

基于网络药理学及体外实验验证探讨 乌药抗胃癌的作用机制

梁霄¹, 张筠昊¹, 白皓天¹, 李娅兰¹, 孙淑慧¹, 张倩倩¹, 杨婧², 王锐^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江中医药大学 基础医学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 利用网络药理学、分子对接技术和体外细胞实验, 研究乌药抗胃癌的主要活性成分和潜在作用机制。利用中药系统药理学分析平台(TCMSP)数据库、在线人类孟德尔遗传(OMIM)和 GeneCards 数据库提取乌药活性成分, 并预测了乌药与胃癌有关靶点。筛选二者共同的潜在功能靶位之后, 再利用 STRING 数据库实现与二者共同靶点的蛋白相互作用(PPI)网络构建。利用 DAVID 数据库进行 GO 和 KEGG 富集分析; 以 STRING 和 DAVID 数据库为基础, 运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“活性成分-靶点”网络和“活性成分-靶点-通路”网络; 利用 AutoDock Vina 进行分子对接, 预测有效成分与关键作用靶点的结合度, 最后对关键靶点和通路进行体外实验验证。预测结果共获得乌药活性成分 9 个、相关靶点 179 个, 乌药与胃癌的共同靶点 107 个, 靶点共涉及生物过程 693 种, 细胞组成 57 种, 分子功能 129 种, 参与肿瘤抗原 p53、缺氧诱导因子 1 等信号通路 161 条; 分子对接结果显示核心成分吉马酮与 TP53 有较高的结合活性。最后体外实验将筛选出的乌药活性成分吉马酮对人胃癌细胞 SGC-7901 进行核心靶点和通路的初步验证, 结果表明吉马酮可明显抑制胃癌细胞增殖并通过调控 p53、Bax、Bcl-2 等关键蛋白的表达来诱导 SGC-7901 凋亡。综上所述, 乌药通过多成分、多靶点、多通路协同作用控制胃癌的发生发展, 为今后临床进一步探讨乌药治疗胃癌的机制提供理论依据。

[关键词] 乌药; 胃癌; 网络药理学; 分子机制; 实验验证

Mechanism of *Linderae Radix* against gastric cancer based on network pharmacology and *in vitro* experimental validation

LIANG Xiao¹, ZHANG Jun-hao¹, BAI Hao-tian¹, LI Ya-lan¹, SUN Shu-hui¹, ZHANG Qian-qian¹, YANG Jing², WANG Rui^{1*}

(1. Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. Basic Medical College of Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] The present study explored the main active ingredients and the underlying mechanism of *Linderae Radix* the treatment of gastric cancer by network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* cell experiments. TCMSP, OMIM and GeneCards database were used to obtain the active ingredients of *Linderae Radix* to predict the related targets of both *Linderae Radix* and gastric cancer. After screening the common potential action targets, the STRING database was used to construct the PPI network for protein interaction of the two common targets. Enrichment analysis of GO and KEGG by DAVID database. Based on STRING and DAVID platform data, Cytoscape software was used to construct an "active ingredient-target" network and an "active ingredient-target-pathway" network. Molecular docking was performed using the AutoDock Vina to predict the binding of the active components to the key action targets, and finally the key targets and pathways were verified *in vitro*. According to the prediction results, there were 9 active components, 179 related targets of *Radix Linderae*, 107 common targets of *Linderae Radix* and gastric cancer, 693 biological processes, 57 cell compositions, and 129 molecular functions involved in the targets, and 161 signaling pathways involved in tumor antigen p53, hypoxia-inducible factor 1, etc. Molecular docking results showed that the core component, jimadone, had high binding activity with TP53. Final-

[收稿日期] 2022-05-12

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603418, 82074271); 黑龙江优秀青年人才项目(2020YQ05)

[通信作者] * 王锐, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为新药开发, Tel: (0451) 87266893, E-mail: wrdx@sina.com

[作者简介] 梁霄, 硕士研究生, E-mail: 3153047168@qq.com

ly, in an *in vitro* experiment, the screened radix linderiae active ingredient gemmadone is used for preliminarily verifying the core targets and pathways of the human gastric cancer cell SGC-7901, The results showed that germacrone could significantly inhibit the proliferation of gastric cancer cells and induce the apoptosis of SGC-7901 by regulating the expression of p53, Bax, Bcl-2 and other key proteins. In summary, Radix Linderae can control the occurrence and development of gastric cancer through multi-components, multi-targets and multi-pathways, which will provide theoretical basis for further clinical discussion on the mechanism of Radix Linderae in treating gastric cancer.

[Key words] Linderae Radix; gastric cancer; network pharmacology; molecular mechanism; experimental validation

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220529.501

胃癌(gastric cancer)是人类最常见的胃肠道恶性肿瘤之一,是全球发病率排名第4和病死率第2的癌症。根据2018年全球癌症统计数据,胃癌新增病例超过100万,死亡人数约80万^[1-2]。幽门螺杆菌感染、EB病毒感染、基因调控异常和遗传多态性等因素是胃癌的主要危险发病因素^[3]。并且,胃癌的发生过程也与摄入高浓度的盐、长期吸烟、喝酒或者是微生物补充不足,比如水果和蔬菜的摄入过少等原因相关^[4]。现代临床治疗手段防治胃癌主要还是通过化疗,但该手段疗效限制较大,且所带来的副作用在一定程度上降低了患者的生活质量^[5]。因此寻找一种安全可靠且疗效高的防治胃癌的药物是当前最紧急的任务,现代研究发现将中药作用于胃癌可以在很大程度上减少化疗的副作用,在提升患者的存活率、改善预后生活质量的功效已得到公认^[6]。

乌药 *Linderae Radix* 是樟科山胡椒属植物,主要以其干燥块根入药,性味辛温,归肺、脾、肾、膀胱经,主要作用是行气镇痛、温肾散寒^[7]。目前关于乌药的化学成分相关研究成果较少,但目前科学研究已表明乌药的有效活性成分主要为挥发性油类、异喹啉类生物碱、呋喃倍半萜、大黄酮属等。乌药有着广泛的药理作用,如预防癌症、抗炎止痛、抗菌、抗氧化、耐病毒、自身免疫力、保肝、保护心血管功能和对人体内消化系统的调节作用等^[8-10]。但目前对乌药治胃癌的研究报道相对较少,随着现代药理学的发展,乌药在中医治疗中的抗肿瘤作用逐渐受到关注,其有效成分抗肿瘤研究表明,乌药及其主要活性成分在治疗胃癌的进程中发挥着重要作用^[11]。

网络药理学近年来已逐步成为与药理学相结合的有力工具,为评价药物的作用机制提供了一种新的工具和概念^[12]。将中医各疾病靶标数据库与分子验证相结合,为分子靶标及其作用机制提供了依据。因此,本研究通过运用中药网络药理学与分子对接技

术,从分子水平预测乌药的有效成分、作用靶点及相关信号通路,推测中药可能发挥作用的生物学过程和途径,进而分析中药治疗疾病的作用机制,同时结合体外细胞实验进一步探究乌药抗胃癌的潜在作用机制,为今后临床治疗胃癌的中药研究提供思路和实验参考依据。乌药治疗胃癌的流程见图1。

