蟾酥注射液通过 PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 轴调控胃癌细胞周期和凋亡

孙 腾[1]，葛 姮[1#]，姜 盼[1]，张 馨[1]，马 昂[1]，潘钊海[1]，郑秋生[1,2]，李德芳[1*]，叶 蕾[1*]

1. 山东医药大学中医学院，山东 烟台 264003
2. 石河子大学药学院，新疆 石河子 832003

摘 要：目的 探讨蟾酥注射液抑制胃癌细胞增殖的作用及其潜在机制。**方法** 采用 CCK-8 实验、克隆形成实验、流式细胞术及 Hoechst 33342 染色考察蟾酥注射液对 HGC-27 细胞增殖、周期与凋亡的影响。通过网络药理学筛选蟾酥治疗胃癌的靶点，利用蛋白质组学技术分析蟾酥注射液处理 HGC-27 细胞后的差异表达蛋白，取二者交集确定关键靶点。通过基因富集分析预测核心信号通路，并采用 Western blotting 进行验证。通过体外沉默糖原合成酶激酶-3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）和过表达细胞周期蛋白 E1（cyclin E1，CCNE1）的功能回复实验，以及基于裸鼠移植瘤模型的体内实验，进一步验证核心分子轴的功能。**结果** 蟾酥注射液能显著抑制 HGC-27 细胞增殖，其半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）值为 26.56 ng/mL。蟾酥注射液能诱导细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期并促进细胞凋亡（$P<0.01$）。网络药理学与蛋白质组学共同筛选出 29 个关键靶点，富集分析提示磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路是核心通路。Western blotting 结果显示，蟾酥注射液可下调 HGC-27 细胞中 p-PI3K、p-Akt、B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）、CCNE1 和细胞周期蛋白依赖性激酶 2（cyclin-dependent kinase 2，CDK2）的蛋白表达（$P<0.01$），上调 GSK-3β、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）和剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cleaved cysteine-aspartate protease-3，cleaved Caspase-3）表达（$P<0.05$、0.01）。功能回复实验证实，沉默 GSK-3β 或过表达 CCNE1 均可部分逆转蟾酥注射液诱导的细胞周期阻滞、凋亡及增殖抑制（$P<0.05$、0.01）。体内实验结果显示，蟾酥注射液能显著抑制裸鼠移植瘤的生长，促进肿瘤细胞凋亡并抑制肿瘤细胞增殖，下调肿瘤组织中 p-PI3K、p-Akt 及 CCNE1 表达，上调 GSK-3β 表达。**结论** 蟾酥注射液通过抑制 PI3K/Akt 信号通路，上调 GSK-3β 表达，进而下调 CCNE1 的表达，诱导细胞周期阻滞和凋亡，从而抑制胃癌生长。

关键词：蟾酥注射液；PI3K/Akt 信号通路；GSK-3β；细胞周期阻滞；细胞凋亡

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2026)22 - 8981 - 12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.22.014

Bufonis Venenum Injection regulates gastric cancer cell cycle and apoptosis via PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 axis

SUN Teng[1], GE Heng[1], JIANG Pan[1], ZHANG Xin[1], MA Ang[1], PAN Zhaohai[1], ZHENG Qiusheng[1,2], LI Defang[1], YE Lei[1]

1. School of Traditional Chinese Medicine, Shandong Medical and Pharmaceutical University, Yantai 264003, China
2. School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832003, China

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect and potential mechanism of *Bufonis Venenum* Injection (蟾酥注射液) on gastric cancer cell proliferation. **Methods** CCK-8 assay, colony formation assay, flow cytometry and Hoechst 33342 staining were used to investigate the effects of *Bufonis Venenum* Injection on the proliferation, cell cycle and apoptosis of HGC-27 cells. Targets for treating gastric cancer with *Bufonis Venenum* Injection were screened through network pharmacology, and differentially expressed proteins in HGC-27 cells treated with *Bufonis Venenum* Injection were analyzed using proteomics techniques. The intersection was taken to determine the key targets. Core signaling pathways were predicted through gene enrichment analysis and validated using Western blotting. Through *in vitro* silencing of glycogen synthase kinase-3β (GSK-3β) and overexpression of cyclin E1 (CCNE1), as well as *in*

收稿日期：2026-04-17

基金项目：烟台市科技局项目（2024JCYJ048）

作者简介：孙 腾，硕士研究生，从事中药活性成分与靶点发现研究。E-mail: 17861173816@163.com

#共同第一作者：葛 姮，硕士研究生，从事中药活性成分与靶点发现研究。E-mail: 993439400@qq.com

***通信作者：**李德芳，博士，教授，从事中药活性成分生物合成与靶点机制研究。E-mail: lidefang@163.com

叶 蕾，博士，教授，从事中药活性成分及复方靶点机制研究。E-mail: bzmcyelei@163.com

vivo experiments based on a nude mouse transplant tumor model, the function of core molecular axis was further validated. **Results** *Bufonis Venenum* Injection could significantly inhibit the proliferation of HGC-27 cells, with a half inhibitory concentration (IC_{50}) value of 26.56 ng/mL. *Bufonis Venenum* Injection could induce cell cycle arrest in G_0/G_1 phase and promote cell apoptosis ($P < 0.01$). Network pharmacology and proteomics jointly screened 29 key targets, and enrichment analysis revealed that phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway was the core pathway. Western blotting results showed that *Bufonis Venenum* Injection could downregulate the protein expressions of p-PI3K, p-Akt, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), CCNE1 and cyclin dependent kinase 2 (CDK2) in HGC-27 cells ($P < 0.01$), and upregulate the expressions of GSK-3β, Bcl-2 associated X protein (Bax) and cleaved cysteine-aspartate protease-3 (cleaved Caspase-3) ($P < 0.05$, 0.01). Functional recovery experiments confirmed that silencing GSK-3β or overexpression of CCNE1 could partially reverse the cell cycle arrest, apoptosis and proliferation inhibition induced by *Bufonis Venenum* Injection ($P < 0.05$, 0.01). The *in vivo* experimental results showed that *Bufonis Venenum* Injection could significantly inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice, promote tumor cell apoptosis and inhibit tumor cell proliferation, downregulate the expressions of p-PI3K, p-Akt and CCNE1 in tumor tissues, and upregulate the expression of GSK-3β. **Conclusion** *Bufonis Venenum* Injection inhibits PI3K/Akt signaling pathway, upregulates the expression of GSK-3β, thereby downregulating the expression of CCNE1, inducing cell cycle arrest and apoptosis, thereby inhibiting the growth of gastric cancer.

Key words: *Bufonis Venenum* Injection; PI3K/Akt signaling pathway; GSK-3β; cell cycle arrest; apoptosis

胃癌是全球高发的恶性肿瘤之一，亚洲地区疾病负担尤重，发病率仍呈上升趋势[1-4]。手术切除是早期胃癌的首选治疗方式[5-8]；但受医疗资源分布不均与早期筛查体系不完善的限制，多数患者确诊时已处晚期，药物治疗由此成为晚期胃癌的主要手段[1,4,9]。在中国、印度等国家，传统医药与民族医药长期用于肿瘤的辅助治疗[10-11]。蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾蜍 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *B. melanostictus* Schneider 的干燥分泌物，对多种类型肿瘤均具有抑制作用[1,3,12-14]；蟾酥制剂及其活性成分可抑制肺癌、肝癌[15]、人头颈部鳞状细胞癌[16]及宫颈癌细胞的增殖，对难治性炎症及脓毒症亦显示出干预潜力[4,17-18]。磷脂酰肌醇 3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，Akt）信号通路作为细胞存活、增殖和代谢的关键调控因子，在胃癌的发生、发展、转移及化疗耐药中扮演着核心角色，其异常激活是胃癌最显著的分子特征之一[19]。该通路的下游关键效应分子糖原合酶激酶-3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）能够影响细胞增殖、多种代谢及信号通路调控等[20]。细胞周期蛋白 E1（cyclin E1，CCNE1）是 GSK-3β 的一个重要下游靶点，在多种恶性肿瘤中，CCNE1 频繁扩增或过表达，是导致细胞周期失控、增殖异常的关键因素，并与胃癌等癌症的不良预后显著相关[21]。蟾酥在肿瘤领域应用历史悠久，现代研究也显示其具备良好的应用前景[22-23]，然而其用于胃癌治疗的具体作用机制尚有待系统阐明。本研究通过网络药理学技术整合分析多数据库的关键数据，以筛选蟾酥的有效活性成分，阐明其抗肿瘤效应及作用通路，从而初步确定胃癌治疗的潜在靶点；利用前沿蛋白质组学技术对胃癌细胞在蟾酥注射液处理前后的差异表达蛋白谱进行比较分析，以揭示由蟾酥注射液诱导的特异性蛋白变化，进而验证其潜在治疗靶点。

