

本文引用: 邵昌明, 谢珊珊, 智勇, 曙阿克·哈尔恒, 林柏桐, 于燕艳, 曾斌芳. 基于网络药理学及实验验证探讨养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 847-856.

基于网络药理学及实验验证探讨养阴活胃合剂 治疗慢性萎缩性胃炎的作用机制

邵昌明¹, 谢珊珊¹, 智勇¹, 曙阿克·哈尔恒¹, 林柏桐², 于燕艳¹, 曾斌芳^{1*}

1. 新疆医科大学中医学院, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150006

[摘要] **目的** 基于网络药理学预测养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)的活性成分及潜在靶点,通过动物实验进行验证 PI3K-Akt、信号通路,为临床应用提供科学依据。**方法** 通过中医药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)、SymMap 数据库筛选得到中药的有效活性成分,同时从 GeneCard、OMIM 和 DisGeNET 数据库对 CAG 的靶点进行检索及筛选;预测其活性成分与疾病靶点,使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建网络图,对该网络进行拓扑分析筛选节点,利用 STRING 数据库分析核心靶点蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,利用 DAVID 数据库对核心靶点基因进行 GO 和 KEGG 富集分析,探讨养阴活胃合剂治疗 CAG 的作用机制。**实验验证**:选用 SPF 级 SD 雄性大鼠,采用随机分配法分为空白组及造模组,利用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)及饥饿失常法等方法进行造模,造模成功后随机分为模型组、维酶素组以及养阴活胃合剂低、中、高剂量组,每组 10 只,连续干预 56 d;通过 HE 染色观察各组 SD 大鼠胃黏膜病理组织的变化,IHC 检测各组大鼠胃黏膜 PI3K、AKT1、mTOR 中蛋白的表达含量。**结果** 从养阴活胃合剂中筛选出 309 个化学成分,涉及治疗 CAG 的靶点 378 个;筛选疾病靶点 698 个,共同靶点 130 个,根据节点自由度 \geq 平均自由度,筛选核心靶点 38 个;通过 GO、KEGG 富集分析得到,养阴活胃合剂可以影响 PI3K-Akt、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、癌症相关等多个信号通路。养阴活胃合剂能够有效降低 CAG 模型大鼠胃组织中 PI3K、AKT1、mTOR 中蛋白表达情况($P<0.05$)。**结论** 养阴活胃合剂通过多通路、多靶点治疗 CAG,可以有效改善 CAG 模型大鼠胃黏膜细胞的增殖、凋亡及炎症反应等,有效调控 PI3K/Akt 信号通路,能够有效改善 CAG 大鼠胃黏膜的损伤。

[关键词] 养阴活胃合剂;慢性萎缩性胃炎;胃黏膜;活性成分;网络药理学;作用机制

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.013

Mechanism of action of Yangyin Huowei Mixture in treating chronic atrophic gastritis based on network pharmacology and experimental verification

SHAO Changming¹, XIE Shanshan¹, ZHI Yong¹, SHUAK Harheng¹, LIN Baitong², YU Yanyan¹, ZENG Binfang^{1*}

1. Xinjiang Medical University Institute of TCM, Urumqi, Xinjiang 830011, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin, Heilongjiang 150006, China

[Abstract] **Objective** To predict the active ingredients and potential targets of Yangyin Huowei Mixture (YYHWM) in treating chronic atrophic gastritis (CAG) based on network pharmacology, and to provide scientific basis for clinical application through animal experimental verification of PI3K-Akt, signaling pathways. **Methods** The effective active ingredients of Chinese medicine were screened by traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP) and SymMap database, and the targets of CAG were searched and screened from GeneCard, OMIM and DisGeNET database. To predict the active

[收稿日期]2022-12-02

[基金项目]新疆维吾尔自治区高校科研计划项目(XJEDU2021H018);新疆维吾尔自治区区域协同创新专项(上海合作组织科技伙伴计划及国际科技合作计划)项目(2022E01008)。

[第一作者]邵昌明,男,硕士研究生,研究方向:中医内科肝胆脾胃。

[通信作者]*曾斌芳,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:2552721714@qq.com。

ingredients and disease targets, the network diagram was constructed by Cytoscape 3.7.1 software and the nodes were screened by topological analysis of the network. The protein-protein interaction (PPI) network of the core target was analyzed by STRING database. GO and KEGG enrichment analysis was performed on the core target genes using DAVID database to explore the mechanism of YYHWM in treating CAG. Experimental verification: SPF SD male rats were selected and randomly divided into blank group and model group. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) and hunger-satiety disorder were used for modeling. After successful modeling, they were randomly divided into model group, vitamycin group, low-, medium- and high-dose YYHWM groups, with 10 rats in each group, and were continuously intervened for 56 d. The pathological changes of gastric mucosa in SD rats were observed by HE staining. The expressions of PI3K, AKT1 and mTOR in gastric mucosa of rats in each group were determined by IHC. **Results** A total of 309 chemical ingredients were screened from YYHWM, involving 378 targets for treating CAG; a total of 698 disease targets and 130 common targets were screened, and 38 core targets were screened according to the the nodal degree of freedom \geq average degree of freedom. Through GO and KEGG enrichment analysis, YYHWM can affect PI3K-Akt, TNF signaling pathway, MAPK signaling pathway, cancer-related and other signaling pathways. YYHWM can effectively reduce the protein expressions of PI3K, AKT1 and mTOR in gastric tissue of CAG model rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Through multi-pathway and multi-target treatment of CAG, YYHWM can effectively alleviate the proliferation, the apoptosis and inflammatory response of gastric mucosal cells in CAG model rats, and regulate PI3K/Akt signaling pathway, thus reducing gastric mucosal injury in CAG rats.

[**Keywords**] Yangyin Huowei Mixture; chronic atrophic gastritis; gastric mucosa; active ingredients; network pharmacology; mechanism of action

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)大部分由于幽门螺杆菌(helicobacter pylori, HP)感染及自身免疫功能缺陷致使胃黏膜内固有腺体萎缩、减少、胃黏膜变薄而引起的疾病^[1-3],严重可能发展成为伴肠上皮化生或异型增生的疾病,最后发展成为胃癌^[4],是肠型胃癌 Correa 模式的关键环节^[5]。西医治疗主要是以对症治疗为主,比如消炎保护胃黏膜、促进胃肠道蠕动、根除 HP 以及抗氧化治疗^[6],对于部分患者的治疗可能效果不明显。经研究及临床试验表明,中药复方治疗 CAG 具有突出的效果,并且预后较好,对药物依赖性比较小。中药复方具有“多成分、多靶点、多途径”的特点^[7],因此,中医治疗 CAG 具有巨大优势,在治疗中可以改善胃黏膜的萎缩症状,防止病情的蔓延,并且能够实现萎缩的逆转^[8]。

