

## 基于网络药理学和体外实验验证二氢杨梅素抗胰腺癌的作用机制

张月芬, 戴雅彬, 郭 丹, 黄 慧\*

福建卫生职业技术学院 科技服务中心, 福建 福州 350101

**摘 要:** **目的** 基于网络药理学、分子对接及体外实验探讨二氢杨梅素通过下调磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号通路治疗胰腺癌的作用机制。**方法** 运用网络药理学筛选二氢杨梅素与胰腺癌的共同作用靶点, 构建蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 进行基因本体 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析, 并进行分子对接验证。采用 CCK-8、克隆形成、划痕、Transwell 及 Annexin V-FITC/PI 双染实验分别检测二氢杨梅素对胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响; Western blotting 检测 PI3K/Akt 通路中 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白的表达。**结果** 共获得 89 个二氢杨梅素治疗胰腺癌的候选靶点, 其中 Akt1、低氧诱导因子-1A (HIF-1A)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、胱天蛋白酶 3 (CASP3) 等为前 10 位核心靶点。GO 和 KEGG 分析提示二氢杨梅素可能通过胰腺癌通路、PI3K/Akt 信号通路及细胞凋亡等过程发挥作用。分子对接显示二氢杨梅素与核心靶点的结合能均小于 -6.0 kcal/mol。体外实验结果显示二氢杨梅素可显著抑制胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭, 并促进细胞凋亡, 同时下调 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达。**结论** 二氢杨梅素通过多靶点、多通路抑制胰腺癌细胞增殖、迁移、侵袭并诱导凋亡, 其机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路相关。

**关键词:** 二氢杨梅素; 胰腺癌; 网络药理学; 分子对接; PI3K/Akt 信号通路; 细胞凋亡

中图分类号: R286.7 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)12-2990-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.12.004

## Network pharmacology combined with *in vitro* experimental validation to elucidate the mechanism of dihydromyricetin against pancreatic cancer

ZHANG Yuefen, DAI Yabin, GUO Dan, HUANG Hui

Science and Technology Service Center, Fujian Health College, Fuzhou 350101, China

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism by which dihydromyricetin treats pancreatic cancer through downregulation of the PI3K/Akt signaling pathway, based on network pharmacology, molecular docking, and *in vitro* experiments. **Methods** Network pharmacology was used to screen the co-action targets of dihydromyricetin and pancreatic cancer, construct a PPI network, conduct GO function and KEGG pathway enrichment analysis, and perform molecular docking verification. The effects of dihydromyricetin on the proliferation, migration, invasion and apoptosis of pancreatic cancer cells were detected by CCK-8, clone formation, scratch, Transwell and Annexin V-FITC/PI double staining assay, respectively. Western blotting was used to detect the expression of PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt proteins in the PI3K/Akt pathway. **Results** A total of 89 potential targets of dihydromyricetin against pancreatic cancer were identified, with Akt1, HIF-1A, Bcl-2, CASP3 among the top 10 core targets. GO and KEGG analyses indicated that dihydromyricetin may exert its effects through pathways such as pancreatic cancer, PI3K/Akt signaling, and apoptosis. Molecular docking demonstrated that the binding energies between dihydromyricetin and the core targets were all below -6.0 kcal/mol, indicating stable binding. *In vitro* experiments confirmed that dihydromyricetin significantly inhibited the proliferation, migration, and invasion of pancreatic cancer cells, promoted apoptosis, and downregulated the expression of p-PI3K and p-Akt proteins. **Conclusion** Dihydromyricetin inhibits proliferation, migration, and invasion while inducing apoptosis in pancreatic cancer cells through multi-target and multi-pathway mechanisms, which may be associated with the suppression of the PI3K/Akt signaling pathway.

**Key words:** dihydromyricetin; pancreatic cancer; network pharmacology; molecular docking; PI3K/Akt signaling pathway; apoptosis

收稿日期: 2025-10-01

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (2022J01392); 福建省中青年骨干教师教育科研项目 (JAT210791); 福建卫生职业技术学院青年科研项目 (MWY2023-1-03)

作者简介: 张月芬, 助理研究员, 研究方向为中药活性成分筛选及评价。E-mail: zhangyuefen@fjwzy.edu.cn

\*通信作者: 黄 慧, 助理研究员, 研究方向为中药药效成分筛选及色谱应用研究。E-mail: huanghui@fjwzy.edu.cn

胰腺癌是全球范围内最具侵袭性的消化道恶性肿瘤之一,其年龄标准化发病率呈持续上升趋势。该疾病死亡率极高,与发病率近乎持平,5 年总生存率长期低于 10%,是全球癌症相关死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。2024 年美国癌症统计报告显示其 5 年相对生存率微升至 13%,但总体预后仍不乐观<sup>[2]</sup>。由于缺乏早期特异性症状和有效的生物标志物,胰腺癌的早期诊断面临重大挑战,致使多数患者在确诊时已进展至晚期,常伴有局部肿瘤浸润或远处转移,从而丧失了根治性手术机会<sup>[3]</sup>。于此同时,常规化疗方案疗效有限且易产生耐药性,治疗选择显著不足,这进一步加剧了该疾病的不良预后。因此,持续开发针对胰腺癌的有效治疗药物,对于改善患者生存结局至关重要。

近年来,从天然产物中寻找高效低毒的抗胰腺癌候选药物,已成为该领域的重要研究方向。二氢杨梅素是一种从藤茶等植物中提取的天然黄酮类化合物,近年来因其广泛的药理活性而备受关注。值得注意的是,多项研究证实,二氢杨梅素在多种消化道肿瘤模型中表现出显著的广谱抗癌活性,是一种潜在的消化道肿瘤化学预防与治疗剂。在肝癌研究中,邱志东等<sup>[4]</sup>发现二氢杨梅素通过调控 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子蛋白的表达,抑制肝癌细胞的黏附、迁移和侵袭;在结直肠癌研究上,Wang 等<sup>[5]</sup>的研究表明二氢杨梅素能通过阻断核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)/核因子红系 2 相关因子 2(Nrf2)信号通路逆转多药耐药相关蛋白(MRP2)介导的多药耐药;在胃癌研究中,王胜男等<sup>[6]</sup>进一步揭示,二氢杨梅素可通过抑制蛋白激酶 B(Akt)/信号转导与转录激活因子 3(STAT3)信号通路活化及降低高转移率族蛋白 B1(HMGB1)表达,从而减弱胃癌细胞的增殖与迁移能力。这些发现共同为二氢杨梅素抗消化道肿瘤的潜力提供了有力证据。因此,本研究旨在通过网络药理学分析和分子对接技术<sup>[7]</sup>,并结合体外细胞实验,探讨二氢杨梅素对胰腺癌细胞增殖、迁移侵袭、凋亡等生物学行为的影响及其潜在分子机制,以期开发新型胰腺癌治疗药物提供科学依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

