

## 【实验研究】

## 基于网络药理学预测三七治疗幽门螺杆菌相关疾病机制及实验验证

耿乐<sup>1,2</sup>, 刘璇<sup>1,2</sup>, 冯小可<sup>1,2</sup>, 蒲美旨<sup>1,2</sup>, 魏睦新<sup>1,2\*</sup>

1. 南京医科大学第一附属医院 中医科, 江苏 南京 210029

2. 南京医科大学 中西医结合研究所, 江苏 南京 210029

**摘要:** 目的 基于网络药理学预测三七治疗幽门螺杆菌(Hp)相关疾病机制, 研究三七中有效活性成分人参皂苷Rb<sub>3</sub>对Hp造成的胃上皮细胞损伤的保护作用及机制。方法 使用Herb数据库收集“三七”的相关预测靶点, 使用Gene Cards数据库收集Hp相关疾病的靶点; 使用Draw Venn Diagram网站绘制Venn图, 得到靶点交集; 进行蛋白互作(PPI)网络分析、基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。将GES-1细胞分为对照组、模型组及人参皂苷Rb<sub>3</sub>低、中和高浓度(1、5、10 μmol·L<sup>-1</sup>)组, 人参皂苷Rb<sub>3</sub>组使用相应浓度的人参皂苷Rb<sub>3</sub>预处理, 培养过夜12 h至融合度为70%~80%。Hp悉尼株1(SS1)按感染复数(MOI)100加入细胞中制备损伤模型, 人参皂苷Rb<sub>3</sub>继续给药, 共培养48 h。对照组不加SS1, 对照组和模型组不加药。改良吉姆萨染色后通过光学显微镜观察细胞形态; 结合Hoechst 33342荧光染色和Annexin V/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡; 试剂盒法检测活性氧(ROS)水平; 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测凋亡相关基因TP53、Bax、Bcl-2表达量; Western blotting法检测P53、p-Akt、cleaved/pro-Caspase 9、Bcl-2、Bax、cleaved/pro-Caspase 3的蛋白表达情况。结果 网络药理学结果表明三七治疗Hp相关疾病的靶点共16个, 其PPI网络分析得到按度值大小排名前6位靶点为TP53、CASP3、PTGS2、IL6、TNF、IL1β。GO富集分析与KEGG富集分析结果均显示与凋亡相关。与模型组比较, 经人参皂苷Rb<sub>3</sub>处理后, GES-1细胞的细胞核染色质致密深染, 破裂的细胞逐渐减少; Hoechst 33342荧光染色细胞核强荧光数目明显减少; 细胞凋亡率显著降低(P<0.05); ROS水平显著降低(P<0.05); TP53与Bax的mRNA水平显著降低, Bcl-2 mRNA水平显著升高(P<0.05); p-Akt、Bcl-2蛋白表达显著升高(P<0.05), P53、Bax、cleaved/pro-Caspase 9与cleaved/pro-Caspase 3蛋白表达显著降低(P<0.05)。结论 三七可能通过包括炎症及凋亡在内的多种途径治疗Hp相关疾病, 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对Hp诱导的胃上皮细胞凋亡发挥显著改善作用, 其可能机制是降低氧化应激水平, 并调节Akt的磷酸化和P53的表达。

关键词: 三七; 人参皂苷Rb<sub>3</sub>; 幽门螺杆菌; 胃上皮细胞; 网络药理学; 凋亡; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)05-0833-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.004

Prediction of mechanism of *Panax notoginseng* in treating *Helicobacter pylori* related diseases by network pharmacology and experimental verificationGENG Le<sup>1,2</sup>, LIU Xuan<sup>1,2</sup>, FENG Xiaoke<sup>1,2</sup>, PU Meizhi<sup>1,2</sup>, WEI Muxin<sup>1,2</sup>

1. Department of Traditional Chinese Medicine, First Affiliated Hospital with Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

2. Institute of Integrative Medicine, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

**Abstract: Objective** To explore the protective effect and mechanism of ginsenoside Rb<sub>3</sub> (G-Rb<sub>3</sub>) on gastric epithelial cell injury caused by *Helicobacter pylori* (Hp). **Methods** Herb database was used to collect predicted targets of "*Panax notoginseng*", Gene Cards database was used to collect targets of Hp-related diseases. The Venn Diagram was drawn using the Draw Venn Diagram website to obtain the intersection of target points. Protein interaction (PPI) network analysis, gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis were performed. GES-1 cells were divided into control group, model group, and G-Rb<sub>3</sub> low, medium and high concentration groups (1, 5, 10 μmol·L<sup>-1</sup>). G-Rb<sub>3</sub> group was pretreated with the

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 江苏省中医药局科技项目(YB2015166)

