

本文引用: 娄余, 朱莹, 彭瑶, 王焱霏, 易书林. 基于网络药理学探讨三物白散治疗胃癌的分子机制及初步验证[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(4): 566-575.

基于网络药理学探讨三物白散治疗胃癌的 分子机制及初步验证

娄余¹, 朱莹^{2*}, 彭瑶¹, 王焱霏¹, 易书林¹

(1. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南长沙 410005; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007)

〔摘要〕 **目的** 运用网络药理学联合分子对接探讨三物白散治疗胃癌的作用机制, 通过体外细胞实验对相关靶点作初步验证。**方法** 利用 TCMSp 数据库获取三物白散的活性成分及潜在靶点; 通过 Genecards、OMIM、TTD 数据库, 收集胃癌相关的作用靶点; 将三物白散潜在靶点与胃癌靶点相匹配, 获得三物白散抗胃癌的作用靶点, 使用 STRING 数据库对作用靶点进行蛋白互作分析, 构建 PPI 网络, 并进行拓扑分析筛选核心靶点; 用 R 语言对作用靶点进行 GO 生物学过程和 KEGG 通路富集分析; 采用 Auto Dock Vina 软件对核心靶点与对应活性成分进行分子对接; 运用 qPCR 验证三物白散对胃癌细胞 SGC-7901 中 Caspase-3、Caspase-7 作用靶点的调控作用。**结果** 经筛选获得三物白散活性成分 17 个, 三物白散作用靶点 84 个, 经拓扑分析得到 12 个核心作用靶点, 包括 TP53、AKT1、MAPK1、JUN、CASP3 等。三物白散作用靶点涉及 PI3K-AKT、p53、HIF-1、IL-17 等多条信号通路, 通过诱导细胞凋亡、抑制细胞增殖、调节缺氧及炎症微环境发挥抗肿瘤作用。分子对接结果表明, 活性成分与核心靶点有良好的结合能力。体外实验结果证实, 三物白散可上调凋亡相关分子 Caspase-3、Caspase-7 的表达, 这在一定程度上证实了网络药理学预测及指导实验设计的可靠性。**结论** 本研究结果体现了三物白散多成分、多靶点、多通路的治疗特点, 系统地揭示了其抗胃癌的药效物质、核心靶点和信号通路, 为后续深入研究作用机制提供参考。

〔关键词〕 胃癌; 三物白散; 网络药理学; 作用靶点; 分子对接; 体外细胞实验

〔中图分类号〕R285.5 **〔文献标志码〕**A **〔文章编号〕**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.04.013

Molecular Mechanism of Sanwubai Powder in Treatment of Gastric Cancer Based on Network Pharmacology and Preliminary Validation

LOU Yu¹, ZHU Ying^{2*}, PENG Yao¹, WANG Yipei¹, YI Shulin¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

〔Abstract〕 **Objective** To investigate the mechanism of Sanwubai Powder in the treatment of gastric cancer based on network pharmacology combined with molecular docking, and to preliminarily verify the related targets by in vitro cell experiments. **Methods** TCMSp was used to screen and predict the compounds and targets in Sanwubai Powder. Targets related to gastric cancer were collected by GeneCards, OMIM and TTD databases. The potential targets of Sanwubai Powder were matched with the targets of gastric cancer to obtain the anti-gastric cancer targets of Sanwubai Powder, STRING was used to analyze the protein-protein interaction of targets, PPI network was structured and then the core targets were screened by using topology analysis. GO biological process analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed by R language. Auto Dock Vina software was used

〔收稿日期〕2020-08-18

〔基金项目〕中医内科重大疾病防治研究与转化教育部重点实验室开放基金(ZYNK201705); 湖南省研究生科研创新项目(CX20190546)。

〔作者简介〕娄余, 女, 在读博士研究生, 研究方向: 中西医防治消化系统疾病。

〔通讯作者〕* 朱莹, 女, 博士研究生导师, 主任医师, E-mail: zhuying089@126.com。

to dock the core targets with the active ingredients. qPCR was used to verify the regulatory effects of Sanwubai Powder on the targets of Caspase-3 and Caspase-7 in gastric cancer cells SGC-7901. **Results** 17 active components were screened, and 12 hub targets of 84 targets including TP53, AKT1, MAPK1, JUN and CASP3 were obtained of Sanwubai Powder. The targets of Sanwubai Powder involved PI3K-Akt, p53, HIF-1, IL-17 signal pathways, which played an anti-tumor role by inducing cell apoptosis, inhibiting cell proliferation, regulating hypoxia and inflammatory microenvironment. The results of molecular docking showed that active ingredients had good binding capacity with targets. The results of in vitro experiments confirm that, Sanwubai Powder could up-regulate the expression of apoptosis-related molecules Caspase-3 and Caspase-7, which to a certain extent confirmed the reliability of network pharmacological prediction and experimental design guidance. **Conclusion** The results of this study reflected the therapeutic characteristics of Sanwubai Powder with multiple components, multiple targets and multiple pathways, revealed the active components, key targets and important pathways of Sanwubai Powder in the treatment of gastric cancer, and provided research ideas and reference basis for further discussion on the mechanism of action.