人胰腺癌细胞 PANC-1 和 BxPC-3 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

### 1.2 主要试剂

二氢杨梅素(质量分数>98%,货号 HY-N0112)购自美国 Med Chem Express 公司;胎牛血清(货号 C04001-500)购自上海道鹏生物科技有限公司;DMEM 培养基(货号 PM150210)、RPMI-1640 培养基(货号 PM150110)、磷酸盐缓冲液(货号 PB180327)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶(货号 25200-056)购自美国 Gibco 公司;CCK-8 试剂盒(货号 BS350B)、青霉素-链霉素溶液(货号 BL505A)购自北京兰杰柯科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(货号 KGA1102-50)购自江苏凯基生物科技股份有限公司;Matrigel 基质胶(货号 356234)购自美国 Corning 公司;抗体甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,货号 60004-1-Ig)、Akt(货号 10176-2-AP)、p-Akt(货号 66444-1-Ig)、磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K,货号 60225-1-Ig)购自武汉三鹰生物技术有限公司;抗体 p-PI3K(货号 AF3242)购自江苏亲科生物研究中心有限公司;HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)(货号 AS014)、HRP Goat Anti-Mouse IgG(H+L)(AS003)购自爱博泰克生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

Infinite F50 酶标仪(瑞士帝肯公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国碧迪公司);CLM-170B-8-NF 二氧化碳培养箱(新加坡艺思高科技有限公司);DMIL LED 倒置荧光显微镜(德国徕卡公司);DYY-6D、DYCZ-MINI4、DYCZ-TRANS2 蛋白电泳装置(北京六一生物科技有限公司);ChemiScope 6200Touch 化学发光成像仪(上海勤翔科学仪器有限公司);Centrisart D-16C 台式高速冷冻离心机(德国赛多利斯公司);Jimbio iCytal S1 细胞计数仪(江苏卓微生物科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

**2.1.1 二氢杨梅素靶点的获取** 以“dihydromyricetin”为关键词,在 PubChem 数据库(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)中获得二氢杨梅素的分子结构及 Canonical SMILES,通过 Swiss TargetPrediction(<https://www.swisstargetprediction.ch/>)、CTD(<https://ctdbase.org/>)、STITCH(<http://stitch.embl.de/>)和 TC MSP(<https://www.tcmsp-e.com>)数据库进行靶点预测和收集,物种选“homo

sapiens”。利用 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将获得的二氢杨梅素靶点蛋白名称转化为标准基因名, 合并去重得到二氢杨梅素的潜在靶点, 通过 Cytoscape 3.10.0 软件进行可视化处理。

**2.1.2 胰腺癌靶点的获取** 以“pancreatic cancer”“Pancreatic carcinoma”为检索词, 在 OMIM (<http://www.omim.org/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、DisGeNET (<https://disgenet.com/>)、DrugBank (<https://go.drugbank.com/>) 数据库获取胰腺癌的相关靶点, 结合 UniPort 数据库确认并转换成统一基因名, 合并去重, 得到胰腺癌的疾病靶点。

**2.1.3 药物与疾病交集靶点的筛选** 利用 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 平台将药物潜在作用靶点和疾病靶点进行交集, 获得二氢杨梅素治疗胰腺癌的潜在作用靶点, 并绘制韦恩图。

**2.1.4 蛋白相互作用 (PPI) 网络构建及核心靶点基因筛选** 将交集靶点导入 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>), 物种限定为“homo sapiens”, 置信度选择“0.4”, 其余为系统默认值, 获得 PPI 网络。将所得数据导入 Cytoscape 3.10.0 进行可视化分析, 绘制 PPI 网络图, 使用 CytoHubba 插件, 通过 MCC 算法筛选出关联作用排前 10 名的核心靶点。

**2.1.5 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析** 将交集靶点使用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/content.jsp?file=citation.htm>) 分别进行 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析, GO 富集分析以  $P$  值为筛选条件, 选取结果中  $P < 0.05$  的前 10 个生物学条目绘制条形图。KEGG 富集分析选取前 30 条信号通路绘制气泡图进行可视化分析。

## 2.2 分子对接

从 PubChem 数据库下载 DHM 的 3D 分子结构, 通过 OpenBabel 3.1.1 软件转换为 pdb 格式, 作为配体文件。从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载核心靶蛋白结构的 pdb 格式文件, 使用 Pymol 软件将靶蛋白上的水分子、原始配体等去除, 作为受体文件。随后将配体和受体文件导入 AutoDock Tools 1.5.6 软件进行加氢、分配电荷等处理, 保存为 pdbqt 格式。再利用 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 并使用 Pymol 软件对结果进行可视化分析。结合自由能值低于 0 说明配体能够与受体结合, 且自由能越低, 配体-受体结合越稳定。

## 2.3 体外实验

**2.3.1 细胞培养和药物配制** PANC-1、BxPC-3 细胞分别以含 10%胎牛血清、1%青链霉素的 DMEM 培养基和 RPMI-1640 培养基进行培养, 并置于 37 °C、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中, 隔天换液, 待细胞生长融合至 80%~90%时进行传代处理。将 DHM 溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 制成 200 mg/mL 储备液, 根据实验设置将二氢杨梅素用培养基稀释成对应的实验浓度。

**2.3.2 CCK-8 法检测细胞活力** 取处于对数生长期的细胞, 胰酶消化后收集细胞, 计数, 以每孔 200  $\mu$ L 含  $5 \times 10^3$  个细胞接种于 96 孔板中, 待细胞培养过夜至贴壁后, 弃去旧培养液, 每孔加入 200  $\mu$ L 不同质量浓度 [0 (对照)、25、50、100、150、200  $\mu$ g/mL] 二氢杨梅素的新鲜完全培养液, 共培养 24、48、72 h。干预结束后, 弃去旧培养液, 每孔加入 100  $\mu$ L 含 10% CCK-8 试剂的培养液, 继续在培养箱中避光孵育 2 h, 另设不加细胞的空白组。随后在酶标仪上于 450 nm 波长处测定吸光度 ( $A$ ) 值。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

**2.3.3 克隆形成实验检测细胞增殖能力** 取对数生长期细胞, 按每孔 1 000 个细胞数接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后加入不同质量浓度 [0 (对照)、25、50、100  $\mu$ g/mL] 二氢杨梅素, 干预 48 h 后撤去药物, 更换为新鲜完全培养液, 隔天换液, 继续培养 14 d。2 周后, 弃去培养液, 用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 清洗 3 次, 然后用 0.1%结晶紫溶液染色 15 min, 蒸馏水洗至澄清, 拍照, 并利用 Image J 软件统计每组细胞克隆形成数目。

**2.3.4 划痕实验检测细胞横向迁移能力** 在划痕实验中, 因 BxPC-3 细胞无法耐受无血清的培养条件, 故只考察了 PANC-1 细胞的横向迁移能力。将 PANC-1 细胞按每孔  $5 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁且细胞单层覆盖率达 90%以上时, 用 10  $\mu$ g/mL 丝裂霉素 C 处理 2 h 后用 10  $\mu$ L 无菌吸头垂直于 6 孔板均匀划出直线划痕, 用 PBS 漂洗 3 次以除去漂浮的细胞, 加入含 DHM 的无血清培养基, 分别在 0、24 h 观察各组细胞迁移情况, 并拍照记录, 使用 Image J 软件对图像进行统计分析。

**2.3.5 Transwell 实验检测细胞纵向迁移及侵袭能力** 接种 PANC-1、BxPC-3 细胞于 6 孔板中, 用含药培养基预先处理 48 h 后收集各组细胞。加入无血清培养基, 离心、重悬细胞, 计数并调整成相同细

胞浓度。迁移实验中,直接在 Transwell 上室中加入 200  $\mu\text{L}$  细胞悬液(含  $4 \times 10^4$  个细胞),下室加入 600  $\mu\text{L}$  含 10%胎牛血清的培养基;侵袭实验中,预先在小室上层铺 50  $\mu\text{L}$  基质胶(按 1:8 比例用无血清培养基稀释后使用),水化 1 h 后再加入细胞,后续操作与上述 Transwell 迁移处理步骤相同。于培养箱中继续培养 24 h 后,取小室用 4%多聚甲醛固定 30 min,加入 0.1%结晶紫溶液染色 30 min, PBS 润洗至清,用棉签擦拭小室上层未迁移细胞,风干,使用显微镜对小室底部迁移或侵袭细胞进行拍照记录,并用 Image J 软件统计各组迁移或侵袭过膜的细胞数目。

