【实验研究】

基于网络药理学的黄瑞香抗胃癌作用机制探讨及实验验证

姜金玲，候骄洋，姚国栋*
沈阳药科大学 中药学院，辽宁 沈阳 110016

摘 要：目的 采用网络药理学方法预测黄瑞香发挥抗胃癌作用的潜在机制，并通过体外细胞实验进行初步验证。**方法** 利用中药系统药理学数据库和分析平台（TCMSP）筛选黄瑞香的有效成分，通过 Swiss Target Prediction 数据库和 PharmMapper 数据库筛选获得黄瑞香活性成分的相关靶点。通过 GeneCards 及 DisGeNET 数据库检索获得胃癌疾病相关靶点。利用 Cytoscape 软件构建黄瑞香活性成分-靶点网络；通过 STRING、Metascape 数据库对成分和胃癌疾病交集靶点进行蛋白质相互作用（PPI）网络和基因本体（GO）注释及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析。采用 MTT 实验考察黄瑞香异戊烯基黄酮成分构树黄酮醇 F（broussoflavonol F）、daphnegiravone D、daphgiflavone C 体外对胃癌 MGC803 细胞生长的影响，采用实时荧光定量 PCR 方法检测这 3 种异戊烯基黄酮类化合物作用 48 h 后胃癌 MGC803 细胞表皮生长因子受体（*EGFR*）、磷脂酰肌醇 3-激酶（*PI3K*）和蛋白激酶 B（*Akt*）基因的表达。**结果** 筛选得到黄瑞香 70 个活性成分，黄瑞香作用于胃癌的 42 个相关靶点，其中表皮生长因子受体（EGFR）、鼠肉瘤病毒癌基因同源物 B1（BRAF）、I类磷脂酰肌醇-3 激酶催化亚基 α（PIK3CA）、酪氨酸激酶（MET）以及丝裂原活化蛋白激酶 1（MAPK1）等为核心靶点。KEGG 富集分析发现黄瑞香作用于胃癌主要富集在癌症、PI3K/Akt 以及丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）等通路中。活性测试结果发现，异戊烯基黄酮成分构树黄酮醇 F、daphnegiravone D、daphgiflavone C 对胃癌 MGC803 细胞生长具有较好的抑制作用。同时，与对照组比较，构树黄酮醇 F、daphnegiravone D、daphgiflavone C 可显著抑制胃癌 MGC803 细胞 *EGFR*、*PI3K* 和 *Akt* 基因的表达（$P<0.05$、0.01、0.001）。**结论** 黄瑞香可能以异戊烯基黄酮为主要的抗胃癌活性成分，以 EGFR、BRAF、PIKC3A、MET 等蛋白为核心作用靶点，主要经 PI3K/Akt 以及 MAPK 等相关信号通路发挥治疗胃癌的作用。

关键词： 黄瑞香；胃癌；网络药理学；癌症通路；表皮生长因子受体；磷脂酰肌醇-3 激酶；蛋白激酶 B；丝裂原活化蛋白激酶；异戊烯基黄酮成分

中图分类号： R285.5 **文献标志码：** A **文章编号：** 1674-6376（2023）01-0024-13

DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.01.005

Study on mechanism of *Daphne giraldii* against gastric cancer based on network pharmacology and experimental verification

JIANG Jinling, HOU Jiaoyang, YAO Guodong

School of Traditional Chinese Materia Meidca, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Daphne giraldii* in the treatment of gastric cancer by using the method of network pharmacology and cellular experiments. **Methods** Systematic Pharmacology Database and TCMSP database were used to obtain the chemical components and action targets of *D. giraldii*. Then, from the Swiss target prediction, PharmMapper, GeneCards and DisGeNET databases, the targets of chemical constituents from *D. giraldii* and gastric cancer related target information were searched. The active ingredient-target network of *D. giraldii* was further constructed by Cytoscape. Afterwards, STRING and Metascape databases were used for protein-protein interaction, GO and KEGG pathway enrichment analysis. MTT assay was used to detect the anti-tumor activity of broussoflavonol F, daphnegiravone D, daphgiflavone C. The expression of mRNA level of *EGFR*, *PI3K* and *Akt* of gastric cancer MGC803 cells were examined by using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) analysis after 48 h treated by these three prenylated flavonoids. **Results** Totally 70 potential active ingredients of *D. giraldii* were obtained.

收稿日期： 2022-08-13

基金项目： 国家级大学生创新创业训练计划支持项目（202110163030）；国家自然科学基金资助项目（81973528）

第一作者： 姜金玲（2000—），女，本科在读，主要研究方向为中药成分的抗肿瘤作用。E-mail：1598566656@qq.com

***通信作者：** 姚国栋（1988—），教授，博士生导师，主要研究方向为中药成分的抗肿瘤作用。E-mail：guodong_yao@126.com

And through screening, 42 targets of *D. giraldii* on gastric cancer were obtained. Among them, EGFR, BRAF, PIK3CA, MET and MAPK1 were the core targets, which were mainly enriched in cancer, PI3K/Akt and MAPK signaling pathways. MTT assay showed that three prenylated flavones (broussoflavonol F, daphnegiravone D, daphgiflavone C) had better activity against gastric cancer MGC803 cells growth, and they also significantly decreased the mRNA level of *EGFR*, *PI3K* and *Akt*. **Conclusion** The main anti-gastric cancer active component of *D. giraldii* may be prenylated flavonoids, with EGFR, BRAF, PIKC3A, MET and other proteins as core targets, and it mainly plays a role in the treatment of gastric cancer through PI3K/Akt and MAPK signaling pathways.

Key words: *Daphne giraldii* Nitsche; gastric cancer; network pharmacology; pathways in cancer; EGFR; PI3K; Akt; MAPK; prenylated flavonoids

胃癌通常起源于胃黏膜上皮细胞[1]，是我国较为常见的消化道恶性肿瘤之一。根据我国的流行病学调查研究，胃癌的死亡率居于总体肿瘤的第3位，发病率居于总体肿瘤的第2位[2]。由于其起病隐匿，早期通常无明显症状，明确诊断时多数患者已处于中晚期，无法及时通过手术进行治疗[3]。而以药物为主的治疗方法又因胃癌病因的复杂性，导致药物的利用率过低[4]。因此，发现胃癌治疗的新靶点并开发相关药物迫在眉睫。近年来的研究表明，中药或天然药物可以通过调节免疫系统、调节细胞凋亡等功能发挥抗癌作用[5]。且大量临床研究证明，活血化瘀类中药或中药复方治疗胃癌有显著作用[6]。因此，从传统中药或天然药物中寻找具有抗胃癌作用的药物并探索其作用机制在临床及新药开发方面均具有重要意义。

黄瑞香*Daphne giraldii* Nitsche为瑞香科瑞香属植物，其根皮和茎皮可入药，为祖师麻的基原植物之一。其性温，味辛、苦，入心、肝经，具有活血通络、散瘀止痛之功效，民间常用于治疗胃痛、风湿疼痛、跌打损伤等症[7]。从黄瑞香中分离并鉴定的主要有香豆素类、黄酮类、木脂素类、二萜类、三萜类等化合物[8]。现代药理学研究表明，黄瑞香化学成分具有显著的抗肿瘤活性，包括对胃癌细胞的抑制作用[9]。

网络药理学是基于系统生物学，使用一系列生物网络，以药物的活性化合物、潜在靶点、所治疗疾病之间相互作用的系统性和整体性为出发点，预测药物治疗疾病的药理学机制的一种方法，其与中医治病的“整体观”理论及中药多成分-多靶点-多作用的特点具有一致性[10-11]。因此，本研究以网络药理学为基础，对祖师麻基原植物黄瑞香的潜在靶点及通路进行预测和研究，同时结合细胞实验进行初步验证，为其治疗胃癌提供理论基础与科学依据。