1 材料

1.1 细胞与动物

人胃癌 HGC-27 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库（CSTR：19375.09.3101 HUMTCHu22），使用 RPMI 1640 培养基于 37 ℃、5% CO_2 条件下培养。

SPF 级雄性 BALB/c-nu 裸鼠，8 周龄，体质量 21～24 g，购自山东医药大学实验动物中心，动物质量合格证号 BZMU2022-7-3-L。动物饲养于山东医药大学实验动物中心 SPF 级屏障环境中，实验动物使用许可证号为动研批第 2021-259 号，饲养条件维持温度（22±2）℃、相对湿度 50%～60%、12 h 光照/12 h 黑暗循环，小鼠可自由摄食饮水。动物实验经山东医药大学伦理委员会批准，批准号为[滨]20220127。

1.2 药品与试剂

蟾酥注射液（国药准字 Z32020693，批号 191001）购自江苏浦金药业有限公司；RPMI 1640 基础培养基（批号 ZQ-200）购自上海中乔新舟生物科技有限公司；青链霉素混合液（批号 P1400）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO，批号 D8375）、0.1%结晶紫染色液（批号 G1063）、细胞增殖及毒性检测试剂盒（批号 CA1210）、BCA 蛋白浓度测定试剂盒（批号 PC0020）、ActivAb™ Solar Fluor 568 标

记的羊抗兔 IgG 二抗（批号 K1034G-AF568）、剪切型半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3（cleaved cysteine-aspartate protease-3，cleaved Caspase-3）抗体（批号 K011796RR）、高效 RIPA 裂解液（批号 R0010）、ECL Plus 超敏发光液（批号 PE0010）、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒（批号 CA1020）、Hoechst 33342/PI 双染试剂盒（批号 CA1120）、细胞周期检测试剂盒（批号 CA1510）、蛋白磷酸酶抑制剂混合物（批号 P1260）、4×蛋白上样缓冲液（批号 P1015）、SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒（批号 P1200）购自北京索莱宝生物科技有限公司；PVDF 膜（批号 E801-01）、Plus Prestained Protein Marker（相对分子质量 1.8×10^5，批号 MP201-01）购自南京诺唯赞生物科技有限公司；胎牛血清（批号 A5669701）购自美国赛默飞世尔科技有限公司；无血清细胞冻存液（批号 C0210B）、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒（批号 C1091）、细胞增殖检测试剂盒（DAB 法，批号 C0085S）购自上海碧云天生物技术股份有限公司；0.25%胰蛋白酶溶液（批号 T6539）购自上海麦克林生化科技股份有限公司；β-actin 抗体（批号 AC026）、PI3K 抗体（批号 A23303PM）、p-PI3K 抗体（批号 AP0854）、Akt 抗体（批号 A17909）、p-Akt 抗体（批号 A18675）、GSK-3β 抗体（批号 A27666）、B 细胞淋巴瘤-2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体（批号 A19693）、Bcl-2 相关 X 蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体（批号 A19684）、CCNE1 抗体（批号 A22360）、细胞周期蛋白依赖性激酶 2（cyclin-dependent kinase 2，CDK2）抗体（批号 A27938）、细胞周期蛋白 A1（Cyclin A1）抗体（批号 A2635）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器

BSC-1000IIB2 型生物安全柜（浙江孚夏医疗科技有限公司）；H1650R 型台式高速冷冻离心机（湖南湘仪实验仪器开发有限公司）；Feyond-A300 型多功能酶标仪（杭州奥盛仪器有限公司）；徕卡 DM IL LED 型倒置实验室显微镜（上海徕卡显微系统贸易有限公司）；BD LSRFortessa™ 型流式细胞分析仪（碧迪医疗器械有限公司）；Tanon 4600 型全自动化学发光图像分析成像仪（天能生命科学有限公司）；L01027C 型电泳仪电源（金斯瑞生物科技有限公司）；Criterion Blotter 型蛋白转印设备（美国 Bio-Rad 公司）；Forma™ Steri-Cycle™ i160 型 CO_2 165 L 培养箱（美国赛默飞世尔科技公司）。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞活力

HGC-27 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板，培养过夜。分别加入含不同质量浓度（10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 ng/mL）蟾酥注射液的培养基，继续培养 24 h。对照组加入不含药物的培养基。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，37 ℃孵育 4 h 后，采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度（A）值，计算细胞活力。

细胞活力＝$A_{给药}/A_{对照}$

2.2 克隆形成实验检测细胞增殖

HGC-27 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 待细胞贴壁后，分别加入含不同质量浓度（15、25、35 ng/mL）蟾酥注射液的培养基处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。弃去培养基，更换为新鲜完全培养基，继续培养 15 d，期间每 2 天换液 1 次。培养结束后，加入 4%多聚甲醛于室温固定 20 min，加入 1%结晶紫染色 15 min，于倒置显微镜下观察并拍照。

2.3 Hoechst 33342 染色检测细胞凋亡

HGC-27 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 待细胞贴壁后，分别加入含不同质量浓度（15、25、35 ng/mL）蟾酥注射液的培养基处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。收集细胞，用 PBS 洗涤 3 次，加入 4%多聚甲醛于室温固定 20 min。加入 Hoechst 33342 试剂避光染色 30 min，PBS 洗涤后，于荧光显微镜下观察并拍照。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期分布

HGC-27 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 待细胞贴壁后，分别加入含不同质量浓度（15、25、35 ng/mL）蟾酥注射液的培养基处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。收集细胞，加入结合缓冲液重悬，避光孵育 Annexin V-FITC 和 PI 染液，使用流式细胞仪分析细胞凋亡及周期分布情况。

2.5 蛋白质组学和网络药理学分析

2.5.1 蛋白质组学分析 HGC-27 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 待细胞贴壁后，加入含 25 ng/mL 蟾酥注射液的培养基处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。收集细胞，加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白，采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。通过 FASP 法进行蛋白酶解[31-32]，经 C_{18} 固相萃取柱脱盐浓缩后，进行 NanoLC-MS/MS 检测。Acclaim PepMap RSLC C_{18}

色谱柱，质谱采用 DDA 扫描模式。利用 MaxQuant 软件检索 UniProt Human 数据库（https://www.uniprot.org/）鉴定蛋白，设定 q 值＜0.05 且 $|\log_2$ 差异倍数（fold change，FC）|＞1 筛选差异表达蛋白。

2.5.2 网络药理学分析 从文献[31-32]中收集蟾酥所含化合物共 116 个，采用 ChemDraw 20.0 软件将化学结构转换为 SMILES 格式，用于后续分析。将 116 个化合物的 SMILES 分别提交至 SwissTarget Prediction 数据库（http://swisstargetprediction.ch/）与 SEA Search Server 数据库（https://sea.bkslab.org/）进行预测。SwissTargetPrediction 数据库物种限定为“Homo sapiens”，SEA 数据库提交后导出结果并剔除非人源基因。合并 2 个数据库结果并去除重复值，获得蟾酥化合物潜在靶点。以“gastric carcinoma”“gastric cancer”“stomach cancer”为检索词，检索 GeneCard、OMIM、Drugbank 及 TTD 数据库，其中 GeneCard 数据库保留 Relevance score≥20 的靶点。合并 4 个数据库结果并去除重复值；经人工核对、统一为官方基因符号并剔除无效条目后，获得胃癌相关靶点。采用 Bioinformatics & Evolutionary Genomics 在线工具（http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/）对蟾酥化合物靶点与胃癌相关靶点进行 Venn 分析，获得交集靶点。

2.6 Western blotting 检测细胞周期、凋亡、PI3K/Akt/GSK-3β 通路相关蛋白表达

HGC-27 细胞以 1×10^3 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 待细胞贴壁后，分别加入含不同质量浓度（15、25、35 ng/mL）蟾酥注射液的培养基处理 24 h，对照组加入不含药物的培养基。收集细胞，加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液，于冰上裂解 30 min，4 ℃、12 000×g 离心 20 min，取上清，采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶于室温封闭 1 h。加入一抗，4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤后，加入二抗，室温孵育 1 h。加入 ECL 化学发光试剂显影，采用 Image J 软件对条带进行灰度分析。

