string-db.org/>), 限定物种为人, 设置置信度为 0.4, 构建 PPI 网络。将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行网络可视化, 利用 CytoNAC 插件进行分析, 根据中介中心性(betweenness, BC)、接近中心性(closeness, CC)、度中心性(degree centrality, DC)筛选关键靶点, 并设置节点大小和颜色用于反映 DC 值大小。根据上述得到的 DC 值筛选“DDIE-CA”的交集关键靶点, 并调整网络图中节点的大小和颜色, 以反映其度值的大小。将上述得到的潜在靶点导入基因功能注释分析工具 Metascape 数据库中, 对潜在靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析和基因本体(GO)功能分析。

1.3 细胞培养 CT26、HCT116、NCM460 细胞培养于含体积分数为 10% 的 FBS、100 g/L 链霉素、100 U/L 青霉素的 RPMI-1640 培养基中, 置于体积分数为 5% 的 CO₂、37 °C 细胞培养箱中, 每两天进行传代/换液。

1.4 CCK-8 法检测细胞活力 分别取对数生长期的 CT26、HCT116、NCM460 细胞, 常规消化后, 于 96 孔培养板中每孔加入 5×10⁴ 个细胞(100 μ L), 置于培养箱中培养。12 h 后, 分别设置空白组、对照组、不同浓度(5 μ mol/L、10 μ mol/L、15 μ mol/L、20 μ mol/L、25 μ mol/L、30 μ mol/L、40 μ mol/L、50 μ mol/L、60 μ mol/L、70 μ mol/L、80 μ mol/L、100 μ mol/L) DDIE 组, 每组设 6 个复孔。空白组加入含二甲亚砜(DMSO)的培养基, 对照组加入含阳性药 CPT11 的培养基[终浓度为 10 μ mol/L], 不同浓度 DDIE 组分别加入含相应浓度 DDIE 的培养基, 药物处理 24 h 后, 弃去培养液, 每孔加入 10 μ L CCK-8 试剂, 在 37 °C 避光条件下孵育 30 min, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度(OD)值。细胞活力计算公式: 细胞活力(%)=(OD_{给药组}-OD_{空白组})/(OD_{对照组}-OD_{空白组})×100%。

1.5 划痕实验检测细胞迁移能力 在 24 孔培养板中放置 ibidi 插件, 将对数生长期的 HCT116 细胞消化后, 800 r/min 离心 4 min, 以 5×10⁴ 个/mL 的密度接种于插件中, 每室 70 μ L。药物处理时, 取出插件, 清除培养基

后,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次。随后,采用无血清培养基培养细胞,并分别添加了浓度为0(空白)、5 $\mu\text{mol/L}$ 、15 $\mu\text{mol/L}$ 、20 $\mu\text{mol/L}$ 的DDIE处理细胞。在药物作用0 h和24 h后,使用倒置显微镜拍摄划痕区域的照片。通过ImageJ软件对划痕区域的宽度进行分析,测量细胞迁移距离(d),每张图测量3次。细胞迁移率的计算公式:细胞迁移率($\%$)= $(d_{\text{给药}0\text{ h}}-d_{\text{给药}24\text{ h}})/(d_{\text{空白}0\text{ h}}-d_{\text{空白}24\text{ h}})\times 100\%$ 。

1.6 Western blot 法检测相关蛋白表达 取对数生长期的CT26、HCT116细胞,加入含DDIE的培养基[终浓度为0、25、50 $\mu\text{mol/L}$],处理24 h后,检测Bax、Caspase-3蛋白表达。用放射免疫沉淀(RIPA)法提取样本总蛋白,加入RIPA裂解液后样本在冰上静置30 min,12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min,取上清液检测蛋白浓度。通过10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,采用聚偏二氟乙烯(PVDF)膜冰浴转膜,转膜后,用等渗缓冲盐溶液(TBST)清洗5 min,用体积分数为5% FBS封闭2 h。分别加入甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)、Bax、Caspase-3、p53、MDM2抗体(稀释比例均为1:1 000),在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育过夜。TBST洗膜3次,每次10 min;随后加入兔二抗(稀释比例为1:10 000),在室温下摇床孵育1 h;TBST洗膜3次,每次10 min。按照ECL试剂盒说明操作步骤,进行曝光显影操作,使用凝胶成像系统拍照。最后,使用ImageJ软件对蛋白条带进行定量分析。

1.7 Hoechst 染色实验检测细胞凋亡 将HCT116、CT26细胞接种于6孔板上,采用含50 $\mu\text{mol/L}$ DDIE的培养基处理24 h,按照Hoechst染色试剂盒说明书进行,荧光显微镜拍摄细胞凋亡情况。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡 将CT26和HCT116细胞悬液以 8×10^5 个/mL的密度接种于6孔细胞培养板。培养24 h后,加入DDIE终浓度分别为0(空白)、25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基处理细胞24 h。弃去培养基,PBS洗涤2次,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化细胞,300 r/min离心5 min,用预冷的PBS洗涤2次,加入结合缓冲液(Binding Buffer)调整细胞密度至 3×10^6 个/mL。每孔加入100 μL 相应细胞悬液,5 μL 异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白(Annexin V-FITC),充分混匀,避光、室温孵育15 min;流式细胞仪检测前加入5 μL 碘化丙啶(PI)染料,随后加入300 μL Binding Buffer混匀;设置4份空白样本,其中1份不添加染色剂,2份分别加入Annexin V-FITC或PI染料单染,1份加入Annexin V-FITC和PI染料双染。随后流式细胞仪设置激发波长为488 nm、发射波长为530 nm,检测Annexin V-FITC绿色荧光和PI红色荧光,采用Guava流式细胞仪软件记录数据并分析。

1.9 小鼠CA皮下移植瘤实验

1.9.1 分组、造模与干预 取适量对数生长期CT26细胞,进行常规消化和离心,洗涤后用PBS调整细胞密度至 1×10^7 个/mL,在冰上备用。Balb/c小鼠经过适应性饲养后,皮下注射CT26细胞悬液(100 μL /只)于右前肢腋下,构建小鼠CT26 CA皮下移植瘤模型。造模3 d后,根据肿瘤大小将小鼠随机分为4组($n=8$):模型组、CPT11组(60 mg/kg)、DDIE低剂量组(25 mg/kg)、DDIE高剂量组(50 mg/kg)。