第一作者: 耿乐, 医学硕士, 住院医师, 研究方向为脾胃常见疾病的诊治研究。

\*通信作者: 魏睦新, 男, 主任中医师, 教授, 研究方向为脾胃常见疾病的诊治研究。E-mail: weimuxin@njmu.edu.cn

corresponding concentration of G-Rb<sub>3</sub>, and cultured overnight for 12 h until the degree of fusion was 70% — 80%. Hp Sydney strain 1 (SS1) was added into the cells according to the infection number (MOI) 100 to prepare the injury model, and G-Rb<sub>3</sub> was continued to be administered for 48 h. Control group did not add SS1, control group and model group did not add drugs. The effects of drugs on cell morphology were observed by optical microscope, the reversal effect of drugs on Hp-induced apoptosis was detected by Hoechst 33342 fluorescence staining and Annexin V/PI double staining. In mechanism research, on the one hand, qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expression of apoptosis-related genes P53, Bax, Bcl-2 and related proteins P53, p-Akt, Cleaved/Pro-Caspase 9, Bcl-2, Bax, Cleaved/Pro-Caspase 3, and the difference of ROS levels between groups was detected. **Results** The results of network pharmacology showed that there were 16 targets for *Panax notoginseng* in the treatment of Hp-related diseases. The top six PPI network analysis were TP53, CASP3, PTGS2, IL6, TNF and IL1 $\beta$ . GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis showed apoptosis-related results. After pretreatment with G-Rb<sub>3</sub>, the nuclear chromatin of gastric epithelial cells was dense and deeply stained, and the number of broken cells decreased gradually. Hoechst 33342 fluorescence staining was used to detect apoptotic cells. Compared with Hp group, the number of nuclear strong fluorescence in G-Rb<sub>3</sub> low, medium and high groups was significantly ( $P < 0.05$ ). Flow cytometry showed that compared with the normal group, the apoptosis rate of Hp group was significantly increased. Compared with Hp group, the apoptosis rate of G-Rb<sub>3</sub> group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Reactive oxygen species detection showed that the fluorescence intensity of the three concentrations of G-Rb<sub>3</sub> was significantly lower than that of the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the Hp group, the expressions of TP53 and Bax genes were significantly decreased, and the expression of Bcl-2 gene was significantly increased ( $P < 0.05$ ). Western blotting results showed that compared with Hp group, p-Akt and Bcl-2 protein expression increased, P53, Bax, Cleaved-Caspase 9 and Cleaved-Caspase 3 protein expression decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Panax notoginseng* may treat Hp-related diseases through multiple pathways including inflammation and apoptosis. Its main component G-Rb<sub>3</sub> can effectively protect GES-1 and reduce SS1-induced apoptosis, which may be due to the promotion Akt phosphorylation and P53 degradation by regulating oxidative stress.

**Key words:** ginsenoside Rb<sub>3</sub>; *Panax notoginseng*; *Helicobacter pylori*; gastric epithelial cells; network pharmacology; apoptosis; oxidative stress

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是一种革兰阴性菌, 是最常见的细菌病原体之一, 且已被世界卫生组织列为 I 类致癌物<sup>[1]</sup>。Hp 感染胃黏膜已经被认为是许多胃部疾病的主要原因, 包括慢性胃炎、消化性溃疡、黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤和胃腺癌<sup>[2]</sup>。尽管临床上有众多方案根除 Hp, 但 Hp 感染对胃黏膜造成的损伤及其相应的临床症状如胃痛、嗝气等, 并不会因为 Hp 的根除而在短期内好转<sup>[2]</sup>。现代医学对此并没有解决方案, 寻求改善 Hp 造成的胃上皮损伤的治疗方法具有重要意义, 祖国医学在一定程度上展现出良好前景。

三七具有化瘀止血、活血定痛的功效<sup>[3-4]</sup>。《本草择要纲目》云: “大抵此药气温味甘微苦, 乃阳明厥阴血分之药, 故能治一切血病”。临床上三七在多类消化性疾病如消化性溃疡及慢性萎缩性胃炎中广泛使用<sup>[5-6]</sup>。人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 是三七中的有效活性成分<sup>[7]</sup>, 现代药理学研究表明其具有抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤等作用, 还可以保护神经及抗抑郁<sup>[8]</sup>。已有研究表明人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 在心肌损伤及肺部损伤中都发挥着重要的治疗作用, 但其在脾胃病中的作用仍不明确<sup>[9-10]</sup>。

本研究首先基于网络药理学对三七治疗 Hp 相

关胃疾病进行预测分析, 接着制备 Hp 菌株诱导胃上皮细胞 GES-1 凋亡的模型, 验证人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对 GES-1 细胞的保护作用, 并进一步揭示其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞与菌株

人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 购自北纳创联生物科技有限公司; Hp 悉尼株 1 (Sydney Strain 1, SS1) 由江苏省人民医院消化科赠予。

### 1.2 药物及主要试剂

人参皂苷 Rb<sub>3</sub> (质量分数  $\geq 98\%$ , 货号 68406-26-8) 购自上海阿拉丁生物科技股份有限公司; DMEM 培养液、胎牛血清、磷酸盐缓冲液, 购自以色列 BI 公司; 哥伦比亚琼脂培养基购自广东环凯微生物科技有限公司; 改良吉姆萨染色液、Hoechst 33342 染色液、活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; AV/PI 凋亡检测试剂盒、HiScript II 逆转录试剂盒、ChamQ qPCR 专用预混液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 引物 (序列见表 1) 购自英潍捷基贸易有限公司; 一抗 GAPDH、P53、P-Akt 购自 Proteintech 公司; 一抗 Bcl-2、Caspase-3 购自 Affinity 公司; 一抗 Bax、Caspase-9 购自 CST 公司;

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称	上游序列(5'-3')	下游序列(5'-3')	种属
$\beta$ -actin	TCATGAAGGTGTGACGTGGACATC	CAGGAGGAGCAATGATCTTGATCT	人
P53	TAACAGTTCCTGCATGGCGGC	AGGACAGGCACAAACACGCACC	人
Bax	ATCCAGGATCGAGCAGGGCG	ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG	人
Bcl-2	AAACAGAGGCCGCATGCTG	AAACAGAGGCCGCATGCTG	人

山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG 购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司; ECL 发光液购自杭州弗德生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

电泳仪、电泳槽、转模仪、化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司); 荧光定量 PCR 仪(ABI Q5, 美国 Thermo Fisher 公司); 流式细胞仪(CytoFLEX LX, 美国贝克曼库尔特有限公司); 荧光显微镜(Axio Imager 2, 德国卡尔蔡司公司); 光学显微镜(PH-XDS5, 凤凰光学股份有限公司); 可见光分光光度计(721-100, 上海菁华科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 网络药理学分析

