

基于网络药理学结合实验验证探讨钩吻素子抗胃癌的分子机制

黄小燕¹, 陈茗¹, 毛云屹¹, 黄颖斌¹, 姜禄琪¹, 王林瑶¹, 林添¹, 林巨里², 丘宏强^{1*}, 程昱^{1*}

1. 福建医科大学附属协和医院 药理学部, 福建 福州 350001

2. 福建医科大学附属协和医院 胃外科, 福建 福州 350001

摘要: **目的** 采用网络药理学与体外细胞实验相结合的策略, 系统探讨钩吻素子发挥抗胃癌效应的潜在分子机制。方法 通过 GeneCards 数据库获取胃癌相关疾病靶点; 利用 Pharmmapper、SwissTargetPrediction 及 TargetNet 平台预测钩吻素子的潜在作用靶点; 借助 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 并进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析; 使用 Cytoscape 构建“成分-疾病-靶点-通路”可视化网络; 通过分子对接与分子动力学模拟对核心靶点进行初步验证。同时采用 CCK-8 法、Annexin V FITC/PI 双染流式细胞术及 Western blotting 实验对预测结果开展体外验证。**结果** 共筛选得到钩吻素子相关靶点 176 个、胃癌疾病靶点 5 535 个, 二者交集靶点 106 个; 核心靶点包括: 丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)-细胞外调节蛋白激酶 2 (ERK2)、生长因子受体结合蛋白 2 (GRB2)、丝裂原活化蛋白激酶激酶 1 (MAP2K1)-丝裂原/细胞外信号调节激酶激酶 1 (MEK1)、糖原合成激酶 3 β (GSK3B)、丝裂原活化蛋白激酶 14 (MAPK14)-p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38)、肝细胞生长因子受体 (MET)、酪氨酸蛋白激酶 JAK2-JAK2 等。分子对接结果显示钩吻素子与 MAPK1、MAP2K1、MAPK14 等靶点具有较强结合亲和力, 分子动力学模拟证实钩吻素子可与 MAPK1 形成稳定复合物。细胞实验表明, 不同浓度钩吻素子作用 MGC-803 细胞 24 h 后, 与对照组相比, 细胞活力呈浓度相关性下降, 差异具有统计学意义; 细胞凋亡率随给药浓度升高而显著上升; 钩吻素子可明显下调 p-ERK1/2 表达并上调 p-p38 表达水平。**结论** 钩吻素子通过多靶点、多通路协同发挥抗胃癌作用。体外实验证实其能够抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖, 并促进细胞凋亡, 调控 MAPK 信号通路是其发挥抗肿瘤作用的重要潜在机制之一。

关键词: 钩吻素子; 胃癌; 网络药理学; 分子对接; MAPK 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)06-1994-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.06.012

Mechanistic investigation of koumine against gastric cancer based on network pharmacology and experimental validation

HUANG Xiaoyan¹, CHEN Ming¹, MAO Yunyi¹, HUANG Yingbin¹, LOU Luqi¹, WANG Linyao¹, LIN Tian¹, LIN Juli², QIU Hongqiang¹, CHENG Yu¹

1. Department of Pharmacy, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

2. Department of Gastric Surgery, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China

Abstract: Objective To explore the potential mechanism of koumine against gastric cancer combined network pharmacology and *in vitro* cell experiments. **Methods** Gastric cancer-related targets were retrieved from the GeneCards database. The potential targets of koumine were predicted using Pharmmapper, SwissTargetPrediction and TargetNet. The protein-protein interaction (PPI) network was constructed via STRING, followed by GO and KEGG enrichment analyses. The “component-disease-target-pathway” network was visualized by Cytoscape, and key targets were preliminarily verified by molecular docking and molecular dynamics simulation. In addition, CCK-8 assay, Annexin V-FITC/PI flow cytometry and Western blotting were performed to validate the bioinformatic predictions. **Results** A total of 176 koumine-related targets and 5 535 gastric cancer-related targets were screened, among which 106

收稿日期: 2025-11-16

基金项目: 福建省科技创新联合基金项目 (2021Y9038, 2024Y9255)

作者简介: 黄小燕, 硕士研究生, 研究方向为临床药理。E-mail: 385622759@qq.com

*通信作者: 丘宏强, 硕士生导师, 从事药物分析和药理学研究。E-mail: hongqiangqiu@fjmu.edu.cn

程昱, 硕士生导师, 从事药物分析和药理学研究。E-mail: chengyu@fjmu.edu.cn

overlapping targets were identified. The core targets included MAPK1 (ERK2), GRB2, MAP2K1 (MEK1), GSK3B, MAPK14 (p38), MET, JAK2, etc. Molecular docking showed that koumine had strong binding affinity with MAPK1, MAP2K1 and MAPK14, and molecular dynamics simulation confirmed that koumine could form a stable complex with MAPK1. Cell experiments demonstrated that after treatment with different concentrations of koumine for 24 h, the viability of MGC-803 cells was decreased in a concentration-dependent manner, and the apoptosis rate was significantly increased. Meanwhile, koumine obviously down-regulated the expression of p-ERK1/2 and up-regulated the expression of p-p38. **Conclusion** Koumine exerts anti-gastric cancer effects through multiple targets and signaling pathways. *In vitro* experiments confirmed that koumine inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of gastric cancer MGC-803 cells, and the regulation of the MAPK signaling pathway serves as one of its key underlying mechanisms.

Key words: koumine; gastric cancer; network pharmacology; molecular docking; MAPK signaling pathway

胃癌在全球范围内位居恶性肿瘤发病率第 5 位, 每年新发病例超百万, 死亡病例约 80 万, 在全球肿瘤疾病负担中占据重要地位^[1-2]。当前晚期胃癌的治疗手段主要包括新辅助放化疗、常规化疗、靶向治疗及免疫治疗等^[3]。然而, 现有临床方案普遍存在疗效有限、不良反应明显以及耐药性频发等问题, 导致患者依从性下降, 直接影响整体治疗效果^[4]。细胞毒性化疗药物易引发较为严重的不良反应, 而靶向与免疫治疗则受限于肿瘤异质性、免疫逃逸及个体疗效差异等挑战^[5-6]。上述临床局限凸显了研发新型、高效、低毒的胃癌治疗药物的迫切需求。

天然药用植物提取物是抗肿瘤新药发现的重要宝库。紫杉醇、长春碱、长春新碱等经典药物均来源于植物活性成分, 其临床应用充分证明了天然产物在肿瘤治疗中的重要价值, 不仅抗肿瘤活性明确, 安全性与耐受性也相对可控^[7-10]。钩吻为马钱科钩吻属植物胡蔓藤的全草^[11], 在传统医学中应用历史悠久, 常用于肿瘤、炎症及神经性疼痛等疾病的治疗^[12-14]。植物化学研究表明, 钩吻主要药效成分为生物碱类化合物, 具有抗肿瘤、免疫调节、镇痛等多种药理活性^[15]。在已分离鉴定的百余种钩吻生物碱中, 钩吻素子含量约占总生物碱的 30%, 生物活性突出^[16-17]。前期临床前研究已证实, 钩吻素子在体内外模型中均对胃癌细胞具有明显的增殖抑制作用^[18-21]。但目前其抗胃癌的具体分子机制尚未完全阐明, 一定程度上限制了其进一步开发与临床转化。

网络药理学作为系统生物学的重要研究手段, 通过对多组分、多靶点、多通路的相互作用进行整合分析, 能够系统揭示中药及天然产物的整体调控特点, 与中医药整体观高度契合^[22-23]。本研究整合网络药理学、分子对接、分子动力学模拟与体外细胞功能实验, 系统探究钩吻素子抗胃癌的分子机制, 为阐明其作用靶点与信号通路提供新的研究思路与实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人胃癌 MGC-803 细胞株购自瑟欧生物有限公司, 细胞冻存于 -80°C 超低温冰箱, 实验前复苏并传代培养。

1.2 主要试剂与抗体

1.2.1 主要试剂 钩吻素子(质量分数 99.47%, 上海彩途文生化科技有限公司, 批号 WS-KMY-B741); 胰蛋白酶 EDTA 消化液、RPMI 1640 培养基(美国赛默飞世尔科技公司, 批号 2277235、8121595); 青霉素-链霉素双抗(北京兰杰柯科技有限公司, 批号 21083589); 磷酸盐缓冲液(PBS, 美国思拓凡全球生命科学公司, 批号 AB10136405); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司, 批号 21100702); CCK-8、Annexin V FITC/PI 凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 批号 031921211102、051221211111); BCA 蛋白定量试剂盒、5×SDS PAGE 上样缓冲液(福州飞净生物科技有限公司, 批号 20211205、20211203); RIPA 强裂解液、PMSF $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、磷酸酶抑制剂混合物 A、超敏 ECL 发光试剂盒、彩色蛋白 Marker、QuickBlock 封闭液、Western 快速转膜液、Western 二抗稀释液(上海碧云天生物技术有限公司, 批号 090121211229、120721211228、081321211216、071421211222、080221211213、061021211215、091021211230、072921211216)。

