基于网络药理学探讨八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的作用机制

瞿颖[1]，向科旭[2]，王蓓茹[1]，侯铖宇[1]，王继勇[3]

1. 广州中医药大学第一临床医学院，广东 广州 510006
2. 湖南医药学院第一附属医院，湖南 怀化 418000
3. 广州中医药大学第一附属医院，广东 广州 510405

［摘要］**目的：**基于网络药理学和生物信息学探讨八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的作用机制。**方法：**收集中药系统药理学数据库与分析平台（TCMSP）中八珍汤组方药物的有效成分及其靶点，从TCGA数据库下载食管癌患者的转录组数据和临床信息，根据ESTIMATE算法计算食管癌样本的基质评分、免疫评分、综合评分，筛选食管癌肿瘤微环境预后相关基因，将这些基因作为重塑食管癌肿瘤微环境的相关靶点。最后将中药靶点和疾病靶点取并集，获得八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的相关靶点，并通过Cytoscape 3.9.1构建“中药-成分-靶点”网络。基于STRING 11.5数据库及Cytoscape 3.9.1软件构建蛋白质-蛋白质相互作用（PPI）网络并通过Cytoscape 3.9.1的插件CytoHubba筛选核心基因，运用DAVID数据库对中药与疾病共有靶点进行基因本体（GO）富集分析以及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路分析，并对药物有效成分和核心基因进行分子对接验证。**结果：**获得八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的31个相关基因，根据MCC算法筛选得到前5个较为重要的基因：ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1。GO功能、KEGG通路富集分析结果显示，中药-疾病共有靶点基因主要富集于趋化因子信号通路、TNF信号通路、NF-κB信号通路等。分子对接结果显示，八珍汤药物主要有效成分和核心靶点蛋白有良好的结合力。**结论：**八珍汤可能通过靶向ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1等关键基因调控趋化因子、TNF、NF-κB等信号通路重塑食管癌肿瘤微环境，从而影响食管癌细胞生长、侵袭转移、血管生成、化学耐药等。

［关键词］食管癌；肿瘤微环境；八珍汤；生物信息学；网络药理学；分子对接技术
［中图分类号］R735.1 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）24-0119-10
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.24.023

Study on the Mechanism of Bazhen Decoction in Remodeling Esophageal Cancer Tumor Microenvironment Based on Network Pharmacology

QU Ying[1], *XIANG Kexu*[2], *WANG Beiru*[1], *HOU Chengyu*[1], *WANG Jiyong*[3]

1. The First Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510006, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Medicine, Huaihua Hunan 418000, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou Guangdong 510405, China

Abstract: Objective: To explore the mechanism of Bazhen Decotion in remodeling esophageal cancer tumor microenvironment based on network pharmacology and bioinformatics. **Methods:** The active ingredients and targets of Bazhen Decotion were collected from the Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), transcriptome data and clinical information of esophageal cancer patients were downloaded from the TCGA database, and stromal score, immune score

［收稿日期］2023-05-06
［修回日期］2023-09-10
［基金项目］国家中医药传承创新中心科研专项项目（2022ZD08）
［作者简介］瞿颖（1997-），女，在读硕士研究生，E-mail：1428660550@qq.com。
［通信作者］王继勇（1971-），男，副主任医师，E-mail：13802447736@139.com。

and comprehensive score of esophageal cancer samples were calculated according to the ESTIMATE algorithm. To screen the genes related to the prognosis of esophageal cancer microenvironment, and use these genes as the relevant targets to reshape the esophageal cancer microenvironment. Finally, Chinese medicinals targets and disease targets were selected and combined to obtain the related targets of Bazhen Decoction in reshaping esophageal cancer microenvironment, and the "Chinese medicinals-ingredients-targets" network was constructed by Cytoscape 3.9.1. Construct protein-protein interaction (PPI) network based on STRING 11.5 database and Cytoscape 3.9.1 software, and screen core genes through CytoHubba, a plugin of Cytoscape 3.9.1. DAVID database was used to conduct gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis for common targets of TCM and diseases, and molecular docking verification of drug active ingredients and core genes was carried out. **Results:** A total of 31 genes related to the remodeling of esophageal cancer tumor microenvironment by Bazhen Decoction were obtained, and the top 5 important genes were selected according to MCC algorithm: ICAM1, CCL2, CXCL10, STAT1 and VCAM1. GO function and KEGG pathway enrichment analysis showed that the common target genes of Chinese medicinals-diseases were mainly enriched in chemokine signaling pathway, TNF signaling pathway, NF-κB signaling pathway and so on. The results of molecular docking showed that the main active components of Bazhen Decoction had good binding force with the core target protein. **Conclusion:** Bazhen Decoction may regulate chemokine, TNF, NF-κB and other signaling pathways by targeting ICAM1, CCL2, CXCL10, STAT1, VCAM1 and other key genes to remodel the tumor microenvironment of esophageal cancer, thereby affecting the cell growth, invasion and metastasis, angiogenesis, and chemical drug resistance of esophageal cancer.

Keywords: Esophageal cancer; Tumor microenvironment; Bazhen Decoction; Bioinformatics; Network pharmacology; Molecular docking technique

食管癌是全球性的常见恶性肿瘤之一，发病率及死亡率分别占至恶性肿瘤第7位及第6位[1]。当前，食管癌主要采用手术、放化疗、免疫和靶向治疗等联合治疗方案。其中手术仍然是首选治疗，但是食管癌发现时往往是局部晚期，手术切除局部肿瘤后，局部失败率和远处转移率很高，故而术前常进行新辅助治疗(放疗、化疗或联合治疗)，能够减少肿瘤微转移、提高完全切除率。目前本科室针对局部晚期食管癌患者术前主要采用化疗加免疫治疗(卡铂+白蛋白紫杉醇+卡瑞丽珠单抗)，待病灶缩小后行手术治疗，该方式治疗效果良好，部分患者可以达到病理完全缓解[2]。但是，辅助治疗后患者往往出现气血不足的表现，出现贫血、白细胞降低等相关并发症，从而影响食管癌治疗效果。由于食管癌手术范围大(切除全部食管以及部分胃)，手术时间长，中医认为手术、长时间麻醉会耗伤人体气血，故而食管癌术后往往气血不足[3]，且部分患者行化学治疗后，常出现骨髓抑制，中医认为化疗后骨髓抑制基本属于气血不足[4]，术后还会继续行一定疗程的化学辅助治疗，往往会损伤脾胃，加之食管癌患者脾胃本不足，气血生化无源，更加耗伤人体气血，故而在治疗食管癌期间注重恢复气血。八珍汤为气血双补的经典方剂，本科室在临床上运用八珍汤联合化疗加免疫治疗方式能够减少血液系统相关并发症的发生，有效改善患者气血不足的表现。故探讨食管癌气血不足证的治疗及机制研究尤为重要。文献表明，八珍汤辅助放化疗治疗恶性肿瘤可取得满意的疗效[5-7]。其在改善患者营养状况、增强免疫功能、提高生活质量以及延长生存期等方面发挥着重要的作用[8-9]。有研究表明，八珍汤联合放化疗可激活CD4、CD8、NK细胞活性，增强中晚期食管癌患者的免疫功能，同时减轻放化疗引起的骨髓