1 材料

本课题组中从黄瑞香中分离出构树黄酮醇F（broussoflavonol F）、daphnegiravone D、daphgiflavone C、broussoflavonol B、macarindicin E、daphnegiranol D、（2*S*）-kazinol B、isolicoflavonol、broussonol D[12]（质量分数均≥95%），将其溶解在二甲基亚砜（DMSO）中以制备原料储备溶液。DMEM高糖培养基以及0.25%胰蛋白酶均购自Gibco公司；磷酸盐缓冲液（PBS）、双抗均购于HyClone公司；Clark胎牛血清（FBS）购于美国Clark公司；甲基噻唑蓝（MTT）和DMSO均购于美国Sigma公司；Trizol试剂（TaKaRa，Shiga，日本）；Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit试剂盒（TaKaRa，Shiga，日本）。

恒温二氧化碳培养箱（Thermo，美国）；超净工作台（苏州净化设备厂）；电热恒温水浴锅（上海一恒科学仪器有限公司）；倒置显微镜（Motic）；Varioskan BIO-RAD Model 680Flash酶标仪（Thermo，美国）；移液器（Genex Beta，Bio-DL，美国）；6孔、96孔板（Nest Biotech，美国）；LD4-2A型低速离心机（北京医用离心机厂）；J-2HS高速冷冻离心机（Beckman，德国）；PCR热循环仪（BIO-RAD公司）。

2 方法

2.1 药物活性成分靶点的筛选

利用中药系统药理学数据库和分析平台（TCMSP，http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php）筛选黄瑞香的有效成分[13]。根据吸收、分布、代谢、排泄（ADME）特征，将口服生物利用度（OB）≥30%和类药性（DL）≥18%作为条件进行成分筛选[14]。根据课题组前期研究[9]以及以“黄瑞香”为关键词检索TCMSP数据库，筛选获得黄瑞香的活性成分。将筛选得到的成分的化学结构输入到Swiss Target Prediction数据库（http://www.swisstargetprediction.ch/），并设置研究物种为“Homo sapiens”，选择Probability＞0.5筛选潜在有效靶点。此外，同时将筛选到的成分结构输入到PharmMapper数据库（http://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper）中，选取*Z*≥0.5的靶点。将2个数据库收集到的潜在靶点进行合并且删除重复值，将得到的靶点导

入 Uniprot 数据库（http：//www.uniprot.org）中，进行靶点矫正，最终获得黄瑞香化学成分相关靶点。

2.2 胃癌疾病靶点的筛选

以“gastric carcinoma”和“gastric cancer”为关键词在 GeneCards 及 DisGeNET 数据库中进行检索[15-16]。将所得到的靶点根据 Score 值进行排序，Score 值越高代表靶点与疾病越相关。因此，在 GeneCards数据库中，选用Score≥5为阈值筛选靶点；在 DisGeNET数据库中，以Score≥0.3为阈值筛选靶点。

2.3 成分和疾病交集靶点的获取

将筛选得到的化学成分靶点和胃癌疾病相关靶点输入jvenn在线网站（http：//jvenn.toulouse.inra.fr/app/example.html）进行分析并绘制韦恩图。

2.4 化学成分-靶点网络的构建

将筛选得到的化合物及其靶点输入 Cytoscape 软件[17]中，构建可反映化合物与其潜在靶点之间相互作用关系的网络图。其中，节点代表化合物和靶点，边则代表化合物和靶点之间的关系。

2.5 蛋白质相互作用（PPI）网络的构建

将“2.3”项得到的交集靶点上传至 STRING（https：//string-db.org/cgi/input.pl）数据库，进行 PPI 网络构建和分析（隐藏无连接的节点并选择最低相互作用阈值为 0.7）。将结果导入 Cytoscape 3.9.1 软件绘制 PPI 网络图，根据度（degree）值筛选出黄瑞香治疗胃癌的核心靶点。

2.6 基因本体（GO）注释及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析

利用 Metascape 数据库对黄瑞香抗胃癌作用对应靶点进行生物过程（BP）、分子功能（MF）、细胞成分（CC）以及 KEGG 通路富集分析。设置 $P<0.01$，并选取前 20 条通路，将其分别输入 Image GP（http：//www. ehbio. com/ImageGP/）和微生信（http：//www.bioinformatics.com.cn/）网站，绘制 GO 富集分析气泡图以及 KEGG 富集分析条形图。

2.7 化合物-靶点-通路网络的构建

将处理后的药物化学成分、靶点、信号通路文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行分析。根据各节点度值及紧密度等网络拓扑学参数筛选出可能起主要药效作用的化学成分、靶点以及通路，并将结果与成分-靶点网络和 PPI 网络结果进行对比，筛选出共同的有效成分及靶点。

2.8 黄瑞香部分化合物体外抗肿瘤活性考察

人胃癌细胞 MGC803 购于中国科学院细胞库，细胞采用 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素的 DMEM 配制的培养液在培养箱进行培养。取对数生长期的胃癌 MGC803 细胞，经 0.25% 胰酶消化后以每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔微板，实验组加不同浓度课题组前期分离得到的黄瑞香化学成分（2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 μmol·L^{-1}），对照组加等体积的空白培养基，每组设 3 个复孔。微孔板置于 5% CO_2、37 ℃条件下继续培养 48 h，每孔加 5 mg·mL^{-1} MTT 20 μL，孵育 4 h，小心吸弃孔内培养上清液，每孔加入 DMSO 150 μL 以溶解形成的甲臜结晶，室温振荡使结晶充分溶解。用酶标仪检测 490 nm 处各孔的吸光度（A）值，实验重复 3 次。计算胃癌 MGC803 细胞的存活率。

细胞存活率 $=A_{实验}/A_{对照}$

2.9 化合物对 MGC803 细胞相关基因表达的影响

将 MGC803 细胞（每孔 2×10^5 个细胞）置于 6 孔板中，分别加入 10 μmol·L^{-1} 的黄瑞香活性化合物（构树黄酮醇 F、daphnegiravone D、daphgiflavone C），48 h 后弃去上清，使用 Trizol 试剂提取总 RNA，使用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit 试剂盒进行 cDNA 的合成。随后，对合成的 cDNA 进行扩增。使用的引物如表 1 所示。实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）的结果用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示基因表达的相对倍数。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of qRT-PCR

基因	引物序列（5’→3’）
EGFR	正向5’-ACCCATATGTACCATCGATGTC-3’
	反向5’-GAATTCGATGATCAACTCACGG-3’
PI3K	正向5’-GAGATTGCAAGCAGTGATAGTG-3’
	反向5’-TAATTTTGGCAGTGATTGTGGG-3’
Akt	正向5’-GAAGCAGGAGGAGGAGGAGATGG-3’
	反向5’-AGGTACTCAAACTCGTTCATGGTCAC-3’
GAPDH	正向5’-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3’
	反向5’-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3’

2.10 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件对实验数据进行处理，所有实验至少独立重复操作 3 次，实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两独立样本之间进行比较，采用 t 检验及单因素方差分析（ANOVA）进行统计学分析。$P<0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 黄瑞香化学成分靶点筛选

通过 TCMSP 数据库以及课题组前期的研究，筛选得到黄瑞香的 70 个活性成分。通过 Swiss Target Prediction 数据库和 PharmMapper 数据库预测筛选其潜

