

基于网络药理学白花蛇舌草治疗胰腺神经内分泌肿瘤作用机制探讨及体外实验验证

田超¹, 郭懿莹², 胡少博¹, 程梓轩¹, 谭煌英^{3*}

1. 北京中医药大学 研究生院, 北京 100029

2. 中国医学科学院 北京协和医学院 研究生院, 北京 100730

3. 中日友好医院 中西医结合肿瘤内科, 北京 100029

摘要: **目的** 采用网络药理学方法探讨白花蛇舌草治疗分化良好的胰腺神经内分泌肿瘤(pNET)的作用机制, 并通过体外细胞实验进行验证。**方法** 应用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)获取白花蛇舌草的活性成分和作用靶点, 通过GEO、GeneCards、OMIM、PharmGkb、Drugbank数据库获取pNET的疾病相关靶点, 通过R软件对共同靶点进行基因本体(GO)和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。以CCK-8法和Western blotting体外实验观察白花蛇舌草提取物对人胰腺神经内分泌肿瘤BON-1、QGP-1细胞的增殖抑制作用及对细胞凋亡相关蛋白Bcl-2表达的影响。**结果** 筛选得到白花蛇舌草活性成分7个, 成分相关靶点158个; 获得pNET疾病相关靶点2 870个, 成分与疾病共同相关靶点119个。共同靶点的GO功能富集分析共得到2 099个条目, KEGG富集分析共得到162条信号通路, 包括细胞凋亡、PI3K/Akt、P53等信号通路。不同质量浓度[0(对照)、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 mg·mL⁻¹]白花蛇舌草提取物干预BON-1、QGP-1细胞48 h后, 细胞增殖明显受到抑制, 且抑制作用具有明显的浓度相关性。与对照组比较, 随着白花蛇舌草提取物质量浓度增加, BON-1、QGP-1细胞的增殖受到明显抑制, 漂浮死亡细胞数增加; 与对照组比较, 高质量浓度白花蛇舌草提取物可显著降低BON-1、QGP-1细胞Bcl-2蛋白表达($P < 0.05$)。**结论** 白花蛇舌草提取物能够有效抑制人胰腺神经内分泌肿瘤BON-1、QGP-1细胞增殖, 通过抑制Bcl-2蛋白表达促进细胞凋亡; 白花蛇舌草能够通过多成分、多靶点、多通路的途径治疗胰腺神经内分泌肿瘤。

关键词: 白花蛇舌草; 胰腺神经内分泌肿瘤; BON-1细胞; QGP-1细胞; 网络药理学; 凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2023)07-1452-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.07.008

Mechanism of *Hedyotis diffusa* in treatment of pancreatic neuroendocrine tumor based on network pharmacology and *in vitro* experimental verification

TIAN Chao¹, GUO Yiyang², HU Shaobo¹, CHENG Zixuan¹, TAN Huangying³

1. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

3. Department of Integrative Oncology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of *Hedyotis diffusa* in treatment of well differentiated pancreatic neuroendocrine tumor (pNET) via network pharmacology and *in vitro* cytologic experiments. **Methods** The active constituents of *H. diffusa* and drug targets were obtained from the Traditional Chinese Medicine System Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP), and the disease-related targets of pNET were retrieved from GEO, GeneCards, OMIM, PharmGkb, and Drugbank databases. Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis for common targets of drugs and disease was performed using the R software. CCK-8 assay were used to verify the inhibition of *H. diffusa* extract on proliferation of human pancreatic neuroendocrine tumor of BON-1 and QGP-1 cells and apoptosis related proteins of the influence of the Bcl-2 expression. Western blotting was used to observe effect of *H. diffusa* extract on apoptosis of BON-1 and QGP-1 cells. **Results** A

收稿日期: 2023-03-03

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFB1309704)

第一作者: 田超(1994—),男,在读博士研究生,研究方向为中西医结合诊治神经内分泌肿瘤。E-mail:tianchao9455@163.com

*通信作者: 谭煌英(1965—),女,主任医师,教授,博士生导师,研究方向为中西医结合诊治神经内分泌肿瘤。E-mail:tanhuangying@263.net

total of 158 drug targets of seven active ingredients of *H. diffusa*, and 2 870 disease-related targets related to pNET were obtained resulting in 119 common targets. A total of 2 099 items were obtained by GO functional enrichment analysis. A total of 162 signaling pathways were obtained by KEGG enrichment analysis, including apoptosis, PI3K-Akt, and P53 signaling pathways, etc ($P < 0.05$). CCK-8 assay showed that the extract of *H. diffusa* had a concentration-dependent inhibitory effect on proliferation of BON-1 and QGP-1 cells. Western blotting showed that the protein expression of Bcl-2 in the high-concentration extract of *H. diffusa* group was significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** The extract of *H. diffusa* can effectively inhibit the proliferation of human pancreatic neuroendocrine tumors of BON-1 and QGP-1 cells and promote apoptosis by inhibiting the expression of Bcl-2 protein. *H. diffusa* can treat pancreatic neuroendocrine tumors through multi-component, multi-target and multi-pathway approaches.

Key words: *Hedyotis diffusa* Willd.; pancreatic neuroendocrine tumor; BON-1 cells; QGP-1 cells; network-pharmacology; apoptosis

胰腺神经内分泌肿瘤(pNEN)是起源于胰腺内分泌细胞的恶性肿瘤,胰腺神经内分泌肿瘤可分为分化差的胰腺神经内分泌癌(pNEC)与分化良好的胰腺神经内分泌肿瘤(pNET)。根据美国最新SEER数据报道,pNEN发病率从1973年的每10万人0.16例,增加到2012年的每10人0.82例^[1]。我国由于全国性神经内分泌肿瘤登记系统尚不完善,暂无pNEN的大型流行病学数据。尽管现阶段对于pNET的诊治可以使众多患者获益,但也存在一定的局限性,如耐药性、不良反应等^[2]。发现新的药物及治疗手段,对于pNET的治疗非常重要。

