



DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.06.10

文章编号: 2095-1264(2023)06-0719-10

基于网络药理学和实验验证探讨胃复方对胃癌的 效应及作用机制^{*}

刘丝雨^{1,3}, 李东芳^{1,2*}, 何迎春³, 唐麒¹, 孙蕊¹, 邓振中¹

(¹湖南中医药大学研究生院, 湖南长沙, 410208; ²湖南省肿瘤医院/中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院
中西医结合科, 湖南长沙, 410013; ³湖南中医药大学 中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病湖南省重点实验室/湖南省
中医药防治眼耳鼻喉咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南长沙, 410208)

摘要: **目的** 基于网络药理学探究胃复方治疗胃癌的作用机制。**方法** 应用中药系统药理学数据库及分析平台、DrugBank、GeneCards 等数据库检索胃复方所含 12 味中药的有效化学成分及治疗胃癌的潜在靶点, 将潜在靶点导入 DAVID 数据库进行基因本体论(GO)及京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析, 筛选出潜在的生物过程和涉及的信号通路。采用 CCK-8 及 Western blotting 对 KEGG 分析富集程度最大的信号通路进行验证。**结果** 胃复方治疗胃癌可能涉及以槲皮素、木樨草素为代表的 88 种有效活性成分, 可能作用于以 TP53、STAT3、Akt 为代表的 194 个靶点。GO 分析涉及 148 个生物过程, KEGG 分析筛选出 PI3K/Akt、TNF、HIF-1 等信号通路。体外实验证实胃复方提取物可抑制人胃癌细胞 HGC-27 增殖, 降低其 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达水平; 而对于人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1, 胃复方提取物可促进其增殖, 上调其 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达。**结论** 本研究初步预测了胃复方治疗胃癌“中药-多成分-多靶点-多通路”的调控网络, 并验证了胃复方提取物可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达发挥抑制胃癌细胞增殖的作用, 证明了网络药理学技术挖掘胃复方具有一定的可信度, 但同时兼有不完全性, 为进一步探索胃复方的作用机制奠定了基础。

关键词: 网络药理学; 胃复方; 胃癌; PI3K/Akt

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

Experimental verification of the effect and mechanism of Weifufang on gastric cancer based on network pharmacology^{*}

LIU Siyu^{1,3}, LI Dongfang^{1,2*}, HE Yingchun³, TANG Qi¹, SUN Rui¹, DENG Zhenzhong¹

(¹The Graduate School of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208, Hunan, China; ²Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan Cancer Hospital / the Affiliated Hospital of Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha, 410013, Hunan, China; ³Hunan Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine / Hunan Provincial Engineering Technology Research Center for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases and Protection of Visual Function with Traditional Chinese Medicine, Changsha, 410208, Hunan, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Weifufang (an experienced effective prescription for the treatment of gastric cancer developed by Hunan Cancer Hospital) in treating gastric cancer on the base of network pharmacology. **Methods** The effective active ingredients and potential targets for treating gastric cancer of 12 traditional Chinese medicines contained in Weifufang were searched by using the Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform,

^{*}基金项目:湖南省卫健委重点资助课题(20200984);湖南省中医药管理局重点项目(2022007)。

作者简介:刘丝雨,女,博士研究生,医师,研究方向:中西医结合防治恶性肿瘤。

^{*}通信作者:李东芳,女,硕士生导师,主任医师,研究方向:中西医结合防治恶性肿瘤。

DrugBank, GeneCards and other databases. The potential targets were imported into DAVID database for gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis, and the potential biological processes and involved signal pathways were screened out. CCK-8 and Western blotting were used to verify the signal pathway with the highest enrichment degree in KEGG analysis. **Results** Weifufang therapy for gastric cancer may involve 88 active ingredients represented by quercetin and luteolin, and may act on 194 targets represented by TP53, STAT3 and Akt. GO analysis involved 148 biological processes, and KEGG analysis screened PI3K/Akt, TNF, HIF-1 and other signal pathways. *In vitro* experiments proved that the Weifufang extract could inhibit the proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells, and decrease the protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt. However, Weifufang extract could promote the proliferation of human normal gastric epithelial cells GES-1 and up-regulate the protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt and Akt. **Conclusion** This study preliminarily predicted the regulatory network of "traditional Chinese medicine-multicomponents-multitargets-multipathways" in the treatment of gastric cancer, and verified that the Weifufang extract could inhibit the proliferation of gastric cancer cells by inhibiting the expression of PI3K/Akt signal pathway related proteins. It proved that the network pharmacology technology was credible in mining Weifufang, but it was incomplete at the same time, providing a basis for further exploring the mechanism of Weifufang.

Keywords: Network pharmacology; Weifufang; Gastric cancer; PI3K/Akt

前言

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,约 50% 的新发病例分布于亚洲东部,主要集中在我国^[1]。胃癌发病隐匿,30%~40% 的患者发现时为中晚期,治疗以手术、放化疗、靶向治疗、中医药治疗等多学科诊疗为主。中医药“辨证论治”在放化疗、靶向治疗、免疫治疗期间增效解毒,术后延缓肿瘤复发,提高患者生存质量等方面发挥重要作用,具有实用性、有效性。因此,探索中医药治疗胃癌意义重大。胃复方是全国名老中医学术经验继承指导老师、湖南省名中医黎月恒教授治疗胃癌的经验方。前期临床研究显示,胃复方联合化疗可减少胃癌患者骨髓抑制、减轻消化道反应、缓解癌因性疲乏等^[2]。基础研究显示,胃复方含药血浆可能通过活化过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ)上调磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)蛋白表达^[3-4]、下调垂体肿瘤转化基因(pituitary tumor-transforming gene, PTTG)、人体端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)蛋白的表达,发挥抑制人胃癌细胞增殖、促进凋亡的作用^[5],并在体内实验中进一步得到印证^[6]。但中药复方组合方式多样,重复性差,药味繁杂,具有“多成分、多靶点、多途径”的特点,物质基础及网络作用机制难以完全明确^[7]。网络药理学技术注重从生物网络平衡角度认识生物的作用,认为疾病的本质是复杂生物网络的失衡,不单独着重于碎片靶标,在挖掘中药复方作用机制中有着重要作用。因此,本研究依