药物及疾病靶点收集: 首先, 使用 Herb 数据库(<http://herb.ac.cn/>)收集“三七”的相关预测靶点, 检索词“三七”; 接着, 使用 Gene Cards 数据库(<https://www.genecards.org/>)收集 Hp 相关疾病的靶点, 检索词“*Helicobacter pylori*”(score $\geq$ 5); 最后, 使用 Draw Venn Diagram 网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)绘制 Venn 图, 得到靶点交集。蛋白互作(PPI)网络分析: 将获得的靶点交集导入 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)进行分析, 将分析结果导入 Cytoscape 软件导出 PPI 网络图, 得到靶点的度(degree)和中介中心性(betweenness centrality)及拓扑系数(topological coefficient), 并将数据按度值从大到小排列。基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析: 将获得的交集靶点通过 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)进行 GO 与 KEGG 富集分析。按 *P* 值分别罗列生物功能(biological process, BP)、细胞成分(cellular component, CC)、分子功能(molecular function, MF)的前 5 位, 绘制柱状图。KEGG 富集分析的结果按 *P* 值排序, 选取前 20 位绘制气泡统计图。

### 2.2 细胞培养、造模及分组给药

将 GES-1 细胞按  $2.5 \times 10^5$  个接种于 6 孔板, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行培养, 分为对照组, 模型组, 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 低、中和高浓

度(1、5、10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )组, 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 组使用相应浓度的人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 预处理, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养过夜 12 h 至融合度为 70%~80%。收集 SS1, 用 DMEM 培养基重悬后按感染复数(MOI)为 100 加入细胞中<sup>[11-14]</sup>, 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 继续给药, 共培养 48 h。对照组不与 SS1 共培养, 对照组和模型组不加药。

### 2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

按诺唯赞公司 AV/PI 检测试剂盒说明操作: 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 终止消化后收集细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 每次均 4  $^{\circ}\text{C}$ 、1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min, 弃上清, 加入 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$  Binding Buffer, 轻轻吹匀至单细胞悬液。加入 5  $\mu\text{L}$  Annexin V-FITC 和 5  $\mu\text{L}$  PI Staining Solution, 轻轻吹匀; 避光、室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ )孵育 10 min; 加入 400  $\mu\text{L}$  1 $\times$  Binding Buffer, 轻轻混匀。染色后用流式细胞仪检测。

### 2.4 改良吉姆萨染色和 Hoechst 33342 染色

①改良吉姆萨染色: 先将 6 孔板中细胞用 70% 乙醇固定 10 min, 去酒精, 用去离子水将染液稀释, 加入染液染色 45 min, 镜下观察细胞形态。②Hoechst 33342 染色: 在 6 孔板中加入 1 mL Hoechst 33342 染色液, 充分覆盖住细胞, 在适宜于细胞培养的温度培养 20~30 min。弃染色液, 用 PBS 或培养液洗涤 3 次后进行荧光检测, 随机 3 个视野计数高亮细胞数。

### 2.5 qRT-PCR 检测相关基因表达情况

用 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录成 cDNA 后, 进行 qRT-PCR 扩增(反应体系为 5  $\mu\text{L}$ ), 扩增条件: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 40 个循环; 溶解曲线: 95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s, 95  $^{\circ}\text{C}$ 、15 s。每个样品设置 3 个复孔, 用  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行相对基因表达分析。

### 2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达情况

将细胞用 PBS 洗涤 3 次, 加入全蛋白提取试剂, 置于冰上裂解 30 min 后, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 加入 5 $\times$  SDS-PAGE 上样缓冲液, 混匀后用水浴 100  $^{\circ}\text{C}$  加热 10 min。将待测蛋白样本进行 SDS-

PAGE凝胶电泳,电泳完成后采用PVDF膜湿转法,冰水浴转膜2 h后,将膜放入5% BSA中封闭2 h,放入一抗中4 °C孵育过夜,次日孵育二抗2 h, TBST清洗3次。PVDF膜经ECL化学发光法显影后,用Image Lab软件获取图像并分析灰度值。

### 2.7 活性氧(ROS)检测

给药结束后,收集细胞悬液,布于96孔板中,待细胞贴壁后进行处理。将空培养基与DCFH-DA溶液按照1:1 000充分混匀,使DCFH-DA的终浓度为10 mol·L<sup>-1</sup>。弃上清,加入100 μL稀释好的DCFH-DA,使其充分覆盖细胞。在细胞培养环境中继续培育20 min。接着,弃上清,用空DMEM细胞培养基清洗细胞,最后1次洗涤保留培养基。在荧光分光光度计下检测,激发波长设定为488 nm,发射