抑制等不良反应，从而提高抗肿瘤作用[10]。也有研究报道术前同步放化疗联合八珍汤治疗食管癌获得良好的疗效[11]。虽然八珍汤在食管癌治疗方面发挥重要作用，但是其具体机制尚不清楚。肿瘤微环境是肿瘤细胞生长和转移的土壤，中药干预肿瘤微环境已成为肿瘤治疗的研究热点。现代研究发现中医药抗肿瘤的优势不在于彻底消灭肿瘤，在于重塑肿瘤微环境，从而诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤的增殖、血管生成、免疫逃逸等[12]。肿瘤微环境的理论基础与中医整体观念一致，不单纯研究肿瘤本身，还探索肿瘤周围环境对肿瘤生长的影响。故而基于肿瘤微环境探索八珍汤重塑肿瘤微环境的机制更能阐释八珍汤的作用机制与辨病辨证施治。生物信息学和网络药理学能从生物网络出发分析药物有效成分与疾病和靶点之间的作用关系，进而阐明药物的药效物质基础和作用机制。本研究运用生物信息学和网络药理学方法探讨八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的潜在靶点与作用机制，并借助分子对接技术进行验证，以期为后续研究提供理论依据及数据支持。

1 资料与方法

1.1 筛选药物有效成分及靶点 通过检索中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP，https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php)数据库，分别根据筛选标准检索八珍汤中各个中药(人参、白术、茯苓、甘草、当归、熟地黄、白芍、川芎)的活性成分。筛选标准：口服生物利用度(OB)≥30%、类药性(DL)≥0.18。利用TCMSP获取八珍汤活性成分的靶标蛋白，根据UniProt(http：//www.uniport.org/)数据库中蛋白注释文件将靶蛋白的名称转换为基因名。

1.2 获取影响食管癌肿瘤微环境的相关靶点 通过R语言中的TCGAbiolinks包(版本2.25.3)从美国国家癌症研究所建立的癌症基因组图谱(TCGA，https://portal.gdc.cancer：gov)数据库下载食管癌患者的转录组数据和临床信息，转录组数据格式为FPKM，从原始数据中筛选具有完整预后信息的食管癌样本，对于食管癌样本基因表达矩阵重复数据保留表达值最高的数值。通过使用R语言的ESTIMATE包(版本1.0.13)计算食管癌肿瘤样本的相关评分。使用survminer包的surv_cutpoint函数确定各相关评分生存曲线的最佳截断值(cut-off值)，并根据cut-off值将肿瘤样本分为高低评分两组，并利用survival包(版本3.5-0)和survminer包(版本0.4.9)分析高低分组间的生存率，绘制相应的生存曲线，$P<0.05$时认为差异具有统计学意义。根据上述高低分组生存分析结果，使用R软件的limma包(版本3.54.1)筛选与食管癌患者生存显著相关的免疫评分高低组和基质评分高低组间的差异表达基因并取并集。筛选标准为$|logFC|>0.585$和校正后的$P<0.05$。并集中的差异基因是食管癌肿瘤微环境预后相关基因，将这些预后相关基因作为重塑食管癌肿瘤微环境的相关基因。

1.3 八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的靶点筛选及“中药-成分-靶点”网络构建 使用在线工具Venny(https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/)对上述八珍汤有效成分靶点及重塑食管癌肿瘤微环境相关基因取交集，获得交集基因。结合药物成分信息文件，使用Cytoscpe 3.9.1构建“中药-成分-靶点”网络。

1.4 生物信息学分析 采用生物学富集方法对上述过程得到的交集基因进行分析，本过程采用注释、可视化和集成发现数据库(DAVID，https://david.ncifcrf.gov/home.jsp)完成，从基因本体(GO)富集分析以及京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集两方面对共有基因进行分析，并通过三线表呈现，筛选条件：FDR<0.05。

1.5 八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关基因的蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建及Hub基因筛选 将八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关基因导入STRING数据库获得其PPI网络映射关系，并通过Cytoscape 3.9.1对该映射关系进行可视化，并利用Cytoscape的插件CytoHubba筛选网络中的关键基因，根据最大团中心(MCC)算法筛选最为重要的前5个Hub基因，并将这5个Hub基因作为核心基因。

1.6 分子对接 将PPI网络中筛选得到的核心基因作为后续分析的核心靶点，检索核心靶点对应的药物成分作为核心药物成分。通过PubChem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)获取核心药物成分的3D结构，下载其SDF格式文件，并通过OpenBabelGUI将其转换成mol2格式文件。在PDB(https://www.rcsb.org/)数据库下载核心靶点蛋白的三维结构并应用Pymol软件去溶剂分子、水分子及配体，保存为pdb格式文件，其中靶蛋白的选择标

准为来源于人蛋白且具有高分辨率。将受体蛋白文件和药物配体文件分别导入 AutoDockTools 1.5.7 软件加全氢、分配电荷、检测和设置扭转键，并保存为 pdbqt 格式文件。将受体蛋白和药物配体的 pdbqt 格式文件导入 AutoDockTools 1.5.7 软件生成对接盒子并保存为 gpf 格式文件，然后运行 autogrid 计算格点中相关能量，该数据保存为 GLG 文件。使用半柔性对接方式进行对接，设置相关参数，并运行 autodock，结果文件为 GLG 文件，该文件记录了 50 种对接结果的结合自由能等信息，下载结合自由能最低的一种对接方式通过 Pymol 绘制模型图。