托网络药理学技术分析胃复方治疗胃癌的作用机制,并通过体外实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 网络药理学

1.1.1 胃复方有效化学成分的筛选 登录中药系统药理学数据库与分析平台(Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP)数据库(<https://tcmispw.com/tcmisp.php>)^[8]检索选定中草药(herb name),分别输入关键词“黄芪”“党参”“茯苓”“白术”“香附”“郁金”“白花蛇舌草”“半枝莲”“莪术”“女贞子”“菟丝子”“甘草”,设定筛选条件:OB \geq 30%、DL \geq 0.18、HL \geq 4,选择有明确 CAS 号的化学成分,构建胃复方有效化学成分库。

1.1.2 胃复方相关靶点的预测 登录 DrugBank 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)检索上述有效化学成分的蛋白靶点。登录 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[9],物种限定为“homo sapiens”,将蛋白靶点名称校正为官方基因 Symbol。

1.1.3 胃复方-胃癌交集靶点数据库的构建 登录 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)^[10],输入关键词“Gastric cancer”,设定筛选条件:RS \geq 20,构建胃癌相关靶点数据库。利用 Excel 中“=VLOOK()”函数,获得胃复方有效靶点与胃癌相关靶点的交集靶点,即胃复方发挥抗胃癌作用的潜在靶点。

1.1.4 PPI 网络的构建 登录 STRING 数据库(<https://string-db.org/>)^[11],选择 Multiple Proteins,输入上述交集靶点,物种限定为“homo sapiens”,建立蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interac-

tion, PPI)网络。将 PPI 分析的数据信息导入 Cytoscape V3.7 软件,利用 Network Analyze 插件,根据节点度和介数中心性等拓扑属性进行分析,优化核心靶点并实现可视化。

1.1.5 GO 分析及 KEGG 分析 利用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>)^[12],输入胃复方-胃癌交集靶点,物种限定为“homo sapiens”,进行基因本体论(gene ontology, GO)分析,包括细胞组成(cell composition, CC)、分子功能(molecular function, MF)、生物过程(biological process, BP),并进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)^[13]通路富集分析,二者均设定错误发现率(false discovery rate, FDR)<0.05 作为筛选条件。利用 R 语言及 Omicshare 工具平台将富集结果可视化。

1.1.6 胃复方治疗胃癌的网络构建与分析 整合胃复方的有效化学成分、对应靶点及代谢通路信息,导入 Cytoscape V3.7 软件,构建“中药-多成分-多靶点-多通路-胃癌”的调控网络,并对网络拓扑参数进行分析。

1.2 体外实验

1.2.1 材料与试剂

1.2.1.1 细胞培养 人胃癌细胞 HGC-27 与人正常胃上皮细胞 GES-1 均购于中国科学院上海细胞库。将 HGC-27 细胞培养于 T25 培养瓶,加入 5 mL 含 10% 胎牛血清的 RPMI Medium 1640 培养基(含青、链霉素共 1%),GES-1 细胞则加入 5 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基(含青、链霉素共 1%),均置于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中静置培养。培养约 1~2 d 后,细胞可以黏附于瓶壁并伸展、生长,换液后 1 d 可以长满瓶壁,进行传代。

1.2.1.2 胃复方提取物制备 按黄芪:党参:茯苓:白术:香附:郁金:女贞子:菟丝子:莪术:白花蛇舌草:半枝莲:甘草=6:2:2:2:2:2:2:2:3:3:1 的质量比购置上述中药饮片共 870 g。中药饮片均来自湖南省肿瘤医院中药房,并由湖南省肿瘤医院中药房进行鉴定。参考《天然药物化学》中药饮片水提醇沉提取方法,由湖南省中药活性物质筛选工程技术研究中心制备提取物,方法如下:①浸泡 30 min 后回流提取 2 次,第 1 次取 10 倍量的水提取 2 h,第 2 次取 8 倍量的水提取 1.5 h。②将 2 次提取的药液混匀后进行旋转蒸发,浓缩物与药液比约为 1:3。③将 95% 乙醇加入浓缩药液中使得醇含量为 50%,

置于 4 °C 冰箱沉淀 24 h,取上清液。④将上清液进行旋转蒸发浓缩至一定稠度,置于 -80 °C 冰箱储存 24 h 后转移至冷冻干燥机过夜,获得胃复方提取物粉末 245 g,相当于每 1 g 提取物含生药 3.55 g,置于 4 °C 冰箱避光储存。⑤临用时使用 RPMI Medium 1640 溶解,并用 0.22 μm 过滤器除菌。

1.2.1.3 主要仪器与试剂 主要仪器:超净工作台(安泰,型号 SW-CJ-2FD)、恒温 CO₂ 培养箱(Thermo,型号 31111)、显微镜(ZEISS,型号 ZOETM)、冷冻干燥机(北京博医康,型号 FD1A5D)、酶标仪(Thermo,型号 Multiskan Fu)、化学发光仪(Minichemi,型号 G10MAX96)。

主要试剂:胎牛血清(Gibco, 42A0378K)、CCK-8 试剂盒(日本同仁,货号 NU679)、LY294002(Selleck, 货号 S110507)、重组人胰岛素生长因子-1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)(REPROTEACH, 货号 100-11)、Anti-PI3Kinase p85 alpha (Abcam, 货号 ab191606)、Anti-AKT1+AKT2+AKT3 (Abcam, 货号 ab179463)、Anti-PI3Kinase p85 alpha(phospho Y607) (Abcam, 货号 ab182651)、Anti-AKT1+AKT2+AKT3 (phospho S472+S473+S474) (Abcam, 货号 ab183758)、β-actin(66009-1-Ig)(Proteintech, 货号 66009-1-Ig)。

1.2.2 CCK-8 检测细胞活力 取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL,按每孔 200 μL 接种于 96 孔板,隔夜后弃去孔内培养基。以每孔 200 μL 分组给药(空白组无细胞,仅有 CCK-8 试剂),每组设置 5 个复孔,分别于 24、48、72 h 避光加入终浓度为 10% 的 CCK-8 试剂 100 μL,置于细胞培养箱培养 2 h,酶标仪测定 450 nm 处光密度(optical density, OD)值。细胞活力(cell viability rate, CV) = $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{NC组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