波长设定为525 nm。

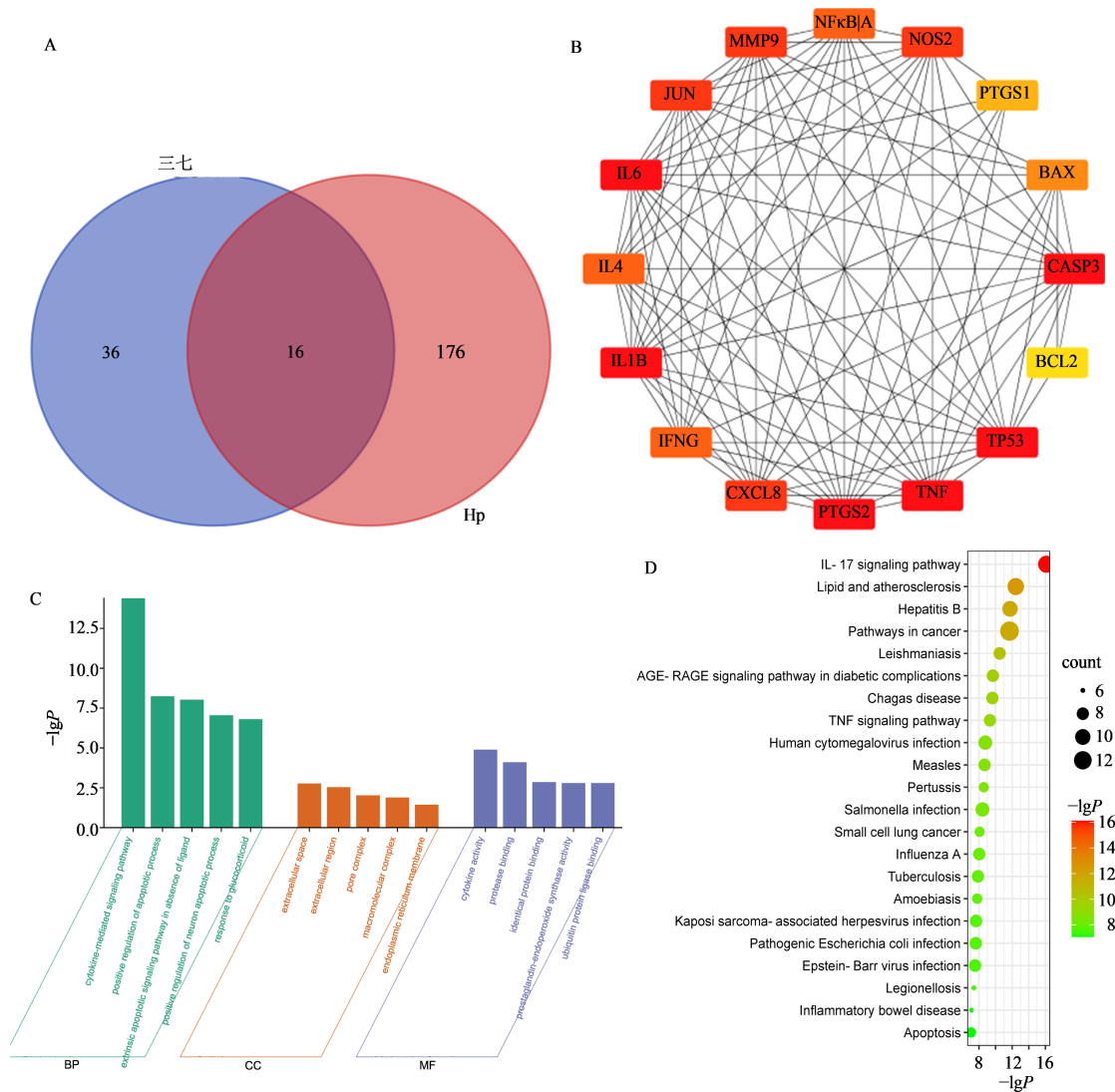
### 2.8 统计学分析

采用Graphpad prism 8.3.0软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间比较采用t检验,多组间分析比较采用单因素方差分析。

## 3 结果

### 3.1 网络药理学预测三七的治疗靶点

通过Herb数据库获取三七的相关靶点52个,通过Gene Cards (score ≥ 5)获取Hp相关靶点192个,将两者取交集制作Venn图,共得到交集靶点数目为16(图1-A)。将16个靶点导入STRING数据库,绘制PPI网络(图1-B),并按度值从大到小排列,前6位为TP53、CASP3、PTGS2、IL6、TNF、IL1B,其度值均为14,并列出了所有结果的中介中心性及拓扑



A-三七与Hp相关疾病的靶点韦恩图;B-16个交集靶点的PPI网络分析;C-GO富集分析结果;D-KEGG富集分析结果  
A-Venn diagram of targets of *Panax notoginseng* and Hp related diseases; B-PPI network analysis of 16 intersection targets; C-GO enrichment analysis results; D-KEGG enrichment analysis results

图1 基于网络药理学预测三七治疗靶点

Fig. 1 Prediction of therapeutic targets of *Panax notoginseng* based on network pharmacology

系数(表2)。将16个目的靶点通过DAVID数据库进行GO与KEGG富集分析,其中GO富集分析P值排序前5位的包括细胞因子介导的信号通路、凋亡过程的正调控、无配体的外源性凋亡通路、神经元凋亡的正调控、对糖皮质激素的反应(图1-C)。这反映了三七治疗Hp相关疾病的途径与凋亡过程存在潜在联系。KEGG富集的结果为218项,主要富集于IL-17信号通路、血脂和动脉粥样硬化、乙型肝炎、癌症信号通路等,按P值排序列出20项,其中包含了凋亡信号通路(图1-D)。结果表明,三七治疗Hp相关疾病的靶点除了与炎症相关外,还与凋亡等途径相关。炎症的相关治疗已经被广泛研究,本研究进行凋亡相关靶点实验验证。