中医药在治疗肿瘤方面有着丰富的临床经验和大量有效药物。白花蛇舌草其味微苦、甘,性寒,归胃、大肠、小肠经,具有清热解毒、利湿通淋的功效^[3]。白花蛇舌草具有多种有效成分,可以治疗消化系统肿瘤、肺癌、前列腺癌及宫颈癌等多种肿瘤,具有抑制血管生成、抑制增殖、促进凋亡等抗肿瘤作用^[4-6]。“态靶辨治医学”是全小林院士提出的现代中医学理论实践体系的重构,强调宏观调态与微观打靶相结合的“态靶结合”模式,针对病靶选择有特定疗效的靶方靶药,往往可以取得更好的疗效^[7-8]。谭煌英主任医师在临床中使用白花蛇舌草作为针对病靶pNET的最常用中药,如自拟方“芪贞抑瘤方”中白花蛇舌草就是作为病靶的靶药,使患者获益明显^[9]。白花蛇舌草治疗pNET的分子机制研究目前未见报道。故笔者以网络药理学为导向,结合体外实验阐释白花蛇舌草治疗pNET的作用机制,为白花蛇舌草治疗pNET提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 白花蛇舌草活性成分及靶点获取 以“白花蛇舌草”为检索词,在中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP, <https://tcmsp-e.com/tcmsp.php>)^[10]检索其所含化学成分,以类药性(DL)≥0.18和口服生物利用度(OB)≥30%为条件筛选白花蛇舌草活

性成分,并获取所有作用靶点。应用 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)^[11]下载人类相关蛋白及对应基因,利用 Perl 脚本得到靶点对应的人类基因靶点名称。

1.1.2 pNET 疾病相关靶点获取 通过 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)^[12]以“pancreatic neuroendocrine tumor”为检索词,获得基因芯片 GSE73338,利用 R 软件进行差异分析,以 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1.5$ 为截断值筛选出差异基因。以“pancreatic neuroendocrine tumor”为关键词在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)^[13]、OMIM 数据库(<https://www.omim.org/>)^[14]、PharmGkb 数据库(<https://www.pharmgkb.org/>)^[15]和 Drugbank 数据库(<https://go.drugbank.com/>)^[16]分别查找 pNET 相关潜在靶点,通过 UniProt 数据库对得到的疾病靶点名称进行规范化处理。去除重复基因,建立 pNET 靶点数据库。

1.1.3 白花蛇舌草-pNET 共同靶点筛选 应用 R 4.1.2 软件将白花蛇舌草活性成分靶点与 pNET 相关靶点取交集,得到白花蛇舌草活性成分-pNET 共同靶点基因。

1.1.4 “白花蛇舌草活性成分-pNET 靶点”网络构建 将白花蛇舌草活性成分及 pNET 对应的疾病靶点导入 Cytoscape 3.9.0 软件,构建“白花蛇舌草活性成分-pNET 疾病靶点”网络。在网络图中,节点代表白花蛇舌草活性成分和 pNET 疾病靶点,边分别代表白花蛇舌草活性成分与 pNET 靶点之间的相互关系。节点的度值代表网络中节点与节点相连的数目,度值越大,越有可能成为白花蛇舌草活性成分作用于 pNET 的关键作用靶点。

1.1.5 蛋白质相互作用(PPI)网络的构建与分析 通过 STRING 11.5 数据库(<https://cn.string-db.org/>)^[17],导入白花蛇舌草活性成分与 pNET 所对应的共同基因靶点,设置物种为“Homo Sapiens”,最小互相作用分数设定为“highest confidence(0.9)”,其

余设置均为默认设置,构建PPI网络图,然后将网络图以tsv式下载保存,最后导入Cytoscape 3.9.0^[18]软件中构建PPI网络。使用CytoNCA插件对相应靶点进行centralities(BC)、closeness(CC)、degree(DC)、eigenvector(EC)、local average connectivity-based method(LAC)、network(NC)参数分析,利用R 4.1.2软件找出参数均大于中位值的关键靶点,并从关键靶点中筛选出活性成分和pNET直接相关的靶点作为核心靶点。

1.1.6 白花蛇舌草-pNET靶点基因本体(GO)注释及京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析 使用R 4.1.2进行GO和KEGG分析, $P<0.05$ 和 $q<0.05$ 认为具有显著性差异,构建可视化图形。

1.2 体外细胞实验

1.2.1 细胞 人源胰腺神经内分泌肿瘤细胞系BON-1由英国的Martyn Caplin教授惠赠,人源胰腺神经内分泌肿瘤细胞系QGP-1购自中国南京科佰生物科技有限公司。

1.2.2 试剂与药物制备 DMEM/F-12培养基、RPMI 1640培养基、0.25%胰酶(含EDTA)、特级胎牛血清、青霉素-链霉素($10\,000\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$)(Gibco公司,货号分别为C11330500BT、C11875500BT、25200056、16000044、15140122);CCK-8试剂(白鲨生物科技有限公司,货号为BS350B);RIPA裂解液、蛋白酶抑制剂混合物、蛋白磷酸酶抑制剂、BCA蛋白定量试剂盒(普利莱基因技术有限公司,货号分别为C1053、P1265、P1260、P1511);一抗:BCL-2(Abcam公司,货号为ab32124); β -actin(北京中杉金桥生物技术有限公司,货号TA-O9);山羊抗小鼠与山羊抗兔IgG(Cell Signaling Technology公司,货号分别为5257p、5151)。

白花蛇舌草购自中日友好医院中药房,由中日友好医院药学部主管药师王巍鉴定为茜草科植物白花蛇舌草*Hedyotis diffusa* Willd.的带根全草。取白花蛇舌草饮片300 g,使用纯净水3 000 mL浸泡30 min,大火烧开后转小火煎煮60 min,纱布滤过中药残渣,分别用纯净水3 000 mL煎煮残渣2次,将3次滤液混匀后分装到无菌瓶内,每瓶3 mL,冷冻干燥机提取冻干粉,将提取出的冻干粉分装于离心管中保存,共提取出冻干粉25.85 g,提取率为8.62%。用DMEM/F-12培养基和RPMI 1640培养基分别将冻干粉配成 $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 原液,备用。