1.2.3 Western blotting 检测蛋白表达 将细胞以每孔 2 mL 接种于 6 孔板,24 h 后,待细胞融合约 80% 时,按分组设置每孔加入 2 mL 药物。提取细胞中的总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,并计算样品上样量,进行凝胶电泳,接着转印至 NC 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h。一抗 4 °C 过夜孵育,1×TBST 充分洗膜(10 min×3 次),二抗常温孵育 1 h,1×TBST 充分洗膜后 ECL 发光显色。以 β-actin 作为内参,利用 Image J 计算条带灰度值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 软件进行统计学分析。各组 OD 值及灰度值属于数值变量,若满足正

态分布及方差齐性,使用单因素方差分析,否则使用 Kruskal-Wallis 检验;若数值符合方差齐性,组间比较使用 LSD 法,否则使用 Game-Howell 法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 胃复方作用机制的网络药理学分析

2.1.1 胃复方有效化学成分的筛选与构建 共筛选出 113 个有效化学成分,删去重复值后剩余 88 个。其中黄芪、香附中的有效成分达 14 个,甘草次之,有 13 个(图 1)。有效化学成分中,槲皮素(querعتin)、木樨草素(luteolin)、山柰酚(kaempferol)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、异鼠李素(isorhamnetin)等出现的频次较高。

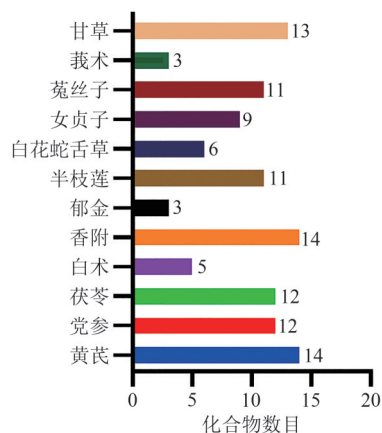


图 1 胃复方中有效化学成分数量

Fig. 1 The number of effective compounds in Weifufang

2.1.2 胃复方相关靶点的预测 将筛选后的有效化学成分在 Drugbank 数据库中靶标垂钓,并在 Uniprot 数据中进行官方基因 Symbol 校正,除去未能匹配及重复的靶点,最终得到各药味的相关靶点(表 1)。其中黄芪、香附、菟丝子、女贞子、甘草对应的靶点数量较多,同一味中药可对应大量不同靶点,同一靶点也可对应不同中药。

2.1.3 胃复方-胃癌交集靶点数据库的构建 在 GeneCards 数据库中得到胃癌相关靶点 11 843 个,以 $RS \geq 20$ 为条件进行筛选,得到 570 个胃癌相关靶点。将胃复方相关靶点映射到胃癌相关靶点,得到 94 个交集靶点,即胃复方治疗胃癌可能发挥作用的靶点。

2.1.4 PPI 网络的构建 将 94 个交集靶点使用 STRING 数据库进行 PPI 网络分析,剔除 2 个孤立靶点,得到 92 个靶点、510 条边。将 PPI 网络分析所得

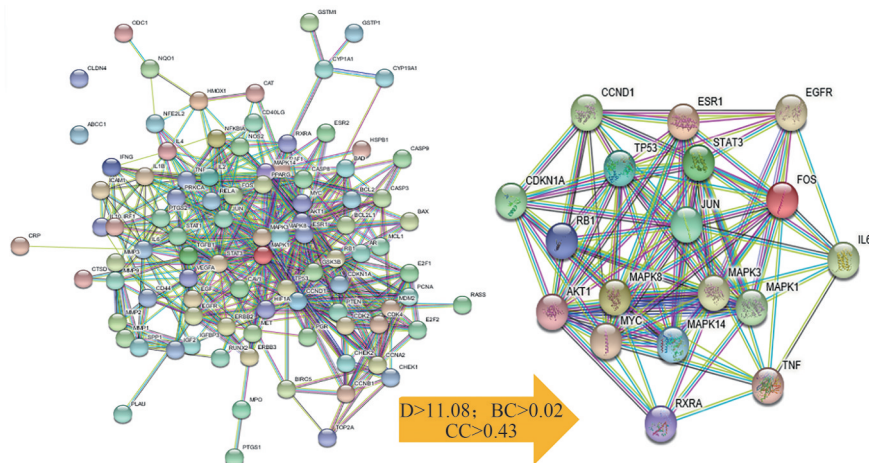
表 1 胃复方相关靶点数量

Tab. 1 The number of Weifufang-related targets

中药名称	DrugBank 垂钓	UniProt 校正	去重
黄芪	391	367	197
党参	164	162	107
茯苓	27	27	23
白术	7	7	7
香附	441	438	218
郁金	79	78	70
女贞子	348	352	187
菟丝子	344	341	204
半枝莲	112	108	61
白花蛇舌草	258	254	85
莪术	10	10	10
甘草	400	315	218

数据导入 Cytoscape V3.7 软件进行网络拓扑学分析及可视化,根据度(degree)、度介中心度(betweenness centrality)、接近中心度(closeness centrality)三个拓扑参数筛选大于平均值(分别为 11.08、0.02、0.43)的靶点作为核心靶点,获得 19 个核心靶点。追溯胃复方中主要发挥作用的化学成分,分别为槲皮素(querعتin)、木樨草素(luteolin)、山柰酚(kaempferol)、 β -谷甾醇(beta-sitosterol)、异鼠李素(isorhamnetin)等(图 2、图 3)。