[**Keywords**] gastric cancer; Sanwubai Powder; network pharmacology; effect target; molecular docking; in vitro cell experiment

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,据全国肿瘤登记中心发布的数据显示,我国胃癌的发生率及病死率位居各类肿瘤的第二位^[1],已严重危害了人们的生命和健康。目前,胃癌的发病机制尚未完全明确,但不可否认的是,胃癌的发生发展是由癌基因和抑癌基因大量遗传改变积累而成,导致多种信号通路失调,扰乱细胞周期和细胞增殖与死亡的平衡^[2]。在治疗上,早期胃癌缺乏特异性的症状与体征,导致其早期检出率较低,多数患者在确诊时已处于进展期,治疗效果不佳,且无论是放化疗,还是靶向治疗,毒副作用都较大,严重降低了患者的生存质量,甚至可能因不能耐受而被迫终止治疗。

中医药治疗胃癌具有独特优势,其在减轻化疗不良反应、增强疗效、改善生存质量、延长生存期等方面发挥重要作用^[3-4]。中医学基于胃癌临床症状,将其归于“噎膈”“反胃”“积聚”等范畴,认为胃癌的发生发展是一个邪正斗争、正邪力量不断变化的过程,进展期胃癌表现为邪盛为主,兼顾正虚。在治疗上,医家张从正认为“医之道,损有余乃所以补其不足”“不补之中有真补存焉”,突出强调了“祛邪以扶正”的治疗原则^[5]。三物白散是温下攻邪的代表方,出自《伤寒论·辨太阳病脉证并治》:“寒实结胸,无热证者,与三物白散”,方中巴豆温通寒实、攻逐痰水;贝母消痰散结;桔梗宣畅气机,辅以祛痰,共奏温下逐瘀、消痰散结之功。前期研究^[6]发现,三物白散治疗胃癌具有确切的临床疗效,相关基础实验研究^[7]证实了该复方能够抑制胃癌细胞增殖,促进其凋亡,但其抗癌作用的分子机制尚未完全阐明。

中药复方具有多成分、多靶点、多通路的整体性作用特点,其作用机制的研究较为复杂。网络药理学是发展于系统生物学和多向药理学基础上的,利用多种数据库平台及计算机软件,构建药物成分、作用靶点、疾病网络关系,其整体性的研究策略与中医学整体观的理念不谋而合^[8-9]。因此,本研究借助网络药理学系统地预测三物白散治疗胃癌的活性成分、潜在靶点、信号通路,利用分子对接法初步模拟成分与靶点的结合,并结合体外实验进行初步验证,为后续深入研究提供参考依据。

1 资料

1.1 主要材料及试剂

人胃癌细胞 SGC-7901 购自上海吉凯基因技术有限公司;SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供(动物合格证号:43004700030743),饲养于湖南中医药大学动物实验中心[场地许可证号:SKY(湘)2013-0005]。二甲基亚砜(北京索莱宝科技有限公司,批号:D8370);MTT 试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号:M8180);Giemsa 染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号:G1010);逆转录试剂盒(promega 公司,批号:A3500);q-PCR mix(promega 公司,批号:A6001)。三物白散混悬液由巴豆霜(含 10%油)、浙贝母、桔梗以 1:3:3 组成,所需饮片购自湖南中医药大学第二附属医院中药房。

1.2 主要仪器

二氧化碳培养箱(德国 Eppendorf 公司,型号:

Galaxy 48 R);超净工作台(苏州苏净仪器自控设备有限公司,型号:SW-CJ-1FD);倒置显微镜(德国 ZEISS 公司,型号:Axio Vert.A1);多功能酶标仪(美国 BioTek 公司,型号:Cytation3);台式高速冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司,型号:Fresco17);实时定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:CFX Connect)。

2 方法

2.1 活性成分的筛选

利用 TCMSp 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcm-sp.php>),检索三物白散方中巴豆、浙贝母、桔梗 3 味药物的化学成分,以口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ 和化合物类药性(DL) ≥ 0.18 为筛选标准^[10],选出三物白散方中具有较高活性的成分。利用 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>),收集与校对活性成分的名称,下载对应的活性成分信息,以 3D 结构保存为 SDF 格式,以备分子对接。

2.2 作用靶点的筛选

2.2.1 活性成分靶点预测 利用 TCMSp 数据库获取三物白散活性成分的潜在作用靶点,利用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>),限定物种为“Homo sapiens”,对靶点进行规范化基因注释。

2.2.2 胃癌靶点筛选 在 GeneCards(<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org/>)和 TTD 数据库(<http://db.idrblab.net/ttd/>)三大数据库中输入检索词“gastric cancer”,收集胃癌相关的非重复靶基因。

2.2.3 作用靶点筛选 将胃癌相关靶点与药物活性成分作用靶点进行匹配,最终获得三物白散治疗胃癌的作用靶点,用作后续分析。

2.3 “药物成分-作用靶点”网络构建

应用 Cytoscape 3.8.0 软件将药物活性成分与疾病作用靶点进行关联,构建药物活性成分与作用靶点的关系网络图,其中“节点(node)”代表活性成分、作用靶点,“边(edge)”代表节点之间的相互关系,进而分析出主要的药物活性成分。

2.4 蛋白相互作用(PPI)和网络拓扑分析

2.4.1 PPI网络 利用 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)分析作用靶点,选择 Multiple Protein,限定物种为“Homo sapiens”,设定 combined score >0.7 ,将获

得的信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建靶蛋白互作网络,并对网络图进行拓扑分析,进一步筛选获得核心靶点,网络拓扑分析过程见方法“2.4.2”项。

2.4.2 网络拓扑分析 将方法“2.4.1”项构建的 PPI 网络分析结果导入 Cytoscape 3.8.0 软件,根据 3 个主要参数度(DC)、度介中心度(BC)和接近中心度(CC)大于中位数进行网络拓扑分析,筛选核心靶点。

2.5 作用靶点 GO 和 KEGG 富集分析

应用 R 软件对疾病与药物共同作用靶点进行 GO 富集分析,将富集结果以柱状图形式呈现,分析其涉及的主要生物学过程。并应用 R 软件对以上靶点进行 KEGG 通路富集分析,将结果以气泡图形式呈现,并根据 *P* 值的大小分析核心通路富集程度,以探讨三物白散抗胃癌的可能作用机制。

2.6 分子对接

选取 PPI 网络拓扑分析后筛选出的核心靶蛋白作为核心受体蛋白,在 PDB 数据库(<https://www.rcsb.org>)中输入靶蛋白名称,设置 ORGANISM 为“Homo sapiens”,选取分辨率高的靶蛋白三维结构。使用 Pymol 软件对原受体蛋白 pdb 文件去除水分子及原配体分子,将处理后的受体和配体的 pdb 文件导入 Auto Dock Tools,进行常规处理,保存为 pdbqt 的格式文件,再用 Auto Grid 得到对接位点参数,运行 Auto Dock Vina^[11]进行分子对接。以最低结合能作为靶蛋白和配体对接的结果,使用 Pymol 软件进行分析及可视化。