1.2.3 CCK-8实验 分别使用DMEM/F-12、RPMI 1640完全培养基(含10%胎牛血清,1%的青霉素-

链霉素的双抗)培养BON-1、QGP-1细胞,取处于对数生长期的BON-1、QGP-1细胞,96孔板每孔分别接种5 000个细胞,即每孔加入100 μL 细胞悬液,培养12 h后,吸弃96孔板内的培养基,加入不同质量浓度[0(对照)、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$]培养基稀释的白花蛇舌草提取物100 μL ,同时设不加细胞(只含培养基)的空白组,每组设置6个复孔,给药48 h后,吸弃培养基。用培养基配制10%的CCK-8溶液,每孔加入110 μL ,放入孵箱中孵育2 h。使用Multiskan FC酶标仪(Thermo Fisher Scientific公司)测定各孔溶液在波长450 nm处的吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。最终结果采用GraphPad软件进行图形绘制。

$$\text{增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{给药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.4 Western blotting法检测BON-1、QGP-1细胞Bcl-2蛋白表达 取对数生长期的BON-1、QGP-1细胞,6 cm培养皿,每皿种植 8×10^5 个细胞,培养12 h后,分为对照组及白花蛇舌草提取物低、中、高质量浓度(BON-1细胞:1.3、1.8、2.3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,QGP-1细胞:1.6、2.1、2.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,分别加药干预48 h后,使用显微镜观察并拍照保存细胞状态。提取蛋白,BCA法测定蛋白质量浓度,调整质量浓度为2 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,每皿取出15 μL 样本,进行电泳。在恒流280 mA、100 min转膜至PVDF膜,用5%脱脂奶粉封闭1 h后,分别加入Bcl-2(1:1 000)、 β -actin抗体(1:2 000),4℃过夜,TBST洗涤3次,每次5 min。加入对应二抗(1:10 000),室温摇床孵育1 h,TBST洗涤3次,每次5 min。使用Odyssey Sa凝胶成像仪进行扫描。Image J分析各组相对蛋白表达差异。

1.2.5 统计学方法 定量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,符合正态分布且方差齐,两组间的数据比较采用独立样本 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析;不符合正态分布或方差不齐的数据,两组间的数据比较采用Mann-Whitney U检验,多组间比较则使用Kruskal-Wallis秩和检验, $P<0.05$ 认为具有统计学差异。使用SPSS 23.0统计软件进行数据分析,GraphPad Prism 9.0.0进行作图。

2 结果

2.1 网络药理学分析结果

2.1.1 白花蛇舌草活性成分和潜在靶点 通过数据库获得白花蛇舌草活性成分7个(表1)。去除重复靶点,得出潜在作用靶点158个。

2.1.2 pNET疾病相关靶点 以 $P<0.05$ 且 $|\log_2\text{FC}|\geq 1.5$ 为截断值,与正常组织相比,从数据集GSE73338

表1 白花蛇舌草活性成分信息

Table 1 Information of active components from *Hedyotis diffusa*

编号	成分名称	分子式	OB/%	DL	靶点数量
MOL001646	2,3-二甲氧基-6-甲基吡啶(2,3-dimethoxy-6-methyanthraquinone)	NA	34.86	0.26	0
MOL001659	poriferasterol	C ₂₉ H ₄₈ O	48.83	0.76	2
MOL001663	(4a <i>S</i> , 6a <i>R</i> , 6a <i>S</i> , 6b <i>R</i> , 8a <i>R</i> , 10 <i>R</i> , 12a <i>R</i> , 14b <i>S</i>)-10-hydroxy-2,2,6a,6b,9,9,12a-heptamethyl-1,3,4,5,6,6a,7,8,8a,10,11,12,13,14b-tetradecahydronicene-4a-carboxylic acid	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	32.03	0.76	0
MOL001670	2-甲氧基-3-甲基蒽醌(2-methoxy-3-methyl-9,10-anthraquinone)	C ₁₆ H ₁₂ O ₃	37.83	0.21	26
MOL000449	豆甾醇(stigmasterol)	C ₂₉ H ₄₈ O	43.83	0.76	27
MOL000358	β -谷甾醇(beta-sitosterol)	C ₂₉ H ₅₀ O	36.91	0.75	29
MOL000098	槲皮素(quercetin)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	46.43	0.28	131

中共筛选出pNET差异基因522个,其中上调318个,下调204个。GeneCards数据库获得pNET疾病相关靶点基因2 334个、OMIM数据库285个、PharmGkb数据库122个和Drugbank数据库34个。将GEO数据库获得差异基因及GeneCards等4个数据库获得的靶点基因合并去重后共得到pNET疾病相关靶点基因2 870个(图1)。

2.1.3 白花蛇舌草-pNET的共同靶点 共检索白花蛇舌草活性成分靶点158个,pNET疾病相关靶点2 870个,其中白花蛇舌草-pNET共同交互靶点119个(图2)。

2.1.4 “白花蛇舌草活性成分-pNET靶点”网络 将根据交集靶点筛选出的5个白花蛇舌草活性成分与pNET相关的119个靶点导入Cytoscape 3.9.0软件,

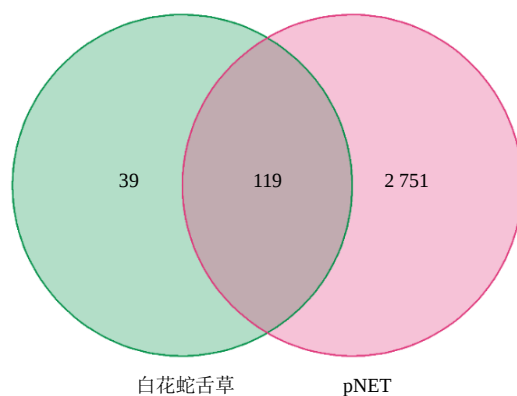


图2 白花蛇舌草活性成分-pNET共同靶点

Fig. 2 Common targets of active components from *H. diffusa*-pNET

构建白花蛇舌草活性成分-pNET靶点可视化网络(图3)。

2.1.5 PPI网络及核心靶点 将119个白花蛇舌草-pNET交集基因靶点上传至String 11.5数据库,得到靶点PPI网络,经筛选后导入Cytoscape 3.9.0软件中,使用CytoNCA插件对相应靶点进行参数分析,利用R 4.1.2软件找出各参数值均大于中位值的关键靶点,经过筛选,最后得出13个白花蛇舌草-pNET共同核心靶点:AKT1、HSP90AA1、RB1、CDKN1A、CCND1、FOS、RELA、ESR1、MAPK1、JUN、TP53、MYC、HIF1A(图4)。