2.1.5 GO 分析和 KEGG 分析 利用 DAVID 数据库对胃复方-胃癌交集的 94 个靶点进行 GO 分析与 KEGG 分析。GO 包含 3 个子类,分别为 BP、CC 和 MF,以 $FDR < 0.05$ 为条件进行筛选后,得到富集于 BP 的条目 115 个、CC 9 个、MF 24 个。根据富集基因数量,截取排名前 15 位的 BP、前 10 位的 MF、前 9 位的 CC(图 4)。94 个基因靶点的 BP 主要涉及 RNA 聚合酶核 II 启动子对转录正调控、DNA 转录的正调控、药物反应、细胞凋亡、细胞增殖、细胞老化、细胞缺氧、炎症反应、信号转导、基因表达等;CC 主要涉及细胞核、细胞质、核质、线粒体、核染色质、胞外区域等;MF 主要涉及酶连接、蛋白连接、蛋白酶连接、转录因子连接、蛋白酶活性、蛋白酶连接转录因子活性、蛋白异二聚化活性、蛋白同二聚化活性等。KEGG 通路分析富集到 69 条通路,筛选其中排名前 10 位的疾病富集图及信号通路(图 5),信号通路多富集在磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)、缺氧诱导

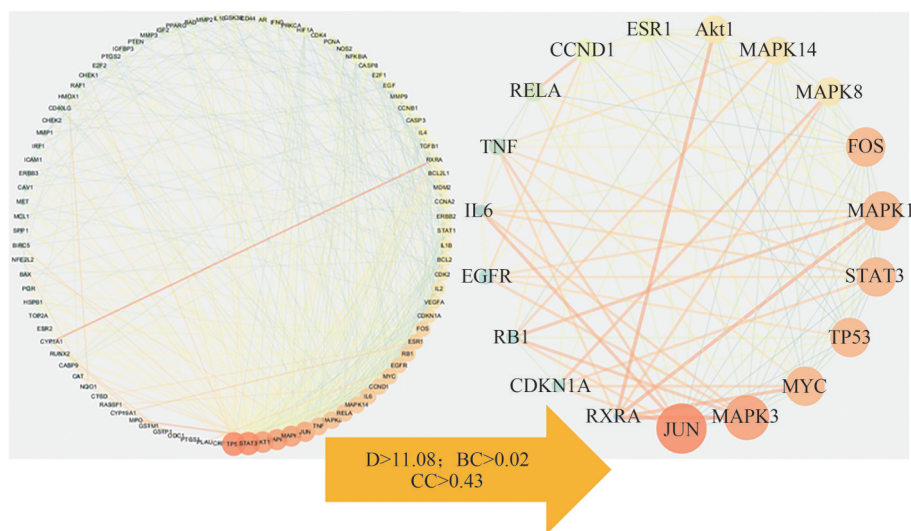


注：节点代表不同基因编码的蛋白质，不同颜色的横线表示靶点交互的不同意义。

Note: Nodes represent proteins encoded by different targets, and horizontal lines with different colors indicate different meanings of target interaction.

图 2 核心靶点筛选前后 PPI 网络图

Fig. 2 PPI network before and after core target screening



注：圆圈代表交集靶点，横线代表靶点之间的交互作用；圆圈越大，颜色越亮，表示靶点贡献度越大；横线越粗，颜色越亮，表示靶点之间联系越密切。

Note: The circles represent the intersection targets, and the horizontal lines represent the interaction between the targets; The bigger the circle, the brighter the color, and the greater the contribution of the target is; The thicker the horizontal line, the brighter the color, and the more closely connected the targets are.

图 3 核心靶点筛选前后网络拓扑学分析展示图

Fig. 3 PPI network topology analysis before and after core target screening

因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1) 等。整合前述信息，构建胃复方治疗胃癌的“中药-多成分-多靶点-多通路-疾病”调控图，并选取 KEGG 分析中贡献度最大的 PI3K/Akt 信号通路，以 GO 分析中的细胞增殖作为研究效应，对胃复方进行体外实验验证(图 6)。

2.2 胃复方通过 PI3K/Akt 信号通路抑制胃癌细胞增殖

2.2.1 不同浓度胃复方提取物对人胃癌 HGC-27 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示，与 NC 组同一时间点相比，胃复方对 HGC-27 细胞的增殖有明显抑制作用，细胞活力随药物浓度增加而降低，呈浓度依赖性，差异有统计学意义 ($P < 0.01$)，且各时间点的组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2)。24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 0.75、0.56、0.64 $g \cdot L^{-1}$ 。考虑后续 Western blotting 实验药物作用时间为 24 h，故取

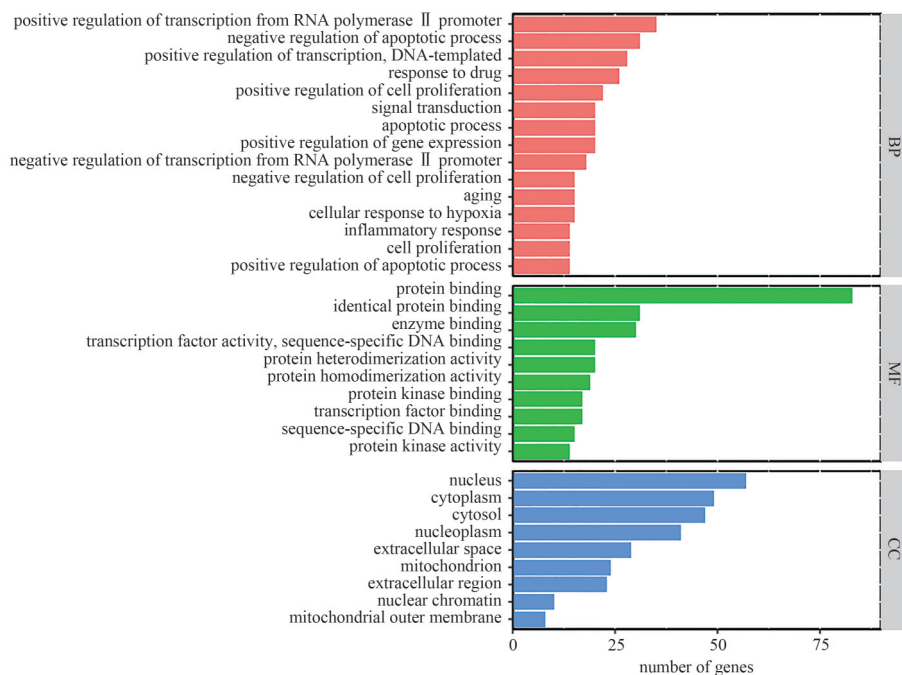
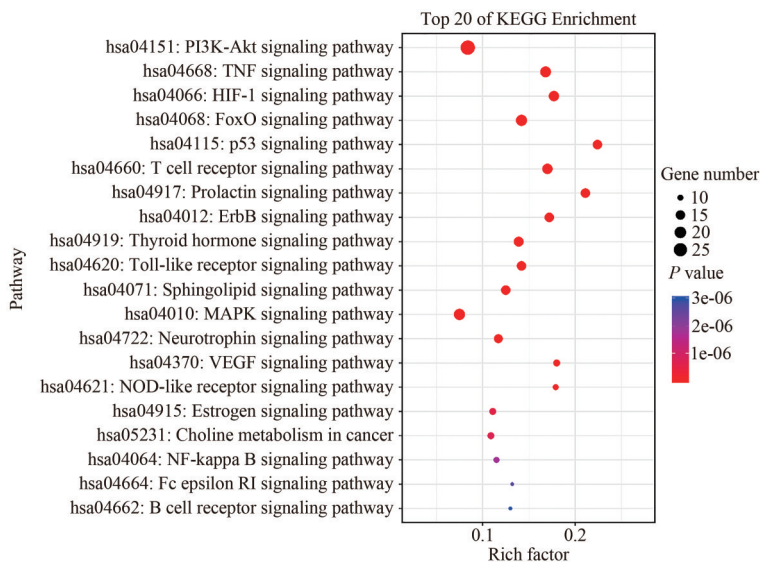