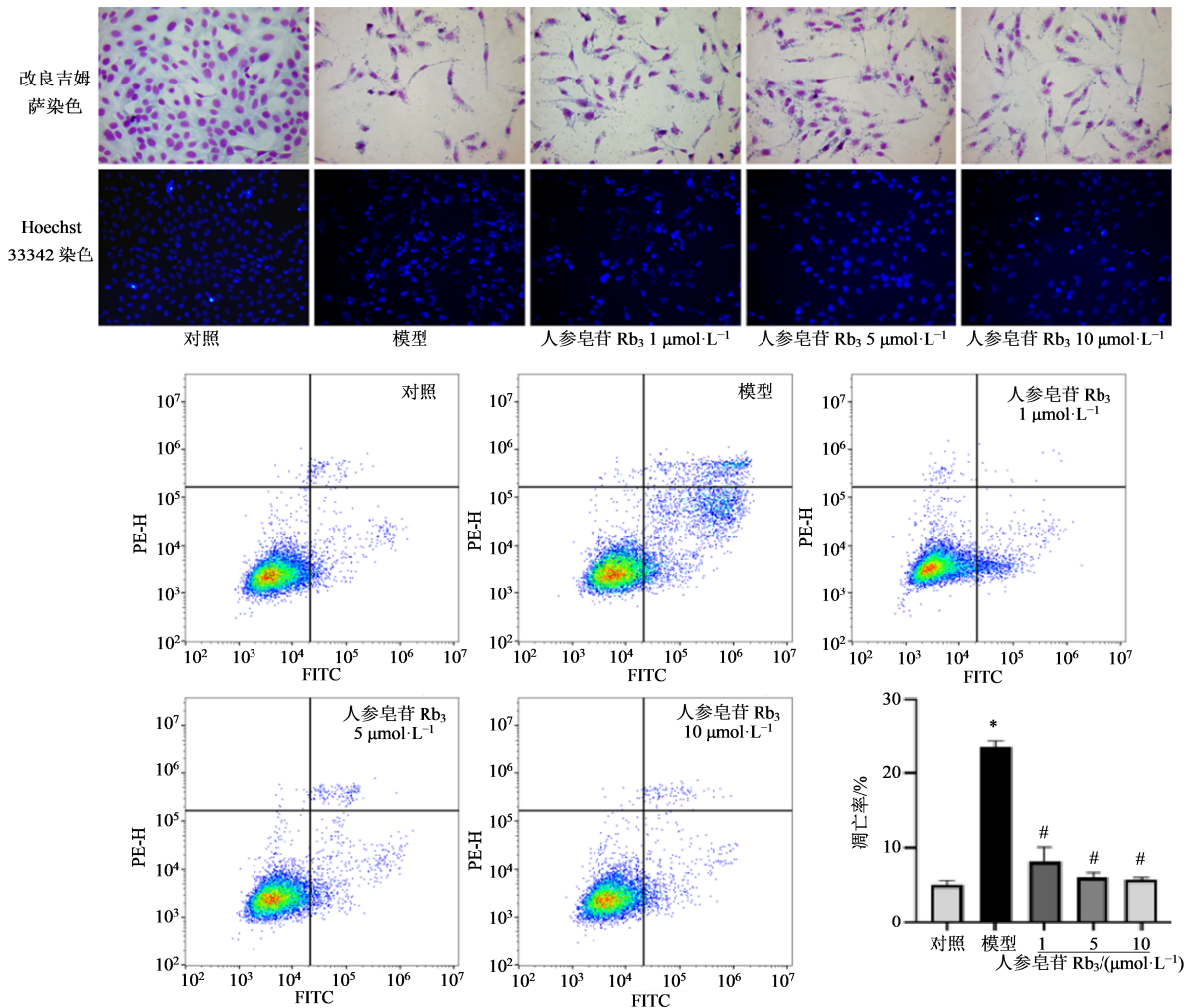
### 3.2 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对Hp诱导GES-1细胞凋亡的影响

如图2所示,改良吉姆萨染色结果表明,与对照组比较,模型组GES-1细胞的细胞核染色质致密深

表2 PPI网络分析结果

Table 2 PPI network analysis results

靶点	度	中介中心性	拓扑系数
TP53	14	0.052 4	0.809 5
CASP3	14	0.052 4	0.809 5
PTGS2	14	0.021 2	0.823 8
IL6	14	0.021 2	0.823 8
TNF	14	0.021 2	0.823 8
IL1B	14	0.021 2	0.823 8
CXCL8	13	0.012 3	0.846 2
NOS2	13	0.012 3	0.846 2
JUN	13	0.006	0.861 5
MMP9	13	0.006	0.861 5
NFKBIA	12	0	0.888 9
IFNG	12	0	0.888 9
IL4	12	0	0.888 9
BAX	9	0.021 4	0.837 0
PTGS1	6	0	0.976 2
BCL2	3	0	0.881 0



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group

图2 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effect of G-Rb<sub>3</sub> on cell apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

染,破裂的细胞明显增多;与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>组细胞核染色质致密深染改善,破裂的细胞逐渐减少,且形态更为饱满。

使用Hoechst 33342荧光染色对凋亡细胞进行测定,与对照组比较,模型组细胞核强荧光数目明显增加;与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>低、中、高浓度组细胞核强荧光数目明显减少。

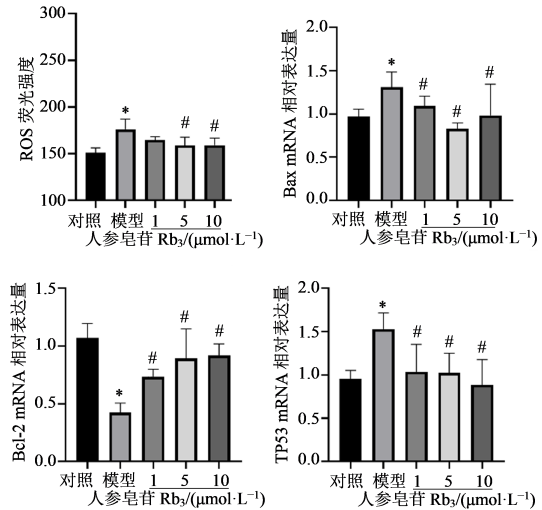
流式细胞术表明,与对照组比较,模型组凋亡率显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub> 3浓度组凋亡率显著降低( $P < 0.05$ )。

### 3.3 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对ROS水平和Bcl-2、Bax、TP53 mRNA水平的影响

与对照组比较,模型组ROS水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>中、高浓度组ROS水平显著降低( $P < 0.05$ )。与对照组比较,模型组Bax、TP53 mRNA水平显著升高,Bcl-2 mRNA水平显著降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub> 3个浓度的Bax、TP53 mRNA水平显著降低,Bcl-2 mRNA水平显著升高( $P < 0.05$ )。结果表明人参皂苷Rb<sub>3</sub>可能通过抗氧化,并降低TP53 mRNA的表达,减轻Hp对GES-1细胞的凋亡作用。结果见图3。