**2.3.6 Annexin V-FITC/PI 法检测细胞凋亡** 将对数生长期的细胞按每孔  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中,过夜培养贴壁后加入含药培养基处理 48 h。按细胞凋亡检测试剂盒说明书进行如下操作:收集细胞培养上清和 PBS 清洗液,用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞于离心管中,加入 PBS 洗涤细胞 2 次,1 000 r/min 离心 5 min;每管加入 500  $\mu\text{L}$  Binding Buffer 轻轻吹匀成单细胞悬液;实验管加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  PI,轻轻混匀,并设阴性管(不加染料)和单染管(只加 Annexin V-FITC 或 PI)用于调节参数;室温、避光条件下反应 5~10 min,1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测;通过 FlowJo 软件对细胞的凋亡情况进行分析。

**2.3.7 Western blotting 检测相关蛋白表达** 将对数生长期的细胞按每孔  $2 \times 10^5$  个接种于 6 孔板中,过夜培养贴壁后加入含药培养基处理 48 h。弃去细胞培养液,加入 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 PBS 清洗 2 次。把 6 孔板置于冰上,加入 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液于冰上裂解 10 min,然后用细胞刮将细胞刮于一侧,用枪将细胞碎片与裂解液一同转移至 1.5 mL EP 管中,震荡后等待裂解 20 min,于 4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 10 min,取上清即得蛋白样品。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书操作进行蛋白定量,得到标准曲线,计算蛋白样品浓度。将上样蛋白样品混匀并离心后,置于 100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴加热变性 10 min,经 SDS-PAGE 电泳,转膜、脱脂牛奶室温封闭,一抗 Akt(1:2 000)、p-Akt(1:2 000)、PI3K(1:5 000)、p-PI3K(1:2 000) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 室温洗涤 3 次,每次 10 min;回收一抗,加入二抗室温孵育 50 min 后, TBST 室温洗涤 3 次,每次 10 min;使用 ECL 发光液对膜进行显色反应,利用化学发光成像仪对

膜进行曝光,摄取蛋白条带显影图像。使用 Image J 软件对条带的灰度值进行测量。

## 2.4 统计学分析

本研究收集的数据运用 GraphPad Prism 8.3.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用  $t$  检验。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学分析结果

**3.1.1 二氢杨梅素抗胰腺癌潜在靶点** 从 SwissTargetPrediction、CTD、STITCH、TCMSP 数据库中获取了 105 个二氢杨梅素的潜在靶点。通过 OMIM、GeneCards、DisGeNET、DrugBank 数据库筛选得到了 5 644 个胰腺癌的相关靶点,将药物与疾病靶点取交集,获得 89 个共同靶点,即为二氢杨梅素抗胰腺癌的潜在靶点,见图 1。

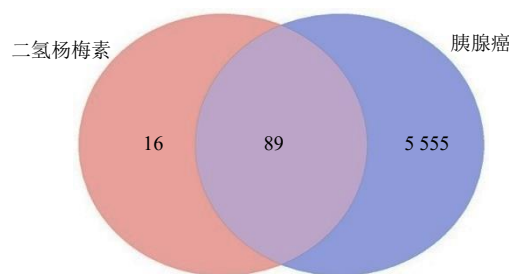


图 1 二氢杨梅素与胰腺癌的交集靶点韦恩图

Fig. 1 Venn diagram of the intersecting targets between dihydromyricetin and pancreatic cancer

**3.1.2 PPI 网络分析及核心靶点获取** 将获得的 89 个共有靶点导入 STRING 数据库构建 PPI 网络,再通过 Cytoscape 软件进行可视化,绘制 PPI 网络图,见图 2A。该网络中包含 89 个节点,1 067 条边。EGFR、Akt1、白细胞介素(IL)-6、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、胱天蛋白酶 3(CASP3)等靶点的 degree 值较高,在 PPI 网络中具有重要的联系作用。通过 CytoHubba 插件,采用 MCC 算法进一步得到在网络中关联度排在前 10 位的核心靶点,分别为 Akt1、低氧诱导因子-1A(HIF-1A)、Bcl-2、CASP3、IL-6、非受体酪氨酸激酶(SRC)、前列腺素内过氧化物合酶 2(PTGS2)、MMP9、EGFR、IL-1B,以上结果提示这些核心靶点可能在二氢杨梅素治疗胰腺癌中至关重要,见图 2B。

**3.1.3 GO 和 KEGG 富集分析** 利用 DAVID 数据库对 89 个交集靶点进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。根据  $P < 0.05$  共筛选得到 622 条 GO



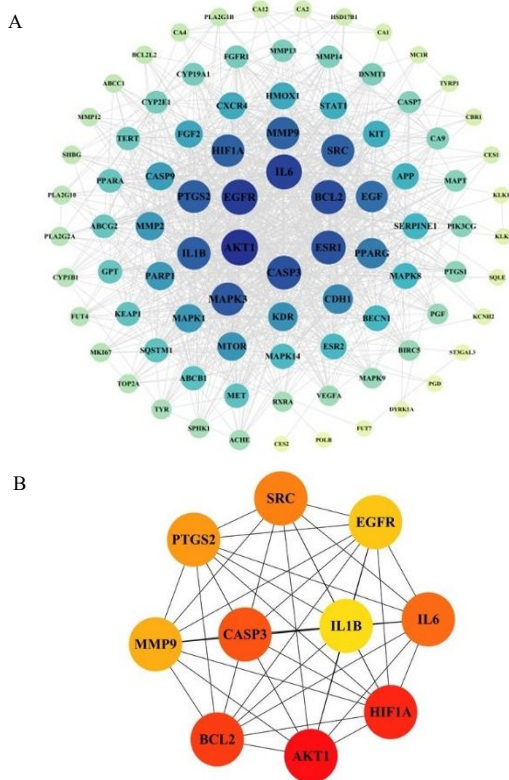


图 2 交集靶点 PPI 网络图 (A) 及核心靶点 (B)  
Fig. 2 PPI network of the overlapping targets (A) and the core targets (B)

富集条目, 其中属于生物学过程 (BP) 450 条, 主要包括 RNA 聚合酶介导的转录正调控、凋亡过程、凋亡过程的正调控等; 属于细胞组成成分 (CC) 53 条, 主要包括细胞质、细胞核、细胞外区域等; 属于分子功能 (MF) 119 条, 主要包括同源蛋白结合、酶结合、锌离子结合等。按照  $P$  值分别选取 GO 功能中 BP、CC 和 MF 的前 10 条通路进行展示, 见图 3。对靶点进行 KEGG 通路富集分析, 共富集得到 144 条信号通路, 涉及了癌症通路、胰腺癌通路、PI3K/Akt 信号通路等。按照  $P$  值对富集通路进行排序, 对前 30 条通路绘制气泡图进行可视化分析, 见图 4。