图 4 GO 分析图

Fig. 4 GO analysis chart



注：圆圈越大表示富集基因数量越多，颜色越红表示可信度越高。Rich factor为目的基因与该通路背景基因的比值。

Note: The larger the circle, the more the number of enriched genes; the redder the color, the higher the credibility. Rich factor is the ratio of the target gene to the background gene of this pathway.

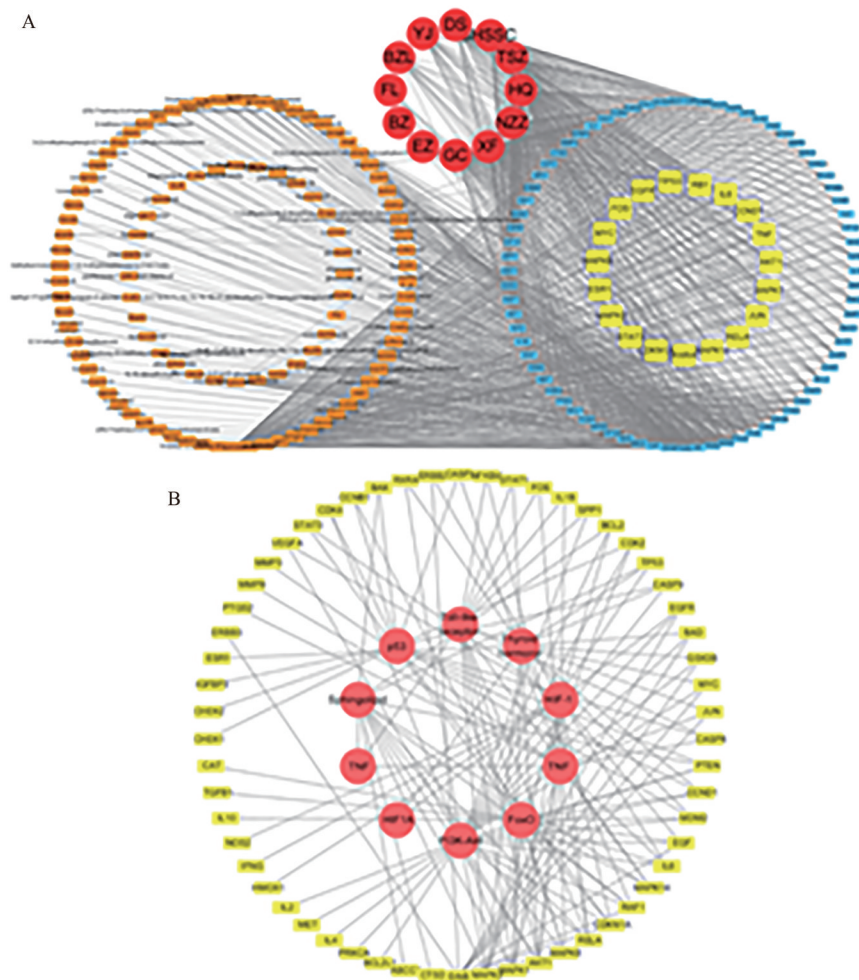
图 5 KEGG 分析气泡图

Fig. 5 KEGG analysis bubble chart

0.75 g·L⁻¹作为后续实验胃复方干预浓度。

2.2.1 PI3K/Akt 信号通路在胃复方抑制人胃癌 HGC-27 细胞增殖中的作用 为进一步验证 PI3K/Akt 信号通路在胃复方抑制人胃癌 HGC-27 细胞增殖中的作用,在胃复方提取物中分别加入 PI3K/Akt 信号通路激活剂 IGF-1^[14] 和抑制剂

LY294002^[15]。CCK-8 结果显示,与胃复方组相比,胃复方联合 LY294002 组对 HGC-27 细胞增殖的抑制有协同作用,差异均有统计学意义($P < 0.01$);胃复方联合 IGF-1 组对 HGC-27 细胞增殖的抑制有拮抗作用,但仅在 48 h 时差异有统计学意义($P < 0.01$) (表 3、图 7)。Western blotting 结果显示,与 NC 组相比,



注:(A)红色圆圈代表胃复方所含药味,橙色长方形代表多成分,蓝色长方形代表多靶点,黄色正方形代表核心靶点;(B) KEGG 分析后“多靶点-多通路”展示图,粉色圆圈代表信号通路,黄色长方形代表参与信号通路的靶点。

Note: (A) The red circle represents the herbs contained in Weifufang, the orange rectangle represents multicomponents, the blue rectangle represents multitargets, and the yellow square represents the core targets; (B) The "multitargets-multipathways" display after KEGG analysis. The pink circle represents the pathways, and the yellow rectangle represents the targets participating in the signal chan.