2.7 SGC-7901 细胞体外实验验证

2.7.1 含药血清制备 将 20 只 SD 雄性大鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为空白对照组和三物白散组,每组 10 只。参照课题组前期研究的方法^[12]进行含药血清制备:三物白散组按 0.07 g/kg 剂量灌胃,空白对照组给予等体积生理盐水灌胃,1 次/d,连灌 7 d。于末次给药 1 h 后,腹腔注射 10%水合氯醛(4 mL/kg)麻醉后,腹主动脉采血,4 ℃下静置 4 h,以 3 000 r/min 离心 20 min,分离血清。经 56 ℃水浴锅灭活 30 min 后,经 0.22 μm 微孔滤膜无菌过滤后,放置于-20 ℃冰箱保存备用。

2.7.2 细胞培养 SGC-7901 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基(含 100 IU/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素),在 37 ℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养,

至细胞生长至70%~80%开始传代,以备后续实验。

2.7.3 MTT法检测细胞增殖活性 SGC-7901细胞分为空白对照组与三物白散组,空白对照组加入含5%空白对照组大鼠血清的DMEM培养基;三物白散组加入含5%含药血清的DMEM培养基。培养48 h后,每孔加5 mg/mL MTT试剂10 μ L,继续放入培养箱孵育4 h。弃培养液,每孔加DMSO 150 μ L,振荡10 min。在490 nm波长下用酶标仪测定每孔吸光度(OD)值。

2.7.4 Giemsa染色法检测细胞克隆形成 将SGC-7901细胞以500个/孔接种到6孔板,每组设3个复孔。干预方法同上。当6孔板中出现肉眼可见克隆时终止培养,PBS浸洗细胞2次,甲醇固定5 min,Giemsa染色30 min,冲去染色液,室温下干燥。在显微镜下计数含50个细胞以上的细胞克隆数。

2.7.5 q-PCR法检测Caspase-3、Caspase-7 mRNA的表达 提取各组细胞总RNA,按试剂盒指导逆转录为cDNA。Caspase-3上游引物为5'-TGGAAGC-GAATCAATGGACTCTGG-3',下游引物为5'-CCA-GACCGAGATGTCATTCCAGTG-3',扩增片段为132 bp;Caspase-7上游引物为5'-GCTGACTTCCTCTTCGCCTATTCC-3',下游引物为5'-TGCCTG-GCAACTCTGTCATTAC-3',扩增片段为167 bp。 β -actin上游引物为5'-TATGACTT GTTGCCTTA

CAC-3',下游引物为5'-CCTTCCCGTTCAGTTT-3',扩增片段为155 bp。按如下程序扩增:94 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 40 s,60 $^{\circ}$ C 30 s, \times 40 cycle。导出CT值,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算mRNA的相对表达量。

2.7.6 统计学方法 采用SPSS 21.0进行统计分析,数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,若满足正态性和方差齐性,两组间比较采用独立样本 t 检验,均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 活性成分及作用靶点

通过检索TCMSP共检索到三物白散方中化学成分158个,其中包括桔梗102个,浙贝母17个,巴豆39个。以 $OB\geq 30\%$ 和 $DL\geq 0.18$ 为条件筛选出18个化学成分,去重后得到17个活性成分。见表1。

3.2 作用靶点的筛选结果

通过TCMSP数据库共得到三物白散活性成分潜在作用靶点176个,其中巴豆35个、桔梗85个、浙贝母56个,剔除重复部分,共有潜在靶点90个。利用Genecards、OMIM、TTD 3个数据库分别获得8 611、170、37个与胃癌相关的疾病靶基因,整合数据并删除重复靶点,获得与胃癌相关的靶点共8 633个。将药物活性成分靶点与疾病靶点取交集,最终收集84个共同作用靶点用于后续分析。见图1。

表1 三物白散活性成分信息表

Mol ID	活性成分	OB/%	DL	药物来源
MOL001689	Acacetin	34.97	0.24	桔梗
MOL004355	Spinasterol	42.98	0.76	桔梗
MOL004580	cis-Dihydroquercetin	66.44	0.27	桔梗
MOL005996	2-O-methyl-3-O- β -D-glucopyranosyl platycogenate A	45.15	0.25	桔梗
MOL000006	Luteolin	36.16	0.25	桔梗
MOL006026	dimethyl 2-O-methyl-3-O-a-D-glucopyranosyl platycogenate A	39.21	0.25	桔梗
MOL006070	Robinin	39.84	0.71	桔梗
MOL001004	Pelargonidin	37.99	0.21	浙贝母
MOL000358	beta-sitosterol	36.91	0.75	浙贝母、巴豆
MOL004440	Peimisine	57.40	0.81	浙贝母
MOL004443	Zhebeiresinol	58.72	0.19	浙贝母
MOL004444	Ziebeimine	64.25	0.70	浙贝母
MOL004446	6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucopyranoside	33.31	0.57	浙贝母
MOL004450	Chaksine	65.63	0.66	浙贝母
MOL001638	Phorbol	46.81	0.47	巴豆
MOL001645	Linoleyl acetate	42.10	0.20	巴豆
MOL000359	Sitosterol	36.91	0.75	巴豆