造模后第3天,模型组和CPT11组小鼠每天灌胃5 g/L羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液,DDIE低、高剂量组小鼠每天分别灌胃25 mg/kg或50 mg/kg的DDIE(溶于CMC-Na溶液),连续干预14 d。造模后第5天,模型组和DDIE低、高剂量组小鼠每天腹腔注射氯化钠溶液(9 g/L, 0.2 mL/20 g);CPT11组小鼠每天腹腔注射60 mg/kg的CPT11[0.2 mL/20 g,溶解于氯化钠溶液(9 g/L)],连续干预9 d。

1.9.2 检测指标与方法

1.9.2.1 一般情况 记录各组小鼠试验期间体质量变化,电子游标卡尺记录移植瘤的长径(L)和横径(W),计算肿瘤体积(V),并绘制移植瘤生长曲线图,计算公式: $V(\text{mm}^3)=(L\cdot W^2)/2$ 。造模后第14天,异氟烷麻醉小鼠后,取血,处死小鼠,剥取肿瘤组织,称量并拍摄照片,每组剪取一部分保存于多聚甲醛溶液(40 g/L),剩下的保存于 -80°C 。

1.9.2.2 苏木精-伊红(HE)染色法观察肿瘤组织病理变化情况 HE染色切片由武汉赛维尔生物科技有限公司制备。具体步骤如下:将肿瘤组织石蜡切片使用65 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱烘烤1 h;使用二甲苯和体积分数为100%、95%、85%、70%梯度浓度的乙醇、去离子水分别依次清洗切片,进行脱蜡;采用苏木精和伊红染色后,分别使用体积分数为80%、95%、100%的乙醇和二甲苯洗涤切片,进行脱水;中性树脂封片;HE染色切片制成后,在显微镜下观察并拍照。

1.9.2.3 Western blot 法检测肿瘤组织相关蛋白表达水平 各组小鼠肿瘤组织用RIPA法提取总蛋白,然后采用“1.6”项下方法检测Bax、Caspase-3、p53、MDM2蛋白表达水平。

1.10 统计学方法 研究采用GraphPad Prism 9.0软件进行数据分析、处理及绘图。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验,两组数据之间比较采用LSD- t 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 DDIE 抗 CA 靶标预测及 PPI 网络的构建 从 TCMSP、SwissTargetPrediction 数据库中共筛选获得 DDIE 潜在靶点 132 个,通过 GeneCards 数据库和 OMIM 数据库共筛选获得 CA 靶点 10 317 个。使用 Venny 网站将药物与疾病靶标整合对比,共收集到 112 个 DDIE 抗 CA 的关键靶标,见图 1。利用 String 数据库构建这 112 个关键靶标的 PPI 网络图(见图 2),将 PPI 网络图导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行可视化分析,通过 CytoNCA 内置插件计算节点拓扑参数,按度中心性从大到小排列,得到核心靶点,包括细胞周期蛋白依赖激酶 1(CDK1)、

细胞周期蛋白 A2(CCNA2)等,见表 1。

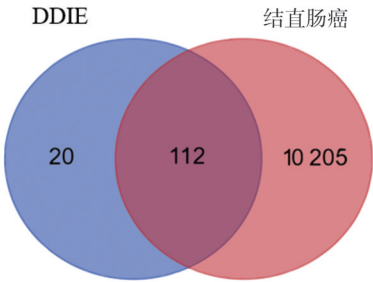


图1 去氢二异丁香酚(DDIE)与结直肠癌靶点交集韦恩图

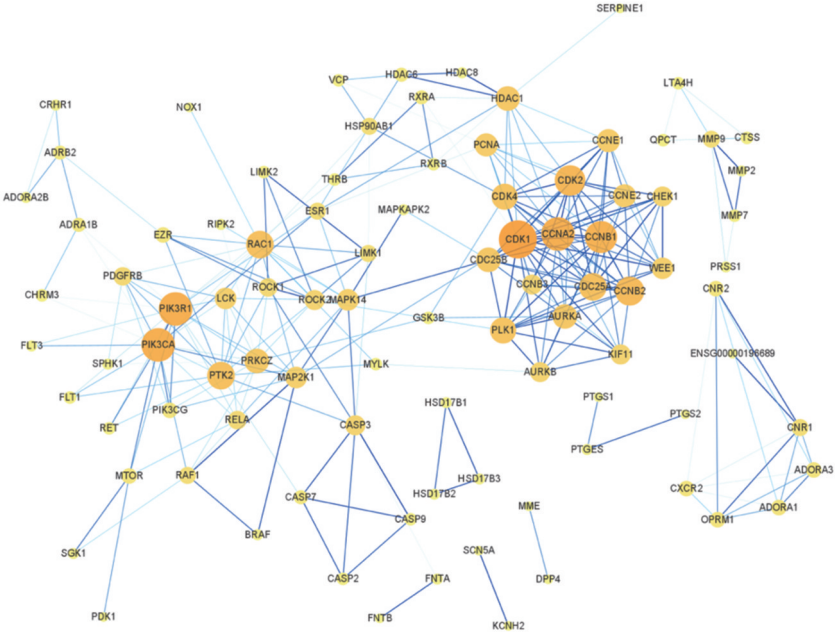


图2 去氢二异丁香酚抗结直肠癌关键靶点的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络图

表 1 去氢二异丁香酚-结直肠癌关键靶点

靶点蛋白名称	介数中心性	接近中心性	度中心性
细胞周期蛋白依赖激酶 1(CDK1)	0.131 840 815	0.433 121 019	20
细胞周期蛋白 A2(CCNA2)	0.021 309 512	0.382 022 472	17
磷酸肌醇-3 激酶调节亚单位 1(PIK3R1)	0.142 076 938	0.459 459 459	17
磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶催化亚单位 α(PIK3CA)	0.115 320 410	0.453 333 333	17
细胞周期蛋白 B1(CCNB1)	0.010 801 534	0.371 584 699	16
细胞周期蛋白依赖激酶 2(CDK2)	0.011 760 847	0.359 788 360	15
细胞周期蛋白 B2(CCNB2)	0.006 620 997	0.363 636 364	14
Rac 家族小型 GTPase 1(RAC1)	0.105 250 467	0.447 368 421	13
细胞分裂周期 25A(CDC25A)	0.005 528 330	0.359 788 360	13
蛋白酪氨酸激酶 2(PTK2)	0.097 271 623	0.422 360 248	13