2.7 GSK-3β 干扰（si-GSK-3β）对蟾酥注射液干预 HGC-27 细胞的影响

si-GSK-3β 及阴性对照 siRNA（si-NC）由上海艾博思生物科技有限公司设计合成，si-GSK-3β 序列为 5’-GCUCAUUGCUGUCCUUAUATT-3’，si-NC 序列为 5’-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3’。HGC-27 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 至细胞融合度达 60%～70%。设置对照组、si-NC 组、si-GSK-3β 组、蟾酥注射液（25 ng/mL）组和 si-GSK-3β＋蟾酥注射液（25 ng/mL）组，按照 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书，分别将 si-GSK-3β 与 si-NC 转染至细胞中，转染 36 h 后，根据分组将蟾酥注射液组和 si-GSK-3β＋蟾酥注射液组培养基更换为含 25 ng/mL 蟾酥注射液的培养基继续培养 24 h。其余组更换为完全培养基继续培养 24 h。按“2.1”项下方法检测细胞活力，按“2.4”项下方法检测细胞凋亡和周期分布，按“2.6”项下方法检测 CCNE1、GSK-3β、CDK2、Bax 和 cleaved Caspase-3 的蛋白表达。

2.8 CCNE1 过表达（overexpression of CCNE1，OE-CCNE1）对蟾酥注射液干预 HGC-27 细胞的影响

CCNE1 过表达质粒（OE-CCNE1）及空载体对照质粒（OE-NC）由上海艾博思生物科技有限公司设计合成。以人 *CCNE1* 基因全长 CDS 序列（GenBank 登录号 NM_001238.2）为模板，通过 PCR 扩增目的片段后，插入 pcDNA3.1（+）真核表达载体，经酶切鉴定及 DNA 测序验证构建正确性。HGC-27 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板，培养 24 h 至细胞融合度达 60%～70%。设置对照组、OE-NC 组、OE-CCNE1 组、蟾酥注射液（25 ng/mL）组和 OE-CCNE1＋蟾酥注射液（25 ng/mL）组，按照 Lipofectamine 3000 转染试剂说明书，分别将 OE-CCNE1 质粒与 OE-NC 质粒转染至细胞中，转染 36 h 后，根据分组将蟾酥注射液组和 OE-CCNE1＋蟾酥注射液组培养基更换为含 25 ng/mL 蟾酥注射液的培养基继续培养 24 h。其余组更换为完全培养基继续培养 24 h。按“2.1”项下方法检测细胞活力，按“2.4”项下方法检测细胞凋亡和周期分布，按“2.6”项下方法检测 CCNE1、CDK2、Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达。

2.9 体内实验

2.9.1 动物造模、分组、给药与取材 于裸鼠腋下皮下接种 1×10^7 个 HGC-27 细胞（100 μL/只），待肿瘤体积生长至约 100 mm^3 时，将荷瘤小鼠随机分为对照组和蟾酥注射液低、中、高剂量（30、60、120 μg/kg，分别相当于临床等效剂量的 0.5、1、2 倍）组，每组 5 只。给药组每 2 天尾 iv 蟾酥注射液，对照组给予等体积的生理盐水。自给药起，每 2 天使用游标卡尺测量肿瘤最长径（L）和最短径

（W），按照 $V=(L\times W^2)/2$ 计算肿瘤体积，并记录小鼠体质量。实验结束，小鼠麻醉后颈椎脱臼处死，完整剥离肿瘤组织并拍照记录。肿瘤组织一部分于−80 ℃保存用于蛋白分析，另一部分用 4%多聚甲醛固定，石蜡包埋用于后续切片染色。

2.9.2 TUNEL 检测肿瘤组织细胞凋亡 肿瘤组织石蜡切片经脱蜡、水化后，用蛋白酶 K 通透处理，3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶。加入 TdT 酶和 DIG-dUTP 于 37 ℃反应 1 h，再加入链霉亲和素-HRP 及 DAB 底物显色，苏木素复染，于显微镜下观察凋亡细胞（棕褐色）。

2.9.3 免疫组化检测肿瘤组织 Ki67、PI3K、Akt、GSK-3β 和 CCNE1 表达 取小鼠肿瘤组织，福尔马林固定，常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明及石蜡包埋。将组织块切成 5 μm 厚切片，脱蜡、水化后，用含 10%牛血清白蛋白的 PBST 于室温封闭 2 h。加入一抗，4 ℃孵育过夜，经二抗孵育后，DAB 显色，苏木素复染，于显微镜下观察并拍照。

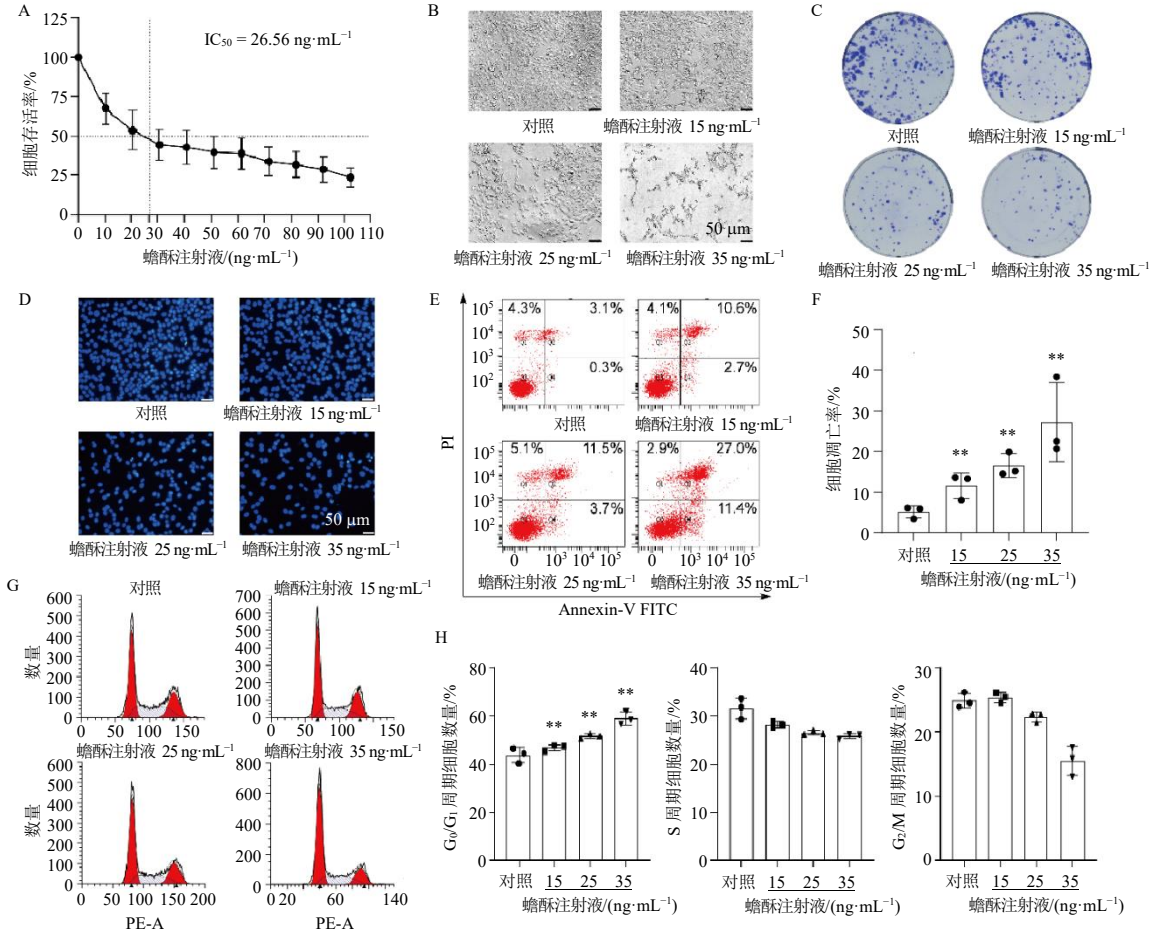
2.10 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析，两组独立样本比较采用双尾 Student's t 检验，多组间比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA）；若方差分析提示组间存在显著性差异，采用 LSD 法或 Tuck 法进行事后多重比较。

3 结果

3.1 蟾酥注射液对 HGC-27 细胞增殖、凋亡及细胞周期分布的影响

如图 1-A 所示，蟾酥注射液呈剂量相关性抑制



A-蟾酥注射液对 HGC-27 细胞活力的影响；B-蟾酥注射液对 HGC-27 细胞形态的影响（×400）；C-蟾酥注射液对 HGC-27 细胞增殖的影响；D-Hoechst 33342 染色检测蟾酥注射液对 HGC-27 细胞凋亡的影响（×400）；E、F-流式细胞术检测细胞凋亡；G、H-流式细胞术分析细胞周期分布；与对照组比较：$^{**}P<0.01$。

A-effect of *Bufonis Venenum* Injection on viability of HGC-27 cells; B-effect of *Bufonis Venenum* Injection on morphology of HGC-27 cells (× 400); C-effect of *Bufonis Venenum* Injection on proliferation of HGC-27 cells; D-effect of *Bufonis Venenum* Injection on apoptosis of HGC-27 cells detected by Hoechst 33342 staining (× 400); E, F-cell apoptosis detected by flow cytometry; G, H-cell cycle distribution detected by flow cytometry; $^{**}P < 0.01$ *vs* control group.