图 6 胃复方治疗胃癌“中药-多成分-多靶点-多通路”调控图

Fig. 6 The “traditional Chinese medicine-multicomponents-multitargets-multipathways” regulation chart of Weifufang for GC

表 2 不同浓度胃复方提取物对 HGC-27 细胞活力的影响

Tab. 2 OD and CV values of HGC-27 cells treated with different concentrations of water extract of Weifufang at different time points

组别	24 h		48 h		72 h	
	OD	CV	OD	CV	OD	CV
NC 组	0.73±0.01	—	1.31±0.03	—	1.38±0.01	—
0.5 g·L ⁻¹ 胃复方组	0.68±0.01**	99%	0.83±0.02**	60%	1.18±0.01**	84%
0.6 g·L ⁻¹ 胃复方组	0.61±0.02**	80%	0.75±0.02**	53%	0.97±0.02**	66%
0.7 g·L ⁻¹ 胃复方组	0.50±0.02**	61%	0.40±0.02**	23%	0.78±0.03**	53%
0.8 g·L ⁻¹ 胃复方组	0.43±0.01**	49%	0.34±0.02**	19%	0.30±0.01**	14%
0.9 g·L ⁻¹ 胃复方组	0.29±0.01**	25%	0.30±0.03**	15%	0.18±0.01**	1%
1.0 g·L ⁻¹ 胃复方组	0.24±0.01**	16%	0.28±0.01**	15%	0.15±0.01**	1%
空白组	0.13±0.00**	—	0.10±0.00**	—	0.10±0.00**	—

注:与 NC 组同一时间点对比,** $P<0.01$ 。n=6。

Note: Compared with NC group at the same time piont, ** $P<0.01$ 。n=6.

表 3 胃复方联合 IGF-1 或 LY294002 对 HGC-27 细胞活力的影响

Tab. 3 Effects of Weifufang combined with IGF-1 or LY294002 on the viability of HGC-27 cells at different time points

组别	24 h		48 h		72 h	
	OD	CV	OD	CV	OD	CV
NC 组	1.03±0.14	—	1.17±0.06	—	1.11±0.05	—
胃复方组	0.59±0.02**	50%	0.57±0.01**&	42%	0.70±0.02**	20%
胃复方+LY294002 组	0.34±0.45**&	14%	0.30±0.02**&	17%	0.27±0.02**&	56%
胃复方+IGF-1 组	0.60±0.03**	53%	0.68±0.04**&	53%	0.67±0.02**	61%
LY294002 组	0.45±0.07**&	36%	0.67±0.01**&	52%	0.65±0.02**&	52%
IGF-1 组	1.05±0.14**&	102%	1.12±0.04	124%	1.42±0.16#	133%
空白组	0.12±0.00**&	—	0.12±0.00**&	—	0.12±0.00***	—

注:同一时间点,与 NC 组相比,** $P<0.01$ 、* $P<0.05$;与胃复方组相比,& $P<0.01$ 。 $n=6$ 。

Note: Compared with the NC group in the same time, ** $P<0.01$, * $P<0.05$; Compared with Weifufang group, & $P<0.01$. $n=6$.

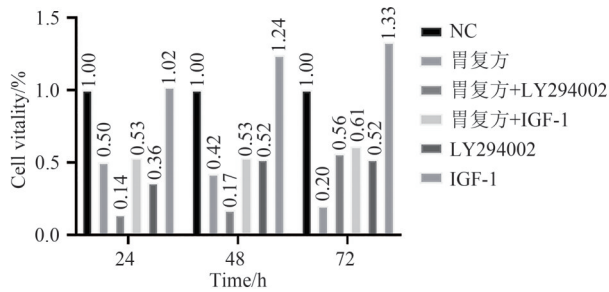
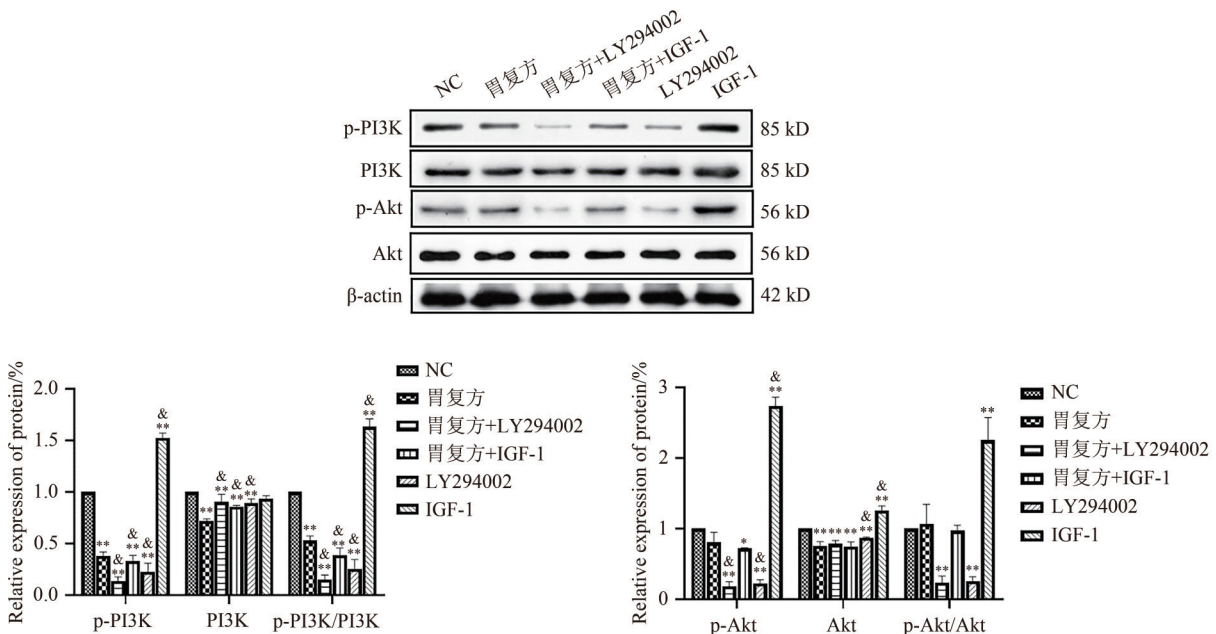


图 7 胃复方联合 IGF-1 或 LY294002 对 HGC-27 细胞增殖的影响

Fig. 7 Inhibitory effect of different treatments on the proliferation of human gastric cancer HGC-27 cells

胃复方组 p-PI3K、PI3K、Akt 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.05$), p-Akt 蛋白表达水平有所下降,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与 NC 组相比,LY294002 组 p-PI3K、PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平均显著降低 ($P<0.01$), IGF-1 组 p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)。与胃复方组相比,加入 LY294002 后,p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$);加入 IGF-1 后,PI3K 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$),而 p-PI3K 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.05$), p-Akt、Akt 蛋白表达水平无明显差异。以上



注:与 NC 组相比,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$;与胃复方组相比,& $P<0.05$ 。

Note: Compared with NC group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; Compared with Weifufang group, & $P<0.05$.