1.2.2 主要抗体 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、Phospho p38 MAPK、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)、Phospho ERK1/ERK2、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、HRP 标记山羊抗兔 IgG、HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(上海碧云天生物技术有限公司, 批号 052521211130、121620211208、031221220128、101921220128、043021211231、062421220114、

101221211125、070921220104、070921211203)。

1.3 主要仪器

SW-CJ-1D 生物超净工作台 (中国尚光生物有限公司); HF151 CO₂ 恒温培养箱 (中国力康生物医疗科技控股有限公司); Legend Micro 21R 超速低温离心机 (美国赛默飞世尔科技公司); CP114 电子天平 (美国奥豪斯公司); DHG-9070 电热恒温鼓风干燥箱 (上海精宏公司); HSC-12A 恒温水浴箱 (中国俊思电子有限公司); 5430 型低速离心机 (德国艾本德公司); TY-80 水平摇床 (金坛医疗仪器厂); ECLIPSE E100 光学显微镜 (日本尼康公司); BD-226W 4 °C 冰箱 (中国集团海尔公司); MDF-U53V 立式 -80 °C 超低温冰箱 (日本三洋公司); Elix3 Milli Q 超纯水系统 (德国默克公司); geldoc XR+ 化学发光成像仪 (美国伯乐公司); i3x 多功能酶标仪 (美国美谷分子仪器公司); Quanteon 流式细胞仪 (美国安捷伦公司)。

2 方法

2.1 钩吻素子抗胃癌潜在靶点筛选

从 PubChem 数据库获取钩吻素子结构信息, 分别使用 Pharammapper、SwissTargetPrediction 及 TargetNet 平台进行靶点预测^[24-26], 合并结果并去除重复项。通过 Uniprot 数据库对靶点名称进行标准化校正, 限定物种为人类, 最终得到钩吻素子潜在作用靶点。以“gastric cancer”“stomach neoplasms”为关键词在 Genecards 数据库检索胃癌相关疾病靶点^[27]。将药物靶点与疾病靶点取交集, 利用 R 4.1.1 绘制 Venn 图, 获得钩吻素子抗胃癌潜在共同靶点。

2.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建与核心靶点分析

将交集靶点导入 STRING 数据库^[28], 物种设为 Homo sapiens, 置信度设置为高置信度 (0.700), 构建 PPI 网络。利用 Cytohubba 插件根据节点度 (degree) 值筛选核心靶点, 并通过 Cytoscape 3.7.2 绘制核心靶点互作网络图。

2.3 基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

将潜在靶点导入 STRING 平台, 以 FDR < 0.05 为筛选条件, 进行生物学过程 (BP)、细胞组分 (CC)、分子功能 (MF) 的 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析, 明确靶点主要功能与富集通路。

2.4 “成分-疾病-靶点-通路”的网络构建

以钩吻素子、胃癌、靶点及关键通路为节点,

利用 Cytoscape 构建可视化调控网络, 分析拓扑参数以识别核心靶点与关键通路。

2.5 分子对接

钩吻素子的 3D 结构通过 PubChem 数据库获取, 获取后采用 Chem3D 软件对其进行 MMFF94 力场优化, 以确保小分子结构的稳定性与合理性, 为后续对接实验奠定基础。使用 AutodockTools 1.5.6 软件在 PMV (Python Molecular Viewer) 界面中打开优化后的钩吻素子结构, 依次完成加氢、电荷分配、配体 root 位点检测、可旋转键的搜寻与定义等操作, 所有预处理步骤完成后, 将配体保存为 pdbqt 格式文件, 用于后续对接分析。X 射线晶体学是目前解析蛋白质三维结构最常用、最可靠的方法之一, 该方法通过测定蛋白质晶体中电子密度的空间分布特征, 可在一定分辨率范围内精准解析出蛋白质分子中所有原子的三维坐标信息。RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) 是专门存储蛋白质和核酸分子结构的权威数据库, 该数据库中收录的大部分蛋白质结构均通过 X 射线晶体学方法测定获得。

本研究中分子对接所用蛋白的三维结构均从上述 RCSB PDB 数据库下载获取, 对接靶点的筛选依据“成分-疾病-靶点-通路”网络图确定: 优先选取网络图中 degree 值较高的核心靶点, 同时剔除该数据库中不存在原配体的蛋白靶点, 且优先选用分辨率 < 3 Å (1 Å = 0.1 nm) 的蛋白晶体, 以保证对接结果的准确性。经严格筛选后, 最终确定 MAPK1、MAP2K1、GSK3B、MAPK14、MET、JAK2 这 6 种蛋白作为本次分子对接的受体蛋白。受体蛋白的预处理步骤如下: 采用 pymol 软件移除蛋白配体复合物中的原配体及冗余水分子, 将处理后的蛋白导入 AutodockTools 1.5.6 软件的 PMV 界面, 依次完成添加所有氢原子、计算 Gasteiger 电荷、合并非极性氢等操作, 完成后将其定义为对接受体, 并保存为 pdbqt 格式文件。分子对接参数设置: 根据配体小分子的空间位置, 精准确定 Autodock Vina 分子对接的坐标范围及盒子大小, 其余对接参数均采用软件默认设置。采用 Autodock Vina 1.1.2 版本软件进行半柔性对接实验, 每对配体-受体对接均会产生 9 种不同的构象, 选取结合能最低 (结合能力最强) 的构象作为最终对接构象, 用于后续对接结合模式的分析, 并用 pymol 软件绘制对接构象图, 直观展示配体与受体的结合状态。

2.6 分子动力学模拟

为进一步明确钩吻素子与预测核心靶点之间对接结合的稳定性,本研究对筛选出的蛋白质-配体结合物进行了 100 ns 的分子动力学模拟分析。

采用 GROMACS 2020 软件完成,该软件借助 NVIDIA RTX 2060 GPU 进行加速运算,运行于 Linux Ubuntu 20.04 操作系统,由 AMD R5 3600 CPU 提供驱动支持,确保模拟过程的高效性与稳定性。蛋白质的拓扑结构通过 Charmm36^[30]力场生成,配体(钩吻素子)的拓扑结构及分子动力学模拟所需的相关参数则通过 CGenFF^[31](<https://cgenff.umaryland.edu/>)软件构建获得,该软件可通过自动化方式完成原子分型、参数分配及电荷计算,保障配体拓扑结构的合理性。

模拟系统的构建流程如下:将蛋白质-配体复合物置于 TIP3P 水模型中进行溶解,为维持系统的电中性,加入适当浓度的 Na⁺和 Cl⁻进行中和处理。采用最陡下降算法对每个模拟系统进行能量最小化处理,设置最大步长为 50 000,力的阈值为 10.0 kJ·mol⁻¹,以消除系统内的不合理作用力,确保系统处于能量稳定状态。模拟过程分为加热、平衡和生产运行 3 个阶段:加热阶段(温度 300 K),对每个系统的受体蛋白和配体分子施加位置约束,约束时间持续 100 ps,采用 NVT 系综(固定原子数、体积和温度),选用蛙跳算法(时间步长设为 2 fs)及 P-LINCS^[32]整体约束,确保系统温度平稳升至设定值;平衡阶段,采用 NPT 系综(固定原子数、压力和温度),在 300 K 条件下持续平衡 100 ps,时间步长仍为 2 fs,使系统的压力和密度达到稳定状态;能量最小化和系统平衡完成后,进行无约束的 100 ns 分子动力学生产运行,时间步长为 2 fs,每 10 ps 存储 1 次系统结构坐标,用于后续动力学特征分析。100 ns 分子动力学模拟完成后,对获取的轨迹文件进行动力学特征分析,主要包括均方根偏差(RMSD)和均方根涨落(RMSF)分析,通过将钩吻素子-受体结合物的动力学特征与原始配体-受体复合物进行对比,进一步验证钩吻素子与核心靶点结合的稳定性。

2.7 主要试剂配制

2.7.1 完全培养基 按 RPMI 1640:胎牛血清:双抗=100:10:1 的比例配制,混匀后 4 °C 冷藏保存。

2.7.2 钩吻素子储备液 精密称取钩吻素子粉末,以 0.9%氯化钠溶液配制制成 20 mg·mL⁻¹ 储备液, pH

值调至 7.2,室温保存,避光。实验时用完全培养基稀释至所需浓度。

2.8 细胞培养

MGC 803 细胞置于完全培养基中,在 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养并常规传代。

2.9 CCK-8 检测细胞增殖

取对数生长期细胞,以每毫升 5×10⁴ 个的密度接种于 96 孔板,设置实验组、对照组、空白组,每组设 4 个平行样品,细胞培养 24 h 贴壁后,用移液枪缓慢吸出 96 孔板中的培养液,实验组加入不同浓度钩吻素子(200、300、400、600、800 μg·mL⁻¹)含培养基溶液,每孔 100 μL;对照组(有细胞)加 100 μL 含有溶媒的培养基,空白组(无细胞)加入 100 μL 含有溶媒的培养基。继续培养 24 h 后加入 10 μL 的 CCK-8 试剂,孵育 1 h 后,在 450 nm 处测定吸光度(A)值。计算细胞存活率。