中医学将 CAG 归属为“胃痞”“呃逆”“胃脘痛”“痞满”等范畴^[9]。CAG 主要是由于外邪入侵、情志内伤及饮食不洁而引起的,致使脾失健运,胃失和纳,肝郁气滞,肝胃不和,痰湿阻滞,痰瘀互结,气血运行失常,致使胃黏膜发生萎缩甚至发展成为肠化生^[10],应以“活血化瘀,益气养胃”为治疗大法。“养胃阴”的思想在古代就已经流行,养阴活胃合剂是曾斌芳教授的经验方^[11-12],经过组方加减及临床研究,得到了养阴活胃合剂,对于临床的治疗具有丰富的经验。围绕 CAG 的发病机制,以活血化瘀、益气养胃为原

则,“养阴”意为滋阴生津,“活胃”意为活血化瘀,从而推动胃肠动力,促进蠕动,使萎缩恢复,目前养阴活胃合剂治疗 CAG 在临床上取得了很好的疗效,通过前期临床实验研究,证实了养阴活胃合剂可以治疗多种证型的 CAG^[13]。养阴活胃合剂是由芦根、莪术、甘草、玉竹、茜草、白术、鸡内金组成,具有活血化瘀、益气养胃的功效。方中君药芦根止呕、生津止渴、滋养胃内津液;莪术破血行气、消积止痛。臣药玉竹养阴润燥、生津止渴能够顾护胃阴;茜草入脾胃经,凉血止血、活血化瘀。佐药白术健脾益气、化浊和胃;鸡内金宽中健脾、消食磨胃。使药甘草健脾益气,调和诸药。诸药合用,共奏活血化瘀、益气养胃之功。因此,本文以网络药理学来挖掘养阴活胃合剂治疗 CAG 的主要靶点并进行实验验证,来探讨养阴活胃合剂的对于临床应用的作用机制。

1 资料与方法

1.1 实验药物、药品和试剂

芦根 30 g(批号:20210901)、莪术 9 g(批号:201001)、玉竹 10 g(批号:200301)、茜草 9 g(批号:191201)、白术 10 g(批号:200601)、鸡内金 9 g(批号:210301)、甘草 6 g(批号:201002),以上药材均购自于新疆医科大学第一附属医院中药房。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG,上海罗恩试剂,

批号:RH222415);盐酸雷尼替丁胶囊(云鹏医药集团有限公司,批号:E210303);雷尼替丁大鼠饲料(含3%的雷尼替丁)由新疆医科大学动物实验中心制作;维酶素胶囊(德州博诚制药有限公司,批号:w20210401);无水乙醇、氯化钠AR分析纯(天津市致远化学试剂有限公司,批号20220201、20210601);无菌去离子水、中性树胶(北京索莱宝科技有限公司,批号:F0020、1117L021);4%多聚甲醛通用型组织固定液(北京博奥森生物技术有限公司,批号:BA02198228);苏木素染液、伊红染液(Biosharp公司,批号:21236146);黏附载玻片(江苏世泰实验器材有限公司,REF.188105);兔二步法试剂盒、封闭用羊血清、抗体稀释液、DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为2241D0301、228060225、21110301、224020208);PI3K、AKT1、mTOR抗体(美国Abcam试剂公司,批号分别为ab151549、ab81283、ab32028)。

1.2 动物

健康雄性SD大鼠SPF级别选用4~5周龄,体质量为180~220 g,购买于新疆医科大学动物实验中心,饲养于屏障环境中,采用架式笼养,维持室温在19~22℃,昼夜明暗交替12 h,许可证号:SCXK(新)2018-0002。该实验通过新疆医科大学动物实验中心伦理委员会审批(审批号:IACUC-20210331-03)。

1.3 仪器

EG1150型组织包埋机、RM2235型石蜡切片机、CV5030封片机(德国LEICA公司);XSP-C204型光学显微镜(重庆光电仪器有限公司);电子秤(AB104-N,瑞士Mettler Toledo公司)。

1.4 网络药理学分析

1.4.1 养阴活胃合剂有效活性化学成分的筛选及其靶点的预测 通过TCMSP(<https://old.tcmssp-e.com/tcmssp.php>),SymMap(<http://www.symmap.org/>)数据库收集养阴活胃合剂中芦根、甘草、莪术、玉竹、茜草、白术的成分,设置口服生物利用度(OB)≥30%和类药性(DL)≥0.18,获得有效成分,鸡内金通过SymMap数据库获取有效化学成分,FDR(BH)<0.05,再通过TCMSP输入有效化学成分,同上筛选条件,得到鸡内金的有效活性成分。

1.4.2 有效成分的靶点预测 通过TCMSP、SymMap数据库将有效活性成分通过UniProt数据库中查询成分并设置已被认证的Reviewed,设置生物物种为Homo sapiens,来获取药物的有效成分靶点,查阅文献获取相关药物成分的化学结构,使用SMILES格式保存,对无法直接获取的活性成分,利用Swiss Target Prediction数据库来绘制2D结构获取。

1.4.3 CAG靶点的预测 通过OMIM、DisGeNET和GeneCard数据库对CAG的靶点进行检索,输入

“Chronic atrophic gastritis”,查询CAG靶点,通过3个数据库的整合,去除重复项及删除假阳性来获取疾病的靶点。

1.4.4 养阴活胃合剂的靶点与CAG的相关靶点的相互作用及网络的构建 通过Venny 2.1.0分别将养阴活胃合剂和CAG的靶点录入在线作图工具平台上,来绘制韦恩图,获得两者交集的靶点蛋白。用Cytoscape 3.7.1软件进行构建养阴活胃合剂成分、靶点及疾病的网络图。

1.4.5 PPI网络拓扑分析及核心靶点的选择 通过STRING 11.0数据库输入药物和疾病共同靶点,选择蛋白种类为“Homo sapiens”获取相关信息,将结果导出为TSV格式,通过Cytoscape将文件导入进行拓扑分析,通过选择节点自由度≥平均自由度,筛选出核心靶点,导出文件。在通过STRING数据库将得到的核心靶点输入来绘制PPI网络。

1.4.6 GO功能和KEGG通路富集分析 通过DAVID数据库对重要靶点进行GO和KEGG分析,物种选择人类(Homo sapiens),统计学方法运用超几何法以 $P<0.01$ 评估GO注释中的蛋白质群,以 P 值反映蛋白质生物学功能的突出性,选择生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)。通过对重要靶点进行KEGG富集分析,分析中药复方靶点具有的生物学功能及信号传导通路,进而得到养阴活胃合剂治疗CAG的主要作用通路。