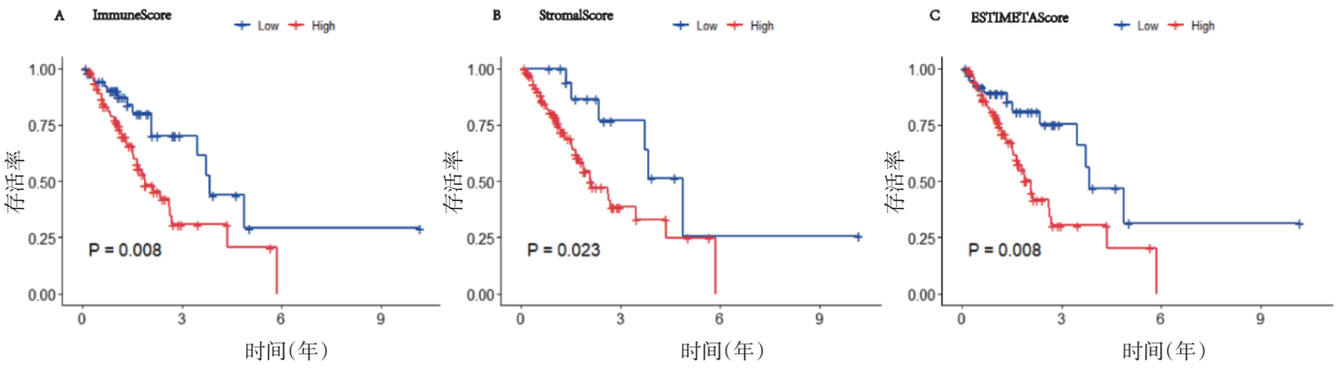
2　结果

2.1　药物有效成分及靶蛋白获取　通过 TCMSP 数据库进行筛选，共获得八珍汤组方药物 150 个有效成分，并通过 UniProt 数据库匹配基因名成功的有效成分有 123 个，其中当归药物成分 2 个、川芎药物成分 6 个、熟地黄药物成分 2 个、白芍药物成分 8 个、白术药物成分 4 个、茯苓药物成分 6 个、甘草药物成分 88 个、人参药物成分 17 个，其中重复成分有 5 个。基于上述有效成分，经过筛查和注释后获得 239 个靶点。

2.2　不同评分分组与食管癌患者预后的关系　见图 1。通过 TCGA 数据库下载食管癌患者的转录组数据和临床信息，经过筛选得到具有完整临床预后信息的食管癌样本 151 例。根据食管癌样本的免疫评分和基质评分的 cut-off 值进行分组，高于 cut-off 值的样本归为高分组，低于 cut-off 值的样本归为低分组。免疫评分最佳 cut-off 值为 219.2，共 96 例样本分入高分组，另 55 例样本属于低分组。基质评分的最佳 cut-off 值为-1 164.9，同样 133 例和 18 例样本分别归入高分组和低分组。综合评分的 cut-off 值为-663.3，同样 112 例和 39 例样本分别归入高分组和低分组。采用 Kaplan-Meier 法分析高低分组间的生存概率，并绘制生存曲线。结果发现，高评分组较低评分组预后差，差异有统计学意义（$P<0.05$），说明肿瘤微环境中的免疫成分和基质成分共同影响着食管癌患者的预后。

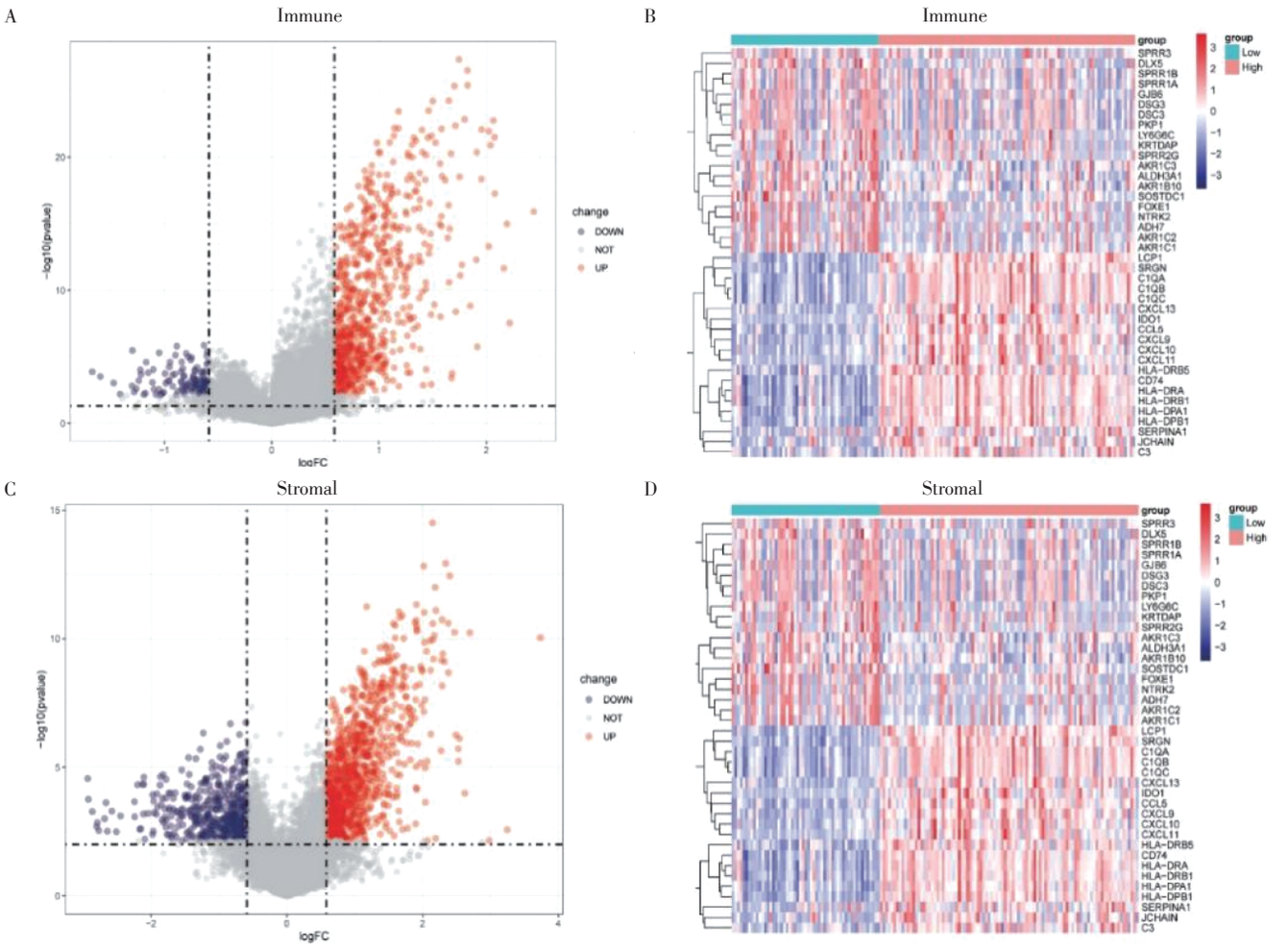
2.3　食管癌肿瘤微环境相关差异基因筛选　见图 2。通过对免疫评分和基质评分不同分组间的生存分析发现，评分高组较评分低组预后差，差异显著，为探索重塑食管癌肿瘤微环境的相关靶点，分别根据免疫评分和基质评分进行高低分组，并通过 limma 包筛选它们的差异基因，结果如下：根据基质评分分组筛选到 1 096 个上调基因，488 个下调基因；根据免疫评分分组筛选到 770 个上调基因，117 个下调基因；筛选标准：|log2FC| > 1，FDR < 0.05。分别将上调和下调基因以及前 40 个差异基因通过火山图和热图进行可视化展现。最后通过将基质评分分组及免疫评分分组的差异基因取并集，去除重复基因，共获得 1 373 个差异基因作为重塑食管癌肿瘤微环境的主要靶点。