1 材料与方法

1.1 数据库与软件

TCMSP 数据库 (<http://tcmsp.com/tcmsp.php>); UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>); GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>); OMIM 数据库 (<http://www.omim.org/>); Venny 平台 (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>); STRING 数据库 (<https://string-db.org/>); DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>); PubChem 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pc-compound/>); PDB 数据库 (<https://www.pdb.org/>); Cytoscape 3.7.2 软件; GraphPad Prism 8.0.2 软件; Chemoffice 15.1 软件; ChemBio3D 19.0.0.22 软件; PyMOL 2.5.1 软件; AutoDockTools 1.5.6 软件; AutoDock Vina 1.1.2 软件。

1.2 乌药活性成分与潜在作用靶点的收集

以“乌药”为关键检索词,筛选条件为口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性(drug likeness, DL) ≥ 0.18 ^[13],使用 TCMSP 数据库^[14]收集符合条件的乌药活性成分,并根据所选活性成分获得潜在作用靶点。同时利用 UniProt 数据库^[15]的 UniProKB 搜索功能,将“*Homo sapiens*”限定为物种条件,互作匹配收集乌药有效成分所对应靶标的基因 ID。

1.3 胃癌疾病潜在靶点的收集

以“gastric cancer”为检索词,利用 GeneCards 数据库(相关性评分 ≥ 10.0)^[16]和 OMIM 数据库^[17]对胃癌相关的作用靶点进行检测,将检索到的基因去

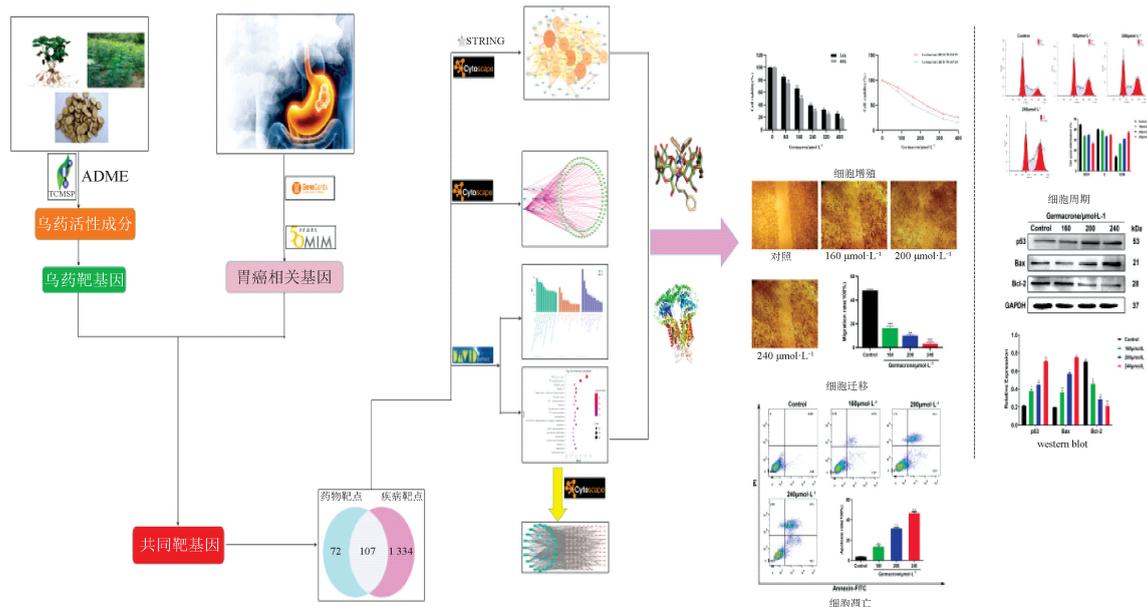


图1 乌药治疗胃癌的流程

Fig. 1 Process of treating gastric cancer with Linderæ Radix

除重复部分,剩余部分进行合并,最后得到胃癌潜在作用靶点。

1.4 “药物-成分-靶点”网络模型的构建与分析

使用 Venny 2. 1. 0 软件绘制韦恩图将药物与疾病的共同靶点更加直观地显示。利用 Cytoscape 3. 7. 2 软件构建“药物成分-靶点”网络,并根据网络图中各个节点的 degree 筛选乌药用于防治胃癌的主要活性成分。

1.5 蛋白相互作用(PPI)网络的构建

将 1.4 项中所获取的药物与疾病的交集靶点导入到 STRING 数据库^[18],选择设定的物种条件为“*Homo sapiens*”、置信度 ≥ 0.90 ,如有无关节点则隐藏无关节点。获得蛋白互作关系构建靶标 PPI 网络,同时将导出的数据利用 Cytoscape 3. 7. 2 软件的 Centiscape 2. 2 menu 插件,通过介度(betweenness)、连接度(degree)、紧密度(closeness)算法筛选出核心靶点并将蛋白互作网络中排名前 15 位的蛋白利用 GraphPad Prism 8. 0. 2 进行可视化。

1.6 生物功能注释与通路富集分析

使用 DAVID 功能数据库^[19-20]注释工具(functional annotation)进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路分析,筛选条件设定为以 $P < 0.05$,各选择出了前 12 个主要生物过程(biological process, BP)、细胞成

分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)和前 20 个主要 KEGG 通路,采用条形图和气泡图形式将显著富集的基因结果和通路结果进行绘制。再将乌药主要活性成分、药物与疾病的共同靶点及前 20 位的 KEGG 通路通过 Cytoscape 3. 7. 2 软件构建药物“成分-靶点-通路”网络。

1.7 有效成分-关键靶点分子对接分析

为进一步阐明所选蛋白的生物活性,将乌药活性较高的 3 个活性成分与 PPI 网络中前 4 个核心靶点进行分子对接。使用 Chemoffice 15. 1 软件将通过 PubChem 在线数据库^[21]获得的乌药核心成分的 2D 结构保存为 SDF 文件格式转为 3D 结构。最终利用 ChemBio3D 19. 0. 0. 22 软件进行能量最小化后保存为 mol 格式。使用 PDB 数据库^[22]查找并加载中心靶蛋白的三维晶体结构,应用 PyMOL 2. 5. 1 软件进行氢化、去除水分子和小分子配体等初步处理。使用 AutoDockTools 1. 5. 6 软件将活性成分和目标蛋白的三维结构转换为 PDBQT 格式,利用 AutoDock Vina 1. 1. 2 分子对接软件,分析小分子与靶蛋白之间的作用模式,得到蛋白残基与它们的作用情况,推测活性成分是否与靶蛋白良好缔合,通过结合能评估活性物质与靶蛋白的结合活性,最后使用 PyMOL 2. 5. 1 软件进行可视化^[23-24]。

1.8 体外细胞实验验证

1.8.1 药物 吉马酮(纯度 $\geq 98\%$,批号 wkq21052413)购自四川省维克奇生物科技有限公司。

1.8.2 细胞株 人胃癌细胞 SGC-7901,由黑龙江中医药大学基础医学院提供。

1.8.3 试剂 胎牛血清(批号 C0230, Bovogen 公司);RPMI 1640 培养基(批号 C11875500BT, Gibco 公司);MTT 试剂盒(批号 M1020)、细胞级二甲基亚砜(批号 710N0310)均购自于北京索莱宝科技有限公司;Hoechst 33342 染色液(批号 C1017)、BCA 蛋白检测试剂盒(批号 P0012)均购自于上海碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡试剂盒(批号 KGA1030-20)、细胞周期检测试剂盒(批号 KGA512)均购自于江苏凯基生物技术股份有限公司;p53(批号 2524T)、Bax(批号 2774S)、Bcl-2(批号 15071T)、GAPDH(批号 5174P)、HRP 山羊抗兔抗体(批号 7074)、HRP 山羊抗鼠抗体(批号 91196S)均购自于美国 Cell Signaling Technology 公司;ECL 检测试剂盒(批号 D412DA0006)购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.8.4 仪器 CO₂ 细胞培养箱(德国 MMM 公司);Synrgy H1 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司);CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);5424 R 冷冻型离心机(德国 Eppendorf 公司);FACSCalibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);DYY-6C 型电泳仪、DYCZ-24K 型转印电泳仪、WD-9413B 凝胶成像系统(北京六一公司)。