### 3.4 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对凋亡相关蛋白表达的影响

如图4所示,与对照组比较,模型组p-Akt、Bcl-2蛋白表达显著下降( $P < 0.05$ ),P53、Bax、cleaved/pro-Caspase 9与cleaved/pro-Caspase 3蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,人参皂苷Rb<sub>3</sub>中、高浓度组的p-Akt、Bcl-2蛋白表达显著升高( $P < 0.05$ ),P53、Bax蛋白表达显著下降( $P < 0.05$ ),低、高浓度组cleaved/pro-Caspase 9与高浓度组cleaved/



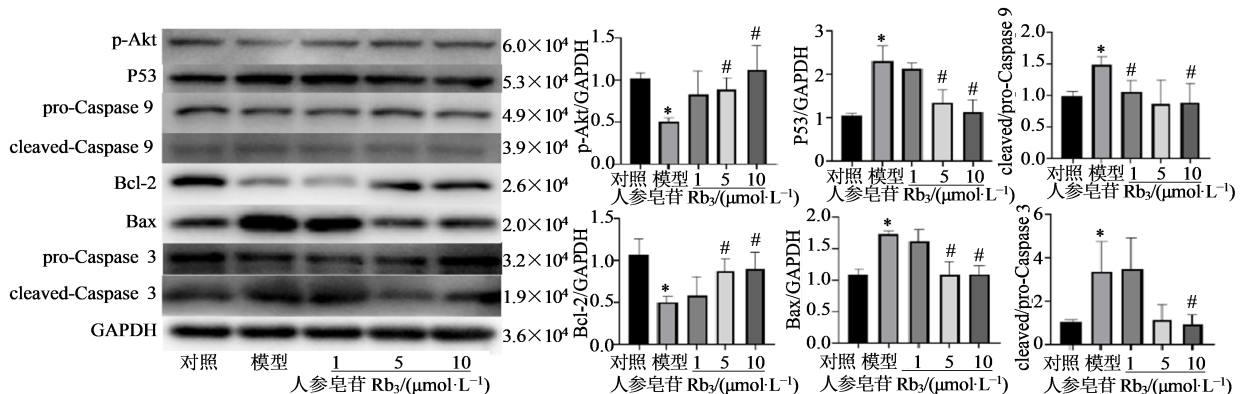
与对照组比较: \* $P < 0.05$ ;与模型组比较: # $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group  
图3 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对ROS和Bcl-2、Bax、TP53 mRNA水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 3 Effects of G-Rb<sub>3</sub> on ROS and Bcl-2, Bax, TP53 mRNA levels ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

pro-Caspase 3蛋白表达显著下降( $P < 0.05$ )。

## 4 讨论

Hp致病结局的多样性反映了其对胃上皮细胞的损伤是复杂的,慢性胃炎、胃溃疡、十二指肠溃疡、胃淋巴瘤以及胃癌都与其相关,尤其是与恶性肿瘤的关系,数据显示1%~2%的Hp感染者最终发展为胃腺癌。尽管临床上有众多方案根除Hp,但Hp感染对胃黏膜造成的损伤,并不会因为Hp的根除而在短期内恢复<sup>[11]</sup>。西医目前尚无专门针对Hp导致的胃上皮细胞损伤的治疗策略,中医药治疗从一定程度上填补了这份空白。因Hp的传染性和致病特点,中医上将Hp相关胃病归于外感邪毒疔气的范畴。孙立扬等<sup>[15]</sup>拟祛瘀消癥生肌散治疗Hp相



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ;与模型组比较: # $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs model group

图4 人参皂苷Rb<sub>3</sub>对凋亡相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Effect of G-Rb<sub>3</sub> on expression of apoptosis related proteins ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

关萎缩性胃炎治愈总效率为95.3%。还有研究表明左金方作用于Hp感染的GES-1细胞24h后,能够降低细胞的凋亡率至 $(31.04 \pm 1.02)\%$ <sup>[16]</sup>。水滑石、头花蓼等单味中药提取物及其主要化合物也被证实对Hp相关损伤有修复及保护作用<sup>[12-13]</sup>,其中广藿香醇(PA)不仅具有抗Hp作用,可能通过抗氧化同时抑制促炎因子并调节NLRP3炎症小体功能等多种方式改善Hp诱导的上皮组织损伤<sup>[16]</sup>。这些研究表明中医药在治疗Hp相关疾病中的重要作用。

三七归肝、胃经,功能化瘀止血、活血定痛。《本草新编》云:“无论上、中、下之血,凡有外越者,一味独用亦效。”古籍中多取其止血之力,拟各类止血方,如《医学衷中参西录》中的化血丹,而近代对其应用又有了进一步的拓展,如全小林院士使用蟾皮、硃砂、三七组成的三味小方治疗胃癌<sup>[17]</sup>。此外,越来越多的证据表明,三七在脾胃病中发挥着重要的作用。在体内实验中,黄芪、三七通过诱导并增加转录因子GAF的表达和促进HSP70的表达改善萎缩性胃炎大鼠胃黏膜状态,并可明显改善慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞的增殖及凋亡水平<sup>[18-19]</sup>。

但三七在Hp相关性胃病中的作用尚不明确,本研究首先基于网络药理学探索了三七在Hp相关疾病中的潜在靶点。在Herb数据库及Gene Cards数据库分别筛选了药物与疾病的相关靶点,取交集后得到16个目标靶点。接着对这16个目标靶点进行PPI网络分析,发现度值大小排名前6位靶点为TP53、CASP3、PTGS2、IL6、TNF、IL1B。最后,对16个靶点进行GO及KEGG富集分析,结果表明,三七治疗Hp相关胃病的靶点和通路主要包括炎症、癌症以及细胞凋亡等。