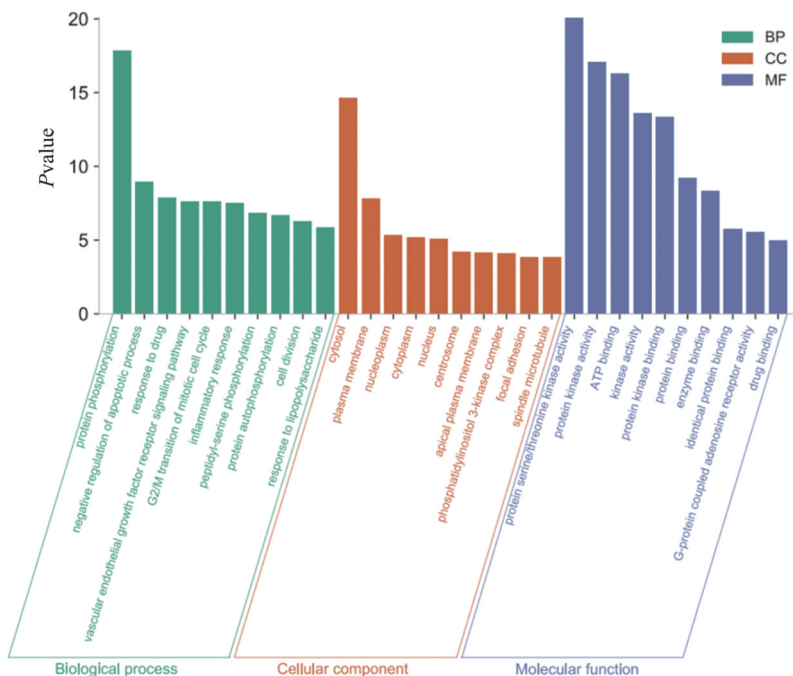
2.1.2 GO 和 KEGG 富集分析 将图 2 中得到的核心靶点导入 DAVID 数据库,分析 GO 和 KEGG 富集情况。GO 富集分析(图 3)显示,DDIE 潜在介导的主要生物活性有蛋白酶/磷酸激酶信号传导、凋亡过程的负向调节等。在细胞成分中,DDIE 主要作用在细胞质中。GO 分子功能显示 DDIE 参与调控的分子功能有蛋白质丝

氨酸苏氨酸激酶活性、腺苷三磷酸结合等。KEGG 富集分析(图 4)显示,与 DDIE 治疗 CA 相关的通路包括癌症(cancer pathway)、细胞周期(cell cycle)、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路、p53 信号通路等。

将收集到的关键靶点导入 KEGG 网页[KEGG PATHWAY: p53 signaling pathway - Reference pathway

(genome.jp)], 将关键靶点在 p53 通路上的蛋白富集情况以通路图的形式进行可视化呈现(图 5), 发现 DDIE

可能通过调控 MDM2 蛋白、胱天蛋白酶 9(CASP9) 等 p53 信号通路上下游蛋白水平, 参与 CA 的治疗。



注:BP为生物过程,CC为细胞组分,MF为分子功能。

图3 去氢二异丁香酚核心靶点基因本体(GO)功能富集分析结果

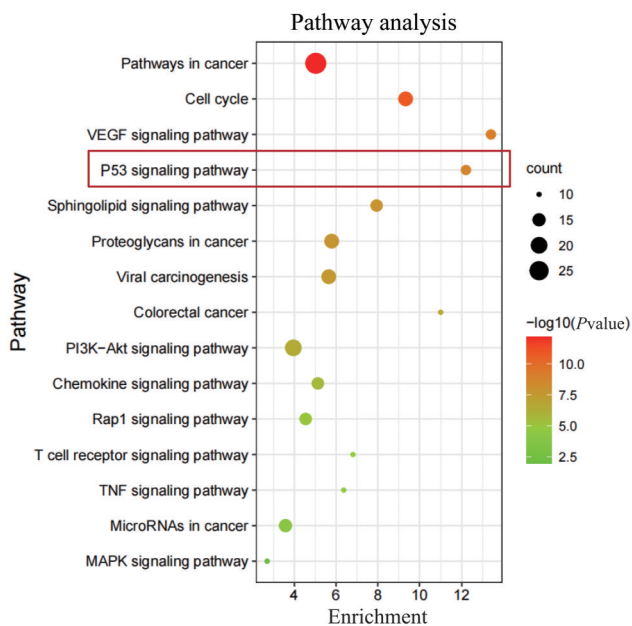


图4 去氢二异丁香酚核心靶点京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析结果

2.2 对CA细胞活力的影响 CCK-8实验结果显示, DDIE呈剂量依赖性地抑制CA细胞HCT116、CT26的细胞活力, 其IC₅₀分别为63.36 μmol/L、53.56 μmol/L; DDIE对正常结肠上皮细胞NCM460影响较小, 其IC₅₀>100 μmol/L。见图6。

2.3 对HCT116细胞迁移能力的影响 划痕实验结果

显示, 与空白组(0 μmol/L)相比, 10 μmol/L、20 μmol/L DDIE处理后HCT116细胞的迁移率明显降低($P<0.001$), 且其抑制作用呈剂量依赖性。上述表明, DDIE能有效抑制HCT116细胞的迁移能力, 进一步验证了DDIE对CA细胞的抑制效果。见图7。

2.4 对CA细胞凋亡的影响 Hoechst染色实验结果显示(图8A), 采用50 μmol/L DDIE处理CT26、HCT116细胞后, 细胞凋亡明显, 并出现核固缩, 且50 μmol/L DDIE处理后的CT26、HCT116细胞荧光强度较未经过DDIE处理的显著增加($P<0.05$), 表明DDIE能诱导结直肠癌细胞凋亡。Western blot结果显示(图8B), 与空白组相比, DDIE能明显增加HCT116细胞中促凋亡蛋白Bax、Caspase-3的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$), 以及CT26细胞中Bax的表达水平($P<0.001$)。流式细胞术结果显示(图8C), 与空白组相比, 25 μmol/L和50 μmol/L的DDIE处理后, CT26和HCT116细胞的凋亡率明显升高($P<0.001$)。上述结果表明, DDIE可诱导CT26、HCT116细胞核固缩, 促进CT26、HCT116细胞凋亡。