1.5 动物实验验证

1.5.1 实验动物造模 选取健康SD雄性大鼠60只,采用随机数字表法随机分组:空白组10只、造模组50只;空白组采取普通饲养,其他50只进行造模,造模组参考文献改良的四因素法进行造模^[14-15]。(1)采用N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG):150 μg/mL MNNG溶液每天饮用,全程避光;(2)盐酸雷尼替丁:制作含有3%雷尼替丁的特殊饲料进行隔日喂养;(3)饥饱失常法:即每周一、周三、周五饱食,每周二、周四、周六、周日禁食,不禁水,禁食日来灌胃;(4)禁食日进行隔天灌胃,周二、周六进行空腹灌胃15% NaCl溶液2 mL/100 g,周四、周日进行空腹灌胃30%乙醇1 mL/100 g;持续造模10周,在第10周随机抽取空白组和模型组各一只大鼠空腹12 h,进行麻醉解剖,取全胃,使用HE染色,光镜下观察CAG大鼠胃黏膜的病理变化,可以观察腺体萎缩,减少,病理分析采取全国慢性胃炎的中西医结合诊治方案意见中的病理诊断为标准^[16]。造模成功后,将SD大鼠随机分为空白组、模型组、维酶素组以及养阴活胃合剂低、中、高剂量组。

1.5.2 实验动物分组及处理 空白组不进行药物干

预,进行正常饲养;造模成功后,于第 11 周开始进行药物干预,干预组停止饮用 MNNG 及特殊饲料喂养,恢复饮用正常水和正常饲料。各组药物干预时间每天 1 次,连续给药 56 d,模型组不进行药物干预,继续饮用 MNNG 及特殊饲料;养阴活胃合剂低、中、高剂量组按照成人与大鼠的体表面积换算等效剂量^[7],以 1:2:4 的比例给药,低剂量组中药饮片量 3.55 g/kg、中剂量组中药饮片量 7.11 g/kg,高剂量组中药饮片量 14.22 g/kg;维酶素组药量 0.16 g/kg。大鼠最后一次灌胃干预后,禁食 24 h,水正常给予,次日进行麻醉解剖以 10%水合氯醛(0.3 mL/kg)腹腔注射进行麻醉,取全胃,生理盐水清理,分离后迅速放入 4%多聚甲醛固定液及冻存管放入液氮中,-80 ℃冰箱存放。

1.5.3 HE 染色观察胃黏膜组织病理变化 胃组织固定,脱水,石蜡包埋切片,烤片 1 h,二甲苯脱蜡,乙醇梯度脱水,苏木素染色,1%盐酸乙醇分化,PBS 返蓝,伊红染色,乙醇梯度脱水,二甲苯脱蜡,中性树脂胶封片,光镜下多倍视野进行观察 SD 大鼠胃黏膜的病理情况。

1.5.4 IHC 法观察胃黏膜组织 PI3K、AKT1、mTOR 含量表达情况 将石蜡切片在烤片机上 60 ℃ 1 h 后,二甲苯透明,乙醇梯度脱蜡,柠檬酸盐修复,灭活内源性过氧化物酶,山羊血清封闭,滴加一抗(PI3K、

1:100 抗体稀释液稀释;AKT1,1:250 抗体稀释液稀释;mTOR,1:400 抗体稀释液稀释)孵育过夜大于 16 h,滴加酶标山羊抗兔 IgG 聚合物,37 ℃孵育 20 min,DAB 显色。苏木素染核,1%盐酸乙醇注液分化,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,显微镜观察,使用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行半定量分析。

1.6 统计学分析

实验数据利用 GraphPad Prism 8.0.2 对实验结果进行分析,采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,多组间采取平均数比较,单因素方差分析,各组间比较单因素 ANOVA 分析,以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 网络药理学结果分析

2.1.1 养阴活胃合剂的有效成分 从 TCMSP,SymMap 数据库获得养阴活胃合剂有效成分 309 种,其中芦根 1 种、菝葜 23 种、玉竹 8 种、茜草 168 种、白术 7 种、鸡内金 10 种、甘草 92 种,其中 2 种及以上中药所共有成分为 2 种。

2.1.2 作用靶点的筛选 获取的有效活性成分经 Uniport 转换疾病靶点,经过去重重复项,共获得养阴活胃合剂治疗 CAG 靶点 378 个。通过 Cytoscape 3.7.1 绘制出药物成分与靶点之间的关系图。详见图 1。

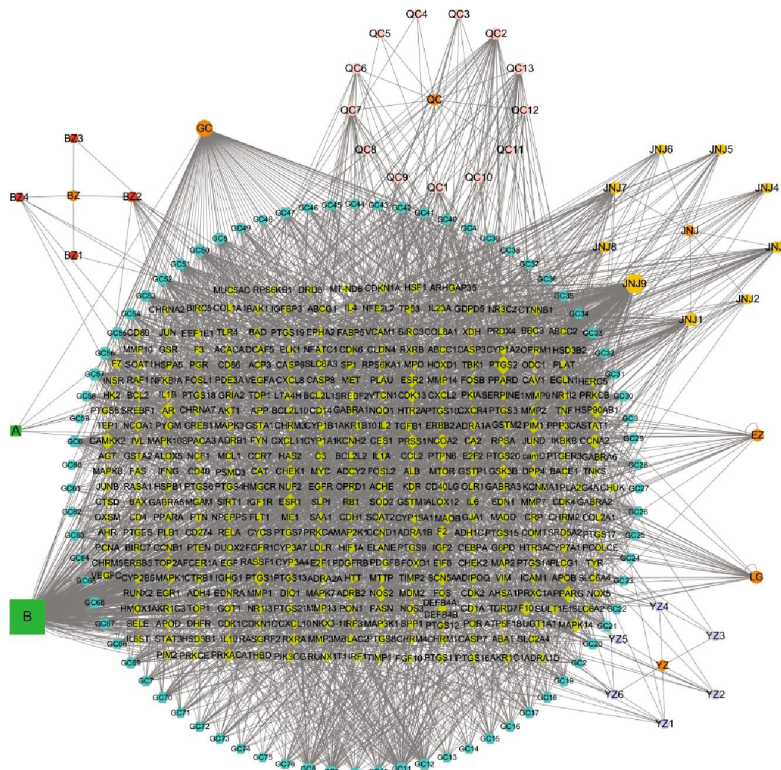


图 1 养阴活胃合剂治疗 CAG 的活性成分-作用靶点相互作用网络图

注:其中四边形绿色为 2 种药物及以上的共同成分标记为 A、B。菱形黄色为有效成分作用的靶点,圆形橙色为药物名称以每个字首字母命名。

2.1.3 CAG 相关靶点的筛选 通过 OMIM、Dis-GeNET 和 GeneCards 数据库对 CAG 的靶点进行检索,分别收集了蛋白靶点基因 83、203、681 个,整合后去除重复值共获得 698 个 CAG 的相关蛋白靶点。

2.1.4 养阴活胃合剂的作用靶点与 CAG 相关靶点基因的 Venny 分析 将养阴活胃合剂中的 378 个作用靶点与 CAG 中 698 个作用靶点输入 Venny 2.1 作图工具平台,共获得 130 个共同靶点,绘制韦恩图,得到养阴活胃合剂治疗 CAG 潜在的活性靶点。

2.1.5 PPI 网络拓扑分析以及核心靶点的筛选 将获得的共同靶点输入到 STRING 数据库后获得 TSV 格式文件后,将信息导入 Cytoscape 3.7.1 选择自由度 (degree) \geq 平均自由度的节点后,获取到重要靶点 38