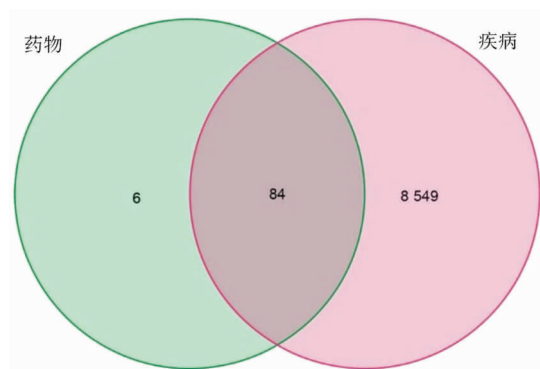


图 1 三物白散靶点与胃癌靶点的韦恩图

3.3 “药物成分-作用靶点”网络

为进一步分析三物白散中发挥抗胃癌的关键活性成分,应用 Cytoscape 软件将 11 个药物成分与 84 个作用靶点进行关联,构建“药物成分-作用靶点”网络(图 2),共包括 95 个节点(药物活性成分 11 个,作用靶点 84 个)和 134 条边,结果显示三物白散关键作用成分有木犀草素(luteolin,与 51 个靶点相关), β -谷甾醇(beta-sitosterol,与 25 个靶点相关),金合欢素(acacetin,与 21 个靶点相关)及天竺葵素(pelargonidin,与 13 个靶点相关),这些关键作用成分主要是黄酮类和甾醇类。

3.4 PPI 网络构建与分析

将 84 个共同靶点输入 STRING 数据库,得到靶蛋白间互作关系,节点数(靶点蛋白)78 个,边数(蛋白间相互作用)441 条,将数据导入 Cytoscape 3.8.0 软件构建 PPI 网络。并采用 CytoNCA 插件,根据 DC、BC、CC 对此网络进行拓扑分析,选取大于中位值的靶点构建三物白散抗胃癌的核心靶点网络。对由 78 个节点和 441 条边组成的 PPI 网络进行筛选,经过

第 1 次筛选($DC \geq 10, BC \geq 25.5817, CC \geq 0.4502$)初步得到含 26 个节点和 172 条边的互作网络图,经过第 2 次筛选($DC \geq 12, BC \geq 5.0039, CC \geq 0.6579$)得到含 12 个节点和 57 条边的核心作用网络(图 3),12 个核心靶点信息详见表 2。

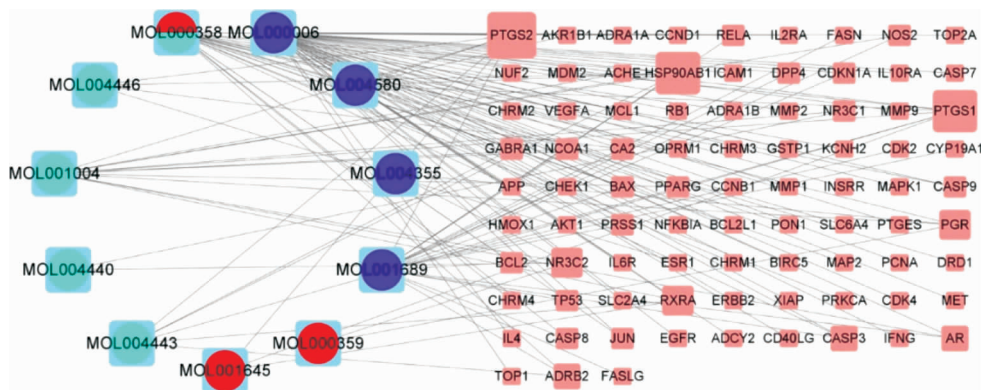
表 2 核心靶蛋白与对应活性成分的对接结果

Uniprot ID	基因名称	蛋白名称	Degree
P04637	TP53	Cellular tumor antigen p53	43
P31749	AKT1	RAC-alpha serine/threonine-protein kinase	36
P28482	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	32
P05412	JUN	Transcription factor AP-1	31
P42574	CASP3	Caspase-3	29
P24385	CCND1	G1/S-specific cyclin-D1	26
P00533	EGFR	Epidermal growth factor receptor	24
P10275	AR	Androgen receptor	22
P15692	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	21
P03372	ESR1	Estrogen receptor	20
Q04206	RELA	Transcription factor p65	20
P14780	MMP9	Matrix metalloproteinase-9	19

将 12 个核心靶点与其他靶点进一步构建 PPI 网络,按节点大小降序排序(图 4),节点越大说明该靶点连接的节点越多,在网络中作用越重要,如 TP53、AKT1、MAPK1、JUN、CASP3、CCND1 等,可作为三物白散抗胃癌的潜在作用靶点。

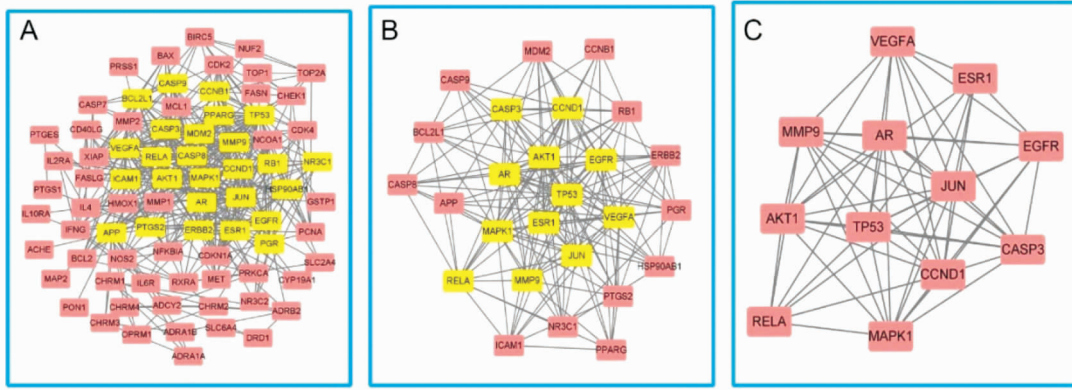
3.5 GO 功能富集分析

应用 R 软件对共同靶点进行 GO 富集分析,得到柱状图(图 5),主要涉及外源性凋亡信号通路、半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡过程、细胞对药物的反应、肌细胞增殖、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全