### 3.2 分子对接结果

筛选出的前 10 个核心靶点与二氢杨梅素通过 AutoDock Vina 软件进行分子对接。结果显示二氢杨梅素与 10 个核心靶蛋白的结合能均小于 6.0 kcal/mol ( $1\text{ cal}=4.2\text{ J}$ ), 表示二氢杨梅素可与 10 个核心靶点能自发地稳定结合, 尤其与 Akt1 和 PTGS2 结合最好, 分子对接模式见表 1、图 5。

### 3.3 体外实验验证结果

**3.3.1 二氢杨梅素对胰腺癌细胞增殖的影响** 如图 6A 所示, 与对照组相比, 二氢杨梅素分别处理 24、48、72 h 后, 胰腺癌细胞的存活率呈时间、剂量相关性的显著下降 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。二氢杨梅素作用于 PANC-1 细胞 24、48、72 h 的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为 96.21、58.45、48.91  $\mu\text{g/mL}$ ; 二氢杨梅素作用于 BxPC-1 细胞 24、48、72 h 的半数抑制浓度  $IC_{50}$  分别为 118、91.91、81.91  $\mu\text{g/mL}$ 。如图 6B 所示, 克隆形成实验结果显示, 与对照组相比, PANC-1 和 BxPC-3 细胞经二氢杨梅素 50、100  $\mu\text{g/mL}$  48 h 处理后, 克隆数目显著降低 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ )。

**3.3.2 二氢杨梅素对胰腺癌细胞迁移和侵袭影响** 在细胞划痕实验中, BxPC-3 细胞无法耐受无血清的培养条件, 故只进行了 Transwell 实验考察。细胞划痕和 Transwell 实验结果显示, 与对照组相比, PANC-1 细胞经 25、50、100  $\mu\text{g/mL}$  二氢杨梅素作用后, 细胞的划痕愈合率、迁移、侵袭过膜的细胞数目均显著降低 ( $P<0.001$ ), BxPC-3 细胞经 25、50、100  $\mu\text{g/mL}$  二氢杨梅素处理后, 迁移、侵袭过膜的细胞数目亦显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 表明了二氢杨梅素对 2 株胰腺癌细胞迁移和侵袭的抑制作用, 见图 7、8。

**3.3.3 二氢杨梅素促进胰腺癌细胞的凋亡** 与对照组比较, 二氢杨梅素 100、200  $\mu\text{g/mL}$  组的细胞凋亡率显著增加 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ), 见图 9。表明二氢杨梅素对细胞凋亡过程的潜在影响, 并且随着二氢杨梅素质量浓度的增加, 细胞凋亡率的变化趋势也更为明显。

**3.3.4 二氢杨梅素对胰腺癌细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响** 结合核心靶点、分子对接和 KEGG 通路富集结果, 预测二氢杨梅素可能通过 PI3K/Akt 信号通路参与胰腺癌的治疗。通过 Western blotting 检测二氢杨梅素作用胰腺癌细胞后 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达情况, 发现二氢杨梅素 100、200  $\mu\text{g/mL}$  组细胞 p-PI3K 与 p-Akt 的表达水平均明显下降 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ), 见图 10。结果表明二氢杨梅素抗胰腺癌的作用机制与下调 PI3K/Akt 信号通路密切相关。

### 4 讨论

胰腺癌是一种高致死率的恶性肿瘤, 其复杂的分子机制使得单一靶向治疗疗效具有局限性<sup>[8]</sup>。在

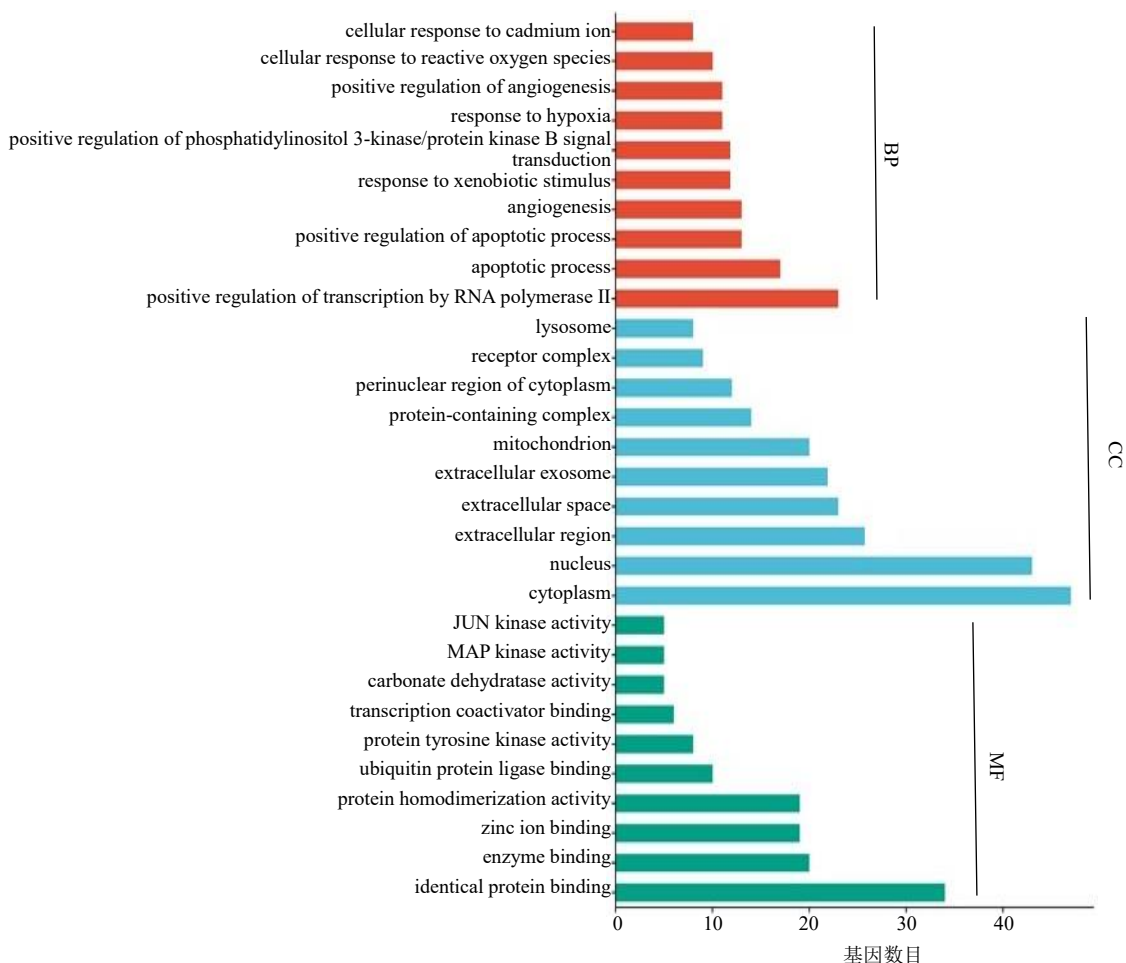


图 3 交集靶点 GO 富集分析

Fig. 3 GO enrichment analysis of the overlapping targets

此背景下，具有多靶点特性的植物活性成分展现出巨大的治疗潜力<sup>[9-10]</sup>。与之类似，二氢杨梅素作为传统药用植物显齿蛇葡萄（藤茶）的主要活性成分，因其含量丰富、安全性高及药理活性广泛而备受关注<sup>[11-13]</sup>。因此，本研究旨在系统探讨二氢杨梅素抗胰腺癌的作用及其可能的分子机制。