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

2.10 流式细胞术检测凋亡

将对数生长期的细胞接种于 6 孔板,恒温箱培养 24 h 后,给予 200、400、800 μg·mL⁻¹ 钩吻素子处理 24 h,收集细胞,取 1×10⁵ 个细胞于 1.5 mL EP 管中。按照凋亡试剂盒说明书进行 Annexin V FITC/PI 染色,流式细胞仪检测,FlowJo V10 软件分析凋亡率。

2.11 Western blotting 检测蛋白表达

将 1×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板,常规培养 24 h 后,以 200、400、800 μg·mL⁻¹ 钩吻素子分别处理细胞 24 h。收集上清置于 1.5 mL EP 管,1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃上清后用 PBS 洗涤细胞 2 次,同条件再次离心并弃上清。每孔加入 150 μL 预冷蛋白裂解液,冰上裂解 5 min,收集裂解物至 EP 管,4 °C、15 000 r·min⁻¹ 离心 20 min,取上清备用。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,蛋白样品与 5×Loading Buffer 混匀后,100 °C 水浴煮沸 10 min 完成变性。

经 SDS-PAGE 电泳分离后,将蛋白转印至 PVDF 膜,用 QuickBlock 封闭液封闭 1 h。以 1×TBST 洗涤 1 次,一抗加入 Bcl-2、Bax、p38、p-p38、ERK1/2、p-ERK1/2 (1:1 000),4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后加入二抗溶液(1:1 000),室温孵育 2 h,再次洗涤 3 次后,加特超敏 ECL 发光液避光显影,使用 Photoshop 及 Image J 软件对曝光结果进行分析处理。

2.12 数据统计

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行统计分析。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 钩吻素子抗胃癌潜在靶点筛选

从 PubChem 数据库中获取钩吻素子 3D 结构。经多数据库预测及去重、ID 校正后得到 176 个潜在靶点。Genecards 检索获得胃癌相关靶点 5 535 个。获得两者交集靶点共 106 个 (图 1)。

3.2 PPI 网络与核心靶点分析

106 个交集靶点构建的 PPI 网络中 (图 2), 共 106 个节点、273 条边。Degree 值表示节点之间

连线的数量, degree 值越大表示其在网络中越重要。根据自由度将网络中的核心靶点排序, 选

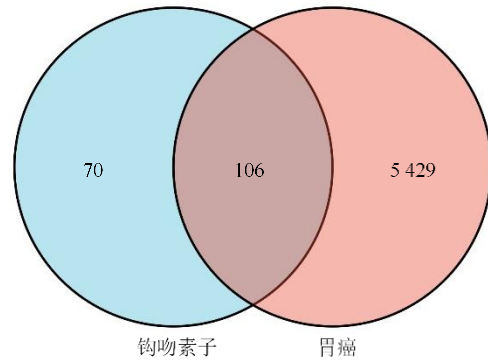


图 1 钩吻素子抗胃癌疾病靶点 Venn 图

Fig. 1 Venn diagram of targets of koumimine against gastric cancer

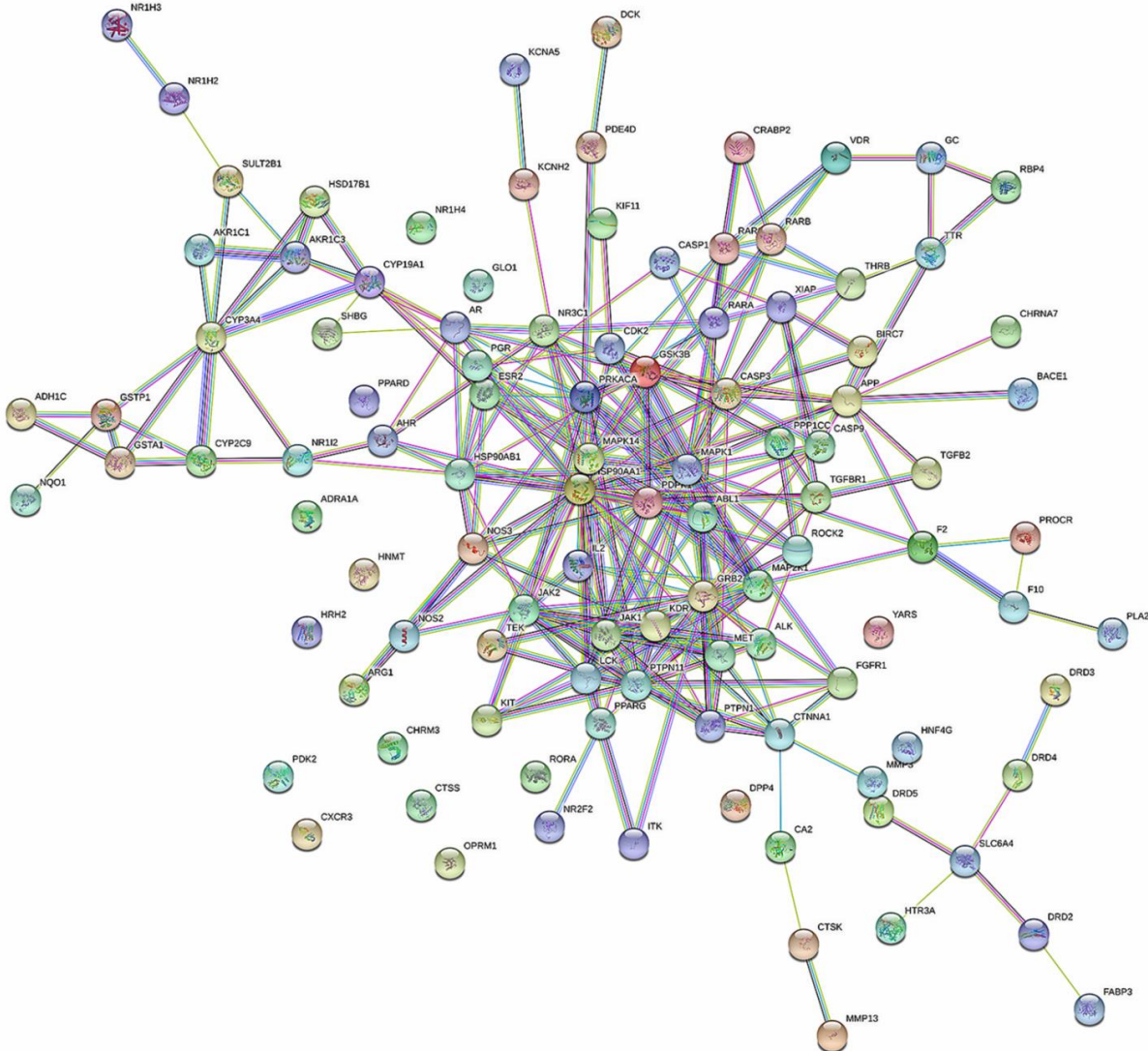


图 2 钩吻素子抗胃癌潜在靶点 PPI 网络

Fig. 2 PPI network of potential targets of koumimine in anti-gastric cancer

degree 值前 10 的核心靶点生成 PPI 网络图 (图 3), 包括 MAPK1、HSP90AA1、GRB2、MAPK14、PTPN11、JAK2、PRKACA、LCK、JAK1、HSP90AB1。

3.3 GO 富集分析

GO 富集结果显示, BP 主要集中在细胞过程、生物学调控、应激反应、代谢细胞过程、细胞调控等条目; CC 主要涉及内区域、细胞器、细胞质、细胞核等; MF 以蛋白结合、离子结合、催化活性、小分子结合等为主。见图 4。

3.4 KEGG 通路富集分析

KEGG 分析显示靶点显著富集于癌症通路、PI3K-Akt 通路、癌症蛋白多糖、MAPK 信号通路、Ras 通路、胃癌、T 细胞受体通路、PD-L1/PD-1 通

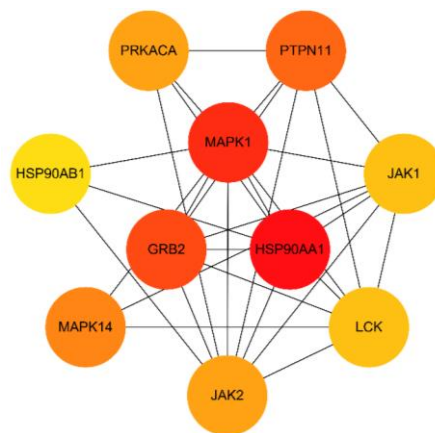


图 3 钩吻素子抗胃癌核心靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network diagram of core target of koumine against gastric cancer