在靶点，根据阈值进行筛选，共得到929个靶点。

3.2 黄瑞香化学成分-靶点网络分析

为进一步了解化合物与其靶点之间的关系，使用Cytoscape软件建立化合物-靶点网络图（图1）。在化合物-靶点网络中，共包含944个节点和7 169条边，体现了黄瑞香多成分、多靶点的特点（表2）。

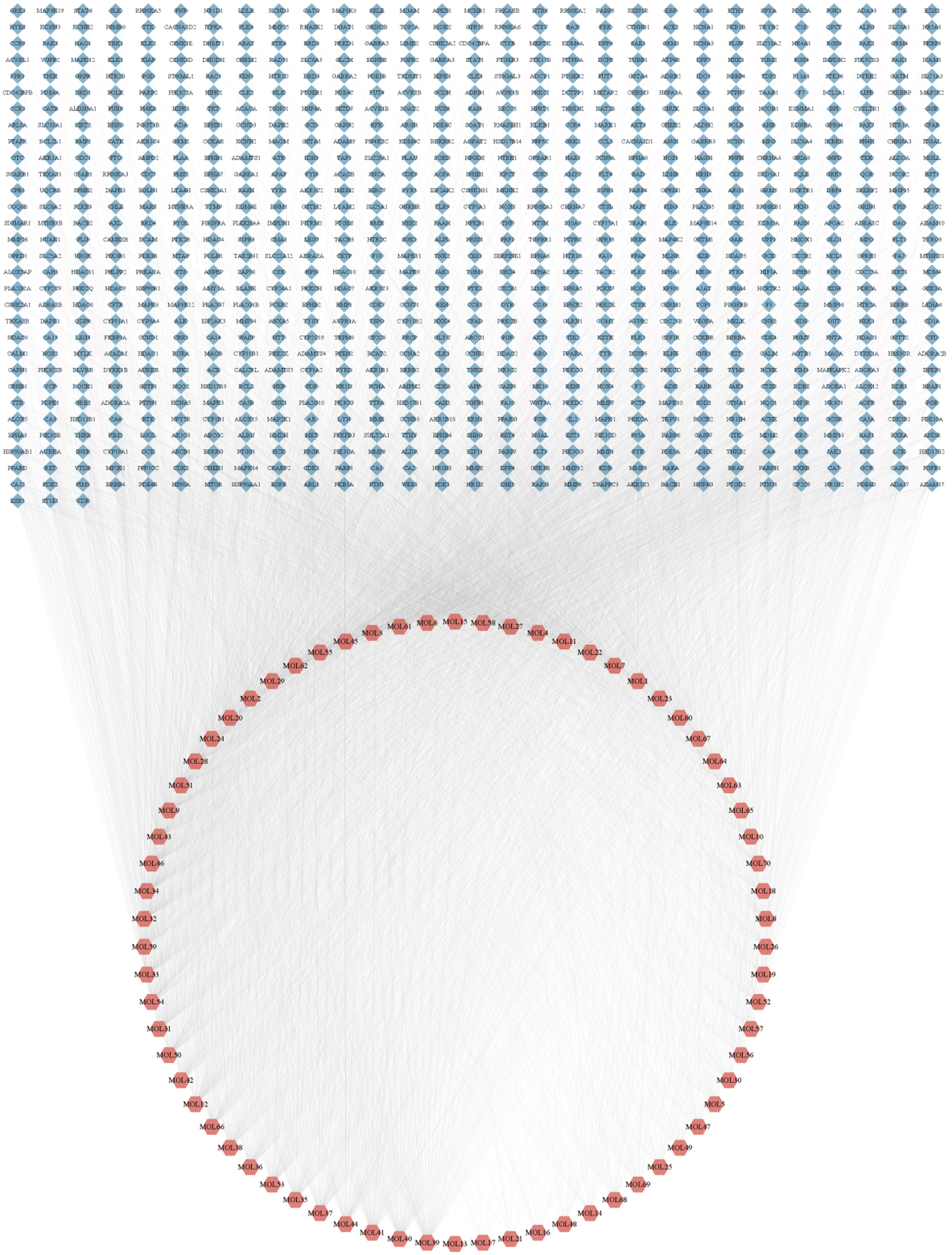


图1 黄瑞香成分-靶点网络

Fig. 1 Compound-target network of *Daphne giraldii*

表2 黄瑞香化学成分及度值

Table 2 Chemical constituents of *D. giraldii* and degree value

编号	成分	度值
MOL 39	daphnegiralin C_1	151
MOL 37	broussoflavonol F	150
MOL 44	daphnegiranin A	150
MOL 40	daphnegiralin C_2	150
MOL 36	daphnegiralin B_2	149
MOL 41	daphnegiralin E	150
MOL 35	daphnegiravone D	149
MOL 53	daphnegiravan C	149
MOL 38	daphnegiralin B_4	148
MOL 12	(2*S*)-daphnegiranol B	146
MOL 66	luvangetin	146
MOL 42	daphnegiralin F	145
MOL 50	daphnegiratin B	145
MOL 31	daphnegiralin A_1	144
MOL 54	daphnegiravan D	144
MOL 32	broussflavonol B	143
MOL 33	daphnegiralin A_3	143
MOL 34	daphnegiralin A_4	143
MOL 59	daphnegiravan M	143
MOL 46	daphnegiranol C_2	142
MOL 9	daphgiflvaone C	140
MOL 43	daphnegiralin G	140
MOL 28	broussonin A	138
MOL 51	daphnegiravan A	138
MOL 20	2',4'-dihydroxy-3-(4-methoxyphenyl)-propiophenone	133
MOL 24	5-methoxy- 2-[3-(4 methoxyphenyl) propyl] phenol	133
MOL 2	(-)-pinoresinol	132
MOL 29	broussonin B	131
MOL 62	daphnegiravone C	130
MOL 55	daphnegiravan E	129
MOL 3	(2*R*)-daphnegiranol A	128
MOL 45	daphnegiranol C_1	128
MOL 61	daphnegiravone B	125
MOL 6	(2*R*)-kazinol U	124
MOL 15	macarindicin E	123
MOL 58	daphnegiravan K	123
MOL 27	broussoflavonol B	122
MOL 4	(2*R*)-daphnegiranol B	119
MOL 11	(2*S*)-daphnegiranol A	119
MOL 1	5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-chromen-4-one	101
MOL 7	(2*S*)-4'-hydroxy-7-methoxyflavan	101
MOL 22	3,5,7,4-tetrahydroxyflavone	101
MOL 23	5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone	96
MOL 60	broussoflavonol B	91

续表2

编号	成分	度值
MOL 67	morusin	80
MOL 64	isolicoflavonol	76
MOL 63	daphnogirin B	72
MOL 65	eupatilin	71
MOL 10	(2*S*)-7-hydroxy-3',4'-dimethoxyflavan	67
MOL 70	umbelliferone	65
MOL 8	(2*S*)-7,3'-dimethoxy-4'-hydroxyflavan	61
MOL 18	1-(4'-hydroxy-2'-methoxyphenyl)-3-(3"-hydroxy-4"-methoxyphenyl) propane	61
MOL 26	8-hydroxyxanthyletin	59
MOL 19	1-(2'-hydroxy-4'-methoxyphenyl)-3-(4"-hydroxy-3"-methoxy-phenyl) propane	58
MOL 52	daphnegiravan B	54
MOL 57	daphnegiravan H	54
MOL 56	broussonol D	53
MOL 30	broussonin E	51
MOL 5	(2*R*)-kazinol B	50
MOL 47	acuminatin	49
MOL 25	7-demethylsuberosin	48
MOL 49	daphnegiratin A	48
MOL 69	salicifoliol	47
MOL 68	nodakenetin	45
MOL 14	(2*S*)-kazinol I	40
MOL 48	daphnegiranol D	32
MOL 16	(4*S*)-4-hydroxy-α- tetralone	21
MOL 21	3,4,5-trimethoxyphenol	17
MOL 17	(4*S*)-isosclerone	13
MOL 13	(2*S*)-kazinol B	2