1.8.5 噻唑蓝比色法(MTT)检测细胞增殖抑制率

采用 MTT 法测定在不同浓度条件下吉马酮对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制的效果。收集对数期细胞,按照每孔 100 μL 移种到 96 孔板(5×10^3 个/孔)中培养后,加入不同浓度梯度的吉马酮(0、80、160、240、320、400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)继续培养 24、48 h 以观察细胞形态,之后向孔中加入 20 μL MTT 溶液,黑暗孵育 4 h 后,在孔板上弃掉上清液,向每个孔中加入 150 μL 的二甲基亚砜以溶解甲瓚结晶。最后,使用酶联检测分析仪在 490 nm 测量实验孔的吸光度(A),计算细胞增殖抑制率。细胞抑制率 = $(A_c - A_s) / A_c \times 100\%$,其中 A_c 为对照组吸光度, A_s 为实验组吸光度。

1.8.6 细胞划痕实验 将处于对数生长期的人胃

癌 SGC-7901 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度移植于 6 孔板中,每孔平均加入 2 mL 培养基,当细胞密度达 80%~90%,用无菌枪头在孔中垂直刮擦细胞,随后用细胞洗液冲洗刮下的悬浮细胞,各实验组分别加入不同浓度的吉马酮(0、160、200、240 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),在显微镜下观察 0、24 h 的细胞划痕,通过测量划痕宽度计算划痕愈合率。划痕愈合率 = $(0 \text{ h 划痕宽度} - 24 \text{ h 划痕宽度}) / 0 \text{ h 划痕宽度} \times 100\%$ 。

1.8.7 Hoechst 33342 荧光染色 将对数生长中的人胃癌 SGC-7901 细胞以 5×10^4 个/mL 的密度接种于 6 孔板中,每孔加入 2 mL 培养基培养至细胞密度达 80%~90% 时进行实验,向每孔加入不同浓度的吉马酮(0、160、200、240 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),继续培养生长 24 h 后,除去上清液。将 100 μL Hoechst 染色溶液加入孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 30 min,舍弃染色液,用细胞洗液洗涤 2~3 次,使用荧光显微镜观察并拍摄照片。

1.8.8 流式细胞术检测细胞周期与细胞凋亡率
细胞周期:收集对数期细胞, 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中。然后用不同浓度的吉马酮(0、160、200、240 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理 24 h。用胰蛋白酶消化细胞,PBS 洗涤 2 次, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。然后将细胞收集到 1.5 mL 的试管中,用 70% 乙醇固定细胞 24 h。用碘化丙啶(PI)溶液孵育,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中染色 30 min 不光照,采用流式细胞仪研究吉马酮处理后的细胞周期分布。细胞凋亡:收集对数期细胞,调整密度为 5×10^4 个/孔接种于 6 孔板中 12 h。每孔中加入不同浓度的吉马酮(0、160、200、240 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 24 h。使用胰蛋白酶消化细胞, $1\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞。PBS 洗 1 次,400 μL Binding Buffer 悬浮细胞,5 μL Annexin V-FITC 染色,4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗孵育 15 min。随后,在细胞中加入 10 μL 的 PI,在不直接光照条件下孵育 5 min。采用流式细胞术,检测细胞凋亡。

1.8.9 Western blot 检测相关蛋白表达 将各组人胃癌 SGC-7901 细胞用不同浓度的吉马酮(0、160、200、240 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理后,加入蛋白裂解液冰浴条件下裂解,BCA 法定量测定蛋白总浓度,经 10% 或 12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,随后转移至 PVDF 膜,将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉中摇晃封闭,加入蛋白特异性一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 13 h,相应二抗进一步孵育 1.5 h,ECL 发光试剂盒显色,放入成像系统曝光显影并拍照,用 ImageJ 软件分析蛋白条带并

计算灰度值。

1.8.10 统计分析 采用 GraphPad 8.0.2 统计软件分析处理数据,测量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,单因素方差分析用于组间比较。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乌药活性成分与作用靶点的收集

通过 TCMSP 数据库共获得 128 个乌药有效成分,基于吸收、分布、代谢、排泄参数模型以 $OB \geq 30\%$ 与 $DL \geq 0.18$ 为筛选指标,得到槲皮素、吉马酮等 9 种潜在有效成分,依次将 9 种成分编号 L1~L9,方便展示活性成分与靶点间的关系,见表 1。随后利用 UniProt 数据库对 TCMSP 数据库中获得的 288 个与乌药相关靶点基因名进行校对,删除重复与无效靶点后最终得到 179 个作用靶点。

表 1 乌药的有效活性成分信息

Table 1 Active ingredients information of Linderae Radix

No.	molecule ID	活性成分	相对分子质量	OB /%	DL
L1	MOL000910	germacron	218.37	32.50	0.27
L2	MOL010496	DMPEC	340.40	32.38	0.39
L3	MOL010907	norboldine	313.38	40.92	0.46
L4	MOL010913	C09495	260.31	77.09	0.25
L5	MOL010916	nubigenol	290.29	42.55	0.19
L6	MOL010917	boldine	327.41	31.18	0.51
L7	MOL000358	beta-sitosterol	414.79	36.91	0.75
L8	MOL000359	sitosterol	414.79	36.91	0.75
L9	MOL000098	quercetin	302.25	46.43	0.28

2.2 胃癌潜在靶点的收集

通过 GeneCards 数据库及 OMIM 数据库合并取交集,共获得 12 216 个胃癌相关靶点,合并剔除重复值并以相关性评分 ≥ 10.0 为条件进行筛选,最终获得 1 441 个胃癌潜在靶点。

2.3 “药物活性成分-靶点”网络的构建

将筛选收集的 179 个乌药潜在靶点与符合筛选条件的 1 441 个胃癌相关靶点进行匹配分析取交集剔除重复,最终得到乌药胃癌的共同靶点 107 个用于后续研究分析,利用 Venny 2.1.0 软件以 Venn 图形式体现,见图 2。

将乌药活性成分与上述 107 个关键靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件构建乌药“活性成分-靶点”网络,见图 3,共有 117 个节点,154 条边,其中包括 9 个活性成分(蓝色六边形),107 个药物与疾病的共有靶点(绿色矩形)。利用 Cytoscape 3.7.2 软件中

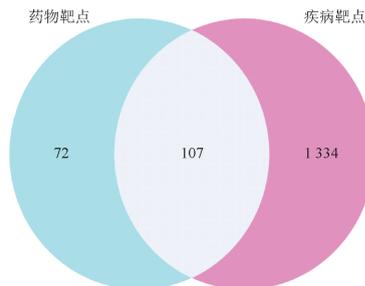


图 2 乌药活性成分靶点与胃癌靶点韦恩图

Fig.2 Venn diagram of active ingredients targets of Linderae Radix and gastric cancer targets