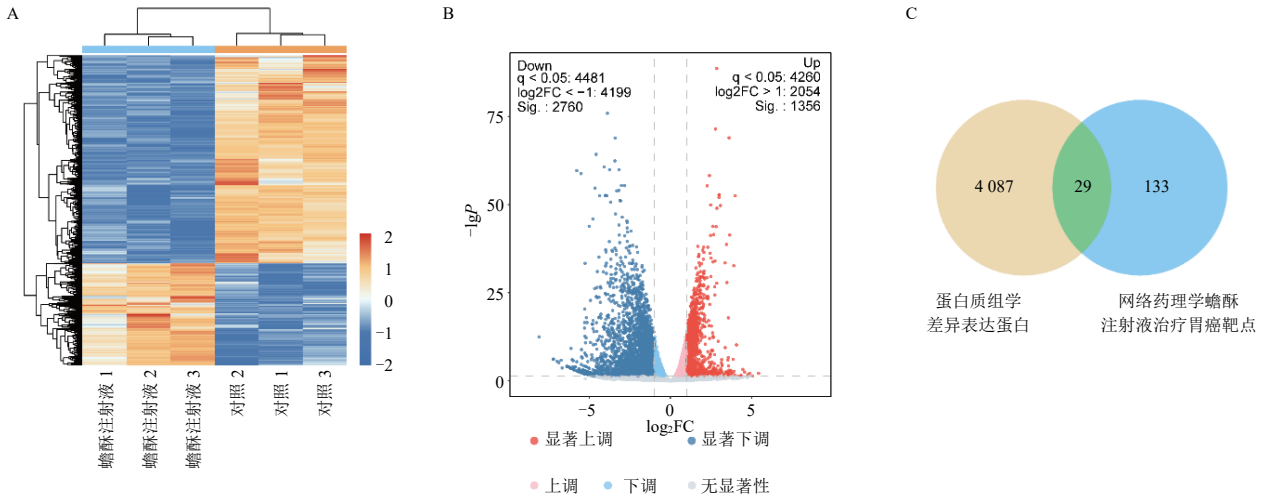
图 1 蟾酥注射液对 HGC-27 细胞增殖、凋亡及细胞周期分布的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 1 Effect of *Bufonis Venenum* Injection on proliferation, apoptosis and cell cycle distribution of HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

HGC-27 细胞活力，其半数抑制浓度（half inhibitory concentration，IC_{50}）为 26.56 ng/mL。如图 1-B 所示，与对照组相比，蟾酥注射液（15、25、35 ng/mL）组细胞贴壁能力下降、密度降低，且形态出现明显皱缩。克隆形成实验结果（图 1-C）显示，与对照组相比，蟾酥注射液（15、25、35 ng/mL）组细胞克隆数量减少、体积缩小，且呈剂量相关性。Hoechst 33342 染色结果（图 1-D）显示，与对照组相比，蟾酥注射液（15、25、35 ng/mL）组细胞出现细胞核固缩、碎裂等典型凋亡形态学改变。进一步采用流式细胞术检测细胞凋亡及周期分布情况，如图 1-E、F 所示，与对照组比较，蟾酥注射液（15、25、35 ng/mL）组细胞凋亡率显著升高（$P<0.01$），且呈剂量相关性；如图 1-G、H 所示，与对照组比较，蟾酥注射液（15、25、35 ng/mL）组 G_0/G_1 期细胞比例显著升高（$P<0.01$），提示细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期。以上结果表明，蟾酥注射液可通过诱导 HGC-27 细胞凋亡及阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期，有效抑制细胞增殖。

3.2 基于网络药理学与蛋白质组学筛选蟾酥注射液治疗胃癌的靶点

使用 25 ng/mL 蟾酥注射液处理 HGC-27 细胞，采用蛋白质组学技术进行分析。如图 2-A、B 所示，与对照组比较，蟾酥注射液组有 4 116 个蛋白的表达发生显著变化，其中 2 760 个蛋白表达显著下调，1 356 个蛋白表达显著下调。通过整合文献中 116 个蟾酥相关化合物的结构信息，利用 SwissTarget Prediction 与 SEA Search Server 数据库预测其潜在靶点，共获得药物靶点 930 个；从 GeneCard、OMIM、Drugbank 及 TTD 数据库中，检索并整合得到胃癌相关靶点 2 408 个；取交集获得蟾酥治疗胃癌的靶点 162 个。将蛋白质组学差异表达蛋白与网络药理学蟾酥注射液治疗胃癌靶点进行 Venn 分析（图 2-C），最终得到核心靶蛋白 29 个，分别为神经营养因子受体酪氨酸激酶 1（neurotrophic receptor tyrosine kinase 1，NTRK1）、一氧化氮合酶 2（nitric oxide synthase 2，NOS2）、脂肪酸合成酶（fatty acid synthase，FASN）、平滑蛋白（smoothened，SMO）、CCNE1、GSK-3β、髓细胞白血病序列 1（myeloid cell leukemia sequence 1，MCL1）、Rho 相关卷曲螺旋蛋白激酶 1（Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1，ROCK1）、激酶插入域受体（kinase insert domain receptor，KDR）、ATP 结合盒亚家族 G 成员 2（ATP binding cassette subfamily G member 2，ABCG2）、金属基质蛋白酶 14（matrix metalloproteinase 14，MMP14）、EPH 受体 A5（EPH receptor A5，EPHA5）、极光激酶 A（aurora kinase A，AURKA）、二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase，DHFR）、组织蛋白酶 B（cathepsin B，CTSB）、CREB 结合蛋白（CREB binding protein，CREBBP）、血清/



A-蛋白质组学结果热图；B-蛋白质组学结果火山图；C-蛋白质组学差异表达蛋白与网络药理学蟾酥注射液治疗胃癌靶点的 Venn 图。

A-heatmap of proteomics results; B-volcanic diagram of proteomics results; C-Venn diagram of differentially expressed proteins in proteomics and therapeutic targets of *Bufonis Venenum* Injection for gastric cancer in network pharmacology.