3.3 疾病靶点的检索以及交集基因的分析

通过GeneCards数据库和DisGeNET数据库搜索分别得到胃癌相关靶点3 485个和301个。使用jvenn网站对成分相关靶点及疾病靶点进行分析，绘制韦恩图（图2），共得到42个交集靶点。

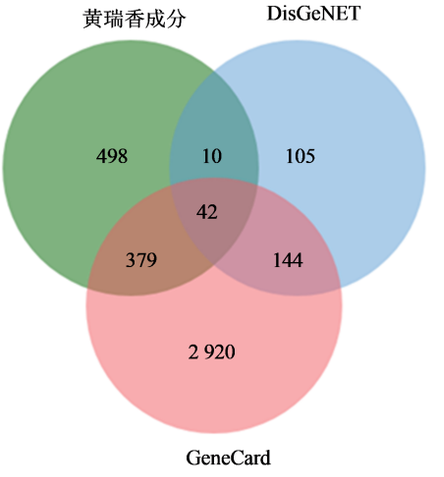


图2 黄瑞香化学成分与胃癌交集靶点

Fig. 2 Intersection targets of chemical components of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

3.4 交集基因的PPI网络分析

将42个交集靶点上传至STRING数据库进行分析，得到PPI网络。该网络包括32个节点以及128条边。这些靶点之间紧密连接，形成一个复杂的网络。利用Cytoscape软件构建网络图，如图3所示。结果发现，表皮生长因子受体（*EGFR*，degree＝23）、丝裂原活化蛋白激酶1（*MAPK1*，degree＝21）、丝裂原活化蛋白激酶3（*MAPK3*，degree＝20）、肿瘤坏死因子（*TNF*，degree＝18）、丝裂原激活蛋白激酶8（*MAPK8*，degree＝15）、人环加氧酶2（*PTGS2*，degree＝15）、酪氨酸激酶受体2（*ERBB2*，degree＝13）、磷脂酰肌醇（*PIK3CA*，degree＝12）等基因具有较高的度值，表明这些基因靶点可能在黄瑞香抗胃癌中发挥重要作用。

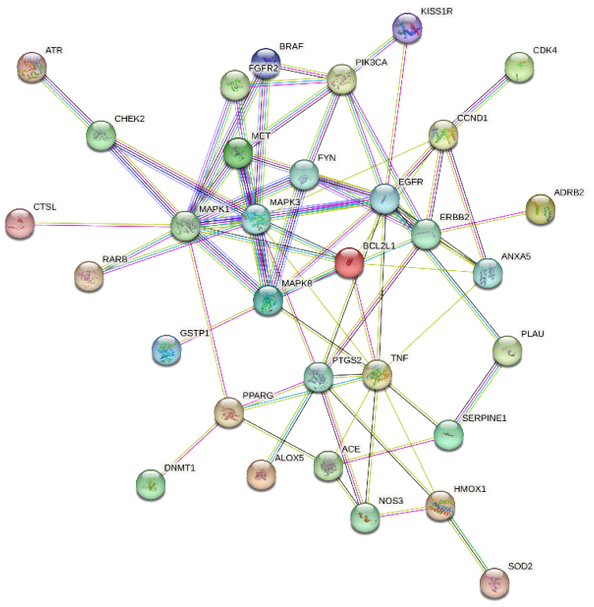


图 3　黄瑞香治疗胃癌交集靶点的 PPI 网络

Fig. 3　PPI network of intersection targets of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

3.5　交集靶点的 GO 分析

将交集靶点导入到 Metascap 数据库进行 GO 以及 KEGG 富集分析，并将其分析数据结果按照 *P* 值进行排序，并用 Image GP 作图。结果表明，这些潜在靶点的功能与多种 BP、CC、MF 有关。

在 GO-BP 方面（图 4），共富集到 650 个 BP。用气泡图富集最为显著的前 20 个 BP，其主要包括脂多糖反应、细胞应激反应、蛋白质磷酸化的正调控、细胞对化学应激的反应、细胞对有机氮化合物的反应以及氧化应激等过程。表明黄瑞香的活性化合物可能通过调节多种生物途径发挥治疗胃癌的作用。

在 GO-CC 方面，共富集到 35 个与 CC 相关的条目。按 $P<0.01$ 选取前 20 个条目进行分析。如图 5 所示，靶点主要富集在膜筏、膜微区、受体复合体、核被膜以及核膜等 CC 中。

在 GO-MF 方面，共富集到与 MF 相关的 37 个条目。按 $P<0.01$ 选取前 20 个条目进行分析。图 6 的气泡图表明，交集靶点主要富集在蛋白激酶活性、磷酸转移酶活性、氧化还原酶活性、激酶结合、跨膜受体蛋白酪氨酸激酶活性等 MF 中。

3.6　交集靶点的 KEGG 富集分析

利用 Metascape 对交集靶点进行 KEGG 富集分析，并利用微生信在线作图软件根据 *P* 值和富集的靶点数量构建排名靠前的 20 条通路的柱状图，如图 7 所示，主要包括癌症、胃癌、磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B（PI3K/Akt）以及丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）等信号通路。利用 Cytoscape 软件构建化合物-靶点-通路网络图（图 8）。通过该网络图，表皮生长因子受体（EGFR）、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（BRAF）、MAPK3、磷脂酰肌醇（PIK3CA）、甲硫氨酸（MET）等蓝色节点以及 daphnegiralin B2（MOL 36，degree＝10）、daphnegiralin A1（MOL

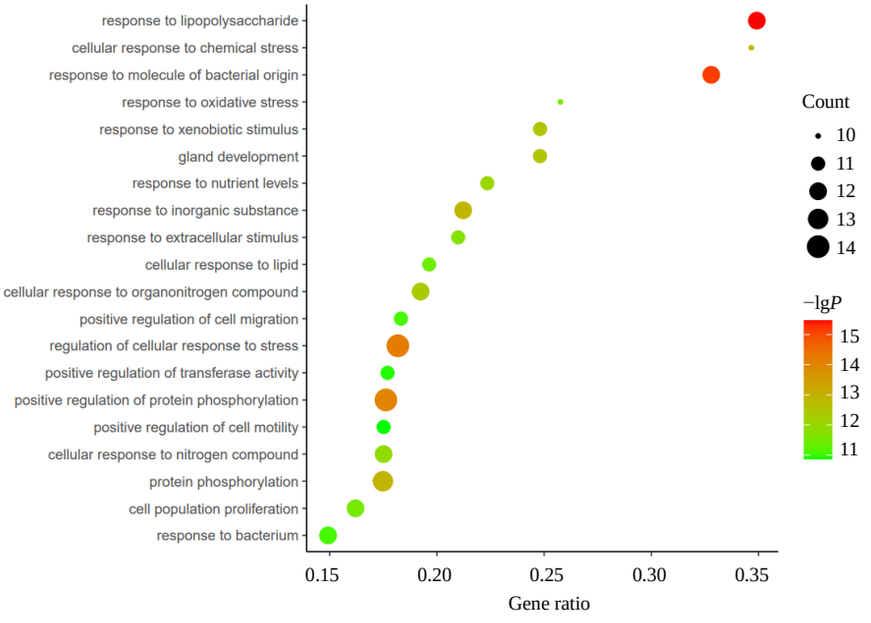


图 4　黄瑞香治疗胃癌交集靶点的 GO-BP 富集分析

Fig. 4　GO-BP enrichment analysis of intersection targets of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