2.4　八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关药物靶点获取　见图 3。通过上述差异分析获得食管癌肿瘤微环境预后相关基因 1 373 个。将上述基因与 239 个八珍汤有效成分靶基因取交集，得到八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关药物靶点 31 个。



注：A. 高低免疫评分组（Immune score）生存曲线；B. 高低基质评分组（Stromal score）生存曲线；C. 高低综合评分组（ESTIMATE score）生存曲线

图 1　不同评分分组生存曲线



注：A. 高低免疫评分组间差异基因火山图；B. 高低免疫评分组间差异基因热图；C. 高低基质评分组间差异基因火山图；D. 高低基质评分组间差异基因热图

图 2　高低免疫及基质评分组间差异基因筛选

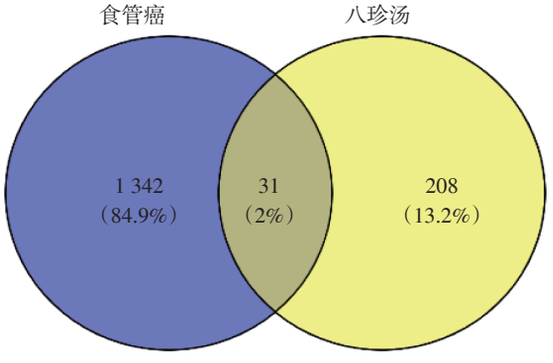


图 3　八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关靶点

2.5　构建“中药-有效成分-靶点-疾病”可视化网络　见图 4。基于药物有效成分及靶点信息，使用 Cytoscape 3.9.0 软件构建“中药-成分-靶点”网络，网络中包含 46 个节点、46 条边，其中蓝色菱形代表靶点，绿色圆形代表不同中药，不同颜色正方形代表不同中药的药物有效成分。网络显示，甘草(GC)重塑食管癌肿瘤微环境相关靶点的有效成分有 4 种，分别为：槲皮素(MOL000098)、异鼠李素(MOL000354)、柚皮素(MOL004328)、山奈酚(MOL000422)。川芎(CX)重塑食管癌微环境相关靶点的有效成分有 1 种，为：杨梅酮(MOL002135)。熟地黄(SDH)重塑食管癌微环境相关靶点的有效成分有 1 种，为：豆甾醇(MOL000449)。当归(DG)重塑食管癌微环境相关靶点的有效成分有 2 种，为：豆甾醇(MOL000449)、β-谷甾醇(MOL000358)。人参(RS)重塑食管癌微环境相关靶点的有效成分有 4 种，为：豆甾醇(MOL000449)、β-谷甾醇(MOL000358)、人参皂苷 Rh2(MOL005344)、山奈酚(MOL000422)。白芍(BS)重塑食管癌微环境

相关靶点的有效成分有3种，为β-谷甾醇（MOL000358）、山奈酚（MOL000422）、芍药苷（MOL001924），其中茯苓（FL）、白术（BZ）无对应有效成分。甘草（GC）为连线数量最多的节点，其主要有效成分如槲皮素、山奈酚可能是八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境并影响食管癌预后的潜在成分，其中山奈酚也是人参和白芍的有效成分之一。

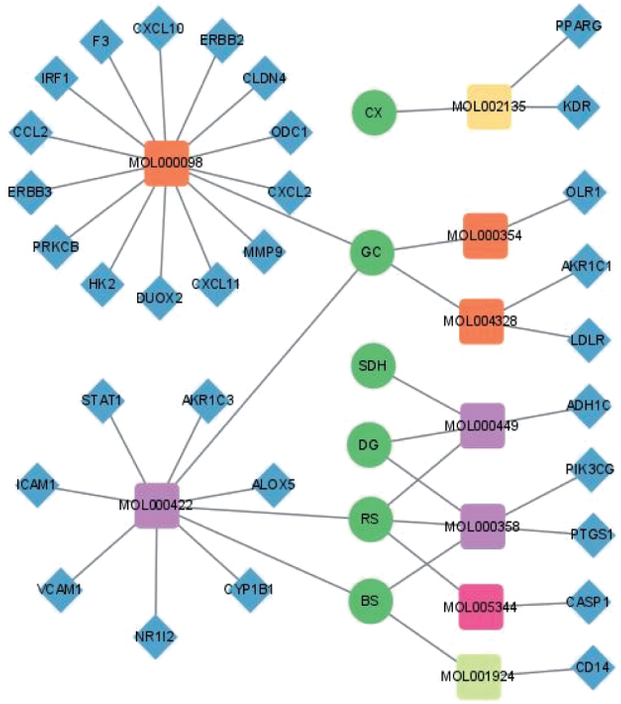


图4　中药-有效成分-靶点-疾病网络图

2.6　核心蛋白互作网络及核心蛋白获取　见图5。将八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的相关靶点导入STRING 11.5数据库，构建PPI网络，网络中共有29个节点，112条边。将PPI网络导入Cytoscape 3.9.1软件进行网络拓扑分析，基于CytoHubba插件计算评分。得到八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的核心靶点PPI网络。网络展示前5个核心靶点，分别为ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1。