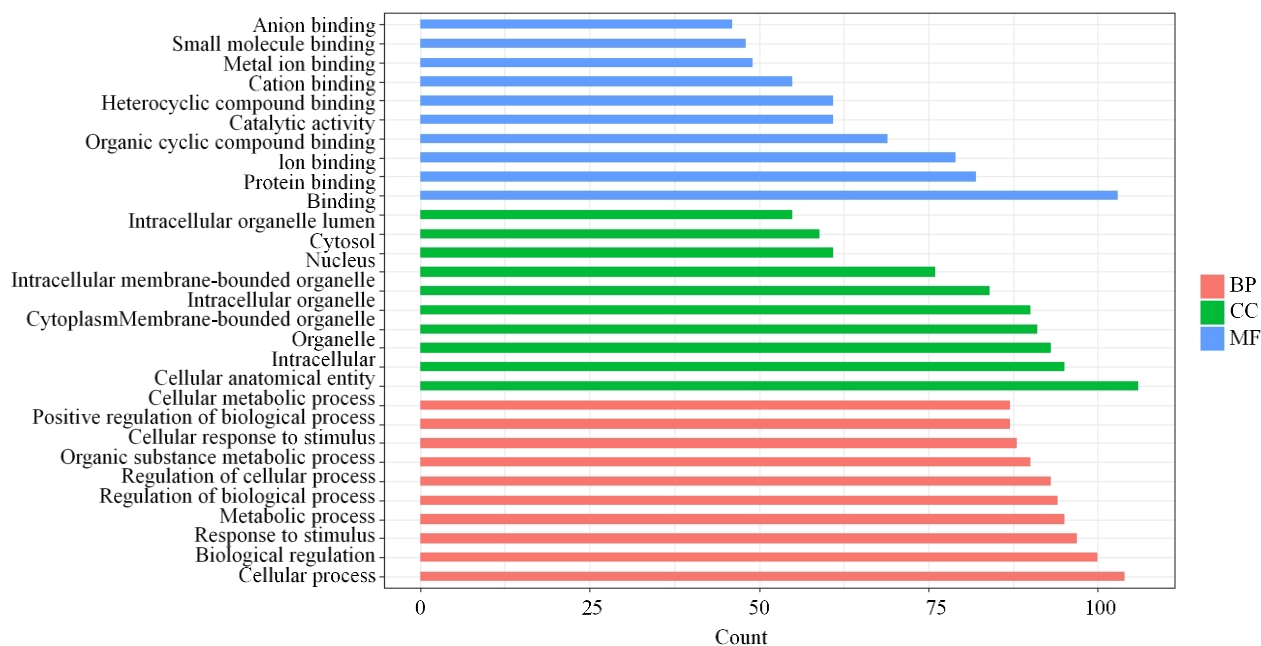


图 4 钩吻素子抗胃癌的潜在靶点的 GO 富集分析

Fig. 4 GO analysis of potential targets of koumine in anti-gastric cancer

路、IL-17 通路等 (图 5), 提示钩吻素子通过多通路协同发挥抗胃癌作用。

3.5 “成分-疾病-靶点-通路”网络构建

用钩吻素子抗胃癌的潜在靶点和相关通路作节点, 导入 Cytoscape 软件做可视化操作, 得到“成分-疾病-靶点-通路”网络图 (图 6)。网络中共 68 个节点、279 条边, degree 值排名靠前的 6 个核心靶点为 MAPK1、MAP2K1、GRB2、GSK3B、MAPK14 和 MET, 提示这些靶点在网络中具有关键调控地位。网络图中的核心靶点及核心通路的 degree 值、介数

中心性 (BC) 和接近中心性 (CC) 见表 1。

3.6 分子对接结果

钩吻素子与 MAPK1、MAP2K1、GSK3B、MAPK14、MET 和 JAK2 靶点的对接结果如表 2 所示, 表明钩吻素子和蛋白 MAPK1、MAP2K1、GSK3B、MAPK14、MET 和 JAK2 具有较强的结合能力。将结合结果用 pymol 可视化处理后 (图 7), 从模拟的结合构象可以看出, 钩吻素子与靶点 MAPK1、MAP2K1、GSK3B、MAPK14、MET、JAK2 呈现出紧凑的结合模式。

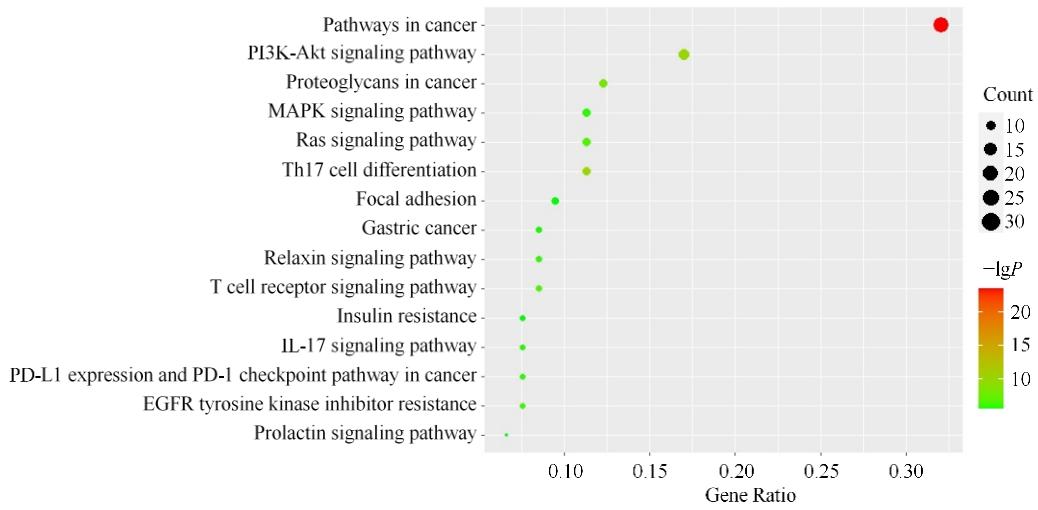


图 5 钩吻素子抗胃癌的潜在靶点 KEGG 富集通路气泡

Fig. 5 Bubble diagram of KEGG enrichment pathway of potential targets of koumine against gastric cancer