2.5 对小鼠体质量及皮下移植瘤生长的影响 小鼠接种CT26细胞后第3天左右形成皮下移植瘤。与模型组相比, DDIE低、高剂量组小鼠在给药期间表现出良好的精神状态和活跃性, 能正常进食; 由于CPT11引起的胃肠道毒副反应, CPT11组小鼠表现出精神状态萎靡, 被毛失去光泽, 并伴有稀便现象, 体质量较模型组明显

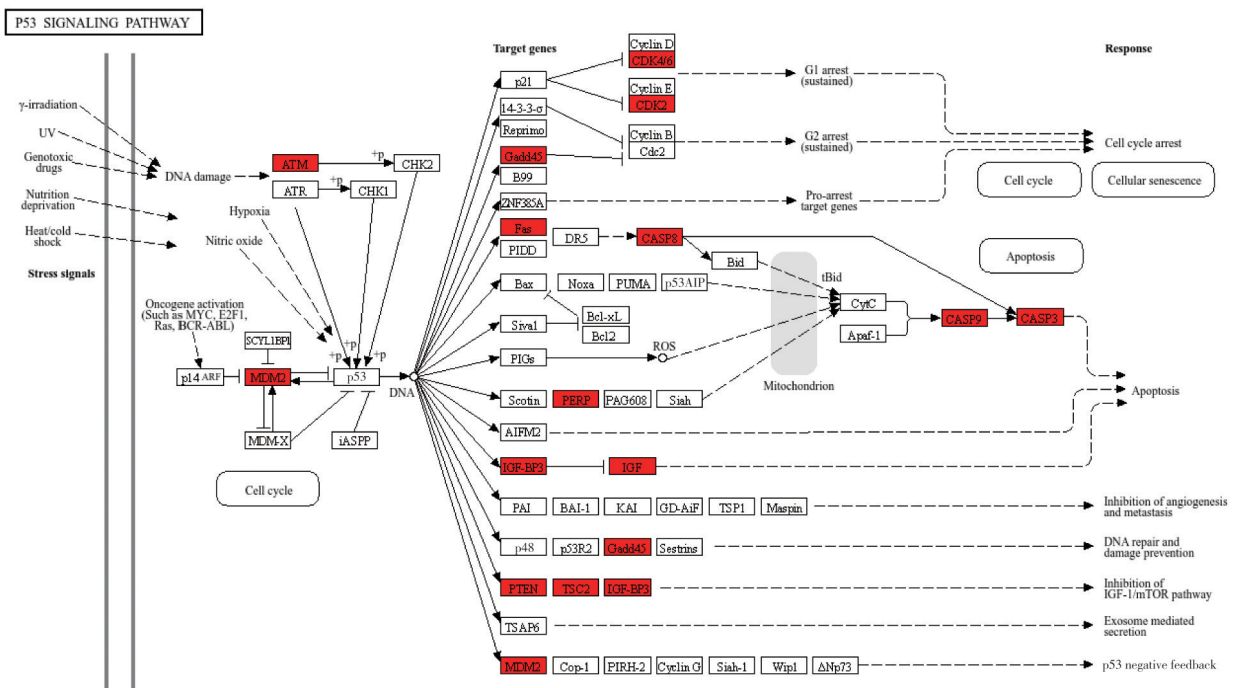
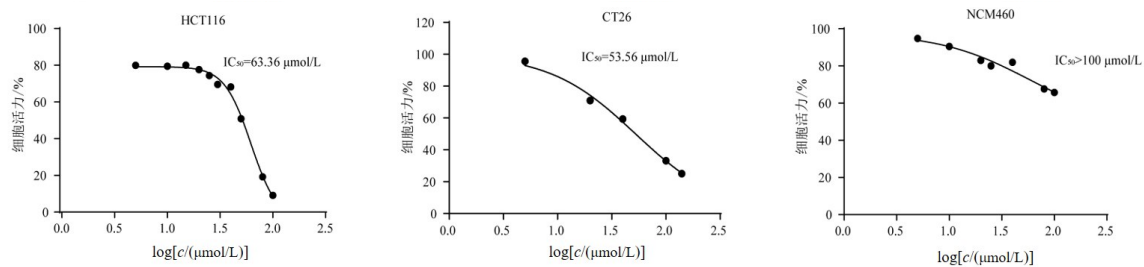
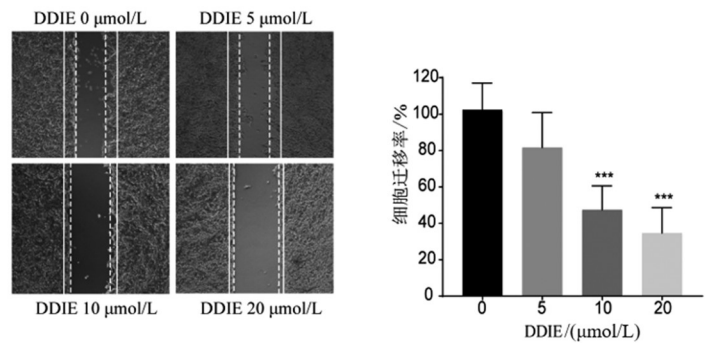


图5 去氢二异丁香酚-结直肠癌关键靶点在肿瘤蛋白p53通路上的蛋白富集情况通路图



注:IC₅₀为半抑制浓度。

图6 不同浓度去氢二异丁香酚对HCT116、CT26、NCM460细胞活力的影响(n=6, $\bar{x} \pm s$)