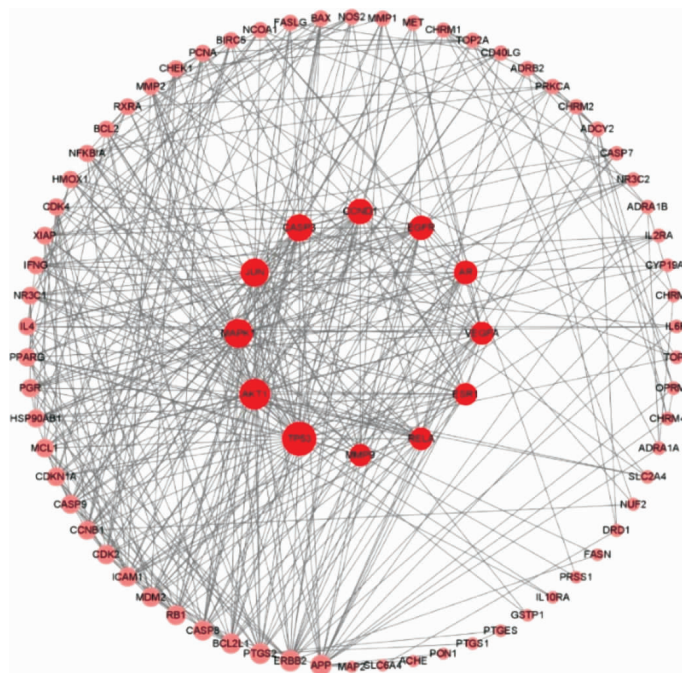
注:红色代表巴豆有效成分,蓝色代表贝母有效成分,紫色代表桔梗有效成分;粉色代表作用靶点,其大小表示作用于该靶点的药物活性成分数量