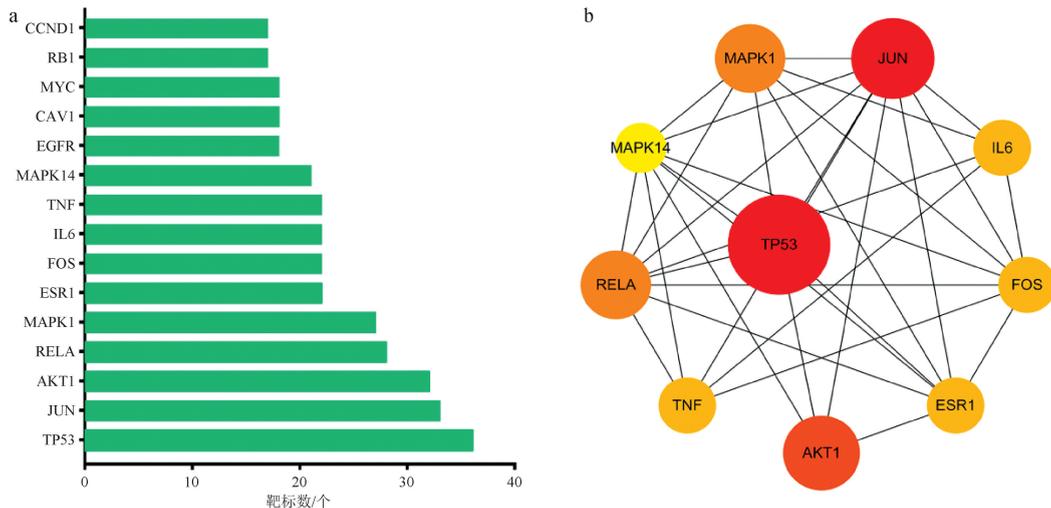
Network Analysis 功能计算分析网络中平均度值,以 ≥ 2 倍平均度值的化学成分作为乌药治疗胃癌的主要活性成分。其中,前 3 位的化学成分为 quercetin(槲皮素)、germacron(吉马酮)、 β -sitosterd(β -谷甾醇)。

2.4 乌药与胃癌共有靶点的 PPI 网络构建

将乌药与胃癌的共有靶点导入 STRING 数据库获得蛋白质相互作用关系,将网络数据 tsv 文件导入 Cytoscape 3.7.2 软件绘制 PPI 网络,见图 4。该网络由 102 个节点(隐藏 ODC1、ACPP、ABCG2、CLDN4、RASSF1 共 5 个不相关节点)和 449 条边(代表靶点间相互作用关系)组成,平均节点度值为 8.39,平均局部聚类系数为 0.44, $P < 1.0 \times 10^{-16}$,表明该组交互靶标与随机靶标组合对比具有显著性差异,这些蛋白质之间的相互作用在网络中起重要作用。通过 Cytoscape 3.7.2 软件中 Centiscape 2.2 menu 插件,分析计算交集网络中 betweenness、degree、closeness 各个节点的属性值,筛选同时满足 3 个条件的关键靶点并以前 15 位相互作用次数最多的靶点做柱状图进行可视化分析,见图 5a。结果显示,TP53、JUN、AKT1、RELA 是乌药抗胃癌的核心靶点,相邻靶目标的数量分别为 36、33、32、28。进一步用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制核心靶点的交互网络,图中的节点越大、颜色越深代表度值越大,见图 5b。

2.5 乌药与胃癌互作靶点的 GO 与 KEGG 通路富集分析

利用 DAVID 数据库对乌药与胃癌 107 个共同靶点进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路分析,结果共得到 879 个 GO 富集条目,其中 693 个与生物过程(BP)相关、57 个与细胞组分(CC)相关、129 个



a. 核心靶点互作次数直方图; b. 核心靶点互作网络。

图5 乌药抗胃癌的核心靶点

Fig. 5 Core targets of anti-gastric cancer targets in Linderae Radix

与分子功能(MF)相关。并选取 $P < 0.05$ 的前 12 个 GO 条目绘制条形图, 见图 6。在细胞生物过程中, 乌药抗胃癌功能主要富集在细胞对药物的反应、RNA 聚合酶 II 启动子转录的正负调控、DNA 模板转录的正负调控、细胞凋亡过程、基因表达的正负调节、细胞对有机环物质的反应、对雌二醇的反应、缺

乏配体的外源性凋亡信号通路等方面; 细胞组分主要富集在细胞外间隙、胞浆、核质、细胞核、细胞外组分、线粒体、细胞质、线粒体外膜等方面; 分子功能主要富集在酶结合、相同蛋白结合、蛋白质结合、转录因子结合、蛋白激酶结合、蛋白质异源二聚活性、蛋白质同源二聚化活性、蛋白激酶活性等方面。

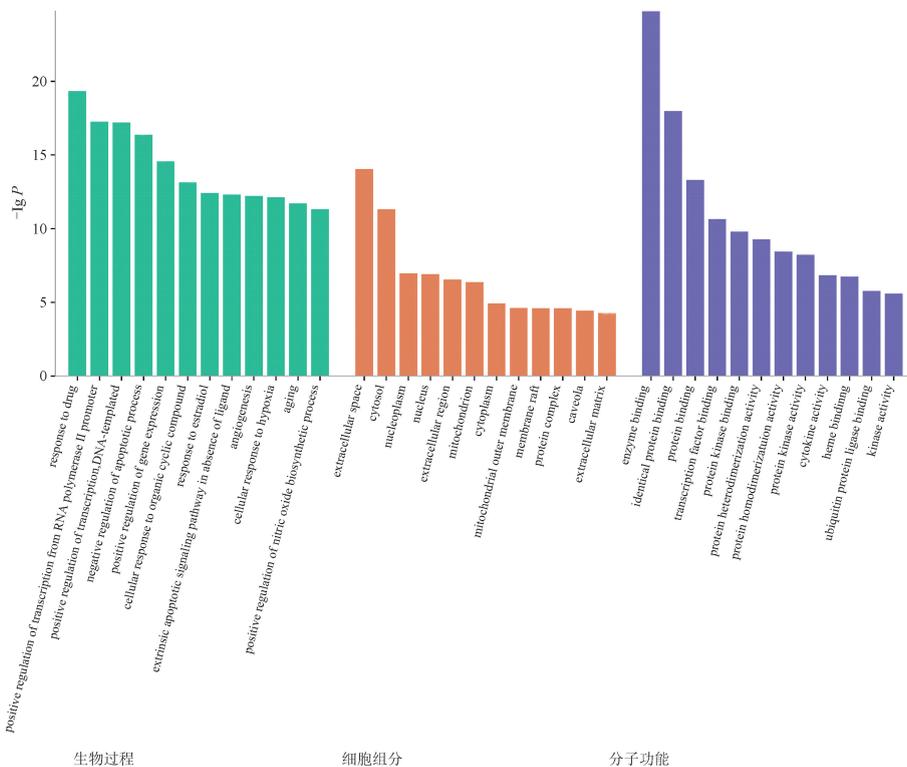


图6 乌药活性成分抗胃癌关键靶点的 GO 功能分析

Fig. 6 GO functional analysis of key anti-gastric cancer targets from active compounds of Linderae Radix