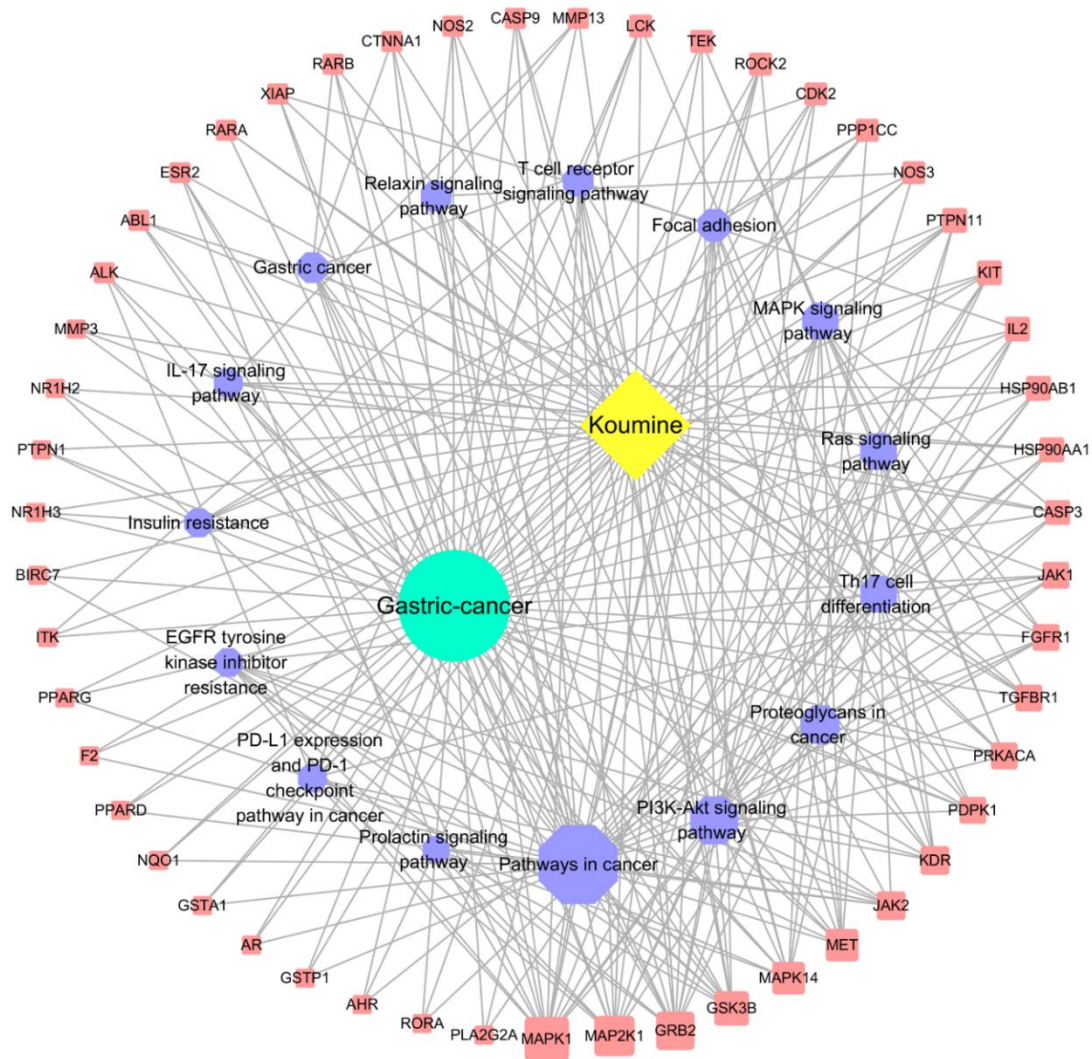


图 6 “成分-疾病-靶点-通路”网络图

Fig. 6 “Component-disease-target-pathway” network diagram

表 1 “成分-疾病-靶点-通路”网络信息

Table 1 “Component-disease-target-pathway” network information

分类	名称	Degree 值	BC	CC
Target spot	MAPK1	16	0.045 892	0.563 025
Target spot	MAP2K1	14	0.032 898	0.544 715
Target spot	GRB2	13	0.027 524	0.536 000
Target spot	GSK3B	11	0.026 615	0.519 380
Target spot	MAPK14	10	0.019 393	0.511 450
Target spot	MET	10	0.015 043	0.511 450
Target spot	JAK2	8	0.011 976	0.496 296
Pathway	Pathways in cancer	34	0.109 572	0.572 650
Pathway	PI3K-Akt signaling pathway	18	0.026 870	0.449 664
Pathway	Proteoglycans in cancer	13	0.013 118	0.421 384
Pathway	MAPK signaling pathway	12	0.009 648	0.411 043
Pathway	Th17 cell differentiation	12	0.012 220	0.411 043
Pathway	Ras signaling pathway	12	0.011 001	0.416 149

表 2 钩吻素子与核心靶点对接结果

Table 2 Docking results of koumine and core targets

蛋白	PDB:ID	结合能/(kJ·mol ⁻¹)	Site (x, y, z)
MAPK1	5ik4	-30.10	14.696, -4.135, 15.275
MAP2K1	7b94	-29.68	-31.581, 7.516, -7.409
GSK3B	6v6l	-37.62	2.948, 9.168, -17.429
MAPK14	6sfi	-33.86	53.445, 69.423, 17.777
MET	3dkg	-27.17	16.538, 12.598, 59.986
JAK2	4d1s	-35.53	8.108, -3.321, 3.103

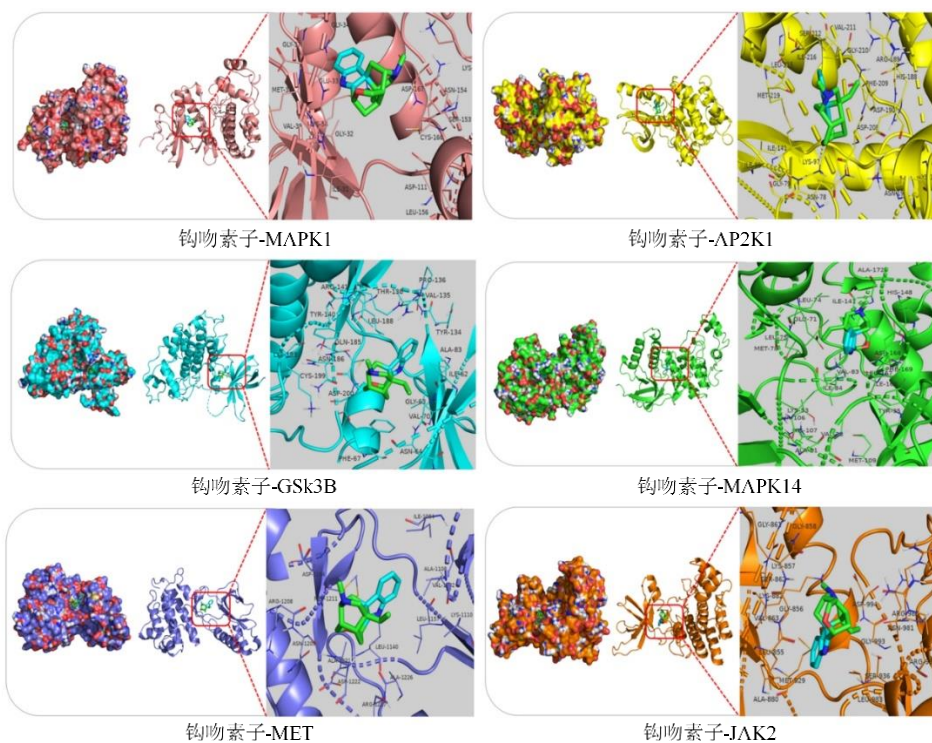


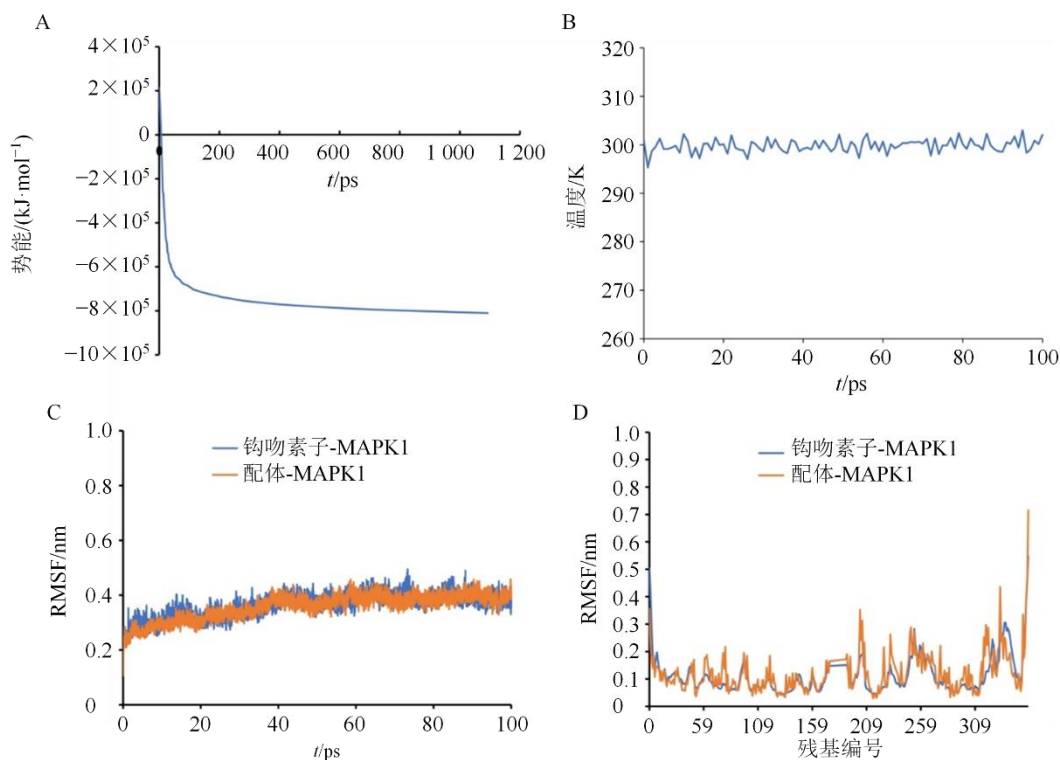
图 7 钩吻素子与核心靶点结合构象

Fig. 7 Combined conformation of koumine and core targets

3.7 分子动力学模拟结果

选择图 6 中 degree 值最大的靶点 MAPK1 与钩吻素子进行分子动力学模拟,展示钩吻素子-MAPK1 结合物的动态作用。结果显示势能在 100 ps 后开始稳定(图 8-A),温度从 100 ps 时稳定在 300 K(图 8-B)。钩吻素子-MAPK1 结合物的 RMSD (0.365 ± 0.044) nm 和原始配体复合物 (0.358 ± 0.046) nm 相

似,均在 40 ns 后逐渐稳定(图 8-C)。钩吻素子-MAPK1 结合物和原始配体复合物的 RMSF 分别是 (0.111 ± 0.070) nm 以及 (0.119 ± 0.074) nm,所有钩吻素子-MAPK1 复合物和原始配体复合物的氨基酸残基波动均无明显差异(图 8-D)。整个模拟结果表明,钩吻素子可与 MAPK1 形成稳定构象,也验证了分子对接结果的可靠。



A-势能变化曲线; B-温度变化曲线; C-蛋白质骨架 RMSD 曲线; D-残基 RMSF 分析。
A-potential energy curve; B-temperature curve; C-RMSD curve of protein backbone; D-RMSF analysis of residues.