图 2 “药物成分-作用靶点”网络



注:A图中包含78个节点、441条边;B图中包含26个节点、172条边;C图中包含12个节点、57条边

图3 PPI网络拓扑分析



注:网络中节点的大小反映Degree值的大小,节点越大说明Degree值越大

图4 药物作用靶点蛋白PPI网络图

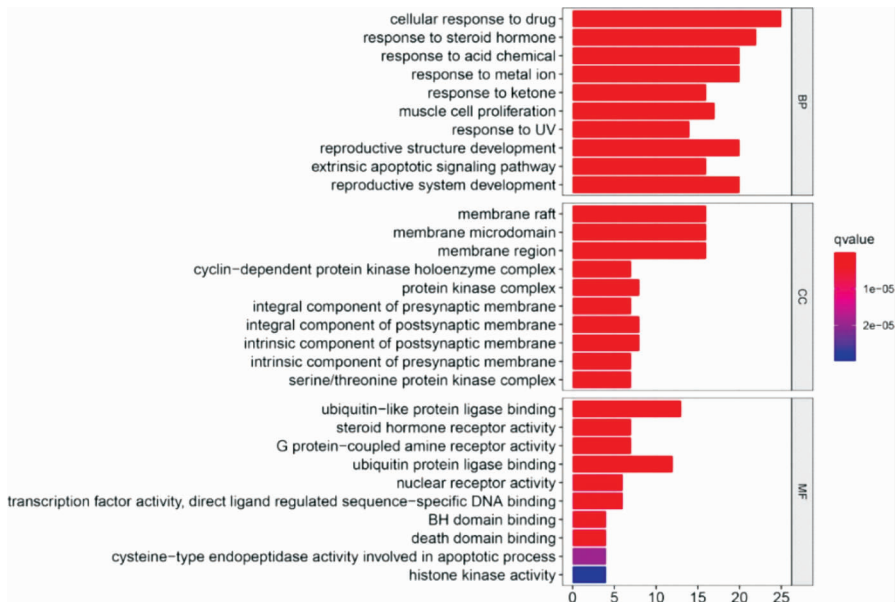


图5 作用靶点GO功能富集分析

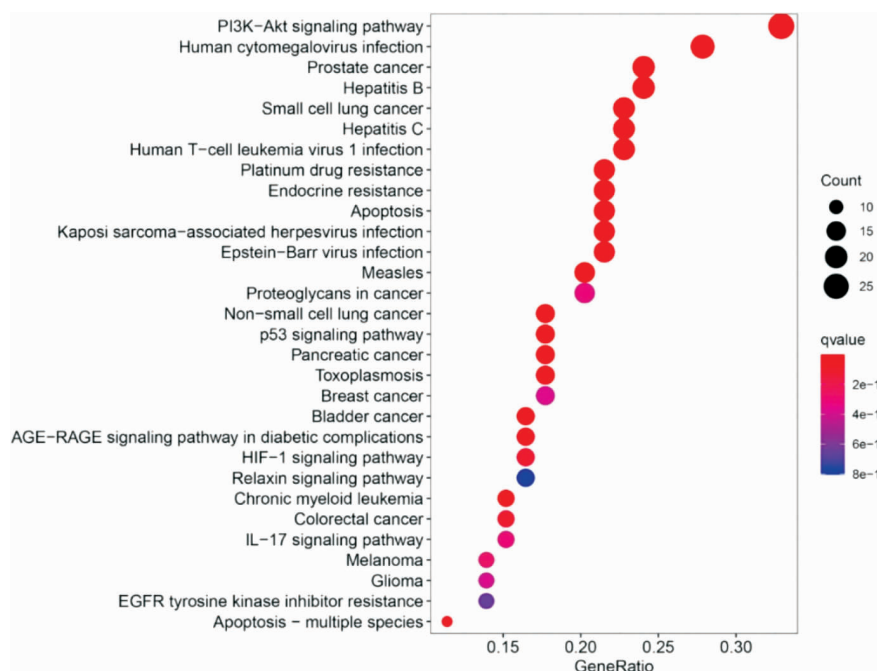


图 6 作用靶点 KEGG 通路富集分析

酶复合物等生物学过程,体现了三物白散抗胃癌作用可能通过调控多种生物学过程协同作用的结果。

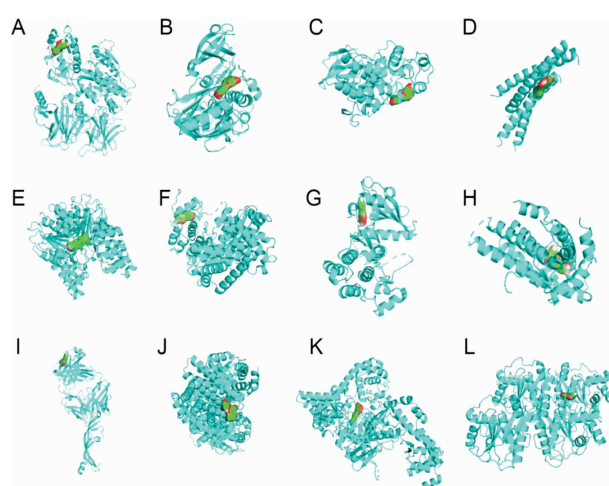
3.6 KEGG 通路富集分析

为了揭示三物白散对胃癌的抗癌作用机制,应用 R 软件对筛选出的 84 个共同靶点进行 KEGG 富集分析,节点的大小表示富集到该通路的靶点数目,节点越大表示靶点富集数目越多;节点的颜色由蓝色至红色表示 P 值大到小,故红色节点越大表明信号通路的显著性越高,作用越重要。图 6 中列出了排名前 30 的信号通路,包括 PI3K-Akt、p53、HIF-1 及 IL-17 等涉及调控细胞凋亡、缺氧代谢、免疫炎症等的信号通路,提示了三物白散可通过多条通路发挥抗胃癌作用,且作用靶点可作用于多条通路发挥作用,通路间存在着较为复杂的交互作用。

3.7 分子对接结果分析

利用 Auto Dock Vina 软件,将 12 个核心靶蛋白与对应的活性成分进行分子对接,结果见表 2,结合能 < -5.0 kcal/mol,表明靶蛋白与活性成分结合性好,且结合能越小表明两者对接越好^[13]。TP53 与 luteolin、AKT1 与 luteolin、MAPK1 与 luteolin、JUN 与 luteolin、CASP3 与 beta-sitosterol、CCND1 与 luteolin、EGFR 与 luteolin、AR 与 luteolin、VEGFA 与 luteolin、ESR1 与 6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucopyranoside、RELA 与

acacetin、MMP9 与 luteolin 为靶蛋白与活性成分对接最好的组合。见图 7。

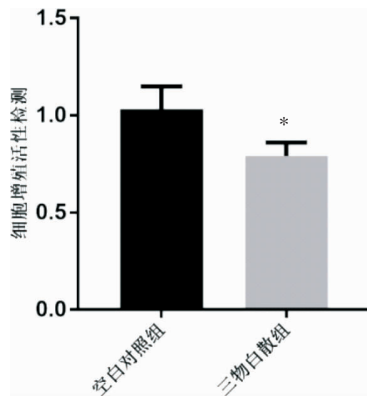


注:A 为 TP53 与 luteolin, B 为 AKT1 与 luteolin, C 为 MAPK1 与 luteolin, D 为 JUN 与 luteolin, E 为 CASP3 与 beta-sitosterol, F 为 CCND1 与 luteolin, G 为 EGFR 与 luteolin, H 为 AR 与 luteolin, I 为 VEGFA 与 luteolin, J 为 ESR1 与 6-Methoxyl-2-acetyl-3-methyl-1,4-naphthoquinone-8-O-beta-D-glucopyranoside, K 为 RELA 与 acacetin, L 为 MMP9 与 luteolin

图 7 药物活性成分与核心靶点的分子对接模式图

3.8 体外实验验证结果

3.8.1 细胞活性检测结果 MTT 检测结果表明,与空白对照组比较,三物白散组细胞增殖活性明显降低 ($P < 0.05$)。见图 8。

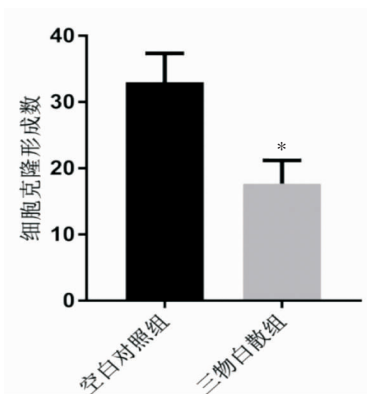


注:与空白对照组比较,* $P<0.05$

图8 三物白散对SGC-7901细胞增殖活性的影响

3.8.2 细胞克隆形成实验结果

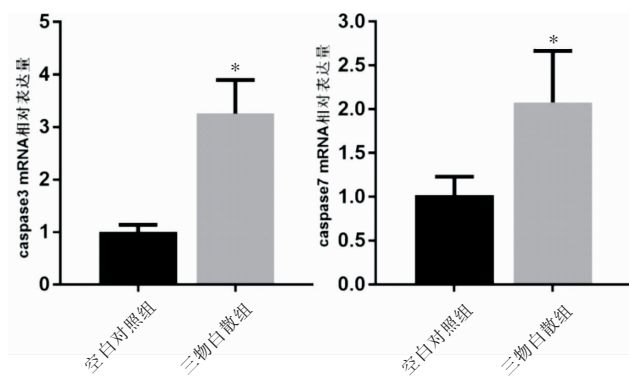
与空白对照组比较,三物白散组SGC-7901细胞克隆形成数显著降低($P<0.05$)。见图9。



注:与空白对照组比较,* $P<0.05$

图9 三物白散对SGC-7901细胞克隆形成的影响

3.8.3 靶基因Caspase-3、Caspase-7 mRNA的表达 与空白对照组相比,三物白散组Caspase-3、Caspase-7 mRNA的表达量显著增高($P<0.05$)。见图10。



注:与空白对照组比较,* $P<0.05$

图10 SGC-7901细胞中Caspase-3、Caspase-7 mRNA的相对表达量

4 讨论

研究^[7,14-15]发现,三物白散可通过抑制肿瘤细胞增殖、拮抗多药耐药、减少免疫抑制因子释放等方面抑制胃癌发展,并能在整体水平上发挥抗肿瘤免疫正相调节作用,但其具体分子机制尚不清楚。因此,本研究采用网络药理学和分子对接法,对三物白散抗胃癌的药效物质及其作用机制进行了探讨。