2.1.6 GO和KEGG富集分析 GO富集分析共得到2 099个条目,其中生物学过程(BP)、细胞组成(CC)、分子功能(MF)的前10条条目见图5。BP主要富集在对外来刺激的反应、金属离子响应、对脂多糖的反应等。CC主要富集在膜筏、膜微结构域、质膜筏等。MF主要富集在DNA-结合转录因子结合、RNA聚合酶II-特异性DNA-结合转录因子结

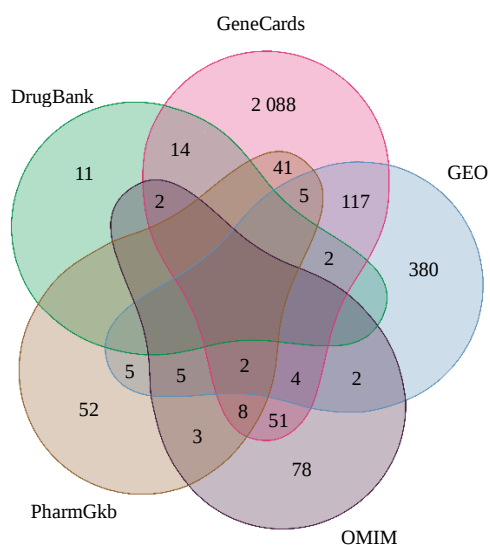


图1 各数据库获得的pNET疾病相关靶点基因

Fig. 1 Disease related target genes of pNET in each data-bases

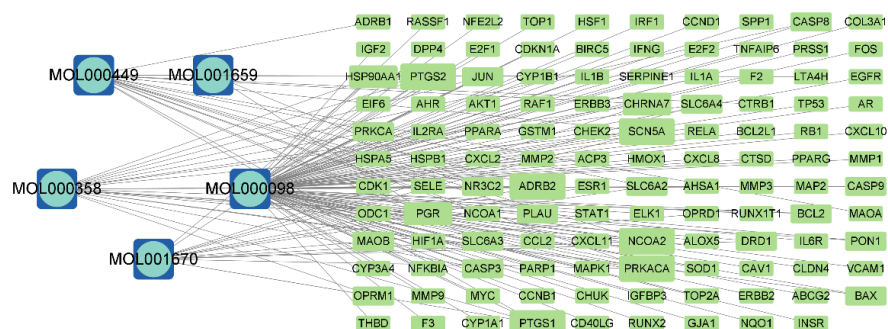


图3 白花蛇舌草活性成分与pNET靶点互作网络

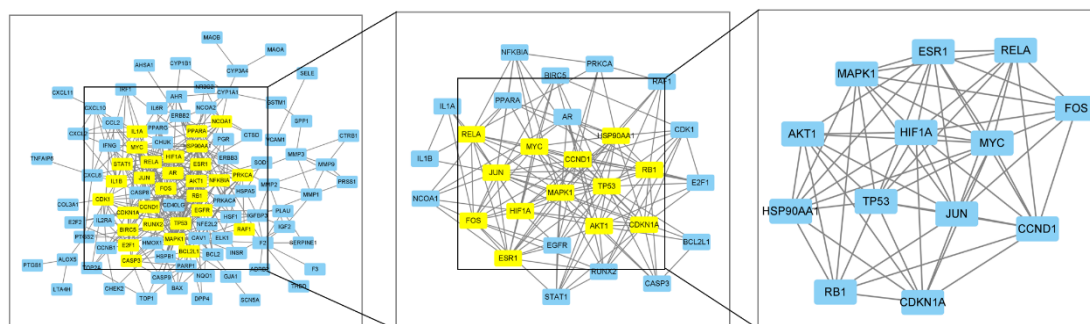
Fig. 3 Interaction network between active constituents of *H. diffusa* and pNET targets

图4 白花蛇舌草与pNET核心靶点网络筛选

Fig. 4 Screening of core target network of *H. diffusa* and pNET

合、泛素样-蛋白连接酶结合等。

对白花蛇舌草-pNET共同靶点进行KEGG富集分析,共得到162条信号通路,前30条通路进行可视化处理,见图6。共同靶点涉及的信号通路包括凋亡、PI3K-Akt信号通路、P53等,后续体外实验对凋亡通路关键蛋白Bcl-2进行实验验证。

2.2 细胞实验验证结果

2.2.1 白花蛇舌草提取物对BON-1、QGP-1细胞增殖的影响 给药48 h后,随着白花蛇舌草提取物质量浓度逐渐增加,其对BON-1、QGP-1细胞的增殖抑制作用逐渐增强,见图7。统计结果显示白花蛇舌草提取物干预BON-1细胞48 h的半数抑制浓度(IC_{50})为 $1.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{25} 为 $1.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{75} 为 $2.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;白花蛇舌草提取物干预QGP-1细胞48 h的 IC_{50} 、 IC_{25} 、 IC_{75} 分别为 2.1 、 1.6 、 $2.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。基于此,确定后续实验干预BON-1细胞的白花蛇舌草提取物低、中、高质量浓度分别为 1.3 、 1.8 、 $2.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;干预QGP-1细胞的白花蛇舌草提取物低、中、高质量浓度分别为 1.6 、 2.1 、 $2.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.2 白花蛇舌草提取物对BON-1、QGP-1细胞形态的影响 白花蛇舌草提取物不同质量浓度干预BON-1、QGP-1细胞后,显微镜下观察细胞状态,结果显示,白花蛇舌草提取物处理后细胞增殖受到抑