靶标(粉色菱形),排名前20的KEGG信号通路(绿色矩形)及653条边,并清晰、直观地反映出乌药通

过作用于多成分、多通路的多个靶点抑制胃癌的发生发展,以发挥其抗癌作用。

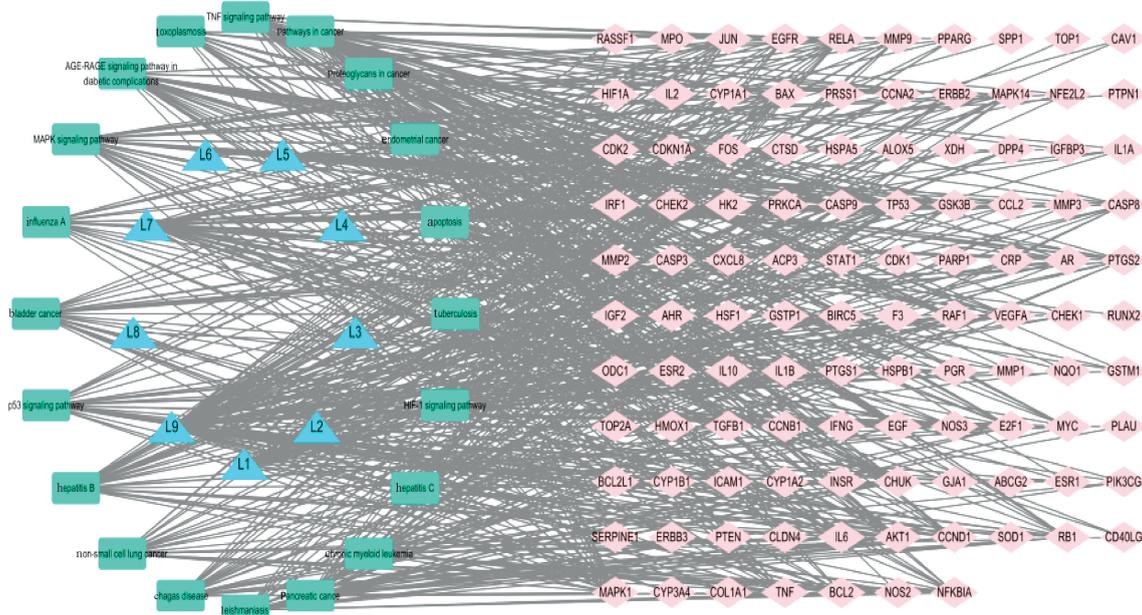


图9 乌药“活性成分-靶点-通路”网络

Fig. 9 Network of "active component-target-pathway" of Linderae Radix

2.6 分子对接

将槲皮素、吉马酮、β-谷甾醇与PPI网络中排名前4位核心靶点进行分子对接,分子与靶点彼此结合能越低,表明配体和受体蛋白之间的结合越稳定,通常一般以结合能 $\leq -4.52 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 作为评分标准,表明配体和受体蛋白间存在着一定的结合活性;当结合能 $\leq -7.00 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 表明配体和受体蛋白间具有很强的结合活性^[25-26]。槲皮素、吉马酮、β-谷甾醇与靶标蛋白的分子对接数据见表2。结果发现所有的对接结合自由能均小于 $-4.52 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,其中吉马酮与TP53蛋白的结合势能最低为 $-8.90 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$,吉马酮与AKT1蛋白为 $-8.50 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、槲皮素与RELA蛋白为 $-7.70 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 位于其后,表明槲皮素、吉马酮与核心靶点均有较高的亲和力,分子间可通过相互作用力形成稳定构象。选取上述3组成分与其蛋白结合势能最低的分子对接结果对其进行可视化见图10。各分组对接复合物的三维结构、活性成分与靶点间的详细结合位点及详细结合位点的呈现,其中蓝色结构为化合物;黄色虚线为氢键;粉色结构为结合残基。吉马酮与TP53的氨基酸残基LEU-771、GLN-769、THR-768、ASP-

833;吉马酮与AKT1的氨基酸残基MET-1160、ARG-1227、ALA-1226;槲皮素与RELA的氨基酸残基TYR-404、PHE-399、ALA-1651、TYR-1769、SER-1655彼此间均通过氢键相互作用,对于稳定蛋白活性位点的小分子有着重要贡献。基于吉马酮的作用核心靶点数目及与靶点蛋白分子对接结合能结果,本实验选择吉马酮进行后续的细胞实验验证。

表2 活性成分与核心靶点的分子对接

Table 2 Molecular docking of active component and core target

活性成分	靶点	PDB ID	结合能/ $\text{kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$
quercetin	TP53	3ZME	-6.70
	JUN	1JNM	-6.40
	AKT1	4GV1	-6.00
	RELA	11KN	-7.70
germacron	TP53	3ZME	-8.90
	JUN	1JNM	-6.70
	AKT1	4GV1	-8.50
β-sitosterd	RELA	11KN	-6.90
	TP53	3ZME	-6.80
	JUN	1JNM	-5.70
	AKT1	4GV1	-7.00
	RELA	11KN	-6.30

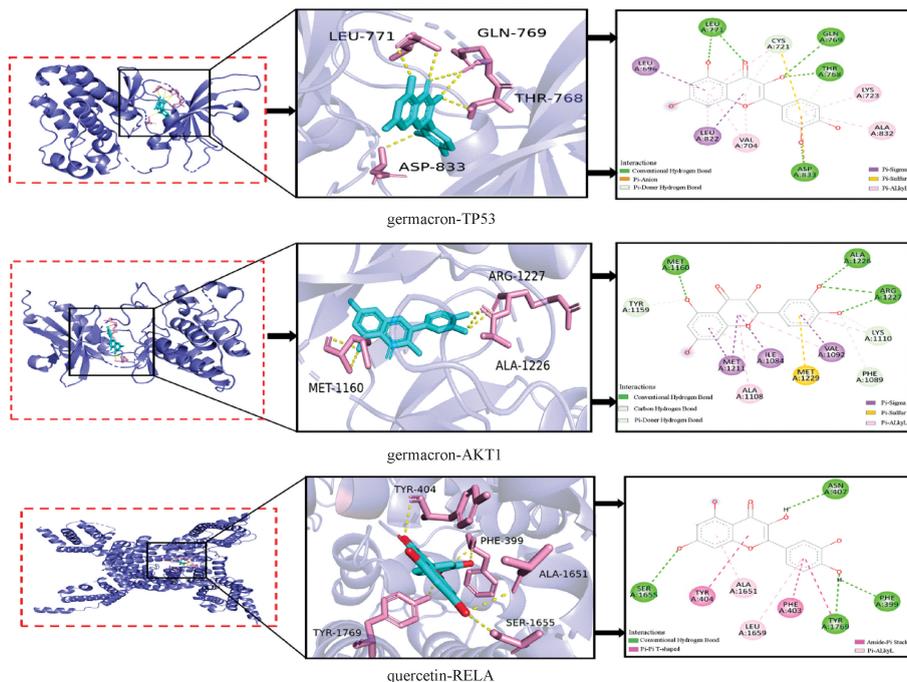


图 10 核心成分与靶点的相互作用分析

Fig. 10 Analysis of interaction between core components and target

2.7 吉马酮对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响

本实验利用 MTT 法检测不同浓度吉马酮作用 SGC-7901 细胞 24、48 h 对增殖的影响,见图 11。与对照组比较,吉马酮呈剂量依赖性显著抑制 SGC-7901 细胞增殖。吉马酮作用 SGC-7901 细胞 24、48 h 的半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 224.91、165.20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