注:DDIE为去氢二异丁香酚。与空白组(0 μmol/L)相比,*** $P < 0.001$; n=6, $\bar{x} \pm s$ 。

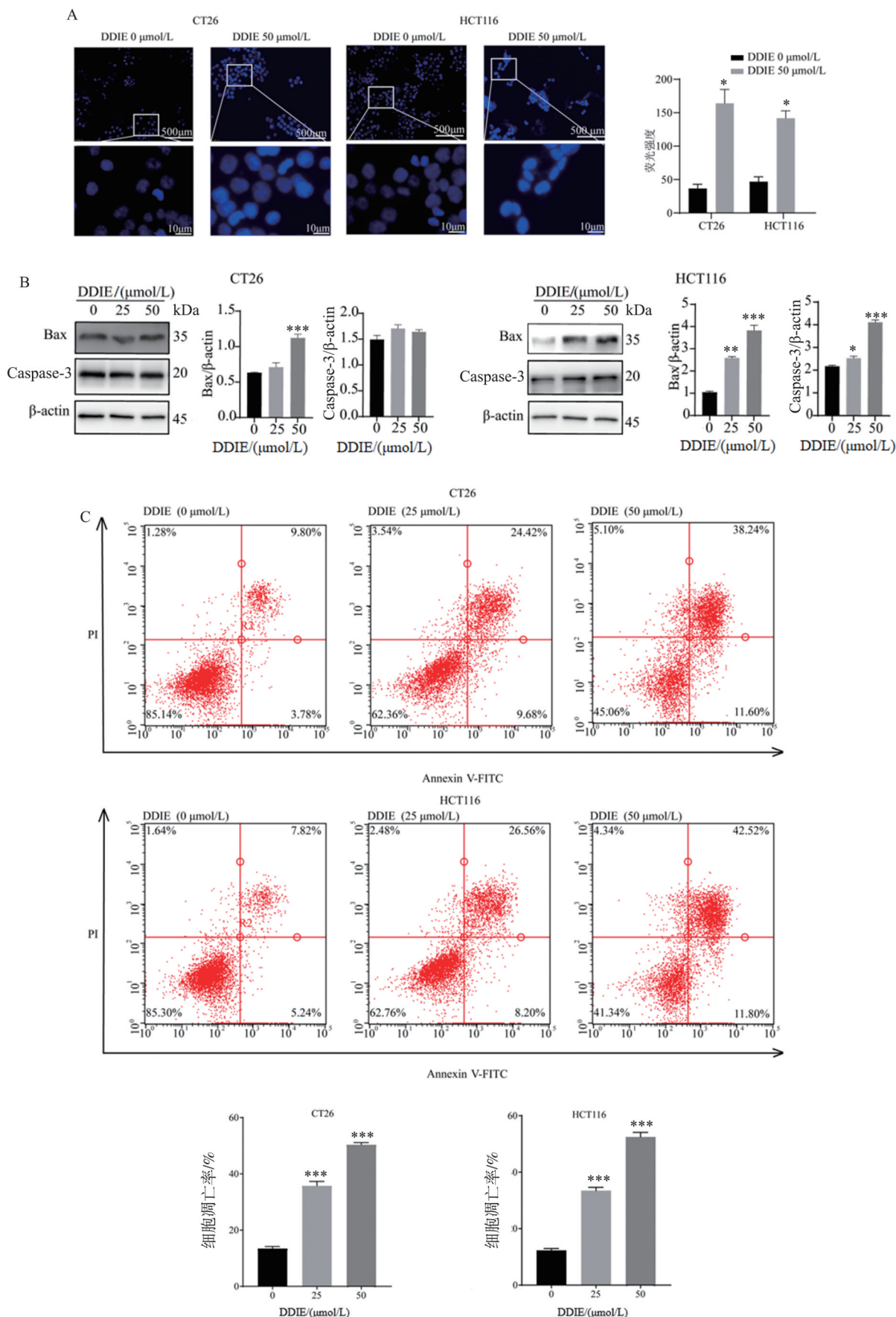
图7 DDIE对HCT116细胞迁移能力的影响

减轻($P < 0.05$)。从造模后第5天起,各给药组小鼠体质量减轻现象明显改善。与模型组相比,DDIE低、高剂量组小鼠体质量明显增加($P < 0.05$),CPT11组小鼠体质量明显降低($P < 0.05$);与CPT11组相比,DDIE低、高剂量组小鼠体质量明显增加($P < 0.05$, $P < 0.001$)。结果表明,DDIE可改善荷瘤小鼠体质量减轻情况。见图9A。

与模型组比较,DDIE低、高剂量组和CPT11组小

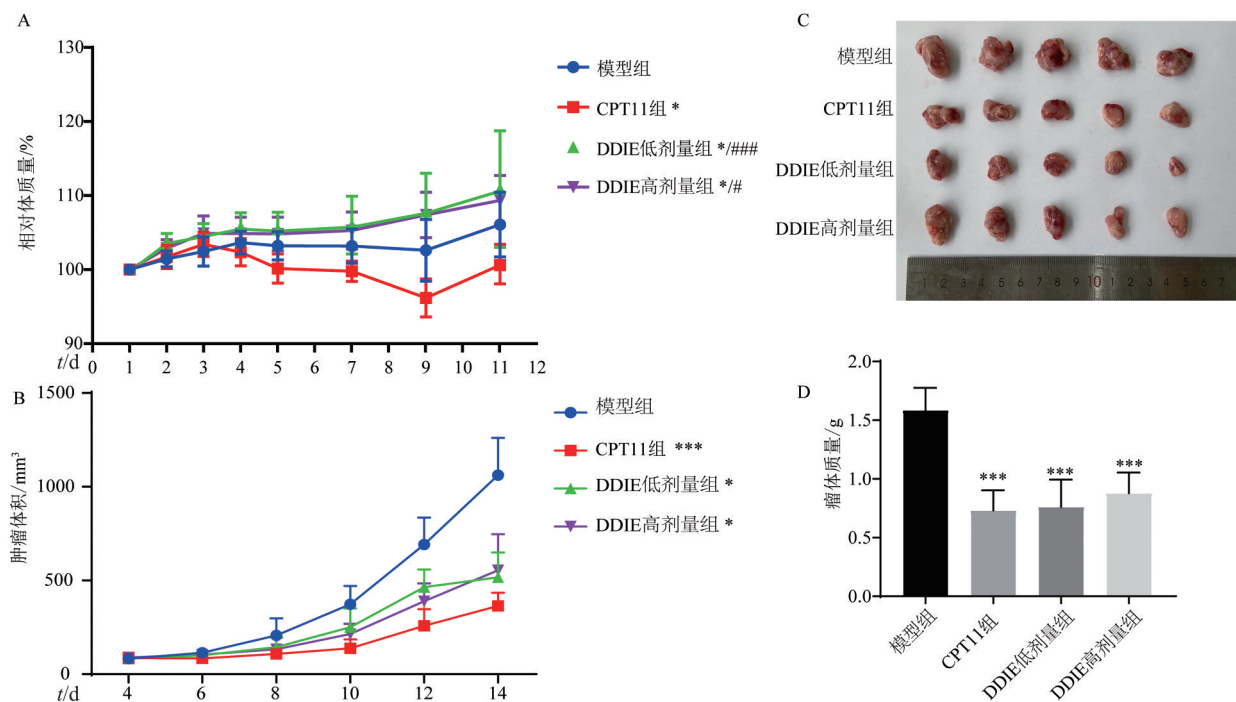
鼠瘤体质量显著降低($P < 0.001$),肿瘤体积明显减小($P < 0.05$, $P < 0.001$)。但与CPT11组相比,DDIE低、高剂量组小鼠瘤体质量与肿瘤体积均无显著性差异($P > 0.05$)。上述结果表明,DDIE对小鼠CA皮下移植瘤生长有抑制作用。见图9B~D。