个,将核心靶点导入 STRING 数据库绘制核心靶点 PPI 网络图,详见图 2。图中包含 38 个节点,159 条边,平均节点度是 8.37,节点为蛋白,边与边是蛋白和蛋白的相互关系,线条越多显示各个蛋白之间的关联性越大,核心靶点排在前几位的分别是 PPARG、ALB、MTOR、PTEN、AKT1、CD4、HMOX1、MMP2、CCL2、IL-2。

2.1.6 重要靶点的富集分析 应用 DAVID 数据库,将养阴活胃合剂治疗 CAG 的 38 个核心靶点进行 GO 富集分析,BP、CC、MF 每组按照 *P* 值选择前 10 个利用微生信绘制条形图。详见图 3。

在 GO 富集分析过程中,主要包括细胞因子介导的信号通路、基因表达的正调控、耐药性药物敏感性/耐药性、激活平滑肌细胞增殖、对异种生物刺激

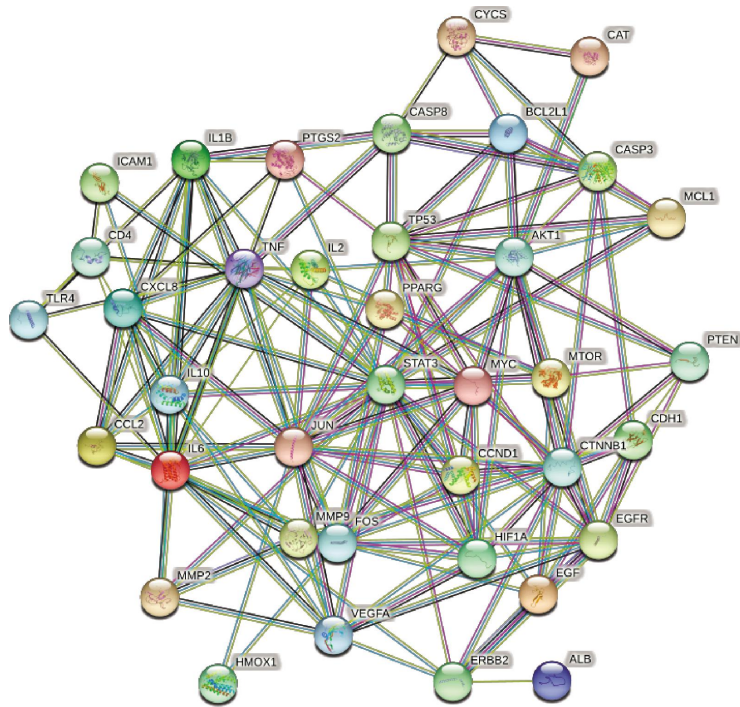


图 2 核心蛋白 PPI 网络

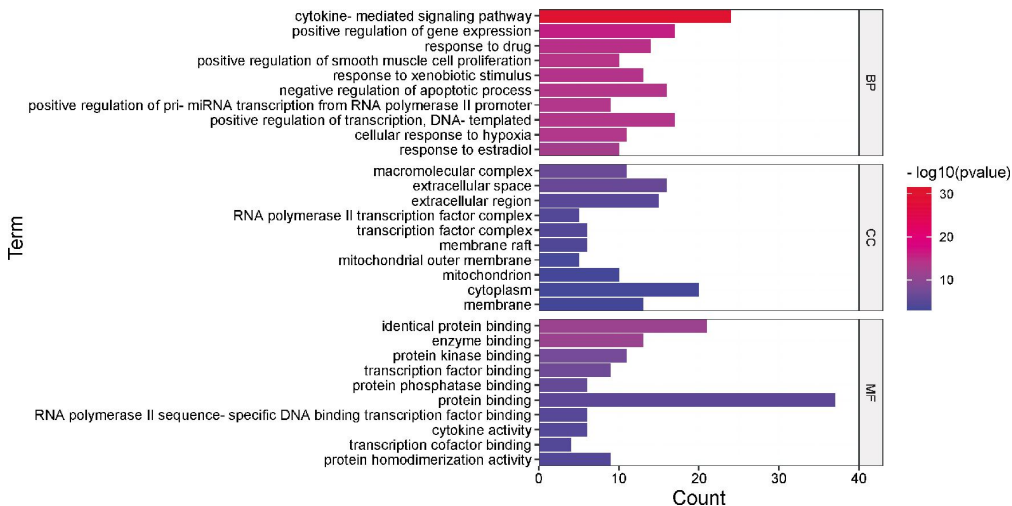


图 3 养阴活胃合剂有效成分治疗 CAG 潜在靶点的 GO 富集分析

的反应、细胞凋亡抑制等生物过程、蛋白质-蛋白质复合物、细胞质转录因子复合物、蛋白质均聚、细胞对缺氧应激的反应等信号通路。在 KEGG 富集分析中,应用 DAVID 数据库,将养阴活胃合剂治疗 CAG 的 38 个核心靶点进行 KEGG 富集分析,每组按照 *P* 值选择前 30 个通过微生信绘制气泡图,结果显示,养阴活胃合剂可能涉及 PI3K-Akt 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、癌症相关等信号通路见图 4。

养阴活胃合剂治疗 CAG 的最主要的研究通路为 PI3K-Akt 信号通路选择的研究靶点为 PI3K、AKT1、mTOR,胃癌的疾病示意图见图 5,从图中可以看出胃癌在发育不良的阶段与 PI3K-Akt 信号通路最为密切,可以使细胞重生。主要的作用靶点是 AKT1、MTOR、EGF、PTEN、EGFR、IL-2、VEGFA、IL-6、CCND1 等,通过 Cytoscape 3.7.1 构建养阴活胃合剂治疗 CAG 的 KEGG 活性成分与靶点之间的关系