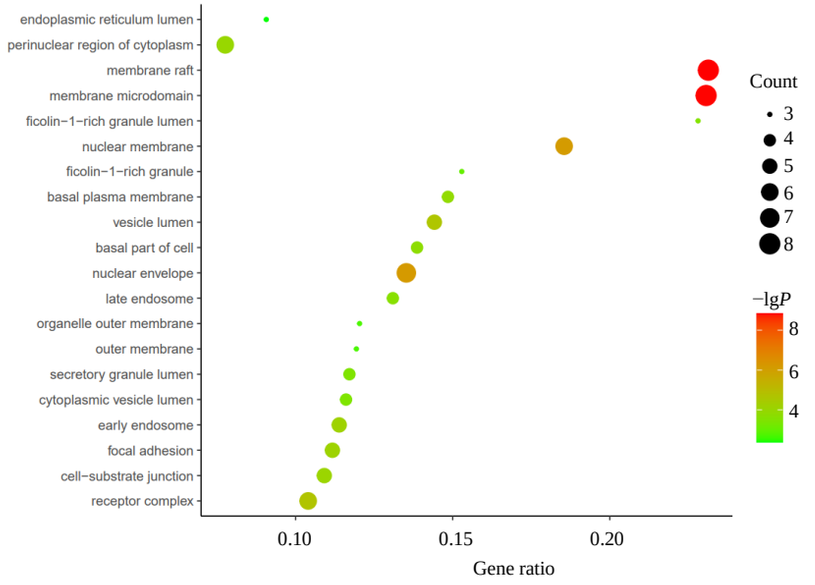


图5 黄瑞香治疗胃癌交集靶点的GO-CC富集分析

Fig. 5 GO-CC enrichment analysis of intersection targets of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

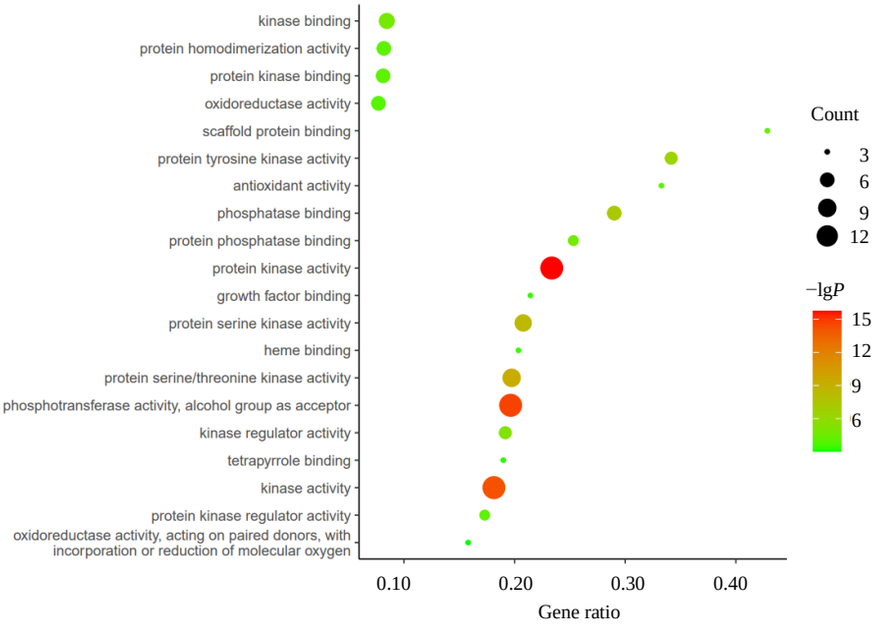


图6 黄瑞香治疗胃癌交集靶点的GO-MF富集分析

Fig. 6 CO-MF enrichment analysis of intersection targets of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

31，degree＝10）、daphnegiralin A_4（MOL 34，degree＝9）和 daohnegiravan E（MOL 55，degree＝8）等绿色节点（大部分为异戊烯基黄酮成分）可能为黄瑞香发挥抗胃癌作用的主要靶蛋白和成分。以上结果表明，黄瑞香中的同1个活性成分可能作用于多个靶点或通路，且同1个靶点也可能被多个活性成分影响，层层链接，形成多组分-多靶点-多途径的调控网络，从而发挥治疗胃癌的作用。

3.7 黄瑞香中的异戊烯基黄酮成分可能通过调控EGFR/PI3K/Akt通路抑制胃癌细胞的生长

3.7.1 部分化合物对胃癌MGC803细胞生长的影响 为进一步探讨黄瑞香发挥抗胃癌作用的主要成分，首先从课题组现有的前期从黄瑞香中分离得到的部分化合物构树黄酮醇F、daphnegiravone D、daphgiflavone C、broussoflavonol B、macarindicin E、daphnegiranol D、（2*S*）-kazinol B、isolicoflavonol、broussonol D进行活性筛选[12]。结果发现，在筛选

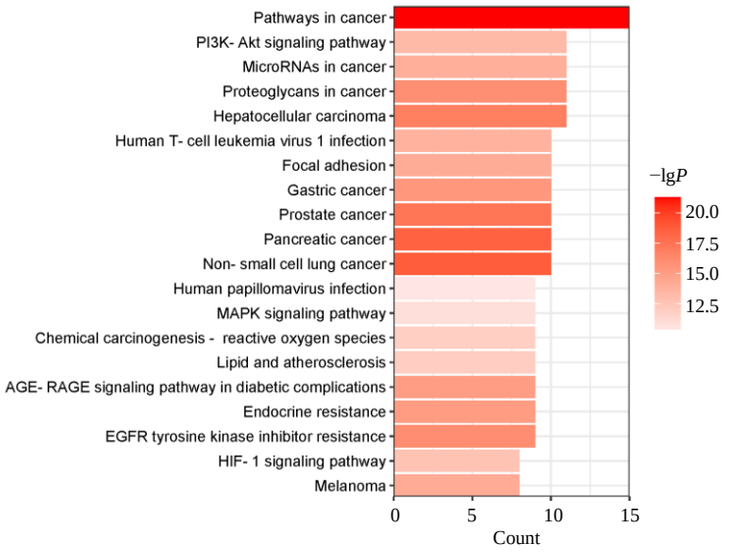


图 7 黄瑞香治疗胃癌交集靶点的 KEGG 通路富集分析

Fig. 7 KEGG pathway enrichment analysis of intersection targets of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