图 8 胃复方联合 IGF-1 或 LY294002 对 HGC-27 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 8 Expressions of different proteins in HGC-27 cells treated by Weifufang combined with IGF-1 or LY294002

结果提示,胃复方联合 LY294002 对 HGC-27 细胞增殖的抑制具有较好的协同作用,联合 IGF-1 具有一定的拮抗作用(图 8)。

2.2.3 胃复方提取物对人正常胃黏膜上皮细胞增殖的影响 为证明胃复方提取物是通过抑制 HGC-27 细胞增殖影响细胞活力而非直接杀伤细胞,将胃复方提取物作用于正常人胃黏膜上皮细胞 GES-1。

CCK-8 结果显示,与 NC 组同一时间点相比,胃复方提取物对 GES-1 细胞增殖具有促进作用,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(表 4)。Western blotting 结果进一步证实,胃复方提取物可上调 GES-1 细胞中 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白的表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图 9)。

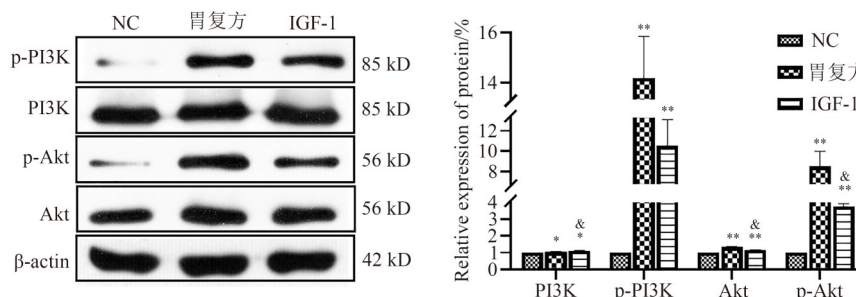
表 4 胃复方提取物对 GES-1 细胞活力的影响

Tab. 4 Effects of Weifufang extract on the viability of GES-1 cells at different time points

组别	24 h		48 h		72 h	
	OD	CV	OD	CV	OD	CV
NC 组	0.79±0.03	—	0.79±0.04	—	0.79±0.04	—
IGF-1 组	0.87±0.02 ^{*△&}	111%	0.94±0.03 ^{**△&}	122%	1.09±0.05 ^{**△&}	104%
LY294002 组	0.71±0.01 ^{**#&}	12%	0.72±0.02 ^{**#&}	10%	0.78±0.03 ^{#&}	2%
胃复方组	1.12±0.05 ^{**#△}	150%	1.05±0.04 ^{**#△}	135%	0.96±0.06 ^{**#△}	123%
空白组	0.14±0.00 ^{**#△&}	—	0.14±0.00 ^{**#△&}	—	0.14±0.01 ^{**#△&}	—

注:与 NC 组同一时间点相比,^{*} $P < 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$;与 IGF-1 组相比,[#] $P < 0.01$;与 LY294002 相比,[△] $P < 0.01$;与胃复方组相比,[&] $P < 0.01$ 。n=6。

Note: Compared with the NC group at the same time point, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with IGF-1 group, [#] $P < 0.01$; Compared with LY294002 group, [△] $P < 0.01$; Compared with Weifufang group, [&] $P < 0.01$. n=6.



注:与 NC 组相比,^{*} $P < 0.05$ 、^{**} $P < 0.01$;与胃复方组相比,[&] $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the NC group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; Compared with Weifufang group, [&] $P < 0.05$ 。

图 9 胃复方提取物和 IGF-1 对 GES-1 细胞中 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

Fig. 9 Effects of Weifufang extract and IGF-1 on the expression of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins in GES-1 cells

3 讨论

胃复方是全国名老中医学术经验继承指导老师、湖南省名中医黎月恒教授治疗胃癌的经验方。全方主要由黄芪、党参、白术、茯苓、香附、郁金、莪术、半枝莲、女贞子、菟丝子、白花蛇舌草、甘草等组成。本研究基于网络药理学筛选出胃复方中以槲皮素、木樨草素、山柰酚为代表的 88 种活性成分,将其对应的靶点映射到胃癌相关靶点后得到 94 个交集靶点。槲皮素、木樨草素、山柰酚是广泛存在于天然中草药中的黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等作用^[16-18]。本研究通过 PPI 分析及网络拓

扑学分析,得到以 TP53, STAT3, Akt1, MAPK1 为代表的 19 个核心靶点,可作为今后本课题组进一步挖掘胃复方的研究基础。KEGG 分析挖掘到胃复方可能参与 PI3K/Akt、TNF、HIF-1、FOXO 等信号通路的调控,其中 PI3K/Akt 信号通路贡献度最大。PI3K/Akt 是恶性肿瘤的经典通路,与其他信号通路多有交叉,该通路的激活可导致肿瘤细胞的异常增殖与凋亡,与恶性肿瘤的分化程度、转移、预后密切相关^[19]。利用网络药理学技术预测胃复方的主要有效化学成分、靶点、信号通路仅来自于算法的整合,可能存在一定的假阳性结果。研究发现,黄酮类化合物如木樨草素、槲皮素等均可通过 PI3K/Akt