Hp对胃上皮细胞的影响除了炎症以外,另一个重要的损伤是对胃上皮细胞增殖和凋亡稳态的破坏。近年的研究显示<sup>[20]</sup>,Hp可以引起DNA损伤诱导细胞凋亡,而DNA损伤修复不当会促进癌变。有大量体内外研究表明,Hp可以诱导胃上皮细胞凋亡:小鼠胃上皮细胞的凋亡程度和胃炎的严重程度已被证实与P53上调Bcl-2相关<sup>[21]</sup>;在体外Hp菌株SBK被证实可诱导GES-1细胞凋亡<sup>[22]</sup>。细胞增殖与凋亡平衡的失调与癌症的发生密切相关,也在细胞的萎缩样变和黏膜溃疡等疾病中发挥重要作用。

人参皂苷Rb<sub>3</sub>是从三七中分离出的一种具有代表性的三萜皂苷,它在细胞凋亡、氧化应激、炎症等方面具有多种生物学活性。在多项研究中表明其具有抗凋亡活性,人参皂苷Rb<sub>3</sub>通过激活PPAR $\alpha$ 途

径调节心肌细胞能量代谢和凋亡<sup>[23]</sup>,此外,人参皂苷Rb<sub>3</sub>通过调节AMPK-mTOR介导的自噬和抑制细胞凋亡,对顺铂所致肾毒性有保护作用<sup>[24]</sup>。在最近的一项研究中,人参皂苷Rb<sub>3</sub>通过增加细胞存活,减少氧化应激和炎症反应,对烟雾所致的肺损伤发挥保护作用<sup>[7]</sup>。还有研究表明,人参皂苷Rb<sub>3</sub>在体内和体外通过激活Perk/Nrf 2/Hmox 1的抗氧化信号途径来保护心肌细胞免受缺氧/复氧损伤<sup>[25]</sup>。这些研究表明了人参皂苷Rb<sub>3</sub>的抗凋亡活性。

为了进一步验证网络药理学结果,本研究用人参皂苷Rb<sub>3</sub>对Hp诱导的细胞凋亡模型进行干预。首先通过瑞氏-吉姆萨染色、Hoechst 33342荧光染色以及流式细胞术验证了在人参皂苷Rb<sub>3</sub>处理后,GES-1受Hp诱导的凋亡情况明显降低。为了进一步阐明其保护机制,检测了各组的ROS水平,结果显示,模型组ROS表达明显升高,经人参皂苷Rb<sub>3</sub>处理后,ROS表达降低。接着使用qRT-PCR对TP53、Bcl-2以及Bax基因表达进行检测,均显示了人参皂苷Rb<sub>3</sub>对胃上皮细胞具有保护作用,并提示了其潜在机制可能是抗氧化应激。最后使用Western blotting对凋亡相关蛋白进行检测,结果进一步加强了证据。其中Akt通过磷酸化影响着细胞周期、生长、存活、代谢和迁移,其最直接的作用是影响Caspase-9的活化,接着Caspase级联展开,并最终诱导细胞凋亡<sup>[26]</sup>。P53蛋白在维持基因组的稳定中起关键作用,其也被认为是DNA损伤的感受器<sup>[27]</sup>。P53依赖的凋亡可以消除DNA损伤的细胞,这是预防癌变的重要因素之一。P53通过细胞周期和线粒体凋亡途径影响着细胞凋亡,其机制之一为影响Bcl-2家族的Bcl-2和Bax的表达<sup>[28]</sup>。Bax是人体最主要的凋亡基因,其可以与Bcl-2形成异二聚体,通过控制线粒体膜的通透性来调节细胞色素C的释放,进而影响Caspase级联。综上所述,本研究结果表明人参皂苷Rb<sub>3</sub>能有效改善胃上皮细胞受Hp诱导的凋亡影响,其可能机制是降低氧化应激水平,并调节Akt的磷酸化和P53的表达。