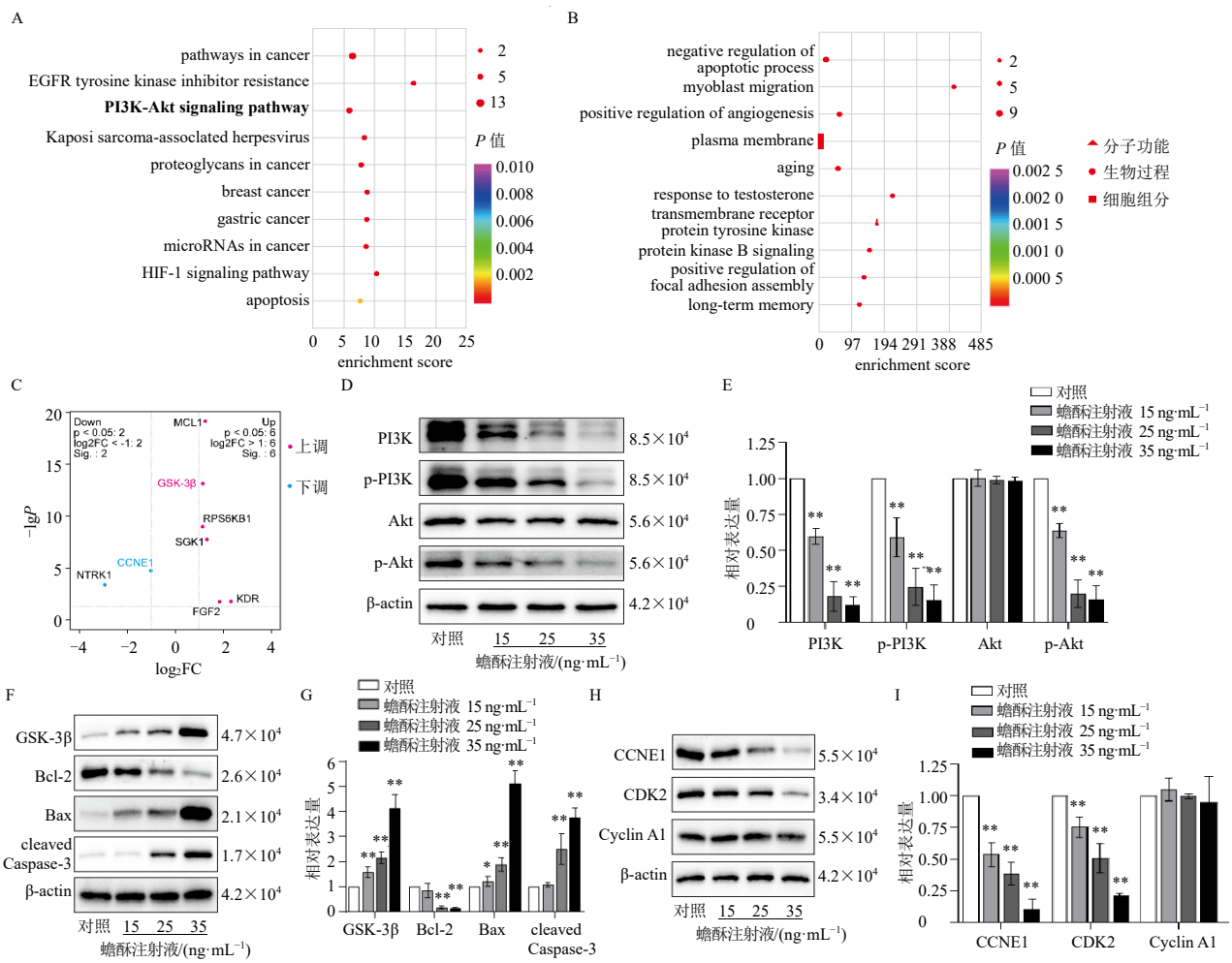
图 2 基于网络药理学与蛋白质组学筛选蟾酥注射液治疗胃癌的靶点

Fig. 2 Screening of targets for treatment of gastric cancer with *Bufonis Venenum* Injection based on network pharmacology and proteomics

糖皮质激素调节激酶 1（serum/glucocorticoid regulated kinase 1，SGK1）、信号转导与转录激活因子 3（signal transducer and activator of transcription 3，STAT3）、碳酸酐酶 9（carbonic anhydrase 9，CA9）、成纤维细胞生长因子 2（fibroblast growth factor 2，FGF2）、细胞间黏附分子 1（intercellular adhesion molecule 1，ICAM1）、端粒酶逆转录酶（telomerase reverse transcriptase，TERT）、胰岛素样生长因子结合蛋白 3（insulin like growth factor binding protein 3，IGFBP3）、前列腺素内过氧化物合酶 1（prostaglandin-endoperoxide synthase 1，PTGS1）、Jun 原癌基因（Jun proto-oncogene，JUN）、雌激素受体 2（estrogen receptor 2，ESR2）、NPC 胞内胆固醇转运蛋白 1（NPC intracellular cholesterol transporter 1，NPC1）、核糖体蛋白 S6 激酶 B1（ribosomal protein S6 kinase B1，RPS6KB1）、DNA 拓扑异构酶 I（DNA topoisomerase I，TOP1）。

3.3 蟾酥注射液对 HGC-27 细胞 PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 信号轴相关蛋白表达的影响

对 29 个核心靶蛋白进行 KEGG 通路与 GO 功能富集分析，结果见图 3-A、B，靶点显著富集于 PI3K/Akt 信号通路和细胞凋亡调控相关生物学过



A-KEGG 通路富集分析结果；B-GO 功能富集分析结果；C-PI3K 信号通路中 8 个靶蛋白的火山图；D、E-Western blotting 检测 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达；F、G-Western blotting 检测 GSK-3β 及凋亡相关蛋白表达；H、I-Western blotting 检测 CCNE1 及细胞周期相关蛋白表达；与对照组比较：$^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$。

A-KEGG pathway enrichment analysis results; B-GO functional enrichment analysis results; C-volcano diagram of eight target proteins in PI3K signaling pathway; D, E-expressions of PI3K/Akt pathway related proteins detected by Western blotting; F, G-expressions of GSK-3β and apoptosis related proteins detected by Western blotting; H, I-expressions of CCNE1 and cell cycle related proteins detected by Western blotting; $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ *vs* control group.

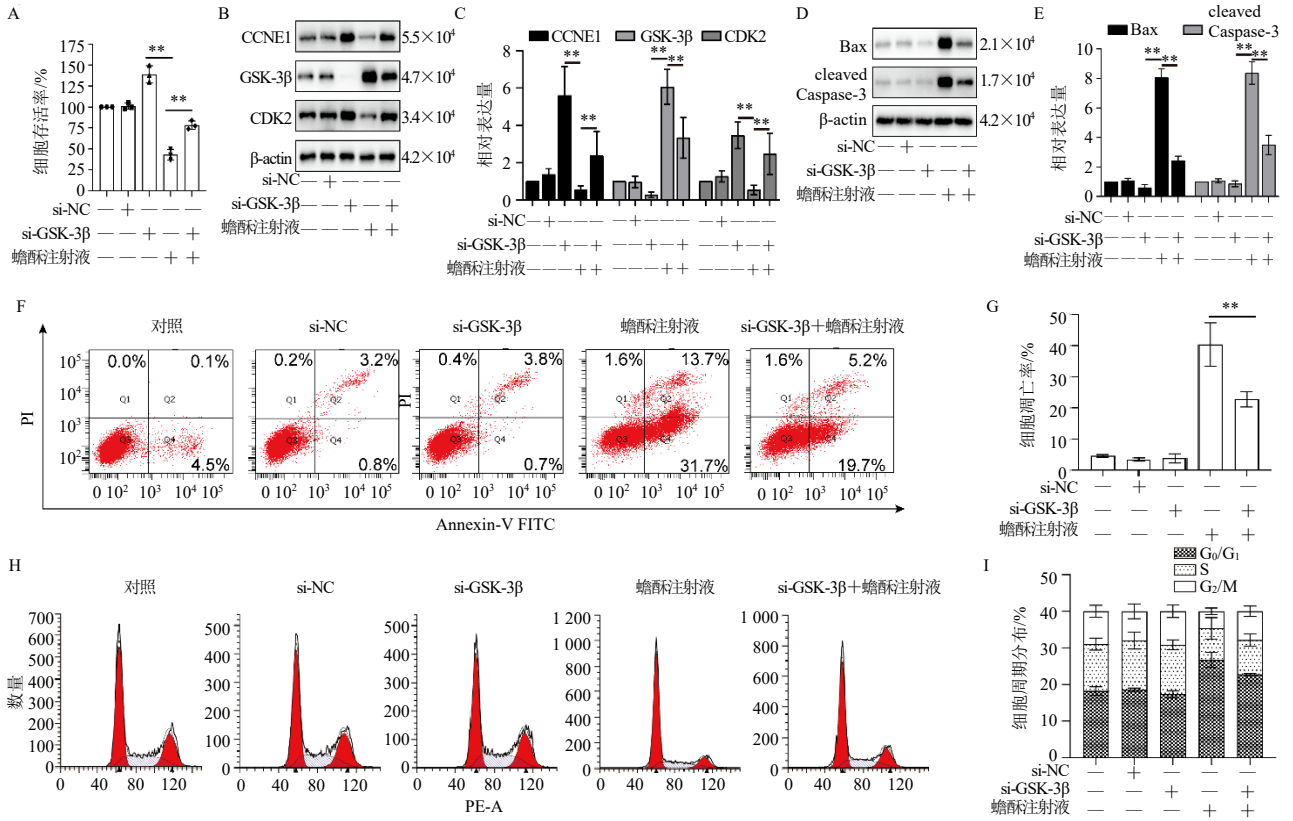
图 3 蟾酥注射液对 HGC-27 细胞 PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 信号轴相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Fig. 3 Effect of *Bufonis Venenum* Injection on expressions of PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 signaling axis related proteins in HGC-27 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

程。PI3K/Akt 通路是调控胃癌细胞增殖、周期分布及凋亡的经典核心通路，而其他通路或与胃癌核心病理机制关联薄弱，或靶点覆盖度低、与实验表型周期和凋亡的匹配度差，缺乏针对性。29 个核心靶蛋白靶点中，GSK-3β、CCNE1 为 PI3K/Akt 通路的下游核心效应因子（图 3-C），靶点关联性与覆盖度显著优于其他靶蛋白，故对 PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 信号轴进行后续验证。Western blotting 结果（图 3-D～I）显示，与对照组比较，蟾酥注射液各剂量组 PI3K、p-PI3K、p-Akt、CCNE1、CDK2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$），GSK-3β 和 Bax 蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$、0.01）；蟾酥注射液（25、35 ng/mL）组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$），cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著升高（$P<0.01$）；各组 Cyclin A1 蛋白表达无明显差异。以上结果表明蟾酥注射液能通过抑制 PI3K/Akt 通路的激活，引起下游 GSK-3β 表达上调和 CCNE1 表达下调。此外，蟾酥注射液还能上调促凋亡蛋白 Bax、下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达，同时抑制细胞周期相关蛋白 CDK2 及 CCNE1 的表达，与蟾酥注射液阻滞 HGC-27 细胞于 G_0/G_1 期一致。