信号通路诱导恶性肿瘤细胞凋亡和自噬、抑制细胞增殖和上皮-间质转化进程^[20],在一定程度上与本次挖掘结果吻合。因此,本研究设计体外实验对胃复方在胃癌中的作用及其调控 PI3K/Akt 信号通路的作用机制进行验证,结果显示,胃复方提取物对正常胃黏膜上皮细胞的增殖并无抑制作用,胃复方确实可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达抑制胃癌细胞增殖。

综上所述,本研究采用网络药理学技术挖掘出胃复方治疗胃癌的潜在活性成分和涉及的靶点,体现了中药复方“多成分-多靶点-多通路”的作用特点;通过细胞实验证实胃复方可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达抑制胃癌细胞增殖,为进一步探讨胃复方治疗胃癌的作用机制奠定了基础。网络药理学技术具有一定的可信度,但同时也兼具局限性。科学研究没有捷径,依托生物信息平台挖掘中药复方可能获得客观的、数字化的结果,但将名老中医隐形的经验转化为显性的知识,仍需临床上不断总结和基础研究不断探索。

参考文献

- [1] FERLAY J, SOERJOMATARAM I, DIKSHIT R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): E359-E386. DOI: 10.1002/ijc.29210.
- [2] 李东芳,樊江丽,王云启,等.胃复方干预治疗脾虚癌毒型中晚期胃癌临床研究[J].*中国中医药信息杂志*, 2015, 22(3): 20-24. DOI: 10.3969/j.issn.1005-5304.2015.03.006.
- [3] 胡亚,李东芳.胃复方含药血浆对胃癌 SGC-7901 细胞株增殖及 PPAR γ 基因活性的影响[J].*中国中西医结合消化杂志*, 2016, 24(3): 178-181. DOI: 10.3969/j.issn.1671-038X.2016.03.05.
- [4] 李东芳,李超年,张顺荣,等.基于 PPAR γ 、PTEN 基因探讨胃复方含药血浆对人胃癌 BGC-823 细胞的影响[J].*肿瘤药学*, 2019, 9(4): 565-571. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2019.04.08.
- [5] 张顺荣,李东芳,何寄琴,等.胃复方对人胃癌 BGC-823 细胞移植瘤裸鼠作用及其对 c-Myc、人端粒酶逆转录酶基因表达的影响[J].*世界中医药*, 2019, 14(10): 2618-2622. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.10.016.
- [6] HE J Q, ZHANG S R, LI D F, et al. Experimental study on the effect of a Weifufang on human gastric adenocarcinoma cell line BGC-823 xenografts and *PTEN* gene expression in nude mice [J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020, 35(3): 199-207. DOI: 10.1089/cbr.2019.2906.
- [7] 段贤春,黄石,彭代银,等.网络药理学在中药复方研究中的应用[J].*中国药理学通报*, 2020, 36(3): 303-308. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2020.03.003.
- [8] RU J L, LI P, WANG J N, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines [J]. *J Cheminform*, 2014, 6: 13. DOI: 10.1186/1758-2946-6-13.
- [9] CONSORTIUM U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D506-D515. DOI: 10.1093/nar/gky1049.
- [10] SAFRAN M, DALAH I, ALEXANDER J, et al. GeneCards Version 3: the human gene integrator [J]. *Database (Oxford)*, 2010, 2010: baq020. DOI: 10.1093/database/baq020.
- [11] SZKLARCZYK D, GABLE A L, LYON D, et al. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613. DOI: 10.1093/nar/gky1131.
- [12] DENNIS G Jr, SHERMAN B T, HOSACK D A, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(9): R60. DOI: 10.1186/gb-2003-4-9-r60.
- [13] KANEHISA M, GOTO S, SATO Y, et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(Database issue): D109-D114. DOI: 10.1093/nar/gkr988.
- [14] ZHAO X G, LI X, REN Q Y, et al. Calycosin induces apoptosis in colorectal cancer cells, through modulating the ER β /MiR-95 and IGF-1R, PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Gene*, 2016, 591(1): 123-128. DOI: 10.1016/j.gene.2016.07.012.
- [15] TAO H, TANG T, WANG S N, et al. The molecular mechanisms of Aloin induce gastric cancer cells apoptosis by targeting High Mobility Group Box 1 [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1221-1231. DOI: 10.2147/DDDT.S201818.
- [16] SHEN X S, SI Y Q, WANG Z, et al. Quercetin inhibits the growth of human gastric cancer stem cells by inducing mitochondrial-dependent apoptosis through the inhibition of PI3K/Akt signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 38(2): 619-626. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2625.
- [17] 王丽君,戴志升.山奈酚对胃癌细胞 PARP1 以及 P53 基因表达的影响研究[J].*基因组学与应用生物学*, 2020, 39(3): 1270-1274. DOI: 10.13417/j.gab.039.001270.
- [18] RADZIEJEWSKA I, BORZYM-KLUCZYK M, LESZCZYŃSKA K. Luteolin alters MUC1 extracellular domain, sT antigen, ADAM-17, IL-8, IL-10 and NF- κ B expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric cancer CRL-1739 cells: a preliminary study [J]. *Biomed Rep*, 2021, 14(2): 19. DOI: 10.3892/br.2020.1395.
- [19] JOO M K, PARK J J, YOO H S, et al. The roles of HOXB7 in promoting migration, invasion, and anti-apoptosis in gastric cancer [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(10): 1717-1726. DOI: 10.1111/jgh.13330.
- [20] 韦燕飞,刘莎莎,金丽杰,等.黄酮类中药单体通过 PI3K/Akt 信号通路抑制肿瘤的研究进展[J].*中华中医药学刊*, 2021, 39(10): 6-10. DOI: 10.13193/j.issn.1673-7717.2021.10.002.

校稿:李征 于静

本文引用格式:刘丝雨,李东芳,何迎春,等.基于网络药理学和实验验证探讨胃复方对胃癌的效应及作用机制[J].*肿瘤药学*, 2023, 13(6): 719-728. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.06.10.

Cite this article as: LIU Siyu, LI Dongfang, HE Yingchun, et al. Experimental verification of the effect and mechanism of Weifufang on gastric cancer based on network pharmacology [J]. *Anti-tumor Pharmacy*, 2023, 13(6): 719-728. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2023.06.10.