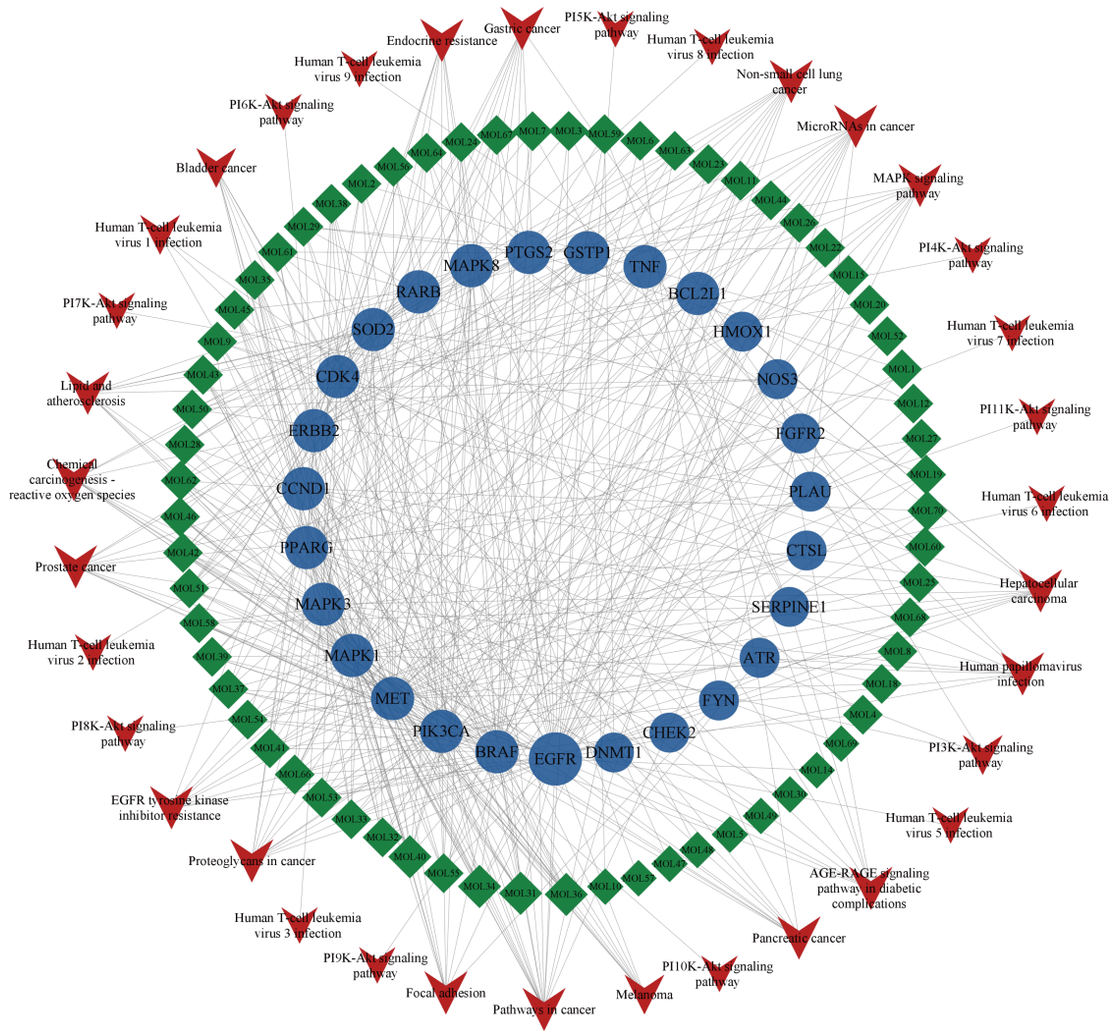


图 8 黄瑞香治疗胃癌成分-靶点-通路网络

Fig. 8 Compound-target-pathway network of *D. giraldii* in treatment of gastric cancer

的化合物中，构树黄酮醇F（MOL 37）、daphnegiravone D（MOL 35）、daphgiflavone C（MOL 9）具有较强的体外抑制胃癌细胞MGC803生长作用，且3种成分对胃癌MGC803细胞的生长抑制作用呈浓度相关性（图9）。其作用于胃癌MGC803细胞48 h的半数抑制浓度（IC_{50}）分别为（12.19±2.31）、（10.41±1.78）、（9.02±1.49）μmol·L^{-1}。而这3种化合物也在所构建的化学成分-靶点网络图中的排名较靠前，其度值分别为150、149、140。此外，在化学成分-靶点-通路网络图中，这3种化合物的度值同样比较高，分别为7、6、6。以上活性筛选结果，也说明了网络药理学预测的科学性，即活性较好的成分在网络的构建中具有较高的排名。

3.7.2 部分化合物对胃癌MGC803细胞*EGFR*、*PI3K*、*Akt*基因表达的影响 为初步考察黄瑞香活性成分抑制胃癌细胞的分子机制，采用qRT-PCR法检测网络药理学预测的可能其主要作用的基因*EGFR*、*PI3K*、*Akt*表达情况，由图10可知，与对照组比较，化合物构树黄酮醇、daphnegiravone D、daphgiflavone C（10 μmol·L^{-1}）均可显著抑制上述基因的表达（P＜0.05、0.01、0.001），验证了网络药理学预测结果。

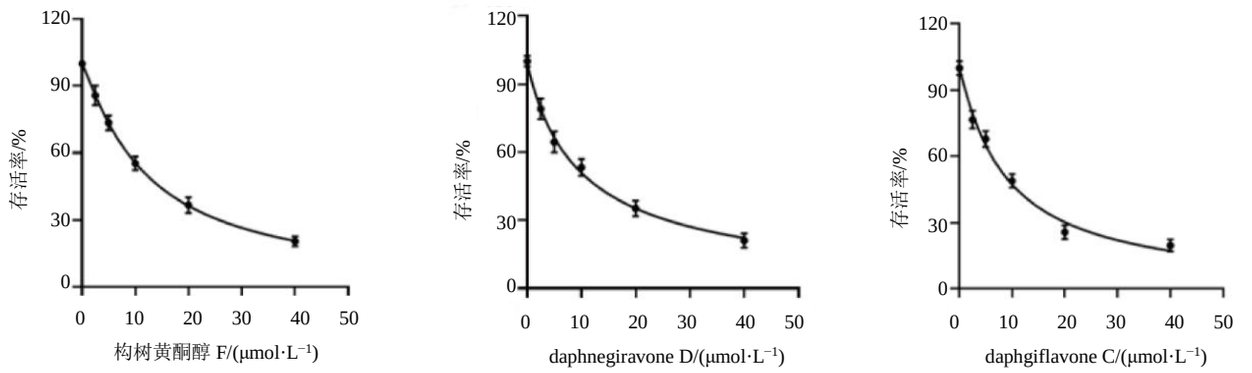
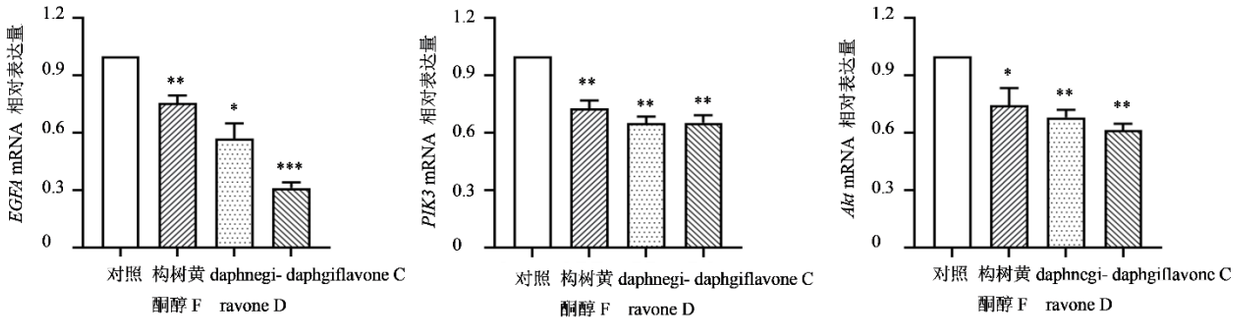


图9 黄瑞香中异戊烯基黄酮成分对MGC803细胞生长的抑制作用（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 9 Inhibition of prenylated flavones from *D. giraldii* on growth of MGC803 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）



与对照组比较：$^{*}P$＜0.05 $^{**}P$＜0.01 $^{***}P$＜0.001

$^{*}P$ < 0.05 $^{**}P$ < 0.01 $^{***}P$ < 0.001 *vs* control group

图10 黄瑞香中活性成分对胃癌细胞EGFR/PI3K/Akt通路中相关基因表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Fig. 10 Effect of active compounds from *D. giraldii* on gene expression of EGFR/PI3K/Akt pathway genes in MGC803 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