3.4　沉默 GSK-3β 逆转蟾酥注射液诱导的细胞周期阻滞与凋亡

为明确 GSK-3β 的作用，利用 siRNA 敲低 GSK-3β 表达，考察蟾酥注射液对 HGC-27 细胞的影响。CCK-8 结果（图 4-A）显示，与蟾酥注射液组比较，si-GSK-3β＋蟾酥注射液组细胞活力显著升高（$P<0.01$），表明敲低 GSK-3β 可显著逆转蟾酥注射液对细胞增殖的抑制作用。Western blotting 结果（图 4-B～E）显示，与蟾酥注射液组比较，si-GSK-3β＋蟾酥注射液组 GSK-3β、Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$），CCNE1、CDK2 蛋



A-CCK-8 检测转染 si-GSK-3β 及蟾酥注射液处理后 HGC-27 细胞活力；B、C-Western blotting 检测转染 si-GSK-3β 及蟾酥注射液处理后 HGC-27 细胞中 CCNE1、GSK-3β、CDK2 蛋白表达；D、E-Western blotting 检测处理后 HGC-27 细胞中 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达；F、G-流式细胞术检测处理后 HGC-27 细胞凋亡；H、I-流式细胞术检测处理后 HGC-27 细胞周期分布；$^{**}P<0.01$。

A-cell viability of HGC-27 cells after si-GSK-3β transfection and *Bufonis Venenum* Injection treatment detected by CCK-8 assay; B, C-expressions of CCNE1, GSK-3β and CDK2 proteins in HGC-27 cells after si-GSK-3β transfection and *Bufonis Venenum* Injection treatment detected by Western blotting; D, E-expressions of Bax and cleaved Caspase-3 proteins in HGC-27 cells after treatment detected by Western blotting; F, G-apoptosis of HGC-27 cells after treatment detected by flow cytometry; H, I-cell cycle distribution of HGC-27 cells after treatment detected by flow cytometry; $^{**}P<0.01$.

图 4　沉默 GSK-3β 逆转蟾酥注射液诱导的细胞凋亡与周期阻滞（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 4　GSK-3β knockdown reversed *Bufonis Venenum* Injection-induced cell apoptosis and cycle arrest ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

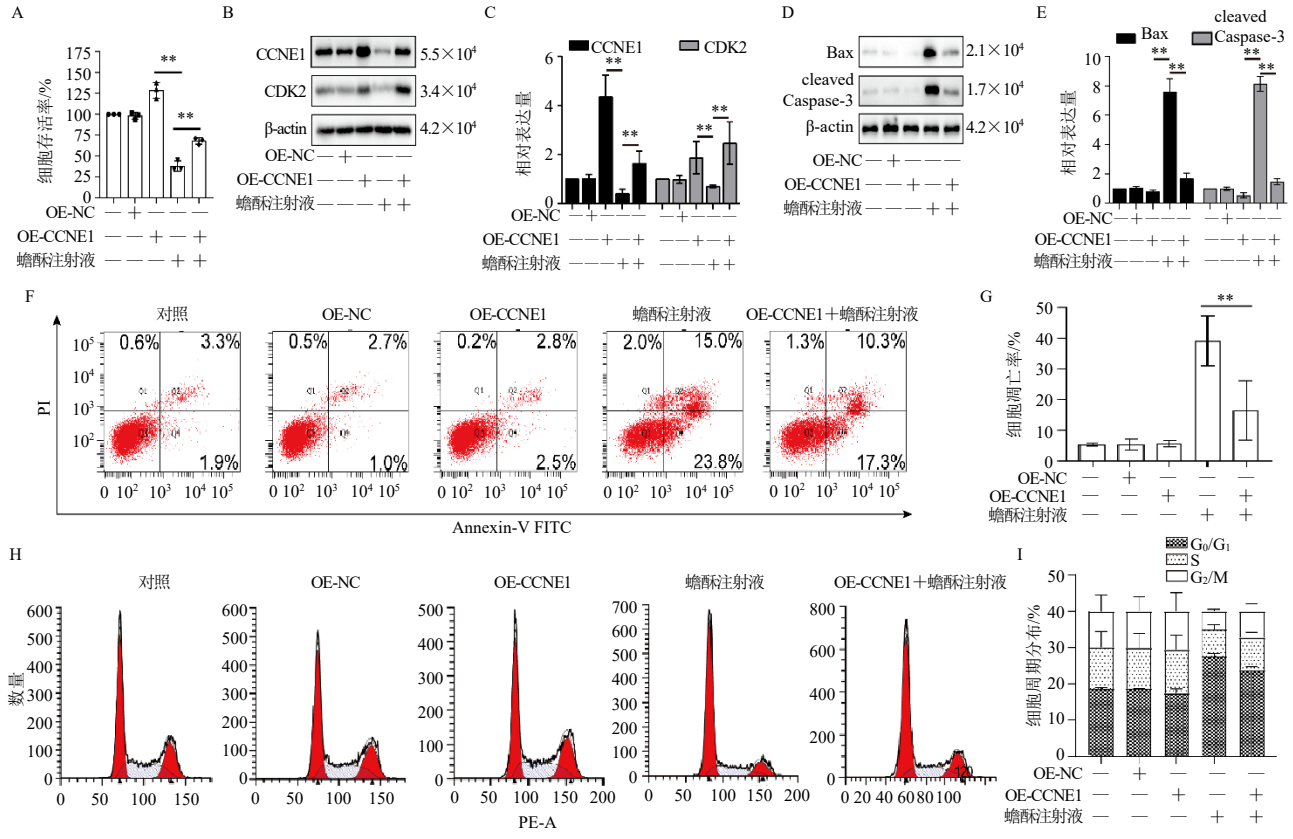
白表达水平显著升高（$P<0.01$）。流式细胞术结果（图 4-F、G）显示，与蟾酥注射液组比较，si-GSK-3β＋蟾酥注射液组细胞凋亡率显著降低（$P<0.01$）。细胞周期分析（图 4-H、I）显示，与蟾酥注射液组比较，si-GSK-3β＋蟾酥注射液组 G_0/G_1 期细胞比例显著降低（$P<0.01$）。以上结果表明，沉默 GSK-3β 可部分逆转蟾酥注射液对 HGC-27 细胞的增殖抑制、G_0/G_1 期阻滞及促凋亡作用。

3.5 过表达 CCNE1 逆转蟾酥注射液诱导的细胞周期阻滞与凋亡

通过转染过表达质粒上调 HGC-27 细胞中 CCNE1 的表达，考察蟾酥注射液对 HGC-27 细胞的影响。CCK-8 结果（图 5-A）显示，与蟾酥注射液组比较，OE-CCNE1＋蟾酥注射液组细胞活力显著升高（$P<0.01$），表明过表达 CCNE1 可部分抵抗蟾酥注射液对细胞增殖的抑制作用。Western blotting 结果（图 5-B～E）显示，与蟾酥注射液组比较，OE-CCNE1＋蟾酥注射液组 CCNE1、CDK2 蛋白表达显著升高（$P<0.01$），Bax、cleaved Caspase-3 蛋白水平显著降低（$P<0.01$）。流式细胞术结果（图 5-F、G）显示，与蟾酥注射液组比较，OE-CCNE1＋蟾酥注射液组细胞凋亡率显著降低（$P<0.01$）。细胞周期分析（图 5-H、I）显示，与蟾酥注射液组比较，OE-CCNE1＋蟾酥注射液组 G_0/G_1 期细胞比例显著降低（$P<0.01$）。以上结果表明，过表达 CCNE1 可部分逆转蟾酥注射液对 HGC-27 细胞的增殖抑制、G_0/G_1 期阻滞及促凋亡作用。