图 8 钩吻素子-MAPK1 结合物分子动力学模拟结果

Fig. 8 Molecular dynamics simulation results of koumine-MAPK1 complex

3.8 钩吻素子抑制 MGC-803 细胞增殖

CCK-8 结果显示,与对照组比较,不同浓度钩吻素子处理细胞 24 h 后,细胞活力随药物浓度升高呈浓度相关性下降,其中 $300 \sim 800 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度组抑制作用显著 ($P < 0.01$),具有统计学差异(图 9)。钩吻素子有抑制胃癌 MGC-803 细胞增殖的作用,其半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 (1.90 ± 0.23) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,相当于 $581 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.9 钩吻素子诱导 MGC-803 细胞凋亡

流式结果显示,与对照组相比,钩吻素子各给药组细胞凋亡率明显升高,并呈浓度相关性增强。(图 10-A);相比对照组,经不同浓度的钩吻素子处理后的细胞凋亡率,包括早期凋亡率显著增多 ($P <$

0.05 、 0.01) (图 10-B、C)。

3.10 钩吻素子对相关蛋白的影响

Western blotting 结果显示,钩吻素子可下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,上调促凋亡蛋白 Bax 表达(图 11)。在 MAPK 通路中,钩吻素子显著下调 p-ERK1/2 水平,同时上调 p-p38 表达,总 ERK1/2 与 p38 蛋白无明显变化(图 12)。

4 讨论

本研究联合网络药理学、分子对接及实验验证技术,系统阐明钩吻素子抗胃癌作用机制。核心研究发现筛选获得钩吻素子的 106 个抗胃癌作用靶点,富集于 122 条信号通路,提示钩吻素子抗胃癌具有“多靶点、多通路”的特性;分子对接结果表明,

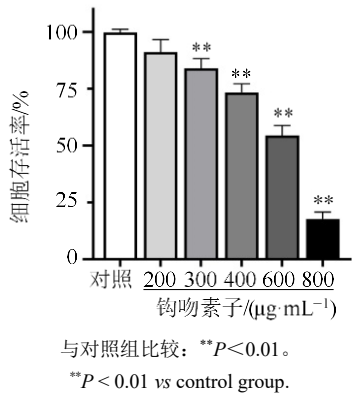


图 9 CCK-8 法检测钩吻素子作用于胃癌 MGC-803 细胞 24 h 后细胞的活力 ($\bar{x} \pm s, n=4$)
Fig. 9 Cell vitality of gastric cancer MGC-803 cells detected by CCK-8 assay after 24 h treatment with koumine ($\bar{x} \pm s, n=4$)

钩吻素子在 MAPK1、MAP2K1、GSK3B、MAPK14、MET 和 JAK2 的活性结构域中呈现紧凑的结合模式。钩吻素子与 MAPK1 存在高亲和力结合 (结合能 = -30.10 kJ·mol⁻¹)；体外实验验证发现，钩吻素子可通过调控 MAPK 信号通路，显著抑制胃癌细胞增殖并诱导其凋亡。

网络药理学研究结果表明，钩吻素子通过“多靶点、多通路”作用于胃癌。其中，MAPK1(ERK2)、GRB2、MAP2K1(MEK1)、GSK3B、MAPK14(p38)、MET 和 JAK2 被确定为核心理疗靶点。作为 MAPK 信号通路的关键调控因子，MAPK1/ERK2 通过 Raf-MEK-ERK 磷酸化级联反应传递细胞外信号，最终调控细胞转录、增殖、分化及凋亡等关键过程^[33-34]。该系列过程与 GO 分析结果中“细胞对刺激的反应”

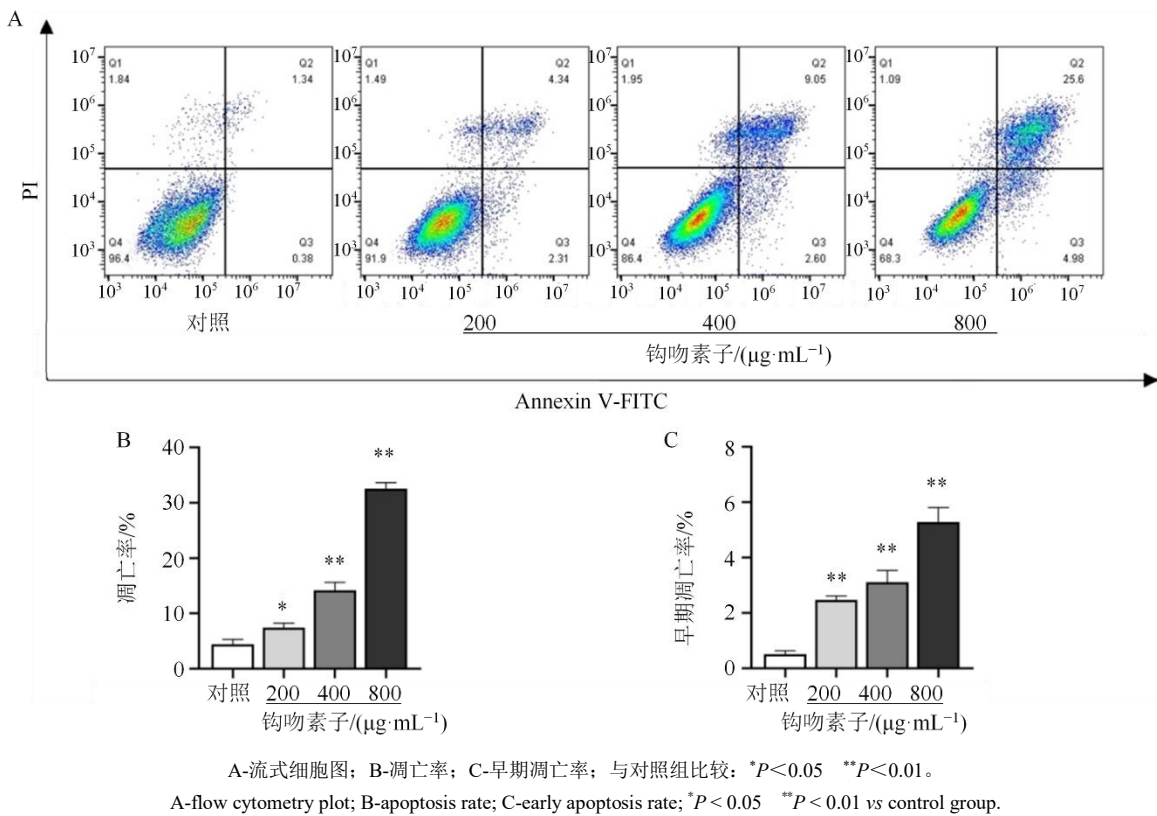


图 10 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测钩吻素子处理 MGC-803 细胞 24 h 后对凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 10 Detection of effect of koumine on MGC-803 cell apoptosis after 24 h of treatment by Annexin V-FITC/PI double-staining method ($\bar{x} \pm s, n=3$)

条目所对应的生物学过程一致。值得注意的是，已有研究证实 ERK1/2 的激活可驱动同源盒基因 A13 (HOXA13) 介导的胃癌进展与转移^[34]。而抑制 ERK1/2 既可作为一种极具潜力的治疗策略，其本身也可作为潜在的治疗靶点^[35-36]。与之一致的是，本研究中 ERK2 显著表达，提示钩吻素子可能通过

靶向抑制 ERK2 活性发挥抗胃癌效应。生长因子受体结合蛋白 2 (GRB2) 是一种在细胞中广泛表达的关键衔接蛋白^[37]。Yu 等^[38]研究发现，GRB2 在胃癌细胞中过表达。作为主要的信号转导分子，GRB2 在多种下游肿瘤信号通路中发挥作用^[39]，可通过 SH3 结构域的相互作用促进 SOS-Ras-Raf-MEK-ERK 信

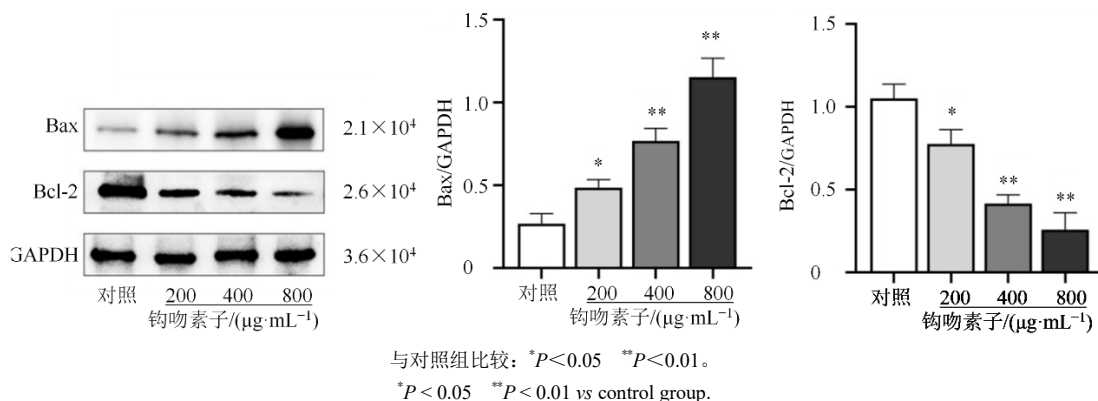


图 11 钩吻素子处理 MGC-803 细胞 24 h 后 Western blotting 实验检测细胞凋亡蛋白 Bax 和 Bcl-2 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 11 Detection of expression of apoptosis proteins Bax and Bcl-2 by Western blotting after MGC-803 cells treated with koumine for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