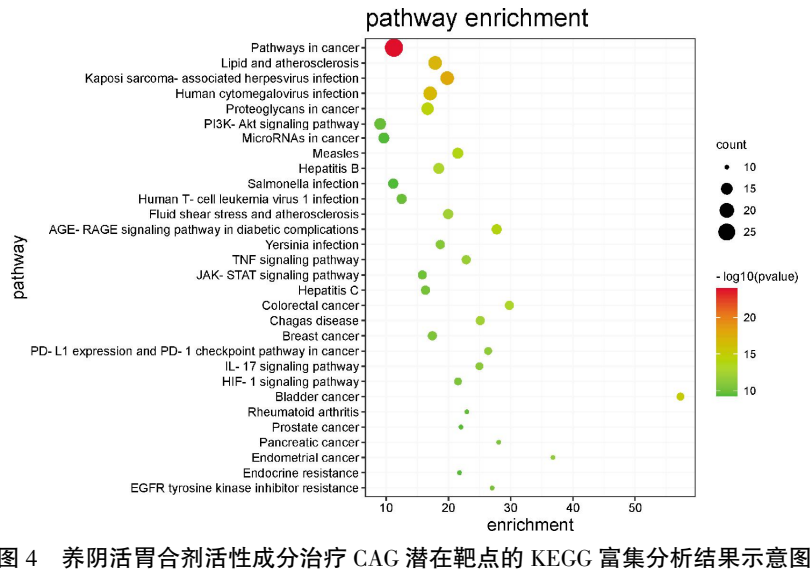


图 4 养阴活胃合剂活性成分治疗 CAG 潜在靶点的 KEGG 富集分析结果示意图

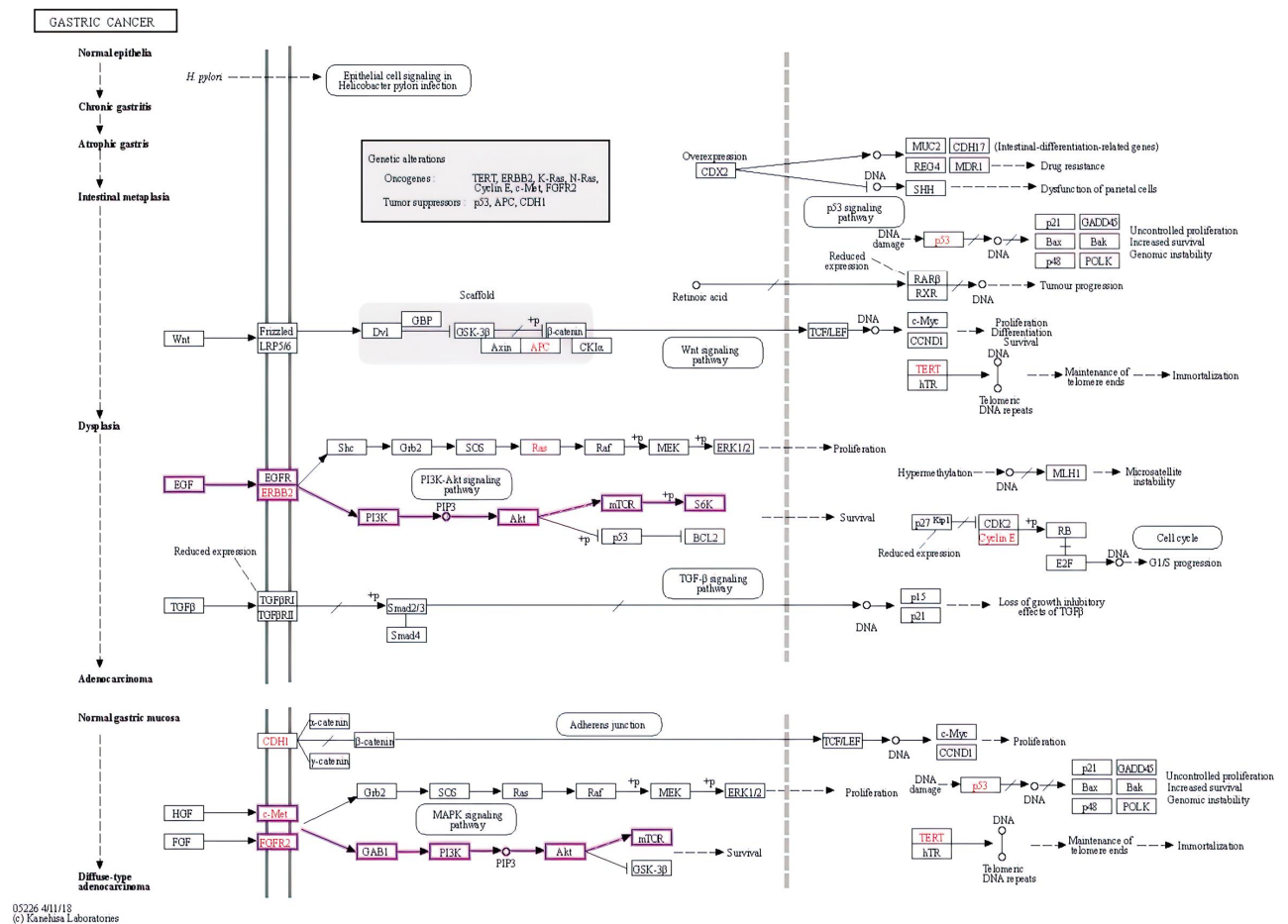


图 5 PI3K-Akt 信号通路在胃癌前期疾病通路图

图。详见图6。

2.2 养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎动物实验结果验证

2.2.1 大鼠胃黏膜的病理观察 经HE染色后,光镜下显示,空白组胃黏膜细胞排列紧密整齐,腺体大小正常,没有炎症增生以及肠化的出现;模型组胃黏膜出现腺体萎缩,排列不规则,黏膜层可见充血,显现出炎症以及肠化现象;与模型组相比,养阴活胃合剂低、中、高剂量组及维酶素组胃黏膜腺体萎缩明显

减少,并未见大量炎症浸润,没有出现肠上皮化生,并且均有不同程度的改变,主要以养阴活胃合剂中剂量组和高剂量组较为明显。详见图7。

2.2.2 养阴活胃合剂对CAG模型大鼠PI3K、AKT1、mTOR含量的影响 与空白组相比,模型组大鼠胃组织PI3K、AKT1、mTOR的表达量均升高($P<0.05$);与模型组相比,养阴活胃合剂低、中、高剂量组及维酶素组胃组织中PI3K、AKT1、mTOR的蛋白表达量降低($P<0.05$)。详见表1和图8—10。