3.6 蟾酥注射液抑制体内胃癌肿瘤生长

进一步在裸鼠皮下移植瘤模型中考察蟾酥注射液的体内抗肿瘤效果。如图 6-A～C 所示，与对

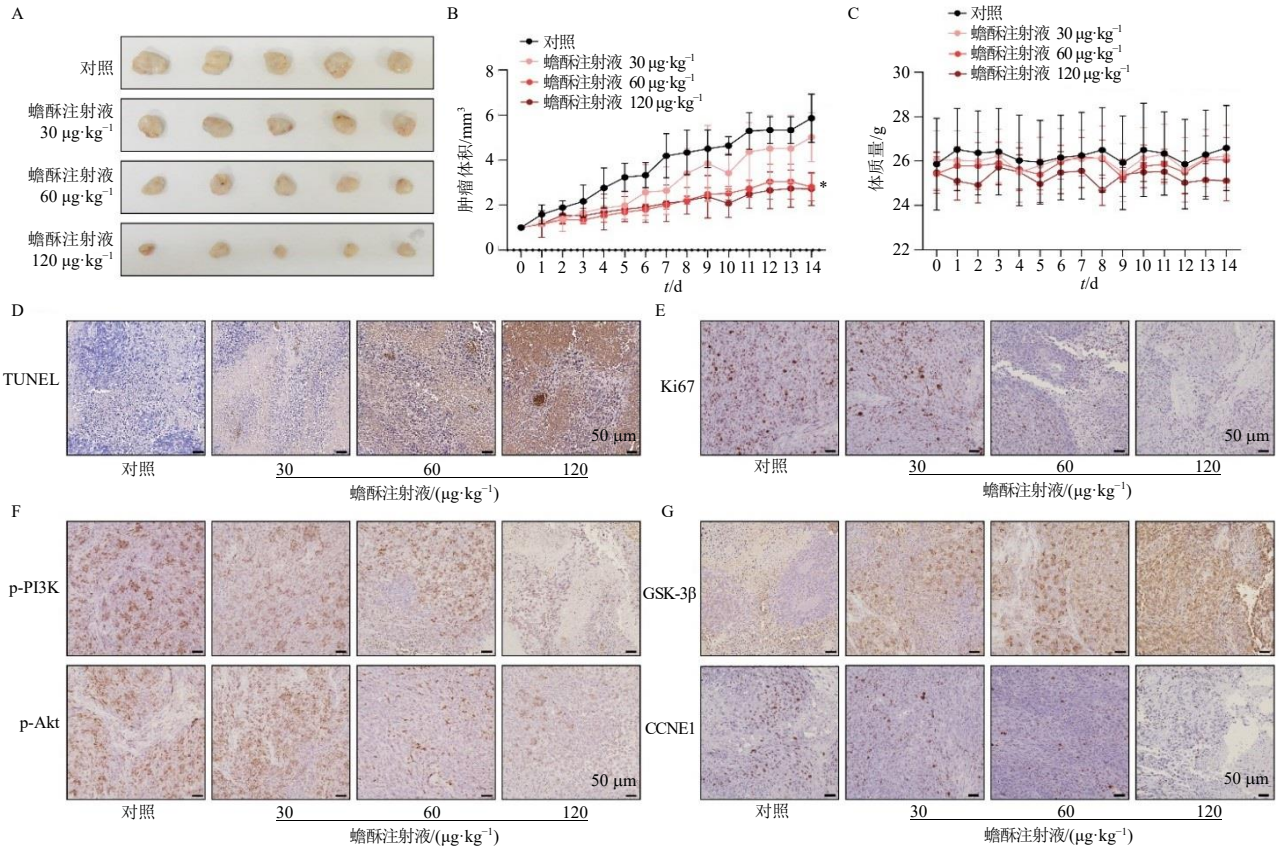


A-CCK-8 检测转染 OE-CCNE1 及蟾酥注射液处理后 HGC-27 细胞活力；B、C-Western blotting 检测转染 OE-CCNE1 及蟾酥注射液处理后 HGC-27 细胞中 CCNE1、CDK2 蛋白表达；D、E-Western blotting 检测处理后 HGC-27 细胞中 Bax、cleaved Caspase-3 蛋白表达；F、G-流式细胞术检测处理后 HGC-27 细胞凋亡；H、I-流式细胞术检测处理后 HGC-27 细胞周期分布；$^{**}P<0.01$。

A-cell viability of HGC-27 cells after OE-CCNE1 transfection and *Bufonis Venenum* Injection treatment detected by CCK-8 assay; B, C-expressions of CCNE1 and CDK2 proteins in HGC-27 cells after OE-CCNE1 transfection and *Bufonis Venenum* Injection treatment detected by Western blotting; D, E-expressions of Bax and cleaved Caspase-3 proteins in HGC-27 cells after treatment detected by Western blotting; F, G-apoptosis of HGC-27 cells after treatment detected by flow cytometry; H, I-cell cycle distribution of HGC-27 cells after treatment detected by flow cytometry; $^{**}P < 0.01$.

图 5 过表达 CCNE1 逆转由蟾酥注射液诱导的细胞周期阻滞与凋亡（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Fig. 5 CCNE1 overexpression reversed *Bufonis Venenum* Injection-induced cell apoptosis and cycle arrest ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A-各组小鼠肿瘤组织外观；B-给药期间各组小鼠肿瘤体积变化；C-给药期间各组小鼠体质量变化；D-TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡（×100）；E-免疫组化检测肿瘤组织中 Ki67 表达（×100）；F、G-免疫组化检测肿瘤组织 p-PI3K、p-Akt、GSK-3β 和 CCNE1 的表达（×100）；与对照组比较：$^{*}P<0.05$。

A-appearance of tumor tissues of mice in each group; B-changes in tumor volume of mice in each group during administration; C-changes in body weight of mice in each group during administration; D-apoptosis of tumor tissue cells detected by TUNEL staining (× 100); E-Ki67 expression in tumor tissue detected by immunohistochemistry (× 100); F, G-expressions of p-PI3K, p-Akt, GSK-3β and CCNE1 in tumor tissue detected by immunohistochemistry (× 100); $^{*}P < 0.05$ *vs* control group.

图 6　蟾酥注射液抑制体内胃癌肿瘤生长（$\bar{x} \pm s$，$n = 5$）

Fig. 6　*Bufonis Venenum* Injection inhibits growth of gastric cancer tumors *in vivo* ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

照组比较，蟾酥注射液能显著抑制肿瘤生长（$P<0.05$），且对小鼠体质量无明显影响。TUNEL 染色结果（图 6-D）显示，蟾酥注射液组 TUNEL 染色阳性比例升高，表明蟾酥注射液能够促进肿瘤细胞凋亡。Ki67 染色结果（图 6-E）显示，蟾酥注射液组 Ki67 阳性比例降低，表明蟾酥注射液能够抑制肿瘤细胞增殖。免疫组化结果（图 6-F、G）显示，蟾酥注射液组肿瘤组织中 p-PI3K、p-Akt、CCNE1 的阳性表达减少，GSK-3β 的阳性表达增加，且呈剂量相关性，与体外实验结果一致，表明蟾酥注射液通过调控 PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 信号轴发挥体内抗胃癌作用。

4　讨论

胃癌的治疗近年来虽有进展，但晚期患者的总体疗效仍不理想，仍需新的治疗策略[17,24]。蟾酥注射液是蟾酥的临床常用制剂，用于肿瘤的辅助治疗，其抗肿瘤活性已有报道，而作用机制尚未系统阐明。本研究结合网络药理学预测、蛋白质组学筛选与体内外实验，观察到蟾酥注射液可调控 PI3K/Akt/GSK-3β/CCNE1 轴，并诱导胃癌细胞周期阻滞与凋亡，为解释其抗胃癌作用提供了实验依据。

本研究以网络药理学预测与蛋白质组学筛选联合的方式获得 29 个候选靶点，富集分析显示其主要参与细胞凋亡调控及 PI3K/Akt 信号通路。蟾酥及其活性成分（如蟾毒灵、蟾蜍二烯内酯）的抗肿瘤作用涉及多靶点与多通路，主要效应包括诱导凋亡、阻滞细胞周期及抑制血管生成[14,23]。Liu 等[14]

报道蟾蜍二烯内酯可调控 Bax、Bcl-2 等凋亡相关蛋白而抑制肺癌细胞增殖；Jia 等[23]在综述中指出蟾酥活性成分可干预 Wnt/β-catenin、丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）等通路。已有研究也提示蟾酥可影响 PI3K/Akt 通路，但多数停留于该通路对细胞存活的整体效应，未涉及其下游分支[14,19]。在 29 个候选靶点中，GSK-3β 与 CCNE1 位于 PI3K/Akt 通路下游，且本研究观察到的表型为 G_0/G_1 期阻滞伴凋亡增加，与该通路调控增殖与凋亡的功能相符，故以其作为后续验证对象。