本研究基于网络药理学探讨三七治疗Hp相关疾病的潜在靶点,并选取了三七中的活性成分人参皂苷Rb<sub>3</sub>对结果进行验证,证实了人参皂苷Rb<sub>3</sub>通过抗氧化应激及调节Akt蛋白的磷酸化对Hp诱导的胃上皮细胞凋亡发挥保护作用。为Hp相关疾病提供治疗的新策略,并为三七的临床应用提供证据。但本研究只进行了体外验证,后续还将在动物实验中进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Mao L Q, Zhou Y L, Wang S S, et al. Impact of *Helicobacter pylori* eradication on the gastric microbiome [J]. Gut Pathog, 2021, 13(1): 60.
- [2] Hathroubi S, Servetas S L, Windham I, et al. *Helicobacter pylori* biofilm formation and its potential role in pathogenesis [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2018, 82(2): e00001-e00018.
- [3] 田会东, 郭丽娜, 王单单, 等. 三七主要活性成分作用机制的网络药理学研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(1): 72-77.  
Tian H D, Guo L N, Wang D D, et al. Research progress on *Notoginseng Radix* et *Rhizoma* and predictive analysis on its Q-Marker [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(1): 72-77.
- [4] 刘耀晨, 张铁军, 郭海彪, 等. 三七的研究进展及其质量标志物预测分析 [J]. 中草药, 2021, 52(9): 2733-2745.  
Liu Y C, Zhang T J, Guo H B, et al. Research progress on *Notoginseng Radix* et *Rhizoma* and predictive analysis on its Q-Marker [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2021, 52(9): 2733-2745.
- [5] 何欣芮, 马肖, 王萍, 等. 三七芪英饮对慢性萎缩性胃炎大鼠的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(3): 341-347.  
He X R, Ma X, Wang P, et al. Effect of Sanqi qiying decoction on chronic atrophic gastritis rats [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2022, 42(3): 341-347.
- [6] 任元庆. 黄芪与三七联用治疗胃溃疡的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2018, 10(30): 76-78.  
Ren Y Q. Clinical observation of *Astragalus membranaceus* combined with *Panax notoginseng* in treating gastric ulcer [J]. Clin J Chin Med, 2018, 10(30): 76-78.
- [7] Zhu J R, Tao Y F, Lou S, et al. Protective effects of ginsenoside Rb<sub>3</sub> on oxygen and glucose deprivation-induced ischemic injury in PC12 cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(3): 273-280.
- [8] Wu W J, Tang Y F, Dong S, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> alleviates the toxic effect of cisplatin on the kidney during its treatment to oral cancer via TGF- $\beta$ -mediated mitochondrial apoptosis [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6640714.
- [9] Tan Y, Sun D X, Chen J, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> alleviates smoke-induced lung injury via the H19/miR-29b-3p/HGMB1/TLR4 signalling pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(5): 2725-2729.
- [10] Chen X, Wang Q Y, Shao M Y, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> regulates energy metabolism and apoptosis in cardiomyocytes via activating PPAR $\alpha$  pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120: 109487.
- [11] Megraud F, Coenen S, Versporten A, et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption [J]. Gut, 2013, 62(1): 34-42.
- [12] Wang G Z, Pang J, Hu X X, et al. Daphnetin: A novel anti-*Helicobacter pylori* agent [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(4): E850.
- [13] Shi Y Y, Guo Y L, Zhang T, et al. Hydrotalcite can prevent the damaging effects of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells [J]. Microsc Microanal, 2018, 24(3): 277-283.
- [14] Lian D W, Xu Y F, Ren W K, et al. Unraveling the novel protective effect of patchouli alcohol against *Helicobacter pylori*-induced gastritis: Insights into the molecular mechanism *in vitro* and *in vivo* [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1347.
- [15] 孙立杨. 中医辨证治疗慢性萎缩性胃炎 86 例 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(4): 439-440.  
Sun L Y. 86 cases of chronic atrophic gastritis treated by TCM syndrome differentiation [J]. Liaoning J Tradit Chin Med, 2007, 34(4): 439-440.
- [16] 周红祖, 黎莹斯, 陈永恒, 等. 左金方对幽门螺旋杆菌感染的人 GES-1 细胞增殖与凋亡的作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(4): 880-887.  
Zhou H Z, Li Y S, Chen Y H, et al. Effect of Zuojin Formula on proliferation and apoptosis of human GES-1 cells infected by *Helicobacter pylori* [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2019, 50(4): 880-887.
- [17] 徐坤元, 王佳, 周毅德. 干蟾皮、礞砂、三七治疗胃癌经验: 全小林三味小方撮萃 [J]. 吉林中医药, 2020, 40(8): 986-988.  
Xu K Y, Wang J, Zhou Y D. Toad skin, sal-ammonite and *Panax notoginseng* in the treatment of gastric cancer—three prescription by professor TONG Xiaolin [J]. Jilin J Chin Med, 2020, 40(8): 986-988.
- [18] 张会存, 史瑞, 李健, 等. 黄芪、三七对萎缩性胃炎大鼠胃黏膜 HSP70 及其转录因子 GAF 表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(7): 559-566.  
Zhang H C, Shi R, Li J, et al. Effect of *Astragalus* and *Panax notoginseng* on expression of heat shock protein 70 and GAF in atrophic gastritis in rats [J]. World Chin J Dig, 2013, 21(7): 559-566.
- [19] 赵唯含, 毛堂友, 杨美娟, 等. 黄芪、三七及其配伍对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞凋亡及增殖的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2017, 25(5): 376-380.  
Zhao W H, Mao T Y, Yang M J, et al. Effect of *Astragalus*, *Panax notoginseng* and their compatibility on



- apoptosis and proliferation of the gastric mucosa in rats with chronic atrophic gastritis [J]. Chin J Integr Tradit West Med Dig, 2017, 25(5): 376-380.
- [20] Fu L, Xie C. A lucid review of *Helicobacter pylori*-induced DNA damage in gastric cancer [J]. Helicobacter, 2019, 24(5): e12631.
- [21] Yang H, Wei B, Hu B. Chronic inflammation and long-lasting changes in the gastric mucosa after *Helicobacter pylori* infection involved in gastric cancer [J]. Inflamm Res, 2021, 70(10/11/12): 1015-1026.
- [22] 刘加霏, 国东, 褚衍六, 等. 幽门螺杆菌急性感染对胃上皮细胞凋亡的影响 [J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32(8): 880-883.
- Liu J F, Guo D, Chu Y L, et al. Effects of acute *Helicobacter pylori* infection on apoptosis of gastric epithelial cells [J]. Chin J Microecol, 2020, 32(8): 880-883.
- [23] Zhang Y, Ji H X, Qiao O, et al. Nanoparticle conjugation of ginsenoside Rb<sub>3</sub> inhibits myocardial fibrosis by regulating PPAR $\alpha$  pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111630.
- [24] Xing J J, Hou J G, Ma Z N, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> provides protective effects against cisplatin-induced nephrotoxicity via regulation of AMPK-/ mTOR-mediated autophagy and inhibition of apoptosis *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Prolif, 2019, 52(4): e12627.
- [25] Sun J, Yu X H, Huangpu H Q, et al. Ginsenoside Rb<sub>3</sub> protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via activating the antioxidation signaling pathway of PERK/Nrf2/HMOX1 [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 254-261.
- [26] Neophytou C M, Trougakos I P, Erin N, et al. Apoptosis deregulation and the development of cancer multi-drug resistance [J]. Cancers (Basel), 2021, 13(17):4363.
- [27] Liu Y, Luo Y H, Li S M, et al. 2-(Naphthalene-2-thio)-5,8-dimethoxy-1, 4-naphthoquinone induces apoptosis via ROS-mediated MAPK, AKT, and STAT3 signaling pathways in HepG2 human hepatocellular carcinoma cells [J]. Drug Chem Toxicol, 2022, 45(1):33-43.
- [28] Pei J, Velu P, Zareian M, et al. Effects of syringic acid on apoptosis, inflammation, and AKT/mTOR signaling pathway in gastric cancer cells [J]. Front Nutr, 2021, 8: 788929.

[责任编辑 兰新新]