4 讨论

本研究基于网络药理学方法[18]对黄瑞香抗胃癌作用的潜在靶点及通路进行预测。化合物-靶点网络以及化合物-靶点-信号通路网络中，度值最高的成分大部分为异戊烯基黄酮类化合物。有研究表明，异戊烯基黄酮类化合物黄腐酚能够诱导胃癌细胞发生凋亡以及活性氧的累积从而抑制胃癌细胞AGS的增殖[19]。此外，Toume等[20]研究也表明，从面包树提取得到的异戊烯基黄酮类化合物artonin E能够通过诱导活性氧的产生和p53介导的DR5表达上调诱导胃腺癌细胞外源性凋亡。

本研究网络药理学预测研究中，通过对化合物-靶点-信号通路网络图以及PPI网络图分析，发现EGFR、PIK3CA等可能是黄瑞香活性成分主要的潜

在作用靶点。EGFR 是一种多功能受体跨膜糖蛋白，是生长因子受体酪氨酸激酶家族的成员，对于肿瘤细胞的增殖、迁移起到促进作用[21]。在胃癌组织中，EGFR 处于阳性表达且与预后恶化显著相关[22]。而基于 EGFR 的靶向治疗可通过阻断 EGFR 驱动的抗凋亡途径达到肿瘤特异性治疗效果[23]。研究表明，萘酰亚胺衍生物 NA20 可通过抑制 EGFR 引起细胞发生周期阻滞和细胞凋亡，从而抑制胃癌细胞的增殖[24]。从贝母中提取的天然活性成分贝母乙素可通过调节 EGFR 的表达从而提高胃癌细胞对化疗药物阿霉素的敏感性[25]。同时黄瑞香中的西瑞香素也能够抑制人 EGFR 酪氨酸特异性蛋白激酶活性[9]。PIK3CA 是 PI3K 家族成员。PIK3CA 的突变能够催化 PI3K，进而持续激活 PI3K/Akt 信号通路，从而参与多种肿瘤的发生发展过程[26]。而 KEGG 通路富集结果也表明黄瑞香发挥抗胃癌作用可能与 PI3K/Akt 信号通路有密切关系。已有研究表明，红树莓提取物能够通过阻碍 PI3K/Akt 信号通路抑制胃癌细胞 AGS 的增殖、迁移和侵袭[27]。黄瑞香中的瑞香素同样可以通过下调 Akt 通路以及 ERK1/2 通路显著抑制肿瘤坏死因子-α（TNF-α）和 VEGF 诱导的血管生成[28]。本研究体外细胞实验结果也证实了黄瑞香中的 3 种异戊烯基黄酮类化合物能够抑制 *EGFR*、*PI3K* 以及 *Akt* 基因的表达。此外，有实验表明，微小 RNA-4295 能够靶向 LRIG1 促进 EGFR/PI3K/Akt 信号通路的激活，从而促进胃癌细胞增殖。而 Du 等[29]的研究表明 3-甲基腺嘌呤可通过协同抑制 PI3K/Akt/FOXO3a 信号通路和 EGFR 表达促进埃索美拉唑的抗胃癌增殖活性。因此，推测黄瑞香可能通过调控 EGFR 的表达，影响 PI3K/Akt 信号通路，从而发挥治疗胃癌的作用。

结合本研究化合物-靶点-信号通路网络图以及 KEGG 通路分析结果，还发现丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（BRAF）、甲硫氨酸（MET）具有较高的度值，且 MAPK 信号通路也与黄瑞香发挥抗胃癌作用有一定关系。研究表明[30]，黄酮苷类化合物木犀草苷能够促进 MET 的泛素化和降解以及其蛋白水平从而发挥抑制胃癌细胞生长、迁移和侵袭作用。MAPK 信号通路由细胞外调节蛋白激酶 ERK、p38 MAPK 和 c-Jun 氨基末端激酶 JNK 组成[31]。研究表明，BRAF 作为丝裂原活化激酶 MAPK 通路的一部分，可增强胃癌细胞的增殖及侵袭能力[32]。从黄瑞香中提取分离得到的异戊烯基黄酮 daphnegiravone D 可通过调节 MAPK 信号通路抑制肝癌细胞的增殖[33]。曹少祥等[34]研究表明顺铂与尼美舒利能够阻断 p38 MAPK 信号通路，进而抑制人胃癌细胞 SGC7901 增殖。此外，研究表明阿法替尼能够抑制 EGFR 和下游 PI3K/Akt/mTOR 以及 MAPK 信号通路发挥抗胃癌的作用[35]。因此，推测黄瑞香中的化学成分可能以 EGFR 为主要靶点，影响下游 PI3K/Akt、MAPK 等信号通路发挥治疗胃癌的作用。后续可通过动物实验进一步验证黄瑞香抗肿瘤机制及其安全性。

本研究基于网络药理学预测以及初步的细胞实验验证，发现黄瑞香可能以异戊烯基黄酮为主要的抗胃癌活性成分，以 EGFR、BRAF、PIKC3A、MET 等蛋白为核心作用靶点，主要经 PI3K/Akt 以及 MAPK 等相关信号通路发挥治疗胃癌的作用。这不仅初步证明了网络药理学分析的合理性和科学性，也为进一步深入研究黄瑞香抗胃癌的作用机制提供了思路和方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Carcas L P. Gastric cancer review [J]. J Carcinog, 2014, 13: 14.

[2] 简丹丹, 吴清明, 龙辉. 胃癌可控危险因素 10 年研究进展 [J]. 临床消化病杂志, 2021, 33(5): 374-378.
Jian D D, Wu Q M, Long H. Research progress on controllable risk factors of gastric cancer in the past 10 years [J]. Chin J Clin Gastroenterol, 2021, 33(5): 374-378.

[3] 张志强. 基于转录组学芯片数据和网络药理学预测龙葵干预胃癌的活性成分和作用机制 [J]. 江西中医药大学学报, 2022, 34(1): 75-79, 124.
Zhang Z Q. Prediction of active components and mechanism of *Solanum nigrum* intervention in gastric cancer based on transcriptome microarray data and network pharmacology [J]. J Jiangxi Univ Chin Med, 2022, 34(1): 75-79, 124.

[4] Gakuhara A, Miyazaki Y, Takahashi T, et al. Laparoscopic total gastrectomy with pancreatosplenectomy after neoadjuvant chemotherapy for advanced gastric cancer with adjacent organs invasion [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2017, 44(12): 1805-1807.

[5] 蒋文仪, 包艺运, 都广礼. 网络中药药理学研究进展 [J]. 中医药信息, 2018, 35(5): 122-126.
Jiang W Y, Bao Y Y, Du G L. Research progress of network Chinese pharmacology [J]. Inf Tradit Chin Med, 2018, 35(5): 122-126.

[6] 郑媛, 范祥祯, 应智琦, 等. 活血化瘀中药在胃癌防治中

的研究进展 [J]. 临床医学研究与实践, 2021, 6(14): 192-194, 198.
Zheng Y, Fan X Z, Ying Z Q, et al. Research progress of traditional Chinese medicine for promoting blood circulation and removing blood stasis in prevention and treatment of gastric cancer [J]. Clin Res Pract, 2021, 6 (14): 192-194, 198.

[7] 武旭, 贺素容, 王晶, 等. 祖师麻治疗类风湿性关节炎的网络药理学研究 [J]. 中国药理学通报, 2021, 37(8): 1168-1175.
Wu X, He S R, Wang J, et al. Mechanism of Zushima in treating rheumatoid arthritis based on network pharmacology and molecular docking [J]. Chin Pharmacol Bull, 2021, 37(8): 1168-1175.