GSK-3β 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶，参与细胞增殖、分化与凋亡等过程[26]。其在肿瘤中的作用因组织背景不同而存在差异，在胃癌中亦表现出双向调节的特点[24,27]。有研究报道，激活 GSK-3β 可抑制胃癌细胞的生长与侵袭，该作用与其对凋亡及周期相关分子的调节有关[28]。本研究中蟾酥注射液处理后 GSK-3β 表达上调，与上述结果一致；在此基础上，本研究进一步观察到 GSK-3β 上调伴随下游周期蛋白 CCNE1 表达下降，提示蟾酥的抗胃癌作用可能经由该分支实现。CCNE1 是 G_1/S 期转换的关键调控蛋白[29]，在包括胃癌在内的多种肿瘤中常呈过表达，并与肿瘤进展及不良预后相关[30]。GSK-3β 活化后 CCNE1 的表达与功能受到负向调控，进而引起周期阻滞与凋亡。本研究中蟾酥注射液处理后 CCNE1 表达下降，且外源过表达 CCNE1 可部分逆转蟾酥注射液引起的周期阻滞与凋亡，提示 CCNE1 下调是其发挥抗肿瘤作用的环节之一。对于 CCNE1 过表达的胃癌，该结果为寻找可干预的作用位点提供了线索。本研究通过功能回复实验对 GSK-3β 与 CCNE1 的上下游关系进行了验证：沉默 GSK-3β 可减弱蟾酥注射液对 CCNE1 的抑制并削弱其抗肿瘤作用，过表达 CCNE1 亦可部分抵消药物的效应，提示二者处于同一调控链中。蟾酥注射液上调 GSK-3β、下调 CCNE1 的同时诱导 G_0/G_1 期阻滞并促进凋亡，但本研究数据尚不足以确定周期阻滞与凋亡的先后关系，二者的因果顺序有待进一步验证。

综上，蟾酥注射液可抑制 PI3K/Akt 通路、上调 GSK-3β 并下调 CCNE1，最终引起细胞周期阻滞与凋亡，抑制胃癌细胞及移植瘤的生长。该结果为其抗胃癌作用提供了一种可验证的机制解释，也为后续围绕 GSK-3β/CCNE1 开展研究提供了依据。但本研究仍存在局限性，有待后续研究进一步完善与拓展。其一，机制验证仅采用 HGC-27 细胞系，需在更多胃癌细胞系、原代细胞及类器官模型中验证该通路的适用性。其二，已筛选得到 29 个候选靶点并验证了关键通路，但未明确蟾酥注射液中起主要作用的活性单体，后续可结合活性追踪分离与高分辨质谱鉴定进行筛选。其三，未考察蟾酥注射液与化疗或靶向药物的联合效应，其协同与增敏作用有待评价。其四，体内安全性仅通过体质量变化等宏观指标进行观察，尚未开展系统毒理学评价，安全剂量范围有待明确。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, *et al*. Gastric cancer: Descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014, 23(5): 700-713.

[2] Machlowska J, Baj J, Sitarz M, *et al*. Gastric cancer: Epidemiology, risk factors, classification, genomic characteristics and treatment strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4012.

[3] Thrift A P, El-Serag H B. Burden of gastric cancer [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2020, 18(3): 534-542.

[4] Xia J Y, Aadam A A. Advances in screening and detection of gastric cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2022, 125(7): 1104-1109.

[5] Alsina M, Arrazubi V, Diez M, *et al*. Current developments in gastric cancer: From molecular profiling to treatment strategy [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(3): 155-170.

[6] Che G, Yin J, Wang W K, *et al*. Circumventing drug resistance in gastric cancer: A spatial multi-omics exploration of chemo and immuno-therapeutic response dynamics [J]. *Drug Resist Updat*, 2024, 74: 101080.

[7] Gotoda T, Yamamoto H, Soetikno R M. Endoscopic submucosal dissection of early gastric cancer [J]. *J Gastroenterol*, 2006, 41(10): 929-942.

[8] Waller G C, Patel D J, Baker M S. Early-stage gastric and gastroesophageal junction cancer: Is there a survival benefit to neoadjuvant therapy? [J]. *Surgery*, 2022, 172(6): 1753-1758.

[9] Huang J J, Lucero-Prisno D E, Zhang L, *et al*. Updated epidemiology of gastrointestinal cancers in east Asia [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2023, 20(5): 271-287.

[10] Li X L, Wu L, Wu R X, *et al*. Comparison of medicinal preparations of Ayurveda in India and five traditional medicines in China [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 284:

114775.

[11] Pei Y F, Zhang Q Z, Wang Y Z. Application of authentication evaluation techniques of ethnobotanical medicinal plant genus *Paris*: A review [J]. *Crit Rev Anal Chem*, 2020, 50(5): 405-423.

[12] Zhang Y, Wang Z X, Shen L, *et al*. A phase Ib/II study of fruquintinib in combination with paclitaxel as the second-line therapy for advanced gastric cancer [J]. *Cancer Commun*, 2023, 43(1): 150-153.

[13] Yu J, Huang C M, Sun Y H, *et al*. Effect of laparoscopic vs open distal gastrectomy on 3-year disease-free survival in patients with locally advanced gastric cancer: The CLASS-01 randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2019, 321(20): 1983-1992.

[14] Liu J S, Deng L J, Tian H Y, *et al*. Anti-tumor effects and 3D-quantitative structure-activity relationship analysis of bufadienolides from toad venom [J]. *Fitoterapia*, 2019, 134: 362-371.

[15] Peng C Y, Chen J, Cui W, *et al*. Comparative efficacy of various CHIs combined with western medicine for non-small cell lung cancer: A Bayesian network Meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1037620.

[16] 安雪菁, 崔齐晓, 赵盈, 等. 蟾蜍它灵对人头颈部鳞状细胞癌的影响及作用机制 [J]. 中草药, 2026, 57(4): 1325-1335.

[17] Ye M, Guo H, Guo H Z, *et al*. Simultaneous determination of cytotoxic bufadienolides in the Chinese medicine Chansu by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array and mass spectrometry detections [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 838(2): 86-95.

[18] Scott L J. Apatinib: A review in advanced gastric cancer and other advanced cancers [J]. *Drugs*, 2018, 78(7): 747-758.

[19] Liu L, Liu W X, Deng W H. Amylin inhibits gastric cancer progression by targeting CCN1 and affecting the PI3K/Akt signalling pathway [J]. *Ann Med*, 2025, 57(1): 2480754.

[20] Lin J T, Song T, Li C, *et al*. GSK-3β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118659.

[21] Zhang N, Zhang H, Li S Y, *et al*. Uncovering the predictive and immunomodulatory potential of transient receptor potential melastatin family-related CCNE1 in pan-cancer [J]. *Mol Cancer*, 2024, 23(1): 258.

[22] Avgerinos K I, Spyrou N, Mantzoros C S, *et al*. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives [J]. *Metabolism*, 2019, 92: 121-135.

[23] Jia J H, Li J, Zheng Q S, *et al*. A research update on the antitumor effects of active components of Chinese medicine Chansu [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1014637.

[24] Dong Z H, Tao X, Du H L, *et al*. Exploring the challenge of early gastric cancer diagnostic AI system face in multiple centers and its potential solutions [J]. *J Gastroenterol*, 2023, 58(10): 978-989.

[25] Lin J T, Song T, Li C, *et al*. GSK-3β in DNA repair, apoptosis, and resistance of chemotherapy, radiotherapy of cancer [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(5): 118659.

[26] Moreno-Jiménez E P, Flor-García M, Hernández-Vivanco A, *et al*. GSK-3β orchestrates the inhibitory innervation of adult-born dentate granule cells *in vivo* [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(8): 225.

[27] Yu J H, Liu D, Sun X J, *et al*. CDX2 inhibits the proliferation and tumor formation of colon cancer cells by suppressing Wnt/β-catenin signaling via transactivation of GSK-3β and Axin2 expression [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10: 26.

[28] Hu W L, Shen J, Tao Y, *et al*. CCDC85C suppresses colorectal cancer cells proliferation and metastasis through activating GSK-3β and promoting β-catenin degradation [J]. *Cell Signal*, 2023, 109: 110799.

[29] Xu H N, George E, Kinose Y, *et al*. CCNE1 copy number is a biomarker for response to combination WEE1-ATR inhibition in ovarian and endometrial cancer models [J]. *Cell Rep Med*, 2021, 2(9): 100394.

[30] Guerrero-Zotano Á, Belli S, Zielinski C, *et al*. CCNE1 and PLK1 mediate resistance to palbociclib in HR^{+}/$HER2^{-}$ metastatic breast cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2023, 29(8): 1557-1568.

[责任编辑　李亚楠]