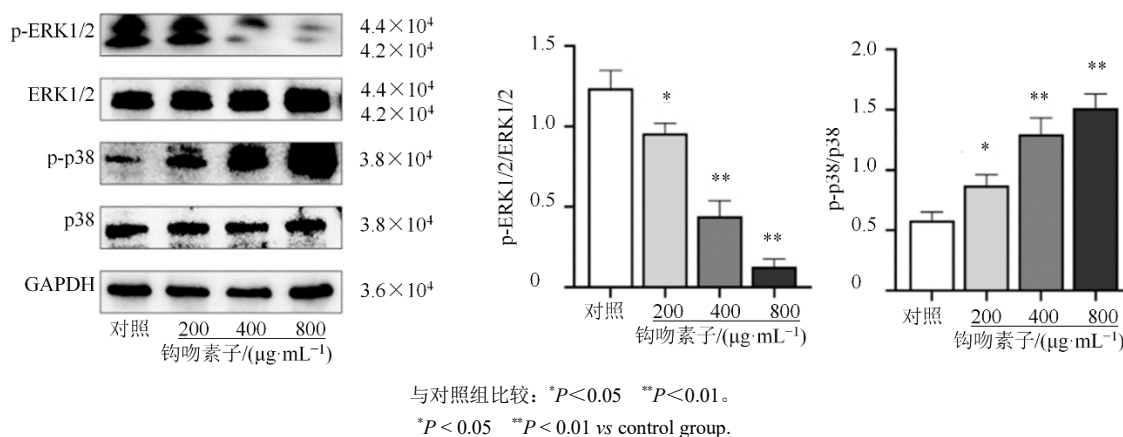


图 12 钩吻素子处理 MGC-803 细胞 24 h 后 Western blotting 实验检测 MAPK 信号通路中 p-ERK1/2、ERK1/2、p-p38、p38 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
 Fig. 12 Western blotting detected expressions of p-ERK1/2, ERK1/2, p-p38, and p38 proteins in MAPK signaling pathway after MGC-803 cells were treated with koumine for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

号传导^[40-42]。MAP2K1 (MEK1) 也是 MAPK 信号通路上的重要蛋白。Liu 等^[43]研究表明, MEK1/2 抑制剂曲美替尼可通过特异性抑制 ERK 并调控 ERK 介导的 Bcl-2 凋亡蛋白家族, 从而逆转胃癌治疗耐药。MAPK14 (p38) 是 MAPK 信号通路中除 ERK 通路外的另一重要靶点^[44]。ERK 与 p38 通路的双重调控尤为重要——ERK1/2 通常促进细胞增殖, 而 p38 激活后可通过磷酸化包括 Bcl-2 家族蛋白在内的 100 多种底物诱导细胞凋亡^[45-46]。上述所有靶点均能通过 MAPK 信号通路直接或间接影响细胞增殖、生长、转移及凋亡, 提示钩吻素子对胃癌的作用可能主要通过调控 MAPK 信号通路实现。

分子对接结果显示, 钩吻素子可自主结合至 MAPK1、MAP2K1、GSK3B、MAPK14、MET 及 JAK2 这 6 种蛋白的活性结构域, 结合能均小于 0,

表明配体 (钩吻素子) 可自发与受体 (靶点蛋白) 结合。动力学模拟结果显示, 钩吻素子-MAPK1 复合物同样呈现稳定状态, 提示钩吻素子能与 MAPK1 形成稳定复合物。由于 MAP2K1、GSK3B 等靶点无可用原始配体复合物, 无法构建稳定模拟体系, 且实验室条件限制无法开展多靶点平行验证, 故本研究最终选取“成分-疾病-靶点-通路”网络中 degree 值最高且可获取原始配体复合物的 MAPK1 开展分子动力学模拟及后续体外机制验证, 其余靶点的抗胃癌的具体作用机制有待后续深入研究。

体外实验验证结果显示, 钩吻素子对 MGC-80 胃癌细胞的增殖抑制与凋亡诱导作用呈浓度相关性, 且该效应与 Bax/Bcl-2 值升高相关。已知 Bcl-2 蛋白可抑制细胞凋亡, 而 Bax 蛋白则能促进细胞凋亡并拮抗 Bcl-2 的功能^[47]。作为可溶性蛋白, Bax 主

要定位于细胞质；当细胞凋亡被诱导时，Bax 会快速转移至线粒体并与 Bcl-2 结合^[48]。此外，MAPK 信号通路分析结果表明，钩吻素子可呈剂量相关性抑制 ERK1/2 磷酸化，同时激活 p38。其中，p38 与 ERK1/2 既是网络药理学筛选出的核心靶点，也是 MAPK 信号通路中的关键蛋白激酶。多种细胞外刺激可诱导 ERK1/2 激活并转位至细胞核，随后 ERK1/2 通过磷酸化作用调控多种转录因子活性，最终影响细胞增殖、分化、凋亡及转录过程^[49-51]。Yuan 等^[21]研究证实，钩吻素子可通过 ERK/p38 MAPK 信号通路抑制肝癌细胞增殖并促进其凋亡。另有研究显示，使用 SB203580 (p38 抑制剂) 处理胃癌细胞，可通过升高 ERK 磷酸化水平促进肿瘤发展^[52]；幽门螺杆菌 SS1 株脂多糖 (HpyloriSS1-LPS) 可诱导胃癌细胞凋亡，其机制可能涉及诱导 p-p38MAPK 生成^[53]；Wang 等^[54]则发现，长春新碱可能通过激活胃癌细胞中的 p38 MAPK 信号转导通路发挥抗肿瘤活性。综上，钩吻素子可能通过抑制 ERK1/2 磷酸化、促进 p38 磷酸化，从而对胃癌产生抑制效应。目前仍需进一步深入探究钩吻素子抗胃癌的作用机制，这或将为挖掘新型抗癌候选药物提供重要依据。

尽管本研究提供了创新性见解，但仍存在若干局限性需加以考量。第一，实验仅验证了网络药理学预测中与 MAPK 信号通路相关的 ERK1/2 和 p38 2 种蛋白，尚未对其他靶点及通路进行验证，这使得钩吻素子抗胃癌机制的阐释不够全面。第二，钩吻素子对各靶点的作用究竟是直接作用还是间接调控，目前尚未明确，仍需通过进一步实验探究。第三，受限于资金与技术条件，本研究未开展体内抗肿瘤实验，无法完全反映钩吻素子在活体环境中的作用效果与安全性。最后，未来研究将引入一线化疗药作为对照，进一步评估钩吻素子的临床转化潜力。

本研究表明钩吻素子抗胃癌作用机制主要通过调控 MAPK 信号通路实现。网络药理学研究筛选出 106 个钩吻素子作用靶点，并富集于多种致癌通路；分子对接与动力学模拟结果则验证了钩吻素子与 MAPK1 可形成稳定结合。体外实验进一步证实，钩吻素子对胃癌细胞的增殖抑制与促凋亡作用呈浓度相关性，且该效应与 Bax/Bcl-2 表达调控及 ERK/p38 磷酸化水平改变相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] Smyth E C, Nilsson M, Grabsch H I, et al. Gastric cancer [J]. *Lancet*, 2020, 396(10251): 635-648.
- [3] Song Z Y, Wu Y Y, Yang J B, et al. Progress in the treatment of advanced gastric cancer [J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(7): 1010428317714626.
- [4] Thompson J A, Schneider B J, Brahmer J, et al. Management of immunotherapy-related toxicities, version 1.2019 [J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019, 17(3): 255-289.
- [5] 王燕婷, 戴媛媛, 杨珺, 等. 细胞毒化疗药物不良反应支持治疗的指南进展及实践总结 [J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(20): 1726-1735.
Wang Y T, Dai Y Y, Yang J, et al. Progress of guidelines and practice summary for supportive care of adverse reactions induced by cytotoxic chemotherapy drugs [J]. *Chin Pharm J*, 2020, 55(20): 1726-1735.
- [6] 尹振宇, 刘乾, 李晓梅, 等. 胃癌靶向治疗药物及耐药机制的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2021, 30(9): 701-710.
Yin Z Y, Liu Q, Li X M, et al. Progress on targeted therapy and drug resistance mechanism of gastric cancer [J]. *China Cancer*, 2021, 30(9): 701-710.
- [7] Zhu L Y, Chen L Q. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 40.
- [8] Abu Samaan T M, Samec M, Liskova A, et al. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12): 789.
- [9] 郑永强, 付俊伟, 朱慧敏, 等. 一种用于实现脑靶向的负载长春新碱抗肿瘤纳米药物制剂的制备及表征 [J]. *肿瘤药学*, 2021, 11(5): 547-553.
Zheng Y Q, Fu J W, Zhu H M, et al. Preparation and characterization of brain-targeting anticancer nanopharmaceuticals [J]. *Anti Tumor Pharm*, 2021, 11(5): 547-553.
- [10] 刘隽怡, 潘清波. 浅析癌症现状以及抗癌药物的发展与前景 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(26): 103-105.
Liu J Y, Pan Q B. Current status of cancer and development prospect of anticancer drugs [J]. *World Latest Med Inform*, 2019, 19 (26): 103-105.
- [11] 中国科学院中国植物志编辑委员会编. 中国植物志 [M]. 第 8 卷. 北京: 科学出版社, 1992: 251.
Editorial Committee of Flora Reipublicae Popularis Sinicae, Chinese Academy of Sciences. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* [M]. Volume 8. Beijing: Science Press, 1992: 251.