2.6 对小鼠肿瘤组织病理形态的影响 HE染色结果显示,CPT11组小鼠肿瘤细胞呈巢状生长,且肿瘤细胞



注: DDIE 为去氢二异丁香酚, Bax 为 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白, Caspase-3 为胱天蛋白酶-3, β -actin 为 β -肌动蛋白, PI 为碘化丙啶, Annexin V-FITC 为异硫氰酸荧光素标记的膜联蛋白。A 为 Hoechst33258 染色实验结果, B 为 Western blot 实验结果, C 为流式细胞术实验结果。与空白组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; $n = 3, \bar{x} \pm s$ 。

图 8 DDIE 对结直肠癌 CT26、HCT116 细胞凋亡的影响

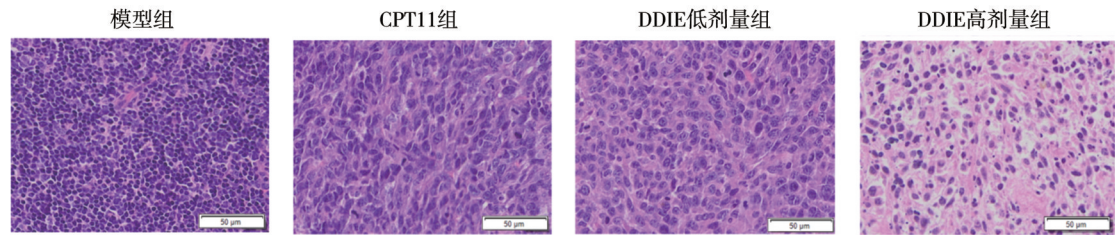


注:DDIE 为去氢二异丁香酚,CPT11 为盐酸伊立替康。A 为相对小鼠体重,B 为小鼠皮下移植瘤体积,C 为小鼠瘤体实物,D 为小鼠瘤体质量。与模型组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与 CPT11 组比较,# $P<0.05$,### $P<0.001$;n=6, $\bar{x}\pm s$ 。

图9 各组小鼠体质量和CT26结直肠癌皮下移植瘤生长情况

灶内可见坏死,肿瘤细胞较模型组小;DDIE 组肿瘤细胞呈巢状生长,并可见坏死和凋亡现象,肿瘤细胞较模

型组小,可见核分裂象,分化程度较低。结果表明,DDIE 可能诱导CT26细胞凋亡。见图10。



注:DDIE 为去氢二异丁香酚,CPT11 为盐酸伊立替康。标尺:50 μm。

图10 各组小鼠肿瘤组织病理情况(苏木精-伊红染色法)