制,随着质量浓度增加,细胞数量减少,漂浮死亡细胞数量增加,见图8。

2.2.3 白花蛇舌草提取物对BON-1、QGP-1细胞Bcl-2蛋白相对表达量的影响 与对照组比较,白花蛇舌草提取物低、中质量浓度组有降低BON-1、QGP-1细胞Bcl-2蛋白表达的趋势,但无统计学差异;与对照组比较,白花蛇舌草提取物高质量浓度组可明显降低BON-1、QGP-1细胞中Bcl-2蛋白表达,差异显著($P < 0.05$),见图9。

3 讨论

pNET是原发于胰腺的恶性肿瘤,患者常出现食欲不振、腹胀、腹痛、腹泻、恶心呕吐、乏力等以“脾滞”病证特点为主的症状。pNET属于中医学“伏梁”“积聚”“癥瘕”的范畴,pNET的发生多因情志郁结、饮食不调、邪毒内聚等因素导致气滞、血瘀、痰凝、毒结,日久而形成肿瘤。在pNET病程中,痰、瘀、毒贯穿病程始终,治疗过程中应该注重解毒化痰、化瘀消积^[19]。白花蛇舌草是常用的抗肿瘤中药,可以通过多个途径抑制多种肿瘤进展^[20]。通过国家专利数据库治疗胰腺癌的中药复方用药规律分析发现白花蛇舌草为使用频次最多的中药^[21]。谭煌英教授临床中经常使用自拟芪贞抑瘤方来治疗神经内分泌肿瘤,通过临床回顾性研究发现芪贞

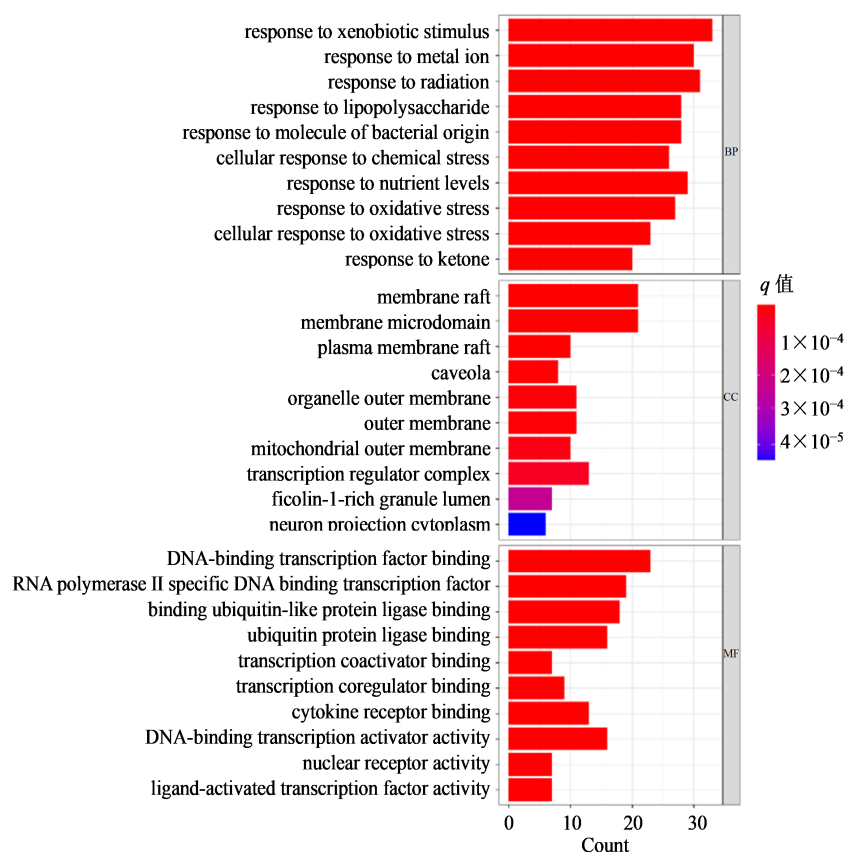


图5 白花蛇舌草治疗pNET相关基因GO富集分析

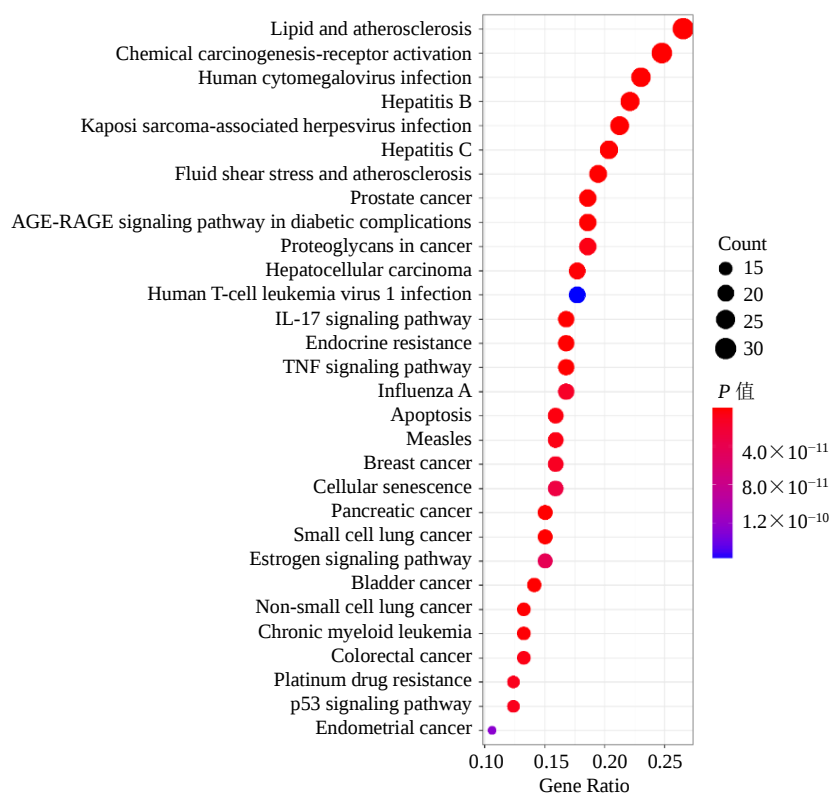
Fig. 5 GO enrichment analysis of related genes of *H. diffusa* in treatment of pNET