通过网络药理学分析，发现二氢杨梅素可能作用于 Akt1、HIF-1A、Bcl-2、CASP3 等核心靶点；分子对接结果进一步表明二氢杨梅素能够与这些核心靶点稳定结合，提示二氢杨梅素可能通过同时作用于多个环节而协同发挥抗胰腺癌作用。靶点的网络拓扑分析和通路富集显示，Akt1 位于 PI3K/Akt 等多条核心通路交汇处的关键节点，网络中心性最高，且能够与二氢杨梅素紧密结合。这表明 Akt1 在二氢杨梅素抗胰腺癌的预测作用网络中处于最核心的调控地位。Akt1 是 PI3K/Akt 信号通路的核心下游效应分子，其活化直接依赖于 PI3K 的激活，

并在多种生物学过程中发挥关键作用。PI3K/Akt 信号通路是调控细胞存活、增殖与代谢的核心通路，其在胰腺癌中的异常激活是驱动肿瘤恶性进展的关键因素<sup>[14-15]</sup>。值得注意的是，超过 90% 的胰腺导管腺癌患者存在 KRAS 突变，该突变会激活 PI3K/Akt 信号通路，进而驱动肿瘤增殖、耐药与转移<sup>[16-17]</sup>。尽管网络药理学预测未提示二氢杨梅素直接靶向 KRAS，但其能与 KRAS 信号网络中的下游效应因子 Akt1、上游激活因子 EGFR 及调控蛋白 SRC 相互作用，表明二氢杨梅素可能通过多层次干扰 KRAS 驱动的致癌信号网络，最终实现对 PI3K/Akt 信号通路的有效抑制<sup>[18-20]</sup>。此外，多项研究显示，在宫颈癌、卵巢癌、胶质瘤等肿瘤模型以及代谢性与炎症性疾病中，二氢杨梅素均可通过调控 PI3K/Akt 通路抑制增殖、诱导自噬、调节免疫或改善纤维化<sup>[21-25]</sup>，进一步提示该通路是二氢杨梅素发挥药理作用的关键枢纽。基于以上预测，本研究通

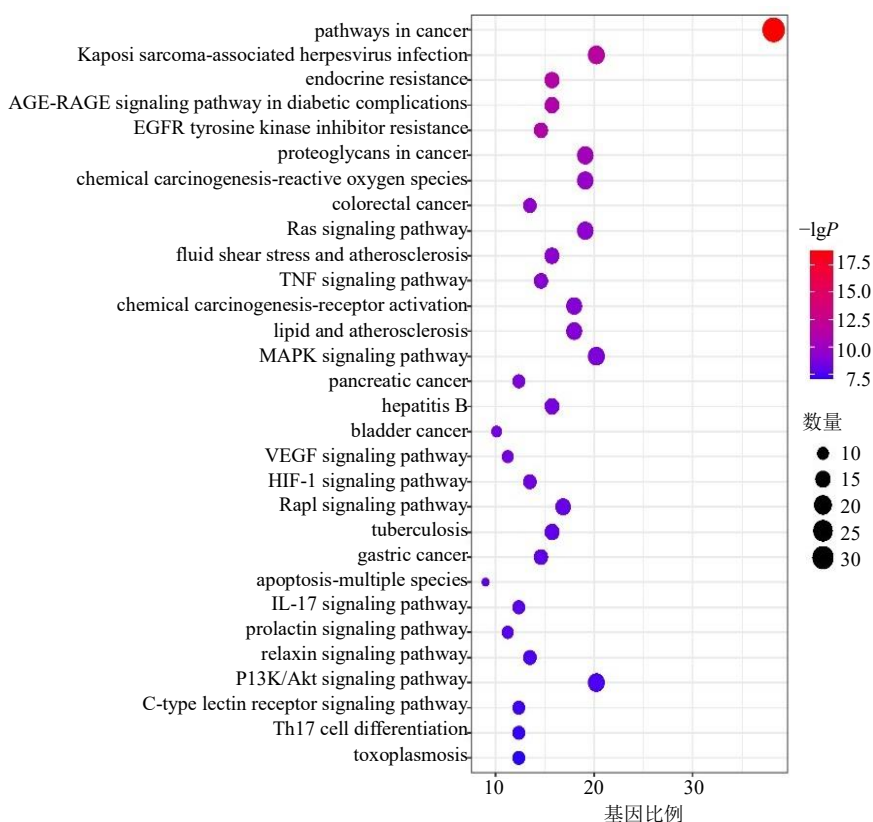


图 4 交集靶点 KEGG 富集分析

Fig. 4 KEGG enrichment analysis of the overlapping targets

表 1 二氢杨梅素与前 10 位核心靶点的分子对接结果

Table 1 Molecular docking results of dihydromyricetin with the top 10 core targets

核心靶点蛋白	对接结合能/(kcal·mol <sup>-1</sup> )
Akt1	-8.24
HIF-1A	-6.73
Bcl-2	-6.82
CASP3	-6.10
IL-6	-6.63
SRC	-6.13
PTGS2	-8.49
MMP9	-6.40
EGFR	-6.71
IL-1B	-6.22

过体外实验,验证了二氢杨梅素可抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭,并诱导细胞凋亡。Western blotting 结果显示,二氢杨梅素能显著下调胰腺癌细胞 p-PI3K 和 p-Akt 的蛋白水平,而不影响其总蛋白表达,说明二氢杨梅素是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的磷酸化活化过程来发挥其抗胰腺癌作用。本研究中发现二氢杨梅素除作用于 Akt1 靶点外,分子对接结果还提示其与 PTGS2 具有高度结合亲和力。PTGS2 在胰腺癌中常高表达,参与肿瘤发展、免疫逃避和血管生成,是潜在的治疗靶点<sup>[26-28]</sup>。已有研究表明,二氢杨梅素可通过抑制 NF-κB 通路及直接