通过构建药物活性成分-作用靶点网络、PPI网络及对PPI网络进行拓扑分析,得到核心靶点及相互作用的药物活性成分关系,利用分子对接法对两者进行初步模拟验证,证实其具有良好的结合能力,发现木犀草素、金合欢素、 β -谷甾醇、天竺葵素等可能是三物白散抗胃癌作用的关键药效成分。木犀草素具有抑制胃癌细胞集落形成、迁移、侵袭及促进细胞凋亡的作用,参与调控胃癌细胞PI3K/AKT等信号通路^[16]。 β -谷甾醇可抑制肿瘤细胞增殖,诱导其发生细胞凋亡,其机制可能与上调凋亡相关分子Caspase-3、Caspase-8及Caspase-9 mRNA和蛋白的表达相关^[17]。金合欢素可通过线粒体通路,即金合欢素减少Bcl-2表达,Bax/Bcl-2比例上调,引发线粒体膜电位的丧失,诱导细胞色素C的释放,启动Caspase级联反应,激活下游的Caspase-3,诱导肿瘤细胞凋亡^[18]。天竺葵素具有抗细胞肿瘤转化的防御作用,其分子机制可能是通过Nrf2启动子去甲基化激活Nrf2-ARE防御途径^[19]。同时发现一个活性成分可作用多个靶蛋白,一个靶蛋白亦能同时被多个活性成分干预,不同靶蛋白之间可通过直接或间接作用组成强大的互作网络,充分说明了三物白散是通过多种活性成分作用于多靶点协同发挥抗癌效应。

通过对靶点进行功能富集分析,其涉及的生物学过程主要有凋亡信号通路的调控、半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡过程、细胞对药物的反应、肌细胞增殖、细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶全酶复合物等。靶点通路富集分析结合已有研究发现^[20-23],胃癌的发生发展与PI3K-AKT、p53、HIF-1、IL-17等多条信号通路相关。细胞异常增殖、凋亡抑制在肿瘤发生发展

过程中起着重要作用,PI3K-AKT 信号通路对细胞增殖起促进作用,PI3K 和 AKT 蛋白激活后可促进下游抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xL 的表达增强,其异常可导致包括胃癌在内的恶性肿瘤的发生、发展^[24-25]。p53 是人体内与肿瘤相关性最高的抑癌基因,具有重要的促使细胞周期停滞和细胞凋亡的功能^[26-27],故可介导 2 条信号通路:其一,是 p53 能转录上调细胞周期素依赖性激酶抑制因子 p21 的表达,导致细胞周期停滞^[28];其二,是通过下调 Bcl-2、上调 Bax,使 Bcl-2/Bax 蛋白比例下降,进而激活线粒体通路中的 Caspase-9 和 Caspase-3,触发 Caspase 级联反应引起细胞凋亡^[29-30]。缺氧在肿瘤的发展和进程中起着重要作用,HIF-1 信号通路对血管内皮细胞、巨噬细胞具有细胞特异性反应,已证实在多种肿瘤细胞中过表达的 HIF-1 α ,可上调促血管生成因子 VEGF 的表达,诱导血管生成,发挥促癌作用^[31]。炎症细胞因子 IL-17 在炎症相关癌变中发挥重要作用,其可通过 JAK2/STAT3 信号通路促进胃癌细胞的上皮间质转化^[32-33]。因此,推测三物白散活性成分可能通过靶向作用于介导肿瘤细胞增殖、凋亡、缺氧及炎性微环境的关键信号通路发挥抗胃癌作用。

体外细胞实验结合前期研究^[12]结果证实,三物白散具有抑制人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、诱导其凋亡、抑制其迁移的作用。通过网络药理学方法,对三物白散的作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析,发现其主要涉及对凋亡信号通路的调控,细胞凋亡抵抗是肿瘤发生发展的重要机制之一,Caspase 家族对细胞凋亡具有十分重要的作用,在预测的药物作用靶点中涉及多个 Caspase 家族成员,有 Caspase-3、Caspase-7、Caspase-8 及 Caspase-9,其中 Caspase-8 和 Caspase-9 属于细胞凋亡的启动分子^[34-35],Caspase-3 和 Caspase-7 是执行细胞凋亡的效应分子^[36]。经 qPCR 法验证,三物白散可上调 Caspase-3 和 Caspase-7 mRNA 的表达,在一定程度上验证了本研究中网络药理学筛选结果的准确性和可靠性。