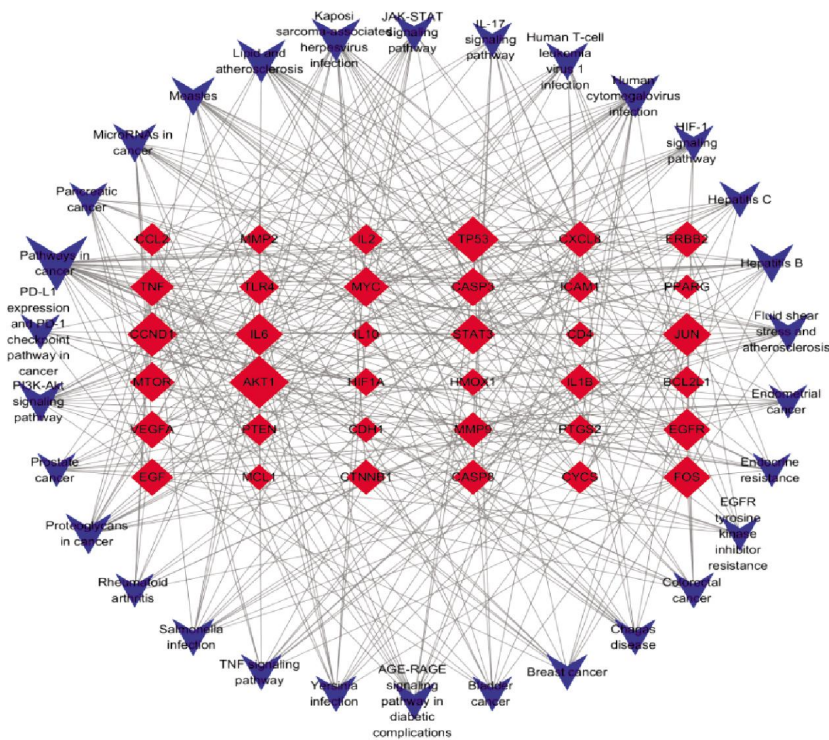


图6 养阴活胃合剂治疗CAG的KEGG信号通路与靶点之间的关系图
注:蓝色图标为信号通路,红色菱形图标为靶点名称。

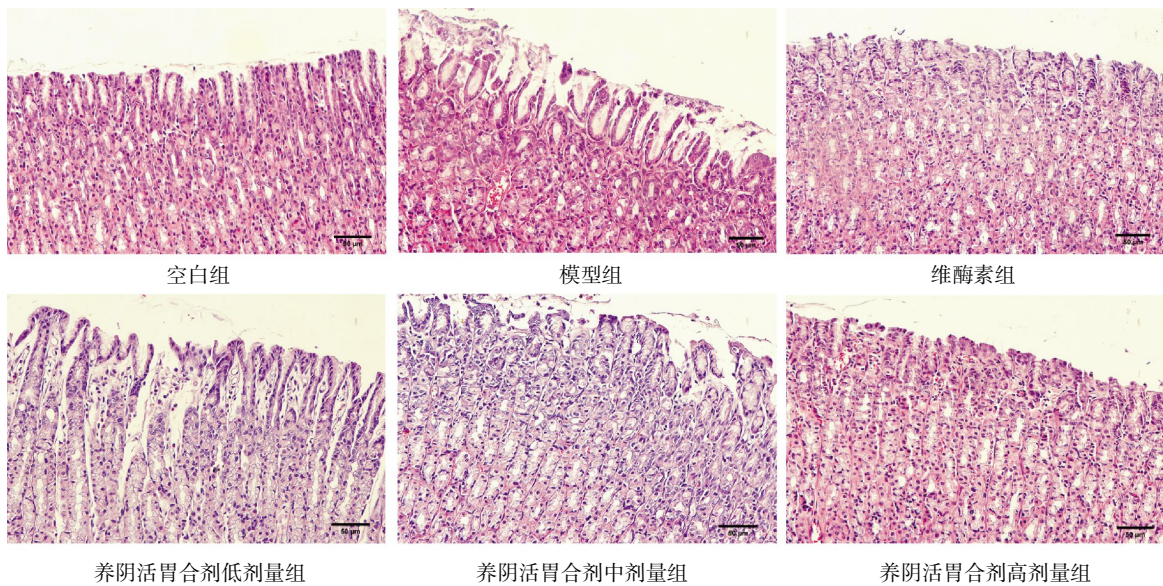


图7 养阴活胃合剂对CAG大鼠胃黏膜组织病理的影响(HE×200)

表 1 养阴活胃合剂对 CAG 模型大鼠胃组织中 PI3K、AKT1、mTOR 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PI3K	AKT1	mTOR
空白组	—	0.016 1±0.020 2 [#]	0.010 3±0.005 2 [#]	0.011 1±0.011 1 [#]
模型组	—	0.288 3±0.198 3 [*]	0.181 3±0.064 4 [*]	0.442 8±0.255 8 [*]
维酶素组	0.16	0.053 2±0.034 7 [#]	0.048 9±0.032 2 [#]	0.044 8±0.049 9 [#]
养阴活胃合剂低剂量组	5.44	0.060 9±0.055 2 [#]	0.062 7±0.030 6 [#]	0.069 6±0.045 3 [#]
养阴活胃合剂中剂量组	10.88	0.051 2±0.038 1 [#]	0.023 2±0.024 3 [#]	0.037 0±0.034 6 [#]
养阴活胃合剂高剂量组	21.76	0.048 5±0.025 0 [#]	0.013 7±0.011 2 [#]	0.030 3±0.024 3 [#]

注:与空白组比较,* $P<0.05$,与模型组比较,[#] $P<0.05$

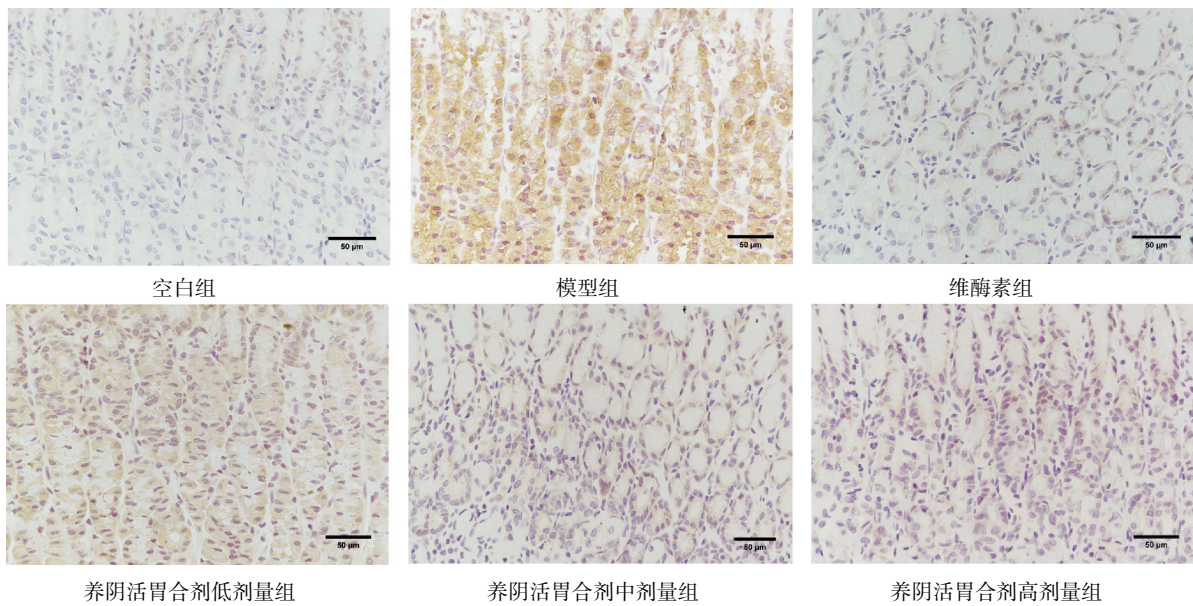


图 8 养阴活胃合剂对 CAG 模型大鼠胃组织 PI3K 蛋白表达的影响(IHC×400)