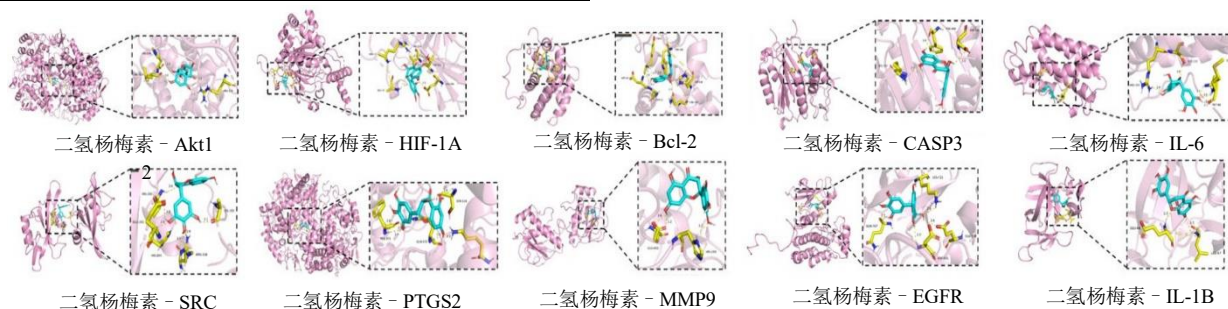
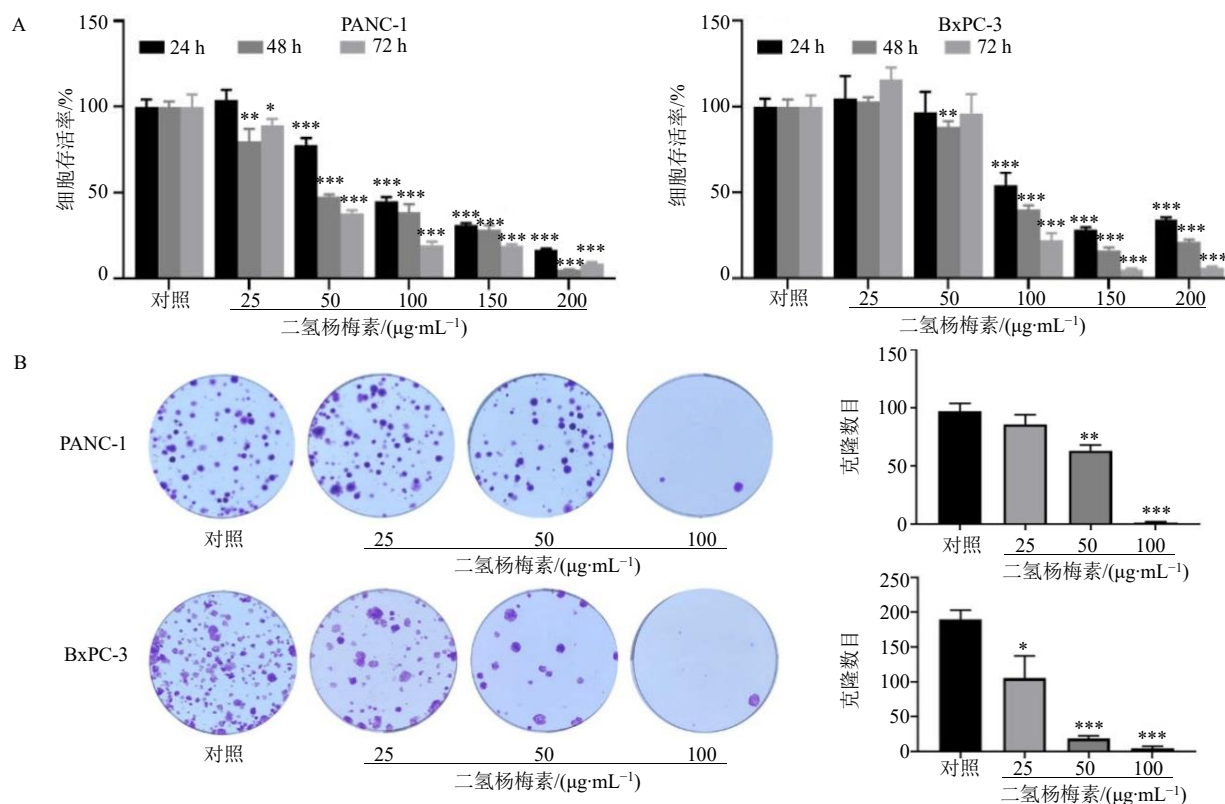


图 5 二氢杨梅素与核心靶点的可视化分子对接模式图

Fig. 5 Binding mode diagrams of molecular docking between dihydromyricetin and the core targets



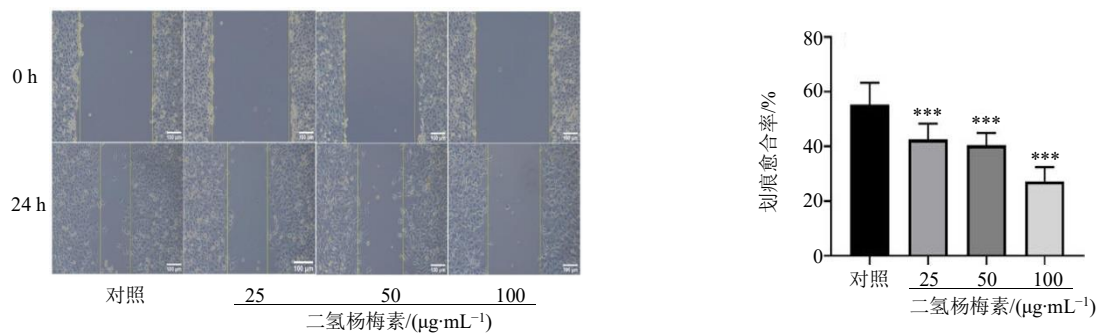


A-CCK-8 细胞活力检测实验, B-克隆形成实验 (结晶紫染色); 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-CCK-8 cell viability detection experiment, B-clone formation assay (crystal violet staining); \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 6 二氢杨梅素对胰腺癌细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 6 Effect of proliferation of dihydromyricetin on the pancreatic cancer cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.001$ 。

\*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

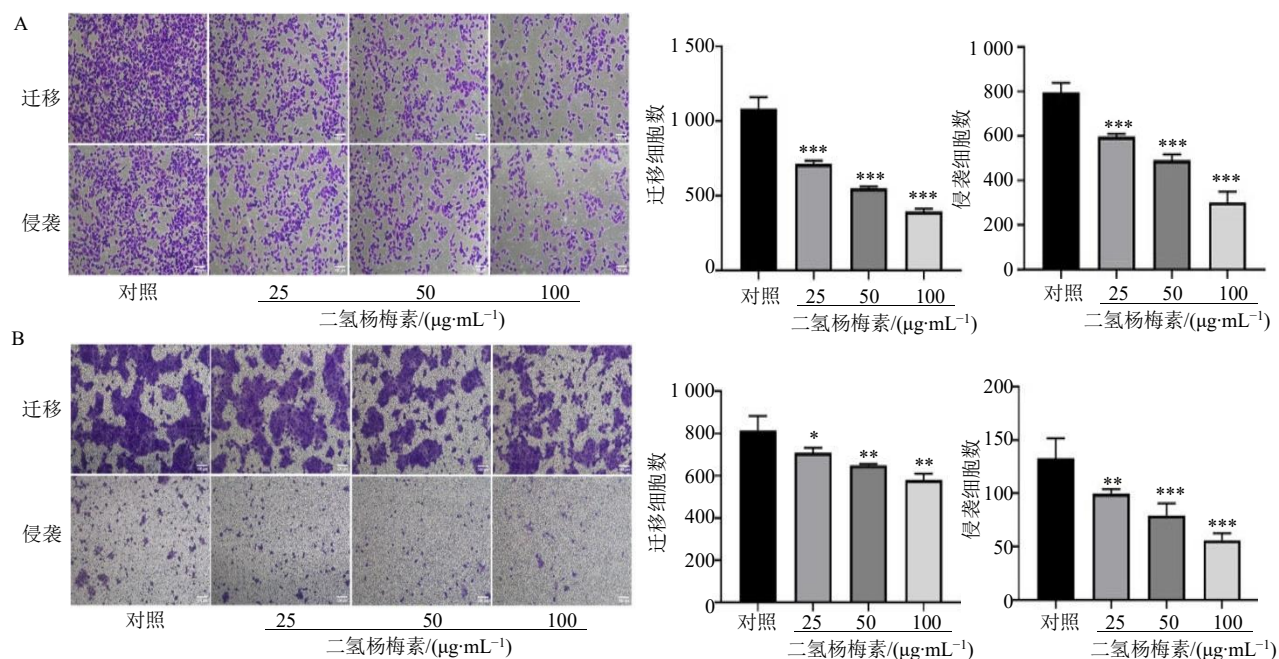
图 7 PANC-1 细胞划痕实验 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 7 PANC-1 cell scratch experiment ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