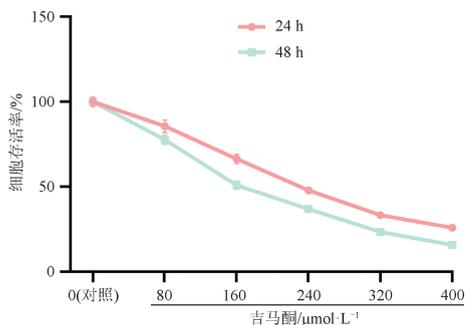


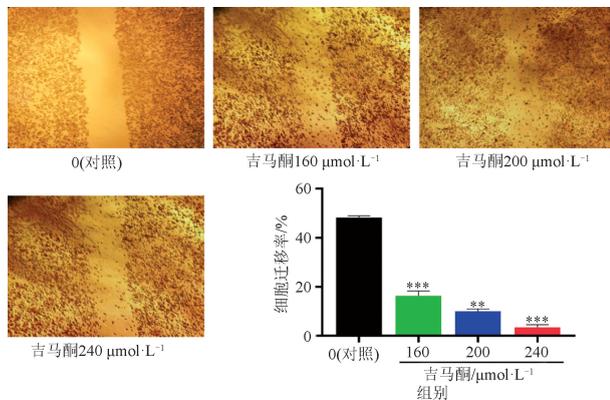
图 11 吉马酮对 SGC-7901 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Fig. 11 Effect of gemarone on proliferation of SGC-7901 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

2.8 吉马酮对人胃癌 SGC-7901 细胞划痕愈合的抑制作用

细胞划痕实验结果见图 12。与对照组比较,药

物处理组细胞汇合程度明显降低,对照组与吉马酮 160、200、240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞迁移率分别为 $48.5\%\pm 2.7\%$ 、 $17.0\%\pm 1.8\%$ 、 $9.2\%\pm 1.4\%$ 、 $3.6\%\pm 0.7\%$,呈剂量依赖性抑制 SGC-7901 细胞迁移 ($P<0.01$)。



与对照组相比 * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ (图 13~15 同)。

图 12 吉马酮对 SGC-7901 细胞迁移能力的影响 ($\times 40; \bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 12 Effects of gemarone on migration of SGC-7901 cells ($\times 40; \bar{x}\pm s, n=3$)

2.9 吉马酮对人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响

不同浓度的吉马酮作用胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 对凋亡的影响见图 13。随着吉马酮浓度的增加,

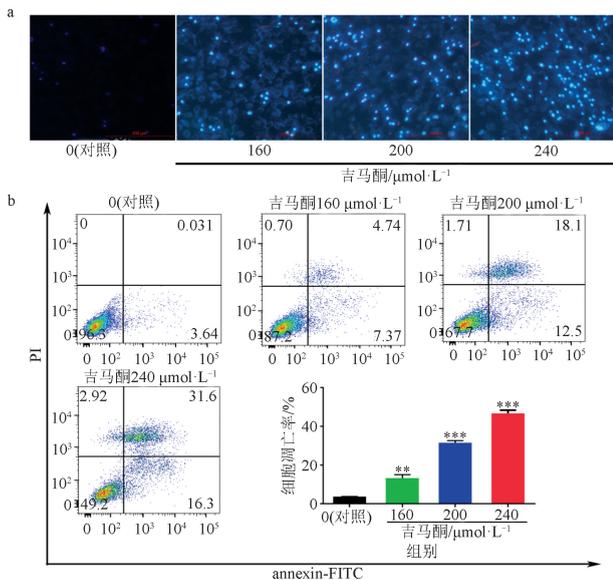
各组细胞总凋亡率也呈剂量依赖性上升($P < 0.01$),表明吉马酮可诱导 SGC-7901 细胞凋亡。同时将不同浓度的吉马酮处理的 SGC-7901 细胞经 Hoechst 33342 染色,正常细胞显微弱蓝色荧光,而凋亡细胞显明亮蓝色荧光。与对照组比较,经不同浓度吉马酮作用后,SGC-7901 细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$)。

2.10 吉马酮诱导人胃癌 SGC-7901 细胞 G₂/M 期阻滞

不同浓度的吉马酮处理 SGC-7901 细胞 24 h 对细胞周期分布的影响见图 14。与对照组比较,在吉马酮处理 24 h 后,SGC-7901 细胞的 G₂/M 期细胞比例显著上升($P < 0.05$),表明吉马酮可选择性诱导胃癌 SGC-7901 细胞 G₂/M 期阻滞。

2.11 吉马酮对 p53 信号通路中凋亡蛋白的调控

不同浓度的吉马酮处理 SGC-7901 细胞 24 h 后,细胞内 p53、Bax、Bcl-2 的蛋白表达水平见图 15。随着吉马酮浓度的增加,与对照组相比,SGC-7901



a. Hoechst 33342 荧光染色检测;b. 流式细胞术检测。

图 13 吉马酮对 SGC-7901 细胞凋亡的影响($\times 200; \bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 13 Effects of gemarone on apoptosis of SGC-7901 cells ($\times 200; \bar{x} \pm s, n=3$)

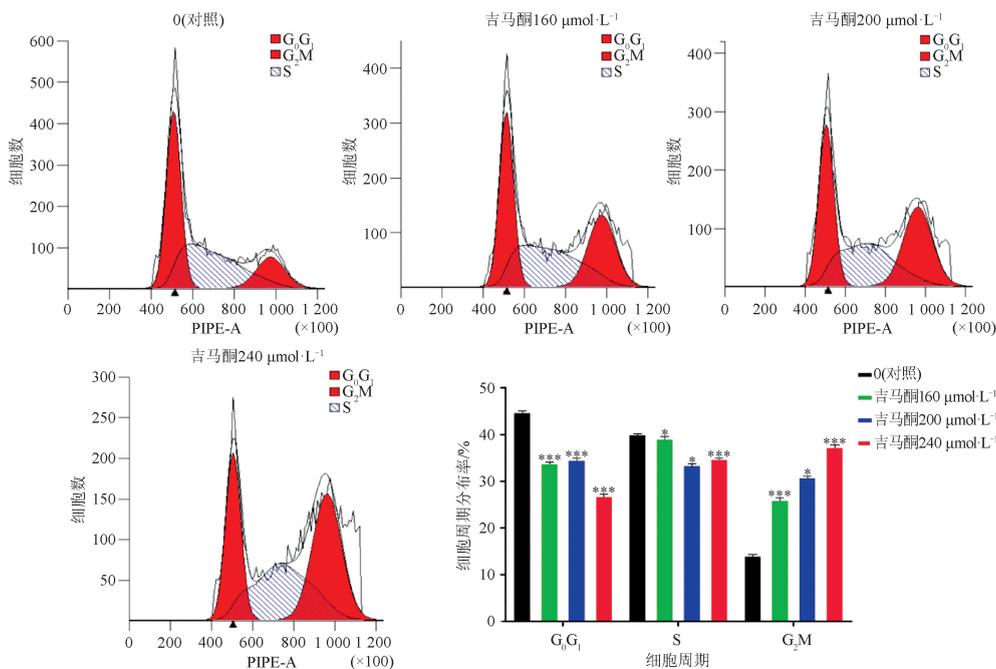


图 14 吉马酮对 SGC-7901 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 14 Effects of gemarone on cell cycle progression in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

细胞中 p53、Bax 的相对表达水平显著上升($P < 0.05$),同时 Bcl-2 蛋白的相对表达水平显著降低($P < 0.05$),呈浓度依赖关系。

3 讨论

胃癌是严重威胁人类健康的全球第五大常见癌

症,具有高发病率、高侵袭、转移快等特点。中晚期即使接受手术治疗,五年存活率仍低于 30%。胃癌在中医归属于“胃痛痞”“癥瘕”等范畴,患者临床表现辨证分型为毒瘀交阻并(兼)气阴两虚、毒瘀交阻并(兼)脾胃虚弱^[27]。近年来研究发现乌药在抗肿