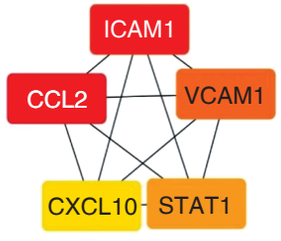


图5　八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境核心靶点

2.7　GO功能与KEGG通路富集分析　见图6。为了揭示筛选出的八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关基因在食管癌进展中的生物学意义，使用DAVID网站对其31个相关靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析，FDR<0.05被认为具有统计学意义。GO富集分析结果显示八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关基因主要涉及以下几方面。①MF：相同蛋白质结合、趋化因子活性、CXCR趋化因子受体结合；②BP：炎症反应、细胞增殖的调控、类固醇代谢过程、血管生成的正负调节、趋化因子介导的信号通路、白细胞-细胞黏附、血液循环等生物学过程；③CC：受体复合物、质膜外侧、细胞外空隙等细胞组分。KEGG通路富集分析结果显示共有靶点主要与趋化因子信号通路、TNF信号通路、NF-κB信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性等通路相关。根据富集结果可以推测出八珍汤可能通过趋化因子信号通路、TNF信号通路、NF-κB信号通路、EGFR酪氨酸激酶抑制剂耐药性等重塑食管癌肿瘤微环境从而影响肿瘤的增殖、凋亡、侵袭转移、血管生成和耐药等。

2.8　分子对接　见表1、图7。为了更明确地探求八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境的治疗机制，将上述核心靶点ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1分别与各自对应的有效成分山奈酚、槲皮素进行分子对接。各有效成分与其对应靶点的结合自由能均小于-1.2 kcal/mol，提示对接结果良好，提示八珍汤有效成分与食管癌肿瘤微环境关键靶点有良好的结合作用。

3　讨论

气血双补之剂八珍汤在临床上使用广泛，其由健脾益气作用的四君子汤和养血活血的四物汤组成，由此方为底加减化裁，对于肿瘤患者气血两虚证有良好的功效。食管癌患者由于其肿瘤部位以及肿瘤形成原因特殊，患者常常表现出消瘦、气血不足的表现，大量研究以及临床经验表明八珍汤对改善食管癌患者生活质量具有重要作用[13-14]，但是其具体机制尚不清楚。随着信息时代的发展，运用生物信息学和网络药理学相关技术能够从大量数据中寻找药物的有效成分和疾病作用靶点，从而探索药物对疾病的药理作用及其机制。分子对接技术已广泛运用于药物有效成分的筛选、发现药物-靶点相互作

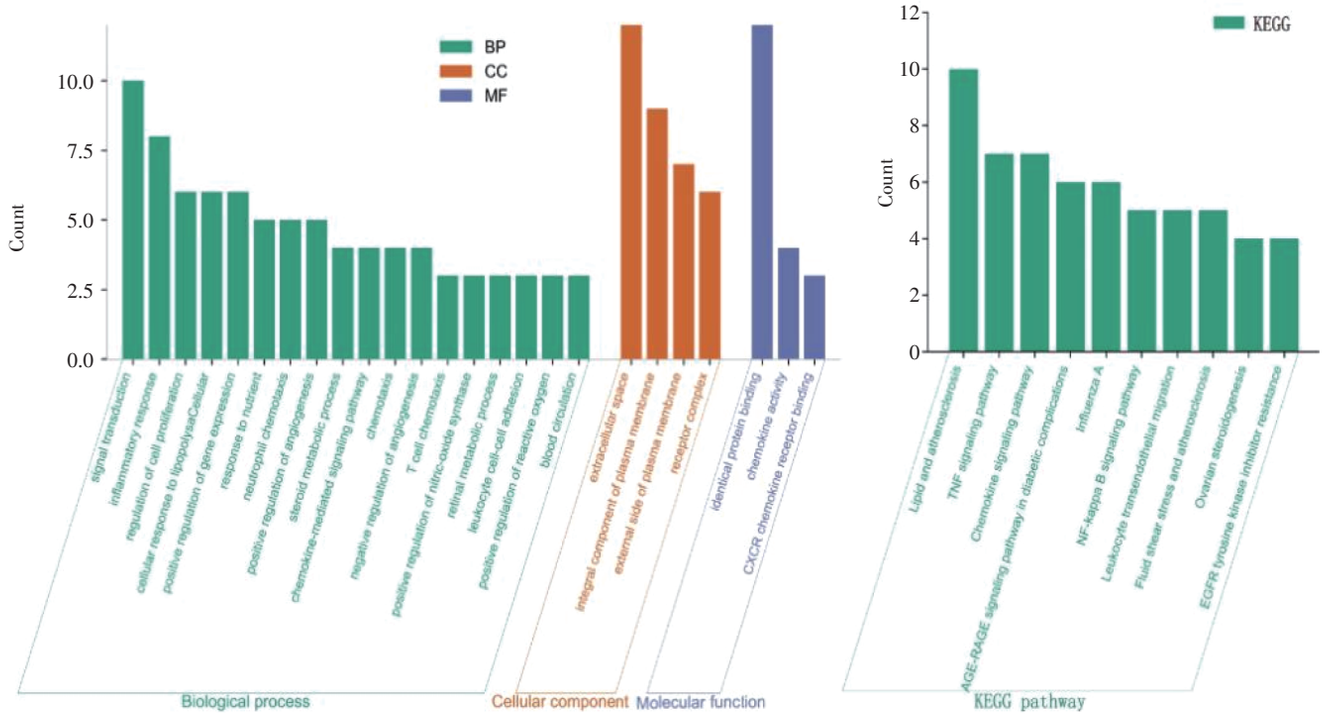
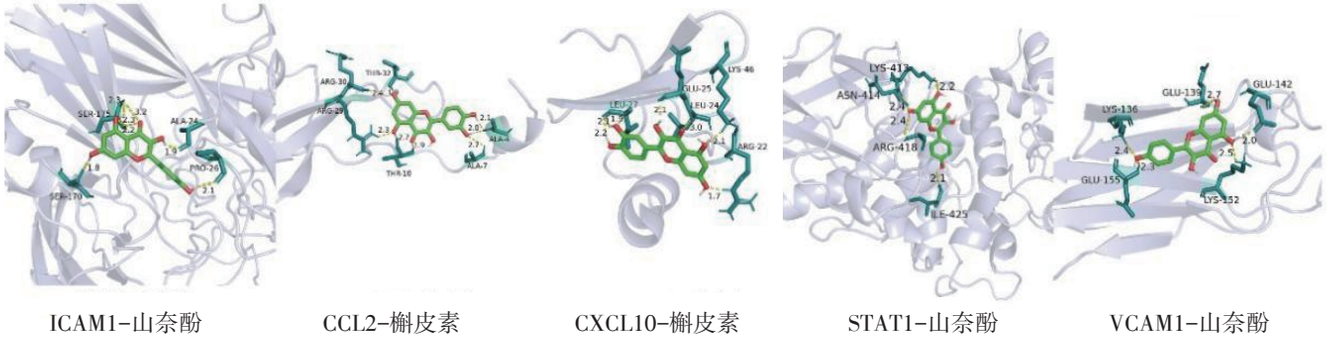