调控转录翻译过程,降低 PTGS2 的表达和活性,从而减少炎症介质生成,该作用在免疫细胞及部分癌细胞中得到验证<sup>[29-31]</sup>。因此,PTGS2 在二氢杨梅素抗胰腺癌中的具体作用机制值得进一步探讨,这也将是本课题组后续研究的重点。此外,在体外实验中,本研究还发现二氢杨梅素对不同胰腺癌细胞系

的抑制效果存在差异,其中对 PANC-1 细胞的增殖抑制和促凋亡作用最为显著。这可能与胰腺癌细胞的异质性有关: PANC-1 细胞为 KRAS 突变型,而 BxPC-3 细胞为 KRAS 野生型,二者在生物学行为及治疗反应上具有显著区别<sup>[32]</sup>。上述结果提示,二氢杨梅素可能特异性作用于 KRAS 突变型胰腺癌细

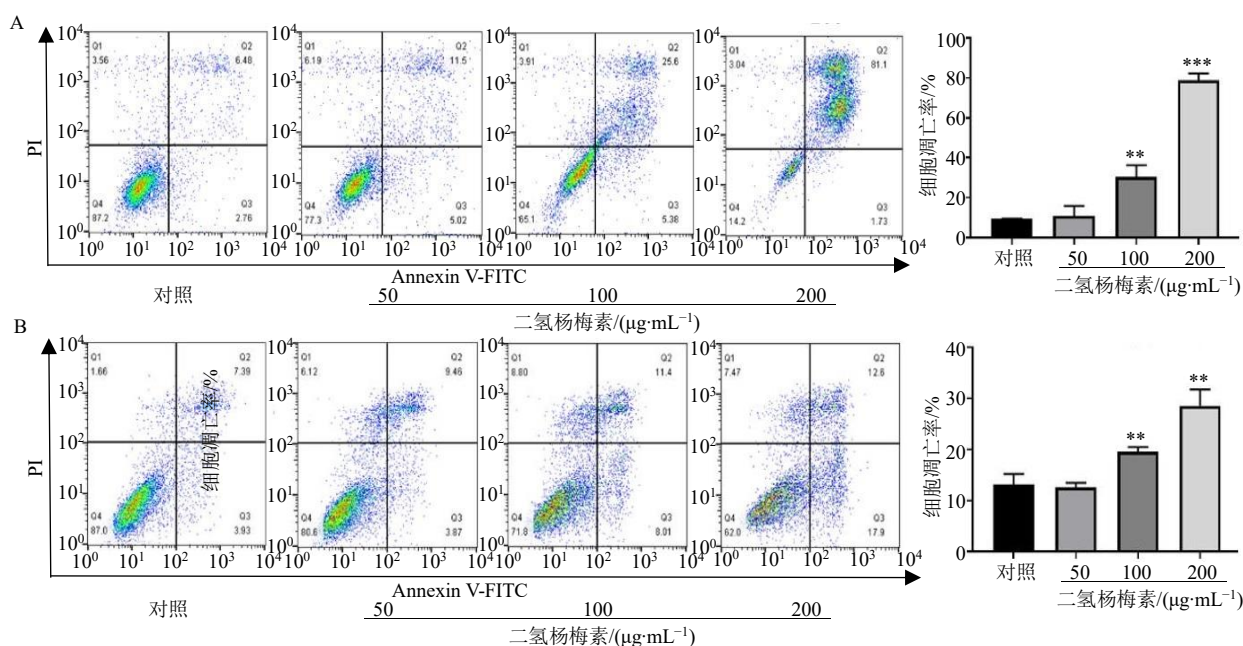




A-PANC-1 细胞 Transwell 小室迁移/侵袭实验, B-BxPC-3 细胞 Transwell 小室迁移/侵袭实验; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-PANC-1 cell Transwell chamber migration/invasion assay, B-BxPC-3 cell Transwell chamber migration/invasion assay; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

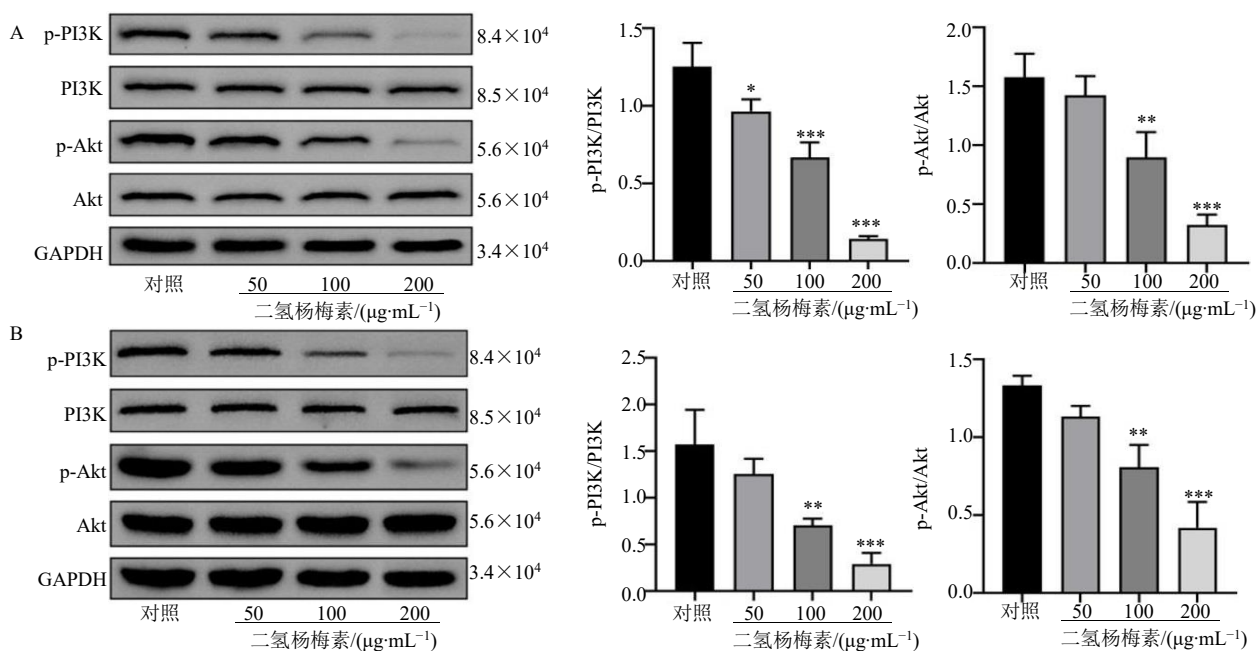
图 8 Transwell 小室迁移/侵袭实验 ( $\times 100$ , 标尺:  $100\ \mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Fig. 8 Transwell chamber migration/invasion assay ( $\times 100$ , scale:  $100\ \mu\text{m}$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



A-PANC-1 细胞, B-BxPC-3 细胞; 与对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-PANC-1 cell, B-BxPC-3 cell; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 9 二氢杨梅素对胰腺癌细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )  
Fig. 9 Effect of dihydromyricetin on apoptosis of pancreatic cancer cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )



A-PANC-1 细胞, B-BxPC-3 细胞; 与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

A-PANC-1 cell, B-BxPC-3 cell; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图 10 二氢杨梅素对胰腺癌细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Effect of dihydromyricetin on the expression of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins in pancreatic cancer cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