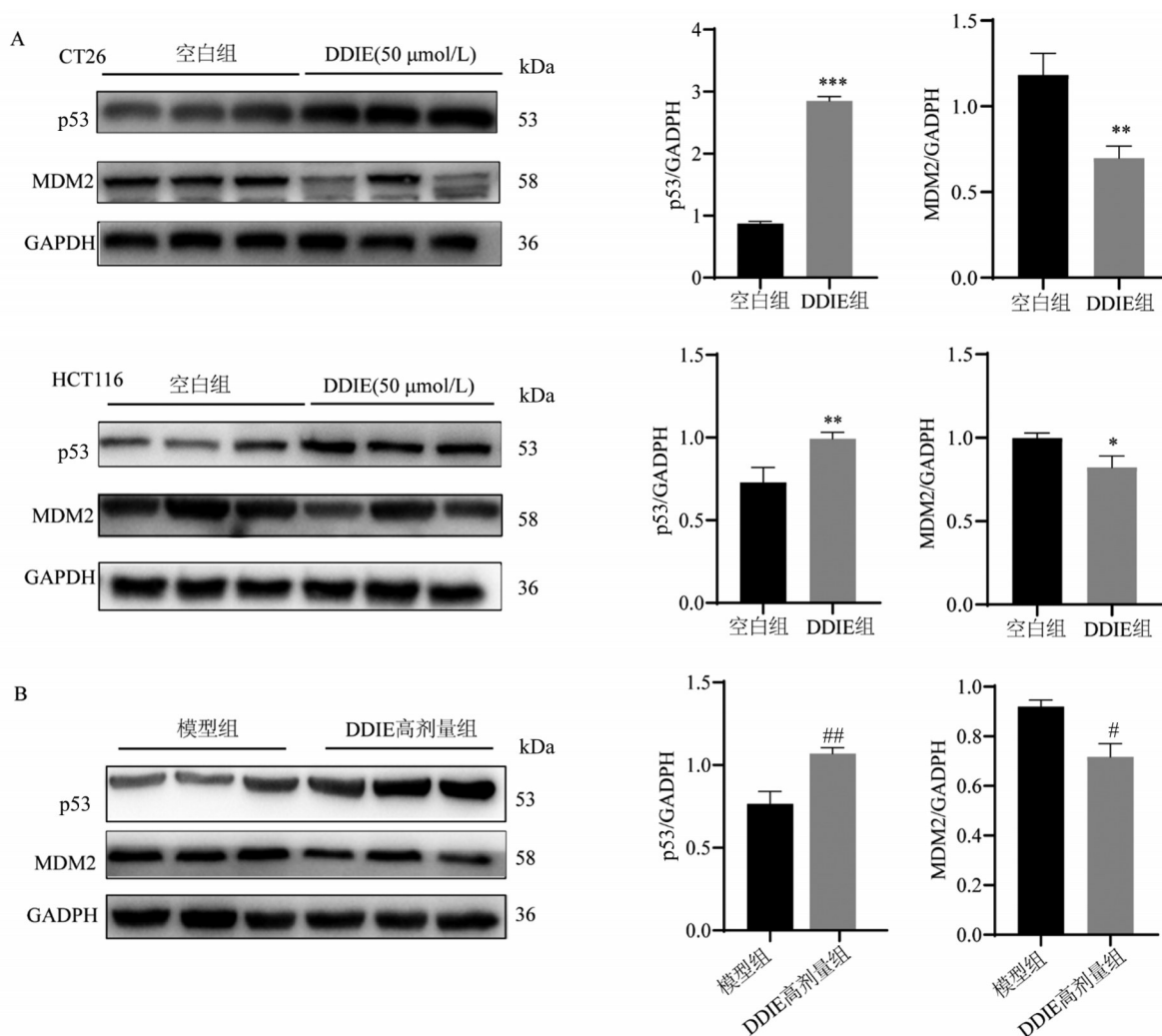
2.7 对 p53 信号通路的影响 Western blot 结果显示,与空白组相比,DDIE 显著提高 CT26 和 HCT116 细胞中 p53 蛋白表达水平($P<0.01$, $P<0.001$),并降低负向调节因子 MDM2 的表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组相比,DDIE 显著提高 DDIE 高剂量组小鼠肿瘤组织中 p53 蛋白表达水平($P<0.01$),并降低 MDM2 蛋白表达水平($P<0.05$)。上述结果表明,DDIE 能通过上调 p53 蛋白表达水平、下调 MDM2 蛋白表达水平,从而发挥抗肿瘤作用。见图 11。

3 讨论

尽管临床上已经实施了多种策略来治疗 CA,但其仍是一种病死率较高的恶性肿瘤^[11-12]。由于化疗药物的毒性或放疗的副作用,晚期或复发性 CA 患者的生存率通常较低^[13]。因此,积极探索术后用药,寻找高效低

毒的药物,以提高患者生存率和生活质量至关重要。目前,中医药在多种疾病的治疗中发挥着重要作用^[14],而从中药中提取的单体相关研究也日益增多。此外,中药在长期应用过程中显示出较低的毒性,因此在癌症治疗领域具有重要的研究价值和应用意义。肉豆蔻是常绿乔木的种子,药用历史悠久,已被证实具有治疗胃癌、肺癌、皮肤肿瘤、黑色素瘤、骨肉瘤和白血病的潜力^[15-16]。DDIE 是从肉豆蔻中提取的一种活性单体,研究^[17]表明,DDIE 在治疗多种消化系统疾病中展现出显著的药理活性,包括抗炎和抗过敏作用等。

本研究通过网络药理学筛选获得 DDIE 抗 CA 的潜在核心靶点,包括 CDK1、CCNA2、磷酸肌醇-3 激酶调节亚单位 1(PIK3R1)等。GO 富集分析显示,DDIE 抗 CA 的作用涉及细胞信号的传导、凋亡过程的调控等。



注:DDIE 为去氢二异丁基酚, p53 为肿瘤蛋白 p53, MDM2 为双微体同源基因 2, GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶。A 为 CT26 和 HCT116 细胞中 p53、MDM2 蛋白的表达, B 为 DDIE 高剂量组小鼠肿瘤组织中 p53、MDM2 蛋白表达。与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; $n = 3$, $\bar{x} \pm s$ 。

图 11 Western blot 法检测肿瘤组织凋亡相关蛋白表达

KEGG 通路富集分析显示,肿瘤细胞生长周期相关信号通路可能在 DDIE 抗 CA 作用中发挥作用,DDIE 可能通过调控 p53 信号通路来诱导 CA 细胞凋亡,抑制肿瘤生长。在癌症相关信号通路中,经典的 p53 信号参与调控机体的多种生物学功能,且大多数 CA 都存在这种通路的突变^[18],已有相关文献^[19-20]报道激活肿瘤蛋白 p53 或 p53 相关的下游靶基因,可抑制 CA 的发展。因此,我们专注于研究 DDIE 对 p53 信号的影响。p53 信号通路在细胞生物学中扮演着关键角色,是细胞内一个重要的调节系统,在维持细胞稳态、修复 DNA 损伤以及诱导细胞凋亡等方面起着关键作用^[21]。p53 蛋白在细胞内发挥着重要的调控作用,而其活性主要受到细胞内外环境的影响。当细胞受到 DNA 损伤、细胞应激等因素刺激时, p53 蛋白会被激活并进入细胞核,从而引发一系列信号级联反应,包括启动 DNA 修复机制、阻止异常细胞增殖以及诱导细胞凋亡等。p53 信号通路的异常活化或失活与多种疾病的发生密切相关,如癌

症、神经退行性疾病等^[22]。因此,研究 p53 信号通路的调控机制对于理解细胞生物学的基本原理以及疾病发生机制具有重要意义。

本研究采用了 CA 细胞系探讨 DDIE 在 CA 治疗中的作用和分子机制。我们评估了 DDIE 的抗 CA 活性,通过 CCK-8 法和划痕实验证明,DDIE 在体外以剂量依赖性方式抑制 HCT116 和 CT26 CA 细胞增殖和迁移;通过 Hoechst 染色实验证明,DDIE 可体外诱导 CA 细胞凋亡;通过 Western blot 实验证实,DDIE 能上调 HCT116 和 CT26 细胞内 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达水平,激活内源性凋亡通路。