图 6　八珍汤重塑食管癌肿瘤微环境相关基因的 GO 功能和 KEGG 通路富集分析

表 1　八珍汤有效成分与食管癌肿瘤微环境预后相关靶点对接结果

靶蛋白	有效成分	结合能(kcal/mol)	相互作用的氢键残基
ICAM1	山奈酚	−4.98	SER−170、SER−175、ALA−24、PRO−26
CCL2	槲皮素	−5.59	ARG−29、ARG−30、THR−32、THR−10、ALA−4、ALA−7
CXCL10	槲皮素	−6.08	LEU−27、LEU−24、GLU−25、LYS−46、ARG−22
STAT1	山奈酚	−4.64	LYS−413、ASN−414、ARG−418、ILE−425
VCAM1	山奈酚	−4.15	LYS−136、GLU−155、GLU−139、LYS−152、GLU−142



ICAM1−山奈酚　CCL2−槲皮素　CXCL10−槲皮素　STAT1−山奈酚　VCAM1−山奈酚

图 7　八珍汤有效成分与食管癌肿瘤微环境预后相关靶点分子对接构象图

用的机制。“种子与土壤”假说形象地揭示了癌症的扩散和生长很依赖周围的“微环境”。而中医药的优势在于改善整个机体的微环境从而达到治疗疾病的目的，不仅可以直接消灭致癌“种子”，还可以改善肿瘤生长依赖的“土壤环境”[15]。由于八珍汤治疗肿瘤旨在改善肿瘤患者生活质量、延长其生存期，尚无研究证实八珍汤能够直接杀灭肿瘤，说明八珍汤治疗食管癌的机制主要在于重塑肿瘤生长的环境从而发挥治疗作用，所以，本研究基于生物信息学和网络药理学研究方法旨在从肿瘤微环境层面探讨八

珍汤治疗食管癌的作用机制，并结合分子对接技术科学实现药物有效成分与靶点的有效衔接，进一步探索八珍汤重塑食管癌更微观的分子机制。

本研究首先基于TCGA食管癌患者临床信息和表达谱数据分析得到与食管癌患者预后密切相关的基因，并通过与八珍汤有效成分靶点取交集获得八珍汤潜在的作用靶点，并对这些靶点进行GO和KEGG富集分析。GO富集分析结果显示八珍汤调节食管癌肿瘤微环境的靶点主要富集于趋化因子活性、炎症反应、细胞增殖、类固醇代谢、血管生成、细胞黏附、血液循环等方面。KEGG通路富集分析结果显示八珍汤调节食管癌肿瘤微环境的靶点主要与趋化因子信号通路、TNF信号通路、NF-κB信号通路等密切相关。研究表明趋化因子[16]、炎症反应[17-18]、血管生成[19]、细胞黏附[20]等与食管癌的发生发展密切相关。众多趋化因子被证明影响肿瘤侵袭转移、血管生成、化学耐药等。如干细胞自分泌CXC基序趋化因子配体12(CXCL12)/CXC基序趋化因子受体4(CXCR4)刺激食管癌侵袭转移[21]；癌症相关成纤维细胞的白细胞介素-6(IL-6)通过上调CXC基序趋化因子受体7(CXCR7)的表达，从而在化疗耐药中发挥最重要的作用[22]，CXC基序趋化因子配体5(CXCL5)通过增强结直肠癌中AKT/NF-κB通路介导的FOXD1表达诱导肿瘤血管生成[23]。肿瘤坏死因子(TNF)是一种主要由活化的巨噬细胞产生能直接杀伤肿瘤细胞且对正常细胞无明显细胞毒性的细胞因子，其介导的TNF信号通路的激活可引发肿瘤细胞溶解或细胞死亡[24]。NF-κB通路由经典和非经典通路组成。典型的NF-κB调节各种促炎基因的表达，是炎症反应的关键介质。非经典NF-κB通路的激活通过少数TNF受体超家族成员发生。失调的NF-κB活性会导致炎症相关疾病和癌症的发生[25]。总之，GO和KEGG富集分析的结果中相关通路和生物功能在肿瘤发生发展过程中起到重要作用。