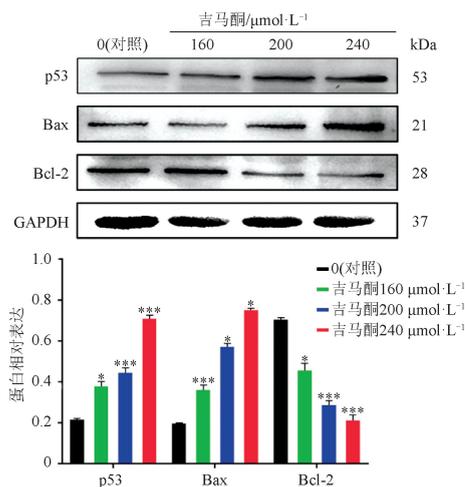


图 15 吉马酮处理后 p53、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 15 Protein expression levels of p53, Bax, Bcl-2 treated with germacrone ($\bar{x} \pm s, n=3$)

瘤方面起到了积极作用,具有包括抗肿瘤作用在内的多种药理活性,但由于乌药成分众多,其抗胃癌的活性物质及作用机制至今未清晰阐明。

因此,本研究利用网络药理学,通过构建“药物活性成分-靶点”“核心靶点互作”等网络,多方面、多层次深入研究乌药治疗胃癌的有效活性成分、潜在靶点及作用机制,进一步结合分子对接、MTT 检测、细胞凋亡和 Western blot 实验进行验证。通过构建“药物活性成分-靶点”网络发现乌药作用于胃癌的 9 个活性成分中萜类、甾醇和黄酮类是关键的活性成分,可能在乌药治疗胃癌中发挥作用。其中分子对接结果显示,主要活性成分吉马酮与 TP53、AKT1,槲皮素与 RELA 均有较高的结合活性,其中吉马酮与 TP53 的对接结果最优。这一结果提示,吉马酮可能为乌药的主要活性成分。基于以上原因,本实验选择分子对接中与靶蛋白结合能力最好的吉马酮用于后续的体外细胞实验验证,对其作用机制进行研究。

本研究采用网络药理学与细胞实验相结合,以乌药为研究对象,探究其治疗胃癌的作用机制。共收集到乌药与胃癌的共同靶标 107 个,通过 PPI 核心靶点互作网络得到 4 个治疗胃癌的核心作用靶点 TP53、JUN、AKT1、RELA。其中肿瘤抑制因子 P53 (TP53) 基因是目前已知与人类肿瘤发生相关性最高的抑癌基因 (>50%),在胃癌的发生发展中起到

关键作用^[28]。JUN 蛋白归属于转录因子激活蛋白 1 (AP-1) 家族^[29],其在胃癌组织中转录活性明显增强^[30],同时 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 也能影响胃癌的发展^[31]。AKT1 是 3 种密切相关的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT1、AKT2 和 AKT3) 之一^[32],且 AKT1 基因位点的突变与肿瘤的发生及生成关系密切,可调控肿瘤细胞增殖和生长^[33]。RELA 是 NF- κ B 家族成员之一,通过与 I- κ B 的解离而活化,并成为 NF- κ B 主要活性形式,RELA 过表达是胃癌发生过程中的一个重要指标^[34]。综上,乌药可通过调控上述包括核心靶点在内的众多靶点起到治疗胃癌的作用。

为了阐明乌药如何通过这些靶点产生作用,本研究进一步进行了靶点功能富集分析。KEGG 结果显示,乌药的主要作用可能与凋亡信号通路、p53 信号通路、HIF-1 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路等有关。在上述通路中,细胞凋亡是最普遍、最重要的信号通路。HIF-1 是由 α 和 β 亚基组成的异二聚体蛋白,是一种对细胞低氧非常敏感的特异性转录因子,是机体耐受低氧的最重要物质,可能与胃癌的发生密切相关^[35-36]。其中 HIF-1 α 与低氧微环境关系密切相关,HIF-1 α 在低氧状态下被激活,调节 60 多个基因,如促红细胞生成素、VEGF、葡萄糖转运蛋白和糖酵解酶,它参与细胞生存、增殖、凋亡等,与肿瘤的发生发展、侵袭、转移密切相关^[37-38]。TNF 是机体炎症和免疫的重要调节因子,包括 TNF- α 、TNF- β 。TNF- α 是一种主要由巨噬细胞和单核细胞产生的促炎细胞因子,在调节肿瘤细胞的存活和凋亡中起重要作用^[39]。大量研究表明^[40-42],TNF- α 参与许多生物学过程,例如胃癌的发生、增殖、侵袭和转移,以及血管生成。MAPK 信号通路通过 MAPKKK、MAPKK (促丝裂原活化蛋白激酶激酶) 和 MAPK (丝裂原活化蛋白激酶) 一系列酶的激活和失活调节细胞内的某些反应,参与肿瘤生长、增殖和转移^[43-44]。研究结果显示,p53 富集倍数最高,说明 p53 信号通路是 KEGG 预测的乌药发挥抗胃癌作用的最主要通路,此通路中各靶点与乌药成分的药理作用最为密切,提示乌药可能通过调控 p53 信号通路激活,从而改善疾病,防止胃癌恶化发展。

p53 为经典的促凋亡蛋白,是细胞内多种信号转导途径的连接点,是控制细胞增殖和凋亡的中枢

介导开关^[45]。能够阻滞细胞周期、促进肿瘤细胞衰老、参与外源性与内源性凋亡途径,达到促进细胞凋亡、抑制肿瘤转移进而终止细胞进程^[46-48]。根据KEGG通路的富集分析,p53通路在乌药抗胃癌中发挥重要作用。Western blot结果显示,吉马酮呈浓度依赖性上调p53和Bax表达、下调Bcl-2表达,证实了系统药理学筛选的乌药成分治疗胃癌相关靶点的正确性。Bcl-2家族在细胞凋亡中起着非常重要的作用,Bcl-2和Bax是这个家族的重要成员,它们的水平与细胞凋亡的调节直接相关^[49-50]。研究表明,p53可调节Bcl-2家族成员来诱导癌细胞凋亡,如Bax、Bcl-2、Bak、Bid^[51-52]。故推测吉马酮可能通过激活p53通道,调节Bax及Bcl-2的水平诱导癌细胞凋亡,阻断肿瘤组织的生长。

综上所述,本研究通过网络药理学系统分析了乌药治疗胃癌的潜在机制,同时通过分子对接技术初步验证了其作用靶点,最后通过细胞实验验证了乌药抗胃癌作用的药效。对传统中药乌药进行了多方面考察,从系统方面揭示了乌药治疗胃癌的药理作用机制并初步探讨了乌药抗胃癌的潜在机制。研究结果进一步证实,吉马酮在此阶段起了关键作用,可以控制细胞凋亡和细胞周期,有效的控制胃癌SGC-7901细胞的生长,并且与p53的途径相关,为今后药物控制癌症的研究与医学诊断奠定方向和基础。

[参考文献]

[1] VAN CUTSEM E, SAGAERT X, TOPAL B, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2016, 388(10060): 2654.

[2] 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.