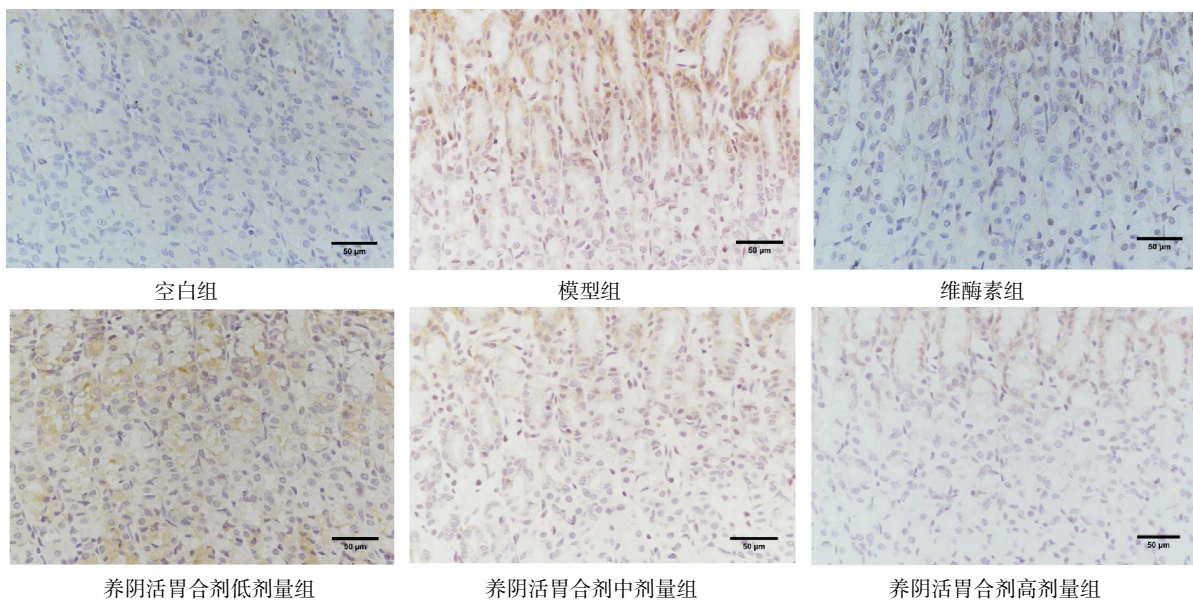


图 9 养阴活胃合剂对 CAG 模型大鼠胃组织 AKT1 蛋白表达的影响(IHC×400)

3 讨论

CAG 中西医结合诊疗共识意见指出:CAG 的确诊主要是应用医学技术胃镜检查及胃黏膜组织学检

查,尤其是胃黏膜组织学检查的诊断价值更大,可见胃黏膜固有腺体萎缩、黏膜层变薄、伴或不伴肠腺化生和(或)假幽门腺化生等为特征的消化系统疾病。中医讲究的是辨证论治,对于 HP 感染的

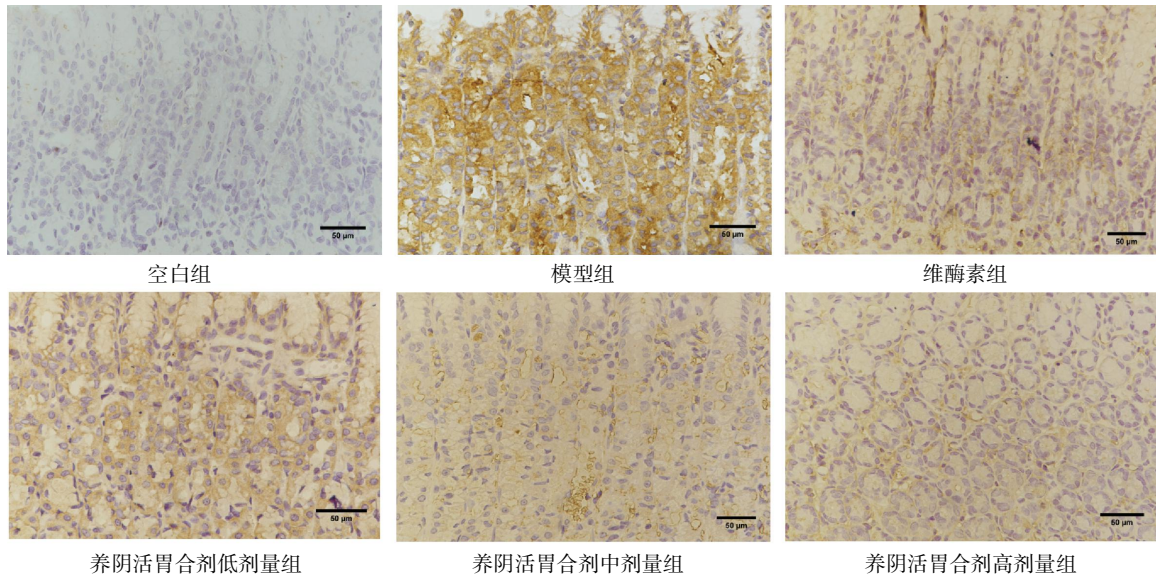


图 10 养阴活胃合剂对 CAG 模型大鼠胃组织 mTOR 蛋白表达的影响(IHC×400)

CAG 患者,加苍术、薏苡仁、黄柏、仙鹤草等,对于细菌的抑制有很好的疗效。对一些胆汁反流的患者,加枳实、茯苓、香附、青皮等,对于吐酸、嗝气有一定疗效。出现肠上皮化生及癌前病变的患者,可加白花蛇舌草、紫花地丁、半枝莲、半边莲等药物治疗,这些药物对于胃黏膜的保护及抑制肠上皮化生具有很好的作用^[6]。

通过网络药理学探究养阴活胃合剂治疗 CAG 的作用机制,对获取养阴活胃合剂有效成分及得到的核心靶点进行分析,共获得有效成分 309 种,这些可能是治疗 CAG 的重要成分。 β -谷甾醇、豆甾醇是植物甾醇类化合物,经过研究发现该类物质具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化和抗菌等生物活性^[18-20];槲皮素属于黄酮类化合物,研究发现该物质具有抗氧化、抗炎、抗病毒、免疫调节、抗癌、防止血管增生等多种药理学活性,槲皮素可以下调 p-PI3K 的表达,展现了槲皮素能够有效诱导 CAG 的凋亡,与 PI3K/AKT 信号通路密切相关,细胞内可以降低 p-PI3K 蛋白的表达,阻止胃上皮细胞免受氧化损伤^[21-24]。

本研究预测出养阴活胃合剂治疗 CAG 的 130 条信号通路,结果表明养阴活胃合剂主要通过 PI3K/Akt 信号通路来治疗 CAG。PI3K/Akt 信号通路主要参与及调控细胞的增殖和凋亡。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,其结构为调节亚基 p85 及催化亚基 p110,具有丝氨酸/苏氨酸(Ser/Thr)激酶的活性。文献研究表明,PI3K 在 CAG 模型大鼠的胃黏膜上表达,PI3K 被激活后,p110 使 PIP2 磷酸化后为 PIP3,使 Akt