同时，根据八珍汤重塑食管癌中的潜在靶点进行蛋白互作网络构建，其中错综复杂的网络关系根据连接的度值排序筛选得到的关键靶点主要有ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1。这5个关键靶点通过调节肿瘤微环境中的免疫细胞或基质细胞功能发挥相应的功能。细胞间黏附分子1(ICAM1)编码一种在内皮细胞和免疫系统细胞上表达的细胞表面糖蛋白，肿瘤细胞表达的ICAM1可以通过促进肿瘤免疫细胞黏附相互作用或通过传递由外而内的信号来调节肿瘤细胞功能而影响肿瘤的发展[26]。同时ICAM1引起T细胞募集会损害浸润性T细胞的效应功能，从而使肿瘤细胞能够逃避免疫识别和杀伤[27]。血管细胞黏附分子1(VCAM1)编码一种由内皮细胞表达的细胞表面唾液酸糖蛋白。炎症中由白细胞分泌的肿瘤坏死因子-α(TNF-α)上调内皮细胞表面VCAM1的表达，活化后的VCAM1直接与白细胞上的α4β1整合素相互作用反过来激活VCAM1下游信号分子最终影响白细胞迁移。VCAM1的表达影响白细胞的黏附功能进一步影响肿瘤血管生成和转移[28]。研究表明，癌细胞上VCAM1的表达影响微环境中播散性肿瘤细胞(DTC)和基质细胞之间的相互作用从而影响远端器官的肿瘤定植[29]。可见VCAM1在通过影响肿瘤微环境中免疫细胞的黏附功能进而影响肿瘤细胞的侵袭和转移。CC基序趋化因子配体2(CCL2)是一种蛋白质编码基因。CCL2是一种有效的单核细胞吸引趋化因子，基质细胞或肿瘤细胞产生的炎症介质(如IL-1、IL-6、TNF-α或转化生长因子-β)可上调肿瘤微环境中肿瘤细胞产生的CCL2，从而刺激肿瘤细胞释放促血管生成因子VEGF-A而诱导肿瘤血管生成，同时由基质细胞而非肿瘤细胞产生的CCL2能够将巨噬细胞募集到乳腺癌组织中发挥抗肿瘤作用[30]。CCL2可能具有促进肿瘤、抑制肿瘤的活性，或两者兼而有之[31]。其具体作用还要视具体情况而定，总体来说，CCL2能够调节肿瘤微环境从而影响肿瘤的发生发展。研究表明CXCL10有望成为治疗自身免疫性疾病、癌症等的有效靶点，成为关键驱动趋化因子[32]。趋化因子是一类具有诱导趋化性、促进免疫细胞分化和引起组织外渗作用的蛋白质。鉴于这些特性，它们在肿瘤微环境中的作用非常重要。趋化因子CXCL9、CXCL10以及CXCL11/CXCR3轴调节免疫细胞迁移、分化和激活，从而抑制肿瘤生长[32]。因此，趋化因子相关信号轴在调节肿瘤微环境、影响肿瘤细胞生长和转移方面具有重要作用。STAT1是干扰素(IFN)信号传导的重要组成部分，主要参与细胞凋亡、细胞周期和上皮间充质转化(EMT)[33]，研究表明，STAT1能够增强头颈部鳞癌肿瘤微环境中的T细胞抗肿瘤免疫力[34]，故激活STAT1在癌细胞中起到抑癌作用。然而，STAT1在

特定条件下也发挥肿瘤促进作用[35]。研究表明，在人乳腺癌细胞中单独抑制 STAT1 和 STAT3 激活能部分下调 PD-L1，而联合抑制则完全下调 PD-L1 表达[36]。说明 STAT1 可以通过调节肿瘤免疫微环境中免疫细胞和肿瘤细胞上某些蛋白的表达影响肿瘤的发生发展。

根据富集结果可以推测出八珍汤可能通过靶向 ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1 激活趋化因子信号通路、TNF 信号通路、NF-κB 信号通路等重塑食管癌的肿瘤微环境，从而影响食管癌增殖、凋亡、迁移、血管生成。研究表明食管鳞状细胞癌中的 STAT1 信号下调了具有致癌潜力的 NF-κB 和 STAT3 的表达或活性[37]，同时 STAT1 可以通过下调 TNF-α 来阻断 NF-κB[37]。李闪闪等[38]通过查阅大量文献发现，中药可以通过调控 PI3K/Akt、Wnt/β-catenin、MAPK、Notch、NF-κB、JAK2/STAT3 等多个信号通路治疗食管癌。所以，富集分析的结果对于后续食管癌治疗靶点和分子机制研究具有一定指导意义。Chen X M 等[39]的研究表明藏红花的提取物羟基红花黄色素 A 可抑制 ICAM1、MMP9、TNF-α 和 VCAM1 的表达，从而调节 NF-κB 信号通路抑制食管癌细胞的恶性发展。说明基于中药单个成分的分子机制研究有助于阐释中药的药理作用机制。故本研究通过分子对接技术证实八珍汤部分有效成分确实能够靶向食管癌肿瘤微环境预后相关靶点。同时已有大量研究证实八珍汤的有效成分槲皮素[40-41]、山奈酚[42]能够抑制食管癌细胞的增殖、侵袭和血管生成。故基于八珍汤有效成分和食管癌肿瘤微环境相关靶点之间相互作用的分子机制的探索，有助于阐释八珍汤治疗食管癌的肿瘤微环境相关分子机制。由于中药具有多成分、多靶点的特点，且肿瘤微环境也是复杂多变的肿瘤生态环境，故探索中药治疗肿瘤的分子机制从肿瘤微环境预后相关基因进行探索，更能从整体阐释中药抗肿瘤的作用机制，而不是局限于单纯杀灭肿瘤。

综上所述，本研究为探索八珍汤干预食管癌肿瘤微环境的靶点和机制，采用综合生物信息学和网络药理学以及分子对接的方法进行研究，不仅为临床应用八珍汤治疗食管癌提供相应的理论基础，还为进一步深入机制研究提供参考。本研究筛选出 5 个具有重要意义的靶基因作为后续实验研究的候选基因，即 ICAM1、CCL2、CXCL10、STAT1、VCAM1。同时通过大量参考文献也证实这些基因在调节肿瘤微环境方面具有重要意义，所以有希望成为八珍汤调节食管癌肿瘤微环境的作用靶点。

[参考文献]

[1] FREDDIE B，JACQUES F，ISABELLE S，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] HAO Q，FUTAO L，YAOZHONG Z，et al. Comparison of neoadjuvant immunotherapy versus routine neoadjuvant therapy for patients with locally advanced esophageal cancer：A systematic review and meta-analysis[J]. Front Immunol，2023，14：1108213.

[3] 张亚玲，郑玉玲，刘怀民，等. 食管癌手术后中医辨证新体系Delphi法专家问卷分析[J]. 中医学报，2021，36(11)：2450-2454.

[4] 郑玉玲，张亚玲，宋学坤，等. 食管癌化疗后中医证候分型及辨证要点的研究[J]. 中医研究，2021，34(11)：11-17.

[5] 刘凤斌，彭陈文，何沛聪，等. 八珍汤抗癌机制的网络药理学探讨[J]. 中华中医药学刊，2020，38(5)：30-36.

[6] 周芸娜，吕星旺. 八珍汤联合化疗治疗晚期结肠癌疗效观察[J]. 世界中西医结合杂志，2020，15(8)：1524-1527.

[7] 曹晓霞，延学学. 八珍汤联合放化疗治疗宫颈癌的临床效果及对患者免疫功能、癌因性疲乏及毒副反应的影响[J]. 临床医学研究与实践，2022，7(12)：138-141.

[8] 项硕. 八珍汤联合放化疗治疗中晚期食管癌39例[J]. 中国中医药现代远程教育，2019，17(10)：72-73.

[9] 郭书伟. 中药八珍汤配合放化疗对中晚期食管癌患者免疫功能及生活质量的影响研究[J]. 亚太传统医药，2017，13(10)：126-127.