- [12] Que W C, Chen M H, Yang L, et al. A network pharmacology-based investigation on the bioactive ingredients and molecular mechanisms of *Gelsemium elegans* Benth against colorectal cancer [J]. BMC Complement Med Ther, 2021, 21(1): 99.
- [13] 孙铭学, 徐庆强, 孟文琪, 等. 钩吻药理及毒理机制研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(4): 336-341.
Sun M X, Xu Q Q, Meng W Q, et al. Research progress on pharmacology and toxicological mechanism of *Gelsemium elegans* [J]. J Toxicol, 2020, 34(4): 336-341.
- [14] 沈舶宁, 王文忠, 曹娜, 等. 钩吻的本草考证 [J]. 中国民族民间医药, 2019, 28(10): 30-34.
Shen B N, Wang W Z, Cao N, et al. Textual research of *Gelsemium elegans* (gardn. et champ.) Benth [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacology, 2019, 28(10): 30-34.
- [15] 赵雅婷, 武淑鹏, 胡春丽, 等. 钩吻的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 200-210.
Zhao Y T, Wu S P, Hu C L, et al. Reviews on chemical compositions and pharmacological effect of *Gelsemium elegans* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(3): 200-210.
- [16] Jin G L, Su Y P, Liu M, et al. Medicinal plants of the genus *Gelsemium* (Gelsemiaceae, Gentianales): A review of their phytochemistry, pharmacology, toxicology and traditional use [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(1): 33-52.
- [17] 杨峻山, 陈玉武. 胡蔓藤生物碱的化学研究: I. 生物碱的分离与胡蔓藤碱甲的结构 [J]. 药化学报, 1983, 18(2): 104-112.
Yang J S, Chen Y W. Chemical studies on the alkaloids of hu-man-Teng (*Gelsemium elegans* Banth.) i. isolation of the alkaloids and structure of humantenmine [J]. Acta Pharm Sin, 1983, 18(2): 104-112.
- [18] 黄静. 钩吻生物碱化合物抗肿瘤作用及其作用机制初探 [D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
Huang J. Preliminary study on the antitumor effect and mechanism of gelsemium alkaloids [D]. Fuzhou: Fujian Medical University, 2010.
- [19] 迟德彪, 雷林生, 金宏, 等. 钩吻素子体外诱导人结肠腺癌 LoVo 细胞凋亡的实验研究 [J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(9): 911-913.
Chi D B, Lei L S, Jin H, et al. Study of koumine-induced apoptosis of human colon adenocarcinoma LoVo cells *in vitro* [J]. J First Mil Med Univ, 2003, 23(9): 911-913.
- [20] 郇文彬. 钩吻素子对不同种属细胞的作用及抗肿瘤活性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.
Huan W B. Study on the effect of koumine on cells of different species and its antitumor activity [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [21] Yuan Z H, Liang Z, Yi J E, et al. Koumine promotes ROS production to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation via NF- κ B and ERK/p38 MAPK signaling [J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 559.
- [22] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. 中草药, 2024; 55(12): 4204-4213.
Liao Y N, Zhao K L, Guo H W. Application and challenges of network pharmacology research in traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024; 55(12): 4204-4213.
- [23] Li M Y, Gao Y J, Yue X Y, et al. Integrated metabolomics and network pharmacology approach to reveal immunomodulatory mechanisms of Yupingfeng Granules [J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113660.
- [24] Wang X, Shen Y H, Wang S W, et al. PharmMapper 2017 update: A web server for potential drug target identification with a comprehensive target pharmacophore database [J]. Nucleic Acids Res, 2017, 45(W1): W356-W360.
- [25] Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissTargetPrediction: Updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.
- [26] Yao Z J, Dong J, Che Y J, et al. TargetNet: A web service for predicting potential drug-target interaction profiling via multi-target SAR models [J]. J Comput Aided Mol Des, 2016, 30(5): 413-424.
- [27] Safran M, Rosen N, Twik M, et al. *The GeneCards Suite* [M]. Practical Guide to Life Science Databases. Singapore: Springer, 2021: 27-56, doi: org/10.1007/978-981-16-5812-9_2.
- [28] 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.
- [29] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2): 455-461.
- [30] Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, et al. CHARMM36m: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins [J]. Nat Methods, 2017, 14(1): 71-73.
- [31] Vanommeslaeghe K, Hatcher E, Acharya C, et al. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields [J]. J Comput Chem, 2010, 31(4): 671-690.

- [32] Hess B. P-LINCS: A parallel linear constraint solver for molecular simulation [J]. *J Chem Theory Comput*, 2008, 4(1): 116-122.
- [33] Eblen S T. Extracellular-regulated kinases: Signaling from ras to ERK substrates to control biological outcomes [J]. *Adv Cancer Res*, 2018, 138: 99-142.
- [34] Qin Z W, Chen Z Q, Weng J Y, et al. Elevated HOXA13 expression promotes the proliferation and metastasis of gastric cancer partly via activating Erk1/2 [J]. *Oncotargets Ther*, 2019, 12: 1803-1813.
- [35] Shin M, Franks C E, Hsu K L. Isoform-selective activity-based profiling of ERK signaling [J]. *Chem Sci*, 2018, 9(9): 2419-2431.
- [36] Yan W X, Chen S H, Zhao Y Y, et al. Fisetin inhibits the proliferation of gastric cancer cells and induces apoptosis through suppression of ERK 1/2 activation [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(6): 8442-8446.
- [37] Ahmed Z, Lin C C, Suen K M, et al. Grb2 controls phosphorylation of FGFR2 by inhibiting receptor kinase and Shp2 phosphatase activity [J]. *J Cell Biol*, 2013, 200(4): 493-504.
- [38] Yu G Z, Chen Y, Wang J J. Overexpression of Grb2/HER2 signaling in Chinese gastric cancer: Their relationship with clinicopathological parameters and prognostic significance [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(10): 1331-1339.
- [39] Li L Y, Li E M, Wu Z Y, et al. Overexpression of GRB2 is correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 3132-3140.
- [40] Cussac D, Vidal M, Leprince C, et al. A Sos-derived peptidimer blocks the Ras signaling pathway by binding both Grb2 SH3 domains and displays antiproliferative activity [J]. *FASEB J*, 1999, 13(1): 31-39.
- [41] Hill R J, Zozulya S, Lu Y L, et al. The lymphoid protein tyrosine phosphatase Lyp interacts with the adaptor molecule Grb2 and functions as a negative regulator of T-cell activation [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(3): 237-244.
- [42] Lee S, Bae Y S. Monomeric and dimeric models of ERK2 in conjunction with studies on cellular localization, nuclear translocation, and *in vitro* analysis [J]. *Mol Cells*, 2012, 33(4): 325-334.
- [43] Liu H F, Yao Y, Zhang J, et al. MEK inhibition overcomes everolimus resistance in gastric cancer [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2020, 85(6): 1079-1087.
- [44] Sun Y, Liu W Z, Liu T, et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2015, 35(6): 600-604.
- [45] Cuadrado A, Nebreda A R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling [J]. *Biochem J*, 2010, 429(3): 403-417.
- [46] Zarubin T, Han J H. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway [J]. *Cell Res*, 2005, 15(1): 11-18.
- [47] Spitz A Z, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(3): 206-220.
- [48] Ke F, Voss A, Kerr J B, et al. BCL-2 family member BOK is widely expressed but its loss has only minimal impact in mice [J]. *Cell Death Differ*, 2012, 19(6): 915-925.
- [49] Keshet Y, Seger R. The MAP kinase signaling cascades: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 661: 3-38.
- [50] Sabio G, Davis R J. TNF and MAP kinase signalling pathways [J]. *Semin Immunol*, 2014, 26(3): 237-245.
- [51] Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(9): 1619-1633.
- [52] Lee K H, Choi E Y, Kim M K, et al. Regulation of hepatocyte growth factor-mediated urokinase plasminogen activator secretion by MEK/ERK activation in human stomach cancer cell lines [J]. *Exp Mol Med*, 2006, 38(1): 27-35.
- [53] 周超, 马洪升. 乳酸杆菌对幽门螺旋杆菌脂多糖作用下的 SGC-7901 细胞 p38MAPK 磷酸化水平和凋亡率的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007(8): 807-812.
Zhou C, Ma H S. Effects of Lactobacillus on phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis in SGC-7901 cells treated with lipopolysaccharide of Helicobacter pylori [J]. *World Chin J Dig*, 2007(8): 807-812.
- [54] 王雨田, 张忠兵, 药立波, 等. p38 分裂原激活蛋白激酶信号转导途径与胃癌细胞长春新碱耐药相关 [J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(2): 83-85.
Wang Y T, Zhang Z B, Yao L B, et al. The effects of vincristine on the activity of p38 MAPK in gastric cancer cell SGC7901 and multidrug resistant cell SGC7901/VCR [J]. *Chin J Dig*, 2001, 21(2): 83-85.

[责任编辑 齐静雯]