本研究通过建立小鼠皮下移植瘤模型,考察了 DDIE 对小鼠体质量和移植瘤生长的影响。CPT11 是一种常用的化疗药物,在 CA 治疗中被广泛应用^[23],其在本研究中被作为阳性药物。通过与 CPT11 进行比较,本研究发现 DDIE 不仅具有类似的抗肿瘤效果,甚至显著改善了造模引起的小鼠体质量减轻,而 CPT11 没有改善作

用,反而小鼠体质量减轻更加明显,显示出 DDIE 作为一种潜在的抗癌药物的优势。我们还检测了小鼠肿瘤组织中 p53 相关蛋白表达水平,并对网络药理学结果进行验证。结果表明,DDIE 可明显抑制肿瘤生长,并上调 p53 蛋白表达水平。在 p53 信号通路中,p53 蛋白的活性受到多种调控因子的影响。例如,MDM2 是一个负调控因子,在肿瘤中高表达,对肿瘤的发生和发展具有重要作用^[24]。研究^[25]指出,MDM2 可以与 p53 结合,阻断其肿瘤抑制反式激活域,同时作为一种 E3 连接酶,可标记 p53,促使其被蛋白酶体降解;因此,抑制 p53-MDM2 互作可以延长 p53 的活性时间,进而抑制肿瘤的生长。p53 作为肿瘤抑制因子,能够抑制正常细胞的生长和增殖,而 MDM2 作为 p53 的抑制因子,则通过抑制 p53 的乙酰化来阻碍其发挥抗肿瘤作用^[26]。

综上所述,本研究基于网络药理学对 DDIE 治疗 CA 的作用靶点和信号通路进行系统性预测,并采用体内实验进行验证。结果表明,DDIE 通过下调 MDM2 蛋白的表达,提高 p53 的表达水平,进而抑制 CT26 和 HCT116 癌细胞的活力,同时促进细胞中 Bax 和 Caspase-3 蛋白的表达,并诱导小鼠肿瘤细胞发生凋亡,从而抑制小鼠肿瘤生长。这些发现为 CA 的临床治疗策略提供了新的方向,为开发新的癌症治疗方法提供了重要依据。

参考文献:

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] LI J, MA X, CHAKRAVARTI D, et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer [J]. *Genes Dev*, 2021, 35 (11-12): 787-820.
- [3] BRODY H. Colorectal cancer [J]. *Nature*, 2015, 521(7551): S1.
- [4] WENG W, GOEL A. Curcumin and colorectal cancer: An update and current perspective on this natural medicine [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80: 73-86.
- [5] 刘芝亦,龚航军,周利红.基于虚实辨证的大肠癌血瘀证中医药治疗和作用机制研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2024, 58(6): 95-100.
- [6] 白姣姣,阿丽亚·依拉木,阿布都艾则孜·艾尔肯,等.中药复方及单体治疗结直肠癌药效与机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(4): 246-252.
- [7] ASHOKKUMAR K, SIMAL-GANDARA J, MURUGAN M, et al. Nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt.) essential oil: A review on its composition, biological, and pharmacological activities [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(7): 2839-2851.
- [8] GODÍNEZ-CHAPARRO B, PÉREZ-GUTIÉRREZ S, PÉREZ-RAMOS J, et al. Synthesis and biological activities of dehydrodiisoeugenol: a review [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022, 15(11): 1351.
- [9] LI C, ZHANG K, PAN G, et al. Dehydrodiisoeugenol inhibits colorectal cancer growth by endoplasmic reticulum stress-induced autophagic pathways [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 125.
- [10] 国务院.实验动物管理条例[EB/OL]. (2017-03-01) [2024-09-13]. https://www.gov.cn/gongbao/content/2017/content_5219148.htm.
- [11] RABINOWITZ J D, WHITE E. Autophagy and metabolism [J]. *Science*, 2010, 330(6009): 1344-1348.
- [12] LEVINE B, KROEMER G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27-42.
- [13] MAHESWARI U, GHOSH K, SADRAS S R, Licarin A induces cell death by activation of autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells [J]. *Apoptosis*, 2018, 23(3-4): 210-225.
- [14] ZHANG Z, ZHOU L, XIE N, et al. Overcoming cancer therapeutic bottleneck by drug repurposing [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 113.
- [15] SHINTANI T, KLIONSKY D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. *Science*, 2004, 306(5698): 990-995.
- [16] ZHANG K, FU G, PAN G, et al. Demethylzeylasteral inhibits glioma growth by regulating the miR-30e-5p/MYBL2 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(10): 1035.
- [17] DANIELS M S, BANNON S A, MORK M E. Frequency of germline BRCA1/2 mutations in unselected patients with colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(22): 2588.
- [18] LIN X B, DIELEMAN L A, KETABI A, et al. Irinotecan (CPT-11) chemotherapy alters intestinal microbiota in tumour bearing rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39764.
- [19] HOU Y, ZHANG X, YAO H, et al. METTL14 modulates glycolysis to inhibit colorectal tumorigenesis in p53-wild-type cells [J]. *EMBO Rep*, 2023, 24(4): e56325.
- [20] KANAPATHIPILLAI M. Treating p53 mutant aggregation-associated cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2018, 10(6): 154.
- [21] BIAN J, DANNAPPEL M, WAN C, et al. Transcriptional regulation of Wnt/ β -catenin pathway in colorectal cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(9): 2125.
- [22] ZHOU Z, SHU Y, BAO H, et al. Stress-induced epinephrine promotes epithelial-to-mesenchymal transition and stemness of CA through the CEBPB/TRIM2/p53 axis [J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 262.
- [23] LIEBL M C, HOFMANN T G. The role of p53 signaling in colorectal cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2125.
- [24] KOO N, SHARMA A K, NARAYAN S. Therapeutics targeting p53-MDM2 interaction to induce cancer cell death [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5005.
- [25] 闫宁,李楨,吴成军,等.作用于p53/MDM2/MDMX系统的抗肿瘤小分子抑制剂的研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2016, 26(5): 419-430.
- [26] SHANGARY S, QIN D, MCEACHERN D, et al. Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(10): 3933-3938.

编辑:杨铁舜

收稿日期:2024-06-04