[10] 李小军，冯春兰，罗海亮，等. 八珍汤辅助放化疗治疗中晚期食管癌45例临床观察[J]. 中医杂志，2016，57(5)：416-419.

[11] 陈震宏，许盈，舒敬德，等. 术前同步放疗、化疗联合八珍汤辅助治疗食管癌疗效分析[J]. 中医学报，2013，28(9)：1269-1270.

[12] 殷书敏，徐振晔，邓海滨，等. 中医药重塑肿瘤微环境的作用机制与优势[J]. 上海中医药大学学报，2019，33(5)：1-7.

[13] 王会丽. 八珍汤对中晚期食管癌化疗患者毒副反应及生活质量的影响[J]. 中国民间疗法，2017，25(8)：60-61.

[14] 杨永峰. 八珍汤配合放化疗对中晚期食管癌患者免疫功能及生活质量的影响[J]. 河南医学研究，2017，26(12)：2187-2188.

[15] LUCHANG C，XINMIAO W，GUANGHUI Z，et al. Traditional Chinese Medicine Therapy for Esophageal Cancer：A Literature Review[J]. Integrative Cancer Therapies，2021，20：15347354211061720.

[16] BHAT A A，NISAR S，MAACHA S，et al. Cytokine-chemokine network driven metastasis in esophageal cancer，promising avenue for targeted therapy[J]. Molecular Cancer，2021，20(1)：2.

[17] ABDEL-LATIF M M M, DUGGAN S, REYNOLDS J V, et al. Inflammation and esophageal carcinogenesis[J]. Current Opinion in Pharmacology, 2009, 9(4): 396-404.

[18] O'RIORDAN J M, ABDEL-LATIF M M, RAVI N, et al. Proinflammatory cytokine and nuclear factor kappa-B expression along the inflammation-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in the esophagus[J]. Am J Gastroenterol, 2005, 100(6): 1257-1264.

[19] AFSANEH B, EDDIE T. Angiogenesis in esophageal and gastric cancer: a paradigm shift in treatment[J]. Expert Opinion on Biological Therapy, 2014, 14(9): 1319-1332.

[20] NAIR K S, NAIDOO R, CHETTY R. Expression of cell adhesion molecules in oesophageal carcinoma and its prognostic value[J] Journal of Clinical Pathology, 2005, 58(4): 343-351.

[21] XINGWEI W, YAN C, SHIRONG Z, et al. Stem cell autocrine CXCL12/CXCR4 stimulates invasion and metastasis of esophageal cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(22): 36149-36160.

[22] QIAO Y, ZHANG C, LI A, et al. IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncogene, 2018, 37(7): 873-883.

[23] CHEN C, XU Z Q, ZONG Y P, et al. CXCL5 induces tumor angiogenesis via enhancing the expression of FOXD1 mediated by the AKT/NF-κB pathway in colorectal cancer[J]. Cell Death & Disease, 2019, 10(3): 178.

[24] HORSSEN R V, HAGEN T L M T, EGGERMONT A M M. NF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility[J]. Oncologist, 2006, 11(4): 397-408.

[25] HUI Y, LIANGBIN L, ZHIQIANG Z, et al. Targeting NF-κB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2020, 5(1): 209.

[26] BUI T M, WIESOLEK H L, SUMAGIN R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis[J]. Journal of Leukocyte Biology, 2020, 108(3): 787-799.

[27] ALBA Y, SARAY G, ÁLVARO T, et al. ICAM-1-LFA-1 Dependent $CD8^+$ T-Lymphocyte Aggregation in Tumor Tissue Prevents Recirculation to Draining Lymph Nodes[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 2084.

[28] DEOK-HOON K, KWAN K Y, RA K M, et al. Emerging Roles of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) in Immunological Disorders and Cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(4): 1057.

[29] QING C, JOAN M. Molecular pathways: VCAM-1 as a potential therapeutic target in metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(20): 5520-5525.

[30] TEIZO Y. The chemokine MCP-1 (CCL2) in the host interaction with cancer: a foe or ally?[J]. Cell Mol Immunol, 2018, 15(4): 335-345.

[31] ILARIA C, BARRETT J R. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer[J]. Seminars in Cancer Biology, 2004, 14(3): 149-154.

[32] KARIN N, RAZON H. Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity[J]. Cytokine, 2018, 109: 24-28.

[33] MIN Z, PING Z, MENGTING D, et al. A pan-cancer analysis of the expression of STAT family genes in tumors and their relationship to the tumor microenvironment[J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 925537.

[34] KELVIN A, NATHAN R, DIVYA N, et al. STAT1 is regulated by TRIM24 and promotes immunosuppression in head and neck squamous carcinoma cells, but enhances T cell antitumour immunity in the tumour microenvironment[J]. British Journal of Cancer, 2022, 127(4): 624-636.

[35] YING Z, ZHAOYONG L. STAT1 in cancer: friend or foe?[J]. Discovery Medicine, 2017, 24(130): 19-29.

[36] NAIR V S, TOOR S M, ALI B R, et al. Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells[J]. Expert Opin Ther Targets, 2018, 22(6): 547-557.

[37] YING Z, OMMOLEILA M, MIN S, et al. The clinical and biological significance of STAT1 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 791.

[38] 李闪闪, 魏丹丹, 裴俊文, 等. 中药调控食管癌相关信号通路研究进展[J/OL]. 中国实验方剂学杂志: 1-15[2023-09-11]. https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20230427.

[39] CHEN X M, WANG Y F, ZHANG L J, et al. Hydroxysafflor Yellow A of Carthamus Tinctorius L, Represses the Malignant Development of Esophageal Cancer Cells via Regulating NF-κB Signaling Pathway[J]. Cell Biochem Biophys, 2020, 78(4): 511-520.

[40] YUE L, LI L C, QIAN X Q, et al. Quercetin Inhibits Invasion and Angiogenesis of Esophageal Cancer Cells[J]. Pathology-Research and Practice, 2021, 222: 153455.

[41] DAVOODVANDI A, VARKANI M S, CLARK C C T, et al. Quercetin as an anticancer agent: Focus on esophageal cancer[J]. Journal of Food Biochemistry, 2020, 44(9): e13374.

[42] SHIHUA Y, XIAOWEI W, CHUNGUANG L, et al. Kaempferol inhibits cell proliferation and glycolysis in esophagus squamous cell carcinoma via targeting EGFR signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2016, 37(8): 10247-10256.

(责任编辑: 吴凌, 李海霞)