[8] 白玮, 张娇, 叶潇, 等. 祖师麻的研究进展 [J]. 现代中医药, 2017, 37(5): 113-116.
Bai W, Zhang J, Ye X, et al. Research progress of Zushima [J]. Mod Tradit Chin Med, 2017, 37(5): 113-116.

[9] Han S, Li L Z, Song S J. *Daphne giraldii* Nitsche (Thymelaeaceae): Phytochemistry, pharmacology and medicinal uses [J]. Phytochemistry, 2020, 171: 112231.

[10] 李雪梅, 吴坚, 徐文坚. 基于网络药理学的盐酸小檗碱治疗胃炎机制研究 [J]. 中国药业, 2020, 29(12): 9-17.
Li X M, Wu J, Xu W J. Mechanisms of berberine hydrochloride in the treatment of gastritis based on network pharmacology [J]. China Pharm, 2020, 29(12): 9-17.

[11] 王高举, 焦红军. 基于网络药理学和分子对接技术的热毒宁注射液抗SARS、MERS和COVID-19的潜在共性作用机制与活性成分研究 [J]. 药物评价研究, 2022, 45 (5): 842-852.
Wang G J, Jiao H J. Study on potential common action and mechanism of Reduning Injection against SARS, MERS and COVID-19 based on network pharmacology and molecular docking technology [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(5): 842-852.

[12] 邱爽. 黄瑞香化学成分及肝癌细胞抑制活性研究 [D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2022.
Qiu S. Studies on chemical constituents of *Daphne giraldii* and their inhibitory activity on hepatoma cells [D]. Shenyang: Shenyang Pharmaceutical University, 2022.

[13] 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.

[14] Yue S J, Liu J, Feng W W, et al. System pharmacology-based dissection of the synergistic mechanism of Huangqi and Huanglian for diabetes mellitus [J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 694.

[15] Fishilevich S, Nudel R, Rappaport N, et al. GeneHancer: Genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards [J]. Database , 2017, 2017: bax028.

[16] Bauer-Mehren A, Rautschka M, Sanz F, et al. DisGeNET: A Cytoscape plugin to visualize, integrate, search and analyze gene-disease networks [J]. Bioinformatics, 2010, 26(22): 2924-2926.

[17] Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks [J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498-2504.

[18] 牛明, 张斯琴, 张博, 等. «网络药理学评价方法指南»解读 [J]. 中草药, 2021, 52(14): 4119-4129.
Niu M, Zhang S Q, Zhang B, et al. Interpretation of Network Pharmacology Evaluation Method Guidance [J]. Chin Tradit Herb Drug, 2021, 52(14): 4119-4129.

[19] Wei S S, Sun T L, Du J, et al. Xanthohumol, a prenylated flavonoid from Hops, exerts anticancer effects against gastric cancer *in vitro* [J]. Oncol Rep, 2018, 40(6): 3213-3222.

[20] Toume K, Habu T, Arai M A, et al. Prenylated flavonoids and resveratrol derivatives isolated from *Artocarpus communis* with the ability to overcome TRAIL resistance [J]. J Nat Prod, 2015, 78(1): 103-110.

[21] Becker J C, Muller-Tidow C, Serve H, et al. Role of receptor tyrosine kinases in gastric cancer: New targets for a selective therapy [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(21): 3297-3305.

[22] Du F, Zheng Z X, Shi S S, et al. S-1 and cisplatin with or without nimotuzumab for patients with untreated unresectable or metastatic gastric cancer: A randomized, open-label phase 2 trial [J]. Medicine, 2015, 94(23): e958.

[23] Zhang G H, Cai L J, Wang Y F, et al. Novel compound PS-101 exhibits selective inhibition in non-small-cell lung cancer cell by blocking the EGFR-driven antiapoptotic pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86 (12): 1721-1730.

[24] Zhang G H, Li L P, Bi J G, et al. Targeting DNA and mutant p53 by a naphthalimide derivative, NA20, exhibits selective inhibition in gastric tumorigenesis by blocking mutant p53-EGFR signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 887: 173584.

[25] Tang Q Q, Wang Y F, Ma L J, et al. Peiminine serves as an adriamycin chemosensitizer in gastric cancer by modulating the EGFR/FAK pathway [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1299-1305.

[26] 杨斌, 郭江红, 白玮, 等. EB病毒相关性胃癌临床病理特征及磷脂酰肌醇3激酶α基因突变分析 [J]. 中国药物与临床, 2020, 20(12): 1921-1923.

Yang B, Guo J H, Bai W, et al. Clinicopathological characteristics and PIK3CA mutation in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer [J]. Chin Remed Clin, 2020, 20(12): 1921-1923.

[27] 杨学军, 全信保, 王强. 红树莓提取物通过 miR-194-5p/PI3K/AKT 信号通路抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭的分子机制研究 [J]. 河北医药, 2022, 44(12): 1790-1794.
Yang X J, Quan X B, Wang Q. Study on the molecular mechanism of red raspberry extract in inhibiting the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells through the miR-194-5p/PI3K/AKT signaling pathway [J]. Hebei Med J, 2022, 44(12): 1790-1794.

[28] Kumar A. Daphnetin ameliorates 7, 12-dimethylbenz[a] anthracene-induced mammary carcinogenesis through nrf-2-Keap1 and NF-κB pathways [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 82: 439-448.

[29] Du J F, Xu Q, Zhao H, et al. PI3K inhibitor 3-MA promotes the antiproliferative activity of esomeprazole in gastric cancer cells by downregulating EGFR via the PI3K/FOXO3a pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 148: 112665.

[30] Ji J L, Wang Z Z, Sun W, et al. Effects of cynaroside on cell proliferation, apoptosis, migration and invasion though the MET/AKT/mTOR axis in gastric cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12125.

[31] 左铮云, 黄艳美, 崔言坤, 等. 附子理中丸通过调节 MAPK 信号通路改善顺铂诱导 CIPN 模型小鼠损伤的作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 1-7.
Zuo Z Y, Huang Y M, Cui Y K, et al. Mechanism of Fuzi Lizhongwan improving injury in cisplatin-induced CIPN mice by regulating MAPK signaling pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(5): 1-7.

[32] 付浩. B-RAF 基因及 MAPK 信号转导通路和胃癌相关性及其机制的研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2007.
Fu H. Relationship between B-*RAF* gene and *MAPK* signal transduction pathway and gastric cancer and study of mechanism [D]. Shenyang: China Medical University, 2007.

[33] Wang D, Sun Q, Wu J, et al. A new prenylated flavonoid induces G_0/G_1 arrest and apoptosis through p38/JNK MAPK pathways in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5736.

[34] 曹少祥, 李华顺, 谭海洋, 等. p38MAPK 信号转导通路在 COX-2 抑制剂联合顺铂诱导人胃癌 SGC7901 细胞凋亡中的作用机制 [J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(9): 12-17, 21.
Cao S X, Li H S, Tan H Y, et al. Action mechanism of p38MAPK signal transduction pathway on apoptosis of human gastric cancer SGC7901 cells induced by COX-2 inhibitor combined with cisplatin [J]. Med Pharm J Chin PLA, 2019, 31(9): 12-17, 21.

[35] Chen Z H, Liu Z T, Zhang M Q, et al. EPHA2 blockade reverses acquired resistance to afatinib induced by EPHA2-mediated MAPK pathway activation in gastric cancer cells and avatar mice [J]. Int J Cancer, 2019, 145 (9): 2440-2449.

[责任编辑 刘东博]