[3] RAWLA P, BARSOUK A. Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention[J]. *Prz Gastroenterol*, 2019, 14(1): 26.

[4] SMYTH E C, NILSSON M, GRABSCH H I, et al. Gastric cancer[J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635.

[5] 田文敏,周欣,赵超,等. 中药有效成分抗胃癌作用机制的研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15): 3584.

[6] LIU J, WANG S, ZHANG Y, et al. Traditional Chinese medicine and cancer: history, present situation, and development[J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(5): 561.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

[8] 邢梦雨,田崇梅,夏道宗. 乌药化学成分及药理作用研究进

展[J]. *天然产物研究与开发*, 2017, 29(12): 2147.

[9] 刘慧芳,黄建波,黄敏聪,等. 乌药调节胆固醇逆转抗高脂血症作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(7): 1795.

[10] 段绪红,张学文,何培,等. 乌药中1个新的苯基异喹啉生物碱[J]. *中药材*, 2021, 44(1): 76.

[11] YAN R, YANG Y, ZOU G. Cytotoxic and apoptotic effects of *Lindera strychnifolia* leaf essential oil[J]. *J Essent Oil Res*, 2014, 26(4): 308.

[12] 王子怡,王鑫,张岱岩,等. 中医药网络药理学:《指南》引领下的新时代发展[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1): 7.

[13] XU X, ZHANG W, HUANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964.

[14] RU J, LI P, WANG J, et al. TCMSp: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines[J]. *J Cheminform*, 2014, 6(1): 1.

[15] UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021[J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D480.

[16] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The GeneCards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54(1): 1.

[17] AMBERGER J S, BOCCHINI C A, SCOTT A F, et al. OMIM.org: leveraging knowledge across phenotype-gene relationships[J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D1038.

[18] SZKLARCZYK D, MORRIS J H, COOK H, et al. The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45(D1): D362.

[19] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44.

[20] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1.

[21] KIM S, THIESSEN P A, BOLTON E E, et al. PubChem substance and compound databases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(D1): D1202.

[22] SUSSMAN J L, LIN D, JIANG J, et al. Protein data bank (PDB): database of three-dimensional structural information of biological macromolecules[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1998, 54(6): 1078.

[23] 钟佳倚,陈海兵,叶大增,等. 基于网络药理学及实验验证探讨灵芝抗胃癌的分子机制[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(1): 203.

[24] 朱时纯,蔡俊,吴承玉,等. 基于网络药理学和实验验证分析鸡血藤治疗卵巢癌的分子机制[J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(3): 786.

[25] 裴超,邵霖霖,刘晶,等. 基于网络药理学与分子对接技术

- 探讨红花治疗视网膜静脉阻塞的作用机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2020, 32(11): 1844.
- [26] 陈云婷, 罗光明, 周丽, 等. 基于网络药理学-分子对接探讨茵陈蒿汤治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的作用机制[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2021, 23(5): 1588.
- [27] 房传赐, 钱亚云. 中医治疗胃癌研究进展[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(4): 182.
- [28] NEVES FILHO E H C, CORDEIRO D E F, VIEIRA A P F, et al. TP53 codon 72 and intron 3 polymorphisms and mutational status in gastric cancer: an association with tumor onset and prognosis[J]. Pathobiology, 2012, 79(6): 323.
- [29] BOHMANN D, BOS T J, ADMON A, et al. Human proto-oncogene c-Jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties PF transcription factor AP-1[J]. Science, 1987, 238(4832): 1386.
- [30] PARK J S, PARK J H, KHOI P N, et al. MSP-induced RON activation upregulates uPAR expression and cell invasiveness via MAPK, AP-1 and NF- κ B signals in gastric cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2011, 32(2): 175.
- [31] XIA H H, HE H, DE WANG J, et al. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a specific c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) inhibitor, SP-600125, in gastrointestinal cancers[J]. Cancer Lett, 2006, 241(2): 268.
- [32] OU R, MO L, TANG H, et al. circRNA-AKT1 sequesters miR-942-5p to upregulate AKT1 and promote cervical cancer progression[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2020, 20: 308.
- [33] LI X, KONG X, WANG Y, et al. BRCC2 inhibits breast cancer cell growth and metastasis *in vitro* and *in vivo* via downregulating AKT pathway[J]. Cell Death Dis, 2013, 4(8): e757.
- [34] HUANG T, KANG W, ZHANG B, et al. miR-508-3p concordantly silences NFKB1 and RELA to inactivate canonical NF- κ B signaling in gastric carcinogenesis[J]. Mol Cancer, 2016, 15(1): 1.
- [35] LIU H L, LIU D, DING G R, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α and Wnt/ β -catenin signaling pathways promote the invasion of hypoxic gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 3365.
- [36] 钟婵, 张涛, 黄李冰雪, 等. 基于网络药理学的半夏泻心汤对治疗胃癌的作用机制[J]. 中成药, 2020, 42(9): 2496.
- [37] HIROTA K, SEMENZA G L. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2006, 59(1): 15.
- [38] GREIJER A E, VAN DER WALL E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis[J]. J Clin Pathol, 2004, 57(10): 1009.
- [39] SHENG Y, LI F, QIN Z. TNF receptor 2 makes tumor necrosis factor a friend of tumors[J]. Front Immunol, 2018, 9: 1170.
- [40] WILKIE K P, HAHNFELDT P. Modeling the dichotomy of the immune response to cancer: cytotoxic effects and tumor-promoting inflammation[J]. Bull Math Biol, 2017, 79(6): 1426.
- [41] CUI X, ZHANG H, CAO A, et al. Cytokine TNF- α promotes invasion and metastasis of gastric cancer by down-regulating pentraxin 3[J]. J Cancer, 2020, 11(7): 1800.
- [42] ZHANG X, WANG J, SHAO H, et al. Function of tumor necrosis factor alpha before and after mutation in gastric cancer[J]. Saudi J Biol Sci, 2017, 24(8): 1920.
- [43] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis[J]. Exp Ther Med, 2020, 19(3): 1997.
- [44] YUAN J, DONG X, YAP J, et al. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy[J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 1.
- [45] MUÑOZ-FONTELA C, MANDINOVA A, AARONSON S A, et al. Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation[J]. Nat Rev Immunol, 2016, 16(12): 741.
- [46] UMAMAHESWARI S, PRIYADARSHINEE S, KADIRVELU K, et al. Polystyrene microplastics induce apoptosis via ROS-mediated p53 signaling pathway in Zebrafish[J]. Chem Biol Interact, 2021, 345: 109550.
- [47] VOUSDEN K H. p53: death star[J]. Cell, 2000, 103(5): 691.
- [48] AUBREY B J, KELLY G L, JANIC A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? [J]. Cell Death Differ, 2018, 25(1): 104.
- [49] XIE Z, KOYAMA T, SUZUKI J, et al. Coronary reperfusion following ischemia different expression of Bcl-2 and Bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis[J]. Jpn Heart J, 2001, 42(6): 759.
- [50] 王庆华, 韩玮, 陈达飞, 等. 槐果碱对肝癌细胞 SMMC-7721 生长与侵袭的影响及机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39(1): 67.
- [51] NAKANO K, VOUSDEN K H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53[J]. Mol Cell, 2001, 7(3): 683.
- [52] THORNBORROW E C, PATEL S, MASTROPIETRO A E, et al. A conserved intronic response element mediates direct p53-dependent transcriptional activation of both the human and murine Bax genes[J]. Oncogene, 2002, 21(7): 990.

[责任编辑 张燕]