图6 白花蛇舌草治疗pNET相关基因KEGG富集分析

Fig. 6 KEGG enrichment analysis of related genes of *H. diffusa* in treatment of pNET

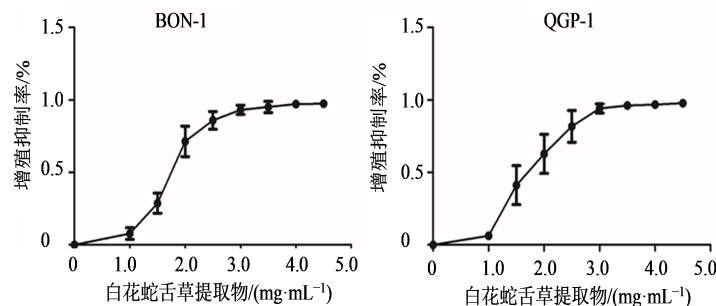


图7 白花蛇舌草提取物对BON-1、QGP-1细胞增殖抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Inhibition of *H. diffusa* extract on proliferation of BON-1 and QGP-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

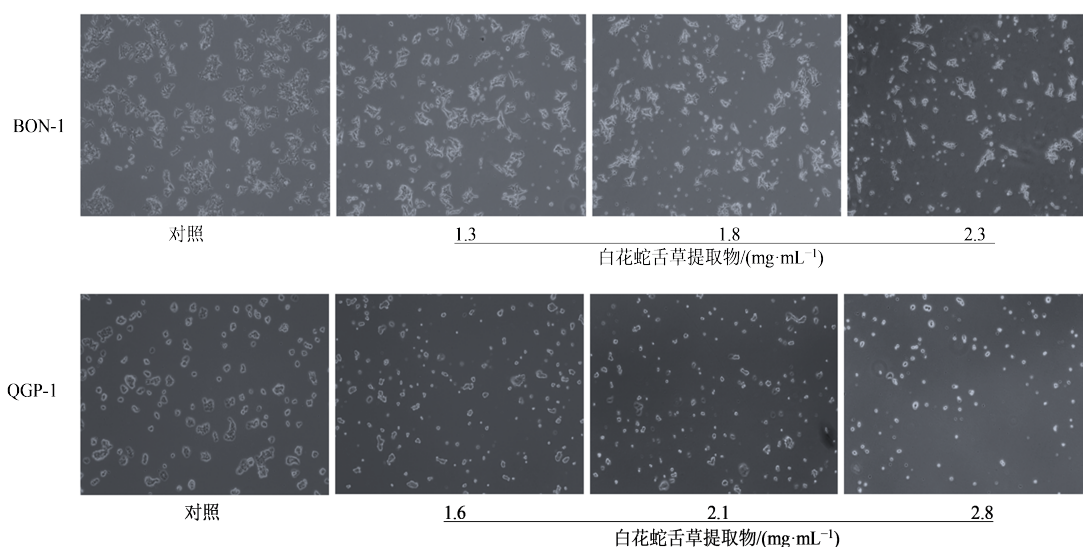
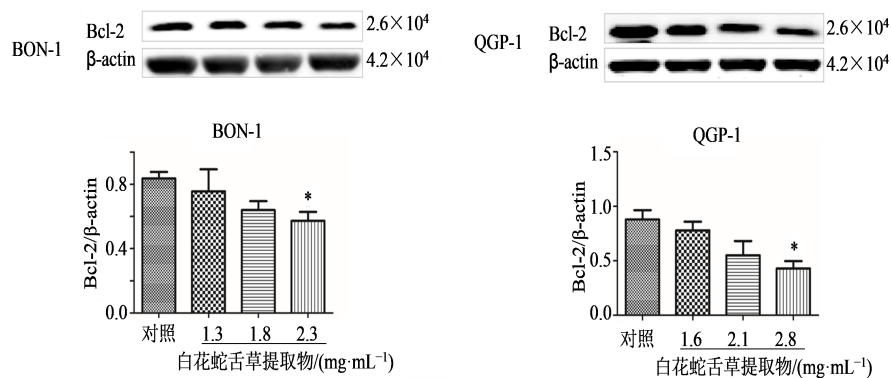


图8 白花蛇舌草提取物对BON-1、QGP-1细胞形态的影响($\times 100$)

Fig. 8 Effects of *H. diffusa* extract on morphology of BON-1 and QGP-1 cells ($\times 100$)



与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

图9 白花蛇舌草提取物对BON-1、QGP-1细胞Bcl-2蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effect of *H. diffusa* extract on expression of Bcl-2 protein in BON-1 and QGP-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

抑瘤方在降低pNET根治术后患者复发转移风险、延长无复发生存时间方面具有一定的疗效^[9]。结合

态靶辨治理论,其方中白花蛇舌草是重要的针对靶pNET的抑瘤靶药^[22]。

本研究筛选出白花蛇舌草具有治疗 pNET 靶点的活性成分 5 个,分别是 poriferasterol、2-甲氧基-3-甲基蒽醌、豆甾醇、 β -谷甾醇、槲皮素。通过 GO 及 KEGG 分析发现,白花蛇舌草可能通过细胞凋亡、PI3K/Akt、P53 等相关通路抑制 pNET 肿瘤进展。细胞凋亡是细胞对环境的生理性或病理性刺激信号,环境条件的变化或缓和性损伤产生的应答有序变化的死亡过程,凋亡的主要形态学特征包括细胞收缩、染色质浓缩和细胞分裂,产生凋亡小体。外界刺激因素激活 PI3K/Akt、P53 等通路,与抗凋亡的 Bcl-2 家族成员如 Bcl-2 和 Bcl-xL 相互作用,抑制表达,并激活促凋亡蛋白 Bax 和 Bak,从而触发线粒体功能障碍,释放细胞色素 C(Cyt C),激活 Caspase-3、Caspase-9,从而诱导细胞凋亡^[23]。体外细胞实验结果表明,白花蛇舌草能够通过 PI3K/Akt 通路抑制人肺癌 A549 细胞、人肾癌 780-0 细胞、人非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞增殖,促进凋亡,诱导 G₀/G₁ 期阻滞^[24-26]。白花蛇舌草多糖可以降低 Lewis 肺癌小鼠肿瘤组织中的 Bcl-2 mRNA 表达,从而增加肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤瘤体的增长^[27]。