胞的某种分子依赖环节, 其针对该类亚型胰腺癌的治疗潜力值得进一步探索。

综上所述, 本研究采用网络药理学预测、实验验证的策略, 揭示了二氢杨梅素通过抑制 PI3K/Akt 信号通路在体外有效抑制胰腺癌细胞的恶性表型。该发现不仅阐明了二氢杨梅素抗胰腺癌的核心机制, 凸显了其作为多靶点天然抗肿瘤候选药物的开发潜力, 也为藤茶资源的进一步开发利用提供了重要的实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Luo W H, Wang J, Chen H, *et al.* Epidemiology of pancreatic cancer: New version, new vision [J]. *Chin J Cancer Res*, 2023, 35(5): 438-450.
- [2] Siegel R L, Giaquinto A N, Jemal A. Cancer statistics, 2024 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2024, 74(1): 12-49.
- [3] Stoop T F, Javed A A, Oba A, *et al.* Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2025, 405(10485): 1182-1202.
- [4] 邱志东, 罗芳兰, 舒洋, 等. 二氢杨梅素对肝癌细胞黏附、侵袭及迁移的抑制作用及机制 [J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9): 1263-1268.
- [5] Wang Z Y, Sun X T, Feng Y Y, *et al.* Dihydromyricetin

reverses MRP2-induced multidrug resistance by preventing NF- $\kappa$ B-Nrf2 signaling in colorectal cancer cell [J]. *Phytomedicine*, 2021, 82: 153414.

- [6] 王胜男, 葛菲, 蔡田雨, 等. 二氢杨梅素通过抑制 Akt/stat3 信号途径的活化和 HMGB1 的表达降低胃癌细胞的增殖和迁移能力 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(1): 87-92.
- [7] 宋辉, 黄晓俏, 孙向明, 等. 基于网络药理学、分子对接和动物实验探讨菟丝子醇提物抗乳腺癌作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(14): 4747-4758.
- [8] Li S, Xu H X, Wu C T, *et al.* Angiogenesis in pancreatic cancer: Current research status and clinical implications [J]. *Angiogenesis*, 2019, 22(1): 15-36.
- [9] Triantafyllidis J K, Triantafyllidi E, Sideris M, *et al.* Herbs and plants in the treatment of pancreatic cancer: A systematic review of experimental and clinical studies [J]. *Nutrients*, 2022, 14(3): 619.
- [10] Arnab MKH, Islam M R, Rahman M S. A comprehensive review on phytochemicals in the treatment and prevention of pancreatic cancer: Focusing on their mechanism of action [J]. *Health Sci Rep*, 2024, 7(5): e2085.
- [11] He C Y, Chen Y F, Xie J, *et al.* Dihydromyricetin: An emerging compound with comprehensive effects on multiple systems [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 15:

- 1488003.
- [12] Xia T, Zhu R Z. Multiple molecular and cellular mechanisms of the antitumour effect of dihydromyricetin (Review) [J]. *Biomed Rep*, 2024, 20(5): 82.
- [13] Liu D, Mao Y Q, Ding L J, *et al*. Dihydromyricetin: A review on identification and quantification methods, biological activities, chemical stability, metabolism and approaches to enhance its bioavailability [J]. *Trends Food Sci Technol*, 2019, 91: 586-597.
- [14] Engelman J A. Targeting PI3K signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 550-562.
- [15] Fruman D A, Rommel C. PI3K and cancer: Lessons, challenges and opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(2): 140-156.
- [16] Mehra S, Deshpande N, Nagathihalli N. Targeting PI3K pathway in pancreatic ductal adenocarcinoma: Rationale and progress [J]. *Cancers*, 2021, 13(17): 4434.
- [17] Chen C K, Jiang Y P, You I, *et al*. Down-regulation of AKT proteins slows the growth of mutant-KRAS pancreatic tumors [J]. *Cells*, 2024, 13(12): 1061.
- [18] Cheng D K, Oni T E, Thalappillil J S, *et al*. Oncogenic KRAS engages an RSK1/NF1 pathway to inhibit wild-type RAS signaling in pancreatic cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(21): e2016904118.
- [19] Han S, Tushoski-Alemán GW, Zhang P Y, *et al*. A novel regimen for pancreatic ductal adenocarcinoma targeting MEK, BCL-xL, and EGFR [J]. *Neoplasia*, 2025, 59: 101070.
- [20] Poh A R, Ernst M. Functional roles of SRC signaling in pancreatic cancer: Recent insights provide novel therapeutic opportunities [J]. *Oncogene*, 2023, 42(22): 1786-1801.
- [21] 邹雪, 熊晓妹, 杨晓利, 等. 蛇葡萄素通过 PI3K/AKT/mTOR 通路诱导人宫颈癌细胞 SiHa 自噬 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(11): 2121-2128.
- [22] 谭武鹏, 谭雄, 伍菊花. 二氢杨梅素通过 PI3K/Akt 信号通路调节巨噬细胞极化抑制卵巢癌细胞的侵袭 [J]. 中南医学科学杂志, 2021, 49(6): 636-639.
- [23] 陈建军, 常成, 宋晓圆, 等. 二氢杨梅素对胶质瘤细胞株 U87 增值凋亡及 PI3K/Akt 通路的影响 [J]. 中国药师, 2019, 22(11): 1992-1997.
- [24] Li J, Li L J, Lin T H, *et al*. Dihydromyricetin preserves  $\beta$ -cell function in type 1 diabetes via PI3K/AKT-mediated metabolic reprogramming [J]. *Front Nutr*, 2025, 12: 1682308.
- [25] Wang X C, Li X L, Ma X N, *et al*. Dihydromyricetin alleviates inflammatory bowel disease associated intestinal fibrosis by inducing autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(6): 4183-4194.
- [26] Kokawa A, Kondo H, Gotoda T, *et al*. Increased expression of cyclooxygenase-2 in human pancreatic neoplasms and potential for chemoprevention by cyclooxygenase inhibitors [J]. *Cancer*, 2001, 91(2): 333-338.
- [27] Conejo-Garcia J R. Breaking barriers for T cells by targeting the EPHA2/TGF- $\beta$ /COX-2 axis in pancreatic cancer [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3521-3523.
- [28] Markosyan N, Li J Y, Sun Y H, *et al*. Tumor cell-intrinsic EPHA2 suppresses anti-tumor immunity by regulating PTGS2 (COX-2) [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(9): 3594-3609.
- [29] Hou X L, Tong Q, Wang W Q, *et al*. Suppression of inflammatory responses by dihydromyricetin, a flavonoid from *Ampelopsis grossedentata*, via inhibiting the activation of NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways [J]. *J Nat Prod*, 2015, 78(7): 1689-1696.
- [30] Liang J, Wu J, Wang F, *et al*. Semaphoring 4D is required for the induction of antioxidant stress and anti-inflammatory effects of dihydromyricetin in colon cancer [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 67: 220-230.
- [31] Chu J G, Wang X J, Bi H J, *et al*. Dihydromyricetin relieves rheumatoid arthritis symptoms and suppresses expression of pro-inflammatory cytokines via the activation of Nrf2 pathway in rheumatoid arthritis model [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 59: 174-180.
- [32] Zhu Y R, Zhou S, Yang F Q, *et al*. Erianin inhibits the proliferation and stemness of pancreatic cancer cells by interacting with MEK1/2 [J]. *Biochem Pharmacol*, 2025, 239: 117046.