综上所述,本研究借助网络药理学和分子对接的方法,预测了三物白散抗胃癌的药效物质、作用靶

点,系统分析了其潜在的分子机制,充分体现了中药复方多成分、多靶点、多通路协同治疗的独特优势。同时,细胞实验结果初步证实了网络药理学的预测结果有一定的可靠性,为后续指导实验设计、研发新药、推广临床应用提供依据。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] BERGER H, MARQUES M S, ZIETLOW R, et al. Gastric cancer pathogenesis[J]. Helicobacter, 2016, 21(Suppl 1): 34-38.
- [3] 李朝燕,赵爱光,竹永宝,等.基于健脾法探讨中药胃肠安对晚期胃癌的影响[J].中华中医药杂志,2019,34(5):2012-2017.
- [4] 蔡俊媛,金宇,林洪,等.健脾益气中药佐治晚期胃癌疗效及对生活质量的影响[J].现代中西医结合杂志,2019,28(33):3711-3714.
- [5] 濮文渊,凌云,张曦,等.抗肿瘤中药的耐药潜质:假说的建立及对未来研究的思考[J].中医杂志,2013,54(19):1627-1629.
- [6] 朱莹,袁伟建,张晓江,等.加味三物白散方治疗进展期胃癌临床研究[J].中国中医急症,2010,19(4):578-580.
- [7] 邹君君,朱莹.三物白散对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡的影响[J].中国中医急症,2011,20(5):749-750,761.
- [8] 王萍,唐仕欢,苏瑾,等.基于整合药理学的中药现代研究进展[J].中国中药杂志,2018,43(7):1297-1302.
- [9] 陈铭泰,肖娇,林海丹,等.基于网络药理学探讨逍遥散对动脉粥样硬化和抑郁症“异病同治”的作用机制[J/OL].中国中药杂志:1-13[2020-03-23].<https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcm.20200227.401>.
- [10] 欧阳效强,饶炼,雷敏,等.基于网络药理学探讨加味二至丸治疗动脉粥样硬化的作用机制[J].中国实验方剂学杂志,2020,26(3):175-182.
- [11] TROTT O, OLSON A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. Journal of Computational Chemistry, 2010, 31(2): 455-461.
- [12] 范婧莹,娄余,张娜,等.三物白散对 Survivin-RNA 基因沉默转染胃癌 SGC-7901 细胞凋亡、迁移的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):937-942.
- [13] 庄莉,翟园园,姚卫峰,等.基于网络药理学的二至丸对肾脏保护作用的机制研究[J].药学报,2019,54(5):877-885.
- [14] 徐力,王明艳,许冬青,等.三物白散加味方影响肿瘤多药耐药基因表达实验研究[J].上海中医药杂志,2005,39(8):59-60.
- [15] 王梅,刘红艳,周春祥.三物白散整体水平抗肿瘤免疫正相调节

- 效应研究[J].南京中医药大学学报,2006,22(2):83-85.
- [16] PU Y S, ZHANG T, WANG J H, et al. Luteolin exerts an anti-cancer effect on gastric cancer cells through multiple signaling pathways and regulating miRNAs[J]. *Journal of Cancer*, 2018, 9(20): 3669-3675.
- [17] 赵秀红.β-谷甾醇对肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响及机制研究[D].兰州:兰州大学,2018.
- [18] KIM C D, CHA J D, LI S J, et al. The mechanism of a-cacectin-induced apoptosis on oral squamous cell carcinoma[J]. *Archives of Oral Biology*, 2015, 60(9): 1283-1298.
- [19] LI S Y, LI W J, WANG C, et al. Pelargonidin reduces the TPA induced transformation of mouse epidermal cells-potential involvement of Nrf2 promoter demethylation[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 309: 108701.
- [20] 陈龙云,柳叶.槲皮苷通过抑制 PI3K/AKT 信号通路诱导胃癌 SGC7901 细胞凋亡[J].*中国病理生理杂志*,2018,34(11):1976-1980.
- [21] 蔡甜甜,潘华峰,张成哲,等.黄芪甲苷保护胃癌前病变大鼠胃黏膜损伤研究[J].*中华中医药杂志*,2018,33(9):4066-4070.
- [22] 马玉滨,燕速,于鹏杰,等.低氧诱导因子-1α 在胃癌组织中表达水平及分子作用机制研究[J].*中国免疫学杂志*,2017,33(12):1799-1803.
- [23] WU X Q, ZENG Z R, XU L X, et al. Increased expression of IL17A in human gastric cancer and its potential roles in gastric carcinogenesis[J]. *Tumor Biology*, 2014, 35(6): 5347-5356.
- [24] 张红娜,邹佳楠,李昆,等.基于网络药理学推测和分子生物学验证探讨半枝莲抗胰腺癌的活性成分及其作用机制[J].*中草药*, 2020,51(12):3234-3245.
- [25] MAYER I A, ARTEAGA C L. The PI3K/AKT pathway as a target for cancer treatment[J]. *Annual Review of Medicine*, 2016, 67: 11-28.
- [26] REYES J, CHEN J Y, STEWART-ORNSTEIN J, et al. Fluctuations in p53 signaling allow escape from cell-cycle arrest[J]. *Molecular Cell*, 2018, 71(4): 581-591.
- [27] ROBIN M, ISSA A R, SANTOS C C, et al. Drosophila p53 integrates the antagonism between autophagy and apoptosis in response to stress[J]. *Autophagy*, 2019, 15(5): 771-784.
- [28] 涂潇,李雷,张海波,等.一种新的 MDM2-p53 信号通路抑制剂的研 究[J].*四川大学学报(自然科学版)*,2019,56(2):369-376.
- [29] 蔡甜甜,林琳,潘华峰,等.三七总皂苷激活 JNK 信号通路对胃癌前病变大鼠胃黏膜组织的保护作用[J].*中华中医药杂志*, 2019,34(12):5877-5880.
- [30] 甘彩玉,郑作文,梁冰洁,等.从 PI3K/Akt/p53 通路探讨藤茶总黄酮抗肝癌的作用机制[J].*中国实验方剂学杂志*,2019,25(12):90-96.
- [31] YE J W, CHEN K L, QI L, et al. Metformin suppresses hypoxia induced migration via the HIF 1α/VEGF pathway in gallbladder cancer in vitro and in vivo[J]. *Oncology Reports*, 2018, 40(6): 3501-3510.
- [32] ZHOU F, QIU L X, CHENG L, et al. Associations of genotypes and haplotypes of IL-17 with risk of gastric cancer in an eastern Chinese population[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50): 82384-82395.
- [33] LI S, CONG X L, GAO H Y, et al. Tumor-associated neutrophils induce EMT by IL-17a to promote migration and invasion in gastric cancer cells[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 6.
- [34] IWAI N, YASUI K, TOMIE A, et al. Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the Caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma[J]. *International Journal of Oncology*, 2018, 53(1): 237-245.
- [35] FULDA S. Caspase-8 in cancer biology and therapy[J]. *Cancer Letters*, 2009, 281(2): 128-133.
- [36] BRENTNALL M, RODRIGUEZ-MENOCAL L, DE GUEVARA R L, et al. Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis[J]. *Bmc Cell Biology*, 2013, 14: 32.

(本文编辑 匡静之)