在基因芯片和肿瘤测序研究结果表明 pNET 的发病与 PI3K/Akt/mTOR 通路密切相关,在原发性 pNET 肿瘤样本中发现 PI3K/Akt/mTOR 通路的关键负调控因子结节性硬化蛋白 2(TSC2)和同源性磷酸酶(PTEN)有 61 例(85%)下调,而 TSC2 和 PTEN 的低表达与肿瘤侵袭性增强、无病生存期和总生存期缩短显著相关,并且在胰岛腺瘤小鼠模型中也发现了 Akt 激活^[28-30]。PI3K/Akt 的激活可以激活另一重要的下游靶标因子是 mTOR,激活的 mTOR 可激活其下游信号分子,磷酸化促凋亡蛋白 Bad 上的 Ser136/Ser12 残基磷酸化,使其与抗凋亡蛋白 Bcl-2 或 Bcl-xL 解聚,游离的 Bcl-2 发挥抗凋亡作用,同时通过磷酸化促凋亡因子 Bad、Caspase-9、Par-4 使其失活,抑制其促凋亡作用,促进细胞异常增殖^[31-32]。体外实验结果显示,不同质量浓度白花蛇舌草提取物干预 BON-1、QGP-1 细胞 48 h 后,具有明显的浓度相关性抑制细胞增殖作用。与对照组比较,低、中、高质量浓度白花蛇舌草提取物显著抑制了 BON-1、QGP-1 细胞增殖,促进死亡。并且与对照组比较,高质量浓度组可显著降低 Bcl-2 蛋白表达($P<0.05$),表明高质量浓度白花蛇舌草提取物可以显著增加 pNET 细胞系 BON-1、QGP-1 细胞凋亡。体外实验结果提示白花蛇舌草可以通过促进凋亡而治疗 pNET,其可能通过 PI3K/Akt/mTOR 通路,与网络药

理学及文献研究结果相符合。

本研究通过网络药理学结合体外细胞实验探索白花蛇舌草治疗 pNET 的机制,发现白花蛇舌草提取物能够有效抑制人胰腺神经内分泌肿瘤 BON-1、QGP-1 细胞增殖,促进凋亡;白花蛇舌草能够通过多成分、多靶点、多通路的途径治疗胰腺神经内分泌肿瘤,为白花蛇舌草治疗 pNET 提供实验和理论依据。但通过数据库筛选有效成分的网络药理学研究方法会存在一定的误差,不能很好阐释药物实际有效成分,故还需针对白花蛇舌草冻干粉进行超高效液相色谱串联质谱分析药物所含成分,及后续实验进行药物代谢组学等更加深入的药理学研究,进一步阐释白花蛇舌草治疗 pNET 的作用成分和机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Lawrence B, Gustafsson B I, Chan A, et al. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2011, 40 (1): 1-18.
- [2] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)神经内分泌肿瘤诊疗指南-2021 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2021.
Guidelines Working Committee of the Chinese Clinical Oncology Society Chinese Society of clinical oncology (cscoc). *guidelines for diagnosis and Treatment of Neuroendocrine Tumor -2021* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2021.
- [3] 中国药典[S]. 一部. 2020.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume I. 2020.
- [4] 李梓盟, 张佳彦, 李菲, 等. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中医药信息*, 2021, 38(2): 74-79.
Li Z M, Zhang J Y, Li F, et al. Research progress on chemical components and pharmacological action of *Hedyotis diffusa* in treating cancer [J]. *Inf Tradit Chin Med*, 2021, 38(2): 74-79.
- [5] 逯双, 杨培民, 曹广尚. 白花蛇舌草活性成分多糖与黄酮研究进展 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2016, 23(3): 122-125.
Lu S, Yang P M, Cao G S. Research progress in active constituents of polysaccharides and flavones from herba *Hedyotis diffusa* [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2016, 23(3): 122-125.
- [6] 伍友春, 张昆, 康志龙, 等. 白花蛇舌草醇提物和半枝莲醇提物联用抗胰腺癌作用及机制研究 [J]. *药物评价研*