的 N 端 PH 结构域结合,促使 AKT 活化^[25-26]。磷酸化后作用到下游的 mTOR 通路,与 mTOR 发生磷酸化反应,调控下游基因,使细胞生长,遏制细胞凋亡,抑制了 PI3K/AKT 信号通路的激活,减少了对于大鼠胃黏膜的损伤,使在 CAG 过程中出现细胞增殖和凋亡最终引起细胞死亡,进一步阻断胃癌前病变^[27-30]。本研究将大鼠造模之后给予养阴活胃合剂进行干预,观察大鼠胃组织 PI3K、AKT1、mTOR 的蛋白表达情况,模型组中胃组织 PI3K、AKT1、mTOR 蛋白表达均升高,这说明 PI3K、AKT1、mTOR 能够抑制细胞的迁移、侵袭和肿瘤的生长,防止胃癌前病变的发生,而养阴活胃合剂各组及维酶素组药物干预后,胃组织 PI3K、AKT1、mTOR 中的蛋白表达均下降,进一步验证了网络药理学的预测结果,但需临床研究进一步加以验证。

综上所述,通过网络药理学预测其重要通路 PI3K/Akt 信号通路,并进行动物实验验证,结果表明:养阴活胃合剂能有改善 CAG 模型大鼠胃黏膜组织的病理变化,调控 PI3K/Akt 信号通路,抑制细胞的增殖和凋亡,阻断其癌变,实现萎缩逆转,为临床应用提供一定的理论依据。但是网络药理学也有一定的局限性,TCMSP 数据库只包括一些草药的活性成分,其他药物还需根据查阅文献分析其化学成分来预测其靶点,中药复方也是将各个中药简单叠加,人体内的代谢也会影响其作用,在后期本团队将对其他的一些领域继续验证,来进一步阐明养阴活胃合剂治疗 CAG 的研究机制。

参考文献

- [1] 李昆阳, 刘华一. 基于网络药理学探索丹参饮治疗慢性萎缩性胃炎的机制研究[J]. 环球中医药, 2020, 13(8): 1323-1332.
- [2] ISLAMI F, SHEIKHATTARI P, REN J S, et al. Gastric atrophy and risk of oesophageal cancer and gastric cardia adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis[J]. Annals of Oncology, 2011, 22(4): 754-760.
- [3] 黄新星. 雷贝拉唑联合叶酸及替普瑞酮治疗老年幽门螺杆菌阳性慢性萎缩性胃炎的临床疗效[J]. 临床合理用药杂志, 2022, 15(1): 93-95.
- [4] YE X S, YU C P, AGGARWAL A, et al. Genomic alterations and molecular subtypes of gastric cancers in Asians[J]. Chinese Journal of Cancer, 2016, 35: 42-48.
- [5] 王杰, 高云霄, 马虹宇, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨香连化浊方对慢性萎缩性胃炎的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(18): 161-168.
- [6] 邓冬梅. 慢性萎缩性胃炎的临床治疗进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(85): 105-106.
- [7] 李军祥, 陈諝, 吕宾, 等. 慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2018, 26(2): 121-131.
- [8] 范明, 王玲玲, 鄧扶旻, 等. 慢性萎缩性胃炎证治简析[J]. 中医药学刊, 2004, 22(3): 482-516.
- [9] 李赛鹤, 刘力, 王捷虹, 等. 基于“和”法探究中医药治疗慢性萎缩性胃炎[J]. 陕西中医, 2020, 41(6): 793-795.
- [10] 冯五金. 慢性萎缩性胃炎之中医观[J]. 中华消化杂志, 2021, 41(Z1): 19-23.
- [11] 马慧娟. 从水通道蛋白 AQP_s 探讨养阴活胃合剂治疗 CAG 的作用机制研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2021.
- [12] 曙阿克·哈尔恒, 谢珊珊, 邵昌明, 等. 养阴活胃合剂对 CAG 大鼠胃内菌群组成及物种差异性分析[J]. 新疆医科大学学报, 2022, 45(7): 789-795.
- [13] 戴明, 雷云霞, 曾斌芳. 养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎 30 例[J]. 陕西中医, 2012, 33(1): 21-23.
- [14] 林倚莉, 王煜姣, 贾庆玲, 等. MNNG 综合法诱导大鼠胃癌形成的胃组织学与超微结构研究[J]. 广西中医药大学学报, 2021, 24(2): 8-12.
- [15] 马慧娟, 谢珊珊, 曙阿克·哈尔恒, 等. 养阴活胃合剂对慢性萎缩性胃炎大鼠血清胃蛋白酶原和胃组织水通道蛋白的影响[J]. 安徽中医药大学学报, 2021, 40(4): 69-74.
- [16] 张万岱, 陈治水, 危北海, 等. 慢性胃炎的中西医结合治疗方案(草案)[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2004, 12(5): 314-317.
- [17] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 30.
- [18] 任建敏. 食物中植物甾醇生理活性及药理作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(22): 389-393, 399.
- [19] SALEHI B, QUISPE C, SHARIFI-RAD J, et al. Phytosterols: From preclinical evidence to potential clinical applications[J]. Frontiers in Pharmacology, 2020, 11: 599959.
- [20] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展[J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [21] 周乐, 赵晓莉, 狄留庆, 等. 黄酮类化合物口服吸收与代谢特征及其规律分析[J]. 中草药, 2013, 44(16): 2313-2320.
- [22] 祝珊珊, 陆灵松, 毕丽伟, 等. 槲皮素影响胃癌细胞增殖并诱导细胞凋亡的研究[J]. 海峡药学, 2021, 33(11): 14-17.
- [23] LESJAK M, BEARA I, SIMIN N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives[J]. Journal of Functional Foods, 2018, 40: 68-75.
- [24] WANG Y Y, CHANG C Y, LIN S Y, et al. Quercetin protects against cerebral ischemia/reperfusion and oxygen glucose deprivation/reoxygenation neurotoxicity[J]. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2020, 83: 108436.
- [25] 段永强, 巩子汉, 王丽园, 等. 香砂六君子汤对慢性萎缩性胃炎大鼠胃组织 PI3K 信号通路相关因子表达的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(3): 33-38.
- [26] 张玉扬, 赵津平, 张丹, 等. 沉默 CENP-N 基因表达对胃癌细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响[J]. 广东医学, 2022, 43(4): 426-433.
- [27] MAO S, LUO X H, LI Y, et al. Role of PI3K/AKT/mTOR pathway associated oxidative stress and cardiac dysfunction in takotsubo syndrome[J]. Current Neurovascular Research, 2020, 17(1): 35-43.
- [28] 韦维, 林寿宁, 汪波, 等. 安胃汤对慢性萎缩性胃炎大鼠 PI3K/Akt 信号传导通路的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(5): 1088-1091, 1122.
- [29] 巩子汉, 王艳威, 段永强, 等. 白及多糖对 GU 模型大鼠胃组织 PI3K/Akt 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(6): 52-57.
- [30] WANG L L, ZHANG L, CUI X F. Downregulation of long non-coding RNA LINC01419 inhibits cell migration, invasion, and tumor growth and promotes autophagy via inactivation of the PI3K/Akt1/mTOR pathway in gastric cancer[J]. Therapeutic Advances in Medical Oncology, 2019, 11: 1-16.

(本文编辑 苏维)