- 究, 2020, 43(7): 1233-1238.
- Wu Y C, Zhang K, Kang Z L, et al. Anti-tumor activity and mechanism of combination of ethanol extract from *Hedyotis diffusa* and ethanol extract from *Scutellaria barbata* on pancreatic cancer [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43 (7): 1233-1238.
- [7] 全小林. 态靶医学: 中医未来发展之路 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2021, 41(1): 16-18.
- Tong X L. State target medicine: The future development of Chinese medicine [J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2021, 41(1): 16-18.
- [8] 董立硕, 李青伟, 张莉莉, 等. 基于态靶辨治选方用药的思路与临床应用 [J]. *中医杂志*, 2023, 64(3): 250-254.
- Dong L S, Li Q W, Zhang L L, et al. Thoughts and clinical application of prescription and medication based on state-target differentiation and treatment [J]. *J Tradit Chin Med*, 2023, 64(3): 250-254.
- [9] 余美欢, 李远良, 苏菲, 等. 芪贞抑瘤方预防胰腺神经内分泌肿瘤术后复发的回顾研究 [J]. *中日友好医院学报*, 2023, 37(1): 21-24.
- Yu F H, Li Y L, Su F, et al. Retrospective study on Qizhen Yiliu recipe to prevent postoperative recurrence of pancreatic neuroendocrine tumor [J]. *J China Jpn Friendsh Hosp*, 2023, 37(1): 21-24.
- [10] 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.
- [11] Soudy M, Anwar A M, Ali Ahmed E, et al. UniprotR: Retrieving and visualizing protein sequence and functional information from Universal Protein Resource (UniProt knowledgebase) [J]. *J Proteom*, 2020, 213: 103613.
- [12] Barrett T, Wilhite S E, Ledoux P, et al. NCBI GEO: Archive for functional genomics data sets: Update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(Database issue): D991-D995.
- [13] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database*, 2010, 2010: baq020.
- [14] Amberger J S, Hamosh A. Searching Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): A knowledgebase of Human Genes and Genetic Phenotypes [J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2017, 58: 1-2.
- Amberger J S, Hamosh A. Searching online Mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes [J]. *CP Bioinformatics*, 2017, 58(1): 1-2.
- [15] Whirl-Carrillo M, McDonagh E M, Hebert J M, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2012, 92(4): 414-417.
- [16] Wishart D S, Feunang Y D, Guo A C, et al. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018 [J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(D1): D1074-D1082.
- [17] Szklarczyk D, Gable A L, Nastou K C, et al. The STRING database in 2021: Customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D605-D612.
- [18] Otasek D, Morris J H, Bouças J, et al. Cytoscape Automation: Empowering workflow-based network analysis [J]. *Genome Biol*, 2019, 20(1): 185.
- [19] 张佳慧, 王笑民, 杨永, 等. 王笑民教授从"毒"论治肿瘤经验 [J]. *中国医药导报*, 2020, 17(8): 190-193.
- Zhang J H, Wang X M, Yang Y, et al. Professor Wang Xiaomin's experience in treating tumor from "poison" [J]. *China Med Her*, 2020, 17(8): 190-193.
- [20] 吴朗杰, 赵春燕, 战丽彬. 基于网络药理学和分子对接研究白花蛇舌草和半枝莲药对治疗宫颈癌的作用机制 [J]. *中草药*, 2021, 52(4): 1049-1058.
- Wu L J, Zhao C Y, Zhan L B. Mechanism of *Hedyotis diffusa* and *Scutellaria barbata* in treatment of cervical cancer based on network pharmacology and molecular docking [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(4): 1049-1058.
- [21] 田超, 程梓轩, 郭懿莹, 等. 国家专利数据库的中药复方治疗胰腺癌用药规律分析 [J]. *中国医药导报*, 2023, 20 (6): 9-13.
- Tian C, Cheng Z X, Guo Y Y, et al. Analysis of medication rule of traditional Chinese medicine compound prescription in treating pancreatic cancer based on national patent database [J]. *China Med Her*, 2023, 20(6): 9-13.
- [22] 杨浩宇, 杨映映, 张培. 全小林院士"以方测证-以药定靶"传承模式探析 [J]. *中医学报*, 2021, 36(1): 103-105.
- Yang H Y, Yang Y Y, Zhang P. Analysis of academician Tong Xiaolin's inheritance mode of "surmising syndrome type by prescriptions-surmising symptoms by medicine" [J]. *Acta Chin Med*, 2021, 36(1): 103-105.
- [23] Pistrutto G, Trisciuglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603-619.
- [24] 周林水, 吕昕, 郑苏群. 基于PI3K/Akt通路探讨白花蛇舌草对EGFR-TKIs抵抗的A549细胞的增殖抑制作用 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(11): 1931-1939.
- Zhou L S, Lü X, Zheng S Q. Study on the inhibitory effect of *Hedyotis diffusa* on the proliferation of EGFR-TKIs-resistant A549 cells based on PI3K/Akt pathway

- [J]. Chin J Pharm Anal, 2021, 41(11): 1931-1939.
- [25] 周兴波, 李慕刚, 蒋峰, 等. 白花蛇舌草对人肾癌 780-0 细胞体外增殖及凋亡的影响 [J]. 四川中医, 2021, 39(11): 57-61.
- Zhou X B, Li M G, Jiang F, et al. Effect of *Hedyotis diffusa* on proliferation and apoptosis for human renal cell carcinoma 780-0 cells *in vitro* [J]. J Sichuan Tradit Chin Med, 2021, 39(11): 57-61.
- [26] 李华, 周云, 温省初, 等. 白花蛇舌草通过 PI3K/Akt 信号通路抑制人非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞增殖 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28(20): 3495-3499.
- Li H, Zhou Y, Wen X C, et al. *Hedyotis diffusa* inhibiting Raji cell proliferation of human non-Hodgkin lymphoma by PI3K/Akt signaling pathway [J]. J Mod Oncol, 2020, 28(20): 3495-3499.
- [27] 贾羲, 王娟, 贾文瑞, 等. 白花蛇舌草多糖对 Lewis 肺癌小鼠肿瘤抑制作用及机制研究 [J]. 中医学报, 2021, 36(1): 143-147.
- Jia X, Wang J, Jia W R, et al. Anti-tumor effect and mechanism of *Hedyotis diffusa* polysaccharide on lewis lung cancer mice [J]. Acta Chin Med, 2021, 36(1): 143-147.
- [28] Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, et al. Pancreatic endocrine tumors: Expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(2): 245-255.
- [29] Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, et al. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours [J]. Endocr Relat Cancer, 2011, 18(1): 181-192.
- [30] Zhou B, Xiang J E, Zhan C Y, et al. STK33 promotes the growth and progression of human pancreatic neuroendocrine tumour via activation of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Neuroendocrinology, 2020, 110(3/4): 307-320.
- [31] Yu L, Wei J, Liu P D. Attacking the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway for targeted therapeutic treatment in human cancer [J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 69-94.
- [32] Xue C, Li G L, Lu J, et al. Crosstalk between circRNAs and the PI3K/AKT signaling pathway in cancer progression [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 400.

[责任编辑 刘东博]